

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7604530号
(P7604530)

(45)発行日 令和6年12月23日(2024.12.23)

(24)登録日 令和6年12月13日(2024.12.13)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)

F I

C 1 2 Q 1/6869
C 1 2 N 15/09

Z Z N A
Z

請求項の数 18 外国語出願 (全20頁)

(21)出願番号	特願2023-12722(P2023-12722)
(22)出願日	令和5年1月31日(2023.1.31)
(62)分割の表示	特願2019-572006(P2019-572006 の分割 原出願日 平成30年5月10日(2018.5.10)
(65)公開番号	特開2023-61989(P2023-61989A)
(43)公開日	令和5年5月2日(2023.5.2)
審査請求日	令和5年2月22日(2023.2.22)
(31)優先権主張番号	15/645,082
(32)優先日	平成29年7月10日(2017.7.10)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73)特許権者	399117121 アジレント・テクノロジーズ・インク A G I L E N T T E C H N O L O G I E S , I N C . アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタ クララ スティーブンス・クリーク・ブ ールバード 5301
(74)代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(74)代理人	100125380 弁理士 中村 紗子
(74)代理人	100142996 弁理士 森本 聰二
(74)代理人	100180231 弁理士 水島 亜希子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸識別子の夾雜を検出するためのアッセイ方法および組成物

(57)【特許請求の範囲】**【請求項1】**

アッセイ識別子を、オリゴヌクレオチドを含む一セットのオリゴヌクレオチドサンプルに取り付ける方法であって、各オリゴヌクレオチドが、5'定常領域、サンプル識別子、および3'定常領域を含み、前記方法が、

前記セットの前記オリゴヌクレオチドサンプルのそれぞれを、別個のベッセル内に用意するステップと、ここで、各ベッセルが、前記サンプルの1つまたは複数が夾雜した場合を除いて、たった1つのサンプル識別子を含み；

各ベッセル内で前記オリゴヌクレオチドをアッセイプライマーおよび第2のプライマーで増幅するステップと、ここで、前記アッセイプライマーが、1つまたは複数の定常領域、アッセイ識別子、および、前記オリゴヌクレオチドの前記定常領域の1つと同じであるまたは相補的であるプライミング部分を含み、各ベッセルが、前記アッセイプライマーの1つまたは複数が夾雜した場合を除いて、たった1つのアッセイ識別子を含み；

これらのステップによって、アッセイ識別子およびサンプル識別子を含むオリゴヌクレオチドアンプリコンを用意するステップとを含む方法。

【請求項2】

オリゴヌクレオチドサンプルの前記セットが、少なくとも8つのサンプルを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記オリゴヌクレオチドアンプリコンが、
配列決定プラットフォームおよび配列決定プライミング領域のための標準 5' 増幅領域を
含む 5' 定常領域と、
アッセイ識別子と、
配列決定プライミング領域を含む中央の定常領域と、
サンプル識別子と、
配列決定プラットフォームのための標準 3' 増幅領域を含む 3' 定常領域と
を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記標準 5' 増幅領域が P 5 配列を含み、かつ、前記標準 3' 増幅領域が P 7' 配列を含む 10
、または前記標準 5' 増幅領域が P 7 配列を含み、かつ、前記標準 3' 増幅領域が P 5' 配列
を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記オリゴヌクレオチドアンプリコンが、
標準 5' 增幅領域を含む 5' 定常領域と、
サンプル識別子と、
中央の定常領域と、
アッセイ識別子と、
標準 3' 增幅領域を含む 3' 定常領域と
を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記第 2 のプライマーが、前記オリゴヌクレオチドの前記定常領域の 1 つと同じ、または相補的な、第 1 の配列決定プラットフォームに適合する 3' 領域を含み、前記第 2 のプライマーがさらに、第 2 の配列決定プラットフォームのための標準増幅領域を含む 5' 領域を含み、前記第 2 のプライマーの前記 5' 領域が、前記オリゴヌクレオチドの前記定常領域によって支持されていない前記第 2 の配列決定プラットフォームでの配列決定を可能にする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記オリゴヌクレオチドが、ライプラリ分子である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 8】

核酸サンプルについて一セットのオリゴヌクレオチド内の夾雜を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを含む一セットのオリゴヌクレオチドサンプルを用意するステップ
と、ここで、各オリゴヌクレオチドが、5' 定常領域、サンプル識別子、および 3' 定常領域
を有し、サンプル内の前記オリゴヌクレオチドのそれぞれが、同じサンプル識別子を有し、
前記セット内の前記サンプルのそれぞれが、前記サンプルの 1 つまたは複数が夾雜さ
れた場合を除いて、異なるサンプル識別子を有し；

前記オリゴヌクレオチドまたは前記オリゴヌクレオチドの相補体を、アッセイプライマ
ーおよび第 2 のプライマーで増幅するステップと、ここで、サンプル毎に前記アッセイプ
ライマーが異なっており、各アッセイプライマーが、プライミング部分およびアッセイ識
別子を含むことによって、一セットのオリゴヌクレオチドアンプリコンを生成し、各オリ
ゴヌクレオチドアンプリコンが、前記アッセイ識別子の 1 つ、前記 5' 定常領域、前記サン
プル識別子の 1 つ、および前記 3' 定常領域を含み； 40

前記オリゴヌクレオチドアンプリコンを、1 つまたは複数のプール内にプールするステ
ップと；

前記オリゴヌクレオチドアンプリコンの少なくとも前記サンプル識別子および前記アッ
セイ識別子についての配列を決定するために、前記 1 つまたは複数のプールについて配列
決定を行うステップと；

前記 1 つまたは複数のプール内の前記サンプル識別子が夾雜サンプル識別子を含むかど
うかを判定するステップと 50

を含む方法。

【請求項 9】

前記 1 つまたは複数のプールが第 1 のプールおよび第 2 のプールを含み、前記第 1 のプール内の前記アッセイ識別子が夾雜アッセイ識別子を含むかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記夾雜サンプル識別子が、(i) 複数のアッセイ識別子と関連する前記サンプル識別子の少なくとも 1 つを同定するステップと、(ii) 複数のサンプル識別子と関連する前記アッセイ識別子の少なくとも 1 つを同定するステップのいずれかまたは双方によって判定される、請求項 8 または 9 に記載の方法。 10

【請求項 11】

前記オリゴヌクレオチドアンプリコンの、少なくとも前記サンプル識別子および前記アッセイ識別子について配列を決定するために、前記第 1 のプールおよび前記第 2 のプールを別個に配列決定するステップと；

前記第 2 のプール内の前記サンプル識別子が夾雜サンプル識別子を含むかどうかを判定するステップと

を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 2 のプール内の前記アッセイ識別子が夾雜アッセイ識別子を含むかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。 20

【請求項 13】

夾雜サンプル識別子を、前記夾雜サンプル識別子が第 2 のプール由来であることを判定することによって同定するステップ

をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

夾雜サンプル識別子を、前記第 2 のプールが夾雜アッセイ識別子を含まないことを判定することによって同定するステップ

をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

夾雜アッセイ識別子を、前記第 2 のプールが夾雜アッセイ識別子を含むことを判定することによって同定するステップ

をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。 30

【請求項 16】

オリゴヌクレオチドの前記セットは、少なくとも 8 つのオリゴヌクレオチドを含む、請求項 8 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

アッセイグループを形成するために、前記アッセイ識別子に従って前記オリゴヌクレオチドアンプリコンの配列をグループ化し、前記アッセイグループのそれぞれに複数のサンプル識別子配列が存在するかを判定するステップと；

サンプルグループを形成するために、前記サンプル識別子に従って前記オリゴヌクレオチドアンプリコンの配列をグループ化し、前記サンプルグループのそれぞれに複数のアッセイ識別子配列が存在するかを判定するステップ

のいずれかまたは双方をさらに含む、請求項 8 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 18】

前記アッセイ識別子の少なくとも 1 つと前記サンプル識別子の少なくとも 1 つとの間のミスマッチを判定するステップを含む、請求項 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2017年7月10日出願の米国非仮特許出願第15/645,085号明細書の利益を主張し、この出願の内容は、その全体が参照によって本明細書の一部をなすものとする。

【0002】

[発明の分野]

本発明は、分子生物学の分野に関する。特に、本発明は、サンプルバーコード等の核酸識別子の夾雜を検出するためのアッセイ方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0003】

識別子（例えば、サンプルバーコードまたは分子バーコード）は、種々の目的のために核酸中に存在し得る。最も一般的には、サンプルバーコードは、配列情報の起源またはソースを同定することができるようになるために、標的核酸分子の増幅および/または配列決定（シークエンシング）の前に当該分子に加えられる。様々なサンプル由来の核酸分子が、一緒にプールされて、超並列配列決定にかけられて、多数の様々なサンプル由来の配列情報が効率的に決定され得る。配列決定の前に、サンプル識別子（多くの場合、サンプルバーコードと呼ばれる）が、核酸分子に加えられてよく、これは、情報のグループ化、分析、および解釈を容易にする。別の例として、分子バーコードが、増幅の前に、標的核酸分子に加えられて、その後、最初の標的分子の複製を同定し、かつ一緒にグループ化することができる。

10

【0004】

サンプルバーコードは、様々なサンプル由来の核酸分子を、配列決定のためにプールし、かつ、配列情報をサンプルに割り当てることができるように、超並列配列決定によって分析されることとなる標的分子に頻繁に用いられる。超並列配列決定を実行する科学者およびラボは、サンプルバーコードが配列決定プール内に含まれなかつた場合であつても、プール内にこのサンプルバーコードを時折検出する。これは、夾雜サンプルバーコードが、プールされた核酸中に存在することを示しており、当該夾雜サンプルコードは、複数のサンプルバーコード配列を含有するサンプルバーコードアリコート、すなわち、予想されるバーコード配列および夾雜バーコード配列によってもたらされている可能性がある。夾雜バーコードは、最も初期のステージに始まり、サンプルバーコードアリコートの調製のいかなるステージ（DNAオリゴの合成および精製が挙げられる）においても、またはサンプルバーコード配列を希釈かつ分注するプロセスにおけるハンドリング工程を通して導入される可能性があった。低い頻度、例えば1%以下で存在する場合であつても、夾雜サンプルバーコードの存在は、配列情報の信頼性および解釈に関して、問題を引き起こす虞がある。

20

【0005】

サンプルバーコードは、多くの場合、一セットのコンテナ、例えばウェルプレート内に用意され、各コンテナは、異なるサンプルバーコードを保持する。サンプルバーコードが、例えば、サンプルバーコードをコンテナから、分析されることとなる種々のサンプルにピペットで移すことによって、ラボ分析に用いられる場合、コンテナまたはサンプルが夾雜されてしまうリスクが存在する。

30

【0006】

サンプルバーコードの夾雜は、サンプルバーコード毎に個々の配列決定ライブラリを調製して、これらを個々に配列決定することによって検出することができた。これ以外にも、夾雜は、ブーリングスキームで検出することができた。これは、プールの少なくとも1つにおいて、サンプルバーコードと別のサンプルバーコードの夾雜とを比較する能力を提供するものである。しかしながら、サンプルバーコードを多数のサンプル、例えば48サンプルまたは96サンプルから単離するには、多数のプールが、別個の配列決定ランにおいて調製され、かつ配列決定されなければならなかつた。これは、高価であり、効率が悪く、かつ時間を浪費することとなつた。また、チューブ内に存在しなかつたが、その代わりに、多くのライブラリ調製工程の1つにおいて導入されたサンプルバーコード中に夾雜を

40

50

誤って見出して、偽陽性に至る可能性もある。

【発明の概要】

【0007】

本発明の一態様として、アッセイ識別子（例えば品質制御バーコード）を、オリゴヌクレオチドを含む一セットのオリゴヌクレオチドサンプルに取り付ける方法であって、各オリゴヌクレオチドは、5'定常領域、サンプル識別子（例えばサンプルバーコード）、および3'定常領域を含み、各サンプル識別子は、夾雜の不在下で、セット内で固有である、方法が提供される。一部の実施形態において、定常領域は、配列決定プラットフォーム用の標準増幅領域、またはその逆相補体を含む。例えば、一部の実施形態において、5'定常領域は、*Illumina Index 1*配列であり、3'定常領域は、*Illumina P7*配列の逆相補体(*P7'*)である。他の実施形態において、向きは逆であり、5'定常領域が*Illumina P7*配列であり、そして3'定常領域が*Illumina Read 2*配列とされる。本方法は、サンプルの1つまたは複数が夾雜されていない限り各ベッセルがたった1つのサンプル識別子を含むように、別個のベッセル内に当該セットのオリゴヌクレオチドサンプルのそれぞれを用意するステップを含む。本方法はまた、アッセイプライマーおよび第2のプライマーを用いて、各ベッセル内でオリゴヌクレオチドを増幅するステップを含む。アッセイプライマーは、1つまたは複数の定常領域（例えば、*P5*および*Read 1*プライマー配列）、アッセイ識別子、および、オリゴヌクレオチドの定常領域の1つと同じである、または相補的であるプライミング部分を含む。各ベッセルは、アッセイプライマーの1つまたは複数が夾雜されていない限り、たった1つのアッセイ識別子を含む。ゆえに、本方法は、アッセイ識別子およびサンプル識別子を含むオリゴヌクレオチドアンプリコンを提供する。

10

【0008】

別の態様として、サンプル識別子を含む一セットのオリゴヌクレオチド内の夾雜を検出する方法が提供される。本方法は、オリゴヌクレオチドを含む一セットのオリゴヌクレオチドサンプルを用意するステップを含み、各オリゴヌクレオチドは、5'定常領域、サンプル識別子（例えばサンプルバーコード）、および3'定常領域を有する。サンプル内のオリゴヌクレオチドは、同じサンプル識別子を有し、そしてセット内のサンプルのそれぞれは、サンプルの1つまたは複数が夾雜されていない限り、異なるサンプル識別子を有する。本方法はまた、オリゴヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドの相補体を、アッセイプライマーおよび第2のプライマーで増幅するステップを含む。サンプル毎に異なるアッセイプライマーが用いられ、そして各アッセイプライマーは、プライミング部分およびアッセイ識別子（例えばQCバーコード）を含むことによって、一セットのオリゴヌクレオチドアンプリコンを生成する。各オリゴヌクレオチドアンプリコンは、アッセイ識別子の1つ、5'定常領域、サンプル識別子の1つ、および3'定常領域を含む。本方法はまた、オリゴヌクレオチドアンプリコンを、1つまたは複数のプール内にプールするステップと；オリゴヌクレオチドアンプリコンの少なくともサンプル識別子およびアッセイ識別子についての配列情報を決定するために、1つまたは複数のプールについて配列決定を行うステップと；第1のプール内のサンプル識別子が夾雜サンプル識別子を含むかどうかを判定するステップと；第1のプール内のアッセイ識別子が夾雜アッセイ識別子を含むかどうかを判定するステップとを含む。

20

【0009】

一部の実施形態において、本方法は、オリゴヌクレオチドアンプリコンを、少なくとも2つのプール内にプールするステップと、オリゴヌクレオチドアンプリコンの少なくともサンプル識別子およびアッセイ識別子について配列を決定するために、第1のプールおよび第2のプールについて別個に配列決定を行うステップとを含む。本方法はまた、第2のプール内のサンプル識別子が夾雜サンプル識別子を含むかどうかを判定するステップを含んでもよい。一部の実施形態において、本方法はまた、第2のプール内のアッセイ識別子が夾雜アッセイ識別子を含むかどうかを判定するステップを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、第1のプール内の夾雜サンプル識別子を、その夾雜サンプル識別子

30

40

50

が第2のプール由来のものであることを判定することによって同定することを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、第1のプール内の夾雜サンプル識別子を、第2のプールが夾雜アッセイ識別子を含んでいないことを判定することによって同定するステップを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、第1のプール内の夾雜アッセイ識別子を、第2のプールが夾雜アッセイ識別子を含んでいることを判定することによって同定するステップを含む。一部の実施形態において、夾雜サンプル識別子は、(i)複数のアッセイ識別子と関連するサンプル識別子の1つまたは複数を同定するステップと、(ii)複数のサンプル識別子と関連するアッセイ識別子を同定するステップとの一方または双方によって判定される。

【0010】

10

別の態様として、サンプル識別子を含む一セットのオリゴヌクレオチド内の夾雜を判定するように適合したアッセイに有用である組成物が提供される。本組成物は、5'定常領域、サンプル識別子(例えばサンプルバーコード)、および3'定常領域を有する少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、ならびにプライミング部分およびアッセイ識別子を含む少なくとも1つのアッセイプライマーを含む。一部の実施形態において、組成物はさらに、DNAポリメラーゼおよびデオキシヌクレオチドの1つまたは複数を含む。

【0011】

20

さらに別の態様として、サンプル識別子を含む一セットのオリゴヌクレオチド内の夾雜を判定するように適合したアッセイ用のキットが提供される。本キットは、少なくとも8個のアッセイプライマー、代わりに少なくとも16個のアッセイプライマー、代わりに少なくとも32個のアッセイプライマー、代わりに少なくとも48個のプライマー、または少なくとも96個のプライマーを、別個のベッセル内に含む。各アッセイプライマー識別子は、プライミング部分およびアッセイ識別子を含む。

【0012】

30

上述の態様の一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドサンプルのセットまたはプールは、少なくとも8個のサンプル、代わりに少なくとも16個のサンプル、代わりに少なくとも32個のサンプル、代わりに少なくとも48個のサンプル、代わりに少なくとも96個のサンプルを含み、各サンプルは、セットまたはプール内に固有のサンプル識別子を有する。一部の実施形態において、一セットのアッセイプライマーは、少なくとも32個のアッセイ識別子、代わりに少なくとも48個のアッセイ識別子、代わりに少なくとも96個のアッセイ識別子を含み、各アッセイプライマーは、セットまたはプール内につき固有であるアッセイサンプル識別子を有する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1A】サンプル識別子を有するオリゴヌクレオチドにアッセイ識別子を取り付ける本方法の実施形態を示す図である。

【図1B】サンプル識別子を有するオリゴヌクレオチドにアッセイ識別子を取り付ける本方法の実施形態を示す図である。

【図1C】サンプル識別子を有するオリゴヌクレオチドにアッセイ識別子を取り付ける本方法の実施形態を示す図である。

【図2】本開示に従うアッセイプライマーの2つの異なる実施形態の配列を示す図である。2つの実施形態は、多くの同じ領域を含有するが、5'定常領域が異なる。バージョン2において、5'定常領域と3'定常領域との重複は、より少ない。

【図3】図2における第1の実施形態のアッセイプライマーを用いたオリゴヌクレオチドの増幅由来のアンプリコンのサイズの分布を示す図である。

【図4】図2における第2の実施形態のアッセイプライマーを用いたオリゴヌクレオチドの増幅由来のアンプリコンのサイズの分布を示す図である。

【図5】アッセイ識別子を、サンプル識別子を有するオリゴヌクレオチドに取り付ける本方法の別の実施形態を示す図であり、識別子は、サンプル識別子に対して3'の位置に取り付けられる。

40

50

【図6】アッセイ識別子を、サンプル識別子を有するオリゴヌクレオチドに取り付ける本方法の別の実施形態を示す図であり、オリゴヌクレオチドの定常領域は、所望の配列決定プラットフォームと適合しない。

【図7】本方法および本組成物を用いてサンプル識別子の夾雜を検出するブーリングスキームを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本方法、本組成物、および本キットは、核酸サンプルについての一セットのオリゴヌクレオチド内の夾雜を検出するのに有用であり、これは、夾雜が実質的でないサンプル識別子セットの生成を可能とする。これは大きな進歩、そして利益である。というのも、サンプルバーコード夾雜の存在は、遺伝的変異体の偽コーリング (false calling) を生じさせる場合があり、これが研究および臨床用途について深刻な結果をもたらす虞があるからである。10

【0015】

本方法、本組成物、および本キットは、5'定常領域、サンプル識別子、および3'定常領域を有するオリゴヌクレオチドを使用する。サンプルの1つまたは複数が、夾雜サンプル識別子によって夾雜されていない限り、サンプル内のオリゴヌクレオチドのそれぞれが同じサンプル識別子を有し、そしてセット内のサンプルのそれぞれが異なるサンプル識別子を有する。一部の実施形態において、セット内のサンプルのそれぞれがセットに固有のサンプル識別子を有し、このことは、夾雜がない場合に固有であることが意図され、かつ固有となることを意味する。20

【0016】

「サンプル識別子」は、サンプルを同定するのに用いることができるサンプルバーコード、またはあらゆる縮重 (degenerate) 配列もしくはランダム配列を含む。サンプル識別子は、定常領域が側面に（直接的または間接的に）位置してよい。一部の実施形態において、サンプル識別子は、6つ以上のランダムヌクレオチドまたは縮重ヌクレオチドを含むサンプルバーコードであってよい。これ以外にも、サンプル識別子は、8つ以上のランダムヌクレオチドもしくは縮重ヌクレオチド、または10個以上のランダムヌクレオチドもしくは縮重ヌクレオチドを含むサンプルバーコードであってよい。一部の実施形態において、サンプル識別子は、8つの既知の塩基を含み、そしてアッセイ識別子は、10個の縮重塩基を含む。他の実施形態において、サンプル識別子は、4つの既知の塩基または6つの既知の塩基を含む。一部の実施形態において、サンプル識別子中の塩基の数は、識別されることとなるサンプルの数に基づいて選択されてよい。より長いサンプル識別子およびサンプルバーコードも可能である。例えば、18塩基（8つの既知の塩基および10個の縮重塩基）を含むサンプル識別子が、Ion Torrent配列決定プラットフォーム用のオリゴヌクレオチドのライブラリを調製するのに使用されている。とりわけ、アッセイが、他の配列決定プラットフォームおよび用途に用いられるならば、19塩基を超えるサンプル識別子もまた実行可能であり、所望されてもよい。一部の実施形態において、最初のサンプルバーコードの相補体は、オリゴヌクレオチドアンプリコン内にあり、そしてこの相補体もまた、サンプル識別子とみなされる。30

【0017】

「定常」領域は、既知の配列を含む領域である。定常領域は既知であるので、所望の機能を提供することができる。定常領域は、通常、セットのオリゴヌクレオチド間で、同じ、または実質的に同じであろう。既知の配列は、増幅またはプライマー伸長用のプライミング部位（領域）として機能することができ、かつ／または支持体に取り付けられた核酸にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態において、定常領域は、一連の標準領域、例えば、配列決定プラットフォームに用いられる標準増幅領域を含む。定常領域は、標準領域の機能にとって十分な数の、既知の、または標準領域由来のヌクレオチド、例えば、増幅用の標準プライマーにハイブリダイズするのに十分な数のヌクレオチドを含み得る。40

【 0 0 1 8 】

「夾雜」分子または配列は、何らかの夾雜がある場合を除き、セットまたはプール中にあるように設計されている分子もしくは配列ではなく、セット、プール、またはサンプル中に存在するべき分子もしくは配列でもない。例えば、配列の第1のセットまたはプール中のバーコードは、第1のセットもしくはプール中に存在するべきでない、かつ／または、第2のセットもしくはプール中にのみ存在するべきであるならば、夾雜バーコードである。

【 0 0 1 9 】

本方法および本組成物は、サンプルバーコード等のサンプル識別子を含むオリゴヌクレオチドのセット内に夾雜を認める問題の解決策を提供する。本技術は、比較的少数のハンドリング工程しかなく、このことは望ましい。なぜなら、ハンドリング工程は、夾雜のリスクを増大させるからである。加えて、サンプル間の夾雜を検出するのに必要とされるプール数および配列決定ラン数を少なくするブーリングスキームおよび分析法が提供される。多数のプールの代わりに、本方法は、用いられるプールを少なくして、一セットの96サンプル識別子内の夾雜を検出することができる。一部の実施形態において、一セットの96サンプル識別子中のサンプル識別子夾雜を検出するのに、2つの配列決定プールが用いられる。

10

【 0 0 2 0 】

本方法および本組成物はまた、オリゴヌクレオチド（例えば、タンパク質またはペプチドを標的とするのに用いられる、ライプラリ分子、アダプター、アプタマー、または他のssDNA分子）を増幅するのに用いることができ、これは、分子バーコードを検出することを含む、配列多様性を検出するための一連のランダムなヌクレオチド（本明細書中でサンプル識別子とみなされる）を、2つの定常領域間に有する。また、DNAの既知の領域において、突然変異誘発の单一ヌクレオチド多型（SNP）または部位を同定するのに用いることができる。

20

【 0 0 2 1 】

本方法によってアッセイすることができるオリゴヌクレオチドとしては、標準アダプター由来の核酸分子または領域、例えば配列決定プラットフォーム用の標準アダプター由来の増幅領域用のアダプターが挙げられる。また、オリゴヌクレオチドとしては、標識、タグ、または他の部分が挙げられ得る。一例として、オリゴヌクレオチドとしては、ビオチン部分が挙げられ、これは、アビジンまたはストレプトアビジンへの結合によってオリゴヌクレオチドを濃縮することを可能とする。このアプローチは、市販のHaloplexキット（Agilent Technologies）に用いられている。本方法によってアッセイすることができるオリゴヌクレオチドとしては、ライプラリ分子が挙げられ、これは、配列決定プラットフォーム用のライプラリの一部となるべくして調製された分子である。ライプラリ分子は、通常、プラットフォームを配列決定するためのサンプル識別子および1つまたは複数の標準領域が取り付けられる挿入部を含む。他の領域が、ライプラリ分子中に含まれてもよい。ライプラリ分子により、サンプル識別子は、分子バーコードとなり得、または、第1のサンプルバーコードに加えて、第2のサンプルバーコードとなり得る。

30

【 0 0 2 2 】

本方法はまた、アッセイプライマーおよび第2のプライマーにより、オリゴヌクレオチド、またはオリゴヌクレオチドの相補体を増幅するステップを含む。サンプル毎に異なるアッセイプライマーが用いられ、そして各アッセイプライマーは、プライミング部分およびアッセイ識別子（例えばQCバーコード）を備えることによって、一セットのオリゴヌクレオチドアンプリコンを生成する。各オリゴヌクレオチドアンプリコンは、アッセイ識別子の1つ、5'定常領域、サンプル識別子の1つ、および3'定常領域を含む。本アッセイ法は、種々の標準化された配列決定プラットフォーム（例えば、Illumina配列決定プラットフォームおよびIon Torrent配列決定プラットフォーム）にとって標準である定常領域を選択することによって、それらのプラットフォームに容易に適

40

50

合し得る。

【0023】

一部の実施形態において、本方法は、アッセイによって誘導される夾雜を回避または防止するために少数のハンドリング工程を用いて、1%未満、代わりに0.5%未満、あるいは0.1%未満のレベルのサンプル識別子夾雜を検出して、少数の配列決定ランが実行されるようなプリーリングおよび分析の方法を提供する。本開示は、サンプル識別子を有する、潜在的に夾雜されたオリゴヌクレオチド由来のライブラリを調製するための、高速かつ比較的安価な方法を提供する。ライブラリは、1つまたは複数の所望の配列決定プラットフォームでの配列決定、とりわけ超並列配列決定に適合する。

【0024】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドアンプリコンは、5'定常領域および3'定常領域を含む。さらに、5'定常領域は、配列決定プラットフォームおよび配列決定プライミング領域のための標準5'アダプター、アッセイ識別子、配列決定プライミング領域を含む中央の定常領域、ならびにサンプル識別子を含み、そして3'定常領域は、配列決定プラットフォームのための標準3'アダプターを含む。一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドアンプリコンは、(i)配列決定プラットフォームおよび配列決定プライミング領域のための標準5'アダプターを含む5'定常領域、(ii)アッセイ識別子、(iii)配列決定プライミング領域を含む中央の定常領域、(iv)サンプル識別子、ならびに(v)配列決定プラットフォームのための標準3'アダプターを含む3'定常領域を含む。例えば、標準5'アダプターは、Illumina P5またはP5'配列を含んでよく、そして標準3'アダプターは、Illumina P7またはP7'配列を含んでよい。P7'は、P7の相補体を示す。同様に、P5'は、P5の相補体を示す。他の実施形態において、オリゴヌクレオチドアンプリコンは、標準5'アダプターを含む5'定常領域、サンプル識別子、中央の定常領域、アッセイ識別子、および標準3'アダプターを含む3'定常領域を含む。

【0025】

本方法、本組成物、および本キットはまた、第1の配列決定プラットフォーム用の標準領域（例えば、増幅領域または配列決定プライマー部位（領域））を含むオリゴヌクレオチドを修飾して、異なる配列決定プラットフォーム用の標準領域を含ませるのに用いることができる。一部の実施形態において、第2のプライマーは、オリゴヌクレオチドの3'定常領域と相補的な3'領域を含み、そして第2のプライマーはさらに、標準増幅領域を含む5'領域を含み、オリゴヌクレオチドの3'定常領域は、第2のプライマーの5'領域の標準増幅領域とは異なる配列決定プラットフォーム用の標準増幅領域を含む。

【0026】

本開示はまた、サンプル識別子およびアッセイ識別子の夾雜を同定する新規のプリーリングスキームおよび配列決定スキームを提供する。一部の実施形態において、本方法は、オリゴヌクレオチドアンプリコンを、少なくとも2つのプール内にプールするステップと；サンプル識別子およびアッセイ識別子を含むオリゴヌクレオチドアンプリコンの少なくとも一部の配列を決定するために、2つのプールについて配列決定を行うステップと；第2のプール内のサンプル識別子が夾雜サンプル識別子を含むかどうかを判定するステップと；第2のプール内のアッセイ識別子が夾雜アッセイ識別子を含むかどうかを判定するステップとを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、夾雜サンプル識別子を、その夾雜サンプル識別子が第2のプールに由来すると判定することによって判定するステップを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、夾雜サンプル識別子を、第2のプールが夾雜アッセイ識別子を含んでいないことを判定することによって同定することを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、夾雜アッセイ識別子を、第2のプールが夾雜アッセイ識別子を含んでいないことを判定することによって同定することを含む。

【0027】

一部の実施形態において、本方法はさらに、アッセイグループを形成するために、アッセイ識別子に従ってオリゴヌクレオチドアンプリコンの配列をグループ化するステップと

10

20

30

40

50

; アッセイグループのそれぞれにおいて複数のサンプル識別子配列が存在するかを判定するステップとを含む。一部の実施形態において、本方法はさらに、サンプルグループを形成するために、サンプル識別子に従ってオリゴヌクレオチドアンプリコンの配列をグループ化するステップと；サンプルグループのそれぞれにおいて複数のアッセイ識別子配列が存在するかを判定するステップとを含む。一部の実施形態において、本方法は、オリゴヌクレオチドアンプリコンから少なくとも2つのプールを形成するステップと；オリゴヌクレオチドアンプリコンの配列情報を得るために、アンプリコンの少なくとも2つのプールについて配列決定を行うステップとを含み；個々のオリゴヌクレオチドアンプリコンについての配列情報は、少なくとも、アッセイ識別子およびサンプル識別子の配列を含む。一部の実施形態において、本方法は、アッセイ識別子に従ってアンプリコン配列情報をグループ化するステップと；グループ化されたアンプリコン配列情報が複数のサンプル識別子を含有するかを判定するステップとを含んでよい。

【0028】

本方法は、例えば、サンプル識別子の少なくとも1つが、関連するはずのないアッセイ識別子と関連する場合、かつ／またはアッセイ識別子の少なくとも1つが、関連するはずのないサンプル識別子と関連する場合、アッセイ識別子とサンプル識別子間のミスマッチが存在するかを判定するステップを含んでよい。

【0029】

本方法は、NGS用のサンプル調製キットとともに用いることができる。また、ライブラリ調製試薬に用いることができる。本方法はまた、SureSelect試薬キットなどの、サンプルバーコードまたは他の識別子を含有するアッセイ標的濃縮キットおよびセットに用いることができる。SureSelectキット(Agilent Technologiesから入手可能)は、サンプル識別子を有し、かつサンプル識別子に対する1つまたは複数の定常領域5'および3'を有するオリゴヌクレオチド、すなわちPCRプライマーを含有する。

【0030】

本開示は、夾雑が実質的でない、例えば、夾雑サンプル識別子が0.1%未満、または0.01%未満であるサンプル識別子セットまたはキットの製造を可能にする。

【0031】

図1Aにおいて、オリゴヌクレオチド102は、5'定常領域110、サンプル識別子112、および3'定常領域114を含む。例えば、5'定常領域110は、標準配列、例えばIllumina Index 1配列を含んでよく、サンプル識別子112、および3'定常領域114は、標準増幅配列、例えばIllumina P7'配列を含んでよい。定常領域は、増幅または配列決定用のあらゆる標準プライミング部位(領域)を含んでよい。オリゴヌクレオチド102は、3'定常領域114の少なくとも一部と相補的なプライミング領域115を有するプライマー104を用いて増幅される。例えば、プライマー104は、P7プライマーであってよい。同じ工程または以降の工程において、オリゴヌクレオチド102またはその相補体は、5'定常領域110またはその相補体111の少なくとも一部と相補的なプライミング領域120を有するプライマー106で増幅される。プライマーはまた、アッセイ識別子122および1つまたは複数の定常領域126、124(例えば、Illumina P5配列126およびread 1配列決定プライマー124)を含む。増幅の更なるラウンドにより、1つまたは複数の定常領域126、124、アッセイ識別子122、最初のオリゴヌクレオチドの5'定常領域120の配列、サンプル識別子配列128、および最初のオリゴヌクレオチドの3'定常領域130を含むオリゴヌクレオチドアンプリコン108が生じる。アンプリコン108内のサンプル識別子配列128は、通常、オリゴヌクレオチド102のサンプル識別子112の同一コピーである。アンプリコン108の定常領域120は、ほとんどの場合、オリゴヌクレオチド102の定常領域110と同一であろう。しかしながら、いずれかが部分的にトランケートされている場合がある。例えば、定常領域110は、5'末端上でトランケートされている場合があり、そして定常領域120は、3'末端上でトランケートされて

10

20

30

40

50

いる場合がある。同様に、定常領域 114 は、3' 末端上で部分的にトランケートされている場合があり、そして定常領域 130 は、5' 末端上で部分的にトランケートされている場合があるが、アンプリコン 108 の定常領域 130 およびオリゴスクレオチド 102 の定常領域 114 は、通常、同じであろう。オリゴスクレオチドアンプリコン 108 は、定常領域により、超並列配列決定用の標準プラットフォームでの配列決定に適合する。

【0032】

図 1B は、本方法の別の実施形態を示す。この実施形態において、オリゴスクレオチド 103 は、3' 定常領域 111、サンプル識別子 113、および 5' 定常領域 115 を含む。例えば、3' 定常領域 111 は、Illumina Read 2 配列（または配列決定プラットフォーム用の別の標準領域）であってよく、そして 5' 定常領域 115 は、増幅または配列決定用の Illumina P7 配列またはあらゆる標準プライミング部位（領域）であってよい。増幅により、1つまたは複数の定常領域 127、125、アッセイ識別子 123、3' 定常領域 111、サンプル識別子配列 113、および 5' 定常領域 115 の配列を含むオリゴスクレオチドアンプリコン 109 が生じる。増幅の更なるラウンドが、プライマー 131 で行われてよく、これは、プライマーとして機能するのに十分な定常領域 115 の部分と同じ配列を有する。

【0033】

図 1C は、最初のオリゴスクレオチドが、配列決定プラットフォーム用のサンプル識別子および標準領域が取り付けられている挿入部を含む分子であるライプラリ分子である場合に、いかにアッセイ方法が実行され得るかを実証している。この実施形態において、アッセイ方法は、ライプラリ調製中に起こった夾雑を検出することができる。オリゴスクレオチド 102 は、第 1 の 5' 定常領域 110、サンプル識別子 112、3' 定常領域 114 を含み、そしてさらに挿入部 140、第 2 の 5' 定常領域 142（例えば、Read 1 プライミング部位）、任意選択の第 2 のサンプル識別子 144、および第 3 の 5' 定常領域 146（例えば、増幅プライミング部位）を含む。挿入部 140 は、研究され、分析され、または追加試験、例えば超並列配列決定プラットフォームでの配列決定にかけられることとなる標的配列を含む。第 2 のサンプル識別子 144 は、場合によっては、多くのライプラリ調製物内に含まれる。オリゴスクレオチド 103（オリゴスクレオチド 102 の相補鎖である）は、第 1 の 3' 定常領域 111、サンプル識別子 113、5' 定常領域 115 を含み、そしてさらに、挿入部 141、第 2 の 3' 定常領域 143（例えば、Read 1 プライミング部位）、任意選択の第 2 のサンプル識別子 145、および第 3 の 3' 定常領域 147（例えば、増幅プライミング部位）を含む。オリゴスクレオチド 102 は、3' 定常領域 111 の少なくとも一部と相補的なプライミング領域 115 を有するアッセイプライマー 104 を用いて増幅される。例えば、プライマー 104 は、P7 プライマーであってよい。同じ工程または以降の工程において、オリゴスクレオチド 102 またはその相補体は、5' 定常領域 110 またはその相補体 111 の少なくとも一部と相補的なプライミング領域 120 を有するプライマー 106 で増幅される。プライマーはまた、アッセイ識別子 122 および 1 つまたは複数の定常領域 126、124（例えば、Illumina P5 配列 126 および Read 1 配列決定プライマー領域 124）を含む。増幅の更なるラウンドは、1 つまたは複数の定常領域 126、124、アッセイ識別子 122、最初のオリゴスクレオチドの 5' 定常領域 120 の配列、サンプル識別子配列 128、および最初のオリゴスクレオチドの 3' 定常領域 130 を含むオリゴスクレオチドアンプリコン 108 を生成する。示される実施形態において、オリゴスクレオチドアンプリコン 108 は、挿入部 140 を含まないが、一部の実施形態において、プライマー 106 は、領域 3' を挿入部 140 に結合させ、そしてそれによって、挿入部 140 はアンプリコン内に含まれる。ブーリング方法（実施例 4 に記載される）が、2 つ以上のサンプルバーコード（バーコードが、ライゲーションまたは増幅のいずれかを介して取り付けられている場合）で調製されたライプラリに使用することができ、そして当該ブーリング方法は、ライプラリ調製が実行された後にサンプルバーコード夾雑が起きたかを同定するのに用いることができる。

10

20

30

40

50

【0034】

アッセイプライマー上の定常領域およびプライミング領域の選択によって、本方法は、様々なライプラリ調製方法 (Haloplex XTHS、Haloplex HS、SureSelect XT、およびSureSelect QXT (全てAgilent由来) が挙げられる)、および様々な標準化された配列決定プラットフォーム (Illumina およびIon Torrentが挙げられる) に適合性がある。超並列配列決定用の配列決定プラットフォームとして、Ion Torrent PGM および陽子半導体シーケンサー、ならびに Illumina MiSeq、HiSeq、Miniseq、およびNextSeq が挙げられる。他の配列決定プラットフォームが開発中であり、そして本組成物および方法は、それらのプラットフォーム用の標準増幅領域に用いることができる。

10

【0035】

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチド上の定常領域および / またはアッセイ識別子は、標準化された配列決定プラットフォームでの使用に適した配列を含む。例えば、定常領域は、Illumina 配列決定プラットフォーム用の増幅領域の配列、例えば Illumina P5 配列もしくは Illumina P7 配列、または例えば Ion Torrent アダプター A 配列もしくは Ion Torrent アダプター P1 配列、または例えば配列決定プライマー領域、例えば Illumina Read1、Index1、Read2、もしくは Index2 を有してよい。他の増幅領域または配列決定プライマー領域を、様々なプラットフォームに用いることができる。表 1 は、Illumina および Ion Torrent 配列決定プラットフォームに現在用いられている標準領域の配列を示す。

20

【0036】

【表 1】

表 1

Illumina	P5	5'-	AATGATAACGGCGACCACCGA	-3'
Illumina	P7	5'-	CAAGCAGAACGGCATACGAGAT	-3'
Illumina	Read1	5'-	ACACTCTTCCTACACGACGCTCTCCGATCT	-3'
Illumina	Index1	5'-	GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACCTCCAGTCAC	-3'
Illumina	Read2	5'-	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	-3'
Illumina	Index2	5'-	AGATCGGAAGAGCGTCGTAGGGAAAGAGTGT	-3'
IonTorrent	A	5'-	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	-3'
IonTorrent	P1	5'-	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT	-3'

30

一部の実施形態において、オリゴヌクレオチドの定常領域は、表 1 に示される配列から選択される配列を含む。

【0037】

図 5 は、本方法および本組成物が、サンプル識別子に対して 3' の位置にアッセイ識別子を加えるためにどのように用いられ得るかを示す。このアプローチは、とりわけ、配列決定されることとなる標的分子の 5' 末端への取付け用に構成されるアダプター、または標的分子の 5' 末端を増幅することが意図されるプライマーであるオリゴヌクレオチドに適している。ゆえに、この実施形態において、本方法は、5' アダプター (図 1 に示される 3' アダプターに代わるものである) 内に存在する識別子を検出するのに特に適している。

40

【0038】

図 5において、オリゴヌクレオチド 502 は、5' 定常領域 510、サンプル識別子 512、および 3' 定常領域 514 を含む。例えば、5' 定常領域 510 は、Illumina P5 配列であってよく、サンプル識別子 512 は、サンプルバーコードであってよく、そして 3' 定常領域 514 は、Illumina Read 1 配列であってよい。

50

オリゴヌクレオチド 502 は、3' 定常領域 514 の少なくとも一部と相補的なプライミング領域 515 を有するプライマー 504 を用いて増幅される。例えば、プライミング領域 515 は、3' 定常領域 514 の逆相補体、すなわち Illumina Read 1 配列の逆相補体であってよい。プライマー 504 はまた、配列決定プラットフォームまたはその相補体、例えば Illumina P7 の逆相補体 (P7') 用のアッセイ識別子 517 およびアダプター 519 を含む。オリゴヌクレオチド 502 またはその相補体は、5' 定常領域 510 またはその相補体の少なくとも一部と相補的なプライミング領域 520 を有するプライマー 506 で増幅される。増幅の更なるラウンドは、3' アダプター 518、アッセイ識別子 522、516、3' 定常領域 514、サンプル識別子 512、および 5' 定常領域 520 を含むオリゴヌクレオチドアンプリコン 508 を生成する。オリゴヌクレオチドアンプリコン 508 は、超並列配列決定用の標準プラットフォームでの配列決定に適合する。なぜなら、少なくとも 1 つの定常領域、そして多くの場合、双方の定常領域が、そのようなプラットフォーム用のアダプターを含むからである。

【0039】

図 6 は、本アッセイ方法および組成物が、2 つの定常領域によって囲まれるオリゴヌクレオチドであって、当該定常領域のどちらもアッセイに用いられることとなる配列プラットフォームと適合しない場合に、そのオリゴヌクレオチド内の夾雑を検出するのにいかに用いられ得るかを示す。これ以外にも、このアプローチは、アダプターおよびプライマーを、ある配列決定プラットフォームから変換して、別のプラットフォームで配列決定できるようにするのに用いることができる。例えば、Ion Torrent Haloplex × アッセイに用いられるアダプター等のオリゴヌクレオチドは、Illumina P5、QXT Read 1、QC インデックス、Ion Torrent Read プライマーを含むアッセイプライマー、ならびに Illumina P7 および Haloplex ダーク塩基 (dark base) (ダーク塩基は、配列決定中のヌクレオチド組込みと関連する蛍光を生じさせないものである) に対する逆相補体を含む増幅プライマーを用いてアッセイすることができる。これにより、これらのプライマーを、Illumina シーケンサーで夾雫についてアッセイすることができる。このアプローチはまた、配列決定が意図されていない、そしてプラットフォームを配列決定するための増幅領域を含まないオリゴヌクレオチドの配列決定を可能にするにも用いることができる。ただし、当該オリゴヌクレオチドが、5' 定常領域、知られていない領域、および 3' 定常領域を含む場合である。

【0040】

図 6において、オリゴヌクレオチド 602 は、5' 定常領域 610、サンプル識別子 612、および 3' 定常領域 614 を含む。この実施形態において、オリゴヌクレオチド 602 の定常領域 610、614 は、第 1 の配列決定プラットフォーム、例えば Ion Torrent 配列決定プラットフォーム用であるが、第 2 の配列決定プラットフォーム、例えば Illumina 配列決定プラットフォームでオリゴヌクレオチド 602 を配列決定することが所望される。例えば、5' 定常領域 610 は、Ion Torrent アダプター A 配列であってよく、サンプル識別子 612 は、サンプルバーコードであってよく、そして 3' 定常領域 614 は、ライゲーションおよび品質制御を可能するために提供されるダーク塩基であってよい。オリゴヌクレオチド 602 は、3' 定常領域 614 の少なくとも一部と相補的な（すなわち、ダーク塩基の少なくとも一部と相補的な）プライミング領域 615 を有するプライマー 604 を用いて増幅される。プライマー 604 はまた、配列決定プラットフォーム用の標準増幅領域、例えば Illumina P7 配列に相当する領域を含む領域 617 を含む。オリゴヌクレオチド 602 またはその相補体は、5' 定常領域 610 またはその相補体 611 の少なくとも一部と相補的なプライミング領域 620 を有するプライマー 606 で増幅される。プライマー 606 はまた、アッセイ識別子 622 および 1 つまたは複数の定常領域（例えば、Illumina P5 配列 626 および Illumina Read 1 配列 624）を含む。増幅が、適切な増幅サイクルを用いて、プライマー 606 およびプライマー 604 で続けられて、Illumina

10

20

30

40

50

配列決定プラットフォームでの配列決定に適したオリゴヌクレオチドアンプリコンを提供する。増幅の更なるラウンドにより、1つまたは複数の定常領域 626、624、アッセイ識別子 622、最初のオリゴヌクレオチド 620 の 5' 定常領域 610 の配列 620、サンプル識別子 612、3' 定常領域 614 の配列、および増幅領域 628 を含むオリゴヌクレオチドアンプリコン 608 が生じる。オリゴヌクレオチドアンプリコン 608 は、定常領域 626 および / または増幅領域 628 により、超並列配列決定用の標準プラットフォームでの配列決定に適合する。

【0041】

一部の実施形態において、（アダプターの場合のような）相補的 DNA 鎖の存在は、相補的アダプター鎖が増幅プライマー用の結合領域の双方を含有するならば、夾雜または配列変化の検出に関する問題を引き起こす虞がある。そのような状況では、双方の鎖が増幅されることとなり、検出されるあらゆる夾雜 / 配列変化が、2本の鎖上に存在するバーコード配列の配列差異に起因し得た。多くの場合において、アダプター設計は、こうしたことが起こらないようになれる。

10

【0042】

[実施例 1]

本方法の実施形態は、サンプルバーコード夾雜が、Illumina アダプター配列を有するキット内に存在するかを判定するのに使用される。図 1A に示すように、オリゴヌクレオチド 102 は、サンプル識別子 112 を有し、Illumina Index 1 配列がその 5' 定常領域 110 として、そして Illumina P7' 配列がその 3' 定常領域 114 として、側面に位置する。P7' は、P7 の相補体を示す。同様に、P5' は、P5 の相補体を示す。図 1 は、このオリゴヌクレオチド 102 の夾雜を、様々なサンプル識別子を有するオリゴヌクレオチドで検出する方法を示す。増幅は、標準的な DNA ポリメラーゼ、P7 プライマー、および P5 を含む別のプライマー、Read 1 プライマー配列、QC バーコード、および Index 1 配列（それぞれ 5' から 3'）を用いて実行することができる。高フィデリティ（high fidelity）DNA ポリメラーゼを用いて、PCR エラーに起因する誤った夾雜検出を引き下げ、または最小にすることができる。

20

【0043】

アッセイプライマーの 2 つのバージョンまたは実施形態を用いて、アッセイを開発した。当該 2 つのバージョンの配列を、図 2 に示す。Illumina Read 1 プライマー、および Illumina Read 2 (Index 1) プライマー配列の逆相補体の双方をアッセイプライマー内に含むアッセイプライマーのバージョン 1 を用いた最初の試みにより、少量の予想される 130 bp のアンプリコンおよび大量のより短い増幅産物が生じた（図 3 のレーン B1）。これらの産物は、潜在的に、Read 1 の 3' 末端と Index 1 の 5' 末端間の 13 bp の相補性に起因して生じる二次増幅産物に由来する。Read 1 の配列を Illumina 配列から QXT Read 1 配列（アッセイプライマーのバージョン 2）に変えることによって、これらの二次増幅産物は、大部分が除外された（図 4 のレーン B1）。

30

【0044】

[実施例 2]

Haloplex および Haloplex HS キットを試験して、サンプルバーコードを含有するオリゴヌクレオチドが、キット内に供給される供給インデックス溶液内で増幅し得るかを見た。オリゴヌクレオチドは、きれいに増幅し得ることが判明した。というのも、アッセイプライマーを用いた場合に、強い増幅産物が生じたからである（図 4、レーン B1（供給したインデックス溶液））。

40

【0045】

[実施例 3]

アッセイプライマーを、SureSelect XT および SureSelect X T 2 試薬キットで試験して、オリゴヌクレオチドが首尾よく増幅された。また、本アッセ

50

イプライマーを用いて、重複配列に修飾がある Sure Select XTHS 試薬キットを試験して、オリゴヌクレオチドが首尾よく増幅された。

【0046】

これらのライプラリの増幅は、オリゴヌクレオチドが伸長を防止するように修飾されている場合ですら、起こり得る。というのも、最初の 2 ラウンド後以降のラウンドが、合成された分子を鋳型として用いるからである。増幅方法もまた、5' ビオチン修飾の存在下で機能する。

【0047】

[実施例 4]

96 個以上のサンプル識別子の一セットを用意する。当該セットは、配列決定前の増幅に先立って、かつ／またはブーリングに先立って、サンプル識別子を核酸に加えるのに用いることができる。しかしながら、キットのアセンブリまたは試薬の調製中に、これらのサンプル識別子の 1 つにおいて夾雜が生じたならば、サンプル中の低い対立遺伝子変異体の検出が生じる場合がある。夾雜の欠如について確信を持つために、多数の配列決定ランを実施して、全てのサンプル識別子に夾雜がないと確認することができることを確実にした。

10

【0048】

以下のスキームは、この制限を克服し、そして以下のスキームを用いて、サンプル識別子（この実施例においてサンプルバーコードまたは SBC とも呼ばれる）および／またはアッセイ識別子（この実施例において QCB とも呼ばれる）の夾雜を判定することができる。様々なサンプル識別子を含有する 96 個のオリゴヌクレオチドの一セットを、2 つのグループ、グループ 1 およびグループ 2 に分割する。それぞれは 48 個のオリゴヌクレオチドを含有する。グループ 1 は、SBC1 ~ SBC48 を有し、グループ 2 は、SBC49 ~ SBC96 を有する。グループ 1 内の各サンプル識別子を、48 個の様々なアッセイ識別子（QCB1 ~ QCB48）の 1 つを含有するアッセイプライマーで増幅する。グループ 2 内の各サンプル識別子を、グループ 1 に用いた同じ 48 個のアッセイ識別子の 1 つで、全てのアッセイ識別子（QCB1 ~ QCB48）が双方のグループに、かつ 2 つの増幅反応に存在するように、そして全てのサンプル識別子（SBC1 ~ SBC96）が、1 つのグループにのみ、かつ 1 つの増幅反応にのみ存在するように、増幅する。スキームに従うサンプル識別子（SBC）とのアッセイ識別子（QCB）の関連を、図 7 に示す。説明目的で、SBC を、96 ウェルプレート内に配置するように示すが、ウェルプレート内に用意する必要もなければ、ウェルプレートに用いる必要もない。

20

【0049】

PCR 増幅は、QCB および SBC を有するオリゴヌクレオチドアンプリコンを生成する。夾雜がない場合、各 SBC は、一つの QCB と関連する。言い換えると、配列決定した場合、SBC 每の配列情報は、それと関連する単一の QCB を有するはずである。図 7 は、このスキームを用いて生じることとなる関連を示す。しかしながら、超並列配列決定を用いて、個々にではなくプールでアンプリコンを配列決定することによって、配列決定に必要とされる時間、費用、および努力を引き下げることが所望される。ゆえに、グループ 1 において生じるオリゴヌクレオチドアンプリコンを、一緒にプールして配列決定し、そしてグループ 2 由来のオリゴヌクレオチドアンプリコンを、一緒にプールして配列決定する。プールの配列決定は、プール内に含まれる種々のアンプリコンについての配列情報を生じさせ、そして所定のアンプリコンについての配列決定情報は、サンプル識別子、およびそれと関連するアッセイ識別子を有することとなる。

30

【0050】

こうした配列決定により、配列情報の分析後に同定される関連に基づいた、サンプル識別子またはアッセイ識別子に起因する夾雜の検出が可能となることとなる。この分析のために、全ての潜在的サンプル識別子（プール内に存在することが意図されるか否かに拘らない）を、配列決定情報の分析に含めることが有益である。夾雜が起こるならば、夾雜は

40

50

、サンプル識別子またはアッセイプライマーに由来し得る。サンプル識別子およびアッセイ識別子が（グループ1およびグループ2由来の）2つの配列決定プールにおいて現れるパターンは、夾雜がサンプル識別子夾雜またはアッセイ識別子夾雜のいずれであるかを判定することとなる。本スキームにより、どちらが夾雜の源であるかを判定することができる。

【0051】

グループ2由来のサンプル識別子が、グループ1において観察されるならば（例えば、SBC66の配列が、グループ1についての配列決定情報において見出されるならば）、これは、グループ1内における一つのサンプルバーコードの夾雜を示す。というのも、予想される48個ではなく49個のサンプル識別子が存在するからである。しかしながら、この知識のみでは、グループ1内のどのサンプル識別子にSBC66が夾雜したかを示せない。どのアッセイ識別子が夾雜SBC66と関連するかに基づいて、夾雜した具体的なサンプルバーコードを判定する。第1のプール内に見出されたSBC66がQCB10と関連するならば、SBC10は、SBC66が夾雜したサンプル識別子である。グループ1内のいずれのサンプル識別子も、それと関連する、夾雜サンプル識別子と同じアッセイ識別子を有するならば、サンプル識別子は夾雜している。

10

【0052】

加えて、本方法、本組成物、および本キットはまた、複数のアッセイ識別子と関連するサンプル識別子を同定することによって、かつ／または複数のサンプル識別子と関連するアッセイ識別子を同定することによって、プール内の夾雜を検出することもできる。配列情報がSBC13およびQCB13を有するアンプリコン、ならびにSBC13およびQCB29を有するアンプリコンの存在を示す（すなわち、SBC13は、QCB13と、そしてQCB29と関連する）ならば、これは、何らかの夾雜が存在することを示す。しかしながら、この知識のみでは、SBC29にSBC13が夾雜したのか、QCB13にQCB29が夾雜したのかを示せない。同じアッセイ識別子の夾雜が第2のプール内に存在するか同定することによって、夾雜の源を同定することができる。第2のプールにおいて、SBC61は、夾雜の不在下で、QCB13とのみ関連することとなる。しかしながら、SBC61が、QCB29とも関連するならば、これは、QCB13が夾雜されたことを示す。なぜなら、夾雜が双方のプールにおいて生じたからである。SBC61がQCB29と関連しないならば、QCB13は夾雜されておらず、SBC29が、第1のプールにおける夾雜の源であった。また、同じアプローチが、グループ2のプール内に存在するグループ1サンプル識別子について機能する。本方法は、2つの配列決定プールを用いて、サンプル識別子の夾雜と、アッセイ識別子の夾雜との間に差異を認める能力を提供する。

20

【0053】

本方法および本組成物はまた、2つの定常領域間で見出されるランダムなヌクレオチドの配列変異を判定するのに用いることもできる。アッセイ識別子は、配列決定出力が、所望される夾雜のレベルを検出するのに十分であると仮定して、標準サンプルバーコードとして作用することができ、そしてサンプルの1つのみのプールが必要とされることとなる。例えば、このアッセイは、小さな可変領域が2つの定常領域間に存在する場合、配列内に生じる夾雜の低いレベル量を同定するのに用いることができ、そして意図されるあらゆる用途に用いられるオリゴヌクレオチド内の夾雜または変異を同定するのに有益であり得る。

30

【0054】

例示的な、または好ましい実施形態の上述の説明は、特許請求の範囲によって定義される本発明を限定するのではなく、具体的に説明するものととられるべきである。容易に理解されるように、先に記載した特徴の多数の変異および組合せを、特許請求の範囲に記載される本発明を逸脱しない範囲で利用することができる。そのような変形は、本発明の範囲からの逸脱とみなされず、そしてそのような変形は全て、以下の特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。本明細書中で引用される参考文献は全て、その全体が参

40

50

照によって組み込まれる。

【図面】

【図 1 A】

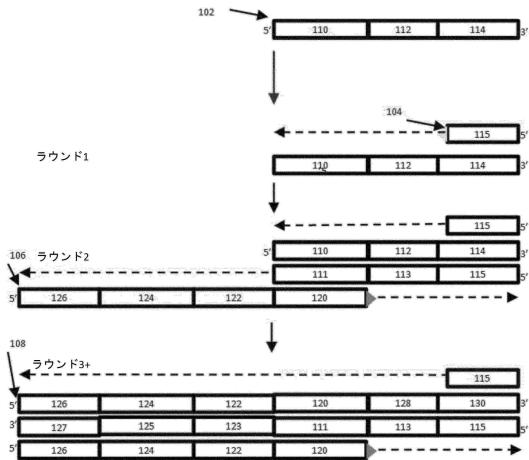
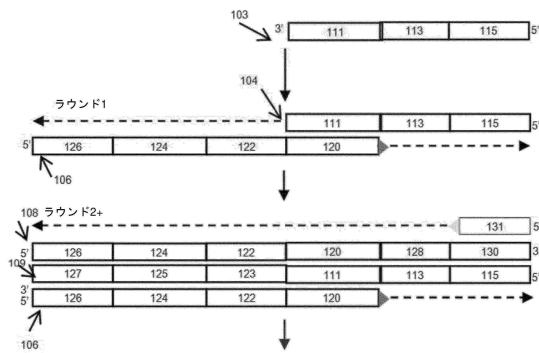


FIG. 1A

【図 1 B】



10

FIG. 1B

【図 1 C】

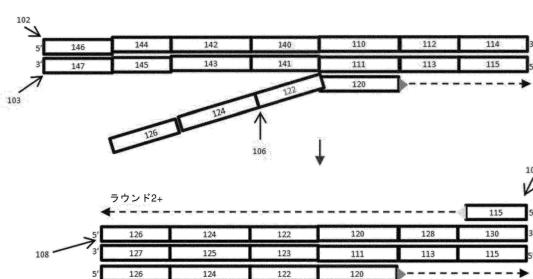
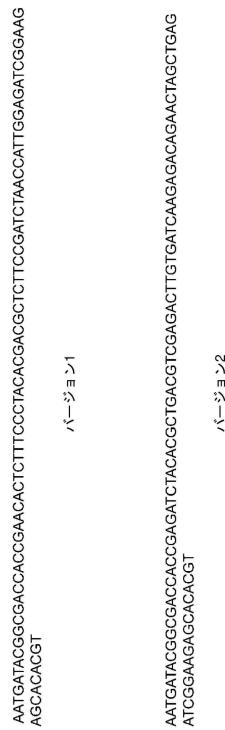


FIG. 1C

【図 2】



30

FIG. 2

40

50

【図3】

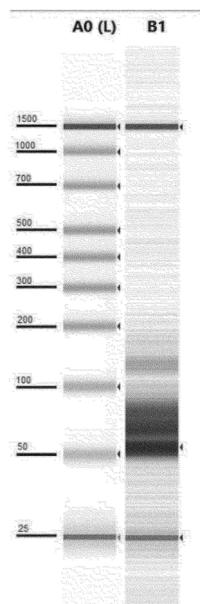


FIG. 3

【図4】

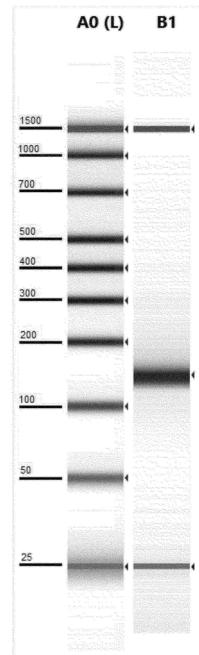


FIG. 4

【図5】

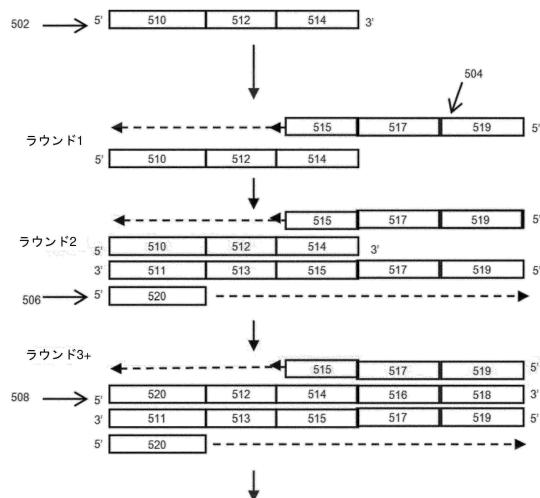


FIG. 5

【図6】

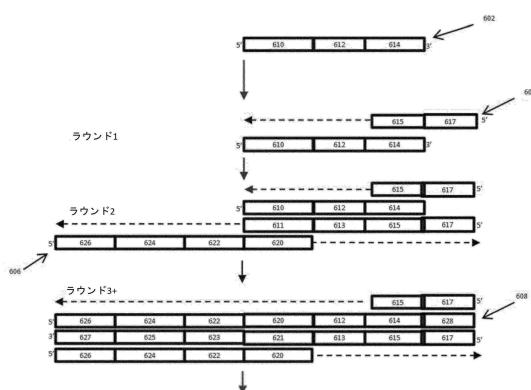


FIG. 6

10

20

30

40

50

【図 7】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SBC1	SBC9	SBC17	SBC25	SBC33	SBC41	SBC49	SBC57	SBC65	SBC73	SBC81	SBC89
	QCB8C1	QCB8C9	QCB8C17	QCB8C25	QCB8C33	QCB8C41	QCB8C49	QCB8C57	QCB8C65	QCB8C73	QCB8C81	QCB8C89
B	SBC2	SBC10	SBC18	SBC26	SBC34	SBC42	SBC50	SBC58	SBC66	SBC74	SBC82	SBC90
	QCB8C2	QCB8C10	QCB8C18	QCB8C26	QCB8C34	QCB8C42	QCB8C50	QCB8C58	QCB8C66	QCB8C74	QCB8C82	QCB8C90
C	SBC3	SBC11	SBC19	SBC27	SBC35	SBC43	SBC51	SBC59	SBC67	SBC75	SBC83	SBC91
	QCB8C3	QCB8C11	QCB8C19	QCB8C27	QCB8C35	QCB8C43	QCB8C51	QCB8C59	QCB8C67	QCB8C75	QCB8C83	QCB8C91
D	SBC4	SBC12	SBC20	SBC28	SBC36	SBC44	SBC52	SBC60	SBC68	SBC76	SBC84	SBC92
	QCB8C4	QCB8C12	QCB8C20	QCB8C28	QCB8C36	QCB8C44	QCB8C52	QCB8C60	QCB8C68	QCB8C76	QCB8C84	QCB8C92
E	SBC5	SBC13	SBC21	SBC29	SBC37	SBC45	SBC53	SBC61	SBC69	SBC77	SBC85	SBC93
	QCB8C5	QCB8C13	QCB8C21	QCB8C29	QCB8C37	QCB8C45	QCB8C53	QCB8C61	QCB8C69	QCB8C77	QCB8C85	QCB8C93
F	SBC6	SBC14	SBC22	SBC30	SBC38	SBC46	SBC54	SBC62	SBC70	SBC78	SBC86	SBC94
	QCB8C6	QCB8C14	QCB8C22	QCB8C30	QCB8C38	QCB8C46	QCB8C54	QCB8C62	QCB8C70	QCB8C78	QCB8C86	QCB8C94
G	SBC7	SBC15	SBC23	SBC31	SBC39	SBC47	SBC55	SBC63	SBC71	SBC79	SBC87	SBC95
	QCB8C7	QCB8C15	QCB8C23	QCB8C31	QCB8C39	QCB8C47	QCB8C55	QCB8C63	QCB8C71	QCB8C79	QCB8C87	QCB8C95
H	SBC8	SBC16	SBC24	SBC32	SBC40	SBC48	SBC56	SBC64	SBC72	SBC80	SBC88	SBC96
	QCB8C8	QCB8C16	QCB8C24	QCB8C32	QCB8C40	QCB8C48	QCB8C56	QCB8C64	QCB8C72	QCB8C80	QCB8C88	QCB8C96

FIG. 7

10

【配列表】

0007604530000001.xml

20

30

40

50

フロントページの続き

(72)発明者 ゾベック , ケイティ・リー
アメリカ合衆国カリフォルニア州 95051 - 7201 , サンタクララ , メイル・ストップ 1A
- P B , スティーブンス・クリーク・ブルバード 5301

(72)発明者 アンダーソン , ペイジ
アメリカ合衆国カリフォルニア州 95051 - 7201 , サンタクララ , メイル・ストップ 1A
- P B , スティーブンス・クリーク・ブルバード 5301

(72)発明者 チー , ジャヴェリン
アメリカ合衆国カリフォルニア州 95051 - 7201 , サンタクララ , メイル・ストップ 1A
- P B , スティーブンス・クリーク・ブルバード 5301

(72)発明者 ヨハンソン , ヘンリク
アメリカ合衆国カリフォルニア州 95051 - 7201 , サンタクララ , メイル・ストップ 1A
- P B , スティーブンス・クリーク・ブルバード 5301

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献 特表 2020 - 527033 (JP, A)
米国特許出願公開第 2014 / 0378349 (US, A1)
特表 2013 - 528058 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
C12Q 1 / 6869
C12N 15 / 09
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)
Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)