

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529069

(P2017-529069A)

(43) 公表日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 3
C 4 O B 40/06 (2006. 01)	C 4 O B 40/06	
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 65 頁)

(21) 出願番号	特願2017-508557 (P2017-508557)	(71) 出願人	516269490 オックスフォード ジーン テクノロジー (オペレーションズ) リミテッド OXFORD GENE TECHNOLOGY (OPERATIONS) LTD イギリス オーエックス5 1 ビーエフ, ベグブローク オックスフォードシャー , ウッドストック ロード, ベグブロー ーク ヒル, ベグブローク サイエンス パーク
(86) (22) 出願日	平成27年8月14日 (2015. 8. 14)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(85) 翻訳文提出日	平成29年4月11日 (2017. 4. 11)	(74) 代理人	100118902 弁理士 山本 修
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/052370		
(87) 国際公開番号	W02016/024134		
(87) 国際公開日	平成28年2月18日 (2016. 2. 18)		
(31) 優先権主張番号	1414451.3		
(32) 優先日	平成26年8月14日 (2014. 8. 14)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸濃縮用のハイブリダイゼーションカラム

(57) 【要約】

本発明は、例えば臨床使用のためならびに他の適用のために、遺伝子および変異体を配列決定する目的で、核酸の複雑な混合物から関心対象の核酸分子を迅速に濃縮することに関する。内部チャネルの部分が多孔性固体支持体で完全に充填されている内部チャネルを含む、ハイブリダイゼーションカラムであって、該固体支持体が：(a) 空隙およびチャネルの残りの間を流体が流動することを可能にする、複数の相互連結されたミクロンサイズの空隙、ならびに (b) 空隙を形成する固体支持体の表面に結合された複数のハイブリダイゼーションプローブを含む、前記ハイブリダイゼーションカラムを開示する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

内部チャネルの部分が多孔性固体支持体で充填されている内部チャネルを含む、ハイブリダイゼーションカラムであって、該固体支持体が：

(i) 空隙およびチャネルの残りの間を流体が流動することを可能にする、複数の相互連結されたミクロンサイズの空隙、ならびに

(i i) 空隙を形成する固体支持体の表面に結合された複数のハイブリダイゼーションプローブを含み、

該固体支持体の孔構造が、すべての次元で均一であり、該固体支持体がチャネルの全横断面を充填する

前記ハイブリダイゼーションカラム。

【請求項 2】

空隙が、 $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$ の平均孔サイズを有する、請求項 1 のハイブリダイゼーションカラム。

【請求項 3】

固体支持体に占められるチャネルの部分が、 $0.1 \text{ mm}^3 \sim 100 \text{ mm}^3$ の範囲の体積を有する、請求項 1 または 2 のハイブリダイゼーションカラム。

【請求項 4】

固体支持体内の空隙が、チャネル中の固体支持体によって占められる体積の約 30 ～ 50 % を占める、先行する請求項のいずれか一項のハイブリダイゼーションカラム。

【請求項 5】

チャネルの一端が、多孔性フィルター、フリットまたは透過性膜を含み、チャネルの前記端に吸引を適用するか、またはチャネルの反対端に圧を適用した際、カラム中に固体支持体を保持する、先行する請求項のいずれか一項のハイブリダイゼーションカラム。

【請求項 6】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項記載の 1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラム、温度調節要素および温度センサーを含む微量流体デバイスであって、温度調節要素を用いて、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャネル内の温度を調節することが可能である、前記微量流体デバイス。

【請求項 7】

各リザーバーが、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャネルの一端に連結された、1 またはそれより多いリザーバーをさらに含み、各リザーバーが密封されそして加圧されることも可能である、請求項 6 の微量流体デバイス。

【請求項 8】

チュービングを通じて 1 またはそれより多いリザーバーに連結されている圧縮ガス供給源によって圧を供給する、請求項 7 の微量流体デバイス。

【請求項 9】

1 またはそれより多い密封リザーバーに適用された圧が、固体支持体を通じて、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャネル内に流体を押し込む、請求項 8 の微量流体デバイス。

【請求項 10】

圧縮ガス供給源を 1 またはそれより多いリザーバーにつなぐチュービング内にバルブをさらに含み、ここで 1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャネルを通じて駆動される流体の流速を調節可能なコントローラーによって、バルブが開閉可能である、請求項 8 の微量流体デバイス。

【請求項 11】

ポンプによって圧を供給し、ポンプが、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャネルを通じて駆動される流体の流速を調節するようにプログラム可能である電子コントローラーに連結されている、請求項 7 の微量流体デバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネルの他方の端に付着された 1 またはそれより多い収集チュービングをさらに含む、請求項 7 ～ 1 1 のいずれか一項の微量流体デバイス。

【請求項 1 3】

1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネルの一端が吸引ポンプに連結され、ここで吸引ポンプがコントローラーに連結され、該コントローラーが、吸引が適用された際に、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネルを通じて駆動される流体の流速を調節することが可能である、請求項 8 の微量流体デバイス。

【請求項 1 4】

請求項 6 ～ 1 3 のいずれか一項のデバイスを産生するため、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項のカラムを受け入れるよう適応させた微量流体デバイス。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項のカラムを挿入することによって、請求項 6 ～ 1 3 のいずれか一項の微量流体デバイスを調製する方法。

【請求項 1 6】

核酸の複雑な混合物から核酸分子を濃縮するための方法であって：

(i)

(a) 空隙間を流体が流動することを可能にする、複数の相互連結されたミクロンサイズの空隙、および

(b) 空隙を形成する固体支持体の表面に結合された複数のハイブリダイゼーションプローブ

を含む多孔性固体支持体を提供し、

(i i) 核酸混合物を、固体支持体を通じて駆動し、それによってハイブリダイゼーションプローブの核酸配列に相補的な核酸配列を含む核酸分子がプローブにハイブリダイズすることを可能にし、ハイブリダイゼーションが 1 0 時間未満進行することが可能になり、

(i i i) 固体支持体を洗浄して、プローブにハイブリダイズしていない、いかなる核酸も取り除き、そして

(i v) 固体支持体から、ハイブリダイゼーションプローブに結合した核酸分子を溶出させる

工程を含む、前記方法。

【請求項 1 7】

各相補核酸配列に対する個々のハイブリダイゼーションプローブが、固体支持体表面上にランダムに分布している、請求項 1 6 の方法。

【請求項 1 8】

混合物が、1 ～ 1 0 0 μ l / 分の流速で、固体支持体を通じて駆動される、請求項 1 6 または 1 7 の方法。

【請求項 1 9】

ハイブリダイゼーションが 5 5 ～ 6 5 $^{\circ}$ C の温度で行われる、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項の方法。

【請求項 2 0】

洗浄工程が、ハイブリダイゼーションに用いた温度より 5 ～ 1 0 $^{\circ}$ C 低い温度で行われる、請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 1】

溶出が、約 9 0 ～ 1 0 0 $^{\circ}$ C の温度まで固体支持体を加熱することによって達成される、請求項 1 4 ～ 1 8 のいずれか一項の方法。

【請求項 2 2】

ハイブリダイゼーションプローブが同じ長さの 5 0 ～ 2 5 0 量体オリゴヌクレオチドであり、そして / または混合物中の核酸分子が 1 0 0 ～ 3 5 0 の長さを有する、請求項 1 6

10

20

30

40

50

～ 2 1 のいずれか一項の方法。

【請求項 2 3】

より大きい核酸分子を得て、これを核酸断片に断片化し、そして断片をアダプター分子に連結することによって混合物を調製する、請求項 1 6 ～ 2 2 のいずれか一項の方法。

【請求項 2 4】

ハイスループット配列決定のための核酸分子混合物を含む試料を調製する方法であって：

(i) 核酸分子およびハイブリダイゼーションプローブの相補核酸配列が結合することを可能にする条件下で、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションプローブを含む固体支持体と、試料を接触させ；

(i i) 未結合核酸分子を取り除き；

(i i i) 結合した核酸分子をアダプター分子と接触させ；

(i v) 結合した核酸分子をアダプター分子に連結させて、アダプター末端を有する核酸分子を得て；そして

(v) アダプター末端を有する核酸分子を固体支持体から放出させる；

工程を含む、前記方法。

【請求項 2 5】

ハイスループット配列決定のための核酸分子混合物を含む試料を調製する方法であって：

(i) 核酸分子およびハイブリダイゼーションプローブの相補核酸配列が結合することを可能にする条件下で、1 またはそれより多いハイブリダイゼーションプローブを含む固体支持体と、試料を接触させ；

(i i) 未結合核酸分子を取り除き；

(i i i) 結合した核酸分子を固体支持体から放出させ；

(i v) 放出された核酸分子をアダプター分子と接触させ；そして

(v) 核酸分子をアダプター分子に連結させて、アダプター末端を有する核酸分子を得る；

工程を含む、前記方法。

【請求項 2 6】

アダプター分子が二重鎖 DNA を含有する、請求項 2 4 または 2 5 の方法。

【請求項 2 7】

アダプター分子がヘアピンを含有する、請求項 2 4 または 2 5 の方法。

【請求項 2 8】

核酸分子が DNA または RNA である、先行する請求項のいずれか一項のデバイスまたは方法。

【請求項 2 9】

固体支持体が複数のマイクロビーズで構成される、先行する請求項のいずれか一項のデバイスまたは方法。

【請求項 3 0】

内部チャネル (2) および多孔性フリット (3) を含むカラム (1) であって、前記内部チャネル (2) が段階的にテーパリングされ、カラム (1) をトップセクション (4) 、ネックセクション (5) およびボトムセクション (6) に分割し、ここでフリット (3) はカラム (1) のボトムセクション (6) に位置し、そして内部チャネル (2) の全横断面をふさぎ、内部チャネル (2) は、ネックセクション (5) において、カラム (1) のトップセクション (4) の内部チャネル (2) 直径の約 3 0 % ～ 約 5 0 % まで細くなり、そして内部チャネル (2) は、ボトムセクション (6) において、カラム (1) のトップセクション (4) の内部チャネル (2) 直径の約 2 0 % ～ 約 3 0 % まで細くなる、前記カラム。

【請求項 3 1】

ボトムセクション (6) が約 1 0 μ l ～ 約 3 0 μ l の体積を有する、請求項 3 0 のカラ

10

20

30

40

50

ム。

【請求項 3 2】

トップセクション (4) がカラム (1) の全長の約 60～75%を構成し、ネックセクション (5) がカラム (1) の全長の約 5～10%を構成し、そしてボトムセクション (6) がカラム (1) の全長の約 20～30%を構成する、請求項 30 または 31 のカラム。

【請求項 3 3】

請求項 1～5 のいずれか一項のハイブリダイゼーションカラムを調製する方法であって：

(i) 内部チャネルを含むカラムを提供し、そして

10

(i i) ほぼ同じ直径を有し、そしてその表面に複数のハイブリダイゼーションプローブが連結されている、複数のマイクロビーズでチャネルの全横断面を充填し、ここでマイクロビーズが多孔性固体支持体を形成する；

工程を含む、前記方法。

【請求項 3 4】

直径が 0.5～500 μm である、請求項 33 の方法。

【請求項 3 5】

(i) 内部チャネルを含む 1 またはそれより多いカラム、および (i) ほぼ同じ直径を有し、そしてその表面に複数のハイブリダイゼーションプローブが連結されている、複数のマイクロビーズを含む容器を含む、請求項 1～5 のいずれか一項のハイブリダイゼーションカラムを調製するためのキット。

20

【請求項 3 6】

カラムが請求項 30～32 のいずれか一項記載のカラムである、請求項 33 または 34 の方法あるいは請求項 35 のキット。

【請求項 3 7】

1 セットより多いハイブリダイゼーションプローブを含むマイクロビーズであって、同じセット中の各ハイブリダイゼーションプローブが、生物ゲノムの同じ領域に結合し、そして各セットがゲノム中の異なる領域に結合する、前記マイクロビーズ。

【請求項 3 8】

異なる領域が、ゲノム内の異なるコードまたは非コード領域である、請求項 37 のマイクロビーズ。

30

【請求項 3 9】

異なる領域の少なくとも 1 つが、異なる染色体上に位置する、請求項 37 のマイクロビーズ。

【請求項 4 0】

異なる領域が同じ遺伝子内に位置する、請求項 37 のマイクロビーズ。

【請求項 4 1】

異なる領域が互いに重複している、請求項 37 のマイクロビーズ。

【請求項 4 2】

異なる領域が前記ゲノムのコード領域内に位置し、前記コード領域が疾患または障害と関連する、請求項 37～41 のいずれか一項のマイクロビーズ。

40

【請求項 4 3】

疾患または障害が、新生物性疾患、神経学的疾患、自己免疫疾患、代謝疾患、遺伝子疾患または体質性障害より選択される、請求項 42 のマイクロビーズ。

【請求項 4 4】

異なる領域が 1 またはそれより多い出生前疾患または障害に関連する、請求項 37～41 のいずれか一項のマイクロビーズ。

【請求項 4 5】

請求項 37～44 のいずれか一項記載の複数のマイクロビーズを含むライブラリー。

【請求項 4 6】

50

1 セットより多いハイブリダイゼーションプローブを含むマイクロビーズであって、同じセット中の各ハイブリダイゼーションプローブが、ゲノムの同じ領域に結合し、そして各ハイブリダイゼーションプローブの相補性領域が、同じセット内の少なくとも1つの他のハイブリダイゼーションプローブと重複し、そして各セットがゲノムの異なる領域に相当する、前記マイクロビーズ。

【請求項47】

少なくとも5、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20の異なるセットのハイブリダイゼーションプローブを含む、請求項46のマイクロビーズ。

【請求項48】

重複が2xの最小タイリング深度を提供する、請求項46または47のマイクロビーズ 10

【請求項49】

第一のマイクロビーズおよび第二のマイクロビーズを含むライブラリーであって、前記の第一のマイクロビーズが、生物ゲノム中の第一の相補性領域に結合する複数のハイブリダイゼーションプローブに連結され、そして前記の第二のマイクロビーズがゲノム中の第二の相補性領域に結合し、前記の第一の領域および前記の第二の領域が、前記ゲノムの異なる領域に位置する、前記ライブラリー。

【請求項50】

前記の第一の領域および前記の第二の領域が、ゲノムの異なるコードまたは非コード領域である、請求項49のライブラリー。 20

【請求項51】

第一の領域および第二の領域が異なる染色体上に位置する、請求項49のライブラリー。

【請求項52】

第一の相補性領域に結合するハイブリダイゼーションプローブおよび第二の相補性領域に結合するハイブリダイゼーションプローブが、すべて、同じ配列を有する、請求項49～51のいずれか一項のライブラリー。

【請求項53】

第一の相補性領域に結合するハイブリダイゼーションプローブおよび第二の相補性領域に結合するハイブリダイゼーションプローブが、すべて、異なる配列を有する、請求項49～51のいずれか一項のライブラリー。 30

【請求項54】

前記ゲノムの10の異なる領域に結合する少なくとも10の異なるマイクロビーズを含む、請求項49～51のいずれか一項のライブラリー。

【請求項55】

第一のマイクロビーズおよび第二のマイクロビーズを含むライブラリーであって、前記の第一のマイクロビーズが、生物ゲノム中の第一の癌遺伝子に結合する複数のハイブリダイゼーションプローブに連結され、そして前記の第二のマイクロビーズが、ゲノム中の第二の癌遺伝子に結合する複数のハイブリダイゼーションプローブに連結される、前記ライブラリー。 40

【請求項56】

100を超えるマイクロビーズを含むライブラリーであって、各マイクロビーズが生物ゲノム中の異なる領域に結合するハイブリダイゼーションプローブを含む、前記ライブラリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば臨床使用のためならびに他の適用のために、遺伝子および変異体を配列決定する目的で、核酸の複雑な混合物から関心対象の核酸分子を迅速に濃縮することに 50

関する。

【背景技術】

【0002】

ゲノム技術をルーチンのヘルスケアに組み入れて、診断を改善し、そして階層化医療（個別医療または精密医療としても知られる）を推進することが強く求められている。いかなるターゲット配列決定アッセイでも、最初の工程は、全ゲノムDNAまたはRNAの混合物から、関心対象の配列を濃縮することである。診断で最優先されるのは、データの品質、ならびにアッセイのロバストネスおよびスピードである。現在の濃縮アッセイは、緩慢であるかまたは変異体を見逃すため、臨床目的には適合しない。

【0003】

商業的に入手可能なアンプリコン（PCR）に基づく濃縮法は、バイアスが掛かる傾向があり、変異体を検出する際に信頼性が低い可能性があり、そしてアッセイ可能な領域の総数が限られている。ベイトライブラリーを用いたハイブリダイゼーションに基づく濃縮法は、より優れた品質のデータおよびより高い柔軟性を提供するが、時間が掛かり；ゲノムDNA試料中の特定の遺伝子を配列決定するため、関心対象の遺伝子を含有する領域に対応する断片を抽出するかまたは濃縮しなければならない。典型的には、ハイブリダイゼーションに基づく濃縮法において、ビオチン化ハイブリダイゼーションプローブセット（ベイトライブラリー）を、溶液中で、ゲノムDNA試料とハイブリダイズさせる。続いて、ストレプトアビジン-コンジュゲート化マイクロビーズを用いて、ベイトターゲット二重鎖を溶液から捕捉する一方、非ターゲットDNAを捕捉せず、そして洗い流す。次いで、ターゲットDNAをPCRによって増幅し、そして配列決定する。DNA試料調製から配列決定までの全ワークフローは、アンプリコンに基づく方法が数時間であるのに比較して、典型的には完了までに何日も掛かる。

【0004】

ベイトライブラリーを使用するハイブリダイゼーションに基づく濃縮法において、最も長い期間を要する工程は、実際のハイブリダイゼーション工程である。水におけるDNAの拡散定数は非常に低い。例えば、水中での80bp断片の拡散長は、1日で1.9mmである。プローブアレイ上のターゲット溶液の高さが数百ミクロンであるマイクロアレイ実験において、ハイブリダイゼーション反応が起こるために十分な数のターゲット分子がプローブに十分に近く拡散することを可能にするために、典型的には一晚インキュベーションが必要である。

【0005】

本発明の目的は、アンプリコンに基づく方法と速さに関して競合可能でありつつ、これらの方法に関連する信頼性の低さの問題を回避するプロセスを提供することである。特に、本発明は、1日未満で、配列決定のための核酸試料のハイブリダイゼーションに基づく濃縮を可能にするための方法を提供することを目的とする。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、核酸試料から特定の配列を迅速に濃縮するためのハイブリダイゼーションに基づく方法を提供することによって、当該技術分野における前述の欠点に取り組む。本発明は、微量流体力工学（microfluidics）および表面ハイブリダイゼーションを利用して、核酸混合物からの核酸分子の選択的捕捉および核酸分子プロセッシングを加速する。本発明のプロセスを用いると、ゲノムDNA由来の一団のDNA配列を非常に濃縮することが可能であり、生じたDNAを迅速に、安価に、そして均一な被覆で配列決定することが可能になる。

【0007】

先行技術において、ハイブリダイゼーションプローブを覆う液体層の高さを減少させることによって、ハイブリダイゼーション速度が加速し、そしてマイクロアレイ実験が数日ではなく、数分で完了することも可能であることが知られる（参考文献1、2、3を参照されたい）。拡散する長さを減少させることで、ターゲット分子がハイブリダイゼーショ

10

20

30

40

50

ンプローブとハイブリダイズする機会がより増える。チャンネルが充填ベッド中のマイクロビーズ間の空隙として存在する場合、狭い微量流体チャンネルもまた、蛍光オリゴヌクレオチドの検出を加速させるために利用されてきている（参考文献4を参照されたい）。この場合、プローブはマイクロビーズにコンジュゲート化され、そしてターゲット溶液をこの間に通過させ、数分の桁のハイブリダイゼーション時間を可能にする。

【0008】

現在まで、続く配列決定のため、試料からの特定のDNA断片の固相捕捉を加速するためのミクロン規模の微量流体チャンネルは開発されてきていない。参考文献4において、制約された拡散長を用いて、特定の配列の検出が加速されているが、他の目的、例えば配列決定のための濃縮は加速されない。配列決定前に、DNA試料を濃縮するため、マイクロアレイが使用されている（参考文献5、6および7を参照されたい）が、ハイブリダイゼーションを駆動するミクロン規模の多数の空隙を持つ固相は用いられず、そしてしたがって一晩ハイブリダイゼーションが必要であった。

【0009】

参考文献8は、ガラスマイクロファイバーフィルターにカップリングされたハイブリダイゼーションプローブを使用して、関心対象のエクソン性配列に関して断片化ゲノムDNAを濃縮するマイクロスピナラムを提供することによって、先行技術の方法の欠点に取り組むことを試みた。しかし、高い配列濃縮効率、濃縮能および高い特異性の利点が示唆されるにもかかわらず、参考文献8は、数時間ではなく数分の桁でのハイブリダイゼーション時間を必要とする、ハイブリダイゼーションに基づく濃縮法を提供するには至らない。

【0010】

本発明者らは、断片化ゲノムDNA試料の迅速な濃縮が、表面にオリゴヌクレオチドプローブ混合物がカップリングされたマイクロビーズの充填ベッドを通じて試料を駆動することによって、達成可能であることを発見した。マイクロビーズの広い表面積およびこれらの間の狭いミクロン規模の空隙によって、DNA断片が流動する間、プローブと緊密に接触したままであることが確実にあり、迅速なハイブリダイゼーションが可能になる。非ターゲットDNAは、プローブと弱くしか相互作用せず、そしてハイブリダイゼーション緩衝液、そして続いて、ストリンジェントな洗浄緩衝液の連続流によってマイクロビーズ・ベッドからフラッシュされる。洗浄後、温度を上昇させるか、または他の方法によって物理化学環境を修飾することによって、ターゲットDNAをマイクロビーズから放出させる。この溶出したDNAは、ゲノムの残りに比較して、ターゲット領域に関して濃縮されている。本発明者らは、このアプローチを用いて、ゲノムDNA試料中のターゲット分子を濃縮するために必要な時間を2時間未満に減少させることが可能であることを見出した。

【0011】

本発明は、内部チャンネルの部分が多孔性固体支持体で充填されている内部チャンネルを含む、ハイブリダイゼーションカラムに関する。典型的には、チャンネルの一端は、多孔性フィルター、フリットまたは透過性膜を含み、チャンネルの前記端に吸引を適用するか、またはチャンネルの反対端に圧を適用した際、固体支持体をカラム中に保持する。固体支持体は、チャンネルの全横断面を充填する。固体支持体は、(a)空隙およびチャンネルの残りの間を流体が流動することを可能にする、複数の相互連結されたミクロンサイズの空隙、ならびに(b)空隙を形成する固体支持体の表面に結合された複数のハイブリダイゼーションプローブを含む。好ましくは、固体支持体の孔構造は、すべての次元で均一である。固体支持体内の空隙は、典型的には、0.1~100 μmの平均孔サイズを有する。

【0012】

固体支持体は、0.1 mm³~100 mm³の範囲の体積を有することも可能である。いくつかの態様において、チャンネルのかなりの部分は、固体支持体によって占められる。例えばチャンネルの≥10%、好ましくは≥30%、より好ましくは≥60%が固体支持体によって占められることも可能である。固体支持体内の空隙は、チャンネル中の固体支持体

によって占められる体積の約30～50%を占めることも可能である。

【0013】

ハイブリダイゼーションカラムを用いて、核酸混合物から関心対象の核酸分子を濃縮することも可能である。関心対象の核酸分子は、ハイブリダイゼーションプローブに特異的に結合する一方、流体中の残りの核酸は、カラム使用中にチャンネルを流れる流体の流動によって洗い流される。

【0014】

本発明はまた、1またはそれより多いこれらのハイブリダイゼーションカラム、温度調節要素および温度センサーを含む微量流体デバイスにも関し、ここで温度調節要素を用いて、1またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネル内の温度を調節することが可能である。

10

【0015】

微量流体デバイスはまた、各リザーバーが、1またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネルの一端に連結された、1またはそれより多いリザーバーを含むことも可能である。例えば圧縮ガス供給源をチュービングを通じてリザーバーに連結して、供給することによって、リザーバーを密封しそしてこれに加圧することも可能である。デバイス操作中に密封リザーバーに圧を適用した際、リザーバーに適用されていた流体は、ハイブリダイゼーションカラムのチャンネル内に押し込まれ、そしてハイブリダイゼーションカラム内に位置する固体支持体を通じて流れる。好適には、微量流体デバイスはまた、圧縮ガス供給源をリザーバーにつなぐチュービング内にバルブも含む。例えばプログラム可能な電子コントローラーによって、バルブを開閉することによって、チャンネルを通じて駆動する流体の流速を調整することも可能である。

20

【0016】

あるいは、1またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネルの一端を、吸引ポンプに連結し、ここで吸引ポンプをコントローラーに連結し、該コントローラーは、吸引が適用された際に、1またはそれより多いハイブリダイゼーションカラムのチャンネルを通じて駆動される流体の流速を調節することが可能である。例えば、デバイスには、ハイブリダイゼーションカラムのチャンネルを通じて、流速を調節するようにプログラム可能な、電子コントローラーが含まれることも可能である。

【0017】

典型的には、微量流体デバイスにはまた、チャンネルの他方の端、すなわち使用中の固体支持体の下流に、収集チュービングが含まれる。収集チュービングは、固体支持体を通してきたいかなる流体も収集する収集容器に取り付けられていてもよい。

30

【0018】

本発明はまた、上述のハイブリダイゼーションカラムを調製する方法も指す。該方法は、内部チャンネルを含むカラムを提供し、そしてほぼ同じ直径を有し、そしてその表面に複数のハイブリダイゼーションプローブが連結されている、複数のマイクロビーズでチャンネルの全横断面を充填し、ここでマイクロビーズが多孔性固体支持体を形成する工程を含む。内部チャンネルを含むカラム、およびほぼ同じ直径を有し、そしてその表面に複数のハイブリダイゼーションプローブが連結されている、複数のマイクロビーズを含む容器を含有する、本発明のハイブリダイゼーションカラムを調製するためのキットを提供することも可能である。

40

【0019】

別の側面において、本発明は、核酸の複雑な混合物から核酸分子を濃縮するための方法に関する。第一の工程において、該方法は、(a) 空隙間を流体が流動することを可能にする、複数の相互連結されたミクロンサイズの空隙、および(b) 空隙を形成する固体支持体の表面に結合された複数のハイブリダイゼーションプローブを含む固体支持体を提供する工程を含む。第二の工程において、核酸混合物は、固体支持体を通じて駆動され、それによってハイブリダイゼーションプローブの核酸配列に相補的な核酸配列を含む核酸分子がプローブにハイブリダイズすることを可能にする。試料が固体支持体を通じて駆動さ

50

れる間、ハイブリダイゼーションが進行することが可能になる。典型的には、10時間未満、好ましくは5時間未満、より好ましくは1時間未満のハイブリダイゼーション時間が必要とされる。好ましくは、ハイブリダイゼーション時間は、1秒間～1時間、例えば約30分間またはそれ未満、より好ましくは約5分間またはそれ未満、例えば30秒間～2分間の範囲である。混合物は、典型的には、1～100 μ l / 分の流速で、固体支持体を通じて駆動される。ハイブリダイゼーションに関しては、流速は、固体支持体の体積に基づいて調整され、1分あたり1～10の体積変化を達成する一方、洗浄工程には、1分あたりより高い体積変化が望ましい。ひとたび試料を適用したら、洗浄緩衝液を固体支持体にフラッシュして、プローブにハイブリダイズしていない、いかなる核酸も取り除く。最終工程において、固体支持体からハイブリダイゼーションプローブに結合した核酸分子を溶出させることによって、濃縮した核酸分子を回収する。

10

【0020】

ハイブリダイゼーション、洗浄および溶出工程は、同じ温度で実行することも可能であるが、典型的には、温度が各工程に関して最適化されている方が、濃縮はるかにより効率的である。例えば、ハイブリダイゼーションは、通常、55～65℃の温度で行われる。洗浄工程は、ハイブリダイゼーションに用いた温度より5～10℃低い温度、または室温／周囲温度（18～26℃）で実行可能である。ハイブリダイズした核酸分子の溶出は、固体支持体を約90～100℃に加熱することによって達成可能である。あるいは、ハイブリダイゼーション二重鎖は、pHの修飾などの物理化学的手段によって破壊可能である。

20

【0021】

本発明のさらなる側面において、ハイスループット配列決定のための核酸分子の混合物を含む試料を調製する方法を提供する。該方法は、核酸分子およびハイブリダイゼーションプローブの相補核酸配列が結合することを可能にする条件下で、1またはそれより多いハイブリダイゼーションプローブを含む固体支持体と、試料を接触させ；未結合核酸分子を取り除き；結合した核酸分子をアダプター分子と接触させ；結合した核酸分子をアダプター分子に連結させて、アダプター末端を有する核酸分子を得て；そしてアダプター末端を有する核酸分子を固体支持体から放出させる工程を含む。

【0022】

本発明の別の側面において、ハイスループット配列決定のための核酸分子混合物を含む試料を調製する方法を提供する。該方法は、核酸分子およびハイブリダイゼーションプローブの相補核酸配列が結合することを可能にする条件下で、1またはそれより多いハイブリダイゼーションプローブを含む固体支持体と、試料を接触させ；未結合核酸分子を取り除き；結合した核酸分子を固体支持体から放出させ；放出された核酸分子をアダプター分子と接触させ；そして核酸分子をアダプター分子に連結させて、アダプター末端を有する核酸分子を得る。

30

【0023】

さらなる側面において、本発明は、1セットより多いハイブリダイゼーションプローブを含むマイクロビーズに関し、ここで、同じセット中の各ハイブリダイゼーションプローブは、生物ゲノムの同じ領域に結合し、そして各セットはゲノム中の異なる領域に結合する。異なる領域は、ゲノムの異なる部分（例えば異なるコードまたは非コード領域あるいは異なる染色体上）に位置していてもよい。異なる領域は異なる遺伝子中であってもよいし、またはこれらは同じ遺伝子内に位置していてもよい。特定の態様において、異なる領域は互いに重複していてもよい。異なる領域は、典型的には、ゲノムのコード領域内に位置し、そしてコード領域は疾患または障害に関連していることも可能である。疾患または障害の例には、新生物性疾患、神経学的疾患、自己免疫疾患、代謝疾患または障害、遺伝子疾患および体質性障害が含まれる。あるいは、異なる領域は、例えば早期検出および介入を可能にするために出生前診断が望ましい、1またはそれより多い出生前疾患または障害、あるいは遺伝性または遺伝子障害と関連することも可能である。いくつかの態様において、複数のこれらのマイクロビーズを含むライブラリーを提供する。

40

50

【0024】

さらなる側面において、本発明は、1（好ましくは1より多い）セットのハイブリダイゼーションプローブを含むマイクロビーズを提供し、ここでセット中の各ハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムの同じ領域に結合し、そしてセット中のハイブリダイゼーションプローブの相補性領域は、同じセット内の少なくとも1つの他のハイブリダイゼーションプローブの相補性領域と重複し、ここで各セットはゲノム中の異なる領域に結合する。好ましくは、各ハイブリダイゼーションプローブ間の重複は、2xの最小タイリング深度を提供する。マイクロビーズは、少なくとも5、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20の異なるセットのハイブリダイゼーションプローブを含むことも可能である。

10

【0025】

いくつかの側面において、本発明は第一のマイクロビーズおよび第二のマイクロビーズを含むライブラリーに関し、ここで前記の第一のマイクロビーズは、生物ゲノム中の第一の相補性領域に結合する複数のハイブリダイゼーションプローブに連結され、そして前記の第二のマイクロビーズはゲノム中の第二の相補性領域に結合し、前記の第一の領域および前記の第二の領域は、前記ゲノムの異なる領域に位置する。第一の領域および第二の領域は、ゲノムの異なる部分（例えば異なるコードまたは非コード領域あるいは異なる染色体上）に位置していてもよい。異なる領域は異なる遺伝子中であってもよい。第一の相補性領域に結合するハイブリダイゼーションプローブおよび第二の相補性領域に結合するハイブリダイゼーションプローブは、すべて、同じ配列を有してもよいし、またはこれらはすべて、異なる配列を有してもよい。ライブラリーは、ゲノムの2より多い異なる領域に結合する、2より多いマイクロビーズを含んでもよい。例えば、ライブラリーは、前記ゲノムの10の異なる領域に結合する少なくとも10のマイクロビーズ、好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも50のマイクロビーズを含んでもよい。

20

【0026】

本発明はまた、第一のマイクロビーズおよび第二のマイクロビーズを含むライブラリーに関し、前記の第一のマイクロビーズは、生物ゲノム中の第一の癌遺伝子に結合する第一の複数のハイブリダイゼーションプローブに連結され、そして前記の第二のマイクロビーズは、ゲノム中の第二の癌遺伝子に結合する第二の複数のハイブリダイゼーションプローブに連結される。

30

【0027】

本発明はさらに、100を超えるマイクロビーズを含むライブラリーを提供し、ここで各マイクロビーズは生物ゲノム中の異なる領域に結合するハイブリダイゼーションプローブを含む。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】図1：配列決定のためのDNA断片を迅速に濃縮するためのハイブリダイゼーションカラム中のマイクロビーズの配置。（A）マイクロビーズ（円）を、多孔性フリット（波線で満たされた領域）を含むプラスチックカラム（ストライプ領域）内に、長さに沿ったあるポイントまで装填する。フリットの孔は、マイクロビーズよりも小さく、したがって、流体流動は、フリットに対して緊密なベッドになるようにマイクロビーズを充填する。（B）充填されたマイクロビーズは、これらの間を流体が流動する（矢印）ことを可能にする、狭いミクロンサイズの空隙を有する。（C）小さいチャンネルは、流動中のDNA分子（ストライプの線）を、充填されたマイクロビーズの表面上に位置する、ターゲットDNA（実線）または他のターゲット（点線）に相補的なオリゴヌクレオチドプローブの混合物と緊密に接触させる。（C）中のスケールバーは、マイクロビーズが直径5μmである場合の空隙のおよそのサイズを示す。DNA断片およびプローブが実際よりも5〜10倍長く示されていることに注意されたい（断片は長さ<300ヌクレオチドであり、したがって<100nmである）。

40

【図2】図2：ハイブリダイゼーションを加速するために微量流体流動を用いた、配列決

50

定用のDNAを濃縮するためのプロセス。マイクロビーズを、ゲノム、例えばヒトの特定の領域に対してターゲティングされる数十、数百、または数千の異なるオリゴヌクレオチド（60～120nt）で官能化し、各マイクロビーズは、これらのプローブの混合物をディスプレイする。マイクロビーズをデバイス内に装填し、そして流体流動によって、緊密なベッドに充填する。ゲノムDNA試料を、150～200bpの小片に断片化し、配列決定用のアダプターを場合によって付加し、そしてDNAを充填ベッド上流のデバイス内に装填する。DNA試料は、調節された温度（65℃）で、ハイブリダイゼーション緩衝液の緩慢な流動によって充填ベッドを通じて駆動される。オリゴヌクレオチドプローブに認識される試料中のDNA断片が、マイクロビーズ表面にハイブリダイズし、そして保持される。DNA断片をプローブと緊密に接触させ、そして核形成反応速度を増加させることによって、マイクロビーズ間の狭いチャンネルは、このプロセスを加速させる。非ターゲットDNA断片は、プローブにハイブリダイズせずに、または弱くしかハイブリダイズせずに通過する。洗浄緩衝液が、流動中のハイブリダイゼーション緩衝液と置き換わる1またはそれより多い洗浄工程は、いかなる残存非ターゲットDNAも取り除く。この工程の温度を調整して、洗浄（単数または複数）のストリンジェンシーを調節する。最後に、プローブにハイブリダイズしたままであるターゲットDNAを、洗浄緩衝液流動を続けながら、温度上昇によって溶出させる。次いで、この溶出したDNAを配列決定のために収集する。断片がアダプターを欠く場合、配列決定前にアダプターを付加する必要がある。

【図3】図3：2つの混合物からの1つのオリゴヌクレオチドの選択的な濃縮を示す実験データ。この実行においては、50pmolのプローブおよび500fmolの各標識オリゴヌクレオチドがあった。

【図4】図4：ラムダファージの全ゲノムに渡る、塩基数に対する読み取り深度のプロット。塩基21,986でピークになるスパイクは、マイクロビーズコンジュゲート化プローブによってターゲティングされるゲノム領域に対応する。

【図5】図5：実施例4に記載するセットアップを用いたATM遺伝子被覆。ターゲット領域の特異的で再現可能、そして均一な濃縮が観察される。

【図6A】図6：マイクロビーズベッドを調製するために用いるカラムのテーパリングが、どのように一貫した厚みおよび孔サイズのマイクロビーズベッドを達成し、そして試料添加およびマイクロビーズ洗浄などの続く工程中のマイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするのを補助しうるかを例示する、カラム設計。カラム寸法をミリメートルで示す。パネルAは、DNA試料を装填するため、マイクロビーズベッドまで1～4mm離れたレベルまでP20の挿入を可能にしつつ、P100チップの完全な挿入を防止する、狭い内部チャンネルへとテーパリングするリザーバーを最上部に含むカラム設計を示す。パネルBは、カラムの広い内部チャンネルの最上部に配置したキャップ中にチップ・ガイダンス特徴を含むカラム設計を示す。ガイダンス特徴は、形成中および試料装填中の、マイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするために十分な距離で、マイクロビーズベッドの位置の上に、P20およびP100チップ両方の中心を配置するフランジを含有する。さらに、パネルB中のカラム設計は、カラムの長さの約半分まで下る、カラムの内部チャンネル中のリムを示す。リムは、カラムの最上部から十分な距離で配置され、ガイダンス特徴に挿入されるP200チップは、リムが配置されるレベルで底に達する。P200チップを用いて洗浄緩衝液をカラムに添加する場合、リムはチップを、緩衝液が壁の側面を伝い、マイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするようにガイドする。

【図6B】図6：マイクロビーズベッドを調製するために用いるカラムのテーパリングが、どのように一貫した厚みおよび孔サイズのマイクロビーズベッドを達成し、そして試料添加およびマイクロビーズ洗浄などの続く工程中のマイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするのを補助しうるかを例示する、カラム設計。カラム寸法をミリメートルで示す。パネルAは、DNA試料を装填するため、マイクロビーズベッドまで1～4mm離れたレベルまでP20の挿入を可能にしつつ、P100チップの完全な挿入を防止する、狭い内部チャンネルへとテーパリングするリザーバーを最上部に含むカラム設計を示す。パネルBは、カラムの広い内部チャンネルの最上部に配置したキャップ中にチップ・ガイダン

10

20

30

40

50

ス特徴を含むカラム設計を示す。ガイダンス特徴は、形成中および試料装填中の、マイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするために十分な距離で、マイクロビーズベッドの位置の上に、P 2 0 および P 1 0 0 チップ両方の中心を配置するフランジを含有する。さらに、パネル B 中のカラム設計は、カラムの長さの約半分まで下る、カラムの内部チャンネル中のリムを示す。リムは、カラムの最上部から十分な距離で配置され、ガイダンス特徴に挿入される P 2 0 0 チップは、リムが配置されるレベルで底に達する。P 2 0 0 チップを用いて洗浄緩衝液をカラムに添加する場合、リムはチップを、緩衝液が壁の側面を伝い、マイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするようにガイドする。

【図 7】図 7：本発明を実施するために適したカラムの模式図。カラム（1）は、内部チャンネル（2）および多孔性フリット（3）を含む。内部チャンネル（2）は段階的にテーパリングされ、カラム（1）をトップセクション（4）、ネックセクション（5）およびボトムセクション（6）に分割する。フリット（3）はボトムセクション（6）に位置し、そして内部チャンネル（2）の全横断面をふさぐ。トップセクション（4）には取り外し可能キャップ（7）が取り付けられていてもよく、該キャップは、最上部に、カラム（1）内に挿入されたピペットチップを内部チャンネル（2）の中心にガイドする開口部を含有する。トップセクション（4）は、リム（8）によって、上部トップセクションおよび下部トップセクションに分割される。左の挿入図は、成形カラムの完成予想図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

本発明は、ハイブリダイゼーションを用いて、関心対象の核酸分子に関して試料を濃縮するプロセスに関する。該プロセスは、参考文献 4 に記載される研究の側面と、配列決定前に DNA を濃縮するためのハイブリダイゼーションに基づく方法を組み合わせる。参考文献 4 に対する重要な相違は以下の通りである：

1. 関心対象の核酸分子は、検出ではなく、増幅および／または配列決定のような下流適用のために濃縮され、そしてしたがって、該核酸分子は蛍光色素または類似の外因性検出可能標識を含有しない。

【0030】

2. ハイブリダイゼーションプローブを含む固体支持体は、本発明の微量流体デバイス中のミリメートル規模のチャンネル中に充填され、そしてしたがって関心対象の核酸分子がハイブリダイゼーションプローブに結合するために、参考文献 4 のミクロン規模のチャンパー中のマイクロビーズよりも、はるかにより広い表面積を提供する。

【0031】

3. 微量流体デバイスは、（i）固体支持体を含むチャンネル中の温度および（ii）固体支持体を通ずる流体の流速を調節するための手段を提供することによって、ハイブリダイゼーション条件、そしてしたがってハイブリダイゼーション時間の正確な調節を可能にする。

【0032】

4. ハイブリダイゼーションおよび洗浄が完了した後、濃縮した核酸分子を、例えば温度の増加によって、固体支持体から放出させ、そして配列決定などの下流適用のために収集する。

【0033】

5. 捕捉の特異性は、固体支持体内のハイブリダイゼーション条件の正確な調節を通じて、本発明の微量流体デバイスで達成される。参考文献 4 は、これを想定もせず、また可能にもしない。参考文献 4 に開示される微量流体デバイスによって提供されるハイブリダイゼーション条件は、特異的および非特異的両方のハイブリダイゼーションが起こる複雑なプールからの核酸の特異的捕捉には適していない。

【0034】

本発明の微量流体デバイスは、ペーパーパンチを用いてより大きなフィルターからディスクを切り取ることによって、ハイブリダイゼーションプローブの付着のための固体支持体として働くガラスマイクロファイバーフィルターディスクが用意される、参考文献 8 の

10

20

30

40

50

マイクロスピncラムとは異なる。ディスクがマイクロスピncラム内に容易に入れられるように、フィルターディスクは、マイクロスピncラムの内部穿孔よりもわずかに小さい直径を持たなければならず、そしてしたがって全横断面を完全には満たさない。マイクロラムに適用される試料の一部は、したがって、フィルターディスク内に進入せずにラムを通過するであろう。効率的なハイブリダイゼーションを可能にするため、フィルターディスクを含むラムを含有するチューブを、回転装置内に入れ、そして16〜20時間インキュベーションする。対照的に、本発明のハイブリダイゼーションラムは、全試料を、ハイブリダイゼーションラム内のチャネルの全横断面を充填する固体支持体と直接接触させるため、ハイブリダイゼーションが起こるために長期のインキュベーション時間を伴わずに、固体支持体に試料を適用することを可能にする。

10

【0035】

マイクロアレイに基づく濃縮法に対する相違点は以下の通りである：

1. 本発明の固体支持体は、マイクロアレイに用いられる典型的なガラススライドよりも、ハイブリダイゼーションプローブが付着するためのより広い表面積を提供し；
2. 相互連結された微量流体チャネルのネットワークは、固体支持体内のミクロン規模の空隙として存在し、関心対象のハイブリダイゼーションプローブがハイブリダイゼーションプローブから非常に離れて拡散することを防ぐ一方、先行技術のマイクロアレイは、単一の深いチャネルまたはハイブリダイゼーションプローブを含有する表面上の空間のいずれかを含み；そして
3. 関心対象のターゲット核酸分子に対するハイブリダイゼーションプローブが互いに混合され、そして個々のプローブスポットの秩序だったアレイではなく、固体支持体表面にランダムに付着している。

20

【0036】

試料調製

関心対象の核酸分子を含む試料を、多様な供給源から得ることも可能であり、そして典型的にはプレプロセッシングして、関心対象の核酸分子ではない、大部分の他の構成要素を取り除く。試料中の核酸分子は、DNAまたはRNAのいずれであってもよい。例えば、関心対象の核酸分子がゲノムDNAである場合、RNA分子は任意のさらなるプロセッシング工程の前に、取り除かれる。同様に、関心対象の核酸分子がRNAである場合（例えばトランスクリプトームプロファイリングのため）、混入しているいかなる細胞性DNAも、また関心対象のRNA分子を分解させうるいかなるRNaseも取り除かれる。さらに、RNA分子を濃縮前にDNAに逆転写してもよいし、またはあらかじめ逆転写することなく直接濃縮してもよい。いくつかの態様において、関心対象の核酸分子は、例えば関心対象の特定の転写因子によって結合されるものであってもよく、その場合、プレプロセッシングは、ゲノムの他の部分から、転写因子に結合するDNA断片を単離するクロマチン免疫沈降（ChIP）を伴ってもよい。

30

【0037】

いくつかの態様において、試料中の核酸分子を濃縮プロセス前に修飾する。例えば、メチル化DNAを亜硫酸水素塩で処理してもよい。この処理は、シトシン残基をウラシルに変換するが、5-メチルシトシン残基が影響を受けないままにする。

40

【0038】

リボース部分が2'酸素および4'炭素を連結する余分な架橋を含有するロック化核酸（LNA）に、核酸分子を連結することによって、該核酸分子を修飾することも可能である。ロック化リボースコンホメーションは、塩基スタッキングおよび主鎖事前構築を増進させ、そして修飾核酸分子のターゲット特異性および安定性を改善することも可能である。

【0039】

いくつかの例において、ペプチド核酸（PNA）に連結することによって、核酸分子を修飾することもまた好適でありうる。PNAは、核酸分子の捕捉効率を増加させるタグとして働くことも可能である。

50

【0040】

適用に応じて、より大きい核酸分子を、ハイブリダイゼーションによる濃縮、ならびに増幅および配列決定などの下流適用に適するように、より取り扱いやすい小片に断片化する必要がある可能性もある。本発明の濃縮プロセスに適切であるように、核酸は、典型的には、10～1,000塩基の長さを有する。長さ50～500塩基対の核酸分子が特に有用である。好ましい態様において、核酸分子は、100～350塩基（例えば150～200塩基）の長さを有する。より短い配列（<1,000塩基、好ましくは<500塩基、より好ましくは<300塩基）は、より効率的にハイブリダイズする。短すぎる配列（<50塩基、例えば<25塩基または<10塩基）は、配列決定などの下流プロセスを非効率的にする可能性もある。

10

【0041】

一般的に、ターゲット長の制限は、空隙表面上でのハイブリダイゼーションプローブの結合能などの要因に応じる。核酸分子サイズはまた、望ましい適用に応じる可能性もある。例えば、100～350塩基の核酸サイズは、一塩基多型（SNP）、一塩基多様性（SNV）、および短い挿入または欠失（インデル）を分析する際に有用である可能性もあり、この場合、関心対象の配列には、典型的には、SNP、SNVまたはインデル周囲の50塩基が含まれる。

【0042】

大きな核酸分子を、機械的剪断によって、例えば超音波によって、断片化することも可能である。いくつかの態様において、機械的に剪断され、断片化された核酸分子は、末端修復され、そしてハイブリダイゼーションによる濃縮の前にアダプター配列に連結される。アダプター分子は、増幅および配列決定のような下流適用に必要なプライミング部位を含有する。アダプター連結および適切なアダプター分子を以下に記載する。

20

【0043】

ゲノムDNAを、例えば超音波剪断または噴霧によって（参考文献9および10を参照されたい）、二本鎖断片にランダムに断片化することも可能である。典型的には、ゲノムDNAを長さ<1000塩基対（bp）の小片に断片化する。適切な長さは、50～500bp、例えば100～350bpの範囲である。150～200bpの長さを有する断片が特に適切である。これらの断片を、増幅および配列決定に使用する前に、アダプターに連結する必要がある。あるいは、機械的剪断および連結の代わりに、酵素的方法を用いることも可能である（例えばIlluminaのNextera系、New England BiolabsのDNase I断片化酵素）。あらかじめアダプター配列を装填しておいたトランスポザーゼ酵素を、DNAの大きな片に添加する。トランスポザーゼ酵素は、大きな片をはるかにより短い断片にランダムに切断しながら、同時に、アダプターでこれらにタグ付けする。アダプターは、順方向プライマー部位および逆方向プライマー部位を導入する。次いで、断片に関心対象のDNA分子に関して濃縮する前に清浄化して、試料中に残るいかなる未連結アダプタータンパク質およびいかなるリガーゼ／トランスポザーゼも取り除くことも可能である。濃縮前の場合による工程は、タグ化アダプター中のオーバーハングを埋め込むことである可能性もある。生じた断片を、濃縮前に連結されたDNA断片と同じ方式で濃縮することも可能である。

30

40

【0044】

一本鎖核酸分子のみが、濃縮に用いるハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズ可能である。二本鎖核酸分子は、ハイブリダイゼーションによる濃縮前に変性させる必要がある。変性工程は、典型的には、90～100℃、好ましくは約95℃、より好ましくは約98℃で行われる。DNA試料に関する典型的な変性プロトコルは、試料が98℃で5分間インキュベーションされ、65℃に5分間冷却され、そして次いで試料を固体支持体に適用する前に、4℃で5分間保存されることを必要とする。

【0045】

ハイブリダイゼーションによる濃縮

本発明の濃縮プロセスは、ストリンジェントな条件下で、第一の核酸分子が、高い特異

50

性で第二の核酸分子に結合し、ここで第二の核酸分子が、第一の核酸分子の配列に相補的な配列を有するという原理に基づく。関心対象の核酸配列を濃縮するため、複数の核酸分子を含む試料を、関心対象の核酸配列に相補的な核酸配列を有するハイブリダイゼーションプローブと緊密に接触させる。ストリンジェントな条件下で、関心対象の核酸配列を含む核酸分子は、関心対象の核酸配列に相補的な配列を有するハイブリダイゼーションプローブに結合するであろう。ハイブリダイゼーションプローブを固体支持体に連結させる。試料を添加した後、洗浄緩衝液を固体支持体に適用して、ハイブリダイゼーションプローブに結合していないすべての核酸分子を洗い流す。関心対象の配列を含有する核酸分子は、ハイブリダイゼーションプローブを通じて、固体支持体に結合したままであり、そして例えば温度または洗浄緩衝液の温度または塩濃度を増加させることによって、固体支持体から溶出させることも可能である。溶出物は、関心対象の配列を含有する核酸分子に関して、非常に濃縮されている。

10

【0046】

ハイブリダイゼーションカラム

本発明は、内部チャンネルを含むハイブリダイゼーションカラムに関し、ここで、前記チャンネルは、多孔性固体支持体で充填されている。カラム内の固体支持体によって占められる総体積は、最大 1.5 cm^3 であることも可能であるが、より一般的には、体積は $0.1\text{ mm}^3 \sim 100\text{ mm}^3$ 、より好ましくは $0.25 \sim 10\text{ mm}^3$ の範囲である。典型的な体積は $0.5 \sim 1.5\text{ mm}^3$ である。典型的には、固体支持体に取り込まれる体積の約30～50%は空隙であり、これは本発明の固体支持体の多孔性の性質のためである。例えば、固体支持体に取り込まれる体積が 1 mm^3 である場合、固体支持体内の空隙は、約 $0.3 \sim 0.5\text{ mm}^3$ である。

20

【0047】

固体支持体は、完全に、ハイブリダイゼーションカラムの内部チャンネルの全横断面を充填する。固体支持体は、チャンネルの深さに沿ったかなりの部分の全体に広がることも可能であるし、またはチャンネルの深さのわずかな部分のみを充填することも可能である。典型的には、固体支持体は、約 $0.1 \sim 50\text{ mm}$ 、好ましくは約 $0.3 \sim 20\text{ mm}$ の深さを有し、これによって深さは、チャンネルを通じた流動方向に対して、チャンネル内に広がる固体支持体の寸法を指す。チャンネルの内部穿孔は、 $100\text{ }\mu\text{m} \sim 20\text{ mm}$ 、好ましくは $200\text{ }\mu\text{m} \sim 10\text{ mm}$ 、より好ましくは $300\text{ }\mu\text{m} \sim 2\text{ mm}$ であることも可能である。当業者は、チャンネルの長さおよびその直径が、固体支持体を望ましい体積にするように選択されることを認識するであろう。

30

【0048】

カラムの内部チャンネルの形状は、多様であることも可能である。例えば、チャンネルの内部穿孔は、一方の端で他方の端よりも広いことも可能であり、そしてテーパリングされていることも可能である。典型的には、内部チャンネルの直径は、ハイブリダイゼーションカラム全体で同じであろう。円形の横断面が典型的である。

【0049】

いくつかの態様において、チャンネルはテーパリングされ、そしてテーパリングされた末端は、多孔性フィルターまたはフリットあるいは透過性膜によって閉鎖される（上に論じられる通り）。例えば、チャンネルは、 $5 \sim 10\text{ mm}$ の内部穿孔から、 $50\text{ }\mu\text{m} \sim 1\text{ mm}$ の内部穿孔へと狭くなることも可能である。チャンネルの狭窄は、より深い深さの固体支持体の形成を可能にし、そしてしたがって固体支持体を通過する核酸分子は、より多数のハイブリダイゼーションプローブと相互作用することが可能であり、捕捉事象成功の確率が増加する。チャンネルのテーパリングされた部分にはより広いヘッドスペースが先行し、圧調節をより容易にする。

40

【0050】

本発明記載のハイブリダイゼーションカラムは、多様な形状およびサイズを有することも可能である。例えば、ハイブリダイゼーションカラムは、本発明の固体支持体を含む、薄くそして伸長されたキャピラリーであることも可能である。あるいは、慣用的なスピ

50

カラム、またはクロマトグラフィ分離および精製に慣用的に用いられる、任意の他のタイプのカラムに類似の形式を有することも可能である。本発明で用いる典型的なハイブリダイゼーションカラム(1)を図7に示し、そして該カラムは、内部チャンネル(2)および多孔性フリット(3)を含み、ここで前記内部チャンネル(2)は段階的にテーパリングされ、カラムをトップセクション(4)、ネックセクション(5)およびボトムセクション(6)に分割し、ここでフリット(3)はカラム(1)のボトムセクション(6)に位置し、そして内部チャンネル(2)の全横断面をふさぐ。内部チャンネル(2)は、ネックセクション(5)において、カラム(1)のトップセクション(4)の内部チャンネル(2)直径の約30%~約50%までテーパリングされることも可能である。内部チャンネル(2)は、ボトムセクション(6)において、カラム(1)のトップセクション(4)の内部チャンネル(2)直径の約20%~約30%までさらにテーパリングされることも可能である。いくつかの態様において、トップセクション(4)は、内部チャンネル(2)内に突き出すリム(8)によって、上部トップセクションおよび下部トップセクションに分割される。特定の態様において、ボトムセクション(6)は、約 $10\mu\text{l}$ ~約 $30\mu\text{l}$ (例えば約 $20\mu\text{l}$)の体積を有する。トップセクション(4)は、カラム(1)の全長の約60~75%を占めることも可能である。ネックセクション(5)は、カラム(1)の全長の約5~10%を占めることも可能である。ボトムセクション(6)は、カラム(1)の全長の約20~30%を占めることも可能である。

【0051】

典型的には、カラムは、低いDNA結合能を持つ材料から調製される。ランダムプライマーを伴うqPCRを用いて、カラムが結合したDNAを有するかどうかを評価することも可能である。カラム材料が熱を伝導することが望ましい。理想的には、ハイブリダイゼーションカラムは、使用前にDNase不含およびRNase不含にするために、オートクレーブ可能である。適切なカラム材料には、ポリプロピレンまたはポリアロマー製の低DNA結合性プラスチックが含まれる。ポリプロピレンまたはポリアロマー製のカラムはまた、これらを、本発明を実施するために適したものにする、熱伝導特性を有する。ポリエチレンに基づくカラムもまた、本発明で使用するために適している可能性もある。好ましくは、ハイブリダイゼーションカラムは、(ステンレス)スチール製または類似の金属製ではない。

【0052】

ハイブリダイゼーション、洗浄および溶出中の固体支持体内の条件をよりよく調節するために、本発明のハイブリダイゼーションカラムは、好ましくは、本発明記載の微量流体デバイスとともに用いられる。しかし、本発明のいくつかの側面において、ハイブリダイゼーションカラムはまた、専用の微量流体デバイスを使用せずに、本発明の方法を実施するために用いられることも可能である。

【0053】

例えば、関心対象の核酸分子を含有する試料を、ハイブリダイゼーションカラムに手動で、例えば試料を、ハイブリダイゼーションカラムの固体支持体上の内部チャンネル内にピペッティングすることによって、適用することも可能である。ハイブリダイゼーション条件を調節するため、試料を含有するハイブリダイゼーション緩衝液をあらかじめ温め、そしてハイブリダイゼーションカラムをハイブリダイゼーションオープン、加熱ブロック等に入れて、ハイブリダイゼーション工程を完了させることも可能である。関心対象の核酸分子が固体支持体上のハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズしたら、ハイブリダイゼーションカラムを、チューブ内に入れて、そして遠心力を適用し、固体支持体中に残ったいかなる流体もチューブ内に押し出すことによって、ハイブリダイゼーション緩衝液を取り除くことも可能である。続く洗浄工程を、同じ方式で、すなわち洗浄緩衝液を固体支持体に適用し、そして遠心力を適用することによって、洗浄緩衝液を取り除くことによって、実行することも可能である。各例において、チューブ中のフロースルーは廃棄されるであろう。洗浄が完了したら、ハイブリダイゼーションカラムを新鮮なチューブに入れ、そして溶出緩衝液を固体支持体に適用することも可能である。関心対象の核酸分子

を含有する濃縮試料を、チューブ内のハイブリダイゼーションカラムを遠心装置に入れて、そして遠心力を適用することによって、溶出させることも可能である。濃縮試料はチューブ内に押し込まれ、次いでチューブが濃縮材料を含有するであろう。遠心装置の代わりに、ハイブリダイゼーションカラムの内部チャンネルに圧または吸引を適用することによってまた、試料ならびに洗浄および溶出緩衝液をカラムに通過させることも可能である。例えば、ハイブリダイゼーションカラムは、ルアーロックを取り付けられて、シリンジの連結を可能にしてもよく、これを用いて、固体支持体を通じて試料および緩衝液を駆動することも可能である。

【0054】

固体支持体

本発明の固体支持体は多孔性であり、ハイブリダイゼーションプローブが結合する広い表面積を提供する。用語「多孔性」は、この文脈において、固体支持体内のミクロンサイズの空隙を指し、これらは、固体支持体を形成する材料内に何らかの孔があるのではなく、相互連結されて、これらの間で流体が流動することを可能にしている。固体支持体は、それ自体、多孔性であるかまたは非孔性である材料から形成されることも可能である。例えば、固体支持体は、それ自体多孔性でありうるガラス微小球体から形成されることも可能である。しかし、好ましくは、固体支持体は、金属製またはシリカマイクロビーズなどの非孔性材料から形成され、これは、固体支持体を形成する材料内に孔が存在すると、適用された核酸が固体支持体に捕捉され、濃縮プロセスが緩慢になり、そして固体支持体からの濃縮核酸の回収が減少する可能性もあるためである。本発明にしたがった典型的な固体支持体は、 1 mm^3 あたり、約 $600\sim 800\text{ mm}^2$ の表面積を提供する（ $600\sim 800$ の表面積対体積比に相当する）。

【0055】

関心対象の核酸分子を含有する試料を固体支持体に適用したら、内部のミクロンスケールの空隙によって、核酸分子が固体支持体を通じて流動するにつれて、ハイブリダイゼーションプローブと緊密に接触することが確実に、迅速なハイブリダイゼーションが可能になる。非ターゲット核酸分子は、ハイブリダイゼーションプローブと弱くしか相互作用せず、そしてハイブリダイゼーション緩衝液、そして続いてストリンジェントな洗浄緩衝液の連続流によって、固体支持体からフラッシュされる。

【0056】

固体支持体内の空隙は、不規則な形状であってもよく、そしてこれらのサイズは、固体支持体全体でわずかに多様であることも可能である。多孔性材料に関しては、平均孔サイズを用いて、固体支持体内の空隙の特性を定義することも可能である。本発明記載の固体支持体の概念的な「平均孔サイズ」を決定するための現実的なアプローチは、固体支持体を含有する微量流体デバイスチャンネルを通じた流動に対して、増加するサイズの粒子を段階的に添加することである。試験に用いる粒子は、平均直径によって定義されることが認識されるであろう。平均孔サイズを決定するため、試験集団中のすべての粒子は、ほぼ同じ直径を有するであろう。この文脈において、ほぼ同じ直径を持つ粒子集団は、85%の数が、直径中央値の $\pm 10\%$ 以内の直径を有する粒子集団を指す。

【0057】

流動に添加される粒子の10%未満が固体支持体から流出する流体中に回収されるような粒子サイズに到達したら、この粒子サイズを用いて、固体支持体の平均孔サイズを定義することも可能である。例えば、 $9\text{ }\mu\text{m}$ の平均サイズを有する微小球体を保持しないが、 $10\text{ }\mu\text{m}$ の平均サイズを有する粒子の90%より多くを保持する固体支持体は、 $10\text{ }\mu\text{m}$ の平均孔サイズを有すると定義することも可能である。本発明の固体支持体中の空隙は、例えば $50\text{ }\mu\text{m}$ 、 $30\text{ }\mu\text{m}$ または $10\text{ }\mu\text{m}$ の平均孔サイズを有することも可能である。典型的な平均孔サイズは、 $0.1\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ の範囲内に属する。いくつかの態様において、本発明の固体支持体内の空隙は、 $\leq 2\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは $\leq 1.5\text{ }\mu\text{m}$ 、より好ましくは $\leq 1\text{ }\mu\text{m}$ の平均孔サイズを有する。

【0058】

好ましくは、固体支持体の孔構造は、すべての次元で均一である。例えば、緊密に充填されたマイクロビーズのベッドまたはセラミックフィルターは、任意の横断面で同じ範囲の孔サイズを有する一方、マイクロファイバー製の固体支持体は、横断面が、マイクロファイバーが固体支持体内に配置される方向に垂直であるかまたは平行であるかに応じて、異なる範囲の孔サイズを有するであろう。固体支持体全体で同じ範囲の孔サイズを有することで、核酸分子が固体支持体内を移動する際に、いかなる箇所でも一定の結合条件が提供される。ミクロンサイズの空隙内では拡散距離が小さいため、関心対象の核酸分子のハイブリダイゼーションは、ほぼ確実に固体支持体を通じた経路上で、相補的ハイブリダイゼーションプローブと出会うため、実質的に保証される。

【0059】

固体支持体内の空隙は、相互連結された微量流体経路を形成する。試料内のすべての核酸分子がハイブリダイゼーションプローブと接触する可能性を増加させるため、ハイブリダイゼーションプローブは、固体支持体表面上にランダムに分布する。好ましくは、関心対象の特定の核酸分子に対するハイブリダイゼーションプローブは、固体支持体内の空間的に定義された位置にはないが、固体支持体全体に、実質的に等しい密度で見出されうる。

【0060】

ハイブリダイゼーションプローブが結合可能な広い表面積を達成するため、固体支持体は、マイクロファイバー（すなわち1または1.3デニールまたはデシテックス／スレッドより細い合成ファイバー）、多孔性ガラス微小球体（典型的には1 μ m～1mmの直径を有する）、マイクロビーズ（典型的には0.5～500 μ mの直径を有する）、セラミックフィルター等で形成されることも可能であるが、ビーズまたは球体が好ましい。固体支持体は、ガラス、水晶、雲母、炭素、アパタイト、アルミナ、シリカ、炭化シリコン、窒化シリコン、炭化ホウ素、グラファイト、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアミド、フェノール樹脂、エポキシ樹脂、ポリカルボジイミド樹脂、塩化ポリビニル、フッ化ポリビニリデン、フッ化ポリエチレン、ポリイミド、アクリレート樹脂等を含む、多様な基質で作製可能である。固体支持体上の基質表面は、当該技術分野に周知の方法を用いて、直接またはリンカー基を通じてのいずれかで、ハイブリダイゼーションプローブの付着を可能にするために、官能化される必要がありうる。

【0061】

典型的には、固体支持体は、ハイブリダイゼーションカラムの一部として提供され、ここで、カラムは、その全横断面が固体支持体で充填される内部チャンネルを含む。いくつかの場合、固体支持体を調製するための材料（例えばハイブリダイゼーションプローブが付着しているマイクロビーズ）は、カラムとは別個に提供され、そして固体支持体を含むハイブリダイゼーションカラムは、最終使用者によって調製されるであろう。本発明の1つの側面において、本発明の固体支持体を含むハイブリダイゼーションカラムを調製する方法を提供する。該方法は、内部チャンネルを含むカラムを提供し、そしてほぼ同じ直径を有する複数のマイクロビーズでチャンネルの全横断面を充填し、マイクロビーズが多孔性固体支持体を形成するようにする工程を含む。

【0062】

マイクロビーズ

好ましい態様において、固体支持体はマイクロビーズで形成される。いくつかの態様において、マイクロビーズは磁性である。他の態様において、マイクロビーズは非磁性である。マイクロビーズを用いると、いくつかの利点を提供される。マイクロビーズは商業的に容易に入手可能であり、そして多様な基を用い、そして多様なサイズで官能化される。当該技術分野に知られる方法を用いて、ハイブリダイゼーションプローブをマイクロビーズに付着させることも可能である。典型的には、ハイブリダイゼーションプローブを官能化マイクロビーズに共有結合させる。例えば、5'アミン修飾を有する核酸分子は、NH₂官能化マイクロビーズに容易に連結可能である。マイクロビーズに核酸分子を共有結合させる代わりに、高アフィニティ、非共有付着手段を用いて、マイクロビーズに核酸を連

10

20

30

40

50

結させることも可能である。例えば、ストレプトアビジン官能化マイクロビーズは、ビオチンに連結された核酸分子にコンジュゲート化可能である。

【0063】

マイクロビーズは、ミクロン規模の空隙を持つ多孔性固体支持体を形成するように緊密に充填可能である。空隙のサイズは、用いるマイクロビーズのサイズによって決定され、そしてしたがって、適用に応じて、例えばより大きいマイクロビーズを使用して、より大きい空隙を生成することによって、サイズを容易に変化させることも可能である。例えば、より大きい核酸断片 ($> 500 \text{ bp}$)、例えば断片化ゲノム DNA を使用する適用は、より小さい断片サイズ (< 300 塩基) を用いる適用よりも、より大きい空隙を必要とする。したがって、固体支持体を含むハイブリダイゼーションカラムは、同じ材料のより大きいマイクロビーズを選択することによって、より大きい断片を用いた使用に容易に適応可能である。

10

【0064】

典型的には、マイクロビーズは、 $0.5 \sim 500 \mu\text{m}$ の平均直径を有する。 $\leq 20 \mu\text{m}$ の平均直径を有するマイクロビーズが特に有用である。本発明での使用のため、マイクロビーズは好ましくは平均直径 $2 \sim 10 \mu\text{m}$ 、より好ましくは $4 \sim 8 \mu\text{m}$ である。適切なマイクロビーズは、およそ $5 \mu\text{m}$ の平均直径を有する。平均直径が与えられている場合、固体支持体中のすべてのマイクロビーズは、ほぼ同じ直径を有するであろう。ほぼ同じ平均直径を持つ複数のマイクロビーズに関して、85% の数のマイクロビーズが、直径中央値の $\pm 10\%$ 以内の直径を有する粒子集団を指す。例えば、Dynabeads (Life Technologies, Inc.) M-280 ストレプトアビジン・マイクロビーズは、 $2.8 \mu\text{m}$ の直径および $\text{CV} < 3\%$ を有する。

20

【0065】

マイクロビーズを用いるさらなる利点は、これらが、隣接するプローブとのハイブリダイゼーション反応を妨害することなく、数十、数百、または数千の異なるハイブリダイゼーションプローブに連結可能であることである。異なるハイブリダイゼーションプローブの混合物を、官能化マイクロビーズに連結した結果、ビーズ表面上の混合物中に、各個々のハイブリダイゼーションプローブがランダムに分布する。固体支持体が数百または数千のマイクロビーズで形成されると、固体支持体全体で個々のマイクロビーズプローブの均一な分布が達成される。

30

【0066】

マイクロビーズは、1 セットより多いハイブリダイゼーションプローブを含むことも可能である。同じセット中の各ハイブリダイゼーションプローブは、生物ゲノムの同じ領域に結合し、そして各セットはゲノム中の異なる領域に結合する。異なる領域は、ゲノムの別個の部分 (例えば異なるコードまたは非コード領域または遺伝子中、あるいは異なる染色体上) に位置していてもよい。セット中のハイブリダイゼーションプローブは、ゲノムの同じ領域に結合するが、すべてが同じ配列を持たなくてもよい。例えば、ハイブリダイゼーションプローブは、領域に渡ってタイリングされていることも可能であり、そして各ハイブリダイゼーションプローブは、隣接するプローブと、例えば 10 またはそれより多い核酸分、重複して、少なくとも $2 \times$ 、好ましくは少なくとも $4 \times$ 、より好ましくは少なくとも $8 \times$ (例えば $10 \times$ またはそれより多く) のタイリング深度まで、全領域を被覆することも可能である。代替法として、ハイブリダイゼーションプローブは、 $10 \sim 50$ 塩基またはさらに 100 塩基または 1000 塩基を超えて離れていることも可能である。プローブ間の間隔は、下流適用に応じることも可能である。例えば、ナノポア配列決定は、長さ最大 10 キロ塩基の読み取りを達成し、この場合、ハイブリダイゼーションプローブは、約 1000 塩基 $\sim$ 約 $10,000$ 塩基離れ、例えば約 $2000 \sim 8000$ 塩基離れるか $3000 \sim 5000$ 塩基離れた間隔を空けられることも可能である。

40

【0067】

関心対象のゲノム内の相補性領域、特に疾患または障害と関連する可能性もあるゲノムのコード領域中に結合するように、ハイブリダイゼーションプローブを設計することも可

50

能である。疾患または障害の例には、新生物性疾患、神経学的疾患、自己免疫疾患、代謝疾患または障害、遺伝子疾患および体質性障害が含まれる。あるいは、異なる領域は、例えば早期検出および介入を可能にするために出生前診断が望ましい、1またはそれより多い出生前疾患または障害、あるいは遺伝性または遺伝子障害と関連することも可能である。異数性、特にトリソミー13、トリソミー18およびトリソミー21、ならびにターナー症候群の検出が特に有用である。いくつかの態様において、本発明のマイクロビーズは、癌遺伝子中の突然変異を検出するために、癌診断で用いられることも可能である。例えば、ハイブリダイゼーションプローブは、循環する腫瘍DNA中で検出可能な、腫瘍進行に関連する遺伝子の突然変異型に結合することも可能である。マイクロビーズは、少なくとも5、好ましくは少なくとも10、より好ましくは少なくとも20の異なるセットのハイブリダイゼーションプローブを含むことも可能である。いくつかの態様において、マイクロビーズは、100、好ましくは500、より好ましくは1000の異なるセットのハイブリダイゼーションプローブを含むことも可能である。

10

【0068】

あるいは、マイクロビーズは、数十、数百、または数千の同じハイブリダイゼーションプローブに連結されてもよく、そして個々のハイブリダイゼーションプローブに連結されたマイクロビーズを混合することによって、固体支持体を形成することも可能である。いくつかの態様において、ハイブリダイゼーションプローブはすべてが同じではないが、すべてゲノムの同じ領域に結合する。例えば、各ハイブリダイゼーションプローブは、隣接するプローブと、例えば10またはそれより多い核酸分、重複して、少なくとも2x、好ましくは少なくとも4x、より好ましくは少なくとも8x（例えば10xまたはそれより多く）のタイリング深度まで、関心対象の全領域を被覆することも可能である。多数のマイクロビーズを混合することによって、固体支持体全体で個々のハイブリダイゼーションプローブの実質的に均一な分布を達成しつつ、固体支持体全体で、異なるハイブリダイゼーションプローブの実質的に等しい分布を維持することも可能である。

20

【0069】

したがって、本発明はまた、第一のマイクロビーズおよび第二のマイクロビーズを含むライブラリーにも関し、ここで前記の第一のマイクロビーズは、生物ゲノム中の第一の領域に結合する複数のハイブリダイゼーションプローブに連結され、そして前記の第二のマイクロビーズはゲノム中の第二の領域に結合する複数のハイブリダイゼーションプローブに連結される。第一の領域の核酸配列および第二の領域の核酸配列は、典型的には、互いに異なる。第一の領域および第二の領域は、前記生物に影響を及ぼす疾患または障害に関連していてもよい。例えば、第一の領域および第二の領域は、異なる癌遺伝子中に位置していてもよい。あるいは、第一の領域および第二の領域は、出生前診断におけるライブラリーの使用を可能にするため、各々、体質性障害または遺伝病、例えば遺伝性代謝障害に関連する、異なるコードまたは非コード領域（例えばプロモーター領域、イントロンおよびエクソンを含む遺伝子）中に位置していてもよい。典型的には、ライブラリーは、ゲノムの2より多い異なる領域に結合する、2より多いマイクロビーズを含んでもよい。例えば、ライブラリーは、少なくとも10のマイクロビーズ、好ましくは少なくとも20、より好ましくは少なくとも50のマイクロビーズ（例えば100マイクロビーズより多く）を含んでもよい。マイクロビーズ上のハイブリダイゼーションプローブは、すべて同じ配列を有してもよいし、またはすべて異なる配列を有してもよい。

30

40

【0070】

いくつかの態様において、形状が球状であるマイクロビーズの代わりに、形状が多角体であり、そしてほぼ球の形状である（例えば十二面体、二十・十二面体、菱形三十面体など）微小粒子によって形成可能である。

【0071】

マイクロビーズベッド

いくつかの態様において、数百、数千、数万またはそれより多いマイクロビーズを、限定された空間中のマイクロビーズベッドに緊密に充填することによって（例えばビーズが

50

チャンネルの横断面を完全に充填し、そしてチャンネルに適用されたいかなる流体も移動しなければならないマイクロビーズベッドを形成するように、カラムまたは微量流体デバイスのチャンネル内にビーズを充填することによって）、固体支持体を形成する。例えば、ハイブリダイゼーションプローブに連結されたマイクロビーズの懸濁物を、長さに沿ったある箇所、例えば多孔性フリットで閉塞されているカラムの内部チャンネル内に装填することによって、マイクロビーズベッドを形成することも可能である。いくつかの態様において、フリットの孔はマイクロビーズより小さく、したがって、流体流動が、フリットに対して緊密なベッドになるようにマイクロビーズを充填する。他の態様において、フリットの孔の直径は、フリットが、マイクロビーズのカラムからの流出を防ぐ限り、マイクロビーズベッドを形成するマイクロビーズの平均直径より大きくてもよい。例えば、フリットの孔の直径は、マイクロビーズベッド中のマイクロビーズの平均直径よりも、40～300%大きいことも可能である。これらのより大きい孔サイズを持つフリットは、5～100 μl /分の流速を維持しながら、マイクロビーズベッドを保持可能であることが、実験的に示されてきている。フリットに対してマイクロビーズを充填すると、その間を流体が流動することが可能になる、マイクロビーズ間の狭いミクロンサイズの空隙が生成される。空隙は、マイクロビーズベッドが形成される微量流体チャンネルで相互連結されている。マイクロビーズ間の狭い経路または空隙は、試料中の核酸分子を、ハイブリダイゼーションプローブと緊密に接触させ、そして核形成反応速度（すなわち最初の数塩基対が形成される速度）を増加させることによって、ハイブリダイゼーションプロセスを加速させる。

【0072】

非特異的結合を最小限にするため、フリット材料は、低いDNA結合能を有する。ポリプロピレン、特にいかなる表面コーティングも含まないポリプロピレンは、低いDNA結合能を有する。理想的には、該材料は、ハイブリダイゼーション中の温度の迅速な変化に耐える。適切なフリット材料は、20～100℃の範囲の温度で機能する。典型的には、フリット材料は、最大100℃（例えば95℃または99℃）の温度に耐える。適切なフリット材料は、121℃の高圧飽和蒸気にはほぼ15～20分間耐えるならば、オートクレーブ可能である。フリット材料は、試料および洗浄緩衝液中、そして溶出緩衝液中に存在する多様な化学物質に耐える。特に、フリット材料は、95%エタノールおよび0.1N

NaOHと化学適合性を有する。好ましいフリット材料は、ポリエチレン（例えば超高分子量ポリエチレンまたは高密度ポリエチレン）、ポリプロピレンまたはガラス（例えばホウケイ酸塩）である。シリカに基づくフリット材料もまた、本発明を実施するために適切でありうる。フリット材料を化学的に修飾して親水性にすることも可能である。親水性フリット材料は、湿潤であることを補助するために好ましい。適切な親水性フリット材料には、ポリテトラフルオロエチレンが含まれる。ポリエチレンまたはポリプロピレン焼結多孔性プラスチック材料（例えばBioVyonTM）はフリット材料として特に適切であり、そして5～100 μm （平均流動孔）の孔サイズで入手可能である。

【0073】

いくつかの態様において、圧を適用して、マイクロビーズベッドを通じて試料を駆動する。典型的には、圧は10～500ミリバールの間、例えば25～300ミリバールの間である。好ましくは、マイクロビーズベッドに適用される圧は、40～250ミリバールの間である。例えば、ハイブリダイゼーション中、圧は40～100ミリバールの間、好ましくは40～60ミリバールの間または約50ミリバールである。洗浄中の圧は、典型的には、ハイブリダイゼーション工程（単数または複数）中より高く、例えば洗浄中の圧は、100～500ミリバールの間、好ましくは150～300ミリバールの間または約200ミリバールであることも可能である。マイクロビーズベッドを適所に保持するフリットは、望ましい圧で、5～100 μl /分の流速を可能にするように選択される。好ましい流速は、25～80 μl /分の範囲、例えば30～70 μl /分の範囲である。流速は、フリットの厚さおよび平均孔サイズによって決定される。孔サイズは、マイクロビーズサイズと適合しなければならない。本発明者らは、5 μm またはそれより大きい平均直径を有するビーズを保持するには、7～20 μm の孔サイズを有するフリット材料で十分

であることを見出している。典型的には、フリットは、1 mm～4 mmの間の厚さを有するであろう。適切なフリットの平均体積多孔性は20%～50%、好ましくは25～40%または約30%である。適切なフリットは、マイクロビーズベッドに適用された水が、圧の非存在下でカラムから流出することを防ぎ、すなわち重力流はまったく生じず、そしてマイクロビーズベッドに圧が適用されない場合、試料はカラムから滴り落ちない。

【0074】

マイクロビーズベッドの調製に適したカラムを図7に示す。適切なカラム(1)は、内部チャンネル(2)および多孔性フリット(3)を含み、ここで前記内部チャンネル(2)は段階的にテーパリングされ、カラムをトップセクション(4)、ネックセクション(5)およびボトムセクション(6)に分割し、ここでフリット(3)はカラム(1)のボトムセクション(6)に位置し、そして内部チャンネル(2)の全横断面をふさぐ。内部チャンネル(2)は、ネックセクション(5)において、カラム(1)のトップセクション(4)の内部チャンネル(2)直径の約30%～約50%までテーパリングされることも可能である。内部チャンネル(2)は、ボトムセクション(6)において、カラム(1)のトップセクション(4)の内部チャンネル(2)直径の約20%～約30%までテーパリングされることも可能である。いくつかの態様において、トップセクション(4)は、内部チャンネル(2)内に突き出すリム(8)によって、上部トップセクションおよび下部トップセクションに分割される。特定の態様において、ボトムセクション(6)は、約10 μ l～約30 μ l (例えば約20 μ l)の体積を有する。トップセクション(4)は、カラム(1)の全長の約60～75%を占めることも可能である。ネックセクション(5)は、カラム(1)の全長の約5～10%を占めることも可能である。ボトムセクション(6)は、カラム(1)の全長の約20～30%を占めることも可能である。

【0075】

マイクロビーズベッドが形成されるカラムの内部チャンネルの形状は、一貫した厚さおよび孔サイズのマイクロビーズベッドを形成するために特に適合していることも可能である。この文脈において、フリットの最上部にマイクロビーズ懸濁物を添加するために用いるいかなるピペットチップも、空のチップが懸濁物に触れることなしに、マイクロビーズベッドの形成に必要な懸濁物の全体積がピペットチップから排出されることを可能にするために、フリット表面から十分な距離で、内部チャンネルの中心部にガイドされることが重要である。これは、ピペットチップの完全な挿入が防止され、そしてテーパリングが、フリットから十分な距離で、チャンネル中心部にチップを位置づけるように、内部チャンネルをテーパリングすることによって、達成可能である。

【0076】

マイクロビーズベッドが位置するカラムの内部チャンネルは、試料適用および洗浄工程中、マイクロビーズベッドに対する攪乱を最小限にするように成形されていることも可能である。これは、例えば、内部チャンネルに挿入されるピペットチップが、ベッドのいかなる攪乱も最小限にするため、マイクロビーズベッドから十分に離れた距離で(典型的には2～5 mm)、カラム中心部にガイドされるように、カラムの内部チャンネルをテーパリングすることによって達成可能である。代替法として、フランジをカラムの最上部に加えることも可能である(フランジは典型的には、例えばヒンジによってカラムの最上部に付着するキャップの形で、取り外し可能である)。フランジは、カラムに挿入されるピペットチップが、カラムの内部チャンネルの中心部にガイドされるように、最上部でチャンネルの直径を狭め、そしてチップがカラムの内部チャンネルに進入することを妨げ、ベッドのいかなる攪乱も最小限にするため、マイクロビーズベッドから十分に離れた距離にチップを維持する。

【0077】

いくつかの態様において、カラムの内部チャンネルの上半分または上1/3にリムを加えることも可能である(図7を参照されたい)。リムは、チップの出口を閉塞させることなく、該リムでピペットを支えるために十分に広い。その目的は、ピペットチップをカラムの壁にガイドし、洗浄工程中のマイクロビーズベッドのいかなる攪乱も最小限にするよう

に、洗浄緩衝液が内部チャネルの側面に沿ってピペッティング可能であるようにすることである。さらに、懸濁物を含有するピペットチップをリムで支えることによって、マイクロビーズ懸濁物をカラムに適用することも可能であり、懸濁物がカラムの内部チャネルの壁に沿って流動し、そして懸濁物中に包埋されていると適切なマイクロビーズベッドの形成に干渉しうる泡の形成を伴わずに、カラムの底に充填されるため、該リムは、マイクロビーズベッドの形成を補助することも可能である。リムは、カラム最上部のフランジと組み合わされてもよく、この場合、フランジは、リムを越えたカラム内へのピペットチップの挿入を防止する。

【0078】

さらなる態様において、カラムのボトムセクション（内部チャネルを含む）は、カラムに適用された流体がカラムの内部チャネルを出る部分であり、内部チャネルの最小の直径がカラムの底で見られるように、さらにテーパリングされている。カラムのボトムセクションの形状を適応させると、より優れたドリッピングが可能になり、そして隣接するカラム上の滴が接触するために十分に大きい（例えば96ウェルプレート上に配置されたカラムアレイにおいて）場合には隣接試料、または例えばデバイスからのカラムの除去中にカラムが挿入された微量流体デバイスを汚染しうる、カラム底部での「懸滴」を防止する。さらに、発泡が減少する。理想的には、カラムのボトムセクションは、隣接するウェルのいかなる交差汚染も伴わずに、カラムのアレイの下に配置される例えば96ウェルプレート内に、内部チャネルを出た流体を正確に配置することが可能な、ピペットチップのような形状であろう。いくつかの態様において、カラム壁は、ピペットチップと同様に、カラムの他の部分よりも、カラムのボトムセクションの先端でより薄く、例えば発泡および「懸滴」形成をさらに減少させる。

【0079】

好ましくは、カラムの最大直径は、96ウェルプレートの最上部に96カラムのアレイが配置可能であり、そして好ましくはいかなるカラムも互いに接触することなく、96ウェルプレート上の対応するウェルの中心部に、各カラムの先端が整列するようなものである。いくつかの態様において、カラムは、本発明の微量流体デバイスで使用するためのアレイに配置される。

【0080】

カラムのボトムセクションもまた、フリットを収容し、これはマイクロビーズベッドのより低い境界を形成する。典型的には、カラムのボトムセクションはフリットを保持する。カラムのボトムセクションをテーパリングすると、フリットの緊密な適合が可能になり、そしてしたがって、フリットのリム周辺のビーズの漏洩が防止される。

【0081】

いくつかの態様において、カラムは横断面の最も広い直径で外部フランジを有する。外部フランジを付加すると、以下に記載する微量流体デバイスとともにカラムを用いた際に、圧のバイパスが防止される。代替法として、カラムの外側がテーパリングされる（好ましくは、上述のような内部チャネルのテーパリングを反映する）。カラムのテーパリングは、摩擦適合を提供するために十分である可能性もあり、したがって、カラムの外部形状にあうようにテーパリングされた穿孔を含む加熱装置または加熱ブロック中にカラムを配置する場合、カラムおよび加熱ブロック間にシールを生成する。好ましくは、カラム外部はリブを持たず、したがって、カラムのテーパリングされた形状は、カラムおよび加熱ブロックの間の直径方向の干渉を生成しうる。

【0082】

代表的なカラム設計を図6および7に示す。

ハイブリダイゼーションプローブでの官能化のために適したマイクロビーズベッドを含むカラムが商業的に入手可能である（参考文献11を参照されたい）。しかし典型的には、ハイブリダイゼーションプローブでの官能化は、マイクロビーズベッドを形成する前に行われるであろう。

【0083】

ハイブリダイゼーションプローブ

ハイブリダイゼーションプローブは、濃縮のためにターゲティングされる核酸分子中の関心対象の配列に相補的な核酸配列を含有する。ハイブリダイゼーションプローブは、関心対象の特定のターゲット配列の結合に特異性を与えるために十分に長い。ハイブリダイゼーションプローブは、10～500量体オリゴヌクレオチドであることも可能である。好ましくは、ハイブリダイゼーションプローブは、20～250量体オリゴヌクレオチドであり、そしてより好ましくは長さ30～150塩基である。特に適切なハイブリダイゼーションプローブは、80～120量体であることが見出されてきており、そして典型的には、ハイブリダイゼーションプローブは、100～140塩基または約120塩基の長さを有することも可能である。 ≥ 25 塩基、好ましくは ≥ 50 塩基を含むハイブリダイゼーションプローブが好ましい。 < 500 塩基、好ましくは < 400 塩基、より好ましくは < 300 塩基の長さを有するプローブが好ましい。典型的なハイブリダイゼーションプローブは50～250量体オリゴヌクレオチド（例えば150～200量体オリゴヌクレオチド）である。

10

【0084】

いくつかの態様において、はるかに大きい核酸分子（長さ $> 10,000$ 塩基）をハイブリダイゼーションプローブとして用いる。例えば、いくつかの適用において、細菌人工染色体（BAC）および酵母人工染色体をハイブリダイゼーションプローブとして用いて、例えばさらなる下流分析のために試料から全染色体を単離することも可能である。BACは、長さ100～175 kbを越える巨大DNA挿入物を含有しうる。

20

【0085】

BACは、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）のプローブとして使用されてきている。この技術の1つの適用は、ときに、BACオンビーズ（BoB）と称される、染色体異常検出のための分子核型決定である（参考文献12および13を参照されたい）。試料からの単離後、ゲノム試料DNAを参照DNAと混合し、そして次いで、標識し、そして精製した後、ビーズにカップリングしたBACにハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄後、特定のBACにハイブリダイズした試料に対する参照の比を検出する。こうしたアッセイに関して、溶液中のハイブリダイゼーション時間は、典型的には16～20時間である。

30

【0086】

本発明は、ハイブリダイゼーション時間を一桁以上減少させて、1日の労働時間内のアッセイの実行を容易にすることによって、この方法を有意に改善する。これは、BACを固体支持体に付着させ、そして本明細書に記載するようなハイブリダイゼーションプローブとしてBACプローブを使用することによって達成される。これは、ターゲット断片の単離を可能にし、挿入、欠失、微小欠失、転位置、異数性、コピー数変動（CNV）および他の染色体再編成などの染色体異常の検出を容易にする。こうしたゲノム事象は、より短いオリゴヌクレオチドプローブを用いた場合には見落とされる可能性もある[14]。高解像度分子核型決定のためのオリゴヌクレオチドの使用は、表現型に対する不確かな寄与を伴うCNVの検出増加を生じうることもまた報告されてきている[15]。

40

【0087】

ハイブリダイゼーションプローブとして用いるオリゴヌクレオチドが短ければ短いほど、未結合であり、試料中のいかなる相補体にも結合する、関心対象のハイブリダイズした一本鎖核酸分子の未結合領域は長くなる。利用可能な未結合領域を減少させるため、ハイブリダイゼーションプローブの長さは、好適には、試料中の核酸分子の平均断片長の $\geq 40\%$ （例えば50%～60%）である。しかし、大部分の適用に関しては、ハイブリダイゼーションプローブの長さは、試料中の核酸分子の平均断片長の $\leq 30\%$ である。

【0088】

固体支持体に付着したハイブリダイゼーションプローブは、特定の平均長の核酸分子を含有する試料で最適に働くように設計される。核酸分子の平均長は、典型的には、濃縮プロセスの下流の任意の適用に関する要件によって特定される。例えば、濃縮核酸を配列決

50

定に用いる場合、選択する配列決定法の読み取り長が、固体支持体に適用される核酸分子の平均長を決定するであろう。

【0089】

ハイブリダイゼーションプローブの長さは、典型的には、混合物中の核酸分子の平均断片長の $\geq 40\%$ 、 $\geq 50\%$ または $\geq 60\%$ であるように設計される。例えば、ハイブリダイゼーションプローブが60塩基の平均長を有する場合、微量流体デバイスは、100～150塩基の長さを有する核酸の濃縮に特によく適している。あるいは、固体支持体上のハイブリダイゼーションプローブは、濃縮のために微量流体デバイスに適用される混合物中の平均核酸分子よりも長いように設計される。ハイブリダイゼーションプローブは、混合物中の核酸分子の平均断片長よりも、 ≥ 10 塩基、好ましくは ≥ 20 、より好ましくは ≥ 50 塩基長いことも可能である。例えば、ハイブリダイゼーションカラムを用いて、150塩基の平均サイズを有する関心対象の核酸分子に関して試料を濃縮する場合、ハイブリダイゼーションプローブは、長さ160～200塩基であることも可能である。固体支持体に適用される試料中の核酸分子より長いハイブリダイゼーションプローブを用いると、一本鎖アダプター分子を *in situ* で、ハイブリダイズした核酸分子に連結させる場合には特に好適でありうる（以下を参照されたい）。

10

【0090】

固体支持体にハイブリダイゼーションプローブを連結させるため、ハイブリダイゼーションプローブは、好ましくは、官能基を含有するが、官能基の付加は常に必要とされるわけではない。官能基は、官能化固体支持体と化学的に反応する能力に関して選択される。いくつかの態様において、ハイブリダイゼーションプローブは、官能基を含有するリンカー基に共有結合するが、連結が官能基を介して導かれることもまた可能である。例えば、5'アミン修飾を用いて、NH₂官能化固体支持体にハイブリダイゼーション基を連結させることも可能である。他の態様において、ハイブリダイゼーションプローブは、ハイブリダイゼーションプローブに共有結合する高アフィニティ非共有リンカー基を通じて固体支持体に連結される。こうした官能基またはリンカー基の一例はビオチンであり、これは、ストレプトアビジンで官能化されている固体支持体とともに使用可能である。一般的に、すべてのハイブリダイゼーションプローブは、同じ官能基を通じて固体支持体に連結される。

20

【0091】

典型的には、固体支持体上のすべてのハイブリダイゼーションプローブは同じかまたはほぼ同じ長さを有する。例えば、平均ハイブリダイゼーションプローブは、180量体オリゴヌクレオチドであることも可能であるが、固体支持体は、例えば178量体オリゴヌクレオチド、179量体オリゴヌクレオチド、180量体オリゴヌクレオチド、181量体オリゴヌクレオチド、182量体オリゴヌクレオチド等を含むことも可能な、個々のハイブリダイゼーションプローブの混合物を含有することも可能である。これは、ハイブリダイゼーションプローブ混合物中の個々のプローブを、同じ効率で固体支持体に連結し、したがって、個々のプローブのいずれも、固体支持体表面上に過剰に存在しない可能性を増加させる。好ましくは、すべてのハイブリダイゼーションプローブは、正確に同じ長さを有し（すなわち同じ数のヌクレオチドで構成され）、そして同じ官能基を含有するであろう。

30

40

【0092】

物理化学特性、例えば長さではなくプローブの融点（ T_m ）が一致しているいくつかのプローブ設計戦略に関して、ハイブリダイゼーションプローブは長さが異なることも可能である。こうした態様において、個々のハイブリダイゼーションプローブの長さは、20～250塩基、好ましくは30～150塩基、より好ましくは80～120塩基の範囲であることも可能である。

【0093】

マイクロアレイ上に適合可能なハイブリダイゼーションプローブの数は、利用可能な表面積および関与するコストの両方によって制限される一方、本発明の固体支持体を濃縮に

50

用いる場合には、こうした制限は同じ度合いでは存在せず、これは、ハイブリダイゼーションプローブが、官能化固体支持体の全表面にランダムに付着しており、固定された位置にプローブを配置するための特別な装置を必要としないためである。したがって、当該技術分野に周知の方法を用いて、固体支持体の全表面の高いプローブ密度が、容易にそして安価に達成可能である。多孔性固体支持体上では利用可能な表面積もはるかに広いため、ハイブリダイゼーションプローブの数もまた、比較的容易に増加させる。例えば、最大核酸ハイブリダイゼーション効率のための最適表面ハイブリダイゼーションプローブ密度は、先行技術において、約 1×10^{12} ～ 約 9×10^{12} プローブ分子 / cm^2 の範囲のハイブリダイゼーションプローブ密度で観察されてきている [4]。固体支持体がマイクロビーズベッドである場合、プローブ密度は、 $1 \text{ a mol} / \text{mg}$ マイクロビーズ ～ $1 \mu \text{ mol} / \text{mg}$ マイクロビーズの範囲でありうる。典型的には、プローブ密度は $0.01 \text{ pmol} / \text{mg}$ ～ $2500 \text{ pmol} / \text{mg}$ の間、好ましくは $0.1 \text{ pmol} / \text{mg}$ ～ $100 \text{ pmol} / \text{mg}$ の間または $0.1 \text{ pmol} / \text{mg}$ ～ $10 \text{ pmol} / \text{mg}$ の間である。

【0094】

ハイブリダイゼーション効率は、駆動因子を必要とする。駆動因子は、試料中の過剰な投入核酸または固体支持体上の過剰なハイブリダイゼーションプローブのいずれであることも可能である。捕捉効率は、関心対象の特定の配列に相補的な個々のハイブリダイゼーションプローブの数が、固体支持体に適用される典型的な試料中のこの特定の配列を所持する核酸分子の理論的な数値を超えるようなハイブリダイゼーションプローブ密度を持つ固体支持体を提供することによって増加させる。例えば、典型的な試料が 100 ng の DNA を含有し、したがって約 $1,000,000$ コピーの関心対象の特定の DNA 配列が試料中に存在する場合、試料を分析するための固体支持体は、関心対象の特定の DNA 配列に相補的なプローブが例えば 10 倍または 100 倍過剰であることを可能にするプローブ密度を有するべきである。これらの条件下で、過剰プローブ濃度は、ハイブリダイゼーションを駆動可能である。

【0095】

単一のハイブリダイゼーションプローブを用いて、関心対象の核酸分子をターゲティングすることも可能である。しかし、より典型的には、 1 より多いハイブリダイゼーションプローブを用いて、関心対象の核酸分子をターゲティングする。典型的には、試料調製は、ターゲット核酸分子のランダム断片を生じる。したがって、関心対象の核酸分子が完全に提示される可能性を増加させるため、多数のプローブが必要である。

【0096】

関心対象の配列が完全に提示される可能性を増加させるため、特定のターゲット Territories に対するハイブリダイゼーションプローブが互いに重複することが好ましい可能性もある。例えば、 $2 \times$ の深度、より好ましくは $3 \times$ の深度、さらにより好ましくは $4 \times$ 、 $8 \times$ または $12 \times$ の深度まで、ターゲット Territories をタイリングするように設計されることも可能である（詳細に関しては、例えば参考文献 16 を参照されたい）。いくつかの態様において、塩基で示されるハイブリダイゼーションプローブの組み合わせた全長は、 10% 、より好ましくは 20% 、さらにより好ましくは 30% 、ターゲット配列の組み合わせた全長を超える。

【0097】

ターゲット Territories の中心から、そしてターゲット Territories の境界から生じる、関心対象の核酸分子が同等に提示される可能性を増加させるため、特定のターゲット Territories のハイブリダイゼーションプローブは、 $10 \sim 100$ 塩基、例えば 20 塩基、好ましくは 40 塩基、より好ましくは 60 塩基、境界を越えて伸長するように設計される。例えば、ターゲット Territories が、遺伝子の特定のエクソンである場合、ターゲット Territories を被覆するハイブリダイゼーションプローブのあるものは、イントロン領域内に、例えば 25 bp 伸長する。

【0098】

ハイブリダイゼーション条件

ハイブリダイゼーションプローブは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、試料中の関心対象の核酸分子に結合する。ハイブリダイゼーションプローブの核酸配列に相補的な配列を含有しない核酸分子の非特異的結合を減少させるため、試料添加前に、典型的にはブロッキング工程を実行する。試料添加前に、典型的にはブロッキングオリゴヌクレオチドを含有するブロッキング緩衝液を用いて、固体支持体を洗浄する。ハイブリダイゼーション緩衝液にブロッキングオリゴヌクレオチドを添加することによって、試料中の核酸分子と固体支持体の非特異的な相互作用をさらに最小限にすることも可能である。例えば、サケ精子DNAを含有するハイブリダイゼーション緩衝液で固体支持体を洗浄することによって、試料DNAの非特異的相互作用をブロッキングすることも可能である。典型的なハイブリダイゼーション緩衝液は、 $50 \text{ ng} / \mu\text{l}$ サケ精子DNAを補充した $1 \times \text{Hi-RPM}$ 緩衝液 (Agilent Technologies, Inc.) からなる。

10

【0099】

固体支持体を通じた流体の流速は、 $1 \text{ nl} / \text{分} \sim 1 \text{ l} / \text{分}$ の範囲であることも可能であるが、典型的には、微量流体デバイスの背景において、 $1 \sim 100 \mu\text{l} / \text{分}$ 、好ましくは $2 \sim 50 \mu\text{l} / \text{分}$ 、より好ましくは $4 \sim 25 \mu\text{l} / \text{分}$ の流速を維持して、固体支持体を通じて流体を駆動する。例えば、約 $5 \mu\text{l} / \text{分}$ の流速を用いて、固体支持体を通じてハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄緩衝液および溶出緩衝液を駆動することも可能である。重力流または拡散ではなく、固体支持体に試料を適用するために一定の流速を用いることで、固体支持体の各部分が、同じ条件下で試料と接触するようになるため、ハイブリダイゼーションが改善する可能性もある。

20

【0100】

一般的に、所定の期間に渡って、固体支持体内で特定の回数の体積交換を達成するように、流速を選択する。例えば、ハイブリダイゼーションを達成するには、1分あたり $1 \sim 10$ 体積変化が適切である一方、洗浄工程中には、1分あたりより多数回の体積交換（例えば1分あたり 20 またはそれより多く、好ましくは 40 またはそれより多く、より好ましくは 60 またはそれより多い体積交換）が望ましい可能性もある。例えば、本発明の固体支持体が約 0.5 mm^3 の空隙体積を有する場合、固体支持体を通じた $5 \mu\text{l} / \text{分}$ の流速は、1分あたり 10 回の空隙体積変化に対応し、そして $30 \mu\text{l} / \text{分}$ の流速は、1分あたり 60 回の空隙体積交換に対応する。どの流速を選択するかは、試料中の核酸濃度および総試料体積に応じる可能性もある。例えば、比較的希薄な試料を大きな体積で適用するために、1分あたりより多くの体積変化が望ましい可能性もある。1分あたりの体積変化の上記範囲は、本発明の固体支持体に適用される試料中のDNA濃度が、約 $1 \text{ ng} / \mu\text{l} \sim$ 約 $100 \text{ ng} / \mu\text{l}$ である場合、特に適切である。

30

【0101】

関心対象の核酸分子を含有する混合物を、固体支持体と接触させる前に、ハイブリダイゼーション緩衝液中で希釈する。試料を固体支持体に接触させたら、典型的には $55 \sim 65^\circ\text{C}$ の間まで温度を増加させて、核酸分子がハイブリダイゼーションプローブとアニーリングすることを可能にする。ミクロン規模の空隙を含む固体支持体にハイブリダイゼーションプローブが連結されていると、核酸分子がハイブリダイゼーションプローブから非常に遠くに拡散する（慣用的なマイクロアレイの場合のように）ことが妨げられるため、ハイブリダイゼーションプロセスは、非常に迅速でありうる。ハイブリダイゼーション工程を1秒間～1時間の期間行うことも可能である。しかし、典型的には、ハイブリダイゼーション時間は $1 \sim 15$ 分間、例えば $2 \sim 10$ 分間の間である。一般的には、ハイブリダイゼーション緩衝液またはブロッキング緩衝液の連続流を全プロセスで維持して、固体支持体を通じて試料を駆動する。しかし、固体支持体に試料を適用して、そして次いで流動を停止し、ハイブリダイゼーションを可能にするか、または間隔を置いて固体支持体を通じて試料を駆動して、間隔の間の期間が試料内の核酸分子が固体支持体上のハイブリダイゼーションプローブと相互作用可能であるさらなる時間を可能にすることもまた可能である。相補配列を含有しない核酸分子は、未結合のままであり、そしてハイブリダイゼーション

40

50

ン緩衝液の一定流によって取り除かれる。続いて、固体支持体をストリンジェントな洗浄緩衝液でフラッシュすることによって、いかなる非特異的結合核酸分子も取り除く。ストリンジェントな洗浄緩衝液の典型的な組成は、当業者に周知である。例えば、高ストリンジェンシーは、0.1 x S S P E および 0.005 % (v/v) N-ラウロイルサルコシンまたは 0.1 % S D S および 0.1 x S S C を緩衝液に含めることによって達成可能である。

【0102】

非特異的相互作用をさらに減少させ、そして洗浄工程の効率を増加させるため、洗浄緩衝液を固体支持体に適用しながら、ハイブリダイゼーションまたはアニーリング温度から、温度を約 5 ~ 10 % だけ減少させることも可能である。あるいは、洗浄工程中、温度を 20 ~ 30 °C に減少させる。

10

【0103】

洗浄緩衝液を、ハイブリダイゼーション緩衝液またはブロック緩衝液よりも高い流速で適用することも可能である。例えば、洗浄工程中の流速を 5 ~ 10 倍に、例えば 5 μ l / 分から 30 μ l / 分に、増加させることも可能である。洗浄緩衝液を、例えば 5 ~ 30 分間、連続適用することも可能であるし、または不連続に、例えば各洗浄工程の間に 1 分間の休止を伴い、5 分間隔で複数回、適用することも可能である。

【0104】

洗浄後、核酸分子混合物は、関心対象の核酸配列が非常に濃縮されて、固体支持体上に保持される。

20

溶出

最後に、ハイブリダイゼーションプローブに結合したままである、非常に濃縮された関心対象の核酸分子を、例えば温度上昇、塩濃度減少または両方の組み合わせを通じて溶出させる。例えば、固体支持体温度を約 90 ~ 100 °C、好ましくは約 95 °C に上昇させて、いかなる結合した核酸も溶出させることも可能である。溶出が、温度増加によって開始される場合、洗浄緩衝液の流動を続けることも可能であるし、または溶出試料を保存するために使用可能な溶出緩衝液（例えば T E）に、流動を切り替えることも可能である。

【0105】

あるいは、物理化学的手段、例えば pH 修飾によって、ハイブリダイゼーション二重鎖を破壊することも可能である。例えば、100 mM N a O H を用いて、固体支持体からいかなる結合核酸も取り除くことも可能である。続く適用のため、溶出物の pH を、例えば T r i s - H C l、pH 7.5 の添加によって、中性に調整する必要がある。

30

【0106】

溶出核酸分子を、例えば固体支持体から収集チューブへの洗浄緩衝液の流出を流用することによって、収集する。試料をさらに濃縮するため、溶出した核酸分子を、1 またはそれより多いさらなるハイブリダイゼーション周期のため、（必要な場合、ハイブリダイゼーション緩衝液に希釈した後）固体支持体に添加することも可能である。固体支持体は、先のハイブリダイゼーション工程中に用いたものと同じ固体支持体であってもよいし、または異なる固体支持体であってもよい。さらなるハイブリダイゼーション工程の前に、溶出した核酸分子を増幅し、そして場合によって精製することも可能である。代替法として、配列決定などの下流適用で使用するために、溶出した核酸分子を増幅し、そして続いて精製することも可能である。核酸分子が増幅のための適切な配列を欠く場合、溶出した核酸分子に、必要な配列を含有するアダプターを連結することも可能である。

40

【0107】

いくつかの態様において、溶出した核酸は、すでに、配列決定のためのアダプター分子を含有する。好適には、本発明は、非常に少量の体積（10 ~ 50 μ l）を用いた溶出を可能にする。溶出し、そして濃縮された核酸分子は、下流適用、例えば配列決定に直接利用されるために十分に純粋である。

【0108】

アダプター分子の連結

50

特定の下流適用、例えば増幅およびNGSのため、核酸分子が、各分子の両端に連結されるアダプター核酸を備えていることが好ましい。アダプター分子は、PCRによる続く増幅のためのプライミング部位、ならびに選択した配列決定法に特異的な配列、例えば Illumina（登録商標）配列決定装置中のフローセル表面にハイブリダイズする配列を提供することも可能である。例えば、5'アダプターは、下流増幅および配列決定のための順方向プライマー部位を含有する一方、3'アダプター分子は逆方向プライマー部位を含有することも可能である。

【0109】

典型的には、濃縮前にこれらの配列を断片化核酸分子に連結し、したがってすべての断片がアダプター配列を所持し、したがって濃縮後のさらなる連結工程の必要性が回避される。本発明者らは、濃縮後にターゲット核酸分子に指標を付けそして配列決定するためのアダプター核酸を連結することで、必要な試薬の量を減少させることが可能であり、そして特にアダプター核酸を微量流体デバイスの固体支持体を通じて流動に添加した際には、配列決定のための濃縮核酸分子の調製をさらに加速することが可能であることを見出した。

10

【0110】

本発明のいくつかの態様において、固体支持体から溶出する関心対象の核酸分子の非常に濃縮した混合物を、下流適用、例えば増幅および／または配列決定のために必要な結合部位を提供するアダプター分子に連結する。

【0111】

あるいは、核酸分子を固体支持体のハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズさせながら、アダプター核酸に連結させることも可能である（*in situ*）。連結を含む、ハイブリダイズしたDNAの *in situ* 修飾は、以前示されてきており、そして参考文献17に記載される。

20

【0112】

連結反応後、一本鎖アダプター末端核酸分子を、温度上昇、塩濃度減少または両方の組み合わせを通じて、固体支持体から溶出させる。

核酸分子の3'端および5'端へのアダプター連結を、同時にまたは連続して行ってもよい。一般的に、連結反応を、もっぱら二本鎖核酸配列を認識するリガーゼ、典型的にはDNAリガーゼによって触媒する。核酸分子の3'端へのアダプター連結および5'端へのアダプター連結は、好ましくは連続的に（すなわち別個の工程で）行われる。これは、望ましくない連結産物の産生が減少する利点を有する。さらに、例えば微量流体デバイスの別個のカートリッジ中に配置することによって、配列決定プライマーを変化させるかまたは別個に補充することも可能である。

30

【0113】

例えば、連結工程が連続している場合、5'アダプターおよびリガーゼの混合物をまず添加することも可能である。順序は逆であることも可能であり、そして3'アダプターを、5'アダプターの連結前に、核酸分子に連結することも可能である。

【0114】

例えば、5'アダプターをハイブリダイゼーションプローブ（例えば *in situ* ハイブリダイゼーションを用い、そしてハイブリダイゼーションプローブが、試料中の平均核酸分子より長い場合）、または核酸分子（例えば二重鎖アダプターを一本鎖核酸分子に連結させる場合）にハイブリダイズさせることも可能であるし、そして核酸分子の5'端および5'アダプターの3'端の間のニックをリガーゼによって連結する。洗浄工程後、3'アダプターおよびリガーゼの混合物を添加する。3'アダプターもまた、ハイブリダイゼーションプローブ（例えば *in situ* ハイブリダイゼーションを用い、そしてハイブリダイゼーションプローブが、試料中の平均核酸分子より長い場合）、または核酸分子（例えば二重鎖アダプターを一本鎖核酸分子に連結させる場合）のいずれかにハイブリダイズし、そして核酸分子の3'端および3'アダプターの5'端の間のニックをリガーゼによって連結する。さらなる洗浄工程後、一本鎖アダプター末端核酸分子を下流適用（

40

50

例えば増幅および配列決定)のために回収することも可能である。

【0115】

あるいは、核酸分子の3'端および5'端の両方へのアダプター連結は、単一工程で実行可能である。この態様において、5'アダプター、3'アダプターおよびリガーゼを含む混合物を核酸分子に添加する。核酸分子末端およびアダプターの間のニックを連結によって結合させる。連結混合物を除去する洗浄工程後、一本鎖アダプター末端核酸分子を、下流適用(例えば増幅および配列決定)のために回収することも可能である。

【0116】

核酸をとともに連結するための連結の代替法が存在し、そしてこれを用いて、前述の態様を修飾することも可能である。例えば、トランスポザーゼなどの酵素を用いたアダプター分子の添加が成功裡に使用されてきている[18]。

【0117】

適切なアダプター分子

適切なアダプター分子は、一本鎖または二本鎖のいずれかであることも可能である。in situ連結のため、アダプター分子の選択は、固体支持体に添加された混合物中の核酸分子の長さに対する、固体支持体に結合したハイブリダイゼーションプローブの長さに応じる可能性もある。

【0118】

好ましくは、アダプター分子には、末端ブロック基(例えばC3スペーサーまたはジグザグブロック)が含まれ、アダプター分子の一方の端のみが連結に感受性である。これは、望ましくない連結産物の産生を減少させることも可能である。

【0119】

一本鎖アダプター分子

本発明の1つの態様において、固体支持体上のハイブリダイゼーションプローブは、ハイブリダイズした核酸分子よりも長い。この態様において、一端に縮重塩基の短いストレッチを含有する一本鎖アダプター分子の混合物を用いて、固体支持体上のハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズさせることも可能である。これらのアダプター分子の小さいサブセットのみが、ハイブリダイズした核酸分子にすぐ隣接して結合するであろう。アダプター分子が、ハイブリダイズした核酸分子のいずれかの側のプローブにハイブリダイズしたら、もっぱら二本鎖核酸配列を認識するリガーゼが、5'および3'アダプター分子のそれぞれの端を、ハイブリダイズした核酸分子の3'および5'それぞれの端に連結させることも可能である。

【0120】

アダプター分子の1つの端上に縮重塩基の短いストレッチを、そしてアダプター分子の反対側にブロック基を配置することによって、もっぱら二本鎖核酸配列を認識するリガーゼを用いた連結反応は、アダプター分子が、ハイブリダイズした核酸分子にすぐ隣接するハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズした場合にのみ起こる。

【0121】

二本鎖アダプター分子

1つの態様において、二本鎖アダプター分子は、二本鎖または二重鎖領域を形成する2つのオリゴヌクレオチドで構成される。これらのアダプター分子はまた、アダプター二重鎖とも称される。オリゴヌクレオチドの1つは、これを通じてアダプター二重鎖が一本鎖核酸分子の末端にハイブリダイズ可能である縮重塩基の短いストレッチによって形成される一本鎖オーバーハング領域をさらに含む。オーバーハングの反対側のアダプター複合体中の両方のオリゴヌクレオチドの末端は、典型的にはブロック基で終結する。

【0122】

二本鎖アダプター分子を、in situで固体支持体上の核酸分子にハイブリダイズさせることも可能であり、この場合、固体支持体上のハイブリダイゼーションプローブは、ハイブリダイズした核酸分子より短い必要性がある。

【0123】

10

20

30

40

50

典型的には、縮重塩基のストレッチは、ブロッキング基によって終結し、したがって、連結は、アダプター二重鎖が核酸分子にハイブリダイズした場合にのみ起こりうる。さらに、連結反応は、一本鎖オーバーハングを欠くアダプター複合体の核酸分子およびオリゴヌクレオチド間でのみ起こりうる。

【0124】

in situ 連結を用いる場合、末端ブロッキング基が存在するために連結されていない、各アダプター二重鎖中のオリゴヌクレオチドは、溶出（例えば温度上昇または塩濃度減少によって誘発可能）中に、一本鎖アダプター末端核酸分子から分離される。これらのオリゴヌクレオチドは、アダプター末端核酸分子より短いため、これらは固体支持体からより迅速に溶出する。一本鎖アダプター末端核酸分子は、より緩慢に溶出し、そして下流適用、例えば増幅および配列決定で使用するために別個に回収可能である。

10

【0125】

別の態様において、二本鎖アダプター分子は、それ自体塩基対形成して、短い相補領域（ステム）および一本鎖領域（ループ）を生成する、単一のオリゴヌクレオチドで構成される。これらのステム・ループアダプター（ヘアピンアダプターとも称される）をアダプター二重鎖の代替物として用いることも可能である。オリゴヌクレオチドの一端は、縮重塩基の短いストレッチによって形成される一本鎖オーバーハング領域を含み、この領域を介してヘアピンアダプターが一本鎖核酸分子の端にハイブリダイズ可能である。縮重塩基のストレッチは、ブロッキング基によって終結し、したがって、連結は、アダプター二重鎖が核酸分子にハイブリダイズした場合にのみ起こりうる。単一のオリゴヌクレオチドをアダプターとして用いる利点は、望ましくない連結産物を回避するため、縮重塩基のストレッチを終結させるために用いるブロッキング基が1つあればよいことである。

20

【0126】

下流適用

核酸分子を濃縮し、そして適切なアダプター配列でタグ付けしたら、例えば慣用的な PCR を用いることによって、アダプター末端核酸分子を増幅することも可能であり、そして／または好ましくは次世代配列決定（NGS）を用いて配列決定することも可能である。この文脈において、NGSは、サンガー配列決定〔19〕またはマクサム・ギルバート配列決定〔20〕とも称される、不可逆性鎖終結阻害剤を用いたDNA配列決定以外の方法によって配列決定を可能にする、任意の技術を指す。

30

【0127】

下流適用の前に、核酸分子の他の修飾を行うことも可能である。例えば、濃縮プロセス後に、メチル化DNAを亜硫酸水素塩処理して、亜硫酸水素配列決定を可能にすることも可能である。

【0128】

NGSは、「大規模平行シグネチャー配列決定」（MPSS）、ポリマー（poly）配列決定、ピロシーケンシング、クラスター配列決定または合成時配列決定（sequencing-by-synthesis）（IlluminaまたはSolexa配列決定とも称される）および連結時配列決定（sequencing-by-ligation）（例えばSOLID配列決定）、一分子リアルタイム（SMART）配列決定、可逆性ターミネーターヌクレオチドを取り込むことによる配列決定、ナノポア配列決定（例えば溶血素ナノポア配列決定）、およびヌクレオチド取り込み中に放出された水素イオンの検出による配列決定（Ion Torrent）等の多様な配列決定技術を含む（参考文献21および22を参照されたい）。

40

【0129】

NGSによって2つの重要な利点を提供される。第一に、単一遺伝子から全ゲノムまでのいずれかの多数の遺伝子および変異体が、平行してスクリーニング可能である。NGSの第二の重要な利点は拡張性であり、これは、分子試験に対する要求が増加するにつれて必要とされている、多数の患者において、多数のターゲットを試験する能力である。

【0130】

50

特定の N G S 技術と本発明の濃縮プロセスを組み合わせると特に好適でありうる。例えば、クラスター配列決定または合成時配列決定によって達成されるハイスループットは、これを本発明の濃縮プロセスと組み合わせることによって、さらに増加させることも可能であり、そしてしたがって、診断適用のより価値が高いツールとなる。同様に、本発明の濃縮プロセスをナノポア配列決定と組み合わせると、多数の D N A 配列を配列決定する際の速度および費用に関して有意な利点を提供しうる。

【0131】

本発明の濃縮法を、ピロシーケンシング、ポロニー配列決定、可逆性ターミネーターヌクレオチドを取り込むことによる配列決定、ナノポア配列決定、連結時配列決定、およびイオン・トレント配列決定と組み合わせることも可能である。

10

【0132】

全ゲノムおよびエキソーム配列決定は、多くの疾患に関して、診断的価値を有するが、ターゲット配列決定アプローチは、典型的には、診断目的のためにはるかにより適切であり：偶発所見を減少させ、データ分析の複雑性を減少させ、そして試料あたりのコストを減少させる。

【0133】

多くの遺伝疾患に関して、臨床的に作用可能な遺伝子および変異体の小さいパネルを用いて、非常に高い診断量が達成可能である。癌に関しては、より小さいパネルで、低頻度の突然変異検出のための非常に高深度の配列決定が可能である。典型的には、パネルは 5 ~ 20 遺伝子からなるが、いくつかの場合、例えば 30、50 または 100 遺伝子からなる、より大きいパネルが好ましい可能性もある。全遺伝子をターゲティングするよりも、「ホットエクソン」、「ホットスポット」および非コード配列を含む領域をターゲティングすることも可能である。遺伝子および領域は、本開示の文脈において、交換可能と見なされるべきである。

20

【0134】

微量流体デバイス

ハイブリダイゼーションによる濃縮プロセスを専用の微量流体デバイスで好適に行う。微量流体デバイスは、固体支持体が充填されるチャンネルを含む。固体支持体は、複数の相互連結されたミクロンサイズの空隙を含み、該空隙は、それらの間を流体が流動することを可能にする。複数のハイブリダイゼーションプローブが、空隙を形成する表面に結合する。

30

【0135】

好ましくは、チャンネルは、微量流体デバイスに挿入され、そしてそこから取り除くことも可能なハイブリダイゼーションカラムの一部を形成する。これは、ハイブリダイゼーションカラムを単純に交換することによって、異なる濃縮適用のためにデバイスを再度利用可能にするために好適である。いくつかの態様において、微量流体デバイスは、1 より多いハイブリダイゼーションカラム、例えば 6、8、12、24、48、96 または 384 のハイブリダイゼーションカラムを収容可能である。例えば、デバイスは、2 : 3 の長方形マトリックスで配置される、96 または 384 のハイブリダイゼーションカラムのアレイを保持するようセットアップ可能である。代替法として、デバイスは、8 または 12 カラムのアレイを保持するようセットアップ可能である。ハイブリダイゼーションカラムを個々に、またはあらかじめ配置したアレイ（例えば互いに連結された多数のカラム単位を含有するストリップまたはプレートの形で）のいずれかで提供することも可能である。例えば、ハイブリダイゼーションカラムを、8 または 12 カラムのストリップとして、あるいは 8 または 12 カラムのストリップとして分割される 8 x 12 カラムの分割プレートとして、あるいは 96 または 384 カラムアレイのプレートとして、提供することも可能である。単純なハイブリダイゼーションカラムに関連して以下に記載する多様な態様は、多数カラムのセットアップを収容するように、容易に適応可能である。

40

【0136】

典型的には、チャンネルは、温度調節要素（例えば 1 またはそれより多いハイブリダイゼ

50

ーションカラムを挿入可能である 1 またはそれより多い穿孔を含む、加熱要素または加熱ブロック) および温度センサー内に配置され、チャンネル内の流体温度の正確な調節を可能にする。好ましくは、加熱要素には、温度の迅速な変化を達成するペルチェ要素が含まれる。

【0137】

いくつかの態様において、チャンネルはリザーバーに連結される。リザーバーを密封して、リザーバーが、チュービングを通じてリザーバーに連結されている圧縮ガス（例えば窒素）供給源で加圧されるようにすることも可能である。リザーバーおよび下流チャンネル間で生じる圧勾配によって、チャンネル内のいかなる流体も、固体支持体を通じて駆動される。リザーバーにガス供給源を連結するチュービング内のバルブは、チャンネルを通じて駆動される流体の流速を調節可能であるコントローラーによって開閉可能である。例えば、デバイスには、電子コントローラーが含まれることも可能であり、これは、ハイブリダイゼーションカラムのチャンネルを通じて流速を調節するようプログラム可能である。いくつかの態様において、圧センサーは、リザーバー中に位置して、リザーバーにおける圧を測定する。

【0138】

チャンネルを通じて流体を駆動するポンピング手段を含むセットアップによって、固体支持体を通じた流体の流速に対して調節することが可能になる。固体支持体を通じて流体をポンピングするため、先行するパラグラフ中に記載するもの以外の手段（例えば微量流体適用に適したシリンジポンプまたは蠕動もしくは隔膜ポンプ、あるいは吸引デバイス）は、当業者に容易に明らかである。典型的には、ポンプまたは任意の他の適切な圧勾配生成デバイスは、リザーバー内に 10～500 ミリバール、例えば 25～300 ミリバールの圧を生成する。好ましくは、例えば電子圧制御装置によって、マイクロビーズベッドに適用される圧を操作中に調節して異なる流速を生じる。適切な操作範囲は、40～250 ミリバールの間である。例えば、ハイブリダイゼーション中、圧を 40～100 ミリバールの間、好ましくは 40～60 ミリバールの間、または約 50 ミリバールに調節することも可能である。約 50 ミリバールの圧は、試料変性およびハイブリダイゼーション中に遭遇する温度（95℃および 65℃）でのガス形成を防止するために十分に高いことが見出されてきている。洗浄中の圧は、典型的には、ハイブリダイゼーション工程（単数または複数）中よりも高く、例えば洗浄中の圧は、100～500 ミリバールの間、好ましくは 150～300 ミリバールの間、または約 200 ミリバールに調節されることも可能である。例えば、固体支持体を通じた流体の流速を、50 n l / 分～5 m l / 分に調節することも可能である。より典型的には、流速を 1～100 μ l / 分に調節することも可能であり、好ましくは 2～50 μ l / 分、より好ましくは 4～25 μ l / 分を維持して、固体支持体を通じた流動を駆動する。適切な流速には、25～80 μ l / 分、例えば 30～70 μ l / 分が含まれる。例えば、約 5 μ l / 分の流速を用いて、固体支持体を通じて、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄緩衝液および溶出緩衝液を駆動することも可能である。あるいは、洗浄緩衝液を適用する流速は、ハイブリダイゼーション緩衝液を適用する流速よりも、5～10 倍高いことも可能である。例えば、洗浄を流速 30 μ l / 分で行う一方、ハイブリダイゼーション緩衝液を、5 μ l / 分の流速で、固体支持体に適用することも可能である。

【0139】

微量流体デバイスを、上述のハイブリダイゼーションカラムで用いる場合、圧のバイパスを防止するため、カラムは、好ましくは、加熱ブロック内に摩擦適合している。加熱ブロック内へのカラムの緊密な適合は、カラム周囲の空気漏洩を防止する。

【0140】

一体型の温度調節および流速調節は、プロセスの自動化を可能にし、したがってハイブリダイゼーション条件の変動を最小限にし、そして濃縮プロセスの再現性を増加させるため、好適である。さらに、ハイブリダイゼーションプロセスのストリンジェンシーは緊密に制御可能であり、したがって濃縮プロセスの特異性および選択性を改善することも可能

である。

【0141】

固体支持体を含むチャンネルの一端をチュービングに連結することも可能である。チュービングを収集チューブに連結して、濃縮された関心対象の核酸分子を含有する固体支持体からの溶出物を収集することも可能である。いくつかの態様において、収集チューブは、検出チャンバーを通過する。検出チャンバーは、標識不含リアルタイム検出のための、そして場合によって、固体支持体からの流出物内の核酸の定量化のための、光学センサーを含む。検出チャンバーの存在は、一本鎖アダプター末端核酸分子が *in situ* 連結に用いたアダプター二重鎖の未連結オリゴヌクレオチドから区別する必要があるプロセスには、特に好適である。

10

【0142】

本発明のいくつかの態様において、関心対象の核酸分子を含有する試料をチャンネルに適用して、そして固体支持体を通じて手動で駆動させることも可能である。これは、微量流動デバイスを単純化し、そしてコストを減少させる。手動介入は、本発明によって達成されるハイブリダイゼーション時間の劇的な減少のために可能である。例えば、試料をカラム内に直接ピペッティングすることによって、あるいはハイブリダイゼーションカラムの内部チャンネルの一端に連結されているチュービングまたはキャピラリーに連結されている、試料含有シリンジによってのいずれかで、試料を、ハイブリダイゼーションカラムの内部チャンネル内に位置する固体支持体に適用することも可能である。シリンジプランジャーが押圧されると、試料はチュービングまたはキャピラリー内に注射され、そしてチャンネル中にそして固体支持体を通じて押し込まれるであろう。

20

【0143】

いくつかの態様において、微量流体デバイスを用いて、本発明の固体支持体を調製する。例えば、一端で部分的に閉鎖された内部チャンネルを含む空のカラム（例えば多孔性フィルター、フリットまたは透過性膜の存在によって）をデバイスに入れることも可能である。固体支持体は、部分的に閉鎖された端より上のチャンネル中にマイクロビーズ懸濁物を入れることによって、チャンネル中に形成可能である。例えば、チャンネルの上流のリザーバーに連結された圧縮ガスの供給源からの圧を適用して、懸濁物をチャンネルに押し込むことも可能である。あるいは、吸引を用いて、チャンネルを通じて懸濁物を駆動することも可能である。マイクロビーズはチャンネルの部分的に閉鎖された部分を通過不能であるため、緊密に充填されたマイクロビーズベッドを形成する。懸濁物は、 $1\ \mu\text{g} \sim 1.5\ \text{g}$ の間のマイクロビーズを含有することも可能であるが、より典型的には、マイクロビーズの量は $0.1 \sim 100\ \text{mg}$ 、好ましくは $0.25 \sim 10\ \text{mg}$ の間の範囲である。

30

【0144】

固体支持体を通じた微量流体流動に少量の必要な試薬を添加することによって、下流分子操作、例えば指標および配列決定アダプターの核酸分子への連結を行うことも可能である。これは、配列決定の準備が出来た濃縮核酸分子の調製をさらに加速させる。

【0145】

いくつかの態様において、微量流体デバイスに適用される核酸分子の混合物は、すでに必要な指標および配列決定アダプターを含有し、そして溶出され、そして濃縮された核酸を下流適用、例えば配列決定に直接用いることも可能である。特定の態様において、本発明の微量流体デバイスは、したがって、配列決定装置にカップリングさせることも可能である。

40

【0146】

総則

用語「を含む」「含む」「含まれる」ならびに「からなる」、例えばX「を含む」組成物は、もっぱらXからなることも可能であるし、またはさらなるものを含み、例えばX+Yであることも可能である。

【0147】

語「実質的に」は、「完全に」を排除せず、例えばYを「実質的に含まない」組成物は

50

、Yを完全に含まないことも可能である。必要な場合、語「実質的に」は、本発明の定義から省くことも可能である。

【0148】

用語「約」は、数値xと関連して、場合により、そして例えば $x \pm 10\%$ を意味する。

【実施例】

【0149】

関心対象のDNA分子中の特定の配列に対するハイブリダイゼーションプローブとコンジュゲート化されたマイクロビーズの充填ベッドを通じてDNA試料を通過させることによって、関心対象のDNA分子を迅速に濃縮することも可能である（図1）。マイクロビーズベッドの拡散長が制限されているため、ターゲットDNAが捕捉され、そして数時間ではなくほんの数分で、非ターゲットDNAに対して濃縮されることが可能になる。

10

【0150】

DNA試料中の関心対象のDNA分子を濃縮するためのワークフローの概観を図2に提供する。マイクロビーズを、ゲノム、例えばヒトゲノムの特定の領域に対してターゲティングされた数十、数百、または数千の異なるオリゴヌクレオチド（典型的には60～120量体）で官能化し、各マイクロビーズはこれらプローブの混合物をディスプレイする。マイクロビーズを微量流体デバイス内に装填し、そして流体流動によって、緊密なベッドに充填する。

【0151】

ゲノムDNAの試料を150～200bpの小片に断片化し、配列決定のためのアダプターを場合によって付加し、そしてDNAを充填ベッドの上流のデバイス内に装填する。調節された温度（65℃）で、ハイブリダイゼーション緩衝液の緩慢な流動によって、充填ベッドを通じて、DNA試料を駆動する。オリゴヌクレオチドプローブによって認識される試料中のDNA断片は、マイクロビーズ表面にハイブリダイズし、そして保持される。非ターゲットDNA断片は、ベッドを通過し、プローブには弱くしか結合しないかまたはまったく結合しない。

20

【0152】

洗浄緩衝液が、流動中のハイブリダイゼーション緩衝液に置き変わる、1またはそれより多い洗浄工程は、いかなる残存非ターゲットDNAも排除する。この工程の温度は、洗浄（単数または複数）のストリンジェンシーを調節するように調整される。

30

【0153】

最後に、プローブになおハイブリダイズしているターゲットDNAは、洗浄緩衝液の流動を続けながら、温度を上昇させることによって溶出される。この溶出DNAを次いで、下流適用、例えば配列決定のために収集する。断片がアダプターを欠く場合、配列決定前にこれらを付加する必要がある。

【0154】

実施例1：蛍光標識オリゴヌクレオチドの迅速な濃縮

核酸混合物中の特定の配列の迅速な濃縮を立証し、そして定量化するため、2つの蛍光標識オリゴヌクレオチドを組み合わせて、そしてこのうち一方に相補的なプローブで官能化されたマイクロビーズベッドを通過させた。

40

【0155】

プローブ官能化マイクロビーズの調製

1. 5'アミン修飾を含む60量体オリゴヌクレオチド（FB-AmC6-プローブA：5'-TGAGGCTTGC ATAA TGGCAT TCAGAA TGAG TGAACAACCA CGGACCATAA AAA TTTATAA-3'（配列番号1）；Integrated DNA Technologies, Inc.）を合成し、そしてヌクレアーゼ不含水中で、1μM濃度に希釈した。

【0156】

2. 5μm直径NHS官能化シリカマイクロビーズ（Bioclone, Inc.）を2x懸濁緩衝液（Bioclone, Inc.）中に、200g/lの密度まで再

50

懸濁した。

【0157】

3. 100 μ l のオリゴヌクレオチド溶液を、1.5 ml 微量遠心管中で、100 μ l のマイクロビーズ懸濁物と組み合わせた。したがって、カップリング反応をマイクロビーズミリグラムあたり5ピコモルのプローブ密度で行った。

【0158】

4. チューブを回転ハイブリダイゼーションオープン中のロティサリーに乗せ、そして一定の回転を加えながら、50 $^{\circ}$ Cで16時間インキュベーションした。

5. 磁気ラックを用いて、上清からマイクロビーズを分離し、上清を廃棄した。

【0159】

6. マイクロビーズを200 μ l の1x洗浄緩衝液 (Bioclone, Inc.) 中に再懸濁し、ボルテックスし、そして磁気ラックに戻した。再び、上清を廃棄した。この工程は1回の「洗浄」を構成した。

【0160】

7. マイクロビーズを、200 μ l の1x洗浄緩衝液 (Bioclone, Inc.) 中でさらに2回、そして500 μ l のヌクレアーゼ不含水中、99 $^{\circ}$ Cで2回洗浄した。

【0161】

8. 250 mM Tris-HCl、pH 7.6、20 mM EDTA、0.1% Tween-20、および0.02% アジ化ナトリウム (すべてSigma-Aldrich Co. LLC) を含有する保存緩衝液中、20 mg/ml の密度でマイクロビーズを再懸濁した。

【0162】

上記工程を、マイクロビーズが10倍高い密度 (50 pmol/mg) のプローブとカップリングするように、工程1のFB-AmC6-プローブAの10 μ M溶液で反復した。

【0163】

濃縮

1. 1 mg のプローブ官能化マイクロビーズを、381 μ m の内部穿孔を有するPEEKキャピラリー (IDEX Corp.) 内に装填した。キャピラリー末端の0.5 μ m 孔PEEKフィルター (IDEX Corp.) がマイクロビーズを捕捉し、これらを直径381 μ m および長さ約10 mm でベッド内に充填させた。

【0164】

2. 50 ng/ μ l サケ精子DNA (Life Technologies) を補充した1xHi-RPM緩衝液 (Agilent Technologies, Inc.) としてハイブリダイゼーション緩衝液を調製した。キャピラリーを水槽中で65 $^{\circ}$ Cに加熱し、そしてMitros Duo XSポンプ (Dolomite Ltd.) を用いて、10 μ l/分で10分間、マイクロビーズベッドを通じて、ハイブリダイゼーション緩衝液をポンピングした。このインキュベーションは、マイクロビーズおよびキャピラリー内部の他の表面をプレハイブリダイズする (ブロックする) ように働いた。

【0165】

3. 9725i HPLC手動注入バルブ (IDEX Corp.) を用いて、同じハイブリダイゼーション緩衝液中に溶解した5 μ l パルスの蛍光標識100量体オリゴヌクレオチドを導入した。この等モル混合物は、以下の2種各々を50、500、または5,000 fmol 含有した: (i) マイクロビーズ上のプローブに相補的なCy3標識オリゴヌクレオチド (FB-Cy3-ターゲットA: 5'-CATTAGTTCCGGCCAGCAGATTATATAAATTTT TTAGGTCCGTGGTTGTTCACCTCATTTCTGA ATGCCATTAT GCAAGCCTCA CAATATAGTT AAATGCAATG-3' (配列番号2); Integrated DNA Technologies, Inc.) および(ii) 非相補配列を含むCy5標識

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド (FB-Cy 5-ターゲットB: 5'-GAGTTGCCCCA TC
GATATGGG CAACCTCTATC TGCACCTGCTC ATTAATATA
C TTCTGGGTTC CTTCCAGTTG TTTTGTGCATA GTGAT
CAGCC TCTCTCTGAG-3' (配列番号3); Integrated DN
A Technologies, Inc.)。

【0166】

4. マイクロビーズベッドを通じてパルスをポンピングし、そしてマイクロビーズベ
ッドから流出する流れの蛍光を474 HPLCスキャニング蛍光検出装置 (Water
s Corp.) で測定した。2つのオリゴヌクレオチド各々からの蛍光シグナルは、各
種のフロースルーを測定することを可能にした。

10

【0167】

5. キャピラリーの温度を25℃に減少させ、そして50 µl /分でポンピングされ
る0.1xSSPE (Sigma-Aldrich Co. LLC) および0.005
% (v/v) N-ラウロイルサルコシン (Sigma-Aldrich Co. LLC
) を含有する洗浄緩衝液に、可動相をスイッチした。この洗浄相は、非ハイブリダイズオ
リゴヌクレオチド除去を補助した。

【0168】

6. 洗浄が完了した後、洗浄緩衝液の流速を10 µl /分に戻し、そしてキャピラリ
ー温度を65℃に上昇させて、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドをマイクロビーズ
表面から遊離させた。2つのオリゴヌクレオチド種各々からの蛍光シグナルによって、特
異的捕捉を定量化することが可能であった。

20

【0169】

結果

単一の120量体オリゴヌクレオチドを、NHS /アミン化学反応を通じて、マイクロ
ビーズアリコットにコンジュゲート化した。マイクロビーズより小さい孔サイズを持つ多
孔性フリットが末端にある短いキャピラリー内に、マイクロビーズを充填し、マイクロビ
ーズをキャピラリー内部に捕捉した。キャピラリーを通じてハイブリダイゼーション緩衝
液をポンピングして、マイクロビーズをブロッキングした。

【0170】

HPLC注入バルブを用いて、2つの蛍光標識オリゴヌクレオチドのパルスをハイブリ
ダイゼーション緩衝液流に導入した。HPLC蛍光検出装置を用いて、緑色および赤色蛍
光チャンネル中で、ベッドからの流出を監視した (図3)。緑色色素Cy 3で標識された1
つオリゴヌクレオチドは、マイクロビーズ上のプローブオリゴヌクレオチドに相補的であ
り、そしてその分子の大部分がハイブリダイズした。ある程度の分子は捕捉されず、そし
て0~600秒の間の流出蛍光中のピーク (ストライプ領域) によって例示されるように
、ベッドをまっすぐ通過した。次いで、「洗浄」相中、可動相を低温だがストリンジェン
トな洗浄緩衝液にスイッチした。どのくらい多くの標識オリゴヌクレオチドが実際に結合
したかを決定するため、1200~2000秒の間の蛍光中のピーク (点描領域) によっ
て例示されるように、温度を増加させ、そしてハイブリダイズした分子をプローブから融
解させて、そしてベッドから流出させた。2つのピークの相対面積によって、マイクロビ
ーズ表面に捕捉されたターゲットオリゴヌクレオチド分子の割合が示される。赤色色素C
y 5で標識されたもう一方のオリゴヌクレオチドは、プローブに相補的ではなく、そして
ハイブリダイズしなかった。DNAの大部分は、「ハイブリダイゼーション」工程中にま
っすぐ流出し、表面にはほとんど結合していなかった。

30

40

【0171】

マイクロビーズ上のハイブリダイゼーションプローブの密度および注入パルス中のオリ
ゴヌクレオチド濃度を変化させることによって、捕捉効率に対するこれらの変数各々の影
響を調べることが可能であった (表1)。

【0172】

【表 1】

プローブの モル数 (pmol)	各注入オリゴのモル数 (fmol)	捕捉された Cy3 オリゴ (%)	捕捉された Cy5 オリゴ (%)	濃縮 (倍)
5	50	31.9	NM	-
5	500	11.8	NM	-
5	5000	4.60	NM	-
50	50	89.4	NM	-
50	500	64.5	0.440	147
50	5000	9.42	NM	-

10

20

【0173】

表 1. 異なるプローブ密度およびオリゴヌクレオチド濃度でのターゲットおよび非ターゲットオリゴヌクレオチドの捕捉効率。測定しなかった値を「NM」によって示す。

結果は、マイクロビーズに対するプローブの量および注入したオリゴヌクレオチドの量の両方が、ターゲットオリゴヌクレオチドの全体の捕捉に影響を及ぼしたことを示す。プローブの量が最高であり（50 pmol）そして注入オリゴヌクレオチドの量が最低であった（50 fmol）際に、捕捉効率が最高であった。捕捉プローブの量を減少させるか、または注入オリゴヌクレオチドの量を増加させると、ターゲットオリゴヌクレオチドの捕捉が減少する影響があった。非ターゲットオリゴヌクレオチドの捕捉もまた測定した場合、決定した値は、ターゲットオリゴヌクレオチドに関するものよりもはるかに低かった（0.44対64.5%）。これらの捕捉効率の比は、147倍の全体の濃縮係数が達成されたことを示す。すべての場合で、ハイブリダイゼーション工程は10分しか続かなかった。

30

【0174】

実施例 2：ラムダファージゲノムにおける単一ターゲットの迅速濃縮

生物の完全ゲノムからの特定の配列の濃縮を立証しそして定量化するため、ラムダファージゲノムDNAから断片のライブラリーを生成し、そして1つの120bpターゲットに相補的なプローブで官能化したマイクロビーズのベッドを通じて駆動した。

【0175】

プローブ官能化マイクロビーズの調製

5'アミン修飾を含む120量体オリゴヌクレオチド（FB-AmC6-プローブA120:5'-CCGTCAAAAA CATTGCATTT AAC TATATTG T GAGGCTTGC ATAATGGCAT TCAGAAATGAG TGAACAAC CA CGGACCATAA AAAATTTATATA TCTGCTGGCC GGAA CTAATG AATTTATTGG-3'（配列番号4）；Integrated DNA Technologies, Inc.）を、実施例1に記載するのと同じ方式で、5 pmol/mg密度でマイクロビーズにカップリングした。このプローブは、J02459ラムダファージ参照ゲノム（GenBank）中の単一の領域：塩基21930-22049に対してターゲティングされた。

40

【0176】

50

アダプター二重鎖の調製

1. Integrated DNA Technologies, Incによって、相補オリゴヌクレオチド対を合成した。5' C3キャップおよび3'末端塩基上のホスホロチオエート結合を含む「上部」オリゴヌクレオチドを合成した(FB-PreLig-Ad-5'-T:5'-ACTCTTTTCCC TACACGACGC TCTTTC CGATC T-3' (配列番号5))。5'リン酸および3' C3キャップを含む「下部」オリゴヌクレオチドを合成した(FB-PreLig-Ad-5'-B:5'-GATCGGAAGA GCGTCGTGTA GGGAAAGAGT-3' (配列番号6))。

【0177】

2. 50mM塩化ナトリウム、1mM Tris-HCl、pH7.5および100μM EDTA(すべてSigma-Aldrich Co. LLC)を含有する50μl体積のアニーリング緩衝液中に、30μM濃度で、オリゴヌクレオチドを再懸濁した。

【0178】

3. 混合物を95℃で2分間変性させ、ゆっくりと25℃に冷却し(0.1℃/秒)、25℃で5分間維持し、そして次いで4℃で保存した。オリゴヌクレオチド対をアニーリングさせ、FB-PreLig-Ad-5'アダプター二重鎖を生成した。

【0179】

4. 別のオリゴヌクレオチド対で上記工程を反復して、FB-PreLig-Ad-3'アダプター二重鎖を生成した。5'リン酸および3' C3キャップを含む「上部」オリゴヌクレオチド(FB-PreLig-Ad-3'-T:5'-GATCGGAAGA GCACACGTCTT GAAC TCCA-3' (配列番号7))を合成した。5' C3キャップおよび3'末端塩基上のホスホロチオエート結合を含む「下部」オリゴヌクレオチド(FB-PreLig-Ad-3'-B:5'-ACTCTTTTCCC TACACGACGC TCTTTC CGATC T-3' (配列番号5))を合成した。

【0180】

濃縮用のDNAの調製

1. 2μgのラムダファージゲノムDNA(Promega Corp.)を、製造者の指示にしたがって、S2集束超音波発生装置(Covaris Inc.)を用いて、180bp二本鎖DNA断片にランダムに切断した。

【0181】

2. 製造者の指示にしたがって、1x比のAgencourt AMPure XPビーズ(Beckman Coulter, Inc.)で、切断DNAを清浄化し、そしてサイズ選択した。溶出体積は、27μlのヌクレアーゼ不含水であった。

【0182】

3. 25μlの清浄切断DNAを、以下の構成要素で50μlに希釈することによって、末端修復し、そしてAテール付加した: 1xT4 DNAリガーゼ緩衝液(Life Technologies)、1mM dATP(Enzymatics, Inc.)、200μM dNTP混合物(Enzymatics, Inc.)、100U/mlクレノウ断片(Enzymatics, Inc.)、30U/ml T4 DNAポリメラーゼ(Enzymatics, Inc.)、220U/ml T4ポリヌクレオチドキナーゼ(Enzymatics, Inc.)、および0.3U/μl Top DNAポリメラーゼ(Bioneer Corp.)。

【0183】

4. 試料を25℃で30分間インキュベーションし、72℃に30分間加熱し、そして次いで4℃に冷却した。

5. 15μlの試薬をDNA試料に添加し、添加される連結構成要素: 2.3μM FB-PreLig-Ad-5'アダプター二重鎖、2.3μM FB-PreLig-Ad-3'アダプター二重鎖、および18,500U/ml T4 DNAリガーゼ(L

10

20

30

40

50

ife Technologies) を含む 65 μ l 反応を生じた。

【0184】

6. 試料を 20 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベーションした。

7. 製造者の指示にしたがって、1.8x 比の Agencourt AMPure XP ビーズで、連結 DNA を清浄化し、そしてサイズ選択した。溶出体積は、30 μ l のヌクレアーゼ不含有水であった。

【0185】

8. Qubit dsDNA HS アッセイ (Life Technologies) を用いて、清浄な連結された DNA 試料中の DNA の濃度を決定した。

9. 以下を含有する 50 μ l 「捕捉前」PCR で、アリコット DNA を増幅した：300 ng の清浄な連結された DNA、1x AccuBuffer (BioLine)、1 mM dNTP 混合物 (BioLine)、0.1 / μ l ACCUZYME DNA ポリメラーゼ (BioLine)、1 μ M 順方向 PCR プライマー (FB-PCR1-5' : ACTCTTTTCCC TACACGACGC TCTTCCGATC T (配列番号 5) ; Integrated DNA Technologies, Inc.)、および 1 μ M 逆方向 PCR プライマー (FB-PCR1-3' : TGGAGTTTCAG ACGTGCTC TTCGATCT (配列番号 8) ; Integrated DNA Technologies, Inc.)。

【0186】

10. 試料を以下のように熱周期処理し：98 $^{\circ}$ C 3 分間のホットスタート；6 周期の 98 $^{\circ}$ C 30 秒間、65 $^{\circ}$ C 30 秒間、および 72 $^{\circ}$ C 1 分間；72 $^{\circ}$ C 10 分間の最終伸長工程；そして 4 $^{\circ}$ C に冷却した。

【0187】

11. Qubit dsDNA HS アッセイ (Life Technologies) を用いて、清浄な増幅 DNA 試料中の DNA の濃度を決定した。

濃縮

1. 中空シリンダーを直径 10 mm および長さ 31 mm で PTFE から圧延した。直径 6 mm および長さ 10.7 mm の内部ウェルを、幅約 1 mm および長さ約 10 mm の細いスロットにテーパリングした。0.5 μ m 孔 PEEK フェルール中フリット (IDEX Corp.) を PTFE カラムの他方の側からねじ込んで、スロットの底部を密封した。100 μ m 穿孔、50 cm 長の FEP キャピラリーチュービング (IDEX Corp.) は、このフェルールを 1.5 ml 微量遠心管に連結して、流出物の収集を可能にした。

【0188】

2. カラムアセンブリをアルミニウムから圧延したカスタム・リグにはめ、そして CP-200HT-TT ペルチェ温度コントローラー (TE Technology, Inc.) に取り付け、正確な温度調節を可能にした。やはりアルミニウムから圧延した蓋をリグ上にねじ込んで、カラム内容物が、圧縮ガス供給源で加圧されることを可能にしてもよい。

【0189】

3. 0.1x SSPE および 0.005% (v/v) N-ラウロイルサルコシンを含有する 250 μ l の洗浄緩衝液をカラム中のウェル内にピペティングした。

4. 蓋を閉め、そしてカラム上部のヘッドスペースを窒素ガスで加圧し、緩衝液を、ウェル、スロット、フリット、およびキャピラリーチュービングから微量遠心管内に押し込んだ。約 5 μ l / 分の流速を 2.5 分間維持して、流動経路を完全にプライミングした。

【0190】

5. 0.5 mg に同等である、25 μ l のあらかじめ調製したマイクロビーズ懸濁物を 10 μ l の洗浄緩衝液に再懸濁し、そしてカラムアセンブリのスロット内、ウェル中の洗浄緩衝液表面より下にピペティングした。

【0191】

6. ヘッドスペースに再加圧して、約 $5\mu\text{l}$ /分の速度で2.5分間、マイクロビーズ懸濁物を駆動した。スロット基部のフリットは、マイクロビーズを捕捉し、これらを直径 1mm および深さ約 0.7mm のベッドに充填させた。

【0192】

7. カラムアセンブリのウェル中に残った洗浄緩衝液を廃棄し、そして $1\times\text{Hi-RPM}$ 緩衝液 (Agilent Technologies, Inc.) および $50\text{ng}/\mu\text{l}$ サケ精子DNA (Life Technologies) からなる $250\mu\text{l}$ のハイブリダイゼーション緩衝液と交換した。

【0193】

8. カラムアセンブリをペルチェ系で 65°C に加熱し、そして上部のヘッドスペースを加圧して、約 $5\mu\text{l}$ /分の速度で、マイクロビーズベッドを通じてハイブリダイゼーション緩衝液を駆動した。この流動を10分間維持して、マイクロビーズおよびカラムアセンブリ内部の他の表面をプレハイブリダイズした (ブロッキングした)。

【0194】

9. 300ng の清浄な増幅DNA試料を、 3.125% (v/v) グリセロール (Sigma-Aldrich Co. LLC) ならびに $10\mu\text{M}$ の $5'$ アダプターブロッキングオリゴヌクレオチド (FB-PreLig-ブロック- $5':5'-\text{ACTCTTTCCTTACACGACGCCTCTTCGATCT}-3'$ (配列番号5); Integrated DNA Technologies, Inc.) および $3'$ アダプターブロッキングオリゴヌクレオチド (FB-PreLig-ブロック- $3':5'-\text{TGGAGTTTCAGACGTGTGCTCTTTCGATCT}-3'$ (配列番号8); Integrated DNA Technologies, Inc.) を補った $8\mu\text{l}$ ハイブリダイゼーション緩衝液に溶解した。

【0195】

10. リグ温度を 25°C に減少させた。

11. このDNA試料を 98°C で5分間変性させ、 65°C に5分間冷却し、そして次いで 4°C で5分間保存した。 65°C 工程によって、ブロッキングオリゴヌクレオチドが、DNA試料中のアダプター配列にハイブリダイズすることが可能になり、濃縮を妨げうる「デジー・チェーン」の形成が防止される。

【0196】

12. 75ng のDNAを含有する $2\mu\text{l}$ の変性DNA試料を、ピペットを用いて、カラムアセンブリのスロット内にピペッティングした。試料中のグリセロールは、ハイブリダイゼーション緩衝液を通じてこれを沈め、そしてマイクロビーズベッド上に収集した。

【0197】

13. リグの温度を 65°C に増加させ、そしてヘッドスペースを再加圧し、DNA試料を約 $5\mu\text{l}$ /分の流速で10分間、マイクロビーズの充填ベッドに通した。

14. リグの温度を 25°C に減少させた。

【0198】

15. カラムアセンブリのウェル中の緩衝剤を、 $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝剤と置き換え、そしてヘッドスペースを再加圧して、マイクロビーズを通じて緩衝剤を約 $30\mu\text{l}$ /分で5分間、駆動した。

【0199】

16. 先の工程を新鮮な洗浄緩衝液でさらに4回反復した。

17. 新鮮な洗浄緩衝液をカラム内にピペッティングし、そしてマイクロビーズベッドを通じて、約 $10\mu\text{l}$ /分、駆動した。緩衝液が流動する際、カラムアセンブリの温度を 95°C に上昇させて、マイクロビーズ表面からハイブリダイズしたDNAを放出させた。この間、カラムアセンブリの流出物を、清浄な 1.5ml 微量遠心管に収集した。

【0200】

濃縮DNAの回収および配列決定

1. 濃縮DNAを、以下を含有する50 μ l「捕捉後」PCRで増幅した：14 μ l 溶出DNA、1 $\times$ AccuBuffer (BioLine)、1mM dNTP混合物 (BioLine)、0.1/ μ l ACCUZYME DNAポリメラーゼ (BioLine)、200nM順方向PCRプライマー (FB-PCR2-5' : 5'-AATGATACGG CGACCAACCGA GATCTACACT CTTTCCCTAC AC GACGCTCT TCCGATC-3' (配列番号9) ; Integrated DNA Technologies, Inc.)、および200nM逆方向PCRプライマー (FB-PCR2-3' -指標39 : 5'-CAAGCAGAAAG ACGGCATACG AGATGCACTT GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGC TC-3' (配列番号10) ; Integrated DNA Technologies, Inc.)。

【0201】

2. 試料を以下のように熱周期処理し：98 $^{\circ}$ C 3分間のホットスタート；16周期の98 $^{\circ}$ C 30秒間、65 $^{\circ}$ C 30秒間、および72 $^{\circ}$ C 1分間；72 $^{\circ}$ C 10分間の最終伸長工程；そして4 $^{\circ}$ Cに冷却した。

【0202】

3. 製造者の指示にしたがって、1.8x比のAgencourt AMPure XPビーズで、増幅DNAを清浄化し、そしてサイズ選択した。溶出体積は30 μ lのヌクレアーゼ不含水であった。

【0203】

4. 清浄な増幅DNAを他の試料とプールし、そして製造者の指示にしたがって、MiSeq卓上配列決定装置 (Illumina Corp.) および600周期のMiSeq試薬キットv3 (Illumina Corp.) を用いて配列決定した。

【0204】

5. 読み取りを100塩基にトリミングして、そして：BWAバージョン0.6.2 [23]、FastQCバージョン0.10.1 (Babraham Institute)、ゲノム分析ツールキットバージョン1.6-13 [24]、Picardバージョン1.104、およびSAMtoolsバージョン0.1.18 [25]に基づくバイオフィンフォマティクスパイプラインを用いて、J02459ラムダファージ参照ゲノムに整列させた。

【0205】結果

ラムダゲノムの1つの領域に相補的な単一の120量体オリゴヌクレオチドを、NHS/アミン化学反応を通じて、マイクロビーズアリコットにコンジュゲート化した。これらのマイクロビーズをPTFEカラム内にパッキングし、これをマイクロビーズより小さい孔サイズを持つ多孔性フリットに組み込んだ。マイクロビーズベッドを通じてハイブリダイゼーション緩衝液をポンピングして、続く非特異的相互作用をブロッキングした。

【0206】

ラムダファージゲノムDNAを超音波によって断片化し、末端修復し、そしてAテール付けした。相補オリゴヌクレオチドをアニーリングして、そして次いで修復した断片に連結することによって、T-オーバーハングを含むアダプター二重鎖を調製した。これらの連結断片を、次いで、PCRによって増幅して、そしてハイブリダイゼーション緩衝液中に再懸濁した。次いで、この試料をマイクロビーズベッド上にピペティングして、そして流動を再開し、DNAをマイクロビーズの間に通し、そしてターゲット断片のハイブリダイゼーションを促進した。ハイブリダイゼーション後、充填ベッドを通じて洗浄緩衝液をポンピングすることによって、非ターゲットDNAを洗い流した。温度を上昇させることによって、マイクロビーズにハイブリダイズしたDNAを放出させた。この溶出工程中のカラムからの流出物を収集し、PCRによって増幅し、そして次いで、NGSによって配列決定した。

【0207】

486, 000対末端読み取りをラムダ参照ゲノムに整列させて、そしてこれを用いて濃縮計量を計算した。図4に示すように、ラムダゲノム中のすべての塩基に対する読み取り数をプロットすると、120bpターゲット領域に対応するスパイクが明らかになった (GenBank J02459、21930-22049)。この領域の読み取り平均数+/-250bp隣接は、残りのゲノムに関しては329であったのに比較して、32, 294読み取りであった。その結果、バイト領域の濃縮は、98倍であり、10分間のハイブリダイゼーション工程で達成された。

【0208】

実施例3：ヒトゲノムにおける多数遺伝子の濃縮

10

プローブ官能化マイクロビーズの調製

以下の修飾を伴い、実施例1に記載するものと同じ方式でマイクロビーズを調製した：876の120量体オリゴヌクレオチドプローブを、各0.5pmol/mgの密度でマイクロビーズにカップリングした。これらのプローブを、GRCh37ヒト参照ゲノム (ゲノム参照コンソーシアム) の5つの遺伝子：ATM (chr11:108098327-108236260)、BRCA1 (chr17:41197670-41276138)、BRCA2 (chr13:32890573-32972932)、PALB2 (chr16:23614755-23652503)、およびTP53 (chr17:7572902-7579937) 中の135領域に対して設計した。プローブは、25bpフランクを含めてすべてのエクソンを被覆し、そして3xの深度までタイリングされた。総ターゲットテリトリーは36.8kbであり、そして総バイトテリトリーは45.5kbであった。

20

【0209】

濃縮のためのDNAの調製

以下の修飾を伴い、DNAを実施例2に記載するものと同じ方式で調製した：ゲノムDNAはヒトであった (Promega Corp.)。

【0210】

濃縮

1. オリゴ・クリーン&濃縮カラム (Zymo Research Corp.) を、アルミニウムから圧延したカスタムリグにはめ、そしてCP-200HT-TTペルチェ温度コントローラー (TE Technology, Inc.) に取り付けて、正確な温度調節を可能にした。やはりアルミニウムから圧延した蓋をリグ上にねじ込んで、カラム内容物が、圧縮ガス供給源で加圧されることを可能にしてもよい。

30

【0211】

2. 1mgに同等である、50µlのあらかじめ調製したマイクロビーズ懸濁物をZymoカラム内にピペティングした。

3. 蓋を閉め、そしてZymoカラム上部のヘッドスペースを50ミリバールに加圧し、懸濁物をカラムに押し込んだ。Zymoカラム中のフリットは、直径約2mmおよび深さ約0.35mmのベッド内にマイクロビーズを収集させた。カラムの流出物は、下に配置した1.5ml微量遠心管に滴り落ちた。圧を2.5分間維持し、緩衝液の全体積をカラム外に押し出したが、マイクロビーズベッド「ダンプ」は残った。

40

【0212】

4. 5.38mM EDTA (Life Technologies)、750ng/µlサケ精子DNA (Life Technologies)、5.44xデンハルト溶液 (Life Technologies)、0.11% SDS (Life Technologies)、5.43xSSPE (Sigma-Aldrich Co. LLC)、10µM FB-PreLig-ブロッカー5'、および10µM FB-PreLig-ブロッカー3'を含有する、ブロッキング緩衝液を調製した。100µlをマイクロビーズベッド上にピペティングした。

【0213】

50

5. Z y m oカラムを、ペルチェ系で65℃に加熱し、そしてその上のヘッドスペースに50ミリバールで2.5分間加圧して、マイクロビーズベッドを通じて、マイクロリットル／分の速度で、ブロッキング緩衝液を駆動した。この工程は、マイクロビーズおよびZ y m oカラム内部の他の表面をプレハイブリダイズした（ブロッキングした）。

【0214】

6. リグの温度を25℃に減少させた。

7. ブロッキング緩衝液と同じ構成要素を含有するが、10倍高い濃度の2つのブロッキングオリゴヌクレオチド（各100μM）を含む、ハイブリダイゼーション緩衝液を調製した。750ngのあらかじめ調製したアダプター修飾DNA試料を、この緩衝液50μlに溶解した。

【0215】

8. 試料を98℃で5分間変性させ、65℃に5分間冷却し、そして次いで、4℃で5分間保存した。

9. 75ngのDNAを含有する5μlの変性DNA試料を、マイクロビーズベッド上にピペッティングした。

【0216】

10. リグの温度を65℃に上昇させ、そしてヘッドスペースを50ミリバールに2.5分間再加圧し、マイクロリットル／分の速度で、マイクロビーズの充填ベッドを通じて、DNA試料を押し出した。

【0217】

11. リグ温度を55℃に減少させた。

12. 0.1% SDSおよび0.1x SSC（Sigma-Aldrich Co. LLC）を含有する洗浄緩衝液を調製した。

【0218】

13. 1μM FB-PreLig-ブロッカー5'および1μM FB-PreLig-ブロッカー3'を補充した200μlの洗浄緩衝液をマイクロビーズベッド上にピペッティングした。ヘッドスペースを50ミリバールに2.5分間再加圧して、マイクロリットル／分の速度で、マイクロビーズを通じて緩衝液を駆動した。

【0219】

14. ブロッキングオリゴヌクレオチドを補充しない洗浄緩衝液の200μlアリコットで、先の工程をさらに7回反復した。

15. リグの温度を25℃に減少させた。

【0220】

16. 100μlの100mM NaOH（Sigma-Aldrich Co. LLC）をマイクロビーズベッド上にピペッティングし、そしてこれらを5分間インキュベーションすることによって、マイクロビーズから、ハイブリダイズしたDNAを溶出させた。

【0221】

17. ヘッドスペースに50ミリバールで5分間再加圧し、そして溶出物を清浄な1.5ml微量遠心管中に収集した。

18. 100μlのTris-HCl、pH7.5（Sigma-Aldrich Co. LLC）を溶出したDNAに添加して、pHを中和した。

【0222】

19. 製造者の指示にしたがって、DNAクリーン&濃縮装置-5カラム（Zymo Research Corp.）を用いて、濃縮したDNAを清浄化した。用いたDNA結合緩衝液：DNA比は7であり、そして溶出体積は、32μlのヌクレアーゼ不含有であった。

【0223】

濃縮DNAの回収および配列決定

1. 濃縮DNAを、以下を含有する50μl「捕捉後」PCRで増幅した：30μl

10

20

30

40

50

清浄濃縮DNA、1×AccuBuffer (Bio line)、1mM dNTP混合物 (Bio line)、0.1/μl ACCUZYME DNAポリメラーゼ (Bio line)、200nM順方向PCRプライマー (FB-PCR2-5':5'-AATGATACGG CGACCAACCGA GATCTACACT CTTTCCCTACACGACGCTCT TCCGATC-3' (配列番号9); Integrated DNA Technologies, Inc.)、および200nM逆方向PCRプライマー (FB-PCR2-3'-指標6:5'-CAAGCAGAAAG ACGGCA TACG AGATGCCAAT GTGACTGGAG TTCAGACGTG TGCTC-3' (配列番号10); Integrated DNA Technologies, Inc.)。

10

【0224】

2. 試料を以下のように熱周期処理し: 98℃3分間のホットスタート; 16周期の98℃30秒間、65℃30秒間、および72℃1分間; 72℃10分間の最終伸長工程; そして4℃に冷却した。

【0225】

3. 増幅したDNAを、製造者の指示にしたがって、DNAクリーン&濃縮装置-5カラム (Zymo Research Corp.) を用いて清浄化した。用いたDNA結合緩衝液: DNA比は5であり、そして溶出体積は、30μlのヌクレアーゼ不含有水であった。

【0226】

4. 清浄な増幅DNAを他の試料とプールし、そして製造者の指示にしたがって、MiSeq卓上配列決定装置 (Illumina Corp.) および150周期のMiSeq試薬キットv3 (Illumina Corp.) を用いて配列決定した。

20

【0227】

5. BWAバージョン0.6.2 [23]、dsSNPビルド135 [26]、FastQCバージョン0.10.1 (Babraham Institute)、ゲノム分析ツールキットバージョン1.6-13 [24]、Picardバージョン1.107、およびSAMtoolsバージョン0.1.18 [25]、VCFtoolsバージョン0.1 [27]、VEPスクリプト [28] に基づくバイオインフォマティクスパイプラインを用いて、75塩基読み取りをGRCh37ヒト参照ゲノムに整列させた。

30

【0228】

結果

ヒトゲノムDNAを超音波によって断片化し、末端修復し、そしてAテール付けした。これらの断片に、アダプター二重鎖を連結し、これを次いで、PCRによって増幅して、そしてハイブリダイゼーション緩衝液中に再懸濁した。次いで、フリットを取り込む使い捨て商業的DNAクリーンアップカラムに充填されたマイクロビーズベッドを通じて、この試料をポンピングした。ヒトゲノム中の5つの遺伝子: ATM、BRCA1、BRCA2、PALB2、およびTP53に対する876オリゴヌクレオチドプローブに、マイクロビーズをコンジュゲート化した。ハイブリダイゼーション後、充填ベッドを通じて洗浄緩衝液をポンピングすることによって、非ターゲットDNAを洗い流した。水酸化ナトリウムでpHを上昇させることによって、なおマイクロビーズにハイブリダイズしているターゲットDNAを放出させた。次いで、放出させたDNAをカラムから収集し、PCRによって増幅し、そして次いで、NGSによって配列決定した。

40

【0229】

3,030,000対末端読み取りをヒトゲノムに整列させて、そしてこれを用いて濃縮計量を計算した。ターゲット領域の平均被覆は236のユニーク読み取りであり、少なくとも50読み取りを有するターゲット塩基が100%であった。「選択された塩基」の割合、すなわちベイトされた領域およびほぼベイトされた領域 (+/-250bp) 内の塩基読み取りは7.16%であった。その結果、ベイトされた領域の濃縮は4000倍であり、2.5分のハイブリダイゼーション工程で達成された。

50

【0230】

実施例4：2つのハイブリダイゼーション工程を用いたヒトゲノムにおける多数遺伝子の濃縮

プローブ官能化マイクロビーズの調製

実施例3に記載するものと同じ方式でマイクロビーズを調製した。

【0231】

濃縮用のDNAの調製

実施例3に記載するものと同じ方式でDNAを調製した。

ハイブリダイゼーション1マイクロビーズの調製および装填

1. カスタム設計ハイブリダイゼーションカラム（多孔性親水性／ポリエチレンフリットを含み、そして2.0mmのカラム厚で孔サイズ7～12μm）をカスタムリグにはめ、そしてペルチェ温度コントローラーに取り付けて、正確な温度調節を可能にした。蓋をリグ上にねじ込んで、カラム内容物が、圧縮ガス供給源で加圧されることを可能にしてもよい。

【0232】

2. 50μlのあらかじめ調製したマイクロビーズ懸濁物（20mg/ml）をフリットのすぐ上の各ハイブリダイゼーションカラムの中心にピペティングした。

3. 蓋を閉め、そしてカラム上部のヘッドスペースを50ミリバールに加圧し、懸濁物をカラムに押し込んだ。カラムの流出物は、下に配置した微量遠心管または96ウェルプレートに滴り落ちた。圧を2.5分間維持し、緩衝液の全体積をカラム外に押し出したが、マイクロビーズベッド「ダンプ」は残った。

【0233】

プレハイブリダイゼーション相

1. 5.38mM EDTA（Life Technologies）、750ng/μlサケ精子DNA（Life Technologies）、5.44xデンハルト溶液（Life Technologies）、0.11% SDS（Life Technologies）、5.43xSSPE（Sigma-Aldrich Co. LLC）、10μM FB-PreLig-ブロッカー5'、および10μM FB-PreLig-ブロッカー3'を含有する、ブロッキング緩衝液を調製した。100μlをマイクロビーズベッド上にピペティングした。

【0234】

2. カラムを、ペルチェ系で65℃に加熱し、そしてその上のヘッドスペースに50ミリバールで2.5分間加圧して、マイクロビーズベッドを通じて、マイクロリットル／分の速度で、ブロッキング緩衝液を駆動した。この工程は、マイクロビーズおよびカラム内部の他の表面をプレハイブリダイズした（ブロッキングした）。

【0235】

3. カラムの流出物は、下に配置した微量遠心管に滴り落ちた。圧を2.5分間維持し、緩衝液の全体積をカラム外に押し出したが、マイクロビーズベッド「ダンプ」は残った。

【0236】

4. 第一のハイブリダイゼーション工程のために、DNA試料を装填する次の相のため、リグ温度を65℃に維持した。

DNAの変性

1. ブロッキング緩衝液と同じ構成要素を含有するが、10倍高い濃度の2つのブロッキングオリゴヌクレオチド（各100μM）を含む、ハイブリダイゼーション緩衝液を調製した。

【0237】

2. 300ngのあらかじめ調製したアダプター修飾DNA試料を乾燥させ、そしてハイブリダイゼーション緩衝液5μlに添加し、次いで短時間ボルテックスし、そして遠

10

20

30

40

50

心分離した。

【0238】

3. このDNA試料を98℃で5分間変性させ、65℃に5分間冷却し、そして次いで、4℃で5分間保存した。

ハイブリダイゼーション相

1. 300 ngのDNAを含有する5 µlの変性DNA試料を、マイクロビーズベッド上にピペッティングした。

【0239】

2. リグの温度をなお65℃にしたまま、ヘッドスペースを50ミリバールに2.5分間再加圧し、DNA試料をマイクロビーズの充填ベッドに通した。

10

リンスおよび洗浄相

1. リグの温度を55℃に減少させた。

【0240】

2. 0.1% SDSおよび0.1xSSC (Sigma-Aldrich Co. LLC) を含有する洗浄緩衝液を調製した。

3. 200 µlのリンス緩衝液(1 µM FB-PreLig-ブロッカー5'および1 µM FB-PreLig-ブロッカー3'を補充した洗浄緩衝液)をマイクロビーズベッド上にピペッティングした。ヘッドスペースを100ミリバールに3.5分間再加圧して、マイクロビーズを通じてリンス緩衝液を駆動した。

【0241】

20

4. ブロッキングオリゴヌクレオチドを補充しない洗浄緩衝液の200 µlアリコットで、先の工程をさらに5回反復した。

溶出相

5. リグの温度を25℃に減少させた。

【0242】

6. 100 µlの100 mM NaOH (Sigma-Aldrich Co. LLC) をマイクロビーズベッド上にピペッティングし、そしてこれらを5分間インキュベーションすることによって、ハイブリダイズしたDNAをマイクロビーズから溶出させた。

【0243】

30

7. ヘッドスペースに50ミリバールで5分間再加圧した。溶出物を微量遠心管または96ウェルプレートブロック中に収集した。

溶出したDNAの中和およびクリーンアップ

8. 100 µlのTris-HCl、pH 7.5 (Sigma-Aldrich Co. LLC) を溶出したDNAに添加し、pHを中和した。

【0244】

19. 製造者の指示にしたがって、DNAクリーン&濃縮装置-5カラム (Zymo Research Corp.) を用いて、濃縮したDNAを清浄化した。用いたDNA結合緩衝液: DNA比は7であり、そして溶出体積は、32 µlのヌクレアーゼ不含有であった。

40

【0245】

捕捉後PCR

1. 各DNA試料を、以下を含有する50 µl「捕捉後」PCRで増幅した: 30 µl 清浄濃縮DNA、1×AccuBuffer (Bioline)、1 mM dNTP混合物 (Bioline)、0.1/µl ACCUZYME DNAポリメラーゼ (Bioline)、200 nM順方向PCRプライマー (FB-PCR2-5': 5'-AATGATACGG CGACCAACCGA GATCTACACT CTTTCCCTAC ACGACGCTCT TCCGATC-3' (配列番号9); Integrate DNA Technologies, Inc.)、および200 nM逆方向PCRプライマー (FB-PCR2-3'-指標1: 5'-CAAGCAGAGA CCGC

50

A T A C G A G A T C G T G A T G T G A C T G G A G T T C A G A C G T G T
G C T C - 3' (配列番号 11))。

【0246】

2. 試料を以下のように熱周期処理し：98℃3分間のホットスタート；20周期の98℃30秒間、65℃30秒間、および72℃1分間；72℃10分間の最終伸長工程；そして4℃に冷却した。

【0247】

3. 増幅したDNAを、製造者の指示にしたがって、DNAクリーン&濃縮装置－5カラム (Zymo Research Corp.) を用いて清浄化した。用いたDNA結合緩衝液：DNA比は5であり、そして溶出体積は、30μlのヌクレアーゼ不含有水であった。

10

【0248】

4. Qubit dsDNA HSアッセイ (Life Technologies) を用いて、清浄な連結DNA試料中のDNA濃度を決定した。

5. 高感度D1K Screen Tapeを用いて、270～320bpの間であるはずのピーク断片サイズを決定した。

【0249】

ハイブリダイゼーション2

ハイブリダイゼーション1から回収した、増幅し清浄化し、そして濃縮した300ngのDNAを用いて、ハイブリダイゼーション1の濃縮プロセスを反復した。回収した試料をさらなる周期の捕捉後PCRに供した。

20

【0250】

濃縮DNAの配列決定

ハイブリダイゼーション2から回収した、増幅し濃縮した清浄DNAをプールし、そして製造者の指示にしたがって、MiSeq卓上配列決定装置 (Illumina Corp.) および150周期MiSeq試薬キットv3 (Illumina Corp.) を用いて配列決定した。

【0251】

結果

ヒトゲノムDNAを超音波によって断片化し、末端修復し、そしてAテール付けした。これらの断片に、アダプター二重鎖を連結し、これを次いで、PCRによって増幅して、そしてハイブリダイゼーション緩衝液中に再懸濁した。次いで、フリットの上部に圧縮されたマイクロビーズベッドを通じて、圧の下で、試料を押し込んだ。Porexフリット (Frit Make: Porex、孔サイズ7～12μm、厚み－2.0mm、材料－XS－82591) を取り込む特注カラムを用いた。特注カラムを、先に用いた使い捨て商業的DNAクリーンアップカラムと交換した。ヒトゲノム中の5つの遺伝子：ATM、BRCA1、BRCA2、PALB2、およびTP53に対する876オリゴヌクレオチドプローブに、マイクロビーズをコンジュゲート化した。各ハイブリダイゼーションはわずか150秒であった。ハイブリダイゼーション後、圧力下で充填ビーズベッドを通じて洗浄緩衝液を押し込むことによって、非ターゲットDNAを洗い流した。水酸化ナトリウムでpHを上昇させることによって、なおマイクロビーズにハイブリダイズしているターゲットDNAを放出させた。次いで、放出させたDNAをカラムから収集し、清浄化し、そしてPCRによって増幅した。

30

40

【0252】

2周期のハイブリダイゼーションを用いた。第一周期のハイブリダイゼーションにおいて、ターゲットDNAはマイクロビーズにハイブリダイズし、そして非ターゲットDNAは洗い流された。pHを上昇させることによってターゲットDNAを放出させ、カラムから収集し、そしてPCRによって増幅した。第二周期のハイブリダイゼーションにおいて、ターゲットDNAはハイブリダイゼーション1からの増幅産物であり、そしてプロトコルは上記と同じ工程にしたがった。

50

【0253】

HapMap DNA 試料で最初のデータセットを生成した (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/hapmap/populations.html>)。すべての試料は、試験した5遺伝子パネルに関して、臨床測定基準を満たした(48試料/MiSeq実行、深度 ≥ 30 で、 $>99\%$ 塩基のターゲット被覆)。ハイブリダイゼーション工程を反復すると、バイト領域の $>14,000$ 倍の濃縮が生じ、すなわち実施例3で用いた単回のハイブリダイゼーション工程よりも3倍を超える改善があった。ターゲット領域の濃縮は特異的で、再現可能であり、そして均一であった(ATM遺伝子に関する結果を示す図5を参照されたい)。平均ターゲット被覆は、 >600 であった。100.0%のターゲット塩基が、 $>30\times$ 深度で被覆された。データを表2に要約する。

【0254】

表2

【0255】

【表2】

試料 番号	総読み取 り	選 択 さ れる 塩 基(%)	平均ター ゲット被 覆	倍濃縮	深度 $\geq$ でのターゲ ット塩基%		重複 (%)
					30 $\times$	50 $\times$	
1	1,940,644	26	616	15230	100.00	99.99	13.4
2	1,654,316	29	573	16803	100.00	99.98	14.4
3	1,799,918	30	651	17483	100.00	100.00	14.0
4	1,654,248	28	563	16201	100.00	100.00	13.0
5	1,840,250	31	738	18184	100.00	100.00	9.8
6	1,577,008	29	558	17240	100.00	100.00	15.3
7	1,916,692	25	635	14815	100.00	100.00	7.7
8	1,618,434	38	740	22620	100.00	100.00	17.6

【0256】

実施例5：全血DNAからの遺伝／生殖系列変異体検出

プローブ官能化マイクロビーズの調製

実施例3に記載するものと同じ方式でマイクロビーズを調製した。

【0257】

濃縮用のDNAの調製

以下の修飾を伴い、実施例3に記載するものと同じ方式でDNAを調製した：ゲノムDNAを全血から抽出した。

【0258】

DNAの濃縮

実施例4に記載するものと同じ方式でDNAを濃縮した。

結果

HapMap DNA 試料を用いた実施例4の実験を、臨床DNA試料で反復した。MiSeqレーンあたり、48試料を処理した。この実験由来のデータを表3に要約する。

【0259】

実施例4に記載するセットアップを用いて、 $>50\%$ 頻度の生殖系列／遺伝変異体を、標準的全血DNA試料から単離したDNA中で検出可能であり、したがって、マイクロビーズに基づくハイブリダイゼーションおよび濃縮が、高品質ゲノムDNA試料において生殖系列／遺伝性変異体を信頼可能に検出するために十分な配列決定深度を生じることが立証された。

【0260】

表3

【0261】

【表3】

試料 番号	総読み取 り	選択さ れる塩 基(%)	平均ター ゲット被 覆	倍濃縮	深度 $\geq$ でのターゲット 塩基%		重複 (%)
					30×	50×	
1	1,363,484	31	382.74	17748	99.87	99.85	33.40
2	1,563,518	24	399.94	13010	99.92	99.88	17.90
3	1,246,672	28	391.10	15809	99.92	99.88	17.31
4	1,317,570	28	351.87	15187	99.92	99.87	25.61
5	1,360,830	26	394.17	14662	99.93	99.89	17.19
6	1,301,994	27	346.98	14944	99.91	99.88	25.33
7	1,418,390	24	338.49	13410	99.89	99.87	25.69
8	1,284,642	26	393.81	15234	99.98	99.92	17.06

【0262】

サンガー配列決定と組み合わせて、Illumina TruSight 癌パネルまたは Fluidigm PCR パネルを用いて、3 遺伝子 (TP53、BRCA1、BRCA2) のサブセットを試験した、45 人の個体由来の臨床試料で、結果を独立に検証した。45 試料のうち44が臨床的に必要な測定基準を満たした。1つの試料のみがこれらの測定基準を満たさず、これは、供給されたDNAが低濃度であったためであった。平均ターゲット被覆は、 >300 で、約50%低かった。倍濃縮は、 $>12,000$ で同等であった。データを表4に要約する。

【0263】

表4

【0264】

【表4】

測定 基準	総読み取 り	選択さ れる塩 基(%)	平均ター ゲット被 覆	倍濃縮	深度 $\geq$ でのターゲッ ト塩基%		重複 (%)
					30×	50×	
最小	961,960	14	174	8,277	99.61	98.87	8.5
平均	1,376,772	22	324	12,629	99.92	99.77	22.1
最大	1,916,802	31	457	17,748	100.00	100.00	41.6

【0265】

両データセットの比較は、実施例4の設定が、高品質の血液由来DNA試料に適用された場合、Illumina TruSight 癌パネルまたは Fluidigm PCR パネルのいずれかで同定され、そしてサンガー配列決定で検証されている変異体の100%を検出可能であることを示した：総数45の臨床試料に渡り、41のユニークな変異体を含む総数461/461。例えば、TP53 遺伝子中の9bp欠失(c. 762_770delCATCACACT)などの欠失が、試験した臨床試料中で明らかに同定された。

【0266】

10

20

30

40

50

実施例 6：全血調製物由来の DNA 中の体細胞変異検出プローブ官能化マイクロビーズの調製

真性多血症（PV）、本態性血小板血症（ET）および骨髓線維症（MF）を含むある範囲の骨髓増殖性新生物に関して、駆動因子突然変異を含有することが知られる 21 の重要な遺伝子に対して設計されたプローブを含むパネルを用いて、実施例 3 に記載するものと同じ方式で、マイクロビーズを調製した。遺伝子内容は、臨床的に関連する突然変異が知られる「ホットスポット」エクソン、ならびに腫瘍抑制因子、遺伝性および高関連研究関連遺伝子のすべてのエクソンをターゲティングする。含まれる遺伝子は、ASXL-1、CBL、CALR、KIT、CSF3R、EZH2、IDH1、IDH2、JAK2、MPL、NRAS、KRAS、RUNX1、SETBP1、SRSF2、TP53、TET2、DNMT3A、U2AF1、SF3B1、SH2Bであり、総ターゲットサイズは、37.6 kb であった。

10

【0267】濃縮用の DNA の調製

実施例 5 に記載するものと同じ方式で、HapMap DNA 試料から DNA を調製した。

【0268】DNA の濃縮

実施例 4 に記載するものと同じ方式で DNA を濃縮した。

結果

20

実施例 4 に記載するセットアップおよび DNA 試料の供給源としての標準的全血を用いて、上記の 21 遺伝子パネルは、任意の遺伝子座の読み取りのわずかな割合でしか観察されない低頻度（>1%）の体細胞変動を検出可能であった。結果は、このセットアップが、優れた品質の DNA 試料において、低頻度を検出する高ストリンジェントな感度を提供することを立証する。

【0269】

濃縮によって、ベイト領域の～10,000 倍の濃縮、すなわち生殖系列 DNA 試料を用いた実施例 4 の濃縮よりわずかに 30% 少ない濃縮が生じた。平均ターゲット被覆は、～1000×であった（表 5 を参照されたい）。表 6 は、12 の HapMap DNA 試料で観察される関心対象の部位に渡る被覆を示す。該データによって、該パネルが MPN 中の関心対象の以下の部位での体細胞突然変異を、信頼性をもって検出可能であることが確認される：JAK2（エクソン 12-AAS536-547）、JAK2（V617F）、MPL（W515）、KIT（D816V）、および TET2（R550）。

30

【0270】

同じセットアップを用いて、臨床研究試料の分析はさらに、パネルが信頼性をもって SNV だけでなく、最大 52 bp の欠失も検出可能であることを示し、こうした情報は特に CALR 遺伝子で有益であった。

【0271】

表 5

【0272】

40

【表 5】

試料番号	総読み取り	選択される塩基(%)	平均ターゲット被覆	倍濃縮	重複 (%)
1	4,408,302	25	1008	12078	20.5
2	4,982,940	15	826	7501	6.2
3	4,630,950	24	1062	11866	18.5
4	5,257,924	27	1372	13240	18.0
5	5,792,398	21	1149	10153	17.8
6	5,146,086	18	944	8771	11.9
7	5,199,820	13	772	6664	5.6
8	5,505,042	24	1182	11395	20.5
9	5,815,684	25	1423	12247	16.6
10	6,047,848	19	1189	9492	13.0
11	4,729,418	24	1149	11733	12.8
12	5,456,088	23	1294	11446	13.4

【 0 2 7 3 】

表 6

【 0 2 7 4 】

【表 6】

名称	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
<i>MPL_W515</i>	546	810	762	1031	964	732	700	982	1234	1055	746	987
<i>KIT_D816V</i>	1142	792	1075	1319	1121	898	721	1119	1375	1098	1197	1189
<i>TET2_R550</i>	834	617	787	1116	879	809	649	819	1144	1026	930	939
<i>JAK2_Exon_12</i>	892	647	833	1013	889	761	546	882	1001	823	918	800
<i>JAK2_V617F</i>	1083	810	1143	1334	1092	958	752	1215	1333	1158	1251	1188

【 0 2 7 5 】

実施例 7 : F F P E 組織由来の D N A における体細胞変異検出

プローブ官能化マイクロビーズの調製

実施例 3 に記載するものと同じ方式でマイクロビーズを調製した。

【 0 2 7 6 】

濃縮用の D N A の調製

以下の修飾を伴い、実施例 3 に記載するものと同じ方式で D N A を調製した：ゲノム D N A をホルマリン固定パラフィン包埋 (F F P E) 癌組織から抽出した。

【 0 2 7 7 】

D N A の濃縮

実施例 4 に記載するものと同じ方式で D N A を濃縮した。

結果

5 遺伝子パネルおよび実施例 4 に記載するセットアップを用いて、 F F P E 組織試料から得た D N A 由来の低頻度 (> 1 %) の体細胞変異体を検出することもまた可能であった。 F F P E 試料は、固形癌診断および科学研究のための生物学的材料の一般的な供給源であるが、重度の分解、損傷および D N A の分子または生物学的修飾につながる調製および／または固定プロセスの結果として、抽出される D N A の品質が劣っているため、研究

が困難である可能性もある。その結果、F F P E 試料はしばしば、少量の使用可能 D N A しか生じない。

【0278】

これらの困難にもかかわらず、実施例 4 に記載するセットアップは、F F P E 乳癌組織由来のターゲット D N A の～6500 倍の濃縮を生じ（表 7 を参照されたい）、すなわち、高品質 D N A 試料を用いた実施例 4 の濃縮より 50 % 低いだけであり、そして全血臨床 D N A 試料を用いた実施例 5 の濃縮より 35 % 低いだけであった。M i S e q レーンあたり 24 試料で、平均ターゲット被覆は～300–500 であった。被覆は、M i S e q レーンあたり 12 試料のみで行う場合二倍になることも可能であり、体細胞変異体コーリングにより適切な 600～1000 ターゲット被覆を生じた。

10

【0279】

表 7

【0280】

【表 7】

試料番号	総読み取り	選択される塩基(%)	平均ターゲット被覆	倍濃縮	重複 (%)
1	3,048,166	11	347	6772	28.2
2	5,102,910	11	515	6362	31.4

20

【0281】

実施例 8：マイクロビーズベッド形成に適したフリットの同定

実施例 3 において、カラム内にマイクロビーズを保持するフリットで反対端をブロッキングしてあるカラムに、マイクロビーズ懸濁物を適用することによって、マイクロビーズベッドを調製した。マイクロビーズベッドの形成を補助する圧力の下で、マイクロビーズを適用した。試料ならびにハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液もまた圧の下で適用して、マイクロビーズベッドの最適配置を維持し、そしてマイクロビーズベッドを通じた流速を調節して、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を最適にすることを可能にした。

【0282】

30

多くの商業的に入手可能な D N A または R N A 精製カラムは、重力流用に、または高速での遠心分離に耐えるように設計されるかいずれかである。これらのカラムの大部分は、実施例 3 に記載するセットアップで使用するには適しておらず、これは、これらが十分な時間、試料を保持しない（重力流の場合）か、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を調節することが困難になっているか、または流動させるために高圧が必要であり（例えばスピンカラム）、実施例 3 で用いる低圧条件下では不適切な低い流速を生じるためである。

【0283】

フリット要件

実施例 3 に記載する微量流体適用に適したフリット材料を同定するため、多様な供給業者からのいくつかの異なる材料を試験した。各材料は、試験に含まれるべき以下の要件を満たしていた：

40

- ・湿潤性を補助する親水性
- ・低 D N A 結合能
- ・D N A / R N A 精製で使用するのに適切
- ・D N A / R N A 不含
- ・> 5 μ m サイズ（実施例 3 で用いたビーズサイズ）のビーズを保持可能な適切な孔サイズ
- ・95 °C の最大温度に耐性

試験

50

空のカラムに挿入するための試験材料を調製するため、フリットを形成するためのパンチ（直径：2.5 mm）でシリンダーを切り取った。新規に形成したフリットをピンセットで空のプラスチックカラムに挿入した。次いでカラムをリグ内に垂直に入れた。2つの試験を実行した。第一の試験において、500 μ lの水をカラム内にピペッティングした。水レベルをフェルトペンでマークした。300秒後、カラムの写真を撮影して水レベルを記録した。300秒の期間、圧を適用せずに流動が生じなかった場合には、試験した材料は、フリットとして使用するために適していると見なされた。

【0284】

第二の試験において、50ミリバールに設定した真空ポンプをカラムの基部に連結した。500 μ lの水をカラム内にピペッティングし、そして水レベルをカラム中に再びマークした（必要な場合）。さらに500 μ lの水をカラム内にピペッティングし、そして真空ポンプのスイッチを入れ、そしてタイマーを開始した。水レベルが500 μ lマークに到達したらタイマーを止め、そして時間を記録した。試験材料は、50ミリバール圧で5～100 μ l／分の流速を可能にする場合、フリットとして使用するために適していると見なされた。

【0285】

結果

ある範囲の18のフリット材料を試験した。適切性要件を満たす2つのフリットタイプを同定し、そしてこれらは本発明を実施するために特に適していることが見出された。フリット特性を表8に要約する。

【0286】

表8

【0287】

【表8】

参照	製造者	孔サイズ	厚み	材料
フリットタイプ1	Porex	7-12 μ m	2.0 mm	XS-82591
フリットタイプ2	ROBU	4-5.5 μ m	2.5 mm	VitraPOR

【0288】

フリットタイプ1は、漏洩を防止するため、小さい孔サイズ（7～12 μ m）を持つ親水性ポリエチレンシート製であった。この材料は、95%エタノールおよび0.1N NaOHに化学的に適合し、そして121℃の最大温度に耐えることが可能であり、このためオートクレーブに適している。この材料から調製したフリットは、カラムに組み立てるのが比較的容易であった。フリットタイプ1を使用すると、50ミリバール圧で優れた流速（30～40 μ l／分）および優れたマイクロビーズベッド特性を生じた。わずかにより大きい孔サイズにもかかわらず、該タイプは、ビーズの優れた保持能を有した。フリットタイプ1を実施例4に記載するセットアップに用いた。

【0289】

フリットタイプ2は、ホウケイ酸ガラス製であった。この材料は最高515℃の温度に耐えることも可能であり、そして水、酸およびアルカリ、塩、有機物質、塩素および臭素に化学的に適合した。このフリットタイプは、流速、マイクロビーズベッド特性およびビーズ保持能に関しては、フリットタイプ1と類似の特性を示した。この材料から調製したフリットは固形であり、カラム内に組み立てた際、形状を維持し、そしてカラム中に挿入した後、平坦な上部表面を有した。

【0290】

本発明が例によってのみ記載されており、そして本発明の範囲および精神内にありなが

ら、修飾を行うことも可能であることが理解されるであろう。

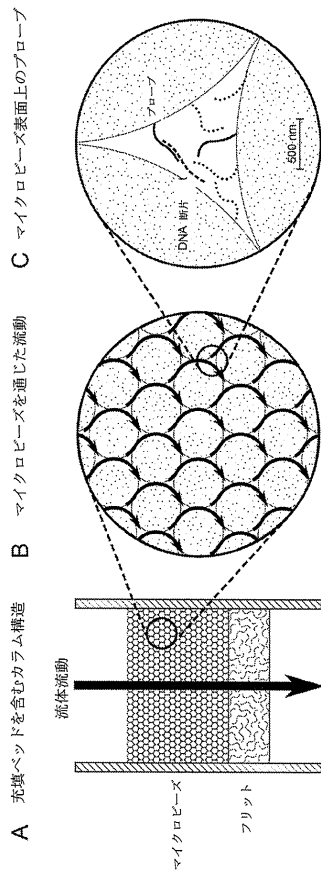
参考文献

【 0 2 9 1 】

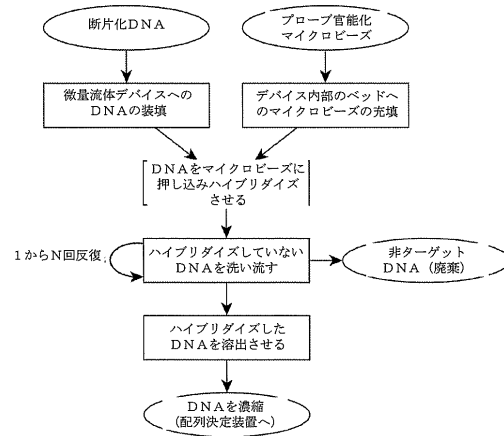
【 化 1 】

- [1] Wei *et al.*, Nucleic Acids Res. 2005 May 12;33(8):e78.
- [2] Peytavi *et al.*, Clin Chem. 2005 Oct;51(10):1836-44.
- [3] Carter *et al.*, Nucleic Acids Res. 2007;35(10):e74.
- [4] Kim *et al.*, Langmuir. 2006 Nov 21;22(24):10130-4. 10
- [5] Summerer *et al.*, Genome Res. 2009 Sep;19(9):1616-21.
- [6] Albert *et al.*, Nat Methods. 2007 Nov;4(11):903-5.
- [7] Hodges *et al.*, Nat Protoc. 2009;4(6):960-74.
- [8] US 2013/0130917
- [9] Knierim *et al.*, PLoS One. 2011;6(11):e28240
- [10] Poptsova *et al.*, Sci Rep. 2014 Mar 31;4:4532
- [11] Supelco Technical Bulletin 862B, Sigma-Aldrich Co. 1996
- [12] Vialard *et al.*, Prenat Diagn. 2011 May;31(5):500-8 20
- [13] García-Herrero *et al.*, Biomed Res Int. 2014;2014:590298
- [14] Manning *et al.*, Genet Med. 2010 Nov;12(11):742-5
- [15] Wincent *et al.*, Clin Genet. 2011 Feb;79(2):147-57
- [16] Mockler *et al.*, Genomics. 2005 Jan;85(1):1-15
- [17] US 6,770,751
- [18] Parkinson *et al.*, Genome Res. 2012 Jan;22(1):125-33
- [19] Sanger *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7
- [20] Maxam & Gilbert, Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Feb;74(2):560-4 30
- [21] Mardis *et al.*, Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif). 2013;6:287-303
- [22] Buermans & den Dunnen, Biochim Biophys Acta. 2014 Jul 1. pii: S0925-4439(14)00180-X
- [23] Li, arXiv:1303.3997v2 [q-bio.GN] (2013).
- [24] McKenna *et al.*, Genome Res. 2010 Sep;20(9):1297-303.
- [25] Li *et al.*, Bioinformatics. 2009 Aug 15;25(16):2078-9
- [26] Sherry *et al.*, Nucleic Acids Res. 2001 Jan 1;29(1):308-11. 40
- [27] Danecek *et al.*, Bioinformatics. 2011 Aug 1;27(15):2156-8.
- [28] McLaren *et al.*, Bioinformatics. 2010 Aug 15;26(16):2069-70.

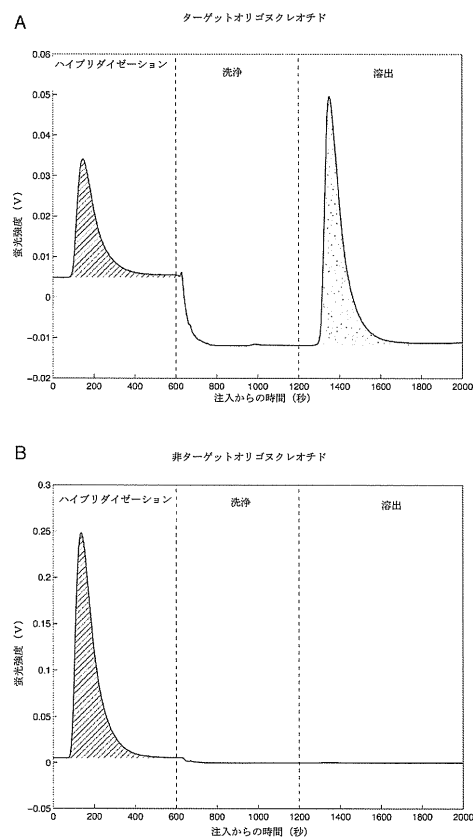
【図 1】



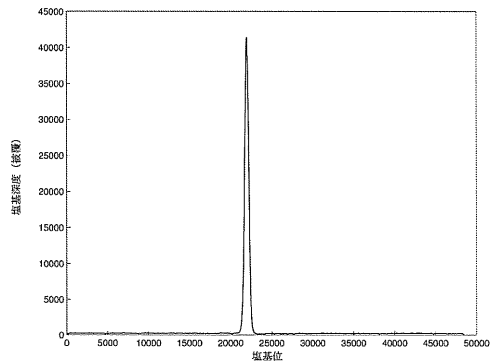
【図 2】



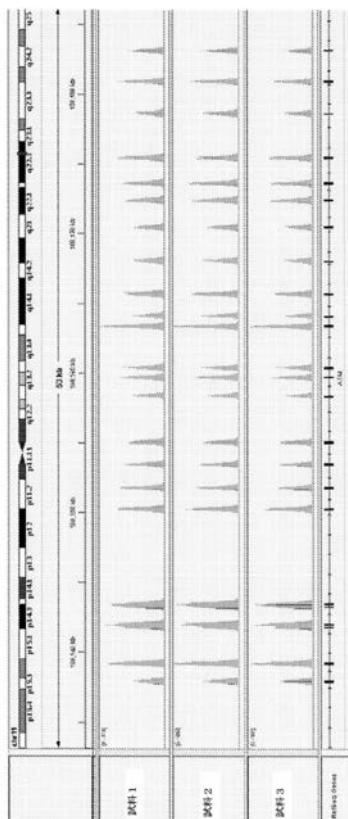
【図 3】



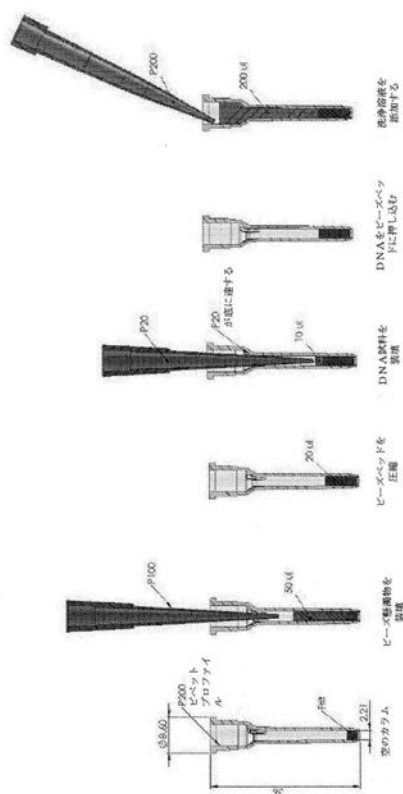
【図 4】



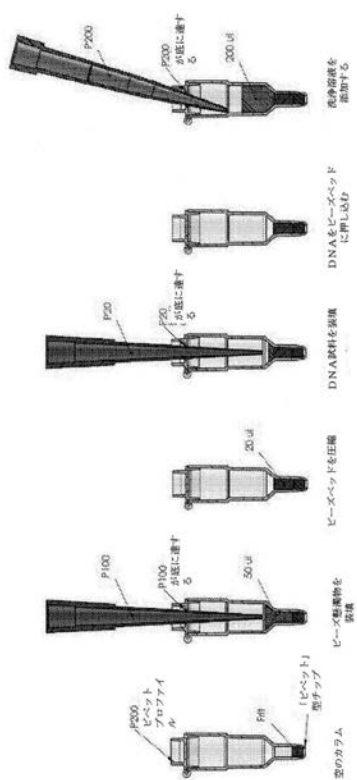
【図 5】



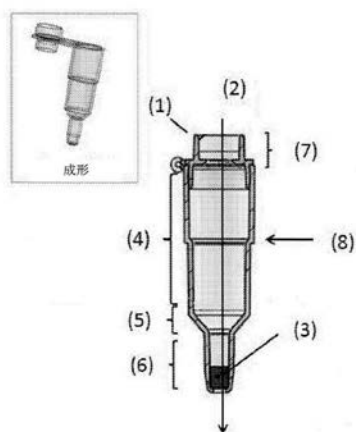
【図 6 A】



【図 6 B】



【圖 7】



【配列表】

2017529069000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/052370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68 C12N15/10
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/130917 A1 (CAI WEI-WEN [US]) 23 May 2013 (2013-05-23) example 8	1-23, 33-36
A	----- BLOW NATHAN: "Genomics: catch me if you can", NATURE METHODS, vol. 6, no. 7, July 2009 (2009-07), pages 539-542, XP055219211, ISSN: 1548-7091 figure 2 -----	6-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier application or patent but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2016

Date of mailing of the international search report

29/01/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Aslund, Fredrik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2015/052370

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-23, 33-36

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2015/ 052370

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-23, 33-36

A hybridisation column comprising an inner channel, wherein a portion of said channel is filled with a porous solid support comprising:(i) a plurality of interconnected, micron-sized voids that permit a fluid to flow between them and the remainder of the channel, and(ii) a plurality of hybridisation probes, which are bound to the surfaces of the solid support forming the voids, wherein the pore structure of the solid support is homogeneous in all dimensions, wherein the solid support fills the entire cross-section of the channel. Furthermore, a microfluidic device as above, and a method for enriching nucleic acids using a porous solid support. Furthermore, a method and a kit for preparing a hybridization column.

2. claims: 24-29

A method of preparing a sample comprising a mixture of nucleic acid molecules for high-throughput sequencing, wherein the method comprises:(i) contacting the sample with a solid support comprising one or more hybridisation probes under conditions that allow for binding of complementary nucleic acid sequences of the nucleic acid molecules and the hybridisation probes;(ii) removing unbound nucleic acid molecules;(iii) contacting the bound nucleic acid molecules with adapter molecules, optionally after releasing the nucleic acids; (iv) joining the bound nucleic acid molecules to the adapter molecules to obtain adapter-terminated nucleic acid molecules; and(v) optionally releasing the adapter-terminated nucleic acid molecules from the solid support.

3. claims: 30-32

A column (1) comprising an inner channel (2) and a porous frit (3), wherein said inner channel (2) is stepwise tapered, dividing the column (1) into a top section (4), a neck section (5) and a bottom section (6), wherein the frit (3) is located in the bottom section (6) of the column (1) and obstructs the entire cross-section of the inner channel (2), wherein the inner channel (2) narrows in the neck section (5) to about 30% to about 50% of the diameter of the inner channel (2) at the top section (4) of the column (1), and wherein the inner channel (2) narrows further in the bottom section (6) to about 20% to about 30% of the diameter of the inner channel (2) at the top section (4) of the column (1).

International Application No. PCT/ GB2015/ 052370

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**4. claims: 37-56**

A microbead comprising more than one set of hybridisation probes, wherein each hybridisation probe in the same set binds to the same region of a genome of an organism, wherein each set binds to a different region in the genome.

The microbead of claim 46, wherein the microbead comprises at least 5, preferably at least 10, more preferably at least 20 different sets of hybridisation probes.

A library comprising a first microbead and a second microbead, wherein said first microbead is linked to a plurality of hybridisation probes which bind to a first oncogene in a genome of an organism, and wherein said second microbead is linked to a plurality of hybridisation probes which bind to a second oncogene in the genome.

A library comprising more than 100 microbeads, wherein each microbead comprises a hybridisation probe that binds to a different region in a genome of an organism.

Information on patent family members

PCT/GB2015/052370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013130917 A1	23-05-2013	NONE	

フロントページの続き

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

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100128750

弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 ミラー, オリバー

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス5・1ピーエフ, ベグブローク, ウッドストック・ロード, ベグブローク・ヒル, ベグブローク・サイエンス・パーク, ケア・オブ・オックスフォード・ジーン・テクノロジー (オペレーションズ) リミテッド

(72)発明者 スパイト, グラハム

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス5・1ピーエフ, ベグブローク, ウッドストック・ロード, ベグブローク・ヒル, ベグブローク・サイエンス・パーク, ケア・オブ・オックスフォード・ジーン・テクノロジー (オペレーションズ) リミテッド

(72)発明者 サウザン, エド

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス5・1ピーエフ, ベグブローク, ウッドストック・ロード, ベグブローク・ヒル, ベグブローク・サイエンス・パーク, ケア・オブ・オックスフォード・ジーン・テクノロジー (オペレーションズ) リミテッド

(72)発明者 マクアンドリュウ, マイク

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス5・1ピーエフ, ベグブローク, ウッドストック・ロード, ベグブローク・ヒル, ベグブローク・サイエンス・パーク, ケア・オブ・オックスフォード・ジーン・テクノロジー (オペレーションズ) リミテッド

(72)発明者 ハード, ダグラス

イギリス国オックスフォードシャー オーエックス5・1ピーエフ, ベグブローク, ウッドストック・ロード, ベグブローク・ヒル, ベグブローク・サイエンス・パーク, ケア・オブ・オックスフォード・ジーン・テクノロジー (オペレーションズ) リミテッド

Fターム(参考) 4B029 AA23 BB01 BB20 GB09 GB10

4B063 QA18 QR32 QR35 QR82