

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7528103号
(P7528103)

(45)発行日 令和6年8月5日(2024.8.5)

(24)登録日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6874(2018.01)	C 1 2 Q	1/6874	Z
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A
請求項の数 21 (全115頁)				
(21)出願番号	特願2021-546249(P2021-546249)	(73)特許権者	520167449	
(86)(22)出願日	令和2年2月10日(2020.2.10)		ウルティマ・ゲノミクス・インコーポレ	
(65)公表番号	特表2022-519324(P2022-519324		ーテッド	
	A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4	
(43)公表日	令和4年3月22日(2022.3.22)		5 6 0、ニューアーク、ゲートウェイ・	
(86)国際出願番号	PCT/US2020/017491		ブルバード・7 9 7 9、スイート・1	
(87)国際公開番号	WO2020/167656		0 1	
(87)国際公開日	令和2年8月20日(2020.8.20)	(74)代理人	100114188	
審査請求日	令和5年2月7日(2023.2.7)		弁理士 小野 誠	
(31)優先権主張番号	62/804,082	(74)代理人	100119253	
(32)優先日	平成31年2月11日(2019.2.11)		弁理士 金山 賢教	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100124855	
			弁理士 坪倉 道明	
(31)優先権主張番号	62/890,240	(74)代理人	100129713	
(32)優先日	令和1年8月22日(2019.8.22)		弁理士 重森 一輝	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 核酸分析方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

核酸処理のための方法であって、
(a) 複数のビーズを有する複数のパーティションおよび複数の核酸分子を生成するステップであって、前記複数のパーティションのうちの1つのパーティションが、(i) 前記複数のビーズのうちの1つのビーズであって、第1のプライマー配列を含む第1のプライマーを含むビーズ、(i i) 前記複数の核酸分子のうちの、第1の核酸分子及び第2の核酸分子を含む少なくとも2つの核酸分子であって、前記第1の核酸分子と第2の核酸分子が異なる核酸配列を含み、第1の核酸分子と第2の核酸分子がそれぞれ第1のアダプター配列を含み、前記第1のプライマー配列は、前記第1のアダプター配列に対して配列相補性を有さず、及び、(i i i) 第2のプライマーを含む1つ以上の試薬であって、第2のプライマーは第1の部分および第2の部分を含み、該第1の部分は前記第1のアダプター配列とハイブリダイズすることができ、第2の部分は前記第1のプライマー配列に対応する第2のプライマー配列を含み、前記パーティションにおける第1のプライマー濃度に対する第2のプライマー濃度の比率が、 10^{-1} 以下程度である試薬を含む、ステップと、
(b) 前記第2のプライマーが前記第1の核酸分子の第1のアダプター配列とハイブリダイズする前記パーティションにおいて、(i) 前記1つ以上の試薬を使用して、前記第2のプライマー配列またはその逆相補体を含む前記第1の核酸分子の1つ以上の伸長産物を生成するステップ(i i) 前記第2のプライマー配列またはその逆相補体を前記第1のプライマー配列にアニールし、前記第1のプライマーを伸長することで、前記1以上の伸

10

20

長産物のうちの1つの伸長産物を前記ビーズに付着させるステップ、及び(iii)前記ビーズに付着された前記伸長産物の増幅産物を生成するステップと、

(c) 前記パーティションから前記ビーズを回収するステップと、

(d) 前記ビーズに付着する前記伸長産物の増幅産物のうちの1つの増幅産物をアッセイして、前記第1の核酸分子の配列を同定するステップと、
を含む方法。

【請求項2】

(a) は、(i) 前記複数の核酸分子を含む第1の溶液、及び、(ii) 前記複数のビーズを含む第2の溶液を、前記第1の溶液及び前記第2の溶液と混和しない流体と接触させて、前記複数のパーティションを生成するステップを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記ビーズには、1つ以上の増幅反応を行なうための前記第1のプライマーを含む第1の複数のプライマー分子が付着しており、前記1つのビーズに付着した前記伸長産物の増幅産物を生成する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記複数のパーティションの少なくとも50%のそれぞれが、前記複数のビーズのうちの2つ以上のビーズを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記複数のパーティションの少なくとも50%のそれぞれが、前記複数の核酸分子のうちの2つ以上の核酸分子を含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項6】

前記1つ以上の試薬は、プライミング配列を含む核酸分子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記プライミング配列を含む前記核酸分子が固有分子識別子配列を更に含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記プライミング配列を含む前記核酸分子がバーコード配列を更に含む、請求項6に記載の方法。

【請求項9】

前記1つ以上の試薬が1つ以上の重合酵素を含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項10】

前記複数のパーティションが複数の液滴である、請求項1に記載の方法。

【請求項11】

(d) は、前記ビーズに付着した前記伸長産物の前記増幅産物のうちの1つの増幅産物を配列決定するステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

前記複数のパーティションを生成するステップをさらに含み、前記パーティションの少なくとも50%がそれぞれ、少なくとも1つのビーズおよび少なくとも1つの核酸分子を含む、請求項1に記載の方法。

40

【請求項13】

前記複数のパーティションを生成するステップをさらに含み、前記パーティションの少なくとも80%がそれぞれ、少なくとも1つのビーズおよび少なくとも1つの核酸分子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記(c)の後、前記ビーズがモノクロールである、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記複数の核酸分子が単離された核酸分子を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記ビーズが前記配列決定のために平面基材上に配置される、請求項11に記載の方法。

50

【請求項 17】

前記複数のパーティションの多くとも50%のそれぞれが、前記複数のビーズまたは前記複数の核酸分子によって非占有である、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

前記1つ以上の試薬が前記ビーズに付着していない第1の溶液プライマーを含み、該第1の溶液プライマーがそれぞれ、前記第1のプライマー配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 19】

前記1つ以上の試薬が前記ビーズに付着していない第3の溶液プライマーを含み、前記少なくとも2つの核酸分子がそれぞれ前記第1のアダプター配列と異なる第2のアダプター配列を含み、該第3の溶液プライマーがそれぞれ、前記第2のアダプター配列と同一または逆相補の第3のプライマー配列を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記パーティションにおける前記第1のプライマーの濃度に対する前記第2のプライマー濃度の比率が、 1.0×10^{-2} 以下程度である、請求項1に記載の方法。

【請求項 21】

前記パーティションにおける前記第1のプライマーの濃度に対する前記第2のプライマー濃度の比率が、 1.0×10^{-3} 以下程度である、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

この出願は、2019年2月11日に提出された米国仮特許出願第62/804,082号、2019年8月22日に提出された米国仮特許出願第62/890,240号、及び、2019年10月17日に提出された米国仮特許出願第62/916,683号の利益を主張し、これらの出願はそれぞれ、あらゆる目的のために参照により全体が本願に組み入れられる。

【背景技術】

【0002】

生体分子の研究の進歩は、部分的には、分子及び/又はそれらの生体反応を特徴付けるために使用される技術の向上によってもたらされてきた。特に、核酸の研究は、配列分析に使用される技術の開発から恩恵を受けている。核酸の配列決定は、分子生物学及び医学の分野において様々な用途がある（例えば、診断及び処置モニタリング）。核酸配列決定は、被検体における特定の状態を診断するため及び/又は処置計画を調整するために使用され得る情報を提供し得る。配列決定は、ベクター設計、遺伝子治療、ワクチン設計、工業用菌株設計、及び、検証を含む分子生物学用途に広く使用される。最終的な配列分析が実行される方法は、そのような分析で取得され得る情報のタイプ及び品質において役割を果たし得る。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

核酸サンプルを分析及び/又は処理するための方法（例えば、エマルジョンPCR）の効率、感度、及び、精度を高めるための方法、プロセス、及び、組成物の必要性が本明細書中で認識される。本開示は、核酸分子（例えば、生体サンプル中で見出されるもの）を高い精度及び感度並びに効率的な試薬使用量で分析及び/又は処理するための方法及び組成物を提供する。核酸増幅又は配列決定（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、すなわち、PCR）のためにエマルジョン液滴（又はウェルなどの他のタイプのパーティション）中でより多数のビーズを使用する（例えば、核酸分子に対するビーズのより高い比率を使用する）と、クローンコピー数がより多くなって、鋳型損失が減少し、それにより、効率的なワークフローを維持しながら精度及び感度が向上し得る。また、本開示は、パーティション（例えば、エマルジョンパーティション）内に2つ以上の核酸鋳型が存在する場合で

40

50

もクローン増幅を達成するための方法及びシステムも提供する。本明細書中に記載されるシステム及び方法は、例えば試薬（例えば、PCR試薬）を効率的に使用できるように、（例えば、ポアソン分布よりも大きい密度で）パーティション内に複数のビーズ及び/又は核酸鋳型を装填できるようにし得る。

【0004】

一態様では、核酸処理のための方法であって、（a）複数のパーティションを与えるステップであって、複数のパーティションのうちの1つのパーティションが、（i）複数のビーズのうちの少なくとも2つのビーズ、（ii）核酸分子、及び、（iii）1つ以上の試薬を含む、ステップと、（b）パーティションにおいて、核酸分子及び1つ以上の試薬を使用して、核酸分子の1つ以上の増幅産物を生成するステップであって、1つ以上の増幅産物の少なくとも1つのサブセットが、少なくとも2つのビーズのうちの1つのビーズに付着される、ステップと、（c）パーティションからビーズを回収するステップと、（d）ビーズに付着される1つ以上の増幅産物のうちの1つの増幅産物又はその誘導体をアッセイして、核酸分子の配列を同定するステップとを含む方法が提供される。

10

【0005】

幾つかの実施形態において、（a）は、（i）核酸分子を含む複数の核酸分子を含む第1の溶液、及び、（ii）少なくとも2つのビーズを含む前記複数のビーズを含む第2の溶液を、第1の溶液及び第2の溶液と混和しない流体と接触させて、複数のパーティションを生成するステップを含む。幾つかの実施形態では、第1の溶液及び第2の溶液が同じ溶液である。幾つかの実施形態では、第1の溶液及び第2の溶液が異なる溶液である。

20

【0006】

幾つかの実施形態において、ビーズには、核酸分子を使用して1つ以上の増幅反応を行なうための複数のプライマー分子が付着されてしまっており、（b）は、複数のプライマー分子のうちのプライマー分子を使用して、1つ以上の増幅反応を行なって、1つ以上の増幅産物のうちの増幅産物を生成するステップを含む。幾つかの実施形態において、ビーズには、核酸分子を使用して1つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、これらの複数の更なるプライマー分子は複数のプライマー分子とは異なる。

【0007】

幾つかの実施形態において、（b）は、複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、1つ以上の更なる増幅反応を行なって、1つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップを更に含み、更なる増幅産物の少なくとも1つのサブセットがビーズに付着され、（d）は、核酸分子の配列を同定するために、ビーズに付着される更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイするステップを更に含む。幾つかの実施形態では、核酸分子が二本鎖核酸分子である。幾つかの実施形態では、核酸分子の第1鎖に対応する増幅産物が複数のプライマー分子を使用して生成され、核酸分子の第2鎖に対応する増幅産物が複数の更なるプライマー分子を使用して生成される。幾つかの実施形態において、（d）は、1つ以上の増幅産物又はその誘導体の配列と会合されるペアエンド配列決定リードを生成するステップを含む。

30

【0008】

幾つかの実施形態において、少なくとも2つのビーズのうちの更なるビーズには、核酸分子を使用して1つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、これらの複数の更なるプライマー分子は複数のプライマー分子とは異なる。幾つかの実施形態において、方法は、（e）複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、1つ以上の更なる増幅反応を行なって、1つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップであって、更なる増幅産物の少なくとも1つのサブセットが少なくとも2つのビーズのうちの更なるビーズに付着される、ステップと、（f）パーティションから更なるビーズを回収するステップと、（g）更なるビーズに付着される更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイして、核酸分子の配列を同定するステップとを更に含む。幾つかの実施形態では、核酸分子が二本鎖核酸分子で

40

50

ある。幾つかの実施形態では、核酸分子の第 1 鎖に対応する増幅産物が、ビーズに結合される複数のプライマー分子を使用して生成され、また、核酸分子の第 2 鎖に対応する増幅産物が、更なるビーズに結合される複数の更なるプライマー分子を使用して生成される。幾つかの実施形態において、(d) は、複数の増幅産物又はその誘導体の配列と会合されるペアエンド配列決定リードを生成するステップを更に含む。

【0009】

幾つかの実施形態において、複数のパーティションの少なくとも 80% のそれぞれは、複数のビーズのうちの 2 つ以上のビーズを含む。幾つかの実施形態において、複数のパーティションの少なくとも 85% のそれぞれは、複数のビーズのうちの 2 つ以上のビーズを含む。幾つかの実施形態において、複数のパーティションの少なくとも 90% のそれぞれは、複数のビーズのうちの 2 つ以上のビーズを含む。

10

【0010】

幾つかの実施形態において、複数のパーティションの少なくとも 80% のそれぞれは、複数のビーズのうちの 3 つ以上のビーズを含む。幾つかの実施形態において、複数のパーティションの少なくとも 85% のそれぞれは、複数のビーズのうちの 3 つ以上のビーズを含む。幾つかの実施形態において、複数のパーティションの少なくとも 90% のそれぞれは、複数のビーズのうちの 3 つ以上のビーズを含む。

【0011】

幾つかの実施形態では、少なくとも 2 つのビーズが互いに付着される。幾つかの実施形態において、少なくとも 2 つのビーズは、少なくとも 1 つの化学リンカーを介して互いに付着される。幾つかの実施形態において、少なくとも 2 つのビーズは、スプリントオリゴヌクレオチドを介して互いに付着される。

20

【0012】

幾つかの実施形態において、方法は、少なくとも 2 つのビーズをそれぞれが含む複数のパーティションのうちのパーティションを、多くとも 1 つのビーズをそれぞれが含む複数のパーティションのうちの他のパーティションから分離するステップを更に含む。幾つかの実施形態において、分離するステップは、それぞれが少なくとも 2 つのビーズを含むパーティション又はそれぞれが多くとも 1 つのビーズを含む他のパーティションを光学的に検出するステップと、光学的に検出するステップに少なくとも基づき、流体装置内の流体の流れの方向を調整して、流体装置の第 1 のチャンネル内に少なくとも 2 つのビーズをそれぞれが含むパーティションと、流体装置の第 2 のチャンネル内に多くとも 1 つのビーズをそれぞれが含む他のパーティションとを与えるステップとを含む。

30

【0013】

幾つかの実施形態において、1 つ以上の試薬は、プライミング配列を含む核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、プライミング配列を含む核酸分子は、固有分子識別子配列を更に含む。幾つかの実施形態において、プライミング配列を含む核酸分子は、バーコード配列を更に含む。幾つかの態様では、プライミング配列がターゲット特異的プライミング配列である。幾つかの態様では、プライミング配列が非ターゲット特異的プライミング配列である。

【0014】

幾つかの実施形態では、1 つ以上の試薬が 1 つ以上の重合酵素を含む。

40

【0015】

幾つかの実施形態では、核酸分子が細胞又は細胞の構成要素に由来する。

【0016】

幾つかの実施形態では、複数のパーティションが複数の液滴である。

【0017】

幾つかの実施形態において、(d) は、増幅産物又はその誘導体を配列決定するステップを含む。

【0018】

幾つかの実施形態では、(a) において、核酸分子がビーズに付着される。

50

【 0 0 1 9 】

他の態様では、核酸処理のための方法であって、(a) 複数のパーティションを与えるステップであって、複数のパーティションのうちの 1 つのパーティションが、(i) 複数のビーズのうちの少なくとも 2 つのビーズであって、少なくとも 2 つのビーズが互いに付着される、少なくとも 2 つのビーズと、(i i) 核酸分子と、(i i i) 1 つ以上の試薬とを含む、ステップと、(b) パーティションにおいて、核酸分子及び 1 つ以上の試薬を使用して、核酸分子の 1 つ以上の増幅産物を生成するステップであって、1 つ以上の増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが少なくとも 2 つのビーズのうちの 1 つのビーズに付着される、ステップとを含む方法が提供される。

【 0 0 2 0 】

10

幾つかの実施形態において、方法は、(c) パーティションからビーズを回収するステップと、(d) ビーズに付着される 1 つ以上の増幅産物のうちの 1 つの増幅産物又はその誘導体をアッセイして、核酸分子の配列を同定するステップとを更に含む。幾つかの実施形態において、(a) は、(i) 核酸分子を含む複数の核酸分子を含む第 1 の溶液、及び、(i i) 少なくとも 2 つのビーズを含む複数のビーズを含む第 2 の溶液を、第 1 の溶液及び第 2 の溶液と混和しない流体と接触させて、複数のパーティションを生成するステップを含む。

【 0 0 2 1 】

幾つかの実施形態において、ビーズには、核酸分子を使用して 1 つ以上の増幅反応を行なうための複数のプライマー分子が付着されてしまっており、(b) は、複数のプライマー分子のうちのプライマー分子を使用して、1 つ以上の増幅反応を行なって、1 つ以上の増幅産物のうちの増幅産物を生成するステップを含む。

20

【 0 0 2 2 】

幾つかの実施形態において、ビーズには、核酸分子を使用して 1 つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、これらの複数の更なるプライマー分子は複数のプライマー分子とは異なる。幾つかの実施形態において、(b) は、複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、1 つ以上の更なる増幅反応を行なって、1 つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップを更に含み、更なる増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットがビーズに付着され、(d) は、核酸分子の配列を同定するために、ビーズに付着される更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイするステップを更に含む。

30

【 0 0 2 3 】

幾つかの実施形態において、少なくとも 2 つのビーズのうちの更なるビーズには、核酸分子を使用して 1 つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、これらの複数の更なるプライマー分子は複数のプライマー分子とは異なる。幾つかの実施形態において、方法は、(e) 複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、1 つ以上の更なる増幅反応を行なって、1 つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップであって、更なる増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが少なくとも 2 つのビーズのうちの更なるビーズに付着される、ステップと、(f) パーティションから更なるビーズを回収するステップと、(g) 更なるビーズに付着される更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイして、核酸分子の配列を同定するステップとを更に含む。

40

【 0 0 2 4 】

他の態様では、核酸分子をクローン的に増幅するための方法であって、(a) (i) 複数の第 1 のプライマーが固定化されて成る表面であって、複数の第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性 (又は相同性) を有する表面と、(i i) 核酸分子であって、核酸分子が第 1 の配列の相補体とは異なる末端配列を含む、核酸分子と、(i i i) 第 1 の部分及び第 2 の部分を含む第 2 のプライマーであって、第 1 の部分が核酸分子にアニールするように構成され、第 2 の部分が伸長配列を含み、前記伸長配列又はその相補体が第 1 の配列とハイブリダイズするように構成される、第 2 のプライマーと、を含む反応混合

50

物を与えるステップと、(b) 核酸分子及び第2のプライマーを使用して伸長産物を生成するステップであって、伸長産物が伸長配列又はその相補体を含む、ステップと、(c) 表面に固定化される複数の第1のプライマーを使用して伸長産物を増幅するステップとを含む方法が提供される。

【0025】

幾つかの態様では、第2のプライマーが表面に固定化される。

【0026】

幾つかの実施形態において、核酸分子は、(b)の前に複数の第1のプライマーとハイブリダイズしない。

【0027】

幾つかの実施形態では、表面が増幅部位のアレイを含み、増幅部位のアレイは、それに固定化される第1のプライマーの複数のセットを含み、第1のプライマーの複数のセットが第1の配列に対して配列相同性を有する。幾つかの実施形態において、核酸分子は、反応混合物中の増幅部位のアレイに流体アクセスできる。幾つかの実施形態において、増幅部位のアレイの各増幅部位は、その表面に固定化された第1のプライマーの複数のセットのうちの第1のプライマーの1つのセットを含む。

【0028】

幾つかの実施形態では、表面がビーズである。

【0029】

幾つかの実施形態において、反応混合物は、エマルジョンのある量の分散相に与えられる。幾つかの実施形態において、エマルジョンは、第2の表面を含む第2の反応混合物を含む第2の量の分散相を含む。

【0030】

幾つかの実施形態では、(b)及び(c)が反応混合物中で行なわれる。

【0031】

幾つかの実施形態では、反応混合物が複数の核酸分子を含み、複数の核酸分子は、異なる核酸配列を含む核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、複数の核酸分子のそれぞれは、第2のプライマーに結合して伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するように構成される。

【0032】

幾つかの実施形態において、方法は、複数の反応混合物を含む複数のパーティションを与えるステップを更に含み、複数のパーティションは、(i)核酸分子を含む複数の核酸分子と、(ii)表面を含む複数の表面とを含み、複数のパーティションのうちの第1のパーティションが反応混合物を含み、複数のパーティションのうちの第2のパーティションは、複数の核酸分子のうちの第2の核酸分子と複数の表面のうちの第2の表面とを含む。幾つかの実施形態において、複数の核酸分子は、複数のパーティション間において、複数のパーティションにおいて1パーティション当たり平均1核酸分子よりも大きい密度で分布される。

【0033】

幾つかの実施形態では、反応混合物が第3の核酸分子及び更なる第2のプライマーを含み、第2の核酸分子が更なる第2のプライマーに結合する前に、核酸分子又はその誘導体が複数の第1のプライマーの少なくとも99%に結合される。

【0034】

幾つかの実施形態において、(c)は、(b)の速度よりも少なくとも10倍速い速度で行なわれる。

【0035】

幾つかの実施形態では、核酸分子が一本鎖である。

【0036】

幾つかの実施形態において、第2のプライマーは、(c)の速度に対して(b)の速度を制限する所定の濃度を反応混合物において有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

幾つかの実施形態において、反応混合物は、表面に固定化されない更なる第 1 のプライマーを更に含み、更なる第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性を有する。

【 0 0 3 8 】

幾つかの実施形態において、反応混合物は、第 1 のプライマー又は第 2 のプライマーとのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 反応で使用されるときに核酸分子を指数関数的に増幅するように構成される複数の第 3 のプライマーを更に含む。幾つかの実施形態では、反応混合物が第 4 のプライマーを更に含み、第 4 のプライマーが第 3 の部分及び第 4 の部分を有し、第 3 の部分が核酸分子にアニールするように構成され、第 2 の部分が第 2 の伸長配列を含む。

10

【 0 0 3 9 】

幾つかの実施形態において、方法は、(d) 核酸分子及び第 4 のプライマーを使用して第 2 の伸長産物を生成するステップであって、第 2 の伸長が、第 3 のプライマーとハイブリダイズするように構成される第 2 の伸長配列又はその相補体を含む、ステップと、(e) 複数の第 3 プライマーを用いて第 2 の伸長産物を増幅するステップとを更に含む。幾つかの実施形態において、核酸分子は、(d) の前に複数の第 3 のプライマーのうちの 1 つの第 3 のプライマーとハイブリダイズしない。幾つかの実施形態において、複数の第 3 のプライマーの濃度は、反応混合物中の第 4 のプライマーの濃度より少なくとも 1 0 倍高い。

【 0 0 4 0 】

幾つかの実施形態では、反応混合物が核酸ポリメラーゼを更に含む。

20

【 0 0 4 1 】

幾つかの実施形態では、(b) が等温条件下で行なわれる。

【 0 0 4 2 】

幾つかの実施形態では、(c) が等温条件下で行なわれる。

【 0 0 4 3 】

幾つかの実施形態において、方法は、表面を回収するステップを更に含む。

【 0 0 4 4 】

幾つかの実施形態において、方法は、核酸分子の増幅産物又はその誘導体をアッセイして核酸分子の配列を同定するステップを更に含む。

【 0 0 4 5 】

幾つかの実施形態において、核酸分子は、核酸分子の 5 ' 末端に付着される第 1 のアダプターと、核酸分子の 3 ' 末端に付着される第 2 のアダプターとを含む。幾つかの実施形態では、第 1 のアダプター及び第 2 のアダプターが同一の配列を有する。

30

【 0 0 4 6 】

幾つかの実施形態において、方法は、(b) を (c) に対してより遅い及び / 又はより稀な事象にする条件に反応混合物を供するステップを更に含む。幾つかの実施形態では、条件が温度を含む。幾つかの実施形態において、温度は、核酸分子と第 2 のプライマーとの間のアニリング温度にほぼ等しい。

【 0 0 4 7 】

他の態様では、核酸分子をクローン的に増幅するためのシステムであって、(i) 複数の第 1 のプライマーが固定化されて成る表面であって、複数の第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性 (又は相同性) を有する表面と、(i i) 核酸分子であって、核酸分子が第 1 の配列の相補体とは異なる末端配列を含む、核酸分子と、(i i i) 第 1 の部分及び第 2 の部分を含む第 2 のプライマーであって、第 1 の部分が核酸分子にアニールするように構成され、第 2 の部分が伸長配列を含み、伸長配列又はその相補体が第 1 の配列とハイブリダイズするように構成される、第 2 のプライマーと、(i v) 核酸分子を使用して核酸伸長反応を行なうように構成される試薬とを含む反応混合物を含む、システムが提供される。

40

【 0 0 4 8 】

幾つかの実施形態では、核酸分子が一本鎖である。

50

【 0 0 4 9 】

幾つかの実施形態において、第 2 のプライマーは、核酸分子に結合して、第 1 の配列とハイブリダイズするように構成される伸長配列又は相補体を含む伸長産物を生成するように構成される。

【 0 0 5 0 】

幾つかの実施形態では、伸長産物が反応混合物中で生成され得る。幾つかの実施形態では、伸長産物が等温条件下で生成され得る。幾つかの実施形態において、伸長産物又はその増幅産物は、表面に固定化される複数の第 1 のプライマーに結合するように構成される。幾つかの実施形態において、伸長産物又はその増幅産物は、反応混合物内で表面に固定化される複数の第 1 のプライマーに結合するように構成される。幾つかの実施形態において、伸長産物の増幅産物は、等温条件下で生成するように構成される。幾つかの実施形態では、反応混合物が第 2 の核酸分子及び更なる第 2 のプライマーを含み、第 2 の核酸分子が更なる第 2 のプライマーに結合する前に、核酸分子又はその誘導体が複数の第 1 のプライマーの少なくとも 99% に結合するように構成される。

10

【 0 0 5 1 】

幾つかの実施形態において、第 2 のプライマーは、核酸分子が第 2 のプライマーに結合して伸長産物を生成する速度を、伸長産物が表面上で増幅される速度に対して制限する所定の濃度を反応混合物において有する。

【 0 0 5 2 】

幾つかの態様では、第 2 のプライマーが表面に固定化される。

20

【 0 0 5 3 】

幾つかの実施形態では、表面が増幅部位のアレイを含み、増幅部位のアレイは、それに固定化される第 1 のプライマーの複数のセットを含み、第 1 のプライマーの複数のセットが第 1 の配列に対して配列同一性を有する。幾つかの実施形態において、核酸分子は、反応混合物中の増幅部位のアレイに流体アクセスできる。幾つかの実施形態において、増幅部位のアレイの各増幅部位は、その表面に固定化された第 1 のプライマーの複数のセットのうちの第 1 のプライマーの 1 つのセットを含む。

【 0 0 5 4 】

幾つかの実施形態では、表面がビーズである。

【 0 0 5 5 】

幾つかの実施形態では、システムがエマルジョンを更に含み、反応混合物がエマルジョンのある量の分散相に与えられる。幾つかの実施形態において、エマルジョンは、第 2 の表面を含む第 2 の反応混合物を含む第 2 の量の分散相を含む。

30

【 0 0 5 6 】

幾つかの実施形態では、反応混合物が複数の核酸分子を含み、複数の核酸分子は、異なる核酸配列を含む核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、複数の核酸分子のそれぞれは、第 2 のプライマーに結合して伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するように構成される。

【 0 0 5 7 】

幾つかの実施形態において、システムは、複数の反応混合物を含む複数のパーティションを更に含み、複数のパーティションは、(i) 核酸分子を含む複数の核酸分子と、(i i) 表面を含む複数の表面とを含み、複数のパーティションのうちの第 1 のパーティションが反応混合物を含み、複数のパーティションのうちの第 2 のパーティションは、複数の核酸分子のうちの第 2 の核酸分子と複数の表面のうちの第 2 の表面とを含む。幾つかの実施形態において、複数の核酸分子は、複数のパーティション間において、複数のパーティションにおいて 1 パーティション当たり平均 1 核酸分子よりも大きい密度で分布される。

40

【 0 0 5 8 】

前記反応混合物は、表面に固定化されない更なる第 1 のプライマーを更に含む。

【 0 0 5 9 】

幾つかの実施形態において、反応混合物は、第 1 のプライマー又は第 2 のプライマーと

50

のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）反応で使用されるときに核酸分子を指数関数的に増幅するように構成される複数の第3のプライマーを更に含む。幾つかの実施形態では、反応混合物が第4のプライマーを更に含み、第4のプライマーが第3の部分及び第4の部分を有し、第3の部分が核酸分子にアニールするように構成され、第4の部分が第2の伸長配列を含む。

【0060】

幾つかの実施形態において、システムは、核酸分子の配列を同定するために核酸分子の増幅産物又はその誘導体をアッセイするように構成される1つ以上のプロセッサを個別に又は集合的に更に備える。

【0061】

幾つかの実施形態では、表面が複数の増幅部位を含み、増幅部位のそれぞれが表面に付着される異なる第1のプライマーの複数のコピーを有する。

【0062】

幾つかの実施形態において、核酸分子は、核酸分子の5'末端に付着される第1のアダプターと、核酸分子の3'末端に付着される第2のアダプターとを含む。幾つかの実施形態では、第1のアダプター及び第2のアダプターが同一の配列を有する。

【0063】

他の態様では、核酸サンプルをクローン的に増幅するための方法であって、(a)複数のパーティションを含むエマルジョンを形成するステップであって、複数のパーティションのうちの1つのパーティションが、(i)核酸分子と、(ii)複数の第1のプライマーが固定化されて成るビーズであって、複数の第1のプライマーが第1の配列に対して配列同一性（又は相同性）を有する、ビーズと、(iii)核酸分子又はその誘導体がビーズに付着できるようにする付着反応と複数の第1のプライマーを使用する増幅反応とを実行するように構成される試薬混合物を含む、ステップと、(b)エマルジョンをインキュベートし、それにより、(i)核酸分子又はその誘導体をビーズに付着させるために付着反応を実行する、及び、(ii)増幅反応を行なって、ビーズに付着される核酸分子又はその誘導体のコピーを生成する、ステップとを含み、第1の期間が第2の期間よりも長く、第1の期間は、(b)でのインキュベートするステップから始まるとともに、核酸分子又はその誘導体がビーズに付着するときに終了し、第2の期間は、核酸分子又はその誘導体がビーズに付着するときに始まるとともに、増幅反応が終了するときに終了する、方法が提供される。

【0064】

幾つかの実施形態において、第1の期間は、第2の期間よりも少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、又は、少なくとも約100倍長い。

【0065】

幾つかの態様において、(b)でのインキュベートするステップは、エマルジョンを少なくとも2つの異なる条件に供するステップを含む。幾つかの実施形態において、エマルジョンは、(i)第1の期間にわたる少なくとも2つの異なる条件のうちの第1の条件、及び、(ii)第2の期間にわたる少なくとも2つの異なる条件のうちの第2の条件に供される。

【0066】

幾つかの実施形態において、(b)でのインキュベートするステップは、エマルジョンが付着反応を開始させるのに十分な条件に供されるときに始まる。幾つかの実施形態において、条件は、温度、圧力、試薬の濃度、電場、磁場、及び、放射線への曝露からなるグループから選択される。

【0067】

幾つかの実施形態では、核酸分子が試薬混合物に溶解され、試薬混合物がビーズと接触している。

【0068】

10

20

30

40

50

幾つかの実施形態において、核酸分子は、エマルジョンのインキュベーションの前にビーズに付着することができない。

【0069】

幾つかの実施形態において、核酸分子は、エマルジョンのインキュベーションの前に第1のプライマーとハイブリダイズしない。

【0070】

幾つかの実施形態では、付着反応がライゲーション反応である。

【0071】

幾つかの実施形態では、付着反応がプライマー伸長反応である。

【0072】

幾つかの実施形態において、第1の部分及び第2の部分を含む試薬混合物、第2のプライマー、第1の部分は核酸分子にアニーリングし、第2の部分は伸長配列を含む。

【0073】

幾つかの実施形態では、第2のプライマーがビーズに付着される。幾つかの実施形態において、付着反応は、第2のプライマー及び核酸分子を使用して伸長産物を生成し、該産物は、第1の配列とハイブリダイズするように構成される伸長配列又はその相補体を含む。幾つかの実施形態において、増幅反応は、ビーズに固定化される複数の第1のプライマーを使用して伸長産物を増幅する。幾つかの実施形態において、第2のプライマーは、第1の期間が第2の期間よりも長くなるように所定の濃度を有する。幾つかの実施形態において、エマルジョンは、第1のプライマー又は第2のプライマーとのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）反応で使用されるときに核酸分子を指数関数的に増幅できる複数の第3のプライマーを更に含む。

【0074】

幾つかの実施形態において、増幅反応は、ビーズに付着される複数の第1のプライマーの少なくとも99%が伸長産物又はその誘導体に結合されるときに終了する。

【0075】

幾つかの実施形態において、エマルジョンは、複数のパーティション間において、複数のパーティションにおける1パーティション当たり平均1核酸分子よりも大きい密度で分布される、核酸分子を含む核酸分子のライブラリーを含む。幾つかの実施形態において、核酸分子のライブラリーの各核酸分子は、第2のプライマーに結合できる。

【0076】

幾つかの実施形態では、複数のパーティションのうちのパーティションが複数の核酸分子を含み、複数の核酸分子が核酸分子を含む。幾つかの実施形態において、核酸分子は、第2の核酸分子がビーズに付着する前に付着反応及び増幅反応を完了する。

【0077】

幾つかの実施形態では、核酸分子が一本鎖である。

【0078】

幾つかの実施形態において、エマルジョンは、ビーズに付着されない更なる第1のプライマーを更に含む。

【0079】

幾つかの実施形態では、エマルジョンが核酸ポリメラーゼを更に含む。

【0080】

幾つかの実施形態では、伸長反応が等温条件下で行なわれる。

【0081】

幾つかの実施形態では、増幅反応が等温条件下で行なわれる。

【0082】

幾つかの実施形態において、方法は、エマルジョンからビーズを回収するステップを更に含む。

【0083】

幾つかの実施形態において、方法は、核酸分子の増幅産物又はその誘導体をアッセイし

10

20

30

40

50

て核酸分子の配列を同定するステップを更に含む。

【0084】

幾つかの実施形態において、試薬混合物は、増幅反応が進行できるようにするべく付着反応の前に伸長反応を行なうように更に構成される。幾つかの態様において、伸長反応は第3の期間において行なわれ、この第3の期間は、エマルジョンがインキュベーションを開始するときに始まり、増幅反応が開始するときに終了する。幾つかの実施形態では、第3の期間が第1の期間と同時に起こる。幾つかの実施形態では、第3の期間が第2の期間の前に起こる。

【0085】

本開示の他の態様は、核酸分子に付着するように構成される担体を調製するための方法であって、(a)複数の担体及び複数の伸長基を含む混合物を与えるステップであって、複数の担体のうちの1つの担体が第1のプライマーを含み、複数の伸長基のうちの1つの伸長基が伸長プライマー分子を含む、ステップと、(b)担体の第1のプライマーを伸長基の伸長プライマーに付着させるのに十分な条件に混合物を供して、(i)複数の伸長基と会合されない非伸長担体と、(ii)伸長基と会合される伸長担体及びキャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成されるキャプチャエンティティを含む、結果として生じる混合物を生成するステップであって、伸長担体が、伸長プライマー分子の配列に対して相補的な配列を含む第2のプライマーを含む、ステップと、(c)キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップとを含む方法を提供する。

【0086】

幾つかの実施形態において、本方法は、伸長担体から伸長基を解離させるステップを更に含む。幾つかの実施形態では、解離するステップが融解を含む。幾つかの実施形態において、方法は、核酸分子を第2のプライマーにアニーリングして鑄型付着担体を生成するステップを更に含む。幾つかの実施形態において、方法は、鑄型付着担体をパーティションで仕切るステップを更に含む。幾つかの実施形態において、方法は、増幅反応を行なって、核酸分子の複数の増幅産物を伸長担体に固定化するステップを更に含む。

【0087】

幾つかの実施形態では、担体がビーズを含む。幾つかの実施形態では、担体が複数の第1のプライマーを含み、複数の第1のプライマーが第1のプライマーを含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティがビオチンを含み、キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列を含み、キャプチャリングエンティティがキャプチャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含む。

【0088】

幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが磁性粒子を含み、キャプチャリングエンティティが磁場系を含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが荷電粒子を含み、キャプチャリングエンティティが電場系を含む。

【0089】

幾つかの実施形態では、(a)において、伸長基がキャプチャエンティティを含む。

【0090】

幾つかの実施形態において、(b)は、キャプチャエンティティを含むヌクレオチドを組み入れるために第1のプライマーを使用して伸長反応を行なうステップを含む。

【0091】

幾つかの実施形態において、キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップは、(i)キャプチャリングエンティティ及び(ii)二次キャプチャリングエンティティにより捕捉するように構成される二次キャプチャエンティティを含むキャプチャリング基を与えるステップと、キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによってキャプチャリング基を伸長担体と会合させるステップと、二

10

20

30

40

50

次キャプチャリングエンティティを使用して二次キャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップとを含む。

【0092】

幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティがビオチンを含み、二次キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティがキャプチャ配列を含み、二次キャプチャリングエンティティがキャプチャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティが磁性粒子を含み、二次キャプチャリングエンティティが磁場系を含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティが荷電粒子を含み、二次キャプチャリングエンティティが電場系を含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャリングエンティティが複数の伸長担体を捕捉し、複数の伸長担体が伸長担体を含む。幾つかの実施形態において、方法は、キャプチャ基を伸長担体から解離させるステップを更に含む。

10

【0093】

他の態様において、本開示は、核酸分子に付着するように構成される担体を調製するための方法であって、(a)複数の非伸長担体と複数の伸長担体とを含む混合物を与えるステップであって、複数の非伸長担体のうちの1つの非伸長担体がプライマー配列を含まず、複数の伸長担体のうちの1つの伸長担体がプライマー配列を含み、プライマー配列が核酸分子に付着するように構成される、ステップと、(b)(i)キャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成されるキャプチャエンティティ、及び、(ii)伸長担体のプライマー配列及びキャプチャ基の配列を使用して伸長担体をキャプチャ基と会合させるべくプライマー配列を混合物に付着させるように構成される配列を含む、キャプチャ基を与えるステップと、(c)キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップとを含む方法を提供する。

20

【0094】

幾つかの実施形態において、方法は、キャプチャ基を伸長担体から解離させるステップを更に含む。幾つかの実施形態では、解離させるステップが融解を含む。

【0095】

幾つかの実施形態において、方法は、キャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離した後に、キャプチャリングエンティティを使用して核酸分子をプライマー配列に付着させるステップを更に含む。幾つかの実施形態では、伸長担体がビーズを含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティがビオチンを含み、キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含む。

30

【0096】

幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列を含み、キャプチャリングエンティティがキャプチャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが磁性粒子を含み、キャプチャリングエンティティが磁場系を含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが荷電粒子を含み、キャプチャリングエンティティが電場系を含む。

【0097】

他の態様において、本開示は、担体を調製するための方法であって、(a)複数の担体及び複数の鋳型核酸分子を含む混合物を与えるステップであって、複数の担体のうちの1つの担体が複数のプライマーを含み、複数の鋳型核酸分子のうちの1つの鋳型核酸分子が、(i)複数のプライマーのうちの1つのプライマーに付着するように構成されるアダプター、及び、(ii)それに結合されるキャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成されるキャプチャエンティティを含む、ステップと、(b)担体のプライマーを鋳型核酸分子のアダプターに付着させるのに十分な条件に混合物を供して、(i)複数の鋳型核酸分子と会合されない非伸長担体と、(ii)鋳型核酸分子に結合されるキャプチャエンティティと会合される伸長担体とを含む結果として生じる混合物を生成するステップであって、伸長担体が、鋳型核酸分子の配列に対して相補的な配列を含む核酸分子を

40

50

含み、伸長担体上の複数のプライマーの少なくとも50%が複数の鋳型核酸分子と会合されない、ステップと、(c)キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップとを含む方法を提供する。

【0098】

他の態様において、本開示は、担体を調製するための方法であって、(a)複数の担体及び複数の鋳型核酸分子を含む混合物を与えるステップであって、複数の担体のうちの1つの担体が複数のプライマーを含み、複数の鋳型核酸分子のうちの1つの鋳型核酸分子が、複数のプライマーのうちの1つのプライマーに付着するように構成されるアダプターを含む、ステップと、(b)担体のプライマーを鋳型核酸分子のアダプターに付着させるのに十分な条件に混合物を供して、(i)複数の鋳型核酸分子と会合されない非伸長担体と、(ii)鋳型核酸分子に結合されるキャプチャエンティティと会合される伸長担体とを含む結果として生じる混合物を生成するステップであって、キャプチャエンティティがキャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成され、伸長担体が、鋳型核酸分子の配列に対して相補的な配列を含む核酸分子を含み、伸長担体上の前記複数のプライマーの少なくとも50%が前記複数の鋳型核酸分子と会合されない、ステップと、(c)キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップと、(d)複数の伸長担体を複数の液滴に分割するステップであって、複数の伸長担体が伸長担体を含み、複数の液滴のうちの1つの液滴が伸長担体を含む、ステップとを含む方法を提供する。

【0099】

幾つかの実施形態において、伸長担体上の複数のプライマーの少なくとも80%は、複数の鋳型核酸分子と会合されない。幾つかの実施形態において、伸長担体上の複数のプライマーの少なくとも90%は、複数の鋳型核酸分子と会合されない。幾つかの実施形態において、伸長担体上の複数のプライマーの少なくとも95%は、複数の鋳型核酸分子と会合されない。幾つかの実施形態において、伸長担体上の複数のプライマーの少なくとも99%は、複数の鋳型核酸分子と会合されない。

【0100】

幾つかの実施形態において、方法は、鋳型核酸分子を伸長担体から解離させるステップを更に含む。幾つかの実施形態では、解離させるステップが融解を含む。幾つかの実施形態では、担体がビーズを含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティがピオチンを含み、キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列を含み、キャプチャリングエンティティがキャプチャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが磁性粒子を含み、キャプチャリングエンティティが磁場系を含む。幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが荷電粒子を含み、キャプチャリングエンティティが電場系を含む。

【0101】

幾つかの実施形態において、キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップは、(i)キャプチャリングエンティティ及び(ii)二次キャプチャリングエンティティにより捕捉するように構成される二次キャプチャエンティティを含むキャプチャリング基を与えるステップと、キャプチャリングエンティティを使用してキャプチャエンティティを捕捉することによってキャプチャリング基を伸長担体と会合させるステップと、二次キャプチャリングエンティティを使用して二次キャプチャエンティティを捕捉することによって結果として生じる混合物から伸長担体を単離するステップとを含む。

【0102】

幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティがピオチンを含み、二次キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティがキャプチャ配列を含み、二次キャプチャリングエンティティがキャプ

チャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャエンティティが磁性粒子を含み、二次キャプチャリングエンティティが磁場系を含む。

【0103】

幾つかの実施形態では、キャプチャエンティティが荷電粒子を含み、二次キャプチャリングエンティティが電場系を含む。幾つかの実施形態では、二次キャプチャリングエンティティが複数の伸長担体を捕捉し、複数の伸長担体が伸長担体を含む。幾つかの実施形態において、方法は、キャプチャ基を伸長担体から解離するステップを更に含む。

【0104】

幾つかの実施形態では、(a)において、鋳型核酸分子がキャプチャエンティティを含む。

【0105】

幾つかの実施形態において、(b)は、キャプチャエンティティを含むヌクレオチドを組み入れるためにプライマーを使用して伸長反応を行なうステップを含む。

【0106】

幾つかの実施形態において、液滴は、複数の伸長担体のうちの単一の伸長担体を含み、単一の伸長担体が伸長担体である。幾つかの実施形態では、複数の液滴の占有液滴の大部分が、複数の伸長担体のうちの単一の伸長担体を含む。幾つかの実施形態では、複数の液滴が非占有液滴を含み、非占有液滴が複数の伸長担体のいずれの伸長担体も含まない。

【0107】

幾つかの実施形態において、(d)は、混合物を分割するステップであって、混合物が複数の伸長担体を含み、混合物が非伸長担体よりも多くの伸長担体を含む、ステップを含む。幾つかの実施形態では、混合物中の実質的に全ての担体が伸長担体である。

【0108】

本開示の他の態様は、1つ以上のコンピュータプロセッサによる実行時に、先に記載された又は本明細書中の他の場所で説明された方法のいずれかを実施する機械実行可能なコードを含む持続性コンピュータ可読媒体を提供する。

【0109】

本開示の他の態様は、1つ以上のコンピュータプロセッサ及びそれに結合されるコンピュータメモリを備えるシステムを提供する。コンピュータメモリは、1つ以上のコンピュータプロセッサによる実行時に、先の又は本明細書中の他の場所の方法のいずれかを実施する機械実行可能コードを含む。

【0110】

本開示の更なる態様及び利点は、本開示の単なる例示的な実施形態が示されて記載されるにすぎない以下の詳細な説明から当業者に容易に明らかになる。理解されるように、本開示は、他の異なる実施形態が可能であり、その幾つかの詳細は、全てが本開示から逸脱することなく、様々な自明な点で変更が可能である。したがって、図面及び説明は、本質的に例示と見なされるべきであり、限定的であると見なされるべきでない。

【0111】

参照による組み入れ

この明細書中で言及される全ての刊行物、特許、及び、特許出願は、あたかもそれぞれの個々の刊行物、特許、又は、特許出願が参照により組み入れられるべく具体的に且つ個別に示唆されたと同じ程度に参照により本願に組み入れられる。参照により組み入れられる刊行物及び特許又は特許出願が明細書中に含まれる開示と矛盾する程度まで、明細書は、任意のそのような矛盾する資料よりも優先する及び/又は優ることを意図している。

【0112】

本発明の新規の特徴が添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本発明の特徴及び利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明及び添付図面(本明細書中の「図」及び「FIG」も)を参照することによって得られ、添付図面は以下の通りである。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

【図 1】一般的な次世代配列決定 (NGS) 手法の概略図を描き、遺伝物質が分析から逃れる可能性がある状況を示し、及び/又は、ワークフローに存在し得る潜在的なノイズ源及び突然変異を表わす。

【図 2】一般的な NGS 手法の概略図を描き、分析ワークフローに対する修正が収率 (例えば、分析された生体サンプルから得られる情報の量) を増大させ、核酸分析中のノイズ及び突然変異の確率を低下させ得る状況を示す。

【図 3】パーティションのシングルビーズ (左図) 及びマルチビーズ (右図) 装填の比較を示す。図に示されるように、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応 (emPCR 又は ePCR) 中の液滴 (又はウェルなどの他のパーティション) のマルチビーズ装填は、ePCR ワークフローにおけるサンプル材料 (例えば、ゲノム材料) の損失を有意に減少させることができ、その結果、シングルビーズ装填 (左の図) を伴う方法と比較して、配列分析中のノイズを低減しながら、試薬の精度及び利用を改善し得る。

【図 4】コード鎖及び逆相補鎖の読み取り (例えば、ペアエンド配列リードの生成) などの更なる手段を核酸分析ワークフローに組み込むことによって配列分析におけるノイズが更に低減され得ることを示す。

【図 5 A】液滴装填、L droplet 及び掃引 ($F_{split} = 50\%$ 、 $F_{seq} = 100\%$) についてのリード対合結果を示す。

【図 5 B】液滴装填、L droplet 及び掃引 ($F_{split} = 50\%$ 、 $F_{seq} = 100\%$) についてのリード対合結果を示す。

【図 6】本明細書中で与えられる方法を実施するようにプログラムされる或いはさもなければ構成されるコンピュー制御システムを示す。

【図 7】異なるアダプター配列が隣接する生体サンプル (核酸分子 5) の概略図を示す。アダプター A はプライマー A (1 - 7) 及びプライマー A' (703) を含み、アダプター B はプライマー B (4 - 7) 及びプライマー B' (702) を含む。

【図 8】二種類のビーズ (806) の概略図を示す。ビーズの 1 つのタイプは、固定化プライマー A (1 - 8) 又はそのフラグメントもしくは部分を含む。1 つのタイプのビーズは、固定化されたプライマー B (4 - 8) 又はそのフラグメントもしくは部分を含む。

【図 9】鋳型装填及び配列決定のそれぞれのためのビーズの第 1 及び第 2 のセットを含むワークフローを示す。

【図 10 A】ビーズ及び鋳型の両方に関してポアソン装填により制限される ePCR 法を示す。

【図 10 B】ビーズに関してポアソン装填により制限されるがポアソン分布よりも大きい鋳型の密度を達成する ePCR 法を示す。

【図 10 C】ポアソン分布よりも大きい鋳型の密度及びビーズの密度を達成する ePCR 法を示す。

【図 11】ePCR 方法の一例を示す。

【図 12】ポリクローナルビーズをもたらす ePCR 法の一例を示す。

【図 13】本開示の ePCR 方法の一例を示す。

【図 14】複数の鋳型を有する本開示の ePCR 方法の一例を示す。

【図 15 A】本開示の ePCR 方法の更なる詳細を示す。

【図 15 B】本開示の ePCR 方法の更なる詳細を示す。

【図 15 C】本開示の ePCR 方法の更なる詳細を示す。

【図 16 A】本開示の ePCR 方法の更なる詳細を示す。

【図 16 B】本開示の ePCR 方法の更なる詳細を示す。

【図 17 A】開放表面上で実行される本開示の方法を示す。

【図 17 B】開放表面上で実行される本開示の方法を示す。

【図 17 C】開放表面上で実行される本開示の方法を示す。

【図 17 D】開放表面上で実行される本開示の方法を示す。

【図 18 A】第 2 のプライマーが表面に付着される本開示の一実施形態を示す。

【図 1 8 B】第 2 のプライマーが表面に付着される本開示の一実施形態を示す。

【図 1 8 C】表面上のコロニー位置のそれぞれが異なる第 1 のプライマーを有する本開示の一実施形態を示す。

【図 1 8 D】表面上のコロニー位置のそれぞれが異なる第 1 のプライマーを有する本開示の一実施形態を示す。

【図 1 8 E】表面上のコロニー位置のそれぞれが異なる第 1 のプライマーを有する本開示の一実施形態を示す。

【図 1 9 A】第 2 の遅い伸長ステップを含む本開示の一実施形態を示す。

【図 1 9 B】第 2 の遅い伸長ステップを含む本開示の一実施形態を示す。

【図 1 9 C】第 2 の遅い伸長ステップを含む本開示の一実施形態を示す。

【図 1 9 D】第 2 の遅い伸長ステップを含む本開示の一実施形態を示す。

【図 2 0】アダプターが鋳型核酸分子の各末端に付着される例を示す。

【図 2 1】伸長担体を生成する一例を示す。

【図 2 2 A】磁力を加えることによって伸長担体を溶液から分離する例を示す。

【図 2 2 B】磁力を加えることによって伸長担体を溶液から分離する例を示す。

【図 2 3】磁力を加えることによって伸長担体を溶液から分離する別の例を示す。

【図 2 4 A】複数の予め濃縮された担体を生成するための予濃縮方法の一例を示す。

【図 2 4 B】複数の予め濃縮された担体を生成するための予濃縮方法の一例を示す。

【図 2 5】予濃縮手順を使用する増幅の結果を示す。

【図 2 6】異なる伸長プライマー入力濃度で捕捉された濃縮ビーズの存在を示す。

【図 2 7】異なる伸長プライマー入力濃度での濃縮ビーズにおける伸長プライマー配列の存在を示す。

【図 2 8】異なる伸長プライマー入力濃度での増幅ビーズの存在を示す。

【図 2 9】異なる伸長プライマー入力濃度での増幅ビーズにおけるポリクロナリティを示す。

【発明を実施するための形態】

【0 1 1 4】

本発明の様々な実施形態を本明細書中で示して説明してきたが、当業者に明らかなように、そのような実施形態は単なる一例として与えられる。本発明から逸脱することなく、多くの変形、変更、及び、置換は当業者に想起し得る。本明細書中に記載される発明の実施形態の様々な代替案を使用できることが理解されるべきである。

【0 1 1 5】

値が範囲として記載されている場合、そのような開示は、特定の数値又は特定の部分範囲が明示的に記載されているかどうかにかかわらず、そのような範囲内の全ての可能な部分範囲並びにそのような範囲内に入る特定の数値の開示を含むことが理解される。

【0 1 1 6】

範囲は、本明細書中では、「約」1つの特定の値から、及び/又は、「約」別の特定の値までとして表現され得る。「約 (about)」及び「およそ (approximately)」という用語は、一般に、所定の値又は値の範囲に対する許容可能な誤差又は変動の程度、例えば、所定の値又は値の範囲の 20 パーセント (%) 以内、15 % 以内、10 % 以内、又は、5 % 以内の誤差又は変動の程度を意味するものとする。

【0 1 1 7】

本明細書中で使用される「増幅」という用語は、一般に、核酸分子又は伸長産物 (例えば、核酸分子上のプライマー伸長反応の産物) の 1 つ以上のコピーの産生を指す。核酸分子の増幅は、核酸分子にハイブリダイズした一本鎖又は核酸分子もしくはその相補体の複数のコピーを生じ得る。アンプリコンは、出発鋳型核酸分子から増幅手順によって生成される一本鎖又は二本鎖核酸分子であってもよい。アンプリコンは、その少なくとも一部が出発鋳型の少なくとも一部と実質的に同一又は実質的に相補的であってもよい核酸鎖を含み得る。出発鋳型が二本鎖核酸分子である場合、アンプリコンは、一方の鎖の少なくとも一部と実質的に同一であり、いずれかの鎖の少なくとも一部と実質的に相補的である核酸

10

20

30

40

50

鎖を含み得る。アンプリコンは、最初の鋳型が一本鎖であるか二本鎖であるかにかかわらず、一本鎖又は二本鎖であり得る。増幅反応は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、例えばエマルジョンポリメラーゼ連鎖反応（ePCR；例えば、ウェル又は液滴などのマイクロリアクタ内で行なわれるPCR）であってもよい。

【0118】

本明細書で使用される「変性」という用語は、一般に、二本鎖分子（例えば、DNA）の一本鎖分子への分離を指す。変性は、完全又は部分的な変性であってもよい。部分変性では、DNA中の二本鎖領域に隣接する2本のデオキシリボ核酸（DNA）鎖の変性によって、二本鎖分子内に一本鎖領域が形成され得る。

【0119】

本明細書で使用される「クローン」という用語は、一般に、そのメンバーのかなりの部分（例えば、50%、60%、70%、80%、90%、95%、又は99%超）が実質的に同一の配列を有する核酸の集団を指す。核酸分子のクローン集団のメンバーは、互いに配列相同性を有し得る。幾つかの例において、そのようなメンバーは、鋳型核酸分子に対して配列相同性を有し得る。幾つかの例では、そのようなメンバーは、鋳型核酸分子の相補体（一本鎖の場合）に対して配列相同性を有し得る。クローン集団のメンバーは、二本鎖又は一本鎖であってもよい。集団のメンバーは、例えば、合成の過程で「エラー」が起こり得、所定の集団の少数が集団の大部分と配列相同性を有さないため、100%同一又は相補的ではない場合がある。例えば、集団のメンバーの少なくとも50%は、互いに又は参照核酸分子（すなわち、配列比較の基礎として使用される定義された配列の分子）と実質的に同一であってもよい。集団のメンバーの少なくとも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%、少なくとも99%、又はそれ以上が、参照核酸分子と実質的に同一であってもよい。2つの分子間の同一性パーセントが少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.9%又はそれを超える場合、2つの分子は実質的に同一（又は相同）であると見なされ得る。2つの分子間の相補性パーセントが少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.9%又はそれを超える場合、2つの分子は実質的に相補的であると見なされ得る。非相同核酸の混合は低レベル又はわずかなレベルで起こり得るものであり、したがってクローン集団は少数（例えば30%未満、例えば10%未満）の多様な核酸を含み得る。

【0120】

本明細書で使用される「相補的配列」という用語は、一般に、別の配列にハイブリダイズするか又はそのような他の配列と配列相補性を有する配列を指す。2つの一本鎖核酸分子間のハイブリダイゼーションは、特定の条件下で安定な二本鎖構造の形成を含み得る。2つの一本鎖ポリヌクレオチドは、それらが2つ以上の連続的に隣接する塩基対合によって互いに結合している場合、ハイブリダイズしていると見なされ得る。二本鎖構造の一方の鎖中のヌクレオチドのかなりの割合が、他方の鎖上のヌクレオシドとワトソン-クリック塩基対合を起こし得る。また、ハイブリダイゼーションは、そのような対形成が水素結合の形成を伴うか否かにかかわらず、プローブの縮重を減少させるために使用され得る、デオキシイノシン、ヌクレオシドと2-アミノプリン塩基などのヌクレオシド類似体の対形成を含み得る。

【0121】

本明細書で使用される「重合酵素」という用語は、一般に、重合反応を触媒する物質を指す。重合酵素を使用して、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の組み込みによって鋳型鎖と対になった核酸プライマーを伸長することができる。重合酵素は、既存のヌクレオチド鎖の3'末端を伸長し、ホスホジエステル結合の生成を介して鋳型鎖に一度に1つずつ適合する新しいヌクレオチドを付加することによって、DNAの新しい鎖を付加し得る。重合酵素は、核酸ポリメラーゼなどのポリメラーゼであってもよい。ポリメラーゼは、天然に存在していてもよく又は合成されていてもよい。ポリメラーゼは、比較的高い加工性、すなわち、核酸鋳型を放出することなく核酸鋳型にヌクレオチドを連続的に組み込むポ

10

20

30

40

50

リメラーゼの能力を有し得る。重合酵素は、転写酵素であってもよい。ポリメラーゼの例としては、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、熱安定性ポリメラーゼ、野生型ポリメラーゼ、修飾ポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ、029(phi 29) DNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Tliポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、VENTポリメラーゼ、DEEPVENTポリメラーゼ、EXTaqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、Ssoポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Teaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、Platinum Taqポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tflポリメラーゼ、Pfu Turboポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Klenowフラグメント、3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ、並びにその変異体、修飾産物及び誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。ポリメラーゼは、単一サブユニットポリメラーゼであってもよい。

【0122】

本明細書で使用される「融解温度」又は「融点」という用語は、一般に、サンプル中の核酸分子の鎖の少なくとも一部が相補鎖の少なくとも一部から分離した温度を指す。融解温度は、二本鎖核酸分子が部分的又は完全に変性した温度であってもよい。融解温度は、所定の核酸分子の複数の配列間の配列の温度又は複数の配列の温度を指し得る。二本鎖核酸分子の異なる領域は、異なる融解温度を有し得る。例えば、二本鎖核酸分子は、第1の融点を有する第1の領域と、第1の融点よりも高い第2の融点を有する第2の領域とを含み得る。したがって、二本鎖核酸分子の異なる領域は、異なる温度で融解（例えば、部分的に変性する）し得る。核酸分子又はその領域（例えば、核酸配列）の融点は、実験的に決定されてもよく（例えば、溶融分析又は他の手順を介して）又は核酸分子の配列及び長さに基づいて推定されてもよい。例えば、MELTINGなどのソフトウェアプログラムを使用して、核酸配列の融解温度を推定することができる（Dumousseau M、Rodriguez N、Juty N、Le Novere N、MELTING、核酸の融解温度を予測するための柔軟なプラットフォーム。BMC Bioinformatics. 2012 May 16; 13:101. doi: 10.1186/1471-2105-13-101）。したがって、本明細書に記載の融点は、推定融点であってもよい。核酸配列の真の融点は、目的の核酸配列に隣接する配列又はその欠如、並びに他の要因に基づいて変化し得る。

【0123】

本明細書で使用される「ヌクレオチド」という用語は、一般に、塩基（例えば、核酸塩基）、糖部分、及びリン酸部分を含む物質を指す。ヌクレオチドは、リン酸基が付着した遊離塩基を含み得る。3つのリン酸基が付着した塩基を含む物質は、ヌクレオシド三リン酸と称され得る。ヌクレオチドが成長中の核酸分子鎖に付加されている場合、ヌクレオチドの近位リン酸と成長鎖との間のホスホジエステル結合の形成は、2つの遠位リン酸のピロリン酸としての放出を伴う高エネルギーリン酸結合の加水分解を伴い得る。ヌクレオチドは、天然に存在してもよく又は天然に存在しなくてもよい（例えば、修飾又は操作されたヌクレオチド）。

【0124】

本明細書で使用される「ヌクレオチド類似体」という用語は、天然に存在するヌクレオチドであってもなくてもよいヌクレオチドを含み得るが、これらに限定されない。例えば、ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチドを含むアデニン - (A)、チミン - (T)、シトシン - (C)、ウラシル - (U)、又はグアニン - (G) などのカノニカルヌクレオチドに由来し得る及び/又はそれに対する構造類似性を含み得る。ヌクレオチド類似体は、天然ヌクレオチドと比較して1つ以上の相違又は修飾を含み得る。ヌクレオチド類似体の例としては、イノシン、ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5

10

20

30

40

50

- クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、デアザキサンチン、デアザグアニン、イソシトシン、イソグアニン、4 - アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルケオシン、N 6 - イソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、5 - メトキシアミノメチル - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルケオシン、5 ' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - D 4 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、ウィプトキソシン、シュードウラシル、クエオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸 (v)、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)w、2 , 6 - ジアミノプリン、エチニルヌクレオチド塩基、1 - プロピニルヌクレオチド塩基、アジドヌクレオチド塩基、ホスホロセレノエート核酸、及び、(例えば、酸化、還元、及び/又はアルキル、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシル、又はハロゲン部分による)それらの修飾バージョンが挙げられる。核酸分子(例えば、ポリヌクレオチド、二本鎖核酸分子、一本鎖核酸分子、プライマー、アダプターなど)は、塩基部分(例えば、一般に相補的ヌクレオチドと水素結合を形成するために利用可能な1つ以上の原子及び/又は一般に相補的ヌクレオチドと水素結合を形成することができない1つ以上の原子において)、糖部分、又は、リン酸骨格で修飾され得る。ある場合には、ヌクレオチドは、そのリン酸部分に、三リン酸部分の修飾を含む修飾を含み得る。修飾の更なる非限定的な例としては、より長いリン酸鎖(例えば、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又はそれを超えるホスフェート部分を有するホスフェート鎖)、チオール部分による修飾(例えば、アルファ - チオ三リン酸及びベータ - チオ三リン酸)、及び、セレン部分による修飾(例えば、ホスホロセレノエート核酸)が挙げられる。ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体は、リボース、デオキシリボース、及び、(例えば、アルキル、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシル又はハロゲン部分などの置換基の酸化、還元及び/又は付加による)それらの修飾型から成るグループから選択される糖を含み得る。また、ヌクレオチド類似体は、修飾リンカー部分(例えば、リン酸部分の代わりに)を含み得る。また、ヌクレオチド類似体は、N - ヒドロキシスクシンイミドエステル(NHS)などのアミン反応性部分の共有付着を可能にするために、アミノアリル - dUTP(aa-dUTP)及びアミノヘキシルアミド - dCTP(aha-dCTP)などのアミン修飾基を含有し得る。本開示のオリゴヌクレオチド中の標準的なDNA塩基対又はRNA塩基対の代替物は、例えば、ビット/立方mmでのより高い密度、より高い安全性(天然毒素の偶発的又は意図的な合成に対する耐性)、光プログラム化ポリメラーゼにおけるより容易な識別、及び/又は、より低い二次構造を提供し得る。ヌクレオチド類似体は、ヌクレオチド検出のために検出可能な部分と反応又は結合することができる。

【0125】

本明細書中で使用される「担体」又は「基板」という用語は、一般に、核酸分子などの試薬が固定化され得る任意の固体又は半固体物品を指す。核酸分子は、合成され、付着され、ライゲートされ、或いはさもなければ、固定化され得る。核酸分子は、物理的吸着、イオン結合もしくは共有結合形成、又は、それらの組み合わせを含むがこれらに限定されない任意の方法によって基板上に固定化され得る。基板は、2次元(例えば、平面2D基板)又は3次元であってもよい。ある場合には、基板は、フローセルの構成要素であってもよく、及び/又は、配列決定機器内に含まれてもよく又は配列決定機器によって受けられるようになっていてもよい。基板は、ポリマー、ガラス、又は、金属材料を含むことができる。基板の例としては、膜、平面基材、マイクロタイタプレート、ビーズ(例えば、磁気ビーズ)、フィルタ、試験片、スライド、カバースリップ、及び、試験管が挙げら

れる。基板は、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフルオロエチレン、ポリエチレンオキシ、及びポリアクリルアミド（例えば、ポリアクリルアミドゲル）などの有機ポリマー、並びにそれらのコポリマー及びグラフトを含み得る。基板は、ラテックス又はデキストランを含み得る。また、基板は、ガラス、シリカ、金、制御細孔ガラス（CPG）、又は、逆相シリカなどの無機であってもよい。担体の形態は、例えば、ビーズ、球体、粒子、顆粒、ゲル、多孔性マトリックス、又は、基板の形を成してもよい。場合によっては、基板は、単一の固体又は半固体物品（例えば、単一粒子）であってもよく、他の場合では、基板は、複数の固体又は半固体物品（例えば、粒子の集合体）を含んでもよい。基板は、平面、実質的に平面、又は、非平面であってもよい。基板は、多孔質又は非多孔質であってもよく、膨潤又は非膨潤特性を有してもよい。基板は、1つ以上のウェル、凹部、又は、他の容器、うつわ、特徴、又は、位置を含むように成形されてもよい。複数の基板が、様々な位置でアレイ状に構成されてもよい。基板は、（例えば、試薬のロボット送達のために）アドレス指定可能であってもよく、又は、レーザ照射及び共焦点又は偏向光の収集による走査などの検出手法によってアドレス指定可能であってもよい。例えば、基板は、検出器と光学的及び／又は物理的に連通していてもよい。或いは、基板は、ある距離だけ検出器から物理的に分離されてもよい。増幅基板（例えば、ビーズ）は、別の基板（例えば、第2の担体のウェル内）の中又は上に配置することができる。

【0126】

本明細書中で使用される「標識」という用語は、一般に、例えばヌクレオチド類似体などの種と結合することができる部分を指す。標識は、親和性部分を含み得る。場合によっては、標識は、検出され得る信号を放出する（又は既に放出された信号を減少させる）検出可能な標識であってもよい。ある場合には、そのような信号は、1つ以上のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の取り込みを示し得る。ある場合には、標識は、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体に結合されてもよく、そのヌクレオチド又はヌクレオチド類似体は、プライマー伸長反応において使用され得る。ある場合には、標識は、プライマー伸長反応後にヌクレオチド類似体に結合され得る。標識は、ある場合には、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体と特異的に反応性であってもよい。結合は、共有結合又は非共有結合（例えば、イオン相互作用、ファンデルワールス力などを介して）であってもよい。ある場合には、結合は、開裂可能、例えば光開裂可能（例えば、紫外光下で開裂可能）、化学開裂可能（例えば、還元剤、例えばジチオスレイトール（DTT）、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）、トリス（ヒドロキシプロピル）ホスフィン（THP）により）又は酵素開裂可能（例えば、エステラーゼ、リパーゼ、ペプチダーゼ又はプロテアーゼにより）であってもよいリンカーによるものであってもよい。場合によっては、標識は、発光性、すなわち、蛍光性又はリン光性であってもよい。標識は消光分子であってもよい。本明細書中で使用される「消光剤」という用語は、放出された信号を減少させることができる分子を指す。例えば、鋳型核酸分子は、検出可能な信号を放出するように設計され得る。消光剤を含むヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の組み込みは、信号を低減又は排除することができ、その後、その低減又は排除が検出される。場合によっては、本明細書中の他の箇所に記載されるように、消光剤による標識化は、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の取り込み後に起こり得る。色素及び標識は、核酸配列に組み込まれ得る。染料及び標識は、1つ以上のビーズを互いに連結するためのリンカーなどのリンカーに組み込まれてもよい。染料の非限定的な例としては、SYBRグリーン、SYBRブルー、DAPI、プロピジウムヨウ素、ヘキスト、SYBRゴールド、臭化エチジウム、アクリジン、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリフラビン、フルオロクマニン、エリプチシン、ダウノマイシン、クロロキン、ジスタマイシンD、クロモマイシン、ホミジウム、ミトラマイシン、ルテニウムポリビリジル、アントラマイシン、フェナントリジン及びアクリジン、臭化エチジウム、ヨウ化プロピジウム、ヨウ化ヘキシジウム、ジヒドロエチジウム、エチジウムホモダイマー-1及び-2、エチジウムモノアジド、及びACMA、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hoechst 34580、DAPI、アクリジンオレンジ、7-AAD、アクチノマイシンD、LDS 7

10

20

30

40

50

51、ヒドロキシスチルバミジン、SYTOXブルー、SYTOXグリーン、SYTOXオレンジ、POPO-1、POPO-3、YOYO-1、YOYO-3、TOTO-1、TOTO-3、JOJO-1、LOLO-1、BOBO-1、BOBO-3、PO-PRO-1、PO-PRO-3、BO-PRO-1、BO-PRO-3、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TO-PRO-5、JO-PRO-1、LO-PRO-1、YO-PRO-1、YO-PRO-3、PicoGreen、OliGreen、RiboGreen、SYBR Gold、SYBR Green I、SYBR Green II、SYBR DX、SYTO-40、-41、-42、-43、-44、-45(青)、SYTO-13、-16、-24、-21、-23、-12、-11、-20、-22、-15、-14、-25(緑)、SYTO-81、-80、-82、-83、-84、-85(オレンジ)、SYTO-64、-17、-59、-61、-62、-60、-63(赤)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)、ローダミン、テトラメチルローダミン、R-フィコエリトリン、Cy-2、Cy-3、Cy-3.5、Cy-5、Cy5.5、Cy-7、テキサスレッド、ファーレッド、アロフィコシアニン(APC)、Sybr Green I、Sybr Green II、Sybr Gold、CellTracker Green、7-AAD、エチジウムホモダイマーI、エチジウムホモダイマーII、エチジウムホモダイマーIII、エチジウムブロマイド、アンペリフェロン、エオシン、緑色蛍光タンパク質、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、カスケードブルー、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、ユーロピウムやテルビウムなどの蛍光ランタニド錯体、カルボキシテトラクロロフルオレセイン、5及び/又は6-カルボキシフルオレセイン(FAM)、VIC、5-(又は6-)ヨードアセトアミドフルオレセイン、5-{[2(及び3)-5-(アセチルメルカプト)-スクシニル]アミノ}フルオレセイン(SAMSA-フルオレセイン)、リサミンローダミンBスルホニル塩化物、5及び/又は6カルボキシローダミン(ROX)、7-アミノ-メチル-クマリン、7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸(AMCA)、BODIPYフルオロフォア、8-メトキシピレン-1,3,6-トリスルホン酸三ナトリウム塩、3,6-ジスルホネート-4-アミノ-ナフタルイミド、フィコビリプロテイン、AlexaFluor 350、405、430、488、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750、及び790色素、DyLight 350、405、488、550、594、633、650、680、755、及び800色素、又はその他のフルオロフォア、BH1-0、BHQなどのブラックホール消光剤色素(Biosearch Technologies)-1、BHQ-3、BHQ-10); QSY7、QSY9、QSY21、QSY35などのQSY色素蛍光消光剤(Molecular Probes/Invitrogen製)、及びDabcylやDabsylなどの他の消光剤、Cy5Q及びCy7Q及びダークシアニン色素(GEヘルスケア); DYQ-660やDYQ-661などのDy-Quenchers(Dyomics)、及び、ATTO540Q、580Q、612QなどのATTO蛍光消光剤(ATTO-TEC GmbH)が挙げられる。ある場合には、標識は、自己消光しないか又は近接消光を示すタイプであってもよい。自己消光又は近接消光を示さない標識タイプの非限定的な例としては、モノプロモビマンなどのビマン誘導体が挙げられる。本明細書で使用される「近接消光」という用語は、一般に、互いに近接する1つ以上の色素が、それらが個々に示す蛍光と比較してより低い蛍光を示し得る現象を指す。ある場合には、色素は、ドナー色素及びアクセプター色素が互いに1nm~50nm以内にある近接消光に供し得る。

【0127】

本明細書で使用される「検出器」という用語は、一般に、組み込まれたヌクレオチド又はヌクレオチド類似体の存在又は非存在を示す信号などの信号を検出することができる装置を指す。検出器は、信号を検出することができる光学部品及び/又は電子部品を含むことができる。検出器を含む検出方法の非限定的な例には、光学的検出、分光学的検出、静

10

20

30

40

50

電検出、及び電気化学的検出が含まれる。光学的検出方法としては、蛍光測定及び紫外可視吸光度が挙げられるが、これらに限定されない。分光検出方法としては、質量分析、核磁気共鳴（NMR）分光法、及び赤外分光法が挙げられるが、これらに限定されない。静電検出方法としては、例えばゲル電気泳動などのゲルベースの技術が挙げられるが、これらに限定されない。電気化学的検出方法としては、増幅産物の高速液体クロマトグラフィー分離後の増幅産物の電気化学的検出が挙げられるが、これに限定されない。

【0128】

本明細書中で使用される「配列決定」という用語は、一般に、核酸分子などの生体分子の配列を生成又は同定するプロセスを指す。そのような配列は、核酸塩基の配列（例えば、核酸塩基）を含み得る核酸配列であってもよい。配列決定は、例えば、一分子配列決定、合成による配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、又は、ライゲーションによる配列決定であってもよい。配列決定は、フローセル又は1つ以上のビーズなどの担体上に固定化された鋳型核酸分子を使用して実施され得る。配列決定アッセイは、1つ以上の鋳型核酸分子に対応する1つ以上の配列決定リードをもたらし得る。

【0129】

本明細書中で使用される「リード」という用語は、一般に、配列決定リードなどの核酸配列を指す。配列決定リードは、核酸配列決定アッセイを介して取得された核酸塩基（例えば、ヌクレオチド）又は塩基対の推測配列であってもよい。配列決定リードは、超並列アレイシーケンサー（例えば、Illumina又はPacific Biosciences of California）などの核酸シーケンサーによって生成され得る。配列決定リードは、被検体のゲノムの一部又は場合によっては全部に対応し得る。配列決定リードは一連の配列決定リードの一部であってもよく、これは、例えば、（例えば、参照ゲノムに対する）アラインメントによって組み合わされて被検体のゲノムの配列をもたらし得る。

【0130】

本明細書中で使用される「被検体」という用語は、一般に、生体サンプル（例えば、処理又は分析を受けているか又は受けることになる生体サンプル）が由来し得る個体又はエンティティを指す。被検体は、動物（例えば、哺乳動物又は非哺乳動物）又は植物であってもよい。被検体は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、鳥、非ヒト霊長類、サル、家畜、コンパニオンアニマル、スポーツ動物、又は、げっ歯類であってもよい。被検体は患者であってもよい。被検体は、癌（例えば、乳癌、結腸直腸癌、脳癌、白血病、肺癌、皮膚癌、肝臓癌、膵臓癌、リンパ腫、食道癌又は子宮頸癌）又は感染性疾患などの疾患又は障害を有してもよく又は有すると疑われてもよい。これに代えて又は加えて、被検体は、疾患又は障害を以前に有していたことが知られていてもよい。被検体は、軟骨無形成症、アルファ-1抗トリプシン欠損症、抗リン脂質症候群、自閉症、常染色体優性多発性嚢胞腎疾患、シャルコー・マリー・トゥース、クリ・デュ・チャット、クローン病、嚢胞性線維症、デルカム病、ダウン症候群、デュアン症候群、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、第V因子ライデン型血小板増加症、家族性高コレステロール血症、家族性地中海熱、脆弱x症候群、ゴーシェ病、ヘモクロマトーシス、血友病、全前脳脊髄症、ハンチントン病、クラインフェルター症候群、マルファン症候群、筋緊張性ジストロフィー、神経線維腫症、Noonan症候群、骨形成不全症、パーキンソン病、フェニルケトン尿症、ポーランド異常、ポルフィリン、早老症、網膜色素変性、重症複合免疫不全、鎌状鎌状鎌状赤血球症、筋萎縮症、筋萎縮症、サラセミア、トリメチルアミン尿症、ターナー症候群、軟口蓋顔面症候群、WAGR症候群、又は、ウィルソン病などの遺伝性疾患を有してもよく又は有すると疑われてもよい。被検体は、疾患又は障害の処置を受けていてもよい。被検体は、所定の疾患又は障害の症候性又は無症候性であってもよい。被検体は、健康（例えば、疾患又は障害を有することが疑われない）であってもよい。被検体は、所定の疾患に対する1つ以上の危険因子を有してもよい。被検体は、所定の体重、身長、ボディマス指数又は他の身体的特徴を有してもよい。被検体は、所定の民族的又は人種的背景、出生地又は居住地、国籍、疾患又は寛解状態、家族の病歴又は他の特徴を有してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 1 】

本明細書中で使用される場合、「生体サンプル」という用語は、一般に、被検体から取得されたサンプルを指す。生体サンプルは、被検体から直接的又は間接的に取得されてもよい。サンプルは、スピitting、スワビング、採血、生検、排泄物（例えば、尿、便、痰、嘔吐物、又は唾液）の取得、切除、掻き取り、及び、穿刺を含むがこれらに限定されない任意の適切な方法によって被検体から得ることができる。サンプルは、例えば、静脈内又は動脈内で循環系にアクセスすること、分泌された生体サンプル（例えば、便、尿、唾液、痰など）を収集すること、呼吸すること、又は、組織（例えば、生検）を外科的に抽出することによって被検体から取得することができる。サンプルは、皮膚又は子宮頸部のこすり取り、頬の拭き取り、又は、唾液、尿、糞便、月経、涙もしくは精液の採取を含むがこれらに限定されない非侵襲的方法によって取得することができる。或いは、サンプルは、生検、穿刺吸引又は静脈切開などの侵襲的手順によって取得されてもよい。サンプルは、例えば限定されないが、血液（例えば、全血、赤血球、白血球又は白血球、血小板）、血漿、血清、汗、涙、唾液、痰、尿、精液、粘液、滑液、母乳、初乳、羊水、胆汁、骨髓、間質液もしくは細胞外液、又は、脳脊髄液などの体液を含んでもよい。例えば、穿刺法によってサンプルを得て、血液及び／又は血漿を含む体液を取得することができる。そのようなサンプルは、細胞及び無細胞核酸材料の両方を含み得る。或いは、サンプルは、血液、汗、毛包、頬組織、涙、月経、糞便、又は、唾液を含むがこれらに限定されない任意の他の供給源から取得することができる。生体サンプルは、腫瘍生検などの組織サンプルであってもよい。サンプルは、皮膚、心臓、肺、腎臓、乳房、脾臓、肝臓、腸、脳、前立腺、食道、筋肉、平滑筋、膀胱、胆嚢、結腸、又は甲状腺を含むがこれらに限定されない本明細書で与えられる組織のいずれかから取得することができる。本明細書中で与えられる取得方法としては、細針吸引、コアニードル生検、真空補助生検、大コア生検、切開生検、切除生検、パンチ生検、シェーピング生検又は皮膚生検を含む生検方法が挙げられる。生体サンプルは、1つ以上の細胞を含み得る。生体サンプルは、1つ以上のデオキシリボ核酸（DNA）及び／又はリボ核酸（RNA）分子（例えば、細胞内に含まれる又は細胞内に含まれない）などの1つ以上の核酸分子を含み得る。核酸分子は、細胞内に含まれ得る。これに代えて又は加えて、核酸分子は、細胞内に含まなくてもよい（例えば、無細胞核酸分子）。生体サンプルは無細胞サンプルであってもよい。

10

20

【 0 1 3 2 】

本明細書中で使用される「無細胞サンプル」という用語は、一般に、細胞（例えば、体積基準で10%未満の細胞）を実質的に含まないサンプルを指す。無細胞サンプルは、任意の供給源（例えば、本明細書に記載されるように、）に由来し得る。例えば、無細胞サンプルは、血液、汗、尿又は唾液に由来し得る。例えば、無細胞サンプルは、組織又は体液に由来し得る。無細胞サンプルは、複数の組織又は体液に由来し得る。例えば、第1の組織又は体液からのサンプルは、（例えば、サンプルが得られている間又はサンプルが取得された後に）第2の組織又は体液からのサンプルと組み合わせることができる。一例では、第1の流体及び第2の流体を被検体（例えば、同じ時間又は異なる時間に）から収集することができ、第1及び第2の流体を組み合わせるサンプルを提供することができる。無細胞サンプルは、1つ以上のDNA又はRNA分子などの1つ以上の核酸分子を含み得る。

30

40

【 0 1 3 3 】

無細胞サンプルでないサンプル（例えば、1つ以上の細胞を含むサンプル）は、無細胞サンプルを提供するために処理され得る。例えば、1つ以上の細胞並びに細胞内に含まれない（例えば、無細胞核酸分子）1つ以上の核酸分子（例えば、DNA及び／又はRNA分子）を含むサンプルを被検体から取得することができる。サンプルを（例えば、本明細書に記載されるように）処理して、細胞内に含まれない核酸分子から細胞及び他の物質を分離し、それによって無細胞サンプル（例えば、細胞内に含まれない核酸分子を含む）を提供することができる。その後、無細胞サンプルを更なる分析及び処理に供してもよい（例えば、本明細書で提供されるように）。細胞内に含まれない核酸分子（例えば、無細胞

50

核酸分子)は、細胞及び組織に由来し得る。例えば、無細胞核酸分子は、(例えば、身体の組織の)腫瘍組織又は分解された細胞に由来し得る。無細胞核酸分子は、任意のタイプの核酸分子(例えば、本明細書に記載されるように)を含み得る。無細胞核酸分子は、二本鎖、一本鎖、又はそれらの組み合わせであってもよい。無細胞核酸分子は、分泌又は細胞死プロセス、例えば細胞壊死、アポトーシスなどを介して体液に放出され得る。無細胞核酸分子は、癌細胞(例えば、循環腫瘍DNA(ctDNA))から体液中に放出され得る。また、無細胞核酸分子は、母体血流中を自由に循環する胎児DNAであってもよい(例えば、cffDNAなどの無細胞胎児核酸分子)。これに代えて又は加えて、無細胞核酸分子が健康な細胞から体液に放出されてもよい。

【0134】

被検体から直接得られた生体サンプルは、被検体から取得された後に更に処理されてしまっていないかてもよい。例えば、血液サンプルは、被検体の循環系にアクセスし、被検体から血液を取り出し(例えば、針を介して)、取り出した血液を容器に移すことによって、被検体から直接取得することができる。容器は、血液サンプルが更なる分析に有用であるように試薬(例えば、抗凝固剤)を含んでもよい。別の例では、スワブを使用して、被検体の中咽頭表面上の上皮細胞にアクセスすることができる。被検体から生体サンプルを取得した後、生体サンプルを含有するスワブを流体(例えば、緩衝液)と接触させて、スワブから生物学的流体を収集することができる。

【0135】

1つ以上の核酸分子を含む任意の適切な生体サンプルを被検体から取得することができる。本明細書中で与えられる方法に従って使用するのに適したサンプル(例えば、生体サンプル又は無細胞生体サンプル)は、試験される個体の組織、細胞、分解細胞、核酸、遺伝子、遺伝子フラグメント、発現産物、遺伝子発現産物、及び/又は遺伝子発現産物フラグメントを含む任意の材料であってもよい。生体サンプルは、固形物(例えば、生体組織)であってもよく、流体(例えば、生物学的流体)であってもよい。一般に、生物学的流体は、生物と会合される任意の流体を含み得る。生体サンプルの非限定的な例としては、被検体の任意の解剖学的位置(例えば、組織、循環系、骨髓)から得られた血液(又は血液の成分、例えば白血球、赤血球、血小板)、被検体の任意の解剖学的位置から取得された細胞、皮膚、心臓、肺、腎臓、呼吸、骨髓、便、精液、腔液、腫瘍組織に由来する間質液、乳房、脾臓、脳脊髄液、組織、喉スワブ、生検、胎盤液、羊水、肝臓、筋肉、平滑筋、膀胱、胆嚢、結腸、腸、脳、空洞液、痰、膿、微生物叢、メコニウム、母乳、前立腺、食道、甲状腺、血清、唾液、尿、胃及び消化液、涙、眼液、汗、粘液、耳垢、油、腺分泌物、髄液、毛髪、指爪、皮膚細胞、血漿、鼻咽頭スワブ又は鼻咽頭洗浄液、脊髄液、血液、空体液、及び/又は、他の排泄物又は身体組織が挙げられる。サンプルの適合性及び/又は適切性を決定するための方法が提供される。サンプルは、血液、血漿、組織、細胞、分解細胞、無細胞核酸分子、及び/又は細胞からの、又は無細胞核酸分子などの個体の細胞に由来する生物学的材料を含み得るが、これらに限定されない。サンプルは、細胞、組織又は無細胞生物学的材料の不均一又は均一な集団であってもよい。生体サンプルは、本明細書に記載の分析方法に適したサンプルを提供できる任意の方法を使用して取得することができる。

【0136】

サンプル(例えば、生体サンプル又は無細胞生体サンプル)は、分析のための調製において、濾過、遠心分離、選択的沈殿、透過処理、単離、攪拌、加熱、精製、及び/又は他のプロセスを含むがこれらに限定されない1つ以上のプロセスを経てもよい。例えば、サンプルは、汚染物質又は他の材料を除去するために濾過され得る。一例では、細胞を含むサンプルを処理して、サンプル中の他の材料から細胞を分離することができる。そのようなプロセスは、無細胞核酸分子のみを含むサンプルを調製するために使用され得る。そのようなプロセスは、多段階遠心分離プロセスから成ってもよい。同じ被検体からの複数のサンプル(例えば、同じもしくは異なる身体位置から同じもしくは異なる方法で得られる、及び/又は同じもしくは異なる時間(例えば、数秒、数分、数時間、数日、数週間、数

10

20

30

40

50

ヶ月、又は数年離れている)に取得される)又は異なる被検体からの複数のサンプルなどの複数のサンプルを、本明細書に記載の分析のために得ることができる。一例において、第1のサンプルは、被検体が治療レジメン又は処置を受ける前に被検体から得られ、第2のサンプルは、被検体が治療レジメン又は処置を受けた後に被検体から取得される。これに代えて又は加えて、複数のサンプルを同じ被検体から同じ時間又はほぼ同じ時間に取得することができる。同じ被検体から得られた異なるサンプルは、同じ又は異なる方法で取得され得る。例えば、第1のサンプルは生検を介して取得されてもよく、第2のサンプルは採血を介して取得されてもよい。異なる方法で得られたサンプルは、異なる技術を使用して、異なる時間に、及び/又は異なる場所で、異なる医療専門家によって取得されることができる。同じ被検者から得られた異なるサンプルは、身体の異なる領域から取得されてもよい。例えば、第1のサンプルは、身体の前1の領域(例えば、前1の組織)から得られてもよく、第2のサンプルは、身体の前2の領域(例えば、前2の組織)から取得されてもよい。

10

【0137】

本明細書で使用する生体サンプル(例えば、1つ以上の核酸分子を含む生体サンプル)は、反応容器に提供される場合、精製されなくてもよい。更に、1つ以上の核酸分子を含む生体サンプルに関しては、生体サンプルが反応容器に提供されるときに、1つ以上の核酸分子が抽出されなくてもよい。例えば、生体サンプルを反応容器に供給する際に、生体サンプルから生体サンプルのリボ核酸(RNA)及び/又はデオキシリボ核酸(DNA)分子を抽出しなくてもよい。また、生体サンプルを反応容器に供給する際に、生体サンプル中に存在するターゲット核酸(例えば、ターゲットRNA又はターゲットDNA分子)を濃縮しなくてもよい。或いは、生体サンプルを精製してもよく及び/又は核酸分子を生体サンプル中の他の材料から単離してもよい。

20

【0138】

本明細書中に記載の生体サンプルは、ターゲット核酸を含有し得る。本明細書中で使用される「鑄型核酸」、「ターゲット核酸」、「核酸分子」、「核酸配列」、「核酸フラグメント」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド」、及び、「核酸」という用語は、一般に、デオキシリボヌクレオチド(dNTP)もしくはリボヌクレオチド(rNTP)又はそれらの類似体などの任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指し、互換的に使用され得る。核酸は、任意の三次元構造を有してもよく、既知又は未知の任意の機能を果たしてもよい。核酸分子は、少なくとも約10核酸塩基(「塩基」)、20塩基、30塩基、40塩基、50塩基、100塩基、200塩基、300塩基、400塩基、500塩基、1キロ塩基(kb)、2kb、3kb、4kb、5kb、10kb、50kb又はそれを超える長さを有し得る。オリゴヌクレオチドは、一般に、4つのヌクレオチド塩基、すなわち、アデニン(A);シトシン(C);グアニン(G);及び、チミン(T)(ポリヌクレオチドがRNAである場合、チミン(T)についてはウラシル(U))の特定の配列から構成される。オリゴヌクレオチドは、1つ以上の(1又は複数の)非標準ヌクレオチド、(1又は複数の)ヌクレオチド類似体及び/又は修飾ヌクレオチドを含み得る。核酸の非限定的な例としては、DNA、RNA、ゲノムDNA(例えば、切断gDNAなどのgDNA)、無細胞DNA(例えば、cfDNA)、合成DNA/RNA、遺伝子又は遺伝子フラグメントのコード領域又は非コード領域、連結分析から定義される複数の遺伝子座(1つの遺伝子座)、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、リボソームRNA、低分子干渉RNA(siRNA)、ショートヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、リボザイム、相補的DNA(cDNA)、組換え核酸、分枝核酸、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ及びプライマーが挙げられる。核酸は、メチル化ヌクレオチド及びヌクレオチド類似体などの1つ以上の修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、核酸の構築の前又は後に行なわれ得る。核酸のヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。核酸は、重合後に、例えばレポーター剤とのコンジュゲーション又は結合

30

40

50

によって更に修飾され得る。

【0139】

本明細書に記載のターゲット核酸又はサンプル核酸を増幅して増幅産物を生成することができる。ターゲット核酸は、ターゲットRNA又はターゲットDNAであってもよい。ターゲット核酸がターゲットRNAである場合、ターゲットRNAは、本明細書の他の箇所に記載されるRNAのタイプを含む任意のタイプのRNAであってもよい。ターゲットRNAは、ウイルスRNA及び/又は腫瘍RNAであってもよい。ウイルスRNAは、被検体に対して病原性であってもよい。病原性ウイルスRNAの非限定的な例としては、ヒト免疫不全ウイルスI (HIV I)、ヒト免疫不全ウイルスn (HIV 11)、オルトミクソウイルス、エボラウイルス、デングウイルス、インフルエンザウイルス (例えば、H1N1、H3N2、H7N9、又はH5N1)、ヘルペスウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎 (例えば、外装RNA-HCVウイルス) ウイルス、D型肝炎ウイルス、E型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルス、エプスタイン・バーウイルス、単核球症ウイルス、サイトメガロウイルス、SARSウイルス、西ナイル熱ウイルス、ポリオウイルス及び麻疹ウイルスが挙げられる。

10

【0140】

生体サンプルは、複数のターゲット核酸分子を含み得る。例えば、生体サンプルは、単一の被検体由来の複数のターゲット核酸分子を含み得る。別の例では、生体サンプルは、第1の被検体由来の第1のターゲット核酸分子及び第2の被検体由来の第2のターゲット核酸分子を含み得る。

20

【0141】

本明細書中に記載の方法は、反応容器 (例えば、エマルジョン中の液滴、又は複数のウェルのうちのウェル) 中に行なわれ得る。任意の適切な反応容器を使用してもよい。反応容器は、内面、外面、並びに場合によっては開放端及び反対側の閉鎖端を含み得る本体を備える。場合によっては、反応容器は、開放端又は閉鎖端を備えなくてもよい。例えば、反応容器は液滴であってもよい。他の場合には、反応容器がキャップを備えてもよく、このキャップは、接触が行なわれると反応容器の開放端が閉じられるように、開放端で本体に接触するように構成されてもよい。キャップは、開放構成及び閉鎖構成で反応容器に付着されたままであるように、反応容器に恒久的に関連付けられてもよい。反応容器が開いているときにキャップが反応容器から分離されるように、キャップが取り外し可能であってもよい。フローセルチャンバ (例えば、油中水型エマルジョン又は複数のウェルを含むフローセルチャンバ) などの反応容器は、1つ以上の入口又は出口を備えてもよく、この入口又は出口は、反応に使用するための試薬を提供及び除去するために使用することができる。試薬は、圧力及び真空制御を介してチャンバの内外に移動させることができる。本明細書で使用される反応容器は、シールされていてよく、密閉されていてよい (例えば、シールされたマイクロウェルプレート)。

30

【0142】

反応容器は、様々なサイズ、形状、重量、及び、形態のものであってもよい。幾つかの反応容器は、実質的に円形又は楕円形の管状であってもよい。幾つかの反応容器は、長方形、正方形、ダイヤモンド、円形、楕円形、又は三角形の形状であってもよい。反応容器は、規則的な形状又は不規則な形状であってもよい。例えば、液滴 (例えば、エマルジョン中の液滴、例えば水性液滴) である反応容器は、実質的に球形であってもよい。反応容器 (例えば、マイクロウェルプレート又はフローセルのウェル) の閉じた末端は、先細、丸みを帯びた、又は平坦な表面を有することができる。反応容器の種類の非限定的な例としては、チューブ、ウェル、毛細管、カートリッジ、キュベット、遠心管、液滴又はピペットチップが挙げられる。反応容器は、ガラス、金属、プラスチック、非混和性流体、及びそれらの組み合わせを含むそのような材料の非限定的な例を有する任意の適切な材料から構成され得る。一例では、反応容器は、油などの非混和性流体中の水性液滴などの液滴であってもよい。反応容器は、任意の適切なサイズであってもよい。例えば、反応容器は、少なくとも約1ナノメートル (nm)、10nm、50nm、100nm、1ミクロン

40

50

(μm)、 $10\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $100\mu\text{m}$ 、 1mm 、 10mm 、 50mm 、 100mm 、又は 1cm の直径を有するほぼ球形の液滴であってもよい。或いは、反応容器は、少なくとも約 $100\mu\text{m}$ 、 1mm 、 5mm 、又は 10mm の直径を有するウェルであってもよい。ウェルの深さは、ウェルの直径と同じであっても異なってもよい。例えば、ウェルは、約 5mm の直径及び約 10mm の深さを有することができる。

【0143】

反応容器は、反応容器の集合体又はアレイの一部であってもよい。反応容器の集合体又はアレイは、方法の自動化及び/又は複数のサンプルの同時処理に特に有用であり得る。反応容器は、多数のウェルからなるマイクロウェルプレートのウェルであってもよい。反応容器は、サーモサイクラーのサーマルブロックのウェル内に保持されてもよく、サーマルサイクルのブロックは、それぞれがサンプル容器を受けることができる複数のウェルを含む。反応容器(例えば、液滴又はマイクロウェル)から構成される集合体又はアレイは、任意の適切な数の反応容器を含んでもよい。反応容器の集合体又はアレイは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500、1,000、1万個又はそれ以上の容器を含み得る。例えば、反応容器の集合体又はアレイは、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、35、48、96、144、384個、又はそれ以上の反応容器を含み得る。流体ハンドリングデバイスが反応容器を正しく識別し、適切な流体材料を反応容器に分注することができるように、反応容器の集合体又は一連の反応容器(例えば、マイクロウェル)の反応容器部分は、流体ハンドリング装置によって個別にアドレス指定することもできる。流体ハンドリング装置は、反応容器への流体材料の添加を自動化するのに有用であり得る。

【0144】

場合によっては、1つ以上の反応容器が別の反応容器内に含まれてもよい。例えば、ビーカー、試験管、フローセルチャンバ、又は他の容器などの容器に複数の液滴が含まれてもよく、或いは、フローセルチャンバなどの容器に(例えば、マイクロウェルプレート又はフローセルの)複数のウェルが含まれてもよい。一例では、核酸反応がフローセル上で直接起こり得るように、複数のウェルをフローセルチャンバの表面に設けることができる。別の例では、1つ以上の液滴が、容器の表面などの所定の領域に物理的に拘束されてもよい。液滴は、例えば、容器の材料(例えば、表面)と液滴内に含まれる材料(例えば、常磁性ビーズ又はビーズに結合した磁気標識)との間の磁気引力を介して又は光学ピンセットの使用を介してなど、電磁力を介して物理的に拘束され得る。一例では、液滴は(例えば、マイクロウェルプレート又はフローセルの)ウェル内に拘束され得る。

【0145】

本明細書で使用される反応容器(例えば、液滴又はウェル)は、複数の熱ゾーンを含み得る。反応容器内の感熱性層状材料を用いて、反応容器内に熱ゾーンを形成することができる。そのような場合、感熱性積層材料の加熱を使用して、1つの熱ゾーンから次のゾーンに反応混合物を放出することができる。反応容器は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20又はそれ以上の熱ゾーンを含み得る。反応容器内の熱ゾーンは、反応容器の異なる領域を異なる温度サイクル条件に曝露することによって達成され得る。例えば、フローセルチャンバの異なる領域(例えば、複数のウェル及び/又は液滴を含む)は、異なる温度サイクル条件に供されてもよい。或いは、反応容器のアレイ又は集合体のうちの1つ以上の反応容器は、1つ以上の異なる熱ゾーンに供されてもよい。例えば、反応容器の第1のセットを第1の熱ゾーン内に配置することができ、反応容器の第2のセットを第2の熱ゾーン内に配置することができる(例えば、様々な反応容器を物理的に分離することによって)。これに代えて又は加えて、反応容器のアレイ又は集合体のうちの1つ以上の反応容器は、複数の異なる温度(例えば、プロセス全体の異なる時間に)に晒されてもよい。反応容器に適用される温度は、例えば、核酸反応の初期化、核酸分子のアニーリング、アニーリングされた核酸分子の伸長(例えば、プライ

10

20

30

40

50

マー伸長)、二本鎖核酸配列又はその一部の部分的又は完全な変性又は任意の他の有用なプロセスに適し得る。例えば、温度は、熱サイクリングプロトコルに従って制御されてもよい。一例において、反応容器の全部又は一部は、第1の時間に第1の期間にわたって第1の温度に晒されてもよく、反応容器又はその一部は、その後、第2の時間に第2の期間にわたって第2の温度に晒されてもよい。第1の温度は、例えば、核酸反応の初期化(例えば、PCR)又は第1の核酸分子の第2の核酸分子へのアニーリング(例えば、ハイブリダイゼーション)に適した温度であってもよい。第2の温度は、例えば、アニーリングされた核酸分子(例えば、プライマー分子)の伸長及び/又はアニーリングされた核酸分子の変性に適した温度であってもよい。更なる異なる温度を適用することもできる。温度は、任意の適切な回数(例えば、任意の数の熱サイクルにわたって)繰り返されてもよい。

10

【0146】

本明細書中に記載の「ビーズ」という用語は、一般に、任意の形状及び寸法の固体担体、樹脂、ゲル(例えば、ヒドロゲル)、コロイド、又は、粒子を指す。ビーズは、ガラス又はセラミック、1つ以上のポリマー、及び/又は、金属などの任意の適切な材料を含んでもよい。適切なポリマーの例としては、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、アガロース、セルロース、セルロース誘導体、又はデキストランが挙げられるが、これらに限定されない。適切な金属の例としては、常磁性金属、例えば鉄が挙げられる。ビーズは、磁性又は非磁性であってもよい。例えば、ビーズは、1つ以上の磁気標識を有する1つ以上のポリマーを含み得る。磁気ビーズは、電磁力を使用して操作されてもよい(例えば、位置間で移動されてもよく又は例えばフローセルチャンバなどの反応容器の所定の位置に物理的に拘束されてもよい)ビーズは、直径を含む1つ以上の異なる寸法を有することができる。ビーズの寸法(例えば、ビーズの直径)は、約1mm未満、約0.1mm未満、約0.01mm未満、約0.005mm未満、約1nm~約100nm、約1µm~約100µm、又は約1mm~約100mmであってもよい。ビーズの集合体は、同じ又は異なる特性を有する1つ以上のビーズを含み得る。例えば、ビーズの集合体のうちの第1のビーズが第1の直径を有してもよく、ビーズの集合体のうちの第2のビーズが第2の直径を有してもよい。第1の直径は、第2の直径と同じであってもよく又はほぼ同じであってもよく又は異なってもよい。同様に、第1のビーズは、第2のビーズと同じ又は異なる形状及び組成を有してもよい。一例では、第1のビーズが第1のポリマー材料を含んでもよく、第2のビーズが第2のポリマー材料を含んでもよい。第1のポリマー材料は、第2のポリマー材料と同じであっても異なってもよい。第1のビーズは、それに結合した第1のオリゴヌクレオチド(例えば、プライマー)などの第1の材料を含んでもよく、第2のビーズは、それに結合した第2のオリゴヌクレオチド(例えば、プライマー)などの第2の材料を含んでもよい。第1及び第2のオリゴヌクレオチドは、同じであっても異なってもよい。例えば、第1のオリゴヌクレオチド(例えば、第1のプライマー)は、第2のオリゴヌクレオチド(例えば、第2のプライマー)と同じ核酸配列又は異なる核酸配列を有し得る。ある場合には、第1のオリゴヌクレオチド(例えば、第1のプライマー)は、第1の核酸配列及び第2の核酸配列を含んでもよく、第2のオリゴヌクレオチド(例えば、第2のプライマー)は、第3の核酸配列及び第4の核酸配列を含んでもよい。第1及び第3の核酸配列が同じであってもよい。例えば、第1及び第3の核酸配列がバーコード配列であってもよい。第2及び第4の核酸配列が異なってもよい。例えば、第2及び第4の核酸配列は、異なる機能を果たすように構成された機能配列であってもよい。第2及び第4の核酸配列は、本明細書に記載されるように、異なる核酸分子を捕捉するように構成されたプライマー(例えば、キャプチャ)配列であってもよい。一例において、第1のビーズは、それに結合した複数の第1のオリゴヌクレオチド(例えば、第1のプライマー)を有してもよく、第2のビーズは、それに結合した複数の第2のオリゴヌクレオチド(例えば、第2のプライマー)を有してもよく、複数の第1のオリゴヌクレオチドのうちの所定の第1のオリゴヌクレオチドは、第1の核酸配列及び第2の核酸配列を含み、複数の第2のオリゴヌクレオチドのうちの所定の第2のオリゴヌクレオチドは、第3の核酸配列及び第4の核酸配列を含む。第1及び第3

20

30

40

50

の核酸配列が同じであってもよい（例えば、バーコード配列）。第2及び第4の核酸配列が異なってもよい（例えば、異なる機能配列）。ある場合には、第1のビーズに結合された複数の第1のオリゴヌクレオチドの第2の核酸配列が変化してもよく、及び/又は、第2のビーズに結合された複数の第1のオリゴヌクレオチドの第4の核酸配列が変化してもよい。例えば、第2の核酸配列及び/又は第4の核酸配列は、様々な鋳型核酸分子を捕捉するのに適し得るランダムなN - m e rであってもよい。ビーズに結合されたオリゴヌクレオチドの核酸配列は、任意の有用な塩基組成及び長さの任意の有用な配列を有し得る。ある場合には、ビーズに結合されたオリゴヌクレオチドの核酸配列は、カノニカルヌクレオチドのみを含み得るが、他の場合、ビーズに結合されたオリゴヌクレオチドの核酸配列は、1つ以上のヌクレオチド類似体を含み得る。核酸配列は、1つ以上の標識又は色素、例えば1つ以上の蛍光標識、色素、磁気標識、高周波標識、又は他のタグを含み得る。ビーズに結合されたオリゴヌクレオチドの核酸配列は、複製ブロック、開裂可能な塩基、又は可逆的ターミネーターなどの1つ以上の更なる特徴を含み得る。

10

【0147】

本明細書で使用される場合、「プライマー」又は「プライマー分子」という用語は、一般に、鋳型核酸分子の一部に対して相補的なポリヌクレオチドを指す。例えば、プライマーは、鋳型核酸分子の鎖の一部に対して相補的であってもよい。プライマーは、核酸反応（例えば、PCRなどの核酸増幅反応）の成分であり得るプライマー伸長反応などの、核酸合成のための出発点としての機能を果たす核酸の鎖であってもよい。プライマーは鋳型鎖にハイブリダイズしてもよく、その後、時としてポリメラーゼなどの重合酵素を用いて、ヌクレオチド（例えば、カノニカルヌクレオチド又はヌクレオチド類似体）がプライマーの（1つ又は複数の）末端に付加されてもよい。したがって、DNAサンプルの複製中、複製を触媒する酵素は、DNAサンプルに付着したプライマーの3'末端で複製を開始し、反対の鎖をコピーし得る。プライマー（例えば、オリゴヌクレオチド）は、プライマーをビーズ又は粒子などの担体又はキャリアに結合するために使用され得る1つ以上の官能基を有し得る。

20

【0148】

プライマーは、鋳型核酸に対して完全に又は部分的に相補的であってもよい。プライマーは、鋳型核酸に対して配列同一性又は相同性又は相補性を示し得る。プライマーと鋳型核酸との間の相同性又は配列同一性又は相補性は、プライマーの長さに基づき得る。例えば、プライマー長が約20個の核酸である場合、プライマーは鋳型核酸に対して相補的な10個以上の連続する核酸塩基を含有し得る。

30

【0149】

プライマーと鋳型核酸との間の相補性又は相同性又は配列同一性が限定されてもよい。プライマーの長さは、8ヌクレオチド塩基～50ヌクレオチド塩基であってもよい。プライマーの長さは、2ヌクレオチド塩基超、3ヌクレオチド塩基超、4ヌクレオチド塩基、5ヌクレオチド塩基、6ヌクレオチド塩基、7ヌクレオチド塩基、8ヌクレオチド塩基、9ヌクレオチド塩基、10ヌクレオチド塩基、11ヌクレオチド塩基、12ヌクレオチド塩基、13ヌクレオチド塩基、14ヌクレオチド塩基、15ヌクレオチド塩基、16ヌクレオチド塩基、17ヌクレオチド塩基、18ヌクレオチド塩基、19ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基、21ヌクレオチド塩基、22ヌクレオチド塩基、23ヌクレオチド塩基、24ヌクレオチド塩基、25ヌクレオチド塩基、26ヌクレオチド塩基、27ヌクレオチド塩基、28ヌクレオチド塩基、29ヌクレオチド塩基、30ヌクレオチド塩基、31ヌクレオチド塩基、32ヌクレオチド塩基、33ヌクレオチド塩基、34ヌクレオチド塩基、35ヌクレオチド塩基、37ヌクレオチド塩基、40ヌクレオチド塩基、42ヌクレオチド塩基、45ヌクレオチド塩基、47ヌクレオチド塩基又は50ヌクレオチド塩基であってもよい。プライマーの長さは、50ヌクレオチド塩基、47ヌクレオチド塩基、45ヌクレオチド塩基、42ヌクレオチド塩基、40ヌクレオチド塩基、37ヌクレオチド塩基、35ヌクレオチド塩基、34ヌクレオチド塩基、33ヌクレオチド塩基、32ヌクレオチド塩基、31ヌクレオチド塩基、30ヌクレオチド塩基、29ヌクレオチド

40

50

塩基、28ヌクレオチド塩基、27ヌクレオチド塩基、26ヌクレオチド塩基、25ヌクレオチド塩基、24ヌクレオチド塩基、23ヌクレオチド塩基、22ヌクレオチド塩基、21ヌクレオチド塩基、20ヌクレオチド塩基、19ヌクレオチド塩基、18ヌクレオチド塩基、17ヌクレオチド塩基、16ヌクレオチド塩基、15ヌクレオチド塩基、14ヌクレオチド塩基、13ヌクレオチド塩基、12ヌクレオチド塩基、11ヌクレオチド塩基、10ヌクレオチド塩基、9ヌクレオチド塩基、8ヌクレオチド塩基、7ヌクレオチド塩基、6ヌクレオチド塩基、5ヌクレオチド塩基、4ヌクレオチド塩基、3ヌクレオチド塩基又は2ヌクレオチド塩基未満であってもよい。

【0150】

「%配列同一性」という用語は、本明細書では「%同一性」という用語と互換的に使用されてもよく、配列アラインメントプログラムを使用して整列させた場合の2つ以上のヌクレオチド配列間のヌクレオチド配列同一性のレベルを指し得る。本明細書で使用される80%同一性は、定義されたアルゴリズムによって決定される80%配列同一性と同じものとなり得るものであり、所定の配列が別の配列の別の長さで少なくとも80%同一であることを意味する。%同一性は、例えば、所定の配列に対する少なくとも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%、又は少なくとも99%以上の配列同一性から選択され得る。%同一性は、例えば、約60%～約70%、約70%～約80%、約80%～約85%、約85%～約90%、約90%～約95%、又は、約95%～約99%の範囲であってもよい。

【0151】

「%配列相同性」又は「パーセント配列相同性」又は「パーセント配列同一性」という用語は、本明細書では「%相同性」、「%配列同一性」又は「%同一性」という用語と互換的に使用されてもよく、配列アラインメントプログラムを使用して整列させた場合の2つ以上のヌクレオチド配列間のヌクレオチド配列相同性のレベルを指し得る。例えば、本明細書中で使用される場合、80%相同性は、定義されたアルゴリズムによって決定される80%配列相同性と同じものであってもよく、したがって、所定の配列の相団体は、所定の配列の長さによって80%を超える配列相同性を有する。%相同性は、例えば、所定の配列に対する少なくとも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%、又は少なくとも99%以上の配列相同性から選択され得る。%相同性は、例えば、約60%～約70%、約70%～約80%、約80%～約85%、約85%～約90%、約90%～約95%、又は約95%～約99%の範囲であってもよい。

【0152】

本明細書中で使用される場合、「プライマー伸長反応」という用語は、一般に、鋳型核酸の鎖に対するプライマーの結合、それに続く(1又は複数の)プライマーの伸長を指す。また、「プライマー伸長反応」という用語は、二本鎖核酸の変性及び変性した鋳型核酸鎖の一方又は両方に対するプライマー鎖の結合、その後の(1又は複数の)プライマーの伸長を含み得る。プライマー伸長反応を使用して、酵素(例えば、ポリメラーゼなどの重合酵素)を使用することによって鋳型指向様式でヌクレオチド又はヌクレオチド類似体をプライマーに組み込むことができる。プライマー伸長反応は、核酸増幅反応のプロセスであってもよい。

【0153】

本明細書中で使用される「アダプター」という用語は、一般に、例えばターゲット核酸分子と相互作用して配列決定(例えば、次世代配列決定(NGS))を促進することによって、配列決定機器がターゲットポリヌクレオチドを配列決定できるようにするようになっている分子(例えば、ポリヌクレオチド)を指す。配列決定アダプターは、配列決定機器によってターゲット核酸分子を配列決定できるようにし得る。例えば、配列決定アダプターは、ビーズ又はフローセルなどの配列決定システムの固体担体に付着したキャプチャポリヌクレオチドにハイブリダイズ又は結合するヌクレオチド配列を含み得る。配列決定

アダプターは、配列決定システムによってターゲットポリヌクレオチドを配列決定できるようにするヘアピンループを生成するためにポリヌクレオチドにハイブリダイズ又は結合するヌクレオチド配列を含み得る。配列決定アダプターは、別の分子（例えば、ポリヌクレオチド）のフローセル配列に対して相補的であり且つターゲットポリヌクレオチドを配列決定するために配列決定システムによって使用可能なヌクレオチド配列であってもよいシーケンサーモチーフを含み得る。また、シーケンサーモチーフは、合成による配列決定などの配列決定に使用するためのプライマー配列を含み得る。シーケンサーモチーフは、ライブラリーアダプターを配列決定システムに結合するための（１又は複数の）配列を含んで、ターゲットポリヌクレオチド（例えば、サンプル核酸）を配列決定することができる。

10

【 0 1 5 4 】

本明細書中に記載されるように、アダプターは、第１のサブパート及び第２のサブパートを有することができる。第１のサブパート及び第２のサブパートは、配列相補性を有し得る。本明細書中に記載のアダプターは、ペアエンド配列リードを生成するのに有用なペアエンドアダプターであってもよい。

【 0 1 5 5 】

本明細書中で使用される「ポリメラーゼ」、「重合酵素」、又は、「ポリメライゼーション酵素」という用語は、一般に、重合反応を触媒することができる任意の酵素を指し、互換的に使用され得る。重合酵素を使用して、ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を組み込んでプライマーを伸長させることができる。ポリメラーゼの例としては、限定されないが、核酸ポリメラーゼが挙げられる。ポリメラーゼは、天然に存在していてもよく又は合成されていてもよい。ポリメラーゼの例は、 ϕ 29ポリメラーゼ又はその誘導体である。ポリメラーゼは、重合酵素であってもよい。転写酵素又はリガーゼも使用され得る（すなわち、結合の形成を触媒する酵素）。ポリメラーゼの例としては、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、耐熱性ポリメラーゼ、野生型ポリメラーゼ、修飾ポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ ϕ 29 (phi 29) DNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Tliポリメラーゼ、PfuポリメラーゼPwoポリメラーゼ、VENTポリメラーゼ、DEEPVENTポリメラーゼ、Ex-Taqポリメラーゼ、LA-Tawポリメラーゼ、SsoポリメラーゼPocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、MthポリメラーゼES4ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tcaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、白金Taqポリメラーゼ、Tbrポリメラーゼ、Tflポリメラーゼ、Pfu tuboポリメラーゼ、Pyrobestポリメラーゼ、KODポリメラーゼ、Bstポリメラーゼ、Sacポリメラーゼ、Klenowフラグメント、3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ、及び、その変異体、修飾産物及び誘導体が挙げられる。ポリメラーゼは、単一サブユニットポリメラーゼであってもよい。ポリメラーゼは、高い加工性、すなわち、核酸鋳型を放出することなく核酸鋳型にヌクレオチドを連続的に組み込むポリメラーゼの能力を有し得る。

20

30

【 0 1 5 6 】

本明細書で使用される「少なくとも部分的に」という用語は、一般に、全体の量の任意の一部分を指す。例えば、「少なくとも部分的に」は、全体の量の少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又は99.9%を指し得る。

40

【 0 1 5 7 】

本明細書で使用される「バーコード」又は「バーコード配列」という用語は、一般に、1つ以上の特定の核酸を同定するために使用され得る1つ以上のヌクレオチド配列を指す。バーコードは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上のヌクレオチド（例えば

50

、連続ヌクレオチド)を含み得る。バーコードは、少なくとも約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約100又はそれを超える連続ヌクレオチドを含み得る。増幅及び/又は配列決定プロセス(例えば、NGS)に使用されるバーコードは全て異なっているとしてもよい。バーコードを含む核酸の集団における異なるバーコードの多様性は、ランダムに生成されても非ランダムに生成されてもよい。

【0158】

バーコードは、1つ以上のセグメントから構成され得る。例えば、バーコードは、第1の核酸配列を有する第1のセグメントと、第2の核酸配列を有する第2のセグメントとを含み得る。第1の核酸配列は、第2の核酸配列と同じであっても異なっているとしてもよい。複数のセグメントを含むバーコード配列は、スプリットプール方式に従って組み合わせ形態で組み立てられてもよく、このスプリットプール方式では、複数の異なる第1のセグメントが複数の第1のパーティション間で分配され、その内容物は、その後、プールされて複数の第2のパーティション間で分配される。その後、複数の異なる第2のセグメントが、複数の第2のパーティション間で分配されて、複数の第2のパーティション内の複数の異なる第1のセグメントに連結され、その後、複数の第2のパーティションの内容物がプールされる。プロセスは、任意のレベルのバーコード多様性を与えるために、任意の数の異なるセグメント及びパーティションを使用して任意の回数繰り返すことができる。ある場合には、バーコード配列の第1のセグメントがビーズに結合され得る。

【0159】

本明細書中に記載されるように、バーコードの使用は、次世代配列決定技術を使用して複数のサンプルのハイスループット分析を可能にし得る。複数の核酸分子を含むサンプルは、複数のパーティション(例えば、エマルジョン中の液滴)全体に分布していてもよく、各パーティションは、固有のバーコード配列を含む核酸バーコード分子を含む。サンプルは、複数のパーティションのうちの全て又は大部分のパーティションが複数の核酸分子のうちの少なくとも1つの核酸分子を含むように分割され得る。その後、所定のパーティションの核酸分子及び核酸バーコード分子を使用して、核酸分子の少なくとも1つの配列の1つ以上のコピー及び/又は相補体を(例えば、核酸増幅反応を介して)生成することができ、このコピー及び/又は相補体は、核酸バーコード分子のバーコード配列又はその相補体を含む。その後、様々なパーティションの内容物(例えば、増幅産物又はその誘導体)をプールし、配列決定に供することができる。ある場合には、核酸バーコード分子がビーズに結合され得る。そのような場合、コピー及び/又は相補体もビーズに結合され得る。核酸バーコード分子並びにコピー及び/又は相補体は、配列決定機器を使用して核酸配列決定を容易にするためにパーティション内又はプール後にビーズから放出され得る。複数の核酸分子のうちの核酸分子のコピー及び/又は相補体はそれぞれ固有のバーコード配列又はその相補体を含むため、核酸配列決定アッセイを使用して取得された配列決定リードは、それらに対応する複数の核酸分子のうちの核酸分子と会合され得る。この方法は、複数のパーティション間で分割された細胞内に含まれる核酸分子及び/又は複数の異なるサンプルに由来する核酸分子に適用され得る。

【0160】

幾つかの態様では、本明細書において、パーティションが複数のビーズを含むシステム、方法及び組成物が提供される。幾つかの態様では、本明細書において、パーティションが2つ以上の検体(例えば、核酸分子、例えば鋳型核酸分子)を含むシステム、方法、及び組成物が提供される。有益なことに、本開示のシステム、方法、及び組成物は、下流側処理をうまく行なうために(例えば、シングルビーズを用いる、単一検体を用いる)内容物の単一装填に依存する必要がない。有益には、本開示のシステム、方法、及び組成物は、ポアソン分布に従って(例えば、シングルビーズを用いて、単一検体を用いて)最大でも単一に装填されるパーティションを形成することに依存する必要がなく、これは、多くの場合、かなりの数のパーティションが特定のリソース(例えば、ビーズ、検体、試薬など)を消費するが特定の他のリソース(例えば、ビーズ、検体)のうちの1つ以上の欠如(又はそうでなければ誤った数もしくは誤った組成)に起因して有用ではないリソースの

10

20

30

40

50

浪費をもたらし得る。幾つかの例では、有益には、本開示のシステム、方法及び組成物は、単一装填に依存するシステム、方法及び組成物よりも高い効率及び／又は高い出力を達成することができる。

【 0 1 6 1 】

方法

本開示は、生体サンプルを分析及び／又は処理するための方法を提供する。特に、本開示は、1つ以上の核酸分子（例えば、複数の核酸分子）を含む核酸サンプルを分析及び／又は処理する方法を提供する。核酸サンプル（例えば、生体サンプル又は無細胞生体サンプル）は、複数のデオキシリボ核酸（DNA）及び／又はリボ核酸（RNA）分子などの複数の核酸分子を含み得る。本明細書中に開示される生体サンプルを分析及び／又は処理する方法は、複数のパーティション（例えば、複数の液滴を含むエマルジョンを生成することなどによって、複数のウェル又は液滴）を生成することを含むことができ、各パーティション（例えば、液滴又はウェル）は、（i）複数のビーズ及び（ii）少なくとも1つの核酸分子（例えば、生体サンプルのターゲット核酸分子）を含み得る。また、複数のパーティションの所定のパーティションは、1つ以上の試薬を含み得る。

【 0 1 6 2 】

場合によっては、複数のパーティションのうちの1つのパーティション（例えば、所定のパーティション）は、少なくとも2つのビーズを含み得る。したがって、本開示の方法は、エマルジョン中の液滴などのパーティション内部の核酸分子に対するビーズの比率（例えば、2以上又は4以上の比率など）を増加させることができる。複数のパーティションのうちの第1のパーティションの少なくとも1つの核酸分子は、複数のパーティションのうちの第2のパーティションの少なくとも1つの核酸分子と異なってもよい（例えば、異なるヌクレオチド配列を有する）。例えば、第1のパーティションの少なくとも1つの核酸分子は、第1の生体サンプル（例えば、第1の被検体からのもの）に由来してもよく、第2のパーティションの少なくとも1つの核酸分子は、第2の生体サンプル（例えば、第2の被検体又は第1の被検体からのものであるが、異なる時間に又は異なる方法を介して採取されたもの）に由来し得る。別の例では、第1のパーティションの少なくとも1つの核酸分子は、生体サンプルからの第1の細胞に由来してもよく、第2のパーティションの少なくとも1つの核酸分子は、同じ生体サンプルからの第2の細胞に由来し得る。或いは、複数のパーティションのうちの第1のパーティションの少なくとも1つの核酸分子は、複数のパーティションのうちの第2のパーティションの少なくとも1つの核酸分子と同一（例えば、同一のヌクレオチド配列を有する）又はほぼ同一（例えば、高い配列相補性を有する）であってもよい。

【 0 1 6 3 】

複数のパーティションのうちの1つのパーティション内に配置された少なくとも1つの核酸分子は、少なくとも1つの核酸分子の1つ以上の増幅産物を生成することによって、パーティション内（例えば、エマルジョン中の液滴の内部）で増幅され得る。増幅プロセス及び／又は配列決定プロセスは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を介して行なうことができる。増幅プロセスは、少なくとも1つの核酸分子がビーズに付着され（例えば、共有又は非共有連結され）る間又は少なくとも1つの核酸分子がビーズに付着していない間に実施され得る。例えば、少なくとも1つの核酸分子がパーティション内に含まれる少なくとも2つのビーズのうちの1つのビーズに付着される間に、少なくとも1つの核酸分子の1つ以上の増幅産物が複数のパーティションの1つのパーティション内で生成され得る。複数のパーティションの内容物がプールされてもよい（例えば、核酸分子並びに対応する増幅産物及びビーズは、エマルジョン中の複数の液滴のうちの液滴から放出され得る）。複数のパーティションのうちのパーティションからビーズ-核酸分子複合体（又は複数の複合体）が放出されると、ビーズ-核酸分子複合体（又は複数の複合体）が他の材料から（例えば、エマルジョンの複数の液滴のうちの液滴のプールされた内容物から）分離され（例えば、磁気的に分離され）得る。続いて、形成されてしまった可能性のある複数のパーティションのうちの1つのパーティションの少なくとも1つの核酸分子もしくはそれ

10

20

30

40

50

に対応する任意の増幅産物又はその誘導体をアッセイ又は分析することができる（例えば、シーケンサーにおいてヌクレオチド配列を決定することによって）。

【 0 1 6 4 】

図 1 は、一般的な次世代配列決定（NGS）手法の概略図を描き、遺伝物質が分析から逃れることができ、及び／又は潜在的なノイズ源及び突然変異が導入され得るワークフローの部分を示す。生体サンプルを提供することができる（101）。例えば、生体サンプルは、cfDNA及び剪断gDNAなどの適切なサイズのDNAを含み得る。生体サンプルは、稀な変異体を含む全材料を表わす限られた入力（111）であってもよい。生体サンプルは、アダプターライゲーション（102）に供され得る。このプロセスの間、ゲノム材料は、不完全なライゲーション及び非生産的なアダプターの組み合わせなどのために失われ得る（112）。アダプター連結サンプルをPCT増幅に供してもよく（103）、これにより、コピー数及び突然変異の増加をもたらし得る（113）。産物は、エマルジョンPCR（104）などによるクローン増幅に供され得る。このプロセスの間に、二重ポアソン装填スキーム、混合鋳型のクローンコピーを最小化するための最適化スキームなどにより、より多くの材料が失われる可能性があり、突然変異数が増加する可能性がある（114）。クローン増幅産物を配列決定に供することができる（105）。このプロセス中、一般的なノイズ及び信号減衰（115）からエラーが生じる可能性がある。図 2 は、ワークフローに対する修正が収率（例えば、分析された生体サンプルから得られた情報の量）を増加させて核酸分析中のノイズ及び突然変異の確率を低下させ得る、図 1 の概略図の修正バージョンを描く。生体サンプルを提供することができる（201）。この準備の間、PCR濃縮を行なうことにより、サンプル損失を低減することができる（211）。場合によっては、突然変異率が増加し得る。生体サンプルは、アダプターライゲーション（202）に供され得る。このプロセスの間、ランダム化された識別子を有するアダプターが使用されてもよい。場合によっては、ペアエンドアダプターが使用されてもよい（212）。配列決定中（例えば、205）、そのようなアダプターは、複数のリードの必要性を低減又は排除し得る。アダプター連結サンプルをPCT増幅に供してもよく（203）、その間に突然変異をランダム化識別子によって修正することができる（213）。産物は、エマルジョンPCR（204）などによるクローン増幅に供され得る。このプロセスの間、ライブラリー鋳型ごとに複数のビーズを使用することができ（214）、これにより鋳型損失を最小限に抑えることができる。クローン増幅産物を配列決定に供することができる（205）。このプロセスの間、複数のリード及び／又はペアエンドリードが処理され得る（215）。ある場合には、1ライブラリー鋳型当たり複数のビーズ（例えば、214）を使用することにより、複数のリードを生成する必要性及び／又はランダム化された識別子を使用してPCR増幅由来変異を補正する必要性が低減又は排除され得る。本明細書で提供される方法は、核酸増幅及び配列決定を強化するための一般的なNGS手法に対する修正を導入する。本開示の方法の利点は、パーティション（例えば、液滴）内の核酸分子に対するビーズの比率（例えば、>2）を増大させることができることであり、これは、例えば、所定の核酸分子のより高いクローンコピー数及び減少したサンプル又は鋳型損失に起因して、サンプル分析中の精度及び感度の向上をもたらし得る。

【 0 1 6 5 】

本明細書で使用される「二重ポアソン」という用語は、一般に、2つの異なる種類の項目からの単一の個別の項目をランダムサンプリングによってパーティションに分配する統計的困難性を指す。一般に、それぞれの種の装填はポアソン統計によって支配される。M個の等しいパーティション間にランダムに分布したN個の項目の所定のケースの場合、パーティションに見られる相対母集団は、パーティションに対する項目の比率に依存する。

【 数 1 】

$$\lambda = \frac{N}{M}$$

10

20

30

40

50

【 0 1 6 6 】

。

【 0 1 6 7 】

項目の 2 つの種が別々にパーティションに分配される場合、それぞれがそれ自体のポアソン分布に従うことになり、それにより、二重ポアソン分布がもたらされ、せいぜい、各種の単一インスタンスを有するパーティションの小部分がもたらされる。パーティションに対する項目の比率 が与えられると、 n 個の項目を含むパーティションの確率は、以下のように計算することができる。

【数 2】

$$P(n|\lambda) = \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!}$$

10

【 0 1 6 8 】

。

【 0 1 6 9 】

単一のポアソンプロセスの場合、パーティションごとに 1 つの装填で 1 つの項目のみを有するパーティションの割合は、次のように計算される。

20

【 0 1 7 0 】

$$P(n=1 | \lambda=1) = 1/e \approx 36.8\%.$$

【 0 1 7 1 】

これは、導関数

【数 3】

$$P(n=1|\lambda=1) = 1/e \approx 36.8\%$$

【 0 1 7 2 】

を設定して任意の n に関して $n =$ の場合に極値が生じることに留意することによって導出することができる。これは、項目の 36.8% にも相当する。2 つの種 a 及び b がパーティションに装填される場合、分布は次の通りである。

30

【数 4】

$$P(n_a, n_b | \lambda_a, \lambda_b) = P(n_a | \lambda_a) P(n_b | \lambda_b) = \frac{\lambda_a^{n_a} \lambda_b^{n_b} e^{-\lambda_a - \lambda_b}}{n_a! n_b!}$$

【 0 1 7 3 】

。

【 0 1 7 4 】

これを、それぞれの種ごとに $\lambda = 1$ に関して以下の表 1 にまとめる。この場合、 $1/e \approx 36.8\%$ のパーティションのみが、種 a 及び b のそれぞれの単一の項目を有する。

40

50

【表 1】

b の数	a の数				
	0	1	2	3	4
0	13.5%	13.5%	6.8%	2.3%	0.6%
1	13.5%	13.5%	6.8%	2.3%	0.6%
2	6.8%	6.8%	3.4%	1.1%	0.3%
3	2.3%	2.3%	1.1%	0.4%	0.1%
4	0.6%	0.6%	0.3%	0.1%	0.0%

10

表 1-パーティション集団の分布

【0175】

本開示で企図されるように、核酸鋳型の種（例えば、a）及びビーズの種（例えば、b）が液滴（例えば、パーティション）に分割される場合、鋳型、ビーズ、パーティション及び陽性ビーズ（少なくとも1つの鋳型を有するパーティション中のビーズ）の相対コストは実質的に変動し得るため、template及びbeadに関する最適値は、コストを最小化して効率を高めるように最適化され得る。例えば、パーティション及びビーズがより低いコストで重み付けされてもよく、鋳型及び陽性ビーズがより高いコストで重み付けされてもよい。そのような最適化は、液滴及びビーズにコストがかかる鋳型を液滴に装填することができないなど、異なる故障事象のコストを考慮することができる。しかしながら、この場合、ビーズはネガティブビーズ（鋳型を含まないパーティションのビーズ）であるため、陰性ビーズを洗い流す濃縮ステップ後に更なるコストは評価されない。別の故障事象では、パーティションに2つ以上の鋳型及び1つ以上のビーズが装填され、それにより、鋳型及びビーズのコストがかかり、更に下流側の処理コストを招く可能性があるポリクロール（混合鋳型を含む）である1つ以上の陽性ビーズが作成される。

20

30

【0176】

本明細書で提供される方法に従って使用するための生体サンプルは、固体生体サンプル（例えば、生検サンプルなどの組織サンプル）又は液体生体サンプル（例えば、血液などの体液から）であってもよい。生体サンプルは、複数の核酸分子を含み得る。ある場合には、生体サンプルは、複数の核酸分子を含む複数の細胞を含み得る。他の場合では、生体サンプルは無細胞生体サンプル（例えば、本明細書に記載されるように）であってもよい。生体サンプルを処理して、細胞物質及び/又は他の残屑を除去し、細胞を単離及び/又は溶解し、試薬を添加又は除去し、或いはその後の処理のために生体サンプルを調製することができる。例えば、生体サンプルは、無細胞生体サンプルを提供するために処理され得る。本明細書に開示される方法を用いて分析され得る核酸分子は、無細胞核酸分子（例えば、cfDNA又はctDNA）であってもよい。無細胞核酸分子は、生物又は被検体の特定の組織又は器官、例えば癌性組織に由来していてもよく、低濃度から非常に低濃度（例えば、 $< 10 \text{ ng/mL}$ ）でサンプル中に存在していてもよい。

40

【0177】

本明細書に開示される生体サンプルを分析する方法は、極性及び粘度などの同じ又は異なる物理化学的特性を有する2つ以上の溶媒、液体、又は流体を接触させること（例えば、混合又は組み合わせ）を含み得る。2つ以上の材料を接触させると、複数の液滴（例えば、油中水型エマルジョン又は水中油型エマルジョン）を含むエマルジョンが生成され得

50

る。2つ以上の材料（例えば、液体）は、非混和性であってもよい。本明細書に開示される方法は、第1の極性を有する（例えば、特定の第1の親水性又は親油性を有する）第1の材料（例えば、溶媒又は溶液）を、第2の極性を有する（例えば、特定の第2の親水性又は親油性を有する）第2の材料（例えば、溶媒又は溶液）と接触させることを含み得る。第1の材料（例えば、水溶液）の極性は、第2の材料（例えば、油などの非極性流体）の極性と同一であってもよく、類似していてもよく、又は異なってもよい。本明細書に開示されるように、第1の材料は水溶液であってもよく、第2の材料は油であってもよい。水溶液が油と接触すると、エマルジョンが形成され得る（例えば、液滴生成接合部で）。エマルジョンは、分散相と連続相とを有していてもよい。

【0178】

一般に、本開示の方法は、水性分散相及び連続油相を含むエマルジョンを含む。したがって、本明細書に開示される方法は、複数の核酸分子、複数のビーズ、及び複数の試薬を含む水溶液と油とを接触させて、複数の核酸分子の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）、複数のビーズのビーズ、及び複数の試薬の試薬を含む複数の水性液滴を生成することを含み得る。ある場合には、複数の核酸分子は、複数の水性液滴が複数の細胞を含み得るように、複数の細胞内に含まれ得る。幾つかの例では、液滴は1つ以下の細胞を含み得る。場合によっては、同じ相の1つ以上の液滴を組み合わせてもよい。例えば、複数の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）を含む複数の第1の液滴（例えば、水性液滴）を、複数のビーズ及び/又は試薬を含む複数の第2の液滴（例えば、水性液滴）と組み合わせて（例えば、併合又は合体される）、複数の核酸分子並びに複数のビーズ及び/又は試薬を含む複数の第3の液滴（例えば、水性液滴）を提供することができる。第1及び第2の複数の液滴は、同じ材料（例えば、極性などの同じ特性を有する）を含んでもよく、又は異なる材料（例えば、異なる極性などの異なる特性を有する）であってもよい。他の場合では、複数の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）を含む第1の材料（例えば、水溶液）を、複数のビーズ及び/又は試薬を含む第2の材料（例えば、水溶液）と組み合わせて、複数の核酸分子並びに複数のビーズ及び/又は試薬を含む第3の材料を提供することができる。その後、第3の材料を、第1及び/又は第2の溶液（例えば、油）と非混和性であってもよい液体又は流体と接触させて（又は接触状態に至らせて）、複数の液滴（例えば、水性液滴）を生成することができる。したがって、第1及び第2の溶液は水溶液であってもよく、第1及び第2の溶液と混和しない第3の液体又は流体は油（又はその任意の誘導体）であってもよい。

【0179】

液滴は、任意の有用な方法によって生成され得る。例えば、エアロゾル又はエアナイフ液滴発生器を使用して、前駆体流体（例えば、水溶液などの第1の材料）の液滴を別の溶液に分配することによって液滴を生成することができる。マイクロ流体液滴生成方法も使用され得る。例えば、第1の材料（例えば、水溶液）は、液滴生成接合部に向かって第1のチャンネル内を流れることができ、液滴生成接合部で、液滴生成接合部に向かって第2のチャンネル内を流れる第2の材料（例えば、油）と接触し、そこで液滴が形成され得る。場合によっては、第1の材料の液滴は、第1の材料をノズルに通して第2の材料を含む領域に押し込むことによって形成されてもよい。第1の材料は、水溶液であってもよく、形成された液滴が核酸分子、ビーズ及び/又は試薬を含み得るように、複数の核酸分子、複数のビーズ及び/又は複数の試薬などの1つ以上の要素を含んでもよい。様々な他の構成を使用して液滴を生成することができる。液滴生成方法のそのような構成及び詳細の例は、例えば、米国特許第9,694,361号及び米国特許出願公開第2018/0334670号に見出すことができ、これらは参照によりその全体が本願に組み入れられる。

【0180】

場合によっては、複数のパーティション（例えば、液滴）を生成することは、複数の核酸分子を含む第1の水溶液及びビーズ（例えば、その表面に付着したプライマー配列を有するミード）などの複数の粒子を含む第2の水溶液の使用を含み得る。その後、第1の水溶液及び第2の水溶液を、第1及び/又は第2の溶液と非混和性であってもよい第3の液

10

20

30

40

50

体又は流体（例えば、油）と接触（例えば、液滴生成接合部で）させることができる。この非混和性又は極性の差は、エマルジョン（例えば、油中水性エマルジョン）の形成をもたらす得る。本明細書に記載のエマルジョンは、液滴（例えば、水性液滴）などの複数のパーティションを含み得る。これらの液滴は、ビーズ、核酸分子、及び試薬などの更なる成分を含み得る。ある場合には、本明細書で提供される方法に従って生成された複数の液滴の液滴はそれぞれ、1つ以上の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）、2つ以上のビーズ、及び1つ以上の試薬を含み得る。そのような試薬は、1つ以上の核酸分子に対応する増幅産物が液滴内で生成され得る反応容器として機能し得る。液滴がそれぞれ1つ以上の核酸分子を含む1つ以上の細胞を含む場合、試薬は、その中の1つ以上の核酸分子へのアクセスを提供するために細胞を溶解及び／又は透過処理するための試薬を含み得る。

10

【0181】

複数の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）は、第1の溶液（例えば、水溶液）に提供されてもよく、複数のビーズは、第2の溶液（例えば、水溶液）に提供されてもよい。第1及び第2の溶液は、同じ溶液（例えば、両方の水溶液）であってもよいし、異なる溶液であってもよい。複数の核酸分子を含む第1の溶液及び複数のビーズを含む第2の溶液を、第3の液体又は流体（例えば、油）と接触させることができる。第3の液体又は流体は、第1及び第2の溶液の両方と非混和性であってもよく、第1及び第2の溶液（例えば、本明細書に記載されるように、）と接触したときにエマルジョンを形成してもよい。1つ以上の溶液を1つ以上の非混和性流体と接触させることから生じるエマルジョンは、複数のパーティション（例えば、複数の液滴）を形成又は生成することができる。

20

【0182】

本明細書に開示されるパーティションは、水性分散相から形成され、連続相（例えば、油）によって封入され得る液滴であってもよい。エマルジョンは、連続相内の分散相粒子（例えば、液滴などのパーティション）のサイズ（例えば、おおよその直径）に応じて、マイクロエマルジョン又はナノエマルジョンであってもよい。場合によっては、パーティションは、第1のパーティションを第2のパーティションから分離する又はパーティションの内部ボリュームをパーティションの外側のボリュームから分離するように構成された任意のユニットを指すことができる。例えば、パーティションは、ウェル、マイクロウェル、容器、チューブ、貯蔵所、レセプタクル又は他の容器であってもよい。

【0183】

30

したがって、分割は、本明細書では、複数の液滴（例えば、エマルジョン中の水性液滴）又はウェルの提供として説明され得る。複数の液滴のうちの1つの液滴などの複数のパーティションのうちの1つのパーティションは、1つ以上の核酸分子及び／又は1つ以上の（例えば、2つ以上）ビーズを含む水溶液を含み得る。また、パーティションは、1つ以上の試薬、例えば、細胞を溶解又は透過処理するための1つ以上の試薬、又は増幅反応（例えば、ヌクレオチド、重合酵素など）を行なうための1つ以上の試薬を含み得る。複数のパーティションのうちのパーティションは、異なる構成要素又はその量を含んでもよい。例えば、複数のパーティションのうちの第1のパーティションは、1つ以上の核酸分子を含み、ビーズを含まなくてもよく、複数のパーティションのうちの第2のパーティションは、1つ以上の核酸分子及び2つ以上のビーズを含んでもよい。更に、複数のパーティションのうちの第3のパーティションは、1つ以上の核酸分子及び1つのビーズを含んでもよく、複数のパーティションのうちの第4のパーティションは、1つ以上のビーズを含んでもよく、核酸分子を含まなくてもよい。場合によっては、複数のパーティションのうちの1つ以上のパーティションは、非占有（例えば、核酸分子、ビーズ又は試薬を含まない）であってもよい。パーティション内の材料の分布は、ポアソン分布によって少なくとも部分的に制御されてもよい。場合によっては、液滴内に供給される材料（例えば、核酸分子、ビーズ及び試薬）の量は、様々な溶液中に供給される材料の量並びにマイクロ流体チャネルを通る溶液及び流体の流量を最適化することによって調整することができる。例えば、マイクロ流体チャネルを通る流体又は溶液の流量は、特定の圧力又は真空の適用、及び／又はチャネルの長さ及び幅の慎重な選択によって少なくとも部分的に制御するこ

40

50

とができる。濾過構造、テーパ領域、流量調整器、及びエアトラップなどの要素を使用して、液滴生成システムを使用して生成された液滴の占有率を制御することもできる。一例では、過剰なビーズを使用してポアソン統計を無効にし、そうでなければ生成され得るよりも少なくとも2つのビーズを含むより多くのパーティションを生成しようと試みることができる。例えば、液滴生成システムには、少なくとも2つのビーズを含む複数のパーティションのより大きな割合のパーティションの生成を促進するためにビーズが過剰に装填され得る。

【0184】

場合によっては、最大で約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、又はそれ以下の生成されたパーティションが非占有さであってもよい。場合によっては、最大で約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、又はそれ以下の生成されたパーティションはビーズを含まない。ある場合には、最大で約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、又はそれ未満の生成されたパーティションは、核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）を含まない。場合によっては、最大で約90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、又はそれ以下の生成されたパーティションは試薬を含まない。生成されたパーティションの少なくとも1つのサブセットは、1つ以上の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）、1つ以上のビーズ、及び1つ以上の試薬を含み得る（例えば、本明細書に記載されるように）。生成されたパーティションの少なくとも1つのサブセットは、1つ以上の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）、2つ以上のビーズ（例えば、少なくとも2つのビーズ）、及び1つ以上の試薬を含み得る（例えば、本明細書に記載されるように）。液滴などのパーティションは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は少なくとも5つの核酸分子と、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも5つ、又は少なくとも10個のビーズとを含み得る。

【0185】

液滴などのパーティションは、それらのヌクレオチド配列に関して、及び/又はそれらの核酸分子が連結されている1つ以上のアダプター配列に関して、同一又は異なるなど、同一又は異なる少なくとも2つの核酸分子を含み得る。一般に、本開示のパーティションは、前記パーティションに存在する核酸分子の数と比較して過剰なビーズを含み得る。パーティションは、核酸分子の少なくとも2倍の数のビーズを含み得る。液滴などのパーティションの少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又はそれ以上のビーズは、同じ（例えば、同一）ビーズであってもよく、又は異なるビーズであってもよい。異なるビーズは、サイズ、直径、流動性、剛性、多孔性、又は圧縮性などの異なる特性を含み得る。異なるビーズは、異なる材料（例えば、異なるヒドロゲル）から形成されてもよい。ある場合には、パーティションは、ヒドロゲルビーズである少なくとも1つのビーズ及び常磁性である少なくとも1つのビーズを含み得る。更に、第1の液滴などの第1のパーティションの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも5つ、又は少なくとも10個のビーズは、第2の液滴などの第2のパーティションの少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも5つ、又は少なくとも10個のビーズと同じであっても異なってもよい。ビーズは、それに結合された複数の材料（例えば、核酸バーコード分子又はプライマー分子）を含んでもよい（例えば、ビーズの構成要素の表面に結合又は連結される）。

【0186】

複数のパーティション（例えば、各液滴）の各パーティション（例えば、複数の液滴）は、複数のパーティション（例えば、別の液滴）の任意の他のパーティション（例えば、複数の液滴）、又はそれらの任意の組み合わせと比較して、同一又は異なる核酸分子及び/又は同一又は異なるビーズのいずれかを含み得る。したがって、複数のパーティション（例えば、複数の液滴）の第1のパーティション（例えば、第1の液滴）は、複数のパーティション（例えば、複数の液滴）の第2のパーティション（例えば、第1の液滴）と比

10

20

30

40

50

較して、同一又は異なる核酸分子（例えば、異なるヌクレオチド配列を有する）を含み得る。同様に、第1のパーティション（例えば、第1の液滴）は、第2のパーティション（例えば、第1の液滴）と比較して同一又は異なるビーズ（例えば、異なるプライマーを有する）を含んでもよい。

【0187】

本明細書に記載の粒子（例えば、ビーズ）（例えば、エマルジョン液滴などのパーティションの内側に位置するビーズ）は、複数のプライマー分子（例えば、核酸バーコード分子）を含み得る。複数のプライマー分子は、ビーズに付着され（例えば、化学的に連結され）てもよく、1つ以上のプライマー分子から構成されてもよい。ビーズに付着され得る1つ以上のプライマー分子は、同一又は異なるヌクレオチド配列を含み得る。複数のプライマー分子は、核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）がビーズに結合された複数のプライマー分子のうちの少なくとも1つのプライマー分子に結合し（例えば、共有結合又は非共有結合し）又はハイブリダイズし、それによって核酸分子をビーズに連結（例えば、固定化）することができるように、ビーズに付着され（例えば、化学的に連結され）てもよい。複数のプライマー分子を使用して、1つ以上の増幅反応（例えば、PCR）を行ない、液滴などのパーティションの内側に複数の増幅産物を生成することができる。1つ以上の増幅反応は、1つ以上のプライマー伸長反応を含んでもよく、この反応は、ターゲット核酸分子へのプライマーのハイブリダイゼーション、及びその後のターゲット核酸分子の配列の相補体を生成するためのプライマー分子の伸長（例えば、重合酵素を介して）を含み得る。各パーティション（例えば、液滴）で生成される増幅産物は、パーティション（例えば、同一のヌクレオチド配列を有する）内に含まれる核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）又はその誘導体もしくはフラグメント（例えば、異なるヌクレオチド配列を有する）の同一のコピーであってもよい。そのような誘導体及びフラグメントは、それらのヌクレオチド配列の長さ及び/又は配列が異なることができ、増幅反応中に生成され得る（例えば、PCR）。場合によっては、増幅反応を使用して、1つ以上の配列を増幅産物に組み込むことができる。例えば、1つ以上のバーコード配列、固有分子識別子、アダプター配列、フローセルアダプター、又は他の配列を増幅産物に組み込むことができる。そのような配列は、（例えば、核酸配列決定アッセイを介した）後続の処理を容易にすることができる。

【0188】

例えば、第1のビーズは、それに結合した第1のセットの核酸バーコード分子を含んでもよく、第2のビーズは、それに結合した第2のセットの核酸バーコード分子を含んでもよい。第1の核酸バーコード分子セットの核酸バーコード分子はそれぞれ、第1のバーコード配列及び第1のプライマー配列を含んでもよく、第2の核酸バーコード分子セットの核酸バーコード分子はそれぞれ、第2のバーコード配列及び第2のプライマー配列を含んでもよい。第1のバーコード配列は、第2のバーコード配列と異なってもよい。第1のプライマー配列は、第2のプライマー配列と同じであっても異なってもよい。所定のパーティションの第1及び第2のビーズは、互いに連結（例えば、繋がれている）されてもよい。バーコード配列は、ビーズが同じバーコード配列を含まないように固有であってもよい。或いは、バーコード配列は、バーコード配列が異なるパーティション間で繰り返されることが予想されないように著しく希釈され得る（例えば、少なくとも100万、少なくとも1000万、又はそれ以上の異なるバーコード配列など、そのような多数の中に存在するバーコード配列が使用される）。一例では、複数のパーティションのうちの第1のパーティションは、（i）核酸バーコード分子の第1のセットが結合されて成る第1のビーズであって、核酸バーコード分子のそれぞれが第1のバーコード配列及び第1のプライマー配列を含む、第1のビーズと、（ii）核酸バーコード分子の第2のセットが結合されて成る第2のビーズであって、核酸バーコード分子のそれぞれが第2のバーコード配列及び第2のプライマー配列を含む、第2のビーズとを含み得る。複数のパーティションのうちの第2のパーティションは、（i）核酸バーコード分子の第3のセットが結合されて成る第3のビーズであって、核酸バーコード分子のそれぞれが第3のバーコード配列

及び第3のプライマー配列を含む、第3のビーズと、(i i) 核酸バーコード分子の第4のセットが結合されて成る第4のビーズであって、核酸バーコード分子のそれぞれが第4のバーコード配列及び第4のプライマー配列を含む、第4のビーズとを含み得る。第1、第2、第3、及び第4のバーコード配列が全て互いに異なってもよい。第1、第2、第3及び第4のプライマー配列が全て同じであってもよい。例えば、様々なプライマー配列は、所定のターゲット核酸分子、又は1つもしくは複数のターゲット核酸分子に結合されたアダプターにハイブリダイズする及び/又はこれらを捕捉するように構成されたターゲット化プライマー配列であってもよい。一例では、様々なプライマー配列は、ポリ(T) 配列を含み、メッセンジャーRNA(mRNA) 分子などのリボ核酸(RNA) 分子のポリ(A) 配列にハイブリダイズするように構成され得る。

10

【 0 1 8 9 】

図4は、鋳型核酸分子に結合され得る機能配列の一例を示す。例えば、機能配列は、増幅プライマー配列、配列決定プライマー配列、それらの相補体及び/又はそれらの組み合わせである。増幅プライマー配列は、溶液増幅プライマー配列であってもよい。増幅プライマー配列は、基板固定化プライマー配列であってもよい。配列決定プライマー配列は、コード鎖の配列決定を容易にするように構成され得る。配列決定プライマー配列は、鋳型鎖の逆相補体の配列決定を促進するように構成され得る。左パネルの左部分は、鋳型核酸分子の第1鎖420に結合された基板固定化プライマー分子403を介して表面450に固定化された鋳型核酸分子を示す。鋳型核酸分子の第2鎖430は、コード鎖の配列決定のためのアダプター406並びに溶液増幅プライマー分子407を含む。左パネルの右部分

20

は、鋳型核酸分子の第2鎖430に結合された基板固定化プライマー分子403を介して表面450に固定化された鋳型核酸分子の同一のコピーを示す。核酸分子の第1鎖420は、溶液増幅プライマー分子407と、逆相補鎖の配列決定のためのアダプター408とを含む。基板固定化プライマー(例えば、403)は、第2のアダプター402(「アダプター2」)と見なされてもよく、一方、鋳型核酸分子の所定の鎖に結合された増幅及び配列決定プライマー(例えば、406及び407, 408及び407)は、一緒になって第1のアダプター401(「アダプター1」)を構成し得る。図4に示すように、第1のアダプター401は、様々な配列が異なる融解温度を有することができ、したがって、例えばアダプターを含む分子を所定の温度範囲に加熱することによって部分的に変性され得るように構成され得る。図4の右側パネルは、配列決定アダプター475(例えば、配列決定プライマー)を介して第2の鋳型核酸分子480に連結された第1の鋳型核酸分子470を示し、複合体は、基板固定化プライマー分子465を介して基板460に固定化される。配列決定アダプター475は、ステムループ構成403(「アダプター1」)で提供されてもよく、複合体の自由端に付加されたアダプター485は、Y字形構成404(「アダプター2」)で提供されてもよい。アダプター485は、配列決定プライマー及び溶液増幅プライマーを含み得る。

20

30

【 0 1 9 0 】

1つ以上の異なるプライマー分子が1つのビーズに連結され(例えば、化学的に連結され)得る限りにおいて、本明細書中に記載のパーティション又は液滴は複数のビーズを含んでもよく、この場合、各ビーズは1つ以上のプライマー分子に連結され、1つ以上のプライマー分子は同一であっても異なってもよい(例えば、同一又は異なるヌクレオチド配列を含む)。換言すれば、単一のパーティション又は液滴内の複数のビーズは、複数の同一又は異なる核酸分子(例えば、ターゲット核酸分子)に結合することができる複数の同一又は異なるプライマー分子を含み得る。そのため、複数の核酸分子をパーティションで増幅し、複数のプライマー分子を用いて複数の増幅産物を生成してもよい(例えば、核酸バーコード分子)。また、本開示の方法は、第1のビーズを第2のビーズに(例えば、1つ以上の化学リンカー又は1つ以上のスプリントオリゴヌクレオチドを介して)連結することによって形成され得るビーズ対の使用を含んでもよく、ビーズ対の第1のビーズ及び第2のビーズは異なるプライマー分子(例えば、核酸バーコード分子)を含む。

40

【 0 1 9 1 】

50

ビーズは、1つ以上のリンカーを介して連結され得る。リンカーはオリゴヌクレオチドであってもよい。リンカーは、1つ以上の炭水化物分子を含み得る。リンカーは、親和性結合タンパク質を含み得る。リンカーは親水性であってもよい。リンカーは疎水性であってもよい。リンカーは静電的であってもよい。リンカーは標識化されていてもよい。リンカーは、開裂可能なリンカー又は開裂不可能なリンカーであってもよい。1つ以上のヌクレオチド及び/又は1つ以上のリンカー部分は、色素、フルオロフォア又は量子ドット（例えば、本明細書に記載されるように、）で標識化され得る。

【0192】

複数のパーティション（例えば、複数の液滴）の各パーティション（例えば、液滴）は、1つ以上のターゲット核酸分子及び1つ以上のビーズに加えて、1つ以上の試薬を更に含み得る。各パーティションの内側に存在し得る試薬は、緩衝液（例えば、特定の濃度の様々なイオン）、タンパク質（例えば、重合酵素などの酵素）、モノマー分子（例えば、dNTPなどのヌクレオチド）、オリゴマー分子（例えば、オリゴヌクレオチド）、及びポリマー分子（例えば、合成核酸分子などの核酸）を含み得る。試薬は、細胞を溶解又は透過処理して、その中の核酸分子へのアクセスを提供するのに有用であり得る。試薬は、増幅及び/又はプライマー伸長反応に有用であり得る。「試薬」核酸分子は（生体サンプルの「サンプル」又は「ターゲット」核酸分子とは対照的に）、プライミング配列及び/又は固有分子識別子（例えば、ランダム化された識別子又はバーコード）を含み得る。本明細書に記載及び使用されるプライミング配列は、ターゲット特異的又は非ターゲット特異的（例えば、ランダムなN-mer）であってもよい。更に、試薬核酸分子は、配列決定アダプター及びフローセル配列などの機能配列を含んでもよい。そのような「試薬」核酸分子は、ビーズ（例えば、本明細書に記載されるように、）に結合されてもよい。本明細書に開示される重合酵素は、ポリメラーゼ酵素（例えば、本明細書に記載されるように、）であってもよい。ポリメラーゼ酵素は、内因性ポリメラーゼ酵素又は改変（例えば、操作された）ポリメラーゼ酵素であってもよい。ポリメラーゼ酵素は、増幅反応（例えば、PCR、例えば、ePCR）を行なって複数の増幅産物を生成するために使用され得る。

【0193】

パーティションの更なる成分は、合成核酸分子であってもよい。合成核酸分子は二本鎖であってもよい。合成核酸分子は、開裂可能要素を含み得る。開裂可能要素は、合成核酸分子の成分の分離を可能にし得る。分離は、化学的、光、熱又は他の手法によって達成され得る。また、合成核酸分子は、ライゲーション及び/又は環状化に供され得る。ライゲーション及び/又は環状化の際に、合成核酸分子を開裂して、開裂された合成核酸分子を提供することができる。その後、開裂された合成核酸分子は、増幅反応（例えば、本明細書に記載されるように、）によってギャップ装填に供され得る。

【0194】

生体サンプルの核酸分子（例えば、DNA又はRNA分子）は、複数のパーティション間で分割される前に処理され得る。或いは、生体サンプルの核酸分子は、複数のパーティションの間で分割された後に処理されてもよい。例えば、核酸分子は、1つ以上のアダプター（例えば、ハイブリダイゼーション又はライゲーションプロセスを介して）で官能化され得る。アダプターは、データ分析（例えば、配列決定及び配列分析）中に元のサンプル核酸分子及び対応する増幅産物の同定を可能にし得るランダム化された識別子配列（例えば、バーコード又は固有分子識別子（UMI）配列）を含み得る（例えば、本明細書に記載されるように）。アダプター（又は複数のアダプター）に対する核酸分子のライゲーション反応は、溶液（例えば、複数のパーティション間で分割する前に）又はエマルジョン（例えば、複数のパーティション間の分割に続いて）中で起こり得る。したがって、ライゲーション反応は、核酸分子とアダプターの両方が水溶液中にあるときに起こることができ、水溶液は、エマルジョン液滴などのパーティション内部の水溶液であってもよい。核酸分子（例えば、一本の核酸鎖）に付着した（例えば、共有又は非共有的に連結された）アダプターの配列は、プライマー分子又はその配列への核酸分子の結合を促進し得る。そのようなプライマー分子は、アダプター配列を介した核酸分子とプライマーとの相互作用

10

20

30

40

50

用（例えば、共有結合的又は非共有結合的などの結合）がエマルジョン液滴又はウェルなどのパーティション内のビーズに核酸分子を付着させることができるように、ビーズに付着させることができる。核酸分子をビーズに連結すると、1つ以上の増幅反応（例えば、PCR、例えば、ePCR）を実施して、前記核酸分子の複数の増幅産物（例えば、本明細書に記載されるように）を生成することができる。本明細書中に記載される方法及び組成物と組み合わせて使用され得るアダプターは、ペアエンド配列リードの作製を可能にし得る。したがって、核酸分子に対するビーズのより高い量比及びペアエンドアダプターの使用の組み合わせは、生体サンプル（例えば、ターゲット核酸分子）を分析するための精度及び感度が向上した方法を提供し得る。

【0195】

本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、1つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、2つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、3つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、4つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、5つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、6つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、7つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、8つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、9つ以上のビーズを含む。本開示の方法は、複数のパーティション（例えば、液滴）を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも50%、少なくとも60%、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%、少なくとも97%、少なくとも99%、又は100%は、10個以上のビーズを含む。

10

20

30

40

50

液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも85%は、約5~10個のビーズを含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも90%は、約5~10個のビーズを含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも95%は、約5~10個のビーズを含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも97%は、約5~10個のビーズを含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも99%は、約5~10個のビーズを含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの100%は、約5~10個のビーズを含む。

10

【0200】

本開示の方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも75%は、2以上、3以上、4以上、5以上、又は10以上のビーズ対核酸分子比率を含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも85%は、2以上、3以上、4以上、5以上、又は10以上のビーズ対核酸分子比率を含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも95%は、2以上、3以上、4以上、5以上、又は10以上のビーズ対核酸分子比率を含む。方法は、複数のパーティション(例えば、液滴)を提供することができ、複数のパーティションの少なくとも99%は、2以上、3以上、4以上、5以上、又は10以上のビーズ対核酸分子比率を含む。

20

【0201】

本開示の方法は、複数の異なるビーズセットの使用を含み得る。例えば、方法は、第1のビーズセット及び第2のビーズセットの使用を含み得る。ビーズの第1のセット(又は複数)の第1のビーズは、生体サンプル(例えば、1つ以上の核酸分子、例えば1つ以上のDNA又はRNA分子)の第1の核酸鎖に結合された(例えば、共有又は非共有的に連結された)第1のアダプターと少なくとも部分的な配列相補性(例えば、第1のペアエンドアダプター配列)を有する第1のプライマーを含み得る。第2のビーズセットの第2のビーズは、生体サンプルの第2の核酸鎖に結合された第2のアダプターとの配列相補性(例えば、第2のペアエンドアダプター配列)を有する第2のプライマーを含み得る。第1のプライマーは、第2のプライマーと異なってもよい。本明細書に記載の方法は、(i)第1のビーズセットの第1のビーズ、(ii)第2のビーズセットの第2のビーズ、及び(iii)それに結合された第1又は第2のアダプターを含む核酸分子をパーティションに分割すること(例えば、共分配すること)を含み得る。分割は、例えば、1つ以上の液滴(例えば、エマルジョン中で)又はウェルを使用して達成され得る。所定のビーズ対が第1のセットのビーズ及び第2のセットのビーズを含むように、第1及び第2のセットのビーズを含むビーズ対を使用することができる。そのような方法は、ビーズ対を含む所定のパーティションへの第1のプライマー及び第2のプライマーの両方の送達を容易にし得る。

30

【0202】

一例では、少なくとも2つのビーズ(ビーズ対として構成されていてもよい、第1のビーズセットの第1のビーズ及び第2のビーズセットの第2のビーズであって、第1のビーズが第1のプライマー分子を含み、第2のビーズが第2のプライマー分子を含む、第1のビーズセットの第1のビーズ及び第2のビーズセットの第2のビーズ)と、1つ以上のアダプター配列(第1のビーズのプライマー配列と相互作用するように構成された第1のアダプター及び/又は第2のビーズのプライマー配列と相互作用するように構成された第2のアダプター)を含む核酸分子とを含む複数のパーティション(例えば、複数の液滴)のうちの1つのパーティション(例えば、1つの液滴)は、第1及び/又は第2のアダプターに結合された核酸分子又はその鎖(例えば、一本鎖(ss)DNA又はRNA)の1つ以上のコピー、又はその相補体(又はフラグメント)の生成を可能にする条件に供され得

40

50

る。核酸分子が二本鎖核酸分子（例えば、二本鎖（ds）DNA）である場合、核酸分子の両方の鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体もしくはそのフラグメントが生成され得る。第1鎖及び/もしくは第2鎖の1つ以上のコピー、又はそれらの相補体を生成することは、プライマー伸長反応及び/又は核酸増幅反応（例えば、PCR、例えば、ePCR）を実施するのに十分な条件に第1及び第2のビーズ及び核酸分子を供することを含み得る。第1のビーズの第1のプライマー分子及び/又は第2のビーズの第2のプライマー分子は、第1及び/又は第2のアダプター配列の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体を含む核酸分子を生成するために使用され得る。核酸分子の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体は、第1又は第2のビーズに結合されてもよく、したがって、更なる増幅反応に使用されてもよい。特定の例において、核酸分子は、第1のアダプターに連結された第1鎖及び第2のアダプターに結合された第2鎖を含んでもよく、第1のアダプターは第1のビーズの第1のプライマー分子と相互作用するように構成され、第2のアダプターは第2のビーズの第2のプライマー分子と相互作用するように構成される。第1のプライマー分子は、核酸分子の第1鎖の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体を生成するために使用されてもよく、第2のプライマー分子は、核酸分子の第2鎖の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体を生成するために使用されてもよい。核酸分子の第1鎖の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体は、第1のビーズに結合され得る。第2鎖の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体は、第2のビーズに結合され得る。これらの結合したコピー及び/又は相補体は、更なる増幅反応に使用され得る。第1鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体の配列は、第2鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体の配列と少なくとも部分的に重複し得る。

10

20

【0203】

当業者であれば分かるように、二本鎖鋳型分子を記載する例は、一本鎖鋳型分子にも適用される。特定の例において、鋳型一本鎖は、第1アダプターに結合されてもよく、第2のアダプターに相補的な領域を含んでもよく、第1アダプターは第1のビーズの第1のプライマー分子と相互作用するように構成され、第2のアダプターは第2のビーズの第2のプライマー分子と相互作用するように構成される。第2のアダプターは鋳型に存在しないが、相補鎖の合成後、新しい鎖が第2のアダプターを含む。第1のプライマー分子は鋳型の1つ以上の相補体を生成するために使用されてもよく、第2のプライマー分子は鋳型の相補体の1つ以上の相補体又はコピーを生成するために使用されてもよい。鋳型一本鎖分子の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体は、第1のビーズに結合され得る。鋳型一本鎖分子に対する相補体の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体は、第2のビーズに結合され得る。一般に、前述の実施例の全体にわたって二本鎖鋳型が記載されるが、第2鎖に記載される領域に相補的な領域を含む一本鎖鋳型も使用され得ることが理解される。

30

【0204】

増幅プロセスが完了すると、複数のパーティションに分配された複数のビーズ（例えば、複数のビーズ-核酸分子複合体）は、複数のパーティション（例えば、液滴又はウェル）から回収されてもよく、ビーズ（例えば、複数のビーズ-核酸分子複合体）は、エマルジョン又は混合物から分離（例えば、磁気的に分離）されてもよい。続いて、先の増幅及び/又は処理工程のいずれかの間に形成され得る核酸分子又はその任意の誘導体をアッセイ又は分析することができる（例えば、シーケンサーにおいてヌクレオチド配列を決定することによって）。

40

【0205】

場合によっては、異なる数のビーズを含むパーティション（例えば、液滴）を互いに分離することができる。例えば、第1の数のビーズを含む第1のパーティション（例えば、液滴）は、第2の数のビーズを含む第2のパーティション（例えば、液滴）から分離されてもよい。第1の数のビーズ及び第2の数のビーズは、同じであっても異なってもよい。例えば、第1のパーティションは単一のビーズを含んでもよく、第2のパーティションは2つのビーズを含んでもよい。場合によっては、所定の数のビーズを含むパーティションの全部又は大部分は、異なる数のビーズを含むパーティションの全部又は大部分から

50

分離され得る。例えば、シングルビーズを含むパーティションの全部又は大部分は、0 ビーズを含むパーティション及び/又は2つ以上のビーズを含むパーティションから分離され得る。別の例では、2つのビーズを含むパーティションの全部又は大部分が、他の数のビーズを含むパーティションから分離され得る。異なる数のビーズを含むパーティションの分離は、例えば、異なる数のビーズを含むパーティションを光学的に検出し、そのような光学的検出に少なくとも部分的に基づいて、第1の方向に（例えば、第1のチャンネルに沿って）第1の数のビーズを含むパーティション（例えば、液滴）を送るとともに第2の方向に（例えば、第2のチャンネルに沿って）第2の数のビーズを含むパーティション（例えば、液滴）を送るために（例えば、マイクロ流体チャンネルシステム内の）流れの方向を調整することによって達成され得る。それに代えて又は加えて、光学的及び非光学的戦略を含む他の分離戦略を使用することができる。例えば、パーティションの質量又は密度などの物理的特性を使用して、パーティションを分離することができる。幾つかの例では、複数のパーティションは、そのような分離を容易にするために1つ以上の力又は場を受けることができる。

【0206】

ある場合には、ビーズに付着した核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）が配列決定される。他の場合では、ビーズに付着していない核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）が配列決定される。例えば、ビーズに付着した核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）は、ビーズから除去され（例えば、核酸分子とビーズを分離することによって）、配列決定のための配列決定システムに提供され得る（例えば、本明細書に記載されるように）。核酸分子は、例えば、ビーズ又はそれを含むパーティションに刺激を加えることによってビーズから除去され得る。このような刺激としては、例えば、熱刺激、光刺激、化学刺激（例えば、還元剤）等が挙げられる。ビーズから除去された核酸分子は、続いてフローセル（例えば、フローセル内の1つ以上のウェルに）の表面に付着することができ、そこで1つ以上の配列決定反応及び/又は1つ以上の更なる増幅反応を受けることができる。

【0207】

ある場合には、複数の異なるビーズセットを使用して、配列決定のための核酸サンプルを調製することができる。例えば、第1のビーズセットの第1のビーズを使用して第1の機能を実行することができ、第2のビーズセットの第2のビーズを使用して第2の機能を実行することができる。ビーズの異なるセットは、同じ又は異なる材料を含み、任意の数の共有又は異なる特性（例えば、形状、サイズ、常磁性状態など）を有し得る。例えば、第1のビーズセットの第1のビーズは、第2のビーズセットの第2のビーズより小さくてもよい。ビーズの第1のセットの第1のビーズは、約50 nmなどの約1~100ナノメートル（nm）の直径を有するナノビーズであってもよく、ベッドの第2のセットの第2のビーズは、約100 nmより大きい直径を有し得る。例えば、ビーズの第2のセットの第2のビーズは、約1~100マイクロメートル（ μm ）の直径を有するマイクロビーズであってもよい。第1のビーズは磁性であってもよく、第2のビーズは磁性でなくてもよい。ビーズの異なるセットによって行なわれる異なる機能には、例えば、鋳型装填、増幅及び配列決定が含まれ得る。一例では、第1のビーズセットの第1のビーズを使用して、後続の処理のために複数の核酸分子を含むサンプルを調製することができる。第1のビーズは、それに結合された複数のプライマー分子を含んでもよく、このプライマー分子は、複数の核酸分子の核酸分子の配列に対して相補的であってもよい。例えば、ビーズの第1のセットの第1のサブセットは、複数の核酸分子のうちの核酸分子の第1の配列に対して相補的な第1のプライマー分子を含んでもよく、ビーズの第1のセットの第2のサブセットは、複数の核酸分子のうちの核酸分子の第2の配列に対して相補的な第2のプライマー分子を含んでもよい。第1の配列は、複数の核酸分子の核酸分子に結合した第1のアダプターの配列であってもよく、第2の配列は、複数の核酸分子の核酸分子（例えば、同じ又は異なる核酸分子）に結合した第2のアダプターの配列であってもよい。第1の配列は、複数の核酸分子の核酸分子の第1鎖に結合されてもよく、第2の配列は、複数の核酸分子

10

20

30

40

50

の核酸分子の第2鎖に結合されてもよい。ビーズの第1のセット及び複数の核酸分子は、バルク溶液中で組み合わせられ、ビーズの第1のセットの第1のビーズに結合したプライマー分子を複数の核酸分子の核酸分子の配列にハイブリダイズさせるのに十分な条件に供され得る。その後、プライマー分子を伸長させて、複数の核酸分子の鎖に相補的な鎖を生成することができる。結果として得られた二本鎖核酸分子は、ビーズの第1のセットの第1のビーズに結合され得る。ビーズに結合された二本鎖核酸分子は、例えば、末端トランスフェラーゼを使用して末端ブロックされ得る。ある場合には、一本鎖二本鎖核酸分子が所定の第1のビーズに結合され得る。他の場合には、複数の二本鎖核酸分子が所定のビーズに結合され得る。その後、バルク溶液を洗浄し、第1のビーズセットを、複数の核酸分子の遊離核酸分子を含む溶液中の他の材料（例えば、磁気分離を介して）から分離することができる。

10

【0208】

その後、第1のビーズセットを複数のパーティション（例えば、液滴；本明細書に記載されるように）に分割することができる。複数のパーティションのパーティションは、1つ以上の二本鎖核酸分子（例えば、鋳型核酸分子）に結合したビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズを含み得る。複数のパーティションの他のパーティションは、二本鎖核酸分子に結合していないビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズを含み得る。複数のパーティションの更に他のパーティションは、ビーズの第1のセットの第1のビーズを含まなくてもよい。

【0209】

20

ビーズの第1のセットは、1つ以上の試薬（例えば、本明細書に記載されるように、）及びビーズの第2のセットと共分割され得る。ビーズの第2のセットは、配列決定の調製において鋳型核酸分子を捕捉及び増幅するのに適したプライマー分子を含み得る（例えば、本明細書に記載されるように）。ビーズの第2のセットは、本明細書では「配列決定ビーズ」と呼ばれることがある。したがって、複数のパーティションは、(i) 1つ以上の二本鎖核酸分子に結合されたビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズとビーズの第2のセットの少なくとも2つの第2のビーズとを含むパーティションの第1のサブセット；(ii) 1つ以上の二本鎖核酸分子に結合されるビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズとビーズの第2のセットのたった1つの第2のビーズとを含むパーティションの第2のサブセット；(iii) 1つ以上の二本鎖核酸分子に結合されるビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズを含むがビーズの第2のセットの第2のビーズを含まないパーティションの第3のサブセット；(iv) 二本鎖核酸分子に結合されないビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズとビーズの第2のセットの少なくとも2つの第2のビーズとを含むパーティションの第4のサブセット；(v) 二本鎖核酸分子に結合されないビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズとビーズの第2のセットのたった1つの第2のビーズとを含むパーティションの第5のサブセット；(vi) 二本鎖核酸分子に結合されないビーズの第1のセットの1つ以上の第1のビーズを含むがビーズの第2のセットの第2のビーズを含まないパーティションの第6のサブセット；(vii) ビーズの第1のセットの第1のビーズを含まずビーズの第2のセットの少なくとも2つの第2のビーズを含むパーティションの第7のサブセット；(viii) ビーズの第1のセットの第1のビーズを含まずビーズの第2のセットのたった1つの第2のビーズを含むパーティションの第8のサブセット；(ix) ビーズの第1のセットの第1のビーズ又はビーズの第2のセットの第2のビーズを含まないパーティションの第9のサブセットのうちの1つ以上を含んでもよい。したがって、複数のパーティションの特定のサブセットのみが、鋳型核酸分子と第2のビーズセットの少なくとも1つの第2のビーズの両方を含み得る。上記のパーティションの第3のサブセットのうちのパーティションは、ビーズの第1のセットの第1のビーズに結合した少なくとも1つの鋳型核酸分子を含むが、ビーズの第2のセットの第2のビーズ（例えば、配列決定ビーズ）を含まない。これらのパーティションは配列決定ビーズを含まないので、配列決定のための材料は調製されない。パーティションの第3のセットのうちのパーティションの内容物を回収すると、磁気捕捉を使用して第1

30

40

50

のビーズを除去することができる。したがって、パーティションの第3のセットのうちのパーティションに対応する配列決定産物は検出されない。上記のパーティションの第7のサブセットのうちのパーティションは、鋳型核酸分子を担持する第1のビーズを含まないが、ビーズの第2のセットの少なくとも2つの第2のビーズを含む。これらのパーティションは鋳型核酸分子を含まないので、鋳型核酸分子に対応する増幅産物は生成されず、配列決定リードは得られない。磁気分離を使用して、鋳型核酸分子に連結されていない任意の第1のビーズを除去することができる。上記のパーティションの第1のサブセットのうちのパーティションは、鋳型核酸分子に結合された少なくとも1つの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの少なくとも2つの第2のビーズを含む（例えば、本明細書に記載されるように）。したがって、増幅及び配列決定は、本明細書に記載されるように、少なくとも2秒間のビーズに対して行なわれ得る。増幅後の磁気捕捉は、これらのビーズが配列決定アッセイによって検出されないように、鋳型装填ナノビーズ（例えば、第1のビーズ）を排除し得る。図9は、第1及び第2のビーズセットを含むこの方法を示す。配列決定ビーズ901のセット及び鋳型装填ナノビーズ902のセットが提供される。一例では、鋳型装填ナノビーズが直径約50ナノメートルである。鋳型装填ナノビーズは、磁性であってもよく、及び/又は別の捕捉機構を含んでもよい。鋳型装填ナノビーズはプライマーでコーティングすることができる。第1の鋳型調製操作910では、鋳型装填ナノビーズ（プライマー被覆）及び鋳型核酸分子をバルク混合物中で組み合わせることができる。ナノビーズは過剰に提供されてもよい。第2の鋳型調製操作920において、鋳型は、（i）鋳型をナノビーズにアニールし、（ii）伸長するのに十分な条件に供され得る。結合していない鋳型は、ナノビーズを固定化するか、そうでなければ捕捉し、洗浄液を適用することなどによって洗い流され得る。末端は、末端トランスフェラーゼを使用してブロックされてもよい。そのような鋳型調製操作は、ナノビーズ結合鋳型を生成し得る。エマルジョン操作930では、ナノビーズ結合鋳型を配列決定ビーズ及び他の試薬（例えば、溶液プライマー分子）と共に液滴に分割して、様々に占有された液滴、場合によっては非占有液滴を生成することができる（940）。幾つかの液滴（i）は、配列決定ビーズを伴うことなくナノビーズ結合鋳型を含み得る。幾つかの液滴（ii）は、ナノビーズ結合鋳型を伴わない配列決定ビーズを含み得る。幾つかの液滴（iii）は、ナノビーズ結合鋳型と配列決定ビーズの両方を含み得る。鋳型陽性配列決定ビーズを達成するためには、ナノビーズが存在しなければならない。液滴は、増幅940に供され得る。エマルジョンが破壊され、液滴の内容物がプールされ得る。事例（i）のように配列決定ビーズが存在しない場合、増幅後のナノビーズ捕捉（例えば、磁石を使用する）がナノビーズ結合鋳型を排除することができ、また、ナノビーズの捕捉及び小さいサイズに起因して、シーケンサーはナノビーズ（又はそのようなナノビーズに結合した鋳型）を検出せず、その結果、これらの液滴からの配列決定リードが得られない。（ii）の場合のように鋳型が存在しない場合、鋳型が存在しないので増幅は進行し得ない。増幅後のナノビーズ捕捉は、空のナノビーズ（それらに結合した鋳型を有しない）を排除することができる。これらの液滴から配列決定リードは生成されない。事例（iii）のように配列決定ビーズ及びナノビーズ結合鋳型が存在する場合、増幅産物を配列決定ビーズに固定化することができる。増幅後のナノビーズ捕捉は、ナノビーズに結合した鋳型及び他のナノビーズを排除し得る。ナノビーズの捕捉及び小さいサイズに起因して、シーケンサーはナノビーズ（又はそのようなナノビーズに結合した鋳型）を検出しない場合があり、配列決定リードは、これらの液滴中の配列決定ビーズ上の核酸分子の配列決定から生成される。

【0210】

増幅反応

本明細書に開示される生体サンプルを分析及び/又は処理する方法は、ターゲット核酸分子を分析及び/又は処理して、ターゲット核酸分子の1つ以上のコピー又は相補体（例えば、増幅された核酸分子又は増幅産物）を生成するための任意の有用なタイプの反応（例えば、任意の核酸増幅反応）を含み得る。核酸分子の増幅産物（例えば、コピー又は相補体）は、核酸分子に対して少なくとも部分的な配列相補性（例えば、>90%）を有し

10

20

30

40

50

得る。本明細書に記載される増幅反応は、例えば核酸増幅が行なわれる場合、単一プライマー伸長反応を含み得る。核酸の増幅は、線形、指数関数、又はそれらの組み合わせであってもよい。増幅は、エマルジョン系であってもよく、非エマルジョン系であってもよい。本明細書に開示される方法と組み合わせて使用され得る核酸増幅反応の非限定的な例としては、逆転写、プライマー伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、PCR）、リガーゼ連鎖反応、ヘリカーゼ依存性増幅、非対称増幅、ローリングサークル増幅、及び多置換増幅（MDA）が挙げられる。本明細書に記載の方法を使用して生成され得る増幅産物は、DNAであってもよい。ターゲットRNAを増幅する場合、RNAの逆転写によってDNA（例えば、相補的DNA（cDNA））を取得し、その後DNAを増幅して増幅DNA産物を生成することができる。増幅されたDNA産物は、生体サンプル中のターゲットRNAの存在を示し得る。DNAを増幅する場合、どのようなDNA増幅方法を用いてもよい。DNA増幅法の非限定的な例としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、PCRの変異体（例えば、リアルタイムPCR、対立遺伝子特異的PCR、アセンブリPCR、非対称PCR、デジタルPCR、エマルジョンPCR（例えば、ePCR）、ダイヤルアウトPCR、ヘリカーゼ依存性PCR、ネステッドPCR、ホットスタートPCR、逆PCR、メチル化特異的PCR、ミニプライマーPCR、マルチプレックスPCR、ネステッドPCR、重複伸長PCR、熱非対称インターレースPCR、タッチダウンPCR）、及びリガーゼ連鎖反応（LCR）が挙げられる。本明細書に記載の方法は、線形DNA増幅を含み得る。本明細書に記載の方法は、指数関数的DNA増幅を含み得る。DNA増幅は、増幅されたDNA産物を検出する感度を改善し得るネステッドPCRによって達成され得る。更に、生体サンプルを分析するための精度及び/又は感度（例えば、信号対雑音比を増加させることによって、）を高めるために、ペアエンドアダプターをPCR増幅に使用することができる。

10

20

【0211】

本明細書に記載の方法は、様々な期間（例えば、数分又は数時間）の増幅反応を使用することができる。生体サンプル中のターゲット核酸分子の存在を示す検出可能な量の増幅産物を増幅がもたらす期間は、ターゲット核酸分子が取得され得る生体サンプル、実施され得る特定の核酸増幅反応、実施され得る増幅反応の特定のサイクル数、及び複数の液滴の生成などの実施される分割プロセスに応じて変化し得る。また、様々な検出及び配列決定スキームが様々な検出限界を可能にし得る。ターゲット核酸分子の増幅は、240分以下、120分以下、90分以下、60分以下、50分以下、45分以下、40分以下、35分以下、30分以下、25分以下、20分以下、15分以下、10分以下、又は、5分以下の期間にわたってターゲット核酸の存在を示す検出可能な量の増幅産物をもたらし得る。ある場合には、核酸分子の単一コピー又は相補体が検出可能であってもよい（例えば、核酸配列決定アッセイの使用）。そのような低い検出限界は、ペアエンド配列決定によって可能になり得る。

30

【0212】

本明細書で提供される方法のいずれにおいても、核酸配列決定を使用して、核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）のコピー及び/又は相補体の配列を同定することができる。配列決定リードとして核酸配列決定アッセイで取得された核酸分子のコピー及び/又は相補体の配列は、バーコード配列又は他のサンプルインデックスもしくは標識を使用して、それらが由来する核酸分子と会合され得る。例えば、所定の細胞又は所定のサンプルの核酸分子に対応する配列決定リードは、バーコード配列などを使用して所定の細胞又はサンプルで同定され得る。ある場合には、サンプルの核酸分子の第1鎖の1つ以上のコピー（例えば、ターゲット核酸分子）及び核酸分子の第2鎖の1つ以上のコピー、又はそれらの相補体は、核酸配列決定を受け得る（例えば、本明細書に記載されるように）。上記のように、核酸配列決定は、合成又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による配列決定を含み得る核酸プロセッシング反応の一種である。幾つかの方法では、核酸配列決定は、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応（ePCR）を含み得る。

40

【0213】

50

複数のパーティションのうちの少なくとも1つのパーティションは、少なくとも第1のビーズ、第2のビーズ、並びに第1及び第2のサンプル核酸分子に加えて、材料又は成分を含み得る。パーティションの更なる成分は、合成核酸分子であってもよい。合成核酸分子は二本鎖であってもよい。合成核酸分子は、開裂可能要素を含み得る。開裂可能要素は、合成核酸分子の成分の分離を可能にし得る。分離は、化学的、光、熱又は他の手法によって達成され得る。また、合成核酸分子は、ライゲーション及び/又は環状化に供され得る。ライゲーション及び/又は環状化の際に、合成核酸分子を開裂して、開裂された合成核酸分子を提供することができる。その後、開裂された合成核酸分子は、増幅反応（例えば、本明細書に記載されるように、）によってギャップ装填に供され得る。

【0214】

（例えば、一定期間及び/又は増幅サイクル数の後に）増幅プロセスが完了すると、複数のパーティション間で分配された複数のビーズ（例えば、複数のビーズ-核酸分子複合体）を複数のパーティション（例えば、液滴又はウェル）から回収することができ、また、ビーズ（例えば、複数のビーズ-核酸分子複合体）をエマルジョン又は混合物から分離（例えば、磁気的に分離）することができる。続いて、先の増幅及び/又は処理工程のいずれかの間に形成され得る核酸分子又はその任意の誘導体をアッセイ又は分析することができる（例えば、シーケンサーにおいてヌクレオチド配列を決定することによって）。ある場合には、ビーズに結合された核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）のみが配列決定される。他の場合では、ビーズに結合されていない核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）のみが配列決定される。ある場合には、ビーズに結合された核酸分子とビーズに結合されていない核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）の両方が配列決定される（例えば、同時に又は別々に）。

【0215】

本開示の方法の利点は、パーティション（例えば、液滴）内の核酸分子に対するビーズの比率（例えば、 >2 ）を増大させることができることであり、これは、少なくとも部分的に、所定の核酸分子のより高いクローンコピー数及び減少したサンプル又は鑄型損失に起因して、サンプル分析中の精度及び感度の向上をもたらし得る。鑄型を有するがビーズを含まないパーティションの割合は、十分に多数のビーズを添加することによって大幅に減少させることができる。これにより、二重ポアソン分布方式が単一ポアソン分布方式に低減される。これは、生体サンプルが腫瘍の診断及び病期分類においてcfDNAなどの微量の核酸しか含有しない可能性がある領域では非常に重要であり得る。更に、核酸分子に対するビーズのより高い量比及びペアエンドアダプターの使用の組み合わせは、生体サンプル（例えば、サンプル核酸分子）を分析するための精度及び感度が向上した方法を提供し得る。

【0216】

ビーズ組成物

生体サンプルを分析するための本明細書に開示される方法は、1つ以上の（例えば、複数の）核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）の増幅を含み得る。本明細書に記載の核酸増幅は、1つ以上の核酸分子（例えば、一本鎖核酸分子）が結合し得る1つ以上のビーズ又はビーズ粒子（例えば、ビーズの1つ以上のセット）を使用して実施され得る。ビーズの第1のセット及び/又はビーズの第2のセットは、様々な方法を使用して調製することができる。ビーズの第1のセット及び/又はビーズの第2のセットは、1つ以上の材料及び/又は成分から構成されてもよい。ビーズの第1のセット及び/又はビーズの第2のセットは、例えば、ポリマービーズであってもよい（例えば、本明細書に記載されるように）。ビーズの第1及び/又は第2のセットは、PEG層又はヒドロゲルなどのコーティングを有し得る（例えば、本明細書に記載されるように）。ビーズの第1及び/又は第2のセットは、同じコアビーズ又は異なるコアビーズを含有し得る（例えば、同じ又は異なる材料を含む）。したがって、ビーズの第1のセットのビーズは第1の材料から調製されてもよく、ビーズの第2のセットのビーズは第2の材料から調製されてもよく、第1の材料は第2の材料と同じであっても異なってもよい。ビーズの第1のセットのビーズは

、それに結合された第1のプライマー分子を含んでもよく、ビーズも第2のセットのビーズは、それに結合された第2のプライマー分子を含んでもよい。第1及び第2のプライマー分子は、ビーズの第1及び第2のセットの調製（例えば、合成）中に、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットにそれぞれ提供され得る。或いは、第1及び第2のプライマー分子は、ビーズの第1及び第2のセットの調製後に、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットにそれぞれ提供され得る（例えば、プライマー分子をまだ含まない「コアビーズ」及び／又は予め官能化されたビーズ）。プライマー分子がその後のプロセスでビーズに固定化される場合、ビーズの第1及び第2のセットのビーズは別々に更に処理され得る。各ビーズセットにおけるプライマー分子は、様々な化学反応を使用してビーズに固定化され得る。結合は、例えば、アミド、エステル又はジスルフィド官能基を介して起こり得る。クリックケミストリー（例えば、シュタウディンガーライゲーション又はディールス・アルダー化学反応）は、ビーズへのプライマー分子の固定化に使用され得る。固定化されたプライマー分子は、更なる下流側の化学反応を用いて更に修飾され得る。

10

【0217】

生体サンプルを分析及び／又は処理するための本明細書に開示される方法は、解放可能に（例えば、熱的に又は化学的に解放可能に）結合された第1のビーズ及び第2のビーズのセットが生成されるように、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットの調製（例えば、合成）を含み得る。例えば、第1のビーズは、第2のビーズに解放可能に結合されてもよく、それにより、ビーズは、刺激（例えば、熱刺激、化学刺激、又は光刺激）の適用時に互いに解放可能であってもよい。同様に、第1及び／又は第2のビーズセットのビーズに結合したプライマー分子は、熱、化学、又は光刺激などの刺激の適用時にビーズから解放可能であってもよい。

20

【0218】

解放可能に結合された第1のビーズ及び第2のビーズは、非共有結合相互作用又は結合（例えば、タンパク質相互作用）又は共有結合を介して結合され得る。第1のビーズは、1つ以上の化学リンカーを介して、及び／又は1つ以上のスプリントオリゴヌクレオチドを介して、第2のビーズに連結され得る。タンパク質相互作用などの非共有結合相互作用は、水素結合、ファンデルワールス力、双極子-双極子相互作用、又はそれらの任意の組み合わせであってもよい。共有結合は、結合反応（例えば、アミド結合形成）又はクリックケミストリー（例えば、シュタウディンガーライゲーション又はディールス・アルダー反応）などの様々な化学反応を使用してビーズ間に形成され（例えば、合成的に形成され）得る。

30

【0219】

第2のビーズに解放可能に結合された第1のビーズを含む解放可能に結合されたビーズ対は、第2のビーズからの第1のビーズの解放を刺激する刺激（例えば、熱的又は化学的な刺激）を受けてもよい。刺激は、温度変化及び／又は化学的刺激（例えば、pH及び／又はイオン濃度の変化）を含み得る。

【0220】

或いは、不可逆的に結合された第1のビーズ及び第2のビーズのセット（例えば、各々が第2のビーズに不可逆的に結合された第1のビーズを含むビーズ対のセット）が生成され得るように、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットも調製され得る（例えば、合成される）。また、ビーズの第1のセットの第1のビーズは、ビーズの第2のセットの第2のビーズに除去不能に結合されてもよい。この除去不能な結合は、共有化学結合を介した第1のビーズと第2のビーズとの間の架橋を含み得る。

40

【0221】

ビーズの第1及び第2のセットのビーズの初期調製（例えば、合成）に続いて、第1のビーズ及び／又は第2のビーズの様々な組み合わせを区別することができるサイズ選択プロセスを実施することができる。例えば、サイズ選択プロセスは、第2のビーズに結合された第1のビーズを含むビーズ対と、2つの第1のビーズを含むビーズ対又は2つの第2のビーズを含むビーズ対とを区別することができる。濾過プロセスなどのサイズ選択プロ

50

セスを使用して、ビーズの塊又は凝集体を分離し、及び／又は複数のビーズを含む溶液から破片を除去することもできる。

【0222】

ペアエンド配列リードを生成するための方法

本明細書に記載されるように、本開示の方法は、増幅及び／又は配列決定プロセスを実行する場合、パーティション（例えば、液滴）内の核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）に対するビーズの増加した比率（例えば、 > 2 ）を利用し得る。これは、少なくとも部分的には、サンプル又は鑄型の損失が減少した所定の核酸分子のより高いクローンコピー数を生成する能力に起因して、サンプル分析中の精度及び感度の向上をもたらす。より高いビーズ対核酸分子比率の使用とペアエンドアダプターの使用とを組み合わせることにより、生体サンプルの核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）を分析するための更に高い精度及び感度を有する方法を提供することができる。

10

【0223】

ある場合には、本明細書において提供される方法は、生体サンプルの核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）の配列と会合し得るペアエンド配列決定リードを生成することを含み得る。ペアエンド配列決定リードの生成は、本明細書で提供される方法の感度及び精度を高め得る。

【0224】

ペアエンド配列決定リードを生成するための1つ以上のステップを含む本明細書に記載の方法は、粒子の第1のセット（例えば、ビーズ）及び粒子の第2のセット（例えば、ビーズ）を提供することを含み得る（例えば、本明細書に記載されるように）。ビーズの第1のセットの第1のビーズは、生体サンプル（例えば、ターゲット核酸分子、例えばDNA又はRNA分子）の核酸分子の第1の核酸鎖に結合された第1のアダプターに対して少なくとも部分的な配列相補性を有する第1のプライマー分子（例えば、第1のビーズに結合される）を含み得る。ビーズの第2のセットの第2のビーズは、ターゲット核酸分子の第2の核酸鎖に結合された第2のアダプターに対して配列相補性を有する第2のプライマー分子（例えば、第2のビーズに結合される）を含み得る。第1のプライマー分子は、第2のプライマー分子と異なってもよい。或いは、第1及び第2のプライマー分子は、同じ（例えば、同じ核酸配列を含む）又は互いに相補的であってもよい。

20

【0225】

ペアエンド配列決定リードを生成することを含む方法は、(i) ビーズの第1のセットの第1のビーズ、(ii) ビーズの第2のセットの第2のビーズ、及び(iii) 生体サンプルの核酸分子（例えば、ターゲット核酸分子）を分割（例えば、共分割）することを含んでもよく、この場合、核酸分子は、核酸分子の第1鎖に結合された第1のアダプター及び核酸分子の第2鎖に結合された第2のアダプターをパーティション（例えば、エマルジョン中の水性液滴などの液滴）内に含む。分割は、本明細書で提供される方法に従って達成されてもよく、複数のパーティション（例えば、複数の液滴又はウェル）を提供してもよく、該パーティションの少なくとも1つのサブセットはそれぞれ、ビーズの第1のセットの少なくとも1つの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの少なくとも1つの第2のビーズ並びに複数の核酸分子のうちの1つの核酸分子を含んでもよく、その核酸分子は、第1のアダプター配列を含む第1鎖及び第2のアダプター配列を含む第2鎖を含んでもよい。第1及び第2のアダプター配列は、ペアエンドアダプター配列であってもよい。また、複数の核酸分子の所定の核酸分子の各鎖は、鑄型核酸配列も含み得る。

30

40

【0226】

ペアエンド配列決定リードを生成することを含む方法は、(i) ビーズの第1のセットの第1のビーズ、(ii) ビーズの第2のセットの第2のビーズ、及び(iii) 生体サンプルの核酸分子（例えば、ターゲット一本鎖核酸分子）を分割（例えば、共分割）することを含んでもよく、この場合、核酸分子は、それに結合された第1のアダプター及び第2のアダプターに対して相補的な領域（例えば、配列）をパーティション（例えば、エマルジョン中の水性液滴などの液滴）内に含む。分割は、本明細書で提供される方法に従っ

50

て達成されてもよく、複数のパーティション（例えば、複数の液滴又はウェル）を提供してもよく、該パーティションの少なくとも1つのサブセットはそれぞれ、ビーズの第1のセットのうちの少なくとも1つの第1のビーズ及びビーズの第2のセットのうちの1つの第2のビーズ並びに複数の核酸分子のうちの1つの核酸分子を含んでもよく、その核酸分子は、それに結合された第1のアダプター配列と第2のアダプター配列に対して相補的な領域（例えば、配列）とを含んでもよい。第1及び第2のアダプター配列は、ペアエンドアダプター配列であってもよい。

【0227】

ビーズの第1のセットの少なくとも1つの第1のビーズ、ビーズの第2のセットの1つの第2のビーズ、及び、核酸分子の第1鎖に結合された第1のアダプターと核酸分子の第2鎖に結合された第2のアダプターとを含む複数の核酸分子のうちの1つの核酸分子を含むパーティションは、第1の核酸分子の第1鎖の1つ以上のコピー又はその相補体、及び／又は、第2のアダプターに結合された第2の核酸分子の第2鎖の1つ以上のコピー又はその相補体を生成するのに十分な条件に供され得る。第1鎖及び／又は第2鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体を生成することは、第1及び第2のビーズと核酸分子とを含むパーティションを、プライマー伸長反応及び／又は核酸増幅反応（例えば、PCR、例えば、ePCR）を実施するのに十分な条件に供することを含み得る。反応は、1つ以上の試薬の使用を含んでもよく、この1つ以上の試薬は、パーティション内に含まれてもよい。第1のビーズの第1のプライマー分子は、第1鎖の1つ以上のコピー、及び／又はその相補体を生成するために使用され得る。第1鎖の1つ以上のコピー及び／又はその相補体は、第1のビーズに結合されてもよく、したがって、更なる増幅反応（例えば、指数関数的増幅）のための鋳型として使用され得る。第2のビーズの第2のプライマー分子は、第2鎖の1つ以上のコピー、及び／又はその相補体を生成するために使用され得る。第2鎖の1つ以上のコピー及び／又はその相補体は、第2のビーズに結合されてもよく、したがって、更なる増幅反応（例えば、指数関数的増幅）のための鋳型として使用され得る。第1鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体の配列は、第2鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体の配列と少なくとも部分的に重複し得る。

【0228】

本明細書に記載の生体サンプルを分析するために、任意の有用なタイプの反応（例えば、任意の核酸増幅反応）を使用してターゲット核酸分子を処理し、ターゲット核酸分子の1つ以上のコピー又はその相補体（例えば、増幅産物）を生成することができる。増幅は、エマルジョン系であってもよく、非エマルジョン系であってもよい。本明細書に開示される方法と組み合わせて使用され得る核酸増幅反応の非限定的な例としては、逆転写、プライマー伸長、ポリメラーゼ連鎖反応（例えば、PCR）、リガーゼ連鎖反応、ヘリカーゼ依存性増幅、非対称増幅、ローリングサークル増幅、及び多置換増幅（MDA）が挙げられる。本明細書に記載の方法を使用して生成され得る増幅産物は、DNAであってもよい。ターゲットRNAを増幅する場合、RNAの逆転写によってDNA（例えば、相補的DNA（cDNA））を取得し、その後DNAを増幅して増幅DNA産物を生成することができる。増幅されたDNA産物は、生体サンプル中のターゲットRNAの存在を示し得る。DNAを増幅する場合、どのようなDNA増幅方法を用いてもよい。DNA増幅法の非限定的な例としては、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、PCRの変異体（例えば、リアルタイムPCR、対立遺伝子特異的PCR、アセンブリPCR、非対称PCR、デジタルPCR、エマルジョンPCR（例えば、ePCR）、ダイヤルアウトPCR、ヘリカーゼ依存性PCR、ネステッドPCR、ホットスタートPCR、逆PCR、メチル化特異的PCR、ミニプライマーPCR、マルチプレックスPCR、ネステッドPCR、重複伸長PCR、熱非対称インターレースPCR、タッチダウンPCR）、及びリガーゼ連鎖反応（LCR）が挙げられる。本明細書に記載の方法は、線形DNA増幅を含み得る。本明細書に記載の方法は、指数関数的DNA増幅を含み得る。DNA増幅は、増幅されたDNA産物を検出する感度を改善し得るネステッドPCRによって達成され得る。更に、生体サンプルを分析するための精度及び／又は感度（例えば、信号対雑音比を増加させることによ

10

20

30

40

50

って、)を高めるために、ペアエンドアダプターをPCR増幅に使用することができる。

【0229】

増幅されたターゲット核酸の存在を示す検出可能な量の増幅産物を増幅がもたらす期間
は、ターゲット核酸が取得された生体サンプル、実施される特定の核酸増幅反応、増幅反
応の特定のサイクル数(例えば、最大120分)、及び複数の液滴の生成などの実施され
る分割プロセスに応じて変化し得る。ターゲット核酸分子の増幅は、240分以下、12
0分以下、90分以下、60分以下、50分以下、45分以下、40分以下、35分以下
、30分以下、25分以下、20分以下、15分以下、10分以下、又は、5分以下の期
間にわたってターゲット核酸の存在を示す検出可能な量の増幅産物をもたらし得る。

【0230】

ビーズの第1のセット(例えば、複数のビーズ)からの第1のビーズは、ビーズの第2
のセット(例えば、複数のビーズ)からの第2のビーズに解放可能に(例えば、熱的及び
/又は化学的に解放可能に)結合され得る。同様に、ビーズの第1のセットの更なるビー
ズは、解放可能に結合された第1のビーズ及び第2のビーズのセットが存在し得るよう
に、ビーズの第2のセットの更なるビーズに解放可能に結合され得る。例えば、第1のビー
ズは、第2のビーズに解放可能に結合されてもよく、それにより、ビーズは、刺激(例
えば、熱刺激、化学刺激、又は光刺激)の適用時に互いに解放可能であってもよい。同様
に、第1及び/又は第2のビーズセットのビーズに結合したプライマー分子は、熱、化学
、又は光刺激などの刺激の適用時にビーズから解放可能であってもよい。

【0231】

解放可能に結合された第1のビーズ及び第2のビーズは、非共有結合相互作用又は結合
(例えば、タンパク質相互作用)又は共有結合を介して結合され得る。第1のビーズは、
1つ以上の化学リンカーを介して、及び/又は1つ以上のスプリントオリゴヌクレオチド
を介して、第2のビーズに連結され得る。タンパク質相互作用などの非共有結合相互作用
は、水素結合、ファンデルワールス力、双極子-双極子相互作用、又はそれらの任意の組
み合わせであってもよい。共有結合は、結合反応(例えば、アミド結合形成)又はクリッ
クケミストリー(例えば、シュタウディンガーライゲーション又はディールス・アルダー
反応)などの様々な化学反応を使用してビーズ間に形成され(例えば、合成的に形成され
)得る。

【0232】

第2のビーズに解放可能に結合された第1のビーズを含む解放可能に結合されたビーズ
対は、第2のビーズからの第1のビーズの解放を刺激する刺激(例えば、熱的又は化学的
な刺激)を受けてもよい。刺激は、温度変化及び/又は化学的刺激(例えば、pH及び/
又はイオン濃度の変化)を含み得る。

【0233】

或いは、不可逆的に結合された第1のビーズ及び第2のビーズのセット(例えば、各々
が第2のビーズに不可逆的に結合された第1のビーズを含むビーズ対のセット)が生成さ
れ得るよう、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットも調製され得る(例えば
、合成される)。また、ビーズの第1のセットの第1のビーズは、ビーズの第2のセッ
トの第2のビーズに除去不能に結合されてもよい。この除去不能な結合は、共有化学結合を
介した第1のビーズと第2のビーズとの間の架橋を含み得る。

【0234】

ビーズの第1及び第2のセットのビーズの初期調製(例えば、合成)に続いて、第1の
ビーズ及び/又は第2のビーズの様々な組み合わせを区別することができるサイズ選択プ
ロセスを実施することができる。例えば、サイズ選択プロセスは、第2のビーズに結合さ
れた第1のビーズを含むビーズ対と、2つの第1のビーズを含むビーズ対又は2つの第2
のビーズを含むビーズ対とを区別することができる。濾過プロセスなどのサイズ選択プ
ロセスを使用して、ビーズの塊又は凝集体を分離し、及び/又は複数のビーズを含む溶液か
ら破片を除去することもできる。

【0235】

10

20

30

40

50

本明細書に記載されるように、第1鎖（例えば、生体サンプルの第1の核酸分子）は第1のアダプター（例えば、第1のペアエンドアダプター）に結合されてもよく、第2鎖（例えば、生体サンプルの第2の核酸分子）は第2のアダプター（例えば、第1のペアエンドアダプター）に結合されてもよい。第1及び/又は第2のアダプターは、核酸配列決定プロセス（例えば、PCR、例えば、ePCR）に関与し得る。第1のアダプターは、第1のサブパート及び第2のサブパートを含むことができ、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有することができる。配列相補性は、一般に、対になっている配列と相補的な配列を指す。同様に、第2のアダプターは、第1のサブパート及び第2のサブパートを含むことができ、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有することができる。アダプターの1つ以上の部分は、異なる融解温度を有してもよい。例えば、アダプターは、第1の融解温度を有する第1の部分と、第2の融解温度を有する第2の部分とを備えてもよく、第1の融解温度は第2の融解温度よりも高い。例えば、アデニン、チミン及びイノシンが濃縮された配列を含むアダプターを使用することによって、異なる融解温度が付与され得る。そのようなアダプターは、それらが結合している核酸分子のその後の処理のためのアクセスを提供するために、アダプターの部分的な変性を促進し得る。

10

【0236】

本明細書に記載されるように、核酸配列決定（例えば、NGS）は、1つのパーティション又は複数のパーティション（例えば、複数の液滴又はウェル）で行なわれ得る。そのようなパーティション（例えば、複数のパーティション）は、少なくとも（i）ビーズの第1のセットからの1つの第1のビーズ、（ii）ビーズの第2のセットからの少なくとも1つの第2のビーズ、及び、（iii）第1鎖（例えば、第1の核酸分子）に結合された第1のアダプターと第2鎖（例えば、第2の核酸分子）に結合された第2のアダプターとを含む生体サンプル（又はその特定の割合の量）（例えば、核酸分子）を含み得る。パーティションは、液滴であってもよく又はウェルであってもよい。

20

【0237】

本明細書中に記載のペアエンド配列リードを含む方法は、第1のアダプターとの配列相補性を有する第1のプライマー分子（例えば、図8の部分1-8）を伴うビーズの第1のセットからの第1のビーズと、第2のアダプターとの配列相補性を有する第2のプライマー分子（例えば、図8の部分4-8）を伴うビーズの第2のセットからの第2のビーズとを与えることを含み得る（例えば、図8参照）。その後、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットは、複数のパーティションのうちの所定のパーティションがビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズを含むように、複数のパーティション間で分布（例えば、ランダムに分布）され得る（例えば、本明細書に記載されるように）。図7に示すように、核酸分子705は、第1鎖及び第2鎖を含んでもよく、第1鎖は第2鎖に対して配列相補性を有する。アダプター1-7及び4-7は、両端からの核酸増幅が重複領域を作り出すように選択され得る。アダプター1-7は相補配列703に対応し、アダプター4-7は相補配列702に対応する。重複は、生体サンプルの第1鎖のコピー又はその相補体と、生体サンプルの第2鎖のコピー又はその相補体とのマッチングを可能にし得る。重複は、例えば、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350又はそれを超える塩基対（例えば、各鎖のコピーの10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350個又はそれを超えるヌクレオチド又はその相補体）を含み得る。第1鎖及び第2鎖又はそのコピーもしくは相補体の核酸配列決定（例えば、PCR、例えば、ePCR）は、重複の全部又は一部を含む配列リードを提供し得る。重複領域は、2つのアダプター間に位置されてもよい。例えば、第1鎖は、第1のアダプター及び第3のアダプターを含んでもよく、第1及び第3のアダプターは第1の鋳型配列に隣接し、また、第2鎖は、第2のアダプター及び第4のアダプターを含んでもよく、第2及び第4のアダプ

30

40

50

ターは第2の鋳型配列に隣接し、この場合、第1の鋳型配列は第2の鋳型配列に対して配列相補性を有し得る。これらのアダプターは、一本鎖アダプターであってもよい。第3及び第4のアダプターは、それぞれ第2及び第1のアダプターの相補体であってもよい。或いは、二本鎖アダプターが使用されてもよい。そのようなシステムが図7に示されており、この場合、第1のアダプターは、第1のサブパート（例えば、図7の部分1-7）及び第2のサブパート（例えば、図7の配列703）を含み、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有し得る。第2のアダプターは、第1のサブパート（例えば、図7の部分4-7）及び第2のサブパート（例えば、図7の配列702）を有し、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有し得る。第1鎖及び第2鎖を含む生体サンプル（例えば、核酸分子）は、ビーズの第1のセットからの第1のビーズ及びビーズの第2のセットからの第2のビーズを伴って1つのパーティション（例えば、1つ以上の液滴又はウェル）に分割されてもよい（例えば、本明細書に記載されるように）。パーティションに含まれる材料は、その後、核酸増幅反応及び/又は核酸配列決定に供され得る。生体サンプルは、図7に示すような核酸分子であってもよい。核酸分子は、複数の塩基対を含む重複領域（例えば、白色で示される図7の核酸分子705）を含む。第1及び第2のビーズを伴うパーティション分割に続いて、パーティション中の材料を核酸配列決定に供して、核酸分子の第1鎖及び第2鎖に対応する配列リードを提供することができる。一例として、システムリード長が約1000ヌクレオチドであり、生体サンプルの長さが約1800ヌクレオチドである場合、第1鎖に対応する約1000ヌクレオチドの配列リード及び第2鎖に対応する約1000ヌクレオチドの配列リードが生成されてもよく、この場合、第1及び第2の配列リードは約200ヌクレオチドの重複を有する。

【0238】

本明細書に記載の生体サンプルを分析及び/又は処理するための方法は、第1のアダプターと配列相補性を有する第1のプライマー分子（例えば、図8の部分1-8）を伴うビーズの第1のセットの第1のビーズと、第2のアダプターと配列相補性を有する第2のプライマー分子（例えば、図8の部分4-8）を伴うビーズの第2のセットの第2のビーズとを含み得る（例えば、図8参照）。ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズは、解放可能に結合されてもよい。したがって、ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズを含む解放可能に結合されたビーズ対を形成することができる。第1のビーズと第2のビーズとの結合は、本明細書に記載のタンパク質相互作用又は共有結合によって達成され得る。そのような解放可能に結合されたビーズ対のセットを調製することができ、この場合、各ビーズ対は、ビーズの第2のセットのビーズに解放可能に結合されたビーズの第1のセットのビーズを含む。解放可能に結合された第1のビーズ及び第2のビーズのセットの調製中に、サイズ選択プロセスを実行して、第1のビーズ及び/又は第2のビーズの他の組み合わせとは別個の解放可能に結合された第1のビーズ及び第2のビーズの対を識別又は選択することができる（例えば、ビーズの第1のセットの2つのビーズ又はビーズの第2のセットの2つのビーズを含む対）。本明細書に記載されるように、第2のビーズに解放可能に結合された第1のビーズを含む解放可能に結合されたビーズ対は、刺激（例えば、熱的又は化学的的刺激）を受けることができる。刺激の適用は、第1のビーズを第2のビーズから解放することができる。

【0239】

生体サンプルの第1鎖及び第2鎖は、それぞれが二本鎖アダプターであってもよい2つの別個のアダプター、すなわち、第1のアダプター及び第2のアダプターに隣接し得る。第1のアダプターは、第1のサブパート（例えば、図7の部分1-7）及び第2のサブパート（例えば、図7の配列703）から構成され、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有することができる（例えば、図7参照）。第2のアダプターは、第1のサブパート（例えば、図7の部分4-7）及び第2のサブパート（例えば、図7の配列702）を有し、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有し得る。（例えば、図7参照）その後、生体サンプルは、ビーズの第1のセットの第1の

ビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズを伴ってパーティションに分割される（例えば、1つ以上のエマルジョン中の1つ以上の液滴）。パーティション内に配置された又は存在する材料及び／又は構成要素（例えば、液滴）は、その後、核酸増幅及び核酸配列決定（例えば、PCR、例えば、ePCR）などの後続の処理に供され得る。

【0240】

本開示の方法は、第1のアダプターと配列相補性を有する第1のプライマー分子を（例えば、図8の部分1～8によって示されるように）含むビーズの第1のセットの第1のビーズと、第2のアダプターと配列相補性を有する第2のプライマー分子を（例えば、図8の部分4～8によって示されるように）含むビーズの第2のセットの第2のビーズとを含み得る（例えば、図8参照）。ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズは、解放不能に（例えば、不可逆的に）結合されて、ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズを含むビーズ対を形成し得る。第1のビーズと第2のビーズとの結合は、タンパク質相互作用、共有結合、1つ以上の化学リンカーを介して、及び／又は1つ以上のスプリントオリゴヌクレオチドを介して達成され得る。そのような解放不能に結合されたビーズ対のセットを調製することができ、この場合、各ビーズ対は、ビーズの第2のセットのビーズに解放不能に結合されたビーズの第1のセットのビーズを含む。解放不能に結合された第1のビーズ及び第2のビーズのセットの調製中に、サイズ選択プロセスを実行して、第1のビーズ及び／又は第2のビーズの他の組み合わせとは別個の第1のビーズ及び第2のビーズの対を識別及び／又は選択することができる（例えば、ビーズの第1のセットの2つのビーズ又はビーズの第2のセットの2つのビーズを含む対）。

【0241】

生体サンプルは（例えば、第1鎖及び第2鎖を含む図7の核酸分子705によって示されるように）、両端からの核酸増幅が重複するように選択されてもよい（例えば、図7参照）。重複は、生体サンプルの第1鎖のコピーと生体サンプルの第2鎖のコピーとのマッチングを可能にする。生体サンプルは、2つの別個のアダプター、すなわち、第1のアダプター及び第2のアダプターに隣接していてもよく、それぞれが二本鎖アダプターであってもよい。第1のアダプターは、（例えば、図7の部分1～7によって示されるような）第1のサブパート及び（例えば、図7の配列703によって示されるような）第2のサブパートから構成されてもよく、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有してもよい（例えば、図7参照）。第2のアダプターは、（例えば、図7の部分4～7によって示されるような）第1のサブパート及び（例えば、図7の配列702によって示されるような）第2のサブパートを含み、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有してもよい（例えば、図7参照）。その後、生体サンプルは、ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズを伴ってパーティション（例えば、1つ以上の液滴又はウェル）に分割される（例えば、1つ以上の液滴に分割される）。その後、パーティション内の材料は、核酸増幅及び／又は核酸配列決定などの後続の処理に供される。

【0242】

本開示は、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットを提供することを含む、生体サンプル（例えば、第1鎖及び第2鎖を含む核酸分子）を処理するための方法を更に提供する。ビーズの第1のセットの第1のビーズは、生体サンプルの第1鎖に結合された第1のアダプターに対して配列相補性を有する第1のプライマー分子を含み得る。ビーズの第2のセットの第2のビーズは、生体サンプルの第2鎖に結合された第2のアダプターに対して配列相補性を有する第2のプライマー分子を含み得る。第1のプライマー分子は、第2のプライマー分子と異なってもよい。

【0243】

方法は、(i) ビーズの第1のセットの第1のビーズ、(ii) ビーズの第2のセットの第2のビーズ、及び(iii) 第1鎖に結合された第1のアダプター及び第2鎖に結合された第2のアダプターを含む生体サンプルをパーティションに分割すること（例えば、

10

20

30

40

50

1つ以上の液滴を生成すること)を含み得る。分割は、例えば、エマルジョン又はウェル中の液滴を使用して達成され得る。

【0244】

第1及び第2のビーズと生体サンプルとを含むパーティションは、第1のアダプターに結合された第1鎖の1つ以上のコピー又はその相補体、及び/又は、第2のアダプターに結合された第2鎖の1つ以上のコピー又はその相補体を生成するのに十分な条件に供され得る。第1鎖及び/又は第2鎖の1つ以上のコピー、又はそれらの相補体を生成することは、プライマー伸長反応及び/又は核酸増幅反応(例えば、PCR、例えば、ePCR)を実施するのに十分な条件に第1及び第2のビーズ及び生体サンプルを供することを含み得る。第1のビーズの第1のプライマーは、第1鎖の1つ以上のコピー、及び/又はその相補体を生成するために使用され得る。第1鎖の1つ以上のコピー及び/又はその相補体は、第1のビーズに結合されてもよく、増幅反応(例えば、線形又は指数関数的増幅)に使用されてもよい。第2のビーズの第2のプライマーは、第2鎖の1つ以上のコピー及び/又はその相補体を生成するために使用され得る。第2鎖の1つ以上のコピー及び/又はその相補体は、第2のビーズに結合されてもよく、増幅反応(例えば、線形又は指数関数的増幅)に使用されてもよい。第1鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体の配列は、第2鎖の1つ以上のコピー、又はその相補体の配列と少なくとも部分的に重複し得る。本明細書に記載されるように、増幅産物(例えば、第1鎖及び/又は第2鎖又はその相補体の1つ以上のコピー)を生成するために、任意のタイプの核酸増幅反応を使用することができる。第1鎖の1つ以上のコピーは、第2鎖の1つ以上のコピーと重複しなくてもよい。

【0245】

複数のパーティションのうちの少なくとも1つのパーティションは、少なくとも第1のビーズ、第2のビーズ、並びに第1及び第2のサンプル核酸分子に加えて、材料又は成分を含み得る。パーティションの更なる成分は、合成核酸分子であってもよい。合成核酸分子は二本鎖であってもよい。合成核酸分子は、開裂可能要素を含み得る。開裂可能要素は、合成核酸分子の成分の分離を可能にし得る。分離は、化学的、光、熱又は他の手法によって達成され得る。また、合成核酸分子は、ライゲーション及び/又は環状化に供され得る。ライゲーション及び/又は環状化の際に、合成核酸分子を開裂して、開裂された合成核酸分子を提供することができる。その後、開裂された合成核酸分子は、増幅反応(例えば、本明細書に記載されるように、)によってギャップ装填に供され得る。これに代えて又は加えて、パーティションは、1つ以上の試薬、例えば、細胞を溶解もしくは透過処理するための又はプライマー伸長もしくは増幅反応(例えば、ヌクレオチド及び重合酵素)に使用するための1つ以上の試薬を含み得る。

【0246】

本明細書に開示されるように、生体サンプルを分析及び/又は処理するための方法は、ビーズの第1のセットの第1のビーズを、ビーズの第2のセットの第2のビーズに解放可能に結合させることができる。ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズは、タンパク質相互作用又は共有結合を介して解放可能に結合され得る。タンパク質相互作用は、水素結合、ファンデルワールス力、双極子-双極子相互作用、又はそれらの任意の組み合わせを指し得る。共有結合は、結合反応及び/又はクリックケミストリーなどの様々な化学反応を使用してビーズ間で形成(例えば、合成的に形成)され得る。

【0247】

第2のビーズに解放可能に結合された第1のビーズは、刺激に供され得る。刺激は、第2のビーズからの第1のビーズの解放を引き起こす。刺激は、温度変化であってもよく、化学的刺激であってもよい。或いは、ビーズの第1のセットの第1のビーズは、ビーズの第2のセットの第2のビーズに除去不能に結合されてもよい。この除去不能な結合は、第1のビーズと第2のビーズとの間の架橋(例えば、共有連結)を含み得る。

【0248】

生体サンプルを分析及び/又は処理するための本開示の方法において、方法は、ビーズ

の第1のセット及び/又はビーズの第2のセットを含む複数のビーズを調製すること（例えば、合成すること）を含み得る。ビーズの第1のセット又はビーズの第2のセットは、例えば、ポリマービーズであってもよい。ビーズは、ヒドロゲルビーズであってもよい。ビーズは、PEG層又はヒドロゲルなどのコーティングを有していてもよい。ビーズの複数のセットが使用される場合、ビーズの複数のセットは、同じコアビーズ又は異なるコアビーズを含有する（例えば、同じ又は異なる材料を含む）ことができる。例えば、ビーズの第1のセットのうちのビーズが第1の材料から調製されてもよく、ビーズの第2のセットのうちのビーズが第2の材料から調製されてもよく、第1の材料は第2の材料と同じであっても異なってもよい。第1及び第2のプライマー分子は、ビーズの第1及び第2のセットの調製（例えば、合成）中に、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットにそれぞれ提供され得る。或いは、第1及び第2のプライマー分子は、ビーズの第1及び第2のセットの調製後に、ビーズの第1のセット及びビーズの第2のセットに（例えば、まだプライマー分子を含まない「コアビーズ」に）それぞれ提供され得る。プライマー分子がその後のプロセスでビーズに固定化される場合、ビーズの第1及び第2のセットのビーズは別々に更に処理され得る。各ビーズセットにおけるプライマー分子は、様々な化学反応を使用してビーズに固定化され得る。結合は、例えば、アミド、エステル又はジスルフィド官能基を介して起こり得る。クリックケミストリー（例えば、シュタウディンガーライゲーション又はディールス・アルダー化学）は、ビーズへのプライマーの固定化に使用され得る。固定化されたプライマー分子は、更なる下流側の化学反応を用いて更に修飾され得る。

10

20

【0249】

本明細書に記載されるように、ビーズはビーズ対を成して提供され得る。ビーズ対のビーズは、互いに解放可能又は解放不能に（例えば、不可逆的に）結合され得る（例えば、本明細書に記載されるように）。ビーズ対は、ビーズの第1のセットの第1のビーズ及びビーズの第2のセットの第2のビーズを含み得る（例えば、本明細書に記載されるように）。

【0250】

生体サンプルを分析及び/又は処理するための本明細書に開示される方法は、核酸配列決定（例えば、NGS）を受け得る第1鎖の1つ以上のコピー及び第2鎖の1つ以上のコピーを含み得る。本明細書に記載されるように、核酸配列決定は、合成又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による配列決定を含み得る核酸増幅反応の一種である。核酸増幅及び/又は配列決定は、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応（ePCR）を含み得る。本明細書に開示されるように、ePCRなどのPCRは、エマルジョン液滴などのパーティションで行なわれてもよく、その少なくとも1つのサブセットはそれぞれ、第1のプライマー分子を含む少なくとも1つの第1のビーズ、第2のプライマー分子を含む1つの第2のビーズ、並びに、第1及び第2のアダプターを含む第1及び第2の核酸鎖をそれぞれ含んでもよく、第1及び第2のアダプター（例えば、ペアエンドアダプター）はそれぞれ第1及び第2のプライマー分子に対して少なくとも部分的な配列相補性を有し得る。

30

【0251】

第1のアダプターは、第1のサブパート及び第2のサブパートを含むことができ、第1のサブパートは、第2のサブパートに対して配列相補性を有する（例えば、図7に示すように）。配列相補性は、一般に、対になっている配列に対して相補的な配列を指す。

40

【0252】

複数のパーティションの各パーティション（例えば、各液滴又はウェル）は、ビーズの第1のセットの少なくとも1つの第1のビーズ、ビーズの第2のセットの少なくとも1つの第2のビーズ、及び、第1鎖に結合された第1のアダプター及び第2鎖に結合された第2のアダプターを含む生体サンプルを含み得る。パーティションは、液滴又はウェルであってもよい。

【0253】

生体サンプルを分析するための本明細書に記載の方法は、それぞれが特定のアダプター

50

に対応するプライマー配列を含む２種類のビーズ（例えば、第１のビーズ及び第２のビーズ）を含んでもよく、この場合、アダプターは、１つ以上の鋳型配列を含む生体サンプルの核酸分子に結合され得る。核酸分子の鋳型配列は、アダプターに含まれる１つ以上のバーコード配列によって同定可能であってもよい。ターゲット核酸ライブラリーインサート（例えば、図７の核酸分子７０５によって示される）の長さは、両端からの核酸配列決定が重複を全く有さない又は非常に最小限の重複を有する配列リードを提供するように選択され得る。インサートは、末端修復及びＡテール加工されてもよい。合成二本鎖核酸分子は、合成二本鎖が好ましくは末端ホスフェートを伴うことなくＴオーバーハングを含有し得るように、インサートとループしてライゲートし得るように設計され得る。合成二本鎖核酸分子の配列は、以下の通り、すなわち、バーコード２'、ＰＢ'開裂可能要素、ＰＡ、バーコード１であってもよい。バーコード１及びバーコード２'は市販されている場合があり、バーコード１及びバーコード２'は異なる配列であってもなくてもよい。本明細書に記載の方法で使用されるバーコード配列は、互いに対して割り当てられるように十分に定義され得る。開裂可能要素は、化学的、光、熱、又は他の機構による合成二本鎖核酸分子の鎖の分離を可能にし得る。ライゲーション及び環状化の後、合成二本鎖核酸分子を開裂してポリメラーゼに基づく伸長によってギャップ装填することができる。２つのタイプのビーズ（例えば、図８の部分８０６を参照）がクローン増幅のために利用可能であってもよく、１つのタイプのビーズは固定化ＰＡ（１－２）オリゴヌクレオチドを伴い又はＰＡのサブ部分を最小限に含み、もう１つのタイプのビーズはＰＢ（４－２）オリゴヌクレオチドを伴い又はＰＢのサブ部分を最小限に含む。

【０２５４】

増幅プロセスが完了すると、複数のパーティションに分配された複数のビーズ（例えば、複数のビーズ－核酸分子複合体）は、複数のパーティション（例えば、液滴又はウェル）から回収されてもよく、ビーズ（例えば、複数のビーズ－核酸分子複合体）は、エマルジョン又は混合物から分離（例えば、磁氣的に分離）されてもよい。続いて、先の増幅及び／又は処理工程のいずれかの間に形成され得る核酸分子又はその任意の誘導体をアッセイ又は分析することができる（例えば、シーケンサーにおいてヌクレオチド配列を決定することによって）。ある場合には、ビーズに結合された核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）のみが配列決定される。他の場合では、ビーズに結合されていない核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）のみが配列決定される。ある場合には、ビーズに結合された核酸分子とビーズに結合されていない核酸分子（例えば、増幅産物又はその誘導体）の両方が配列決定される（例えば、同時に又は別々に）。

【０２５５】

したがって、本明細書に開示される方法の利点は、生体サンプルが低量及び／又は低濃度の核酸分子（例えば、cfDNA）を含有する場合に特に重要であり得る。同様に、本開示の方法の精度及び感度は、稀な対立遺伝子を検出するために（例えば、癌の診断及び検出において）サンプルを分析するときに特に重要であり得る。

【０２５６】

クローン増幅のための方法及びシステム

増幅後にモノクローナルビーズを確保にするために液滴にシングルビーズ及び単一鋳型を装填する、プライマービーズのクローン増幅のためのエマルジョンPCRの以前の方法は、二重ポアソン分布に起因して大量の試薬が有効に利用されていないという問題を抱え得る。図１０Ａは、シングルビーズ及び単一の鋳型を含む液滴を達成するための概略図の一例を示す。液滴が最大でもシングルビーズ及び／又は最大でも単一の鋳型を有するようになるべく、ポアソン分布に従って液滴に試薬（例えば、鋳型１０１０及びビーズ１００８）を装填することができる。しかしながら、図１０Ａに示されるように、これは、ビーズ１００２及び鋳型１００４を有する液滴のごく一部（例えば、液滴１０００）をもたらし得る。これにより、分割のために入力されるビーズ１００８及び鋳型１０１０の初期量に対してわずかな増幅ビーズ１００６しか得られない。また、そのような手順は、エマルジョン液滴の多くがビーズを欠く（例えば、液滴１０１２）、鋳型を欠く（例えば、液滴

1014)、又はビーズと鑄型の両方を欠く(例えば、液滴1016)ため、増幅試薬を非効率的に使用し得る。幾つかのプロトコルは、全ての液滴の約20~30%のみに鑄型を装填することを提案することができる。鑄型は、ポアソン分布に従って分布することができる。30%装填では、全ての増幅されたビーズの15%未満がポリクローマルビーズである可能性が高い(パーティション内に2つ以上の鑄型)。しかしながら、鑄型を含まない全ての液滴(例えば、残りの70%)は、下流側処理のために機能的ではなく、ポリメラーゼ、dNTP、プライマービーズ及びプライマーなどの試薬は、それらの液滴中で浪費される。幾つかの例において、ビーズは、また、「機能的」液滴の数を更に希釈するポアソン分布に従って装填される(例えば、シングルビーズ及び少なくとも1つのビーズを有する)。第2の欠点は、増幅されたプライマービーズのみに関心がある場合、増幅されたビーズを増幅されていないビーズ(例えば、鑄型を含まないパーティションに由来するビーズ)から選別するために更なる濃縮ステップが必要であることである。

10

【0257】

これに対し、図10Bを参照すると、本明細書に開示される方法、システム及び組成物は、液滴1020の多くが複数の鑄型を含有し、それでも下流側処理に実行可能なモノクローマルビーズ1022を生成するように、実質的により多くの鑄型1018をエマルジョンに装填することができる。本明細書に記載の特徴がなければ、そのような鑄型の過剰装填(例えば、複数の装填)は、増幅後に大きな割合のポリクローマルビーズ(例えば、複数の鑄型から誘導されるコピーを含むビーズ)をもたらすと予想される。しかしながら、本明細書に記載の方法、システム及び組成物を使用すると、結果として生じるビーズ(例えば、増幅ビーズ)は実質的にモノクローマル(例えば、モノクローマルビーズ1022)のままである。したがって、本明細書において、複数の鑄型及びビーズ(又は他の担体、例えば表面)を含むパーティションを含む方法、システム及び組成物、並びに、複数の鑄型を含むそのようなパーティションからモノクローマルビーズ(又は他の担体、例えば表面)を得るための方法、システム及び組成物が提供される。

20

【0258】

有益なことに、ビーズは、また、より効率的に使用され、場合によっては、後の方法(例えば、DNA配列決定のために)で使用される前に、増幅されたビーズのための別個の濃縮手順を必要としないことがある。幾つかの例において、本明細書中に記載される方法は、分割のために入力されるビーズの約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%又は約97%の増幅をもたらす。幾つかの例において、本明細書中に記載される方法は、分割のために入力されるビーズの少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも又は約97%の増幅をもたらす。

30

【0259】

有益には、鑄型は、また、より効率的に使用され、これは希少な又は貴重なサンプルにとって特に重要である。ある場合には、本明細書中に記載される方法は、分割のために入力される鑄型分子の少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%又は約97%の増幅をもたらす。ある場合には、本明細書中に記載される方法は、分割のために入力される鑄型分子の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも又は約97%の増幅をもたらす。

40

【0260】

図10Bに記載された実施形態は、図10Aの実施形態よりも効率的であり得る。これは、図10Aの実施形態ではモノクローマルビーズがシングルビーズ及び単一の鑄型を有する液滴から生じ得るが、図10Bでは、鑄型の数にかかわらず、ビーズ及び少なくとも1つの鑄型を含む液滴の大部分がモノクローマルビーズをもたらし得るからである。しかしながら、そのような実施形態では、ビーズを欠く液滴は依然として増幅試薬を浪費する。したがって、本開示は、液滴1026の大部分が少なくとも1つのビーズ及び少なくとも1つの鑄型を含むように、比較的多数の鑄型1024及び比較的多数のビーズ1028

50

が液滴の数に対して装填される、図 10C に示すような実施形態を提供する。そのような実施形態は、モノクロナルビーズが少なくとも 1 つの鋳型及び少なくとも 1 つのビーズを有する液滴から生じ得るので、試薬の効率的な使用、ビーズの効率的な使用、及び/又は核酸鋳型の効率的な使用をもたらす。したがって、本明細書では、少なくとも 1 つの鋳型及び少なくとも 1 つのビーズ（又は他の担体、例えば表面）を含むパーティションを含む方法、システム及び組成物、並びに、少なくとも 1 つの鋳型及び少なくとも 1 つのビーズ（又は他の担体、例えば表面）を含むそのようなパーティションからモノクロナルビーズ（又は他の担体、例えば表面）を得るための方法、システム及び組成物が提供される。

【0261】

10

本明細書に記載の方法は、分割のために入力されるビーズ 1026 の初期量及び/又は核酸鋳型 1024 の初期数に対して多数のモノクロナル増幅ビーズ 1030 をもたすことができる。幾つかの実施形態において、本明細書中に記載される方法は、分割のために入力される鋳型核酸分子の約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95% 又は約 97% の増幅及びビーズに対する付着をもたらす。幾つかの実施形態において、本明細書中に記載される方法は、分割のために入力される鋳型核酸分子の少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも又は約 97% の増幅及びビーズに対する付着をもたらす。

【0262】

20

ある場合には、分割に続いて、液滴の約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95% 又は約 97% が、少なくとも 1 つのビーズ及び少なくとも 1 つの核酸鋳型を含有する。ある場合には、分割に続いて、本明細書に記載の方法は、液滴の少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも又は約 97% が少なくとも 1 つのビーズ及び少なくとも 1 つの核酸鋳型を含有することをもたらす。

【0263】

増幅される任意の適切な割合のビーズは、モノクロナルであってもよい。例えば、本明細書に記載の方法は、増幅されたビーズの約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95%、又は約 97% がモノクロナルであることをもたす。幾つかの例では、増幅されたビーズの少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 80%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、又は少なくとも約 97% がモノクロナルである。

30

【0264】

核酸鋳型を表面に付着させて増幅することができる。例えば、図 11 を参照すると、増幅は、液滴内のエマルジョン中で行なうことができる。エマルジョンの連続相 1100（例えば、油）は、分散相 1102（例えば、水溶液）を取り囲む。連続相は、分散相を複数のパーティションに分割することができる。複数のパーティションの一部は、ビーズの表面に付着された表面プライマー 1106（第 1 のプライマー）の複数のコピーを有する 1 つ以上のビーズ 1104 を含み得る。複数の第 1 のプライマーは、第 1 の配列に対して配列相性を有していてもよい。また、核酸鋳型 1108 は、分散相のパーティション中にもあり得る。鋳型の一端 1110 は、表面プライマー 1106 にアニールすることができる、及び/又は、表面プライマー 1106 によって増幅することができる。他端 1112 は、第 2 のプライマー 1114 にアニールすることができる、及び/又は、第 2 のプライマーによって増幅することができる。場合によっては、第 2 のプライマー 1114 は、パーティション内の分散相中にあり得る。増幅 1116 に続いて、そのような系は、ビーズに付着した鋳型核酸（又はその逆相補体）の複数の（クローン）コピーを有するビーズをもたらす。鋳型のクローンコピーを有するそのようなビーズは、例えば、鋳型の単一コピーから生成され得る信号と比較して配列決定信号を増幅するために、DNA 配列決定方法において使用され得る。

40

【0265】

50

従来の方法では、分散相が2つ以上の異なる鋳型核酸を含む場合に合併症が生じ得る。異なる鋳型は、核酸ライブラリーの非クローン性メンバーであり得る。例えば、図12を参照すると、複数のパーティションのうちの1つのパーティション1200は、第1の核酸鋳型1202と、第1の核酸鋳型1202とは異なる第2の核酸鋳型1204とを含む。鋳型ライブラリーを作成する過程で、共通の第1の末端1206及び共通の第2の末端1208をそれぞれの鋳型に追加することができる（例えば、ライブラリーメンバーをビーズに付着させて単一のプロトコルを使用して増幅することを容易にするために）。増幅1210に続いて、そのような系は、非クローン性（すなわち、第1の鋳型の少なくとも1つのコピー及び第2の鋳型の少なくとも1つのコピーがビーズに付着している）のビーズをもたらす。例えば、非クローンビーズがDNA配列決定方法で使用される場合、配列決定データはクローンビーズと比較して不十分であり得る。両方の鋳型に由来する非クローンビーズからの信号は、シングルビーズの分解能で分解することが困難又は不可能であり得る。

10

【0266】

本明細書で認識されるのは、2つ以上の核酸鋳型がパーティション（例えば、液滴）に装填されるが、鋳型のうちの1つのみがビーズ（又は他の担体）に付着して増幅される方法の必要性である。本明細書では、少なくとも上記の（1又は複数の）必要性に対処する方法、システム、及び組成物が提供される。本開示のシステム、方法、及び組成物は、モノクローナルであるビーズの割合を犠牲にすることなく、単一鋳型パーティションに限定される従来の方法よりも少ない試薬を廃棄することができる（すなわち、提示された方法を使用することにより、増幅が可能な少なくとも1つの核酸鋳型分子を含有するより多くの液滴が可能になるからである）。

20

【0267】

本開示の方法は、最初に鋳型核酸又はその誘導体を表面に最初に付着させ、続いてそのような付着した鋳型を表面上で増幅させる2つの重要な段階で、分割からクローン増幅までのプロセス全体を制御することを含む。本明細書に記載の方法は、前者の速度を低下させること（すなわち、付着）及び/又は後者の速度を増加させること（すなわち、増幅）を含むことができる。その結果、複数の異なる鋳型の存在下であっても、ほとんどのビーズは単一鋳型のクローンコピーのみを有する。例えば、付着が増幅と比較して遅い及び/又は稀な事象である場合、表面に付着する第1の鋳型は、迅速に増幅され、第2の鋳型が表面に付着することができる前に実質的に全ての表面プライマーを消費する。

30

【0268】

図13を参照すると、エマルジョン液滴1300は、ビーズ1302、鋳型核酸分子1304、ビーズ1306に付着した第1のプライマー、及び第2のプライマー1308を含むことができる。ビーズは、第1の配列に対して配列相同性を有する複数の第1のプライマーを含み得る。また、液滴は、溶液中に第3のプライマー1310を含むことができる。鋳型は、第1の末端1316及び第2の末端1318を備えてもよい。鋳型のいずれの末端も、場合によっては、第2のプライマー1306によって伸長される前にビーズ上の第1のプライマー1308にアニーリングすることができないことがある。例えば、鋳型の末端配列は、第1の配列に対して相補的でなくてもよい。第2のプライマー1308は、第1の部分1312と第2の部分1314とを有する。第2の部分は、伸長配列を含み得る。第1の部分1312は鋳型の第1の末端1316にアニールしてもよく、また、複合体を核酸伸長反応に供して、伸長配列又はその相補体を含む伸長産物1320を生成することができる。伸長産物1320は、伸長配列又はその相補体を使用してビーズ上の第1のプライマー1306にアニーリングすることができる。第3のプライマー1310は、伸長反応を開始するために、核酸鋳型の第2の末端1318又はその相補体にアニーリングすることができる。伸長産物1320を増幅してビーズ1302に付着したクローン増幅鋳型を作製するために使用することができるビーズ1322上の第1のプライマー1306のコピーが多数存在し得る。

40

【0269】

50

本明細書に記載の方法及びシステムを使用して、クローン増幅ビーズ（すなわち、ポリクローナルではないビーズ）を作製することができる。図 14 を参照すると、エマルジョン液滴 1400 は、複数の核酸鋳型分子を有することができる。この図は、第 1 の鋳型 1402 及び第 2 の鋳型 1404 を示しているが、2 つより多い鋳型が存在してもよい。両方の鋳型は、第 2 のプライマー 1406 によって伸長され得る。しかしながら、このプロセスは、ビーズ 1408 に付着した第 1 のプライマーへの伸長産物のアニーリング及び／又は第 1 のプライマーを使用したビーズ上での指数関数的増幅と比較して、より遅くなる（例えば、より稀に発生する）ように操作される。したがって、少なくとも第 1 の核酸鋳型の伸長産物からの第 1 の核酸鋳型のその後の増幅の前に、第 2 の鋳型ではなく第 1 の核酸鋳型 1410 から伸長産物が作製される可能性が高い。増幅は伸長及び／又は付着よりも速いため、複数の鋳型が最初に液滴中に装填されたとしても、第 1 の核酸鋳型 1415 に対応するモノクローナル増幅産物を有するビーズを作製することができる。ビーズを回収することができ、及び／又は、非増幅鋳型をビーズから洗い流すことができる。

【0270】

核酸鋳型は、一本鎖又は二本鎖であり得る。図 10 ~ 図 14 は、これらの図が核酸鋳型を表わす単一の線を示す場合であっても、鋳型の単一又は二重鎖を区別しない。図 15 A は、第 1 の鋳型 1500 及び第 2 の鋳型 1502 が最初是一本鎖である実施形態を具体的に示す。明確にするために、一本鎖鋳型の 5' 末端及び 3' 末端を示す。第 2 のプライマーの第 1 の部分 1504 は、鋳型核酸分子の 3' 末端とハイブリダイズすることができる。その後、第 2 のプライマー及び第 1 の核酸鋳型をそれぞれの 3' 末端から伸長させて、二本鎖伸長産物 1506 を得ることができる。鋳型が一本鎖であることの利点の 1 つは、伸長産物が作製されるまで第 3 のプライマー（第 3 のプライマー）1508 が鋳型を（直線的にさえ）増幅しないことである。

【0271】

ある場合には、第 2 のプライマー（すなわち、伸長プライマー）は、限界濃度を有する。ある場合には、エマルジョン液滴は、伸長プライマーのコピー 1510 を 1 つだけ有する。そのような場合、伸長プライマーは消費され、第 2 の核酸鋳型を伸長するために利用できない。第 2 の鋳型が伸長されない場合、第 2 の鋳型はビーズに付着したプライマーとハイブリダイズすることができず、増幅されたビーズはモノクローナルである可能性が高い（液滴が最初に多くの異なる鋳型を含有していたとしても）。伸長プライマーの濃度を制限する（低下させる）ことは、液滴中に伸長プライマーが数コピー存在する場合であっても有益であり得る。低濃度の伸長プライマーは、伸長後のビーズ上の増幅率と比較して、伸長反応を起こりにくくすることができる（すなわち、より遅い）。これらのプロセスの速度のこの差は、高い割合のモノクローナルビーズをもたらす得る。場合によっては、第 1 のプライマーの濃度に対する伸長プライマーの濃度の比率は、約 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 以下の程度である。場合によっては、第 3 のプライマーの濃度に対する伸長プライマーの濃度の比率は、約 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 以下程度である。

【0272】

引き続き図 15 B を参照すると、二本鎖伸長産物 1506 中の二本鎖は解離することができ（例えば、変性によって）、伸長産物 1512 の鎖の一方は、ビーズ（表面プライマー）1514 に付着した第 1 のプライマーとアニールすることができる（例えば、その 3' 末端で）。表面プライマーを伸長させることができ（1516）、それにより、一本鎖がビーズに付着した二本鎖構築物 1518 が得られる。引き続き図 15 C を参照すると、ビーズ 1520 に付着していない二本鎖構築物の鎖は解離し、表面プライマー 1522 の第 2 のコピーとハイブリダイズすることができる。方法（すなわち、図 15 C）のこの増幅プロセスは、伸長及びアニーリング（すなわち、図 15 A ~ 図 15 B）よりも速くすることができる。場合によっては、増幅は指数関数的である。表面プライマーの第 2 のコピーを伸長させることができる 1524。第 1 の表面プライマーの伸長されたコピーを溶液プ

ライマー（第3のプライマー）1526と併せて使用して、更に多くの表面プライマーを伸長することができる別の鋳型を作製することもできる。

【0273】

幾つかの例において、エマルジョン液滴は、増幅速度を促進するために表面に付着していない第1のプライマーの更なるコピーを更に含み得る。図16Aを参照すると、二本鎖伸長産物1600を作製するための鋳型核酸分子の最初の伸長（第2のプライマーを使用）の後、溶液中の伸長産物を指数関数的に増幅するために、溶液1602中の幾つかの更なる第1のプライマーを溶液（第3の）プライマー1604と併せて使用することができる。この溶液ベースの増幅の利点は、伸長産物1606の更なる溶液コピーのため、（1又は複数の）伸長産物が更なる指数関数的増幅のためにビーズに対してより速くアニール

10

【0274】

第1のプライマーを溶液中にも有するという更なる利点があり得る。図16Bを参照すると、第2の（伸長）プライマー1608の余分なコピーを第1の鋳型の伸長後に迅速に消費することができ、その結果、それらは第2の鋳型を伸長するために利用できない。第1のプライマーの溶液コピーは、（溶液ベースの増幅と比較して）より遅い表面ベースの増幅に頼ることなく、伸長産物1610の更なるコピーを迅速に生成することができる。伸長産物の更なるコピーは、第2のプライマー1612の更なるコピーをハイブリダイズ及び消費するための基板であり得る。第2のプライマーの全てのコピーは、それらが第2の核酸鋳型を伸長するために使用され得る前に、第1の核酸鋳型（又はその誘導体コピー）を使用して迅速に伸長され得る。

20

【0275】

本明細書に記載のシステム及び方法は、ビーズ上の鋳型のクローン増幅及び/又はエマルジョン中の増幅に限定されないことが理解される。図17Aを参照すると、方法は、ガラス、プラスチック、シリコンウェハ、又は任意の他の適切な表面などの表面1700上で実行することができる。表面は、分離された領域1702、1704を有することができる。各領域は、表面の領域内に付着された複数の第1のプライマー1706を有する。例えば、各領域は、十分なギャップ領域（第1のプライマーの欠如を有する）によって分離され得る。ある場合には、第1の領域における任意の第1のプライマーと第2の領域における任意の第1のプライマーとの間の最小距離は、およそ 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} m又はそれ未満であってもよい。鋳型核酸分子1708、1710のライブラリーは、複数の分離された領域と流体接触することができる。すなわち、本明細書に記載の方法は、複数のエマルジョン液滴で実施される必要はないが、実施されてもよい。

30

【0276】

全ての成分が第1のプライマーの複数のクラスターに流体アクセスできる開放表面上の主要な機構は、エマルジョン中で実施される場合と同様であり得る。図17Bを参照すると、第2のプライマー1712は、第1核酸鋳型を伸長することができる。図17Cにおいて、伸長産物1714は、伸長され得る開放表面上の第1のクラスター上の第1のプライマーのコピーの一方にハイブリダイズし得る1716。伸長産物を作製する遅いプロセスに続いて、第2の鋳型に由来する伸長産物が同じクラスター位置でアニールすることができる前に、クラスター位置での第1のプライマーのコピーの実質的に全てが消費され得る（及びクローンであり得る）ように、表面での増幅をより速くすることができる。図17Dを参照すると、第1の核酸鋳型1718に対応するクローンクラスターを作成することができる。他のクラスター位置1720は、別の（1又は複数の）核酸鋳型のクローン増幅に利用可能であり得る。

40

【0277】

場合によっては、第2のプライマーも表面に付着される（溶液中に存在することに代えて又は加えて）。第2のプライマーの濃度は、クラスター内（又はビーズ上）に付着した

50

第1のプライマーの数に対して制限的であり得る（例えば、低い）。これらの実施形態の利点は、本方法の初期プロセスが、第1のプライマーの局所コピーを迅速に消費する後の増幅プロセスと比較して更に減速され得ることであり得る。図18Aを参照すると、表面1800は複数のクラスターを有することができる。クラスターは、（例えば、別個のクラスターの撮像によるDNA配列決定のために）アレイを形成することができる。クラスターは、幾つかのコピーの第1のプライマー1802及びより少ないコピーの第2のプライマー1804を有することができる。ある場合には、第1のプライマーの濃度に対する第2のプライマーの濃度の比率は、約 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 以下程度である。クラスターは、第1の鋳型1806及び第2の鋳型1808を含む核酸ライブラリーと流体接触することができる。引き続き図18Bを参照すると、第1の核酸鋳型1806を第2のプライマーで伸長して伸長産物を作製することができ、これをして第1のプライマー1802で増幅してクローンクラスターを作製することができる。

10

【0278】

幾つかの実施形態において、第1のプライマーのそれぞれの配列は、表面の異なるクラスター位置（又は異なるビーズ上）で異なる。図18Cを参照すると、第1のクラスター位置1812（又は第1のビーズ上）にある複数の第1のプライマー1810は、第2のクラスター位置1816（又は第2のビーズ上）にある複数の第1のプライマー1814とは異なる配列を有する。また、第2のプライマーは、異なるクラスター又はビーズ位置で異なり得る。ある場合には、第2のプライマーは、共通の第1の部分及び異なる第2の部分（又は異なる第2の部分）を有する。図18Cに示されるように、第1クラスター位置1812（又は第1のビーズ上）に位置する第1の第2のプライマーの第1の部分1818は、第2のクラスター位置1816（又は第2のビーズ上）に位置する第2の第2のプライマーの第1の部分1820と同じである。しかしながら、それぞれの第2のプライマーの第2の部分は異なっている。場合によっては、第1の第2のプライマーの第2の部分1822は、第1の第1のプライマー1810と同じであり得る。ある場合には、第2の第2のプライマーの第2の部分1824は、第2の第1のプライマー1814と同じであり得る。

20

【0279】

第1のプライマーを異なるクラスター位置（又は異なるビーズ上）で異なるようにすることにより、最初にクラスター位置で伸長される鋳型が得られ、そのクラスター位置に対して更なる親和性を発現する（他のクラスター位置に対して更なる親和性を有さない）。所定のクラスター位置からの伸長領域は、非伸長鋳型と第2のプライマーとの間のハイブリダイゼーションの親和性と比較して、所定のクラスター位置に対する相溶性及び増加した親和性の更なる塩基対を提供する。アニーリング反応、伸長反応、及び/又はエマルジョンのインキュベーションは、伸長を伴わずにアニーリング及び/又は伸長が稀な及び/又は遅い事象であるような十分なストリンジェンシーの条件（例えば、温度）で行なうことができる。

30

【0280】

図18Dを参照すると、第1の鋳型1806を第1のクラスター位置（又はビーズ）1812で伸長させて、第1の第1のプライマー1810に対して相補的な領域を含む第1の伸長産物を得ることができる。第2の鋳型1808を第2のクラスター位置（又はビーズ）1816で伸長させて、第2の第1のプライマー1814に対して相補的な領域を含む第2の伸長産物を得ることができる。図18Eを参照すると、第1の伸長産物1826は、第1のクラスター位置1812にある第1のプライマーと相溶性の領域を有し、第1のプライマーにアニールすることができ、第1のプライマーの伸長のための鋳型を提供することができるが、第2のクラスター位置1816ではそうではない。すなわち、これは、第1の鋳型が最初に第1のクラスター位置で伸長されたからである。同様に、第2の伸長産物1828は、第2のクラスター位置1816にある第1のプライマーと相溶性の領域を有し、第1のプライマーにアニールすることができ、第1のプライマーの伸長のための鋳型を提供することができるが、第2のクラスター位置1812ではそうではない。す

40

50

なわち、これは、第1の鋳型が最初に第2のクラスター位置で伸長されたからである。特に、第2のプライマーと核酸鋳型との間のアニーリング温度より高いか又は類似する温度が使用される場合、クラスター位置間の伸長産物の移動は好ましくない。本明細書に記載の任意の溶液は、バルク溶液又は液滴内の環境（例えば、表面、例えばビーズ又は他の担体の表面を含む）を指し得る。

【0281】

本開示は、表面への鋳型の最初の遅い又は稀な付着と、それに続く表面プライマーを使い果たすための表面付着鋳型（又はその誘導体）の迅速な増幅とを含み、それにより、クローン増幅鋳型（又はその誘導体）を提供することができる。前述のように、これは、付着を可能にするために鋳型の伸長部を使用することによって達成することができる。更に、増幅前の別の遅い又は稀なステップを本明細書に記載の方法に加えることができる。更に遅いステップも、鋳型の伸長を、このときには、表面に付着する鋳型の末端よりも遠位側の末端で伴うこともできる。

【0282】

図19Aを参照すると、システム、方法、及び組成物は、（表面に固定化された）第2のプライマー1902にアニーリングして伸長することにより伸長産物を生成する鋳型1900を含み得る。第2のプライマーは、核酸鋳型分子を鋳型として使用して伸長させることができ、それにより、配列決定されるべき核酸分子の最終的なコロニーの第1のコピーを作製する。引き続き図19Bを参照すると、伸長産物1904は、第2のプライマーから拡散し、表面に付着した第1のプライマー1906のコピーとハイブリダイズして、第1のプライマー1908の伸長のための鋳型として機能することができる。しかしながら、この伸長は指数関数的ではなく線形であり、すなわち、第1の（表面）プライマーのたった1つのコピーのみが各サイクルで伸長される。これは、鋳型及び/又は伸長産物1904の遠位端1910（表面固定化プライマーに結合する末端とは反対側の末端）が最初は第3のプライマー1912と相補的ではないためである。システムは、第1の部分1916及び第2の部分1918を有する第4のプライマー1914を更に含み得る。第1の部分は核酸鋳型にアニールすることができ、第2の部分は、伸長産物が第3のプライマーとハイブリダイズすることができるように核酸鋳型を伸長することができる。

【0283】

引き続き図19Cを参照すると、第4のプライマー1914は、表面1920に固定化された（第1のプライマー又は第2のプライマーのいずれかからの）以前に伸長したコピーを更に伸長することができる。また、第4のプライマーは、ある場合には、例えばライブラリー鋳型が二本鎖である場合、溶液中で鋳型核酸（又はその産物）を伸長させることができる。ある場合には、ライブラリー鋳型は一本鎖であり、第4のプライマーは、第1又は第2のプライマーで最初に伸長されるまでライブラリー鋳型とハイブリダイズしない。

【0284】

この伸長に続いて、図19Dを続けると、第3のプライマー1912を伸長させて、第1のプライマー1906の更なるコピーの伸長のための鋳型として機能することができる更なるポリヌクレオチドを作製することができる。（第2のプライマー及び第4のプライマーを使用した）各末端における元のライブラリー鋳型の最初の伸長は、（第1のプライマー及び第3のプライマーを使用した）指数関数的増幅と比較して比較的遅く、稀な事象であり得る。場合によっては、指数関数的増幅が表面に付着した第1のプライマーのクラスターによって定義されるコロニー位置を満たす前に、両方の伸長が完了する必要がある。

【0285】

別の態様では、核酸サンプルをクローン増幅するための方法が本明細書で提供される。この方法は、複数のパーティションを有するエマルジョンを形成することを含むことができる。複数のパーティションのうちの1つのパーティションは、鋳型核酸と、ビーズに付着した第1のプライマーの複数のコピーを有するビーズと、鋳型核酸又はその誘導体をビーズに付着させる付着反応及び第1のプライマーの複数のコピーを使用する増幅反応を行なうことができる試薬混合物とを含むことができる。方法は、エマルジョンをインキュベ

10

20

30

40

50

ートすることにより、鋳型核酸又はその誘導体をビーズに付着させる付着反応を行なうとともに、ビーズに付着した鋳型核酸又はその誘導体を増幅させる増幅反応を行なうことを更に含み得る。

【0286】

場合によっては、第1の期間（後述する期間）は、第2の期間（後述する期間）よりも長い。第1の期間は、エマルジョンがインキュベーションを開始するときに始まり、鋳型核酸又はその誘導体がビーズに付着するときに終了することができる。ある場合には、第2の期間は、鋳型核酸又はその誘導体がビーズに付着するときに始まり、増幅反応が終了したときに終了することができる。場合によっては、第2の期間を定義する目的で、表面上のクラスター位置のビーズ上の第1のプライマー又は第1のプライマーのクラスターが完全に伸長されるときに増幅反応が終了したと見なすことができる。場合によっては、第2の期間を定義する目的で、表面上のクラスター位置のビーズ上の第1のプライマー又は第1のプライマーのクラスターの少なくとも75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%又はそれ以上が伸長されるときに増幅反応が終了したと見なすことができる。

10

【0287】

第1の期間は、第2の期間よりも任意の適切な係数だけ大きくすることができる。幾つかの実施形態において、第1の期間は、第2の期間よりも約5、約10、約20、約50、又は約100倍長い。幾つかの実施形態において、第1の期間は、第2の期間よりも少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、少なくとも約20倍、少なくとも約50倍、又は少なくとも約100倍長い。

20

【0288】

担体を提供する方法

本明細書の他の箇所に記載されるように、伸長プライマー（例えば、第2のプライマー）を含む担体を生成及び/又は提供するための方法が本明細書で提供される。本明細書に記載の担体のいずれかは、その後、例えばePCR操作中に分割され得る。少なくとも1つの伸長プライマー分子（例えば、第2のプライマー）及び/又は少なくとも1つの鋳型核酸分子を含む担体は、一般に、本明細書では伸長担体と呼ばれ得る。例えば、図18Aを参照すると、伸長担体は表面1800を含み、この表面は、プライマーのクラスター又は複数のそのようなクラスターを含み、クラスターは、第1の数の第1のプライマー（例えば、1802）及び第2の数の第2のプライマー（例えば、1804）を含む。場合によっては、第2の数を第1の数よりも小さくすることができる。例えば、表面上の第1のプライマーの濃度に対する第2のプライマーの濃度の比率は、約 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 以下程度である。操作の一例では、本明細書中に記載されるように、核酸鋳型が、表面に付着された第2のプライマーに結合し（例えば、アニール）、核酸伸長反応に供されて伸長産物が作製され、この伸長産物又はその誘導体は、その後、表面に付着された第1のプライマーで増幅され得る。ある場合には、核酸鋳型は、第1のプライマーにアニーリングすることができない可能性がある。別の例において、伸長担体は表面を含み、表面はプライマーのクラスター又は複数のプライマーを含み、鋳型核酸分子はクラスターのプライマーに結合される。

30

40

【0289】

（1又は複数の）非伸長担体と（1又は複数の）伸長担体との混合物から伸長担体を単離するための方法が本明細書で提供される。場合によっては、担体は、個別に又は集合的に他の担体と共に、第1の位置から第2の位置に輸送することができる可動担体（例えば、ビーズ、粒子など）となり得る。担体は、本明細書の他の箇所に記載されている任意の担体であってもよい。単離された伸長担体の組成物、混合物、又は溶液は、本明細書の他の箇所に記載されているように、液滴へのその後の分割などの下流側の操作に特に有益となる場合があり、そのような液滴の占有は、一般に、単独で占有された液滴の有効濃度の生成を確保するために、非占有又は単独で占有された液滴の大部分の生成をもたらすポア

50

ソン分布に従う。好適には、伸長担体のみが分割される場合、担体によって占有される液滴の集団は、伸長担体よりも下流側の操作（例えば、ライブラリーのクローン増幅）のために、使用不可能ではないにしても非効率的である非伸長担体を含有する液滴によって希釈されない。伸長担体が、それに結合した鋳型核酸分子を含む場合、（担体占有率及び液滴中の鋳型占有率のそれぞれに関する）二重ポアソン分布は、（液滴中の単一の鋳型 - 担体アセンブリ占有率に関する）単一ポアソン分布に低減され得る。本明細書の他の箇所に記載されているように、伸長担体は、液滴の過装填（例えば、液滴で2つ以上）を有利に可能にし得る。ウェル又は他の容器などの液滴以外のパーティションを使用することができる。本明細書の他の箇所に記載されているように、伸長担体は、バルク溶液での使用にも有益であり得る。

10

【0290】

図21は、伸長担体2100を生成及び/又は提供するための例示的な方法を示し、伸長担体2100は、担体の表面（例えば、ビーズ）に付着された複数のプライマーを含む。複数のプライマーは、第1のプライマー2102のうちの1つ以上及び第2のプライマー2103のうちの1つ以上を含んでもよい。場合によっては、第1のプライマー2102の数と比較して相対的に少ない数の第2のプライマー2103を含むクラスターを含む伸長担体2100を生成することが特に重要であり得る。場合により、伸長担体は、それに付着した第2のプライマー2103の1つのコピーを有する。他の場合、伸長担体は、第2のプライマー2103の複数のコピー、例えば第2のプライマー2103の少数のコピー又は幾つかのコピー（図示せず）を有する。これに代えて又は加えて、第1のプライマー2102の数又は濃度は、担体の表面に付着した第2のプライマー2103の数又は濃度より高くてもよい。一例では、本明細書中に記載されるように、伸長担体がサンプル調製のために（例えば、核酸鋳型の増幅のために）使用されるとき、核酸鋳型は、その後第1のプライマーで増幅され得る伸長産物を作製するために、稀に、したがって律速操作において、第2のプライマーで伸長されてもよく、その増幅は、担体上に提供された第2のプライマーよりも第1のプライマーのコピーが多いため、最初の伸長産物生成反応よりも有意に速い速度で起こり得る。ある場合には、増幅反応は、別の核酸鋳型が反応混合物中の別の第2のプライマー（もしあれば）で伸長され得る前に、伸長担体上の第1のプライマーのコピーを排出し（例えば、それに結合することによって）、それにより、担体上の（又は担体上のクラスター内の）モノクローナル集団を促進し得る

20

30

出発担体2101（又は非伸長担体）は、第1のプライマー2102を含み得る出発担体は、複数の第1のプライマー、例えば第1のプライマーのクラスターを含み得る第1のプライマーは、例えば相補的配列のハイブリダイゼーションを介して伸長プライマー2104に付着され、続いて伸長されて、担体に固定化された伸長プライマーである第2のプライマー2103を生成することができる。付着反応（例えば、ハイブリダイゼーション）は、溶液中で、例えば複数の非伸長担体を含むバルク溶液中で、及び/又は非伸長担体を含むパーティションを含むエマルジョン中で行なわれ得る。付着プロセス（ハイブリダイゼーションなど）は、単一サイクル伸長プロセスを含み得る。第2のプライマーが生成された後、洗浄及び/又は溶融操作を行なって伸長プライマーを解離させて伸長担体2100を生成することができる。

40

【0291】

場合によっては、反応混合物中の非伸長担体（例えば、2101）及び伸長プライマー（例えば、2104）のそれぞれの濃度を調節して、最小数（例えば、1つ、少数、幾つかなど）の第2のプライマーを含む伸長担体の生成を促進することができる。例えば、伸長担体は、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.99%、99.999%、99.9999%又はそれを超える（第1のプライマー及び第2のプライマー集団の合計の中からの）第1のプライマーを含み得る。

【0292】

50

例えば、反応混合物は、存在する第1のプライマーの数又は濃度に対して少ない数又は少ない濃度の伸長プライマーを含有し得る（例えば、非伸長担体への付着を介して）。ある場合には、溶液中の非伸長担体の濃度に対する伸長プライマーの濃度の比率は、最大で約1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:30、1:40、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000又はそれ以下である。これに代えて又は加えて、溶液中の非伸長担体の濃度に対する伸長プライマーの濃度の比率は、少なくとも約1:50、1:40、1:30、1:20、1:29、1:18、1:17、1:16、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10又はそれを超える。ある場合には、溶液中の非伸長担体の濃度に対する伸長プライマーの濃度のパーセンテージは、最大で約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%以下である。これに代えて又は加えて、非伸長担体の濃度に対する伸長プライマーの濃度のパーセンテージは、少なくとも約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%又はそれを超える。結果として生じる混合物は、（1又は複数の）伸長担体と伸長されないままの（1又は複数の）非伸長担体との混合物を含み得る。

【0293】

本明細書では、（1又は複数の）非伸長担体と（1又は複数の）伸長担体との混合物から伸長担体を単離する方法が提供される。

【0294】

図22Aは、伸長担体を単離するための方法の一例を示す図である。出発担体2201（又は非伸長担体）は、第1のプライマー2202を含み得る。出発担体は、複数の第1のプライマー、例えば第1のプライマーのクラスターを含み得る出発担体は、伸長基2204と接触させることができる。第1のプライマーは、伸長基に付着され得る。伸長基は、キャプチャエンティティ2205を含むプライマー分子を含み得る。幾つかの例では、キャプチャエンティティがビオチン（B）を含むことができ、それによりプライマー分子がビオチン化される。幾つかの例では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列（例えば、核酸配列）を含み得る。幾つかの例において、プライマー分子の配列は、キャプチャ配列として機能し得る。他の例において、キャプチャエンティティは、キャプチャ配列を含む別の核酸分子を含み得る。幾つかの例において、キャプチャエンティティは、磁場の印加によって捕捉することができる磁性粒子を含み得る。幾つかの例において、キャプチャエンティティは、電場の印加によって捕捉することができる荷電粒子を含み得る。幾つかの例において、キャプチャエンティティは、キャプチャリングエンティティにより捕捉するように構成される又はキャプチャリングエンティティによって捕捉可能な1つ以上の他の機構を含み得る。

【0295】

第1のプライマー2202は、例えば相補的な配列のハイブリダイゼーション（例えば、第1のプライマー2202の配列とプライマー分子の配列との間）を介して伸長基2204に付着し、続いて伸長して、担体に固定化された伸長プライマーである第2のプライマー2203を生成し得る。付着反応（例えば、ハイブリダイゼーション）は、溶液中で、例えば複数の非伸長担体を含むバルク溶液中で、及び/又は非伸長担体を含むパーティションを含むエマルジョン中で行なわれ得る。付着プロセス（ハイブリダイゼーションなど）は、単一サイクル伸長プロセスを含み得る。第2のプライマーが生成された後、伸長基2204は、第1のプライマー2202と会合して担体に固定されたままであってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 2 9 6 】

或いは、図 2 2 B を参照すると、出発担体 2 2 0 1 (又は非伸長担体) は、第 1 のプライマー 2 2 0 2 を含み得る。出発担体は、複数の第 1 のプライマー、例えば第 1 のプライマーのクラスターを含み得る出発担体は、伸長基 2 2 0 4 と接触させることができる。第 1 のプライマーは、伸長基に付着され得る。この例の伸長基はキャプチャエンティティ 2 2 0 5 を欠く。第 1 のプライマー 2 2 0 2 は、例えば相補的な配列のハイブリダイゼーション (例えば、第 1 のプライマー 2 2 0 2 の配列とプライマー分子の配列との間) を介して伸長基 2 2 0 4 に付着し、続いて伸長して、担体に固定化された伸長プライマーである第 2 のプライマー 2 2 0 3 を生成し得る。伸長反応のために、キャプチャエンティティ (例えば、ピオチンなどのキャプチャエンティティを含むヌクレオチド) を含む試薬を使用して、キャプチャエンティティ 2 2 0 5 を含む第 2 のプライマー 2 2 0 3 を得ることができる。幾つかの例では、ピオチン標識ヌクレオチドが伸長反応に使用されるように、キャプチャエンティティはピオチン (B) であってもよい。標識アデニン、標識チミン、標識グアニン、もしくは標識シトシン、又はそれらの類似体などの単一の標識塩基を使用することができる。標識されたヌクレオチドは、伸長基 2 2 0 4 の配列に基づいて選択され得る。一例では、単一の標識ヌクレオチドのみが付加される。これは、特定の塩基の一残基のみを含む伸長基 2 2 0 4 の配列を選択することによって達成することができる。或いは、伸長は 2 回の操作で行なうことができる。最初の操作では、最初のヌクレオチドのみが付加され、このヌクレオチドはキャプチャエンティティ 2 2 0 5 で標識化される。第 2 の伸長反応は、全ての塩基を用いて行なわれ、標識化された塩基は使用されない。これにより、1 つのキャプチャエンティティ 2 2 0 5 のみを含む第 2 のプライマー 2 2 0 3 が得られる。或いは、段階的な単一標識ヌクレオチド付加は、伸長の任意の他の位置 (例えば、第 2 の位置、第 3 の位置、第 4 の位置など) で行なうことができる。幾つかの例では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列 (例えば、核酸配列) を含み得る。ある場合には、第 2 のプライマー 2 2 0 3 がキャプチャ配列を含むように、伸長基 2 2 0 4 の相補体がキャプチャ配列である。

【 0 2 9 7 】

図 2 2 A を再び参照すると、付着された伸長基 2 2 0 4 を含む担体は、キャプチャリング基 2 2 2 0 と接触させられる或いはさもなければキャプチャリング基 2 2 2 0 による捕捉に供されてもよい。場合によっては、キャプチャリング基は、キャプチャエンティティ 2 2 0 5 を捕捉するように構成されたキャプチャリングエンティティ 2 2 0 7 を含むことができる。例えば、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティをターゲットとするように構成され得る。幾つかの例では、キャプチャ部分がピオチンを含む場合、キャプチャリングエンティティがストレプトアビジン (S A) を含み得る。幾つかの例では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列 (例えば、これは相補的なキャプチャ配列に対して相補的である) を含む場合、キャプチャリングエンティティは相補的なキャプチャ配列を含み得る。幾つかの例では、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティが磁性粒子を含む場合に磁場を印加するように構成された装置、システム、又はデバイスを含み得る。幾つかの例では、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティが荷電粒子を含むときに電場を印加するように構成された装置、システム、又はデバイスを含み得る。場合によっては、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティを捕捉するように構成された 1 つ以上の他の機構を含み得る。場合によっては、キャプチャリング基は、例えば、二次キャプチャリングエンティティ 2 2 0 6 による後続の捕捉のために、二次キャプチャエンティティ 2 2 0 8 を含むことができる。二次キャプチャエンティティ及び二次キャプチャリングエンティティは、本明細書の他の箇所に記載されている捕捉機構 (例えば、ピオチン及びストレプトアビジン、相補的なキャプチャ配列など) のいずれか 1 つ以上を含み得る。幾つかの例では、二次キャプチャエンティティは磁性粒子 (例えば、磁気ビーズ) を含むことができ、二次キャプチャリングエンティティは磁気系 (例えば、磁場を印加するように構成された磁石、装置、システム、又はデバイスなど) を含むことができる。幾つかの例では、二次キャプチャエンティティは

10

20

30

40

50

荷電粒子（例えば、電荷を運ぶ荷電ビーズ）を含むことができ、二次キャプチャリングエンティティは電気系（例えば、電場を印加するように構成された磁石、装置、システム、又はデバイスなど）を含むことができる。

【0298】

伸長基2204が付着されて成る担体をキャプチャリング基2220と接触させる或いはさもなければキャプチャリング基2220による捕捉に供されると、キャプチャリング基のキャプチャリングエンティティ2207は、担体に固定化されたキャプチャエンティティ2205と結合、連結、ハイブリダイズ、又はそうでなければ会合し得る。キャプチャエンティティとキャプチャリングエンティティとの間の会合は、非共有結合の形成を含み得る。会合は、共有結合の形成を含み得る。会合は、例えば刺激の適用時に、解放可能な結合の形成を含み得る。幾つかの例では、会合は結合を形成しなくてもよい。例えば、会合は、キャプチャリングエンティティとキャプチャエンティティとの間の物理的近接性を増加させる（又は物理的距離を減少させる）ことができる。場合によっては、単一のキャプチャエンティティは、単一のキャプチャリングエンティティと会合できてもよい。或いは、単一のキャプチャエンティティは、複数のキャプチャリングエンティティと会合できてもよい。それに代えて又は加えて、単一のキャプチャリングエンティティは、複数のキャプチャエンティティと会合できてもよい。キャプチャエンティティ/キャプチャリングエンティティの対は、任意の組み合わせであってもよい。この対には、ピオチン/ストレプトアビジン、アジド/シクロオクチン及びチオール/マレイミドが含まれ得るが、これらに限定されない。当業者であれば分かるように、対のいずれかの分子がキャプチャエンティティ又はキャプチャリングエンティティのいずれかとして使用されてもよく、キャプチャエンティティはヌクレオチドに連結することができる。ピオチン、アジド、シクロオクチン、テトラゾール及びチオールを含む化学的に修飾された塩基、及び多くの他のものがキャプチャエンティティとして適している。

【0299】

複数の非伸長担体及び複数の伸長基は、バルク溶液中で本明細書に記載の操作を受けることができる。場合によっては、反応混合物中の非伸長担体及び伸長基のそれぞれの濃度を調節して、最小数（例えば、1つ、少数、幾つかなど）の第2のプライマーを含む伸長担体の生成を促進することができる。例えば、反応混合物は、存在する第1のプライマーの数又は濃度（例えば、非伸長担体への付着を介して）と比較して、少ない数又は少ない濃度の伸長プライマー（例えばプライマー分子）を含有し得る。幾つかの例では、溶液中の非伸長担体の濃度に対する伸長基の濃度の比率は、最大で約1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:30、1:40、1:50、1:100、1:500、1:1000、1:5000、1:10000以下である。これに代えて又は加えて、溶液中の非伸長担体の濃度に対する伸長基の濃度の比率は、少なくとも約1:50、1:40、1:30、1:20、1:29、1:18、1:17、1:16、1:14、1:13、1:12、1:11、1:10又はそれを超える。ある場合には、溶液中の非伸長担体の濃度に対する伸長基の濃度の百分率は、最大で約50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%以下である。これに代えて又は加えて、非伸長担体の濃度に対する伸長基の濃度の百分率は、少なくとも約0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%又はそれを超える。結果として生じる混合物は、（1又は複数の）伸長担体と伸長されないままの（1又は複数の）非伸長担体との混合物を含み得る。

【0300】

ある場合には、キャプチャリング基は、それに付着した伸長基をターゲットとすること

によって、（１又は複数の）伸長担体（それぞれが伸長担体に付着された伸長基を含む）及び（１又は複数の）非伸長担体（伸長基に付着されない）の混合物から伸長担体を単離し得る。幾つかの例において、キャプチャリング基は、それに付着されたそれぞれの伸長基をターゲットとすることによって、（１又は複数の）伸長担体（それぞれが伸長担体に付着された伸長基を含む）と（１又は複数の）非伸長担体（伸長基に付着されない）との混合物から複数の伸長担体を単離することができる。幾つかの例では、複数のキャプチャリング基を使用して、（１又は複数の）伸長担体（それぞれが伸長担体に付着された伸長基を含む）及び（１又は複数の）非伸長担体（伸長基に付着されない）の混合物から、それに付着した伸長基をターゲットとすることによって伸長担体を単離することができる。

【０３０１】

一旦単離されると、洗浄及び／又は溶融操作を実行して、伸長担体２２００を提供するために担体から伸長基を解離することができる。

【０３０２】

幾つかの例において、キャプチャリング基２２２０は、混合物から伸長担体を単離することなく、伸長担体と会合し得る。場合によっては、キャプチャリング基が二次キャプチャエンティティ２２０６を更に含む場合、担体は混合物中の二次キャプチャエンティティと会合されたままであってもよい。担体は、二次キャプチャリングエンティティ２２０８と接触されてもよく或いはさもなければ二次キャプチャリングエンティティ２２０８による捕捉に供されてもよい。二次キャプチャリングエンティティは、キャプチャリング基の二次キャプチャエンティティと結合、連結、ハイブリダイズし、或いはさもなければ会合し得る。二次キャプチャエンティティと二次キャプチャリングエンティティとの間の会合は、非共有結合の形成を含み得る。会合は、共有結合の形成を含み得る。会合は、例えば刺激の適用時に、解放可能な結合の形成を含み得る。幾つかの例では、会合は結合を形成しなくてもよい。例えば、会合は、二次キャプチャリングエンティティ及び二次キャプチャエンティティの物理的近接性（例えば、物理的距離を減少させる）を増加させることができる。場合によっては、単一の二次キャプチャエンティティは、単一の二次キャプチャリングエンティティと会合できてもよい。或いは、単一の二次キャプチャエンティティは、複数の二次キャプチャリングエンティティと会合できてもよい。これに代えて又は加えて、単一の二次キャプチャリングエンティティは、複数の二次キャプチャエンティティと会合できてもよい。ある場合には、二次キャプチャリング基は、それに付着したキャプチャ基をターゲットとすることによって、（１又は複数の）伸長担体（それぞれが伸長担体に付着されたキャプチャ基を含む）と（１又は複数の）非伸長担体（キャプチャ基に付着されない）との混合物から伸長担体を単離し得る。ある場合には、二次キャプチャリング基は、それに付着したそれぞれのキャプチャ基をターゲットとすることによって、（１又は複数の）伸長担体（それぞれが伸長担体に付着されたキャプチャ基を含む）と（１又は複数の）非伸長担体（キャプチャ基に付着されない）との混合物から複数の伸長担体を単離し得る。ある場合には、複数の二次キャプチャリング基を使用して、それに付着したキャプチャ基をターゲットとすることによって、（１又は複数の）伸長担体（それぞれが伸長担体に付着されたキャプチャ基を含む）と（１又は複数の）非伸長担体（キャプチャ基に付着されない）との混合物から伸長担体を単離することができる。

【０３０３】

一旦単離されると、洗浄及び／又は溶融操作が実行されて、伸長担体２２００を提供するために、担体から伸長基及びキャプチャ基（場合によっては二次キャプチャリングエンティティも）を解離することができる。

【０３０４】

場合によっては、二次キャプチャリングエンティティ２２０８は、混合物から伸長担体を単離することなく、伸長担体と会合されてもよい。場合によっては、二次キャプチャリングエンティティは、第３のキャプチャリングエンティティ（図示せず）によってその後捕捉するように構成された第３のキャプチャエンティティを含み得る。任意の程度のキャプチャリングエンティティは、混合物からの単離及び／又は次の程度のキャプチャリン

10

20

30

40

50

グエンティティによる会合のために、次の程度のキャプチャリングエンティティによって捕捉され得る別のキャプチャ基を含み得ることが理解される。単離されると、洗浄及び／又は溶融操作を実行して、伸長担体 2 2 0 0 を提供するために、伸長基（並びに任意の数のキャプチャエンティティ及び／又はキャプチャリングエンティティ）を担体から解離することができる。

【 0 3 0 5 】

操作の一例では、それぞれが複数の第 1 のプライマーを含む複数の担体を、それぞれがビオチン化プライマー分子を含む複数の伸長基と接触させる。幾つかの例において、プライマー分子は、第 1 のプライマーに付着し、核酸伸長を受けて、担体に固定化された第 2 のプライマーを生成する。担体は、ビオチン化プライマー分子と会合したままであり、磁気ビーズに結合したストレプトアビジンを含むキャプチャ基と接触させる。ストレプトアビジンがビオチンに結合することにより、磁性ビーズと担体とが会合する。幾つかの例では、担体は伸長基と接触せず、磁気ビーズと会合されない。例えば、混合物は、（ 1 又は複数の）磁気ビーズと会合した（ 1 又は複数の）伸長担体と、磁気ビーズと会合していない（ 1 又は複数の）非伸長担体とを含み得る。磁石を使用するか又は他の磁場を印加して、（ 1 又は複数の）磁気ビーズをターゲットとし、（ 1 又は複数の）磁気ビーズと会合される（ 1 又は複数の）伸長担体を混合物から単離する。結果として生じる単離された組成物は、（ 1 又は複数の）伸長担体のみ又は（ 1 又は複数の）伸長担体の大部分を含む。単離された組成物中に幾らかの汚染が存在し得ることが理解される。洗浄操作は、（ 1 又は複数の）伸長担体から（ 1 又は複数の）伸長基及び／又は（ 1 又は複数の）キャプチャ基を解離するために行なわれる。

【 0 3 0 6 】

図 2 3 は、伸長担体を単離するための別の例示的な方法を示す。図 2 1 に関して説明した方法などに従って、第 2 のプライマー 2 3 0 2 を含む伸長担体 2 3 0 0 を提供することができる。キャプチャエンティティ 2 3 0 5（例えば、磁気ビーズ）及びそれに付着した核酸配列 2 3 0 3 を含むキャプチャ基が提供され得る。キャプチャエンティティに付着した核酸配列は、伸長担体に付着した第 2 のプライマーの配列との配列相同性を含み得る。キャプチャ基は、核酸配列と第 2 のプライマーの配列とのハイブリダイゼーションなどを介して伸長担体と会合し、それによってキャプチャエンティティを伸長担体と会合することができる。キャプチャ基会合担体は、キャプチャリングエンティティ 2 3 0 6（例えば、磁石）と接触させられ得る或いはさもなければキャプチャリングエンティティ 2 3 0 6 による捕捉に供され得る。キャプチャ基及び／又はキャプチャエンティティは、会合後に伸長担体から解離できてよい。場合によっては、キャプチャ基を再利用することができる。場合によっては、キャプチャエンティティを再利用することができる。ある場合には、核酸配列 2 3 0 3 を含む核酸分子を再使用することができる。異なる試薬を再使用することは、伸長担体を単離するための費用効果の高い手法であってもよい。キャプチャエンティティ及びキャプチャリングエンティティは、本明細書の他の箇所に記載される捕捉機構（例えば、ビオチン及びストレプトアビジン、相補的なキャプチャ配列、磁性粒子及び磁場、荷電粒子及び電場など）のいずれか 1 つ以上を含み得る。例えば、キャプチャエンティティは、磁気特性を有する粒子を含んでもよく、キャプチャリングエンティティは、磁場を印加するように構成され得る。例えば、キャプチャエンティティは、電荷を運ぶ荷電粒子を含んでもよく、キャプチャリングエンティティは、電場を印加するように構成され得る。例えば、キャプチャエンティティは核酸キャプチャ配列を含んでもよく、キャプチャリングエンティティは相補的な核酸キャプチャ配列を含み得る。当業者であれば分かるように、核酸配列 2 3 0 3 は、キャプチャエンティティ 2 3 0 5 を第 2 のプライマー 2 3 0 2 に直接付着させるために使用され得る。図 2 2 B に記載されたように、伸長反応を使用して、キャプチャ配列又はキャプチャエンティティ 2 3 0 5 を含む修飾ヌクレオチドを担体上のプライマーに直接付加することができる。図 2 2 B では、プライマーは第 1 のプライマーであったが、プライマーは第 2 のプライマー 2 3 0 2 であってもよいことが理解される。

10

20

30

40

50

【0307】

他の方法を使用して、伸長担体を混合溶液から分離することができる。そのような分離方法は、伸長担体に結合することができる1つ以上の他の配列又は部分（例えば、2300）を使用し、それにより、伸長担体を担体集団の残りの残りの試薬、材料及び／又は部分と比較して、伸長担体に対してより高い又は有意に高い結合親和性を含み得る。したがって、そのような配列又は部分（本明細書では分離部分と呼ばれる）は、伸長担体に結合し、伸長担体と会合し、及び／又は伸長担体を捕捉することができる。伸長担体を溶液の残りの部分から分離することは、伸長担体のより精製された組成物を提供することに寄与することができ、これは、幾つかの例では、本明細書の他の箇所に記載される方法及びシステムなどの実験、アッセイ又は手順における試薬として使用され得る。

10

【0308】

伸長担体は、試薬として生成、分離、製造、及び／又は調製することができる。伸長担体は、実験キット又は試験などのキットに含まれてもよい。伸長担体は、実験又は他の手順で使用されてもよい。例えば、キットは、少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%又はそれを超える純度（伸長担体と非伸長担体とを合わせた濃度までの伸長担体の濃度）を有する伸長担体試薬溶液を含む組成物を含み得る。

【0309】

20

本開示は、実験において伸長担体を使用する方法を提供する。例えば、伸長担体には、実験において分析される核酸配列のライブラリー（例えば、配列決定実験、例えば次世代配列決定、又は任意の他のタイプの配列決定）などの配列のライブラリーが提供され得る。配列のライブラリーは、それに付着した1つ以上のアダプター配列を含み得る核酸配列を含み得る。配列のライブラリーは、鋳型核酸配列を含み得る。鋳型核酸配列は、それに付着した1つ以上のアダプター配列を含み得る。例えば、鋳型核酸配列は、第1の末端に隣接するアダプター配列を含み得る。別の例では、鋳型核酸配列は、2つの末端に隣接する同じ又は異なるアダプター配列を含み得る。或いは、鋳型分子はアダプター配列を含まなくてもよい。

【0310】

30

幾つかの例において、伸長担体は、核酸配列のライブラリーと混合されてもよく、混合物は、鋳型核酸配列（又はその相補体）を担体に固定化することができる核酸伸長反応を開始するのに十分な条件に供され得る。幾つかの例において、そのような反応は、本明細書の他の箇所に記載されるように、パーティション（例えば、エマルジョン中の液滴）において行なわれてもよく、パーティションは、1つ以上の伸長担体及び1つ以上の鋳型核酸配列を含む。他の例では、そのような反応はバルク溶液中で行なわれ得る。幾つかの例において、固定化（例えば、ハイブリダイゼーション）は、溶液（例えば、オフチップ）中で行なわれてもよく、溶液中での固定化の後、固定化されたアセンブリ（伸長担体と鋳型分子との組み合わせ）は、その後の操作のためにパーティション（本明細書中に記載されるパーティションなど）に封入され得る。幾つかの例では、パーティションは液滴である。幾つかの例では、パーティションはウェルである。

40

【0311】

予濃縮

本明細書では、本明細書で一般にアセンブリと呼ばれる事前に組み立てられた担体を生成する方法であって、アセンブリが単一の担体に固定化された単一の鋳型核酸分子を含む、方法が提供される。その後の操作では、そのようなアセンブリは、本明細書に記載されるように、増幅試薬（例えば、溶液プライマー）と共に分割されて、エマルジョンの個々の反応チャンバ内の鋳型核酸分子の増幅反応を促進し得る。有益には、単一のアセンブリを含むパーティションは、増幅産物のモノクローナル集団をパーティション内の同じ担体に固定化することができる。パーティション内のそのようなアセンブリの区分化又はカプ

50

セル化は、例えば、単一のアセンブリを含むパーティション、アセンブリを含まないパーティション、及び／又は複数のアセンブリ（例えば、異なる鋳型配列を有する）を含むパーティションに加えて、ポアソン分布に従うことができる。分割前に予め組み立てられた担体を提供することにより、有益には、エマルジョンの分割間の分布に関する二重ポアソン問題を単一ポアソン分布問題に低減することができる。複数の担体及び複数の鋳型（担体に固定されていない）が、それぞれがそれ自体のポアソン分布モデルに従って区分化される場合、１次ポアソン分布モデルと比較して、単一の担体及び単一の鋳型を有する区分が著しく少なく生成される。これは、本明細書に記載の方法と比較した場合、貴重なリソースの非効率的な使用及び貴重な鋳型の損失をもたらす。

【 0 3 1 2 】

幾つかの例において、方法は、それぞれが異なる核酸配列を有する複数の伸長担体及び複数の鋳型核酸分子（例えば、ライブラリーにおいて）を含む混合物を提供することを含み得る。複数の伸長担体は、本明細書の他の箇所に記載されているように、（伸長担体と非伸長担体との混合物からの）伸長担体の精製された組成物を含み得る。鋳型核酸分子のそれぞれは、第２のプライマーとアニーリングするように及び／又はアニーリングすることができるように構成され得る。複数の伸長担体のうちの１つの伸長担体は、複数の第１のプライマーと、鋳型核酸分子へのアニーリングに利用可能な複数の第１のプライマーの数と比較して、単一のコピー、少数コピー、幾つかのコピー、及び／又は有意に少ない数の第２のプライマーとを含み得る。混合物は、複数の鋳型核酸分子を、複数の伸長担体にわたって分布した複数の第２のプライマーにアニール又は会合させるのに十分な条件に供され得る。混合物は、担体に結合していない鋳型核酸分子を洗浄するのに十分な条件に供され得る。場合によっては、これは、洗浄中に担体が安定化されたままであるように、担体を固定化プラットフォーム（例えば、担体に対する何らかの親和性（例えば、磁性、電気、疎水性、親水性など）などを介して、担体を固定化するように構成された別の表面又は構造）に固定化することによって達成され得る。各伸長担体は、複数の第１のプライマーの数と比較して、ただ１つのコピー、少数のコピー、幾つかのコピー、及び／又は有意に少ない数の第２のプライマーを有するため、得られた反応産物は、複数のアセンブリを含むことができ、アセンブリの大部分又は実質的に全ては、それぞれ、担体に固定化された単一の鋳型核酸分子を含む。そのようなアセンブリは、個々の反応チャンバ内の鋳型核酸分子の増幅反応を促進するために、本明細書の他の箇所に記載されるように、例えば増幅試薬（例えば、溶液プライマーを含む）と共に分割され得る。有益には、単一のアセンブリを含むパーティションは、増幅産物のモノクローナル集団をパーティション内の同じ担体に固定化することができる。

【 0 3 1 3 】

幾つかの例において、伸長担体と鋳型核酸分子との混合プロセスの間、伸長担体の濃度は、適切な場合、鋳型核酸分子の濃度よりも低くてもよい（例えば、利用可能なサンプルが豊富にある場合）。例えば、（１又は複数の）サンプルは過剰に提供されてもよい。サンプルを過剰に提供すると、混合及びハイブリダイゼーションから生じるブランク伸長担体（鋳型を欠く）の数が減少し得る。

【 0 3 1 4 】

幾つかの方法を使用して、技術者は、サンプルを担体と混合してアセンブリの有用な集合体を生成する前などに、サンプルを調製するために非常に正確な測定を行わなければならない場合がある。本開示において提供される伸長担体は、反応混合物中のライブラリーの濃度の正確な測定を必要としないプロセスと有利に適合し得る。幾つかの例では、ライブラリーの濃度が高精度で測定されない場合でも、単にサンプルを過剰に提供することが、ハイブリダイゼーションプロセスの成功に（例えば、伸長担体に）寄与し得る。例えば、場合によっては、サンプルを過剰に提供することにより、ハイブリダイゼーション反応のためのインキュベーション時間の短縮が可能になり得る。サンプル（ライブラリー）を過剰に提供することは、ハイブリダイゼーションの速度及び収率を増加させ得る。或いは、場合によっては、サンプルは過剰に提供されなくてもよい（例えば、サンプルが貴重

10

20

30

40

50

である場合)。

【0315】

幾つかの例において、図24Aを参照すると、方法は、それぞれが異なる核酸配列を有する複数の担体(例えば、担体2401、非伸長担体)及び複数の鋳型核酸分子(例えば、鋳型核酸分子2402)を含む混合物を提供することを含み得る。鋳型核酸分子は、担体に付着したプライマーとアニーリングするように及び/又はアニーリングすることができるように構成され得る。鋳型核酸分子は、キャプチャリング基2408のキャプチャリングエンティティによってその後に捕捉するように構成されたキャプチャエンティティ2406を含み得る。担体は、鋳型核酸分子へのアニーリングに利用可能な複数のプライマーを含み得る。

10

【0316】

或いは、図24Bは、鋳型核酸分子がキャプチャエンティティ2406を欠き、キャプチャエンティティ2406が伸長産物に付加される方法の一例を示す。図24Aに関して説明したように、複数の担体(例えば、担体2401、非伸長担体)と、それぞれ異なる核酸配列を有する複数の鋳型核酸分子(例えば、鋳型核酸分子2402)を含む混合物が提供される。キャプチャエンティティを欠く鋳型核酸分子は、担体に付着したプライマーとアニーリングするように及び/又はアニーリングすることができるように構成され得る。図22Bの説明と同様に、プライマーは、例えば相補的配列のハイブリダイゼーション(例えば、第1のプライマーの配列とアダプター1の配列との間)を介して鋳型核酸分子に付着し、続いて伸長して、担体に固定化される伸長産物を生成し得る。伸長反応のために、キャプチャエンティティ(例えば、キャプチャエンティティを含むヌクレオチド)を含む試薬を使用して、キャプチャエンティティ2406を含む伸長産物を得てもよい。幾つかの例では、ビオチン標識ヌクレオチドが伸長反応に使用されるように、キャプチャエンティティはビオチン(B)であってもよい。標識アデニン、標識チミン、標識グアニン、もしくは標識シトシン、又はそれらの類似体などの単一の標識塩基を使用することができる。標識されたヌクレオチドは、鋳型2402のアダプター1の配列に基づいて選択され得る。一例では、単一の標識ヌクレオチドのみが付加される。これは、2回の操作で伸長を行なうことで実現できる。最初の操作では、最初のヌクレオチドのみが付加され、このヌクレオチドはキャプチャエンティティ2406で標識化される。これは、第1のプライマーの配列に相補的ではないアダプター1の配列に存在する第1の塩基であり得る。第2の伸長反応は、全ての塩基を用いて行なわれ、標識化された塩基は使用されない。これにより、ただ1つのキャプチャエンティティ2406を含む担体に固定化された伸長産物が得られる。或いは、段階的な単一標識ヌクレオチド付加は、伸長の任意の他の位置(例えば、第2の位置、第3の位置、第4の位置など)で行なうことができる。

20

30

【0317】

ある場合には、反応混合物中の担体及び鋳型核酸分子のそれぞれの濃度を調節して、単一の担体及び担体に固定化された単一の鋳型核酸分子(又はその相補体)を含むアセンブリの大部分の生成を促進することができる。例えば、結果として生じる担体は、鋳型核酸分子と会合していない(全プライマー集団のうちの)プライマーの少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.99%、99.999%又はそれ以上を含み得る。

40

【0318】

例えば、反応混合物は、存在する担体の数又は濃度に対してより少ない数又はより低い濃度の鋳型核酸分子を含有し得る。幾つかの例において、溶液中の担体の濃度に対する鋳型核酸分子の濃度の比率は、最大で約1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:30、1:40、1:50又はそれ未満である。これに代えて又は加えて、溶液中の担体の濃度に対する鋳型核酸分子の

50

濃度の比率は、少なくとも約 1 : 50、1 : 40、1 : 30、1 : 20、1 : 29、1 : 18、1 : 17、1 : 16、1 : 14、1 : 13、1 : 12、1 : 11、1 : 10 又はそれを超える。ある場合には、溶液中の担体の濃度に対する鋳型核酸分子の濃度のパーセンテージは、最大で約 50 %、45 %、40 %、35 %、30 %、25 %、20 %、19 %、18 %、17 %、16 %、15 %、14 %、13 %、12 %、11 %、10 %、9 %、8 %、7 %、6 %、5 %、4 %、3 %、2 %、1 %、0.9 %、0.8 %、0.7 %、0.6 %、0.5 %、0.4 %、0.3 %、0.2 %、0.1 % 以下である。これに代えて又は加えて、溶液中の担体の濃度に対する鋳型核酸分子の濃度のパーセンテージは、少なくとも約 0.1 %、0.2 %、0.3 %、0.4 %、0.5 %、0.6 %、0.7 %、0.8 %、0.9 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 % 又はそれを超える。

【0319】

図 24A に戻って参照すると、混合物は、複数の担体にわたって分布した複数のプライマーに複数の鋳型核酸分子をアニールさせる (2403) のに十分な条件に供され、それぞれの担体に固定化されたそれぞれの鋳型核酸分子の相補体を生成させるために伸長 (2404) に供され得る。担体は、それぞれの鋳型核酸分子 (例えば、2402) のそれぞれのキャプチャエンティティ (例えば、2406) と会合したままであってもよい。結果として生じる混合物は、それに会合した 1 つ以上の鋳型核酸分子 (及びキャプチャエンティティ) を含む担体と、それに会合したいかなる鋳型核酸分子 (及びキャプチャエンティティ) も含まない担体との混合物を含み得る。

【0320】

幾つかの例では、キャプチャエンティティ 2406 はビオチン (B) を含み得る。幾つかの例では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列 (例えば、核酸配列) を含み得る。幾つかの例において、鋳型核酸分子の配列は、キャプチャ配列として機能し得る。他の例において、キャプチャエンティティは、キャプチャ配列を含む別の核酸分子を含み得る。幾つかの例において、キャプチャエンティティは、磁場の印加によって捕捉することができる磁性粒子を含み得る。幾つかの例において、キャプチャエンティティは、電場の印加によって捕捉することができる荷電粒子を含み得る。場合によっては、キャプチャエンティティは、本明細書の他の箇所に記載されているように、キャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成された又はキャプチャリングエンティティにより捕捉できる 1 つ以上の他の機構を含み得る。

【0321】

鋳型核酸分子 2402 が会合されて成る担体 2401 は、キャプチャリング基 2408 と接触させられてもよく或いはさもなければキャプチャリング基 2408 による捕捉に供されてもよい。キャプチャリング基は、キャプチャエンティティ 2406 を捕捉するように構成されたキャプチャリングエンティティを含むことができる。例えば、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティをターゲットとするように構成され得る。幾つかの例では、キャプチャ部分がビオチンを含む場合、キャプチャリングエンティティがストレプトアビジン (SA) を含み得る。幾つかの例では、キャプチャエンティティがキャプチャ配列 (例えば、これは相補的なキャプチャ配列に対して相補的である) を含む場合、キャプチャリングエンティティは相補的なキャプチャ配列を含み得る。幾つかの例では、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティが磁性粒子を含む場合に磁場を印加するように構成された装置、システム、又はデバイスを含み得る。幾つかの例では、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティが荷電粒子を含むときに電場を印加するように構成された装置、システム、又はデバイスを含み得る。場合によっては、キャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティを捕捉するように構成された 1 つ以上の他の機構を含み得る。場合によっては、キャプチャリング基は、例えば、二次キャプチャリングエンティティ 2407 による後続の捕捉のための二次キャプチャエンティティを含むことができる。二次キャプチャエンティティ及び二次キャプチャ

リングエンティティは、本明細書の他の箇所に記載されている捕捉機構（例えば、ピオチン及びストレプトアビジン、相補的なキャプチャ配列など）のいずれか1つ以上を含み得る。幾つかの例では、二次キャプチャエンティティは磁性粒子（例えば、磁気ビーズ）を含むことができ、二次キャプチャリングエンティティは磁気系（例えば、磁場を印加するように構成された磁石、装置、システム、又はデバイスなど）を含むことができる。幾つかの例では、二次キャプチャエンティティは荷電粒子（例えば、電荷を運ぶ荷電ビーズ）を含むことができ、二次キャプチャリングエンティティは電気系（例えば、電場を印加するように構成された磁石、装置、システム、又はデバイスなど）を含むことができる。

【0322】

キャプチャエンティティ2406が会合されて成る担体がキャプチャリング基2408と接触させられてもよい或いはそうでなければキャプチャリング基2408による捕捉に供されてもよい場合、キャプチャリング基のキャプチャリングエンティティは、キャプチャエンティティと結合するか、連結するか、ハイブリダイズするか、そうでなければ会合し得る。キャプチャエンティティとキャプチャリングエンティティとの間の会合は、非共有結合の形成を含み得る。会合は、共有結合の形成を含み得る。会合は、例えば刺激の適用時に、解放可能な結合の形成を含み得る。幾つかの例では、会合は結合を形成しなくてもよい。例えば、会合は、キャプチャリングエンティティとキャプチャエンティティとの間の物理的近接性を増加させる（又は物理的距離を減少させる）ことができる。場合によっては、単一のキャプチャエンティティは、単一のキャプチャリングエンティティと会合できてもよい。或いは、単一のキャプチャエンティティは、複数のキャプチャリングエンティティと会合できてもよい。それに代えて又は加えて、単一のキャプチャリングエンティティは、複数のキャプチャエンティティと会合できてもよい。

【0323】

幾つかの例において、キャプチャリング基2408は、鋳型核酸分子2402（及びキャプチャエンティティ2406）を含む担体2401を、キャプチャエンティティをターゲットとすることによって混合物から単離することができる。幾つかの例において、キャプチャリング基は、それぞれが混合物から1つ以上の鋳型核酸分子を含む複数の担体を単離し得る。ある場合には、複数のキャプチャリング基を使用して、混合物から鋳型核酸分子を含む担体を単離することができる。単離されると、洗浄及び/又は融解操作（2405）を行なって、鋳型核酸分子を担体から解離させてアセンブリ2400を提供することができる。

【0324】

ある場合には、キャプチャリング基2408は、混合物から担体を単離することなく担体と会合することができる。場合によっては、キャプチャリング基が二次キャプチャエンティティを更に含む場合、担体は混合物中の二次キャプチャエンティティと会合されたままであってもよい。担体は、二次キャプチャリングエンティティ2407と接触させられてもよく或いはさもなければ二次キャプチャリングエンティティ2407による捕捉に供されてもよい。二次キャプチャリングエンティティは、キャプチャリング基の二次キャプチャエンティティと結合、連結、ハイブリダイズし、或いはさもなければ会合し得る。二次キャプチャエンティティと二次キャプチャリングエンティティとの間の会合は、非共有結合の形成を含み得る。会合は、共有結合の形成を含み得る。会合は、例えば刺激の適用時に、解放可能な結合の形成を含み得る。幾つかの例では、会合は結合を形成しなくてもよい。例えば、会合は、二次キャプチャリングエンティティ及び二次キャプチャエンティティの物理的近接性（例えば、物理的距離を減少させる）を増加させることができる。場合によっては、単一の二次キャプチャエンティティは、単一の二次キャプチャリングエンティティと会合できてもよい。或いは、単一の二次キャプチャエンティティは、複数の二次キャプチャリングエンティティと会合できてもよい。これに代えて又は加えて、単一の二次キャプチャリングエンティティは、複数の二次キャプチャエンティティと会合できてもよい。幾つかの例において、二次キャプチャリング基は、鋳型核酸分子を含む担体を混合物から単離し得る。場合によっては、二次キャプチャリング基は、混合物から複数の担体

を単離し得る。場合によっては、複数の二次キャプチャリング基を使用して、混合物から担体を単離することができる。

【 0 3 2 5 】

単離されると、洗浄及び / 又は融解操作を行なって、鋳型核酸分子 2 4 0 2 及びキャプチャ基 2 4 0 8 (場合によっては二次キャプチャリングエンティティ 2 4 0 7 も) を担体から解離させ、アセンブリ 2 4 0 0 を提供することができる。

【 0 3 2 6 】

場合によっては、二次キャプチャリングエンティティ 2 4 0 7 は、混合物から担体を単離することなく担体と会合されてもよい。場合によっては、二次キャプチャリングエンティティは、第 3 のキャプチャリングエンティティ (図示せず) によりその後捕捉するように構成された第 3 のキャプチャエンティティを含み得る。任意の程度のキャプチャリングエンティティは、混合物からの単離及び / 又は次の程度のキャプチャリングエンティティによる会合のために、次の程度のキャプチャリングエンティティによって捕捉され得る別のキャプチャ基を含み得ることが理解される。単離されると、洗浄及び / 又は融解操作を行なって、鋳型核酸分子 (並びに任意の数のキャプチャエンティティ及び / 又はキャプチャリングエンティティ) を担体から解離させ、アセンブリ 2 4 0 0 を提供することができる。

10

【 0 3 2 7 】

そのようなアセンブリは、個々の反応チャンバ内の鋳型核酸分子の増幅反応を促進するために、本明細書の他の箇所に記載されるように、例えば増幅試薬 (例えば、溶液プライマーを含む) と共に分割され得る。有益には、単一のアセンブリを含むパーティションは、増幅産物のモノクローナル集団をパーティション内の同じ担体に固定化することができる。

20

【 0 3 2 8 】

(鋳型核酸分子又はその相補体を用いた) 担体の予濃縮のための方法は、溶液中で実施され得る。幾つかの例では、予濃縮方法は、エマルジョン又はパーティションを含まない溶液中で実施され得る。他の例では、予濃縮方法はパーティションで実行されてもよい。手順は統合されてもよい。或いは、プロセスは統合されなくてもよい。

【 0 3 2 9 】

コンピュータ制御システム

30

本開示は、本開示の方法を実施するようにプログラムされるコンピュータシステムを提供する。図 6 は、核酸配列及び配列分析を実行するなど、本開示の方法及びシステムを実施するようにプログラム又は他の方法で構成されたコンピュータシステム 6 0 1 を示す。

【 0 3 3 0 】

コンピュータシステム 6 0 1 は、シングルコア又はマルチコアプロセッサ、或いは、並列処理のための複数のプロセッサとなり得る中央処理ユニット (C P U 、本明細書では「プロセッサ」及び「コンピュータプロセッサ」でもある) 6 0 5 を含む。また、コンピュータシステム 6 0 1 は、メモリ又は記憶場所 6 1 0 (例えば、ランダムアクセスメモリ、リードオンリーメモリ、フラッシュメモリ) 、電子ストレージユニット 6 1 5 (例えば、ハードディスク) 、 1 つ以上の他のシステムと通信するための通信インタフェース 6 2 0 (例えば、ネットワークアダプター) 、及び、キャッシュ、他のメモリ、データストレージ、及び / 又は、電子ディスプレイアダプターなどの周辺装置 6 2 5 も含む。メモリ 6 1 0 、ストレージユニット 6 1 5 、インタフェース 6 2 0 、及び、周辺装置 6 2 5 は、マザーボードなどの通信バス (実線) を介して C P U 6 0 5 と通信している。ストレージユニット 6 1 5 は、データを記憶するためのデータストレージユニット (又はデータリポジトリ) となり得る。コンピュータシステム 6 0 1 は、通信インタフェース 6 2 0 の助けを借りて、コンピュータネットワーク (「ネットワーク」) 6 3 0 に動作可能に結合することができる。ネットワーク 6 3 0 は、インターネット、インターネット及び / 又はエクストラネット、或いは、インターネットと通信しているイントラネット及び / 又はエクストラネットとなり得る。ネットワーク 6 3 0 は、電気通信及び / 又はデータネットワークであ

40

50

ってもよい。ネットワーク 630 は、クラウドコンピューティングなどの分散コンピューティングを可能にし得る 1 つ以上のコンピュータサーバを含むことができる。ネットワーク 630 は、場合によっては、コンピュータシステム 601 の助けを借りて、ピアツーピアネットワークを実装することができ、これにより、コンピュータシステム 601 に結合された装置がクライアント又はサーバとして動作することが可能になる。

【0331】

CPU 605 は、プログラム又はソフトウェアで具体化することができる一連の機械可読命令を実行することができる。命令は、メモリ 610 などの記憶場所に記憶することができる。命令を CPU 605 に向けることができ、該命令は、その後、本開示の方法を実施するように CPU 605 をプログラムする或いはさもなければ構成することができる。CPU 605 によって実行される動作の例としては、フェッチ、デコード、実行、及び、ライトバックを挙げることができる。

10

【0332】

CPU 605 は、集積回路などの回路の一部であってもよい。システム 601 の 1 つ以上の他の構成要素が回路に含まれてもよい。回路は、特定用途向け集積回路 (ASIC) であってもよい。

【0333】

ストレージユニット 615 は、ドライバ、ライブラリー、及び、保存されたプログラムなどのファイルを記憶することができる。ストレージユニット 615 は、ユーザデータ、例えば、ユーザ選択及びユーザプログラムを記憶することができる。コンピュータシステム 601 は、イントラネット又はインターネットを介してコンピュータシステム 601 と通信しているリモートサーバ上に位置されるようなコンピュータシステム 601 の外部にある 1 つ以上の更なるデータストレージユニットを含むことができる。

20

【0334】

コンピュータシステム 601 は、ネットワーク 630 を介して 1 つ以上のリモートコンピュータシステムと通信することができる。例えば、コンピュータシステム 601 は、ユーザのリモートコンピュータシステムと通信することができる。リモートコンピュータシステムの例としては、パーソナルコンピュータ (ポータブル PC など)、スレート又はタブレット PC (Apple (登録商標) iPad (登録商標)、Samsung (登録商標) Galaxy Tab など)、電話、スマートフォン (Apple (登録商標) iPhone (登録商標)、Android 対応装置、Blackberry (登録商標) など) 又は携帯情報端末が挙げられる。ユーザは、ネットワーク 630 を介してコンピュータシステム 601 にアクセスすることができる。

30

【0335】

本明細書に記載の方法は、例えば、メモリ 610 又は電子ストレージユニット 615 などの、コンピュータシステム 601 の電子記憶場所に記憶された機械 (例えば、コンピュータプロセッサ) 実行可能コードによって実施することができる。機械実行可能コード又は機械可読コードは、ソフトウェアの形で提供できる。使用中、コードはプロセッサ 605 によって実行することができる。コードは、ストレージユニット 615 から取り出され、プロセッサ 605 による即時アクセスのためにメモリ 610 に記憶され得る。状況によっては、電子ストレージユニット 615 を排除することができ、また、機械実行可能命令がメモリ 610 に記憶される。

40

【0336】

コードは、事前にコンパイルして、コードを実行するようになっているプロセッサを有するマシンで使用するよう構成することもでき、また、実行時にコンパイルすることもできる。コードは、コードが予めコンパイルされた又はコンパイルされる態様で実行できるようにするべく選択されるプログラミング言語で供給されてもよい。

【0337】

コンピュータシステム 1101 など、本明細書で提供されるシステム及び方法の態様は、プログラミングで具体化することができる。技術の様々な態様は、典型的には機械 (又

50

はプロセッサ) 実行可能コード及び/又はあるタイプの機械可読媒体に保持又は組み込まれる関連データの形の「製品」又は「製造品」と考えることができる。機械実行可能コードは、メモリ(例えば、リードオンリーメモリ、ランダムアクセスメモリ、フラッシュメモリ)又はハードディスクなどの電子記憶ユニットに記憶することができる。「ストレージ」タイプの媒体としては、コンピュータ、プロセッサなどの有形メモリのいずれか又は全て、或いは、ソフトウェアプログラミングのためにいつでも持続性ストレージを提供できる、様々な半導体メモリ、テープドライブ、ディスクドライブなどの関連モジュールを挙げることができる。ソフトウェアの全て又は一部は、インターネット又はその他の様々な通信ネットワークを通じて通信される場合がある。そのような通信は、例えば、あるコンピュータ又はプロセッサから別のコンピュータへの、例えば、管理サーバ又はホストコンピュータからアプリケーションサーバのコンピュータプラットフォームへのソフトウェアのロードを可能にし得る。したがって、ソフトウェア要素を担うことができる別のタイプの媒体は、有線及び光の地上回線ネットワークを介して、及び様々なエアリンクを介して、ローカルデバイス間の物理インタフェース全体で使用されるような、光、電気及び電磁波を含む。有線又は無線リンク、光リンクなど、そのような波を運ぶ物理的要素も、ソフトウェアを搭載したメディアと見なすことができる。本明細書中で使用されるコンピュータ又は機械「読み取り可能媒体」などの用語は、持続性の有形な「記憶」媒体に限定されなければ、実行のためにプロセッサに命令を与えることに関与する任意の媒体を指す。

【0338】

したがって、コンピュータ実行可能コードなどの機械可読媒体は、有形の記憶媒体、搬送波媒体、又は物理的伝送媒体を含むがこれらに限定されない多くの形態をとることができる。不揮発性記憶媒体は、例えば、図面に示されるデータベースなどを実装するために使用され得るような、(1又は複数の)任意のコンピュータなどの任意の記憶装置などの、光ディスク又は磁気ディスクを含む。揮発性記憶媒体は、そのようなコンピュータプラットフォームのメインメモリなどのダイナミックメモリを含む。有形の伝送媒体としては、同軸ケーブル、コンピュータシステム内のバスを構成する配線を含めて、銅線及び光ファイバが挙げられる。搬送波伝送媒体は、電気信号又は電磁信号、又は無線周波数(RF)及び赤外線(IR)データ通信中に生成されるような音響波又は光波の形をとることができる。したがって、コンピュータ可読媒体の一般的な形式としては、例えば、フロッピーディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、その他の磁気媒体、CD-ROM、DVD又はDVD-ROM、その他の光学媒体、パンチカード紙テープ、穴のパターンがある任意の他の物理的な記憶媒体、RAM、ROM、PROM及びEPROM、FLASH-EPROM、任意の他のメモリチップ又はカートリッジ、データ又は命令を伝送する搬送波、そのような伝送波を伝送するケーブル又はリンク、又は、コンピュータがプログラミングコード及び/又はデータを読み取ることができるようにする任意の他の媒体が挙げられる。これらの形態のコンピュータ可読媒体の多くは、実行のためにプロセッサに1つ以上の命令の1つ以上のシーケンスを担持することに関与し得る。

【0339】

コンピュータシステム601は、例えば、核酸配列(例えば、配列リード、コンセンサス配列など)の結果を提供するためのユーザインタフェース(UI)640を備える電子ディスプレイ635を含む或いは電子ディスプレイ635と通信することができる。UIの例としては、グラフィカルユーザインタフェース(GUI)やウェブベースのユーザインタフェースが挙げられるが、これらに限定されない。

【0340】

本開示の方法及びシステムは、1つ以上のアルゴリズムによって実装することができる。アルゴリズムは、中央処理ユニット605による実行時にソフトウェアを介して実装することができる。アルゴリズムは、例えば、本開示の方法を実施することができる。

【0341】

[実施例]

以下の例は、本開示の特定の態様を更に説明するために含まれ、本開示の範囲を限定す

10

20

30

40

50

るために使用されるものではない。

【 0 3 4 2 】

[実施例 1]

この例は、核酸サンプルを分析するための本明細書に記載の手法が他の技術よりも優れていることを実証する。

【 0 3 4 3 】

e P C R ワークフローが、実行されて、図 3 の左パネルに示されている。D N A 鋳型分子の変異体 1 (3 0 1) 及び 2 (3 0 2) をビーズ (3 0 3) と共に乳化させた (3 0 4) 。鋳型及びビーズの両方が、エマルジョン中の液滴の総数と比較して低存在量であり、最小のポリクロナルビーズ及びクローンコピーをもたらした。液滴の大部分は空であり (3 0 5) 、幾つかの液滴は単一のビーズのみを含有し (3 0 6) 、幾つかの液滴は鋳型核酸分子のみを含有した (3 0 7) 。 (3 0 6) 及び (3 0 7) の両方は、増幅された鋳型陽性ビーズを送達せず、 (3 0 7) の D N A 鋳型は分析ワークフローを脱したので分析しなかった。鋳型核酸分子とビーズ (例えば、 3 0 8) の両方を含む液滴のみが、その後の分析のための増幅産物を生成することができる機能的増幅反応器であった。エマルジョンブレイク及び濃縮 (3 0 9) の後、鋳型陽性ビーズは、配列決定に有用なビーズを送達した (3 1 0) 。

【 0 3 4 4 】

本明細書に記載の核酸分析手法が、実施されて、図 3 の右側パネルに示される。本明細書に記載されるように、有意により多数のビーズ (3 1 1) をエマルジョン液滴中に装填した。したがって、エマルジョン中の大部分の液滴中の液滴あたり 0 ~ 1 個のビーズとは対照的に、エマルジョン中の大部分の液滴中の各液滴中に複数のビーズ (例えば、 0 ~ 1 0 個のビーズ) を装填した。鋳型核酸分子を含む全ての液滴もビーズを含み、したがって、全てのビーズの複数のクローンコピーを生成した (3 1 2) 、 (3 1 3) 。本明細書に記載の 1 つ以上の手順を使用すると、破壊及び濃縮後に鋳型核酸分子は失われず、両方の変異体 (3 1 4 / 3 1 5) が複数回配列決定され、精度が向上した。

【 0 3 4 5 】

分解能 (例えば、信号対雑音比) を更に高めるために、鋳型の標識に固有分子識別子 (U M I) を使用して、特定の変異体を個々の出発鋳型に割り当てた。

【 0 3 4 6 】

このデータは、本開示の方法及び組成物が、核酸サンプルを分析するための精度の有意な向上をもたらし得ることを実証している。これは、非常に限られたサンプル材料しか存在しない場合、及び / 又は稀な変異体の検出が重要である場合に特に重要であり得る。

【 0 3 4 7 】

[実施例 2]

この例は、図 5 A 及び図 5 B に示すグラフを生成するために使用された数学的モデルを実証する。図 5 A は、 1 0 % の増分インデックスを有するペアリードを生成する確率 (%) の横軸 5 0 2 と、 1 0 % の増分インデックスを有する固有リードの割合 (%) の縦軸 5 0 1 とを有するグラフを示す。図 5 B は、平均液滴集合 (M e a n D r o p l e t P o p u l a t i o n) の横軸 5 0 4 を有し、 1 つの増分インデックスを有し、縦軸 5 0 3 を有し、 1 0 % の増分インデックスを有するグラフを示す。

【 0 3 4 8 】

以下の数学的関係が使用される。

【数 5】

$$P_{\text{Paired}}(M_A, M_B | L_{\text{droplet}}, F_{\text{split}}, F_{\text{seq}}) =$$

$$\sum_{N_{\text{droplet}}} P_{\text{Poisson}}(N_{\text{droplet}} | L_{\text{droplet}}) \sum_{M'_A} P_{\text{Binomial}}(M'_A | N_{\text{droplet}}, F_{\text{split}}) P_{\text{Binomial}}(M_A | M'_A, F_{\text{seq}}) P_{\text{Binomial}}(M_B | N_{\text{droplet}} - M'_A, F_{\text{seq}})$$

10

20

30

40

50

【 0 3 4 9 】

式中、 $P(X|Y)$ は X の確率分布を示し、 Y 、 M_A 及び M_B はそれぞれ集団 A 及び B のビーズの数であり、 $L_{drop\ let}$ は液滴あたりのビーズの平均数であり、 $N_{drop\ let}$ は液滴中のビーズの数について可変であり、 F_{split} はタイプ A のビーズの割合であり、 F_{seq} はビーズが配列決定される確率である。

【 0 3 5 0 】

[実施例 3]

この例は、ビーズタイプ A 及び B のランダムな液滴装填の効率の分析的關係を示す (図 5 A)。

【 0 3 5 1 】

平均ビーズ装填をパラメトリックに掃引すると、予想される固有リードの割合と、ペアリードを生成する確率、すなわち、 A 及び B の各々の少なくとも 1 つのコピーを達成する確率との間に關係が確立される。例えば、ペアリードを生成する確率が 50 % の場合、リードの 30 % が固有である。図 5 B は、所定の平均液滴ビーズ装填に対する様々な読み取りシナリオ間の關係を示す。シナリオは、 $P(N_A, N_B)$ と標識付けされ、 N_A 及び N_B は、それぞれ読み取られたタイプ A 及び B のビーズの数である。インデックス 505 は、上から順に、(i) $P(>0, >0)$ 、(i i) $P(1, 1)$ 、(i i i) $P(2, 1) | P(1, 2)$ 、(i v) $P(2, 2)$ 、(v) $P(3, 1) | P(1, 3)$ 、及び (v i) $F_{redundant}$ で、異なるグラフ線を標識化する。 $N_A > 0$ 及び $N_B > 0$ の事例、すなわち $P(>0, >0)$ は、 A & B リード対が得られる全てのシナリオを説明し、最も高い実線曲線である。 $P(1, 1)$ は、各リードのただ 1 つのコピーが取得される特別なインスタンスである。点線の曲線は、 A 又は B の冗長コピーであるリードの割合である。 F_{split} は 50 % であり、両方のビーズが等しく可能性があることを示す。 F_{seq} は 100 % であり、ビーズが配列決定される可能性である。アノテーションは、ペアリードを生成するために 100 % の効率を達成することが、配列決定において 90 % の冗長性 (A 及び / 又は B の更なるコピー) をもたらすことを示す。

【 0 3 5 2 】

[実施例 4]

この例は、生体サンプル (例えば、図 7 参照) を分析するための方法を実証する。

【 0 3 5 3 】

生体サンプルを分析するためのこの方法は、各々が複数のアダプターのうちの特定のアダプターに対応するプライマー配列を含む 2 種類のビーズを含み、複数のアダプターは複数のバーコード配列を含む。アダプターは、生体サンプルの複数の核酸分子の核酸分子 (例えば、ターゲット核酸分子) の末端に結合され得る。ターゲット核酸ライブラリーインサートの長さ (例えば、図 7 の核酸分子 705 によって示される) は、両端からの核酸配列決定が、重複を全く有さないか、又は非常に最小の重複を有する配列リードを提供するように選択される。インサートは、複数のアダプターのアダプターによる機能化の前に末端修復及び A テール加工される。合成二本鎖核酸分子は、インサートとループ及びライゲートし得るように設計される。そのため、合成二本鎖は、好ましくは末端リン酸塩を含まない T オーバーハングを含む。合成二本鎖核酸分子の配列は、以下の通り、すなわち、バーコード 2'、 P_B 開裂可能要素、 P_A 、バーコード 1' である。バーコード 1' 及びバーコード 2' は、任意の市販のバーコード配列であってもよく、異なる配列であってもよい。或いは、幾つかの例では、バーコード 1' 及びバーコード 2' は異なる配列でなくてもよい。しかしながら、バーコード配列は十分に定義されているため、互いに対して割り当てられてもよい。開裂可能要素は、化学的、光、熱、又は他の機構による合成二本鎖核酸分子の鎖の分離を可能にする。ライゲーション及び環状化の後、合成二本鎖核酸分子は開裂され、ポリメラーゼに基づく伸長によってギャップ装填される。2 つのタイプのビーズ (例えば、図 8 の部分 806 によって示されるもの) がクローン増幅のために利用可能であり、1 つは固定化 P_A (図 8 の 1 - 8) オリゴヌクレオチド又は最小限 P_A の部分を有し、もう 1 つは P_B (4 - 8、図 8) オリゴヌクレオチド又は最小限 P_B の部分を固定化している。

【0354】

したがって、線形化されたギャップ装填鋳型の熱変性は、ePCRなどのクローン増幅のために十分に分離された区分（例えば、パーティション）にビーズを分配する前に、2つのビーズタイプにアニーリングすることを可能にする。この例を本明細書に記載の方法のいずれかと組み合わせることにより、核酸増幅反応のアニーリングプロセスの排除が可能になり得る。

【0355】

[実施例5]

この例は、各末端（例えば、図20参照）に付着された同じアダプター対（A/A'）を有するインサートライブラリー（I）を使用してクローン増幅ビーズを作製する方法を実証する。本明細書で使用される場合、プライム（'）は逆相補体（例えば、A'はAの逆相補体である）を示す。ビーズは、ビーズに付着した少数コピーの第2のプライマー（XA）及び多くのコピーの第1のプライマー（X）を有する。適合したインサート（A'IA）は、第2のプライマーとハイブリダイズし、伸長される。伸長産物は、第1のプライマー（X）の更なるコピーを伸長させることができるが、指数関数的に伸長させることはできない。伸長された第2（又は第1）のプライマーの他端も第4のプライマー（AB'）を用いて伸長されると、指数増幅が許容される。ここで、表面プライマー（X）の多くのコピー及び溶液プライマー（第3のプライマー、B'）の多くのコピーを用いて指数関数的な表面増幅を行なうことができる。他のビーズは異なる第1のプライマー（Z）を有するため、第1のビーズ（X）から生成された伸長産物は、第2のビーズ（Z）に対して付加された親和性を有さない。温度、濃度及び他の増幅条件は、第1及び第2の伸長が指数関数的増幅と比較して遅い及び/又は稀な事象であるように選択される。温度、濃度及び他の増幅条件は、第1の伸長産物（X）が他のビーズ（Z）の鋳型として機能しないように選択される。

【0356】

以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造並びにそれらの均等物がそれによってカバーされることが意図されている。

【0357】

[実施例6]

本明細書に記載されるように、結合された鋳型核酸分子を含む伸長担体を、以下の手順を使用して調製した。

【0358】

ライブラリーのアニーリング及び伸長：100マイクロリットルの最終容量を含有する反応混合物を、以下の成分/濃度：110×TAQポリメラーゼ反応緩衝液、8.2ミリモル（mM）のMgCl₂、12mMのdNTP、10ピコモル（pM）のライブラリー、1マイクロモル/分（U）Taq DNAポリメラーゼ、及び6.00×10⁷ビーズ/マイクロリットルを用いて調製した。表2の条件を使用して、以下のように混合物をサーモサイクラーでインキュベートした。

【表2】

ステップ	温度	時間
1	95℃	5分
2	50℃	1時間
3	70℃	1時間
4	12℃	浸漬

表2-熱サイクリング条件

【0359】

400マイクロリットル（μL）のTET緩衝液（TE pH8.0、0.05% Tr

i t o n X - 1 0 0) を加えることによってビーズを洗浄した。混合物を 3 0 秒間ボルテックスし、遠心分離機で 2 1 , 0 0 0 回転 / 分 (R P M) で 8 分間スピンドウンした。上清を除去して 1 0 0 μ L を残した。ビーズを 5 0 0 μ L の 1 \times S A B i n d B u f f e r (2 0 m M T r i s p H 3 . 0 , 5 0 m M N a C l , 0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0) で洗浄した。混合物を 3 0 秒間ボルテックスし、遠心分離機で 2 1 , 0 0 0 R P M で 8 分間スピンドウンした。上清を除去して 1 0 0 μ L を残した。

【 0 3 6 0 】

拡張ビーズを濃縮する： 1 0 0 μ L の磁性ストレプトアビジンビーズを伸長ビーズに添加した。この混合物を混合し、室温で 1 時間インキュベートした。溶液が透明になるまでビーズを適切な磁石で磁化し、上清を除去した。ビーズを穏やかな再懸濁によって 5 0 0 μ L の S A B i n d B u f f e r で洗浄した。2 回目の磁化操作では、溶液が透明になるまでビーズを適切な磁石で磁化し、上清を除去した。ビーズを穏やかな再懸濁によって 5 0 0 μ L の S A B i n d B u f f e r で洗浄した。3 回目の磁化操作では、溶液が透明になるまでビーズを適切な磁石で磁化し、上清を除去した。

【 0 3 6 1 】

伸長ビーズを溶出させる。すなわち、ビーズを 3 0 0 μ L の 5 0 M e l t o f f B u f f e r (0 . 1 m o l / リットル (M) N a O H , 0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0) に再懸濁し、5 0 で 5 分間インキュベートした。混合物を短時間ボルテックスし、溶液が透明になるまで適切な磁石でビーズを磁化した。ビーズを含む上清を除去し、保持した。2 回目のメルトオフ操作では、ビーズを 3 0 0 μ L の 5 0 M e l t o f f B u f f e r (0 . 1 m o l / リットル (M) N a O H , 0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0) に再懸濁し、5 0 で 5 分間インキュベートした。混合物を短時間ボルテックスし、溶液が透明になるまで適切な磁石でビーズを磁化した。ビーズを含有する上清を取り出して保持し、ビーズを含有する先の上清と合わせた。溶出したビーズを遠心分離機で 2 1 , 0 0 0 R P M で 8 分間スピンドウンし、上清を除去して 1 0 0 μ L を残した。ビーズを 5 0 0 μ L の 1 \times S A B i n d B u f f e r で洗浄し、3 0 秒間ボルテックスした。ビーズを遠心分離機で 2 1 , 0 0 0 R P M で 8 分間スピンドウンし、上清を除去して 1 0 0 μ L を残した。ビーズを 5 0 0 μ L の T E T 緩衝液で洗浄し、3 0 秒間ボルテックスした。ビーズを遠心分離機で 2 1 , 0 0 0 R P M で 8 分間スピンドウンし、上清を除去して 1 0 0 μ L を残した。

【 0 3 6 2 】

その後、濃縮したビーズを e P C R 手順で使用した。

【 0 3 6 3 】

[実施例 7]

以下の表 3 及び図 2 5 は、予濃縮手順を実施しない対照手順に対する予濃縮（例えば、クローン増幅の前に、増幅のために単離された及び / 又は濃縮された伸長担体混合物を使用するために、担体の混合物（例えば、ビーズ）を濃縮すること）手順を使用した増幅の結果を示す。大腸菌ライブラリー鋳型及び人工鋳型で増幅を行なった。

【表 3】

プロセス	鋳型	濃縮 %	増幅 %	% ポリクロナル
予濃縮	大腸菌ライブラリー	5	95	N/A
予濃縮	人工鋳型	1.6	90	13.25
対照	人工鋳型	N/A	17	11

表 3- 予濃縮対照結果

【 0 3 6 4 】

図 2 5 は、パネル (A) では前濃縮手順に供された大腸菌ライブラリーを示し、パネル (B) では予濃縮手順に供された人工鋳型ライブラリーを示し、パネル (C) では対照手順に供された人工鋳型ライブラリーを示す（前濃縮の非存在下）。各グラフは、カウント対アロフィコシアニン (A P C) 蛍光の分布を示す。パネル (A) 及び (C) の場合、縦

軸インデックスはそれぞれ0、500、1,000、及び1,600の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、及び $10^7 \cdot 2$ の昇順で読み取られる。パネル(B)の場合、縦軸インデックスはそれぞれ0、200、400、600、及び800の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、及び $10^7 \cdot 2$ の昇順で読み取られる。パネル(A)に示すように、大腸菌ライブラリー(予濃縮)は、(理論値の10%に対して)5%の濃縮及び95.3%の増幅をもたらした。パネル(B)に示されるように、人工鋳型ライブラリー(予濃縮)は、(理論値の10%に対して)1.6%の濃縮及び89.6%の増幅をもたらした。パネル(C)に示されるように、人工鋳型ライブラリー(対照)は16.8%の増幅をもたらした。予濃縮人工鋳型ライブラリー集団の約13.25%がポリクローナル増幅をもたらした。濃縮後人工鋳型ライブラリー集団の約11%がポリクローナル増幅をもたらした。

【0365】

[実施例8]

本明細書に記載の鋳型核酸分子(例えば、付着されたアダプター)に付着するように構成された伸長プライマー配列を含む伸長担体を、以下の手順を用いて調製した。

【0366】

ビオチン化伸長プライマー分子の段階希釈物を、10ミリモル(mM)のTris pH 8.0中、10マイクロモルのストックから10ナノモル(nM)、1nM、0.1nM及び0.01nMのストックまでそれぞれ調製し、これらを更に希釈して、6000万ビーズ/ μ L中で1000、100、10及び1ピコモル(pM)の最終濃度を達成した。ビオチン化伸長プライマー分子は、伸長プライマー配列の相補体を含む。ビーズ上のプライマー分子とビオチン化伸長プライマー分子との間のプレアニーリングを95℃で2分間行なった。混合物をゆっくりと50℃まで冷却し、1×EpiMark(R)緩衝液中で合計45分間保持した。プライマーを70℃のヒートブロックで20分間伸長させ、1×BW緩衝液で2回洗浄した。磁性ストレプトアビジンビーズを室温でローター上で1.5時間ビオチン鋳型ビーズとハイブリダイズさせた。ビーズを磁氣的に捕捉した。磁気捕捉後、水中0.1% NaOH及び0.05%及びTriton X-100を用いて50℃で5分間、ビーズ(単一伸長プライマー配列を有する)を溶出した。濃縮したビーズを、1×EpiMark(R)緩衝液を用いて3回洗浄し、その後、ePCR手順で利用した。

【0367】

[実施例9]

以下の表4及び図26～図27は、異なる伸長プライマー：ビーズ入力比率でのプライマー伸長後に捕捉された濃縮ビーズの結果を示す。

【表4】

伸長プライマー(pM)	伸長プライマー：ビーズ(比率)	N個の伸長プライマーを有するビーズの予測%			捕捉されたビーズの予測された%	捕捉されたビーズの観察された%
		N=0	N=1	N=2+		
1000	10:1	0%	0%	100%	100%	51%
100	1:1	37%	37%	26%	63%	35%

表4-濃縮ビーズの捕捉

【0368】

1000pM濃度の伸長プライマー及び10:1の伸長プライマー：ビーズ比率の場合、0、1、及び2+鋳型を有するビーズの予測%は、それぞれ0%、0%、及び100%である。したがって、捕捉された(少なくともN=1個の伸長プライマーを有する)ビーズの予測%は100%である。捕捉されたビーズの観察された%は51%であった。

【 0 3 6 9 】

1 0 0 p M濃度の伸長プライマー、及び 1 : 1 の伸長プライマー : ビーズ比率の場合、0、1、及び 2 + 鋳型を有するビーズの予測 % は、それぞれ 3 7 %、3 7 %、及び 2 6 % である。したがって、捕捉された (少なくとも N = 1 個の伸長プライマーを有する) ビーズの予測 % は 6 3 % である。捕捉されたビーズの観察された % は 3 5 % であった。

【 0 3 7 0 】

図 2 6 は、パネル (A) において 1 0 0 0 p M伸長プライマー入力濃度で捕捉された濃縮ビーズの存在を示し、パネル (B) において 1 0 0 p M伸長プライマー入力濃度で捕捉された濃縮ビーズの存在を示す。各グラフは、8 0 0 F I T C 閾値を有する、フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 蛍光に対するカウントの分布を示す。各グラフについて、縦軸インデックスはそれぞれ 0、1 0 0 0 0、及び 2 5、6 0 0 の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 及び $10^{7 \cdot 2}$ の昇順で読み取られる。

10

【 0 3 7 1 】

図 2 7 は、パネル (A) において、1 0 0 0 p Mの伸長プライマー入力濃度及び 1 0 : 1 の伸長プライマー : ビーズ比率での濃縮ビーズ中の伸長プライマー配列の存在を示し、パネル (B) において、1 0 0 p Mの伸長プライマー入力濃度及び 1 : 1 の伸長プライマー : ビーズ比率での濃縮ビーズ中の伸長プライマー配列の存在を示す。各グラフは、カウント対アロフィコシアニン (A P C) 蛍光の分布を示す。パネル (A) の場合、縦軸インデックスはそれぞれ 0、5、0 0 0、1 0 0 0 0、及び 1 2、8 0 0 の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 及び $10^{7 \cdot 2}$ の昇順で読み取られる。パネル (B) の場合、縦軸インデックスはそれぞれ 0、1、0 0 0、2、0 0 0、及び 3、2 0 0 の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 及び $10^{7 \cdot 2}$ の昇順で読み取られる。パネル (A) 及び (B) に示されるように、濃縮ビーズの 7 5 . 1 % 及び 7 9 . 1 % がそれぞれ、少なくとも 1 つの伸長プライマー配列を含有することが観察された。

20

【 0 3 7 2 】

[実施例 1 0]

本明細書に記載のように、以下の手順を用いて、伸長プライマー配列を含む伸長担体を鋳型核酸分子 (例えば、付着されたアダプター) に付着させた。

30

【 0 3 7 3 】

伸長担体へのライブラリー鋳型のアニーリング前 : 二種の一本鎖鋳型と伸長ビーズ (伸長プライマー配列を含むビーズ) との混合物を、2 0 倍過剰の鋳型 : 濃縮ビーズで準備し、9 5 で 2 分間アニーリングし、5 0 にゆっくり冷却し、1 x E p i M a r k (R) 緩衝液中で合計 4 5 分間保持した。混合物を 2 ~ 2 0 時間回転させながら 5 0 で更に複数回インキュベートした。ビーズを 1 x E p i M a r k (R) 緩衝液で 1 回洗浄した。得られたビーズは、それに結合した鋳型分子 (例えば、単一鋳型分子) を有する。

【 0 3 7 4 】

e P C Rのための鋳型化された伸長担体の分割 : 鋳型化されたビーズを e P C Rのための液滴に分割した。e P C Rのための分割の前に、鋳型を伸長プライマー配列にアニーリングすることによって、及び / 又は伸長プライマー配列からの伸長によって鋳型に鋳型ビーズ (例えば、伸長プライマー配列を介して鋳型分子に結合されたビーズ) を結合して、ビーズに結合された鋳型の相補体を生成し得ることが理解される。

40

【 0 3 7 5 】

[実施例 1 1]

以下の表 5 及び図 2 8 ~ 図 2 9 は、異なる伸長プライマー : ビーズ入力比率で鋳型ビーズを使用した e P C R増幅の結果を示す。2 種の鋳型のためのアトプローブを増幅ビーズにアニーリングし、全増幅を測定した。

【 0 3 7 6 】

50

図 28 は、パネル (A) において、1000 pM 伸長プライマー入力濃度、10 : 1 伸長プライマー : ビーズ入力比率、200 pM 鋳型入力濃度及び 1 : 20 濃縮ビーズ : 鋳型入力比率での増幅ビーズ (又はライブラリー陽性ビーズ) の存在を示し、パネル (B) において、100 pM 伸長プライマー入力濃度、1 : 1 伸長プライマー : ビーズ入力比率、200 pM 鋳型入力濃度及び 1 : 20 濃縮ビーズ : 鋳型入力比率での増幅ビーズ (又は陽性ビーズ) の存在を示す。各グラフは、カウント対アロフィコシアニン (APC) 蛍光の分布を示す。パネル (A) の場合、縦軸インデックスはそれぞれ 0、2000、4000、及び 6400 の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、及び $10^7 \cdot 2$ の昇順で読み取られる。パネル (B) の場合、縦軸インデックスはそれぞれ 0、100、150、及び 200 の昇順で読み取られ、横軸インデックスはそれぞれ 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、及び $10^7 \cdot 2$ の昇順で読み取られる。パネル (A) 及び (B) に示すように、1000 pM 及び 100 pM 伸長プライマー入力濃度についてそれぞれ濃縮ビーズの 80.1% 及び 41.5% を増幅した。

【0377】

図 29 は、垂直パネル (A) において、1000 pM 伸長プライマー入力濃度、10 : 1 伸長プライマー : ビーズ入力比率、200 pM 鋳型入力濃度及び 1 : 20 濃縮ビーズ : 鋳型入力比率での増幅ビーズのポリクロナリティを示す 2 つのグラフを示し、垂直パネル (B) において、100 pM 伸長プライマー入力濃度、1 : 1 伸長プライマー : ビーズ入力比率、200 pM 鋳型入力濃度及び 1 : 20 濃縮ビーズ : 鋳型入力比率での増幅ビーズのポリクロナリティを示す 2 つのグラフを示す。各グラフは、APC 蛍光対 FITC 蛍光の分布を示す。各グラフの縦軸及び横軸のそれぞれについて、軸インデックスはそれぞれ昇順 10^0 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、及び $10^7 \cdot 2$ で読み取られる。上の 2 つのグラフは FITC に閾値を有し、下の 2 つのグラフは APC 蛍光に閾値を有する。

【表 5】

伸長プライマー濃度(pM) (ビーズ:伸長プライマー)	鋳型濃度(pM) (濃縮ビーズ:鋳型)	予測 %ポリクロナル	観察 %ポリクロナル
1000 (1:10)	200 (1:20)	67%	30%
100 (1:1)	200 (1:20)	23%	6%

表 5-ポリクロナル%

【0378】

表 5 に示すように、予備濃縮ビーズについて観察されたポリクロナル割合は、理論予測の 67% 及び 23% のポリクロナル性よりも、それぞれ 30% 及び 6% (それぞれ 1000 pM 及び 100 pM 伸長プライマー入力濃度について) とはるかに低かった。更に、予濃縮なしで ePCR を実施するための予測ポリクロナルパーセンテージは、80.1% 及び 41.5% のライブラリー陽性率 (例えば、図 28 に関するライブラリー陽性ビーズの結果を参照されたい) についてそれぞれ 44% 及び 22% である。したがって、結果は、本明細書に記載の予濃縮手順を実施すると、標準的なポアソン装填 (予濃縮なし) を用いた場合よりも、所定の割合のライブラリー陽性ビーズでより低いレベルのポリクロナリティが生成されることを示した。

【0379】

本発明の好ましい実施形態について図示して本明細書中で説明してきたが、当業者に明らかかなように、そのような実施形態は単なる一例として与えられる。本発明が、明細書中で提供される特定の例によって限定されることは意図されていない。前述の明細書を参照して本発明を説明してきたが、本明細書の実施形態の説明及び例示は、限定的な意味で解

釈されることを意図していない。この時点では、本発明から逸脱することなく、数多くの変形、変更、及び、置換が当業者に想起される。更に、本発明の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書中に記載された特定の描写、形態、又は、相対的比率に限定されないことが理解されるものとする。本明細書に記載された本発明の実施形態に対する様々な代替案が、本発明を実施する際に使用されてもよいことが理解されるべきである。したがって、本発明は、そのような代替、修正、変形、又は同等物もカバーするものとすることが企図されている。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造並びにそれらの均等物がそれによってカバーされることが意図されている。

本発明は一態様において、以下を提供する。

10

[項目 1]

核酸処理のための方法であって、

(a) 複数のパーティションを与えるステップであって、前記複数のパーティションのうちの 1 つのパーティションが、(i) 複数のビーズのうちの少なくとも 2 つのビーズ、(i i) 核酸分子、及び、(i i i) 1 つ以上の試薬を含む、ステップと、

(b) 前記パーティションにおいて、前記核酸分子及び前記 1 つ以上の試薬を使用して、前記核酸分子の 1 つ以上の増幅産物を生成するステップであって、前記 1 つ以上の増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが、前記少なくとも 2 つのビーズのうちの 1 つのビーズに付着される、ステップと、

(c) 前記パーティションから前記ビーズを回収するステップと、

20

(d) 前記ビーズに付着される前記 1 つ以上の増幅産物のうちの 1 つの増幅産物又はその誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップと、
を含む方法。

[項目 2]

(a) は、(i) 前記核酸分子を含む複数の核酸分子を含む第 1 の溶液、及び、(i i) 前記少なくとも 2 つのビーズを含む前記複数のビーズを含む第 2 の溶液を、前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液と混和しない流体と接触させて、前記複数のパーティションを生成するステップを含む、項目 1 に記載の方法。

[項目 3]

前記ビーズには、前記核酸分子を使用して 1 つ以上の増幅反応を行なうための複数のプライマー分子が付着されてしまっており、(b) は、前記複数のプライマー分子のうちのプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の増幅反応を行なって、前記 1 つ以上の増幅産物のうちの前記増幅産物を生成するステップを含む、項目 1 又は 2 に記載の方法。

30

[項目 4]

前記ビーズには、前記核酸分子を使用して 1 つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、前記複数の更なるプライマー分子が前記複数のプライマー分子とは異なる、項目 3 に記載の方法。

[項目 5]

(b) は、前記複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の更なる増幅反応を行なって、前記 1 つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップを更に含み、前記更なる増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが前記ビーズに付着され、(d) は、前記核酸分子の配列を同定するために、前記ビーズに付着される前記更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイするステップを更に含む、項目 4 に記載の方法。

40

[項目 6]

前記核酸分子が二本鎖核酸分子であり、前記核酸分子の第 1 鎖に対応する増幅産物が前記複数のプライマー分子を使用して生成され、前記核酸分子の第 2 鎖に対応する増幅産物が前記複数の更なるプライマー分子を使用して生成される、項目 5 に記載の方法。

[項目 7]

(d) は、前記 1 つ以上の増幅産物又はその誘導体の配列と会合されるペアエンド配列

50

決定リードを生成するステップを含む、項目 6 に記載の方法。

[項目 8]

前記少なくとも 2 つのビーズのうちの更なるビーズには、前記核酸分子を使用して 1 つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、前記複数の更なるプライマー分子が前記複数のプライマー分子とは異なる、項目 3 に記載の方法。

[項目 9]

(e) 前記複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の更なる増幅反応を行なって、前記 1 つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップであって、前記更なる増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが前記少なくとも 2 つのビーズのうちの前記更なるビーズに付着される、ステップと、

10

(f) 前記パーティションから前記更なるビーズを回収するステップと、

(g) 前記更なるビーズに付着される前記更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップと、

を更に含む項目 8 に記載の方法。

[項目 10]

前記複数のパーティションの少なくとも 80 % のそれぞれが、前記複数のビーズのうちの 2 つ以上のビーズを含む、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 11]

前記複数のパーティションの少なくとも 80 % のそれぞれが、前記複数のビーズのうちの 3 つ以上のビーズを含む、項目 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 12]

前記少なくとも 2 つのビーズが互いに付着される、項目 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 13]

前記少なくとも 2 つのビーズは、化学リンカー及びスプリントオリゴヌクレオチドの少なくとも一方を介して互いに付着される、項目 12 に記載の方法。

[項目 14]

少なくとも 2 つのビーズをそれぞれが含む前記複数のパーティションのうちのパーティションを、多くとも 1 つのビーズをそれぞれが含む前記複数のパーティションのうちの他のパーティションから分離するステップを更に含む、項目 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 15]

分離する前記ステップは、それぞれが少なくとも 2 つのビーズを含む前記パーティション又はそれぞれが多くとも 1 つのビーズを含む前記他のパーティションを光学的に検出するステップと、光学的に検出する前記ステップに少なくとも基づき、流体装置内の流体の流れの方向を調整して、前記流体装置の第 1 のチャンネル内に少なくとも 2 つのビーズをそれぞれが含む前記パーティションと、前記流体装置の第 2 のチャンネル内に多くとも 1 つのビーズをそれぞれが含む前記他のパーティションとを与えるステップとを含む、項目 14 に記載の方法。

40

[項目 16]

前記 1 つ以上の試薬は、プライミング配列を含む核酸分子を含む、項目 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 17]

前記プライミング配列を含む前記核酸分子が固有分子識別子配列を更に含む、項目 16 に記載の方法。

[項目 18]

前記プライミング配列を含む前記核酸分子がバーコード配列を更に含む、項目 16 に記載の方法。

[項目 19]

50

前記 1 つ以上の試薬が 1 つ以上の重合酵素を含む、項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 20]

前記複数のパーティションが複数の液滴である、項目 1 から 19 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 21]

(d) は、前記増幅産物又はその誘導体を配列決定するステップを含む、項目 1 から 20 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 22]

(a) において、前記核酸分子が前記ビーズに付着される、項目 1 から 21 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 23]

核酸処理のための方法であって、

(a) 複数のパーティションを与えるステップであって、前記複数のパーティションのうちの 1 つのパーティションが、(i) 複数のビーズのうちの少なくとも 2 つのビーズであって、前記少なくとも 2 つのビーズが互いに付着される、少なくとも 2 つのビーズと、(i i) 核酸分子と、(i i i) 1 つ以上の試薬とを含む、ステップと、

(b) 前記パーティションにおいて、前記核酸分子及び前記 1 つ以上の試薬を使用して、前記核酸分子の 1 つ以上の増幅産物を生成するステップであって、前記 1 つ以上の増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが前記少なくとも 2 つのビーズのうちの 1 つのビーズに付着される、ステップと、

20

を含む方法。

[項目 24]

(c) 前記パーティションから前記ビーズを回収するステップと、

(d) 前記ビーズに付着される前記 1 つ以上の増幅産物のうちの 1 つの増幅産物又はその誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップと、

を更に含む項目 23 に記載の方法。

[項目 25]

(a) は、(i) 前記核酸分子を含む複数の核酸分子を含む第 1 の溶液、及び、(i i) 前記少なくとも 2 つのビーズを含む前記複数のビーズを含む第 2 の溶液を、前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液と混和しない流体と接触させて、前記複数のパーティションを生成するステップを含む、項目 23 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 26]

前記ビーズには、前記核酸分子を使用して 1 つ以上の増幅反応を行なうための複数のプライマー分子が付着されてしまっており、(b) は、前記複数のプライマー分子のうちのプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の増幅反応を行なって、前記 1 つ以上の増幅産物のうちの前記増幅産物を生成するステップを含む、項目 24 又は 25 に記載の方法。

[項目 27]

前記ビーズには、前記核酸分子を使用して 1 つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着してしまっており、前記複数の更なるプライマー分子が前記複数のプライマー分子とは異なり、(b) は、前記複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の更なる増幅反応を行なって、前記 1 つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップであって、前記更なる増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが前記ビーズに付着される、ステップを更に含み、(d) は、前記ビーズに付着される前記更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイして前記核酸分子の配列を同定するステップを更に含む、項目 26 に記載の方法。

40

[項目 28]

前記少なくとも 2 つのビーズのうちの更なるビーズには、前記核酸分子を使用して 1 つ以上の更なる増幅反応を行なうための複数の更なるプライマー分子が付着されてしまっており、前記複数の更なるプライマー分子が前記複数のプライマー分子とは異なり、前記方

50

法は、

（ e ）前記複数の更なるプライマー分子のうちの更なるプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の更なる増幅反応を行なって、前記 1 つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップであって、前記更なる増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが、前記少なくとも 2 つのビーズのうちの前記更なるビーズに付着される、ステップと、

（ f ）前記パーティションから前記更なるビーズを回収するステップと、

（ g ）前記更なるビーズに付着される前記更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップと、

を更に含む項目 2 6 に記載の方法。

[項目 2 9]

核酸分子を処理するための方法であって、

（ a ）（ i ）複数の第 1 のプライマーが固定化されて成る表面であって、前記複数の第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性を有する表面と、（ i i ）前記核酸分子であって、前記核酸分子が前記第 1 の配列の相補体とは異なる末端配列を含む、前記核酸分子と、（ i i i ）第 1 の部分及び第 2 の部分を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第 2 の部分が伸長配列を含み、前記伸長配列又はその相補体が前記第 1 の配列とハイブリダイズするように構成される、第 2 のプライマーと、を含む反応混合物を与えるステップと、

（ b ）前記核酸分子及び前記第 2 のプライマーを使用して伸長産物を生成するステップであって、前記伸長産物が前記伸長配列又はその相補体を含む、ステップと、

（ c ）前記表面に固定化される前記複数の第 1 のプライマーを使用して前記伸長産物を増幅するステップと、

を含む方法。

[項目 3 0]

前記第 2 のプライマーが前記表面に固定化される、項目 2 9 に記載の方法。

[項目 3 1]

前記核酸分子は、（ b ）の前に前記複数の第 1 のプライマーとハイブリダイズしない、項目 2 9 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 2]

前記表面が増幅部位のアレイを含み、増幅部位の前記アレイは、それに固定化される第 1 のプライマーの複数のセットを含み、第 1 のプライマーの前記複数のセットが前記第 1 の配列に対して配列同一性を有する、項目 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 3]

前記核酸分子は、前記反応混合物中の増幅部位の前記アレイに流体アクセスできる、項目 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 4]

前記表面がビーズである、項目 2 9 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 5]

前記反応混合物がエマルジョンのある量の分散相中に与えられる、項目 2 9 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 6]

前記エマルジョンは、第 2 の表面を含む第 2 の反応混合物を含む第 2 の量の前記分散相を含む、項目 3 5 のいずれか一項記載の方法。

[項目 3 7]

（ b ）及び（ c ）が前記反応混合物中で行なわれる、項目 2 9 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 8]

前記反応混合物が複数の核酸分子を含み、前記複数の核酸分子が異なる核酸配列を含む核酸分子を含み、前記複数の核酸分子のそれぞれは、前記伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するべく前記第 2 のプライマーに結合するように構成される、項目 2 9 か

10

20

30

40

50

ら 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 9]

複数の反応混合物を含む複数のパーティションを与えるステップを更に含み、前記複数のパーティションは、(i) 前記核酸分子を含む複数の核酸分子と、(i i) 前記表面を含む複数の表面とを含み、前記複数のパーティションのうちの第 1 のパーティションが前記反応混合物を含み、前記複数のパーティションのうちの第 2 のパーティションは、前記複数の核酸分子のうちの第 2 の核酸分子と前記複数の表面のうちの第 2 の表面とを含む、項目 2 9 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 0]

前記複数の核酸分子は、前記複数のパーティション間において、前記複数のパーティションにおける 1 パーティション当たり平均 1 核酸分子よりも大きい密度で分布される、項目 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 4 1]

前記反応混合物が第 3 の核酸分子及び更なる第 2 のプライマーを含み、前記第 3 の核酸分子が前記更なる第 2 のプライマーに結合する前に、前記核酸分子又はその誘導体が前記複数の第 1 のプライマーの少なくとも 9 9 % に結合される、項目 2 9 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 2]

(c) は、(b) の速度よりも少なくとも 1 0 倍速い速度で行なわれる、項目 2 9 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 4 3]

前記第 2 のプライマーは、(c) の速度に対して (b) の速度を制限する所定の濃度を前記反応混合物において有する、項目 2 9 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。[項目 4 4]

前記反応混合物は、前記表面に固定化されない更なる第 1 のプライマーを更に含み、前記更なる第 1 のプライマーが前記第 1 の配列に対して配列同一性を有する、項目 2 9 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 5]

前記反応混合物は、前記第 1 のプライマー又は前記第 2 のプライマーとのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 反応で使用されるときに前記核酸分子を指数関数的に増幅するように構成される複数の第 3 のプライマーを更に含む、項目 2 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 4 6]

前記反応混合物が第 4 のプライマーを更に含み、前記第 4 のプライマーが第 3 の部分及び第 4 の部分を含み、前記第 3 の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第 2 の部分が第 2 の伸長配列を含み、前記方法は、

(d) 前記核酸分子及び前記第 4 のプライマーを使用して第 2 の伸長産物を生成するステップであって、第 2 の伸長が、前記第 3 のプライマーとハイブリダイズするように構成される前記第 2 の伸長配列又はその相補体を含む、ステップと、

(e) 前記複数の第 3 のプライマーを用いて前記第 2 の伸長産物を増幅するステップと、を更に含む、項目 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

[項目 4 7]

(b) 又は (c) が等温条件下で行なわれる、項目 2 9 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 8]

前記表面を回収するとともに、前記核酸分子の増幅産物又はその誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップを更に含む、項目 2 9 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 9]

前記核酸分子は、前記核酸分子の 5 ' 末端に付着される第 1 のアダプターと、前記核酸分

50

子の 3' 末端に付着される第 2 のアダプターとを含む、項目 29 から 48 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 50]

(b) を (c) に対してより遅い事象にする条件に前記反応混合物を供するステップを更に含む、項目 29 から 49 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 51]

前記条件は、前記核酸分子と前記第 2 のプライマーとの間のアニーリング温度にほぼ等しい温度を含む、項目 50 に記載の方法。

[項目 52]

核酸分子を処理するためのシステムであって、(i) 複数の第 1 のプライマーが固定化されて成る表面であって、前記複数の第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性を有する表面と、(i i) 前記核酸分子であって、前記核酸分子が前記第 1 の配列の相補体とは異なる末端配列を含む、前記核酸分子と、(i i i) 第 1 の部分及び第 2 の部分を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第 2 の部分が伸長配列を含み、前記伸長配列又はその相補体が前記第 1 の配列とハイブリダイズするように構成される、第 2 のプライマーと、(i v) 前記核酸分子を使用して核酸伸長反応を行なうように構成される試薬とを含む反応混合物を含む、システム。

10

[項目 53]

前記第 2 のプライマーは、前記核酸分子に結合して、前記伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するように構成される、項目 52 に記載のシステム。

20

[項目 54]

前記反応混合物は、第 2 の核酸分子及び更なる第 2 のプライマーを含み、前記核酸分子又はその誘導体は、前記第 2 の核酸分子が前記更なる第 2 のプライマーに結合する前に前記複数の第 1 のプライマーの少なくとも 99% に結合するように構成される、項目 53 に記載のシステム。

[項目 55]

前記第 2 のプライマーは、前記核酸分子が前記第 2 のプライマーに結合して伸長産物を生成する速度を、前記伸長産物が前記表面上で増幅される速度に対して制限する所定の濃度を前記反応混合物において有する、項目 53 から 54 のいずれか一項に記載のシステム。

30

[項目 56]

前記第 2 のプライマーが前記表面に固定化される、項目 52 から 55 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 57]

前記表面が増幅部位のアレイを含み、増幅部位の前記アレイは、それに固定化される第 1 のプライマーの複数のセットを含み、第 1 のプライマーの前記複数のセットが前記第 1 の配列に対して配列同一性を有し、前記核酸分子は、前記反応混合物における増幅部位の前記アレイに流体アクセスできる、項目 52 から 56 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 58]

前記表面がビーズである、項目 52 から 57 のいずれか一項に記載のシステム。

40

[項目 59]

エマルジョンを更に含み、前記反応混合物が前記エマルジョンのある量の分散相に与えられ、前記エマルジョンは、第 2 の表面を含む第 2 の反応混合物を含む第 2 の量の前記分散相を含む、項目 52 から 58 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 60]

前記反応混合物が複数の核酸分子を含み、前記複数の核酸分子が異なる核酸配列を含む核酸分子を含み、前記複数の核酸分子のそれぞれは、前記第 2 のプライマーに結合して、前記伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するように構成される、項目 52 から 59 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 61]

50

複数の反応混合物を含む複数のパーティションを更に含み、前記複数のパーティションは、(i) 前記核酸分子を含む複数の核酸分子と、(i i) 前記表面を含む複数の表面とを含み、前記複数のパーティションのうちの第 1 のパーティションが前記反応混合物を含み、前記複数のパーティションのうちの第 2 のパーティションは、前記複数の核酸分子のうちの第 2 の核酸分子と前記複数の表面のうちの第 2 の表面とを含み、前記複数の核酸分子は、前記複数のパーティション間において、前記複数のパーティションにおける 1 パーティション当たり平均 1 核酸分子よりも大きい密度で分布される、項目 5 2 から 6 0 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 6 2]

前記反応混合物は、前記表面に固定化されない更なる第 1 のプライマーを更に含み、項目 5 2 から 6 1 のいずれか一項に記載のシステム。

10

[項目 6 3]

前記反応混合物は、(i) 前記第 1 のプライマー又は前記第 2 のプライマーとのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 反応で使用されるときに前記核酸分子を指数関数的に増幅するように構成される複数の第 3 のプライマー、(i i) 及び第 4 のプライマーを更に含み、前記第 4 のプライマーが第 3 の部分及び第 4 の部分を含み、前記第 3 の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第 4 の部分が第 2 の伸長配列を含む、項目 5 2 から 6 2 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 6 4]

前記核酸分子の配列を同定するために前記核酸分子の増幅産物又はその誘導体をアッセイするように構成される 1 つ以上のプロセッサを個別に又は集合的に更に備える、項目 5 2 から 6 3 のいずれか一項に記載のシステム。

20

[項目 6 5]

前記表面が複数の増幅部位を含み、前記増幅部位のそれぞれが前記表面に付着される異なる第 1 のプライマーの複数のコピーを有する、項目 5 2 から 6 4 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 6 6]

前記核酸分子は、前記核酸分子の 5 ' 末端に付着される第 1 のアダプターと、前記核酸分子の 3 ' 末端に付着される第 2 のアダプターとを含む、項目 5 2 から 6 5 のいずれか一項に記載のシステム。

30

[項目 6 7]

核酸サンプルをクローン的に増幅するための方法であって、

(a) 複数のパーティションを含むエマルジョンを形成するステップであって、前記複数のパーティションのうちの 1 つのパーティションが、(i) 核酸分子と、(i i) 複数の第 1 のプライマーが固定化されて成るビーズであって、前記複数の第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性を有する、ビーズと、(i i i) 前記核酸分子又はその誘導体が前記ビーズに付着できるようにする付着反応と前記複数の第 1 のプライマーを使用する増幅反応とを実行するように構成される試薬混合物を含む、ステップと、

(b) 前記エマルジョンをインキュベートし、それにより、(i) 前記核酸分子又はその誘導体を前記ビーズに付着させるために前記付着反応を実行する、及び、(i i) 前記増幅反応を行なって、前記ビーズに付着される前記核酸分子又はその誘導体のコピーを生成する、ステップと、

40

を含み、

第 1 の期間が第 2 の期間よりも長く、前記第 1 の期間は、(b) でのインキュベートする前記ステップから始まるとともに、前記核酸分子又はその誘導体が前記ビーズに付着するときに終了し、前記第 2 の期間は、前記核酸分子又はその誘導体が前記ビーズに付着するときに始まるとともに、前記増幅反応が終了するときに終了する、

方法。

[項目 6 8]

前記第 1 の期間は、前記第 2 の期間よりも少なくとも約 5 倍長い、項目 6 7 に記載の方

50

法。

[項目 6 9]

核酸分子に付着するように構成される担体を調製するための方法であって、

(a) 複数の担体及び複数の伸長基を含む混合物を与えるステップであって、前記複数の担体のうちの 1 つの担体が第 1 のプライマーを含み、前記複数の伸長基のうちの 1 つの伸長基が伸長プライマー分子を含む、ステップと、

(b) 前記担体の前記第 1 のプライマーを前記伸長基の前記伸長プライマーに付着させるのに十分な条件に前記混合物を供して、(i) 前記複数の伸長基と会合されない非伸長担体と、(i i) 前記伸長基と会合される伸長担体及びキャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成されるキャプチャエンティティを含む、結果として生じる混合物を生成するステップであって、前記伸長担体が、前記伸長プライマー分子の配列に対して相補的な配列を含む第 2 のプライマーを含む、ステップと、

(c) 前記キャプチャリングエンティティを使用して前記キャプチャエンティティを捕捉することによって前記結果として生じる混合物から前記伸長担体を単離するステップと、を含む方法。

10

[項目 7 0]

前記伸長基を前記伸長担体から解離するステップを更に含む、項目 6 9 に記載の方法。

[項目 7 1]

鑄型付着担体を生成するために前記核酸分子を前記第 2 のプライマーにアニールするステップを更に含む、項目 6 9 から 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 7 2]

前記鑄型付着担体をパーティションで仕切るステップを更に含む、項目 7 1 に記載の方法。

[項目 7 3]

増幅反応を行なって、前記核酸分子の複数の増幅産物を前記伸長担体に固定化するステップを更に含む、項目 7 1 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 4]

前記担体がビーズを含む、項目 6 9 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 5]

前記担体が複数の第 1 のプライマーを含み、前記複数の第 1 のプライマーが前記第 1 のプライマーを含む、項目 6 9 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 7 6]

(i) 前記キャプチャエンティティがビオチンを含み、前記キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含み、(i i) 前記キャプチャエンティティがキャプチャ配列を含み、前記キャプチャリングエンティティが前記キャプチャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含み、(i i i) 前記キャプチャエンティティが磁性粒子を含み、前記キャプチャリングエンティティが磁場系を含み、又は、(i v) 前記キャプチャエンティティが荷電粒子を含み、前記キャプチャリングエンティティが電場系を含む、項目 6 9 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 7]

(a) において、前記伸長基が前記キャプチャエンティティを含む、項目 6 9 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

[項目 7 8]

(b) は、前記キャプチャエンティティを含むヌクレオチドを組み込むために前記第 1 のプライマーを使用して伸長反応を行なうステップを含む、項目 6 9 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 7 9]

(c) は、

(i) 前記キャプチャリングエンティティ及び(i i) 二次キャプチャリングエンティティにより捕捉するように構成される二次キャプチャエンティティを含むキャプチャリン

50

グ基を与えるステップと、

前記キャプチャリングエンティティを使用して前記キャプチャエンティティを捕捉することによって前記キャプチャリング基を前記伸長担体と会合させるステップと、

前記二次キャプチャリングエンティティを使用して前記二次キャプチャエンティティを捕捉することによって前記結果として生じる混合物から前記伸長担体を単離するステップと、

を含む項目 6 9 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 0]

核酸分子に付着するように構成される担体を調製するための方法であって、

(a) 複数の非伸長担体と複数の伸長担体とを含む混合物を与えるステップであって、前記複数の非伸長担体のうちの 1 つの非伸長担体がプライマー配列を含み、前記複数の伸長担体のうちの 1 つの伸長担体が前記プライマー配列を含み、前記プライマー配列が前記核酸分子に付着するように構成される、ステップと、

(b) (i) キャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成されるキャプチャエンティティ、及び、(i i) 前記伸長担体の前記プライマー配列及び前記キャプチャ基の前記配列を使用して前記伸長担体を前記キャプチャ基と会合させるべく前記プライマー配列を前記混合物に付着させるように構成される配列を含む、キャプチャ基を与えるステップと、

(c) 前記キャプチャリングエンティティを使用して前記キャプチャエンティティを捕捉することによって前記結果として生じる混合物から前記伸長担体を単離するステップと、を含む方法。

[項目 8 1]

担体を調製するための方法であって、

(a) 複数の担体及び複数の鋳型核酸分子を含む混合物を与えるステップであって、前記複数の担体のうちの 1 つの担体が複数のプライマーを含み、前記複数の鋳型核酸分子のうちの 1 つの鋳型核酸分子が、前記複数のプライマーのうちの 1 つのプライマーに付着するように構成されるアダプターを含む、ステップと、

(b) 前記担体の前記プライマーを前記鋳型核酸分子の前記アダプターに付着させるのに十分な条件に前記混合物を供して、(i) 前記複数の鋳型核酸分子と会合されない非伸長担体と、(i i) 前記鋳型核酸分子に結合されるキャプチャエンティティと会合される伸長担体とを含む結果として生じる混合物を生成するステップであって、前記キャプチャエンティティがキャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成され、前記伸長担体が、前記鋳型核酸分子の配列に対して相補的な配列を含む核酸分子を含み、前記伸長担体上の前記複数のプライマーの少なくとも 5 0 % が前記複数の鋳型核酸分子と会合されない、ステップと、

(c) 前記キャプチャリングエンティティを使用して前記キャプチャエンティティを捕捉することによって前記結果として生じる混合物から前記伸長担体を単離するステップと、

(d) 複数の伸長担体を複数の液滴に分割するステップであって、前記複数の伸長担体が前記伸長担体を含み、前記複数の液滴のうちの 1 つの液滴が前記伸長担体を含む、ステップと、

を含む方法。

[項目 8 2]

前記伸長担体上の前記複数のプライマーの少なくとも 8 0 % が前記複数の鋳型核酸分子と会合されない、項目 8 1 に記載の方法。

[項目 8 3]

前記鋳型核酸分子を前記伸長担体から解離させるステップを更に含む、項目 8 1 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 4]

前記担体がビーズを含む、項目 8 1 から 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 5]

10

20

30

40

50

(i) 前記キャプチャエンティティがビオチンを含み、前記キャプチャリングエンティティがストレプトアビジンを含み、(i i) キャプチャ配列であって、前記キャプチャリングエンティティが前記キャプチャ配列に対して相補的なキャプチャ配列を含む、キャプチャ配列、(i i i) 磁性粒子であって、前記キャプチャリングエンティティが磁場系を含む、磁性粒子、又は、(i v) 荷電粒子であって、前記キャプチャリングエンティティが電場系を含む、荷電粒子、項目 8 1 から 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 6]

(c) は、

(i) 前記キャプチャリングエンティティ及び(i i) 二次キャプチャリングエンティティにより捕捉するように構成される二次キャプチャエンティティを含むキャプチャリング基を与えるステップと、

10

前記キャプチャリングエンティティを使用して前記キャプチャエンティティを捕捉することによって前記キャプチャリング基を前記伸長担体と会合させるステップと、

前記二次キャプチャリングエンティティを使用して前記二次キャプチャエンティティを捕捉することによって前記結果として生じる混合物から前記伸長担体を単離するステップと、

を含む項目 8 1 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 7]

(a) において、前記鋳型核酸分子が前記キャプチャエンティティを含む、項目 8 1 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 8 8]

(b) は、前記キャプチャエンティティを含むヌクレオチドを組み込むために前記プライマーを使用して伸長反応を行なうステップを含む、項目 8 1 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 9]

前記液滴は、前記複数の伸長担体のうちの単一の伸長担体を含み、前記単一の伸長担体が前記伸長担体である、項目 8 1 から 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9 0]

前記複数の液滴の占有液滴の大部分が、前記複数の伸長担体のうちの単一の伸長担体を含む、項目 8 1 から 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 9 1]

前記複数の液滴が非占有液滴を含み、前記非占有液滴が前記複数の伸長担体のいずれの伸長担体も含まない、項目 8 1 から 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9 2]

(d) は、混合物を分割するステップであって、前記混合物が前記複数の伸長担体を含み、前記混合物が非伸長担体よりも多くの伸長担体を含む、ステップを含む、項目 8 1 から 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9 3]

前記混合物中の実質的に全ての担体が伸長担体である、項目 9 2 に記載の方法。

40

【図面】

【図 1】

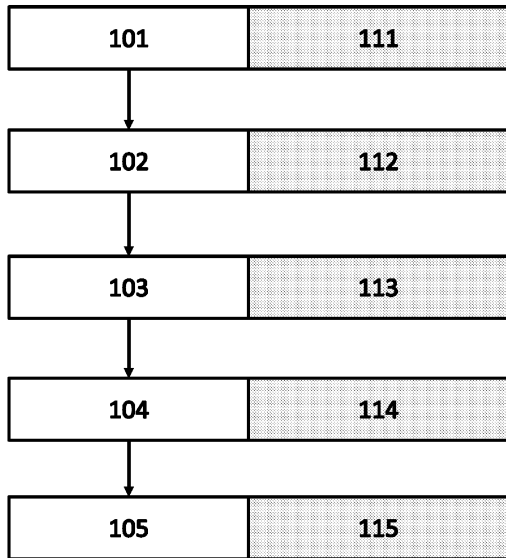
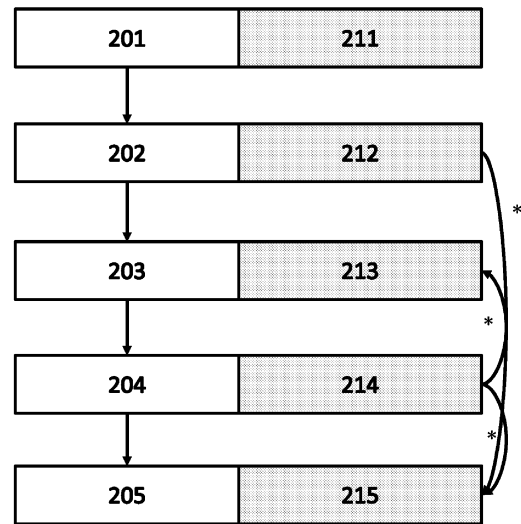


FIG. 1

【図 2】



* 必要性を低減又は排除

FIG. 2

【図 3】

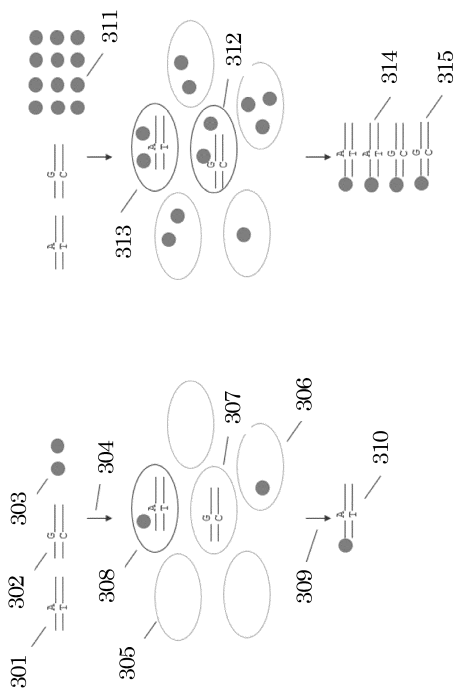


FIG. 3

【図 4】

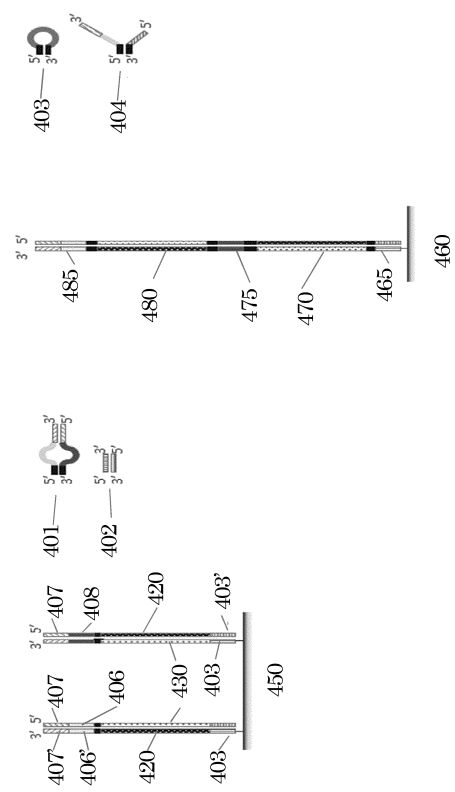
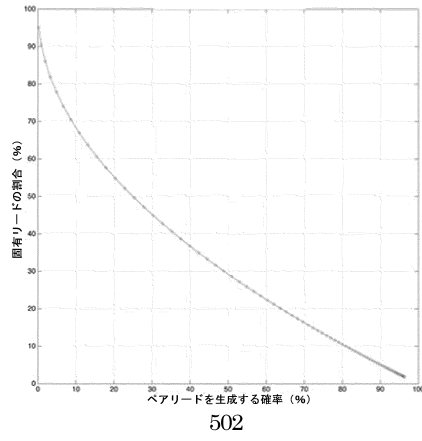


FIG. 4

【図 5 A】

FIG. 5A

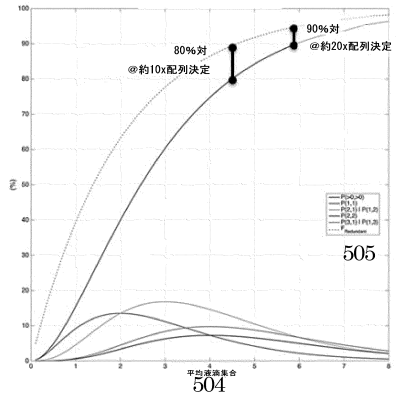
501



【図 5 B】

FIG. 5B

503



【図 6】

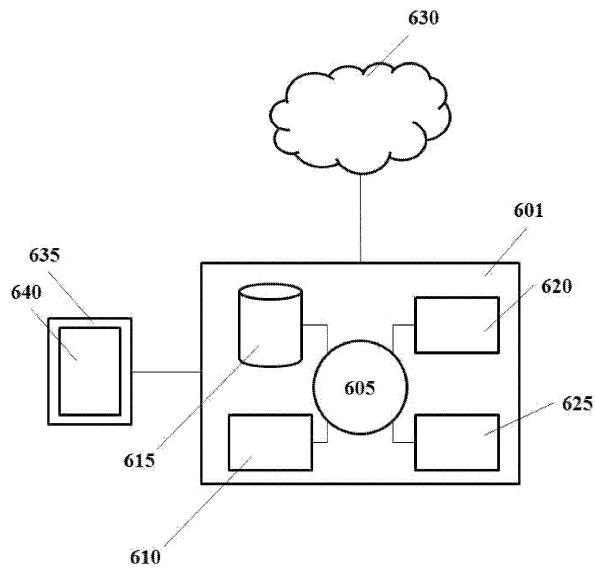


FIG. 6

【図 7】

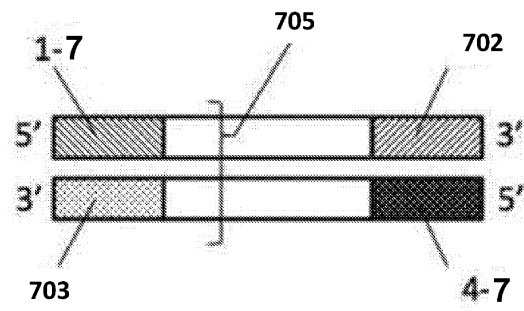


FIG. 7

10

20

30

40

50

【図 8】

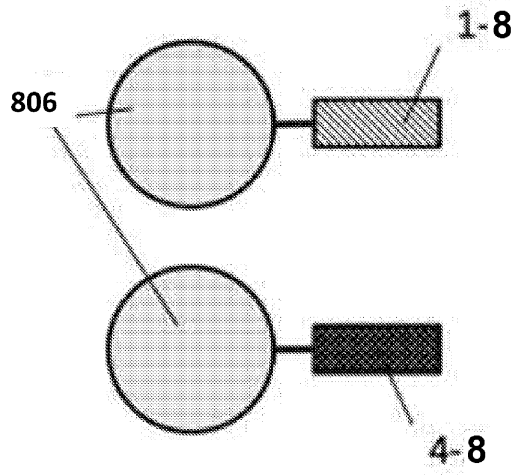


FIG. 8

【図 9】

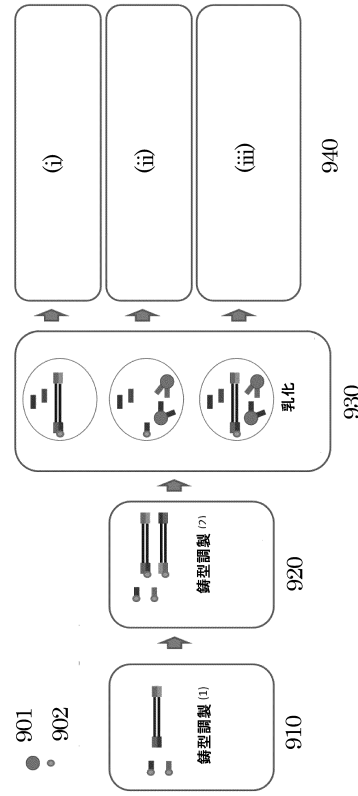


FIG. 9

【図 10 A】

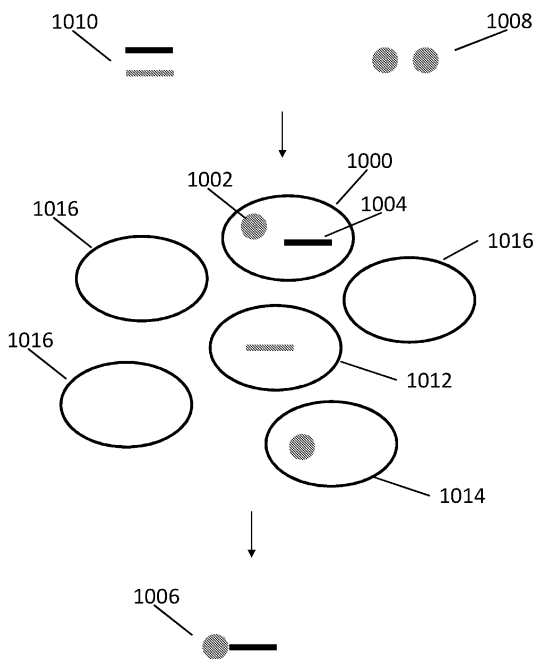


FIG. 10A

【図 10 B】

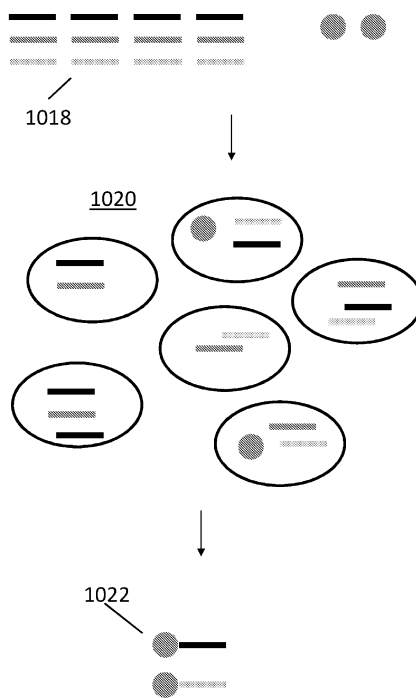


FIG. 10B

10

20

30

40

50

【図 10 C】

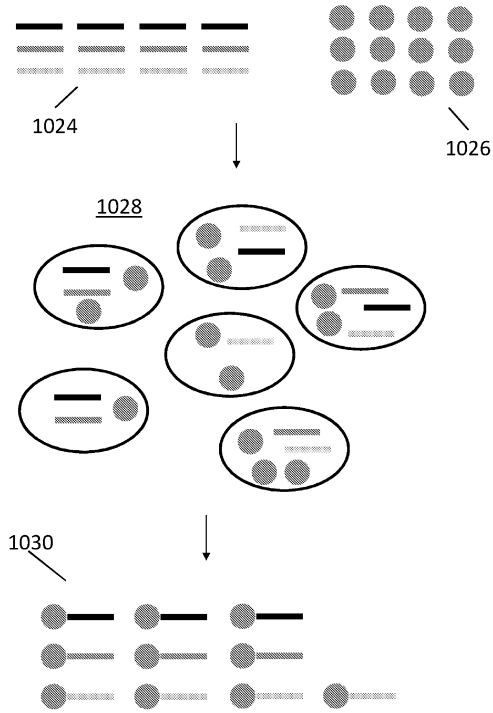


FIG. 10C

【図 11】

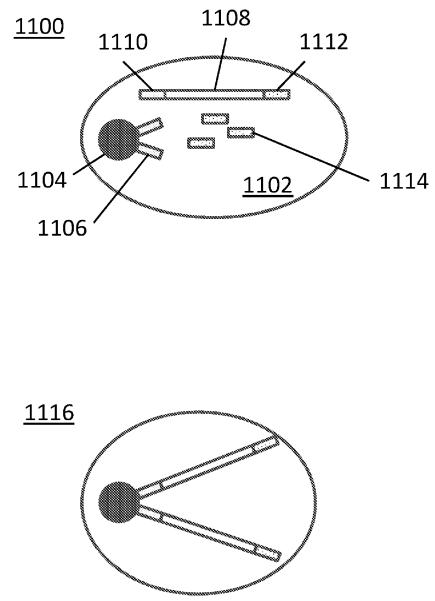


FIG. 11

【図 12】

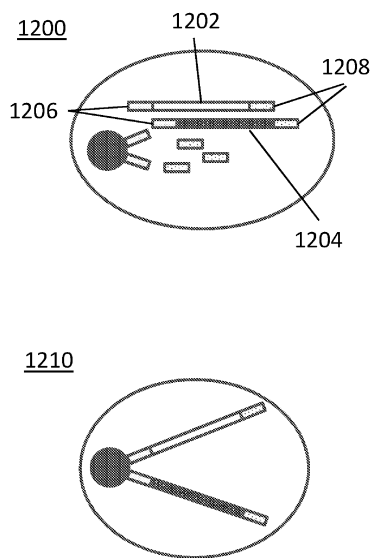


FIG. 12

【図 13】

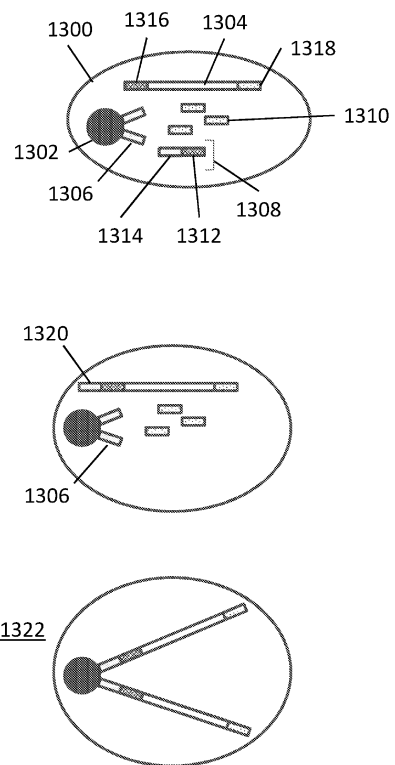


FIG. 13

10

20

30

40

50

【図 14】

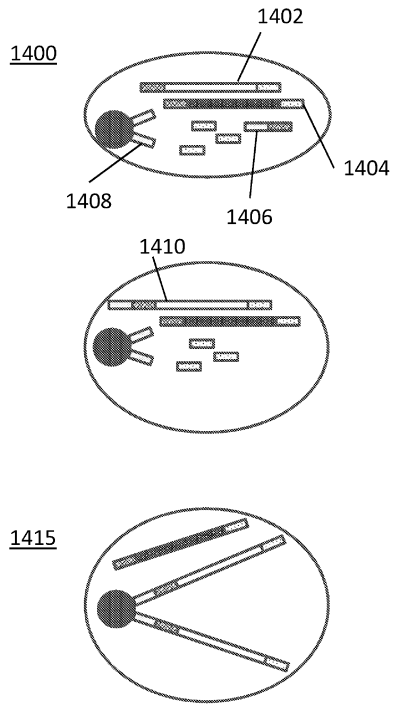


FIG. 14

【図 15 A】

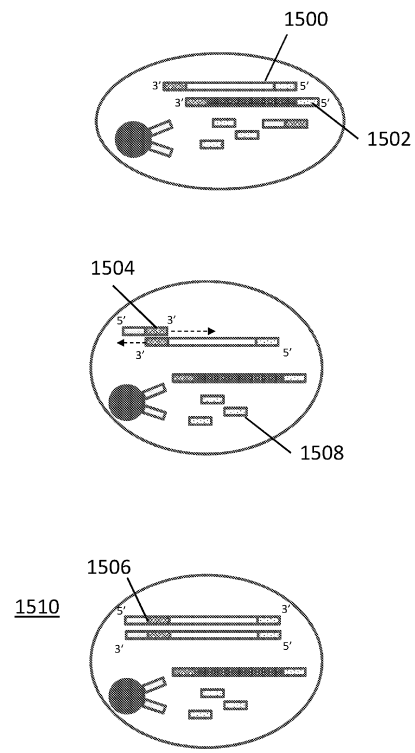


FIG. 15A

【図 15 B】

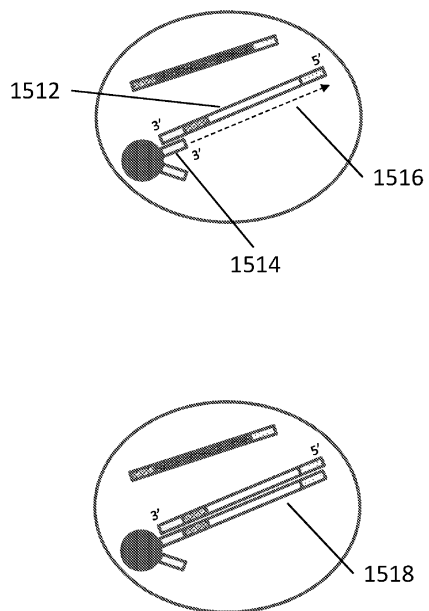


FIG. 15B

【図 15 C】

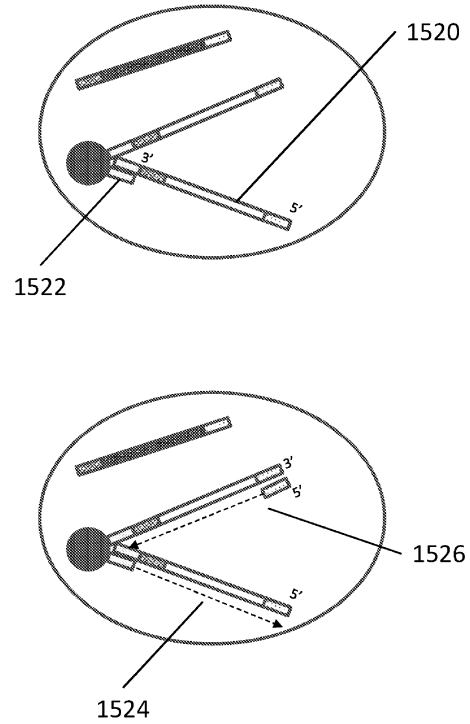


FIG. 15C

10

20

30

40

50

【図 16 A】

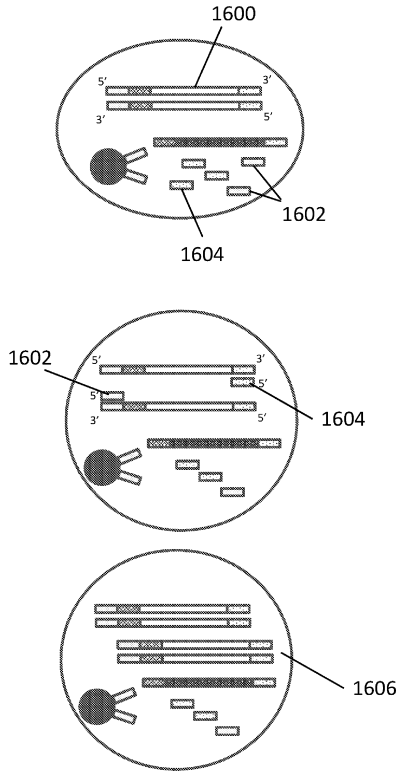


FIG. 16A

【図 16 B】

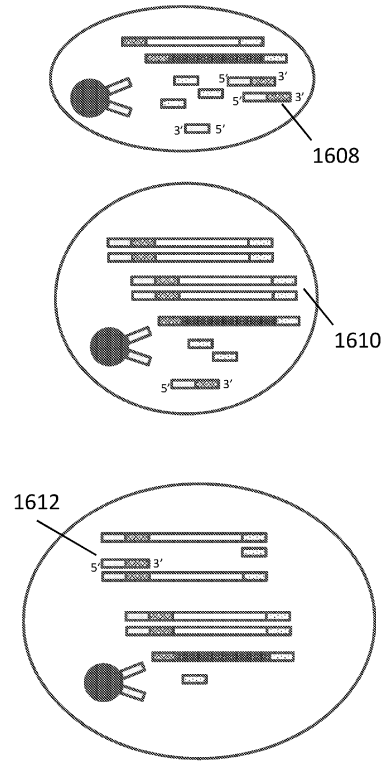


FIG. 16B

【図 17 A】

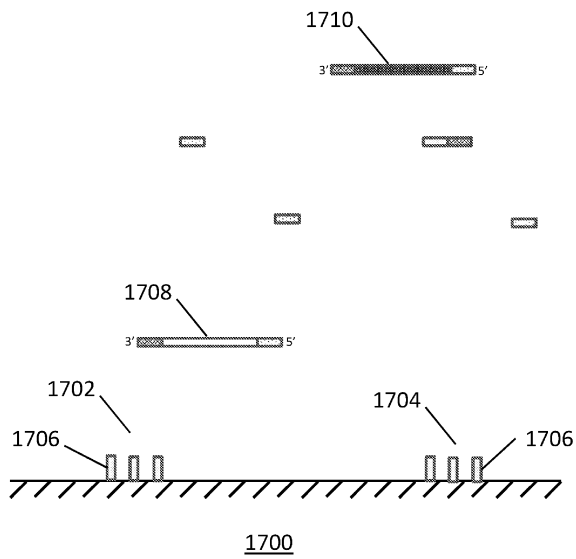


FIG. 17A

【図 17 B】

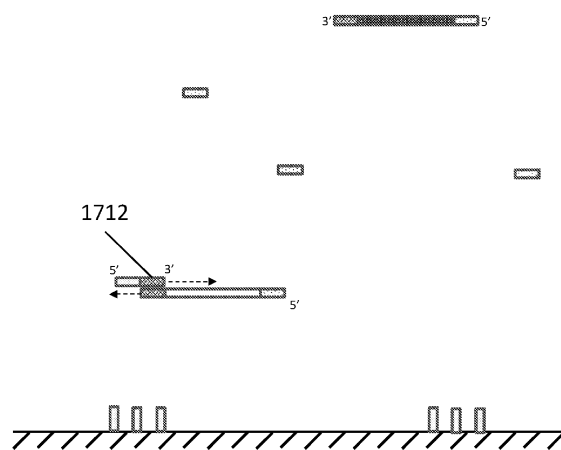


FIG. 17B

【 1 7 C 】

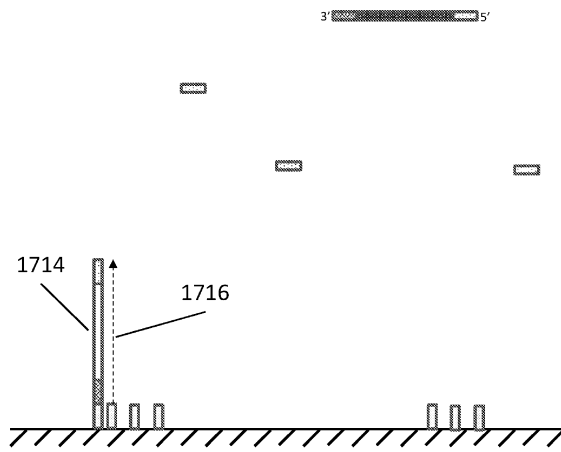


FIG. 17C

【 1 7 D 】

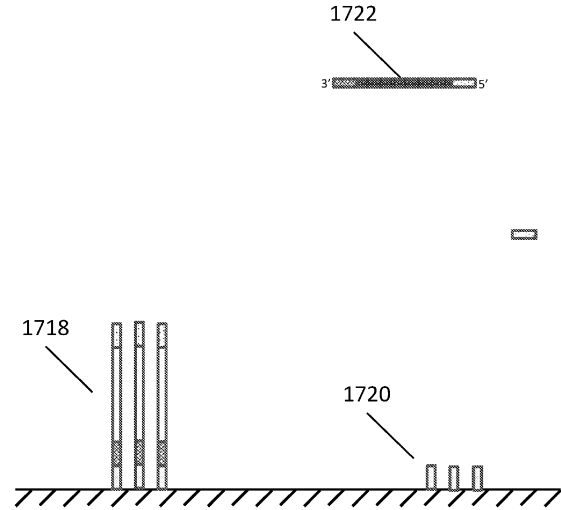


FIG. 17D

【 1 8 A 】

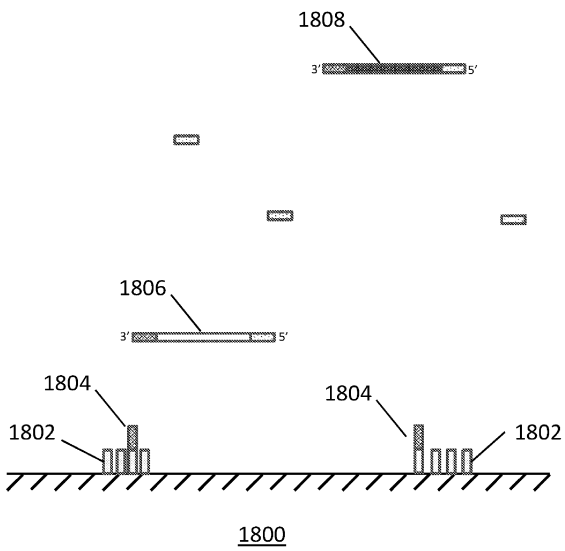


FIG. 18A

【 1 8 B 】

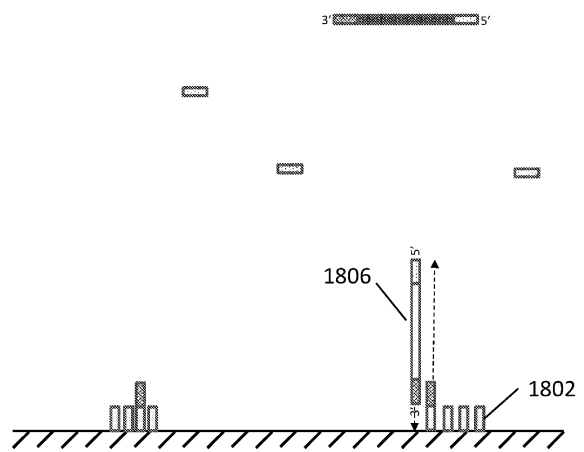


FIG. 18B

【 1 8 C 】

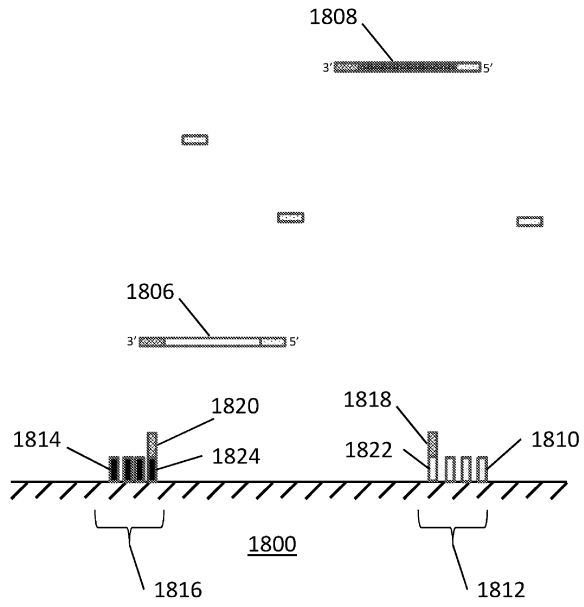


FIG. 18C

【 1 8 D 】

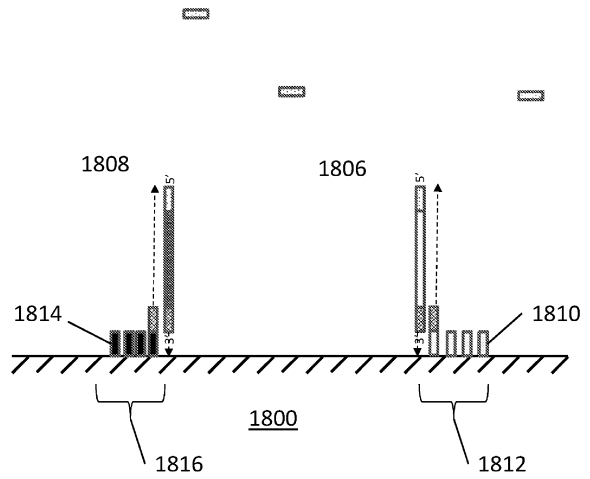


FIG. 18D

【 1 8 E 】

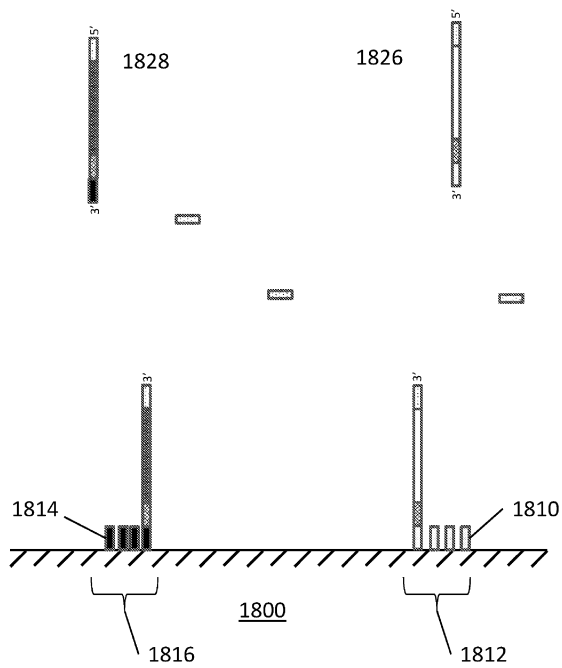


FIG. 18E

【 1 9 A 】

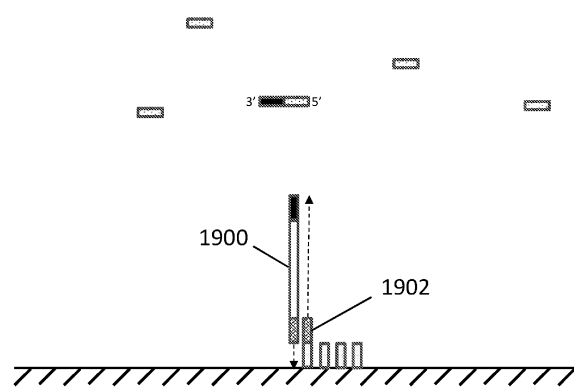


FIG. 19A

10

20

30

40

50

【図 19 B】

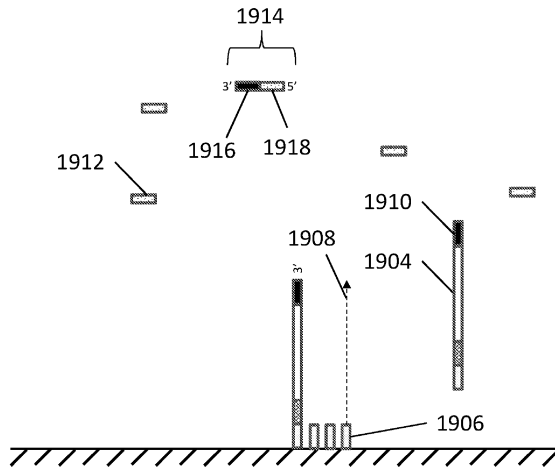


FIG. 19B

【図 19 C】

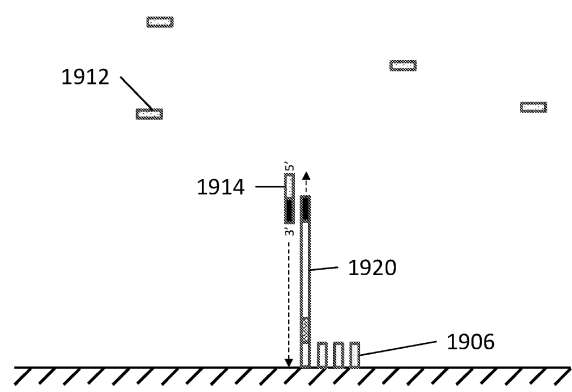


FIG. 19C

【図 19 D】

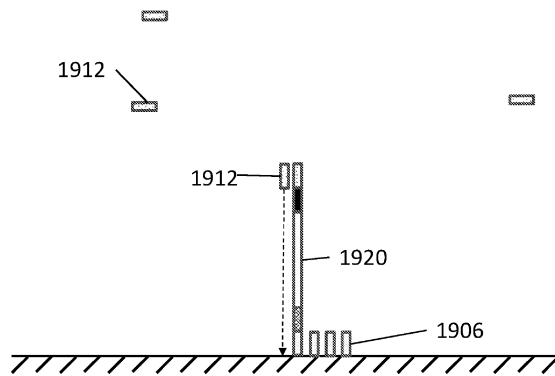


FIG. 19D

【図 20】

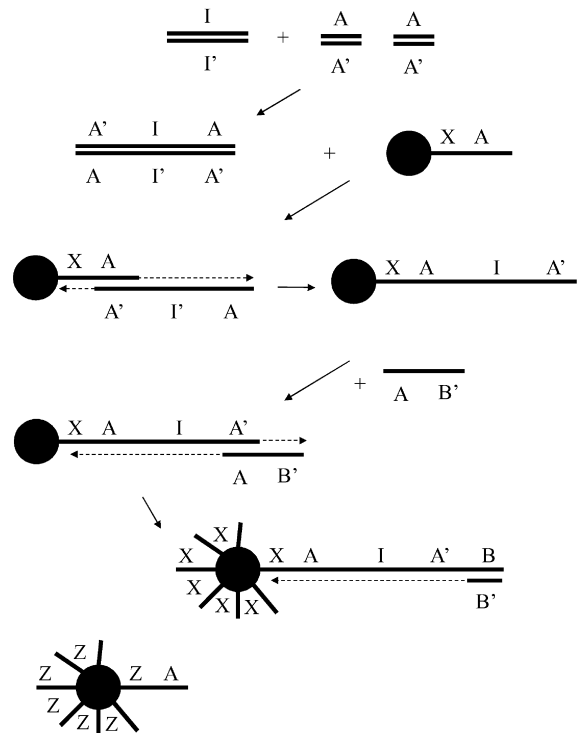


FIG. 20

10

20

30

40

50

【図 2 1】

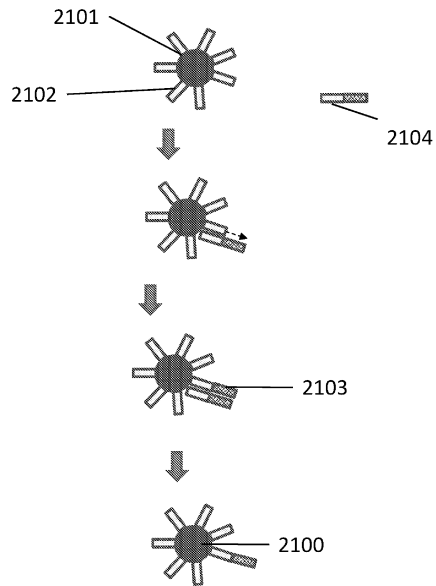


FIG. 21

【図 2 2 A】

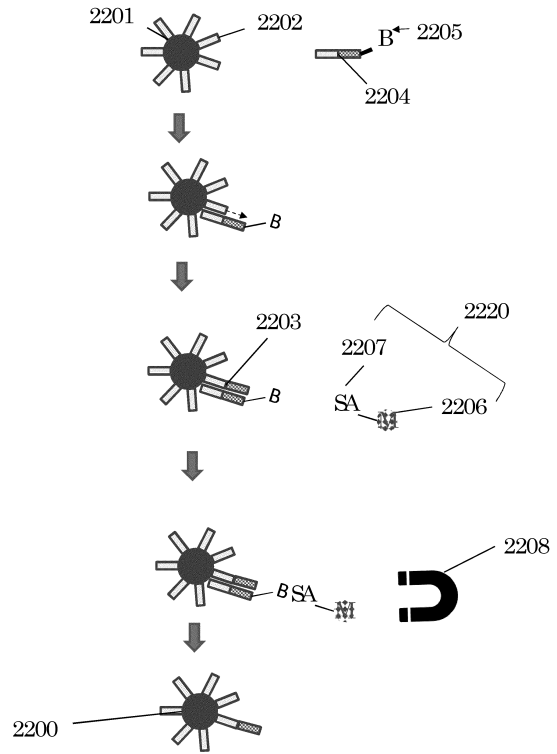


FIG. 22A

【図 2 2 B】

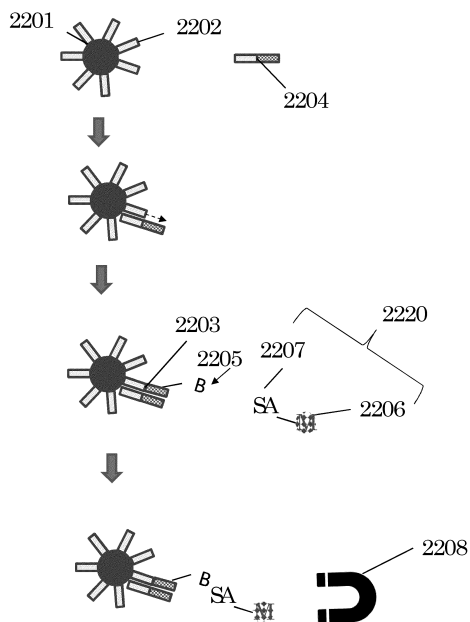


FIG. 22B

【図 2 3】

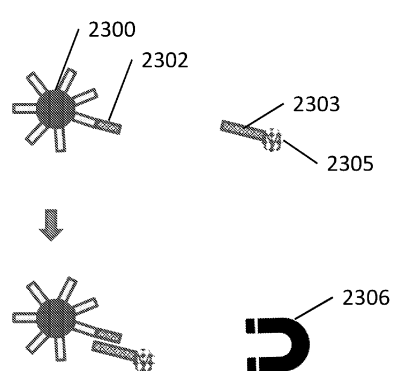


FIG. 23

10

20

30

40

50

【図 24 A】

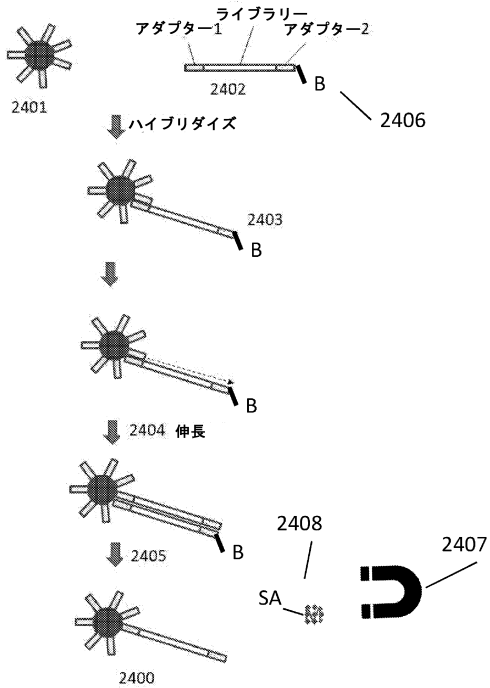


FIG. 24A

【図 24 B】

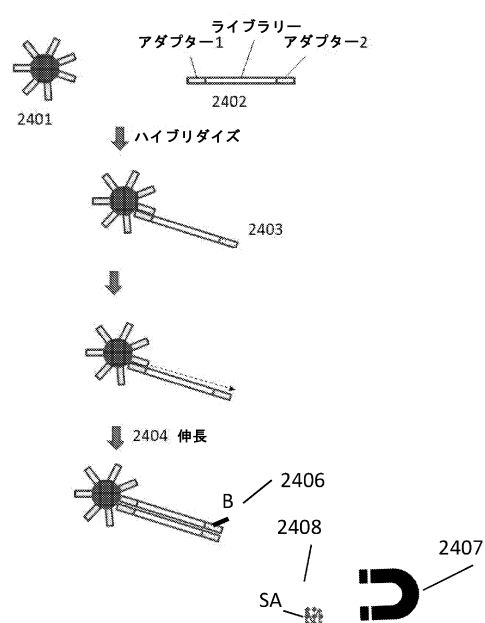


FIG. 24B

【図 25】

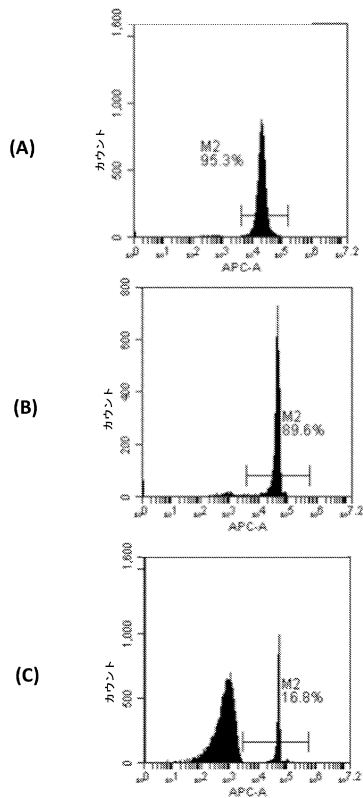


FIG. 25

【図 26】

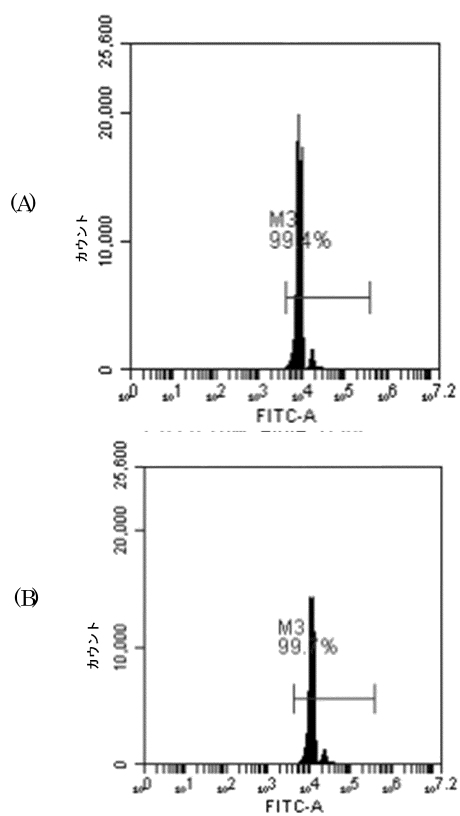


FIG. 26

10

20

30

40

50

【図 27】

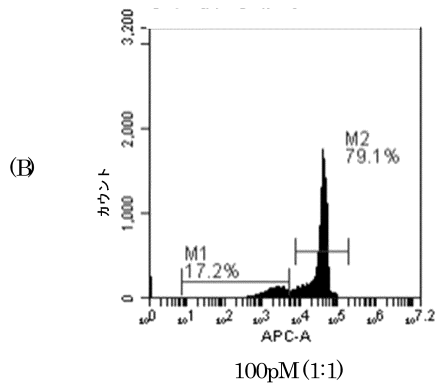
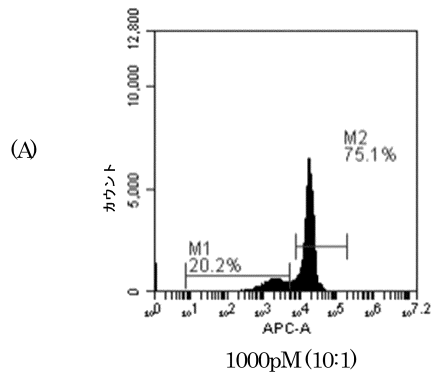


FIG. 27

【図 28】

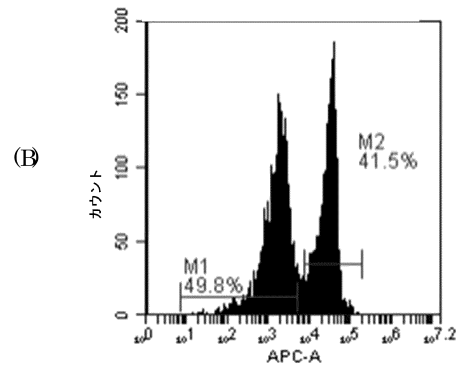
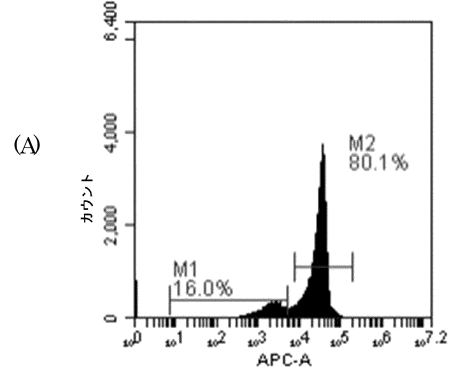
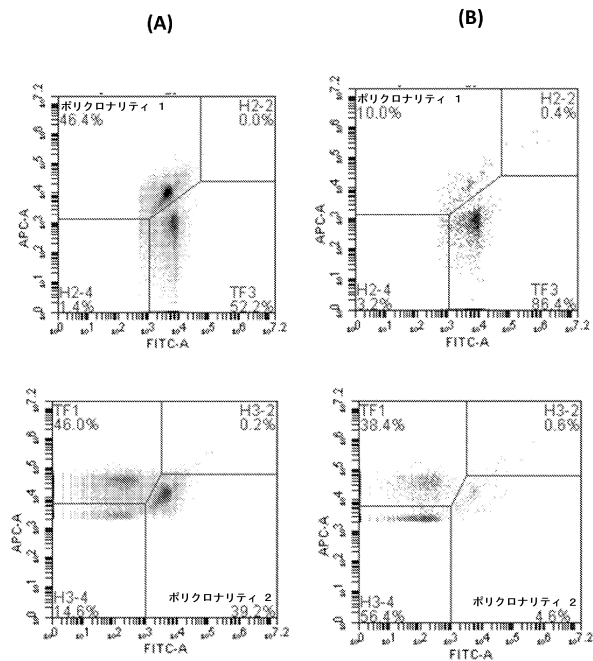


FIG. 28

【図 29】



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)

(31)優先権主張番号 62/916,683

(32)優先日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100137213

弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 アルモギー, ギラッド

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94560、ニューアーク、ゲートウェイ・ブルバード・7979、スイート・101

(72)発明者 オーバーシュトラース, フロリアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94560、ニューアーク、ゲートウェイ・ブルバード・7979、スイート・101

(72)発明者 バラッド, オーマー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94560、ニューアーク、ゲートウェイ・ブルバード・7979、スイート・101

(72)発明者 シー, チャンダン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94560、ニューアーク、ゲートウェイ・ブルバード・7979、スイート・101

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2019-500009(JP,A)

特表2015-528283(JP,A)

国際公開第2014/186152(WO,A1)

特開2018-183097(JP,A)

PLoS ONE, 2015年, Vol.10, No.5, e0126501, pp.1-10

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

C12M 1/00 - 3/10

Caplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

P u b M e d