

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7032930号

(P7032930)

(45)発行日 令和4年3月9日(2022.3.9)

(24)登録日 令和4年3月1日(2022.3.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 2 0 0

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 Z Z N A

C 1 2 Q 1/6874(2018.01)

C 1 2 Q 1/6874 Z

C 1 2 Q 1/6848(2018.01)

C 1 2 Q 1/6848 Z

請求項の数 26 (全88頁)

(21)出願番号 特願2017-524429(P2017-524429)

(86)(22)出願日 平成27年11月11日(2015.11.11)

(65)公表番号 特表2017-533710(P2017-533710  
A)

(43)公表日 平成29年11月16日(2017.11.16)

(86)国際出願番号 PCT/EP2015/076353

(87)国際公開番号 WO2016/075204

(87)国際公開日 平成28年5月19日(2016.5.19)

審査請求日 平成30年11月9日(2018.11.9)

(31)優先権主張番号 62/078,346

(32)優先日 平成26年11月11日(2014.11.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/096,464

(32)優先日 平成26年12月23日(2014.12.23)

最終頁に続く

(73)特許権者 502279294

イルミナ ケンブリッジ リミテッド  
英国シービー 2 1 ・ 6 ディエフ、ケンブ  
リッジシャー、ケンブリッジ、グレート  
・アピントン、グランタ・パーク 1 9 番

(74)代理人 100147485

弁理士 杉村 憲司

(74)代理人 230118913

弁理士 杉村 光嗣

(74)代理人 100141601

弁理士 貴志 浩充

(72)発明者 ケヴィン エル ガンダーソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2  
1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ  
5 2 0 0 イラミーナ インコーポレイテ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸のモノクローナルクラスターの生成および配列決定のための方法およびアレイ

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の a ) ~ c ) を有するマイクロアレイであって：

a ) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含む基材；

b ) 少なくとも部分的に前記内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を含む第一層；および

c ) 前記第一キャプチャープライマー対の機能を保持するよう前記第一層および前記ウェルの周りの表面を覆う第二層が含まれ、前記第二層が備わった後、前記第一層中の前記第一キャプチャープライマー対が存在し、

前記第二層はゲル材料を含有する、マイクロアレイ。

## 【請求項 2】

少なくとも以下 ( i ) ~ ( v i i ) のいずれかである、請求項 1 に記載のマイクロアレイ。

( i ) 前記第一層は、前記ウェルの周りの前記表面を覆っていない、

( i i ) 少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、

( i i i ) 前記ウェルの直径は 1  $\mu$ m 未満であり、

( i v ) 前記第一層には、重合体被覆が含まれ、

( v ) 前記第二層には、重合体被覆が含まれ、

( v i ) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である、並びに

( v i i ) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバ

ーサルキャプチャー領域が含まれる。

【請求項 3】

少なくとも以下 ( x i ) ~ ( x v i i ) のいずれかである、請求項 2 に記載のマイクロアレイ。

( x i ) 少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、前記複数のウェルは 7 0 0 n m のピッチで間隔を置かれる、

( x i i ) 前記ウェルの直径は 3 0 n m および 9 0 0 n m の間である、

( x i i i ) 前記第一層には、重合体被覆が含まれ、前記重合体被覆には、ポリ ( N - ( 5 - アジドアセトアミジルペンチル ) アクリルアミド - c o - アクリルアミド ( P A Z A M ) が含まれる、

( x i v ) 前記第二層には、重合体被覆が含まれ、前記重合体被覆には、P A Z A M またはシランフリーアクリルアミド ( S F A ) が含まれる、

( x v ) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の第一プライマーは、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、及び前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の第二プライマーは、配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、

( x v i ) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の前記第二プライマーは、さらにシーケンシングプライマー結合部位 ( S B S ) をさらに含み、

( x v i i ) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の前記第一プライマーは、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスおよび配列番号 5 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、かつ前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の前記第二プライマーは、配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスおよび配列番号 6 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含む。

【請求項 4】

前記第二層には、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対が含まれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 5】

前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は、複数の第二キャプチャープライマー対であり、請求項 4 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 6】

少なくとも以下 ( a 1 ) ~ ( a 4 ) のいずれかである、請求項 5 に記載のマイクロアレイ。

( a 1 ) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーは、3 ' 端にてブロックされる、

( a 2 ) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーは 3 ' リン酸の終端をなす、

( a 3 ) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記 3 ' リン酸終端化プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、

( a 4 ) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記第一プライマーは、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、及び前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記第二プライマーは、配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含む、請求項 5 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 7】

前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーは、3 ' 端にてブロックされない、請求項 4 又は 5 に記載のマイクロアレイ。

【請求項 8】

少なくとも以下 ( b 1 ) ~ ( b 2 ) のいずれかである、請求項 7 に記載のマイクロアレイ。

( b 1 ) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、

( b 2 ) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記第一プライマーは、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、及び前記少なくとも一の第二キャ

10

20

30

40

50

プチャープライマー対の前記第二プライマーは、配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含む。

【請求項 9】

前記複数の第一キャプチャープライマー対の複数のキャプチャープライマー対は各々標的ポリヌクレオチドに付着される、請求項 2 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 10】

少なくとも以下 (c 1) ～ (c 3) のいずれかである、請求項 9 に記載のマイクロアレイ。

(c 1) 前記複数の標的ポリヌクレオチドは、前記少なくとも一のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を形成する、

(c 2) 前記少なくとも一のウェルには、複数のウェルが含まれ、およびそこでは、複数のウェルの二以上のウェルには、標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団が含まれる、

(c 3) (a) 前記複数のウェルの前記二以上のウェルは同一の標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を含む、あるいは (b) 前記複数のウェルの前記二以上のウェルは異なる標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を含む。

【請求項 11】

前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対であり、および前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対であり、およびそこでは、前記複数の第一キャプチャープライマー対および前記複数の第二キャプチャープライマー対の複数のプライマーは、複数の標的ポリヌクレオチドに付着される、請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載のマイクロアレイ。

【請求項 12】

少なくとも以下 (d 1) ～ (d 3) のいずれかである、請求項 11 に記載のマイクロアレイ。

(d 1) 前記複数の標的ポリヌクレオチドは、前記少なくとも一のウェルで標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を形成する、

(d 2) 前記少なくとも一のウェルは、複数のウェルであり、およびそこでは、複数のウェルの二以上のウェルには、標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団が含まれる、(i)

前記複数のウェルの前記二以上のウェルは同一の標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を含む、あるいは (i i) 前記複数のウェルの前記二以上のウェルは異なる標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を含む。

【請求項 13】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および少なくとも部分的に内側ウェル表面が含まれ、そこでは、前記第一層は前記内側ウェル表面を覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を第一層において堆積すること；

c) 前記第一層および前記ウェルの周りの前記表面を覆い、かつゲル材料を含有する第二層を基材上に生成し、前記第二層が備わった後、前記第一層中の前記第一キャプチャープライマー対が存在し、かつ機能的であること、；

d) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、標的ポリヌクレオチドについて前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させること；および

e) ウェルの内側で標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのクロノナル集団を生成するために、第一の運動排除アッセイ (K E A) を実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅される、ことが含まれる、方法。

【請求項 14】

前記複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させる、請求項 13 の方法。

## 【請求項 15】

少なくとも以下 (e1) ~ (e3) のいずれかである、請求項 14 に記載の方法。

(e1) 前記第一 K E A はキャプチャープライマーとハイブリダイゼーションした単一標的ポリヌクレオチドから前記少なくとも一のウェルにおいてアンプリコンのモノクローナル集団を生成する、

(e2) 前記少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、およびそこでは、アンプリコンのモノクローナル集団が単一標的ポリヌクレオチドから複数のウェルの二以上のウェルにおいて生成される、

(e3) (i) アンプリコンのモノクローナル集団は、前記複数のウェルの前記二以上のウェルで、同一の単一標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団から生成される、あるいは (ii) アンプリコンのモノクローナル集団は、前記複数のウェルの前記二以上のウェルで、2 以上の単一標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団から生成される。

10

## 【請求項 16】

第一層はウェルの周りの表面を覆わない、請求項 13 または 14 の方法。

## 【請求項 17】

少なくとも以下 (i) ~ (v) のいずれかである、請求項 13 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

(i) 前記ウェルの直径は 1  $\mu$ m 以下であり、

(ii) 前記少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、

(iii) 前記第一層には、重合体被覆が含まれ、

(iv) 前記第二層には、重合体被覆が含まれ、ならびに

(v) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である。

20

## 【請求項 18】

少なくとも以下 (f1) ~ (f2) のいずれかである、請求項 17 に記載の方法。

(f1) 前記第一層には重合体被覆が含まれ、前記重合体被覆にはポリ (N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド - co - アクリルアミド (PAZAM) が含まれる、

(f2) 前記第二層には重合体被覆が含まれ、前記重合体被覆には PAZAM またはシランフリーアクリルアミド (SFA) が含まれる。

30

## 【請求項 19】

少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を前記第二層において堆積することがさらに含まれる、請求項 13 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 20】

前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である、請求項 19 に記載の方法。

## 【請求項 21】

前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は、前記第一 K E A の実行前に堆積される、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 22】

以下の (i) ~ (v) の少なくともいずれか一つを有する、請求項 13 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(i) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の前記プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる、

(ii) 複数の標的ポリヌクレオチドは一以上の相補的なユニバーサルキャプチャー領域によって隣接される、

(iii) 標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二 K E A を実行することをさらに含み、

(iv) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは 3' 端でアンブロック化される、

50

(v) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は第一 K E A の実行後に堆積される。

【請求項 23】

以下の (g 1) ~ (g 15) の少なくともいづれか一つを有する、請求項 22 に記載の方法。

(g 1) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の前記第一プライマーは、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、かつ前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対の前記第二プライマーは、配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含む、

(g 2) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは 3' 端にてブロックされる、

(g 3) 3' ブロックプライマーはユニバーサルキャプチャー領域を含み、

(g 4) 前記ユニバーサルキャプチャー領域は、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンス又は配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、

(g 5) 第一 K E A を実行した後に前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーをデブロック化することをさらに含み、

(g 6) 前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーは T 4 - キナーゼを用いてデブロック化される、

(g 7) 前記第一キャプチャープライマー対の前記プライマーは S B S をさらに含み、

(g 8) 前記少なくとも一の第一プライマー対の前記第一プライマーは、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスおよび配列番号 5 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、かつ前記少なくとも一の第一プライマー対の前記第二プライマーは、配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスおよび配列番号 6 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、

(g 9) 複数の標的ポリヌクレオチドは一以上の相補的な S B S によって隣接される、

(g 10) 前記少なくとも一の第二プライマー対のプライマーは、ユニバーサルキャプチャー領域を含み、

(g 11) 前記ユニバーサルキャプチャー領域は配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンス又は配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、

(g 12) 前記第一 K E A は、少なくとも一のウェルを超えてアンプリコンの前記クローン集団を増大するために、延長された時間の間実行される、

(g 13) 前記少なくとも一の第一キャプチャープライマー対および前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の前記プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれ、

(g 14) 前記ユニバーサルキャプチャー領域は、配列番号 1 番で表される又は配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスを含み、

(g 15) 少なくとも一のウェルを超えて標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローン集団を増大するために、ブリッジ増幅または第二 K E A を実行することをさらに含む。

【請求項 24】

核酸を増幅するにあたり、次の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、前記基材には、少なくとも一のウェル、前記ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、前記第一層は前記内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を前記第一層において堆積することであり、そこでは、前記第一キャプチャープライマー対には、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

c) 前記第一層およびウェルの周りの表面を覆い、かつゲル材料を含有する第二層を、前記基材にて生成すること；

10

20

30

40

50

d) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を前記第二層において堆積することであり、そこでは、前記第二キャプチャープライマー対は、3'リン酸の末端をなし、および配列番号1番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび配列番号2番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、標的ポリヌクレオチドは、相補的な配列番号3番で表されるヌクレオチドシーケンスまたは相補的な配列番号4番で表されるヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なユニバーサルプライマー領域によって隣接され；

f) 少なくとも一のウェルの内側で前記単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するために、第一KEAを実行することであり、それによって前記標的ポリヌクレオチドが増幅され；

g) 前記第二プライマー対の前記プライマーをデブロック化するために、基材をT4キナーゼと接触させること；および

h) ウェルを超えて前記単一標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクロノナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二KEAが実行されることが含まれる、方法。

#### 【請求項25】

核酸を増幅するにあたり、以下の：

a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材には、少なくとも一のウェル、前記ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、前記第一層は前記内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；

b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を前記第一層において堆積することであり、そこでは、前記第一キャプチャープライマー対には、配列番号1番で表されるヌクレオチドシーケンスおよび配列番号5番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび配列番号2番で表されるヌクレオチドシーケンスおよび配列番号6番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

c) 前記第一層および前記ウェルの周りの前記表面を覆い、かつゲル材料を含有する第二層を前記基材にて生成すること；

d) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を前記第二層において堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対には、配列番号1番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび配列番号2番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；

e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、複数の標的ポリヌクレオチドは、相補的な配列番号7番で表されるヌクレオチドシーケンスまたは相補的な配列番号8番で表されるヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なSBSによって隣接され；および

f) 少なくとも一のウェルの内側および外側で前記単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するために、KEAを延長された時間の間実行することであり、それによって前記単一標的ポリヌクレオチドがウェルの内側で増幅され、および標的ポリヌクレオチドの前記モノクロノナル集団が前記少なくとも一のウェルを超えて増大することが含まれる、方法。

#### 【請求項26】

核酸を増幅するにあたり、次の：

10

20

30

40

50

- a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、前記基材には、少なくとも一のウェル、前記ウェルの周りの表面、および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、前記第一層は前記内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；
- b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を前記第一層において堆積することであり、そこでは、第一プライマー対には、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；
- c) 前記第一層および前記ウェルの周りの前記表面を覆い、かつゲル材料を含有する第二層を基材にて生成すること；
- d) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションするのに十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、複数のポリヌクレオチドは、相補的な配列番号 3 番で表されるヌクレオチドシーケンスまたは相補的な配列番号 4 番で表されるヌクレオチドシーケンスを各々含む相補的なユニバーサルプライマー領域によって隣接され；
- e) 少なくとも一のウェルの内側で前記単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するために、第一 K E A を実行することであり、それによって前記標的ポリヌクレオチドが増幅され；
- f) 少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を前記第二層において堆積することであり、そこでは、前記少なくとも一の第二キャプチャープライマー対には、配列番号 1 番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよび配列番号 2 番で表されるヌクレオチドシーケンスが含まれる 3' 部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；および
- g) 前記単一標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクロノナル集団を増大させるために、ブリッジ増幅または第二 K E A を実行すること
- が含まれる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

この出願は、核酸配列決定のための方法および組成物に関し、2014年11月11日付け出願の米国仮出願第62/078346号および2014年12月23日付け出願の米国仮出願第62/096464号について優先権を主張する。

【0002】

分野

本開示は、分子生物学の分野に、およびより一層具体的には、固形物表面での標的ポリヌクレオチドをキャプチャリングおよび増幅するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

次世代配列決定（次世代シーケンシングとも言う）は全ゲノム配列決定および全ゲノム解析を可能にした。次世代配列決定の方法は、第一にユニバーサル（普遍的なとも言う）増幅領域を備え、そして次に固体表面上のユニバーサルキャプチャープライマーによって無差別に捕捉されるゲノムフラグメントの普遍的な増幅に依存することが多い。ユニバーサルキャプチャープライマーは、次世代配列決定法における有用な要素であるポリヌクレオチドキャプチャーおよびブリッジ増幅の双方を媒介する（例は、国際公開第WO2011/025477A1、米国特許出願公開第US2011/0172119A1明細書を参照）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在の多くの方法はゲノム全体の配列決定を効果的に支持することができるが、それらは

10

20

30

40

50

概して、特定のポリヌクレオチドの標的化される捕捉を可能とせず、そして従って、たとえば、部分ゲノムの標的化される配列決定を一般に支持しない。しかしながら、たとえば、生物のエキソームまたはトランスクリプトームの特定の画分の標的配列決定を容易にする方法の必要性が高まっている。この必要性は、部分的にはコストだけでなく、データ処理の考慮事項によっても左右される。

【課題を解決するための手段】

【0005】

したがって、部分ゲノムの標的化された次世代配列決定を可能にする新しい方法について必要性が存在する。本開示は、表面での固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法を提供することによってこの必要性に対処する。関連する利点も同様に提供される。

10

【0006】

概略

ここには、固定化キャプチャープライマーを修飾するマイクロアレイおよび方法が提供される。

【0007】

一態様において、ここには、マイクロアレイが提供され、それには：a) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面 (inner well surface) を含む基材；b) 内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を含む第一層；およびc) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層が含まれる。

20

【0008】

いくらかの実施態様において、ウェルの直径は約1  $\mu\text{m}$ 未満である。

【0009】

いくらかの実施態様では、ウェルの直径は約400nmである。

【0010】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である。

【0011】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる。

30

【0012】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーには、シーケンシングプライマー結合部位 (sequencing primer binding site、SBS) がさらに含まれる。

【0013】

いくらかの実施態様では、第二層には、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対が含まれる。

【0014】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である。

40

【0015】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3' 端 (-end) にてブロックされる。

【0016】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3'-リン酸-終端をなす (3'-phosphate-terminated)。

【0017】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対の3'-リン酸の終端化 (3'-phosphate terminated) プライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域が含まれる。

50



## 【 0 0 1 8 】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3' 端にてブロックされない。

## 【 0 0 1 9 】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーはユニバーサルキャプチャー領域を含む。

## 【 0 0 2 0 】

いくらかの実施態様では、複数の第一キャプチャープライマー対の複数のキャプチャープライマーはそれぞれ標的（ターゲットとも言う）ポリヌクレオチドに付着される。

## 【 0 0 2 1 】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは少なくとも一のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成する。

10

## 【 0 0 2 2 】

いくらかの実施態様では、少なくとも一のウェルは複数のウェルを含み、およびそこでは、複数のウェルの二またはそれよりも多く（二以上とも言う）のウェルは標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

## 【 0 0 2 3 】

いくらかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは、同じ標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

## 【 0 0 2 4 】

いくらかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは、二以上の異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

20

## 【 0 0 2 5 】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対であり、および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対であり、およびそこでは、複数の第一キャプチャープライマー対および複数の第二キャプチャープライマー対の複数のプライマーは複数の標的ポリヌクレオチドに付着されている。

## 【 0 0 2 6 】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは少なくとも一のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成する。

30

## 【 0 0 2 7 】

いくらかの実施態様では、少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、複数のウェルの二以上のウェルは標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

## 【 0 0 2 8 】

いくらかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは同じ標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

## 【 0 0 2 9 】

いくらかの実施態様において、複数のウェルの二以上のウェルは、二以上の異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

40

## 【 0 0 3 0 】

別の態様では、ここには、a) 少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含む基材；およびb) 内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一の第一キャプチャープライマー対および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を含む層が含まれるマイクロアレイが提供される。

## 【 0 0 3 1 】

いくらかの実施態様では、ウェルの直径は約1  $\mu\text{m}$ 以上である、国際出願時のクレーム38のマイクロアレイがある。

## 【 0 0 3 2 】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第

50

ーキャプチャープライマー対である。

【0033】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である。

【0034】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーはユニバーサルキャプチャー領域を含む。

【0035】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーはユニバーサルキャプチャー領域およびSBSを含む。

【0036】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対であり、および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対であり、およびそこでは、複数の第一キャプチャープライマー対および複数の第二キャプチャープライマー対の複数のプライマーは複数の標的ポリヌクレオチドに付着される。

【0037】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは少なくとも一のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成する。

【0038】

いくらかの実施態様において、少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、およびそこでは、複数のウェルの二以上のウェルは標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

【0039】

いくらかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルの各々は同じ標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

【0040】

いくらかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは二以上の異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

【0041】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含み、第一層は内側ウェル表面を覆い；b) 少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を第一層に堆積すること；c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；d) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイズさせるために、標的ポリヌクレオチドにとって十分な条件下で、基材と接触させること、およびe) ウェルの内側で標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、第一の運動排除アッセイ (first kinetic exclusion assay) (KEA) (キネティック排除法または結合平衡除外アッセイとも言う) を実行し、それによって標的ポリヌクレオチドを増幅することが含まれる。

【0042】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルは、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーとハイブリダイズさせるために、ウェル当たり単一の標的ポリヌクレオチドに十分な条件下で、基材と接触させられる。

【0043】

いくらかの実施態様では、第一KEAは、少なくとも一のウェルのキャプチャープライマーとハイブリダイズする単一の標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 4 】

いくらかの実施態様では、少なくとも一のウェルは複数のウェルであり、およびアンプリコンのモノクローナル集団は複数のウェルの二以上のウェルにおいて単一標的ポリヌクレオチドから生成される。

## 【 0 0 4 5 】

いくらかの実施態様では、アンプリコンのモノクローナル集団は複数のウェルの二以上のウェルにおいて同じ単一の標的ポリヌクレオチドから生成される。

## 【 0 0 4 6 】

いくらかの実施態様では、アンプリコンのモノクローナル集団は複数のウェルの二以上のウェルにおいて二以上の単一標的ポリヌクレオチドから生成される。

10

## 【 0 0 4 7 】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対は複数の第一キャプチャープライマー対である。

## 【 0 0 4 8 】

いくらかの実施態様では、本方法は第二層において少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を堆積することをさらに含む。

## 【 0 0 4 9 】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は複数の第二キャプチャープライマー対である。

## 【 0 0 5 0 】

いくらかの実施態様では、第一KEAを実行するのに先立ち少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を堆積する。

20

## 【 0 0 5 1 】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーはユニバーサルキャプチャー領域を含む。

## 【 0 0 5 2 】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは一以上の相補的なユニバーサルキャプチャー領域によって隣接される。

## 【 0 0 5 3 】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3'端にてブロックされる。

30

## 【 0 0 5 4 】

いくらかの実施態様では、3'ブロックプライマーはユニバーサルキャプチャー領域を含む。

## 【 0 0 5 5 】

いくらかの実施態様では、本方法は、第一KEAを実行して後に少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーをデブロック化（脱ブロック化とも言う）することをさらに含む。

## 【 0 0 5 6 】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーはT4-キナーゼを用いてデブロック化される。

40

## 【 0 0 5 7 】

いくらかの実施態様では、本方法は、標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローナル集団（クローン集団とも言う）を増大させるために、ブリッジ増幅または第二KEAを実行することをさらに含む。

## 【 0 0 5 8 】

いくらかの実施態様では、第一キャプチャープライマー対のプライマーはSBSをさらに含む。

## 【 0 0 5 9 】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは一以上の相補的なSBSによって隣接される。

50

## 【0060】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーは3'端でアンブロック化（非ブロック化とも言う）される。

## 【0061】

いくらかの実施態様では、少なくとも一の第二プライマー対のプライマーは、ユニバーサルキャプチャー領域を含む。

## 【0062】

いくらかの実施態様において、第一KEAは、少なくとも一のウェルを超えてアンブリコンのクローン集団を増大するために、長期間にわたって実行される。

## 【0063】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は第一KEAを実行して後堆積される。

## 【0064】

いくらかの実施態様において、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対および少なくとも一の第二キャプチャープライマー対のプライマーはユニバーサルキャプチャー領域を含む。

## 【0065】

いくらかの実施態様では、本方法は、少なくとも一のウェルを超えて標的ポリヌクレオチドアンブリコンのクローン集団を増大するために、ブリッジ増幅または第二KEAを実行することをさらに含む。

## 【0066】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ、a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面が含まれ、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b) 第一層において少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を堆積することであり、そこでは、第一キャプチャープライマー対は、Illumina(R) (イルミナ、商標) P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマー、およびIllumina(R) P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマー対が含まれ；c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；d) 第二層において少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を堆積することであり、そこでは、第二キャプチャープライマー対は3'リン酸-終端をなし、およびIllumina(R) P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよびIllumina(R) P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；e) 複数の標的ポリヌクレオチドが含まれるサンプルを、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイズさせるために、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり十分な条件下に基材と接触させることであり、そこでは、標的ポリヌクレオチドは相補的ユニバーサルプライマー領域で各々が相補的なIllumina(R) P5'プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的なIllumina(R) P7'プライマーヌクレオチドシーケンスを含むものによって隣接され；f) 少なくとも一のウェルの内側の単一標的ポリヌクレオチドからのアンブリコンのモノクローナル集団を生成するために、第一KEAを実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅され；g) 第二プライマー対のプライマーをデブロック化するために、基材をT4キナーゼと接触させること、およびh) 単一標的ポリヌクレオチドのアンブリコンのモノクローナル集団を、ウェルを超えて増大させるために、ブリッジ増幅または第二KEAを実行することである。

## 【0067】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ、a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材は少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b) 第一層において少なくとも一の第一キャプチャープ

10

20

30

40

50

ライマー対を堆積することであり、そこでは、第一キャプチャープライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS3プライマーを含め3'部分が含まれる複数の少なくとも一の第一キャプチャープライマー、およびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分が含まれる複数の少なくとも一の第二キャプチャープライマーを含み；c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基板に生成すること；d) 第二層において少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対には、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよびIllumina(R)P7ヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーが含まれ；e) 複数の標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを、少なくとも一の第一のキャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションさせるために、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり十分な条件下に、基材と接触させることであり、そこでは、複数の標的ポリヌクレオチドは、相補的SBSであって各々が相補的Illumina(R)SBS3'プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的Illumina(R)SBS8'プライマーヌクレオチドシーケンスを含むものによって隣接され、およびf) 少なくとも一のウェルの内側および外側の単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するために、長時間KEAを実行することであり、それによってウェル内の単一の標的ポリヌクレオチドが増幅され、および少なくとも一のウェルを超えて標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団が増大されることである。

#### 【0068】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ、a) 基材にて第一層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面、および内側ウェル表面を含み、そこでは、第一層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b) 第一層において少なくとも一の第一キャプチャープライマー対を堆積することであり、そこでは、第一プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーを含み；c) 第一層およびウェルの周りの表面を覆う第二層を基材にて生成すること；d) 複数の標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマーとハイブリダイゼーションさせるために、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり十分な条件下に、基材と接触させることであり、そこでは、複数のポリヌクレオチドは、相補的ユニバーサルプライマー領域であって各々が相補的Illumina(R)P5'プライマーヌクレオチドシーケンスまたは相補的Illumina(R)P7'プライマーヌクレオチドシーケンスを含むものによって隣接され；e) 少なくとも一のウェルの内側で単一標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するために、第一KEAを実行することであり、それによって、標的ポリヌクレオチドが増幅され；f) 第二層において少なくとも一の第二キャプチャープライマー対を堆積することであり、そこでは、少なくとも一の第二キャプチャープライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第一キャプチャープライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含め3'部分を含む複数の第二キャプチャープライマーを含み、およびg) 単一標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクロノナル集団を増大するために、ブリッジ増幅または第二KEAを実行することである。

#### 【0069】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ、a) 基材にて層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも一のウェル、ウェルの周りの表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、ウェルは約1μm以上の直径を有し、およびそこでは、層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b) 層において少なくとも一の第一キャプチャープライマー対および少なくとも一の第二キャプチ

ャープライマー対を堆積させることであって、そこでは、少なくとも一の第一キャプチャープライマー対のプライマー密度は少なくとも第二プライマー対のプライマー密度より高く；c) 複数の標的ポリヌクレオチドを含むサンプルを、第二プライマーとハイブリダイゼーションさせるために、単一標的ポリヌクレオチドについてウェルあたり十分な条件下に接触させること、およびd) ウェルの内側で第二プライマーにハイブリダイズされた単一標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、KEAを実行することであり、それによって、単一標的ポリヌクレオチドが増幅されることである。

【0070】

別の態様では、ここには、固定化キャプチャープライマーを修飾する方法が提供され、それには、次のことが含まれ、a) 複数の固定化されたキャプチャープライマーを含む基材を、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数の固定化されたキャプチャープライマーは、5'末端(-terminal)ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーを含み、およびそこでは、各鋳型核酸は、5'末端および3'末端のユニバーサルキャプチャー領域YまたはZによって隣接され、および一以上の制限部位および5'末端ユニバーサルキャプチャー領域および一以上の制限部位の間または3'末端ユニバーサルキャプチャー領域および一以上の制限部位の間の標的特異的キャプチャー領域を含み、およびb) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化伸長生成物(immobilized extension products)を生成するために、一以上の固定化キャプチャープライマーを伸長することである。

【0071】

いくらかの実施態様では、各鋳型核酸の標的特異的キャプチャー領域は5'末端ユニバーサルキャプチャー領域および一以上の制限部位の間にある。

【0072】

いくらかの実施態様では、各鋳型核酸は二の制限部位および二の制限部位の間のスペーサー領域を含む。

【0073】

いくらかの実施態様では、二の制限部位はSapI部位である。

【0074】

いくらかの実施態様において、スペーサー領域は約150塩基を含む。

【0075】

いくらかの実施態様では、基材は複数のパッドを含むパターン化フローセルである。

【0076】

いくらかの実施態様では、各パッドは、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数の固定化ユニバーサルキャプチャープライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数の固定化ユニバーサルキャプチャープライマーを含む。

【0077】

いくらかの実施態様では、複数のパッドのパッドごとに単一固定化伸長生成物が生成される。

【0078】

いくらかの実施態様では、パッドごとに製造された単一固定化伸長生成物は複数のパッドのすべてのパッドにおいて同じ鋳型核酸に相補的である。

【0079】

いくらかの実施態様では、パッドごとに生成される単一固定化伸長生成物は複数のパッドの二以上のパッドにおいて二以上の異なる鋳型核酸に相補的である。

【0080】

いくらかの実施態様では、パッドあたりに生成される単一固定化伸長生成物は、複数のパッドの少なくとも1%、少なくとも3%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも

10

20

30

40

50

も70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のパッドの各一において異なる鋳型核酸に相補的である。

【0081】

いくらかの実施態様では、単一固定化伸長生成物は、パッドの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%より多くにおいて生成される。

【0082】

いくらかの実施態様では、単一固定化伸長生成物はパッドの100%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、または1%未満において生成される。

10

【0083】

いくらかの実施態様では、本方法は、固定化二重鎖鋳型核酸の一以上のモノクローナルクラスタを生成するために、一以上の固定化伸長生成物をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅することをさらに含む。

【0084】

いくらかの実施態様では、PCRによる増幅には、ブリッジ増幅またはKEAが含まれる。

【0085】

いくらかの実施態様では、本方法は、複数の固定化二重鎖鋳型核酸の一以上の制限部位を切断してユニバーサルキャプチャー領域および標的特異的キャプチャー領域を含む複数の固定化二重鎖キメラキャプチャープライマーおよび複数の二重鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマー(double-stranded immobilized regenerated universal capture primers)を生成するために、固定化二重鎖鋳型核酸の一以上のモノクローナルクラスタを制限酵素と接触させることをさらに含む。

20

【0086】

いくらかの実施態様では、本方法は、複数の一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよび一本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、複数の固定化二重鎖キメラキャプチャープライマーおよび二重鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを熱変性させることをさらに含む。

【0087】

いくらかの実施態様では、本方法は、複数の一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよび一本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、複数の固定化二本鎖キメラキャプチャープライマーおよび二本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを、5'-3'二重鎖デオキシリボ核酸(dsDNA)エキソヌクレアーゼと接触させることをさらに含む。

30

【0088】

いくらかの実施態様では、基材は複数のパッドを含むパターン化フローセルである。

【0089】

いくらかの実施態様では、各パッドは3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数のキャプチャープライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のユニバーサルキャプチャープライマーを含む。

40

【0090】

いくらかの実施態様では、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含むキャプチャープライマーの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%より多くは、複数のパッドの一以上のパッドにおいて一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーに変換される。

【0091】

いくらかの実施態様では、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含むキャプチャープライマーの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%より多くは、複数のパッドの一以上のパッドにおいて一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーに変換される。

50

## 【0092】

いくつかの実施態様では、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含むキャプチャープライマーの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%よりも多くは、一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーに変換され、および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含むキャプチャープライマーの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%よりも多くは、複数のパッドの一以上のパッドにおいて一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーに変換される。

## 【0093】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ：a) 複数の固定化されたキャプチャープライマーを含む基材を、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数の固定化されたキャプチャープライマーは、3'末端Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含む第一の複数のプライマーおよび3'末端Illumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含む第二の複数のプライマーを含み、およびそこでは、各鋳型核酸は、3'末端相補的Illumina(R)P5'プライマーヌクレオチドシーケンスおよび5'末端相補的Illumina(R)P7'プライマーヌクレオチドシーケンスによって隣接され、および二のSapI制限部位、SapI制限部位の間のスペーサー領域、および3'末端相補的Illumina(R)P5'プライマーヌクレオチドシーケンスおよびSapI制限部位の間の標的特異的キャプチャー領域を含み；およびb) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、一以上の固定化されたキャプチャープライマーを伸長すること。c) 固定化された二重鎖鋳型核酸の一以上のモノクロナルクラスターを生成するために、ブリッジ増幅またはKEAによって一以上の固定化された伸長生成物を増幅すること；d) 固定化された二重鎖鋳型核酸の一以上のモノクロナルクラスターを、複数の固定化された二重鎖鋳型核酸において二の制限部位を切断してIllumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスおよび標的特異的キャプチャー領域を含む複数の固定化された二重鎖キメラキャプチャープライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含む複数の固定化された二重鎖再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、SapIと接触すること、およびe) 随意に、複数の固定化された二重鎖キメラキャプチャープライマーおよび固定化された二重鎖再生ユニバーサルキャプチャープライマー (immobilized double-stranded regenerated universal capture primers) を、複数の固定化された一本鎖キメラキャプチャープライマーおよび複数の固定化された一本鎖再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、5'-3' dsDNAエキソヌクレアーゼと接触させることである。

## 【0094】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、そこでは、次のことが含まれ：a) 複数の固定化されたキャプチャープライマーを含む基材を、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数の固定化されたキャプチャープライマーは、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーを含み、およびそこでは、各鋳型核酸は、5'末端および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域YまたはZによって隣接され、および一以上の制限部位および一以上の制限部位および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域の間の標的特異的キャプチャー領域を含み；b) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、一以上の固定化されたキャプチャープライマーを伸長させること；c) 固定化された二重鎖鋳型核酸の一以上のモノクロナルクラスターを生成するために、PCRによって一以上の固定化された伸長生成物を増幅すること；d) 複数の固定化された二重鎖鋳型核酸において一以上の制限部位を切断してユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的特異的キャ

10

20

30

40

50



プチャー領域を含む複数の固定化された二重鎖キメラキャプチャープライマー、およびユニバーサルキャプチャー領域Yを含む複数の固定化された二重鎖再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、固定化された二重鎖鋳型核酸の一以上のモノクロールクラスターを制限酵素と接触させることである。

【0095】

いくらかの実施態様では、一以上の固定化された伸長生成物を増幅することには、ブリッジ増幅またはKEAが含まれる。

【0096】

いくらかの実施態様では、本方法は、複数の一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを形成するために、複数の固定化された二重鎖キメラキャプチャープライマーおよび複数の固定化された二重鎖再生ユニバーサルキャプチャープライマーを変性することを含む。

10

【0097】

いくらかの実施態様では、鋳型核酸は標的特異的部分および3'部分の間にSBSをさらに含む。

【0098】

いくらかの実施態様では、複数の固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーは3'末端の部分的な制限部位 (terminal partial restriction site) を含む。

【0099】

いくらかの実施態様では、本方法は、複数の固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーから3'末端の部分的な制限部位を除去することをさらに含む。

20

【0100】

いくらかの実施態様では、複数の固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーは予め定められる (所定のとも言う) 開裂部位を含む。

【0101】

いくらかの実施態様では、所定の開裂部位は、ジオールリンカー、8-オキソグアニン (8-オキソ-G)、ウラシル塩基、リボヌクレオチド、メチル化ヌクレオチド、またはペプチドを含む。

【0102】

いくらかの実施態様では、部分的な制限部位を除去することは非酵素的な化学的開裂 (non-enzymatic chemical cleavage) を含む。

30

【0103】

いくらかの実施態様では、非酵素的な化学的開裂には、過ヨウ素酸処理、希土類金属イオン処理、アルカリ処理または光化学反応が含まれる。

【0104】

いくらかの実施態様において、3'末端の部分的な制限部位を除去することは酵素的開裂を含む。

【0105】

いくらかの実施態様では、酵素的開裂には、ウラシル-DNAグリコシラーゼ開裂、エンドヌクレアーゼ開裂、リボヌクレアーゼ (RNアーゼ) 処理、制限酵素開裂またはプロテアーゼ開裂が含まれる。

40

【0106】

いくらかの実施態様において、3'末端の部分的な制限部位を除去することには、二本鎖ユニバーサルキャプチャー領域Yを形成するために、逆相補的オリゴヌクレオチドを一本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーにハイブリダイゼーションさせることが含まれる。

【0107】

いくらかの実施態様では、本方法は、二重鎖固定化キメラキャプチャープライマーを形成するために、逆相補的オリゴヌクレオチドを一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーにハイブリダイズさせることがさらに含まれる。

50

## 【0108】

いくらかの実施態様では、本方法は、3'末端の部分的な制限部位を除去するために、基材をヌクレアーゼと接触させることをさらに含む。

## 【0109】

いくらかの実施態様では、ヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼである。

## 【0110】

いくらかの実施態様では、固定化された二重鎖キメラキャプチャープライマーの3'末端標的特異的捕捉領域はトランケーティングされる(truncated、切り詰められるとも言う)。

## 【0111】

いくらかの実施態様では、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Y、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Z、第一および第二の制限部位を含む中央部分および第一および第二の制限部位の間のスペーサー領域、および中央部分および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zの間の標的特異的キャプチャー領域を含む。

10

## 【0112】

いくらかの実施態様では、各鋳型核酸は、標的特異的領域および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zの間にSBSをさらに含む。

## 【0113】

いくらかの実施態様では、本方法は、以下のことをさらに含み：e)複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸サンプルを、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、少なくとも一のプライマーと接触させることであり、前記少なくとも一のプライマーには、アダプターが含まれ；f)複数のアンプリコンを生成するために、前記複数の標的ポリヌクレオチドをPCRによって増幅すること；g)第一の複数の固定化アンプリコンを生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の固定化されたキメラキャプチャープライマーを前記複数のアンプリコンと直接接触させること；h)前記標的ポリヌクレオチドに相補的な複数の固定化された伸長生成物を生成するために、複数の固定化されたキメラキャプチャープライマーを伸長させること、およびi)第二の複数の固定化されたアンプリコンを生成するために、前記複数の固定化された伸長生成物をPCRによって増幅することであり、そこでは、固定化されたアンプリコンの前記集団は、85%以上の均一性を含むことである。

20

## 【0114】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、次のことが含まれ：a)基材にて固定化された複数のユニバーサルキャプチャープライマーを、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサルキャプチャープライマーは、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーを含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Y、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Z、標的特異的キャプチャー領域、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yおよび標的特異的キャプチャー領域の間の制限部位、および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的特異的キャプチャー部分の間のSBSを含み；b)一以上の固定化された鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、一以上のユニバーサルキャプチャープライマーを伸長すること；c)固定化された伸長生成物の一以上のモノクロナルアンプリコンを生成するために、一以上の固定化された伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d)固定化された伸長生成物の一以上のモノクロナルクラスターを、ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的特異的キャプチャー領域を含む複数の固定化されたキメラキャプチャープライマーおよびユニバーサルキャプチャー領域Yおよび部分的制限部位を含む複数の固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、制限酵素と接触させることである。

30

40

## 【0115】

50

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、次のことが含まれ：a) 基材にて固定された複数のユニバーサルキャプチャープライマーを、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサルキャプチャープライマーには、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yおよび第一の所定の開裂部位を含む第一の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーおよび第二の所定の開裂部位を含む5'部分が含まれ、そこでは、各鋳型核酸には、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Y、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Z、標的的特異的キャプチャー領域、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yおよび標的的特異的キャプチャー領域の間の制限部位、および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的的特異的キャプチャー領域の間のSBSが含まれ；

b) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、一以上のユニバーサルキャプチャープライマーを伸長させること；c) 固定化された伸長生成物の一以上のモノクローナルアンプリコンを生成するために、一以上の固定化された伸長産物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的的特異的キャプチャー領域を含む複数の固定化されたキメラキャプチャープライマー、およびユニバーサルキャプチャー領域Yおよび部分的制限部位を含む複数の固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、固定化された伸長生成物の一以上のモノクローナルアンプリコンを制限酵素と接触させること；e) 第一の所定の開裂部位での開裂を介して複数の固定された再生ユニバーサルキャプチャープライマーから部分的な制限部位を除去することである。

#### 【0116】

いくつかの実施態様では、第一の所定の開裂部位はウラシル塩基を含み、および第二の所定の開裂部位はジオールリンカーを含む。

#### 【0117】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ：a) 基材にて固定化された複数のユニバーサルキャプチャープライマーを、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサルキャプチャープライマーには、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーが含まれ、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Y、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Z、第一および第二の制限部位を含む中央部分および第一および第二の制限部位の間のスパーサー領域、ならびに中央部分および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zの間の標的的特異的領域を含み；b) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、複数のユニバーサルキャプチャープライマーの一以上のユニバーサルキャプチャープライマーを伸長させること；c) 固定化された伸長生成物の一以上のモノクローナルアンプリコンを生成するために、ブリッジ増幅またはKEAによって一以上の固定化された伸長生成物を増幅すること、およびd) ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的的特異的キャプチャー領域を含む複数の固定化されたキメラキャプチャープライマー、およびユニバーサルキャプチャー領域Yを含む複数の固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、固定化された伸長生成物の一以上のモノクローナルアンプリコンを制限酵素と接触させることである。

#### 【0118】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ：a) 基材にて固定化された複数のユニバーサルキャプチャープライマーを、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサルキャプチャープライマーは、3'末端ユニバーサルキャプチャー

領域Yを含む第一の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーを含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Y、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Z、標的特異的キャプチャー領域および5'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yおよび標的特異的キャプチャー領域の間の制限部位を含み；b) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、複数のユニバーサルキャプチャープライマーの一以上のユニバーサルキャプチャープライマーを伸長させること；c) 固定化された伸長生成物の一以上のモノクロノアルアンプリコンを生成するために、一以上の固定化された伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的特異的キャプチャー領域を含む複数の二重鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよびユニバーサルキャプチャー領域Yおよび一本鎖部分的制限部位を含む複数の二重鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、固定化された伸長生成物の一以上のモノクロノアルアンプリコンを制限酵素と接触させること；e) 複数の一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、複数の二重鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよび複数の二重鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーを変性させること；f) 二重鎖ユニバーサルキャプチャー領域および二重鎖標的特異的領域を形成するために、複数の一本鎖固定化キメラキャプチャープライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーに逆相補的なオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせること；およびg) 複数の二重鎖固定化再生ユニバーサルキャプチャープライマーから一本鎖の部分的な制限部位を除去するために、表面をエキソヌクレアーゼIと接触させることである。

10

20

#### 【0119】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ：a) 基材にて固定化された複数のユニバーサルキャプチャープライマーを、一以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサルキャプチャープライマーは、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Yを含む第一の複数のプライマー、および3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む第二の複数のプライマーおよび3'末端領域Xを含む第三の複数のプライマーおよび所定の開裂部位が含まれる5'部分を含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端領域X、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域Z、標的特異的なキャプチャー領域、および領域Xおよび標的特異的キャプチャー領域の間の制限部位を含み；b) 一以上の鋳型核酸に相補的な一以上の固定化された伸長生成物を生成するために、一以上のユニバーサルキャプチャープライマーを伸長させること；c) 固定化された伸長生成物の一以上のモノクロノアルアンプリコンを生成するために、一以上の固定化された伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) ユニバーサルキャプチャー領域Zおよび標的特異的キャプチャー領域を含む複数の固定化キメラキャプチャープライマーおよび領域Xおよび部分的制限部位を含む複数の固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーを生成するために、固定化された伸長生成物の一以上のモノクロノアルアンプリコンを制限酵素と接触させること、およびe) 領域Xを含む複数の固定化された再生キャプチャープライマーを、所定の開裂部位での開裂を通して基材から除去することである。

30

40

#### 【0120】

別の態様では、ここには、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域YまたはZ、制限部位および3'末端二量体化(-terminal dimerization、末端ダイマー化とも言う)領域DRを含む第一のオリゴヌクレオチドおよび5'末端ユニバーサルキャプチャー領域YまたはZおよび3'末端二量化領域DRを含む第二のオリゴヌクレオチドダイマーが提供される。

#### 【0121】

いくつかの実施態様では、第一のオリゴヌクレオチドの3'末端DRおよび第二のオリゴヌクレオチドの3'末端DRは、標的特異的キャプチャー領域を含む。

#### 【0122】

50

いくつかの実施態様では、第一のオリゴヌクレオチドの3'末端DRおよび第二のオリゴヌクレオチドの3'末端DRはSBSを含む。

【0123】

別の態様では、ここには、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法が提供され、それには、以下のことが含まれ：a) 複数の固定化されたキャプチャープライマーを含む基材を、複数の異なる固定化されたシード核酸 (immobilized seed nucleic acids、固定化種子核酸とも言う) を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の異なるシード核酸と接触させること；b) 複数の異なる固定化されたシード核酸の二以上に相補的な複数の異なる固定化された伸長生成物を生成するために、二以上の固定化されたキャプチャープライマーを伸長させること；c) 活性化されたキャプチャープライマーを形成するために、複数の異なる固定化伸長生成物の一の固定化された伸長生成物を活性化すること、およびd) 随意に、固定化された修飾キャプチャープライマーのモノクロナルクラスターを生成するために、活性化されたキャプチャープライマーを増幅することである。

10

【0124】

いくつかの実施態様において、固定化された伸長生成物を活性化することには、標的化された活性化 (targeted activation) が含まれる。いくつかの実施態様において、標的化された活性化には、複数の異なる標識シード核酸を生成するために、複数の異なるシード核酸を、複数の異なるラベルにより標識する初期ステップが含まれる。いくつかの実施態様において、標的化された活性化は複数の異なる標識化された固定化シード核酸を形成することをさらに含む。いくつかの実施態様では、標的化された活性化は複数の異なる標識化された固定化伸長生成物を形成することをさらに含む。いくつかの実施態様においては、標的化された活性化は、一の固定化された伸長生成物を活性化するために、複数の異なる標識化された固定化伸長生成物を一以上の標識特異的トリガー分子と接触させることをさらに含む。

20

【0125】

いくつかの実施態様では、初期標識化 (initial labeling、初期ラベリングとも言う) ステップは複数の異なるシード核酸のランダム標識化を含む。いくつかの実施態様において、初期標識化ステップは、複数の異なるシード核酸の標的化された標識化を含む。いくつかの実施態様では、標的化された標識はシーケンス特異的標識である。いくつかの実施態様において、複数の異なるシード核酸は、50未満、45未満、40未満、35未満、30未満、25未満、20未満、18未満、16未満、14未満、12未満、10未満、8未満、6未満、4未満または2未満の異なるラベルにより標識化される。いくつかの実施態様では、複数の異なるシード核酸は、20、18、16、14、12、10、8、6、4または2の異なるラベルにより標識化される。いくつかの実施態様において、複数の異なるシード核酸は、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上、60以上、80以上、90以上、100以上、200以上、250以上、300以上、400以上、500以上、600以上、700以上、800以上、900以上、または1000以上の異なるラベルにより標識化される。いくつかの実施態様では、異なるラベルは、異なる核酸シーケンスを有する異なるプライマーである。いくつかの実施態様では、初期標識ステップは複数の異なるプライマーを複数の異なるシード核酸に連結することを含む。

30

40

【0126】

いくつかの実施態様では、トリガー分子はトリガー領域を含む核酸である。いくつかの実施態様では、トリガー領域は標的特異的キャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、トリガー領域はユニバーサルキャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、ユニバーサルキャプチャー領域はIllumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスまたはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含む。いくつかの実施態様では、トリガー分子は固定化されたキャプチャープライマーである。いくつかの実施態様では、固定化されたキャプチャープライマーは複数の固定化されたキャプチャープライマーである。いくつかの実施態様において、複数の固定化されたキャプチャープライマーは複数の異なる

50

なるキャプチャープライマーである。いくつかの実施態様では、複数の固定化されたキャプチャープライマーは同じ核酸シーケンスを有する複数の同じキャプチャープライマーである。いくつかの実施態様において、固定化されたキャプチャープライマーは標的特異的キャプチャー領域を含む。

【0127】

いくつかの実施態様では、複数の異なる固定化伸長生成物の一の固定化された伸長生成物を活性化することには、確率的活性化 (stochastic activation) が含まれる。いくつかの実施態様では、確率的活性化には、ヘアピン構造を含む複数の異なる固定化されたシード核酸を生成するために、複数の固定化されたキャプチャープライマーを有する基材を、ヘアピン構造をもつ複数の異なるシード核酸と接触させることを含む。いくつかの実施態様では、確率的活性化は、ヘアピン構造を含む複数の異なる固定化された伸長生成物を生成するために、複数の固定化されたキャプチャープライマーの二以上を伸長することをさらに含む。いくつかの実施態様では、確率的活性化は、ヘアピン構造を含む複数の固定化された伸長生成物の一を開裂試薬により活性化することをさらに含む。いくつかの実施態様では、複数の異なるシード核酸の一以上の異なるシード核酸は開裂可能な塩基を含む。

【0128】

いくつかの実施態様では、開裂試薬はヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼはエンドヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、開裂試薬は増幅試薬混合物中にある。いくつかの実施態様では、開裂試薬は、複数の活性化されたモノクロナル固定化キャプチャープライマーを増幅するときに存在する。

【0129】

いくつかの実施態様では、複数の異なる固定化された伸長生成物はユニバーサルキャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、複数の異なる固定化された伸長生成物においてヘアピン構造はユニバーサルキャプチャー領域をマスクする。

【0130】

いくつかの実施態様において、複数の異なるシード核酸はトリガー領域を含まない。いくつかの実施態様では、確率的活性化は、トリガー領域を含むキメラプライマーを用いて複数の異なるシード核酸のうちを増幅する初期ステップを含む。いくつかの実施態様では、複数の異なるシード核酸のうちをキメラプライマーにより増幅する初期ステップにおいて、一以上のシード核酸は、キメラプライマーに対して5倍を超え、10倍を超え、50倍を超え、100倍を超え、250を超え、500を超え、1000倍を超え、2500を超え、5000を超え、10000を超え、25000倍を超え、50000倍を超え、または100000を超える過剰量で存在する。いくつかの実施態様では、トリガー領域は、標的特異的キャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、トリガー領域はユニバーサルキャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、キメラプライマーはトリガー領域およびSBSを含む。

【0131】

いくつかの実施態様では、確率的活性化は、a) 複数の異なるキャプチャープライマーを有する基材を、複数の異なる固定化されたシード核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションにとって十分な条件下に、複数の異なるシード核酸と接触させることを含み、ここでは、各々の異なるシード核酸は一以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、確率的活性化には、b) 複数の異なる固定化されたシード核酸に相補的な複数の異なる固定化された伸長生成物を生成するために、二以上の固定化されたキャプチャープライマーを伸長させることが含まれ、ここでは、各々の複数の異なる固定化された伸長生成物は一以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様では、確率的活性化には、c) 活性化されたキャプチャープライマーを形成するために、複数の異なる固定化された伸長生成物の一を活性化することがさらに含まれ、ここでは、活性化されたキャプチャープライマーは修飾されたヌクレオチドを含まない。いくつかの実施態様では、修飾されたヌクレオチドは、イソグアニン (isoG) またはイソシトシン (isoC) を含む。

【0132】

いくつかの実施態様では、確率的活性化は、複数の固定化されたキャプチャープライマー

を有する基材を、結合したブロッキング剤をそれぞれ有する複数の異なる固定化されたシード核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションによって十分な条件下に、結合したブロッキング剤をそれぞれ有する複数の異なるシード核酸と接触させること、およびブロッキング剤をデブロッキング剤と接触させることを含む。いくつかの実施態様において、ブロッキング剤は核酸結合性タンパク質 (nucleic acid binding protein) であり、およびデブロッキング剤はプロテアーゼである。いくつかの実施態様では、ブロッキング剤はビーズである。

#### 【0133】

いくつかの実施態様では、固定化修飾キャプチャプライマーのモノクローナルクラスターを生成するために、活性化されたキャプチャプライマーを増幅することには、KEAまたはブリッジ増幅が含まれる。

10

#### 【0134】

いくつかの実施態様では、表面は、複数のウェルを含むパターン化されたフローセルである。いくつかの実施態様において、異なる固定化された伸長生成物は、複数のウェルの二以上のウェルにおいて形成される。いくつかの実施態様では、活性化されたキャプチャプライマーは複数のウェルの二以上のウェルのそれぞれにおいて形成される。いくつかの実施態様では、活性化されたキャプチャプライマーは、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の複数のウェルのそれぞれのウェルにおいて形成される。いくつかの実施態様では、少なくとも複数のウェルの二以上のそれぞれのウェルに形成される活性化キャプチャプライマーは、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルにおいて異なる活性化されたキャプチャプライマーである。いくつかの実施態様では、固定化された修飾キャプチャプライマーのモノクローナルクラスターは、複数のウェルのそれぞれの二以上のウェルにおいて形成される。いくつかの実施態様では、固定化された修飾キャプチャプライマーのモノクローナルクラスターは、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の複数のウェルの各々のウェルにおいて形成される。いくつかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルのそれぞれにおいて形成される固定化された修飾キャプチャプライマーのモノクローナルクラスターは、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の少なくともウェルにおいて固定化された修飾キャプチャプライマーの異なるモノクローナルクラスターである。

20

30

40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0135】

【図1 - 1】パターン化された基材上の核酸をパターン化されたクラスターの二重増幅によって増幅する方法の一実施態様を示す概略図である。パターン化 (パターン形成とも言う) された基材は、ピッチ1.5  $\mu\text{m}$  において複数の400nmのウェルを有する(1)。パターン化された表面は、最初にポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-c

50

o-アクリルアミド (poly(N-(5-azidoacetamidylpentyl)acrylamide-co-acrylamide、PAZAM) 層により覆われ、次いで、そのパターン化された表面は、ウェル間の表面から PAZAM 層を除去し、その一方で、P ウェル内の AZAM 層を保持するために、研磨され、およびユニバーサルキャプチャープライマー、例は、ユニバーサル Illumina(R) P5 または P7 をウェルにおいて PAZAM 層にグラフトされる (2)。パターン化された表面は PAZAM またはシランフリーアクリルアミド (SFA) の第二層により、双方のウェルにおいて、およびウェル間の表面にて覆われる (3)。第二層は、3' ブロックされたユニバーサルキャプチャープライマー、例は、リン酸終端化 Illumina(R) P5 または P7 によりグラフトされる (4)。パターン化された表面は、ユニバーサルキャプチャー領域、例は、Illumina(R) P5 または P7 領域によって隣接される複数の標的ポリヌクレオチドを有するシーケンシングライブラリーと接触され、および第一の運動排除アッセイ (kinetic exclusion assay、結合平衡除外アッセイとも言う) (KEA) は、シーディング (播種とも言う) を初期化し、およびアンプリコンのクローン集団をウェル内の標的ポリヌクレオチドから生成するために行われる (3)。3' ブロック化されたユニバーサルキャプチャープライマーは、例は、リン酸終端化 Illumina(R) プライマー P5 または P7 を T4-キナーゼにより脱リン酸化することによってデブロック化される (6)。ウェルを越えて標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローナル集団を増大するために、第二 KEA またはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を実行する (7)。

【図 1 - 2】図 1-1 と同様である。

【図 2 - 1】パターン化された基材にてキャプチャープライマーを用いたワンステップ増幅によって核酸を増幅する方法の一実施態様を示す概略図である。パターン化された基材は、1.5  $\mu\text{m}$  のピッチで複数の 400nm ウェルを有する (1)。パターン化された表面は、最初に PAZAM 層で覆われ；パターン化された表面は次に研磨され、ウェル内の PAZAM 層を保持しながら、ウェル間の表面から PAZAM 層を除去し、およびユニバーサルキャプチャー領域およびシーケンシングプライマー結合部位 (SBS) を有するキメラキャプチャープライマー、例は、Illumina(R) キャプチャープライマー P5-SBS3 または P7-SBS8 は、ウェルでの PAZAM 層においてグラフトされる (2)。パターン化された表面は、ウェルにおいておよびウェル間の表面での双方において、PAZAM またはシランフリーアクリルアミド (SFA) の第二層により覆われる (3)。第二層はユニバーサルキャプチャープライマー、例は、Illumina(R) プライマー P5 または P7 によりグラフトされる (4)。パターン化された表面は、SBS、例は、Illumina(R) SBS3 または SBS8 により隣接される複数の標的ポリヌクレオチドを有するシーケンシングライブラリーと接触され、および標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのクローン集団を生成するために、運動排除アッセイ (KEA) が行われる。標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローン集団は、キメラキャプチャープライマーを用いてウェル内で初期に生成される。延長された KEA 反応時間の後、またはブリッジ PCR に切り替えることによって、アンプリコンのクローン集団は、ウェルの外側の第二層においてグラフトされたユニバーサルキャプチャープライマーを用い、ウェルを超えて増大される。

【図 2 - 2】図 2-1 と同様である。

【図 3 - 1】パターン化基材にて増幅グラフト増幅によって核酸を増幅するための方法の一実施態様を示す概略図である。パターン化された基材はピッチ 1.5  $\mu\text{m}$  において複数の 400nm ウェルを有する (1)。パターン化された表面は初期にポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-コ-アクリルアミド (PAZAM) 層で覆われ、パターン化された表面は研磨され、PAZAM 層をウェル間の表面から除去し、一方、ウェル内で PAZAM 層を保持し、およびユニバーサルキャプチャープライマー、例は、ユニバーサル Illumina(R) キャプチャープライマー P5 または P7 はウェルでの PAZAM 層においてグラフトされる (2)。パターン化された表面は、ウェルにおいておよびウェル間の表面での双方において、PAZAM またはシランフリーアクリルアミド (SFA) の第二層により覆われる (3)。パターン化された表面は、ユニバーサルキャプチャー領域、例は、Illumina(R) P5 または P7 領域によって隣接される複数の標的ポリヌクレオチドを有するシーケンシングライブラ



リーと接触させ、および第一の運動排除アッセイ (KEA) はウェル内で標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのクローナル集団を生成するために実行される。第二層はユニバーサルキャプチャープライマー、例は、Illumina(R)プライマーP5またはP7によりグラフト化される(5)。ウェルの外側の第二層においてユニバーサルキャプチャープライマーを用いて、ウェルを越えて標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローナル集団を増大するために、第二KEAまたはブリッジPCRを実行する(6)。

【図3-2】図3-1と同様である。

【図4】大きなウェルにおいて混合プライマーを用いてパターン化基材にて核酸を増幅するための方法の一実施態様を示す概略図である。パターン化された基材は1.5 μmのピッチにて複数の1.0 μmのウェルを有する(1)。パターン化された表面を最初にPAZAM層により覆い、パターン化された表面を研磨し、ウェル内のPAZAM層を保持しつつウェル間の表面からPAZAM層を除去し、およびユニバーサルキャプチャープライマーの混合物、例は、ユニバーサルIllumina(R)キャプチャープライマーP5またはP7、およびユニバーサルキャプチャー領域およびSBSを有するキメラキャプチャープライマー、例は、Illumina(R)キャプチャープライマーP5-SBS3またはP7-SBS8は、ウェルでのPAZAM層においてグラフトされ；キメラキャプチャープライマーはより一層低い密度にてグラフトされ、およびユニバーサルキャプチャープライマーはより一層高い密度でグラフトされる(2)。パターン化された表面は、SBS、例は、Illumina(R)SBS3またはSBS8によって隣接される複数の標的ポリヌクレオチドを有するシーケンシングライブラリーと接触され、およびKEAを実行してウェル内で標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのクローナル集団を生成する(3)。

【図5】ここに提供される二重層プライマーグラフト法により得られる模範的な結果を示す。上部のパネルは、第一層(PAZAM)によりパターン化フローセルをコーティングし、表面を研磨し、第一のキャプチャープライマー(SBS3-P5)を堆積させ、および第一のキャプチャープライマーをテトラクロロフルオレセイン(TET)オリゴヌクレオチドプローブによりプロービング(探索とも言う)して後に得られる結果を示す。中央のパネルは、パネルAのパターン化フローセルを第二層(SFA)によりさらにコーティングし、第一のキャプチャープライマーをTETオリゴヌクレオチドプローブで再プロービングして後に得られる結果を示す。下部のパネルは、第二の層において第二のキャプチャープライマー(P5/P7)をさらに堆積させ、および第二のキャプチャープライマーをTETオリゴヌクレオチドプローブによりプローブして後に得られる結果を示す。

【図6A】鋳型核酸の模範的な構造を例示する概略図を示す。鋳型核酸は、3'端および/または5'端でのユニバーサルキャプチャー領域によって隣接されることができる。ユニバーサルキャプチャー領域は、例は、Illumina(R)ユニバーサルキャプチャープライマーP5またはP7のシーケンスを有することができる。鋳型核酸は、一以上の標的特異的キャプチャー領域(「標的」)および二以上の制限部位を分離する一以上のスペーサー領域を有する二以上の制限部位(例は、図6DのSapI部位)をさらに含む。標的特異的キャプチャー領域は、3'末端ユニバーサルキャプチャー領域および第一の制限部位の間(図6A)、5'末端ユニバーサルキャプチャー領域および第二の制限部位の間(図6B)、または3'末端ユニバーサルキャプチャー領域および第一の制限部位ならびに5'末端ユニバーサルキャプチャー領域および第二の制限部位の双方の間(図6C)に存在する。

【図6B】図6Aと同様である。

【図6C】図6Aと同様である。

【図6D】図6Aと同様である。

【図7】固定化されたキャプチャープライマーの修飾のためのここに提供される方法を例示する概略図を示す。図7Aは、ユニバーサルキャプチャー領域を介して固定化されたキャプチャープライマーとハイブリダイズする鋳型核酸を例示する。ハイブリダイズされたキャプチャープライマーの伸長は、鋳型核酸に相補的な固定化された伸長生成物の形成をもたらす。伸長生成物の3'端は、相補的な3'端ユニバーサルキャプチャー領域を有する別の固定化されたキャプチャープライマーとハイブリダイズすることができ、それによってブリ

ッジ構造が形成される。KEAの一回以上のラウンドは、固定化された鋳型核酸のモノクロノナルクラスターの形成をもたらす。図7Bは、固定化された鋳型核酸の制限酵素による開裂を例示する。図7Cは、図7Bにおいて制限酵素開裂からもたらされる固定化されたキメラキャプチャープライマーを例示する。キメラキャプチャープライマーはそれぞれ、ユニバーサルキャプチャー領域および標的特異的キャプチャー領域を有する。制限酵素開裂は、固定化された再生ユニバーサルキャプチャープライマーをさらに産生する。図7Dは、パターン化フローセルにて、パターン化フローセルの各ウェルがキメラキャプチャープライマーのモノクロノナル集団を有するように、キメラキャプチャープライマーの複数のモノクロノナル集団を生成することができることを例示しており、それにより、すべてのキメラキャプチャープライマーは、集団において同じ標的特異的キャプチャー領域を有する。パターン化されたフローセルの異なるウェルは、同じ標的特異的キャプチャー領域または異なる標的特異的キャプチャー領域を有するキメラキャプチャープライマーのモノクロノナル集団を有することができる。

10

【図8-1】修飾されたキャプチャープライマーを用いる標的ポリヌクレオチドの標的特異的キャプチャーのための模範的な方法を例示する概略図を示す。図8Aは、DNAサンプル、例は、ゲノムDNAサンプルからのシーケンシングライブラリーの調製を例示する。多重PCR反応において、標的ポリヌクレオチドは濃縮（富化とも言う）され、およびアダプターは富化された標的ポリヌクレオチドの一端に加えられる。図8Bは、図8Aの標的ポリヌクレオチドを、ユニバーサルキャプチャー領域および標的特異的キャプチャー領域を含む固定化されたキメラキャプチャープライマーを有する次世代シーケンシング（NGS）フローセルと接触させるステップを例示する。図8Cは、標的ポリヌクレオチドの相補配列およびそれらのアダプター配列を組み込むために標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズされるキメラキャプチャープライマーの初期の伸長を例示する。図8Cは伸長されたキャプチャープライマーのその後のブリッジ増幅をさらに例示する。

20

【図8-2】図8-1と同様である。

【図9】標的ポリヌクレオチドの標的特異的キャプチャーを実行することを求める際に直面する課題を例示する図である。また、図9AおよびBは、フローセルにて標的ポリヌクレオチドの初期のキャプチャーに關与するNGSプロトコルを例示し、それらの末端ユニバーサルキャプチャー領域を介する。また、図9Cは、標的特異的キャプチャー領域を有する固定されたキャプチャープライマーによるフローセルでの標的ポリヌクレオチドの初期キャプチャーに關与するNGSプロトコルを例示する。

30

【図10】パターン化されたフローセルでのモノクロノナルキャプチャーパッドを生成するための、および標的特異的なキャプチャーおよび標的ポリヌクレオチドの伸長およびパターン化されたフローセルの各パッドにおける標的ポリヌクレオチドのモノクロノナル集団を生成するための模範的な方法を例示する図である。

【図11】固定化されたユニバーサルキャプチャープライマーを修飾するためのここに提供される模範的な方法を例示する図である。

【図12A】図12AおよびBは、固定化されたユニバーサルキャプチャープライマーを修飾するためにここに提供される模範的な方法を例示する図である。

【図12B】図12Aと同様である。

40

【図13】固定化されたユニバーサルキャプチャープライマーを修飾するためにここに提供される模範的な方法を例示する図である。

【図14】固定化されたユニバーサルキャプチャープライマーを修飾するためにここに提供される模範的な方法を例示する図である。

【図15】固定化されたユニバーサルキャプチャープライマーを修飾するためにここに提供される模範的な方法を例示する図である。

【図16】部分的な鋳型核酸の模範的な二量体を例示する図を示す。二量体は、第一のオリゴヌクレオチドを有し、それはその5'端に第一のユニバーサルキャプチャー領域（P5）、制限部位（SapI）（配列番号9および10）、およびその3'端に標的特異的キャプチャー領域（CP）を含む。二量体鋳型核酸は、第二のオリゴヌクレオチドを有し、それはその3'

50

端に相補的な標的特異的キャプチャー領域（CP'）、シーケンシングプライマー結合部位（SBS）およびその5'端に第二のユニバーサルキャプチャー領域（P7）を含む。

【図17】パターン化されたフローセルでのウェルのモノクロノナル占有率が初期シーディング条件（例は、シーディングの単一サイクルの後に占有された部位の%、x軸によって）およびシーディング事象の数（2ないし16の事象のモデル化：菱形：2つの事象；四角：3つの事象；三角：4つの事象；十字：16の事象）に依存してどのように変化しうるかを記載するためにコンピュータシミュレーションの結果を例示するグラフを示す。

【図18】可溶性トリガー分子を用いるパターン化されたフローセルでの固定化された伸長生成物の標的化された活性化についてここに提供される模範的な方法を例示する図を示す。異なる固定化された伸長生成物は、A、BおよびCに標識化される。

10

【図19】固定化されたトリガー分子を用いるパターン化されたフローセルでの固定化された伸長生成物の標的化された活性化についてここに提供される模範的な方法を例示する図を示す。異なる固定化された伸長生成物は、A、BおよびCに標識化される。パターン化されたフローセルのパッドには、異なる端部を有する三つの分子がシードされており、および小量のキメラP5/B'プライマーが各パッドにおいて固定化される。分子Bはキメラプライマーの相補的B'端にハイブリダイズすることができ、それは伸長し、およびパッドの増幅を開始することができる。他のパッドは、異なる端部を有するキメラプライマーを有することができる（例は、P5/A'プライマーまたはP5/C'プライマー）。

【図20】開裂可能なヘアピンを用いる固定化された伸長生成物の確率的活性化のためにここに提供される模範的な方法を例示する図を示す。

20

【図21】トリガーシーケンスを欠くシード核酸の小画分を増幅するために、トリガーシーケンスを有する小量の可溶性プライマーを用いる固定化された伸長生成物の確率的活性化についてここに提供される方法の模範的結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0136】

次世代シーケンシング（NGS）技術は、表面上に固定化された単一標的ポリヌクレオチドの高度に並列なシーケンシング、または標的ヌクレオチドのクロノナル集団のシーケンシング（配列決定とも言う）に依存し、それらは単一の標的ポリヌクレオチドから、例は、ブリッジ増幅によって生成された。標的ポリヌクレオチドのシーケンシングクロノナル集団は、単一標的ポリヌクレオチドのシーケンシングよりもずっと高いシグナル対ノイズ比（SNRs）をもたらし、シーケンシング反応の感度および精度を改善し、およびシーケンシング装置において低コストの光学系の使用を可能にする。

30

【0137】

本開示は、部分的には、NGSのデータ品質および経済性が標的ポリヌクレオチドの固定化されたクロノナル集団のサイズおよび密度を増加させることによってさらに改善され、それはシーケンシング反応のSNRsをさらに改善するという実現に基づく。

【0138】

NGSにおいて、標的ポリヌクレオチドは、個々の標的ポリヌクレオチドが互いに空間的に分離され、シーケンシングのその後のサイクルにおいて区別可能であるように、基材、例は、フローセル（FC）にてキャプチャーされうる。本技術において知られるキャプチャー方法は、事実上普通にランダムであり、および基材にて固定化された標的ポリヌクレオチドの最適密度を達成するために、実験条件の正確なコントロールに少なくとも部分的に依存する。不適当な条件は、個々の標的ポリヌクレオチドが区別可能でないように過密状態を招く可能性があり、または代わりに、シーケンシング操作ごとに得られた情報を減少させ、従って高価なシーケンシング試薬を浪費する可能性がある高い欠損率を導くことがあるりうる。

40

【0139】

近年、パターン化されたフローセルが開発され、それは、多くの商業上入手可能なフローセルでのクロノナル標的ポリヌクレオチド集団よりも大きく、および高密度に配置された固定化標的ポリヌクレオチドのクロノナル集団の秩序ある増殖を可能にする（例は、US2

50

013/0096034A1 ; Illumina(R) HiSeq-X10パターン化フローセル)。たとえば、いくつかのパターン化されたフローセルは、1.5  $\mu\text{m}$ のピッチで400nm直径のナノウェルを有するマイクロアレイを特色とする(例は、図1.1参照)。ナノウェルはそれぞれ、ヒドロゲルおよびヒドロゲルに埋め込まれたプライマーで満たされる(例は、US2014/0079923A1参照)。ナノウェルを取り囲む表面はプライマーがなくてもよく、それによって標的ポリヌクレオチドのクローナル集団のサイズはナノウェルのサイズ、例は、直径400nmに制限される。

#### 【0140】

原則的に、運動排除アッセイ(KEA)は、パターン化されたフローセルでのウェル当たりで単一の標的ポリヌクレオチドの増幅、および一以上のウェルにおけるモノクローナル標的ポリヌクレオチド集団の生成を可能にする(例は、米国特許出願公開第US2013/0338042A1号参照)。KEAでは、ウェル内の第一のキャプチャーされた標的ポリヌクレオチドの増幅速度は、標的ポリヌクレオチドの輸送およびキャプチャーのはるかに遅い速度に比べてはるかに迅速である。ウェルにおいてキャプチャーされた第一の標的ポリヌクレオチドは、迅速に増幅され、およびウェル全体を満たすことができ、同じウェルにおいて追加の標的ポリヌクレオチドのキャプチャーが妨げられる。

10

#### 【0141】

本開示は、部分的には、ナノウェルのサイズが増大するにつれて、パターン化フローセルのナノウェルにおけるモノクローナル標的ポリヌクレオチド集団の生成に関するKEAの有効性が低下するという認識に基づく。第一のキャプチャーされた標的ポリヌクレオチドの増幅および標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団によるウェルの充填は、より小さいウェルよりも大きなウェルにおいてより一層遅いが、第二の標的ポリヌクレオチドのキャプチャーは、より小さいウェルよりも大きなウェルにおいてより一層速い。したがって、ナノウェル内で一よりも多くの標的ポリヌクレオチドが捕捉され、および増幅される可能性は、ナノウェルのサイズとともに増加する。ウェルからのシーケンシングデータ品質は、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団にとって最適である。第一の固定化された標的ポリヌクレオチド以外の標的ポリヌクレオチドのシェアが増加するにつれて、ウェルのデータ品質が低下する。

20

#### 【0142】

したがって、パターン化されたフローセルの大きなナノウェルにおけるモノクローナル標的ポリヌクレオチド集団の生成を促進するための新しい方法が必要とされる。

30

#### 【0143】

本開示は、固定化されたキャプチャープライマーを修飾するための方法およびキットを提供する。一つの有用な実施態様において、本開示は、パターン化されたフローセルのウェルにおいて標的-ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の生成を可能にする。具体的には、本開示は、サイズが拡大され、および当分野で知られる普通に使用されるNGS法を用いて産生される標的ポリヌクレオチドのクローン集団よりも高い密度で配置される標的-ポリヌクレオチドのクローン集団の生成を促進する。本開示の方法は、より一層高いスループットで、特に部分ゲノムの標的配列決定に向けられた用途において、高品質のNGSデータの収集を容易にする。この開示の方法により達成されるより一層高いSNRsは、単純な光学および検出機器の使用を可能にし、アッセイコストが低減される。高いデータ品質および改善されたサンプルスループット(サンプル処理量とも言う)は、例は、疾患診断および予後診断における標的特異的NGSのための広範な新しい分野のアプリケーションを開くことができる。それゆえ、この開示は、例は、希少遺伝子変異の確実な早期検出を容易にすることによって、たとえば、ガン患者のような、まれな遺伝子変異を含む疾患に罹患する患者に利益をもたらすことが期待される。初期の疾患の検出は、より一層多くの治療選択肢および改善された処置結果に変換することができる。

40

#### 【0144】

本開示は、部分的には、多くのパターン化されたフローセルのウェルがユニバーサルキャプチャープライマーの対をもつという具現化にさらに基づき、それは、相補的なユニバー

50

サルキャプチャー領域を有する核酸のブリッジ増幅を可能にするが、それは関心がある対象の個々のポリヌクレオチドの標的-特異的キャプチャーを可能にしない。パターン化されたフローセルの有用な局面は、高いフィーチャー（特色とも言う）密度および既知のパッド位置によるクラスターレジストレーションの容易さに起因するNGS反応の増大したスループットであるが、パターン化フローセルの欠点は、モノクローナルパッド（ウェル）を合成する必要性であり、そこでは、特定のパッドでのDNAのクラスターは単一のDNA分子からのみ生じる。ポリクローナルパッドは、不可能ではないにしても（低い%PF）、基本呼び出しを困難にする。

#### 【0145】

本開示は、部分的には、標的ポリヌクレオチドの標的特異的キャプチャーを含むNGSプロトコルがユニバーサルキャプチャー領域を使用する標的ポリヌクレオチドのキャプチャーを含むNGSプロトコルよりも低い品質のシーケンシングデータをもたらすことができるという具現化にさらに基づく。例は図9を参照。また、図9AおよびBは、ユニバーサルキャプチャー領域を介するフローセルでの標的ポリヌクレオチドの初期のキャプチャーを含むNGSプロトコルを例示する。図9Cは、固定化された標的特異的キャプチャープライマーによって標的ポリヌクレオチドの初期キャプチャーを含むNGSプロトコルの態様を例示する。多くのNGSフローセルでは、固定化されたユニバーサルキャプチャープライマーよりも、標的特異的キャプチャー領域を有する固定化キャプチャープライマーが非常に少ないため（キャプチャーされた標的ポリヌクレオチドの効果的なブリッジ増幅および標的ポリヌクレオチドクラスターの分離を可能にする）、また特異的標的ポリヌクレオチドは、例は、ゲノムDNA断片の集団において、まれであることができるため、標的特異的なシーディング率は、ユニバーサルキャプチャー領域に基づくシーディング率よりもはるかに遅い可能性がある。したがって、競合する副反応および不規則な増幅事象は、ユニバーサルキャプチャーに依存するプロトコルよりも標的特異的捕捉を試みる場合に起こりやすく、それは、標的特異的捕捉に続くNGSシーケンシング反応のデータ品質を最終的に低下させることができる。

#### 【0146】

ここには、興味ある個々のポリヌクレオチドがパターン化されたフローセルの一以上のウェルにおいて標的特異的にキャプチャーされうるように、パターン化されたフローセルの個々のウェルにおいてキャプチャープライマー（例は、ユニバーサル）を修飾する方法が提供される。ここで提供される方法のいくつかの実施態様では、標的特異的キャプチャー領域を伴うキャプチャープライマーの高密度モノクローナル集団をもつモノクローナルキャプチャーパッドが生成される。いくつかの実施態様では、モノクローナルキャプチャーパッドは、標的ポリヌクレオチドの標的特異的シーディング率を高め、および競合する副反応および不規則な増幅事象を抑制することができ、それによってNGSデータ品質が改善される。ここに提供される方法の例示的な図解は、例として、図10に示される。次いで、興味ある標的特異的にキャプチャーされたポリヌクレオチドのブリッジ増幅を用いて、パターン化されたフローセルの一以上のウェルにおいて標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクローナル集団を形成することができる。ここに提供される方法によれば、標的特異的キャプチャーシーケンスを含む単一鋳型核酸は、それらのユニバーサルキャプチャー領域を介してパターン化されたフローセルの個々のパッドにて初期にシーディングすることができ、そしてその後、単一鋳型核酸の増幅は、同じパッドから追加の鋳型核酸を排除し、モノクローナルキャプチャーパッドの形成がもたらされる。

#### 【0147】

単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。したがって、たとえば、「バイオマーカー」への言及には、二以上のバイオマーカーの混合物、およびその他同種類のものなどが含まれる。

#### 【0148】

「約」という用語は、特に与えられた量に関して、プラスまたはマイナス五パーセントの偏差を包含することが意味される。

10

20

30

40

50

## 【0149】

ここに使用されるように、「includes（含む）」、「including（含まれ）」、「includes」、「including」、「contains（含有する）」、「containing（含有され）」、およびそれらの変形は、非排他的な包含をカバーする意図しており、要素または要素のリストを含む、包含する、または含有するプロセス、方法、プロダクト・バイ・プロセス、または組成物は、それらの要素のみでなく、明示的に挙げられていないか、そのようなプロセス、方法、プロダクト・バイ・プロセス、または組成物に固有な他の要素を含むことができる。

## 【0150】

ここに使用されるように、用語「基材」は、固形支持体を意味することが意図される。本用語は、核酸、ポリペプチドおよび/または他のポリマーを含め、生体高分子の堆積のためのウェルのようなものの特色の創作のための固体または半固体の基礎として役立ちうる任意の物質を含む。本発明での基材は改変され、たとえば、または、当業者によく知られる多種多様な方法によるバイオポリマーの付着に適応するように修飾されうる。基材物質の模範的なタイプには、ガラス、改質ガラス、官能化ガラス、無機ガラス、マイクロスフェアが含まれ、不活性および/または磁性粒子、プラスチック、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース、セラミック、樹脂、シリカ、シリカ系物質、炭素、金属、光ファイバーまたは光ファイバー束、上記に例示したもの以外の多種多様なポリマーおよびマルチウェルマイクロタイタープレートなどが含まれる。模範的なプラスチックの特定のタイプには、アクリル、ポリスチレン、スチレンおよび他の物質のコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタンおよびテフロン<sup>TM</sup>（商標）が含まれる。模範的なシリカ系物質の特定のタイプには、シリコンおよび様々な形態の修飾シリコンが含まれる。

## 【0151】

当業者であれば、本発明での基材の組成および幾何学的形状は、使用者の意図する用途および好みに応じて変動しうることを知り、または理解するであろう。したがって、たとえば、スライド、チップまたはウェーハのような平坦基材は、ここに提供される教示および指針を考慮して、例示のためのマイクロアレイに関して例示されているが、ここに例示し、またはよく知られる広範な他の基材が本発明の方法および/または組成物において使用されうることは当業者には理解されるであろう。

## 【0152】

いくつかの実施態様では、固形支持体には、パターン化された表面が含まれる。「パターン化された表面」は、固形支持体の露出した層においてまたはそこでの異なる領域の配置を指す。たとえば、一以上の領域は、一以上の増幅プライマーが存在する特色でありうる。特色は増幅プライマーが存在しない間隙領域（interstitial regions）によって分離することができる。いくつかの実施態様において、パターンは行および列にある特色のx-yフォーマットであることができる。いくつかの実施態様では、パターンは特色および/または間隙領域の繰り返し配置であり得る。いくつかの実施態様では、パターンは特色および/または間隙領域のランダムな配置であってもよい。ここに記載の方法および組成物において使用することができる模範的なパターン化された表面は、米国特許出願第13/661,524号または米国特許出願公開第2012/0316086A1号に記載されており、これらの各々は参照によりここに組み込まれる。

## 【0153】

いくつかの実施態様において、固形支持体は表面においてウェルまたは凹部のアレイを含む。これは、様々な技術、制限されないが、フォトリソグラフィ、スタンピング技術、成形技術およびマイクロエッチング技術を含めて使用して当分野で概して知られるように製造することができる。当業者には理解されるであろうように、使用される技術はアレイ基材の組成および形状に依存する。

## 【0154】

パターン化された表面の特色（特長とも言う）は、ガラス、シリコン、プラスチックまたはパターン化され、共有結合したゲル、たとえば、ポリ(N-5-アジドアセトアミジルペン

10

20

30

40

50

チル)アクリルアミド-コ-アクリルアミド) (PAZAM、たとえば、米国特許出願第61/753,833号を参照し、それは参照することによってここに組み込まれる)を有する他の適切な固形支持体でのウェル(例は、マイクロウェルまたはナノウェル)のアレイにおけるウェルであることができる。本プロセスはシーケンシングに使用されるゲルパッドを作り出し、それは多数のサイクルによりシークエンシングを実行するにあたり安定であることができる。ウェルへのポリマーの共有結合は、種々の用途の間、構造化基材の寿命の期間中、構造化された特長においてゲルを維持するのに役立つ。しかしながら、多くの実施態様において、ゲルはウェルに共有結合される必要はない。たとえば、いくつかの条件では、構造化基材の任意の部分に共有結合していないシランを含まないアクリルアミド(SFA、たとえば、参照によりここに組み込まれる米国特許出願公開第2011/0059865A1号参照)をゲル物質として使用することができる。

10

#### 【0155】

特定の実施態様では、構造化された基材は、ウェル(例は、マイクロウェルまたはナノウェル)により固形支持体材料をパターン化し、パターン化された支持体をゲル材料(例は、PAZAM、SFAまたはそれらの化学的に修飾された変形物、たとえば、SFAのアジド分解されたバージョン(アジド-SFA)などのようなもの)によりコーティングし、およびたとえば、化学的または機械的研磨を介してゲルコーティングされた支持体を研磨し、それによってゲルをウェルにおいて保持するが、ウェル間に構造化された基材の表面での間隙領域から実質的にすべてのゲルを除去または不活性化する。プライマー核酸はゲル材料に付着させることができる。個々の標的核酸がゲル材料に付着したプライマーとの相互作用を介して個々のウェルをシードするように、標的核酸(例は、フラグメント化(断片化とも言う)されたヒトゲノム)の溶液を研磨された基材と接触させることができるが;しかしながら、標的核酸は、ゲル物質の不存在または不活性により、間隙領域を占有しないであろう。間隙領域におけるゲルの不存在または不活性が、増殖する核酸コロニーの外側への移動を妨げるので、標的核酸の増幅はウェルに限定される。本プロセスは、好都合に製造可能であり、スケラブルであり、および慣習的なマイクロまたはナノ製造方法が利用される。

20

#### 【0156】

パターン化された基材は、たとえば、スライドまたはチップにエッチングされたウェルを含むことができる。ウェルのエッチングおよび幾何形状のパターンは、様々な異なる形状およびサイズを、そのような特長が互いに物理的または機能的に分離可能である限りにおいて採用されることができる。このような構造的な特長を有する特に有用な基材は、たとえば、マイクロスフェアなどのようなもので、固形支持体粒子のサイズを選択することができるパターン化された基材である。これらの特徴を有する模範的なパターン化基材は、Bead Array technology(ビードアレイ技術)(Illumina, Inc.(イルミナ社)、San Diego, CA)に関連して使用されるエッチングされた基材である。さらなる例は、米国特許第6,770,441号において記載され、それは参照することによってここに組み込まれる。

30

#### 【0157】

ここに使用されるように、用語「固定化された」とは、核酸に関して使用されるとき、共有結合または非共有結合(群、複数も可能であることを表す)を介した固形支持体への直接的または間接的な付着を意味することを意図する。本発明の一定の実施態様では、共有結合による付着を使用することができるが、必要とされるもののすべては、たとえば、核酸の増幅および/またはシーケンシングを必要とする適用において、支持体を用いることが意図される条件下で、支持体に対して静止するか、または付着することである。キャプチャープライマーまたは増幅プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、3'端が酵素的伸長に利用可能であり、およびシーケンスの少なくとも一部分が相補的シーケンスにハイブリダイズすることが可能であるように固定化することができる。固定化は、表面結合オリゴヌクレオチドへのハイブリダイゼーションによって行うことができ、この場合、固定化オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、3'-5'配向でありうる。あるいは、固定化は、たとえば、上記の共有結合のような塩基対形成ハイブリダイゼーション以外の

40

50

手段によって行うことができる。

【0158】

ここに使用されるように、用語「アレイ」は、相対的な位置に従って互いに区別され得る部位の集団を指す。アレイの異なる部位にある異なる分子は、アレイにおいて部位の位置に応じて互いに区別することができる。アレイの個々の部位は、特定のタイプの一以上の分子を含むことができる。たとえば、部位は、特定のシーケンスを有する単一の標的核酸分子を含むことができ、または部位は、同じシーケンス（および/またはその相補的なシーケンス）を有するいくつかの核酸分子を含みうる。アレイの部位は、同じ基材上に位置する異なる特長であり得る。模範的な特長には、制限されないが、基材におけるウェル、基材においてまたは基材でのビーズ（または他の粒子）、基材からの突起、基材でのリッジまたは基材においてチャンネルが含まれる。アレイの部位は、それぞれ異なる分子を有する別々の基材であってもよい。別個の基材に付着する異なる分子は、基材が結合する表面上の基材の位置に従い、または液体またはゲルにおいて基材の位置に従って識別することができる。別個の基材が表面上に配置される模範的なアレイには、制限されないが、ウェルにおけるビーズを有するものが含まれる。

10

【0159】

ここに使用されるように、用語「複数」は、二以上の異なるメンバーの集団を意味することが意図される。複数のものは、サイズが小、中、大から非常に大きいものまでに及ぶことができる。小さな複数のサイズは、たとえば、数メンバーから数十メンバーまでに及ぶことができる。中規模の複数の範囲は、たとえば、数十のメンバーから約100のメンバーまたは何百のメンバーに及ぶ可能性がある。大多数の多様性は、たとえば、数百のメンバーから約1000のメンバー、何千のメンバー、そして最大で数万に及ぶ可能性がある。非常に大きな複数のものは、たとえば、数万のメンバーから数十万、百万、何千万、何億ものメンバーに及ぶ可能性がある。したがって、複数は、サイズにおいてメンバーの数によって測定されるように、二から一億をはるかに超えるメンバー、さらには、上記の模範的な範囲の範囲内およびより一層大きなすべてのサイズの範囲であり得る。マイクロアレイ内の模範的な数の特長には、 $1.28\text{cm}^2$ 内での複数の約500000またはそれよりも多くの別個の特長が含まれる。模範的な核酸の複数性には、たとえば、約 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ および $1 \times 10^6$ またはそれらよりも多くの異なる核酸種の集団が含まれる。したがって、用語の定義は、二より大きいすべての整数値を含むことを意図する。本発明での複数の核酸の上限は、たとえば、本発明での核酸サンプルにおいてヌクレオチドシーケンスの理論的多様性によって設定することができる。

20

30

【0160】

ここに使用されるように、用語「核酸」は、任意の状況；たとえば、プローブ、標的またはプライマーにおいて提示される核酸分析物を含め、リボ核酸またはデオキシリボ核酸またはその類似体を意味することを意図する。本発明での核酸の特定の形態は、生物において見出されるすべてのタイプの核酸、ならびに化学合成によって生成されるポリヌクレオチドなどのような合成核酸を含む。本発明の方法によって生成されるマイクロアレイへの取り込みによる分析に適用可能な核酸の特定の例は、ゲノムDNA（gDNA）、発現されたシーケンスタグ（ESTs）、DNAコピーされたメッセンジャーRNA（cDNA）、RNAコピーされたメッセンジャーRNA（cRNA）、ミトコンドリアDNAまたはゲノム、RNA、メッセンジャーRNA（mRNA）および/または他のRNA集団を含む。これらの模範的な核酸の断片および/または一部分もまた、ここに使用されるように用語の意味内に含まれる。

40

【0161】

ここに使用されるように、用語「二重鎖」は、核酸分子に関して使用されるとき、核酸分子において実質的にすべてのヌクレオチドが相補的なヌクレオチドに水素結合されることを意味する。部分的に二重鎖の核酸は、相補的なヌクレオチドに水素結合したそのヌクレオチドの少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、80%、90%または95%を有することができる。

【0162】

50



ここに使用されるように、用語「一本鎖」は、核酸分子に関して使用されるとき、核酸分子においてヌクレオチドのいずれも本質的に相補的ヌクレオチドに水素結合しないことを意味する。

【0163】

ここに使用されるように、用語「標的ポリヌクレオチド」は、分析または作用の対象であるポリヌクレオチドを意味することが意図される。分析または作用は、ポリヌクレオチドを複製、増幅、シーケンシングおよび/または核酸調査 (nucleic acid interrogation) のための他の手順に供することを含む。標的ポリヌクレオチドは、分析されるべき標的シーケンスへのヌクレオチドシーケンス付加を含むことができる。たとえば、標的ポリヌクレオチドは、分析されるべき標的ポリヌクレオチドシーケンスに隣接するプライマー結合部位として機能するアダプターを含め、一以上のアダプターを含み得る。キャプチャーオリゴヌクレオチドまたはキャプチャープライマーにハイブリダイズした標的ポリヌクレオチドは、キャプチャーオリゴヌクレオチドの5'または3'端を越えて伸びるヌクレオチドを含むことができ、標的ポリヌクレオチドのすべてが伸長し易くならないようにする。特定の実施態様では、以下でさらに詳細に説明するように、複数の標的ポリヌクレオチドには、それらの標的ポリヌクレオチドシーケンスにおいて異なる異なる種が含まれるが、異なる種の二以上に対して同じであるアダプターを有する。特定の標的ポリヌクレオチドシーケンスに隣接し得る二つのアダプターは同じシーケンスを有することができ、または二つのアダプターは異なる配列を有することができる。したがって、複数の異なる標的ポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチドシーケンスの各端部に同じアダプターシーケンスまたは二つの異なるアダプターシーケンスを有することができる。したがって、複数の標的ポリヌクレオチドにおいての種は、たとえば、シーケンシングによって評価される未知シーケンスの領域に隣接する既知シーケンスの領域を含むことができる。標的ポリヌクレオチドが単一端にアダプターを所有する場合、アダプターは標的ポリヌクレオチドの3'端または5'端のいずれかに位置することができる。標的ポリヌクレオチドは、任意アダプターなしで使用することができ、その場合、プライマー結合シーケンスは標的ポリヌクレオチドに見出されるシーケンスから直接得ることができる。

【0164】

ここに使用されるように、用語「キャプチャープライマー」は、分析またはたとえば、増幅またはシーケンシング反応の、プライマーアニーリングステップにおいて遭遇する条件下に核酸調査に供されるべき一本鎖ポリヌクレオチド配列に特異的にアニーリングすることができるヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを意味することを意図する。用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、ここでは互換的に使用される。異なる用語は、特に断りのない限り、サイズ、配列、または他の特性における特定の違いを示すことを意図するものではない。説明を明確にするために、用語は、いくらかの核酸種を含む特定の手法または組成物を記載する場合に、核酸の一つの種を別の核酸と区別するために使用され得る。

【0165】

ここに使用されるように、「標的特異的」という用語は、キャプチャープライマーまたは他のオリゴヌクレオチドに関して使用されるとき、標的ポリヌクレオチドシーケンスに特異的なヌクレオチドシーケンスを含む、すなわち、標的ポリヌクレオチドの識別性領域に選択的にアニーリングすることが可能なヌクレオチドを含むキャプチャープライマーまたは他のオリゴヌクレオチドを意味することを意図する。標的特異的キャプチャープライマーは、オリゴヌクレオチドの単一の種を有することができ、またはそれは異なるシーケンスを伴う二以上の種を含むことができる。したがって、標的特異的キャプチャープライマーは、3、4、5、6、7、8、9または10またはそれらよりも多くの異なるシーケンスを含めて、二以上のシーケンスであり得る。標的特異的キャプチャーオリゴヌクレオチドは、標的特異的キャプチャープライマーシーケンスおよびユニバーサルキャプチャープライマーシーケンスを含み得る。たとえば、シーケンシングプライマーシーケンスなどのような他のシーケンスおよびその他同種類のものなども、標的特異的キャプチャープライマーに

10

20

30

40

50

含めることができる。

【0166】

比較して、「ユニバーサル」という用語は、キャプチャプライマーまたは他のオリゴヌクレオチドシーケンスに関して使用するとき、複数のキャプチャプライマーの中で共通のヌクレオチドシーケンスを有するキャプチャプライマーまたは他のオリゴヌクレオチドを意味することを意図する。共通のシーケンスは、たとえば、同じアダプターシーケンスに相補的なシーケンスであり得る。ユニバーサルキャプチャプライマーは、異なる種を必ずしも区別せずに複数の異なるポリヌクレオチドを調べるために適用可能であるが、標的特異的キャプチャプライマーは異なる種を区別するために適用可能である。

【0167】

ここに使用されるように、用語「アンプリコン」は、核酸に関して使用されるとき、核酸を複製する生成物を意味し、そこでは、生成物は核酸の少なくとも一部分の核酸シーケンスと同じか、または相補的なヌクレオチドシーケンスをもつ。アンプリコンは、たとえば、ポリメラーゼ伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ローリングサークル増幅（RCA）、ライゲーション伸長、またはライゲーション連鎖反応を含め、鋳型として核酸またはそのアンプリコンを使用する様々な増幅方法のいずれかによって生成することができる。アンプリコンは、特定のヌクレオチドシーケンス（例は、PCR生成物）の単一コピーまたはヌクレオチドシーケンスの複数のコピー（例は、RCAのコンカテマー生成物）を有する核酸分子であり得る。標的核酸の第一のアンプリコンは相補的コピーであり得る。続くアンプリコンは、第一のアンプリコンの生成後、標的核酸または第一のアンプリコンから作り出されるコピーである。続くアンプリコンは、標的核酸と実質的に相補的であるか、または標的核酸と実質的に同一であるシーケンスを有することができる。

【0168】

生成されることができる鋳型コピーまたはアンプリコンの数は、増幅反応の適切な修飾によって、たとえば、増幅反応において様々なプロセッシング性のポリメラーゼを使用すること、および/または増幅反応が行われる時間の長さを変動させること、ならびに増幅収率に影響を及ぼす当分野で知られる他の条件の修飾を含め、調整することができる。核酸鋳型のコピー数は、少なくとも1、10、100、200、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000および10000コピーであり得、および特定のアプリケーションに依存して変動させることができる。

【0169】

ここに使用されるように、用語「クローナル集団（クローン集団とも言う）」は、特定のヌクレオチドシーケンスに関して同種である核酸の集団を指す。同種のシーケンスは、少なくとも10ヌクレオチド長、またはそれよりも長く、たとえば、少なくとも50、100、250、500または1000ヌクレオチド長であることができる。クローン集団は、単一の標的核酸または鋳型核酸から導き出されることができる。クローン集団においての本質的にすべての核酸は、同じヌクレオチドシーケンスを有する。クローン性から離れることなく、少数の変異（例は、増幅アーチファクトによる）がクローン集団において生じ得ることが理解されよう。

【0170】

ここに使用されるように、用語「それぞれ」は、アイテムの集合に関して使用されるとき、集合において個々のアイテムを識別することを意図するが、文脈上明白に他の意味を示さない限り必ずしも集合においてあらゆるアイテムに言及しない。

【0171】

ここに使用されるように、用語「直接」は、基材の表面を覆う層に関して使用されるとき、層が、たとえば、例として、接着剤層などのような重要な中間層なしで基材の表面をカバーすることを意味することを意図する。表面を直接覆う層は、共有結合または非共有結合を含め、任意の化学的または物理的相互作用を通してこの表面に付着することができる。

【0172】

ここには、基材上に固定化された核酸を増幅するためのマイクロアレイ、方法およびキッ

10

20

30

40

50

ト、ならびに固定化されたキャプチャープライマーを修飾する方法が提供される。

【0173】

ここに提供される方法は、ウェルまたは特色ごとにウェルまたは特色において第一の層での第一の対のキャプチャープライマーを使用してパターン化されたフローセルの単一の標的ポリヌクレオチドの初期キャプチャーおよび固定化を含むことができる。初期の標的ポリヌクレオチドキャプチャーの後に、単一の標的ポリヌクレオチドの初期増幅を行い、例は、KEAによって、ウェルまたは特色内に標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクロノナル集団を生成することができる。例は、図1-4を参照。その後、標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクロノナル集団は、その後のシーケンシング反応における特色またはウェルの輝度、シグナル強度またはSNRを増加させるために、例は、KEAまたはPCRによって、ウェルまたは特色の制限を超えて拡大することができる。

10

【0174】

ウェルまたは特色を超えた標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクロノナル集団の拡大は、例は、ウェルを取り囲む第二の層または標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクロノナル集団を含む特色において3'-ブロックされたユニバーサルプライマーをグラフトすることによって、ここに提供される方法に従い達成することができる。例は、図1.4および1.5を参照。アンプリコンの拡大は、例は、3'-ブロックされたユニバーサルプライマーを脱保護して後に、PCRまたはKEAによって起こすことができる。例は、図1.6および1.7を参照。

【0175】

ここに提供されるいくつかの方法では、標的ポリヌクレオチドをポリヌクレオチドライブラリーのメンバー（例は、SBS3またはSBS8プライマー）として認識するキャプチャープライマーを用いることによって、ウェルまたは特色内の標的ポリヌクレオチドの初期のキャプチャーが起こる。例は、図2.2および2.6を参照。モノクロノナル標的ポリヌクレオチドアンプリコンのその後の拡大は、ウェルまたは特色を取り囲む層にグラフトされ、モノクロノナル標的ポリヌクレオチドアンプリコンの標的ポリヌクレオチドを認識するユニバーサルキャプチャープライマー（例は、P5またはP7プライマー）を用いて起こる。例は、図2.4および2.6を参照。

20

【0176】

ここに提供されるいくつかの方法では、ウェルまたは特色内の標的ポリヌクレオチドの初期のキャプチャーは、ウェルまたは特色内の第一の層に位置するキャプチャープライマーの第一の対を使用して起こり、および次いで標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクロノナル集団を生成するためにキャプチャーされた標的ポリヌクレオチドがこのウェル内で続けられる。例は、図3.1-3.4を参照。引き続いて第二の対のキャプチャープライマーがウェルを取り囲む層においてグラフトされ、および標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクロノナル集団の拡大は、第二の対のキャプチャープライマーを用いてPCRまたはKEAによって達成される。例は、図3.5および図3.6を参照。

30

【0177】

ここに提供されるいくつかの方法では、標的ポリヌクレオチドの初期キャプチャー、その増幅および標的ポリヌクレオチドアンプリコンの得られる集団の拡大は、パターン化されたフローセル（例は、1.0  $\mu\text{m}$  直径）の拡大されたウェルまたは特色内で起こり、それは、ユニバーサルキャプチャープライマー（例は、P5およびP7プライマー）およびポリヌクレオチドライブラリーの標的ポリヌクレオチド（例は、P5-SBS3およびP7-SBS8プライマー）を認識するキャプチャープライマーの混合物を含む。例は、図4を参照。

40

【0178】

ここに提供される方法は、パターン化されたフローセルにて高密度で標的ポリヌクレオチドアンプリコンの拡大されたモノクロノナル集団の生成を可能にすることによって標的特定のNGS反応のスループット、感度およびデータ品質を増加させることができる。ここに提供される方法は、シーケンシング反応のスループット、感度およびデータ品質（例は、シーケンスエラーの低い発生率）を高め、および比較的単純な光学的および経済的な装置

50

の使用を可能にする。

【0179】

ここに提供されるマイクロアレイは、一以上のウェル、ウェルの内面および/またはウェルを取り囲む表面を覆う一以上の層を有する基材を含む。

【0180】

ここに提供されるいくつかのマイクロアレイは、複数のウェルを有し、各ウェルは固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有する。例は、図1.5、2.6、3.4および4.3を参照。複数のウェルの異なるウェルは、同じ標的ポリヌクレオチドまたは異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有することができる。

【0181】

ここに提供されるいくつかのマイクロアレイは、一以上の層および一以上の層のそれぞれに一以上キャプチャープライマー対を有する。例は、図1.2、1.4、2.2、2.4、3.2、3.3および4.2を参照。これらのマイクロアレイは、マイクロアレイのウェルにおいて固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の形成を可能にする。例は、図1.5、2.6、3.4および4.3を参照。いくつかのマイクロアレイは、固定化された標的ポリヌクレオチドの運動排除増幅（KEA）およびウェルの範囲内の固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の形成を容易にするように寸法決めされたウェル（例は、ウェル直径は  $1\mu\text{m}$ ）を有する。例は、図1.5、2.6（中央のパネル）、および3.4を参照。マイクロアレイは、第二の増幅ステップにおいて、ウェルの範囲を越えてモノクローナル標的ポリヌクレオチド集団の拡大をさらに可能にすることができる。例は、図1.7、2.6（下部のパネル）および3.6を参照。標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の形成を可能にする他のマイクロアレイは、運動排除に好都合でない拡大ウェル（例は、ウェル径は  $1\mu\text{m}$ ）を有する。例は、図4を参照。いくつかの実施態様では、運動排除に好都合でない拡大ウェルは、少なくとも二対のキャプチャープライマー（例は、P5/P7キャプチャープライマー対）を有する。例は、図4.2を参照。

【0182】

いくつかの実施態様では、排除増幅（ExAmp）とも呼ばれる運動排除増幅（KEA）を使用して等温増幅を行うことができる。本開示の核酸ライブラリーは、それぞれが部位をシードした個々の標的核酸由来のアンプリコンの実質的クローン集団を含む複数の増幅部位を生成するために、増幅試薬を反応させるステップを含む方法を用いて作製することができる。いくつかの実施態様では、増幅反応は、それぞれの増幅部位の容量を満たすのに十分な数のアンプリコンが生成されるまで進行する。このようにして既にシードされた部位を容量に対して充填することは、標的核酸がその部位に着いて増幅するのを阻害し、それによりその部位にアンプリコンのクローン集団が生成される。いくつかの実施態様において、見掛けのクローン性は、増幅部位が容量に満たされなくても、第二の標的核酸がその部位に到達するのに先立って達成され得る。いくつかの条件下では、第一の標的核酸の増幅は、部位に輸送される第二の標的核酸からのコピーの生成を効果的にアウトコンピート（相殺とも言う）するか、または圧倒するのに十分なコピー数が作成される点に進むことができる。たとえば、直径が500nmより小さい円形特色でのブリッジ増幅プロセスを使用する実施態様では、第一の標的核酸の指数関数的増幅の14サイクル後、同じ部位での第二の標的核酸からの汚染が、Illuminaシーケンシングプラットフォームでのシーケンシング・バイ・シンセシスの解析に悪影響を与えるのに不十分な数の汚染性アンプリコンが生成される。

【0183】

上記の例によって実証されるように、アレイにおいての増幅部位は特定の実施態様では完全にクローンであり得るが、必ずしもそうである必要はない。むしろ、いくつかの用途では、個々の増幅部位は、第一の標的核酸由来のアンプリコンを主に占有することができ、第二の標的核酸由来の低レベルの汚染性アンプリコンを有することもできる。アレイは、汚染のレベルがアレイのその後の使用に対して容認できない影響を及ぼさない限り、低レベルの汚染性アンプリコンを有する一以上の増幅部位を有することができる。たとえば、

10

20

30

40

50

アレイが検出用途で使用されるとき、許容される汚染レベルは、ノイズに対する信号または検出技術の分解能に容認できないほど影響を与えないレベルである。したがって、明らかなクローン性は包括的に、ここに記載の方法によって作成されたアレイの特定の使用または用途に関連する。特定の適用のための個々の増幅部位での許容され得る模範的な汚染レベルには、制限されないが、せいぜい0.1%、0.5%、1%、5%、10%または25%の汚染性アンプリコンが含まれる。アレイは、これらの模範的なレベルの汚染性アンプリコンを有する一以上の増幅部位を含むことができる。たとえば、アレイにおける増幅部位の5%、10%、25%、50%、75%、またはさらに100%までは、いくつかの汚染性アンプリコンを有することができる。アレイまたは他の部位の集合において、部位の少なくとも50%、75%、80%、85%、90%、95%または99%またはそれらよりも多くがクローン性または明らかにクローン性であり得ることが理解されるであろう。

10

#### 【0184】

いくつかの実施態様では、運動排除は、プロセスが、別の事象またはプロセスが起こるのを効果的に排除するのに十分に速い速度で起こるときに発生する可能性がある。アレイの部位が溶液からの標的核酸によりランダムにシードされ、および標的核酸のコピーが増幅プロセスにおいて生じてシードされた部位のそれぞれが容量にまで満たされる核酸アレイの作成を例にとる。本開示の運動排除方法によれば、シーディングおよび増幅プロセスは、増幅率がシーディング率を超える条件下で同時に進行することができる。このようにして、第一の標的核酸によってシードされた部位にてコピーが作成される比較的迅速な速度は、増幅のための部位をシーディングすることから第二の核酸を効果的に排除する。運動排除増幅方法は、米国特許出願公開第2013/0338042号の開示に詳細に記載されているように実行することができ、それは、参照することによってその全体がここに組み込まれる。

20

#### 【0185】

運動排除は、増幅を開始するための比較的遅い速度（例は、標的核酸の第一のコピーを作成する遅い速度）対標的核酸の後続のコピーを作成するための比較的速い速度を利用することができる（または標的核酸の第一のコピー）。前のパラグラフの例では、運動排除は、標的核酸のシーディングの比較的遅い速度（例は、比較的遅い拡散または輸送）対核酸シードのコピーにより部位を満たすために増幅が起こる比較的速い速度により起こる。別の模範的な実施態様では、運動排除は、部位をシードした標的核酸の第一のコピーの形成での遅れ（例は、遅れたまたは遅い活性化）対後続のコピーが部位を満たすために作成される比較的速い速度に起因して起こりうる。この例では、個々の部位は、いくつかの異なる標的核酸によりシードされてもよい（例は、いくつかの標的核酸が増幅の前に各部位に存在し得る）。しかし、任意の所与の標的核酸に対する第一のコピー形成は、第一のコピー形成の平均速度が、その後のコピーが生成される速度と比較して比較的遅くなるようにランダムに活性化することができる。この場合、個々の部位はいくつかの異なる標的核酸によりシードされてもよいが、運動排除は、それら標的核酸の一つだけを増幅可能にする。より一層具体的には、第一の標的核酸が増幅のために活性化されると、その部位は迅速にそのコピーで容量まで満たされ、それにより第二の標的核酸のコピーがその部位で作られるのが妨げられる。

30

40

#### 【0186】

増幅試薬は、アンプリコン形成を容易にし、いくつかのケースによってはアンプリコン形成速度を増加させるさらなる成分を含むことができる。例はリコンビナーゼである。リコンビナーゼは、繰り返される侵入/伸長を可能にすることによってアンプリコン形成を促進することができる。より具体的には、リコンビナーゼは、アンプリコン形成の鋳型として標的核酸を用いるポリメラーゼによるポリメラーゼによる標的核酸の侵入およびポリメラーゼによるプライマーの伸長を容易にすることができる。このプロセスは、各ラウンドの侵入/伸長から生成されたアンプリコンがその後のラウンドにおける鋳型として役立つ連鎖反応として反復することができる。このプロセスは、変性サイクル（例は、加熱または化学変性による）が必要とされないもので、標準的なPCRよりも迅速に起こることが可能であ

50

る。このように、リコンビナーゼ促進増幅は等温的に遂行することができる。増幅を促進するために、リコンビナーゼ促進増幅試薬においてATP、または他のヌクレオチド（または場合によってはその非加水分解性アナログ）を含めることが概して望ましい。リコンビナーゼおよび一本鎖結合（SSB）タンパク質の混合物は、SSBが増幅をさらに促進し得るので特に有用である。リコンビナーゼ促進増幅のための模範的な調剤物には、TwistDx（Cambridge（ケンブリッジ）、UK（英国））によるTwistAmpキットとして商業上販売されているものが含まれる。リコンビナーゼが促進された増幅試薬および反応条件の有用な構成要素は、米国特許第5,223,414号および米国特許第7,399,590号に記載されており、これらのそれぞれは参照によりここに組み込まれる。

【0187】

アンプリコン形成を容易にし、および場合によってはアンプリコン形成速度を増加させるために増幅試薬に含めることができる成分の別の例は、ヘリカーゼである。ヘリカーゼは、アンプリコン形成の連鎖反応を可能にすることによってアンプリコン形成を促進することができる。本プロセスは、変性サイクル（例は、加熱または化学変性による）が必要とされないの、標準的なPCRよりも迅速に行うことができる。このように、ヘリカーゼ促進増幅は等温的に行うことができる。ヘリカーゼおよび一本鎖結合（SSB）タンパク質の混合物は、SSBが増幅をさらに促進し得るので、特に有用である。ヘリカーゼ促進増幅のための模範的な調剤物には、Biohelix（バイオヘリックス）（Beverly（ベヴァリー）、MA（米国、マサチューセッツ州））からのIsoAmpキットとして商業上販売されているものが含まれる。さらに、ヘリカーゼタンパク質を含む有用な製剤の例は、米国特許第7,399,590号および米国特許第7,829,284号に記載されており、その各々は参照によりここに組み込まれる。

【0188】

アンプリコン形成を容易にし、および場合によってはアンプリコン形成速度を増加させるために増幅試薬に含めることができる成分のさらに別の例は、オリジン結合（起点結合とも言う）タンパク質である。

【0189】

一態様では、ここには、マイクロアレイが提供され、それには、a) 少なくとも一つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含む基材；b) 内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一つの第一のキャプチャープライマー対を含む第一の層；c) 第一の層およびウェルを取り囲む表面を覆う第二の層が含まれる。

【0190】

いくつかのマイクロアレイでは、ウェルサイズ（例は、直径）は、運動排除増幅（KEA）およびウェル内の標的特異的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の形成に有利な範囲で選定される。核酸ライブラリーの運動排除増幅は、例は、米国特許出願公開第2013/0338042号に記載されており、それを参照によりここに組み込む。たとえば、ウェルのサイズ（例は、直径）は、約30nmおよび約1μmの間、約50nmおよび約800nmの間、約70nmおよび約600nmの間、または100nmおよび約400nmの間で変動させることができる。いくつかの実施態様では、ウェルは約400nmの直径を有する。例は、図1.1を参照。いくつかの実施態様では、ウェルは約1μm未満の直径を有する。模範的なマイクロアレイには、Illumina(R) HiSeq-X10パターン化フローセルでのマイクロアレイが含まれる。

【0191】

別の態様では、ここには、マイクロアレイが提供され、それには、a) 少なくとも一つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含む基材であり、ウェルの直径は約1μm以上であるもの；およびb) 内側ウェル表面を覆い、および少なくとも一つの第一のキャプチャープライマー対および少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対を含む層が含まれる。

【0192】

ここに提供されるマイクロアレイは、例は、米国特許出願公開第2013/0096034号に記載されているように生産することができる。

10

20

30

40

50

## 【0193】

いくつかのマイクロアレイでは、ウェルは、約1  $\mu\text{m}$ および約10  $\mu\text{m}$ の間、約1  $\mu\text{m}$ および約8  $\mu\text{m}$ の間、約1  $\mu\text{m}$ および約6  $\mu\text{m}$ の間、約1  $\mu\text{m}$ および約4  $\mu\text{m}$ の間、または約1  $\mu\text{m}$ および約2  $\mu\text{m}$ の間の直径を有することができる。いくつかの実施態様では、ウェルは約1.5  $\mu\text{m}$ の直径を有する。例は、図4.1を参照。いくつかの実施態様では、ウェルは約1  $\mu\text{m}$ よりも長い直径を有する。例は、図4.1を参照。

## 【0194】

基材は、核酸マイクロアレイの製造に有用であることが当分野で知られる任意の材料から作成され得る。たとえば、基材は、ケイ素または他のシリカまたはケイ酸塩、ガラス、プラスチック、多糖類、ナイロン、ニトロセルロース樹脂、炭素および金属または他の固形支持体であり得る。模範的な基材物質は、米国特許出願公開第2013/0096034号に提供され、それを参照によりここに組み込む。

10

## 【0195】

マイクロアレイは、二以上のウェル（複数のウェル）を有することができる。複数のウェルのウェルは、同じ距離または異なる距離で離間することができる。ウェルの間隔は、例は、二つのウェル間の間隙距離または二つのウェル間の間隙距離および一つのウェルの直径を含む「ピッチ」として表すことができる。例は、図1.1を参照（二つのウェル間の間隙距離は700nm；ピッチは1.5  $\mu\text{m}$ である）。

## 【0196】

いくつかの実施態様では、マイクロアレイは、約100,000および約5,000,000ウェル/ $\text{m}^2$ の間、約250,000および約450,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約500,000および約4,000,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約750,000および約3,500,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約1,250,000および約2,500,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約1,500,000および約2,500,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約1,750,000および約2,250,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、または約2,000,000および約2,250,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間を有することができる。いくつかの実施態様では、マイクロアレイは約2,100,000ウェル/ $\text{mm}^2$ を有する〔例は、Illumina(R)HiSeqパターン化フローセル〕。

20

## 【0197】

いくつかの実施態様において、マイクロアレイは、約10,000および約1,000,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約50,000および約900,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約100,000および約800,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約200,000および約700,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、約300,000および約600,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間、または約400,000および約500,000ウェル/ $\text{mm}^2$ の間を有する。いくつかの実施態様では、マイクロアレイは約450,000ウェル/ $\text{mm}^2$ を有する〔例は、Illumina(R)NextSeqパターン化フローセル〕。

30

## 【0198】

マイクロアレイのウェルは、ローバストな光学的解像度を可能にしながら、ウェル密度を最適化するように間隔を空けて配置することができる。たとえば、複数のウェルの二つのウェルは、約10nmおよび10  $\mu\text{m}$ の間、約50nmおよび8  $\mu\text{m}$ の間、約100nmおよび約6  $\mu\text{m}$ の間、約200nmおよび約4  $\mu\text{m}$ の間、約300nmおよび約2  $\mu\text{m}$ の間、約400nmおよび約1  $\mu\text{m}$ の間、約500nmおよび約900nmの間、または約600nmおよび約800nmの間の間隙距離で離間することができる。いくつかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは約700nmの距離で離間される。例は、図1.1を参照。いくつかの実施態様において、複数のウェルの二以上のウェルは約1  $\mu\text{m}$ 未満の距離で離間される。いくつかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは約1  $\mu\text{m}$ を超える距離で離間される。

40

## 【0199】

複数のウェルの二以上のウェルは、約10nmおよび10  $\mu\text{m}$ の間、約50nmおよび8  $\mu\text{m}$ の間、約100nmおよび約6  $\mu\text{m}$ の間、約500nmおよび約4  $\mu\text{m}$ の間、または約1  $\mu\text{m}$ および約2  $\mu\text{m}$ の間のピッチで配置されることができる。いくつかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは約1.5  $\mu\text{m}$ のピッチで配置される。例は、図1.1を参照。いくつかの実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルが約1  $\mu\text{m}$ 未満のピッチで配置される。いくつか

50

の実施態様では、複数のウェルの二以上のウェルは約1  $\mu\text{m}$ を超えるピッチで間隔を空けられる。

【0200】

ここに提供するマイクロアレイは一以上の層を含む。たとえば、マイクロアレイは、単一の層、第一および第二の層、第一、第二および第三の層などを含むことができる。

【0201】

第一の層は、内側ウェル表面および/またはウェルを取り囲む表面を覆うことができる。いくつかの実施態様では、第一の層はウェルを取り囲む表面を覆わない。第一の層は、たとえば、ウェルの壁の表面およびウェルの底の表面を含め、ウェルの内面全体を覆うことができる。いくつかの実施態様では、第一の層は内側ウェル表面だけを部分的に覆う。たとえば、第一の層は、ウェルの底面の表面だけを覆うことができるが、ウェルの壁の表面は覆わない。第一の層は、複数のウェルのすべてのウェルの内面、または複数のウェルの何分の一かのウェルだけを覆うことができる。たとえば、第一の層は、複数のウェルの100%未満、99%未満、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、2%未満、または1%未満のウェルの内面を覆うことができる。別の例では、第一の層は、複数のウェルの1%より多く、2%より多く、5%より多く、10%より多く、15%より多く、20%より多く、25%より多く、30%より多く、35%より多く、40%より多く、45%より多く、50%より多く、55%より多く、60%より多く、65%より多く、70%より多く、75%より多く、80%より多く、85%より多く、90%より多く、95%より多く、または99%より多くの内側表面を覆うことができる。第一の層は、内側ウェル表面を含め、基材表面を直接的または間接的に、例は、一以上の中間層を介して覆うことができる。一以上の中間層は、たとえば、基材への第一の層の接着性、例は、内側ウェル表面への接着性を改善するために使用することができる。

10

20

【0202】

第二の層は、第一の層および/またはウェルを取り囲む表面を覆うことができる。いくつかの実施態様では、第二の層は第一の層を部分的にだけ覆う。たとえば、第二の層は、ウェルの底部でだけ第一の層を覆うことができる。いくつかの実施態様では、第二の層は第一の層をカバーしない。第二の層は、ウェルを取り囲む表面を完全にか、または部分的にしか覆うことができない。第二の層は、複数のウェルのすべてのウェルを取り囲む表面、または複数のウェルの何分の一かのウェルだけを覆うことができる。たとえば、第二の層は、複数のウェルの100%未満、99%未満、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、2%未満、または1%未満のウェルを取り囲む表面をカバーすることができる。別の例では、第一の層は、複数のウェルの1%を超える、2%を超える、5%を超える、10%を超える、15%を超える、20%を超える、25%を超える、30%を超える、35%を超える、40%を超える、45%を超える、50%を超える、55%を超える、60%を超える、65%を超える、70%を超える、75%を超える、80%を超える、85%を超える、90%を超える、95%を超える、または99%を超えるウェルの周りの表面をカバーすることができる。第二の層は、第一の層および/またはウェルを囲む表面を直接的または間接的に、例は、一以上の中間層を介して覆うことができる。一以上の中間層を、たとえば、第二の層および第一の層の間および/または第二の層およびウェルを取り囲む基材の間の接着性を改善するために使用することができる。

30

40

【0203】

層は、表面にて堆積させることができ、核酸に対する親和性を有し、およびたとえば、プライマーなどのような核酸の堆積に有用である当分野で知られる任意の物質を含むことができる。核酸の堆積に有用なポリマーコーティングは、当分野においてよく知られている。核酸の堆積に有用ないくつかのポリマーコーティングは米国特許出願公開第2014/007

50



9923A1号に記載されており、それは、参照によりここに組み込まれる。模範的なポリマーコーティングには、ポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-co-アクリルアミド(PAZAM)およびシランフリーアクリルアミド(SFA)が含まれる。

【0204】

いくつかの実施態様では、層はポリマーコーティングを含む。いくつかの実施態様では、層においてポリマーコーティングはPAZAMを含む。いくつかの実施態様では、第一の層のポリマーコーティングはPAZAMまたはSFAを含む。いくつかの実施態様では、第二の層のポリマーコーティングはPAZAMまたはSFAを含む。

【0205】

層は一以上のキャプチャープライマーを含むことができる。たとえば、層は、単一のキャプチャープライマー、第一および第二のキャプチャープライマー、第一第二および第三のキャプチャープライマー、などを含むことができる。

10

【0206】

二以上のキャプチャープライマーは任意の割合でウェルに存在し得る。たとえば、第一のキャプチャープライマーおよび第二のキャプチャープライマーは、ほぼ等しい量で、または任意の他の比、例は、モル比で存在し得る。ウェルは、1.1xより大きい、1.2xより大きい、1.3xより大きい、1.4xより大きい、1.5xより大きい、2.0xより大きい、2.5xより大きい、3.0xより大きい、5.0xより大きい、10xより大きい、15xより大きい、20xより大きい、20xより大きい、25xより大きい、30xより大きい、50xより大きい、100xより大きい、300xより大きい、500xより大きい、または1000xより大きい第一のキャプチャープライマーを第二のキャプチャープライマーを超えて過剰に有することができる。マイクロアレイにおいての異なるウェルは、二以上のキャプチャープライマーの同じ比率または異なる比率を有することができる。

20

【0207】

キャプチャープライマーは一以上のキャプチャー領域を含むことができる。キャプチャー領域は、例は、ユニバーサルキャプチャー領域、シーケンシングプライマー結合部位(SBS)、標的特異的キャプチャー領域、所定の開裂部位、たとえば、制限部位などのようなもの、およびリンカー領域、例は、二以上の制限部位を分離するリンカー領域などのようなものを含むことができる。いくつかのキャプチャープライマーには、例は、ユニバーサルキャプチャー領域およびSBSが含まれる。他のキャプチャープライマーには、ユニバーサルキャプチャー領域および標的特異的キャプチャー領域が含まれることができる。キャプチャープライマーは、3'端でブロックされ得る(3'ブロック化される)か、または3'端でアンブロックされ得る(ブロック化され得ない)(3'ブロック化されない)。ブロック化された3'-端を有するプライマーは、たとえば、3'-リン酸終端をなすことができる。ブロックされた3'端を有するいくつかのプライマーは、デブロックング(デブロック化とも言う)をされ得る。デブロックングは酵素反応または化学反応において生じ得る。酵素反応は、例は、キナーゼまたはホスファターゼによって媒介され得る。たとえば、3'-リン酸-終端化プライマーは、T4キナーゼなどのキナーゼによってデブロックされ得る。

30

【0208】

ユニバーサルキャプチャー領域には、例は、ユニバーサルIllumina(R)キャプチャープライマーまたはユニバーサルIllumina(R)キャプチャープライマーと特異的にハイブリダイズする領域のシーケンスを有する領域が含まれ得る。ユニバーサルIllumina(R)キャプチャープライマーには、たとえば、P5

40

5'-AATGATACGGCGACCAACCGA-3'((配列番号1))またはP7

(5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'(配列番号2))またはその断片が含まれる。ユニバーサルIllumina(R)キャプチャープライマーと特異的にハイブリダイズする領域は、例は、Illumina(R)キャプチャープライマーP5の逆相補シーケンス(「抗P5」:

5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'(配列番号3)またはP7(「抗P7」:

5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'(配列番号4))、またはその断片が含まれる。

【0209】

50

SBSには、例は、Illumina(R)シーケンシングプライマー、またはその断片のシーケンスを有する領域、またはIllumina(R)シーケンシングプライマーまたはその断片と特異的にハイブリダイズする領域が含まれ得る。Illumina(R)シーケンシングプライマーには、例は、SBS3

(5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' (配列番号5)) または SBS8 (5'-CGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT-3' (配列番号6)) が含まれる。Illumina(R)シーケンシングプライマー、またはその断片と特異的にハイブリダイズする領域には、例は、Illumina(R)シーケンシングプライマーSBS3の逆相補シーケンス (「抗SBS3」: 5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT-3' (配列番号7)) または SBS8 (「抗SBS8」: 5'-AGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAGACCG-3' (配列番号8))、またはその断片が含まれる。 10

#### 【0210】

キャプチャープライマーは、領域の任意の組合せ、例は、たとえば、P5-SBS3およびP7-SBS8、またはそれらの断片などのようなものの組合せを含め、Illumina(R)P5、P7、SBS3、またはSBS8プライマー領域、またはそれらの断片の任意の組合せを有することができる。

#### 【0211】

キャプチャープライマーは所定の(非ランダムな)開裂部位を含むことができる。可能性のある所定の開裂部位は、例は、米国特許第8,715,966号B2に開示され、それは参照によりここに組み込まれる。所定の部位での開裂は、例は、酵素的開裂または非酵素的開裂として、たとえば、化学的開裂などのようなもので起こり得る。所定の部位、たとえば、制限部位などのようなものでの酵素的開裂は、例は、制限酵素、たとえば、制限エンドヌクレアーゼなどのようなものによって媒介され得る。いくつかの実施態様では、プライマーにおいての所定の開裂部位には、ウラシル塩基が含まれることができる。開裂は、ウラシルDNAグリコシラーゼによるウラシル含有プライマーの処理を通して起こすことができ、プライマーにおいて無塩基部位の形成がされ、次いでエンドヌクレアーゼ、熱またはアルカリによる処理によって続き、無塩基部位でのプライマーを開裂することができる。いくつかの実施態様では、所定の開裂部位には、ジオールリンカーが含まれ、ジオールリンカーは過ヨウ素酸塩で処理することにより開裂することができる。いくつかの実施態様では、所定の開裂部位には、8-オキソ-グアニンが含まれる。 20 30

#### 【0212】

所定の開裂部位には、酵素制限部位が含まれることができる。熟練者(当業者とも言う)に知られる任意の制限酵素または任意の酵素制限部位は、ここに提供される方法または組成物において使用され得る。たとえば、制限エンドヌクレアーゼは、I型酵素(EC3.1.21.3)、II型酵素(EC3.1.21.4)、III型酵素(EC3.1.21.5)、またはIV型酵素(EC3.1.21.5)であり得る。制限エンドヌクレアーゼは、限られないが、たとえば、Alu I、Ava I、Bam HI、Bgl II、Eco P15 I、Eco RI、Eco RII、Eco RV、Hae III、Hga I、Hha I、Hind III、Hinf I、Hpa I、Kpn I、Mbo I、Not I、Pst I、Pvu II、Sac I、Sal I、Sap I、Sau 3A、Sca I、Sma I、Spe I、Spe I、Sph I、Sst I、Stu I、Taq I、Xba I または Xma I が含まれる。制限エンドヌクレアーゼは、組換え制限酵素であり得る。組換え制限酵素には、限られるものではないが、自然または改変DNA結合ドメイン(例は、ジンクフィンガードメイン、TALエフェクタードメイン)およびヌクレアーゼドメイン(例は、IIS型制限酵素FokIの開裂ドメイン)を含め、融合タンパク質が含まれ得る。 40

#### 【0213】

いくつかの実施態様において、制限酵素認識部位には、SapI部位(「5'-GCTCTTCMNN-3' (配列番号9)」)が含まれる。例は、図6Dを参照。

#### 【0214】

制限酵素は、真核生物(例は、植物、昆虫、哺乳動物)および原核生物を含め、それぞれの生体分子を発現する任意の生物から導き出されることができる。一定の実施態様において、生体分子は、真正細菌(例えば、グラム陽性、グラム陰性)、古細菌、酵母、真菌、 50

藻類から導き出される。原核生物は、制限されることなく、たとえば、*Arthrobacter luteus* (アルスロバクター・ルテウス)、*Anabaena variabilis* (アナベナ・バリアビリス)、*Bacillus amyloliquefaciens* (バチルス・アミロリケファシエンス)、*Bacillus globigii* (バチルス・グロビジイ)、*Escherichia coli* (エシェリキア・コリ) RY 13、*Escherichia coli* R245、*Haemophilus aegyptius* (ヘモフィラス・エジプトティウス)、*Haemophilus haemolyticus* (ヘモフィラス・ヘモリティカス)、*Haemophilus influenzae* (*Haemophilus influenza*、ヘモフィラス・インフルエンザエ) Rd、*Haemophilus gallinarum* (ヘモフィラス・ガリナルム)、*Haemophilus parainfluenzae* (*Haemophilus parainfluenza*、ヘモフィラス・パラインフルエンザエ)、*Klebsiella pneumoniae* (*Klebsiella pneumoniae*、クレブシエラ・ニューモニアエ)、*Moraxella bovis* (モラクセラ・ボービス)、*Nocardia otitidis* (ノカルディア・オタイティディス)、*Proteus vulgaris* (プロテウス・ブルガリス)、*Providencia stuartii* (プロピデンシア・スチュアーティイ)、*Serratia marcescens* (セラチア・マルセッセンス)、*Sphaerotilus natans* (スファエロティルス・ナタンズ)、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・アウレウス)、*Streptomyces achromogenes* (ストレプトマイセス・アクロモゲネス)、*Streptomyces albus* (ストレプトマイセス・アルブス) G、*Streptomyces caespitosus* (ストレプトマイセス・カエスピトースス)、*Streptomyces stanford* (ストレプトマイセス・スタンフォード)、*Streptomyces tubercidicus* (ストレプトマイセス・ツパーシディカス)、*Streptomyces phaeochromogenes* (ストレプトマイセス・ファエオクロモゲネス)、*Thermophilus aquaticus* (サーモフィルス・アクアティカス)、*Xanthomonas badrii* (キサントモナス・バドリイ) または *Xanthomonas malvacearum* (キサントモナス・マルバセアルム) を含むことができる。

#### 【0215】

制限酵素は野生型または変異型であり得る。制限酵素は組換え生体分子であり得る。

#### 【0216】

いくつかの実施態様では、本方法には、部分的制限部位を含むキャプチャープライマーをヌクレアーゼと接触させることをさらに含み、そこでは、ヌクレアーゼによって部分的制限部位が除去される。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、エキソヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼIである。

#### 【0217】

キャプチャープライマーは、キャプチャープライマー対を含むことができる。たとえば、第一のキャプチャープライマーは、第一のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーおよび第一のキャプチャープライマー対の第二のプライマーを含め、第一のキャプチャープライマー対であり得る。別の例では、第二のキャプチャープライマーは、第二のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーおよび第二のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーを含め、第二のキャプチャープライマー対であり得る。

#### 【0218】

キャプチャープライマー対のキャプチャープライマーは、任意のキャプチャー領域またはキャプチャー領域の任意の組合せを含むことができる。たとえば、キャプチャープライマー対の第一のプライマーは第一のユニバーサルキャプチャー領域を含み、およびキャプチャープライマー対の第二のプライマーは第二のユニバーサルキャプチャー領域を含むことができる。キャプチャープライマー対のプライマーはSBSをさらに含むことができる。たとえば、キャプチャープライマー対の第一のプライマーは第一のユニバーサルキャプチャープライマー領域および第一のSBSを含み得、およびキャプチャープライマー対の第二のプライマーは、第二のユニバーサルキャプチャー領域および第二のSBSを含み得る。

#### 【0219】

いくつかの実施態様では、キャプチャープライマー対の第一のプライマーには、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれ、およびキャプチャープライマー対の第二のプライマーには、Illumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる。

例は、図1.2を参照。

【0220】

いくつかの実施態様では、キャプチャープライマー対の第一のプライマーには、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれ、およびキャプチャープライマー対の第二のプライマーには、Illumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチドシーケンスが含まれる。例は、図2.2参照。

【0221】

別の例では、第一のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーは第一のユニバーサルキャプチャー領域を含み、第一のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーは第二のユニバーサルキャプチャー領域を含み、第二のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーは第一のユニバーサルキャプチャープライマー領域および第一のSBSを含み、および第二のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーは、第二のユニバーサルキャプチャー領域および第二のSBSを含み得る。

10

【0222】

いくつかの実施態様では、第一のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーはIllumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含み、第一のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含み、第二のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーはIllumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチドシーケンスを含み、および第二のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスおよびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチドシーケンスを含む。例は、図4.2を参照。

20

【0223】

キャプチャープライマー対は、単一のキャプチャープライマー対または複数のキャプチャープライマー対を含むことができる。たとえば、第一のキャプチャープライマー対は、複数の第一のキャプチャープライマー対であり得る。いくつかの実施態様において、第一のキャプチャープライマー対は、少なくとも一つのキャプチャープライマー対である。別の例では、第二のキャプチャープライマー対は、複数の第二のキャプチャープライマー対であり得る。いくつかの実施態様において、第二のキャプチャープライマー対は、少なくとも一つのキャプチャープライマー対である。

30

【0224】

キャプチャープライマーは単一のキャプチャープライマーまたは複数のキャプチャープライマーを含むことができる。

【0225】

キャプチャープライマー対の第一および第二のキャプチャープライマーはそれぞれ、複数のキャプチャープライマーであり得る。たとえば、キャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーは、複数の第一のキャプチャープライマーであることができる。別の例では、キャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーは複数の第二のキャプチャープライマーであり得る。

40

【0226】

いくつかの実施態様では、第一のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーは、第一のキャプチャープライマー対の複数の第一のキャプチャープライマーを含む。いくつかの実施態様では、第一のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーは、第一のキャプチャープライマー対の複数の第二のキャプチャープライマーを含む。いくつかの実施態様では、第二のキャプチャープライマー対の第一のキャプチャープライマーは、第二のキャプチャープライマー対の複数の第一のキャプチャープライマーを含む。いくつかの実施態様において、第二のキャプチャープライマー対の第二のキャプチャープライマーは、第二のキャプチャープライマー対の複数の第二のキャプチャープライマーを含む。

50

## 【0227】

いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第一のキャプチャープライマー対は複数の第一のキャプチャープライマー対である。

## 【0228】

いくつかの実施態様では、第二の層は、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対は複数の第二のキャプチャープライマー対である。

## 【0229】

ここに提供するいくつかのマイクロアレイは、ユニバーサルキャプチャー領域によって隣接されるDNAシーケンシングライブラリーにおいて標的ポリヌクレオチドをキャプチャーすることができる。これらのマイクロアレイは、第一の層において第一のキャプチャープライマーを有することができ、第一の層はユニバーサルキャプチャー領域を有し、およびそれらの3'端でアンブロッック化される。これらのマイクロアレイのいくつかは、第一層においてプライマーと同じユニバーサルキャプチャー領域を有し、および3'ブロックされている第二のキャプチャープライマーと共に第二の層を有する。例は、図1.4を参照。これらのマイクロアレイのいくつかの他のものは、第二のキャプチャープライマーおよび/または第二の層を有しない。例は、図3.2および3.3を参照。

10

## 【0230】

いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第一のキャプチャープライマー対のプライマーは、ユニバーサルキャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第一のキャプチャープライマー対の第一のプライマーはIllumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含み、少なくとも一つの第一のキャプチャープライマー対の第二のプライマーはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含む。

20

## 【0231】

いくつかの実施態様において、第二の層は少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対は複数の第二のキャプチャープライマー対である。

## 【0232】

いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対のプライマーは3'端でブロックされる。いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対のプライマーは、3'-リン酸-終端をなす。いくつかの実施態様において、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対の3'-リン酸終端化プライマーは、ユニバーサルキャプチャー領域を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対の第一のプライマーは、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチドシーケンスを含み、および少なくとも一つの第二のキャプチャープライマー対の第二のプライマーは、Illumina(R)P7プライマーヌクレオチドシーケンスを含む。

30

## 【0233】

ここに提供されるいくつかのマイクロアレイは、SBS領域に隣接するDNA配列決定ライブラリーにおいて標的ポリヌクレオチドを捕捉することができる。例は、図2.2を参照。これらのマイクロアレイは、SBSと組み合わせてユニバーサルキャプチャー領域を有するそれらの第一の層に捕捉プライマーを有することができる。第二の層は、ユニバーサルキャプチャー領域を有し、および3'アンブロッック化された捕捉プライマーを有することができる。いくつかの実施態様において、DNA配列決定ライブラリーは、P5-SBS3および/またはP7-SBS8ヌクレオチド配列、またはその断片に隣接する標的ポリヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施態様では、P5-SBS3および/またはP7-SBS8ヌクレオチド配列のフラグメントは、全長P5-SBS3および/またはP7-SBS8ヌクレオチド配列よりも短く1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25またはそれよりも長いヌクレオチドであることができる。

40

## 【0234】

いくつかの実施態様では、少なくとも一つの第一の捕捉プライマー対のプライマーは、SBS

50

をさらに含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の第1のプライマーは、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチド配列を含み、および少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の第2のプライマーは、Illumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチド配列を含む。

#### 【0235】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、3'端でブロック化されない。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、ユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対の第1のプライマーはIllumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含み、および少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対の第2のプライマーはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。

10

#### 【0236】

ここに提供されるいくつかのマイクロアレイは、複数のウェルを有し、それによって、複数のウェルの各ウェルは、固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有する。固定化された標的ポリヌクレオチドは、例は、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の任意の捕捉プライマーまたは少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対の任意の捕捉プライマーを含め、任意の捕捉プライマーに付着させることができる。標的ポリヌクレオチドは、ウェル内のいくつかのか、またはすべての捕捉プライマーに付着させることができる。マイクロアレイの任意の数のウェルは、1つのウェル、いくつかのウェルまたはすべてのウェルを含め、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有することができる。

20

#### 【0237】

標的ポリヌクレオチドのいくつかのモノクローナル集団は、単一の標的ポリヌクレオチドのアンプリコンから本質的になることができる。標的ポリヌクレオチドのいくつかのモノクローナル集団は、1以上のさらなるポリヌクレオチドの小さな画分を含み得る。たとえば、標的ポリヌクレオチドのいくつかのモノクローナル集団は、単一の優勢な標的ポリヌクレオチドのアンプリコン、および他のポリヌクレオチドの30%未満、20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、3%未満、2%未満、または1%未満の小画分を含むことができる。

#### 【0238】

標的ポリヌクレオチドは、ウェル内のいくつかのか、またはすべての捕捉プライマーに結合させることができる。たとえば、標的ポリヌクレオチドは、ウェル内で捕捉プライマーの0.5%より多く（以下、「より多く」を「超」と称する）、1%超、2%超、3%超、5%超、10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、45%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、98%超、99%超、99.9%超、99.99%超または100%超に結合することができる。

30

#### 【0239】

いくつかのマイクロアレイでは、ウェルの1%超、2%超、3%超、5%超、10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、45%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、98%超、または99%超は、固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有する。

40

#### 【0240】

異なるウェルは、同じ標的ポリヌクレオチドまたは異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有することができる。いくつかのマイクロアレイでは、ウェルの1%超、2%超、3%超、5%超、10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、45%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、98%超、または99%超は、同じ固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有する。いくつかのマイクロアレイでは、ウェルの1%超、2%超、3%超、5%超、10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、45%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超

50

、95%超、98%超、99%超、99.9%超または99.99%超は、異なる固定化標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有する。いくつかのマイクロアレイでは、1より多い、3より多い、30より多い、100より多い、300より多い、1000より多い、3,000より多い、10,000より多い、または30,000より多いウェルは、異なる固定化標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を有する。

【0241】

いくらかの実施態様では、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の複数の捕捉プライマーが標的ポリヌクレオチドに結合される。いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成する。いくらかの実施態様では、少なくとも1つのウェルは複数のウェルを含み、およびそこでは、複数のウェルの2つ以上のウェルは標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。いくらかの実施態様では、複数のウェルの2つ以上のウェルは、同じ標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。いくらかの実施態様では、複数のウェルの2つ以上のウェルは、2つ以上の異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

10

【0242】

いくらかの実施態様では、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対は複数の第1の捕捉プライマー対であり、および少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対は複数の第2の捕捉プライマー対であり、およびそこでは、複数のプライマー第1の捕捉プライマー対の複数のプライマーおよび複数の第2の捕捉プライマー対は複数の標的ポリヌクレオチドに結合される。いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは、少なくとも1つのウェルにおいて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を形成する。いくらかの実施態様では、少なくとも1つのウェルは複数のウェルであり、およびそこでは、複数のウェルの2つ以上のウェルは標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。いくらかの実施態様では、複数のウェルの2つ以上のウェルは同じ標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。いくらかの実施態様では、複数のウェルの2つ以上のウェルは2つ以上の異なる標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を含む。

20

【0243】

ここに提供する核酸を増幅するための方法は、たとえば、マイクロアレイウェルなどのような、ウェルにおいて固定された標的ポリヌクレオチドの拡大したモノクローナル集団の形成を可能にする。いくらかの方法は2段階増幅プロセスを含む。例は、図1-3を参照。この2段階プロセスでは、第一に標的ポリヌクレオチドをKEAに有利な大きさのウェルに捕捉し、およびKEAを実行して、ウェルの範囲内に固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を生成する。単一の標的ポリヌクレオチドは、ウェル内で捕捉して増幅することができる。第二のステップでは、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団は、例は、ブリッジ増幅または第2のKEAによってウェルの限界を超えて拡大される。

30

【0244】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、a) 基材上に第1の層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも1つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、第1の層は内側ウェル表面を覆い；b) 第1の層において少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対を堆積させること；c) 第1の層およびウェルを取り囲む表面を覆う第2の層を基材上に生成すること；d) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、標的ポリヌクレオチドが少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の捕捉プライマーとハイブリダイズするのに十分な条件下で、基材と接触させること、およびe) 第1のKEAを、ウェル内の標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅されることが含まれる。そのような方法の模範的な例示は、例えば、図1に見られる。

40

【0245】

いくらかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、ウェル当たりの単

50

一標的ポリヌクレオチドが少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の捕捉プライマーとハイブリッド形成するに十分な条件下で基材と接触させる。

【0246】

いくつかの実施態様では、第1のKEAは、少なくとも1つのウェルにおいて捕捉プライマーとハイブリダイズした単一標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成する。いくつかの実施態様では、少なくとも1つのウェルは複数のウェルであり、およびアンプリコンのモノクローナル集団は、複数のウェルの2つ以上のウェルにおいて単一標的ポリヌクレオチドから生成される。複数のウェルの2つ以上のウェルは、例は、1%超、2%超、3%超、5%超、10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、45%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超過、80%超過、85%超、90%超、95%超、98%超、99%超、99.9%超、99.99%超または100%超のマイクロアレイのウェルを含むことができる。

10

【0247】

いくつかの実施態様では、アンプリコンのモノクローナル集団は、複数のウェルの2つ以上のウェルにおいて同じ単一の標的ポリヌクレオチドから生成される。いくつかの実施態様では、アンプリコンのモノクローナル集団は、複数のウェルの2つ以上のウェルにおいて2つ以上の単一標的ポリヌクレオチドから生成される。2つ以上の単一標的ポリヌクレオチドは、例は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも30、少なくとも100、少なくとも300、少なくとも1,000、少なくとも3,000、少なくとも10,000、少なくとも30,000、または少なくとも100,000の単一標的ポリヌクレオチドを含むことができる。

20

【0248】

興味ある標的ポリヌクレオチドを含むことが疑われる任意の試料を使用することができる。試料はDNA配列決定ライブラリーを含むことができる。DNA配列決定ライブラリーは、例は、固形組織試料または液状生検から得ることができる。固形組織試料または液状生検試料は、例は、病的な対象または健康な対象から得ることができる。病的な対象は、例は、ガン患者（主として患者）または遺伝病に罹患している患者を含むことができる。健康な対象は、例は、臨床試験のネガティブコントロール群における対象体、または疾患状態に罹患する危険性があると疑われる対象体を含み得る。対象または患者には、例は、任意の哺乳動物（例は、サル、アペット、ラット、マウス、ハムスター、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ヒツジ、およびその他同種類のものなど）を含め、ヒトまたは動物を含むことができる。

30

【0249】

いくつかの実施態様では、本方法は、第2の層において少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対を堆積することをさらに含む。

【0250】

いくつかの実施態様では、第1のKEAを実行するに先立って少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対を堆積する。

【0251】

ここに提供されるいくつかの方法では、第1の層がマイクロアレイのウェルにおいて生成され、および第1の対のユニバーサル捕捉プライマーが第1の層において堆積される。例は、図1.1および1.2を参照。第1の層およびウェルを取り囲むマイクロアレイ表面を覆う第2の層は生成され、および第2の層において第2のユニバーサル捕捉プライマー対が堆積され、第2のプライマー対は第1の対と同じユニバーサル捕捉領域を有するが、3'ブロックされる。例は、図1.3および1.4を参照。3'-および/または5'-端にて隣接するユニバーサルプライマー領域を有する標的ポリヌクレオチドはウェルにおいて捕捉され、第1の対のアンブロック化された捕捉プライマーは伸長され、およびKEAの第1のラウンドは標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団のウェル内での形成をもたらす。例は、図1.5を参照。ユニバーサル捕捉プライマーの第2の対はデブロック化され、およびKEAまたはブリッジ増幅の第2ラウンドが続き、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団がウェルの境

40

50



界を越えて拡大する。例は、図1.6および1.7を参照。

【0252】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマーは、ユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の第1の捕捉プライマーはIllumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含み、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の第2の捕捉プライマーはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは、1つ以上のユニバーサル捕捉領域によって隣接される。

【0253】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、3'端でブロック化される。いくつかの実施態様では、ユニバーサル捕捉領域は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、本方法は、第1のKEAを実行して後に、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーをデブロック化することをさらに含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、T4-キナーゼを用いてデブロック化される。いくつかの実施態様では、本方法は、標的ポリヌクレオチドアンプリコンのモノクローナル集団を拡大するために、ブリッジ増幅または第2のKEAを実行することをさらに含む。

【0254】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、3'端でアンブロック化される。

【0255】

別の態様では、ここには、核酸を増幅する方法が提供され、それには、a) 基材上に第1の層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも1つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、第1の層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b) 少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対を第1の層において堆積させることであり、そこでは、第1の捕捉プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分が含まれる複数の第1の捕捉プライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第2の捕捉プライマーを含み；c) 第1の層およびウェルを取り囲む表面を覆う第2の層を基材上に生成すること；d) 第2の層において少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対を堆積することであり、そこでは、第2の捕捉プライマー対は3'リン酸終端をなし、およびIllumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第1の捕捉プライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第2の捕捉プライマーを含み；e) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、ウェルあたりで単一の標的ポリヌクレオチドについて少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマーとハイブリダイズするのに十分な条件下で、基材と接触させることであり、そこでは、標的ポリヌクレオチドは、ユニバーサルプライマー領域であってそれぞれがIllumina(R)P5'プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7'プライマーヌクレオチド配列を含むものによって隣接され；f) 少なくとも1つのウェル内の単一の標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成するため、第1のKEAを実行することであり、それによって、標的ポリヌクレオチドが増幅され；g) 第2のプライマー対のプライマーをデブロック化するために、基材をT4キナーゼと接触させること、およびh) 単一の標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノクローナル集団がウェルを超えて拡大するために、ブリッジ増幅または第2のKEAを実行することが含まれる。このような方法の模範的な例示は、たとえば、図1に見出せる。

【0256】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、a) 基材上に第1の層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも1つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、第1の層は内側ウェル表面を覆い；b

）少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対を第1の層において堆積すること；c）第1の層およびウェルを取り囲む表面を覆う第2の層を基材上に生成すること；d）複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、標的ポリヌクレオチドについて少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対の捕捉プライマーとハイブリダイズするのに十分な条件下で、基材と接触させること、およびe）ウェル内に標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、第1のKEAを実行することであり、それによって標的ポリヌクレオチドが増幅されることが含まれる。

#### 【0257】

いくつかの実施態様では、第1の層はマイクロアレイのウェルにおいて生成され、および第1の対の捕捉プライマーは第1の層において堆積される。例は、図2.1および2.2を参照。第1の対の捕捉プライマーの捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉領域およびSBSを含み得る。第2の層は生成され、第1の層およびウェルを囲むマイクロアレイ表面が覆われ、および第2の対の捕捉プライマーは第2の層において堆積される。第2の対の捕捉プライマーは、アンブロック化され、および第1の対の捕捉プライマーと同じユニバーサル捕捉領域を含むことができる。例は、図2.3および2.4を参照。隣接するSBS領域を有する標的ポリヌクレオチドはウェルにおいて捕捉され、第1の対の捕捉プライマーは伸長され、およびKEAの第1のラウンドはウェル内に標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の形成をもたらす。例は、図1.6（上部パネルおよび中央パネル）を参照。KEAは継続することができ、および継続されたKEAは、第2の層において捕捉プライマーの第2の対を用いて、標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を、ウェルを超えて拡大させる。例は、図2.6（下部パネル）を参照。

#### 【0258】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第2のプライマー対のプライマーは、ユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマーはSBSをさらに含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1のプライマー対の第1のプライマーは、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチド配列を含み、および少なくとも1つの第1のプライマー対の第2のプライマーは、Illumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは1つ以上のSBSsによって隣接される。

#### 【0259】

いくつかの実施態様において、第1のKEAは、少なくとも1つのウェルを超えてアンプリコンのクローン集団を拡大するために長期間実行される。

#### 【0260】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、a）基材上に第1の層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも1つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、第1の層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b）少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対を第1の層において堆積することであり、そこでは、第1の捕捉プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の少なくとも1つの第1の捕捉プライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の少なくとも1つの第2の捕捉プライマーが含まれ；c）第2の層を基材上に生成することであり、第1の層およびウェルを取り囲む表面が覆われ；d）少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対を第2の層において堆積することであり、そこでは、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第1の捕捉プライマー、およびIllumina(R)P7ヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第2の捕捉プライマーを含み；e）複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、ウェルあたり単一の標的ポリヌクレオチドについて少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマーとハイブリダイズするのに十分な条件下で、基材と接触させることであり、そ

ここでは、複数の標的ポリヌクレオチドは、SBSであってそれぞれがIllumina(R)SBS3'プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)SBS8'ヌクレオチド配列を含むものによって隣接され、およびf)少なくとも1つのウェルの内外で単一の標的ポリヌクレオチドからのアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、長期間KEAを実行することであり、それによって、ウェル内の単一の標的ポリヌクレオチドが増幅され、および少なくとも1つのウェルを越えて標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団が拡大されることが含まれる。そのような方法の模範的な例示は、たとえば、図2に見られる。

#### 【0261】

ここに提供されるいくつかの方法では、第1の層はマイクロアレイのウェルにおいて生成され、および第1の対の捕捉プライマーは第1の層において堆積される。例は、図3.1および3.2を参照。第1の対の捕捉プライマーの捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉領域を含む。第2の層が生成され、ウェルの周囲の第1の層およびマイクロアレイ表面が覆われる。例は、図3.2を参照。隣接するユニバーサル捕捉領域を有する標的ポリヌクレオチドはウェルにおいて捕捉され、第1の対の捕捉プライマーが伸長され、および第1ラウンドのKEAはウェル内で標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団の形成をもたらす。例は、図3.4を参照。捕捉プライマーの第2の対は第2の層において堆積される。第2の対の捕捉プライマーは、アンブロック化され、および第1の対の捕捉プライマーと同じユニバーサル捕捉領域を含むことができる。例は、図3.5を参照。標的ポリヌクレオチドのモノクローナル集団を、第2の層の捕捉プライマーの第2の対を使用してウェルを越えて拡大するために、第2のKEAまたはブリッジ増幅が行われる。例は、図3.6を参照。

#### 【0262】

いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対は、第1のKEAを実行して後に堆積される。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対および少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、ユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、ユニバーサル捕捉領域は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、本方法は、ブリッジ増幅または第2のKEAを、少なくとも1つのウェルを超えて標的ポリヌクレオチドアンプリコンのクローン集団を拡大するために実行することをさらに含む。

#### 【0263】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、a)基材上に第1の層を作成することであり、そこでは、基材は、少なくとも1つのウェル、ウェルを取り囲む表面、および内側ウェル表面を含み、そこでは、第1層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b)少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対を第1の層において堆積させることであり、そこでは、第1のプライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第1の捕捉プライマー、およびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第2の捕捉プライマーを含み；d)第2の層を基材上に生成することであり、第1の層およびウェルを取り囲む表面が覆われ；d)複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、ウェルあたり単一の標的ポリヌクレオチドについて少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマーとハイブリッド形成するのに十分な条件下で、基材と接触させることであり、そこでは、複数のポリヌクレオチドは、ユニバーサルプライマー領域であってそれぞれがIllumina(R)P5'プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7'プライマーヌクレオチド配列を含むものによって隣接され；e)少なくとも1つのウェルの内部で単一の標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクローナル集団を生成するために、第1のKEAを実行することであり、それによって、標的ポリヌクレオチドが増幅され；f)少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対を第2の層において堆積することであり、そこでは、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第1の捕捉プライマー、およびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含めて3'部分を含む複数の第2の捕捉プライマーを含み、およびg)単一の標的ポリヌクレオチドのアンプリコンのモノク

ローナル集団を拡大するために、ブリッジ増幅または第2のKEAを実行することが含まれる。そのような方法の模範的な例示は、たとえば、図3に見られる。

【0264】

ここに提供される方法は、固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクロナル集団を、5%超、10%超、15%超、20%超、25%超、30%超、35%超、40%超、45%超、50%超、55%超、60%超、65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、95%超、または100%超だけ拡大することができる。モノクロナル集団のサイズおよび拡大は、例は、モノクロナル集団の直径に関して、モノクロナル集団内の標的ポリヌクレオチドアンプリコンの数に関して、または配列決定反応中のモノクロナル集団によって生じる相対的信号強度に関してのいずれかでも測定することができる。

10

【0265】

いくつかの実施態様では、ここに提供される方法は、KEAに好都合でない大きさのより一層大きなウェルにおけるワンステップ増幅プロセスを含む。例は、図4を参照。拡大されたウェルは、DNAシーケンシングライブラリーから標的ポリヌクレオチドを捕捉するための小量 (low-abundance) の捕捉プライマーおよび捕捉された標的ポリヌクレオチドを増幅するための多量 (high-abundance) の捕捉プライマーを含むことができ、それによって、より一層大きなウェルの範囲内に固定化された標的ポリヌクレオチドのモノクロナル集団が生成される。

【0266】

別の態様では、ここには、核酸を増幅するための方法が提供され、それには、a) 基材上に層を生成することであり、そこでは、基材は、少なくとも1つのウェル、ウェルを取り囲む表面および内側ウェル表面を含み、そこでは、層は内側ウェル表面を少なくとも部分的に覆い；b) 少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対および少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対を層において堆積させることであり、そこでは、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマー密度は少なくとも第2のプライマー対のプライマー密度より高く；c) 複数の標的ポリヌクレオチドを含む試料を、ウェルあたりの単一の標的ポリヌクレオチドについて第2のプライマーとハイブリッド形成するのに十分な条件下で接触させること、およびd) ウェル内で第2のプライマーにハイブリダイズされる単一の標的ポリヌクレオチドからアンプリコンのモノクロナル集団を生成するために、KEAを実行することであり、それによって、単一の標的ポリヌクレオチドが増幅されることが含まれる。そのような方法の模範的な例示は、たとえば、図4に見られる。

20

30

【0267】

いくつかの実施態様では、ウェルは約1  $\mu\text{m}$  の直径を有する。いくつかの実施態様では、ウェルは約1  $\mu\text{m}$  以上の直径を有する。いくつかの実施態様では、ウェルは約1  $\mu\text{m}$  以下の直径を有する。

【0268】

いくつかの実施態様では、ウェルあたりの単一の標的ポリヌクレオチドについて第2のプライマーとハイブリッド形成するのに十分な条件は、低濃度の標的ポリヌクレオチドまたはDNA配列決定ライブラリーを含む。いくつかの実施態様では、ウェルあたりの単一の標的ポリヌクレオチドについて第2のプライマーとハイブリダイズするのに十分な条件は、KEAによって第1の捕捉された標的ポリヌクレオチドの迅速な増幅を含む。KEAによって最初に捕捉された標的ポリヌクレオチドの迅速な増幅は、第2の標的ポリヌクレオチドが、第1の捕捉された標的ポリヌクレオチドと同じウェルについて捕捉プライマーにハイブリダイズするのを妨げることができる。

40

【0269】

いくつかの実施態様では、複数の標的ポリヌクレオチドは、SBSsであってそれぞれがIllumina(R) SBS3' プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R) SBS8' プライマーヌクレオチド配列を含むものによって隣接される。

【0270】

いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対のプライマーは、

50

ユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第1の捕捉プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含む複数の第1の捕捉プライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む複数の第2の捕捉プライマーを含む。

【0271】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対のプライマーは、ユニバーサル捕捉領域およびSBSを含む。いくつかの実施態様において、少なくとも1つの第2の捕捉プライマー対は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチド配列を含む複数の第1の捕捉プライマーおよびIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチド配列を含む第2の複数の捕捉プライマーを含む。

10

【0272】

別の態様では、ここには、基材上に固定化される捕捉プライマーを修飾するための方法が提供される。具体的には、ここに提供される方法は、パターン化されたフローセルのウェルにおいてユニバーサル捕捉プライマーを、パターン化フローセルの1つ以上のウェルにモノクローナル標的ポリヌクレオチド特異的捕捉プライマーを生成するために、およびモノクローナル標的ヌクレオチド特異的捕捉ウェルまたはパッドをパターン化されたフローセル上に生成するために、修飾することを可能にする。例は、図10を参照。本方法は、パターン化されたフローセルでの鋳型核酸ライブラリーの排除増幅(exclusion amplification)(KEAによる)を含むことができる。ここに提供されるいくつかの方法の模範的な例示が、たとえば、図6および7に示される。各鋳型核酸は、1つ以上の標的特異的捕捉領域を含み得る。例は、図6A-dを参照。パターン化されたフローセル上の鋳型核酸ライブラリーの排除増幅は、パターン化されたフローセルの1つ以上のウェルまたはパッドにおける鋳型核酸アンプリコンのモノクローナル集団の形成をもたらす。例は、図7Aを参照。鋳型核酸アンプリコンのモノクローナル集団のさらなる処理、例は、制限酵素を用いたものは、ユニバーサル捕捉領域および標的特異的捕捉領域を含むキメラ捕捉プライマー、および再生されたユニバーサル捕捉プライマーを産生することができる。例は、図7B-Cを参照。いくつかの実施態様では、複数のモノクローナル標的特異的ウェルまたはパッドは、異なるウェルまたはパッドが目的の異なる標的ポリヌクレオチドを標的特異的に捕捉することができるように、パターン化フローセル上に形成される。例は、図7Dを参照。

20

30

【0273】

ここに提供される方法は、鋳型核酸を固定化された捕捉プライマーにハイブリダイズさせることを含むことができる。例は、図7Aを参照。鋳型核酸は、その3'端および/または5'端に隣接するユニバーサルキャプチャー領域、標的特異的キャプチャー領域、および1つ以上の制限部位を含むことができる。例は、図6A-図6Dを参照。鋳型核酸は、鋳型の隣接するユニバーサル捕捉領域およびプライマーの3'端ユニバーサル捕捉領域のうちの1つ以上を介して固定された捕捉プライマーとハイブリダイズすることができる。例は、図7Aを参照。

【0274】

いくつかの実施態様では、複数の鋳型核酸は、複数の固定化された捕捉プライマーとハイブリッド形成される。複数の鋳型核酸は、複数の同じ鋳型核酸および/または複数の異なる鋳型核酸を含むことができる。異なる鋳型核酸は、例は、異なる標的特異的捕捉領域を有することによって、または異なる位置に同じ標的特異的捕捉領域を有することによって、他のものに達することから区別することができる。

40

【0275】

鋳型核酸を、パターン化されたフローセル上に固定化された捕捉プライマーとハイブリダイズさせるとき、ハイブリダイゼーション条件は、パッドあたり単一の鋳型核酸だけがパッドにおいて固定化された捕捉プライマーとハイブリダイズするように調節することができる。パッドあたり単一の鋳型核酸だけのハイブリダイゼーションは、パターン化されたフローセルにて1つ以上のパッド上で生じ得る。パターン化されたフローセルの2つ以上の

50

パッドは、それぞれ、同じ核酸配列（例は、同じ標的特異的捕捉配列）または異なる核酸配列（例は、異なる標的特異的捕捉配列）を有する単一鑄型核酸とハイブリッド形成され得る。

【0276】

標的核酸とハイブリダイズした捕捉プライマーは、鑄型核酸に相補的である固定化された伸長生成物を形成させるために、伸長させる。パターン化されたフローセルでは、1つ以上のパッドは、単一の伸長生成物だけを有することができる。パターン化されたフローセル上の2つ以上のパッドは、それぞれ、同じ核酸配列または異なる核酸配列を有する単一の伸長生成物を有することができる。異なる伸長生成物は、例は、異なる標的特異的捕捉領域を有することによって、または異なる位置に同じ標的特異的捕捉領域を有することによって、区別することができる。

10

【0277】

伸長生成物の3'端は、その相補的3'端ユニバーサル捕捉領域を介して伸長していない固定化捕捉プライマーとハイブリダイズすることができ、それによって、ブリッジ構造が形成される。ブリッジ増幅の1回以上のラウンドを、単一の伸長生成物から固定化された鑄型核酸のモノクローナルクラスターをパッドごとに形成するために行う。パターン化されたフローセル上の異なるパッドは、同じ固定化鑄型核酸または異なる固定化鑄型核酸のモノクローナルクラスターを有することができる。

【0278】

固定化された鑄型核酸は、固定化されたキメラ捕捉プライマーおよび再生されたユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素で切断されることができる。例は、図7B-Cを参照。キメラ捕捉プライマーはそれぞれ、捕捉領域および標的特異的捕捉領域を有する。パターン化されたフローセル上では、1つ以上のパッドの各々が、同じである複数のキメラ捕捉プライマーを有する。例は、図7Cを参照。パターン化されたフローセルでの2つ以上のパッドは、同じキメラ捕捉プライマーまたは異なるキメラ捕捉プライマーである複数存在するキメラ捕捉プライマーを有することができる。例は、図7Dを参照。異なるキメラ捕捉プライマーは、例は、異なる標的特異的捕捉領域を有することによって区別することができる。再生されたユニバーサル捕捉プライマーは、切断されたユニバーサル捕捉領域またはヌクレオチド伸長を有する3'末端を有することができる。いくつかのヌクレオチド伸長には、部分的な制限部位が含まれ得る。

20

【0279】

別の態様では、本開示は、固定化された捕捉プライマーを修飾するための方法を提供し、それには、a) 複数の固定化された捕捉プライマーを含む基材を、少なくとも1つの鑄型核酸と、少なくとも1つの固定化された鑄型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で接触させることであり、そこでは、複数の固定化された捕捉プライマーは、3'-ターミナルユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数のプライマーおよび3'-ターミナルユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のプライマーを含み、およびそこでは、各鑄型核酸は、5'-ターミナルおよび3'-ターミナルユニバーサル捕捉領域YまたはZによって隣接され、および1つ以上の制限部位および5'-ターミナルユニバーサル捕捉領域および1つ以上の制限部位の間または3'-ターミナルユニバーサル捕捉領域および1つ以上の制限部位の間の標的特異捕捉領域を含み、およびb) 鑄型核酸にハイブリダイズされた少なくとも1つの固定された捕捉プライマーを、少なくとも1つの鑄型核酸に相補的な少なくとも1つの固定化された伸長生成物を生成するために伸長することが含まれる。

40

【0280】

いくつかの実施態様では、鑄型核酸のユニバーサル捕捉領域Yおよび/またはZは、固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域において核酸配列と同じ核酸配列を含むことができる。

【0281】

いくつかの実施態様において、鑄型核酸のユニバーサル捕捉領域Yおよび/またはZは、固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域において核酸配列に相補的な核酸配列

50

を含み得る。

【0282】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸の第1のユニバーサル捕捉領域YまたはZは、第1の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域において核酸配列に相補的な核酸配列を含むことができ、および鋳型核酸の第2のユニバーサル捕捉領域YまたはZは、第2の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域において核酸配列と同じ核酸配列を含むことができる。

【0283】

ユニバーサル捕捉領域YまたはZは、同じ核酸配列または異なる核酸配列を有することができる。ユニバーサル捕捉領域Yは、鋳型核酸の3'端または5'端にあり得る。ユニバーサル捕捉領域Zは、鋳型核酸の3'端または5'端にあり得る。ユニバーサル捕捉領域YまたはZは、任意のユニバーサル捕捉領域を含むことができる。

10

【0284】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、第1のユニバーサル捕捉領域で、第1の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域の核酸配列を含むその3'端または5'端でのもの、および第2のユニバーサル捕捉領域で、第1のユニバーサル捕捉領域からの対向する(3'-または5'-)端でのものを含み、それによって、第2のユニバーサル捕捉領域は、第2の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域に相補的な核酸配列を含む。

【0285】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、第1のユニバーサル捕捉領域Yで、第1の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Y'のヌクレオチド配列を含むもの、および第2のユニバーサル捕捉領域Z'で、第2の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Zのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその3'端でのものを含む。

20

【0286】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、第1のユニバーサル捕捉領域Zで、第1の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Z'のヌクレオチド配列を含むその5'端でのもの、および第2のユニバーサル捕捉領域Y'で、第2の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Yのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその3'端でのものを含む。

【0287】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、第1のユニバーサル捕捉領域Y'で、第1の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Yのヌクレオチド配列を含むその5'端でのもの、および第2のユニバーサル捕捉領域Zで、第2の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Z'のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその3'端でのものを含む。

30

【0288】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、第1のユニバーサル捕捉領域Z'で、第1の固定化された捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域Zのヌクレオチド配列を含むその5'端でのもの、および第2のユニバーサル捕捉領域Yで、第2の固定化された捕捉プライマーのユニバーサルキャプチャー領域Y'のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその3'端でのものを含む。

40

【0289】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、Illumina(R)P7プライマーのヌクレオチド配列を含むその5'端での第1のユニバーサル捕捉領域、およびIllumina(R)P5プライマーのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその3'端での第2のユニバーサル捕捉領域を含む。例は、図7Aを参照。

【0290】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、Illumina(R)P7プライマーのヌクレオチド配列を含むその3'端での第1のユニバーサル捕捉領域、およびIllumina(R)P5プライマーのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその5'端での第2のユニバーサル捕捉領域を含む。

50

## 【0291】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、Illumina(R)P5プライマーのヌクレオチド配列を含むその5'端での第1のユニバーサル捕捉領域、およびIllumina(R)P7プライマーのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその3'端での第2のユニバーサル捕捉領域を含む。

## 【0292】

いくつかの実施態様では、鋳型核酸は、Illumina(R)P5プライマーのヌクレオチド配列を含むその3'端での第1のユニバーサル捕捉領域、およびIllumina(R)P7プライマーのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含むその5'端での第2のユニバーサル捕捉領域を含む。

10

## 【0293】

鋳型核酸は、1つ以上の標的特異的捕捉領域を有することができる。標的特異的捕捉領域は、8を超え、10を超え、12を超え、14を超え、16を超え、16を超え、18を超え、20を超え、22を超え、24を超え、26を超え、28を超え、または30を超える核酸を含む。いくつかの標的特異的捕捉領域は、10および20の間の核酸の標的特異的捕捉配列を有する。いくつかの鋳型核酸において、1つ以上の標的特異的捕捉領域は、3'ターミナルユニバーサル捕捉領域および制限部位の間または5'ターミナルユニバーサル捕捉領域および制限部位の間に位置することができる。例は、図6AおよびBを参照。

## 【0294】

鋳型核酸は、2つ以上の標的特異的捕捉領域を有することができる。例は、図6Cを参照。2つ以上の標的特異的捕捉領域は、同じ標的特異的捕捉領域または異なる標的特異的捕捉領域であり得る。いくつかの鋳型核酸は、第1および第2の標的特異的捕捉領域を有する。第1の標的特異的捕捉領域は、3'ターミナルユニバーサル捕捉領域および第1の制限部位の間に位置することができ、および第2の標的特異的捕捉領域は、5'ターミナルユニバーサル捕捉領域および第2の制限部位の間に位置することができる。第1および第2の標的特異的捕捉領域は、同じ標的特異的捕捉領域または異なる標的特異的捕捉領域であり得る。

20

## 【0295】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの鋳型核酸は、2つの制限部位および2つの制限部位の間のスペーサー領域を含む。いくつかの実施態様では、2つの制限部位はSapI制限部位である。いくつかの実施態様では、スペーサー領域は約150塩基を含む。

30

## 【0296】

少なくとも1つの鋳型核酸は複数の鋳型核酸であり得る。複数の鋳型核酸は複数の同じ鋳型核酸または複数の異なる鋳型核酸であり得る。いくつかの方法では、少なくとも1つの鋳型核酸は、2を超え、3を超え、5を超え、8を超え、10を超え、15を超え、20を超え、30を超え、100を超え、300を超え、1,000を超え、3000を超え、10,000を超え、30,000を超え、100,000を超え、300,000を超え、または1,000,000を超える異なる鋳型核酸を含む。異なる鋳型核酸の各々は複数の鋳型核酸であり得、それらは同じである。

## 【0297】

鋳型核酸は、1つ以上の制限部位を有することができる。いくつかの鋳型核酸は、2つ以上の制限部位を有する。2つ以上の制限部位は同じ制限部位または異なる制限部位であり得る。いくつかの鋳型核酸は1つ以上のSapI制限部位を有することができる。いくつかの鋳型核酸は、5'-GCTCTTC-3'核酸配列または5'-GAAGACG-3'ヌクレオチド配列を含む制限部位を有する。いくつかの鋳型核酸は、5'-GCTCTTCN/NNN-3'核酸配列または5'-N/NNNGAAGACG-3'核酸配列を含む制限部位を有する。例は、図6Dを参照。

40

## 【0298】

鋳型核酸の2つ以上の制限部位はスペーサー領域によって随意に分けることができる。スペーサー領域の長さは、2つの固定化された捕捉プライマーへの、その隣接する捕捉領域を介しての鋳型核酸のハイブリダイゼーションを容易にし、およびブリッジ形成を促進するために最適化することができる。例は、図6Aおよび7Aを参照。スペーサー領域の長さは、3を超え、5を超え、8を超え、10を超え、15を超え、20を超え、25を超え、50を

50



超え、75を超え、100を超え、125を超え、150を超え、175を超え、200を超え、225を超え、または250を超える核酸を含む。いくつかの鋳型核酸は、約150核酸のスペーサー領域を有する。

【0299】

鋳型核酸は、1つ以上の追加の領域、たとえば、SBSなどのようなものを含むことができる。追加の領域は鋳型核酸でのどこにでも位置することができる。たとえば、SBSは、例として、標的特異的領域および3'ターミナルユニバーサル捕捉領域の間に位置することができる。いくつかの鋳型核酸は2つ以上のSBSを含み得る。

【0300】

いくつかの実施態様では、基材は複数のパッドを含むパターン化されたフローセルである。例は、図7A-Cを参照。いくつかの実施態様では、複数のパッドは、マイクロアレイとして配置された複数のウェルである。いくつかのパターン化フローセルは、3を超え、10を超え、30を超え、100を超え、300を超え、1,000を超え、3,000を超え、10,000を超え、30,000を超え、100,000を超え、300,000を超え、または1000,000を超えるパッドを有することができる。いくつかの実施態様では、複数のパッドの各パッドは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数の固定化されたユニバーサル捕捉プライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数の固定化されたユニバーサル捕捉プライマーを含む。例は、図7A参照。

10

【0301】

いくつかの実施態様では、パッド当たりの単一の鋳型核酸は、複数のパッドにおいて1つ以上のパッドでのパッド当たり単一の捕捉プライマーにハイブリダイズする。例は、図10を参照。複数のパッドの2つ以上のパッドにおいて、2つ以上のパッドの各々における単一の捕捉プライマーにハイブリダイズする単一の鋳型核酸は、同じ標的特異的捕捉領域または異なる標的特異的捕捉領域を含む鋳型核酸でありうる。

20

【0302】

単一の鋳型核酸とハイブリダイズする単一の捕捉プライマーは、鋳型核酸に相補的な単一の固定化された伸長生成物を形成するために、例は、DNA重合によって伸長させることができる。パターン化されたフローセルでは、1つ以上のパッドがそれぞれ固定化された単一の伸長生成物のみを有することができる。パターン化されたフローセルの2つ以上のパッドにおいて、単一の固定化伸長生成物は、同じ標的特異的捕捉領域または異なる標的特異的捕捉領域を含むことができる。

30

【0303】

いくつかの実施態様では、パッド当たり単一の固定化された伸長生成物は、パターン化されたフローセルの複数のパッドの1つ以上のパッドにおいて生成される。例は、図10を参照。いくつかの実施態様において、複数のパッドでは、パッド当たりの単一の固定化された伸長生成物は、同じ鋳型核酸に相補的である。いくつかの実施態様では、複数のパッドにおいて、パッド当たりの単一の固定化された伸長生成物は、2つ以上の異なる鋳型核酸に相補的である。いくつかの実施態様では、パッドあたりの単一の固定化された伸長生成物は、複数のパッドの少なくとも1%、少なくとも3%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のパッドにおいて異なる鋳型核酸に相補的である。いくつかの実施態様では、パッド当たり単一の固定化された伸長生成物は、複数のパッドの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%を超えるパッドにおいて生成される。いくつかの実施態様では、パッド当たり単一の固定化された伸長生成物は、複数のパッドの100%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、または1%未満のパッドにおいて生成される。

40

【0304】

いくつかの実施態様では、本方法は、固定化された二重鎖鋳型核酸の少なくとも1つのモノクロナルクラスターを生成するために、少なくとも1つの固定化された伸長生成物を

50

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって増幅することをさらに含む。固定化された二重鎖鋳型核酸のモノクロナルクラスターは、複数の固定化された二重鎖鋳型核酸を含む。たとえば、モノクロナルクラスターは、3を超え、10を超え、30を超え、100を超え、300を超え、1,000を超え、3,000を超え、10,000を超え、30,000を超え、100,000を超え、300,000を超え、または1,000,000を超える固定化された二重鎖鋳型核酸を含むことができる。

【0305】

ここに提供される方法において、PCRによる増幅は、ブリッジ増幅またはKEAを含み得る。例は、図8Cを参照。

【0306】

図11-15は、標的特異的捕捉領域を含む改変された捕捉プライマーを形成するために、固定化された二重鎖鋳型核酸のモノクロナルクラスターを変換するための方法の模範的な実施態様を示す。個々の対の二重鎖鋳型核酸の変換が示される。

【0307】

図11は、単一のSapI制限部位を含む固定化された二重鎖鋳型核酸を処理するために模範的な方法を例示する。鋳型核酸は、3'端（P7'；Illumina(R)P7プライマー配列に相補的）および5'端（P5；Illumina(R)P5プライマー配列を含む）でのユニバーサル捕捉領域、標的特異的捕捉領域（CP）およびシーケンシングプライマー結合部位（SBS）を含む。図11の固定化された二重鎖鋳型核酸のSapI消化は、ユニバーサル捕捉領域（P7）および標的特異的捕捉領域（CP）を含む固定化二本鎖キメラ捕捉プライマー、およびユニバーサル捕捉領域および部分的SapI制限部位（NCTTCTCG）を含む複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーの形成をもたらす。二重鎖捕捉プライマーの変性は、一本鎖ライブラリーレディ捕捉プライマー（single-stranded library-ready capture primers）の形成をもたらす。図11のライブラリーレディ捕捉プライマーを用いて、P5ヌクレオチド配列および部分SapI制限部位を有する修飾されたユニバーサル捕捉領域を含む配列決定ライブラリーから標的ポリヌクレオチドを配列決定することができる。

【0308】

図12は、固定化されたIllumina(R)P7捕捉プライマーを用いて形成された固定化二重鎖鋳型核酸を処理するための模範的な方法を例示し、それによって、固定化されたIllumina(R)P7捕捉プライマーは予め定められた開裂部位（U；8oG）を含む。図12の固定化された二重鎖鋳型核酸のSapI消化は、ユニバーサル捕捉領域（P7）および標的特異的捕捉領域（CP）を含む固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマー、およびユニバーサル捕捉領域、部分SapI制限部位（NCTTCTCG）および予め定められた開裂部位を含む複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーの形成をもたらす。図12A参照。部分SapI制限部位は、再生されたユニバーサル捕捉プライマーからその所定の開裂部位でプライマーを切断することによって除去することができる。図12B参照。二重鎖捕捉プライマーの変性は、一本鎖ライブラリーレディ捕捉プライマーの形成をもたらす。図12Bのライブラリーレディ捕捉プライマーを用いて、P5ヌクレオチド配列を有するユニバーサル捕捉領域（および部分的SapI制限部位なし）を含む配列決定ライブラリーから標的ポリヌクレオチドを配列決定することができる。

【0309】

図13は、2つのSapI制限部位を含む固定化された二重鎖鋳型核酸を処理するための模範的な方法を例示する。図13の固定化された二重鎖鋳型核酸のSapI消化は、ユニバーサル捕捉領域（P7）および標的特異的捕捉領域（CP）を含む固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマー、および複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーの形成をもたらす。二重鎖捕捉プライマーの変性は一本鎖ライブラリーレディ捕捉プライマーの形成をもたらす。図13の方法では、固定化された二重鎖鋳型核酸のSapI消化により、一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーの標的特異的捕捉領域の1つのヌクレオチドが除去される。図12Bのライブラリーレディ捕捉プライマーを用いて、P5ヌクレオチド配列を有するユニバーサル捕捉領域を含む（および部分的SapI制限部位なし）配列決定ライブラリーから標的ポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドを配列決定することができる。

【0310】

図14は、1つのSapI制限部位を含む固定化された二重鎖鋳型核酸を処理するための模範的な方法を例示する。図14の固定化された二重鎖鋳型核酸のSapI消化は、ユニバーサル捕捉領域（P7）および標的特異的捕捉領域（CP）を含む固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマー、およびユニバーサル捕捉領域（P5）および部分SapI制限部位（NCTTCTCG）を含む複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーの形成をもたらす。二重鎖捕捉プライマーの変性は一本鎖捕捉プライマーの形成をもたらす。一本鎖再生ユニバーサル捕捉プライマーから部分SapI制限部位を除去するために、キメラ捕捉プライマーおよび再生ユニバーサル捕捉プライマーのユニバーサル捕捉領域を相補的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせて二重鎖DNAの領域を形成することができ、その一方、再生された捕捉プライマーの一本鎖の部分制限部位が開裂される。一本鎖部分制限部位は、エキソヌクレアーゼ、たとえば、エキソヌクレアーゼIなどのようなもので処理することによって除去することができる。相補的オリゴヌクレオチドは、例は、変性（例えば、化学的または熱的）によって除去して一本鎖ライブラリーレディ捕捉プライマーを形成することができる。図14のライブラリーレディ捕捉プライマーを用いてP5ヌクレオチド配列を有する（そして部分SapI制限部位はない）ユニバーサル捕捉領域を含む配列決定ライブラリーからの標的ポリヌクレオチドを配列決定することができる。

10

【0311】

図15は、1つのSapI制限部位およびユニバーサルキャプチャー領域PXを含む固定化された二重鎖鋳型核酸を処理するための模範的な方法を例示する。図15のフローセルは、Illumina（R）P5およびP7捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉プライマーPXで、それは所定の開裂部位（ジオール）を含み、それらを含む3つの固定化されたユニバーサル捕捉プライマーを含む。図15の固定化された二重鎖鋳型核酸は、Illumina（R）P7捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉プライマーPXを含む。図16の固定化された二重鎖鋳型核酸のSapI消化は、ユニバーサル捕捉領域（P7）および標的特異的捕捉領域（CP）を含む固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマー、および部分SapI制限部位（NCTTCTCG）を含む複数の二重鎖固定化ユニバーサル捕捉プライマーPXの形成をもたらす。二重鎖捕捉プライマーの変性は一本鎖捕捉プライマーの形成をもたらす。部分SapI制限部位（NCTTCTCG）を含む二重鎖固定化ユニバーサル捕捉プライマーPXは、所定の開裂部位にて切断することによって図15のフローセルから除去することができる。図15のライブラリーレディ捕捉プライマーは、ユニバーサル捕捉領域（P7）および標的特異的捕捉領域（CP）およびIllumina（R）P5捕捉プライマーを含むキメラ捕捉プライマーを含む。図15のライブラリーレディ捕捉プライマーを用いて、P5ヌクレオチド配列を有する（および部分的なSapI制限部位を有さない）ユニバーサル捕捉領域を含む配列決定ライブラリーから標的ポリヌクレオチドを配列決定することができる。

20

30

【0312】

いくつかの実施態様では、本方法は、固定化された二重鎖鋳型核酸の少なくとも1つのモノクロナルクラスターを、固定化された二重鎖鋳型核酸において1つ以上の制限部位を切断してユニバーサル捕捉領域および標的特異的捕捉領域を含む複数の固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマー、および複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、少なくとも1つの制限酵素と接触させることをさらに含む。例は、図7BおよびCを参照。

40

【0313】

二重鎖鋳型核酸は1つ以上の異なる制限酵素と接触させることができる。いくつかの方法では、二重鎖鋳型核酸を2、3、4、5またはそれよりも多くの異なる制限酵素と接触させる。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの制限酵素はSapIを含む。

【0314】

二重鎖キメラ捕捉プライマーおよび再生されたユニバーサル捕捉プライマーにおいて、一方の鎖は表面に共有結合するが、他方の鎖は表面に共有結合しない。本方法は、表面に共

50

有結合した一本鎖キメラ捕捉プライマーおよび再生されたユニバーサル捕捉プライマーから2つの鎖を分離するステップを含むことができる。スタンド（ストランド、鎖）は、例えば、変性、たとえば、熱変性または化学変性のようなものによって、または酵素分解によって分離することができる。例は、図11-15を参照。酵素分解には、ヌクレアーゼ消化物（nuclease digests）が含まれ得る。たとえば、二重鎖プライマーは、5' - 3' 方向において二重鎖DNAでのヌクレオチド鎖を特異的に消化する、エキソヌクレアーゼ、たとえば、5' -3' dsDNAエキソヌクレアーゼ（例は、T7エキソヌクレアーゼ）などのようなもので処理することができる。例は、図14を参照。表面付着は、二重鎖キメラ捕捉プライマーおよび再生ユニバーサル捕捉プライマーにおいて共有結合した鎖の5' 端を、5' -3' dsDNAエキソヌクレアーゼ消化から保護するが、表面に共有結合していない鎖は消化される。

10

#### 【0315】

いくつかの実施態様では、本方法は、複数の一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、複数の固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマーおよび複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを変性させることをさらに含む。変性は、例えば、熱変性または化学変性、またはそれらの組合せを含み得る。例は、図10および11を参照。

#### 【0316】

いくつかの実施態様では、本方法は、複数の固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマーおよび複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを、複数の一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、5' -3' 二重鎖デオキシリボ核酸（dsDNA）エキソヌクレアーゼと接触することをさらに含む。

20

#### 【0317】

いくつかの実施態様では、基材は複数のパッドを含むパターン化されたフローセルである。いくつかの実施態様では、複数のパッドはマイクロアレイにおいて配置された複数のウェルである。いくつかの実施態様では、複数のパッドの1つ以上のパッドは、3' 末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数の捕捉プライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のユニバーサル捕捉プライマーを含む。いくつかの実施態様では、3' 末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む捕捉プライマーの1%超、5%超、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超、99%超、99.9%超、または99.99%超は複数のパッドの1つ以上のパッドにおいて一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーに変換される。いくつかの実施態様では、3' 末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む捕捉プライマーの1%超、5%超、10%超、20%超、30%超、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超、90%超、95%超99%超、99.9%超、または99.99%超は、複数のパッドの1つ以上のパッドにおいて一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーに変換される。いくつかの実施態様において、3' 末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む捕捉プライマーの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%超は、1本鎖固定化キメラ捕捉プライマーに変換し、および3' 末端ユニバーサルキャプチャー領域Zを含む捕捉プライマーの1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%超は、複数のパッドの1つ以上のパッドにおいて一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーに変換される。

30

40

#### 【0318】

別の態様では、ここには、固定化された捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 複数の固定化された捕捉プライマーを含む基材を、少なくとも1つの固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも1つの鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数の固定化された捕捉プライマーは、3' 末端Illumina® R) P5プライマーヌクレオチド配列を含む第1の複数のプライマーおよび3' 末端Illumina® R) P7プライマーヌクレオチド配列を含む第2の複数のプライマーを含み、およびそこでは、各鋳型核酸は、Illumina® R) P5プライマーヌクレオチド配列に相補的な3' 末端配列およびIllumina® R) P7プライマーヌクレオチド配列に相補的

50

な5'末端配列に隣接し、および2つのSapI制限部位、SapI制限部位の間のスパーサー領域、およびIllumina(R)P5'プライマーヌクレオチド配列に相補的な3'末端配列およびSapI制限部位の間の標的特異的捕捉領域を含み；b)少なくとも1つの鋳型核酸に相補的な少なくとも1つの固定化された伸長生成物を生成するために、少なくとも1つの固定化された鋳型核酸にハイブリダイズされた少なくとも1つの固定化された捕捉プライマーを伸長すること；c)固定化された二重鎖鋳型核酸の少なくとも1つのモノクロナルクラスターを生成するために、ブリッジ増幅またはKEAによって少なくとも1つの固定化された伸長生成物を増幅すること；d)固定化された二重鎖鋳型核酸において2つの制限部位を切断し、Illumina(R)P5'プライマーヌクレオチド配列を含む複数の固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマーおよびIllumina(R)P7'プライマーヌクレオチド配列を含む複数の固定化された二重鎖再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、固定化された二重鎖鋳型核酸の少なくとも1つのモノクロナルクラスターをSapIと接触させること、およびe)随意に、複数の固定化された一本鎖キメラ捕捉プライマーおよび複数の固定化された一本鎖再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、複数の固定化された二本鎖キメラ捕捉プライマーおよび複数の固定化された二重鎖再生ユニバーサル捕捉プライマーを5'-3' ds DNA-エキソヌクレアーゼと接触させることが含まれる。この方法の模範的な図解は、例えば、図7に示される。

#### 【0319】

別の態様では、ここには、固定化された捕捉プライマーを修飾する方法が提供され、それには、a)複数の固定化された捕捉プライマーを含む基材を、少なくとも1つの固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも1つの鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数の固定化された捕捉プライマーは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のプライマーを含み、およびそこでは、少なくとも1つの鋳型核酸は、5'末端および3'末端ユニバーサル捕捉領域YまたはZに隣接し、および1つ以上の制限部位および1つ以上の制限部位と3'末端ユニバーサル捕捉領域との間の標的特異的捕捉領域を含み；b)少なくとも1つの鋳型核酸に相補的な少なくとも1つの固定化伸長生成物を生成するために、少なくとも1つの鋳型核酸にハイブリダイズした少なくとも1つの固定化された捕捉プライマーを伸長させること；c)固定化された二重鎖鋳型核酸の少なくとも1つのモノクロナルクラスターを生成するために、少なくとも1つの固定化された伸長生成物をPCRによって増幅すること；d)固定化された二重鎖鋳型核酸の少なくとも1つのモノクロナルクラスターを、固定化された二重鎖鋳型核酸において1つ以上の制限部位を切断してユニバーサル捕捉領域Zおよび標的特異的捕捉領域を含む複数の固定化された二重鎖キメラ捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉領域Yを含む複数の固定化された二重鎖再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素と接触させることが含まれる。例は、図7Aを参照。

#### 【0320】

いくつかの実施態様において、複数の固定化された再生ユニバーサル捕捉プライマーは、3'末端部分的制限部位を含む。いくつかの実施態様では、本方法は、複数の固定化された再生ユニバーサル捕捉プライマーから3'末端部分的制限部位を除去することを含む。例は、図12-15を参照。

#### 【0321】

いくつかの実施態様では、複数の固定化された(固定化とも言う)再生ユニバーサル捕捉プライマーは所定の開裂部位(切断部位とも言う)を含む。いくつかの実施態様では、所定の切断部位は、ジオールリンカー、8-オキソグアニン(8-オキソ-G)ウラシル塩基、リボヌクレオチド、メチル化ヌクレオチド、またはペプチドを含む。例は、図12AおよびBを参照。

#### 【0322】

いくつかの実施態様では、部分的制限部位を除去することには、非酵素的化学的切断が含まれる。いくつかの実施態様では、非酵素的化学的切断には、過ヨウ素酸塩処理、希土類

10

20

30

40

50

金属イオン処理、アルカリ処理または光化学反応が含まれる。

【0323】

いくつかの実施態様では、3'末端部分的制限部位を除去することには、酵素的切断が含まれる。いくつかの実施態様では、酵素的切断には、ウラシル-DNAグリコシラーゼ切断、エンドヌクレアーゼ切断、リボヌクレアーゼ(RNアーゼ)処理、制限酵素切断またはプロテアーゼ切断が含まれる。例は、図12を参照。

【0324】

いくつかの実施態様では、3'末端部分的(部分とも言う)制限部位を除去することには、逆相補的(逆相補とも言う)オリゴヌクレオチドを、二重鎖ユニバーサル捕捉領域Yを形成するために、一本鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーにハイブリダイゼーションさせることが含まれる。いくつかの実施態様では、本方法は、逆相補オリゴヌクレオチドを、二本鎖固定化キメラ捕捉プライマーを形成するために、一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーにハイブリダイズさせることをさらに含む。いくつかの実施態様では、本方法は、3'末端部分制限部位を除去するために、基材をヌクレアーゼと接触させることをさらに含む。いくつかの実施態様では、ヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼである。いくつかの実施態様では、エキソヌクレアーゼはエキソヌクレアーゼIである。例は、図14を参照。

【0325】

いくつかの実施態様では、3'末端標的特異的捕捉領域固定化キメラ捕捉プライマーのは切断される。例は、図13に示す模範的な実施態様を参照。

【0326】

いくつかの実施態様では、少なくとも1つの鋳型核酸は、5'末端ユニバーサル捕捉領域Y、3'末端ユニバーサル捕捉領域Z、第1および第2の制限部位を含む中央部分および中央部分と3'末端ユニバーサル捕捉領域Zとの間のスペーサー領域、および標的特異的捕捉領域とを含む。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの鋳型核酸は、標的特異的捕捉領域と3'末端ユニバーサル捕捉領域Zとの間に位置する。例は、図13を参照。

【0327】

いくつかの実施態様では、本方法には、e)複数の標的ポリヌクレオチドを含む核酸試料を、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で少なくとも1つのプライマーと接触させることであり、前記少なくとも1つのプライマーはアダプターを含み；f)複数のアンプリコンを生成するために、前記複数の標的ポリヌクレオチドをPCRにより増幅すること；g)第1の複数の固定化アンプリコンを生成するために、複数の固定化キメラ捕捉プライマーを、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で前記複数のアンプリコンと直接接触させること；h)前記標的ポリヌクレオチドに相補的な複数の固定化伸長生成物を生成するために、複数の固定化キメラ捕捉プライマーを伸長させること、およびi)第2の複数の固定化アンプリコンを生成するために、前記複数の固定化伸長生成物をPCRによって増幅することであり、そこでは、固定化アンプリコンの前記集団には、50%以上の均一性が含まれ。いくつかの実施態様では、固定化アンプリコンの前記集団には、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、95%以上、98%以上または99%以上の均一性が含まれる。いくつかの実施態様の均一性には(some embodiments uniformity)、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94または95またはそれらよりも多くが含まれる。

【0328】

固定化アンプリコンの均一性(また、クラスター均一性とも呼ばれる)は、例は、米国特許出願第61/928,368号に記載されているように決定することができ、それは参照することによってここに組み込まれる。

【0329】

いくつかの実施態様において、アダプターには、ユニバーサル捕捉領域YまたはZが含まれる。

【0330】

いくつかの実施態様において、アダプターには、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド

10

20

30

40

50

配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列が含まれる。

【0331】

別の態様では、ここには、固定化捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 基材上に固定化された複数のユニバーサル捕捉プライマーを、1以上の固定化された鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサル捕捉プライマーは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のプライマーを含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサル捕捉領域Y、3'末端ユニバーサル捕捉領域Z、標的特異的捕捉領域、5'末端ユニバーサル捕捉領域Yと標的特異的捕捉領域との間の制限部位、および3'末端ユニバーサル捕捉領域Zと標的特異的捕捉部分との間のSBSを含み；b) 1つ以上の固定化された鋳型核酸に相補的な1つ以上の固定化伸長生成物を生成するために、1つ以上のユニバーサル捕捉プライマーを伸長させること；c) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクローナルアンプリコンを生成するために、1つ以上の固定化伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクローナルクラスターを、ユニバーサル捕捉領域Zおよび標的特異的捕捉領域を含む複数の固定化キメラ捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉領域Yおよび部分的制限部位を含む複数の固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素と接触させることが含まれる。この方法の模範的な図解は、例えば、図11に示される。

【0332】

別の態様では、ここには、固定化捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 基材上に固定された複数のユニバーサル捕捉プライマーを、1つ以上の固定化鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサル捕捉プライマーは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yおよび第1の所定の切断部位を含む第1の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zおよび第2の所定の切断部位を含む5'部分を含む第2の複数のプライマーを含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサル捕捉領域Y、3'末端ユニバーサル捕捉領域Z、標的特異的捕捉領域、5'末端ユニバーサル捕捉領域Yと標的特異的捕捉領域との間の制限部位、および3'末端ユニバーサル捕捉領域Zと標的特異的捕捉領域との間のSBSを含み；b) 1つ以上の鋳型核酸に相補的な1つ以上の固定化伸長生成物を生成するために、1つ以上のユニバーサル捕捉プライマーを伸長すること；c) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクローナルアンプリコンを生成するために、1つ以上の固定化伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクローナルアンプリコンを、ユニバーサル捕捉領域Zおよび標的特異的捕捉領域を含む複数の固定化キメラ捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉領域Yおよび部分制限部位を含む複数の固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素と接触させることe) 複数の固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーからの部分制限部位を第1の所定の切断部位で切断することによって除去することが含まれる。例は、図12AおよびBを参照。いくつかの実施態様では、ユニバーサル捕捉領域YはIllumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列を含み、およびユニバーサル捕捉領域ZはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、第1の所定の切断部位には、ウラシル塩基が含まれ、第2の所定の切断部位には、ジオール-リンカーが含まれる。この方法の模範的な図解は、例えば、図12AおよびBに示される。

【0333】

別の態様では、ここには、固定化捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 基材上に固定化された複数のユニバーサル捕捉プライマーを、1つ以上の固定化鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサル捕捉プライマーは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のプライマーを含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサル捕捉領

域Y、3'末端ユニバーサル捕捉領域Z、第1および第2の制限部位を含む中央部分および第1の制限部位と第2の制限部位との間のスパーサー領域、ならびに中央部分と3'末端ユニバーサル捕捉領域Zとの間の標的特異的領域を含み；b) 1以上の鋳型核酸に相補的な1以上の固定化伸長生成物を生成するために、複数のユニバーサル捕捉プライマーの1以上のユニバーサル捕捉プライマーを伸長すること；c) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクロノアルアンプリコンを生成するために、ブリッジ増幅またはKEAによって1つ以上の固定化伸長生成物を増幅すること、およびd) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクロノアルアンプリコンを、ユニバーサル捕捉領域Zおよび標的特異的捕捉領域を含む複数の固定化キメラ捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉領域Yを含む複数の固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを含む複数の固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素と接触させることが含まれる。この方法の模範的な図解は、例えば、図13に示される。

10

#### 【0334】

別の態様では、ここには、固定化捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 基材上に固定化された複数のユニバーサル捕捉プライマーを、1つ以上の固定化鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサル捕捉プライマーは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数のプライマーおよび3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のプライマーを含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端ユニバーサル捕捉領域Y、3'末端ユニバーサル捕捉領域Z、標的特異的捕捉領域、および5'末端ユニバーサル捕捉領域Yと標的特異的捕捉領域との間の制限部位を含み；b) 1以上の鋳型核酸に相補的な1以上の固定化伸長生成物を生成するために、複数のユニバーサル捕捉プライマーの1以上のユニバーサル捕捉プライマーを伸長すること；c) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクロノアルアンプリコンを生成するために、1つ以上の固定化伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクロノアルアンプリコンを、ユニバーサル捕捉領域Zおよび標的特異的捕捉領域を含む複数の二重鎖固定化キメラ捕捉プライマーおよびユニバーサル捕捉領域Yおよび一本鎖部分制限部位を含む複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素と接触させること；e) 複数の一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、複数の二重鎖固定化キメラ捕捉プライマーおよび複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを変性させること；f) 逆相補オリゴヌクレオチドを、二重鎖ユニバーサル捕捉領域および二重鎖標的特異的領域を形成するために、複数の一本鎖固定化キメラ捕捉プライマーおよび複数の一本鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーにハイブリダイズさせること、およびg) 表面を、複数の二重鎖固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーから一本鎖部分制限部位を除去するために、エキソヌクレアーゼIにより処理することが含まれる。この方法の模範的な図解は、例えば、図14に示される。

20

30

#### 【0335】

別の態様では、ここには、固定化捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 基材上に固定化された複数のユニバーサル捕捉プライマーを、1つ以上の固定化鋳型核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数の鋳型核酸と接触させることであり、そこでは、複数のユニバーサルキャプチャープライマーは、3'末端ユニバーサル捕捉領域Yを含む第1の複数のプライマー、および3'末端ユニバーサル捕捉領域Zを含む第2の複数のプライマーおよび3'末端領域Xを含む第3の複数のプライマーおよび所定の切断部位を含む5'部分を含み、そこでは、各鋳型核酸は、5'末端領域X、3'末端ユニバーサル捕捉領域Z、標的特異的捕捉領域、および領域Xと標的特異的捕捉領域との間の制限部位を含み；b) 1つ以上のユニバーサル捕捉プライマーを、1つ以上の鋳型核酸に相補的な1つ以上の固定化伸長生成物を生成するために、伸長すること；c) 固定化伸長生成物の1つ以上のモノクロノアルアンプリコンを生成するために、1つ以上の固定化伸長生成物をブリッジ増幅またはKEAによって増幅すること；d) 固定化伸長生成物の1つ以上

40

50



のモノクローナルアンプリコンを、ユニバーサル捕捉領域Zおよび標的特異的捕捉領域を含む複数の固定化キメラ捕捉プライマー、および領域Xおよび部分制限部位を含む複数の固定化再生ユニバーサル捕捉プライマーを生成するために、制限酵素と接触させること、およびe) 領域Xを含む複数の固定化再生捕捉プライマーを、予め定められた切断部位で切断することによって基材から除去することが含まれる。例は、図15を参照。いくつかの実施態様では、ユニバーサル捕捉領域Yには、Illumina<sup>(R)</sup>P5プライマーヌクレオチド配列が含まれ、およびユニバーサル捕捉領域Zには、Illumina<sup>(R)</sup>P7プライマーヌクレオチド配列が含まれる。いくつかの実施態様では、所定の切断部位はジオール-リンカーを含む。この方法の模範的な図解は、例えば、図15に示される。

【0336】

そこに提供される鋳型核酸は、当業者に知られる任意の方法によって生成することができる。たとえば、鋳型核酸は、例は、図6A-Cに例示されるように、それらの完全長形態のオリゴヌクレオチド合成によって産生され得る。

【0337】

別の態様では、ここには、鋳型核酸を生成するための方法が提供され、それには、例は、図16において例示されるように、2つ以上の部分鋳型核酸の生産が含まれる。いくつかの実施態様において、2つ以上の部分的な鋳型核酸は、部分的な鋳型核酸の二量体を形成するように互いに部分的にハイブリダイズすることができる部分的な鋳型核酸の対である。いくつかの実施態様では、本方法は、全長鋳型核酸の二量体を形成するために、部分的な鋳型核酸の二量体において部分的な鋳型核酸を伸長することを含む。

【0338】

別の態様では、ここには、部分的な鋳型核酸の二量体を形成するために、互いに部分的にハイブリダイズすることができる部分的鋳型核酸の対が提供される。対における第1の部分的鋳型核酸は、第2の部分的鋳型核酸の核酸配列の90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、または10%未満と部分的にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施態様では、1対での部分的鋳型核酸は、それらの3'端で互いに部分的にハイブリダイズすることができる。いくつかの実施態様では、対での部分的鋳型核酸は、それらの標的特異的捕捉領域において互いにハイブリダイズすることができる。

【0339】

いくつかの実施態様では、部分的鋳型核酸の二量体は、5'末端ユニバーサル捕捉領域YまたはZ、制限部位および3'末端二量化領域DRを含む第1の部分鋳型核酸および5'末端ユニバーサル捕捉領域YまたはZおよび3'末端二量化領域DRを含む第2の部分鋳型核酸を含み、そこでは、第1の部分鋳型核酸の3'末端DRおよび第2の部分鋳型核酸の3'末端DRは互いにハイブリダイズする。いくつかの実施態様では、第1および第2の部分鋳型核酸の3'末端DRは、標的特異的捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、第1および第2の部分鋳型核酸の3'末端DRは、配列決定プライマー結合部位(SBS)を含む。いくつかの実施態様において、第1および第2の部分鋳型核酸の3'末端DRは、制限部位(例は、SapI制限部位)を含む。

【0340】

いくつかの実施態様では、部分鋳型核酸の二量体には、第1の部分鋳型核酸で、その5'端(P5)にて第1のユニバーサル捕捉領域(P5)、制限部位(SapI)、およびその3'端にて標的特異的捕捉領域(CP)を含むものが含まれる。いくつかの実施態様では、部分鋳型核酸の二量体は、第2の部分鋳型核酸で、その3'端(CP')にて相補的な標的特異的捕捉領域、配列決定プライマー結合部位(SBS)およびその5'端(P7)にて第2のユニバーサル捕捉領域を含むものを有する。例は、図16を参照。

【0341】

KEAは、表面エリア上の、例は、パターン化されたフローセルでのパッド上のモノクローナル標的核酸クラスター(例は、標的核酸アンプリコン)の生成を、「シード」する単一の標的核酸の迅速な増幅によって、さらなる標的核酸が表面エリアにおいて、同じエリア

10

20

30

40

50

でシードされることが可能になる前にできるようにすることが可能であり、およびKEAはポアソン限界を超えるモノクロナル核酸クラスターの密度を達成することができる。典型的には、KEAにおいて、標的核酸のシーディングの速度は標的核酸の増幅の速度よりもずっと低く、および増幅機構は標的ポリヌクレオチドのシーディング中に典型的に存在する。この開示は、部分的には、これらの特性が、KEAを、インフローセル試薬について、または単一分子の表面への送付の速度についての競合する要件のいずれかを有する多数の共通に使用される配列決定ライブラリー調製方法と適合させることができるという認識に基づく。

#### 【0342】

この開示は、部分的には、標的核酸の増幅から標的核酸のシーディングを分離することによって、または標的核酸増幅から試料調製物および標的核酸のシーディングを分離することによって、上記の問題を回避することができるという認識にさらに基づく。たとえば、ここに提供される方法の一実施態様では、当技術分野で知られる標的核酸シーディング方法は、初期には、ポリクロナル標的核酸の表面エリア（例は、パターン化されたフローセルのパッドまたはウェル）での占有をもたらす標的核酸ローディング密度にて実行される。選定された標的核酸シーディング条件の下で、少数の表面要素（例は、ユニバーサル捕捉プライマー）が標的核酸（例は、標的ポリヌクレオチドまたは鋳型核酸）にハイブリダイズされる。選定された実験条件下では、シーディング事象それ自体を核酸増幅およびモノクロナルクラスターの形成のトリガー（引き金とも言う）として効果的に使用することはできない。別の方法ステップでは、殆どの場合、いくらかのシードされた標的核酸のうちの1つだけが増幅されて標的核酸のモノクロナルクラスターを形成することを確実にするために増幅速度よりはるかに遅い速度で標的核酸を活性化するのに、例は、パターン化されたフローセルのウェルまたはパッドにおいて、別のトリガーを導入する。

#### 【0343】

この開示は、標的核酸の活性化を標的化プロセスにおいて（例は、図17-19を参照）または確率過程（確率論のプロセスとも言う）において（例は、図20-21を参照）トリガーすることができるという実現にさらに基づく。標的化されたプロセスでは、標的核酸は、例は、個々に、および無関係に活性化することができる異なるサブグループを含むことができる。確率過程では、異なる標的核酸はランダムに活性化することができ、および活性化条件は、標的核酸のランダムな活性化が低頻度でしか起こらないように選定することができる。

#### 【0344】

標的化された活性化プロセスの一例では、標的核酸の異なるサブグループを区別するために、異なる標的核酸を異なる標識に付着させることができ、そこでは、標的核酸の各メンバーは同じ種類の標識を所有する。標的核酸のラベリング（標識化とも言う）は、例は、ショットガン標識化（例は、バーコード）によってランダムに実行することができ、または標識化は標的化することができる（例は、配列特異的標識化）。

#### 【0345】

図18は、標的核酸の標的化された活性化を使用してここに提供される模範的な方法の一部を例示する。第1のステップでは、異なる標識A、B、Cを所有する標的核酸の異なるサブグループを、パターン化されたフローセルのパッド（例は、パッド1）にシードした。標識特異的トリガー分子は、標的核酸の特定のサブグループを活性化するために別のステップにおいて使用される。いくらかの実施態様では、標的核酸特異的標識は標的核酸特異的核酸配列であることができ、および標識特異的トリガー分子は相補的標的核酸配列を含む核酸プライマーであることができる。標識特異的トリガー分子は、例は、図18に示すような可溶性核酸プライマーであることができる。いくらかの実施態様では、標識特異的トリガー分子は、それ自体が表面上に固定化されてもよく、例は、図19に示されるようである。いくらかの実施態様では、標識特異的トリガー分子は、シード化された標的核酸よりもはるかに低い濃度において表面上に存在する。いくらかの実施態様では、可溶性または固定化されたトリガー分子は、キメラプライマーであってよく、それは、たとえば

10

20

30

40

50

、ユニバーサル捕捉領域および標的特異的捕捉領域を含む（例は、図19においてP5/B'）。

【0346】

図20は、標的核酸の確率的活性化を含むここに提供される方法の模範的な実施態様を例示する。この例では、シード化された標的核酸には、ユニバーサル捕捉領域P5をマスクし、さらに切断可能な塩基を含むヘアピン構造が含まれる。標的核酸の確率的活性化は、たとえば、ヘアピン構造のエンドヌクレアーゼ消化物およびユニバーサル捕捉領域のマスカミング（umasking）によって達成することができる。

【0347】

標的核酸の確率論的活性化を含むここに提供される方法の別の実施態様では、標的核酸は、付着したブロッキング剤により（例は、タンパク質またはビーズ）をシードすることができる。シードされた個々の標的核酸の確率的活性化は、デブロッキング剤（例は、プロテアーゼ）のその後の添加を通して達成することができる。

10

【0348】

標的核酸の確率的活性化を含むここに提供される方法の別の実施態様において、シードされた標的核酸は、天然に発生しないヌクレオチド（例は、イソグアニンまたはイソシトシン塩基を有する）を含み得る。個々の標的核酸の確率的活性化は、天然に存在しないヌクレオチドの代わりに標的核酸アンプリコン中に天然ヌクレオチドを「ミスインコーポレーティングする（誤って取り込む）」ことによってKEAにおいて達成することができる。天然に発生するヌクレオチドは、典型的には、低効率および低頻度を伴うことでのみ、標的核酸の天然に存在しないヌクレオチドと対になる。

20

【0349】

標的核酸の確率的活性化を含む別の例示的な方法では、標的核酸は、例は、配列決定ライブラリーにおいて、最初はトリガー配列を欠く。初期のステップでは、トリガー配列は、確率的プロセスにおいて、個々の標的核酸に、トリガー配列（例は、P5配列）および標的核酸に相補的な配列の双方を含むKEAでの低レベルのキメラプライマー（例は、SBS3配列）を含めることによって付加することができる。次いで、追加されたトリガー配列（例は、P5）を有する個々の標的核酸は、たとえば、パターン化されたフローセルのウェルにおいてシードし、および増幅されてモノクローナルクラスターを形成することができる。例は、図21および例2を参照。

30

【0350】

別の態様では、ここには、固定化された捕捉プライマーを修飾するための方法が提供され、それには、a) 複数の固定化された捕捉プライマーを有する基材を、複数の異なる固定化シード核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で複数の異なるシード核酸と接触させること；b) 複数の異なる固定化されたシード核酸の2つ以上に相補的な複数の異なる固定化された伸長生成物を生成するために、複数の固定化された捕捉プライマーの2つ以上を伸長させること；c) 活性化された捕捉プライマーを形成するために、複数の異なる固定化伸長生成物の1つの固定化伸長生成物を活性化すること、およびd) 随意に、固定化され修飾された捕捉プライマーのモノクローナルクラスターを生成するために、活性化された捕捉プライマーを増幅することが含まれる。

40

【0351】

いくつかの実施態様では、シード核酸は、例は、DNA配列決定ライブラリーでか、またはゲノムDNAにおいて標的核酸を含む。いくつかの実施態様では、シード核酸はここに提供される鋳型核酸を含む。いくつかの実施態様では、標的核酸は1つ以上のキセノ核酸を含むRNAまたは核酸である。

【0352】

固定化された伸長生成物の活性化は、標的化された活性化であり得、そこでは、固定化された伸長生成物のすべてが等しく活性化される可能性があるわけではない。活性化は、固定化された伸長プライマーの他のサブグループより活性化される可能性がより高い固定化された伸長生成物の所定のサブグループを標的とすることができる。他の実施態様では、

50

固定化された伸長生成物の活性化は確率的活性化であり、そこでは、いくつかの固定化された伸長生成物は他の固定化された伸長生成物よりも早く活性化されるが、そこでは、それは、例は、固定化された伸長生成物の構造的または機能的特色に基づいて、予め定めることができず、それは複数の固定化された伸長生成物における固定化された伸長生成物は、より一層早く活性化され、および後に活性化される。

#### 【0353】

いくつかの実施態様では、複数の異なる固定化伸長産物の1つの固定化伸長産物を活性化することには、標的化された活性化が含まれる。いくつかの実施態様では、標的化された活性化は、複数の異なるシード核酸を、複数の異なる標識種子核酸を生成するために、複数の異なる標識でラベリングする初期ステップを含む。いくつかの実施態様では、標的化された活性化は、複数の異なる標識化された固定化シード核酸を形成することをさらに含む。いくつかの実施態様では、標的化された活性化は、複数の異なる標識化された固定化伸長生成物を形成することをさらに含む。いくつかの実施態様では、標的化された活性化は、複数の異なる標識化された固定化伸長生成物を、1つ以上のラベル特異的標的分子と、1つの固定化された伸長生成物と接触させることを含む。

10

#### 【0354】

いくつかの実施態様では、初期標識ステップは複数の異なるシード核酸をランダムに標識することを含む。いくつかの実施態様において、初期標識ステップは複数の異なるシード核酸の標的標識を含む。いくつかの実施態様では、標的標識は配列特異的標識である。いくつかの実施態様では、複数の異なるシード核酸は、50未満、45未満、40未満、35未満、30未満、25未満、20未満、18未満、16未満、14未満、12未満、10未満、8未満、6未満、4未満または2未満の異なる標識で標識される。いくつかの実施態様において、複数の異なるシード核酸は、20、18、16、14、12、10、8、6、4、または2の異なる標識で標識される。いくつかの実施態様において、複数の異なるシード核酸は、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上、60以上、80以上、90以上、100以上、150以上、200以上、250以上、300以上、400以上、500以上、600以上、700以上、800以上、900以上、または1000以上の異なる標識により標識される。いくつかの実施態様では、異なる標識は異なる核酸配列を有する異なるプライマーである。いくつかの実施態様では、初期標識化ステップは複数の異なる種子核酸を複数の異なるプライマーに連結することを含む。いくつかの実施態様では、複数のシード核酸の各シード核酸は固有の標識により標識される。いくつかの実施態様では、複数のシード核酸の2つ以上の異なるシード核酸は同じ標識（例は、図21；標識としてSBS3参照）により標識される。

20

30

#### 【0355】

いくつかの実施態様において、トリガー分子はトリガー領域を含む核酸である。いくつかの実施態様では、トリガー領域は標的特異的捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、トリガー領域はユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、ユニバーサル捕捉領域は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施態様では、トリガー分子は可溶性核酸である。いくつかの実施態様では、トリガー分子は固定化された捕捉プライマーである。いくつかの実施態様では、固定化された捕捉プライマーは複数の固定化された捕捉プライマーである。いくつかの実施態様において、複数の固定化された捕捉プライマーは複数の異なる捕捉プライマーである。いくつかの実施態様において、複数の固定化された捕捉プライマーは複数の同じ捕捉プライマーである。いくつかの実施態様では、固定化された捕捉プライマーは標的特異的捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、固定化された捕捉プライマーはユニバーサル捕捉領域を含む。いくつかの実施態様では、ユニバーサル捕捉領域は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含む。

40

#### 【0356】

いくつかの実施態様では、複数の異なる固定化伸長生成物の1つの固定化伸長生成物を活性化することには、確率的活性化が含まれる。いくつかの実施態様では、確率的活性化は

50

、複数の固定化捕捉プライマーを有する基材を、ヘアピン構造が含まれる複数の異なる固定化シード核酸を生成するために、ヘアピン構造を有する複数の異なるシード核酸と接触させることを含む。例は、図20を参照。いくらかの実施態様では、確率的活性化は、複数の固定化された捕捉プライマーの2つ以上を、ヘアピン構造を含む複数の異なる固定化伸長生成物を生成するために伸長させることをさらに含む。いくらかの実施態様では、確率的活性化は、ヘアピン構造を含む複数の固定化伸長生成物の1つを切断試薬で活性化することをさらに含む。いくらかの実施態様では、切断試薬はヌクレアーゼである。いくらかの実施態様では、ヌクレアーゼはエンドヌクレアーゼである。いくらかの実施態様では、エンドヌクレアーゼはニッキングエンドヌクレアーゼ (nicking endonuclease) である。いくらかの実施態様では、切断試薬は、USER<sup>TM</sup> (ユーザー商品名) 混合物 [New England Biolabs (ニュー・イングランド・バイオラボ社)、Ipswich (イプスウィッチ)、MA (マサチューセッツ州)] またはFpgタンパク質 [例は、E.coli (エシェリキア・コリ) 由来] を含む。いくらかの実施態様では、複数の異なるシード核酸の1つ以上の異なるシード核酸は切断可能な塩基を含む。いくらかの実施態様において、切断可能な塩基はウラシルまたは8-オキソ-グアニン (8-オキソ-dG) である。

【0357】

いくらかの実施態様では、複数の異なるシード核酸はトリガー領域を含まず、および確率的活性化はトリガー領域を含むキメラプライマーにより複数の異なるシード核酸の1つを増幅する初期ステップを含む。

【0358】

いくらかの実施態様では、複数の異なるシード核酸の1つを増幅する初期ステップにおいて、複数の異なるシード核酸は、トリガー領域を含むキメラプライマーに対して5倍を超えて、10倍を超えて、25倍を超えて、50倍を超えて、100倍を超えて、250倍を超えて、500倍を超えて、1000倍を超えて、2,500倍を超えて、5,000倍を超えて、10,000倍を超えて、25,000倍を超えて、50,000倍を超えて、または100,000倍を超えて存在する。

【0359】

いくらかの実施態様において、トリガー領域は標的特異的捕捉領域を含む。いくらかの実施態様では、トリガー領域はユニバーサル捕捉領域を含む。いくらかの実施態様において、キメラプライマーはトリガー領域およびSBSを含む。いくらかの実施態様において、トリガー領域は、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列を含み、およびSBSは、Illumina(R)SBS3プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチド配列を含む。いくらかの実施態様では、キメラプライマーは、Illumina(R)P5プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS3プライマーヌクレオチド配列またはIllumina(R)P7プライマーヌクレオチド配列およびIllumina(R)SBS8プライマーヌクレオチド配列を含む。

【0360】

いくらかの実施態様では、確率的活性化には、a) 複数の異なる固定化された捕捉プライマーを有する基材を、複数の異なる固定化されたシード核酸を生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下で、複数の異なるシード核酸と接触させることが含まれ、そこでは、異なるシード核酸の各々は1つ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくらかの実施態様では、確率的活性化には、b) 2つ以上の固定化された捕捉プライマーを、複数の異なる固定化されたシード核酸に相補的な複数の異なる固定化された伸長生成物を生成するために伸長させることが含まれ、そこでは、複数の異なる固定化された伸長生成物は1つ以上の修飾されたヌクレオチドを含む。いくらかの実施態様では、確率的活性化には、c) 複数の異なる固定化された伸長生成物の1つを、活性化された捕捉プライマーを形成するために活性化することをさらに含み、そこでは、活性化された捕捉プライマーは修飾されたヌクレオチドを含まない。いくらかの実施態様では、修飾ヌクレオチドは、イソグアニン (isoG) またはイソシトシン (isoC) を含む。理論に縛られることを望むものではないが、修飾されたヌクレオチドを用いる確率的活性化プロセスは、自然発生と比較し

10

20

30

40

50

て、確率的活性化が、核酸合成の間に修飾されたヌクレオチドのずっと低い取り込み速度の違いに基づく条件下に実行することができる。確率的活性化プロセスは、修飾されたヌクレオチドの濃度を調整することによってさらに修飾することができる。たとえば、成長する核酸鎖への修飾されたヌクレオチドの取り込み速度は、合成反応における修飾されたヌクレオチドの濃度を低下させることによって、さらに低減され得る。

#### 【0361】

いくつかの実施態様では、確率的活性化には、複数の固定化された捕捉プライマーを有する基材を、複数の異なるシード核酸であって各々のシード核酸の一方の端部に結合したブロッキング剤を含むものと、複数の異なる固定化されたシード核酸であってブロッキング剤を含むものを生成するために、ハイブリダイゼーションに十分な条件下に接触させること、およびブロッキング剤をデブロッキング剤と接触させることが含まれる。いくつかの実施態様では、デブロッキング剤はプロテアーゼである（例は、プロテイナーゼK）。いくつかの実施態様では、デブロッキング剤は洗浄剤またはカオトロピック剤を含む（例は、DNAまたはタンパク質変性剤）。いくつかの実施態様において、ブロッキング剤は核酸結合タンパク質である。いくつかの実施態様では、ブロッキング剤はビーズである（例は、ストレプトアビジンまたは抗DIG被覆ビーズ、またはアガロースまたはポリマービーズ）。いくつかの実施態様では、ブロッキング剤は、ウイルス粒子が含まれ、例を挙げると、バクテリオファージ、レセプター-コレセプター対、または疎水性分子と疎水性粒子の組合せを含む。いくつかの実施態様では、ブロッキング剤はピオチン化ヌクレオチドを含む。いくつかの実施態様において、ブロッキング剤は、ストレプトアビジンを含む。

#### 【0362】

いくつかの実施態様では、固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターを生成するために活性化された捕捉プライマーを増幅することには、KEAまたはブリッジ増幅が含まれる。いくつかの実施態様では、固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターを生成するために活性化された捕捉プライマーを増幅することには、ワイルドファイアー（野火とも言う）プロトコル（例は、ワイルドファイアーペアエンドシークエンシング）またはローリングサークル増幅を用いるDNA合成が含まれる。

#### 【0363】

いくつかの実施態様では、表面は、複数のウェルを含むパターン化されたフローセルである。いくつかの実施態様において、異なる固定化された伸長生成物は、複数のウェルの2つ以上のウェルにおいて形成される。いくつかの実施態様では、活性化された捕捉プライマーが、複数のウェルの2つ以上のウェルのそれぞれに形成される。いくつかの実施態様において、活性化された捕捉プライマーは、複数のウェルの少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルのそれぞれに形成される。いくつかの実施態様では、少なくとも複数のウェルの2つ以上のウェルのそれぞれに形成される活性化された捕捉プライマーは、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルにおいて異なる活性化されたプライマーである。いくつかの実施態様では、固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターは、複数のウェルの2つ以上のウェルのそれぞれに形成される。いくつかの実施態様では、固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターは、複数のウェルの少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルにおいて異なる活性化されたプライマーである。いくつかの実施態様では、固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターは、複数のウェルの2つ以上のウェルのそれぞれに形成される。いくつかの実施態様では、固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターは、複数のウェルの少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルにおいて異なる活性化されたプライマーである。

5%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルのそれぞれにおいて形成される。いくつかの実施態様では、少なくとも複数のウェルの2つ以上のウェルのそれぞれに形成される固定化された修飾捕捉プライマーのモノクロナルクラスターは、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%のウェルにおいて固定化された修飾捕捉プライマーの異なるモノクロナルクラスターである。

#### 【0364】

ここに記載の方法は様々な核酸配列決定技術と組み合わせて使用することができる。特に適用可能な技術は、核酸が、それらの相対的位置が変化しないようにアレイにおいて固定された位置に付着され、アレイが繰り返しイメージングされるものである。異なる色チャンネルで画像が得られる実施態様、たとえば、あるヌクレオチド塩基タイプを他のものと区別するために使用される異なる標識と一致するものが特に適用可能である。いくつかの実施態様では、標的核酸のヌクレオチド配列を決定するためのプロセスは、自動プロセスであり得る。好ましい実施態様には、シーケンシング-バイ-シンセシス（「SBS」）技術が含まれる。

#### 【0365】

SBS技術は、鋳型鎖に対するヌクレオチドの反復的付加（iterative addition）による新生核酸鎖（nascent nucleic acid strand）の酵素的伸長を含むことができる。当技術分野で知られるSBSの方法では、単一のヌクレオチドモノマーを、各送付においてポリメラーゼの存在下で標的ヌクレオチドに提供することができる。しかし、ここに記載の方法では、一よりも多くのタイプのヌクレオチドモノマーを、送付においてポリメラーゼの存在下で標的核酸に提供することができる。

#### 【0366】

SBSは、ターミネーター部分を有するヌクレオチドモノマーまたは任意のターミネーター部分を欠くものを利用することができる。ターミネーターを欠くヌクレオチドモノマーを利用する方法には、例えば、以下にさらに詳述するように、-リン酸標識ヌクレオチドを用いるパイロシーケンシングおよびシークエンシングが含まれる。ターミネーターを欠くヌクレオチドモノマーを使用する方法では、各サイクルで添加されるヌクレオチドの数は可変でありえ、および鋳型配列およびヌクレオチド送付のモードに依存し得る。ターミネーター部分を有するヌクレオチドモノマーを利用するSBS技術について、ターミネーターは、ジデオキシヌクレオチドを用いるサンガー配列決定についての場合と同様に使用される配列決定条件下で効果的に不可逆的であることができ、またはターミネーターは、Solexa（ソレクサ社）〔Illumina, Inc.（現在イルミナ社）〕によって開発された配列決定方法の場合のように、可逆的であることができる。

#### 【0367】

SBS技術は、標識部分を有するヌクレオチドモノマーまたは標識部分を欠くヌクレオチドモノマーを利用することができる。したがって、取り込み事象は、標識の特性、たとえば、標識の蛍光などのようなもの；ヌクレオチドモノマーの特性、たとえば、分子量または電荷などのようなもの；ヌクレオチドの取り込みの副産物、たとえば、ピロリン酸の放出などのようなもの；またはその種の他のものなどに基づいて検出することができる。実施態様では、2つ以上の異なるヌクレオチドが配列決定試薬中に存在することがあり、異なるヌクレオチドは互いに区別することができ、またはあるいは、2つ以上の異なる標識は、使用される検出技術の下で区別ができないようにすることができる。例えば、配列決定試薬中に存在する異なるヌクレオチドは、異なる標識を有することができ、およびSolexa（現在Illumina, Inc.）によって開発された配列決定法によって例示されるような適切な光学系を用いて区別することができる。

#### 【0368】

好ましい実施態様には、パイロシーケンシング技術が含まれる。パイロシーケンシングは、特定のヌクレオチドが新生鎖に組み込まれるとき、無機ピロリン酸 (PPI) の放出を検出する [Ronaghi (ロナギ), M., Karamohamed (カラモハメド), S., Pettersson (ペッターセン), B., Uhlen (ウーレン), M.およびNyren (ニュレン), P. (1996) 「Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release (ピロリン酸放出の検出を用いるリアルタイムDNAシーケンシング)」、Analytical Biochemistry (アナリティカル・バイオケミストリー) 242 (1)、84-9; Ronaghi, M. (2001) 「Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing (パイロシーケンシングはDNAシーケンシングを明らかにする)」、Genome Res. (ゲノム・リサーチ) 11 (1)、3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M.およびNyren, P., (1998) 「A sequencing method based on real-time pyrophosphate (リアルタイムピロリン酸に基づくシーケンシング法)」 Science (サイエンス)、281 (5375)、363; 米国特許第6,210,891号、米国特許第6,258,568号および米国特許第6,274,320号、これらの開示内容は、参照することによってその全体がここに組み込まれる)。パイロシーケンシングでは、放出されたPPIは、ATPスルホリラーゼによってアデノシン三リン酸 (ATP) に直ちに変換されることによって検出することができ、および生成されたATPのレベルがルシフェラーゼ産生光子を介して検出される。配列決定される核酸は、アレイにおいてフィーチャー (特色とも言う) に付着させることができ、およびアレイは、アレイの特色にてヌクレオチドの取り込みのために生成される化学発光シグナルを捕捉するように画像 (イメージとも言う) 化することができる。画像は、アレイを特定のヌクレオチドタイプ (例は、A、T、CまたはG) により処理された後に得ることができる。各ヌクレオチドタイプの添加後に得られる画像は、アレイにおいて検出される特色に関して異なるであろう。画像においてのこれらの違いは、配列上の特色の異なるシーケンス内容を反映する。もっとも、各特色の相対的な位置は画像において変化しないままである。画像は、ここに記載の方法を使用して貯蔵、処理および解析することができる。たとえば、各異なるヌクレオチドタイプによるアレイの処理後に得られる画像は、可逆的ターミネーターベースの配列決定方法のための異なる検出チャンネルから得られる画像についてここに例示されるのと同じ方法において取り扱うことができる。

#### 【0369】

SBSの別の模範的なタイプでは、サイクルシーケンシングが、たとえば、国際公開 (WO) 第04/018497号および米国特許第7,057,026号に記載され、それらの開示が参照することによってここに組み込まれるように、切断可能または光退色性染料標識を含む可逆的ターミネーターヌクレオチドの段階的添加によって達成される。このアプローチは、Solexa (現Illumina Inc.) によって商品化されており、およびWO 91/06678およびWO 07/123,744にも記載されており、これらの各々は参照によってここに組み込まれる。蛍光標識ターミネーターの利用可能性は、そこでは双方で終結が逆転され、および蛍光標識が切断され、効率的なサイクリック・リバーシブル・ターミネーション (周期的可逆的終結とも言う) (CRT) 配列決定を容易にする。ポリメラーゼはまた、効率的に取り込まれ、およびこれらの修飾されたヌクレオチドから伸長するように、同時操作され (co-engineered) 得る。

#### 【0370】

好ましくは、可逆的ターミネーターに基づく配列決定の実施態様において、標識は、SBS反応条件下での伸長を実質的に抑制しない。しかし、検出標識は、たとえば、切断または分解によって除去可能であり得る。配列された核酸の特色への標識の取り込み後に、画像を捕捉することができる。特定の実施態様では、各サイクルは、4つの異なるヌクレオチドタイプのアレイへの同時送付を含み、および各ヌクレオチドタイプはスペクトル的に別個の標識を有する。次いで、4つの画像を得ることができ、各々は4つの異なるラベルの1つに対して選択的な検出チャンネルを使用する。あるいはまた、異なるヌクレオチドタイプを連続して添加することができ、およびアレイの画像を各添加ステップの間に得ることができる。そのような実施態様では、各画像は、特定のタイプのヌクレオチドを取り込んだ



核酸の特色を示すであろう。各特色の異なるシーケンス内容のために、異なる特色が異なるイメージに存在し、または存在しない。しかし、各特色の相対的な位置は画像において変化しないままである。そのような可逆的ターミネーター-SBS法から得られる画像は、ここに記載するように貯蔵、処理および解析することができる。画像捕捉ステップの後、標識は除くことができ、および可逆的ターミネーターはヌクレオチド添加および検出のその後のサイクルのために除去することができる。標識が特定のサイクルにおいて検出されて後、およびその後のサイクルに先立つ標識の除去は、サイクル間の背景信号およびクロストーク（混信とも言う）を減少させる利益を提供することができる。有用な標識および除去方法の例は以下に記載される。

#### 【0371】

特定の実施態様において、ヌクレオチドモノマーのいくらかまたはすべては、可逆的ターミネーターを含み得る。そのような実施態様では、可逆的ターミネーター/切断可能なフルオル（蛍光とも言う）は、3'エステル結合を介してリボース部分に連結されたフルオルを含むことができる〔Metzker（メッケー）、Genome Res.（ゲノム・リサーチ）15：1767-1776（2005）、それは参照によりここに組み込まれる〕。他のアプローチは、ターミネーターの化学を蛍光標識の切断から分離した〔Ruparel（ルパレル）ら、Proc Natl Acad Sci USA（プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ）102：5932-7（2005）、それはその全体において参照によりここに組み込まれる〕。Ruparelらは、伸長をブロックするために小さな3'アリル基を使用するが、パラジウム触媒を用いた短い処理によって容易にデブロックされ得る可逆的ターミネーターの開発を記載する。フルオロフォアは、長波長UV光への30秒間の曝露によって容易に切断され得る光切断可能なリンカーを介して塩基に結合された。したがって、ジスルフィド還元または光切断のいずれかを切断可能なリンカーとして使用することができる。可逆的終結に対するもう1つのアプローチは、dNTP上にかさばった色素を配置した後に生じる自然な終結の使用である。dNTP上に荷電した嵩高い色素が存在すると、立体障害および/または静電的障害を通して効果的なターミネーターとして作用することができる。1つの取り込み事象の存在は、色素が除かれない限りさらなる取り込みが妨げられる。色素の切断はフルオルを除去し、効果的に終端を逆転させる。修飾されたヌクレオチドの例はまた、米国特許第7,427,673号、および米国特許第7,057,026号に記載されており、それらの開示内容は、参照によりその全体がここに組み込まれる。

#### 【0372】

ここに説明された方法およびシステムと共に利用することができる追加の模範的なSBSシステムおよび方法は、米国特許出願公開第2007/0166705号、米国特許出願公開第2006/0188901号、米国特許第7,057,026号、米国特許出願公開第2006/0240439号、米国特許出願公開第2006/0281109号、PCT公開番号WO05/065814、米国特許出願公開第2005/0100900号、PCT公開番号WO06/064199号、PCT公開番号WO07/010251号、米国特許出願公開第2012/0270305号および米国特許出願公開第2013/0260372号に記載されており、これらの開示はその全体が参照によりここに組み込まれる。

#### 【0373】

いくらかの実施態様は4つ未満の異なる標識を用いて4つの異なるヌクレオチドの検出を利用することができる。例えば、SBSは、米国特許出願公開第2013/0079232号の組み込まれた資料に記載される方法およびシステムを利用して実行することができる。第1の例として、一对のヌクレオチドタイプ（ヌクレオチド型とも言う）を同じ波長で検出することができるが、対の一方のメンバーについて他方と比較して強度の差異に基づいて、または対の一方のメンバーへの変化に基づいて（例えば、化学修飾、光化学改変または物理的改変を介して）区別することができる、それはペアの他のメンバーについて検出されたシグナルと比較して、見かけ上のシグナルを出現させるかまたは消失させる。第2の例として、4つの異なるヌクレオチド型の3つを特定の条件下で検出することができるが、第4のヌクレオチド型は、それらの条件下で検出可能な標識を欠くか、またはそれらの条件下で最

10

20

30

40

50

小限にしか検出されない（例えば、背景蛍光、等のため最小限の検出）。最初の3つのヌクレオチド型の核酸への組み込みは、それらのそれぞれのシグナルの存在に基づいて決定することができ、および核酸への第4のヌクレオチド型の取り込みは、任意のシグナルの不存在または最小限検出に基づいて決定することができる。第3の例として、1つのヌクレオチド型は、2つの異なるチャンネルにおいて検出される標識（群）を含むことができるが、その一方で他のヌクレオチド型は、1を超えないチャンネルで検出される。前述の3つの模範的な構成は、互いに排他的ではなく、および様々な組合せで使うことができる。すべての3つの例を組み合わせる模範的な実施態様は、第1のチャンネルにおいて検出される第1のヌクレオチド型（例えば、第1の励起波長によって励起されるときに第1のチャンネルにおいて検出される標識を有するdATP）、第2のチャンネルで検出される第2のヌクレオチド型（例えば、第2の励起波長によって励起されるときに第2のチャンネルで検出される標識を有するdCTP）、第1および第2の双方のチャンネルにおいて検出される第3のヌクレオチド型（例えば、第1および/または第2の励起波長によって励起されたときに双方のチャンネルで検出される少なくとも1つの標識を有するdTTP）およびいずれのチャンネルでも検出されないかまたは最小限にしか検出されない標識を欠く第4のヌクレオチド型（例えば、標識を有さないdGTP）を用いる蛍光ベースのSBS法である。

#### 【0374】

さらに、米国特許出願公開第2013/0079232号の組み込まれた資料に記載されるように、配列決定データは単一チャンネルを用いて得ることができる。そのようないわゆる1色素配列決定アプローチでは、第1のヌクレオチド型が標識されるが、第1の画像が生成された後に標識は除去され、および第1の画像が生成された後にだけ第2のヌクレオチド型が標識される。第3のヌクレオチド型は、第1および第2の画像の両方においてその標識を保持し、および第4のヌクレオチド型は、両方の画像において標識されないままである。

#### 【0375】

いくつかの実施態様はライゲーション技術による配列決定を利用することができる。そのような技術は、オリゴヌクレオチドを組み込むためにDNAリガーゼを利用し、およびそのようなオリゴヌクレオチドの取り込みを識別する。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする配列において特定のヌクレオチドの同一性と相関する異なる標識を有することができる。他のSBS法と同様に、標識された配列決定試薬による核酸フィーチャー（特色とも言う）のアレイを処理した後に画像を得ることができる。各画像は、特定のタイプの標識が組み込まれた核酸の特色を示すであろう。異なる特色は、各特色の異なる配列内容のために異なる画像において存在するかまたは存在しないが、特色の相対位置は画像において変化しないままである。ライゲーションに基づく配列決定方法から得られる画像は、ここに示すように保存、処理および分析することができる。ここに説明する方法およびシステムと共に利用することができる模範的なSBSシステムおよび方法は、米国特許第6,969,488号、米国特許第6,172,218号、および米国特許第6,306,597号に開示されており、それらの開示は、その全体が参照によりここに組み込まれる。

#### 【0376】

いくつかの実施態様は、ナノポア配列決定を利用することができる〔Deamer（デアマー）、D. W. & Akesson（アケソン）、M. 「Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing（ナノポアおよび核酸：超迅速シーケンシングのための展望）」 Trends Biotechnol.（トレンド・イン・バイオテクノロジー）18、147-151（2000）；Deamer, D.およびD. Branton（ブランドン）「Characterization of nucleic acids by nanopore analysis（ナノ細孔分析による核酸のキャラクタリゼーション）」、Acc. Chem. Res（アカウンツ・オブ・ケミカル・リサーチ）35：817-825（2002）；Li（リー）、J.、M. Gershow（ゲーショウ）、D. Stein（スタイン）、E. Brandin（ブランドイン）およびJ. A. Golovchenko（ゴロフチェンコ）、「DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope（固相ナノ細孔顕微鏡におけるDNA分子および構成）」、Nat. Mater.（ネイチャー・マテリアルズ）2：611-615（2003））、これらの開示はその全体が参照によりここに組み込まれる。そのような実施態様で

は、標的核酸はナノポアを通過する。ナノポアは合成細孔または生体膜タンパク質、たとえば、 $\alpha$ -ヘモリジンなどのようなものであり得る。標的核酸がナノ細孔を通過するとき、細孔の電気伝導度における変動を測定することによって各塩基対を識別することができる。(米国特許第7,001,792号、Soni (ソウニ)、G. V. & Meller (メラー)、「A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state nanopores (固体状態のナノ細孔を用いた超高速DNA配列決定に向けた進歩)」、Clin. Chem. (クリニカル・ケミストリー) 53、1996-2001 (2007)、Healy (ヒーリー)、K.、「Nanopore-based single-molecule DNA analysis (ナノ細孔系単一分子DNA分析)」Nanomed. (ナノメディシン)、2、459-481 (2007) ; Cockroft (コックロフト)、SL、Chu (チューー)、J.、Amorin (アモリン)、M. & Ghadiri (ガーディリ)、「A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution (単一分子ナノポアデバイスは、単一ヌクレオチド分解能を用いてDNAポリメラーゼ活性を検出する)」、J. Am. Chem. Soc. (ジャーナル・オブ・ジ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ) 130、818-820 (2008)、これらの開示内容はその全体が参照によりここに組み込まれる)。ナノポア配列決定から得られるデータは、ここに記載されるように貯蔵、処理および分析することができる。特に、データは、ここに記載される光学画像および他の画像の模範的な処理に従って画像として扱うことができる。

#### 【0377】

いくつかの実施態様はDNAポリメラーゼ活性のリアルタイムモニタリングを含む方法を利用することができる。ヌクレオチドの取り込みは、例えば、米国特許第7,329,492号および米国特許第7,211,414号(それらの各々は、参照によりここに組み込まれる)に記載されるように、フルオロフォア担持ポリメラーゼおよび $\gamma$ -リン酸標識ヌクレオチドとの間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)相互作用を通して検出することができ、またはヌクレオチド組み込みは、例えば、米国特許第7,315,019号(それは参照によりここに組み込まれる)に記載されるようにゼロモード導波路により、および例えば、米国特許第7,405,281号および米国特許出願公開第2008/0108082号(それらのそれぞれは参照によりここに組み込まれる)に記載されるように、蛍光ヌクレオチド類似体および工学的ポリメラーゼを用いて検出することができる。イルミネーション(照射とも言う)は、蛍光標識されたヌクレオチドの取り込みが低いバックグラウンドで観察され得るように、表面結合ポリメラーゼの周囲のzeptorリットスケールの容量に制限され得る[Levene (レーベン)、M. J.ら、「Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations (高濃度での単一分子分析のためのゼロモード導波路)」、Science 299、682-686 (2003) ; Lundquist (ランドクイス)、P. M.ら、「Parallel confocal detection of single molecules in real time (リアルタイムでの単一分子の平行共焦点検出)」、Opt. Lett. (オプティクス・レターズ) 33、1026-1028 (2008) ; Korlach (コルラ)、J.、「Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nano structures (ゼロモード導波路ナノ構造における単一DNAポリメラーゼ分子の標的固定化のための選択的アルミニウムパッシベーション)」、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105、1176-1181 (2008)、これらの開示はその全体が参照によりここに組み込まれる)。そのような方法から得られる画像は、ここで記載するように貯蔵し、処理し、および分析することができる。

#### 【0378】

いくつかのSBSの実施態様には、ヌクレオチドの伸長生成物への組み込みの際に放出されるプロトンの検出が含まれる。例えば、放出されたプロトンの検出に基づく配列決定は、Ion Torrent (イオン・トレント) [Guilford (ギルフォード)、CT (コネチカット州)、Life Technologies (ライフ・テクノロジー社)の子会社]から商業上入手可能な電気的検出器および関連技術または米国特許出願公開第US2009/0026082A1 ; US2009/0127589A1 ; US2010/0137143A1 ; またはUS2010/0282617A1に記載され、それらの各々は参照によりここに組み込まれるものに記載される配列決定方法およびシステムを用いることができる。運動排除を用いる標的核酸を増幅するためのここに記載の方法は、

陽子を検出するために使用される基材に容易に適用することができる。より一層具体的には、ここに記載の方法を用い陽子を検出するために使用されるアンプリコンのクローン集団を生成することができる。

#### 【0379】

上記のSBS法は、多重の異なる標的核酸が同時に操作されるように多重フォーマットで有利に遂行することができる。特定の実施態様において、異なる標的核酸は、共通の反応容器においてまたは特定の基材の表面にて処理することができる。これにより、シーケンシング試薬の便利な送付、未反応試薬の除去、および組み込み事象の検出が多重様式で可能になる。表面結合標的核酸を使用する実施態様では、標的核酸はアレイ形式であり得る。アレイ形式では、標的核酸は、空間的に区別可能な様式で表面に結合することができる。標的核酸は、直接共有結合、ピーズまたは他の粒子への結合、またはポリメラーゼまたは表面に結合した他の分子への結合によって結合され得る。アレイは、各部位での標的核酸の単一コピー（1つの特色とも称される）を含むことができ、または同じ配列を有する複数のコピーが各部位または特徴に存在することが可能である。以下にさらに詳細に記載するように、増幅方法、たとえば、ブリッジ増幅またはエマルジョンPCRなどのようなものによって複数のコピーを作製することができる。

#### 【0380】

ここに記載の方法は、様々な密度、例えば、少なくとも約10特色/cm<sup>2</sup>、100特色/cm<sup>2</sup>、500特色/cm<sup>2</sup>、1,000特色/cm<sup>2</sup>、5,000特色/cm<sup>2</sup>、10,000特色/cm<sup>2</sup>、50,000特色/cm<sup>2</sup>、100,000特色/cm<sup>2</sup>、1,000,000特色/cm<sup>2</sup>、5,000,000特色/cm<sup>2</sup>、またはそれらよりも高いものを含め、いずれかで特色を有するアレイを使用することができる。

#### 【0381】

ここに記載の方法の利点は、それらが複数の標的核酸を並行して迅速および効率的に検出することができることである。したがって、本開示は、上記に例示したような当技術分野で知られる技術を用いて核酸を調製および検出することができる統合システムを提供する。このようにして、本開示の統合システムは、増幅試薬および/または配列決定試薬を、1つ以上の固定化されたDNAフラグメントに送付することが可能な流体成分を含むことができ、システムは、ポンプ、バルブ、リザーバ、流体ラインおよびその他同種類のものなどの構成要素が含まれる。フローセルは標的核酸の検出のための統合システムにおいて構成および/または使用することができる。模範的なフローセルは、例えば、米国特許出願公開第2010/0111768号および米国特許出願第13/273,666号に記載され、これらの各々は参照によりここに組み込まれる。フローセルに例示されるように、統合システムの1つ以上の流体構成要素は、増幅方法のために、および検出方法のために使用され得る。一例として、核酸配列決定の実施態様を取ると、統合されるシステムの1つ以上の流体構成要素は、ここに記載の増幅方法のために、および配列決定方法、例えば、上記に例示するものなどのようなものにおける配列決定試薬を送るために用いることができる。あるいは、統合されたシステムは、増幅方法を遂行し、および検出方法を遂行するために別個の流体システムを含むことができる。増幅された核酸を創り出し、およびまた核酸の配列を決定することができる統合された配列決定システムの例には、制限はないが、MiSeq™プラットフォーム（Illumina, Inc., San Diego, CA）および米国特許出願第13/273,666号に記載のデバイスが含まれ、それは参照することによりここに組み込まれる。

#### 【0382】

本開示はさらに、固定化された捕捉プライマーを修飾するためのキットに関する。いくつかの実施態様では、キットには、a)ここに提供される鋳型核酸、およびb)二つ以上のウェルを有するパターン化されたフローセルが含まれ、そこでは、二つ以上のウェルは一組のユニバーサル捕捉プライマーを有する。いくつかの実施態様では、キットはさらに制限酵素を含む。いくつかの実施態様では、制限酵素はSapIである。いくつかの実施態様では、キットは、固定化された捕捉プライマーの修飾のためにキットの構成要素を使用するための指示書をさらに含む。いくつかの実施態様では、キットは、キットを試験する際に使用するための1つ以上のコントロール分析物（被検体）の混合物、例は、2つ以上のコント

ロール分析物をさらに含む。

【0383】

前述の説明から、ここに記載された本発明に対して様々な用途および条件にそれを採用するための変形および修正を行うことができることは明らかであろう。そのような実施態様はまた、添付の請求の範囲の範囲内にある。

【0384】

ここでの変数の任意の定義における要素のリストの列挙は、リストされた要素の任意の単一の要素または組合せ（またはサブコンビネーション）としてのその変数の定義を含む。ここでの実施態様の列挙は、その実施態様を任意の単一の実施態様として、または任意の他の実施態様またはその一部と組み合わせて含む。

10

【0385】

この説明において言及されるすべての特許および刊行物は、あたかもそれぞれの独立した特許および刊行物が具体的および個別に参照により組み入れられると示されているのと同じ程度に、参照によりここに組み込まれる。

【0386】

以下の例は、制限としてでなく例示として提供される。

【実施例】

【0387】

例1：二重層プライマーグラフト

【0388】

この例は、パターン化されたフローセルでの第1および第2の層の堆積および第1の層への第1のプライマーの堆積および第2のフローセルへの第2のプライマーの堆積を含む実験を記載する。

20

【0389】

実質的に米国特許出願公開第2014/0079923A1号および第2013/0096034A1号に記載されているように、第1の層（PAZAM）を700nm間隔の400nmのウェルを有するパターン化フローセル上にコーティングした。研磨後第1の捕捉プライマーを第1の層に堆積させ、第1のプライマーは、Illumina(R)P5プライマー配列およびIllumina(R)SBS3プライマー配列を含む。テトラクロロフルオレセイン標識オリゴヌクレオチド（「TETオリゴハイブリダイゼーション」）とのハイブリダイゼーションは、矩形パターンを示し、P5-SBS3プライマーがナノウェルの内部に特異的に堆積されたことが示される。また、図5（上部のパネル）も参照。

30

【0390】

第2の層（SFA）を、ナノウェルにおいて第1の層にて、およびウェルを取り囲むフローセルの表面にてコーティングした。TET-オリゴハイブリダイゼーションは、矩形のパターンを示し、第1の層での第1の捕捉プライマーが第2の層を堆積した後に依然として存在し、および機能的であることを示した。また、図5（中央のパネル）も参照。

【0391】

Illumina(R)捕捉プライマー対P5およびP7の形態において、第2のプライマーを第2の層において堆積させた。TET-オリゴハイブリダイゼーションは、第2のプライマーが、ウェルにおいてだけでなく、ウェルを取り囲む表面を含む第2の層にわたって好首尾に堆積することを実証した。

40

【0392】

この実験は、パターン化されたフローセルを、異なる捕捉プライマーを含む少なくとも2つの層で被覆することができることを実証する。第1の捕捉プライマーを、パターン化されたフローセルのウェル内の第1の層において堆積させた。第2の捕捉プライマーは、ウェルを取り囲む表面上の第2の層において堆積された。第1および第2のプライマーは、特異的オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズした。

例2：標的核酸増幅の確率的活性化

【0393】

50

この例は、標的核酸の、トリガー配列およびトリガー配列を欠く標的核酸と組み合わせた標的核酸特異的配列を含むKEAにおけるキメラプライマーを用いた確率的活性化を含む実験を記載する。この例では、Illuminaユニバーサル捕捉プライマー配列P5をトリガー配列として使用し、およびIlluminaSBS3配列を標的核酸特異的配列（P5/SBS3）として使用した。

【 0 3 9 4 】

実験設計を表1に示す。模範的な結果を図21に示す。

【表 1】

レーン	標的核酸シード	KEA
1	No P5	No P5/SBS3
2	No P5	0.5 $\mu$ M P5/SBS3
3	No P5	50 nM P5/SBS3
4	No P5	5 nM P5/SBS3
5	No P5	50 pM P5/SBS3
6	なし	0.5 $\mu$ M P5/SBS3
7	なし	50 nM P5/SBS3
8	なし	5 nM P5/SBS3

10

20

【 0 3 9 5 】

ランダムP5/P7表面フローセルを、SBS3において終結するがレーン1ないし5においてP5配列を欠く鋳型核酸によりシードした。鋳型核酸はレーン6ないし8にはシードしなかった。KEAはP5/SBS3キメラプライマーの存在または不存在で実行した。クラスター形成は、KEAにおいてP5/SBS3キメラプライマーを含むレーンにて観察された（レーン2-4）が、KEAにおいてP5/SBS3キメラプライマーを含まない（レーン1）または鋳型核酸を含まない（レーン6-8）レーンにおいてはそうでなかった。レーン5では、P5/SBS3プライマーの濃度が低いためにクラスターは観察されなかった。

30

【 0 3 9 6 】

この実験は、鋳型核酸の確率的活性化を含むここに提供される方法を用いてモノクローナルクラスターを生成できることを実証する。

【 0 3 9 7 】

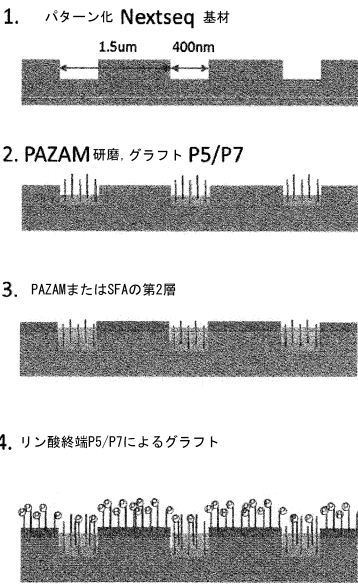
本開示は、開示された実施態様を参照して説明したが、当業者は、上で詳述した特定の例および研究が本開示を例示するに過ぎないことを容易に理解するであろう。本開示の精神から離れることなく、様々な修正を行うことができることは理解されるべきである。したがって、本開示は添付の請求の範囲によって制限されるだけである。

40

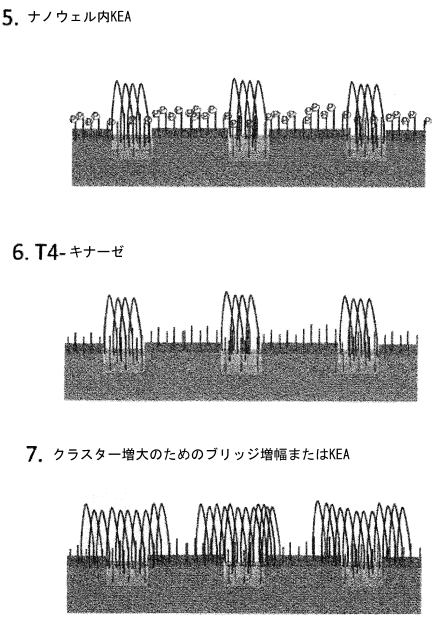
50

【図面】

【図 1 - 1】



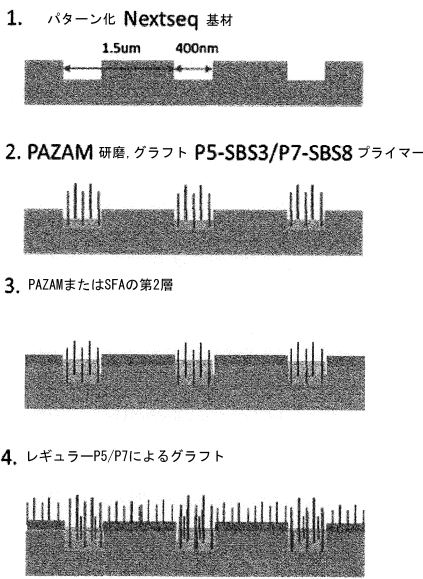
【図 1 - 2】



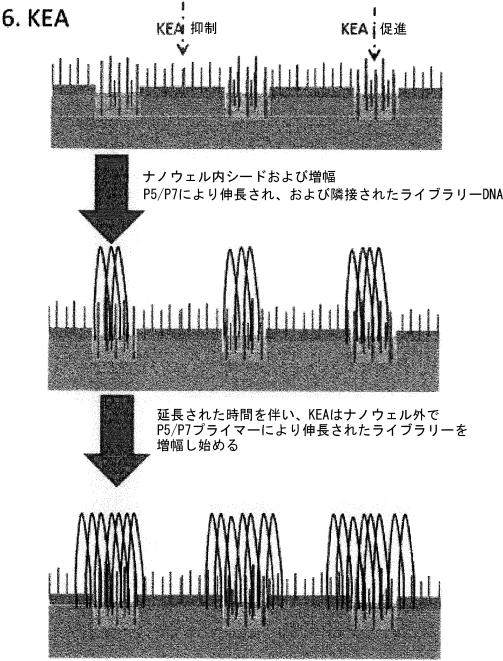
10

20

【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

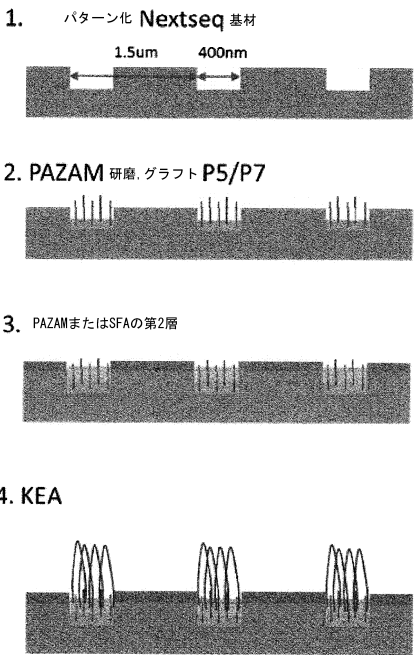


30

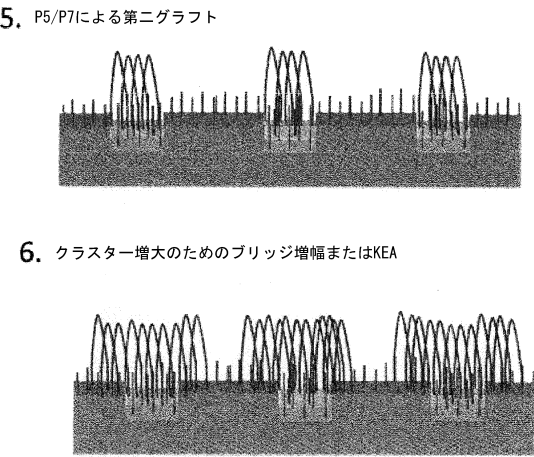
40

50

【図 3 - 1】



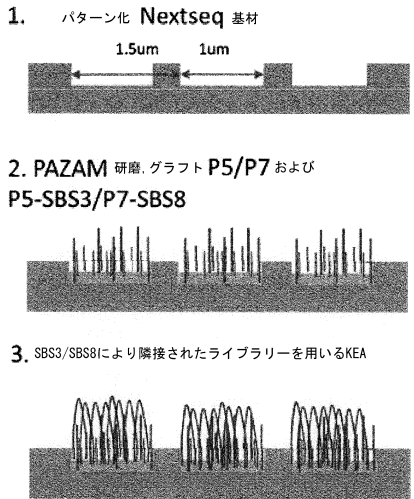
【図 3 - 2】



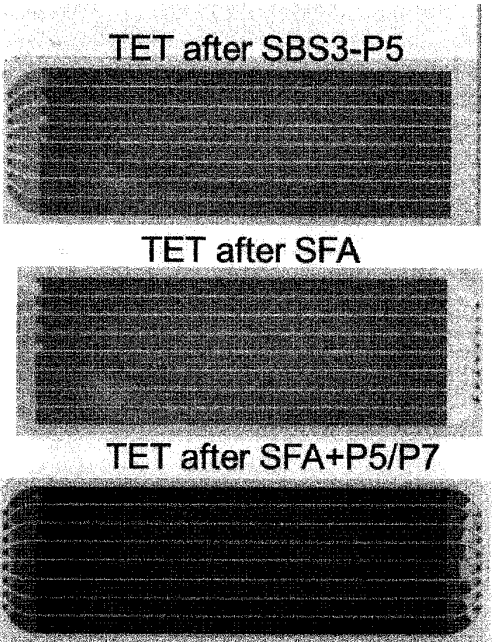
10

20

【図 4】



【図 5】



30

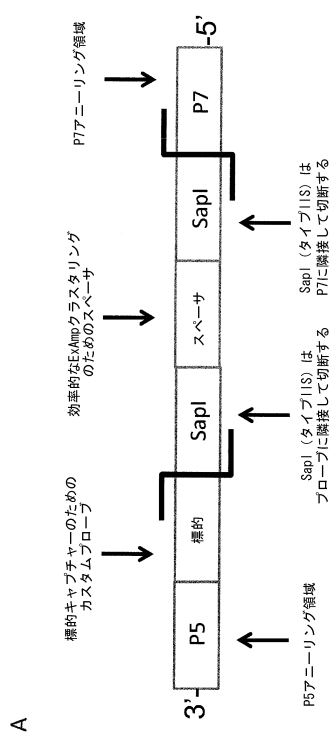
40

FIG. 5

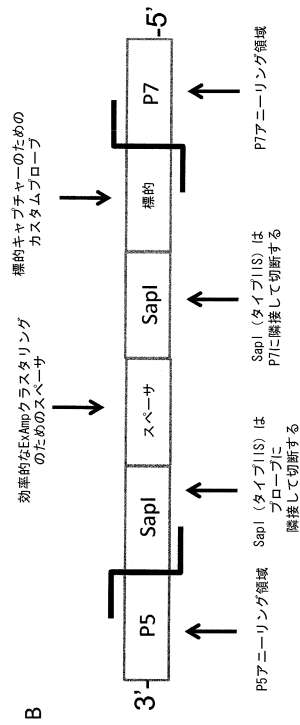
50



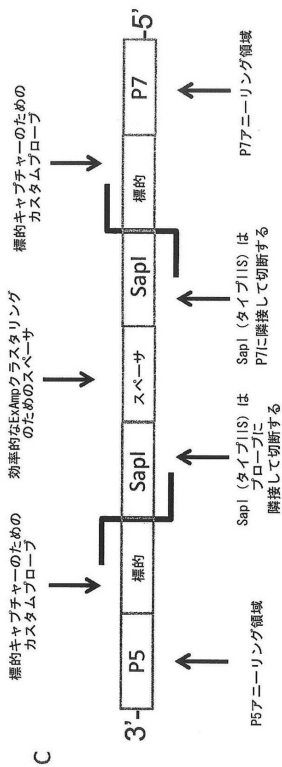
【図 6 A】



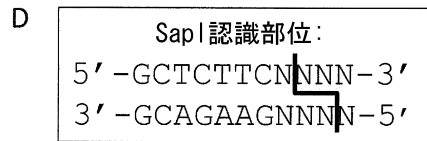
【図 6 B】



【図 6 C】



【図 6 D】



10

20

30

40

50

【図 7 A】

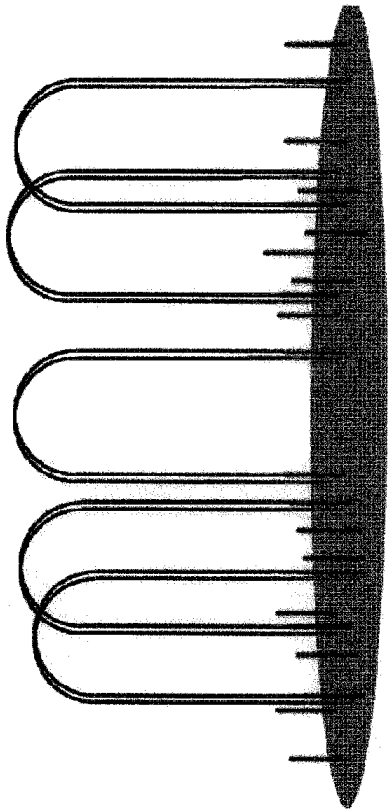


FIG. 7A

【図 7 B】

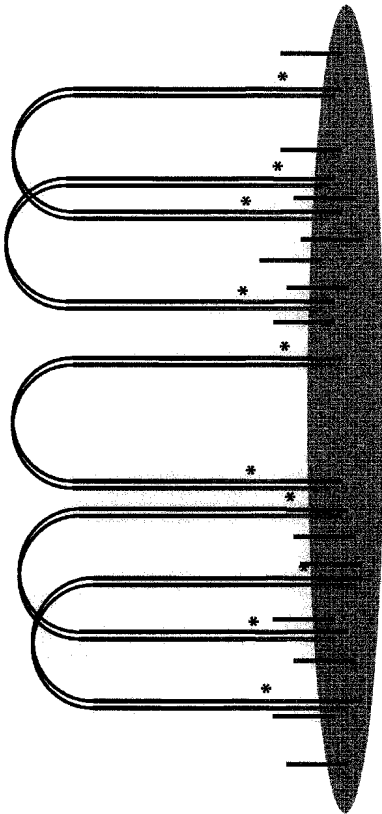


FIG. 7B

【図 7 C】

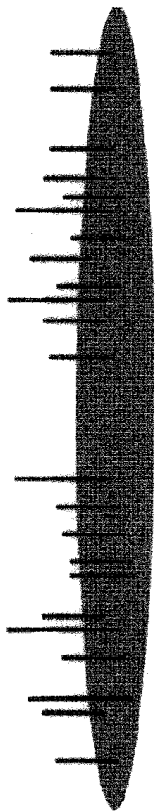


FIG. 7C

【図 7 D】

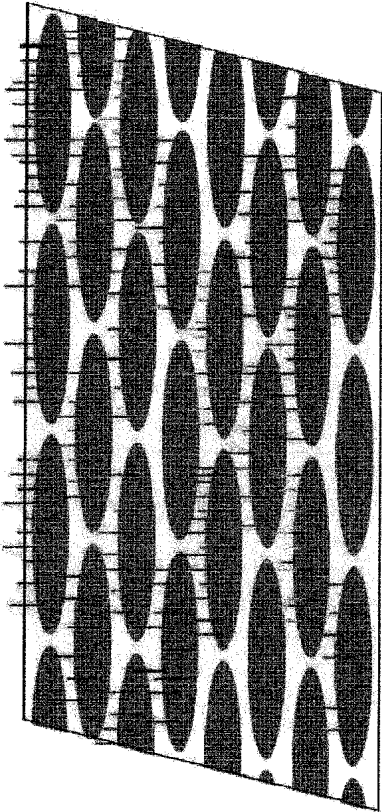


FIG. 7D

10

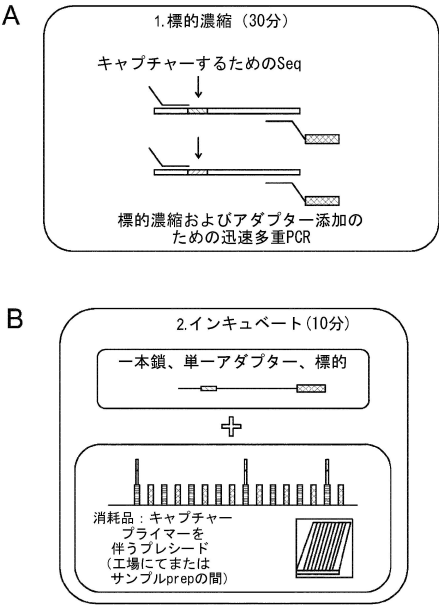
20

30

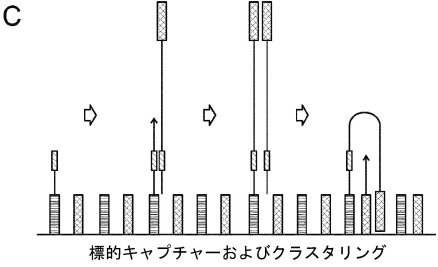
40

50

【 図 8 - 1 】

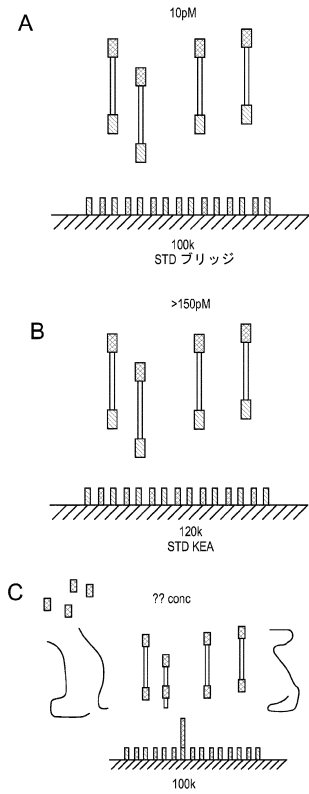


【 図 8 - 2 】

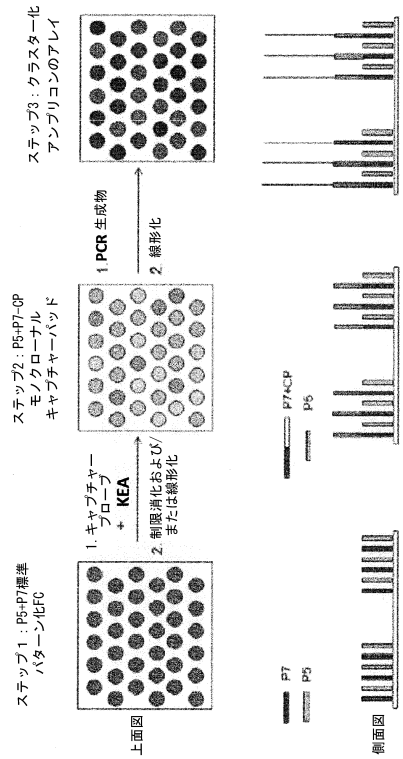


10

【 図 9 】



【 図 10 】



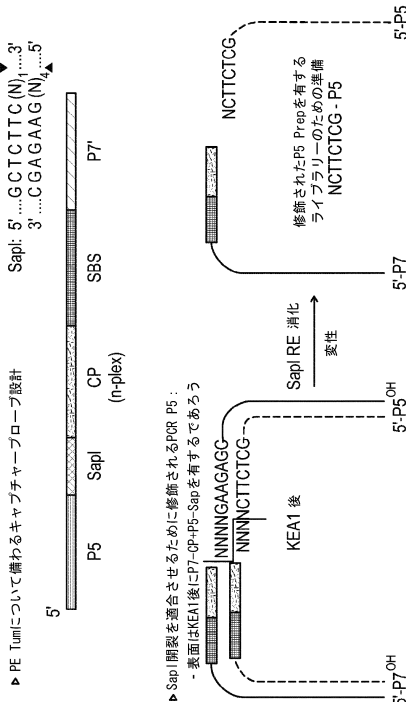
20

30

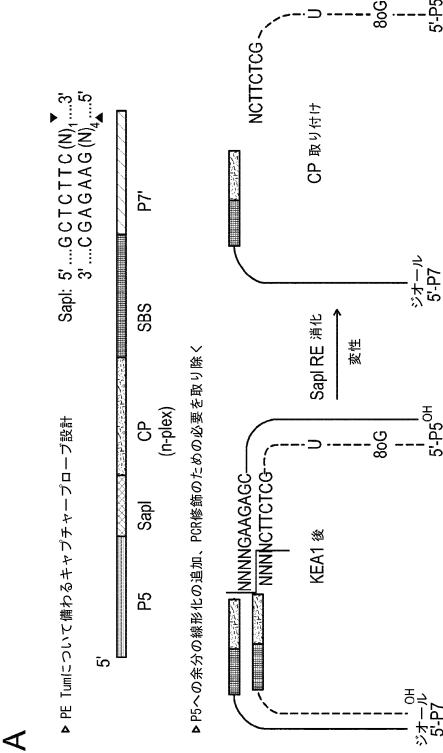
40

50

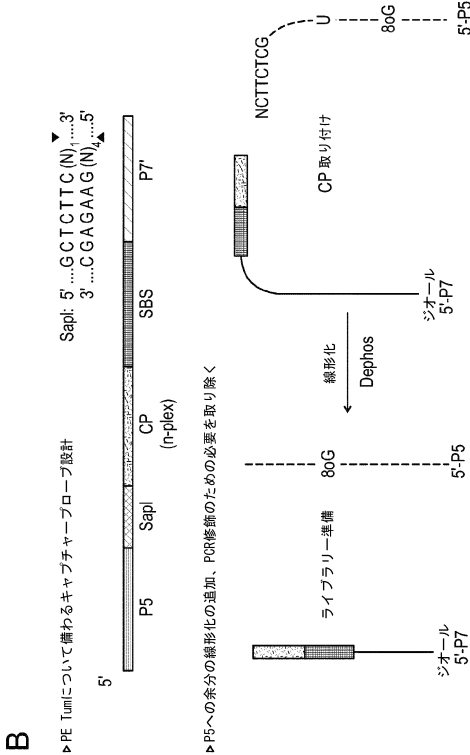
【図 1 1】



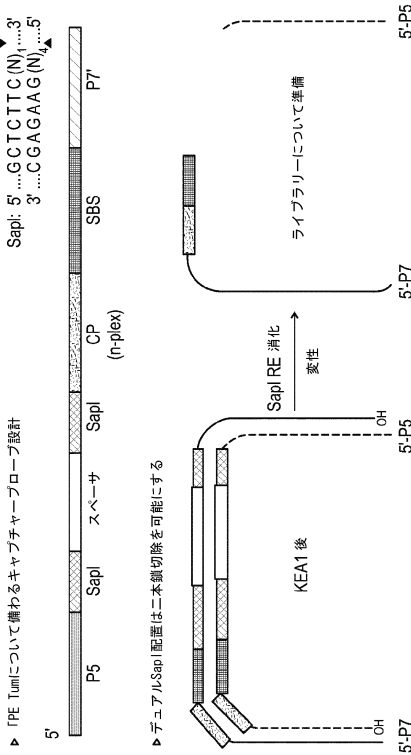
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【図 1 3】



10

20

30

40

50

【図 1 6】

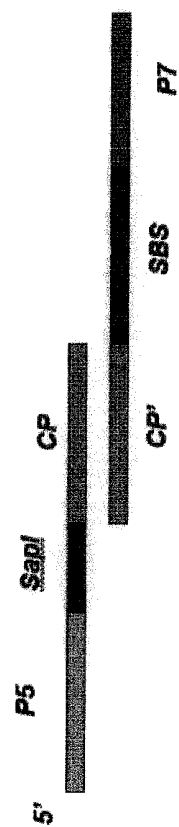
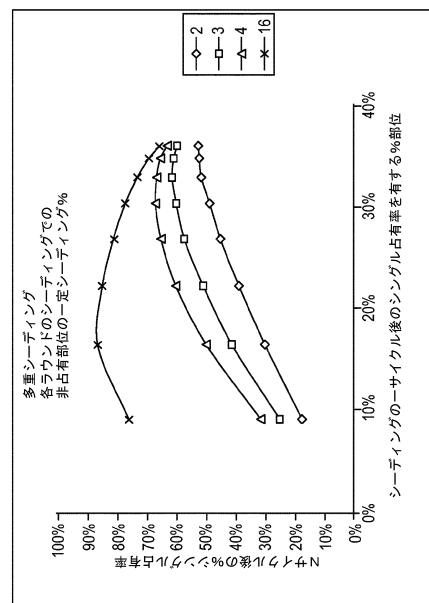
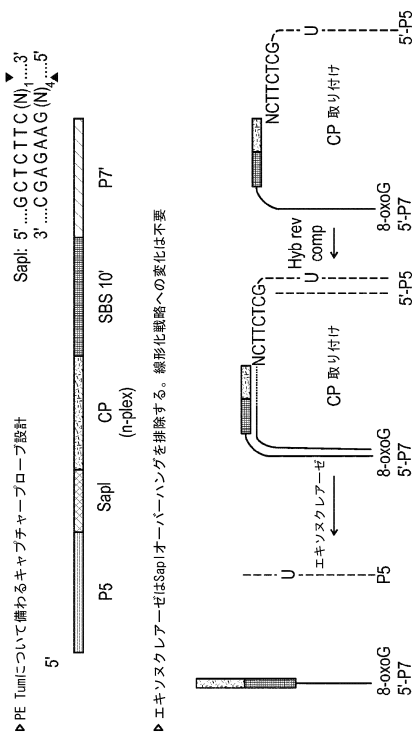


FIG. 16

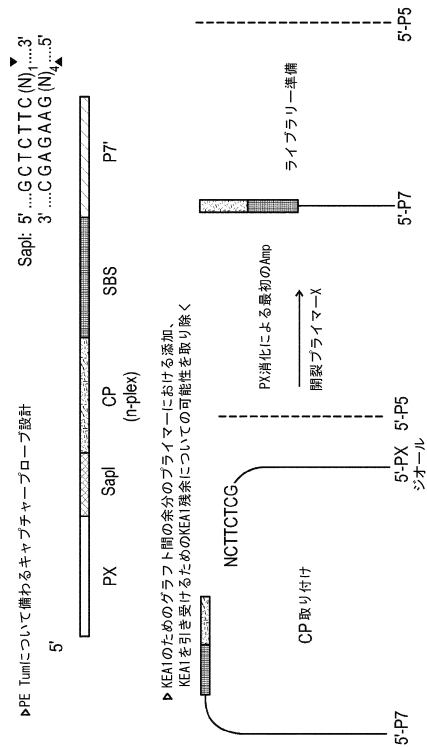
【図 1 7】



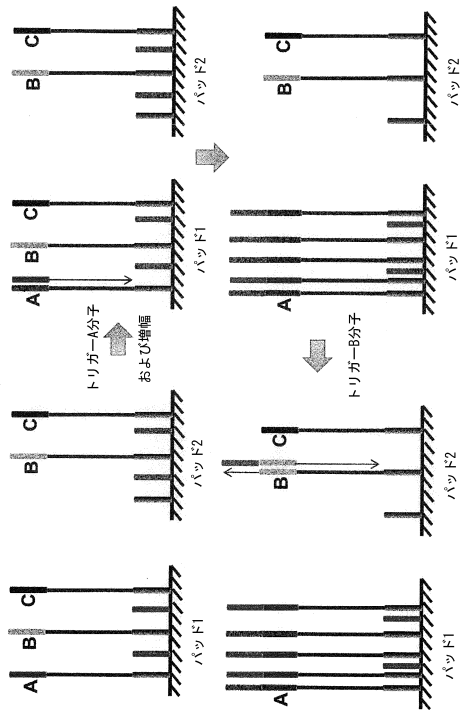
【図 1 4】



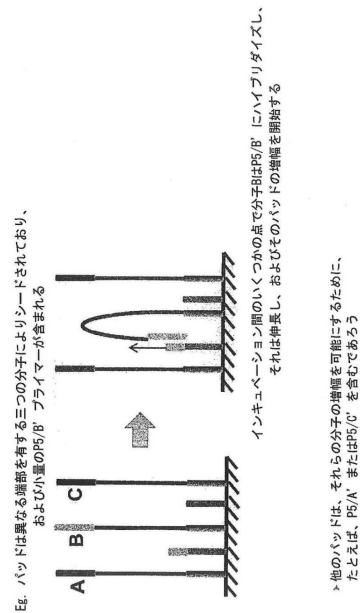
【図 1 5】



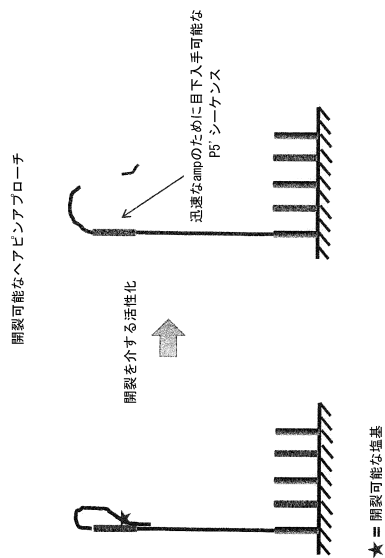
【図 18】



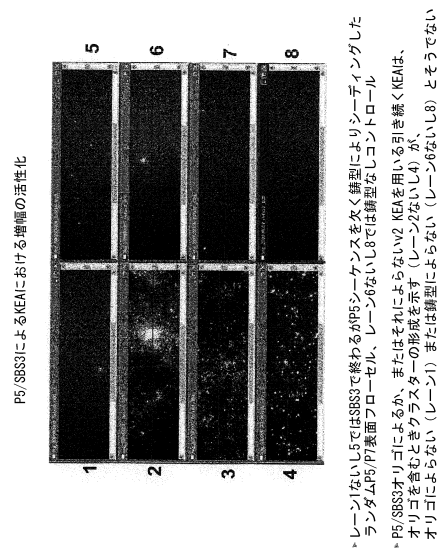
【図 19】



【図 20】



【図 21】



【配列表】  
0007032930000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 前置審査

ッド

(72)発明者 ジンウェイ バイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0 イラ  
ミーナ インコーポレーテッド

(72)発明者 マシュー ウィリアム ケリンジャー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0 イラ  
ミーナ インコーポレーテッド

(72)発明者 ジョン エム バイアール

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0 イラ  
ミーナ インコーポレーテッド

(72)発明者 ジョナサン マーク パウテル

イギリス国 エセックス シービー 1 0 1 エックスエル エヌアール サフロン ワルデン リトル  
チェスターフォード チェスターフォード リサーチ パーク イルミナ ケンブリッジ リミテッド

(72)発明者 ロベルト リガッティ

イギリス国 エセックス シービー 1 0 1 エックスエル エヌアール サフロン ワルデン リトル  
チェスターフォード チェスターフォード リサーチ パーク イルミナ ケンブリッジ リミテッド

(72)発明者 マリア キャンデラリア ロジャート バシガルボ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0 イラ  
ミーナ インコーポレーテッド

(72)発明者 ボヤン ボヤノフ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5 2 0 0 イラ  
ミーナ インコーポレーテッド

(72)発明者 クラウス マイジンガー

イギリス国 エセックス シービー 1 0 1 エックスエル エヌアール サフロン ワルデン リトル  
チェスターフォード チェスターフォード リサーチ パーク イルミナ ケンブリッジ リミテッド

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 7 9 9 2 3 ( US , A 1 )

国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 3 3 8 2 ( WO , A 2 )

国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 7 6 4 0 ( WO , A 2 )

米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 3 8 0 4 2 ( US , A 1 )

国際公開第 2 0 1 4 / 1 3 3 9 0 5 ( WO , A 1 )

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

P u b M e d