

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7675700号
(P7675700)

(45)発行日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(24)登録日 令和7年5月1日(2025.5.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 Z

請求項の数 35 (全130頁)

(21)出願番号	特願2022-511221(P2022-511221)	(73)特許権者	502221282
(86)(22)出願日	令和2年8月14日(2020.8.14)		ライフ テクノロジーズ コーポレーション
(65)公表番号	特表2022-546300(P2022-546300 A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0
(43)公表日	令和4年11月4日(2022.11.4)		0 8 , カールズバッド, ニュートン
(86)国際出願番号	PCT/US2020/046510	(74)代理人	ドライブ 5 8 2 3
(87)国際公開番号	WO2021/034711		100094569
(87)国際公開日	令和3年2月25日(2021.2.25)	(74)代理人	弁理士 田中 伸一郎
審査請求日	令和5年8月7日(2023.8.7)		100103610
(31)優先権主張番号	62/890,003	(74)代理人	弁理士 ▲吉▼田 和彦
(32)優先日	令和1年8月21日(2019.8.21)		100109070
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 須田 洋之
			倉澤 伊知郎
		(74)代理人	100130937
			弁理士 山本 泰史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シーケンシングのためのシステムおよび方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

シーケンシングシステムであって、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および5時間～14時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

【請求項2】

シーケンシングシステムであって、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した32個の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および15時間～24時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

【請求項3】

シーケンシングシステムであって、サンプルごとに2つのDNAプールおよび2つのRNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した6つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時にバリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および20時間

～30時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエーションコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

【請求項4】

シーケンシングシステムであって、サンプルごとに1つのDNAプールと190～220塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した12個の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエーションコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および20時間～28時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエーションコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

10

【請求項5】

前記ランタイムが、5時間～12時間の範囲である、請求項1に記載のシーケンシングシステム。

【請求項6】

前記生読み取り精度が、少なくとも99.0%の生読み取り精度である、請求項1～5のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

【請求項7】

前記生読み取り精度が、少なくとも99.1%である、請求項6に記載のシーケンシングシステム。

【請求項8】

前記性能が、少なくとも100塩基かつ450塩基以下のQ20中央値読み取り長によってさらに特徴付けられる、請求項1～7のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

20

【請求項9】

前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも102塩基かつ300塩基以下である、請求項8に記載のシーケンシングシステム。

【請求項10】

前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも104塩基かつ300塩基以下である、請求項9に記載のシーケンシングシステム。

【請求項11】

前記性能が、少なくとも97%の均一性によってさらに特徴付けられる、請求項1～10のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

30

【請求項12】

前記均一性が、少なくとも98%である、請求項11に記載のシーケンシングシステム。

【請求項13】

前記均一性が、少なくとも98.5%である、請求項12に記載のシーケンシングシステム。

【請求項14】

前記性能が、少なくとも97%の、標的に対する平均読み取りパーセントによってさらに特徴付けられる、請求項1～13のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

40

【請求項15】

標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98%である、請求項14に記載のシーケンシングシステム。

【請求項16】

標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98.1%である、請求項15に記載のシーケンシングシステム。

【請求項17】

前記性能が、1300万塩基～1億塩基の範囲の総読み取りによってさらに特徴付けられる、請求項1～16のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

【請求項18】

50

前記総読み取りが、1300万塩基～6000万塩基の範囲である、請求項17に記載のシーケンシングシステム。

【請求項19】

前記総読み取りが、1450万塩基～2500万塩基の範囲である、請求項18に記載のシーケンシングシステム。

【請求項20】

シーケンシングのための方法であって、

シーケンシング装置に、4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルと、シーケンシング基材と、サンプルごとに1つのDNAプール、および100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズを有するアッセイ用の試薬と、を提供することと、

前記シーケンシング装置で、前記アッセイ用の試薬に由来する複数のポリヌクレオチドを生成することと、

前記シーケンシング装置で、少なくとも98.5%の生読み取り精度で前記複数のポリヌクレオチドをシーケンシングすることと、

前記シーケンシング装置で、前記シーケンシングに基づいてバリエーションコールレポートを作成することと、を含み、

前記生成、前記シーケンシング、および前記作成が、5時間～14時間の範囲内のランタイムで実行される、方法。

【請求項21】

前記ランタイムが、5時間～12時間の範囲である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記生読み取り精度が、少なくとも99.1%である、請求項20または21に記載の方法。

【請求項23】

前記生読み取り精度が、少なくとも99.2%である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記生読み取り精度の性能が、少なくとも100塩基かつ300塩基以下のQ20中央値読み取り長によってさらに特徴付けられる、請求項20～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも102塩基かつ300塩基以下である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも104塩基かつ300塩基以下である、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記生読み取り精度の性能が、少なくとも97%の均一性によってさらに特徴付けられる、請求項20～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記均一性が、少なくとも98%である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記均一性が、少なくとも98.5%である、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記生読み取り精度の性能が、少なくとも97%の、標的に対する平均読み取りパーセントによってさらに特徴付けられる、請求項20～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98%である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98.1%である、請求項31

10

20

30

40

50

1に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記生読み取り精度の性能が、1 3 0 0 万塩基～2 5 0 0 万塩基の範囲の総読み取りによってさらに特徴付けられる、請求項 2 0 ～3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記総読み取りが、1 4 0 0 万塩基～2 5 0 0 万塩基の範囲である、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記総読み取りが、1 4 5 0 万塩基～2 5 0 0 万塩基の範囲である、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 9 年 8 月 2 1 日に出願された米国仮出願第 6 2 / 8 9 0 , 0 0 3 号の権益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

本開示は、一般に、核酸を操作し、分析するためのシステムおよび方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

生物学および医学的研究は、生物学的研究および医学を強化するために、ますます核酸シーケンシングに目を向けている。例えば、生物学者および動物学者は、動物の移動、種の進化、および形質の起源を研究するためにシーケンシングに目を向けている。医学界は、病気の起源、薬に対する感受性、および感染の起源を研究するためにシーケンシングを使用している。したがって、シーケンシングは、生物学、治療、診断、法医学、および研究の多くの側面に幅広い適用可能性を有する。

【0 0 0 4】

それにもかかわらず、シーケンシングの使用は、アッセイの可用性、シーケンシングのランタイム、調製時間、およびコストによって制限される可能性がある。加えて、高品質のシーケンシングは、歴史的に高価なプロセスであり、したがって、その実施を制限してきた。

【0 0 0 5】

したがって、改善されたシーケンシングシステムが望ましいであろう。

【0 0 0 6】

添付の図面を参照することによって、本開示がよりよく理解され、その多くの特徴および利点が当業者に明らかになり得る。

【図面の簡単な説明】

【0 0 0 7】

【図 1】例示的なシーケンシングシステムの説明図を含む。

【図 2】センサレイを含む例示的なシステムの説明図を含む。

【図 3】例示的なセンサおよび関連付けられたウェルの説明図を含む。

【図 4】シーケンシングデバイスを調製するための例示的な方法の説明図を含む。

【図 5】ビーズアセンブリを調製するための例示的なスキームを例示している。

【図 6】例示的なシーケンシングシステムの説明図を含む。

【図 7】例示的な装置の説明図を含む。

【図 8】例示的な装置のデッキの説明図を含む。

【図 9】例示的な装置の試薬保管庫の説明図を含む。

【図 1 0】例示的な消耗品の説明図を含む。

【図 1 1】例示的なカートリッジシステムの説明図を含む。

【図 1 2】例示的なカートリッジシステムの説明図を含む。

10

20

30

40

50

【図 1 3】カートリッジを受け取るための例示的なドッキングステーションの説明図を含む。

【図 1 4】例示的なセンサデバイスの説明図を含む。

【図 1 5】例示的なセンサデバイスの説明図を含む。

【図 1 6】例示的な流体カブラの説明図を含む。

【図 1 7】例示的な流体カブラの説明図を含む。

【図 1 8】例示的な流体カブラの説明図を含む。

【図 1 9】センサデバイスと流体カブラとの間の例示的な相互接続の説明図を含む。

【図 2 0】センサデバイスと流体カブラとの間の例示的な相互接続の説明図を含む。

【図 2 1】センサデバイスとインタラクトするための例示的な機械システムの説明図を含む。

10

【図 2 2】センサデバイスとインタラクトするための例示的な機械システムの説明図を含む。

【図 2 3】機械システムで使用するための例示的なスライド機構の説明図を含む。

【図 2 4】機械システムで使用するための例示的なスライド機構の説明図を含む。

【図 2 5】流体カブラとセンサデバイスとの間の流体接続を提供するための例示的な機械的アセンブリの説明図を含む。

【図 2 6】例示的な流体マニホールドの説明図を含む。

【図 2 7】例示的な流体マニホールドの説明図を含む。

【図 2 8】機械システムを使用してセンサデバイスとインタラクトするための例示的な方法のブロックフロー図を含む。

20

【図 2 9】例示的な磁性体装荷システムの概略表現を含む。

【図 3 0】磁性ビーズを含有する溶液の、磁性パッケージに対する第 1 の速度での移動を概略的に例示している。

【図 3 1】磁性ビーズを含有する溶液の、磁性パッケージに対する第 2 の速度での移動を概略的に例示している。

【図 3 2】磁性ビーズを含有する溶液の、磁性パッケージに対する逆方向の移動を概略的に例示している。

【図 3 3】ビーズが装填されたマイクロチップを例示している。

【図 3 4】磁性体装荷モデルを概略的に例示している。

30

【図 3 5】例示的な装填デバイスの説明図を含む。

【図 3 6】例示的な装填デバイスの説明図を含む。

【図 3 7】例示的な装填デバイスの説明図を含む。

【図 3 8】例示的な装填デバイスの説明図を含む。

【図 3 9】本教示の流体マルチプレクサブロックを一般的に例示する分解図である。

【図 4 0】図 1 の流体マルチプレクサブロックなどの流体マルチプレクサブロックの流体マルチプレクサユニットを一般的に例示する等角図である。

【図 4 1】流体マルチプレクサユニットと本教示のマルチレーンセンサデバイスの選択されたレーンとの間の流体統合を一般的に例示する概略表現である。

【図 4 2】流体マルチプレクサブロックアセンブリが取り付けられた流体マルチプレクサブロッククランプを含む流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリを一般的に例示する背面等角図である。

40

【図 4 3】電極を流体マルチプレクサユニットに一般的に統合することを例示する断面図である。

【図 4 4】流体マルチプレクサブロックアセンブリが取り付けられた流体マルチプレクサブロッククランプを含む流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリを一般的に例示する正面等角図である。

【図 4 5】センサデバイス取り付けアセンブリに位置決めされたマルチレーンセンサデバイスに取り付けられた流体マルチプレクサブロッククランプの流体マルチプレクサブロックのアセンブリを一般的に例示する断面図である。

50

【図 4 6】マルチレーンセンサアレイデバイスへの流体マルチプレクスブロックの取り付けを一般的に例示する拡大等角図である。

【図 4 7】本教示のシーケンシングシステムの流体システムを一般的に例示する概略表現である。

【図 4 8】例示的な電子インターフェースの説明図を含む。

【図 4 9】サーバスシステムコンポーネントの概略図を示す。

【図 5 0】分析パイプラインのブロック図である。

【図 5 1】アッセイ定義ファイルを生成することの概略図である。

【図 5 2】例示的なアッセイ定義ファイルのパッケージの概略図である。

【図 5 3】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 5 4】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 5 5】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 5 6】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 5 7】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 5 8】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 5 9】支持体をシーディングするためのスキーマの説明図を含む。

【図 6 0】様々な増幅方法から結果として得られる読み取りの総数を示すグラフを含む。

【図 6 1 A】鋳型コピー数に対応するパラメータを例示するグラフを含む。

【図 6 1 B】鋳型コピー数に対応するパラメータを例示するグラフを含む。

【図 6 1 C】鋳型コピー数に対応するパラメータを例示するグラフを含む。

【図 6 1 D】鋳型コピー数に対応するパラメータを例示するグラフを含む。

【図 6 1 E】鋳型コピー数に対応するパラメータを例示するグラフを含む。

【図 6 1 F】鋳型コピー数に対応するパラメータを例示するグラフを含む。

【0 0 0 8】

異なる図面での同じ参照記号の使用は、類似または同一のアイテムを示す。

【発明を実施するための形態】

【0 0 0 9】

一実施形態では、シーケンシングシステムは、サンプルのポリヌクレオチドのセットからのポリヌクレオチドの配列およびバリエーションを決定するように適合された自動シーケンシング装置を含む。このシステムは、標的アッセイを利用して、シーケンシングされたアンプリコンまたは標的ポリヌクレオチドのライブラリを生成して、望ましい時間内に、アライメントされた配列リストおよび任意選択的にバリエーションを提供することができる。

【0 0 1 0】

自動シーケンシング装置の実施形態は、標的ポリヌクレオチドのライブラリを調製するための調製デッキを含む。例では、標的ポリヌクレオチドは、ポリマービーズまたはヒドロゲルビーズなどの基質上にシーディングされる。自動シーケンシング装置は、シーディングされた基質をセンサデバイス上に適用するための装填デバイスをさらに含むことができ、例えば、合成によるシーケンシング反応を実行し、ヌクレオチド取り込みを検出するためのシーケンサーを含むことができる。自動シーケンシング装置は、シーケンサーからのデータを利用して、塩基コール、アライメントされた読み取り、およびバリエーションを判定するための計算デバイスをさらに含むことができる。加えて、このシステムは、塩基コール、アライメントされた読み取り、またはバリエーションと関連付けられたレポートをユーザに伝達するためのユーザインターフェースまたはネットワークインターフェースを含むことができる。

【0 0 1 1】

定義

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語およびその変化形は、本明細書で「ポリヌクレオチド」という用語と置き換え可能に使用され、ヌクレオチドのポリマーを指し、例えば、デオキシリボ核酸およびリボ核酸を含む。核酸として、DNA、cDNA、R

10

20

30

40

50

NA、キメラRNA/DNA、および核酸類似体が挙げられるが、これらに限定されない。
【0012】

本明細書で使用される場合、プライマーは、相補的な核酸配列にハイブリダイズすると、核酸合成をプライミングまたは開始することができる任意の一本鎖核酸分子（例えば、オリゴヌクレオチド）である。典型的には、そのような核酸合成は、鑄型依存的に起こり、ヌクレオチドは、そのような核酸合成中にプライマーの少なくとも1つの末端に重合される。プライマーは通常、遊離の3'ヒドロキシルを有するが、いくつかの実施形態では、プライマー末端がブロックされるか（例えば、3'末端からの伸長を防止するため）、またはプライマーは、プライマーの異なる部分が異なるパートナーに結合するように設計された融合プライマーである。プライマー伸長を伴う反応（例えば、プレシーディング増幅）では、ブロックされた融合プライマーの3'末端のブロッキング部分がプライマーダイマー形成のレベルを低下させる可能性がある。いくつかの実施形態では、ブロックされているか、またはブロックされていないプライマーは、テールプライマーであり、5'末端は、プライマーの残りが相補的である標的核酸に対して非相補的である配列を含む。この5'テールを、プライマー伸長の鑄型として使用することができる。本明細書で提供される方法の様々な実施形態では、核酸分子は、第1のプライマー結合配列、および任意選択的に第2のプライマー結合配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される反応は、順方向プライマー結合配列および逆方向プライマー結合配列をそれぞれ結合させる、またはその逆の、第1のプライマーの集団および任意選択的に第2のプライマーの集団を含む。いくつかの実施形態では、第1および第2のプライマーは、プライマーペアと呼ばれる。いくつかの実施形態では、第1のプライマーまたは第2のプライマーは、ユニバーサルプライマーである。第1のプライマーは、順方向プライマー結合配列または逆方向プライマー結合配列のいずれかに結合することができ、第2のプライマーは、順方向プライマー結合配列または逆方向プライマー結合配列のいずれかに結合することができる。よって、プライマーに関して本明細書で使用される場合の「第1」および「第2」という用語は、相対的な用語であり、各々は、それらが使用される文脈に応じて順方向プライマーまたは逆方向プライマーを指すことができる。

【0013】

本明細書で使用される場合、核酸増幅は、核酸の新しい鎖がヌクレオチド重合によって合成されるプロセスを指し、以下の1つ以上のサイクルを伴う：二本鎖核酸の一本鎖への分離、例えば変性または解離、分離された二本鎖核酸の一本鎖へのプライマーのアニールリング、例えばハイブリダイゼーション、およびハイブリダイズしたプライマーの伸長。本明細書で使用される場合、「プライマー伸長」という用語およびその変化形は、核酸分子の末端へのヌクレオチド取り込みを触媒するための任意の方法に関する。いくつかの実施形態では、増幅のサイクルは、（a）二本鎖核酸の鎖の部分的な、不完全な、または完全な変性または解離、（b）部分的に、または完全に一本鎖の核酸へのプライマーのハイブリダイゼーションまたはアニールリング、および（c）伸長したプライマー鎖を形成するためのプライマー伸長を含む。いくつかの実施形態では、増幅のサイクルは、任意選択的に、（a）鑄型核酸鎖への第1のプライマーのハイブリダイゼーション、（b）第1の伸長した核酸鎖を形成するためのプライマー伸長、および（c）鑄型鎖からの伸長した鎖の部分的な、または不完全な変性を含む。任意選択的に、ステップ（c）からの鑄型鎖の変性部分は、次の増幅サイクルで異なるプライマーと自由にハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、増幅サイクルでのプライマー伸長は、二重核酸の一方の鎖の、二重鎖の他方の鎖からの置換、または鑄型鎖からの第1の伸長した鎖の置換を伴う。第1の伸長した鎖の3'末端にハイブリダイズする第2のプライマーを含めることができる。

【0014】

核酸増幅の多くの方法が、当技術分野で知られている。いくつかの例として、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）、鑄型ウォーキング、およびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅が挙げられる。RPA反応では、プライマーおよびヌクレオチドの存在下で、リコンビナーゼ、ポリメラーゼ、および任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタ

10

20

30

40

50

ンパク質を使用して核酸分子を増幅する。リコンビナーゼおよび任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタンパク質は、二本鎖鋳型核酸分子の少なくとも一部分を解離して、次いでポリメラーゼが結合して複製を開始できるようにプライマーがハイブリダイズすることを可能とする。リコンビナーゼアクセサリタンパク質の例は、解離した核酸分子の再ハイブリダイゼーションを防止する一本鎖結合タンパク質（SSB）である。通常、RPA反応は、等温であり、等温温度で実行される。いくつかの事例では、RPA反応をエマルジョン内で実行することができる。鋳型ウォーキング反応では、プライマーがハイブリダイズし、かつ次いでポリメラーゼが結合して複製を開始できるように、二本鎖鋳型核酸分子の少なくとも一部分が解離することを可能にする反応条件で、プライマーおよびヌクレオチドの存在下でポリメラーゼを使用して鋳型核酸分子を増幅する。PCRでは、二本鎖鋳型核酸分子は、典型的には、サーマルサイクリングによって解離する。冷却後、プライマーは、相補的な配列に結合し、ポリメラーゼによる複製に使用できる。本明細書で提供される方法の実施形態のいくつかでは、プレシーディングまたは鋳型化反応は、鋳型核酸分子の増幅に必要な成分で形成された反応混合物中で実行される。開示された態様のいずれかで、反応混合物は、以下のいくつかまたはすべてを含む：鋳型核酸分子の集団、ポリメラーゼ、付着した第1のプライマーの集団を有する1つ以上の支持体または表面（例えば、固体支持体）、ヌクレオチド、または二価カチオンなどの補因子。いくつかの実施形態では、反応混合物は、第2のプライマーおよび任意選択的に拡散制限剤をさらに含む。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子の集団は、第1または第2のプライマーにハイブリダイズする少なくとも1つのアダプタ配列に接合された鋳型核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、反応混合物は、エマルジョンRPAまたはエマルジョンPCRのように、エマルジョンを形成する。RPAを伴う反応では、反応混合物は、リコンビナーゼ、および任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタンパク質を含む。反応混合物の様々な成分は、本明細書でさらに詳細に論じられる。

【0015】

本明細書で使用される場合、「同一性」および「同一の」という用語ならびにそれらの変化形は、2つ以上の核酸配列を参照して使用される場合、2つ以上の配列（例えば、ヌクレオチドまたはポリペプチド配列）の配列の類似性を指す。2つ以上の相同配列の状況下において、配列またはその部分配列の同一性または相同性パーセントは、同じ（すなわち、約70%同一性、好ましくは75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一性）であるすべてのモノマー単位（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸）のパーセンテージを示す。同一性パーセントは、比較ウィンドウまたは指定された領域中での最大の対応に対して比較され、アライメントされた場合、指定された領域で発生し得る。アミノ酸レベルで、またはヌクレオチドレベルで少なくとも約80%、または少なくとも約85%同一性がある場合、配列は「実質的に同一」とあると言われる。いくつかの事例では、アミノ酸レベルまたはヌクレオチドレベルで少なくとも90%同一性、少なくとも91%同一性、少なくとも92%同一性、少なくとも93%同一性、少なくとも94%同一性、少なくとも95%同一性、少なくとも96%同一性、少なくとも97%同一性、少なくとも98%同一性、少なくとも99%同一性が存在する場合、配列は、「実質的に同一」である。好ましくは、同一性は、長さが少なくとも約20、25、50、もしくは100残基である領域にわたって、または少なくとも1つの比較配列の全長にわたって存在する。2つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指標は、2つの分子またはそれらの補体がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で互いにハイブリダイズすることである。

【0016】

本明細書で使用される「相補的」および「補体」という用語ならびにそれらの変化形は、ハイブリダイズした二重鎖のように、逆平行配向にある2つ以上の個々の対応する位置で累積塩基対合を受けることができる任意の2つ以上の核酸配列（例えば、鋳型核酸分子、標的配列、またはプライマーの部分または全体）を指す。そのような塩基対合は、任意のセットの確立された規則に従って、例えば、ワトソン-クリック塩基対合規則に従っ

10

20

30

40

50

て、進行し得る。任意選択的に、第1の核酸配列と第2の核酸配列との間に「完全」または「総」相補性があり得、第1の核酸配列中の各ヌクレオチドは、第2の核酸配列上の対応する逆平行位置のヌクレオチドとの安定化塩基対合相互作用を受けることができる。「部分的」相補性は、一方の核酸配列の残基の少なくとも20%であるが、100%未満が、他方の核酸配列中の残基に相補的である、核酸配列を表現する。いくつかの実施形態では、一方の核酸配列の残基の少なくとも50%であるが、100%未満は、他方の核酸配列中の残基に相補的である。いくつかの実施形態では、一方の核酸配列の残基の少なくとも70%、80%、90%、95%、または98%であるが、100%未満は、他方の核酸配列中の残基に相補的である。一方の核酸配列の残基の少なくとも85%が他方の核酸配列中の残基に相補的である場合、配列は、「実質的に相補的」と言われる。いくつかの実施形態では、2つの相補的または実質的に相補的な配列は、標準的またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で互いにハイブリダイズすることができる。

「非相補的」は、一方の核酸配列の残基の20%未満が他方の核酸配列中の残基に相補的である、核酸配列を表現する。一方の核酸配列の残基の15%未満が他方の核酸配列中の残基に相補的である場合、配列は、「実質的に非相補的」と言われる。いくつかの実施形態では、2つの非相補的または実質的に非相補的な配列は、標準的またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で互いにハイブリダイズすることができない。

「ミスマッチ」は、2つの対向したヌクレオチドが相補的ではない配列中の任意の位置に存在する。相補的ヌクレオチドは、生理学的条件下でのDNA複製中に互に対向するDNAポリメラーゼにより効率的に組み込まれるヌクレオチドを含む。

【0017】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル」という用語およびその変化形は、1つ以上のポリヌクレオチド集団に関して使用される場合、集団のメンバーのうちの約50~99%、または最大100%、または100%で、ヌクレオチド配列レベルで少なくとも80%の同一性、または少なくとも85%の同一性、または少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性、または少なくとも99%の同一性、または約100%の同一性、または100%の同一性を共有するポリヌクレオチドの集団を指す。本明細書で使用される場合、「実質的にモノクローナルの」という語句およびその変化形は、1つ以上のポリヌクレオチド集団に関して使用される場合、1つのポリヌクレオチド分子、例えば増幅された鋳型ポリヌクレオチド分子、がこの集団で単一の最も優勢なポリヌクレオチドである1つ以上のポリヌクレオチド集団を指す。よって、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの集団のすべてのメンバーが、互いに完全に同一であるか、または相補的である必要はない。例えば、ポリヌクレオチド鋳型の異なる部分は、増幅または複製されて、結果として生じるモノクローナルの集団のメンバーを産生することができ、同様に、元の鋳型の増幅中に特定の数の「エラー」または不完全な拡張が発生する可能性があり、それによって、個々のメンバーがそれらの間で配列の変動性を呈し得るモノクローナルの、または実質的にモノクローナルの集団が生成される。いくつかの実施形態では、非同相ポリヌクレオチドの低レベルまたは微小レベルの混合は、核酸増幅反応中に発生する可能性があり、したがって、実質的にモノクローナルの集団は、少数の1つ以上のポリヌクレオチド（例えば、多様なポリヌクレオチドのうちの50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、1%未満、0.5%未満、0.1%未満、または0.001%未満）を含有し得る。特定の例では、集団中のポリヌクレオチドのうちの少なくとも90%は、実質的にモノクローナルの集団を産生するための増幅の基礎として使用される元の単一の鋳型と少なくとも90%同一である。特定の実施形態では、鋳型ポリヌクレオチドの増幅は、ポリヌクレオチドの集団を生じさせ、ポリヌクレオチドの集団のメンバーの少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%が、集団が生成された鋳型核酸に対して少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を共有する。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドの十分に大きい

画分が、高スループットシーケンシングシステムを使用する増幅された鋳型の少なくとも一部分のシーケンシングを可能にするのに十分な配列同一性を共有するポリヌクレオチドの集団を生じさせる。

【0018】

いくつかの実施形態では、鋳型化された支持体に付着した核酸分子のメンバーの少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、または99%は、鋳型核酸分子と90%、95%、97%、99%、または100%超の同一性を共有することとなる。いくつかの実施形態では、増幅方法のいずれかを使用して産生される核酸集団のメンバーは、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件下で互いにハイブリダイズする。

【0019】

いくつかの実施形態では、例えば核酸の鋳型化に使用される増幅プロセスを含む、本明細書で提供される増幅方法、ならびにこれらの方法を伴う機器、デバイス、システム、組成物およびキットは、含まれるポリクローナル汚染物質が十分に少ないことにより高スループットシーケンシング法で正常にシーケンシングできるような核酸分子の実質的にモノクローナルの集団を生成する。例えば、増幅方法は、特定のシーケンシングシステムを使用して検出されるシグナル（例えば、シーケンシングシグナル、ヌクレオチド取り込みシグナルなど）の産生を提供する核酸分子の実質的にモノクローナルの集団を生成することができる。そのようなシグナルとして、光学的な、または光学的に検出可能なシグナル、非光学的なシグナル（または非光学的検出手法によって検出可能なシグナル）、イオン（例えば、水素イオン）濃度、pH、電気的なシグナル、電圧、および任意のそのようなシグナルの変動の変化を含むがこれらに限定されない、ヌクレオチド重合を示す任意の検出可能なシグナルが挙げられる。任意選択的に、続いてシグナルを分析して、集団の任意の核酸分子内に存在する任意の1つ以上のヌクレオチドの配列または塩基の同一性を正しく判定することができる。そのようなシグナルの検出または分析に好適なシーケンシングシステムの例として、イオンセンサ、例えば電界効果トランジスタ（FET）、例えばchemFETまたはISFET、を含むシステムが挙げられるが、これらに限定されない。

「chemFET」または化学的電界効果トランジスタは、化学センサとして作用する電界効果トランジスタの1種である。chemFETは、ゲート電極上の電荷が化学のプロセスによって印加される、MOSFETトランジスタの構造類似体を有する。「ISFET」またはイオン感応性電界効果トランジスタは、溶液中のイオン濃度を測定するために使用され、イオン濃度（ H^+ など）が変化すると、それに応じてトランジスタを通る電流が変化する。FETセンサを含むシステムの非限定的な例は、314、316、および318システムを含むIon Torrent PGM（商標）配列システムなどのIon Torrent配列システム、Proton Iを含むIon Torrent Proton（商標）配列システム（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）ならびにIon S5およびS5XL（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA）を含むIon Torrent Proton（商標）配列システムである。一実施形態では、シグナルの検出または分析のためのISFETベースのシーケンシングシステムが、本明細書に詳細に記載される。いくつかの実施形態では、実質的にモノクローナルの核酸集団は、FETセンサを組み込んだシステム、例えばIon Torrentシーケンシングシステム、上で少なくとも5つの接続するヌクレオチド残基の正確なシーケンシングを可能にする。

【0020】

本明細書で使用される場合、「クローン増幅」という用語およびその変化形は、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルのポリヌクレオチド集団が、ポリヌクレオチドの増幅を介して産生される任意のプロセスを指す。クローン増幅のいくつかの実施形態では、2つ以上のポリヌクレオチドを増幅して、少なくとも2つのモノクローナル、または実質的にモノクローナルのポリヌクレオチド集団を産生する。

【0021】

本明細書で使用される場合、本明細書で「シーディング」とも呼ばれる「プレシーディング」という用語は、表面または支持体へのポリヌクレオチドの付着を伴うプロセスを指す。いくつかの実施形態では、プレシーディングは、1つ以上の核酸の表面または支持体への、または表面または支持体上の1つ以上の部位への付着を伴う。プレシーディングされた表面または支持体は、例えば、付着した核酸の、さらなる操作または分析、例えば、核酸増幅（例えば、鋳型化プロセスでの増幅を含む）、シーケンシングまたは他のプロセスで使用される。いくつかの実施形態では、プレシーディングプロセスは、1つ以上の核酸分子が付着した1つ以上の表面または支持体を生成する。いくつかの実施形態では、プレシーディングは、単一のポリヌクレオチドが付着した1つ以上の表面または支持体を生成する。1つ以上の核酸分子が付着した1つ以上の表面または支持体は、集団をなす、複数の、または集合をなす2つ以上の表面または支持体に含まれ得、ここで、表面または支持体のうちのいくつか、少数、多数、または実質的にすべてには、1つ以上の核酸分子が付着している。いくつかの実施形態では、異なる表面もしくは支持体に、または表面もしくは支持体上の異なる部位に付着した1つ以上の核酸分子は、異なっている。いくつかの実施形態では、プレシーディングプロセスで、核酸分子（または実質的にモノクローナルの核酸）の多数の（または複数の）実質的に同一のコピーが、表面または支持体に付着するか、または多数の（または複数の）異なる核酸が、表面または支持体上の1つ以上の部位に付着する。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドの限られた数の実質的に同一のコピー（または実質的にモノクローナルの核酸）が、プレシーディングプロセスで、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの核酸の集団を生成するために表面または支持体に付着する。いくつかの実施形態では、表面または支持体のプレシーディングは、核酸増幅を伴わないプロセスで、例えば支持体に付着した相補的ポリヌクレオチドへの核酸のハイブリダイゼーションによる、表面または支持体への核酸の付着を含む。いくつかの実施形態で、表面または支持体のプレシーディングは、核酸増幅、例えば、核酸増幅（例えば、PCR）または等温増幅の1つ以上のサイクルを含む。例えば、プレシーディングプロセスで核酸増幅を使用して、表面または支持体に（例えば、ハイブリダイゼーションによって）付着することができる核酸の1つ以上のコピーを生成してもよい。典型的には、2つ以上の核酸、またはそれに付着した核酸の多数のコピーを有する表面または支持体を生成するプレシーディングは、核酸増幅を含む。本明細書で提供されるようなプレシーディングまたはシーディングプロセスで生成された表面または支持体は、「プレシーディングされた」または「シーディングされた」支持体と呼ばれる。

【0022】

本明細書で使用される場合、プレシーディングまたは鋳型法で表面または支持体に付着した核酸（または実質的に同一のコピーまたは実質的にモノクローナルの核酸）の数を指す場合の「限られた数」は、典型的には、様々な目的で制御される核酸の数を指す。核酸の限られた数のコピーは、例えば、反応部位間の鋳型の移動を防止するか、または低減することによって、ポリクローナルの集団の形成を防止するか、または低減するために、核酸のより大きな実質的にモノクローナルの集団を生成するための表面または支持体上の核酸の後続のより大規模な増幅（例えば、鋳型化）で混雑効果を提供するのに十分な数であり得る。そのような限られた数の鋳型コピーは、例えば、比較的短い核酸増幅時間を使用して、反応部位間の鋳型の移動を防止するか、または低減するが、続く増幅で混雑効果を提供するのに十分な数の鋳型コピーを生成するために、制限され得る。

【0023】

本明細書で使用される場合、「鋳型化」という用語は、2つ以上の、または複数のもしくは集団の実質的に同一のポリヌクレオチドを生成するプロセス、または例えば、ポリヌクレオチドの合成によるシーケンシングなどの核酸シーケンシングを含む核酸分析方法で鋳型として使用され得る核酸の実質的にモノクローナルの集団を生成するプロセスを指す。鋳型化プロセスで生成されたポリヌクレオチドは、典型的には、核酸鋳型と呼ばれる。いくつかの実施形態では、鋳型化は、表面または支持体へのポリヌクレオチド鋳型の付着を伴う。いくつかの実施形態では、鋳型化は、2つ以上の、または複数の別個の表面もし

くは支持体、または表面もしくは支持体上の離散的な部位を生成することを伴い、各々には、実質的に同一のポリヌクレオチドの2つ以上、または複数もしくは集団、またはポリヌクレオチドの実質的にモノクローナルの集団が付着している。いくつかの実施形態では、鑄型化は、ポリヌクレオチドの実質的にモノクローナルの集団が付着した、1つ以上の表面もしくは支持体、または表面もしくは支持体上の離散的な部位を生成することを伴う。いくつかの実施形態では、鑄型化は、少なくとも50,000、75,000、100,000、125,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、または 10^6 以上の実質的にモノクローナルの集団が鑄型化された各表面または支持体に付着した、1つ以上の表面または支持体を生成する。いくつかの実施形態では、鑄型化は、約50,000~500,000の鑄型核酸分子の実質的にモノクローナルの集団が、鑄型化された各表面または支持体に付着しているか、または例えば、約50,000~400,000の鑄型核酸分子、約50,000~300,000の鑄型核酸分子、約50,000~200,000の鑄型核酸分子、または約50,000~100,000の鑄型核酸分子が、鑄型化された各支持体に付着した、表面または支持体を生成する。いくつかの実施形態では、鑄型化は、約100,000~400,000の鑄型核酸分子の実質的にモノクローナルの集団が、鑄型化された各表面または支持体に付着しているか、または例えば、約100,000~300,000の鑄型核酸分子、約100,000~200,000の鑄型核酸分子、または約150,000~300,000の鑄型核酸分子が、鑄型化された各支持体に付着した、1つ以上の鑄型化された表面または支持体を生成する。いくつかの実施形態では、鑄型化は、1つ以上のプレシーディングされた、またはシーディングされた表面または支持体から開始して実行される。そのような実施形態では、鑄型は、プレシーディングされた表面または支持体上に存在していた鑄型化された表面または支持体上の鑄型核酸分子の少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも2.5倍、少なくとも3倍、少なくとも3.5倍、少なくとも4倍、少なくとも4.5倍、少なくとも5倍、少なくとも5.5倍、少なくとも6倍、少なくとも6.5倍、少なくとも7倍、少なくとも7.5倍、少なくとも8倍、少なくとも8.5倍、少なくとも9倍、少なくとも9.5倍、少なくとも10倍、少なくとも25倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも1000倍、少なくとも2500倍、少なくとも5000倍、少なくとも10,000倍、少なくとも25,000倍、少なくとも50,000倍、少なくとも100,000倍、少なくとも250,000倍、少なくとも500,000倍、または少なくとも 10^6 倍以上を含む1つ以上の鑄型化された表面または支持体を生成することができる。いくつかの実施形態では、約1つのみまたは1つのみの核酸分子が、プレシーディングされた支持体上に存在する。いくつかの実施形態では、少なくとも50,000、75,000、または100,000の実質的にモノクローナルの鑄型核酸分子、または約25,000~1,000,000の実質的にモノクローナルの鑄型核酸分子が、プレシーディングされた表面または支持体、例えば約25,000~500,000、約25,000~250,000、約25,000~125,000、または約25,000~100,000の実質的にモノクローナルの鑄型核酸分子、がプレシーディングされた表面または支持体、例えば固体表面または支持体、上に存在する。

【0024】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットは、分析方法で使用され得る核酸を閉じ込めるか、濃縮するか、隔離するか、単離するか、局在化させるか、増幅するか、または移送するための支持体、例えば固体支持体または半固体支持体、を含む。固体表面または支持体は、ポリマー材料、ガラス材料、または金属材料を含んでもよい。固体支持体の例として、膜、平面状表面、マイクロタイタープレート、ビーズ、フィルター、試験ストリップ、スライド、カバースリップ、および試験管が挙げられる。固体表面または支持体とは、オリゴマーが合成され、付着し、ライゲーションされ、または別様に固定

10

20

30

40

50

化される任意の固相材料を意味する。支持体として、任意選択的に、「樹脂」、「相」、「表面」、および「支持体」を挙げることができる。支持体は、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どの有機ポリマー、ならびにそれらのコポリマーおよびグラフトから構成されていてもよい。支持体はまた、ガラス、シリカ、制御された多孔質ガラス（CPG）、または逆相シリカなどの無機物であってもよい。支持体の構成は、例えば、ビーズ、球、粒子、顆粒、ゲル、または表面の形態であってもよい。表面は、例えば、平面状、実質的に平面状、または非平面状、ならびに凹面状、凸面状、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。支持体は、多孔性、半多孔性、または非多孔性であってもよく、膨潤特性または非膨潤特性を有してもよい。支持体を、1つ以上のウェル、くぼみもしくは他の器、容器、フィーチャ、または場所を含むように成形することができる。1つ以上の支持体が、様々な場所にアレイで構成されていてもよい。支持体は、任意選択的に、（例えば、試薬のロボット送達のために）、またはレーザ照明および共焦点または偏向光収集による走査を含む検出手段によって、アドレス可能である。支持体（例えば、ビーズ）を、別の支持体内または上（例えば、第2の支持体のウェル内）に配置することができる。ビーズ材料の例として、ゲル、ヒドロゲル、またはアクリルアミドポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、支持体は、イオン球粒子（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）である。固体支持体の例として、「マイクロ粒子」、「ビーズ」、「マイクロビーズ」（ただし、任意選択的に、形状は必ずしも球形ではない）球、フィルター、フローセル、ウェル、溝、チャンネルリザーバー、ゲル、またはキャピラリーの内壁が挙げられる。いくつかの実施形態では、支持体は、テクスチャ（例えば、エッチング、空洞化、細孔、三次元スキャフォールド、または隆起）を含む。支持体のサイズとして、50ミクロン以下、10ミクロン以下、3ミクロン以下、およそ1ミクロン以下、およそ0.5ミクロン以下、例えば、およそ0.1、0.2、0.3、または0.4ミクロン、またはより小さい（例えば、1ナノメートル未満、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）の最小断面長（例えば、直径）を有する支持体が挙げられるが、これらに限定されない。表面または固体支持体には、磁性または常磁性ビーズ（例えば、磁性または常磁性ナノ粒子またはマイクロ粒子）も含まれる。例えば、常磁性マイクロ粒子として、ストレプトアビジンが付着した常磁性ビーズが挙げられる（例えば、Carlsbad, CAのInvitrogen製のDynabeads（商標）M-270）。粒子は、鉄コアを有することができるか、またはヒドロゲルもしくはアガロース（例えば、Sephacrose（商標））であり得る。マイクロ粒子（例えば、Oslo, NorwayのDynal製のDynabeads）は、ガラス（例えば、制御された多孔質ガラス）、シリカ、ジルコニア、架橋ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート、二酸化チタン、ラテックス、ポリスチレンなどを含む多様な無機材料または有機材料で作成され得るが、これらに限定されない。磁化は、増幅後のマイクロ粒子付着試薬（ポリヌクレオチドやリガーゼなど）の収集および濃縮を容易にすることができ、追加の手順（例えば、洗浄、試薬除去など）を容易にすることもできる。ビーズ表面を、プライマーの1つ以上、または複数、または集団を付着させるために機能化することができる。いくつかの実施形態では、ビーズは、反応チャンバに適合し得る任意のサイズである。例えば、1つのビーズが、反応チャンバに適合し得る。いくつかの実施形態では、2つ以上のビーズが、反応チャンバに適合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットは、オリゴヌクレオチド（例えば、プライマー）の1つ、2つ以上、複数、または集団が付着した支持体または表面を含む。支持体または表面を、核酸分子（例えば、第1のプライマーまたは第2のプライマー）を付着させるために、アクリルアミド化合物、カルボン酸化合物、またはアミン化合物でコーティングすることができる。例えば、アミノ修飾された核酸分子（例えば、プライマー）を、カルボン酸でコーティングされた支持体に付着させることができる。プライマーを、表面上のアクリルアミド化合物コーティン

10

20

30

40

50

グに付着させることができる。粒子を、ビオチン化核酸を結合させるために、アビジン様化合物（例えば、ストレプトアビジン）でコーティングすることができる。いくつかの実施形態では、支持体または表面に付着したオリゴヌクレオチドは、実質的に同一であるか、またはすべてのオリゴヌクレオチドで実質的に同一であるプライマー配列を含む。いくつかの実施形態では、2つ以上の異なるオリゴヌクレオチドが、支持体または表面に付着している。いくつかの実施形態では、表面に、第1のプライマーの集団が付着しており、集団の第1のプライマーは、共通の第1のプライマー配列を共有する。いくつかの実施形態では、表面に、第1のプライマーの集団および第2のプライマーの集団が付着しており、集団の第1のプライマーは、共通の第1のプライマー配列を共有し、第2のプライマーの集団の第2のプライマーは、共通の第2のプライマー配列を共有する。いくつかの実施形態では、表面上に、第1のプライマーの集団が、固定化されている。他の実施形態では、表面上に、第1のプライマーの集団および第2のプライマーの集団が、固定化されている。

【0025】

概要

図1では、流体工学回路102を含むシステム100は、インレットによって、少なくとも2つの試薬リザーバー（104、106、108、110、または112）、廃棄物リザーバー120に接続されており、流体工学ノード130を流体連通のためのバイオセンサ134のインレット138に接続する流体経路132によってバイオセンサ134に、接続されている。リザーバー（104、106、108、110、または112）からの試薬は、圧力、シリンジポンプなどのポンプ、重力送りなどを含む多様な方法によって流体回路102に駆動することができ、バルブ114の制御によって選択される。流体工学回路102からの試薬を、制御システム118から廃棄物容器120へのシグナルを受信するバルブ114によって駆動することができる。流体工学回路102からの試薬を、バイオセンサ134によって廃棄物容器136に駆動することもできる。制御システム118は、電気接続116を介して開閉するためのシグナルを生成するバルブ114のコントローラを含む。

【0026】

制御システム118はまた、電気接続122によって制御システム118に接続された洗浄溶液バルブ124、および基準電極128などの、このシステムの他の構成要素のコントローラを含む。制御システム118はまた、バイオセンサ134の制御およびデータ取得機能を含むことができる。一動作モードでは、流体回路102は、選択された試薬フローの間に、流体工学回路102がプライミングされ、洗浄され、かつバイオセンサ134が洗浄されるように、制御システム118のプログラムされた制御の下で選択された試薬1、2、3、4、または5を順次バイオセンサ134に送達する。バイオセンサ134に入る流体は、アウトレット140を通して出て、ピンチバルブレギュレータ144の制御を介して廃棄物容器136に溜まる。バルブ144は、バイオセンサ134のセンサ流体出力140と流体連通している。

【0027】

第1のアクセスおよび第2のアクセスから形成されたウェルを画定し、かつセンサパッドを露出する誘電体層を含むデバイスには、用途の中でもとりわけ、遺伝子シーケンシングに有用な、ヌクレオチドの取り込みに応答した水素イオンの放出の検出などの、化学反応および副産物の検出に特定の用途が見出される。特定の実施形態では、シーケンシングシステムは、センサリーアレイが配設されたフローセルを含み、感覚アレイと電子通信する通信回路を含み、フローセルと流体連通した容器および流体制御装置を含む。例では、図2は、フローセル200の拡大断面図を示し、フローチャンバ206の一部分を例示している。試薬フロー208は、ウェルアレイ202の表面を渡り流れ、試薬フロー208は、ウェルアレイ202のウェルの開口端上を流れる。ウェルアレイ202およびセンサアレイ205は、フローセル200の下壁（またはフロア）を形成する統合ユニットを一体的に形成していてもよい。基準電極204は、フローチャンバ206に流体結合されて

10

20

30

40

50

いてもよい。さらに、フローセルカバー 230 は、フローチャンバ 206 をカプセル化して、限られた領域内に試薬フロー 208 を収容する。

【0028】

図 3 は、図 2 の 210 に例示されるように、ウェル 301 およびセンサ 314 の拡大図を例示している。ウェルの体積、形状、アスペクト比（ベース幅対ウェル深さの比など）、および他の寸法特性は、行われる反応の性質、ならびに試薬、副産物、または使用されるラベリング技術（もしあれば）に基づいて選択され得る。センサ 314 は、化学的電界効果トランジスタ（chemFET）、より具体的には、任意選択的に材料層 316 によってウェル内部から分離された、センサプレート 320 を有するフローティングゲート 318 を有する、イオン感応性 FET（ISFET）であり得る。センサ 314 は、センサプレート 320 の反対側の材料層 316 上に存在する電荷 324 の量に応答する（およびそれに関連する出力シグナルを生成する）ことができる。材料層 316 は、とりわけ、ジルコニウム、ハフニウム、タンタル、アルミニウム、またはチタンの酸化物、またはチタンの窒化物などのセラミック層であり得る。代わりに、材料層 316 を、チタン、タングステン、金、銀、白金、アルミニウム、銅、またはそれらの組み合わせなどの金属で形成することができる。例では、材料層 316 は、10 nm～70 nm の範囲、15 nm～65 nm の範囲、またはさらには 20 nm～50 nm の範囲などの、5 nm～100 nm の範囲の厚さを有することができる。

【0029】

材料層 316 は、例示された FET コンポーネントの境界を超えて延在するように例示されているが、材料層 316 は、ウェル 301 の底部に沿って、および任意選択的にウェル 301 の壁に沿って延在することができる。センサ 314 は、センサプレート 320 の反対側の材料層 316 上に存在する電荷 324 の量に応答する（およびそれに関連する出力シグナルを生成する）ことができる。電荷 324 の変化は、chemFET のソース 321 とドレイン 322 との間の電流の変化を引き起こすことができる。次に、chemFET を直接使用して、電流ベースの出力シグナルを提供するか、または追加の回路機構を間接的に使用して、電圧ベースの出力シグナルを提供することができる。反応物、洗浄溶液、および他の試薬は、拡散機構 340 によってウェルに出入りし得る。

【0030】

ウェル 301 を、材料の 1 つ以上の層から形成することができる壁構造によって画定することができる。例では、壁構造は、0.05 マイクロメートル～10 マイクロメートルの範囲、0.1 マイクロメートル～10 マイクロメートルの範囲、0.3 マイクロメートル～10 マイクロメートルの範囲、または 0.5 マイクロメートル～6 マイクロメートルの範囲などの、0.01 マイクロメートル～10 マイクロメートルの範囲で、ウェルの下面から上面まで延在する厚さを有することができる。特に、厚さは、0.05 マイクロメートル～0.5 マイクロメートルの範囲、または 0.05 マイクロメートル～0.3 マイクロメートルの範囲などの、0.01 マイクロメートル～1 マイクロメートルの範囲であり得る。アレイ 202 のウェル 301 は、3.5 マイクロメートル以下、2.0 マイクロメートル以下、1.6 マイクロメートル以下、1.0 マイクロメートル以下、0.8 マイクロメートル以下、さらには 0.6 マイクロメートル以下などの、5 マイクロメートル以下の、パイで除した断面積（A）の 4 倍の平方根（例えば、 $\sqrt{4 \cdot A / \pi}$ ）として定義される特徴的な直径を有することができる。例では、ウェル 301 は、少なくとも 0.01 マイクロメートルの特徴的な直径を有することができる。さらなる例では、ウェル 301 は、0.05 fL～1 pL の範囲、0.05 fL～100 fL の範囲、0.05 fL～10 fL の範囲、またはさらには 0.1 fL～5 fL の範囲などの、0.05 fL～10 pL の範囲の体積を画定することができる。

【0031】

一実施形態では、ウェル 301 内で実行される反応は、関心の分析物の特徴または特性を同定するか、または判定するための分析反応であり得る。そのような反応は、センサプレート 320 に隣接する電荷の量に影響を与える副産物を直接的に、または間接的に生成

することができる。そのような副産物が少量産生されるか、または急速に崩壊するか、または他の成分と反応する場合には、生成される出力信号を増大させるために、同じ分析物の複数のコピーをウェル301で同時に分析することができる。一実施形態では、分析物の複数のコピーを、ウェル301への堆積の前または後のいずれかで、固相支持体312に付着させてもよい。固相支持体312は、マイクロ粒子、ナノ粒子、ビーズ、ゲルを含む固体または多孔質などであり得る。説明を簡易かつ容易にするために、固相支持体312は、本明細書では粒子またはビーズとも呼ばれる。核酸分析物について、複数の接続されたコピーは、ローリングサークル増幅(RCA)、指数関数的RCA、または同様の手法によって作成され、固体支持体を必要とせずにアンプリコンを産生し得る。

【0032】

特に、ビーズ支持体などの固相支持体は、ポリヌクレオチドのコピーを含むことができる。図4に例示される特定の例では、ポリマー粒子を、シーケンシング手法中にポリヌクレオチドの支持体として使用することができる。例えば、そのような親水性粒子は、蛍光シーケンシング手法を使用してシーケンシングするためにポリヌクレオチドを固定化することができる。別の例では、親水性粒子は、イオン感知手法を使用してシーケンシングするためにポリヌクレオチドの複数のコピーを固定化することができる。代わりに、上述の処理は、センサアレイの表面へのポリマーマトリックスの結合を改善することができる。ポリマーマトリックスは、シーケンシングのためのポリヌクレオチドなどの分析物を捕捉することができる。

【0033】

ビーズ支持体は、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どの有機ポリマー、ならびにそれらのコポリマーおよびグラフトから構成されていてもよい。支持体はまた、ガラス、シリカ、制御された多孔質ガラス(CPG)、または逆相シリカなどの無機物であってもよい。支持体の構成は、ビーズ、球、粒子、顆粒、ゲル、または表面の形態であってもよい。支持体は、多孔質または非多孔性であってもよく、膨潤特性または非膨潤特性を有してもよい。いくつかの実施形態では、支持体は、イオン球粒子である。ビーズ支持体の例は、「Hydrophilic Polymeric Particles and Methods for Making and Using Same」と題されたUS9,243,085、および「Polymer Substrates Formed from Carboxy Functional Acrylamide」と題されたUS9,868,826に開示されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0034】

いくつかの実施形態では、固体支持体は、50ミクロン以下、好ましくは10ミクロン以下、3ミクロン以下、およそ1ミクロン以下、およそ0.5ミクロン以下、例えばおよそ0.1、0.2、0.3、または0.4ミクロン以下(例えば、1ナノメートル未満、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)の最小断面長(例えば、直径)を有する「マイクロ粒子」、「ビーズ」、「マイクロビーズ」など(任意選択的であるが、必ずしも球形である必要はない)である。例では、支持体は、少なくとも0.1ミクロンである。マイクロ粒子(またはビーズ支持体)は、ガラス(例えば、制御された多孔質ガラス)、シリカ、ジルコニア、架橋ポリスチレン、ポリアクリレート、ポリメチルメタクリレート、二酸化チタン、ラテックス、ポリスチレンなどを含む多様な無機材料または有機材料で作成され得るが、これらに限定されない。磁化は、増幅後のマイクロ粒子付着試薬(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することができ、追加の手順(例えば、洗浄、試薬除去など)を容易にすることもできる。特定の実施形態では、異なる形状サイズまたは色を有するマイクロ粒子の集団が使用される。マイクロ粒子は、任意選択的に、例えば、各マイクロ粒子またはマイクロ粒子のグループを個別にまたは一意に識別することができるような量子ドットを用いて符号化することができる。

【0035】

磁性ビーズ（例えば、Oslo, NorwayのDynal製のDynabeads）は、2ミクロン～100ミクロンなどの、1ミクロン～100ミクロンの範囲のサイズを有することができる。磁性ビーズを、ガラス（例えば、制御された多孔質ガラス）、シリカ、ジルコニア、架橋ポリスチレン、ポリスチレン、またはそれらの組み合わせを含むがこれらに限定されない無機材料または有機材料から形成することができる。

【0036】

いくつかの実施形態では、ビーズ支持体は、第1のプライマーの集団を付着させるために機能化される。いくつかの実施形態では、ビーズは、反応チャンバに適合し得る任意のサイズである。例えば、1つのビーズが、反応チャンバに適合し得る。いくつかの実施形態では、2つ以上のビーズが、反応チャンバに適合する。いくつかの実施形態では、ビーズの最小断面長（例えば、直径）は、約50ミクロン以下、または約10ミクロン以下、または約3ミクロン以下、およそ1ミクロン以下、およそ0.5ミクロン以下、例えば、およそ0.1、0.2、0.3、もしくは0.4ミクロン、またはそれよりも小さい（例えば、1ナノメートル未満、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）である。

【0037】

一般に、ポリマー粒子を、ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸（オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチド）、ポリペプチド、糖類、多糖類、脂質、またはそれらの誘導体もしくは類似体を含む生体分子を含むように処理することができる。例えば、高分子粒子は、生体分子に結合するか、または付着することができる。生体分子の末端または任意の内部部分は、ポリマー粒子に結合または付着することができる。ポリマー粒子は、連結化学を用いて生体分子に結合または付着することができる。連結化学は、イオン結合、水素結合、親和性結合、双極子-双極子結合、ファンデルワールス結合、および疎水性結合を含む、共有結合または非共有結合を含む。連結化学は、結合パートナー、例えば、アビジン部分とビオチン部分；抗原性エピトープと抗体またはその免疫学的に反応性の断片；抗体とハプテン；ジゴキシゲン部分と抗ジゴキシゲン抗体；フルオレセイン部分と抗フルオレセイン抗体；オペレーターとリプレッサー；ヌクレアーゼとヌクレオチド；レクチンと多糖類；ステロイドとステロイド結合タンパク質；活性化合物と活性化合物受容体；ホルモンとホルモン受容体；酵素と基質；免疫グロブリンとプロテインA；あるいはオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとその対応する相補体の間の親和性を含む。

【0038】

図4に例示されるように、複数のビーズ支持体404を、複数のポリヌクレオチド402（標的または鋳型ポリヌクレオチド）とともに溶液中に配置することができる。複数のビーズ支持体404を、活性化するか、または別様に調製して、ポリヌクレオチド402と結合することができる。例えば、粒子404は、複数のポリヌクレオチド402のうちのポリヌクレオチドの一部分に相補的なオリゴヌクレオチドを含む（プライマーを捕捉する）ことができる。別の例では、ビーズ支持体404を、ビオチン-ストレプトアビジン結合などの手法を使用して、標的ポリヌクレオチド402で修飾することができる。

【0039】

いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子（鋳型ポリヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチド）は、天然のまたは非天然の供給源に由来し得るサンプルに由来し得る。サンプル中の核酸分子は、生物または細胞に由来することができる。任意の核酸分子を使用することができ、例えば、サンプルは、生物または細胞からのゲノム、mRNA、またはmiRNAの一部分または全体をカバーするゲノムDNAを含むことができる。他の実施形態では、鋳型核酸分子は、合成により得るか、または組換え型であり得る。いくつかの実施形態では、サンプルは、実質的に同一の配列を有するか、または異なる配列の混合物を有する核酸分子を含有する。例示的な実施形態は、典型的には、生細胞内および生細胞によって生成された核酸分子を使用して実施される。そのような核酸分子は、典型的には、インビトロ増幅なしに、細胞または体液などの天然源から直接単離される。よって、サンプル核酸分子は、後続のステップで直接使用される。いくつかの実施形態では、サンプル中の

核酸分子は、異なる配列を有する2つ以上の核酸分子を含むことができる。

【0040】

この方法は、任意選択的に、ライブラリ調製の前、間、または後、およびプレシーディング反応の前に、標的濃縮ステップを含むことができる。標的遺伝子座または関心の領域を含む標的核酸分子を、例えば、マルチプレックス核酸増幅またはハイブリダイゼーションにより濃縮することができる。多様な方法を使用して、マルチプレックスPCRなどのマルチプレックス核酸増幅を実行して、アンプリコンを生成することができ、多様な方法を一実施形態で使用することができる。任意の方法による濃縮の後にユニバーサル増幅反応を続けてから、鋳型核酸分子をプレシーディング反応混合物に添加することができる。本教示の実施形態のいずれも、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、または10,000の標的核酸分子、標的遺伝子座、または関心の領域のうちの複数を濃縮することを含むことができる。開示された実施形態のいずれかで、標的遺伝子座または関心の領域は、長さが少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75、100、125、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、または1,000ヌクレオチドであり、鋳型核酸分子の一部分または全体を含むことができる。他の実施形態では、標的遺伝子座または関心の領域は、長さが約1~10,000ヌクレオチド、例えば、長さが約2~5,000ヌクレオチド、約2~3,000ヌクレオチド、または約2~2,000ヌクレオチドであり得る。本教示の実施形態のいずれかで、マルチプレックス核酸増幅は、各標的核酸分子、標的遺伝子座、または関心の領域の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、または10,000のコピーを生成することを含むことができる。

【0041】

いくつかの実施形態では、ライブラリ調製および任意選択的な濃縮ステップの後、鋳型核酸分子のライブラリを1つ以上の支持体上に鋳型化することができる。1つ以上の支持体を、プレシーディングされた固体支持体を生成するためのシーディング反応と、付着した鋳型核酸分子をさらに増幅するための1つ以上のプレシーディングされた支持体を使用する鋳型化反応と、の2つの反応で鋳型化することができる。プレシーディング反応は、典型的には、増幅反応であり、多様な方法を使用して実行され得る。例えば、プレシーディング反応は、RPA反応、鋳型ウォーキング反応、またはPCRで実行され得る。RPA反応では、プライマーおよびヌクレオチドの存在下で、リコンビナーゼ、ポリメラーゼ、および任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタンパク質を使用して鋳型核酸分子を増幅する。リコンビナーゼおよび任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタンパク質は、二本鎖鋳型核酸分子の少なくとも一部分を解離して、次いでポリメラーゼが結合して複製を開始できるようにプライマーがハイブリダイズすることを可能とする。いくつかの実施形態では、リコンビナーゼアクセサリタンパク質は、解離した鋳型核酸分子の再ハイブリダイゼーションを防止する一本鎖結合タンパク質(SSB)であり得る。典型的には、RPA反応は、等温温度で実行され得る。鋳型ウォーキング反応では、プライマーがハイブリダイズし、かつ次いでポリメラーゼが結合して複製を開始できるように、二本鎖鋳型核酸分子の少なくとも一部分が解離することを可能にする反応条件で、プライマーおよびヌクレオチドの存在下でポリメラーゼを使用して鋳型核酸分子を増幅する。PCRでは、二本鎖鋳型核酸分子は、サーマルサイクリングによって解離する。冷却後、プライマー

10

20

30

40

50

は、相補的な配列に結合し、ポリメラーゼによる複製に使用できる。本教示の態様のいずれかで、プレシーディング反応を、鋳型核酸分子の増幅に必要な成分で形成されるプレシーディング反応混合物中で実施することができる。開示された態様のいずれかで、プレシーディング反応混合物は、以下のいくつかまたはすべてを含む：鋳型核酸分子の集団、ポリメラーゼ、付着した第1のプライマーの集団を有する1つ以上の固体支持体、ヌクレオチド、および二価カチオンなどの補因子。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、第2のプライマーおよび任意選択的に拡散制限剤をさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子の集団は、第1または第2のプライマーにハイブリダイズすることができる少なくとも1つのアダプタ配列に接合された鋳型核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、反応混合物は、エマルジョンRPAまたはエマルジョンPCRのように、エマルジョンを形成することができる。RPA反応によって実行されるプレシーディング反応では、プレシーディング反応混合物は、リコンビナーゼおよび任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタンパク質を含むことができる。反応混合物の様々な成分は、本明細書でさらに詳細に論じられる。

【0042】

シーディングの特定の実施形態では、親水性粒子およびポリヌクレオチドは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅またはリコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）に供される。例では、粒子404は、鋳型ポリヌクレオチド402の一部分に相補的な捕捉プライマーを含む。鋳型ポリヌクレオチドは、捕捉プライマーにハイブリダイズすることができる。捕捉プライマーを伸長させて、付着した標的ポリヌクレオチドを含むビーズ406を形成することができる。他のビーズが、標的核酸に付着していないままであってもよく、他の鋳型ポリヌクレオチドが、溶液中で自由に浮遊し得る。

【0043】

例では、標的ポリヌクレオチドを含むビーズ支持体406を磁性ビーズ410に付着させて、ビーズアセンブリ412を形成することができる。特に、磁性ビーズ410は、二本鎖ポリヌクレオチド結合によってビーズ支持体406に付着する。例では、リンカー部分を含むさらなるプローブは、ビーズ支持体406上の標的ポリヌクレオチドの一部分にハイブリダイズすることができる。リンカー部分を、磁性ビーズ410上の相補的なリンカー部分に付着させることができる。別の例では、ビーズ406に付着した標的核酸を形成するために使用される鋳型ポリヌクレオチドは、磁性ビーズ410に付着するリンカー部分を含むことができる。別の例では、ビーズ支持体406に付着した標的ポリヌクレオチドに相補的な鋳型ポリヌクレオチドを、磁性ビーズ410に付着するリンカーで修飾されたプライマーから生成することができる。

【0044】

ポリヌクレオチドに付着したリンカー部分と、磁性ビーズに付着したリンカー部分と、は互いに相補的であり、互いに付着し得る。例では、リンカー部分は、親和性を有し、アビジン部分とビオチン部分；抗原性エピトープと抗体またはその免疫学的に反応性の断片；抗体とハプテン；ジゴキシゲン部分と抗ジゴキシゲン抗体；フルオレセイン部分と抗フルオレセイン抗体；オペレーターとリプレッサー；ヌクレアーゼとヌクレオチド；レクチンと多糖類；ステロイドとステロイド結合タンパク質；活性化合物と活性化合物受容体；ホルモンとホルモン受容体；酵素と基質；免疫グロブリンとプロテインA；あるいはオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドとその対応する相補体を含むことができる。特定の例では、ポリヌクレオチドに付着したリンカー部分は、ビオチンを含み、磁性ビーズに付着したリンカー部分は、ストレプトアビジンを含む。

【0045】

ビーズアセンブリ412は、ウェル418を含むシーケンシングデバイスの基材416を覆って被着することができる。例では、基材416に磁場を印加して、ビーズアセンブリ412の磁性ビーズ410をウェル418に向かって引き寄せることができる。ビーズ支持体406は、ウェル418に入る。例えば、磁石が、基板416の表面に平行に移動し、ウェル418中へのビーズ支持体406の堆積をもたらすことができる。

【0046】

ビーズアセンブリ412を変性させて、磁性ビーズ410を除去し、ビーズ支持体406をウェル418中に残すことができる。例えば、ビーズアセンブリ412のハイブリダイズした二本鎖DNAを、サーマルサイクリングまたはイオン溶液を使用して変性させて、磁性ビーズ410と、磁性ビーズ410に付着したリンカー部分を有する鋳型ポリヌクレオチドと、を放出することができる。例えば、二本鎖DNAを、脱イオン水などの低イオン含有量の水溶液で処理して、鎖を変性し、分離することができる。例では、フォーム洗浄を使用して、磁性ビーズを除去することができる。

【0047】

任意選択的に、ウェル418中にある間、標的ポリヌクレオチド406を、本明細書では鋳型化と呼ばれる増幅を行って、標的ポリヌクレオチドの複数のコピーを有するビーズ支持体414を提供することができる。特に、ビーズ414は、標的ポリヌクレオチドのモノクロナルの集団を有する。そのような増幅反応を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、組換えポリメラーゼ増幅（RPA）、またはそれらの組み合わせを使用して実行することができる。代わりに、ビーズ支持体414をウェル中に堆積する前に増幅を実行することができる。

【0048】

特定の実施形態では、ポリメラーゼなどの酵素が、粒子またはビーズに存在するか、結合しているか、または近接している。例では、ポリヌクレオチドの複製を容易にするために、ポリメラーゼが、溶液中またはウェル中に存在する。本明細書に記載される方法では、多様な核酸ポリメラーゼを使用し得る。例示的な実施形態では、ポリメラーゼは、ポリヌクレオチドの複製を触媒することができる酵素、断片、またはそのサブユニットを含むことができる。別の実施形態では、ポリメラーゼは、天然に存在するポリメラーゼ、組換えポリメラーゼ、突然変異ポリメラーゼ、変異型ポリメラーゼ、融合または別様に操作されたポリメラーゼ、化学修飾ポリメラーゼ、合成分子、またはそれらの類似体、誘導体または断片であり得る。酵素、溶液、組成物、および増幅方法の例を、“METHODS AND COMPOSITIONS FOR MANIPULATING NUCLEIC ACIDS”と題された、WO2019/094,524に見出すことができ、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0049】

ビーズ支持体414のポリヌクレオチドは表面上にあるものとして例示されているが、ポリヌクレオチドは、ビーズ支持体414内に延在することができる。水に対するポリマーの濃度が低いヒドロゲルおよび親水性粒子が、ビーズ支持体414の内部および全体にポリヌクレオチドセグメントを含むことができるか、またはポリヌクレオチドが、細孔および他の開口部に存在することができる。特に、ビーズ支持体414は、反応を監視するために使用される酵素、ヌクレオチド、プライマー、および反応生成物の拡散を可能にすることができる。1粒子当たり多数のポリヌクレオチドが、より良好なシグナルを生成する。

【0050】

例示的な実施形態では、ビーズ支持体414を、シーケンシングデバイスで利用することができる。例えば、シーケンシングデバイス416は、ウェル418のアレイを含むことができる。

【0051】

例では、シーケンシングプライマーをウェル418に添加することができるか、またはビーズ支持体414を、ウェル418中に配置する前にプライマーに事前曝露することができる。特に、ビーズ支持体414は、結合したシーケンシングプライマーを含むことができる。シーケンシングプライマーおよびポリヌクレオチドは、シーケンシングプライマーにハイブリダイズしたポリヌクレオチド（例えば、鋳型核酸）を含む核酸二重鎖を形成する。核酸二重鎖は、少なくとも部分的に二本鎖のポリヌクレオチドである。ウェル418に酵素およびヌクレオチドを提供して、ヌクレオチド取り込みなどの検出可能な反応を

10

20

30

40

50

促進することができる。

【0052】

シーケンシングを、ヌクレオチド付加を検出することによって実行することができる。ヌクレオチド付加を、蛍光発光法またはイオン検出法などの方法を使用して検出することができる。例えば、蛍光標識ヌクレオチドのセットをシステム416に提供することができる。このセットは、ウェル418に移動することができる。ウェル418に励起エネルギーを提供することもできる。ヌクレオチドがポリメラーゼによって捕捉され、かつ伸長するプライマーの末端に付加されると、ヌクレオチドの標識が蛍光を発し、どのタイプのヌクレオチドが付加されているかを示すことができる。

【0053】

代替例では、単一のタイプのヌクレオチドを含む溶液を順次供給することができる。ヌクレオチド付加に応答して、ウェル418のローカル環境内のpHが変化する可能性がある。そのようなpHの変化を、イオン感応性電界効果トランジスタ（ISFET）によって検出することができる。したがって、pHの変化を使用して、粒子410のポリヌクレオチドに相補的なヌクレオチドの順序を示すシグナルを生成することができる。

【0054】

特に、シーケンシングシステムは、電界効果トランジスタ（FET）などのイオンセンサのセンサパッドの上に配設された1つのウェルまたは複数のウェルを含むことができる。実施形態では、システムは、イオンセンサ（例えば、FET）のセンサパッドの上に配設されたウェルに装填された1つ以上のポリマー粒子、またはイオンセンサ（例えば、FET）のセンサパッドの上に配置された複数のウェルに装填された1つ以上のポリマー粒子を含む。実施形態では、FETは、chemFETまたはISFETであり得る。「chemFET」または化学的電界効果トランジスタは、化学センサとして作用する電界効果トランジスタの1種である。chemFETは、ゲート電極上の電荷が化学的プロセスによって印加される、MOSFETトランジスタの構造類似体を有する。「ISFET」またはイオン感応性電界効果トランジスタは、溶液中のイオン濃度を測定するために使用でき、イオン濃度（H⁺など）が変化すると、トランジスタを通る電流が相応に変化する。

【0055】

いくつかの実施形態では、FETは、FETアレイであり得る。本明細書で使用される場合、「アレイ」とは、センサまたはウェル等のヨウ素の平面編成である。アレイは、一次元または二次元であり得る。一次元アレイは、第1の次元において素子の1つの列（または行）を有し、第2の次元において複数の列（または行）を有するアレイであり得る。第1および第2の次元におけるカラム（または列）の数は、同じであるか、または同じでない。FETまたはアレイは、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、またはそれ以上のFETを含み得る。

【0056】

実施形態では、生物学的反応または化学反応の抑制または制限を提供するために、FETセンサアレイの上方に1つ以上のマイクロ流体構造を組み立てることができる。例えば、1つの実装態様では、マイクロ流体構造を、上に所与のウェルが配設された1つ以上のセンサが所与のウェル中の分析物の存在、レベル、または濃度を検出し、測定するように、アレイの1つ以上のセンサの上方に配設された1つ以上のウェル（またはウェル、または反応チャンバ、または反応ウェルであって、これらの用語は本明細書において置き換え可能に使用される）として構成することができる。いくつかの実施形態では、FETセンサと反応ウェルとの1:1の対応があり得る。

【0057】

図4に戻ると、別の例では、ウェルのアレイのウェル418を、測定デバイスに動作可能に接続することができる。例えば、蛍光発光法について、ウェル418を、光検出デバイスに動作可能に結合することができる。イオン検出の場合、ウェル418の下面を、電界効果トランジスタなどのイオンセンサのセンサパッドの上に配設することができる。

【0058】

ヌクレオチド取り込みのイオン性副産物の検出を介したシーケンシングを伴う1つの例示的なシステムは、Ion Torrent PGM (商標)、Proton (商標)、またはS5 (商標) シーケンサー (Thermo Fisher Scientific) であり、これらは、ヌクレオチド取り込みの副産物として生成された水素イオンを検出することによって核酸鋳型をシーケンシングする、イオンベースのシーケンシングシステムである。典型的には、水素イオンは、ポリメラーゼによる鋳型依存性核酸合成中に生じるヌクレオチド取り込みの副産物として放出される。Ion Torrent PGM (商標)、Proton (商標)、またはS5 (商標) シーケンサーは、ヌクレオチド取り込みの水素イオン副産物を検出することによって、ヌクレオチド取り込みを検出する。Ion Torrent PGM (商標)、Proton (商標)、またはS5 (商標) シーケンサーは、シーケンシングされる複数の鋳型ポリヌクレオチドを含むことができ、各鋳型は、レイ中のそれぞれのシーケンシング反応ウェル内に配設される。アレイのウェルを各々、ヌクレオチド取り込みの副産物として生成されるH⁺イオンの放出、または溶液pHの変化を検出することができる少なくとも1つのイオンセンサに結合することができる。イオンセンサは、H⁺イオンの存在、または溶液pHの変化を感知することができるイオン感応性検出層に結合された電界効果トランジスタ (FET) を含む。イオンセンサは、振幅がそれぞれのウェルまたは反応チャンバ中のH⁺イオン濃度と相関する電圧変化として表され得るヌクレオチド取り込みを示す出力シグナルを提供することができる。異なるヌクレオチドタイプを、反応チャンバ中に連続的に流すことができ、鋳型の配列によって決定される順序で、ポリメラーゼによって、伸長するプライマー (または重合部位) に取り込むことができる。各ヌクレオチド取り込みには、局在化pHの付随する変化とともに、反応ウェル中のH⁺イオンの放出が伴い得る。H⁺イオンの放出は、センサのFETによって記録され、それによりヌクレオチド取り込みの発生を示すシグナルが生成される。特定のヌクレオチドの流れの中で取り込まれなかったヌクレオチドは、シグナルを生成しない場合がある。FETからのシグナルの振幅はまた、伸長する核酸分子に取り込まれる特定のタイプのヌクレオチドの数と相関し、それによって、ホモポリマー領域を分解することが可能になり得る。したがって、シーケンサーの運転中、複数のヌクレオチドの反応チャンバ内への流入、および重複のウェルまたは反応チャンバにわたる取り込み監視は、器具が多くの核酸鋳型を同時に分解することを可能にし得る。

【0059】

ビーズ支持体のシーディングと磁性ビーズによる捕捉とを、様々な方法で実行することができる。例えば、図5の502に目を向けると、ビーズ支持体510に付着した捕捉プローブ (B) によって、鋳型ポリヌクレオチド (B'-A) を捕捉することができる。捕捉プローブ (B) を、鋳型ポリヌクレオチドに相補的に伸長させることができる。任意選択的に、結果として得られた二本鎖ポリヌクレオチドを変性させて、鋳型核酸 (B'-A) を除去し、ビーズ支持体510に付着した一本鎖 (B-A') を残すことができる。504に例示されるように、ビオチンなどのリンカー部分で修飾されたプライマー (A) は、ビーズ支持体510に付着した核酸 (B-A') の部分 (A') にハイブリダイズすることができる。任意選択的に、プライマー (A) を伸長させて、相補的な核酸 (A-B') を形成することができる。

【0060】

506に例示されるように、溶液に磁性ビーズ512を導入することができる。磁性ビーズ512は、プライマー (A) に付着したリンカー部分に相補的なリンカーを含むことができる。例えば、プライマー (A) に付着したリンカーはビオチンであり得、磁性ビーズ512を、ストレプトアビジンでコーティングすることができる。上述したように、磁性ビーズ512を利用して、溶液を洗浄し、ビーズ支持体510および付着した核酸 (B-A') のシーケンシングデバイスのウェルへの堆積を支援することができる。508に例示されるように、二本鎖ポリヌクレオチドを変性させて、ビーズ支持体510に付着した核酸 (B-A') からの核酸 (B'-A) の脱ハイブリダイゼーションをもたらすことができる。したがって、ビーズ支持体510は、シーケンシングデバイスのウェルに堆積され

、一本鎖標的核酸（B-A'）を有する。代わりに、リンカー修飾プローブ（A）を伸長させて、ポリヌクレオチド（B-A'）の長さを有する相補的なポリヌクレオチドを形成しなくてもよい。伸長反応を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）、または他の増幅反応を使用して実行することができる。

【0061】

装置

図6は、調製デッキ604、装填ステーション606、およびシーケンシングステーション608と通信するコントローラ602を含む、例示的なシーケンシング装置システム600の説明図を含む。調製デッキ604は、サンプル614、試薬および溶液616、サーモサイクラー618、ならびに磁気分離器または遠心分離機などの他のデバイス620にアクセスすることができるピペッティングロボット612を含むことができる。調製デッキ604で調製された標的配列を、装填ステーション606に提供することができる。例えば、調製デッキ604は、装填ステーション606に提供される標的配列を含むシーディングされた基材を提供して、センサデバイス上に装填することができる。

【0062】

装填されると、標的配列を含むセンサデバイスを、スライド機構610を利用してシーケンシングステーション608に輸送することができる。シーケンシングステーション608は、合成によるシーケンシング反応中にセンサデバイスとインタラクトしてヌクレオチドの付加を感知するための流体力学および電子インターフェースを含むことができる。感知デバイスから収集されたデータは、塩基コール、読み取りアライメント、およびバリアントコールを実行できるシーケンシングコンピュータ622に提供され得る。

【0063】

コントローラ602は、インターフェースの中でもとりわけ、モニタ、キーボード、マウス、タッチスクリーン、またはそれらの任意の組み合わせなどのユーザインターフェース624とさらに通信することができる。さらに、コントローラ602は、ローカルエリアネットワーク、ワイドエリアネットワーク、またはグローバルネットワークにアクセスし得るネットワークインターフェースと通信することができる。ネットワークインターフェース626は、様々な標準通信プロトコルを使用する有線インターフェースまたは無線インターフェースであり得る。さらに、このシステムは、電源628によって電力供給され得る。

【0064】

図7は、3軸ピペッティングロボットを組み込んだ例示的な装置700の説明図を含む。例では、装置700は、サンプル準備調製プラットフォームを組み込んだシーケンサーであり得る。例えば、装置700は、上側部分102および下側部分104を含むことができる。上側部分は、サンプル、試薬容器、および他の消耗品が配置されるデッキ710にアクセスするためのドア706を含むことができる。下側部分は、追加の試薬溶液を保管するためのキャビネットと、装置700の他の部分と、を含むことができる。加えて、装置は、タッチスクリーンディスプレイ708などのユーザインターフェースを含むことができる。

【0065】

特定の例では、装置700は、シーケンシング装置であり得る。いくつかの実施形態では、シーケンシング装置は、上部セクション、表示画面、および下部セクションを含む。いくつかの実施形態では、上部セクションは、サンプル調製セクション、シーケンシングチップ、ならびに試薬ストリップチューブおよびキャリアを含む、シーケンシング装置の構成要素および消耗品を支持するデッキを含んでもよい。いくつかの実施形態では、下部セクションは、シーケンシングに使用される試薬ボトルおよび廃棄物容器を収容してもよい。

【0066】

いくつかの実施形態では、装置の上部セクションのキャビネットに取り付けられた1つ以上のカメラが、シーケンシングランの準備にどのアイテムが配置されるかを監視するた

10

20

30

40

50

めに、デッキに向けられている。カメラは、時間間隔でビデオまたは画像を得ることができる。例えば、画像を、1～4秒間隔または任意の好適な間隔で得てもよい。別の例では、ビデオストリームのフレームを、0.5秒～4秒の範囲などの間隔で抽出することができる。コンピュータまたはプロセッサが、画像を分析して、ユーザによるタスクの完了を検出する。コンピュータまたはプロセッサは、表示画面を介して準備中の次のタスクのためのフィードバックおよび命令を提供してもよい。表示画面は、ユーザへの指示を例示するために、装置コンポーネントおよび消耗品のグラフィック表現を提示してもよい。

【0067】

例示的な装置デッキ710は、装置デッキ800として図8に例示されている。デッキ800は、装置の上部セクションに収容されて、1つ以上のカメラの視野にある。サンプル調製デッキは、試薬ストリップ、備品、シーケンシングチップ、および他の消耗品を受け入れるように構成された複数の場所を含んでもよい。本明細書で使用される場合、消耗品は、それらが使用されるときに定期的に交換される、装置によって使用されるコンポーネントである。例えば、消耗品として、装置の恒久的なコンポーネントの一部ではない使い捨てコンポーネントの中でもとりわけ、試薬および溶液のストリップまたは容器、ピペットチップ、マイクロウェルアレイ、およびフローセル、ならびに関連付けられたセンサが挙げられる。

【0068】

例では、システム800は、試験を実施するために様々な試薬ストリップおよび容器、ピペットチップ、マイクロウェルアレイ、および他の消耗品にアクセスするピペッティングロボット802を含む。さらに、このシステムは、試験を実行するための機構804を含むことができる。例示的な機構804は、機械的コンベヤまたはスライドおよび流体システムを含む。

【0069】

例では、デッキ800は、特定の構成の溶液または試薬ストリップを受け入れるためのトレイ806または808を含む。シーケンシング装置の例では、トレイ806を、適切に構成されたストリップのライブラリおよび鑄型溶液に使用することができ、トレイ808は、適切な構成のライブラリおよび鑄型試薬を受け入れることができる。

【0070】

さらに、装置を、デッキ上の特定の場所でマイクロウェルアレイ810および812を受け入れるように構成することができる。例えば、サンプルを、マイクロウェルアレイ812などのウェルのアレイで供給することができる。別の例では、このシステムを、異なるストリップ構成で追加の試薬814を受け入れるように構成することができる。別の例では、試薬溶液を、アレイ816で提供することができる。さらなる例では、容器アレイ820を、サーモサイクラーなどの計装と併せて提供することができる。さらに、このシステムは、チューブなどの消耗品とともに供給され得る、遠心分離機などの他の装置を含むことができる。さらに、ピペッティングチップ822を受け入れるためのトレイを提供することができる。

【0071】

これらの場所の各々での消耗品の適切な提供を、1つ以上のカメラを含むビジョンシステムによって監視することができる。デッキには、試薬および他の消耗品の供給および保全を追跡するための1つ以上のカメラが備えられていてもよい。1つの計画を実行するために使用されることとなる試薬が不足している場合、または試薬消耗品が使用済みの状態で存在する場合、ユーザに、ユーザインターフェースを介して促すことができる。

【0072】

図9は、より大容量の試薬および溶液の容器を保管するための試薬保管キャビネット704の説明図を含む。例えば、キャビネット保管庫704は、試薬カートリッジを受け入れるためのインターフェース902を含む。別の例では、保管庫704は、容器904または906のためのスペースを提供することができる。さらなる例では、保管庫704は、廃棄物容器808のためのスペースを含むことができる。

【0073】

スロット1002に適合するように構成された溶液ストリップまたは試薬ストリップなどの例示的な消耗品を、図10に例示する。例では、ストリップは、ベース1002と、ベース1002に結合されたトップ1004と、を含む。トップ1004は、ウェル1010または1012へのアクセスを提供する窓1006を含む。任意選択的に、トップ1004は、ベース1002のチューブレセプタクルに挿入されたチューブ1014へのアクセスを提供するための窓1008を提供することができる。

【0074】

トップは、グリップ1016をさらに含むことができる。例えば、グリップ1016を使用して、分析デバイスから試薬容器1000を挿入または除去するときに試薬容器1000を保持することができる。さらに、トップ1004は、装置上の相補的な構造と係合し、かつ装置内の位置に対してストリップの配向を制限するように構成された端部構造1018または1020を画定することができる。さらに、バーコードまたはQRコード（登録商標）などのコード1022が、トップ1004上に存在し得る。

【0075】

初期化を通した流れ

シーケンシングデバイスで試薬溶液を調製するための例示的なシステムでは、初期溶液の供給源をカートリッジ内の容器に接続することができる。初期溶液は、塩、界面活性剤、および防腐剤を含むことができる。

【0076】

カートリッジは、シーケンシング反応で使用される試薬の濃縮物を保管する容器を含むことができる。例えば、容器は、濃縮ヌクレオチド、濃縮修飾ヌクレオチド、またはヌクレオチドのブレンドを含むことができる。別の例では、容器は、シーケンシングに有用な補因子および酵素を含むことができる。

【0077】

濃縮ヌクレオチドを初期溶液とブレンドして、別個の容器に保存されるヌクレオチド溶液を生じさせることができる。特に、試薬保管容器は、試薬保管容器104、106、108、110、または112を有する、図1に例示されるシステムの一部であり得る。

【0078】

供給源は、カートリッジを通る流れを誘引するための加圧システムであり得る。代わりに、溶液を、供給源からカートリッジにポンプ送給することができる。別の例では、容器を真空引きして、カートリッジを通して容器内に溶液を引き出してもよい。別の例では、真空引きと加圧またはポンプ送給との両方によって、流れを誘引することができる。

【0079】

図11は、カートリッジ1102およびドッキングステーション1104を含む例示的なカートリッジシステムを例示している。カートリッジ1102は、ドッキングステーション1104の一次プラットフォーム1110のドッキングエリア1122に嵌合することができる。特に、ドッキングステーション1104は、例えば図12に例示されるように、カートリッジ1102をドッキングステーション1104に位置決めするために、カートリッジ1102上のレール1118などの他のガイドと協働するレール1116などのガイドを含むことができる。カートリッジ1102は、カートリッジ1102の挿入およびドック1104からのカートリッジ1102の取り外しを支援するためのハンドル1120をさらに含むことができる。

【0080】

ドッキングステーション1104は、第1のプラットフォーム1110に対して移動可能な第2のプラットフォーム1112を含む。例えば、プラットフォーム1112を、モータ機構またはスクリュウ機構などのドライバ1124によって、プラットフォーム1110に対して駆動することができる。特に、プラットフォーム1112を、ガイド1126によって上下にガイドすることができる。

【0081】

プラットフォーム 1112 は、上面でチューブに取り付けられ、かつカートリッジ 1102 の容器 1106 とインターフェース接続することができる流体カプラ 1114 を含む。カートリッジ 1102 がドック 1104 に挿入され、かつプラットフォーム 1110 によって固定されると、流体カプラ 1114 がカートリッジ 1102 の容器 1106 と係合することができるように、プラットフォーム 1112 を、ドライバ 1124 によって下向きに、またはプラットフォーム 1110 に向けて駆動することができる。特に、ガイド 1126 は、カートリッジ 1102 に対する流体カプラ 1114 の位置決めを確実にすることができる。

【0082】

カートリッジ 1102 は、複数の容器 1106 を含む。例えば、カートリッジは、ヌクレオチドの数（すなわち、4）に少なくとも等しい数の容器 1106 を含むことができる。例示されるように、カートリッジ 1102 は、5 つの容器を有しており、5 つよりも多くても少なくてもよい。カートリッジ 1102 は、例えば、ヌクレオチド、他のイオン性組成物、酵素、または界面活性剤の組み合わせを含む、追加の試薬濃縮物容器をさらに含むことができる。

【0083】

カートリッジ 1102 はまた、ドック 1104 と係合するときにカートリッジ 1102 をガイドするための、レールとして例示されるガイド 1118 を含む。カートリッジはまた、ドッキングステーション 1104 からのカートリッジの挿入および取り外しを支援するためのハンドル 1120 を含むことができる。さらに、カートリッジは、流体カプラ 1114 が容器 1106 と係合するように適正に位置決めされることを確実にするのに有用な、刻み目などの位置決めフィーチャを含むことができる。

【0084】

図 13 に例示されるように、容器 1106 は、レシーバー、クリップ、およびシールを含む。シールは、中央ボア 1310 と、中央ボア 1310 から半径方向外側に位置決めされた少なくとも 1 つの周辺ボア 1308 と、を含む。

【0085】

断面において、容器 1106 は、レシーバーの空洞内に配設されたフリット 1312 をさらに含むことができる。フリット 1312 は、シールの中央ボア 1310 とアライメントされた中央ボアを含むことができる。空洞はまた、周辺開口部 1308 と流体連通し得る。流体を、中央ボア 1310 に適用することができ、流体は、フリット 1312 を通って空洞に流れ落ちる。次いで、流体は、外側の穴 1308 からシールのチャンネルに流れ込む。

【0086】

フリット 1312 は、シールの中央ボアと係合するように構成された突起を上面に含むことができる。特に、フリットの突起は、シールの突起でシールの中央ボアに入ることができる。フリットは、流体浸透性であり得る。例えば、フリット 1312 を、多孔質のセラミックまたは金属材料などの多孔質材料で形成することができる。別の例では、フリット 1312 を、多孔質ポリマー材料または透水性ポリマーまたは繊維状材料で形成することができる。フリット 1312 は、フリット 1312 中に少なくとも部分的に、またはフリット 1312 を通って完全に延在する中央ボアを含むことができる。加えて、フリット 1312 は、溶液がフリットを通して流れて、濃縮ヌクレオチド溶液または試薬溶液をフリットからレシーバーの空洞に除去することができる、より大きな表面積を上部に含む。

【0087】

図 13 に例示されるように、カートリッジ 1102 がドック 1104 に挿入され、かつプラットフォーム 1112 がプラットフォーム 1110 に近接して位置決めされると、流体カプラ 1114 は、容器、特に容器 1106 のシールと係合する。流体カプラ 1114 の中央チューブは、シールの中央ボア 1310 に入る。外側の同心リング 1360 は、チャンネルの半径方向外側にシールと係合し、チャンネルを閉鎖する。流体カプラ 1114 は、チューブ 1364 および 1366 と係合するための開口部をさらに含む。例では、開口部

10

20

30

40

50

１３６４は、流体カプラ１１１４の軸方向中心に位置決めされ、第２の開口部１３６６は、流体カプラ１１１４の中心軸から半径方向外側のほうに配設されている。

【００８８】

特定の例では、流体は、開口部１３６４に流れ込み、チューブ１３６０をシールの中央ボア１３１０へと駆動され得る。流体は、フリット１３１２を通してレシーバーの空洞に流れ込む。流体は、開口部１３０８を通して、流体カプラ１１１４によって閉囲されたチャンネルに流れ込むことができる。流体は、開口部１３６６に接続された穴１３６８を通してチャンネルを退出することができる。代わりに、流れを反転させることができる。

【００８９】

チップおよびスライド機構

例では、バイオセンサおよびフローセルは、センサデバイスの例である。図１４および図１５は、フローセルを含むマイクロチップなどの例示的なセンサデバイス１４００を例示している。例えば、センサデバイス１４００は、センサアレイと流体連通した複数のマイクロウェルを有するダイ１４０４を固定する基材１４０２を含む。フローセル１４０６は、基材上に固定され、ダイ１４０４の上に体積を提供する。

【００９０】

例では、フローセル１４０６は、流体インレット１４０８のセットおよび流体アウトレット１４１０のセットを含む。特に、フローセル１４０６を、レーン１４１２に分割することができる。各レーンは、それぞれの流体インレット１４０８および流体アウトレット１４１０によって個別にアクセスされる。

【００９１】

例示されるように、センサデバイス１４００は、４つのレーン１４１２を含む。代わりに、センサデバイス１４００は、４つ未満のレーンまたは４つを超えるレーンを含むことができる。例えば、センサデバイス１４００は、２～８レーン、または４～６レーンなどの、１～１０レーンを含むことができる。レーン１４１２を、互いに流体分離することができる。したがって、レーン１４１２を、ラン計画の態様に応じて、別個の時に、並行して、または同時に使用することができる。

【００９２】

センサデバイス１４００は、例えばフローセル１４０６の一部として形成されて、流体カプラ上の相補的な構造と係合するためのガイド構造１４１４をさらに含むことができる。そのようなガイド構造１４１４は、流体インレット１４０８および流体アウトレット１４１０を流体カプラ上の関連付けられたポートとアライメントするのを支援する。

【００９３】

図１６、図１７、および図１８は、例示的な流体カプラ１６００の説明図を含む。流体カプラ１６００は、ポートのセット間の流体経路を画定する本体１６１４を含む。さらに、流体カプラ１６００は、機械的アセンブリと係合し、かつ流体カプラ１６００を機械的アセンブリに対して位置決めするのを支援するためのコネクタセクション１６１２を含むことができる。別の例では、流体カプラ１６００は、センサデバイスに対して流体カプラ１６００を位置決めするのをさらに支援する、機械的アセンブリのガイドロッドと係合するための基準穴１６１０を画定する翼１６１６を含むことができる。

【００９４】

流体カプラ１６００の本体１６１４は、ポートの第１のセット１６０４と流体連通している開口部１６０２を画定することができる。開口部１６０２を、ピペットチップの端部を受け入れ、かつ開口部１６０２への流体組成物のピペッティングを可能にするようなサイズにすることができる。開口部１６０２は、センサデバイス１４００（図１４）のインレット１４０８と係合するように構成されているポートのセット１６０４と流体連通している。流体カプラ１６００は、センサデバイス１４００（図１４）のアウトレット１４１０と係合し、かつ流体連通を提供することができるポートの第２のセット１６０６をさらに画定することができる。

【００９５】

10

20

30

40

50

図 18 に例示されるように、このシステムは、ポートの第 2 のセット 1606 と流体連通しているポートの第 3 のセット 1818 をさらに含むことができる。ポートの第 3 のセット 1818 は、図 26 および図 27 に例示される流体マニホールド 2540 などの機械的アセンブリの流体マニホールドと係合することができる。任意選択的に、流体カプラ 1600 は、流体マニホールドと接続し得るか、または機械的アセンブリの構成に応じて閉鎖され得るポートの第 4 のセット 1820 を含むことができる。

【0096】

ポート 1604、1606、1818、または 1820 を、ゴムまたはエラストマーポリマーなどの弾力性のある材料で形成することができる。例では、ポートを、弾力性のある材料を使用してオーバーモールドとして形成することができる。

【0097】

図 16 に戻ると、流体カプラ 1600 の本体 1614 は、センサデバイス 1400 (図 14) のガイドフィーチャ 1414 に相補的なガイドフィーチャ 1608 をさらに含むことができる。

【0098】

図 19 および図 20 に例示されるように、流体カプラ 1600 は、センサデバイス 1400 と係合することができる。流体カプラ 1600 の本体 1614 を、センサデバイス 1400 の基材 1402 とアライメントさせることができ、流体カプラ 1600 のポートの第 1 のセット 1604 が、センサデバイス 1400 のインレット 1408 と流体連通することを可能にする。さらに、ポートの第 2 のセット 1606 は、センサデバイス 1400 のアウトレット 1410 と流体連通し得る。例えば、ガイド構造 1414 および 1608 は、係合して、ポートをインレットおよびアウトレットとアライメントさせることができる。任意選択的に、ポートの第 3 のセット 1818 は、マニホールドと流体連通し得る。さらなる例では、流体ポートのセット 1820 は、任意選択的にポートの第 2 のセット 1608 と流体連通しており、流体マニホールドと流体連通し得る。

【0099】

よって、流体組成物を、ポートの第 1 のセット 1604 と流体連通した開口部 1602 にピペッティングすることができ、これらのポートは、フローセル 1406 のインレット 1408 を介してセンサデバイス 1400 のフローセル 1406 に流体組成物を提供する。処理後、流体組成物の残りを、センサデバイス 1400 のアウトレット 1410 から、ポートの第 2 のセット 1606 およびポートの第 3 のセット 1818 を通して流体マニホールドに引き出すことができる。

【0100】

図 21 および図 22 は、このシステム内の様々なステーション間でセンサデバイスを移動させるための例示的な機械システム 2100 の説明図を含む。例えば、スライド機構 2102 は、レール 2104 に沿って移動して、ステーション 2106、2108、および 2110 間でセンサデバイス (例えば、図 14 のセンサデバイス 1400) をガイドすることができる。例えば、センサデバイスを、ステーション 2106 のスライド機構 2102 に挿入することができる。例では、センサデバイスを、インレットおよびアウトレットが上向きとは大きく異なって側部に向けられて、垂直な配向で挿入することができる。センサ 2112 は、センサデバイスの存在を検出し、センサデバイスが存在する場合にスライド機構 2102 が移動することを可能にすることができる。例えば、スライド機構 2102 は、センサデバイスをステーション 2108 に移動させることができ、ステーション 2108 で、図 4 に関連して上述した磁性体装荷方法などによって、センサデバイスにサンプルを装填することができる。特に、流体カプラを、機械的アセンブリ 2114 によって提供されるスペース 2116 に挿入することができ、これにより、流体カプラをセンサデバイスに押し付け、流体カプラをマニホールドと係合させることができる。磁性体装荷手法が完了すると、機械的アセンブリ 2114 は、流体カプラから脱離することができ、スライド 2102 は、センサデバイスを、試薬とシーケンシングのための他の条件とを提供する流体ステーションなどの後続のステーション 2110 に移動させることができる。

【0101】

図22に例示されるように、スクリュー駆動装置などの駆動装置2218は、クラッチ2222と係合してスライド2102を移動させ、したがってステーション2106、2108、および2110間でセンサデバイスを移動させる、スクリュー2220を含むことができる。

【0102】

図23に例示されるように、スライド2102を、ストップポスト2332がフィーチャ2354でスライド2102と係合するステーション2106に位置決めすることができる。さらに、スライド2102は、ステーション2106からステーション2108に前方に移動することができ、そこでソレノイドストップポスト2334に係合することができ、スライドは、後方に移動して（例示されるように左）、ソレノイドストップ2334をフィーチャ2354と係合させる。加えて、スライド2102を、レール2104に沿って移動させて、図24に例示される前方ストップ2436と係合させ、スライドおよびセンサレセプタクル2324をステーション2110とアライメントさせることができる。スライド2102をステーション2106に戻すために、ソレノイドストップポスト2334に係合解除させて、スライド2102が通過できるようにすることができる。

【0103】

センサデバイスがステーション2106でレセプタクル2324に挿入されると、センサ2112は、開口部2356を通してレセプタクル2324中のセンサデバイスの存在を感知することができる。例えば、センサデバイス2112は、開口部2356を通してレセプタクル2324内のセンサデバイスの存在を光学的に検出する光学センサであり得る。

【0104】

クラッチ2222を使用して、ストップ2324または2334に抗する後方力（左に向かうとして例示されている）と、ストップ2436に抗する前方力（右に向かうとして例示されている）と、の両方を提供することができる。例えば、クラッチシステム2222は、スクリュー駆動機構2218のスクリュー2220と係合するためのナット2326を含む。ナット2326は、スクリュー2220がカップリング2328を通過することを可能にする中央ボアを有するカップリング2328と係合している。カップリング2328は、ピンおよびばねシステム2350を使用してナット2326に取り付けられている。ピンおよびばねシステム2350のばねが圧縮されると、ピンがナット2326を通過して移動するように、ピンは、ナットに移動可能に接続されている。

【0105】

カップリング2328はまた、ピンおよびばねシステム2352を使用してコネクタプレート2330に接続されている。ピンおよびばねシステム2352のピンを、ピンおよびばねシステム2352のばねが圧縮されると、コネクタプレート2330を通過して移動するように、構成することができる。代わりにまたは加えて、ピンおよびばねシステム2352のピンを、カップリング2328を通過して移動するように構成することができる。

【0106】

コネクタプレート2330は、スライド2102に結合されており、スクリュー2220の回転に応答して前後に移動する。スライド2102をストップ2332または2334に抗して後方に移動させると（図23では左として例示されている）、ピンおよびばねシステム2352のばねは、圧縮されることができ、ピンは、コネクタプレート2330またはカップリング2328のいずれかを通過して移動することができる。したがって、スクリュー2220の回転は、ロッド2332または2334に抗する既知の力を後方に提供し、レセプタクル2324内のセンサデバイスの正確な位置決めを提供する。さらなる例では、スライド2102を前方に移動させてストップ2436と係合させると、スライド2102は、移動を停止する。スクリュー2220をさらに回転させると、ナットは、さらに前方に移動する（図23では右として例示されている）。ピンおよびばねシステム2350のばねは、圧縮され、ピンおよびばねシステム2350のピンは、ナット232

10

20

30

40

50

6 を通って移動し、前方ストップ 2 4 3 6 に抗するスライド 2 1 0 2 の既知の力を提供する。そのような力および位置決めは、ステーション 2 1 1 0 におけるセンサデバイスレセプタクル 2 3 2 4 およびセンサデバイスの正確な場所を提供する。

【0107】

図 2 5 は、センサデバイスと流体カプラとの間の流体結合を提供するための例示的な機械的アセンブリ 2 1 1 4 の説明図を含む。スライドが所定位置にあるとき、センサデバイス用のスペース 2 5 3 8 が、提供される。さらに、流体カプラのためのスペース 2 1 1 6 が、提供される。機械的アセンブリ 2 1 1 4 が係合すると、流体カプラは、センサデバイスおよびマニホールド 2 5 4 0 と流体連通して押される。例えば、スクリュウ 2 5 4 4 を有するスクリュウ駆動装置を利用する駆動機構 2 5 4 2 は、ナット 2 5 4 6 を有し、かつピン 2 5 6 4 およびばね 2 5 6 6 によってフレーム 2 5 4 8 に結合された、クラッチシステムを利用して、機械的アセンブリ 2 1 1 4 のフレーム 2 5 4 8 を前方（図 2 5 では上として例示されている）および後方（図 2 5 では下として例示されている）に移動させることができる。マニホールド 2 5 4 0 が流体カプラに押し付けられるまで、ピン 2 5 6 4 のヘッド 2 5 7 8 がナット 2 5 4 6 に抗して位置決めされるように、ピン 2 5 6 4 を、ナット 2 5 4 6 と移動可能に結合することができる。ナット 2 5 4 6 を前方にさらに移動させると、ピン 2 5 6 4 がナット 2 5 4 6 を通って移動し、ばね 2 5 6 6 が圧縮されることを可能にする。

【0108】

フレームコンポーネント 2 5 4 8 は、ナット 2 5 4 6 の移動に応答して、一緒に前後に移動することができる。レバー 2 5 5 0 は、締結具 2 5 5 2 でフレーム 2 5 4 8 に回転可能に結合されている。アセンブリが後方位置にあるとき、レバー 2 5 5 0 に取り付けられた調整ねじ 2 5 8 6 は、ストップ 2 5 8 4 と係合し、レバー 2 5 5 0 の反対側を後方に（例示されるものでは下向きに）旋回させる。ナット 2 5 4 6 が前方に移動すると、調整ねじ 2 5 8 6 は、ストップ 2 5 8 4 から徐々に係合解除し、レバー 2 5 5 0 の反対側は、例えば、ばね 2 5 8 2 によってはずみを付けられて前方に旋回される。レバー 2 5 5 0 を旋回させると、ガイドプレート 2 5 5 6 が、同じく前方に（例示されるものでは上向きに）移動しているフレーム 2 5 4 8 に対して前方に移動する。ガイドプレート 2 5 5 6 は、ガイドプレート 2 5 5 6 とともに前方に移動して流体カプラの基準穴と係合するガイドロッド 2 5 5 8 および 2 5 6 0 に接続されている。ガイドロッド 2 5 6 0 を、マニホールド 2 5 4 0 の一部分と係合するガイド 2 5 6 2 によってさらにガイドすることができる。ガイドロッド 2 5 6 0 が前方に移動するにつれて、ガイドロッド 2 5 6 0 は、センサ 2 5 7 6 から係合解除する、すなわちガイドロッド 2 5 6 0 が流体カプラの基準穴に係合していることを示す、可能性がある。

【0109】

マニホールド 2 5 4 0 ならびにガイドロッド 2 5 5 8 および 2 5 6 0 が流体カプラと係合すると、フレーム 2 5 4 6 が静止したままで、ナット 2 5 4 6 は、前方に進み続けることができる。ピン 2 5 6 4 は、ナット 2 5 4 6 を通って移動することができ、ばね 2 5 6 6 は、圧縮され、流体カプラ、および流体カプラと流体連通したセンサデバイスに抗する既知の力を提供する。そのような力は、センサデバイスと流体カプラとの間に望ましい漏れのない流体結合を提供する。

【0110】

センサ 2 5 7 2 および 2 5 7 4 を含む回路基板 2 5 7 0 は、移動可能なフレーム 2 5 4 8 に接続でき、フレーム 2 5 4 8 とともに移動することができる。フラグ 2 5 6 8 を、ナット 2 5 4 6 に接続することができる。後方位置から、マニホールド 2 5 4 0 およびフレーム 2 5 4 8 が流体カプラと接続する第 2 の位置まで、フラグ 2 5 6 8 の位置は、位置センサ 2 5 7 2 に対して一定のままである。マニホールド 2 5 4 0 が流体カプラおよびセンサデバイスと衝接して位置決めされると、ナット 2 5 4 6 は、フレーム 2 5 4 8 に対して前方に移動する。したがって、フラグ 2 5 6 8 は、センサ 2 5 7 2 に向かって前方に移動する。フラグ 2 5 6 8 がセンサ 2 5 7 2 によって検出されると、ナット 2 5 4 6 の前進駆

10

20

30

40

50

動を停止させることができる。したがって、ばね 2 5 6 6 の既知の圧縮が達成され、フレーム 2 5 4 8、マニホールド 2 5 4 0、および流体カプラに抗する既知の力が加えられる。

【0 1 1 1】

ナット 2 5 4 6 を前方位置から後方に移動させると、フラグ 2 5 6 8 は、それらのヘッド 2 5 7 8 のピン 2 5 6 4 がナット 2 5 4 6 に抗して固定されるまで、センサ 2 5 7 2 から係合解除する。ナット 2 5 4 6 が後方に移動し続けるにつれて、フレーム 2 5 4 8 およびマニホールド 2 5 4 0 は、センサ回路基板 2 5 7 0 とともに後方に引かれる。調節可能なねじ 2 5 8 6 は、ストップ 2 5 8 4 と係合し、流体カプラの基準穴からガイドロッド 2 5 5 8 および 2 5 6 0 を引き抜く。ガイドロッドが流体カプラから引き抜かれるにつれて、基準ロッド 2 5 6 0 は、センサ 2 5 7 6 と係合する、すなわち、ガイドロッドが流体カプラの基準穴から引き抜かれたことを示す。センサ 2 5 7 4 は、センサ 2 5 7 4 がフラグ 2 5 8 0 と係合する、すなわちナット 2 5 4 6 が最も後方の位置にあることを示す、まで、センサ回路基板 2 5 7 0 がフレーム 2 5 4 8 に取り付けられて後方に移動し続ける。流体カプラを、機械的アセンブリ 2 1 1 4 から係合解除し、取り外すことができる。さらに、スライド機構 2 1 0 2 は、センサデバイスを次のステーション 2 1 1 0 に移動させることができる。

【0 1 1 2】

図 2 6 および図 2 7 は、機械的アセンブリ 2 1 1 4 とともに使用するための例示的なマニホールド 2 5 4 0 の説明図を含む。マニホールド 2 5 4 0 は、流体カプラを受け入れるためのスロット 2 6 4 2 を前面に含むことができる。スロット 2 6 4 2 は、レスト構造 2 6 4 4 および 2 6 4 6 とともに、図 1 6 に例示される流体カプラ 1 6 0 0 などの流体カプラの垂直位置を設定することができる。流体カプラ 1 6 0 0 のコネクタセクション 1 6 1 2 は、マニホールド 2 5 4 0 を越えてマニホールドの背面に向かって延在することができる。マニホールド 2 5 4 0 は、流体カプラ 1 6 0 0 の基準穴 1 6 1 0 とアライメントする基準穴 2 6 5 0 および 2 6 4 8 をさらに含むことができる。基準穴 2 6 5 0 を、ガイドロッド 2 5 5 8 を受け入れるサイズにすることができる。基準穴 2 6 4 8 を、ガイドロッド 2 5 6 0 および任意選択的にガイド 2 5 6 2 を受け入れるようにサイズ設定することができる。

【0 1 1 3】

特に、マニホールド 2 5 4 0 は、流体カプラ 1 6 0 0 (図 1 8 に例示されている) の第 3 のポート 1 8 1 8 と係合するための流体開口部のセット 2 6 5 2 を含む。開口部のセット 2 6 5 2 は、流体マニホールド 2 5 4 0 の背面上に配設されたポート 2 6 5 4 のセットと流体連通している。そのようなポート 2 6 5 4 を、真空に接続して、流体がポート 2 6 5 4、開口部 2 6 5 2、流体カプラ 1 6 0 0 のポートの第 3 のセット 1 8 1 8、および流体カプラ 1 6 0 0 のポートの第 2 のセット 1 6 0 6 を通して引き出されることを可能にすることができる。任意選択的に、流体カプラ 1 6 0 0 の流体ポートの第 4 のセット 1 8 2 0 と接続するために、流体開口部およびフローポートの追加のセットを提供することができる。

【0 1 1 4】

図 2 8 は、センサデバイスを流体的に係合させるための方法 2 8 0 0 を例示するブロックフロー図を含む。例えば、ブロック 2 8 0 2 に例示されるように、スライドが第 1 の位置にあるとき、センサデバイスを、スライドのホルダーまたはレセプタクルに挿入することができる。任意選択的に、検出器は、スライドを第 2 の位置に移動できるようにする前に、センサデバイスがホルダーまたはレセプタクル内に適正に位置決めされているかどうかを判定することができる。

【0 1 1 5】

ブロック 2 8 0 4 に例示されるように、センサデバイスおよびスライドを、第 2 の位置に移動させることができる。例示的なシステムでは、第 2 の位置は、サンプルがセンサデバイス上に装填される位置を表すことができる。例えば、流体カプラを、ブロック 2 8 0 6 に例示されるように、センサデバイスのフローセルに押し付けることができる。流体カ

10

20

30

40

50

プラは、開口部を含むことができ、これらの開口部は、流体組成物を、開口部に、センサデバイスのフローセルのインレットと係合している流体カプラのポートを通してピペッティングできるようにする。

【0116】

例えば、ピペットは、ブロック2808に例示されるように、流体組成物のアリコートを引き出すことができる。アリコートを、ブロック2810に例示されるように、流体カプラの開口部に適用することができる。アリコートは、流体カプラの開口部を通過し、ポートの第1のセットを通過し、センサデバイスのインレットを通過してセンサデバイスのフローセルに入ることができる。

【0117】

例では、流体組成物を、ブロック2812に例示されるように、フローセル内で処理することができる。例えば、磁性体装荷手法を適用して、センサデバイスのウェル内にサンプルを装填することができる。

【0118】

ブロック2814に例示されるように、流体組成物の残りを、センサデバイスのフローセルから引き出すことができる。例えば、流体カプラに押し付けられ、かつフローセルのアウトレットと流体連通したマニホールドに取り付けられた真空室は、フローセルから流体組成物の残りを引き出すことができる。流体組成物のアリコートをピペッティングし、アリコートを適用し、流体組成物を処理し、流体組成物の残りを引き出すプロセスを繰り返して、例えば、追加のサンプルを適用するか、またはフローセルを洗浄することができる。

【0119】

装填のプロセスが完了すると、ブロック2816に例示されるように、センサデバイスを機械的アセンブリから解放することができる。例えば、機械的アセンブリを後方位置に引き出して、センサデバイスおよび流体カプラを解放し、センサデバイスを後続のステーションに移動させることができる。

【0120】

スライドおよびセンサデバイスは、ブロック2818に例示されるように、第3の位置に移動することができる。例えば、センサデバイスを、このシステムのシーケンシングセクションに移動させることができる。

【0121】

磁性体装荷

図29は、例示的な磁性体装荷システムの概略表現である。具体的には、図29は、チップ表面2910およびフローセル2920を支持する基材2900を示す。磁性パッケージ2950は、基材2900に近位のトレイ2960に配置されている。

【0122】

磁性パッケージ2950は、2つの磁石2952および2954とともに示されている。図29の実施形態は磁石2952および2954を示しているが、開示された原理はそれに限定されず、図29に示されるよりも多いまたは少ない磁石を含んでもよい。磁石2952、2954は、不活性物質2953で分離されてもよい。不活性物質2953は、非導電性の絶縁体として機能することができる。特定の実施形態では、磁石2952および2954を、磁石2952のN極が磁石2954のS極の真向かいになるように配置することができる。この配置では、基材2900は、磁石2952および2954のN極およびS極に同時に曝される。他の実施形態では、磁石2952および2954は、基材2900が磁石のN極またはS極にのみ曝されるように配置されてもよい。

【0123】

基材2900は、マイクロチップ2910（置き換え可能に、チップまたはセンサデバイス）を受け入れるように構成された任意の材料を含んでもよい。マイクロチップ2910は、1つ以上のシーケンシングビーズを受け入れるように構成された、マイクロウェル、空洞、ディボット、ディンプル、または他のレセプタクルなどの複数のレセプタクルを

10

20

30

40

50

有する上面を含んでもよい。一実施形態では、チップ2900は、シーケンシングビーズを受け入れるように構成されたマイクロウェルを含んでもよい。1つのそのような例示的なマイクロチップは、Ion Torrent（登録商標）によってIon 541 Chip（商標）として提供されている。例示的なマイクロチップを、図14を参照して論じる。

【0124】

フローセル2920は、マイクロチップの表面への流体連通を可能にするように、マイクロチップ2910の上面の上に位置決めされている。流体は、チップ2910の上に形成されたポート2922および2924を通して伝達され得る。磁性ビーズおよびシーケンシングビーズ（図示せず）は、1つ以上の試薬とともに、ポート2922および2924を通してマイクロチップ2910の表面に伝達され得る。シーケンシングビーズがマイクロチップ2910の表面に装填されると、洗浄試薬が、ポート2922および2924を通して伝達されて、不要な粒子または試薬を除去し得る。

【0125】

トレイ2960（および磁性パッケージ2950）は、矢印2962によって示されるように、基材2900に対して移動し得る。基材の移動および配向は水平であるとして例示されているが、代替例では、基材は、垂直に配向されてもよく、移動は、上下であってもよい。移動は、トレイ2960の移動の速度および方向を指定するプログラマブルプロセッサまたはコントローラ2980と組み合わせたアクチュエータ2970によって加減されてもよい。アクチュエータ2970は、例えば、1つ以上のプロセッサ回路機構およびメモリ回路機構を有するコントローラ2980によって制御されるモータまたはソレノイドを含んでもよい。コントローラ2980は、プログラマブルコントローラであってもよい。本開示の一実施形態では、コントローラ2980は、補助ソースから入力情報2982を受信して、トレイ2962を基材2900（静止していてもよい）に対していつ移動させるべきかを示すように構成されてもよい。情報2982はまた、チップ上に装填されている粒子のタイプの関数としてのトレイ2960の移動速度に関連するデータを含んでもよい。そのようなデータは、コントローラ2980と関連付けられた1つ以上のメモリ回路機構に記憶されてもよい。

【0126】

図30は、磁性パッケージに対して第1の速度の磁性ビーズを含有する溶液の移動を概略的に示す。図30では、マイクロチップ3010の上面は、試薬（または溶液）3050に曝されている。試薬3050は、磁性ビーズならびにシーケンシングビーズを含み得る。磁性ビーズは、磁場に対して親和性を有するか、または反応性である任意のビーズを含み得る。一実施形態では、磁性ビーズのサイズは、磁性ビーズをマイクロウェル、空洞、またはマイクロチップの表面に形成されたディボットに入らせないように選択される。例示的な磁性ビーズは、実質的に、約1 μm ~100 μm の直径を有する球形であり得る。

【0127】

磁石3052および3054は、不活性物質3053によって分離されて、磁性パッケージを形成している。矢印3059は、マイクロチップ3010に対する磁性パッケージ3050の移動方向を示す。試薬3050は、マイクロチップ3010の上に配設されている。試薬3050は、シーケンシングビーズに結合された1つ以上の磁性ビーズを含み得る。試薬3050は、液体、ゲル、または固体表面の上を移動するための揺変性の粘性を有する任意の材料であり得る。複数の磁性ビーズ（図示せず）を、磁性ビーズが互いに対して自由に移動し得る、または回転し得るような様式で、試薬3050中に配設し得る。

【0128】

図31は、磁性パッケージに対して第2の速度の磁性ビーズを含有する溶液の移動を概略的に示す。図31は、図31のものと比較して（矢印3060によって示されるように）より速い磁石運動を概略的に示す。試薬3050の形状は、試薬3050（磁性ビーズを含有する）の比較的広い分散を示すが、試薬3056の形状は、より狭く、密に詰まった試薬（磁性ビーズを含有する）を示唆している。図30および31はまた、相対的な動

きが遅い場合、試薬／ビーズの先縁部が、遅れている磁石の内縁部または先縁部とアライメントすることを示す。相対運動が速い場合、試薬／ビーズパイルは、遅れている磁石の前縁部に遅れる。

【0129】

図32は、磁性パッケージの反転方向に対する磁性ビーズを含有する溶液の移動を概略的に示す。矢印3062は、磁石の移動方向の反転を示す。図32に見られるように、磁石が移動方向を切り替えると、試薬／ビーズパイルは、新しい遅れている磁石(3054)の内縁部によって拾われるまで同じ場所に留まる。磁石の移動の方向を反転させると、ビーズをマイクロウェル中に装填するか、またはマイクロチップ上のアレイの表面全体に試薬パイルを複数回掃引するのを可能にするのに役立ち得る。

10

【0130】

例では、磁石を、5～35回の掃引または10～30回の掃引などの、5～50回の掃引(往復)で循環させることができる。例では、各掃引に、1分～3分など、1分～5分かかる。ビーズ支持体がウェル中に装填されると、ビーズアセンブリを変性させ、表面をフォーム洗浄して磁性ビーズを除去することができる。

【0131】

マイクロチップ上に実装されると、ビーズ複合体を含む懸濁液が、マイクロチップ表面の上のフローセル中に堆積される。図33は、本開示の一実施形態による、磁性ビーズが上に装填されたマイクロチップを例示している。より具体的には、図33は、フローセル3312が上に位置決めされたマイクロチップ3302を示す。フローセル3312は、試薬を受け入れ、廃棄するためのポート3322および3324を含む。フローセル3312は、例えば、図14に例示されるように、2つよりも多いポートを有し得る。マイクロチップ3302は、基材3310の上に配置されている。1つ以上の磁石(図示せず)が、基材3310の下に配置されている。磁石は、マイクロチップ3302の表面上に磁性ビーズ3350のラインを形成させる磁場を生成する。磁石の移動は、マイクロチップ3302の表面に沿ってライン3350(すなわち、磁性ビーズ)の移動を引き起こす。磁性ビーズが表面に沿って移動するにつれて、試薬中の磁性ビーズに結合されたシーケンシングビーズは、マイクロチップ3302の表面上のウェルまたは空洞に入る。

20

【0132】

図34は、磁性ビーズ装填モデルを概略的に例示している。図34では、マイクロチップ表面3402は、複数のマイクロウェル3410とともに示されている。ストリーム3420は、とりわけ、磁性ビーズ3430に付着したシーケンシングビーズ3432、3434を含有する。図34に例示されるように、シーケンシングビーズ3432および3434は、磁性ビーズ3430よりも小さい直径を有することができる。マイクロウェル3410は、シーケンシングビーズ3432、3434を受け入れるようにサイズ設定されている。各マイクロウェル3410は、少なくとも1つのシーケンシングビーズ3432、3434を受け取り、かつ磁性ビーズ3430を除外するように構成され得る。示されていないが、各マイクロウェル3410は、1つ以上の電極を含む感知回路機構、ならびにマイクロウェル3410中の分析物の存在を検出するように構成された電子回路機構に結合され得る。分析物は、シーケンシングビーズに結合され得るか、またはウェルの内部での1つ以上の反応の結果として放出され得る。表面3450は、入力ポートおよび出力ポート(図示せず)を有するフローセル表面を概略的に例示している。

30

40

【0133】

シーケンシングビーズは、異なるサイズを有し得る。一実施形態では、シーケンシングビーズ3432、3434は、少なくとも1つのシーケンシングビーズがマイクロウェルに入り得るように選択されている。言い換えれば、シーケンシングビーズの直径は、マイクロウェルの開口部よりも小さくなるように選択され得る。マイクロウェル3410は先細の側壁で示されているが、請求される実施形態はそれに限定されず、マイクロウェルは、開示された原理から逸脱することなく、異なる形状および形態を有してもよい。

【0134】

50

示されるように、ストリーム 3 4 2 0 は、複数のビーズを含み得る。磁性ビーズ 3 4 3 0 は、磁気特性を含み得る。特定の実施形態では、ストリーム 3 4 2 0 は、ビーズに加えて他の試薬を含んでもよい。磁性ビーズ 3 4 3 0 は、約 2.8 μm のビーズ直径を有する、Thermo Fisher Scientific によって供給される Dynabeads (登録商標) M-270 または Dynabeads (登録商標) M-280 を含み得る。各磁性ビーズ 3 4 3 0 は、例えば、ビオチン化核酸、抗体、または他のビオチン化リガンドおよび標的とカップリングするためのストレプトアビジンを有し得る。磁性ビーズ 1 5 3 0 を、そのようなビオチン／ストレプトアビジン結合を使用して、シーケンシングビーズ 3 4 3 2、3 4 3 4 に付着させることができる。

【0135】

そのような装填方法は、水平または垂直構成を有するハードウェアに実装することができる。例えば、ハードウェアは、ビーズが水平に堆積されている基材を保持することができる。別の例では、ハードウェアは、基材の平面が重力にほぼ平行である場合に、基材を垂直に保持することができる。本明細書で使用される場合、垂直とは、基材の主表面の平面が重力に垂直であるよりも重力と平行に近い配向を指す。図 3 5、図 3 6、図 3 7、および図 3 8 に例示される例では、磁性体装荷システム 3 5 0 0 は、プレート 3 5 0 2 と、プレート 3 5 0 2 に沿って磁石をガイドする磁石ホルダー 3 5 0 4 と、を含む。例示される例では、プレート 3 5 0 2 は、水平構造 3 5 1 6 に固定されている垂直構造 3 5 1 4 に固定されている。磁石ホルダー 3 5 0 4 は、プレート 3 5 0 2 に沿って磁石を上下に移動させて、プレート 3 5 0 2 の反対側に配設された基材のウェル中への、シーケンシングビーズなどのビーズ支持体の装填を容易にすることができる。

【0136】

特定の例では、駆動機構 3 5 0 6 は、プレート 3 5 0 2 に沿って磁石ホルダー 3 5 0 4 の上下の移動を容易にすることができる。例えば、駆動機構 3 5 0 6 は、スレッドスクリュー 3 5 1 8 を回転させて、コネクタプレート 3 5 1 0 をスクリュー 3 5 1 8 に沿って上下に駆動することができる。コネクタプレート 3 5 1 0 は、磁石ホルダー 3 5 0 4 に接続されている。任意選択的に、コネクタプレート 3 5 1 0 を、ガイドプレート 3 5 0 8 と結合することができる。ガイドプレート 3 5 0 8 は、レール 3 5 1 2 に沿ってスライドすることができる。コネクタプレート 3 5 1 0 および磁石ホルダー 3 5 0 4 の移動に安定性を提供する。

【0137】

図 3 6 に例示されるように、基材ホルダー 3 6 2 0 (例えば、図 2 6 または図 2 7 のマニホールド) は、プレート 3 5 0 2 に抗して挿入され、保持される基材、またはフローセルを有するマイクロチップなどのセンサデバイスのための空間 3 6 2 2 を提供する。ホルダー 3 5 0 4 に取り付けられた磁石がプレート 3 5 0 2 の垂直面に沿って上下に移動するにつれて、溶液中の磁性ビーズに取り付けられたビーズ支持体が、基材のウェル中に堆積される。例では、基材は、溶液が配設されるフローセルを有するシーケンシングチップである。

【0138】

図 3 7 に例示されるように、プレート 3 5 0 2 は、任意選択的に、ヒータ 3 7 2 4 を受け入れるためのくぼみを含むことができる。ヒータ 3 7 2 4 を利用して、プレート 3 5 0 2、および任意選択的にプレート 3 5 0 2 の表面に隣接して位置決めされた基材の温度を制御することができる。代わりに、ヒータ 3 7 2 4 を利用して、二本鎖核酸の融解を促進するか、または増幅の温度を制御することができる。

【0139】

磁石ホルダー 3 5 0 4 は、1 つ以上の磁石を含むことができる。例えば、図 3 8 に例示されるように、磁石ホルダー 3 5 0 4 は、磁石 3 8 2 8 および磁石 3 8 3 0 を含むことができる。磁石 3 8 2 8 または 3 8 3 0 を、空気によって分離することができる。代わりに、磁石を、常磁性材料または絶縁材料によって分離することができる。

【0140】

例では、磁石は、磁石の異なるポーリングがプレート 3 5 0 2 に抗して位置決めされるように構成されている。例えば、磁石 3 8 2 8 を、プレート 3 5 0 2 に隣接して位置決めされた N 極を有するように構成してもよく、磁石 3 8 3 0 を、プレート 3 5 0 2 に隣接する S 極を有するように構成することができる。代わりに、磁石 3 8 2 8 の S 極および磁石 3 8 3 0 の N 極を、プレート 3 5 0 2 に隣接して位置決めすることができる。さらなる代替形態では、各磁石の同じ極を、プレート 3 5 0 2 に隣接して位置決めすることができる。

【0141】

システムは、磁石の位置、例えば下側境界、を検出するセンサ 3 8 2 6 をさらに含むことができる。図 3 8 に例示されるように、ガイドプレート 3 5 0 8 は、磁石が磁石の下側位置にあるとき、光学センサ 3 8 2 6 と干渉する可能性がある。代わりに、他のセンサを使用して、プレートおよび関連付けられた磁石の位置を判定することができる。

10

【0142】

センサデバイスまたはマイクロチップのウェルにビーズを充填した後、シーケンシングビーズ上のポリヌクレオチドを増幅して、シーケンシングビーズ上にポリヌクレオチドのモノクロナルの集団を形成することができる。ポリヌクレオチドのモノクロナルの集団を、例えばイオンベースのシーケンシング手法を使用して、シーケンシングすることができる。

【0143】

マルチレーン流体工学

図 3 9 は、一般に、統合された次世代シーケンシングシステムの流体システムの構成要素として、分析中に使用される様々な溶液の分配をマルチレーンセンサアレイデバイスに提供することができる流体マルチプレクサブブロック 3 9 1 0 0 の分解図を例示している。本教示によれば、本明細書に開示される流体システムの様々な実施形態は、次世代シーケンシング分析の過程にわたってマルチレーンセンサアレイデバイスに様々な溶液を順次送達するための一連の流体操作を実行するように構成されている。例示的な流体操作は、図 3 9 の流体マルチプレクサブブロック 3 9 1 0 0 などの流体マルチプレクサブブロックを通じた洗浄、プライミング、およびヌクレオチド試薬送達を含む。そのような流体マルチプレクサブブロックは、分析中の検出に使用されるマルチレーンセンサアレイデバイスの各レーンに独立した流体分配を提供するように構成されている。本教示によれば、分析中に任意の数または組み合わせのレーンを使用することができるため、分析中に、任意の位置の 1 つのレーンをラン中に単独で 사용할ことができ、4 つのレーンすべてをラン中に同時に使用することができるか、または任意のレーンの組み合わせをラン中に同時に使用することができる。一連の流体操作中にマルチレーンセンサアレイデバイスへの流体分配のために本教示の流体マルチプレクサブブロックを使用することにより、様々な流体コンパートメントでの分析中に使用される溶液の交差汚染を回避するとともに、分析中の試薬流体ストリーム間の急峻な遷移を提供することができる。加えて、本教示の流体システムの様々な実施形態は、基準電極に一定の電解質流体環境を提供し、それによって、マルチレーンセンサアレイデバイスに一定の安定した基準電圧を提供する。

20

30

【0144】

図 3 9 に描示されるように、流体マルチプレクサブブロック 4 1 0 0 は、流体マルチプレクサユニット 4 2 0 0 A ~ 4 2 0 0 D、ならびに第 1 のエンドカバー 4 1 0 5 A および第 2 のエンドカバー 4 1 0 5 B を含む。本教示によれば、各流体マルチプレクサユニットは、流体マルチプレクサユニットの本体内に形成された流体マルチプレクサ回路を有する。よって、図 3 9 に描示されるように、流体マルチプレクサユニット 4 2 0 0 A ~ 4 2 0 0 D の各々は、各流体マルチプレクサユニットの本体内に形成された流体マルチプレクサ回路 4 2 1 5 A ~ 4 2 1 5 D を有する。本明細書でより詳細に開示するように、流体マルチプレクサブブロック 1 0 0 内の各流体マルチプレクサユニットは、マルチレーンセンサアレイデバイスのフローセルレーンの各々の 1 つと独立して制御可能な流体連通にある。よって、マルチレーンセンサアレイデバイスの第 1 のレーンを、流体マルチプレクサユニット 4 2 0 0 A に流体的に統合することができる一方、第 2 のレーンを、流体マルチプレクサ

40

50

ユニット４２００Ｂに流体的に統合することができ、第３のレーンを、流体マルチプレクサユニット４２００Ｃに流体的に統合することができる一方、第４のレーンを、流体マルチプレクサユニット４２００Ｄに流体的に統合することができる。その上、分析中に任意の数または組み合わせのレーンを使用することができるため、分析のセットアップ中に、エンドユーザは、ラン中に単独で使用される任意の位置での１つのレーン、ラン中に同時に使用される４つのレーンすべて、またはラン中に同時に使用されるレーンの任意の組み合わせを選択することができる。

【０１４５】

図４０は、一般に、４つの入力試薬と５つの流体分岐の各々での較正溶液とを収容するとともに、洗浄溶液の分配チャネルを有する、流体マルチプレクサユニット４２００の一実施形態を例示している。流体回路４２１５は、第１の表面４２０１および対向する第２の表面４２０３を有する基材４２０５中に形成されている。図４０に描示されるように、第１の表面４２０１および対向する第２の表面４２０３は、互いに実質的に平行である。流体マルチプレクサユニット４２００は、第１の流体インターフェース側面４２０２を、対向する第２の流体インターフェース側面４２０４とともに有することができる。図４０に描示されるように、第３の流体インターフェース側面４２０６が、一方側で第１および第２のインターフェース縁部を接合する一方、第４の流体インターフェース側面４２０８が、対向側で第１および第２のインターフェース縁部を接合する。基材４２０５を、ガラス、セラミック、およびプラスチックなどの多様な材料で構築することができる。例示的な高分子材料として、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリエーテルイミド、およびポリイミドが挙げられる。試薬インレットポート４２１０、４２１６、４２２２、および４２２８、ならびに較正溶液インレットポート４２３４は、それぞれ、インレットチャネル４２１１、４２１７、４２２３、４２２９、および４２３５と流体連通している。インレットチャネル４２１１、４２１７、４２２３、４２２９は、それぞれ５つの流体分岐の各々の曲線状チャネル４２１３、４２１９、４２２５、４２３１、および４２３５と流体連通している。最後に、洗浄溶液インレットポート４２４０は、洗浄溶液チャネル４２４２と流体連通している。

【０１４６】

図４０に描示されるように、各インレットチャネルは、各曲線状チャネルとＴ字形接合を形成し、その結果、各曲線状チャネルは、２つの分岐からなる。２つの分岐を形成するそのようなＴ字形接合が、図４０に描示されており、インレットチャネル４２１１は、Ｔ字形をなして曲線状チャネル４２１３となり、第１の分岐チャネル４２１２および第２の分岐チャネル４２１４を形成する。同様に、インレットチャネル４２１７は、Ｔ字形をなして曲線状チャネル４２１９となり、第１の分岐チャネル４２１８および第２の分岐チャネル４２２０を形成する一方、インレットチャネル４２２３は、Ｔ字形をなして曲線状チャネル４２２５となり、第１の分岐チャネル４２２４および第２の分岐チャネル４２２６を形成する。加えて、インレットチャネル４２２９は、Ｔ字形をなして曲線状チャネル４２３１となり、第１の分岐チャネル４２３０および第２の分岐チャネル４２３２を形成する。最後に、インレットチャネル４２３５は、Ｔ字形をなして曲線状チャネル４２３７となり、第１の分岐チャネル４２３６および第２の分岐チャネル４２３８を形成する。５つの流体分岐のうちの、それぞれ曲線状チャネル４２１３、４２１９、４２２５、４２３１、および４２３７の第１の分岐チャネル４２１２、４２１８、４２２４、４２３０、および４２３６は、中央チャネル４２５０と流体連通している。図４０に描示されるように、中央チャネル４２５０は、センサインレットポート（図示せず）と流体連通しているセンサインターフェースインレットコネクタポート４２６０と流体連通している。加えて、洗浄溶液インレットポート４２４０は、洗浄溶液チャネル４２４２と流体連通しており、洗浄溶液チャネル４２４２はまた、センサインターフェースインレットコネクタポート４２６０と流体連通している。センサインターフェースアウトレットコネクタポート４２６２は、センサアウトレットポート（図示せず）、ならびにセンサ廃棄物チャネル４２４４と流体連通している。センサ廃棄物チャネル４２４４は、センサ廃棄物レセプタクル（図示

10

20

30

40

50

せず)と流体連通しており、センサ廃棄物レセプタクルは、センサ廃棄物ポートアウトレット4264を通して流体マルチプレクサユニット4200に接続されている。曲線状チャンネル4213、4219、4225、4231、および4237の第2の分岐チャンネル4214、4220、4226、4232、および4238の各々は、主廃棄物チャンネル4246と流体連通しており、主廃棄物チャンネル4246は、主廃棄物レセプタクル(図示せず)と流体連通しており、主廃棄物レセプタクルは、主廃棄物アウトレットポート4266を通して流体マルチプレクサユニット4200に接続されている。

【0147】

図41は、一般に、図39の流体マルチプレクサブロック4100の流体マルチプレクサユニット4200とマルチレーンセンサデバイスとの流体統合の概略表現を例示している。

10

【0148】

図41のセンサアレイデバイス10などのマルチレーンセンサアレイデバイス上で様々な分析を実行するための流体送達および制御に関して、流体マルチプレクサユニット4200の流体回路4215は、センサアレイデバイス10の1つのフローセルレーンと流体連通し得る。例示の目的で、1つの流体マルチプレクサユニットが、図41の1つのフローセルレーンと流体的に統合されて示されている。ただし、各レーンは、図39の流体マルチプレクサユニット4200A~4200Dなどの流体マルチプレクサユニットの1つと流体的に統合されるため、エンドユーザは、分析中に任意の数または組み合わせのレーンを選択することができる。非限定的な例として、図41のセンサアレイデバイス10のフローセルレーン4Aなどの第1のフローセルレーンを、図39の流体マルチプレクサユニット4200Aなどの第1の流体マルチプレクサと流体的に統合することができる一方、図41のセンサアレイデバイス10のフローセルレーン4Bなどの第2のフローセルレーンを、図39の流体マルチプレクサユニット4200Bなどの第2の流体マルチプレクサに流体的に統合することができる。同様に、図41のセンサアレイデバイス10のフローセルレーン4Cなどの第3のフローセルレーンを、図39の流体マルチプレクサユニット4200Cなどの第3の流体マルチプレクサと流体的に統合することができる一方、図41のセンサアレイデバイス10のフローセルレーン4Dなどの第4のフローセルレーンを、図39の流体マルチプレクサユニット4200Dなどの第4の流体マルチプレクサに流体的に統合することができる。その点に関して、図41の例示の目的で本明細書に記載されることは、一般に、各流体マルチプレクサユニット41200が、マルチレーンセンサデバイスの対応するフローセルレーンの各々とどのように流体的に統合されるかを開示している。

20

30

【0149】

したがって、分析のセットアップ中に、エンドユーザは、ラン中に単独で使用される任意の位置での1つのレーン、ラン中に同時に使用される4つのレーンすべて、またはラン中に同時に使用されるレーンの任意の組み合わせを選択することができる。後でより詳細に開示するように、本教示のシーケンサー装置の流体システムは、分析の過程で使用するための多様な溶液を提供する複数の溶液容器を含むことができる。例えば、様々な溶液は、分析に使用される様々なヌクレオチド試薬、校正溶液、希釈剤(洗浄)溶液、およびクリーニング溶液を含むことができる。分析の過程で使用される様々な溶液は、図41のフローセルレーン4Aのフローセルインレット3Aなどのフローセルインレットを介して、センサアレイデバイス10の任意のフローセルレーンと制御可能な流体連通にあり得る。本教示のシーケンサー装置の流体システムは、各試薬容器からの試薬流体ラインを含むことができ、試薬流体ラインを、インレットチャンネル4211、4217、4223、4229、4235、および4242などの流体回路4215のインレットチャンネルと選択的に流体連通させることができる。加えて、図41に描示されるように、分析の過程で使用される様々な溶液の各々は、試薬流体ライン $L_1 \sim L_4$ の各々の、ならびにそれぞれ校正溶液ライン L_5 および洗浄溶液ライン L_6 の、流体ラインバルブ $V_1 \sim V_6$ などのバルブによって、流体の流れを制御され得る。校正流体ラインバルブ V_5 は、ラン中に使用するために選

40

50

択されたセンサアレイを較正するためにランが開始される前の較正シーケンス中を除いて、一般に閉位置にあることに留意されたい。よって、較正流体ラインバルブV₅は、シーケンスラン中に閉じられる。

【0150】

分析の過程で使用される様々な溶液の制御可能な流れと併せて、図41の流体マルチプレクサユニット4200は、例えば、センサアレイデバイス10のフローセルレーンへの選択された試薬送達の提供、流体マルチプレクサ回路4215、およびセンサアレイデバイス10のフローセルレーン4Aなどのフローセルの洗浄、ならびに選択された試薬による流体マルチプレクサ回路4215のプライミング、を含むがこれに限定されない流体操作を実行することができる。そのような流体操作は、図41のフローセルレーン4Aなどのフローセルへの試薬の交差汚染のない送達を提供することができ、試薬流体ストリーム間の急峻な遷移を提供することができるとともに、中央チャネル4250と流体連通し、それによって、センサアレイデバイス10に一定の安定した基準電圧を提供するための図41に示される基準電極4275に一定の電解質流体環境を提供することができる。

10

【0151】

例えば、図41の流体マルチプレクサユニット4200は、試薬流体ラインL₁~L₄のいずれかと第1のフローセルレーン4Aの第1のフローセルインレット3Aとの間の流体連通を選択的に提供し、それによって、センサアレイデバイス10の第1のフローセルレーン4Aを通る選択的な試薬フローを提供することができる。本教示の非限定的な例示的な試薬溶液流体経路は、選択された試薬の1つが流体マルチプレクサ回路4215と流体連通しているという条件で、洗浄溶液流体ラインバルブV₆が閉状態にあり、試薬流体ラインバルブV₁~V₄のうちの1つが開状態にある、試薬送達操作によって与えられる。そのような条件下で、選択された試薬は、流体マルチプレクサ回路4215を通して流れ、次いで、廃棄物チャネル4246を通して廃棄物に流れることができる。加えて、選択された試薬は、流体マルチプレクサ回路4215を通して第1のフローセルレーン4Aの第1のフローセルインレット3Aに流れ、次いで、第1のフローセルレーン4Aを通して第1のアウトレットポート5Aに流れ、最後に、フローセルアウトレットライン（図40を参照）を通してフローセル廃棄物容器に流れることができる。

20

【0152】

洗浄溶液の流体制御に関して、図41の流体マルチプレクサユニット4200は、洗浄溶液と第1のフローセルレーン4Aとの間の流体連通を選択的に提供することができる。したがって、流体マルチプレクサ回路4215および第1のフローセルレーン4Aの洗浄を行うという条件で、開状態の洗浄溶液ラインバルブV₆で、洗浄溶液ラインL₆は、流体マルチプレクサ廃棄物チャネル4246、ならびにフローセル廃棄物チャネル（図39を参照）と流体連通することができる。本教示の非限定的な例示的な洗浄溶液流体経路は、洗浄溶液が洗浄溶液流体チャネル4242を通して中央チャネル4250とのT字形接合に流れることができるという条件で、洗浄溶液流体ラインバルブV₆が開状態にあり、かつ試薬流体ラインバルブV₁~V₄の各々が閉状態にある洗浄操作によって与えられる。中央チャネル4250は、流体マルチプレクサ回路4215を通して廃棄物チャネル4246と流体連通しているため、洗浄溶液は、廃棄物チャネル4246を通して流体マルチプレクサ廃棄物に流れることができる。本明細書でより詳細に開示するように、洗浄溶液は、第1のフローセルレーン4Aを通して第1のインレットポート3Aから第1のアウトレットポート5Aに、次いで、フローセル廃棄物容器に流れることができる。

30

40

【0153】

本教示によれば、流体マルチプレクサユニット4200の流体マルチプレクサ回路4215のプライミングを、例えば、洗浄操作の後で、かつ選択された試薬が図41の第1のフローセルレーン4Aと流体連通するようにされる前に、順次に、選択された試薬で行うことができる。試薬プライミングを例示する非限定的な例は、選択された試薬のうちの1つが、流体マルチプレクサユニット4200の流体マルチプレクサ回路4215と流体連通しているという条件で、溶液流体ラインバルブV₆が開状態にあり、かつ試薬流体ライン

50

バルブ $V_1 \sim V_4$ のうちの 1 つが開状態になる試薬プライミング操作によって与えられる。そのような操作の下で、試薬の流量に対する洗浄溶液の流量は、洗浄溶液が洗浄チャンネル 4 2 4 2 を通り、かつセンサアレイデバイス 1 0 の第 1 のフローセルレーン 4 A を通ってチップ廃棄物に流れるように、選択される。そのような条件下で、選択された試薬は、デバイスを通る洗浄溶液の流れによってセンサアレイデバイス 1 0 を通って流れないように遮断されるため、流体マルチプレクサ回路 4 2 1 5 を通って循環する。したがって、選択された試薬は、流体マルチプレクサ回路 4 2 1 5 を通り、廃棄物チャンネル 4 2 4 6 を通って主廃棄物に流れる。よって、本明細書で前述したような試薬送達操作が開始されるとき、試薬プライミング操作で選択された試薬は、第 1 のフローセルインレット 3 A と直接流動連通している。

10

【0154】

したがって、本教示の流体システムの様々な実施形態は、次世代シーケンシング分析の過程で、センサアレイデバイスへの様々な溶液の順次の送達のための一連の操作を実行するように構成されている。例えば、一連の操作は、図 4 1 に描示されるような、洗浄、プライミング、および流体マルチプレクサブロックユニットを通るセンサアレイデバイスへのヌクレオチド試薬の送達を含むことができる。一連の流体操作中にセンサアレイデバイスへの流体分配のために本教示の流体マルチプレクサブロックを使用することにより、様々な流体コンパートメントでの試薬の交差汚染を回避するとともに、試薬流体ストリーム間の急峻な遷移を提供することができる。加えて、本明細書でより詳細に開示するように、本教示の流体システムの様々な実施形態は、基準電極に一定の電解質流体環境を提供し、それによって、センサアレイデバイスに一定の安定した基準電圧を提供する。

20

【0155】

図 4 2 は、一般に、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 を例示する背面等角図である。図 4 2 に描示されるように、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 は、流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 が中に取り付けられた流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 を含む。流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 は、電極アダプタ流体インターフェースブロック 4 3 4 0 の側面 4 3 4 2 上に取り付けられた電極接続取り付けプレート 4 4 1 0 を含むことができる。電極接続取り付けプレート 4 4 1 0 は、電気リード 4 4 1 2 および接地リード 4 4 1 4 を、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 の電極アダプタ流体インターフェースブロック 4 3 4 0 に接続することを可能にする。流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 はまた、ショルダースクリュー 4 4 2 0、4 4 2 2、および 4 4 2 4、ならびにショルダースクリュー 4 4 2 4 および反対側のショルダースクリュー 4 4 2 2 の下に配置された第 4 のショルダースクリューを含む。流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 のショルダースクリューにかかる力は、流体マルチプレクサブロックをマルチレーンセンサアレイデバイスにドッキングする可撓性を提供するために、流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 に取り付けられた流体マルチプレクサブロックに 4 度の移動を提供するように設定されている。

30

【0156】

図 4 2 に描示されるように、流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 に取り付けられた流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 に関して、流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 および流体ブロック接続の配向は、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 の上部で流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 に取り付けられた流体インターフェースブロック 4 3 1 2 を示す一方、流体インターフェースブロック 4 3 0 2 は、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 の下部で流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 に取り付けられている。図 4 2 に描示されるように、第 1 および第 2 の可撓性チューブセット 4 3 1 4 および 4 3 1 6 の配向は、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 の上部から同様に飛び出るものである一方、第 1 および第 2 の可撓性チューブセット 4 3 0 4 および 4 3 0 6 は、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 の下部から同様に飛び出るものである。同様に、流体インターフェ

40

50

ースブロック4332は、流体マルチプレクサブブロッククランプアセンブリ4150の背部で、かつ電極アダプタ流体インターフェースブロック4340の下で、流体マルチプレクサブブロック4100に取り付けられている。図42に描示されるように、第1および第2の可撓性チューブセット4334および4336の配向は、流体マルチプレクサブブロッククランプアセンブリ4150の背部から同様に飛び出るものである。最後に、流体インターフェースブロック4322は、流体マルチプレクサブブロッククランプアセンブリ4150の背部で、かつ電極アダプタ流体インターフェースブロック4340の上で、流体マルチプレクサブブロック4100に取り付けられている。図42に描示されるように、第1および第2の可撓性チューブセット4324および4326の配向は、電極アダプタ流体インターフェースブロック4340の上部から同様に飛び出るものである。

10

【0157】

図43は、流体マルチプレクサブブロッククランプアセンブリに取り付けられた際の流体マルチプレクサブブロック4100の配向、ならびに流体マルチプレクサユニットへの電極の統合を一般的に例示する断面図である。流体マルチプレクサブブロックの第1の面4102は、第1の面4102上に取り付けられた流体インターフェースブロック4302、および流体インターフェースブロック4302に接続された第1および第2の可撓性チューブセット4304および4306とともに描示されている一方、流体マルチプレクサブブロックの第2の面4104は、第2の面4104上に取り付けられた流体インターフェースブロック4312、および流体インターフェースブロック4312に接続された第1および第2の可撓性チューブセット4314および4316とともに描示されている。同様に、流体マルチプレクサブブロックの第3の面4106は、第3の面4106上に取り付けられた流体インターフェースブロック4332、および流体インターフェースブロック4332に接続された第1および第2の可撓性チューブセット4334および4336とともに描示されている。加えて、流体マルチプレクサブブロックの第3の面4106は、第3の面4106上に取り付けられた電極アダプタ流体インターフェースブロック4340とともに描示されている。図43に描示されるように、流体インターフェースブロック4322は、流体インターフェースブロック4332に接続された第1および第2の可撓性チューブセット4324および4326が、それぞれ電極アダプタ流体インターフェースブロックインレットチャネル4342および4344と流体連通するように、電極アダプタ流体インターフェースブロック4340に取り付けられている。その点に関して、電極アダプタ流体インターフェースブロック4340は、電極アダプタ流体インターフェースブロックインレットチャネル4342および4344が、それぞれセンサ廃棄物アウトレットポート4264および洗浄溶液インレットポート4240に対して結合され、かつ封止されるように、流体マルチプレクサブブロックの第3の面4106に取り付けられている。最後に、図43に描示されるように、流体マルチプレクサブブロックの第4の面4108は、センサインターフェースインレットコネクタポート4260およびセンサインターフェースアウトレットコネクタポート4262を有する。本明細書で先に開示したように、流体マルチプレクサブブロックの第4の面4108は、流体マルチプレクサブブロック4100の各流体マルチプレクサユニットのセンサインターフェースインレットコネクタポートおよびセンサインターフェースアウトレットコネクタポートの対応するセットを有する。本明細書で後でより詳細に開示するように、センサインターフェースインレットコネクタポート4260およびセンサインターフェースアウトレットコネクタポート4262は、マルチレーンセンサデバイスのインレットポートおよびアウトレットポートに対してそれぞれ結合され、かつ封止されている。

20

30

40

【0158】

マルチレーンセンサアレイデバイスに一定の安定した基準電極電圧を提供する各流体マルチプレクサユニットへの電極接続を提供することに関して、図43は、電極接続取り付けプレート4410が上に取り付けられた電極アダプタ流体インターフェースブロック4340の断面図を描示している。図43は、洗浄溶液チャネル4242と流体連通している電極アダプタ流体インターフェースブロックインレットチャネル4344を通る流体通

50

過を提供する、電極アダプタ流体インターフェースブロックインレットチャンネル 4 3 4 4 のセクションの拡大ボア中の電極 4 2 7 5 を描示している。電極 4 2 7 5 は、電気リード 4 4 1 2 および接地リード 4 4 1 4（図 4 2 を参照）を通して電極接続取り付けプレート 4 4 1 0 に接続された電圧源に電氣的に結合されている。本明細書で先に開示したように、第 2 の可撓性チューブセット 4 3 2 6 は、安定した電解質組成の洗浄溶液の供給源と流体連通している。したがって、電極 4 2 7 5 は、マルチレーンセンサアレイデバイスに一定の安定した基準電極電圧を提供する流体環境にある。

【0159】

図 4 4 は、流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 が中に取り付けられた流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 を含む、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 を一般に例示する正面等角図である。図 4 4 に描示されるように、流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 の流体マルチプレクサブロックの第 4 の面 4 1 0 8 は、流体マルチプレクサユニット 4 2 0 0 A、4 2 0 0 B、4 2 0 0 C、および 4 2 0 0 D ごとに、それぞれ、センサインターフェースインレットコネクタポート 4 2 6 0 A ~ 4 2 6 0 D、およびセンサインターフェースアウトレットコネクタポート 4 2 6 2 A ~ 4 2 6 2 D を有する。第 1 の流体マニホールドユニット 4 2 0 0 A の第 1 のアライメントノッチ 4 1 0 7 A、および第 4 の流体マニホールドユニット 4 2 0 0 D の第 2 のアライメントノッチ 4 1 0 7 B は、流体マルチプレクサブロッククランプアセンブリ 4 1 5 0 のマルチレーンセンサアレイデバイスに対するアライメントおよび封止プロセスを支援するように構成されている。本明細書で先に開示したように、流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 は、流体マルチプレクサブロックをマルチレーンセンサアレイデバイスにドッキングする可撓性を提供するために、流体マルチプレクサブロッククランプ 4 4 0 0 に取り付けられた流体マルチプレクサブロックに 4 度の移動を提供する。加えて、第 1 のアライメントノッチ 4 1 0 7 A および第 2 のアライメントノッチ 4 1 0 7 B は、マルチレーンセンサアレイデバイスのマルチレーンセンサアレイデバイスへの自己アライメントを提供するように構成されており、その結果、センサインターフェースインレットコネクタポート 4 2 6 0 A ~ 4 2 6 0 D およびセンサインターフェースアウトレットコネクタポート 4 2 6 2 A ~ 4 2 6 2 D などのセンサインターフェースインレットコネクタポートおよびセンサインターフェースアウトレットコネクタポートの封止を、マルチレーンセンサアレイデバイスのそれぞれのインレットポートおよびアウトレットポートに対して行うことができる。

【0160】

図 4 5 は、図 4 1 に概略的に描示されるマルチレーンセンサデバイス 1 0 などのマルチレーンセンサデバイス 1 0 に取り付けられた流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 を一般に例示する断面図である。図 4 5 に描示されるように、センサデバイス取り付けおよび位置決めアセンブリ 4 4 5 0 に取り付けられているマルチレーンセンサデバイス 1 0。流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 の流体インターフェースブロック 4 3 0 2、4 3 1 2、4 3 2 2、および 4 3 3 2 の位置も、図 4 5 の断面図において明らかである。流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 がマルチレーンセンサデバイス 1 0 に取り付けられている場合、マルチレーンセンサアレイデバイスの各レーンについて、各センサインターフェースインレットコネクタポートおよび各センサインターフェースアウトレットコネクタポートを、それぞれ、対応する各センサアレイインレットポートおよび各センサアレイアウトレットポートに対して結合することおよび封止することが、行われる。その点に関して、図 4 6 は、マルチレーンセンサアレイに対する流体マルチプレクサブロックの取り付けおよび封止を一般的に例示する拡大等角図である。図 4 6 に描示されるように、センサアレイデバイス 1 0 は、レーン 4 A ~ 4 D を有し、各レーンは、インレットポート 3 A およびアウトレットポート 5 A を有するレーン 4 A について例示されるように、インレットポートおよびアウトレットポートを有する。図 4 6 では、センサアレイデバイス 1 0 の第 1 のアライメントピン 1 2 A と流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 の第 1 のアライメントノッチ 4 1 0 7 A との並置は、相補ペアがセンサアレイデバイス 1 0 と流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 とのアライメントのためにどのように係合

10

20

30

40

50

するかを示す。加えて、図 4 6 は、センサアレイデバイス 1 0 の各インレットポートおよび各アウトレットポートが、流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 の対応する各センサインターフェースインレットコネクタポートおよび各センサインターフェースアウトレットコネクタポートに対してどのように結合され、かつ封止され得るかを示す。図 4 6 では、このことはレーン 4 A について例示されており、センサインターフェースインレットコネクタポート 4 2 6 0 A への第 1 のインレットポート 3 A とセンサインターフェースアウトレットコネクタポート 4 2 6 2 A への第 1 のアウトレットポート 5 A との並置を、各 1 回センサアレイデバイス 1 0 に対して結合し、かつ封止することができ、流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 は、互いに完全に係合している。

【0161】

図 4 7 は、本教示のシーケンシングシステムの流体システム 4 1 0 0 0 を一般に例示する概略表現である。図 4 7 に描示されるように、流体システム 4 1 0 0 0 は、空気圧制御システム 4 5 0 0、ならびに溶液処理マニホールド 4 6 0 0 および試薬分配マニホールドアセンブリ 4 7 0 0 などの液体処理制御システムを有する。

【0162】

その点に関して、空気圧制御システム 4 5 0 0 は、バルブ 4 5 0 1 を介して制御される第 1 の空気圧インレットラインを通して第 1 の洗浄溶液容器 4 5 2 0 と流体連通し、バルブ 4 5 0 3 を介して制御される第 2 の空気圧インレットライン 4 5 0 4 を通して第 2 の洗浄溶液容器 4 5 2 2 と流体連通し、バルブ 4 5 0 5 を介して制御される第 3 の空気圧インレットライン 4 5 0 6 を通してクリーニング溶液容器 4 5 2 4 と流体連通している。同様に、空気圧制御システム 4 5 0 0 は、バルブ 4 5 0 7 を介して制御される第 4 の空気圧インレットライン 4 5 0 8 を介して試薬容器アセンブリ 4 6 7 0 と流体連通している。流体システム制御に関して、空気圧制御システム 4 5 0 0 は、バルブ 4 5 0 9 を介して制御される第 5 の空気圧インレットライン 4 5 1 0 を介して溶液処理マニホールド 4 6 0 0 と流体連通している。最後に、空気圧制御システム 4 5 0 0 は、バルブ 4 5 1 1 を介して制御される第 6 の空気圧インレットライン 4 5 1 2 を介してピンチマニホールド 4 8 0 0 と流体連通している。本明細書でより詳細に開示するように、空気圧制御システム 4 5 0 0 およびピンチマニホールド 4 8 0 0 は、流量センサ 4 6 1 0 との組み合わせで、溶液入力源と廃棄物との間のシステム調節および制御を提供する。本教示によれば、流体システム 4 1 0 0 0 の流体システム調節および制御は、第 1 の洗浄溶液容器 4 5 2 0、第 2 の洗浄溶液容器 4 5 2 2、クリーニング溶液容器 4 5 2 4、および試薬容器アセンブリ 4 6 7 0、および廃棄物容器 4 5 5 0 などの、溶液入力源間の定義された制御可能な圧力差を提供する。したがって、定義され制御された圧力差は、流体システム 4 1 0 0 0 の様々な液体回路を通じた分析の過程で使用される様々な溶液の定義され制御された流量を提供する。流量として、シングルレーンチップフローの場合はおよそ $15 \mu\text{l}/\text{秒}$ 、シングルレーンチップおよび主廃棄物フローの場合は $45 \mu\text{l}/\text{秒}$ 、フルチップおよび主廃棄物フローの場合は $180 \mu\text{l}/\text{秒}$ 、またはシステムクリーニング操作中は $300 \mu\text{l}/\text{秒}$ 超の速度が挙げられ得る。

【0163】

溶液処理マニホールド 4 6 0 0 は、クリーニングおよび充填に使用される様々な溶液の分配の制御を提供する。図 4 7 に描示されるように、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 は、流量センサ 4 6 1 0 と流体連通している溶液処理マニホールドライン 4 6 2 0 を有する。本教示によれば、流量センサ 4 6 1 0 は、ピンチマニホールド 4 8 0 0 を使用して流体システム 4 1 0 0 0 の様々な液体回路の定義された流量を較正し、ヌクレオチド容器を充填するときに定義された体積の流れを提供するために、空気圧制御システム 4 5 0 0 に動的な入力を提供する。液体入力源に関して、第 1 の洗浄溶液容器 4 5 2 0 は、第 1 の洗浄溶液アウトレットライン 4 5 3 0 を通して溶液処理マニホールド 4 6 0 0 と流体連通している一方、第 2 の洗浄溶液容器 4 5 2 2 は、第 2 の洗浄溶液アウトレットライン 4 5 3 2 を介して溶液処理マニホールド 4 6 0 0 と流体連通しており、クリーニング溶液容器 4 5 2 4 は、較正溶液アウトレットライン 4 5 3 4 を通して溶液処理マニホールド 4 6 0 0 と流

10

20

30

40

50

体連通している。

【0164】

次世代シーケンシング中に実行される超並列処理に十分な試薬体積を提供するために、流体システム41000は、分析の過程で使用される様々な溶液のかなりの体積を提供するように構成されている。その点に関して、試薬濃縮カートリッジ4660は、洗浄溶液容器4520および4522と流体連通している。本明細書で使用される場合、洗浄溶液は、安定した電解質組成の水溶液ベースの溶液であり、これを、本明細書で先述したような洗浄操作のための、校正溶液およびシーケンシング試薬の調製における溶媒として使用することができる。試薬濃縮物カートリッジ4660は、校正溶液濃縮物容器4661を含むことができる一方、残りの濃縮物は、ヌクレオチド試薬濃縮物である。例えば、第1のヌクレオチド試薬濃縮物容器4663は、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)試薬濃縮物を収容することができる一方、第2のヌクレオチド試薬濃縮物容器4665は、デオキシチジン三リン酸(dCTP)試薬濃縮物を収容することができ、第3のヌクレオチド試薬濃縮物容器4667(例えば、図11のカートリッジ)は、デオキシアデノシン三リン酸(dATP)試薬濃縮物を収容することができる一方、第4のヌクレオチド試薬濃縮物容器4669は、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)試薬濃縮物を収容することができる。試薬濃縮カートリッジ4660はまた、試薬容器アセンブリ4670と流体連通している。試薬容器アセンブリ4670の各容器は、本教示の高スループットの次世代の合成によるシーケンシング分析システムで使用されるかなりの体積の校正溶液およびdNTP試薬を保持する。各試薬容器は、およそ150mlの希釈溶液体積をサポートするために、およそ225mlの容量を有することができる。バルク校正溶液およびバルクヌクレオチド試薬の調製では、濃縮試薬は、試薬容器で混合される場合に約100倍に希釈される。

【0165】

シーケンシングランの開始前に、校正溶液およびヌクレオチド試薬のバルク調製を行うことができる。溶液処理マニホールド4600のバルブ4602および4621を開き、かつ他のすべての溶液処理マニホールドバルブを閉じての、校正溶液のバルク調製に関して、洗浄溶液容器4520中の洗浄溶液は、洗浄溶液アウトレットライン4530を通過して溶液処理マニホールドライン4620に流れ込み、校正濃縮物ライン4631を通過して校正溶液濃縮物容器4661に流れ込み、次いで、校正溶液インレットライン4641を通過して校正溶液容器4671に流れ込むことができる。洗浄溶液は、校正溶液容器4671の所定の充填体積のために、校正溶液濃縮物容器4661を通過して、校正溶液容器4671に流れ続けることができ、その時点で、校正溶液濃縮物容器4661は、校正溶液濃縮物を実効的に使い果たしている。

【0166】

次に、第1のヌクレオチド溶液のバルク調製を、溶液処理マニホールド4600のバルブ4602および4623を開き、かつ他のすべての溶液処理マニホールドバルブを閉じることによって行うことができ、その結果、洗浄溶液容器4520中の洗浄溶液は、溶液処理マニホールドライン4620に流れ込み、第1のヌクレオチド試薬濃縮物ライン4633を通過して第1のヌクレオチド試薬濃縮物容器4663に流れ込み、次いで、第1のヌクレオチド試薬容器4673が充填されるまで、第1のヌクレオチド試薬インレットライン4643を通して第1のヌクレオチド試薬容器4673に流れ込むことができる。

【0167】

第1のヌクレオチド溶液のバルク調製が完了した後、第2のヌクレオチド溶液のバルク調製を、溶液処理マニホールド4600のバルブ4602および4625を開き、かつ他のすべての溶液処理マニホールドバルブを閉じることによって行うことができ、その結果、洗浄溶液容器4520中の洗浄溶液は、洗浄溶液アウトレットライン4530を通過して溶液処理マニホールドライン4620に流れ込み、第2のヌクレオチド試薬濃縮物ライン4635を通過して第2のヌクレオチド試薬濃縮物容器4665に流れ込み、次いで、第2

のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 5 が充填されるまで、第 2 のヌクレオチド試薬インレットライン 4 6 4 5 を通って第 2 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 5 に流れ込むことができる。

【0168】

第 2 のヌクレオチド試薬のバルク調製に続いて、第 3 のヌクレオチド溶液のバルク調製を、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 のバルブ 4 6 0 2 および 4 6 2 7 を開き、かつ他のすべての溶液処理マニホールドバルブを閉じることによって行うことができ、その結果、洗浄溶液容器 4 5 2 0 中の洗浄溶液は、洗浄溶液アウトレットライン 4 5 3 0 を通って溶液処理マニホールドライン 4 6 2 0 に流れ込み、第 3 のヌクレオチド試薬濃縮物ライン 4 6 3 7 を通って第 3 のヌクレオチド試薬濃縮物容器 4 6 6 7 に流れ込み、次いで、第 3 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 7 が充填されるまで、第 3 のヌクレオチド試薬インレットライン 4 6 4 7 を通って第 3 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 7 に流れ込むことができる。

10

【0169】

最後に、第 4 のヌクレオチド溶液のバルク調製を、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 のバルブ 4 6 0 2 および 4 6 2 9 を開き、かつ他のすべての溶液処理マニホールドバルブを閉じることによって行うことができ、その結果、洗浄溶液容器 4 5 2 0 中の洗浄溶液は、洗浄溶液アウトレットライン 4 5 3 0 を通って溶液処理マニホールドライン 4 6 2 0 に流れ込み、第 4 のヌクレオチド試薬濃縮物ライン 4 6 3 9 を通って第 4 のヌクレオチド試薬濃縮物容器 4 6 6 9 に流れ込み、次いで、第 4 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 9 が充填されるまで、第 4 のヌクレオチド試薬インレットライン 4 6 4 9 を通って第 4 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 9 に流れ込むことができる。

20

【0170】

高スループットの次世代の合成によるシーケンシングのランのために調製された十分な校正溶液およびヌクレオチド試薬を用いると、試薬分配マニホールドアセンブリ 4 7 0 0 は、流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 を通したセンサアレイデバイス 1 0 への、および最終的にはチップ廃棄物ライン 4 3 2 4 または主廃棄物ライン 4 3 3 4（例えば、図 4 3 を参照）を通した廃棄物 4 5 3 0 への、試薬容器アセンブリ 4 6 7 0 中の様々な溶液の分配を制御することができる。

【0171】

図 4 7 に描示されるように、試薬分配マニホールドアセンブリ 4 7 0 0 は、試薬分配マニホールド 4 7 0 2、試薬分配マニホールド 4 7 1 2、および試薬分配マニホールド 4 7 2 2 を含むことができる。図 4 7 のヒータブロック 4 7 5 0 は、流体マルチプレクサブロック 4 1 0 0 およびセンサアレイデバイス 1 0 を通って流れる前に、溶液および試薬の均一な温度を確保するために、可撓性チューブセット 4 3 0 4、4 3 0 6、4 3 1 4、4 3 1 6、4 3 2 6、および 4 3 3 6 と接触することができる。

30

【0172】

試薬分配マニホールド 4 7 0 2 は、バルブブロック 4 7 0 4 にバルブの第 1 のセットを有することができる、第 1 のセットは、溶液処理マニホールドライン 4 6 2 0 と可撓性チューブセット 4 3 2 6 との間の流体連通を個々に制御することができる。図 4 3 の流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 3 1 1 0 について描示されるように、可撓性チューブセット 4 3 2 6 の各チューブは、図 4 0 の流体マルチプレクサユニット 4 0 2 0 0 の洗浄溶液インレットポート 4 0 2 4 0 などの、対応する流体マルチプレクサユニットの対応する洗浄溶液インレットポートに接続されている。加えて、試薬分配マニホールド 4 7 0 2 は、バルブブロック 4 7 0 6 にバルブの第 2 のセットを有することができ、第 2 のセットは、校正溶液ラインアウトレット 4 6 5 1 と可撓性チューブセット 4 3 3 6 との間の流体連通を個々に制御することができる。図 4 3 の流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 について描示されるように、可撓性チューブセット 4 3 3 6 の各チューブは、図 4 0 の流体マルチプレクサユニット 4 2 0 0 の校正溶液インレットポート 4 2 3 4 などの、対応する流体マルチプレクサユニットの対応する校正溶液インレットポートに接続されている。

40

【0173】

50

マルチレーンセンサアレイデバイスの選択された1つ以上のレーンを通る洗浄溶液の流れを提供するために、溶液処理マニホールド4600のバルブ4602または4604のいずれかを、溶液処理マニホールド4600の他のすべてのバルブを閉じたまま、開くことができる。試薬分配マニホールド4702のバルブブロック4704の1つのバルブ、4つのバルブすべて、またはバルブの任意の組み合わせのいずれかを開くことができるため、容器4520および4522からの洗浄溶液は、洗浄溶液アウトレットライン4530または4532のいずれかを通して、それぞれ、溶液処理マニホールドライン4620に流れ込んで、対応する流体マルチプレクサブロックユニットによって、バルブブロック4704のバルブの選択に応じて、1つのレーン、4つのレーンすべて、またはレーンの任意の組み合わせに分配され得る。マルチレーンセンサアレイデバイスの選択された1つ以上のレーンを通る較正溶液の流れを提供するために、溶液処理マニホールド4600のすべてのバルブが閉じられる。試薬分配マニホールド4702のバルブブロック4706の1つのバルブ、4つのバルブすべて、またはバルブの任意の組み合わせのいずれかを開くことができるため、較正溶液容器4671からの較正溶液は、較正溶液ラインアウトレット4651に流れ込んで、対応する流体マルチプレクサブロックユニットによって、バルブブロック4706のバルブの選択に応じて、1つのレーン、4つのレーンすべて、またはレーンの任意の組み合わせに分配され得る。

【0174】

試薬分配マニホールド4712は、バルブブロック4714にバルブの第1のセットを有することができ、第1のセットは、第1のヌクレオチド試薬アウトレットライン4653と可撓性チューブセット4304との間の流体連通を個々に制御することができる。図43の流体マルチプレクサブロックアセンブリ4110について描示されるように、可撓性チューブセット4304の各チューブは、図40の流体マルチプレクサユニット4200の第1のヌクレオチド試薬インレットポート4210などの、対応する流体マルチプレクサユニットの対応する第1のヌクレオチド試薬インレットポートに接続されている。加えて、試薬分配マニホールド4712は、バルブブロック4716にバルブの第2のセットを有することができ、第2のセットは、第2のヌクレオチド試薬アウトレットライン4655と可撓性チューブセット4306との間の流体連通を個々に制御することができる。図43の流体マルチプレクサブロックアセンブリ4110について描示されるように、可撓性チューブセット4306の各チューブは、図40の流体マルチプレクサユニット4200の第2のヌクレオチド試薬インレットポート4216などの、対応する流体マルチプレクサユニットの対応する第2のヌクレオチド試薬インレットポートに接続されている。

【0175】

マルチレーンセンサアレイデバイスの選択された1つ以上のレーンを通る第1のヌクレオチド試薬の流れを提供するために、溶液処理マニホールド4600のすべてのバルブが閉じられる。分配マニホールド4712のバルブブロック4714の1つのバルブ、4つのバルブすべて、またはバルブの任意の組み合わせのいずれかを開くことができるため、第1のヌクレオチド試薬容器4673からの第1のヌクレオチド試薬は、第1のヌクレオチド試薬アウトレットライン4653に流れ込んで、対応する流体マルチプレクサブロックユニットによって、バルブブロック4714のバルブの選択に応じて、1つのレーン、4つのレーンすべて、またはレーンの任意の組み合わせに分配され得る。マルチレーンセンサアレイデバイスの選択された1つ以上のレーンを通る第2のヌクレオチド試薬の流れを提供するために、溶液処理マニホールド4600のすべてのバルブが閉じられる。分配マニホールド4712のバルブブロック4716の1つのバルブ、4つのバルブすべて、またはバルブの任意の組み合わせのいずれかを開くことができるため、第2のヌクレオチド試薬容器4675からの第2のヌクレオチド試薬は、第2のヌクレオチド試薬アウトレットライン4655に流れ込んで、対応する流体マルチプレクサブロックユニットによって、バルブブロック4716のバルブの選択に応じて、1つのレーン、4つのレーンすべて、またはレーンの任意の組み合わせに分配され得る。

【0176】

試薬分配マニホールド 4 7 2 2 は、バルブブロック 4 7 2 4 にバルブの第 1 のセットを有することができ、第 1 のセットは、第 3 のヌクレオチド試薬アウトレットライン 4 6 5 7 と可撓性チューブセット 4 3 1 4 との間の流体連通を個々に制御することができる。図 4 3 の流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 について描示されるように、可撓性チューブセット 4 3 1 4 の各チューブは、図 4 0 の流体マルチプレクサユニット 4 0 2 0 0 の第 3 のヌクレオチド試薬インレットポート 4 0 2 2 2 などの、対応する流体マルチプレクサユニットの対応する第 3 のヌクレオチド試薬インレットポートに接続されている。加えて、試薬分配マニホールド 4 7 2 2 は、バルブブロック 4 7 2 6 にバルブの第 2 のセットを有することができ、第 2 のセットは、第 4 のヌクレオチド試薬アウトレットライン 4 6 5 9 と可撓性チューブセット 4 3 1 6 との間の流体連通を個々に制御することができる。図 4 3 の流体マルチプレクサブロックアセンブリ 4 1 1 0 について描示されるように、可撓性チューブセット 4 3 1 6 の各チューブは、図 4 0 の流体マルチプレクサユニット 4 2 0 0 の第 4 のヌクレオチド試薬インレットポート 4 2 2 8 などの、対応する流体マルチプレクサユニットの対応する第 4 のヌクレオチド試薬インレットポートに接続されている。

【0177】

マルチレーンセンサアレイデバイスの選択された 1 つ以上のレーンを通る第 3 のヌクレオチド試薬の流れを提供するために、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 のすべてのバルブが閉じられる。分配マニホールド 4 7 2 2 のバルブブロック 4 7 2 4 の 1 つのバルブ、4 つのバルブすべて、またはバルブの任意の組み合わせのいずれかを開くことができるため、第 3 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 7 からの第 3 のヌクレオチド試薬は、第 3 のヌクレオチド試薬アウトレットライン 4 6 5 7 に流れ込んで、対応する流体マルチプレクサブロックユニットによって、バルブブロック 4 7 2 4 のバルブの選択に応じて、1 つのレーン、4 つのレーンすべて、またはレーンの任意の組み合わせに分配され得る。マルチレーンセンサアレイデバイスの選択された 1 つ以上のレーンを通る第 4 のヌクレオチド試薬の流れを提供するために、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 のすべてのバルブが閉じられる。分配マニホールド 4 7 2 2 のバルブブロック 4 7 2 6 の 1 つのバルブ、4 つのバルブすべて、またはバルブの任意の組み合わせのいずれかを開くことができるため、第 4 のヌクレオチド試薬容器 4 6 7 9 からの第 4 のヌクレオチド試薬は、第 4 のヌクレオチド試薬アウトレットライン 4 6 5 9 に流れ込んで、対応する流体マルチプレクサブロックユニットによって、バルブブロック 4 7 2 6 のバルブの選択に応じて、1 つのレーン、4 つのレーンすべて、またはレーンの任意の組み合わせに分配され得る。

【0178】

流体システム 4 1 0 0 0 のすべての流体コンポーネントのクリーニングのスケジュールを実行することができる。そのようなクリーニングは、典型的には、チップの 4 つのレーンすべてがシーケンシングされた後、または新しいチップがこのシステムに設置される前に実行される。クリーニングを、使い果たされた試薬濃縮カートリッジと、所定位置にある使用済みのマルチレーンセンサアレイデバイスと、で実行することができる。バルブ 4 6 0 6 が開くと、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 のバルブ 4 6 2 3 ~ 4 6 2 9 の各々を順次開くことができ、分配マニホールドアセンブリ 4 7 0 0 の対応するバルブブロックのバルブのセットにおけるバルブのすべてを開くことができる。本明細書で前述したように、校正溶液の、および各ヌクレオチド試薬の各流体経路に対して順次実行されるそのような流路があると、クリーニング溶液容器 4 5 2 4 からのクリーニング溶液は、流体システム 4 1 0 0 0 のあらゆる流体成分を通して廃棄物容器 4 5 5 0 に順次流れることができる。最後に、このシステムを次の使用に備えておくために、乾燥手順が行われる。乾燥手順では、バルブ 4 6 0 2、4 6 0 4、および 4 6 0 6 が閉じられ、溶液処理マニホールド 4 6 0 0 の他のすべてのバルブが開いており、試薬分配マニホールドアセンブリ 4 7 0 0 のすべてのバルブが開いている。その構成では、きれいな乾燥空気を、流体システム 4 1 0 0 0 の液体処理コンポーネントに通過させて、残りの液体を廃棄物容器 4 5 5 0 に駆動する。

【0179】

本明細書で先に開示したように、空気圧制御システム4500およびピンチマニホールド4800は、流量センサ4610との組み合わせで、溶液入力源と廃棄物との間のシステム調節および制御を提供する。ピンチマニホールド4800は、8つのピンチレギュレータを含み、各々は、US9,375,716に記載されているように構築されている。これらのデバイスは、本質的に、入力流体ポート、出力流体ポート、および制御空気圧ポートを有する3つのポート圧力フォロワとして動作する。ピンチレギュレータ出力流体ポートと廃棄物容器4550との間に画定された廃棄物ライン流体抵抗が接続されると、出力流体ポートの圧力は、入力流体ポートの圧力に関わらず、ピンチレギュレータ制御空気圧ポートの圧力とほぼ等しくなる。ピンチレギュレータを通した流量は、出力流体ポート圧力を廃棄物ラインの流体抵抗で除算した値に等しくなる。流量を正確に校正するために、流体制御システム41000は、洗浄溶液がピンチマニホールド4800上の所望のピンチレギュレータに流れることを可能にするように構成されている。既知の空気圧のセットが、各ピンチレギュレータの空気圧制御ポートに印加され、フローセンサ4610は、空気圧制御圧力に対応する正確な流量を測定する。次いで、各ピンチレギュレータの流量対空気圧制御圧力の表が記憶され、表を装置ソフトウェアによって利用して、任意の所望の流量を正確に送達することができる。

【0180】

図48は、センサデバイスとインターフェース接続するための例示的な電子インターフェース4802の説明図を含む。例えば、電子インターフェース4802は、センサデバイスの電子インターフェースとインタラクトするためのピンを含むことができる。任意選択的に、インターフェース4802は、センサデバイスを電子インターフェース4802から係合解除するための機構4804を含むことができる。例えば、流体マニホールドがセンサデバイスに押し付けられると（図46に例示されるように）、機構4804は、押し下げることができる。流体マニホールドがセンサ装置から切り離されると、機構4804は、センサデバイスを電子インターフェース4802から押しのけることができる。任意選択的に、このシステムは、ヒートシンク4806などの、温度を制御するための機構をさらに含むことができる。ヒートシンク4806は、フィンを含むことができる。代わりに、ヒートシンク4806は、液体冷却ヒートシンクであり得る。

【0181】

特に、流体システムおよび電子インターフェースを使用して、合成によるシーケンシング反応中のヌクレオチド取り込みを検出する。データは、収集され、シーケンシング装置サーバシステムに提供される。

【0182】

シーケンサーソフトウェア

いくつかの実施形態では、核酸シーケンシング装置は、シーケンシング装置の様々な構成要素の制御と、シーケンシング装置でのシーケンシングランからのデータ出力の処理と、のためにサーバシステムとインターフェース接続され得る。サーバシステムソフトウェアは、ウェブアプリケーション、データベース、および分析パイプラインを含み、シーケンシング装置からの接続をサポートし得る（例えば、図6）。サーバシステムソフトウェアは、以下の主要な機能性およびアプリケーションプログラムインターフェース（API）を提供し得る。

【0183】

1. ユーザ認証、試薬追跡、ラン情報、およびラン追跡／ロギングのためのAPI。サポートされる装置として、シーケンシング装置および抽出装置が挙げられ得る。

【0184】

2. サンプル、ライブラリの作成、ランを計画し、計画のランステータスを取り出すためのLIMS（ラボラトリー情報管理システム）のためのAPI。

【0185】

3. サンプルおよびランデータの管理のサポート。

【0186】

10

20

30

40

50

4. データ分析およびレポート作成のための、アッセイ構成と分析パイプラインの実行とのサポート。

【0187】

5. ソフトウェアの更新および保守のためのソフトウェア更新サーバに対するインターフェース。

【0188】

6. クラウドベースのシステムまたはローカルシステムにデプロイされた Thermo Fisher Scientific 製の Ion Reporter などの注釈およびレポート作成システムに接続するための構成をサポートし、クラウドベースのシステムとのセキュアな認証された接続を確立して、マッピングされた、またはマッピングされていない BAM ファイルを転送する。

【0189】

7. Thermo Fisher Cloud などのクラウドコンピューティング環境のリソースシステムに接続するための構成をサポートし、クラウドリソースシステムとのセキュアな認証された接続を確立して、ソフトウェアおよびシステムコンテンツをダウンロードし、テレメトリデータを送信する。

【0190】

図 49 は、サーバシステムコンポーネントの概略図を示す。いくつかの実施形態では、基本的なソフトウェアアーキテクチャは、ウェブインターフェース、リモート監視エージェント、データベース、装置に対する API、分析パイプライン、分析パイプラインのコンテナ化（例えば、Docker を使用する）、注釈およびレポート作成システム（例えば、Thermo Fisher Scientific 製の Ion Reporter）、ならびにクラウドベースのサポートおよびリソースシステム（例えば、Thermo Fisher Cloud）への接続性を含み得る。クラウドベースのサポートおよびリソースシステム、またはクラウドベースのリソースシステムを、クラウドコンピューティングおよびストレージシステムに実装してもよい。クラウドベースのサポートおよびリソースシステムは、アッセイ定義ファイルを含むコンテンツを記憶する。クラウドコンピューティングおよびストレージシステムのサーバが、アッセイ定義ファイルなどのコンテンツをローカルサーバシステムにダウンロードしてもよい。クラウドベースのサポートおよびリソースシステムは、ローカルサーバシステムからテレメトリデータを受信してもよい。本明細書では、サーバシステム、ローカルサーバシステム、およびユーザのサーバシステムは、置き換え可能に使用される。

【0191】

いくつかの実施形態では、ユーザインターフェース（UI）は、ウェブアプリケーションソフトウェアを介して実装され得る。UI は、サンプル管理ページを提供してもよい。サンプル管理 UI ページは、ユーザがサンプル情報をこのシステムに入力することを可能にする。サンプル情報として、一意のサンプル識別子（ID）、サンプル名、およびサンプル調製試薬追跡情報が挙げられる。検証ロジックは、サンプル調製ステップを事前定義されたアッセイワークフローにロックするサンプル管理フローに組み込まれている。UI は、アッセイ管理ページを提供してもよい。アッセイ管理 UI ページは、ユーザがアッセイを監視し、アッセイを作成することを可能にする。アッセイは、ワークフローをプロセスの各ステップの事前定義されたパラメータにロックする。アッセイ構成を確保するために、検証ロジックが組み込まれていてもよい。UI は、ラン計画およびモニタページを提供してもよい。ラン計画およびモニタ UI ページは、ユーザがランを計画し、進行中のランをモニタすることを可能にする。UI は、出力データページを提供してもよい。出力データの UI ページは、ユーザが生成された結果の品質管理（QC）メトリック評価、ログ、および監査証跡とともに分析結果を監視することを可能にする。UI は、構成ページを提供してもよい。構成 UI ページは、ユーザがこのシステムを監視し、構成することを可能にする。

【0192】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、アプリケーションプログラミングインターフェース（API）が、Javaプラットフォームを通して提供され得る。例えば、Javaプラットフォームは、webベースのアプリケーション用のWeb Archive（WAR）ファイルをビルドするために使用され得るTomcatサーバを含んでもよい。

【0193】

分析パイプラインの様々なステップのコードモジュールは、Keplerワークフローエンジンのコンテキストではアクターと呼ばれる場合がある。例えば、分析ステップのコードモジュールが、アクターjarに含まれるJavaプログラムのバイナリコードによって実装されてもよい。Keplerワークフローエンジンは、ワークフローの処理コンポーネントを「アクター」として定義し、プロセッサによるアルゴリズムまたは分析パイプラインの実行のステップを連鎖させる。（<https://kepler-project.org>）。例えば、ケプラーワークフローエンジンを使用して、図49の分析パイプラインのワークフローを構成してもよい。

【0194】

サーバシステムは、1つ以上のデータベースを含み得る。例えば、サーバシステムは、サンプルデータ、ランデータ、およびシステム／ユーザ構成を格納するためのリレーショナルデータベースを含んでもよい。リレーショナルデータベースは、2つの別個のデータベース：アッセイ開発データベースおよびDxデータベース、を含み得る。アッセイ開発データベースは、サンプルデータ、ランデータ、およびRUO動作モード、すなわちアッセイ開発動作モードのシステム／ユーザ構成を格納し得る。Dxデータベースは、サンプルデータ、ランデータ、およびIVD動作モード、すなわちDx動作モードのシステム／ユーザ構成を格納し得る。

【0195】

サーバシステムは、注釈ソースデータを格納するための注釈データベースAnnotationDBを含み得る。例えば、注釈データベースは、NoSQLデータベースまたは非リレーショナルデータベース、例えばMongoDBデータベースとして実装されてもよい。各注釈ソースは、ソース名およびバージョンを示すメタ情報を有するJSON（JavaScript Object Notation）文字列として格納され得る。各注釈ソースは、注釈IDにキー設定された注釈のリストを含み得る。サーバシステムは、バリエーション情報を格納するためのバリエーションデータベース、VariomeDBを含み得る。例えば、バリエーションデータベースは、NoSQLデータベースまたは非リレーショナルデータベース、例えばMongoDBデータベースとして実装されてもよい。VariomeDBは、特定のサンプルのバリエーションコール結果のコレクションを格納し得る。例えば、JSON形式のレコードが、サンプルを識別するためのメタ情報を含んでもよい。

【0196】

例えば、AnnotationDBデータベースは、以下の注釈ソースのうちの1つ以上を格納してもよい。

【0197】

1. RefGeneモデル：hg19__refgene__63、バージョン63

【0198】

2. RefGene機能正規トランスクリプトスコア：hg19__refgeneScores__4、バージョン4

【0199】

3. dbSNP：dbSNP__138、バージョン138

【0200】

4. 正規RefSeqトランスクリプト：hg19__refgene__63、バージョン63

【0201】

5. 5000Exomes：hg__esp6500__1、バージョン1

【0202】

10

20

30

40

50

6. ClinVar: clinvar__1、バージョン1

【0203】

7. DGV: dgv__20130723、バージョン20130723

【0204】

8. OMIM: omim__03022014、バージョン03022014

【0205】

他の注釈ソースが含まれていてもよい。上記の注釈ソースの他のバージョンが含まれていてもよい。注釈ソースは、公開注釈情報コンテンツまたは専有注釈情報コンテンツを提供してもよい。

【0206】

バリオームデータベースのコールごとに、バリエーションに一致する注釈について各注釈ソースを照会することができ、バリエーションとともに、一致する注釈をバリオームデータベースにキー値のペアとして格納してもよい。注釈付きのバリエーションを、ユーザの結果ファイル、例えば注釈付きのVCFファイルに含めてもよい。VCFファイルは、遺伝子配列のバリエーションを格納するために使用されるタブ区切り形式のテキストファイルである。いくつかの実施形態では、本教示とともに使用するための注釈方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2016年1月28日公開の米国特許出願公開第2016/0026753号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよい。

【0207】

いくつかの実施形態では、サーバシステムは、シーケンシング装置によって実行されるアッセイのシーケンシングラン中に生成されたシーケンシングデータを処理するための分析パイプラインを含み得る。シーケンサーは、シーケンシングデータファイルおよび実験ログファイルをサーバシステムメモリに、例えば、生.datファイル、ブロック単位の1.wellsファイルを生成する既処理の.datファイル、およびサムネイルデータで転送する。分析パイプラインは、メモリからのデータファイルにアクセスし、ランのデータ分析を開始する。

【0208】

いくつかの実施形態では、分析パイプラインおよびオペレーティングシステム固有のバイナリをパッケージ化するために、DockerコンテナおよびDockerイメージが使用され得る。Dockerは、コンテナを使用することによってアプリケーションを作成し、デプロイし、ランするために使用されるツールである。コンテナは、ライブラリおよび他の依存関係などの、アプリケーションが1つのパッケージとしてバンドルする必要があるすべてのパーツを有するアプリケーションを可能にする。これにより、アプリケーションソフトウェアは、ホストシステムと同じLinuxカーネルを使用することが可能になる。Dockerイメージファイルは、分析パイプラインコードが必要とするライブラリおよびバイナリとともにパッケージ化されてもよい。Dockerを使用して、アプリケーションまたはアルゴリズムを新しいバージョンまたは異なるバージョンのオペレーティングシステム(OS)に適合させて、OSバージョンと互換性のあるアプリケーションのDockerイメージを作成してもよい。

【0209】

いくつかの実施形態では、サーバシステムは、シーケンシング装置から分析パイプラインへのデータ転送のためのクローラサービスを含み得る。クローラは、JAVA NIOウォッチャーAPI(アプリケーションプログラミングインターフェース)を使用して開発され得るイベントベースのサービスである。NIO(ノンブロッキングI/O)は、集中的な入力/出力(I/O)操作の特徴を提供するJavaプログラミング言語APIのコレクションである。クローラは、シーケンシング装置用に構成されたFTPディレクトリを監視して、ランデータをシーケンス装置から分析パイプラインに転送してもよい。

【0210】

図50は、一実施形態に従う、分析パイプラインのブロック図である。シーケンシング装置は、アッセイのシーケンシングラン中に生データファイル(DATまたは.datフ

10

20

30

40

50

ファイル)を生成する。シグナル処理を生データに適用して、1.wellsファイルなどのファイルの取り込みシグナル測定データを生成してもよく、これらのファイルは、ランのログ情報とともにサーバのFTPロケーションに転送される。シグナル処理ステップは、ウェルに対応するバックグラウンドシグナルを導出し得る。バックグラウンドシグナルは、対応するウェルの測定シグナルから減算され得る。残りのシグナルは、各ウェルの各ヌクレオチドの流れでの取り込みを推定するための取り込みシグナルモデルによって適合され得る。上記のシグナル処理からの出力は、ウェルごとおよびフローごとのシグナル測定値であり、1.wellsファイルなどのファイルに記憶され得る。

【0211】

いくつかの実施形態では、塩基コールステップは、位相推定、正規化を実行してもよく、ソルバーアルゴリズムをランして、最良の部分シーケンス適合を識別し、塩基コールを行う。シーケンス読み取りの塩基配列は、マッピングされていないBAMファイルに記憶される。塩基コールステップは、塩基コール品質を示すためのQC測定値として、読み取りの総数、塩基の総数、および平均読み取り長を生成し得る。塩基コールは、任意の好適なシグナル特性(例えば、シグナルの振幅または強度)を分析することによって行われ得る。本教示とともに使用するためのシグナル処理方法は、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2013年4月11日公開の米国特許出願公開第2013/0090860号、2014年2月20日公開の米国特許出願公開第2014/0051584号、および2012年5月3日公開の米国特許出願公開第2012/0109598号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよい。

【0212】

配列読み取りのための塩基配列が判定されると、配列読み取りは、例えば、マッピングされていないBAMファイルでアライメントステップに提供され得る。アライメントステップは、シーケンス読み取りを参照ゲノムにマッピングして、アライメントされたシーケンス読み取りと、関連付けられたマッピング品質パラメータと、を判定する。アライメントステップは、アライメント品質を示すためのQC指標として、マッピング可能な読み取りのパーセントを生成し得る。アライメント結果は、マッピングされたBAMファイルに記憶される。本教示とともに使用するための配列読み取りをアライメントするための方法は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2012年8月2日に公開された米国特許出願公開第2012/0197623号に記載される1つ以上の特徴を含み得る。

【0213】

BAMファイル形式の構造は、2014年9月12日の“Sequence Alignment/Map Format Specification”(https://github.com/samtools/hts-specs)に記載されている。本明細書に記載されるように、「BAMファイル」は、BAM形式と互換性のあるファイルを指す。本明細書に記載されるように、「マッピングされていない」BAMファイルは、アライメントされた配列読み取り情報またはマッピング品質パラメータを含まないBAMファイルを指し、「マッピングされた」BAMファイルは、アライメントされた配列読み取り情報およびマッピング品質パラメータを含むBAMファイルを指す。

【0214】

いくつかの実施形態では、バリエーションコールステップは、一塩基多型(SNP)、挿入および欠失(Indel)、マルチヌクレオチド多型(MNP)、および複雑なブロック置換イベントを検出することを含み得る。様々な実施形態では、バリエーションコーラーを、サンプルゲノムに対して呼び出されたバリエーションを*.vcf、*.gff、または*.hdfデータファイルとして伝達するように構成することができる。呼び出されたバリエーション情報は、分析のために解析するか、または抽出することができる限り、任意のファイル形式を使用して呼び出されたバリエーション情報を伝達することができる。本教示とともに使用するためのバリエーション検出方法は、2013年12月26日公開の米国特許出願公開第2013/0345066号、2014年10月2日公開の米国特許出願公開第2014/0296080号、2014年2月20日公開の米国特許出願公開第2014/00

52381号、および2018年4月24日発行の米国特許第9,953,130号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよく、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、バリエーションコールステップは、分子タグ付き核酸配列データに適用され得る。分子タグ付き核酸配列データのバリエーション検出方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2018年11月22日公開の米国特許出願公開第2018/0336316号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよい。

【0215】

いくつかの実施形態では、分析パイプラインは、融合検出のための融合分析パイプラインを含み得る。融合検出方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2016年1月21日公開の米国特許出願公開第2016/0019340号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよい。いくつかの実施形態では、融合分析パイプラインは、分子タグ付き核酸配列データに適用され得る。分子タグ付き核酸配列データの融合検出方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2019年3月21日公開の米国特許出願公開第2019/0087539号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよい。

【0216】

いくつかの実施形態では、分析パイプラインは、コピー数変異を検出するためのコピー数変異分析パイプラインを含み得る。コピー数変異を検出するための方法は、2014年9月11日公開の米国特許出願公開第2014/0256571号、2012年2月23日公開の米国特許出願公開第2012/0046877号、および2016年4月14日公開の米国特許出願公開第2016/0103957号に記載された1つ以上の特徴を含んでもよく、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0217】

いくつかの実施形態では、サーバシステムソフトウェアは、アッセイ名、アッセイタイプ、パネル、存在する場合にホットスポットファイル、参照名、存在する場合に対照名、品質管理QC閾値、存在する場合にアッセイの説明、データ分析パラメータおよび値、装置ランスクリプト名、ならびにアッセイを定義する他の構成を含むカプセル化されたアッセイ構成をサポートし得る。情報のセット全体は、アッセイ定義と呼ばれる。アッセイ構成コンテンツおよび対応するワークフローは、アッセイ定義ファイル(ADF)のモジュラーソフトウェアコンポーネントとしてユーザにデリバリされ得る。サーバシステムソフトウェアは、アッセイ構成を含むアッセイ定義ファイルをインポートし得る。インポートプロセスは、暗号化されたDebianファイルを含み、かつインストールプロセスをトリガするzipファイルのインポートによって開始され得る。ユーザインターフェースは、ユーザがインポートするADFを選択するためのページを提供し得る。クラウドベースのサポートおよびリソースシステムのアプリケーションストアは、ユーザのローカルサーバシステムにダウンロードするためにユーザによる選択が利用可能な様々なアッセイ、パネル、およびワークフローをサポートするADFを記憶する。

【0218】

アッセイ定義ファイル(ADF)は、分子テストまたはアッセイの構成を定義するカプセル化されたファイルであり、アッセイ名、技術プラットフォーム構成(例えば、次世代シーケンシング(NGS)、チップタイプ、化学タイプ)、ワークフローステップ(サンプル調製、装置スクリプト、分析、レポート)、分析アルゴリズム、規制標記(例えば、研究使用のみ(RUO)、インビトロ診断(IVD)、中央ヨーロッパのインビトロ診断(CE-IVD、内部使用のみ(IUO))、など)、標的マーカー(パネル)、参照ゲノムバージョン、消耗品、対照、QC閾値、レポート遺伝子およびバリエーションを含む。ADFは、ローカルシーケンシング装置のアッセイ能力を構築するためのモジュラーアプローチを提供する。アッセイソフトウェアは、シーケンシング装置のプラットフォームソフトウェアとは別個にADFによって提供され得る。

【0219】

アッセイ構成にADFを使用する利点は、以下を含む：

アッセイワークフローおよび分析のカプセル化

シングルクリックでのインストール

プラットフォームソフトウェアからの分離を可能にする Docker 実装によるソフトウェアのモジュール構造であるため、アッセイ構成のソフトウェア更新後に再検証が必要とされない

セキュアな配信のための多層暗号化

相手先ブランド名製造 (OEM) のアッセイ構成の合理化されたサポート

レポート作成の合理化されたカスタマイズ

地域の規制要件のサポート

プラグアンドプレイ形式は、技術にとらわれないワークフローをサポートする

分子検査メニューの迅速な拡張と実験室によるアッセイの採用とを可能にする

10

【0220】

いくつかの実施形態では、アッセイ定義ファイル (ADF) は、以下のステップ 1) ライブラリ調製、2) 鋳型化、3) シーケンシング、4) 分析、5) バリエーション解釈、および 6) レポート生成、のうちの 1 つ以上のためのソフトウェアコードモジュールを含み得る。ライブラリ調製および鋳型化のワークフローステップについて、ADF は、ライブラリの調製、鋳型化、および鋳型化されたビーズの濃縮のためのスクリプトを含み得る。シーケンシングおよび分析のワークフローステップについて、ADF は、アルゴリズムバイナリコードと、図 50 に関して記載された分析パイプラインのパラメータと、の Docker イメージパッケージを含み得る。バリエーション解釈のワークフローステップについて、ADF は、バリエーションの分析および注釈付けに使用され得る注釈ソースのリストを含み得る。レポート生成のワークフローステップについて、ADF は、レポートの生成時に使用するためのレポート鋳型および画像ファイルを含み得る。

20

【0221】

ADF は、シーケンシング装置に対するワークフローステップの制御のための装置スクリプトを含み得る。例えば、スクリプトは、ピペッティングおよびロボット制御の量を制御するパラメータを含み得る。装置スクリプトは、特定のアッセイ用にカスタマイズされ得る。

【0222】

例えば、シーケンシングおよび分析のステップについて、ADF は、エンドツーエンドの分析パイプラインの Docker イメージを含み得る。Docker イメージは、分析パイプラインの各ステップのアルゴリズム用の OS 固有のライブラリおよびバイナリを含み得る。アルゴリズムバイナリは、図 50 に関して記載されたものなどの、シグナル処理、塩基コール、アライメント、およびバリエーションコールを含む分析パイプラインのステップを含み得る。別の例では、ADF Debian ファイルは、シグナル処理、塩基コール、および RNA Counts のコードモジュールなどの、特定のアッセイ用の特定のコードモジュールをパッケージ化し得る。

30

【0223】

ADF は、試薬キットを構成するためのスクリプトを含み得る。これらのスクリプトは、シーケンシングランに必要とされる消耗品の計算をサポートする。ADF に含まれる構成スクリプトは、以下のうちの 1 つ以上を含み得る：

40

バーコードセットおよびチップ

サンプル対照構成 (例えば、サンプルインライン対照) とその QC パラメータとを関連付ける能力を含む、ライブラリキットおよび消耗品

内部対照と QC パラメータとを関連付ける能力を含む、鋳型化キットおよび消耗品

内部対照と QC パラメータとを関連付ける能力を含む、シーケンスキット

【0224】

ADF は、1 つ以上の参照ゲノムファイルを含み得る。参照ゲノムの例として、hg19 および GRCh38 が挙げられる。参照ゲノムファイルは、ワークフロー情報とともにメイン ADF にパッケージ化され得る。代わりに、参照ゲノムファイルは、メイン ADF を補足する別個の ADF にパッケージ化されてもよい。

50

【0225】

A D F は、融合パネルおよび融合標的領域パネルのワークフロー用のコードモジュールを含み得る。A D F は、分析用の融合標的領域参照ファイルおよびホットスポットファイルを含み得る。

【0226】

A D F は、ユーザによって構成され得るワークフローの様々なポイントにアッセイパラメータを含み得る。構成可能なパラメータは、ユーザによる調整のためにユーザインターフェースに表示され得る。新しいパラメータは、任意のアクターレベルで追加され得る。構成可能なパラメータは、分析パイプラインに渡され得る。構成可能なアッセイパラメータの入力形式は、1つ以上の単一文字列テキスト、ブール値、複数行テキスト、浮動小数点、ラジオボタン、ドロップダウン、およびファイルアップロードを含み得る。例えば、ファイルアップロードは、`.properties` および `.json` などのファイル形式を使用し得る。

10

【0227】

A D F は、ワークフローの様々なポイントで品質管理およびアッセイ性能閾値に使用される Q C パラメータを含み得る。例えば、Q C パラメータのタイプとして、ラン Q C パラメータ、サンプル Q C パラメータ、内部対照 Q C パラメータ、およびアッセイ固有の Q C パラメータが挙げられる。Q C パラメータは、1つ以上のデータ型（例えば、整数、浮動小数点）、下限、上限、およびデフォルト値によって定義され得る。

【0228】

20

A D F は、所与のアッセイのデータベースから選択された結果表現用の指定されたデータタブ列を含み得る。選択されたデータタブ列は、結果のユーザインターフェース表示の構成と、アッセイの P D F レポートに含める列と、をサポートする。A D F は、所与のアッセイの結果表示のための画像ファイルを含み得る。A D F は、P D F レポートの複数言語のサポートを含み得る。A D F は、所与のアッセイの分析パイプラインによって生成される任意のファイルのダウンロードファイルリストを含み得る。サンプルまたはランのファイルリストは、ユーザインターフェースに表示され得る。A D F は、遺伝子リストを含み得る。遺伝子リストを使用して、所与のがんタイプの既知の遺伝子リストをユーザインターフェースに P D F レポートで表示し得る。

【0229】

30

A D F は、所与のアッセイに使用されるプラグインのセットを含み得る。A D F は、プラグインとそれらのバージョンとのセットを指定し得る。A D F がプラグインのバージョンを指定しない場合、サーバシステムにインストールされたプラグインの最新バージョンが、所与のアッセイに使用され得る。

【0230】

A D F は、カスタムアッセイの作成をサポートするための新しいワークフロー鑄型を含み得る。新しいワークフロー鑄型は、一連のアッセイシェブロンステップのセットを含み得る。ステップのパラメータが表示され得る。

【0231】

A D F は、新しい注釈セットの構成をサポートするための、注釈ソースおよびセットのリストを含み得る。A D F は、所与のアッセイの分析パイプラインによって検出されたバリエーションに適用されるフィルターチェーンを含み得る。A D F は、バリエーションの注釈用のルールセットを含み得る。

40

【0232】

A D F を、異なるタイプのアッセイをサポートするように構成することができる。例としては、腫瘍学関連のアッセイ（例えば、Thermo Fisher Scientific 製の Oncomine アッセイ）、免疫腫瘍学関連のアッセイ（例えば、T 細胞受容体（TCR）、マイクロサテライト不安定性（MSI）、および腫瘍突然変異荷重（TML））、感染症関連アッセイ（例えば、microbiome）、生殖ヘルス関連アッセイおよびエクソーム関連アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。A D F を、カ

50

スタムアッセイ用に構成することもできる。

【0233】

図51は、一実施形態による、アッセイ定義ファイルを生成する概略図である。アッセイ定義は、ファイルのコピーとアッセイ情報のデータベースポピュレーションとを開始してDebianファイルを形成する、build.sh、debscripts、およびmakelib.shによって、生成され得る。アッセイ定義の内容は、アッセイパラメータ、BEDファイル（ブラウザー拡張可能データファイル-BEDファイルが、染色体の位置または領域を定義する）、パネルファイル、遺伝子リスト、ホットスポットファイル（典型的にはバリエーションを含む遺伝子内の領域を定義するBEDまたはVCFファイル）、および許容される試薬を含むシードデータを含み得る。アッセイ定義の内容は、異なる言語でのアッセイ情報の表示をサポートするアッセイ名、説明、およびレポートメッセージの局在化されたバージョンを含み得る。アッセイ定義ファイルは、新しい分析パイプラインのパッケージ化をサポートし得る。ADFは、アッセイのタイプに基づいて、バリエーションコール、融合コール、およびCNVコールのために実行され得る任意選択的な後処理スクリプトを含み得る。ADFは、特定の分析パイプラインのバイナリへの更新の、任意選択的なDockerコンテナイメージを含み得る。オペレーティングシステムまたはサードパーティライブラリなどのプラットフォームの変更が、アッセイの結果またはこのシステムの機能に影響を与えないように、DockerコンテナイメージをADFとともにパッケージ化し得る。

【0234】

不正な修正を防ぐために、Debianファイルをシリアル化し得る。シリアル化されたアッセイ定義を、対称鍵アルゴリズムである高度暗号化標準（AES）を使用してさらに暗号化してもよい。アッセイメタ情報を含むテキストファイルもまた、AESおよび同じ暗号キーを使用して暗号化してもよい。暗号化されたアッセイ定義ファイルを、暗号化されたメタ情報ファイルと合わせてzipフォーマットに圧縮してもよい。他の暗号化フォーマットもまた、シリアル化されたアッセイ定義情報に適用してもよい。例えば、メタ情報は、以下のうちの1つ以上を含み得る：

分析パイプラインバージョン、

参照ゲノムファイルロケーションの参照ゲノムパス、

アッセイの一意の名称-このシステム中の一意の出現をチェックするためのアッセイの内部名、

Dockerイメージ名-分析の起動とアッセイに依存するファイル参照のインストールとに使用される、

分析パイプラインの起動に必要とされる任意の依存性パッケージ名。

【0235】

図52は、アッセイ定義ファイルのパッケージ化の例の概略図である。圧縮フォーマット40の圧縮アッセイ定義ファイルは、シリアル化および暗号化されたアッセイ定義Debianパッケージング41、シリアル化および暗号化されたメタ情報テキストファイル42、ならびにシリアル化および暗号化された任意選択的なDockerイメージDebianパッケージング43を含み得る。サーバシステムは、アッセイ定義Debianファイルをインストールする前に、メタ情報テキストファイル42とアッセイ定義シリアル化ファイル41との両方を復号化し得る。

【0236】

サーバシステムおよびモジュラーソフトウェアコンポーネントは、RUE、すなわちADモード、およびIVD、すなわちDXモードを含む、複数の機能モードを制御するように構成され得る。図1を参照すると、Tomcat Serverは、RUEモード用のウェブArchive（WAR）ファイルとIVDモード用のWARファイルとを含むように構成され得る。サーバシステムは、RUEアッセイによって検出されたバリエーションのためのRUEバリウムデータベースと、IVDアッセイによって検出されたバリエーションのためのIVDバリウムデータベースと、を含むように構成され得る。サーバシステム

は、R U OモードおよびI V Dモード用に別個の分析パイプラインと関連付けられたK e p l e rワークフローエンジンとを含むように構成され得る。R U Oアッセイ用のR U O D o c k e rイメージファイルは、I V Dアッセイ用のI V D D o c k e rイメージファイルとは別個のファイルとして構成され得る。リレーショナルデータベースは、別個のデータベース：R U Oモード用のアッセイ開発（A D）データベースとI V Dモード用のD xデータベースとを有するように構成され得る。最初にR U Oモードのみをサポートするサーバシステムは、ソフトウェアアップデートによってR U OモードおよびI V Dモードをサポートするように構成され得る。

【0237】

A D Fは、R U OモードアッセイとI V Dモードアッセイとに別個に生成され得る。R U OモードA D Fは、研究で使用されるアッセイのアッセイ定義を含み得る。R U OモードA D Fは、サードパーティによって開発され得る。I V DモードA D Fは、診断に使用するための地域の規制要件に準拠したアッセイのアッセイ定義を含む。

【0238】

アッセイ

自動シーケンシング装置を、多様な標的アッセイでの使用に適合させることができる。例えば、標的アッセイは、化学物質の中でもとりわけ、I o n A m p l i s e q、I o n A m p l i s e q H Dなどの化学物質を利用することができる。例えば、自動シーケンシング装置を、ライブラリ調製アッセイの中でもとりわけ、R N A - s e q、D i f f - S e q、またはS 1 - s e qなどのアッセイでの使用に適合させることができる。他の例示的なアッセイとして、とりわけ、O n c o m i n eがんアッセイ、例えば、O C A v 3、O n c o m i n eフォーカスアッセイ、またはO n c o m i n e T C RベーターL Rアッセイが挙げられる。

【0239】

このアッセイを、供給源の中でもとりわけ、綿棒、血液、F F P E組織サンプル、c f T N Aから供給された核酸とともに使用することができる。核酸は、D N AまたはR N Aの形態であり、任意選択的にC D N Aに変換され得る。

【0240】

アッセイは、例えば10～24000の範囲の多数のプライマーペアを有することができる。例では、プライマーペアの数は、100～500の範囲または150～300の範囲などの、100～1000の範囲であり得る。別の例では、プライマーペアの数は、400～4000の範囲などの、300～5000の範囲である。

【0241】

アッセイは、50～200の範囲または75～125の範囲などの、50～500の範囲の平均アンプリコンサイズを有するライブラリを産生することができる。別の例では、アンプリコンサイズは、200～400または200～300などの、200～500の範囲であり得る。

【0242】

アッセイを、単一のプールで実行することもできるし、複数のプールを利用することもできる。例えば、アッセイは、単一のD N Aプールを使用することができる。別の例では、アッセイは、2つのD N Aプールを利用する。さらなる例では、アッセイは、2つのR N Aプールを利用する。特定の例では、アッセイは、2つのD N Aプールおよび2つのR N Aプールを利用する。

【0243】

プレシーディング（またはシーディング）および鋳型化

一般に、核酸の分析（例えば、シーケンシング）の前に、分析で生成されたシグナルの最適な検出のために、核酸の量が増加される。典型的には、アンプリコンと呼ばれる核酸の多くのコピーは、増幅によって生成される。これらのコピーは、多くの場合、分析用の鋳型と呼ばれる。例えば、合成法によるシーケンシングでは、アンプリコンは、ヌクレオチドの重合の鋳型として機能し、このことは、検出され、配列判定のためのデータを提供

10

20

30

40

50

する。いくつかの事例では、2つ以上、または複数の異なる核酸配列が、同時に増幅され、次いで、また同時にシーケンシングされ得る。例えば、異なる核酸の同時増幅のいくつかの方法では、増幅は、増幅されている核酸集団中の異なる核酸の各々に存在する配列に相補的であるユニバーサルプライマーのペアを使用して行われるが、増幅されている集団の異なる核酸の配列の残りは、各核酸（すなわち、核酸のポリクロナルの集団）で異なる。そのような事例では、ポリクロナルの集団内の多様な核酸分子の異なる特性が、アッセイ、例えばシーケンシング、のデータの解釈を複雑にする可能性があるため、各々の異なる核酸から生成されるアンプリコンのモノクローナリティーが、多くの場合、望ましい。

【0244】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、分析される核酸は、分析を行う前に増幅される。いくつかの実施形態では、分析される核酸は、例えば核酸鋳型化プロセスで、核酸のアンプリコンのモノクローナルの、または実質的にモノクローナルの集団を生成するためにクローン的に増幅される。いくつかの実施形態では、複数の核酸のポリクロナルの集団内の異なる核酸は、クローン的に増幅されて、異なる核酸の区切られたモノクローナルの、または実質的にモノクローナルの集団を生成する。

【0245】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、サンプル中の核酸分子を使用して、下流のシーケンシングに好適な核酸分子のコレクションまたはライブラリを調製する。いくつかの実施形態は、ライブラリ調製の前、間、または後の標的濃縮ステップを含む。標的遺伝子座または関心の領域を含む標的核酸分子を、例えば、マルチプレックス核酸増幅またはハイブリダイゼーションにより濃縮することができる。多様な方法を使用して、マルチプレックスPCRなどのマルチプレックス核酸増幅を実行して、アンプリコンを生成することができ、本方法の実施形態のいずれかで使用することができる。任意の方法による濃縮に、ユニバーサル増幅反応を続けることができる。

【0246】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、分析される、例えばシーケンシングされる、1つ以上の核酸を鋳型化プロセスで増幅して、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの鋳型核酸の集団を生成する。本明細書で提供される機器、デバイス、システム、組成物、およびキットと組み合わせた鋳型化方法は、迅速な、効率的な、かつ費用対効果が良い核酸の実質的にモノクローナルの集団を生成するか、含有するか、単離するか、移送するか、複製するか、または操作するためのプロセスおよび組成物を組み込むと同時に、既存の方法と比較して、重複するか、無情報の、誤った、または空白の読み取りの数が減少した、高品質核酸シーケンシング読み取り、またはより長い長さの核酸シーケンシング読み取りの生成の大幅な増加を提供する。いくつかの実施形態では、鋳型化プロセスは、例えば固体支持体または表面などの、1つ以上の表面または支持体に核酸が付着している、鋳型核酸の1つ以上のモノクローナルまたは実質的にモノクローナルの集団を生成する。鋳型核酸分子は、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による物理吸着を含むがこれらに限定されない任意の方法によって、表面または支持体に固定化され得る。いくつかの実施形態では、支持体または表面上の部位は、核酸のコレクション（例えば、核酸ライブラリ、増幅された標的、または核酸ライブラリまたはサンプルの一部）からの1つの核酸分子、または限られた数の主に実質的に同一の、またはモノクローナルの核酸分子でプレシーディングされて、単一の核酸分子に、または核酸の局在化した実質的にモノクローナルの集団に付着した個々の支持体または部位（例えば、下流のシーケンシング法で明確に分析できる付着部位）を提供する。そのようなプレシーディングされた支持体または表面を、容易に操作され、例えば鋳型化反応でクローン的に増幅できる、別個の単一核酸分子の、または2つ以上の実質的に同一の

10

20

30

40

50

、もしくはモノクローナルの核酸分子の、クリーンな、閉じ込められた、含有された、または分離された供給源として使用して、シーケンス結果を改善するための高スループットシーケンシングワークフローで使用するための、比較的純粋な、閉じ込められた、含有された、または分離された核酸鑄型のコレクションを生成する。よって、本明細書で提供される核酸を操作する方法のいくつかの実施形態または態様では、プレシーディング反応は、例えば高スループットシーケンシングワークフローで、鑄型化反応の前に、または同時に実行される。

【0247】

本明細書で提供される方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、表面または支持体、例えば固体表面または支持体、上の鑄型核酸の増幅が2つ以上の反応で実行され、これらの反応は、例えば、1つの鑄型核酸分子が付着した1つ以上のプレシーディングされた支持体または表面部位、または付着した鑄型核酸分子の実質的にモノクローナルの集団を生成する1つ以上のプレシーディング反応と、これに続く、付着した鑄型核酸分子または1つ以上の支持体または部位上の分子のコピー（例えば、少なくとも10倍以上のコピー）を生成する、プレシーディングされた支持体または部位上の1つ以上の鑄型化反応を含む。したがって、いくつかの実施形態では、鑄型化反応混合物は、1つ以上のプレシーディングされた支持体または表面を含む。プレシーディング反応および鑄型化反応を実行する利点の1つは、このワークフローが高スループットシーケンシング反応でより高品質のシーケンシング読み取りを生成することである。いくつかの実施形態では、核酸分子は、複数の部位、ビーズもしくはマイクロ粒子、またはアレイの反応チャンバを含む支持体上の部位などの支持体上に直接増幅される。例えば、核酸分子を、反応部位またはチャンバ（例えば、ウェルまたはマイクロウェル）の支持体上にプレシーディングすることができるか、または溶液中に大量に支持体上にプレシーディングしてから、例えば固体支持体または表面上の、反応部位に分配することができる。異なる部位は、任意選択的に、部位のアレイのメンバーである。アレイは、表面上の部位の二次元アレイ（例えば、フローセル、電子デバイス、トランジスタチップ、反応チャンバ、チャネルなどの）、またはマトリックスまたは他の媒体（例えば、固体、半固体、液体、流体など）内の部位の三次元アレイを含むことができる。いくつかの実施形態では、ウェルまたは反応部位は、ウェルまたは反応部位ごとに1つのプレシーディングされた支持体を含む。いくつかの実施形態では、ウェルまたは反応部位に分配されたプレシーディングされた支持体に付着した鑄型核酸は、次いで、1つ以上の鑄型化反応を経て、鑄型が支持体上で増幅されて、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの、鑄型核酸の集団を生成する。代わりに、プレシーディング反応の前に、核酸を、異なる部位に局在化するか、堆積するか、または位置決めする。一例では、支持体を、ウェルのアレイに分配することができ、核酸分子を、固体支持体がウェルのアレイの所定位置に保持されている間に、固体支持体上にプレシーディングすることができる。いくつかの実施形態では、ウェルまたは反応部位の支持体上にプレシーディングされた鑄型核酸は、次いで、1つ以上の鑄型化反応を経て、鑄型が支持体上で増幅されて、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの、鑄型核酸の集団を生成する。いくつかの実施形態では、核酸増幅のための方法は、1つ以上の、または2つ以上の、または複数の表面もしくは支持体、または表面もしくは支持体の集団を含む。

【0248】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるプレシーディング（またはシーディング）方法は、核酸分子（例えば、一本鎖核酸）を、支持体または表面に結合しているか、またはこれら上に固定化された相補的核酸、例えばオリゴヌクレオチドまたはプライマー、にハイブリダイズさせることを含む。そのような方法は、典型的には、短期間にわたるアニーリング条件下で実行される。いくつかの実施形態では、シーディング方法は、支持体、例えばビーズ、粒子、または表面上の部位などの固体支持体、が支持体に付着した1つのみの核酸分子を有する条件下でハイブリダイズすることを伴う。そのような条件は、例えば、核酸の集団（例えば、ライブラリから、増幅された標的、または核酸ライブラリ

10

20

30

40

50

の一部分、または核酸のサンプル)を、アニーリング条件下で、核酸分子の数に対して実質的に過剰の支持体または部位と接触させることを含む。例えば、いくつかの実施形態では、支持体対核酸分子比(または部位対核酸分子)は、支持体に付着した鑄型核酸分子の、単一の鑄型ポリヌクレオチド分子、またはモノクロナルの、または実質的にモノクロナルの集団を有する支持体のパーセンテージを最適化するように選択される。例えば、プレシーディングを、少なくとも約1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、50:1、75:1、または100:1の支持体対核酸分子(または部位対核酸分子)比で実行することができる。いくつかの実施形態では、プレシーディング(またはシーディング)方法は、支持体上に固定化されたプライマーへの鑄型核酸のハイブリダイゼーションの前の、またはこれと同時の、ライブラリまたはサンプル核酸の操作(例えば、変換)をさらに含む。そのような操作は、例えば、1つ以上のアダプタヌクレオチド配列の付加、または核酸増幅を含むことができる。

【0249】

いくつかの実施形態では、1つ以上のプレシーディングされた支持体は、プレシーディング反応混合物を使用して、プレシーディング(またはシーディング)反応中に形成される。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、以下のうちのいくつかまたはすべてを含む:核酸分子の集団、1つ以上の支持体または表面、ポリメラーゼ、第1のプライマーの集団、ヌクレオチド、第2のプライマーの集団、二価カチオン、または拡散制限剤。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、1つ以上の、または少なくとも2つの核酸分子であって、同じまたは異なる配列、第1のプライマーの集団(これらが溶液中にあってもよいし、なくてもよい)、またはそれらのうちのいくつかは溶液中にあってもよいし、またはそれらのうちのいくつかは支持体に固定化されてもよい)、第2のプライマーの集団(これらが溶液中にあってもよいし、なくてもよい)、および任意選択的に1つ以上の支持体または表面を有することができる核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の支持体または表面は、例えば支持体または表面に付着する核酸分子の増幅の1つ以上のサイクルの後に、プレシーディング反応中の特定の時間に反応混合物に導入される。いくつかの実施形態では、1つ以上の支持体または表面は、それらに付着した、第1のプライマーの集団、または第1のプライマーに含有される配列の集団を有する。いくつかの実施形態では、支持体のうちの少なくとも1つ、いくつか、またはすべては、互いに実質的に同一である、第1のプライマーの集団、または第1のプライマーに含有される配列の集団を含む。いくつかの実施形態では、支持体上のプライマーのすべては、互いに実質的に同一であるか、またはすべてが、実質的に同一の第1のプライマー配列、または第1のプライマーに含有される配列を含む。いくつかの実施形態では、支持体のうちの少なくとも1つは、支持体に付着した2つ以上の異なるプライマーを含む。例えば、少なくとも1つの支持体は、第1のプライマーの集団、または第1のプライマーに含有される配列の集団、および第2のプライマーの集団を含むことができる。支持体を、ユニバーサルプライマーに付着させることができる。ユニバーサルプライマーは、任意選択的に、反応混合物内の鑄型核酸分子のすべて、または実質的にすべてにハイブリダイズする(またはハイブリダイズすることができる)。反応混合物は、第1の標的特異的プライマーに共有結合的に付着した第1の支持体と、第2の標的特異的プライマーに共有結合的に付着した第2の支持体と、を含むことができ、第1および第2の標的特異的プライマーは、互いに異なる。任意選択的に、第1の標的特異的プライマーは、第1の標的核酸配列に実質的に相補的であり、第2の標的特異的プライマーは、第2の標的核酸配列に実質的に相補的であり、第1および第2の標的核酸配列は、異なる。いくつかの実施形態では、反応混合物は、複数の異なる支持体または表面を含み、例えば、プレシーディング反応混合物は、1つ以上のビーズ(粒子、ナノ粒子、マイクロ粒子など)を含み、少なくとも2つの異なる鑄型核酸分子が、異なるビーズに付着し、それによって、少なくとも2つの異なるビーズを形成し、これらの各々は、異なる鑄型核酸分子に付着する。いくつ

10

20

30

40

50

かの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、単一の表面（例えば、平面様の表面、フローセル、または反応チャンバのアレイ）を含み、少なくとも2つの異なる鑄型核酸分子が、表面上の2つの異なる領域、部位、または場所上に増幅され、それによって、2つ以上の鑄型核酸分子に付着した単一の表面を形成する。いくつかの実施形態では、支持体または表面は、第2のプライマーの複数の事例を含み、この方法は、ブリッジPCRのように、少なくとも1つの伸長した第1のプライマー鎖を支持体または表面の第2のプライマーにハイブリダイズさせることを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、核酸分子のうちの1つ以上の核酸分子、複数の核酸分子または核酸分子の集団、例えば、二本鎖または一本鎖核酸、ならびに複数の第1のプライマー、または付着した第1のプライマーに含有される複数の配列を有する1つ以上の、または複数の支持体または表面を含み、核酸分子は、第1のプライマーと実質的に相補的な、または実質的に同一のヌクレオチドの配列（すなわち、第1のプライマー結合配列）を含有し、プレシーディング反応混合物は、任意選択的に、ポリメラーゼおよびヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、溶液中にあり得る第2のプライマーをさらに含む。核酸分子は、任意選択的に、第2のプライマー結合配列を含有することができる。いくつかの実施形態では、反応混合物は、鑄型核酸分子内の配列に結合する第1のプライマーの集団および第2のプライマーの集団を含む。第1のプライマーの集団は、同一の、または実質的に同一のコピー、または異なる配列であり得る。第2のプライマーの集団は、同一の、または実質的に同一のコピー、または異なる配列であり得る。いくつかの実施形態では、第1のプライマーおよび任意選択的な第2のプライマーの集団は、ユニバーサルプライマーであり（またはユニバーサルプライマーの配列を含有する）、第1のプライマーのすべてのコピーは、同一であり、第2のプライマーのすべてのコピーは、同一である。したがって、いくつかの実施形態では、第1のプライマーの集団および第2のプライマーの集団は両方とも、鑄型核酸分子上のユニバーサルプライマー結合配列に結合するユニバーサルプライマーである（またはユニバーサルプライマーの配列を含有する）。いくつかの実施形態では、プレシーディング混合物は、リコンビナーゼ、および任意選択的にリコンビナーゼアクセサリタンパク質を含む。

【0250】

いくつかの実施形態では、プレシーディングまたは鑄型化反応は、ヌクレオチドの重合を触媒することができる1つ以上の酵素を使用する。本明細書で提供される実施形態のいずれかで、重合が可能な1つ以上の酵素は、少なくとも1つのポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼまたはリガーゼの1つのタイプまたは混合物との反応が行われる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのポリメラーゼは、熱安定性または熱不安定性ポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのポリメラーゼは、任意の好適な条件下で少なくとも1つのヌクレオチドを重合させるか、または組み込むのに十分な触媒活性を維持する、DNAもしくはRNAポリメラーゼ、またはその突然変異バージョンの、生物学的に活性な断片を含む。ポリメラーゼは、任意選択的に、エキソヌクレアーゼ活性を有するか、または欠くことができる。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性、3'→5'のエキソヌクレアーゼ活性、またはその両方を有する。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、そのようなエキソヌクレアーゼ活性のうちのいずれか1つ以上を欠く。ポリメラーゼの例として、Taq DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Sau DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Bsu DNAポリメラーゼ、クレノウ、ならびにそれらの断片および誘導体が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリメラーゼは、鎖置換活性を有する。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、67 kDaのバチルスステアロサーモフィラスDNAポリメラーゼタンパク質（大型断片）であり、アクセッション番号2BDP_Aで例示され、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を欠く。他のポリメラーゼとして、Thermus aquaticusからの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）、Escherichia

10

20

30

40

50

*coli*からの*Eco* DNAポリメラーゼI（アクセッション番号P00582）、*Aquifex aeolicus*からの*Aea* DNAポリメラーゼI（アクセッション番号067779）、またはその機能的断片またはバリエーションが挙げられる。別の例示的なポリメラーゼは、*Bsu* DNAポリメラーゼ（大型断片（NEB））である。*Bsu* DNAポリメラーゼI、大型断片は、*Bacillus subtilis* DNAポリメラーゼI（1）の5'→3'ポリメラーゼ活性を保持するが、5'→3'エキソヌクレアーゼドメインを欠く。特定の実施形態では、*Bsu* DNAポリメラーゼの大型断片は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を欠く。特定の実施形態では、例えば、反応がRPAを含む場合、重合が可能な1つ以上の酵素は、T5またはT7 DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、重合が可能な1つ以上の酵素は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を低下させる1つ以上のアミノ酸突然変異を有するT5またはT7 DNAポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態では、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を低下させる1つ以上のアミノ酸突然変異を有するT5またはT7 DNAポリメラーゼは、T5またはT7 DNAポリメラーゼのプロセシビティを途絶させるアミノ酸突然変異を含有しない。いくつかの実施形態では、T5またはT7 DNAポリメラーゼは、検出可能な3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を排除する1つ以上のアミノ酸突然変異を含み、1つ以上のアミノ酸突然変異は、T5またはT7 DNAポリメラーゼのプロセシビティを途絶させない。特定の例示的な実施形態では、プレシーディングまたは鋳型化反応混合物は、*Sau*ポリメラーゼ、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が低下したT7 DNAポリメラーゼ、*Bsu*ポリメラーゼ、またはそれらの組み合わせを含み、これらは、RPA反応に特によく適している。

10

20

【0251】

プレシーディング反応混合物、ならびに鋳型化反応混合物を含む、本明細書で提供される方法での他の増幅反応は、伸長反応の基質としてポリメラーゼによって使用されるヌクレオチドまたはその類似体の供給源を含み得る。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、鋳型核酸分子の鎖伸長のためのヌクレオチド（dNTP）を含み、1つ以上の支持体に付着した鋳型核酸分子配列の、1つの、または実質的にモノクロナルの集団をもたらす。いくつかの実施形態では、ヌクレオチドは、外因的に標識されていない。例えば、ヌクレオチドは、蛍光部分、色素、または他の外因性の光学的に検出可能な標識を含まない、天然に存在するヌクレオチドまたは合成類似体であり得る。任意選択的に、ヌクレオチドは、核酸合成を終結させる基（例えば、ジデオキシ基、可逆的ターミネーターなど）を含まない。他の実施形態では、ヌクレオチドは、標識またはタグを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物または鋳型化反応混合物は、1つ以上の補因子を含む。補因子として、例えば、別の反応成分、例えば酵素、の活性を増強するか、または調節する組成物が挙げられる。いくつかの実施形態では、補因子は、1つ以上の二価カチオンを含む。二価カチオンの例として、マグネシウム、マンガン、およびカルシウムが挙げられる。様々な実施形態では、プレシーディングまたは鋳型化反応混合物は、1つ以上の二価カチオンを含有する緩衝液を含む。例示的な実施形態では、緩衝液は、マグネシウムまたはマンガンイオンを含有する。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応または鋳型化反応は、補因子、特に二価カチオン、の添加によって開始される。いくつかの実施形態では、核酸増幅のために本明細書で使用されるプレシーディング反応混合物または鋳型化反応混合物は、核酸上のリコンビナーゼアセンブリの、または相同核酸対合の、少なくとも1つの補因子を含み得る。

30

40

【0252】

いくつかの実施形態では、プレシーディング反応は、（i）一端または両端に標的配列および1つ以上のアダプタ配列（例えば、ユニバーサルアダプタ配列）を含む複数の核酸分子、（ii）複数の可溶性順方向プライマー、（iii）複数の可溶性逆方向プライマー（ブロックプライマーまたはテールプライマーであり得る）、および（iv）アダプタ配列に、または逆方向プライマー内に含有される配列の補体にハイブリダイズする捕捉プライマーが上に固定化された、複数の固体支持体（例えば、反応の開始時、または反応中の他の任意の時点に含まれる）を含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応

50

または鑄型化反応は、同じまたは異なる標的配列を有する複数の核酸分子との単一の反応混合物において行われる。いくつかの実施形態では、サンプルから生成された個々の核酸分子は、末端で少なくとも1つのユニバーサルアダプタ配列（例えば、AアダプタまたはP1アダプタ配列）に接合された標的配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、相補的な上鎖および下鎖を有する二本鎖分子である。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応を行って、アダプタ配列にハイブリダイズする順方向および逆方向の可溶性プライマーを使用して、核酸分子の、1つの、またはモノクロナルの、または実質的にモノクロナルのコピーを増幅し、固体支持体に付着させる（例えば、図4を参照）。図4は、単一の二本鎖核酸分子、および単一の反応混合物内の単一のビーズに対する一連の反応を描示しているが、同じ単一の反応混合物は、複数の二本鎖核酸分子と、同じ一連の反応を経て、各々に1つの鑄型核酸、またはモノクロナルの、もしくは実質的にモノクロナルの鑄型の集団が付着した少なくとも2つのビーズを生成する複数のビーズと、を含有することができる。加えて、ビーズを、複数のB捕捉プライマーに付着させることができる。さらに、図53の下は、B捕捉プライマーに結合するビオチン化プライマー伸長産物を描示しているが、非ビオチン化プライマー伸長産物は、B捕捉プライマーに結合することができる。また、ビオチン化プライマー伸長産物と非ビオチン化プライマー伸長産物との混合物を、ビーズに付着している複数のB捕捉プライマーに付着させることができる。いくつかの実施形態では、単一の反応混合物は、複数の核酸分子を含有し、同じまたは異なる標的配列を有する個々の核酸分子は、少なくとも1つのユニバーサルアダプタ配列に付着している。

【0253】

図53に描示されるような例示的な方法を参照すると、上鎖および下鎖を有する核酸分子が変性され、分離された上鎖および下鎖が、可溶性プライマー（例えば、可溶性Aプライマー）および可溶性ブロックテールプライマー（例えば、可溶性ブロックテールP1/Bプライマー）を使用するプライマー伸長反応に使用されて、プレシーディングまたは鑄型化反応中に固定化Bプライマーに結合することができるアダプタ配列を有する複数のプライマー伸長産物を生成する。プライマー伸長反応は、上鎖および下鎖の配列および配向が異なり、かつ使用されるプライマーが異なることに起因して、2本鎖に対して異なる産物を生成する。第1のプライマー伸長反応では、Aプライマー結合部位を結合させる可溶性プライマーを使用して、下鎖の相補鎖が生成される。図53（左）の説明目的で、可溶性A'プライマーは、Aアダプタ配列に相補的である。いくつかの実施形態では、様々な長さの可溶性A'プライマーの混合物が、第1のプライマー伸長反応のために使用される。可溶性A'プライマーの混合物は、これらのプライマーの5'末端、3'末端、または5'および3'末端の両方で長さがばらつき得る。例えば、プライマーミックスS（5'ビオチン付加物を伴うまたは伴わない様々な長さの5'非相補的配列を含むことができるA'プライマーの混合物（図53で「Bio」として描示されている））を第1のプライマー伸長反応で使用して、どの可溶性A'プライマーが第1のプライマー伸長反応（図53、左）に使用されるかに応じて、いくつかの可能な第1の伸長産物のうちの1つを生成する。例えば、第1の伸長産物は、5'→3'方向に、相補的なAアダプタ配列（図53、左にA'として示されている）、相補的な下配列（図53、左にBOTTOM'として示されている）、および相補的なP1配列（図53、左にP1'として示されている）を含有する。いくつかの実施形態では、第2のプライマー伸長反応で、第1の伸長産物の新たに合成されたP1'配列は、可溶性P1プライマーに結合して、プライマー伸長が第1のプライマー伸長産物のP1'配列の3'末端から生じることを可能にすることができる。可溶性P1プライマーは、テールプライマーであり得る。可溶性P1プライマーは、可溶性P1プライマーの3'末端にブロッキング部分を担持することができ、ブロッキング部分は、プライマーの3'末端からのプライマー伸長を阻害することができる。ブロックプライマーは、低品質のシーケンシング読み取りと、鑄型核酸分子からのシーケンシング読み取りの量の低下と、を発生し得る、プレシーディング反応中のプライマーダイマーアンプリコンの形成を防止することができる。可溶性P1プライマーは、第1の伸長産物のプライマー伸長がテールプライマーP

1を鋳型として使用して3'末端へのB配列の補体の付加(図53の左にB'として示されている)をもたらすような付着した5'Bアダプタ配列を含む、逆方向テールP1プライマーであり得る。例示的な実施形態では、可溶性P1プライマーは、可溶性P1プライマー(図53、左)の3'末端からの伸長を防止するための3'ブロック末端(図53、左に丸で囲まれた「X」として示されている)を有することができる。第2のプライマー伸長反応は、どの可溶性A'プライマーが第1の伸長反応で使用されたかに応じて、様々な長さを有する複数の第2の伸長産物を生成することができる。複数の第2の伸長産物は、5'→3'方向に、相補的なAアダプタ配列(図53、左にA'として示されている)、相補的な下鎖配列(図53、左にBOTTOM'として示されている)、相補的なP1配列(図53、左にP1'として示されている)、および相補的なBアダプタ配列(図53、左にB'として示されている)を含有する。第2のプライマー伸長産物は、5'ビオチン付加物を含むか、または欠くことができる(図53、左)。第2の伸長反応は、異なる長さを有し、かつビオチン付加物を含むか、または欠くことができ、かつB'アダプタ配列を含む複数の第2の伸長産物を生成することができる。これらの第2の伸長産物のいずれかが、固体表面(ビーズ)に固定化されたB捕捉配列に結合/ハイブリダイズすることができる。固定化されたBプライマーは、第3のプライマー伸長反応を経て、それによって、ビーズに固定化され、かつ第2の伸長産物に相補的である第3の伸長産物を生成することができる(図53、下)。図53の右側は、二本鎖核酸が、変性、および上鎖に対する一連の反応を受けることを描示している。いくつかの実施形態では、上鎖のP1'アダプタ配列は、可溶性P1プライマーに結合し、第1のプライマー伸長反応を経て、第1の伸長産物を生成することができる(図53、右)。いくつかの実施形態では、可溶性P1プライマーは、テールプライマーである。可溶性P1プライマーは、可溶性P1プライマーの3'末端にブロッキング部分を担持することができる、ブロッキング部分は、プライマーの3'末端からのプライマー伸長を阻害することができる(図53、右)。可溶性P1プライマーは、プライマー伸長がテールプライマーP1を鋳型として使用して第1の伸長産物の3'末端へのB配列(B')の補体の付加(図53、右)をもたらすような付着した5'Bアダプタ配列を含む、テールP1プライマーであり得る。例示的な実施形態では、可溶性P1プライマーは、可溶性P1プライマー(図53、右)の3'末端からの伸長を防止するための3'ブロック末端(図53、右に丸で囲まれた「X」として示されている)を有することができる。第1のプライマー伸長反応は、5'→3'方向に、A'アダプタ配列、上鎖配列、P1'アダプタ配列、およびB'アダプタ配列を含有する複数の第1の伸長産物を生成する(図53、右)。B'アダプタ配列を含む第1の伸長産物は、固体表面(ビーズ)に固定化されたB捕捉配列に結合/ハイブリダイズすることができる。固定化されたBプライマーは、第2のプライマー伸長反応を経て、それによって、ビーズに固定化され、かつ第1の伸長産物に相補的である第2の伸長産物を生成することができる(図53、下)。

【0254】

いくつかの実施形態では、プレシーディング(またはシーディング)反応を、図54に例示されるように実行することができる。この例では、標的ポリヌクレオチドB-A'およびその補体である鋳型ポリヌクレオチド(A-B')が、捕捉プライマーを有するビーズ支持体の存在下で増幅される。標的ポリヌクレオチドは、ビーズ支持体に結合された捕捉プライマーの配列と同じまたは実質的に類似する捕捉部分(B)を有する。実質的に類似する配列は、補体を実質的に類似する配列の各々にハイブリダイズすることができる配列である。ビーズ支持体は、標的ポリヌクレオチドのB部分の配列と同じ配列または実質的に類似の配列である捕捉プライマーを有することによって、標的ポリヌクレオチドの捕捉部分(B)の補体と、ビーズ支持体に付着したこの捕捉プライマーと、のハイブリダイゼーションを可能にすることができる。任意選択的に、標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドの捕捉部分(B)に隣接する第2のプライマー場所(P1)を含むことができ、プライマーに隣接し、かつ補体部分(A')が標的ポリヌクレオチドのシーケンシングプライマー部分(A)と境界を接する標的領域をさらに含むことができる。捕捉プライマーを含むビーズ支持体の存在下で増幅されると、標的ポリヌクレオチドに相補的な鋳型ポリ

ヌクレオチドは、捕捉プライマー（B）とハイブリダイズすることができる。標的ポリヌクレオチドは、溶液中に残留することができる。システムは、捕捉プライマーBが鋳型ポリヌクレオチドに相補的に伸長されて、ビーズ支持体に結合した標的配列を生じさせる伸長を経ることができる。捕捉プライマーを有する支持体の存在下で、この段階で1つ以上の追加の増幅を実行することができる。1つ以上のさらなる増幅を、遊離プライマー（B）、ビーズ支持体、およびリンカー部分（L）が付着した遊離修飾シーケンシングプライマー（A）の存在下で実行することができる。プライマー（B）および修飾プライマー（L-A）は、浮遊性の標的ポリヌクレオチドおよび鋳型ポリヌクレオチドを妨害し、それらがビーズ支持体および互いに結合するのを妨げる可能性がある。特に、リンカー部分が付着した修飾シーケンシングプライマー（A）は、ビーズ支持体に付着した標的ポリヌクレオチドの相補的部分（A'）とハイブリダイズすることができる。任意選択的に、標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたリンカー修飾シーケンシングプライマーL-Aを伸長させて、リンカー修飾鋳型ポリヌクレオチドを形成することができる。次いで、ビーズ支持体に付着した標的核酸にハイブリダイズしたそのようなリンカー修飾鋳型ポリヌクレオチドを、磁性ビーズによって捕捉し、ビーズに付着した標的ポリペプチドの磁気隔離（濃縮）と、それをシーケンシングデバイスに装填することと、に使用することができる。増幅または伸長を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、リコンビナゼポリメラーゼ増幅（RPA）、または他の増幅手法を使用して実行することができる。特定の例では、図5に例示されるスキームの各ステップは、PCR増幅を使用して実行される。図54は、単一の二本鎖核酸分子、および単一の反応混合物内の単一のビーズに対する一連の反応を描示しているが、同じ単一の反応混合物は、複数の二本鎖核酸分子と、同じ一連の反応を経て、各々に1つの鋳型核酸、またはモノクローナルの、もしくは実質的にモノクローナルの鋳型の集団が付着した少なくとも2つのビーズを生成する複数のビーズと、を含有することができる。

【0255】

いくつかの実施形態では、プレシーディング（またはシーディング）反応を、図55に例示されるように実行することができる。この例では、代替スキームは、標的ポリヌクレオチド（P1-A'）およびその補体鋳型ポリヌクレオチド（A-P1'）を含む。標的ポリヌクレオチドおよび鋳型ポリヌクレオチドは、リンカー修飾シーケンシングプライマー（L-A）と捕捉プライマー（B）の配列を有する部分を有する短縮型P1プライマー（trP1）とを含む溶液の中で増幅される。例では、短縮型P1プライマー（trP1）は、P1の配列のサブセット、または配列P1のすべてを含む。リンカー修飾シーケンシングプライマー（L-A）および短縮型P1プライマー（trP1-B）の存在下での後続の増幅中に、種は、捕捉プライマー（B）を有するビーズ支持体とハイブリダイズするように動作可能なリンカー修飾鋳型ポリヌクレオチド（L-A-B'）を含む。よって、リンカー修飾鋳型ポリヌクレオチド（L-A-B'）は、ビーズ上の捕捉プライマー（B）とハイブリダイズし、伸長して、ビーズ支持体に付着した標的ポリヌクレオチド（B-A'）を形成する。標的ポリヌクレオチド付着ビーズにハイブリダイズしたリンカー修飾鋳型ポリヌクレオチドを利用して、磁性ビーズに付着することができ、例えば、これを使用して、シーケンシングデバイスへのビーズの磁性体装荷を実装するか、またはビーズに付着した核酸を濃縮することができる。リンカー修飾鋳型ポリヌクレオチドのリンカー部分は、ストレプトアビジンなどの磁性ビーズに付着したリンカー部分に結合することができるビオチンなどの様々な形態をとることができる。増幅反応の各々を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リコンビナゼポリメラーゼ増幅（RPA）、または他の増幅手法を使用して実施することができる。図55に例示される例では、このスキームを、2または3サイクルのPCRを使用して実装することができる。そのような一連のPCR反応は、単一の標的ポリヌクレオチドが付着したビーズ支持体のより大きなパーセンテージをもたらす。結果として、例えば、シーケンシングデバイスのウェルでの、例えば鋳型化反応で、より多くのモノクローナルの集団を生成することができる。図55は、単一の二本鎖核酸分子、および単一の反応混合物内の単一のビーズに対する一連の反応を描示しているが、同じ

10

20

30

40

50

単一の反応混合物は、複数の二本鎖核酸分子と、同じ一連の反応を経て、各々に1つの鑄型核酸、またはモノクロナルの、もしくは実質的にモノクロナルの鑄型の集団が付着した少なくとも2つのビーズを生成する複数のビーズと、を含有することができる。

【0256】

いくつかの実施形態では、プレシーディング（またはシーディング）方法を、図56に例示されるように実行することができる。この例では、この方法は、一連の増幅サイクルから所望の支持体付着核酸分子を生成するように設計されており、増幅サイクルでは、所望の標的核酸である増幅産物のうちの1つのみが、支持体に付着することとなる。所望の標的は、核酸の5'末端に付着したリンカー部分、例えばビオチン（図56では文字Lで標記されている）と、支持体（例えば、ビーズ）上に固定化されたプライマー（図56では文字Bで標記されている）に相補的である3'末端のアダプタヌクレオチド配列（図56では文字B'で標記されている）と、を含有する。対照的に、図55に示される方法は、支持体にハイブリダイズする2つの核酸増幅産物を生成し、そのうちの1つのみが、所望のリンカー部分を有する。支持体に付着することとなる増幅産物を1つのみ生成する際に、図56に描示される方法は、所望の標的核酸を含有しない支持体、例えば、下流での分析には使用されないであろう、リンカー部分を欠くものの産生を回避する。したがって、この方法は、支持体および核酸の過剰利用を回避し、単一の核酸標的分子のみが、単一の核酸のみが結合した支持体を使用する後続の鑄型化増幅で高レベルの単クローン性を維持するために望ましい支持体にハイブリダイズすることとなることを確実にする。図56に例示されるように、二本鎖核酸（例えば、ライブラリ核酸）は、5'末端のAアダプタ配列および3'末端のP1アダプタ配列（例えば、標準のIon Torrent AおよびP1ライブラリアダプタ、Thermo Fisher Scientific）として示される、各末端の異なるアダプタ配列を含有する。シーディングプロセスを開始するために、ライブラリ核酸は、図56に描示されるようなプライマーの存在下で1サイクルの増幅（すなわち、変性、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長）に供される。増幅に使用される例示的なプライマーは、ビオチン化プライマーA（順方向プライマー）および逆方向融合プライマーである。融合プライマー（例えば、図56でtrP1と標記されたプライマー）は、標的核酸の3'末端のアダプタ配列の一部に相補的である配列と、支持体上に固定化されたBプライマーの配列と同一であるBプライマー配列と、の融合である。図56に示される例では、trP1は、配列番号：1）の配列を有するイオンP1アダプタの23merセグメントである。融合プライマーは、ライブラリ挿入配列に近いライブラリ核酸分子の3'アダプタ配列の内側部分でハイブリダイズし、プライミングすることとなり、ライブラリ核酸の3'最末端のアダプタ配列の残りの部分とハイブリダイズしない。これにより、融合プライマー配列とライブラリ核酸上のアダプタの3'極端部分との間にミスマッチ末端が形成される。図56に示されるように、2サイクルの増幅（例えば、PCR）の後、4つの増幅産物が生成されるが、1つの産物のみが、支持体（例えば、イオン球粒子）にシーディング（またはハイブリダイズ）することができることとなる。したがって、後続の増幅産物の変性時に、産物のうちの1つのみの一本鎖が、支持体上のBプライマーにハイブリダイズすることとなる。このプライマーを伸長させて、一本鎖が、例えば、シーケンスデバイスへの鑄型ビーズの濃縮または性体装荷に使用するために支持体結合核酸を磁性ビーズに結合させるために使用できるリンカー部分を含有する、二本鎖鑄型核酸を形成することができる。図56は、単一の二本鎖核酸分子、および単一の反応混合物内の単一の支持体に対する一連の反応を描示しているが、同じ単一の反応混合物は、複数の二本鎖核酸分子と、同じ一連の反応を経て、各々に鑄型核酸が付着した少なくとも2つの支持体を生成する複数の支持体と、を含有することができる。

【0257】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットの特定の実施形態は、特定のヌクレオチド配列を有する核酸鑄型を生成するための方法を含む。そのような方法は、単一の核酸を有する1つ以上、2つ以上、または複数の支持体または表面をプレシーディングするのに特に有用であ

10

20

30

40

50

る。一実施形態では、特定のヌクレオチド配列を有する核酸鋳型を生成するための方法は、（a）核酸鎖の5'末端の接続するヌクレオチドの第1の配列と、核酸鎖の3'末端の接続するヌクレオチドの第2の配列と、接続するヌクレオチドの第1の配列と第2の配列との間に位置決めされた第3のヌクレオチド配列と、を有する核酸鎖を含有する核酸、または最初の複数の核酸、または核酸の集団を取得することであって、接続するヌクレオチドの第1の配列と接続するヌクレオチドの第2の配列とは互いに異なり、接続するヌクレオチドの第1の配列は、複数の核酸または核酸の集団の中で実質的に同一であり、接続するヌクレオチドの第2の配列は、複数の核酸または核酸の集団の中で実質的に同一である、取得することと、（b）核酸、または最初の複数の核酸、または核酸の集団を第1のプライマーおよび第2のプライマーの存在下での核酸増幅のサイクルに供することであって、第1のプライマーは、接続するヌクレオチドの第1の配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を含み、第2のプライマーは、（i）接続するヌクレオチドの第2の配列の5'末端の接続するヌクレオチドの第2の配列の一部分に相補的なヌクレオチド配列と、（ii）接続するヌクレオチドの第2の配列に相補的ではなく、かつ相補的な配列の3'末端の接続するヌクレオチドの第2の配列の一部分に相補的な配列に連結されている、第4のヌクレオチド配列と、を含み、第2のプライマーは、接続するヌクレオチドの第2の配列の3'末端に相補的なヌクレオチド配列を含有しない、供することと、（c）（b）の核酸増幅のサイクルの産物を第1および第2のプライマーの存在下で核酸増幅のサイクルに供して、複数の異なる核酸産物を生成することであって、核酸の核酸増幅の複数の異なる核酸産物のうちの1つのみ、またはステップ（a）での最初の複数の核酸もしくは核酸の集団の各別個の核酸が、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む、生成することと、を含む。ステップ（a）が最初の複数の核酸または核酸の集団を含む場合、この方法は、異なる核酸の集団を生成し、各核酸は、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、（c）の核酸増幅のサイクルの産物を、第1および第2のプライマーの存在下での核酸増幅の1つ以上のサイクルに供して、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含有する追加の核酸産物を生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、ステップ（a）に述べられた核酸の集団は、接続するヌクレオチドの第1の配列と実質的に同一のオリゴヌクレオチド配列を含む1つ以上の順方向プライマーと、3'末端でブロックされており、かつオリゴヌクレオチド配列の5'末端で第2の配列に相補的ではない第4のヌクレオチド配列に連結されている接続するヌクレオチドの第2の配列に相補的であるオリゴヌクレオチド配列を含む逆方向プライマーと、の存在下で核酸増幅の2サイクル以上に供されて、産物の実質的にすべてまたはすべてが第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む核酸産物を生成する。特定のヌクレオチド配列を有する核酸鋳型を生成するための方法のいずれかのいくつかの実施形態では、順方向または第1のプライマーは、付着物を含有する修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドへの付着物は、リンカー部分、例えばビオチン、を含む。いくつかの実施形態では、第4のヌクレオチド配列の配列は、1つ以上の支持体または表面、または表面上の部位に固定化されたプライマーの配列と実質的に同一であり、この方法は、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む産物を、固定化されたプライマーとのハイブリダイゼーションにより、1つ以上の支持体、表面、または表面上の部位に付着させることをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、この方法は、支持体に結合していない他の任意の核酸から支持体を除去することによって、支持体に付着した核酸鎖を単離することをさらに含む。

【0258】

特定のヌクレオチド配列を有する核酸鋳型、または特定のヌクレオチド配列を有する2つ以上の核酸鋳型の集団を生成するための方法のいくつかの実施形態では、1つ以上のプライマーが、付着物を含有する修飾ヌクレオチドを含む。例えば、いくつかの実施形態では、順方向プライマーもしくは第1のプライマー、または逆方向もしくは第2のプライマーは、付着物を含有する修飾ヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、修飾ヌクレオチドへの付着物は、リンカー部分、例えばビオチン、を含む。いくつかの実施形態では

10

20

30

40

50

、1つ以上のプライマー（例えば、順方向または第1のプライマー）は、第1のヌクレオチド配列と実質的に同一の3'末端ヌクレオチド配列、5'末端ヌクレオチド配列、および3'末端ヌクレオチド配列と5'末端ヌクレオチド配列との間に位置決めされた非複製可能な部分を含む。順方向または第1のプライマーが、第1のヌクレオチド配列と実質的に同一の3'末端ヌクレオチド配列と5'末端ヌクレオチド配列との間に非複製可能な部分を含むものである実施形態では、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む、最終核酸増幅からの唯一の産物はまた、第1のプライマーの非複製可能な部分および5'末端ヌクレオチド配列を含む、5'末端の一本鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、増幅の最終サイクルの産物の一本鎖核酸を、アニーリング条件下で第4のヌクレオチド配列と実質的に同一である一本鎖オリゴヌクレオチドと組み合わせるか、または接触させ、それによって、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む産物を第4のヌクレオチド配列と実質的に同一である一本鎖オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせて、部分的に二本鎖核酸を生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第4のヌクレオチド配列と実質的に同一である一本鎖オリゴヌクレオチドは、1つ以上、または複数の、支持体または表面または表面上の部位に付着する。いくつかの実施形態では、支持体は、固体支持体である。特定の実施形態では、支持体は、粒子またはビーズである。いくつかの実施形態では、この方法は、部分的に二本鎖核酸のオリゴヌクレオチド部分の3'末端を伸長させ、それによって、一本鎖オリゴヌクレオチドであって、第4のヌクレオチド配列と実質的に同一であり、かつ一本鎖オリゴヌクレオチドがハイブリダイズしている産物に相補的であるヌクレオチド配列を有する一本鎖オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖を合成することによって、伸長された二本鎖核酸を生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第4のヌクレオチド配列と実質的に同一である一本鎖オリゴヌクレオチドを含む核酸鎖は、オリゴヌクレオチド配列である鎖の部分を通して鎖の5'末端で支持体に付着している。いくつかの実施形態では、この方法は、支持体を収集するか、または支持体に結合していない他の核酸または反応成分から核酸鎖を除去することによって、支持体に付着した核酸鎖を単離することをさらに含む。

【0259】

一実施形態では、支持体をプレシーディングするか、またはシーディングするための方法は、（a）核酸鎖の5'末端の接続するヌクレオチドの第1の配列と、核酸鎖の3'末端の接続するヌクレオチド第2の配列と、接続するヌクレオチドの第1の配列と第2の配列との間に位置決めされた第3のヌクレオチド配列と、含有する核酸鎖を含む核酸を取得することと、（b）捕捉プライマーの存在下で核酸を核酸増幅のサイクルに供することとであって、捕捉プライマーは、接続するヌクレオチドの第2の配列に相補的なヌクレオチド配列を含み、支持体に付着している、供することと、（c）（b）の核酸増幅の産物を、支持体に付着していない捕捉プライマーと、接続するヌクレオチドの第1の配列と実質的に同一のヌクレオチド配列を含む第1のプライマーと、の存在下での核酸増幅のサイクルに供することと、を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、リンカー部分に付着している。

【0260】

いくつかの実施形態では、この方法の1つ以上の増幅（例えば、PCR）サイクルを追加して、本質的に図54～56に例示されるように、プレシーディング（またはシーディング）方法が実行される。したがって、増幅の複数のサイクル（例えば、PCR）を使用する任意のそのようなプレシーディング方法では、増幅の2つ以上、例えば、3、4、5以上のサイクルを、プレシーディング方法に含めることができる。例えば、可能な最大の核酸ライブラリ入力量が最適範囲を下回る場合、追加の増幅サイクルをシーディングプロセスに含めて、例えば核酸鑄型の実質的にモノクローナルの集団を生成するための鑄型化増幅および下流のシーケンシングプロセスを含む、さらなる方法で使用され得る十分な量の鑄型シーディングされた支持体を生成してもよい。そのような状況は、例えば、ライブラリ調製方法から結果として得られる予想されるよりも低いライブラリ濃度を含んでもよい。そのような状況では、より大きなライブラリ入力体積に対応するためにシーディングを

スケールアップすることによって、ライブラリ鑄型のコピー数をより最適なレベルに増加させることが可能であってもよいが、反応容器または処理の体積制約に起因して、このことは、利用可能でないオプションである場合がある。増幅サイクルの数の増加を、プレシーディング方法の任意の時点で、例えばオリゴヌクレオチドプライマーが付加された支持体を増幅スキームに導入する前または後に、含めることができる。例えば、図56に描示される方法に関して、支持体が反応混合物に導入される時点の前に追加の増幅サイクルが含まれる場合、増幅の別のサイクルを追加せずに、示されているスキームでハイブリダイズする鎖を生じさせる1つのみの産物と比較して、合計4つの増幅産物が、支持体上のBプライマーにハイブリダイズすることとなる核酸鎖を生成することとなる。さらに、4つの産物鎖の各々は、核酸の5'末端に付着したリンカー部分を含むこととなる。したがって、追加された増幅サイクルの後、Bプライマーが固定化された支持体が反応混合物に添加されると、変性、プライマーハイブリダイゼーション、およびプライマー伸長の次の増幅サイクルは、支持体上のBプライマーに相補的な配列を含む増幅産物のうちの4つすべてをもたらすこととなり、これらの増幅産物は、支持体にハイブリダイズし、伸長し、それによって、1つの支持体と比較して4つの支持体をシーディングする。図56に示される最後の増幅サイクルの後に追加の増幅サイクルが含まれ、Bプライマーが付着した支持体が反応混合物に添加された場合、増幅の別のサイクルを追加せずに示されているスキームでハイブリダイズする鎖を生じさせる1つのみの産物と比較して、合計4つの増幅産物が核酸鎖を生じさせることとなり、この核酸鎖は、支持体上のBプライマーにハイブリダイズすることとなる。さらに、4つの産物鎖の各々は、核酸の5'末端に付着したリンカー部分を含むこととなる。したがって、追加された増幅サイクルの後、Bプライマーが固定化された十分な数の支持体が反応混合物に追加されたと仮定すると、追加の増幅が含まれない場合の1つのシーディングされた支持体と比較して、合計4つの支持体が核酸鑄型でシーディングされることとなる。したがって、これらのようなプレシーディング方法で増幅サイクルの数を増加させることによって、同じ数の入力ライブラリ核酸分子からより多くの数のシーディングされた支持体が取得される。

【0261】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるプレシーディング（またはシーディング）方法は、ハイブリダイゼーションにより核酸を支持体または表面に付着させると同時に、付着した核酸を低レベルに、例えば、約10以上、20以上、50以上、100以上、250以上、500以上、または1000以上のコピー増幅する、組み合わせられたプロセスを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応は、複数のプレシーディングされた支持体、表面、または表面上の部位を生成し、個々のプレシーディングされた支持体、または複数のプレシーディングされた支持体中の部位、または表面上の部位は、支持体または部位に付着した複数の第1のプライマーを含み、複数の第1のプライマーは、実質的に同一の配列を有し、複数の第1のプライマーのうちのいくつかは、鑄型核酸分子に接合され、複数の第1のプライマーのうちのいくつかは、鑄型核酸分子に接合されない。これらの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、典型的には、以下のうちのいくつかまたはすべてを含む：核酸分子の集団、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、第1のプライマーの集団、支持体もしくは表面の集団または複数の支持体もしくは表面、または二価カチオンなどの補因子。多様な方法を使用して、実質的にモノクローナルの鑄型核酸分子とともに支持体をプレシーディングすることができる。非限定的な例として、プレシーディング反応を、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）反応、鑄型ウォーキング反応、PCR、エマルジョンPCR、またはブリッジPCRを使用して実行することができる。プレシーディング反応または鑄型化反応を、溶液中で大量に実行することができる。さらに、プレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物は、1つ以上の支持体に付着した第1のユニバーサルプライマー、溶液中の第2のユニバーサルプライマー（可溶性の第2のユニバーサルプライマー）、および複数の核酸分子を含むことができ、個々の核酸分子は、ライブラリ調製中に追加され得る少なくとも1つのユニバーサルプライマー結合配列に接合され、ユニバーサルプライマー結合配列は、第1および任意選択的な第2の

10

20

30

40

50

ユニバーサルプライマーを結合させる。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応または鑄型化反応は、ウェルで実行される。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応および鑄型化反応は、連続的なRPA反応を使用して実行され、鑄型核酸分子は、プレシーディング反応の後に、鑄型化反応を実行する前に洗浄除去される。

【0262】

いくつかの実施形態では、異なる核酸分子は、増幅の前に区画化する必要なしに、1つ以上の異なる個別の表面または支持体（例えば、ビーズまたは粒子）上にプレシーディングされる。他の実施形態では、核酸分子は、増幅する前に、エマルジョンに分割されるか、または分配される。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応を、単一の連続液相内での増幅とは対照的に、複数の区画化された反応体積で並行して実行することができる。各反応体積は、プレシーディング反応混合物を含むことができる。例えば、核酸分子を、反応チャンバのアレイ、または反応体積のアレイに分配または堆積することができ、アレイの少なくとも2つのそのようなチャンバまたは体積が、単一の核酸分子を受け取るようにする。いくつかの実施形態では、複数の別個の反応体積が、形成される。反応チャンバ（または反応体積）を、任意選択的に、増幅前に封止することができる。プレシーディング反応を反応チャンバの各々で実行して、鑄型核酸分子の実質的にモノクロナルの集団を生成することができる。別の実施形態では、反応混合物は、エマルジョンの連続相内に分散された複数のマイクロリアクターに区画化されるか、または分離される。各コンパートメントまたはマイクロリアクターは、独立した増幅リアクターとして機能し、したがって、エマルジョン全体が、単一の反応容器（例えば、エッペンドルフチューブまたはウェル）中の別個の（不連続な）液相で多くの別個の増幅反応をサポートすることができる。本明細書で使用される場合、「エマルジョン」という用語は、第1の液体と第2の液体との混合物を含む任意の組成物を含み、第1および第2の液体は、互いに実質的に非混和性である。区画化されたまたは別個の反応体積は、任意選択的に、互いに混合するか、または連通しないか、または混合または連通することができない。そのような実施形態では、マイクロリアクター中のプレシーディング反応混合物は、本明細書に記載されるプレシーディング反応混合物のいずれかであり得る。反応混合物がエマルジョン内に分散しているいくつかの実施形態では、この方法は、鑄型核酸分子の実質的にモノクロナルの集団に付着した支持体のうちの少なくともいくつかをエマルジョンから回収することをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、鑄型核酸分子の実質的にモノクロナルの集団に付着した支持体のうちの少なくともいくつかを表面上に堆積することをさらに含む。いくつかの実施形態では、この方法は、鑄型核酸分子の実質的にモノクロナルの集団に付着した支持体のうちの少なくともいくつかを表面上に堆積することによってアレイを形成することをさらに含む。

【0263】

いくつかの実施形態では、プレシーディング反応は、鑄型核酸分子が付着していない支持体（空の支持体）と、1つのタイプの鑄型核酸分子が付着した他のプレシーディングされた支持体と、2つ以上のタイプの鑄型核酸分子が付着した他のプレシーディングされた支持体を生成し得る。1つ以上のプレシーディングされた支持体に付着した鑄型核酸分子の数は、プレシーディング数である。プレシーディング方法のいくつかの実施形態では、プレシーディング数は、1であるか、または約1～150,000の鑄型核酸分子、例えば、約1～100,000、1～75,000、1～50,000、1～25,000、1～10,000、1～5,000、1～2,500、10～100,000、10～75,000、10～50,000、10～25,000、10～10,000、10～5,000、または10～2,500の鑄型核酸分子である。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応後、支持体に付着した任意のプライマーの大部分は、鑄型核酸分子に結合していない。これらの非結合プライマーを、鑄型核酸分子をさらに増幅するための後続の鑄型化反応で使用することができる。例えば、プレシーディング反応後、支持体に付着したプライマーの少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、または99%は、典型的には、鑄型核酸分子に結合していないか、または支持体に付着したプライマーの

うちの1つを除いてすべてが、鋳型核酸分子に結合していない。

【0264】

いくつかの実施形態では、プレシーディング反応または鋳型化反応は、PCR増幅方法を使用することを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応または鋳型化反応は、PCRの単一のラウンドまたはサイクルで実行される。他の実施形態では、プレシーディング反応または鋳型化反応は、PCRの複数のラウンドまたはサイクルで実行される。例えば、増幅（例えば、PCR）サイクルを使用するいくつかの方法では、PCRの1つ以上、または2つ以上のサイクルを、支持体の非存在下（または存在下）で実施して、所望の鋳型またはその量を生成することができ、支持体上に所望の鋳型核酸をシーディングするための支持体の存在下でのPCRの1つ、1つ以上、または2つ以上のサイクルが続くことができる（例えば、図56を参照）。これらの方法は、支持体と反応する核酸分子の量を希釈して、2つ以上の核酸分子と反応する支持体のパーセンテージを低減することを含むことができる。いくつかの実施形態では、核酸分子は、プレシーディング反応が、1つの鋳型核酸分子、または鋳型核酸分子の実質的にモノクローナルの集団が付着した支持体のパーセンテージを最適化するように選択される支持体対鋳型核酸分子比を有するように、希釈される。例えば、プレシーディングを、少なくとも約1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、10:1、15:1、20:1、25:1、50:1、75:1、および100:1の支持体対核酸分子比で実行することができる。いくつかの実施形態では、PCRは、単一の反応混合物中の溶液中で大量に実行される。いくつかの実施形態では、PCRは、連続溶液中のウェルまたは反応チャンバで実施される。いくつかの実施形態では、PCRは、本明細書の他の箇所に記載されるように、エマルジョン中の複数のマイクロリアクターでPCRが実行される場合に、エマルジョン中で実行される。

【0265】

いくつかの実施形態では、プレシーディング反応または鋳型化反応は、プライマーが鎖のうちの1つに結合して複製の新しいラウンドを開始するように、二本鎖核酸分子の部分が解離する鋳型ウォーキングを含む（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2012年6月21日公開の米国特許公開第2012/0156728号を参照）。鋳型ウォーキング反応は、典型的には、等温温度で実行される。いくつかの実施形態では、鋳型ウォーキングは、エマルジョン内で実行される。

【0266】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物または鋳型化反応混合物は、鋳型核酸分子を部分的に変性させるための成分を含む。いくつかの実施形態では、条件を部分的に変性させることは、増幅される鋳型核酸分子を、RPA反応のように、任意選択的に配列特異的または配列指向的に、核酸鋳型を部分的に変性させることができる1つ以上の酵素で処理するか、またはこれに接触させることを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの酵素は、任意選択的に配列特異的に、鎖の侵入またはアンワインドを触媒する。任意選択的に、1つ以上の酵素は、以下から選択される1つ以上の酵素を含む：リコンビナーゼ、トポイソメラーゼ、およびヘリカーゼ。いくつかの実施形態では、鋳型を部分的に変性させることは、鋳型をリコンビナーゼと接触させることと、リコンビナーゼを含む核タンパク質複合体を形成することと、を含む。任意選択的に、鋳型核酸分子を、第1の、および任意選択的に第2のプライマーの存在下でリコンビナーゼと接触させる。部分的に変性させることは、リコンビナーゼを使用して鎖交換を触媒することと、第1のプライマーを第1のプライマー結合配列にハイブリダイズさせる（または第2のプライマーを第2のプライマー結合配列にハイブリダイズさせる）ことと、を含むことができる。いくつかの実施形態では、部分的に変性させることは、鎖交換を実行することと、リコンビナーゼを使用して、第1のプライマーを第1のプライマー結合配列にハイブリダイズさせ、かつ第2のプライマーを第2のプライマー結合

配列にハイブリダイズさせることと、を含む。

【0267】

いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子を部分的に変性させることは、鋳型を1つ以上のリコンビナーゼまたは核タンパク質複合体と接触させることを含む。核タンパク質複合体のうちの少なくとも1つは、リコンビナーゼを含むことができる。理論によって制限されないが、リコンビナーゼは一本鎖DNA (ssDNA) をコーティングして、鋳型核酸分子上の相同性の二本鎖領域に侵入する核タンパク質フィラメント鎖を形成すると考えられている。これにより、Dループとして知られている短いハイブリッドおよび置換鎖バブルが作成される(例えば、Zarlingの米国特許第5,223,414号、Senaの米国特許第5,273,881号および第5,670,316号、ならびに米国特許第7,270,981号、第7,399,590号、第7,435,561号、第7,666,598号、第7,763,427号、第8,017,339号、第8,030,000号、第8,062,850号、および第8,071,308号を参照、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ハイブリダイズしたプライマーの遊離3'末端を、DNAポリメラーゼによって伸長させて、新しい相補鎖を合成する。相補鎖は、鋳型核酸分子が延長されるときに、元々ペアになっていたパートナー鎖を置換する。一実施形態では、ペアをなすプライマーのうちの1つ以上を、任意選択的に二本鎖である鋳型核酸分子と接触させる前に、1つ以上のリコンビナーゼと接触させる。核タンパク質複合体のうちの少なくとも1つは、プライマー(例えば、第1のプライマーもしくは第2のプライマー、または鋳型中の対応するプライマー結合配列に相補的な配列を含むプライマー)を含むことができる。いくつかの実施形態では、鋳型を部分的に変性させることは、鋳型を、プライマーを含む核タンパク質複合体と接触させることを含む。部分的に変性させることは、核タンパク質複合体のプライマーを鋳型の対応するプライマー結合配列にハイブリダイズさせ、それによってプライマー-鋳型二重鎖を形成することを含むことができる。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子を部分的に変性させることは、鋳型を、第1のプライマーを含む第1の核タンパク質複合体と接触させることを含む。部分的に変性させることは、第1の核タンパク質複合体の第1のプライマーを順方向鎖の第1のプライマー結合配列にハイブリダイズさせ、それによって、第1のプライマー-鋳型二重鎖を形成することを含むことができる。いくつかの実施形態では、鋳型を部分的に変性させることは、鋳型を、第2のプライマーを含む第2の核タンパク質複合体と接触させることを含む。部分的に変性させることは、第2の核タンパク質複合体の第2のプライマーを逆方向鎖の第2のプライマー結合配列にハイブリダイズさせ、それによって、第2のプライマー-鋳型二重鎖を形成することを含むことができる。

【0268】

プレシーディング反応または鋳型化反応中の、理論によって制限されない、固定化された第1のプライマーの集団および溶液中の第2のプライマーの集団を含む、本明細書で提供されるプレシーディング方法または鋳型化方法のいくつかの実施形態では、鋳型核酸は、少なくとも部分的に変性し、鋳型上の第1のプライマー結合部位は、固体支持体に付着した第1のプライマーに結合する。第1のプライマーは、鋳型核酸の1本の鎖に相補的な鎖を生成するためにポリメラーゼによって使用される。その相補鎖を、今度は、プライマーを通して固体支持体に共有結合的に付着させる。溶液中の第2のプライマーは、リコンビナーゼとの複合体であり、相補鎖上のプライマー結合部位に結合し、したがって、結合した鋳型核酸分子が部分的に変性する。ポリメラーゼは、プライマーを使用して、元の鋳型核酸鎖と同一の新しい鎖を合成する。いくつかのそのような実施形態では、この鎖は、次いで、リコンビナーゼと固体支持体に付着した近くの第1のプライマーとの複合体の結合によって部分的に変性すると考えられ、ポリメラーゼは、別の相補鎖を合成する。このプロセスの繰り返されるステップにより、鋳型核酸分子の実質的にモノクロナルの集団が、プレシーディング反応または鋳型化反応中の増幅のいくつかの実施形態の間に生成される。

【0269】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物およびキットのいくつかの実施形態では、プレシーディングまたは鑄型化は、リコンビナーゼおよび任意選択的にリコンビナーゼアクセサリータンパク質を使用する、本明細書に記載される任意の1つ以上のステップまたは方法を含む、部分的な変性または増幅を含む。リコンビナーゼは、2つの異なるポリヌクレオチド鎖が互いに組換えられる任意の事象を含む、組換え事象の発生の頻度を誘導するか、または増加させることができる任意の薬剤を含むことができる。リコンビナーゼは、相同組換えを触媒する酵素であり得る。好適なリコンビナーゼとして、任意選択的に1つ以上の一本鎖結合タンパク質 (SSB) と組み合わせた、RecA およびその原核生物または真核生物の相同体、またはその機能的断片またはバリエーションが挙げられる。いくつかの実施形態では、相同組換え酵素は、マイオウイルス科 (例えば、バクテリオファージ T4、RB69 などからの *UvsX*)、*Escherichia coli* (例えば、*recA*) またはヒト (例えば、RAD51) を含む任意の生物からの酵素を含む。実施形態では、反応混合物は、*UvsX*、*RecA*、*RadA*、*RadB*、*Rad51*、それらの相同体、それらの機能的類似体、またはそれらの組み合わせから選択される1つ以上のリコンビナーゼを含む。例示的な実施形態では、リコンビナーゼは、*UvsX* である。*UvsX* タンパク質は、例えば、50~1000 ng/μl、100~750 ng/μl、200~600 ng/μl、または250~500 ng/μl 存在し得る。本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、プレシーディングまたは鑄型化反応混合物は、1つ以上のリコンビナーゼアクセサリータンパク質を含む。例えば、アクセサリータンパク質は、リコンビナーゼ酵素の活性を改善することができる。いくつかの実施形態では、アクセサリータンパク質は、鑄型核酸分子の一本鎖に結合することができるか、または鑄型核酸分子上にリコンビナーゼを装填することができる。アクセサリータンパク質は、例えば、ミオウイルスファージを含む任意のバクテリオファージ、または細菌種に由来し得る。いくつかの実施形態では、核酸増幅のための方法は、一本鎖結合タンパク質、例えばミオウイルス gp32 (例えば、T4 または RB69)、を含むことができる。いくつかの実施形態では、反応混合物は、核酸上へのリコンビナーゼ装填を改善するタンパク質を含む。例えば、*UvsY* タンパク質は、リコンビナーゼ装填タンパク質である。いくつかの実施形態では、*UvsY* は、約20~500 ng/μl、例えば、約20~250 ng/μl、20~125 ng/μl、または75~125 ng/μl 存在し得る。

【0270】

いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物は、他の成分をさらに含むことができる。例えば、組成物は、ヌクレオチド、第1のプライマーの集団、任意選択的に第2のプライマー、補因子、および緩衝液を含むことができる。第1のプライマーの集団および任意選択的に第2のプライマーの集団を、1つ以上の支持体に付着させることができる。非限定的な例として、組成物は、1つ以上の支持体、*UvsX* などのリコンビナーゼ、*Sau* DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼ、*UvsY* などのリコンビナーゼ装填タンパク質、gp32 タンパク質などの一本鎖結合タンパク質、ヌクレオチド、ATP、ホスホクレアチン、およびクレアチンキナーゼを含む。反応成分の組成物は、液体形態であり得るか、または再水和することができる乾燥したペレットの形態などの、固体形態であり得る。脱水ペレットは、例えば、リコンビナーゼ、任意選択的なリコンビナーゼアクセサリータンパク質、任意選択的に gp32、DNAポリメラーゼ、dNTP、ATP、任意選択的にホスホクレアチン、任意選択的な混雑剤、および任意選択的にクレアチンキナーゼを含むことができる。再水和緩衝液は、例えば、Tris 緩衝液、酢酸カリウム塩、および任意選択的に、PEG などの混雑剤を含むことができる。DNAポリメラーゼは、例えば、T4 または T7 DNAポリメラーゼであり得、ポリメラーゼが T7 DNAポリメラーゼである場合、チオレドキシンをさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、反応混合物成分を含む脱水ペレットが使用される場合、ペレットを再水和緩衝液で再水和し、鑄型核酸分子、プライマー、および追加のヌクレアゼフリー水を、最終体積に加える。さらに、組成物の成分を、成分の任意の組み合わせ

がペレットまたは液体の形態であり得、成分の残りの1つ以上の組み合わせが1つ以上の別個のペレットまたは液体の形態であり得るように、分割することができる。そのような組み合わせは、そのような組み合わせのうちの少なくとも2つを含むキットまたはバイアルを形成することができる。例えば、キットまたはバイアルは、ポリメラーゼ酵素を除くすべての反応混合物成分を含むペレットを含むことができ、ポリメラーゼ酵素を、例えばキットの、バイアル中の別個のペレットまたは液体で提供することができる。1つの非限定的な例では、組成物は、核酸分子の集団、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、順方向プライマー、逆方向プライマー、ヌクレオチド、および緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、核酸分子、順方向プライマー、逆方向プライマー、u v s Xリコンビナーゼ、u v s Yリコンビナーゼ装填タンパク質、g p 3 2タンパク質、S a u DNAポリメラーゼ、d N T P、A T P、ホスホクレアチン、およびクレアチンキナーゼを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、第1のプライマー結合配列と第2のプライマー結合配列との両方を有する少なくとも2つの異なる核酸分子、リコンビナーゼ、リコンビナーゼアクセサリタンパク質、ポリメラーゼ、第1のユニバーサルプライマー、第2のユニバーサルプライマー、d N T P、および緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、1つ以上の支持体をさらに含む。例示的な実施形態では、組成物は、第1のプライマー結合配列と第2のプライマー結合配列との両方を有する少なくとも2つの異なる鋳型核酸分子、u v s Xリコンビナーゼ、u v s Yリコンビナーゼ装填タンパク質、g p 3 2タンパク質、S a u DNAポリメラーゼ、A T P、ホスホクレアチン、クレアチンキナーゼ、ビーズ支持体に付着した第1のユニバーサルプライマー、第2のユニバーサルプライマー、および緩衝液を含む。

10

20

【0271】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、鋳型化反応（例えば、1つ、1つ以上、2つ、または2つ以上の鋳型化反応）は、プレシーディング反応後に実行され、プレシーディングされた表面または支持体上の鋳型核酸分子が、増幅されるか、またはさらに増幅される（本明細書では鋳型化反応と呼ばれる）。プレシーディングされた固体支持体は、典型的には、鋳型化反応とは別個であるプレシーディング反応で生成される。一般に、そのような実施形態では、鋳型化反応混合物は、溶液中に追加の鋳型核酸分子を含まず、その結果、1つ以上のプレシーディングされた支持体に付着した鋳型核酸分子は、鋳型化反応が開始される前に、鋳型化反応混合物中の鋳型核酸分子の支配的なまたは唯一の供給源である。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子は、鋳型化反応が開始されたときに、反応混合物中の溶液中存在する。いくつかの実施形態では、1つ以上の洗浄は、それらを鋳型化反応混合物に導入する前に、1つ以上のプレシーディングされた支持体に対して実行される。いくつかの実施形態では、2つ以上の反応が、鋳型化方法で実行される。

30

【0272】

いくつかの実施形態では、1つ以上の鋳型化反応が、実行される（または、鋳型化反応は、2つの別個の増幅の2つのステップ、例えば2つの別個のR P A反応、で実行される）。いくつかの実施形態では、2つ以上の別個の反応が、鋳型化方法で実行される。例えば、本明細書で提供されるいくつかの方法では、第1の、または最初の鋳型化反応が、実行され、第2のまたは後続の鋳型化反応が続く。最初の鋳型化反応は、いくつかの事例では、鋳型化反応の開始前に別個のプレシーディングプロセスで生成された、1つ以上の鋳型ポリヌクレオチドが付着している1つ以上の支持体を含む。最初の鋳型化反応は、例えば実質的に等温条件下でリコンビナーゼおよびポリメラーゼ（すなわち、R P A）を使用する、プレシーディングされた支持体上の1つ以上の鋳型ポリヌクレオチドの増幅を含む。そのような実施形態では、別個の鋳型化反応またはR P A反応を、同じまたは異なる時間にわたって実行することができる。最初の第1の鋳型化反応、およびそれに続く第2のまたは後続の鋳型化反応は、典型的には、後続の第2の鋳型化反応の持続時間よりも短い期間にわたって実施される。例えば、最初の第1の鋳型化反応、およびそれに続く第2の

40

50

または後続の鑄型化反応は、約 1 ～ 10 分、約 1 ～ 9 分、約 1 ～ 8 分、約 1 ～ 7 分、約 1 ～ 6 分、約 1 ～ 5 分、約 1 ～ 4 分、約 1 ～ 3 分、約 1 ～ 2.5 分、約 1 ～ 2 分、約 1 ～ 1.5 分、約 2 ～ 10 分、約 2 ～ 9 分、約 2 ～ 8 分、約 2 ～ 7 分、約 2 ～ 6 分、約 2 ～ 5 分、約 2 ～ 4 分、約 2 ～ 3 分、約 2 ～ 2.5 分、約 2.5 ～ 10 分、約 2.5 ～ 9 分、約 2.5 ～ 8 分、約 2.5 ～ 7 分、約 2.5 ～ 6 分、約 2.5 ～ 5 分、約 2.5 ～ 4 分、または約 2.5 ～ 3 分にわたって実施され得る。いくつかの例では、最初の第 1 の鑄型化反応、およびそれに続く第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、約 15 分未満、約 10 分未満、約 5 分未満、約 4 分未満、約 3 分未満、約 2.5 分未満、約 2 分未満、約 1.5 分未満、または約 1 分未満にわたって実施され得る。1 つの非限定的な例では、最初の鑄型化反応は、RPA を使用して、約 40℃ で約 2.5 分にわたって実施される。いくつかの実施形態では、最初の、または第 1 の鑄型化反応は、第 2 のまたは後続の鑄型化反応の開始前に終了されるか、または制限される。例えば、鑄型化反応阻害剤などの終結組成物が、反応を阻害するかもしれないと停止させるか、または反応が継続することを妨げる、最初の、または第 1 の鑄型化反応に添加されてもよい。鑄型化反応阻害剤の例として、限定されるものではないが、核酸増幅反応の 1 つ以上の成分を阻害する成分、例えば、ポリメラーゼ阻害剤またはリコンビナーゼ阻害剤、または反応が進行するのに必要とされる反応の成分を制限する組成物が挙げられる。例えば、RPA を含む最初の鑄型化反応では、鑄型化反応阻害剤は、リコンビナーゼーポリメラーゼ増幅におけるリコンビナーゼ媒介反応に必要とされ得る、金属またはカチオンキレート剤、例えばマグネシウムなどのカチオンに結合する EDTA、などのキレート剤であってもよい。別の例では、鑄型化反応に必要とされる 1 つ以上の成分を含有しない溶液で、鑄型化反応部位、例えば反応チャンバまたはウェル、を洗浄することなどによって、反応成分を除去することによって、鑄型化反応を制限するか、または中止することができる。例えば、鑄型化反応部位を、鑄型化反応で使用される RPA 反応のリコンビナーゼ、ポリメラーゼ、カチオン、ヌクレオチド、または他の成分を欠く溶液で洗浄するか、または洗い流してもよい。いくつかの実施形態では、最初のまたは第 1 の鑄型化反応に続く第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、1 つ以上の鑄型化反応成分を、最初の、または第 1 の鑄型化反応に供された鑄型結合支持体に添加するか、または接触させることによって、開始されるか、または促進される。例えば、リコンビナーゼーポリメラーゼ核酸増幅を含む第 2 のまたは後続の鑄型化反応では、以下の成分のうちの 1 つ以上を、鑄型結合支持体に添加するか、またはこれと接触させてもよい：リコンビナーゼ、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、またはカチオン。第 1 の、または最初の鑄型化反応に続く第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、典型的には、第 1 の鑄型化反応の持続時間よりも長い期間にわたって実施される。例えば、第 1 の鑄型化反応に続く第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、約 5 ～ 60 分、約 5 ～ 50 分、約 5 ～ 45 分、約 5 ～ 40 分、約 5 ～ 35 分、約 5 ～ 30 分、約 5 ～ 25 分、約 5 ～ 20 分、約 5 ～ 15 分、約 5 ～ 10 分、約 10 ～ 60 分、約 10 ～ 50 分、約 10 ～ 45 分、約 10 ～ 40 分、約 10 ～ 35 分、約 10 ～ 30 分、約 10 ～ 25 分、約 10 ～ 20 分、約 10 ～ 15 分、約 15 ～ 60 分、約 15 ～ 50 分、約 15 ～ 45 分、約 15 ～ 40 分、約 15 ～ 35 分、約 15 ～ 30 分、約 15 ～ 25 分、約 15 ～ 20 分、約 20 ～ 60 分、約 20 ～ 50 分、約 20 ～ 45 分、約 20 ～ 40 分、約 20 ～ 35 分、約 20 ～ 30 分、または約 20 ～ 25 分にわたって実施されてもよい。いくつかの例では、第 1 の、または最初の鑄型化反応に続く第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、少なくとも約 60 分、少なくとも約 55 分、少なくとも約 50 分、少なくとも約 45 分、少なくとも約 40 分、少なくとも約 35 分、少なくとも約 30 分、少なくとも約 25 分、少なくとも約 20 分、2 分未満、1.5 分未満、または 1 分未満にわたって実施されてもよい。1 つの非限定的な例では、第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、RPA を使用して、約 40℃ で約 20 分にわたって実施される。いくつかの実施形態では、第 2 のまたは後続の鑄型化反応は、例えば、最初のまたは第 1 の鑄型化反応について記載されたように、設定された時間に終了するか、中止されるか、または制限される。

【0273】

核酸の実質的にモノクローナルの集団を生成するための鑄型化プロセスに 2 つ以上の反

10

20

30

40

50

応を含めることの1つの利点は、核酸集団の多クローン性を低減するか、または防止することができる鑄型増幅の制御を容易にすることである。例えば、量または持続期間が制限されているプレシーディングされた支持体上での鑄型ポリヌクレオチドの最初の、または第1の増幅は、別の鑄型化反応部位に移動するか、またはマイグレートするために利用可能な遊離鑄型核酸の量を制限することができる。最初のまたは第1の鑄型化反応は、複製された鑄型核酸の、プレシーディングされた支持体または表面または表面部位上の追加の固定化プライマーへの結合を提供し、したがって、第2のまたは後続の鑄型化反応増幅で発生する鑄型核酸の拡散に対してあまり開かれていない環境を提供する。

【0274】

例えば、鑄型化方法で2つ以上の反応が実行される実施形態を含む、本明細書で提供されるプレシーディングまたは鑄型化方法のいくつかの実施形態では、反応のうちの1つ以上は、1つ以上の拡散制限剤を含む。反応混合物の単一の連続液相内で2つ以上の鑄型核酸分子を増幅する場合、拡散制限剤を含むことが有利であり得る。拡散制限剤は、鑄型化反応混合物またはプレシーディング反応混合物内の鑄型核酸分子の少なくともいくつかの部分の複製を介して産生された、鑄型核酸分子または増幅されたポリヌクレオチドの拡散をさらに防止するか、または遅延させることができ、したがって、モノクローナルの鑄型集団を生成するためのある鑄型化反応での核酸を、異なるモノクローナルの鑄型集団を生成するための別の鑄型化反応に変換し、それによって、鑄型化反応またはプレシーディング反応での核酸増幅中のポリクローナルの汚染物質の形成を低減する。したがって、拡散制限剤は、増幅中に物理的手段またはカプセル化手段（例えば、エマルジョン）によるプレシーディングまたは鑄型化反応混合物の区画化を必要とせずに、ポリクローナルの汚染物質の形成を防止するか、または低減することができる。いくつかの実施形態では、拡散制限剤は、第1の、または最初の鑄型化反応に含まれる。いくつかの実施形態では、拡散制限剤は、第1の、または最初の鑄型化反応に含まれるが、第2のまたは後続の鑄型化反応には含まれない。いくつかの実施形態では、拡散制限剤は、第1の、または最初の鑄型化反応に、および1つ以上の後続の鑄型化反応に含まれる。いくつかの実施形態では、1つ以上の反応に含まれる拡散制限剤は、1つ以上のふるい分け剤、例えばメチルセルロースなどのポリマー、であるか、または拡散制限剤は、複数の細孔を有するマトリックスを提供する。ふるい分け剤は、例えば増幅反応生成物または鑄型核酸分子などの、プレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物中に存在する1つ以上の鑄型核酸分子またはポリヌクレオチドをふるいにかけ、その移動を制限するか、または遅延させるのに有効である任意の薬剤であり得る。したがって、ふるい分け剤は、ポリヌクレオチドのブラウン運動を低減することができる。いくつかの実施形態では、ふるい分け剤は、ポリマー化合物である。非限定的な例として、ふるい分け剤は、多糖類、ポリペプチド、有機ポリマー、または任意の他の好適なポリマーを含むことができる。いくつかの実施形態では、ふるい分け剤は、以下のポリマーのうちの1つ以上である：セルロース、デキストラン、デンプン、グリコーゲン、寒天、キチン、ペクチン、またはアガロース。いくつかの実施形態では、ふるい分け剤は、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチル2-ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、2-ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、（ヒドロキシプロピル）メチルセルロースもしくはヒドロキシエチルエチルセルロースなどの、セルロース誘導体、またはそのようなポリマーのいずれか1つ以上を含む混合物を含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物は、混雑剤を含む。例えば、混雑剤は、混雑した反応環境を生成することによって、核酸増幅反応での1つ以上の成分の濃度を増加させることができる。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物は、ふるい分け剤または拡散制限試薬または混雑剤の両方を含む。拡散制限剤は、拡散低減剤を含む。拡散低減剤は、鑄型核酸分子またはポリヌクレオチドの、より高い濃度の領域からより低い濃度を有する領域への移動を低減する任意の化合物を含む。いくつかの実施形態では、拡散低減剤は、サイズに関わらず、核

10

20

30

40

50

酸増幅反応の任意の成分の移動を低減する任意の化合物を含む。

【0275】

いくつかの実施形態では、1つ以上の反応に含まれる拡散制限剤は、抗力化合物 (drag compound) である。「抗力化合物」という用語およびその変形は、核酸に付着し、かつ反応混合物を通したこれらの核酸の拡散を遅らせながらも、核酸合成反応でそのようなポリヌクレオチド、プライマー、鋳型、または増幅産物を使用して拡散合成を進行させることができる、任意の化合物、例えば化学化合物を指す。例えば、抗力化合物は、付着した化合物を欠く核酸と比較して、修飾された核酸の全体的なサイズ、長さ、半径、形状、または電荷を改変することによって、核酸に付着すると流体力学的抗力を提供することができる。いくつかの実施形態では、核酸に付着した抗力化合物は、水性媒体と付着した化合物を欠く核酸との間の相互作用と比較して、核酸と水性媒体との間の相互作用を改変することができる。合成反応内の核酸へのそのような抗力化合物の付着は、典型的には、反応混合物中のそのような核酸の移動度を低下させ、同じ反応混合物内で生じる異なる合成反応間の増幅産物または鋳型の交差汚染を防止するのに役立ち得る。例えば、抗力化合物は、鋳型化反応中に、例えば鋳型核酸増幅中に、鋳型核酸に結合するか、または付着して、鋳型化反応混合物中の鋳型核酸の移動度を低下させる化合物であり得る。いくつかの実施形態では、鋳型核酸は、抗力化合物に結合する部分（「抗力タグ」と呼ばれる）を含むように修飾される。例えば、リンカー部分などの親和性部分を、核酸に付着させてもよく、抗力化合物は、親和性部分に結合する結合パートナー部分、例えば、受容体型部分、であるものである。1つの非限定的な例では、鋳型核酸を、1つ以上の鋳型化反応またはプレシーディング反応に含まれる抗力化合物として機能するアビジン様部分（例えば、ストレプトアビジンまたはその誘導体、例えばニュートラアビジン）を結合させることができるビオチン部分に付着させる。いくつかの実施形態では、抗力化合物は、第1の、または最初の鋳型化反応に含まれる。いくつかの実施形態では、抗力化合物は、第1の、または最初の鋳型化反応に含まれるが、第2のまたは後続の鋳型化反応には含まれない。いくつかの実施形態では、抗力化合物は、第1の、または最初の鋳型化反応に、および1つ以上の後続の鋳型化反応に含まれる。いくつかの実施形態では、拡散低減剤またはふるい分け剤は、ポリアクリルアミド、寒天、アガロース、またはヒドロキシエチルセルロース (HEC)、メチルセルロース (MC)、またはカルボキシメチルセルロース (CMC) などのセルロースポリマーを含む。

【0276】

本明細書で提供される鋳型化方法のいくつかの実施形態では、鋳型化反応は、RPA反応を含む。鋳型化反応混合物は、典型的には、以下のうちのすべてまたはいくつかを含む：付着した実質的に同一の第1のプライマーの集団を含み、かつ実質的にモノクローナルの鋳型核酸分子、例えば、1つの鋳型分子（または2つ以上の鋳型分子）が付着した、1つ以上のプレシーディングされた固体支持体。鋳型分子）、ポリメラーゼ、リコンビナーゼ、任意選択的な一本鎖結合タンパク質、任意選択的なリコンビナーゼ装填タンパク質、固体支持体に付着することができるか、または溶液中である任意選択的な第2のまたは逆方向プライマー、dNTP、ATP、緩衝液、および任意選択的にホスホクレアチンおよびクレアチンキナーゼの一方または両方。MgCl₂またはMg(OAc)₂などの二価カチオンを添加して反応を開始することができる。いくつかの実施形態では、緩衝液は、PEG、Tris緩衝液、または酢酸カリウム塩などの、混雑剤、または拡散制限剤、例えばふるい分け剤または抗力化合物、を含む。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子上の順方向プライマー結合配列は、順方向プライマーの少なくとも一部分に相補的であるか、または同一であり、鋳型核酸分子上の逆方向プライマー結合配列は、逆方向プライマーの少なくとも一部分に相補的であるか、または同一である。いくつかの実施形態では、鋳型化反応は、バルク増幅（例えば、バルク等温増幅）を含むか、または反応チャンバ、例えばマルチウェル固体支持体または表面のウェル、で実行される。

【0277】

いくつかの実施形態では、組成物、ならびに組成物に関連するシステム、方法、キット

および機器は、プレシーディングされた支持体の集団、ヌクレオチド、リコンビナーゼ、およびポリメラーゼを含む鑄型化反応混合物を含み、プレシーディングされた支持体は各々、1つまたは2つ以上の、例えば10～50,000の、付着した第1のプライマーを含む実質的にモノクロナルの鑄型核酸分子を有し、プレシーディングされた支持体に付着し、かつ鑄型拡散分子に結合していない、付着した第1のプライマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、反応混合物は、リコンビナーゼ-ポリメラーゼ増幅反応を開始することができるカチオンを含まないか、または反応混合物中の鑄型核酸分子の少なくとも95%が、1つ以上の支持体に付着している。いくつかの実施形態では、鑄型化反応混合物は、リコンビナーゼ-ポリメラーゼ増幅反応を開始することができるカチオンをさらに含む。いくつかの実施形態では、鑄型核酸分子は、異なる配列を有する2つ以上の鑄型核酸分子を含む。いくつかの実施形態では、鑄型化反応混合物は、リコンビナーゼアクセサリタンパク質を含む。さらなる実施形態では、リコンビナーゼアクセサリタンパク質は、一本鎖結合タンパク質またはリコンビナーゼ装填タンパク質である。いくつかの実施形態では、プレシーディングされた支持体は、PCRサイクルまたはリコンビナーゼ-ポリメラーゼ増幅(RPA)反応を含むプレシーディング反応で生成される。いくつかの実施形態では、RPA反応は、RPA反応混合物を35℃～45℃の温度で2～5分間インキュベートすることによって実行される。

【0278】

本明細書で提供される方法のいくつかの実施形態では、プレシーディング方法がRPA反応を含むことができるか、または鑄型化プロセスが2つ以上のRPA反応を含むことができることから、これらの方法は、順次のRPA反応を含み得る。例えば、第1のRPA反応は、プレシーディング反応であり得、第2のRPA鑄型化反応が続く。別の例では、プレシーディング反応は、1つ以上のPCRサイクルまたは非等温増幅のサイクルであり得、RPA反応を伴う1つ以上の鑄型化反応が続く。RPA反応を、同じ条件下で実行することができる。しかしながら、いくつかの実施形態では、プレシーディングRPA反応、または1つ以上の後続の鑄型化RPA反応が続く最初の鑄型化RPA反応は、最初の鑄型化RPA反応の後に発生する鑄化RPA反応または鑄型化反応よりも少ない増幅サイクルが生じるように実行される。例えば、プレシーディングRPA反応を、プレシーディングされたRPA反応によって生成されたプレシーディングされた固体支持体に付着した鑄型核酸分子を増幅する鑄型化RPA反応よりも短い時間で実行することができる。非限定的な例示的な例として、プレシーディングRPA反応、または1つ以上の鑄型化RPA反応が続く最初の鑄型化RPA反応が、例えば、約2～5分間実行されて、プレシーディングされた支持体または鑄型化された支持体のうちの1つ以上、例えば集団、を生成し、次いで、約10～60分にわたって実行される鑄型化RPA反応に供される。これらの非限定的な例示的な例のいくつかでは、鑄型核酸を含む反応成分は、鑄型化RPA反応の前に、プレシーディングされた固体支持体から洗浄除去流される。

【0279】

いくつかの実施形態では、プレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物は、時期尚早の反応開始を阻害する条件下でプレインキュベートされる。例えば、プレシーディング反応混合物中の1つ以上の成分を反応容器外に保留して、時期尚早の反応開始を防止することができる。いくつかの実施形態では、反応を開始するために、二価カチオンが添加される(例えば、マグネシウムまたはマンガン)。別の例では、反応混合物は、酵素活性を阻害する温度、例えば約0～15℃または約15～25℃で、プレインキュベートされる。次いで、反応物をより高い温度でインキュベートして、酵素活性を増大させる。例示的な実施形態では、プレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物は、反応中に42℃を超える温度に曝されない。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応または鑄型化反応は、等温条件下で実行される。いくつかの実施形態では、等温条件は、例えば、約10℃以下、または約5℃、または約1～5℃、または約0.1～1℃、または約0.1℃以下である温度変化を含む、増幅の少なくとも一部分(または増幅プロセス全体)の間に、限定された範囲内に拘束される温度変化にさらされる反応を含む。等温反応の

10

20

30

40

50

温度は、典型的には、約 15℃～65℃、例えば、約 15℃～55℃、約 15℃～45℃、約 15℃～37℃、約 30℃～60℃、約 40℃～60℃、約 55℃～60℃、約 35℃～45℃、または約 37℃～42℃であり得る。他の実施形態では、プレシーディング反応は、40℃、41℃、42℃、43℃、45℃、または50℃を超える温度に曝されない。よって、特定の実施形態では、反応混合物は、ホットスタート条件に曝されない。いくつかの実施形態では、これらの方法は、二本鎖鋳型核酸分子を増幅中に極端な変性条件にさらすことなく実行される。例えば、これらの方法を、増幅中に核酸鋳型を鋳型の T_m 以上の温度にさらすことなく実行することができる。いくつかの実施形態では、これらの方法は、増幅中に、鋳型を NaOH、尿素、グアニジウムなどの化学的変性剤と接触させることなく実行される。

【0280】

いくつかの実施形態では、鋳型化方法を実行した後、鋳型化された表面または支持体または部位は、鋳型化された各支持体、表面、または部位に付着した少なくとも50,000、75,000、100,000、125,000、150,000、200,000、250,000、300,000、350,000、400,000、450,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、または 10^6 の実質的にモノクローナルの鋳型核酸分子を有する。いくつかの実施形態では、鋳型化方法を実行した後、鋳型化された表面または支持体または部位は、鋳型化された各支持体に付着した約50,000～500,000の実質的にモノクローナルの鋳型核酸分子、例えば、各鋳型支持体に付着した約50,000～400,000、約50,000～300,000、約50,000～200,000、約50,000～100,000、約100,000～400,000、約100,000～300,000、約100,000～200,000、または約150,000～300,000の実質的にモノクローナルの鋳型核酸分子を有する。

【0281】

いくつかの実施形態では、例えば固体支持体などの、1つ以上の鋳型化された支持体または表面を生成するための方法は、例えば、a) 1つ以上のプレシーディングされた支持体、ヌクレオチド、リコンビナーゼ、およびポリメラーゼを組み合わせることによって鋳型化反応混合物を形成することであって、1つ以上のプレシーディングされた支持体は、付着した実質的に同一の第1のプライマーの集団を含み、1つの鋳型分子が付着しているか、または実質的にモノクローナルの鋳型核酸分子が付着しており、1つ以上のプレシーディングされた支持体は、鋳型核酸分子が、いくつかの実施形態では100以上の同一のヌクレオチドを含まない、第1のプライマーを含む近位セグメントを含み、近位セグメントは、プレシーディングされた固体支持体に鋳型核酸セグメントを付着させ、プレシーディングされた支持体は、鋳型核酸分子に結合していない付着した第1のプライマーをさらに含み、鋳型化反応混合物は、可溶性であるか、または溶液中にあり得る、実質的に同一の第2のプライマーの集団をさらに含み、鋳型核酸分子は、近位セグメントの反対側の末端またはその近くに、第2のプライマーのためのプライマー結合部位を含む、形成することと、b) 1つ以上の鋳型化反応を実行することと、を含む。いくつかの実施形態では、鋳型化反応を実行する際に、鋳型化反応混合物を等温条件下でインキュベートして、鋳型核酸分子を増幅して、1つ以上の鋳型化された表面または支持体を生成する。鋳型化反応混合物へのカチオンの添加が、いくつかの鋳型化反応に含まれる。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子は、鋳型化反応が開始されたときに、反応混合物中の溶液中に存在しない。いくつかの実施形態では、鋳型核酸分子は、異なる配列を有する2つ以上の鋳型核酸分子を含む。これらの方法のいくつかの実施形態では、プレシーディングされた支持体上に存在したのと少なくとも100倍多くの実質的にモノクローナルの鋳型核酸分子が、鋳型化された支持体上に存在する。

【0282】

鋳型化反応混合物を形成する際に使用される1つ以上のプレシーディングされた支持体、またはプレシーディングされた支持体の集団が生成されるプレシーディング方法が、鋳

型化反応に先行することができる。プレシーディング法は、プレシーディング条件下でプレシーディング反応混合物を使用して、1つの鑄型分子または複数の、例えば10～100,000の、実質的にモノクローナルの鑄型核酸分子を有し、付着した第1のプライマーを含み、かつ鑄型核酸分子に結合していない付着した第1のプライマーを含む、プレシーディング支持体を生成することを含む。典型的には、プレシーディング反応は、核酸分子の集団と、付着した実質的に同一の第1のプライマーの集団を含む支持体または表面の集団と、を含むプレシーディング反応混合物をインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、核酸分子の集団は、標的配列および1つ以上のユニバーサルアダプタ配列を含む複数の核酸分子を含む。例えば、複数のうちの各核酸分子は、分子の鎖のうちの1つに関して、分子の5'末端の接続するヌクレオチドの第1の配列（例えば、第1のアダプタ）と、分子（例えば、第2のアダプタ）の3'末端の接続するヌクレオチドの第2の配列と、接続するヌクレオチドの第1の配列と第2の配列との間に位置決めされた第3のヌクレオチド配列、例えば標的配列、と、を含有し、核酸分子の接続するヌクレオチドの第1の配列と第2の配列とは異なり、核酸分子の接続するヌクレオチドの第1の配列は、実質的に同一であり、核酸分子の接続するヌクレオチドの第2の配列は、核酸分子の集団の中で実質的に同一である。核酸分子の末端の接続するヌクレオチドの配列のうちの1つ（例えば、アダプタ配列）は、典型的には、支持体に付着した第1のプライマーの少なくとも一部分に相補的であるか、または支持体に付着した第1のプライマーの少なくとも一部分は、プレシーディング反応で核酸分子の末端に付加される。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応でのインキュベーションは、核酸が支持体に付着した第1のプライマーにアニーリングする条件下での増幅（例えば、PCR）のサイクルを含む。プレシーディング反応混合物は、いくつかの実施形態では、核酸にハイブリダイズした第1のプライマーの伸長のための成分（例えば、1つ以上のポリメラーゼ、dNTP）を含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応は、核酸増幅の1つ以上のサイクル（例えば、変性、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長を含む）を含み、支持体に付着した第1のプライマーの少なくとも一部分に相補的な接続するヌクレオチドの配列が、例えば核酸分子がそのような接続するヌクレオチドの配列を含まない場合に、核酸分子の末端に付加される。そのような実施形態では、1つ以上の増幅サイクルを、付着した第1のプライマーの集団を含む支持体または表面の非存在下または存在下で実行することができる。付着した第1のプライマーの集団を含む支持体または表面の非存在下で増幅の1つ以上のサイクルが実行される事例では、支持体または表面は、支持体に付着した第1のプライマーの少なくとも一部分に相補的な接続するヌクレオチドの配列を含む末端を有する核酸の生成後に、プレシーディング反応混合物に付加される。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応は、例えば、複数の第1のプライマーが付着した支持体または表面の非存在下または存在下で、第1のプライマー配列を含むプライマー、または第2のプライマーであるプライマーを含む、溶液中の核酸および1つ以上のプライマーの存在下での増幅の1つ以上のサイクルを含み、このサイクルに、いくつかの実施形態では、複数の第1のプライマーが付着した支持体または表面の存在下での増幅（例えば、変性、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長）の1つ以上のサイクルが続くことができる。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応中の1つ以上の増幅サイクルは、等温条件下で実施される。例えば、いくつかの実施形態では、プレシーディング反応での増幅の1つ以上のサイクルは、RPAを含む。これらの方法のいくつかの実施形態では、プレシーディング反応条件は、約98℃で約2分、続いて約56℃～約58℃で約5分を含む、増幅のサイクルを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディング反応条件は、溶液中の第1のプライマー配列を含むプライマーまたは第2のプライマーの存在下で、約98℃で約15秒、続いて約58℃で約2分を含む、増幅の1回以上のサイクル（例えば、2サイクル）を含み、これを、支持体または表面の存在下または非存在下で実行することができる。これに、いくつかの実施形態では、複数の第1のプライマーが付着した支持体または表面の存在下で、約98℃で約2分、続いて約56℃～約58℃で約5分を含む、増幅のサイクルが続く。これらの方法のいくつかの実施形態では、プレシーディング反応条件は、

10

20

30

40

50

プレシーディング反応混合物を等温条件下で約2～5分にわたってインキュベートすることを含む。いくつかの実施形態では、プレシーディングされた支持体は、第1のリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)反応を使用して生成され、鑄型化反応は、この方法では、第2のRPA反応、および任意選択的に第3以上のRPA反応を含む。いくつかの実施形態では、第1のRPA反応は、RPA反応混合物を35℃～45℃の温度で2～5分間インキュベートすることによって実行される。これらの方法のいくつかの実施形態では、この方法でのプレシーディング反応混合物または鑄型化反応混合物は、例えば、一本鎖結合タンパク質またはリコンビナーゼ装填タンパク質などのリコンビナーゼアクセサリータンパク質をさらに含む。これらの方法のいくつかの実施形態での鑄型化反応混合物またはプレシーディング混合物は、35℃～45℃の温度でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、鑄型化反応混合物は、10～60分にわたってインキュベートされる。本明細書で提供される方法、ならびにこれらの方法を実施するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットでの使用に好適なプレシーディング方法および鑄型化方法の例として、限定されるものではないが、PCT国際公開第2019/094524号、米国特許出願第2019/0194719号、および米国特許出願第16/403,339号に記載されたプレシーディング方法および鑄型化方法が挙げられ、これらの各々の開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0283】

いくつかの実施形態では、1つ以上の鑄型化された固体支持体は、鑄型核酸分子の配列を判定するためのシーケンシング反応で使用される。さらなる実施形態では、鑄型化された固体支持体は、鑄型化されたビーズであり、シーケンシングは、シーケンシング反応が実行される前に、固体支持体または表面のウェルにビーズを分配することを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の鑄型化された固体支持体は、第1の配列を有する鑄型核酸分子の実質的にモノクローナルの集団が付着している第1の鑄型化された固体支持体と、第2の配列を有する鑄型核酸分子の実質的にモノクローナルの集団が付着している少なくとも1つの他の鑄型化された固体支持体と、を含み、第1の付着した鑄型核酸分子の配列は、第2の付着した鑄型核酸分子の配列とは異なる。

【0284】

例えば本明細書で提供される固体支持体などの、1つ以上の鑄型化された支持体または表面を生成するための方法のいくつかの実施形態では、この方法で生成された鑄型化された1つ以上の支持体または支持体に付着した鑄型核酸のうちの少なくともいくつか、ほとんど、実質的にすべて、またはすべては、付着物、例えば第1のリンカー部分、を含む少なくとも1つの修飾ヌクレオチドを含有する。そのような方法は、鑄型化された支持体を、鑄型化された支持体に付着した核酸の修飾ヌクレオチドが修飾ヌクレオチドの付着物またはリンカーを介して結合するか、連結するか、または付着する部分(例えば、結合パートナーまたは第2のリンカー部分)を有する第2の支持体、例えばビーズ、に連結し、それによって、鑄型化された支持体および第2の支持体の支持体アセンブリを形成することをさらに含む得る。これらの方法のいくつかの実施形態では、支持体アセンブリは、第2の支持体を含まない任意の要素から分離され、それによって、支持体アセンブリをそのような要素から分離し、鑄型化された支持体の濃縮された集団を形成する。いくつかの実施形態では、第2の支持体は、磁性コンポーネント(例えば、磁性ビーズ)を含み、支持体アセンブリは、支持体アセンブリに磁場を印加することによって、磁性支持体を含まない要素から分離される。これらの方法のいくつかの実施形態では、分離された支持体アセンブリは、鑄型化された支持体が第2の支持体から解放され、かつさらなる方法、例えばシーケンシング方法、で分析される条件下にさらに供される。

【0285】

いくつかの実施形態では、プレシーディング(シーディング)または鑄型化反応を実施した後、鑄型核酸上のリンカー(例えば、ビオチン)に結合するか、または付着する部分を表面上に有する粒子、例えばビーズ、を使用して、シーディングされた鑄型核酸を直接捕捉し、濃縮する。例えば、いくつかの実施形態では、可溶性ブロックテールプライマー

10

20

30

40

50

(例えば、図 5 3 に描示されるような P 1 / B プライマー) またはビオチン化プライマー (例えば、図 5 6 に描示されるようなプライマー A) を使用するシーディング反応で生成されたビオチン付加物を担持する鋳型核酸を、支持体に固定化されたプライマーにハイブリダイズさせ、次いで、伸長させて、支持体に結合した二本鎖鋳型分子を形成する。次いで、シーディングされた支持体を、ビオチンが結合する部分を有する粒子と接触させ (例えば、ビオチン付加物を介して鋳型核酸に結合してビーズアセンブリを形成する、磁性ビーズなどの、ストレプトアビジンがコーティングされたビーズ (図 5 8 を参照)、これによって、シーディングされた支持体を捕捉する。次いで、ビーズアセンブリを、例えば磁石でビーズアセンブリをペレット化することによって、他の反応成分から分離し得る。後続のストレプトアビジンがコーティングされたビーズの鋳型核酸からの脱離 (例えば、固体支持体に結合している二本鎖鋳型の変性による) と、脱離したビーズからの、固体支持体に結合した鋳型核酸の除去と、は、一本鎖鋳型が結合した固体支持体の濃縮されたコレクションを生じさせる。鋳型核酸がシーディングされた支持体のすべてが確実に捕捉されるように、過剰なストレプトアビジンがコーティングされた磁性ビーズを、捕捉プロセスに含み得る。リンカー (例えば、ビオチン) を担持するが、磁性ビーズによって捕捉され、かつシーディングされた支持体とともに溶出され得る支持体に結合していない任意のシーディング増幅反応産物を、本明細書に記載されるようなさらなる下流処理 (例えば、固体支持体に結合した鋳型のシーケンシングのために、シーディングされた支持体を、表面上のマイクロウェル、例えばチップ、などの反応部位に装填する際に)、シーディングされた支持体から分離し得る。

【0286】

いくつかの実施形態では、プレシーディング (またはシーディング) 方法を、図 5 9 に例示されるように実行することができる。この例では、この方法は、増幅の一連のサイクルから所望の固体支持体付着核酸分子を生成するように設計されており、増幅の一連のサイクルでは、所望の標的核酸である増幅産物のうちの 1 つのみが、支持体に付着することとなる。所望の標的は、核酸の 5' 末端の「ハンドル」部分と呼ばれるヌクレオチドの一本鎖配列と、支持体に固定化されたプライマー (図 5 8 では文字 B で標記されている) に相補的である、3' 末端のアダプタヌクレオチド配列 (図 5 9 では文字 B' で標記されている) と、を含有する。図 5 8 に示されるように、二本鎖核酸 (例えば、ライブラリ核酸) は、5' 末端の A アダプタ配列、および 3' 末端の P 1 アダプタ配列 (標準の Ion Torrent A および P 1 ライブラリアダプタ、Thermo Fisher Scientific) などの、各末端の異なるアダプタ配列を含有する。いくつかの事例では、図 5 8 に描示されるように、入力ライブラリは、A アダプタ上にすでにハンドル構成を有している可能性がある。入力ライブラリが A アダプタ上にハンドル構成を有していない場合、5' → 3' 方向に、ハンドルヌクレオチド配列、非複製可能な部分 (例えば、ポリメラーゼ停止部位)、および A アダプタ配列を含有するプライマーを含むライブラリの増幅反応で、ハンドル構成を追加することができる。プレシーディング増幅反応を始めるために、ライブラリは、図 5 8 に描示されるようなプライマーの存在下で、増幅の 1 サイクル (すなわち、変性、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長) に供される。増幅に使用される例示的なプライマーは、このプライマーの 5' 末端に、ポリメラーゼストップと非複製部分の 5' に位置するハンドル配列とを有するプライマー A (順方向プライマー)、および逆方向融合プライマーである。ハンドル含有プライマーの非複製不可部分は、ポリメラーゼによって複製できない任意の組成物であり得る。そのような非複製不可部分として、例えば、ポリメラーゼによる鋳型ベースのヌクレオチド重合を支持することができない任意の部分が挙げられる。例えば、非複製可能部分として、プライマー伸長を実行するために使用されるポリメラーゼによって認識されない非ヌクレオチジル部分 (例えば、PEG または他の炭素ベースのスペーサー)、アミノ酸またはヌクレオチド類似体を挙げることもできる。非複製可能部分を含有するプライマーの例は、例えば、国際出願公開第 2014/062717 号に記載されており、その開示は、それを参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。ハンドル含有プライマーがポリメラーゼによる鋳型依存性核酸合

10

20

30

40

50

成に使用される場合、ポリメラーゼは、合成された核酸鎖を非複製可能部分を超えて伸長させることができない。このことは、典型的には、核酸合成の停止または終了をもたらす、非複製可能部分は、ポリメラーゼストップ部位として機能する。融合プライマー（例えば、図58でtrP1と標記されたプライマー）は、標的核酸の3'末端のアダプタ配列の一部分に相補的である配列と、固体支持体上に固定化されたプライマーと同一であるBプライマーと、の融合である。図58に示される例では、trP1は、Ion P1アダプタの23merセグメントである。融合プライマーは、ライブラリ挿入配列に近いライブラリ核酸分子の3'アダプタ配列の内側部分でハイブリダイズし、プライミングすることとなり、ライブラリ核酸の3'最末端のアダプタ配列の残りの部分とハイブリダイズしない。これにより、融合プライマー配列とライブラリ核酸上のアダプタの3'極端部分との間にミスマッチ末端が形成される。図58に示されるように、2サイクルの増幅（例えば、PCR）の後、4つの増幅産物が生成されるが、1つの産物のみが、支持体（例えば、イオン球粒子）にシーディング（またはハイブリダイズ）することができることとなる。したがって、後続の増幅産物の変性時に、産物のうちの1つのみの一本鎖が、支持体上のBプライマーにハイブリダイズすることとなる。このプライマーを伸長させて、一本鎖が、例えば、ウェルの濃縮または磁性体装荷で使用するための捕捉部分（例えば、磁性ビーズに結合した捕捉部分）への、支持体に結合した核酸の結合で使用できるハンドルを含有する二本鎖鑄型核酸を形成することができる。

【0287】

図58に描示されるプレシーディング（またはシーディング）方法のいくつかの実施形態では、ハンドル配列を含有するプライマーは、3'→5'方向に、ライブラリDNAアンプリコンの一端の第1の二本鎖アダプタの配列に相補的であるヌクレオチドの第1の配列と、ポリメラーゼストップ部位と、ヌクレオチドの第1の配列に少なくとも部分的に相補的であるか、または完全に相補的であるヌクレオチドの第2の配列（ハンドル配列）と、を含む。ハンドル配列は、例えば、ヌクレオチドの第1の配列の一部分に相補的であり得るが、その部分内に、ヌクレオチドの第1の配列のその部分の対応する位置の塩基に相補的ではない1つ以上のミスマッチ塩基を含有する。特定の許容条件下では、ヌクレオチドの第1の配列とヌクレオチドの第2の配列とが、互いにハイブリダイズして、ヘアピン構造を形成することとなる。しかしながら、例えば、図58に描示されるような方法でのシーディングプロセス中に発生する増幅反応の条件下では、ハンドル含有プライマーのヌクレオチドの第1および第2の配列は、ハイブリダイズしようとしなない。代わりに、そのような非許容条件下で、プライマーのヌクレオチドの第1の配列の、ライブラリアンプリコンの相補的なアダプタ配列（例えば、Aアダプタ）へのハイブリダイゼーションが有利となって発生することとなり、ハンドル配列は、ポリメラーゼストップ部分の部位で、Aアダプタの二重鎖と、シーディング増幅反応で複製されない一本鎖部分としてのプライマーの第1のヌクレオチド配列と、から伸長することとなる。ハンドル含有プライマーのヌクレオチドの第1および第2の配列がハイブリダイズすることができる許容条件として、例えば、シーディング増幅反応が実施される温度よりも低いか、または標準のPCR動作温度よりも低い温度などの、比較的低い温度を挙げることができる。低温として、Aアダプタの二重鎖、二本鎖核酸、およびプライマーの第1のヌクレオチド配列のT_mよりも実質的に、または有意に低い温度が挙げられる。いくつかの実施形態では、ハンドル含有プライマーのヌクレオチドの第1および第2の配列の二本鎖核酸のT_mは、Aアダプタの二重鎖核酸、およびプライマーの第1のヌクレオチド配列のT_mよりも実質的に、または有意に小さい。例えば、ハンドル含有プライマーのヌクレオチドの第1および第2の配列間で形成されるハイブリッドのT_mは、約50℃、45℃、40℃、35℃、30℃、25℃、20℃、またはそれ未満であり得る。許容条件の別の例は、比較的高い塩濃度、例えば、0.25M、0.3M、0.4M、0.5M、0.75M、1M、またはそれよりも高いNaCl濃度である。非許容条件として、例えば、より高い温度（例えば、ハンドル含有プライマーのヌクレオチドの第1および第2の配列間で形成されるハイブリッドのT_mよりも有意に高い温度）、または低レベルまたは存在しないレベルの塩（例えば、0.

10

20

30

40

50

2 M、0.1 M、0.05 M、0.001 M、またはそれよりも低い NaCl 濃度) を挙げることができる。

【0288】

いくつかの実施形態では、図58に描示されるようなシーディング（またはプレシーディング）方法を実施した後、シーディングされた支持体は、他の反応成分からの分離により濃縮される。濃縮の1つの方法では、シーディングされた支持体は、支持体上の二本鎖標的鑄型のハンドルに付着するリンカー部分（例えば、ビオチンなど）を介して間接的に捕捉される。鑄型核酸に付着したリンカーに次に結合するか、または付着する部分（例えば、ストレプトアビジン）を有するビーズを使用して、シーディングされた支持体を濃縮することができる。例えば、図59に描示されるように、支持体に結合した鑄型標的核酸上のハンドル配列に相補的であり、かつリンカー部分（例えば、ビオチン付加物）に付着しているオリゴヌクレオチド（すなわち、「捕捉」オリゴヌクレオチド）を、シーディングされた支持体と、およびストレプトアビジンでコーティングされた表面を有するビーズ（例えば、磁性ビーズ）と、接触させる。このことは、ビーズアセンブリの形成により、サポートに結合した二本鎖標的鑄型核酸の間接的な捕捉をもたらす。磁性ビーズの場合、アセンブリを磁石上でペレット化し、他の反応成分を含有する上澄みを除去することができる。いくつかの実施形態では、捕捉プロセスは、遊離ハンドル含有プライマーの少なくとも部分的に相補的であるヌクレオチドの第1および第2の配列がハイブリダイズすることとなる条件、例えば許容条件、下で実施される。そのような条件下では、存在することとなる遊離ハンドル含有プライマーは、捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしようとし、しないヘアピン構成であることとなる。したがって、遊離ハンドル含有プライマーを、ストレプトアビジンがコーティングされた磁性ビーズが捕捉しようとし、しない。

【0289】

支持体に結合した鑄型核酸が図59に例示される磁性ビーズに連結されるプロセスは、間接捕捉法と呼ばれるのに対して、支持体に結合した鑄型核酸が磁性ビーズに連結される、図57に描示されるプロセスは、直接捕捉法と呼ばれる。図57に示されるように、ストレプトアビジンがコーティングされた磁性ビーズは、支持体に固定化された伸長プライマーである鎖にハイブリダイズしている鑄型二重鎖の鎖に直接結合するビオチンリンカー部分に結合する。対照的に、図59に示される間接捕捉法では、ストレプトアビジンがコーティングされた磁性ビーズは、支持体に結合した鑄型二重鎖の鎖ではなく、代わりに、二重鎖から伸長する一本鎖ハンドルにハイブリダイズする。したがって、直接捕捉方法と間接捕捉方法とで、磁性ビーズによるシーディングされた支持体の捕捉時に形成されるビーズアセンブリは、異なる。いくつかの事例では、ビーズアセンブリの違いは、支持体に結合した鑄型二重鎖のハイブリダイズした鎖間の関連付けに影響を与え得る。例えば、ビーズの移動によって磁性ビーズに直接連結された鑄型鎖に加えられる力は、シーディングされた支持体の移動によって二重鎖の鎖に加えられる力と反対になる場合があり得る。そのような力は、磁性ビーズが捕捉オリゴヌクレオチドを通して鑄型二重鎖に間接的に連結されている鑄型二重鎖に対する場合よりも、関連付けられた鑄型二重鎖に大きな影響を及ぼし得る。影響の程度は、1つ以上の要因、例えば、鑄型ハイブリッドの長さ、培地の塩濃度、捕捉および濃縮中のビーズアセンブリの混合、移送などの温度および量によって、影響され得る。支持体に結合した標的鑄型二重鎖に対するそのような力の影響が増加するにつれて、鑄型二重鎖が解離し得る可能性も増加する。濃縮プロセス中に鑄型二重鎖が解離すると、濃縮されたシーディングされた支持体の収量の減少、または濃縮されているより長い鑄型二重鎖の割合の増大がもたらされ得る。しかしながら、捕捉オリゴヌクレオチドと、間接捕捉法で形成されたビーズアセンブリの鑄型二重鎖のうちの1つのハンドル部分と、の間の短いハイブリッドは、鑄型二重鎖よりも容易かつ迅速に解離しやすく、それによって、磁性ビーズを解放し、鑄型二重鎖に対するその力を排除する。加えて、捕捉オリゴヌクレオチドの短い核酸配列と、鑄型二重鎖のハンドル部分と、は、分離したより長い鑄型二重鎖よりも容易に会合する傾向があり得、これにより、濃縮されたシーディングされた支持体の収量の任意の潜在的な減少が軽減し得る。したがって、捕捉方法および捕

10

20

30

40

50

捉条件を、所望のシーディングされた鋳型二重鎖長およびシーディングされた支持体の収量に一致するように選択することができる。一般に、直接捕捉法を使用する場合にシーディングされた支持体の収量を最適化するために、そのような方法によって生成されたビーズアセンブリは、激しい条件、例えばボルテックス、とは対照的に、より穏やかな条件、例えばゆっくりとしたピペッティングおよび穏やかな混合、を使用して処理される。間接的な捕捉法を使用してビーズアセンブリを生成する場合のシーディングされた支持体の収量は、一般に、ビーズアセンブリのより激しい処理によって悪影響を受けない。

【0290】

プレシーディングされた支持体を濃縮する間接捕捉法のいくつかの実施形態では、捕捉されたシーディングされた支持体は、シーディングされた支持体に結合した二本鎖鋳型核酸が変性しない条件下で、捕捉オリゴヌクレオチドと鋳型核酸上のハンドル配列との間のハイブリダイゼーションの比較的小さい領域を変性させることによって、磁性ビーズに結合した捕捉オリゴヌクレオチドから溶出される。そのような条件を、例えば、ハンドル配列および捕捉オリゴヌクレオチド（例えば、高塩緩衝液中の約32℃のT_m）と支持体に結合した二本鎖標的鋳型核酸（例えば、32℃を超えるT_m）とによって形成される短いハイブリッドの融解温度（T_m）の違いを利用することによって、判定することができる。例えば、いくつかの実施形態では、任意の中程度の変性条件、例えば、上昇させた温度（例えば、約5分間で42℃などの、35℃を超えるまでの穏やかな加熱）、より低い塩濃度（例えば、低TE、水の添加）または物理的妨害もしくは攪拌（例えば、ボルテックス、ピペッティング）を使用して、支持体に結合した二本鎖鋳型核酸を破壊することなく、捕捉オリゴヌクレオチド-ハンドル配列ハイブリッドを解離させることができる。オリゴヌクレオチドを捕捉するために結合した磁性ビーズは、廃棄され、シーディングされた支持体に結合した濃縮された二本鎖鋳型が残る。ハンドル含有プライマーのヌクレオチドの第1および第2の配列が相補的ではなく、かつシーディングプロセスで使用されるいかなる条件下でもハイブリダイズしてヘアピン構造を形成しない実施形態では、過剰の捕捉オリゴヌクレオチドおよび過剰の、ストレプトアビジンがコーティングされた磁性ビーズが、鋳型核酸がシーディングされた支持体のすべてが確実にキャプチャされるように、捕捉プロセスに含まれ得る。磁性ビーズによって捕捉され、かつシーディングされた支持体とともに磁性ビーズから溶出され得る、支持体に結合していない任意のハンドル含有プライマーおよびシーディング増幅反応産物は、本明細書に記載されるようなさらなる下流処理で（例えば、鋳型化反応、または固体支持体に結合した鋳型のシーケンシングのための、表面上のマイクロウェル、例えばチップ、などの反応部位またはチャンバに、シーディングされた支持体を装填する際に）シーディングされた支持体から分離され得る。

【0291】

磁性ビーズを除去するための変性後に、支持体に結合した一本鎖鋳型を生じさせる、図57に描示される濃縮方法とは対照的に、図59に描示される濃縮方法は、磁性ビーズを除去するための変性後に、支持体に結合した二本鎖を生じさせる。いくつかの実施形態では、二本鎖鋳型を支持体に付着させることにより、シーディングプロセス中に発生した可能性のあるエラーの検出が容易になり、エラー含有鋳型がシーディングされた支持体の任意の下流分析の結果が考慮から除外され、それによって、例えばシーディングされた鋳型の集団または複数のシーディングされた鋳型のシーケンシング、の全体的な結果のエラーが低減される。例えば、いくつかの事例では、支持体に結合した二本鎖鋳型を生成する際に、支持体に固定化されたプライマーの鋳型依存性伸長中に重合のエラーが発生する可能性があり得る。このタイプのエラーが発生し、かつ図57に描示されるような、シーディングされた支持体の後続の捕捉および濃縮からシーディングされた一本鎖鋳型のみが結果として生じる場合、下流プロセスでの使用に利用可能である唯一の鋳型シーケンス（例えば、鋳型増幅およびシーケンシング）は、エラーを含むこととなる。この場合、シーディングされた支持体から増幅された鋳型は、エラーを含む配列のモノクロナルの集団であることとなり、鋳型のシーケンシングは、同一である読み取りを生じさせることとなる。代わりに、シーディングされた二本鎖鋳型が、図59に描示されるような、間接的な捕捉

10

20

30

40

50

および濃縮から結果として生じる場合、両方の鎖、すなわち、エラーを有する伸長した固定化されたプライマーである1つと、エラーを有していない固定化されたプライマーにハイブリダイズした元の鋳型である1つと、が、さらなる処理および分析に利用可能である。これにより、鋳型エラーが、一本鎖シード鋳型のみを有する場合に、100%から約50%に効果的に希釈される（すなわち、シーディングエラー率が、約50%だけ低減される）。そのような二本鎖がシーディングされた支持体から増幅された鋳型は、配列のポリクロノナルの集団（すなわち、エラーを有するいくつかの配列（約50%）、およびエラーを有していないいくつかの配列（約50%））を産生することとなるため、エラーを、シーケンシングなどの下流分析で検出することができる。そのポリクロノナルの集団のシーケンシングからの配列読み取りを、複数の核酸鋳型集団の配列結果の分析での考慮から排除することができる。したがって、シーケンスされている他の支持体に結合した鋳型に他のエラーがない場合、鋳型の残りのシーケンスエラー率は、実質的に0%であることとなる。

【0292】

いくつかの実施形態では、1つ以上の、または複数の鋳型核酸集団、例えば、モノクロノナルの、または実質的にモノクロノナルの核酸集団を生成する方法であって、（a）複数の支持体を取得することであって、各支持体は、支持体に固定化された複数の一本鎖オリゴヌクレオチドプライマーと、支持体に付着した鋳型核酸と、を有し、鋳型核酸は、オリゴヌクレオチドプライマー配列である鎖の一端の接続するヌクレオチドの配列を含む、取得することと、（b）溶液中の第1のプライマーの存在下で、複数の支持体に付着した鋳型核酸を、1つ以上の、または2つ以上の等温核酸増幅（例えば、RPA反応）に供することであって、第1のプライマーは、オリゴヌクレオチドプライマー配列である接続するヌクレオチドの配列を有する末端の反対側の鎖の末端の、付着した核酸鎖のプライマー結合配列に相補的である、ヌクレオチドの配列を含む、供することと、を含む方法が、提供される。この方法のいくつかの実施形態では、1つ以上の、または2つ以上の等温核酸増幅は、単一の反応混合物の単一の連続液相内で実行される。いくつかの実施形態では、支持体に付着した核酸は、少なくとも2つの等温核酸増幅反応に供され、第2の増幅は、少なくとも1000倍、少なくとも100,000倍、または少なくとも1,000,000倍多い、第1の増幅後に付着した以外に支持体に付着した核酸を生成する。いくつかの実施形態では、ステップ（b）で、第1の等温核酸増幅は、（i）溶液中のリンカー部分または親和性部分に付着している第1のプライマーと、（ii）リンカー部分または親和性部分に付着するか、またはこれを結合させる組成物と、の存在下で実行され、この方法は、（c）（b）の第1の等温増幅を中止し、第1のプライマーのリンカー部分または親和性部分に付着する組成物を除去することと、（d）複数の支持体に付着した鋳型核酸を、支持体に付着した鋳型核酸のモノクロノナルの、または実質的にモノクロノナルの集団を生成することによって、溶液中での第1のプライマーの存在下で、かつリンカー部分に付着する組成物の非存在下で、第2の等温核酸増幅に供することであって、第2の等温核酸増幅に存在する第1のプライマーは、リンカー部分（または親和性部分）に付着しているか、またはリンカー部分（または親和性部分）に付着していない、供することと、をさらに含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の等温増幅は、拡散制限剤、例えばポリマー、例えばセルロースまたはメチルセルロース、の存在下で実施される。いくつかの実施形態では、第1または第2の等温核酸増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅である。いくつかの実施形態では、第1または第2の等温増幅は、拡散制限剤、例えばポリマー、例えばセルロースまたはメチルセルロース、の存在下で実施される。いくつかの実施形態では、支持体に付着した鋳型核酸を有するステップ（a）の複数の支持体は、方法であって、（1）各核酸が核酸鎖の5'末端の接続するヌクレオチドの第1の配列を含む核酸鎖を含む、核酸の集団を取得することであって、接続するヌクレオチドの第1の配列は、任意選択的に、第1の配列に付着した第1のリンカー部分と、核酸鎖の3'末端の接続するヌクレオチドの第2の配列と、接続するヌクレオチドの第1の配列と第2の配列との間に位置決められた第3の。ヌクレオチド配列と、を含み、接続するヌクレオチドの第1の

10

20

30

40

50

配列と接続するヌクレオチドの第2の配列とは、異なり、接続するヌクレオチドの第1の配列は、実質的に同一であり、接続するヌクレオチドの第2の配列は、実質的に同一であり、いくつかの実施形態では、接続するヌクレオチドの第1配列と第2配列との間に位置決めされた第3のヌクレオチド配列は、核酸の集団の中で異なる、取得することと、(2) アニールング条件下で、核酸の集団の一本鎖を支持体と接触させて、接続するヌクレオチドの第2の配列とのハイブリダイゼーションにより、一本鎖核酸が付着した支持体を生成することであって、支持体は、支持体に固定化された接続するヌクレオチドの第2の配列に相補的なヌクレオチド配列を有する複数のプライマーオリゴヌクレオチドを含む、生成することと、(3) 核酸鎖にハイブリダイズしている支持体の固定化されたプライマーを伸長させて、支持体に付着した二本鎖核酸を生成することであって、二本鎖核酸は、支持体に直接付着している伸長した鎖と、付着した鎖にハイブリダイズしている鎖と、を含む、生成することと、(4) 二本鎖核酸の鎖を分離することと、を含む方法によって取得される。いくつかの実施形態では、ステップ(2)での支持体の数は、核酸分子の数を、少なくとも2倍、または少なくとも5倍超えている。いくつかの実施形態では、ステップ(2)での支持体の数は、核酸分子の数を、少なくとも2倍、または少なくとも2.5倍、または少なくとも3倍、または少なくとも3.5倍、または少なくとも4倍、または少なくとも4.5倍、または少なくとも5倍、または少なくとも5.5倍、または少なくとも6倍、または少なくとも6.5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも7.5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも15倍、または少なくとも20倍、または少なくとも25倍超えている。

【0293】

いくつかの実施形態では、支持体または表面に付着した1つ以上の、または複数の鑄型核酸集団、例えば、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの核酸集団を生成する方法は、1つの、1つ以上の、または複数の核酸が付着した1つ以上の、または複数の支持体または表面を、表面上の1つ以上の、または複数の反応部位またはチャンバ(例えば、ウェル)に移送することを含む。一例では、そのような方法は、複数の一本鎖オリゴヌクレオチドプライマーが固定化され、かつオリゴヌクレオチドプライマー配列である核酸の一末端の接続するヌクレオチドの配列を含む鑄型核酸が付着した、1つ以上の、または複数の支持体を、反応部位を含む表面に移送し、それによって、核酸が付着した支持体が別個の部位に装填されることを含む。いくつかの実施形態では、鑄型核酸が付着した支持体が別個の反応部位に装填された後、核酸は、1つ以上の、または2つ以上の等温核酸増幅反応(例えば、RPA反応)に供される。いくつかの実施形態では、この方法は、支持体に付着した増幅された核酸を核酸シーケンシングに供することをさらに含む。いくつかの実施形態では、シーケンシングプロセスは、少なくとも100、少なくとも200、または少なくとも300のヌクレオチド長である、少なくとも約4500万の配列読み取りを生成する。いくつかの実施形態では、シーケンシングプロセスは、少なくとも300のヌクレオチド長である、少なくとも6000万の配列読み取りを生成する。いくつかの実施形態では、シーケンシングプロセスは、少なくとも100のヌクレオチド長である、少なくとも約4500万または約8000万の配列読み取りを生成する。いくつかの実施形態では、シーケンシングプロセスは、約100~約400のヌクレオチド長の少なくとも8000万の配列読み取りを生成する。

【0294】

いくつかの実施形態では、支持体または表面に付着した1つ以上の、または複数の鑄型核酸集団、例えば、モノクローナルの、または実質的にモノクローナルの核酸集団を生成する方法は、複数の支持体に付着した鑄型核酸を、1つ以上の、または2つ以上の等温核酸鑄型化増幅に供する前に複数の捕捉された支持体を形成することを含む。例えば、1つのそのような方法では、複数の支持体中の支持体には、二本鎖の、または部分的に二本鎖の鑄型核酸が付着しており、二本鎖の、または部分的に二本鎖の各鑄型核酸は、(1) 支持体に直接付着している付着した鎖(例えば、伸長したプライマー鎖)、および付着した鎖にハイブリダイズしている鎖と、(2) 付着している鎖にハイブリダイズしている鎖上

の、リンカー部分または一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列と、を含む。この方法は、（i）複数の支持体を、リンカー部分（または親和性部分）に結合する捕捉部分と、または一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドおよび捕捉部分と接触させることによって、複数の捕捉された支持体を生成することであって、一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドは、一本鎖オーバーハングにハイブリダイズし、捕捉部分が結合するリンカー部分を含む、生成することと、（i i）捕捉された支持体を収集することと、（i i i）鑄型核酸が付着した支持体を、捕捉部分から、または一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドから分離することと、を含む。この方法のいくつかの実施形態では、ステップ（i）の複数の支持体の各支持体は、支持体に付着した1つの二本鎖の、または部分的に二本鎖の鑄型核酸のみを有する。いくつかの実施形態では、捕捉部分は、ビーズまたは粒子に付着し、捕捉された支持体を収集した後、鑄型核酸が付着した支持体は、二本鎖核酸の鎖を解離し、それによって、一本鎖鑄型核酸に付着した複数の支持体を生成することによって、または一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチドと一本鎖オーバーハングとのハイブリッドを解離し、それによって、一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列を含有する部分的に二本鎖の鑄型核酸に付着した複数の支持体を生成することによって、ビーズまたは粒子に付着した捕捉部分から分離される。いくつかの実施形態では、複数の支持体に付着した鑄型核酸を第1の等温核増幅に供する前に、ビーズまたは粒子に付着した捕捉部分から分離された鑄型核酸に付着した支持体が、反応部位（例えば、ウェル）を含む表面に移送され、別個の反応部位に装填される。いくつかの実施形態では、支持体は、方法であって、核酸が付着した支持体を磁性ビーズと組み合わせることであって、支持体上の核酸は、磁性ビーズに付着しない、組み合わせることと、核酸が付着した組み合わせられた支持体および磁性ビーズを、反応部位を含む表面に送達することと、表面に磁場を印加し、それによって、核酸が付着した支持体が別個の反応部位に装填されることと、を含む方法において、反応部位を含む表面に移送される。いくつかの実施形態では、捕捉部分が付着したビーズまたは粒子は、磁性支持体であり、捕捉された支持体は、鑄型核酸が結合した支持体-磁性支持体アセンブリを含み、ステップ（i i）で捕捉された支持体を収集することは、アセンブリに磁場を印加し、それによって、アセンブリを磁性支持体を含まない要素分離することを含む。複数の捕捉された支持体を形成することを含む、支持体に付着した1つ以上の、または複数の鑄型核酸集団を生成することの方法のいくつかの実施形態では、支持体には、部分的に二本鎖の鑄型核酸が付着しており、部分的に二本鎖の各鑄型核酸は、（1）支持体に直接付着している付着した鎖（例えば、伸長したプライマー鎖）、および付着した鎖にハイブリダイズしている鎖と、（2）付着した鎖にハイブリダイズしている鎖上の一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列と、を含む。そのような実施形態の一例では、部分的に二本鎖の鑄型核酸は、以下を含む方法で生成される：（A）核酸分子の最初の集団を、第1のプライマーおよび第2のプライマーの存在下で核酸増幅のサイクルに供することであって、（1）複数の核酸の各々は、鎖の5'末端の接続するヌクレオチドの第1の配列と、鎖の3'末端の接続するヌクレオチドの第2の配列と、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列との間に位置決めされた第3のヌクレオチドの配列と、を含み、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列とは、互いに異なり、核酸分子の集団の第1のヌクレオチド配列は、実質的に同一であり、核酸分子の集団の第2のヌクレオチド配列は、集団の中で実質的に同一であり、（2）第1のプライマーは、第1のヌクレオチド配列と実質的に同一の3'末端ヌクレオチド配列と、5'末端ヌクレオチド配列と、3'末端ヌクレオチド配列と5'末端ヌクレオチド配列との間に位置決めされた非複製可能部分と、を含み、（3）第2のプライマーは、i）第2のヌクレオチド配列の5'末端の第2のヌクレオチド配列の一部分に相補的なヌクレオチド配列と、（i i）第2のヌクレオチド配列に相補的ではなく、かつ相補的な配列の3'末端の第2のヌクレオチド配列の一部分に相補的な配列に連結している、第4のヌクレオチド配列と、を含み、第2のプライマーは、第2のヌクレオチド配列の3'末端に相補的なヌクレオチド配列を含有しない、供すること、（B）ステップ（A）の増幅のサイクルの産物を、第1およ

10

20

30

40

50

び第2のプライマーの存在下で核酸増幅のサイクルに供して、複数の異なる産物を生成することであって、ステップ(A)からの核酸分子の最初の集団中の各別個の核酸分子のステップ(B)での核酸増幅からの複数の異なる核酸産物のうちの1つのみが、第4のヌクレオチド配列に相補的である3'末端のヌクレオチドの配列を有する鎖と、第1のプライマーの非複製可能部分および5'末端ヌクレオチド配列を含む、5'末端の一本鎖領域と、を含む、生成すること、(C)ステップ(B)の核酸産物の一本鎖を、アニーリング条件下で第4のヌクレオチド配列と実質的に同一である複数の一本鎖オリゴヌクレオチドプライマーが固定化した支持体と接触させ、それによって、第4のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチドの配列を含む、ステップ(B)の核酸産物の一本鎖を、第4のヌクレオチド配列と実質的に同一である一本鎖オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせて、部分的に二本鎖核酸を含む鑄型核酸に付着した支持体を生成すること、および(D)鑄型依存性核酸合成によって部分的に二本鎖核酸の固定化されたオリゴヌクレオチドプライマー部分の3'末端を伸長させて、伸長した二本鎖核酸を生成することであって、固定化されたオリゴヌクレオチドプライマー部分の伸長は、伸長鎖がハイブリダイズしている鑄型鎖上に存在する非複製可能部分に続き、次いで、第1のプライマーの5'末端ヌクレオチド配列を含む一本鎖オーバーハングヌクレオチド配列を含有する部分的に二本鎖核酸をもたらして途切れ、それによって、鑄型核酸が付着した複数の支持体を産生し、各支持体には、異なる部分的に二本鎖の鑄型核酸が付着する、生成すること。この方法のいくつかの実施形態では、第1のプライマーの5'末端ヌクレオチド配列と、第1のプライマーの3'末端ヌクレオチド配列と、は、少なくとも実質的に互いに相補的である。

【0295】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプレシーディングまたは鑄型化方法で使用される支持体または表面は、さらなる下流処理(例えば、鑄型化反応、または支持体に結合した鑄型の反応またはシーケンシングの)のために、反応部位またはチャンバ、例えば表面上のマイクロウェル、例えばチップまたは半導体チップ、に移送される。1つの、または1つ以上の、または複数の核酸鑄型が付着した支持体または表面を移送するための、本明細書で提供される一方法であって、核酸鑄型には、第1のリンカー部分が付着している、方法は、第2のリンカー部分を有する磁性支持体、例えばビーズ、を、第2のリンカー部分の第1のリンカー部分への付着により、核酸鑄型に結合させ、それによって、鑄型が付着した支持体-磁性支持体アセンブリ(例えば、ビーズまたは支持体アセンブリ)を形成することと、磁場を使用して支持体を、表面、例えばシーケンシングデバイス、の反応部位またはチャンバ、例えばウェル、に堆積することと、を含む。いくつかのそのような実施形態では、1つの、または1つ以上の、または複数の核酸鑄型が付着した支持体または表面であって、核酸鑄型は、第1のリンカー部分が付着している、支持体または表面は、方法であって、捕捉配列部分、鑄型部分、およびプライマー部分を含む鑄型核酸を生成することと、捕捉配列部分に相補的な捕捉プライマーに結合された支持体上に鑄型核酸を捕捉することであって、捕捉プライマーは、鑄型核酸の捕捉配列部分にハイブリダイズする、捕捉することと、鑄型核酸に相補的な捕捉プライマーを伸長させて、鑄型核酸に相補的な、かつハイブリダイズした標的核酸を形成することと、ハイブリダイズした鑄型核酸と標的核酸とを分離することと、リンカー修飾プライマーを支持体上の標的核酸にハイブリダイズさせることであって、リンカー修飾プライマーは、リンカー部分を含む、ハイブリダイズさせることと、標的核酸に相補的なリンカー修飾プライマーを伸長させることと、磁性支持体、例えばビーズ、をリンカー部分に結合させることであって、磁性支持体は、リンカー部分に付着する第2のリンカー部分を有する、結合させることと、磁場を使用して支持体を、表面、例えばシーケンシングデバイス、の反応部位またはチャンバ、例えばウェル、中に堆積することと、を含む、方法で生成される。いくつかの実施形態では、この方法は、鑄型核酸と配列標的核酸とを分離して、支持体複合体から磁気支持体を解放することをさらに含む。いくつかの実施形態では、分離することは、変性、例えば、熱変性、酵素的変性、イオン性溶液の存在下での変性を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、反応部位を有する表面から磁性支持体を洗浄することをさらに含む。

【0296】

本明細書で提供される、方法、ならびにこれらの方法を実行するための機器、デバイス、システム、組成物、およびキットのいくつかの実施形態では、鋳型化された支持体または表面または部位に付着した鋳型核酸の1つ以上のモノクローナルの、または実質的にモノクローナルの集団であって、鋳型核酸の集団は、本明細書に記載されるプレシーディング方法または鋳型化方法で生成される、集団は、本明細書に記載される方法、機器、デバイス、システム、組成物、およびキットを使用してシーケンシングされる。

【0297】

シーケンシング

センサデバイス上に標的配列を装填し、鋳型化して、標的配列のモノクローナルの集団を形成することに続いて、個々のタイプのヌクレオチドのヌクレオチド溶液が、センサデバイスのフローセルを通して連続的に流れることができる。ヌクレオチドの流れに反応するシグナルを、センサデバイスから測定することができる。そのようなシグナルを、塩基順序を判定するための塩基コールに使用することができる。より小さい配列の順序をアライメントし、分析して、アライメントされた読み取りおよびバリエーションコールを判定することができる。

10

【0298】

ヌクレオチド溶液を、センサデバイスのフローセルを通して、このシステムの読み取り長などの性能を向上させる流れ順序で提供することができる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、2016年8月30日に許可されたUS9,428,807に記載された流れ順序に従うことができる。

20

【0299】

例示的なヌクレオチドの流れ、シグナル検出、および塩基を検出するためのシグナル処理を、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2019年3月26日に許可されたUS10,241,075に記載されているように実行することができる。

【0300】

性能定義およびパラメータ

上記のシステムと方法は、性能および自動化を含む望ましい技術的利点を提供する。特に、上記のシステムは、限られた人間の介入で、望ましくは短時間で、抽出されたDNAサンプルまたはRNAサンプルから、アライメントされた読み取りまたはバリエーションコールまでのシーケンシング動作を実行することができる。例えば、サンプルおよび消耗品（試薬ストリップ、ピペットチップ、センサデバイス、およびアダプタなど）が装置に提供されると、装置は、さらなる手動介入なしにシーケンシングおよびデータ処理を実行することができる。例では、核酸分析のためのサンプル処理に熟練していないユーザは、シーケンシングシステムをセットアップし、さらなる介入なしにシーケンシング分析を実行するようにこのシステムに指示することができる。

30

【0301】

例では、このシステムおよび方法は、少なくとも98.5%の生読み取り精度（参照配列にアライメントすることによって測定される塩基コールされる配列の精度）でのランおよび分析を提供する。例えば、生読み取り精度は、少なくとも99.1%、さらには99.2%などの、少なくとも99.0%であり得る。例では、生読み取り精度は、99.99%以下である。

40

【0302】

さらなる例では、このシステムおよび方法は、少なくとも100bのQ20平均読み取り長（Q20 MRL）でのランおよび分析を提供する。Q20読み取り長は、フレッド品質スコアがすべての塩基で少なくとも20である、読み取りの開始からの塩基の数である。Q20平均読み取り長は、すべてのシーケンスにわたるQ20読み取り長の平均である。例では、Q20 MRLは、少なくとも100bである。例えば、Q20 MRLは、102b〜300bの範囲または104b〜300bの範囲などの、100b〜450bの範囲である。

50

【0303】

追加の例では、このシステムおよび方法は、少なくとも95%の均一性を有するランおよび分析を提供する。例えば、均一性は、96%~98%の範囲などの、96%~99.9%の範囲であり得る。

【0304】

別の例では、このシステムおよび方法は、少なくとも80%の均一性を有するランおよび分析を提供する。感度は、真陽性のコールの数を、対照サンプル中のすべての真のバリエーションの数で除算したものである。そのような感度を、検出の限界のパーセントで提供される対照サンプルについてさらに判定することができ、このパーセントは、シーケンシングデータによって検出できるバリエーションの最低の%である。例えば、感度は、少なくとも90%であり得る。例では、感度は、90%~99%の範囲または94%~99%の範囲などの、90%~100%の範囲であり得る。特に、コピー数バリエーション感度は、90%~100%の範囲または95%~100%の範囲などの、80%~100%の範囲であり得る。

10

【0305】

さらなる例では、このシステムおよび方法は、0.5未満のすべてのペアワイズ差(MAPD)の絶対値の中央値を有するランおよび分析を提供する。所与のランのタイルごとのlog2比間のすべてのペアワイズ差MAPDの絶対値の中央値。タイルは、Ion AmpliSeq(商標)アッセイのアンプリコンに大体対応している。各ペアは、ゲノム距離の観点から接続していると定義される。MAPDは、標準偏差(SD)と同様に、コピー数の変動性のシーケンシングごとのラン推定値である。例えば、MAPDは、0.5~0.01の範囲または0.4~0.01の範囲などの、0.5~0.001の範囲である。

20

【0306】

追加の例では、このシステムおよび方法は、98%~99.9%の範囲または98.1%~99.9%の範囲などの、98%~100%の範囲などの、標的に対する少なくとも97%の平均読み取りパーセントを有するランおよび分析を提供する。標的に対する平均読み取りパーセントは、参照にマッピングされたすべての読み取りに対する、任意の標的領域にマッピングされたフィルター処理された読み取りのパーセンテージである。少なくとも1つのアリメントされた塩基が少なくとも1つの標的領域とオーバーラップする場合、読み取りは、標的上であると見なされる。

30

【0307】

さらなる例では、このシステムおよび方法は、1300万塩基~6000万塩基の範囲、または1450万塩基~2500万の範囲などの、1300万塩基~1億塩基の範囲の総読み取りを有するランおよび分析を提供する。別の例では、このシステムおよび方法は、5M~14Mの範囲などの、5M~20Mの範囲のマッピングされた読み取り/ライブラリを有するランおよび分析を提供する。追加の例では、マルチレーンフローセルを含むセンサデバイスのレーンごとの総読み取りは、50万塩基~1400万塩基などの、50万塩基~4800万塩基の範囲であり得る。

【0308】

追加の例では、このシステムおよび方法は、80%以下のバーコード(BC)不均衡を有するランおよび分析を提供する。BCは、最小値がマッピングされた読み取り/平均がマッピングされた読み取りを有するバーコードである。

40

【0309】

別の方法では、このシステムおよび方法は、25K~100Kの範囲または25K~50Kの範囲の読み取りカバレッジなどの、少なくとも25Kのライブラリごとの読み取りカバレッジを有するランおよび分析を提供する。読み取りカバレッジ/ライブラリは、アンプリコンにマッピングされた読み取りの数である。

【0310】

さらなる例では、このシステムおよび方法は、800~5000の範囲、800~40

50

00の範囲、または1000～3500の範囲のカバレッジ深さなどの、カバレッジ深さまたは少なくとも800を有するランおよび分析を提供する。カバレッジ深さは、標的となるすべての参照塩基の平均読み取り数である。これは、標的に対する塩基読み取りの総数を標的となる塩基の数で除算したものであり、したがって、カバレッジを有していなかった任意の塩基を含む。

【0311】

追加の例では、このシステムおよび方法は、75bp～200bpの範囲または75bp～110bpの範囲などの、少なくとも75bpのアライメントされていない読み取り長を有するランおよび分析を提供する。アライメントされていない読み取り長は、参照にアライメントしていない読み取りの平均読み取り長である。

10

【0312】

別の例では、このシステムおよび方法は、250～10000の範囲、300～10000の範囲、または300～5000の範囲などの、100～10000の範囲のライブラリごとの分子カバレッジを有するランおよび分析を提供する。ライブラリごとの分子カバレッジは、アンプリコンにマッピングされた分子ファミリーの数である。

【0313】

さらなる例では、このシステムおよび方法は、少なくとも90%のエンドツーエンドの読み取りを有するランおよび分析を提供する。エンドツーエンド読み取りは、品質フィルターの後にエンドツーエンドを読み取る読み取り、すなわち、読み取りの末端の3'アダプタをレポート作成した読み取りである。

20

【0314】

追加の例では、このシステムおよび方法は、90%～100%の範囲、92%～99%の範囲、または94%～99%の範囲などの、少なくとも90%の陽性予測値を有するランおよび分析を提供する。陽性予測値は、レポート作成されたバリエーションがサンプルでの真のバリエーションである確率である。

【0315】

さらなる例では、このシステムおよび方法は、通常のサンプルごとに1FP以下の特異性を有するランおよび分析を提供する。特異性は、既知の真のバリエーションを有する対照サンプルについて、真陰性コールの数を（すべての真陰性コールの数+偽陽性コールの数）で除算したものである。

30

【実施例】

【0316】

実施例1—シングルサイクルPCRと、続く等温増幅によるプレシーディングISP

この方法では、下流の次世代シーケンシングの等温増幅（鋳型化反応）の前に、固体支持体（Ion Torrent Ion Sphere Particles (ISP)）を、モノクローナルの鋳型でプレシーディングし、Ion Torrent半導体シーケンシングチップのウェルに分配した。プレシーディングされたISPを、鋳型化反応の前ではなく鋳型化反応中とプレシーディング反応中とに、溶液中に同じ鋳型ポリヌクレオチドを有する、鋳型なし対照（「NTC」）ISPと比較した。様々なメトリックを使用して、異なる増幅反応からのシーケンシング結果を比較した。

40

【0317】

鋳型核酸分子の生成

Oncomine Focus Assay (OFA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 製のPCRプライマー1、12、および13を使用して、ゲノムDNAからDNAを増幅した。シーディング反応で使用する溶液中の固定化されたプライマーBおよびプライマーAへの結合を促進するアダプタを、セカンドテールPCRの10サイクル中にアンプリコンに添加した。増幅により、3つの鋳型が生成された：OFA 1 AB、19.2 ng/μl (148 nM)、OFA 12 AB、15.6 ng/μl (100 nM)、およびOFA 13 AB、17.2 ng/μl (76 nM)。

50

【0318】

プレシーディング反応

OFA 1 AB、OFA 12 AB、およびOFA 13 AB鑄型の希釈液を作成し、これを使用して、プレシーディング反応で別個のプレシーディングされたP1 ISPを生成した。プレシーディング反応は、固定化されたプライマーBを有する6.67 μ lのP1 ISP (400,000,000 ISP)、88.33 μ lの1倍Platinum HiFi Mix (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA)と、所望の数の実質的にモノクローナルの鑄型分子 (P1 ISPについて、コピー数70,665、および4,170)を生成するための5 μ lの適切な鑄型希釈液と、を含んでいた。ISPプレシーディング反応混合物をサーモサイクラーに入れ、98℃で2分間、続いて98℃で25秒間、56℃で10分間の変性ステップを行って、プレシーディングされたISPを生成した。ISPの相対的なサイズをチェックするために、プレシーディングされたP1 ISPの各々の1 μ lを999 μ lのAnnealing Buffer (Ion PGM (商標) Hi-Q (商標) View Sequencing Solutions、(Part No. A30275))で希釈し、Guava easyCyte Flow Cytometer (EMD Millipore、Billerica、MA)を使用して分析した。また、NTC P1 ISPを、結合した鑄型の不存在下で、相対的なサイズについて分析した。

10

【0319】

残りのプレシーディングされたP1 ISPを、1mlの総量のIon OneTouch Wash Solution洗浄緩衝液で2回洗浄した。最初の洗浄後、サンプルを、>21,000 gで8分間遠心分離し、上清を除去して、約100 μ lを残した。2回目の洗浄および遠心分離の後、上清を除去して、チューブに約50 μ lのサンプルを残した。次いで、サンプルを300 μ lの新たに調製したメルトオフ溶液 (125mM NaOH、0.1% Tween 20)で処理し、完全にボルテックスした後、室温で5分間インキュベートした。次いで、これらのサンプルを、1mlの最終体積のヌクレアーゼフリー (NF) H₂Oで3回洗浄した。各洗浄後、サンプルを、>21,000 gで8分間遠心分離し、上清を除去して、約100 μ lを残した。最後の洗浄後にプレシーディングされたP1 ISPのサイズをチェックするために、プレシーディングされたP1 ISPの各々の1 μ lを99 μ lのAnnealing Bufferで希釈し、Guava easyCyte Flow Cytometerを使用して分析した。また、NTC P1 ISPを、結合した鑄型の不存在下で、相対的なサイズについて分析した。

20

30

【0320】

プレシーディングされたP1 ISPのコピー数の判定

洗浄後のサンプルのGuava easyCyte Flow Cytometerからのカウントに基づいて、プレシーディングされたP1 ISPの希釈を行って、50,000、5,000、500、または50 ISP/ μ lを与えた。これらの希釈液を、qPCR反応で以下のように使用した：10 μ lのFast SYBR (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA)、0.2 μ l 10 μ MのランケットPCR Aプライマー (配列番号：2)、0.2 μ l 10 μ MのランケットPCR Bプライマー (配列番号：3)、2 μ lのプレシーディングされたP1 ISP、および7.6 μ lのNF H₂O。反応混合物をリアルタイムPCR装置に入れ、95℃で20秒間、続いて95℃で3秒間と60℃で30秒間との40サイクルを行う変性ステップを行った。各qPCR反応のC_tを、既知の分子数のqPCR反応のC_t値と比較して、各ISPのモノクローナルの鑄型のコピー数を計算した。同じ量の鑄型がプレシーディングされたサンプルを組み合わせ、各グループのISPごとの平均コピー数を取得した。

40

【0321】

モノクローナルの各鑄型のコピー数が同じであるプレシーディングされたISPをプールした、すなわち、OFA 1 AB、OFA 12 AB、またはOFA 13 ABの82コピーがプレシーディングされたISPをすべてプールし、同様に、鑄型の775コピ

50

ーがプレシーディングされたISPをプールし、鋳型の5,400コピーがプレシーディングされたISPをプールした。

【0322】

カセット装填

Ion Torrent 541チップを、100μlの100mM NaOHで60秒間洗浄し、200μlのヌクレアーゼフリー水ですすぎ、200μlのイソプロピルアルコールですすぎ、吸引乾燥させた。チップを装填するために、ISP(500,000,000NTC ISPまたはプールされたプレシーディングされたISP)をボルテックスし、Annealing Buffer (Ion PI (商標) Hi-Q (商標) Sequencing 200 Kit、Ion Torrent)で45μlにし、装填ポートを通して処理したチップに注入した。チップを、1424rcfで2分間遠心分離した。1mlのフォーム(980μlの50% Annealing Bufferと20μlの10% Triton X-100を組み合わせ、1mlの空気をピペットで入れ、フォームを5秒間ピペットでさらに混合した)をチップに注入し、過剰分を吸引した。200μlの60% Annealing Buffer / 40% イソプロピルアルコールフラッシュ溶液をチップに注入し、チップを吸引して乾燥させた。チップを200μlのAnnealing Bufferですすぎ、チップを真空乾燥させた。プレシーディングされたISPを有するチップについて、40μlのPBSTをチップに添加し、各ポートを35μlのPBSTで充填した。NTC ISPを有するチップについて、5μlの100pMライブラリ(等量のOFA 1 AB、OFA 12 AB、およびOFA 13 AB)を110μlのAnnealing Bufferに添加して、ライブラリ混合物を作成した。40μlのライブラリ混合物をチップに添加し、各ポートを35μlのライブラリ混合物で充填した。チップをサーモサイクラー上に置き、95℃で1分間、次いで、37℃で2分間、次いで、4℃で、1回循環させた。チップを200μlのAnnealing Bufferで1回すすぎ、湿らせたままとした。

【0323】

鋳型化反応およびシーケンシング

Ion PGM (商標) 鋳型IAペレットを、871μlのIon PGM (商標) Rehydration Bufferで再水和し、完全にボルテックスし、短時間スピンさせた。各チップに40μlのペレットIA溶液を注入し、置換されたAnnealing Bufferを出口ポートから吸引した。20μlのペレットIA溶液を装填ポートに添加し、チップを1424rcfで2分間スピンさせた。ペレットIA溶液を活性化するために、218.2μlのIon PGM (商標) Start Solutionを8μlのプライマーAと組み合わせ、ペレットIA溶液に添加した。活性化されたペレットIA溶液をボルテックスし、短時間スピンさせた。各チップに、60μlの活性化したペレットIA溶液を注入し、置換された液を吸引した。各チップには、追加の35μlのペレットIA溶液を各ポートに追加した。チップを40℃に設定したサーモサイクラー上に置き、蓋をして、15分間インキュベートした。チップを真空下で200μlの0.5M EDTAですすぎ、吸引乾燥させた。チップを真空下で200μlのAnnealing Bufferですすぎ、吸引乾燥させた。チップを真空下で200μlの1% SDSで2回すすぎ、吸引乾燥させた。チップを真空下で200μlのFlush溶液(50%イソプロピルアルコール / 50% Annealing Buffer)ですすぎ、吸引乾燥させた。次いで、チップを200μlのAnnealing Bufferですすぎ、吸引乾燥させた。各チップに40μlのプライマー混合物(250μlのSequencing Primerおよび250μlのAnnealing Buffer)をフローセルに注入し、35μlのプライマー混合物を各ポートに添加した。チップをサーモサイクラー上に置き、95℃で2分間、次いで、37℃で2分間、次いで、4℃で、1回循環させた。チップを200μlのAnnealing Bufferで1回リンスし、吸引した。各チップに、60μlのEnzyme Mix(60μlのAnnealing Bufferおよび6μlのPSP4酵素)を添加し、5分間インキュベートした。チップを真空

乾燥させ、100 μ LのAnnealing Bufferをすぐに添加した。チップを、シーケンシングのためにIon Proton System上に装填した。Ion Proton Systemを、Hi-Q 200材料で初期化し、400フローを使用してシーケンシングを実行した。

【0324】

結果

ISPにモノクロナルの鑄型をプレシーディングし、次いで、プレシーディングしたものをIon Torrentシーケンシングチップに装填すると、モノクロナルの鑄型が付着し、かつ1つの反応で増幅したNTC ISPよりも良好なシーケンシングメトリックが生成された。装填されたISPのパーセンテージは、ISP上にプレシーディングされた鑄型の82コピーとともに増加したが、プレシーディングのレベルが高くなると、NTC ISPの下に装填されたISPのパーセンテージが減少した（図61A）。使用可能な読み取りのパーセンテージは、プレシーディングされたISPとともに増加した（図61B）。プレシーディングされたISPはまた、NTC ISPと比較して総読み取りが最大9倍に増加し、読み取り長の平均、中央値、およびモードが2倍を超えて増加した（図61C～61D）。プレシーディングされたすべてのISPは、低品質のウェルおよび鑄型のないウェルのパーセンテージの低下を示した（図61E～61F）。この例は、Ion Torrentチップのウェル内に分散されたISP上で鑄型化を実行する方法で、ISPにモノクロナルの鑄型核酸分子をプレシーディングして、改善されたシーケンシングデータを達成することができることを実証している。

【0325】

実施例2－支持体上での実質的にモノクロナルの鑄型核酸集団の生成
プレシーディング／シーディング

PCRチューブでは、Ion Ampliseq Exomeライブラリ（20 μ L 100 pM、標準Ion Torrent AおよびP1ライブラリアダプタ付き）の12億コピーを、3 μ L 3 μ Mビオチン-TPCRA（配列5'ビオチン-配列番号：2）および3 μ L 1.5 μ M B-trP1（trP1は、配列番号：1の配列を有するIon P1アダプタの23merセグメント、Bは、Ion Torrent Ion Sphere Particles（ISP）に付着したプライマー配列）プライマー、および9 μ LのIon Ampliseq HiFi Master Mix 5倍または他の好適なポリメラーゼ含有混合物、例えば3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠く混合物、と混合した。体積を、10 μ Lのヌクレアーゼフリー水で45 μ Lまで充填した。チューブを、以下の温度プロファイルで、サーモサイクラー上でサーモサイクルした：98℃で2分、[98℃で15秒－58℃で2分]の2サイクル、10℃での最終保持。サーモサイクリング後、60億のISP（75 μ L 8000万/ μ L）、および6 μ LのIon Ampliseq HiFi Master Mix 5倍をチューブに添加した。また、5 μ Lのヌクレアーゼフリー水を添加して、総量を131 μ Lにした。溶液をよく混合し、チューブをサーモサイクラーに戻した。増幅の3回目のサイクルを、以下の温度プロファイルで実行した：98℃で2分、56℃で5分、10℃での最終保持。サーモサイクリング後、5 μ LのEDTA 0.5 Mを添加して混合し、反応を停止させた。

【0326】

ISPの濃縮

MyOneストレプトアビジンC1ビーズ（120 μ L）を別個のチューブに移送し、チューブを磁石上に置いて、磁性ビーズをペレット化した。上澄みを破棄し、チューブを磁石から除去した。150 μ LのIon Torrent Annealing Bufferに再懸濁することによって、ビーズを洗浄し、磁石でペレット化した。上澄みを廃棄し、150 μ LのAnnealing Bufferでもう一度洗浄を繰り返した。2回目の洗浄で上清を破棄した後、洗浄したMyOne C1ビーズを50 μ LのAnnealing Bufferで再懸濁した。Annealing Bufferで洗浄したMyOne C1の全内容物を、ライブラリおよびISPを含有するサーモサイクリングさ

れたPCRチューブに移送した。ピペット容量を160 μ Lに設定し、吸引または分注動作ごとに1秒で3回上下にピペッティングすることによって、内容物をゆっくりと混合した。混合物を攪拌せずに室温で30分間放置して、磁性ビーズが、ライブラリがシーディングされたISPを捕捉できるようにした。次いで、チューブを磁石上に置いて、磁性ビーズをペレット化し、上澄みを廃棄した。水中のTween-20 (25 μ L 0.1%) をペレットに添加した。混合物を激しくボルテックスして、MyOne C1ビーズからシーディングされたISPを溶出した。チューブをパルススピンさせた後、磁石に戻した。シーディングされたISPを含有する上清（溶出液）を、下流のチップ装填および増幅ステップのために新しいチューブに収集した。

【0327】

チップ調製およびチップ上へのIPSの磁性体装荷

反応チャンバマイクロウェルチップを含むIon Torrent半導体チップを、200 μ LのNF水で2回すすいだ。ストレプトアビジンが表面に結合した磁性ビーズであるDynabeads M-270ストレプトアビジン (150 μ L, Thermo Fisher Scientific) をチューブに移送し、次いで、チューブを磁石に入れて、磁性ビーズをペレット化した。上澄みを破棄し、チューブを磁石から除去した。次いで、M-270ペレットビーズを含有するチューブに以下を添加した：シーディングプロセスからの20 μ LのISP混合物、9 μ Lの5倍Annealing Buffer、および16 μ Lのヌクレアーゼフリー水の、合計45 μ L。代わりに、20 μ LのISP／ライブラリ混合物を、3.2 μ Lの10倍アニーリング緩衝液、3 μ Lの濃縮M270磁性ビーズ、および5.8 μ Lの水と混合し、合計32 μ Lとした。混合物を混合してM-270ペレットを再懸濁し、装填ポートを通してチップにゆっくりと注入した。チップの下に置かれた磁石を、チップ全体にわたって前後に繰り返し掃引して、ISPをチップマイクロウェルに装填した。磁性体装荷掃引を、30秒／掃引で40分間実行した。装填後、5 mLの1% SDSを含有する15 mLのファルコンチューブを激しく振とうして、高密度の泡を生成し、次いで、その800 μ Lをチップに注入して、チップフローセルから磁性ビーズを除去した。チップ出口を通る流れを破棄した。次いで、Annealing Buffer (200 μ L) をチップに注入し、通り抜ける流れを廃棄した。チップを、チップ出口から真空乾燥させた。Flush (200 μ Lの60% Annealing Buffer、40% IPA) をチップに注入し、次いで、真空乾燥させた。Annealing Buffer (200 μ L) を注入して、チップフローセルを充填し、通る抜ける流れをチップ出口で破棄した。チップを、下流の増幅ステップで増幅する準備ができるまで、Annealing Bufferで充填されたままにした。

【0328】

増幅

第1のステップ増幅

各チップの増幅について、1.1 μ Lのビオチン化プライマーA (100 μ M) と1 μ Lのブロック分子（緩衝液で再水和した10 mg/mLのNeutravidin）とをチューブ中で混ぜ合わせ、氷上で>15分インキュベートした。再水和緩衝液 (871 μ L) を、ION PGM (商標) TEMPLATE IA 500キットからのリコンビナーゼポリメラーゼ増幅を実施するための反応成分（例えば、リコンビナーゼ、ポリメラーゼ、一本鎖結合タンパク質、ヌクレオチド、緩衝液、および他の成分）を含有する1倍IAペレット (PN100032944) に添加した。溶液を10回パルスボルテックスし、すばやくスピンさせて、チューブ内容物を収集した。再水和された内容物（「ペレット溶液」と呼ばれる、大体900 μ L）を、プロセスの間、氷上に保持した。各Ion Torrentチップについて、60 μ Lの再水和IAペレット溶液を、チップにゆっくりと注入した。置換されたアニーリング緩衝液を、出口ポートから吸引した。チップを、再水和したIAペレット溶液とともに、RTで4分間インキュベートした。

【0329】

各チップの増幅について、90 μ Lの再水和したIAペレット溶液を、新しいチューブ

10

20

30

40

50

に移送した。以前に調製したビオチン化プライマーAおよびニュートラアビジンブロッキング分子（2.1 μL ）を添加し、パルス混合した。28 mM Mg (OAc)₂、10 mM Tris アセテートおよび3.75% (V/V) メチルセルロースの水溶液を含有する開始溶液（30 μL ）を、再水和したIAペレット溶液のチューブに添加し、10回パルスボルテックスし、すばやくスピンさせて、約120 μL の総体積の活性化増幅溶液を形成する。各チップについて、約60 μL の活性化増幅溶液を、チップにゆっくりと注入した。置換された液をすべて、両方のポートから吸引した。次に、25 μL の残りの活性化増幅溶液を、各チップポートに添加した。チップを、40℃に設定したホットプレート（サーモサイクラー）上に置いた。チップをピペットチップボックスの蓋または同様のカバー（加熱されたサーモサイクラーカバーではない）で覆い、2.5分間インキュベートさせた。

10

【0330】

短い反応停止および増幅ステップ間のクリーン

増幅されたチップを、ホットプレートまたはサーモサイクラーから取り出した。出口ポートを真空にしなが、200 μL の0.5 M EDTA pH8 (VWR E522-100 ML)をチップに注入し、次いで、真空を使用して、チップを吸引乾燥させた。いくつかの方法では、EDTAをチップに添加せず、代わりに、アニーリング緩衝液をチップに注入して、反応を中止させた。出口ポートを真空にしなが、200 μL の1倍ABをチップに注入し、チップを吸引して乾燥させた。ABの添加をさらに2回繰り返し、第2のステップ増幅のためにチップを充填したままにした。（ABは2回真空引きされ、ABの第3の添加を、チップに残した。）

20

【0331】

第2のステップ増幅（ブロッカーなし）

各チップについて、60 μL の再水和したペレット溶液を、チップにゆっくりと注入した。置換されたアニーリング緩衝液を、出口ポートから吸引した。チップを、ペレット溶液とともに、RTで4分間インキュベートした。各チップの調製について、90 μL の再水和したペレット溶液を、新しいチューブに移送した。ビオチン化プライマーA（100 μM の1.1 μL ）を添加し、チューブをパルスボルテックスし、スピンさせた。再水和したペレット溶液およびプライマーAを含有するチューブに開始溶液（30 μL ）を添加し、10回パルスボルテックスし、すばやくスピンさせて、活性化増幅溶液を生成した。およそ60 μL の活性化増幅溶液を、チップに注入した。置換された液を、両方のポートから吸引した。追加の25 μL の残りの増幅溶液を、各ポートに添加した。チップを、40℃に設定したホットプレート（サーモサイクラー）上に置いた。チップをピペットチップボックスの蓋または同様のカバーで覆い、20分間インキュベートさせた。

30

【0332】

反応停止およびクリーンアップ

増幅反応に供されたチップを、真空を備えたフードの近くに置いた。出口ポートを真空引きしなが、200 μL の0.5 M EDTA pH8を添加し、チップを吸引して、チップを乾燥させた。いくつかの方法では、EDTAをチップに添加せず、代わりに、アニーリング緩衝液をチップに注入して、反応を中止させた。出口ポートを真空引きしなが、200 μL の1倍ABを添加し、次いで、チップを吸引して、乾燥させた。出口ポートを真空にしなが、200 μL の1% SDS水溶液 (Ambion PN AM9822)を添加し、次いで、吸引して、チップを乾燥させた。SDS洗浄を繰り返した。出口ポートを真空にしなが、200 μL のホルムアミドを添加した。チップを50℃で3分間インキュベートし、次いで、吸引して、チップを乾燥させた。出口ポートを真空にしなが、200 μL のFlush（50% IPA / 50% AB）溶液を添加した。チップを吸引して、乾燥させた。出口ポートを真空にしなが、200 μL のアニーリング緩衝液を添加した。チップを、プライミングの準備ができるまで1倍ABのままにした。

40

【0333】

オンチップシーケンシングプライマーハイブリダイゼーションおよび酵素反応

50

Ionシーケンシングプライマー（100 μ M）を含有するチューブを解凍した。各チップのシーケンシングについて、40 μ Lのアニリング緩衝液と40 μ Lのシーケンシングプライマーとのプライマー混合物を調製し、十分にボルテックスした。チップを吸引して、乾燥させ、次いで、80 μ Lのプライマー混合物をチップに添加した（フローセルで50 μ L、各ポートで15 μ L）。チップをサーモサイクラー上に置き、50°Cで2分間、20°Cで5分間インキュベートし、出口ポートを真空にしながら、200 μ Lの1倍ABを注入した。酵素混合物を、60 μ Lのアニリング緩衝液および6 μ Lのシーケンシング酵素（Ion PSP4 Sequencing Polymerase）を使用して調製した。ポートを洗浄および真空にして、インレットポートからチップを乾燥させた。酵素混合物（60 μ L）をチップに添加し、RTで5分間インキュベートした。チップを吸引して、乾燥させた。AB（1倍の100 μ L）を注入して、チップをすぐに充填した。ポートを洗浄にし、チップの裏側を乾燥させ、ライブラリ核酸のシーケンシングのためにチップをIon Torrent Proton（Thermo Fisher Scientific）機器上に装填した。

【0334】

実施例3－異なる核酸操作方法を使用したシーケンス結果の比較

図60は、4つの異なる増幅条件（図のA～D）を使用して生成された核酸鋳型の核酸シーケンシングランのグループの使用可能な総読み取りを示す。方法Aでは、鋳型化されていないイオン球粒子（ISP）が、本明細書の実施例2に記載された方法に従って、Ion Torrent 541チップのマイクロウェルに装填された。続いて、ISPプライマーに相補的なアダプタを有するライブラリ分子（110-bp hg19断片ライブラリ）を、1回の95°C1分／37°C1分のサーモサイクリングステップと、続くライブラリアンプリコンのチップへの注入と、を伴って、事前装填されたISPにハイブリダイズさせた。ライブラリハイブリダイゼーションに続いて、増幅を、本質的に実施例2に記載されているように、シングルステップRPA鋳型化増幅方法を使用して実行した。プライマーを、ピオチン化しなかった。方法Bは、増幅プロトコルAに2つの重要な変更を採用した：1）鋳型化増幅前の追加の増幅ステップ（「第1の」増幅ステップ）、および2）追加された第1の増幅ステップでのニュートラアビジンおよびピオチン化溶液プライマーの組み込み。この例では、等温RPA増幅である第1の増幅ステップは2.5分であり、同等の濃度のピオチン化溶液プライマーおよびニュートラアビジンを含有する。第2の増幅ステップは1.5分であり、ニュートラアビジンを含有しない。この方法では、第1の増幅ステップは、（ニュートラアビジンを介して）抗力を追加しながら鋳型コピーを局在的に増幅して、新生鎖のウェルツーウェル拡散を制限するのに役立つ。2.5分後、抗力成分が不要になるのに十分なローカルコピーが作成される。次いで、実施例2に記載されているように、第2の増幅ステップを実行した。方法CおよびDでは、220-bp hg19 Ampliseq Exome Libraryを使用した。方法Cは、方法AおよびBのライブラリハイブリダイゼーション方法を、本明細書の実施例6に記載されている溶液ベースの事前増幅ISP濃縮方法に置き換えることによって、方法Bを改善する。したがって、ウェルですべてのステップを実行する代わりに、ライブラリをISPにハイブリダイズさせる第1のステップを溶液で行い、次いで、磁性ビーズをチューブに添加し、鋳型含有ISPを濃縮し、次いで、磁性ビーズから分離し、方法Bで行ったように、2ステップ増幅のためにウェルに装填した。事前増幅濃縮方法により、単一のライブラリ鋳型コピーを用いたISPの装填が可能になる。最後に、方法Cに従って実行された増幅方法Dは、方法Cと比較して修飾ISPプライマー配列を使用した。修飾プライマー、AV4は、配列番号：4の配列を有する。図60に示されるように、方法A～Dからなされた改善の組み合わせにより、エマルジョンPCRにより増幅された鋳型核酸に対して実行されるシーケンシングと同等の総読み取りが可能になる。

【0335】

実施例4．鋳型核酸シーディング方法およびシーディングされた支持体の間接的な捕捉標的鋳型核酸を用いて固体支持体をシーディングする方法（図58に例示される）

では、アダプタ修飾核酸ライブラリ分子の一連の増幅反応が実施されて、支持体上に固定化されたプライマーへのハイブリダイゼーションによる固体支持体に付着することができる単一の増幅産物を生成する。この産物は、標的鋳型核酸が結合した支持体の濃縮に使用するために捕捉オリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる短い配列を提供する、「ハンドル」と呼ばれる一本鎖5'末端オーバーハングを含む。

【0336】

シーディング方法

PCR増幅混合物を、ライブラリDNAを、ポリメラーゼ、および以下の2つのプライマーと組み合わせることによって調製した：(1) 3'→5'方向に、ライブラリDNAアンプリコンの一端上の第1の二本鎖アダプタの配列に相補的なヌクレオチド配列と、ポリメラーゼストップ部位と、ライブラリアンプリコン配列に相補的ではないヌクレオチドの配列（ハンドル配列）と、を含むヌクレオチド配列を有するプライマー、および(2) 5'→3'方向に、第1のプライマーが相補的である第1のアダプタが位置する末端と反対側のライブラリDNAアンプリコンの末端上の2本鎖アダプタの配列の一部に相補的であるヌクレオチド配列に融合して鋳型標的核酸がシーディングされるであろう固体支持体に固定化されたプライマーの配列と同一であるヌクレオチド配列を含むヌクレオチドの配列を有する融合プライマー。ライブラリを、Oncomine（商標）Comprehensive Assay v3（Life Technologies Corporation、Carlsbad, CA）およびOncomine focus Assayライブラリ調製プロトコルを、製造元の指示に従って使用して生成した。第1のプライマーは、プライマーの5'末端のハンドル配列と、ハンドルとTPCRA配列との間に位置するポリメラーゼストップ部位と、を有するTPCRAプライマー（配列番号：2）であった。第2のプライマーは、AV4プライマー配列（配列番号：4）とtrP1配列（trP1は、配列番号：1のIon P1アダプタの23merセグメントである）との融合であった。0.2mlのPCRチューブに、30μlの約100pMライブラリ、3μlの3μMハンドル-TPCRAプライマー、3μlの1.5μM AV4-trP1融合プライマー、および9μlのIon Ampliseq 5倍HiFi PCR Master Mix、または他の好適なポリメラーゼ含有混合物、例えば3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠く混合物、を添加し、短時間混合し、すばやくスピンさせた。PCRチューブ中の45μlの内容物を、以下のプロファイルで、サーモサイクラーでサーモサイクルした：98℃で2分間、次いで、98℃で15秒間-64℃で90秒間-58℃で2分間の2サイクルに続いて、10℃で保持する。チューブをサーモサイクラーから除去し、60億（110M/μLで54.5μL）のイオン球粒子（ISP、Thermo Fisher Scientific）と6μLの5倍HiFi PCRマスターミックス、または他の好適なポリメラーゼ含有混合物、例えば3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を欠く混合物、を混合物に添加した。チューブを、短時間混合し、スピンドウンした。PCRチューブ中の合計105.5μLの混合物を、再びサーモサイクラーに入れ、以下のプロファイルでサーモサイクルした：98℃2分-56℃5分-10℃保持。

【0337】

シーディングされた支持体の捕捉および濃縮

ハンドル-TPCRAプライマーのハンドルに相補的なビオチン化捕捉オリゴヌクレオチドを、サーモサイクラーから取り出したPCRチューブに添加し、チューブを完全にボルテックスし、スピンドウンした。チューブを室温で5分間インキュベートさせた。別のチューブに、120μLのMyOne C1磁性ビーズを添加した。磁性ビーズを150μLのAnnealing Bufferで2回洗浄し、次いで、50μLのAnnealing Bufferに再懸濁した。50μLの懸濁液で洗浄した磁性ビーズを、5分のインキュベーション後に捕捉オリゴヌクレオチドを含有するPCR反応チューブと組み合わせた。上下に3回ゆっくりとピペッティングすることによって、内容物全体を穏やかに混合した。チューブを、攪拌せずに室温で30分間インキュベートさせた。30分のインキュベーション後、チューブを、磁性スタンド（または磁性プレート）に注意深く置い

て、ライブラリがシーディングされたISPアセンブリが付着したMyOne C1ビーズをペレット化した。ペレットを乱すことなく、上澄みを除去した。ペレットに25 μ Lの水を添加して、標的鑄型がシーディングされたISPを溶出した。チューブを激しくボルテックスし、すばやくスピンドウンした。チューブを再び磁性スタンドに置いて、ペレット化した。濃縮された、標的鑄型がシーディングされたISPを含有する上清を、新しいチューブに移送し、さらなる分析、例えばシーケンシング、に使用できるようにした。

【0338】

濃縮されたシーディングされたISPの収量を分析するために、1 μ Lの産物をIon Annealing Bufferで100,000倍に段階的に希釈した。SYBR (商標) Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific、S11494)を、ISPを染色するための最終希釈で0.5倍で使用した。SYBR Gold stained ISP希釈液を、Guava easyCyteフローサイトメーター (Luminex Corporation、Austin, TX)で測定し、希釈されていないサンプル中の濃縮されたISPの濃度および総収量を分析した。Oncomine Focus AssayライブラリおよびOncomine (商標) Comprehensive Assay v3 (Life Technologies Corporation、Carlsbad, CA)は、それぞれ4億7500万および3億8300万のISPであると測定された。

【0339】

ライブラリ核酸の鑄型化増幅およびシーケンシング

濃縮されたシーディングされたISPを、反応チャンバマイクロウェルを含むIon (商標) 半導体チップ (Life Technologies、Carlsbad, CA)上に装填した。装填プロセスは、実施例2に記載したとおりであった。以下を150 μ LのDynabeads M-270ストレプトアビジン (Thermo Fisher Scientific)を含有するチューブに添加した：シーディングプロセスからの20 μ LのISP混合物、9 μ Lの5倍Annealing Buffer、および16 μ Lのヌクレアーゼフリー水の、合計45 μ L。混合物を混合してM-270ペレットを再懸濁し、装填ポートを通してチップにゆっくりと注入した。チップの下に置かれた磁石を、チップ全体にわたって前後に繰り返し掃引して、ISPをチップマイクロウェルに装填した。装填後、磁性ビーズおよび過剰なISPを、チップフローセルから除去した。次いで、マイクロウェル中のシーディングされたISP上の核酸を、実施例6に記載されるように、2つの増幅反応の間に短い反応ストップおよびチップ洗浄を伴う2ステップ増幅プロセスに供した。

【0340】

増幅された鑄型を含有するISPを、Ion Proton (Thermo Fisher Scientific)システムを使用してシーケンシングした。Ionシーケンシングプライマー (100 μ M)を含有するチューブを解凍した。各チップのシーケンシングについて、40 μ Lのアニーリング緩衝液と40 μ Lのシーケンシングプライマーとのプライマー混合物を調製し、十分にボルテックスした。チップを吸引して、乾燥させ、次いで、80 μ Lのプライマー混合物をチップに添加した (フローセルで50 μ L、各ポートで15 μ L)。チップをサーモサイクラー上に置き、50 $^{\circ}$ Cで2分間、20 $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし、出口ポートを真空にしながら、200 μ Lの1倍ABを注入した。酵素混合物を、60 μ Lのアニーリング緩衝液および6 μ Lのシーケンシング酵素 (Ion PSP4 Sequencing Polymerase)を使用して調製した。ポートを洗浄および真空にして、インレットポートからチップを乾燥させた。酵素混合物 (60 μ L)をチップに添加し、RTで5分間インキュベートした。チップを吸引して、乾燥させた。Annealing buffer (1倍の100 μ L)を注入して、チップをすぐに充填した。ポートを清浄にし、チップの裏側を乾燥させ、ライブラリ核酸のシーケンシングのためにチップをIon Proton機器上に装填した。Oncomine Focus AssayライブラリおよびOncomine Comprehensive As

10

20

30

40

50

s a y v 3 ライブラリのシーケンス読み取りの平均読み取り長は、それぞれ 1 1 3 b p および 1 0 9 b p であった。識別された読み取りの大部分（99%）は、標的領域にアライメントした。

【0341】

実施例 5

O F A アッセイを使用して 4 つのサンプルから、ライブラリが自動的に調製される。ライブラリは、実施例 2 で上述した自動化されたプロセスで、4 つのレーンの I O N T o r r e n t チップの単一のレーンに適用される。1 4 7 0 万の読み取りを有するバリエーションコールレポートが、1 3 . 8 時間で提供される。ランの生読み取り精度は、9 8 . 9 8 % で、Q 2 0 M R L は、1 1 0 b p であった。

【0342】

実施例 6

D N A と R N A との両方を用いる O C A v 3 アッセイを使用して、6 つのサンプルから、ライブラリが自動的に調製される。ライブラリは、実施例 2 で上述した自動化されたプロセスで、I O N T o r r e n t チップの 4 つのレーンに適用される。5 6 2 0 万の読み取りを有するバリエーションコールレポートが、3 0 . 3 時間で提供される。ランの生読み取り精度は、9 9 . 0 5 % で、Q 2 0 M R L は、1 0 7 b p であった。

【0343】

実施例 7

T C R B e t a - L R アッセイを使用して 4 つのサンプルから、ライブラリが自動的に調製される。ライブラリは、実施例 2 で上述した自動化されたプロセスで、I O N T o r r e n t チップの 1 つのレーンに適用される。1 4 6 0 万の読み取りを有するバリエーションコールレポートが、1 8 . 7 時間で提供される。ランの Q 2 0 M R L は、2 9 2 b p であった。

【0344】

実施例 8

2 つのライブラリが自動的に作成され、O F A アッセイを使用した 4 つのサンプルからの第 1 のもの、および T C R - B e t a - L R アッセイを使用した 4 つのサンプルからの第 2 のものである。ライブラリは、実施例 2 で上述した自動化されたプロセスで、I O N T o r r e n t チップの別個のレーンに適用される。1 3 5 0 万の読み取りおよび 1 1 7 0 万の読み取りの各々のレーンでのそれぞれの読み取りを有するバリエーションコールレポートが、2 2 . 1 時間で提供される。第 1 のライブラリを含む第 1 のレーンは、9 9 . 1 % の生読み取り精度および 1 1 2 b p の Q 2 0 M R L を提供した。第 2 のライブラリがランされたレーンの Q 2 0 M R L は、2 7 5 b p であった。

【0345】

実施例 9

6 つのランのセットが実行され、各々は、O F A アッセイを使用して 4 つのサンプルから自動的に調製され、かつ実施例 2 で上述した自動化されたプロセスで 4 つのレーンの I O N T o r r e n t チップの単一のレーンに適用されるライブラリを利用する。バリエーションコールレポートが、1 3 . 8 時間で提供される。提供されたランは、以下のとおりの平均性能を提供した。

10

20

30

40

50

【表 1】

	平均	CV(%)
生精度	99.2	0.1
Q20 MRL	104.5	0.5
総読み取り (M)	13.1	4.4
塩基カバレッジの均一性	98.6	0.4
標的に対する平均読み取りパーセント	98.1	0.1

10

【 0 3 4 6 】

実施例 9

4つのランのセットが実行され、各々は、FFPE DNA/RNAに由来する6つのサンプルから、OCA v3アッセイを使用して自動的に調製され、かつ実施例2で上述した自動化されたプロセスでION Torrentチップの4つのレーンに適用されるライブラリを利用する。バリエーションコールレポートが、30.8時間で提供される。提供されたランは、以下のとおりの平均性能を提供した。

20

【表 2】

メートル法	平均	%cv
総読み取り/レーン	12.9M	12.10 11.7%
DNA-アンプリコン均一性	95.1%	1.4%
DNA-マッピングされた読み取り	6022807	16.2%
DNA-カバレッジ深さ	1465	13.9%
DNA-MAPD	0.316	9.3%
DNA-アライメントされていない RL	100.6	4.1%
BC 不均衡	<80%	--

30

40

50

【表 3】

ヌクレオチド配列

配列番号	ヌクレオチド配列
1	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT
2	CCATCTCATCCCTGCGTGTC
3	CCTATCCCCTGTGTGCCTTG
4	ATTCGAGCTGTTTCATCTGTATCTTGCGCTACCAA

10

【0347】

第1の態様では、シーケンシングシステムは、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および5時間～14時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む。

【0348】

第2の態様では、シーケンシングシステムは、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した32個の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および15時間～24時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む。

20

【0349】

第3の態様では、シーケンシングシステムは、サンプルごとに2つのDNAプールおよび2つのRNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した6つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時にバリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および20時間～30時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む。

30

【0350】

第4の態様では、シーケンシングシステムは、サンプルごとに1つのDNAプールと190～220塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した12個の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および20時間～28時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む。

【0351】

第5の態様では、シーケンシングシステムは、第1および第2のアッセイに基づく8つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシングであって、8つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのうちの4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルの第1のセットは、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する第1のアッセイを使用し、8つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのうちの4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルの第2のセットは、サンプルごとに1つのDNAと190～220塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する第2のアッセイを使用する、シーケンシング時に、バリエントコールを同時に判定するのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および15時間～24時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む。

40

50

【0352】

第1の態様の例では、ランタイムは、5時間～12時間の範囲である。

【0353】

第1～第5の態様の例および上記の例では、生読み取り精度は、少なくとも99.0%の生読み取り精度である。例えば、生読み取り精度は、少なくとも99.1%である。

【0354】

第1～第5の態様の別の例および上記の例では、性能は、少なくとも100塩基かつ450塩基以下のQ20中央値読み取り長によってさらに特徴付けられる。例えば、Q20中央値読み取り長は、少なくとも102塩基かつ300塩基以下である。別の例では、Q20中央値読み取り長は、少なくとも104塩基かつ300塩基以下である。

10

【0355】

第1～第5の態様のさらなる例および上記の例では、性能は、少なくとも97%の均一性によってさらに特徴付けられる。例えば、均一性は、少なくとも98%である。別の例では、均一性は、少なくとも98.5%である。

【0356】

第1～第5の態様のさらなる例および上記の例では、性能は、標的に対する少なくとも97%の平均読み取りパーセントによってさらに特徴付けられる。例えば、標的に対する平均読み取りパーセントは、少なくとも98%である。例では、標的に対する平均読み取りパーセントは、少なくとも98.1%である。

【0357】

第1～第5の態様の別の例および上記の例では、性能は、1300万塩基～1億塩基の範囲の総読み取りによってさらに特徴付けられる。例えば、総読み取りは、1300万塩基～6000万塩基の範囲である。例では、総読み取りは、1450万塩基～2500万塩基の範囲である。

20

【0358】

第6の態様では、シーケンシングのための方法は、シーケンシング装置に、4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルと、シーケンシング基材と、サンプルごとに1つのDNAプールおよび100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズを有するアッセイのための試薬と、を提供することと、シーケンシング装置でアッセイに由来する複数のポリヌクレオチドを生成することと、少なくとも98.5%の生読み取り精度を有する複数のポリヌクレオチドをシーケンシング装置でシーケンシングすることと、シーケンシング装置でシーケンシングに基づくバリエーションコールレポートを作成することと、を含み、生成すること、シーケンシングすること、および作成することは、5時間～14時間の範囲内のランタイムで実行される。

30

【0359】

第6の態様の例では、ランタイムは、5時間～12時間の範囲である。

【0360】

第6の態様の別の例および上記の例では、生読み取り精度は、少なくとも99.1%である。例えば、生読み取り精度は、少なくとも99.2%である。

【0361】

第6の態様のさらなる例および上記の例では、性能は、少なくとも100塩基かつ300塩基以下のQ20中央値読み取り長によってさらに特徴付けられる。例えば、Q20中央値読み取り長は、少なくとも102塩基かつ300塩基以下である。例では、Q20中央値読み取り長は、少なくとも104塩基かつ300塩基以下である。

40

【0362】

第6の態様の追加の例および上記の例では、性能は、少なくとも97%の均一性によってさらに特徴付けられる。例えば、均一性は、少なくとも98%である。別の例では、均一性は、少なくとも98.5%である。

【0363】

第6の態様の別の例および上記の例では、性能は、標的に対する少なくとも97%の平

50

均読み取りパーセントによってさらに特徴付けられる。例えば、標的に対する平均読み取りパーセントは、少なくとも98%である。例では、標的に対する平均読み取りパーセントは、少なくとも98.1%である。

【0364】

第6の態様のさらなる例および上記の例では、性能は、1300万塩基～1億塩基の範囲の総読み取りによってさらに特徴付けられる。例えば、総読み取りは、1400万塩基～6000万塩基の範囲である。例では、総読み取りは、1450万塩基～2500万塩基の範囲である。

【0365】

第7の態様では、シーケンシングのための方法は、シーケンシング装置に、第1のタイプのアッセイ用の試薬溶液、第2のタイプのアッセイ用の試薬溶液、複数のレーンを有するシーケンシング基材、および少なくとも2つのポリヌクレオチドサンプルを提供することと、シーケンシング装置で少なくとも2つの精製されたポリヌクレオチドサンプルの少なくとも第1のポリヌクレオチドサンプルと第1のタイプのアッセイとに由来する第1の複数のポリヌクレオチドを生成することと、シーケンシング装置で少なくとも2つの精製されたポリヌクレオチドサンプルの少なくとも第2のポリヌクレオチドサンプルと第2のタイプのアッセイとに由来する第2の複数のポリヌクレオチドを生成することと、第1の複数のポリヌクレオチドをシーケンシング基材の複数のレーンの第1のレーンに装填することと、第2の複数のポリヌクレオチドをシーケンシング基材の複数のレーンの第2のレーンに装填することと、シーケンシング装置でポリヌクレオチドの第1および第2の複数のポリヌクレオチドをシーケンシングすることと、シーケンシング装置で、提供することについて10時間～24時間の範囲内のランタイムでバリエーションコールレポートを作成することと、を含み、シーケンシングは、第1および第2の複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つに対する少なくとも98.5%の生読み取り精度によって特徴付けられる性能を有する。

【0366】

第8の態様では、シーケンシング装置は、第1の精製されたサンプルおよび第1のアッセイタイプからポリヌクレオチドの第1の集団を生成すると同時にし、第2の精製されたサンプルおよび第1のアッセイタイプとは異なる第2のアッセイタイプからポリヌクレオチドの第2の集団を生成するための自動システムと、ポリヌクレオチドの第1の集団およびポリヌクレオチドの第2の集団を同時にシーケンシングするためのシーケンシング機器と、を含む。

【0367】

第9の態様では、複数のサンプルをシーケンシングする方法は、シーケンシング装置を使用して、アッセイからのポリヌクレオチドの第1の集団および第1のサンプルを自動的に生成することと、シーケンシング装置を使用して、ポリヌクレオチドの第1の集団をマルチレーンシーケンシング基材の第1のレーンに装填することと、マルチレーンシーケンシング基材およびシーケンシング装置を使用して、ポリヌクレオチドの第1の集団をシーケンシングすることと、シーケンシング装置を使用して、ポリヌクレオチドの第1の集団をシーケンシングすることについて、第2のアッセイおよび第2のサンプルからポリヌクレオチドの第2の集団を自動的に生成することと、シーケンシング装置を使用して、ポリヌクレオチドの第2の集団をマルチレーンシーケンシング基材の第2レーンに装填することと、マルチレーンシーケンシング基材およびシーケンシング装置を使用して、ポリヌクレオチドの第2の集団をシーケンシングすることと、を含む。

【0368】

第10の態様では、システムは、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルを受け取り、かつバリエーションコールレポートを生成するように適合されたシーケンシング装置を含み、シーケンシング装置でランされるサンプルごとに1つのポリヌクレオチドプールを含むアッセイを使用したシーケンシング時の、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルの受け取りから、バリエーションコールレポートの生成までのランタイムは、約5時

間～14時間であり、システムは、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプル、消耗品のセット、およびラン計画を提供する以外に、バリエーションコールレポートを生成するための手動介入を必要としない。

【0369】

第11の態様では、核酸処理および分析のための統合自動システムは、核酸を含有する1つ以上のサンプルから核酸鋳型を調製するためのコンポーネントと、核酸鋳型を1つ以上の表面に付着させるためのコンポーネントと、1つ以上の表面上の核酸鋳型を増幅するためのコンポーネントと、ヌクレオチド重合を通して核酸鋳型に相補的な核酸配列を生成するためのコンポーネントと、核酸鋳型に相補的な核酸配列を生成する際に重合したヌクレオチドを検出するためのコンポーネントと、核酸鋳型に相補的な核酸配列を生成する際に重合されたヌクレオチドを同定するためのコンポーネントと、を含み、統合自動システムは、人間ユーザによる1つの介入ステップのみを必要とする。

10

【0370】

第11の態様の例では、統合自動システムは、同定されたヌクレオチドを分析して核酸鋳型の配列を判定するためのコンポーネントをさらに含む。

【0371】

第11の態様の別の例および上記の例では、統合自動システムは、人間ユーザが、システムによって実行されるサンプル核酸の処理および分析に熟練していないことをさらに含む。

【0372】

第11の態様のさらなる例および上記の例では、統合自動システムは、核酸を処理し、分析して、4つ以上の異なるサンプルの各々から同時に少なくとも約1200万の核酸配列読み取りを生成することができることをさらに含む。

20

【0373】

第11の態様の追加の例および上記の例では、統合自動システムは、核酸を処理し、分析して、96個以上の異なるサンプルの各々から同時に少なくとも約100万の核酸配列読み取りを生成することができることをさらに含む。

【0374】

第11の態様の別の例および上記の例では、統合自動システムは、核酸を処理し、分析して、48個以上の異なるサンプルの各々から同時に少なくとも約50万の核酸配列読み取りを生成することができることをさらに含む。

30

【0375】

第11の態様のさらなる例および上記の例では、核酸配列読み取りの大部分は各々、少なくとも約350のヌクレオチドを含む。

【0376】

第11の態様の追加の例および上記の例では、核酸鋳型を調製するためのコンポーネントは、2つ以上の異なるペアの増幅プライマーを使用して単一の増幅反応混合物中の1つ以上のサンプルのうちの少なくとも1つの核酸を増幅するためのシステムを含む。例えば、核酸鋳型を調製するためのコンポーネントは、50個以上の異なるペアの増幅プライマーを使用して単一の増幅反応混合物中の1つ以上のサンプルのうちの少なくとも1つの核酸を増幅するためのシステムを含む。

40

【0377】

第11の態様の別の例および上記の例では、核酸鋳型を調製するためのコンポーネントは、RNAまたはDNAから鋳型を調製することができる。

【0378】

第11の態様のさらなる例および上記の例では、核酸鋳型を調製するためのコンポーネントは、2つ以上の異なるペアの増幅プライマーを使用して単一の増幅反応混合物中の1つ以上のサンプルのうちの少なくとも1つの核酸を増幅するためのシステムを含む。例えば、システムは、4つ以上のサンプルからの核酸を処理して、約5～14時間で少なくとも1200万の核酸配列読み取りを生成することができる。

50

【0379】

第12の態様では、核酸分析のためにサンプルを処理するための自動化された方法は、核酸を含むサンプルを提供することと、上記の態様のシステムにサンプルを入力し、システムがサンプルを処理できるようにすることと、を含む。例えば、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有するアッセイが使用される場合、システムは、5～14時間のランタイムでバリエーションコールレポートを提供する。

【0380】

第13の態様では、自動核酸分析のための統合サンプル処理デバイスは、ユーザ入力モジュール、核酸ライブラリ調製ユニット、核酸鋳型化ユニット、ヌクレオチド重合シグナル検出ユニット、ヌクレオチド重合シグナルデータ処理ユニット、ヌクレオチド重合データ分析ユニット、および制御ユニットを含み、デバイスは、核酸分析のためのサンプル処理に熟練していないユーザによる1つのみの介入ステップでの自動化サンプル処理のために構成されている。

10

【0381】

第13の態様の例では、デバイスは、4つのサンプルに対してサンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有するアッセイが使用される場合、5～14時間のランタイムでバリエーションコールレポートを提供することができる。

【0382】

第13の態様の別の例および上記の例では、ユーザ命令入力ユニットは、タッチスクリーンユーザインターフェースを含む。

20

【0383】

第13の態様のさらなる例および上記の例では、核酸ライブラリ調製ユニットは、装置デッキ上に配設されたウェルプレートを含む。

【0384】

第13の態様の追加の例および上記の例では、核酸ライブラリ調製ユニットは、ピペッティングロボットを含む。

【0385】

第13の態様の別の例および上記の例では、核酸鋳型化ユニットは、磁性体装荷機器を含む。

30

【0386】

第13の態様のさらなる例および上記の例では、シグナル検出ユニットは、センサデバイスと相互作用するための電子インターフェースを含む。

【0387】

第13の態様の追加の例および上記の例では、シグナルデータ処理ユニットおよび分析ユニットは、計算デバイスに実装されている。

【0388】

一般的な説明または例で上述したアクティビティのすべてが必要とされるわけではなく、特定のアクティビティの一部が必要とされない場合があり、記載されたアクティビティに加えて1つ以上のさらなるアクティビティが実行される場合があることに留意されたい。さらにまた、アクティビティが列挙される順序は、必ずしもそれらが実行される順序ではない。

40

【0389】

前述の明細書では、概念は、特定の実施形態を参照して記載されてきた。しかしながら、当業者は、以下の特許請求の範囲に述べるように、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な修正および変更を行うことができることを認識する。よって、明細書および図は、限定的な意味ではなく例示的な意味で考慮されるものであり、そのようなすべての修正は、本発明の範囲内に含まれることが意図されている。

【0390】

50

本明細書で使用される場合、「含む (comprises)」、「含む (comprising)」、「含む (includes)」、「含む (including)」、「有する (has)」、「有する (having)」という用語、またはそれらの他の任意の変化形は、非排他的な包含に及ぶことが意図されている。例えば、特徴のリストを含むプロセス、方法、物品、または機器は、必ずしもそれらの特徴のみに限定されず、明示的に記載されていないか、またはそのようなプロセス、方法、物品、または機器に固有である他の特徴を含み得る。さらに、明示的に断りの記載がない限り、「または」は、包含的論理和を指し、排他的論理和を指さない。例えば、条件 A または B は、次のいずれか 1 つによって満たされる：A が真（または存在する）であり、かつ B が偽（または存在しない）である、A が偽（または存在しない）であり、かつ B が真（または存在する）である、および A と B との両方が真（または存在する）である。

10

【0391】

また、「a」または「an」の使用は、本明細書に記載される要素および構成要素を記述するために使用される。これは、単に便宜上、かつ本発明の範囲の一般的な意味を与えるために行われる。この記述は、1 つまたは少なくとも 1 つを含むように読まれるものであり、また、別の意味であることが明らかでない限り、単数形は複数形も含む。

【0392】

利益、他の利点、および問題の解決策が、特定の実施形態に関して上述されてきた。しかしながら、利益、利点、問題の解決策、および任意の利益、利点、または解決策を生じさせ得るか、またはより顕著にし得る任意の特徴は、いずれかの、またはすべての請求項の枢要な、必要とされる、または本質的な特徴と解釈されるものではない。

20

【0393】

明細書を読んだ後に、当業者は、特定の特徴が、明確さのために別個の実施形態の文脈で本明細書に記載され、また単一の実施形態において組み合わせて提供されてもよいことを認識するであろう。逆に、様々な特徴が、簡潔さのために単一の実施形態の文脈で記載され、また別個に、または任意のサブコンビネーションで提供されてもよい。さらに、範囲で述べられる値の参照は、その範囲内の各値およびあらゆる値を含む。

なお、好ましい構成態様として、本発明を次のように構成することもできる。

1. シーケンシングシステムであって、サンプルごとに 1 つの DNA プールと 100 ～ 120 塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した 4 つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも 98.5 % の生読み取り精度の性能および 5 時間～14 時間の範囲のランタイムで、1 つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

30

2. シーケンシングシステムであって、サンプルごとに 1 つの DNA プールと 100 ～ 120 塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した 32 個の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定するのに、少なくとも 98.5 % の生読み取り精度の性能および 15 時間～24 時間の範囲のランタイムで、1 つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

40

3. シーケンシングシステムであって、サンプルごとに 2 つの DNA プールおよび 2 つの RNA プールと 100 ～ 120 塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した 6 つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時にバリエントコールを判定するのに、少なくとも 98.5 % の生読み取り精度の性能および 20 時間～30 時間の範囲のランタイムで、1 つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエントコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

4. シーケンシングシステムであって、サンプルごとに 1 つの DNA プールと 190 ～ 220 塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する標的アッセイを使用した 12 個の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシング時に、バリエントコールを判定す

50

るのに、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および20時間～28時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエーションコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

5. シーケンシングシステムであって、第1および第2のアッセイに基づく8つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのシーケンシングであって、前記8つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのうちの4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルの第1のセットは、サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する前記第1のアッセイを使用し、前記8つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルのうちの4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルの第2のセットは、サンプルごとに1つのDNAと190～220塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有する前記第2のアッセイを使用する、シーケンシング時に、バリエーションコールを同時に判定するの、少なくとも98.5%の生読み取り精度の性能および15時間～24時間の範囲のランタイムで、1つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルのバリエーションコールを判定するように適合された自動シーケンシング装置を含む、シーケンシングシステム。

6. 前記ランタイムが、5時間～12時間の範囲である、請求項1に記載のシーケンシングシステム。

7. 前記生読み取り精度が、少なくとも99.0%の生読み取り精度である、請求項1～6のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

8. 前記生読み取り精度が、少なくとも99.1%である、請求項7に記載のシーケンシングシステム。

9. 前記性能が、少なくとも100塩基かつ450塩基以下のQ20中央値読み取り長によってさらに特徴付けられる、請求項1～8のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

10. 前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも102塩基かつ300塩基以下である、請求項9に記載のシーケンシングシステム。

11. 前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも104塩基かつ300塩基以下である、請求項10に記載のシーケンシングシステム。

12. 前記性能が、少なくとも97%の均一性によってさらに特徴付けられる、請求項1～11のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

13. 前記均一性が、少なくとも98%である、請求項12に記載のシーケンシングシステム。

14. 前記均一性が、少なくとも98.5%である、請求項13に記載のシーケンシングシステム。

15. 前記性能が、少なくとも97%の、標的に対する平均読み取りパーセントによってさらに特徴付けられる、請求項1～14のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

16. 標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98%である、請求項15に記載のシーケンシングシステム。

17. 標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98.1%である、請求項16に記載のシーケンシングシステム。

18. 前記性能が、1300万塩基～1億塩基の範囲の総読み取りによってさらに特徴付けられる、請求項1～17のいずれか一項に記載のシーケンシングシステム。

19. 前記総読み取りが、1300万塩基～6000万塩基の範囲である、請求項18に記載のシーケンシングシステム。

20. 前記総読み取りが、1450万塩基～2500万塩基の範囲である、請求項19に記載のシーケンシングシステム。

21. シーケンシングのための方法であって、

シーケンシング装置に、4つの抽出されたポリヌクレオチドサンプルと、シーケンシング基材と、サンプルごとに1つのDNAプール、および100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズを有するアッセイ用の試薬と、を提供することと、

10

20

30

40

50

前記シーケンシング装置で、前記アッセイに由来する複数のポリヌクレオチドを生成することと、

前記シーケンシング装置で、少なくとも98.5%の生読み取り精度で前記複数のポリヌクレオチドをシーケンシングすることと、

前記シーケンシング装置で、前記シーケンシングに基づいてバリエーションコールレポートを作成することと、を含み、

前記生成、前記シーケンシング、および前記作成が、5時間～14時間の範囲内のランタイムで実行される、方法。

22. 前記ランタイムが、5時間～12時間の範囲である、請求項21に記載の方法。

23. 前記生読み取り精度が、少なくとも99.1%である、請求項21または22に記載の方法。

24. 前記生読み取り精度が、少なくとも99.2%である、請求項23に記載の方法。

25. 前記性能が、少なくとも100塩基かつ300塩基以下のQ20中央値読み取り長によってさらに特徴付けられる、請求項21～24のいずれか一項に記載の方法。

26. 前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも102塩基かつ300塩基以下である、請求項25に記載の方法。

27. 前記Q20中央値読み取り長が、少なくとも104塩基かつ300塩基以下である、請求項26に記載の方法。

28. 前記性能が、少なくとも97%の均一性によってさらに特徴付けられる、請求項21～27のいずれか一項に記載の方法。

29. 前記均一性が、少なくとも98%である、請求項28に記載の方法。

30. 前記均一性が、少なくとも98.5%である、請求項29に記載の方法。

31. 前記性能が、少なくとも97%の、標的に対する平均読み取りパーセントによってさらに特徴付けられる、請求項21～30のいずれか一項に記載の方法。

32. 標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98%である、請求項31に記載の方法。

33. 標的に対する前記平均読み取りパーセントが、少なくとも98.1%である、請求項32に記載の方法。

34. 前記性能が、1300万塩基～2500万塩基の範囲の総読み取りによってさらに特徴付けられる、請求項21～33のいずれか一項に記載の方法。

35. 前記総読み取りが、1400万塩基～2500万塩基の範囲である、請求項34に記載の方法。

36. 前記総読み取りが、1450万塩基～2500万塩基の範囲である、請求項35に記載の方法。

37. シーケンシングのための方法であって、

シーケンシング装置に、第1のタイプのアッセイ用の試薬溶液、第2のタイプのアッセイ用の試薬溶液、複数のレーンを有するシーケンシング基材、および少なくとも2つのポリヌクレオチドサンプルを提供することと、

前記シーケンシング装置で、少なくとも2つの精製されたポリヌクレオチドサンプルの少なくとも第1のポリヌクレオチドサンプルと、前記第1のタイプのアッセイと、に由来する第1の複数のポリヌクレオチドを生成することと、

前記シーケンシング装置で、前記少なくとも2つの精製されたポリヌクレオチドサンプルの少なくとも第2のポリヌクレオチドサンプルと、前記第2のタイプのアッセイと、に由来する第2の複数のポリヌクレオチドを生成することと、

前記シーケンシング基材の前記複数のレーンの第1のレーンに前記第1の複数のポリヌクレオチドを装填することと、

前記シーケンシング基材の前記複数のレーンの第2のレーンに前記第2の複数のポリヌクレオチドを装填することと、

前記シーケンシング装置で、前記第1および第2の複数のポリヌクレオチドをシーケンシングすることと、

10

20

30

40

50

前記第 1 および第 2 の複数のポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つに対する少なくとも 98.5% の生読み取り精度によって特徴付けられる性能を有する前記シーケンシングを提供することに続いて、前記シーケンシング装置で、10 時間～24 時間の範囲内のランタイムでバリエーションコールレポートを作成することと、を含む、方法。

38. シーケンシング装置であって、第 1 の精製されたサンプルおよび第 1 のアッセイタイプからポリヌクレオチドの第 1 の集団を生成するのと同時に、第 2 の精製されたサンプルおよび前記第 1 のアッセイタイプとは異なる第 2 のアッセイタイプからポリヌクレオチドの第 2 の集団を生成するための自動システムと、前記ポリヌクレオチドの第 1 の集団および前記ポリヌクレオチドの第 2 の集団を同時にシーケンシングするためのシーケンシング機器と、を含む、シーケンシング装置。

10

39. 複数のサンプルをシーケンシングする方法であって、

シーケンシング装置を使用して、アッセイおよび第 1 のサンプルからポリヌクレオチドの第 1 の集団を自動的に生成することと、

前記シーケンシング装置を使用して、前記ポリヌクレオチドの第 1 の集団をマルチレーンシーケンシング基材の第 1 のレーンに装填することと、

前記マルチレーンシーケンシング基材および前記シーケンシング装置を使用して、前記ポリヌクレオチドの第 1 の集団をシーケンシングすることと、

前記ポリヌクレオチドの第 1 の集団をシーケンシングすることとに続いて、シーケンシング装置を使用して、第 2 のアッセイおよび第 2 のサンプルからポリヌクレオチドの第 2 の集団を自動的に生成することと、

20

前記シーケンシング装置を使用して、前記ポリヌクレオチドの第 2 の集団を前記マルチレーンシーケンシング基材の第 2 のレーンに装填することと、

前記マルチレーンシーケンシング基材および前記シーケンシング装置を使用して、前記ポリヌクレオチドの第 2 の集団をシーケンシングすることと、を含む、方法。

40. システムであって、

1 つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルを受け取り、かつバリエーションコールレポートを生成するように適合されたシーケンシング装置を含み、

前記シーケンシング装置でのサンプルランごとに 1 つのポリヌクレオチドプールを含むアッセイを使用するシーケンシング時に、前記 1 つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプルの受け取りから前記バリエーションコールレポートの生成までのランタイムが、約 5 時間～14 時間であり、

30

前記システムが、前記 1 つ以上の抽出されたポリヌクレオチドサンプル、消耗品のセット、およびラン計画を提供する以外に、前記バリエーションコールレポートを生成するための手動介入を必要としない、システム。

41. 核酸の処理および分析のための統合自動システムであって、

核酸を含有する 1 つ以上のサンプルから核酸鋳型を調製するためのコンポーネントと、

前記核酸鋳型を 1 つ以上の表面に付着させるためのコンポーネントと、

前記 1 つ以上の表面上の前記核酸鋳型を増幅するためのコンポーネントと、

ヌクレオチド重合により前記核酸鋳型に相補的な核酸配列を生成するためのコンポーネントと、

40

前記核酸鋳型に相補的な核酸配列を生成する際に重合したヌクレオチドを検出するためのコンポーネントと、

前記核酸鋳型に相補的な核酸配列を生成する際に重合したヌクレオチドを同定するためのコンポーネントと、を含む、

前記統合自動システムが、人間ユーザによる 1 つのみの介入ステップを必要とする、統合自動システム。

42. 前記同定されたヌクレオチドを分析して前記核酸鋳型の前記配列を判定するためのコンポーネントをさらに含む、請求項 41 に記載の統合自動システム。

43. 前記人間ユーザが、前記システムによって実行されるサンプル核酸処理および分析に熟練していない、請求項 41 または 42 に記載の統合自動システム。

50

44. 前記システムが、核酸を処理し、分析して、4つ以上の異なるサンプルの各々から同時に少なくとも約1200万の核酸配列読み取りを生成することができる、請求項41～43のいずれか一項に記載の統合自動システム。

45. 前記システムが、核酸を処理し、分析して、96個以上の異なるサンプルの各々から同時に少なくとも約100万の核酸配列読み取りを生成することができる、請求項41～43のいずれか一項に記載の統合自動システム。

46. 前記システムが、核酸を処理し、分析して、48個以上の異なるサンプルの各々から同時に少なくとも約50万の核酸配列読み取りを生成することができる、請求項41～43のいずれか一項に記載の統合自動システム。

47. 前記核酸配列読み取りの大部分が各々、少なくとも約350のヌクレオチドを含む、請求項44～46のいずれか一項に記載の統合自動システム。

10

48. 前記核酸鑄型を調製するための前記コンポーネントが、2つ以上の異なるペアの増幅プライマーを使用して単一の増幅反応混合物中の前記1つ以上のサンプルのうちの少なくとも1つの核酸を増幅するためのシステムを含む、請求項41～47のいずれか一項に記載の統合自動システム。

49. 前記核酸鑄型を調製するための前記コンポーネントが、50個以上の異なるペアの増幅プライマーを使用して単一の増幅反応混合物中の前記1つ以上のサンプルのうちの少なくとも1つの核酸を増幅するためのシステムを含む、請求項48に記載の統合自動システム。

50. 前記核酸鑄型を調製するための前記コンポーネントが、RNAまたはDNAから鑄型を調製することができる、請求項41～49のいずれか一項に記載の統合自動システム。

20

51. 前記核酸鑄型を調製するための前記コンポーネントが、2つ以上の異なるペアの増幅プライマーを使用して単一の増幅反応混合物中の前記1つ以上のサンプルのうちの少なくとも1つの核酸を増幅するためのシステムを含む、請求項41～50のいずれか一項に記載の統合自動システム。

52. 前記システムが、4つ以上のサンプルからの核酸を処理して、約5～14時間で少なくとも1200万の核酸配列読み取りを生成することができる、請求項51に記載の統合自動システム。

53. 核酸分析のためのサンプルを処理するための自動化された方法であって、核酸を含むサンプルを提供することと、

30

前記サンプルを請求項41に記載のシステムに入力し、前記システムに前記サンプルを処理させることと、を含む、自動化された方法。

54. サンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有するアッセイが使用される場合、前記システムが、5～14時間のランタイムでバリエーションコールレポートを提供する、請求項53に記載の自動化された方法。

55. 自動核酸分析のための統合サンプル処理デバイスであって、

ユーザ入力モジュールと、

核酸ライブラリ調製ユニットと、

核酸鑄型化ユニットと、

40

ヌクレオチド重合シグナル検出ユニットと、

ヌクレオチド重合シグナルデータ処理ユニットと、

ヌクレオチド重合データ分析ユニットと、

制御ユニットと、を含み、

前記デバイスが、核酸分析のためのサンプル処理に熟練していないユーザによる1つのみの介入ステップを有する自動サンプル処理のために構成されている、統合サンプル処理デバイス。

56. 前記デバイスが、4つのサンプルに対してサンプルごとに1つのDNAプールと100～120塩基の範囲の平均アンプリコンサイズとを有するアッセイが使用される場合、5～14時間のランタイムでバリエーションコールレポートを提供することができる、請

50

求項 5 5 に記載の統合サンプル処理デバイス。

5 7. 前記ユーザ命令入力ユニットが、タッチスクリーンユーザインターフェースを含む、請求項 5 5 または 5 6 に記載の統合サンプル処理デバイス。

5 8. 前記核酸ライブラリ調製ユニットが、装置デッキ上に配設されたウェルプレートを含む、請求項 5 5 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の統合サンプル処理デバイス。

5 9. 前記核酸ライブラリ調製ユニットが、ピペッティングロボットを含む、請求項 5 5 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の統合サンプル処理デバイス。

6 0. 前記核酸鋳型化ユニットが、磁性体装荷機器を含む、請求項 5 5 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の統合サンプル処理デバイス。

6 1. 前記シグナル検出ユニットが、センサデバイスとインタラクトするための電子インターフェースを含む、請求項 5 5 ～ 6 0 のいずれか一項に記載の統合サンプル処理デバイス。

6 2. 前記シグナルデータ処理ユニットおよび前記分析ユニットが、計算デバイスに実装されている、請求項 5 5 に記載の統合サンプル処理デバイス。

【図面】

【図 1】

【図 2】

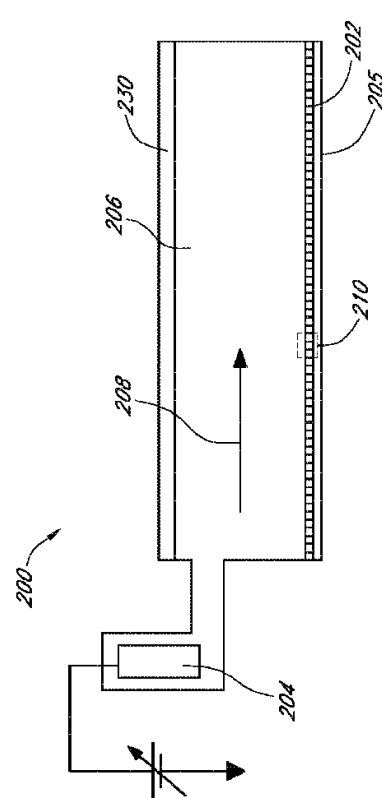
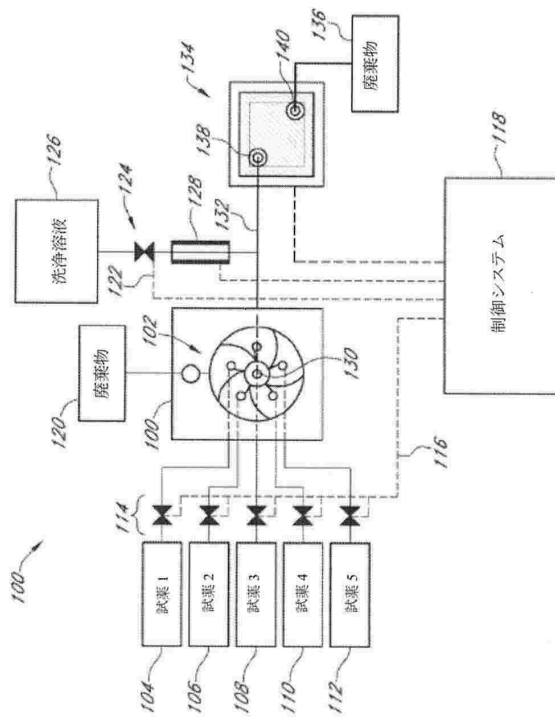
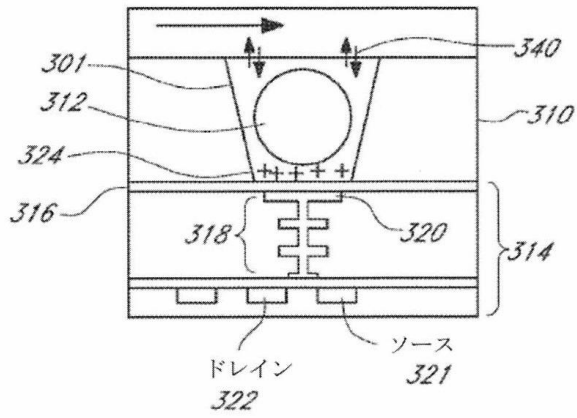


FIG. 2

【図 3】



【図 4】

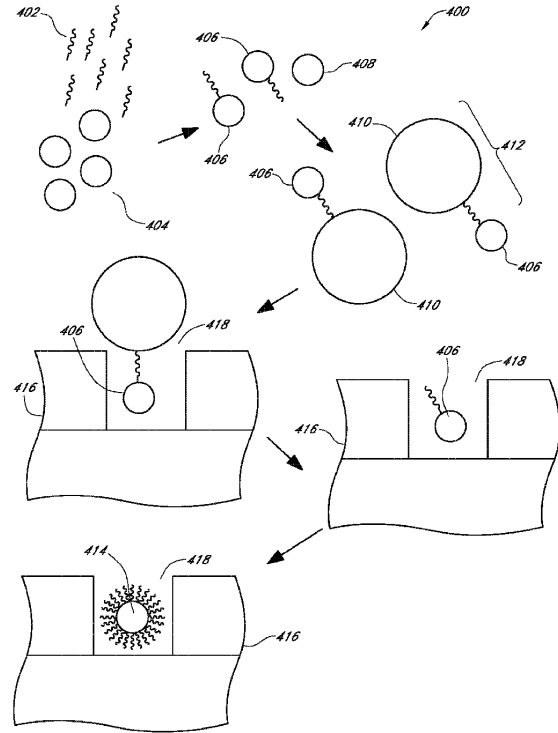
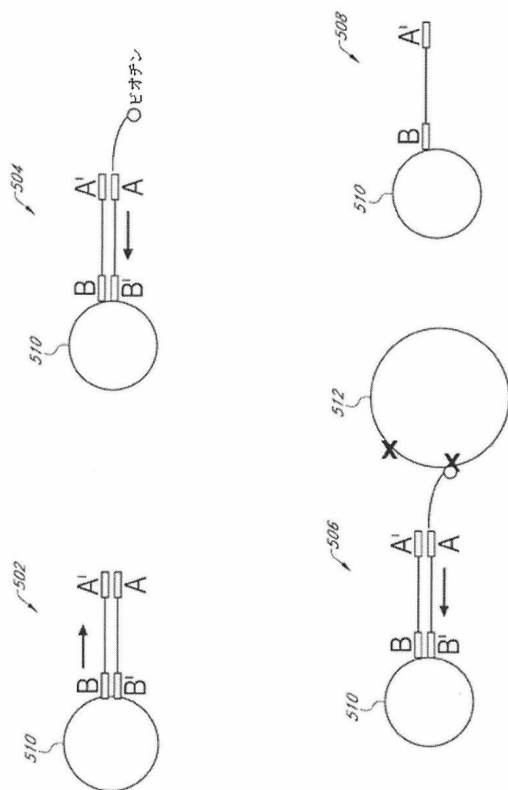


FIG. 4

【図 5】



【図 6】

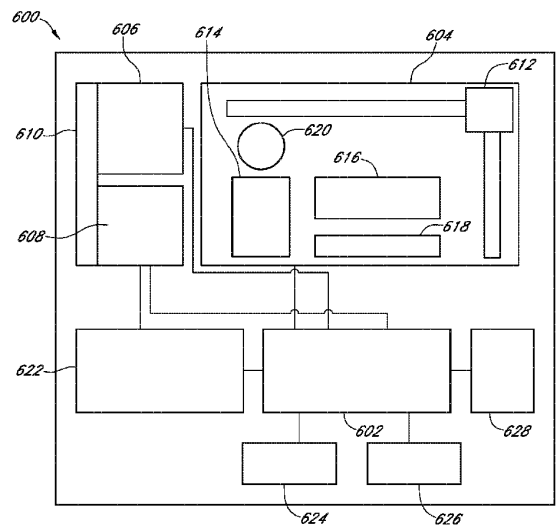


FIG. 6

10

20

30

40

50

【図 7】

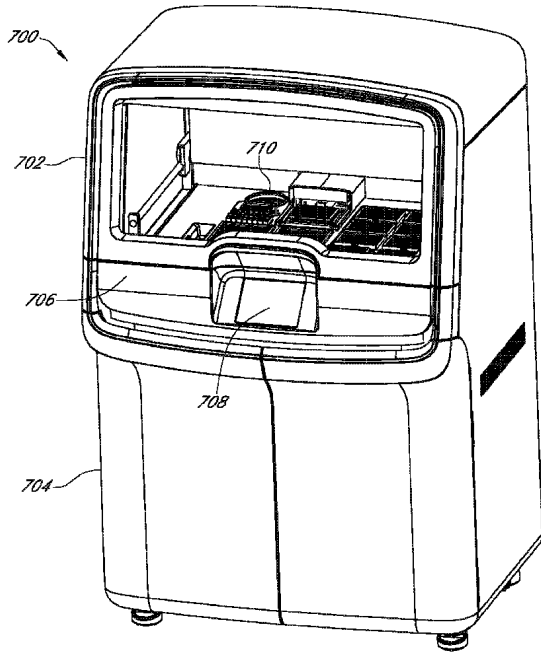


FIG. 7

【図 8】

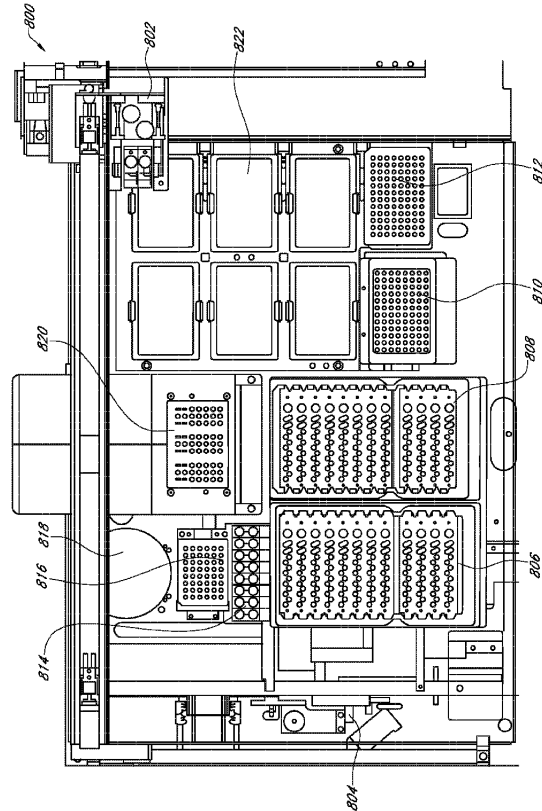


FIG. 8

【図 9】

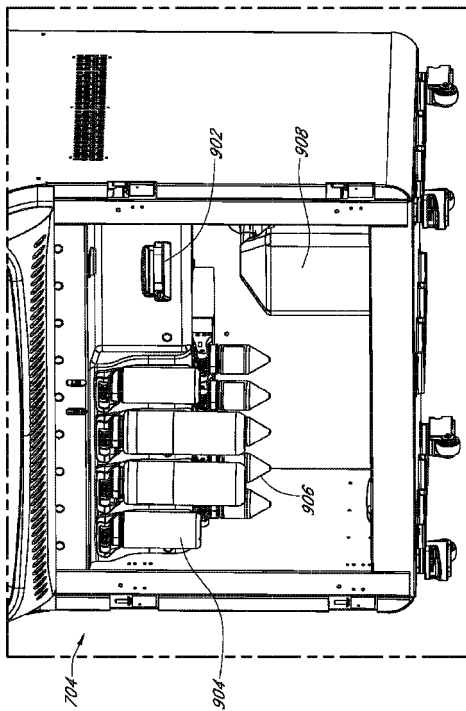


FIG. 9

【図 10】

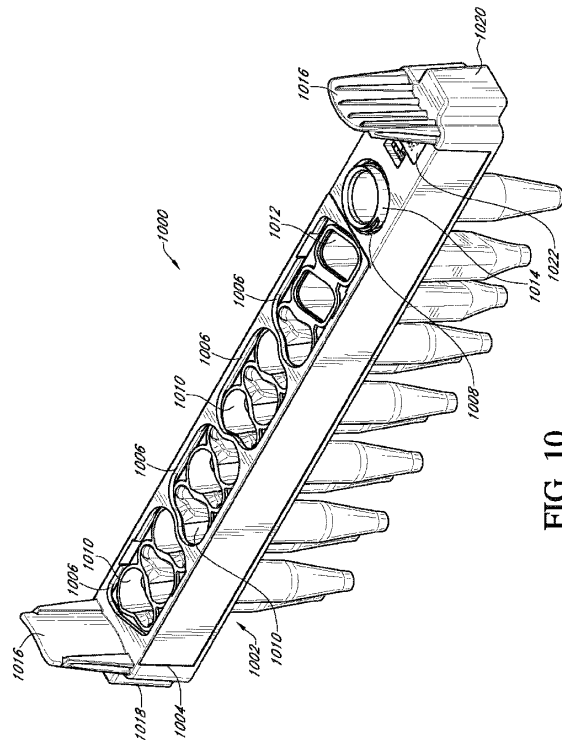


FIG. 10

10

20

30

40

50

【図 1 1】

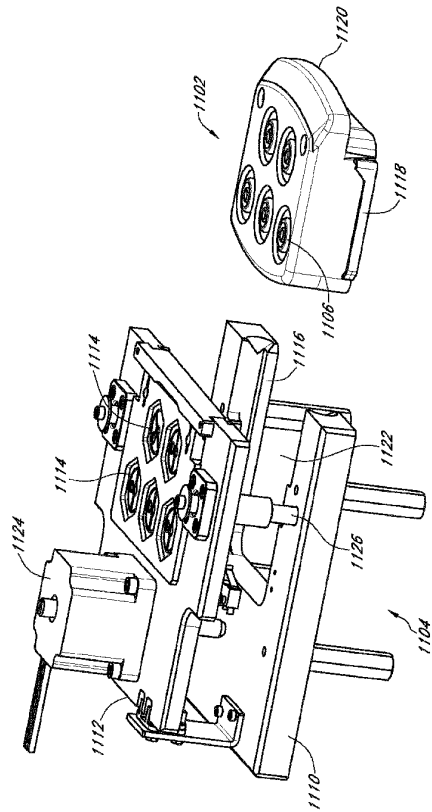


FIG. 11

【図 1 2】

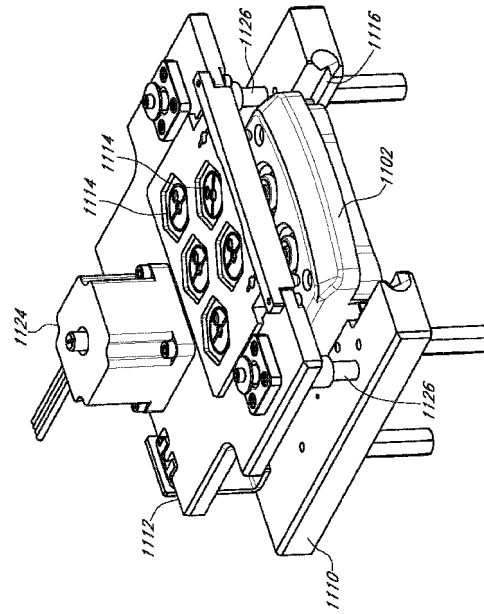


FIG. 12

【図 1 3】

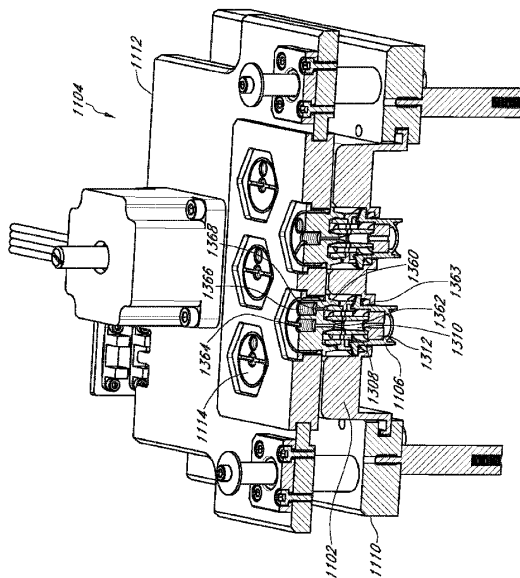


FIG. 13

【図 1 4】

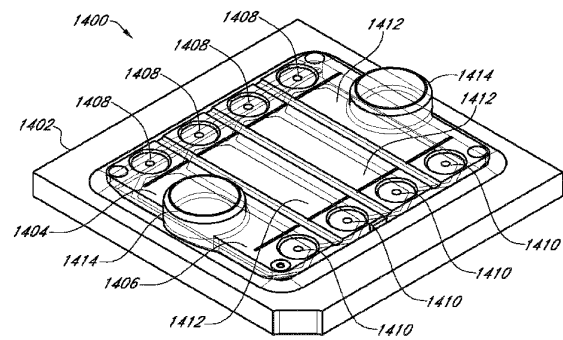


FIG. 14

10

20

30

40

50

【図 15】

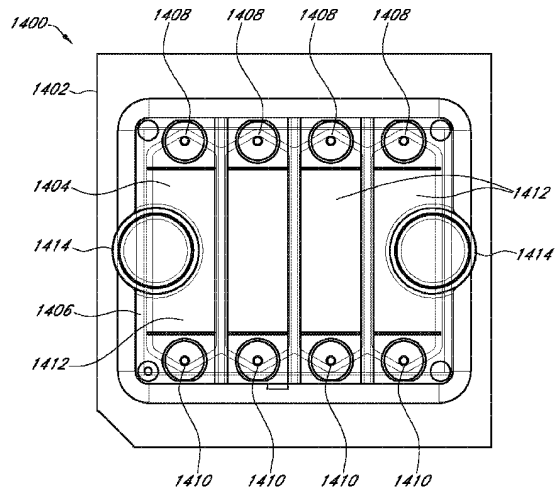


FIG. 15

【図 16】

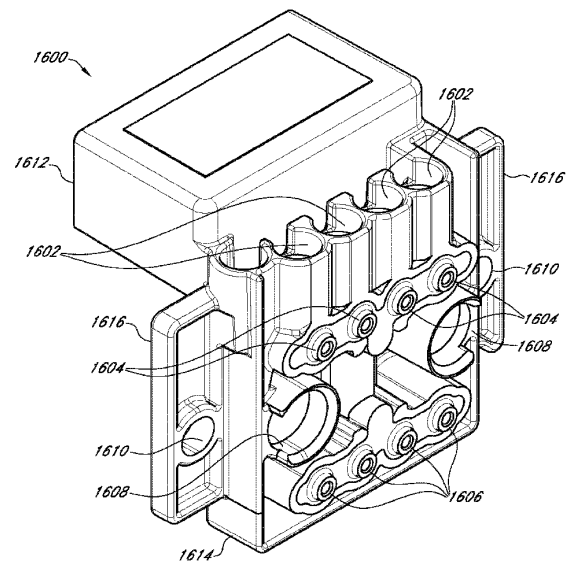


FIG. 16

【図 17】

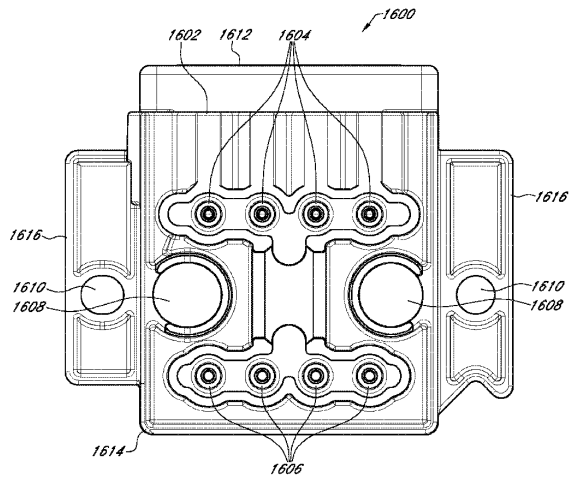


FIG. 17

【図 18】

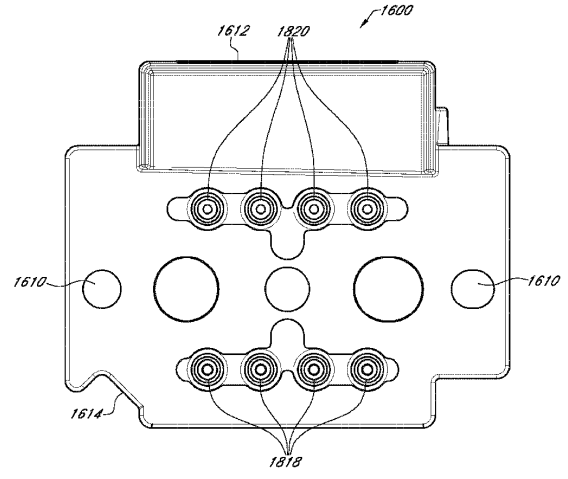


FIG. 18

10

20

30

40

50

【図 19】

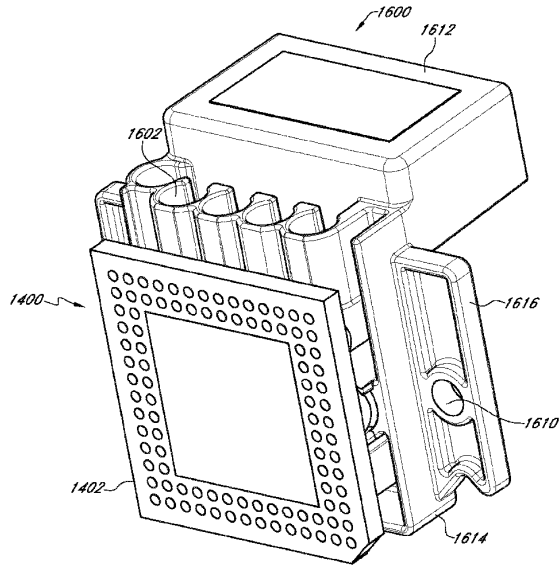


FIG. 19

【図 20】

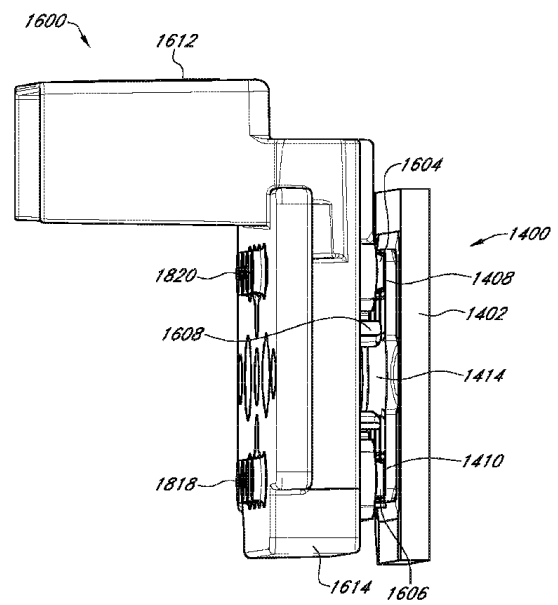


FIG. 20

【図 21】

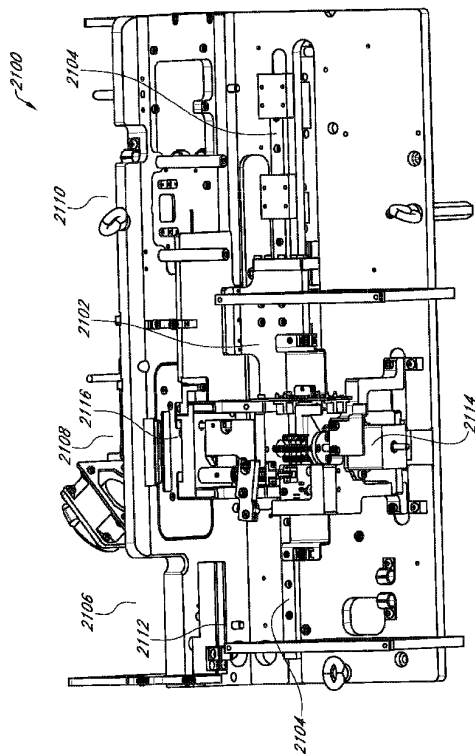


FIG. 21

【図 22】

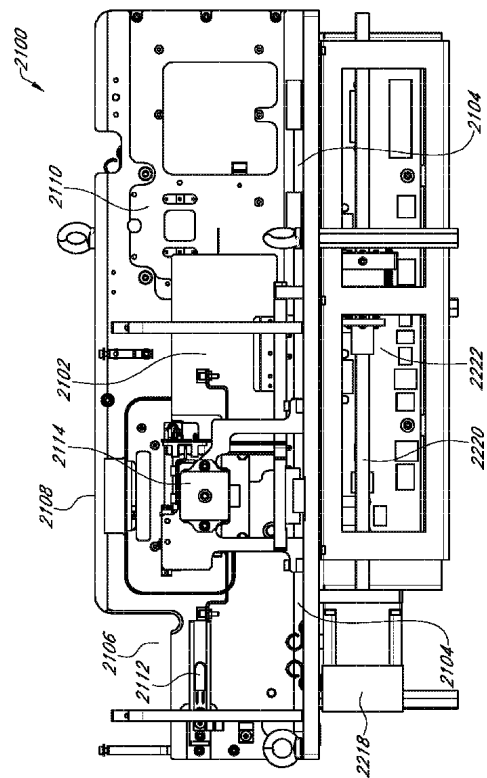


FIG. 22

10

20

30

40

50

【図 23】

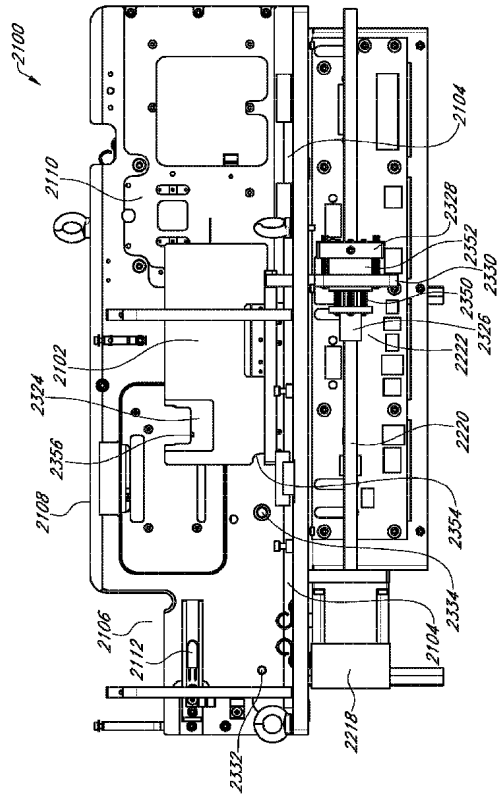


FIG. 23

【図 24】

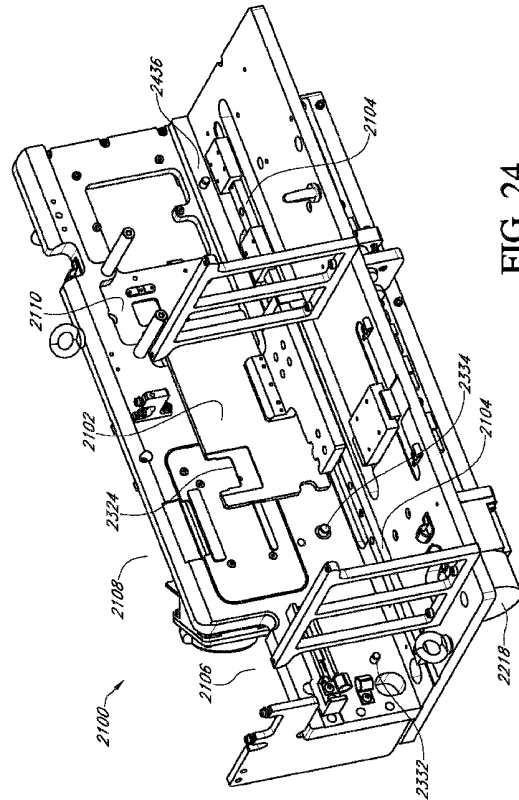


FIG. 24

【図 25】

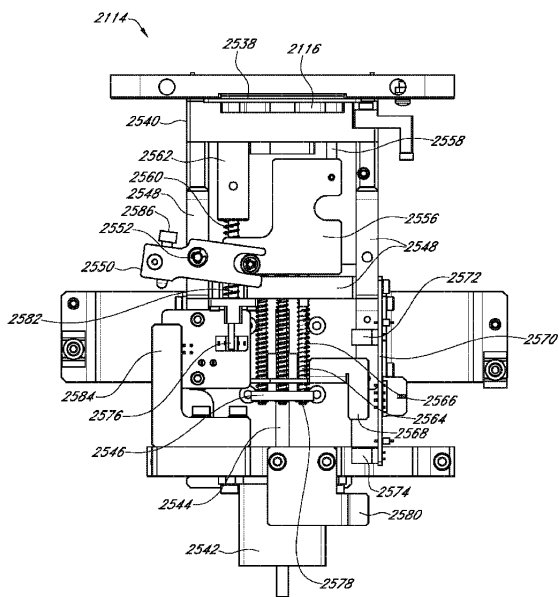


FIG. 25

【図 26】

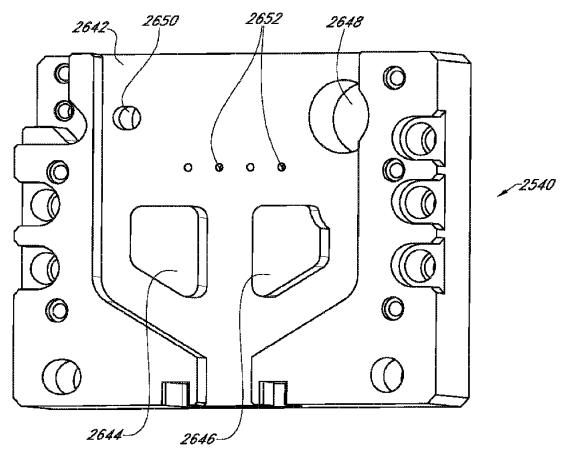


FIG. 26

10

20

30

40

50

【図 27】

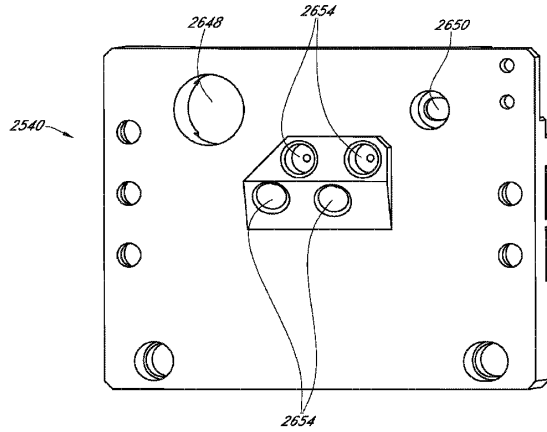
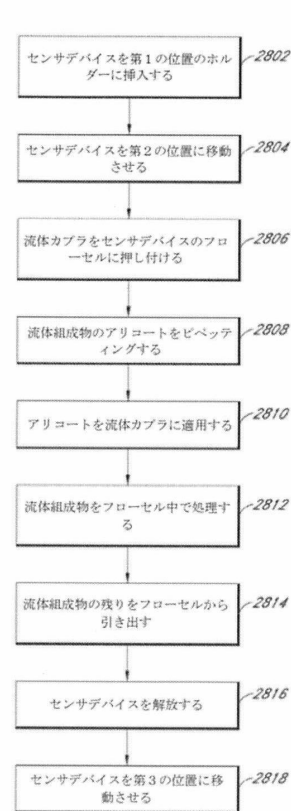
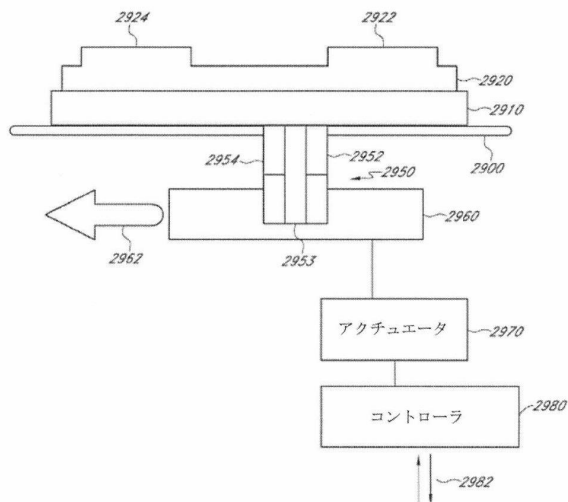


FIG. 27

【図 28】



【図 29】



【図 30】

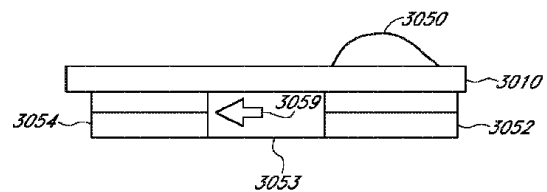


FIG. 30

10

20

30

40

50

【図 3 1】

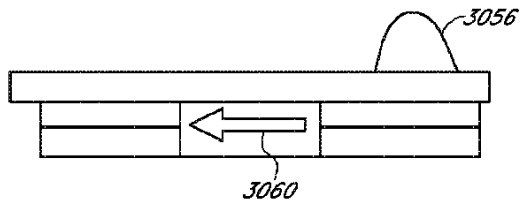


FIG. 31

【図 3 2】

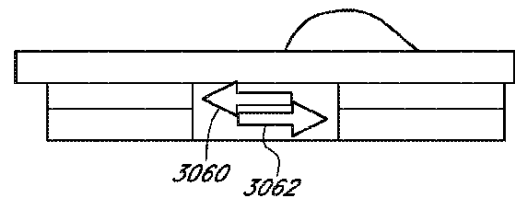


FIG. 32

10

【図 3 3】

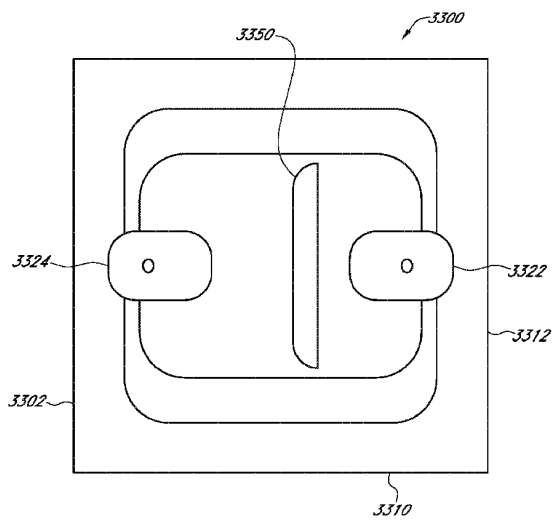


FIG. 33

【図 3 4】

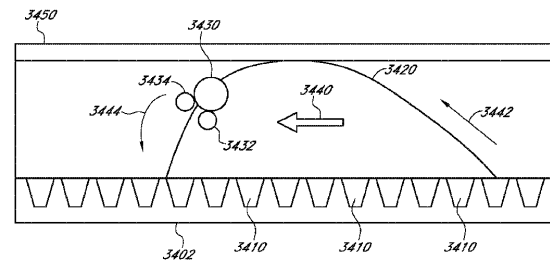


FIG. 34

20

30

40

50

【図 35】

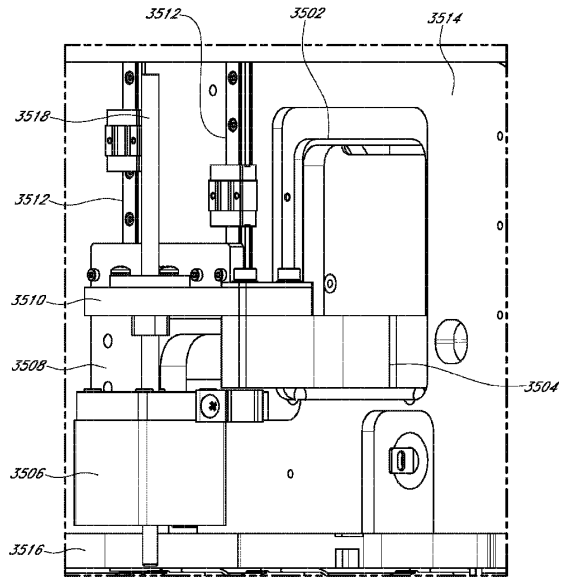


FIG. 35

【図 36】

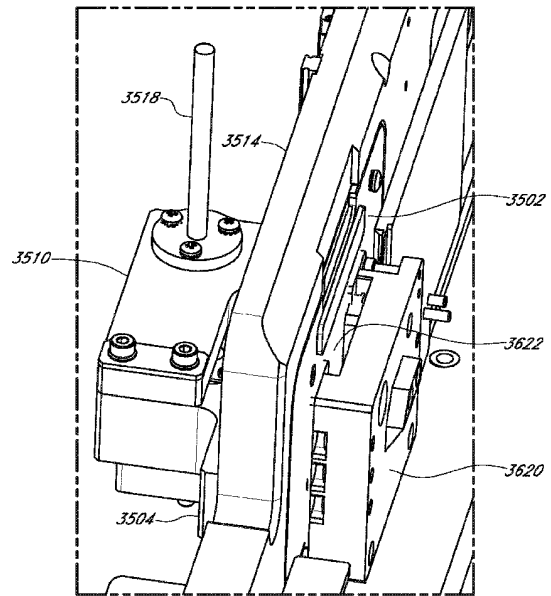


FIG. 36

【図 37】

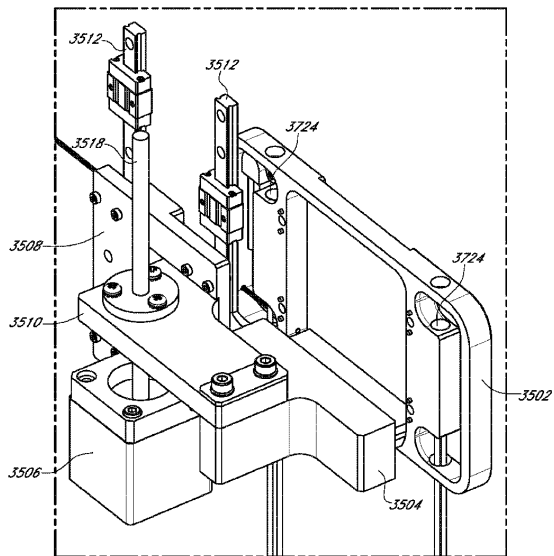


FIG. 37

【図 38】

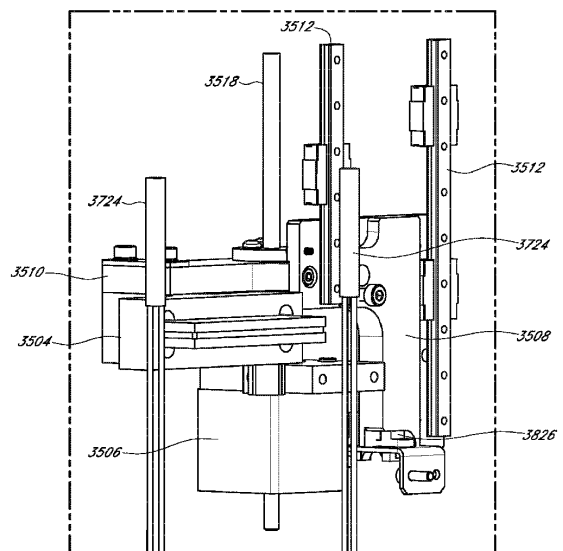


FIG. 38

10

20

30

40

50

【圖 3 9】

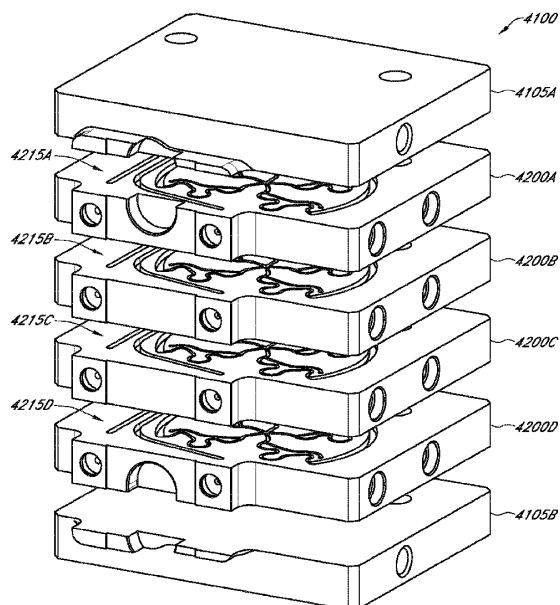


FIG. 39

【図 40】

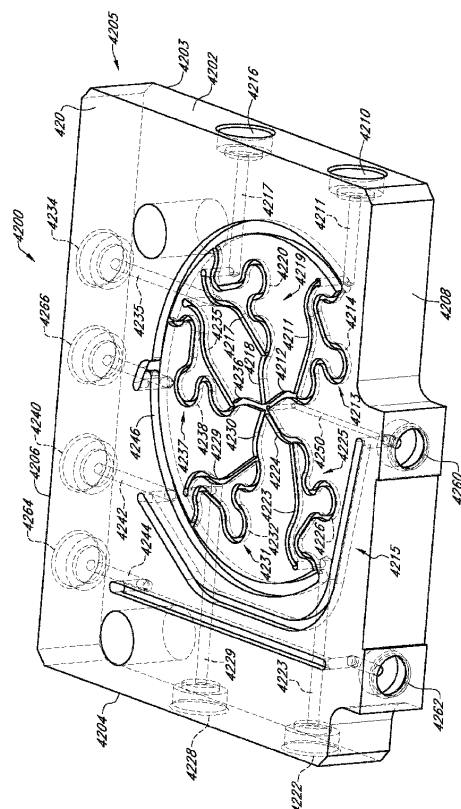
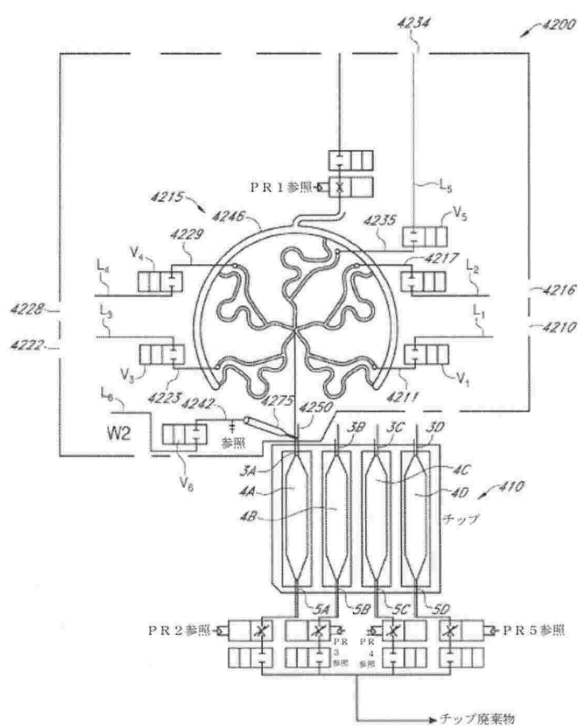


FIG. 40

【図 4 1】



【図 4 2】

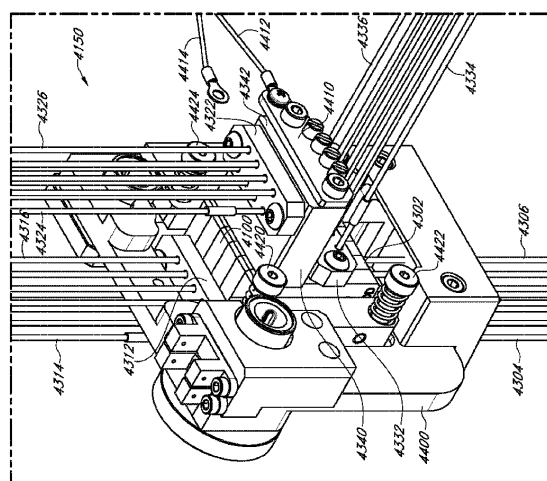


FIG. 42

【図 4 3】

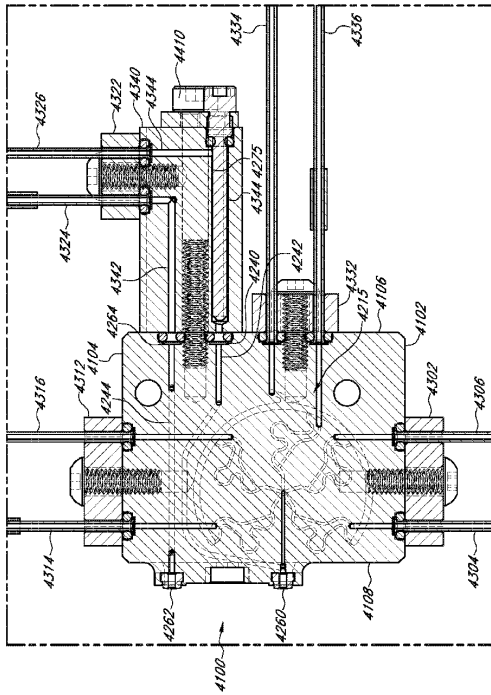


FIG. 43

【図 4 4】

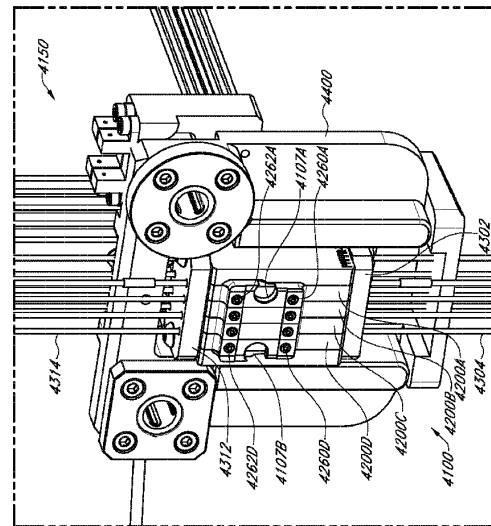


FIG. 44

10

20

【図 45】

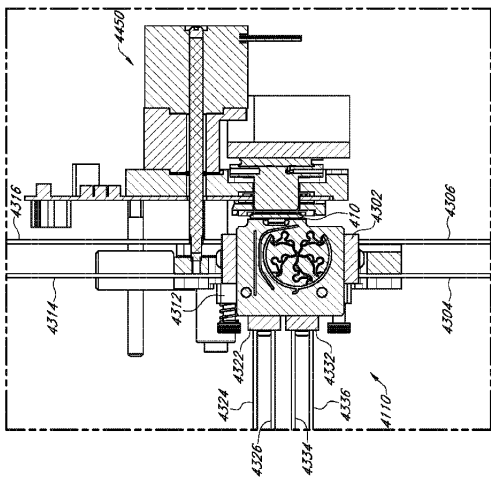


FIG. 45

【図 46】

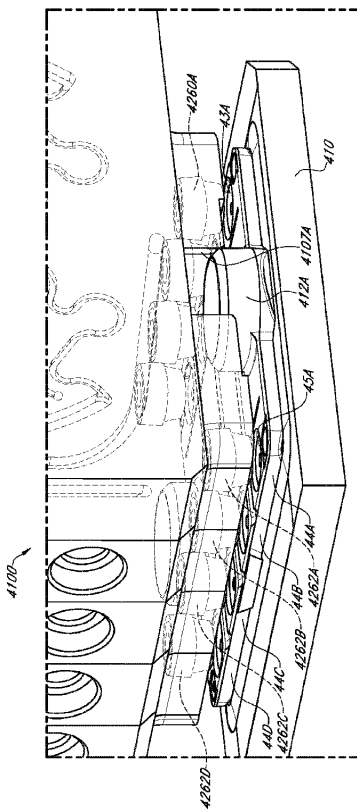


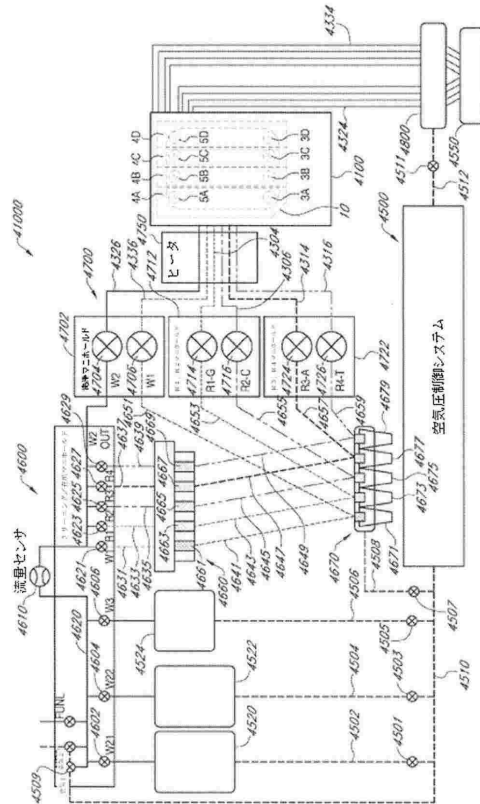
FIG. 46

30

40

50

【図 47】



【図 48】

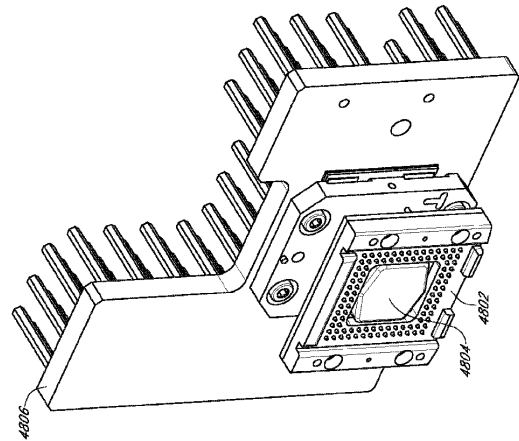
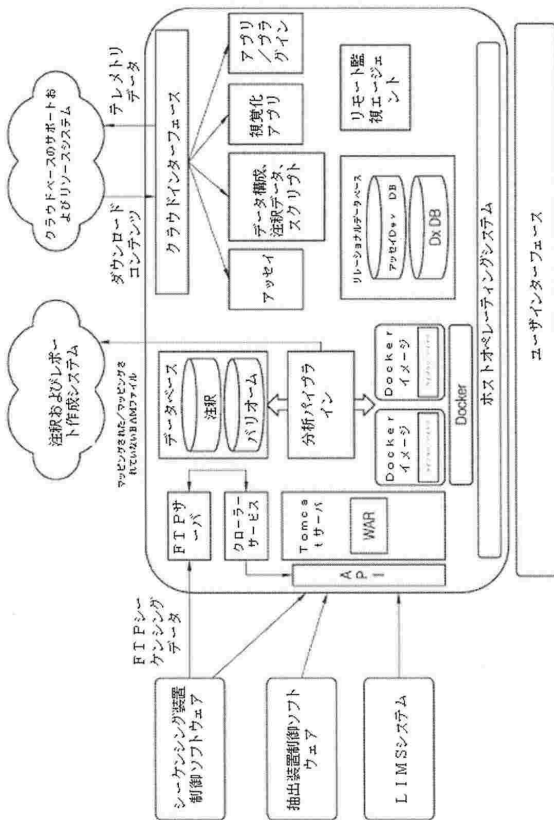
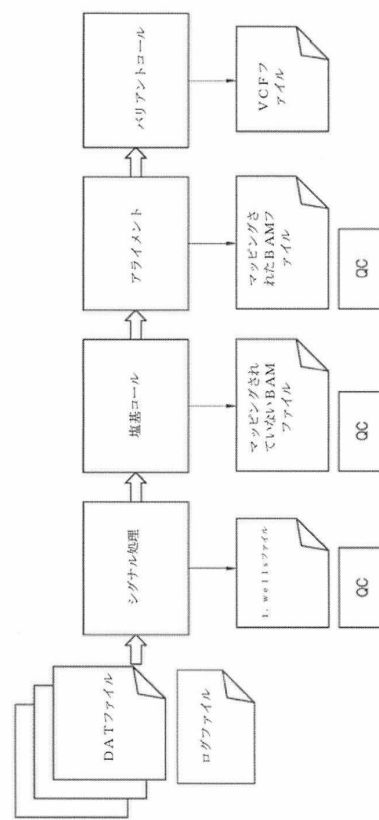


FIG. 48

【図 49】



【図 50】



10

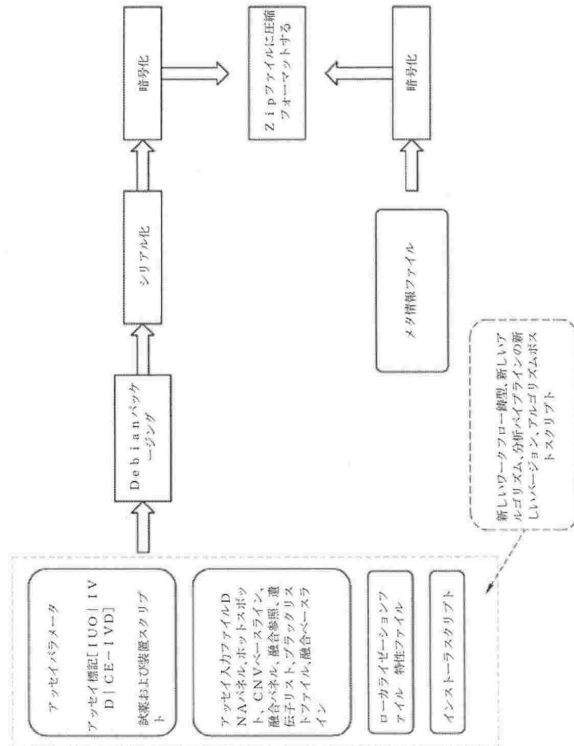
20

30

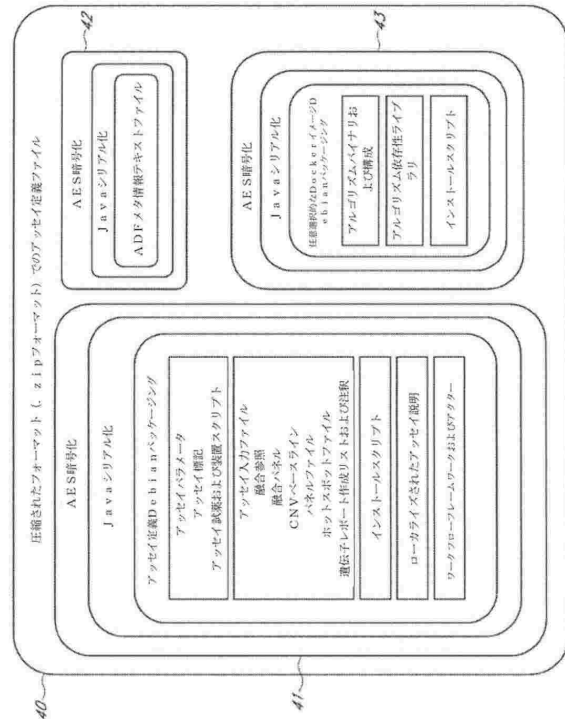
40

50

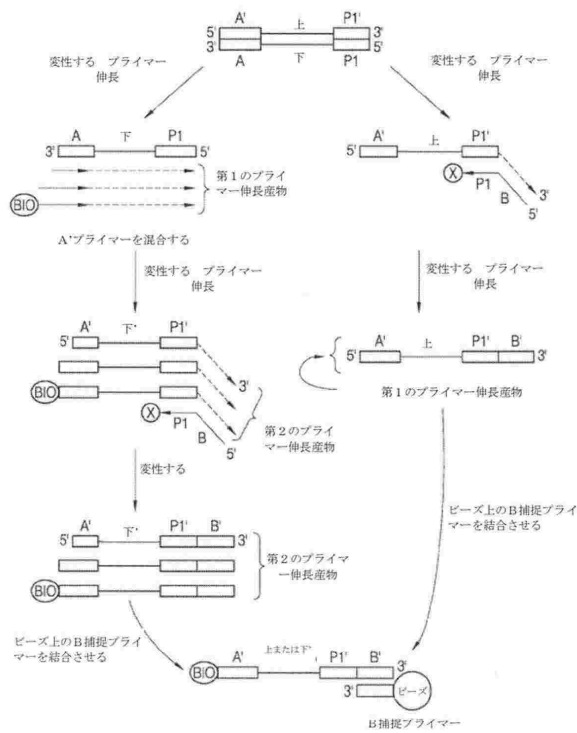
【図 5 1】



【図 5 2】



【圖 5 3】



【図 5 4】

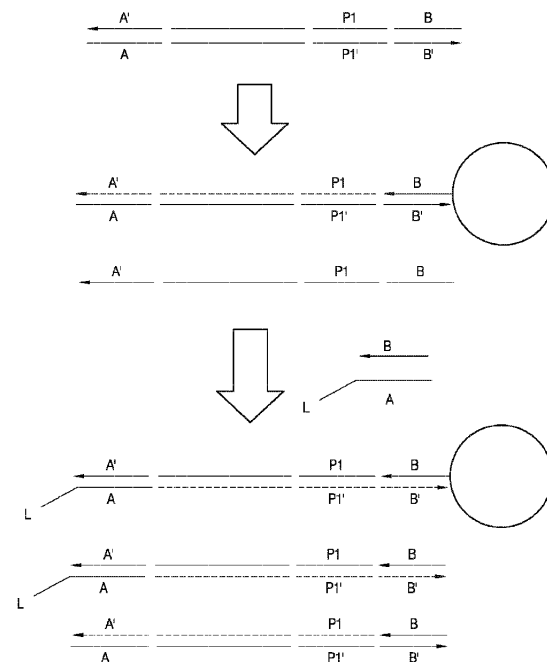


FIG. 54

【図 5 5】

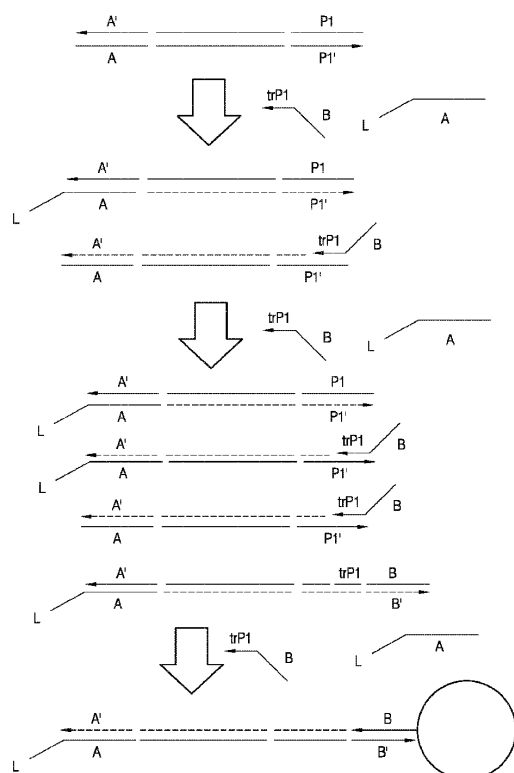


FIG. 55

【圖 5 6】

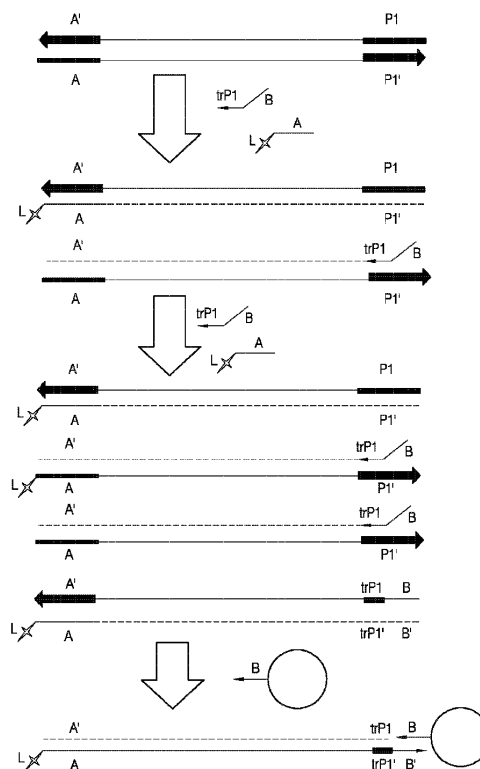
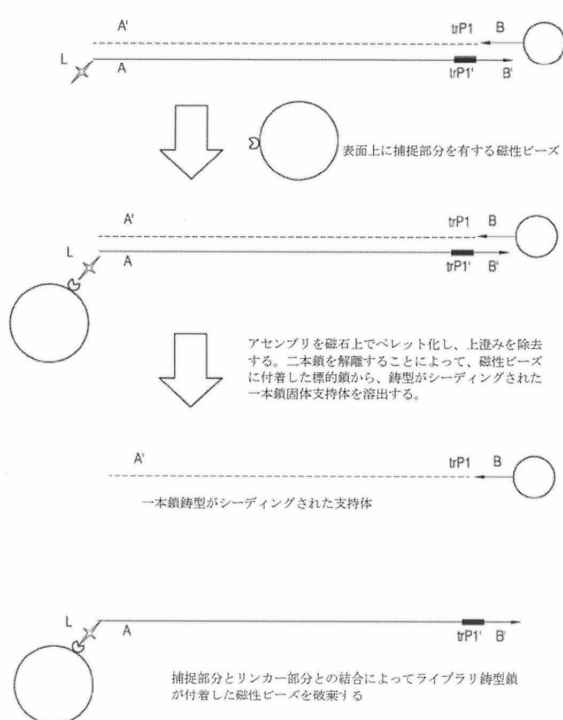
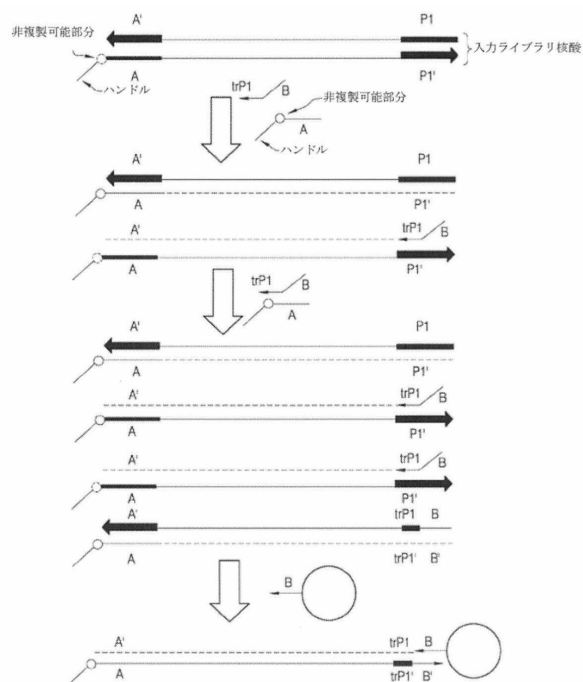


FIG. 56

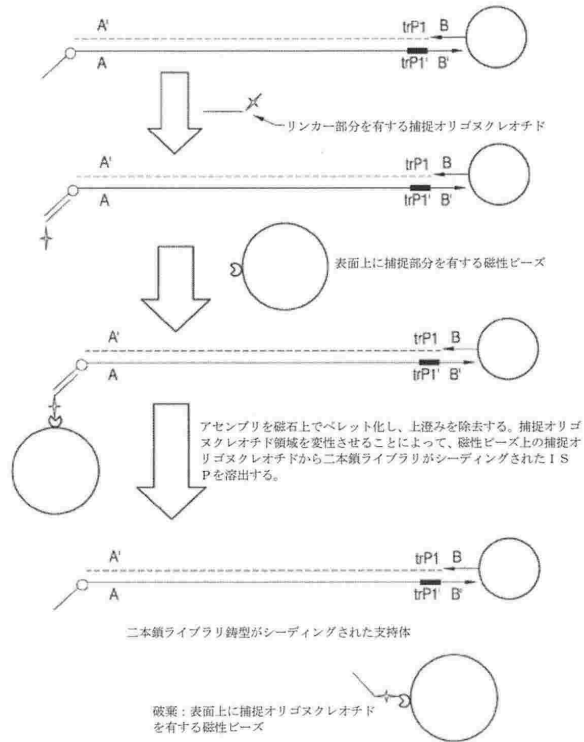
【図 5 7】



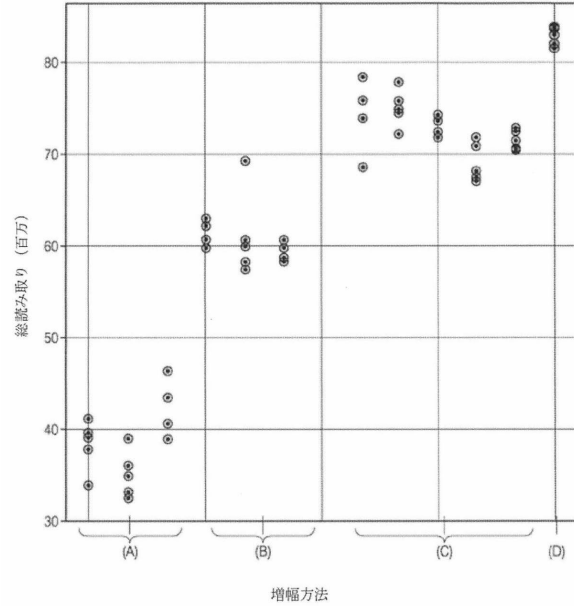
【図 5 8】



【図 59】



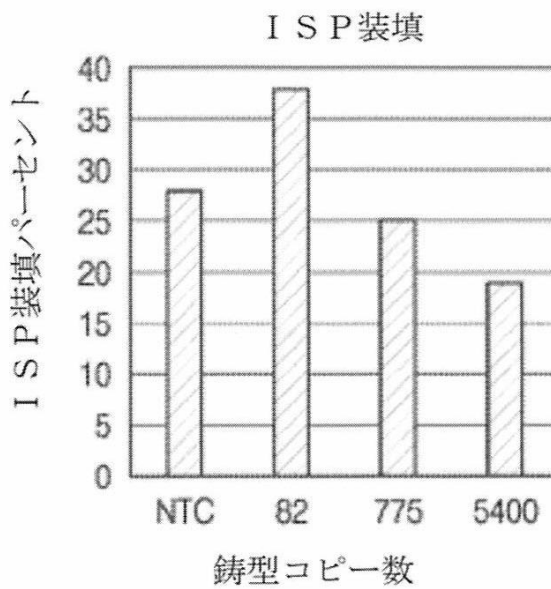
【図 60】



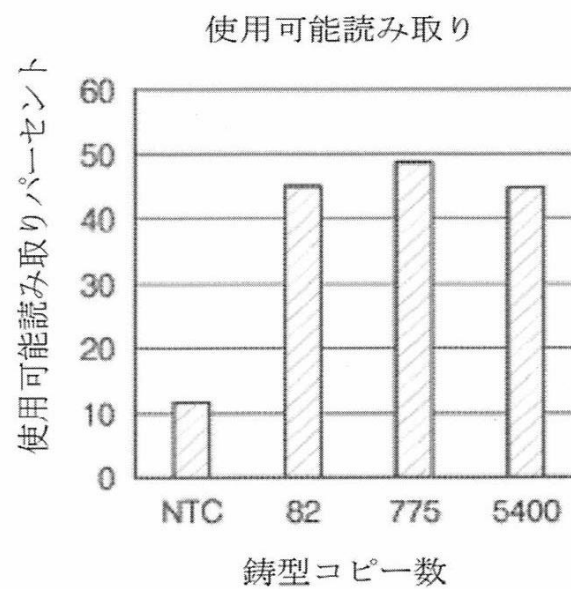
10

20

【図 61 A】



【図 61 B】

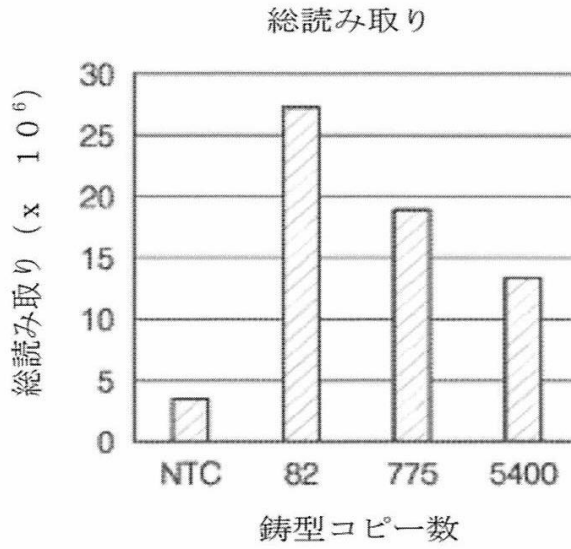


30

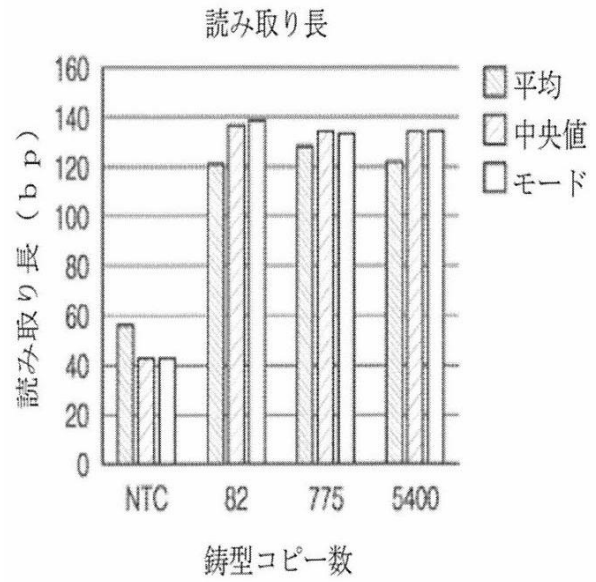
40

50

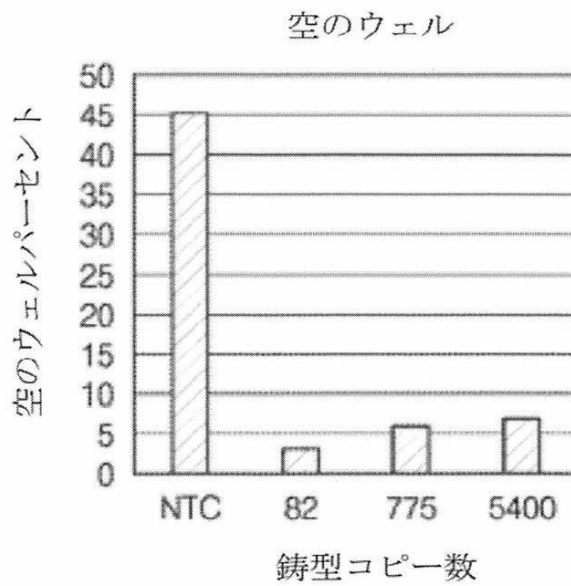
【図 6 1 C】



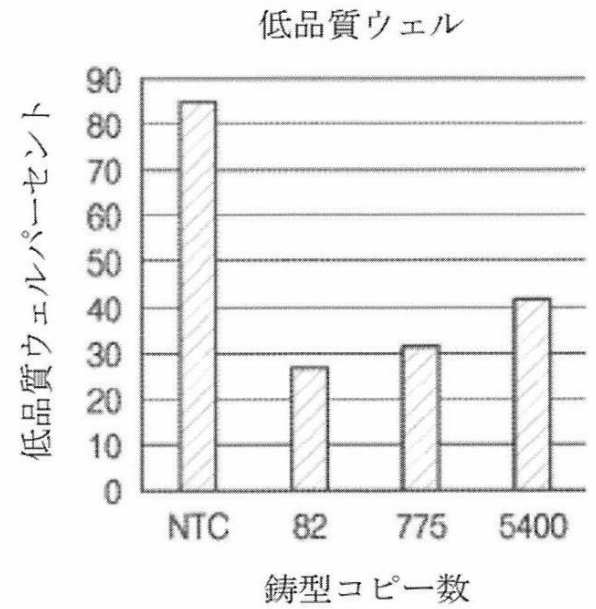
【図 6 1 D】



【図 6 1 E】



【図 6 1 F】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100144451
弁理士 鈴木 博子
- (74)代理人 100123630
弁理士 渡邊 誠
- (72)発明者 リード マーク
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92008 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823
ライフ テクノロジーズ コーポレーション内
- (72)発明者 ウォン チウ タイ アンドリュー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92008 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823
ライフ テクノロジーズ コーポレーション内
- (72)発明者 マラン デヴィッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92008 カールスバッド ニュートン ドライブ 5823
ライフ テクノロジーズ コーポレーション内
- 審査官 斉藤 貴子
- (56)参考文献 国際公開第2019/094524 (WO, A1)
特開2012-231799 (JP, A)
国際公開第2019/152543 (WO, A1)
ZOOK, J. M. et al., Extensive sequencing of seven human genomes to characterize benchmark reference materials, Sci Data, 英国, Nature Research, 2016年06月07日, 3 (160025), P. 1-26
LOKA, T. P. et al., Reliable variant calling during runtime of Illumina sequencing, bioRxiv, 米国, Cold Spring Harbor Laboratory, 2018年08月09日, <https://www.researchgate.net/publication/326949310>
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12M 1/00
C12Q 1/68-1/6897