

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4480715号
(P4480715)

(45) 発行日 平成22年6月16日 (2010. 6. 16)

(24) 登録日 平成22年3月26日 (2010. 3. 26)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 32 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2006-503134 (P2006-503134)
 (86) (22) 出願日 平成16年1月28日 (2004. 1. 28)
 (65) 公表番号 特表2006-515522 (P2006-515522A)
 (43) 公表日 平成18年6月1日 (2006. 6. 1)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/002485
 (87) 国際公開番号 W02004/070005
 (87) 国際公開日 平成16年8月19日 (2004. 8. 19)
 審査請求日 平成17年12月5日 (2005. 12. 5)
 (31) 優先権主張番号 60/443, 471
 (32) 優先日 平成15年1月29日 (2003. 1. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/465, 071
 (32) 優先日 平成15年4月23日 (2003. 4. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 505286730
 4 5 4 コーポレーション
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ブラン
 フォード コマーシャル ストリート 2
 O
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 チェン イージュ
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー
 ヘブン テンプル ストリート 152
 アpartment 207

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重末端シーケンシング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、核酸分子の2つの末端をシーケンシングする方法：

(a) 2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーであって、1つ以外の全てのプライマーが可逆的にブロックされたプライマーを、核酸分子の1つまたは複数の一本鎖に対してハイブリダイズさせる工程、

ここで、少なくとも1つの該核酸分子の鎖または少なくとも1つの該プライマーが固体担体に付着されている；

(b) ブロックが取り除かれたプライマーからポリメラーゼ伸長によって核酸分子に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；

(c) 該ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的にブロックされたプライマーの1つを、ブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；および

(e) 可逆的にブロックされたプライマーの少なくとも1つが脱ブロックされて、少なくとも2つのシーケンシング・プライマーからポリメラーゼ伸長により組み込まれた塩基から核酸分子の配列をピロリン酸シーケンシング法により決定するために使用されるまで、工程 (b) ~ (d) を繰り返す工程。

【請求項 2】

さらなる伸長を防止する工程 (c) が、

(a) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完

了する工程；または、

(b) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、

(c) 化学的に伸長を終結する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項3】

工程(d)の前に、該ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、 PO_4 基、チオ基、およびホスホロチオール基からなる群より選択される化学的部分によってブロックされる、請求項1記載の方法。

10

【請求項5】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、エキソヌクレアーゼと該プライマーを接触させることによって脱ブロックすることができる3'ミスマッチ末端を有する、請求項1記載の方法。

【請求項6】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、ループを形成し、かつ核酸分子にハイブリダイズしない1つまたは複数の非相補的な塩基を有し、該1つまたは複数の塩基が、該可逆的にブロックされたプライマーの5'または3'末端以外であり、および該可逆的にブロックされたプライマーは、その3'末端にジデオキシヌクレオチドを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項7】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、該1つまたは複数の非相補的な塩基のエンドヌクレアーゼ消化によってブロックが取り除かれて、該1つまたは複数の非相補的な塩基にニックを形成する、請求項6記載の方法。

【請求項8】

工程(b)が、鎖置換ポリメラーゼによる該ニックでのポリメラーゼ伸長を含む、請求項7記載の方法。

【請求項9】

30

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、5'-NXX-3'の配列を有し、Nが、任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を表し、Uがウラシルであり、およびXがジデオキシ-ヌクレオチドである、請求項1記載の方法。

【請求項10】

可逆的にブロックされたプライマーが、ウラシルDNAグリコシラーゼおよびAPエンドヌクレアーゼによってブロックが取り除かれて、伸長可能な3'末端を有するブロックが除かれたプライマーを生じる、請求項9記載の方法。

【請求項11】

少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが、5'-NYZ-3'の配列を有し、Nが任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を表し、Yが修飾されたヌクレオチドであり、およびZが単一のヌクレオチド塩基を表し；かつ該修飾されたヌクレオチドが、ホルムアミドピリミジン(fapy)-DNAグリコシラーゼによって脱ブロックすることができる、請求項1記載の方法。

40

【請求項12】

修飾塩基が、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、fapy-グアニン、メチル-fapy-グアニン、fapy-アデニン、アフマトキシン B_1 -fapy-グアニン、5-ヒドロキシシトシン、および5-ヒドロキシ-ウラシルからなる群より選択される、請求項11記載の方法。

【請求項13】

核酸分子が、ゲノムDNA、cDNA、またはエピソームDNAである、請求項1記載の方法。

【請求項14】

50

少なくとも1つのシーケンシング・プライマーが、核酸のセンス鎖にハイブリダイズし、かつ少なくとも1つのシーケンシング・プライマーが、工程(a)の核酸分子のアンチセンス鎖にハイブリダイズする、請求項1記載の方法。

【請求項15】

ポリメラーゼ伸長が、1~250の塩基の間である、請求項1記載の方法。

【請求項16】

試験管、ピコタイタープレートの反応チャンバー、アレイの反応チャンバー、および油中水型エマルジョンのマイクロカプセル化された反応チャンバーからなる群より選択される反応容器で行われる、請求項1記載の方法。

【請求項17】

核酸分子が、100~1000の間の塩基対の長さである、請求項1記載の方法。

【請求項18】

少なくとも1つの該プライマーが、固体担体に固定されて固定されたプライマーを形成し、および該少なくとも1つの鎖が、該固定されたプライマーとのハイブリダイゼーションによって固体担体に結合される請求項1記載の方法。

【請求項19】

固体担体が、球面可動性の固体担体である、請求項18記載の方法。

【請求項20】

少なくとも1つのプライマーが検出可能なラベルを含む、請求項1記載の方法。

【請求項21】

脱ブロック工程が、可逆的にブロックされたプライマーを該可逆的にブロックされたプライマー上のPO₄基を除去するための薬剤と接触させることを含む、請求項1記載の方法。

【請求項22】

薬剤が、ポリヌクレオチドキナーゼおよびアルカリホスファターゼからなる群より選択される、請求項21記載の方法。

【請求項23】

該ポリメラーゼが、3'から5'エキソヌクレアーゼ活性を欠いている、請求項1記載の方法。

【請求項24】

核酸分子の第1の末端に近接する第1の核酸配列、および該核酸分子の第2の末端に近接する第2の核酸配列を決定する、請求項1記載の方法。

【請求項25】

以下の工程を含む、核酸分子の2つの末端をシーケンシングする方法であって、該核酸分子は、第1及び第2のシーケンシング・プライマーからポリメラーゼ伸長により組み込まれた塩基からピロリン酸シーケンシング法によりシーケンシングされる方法：

(a) 核酸分子の第1の鎖に対して第1のブロックが取り除かれたシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程；

(b) 核酸分子の第2の鎖に対して第2のブロックされたシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程

ここで、少なくとも1つの該核酸分子の鎖または少なくとも1つの該プライマーが固体担体に付着されている；

(c) 該第1のブロックが取り除かれたプライマーをポリメラーゼで伸長することによって該第1の鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；

(d) 該ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(e) 第2のシーケンシング・プライマーを脱ブロックする工程；および、

(f) 該第2のプライマーをポリメラーゼで伸長することによって該第2の鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程。

【請求項26】

さらなる伸長を防止する工程(d)が、

(a) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完

10

20

30

40

50

了する工程；または、

(b) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、

(c) 化学的に伸長を終結する工程、
を含む、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

防止工程の後に、該ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含む請求項26記載の方法。

【請求項 28】

第2のプライマーが、PO₄基、チオ基、およびホスホロチオール基からなる群より選択される化学的部分によってブロックされる、請求項25記載の方法。

【請求項 29】

核酸分子の第1の末端に近接する第1の核酸配列を少なくとも決定し、該核酸分子の第2の末端に近接する第2の核酸配列を決定する、請求項25記載の方法。

【請求項 30】

以下の工程を含む、複数の座位でのDNA試料の分子ハプロタイプをシーケンシングにより決定する方法：

(a) DNA試料中の複数の座位に隣接した2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせ、ここで1つ以外の全てのプライマーは、可逆的にブロックされたプライマーであり、かつそれぞれの座位は、ハプロタイプを決定する核酸配列を含む工程

ここで、該DNA試料または少なくとも1つの該プライマーが固体担体に付着されている；

(b) ブロックが取り除かれたプライマーからのポリメラーゼ伸長によって1つの座位のハプロタイプを決定する工程；

(c) 該ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；

(d) 可逆的にブロックされたプライマーの1つを、ブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；および

(e) 少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーが脱ブロックされて、少なくとも2つのシーケンシング・プライマーからポリメラーゼ伸長により組み込まれた塩基から分子ハプロタイプをピロリン酸シーケンシング法により決定するために使用されるまで、工程(b)～(d)を繰り返す工程。

【請求項 31】

さらなる伸長を防止する工程(c)が、

(a) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、

(b) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、

(c) 化学的に伸長を終結する工程、
を含む、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

防止工程の後に、該ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含む、請求項31記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、核酸のセンスおよびアンチセンス鎖をシーケンシングするための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

背景

本発明は、デオキシリボ核酸（DNA）の塩基シーケンシングのための方法に関する。より詳細には、本発明は、ブロックされたシーケンシング・プライマーおよびブロックが取り除かれたシーケンシング・プライマーの使用によりDNAのセンスおよびアンチセンス鎖をシーケンシングする方法に関する。

【0003】

ゲノムシーケンシングにより、疾病の診断、治療、および予防、並びにターゲットされたヒトゲノムの修飾の可能性が提供される。この可能性を使用するためには、迅速なシーケンシング法が必要とされる。デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）の塩基シーケンシングは、バイオテクノロジー、医薬品工業、食品産業、医学的な診断法、およびその他の分野の適用において最も重要な解析技術のうちの1つである。

【0004】

デオキシ終結および変性ゲル電気泳動を使用するサンガーシーケンシング法（Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5463-5467 (1977)）、化学的開裂および変性ゲル電気泳動を使用するマクサム-ギルバートシーケンシング法（Maxam, A.M. & Gilbert, W. Proc Natl Acad Sci USA 74, 560-564 (1977)）、DNAポリメラーゼ反応の間に放出されるピロリン酸（PPi）のピロ・シーケンシング検出（Ronaghi, M. et al., Science 281, 363, 365 (1998)）、並びにオリゴヌクレオチドを使用するハイブリダイゼーションによるシーケンシング（SBH）（Lysov, I. et al., Dokl Akad Nauk SSSR 303, 1508-1511 (1988)；Bains W. & Smith G. C.J. Theor Biol 135, 303-307 (1988)；Drnanc, R. et al., Genomics 4, 114-128 (1989)；Khrapko, K. R. et al., FEBS Lett 256, 118-122 (1989)；Pevzner P. A. J Biomol Struct Dyn 7, 63-73 (1989)；Southern, E. M. et al., Genomics 13, 1008-1017 (1992)）など、多くのDNAシーケンシング方法を利用できる。

【0005】

Ronaghi et al., (Anal. Biochem. 267, pp. 65-71 (1999)) は、核酸の両方の鎖をシーケンシングする方法に言及している。本方法は、ビオチン化されたプライマーおよびビオチン化されていないプライマーでの鋳型核酸のPCR増幅を含む。ビオチン化された鎖およびビオチン化されていない鎖を含む増幅産物は、別々の鎖である。著者は、鎖分離のためにストレプトアビジン被覆ビーズの使用に言及している。ビオチン化された鎖は、ビーズに付着したままであるが、ビオチン化されていない鎖は、変性条件下でビーズから分離される。2つの鎖（ビオチン化されたものおよびビオチン化されていないもの）は、別々にシーケンスされる。両方の鎖に対して固相シーケンシング法を使用する本発明とは異なり、この方法は、ビオチン化された鎖に対して固相シーケンシング法を使用し、ビオチン化されていない鎖に対して液相シーケンシング法を使用する。それゆえに、Ronaghiの方法は、シーケンシングの前に鋳型の鎖の分離（たとえば、尿素ゲルを使用する）を含む従来のDNAシーケンシングの方法と同じである。従って、Ronaghiの方法は、従来の方法と同様の不利点を被り；シーケンシングの前に鎖分離および個体の鎖の単離の労働集約的な工程が必要である。Ronaghiの方法の不利点は、同時に行われるシーケンシング反応の数が増大するにつれて幾何級数的に増大する。たとえば、1000の二重鎖鋳型の同時に行われるシーケンシングでは、1000回の分離および2000回の単鎖の単離が必要である。さらに、Ronaghiの方法は、鎖分離に基づく全ての方法と同様に、二本鎖鋳型につき2つのプライマー（それぞれの鎖について1つ）による配列の決定に限られている。

【0006】

化学的開裂に基づいたシーケンシングは、自動化が困難であることが証明された。その他のシーケンシング法は、あらゆるシーケンシングの試みでハイブリダイゼーション工程を行う必要があるために労働集約的である。多くの状況において、ハイブリダイゼーション工程が、シーケンシング反応の律速段階である。

【0007】

たとえば、2つの明確にラベルされたシーケンシング・プライマー（たとえば、Li-Cor

of Lincoln, Nebraska) を使用して、サンガーシーケンシング反応 (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5463-5467 (1977)) で核酸の2つの末端からシーケンシングを行うことが試みられた。これらの方法は、手動のシーケンシングのバリエーションであり、配列を決定するためにサイズ分画 (たとえば、ゲル) 工程を必要とする。サイズ分画は、小さな試料サイズに適しているのであろうが、サイズ分画技術を使用するゲノムのシーケンシングでは (楽観的にゲルあたり2000bpの能力と考えて)、1,500,000のサイズ分画ゲルが必要である。これらの理由のために、サイズ分画を含むシーケンシング法は、ヒトゲノムのシーケンシングに適応されなかった。

【発明の開示】

【0008】

10

発明の概要

本発明は、単一のプライマーハイブリダイゼーション工程で複数のプライマーから核酸をシーケンシングする方法を提供する。この方法では、2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーを、シーケンスする鋳型DNAにハイブリダイズさせる。鋳型DNAは、一本鎖または変性させた二本鎖であってもよい。次いで、1つを除いて全てのシーケンシング・プライマーをブロックする。ブロックが取り除かれたプライマーを伸長することによって、シーケンシング (たとえば、ピロリン酸シーケンシング) を再び行う。伸長は (必要に応じて、さらなるポリメラーゼおよびdNTPによって)、完了まで行うか、または (ポリメラーゼ、ddNTP、および任意でdNTPによって) 終結させ; いずれの状況においても、ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する。鎖の完了および/または終結試薬を除去する。次いで、ブロックされたプライマーのうちの1つからブロックを取り除き、新たにブロックが取り除かれたプライマーを伸長することによってシーケンシングを行う。全てのシーケンシング・プライマーが脱ブロックされて、シーケンスされるまで、この過程を続ける。好ましい態様において、二重鎖核酸の両方の末端をシーケンスするために、2つのプライマー (ブロックされたものおよびブロックが取り除かれたもの) が使用される。

20

【0009】

発明の詳細な説明

伝統的に、二重鎖のDNA分子の2つの末端のシーケンシングは、少なくともプライマーのハイブリダイゼーション、一端のシーケンシング、第2のプライマーのハイブリダイゼーション、および他端のシーケンシングが必要であると考えられてきた。本変法は、二重鎖核酸の個々の鎖を分離し、それぞれの鎖を個々にシーケンスする。本発明は、最初の2つの方法よりも迅速かつ労働集約的でない第3の変法例を提供する。

30

【0010】

本発明は、複数のプライマーから逐次核酸をシーケンシングする方法を提供する。本出願のDNAシーケンシングに対する参照は、ヌクレオチド三リン酸エステル (NTP) がシーケンシング・プライマーの成長鎖に組み入れられるように配列が決定される、ポリメラーゼを使用するシーケンシングに向けられる。この種のシーケンシングの1つの例は、ピロシーケンシング検出ピロリン酸法である (たとえば、U.S. Patent 6,274,320、6,258,568、および6,210,891を参照されたい。これらのそれぞれは、参照として本明細書に全体が組み入れられる)。

40

【0011】

一つの態様において、本発明は、鋳型の二重鎖核酸の2つの末端をシーケンシングするための方法を提供する。二本鎖DNAは、本明細書において第1の一本鎖のDNAおよび第2の一本鎖のDNAと称される2つの一本鎖のDNAで構成される。第1のプライマーは、第1の一本鎖DNAにハイブリダイズし、第2のプライマーは、第2の一本鎖DNAにハイブリダイズする。第1のプライマーは、ブロックが取り除かれているが、第2のプライマーは、ブロックされている。

【0012】

「ブロックされた」または「ブロックされたプライマー」という用語は、本開示におい

50

て、ポリメラーゼによる伸長ができないようにした任意のプライマーを定義する。妨害物は、DNAポリメラーゼによる重合ができないようにプライマーを妨げる化学的ブロック基であってもよい。さらに、化学基ブロックは、戻した後にオリゴヌクレオチドをシーケンシング・プライマーとしてもう一度利用することができるように、可逆性であるべきである。従って、妨害物は、ブロックと同じ意味であり、ブロックされたは、保護されたと同じ意味であり、脱ブロックされたは、脱ブロックと同じ意味である。

【0013】

「保護」、「保護された」、「妨害物」、および「ブロック」は、本開示において、プライマーの反応部位に対して、DNAポリメラーゼによる重合ができないようにプライマーを妨げる化学基を付加することであると定義される。さらに、このような化学的保護基の付加は、戻した後にすぐに脱保護されたプライマーをシーケンシング・プライマーとしてもう一度利用することができるように、可逆性であるべきである。核酸配列は、ピロリン酸シーケンシングなどの従来法を使用したDNAポリメラーゼで第1のプライマーを伸長することによって一方向に（たとえば、鋳型の一端から）決定される。次いで、第2のプライマーを脱保護し、他方の方向に第2のプライマーを伸長することによって、DNAポリメラーゼ、およびピロリン酸シーケンシングなどの従来法を使用して配列が（たとえば、鋳型の他方の末端から）決定される。第1および第2のプライマーの配列は、二本鎖DNAの2つの末端に、またはこの方法の鋳型に沿ったいずれかの位置にハイブリダイズするように特異的に設計される。

【0014】

上記の定義に加えて、保護および妨害物は、プライマーの外部であってもよい。たとえば、プライマーが、ブロックが取り除かれたプライマーとは化学的に異ならない場合であっても、抗体またはその他のタンパク質（たとえば、配列特異的なDNA結合タンパク質）を下流の部位に結合して、ブロックされたプライマーを作製してもよい。たとえば、妨害物および保護は、核酸プライマーの下流に結合して伸長を防止するDNA結合タンパクによって媒介されてもよい。この場合、プライマーは、ブロックされているか、または保護されていると考えられる。さらに、DNA結合タンパク質が除去できる場合、プライマーは、可逆的にブロックされているか、または可逆的に保護されていると考えられる。DNA結合タンパク質は、合成もしくは天然のDNA結合タンパク質またはこれらのいずれかの機能的相当物である。

【0015】

もう一つの態様において、本発明は、複数のプライマーから核酸をシーケンシングする方法を提供する。この方法では、多くのシーケンシング・プライマーをシーケンスされる鋳型核酸にハイブリダイズさせる。全てのシーケンシング・プライマーは、1つを除いて可逆的にブロックされている。ブロックされたプライマーは、DNAシーケンシング反応に共通して使用されるポリメラーゼおよびdNTPによって伸長することができないオリゴヌクレオチドプライマーである。可逆的にブロックされたプライマーは、脱ブロックすることができるブロックされたプライマーである。本発明において言及した全てのブロックされたプライマーは、可逆的にブロックされる。脱ブロックの後、可逆的にブロックされたプライマーは、正常なシーケンシング・プライマーとして機能し、正常なシーケンシング反応に参与することができる。

【0016】

本発明は、複数のプライマーから逐次核酸をシーケンシングする方法を提供する。本方法は、次の工程を含む：第1に、シーケンスされる1つまたは複数の鋳型核酸が提供される。第2に、複数のシーケンシング・プライマーが鋳型核酸にハイブリダイズされる。シーケンシング・プライマーの数は、数 n によって表すことができ、 n は、1を超える任意の正の数であることができる。その数は、たとえば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上であってもよい。プライマーの中で、 $n-1$ 数がブロック基によってブロックされてもよい。そして、たとえば、 n が2、3、4、5、6、7、8、9、または10である場合、 $n-1$ は、それぞれ1、2、3、4、5、6、7、8、および9である。残りのプライマー（たとえば、 n 数の

プライマー - (n-1) 数のブロックされたプライマー=1つの残りのプライマー) は、ブロックが取り除かれている。第3に、ブロックが取り除かれたプライマーを伸長し、たとえば、ピロリン酸シーケンシングなどの従来法によって鋳型DNA配列を決定する。第4に、第1のプライマーのシーケンシング後に、残りのブロックされたプライマーのうちの1つからブロックを取り除く。第5に、ブロックが取り除かれたプライマーを伸長し、たとえば、ピロリン酸シーケンシングなどの従来法によって鋳型DNA配列を決定する。任意に、全てのブロックされたプライマーでシーケンシングが行われるまで、本方法を繰り返してもよい。

【0017】

もう一つの側面において、本発明は、以下の方法を含む核酸を逐次シーケンシングする方法を包含する：(a) 2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーであって、1つ以外の全てのプライマーが可逆的にブロックされたプライマーを、核酸にハイブリダイズさせる工程；(b) ブロックが取り除かれたプライマーからのポリメラーゼ伸長によって核酸の一方の鎖の配列を決定する工程；(c) 可逆的にブロックされたプライマーの一方をブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；(d) 全ての可逆的にブロックされたプライマーが脱ブロックされて配列を決定するために使用されるまで、工程(b)と(c)を繰り返す工程。一つの態様において、本方法は、工程(b)と(c)の間に1つのさらなる工程、すなわち、ブロックが取り除かれたプライマーをDNAポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸エステルまたはジデオキシヌクレオチド三リン酸の1つもしくは複数と接触させることによってブロックが取り除かれたプライマーの伸長を終結させる工程を含む。さらにもう一つの態様において、本方法は、工程(b)と(c)の間にさらなる工程、すなわち、ブロックが取り除かれたプライマーをDNAポリメラーゼおよびddATP、ddTTP、ddCTP、ddGTP、またはこれらの組み合わせに由来するジデオキシヌクレオチド三リン酸と接触させることによってブロックが取り除かれたプライマーの伸長を終結させることを含む。

【0018】

もう一つの側面において、本発明は、以下の工程を含む核酸をシーケンシングする方法を包含する：(a) 核酸の第1の鎖に対して第1のブロックが取り除かれたプライマーをハイブリダイズさせる工程；(b) 第2の鎖に対して第2のブロックされたプライマーをハイブリダイズさせる工程；(c) 第1のブロックが取り除かれたプライマーが第1の鎖に沿って伸長されるように、ポリメラーゼに対して第1および第2の鎖を曝露する工程；(d) 第1のシーケンシング・プライマーのさらなる伸長を防止する工程(また、第1のシーケンシング・プライマーの伸長を完了させることともいう)；(e) 第2のシーケンシング・プライマーを脱ブロックする工程；および、(f) 第2のシーケンシング・プライマーが第2の鎖に沿って伸長されるように、ポリメラーゼに対して第1および第2の鎖を曝露する工程。さらなる伸長を防止すること(すなわち、伸長を完了すること)は、プライマーを排出するか、またはキャップすること(たとえば、ddNTPで、または化学的手段によって)を可能にすることを含む何らかの適切な手段によって達成してもよい。好ましい態様において、さらなる伸長を防止すること、または完了することは、キャップすること、または伸長を終結することを含む。

【0019】

もう一つの態様において、本発明は、第1および第2の一本鎖DNAを含む鋳型二重鎖核酸の2つの末端をシーケンシングする方法を提供する。この態様では、第1のプライマーが第1の一本鎖のDNAにハイブリダイズされ、第2のプライマーが同じ工程で第2の一本鎖のDNAにハイブリダイズされる。第1のプライマーは、ブロックが取り除かれたが、第2のプライマーは、ブロックされている。

【0020】

ハイブリダイゼーションに続き、ピロリン酸シーケンシングなどの従来法を使用してDNAポリメラーゼで第1のプライマーを伸長することによって、核酸配列が一方向に決定される(たとえば、鋳型の一端から)。好ましい態様において、ポリメラーゼは、3'から5'の

10

20

30

40

50

エキソヌクレアーゼ活性を欠いている。次いで、第2のプライマーを脱ブロックして、その配列は、ピロリン酸シーケンシングなどの従来法を使用してDNAポリメラーゼで、他方の方向に第2のプライマーを伸長することによって（たとえば、鋳型の他方の末端から）決定される。以前に記載されているように、第1のプライマーおよび第2のプライマーの配列は、二本鎖DNAの2つの末端に、または鋳型に沿った任意の位置でハイブリダイズするようにデザインされる。この技術は、特にその2つの末端に独自のシーケンシング・プライマーのハイブリダイゼーション部位を含む多くの鋳型DNAのシーケンシングのために有用である。たとえば、多くのクローニングベクターは、任意のクローン化された配列のその後のシーケンシングを容易にするために、インサート部位に隣接して独自のシーケンシング・プライマーのハイブリダイゼーション部位を提供する（たとえば、Bluescript, Stratagene, La Jolla, CA）。

10

【0021】

本発明のこの方法の1つの利点は、両プライマーを一段階でハイブリダイズさせてもよいことである。本方法およびその他の方法の利点は、特にハイブリダイゼーションが通常よりも多く含まれる同時に行われるシーケンシング系に有用である。同時に行われるシーケンシング系の例は、同時係属中のU.S. patent application serial number 10/104,280に開示されており、その開示は、本明細書に全体が組み入れられる。

【0022】

本発明のオリゴヌクレオチドプライマーは、従来技術によって、たとえば商業的なオリゴヌクレオチド合成機で、および/またはこうして合成された細断片を共に結合することによって合成されてもよい。

20

【0023】

本発明のもう一つの態様において、二重鎖の標的核酸の長さを決定してもよい。二重鎖の核酸の長さを決定する方法は、当該技術分野において既知である。長さの決定は、核酸のシーケンスの前に、又は後に行ってもよい。核酸分子の長さの決定の既知の方法には、ゲル電気泳動、パルスフィールドゲル電気泳動、質量分析などを含む。平滑末端の二重鎖核酸は、同じ長さの2つの一本鎖で構成されているので、対応する二本鎖の長さを決定するためには、核酸の一方の鎖の長さを決定するだけで十分である。

【0024】

また、本発明に従ったシーケンス反応により、鋳型核酸の長さを測定することができる。第1に、核酸の一端からもう一つの末端へのシーケンスを完了することにより、長さを決定することができる。第2に、2つの末端のシーケンスの決定では、中央で重複し、2つの配列を連結することができるであろう。完全にシーケンスすることにより決定して、長さを明らかにしてもよい。たとえば、鋳型が100bpの長さである場合、一端からのシーケンシングにより塩基1~75を決定してもよく、他端からのシーケンシングにより塩基25~100を決定してもよい；このように、塩基25~塩基75まで中央の51塩基に重なりがあり、この情報から、1~100の完全配列を決定してもよく、100塩基の長さを完全配列によって明らかにしてもよい。

30

【0025】

本発明のもう一つの方法は、次の工程を含む方法に向けられる。第1に、複数のシーケンシング・プライマーであって、それぞれの異なる配列を有するプライマーをシーケンスされるDNAにハイブリダイズさせる。たとえば、シーケンシング・プライマーの数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上などの、1を超えるいずれの値であってもよい。これらのプライマーの全てを、1つを除いて可逆的にブロックする。ブロックが取り除かれた1つのプライマーをシーケンシング反応で伸長させて、配列を決定する。通常、プライマーが完全に伸長されると、これは伸長することができず、別のプライマーに由来するその後のシーケンシングには影響を及ぼさない。必要に応じて、シーケンスされるプライマーは、過剰なポリメラーゼおよびdNTPを使用するか、またはddNTPを使用して終結させてもよい。終結工程がなされる場合、本工程の後に終結試薬（dNTPおよびddNTP）を除去すべきである。次いで、可逆的にブロックされたプライマーのうちの1つのブロック

40

50

を取り除いて、第2のプライマーからのシーケンシングを進行する。プライマーを脱ブロックし、脱ブロックされたプライマーからシーケンシングし、および任意に、プライマーからのシーケンシングを終結する工程は、全てのブロックされたプライマーのブロックが取り除かれて、シーケンシングに使用されるまで繰り返される。

【0026】

可逆的にブロックされたプライマーは、異なる化学基によってブロックされるべきである。脱ブロックの適切な方法を選択することによって、一方のプライマーはその他のプライマーのブロッキング基に影響を及ぼすことなく脱ブロックされるであろう。好ましい態様において、ブロック基は、 PO_4 である。すなわち、第2のプライマーは、 PO_4 によってブロックされており、脱ブロックは、T4ポリヌクレオチドキナーゼ（その3'-ホスファターゼ活性を利用する）か、または子牛腸アルカリホスファターゼ（CIAP）もしくは任意の適切なホスファターゼによって達成される。もう一つの好ましい態様において、ブロッキングは、チオ基またはホスホロチオール基である。

【0027】

鋳型核酸は、DNA、RNA、または、ペプチド核酸（PNA）であってもよい。DNAは、好ましい鋳型であるが、ランダムプライムPCR（random primed PCR）、逆転写、RT-PCR、またはこれらの技術の組み合わせなどの既知の技術によって、RNAおよびPNAをDNAに変換してもよい。さらに、本発明の方法は、未知および既知の配列の核酸のシーケンシングのために有用である。既知の配列の核酸のシーケンシングは、たとえば合成されたDNAの配列を確認するために、または既知の核酸配列を有する病原体であることが疑われるものの同一性を確認するために有用である。核酸は、核酸の複数の集団の混合物であってもよい。十分な特異性を有する（たとえば、20塩基、25塩基、30塩基、35塩基、40塩基、45塩基、または50塩基）シーケンシング・プライマーは、長い核酸または無関係な核酸の集団の配列のサブセットをシーケンスするために使用されることが既知である。従って、たとえば、鋳型は、10Kbの一配列またはそれぞれ1Kbの10個の配列であってもよい。好ましい態様において、鋳型DNAは、長さが50bp～700bpの間である。DNAは、一本鎖または二重鎖であることもできる。

【0028】

鋳型核酸が一本鎖である場合、多くのプライマーは、以下に示すように鋳型核酸にハイブリダイズされるであろう：

5'-プライマー-4-3' 5'-プライマー-3-3' 5'-プライマー-2-3' 5'-プライマー-1-3'
3'-----鋳型核酸-----5'

【0029】

この場合、最初にブロックが取り除かれたプライマーは、鋳型の最も5'末端にハイブリダイズするプライマーであることが好ましい。上記の具体例のプライマー1を参照されたい。この向きでは、プライマー1の伸長は、プライマー2、3、または4を（鎖置換によって）置換しない。プライマー1からのシーケンシングが終わると、プライマー2のブロックを取り除くことができ、核酸シーケンシングを開始することができる。プライマー2からのシーケンシングは、プライマー1またはプライマー1の伸長バージョンと置き換えてもよいが、残りのブロックされたプライマー（プライマー3および4）に対しては何の効果も有さないであろう。この順を用いて、それぞれのプライマーを逐次使用してもよく、1つのプライマーからのシーケンシング反応は、その後のプライマーからのシーケンシングに影響を及ぼさないであろう。

【0030】

本発明の1つの特徴は、1つまたは複数の核酸に対して複数のシーケンシング・プライマーを使用する能力および1回のハイブリダイゼーション工程だけを使用して複数のプライマーからシーケンスする能力である。ハイブリダイゼーション工程では、全てのシーケンシング・プライマー（たとえば、n数のシーケンシング・プライマー）を同時に鋳型核酸に対してハイブリダイズさせてもよい。従来のシーケンシングでは、通常、1つのプライマーからシーケンシングするために1つのハイブリダイゼーション工程が必要とされる。

本発明の1つの特徴は、 n 個のプライマー（上で定義した通り）からのシーケンシングを単一のハイブリダイゼーション工程によって行ってもよいことである。これにより、効率的に $n-1$ 回のハイブリダイゼーション工程が省略される。

【0031】

好ましい態様において、 n 数のプライマーの配列は、十分に異なっており、プライマーは、クロスハイブリダイズまたは自己ハイブリダイズしない。クロスハイブリダイゼーションとは、配列相補性のために、1つのプライマーが別のプライマーにハイブリダイゼーションすることをいう。クロスハイブリダイゼーションの1つの形態は、一般に「プライマーダイマー」ともよばれる。プライマーダイマーの場合、2つのプライマーの3'末端が相補であり、伸長したときに、2つのプライマーの長さをほぼ合わせた構造を形成する。自己ハイブリダイゼーションは、プライマーの5'末端がプライマーの3'末端に対して相補である状態をいう。その場合、プライマーは自己ハイブリダイズして、ヘアピン様の構造を形成する傾向を有する。

10

【0032】

プライマーは、鋳型分子と特異的に相互作用するか、または結合させることができる。「相互作用する」または「結合する」という用語は、本明細書において、2つの物質または化合物（たとえば、プライマーと鋳型；化学的部分とヌクレオチド）が、意図したアッセイ法を行うことができるほど十分に互いに結合すること（たとえば、付着し、結合し、ハイブリダイズし、接合し、アニールし、共有結合で結合し、または別の方法で結合すること）を意味する。「特異的な」または「特異的に」の用語は、本明細書において、2つの成分が選択的に互いに結合することを意味する。特異的な相互作用を達成するために必要とされるパラメーターは、通常、たとえば当該技術分野の従来法を使用して決定することができる。

20

【0033】

より優れた感受性を得るため、または複合混合物の解析を補助するために、ブロックされたプライマーを明確な独自のシグナルを与えるようにデザインされた化学的部分で修飾（たとえば、誘導体化）することができる。たとえば、それぞれのブロックされたプライマーは、鎖のハイブリダイズする部分に沿った1つまたは複数の位置でオリゴヌクレオチド鎖にアミド結合で結合した種々の天然もしくは合成のアミノ酸によって誘導体化することができる。化学修飾は、もちろん標的核酸から切断した後か、または標的核酸に結合したままかのいずれでも検出することができる。それぞれのブロックされた標的核酸を識別可能な方法で同定することができることにより、一回のアッセイで、多数の異なる標的核酸をアッセイすること（たとえば、スクリーニングすること）ができる。多くのこのようなアッセイ法は、迅速かつ容易に行うことができる。従って、このようなアッセイ法またはアッセイ法のセットは、本明細書で定義されるようにハイスループットの効率で行うことができる。

30

【0034】

本発明の方法は、第1のプライマーを伸長させて、鋳型DNAの配列を決定した後に、第2のプライマーを脱ブロックしてシーケンスする。第1のプライマーは、完全に伸長され、または終結されているので、第1のプライマーのシーケンシング反応と直ちにブロックが取り除かれた第2のプライマーのシーケンシング反応との間に干渉はない。第1のプライマーは完全に伸長されるので、ピロリン酸シーケンシングなどの従来法を使用する第2のプライマーからのシーケンシングは、伸長された第1のプライマーの存在下でも影響を受けないであろう。また、本発明は、第1のプライマーからの何らかの生じ得るシグナル混入を減少させる方法を提供する。シグナル混入は、第1のプライマーが完全に伸長されない頻度のことをいう。その場合、第1のプライマーは、その後のプライマーが脱ブロックされて伸長されるときにも伸長し続ける。第1および第2のプライマーの両方の伸長は、DNA配列の決定に干渉するかもしれない。

40

【0035】

好ましい態様において、1つのプライマーからのシーケンシング反応（たとえば、鎖伸

50

長反応)は、第2のプライマーでシーケンシング反応が始まる前に最初に終結されるか、または完了される。DNAの鎖伸長反応は、鋳型DNAをDNAポリメラーゼ、並びにddATP、ddTTP、ddGTP、およびddCTPなどのジデオキシヌクレオチド三リン酸(ddNTP)と接触させて終結することができる。終結に続き、ddNTPのない溶液で反応液を洗浄して、ジデオキシヌクレオチド三リン酸を除去してもよい。プライマーのさらなる伸長を防止する第2の方法は、ヌクレオチド三リン酸(dATP、dTTP、dGTP、およびdCTPなどのdNTP)およびDNAポリメラーゼを反応液に添加して、完全に伸長されていないいずれのプライマーも完全に伸長させる。完全な伸長に続き、次のプライマーを脱ブロックする前に、dNTPおよびポリメラーゼを除去する。もう一つのプライマーを脱ブロックする前に、一方のプライマーを完了または終結させることにより、シーケンシング反応(たとえば、ピロリン酸シーケンシング)のシグナル対ノイズ比を改善することができる。第3の方法は、>25塩基の二本鎖領域を認識して、単鎖領域の伸長されていない部分で切断することができる酵素、タンパク質、またはその他の薬剤を含んでもよい。

【0036】

(a)任意にシーケンシングを終結するか、または完了する工程、(b)新たなプライマーを脱ブロックする工程、および(c)脱ブロックしたプライマーからシーケンシングする工程を、それぞれのプライマーの伸長によって配列が決定されるまで繰り返してもよい。この方法では、ハイブリダイゼーション工程に、「n」個の数のプライマーおよび1つのブロックが取り除かれたプライマーを含む。ブロックが取り除かれたプライマーを最初にシーケンスして、上記(a)、(b)、および(c)の工程を繰り返してもよい。

【0037】

好ましい態様において、本発明の方法に従って行われる全てのシーケンシングのために、ピロリン酸シーケンシングが使用される。

【0038】

もう一つの好ましい態様において、図1に概説した方法に従って、二重末端シーケンシングが行われる。この過程は、6つの工程に分割されるであろう：(1)捕獲ビーズの作製(図1AおよびB)；(2)エマルジョンPCR増幅(図1C)；(3)ブロックされたプライマーおよびブロックが取り除かれたプライマーのハイブリダイゼーション(図1D)；(4)ブロックが取り除かれたプライマーの伸長による最初の鎖のシーケンシング(たとえば、ピロリン酸シーケンシング)(図1E)；(4A)任意の第1の鎖からのシーケンシングの終結/完了(図1E)後に続く終結/完了試薬の除去(図1F)；(5)事前にブロックされたプライマーを脱ブロックすることによる第2の鎖の調製(図3H)；(6)ポリメラーゼ(図3I)の添加による第2の鎖のシーケンシングおよびブロックが取り除かれたプライマーの伸長によるシーケンシング(図1J)。両方の鎖のシーケンシングによって収集されるデータを図2に示してある。図3の配列データを得るために、このデータをさらに解析する。

【0039】

工程1では、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)で活性化した捕獲ビーズ(たとえば、Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)(図1A、図4)を5'-アミンラベルされた基を介して2つの異なるプライマーに結合させる。2つのプライマーは、増幅される鋳型のセンス(フォワード捕獲プライマー)鎖およびアンチセンス(リバース捕獲プライマー)鎖の5'末端に対応する(図1B)。これにより、5'-3'配向の両方の捕獲プライマーを有するビーズを生じさせる。これらのプライマーは、40merであり、塩基PCRプライマーが20塩基のシーケンシング・プライマーに連結された2つの20塩基部分から成る。20merのPCRプライマーは、PCR増幅のために利用され、20merのシーケンシング・プライマーはDNA捕獲プライマーから伸長されるDNA分子からの配列情報を引き出すために利用される。NHSカップリングは、一級アミノ基を含むリガンドと化学的に安定なアミド結合を形成する。加えて、アミンのラベルされたピオチンを使用してピオチンを捕獲ビーズに同様に結合させてもよい。ピオチン基は、さらなるシーケンシング試薬(たとえば、ピロリン酸シーケンシング試薬)をビーズに結合させるために有用な機構を提供する。本明細書に使用されるビーズ(すなわち、固体核酸捕獲支持体)は、任意の便利なサイズであってもよく、多くの既知の

材料で製作されていてもよい。このような材料の例は、以下を含む：無機物、天然の重合体、および合成の重合体。

【0040】

これらの材料の具体例は、以下を含む：セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス；シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルおよびアクリルアミドの共重合体、ジビニルベンゼン等で架橋されたポリスチレンなど（Merri field Biochemistry 1964, 3, 1385-1390を参照されたい）、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレン、デキストラン、ゴム、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然スポンジ、シリカゲル、ガラス、金属プラスチック、セルロース、架橋されたデキストラン（たとえば、セファデックス（商標））およびアガロースゲル（セファロース（商標））、並びに当業者に既知の固相担体。好ましい態様において、捕獲ビーズは、直径約25 μ M ~ 30 μ Mのセファロースビーズである。

10

【0041】

核酸鑄型は、当該技術分野において既知のいずれの方法で捕獲ビーズに付着させてもよい。顕微鏡ビーズにDNAを付着するために、多数の方法が当該技術分野に存在する。ビーズに対するDNAの共有結合性の化学的付着は、水溶性カルボジイミドなどの標準的なカップリング剤を使用して、DNAの5'-ホスフェートを、ホスホアミダート結合を介してアミン被覆した微粒子に結合させることによって達成することができる。もう一つの変法例は、まず特異的なオリゴヌクレオチドリンカーを同様の化学を使用してビーズに結合させ、次いでDNAリガーゼを使用してDNAをビーズ上のリンカーに結合させる。その他の結合化学は、ビーズにオリゴヌクレオチドを結合するためのN-ヒドロキシスクシンアミド（NHS）およびその誘導体の使用を含む。このような方法では、オリゴヌクレオチドの一端は、固体担体と共有結合を形成する反応基（アミド基など）を含んでもよいが、リンカーの他端は、オリゴヌクレオチドと結合して固定することができるもう一つの反応基を含む。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、共有結合でDNA捕獲ビーズに結合される。しかし、オリゴヌクレオチドをビーズに結合させるために、キレート化または抗原-抗体複合体などの非共有結合性の結合を使用してもよい。

20

【0042】

制限酵素部位に由来する重複末端またはバクテリオファージのラムダに基づいたクローニングベクターの「粘着末端」などのDNA断片の末端の独自配列に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドリンカーを使用することができるが、平滑末端ライゲーションも、有利に使用することができる。これらの方法は、US 5,674,743に詳述されており、その開示は本明細書に全体が組み入れられる。ビーズを固定するために使用されるいずれの方法も、本発明の方法の工程の全体にわたって固定されたオリゴヌクレオチドに結合し続けることが好ましい。好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、共有結合によってDNA捕獲ビーズに結合される。しかし、オリゴヌクレオチドをビーズに結合させるために、キレート化または抗原抗体複合体などの非共有結合を使用してもよい。

30

【0043】

工程2では、アダプターとしてのフォワードおよびリバースプライマーを有する鑄型DNAを添加して、DNAをPCR増幅ストラテジーで増幅させる（図1C）。一つの態様において、鑄型DNAは、5'および3'末端の両方に結合したDNAアダプターを有する。アダプターは、PCR増幅およびシーケンシングのための配列を1ユニットとして直列に含む40merのものである。2つの異なるアダプターは、試料調製プロセスの一部としてDNA鑄型の末端に連結される。一つの態様において、DNAは、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応、ビーズに対してドライブするポリメラーゼ連鎖反応法（Drive to Bead Polymerase Chain Reaction）、ローリングサークル増幅（Rolling Circle Amplification）、またはループ媒介等温増幅（Loop-mediated Isothermal Amplification）によって増幅される。好ましい態様において、アダプターを有する鑄型DNAは、DNA分子の1つの鎖がDNA捕獲ビーズのプライマーのうちの1つとハイブリダイズするように添加される（5'-3'配向で何百万ものフォワードおよびリバース捕獲プライマーを含む）。次いで、DNA捕獲ビーズをフォワードおよびリバース

40

50

プライマーを含むPCR反応混合物に再懸濁し、乳状にして、増幅する。また、増幅反応は、2つの工程から成る：a) 単一分子からのDNA鋳型の増幅を補助する溶液相PCR増幅プライマー、b) 増幅されたDNA分子をビーズに捕獲するためのビーズに対するドライブ工程。全ての状況において、捕獲された鎖は、捕獲プライマーの伸長のための鋳型として役立つ。捕獲プライマーは、共有結合的にビーズに付着されているので、捕獲プライマーから伸長された鎖も、共有結合的にビーズに付着される。この方法の重要な側面は、2つの鎖の配向である。2つの捕獲プライマーは、フォワードおよびリバースプライマーに対応する配列を含む。2つの捕獲プライマーは、DNAの2つの別々の、しかし相補的な鎖にアニールすることができるので、捕獲ビーズは、鋳型DNAの両方の鎖を含むと考えられる。また、捕獲プライマーは、5'末端で固定されるので、2つの鎖は、5'-3'方向に固定される。増幅後、それぞれの捕獲プライマーは、固定された鎖および相補鎖を含む。次いで、ビーズをプールし、アルカリ処理して固定されていない鎖を開放した。ビーズは、このときシーケンシングの準備が出来ている一本鎖の鋳型を含む。

【0044】

工程3では、シーケンシング酵素および試薬を反応に添加して、プライマーの伸長によるシーケンシングを容易にさせる(図1D)。好ましい態様において、スルフリラーゼおよびルシフェラーゼ(ピロリン酸シーケンシング酵素)は、別々のビーズに固定された形態か、またはピオチン-ストレプトアビジン相互作用を介してDNAビーズに結合させるかのいずれで供給される。シーケンシング法の際の補助酵素の添加は、U.S.S.N. 10/104,280およびU.S.S.N. 10/127,906に開示されており、これらは参照によってその全体が本明細書に組み入れられる。

【0045】

工程4では、ブロックが取り除かれたプライマーを伸長することによって最初のDNA鎖をシーケンスする。シーケンシング法は、当該技術分野において当業者に既知のいずれの方法であってもよい(たとえば、ピロリン酸シーケンシング)(図1E)。好ましい態様において、捕獲ビーズは、ピコタイタープレート(PTP)に充填して、ピロリン酸シーケンシングによって自動的にシーケンスされる。いくつかの場合では、決定される核酸配列は、鋳型DNAの末端近くである。その場合、シーケンシング・プライマーの伸長は、ポリメラーゼがDNAの末端に達すると自然に終了する。大部分の場合、シーケンシング・プライマーは、鋳型DNAの末端近くにはなく、十分な情報をシーケンシング反応から決定した後に、シーケンシング反応の完了または終結によってシーケンシングが終了される。

【0046】

図1Fは、反応にddNTPを添加することによってシーケンシング反応を終了するための1つの好ましい方法を示す。工程5では、ddNTP(図1G)およびポリヌクレオチドキナーゼ(PNK)または子牛腸アルカリホスファターゼもしくはブロックされたプライマー鎖から3'リン酸基を除去することができるその他の酵素(図1H)を除去するためにアピラーゼを添加することによって、第2の核酸鎖を調製する。

【0047】

工程6では、次いでポリメラーゼを添加して第2の鎖をプライムし(図1I)、続いて当該技術分野の当業者に既知の標準的な方法に従って第2の鎖をシーケンシングする(図1J)。工程7では、第1および第2の鎖の両方の配列を解析し、その結果の隣接するDNA配列が決定される(図2)。

【0048】

本発明の方法は、いずれの規模で行ってもよい。たとえば、単一のビーズを試験管でシーケンシングするために使用してもよい。好ましい態様において、シーケンシングの方法は、ビーズをウエハ上に充填することによって並行して行われる。ウエハは、ビーズに結合した核酸に対してシーケンシング反応を行ってもよいほど十分に長期間、複数のビーズが固定されているであろう位置的に定義された部位を有する基質として定義される。ウエハは、複数のビーズから並行して二重鎖のシーケンシングができる。ウエハ(ピコタイタープレートおよびFORAとも呼ばれる)のデザインは、USSN 60/443,471、USSN 60/465,071

、USSN : 10/104,280、USSN 09/814,338、USSN : 09/664,197、および2001年8月14日発行されたU.S. Patent 6,274,320に開示されており、これらは本明細書において参照として組み入れられる。

【 0 0 4 9 】

一つの側面において、本発明は、以下の工程を含む、核酸分子をシーケンシングする方法を包含する：a) 2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーであって、1つ以外の全てのプライマーが可逆的にブロックされたプライマーを、核酸分子の1つまたは複数の一本鎖に対してハイブリダイズさせる工程；b) ブロックが取り除かれたプライマーからポリメラーゼ伸長によって核酸分子に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；c) ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；d) 可逆的にブロックされたプライマーの1つを、ブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；e) 可逆的にブロックされたプライマーの少なくとも1つが脱ブロックされて、配列を決定するために使用されるまで、工程 (b) ~ (d) を繰り返す工程。

10

【 0 0 5 0 】

この方法で使用するために、さらなる伸長を防止する工程 (c) は：i) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、ii) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、iii) 化学的に伸長を終結する工程、を含むことができる。本方法は、工程 (d) の前に、ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含むことができる。

20

【 0 0 5 1 】

この方法において、少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーは、PO₄基、チオ基、およびホスホロチオール基からなる群より選択される化学的部分によってブロックすることができる。加えて、少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーは、ループを形成しかつ核酸分子にハイブリダイズしない1つまたは複数の非相補的な塩基を含むことができ、1つまたは複数の塩基は、可逆的にブロックされたプライマーの5'または3'末端以外であり、および可逆的にブロックされたプライマーは、その3'末端にジデオキシヌクレオチドを含む。加えて、少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーは、1つまたは複数の非相補的な塩基のエンドヌクレアーゼ消化によってブロックが取り除かれて、1つまたは複数の非相補的な塩基にニックを形成する。

30

【 0 0 5 2 】

この方法に従って、工程 (b) は、鎖置換ポリメラーゼによるニックでのポリメラーゼ伸長を含むことができる。加えて、少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーは、5'-N₁X-3'の配列を含んでもよく、Nは、任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を表し、Uは、ウラシルであり、およびXは、ジデオキシ-ヌクレオチドである。可逆的にブロックされたプライマーは、ウラシルDNAグリコシラーゼおよびAPエンドヌクレアーゼによってブロックが取り除かれて、伸長可能な3'末端を有するブロックが除かれたプライマーを生じてよい。または、少なくとも1つの可逆的にブロックされたプライマーは、5'-NYZ-3'の配列を含んでもよく、Nは、任意の長さのオリゴヌクレオチド配列を表し、Yは、修飾されたヌクレオチドであり、およびZは、単一のヌクレオチド塩基を表し；かつ修飾されたヌクレオチドは、ホルムアミドピリミジン (fapy) -DNAグリコシラーゼによって脱ブロックすることができる。この修飾塩基は、たとえば、8-オキソグアニン、8-オキソアデニン、fapy-グアニン、メチル-fapy-グアニン、fapy-アデニン、アフマトキシンB₁-fapy-グアニン、5-ヒドロキシシトシン、および5-ヒドロキシ-ウラシルであることができる。

40

【 0 0 5 3 】

例として、この方法で使用される核酸分子は、ゲノムDNA、cDNA、またはエピソームDNAであることができ、100bp ~ 1000bpの長さであることができる。加えて、核酸分子またはプライマーの少なくとも1つの鎖は、固体担体に付着させることができる。好ましくは、少なくとも1つのプライマーは、固体担体に固定されて固定されたプライマーを形成し、

50

また少なくとも1つの鎖は、固定されたプライマーとのハイブリダイゼーションによって固体担体に結合される。固体担体は、球面可動性の固体担体であることができる。いくつかの場合では、少なくとも1つのプライマーは、検出可能なラベルを含む。加えて、少なくとも1つのシーケンシング・プライマーは、核酸のセンス鎖にハイブリダイズしてもよく、少なくとも1つのシーケンシング・プライマーは、工程(a)で核酸分子のアンチセンス鎖にハイブリダイズする。

【0054】

この方法によれば、ポリメラーゼの伸長は、1塩基～250塩基の間であることができる。本方法は、たとえば、試験管、ピコタイタープレートの反応チャンバー、アレイの反応チャンバー、または油中水型乳剤のマイクロカプセル化された反応チャンバーなどの反応器において、行うことができる。シーケンシングは、ピロリン酸シーケンシング法またはサンガーシーケンシング法で行うことができる。好ましくは、ポリメラーゼは、3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている。好ましくは、ポリメラーゼは、3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている。脱ブロッキング工程は、可逆的にブロックされたプライマー上の PO_4 基を除去するための薬剤と、可逆的にブロックされたプライマーを接触させることを伴うことができる。この薬剤は、たとえばポリヌクレオチドキナーゼまたはアルカリホスファターゼであることができる。1つの適用において、本方法は、核酸分子の一端に近接する核酸配列および核酸分子の第2の末端に近接する第2の核酸配列を決定するために使用することができる。

【0055】

もう一つの側面において、本発明は、以下の工程を含む核酸分子をシーケンシングする方法であって、工程(a)および(b)は、いずれの順序でもまたは同時に行ってもよい方法を包含する：a)核酸分子の第1の鎖に対して第1のブロックが取り除かれたシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程；b)核酸分子の第2の鎖に対して第2のブロックされたシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程；c)第1のブロックが取り除かれたプライマーをポリメラーゼで伸長することによって第1の鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；d)ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；e)第2のシーケンシング・プライマーを脱ブロックすることと；および、f)第2のプライマーをポリメラーゼで伸長することによって第2の鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程。

【0056】

本発明において：工程(d)は、i)ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、b)マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、c)化学的に伸長を終結する工程を含むことができる。本方法は、防止工程の後に、ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含むことができる。種々の側面において、第2のプライマーは、 PO_4 基、チオ基、およびホスホロチオール基などの化学的部分によってブロックすることができる。本方法は、たとえば核酸分子の第1の末端に近接する少なくとも第1の核酸配列を決定し、核酸分子の第2の末端に近接する第2の核酸配列を決定するために使用することができる。

【0057】

また、本発明は、以下の工程を含む、複数の座位でDNA試料の分子ハプロタイプを決定する方法を包含する：a)DNA試料中の複数の座位に隣接した2つまたはそれ以上のシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程であり、ここで1つ以外の全てのプライマーは、可逆的にブロックされたプライマーであり、かつそれぞれの座位は、ハプロタイプを決定する核酸配列を含む工程；b)ブロックが取り除かれたプライマーからのポリメラーゼ伸長によって1つの座位のハプロタイプを決定する工程；c)ブロックが取り除かれたプライマーのさらなる伸長を防止する工程；d)可逆的にブロックされたプライマーの1つを、ブロックが取り除かれたプライマーに脱ブロックする工程；e)全ての可逆的にブロックされたプライマーが脱ブロックされて、分子ハプロタイプを決定するために使用

されるまで、工程 (b) ~ (d) を繰り返す工程。

【0058】

この方法において、さらなる伸長を防止する工程 (c) は：i) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、ii) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、iii) 化学的に伸長を終結する工程を含むことができる。本方法は、防止工程の後に、ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含むことができる。

【0059】

さらに、本発明は、以下の工程を含む、核酸分子をシーケンシングする方法を包含する：a) 核酸分子の1つの鎖に対してシーケンシング・プライマーをハイブリダイズさせる工程；b) シーケンシング・プライマーからのポリメラーゼ伸長によって核酸の1つの鎖に少なくとも1つの塩基を組み込む工程；c) プライマーのさらなる伸長を防止する工程；および、d) 核酸の同じ鎖に対して、または核酸の異なる鎖に対して、所望の量の配列が決定されるまで (a) ~ (c) を繰り返す工程。

【0060】

ある側面において、この方法の工程 (c) は：i) ポリメラーゼおよびdNTPで、ブロックが取り除かれたプライマーからの伸長を完了する工程；または、ii) マンガン含有緩衝液、dNTP、および少なくとも1つのddNTP中でポリメラーゼによる伸長を終結する工程；または、iii) 化学的に伸長を終結する工程を含む。加えて、本方法は、防止工程の後に、ポリメラーゼ、dNTP、およびddNTPを除去する工程をさらに含むことができる。

【0061】

本発明は、さらに、以下の工程を含む、複数の二重鎖の核酸分子をシーケンシングする方法を包含する：a) 各々の二重鎖の分子について、それぞれの二重鎖核酸の2つの鎖を分離し、2つの相補鎖のそれぞれを単一のビーズに付着させて、単一の反応器中に複数のビーズであって、核酸分子の両方の鎖を有するそれぞれのビーズがそれに対して付着されているビーズを作製する工程；b) 鎖のうちの1つの少なくとも1つの塩基の同一性を決定する工程；および、c) 核酸分子の相補鎖の少なくとも1つの塩基の同一性を決定する工程。

【0062】

実施例

実施例1：鋳型品質の管理

本発明の方法の最初の工程であるエマルジョンPCR反応の成功は、一本鎖の鋳型種の品質に関連があることが見いだされた。従って、エマルジョンPCRプロトコルを開始する前に、鋳型材料の品質を2つの別々の品質管理によって評価した。第1に、一本鎖鋳型の一定分量を2100 Bio Analyzer (Agilent) にかけた。RNAピコチップを使用して、試料が約20塩基~500塩基の範囲の大きさの断片の不均一な集団を含むことを検査した。第2に、Bio-Tek FL600プレート蛍光光度計でのリボグリーン (Ribo Green) 蛍光アッセイ法を使用してライブラリーを定量した。5ng/ μ l以下のDNA濃度を有することが決定された試料は、使用するには薄すぎると思われた。

【0063】

実施例2：DNA捕獲ビーズの合成

1mLのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) で活性化したセファロースHPアフィニティーカラム (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) からのバックされたビーズをカラムから取り出した。30および25 μ m孔のフィルターメッシュ切片 (Sefar America, Depew, NY, USA) を連続して通すことによって30 μ m~25 μ mのサイズのビーズを選択した。最初のフィルターを通過したが、第2のフィルターによって保持されたビーズ収集して、製品文献 (Amersham Pharmacia Protocol #71700600AP) に記載されているとおり活性化した。増幅される鋳型のセンスおよびアンチセンス鎖の5'末端に対応する、2つの異なるアミンでラベルされたHEG (ヘキサエチレングリコール) 長捕獲プライマーを得た。

(5'-アミン-3 HEG

スパーサー gcttacctgaccgacctctgcctatccccctgttgctg-3'; SEQ ID NO:23; および 5'-アミン

-3 HEG スパーサー ccattccccagctcgtcttgccatctgttcctccctg-3'; SEQ ID NO:24)

(IDT Technologies, Coralville, IA, USA)

プライマーは、増幅産物の両方の鎖を捕獲して、二重末端シーケンシング、すなわち増幅産物の第1および第2の鎖のシーケンシングができるようにデザインした。捕獲プライマーを20mMのリン酸緩衝液、pH8.0に溶解し1mMの終濃度を得た。3 μ lのそれぞれのプライマーを篩にかけた30 μ m ~ 25 μ mのビーズに結合させた。図5を参照されたい。次いで、ビーズをビーズ保管緩衝液（50mMのトリス、0.02%のTween、および0.02%のアジ化ナトリウム、pH8）に保管した。ビーズを血球計算板で定量し（Hausser Scientific, Horsham, PA, USA）、必要になるまで4 で保管した。

10

【 0 0 6 4 】

実施例3：PCR反応混合物調製および製剤

すべての単一分子の増幅技術と同様に、その他の実験からの外来のまたは残留する単位複製配列が反応に混入すると、シーケンシングの実行を妨害し得る。混入の可能性を減少させるために、PCR反応混合物は、PCRクリーンルームにおかれたUV処理されたラミナーフローフード内で調製した。それぞれ600,000ビーズのエマルジョンPCR反応について、以下の試薬を1.5 mlのチューブに混合した：225 μ lの反応混合液（1 \times プラチナハイファイ（P latinum HiFi）緩衝液（Invitrogen））、1mMのdNTP、2.5mMのMgSO₄（Invitrogen）、0.1%のBSA、0.01%のTween、0.003 U/ μ lの耐熱性PPi-ase（NEB）、0.125 μ Mのフォワードプライマー

20

(5'-gcttacctgaccgacctctg-3'; SEQ ID NO:1)

および0.125 μ Mのリバースプライマー

(5'- ccattccccagctcgtcttg-3'; SEQ ID NO:2) (IDT Technologies, Coralville, IA, USA)

および0.2 U/ μ lのプラチナハイファイTaqポリメラーゼ（Invitrogen）。25 μ lの反応混合物を取り出して、ネガティブ対照として使用するために個々に200 μ lのPCRチューブに保管した。反応混合物およびネガティブ対照は両方とも、必要になるまで氷上に保管した。

30

【 0 0 6 5 】

実施例4：DNA捕獲ビーズに対する鋳型種の結合

シーケンシングのための良好なクローンDNAの増幅は、それぞれのビーズに対する制御された数の鋳型種の送達と関連がある。本明細書に記載された実験のためには、典型的な標的鋳型濃度は、捕獲ビーズにつき0.5鋳型コピーであることが決定された。この濃度において、ポアソン分布は、61%のビーズが鋳型を結合しておらず、30%が1種の鋳型を有し、および9%が2つまたはそれ以上の鋳型種を有することを示す。過剰種の送達は、単一のビーズ上に混合種群（2つまたはそれ以上の種）の結合およびその後の増幅を生じて、意味ある配列データの生成を妨げる可能性がある。しかし、あまりに少ない種の送達では、鋳型（ビーズにつき1種）を含むウェルが少なくなり、シーケンシングの有効範囲が減少してしまう。従って、一本鎖ライブラリーの鋳型濃度は、重要なことが考えられた。

40

【 0 0 6 6 】

鋳型分子は、以下の方法によってDNA捕獲ビーズ上の相補的プライマーにアニールさせ、UV処理したラミナーフローフード内で行った。ビーズ保管緩衝液に懸濁した600,000のDNA捕獲ビーズを（実施例9、上記を参照されたい）200 μ lのPCRチューブに移した。チューブをベンチトップミニ遠心機で10秒間遠心し、180°回転させて、さらに10秒間回転させてさらにペレット形成を確かめた。上清を除去して、ビーズを200 μ lのアニリング緩衝液（20mMのトリス、pH7.5、および5mMの酢酸マグネシウム）で洗浄した。ビーズを再懸濁

50

するために、チューブを5秒間ボルテックスし、前述の通りにビーズをペレットにした。ビーズの上の約10 μ lの上清の全てを除去し、さらに200 μ lのアニリング緩衝液を添加した。ビーズを再び5秒間ボルテックスして1分間おき、次いで前述の通りペレットにした。10 μ lの上清を全て捨てた。

【0067】

次に、1.5 μ lの300,000分子/ μ lの鋳型ライブラリーをビーズに添加した。チューブを5秒間ボルテックスして内容物を混合し、MJサーモサイクラーにおいて予め形成された変性/アニリングの制御プログラムで鋳型をビーズにアニールさせた。プログラムでは、80 $^{\circ}$ Cにおいて5分間のインキュベーション、続いて70 $^{\circ}$ Cまで0.1 $^{\circ}$ C/secで低下、70 $^{\circ}$ Cで1分間のインキュベーション、60 $^{\circ}$ Cまで0.1 $^{\circ}$ C/secで低下、60 $^{\circ}$ Cで1分間の保持、50 $^{\circ}$ Cまで0.1 $^{\circ}$ C/secで低下、50 $^{\circ}$ Cで1分間の保持、20 $^{\circ}$ Cまで0.1 $^{\circ}$ C/secで低下、20 $^{\circ}$ Cで保持させた。アニリングプロセスの完了後、ビーズをサーモサイクラーから取り出し、前述の通りに遠心し、アニリング緩衝液を慎重にデカントした。捕獲ビーズは、平均0.5コピーのそれぞれのビーズに結合した一本鎖鋳型DNAを含み、必要になるまで氷上で保管した。

【0068】

実施例5：乳化

乳化プロセスでは、マイクロリットルにつき10,000の別々のPCRマイクロリアクターを含む熱安定性油中水型乳剤を作製する。これは、単一分子の、標的ライブラリーの個々の分子のクローン増幅のためのマトリックスとして役立つ。単一反応のための反応混合物およびDNA捕獲ビーズは、以下の方法で乳状化した。UV処理されたラミナーフローフード内で、200 μ lのPCR溶液（実施例10から）を600,000のDNA捕獲ビーズ（実施例11から）を含むチューブに添加した。ビーズを反復ピペット操作で再懸濁した。この後に、PCRビーズ混合物を少なくとも2分室温でインキュベートし、PCR溶液でビーズを平衡化させた。同時に、450 μ lのエマルジョンオイル（4.5%（w:w）幅80、1%（w:w）Atlox 4912（Uniqema, Delaware）の軽鉱油（Sigma）溶液）を滅菌した1/4インチの磁気攪拌棒（Fischer）を含む2mlの平らなトップの遠心管（Dot Scientific）に一定分量とった。次いで、このチューブは、オーダーメイドのプラスチックのチューブ保持具に置き、次いで、これを450 RPMにセットしたFisher Isotemp digital stirring hotplate（Fisher Scientific）で遠心した。

【0069】

PCRビーズ溶液を15秒間ボルテックスしてビーズを再懸濁した。次いで、溶液をプラスチック安全注射器針（Henry Schein）を取り付けた1mlの使い捨てのプラスチック注射器（Benton-Dickenson）に引き入れた。注射器は、水平ではなく垂直にポンプを向けて、アルミニウムベースのユニットで改変したシリンジポンプ（Cole-Parmer）に置いた。エマルジョンオイルを含むチューブを、これがプラスチック注射器針の下に中央にくるように、かつ磁気攪拌棒が適切に回転するように攪拌プレート上に並べた。シリンジポンプを5.5ml/hrで0.6mlを供給するようにセットした。PCRビーズ溶液を液滴の様式でエマルジョン油に添加した。液滴を、これらが回転している油に落ちてチューブの側面に接触しないことを確実にするために注意を払った。

【0070】

一旦エマルジョンが形成されたら、乳化プロセスおよび乳化後の一定分量をとる工程の両方の間でエマルジョンの攪拌を最小限にするために多大な注意を払った。ボルテックス、迅速なピペット操作、または過剰な混合は、エマルジョンの破壊を引き起こして、別個のマイクロリアクターを破壊することが見いだされた。エマルジョンを形成する際には、2つの溶液がマヨネーズの粘性を有する均一な乳白色混合物に変わる。注射器の内容物を回転している油にあけた。次いで、エマルジョンのチューブを保持具から取り出して、エマルジョンの上部の全ての残油層がなくなるまで、人差し指でやさしくはじいた。チューブを保持具に置き換えて、さらに数分間磁気攪拌棒で攪拌した。チューブ外側に沿って磁気回収ツールを実行することによって、攪拌棒をエマルジョンから取り出して、攪拌棒を廃棄した。

【0071】

20 μ lのエマルジョンを、P100ピペッタを使用してチューブの中央から取り、顕微鏡スライド上に配置した。剪断力を最小にするために、大きなピペット先端部材を使用した。エマルジョンを50 \times 拡大で検査し、油（図5において示される模型図）中に30ミクロン～150ミクロンの直径のマイクロリアクターのPCR溶液に単一のビーズが主に含まれることを確かめた。目視検査後に、エマルジョンを直ちに増幅した。

【0072】

実施例6：増幅

エマルジョンは、7個～8個の別々のPCR管チューブに一定分量をとった。それぞれのチューブには、約75 μ lのエマルジョンを含んだ。チューブを封着し、上記の様に25 μ lのネガティブ対照とともにMJサーモサイクラーに置いた。以下のサイクルタイムを使用した：94（ホットスタートでの開始）で4分間のインキュベーションを1サイクル、94で30秒間のインキュベーションを30サイクル、並びに68（増幅）で150秒、および94で30秒間のインキュベーションを40サイクル、並びに、68（ハイブリダイゼーションおよび伸長）で360秒。PCRプログラムの完了後、チューブを取り出して、エマルジョンを直ちに破壊するか、または破壊プロセスを開始する前の16時間までの間、反応液を10で保管した。図6を参照されたい。

【0073】

実施例7：エマルジョンの破壊およびビーズの回収

増幅に続き、乳化の破壊（油および水相の分離）について検査した。破壊されていないエマルジョンを単一の1.5mlのマイクロ遠心管内で合わせ、一方でところどころ破壊されたエマルジョンは廃棄した。エマルジョン試料は、強い粘りけがあったので、有意な量がそれぞれのPCRチューブ内に残った。チューブに残っているエマルジョンは、それぞれのPCRチューブに75 μ lの鉱油を添加して混合物をピペットで取ることによって回収した。この混合物を乳状にした材料の大半を含む1.5mlのチューブに添加した。次いで、1.5mlのチューブを30秒間ボルテックスした。この後に、チューブを13.2K rpm（全速）でベンチトップマイクロ遠心機で20分間遠心した。

【0074】

遠心分離の後、エマルジョンは、大きな白い界面を有する二相に分離された。透明な、上部の油相を廃棄し、その一方で、濁った界面物質は、チューブに残したままにした。化学換気フード内で、1mlのヘキサン誘導体を低相および界面層に添加した。混合物を1分間ボルテックスし、ベンチトップマイクロ遠心機で1分間、全速で遠心した。上部の油/ヘキサン相を取り除いて廃棄した。この後に、1mlの80%のエタノール/1 \times アニーリング緩衝液を残りの水相、界面、およびビーズに添加した。この混合物を1分間、または界面から白い物質が溶解するまでボルテックスした。次いで、試料を全速で1分間、ベンチトップマイクロ遠心機で遠心した。チューブを180度回転し、さらに数分間、再び回転した。次いで、ビーズペレットを乱すことなく、上清を慎重に取り除いた。

【0075】

白いビーズペレットを1mlの0.1%のTween20を含むアニーリング緩衝液で2回洗浄した。それぞれを上記の通りに洗浄した後、洗浄溶液を廃棄し、ビーズをペレットにした。ペレットを1mlのピコピュア（Picopure）水で洗浄した。ビーズを以前に使用した遠心-回転-遠心法によってペレットにした。水相を慎重に除去した。次いで、ペレットにして上清を除去する前に、ビーズを中程度の設定で2秒間簡単にボルテックスしたこと以外は、ビーズを前述の通りに1mlの1mMのEDTAで洗浄した。

【0076】

捕獲ビーズ上に固定された増幅DNAを処理して、一本鎖DNAを得た。第2の鎖を塩基性溶解溶液中でのインキュベーションによって除去した。その後に、1mlの溶解溶液（0.125MのNaOH、0.2MのNaCl）をビーズに添加した。ペレットを中程度の設定で2秒間ボルテックスすることによって再懸濁し、チューブを3分間サーモラインラブクエーク（Thermolyne Lab Quake）チューブローラーに置いた。次いで、上記の通りにビーズをペレットにし、

上清を慎重に除去して廃棄した。残った溶融溶液を1mlのアニーリング緩衝液を添加することによって中和した。この後に、ビーズを中程度の速度で2秒間ボルテックスした。ビーズをペレットにし、上清を前述の通り取り除いた。遠心分離後に800 µlのアニーリング緩衝液を除去した以外は、アニーリング緩衝液での洗浄を繰り返した。ビーズおよび残ったアニーリング緩衝液を0.2mlのPCRチューブに移した。ビーズは、直ちに使用するか、または濃縮プロセスを続ける前に48時間まで4℃で保管した。

【0077】

この工程のプロセスを図7に図式的に示してある。

【0078】

実施例8：ビーズ濃縮

ビーズ質量は、増幅された固定されたDNA鎖を有するビーズ、および空またはヌルビーズを含んだ。上記したように、61%のビーズは、増幅過程の間に鋳型DNAを欠いていることが算出された。鋳型DNAを有するビーズを選択的に単離するために濃縮を使用することにより、シーケンシング効率を最大にした。濃縮プロセスは、以下に詳細を記載してある。

【0079】

以前の実施例からの一本鎖ビーズを濃縮-回転-濃縮法によってペレットにして、ビーズを乱すことなくできる限り上清を取り除いた。15 µlのアニーリング緩衝液を、続いて2 µlの100 µMのピオチン化した40塩基の濃縮プライマー（5'-ピオチン-テトラ-エチレングリコールスパーサー

ccattccccagctcgtcttgcacatctgtccctccctgtctcag-3'; SEQ ID NO:3

）をビーズに添加した。プライマーは、ビーズに固定された鋳型の3'末端の増幅部位およびシーケンシング部位の組み合わせに相補的にした（それぞれ20塩基の長さ）。溶液を中程度の設定で2秒間ボルテックスすることによって混合し、MJサーモサイクラーにおいて変性/アニーリングの制御プログラムを使用して、濃縮プライマーを固定されたDNA鎖にアニールさせた。プログラムは、以下のサイクルタイムおよび温度からなった：65℃で30秒間のインキュベーション、58℃まで0.1℃/secで低下、58℃で90秒間のインキュベーション、および10℃での保持。

【0080】

プライマーをアニーリングさせると共に、Dyna1 MyOne（商標）ストレプトアビジンビーズを穏やかに回転させることによって再懸濁した。次に、20 µlのMyOne（商標）ビーズを1mlの増強液（2MのNaCl、10mMのTris-HCl、1mMのEDTA、pH7.5）を含む1.5mlのマイクロ遠心チューブに添加した。MyOneビーズ混合物を5秒間ボルテックスし、チューブをDyna1 MPC-S磁石内に置いた。常磁性ビーズにより、マイクロ遠心チューブの側面に対してペレットにした。上清をMyOne（商標）ビーズを乱さないように慎重に取り除いて廃棄した。チューブを磁石から取り出し、100 µlの増強液を添加した。ビーズを再懸濁するために、チューブを3秒間ボルテックスし、必要になるまで氷上で保管した。

【0081】

アニーリングプログラム終了後、100 µlのアニーリング緩衝液をDNA捕獲ビーズおよび濃縮プライマーを含むPCRチューブに添加した。チューブを5秒間ボルテックスし、内容物を新しい1.5mlのマイクロ遠心チューブに移した。その中で濃縮プライマーが捕獲ビーズにアニールされたPCRチューブを200 µlのアニーリング緩衝液で一回洗浄し、洗浄溶液を1.5mlのチューブに添加した。ビーズを1mlのアニーリング緩衝液で3回洗浄し、2秒間ボルテックスして、前述の通りにペレットにした。上清を慎重に除去した。3回洗浄後、ビーズを1mlの氷冷増強液で2回洗浄した。ビーズをボルテックスし、ペレットにして、上清を前述の通り除去した。ビーズを150 µlの氷冷増強液に再懸濁し、ビーズ溶液を洗浄したMyOne（商標）ビーズに添加した。

【0082】

ビーズ混合物を3秒間ボルテックスし、Lab Quakeチューブローラー上で3分間室温でインキュベートした。ストレプトアビジンでコートしたMyOne（商標）ビーズは、DNA捕獲ビ

10

20

30

40

50

ーズ上に固定された鋳型に対してアニールされたビオチン化された濃縮プライマーに結合させた。次いで、ビーズを2,000 RPMで3分間遠心し、その後、再懸濁されるまで、ビーズを2秒のパルスによってボルテックスした。再懸濁されたビーズを5分間氷上に置いた。これに続き、500 μ lの冷却増強液をビーズに添加し、チューブをDynaI MPC-S磁石に挿入した。ビーズを60秒間妨げずにおいて、磁石に対してペレットを形成させた。この後に、過剰のMyOne (商標) を有する上清およびヌルDNA捕獲ビーズを慎重に取り除いて廃棄した。

【0083】

チューブをMPC-S磁石から取り出して、1mlの冷却増強液をビーズに添加した。穏やかに指ではじいてビーズを再懸濁した。強力に混合することにより、MyOne (商標) とDNA捕獲ビーズの間の結合が壊される可能性があるため、この時ビーズをボルテックスしないことが重要である。ビーズは、磁石に戻して上清を取り除いた。この洗浄を3回繰り返して、全てのヌル捕獲ビーズを確実に除去した。アニールした濃縮プライマーおよびMyOne (商標) ビーズを除去するために、DNA捕獲ビーズを400 μ lの溶解溶液に再懸濁して、5秒間ボルテックスし、磁石によってペレットにした。上清を濃縮されたビーズと共に別々の1.5mlのマイクロ遠心チューブに移した。濃縮されたビーズを最大限回収するために、第2の400 μ lの溶解溶液の一定分量をMyOne (商標) ビーズを含むチューブに添加した。ビーズをボルテックスし、前述の通りにペレットにした。2回目の洗浄からの上清を除去して、濃縮ビーズの最初の全量と合わせた。使用済みのMyOne (商標) ビーズのチューブは、廃棄した。

【0084】

濃縮されたDNA捕獲ビーズのマイクロ遠心チューブをDynaI MPC-S磁石上に置いて、あらゆる残りのMyOne (商標) ビーズをペレットにした。上清中の濃縮されたビーズを第2の1.5mlのマイクロ遠心チューブに移して遠心した。上清を取り除いて、ビーズを1mlのアニリング緩衝液で3回洗浄し、残りの溶解溶液を中和した。3回目の洗浄の後、800 μ lの上清を除去して、残りのビーズおよび溶液を0.2mlのPCRチューブに移した。濃縮されたビーズを2,000 RPMで3分間遠心し、上清をデカントした。次に、20 μ lのアニリング緩衝液および3 μ lの2つの異なる100 μ Mシーケンシングプライマー (5'-

cctatgttccctccctgtc-3'; SEQ ID NO:4; および 5'-cctatccctgttgcgtgtc-3' リン酸; SEQ ID NO:5)

を添加した。チューブを5秒間ボルテックスして、以下の4段階のアニリングプログラムのために、MJサーモサイクラーに配置した: 65 °で5分間のインキュベーション、50 °まで0.1 °/secで低下、50 °で1分間のインキュベーション、40 °まで0.1 °/secで低下、40 °で1分間保持、15 °まで0.1 °/secで低下、および15 °で保持。

【0085】

アニリングプログラムの終了後、ビーズをサーモサイクラーから取り出して、10秒間遠心分離することによってペレットにした。チューブを180 °回転し、さらに10秒間回転させた。上清をデカントして廃棄し、200 μ lのアニリング緩衝液をチューブに添加した。ビーズを5秒間ボルテックスすることによって再懸濁して、前述の通りにペレットにした。上清を除去して、100 μ lのアニリング緩衝液にビーズを再懸濁した。この時点で、ビーズをMultisizer 3 Coulter Counter (Beckman Coulter) で定量した。ビーズは、4 °で保管したが、少なくとも1週間は安定であった。

【0086】

実施例9: 二本鎖シーケンシング

二本鎖シーケンシングのためには、2つの異なるシーケンシング・プライマーを使用する; 無修飾プライマーMMP7Aおよび3'リン酸化されたプライマーMMP2Bp。本プロセスには、複数の工程がある。このプロセスを図8に図式的に示してある。

1) 第1の鎖のシーケンシング。第1の鎖のシーケンシングは、予め定められたサイクル

数でDNAポリメラーゼによるヌクレオチドの逐次付加を介した、無修飾プライマーの伸長を含む。

2) キャッピング：第1の鎖のシーケンシングを、25mMのトリシン、5mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、0.4mg/mlのPVP、0.1mg/mlのBSA、0.01%のTween、並びに2 μ Mのそれぞれのデオキシヌクレオチドおよび2 μ Mのそれぞれのジデオキシヌクレオチドを含むキャッピング緩衝液を流して終了させた。

3) 洗浄：残余のデオキシヌクレオチドおよびジデオキシヌクレオチドを、25mMのトリシン、5mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、0.4mg/mlのPVP、0.1mg/mlのBSA、0.01%のTween、および8.5ユニット/Lのアピラーゼを含むアピラーゼ緩衝液に流して取り除いた。

4) 切断：第2のブロックされたプライマーを、5ユニット/mlの仔ウシ腸ホスファターゼを含む切断緩衝液を流すことによって、修飾された3'リン酸化プライマーの3'末端からリン酸基を除去することによってブロックをなくした。

5) 連続：第2のブロックが取り除かれたプライマーを、1000ユニット/mlのDNAポリメラーゼを流すことによりポリメラーゼを付加することによって活性化して、全ての利用できるプライマー部位を捕えた。

6) 第2の鎖のシーケンシング：予め定められたサイクル数でのDNAポリメラーゼによるヌクレオチドの逐次付加を介した第2の鎖のシーケンシング。

【0087】

上記で記載されている方法を用いて、黄色ブドウ球菌のゲノムDNAをシーケンスした。結果を図9に示してある。合計31,785の読みが、第1の鎖の15770の読み、および第2の鎖の16015の読みに基づいて得られた。これらのうちで、合計11,799の読みは対であり、8187の読みは対ではなく、38%の合計適用範囲を得た。

【0088】

読みの幅は、60～130の範囲であり、95+/-9塩基の平均であった(図10)。ゲノム幅の分布およびそれぞれのゲノム幅のウェル数を図11に示してある。このゲノムのシーケンシングからの代表的なアライメントストリング(alignment strings)を図12に示してある。

【0089】

この明細書の全体にわたって、種々の特許、公開された特許出願、および科学的参考文献は、当該技術分野の水準および内容を記載するために引用してある。これらの開示は、その全体が本明細書により、参照として本願明細書に組み込まれる。

【0090】

特定の態様について本明細書に詳細に開示したが、これは、説明の目的のみに例証としてなされたものであり、添付の特許請求の範囲の範囲に関して限定することは意図されない。特に、本発明者らにより、請求項に記載の本発明の精神と範囲から逸脱することなく、種々の置換、改変、および修飾が本発明になされてもよいことが想定される。

【図面の簡単な説明】

【0091】

(図1) 例示的な二重末端シーケンシングのプロセスを図示する。

(図2) 454 Corpからのピロシーケンシング装置での二重末端シーケンシングのデモンストラーションの結果を図示する。

(図3) DNA鋳型の両方の末端の配列が決定されたことを示す解析二重末端シーケンシングの結果を図示する。

SEQ ID NO:6:

atgcacatggttgacacagtgtg; SEQ ID NO:7: atgcacatggttgacacagtgg; SEQ ID

NO:8: atgccaccgacctaagtctcaaaactt

(図4) 例示的なDNA捕獲ビーズを図示する。

(図5) 二重鎖シーケンシングのための2つのオリゴヌクレオチド配列を含むビーズのカプセル化を図示する。

10

20

30

40

50

(図6) 液相PCRおよびビーズに対するドライブ法 (drive to bead procedure) - 二重末端シーケンシングの好ましい態様の工程を図示する。

(図7) 解乳化およびビーズ上の増幅された鋳型DNAの回収-二重末端シーケンシングの好ましい態様の工程を図示する。

(図8) 二重末端シーケンシングの好ましい方法の概略図である。

(図9) 黄色ブドウ球菌のゲノムシーケンシングの結果を図示する。

(図10) 二重末端シーケンシングを含む1つの実験での平均の読みの長さを図示する。

(図11) 二重末端シーケンシング実験におけるそれぞれのゲノム全長のためのウェルの数を図示する。

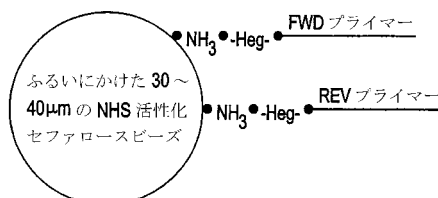
(図12) 二重末端シーケンシング法による典型的な結果およびアライメントストリングを図示する。配列は、順に、上から下へ：SEQ ID NO：9-SEQ ID NO：22で示してある。

10

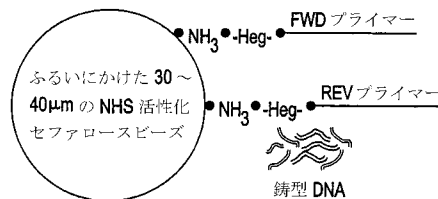
【図1A】



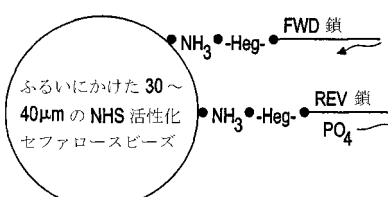
【図1B】



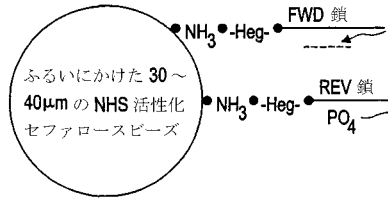
【図1C】



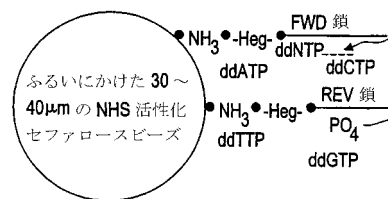
【図1D】



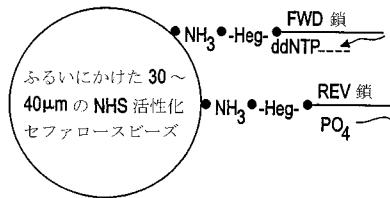
【図1E】



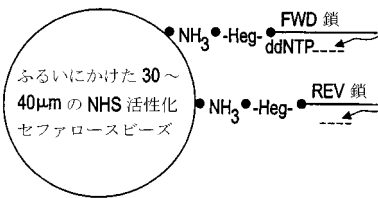
【図1F】



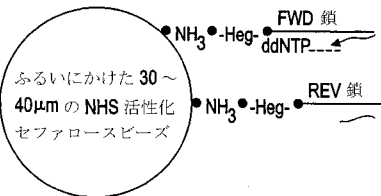
【 図 1 G 】



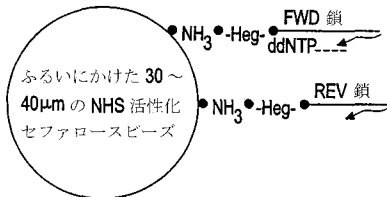
【 図 1 J 】



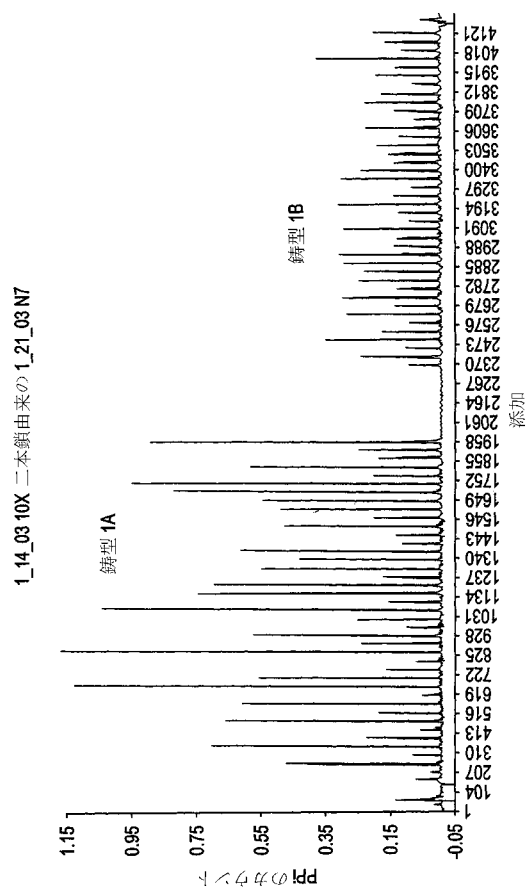
【 図 1 H 】



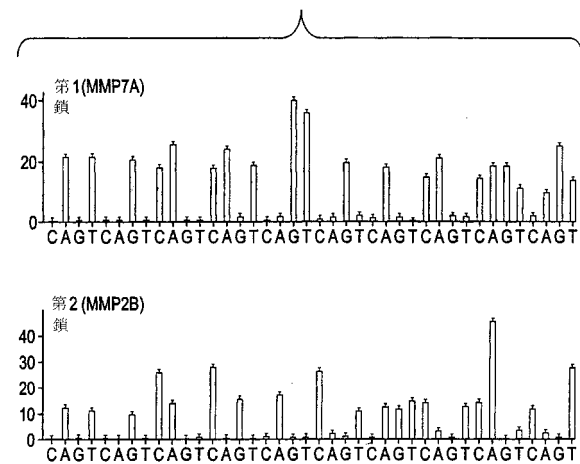
【 図 1 I 】



【 図 2 】



【 図 3 】



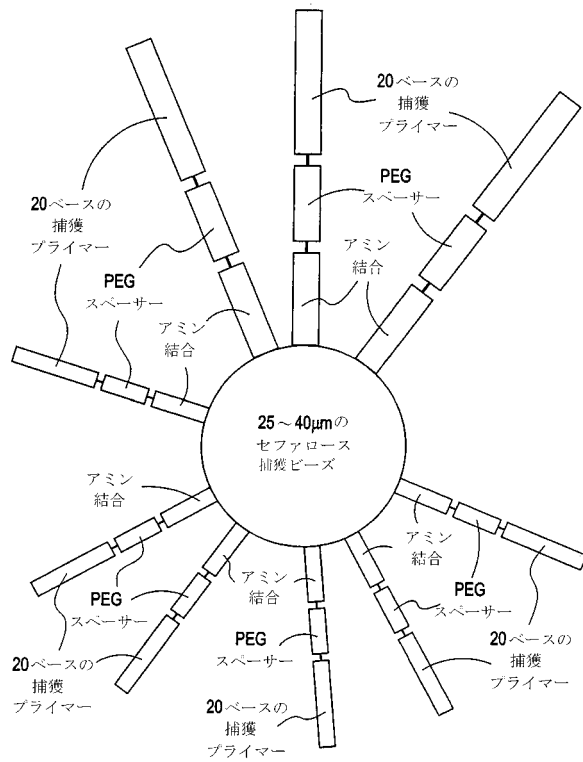
試料	ウェルの位置	配列	完全マッチの長さ
F6 14 1	00001 1362 1660.well	ATGCACATGGTTGACACAGTGGT	22

ATGC ACATGGTTGACACAGTGG

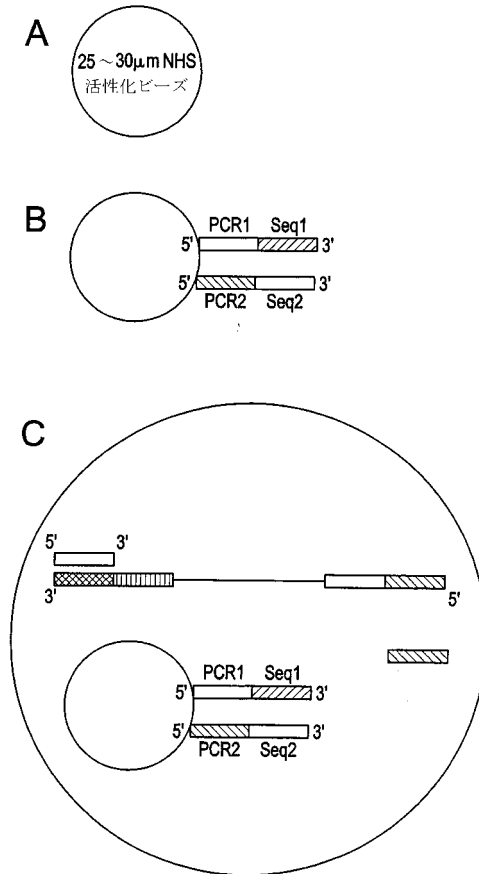
ATGC CACCGACCTAGTCTCAACTT

第2鎖 (MMP2B)	試料	ウェルの位置	配列	完全マッチの長さ
	F6 14 1	00003 1363 1660.well	ATGCCACCGACCTAGTCTCAAACIT	25

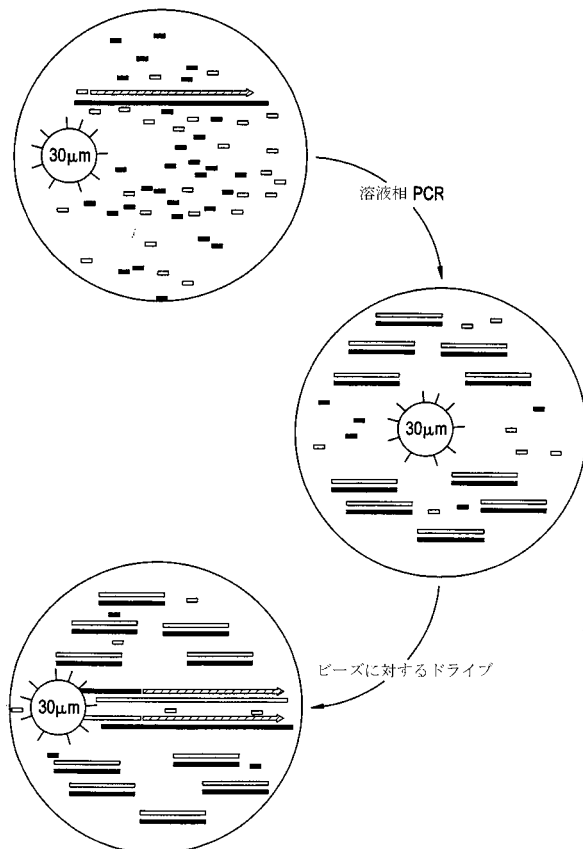
【図 4】



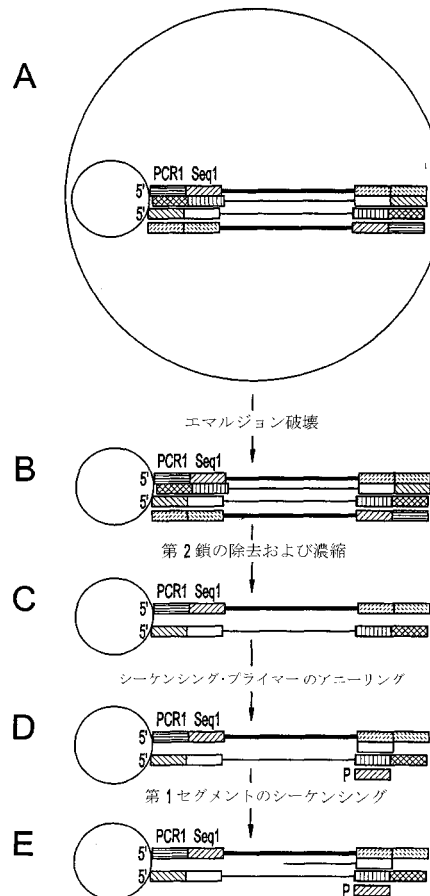
【図 5】



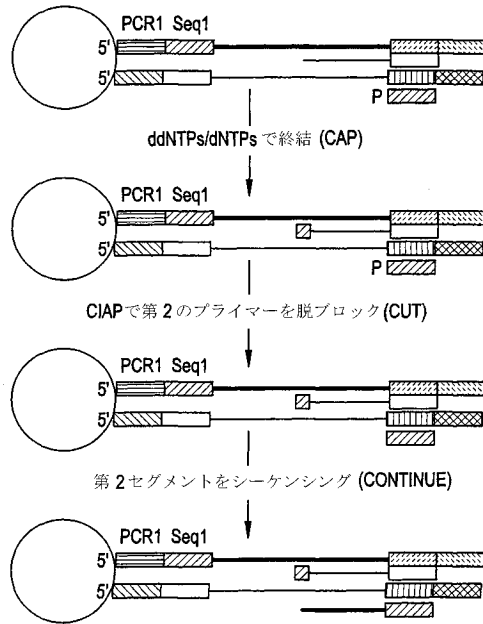
【図 6】



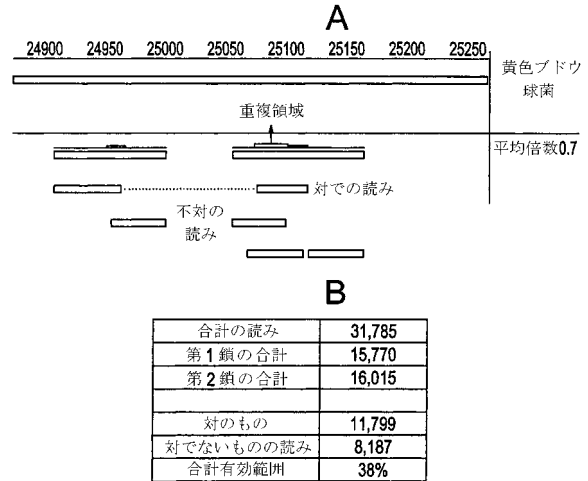
【図 7】



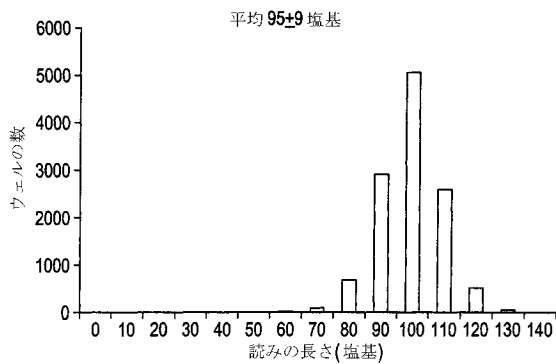
【図 8】



【図 9】



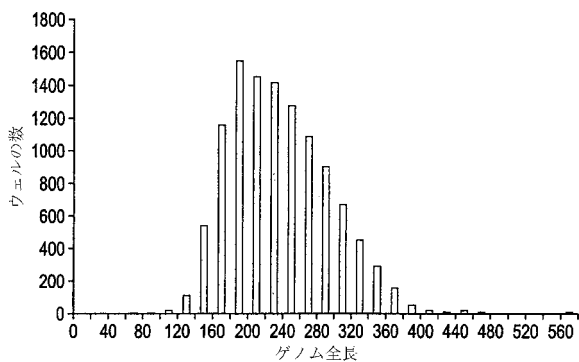
【図 10】



【図 12】

ウェル	ゲノム位置	向き	アライメントストリング
00364_0548_2509	571368	F	TATTGTTGATGCTGTAAAAaGAAGCTACTGGTGTAGIATTTTATGAAGTT
00364_0548_2509_D2	571512	R	TGCTCAAAGAATTCATTAAATATGACCATAITTCATTGTATCTTT
00383_0685_2232	1487890	R	AAGCGAACAGTCAAGTACCACAGTCAGTTGACITTTACACAAGCGGAT
00383_0685_2232_D2	1487769	F	TACAGGTGTTGGTATGCCATTTCGATTTTGTGCGCTTGTGTTAGCCG
00397_0940_2923	2611033	F	AACATATAAACATCCCTATCTCAATTCGCGTTCCATGTAAaCAAAAAAAGC
00397_0940_2923_D2	2611164	R	TAGATATCACTTGCCTGTACTGGTAATGCAGGCATGAG
00417_0611_1933	122001	R	ATTCAACTCTGGAATGCTTCTTGATACGCTCGATGATG
00417_0611_1933_D2	121930	F	GATGAGGAGCTGCAATGGCAATGGGTTAAAGGCATCATCG
00434_0595_0993	2022591	R	TGTATCTCGATTGGATTAGTTGCTTTTGCATCTTCATTAGACC
00434_0595_0993_D2	2022473	F	CATTAACTCTGCACCAAGAAATAGCTTCTAATACGATTGC
00443_1003_0754	107373	F	GCGACGACGTCCAGCTAATAACGCTGCACCTAAGGCTAATGATAAT
00443_1003_0754_D2	107502	R	AAACCATGCAGATGCTAAACAAGCTCAAGCATTACCAAGAACT
00454_1257_3047	59038	R	TGTTGCTGCATCATAATTTAATACTACATCATTTAATCTTTGS
00454_1257_3047_D2	58880	F	GCAGATGGTGTGACTAACCAAGTTTGGTCAAAATGCCCTAAATACAAAAAGAT

【図 11】



【配列表】

0004480715000001.app

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/476,602
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/476,504
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/476,313
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/476,592
(32)優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/497,985
(32)優先日 平成15年8月25日(2003.8.25)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 リーモン ジョン エイチ .
アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード ノートンタウン ロード 251
(72)発明者 ローマン ケントン
アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード スクールサイド レーン 425
(72)発明者 ロナン マイケル ティー .
アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブン クウイニピアク アベニュー 1697 ア
パートメント ディー
(72)発明者 スリニバサン メイスレイアン
アメリカ合衆国 コネチカット州 ブランフォード ケイティ ジョー レーン 4
(72)発明者 ロスバーク ジョナサン
アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード ムース ヒル ロード 1701
(72)発明者 ウェイナー マイケル
アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード レイトン トレイル 52

審査官 清水 晋治

- (56)参考文献 国際公開第03/002767(WO, A1)
特表2001-509393(JP, A)
国際公開第93/021340(WO, A1)
Analytical biochemistry. 1999, Vol.267, No.1, p.65-71

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
C12N 15/00-15/90
PubMed