

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6510978号
(P6510978)

(45) 発行日 令和1年5月8日 (2019. 5. 8)

(24) 登録日 平成31年4月12日 (2019. 4. 12)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/6869 (2018. 01)

C 1 2 M 1/00 (2006. 01)

G O 1 N 33/53 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 M 1/00 A

G O 1 N 33/53 M

請求項の数 17 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2015-537798 (P2015-537798)	(73) 特許権者	507051972
(86) (22) 出願日	平成25年10月16日 (2013. 10. 16)		アボット・モレキュラー・インコーポレイ
(65) 公表番号	特表2015-533503 (P2015-533503A)		テッド
(43) 公表日	平成27年11月26日 (2015. 11. 26)		アメリカ合衆国、イリノイ・60018、
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/065289		デス・プレーンズ、イースト・トウイ・ア
(87) 国際公開番号	W02014/062835		ベニユー・1300
(87) 国際公開日	平成26年4月24日 (2014. 4. 24)	(74) 代理人	110001173
審査請求日	平成28年10月14日 (2016. 10. 14)		特許業務法人川口国際特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/741, 789	(72) 発明者	ヘイデン、マーク・エイ
(32) 優先日	平成24年10月16日 (2012. 10. 16)		アメリカ合衆国、イリノイ・60041、
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イングルサイド、ウエスト・シダーウッド
前置審査			・レイン・25059
		審査官	千葉 直紀
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸を配列決定する方法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

マイクロトランスポンダ上にキャプチャされたターゲットヌクレオチド塩基の配列を、複数のシーケンシング - バイ - シンセシス反応にかけて、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合する単一のヌクレオチド塩基の配列を連続的に付加することと、ここで、前記付加されたヌクレオチド塩基の少なくとも1つは、標識を含み

各配列決定反応の後に、付加された各ヌクレオチド塩基を識別することと、前記配列の付加された各ヌクレオチド塩基を、前記マイクロトランスポンダの識別番号と関連付けることと
を含む、核酸を配列決定する方法であって、

前記方法は、前記マイクロトランスポンダの前記識別番号と、前記ヌクレオチド配列に付加されたヌクレオチド塩基に関連付けられた前記標識との両方を識別するフローメータの使用を含み、各配列決定反応の後、前記マイクロトランスポンダが前記フローメータを通して、そこで、マイクロトランスポンダが識別され、前記標識が検出される、方法。

【請求項 2】

ターゲットヌクレオチド塩基が、キャプチャプローブを介してキャプチャされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ターゲットヌクレオチド塩基が、DNA または RNA を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ターゲットヌクレオチド塩基をクローン増幅することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記クローン増幅が、配列決定反応の前に、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも 1 つが光学標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも 1 つが電気化学標識を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記識別が、付加された前記塩基とともに前記マイクロトランスポンダを、装置の反応ステーションから、前記フローメータを用いる前記装置の識別ステーションに移動させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記識別ステーションが、付加された前記塩基を検出するディテクタを含み、前記ディテクタは、1 つ以上の光学信号、電気信号、および化学信号を検出する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

付加された前記塩基が、蛍光、発光、pH、熱、水素イオン濃度、ピロホスフェート濃度および放射活性の変化によって検出される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

単一の標識が、付加される複数のヌクレオチド塩基に用いられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

種々の複数の標識が、付加される各ヌクレオチド塩基に用いられて、付加された種々のヌクレオチド塩基を区別する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

付加される前記塩基が、単一の塩基として付加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

付加される前記塩基が、オリゴヌクレオチドとして付加される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

オリゴヌクレオチドが、最大約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

複数のマイクロトランスポンダを、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイに用いることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

微流量チップデバイスにおける方法の少なくとも一部を実行することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本開示は、一般に医学的診断装置、より詳細には核酸を配列決定する方法および装置に関する。

【背景技術】**【0002】**

核酸は、ヌクレオチドと呼ばれるユニットがリンクした鎖によって形成される。ヌクレ

10

20

30

40

50

オチドは、連結されて、核酸であるリボ核酸 (RNA) およびデオキシリボ核酸 (DNA) の構造ユニットを生じる分子である。ヌクレオチドは、リン酸基、糖 (RNA の場合はリボース、そして DNA ではデオキシリボース) および核酸塩基を含む。核酸塩基は、ヌクレオチドストランドの塩基対形成に用いられて、周知の二重螺旋のようなより高次の構造を形成する。DNA に見られる 4 つの塩基は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) およびチミン (T) である。DNA 二重螺旋において、一方のストランド上の各タイプの核酸塩基は、通常、他方のストランド上の 1 タイプの核酸塩基とだけしか相互作用せず、これは、相補的な塩基対形成として知られている。具体的に、A は T にのみ結合し、そして C は G にのみ結合する。RNA 核酸塩基は、チミンの代わりにウラシル (U) を含む。DNA および RNA の重要性のため、DNA または RNA 配列についての知識は、多くの目的 (例えば、病的疾患、伝染性疾患、または遺伝的疾患の治療を識別し、診断し、かつ開発することが挙げられる) のために、有用である。

10

【0003】

核酸配列決定ケミストリとして、シーケンシング - バイ - シンセシス (sequencing-by-synthesis) (SBS) またはシーケンシング - バイ - ライゲーション (sequencing-by-ligation) (SBL) 戦略が挙げられる。これらの戦略は、一般的に、配列アイデンティティデータを追跡するために、ランダムな、または規則的な 2 次元 (2D) アレイを用いる。これらのアレイ密度は極めて高く、 10^5 から 10^7 のフィーチャ (feature) に及ぶ (または単一分子の検出ではより高くなる)。ヌクレオチド鎖がポリメラーゼ (SBS) またはリガーゼ (SBL) の作用で増えるのに従い、標識が組み込まれて、リーダによって検出される。標識を伴う塩基または核酸が識別されると、2D 光学画像をキャプチャすることによって、塩基は、アレイ上のフィーチャが割り当てられる。しかしながら、これらの高密度アレイからスペクトルデータを分離するために必要な光学分割 (optical resolution) は、非常に長い露光時間を必要とし、平均ラン時間が数時間から数日となる。また、継続的な配列決定サイクルから得られる光学画像は、容易にテラバイトサイズに達し得、アルゴリズムの計算時間およびデータストレージに対する要求が大きくなる。

20

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】図1は、例となるマイクロトランスポンダ (microtransponder) の概略図である。

30

【図2】図2は、図1の例となるマイクロトランスポンダを用いて核酸を配列決定する、例となる系のブロック図である。

【図3】図3は、本明細書中に開示される例となる系を実施するのに用いられてよい、例となる方法を表すフローチャートである。

【図4】図4は、本明細書中に開示される例となる系を実施するのに用いられてよい、例となる方法を表すフローチャートである。

【図5】図5は、図3および/もしくは図4の方法を実行するための命令、ならびに/または、より詳細には、本明細書中に開示される例となる方法、系および/もしくは装置のいずれかもしくは全てを実施するための命令を実行し得る、例となるプロセッサプラットフォームを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0005】

本開示は、例えば、医学的診断装置に用いられるような、核酸を配列決定する方法および装置に関する。本明細書中に開示される例は、マイクロトランスポンダ技術を、シーケンシング - バイ - シンセシス (SBS) またはシーケンシング - バイ - ライゲーション (SBL) ケミストリが挙げられるがこれらに限定されない次世代の配列決定法と組み合わせるによって、生物、遺伝子および/または増幅されたターゲットの核酸配列を決定するのに用いられ得る。これらの例は、病原性生物 (細菌および/またはウイルス) の検出、RNA 検出、DNA 検出、全ゲノムの新規の (de novo) 配列決定、遺

50

伝子発現、一ヌクレオチド多型 (S N P)、および / または次世代の配列決定法がバックエンド検出系として用いられる遺伝的試験のための一般的な診断系および方法として用いられ得る。これらの例は、例えば、臨床診断、院内感染性の感染症診断、疫学的サーベランス、法医学、研究ディスカバリ、および / または他の適切な利用等の多くの用途に用いられ得る。

【 0 0 0 6 】

配列決定法は、当該技術において知られている任意の方法によるものであってよい。ある実施形態において、配列決定法はシーケンシング - バイ - シンセシスである。他の実施形態において、配列決定法は、合成による、単一分子の配列決定法である。そして、一部の実施形態において、配列決定法は、シーケンシング - バイ - ライゲーション (S B L) によるものである。技術によって包含される他の配列決定技術が、至る所で議論されている。シーケンシング - バイ - シンセシスとして、染料標識ヌクレオチドの組込み、鎖ターミネーション法 (c h a i n t e r m i n a t i o n)、イオン / プロトン配列決定法、またはピロホスフェート (p y r o p h o s p h a t e) 配列決定法等が挙げられ得る。単一分子の技術として、配列決定反応が中断されて、組み込まれたヌクレオチドのアイデンティティを決定するスタガード配列決定法 (s t a g g e r e d s e q u e n c i n g) が挙げられ得る。

【 0 0 0 7 】

ある実施形態において、配列決定は、プライマーをテンプレート (例えば、配列決定されるべき核酸) にハイブリダイズさせてテンプレート / プライマーデュプレックスを形成すること、テンプレートに応じてポリメラーゼがヌクレオチドをプライマーに付加するのを可能とする条件下で、検出可能に標識されたヌクレオチドの存在下で、デュプレックスをポリメラーゼ酵素に接触させること、組み込まれた標識ヌクレオチドから信号を検出すること、ならびに当該接触ステップおよび検出ステップを少なくとも 1 回、順次繰り返すことを含み、組み込まれた標識ヌクレオチドの順次的な検出が、核酸の配列を決定する。例示的な検出可能な標識として、放射性標識、金属標識、量子ドット、蛍光標識、発光標識、質量標識、酵素標識等が挙げられる。特定の実施形態において、検出可能な標識は、蛍光標識等の光学的に検出可能な標識であってよい。例示的な蛍光標識 (配列決定用、および / または核酸、プライマー、プローブ等の標識等の他の目的用) として、シアニン、ローダミン、フルオレセイン、クマリン、B O D I P Y、a l e x a または接合型 (c o n j u g a t e d) マルチ染料が挙げられる。

【 0 0 0 8 】

一部の実施形態において、ターゲット核酸 (例えば、DNA および / または RNA) が固定される。例えば、一部の実施形態において、ターゲット核酸が、例えば、相補的な核酸 (例えば、ターゲット核酸にハイブリダイズする) のようなキャプチャプローブ、抗体、または別のキャプチャ技術 (例えば、一部の実施形態において、例えば、固定されたアビジン部分に結合されたビオチン化核酸の場合、核酸は、キャプチャエンティティによって認識 (例えば、結合) されるタグまたは他の部分を含む) 等の別のエンティティに結合される。

【 0 0 0 9 】

特定の、かつ例示的な S B S プロセスが、DNA サンプルをセグメント化すること、およびポリ (A) テールを一端に取り付けて、例えば、ポリ (T) 分子でコーティングされたガラスカバースリップ上で洗浄されることを含む。A は、T とハイブリダイズして、DNA セグメントを適所に (i n p l a c e) 保持する。例えば染料分子等の標識に連結された種々の DNA 塩基が、固定されたセグメント上で複数回、洗浄される。塩基対ができ、二重螺旋を構築する。標識は、どの塩基が対で結合しているかを示す。画像が撮られて、配列は、標識を読むことによって決定される。

【 0 0 1 0 】

特定の、例示的な S B L プロセスは、未知の DNA 配列のターゲットストランドの少なくとも一端上に既知の配列がフランクされる (f l a n k e d) ことを含む。アンカース

10

20

30

40

50

トランドが導入されて、既知の配列に結合する。標識オリゴヌクレオチド（一般的に50以下の塩基を有する、短い核酸ポリマー）の混合プールが導入される。オリゴヌクレオチドは、アンカーに隣接するターゲットにハイブリダイズする。オリゴヌクレオチドの塩基が未知の（ターゲット）DNA配列にマッチすると、DNAリガーゼがオリゴヌクレオチドをアンカーに連結する。標識（例えば、放射性標識、金属標識、量子ドット、蛍光標識、発光標識、質量標識、酵素標識）に基づいて、未知のターゲットヌクレオチド配列は識別されてよい。

【0011】

本明細書中に開示される例となる系および方法は、配列決定反応において付加されたヌクレオチドを選択的に識別するためのマイクロトランスポンダを用いる。一部の実施形態において、技術は、例えば、複数のマイクロトランスポンダのそれぞれに固有の識別タグ、およびヌクレオチド配列に付加されるヌクレオチド塩基が伴う標識の双方を識別する、フローリーダ等の識別ツールの使用を含む。一部の実施形態において、識別ツール（例えば、識別ステーションおよび/またはフローメータ）は、ヌクレオチド塩基が伴う標識を検出するためのディテクタを含む。一部の実施形態において、ディテクタは、CCD、CMOS、CMOSを覆うイオン感応層等のイオンセンサ、または電流ディテクタ等である。一部の実施形態において、ディテクタは、信号を送るために、蛍光色素等の標識を生じさせるための励起系を伴う。一部の実施形態において、ディテクタは、アークランプ、レーザ、または発光ダイオード（LED）等の照射源を伴う。特定の実施形態において、ディテクタは、照射源からサンプルへ、またはサンプルから画像センサもしくは検出センサへの光伝送のため光学素子を伴う。あるいはまた、一部の実施形態において、例えば、信号が配列決定反応の結果として自然発生的に生じる場合等、ディテクタは照射源を伴わない。例えば、信号が、イオン感応層と相互作用して放出されるイオン、または酵素もしくは他の触媒と反応して化学発光信号を生じるピロホスフェート等の放出部分の相互作用によって生じてよい。別の例において、ディテクタが、照射源の必要なく、電流、電圧または電気抵抗の変化を検出する。

【0012】

したがって、記載される実施形態に従う技術の使用（例えば、複数のマイクロトランスポンダのそれぞれに固有の識別タグ、およびヌクレオチド配列に付加されるヌクレオチド塩基が伴う標識の双方を識別することを含む）が、2次元（2D）アレイから3次元（3D）アレイへと検出フォーマットを変えることによって、配列識別のための2Dデカルト座標（Cartesian coordinates）の使用を除外する。

【0013】

例となるマイクロトランスポンダは、例えば、フローメータ（例えば、本明細書中に記載されるように、例えば、ディテクタを含むフローリーダ）等の識別デバイス（例えば、識別ツールを含む）で読まれるので、ランダムな、または規則的な高密度アレイを光学的に検出する必要がない。合成またはライゲーションの各ラウンドの後、マイクロトランスポンダはフローリーダに通され、そこで各トランスポンダが識別され、そして標識（例えば蛍光）が検出される。陽性の蛍光が、付加された塩基を示す；陰性の蛍光が、塩基が付加されなかったことを示す。各検出の後、マイクロトランスポンダは、塩基の付加および検出の続くラウンドのために、試薬中に再懸濁されてよい。高密度2Dアレイフィーチャを解像するための複雑な光学画像化ハードウェアが必要ない。したがって、ランタイムはかなり短くなる。また、マイクロトランスポンダからの信号の、デジタル方式の「イエス」または「ノー」による検出が、各ラン中に大きなデータ画像ファイルが保存される従来の系と比較して、ストレージ空間をかなり節約する。さらに、高スループットが、フローリーダで可能である。例となるフローリーダが、例えば、毎秒約1,000マイクロトランスポンダの伝送率で操作されて、毎時約350万の検出イベントに変換し得る。例となるメモリまたはストレージが、64ビットROMを含み、 10^{17} を超える種々の識別に変換し、これは、ヒトゲノムを配列決定するのに十分な情報を超えている。

【0014】

本明細書中に開示される例となる系が、キャプチャプローブを介して核酸ターゲットがキャプチャされることとなる表面を有するマイクロトランスポンダを含む。一部の実施形態において、系が、表面結合クローンターゲットを形成するために、核酸ターゲットを表面上でクローン増幅する増幅ステーションを備える。また、例となる系は、表面結合ターゲット（例えば、一部の実施形態では、増幅されたクローンターゲット）を配列決定反応（例えば、第1の配列決定反応）（例えば、重合反応（例えば、第1の重合反応）、ライゲーション反応（例えば、第1のライゲーション反応）等）にかけて、第1の核酸塩基（例えば、標識核酸塩基）またはヌクレオチド塩基に相補的であるヌクレオチド塩基（例えば、第1のヌクレオチド塩基）を核酸ターゲットの配列内に付加する反応ステーションを備える。例となる系はまた、無関係な配列決定反応試薬および/または副産物（例えば、重合反応（例えば、第1の重合反応）に由来する重合試薬、またはライゲーション反応（例えば、第1のライゲーション反応）に由来する無関係なライゲーション試薬）を取り除く洗浄ステーションを備える。さらに、例となる系は、それぞれ、マイクロトランスポンダの識別番号、および、一部の実施形態において、標識ヌクレオチド塩基（例えば、第1の標識ヌクレオチド塩基）の標識（例えば、第1の標識）を用いることで、核酸ターゲットの配列内の（例えば、それぞれの）ヌクレオチド塩基（例えば、第1のヌクレオチド塩基）のアイデンティティ、および/またはヌクレオチド塩基（例えば、第1のヌクレオチド塩基；例えば、標識ヌクレオチド塩基）のアイデンティティを決定する識別ステーションを備える。

10

【0015】

20

増幅ステーションは、表面結合クローンターゲットを、続く第2から第n回の重合またはライゲーション反応にかけて、順次、核酸ターゲットの配列内の第2から第nのヌクレオチド塩基とそれぞれ相補的である第2から第nの標識ヌクレオチド塩基を付加するものであり、nの数は、核酸ターゲットの配列内のヌクレオチド塩基数に基づく。また、洗浄ステーションは、第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基の追加後に、第2から第nの重合またはライゲーション試薬に由来する無関係な重合またはライゲーション試薬を取り除くものである。さらに、識別ステーションは、第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基の追加後に、それぞれ、マイクロトランスポンダの識別番号、および第2から第nの標識ヌクレオチド塩基の第2から第nの標識を用いることで、核酸ターゲットの配列内の第2から第nの各ヌクレオチド塩基のアイデンティティ、および第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基のアイデンティティを決定するものである。

30

【0016】

一部の例において、キャプチャプローブはDNAまたはRNAを含んでよく、そして核酸ターゲットはDNAまたはRNAを含んでよい。また、一部の例において、増幅ステーションは、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応を用いて、核酸ターゲットをクローン増幅するものである。

【0017】

技術は、核酸配列決定技術で限定されない。核酸配列決定プラットフォームの種々の実施形態（例えば、核酸シーケンサ）が、下記のようなコンポーネントを備える。種々の実施形態に従えば、配列決定装置が、流体送達制御ユニット、サンプルプロセッシングユニット、信号検出ユニット、およびデータ収集分析制御ユニットを備える。装置の種々の実施形態が、オートメーション化配列決定を実現し、これは、複数の配列から配列情報を、並列して、そして/または実質的に同時に集めるために用いられる。

40

【0018】

一部の実施形態において、流体送達制御ユニットは、試薬送達系を備える。試薬送達系は、種々の試薬のストレージ用の試薬リザーバを備える。試薬は、RNAベースのプライマー、フォワード/リバーシブルDNAプライマー、シーケンシング-バイ-シンセシス用のヌクレオチド混合物、バッファ、洗浄試薬、ブロッキング試薬、およびストリッピング試薬等を含んでよい。加えて、試薬送達系は、サンプルプロセッシングユニットを試薬リザーバと接続するピペッティング系または連続フロー系を備えてよい。

50

【0019】

一部の実施形態において、データ収集分析制御ユニットは、種々の系パラメータを監視する。系パラメータとして、サンプルプロセッシングユニットもしくは試薬リザーバ等の装置の種々の部分の温度、種々の試薬の容量、マニピュレータ、ステッパモータ、もしくはポンプ等の種々の系サブコンポーネントの状態、またはそれらの任意の組合せが挙げられ得る。

【0020】

装置および系の種々の実施形態が、シーケンシング - バイ - シンセシス、単一分子の方法等の配列決定法、および他の配列決定技術を実践するために用いられることは、当業者によって理解されるであろう。シーケンシング - バイ - シンセシスとして、染料標識ヌクレオチドの組み込み、鎖ターミネーション、イオン / プロトン配列決定法、またはピロホスフェート配列決定法等が挙げられ得る。単一分子の技術として、配列決定反応が中断されて、組み込まれたヌクレオチドのアイデンティティを決定するスタガード配列決定法が挙げられ得る。

10

【0021】

一部の実施形態において、配列決定装置は、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド等の核酸の配列を決定する。核酸は、DNAまたはRNAが挙げられ得、そして、ssDNAおよびRNA等の単一ストランドであってもよいし、dsDNAまたはRNA/cDNA対等の二重ストランドであってもよい。一部の実施形態において、核酸は、フラグメントライブラリ、接合対 (mate pair) ライブラリ、またはChIPフラグメント等が挙げられ得、またはそこから誘導されてよい。特定の実施形態において、配列決定装置は、単一の核酸分子から、または実質的に同じ核酸分子の群から、配列情報を得ることができる。

20

【0022】

一部の実施形態において、配列決定装置は、種々の異なるアウトプットデータファイルタイプ / フォーマットの核酸配列決定リードデータを出力してよい: *.txt、*.fasta、*.csfasta、*.seq.txt、*.qseq.txt、*.fastq、*.sff、*.prb.txt、*.sms、*.srs、および / または *.qvが挙げられるが、これらに限定されない。

【0023】

一部の実施形態において、技術は、次世代の配列決定技術を含む。技術によって意図される特定の配列決定技術が、超並列高スループット戦略の共通のフィーチャを共有し、以前の配列決定法と比較してよりコストを下げることを目的とする、次世代の配列決定 (NGS) 法である (例えば、Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641 - 658, 2009およびMacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287 - 296 参照; それぞれその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)。NGS法は、一般的にテンプレート増幅を利用するものと、利用しないものとに広く分けられ得る。増幅要求法として、Rocheによって454技術プラットフォームとして商品化されている (例えば、GS 20およびGS FLX) パイロシーケンス法 (pyrosequencing)、Illuminaによって商品化されているSolexaプラットフォーム、およびApplied Biosystemsによって商品化されているSupported Oligonucleotide Ligation and Detection (SOLiD) プラットホームが挙げられる。単一分子の配列決定法としても知られている非増幅アプローチが、Helicos Biosciencesによって商品化されているHeliscopeプラットフォーム、ならびにVisiGen、Oxford Nanopore Technologies Ltd.、Life Technologies / Ion TorrentおよびPacific Biosciencesによってそれぞれ商品化されている新生のプラットフォームによって、例示される。

30

40

【0024】

50

パイロシーケンス法 (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641 - 658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287 - 296; 米国特許第6, 210, 891号明細書; 米国特許第6, 258, 568号明細書; それぞれその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる) において、NGSフラグメントライブラリは、単一のテンプレート分子を、アダプタに相補的なオリゴヌクレオチドを支持するビーズによってキャプチャすることによって、インシトゥクロン増幅される。単一のテンプレートタイプを支持するビーズはそれぞれ、油中水の微小胞に区画され、そしてテンプレートは、エマルジョンPCRと呼ばれる技術を用いてクローン増幅される。エマルジョンは増幅後に破壊されて、ビーズは、配列決定反応中、フローセルとして機能する、ピコタイタープレートの個々のウェル中に入れられる。4つのdNTP試薬のそれぞれの規則的な反復的導入 (iterative introduction) が、フローセルにおいて、配列決定酵素およびルシフェラーゼ等の発光リポータの存在下で起こる。適切なdNTPが配列決定プライマーの3'末端に付加された場合、結果として生じるATPの産生により、ウェル内で突発的な (a burst of) 発光が生じ、これがCCDカメラを用いて記録される。400塩基以上のリード長を達成することが可能であり、そして106の配列リードが達成され得、最大5億塩基対 (Mb) の配列が得られる。

【0025】

Solexa/Illuminaプラットフォーム (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641 - 658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287 - 296; 米国特許第6, 833, 246号明細書; 米国特許第7, 115, 400号明細書; 米国特許第6, 969, 488号明細書; それぞれその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる) において、配列決定データは、より短い長さのリードの形態で生じる。この方法において、NGSフラグメントライブラリのフラグメントは、オリゴヌクレオチドアンカーがちりばめられた (studded) フローセルの表面上にキャプチャされる。アンカーは、PCRプライマーとして用いられるが、テンプレートの長さから、そして他のすぐ近くのアンカーオリゴヌクレオチドに近いことから、PCRによる伸張は、隣接するアンカーオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする分子の「アーチオーバー (arching over)」をもたらして、フローセルの表面上に架橋構造を形成する。DNAのこれらのループが、変性され、かつ切断される。続いて、フォワードストランドが、可逆的染料ターミネータで配列決定される。組み込まれたヌクレオチドの配列は、各蛍光およびブロックが、dNTP付加の次のサイクルの前に取り除かれている、組込み後の (post-incorporation) 蛍光を検出することによって、決定される。配列決定リード長は、36ヌクレオチドから100を超えるヌクレオチドに及び、アウトプット全体では分析ランにつき10億ヌクレオチド対を越える。

【0026】

SOLID技術を用いる核酸分子の配列決定 (Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641 - 658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287 - 296; 米国特許第5, 912, 148号明細書; 米国特許第6, 130, 073号明細書; それぞれその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる) は、エマルジョンPCRによるNGSフラグメントライブラリのクローン増幅も伴う。この後、テンプレートを支持するビーズが、ガラスフローセルの誘導体化された表面上に固定され、そして、アダプタオリゴヌクレオチドに相補的なプライマーが、アニールされる。しかしながら、このプライマーを3'伸張用に利用するのではなく、その代わりとして、2つのプローブ特異的塩基に続いて、6つの変性塩基、および4つの蛍光標識の1つを含有するインタロゲーション (interrogation) プローブへのライゲーション用に5'ホスフェート基を提供するのに用いられる。SOLID系において、インタロゲーションプローブは、各プローブの3'末端の2つの塩基、および5'末端の4つの蛍光の1つの、16の組合せがあり

10

20

30

40

50

得る。蛍光カラー、そしてしたがって各プローブのアイデンティティが、特定の色空間コーディングスキームに対応する。プローブアニリング、ライゲーション、および蛍光検出の複数ラウンド（通常7回）の後に変性が、そして次に、最初のプライマーと比較して1つの塩基によってオフセットされるプライマーを用いる配列決定の第2のラウンドが続く。このように、テンプレート配列は、算定的に再構築され得、そしてテンプレート塩基は、2回インターロゲートされて、精度が増す。配列リード長は平均すると35ヌクレオチドになり、アウトプット全体では配列決定ランにつき40億塩基を越える。

【0027】

ある実施形態において、Helicos BiosciencesによるHeliscopeが用いられる(Voelkerding et al., Clinical Chem., 55:641-658, 2009; MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7:287-296; 米国特許第7,169,560号明細書; 米国特許第7,282,337号明細書; 米国特許第7,482,120号明細書; 米国特許第7,501,245号明細書; 米国特許第6,818,395号明細書; 米国特許第6,911,345号明細書; 米国特許第7,501,245号明細書; それぞれその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)。配列決定は、ポリメラーゼの付加、および蛍光標識dNTP試薬の連続的付加によって達成される。組込みイベントは、dNTPに対応する蛍光信号をもたらし、そして信号は、dNTP付加の各ラウンド前に、CCDカメラによってキャプチャされる。配列決定リード長は、25から50ヌクレオチドに及び、アウトプット全体では分析ランにつき10億ヌクレオチド対を越える。

【0028】

一部の実施形態において、Rocheによる454配列決定法が用いられる(Margulies et al. (2005) Nature 437:376-380)。454配列決定法は、2つのステップを伴う。第1ステップでは、DNAが、約300から800塩基対のフラグメントに切断されて、フラグメントは平滑末端を有する(blunt ended)。続いて、オリゴヌクレオチドアダプタが、フラグメントの末端にライゲーションされる。アダプタは、フラグメントの増幅および配列決定のためのプライマーとして役立つ。フラグメントは、例えば、5'-ビオチンタグを含有するアダプタを用いて、例えば、ストレプトアビジンコーティングされたビーズのような、DNAキャプチャビーズに取り付けられてよい。ビーズに取り付けられたフラグメントは、油-水エマルジョンの小滴内でPCR増幅される。ビーズ上にはそれぞれ、クローン増幅されたDNAフラグメントの複数のコピーが生じる。第2のステップでは、ビーズはウェル(ピコリットルのサイズ)内にキャプチャされる。パイロシーケンスが、各DNAフラグメントに並列して実行される。1つ以上のヌクレオチドの付加が光信号を生じ、これがCCDカメラによって配列決定装置内に記録される。信号強度は、組み込まれるヌクレオチドの数に比例する。パイロシーケンスは、ヌクレオチド付加の直後に放出されるピロホスフェート(PPi)を利用する。PPiは、アデノシン5'ホスホ硫酸(adenosine 5' phosphosulfate)の存在下でATPスルフィラーゼによってATPに変換される。ルシフェラーゼが、ATPを用いて、ルシフェリンをオキシルシフェリンに変換する。この反応が光を生じ、これが検出され、かつ分析される。

【0029】

Ion Torrent技術は、DNAの重合中に放出される水素イオンの検出に基づくDNA配列決定法である(例えば、Science 327(5970):1190(2010); 米国特許出願公開第2009/0026082号明細書; 米国特許出願公開第2009/0127589号明細書; 米国特許出願公開第2010/0301398号明細書; 米国特許出願公開第2010/0197507号明細書; 米国特許出願公開第2010/0188073号明細書; 米国特許出願公開第2010/0137143号明細書(それらの全体が、全ての目的について、参照によって組み込まれる)参照)。マイクロウェルが、配列決定されるべきNGSフラグメントライブラリのフラグメントを含有す

る。マイクロウェルの層の下に、高感度 I S F E T イオンセンサがある。全ての層は、エレクトロニクス産業において用いられるものと同様の C M O S 半導体チップ内に含有される。d N T P が、増大する相補ストランド中に組み込まれると、水素イオンが放出され、これが高感度イオンセンサのトリガとなる。ホモポリマーリピートがテンプレート配列内に存在する場合、複数の d N T P 分子が、単一サイクル中に組み込まれることとなる。このことが、放出される水素の対応する数に比例して、より高い電子信号をもたらす。この技術は、修飾ヌクレオチドも光学素子も用いられないという点で、他の配列決定技術と異なる。I o n T o r r e n t シーケンサの塩基あたりの精度は、50 塩基リードについて約 99.6% である (ランにつき約 100 Mb が生じる)。リード長は、100 塩基対である。5 リピート長のホモポリマーリピートの精度は、約 98% である。イオン半導体配列決定法の利点は、迅速な配列決定速度、ならびに低い先行コストおよび運転コストである。しかしながら、p H 介在性シーケンサを入手するコストは、サンプル調製装置およびデータ分析用サーバを除いて、約 50,000 ドルである。

【0030】

本発明の用途に適し得る別の例示的な核酸配列決定アプローチが、S t r a t o s G e n o m i c s , I n c . によって開発されており、X p a n d o m e r s の使用を伴うものである。この配列決定プロセスは、一般的に、テンプレート指向型 (t e m p l a t e - d i r e c t e d) 合成によって生じる娘ストランドを提供することを含む。娘ストランドは、一般に、ターゲット核酸の全体または一部の連続したヌクレオチド配列に対応する配列内で結合する複数のサブユニットを含み、個々のサブユニットは、テザー、少なくとも1つのプローブまたは核酸塩基残基、および少なくとも1つの選択的に切断可能な結合を含む。選択的に切断可能な結合は、切断されて、娘ストランドの複数のサブユニットよりも長い長さの X p a n d o m e r を産生する。X p a n d o m e r は、一般的に、ターゲット核酸の全体または一部の連続したヌクレオチド配列に対応する配列内に、遺伝的情報を解析するためのテザーおよびリポータ要素を含む。続いて、X p a n d o m e r のリポータ要素が検出される。X p a n d o m e r ベースのアプローチに関する付加的な詳細が、例えば、米国特許出願公開第 2009/0035777 号明細書 (表題「H I G H T H R O U G H P U T N U C L E I C A C I D S E Q U E N C I N G B Y E X P A N S I O N」、2008 年 6 月 19 日出願 (その全体が本明細書中に組み込まれる)) に記載されている。

【0031】

他の単一分子の配列決定法として、V i s i G e n プラットホームを用いた合成によるリアルタイム配列決定法が挙げられる (V o e l k e r d i n g e t a l . , C l i n i c a l C h e m . , 55:641-658, 2009; 米国特許第 7,329,492 号明細書; 米国特許出願第 11/671,956 号明細書; 米国特許出願第 11/781,166 号明細書; それぞれその全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)。ここでは、N G S フラグメントライブラリのフラグメントが、固定されて、プライムされ (p r i m e d) てから、蛍光修飾ポリメラーゼおよび蛍光アクセプタ分子を用いたストランド伸張にかけられて、ヌクレオチド付加の直後に検出可能な蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T) が生じる。

【0032】

P a c i f i c B i o s c i e n c e s によって開発された別の単一分子のリアルタイム配列決定系 (V o e l k e r d i n g e t a l . , C l i n i c a l C h e m . , 55:641-658, 2009; M a c L e a n e t a l . , N a t u r e R e v . M i c r o b i o l . , 7:287-296; 米国特許第 7,170,050 号明細書; 米国特許第 7,302,146 号明細書; 米国特許第 7,313,308 号明細書; 米国特許第 7,476,503 号明細書; 全て参照によって本明細書中に組み込まれる) が、直径 50 から 100 nm の、約 20 ゼプトリットル (10 - 21 l) の反応容量を含む反応ウェルを利用するものである。固定されたテンプレート、修飾 p h i 29 D N A ポリメラーゼ、および高い局所的濃度の、蛍光標識 d N T P を用いて、配列決定反応

が実行される。高い局部的濃度および連続反応条件により、組込みイベントが、レーザ励起、光導波路およびCCDカメラを用いた蛍光信号検出によって、リアルタイムにキャプチャされ得る。

【0033】

ある実施形態において、Pacific Biosciencesによって開発されたゼロ - モード導波路 (ZMW) を用いた単一分子のリアルタイム (SMRT) DNA 配列決定法、または同様の方法が、用いられる。この技術により、DNA 配列決定は、それぞれ何千ものゼロ - モード導波路 (ZMW) を含有する SMRT チップ上で実行される。ZMW は、二酸化ケイ素基質上に堆積した 100 nm の金属フィルム内に製造される、直径が何十ナノメートルという穴である。各 ZMW は、ちょうど 20 ゼプトリットル (10 L) の検出容量を提供するナノフォトニック視覚化チャンバとなる。この容量で、単一分子の活性は、何千という標識ヌクレオチドのバックグラウンド中で検出され得る。ZMW は、シーケンシング - バイ - シンセシスを実行するので、DNA ポリメラーゼを見るためのウィンドウを提供する。各チャンバ内で、単一の DNA ポリメラーゼ分子が、検出容量内で常時存在するように、底面に取り付けられている。続いて、異なる着色蛍光体で各タイプが標識されている、ホスホリンクされた (Phospholinked) ヌクレオチドが、酵素速度、精度および進行性 (processivity) を促進する高い濃度で、反応溶液中に導入される。ZMW のサイズが小さいために、これらの高い、生物学的に適切な濃度であっても、検出容量は、ほんの僅かな時間だけヌクレオチドによって占有される。また、拡散がヌクレオチドを持ち去るはずの距離が非常に短いために、検出容量の査察 (visit) は速く、僅か数マイクロ秒しか続かない。結果、非常に低いバックグラウンドとなる。

【0034】

一部の実施形態において、ナノポア配列決定法が用いられる (Sonik Vand Meller A. (2007) Clin Chem 53:1996 - 2001)。ナノポアは、直径が 1 ナノメートル程度の小さな穴である。ナノポアの、導電流体中への浸漬、およびそこへの電位の印加が、ナノポアを通るイオンの伝導により、僅かな電流を生じさせる。流れる電流の量は、ナノポアのサイズに影響される。DNA 分子がナノポアを通過するに従い、DNA 分子上の各ヌクレオチドが、ナノポアを異なる程度に塞ぐ。したがって、DNA 分子がナノポアを通過するに従い、ナノポアを通る電流が変化し、これが DNA 配列のリーディングを表す。

【0035】

一部の実施形態において、配列決定技術が、化学感応性電界効果トランジスタ (chemFET) アレイを用いて DNA を配列決定する (例えば、米国特許出願公開第 2009/0026082 号明細書に記載されている)。技術の 1 つの例において、DNA 分子は、反応チャンバ中に配置され、そしてテンプレート分子は、ポリメラーゼに結合された配列決定プライマーにハイブリダイズされる。配列決定プライマーの 3' 末端での、新しい核酸ストランド中への 1 つ以上のトリホスフェートの組込みが、電流の変化によって、chemFET によって検出され得る。アレイが、複数の chemFET センサを有してよい。別の例では、単一の核酸が、ビーズに取り付けられてよい。核酸は、ビーズ上で増幅され得、そしてビーズは個々に、chemFET アレイ上の個々の反応チャンバ (各チャンバは、chemFET センサを有する) へ移されてよい。そして核酸は、配列決定され得る。

【0036】

一部の実施形態において、配列決定技術が、電子顕微鏡を用いる (Moudrianakis E. N. and Beer M. Proc Natl Acad Sci US A. 1965 March; 53:564 - 71)。技術の 1 つの例において、個々の DNA 分子が、電子顕微鏡を用いて区別可能な金属標識を用いて標識される。続いて、この分子は、平らな表面上で引き伸ばされ (stretched)、かつ電子顕微鏡を用いて画像化されて、配列を測定する。

【0037】

一部の実施形態において、Turro, et al. PNAS 103:19635-40 (2006)に記載されるような「切断可能な蛍光ヌクレオチド可逆ターミネータを用いた4色シーケンシング-バイ-シンセシス(four-color sequencing by synthesis using cleavable fluorescent nucleotide reversible terminators)」(例えば、Intelligent Bio-Systemsによって商品化されている)が用いられる。技術は、米国特許出願公開第2010/0323350号明細書；米国特許出願公開第2010/0063743号明細書；米国特許出願公開第2010/0159531号明細書；米国特許出願公開第2010/0035253号明細書；米国特許出願公開第2010/0152050号明細書に記載されており、全ての目的について、参照によって本明細書中に組み込まれる。

10

【0038】

本発明の用途に適し得るようリアルタイム配列決定のためのプロセスおよび系が、例えば、米国特許第7,405,281号明細書(表題「Fluorescent nucleotide analogs and uses therefor」、2008年7月29日Xu et al.に発行)；米国特許第7,315,019号明細書(表題「Arrays of optical confinements and uses thereof」、2008年1月1日Turner et al.に発行)；米国特許第7,313,308号明細書(表題「Optical analysis of molecules」、2007年12月25日Turner et al.に発行)；米国特許第7,302,146号明細書(表題「Apparatus and method for analysis of molecules」、2007年11月27日Turner et al.に発行)；米国特許第7,170,050号明細書(表題「Apparatus and methods for optical analysis of molecules」、2007年1月30日Turner et al.に発行)；米国特許出願公開第2008/0212960号明細書(表題「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」、2007年10月26日Lundquist et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0206764号明細書(表題「Flowcell system for single molecule detection」、2007年10月26日Williams et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0199932号明細書(表題「Active surface coupled polymerases」、2007年10月26日Hanzel et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0199874号明細書(表題「CONTROLLABLE STRAND SCISSION OF MINI CIRCLE DNA」、2008年2月11日Otto et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0176769号明細書(表題「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」、2007年10月26日Rank et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0176316号明細書(表題「Mitigation of photodamage in analytical reactions」、2007年10月31日Eid et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0176241号明細書(表題「Mitigation of photodamage in analytical reactions」、2007年10月31日Eid et al.によって出願)；米国特許出願公開第2008/0165346号明細書(表題「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multi

20

30

40

50

ple sources」、2007年10月26日Lundquist et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0160531号明細書(表題「Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same」、2007年10月31日Korlachによって出願)；米国特許出願公開第2008/0157005号明細書(表題「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」、2007年10月26日Lundquist et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0153100号明細書(表題「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」、2007年10月31日Rank et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0153095号明細書(表題「CHARGE SWITCH NUCLEOTIDES」、2007年10月26日Williams et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0152281号明細書(表題「Substrates, systems and methods for analyzing materials」、2007年10月31日Lundquist et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0152280号明細書(表題「Substrates, systems and methods for analyzing materials」、2007年10月31日Lundquist et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0145278号明細書(表題「Uniform surfaces for hybrid material substrates and methods for making and using same」、2007年10月31日Korlachによって出願)；米国特許出願公開第2008/0128627号明細書(表題「SUBSTRATES, SYSTEMS AND METHODS FOR ANALYZING MATERIALS」、2007年8月31日Lundquist et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0108082号明細書(表題「Polymerase enzymes and reagents for enhanced nucleic acid sequencing」、2007年10月22日Rank et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0095488号明細書(表題「SUBSTRATES FOR PERFORMING ANALYTICAL REACTIONS」、2007年6月11日Foquet et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0080059号明細書(表題「MODULAR OPTICAL COMPONENTS AND SYSTEMS INCORPORATING SAME」、2007年9月27日Dixon et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0050747号明細書(表題「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing and using same」、2007年8月14日Korlach et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0032301号明細書(表題「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」、2007年3月29日Rank et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0030628号明細書(表題「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」、2007年2月9日Lundquist et al. によって出願)；米国特許出願公開第2008/0009007号明細書(表題「CONTROLLED INITIATION OF PRIMER EXTENSION」、2007年6月15日Lyle et al. によって出

願)；米国特許出願公開第2007/0238679号明細書(表題「Articles having localized molecules disposed thereon and methods of producing same」、2006年3月30日Rank et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0231804号明細書(表題「Methods, systems and compositions for monitoring enzyme activity and applications thereof」、2006年3月31日Korlach et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0206187号明細書(表題「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」、2007年2月9日Lundquist et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0196846号明細書(表題「Polymerases for nucleotide analog incorporation」、2006年12月21日Hanzel et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0188750号明細書(表題「Methods and systems for simultaneous real-time monitoring of optical signals from multiple sources」、2006年7月7日Lundquist et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0161017号明細書(表題「MITIGATION OF PHOTODAMAGE IN ANALYTICAL REACTIONS」、2006年12月1日Eid et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0141598号明細書(表題「Nucleotide Compositions and Uses Thereof」、2006年11月3日Turner et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0134128号明細書(表題「Uniform surfaces for hybrid material substrate and methods for making and using same」、2006年11月27日Korlachによって出願)；米国特許出願公開第2007/0128133号明細書(表題「Mitigation of photodamage in analytical reactions」、2005年12月2日Eid et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0077564号明細書(表題「Reactive surfaces, substrates and methods of producing same」、2005年9月30日Roitman et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0072196号明細書(表題「Fluorescent nucleotide analogs and uses therefore」、2005年9月29日Xu et al.によって出願)；米国特許出願公開第2007/0036511号明細書(表題「Methods and systems for monitoring multiple optical signals from a single source」、2005年8月11日Lundquist et al.によって出願)；およびKorlach et al. (2008)「Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures」PNAS 105(4): 1176-81に記載されており、これらは全て、それらの全体が参照によって本明細書中に組み込まれる。

【0039】

一部の例において、標識ヌクレオチド塩基の少なくとも1つは、1セットの標識ヌクレオチド塩基を含む。用語「標識」または「タグ」は、本明細書中で互換的に用いられており、ヌクレオチドまたは核酸に取り付けられる任意の化学部分を指す。取付けは、共有結合性であっても非共有結合性であってもよい。好ましくは、標識は、検出可能であり、そ

してヌクレオチドまたは核酸を、技術の実践者にとって検出可能とする。本明細書中に提供される技術との使用を満たす例示的な検出可能な標識として、例えば、蛍光標識、化学発光標識、クエンチャ、放射性標識、ビオチンおよび金、またはこれらの組合せが挙げられる。検出可能な標識として、発光分子、蛍光色素、蛍光クエンチング剤、着色分子（例えば、インシトゥハイブリダイゼーション（ISH、FISH）および明視野画像化（bright field imaging）用途に使われるクロモゲン）、放射性同位元素、またはシンチラント（scintillants）が挙げられる。検出可能な標識としてはまた、任意の有用なリンカー分子（ビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、ストレプトアビジン、HRP、Aタンパク質、Gタンパク質、抗体またはそのフラグメント、Grb2、ポリヒスチジン、 Ni^{2+} 、FLAGタグ、mycタグ等）、重金属、酵素（例として、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、およびルシフェラーゼが挙げられる）、電子ドナー/アクセプタ、アクリジニウムエステル、染料およびカロリメトリック基質（calorimetric substrate）も挙げられる。例えば、表面プラズモン共鳴検出での使用を満たすとして、質量の変化が、検出可能な標識と考えられ得るとも想定される。

【0040】

一部の実施形態において、標識は、染料に基づく蛍光検出可能部分を含み、染料は、キサンテン、フルオレセイン、ローダミン、BODIPY、シアニン、クマリン、ピレン、フタロシアニン、フィコビリタンパク質、ALEXA FLUOR(R)350、ALEXA FLUOR(R)405、ALEXA FLUOR(R)430、ALEXA FLUOR(R)488、ALEXA FLUOR(R)514、ALEXA FLUOR(R)532、ALEXA FLUOR(R)546、ALEXA FLUOR(R)555、ALEXA FLUOR(R)568、ALEXA FLUOR(R)568、ALEXA FLUOR(R)594、ALEXA FLUOR(R)610、ALEXA FLUOR(R)633、ALEXA FLUOR(R)647、ALEXA FLUOR(R)660、ALEXA FLUOR(R)680、ALEXA FLUOR(R)700、ALEXA FLUOR(R)750、蛍光半導体結晶またはスクアライン染料である。一部の実施形態において、タグまたは標識は、放射性同位元素、スピン標識、量子ドットまたは生物発光部分を含む。一部の実施形態において、標識は、例えばHaugland (September 2005) MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (10th ed.) (その全体が参照によって本明細書中に組み込まれる)に記載される蛍光検出可能部分である。

【0041】

一部の実施形態において、標識（例えば、蛍光検出可能な標識）は、ATTO-TEC GmbH (Am Eichenhang 50, 57076 Siegen, ドイツ) から入手可能なものがあり、例えば、米国特許出願公開第2011/0223677号明細書；米国特許出願公開第2011/0190486号明細書；米国特許出願公開第2011/0172420号明細書；米国特許出願公開第2006/0179585号明細書；米国特許出願公開第2003/0003486号明細書；米国特許第7,935,822号明細書（全て参照によって本明細書中に組み込まれる）に記載されている。

【0042】

一部の実施形態において、標識ヌクレオチド塩基の少なくとも1つが、1つ以上の、放射性標識、金属標識、量子ドット、蛍光標識、発光標識、質量標識、酵素標識等を含む。特定の実施形態において、検出可能な標識は、蛍光標識等の光学的に検出可能な標識であってよい。例示的な蛍光標識（配列決定用、および/または核酸、プライマー、プローブ等の標識等の他の目的用）として、シアニン、ローダミン、フルオレセイン、クマリン、BODIPY、alexaまたは接合型マルチ染料が挙げられる。一部の例において、標識ヌクレオチド塩基の少なくとも1つは、光学標識を含んでよく、そして/または標識ヌクレオチド塩基の少なくとも1つは、電気化学標識を含んでよい。

【 0 0 4 3 】

一部の例となる系において、識別ステーションは、フローメータを含む。一部の例において、反応ステーションは、複数のヌクレオチド塩基に単一の標識を用いるものである。一部の例において、反応ステーションは、種々のヌクレオチド塩基を区別するために各ヌクレオチド塩基に異なる標識を用いるものである。一部の例において、反応ステーションは、第 1、第 2 または第 n の標識ヌクレオチド塩基の少なくとも 1 つを、単一の塩基として付加するものである。一部の例において、反応ステーションは、第 1、第 2 または第 n の標識ヌクレオチド塩基の少なくとも 1 つを、オリゴヌクレオチドとして付加するものである。一部の例において、オリゴヌクレオチドは、最大約 30 のヌクレオチドを含む。

【 0 0 4 4 】

本明細書中に開示される一部の例となる系が、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイ用の複数のマイクロトランスポンダを含む。また、本明細書中に開示される一部の例となる系が、1 つ以上の増幅ステーション、反応ステーション、洗浄ステーションまたは識別ステーションを備える微流量チップデバイスを含む。

【 0 0 4 5 】

一部の例において、n の数は、実質的に配列全体の末端を表す。

【 0 0 4 6 】

本明細書中に開示される例となる方法が、マイクロトランスポンダ上にキャプチャされたターゲットヌクレオチド塩基の配列を、複数の配列決定反応にかけて、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合する標識ヌクレオチド塩基の配列を構築することを含む。例となる方法はまた、標識ヌクレオチド塩基の配列の各標識ヌクレオチド塩基、および標識ヌクレオチド塩基が結合されるターゲットヌクレオチド塩基の配列の各相補的ターゲットヌクレオチド塩基を、各配列決定反応の後に、そして続く配列決定反応の前に、識別することをも含む。また、例となる方法は、標識ヌクレオチド塩基の配列の各標識ヌクレオチド塩基、および標識ヌクレオチド塩基が結合されるターゲットヌクレオチド塩基の配列の各相補的ターゲットヌクレオチド塩基を、マイクロトランスポンダの識別番号と関連付けることを含む。

【 0 0 4 7 】

また、一部の例が、配列決定反応の前に、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応を介して、ターゲットヌクレオチド塩基をクローン増幅することをも含む。一部の例において、標識ヌクレオチド塩基の識別が、フローメータで標識ヌクレオチド塩基を検出することを含む。

【 0 0 4 8 】

また、本明細書中に開示される一部の例となる方法が、複数のヌクレオチド塩基に単一の標識を用いることをも含む。一部の例となる方法が、異なる標識を各ヌクレオチド塩基に用いて、種々のヌクレオチド塩基を区別することを含む。また、一部の例となる方法が、標識ヌクレオチド塩基を単一の塩基として付加することをも含む。また、本明細書中に開示される一部の例となる方法が、第 n の標識ヌクレオチド塩基をオリゴヌクレオチドとして付加することを含む。一部の例となる方法が、複数のマイクロトランスポンダを、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイに用いることを含む。また、一部の例となる方法が、微流量チップデバイスにおける方法の少なくとも一部を実行することをも含む。さらに、一部の例において、配列決定反応は、ターゲットヌクレオチド塩基の配列の全体が実質的に識別されるまで、繰り返される。

【 0 0 4 9 】

本明細書中に開示される別の例となる方法が、キャプチャプローブを介してマイクロトランスポンダの表面上に核酸ターゲットをキャプチャすること、表面上の核酸ターゲットをクローン増幅して、表面結合クローンターゲットを形成すること、および表面結合クローンターゲットを第 1 の重合反応または第 1 のライゲーション反応にかけて、核酸ターゲットの配列内の第 1 のヌクレオチド塩基に相補的である第 1 の標識ヌクレオチド塩基を付加することを含む。例となる方法はまた、第 1 の重合反応に由来する無関係な重合試薬ま

10

20

30

40

50

たは第1のライゲーション反応に由来する無関係なライゲーション試薬を取り除くこと、ならびに、マイクロトランスポンダの識別番号および第1の標識ヌクレオチド塩基の第1の標識を用いて、核酸ターゲットの配列内の第1のヌクレオチド塩基のアイデンティティおよび第1の標識ヌクレオチド塩基のアイデンティティをそれぞれ決定することを含む。さらに、例となる方法は、表面結合クロンターゲットを、続く第2から第n回の重合またはライゲーション反応にかけて、核酸ターゲットの配列内の第2から第nのヌクレオチド塩基とそれぞれ相補的である第2から第nの標識ヌクレオチド塩基を順次付加することを含む。nの数は、核酸ターゲットの配列内のヌクレオチド塩基の数に基づく。また、例となる方法は、第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基の付加後に、第2から第nの重合またはライゲーション試薬に由来する無関係な重合またはライゲーション試薬を取り除くこと、ならびに、第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基の付加後に、マイクロトランスポンダの識別番号および第2から第nの標識ヌクレオチド塩基の第2から第nの標識を用いて、核酸ターゲットの配列内の第2から第nの各ヌクレオチド塩基のアイデンティティおよび第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基のアイデンティティをそれぞれ決定することを含む。

10

【0050】

一部の実施形態において、本明細書中で提供される技術は、方法（例えば、核酸を配列決定する方法）に関するものであり、当該方法は、マイクロトランスポンダ上にキャプチャされたターゲットヌクレオチド塩基の配列を複数の配列決定反応にかけて、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合するヌクレオチド塩基の配列を付加すること；各配列決定反応の後に、付加された各ヌクレオチド塩基を識別すること；および配列の付加された各ヌクレオチド塩基を、マイクロトランスポンダの識別番号と関連付けることを含む。一部の実施形態において、ターゲットヌクレオチド塩基は、キャプチャプローブを介してキャプチャされる。一部の実施形態において、ターゲットヌクレオチド塩基は、DNAまたはRNAを含む。一部の実施形態において、方法はさらに、ターゲットヌクレオチド塩基をクローン増幅すること（例えば、配列決定反応より前の、例えば、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応）を含む。一部の実施形態において、付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも1つは、標識を含む。技術は、用いられる標識のタイプで限定されない。例えば、一部の実施形態において、付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも1つが光学標識を含み、そして一部の実施形態において、付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも1つが電気化学標識を含む。

20

30

【0051】

一部の実施形態において、付加されたヌクレオチド塩基の識別は、フローメータを用いることによる、付加されたヌクレオチド塩基の検出を含む。一部の実施形態において、識別は、付加された前記塩基を、装置の反応ステーションから、前記フローメータを用いる前記装置の識別ステーションに移動させることを含む。一部の実施形態において、識別ステーションは、付加された前記塩基を検出するディテクタを含み、前記ディテクタは、1つ以上の光学信号、電気信号、および化学信号を検出する。技術は、例えば、標識またはヌクレオチドを検出するために用いられる、ディテクタおよび/または検出モードのタイプで限定されない。例えば、一部の実施形態において、付加された塩基が、蛍光、発光、pH、熱、水素イオン濃度、ピロホスフェート濃度または放射活性の変化によって検出される。さらに、一部の実施形態において、単一の標識が、付加される複数のヌクレオチド塩基に用いられ、そして一部の実施形態において、種々の複数の標識が、付加される各ヌクレオチド塩基に用いられて、付加された種々のヌクレオチド塩基を区別する。そして、一部の実施形態において、付加される塩基は、単一の塩基として付加され、そして一部の実施形態において、付加される塩基は、オリゴヌクレオチド（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35のヌクレオチドの、最大約30のヌクレオチドを含む、例えばオリゴヌクレオチド）として付加される。

40

50

【 0 0 5 2 】

さらなる実施形態において、方法は、複数のマイクロトランスポンダを、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイに用いることを含む。そして、一部の実施形態は、微量チップデバイスにおける方法の少なくとも一部を実行することを含む方法を提供する。方法は、核酸の配列決定での使用を満たす；したがって、一部の実施形態において、配列決定反応は、ターゲットヌクレオチド塩基の配列の全体が実質的に識別されるまで、繰り返される。

【 0 0 5 3 】

付加的な実施形態が、核酸ターゲットがキャプチャプローブを介してキャプチャされることとなる表面を有するマイクロトランスポンダ；表面結合核酸ターゲットを複数の配列決定反応にかけて、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合するヌクレオチド塩基の配列を付加する反応ステーション；複数の配列決定反応に由来する無関係な配列決定試薬を取り除く洗浄ステーション；および各配列決定反応の後に、付加された各ヌクレオチド塩基を識別する識別ステーションを備える装置を提供する。一部の実施形態において、装置はさらに、表面上の核酸ターゲットをクローン増幅して、表面結合クローンターゲットを形成する増幅ステーション（例えば、一部の実施形態において、増幅ステーションは、表面結合核酸ターゲットを、続く第2から第n回の配列決定反応にかけるものである）を備える。一部の実施形態において、続く第2から第n回の配列決定反応は、核酸ターゲットの配列内の第2から第nのヌクレオチド塩基に相補的である第2から第nのヌクレオチド塩基を付加し、nは、核酸ターゲットの配列内のヌクレオチド塩基の数以下である。

【 0 0 5 4 】

洗浄ステーションを備える実施形態において、一部の実施形態は、洗浄ステーションが、第2から第nの各ヌクレオチド塩基の付加後に、第2から第nの配列決定反応に由来する無関係な配列決定試薬を取り除くものであることを定めている。さらに、一部の実施形態において、識別ステーションは、核酸ターゲットの配列内の第2から第nの各ヌクレオチド塩基のアイデンティティを決定するものである。そして、さらに、識別ステーションが、配列の付加された各ヌクレオチド塩基を、マイクロトランスポンダの識別番号と関連付ける実施形態が提供される。

【 0 0 5 5 】

一部の実施形態において、ヌクレオチド塩基が、標識を含む。装置は、検出に用いられる標識のタイプで限定されない。例えば、一部の実施形態において、ヌクレオチド塩基が光学標識を含み、そして一部の実施形態において、ヌクレオチド塩基が電気化学標識を含む。一部の実施形態において、反応ステーションは、単一の標識を複数のヌクレオチド塩基に用いるものである。一部の実施形態において、反応ステーションは、各ヌクレオチドに異なる標識を用いて、種々のヌクレオチド塩基を区別するものである。

【 0 0 5 6 】

一部の実施形態において、キャプチャプローブはDNAまたはRNAを含む。一部の実施形態において、核酸ターゲットはDNAまたはRNAを含む。

【 0 0 5 7 】

一部の実施形態において、増幅ステーションは、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応を用いて、核酸ターゲットをクローン増幅するものである。一部の実施形態において、識別ステーションは、フローメータを含む。一部の実施形態において、識別ステーションは、付加された各ヌクレオチド塩基を検出するディテクタを含む。

【 0 0 5 8 】

装置は、検出される信号のタイプで限定されない。例えば、一部の実施形態において、ディテクタが、1つ以上の光学信号、電気信号および化学信号を検出する。一部の実施形態において、ディテクタは、蛍光、発光、pH、熱、水素イオン濃度、ピロホスフェート濃度または放射活性の変化によって、付加された前記塩基を検出する。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態において、識別ステーションは、付加された前記塩基を、装置の反応ステーションから、前記フローメータを用いる前記装置の識別ステーションへ移動させる。

【0060】

一部の実施形態において、付加される各ヌクレオチド塩基は、単一の塩基として付加され、そして一部の実施形態において、付加される各ヌクレオチド塩基は、オリゴヌクレオチド（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35のヌクレオチドの、最大約30のヌクレオチドを含む、例えばオリゴヌクレオチド）として付加される。

【0061】

さらなる実施形態が、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイ用の複数のマイクロトランスポンダを含む装置を提供する。また、一部の実施形態が、微流量チップデバイス、例えば、1つ以上の反応ステーション、洗浄ステーションもしくは識別ステーション、および/または一部の実施形態において、増幅ステーションを備える微流量チップデバイスを含む装置を提供する。

【0062】

装置は、ヌクレオチド配列を提供する際の使用を満たす；したがって、一部の実施形態において、nの数は、実質的に配列全体の末端を表す。

【0063】

付加的な方法の実施形態が、マイクロトランスポンダ上にキャプチャされたターゲットヌクレオチド塩基の配列を、複数の配列決定反応にかけて、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合するヌクレオチド塩基の配列を付加すること；付加された各ヌクレオチド塩基を、装置の反応ステーションから、フローメータを用いる前記装置の識別ステーションへ移動させること；および各配列決定反応の後に、付加された各ヌクレオチド塩基を識別することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、方法がさらに、マイクロトランスポンダの表面上に核酸ターゲットをキャプチャすることを含み、例えば、一部の実施形態において、核酸ターゲットは、キャプチャプローブによってキャプチャされる。さらなる実施形態において、技術は、核酸ターゲットを増幅して表面結合クローンターゲットを形成することを含む方法を提供する。一部の実施形態において、方法がさらに、ターゲットヌクレオチド塩基をクローン増幅することを含み、例えば一部の実施形態において、クローン増幅は、（例えば、配列決定反応の前に）エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応を含む方法を提供する。

【0064】

一部の実施形態において、方法は、無関係な配列決定試薬を取り除くことを含む。そして、一部の実施形態において、方法が、ターゲットヌクレオチド塩基の配列の全体が実質的に識別されるまで、配列決定反応を繰り返すことを含む。

【0065】

一部の実施形態において、ターゲットヌクレオチド塩基は、DNAまたはRNAを含む。

【0066】

技術は、一部の実施形態において、標識を含むヌクレオチドの使用を含む。例えば、一部の実施形態において、付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも1つが、標識を含む。技術は、用いられる特定の標識で限定されない。例えば、一部の実施形態において、付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも1つが、光学標識を含み、そして例えば、一部の実施形態において、付加されるヌクレオチド塩基の少なくとも1つが、電気化学標識を含む。一部の実施形態において、単一の標識が、付加される複数のヌクレオチド塩基に用いられ、そして一部の実施形態において、種々の複数の標識が、付加される各ヌクレオチド塩基に用いられて、付加された種々のヌクレオチド塩基を区別する。一部の実施形態において、付加される塩基は、単一の塩基として付加され、そして一部の実施形態において、付加される塩基は、オリゴヌクレオチド（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12

10

20

30

40

50

、 13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35のヌクレオチドの、最大約30のヌクレオチドを含む、例えばオリゴヌクレオチド)として付加される。

【0067】

一部の実施形態において、付加されたヌクレオチド塩基の識別は、フローメータを用いることによる、付加されたヌクレオチド塩基の検出を含む。一部の実施形態において、識別ステーションは、付加された前記塩基を検出するディテクタを含み、前記ディテクタは、1つ以上の光学信号、電気信号および化学信号を検出する。一部の実施形態において、付加された塩基は、蛍光、発光、pH、熱、水素イオン濃度、ピロホスフェート濃度または放射活性の変化によって検出される。

10

【0068】

方法の一部の実施形態において、方法が、複数のマイクロトランスポンダを、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイに用いることを含む。一部の実施形態が、微流量チップデバイス、例えば、1つ以上の反応ステーション、増幅ステーション、洗浄ステーションおよび/または識別ステーションを備える微流量チップデバイスにおける方法の少なくとも一部を実行することを含む。

【0069】

一部の実施形態において、本明細書中で提供される技術は、方法(例えば、核酸を配列決定する方法)に関するものであり、当該方法(例えば、微流量チップデバイス上で、1つ以上の以下のステップを任意の順で実行することを含む)は、マイクロトランスポンダ(例えば、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイに用いられる、例えば複数のマイクロトランスポンダ)上に(例えば、キャプチャプローブによって)キャプチャされたターゲットヌクレオチド塩基(例えば、DNAおよび/またはRNA)の配列を、複数の配列決定反応にかけて、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合するヌクレオチド塩基の配列(例えば、標識(例えば、光学標識、電気化学標識、質量標識等)、例えば、付加される複数のヌクレオチド塩基に用いられる単一の標識、および/または付加される各ヌクレオチド塩基に用いられて、付加された種々のヌクレオチド塩基を区別する種々の複数の標識を含む)を付加すること(例えば、単一の塩基として、そして/またはオリゴヌクレオチド(例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または、35のヌクレオチドの、最大約30のヌクレオチドを含む、例えばオリゴヌクレオチド)として、塩基を付加すること)；各配列決定反応の後に、付加された各ヌクレオチド塩基を識別すること(例えば、フローメータを用いること、例えば、付加された前記塩基を、装置の反応ステーションから、前記フローメータを用いる前記装置の識別ステーション(例えば、付加された前記塩基を検出する、例えば、蛍光、発光、pH、熱、水素イオン濃度、ピロホスフェート濃度または放射活性の変化によって、付加された塩基を検出するディテクタを含み、前記ディテクタは、1つ以上の光学信号、電気信号および化学信号を検出する)へ移動させることによって、付加されたヌクレオチド塩基を検出すること)；配列の付加された各ヌクレオチド塩基を、マイクロトランスポンダの識別番号と関連付けること；ターゲットヌクレオチド塩基をクローン増幅すること(例えば、配列決定反応より前の、例えば、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応)；および/またはターゲットヌクレオチド塩基の配列の全体が実質的に識別されるまで、1つ以上のステップを繰り返すことを含む。

20

30

40

【0070】

付加的な実施形態が、核酸ターゲット(例えば、DNAおよび/またはRNA)がキャプチャプローブ(例えば、DNAおよび/またはRNAを含む)を介してキャプチャされることとなる表面を有するマイクロトランスポンダ(例えば、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイ用の複数のマイクロトランスポンダ)；表面結合核酸ターゲットを複数の配列決定反応にかけて、ヌクレオチド塩基の配列(例えば、標識(例えば、光学標識、電気化学標識、質量標識)を含む)を付加する反応ステーション；例えば、複数のヌク

50

レオチド塩基に用いられる単一の標識、および／または、各ヌクレオチドに用いられる異なる標識であって、ターゲットヌクレオチド塩基（例えば、単一の塩基として、そして／またはオリゴヌクレオチド（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34または35のヌクレオチドの、最大約30のヌクレオチドを含む、例えばオリゴヌクレオチド）として付加される）の配列に相補的であり、かつこの配列に結合する種々のヌクレオチド塩基を区別する異なる標識；複数の配列決定反応に由来する無関係な配列決定試薬を取り除く（例えば、第2から第nの各ヌクレオチド塩基の付加後に、第2から第nの配列決定反応に由来する無関係な配列決定試薬を取り除く）洗浄ステーション；ならびに各配列決定反応の後に、付加された各ヌクレオチド塩基を識別する（例えば、核酸ターゲットの配列内の第2から第nの各ヌクレオチド塩基のアイデンティティを決定する；例えば、配列の付加された各ヌクレオチド塩基を、マイクロトランスポンダの識別番号と関連付ける）、そして／または付加された前記塩基を、装置の反応ステーションから、フローメータを用いる前記装置の識別ステーションへ移動させる識別ステーション（例えば、フローメータおよび／または付加された各ヌクレオチド塩基を（例えば、光学信号、電気信号および／もしくは化学信号によって、そして／または蛍光、発光、pH、熱、水素イオン濃度、ピロホスフェート濃度もしくは放射性の変化によって）検出するディテクタを含む）；表面上の核酸ターゲットをクローン増幅して表面結合クローンターゲットを形成する（例えば、エマルジョンポリメラーゼ連鎖反応を用いて核酸ターゲットをクローン増幅する；例えば、表面結合核酸ターゲットを、続く第2から第n回の配列決定反応にかける、例えば、核酸ターゲットの配列内の第2から第nのヌクレオチド塩基に相補的である第2から第nのヌクレオチド塩基を付加する（nは、核酸ターゲットの配列内のヌクレオチド塩基の数以下であり、そしてnの数は、実質的に配列全体の末端を表す））増幅ステーションを備える装置（例えば、微流量チップデバイス、例えば、先に記載された1つ以上の反応ステーション、洗浄ステーション、識別ステーションおよび／または増幅ステーションを備える微流量チップデバイスを含む）を提供する。

【0071】

履行されると、例えば、開示される例となる方法を機械に実行させる命令を有する、例となる有形の（*tangible*）機械読出し可能なストレージ媒体が、本明細書中に開示される。例となる命令が、機械に、キャプチャプローブを介してマイクロトランスポンダの表面上に核酸ターゲットをキャプチャさせ、表面上の核酸ターゲットをクローン増幅させて表面結合クローンターゲットを形成させ、そして表面結合クローンターゲットを第1の重合反応または第1のライゲーション反応にかけさせて、核酸ターゲットの配列内の第1のヌクレオチド塩基に相補的である第1の標識ヌクレオチド塩基を付加させる。例となる命令はまた、機械に、第1の重合反応に由来する無関係な重合試薬または第1のライゲーション反応に由来する無関係なライゲーション試薬を取り除かせ、そして、マイクロトランスポンダの識別番号および第1の標識ヌクレオチド塩基の第1の標識を用いて、核酸ターゲットの配列内の第1のヌクレオチド塩基のアイデンティティおよび第1の標識ヌクレオチド塩基のアイデンティティをそれぞれ決定させる。さらに、例となる命令は、機械に、表面結合クローンターゲットを、続く第2から第n回の重合またはライゲーション反応にかけさせて、核酸ターゲットの配列内の第2から第nのヌクレオチド塩基にそれぞれ相補的である第2から第nの標識ヌクレオチド塩基を順次付加させる。nの数は、核酸ターゲットの配列内のヌクレオチド塩基の数に基づく。また、例となる命令は、機械に、第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基の付加後に、第2から第nの重合またはライゲーション試薬に由来する無関係な重合またはライゲーション試薬を取り除かせ、そして、第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基の付加後に、マイクロトランスポンダの識別番号および第2から第nの標識ヌクレオチド塩基の第2から第nの標識を用いて、核酸ターゲットの配列内の第2から第nの各ヌクレオチド塩基のアイデンティティおよび第2から第nの各標識ヌクレオチド塩基のアイデンティティをそれぞれ決定させる。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

ここで図を参照して、図 1 は、本明細書中に開示される系および方法に用いられる例となるマイクロトランスポンダ 1 0 0 を示す。例となるマイクロトランスポンダ 1 0 0 は、例えば、シリコンを含む小さなチップベースのデバイスである。一部の例において、マイクロトランスポンダ 1 0 0 は、寸法が $250\text{ }\mu\text{m} \times 250\text{ }\mu\text{m} \times 100\text{ }\mu\text{m}$ である。例となるマイクロトランスポンダ 1 0 0 は、固有の数の識別番号またはタグ 1 0 2 を備え、これは、一部の例において、無線周波識別 (R F I D) タグであってよい。例となるマイクロトランスポンダ 1 0 0 は、例えばループアンテナ等のアンテナ 1 0 4 を備える。アンテナ 1 0 4 により、マイクロトランスポンダ 1 0 0 は、識別タグ 1 0 2 に保存された、またはこれと関連付けられたマイクロトランスポンダの識別を識別デバイス (またはリーダー) に送信して、マイクロトランスポンダ 1 0 0 を識別することができる。一部の例において、マイクロトランスポンダの識別は、固有の英数字コードまたは番号である。マイクロトランスポンダ 1 0 0 はまた、マイクロトランスポンダ 1 0 0 に結合される任意の標識ヌクレオチド塩基に内在する (r e s i d e n t) 蛍光を検出する光電セル 1 0 6 を備え、この蛍光は、以下でより詳細に開示されるように、変換されて、デジタル方式の「イエス」または「ノー」信号として送信される。

10

【 0 0 7 3 】

例となるマイクロトランスポンダ 1 0 0 は、キャプチャプローブを担持するように、表面が表面ケミストリで誘導体化されている。キャプチャプローブは、特異的な核酸配列とハイブリダイズすることができ、そして、識別されるべき核酸ターゲットをキャプチャするために用いられる。一部の例において、キャプチャプローブは D N A または R N A を含む。

20

【 0 0 7 4 】

例えば、未知の核酸および / もしくは潜在的に 1 つ以上の核酸ターゲットを含有する血液または他の体液サンプル等のサンプルが洗浄され、そうでない場合はマイクロトランスポンダ 1 0 0 の表面に導入される。一部の例において、核酸ターゲットは、D N A または R N A を含む。一部の例において、図 2 の例となる系 2 0 0 において示されるように、複数のマイクロトランスポンダ 1 0 0 が、サンプル 2 0 2 に加えられる。例となる系 2 0 0 において、複数のマイクロトランスポンダ 1 0 0 は、例えば、複数の核酸ターゲットを含有する多重アッセイに用いられてよい。また、サンプル 2 0 2 およびマイクロトランスポンダ 1 0 0 は、診断コンポーネントまたはデバイス 2 0 4 内で処理されるマイクロチップに (例えば、ピペットまたは他の送達機構を介して) 加えられてよい。

30

【 0 0 7 5 】

例となる診断コンポーネント 2 0 4 は、いくつかのステーションを備え、これらは図 2 において別々のステーションとして示されているが、一体化されたコンポーネントであってもよい。診断コンポーネント 2 0 4 は、増幅ステーション 2 0 6 を備える。核酸ターゲットは、増幅ステーション 2 0 6 にて、マイクロトランスポンダ 1 0 0 の表面上でクローン増幅される。一部の例において、増幅は、エマルジョンポリメラーゼ追跡 (c h a s e) 反応を通して達成される。増幅されたターゲットは、表面結合クローンターゲットを形成する。

40

【 0 0 7 6 】

例となる系 2 0 0 はまた、反応ステーション 2 0 8 を備える。マイクロトランスポンダ 1 0 0 は、輸送機構 2 1 0 (例えば、ロボットアーム、微流量キャピラリーまたは任意の他の輸送機構が挙げられる) を通して、増幅ステーション 2 0 6 から反応ステーション 2 0 8 へ輸送され、そこで、ステーションは種々の物理的位置に配置される。反応ステーション 2 0 8 にて、表面結合クローンターゲットは、重合反応 (S B S) またはライゲーション反応 (S B L) にかけて、第 1 の標識ヌクレオチド塩基を付加する。S B S または S B L 反応中にターゲットが曝されるヌクレオチド塩基が、核酸ターゲットの配列内の第 1 のヌクレオチド塩基に相補的であれば、標識ヌクレオチド塩基はターゲットと結合する。したがって、キャプチャされたターゲットの第 1 のヌクレオチド塩基が A であれば、標

50

識（例えば、蛍光染色された）TがAと対を形成することとなる。キャプチャされたターゲットの第1のヌクレオチド塩基としてAを有する、サンプル中の全てのマイクロトランスポンダ100が、そのAに結合したTを有する。ターゲットの第1のヌクレオチド塩基が、SBSまたはSBL反応中に示されるヌクレオチド塩基と相補的でなければ、マイクロトランスポンダ100およびキャプチャされたターゲットは、塩基が付加されずに進む。一部の例において、付加される標識ヌクレオチド塩基は、1セットの標識ヌクレオチド塩基である。また、標識は、光学標識、蛍光色素、放射性標識および/または電気化学標識であってもよい。一部の例において、単一タイプの標識が、複数のヌクレオチド塩基に用いられる。しかしながら、他の例において、種々のタイプの標識（例えば、種々の色）が、種々のヌクレオチド塩基を区別するために用いられる。一部の例において、標識ヌクレオチド塩基が、単一の塩基として付加される。しかしながら、他の例において、標識ヌクレオチド塩基が、オリゴヌクレオチドとして付加される。オリゴヌクレオチドが、例えば約30のヌクレオチド塩基等のいくつかのヌクレオチド塩基を含み得る。

【0077】

例となる系200は、重合反応に由来する任意の無関係な重合試薬またはライゲーション反応に由来する無関係なライゲーション試薬を取り除くために用いられる洗浄ステーション212を備える。加えられた標識ヌクレオチド塩基がターゲットの第1のヌクレオチド塩基と相補的であれば、各マイクロトランスポンダ100に、キャプチャターゲット、および配列の、第1の相補的な標識ヌクレオチド塩基が残される。上記されたように、標識ヌクレオチド塩基が、ターゲットの第1のヌクレオチド塩基と相補的でなければ、そのようなターゲットを有するマイクロトランスポンダ100は、ヌクレオチド塩基が付加されずに進む。

【0078】

例となる系200はまた、核酸ターゲットの配列内の第1のヌクレオチド塩基のアイデンティティを決定する識別ステーション214を備える。一部の例において、識別ステーション214は、アンテナ104によって送信される信号を読んで、例えば、標識の存在/不在を示すイエス/ノーを表すデジタル方式の1または0を検出する、フローリーダまたはメータである。一部の例において、フローリーダは、蛍光または他の色の存在または不在を検出して、反応ステーション208にて導入されたヌクレオチド塩基が、キャプチャされたターゲットの第1のヌクレオチド塩基に結合しているかを決定する。また、一部の例において、フローリーダは、色の強度を決定してもよい。例えば、キャプチャされたターゲットの第1の2つのヌクレオチド塩基が同じであり、そして反応ステーション208に導入された標識ヌクレオチド塩基が相補的であれば、導入された標識ヌクレオチド塩基の2つが、順番に(in sequence)ターゲットに結合する。標識を有する2つのヌクレオチド塩基が結合されるので、検出可能な色の強度は、2倍になる。例えば、ターゲットが2つの順次的なTを含有し、そして反応ステーション208がAをサンプルに導入すれば、2つのAが第1の2つのTと結合する。識別ステーション214は、単一の連結A塩基の蛍光の2倍であるピーク蛍光を検出する。

【0079】

一部の例において、鎖終止(chain-terminating)ヌクレオチドが用いられる。そのような例では、1つのヌクレオチド塩基が、ターゲット配列に相補的な塩基対として付加されると、反応が停止する。付加されたヌクレオチドは識別され、そしてプロセスは繰り返されて、続くヌクレオチド塩基が付加されてよい。これらの例において、4つのタイプのヌクレオチド塩基について4つの標識が用いられてよく、そしてサンプルは、4つ全て(または4つのいくつかの組合せ)のヌクレオチド塩基に同時に曝されてよい。種々の標識は、識別ステーション214によって認識されて、どのヌクレオチド塩基がどのマイクロトランスポンダ100に付加されたかを決定することができる。

【0080】

識別ステーション214はまた、アンテナ104から送信される、マイクロトランスポンダ100の識別タグ102と関連付けられた識別またはトランスポンダ番号を検出する

10

20

30

40

50

。ヌクレオチドの存在または不在を表すデジタル信号は、マイクロトランスポンダ番号とマッチされる。マイクロトランスポンダ番号は、反応ステーション 208 で付加された標識ヌクレオチド塩基の相補的な対に基づいて決定される、ターゲット配列の第 1 のヌクレオチド塩基と共に、データベース 216 内に維持される。ヌクレオチド塩基が反応ステーション 208 中に付加されていなければ、識別ステーション 214 は、マイクロトランスポンダ番号を読むが、ヌクレオチド塩基を、データベース中に保存される配列に加えない。

【0081】

例となる系 200 はまた、例えば、スクリーン、他のタイプのディスプレイおよび / または任意の適切な通信デバイスであってよいアウトプットインターフェース 218 を備える。アウトプットインターフェース 218 は、ヌクレオチド塩基が検出されるに従い、ターゲット配列のヌクレオチド塩基を示すのに用いられてよい。したがって、系 200 の操作者が、ターゲット配列の検出および識別をリアルタイムで見ることができる。

【0082】

マイクロトランスポンダ 100 が識別ステーション 214 を通って送られた後、マイクロトランスポンダ 100 は、第 2 の導入されたヌクレオチド塩基と混合するために、反応ステーション 208 に戻る。輸送機構 210 は、マイクロトランスポンダ 100 を輸送して反応ステーション 208 へ戻すために用いられてよい。付加的なヌクレオチド塩基が、サンプルに導入される。第 1 のヌクレオチド塩基が、第 1 の反応の標識ヌクレオチド塩基と結合したならば、ターゲットの第 2 のヌクレオチド塩基は、相補的であれば、付加的な標識ヌクレオチドと結合する。ターゲットの第 1 のヌクレオチド塩基が、第 1 の反応中に第 1 の標識ヌクレオチド塩基と結合しなかったならば、第 2 の反応の第 2 の標識ヌクレオチド塩基は、相補的であれば、ターゲットの第 1 のヌクレオチド塩基と結合し得る。第 1 の反応における第 1 の標識ヌクレオチド塩基のうちの 2 つが、第 1 の反応中にターゲットの第 1 の 2 つのヌクレオチド塩基と結合するならば (鎖終止ヌクレオチドが用いられなかった場合)、第 2 の反応の第 2 の標識ヌクレオチド塩基は、相補的であれば、ターゲットの第 3 のヌクレオチド塩基と結合し得る。すなわち、反応ステーション 208 での第 2 の S B S または S B L 反応中に、第 2 のタイプの標識ヌクレオチド塩基が導入され、そして、加えられた標識ヌクレオチド塩基に相補的であれば、鎖内の隣のヌクレオチド塩基 (そのヌクレオチド塩基が第 1、第 2、第 3 等であるかどうかにかかわらず) にてターゲット配列に結合する。したがって、ターゲット配列の鎖および相補的な塩基対が、生じ始める。

【0083】

洗浄ステーション 212 および識別ステーション 214 での操作は繰り返されて、ターゲットの鎖内の隣の配列は、識別され、データベース 216 中に保存され、そしてアウトプットインターフェース 218 を介して操作者に示される。マイクロトランスポンダ 100 は、ここでも、さらに別の付加的な標識ヌクレオチド塩基の導入のために、反応ステーション 208 中に再導入される。プロセスは、ターゲット配列が識別されるまで、一連のステーション 208、212、214 を通して何回も (例えば、n 回) 続く。サイクル数 n は、核酸ターゲットの配列内のヌクレオチドの数に基づいてよい。一部の例において、操作が繰り返される回数 n は、実質的に配列全体の末端に対応してよい。

【0084】

核酸配列を識別する例となる系 200 を実施する例となる方法が、図 2 において示されているが、図 2 において示される 1 つ以上の要素、プロセスおよび / またはデバイスは、組み合わせられても、分割されても、再配置されても、省略されても、除外されても、そして / または他の任意のやり方で実施されてもよい。さらに、1 つ以上の例となるマイクロトランスポンダ 100、例となる診断コンポーネント 204、例となる増幅ステーション 206、例となる反応ステーション 208、例となる洗浄ステーション 212、例となる識別ステーション 214、例となるデータベース 216、例となるアウトプットインターフェース 218、ならびに / または、より一般的に、図 1 および図 2 の例となる系 200

の1つ以上の部分は、ハードウェア、ソフトウェア、ファームウェア、ならびに/またはハードウェア、ソフトウェアおよび/もしくはファームウェアの任意の組合せによって、実施されてよい。したがって、例えば、1つ以上の例となるマイクロトランスポンダ100、例となる診断コンポーネント204、例となる増幅ステーション206、例となる反応ステーション208、例となる洗浄ステーション212、例となる識別ステーション214、例となるデータベース216、例となるアウトプットインターフェース218、ならびに/または、より一般的に、図1および図2の例となる系200の1つ以上の任意の部分は、1つ以上の回路、プログラマブルプロセッサ、特定用途向け集積回路(ASIC)、プログラマブル論理デバイス(PLD)、および/またはフィールドプログラマブル論理デバイス(FPLD)等によって、実施されてよい。さらになお、図2の例となる系200は、1つ以上の要素、プロセス、および/もしくはデバイスを、図2に示されるものに加えて、もしくはそれらの代わりに備えてよく、そして/または、示される要素、プロセスおよびデバイスのいずれか、もしくは全てのうちの2つ以上を備えてよい。

【0085】

図1および図2の装置および系を実施する、例となる方法を表すフローチャートが、図3および図4において示される。この例において、方法は、図5に関連して以下で議論される、例となるコンピュータ500において示されるプロセッサ512等のプロセッサによる履行用プログラムを用いて、実施されてよい。プログラムは、CD-ROM、フロッピー(登録商標)ディスク、ハードディスク、デジタル多用途ディスク(DVD)、ブルーレイディスク、またはプロセッサ512が伴うメモリ等の有形のコンピュータ読出し可能な媒体に保存されたソフトウェアで実現されてよいが、代わりに、プログラムの全体および/もしくはその部分が、プロセッサ512以外のデバイスによって履行されてもよいし、そして/またはファームウェアもしくは専用のハードウェアで実現されてもよい。さらに、例となるプログラムは、図3および図4において示されるフローチャートを参照して記載されているが、代わりに、例となる系200を実施する他の多くの方法が用いられてよい。例えば、ブロックの履行の順序が変えられてもよいし、および/または記載されるブロックの一部が変えられてもよいし、除外されてもよいし、組み合わせられてもよい。

【0086】

先に述べられたように、図3および図4の例となるプロセスまたは方法は、情報が任意の期間(例えば、長時間、常時、短いインスタンス(brief instance)、一時的なバッファリングの間および/または情報のキャッシングの間)保存されるハードディスクドライブ、フラッシュメモリ、読出し専用メモリ(ROM)、コンパクトディスク(CD)、デジタル多用途ディスク(DVD)、キャッシュ、ランダムアクセスメモリ(RAM)および/または任意の他のストレージ媒体等の有形のコンピュータ読出し可能な媒体に保存されるコード化された命令(例えば、コンピュータ読出し可能な命令)を用いて実施されてよい。本明細書中で用いられる用語、有形のコンピュータ読出し可能な媒体は、任意のタイプのコンピュータ読出し可能なストレージを含み、かつ信号の伝播を除くように、明示的に定義される。加えて、または代わりに、図3および図4の例となる方法は、情報が任意の期間(例えば、長時間、常時、短いインスタンス、一時的なバッファリングの間および/または情報のキャッシングの間)保存されるハードディスクドライブ、フラッシュメモリ、読出し専用メモリ、コンパクトディスク、デジタル多用途ディスク、キャッシュ、ランダムアクセスメモリおよび/または任意の他のストレージ媒体等の非一過性の(non-transitory)コンピュータ読出し可能な媒体に保存されるコード化された命令(例えば、コンピュータ読出し可能な命令)を用いて実施されてよい。本明細書中で用いられるように、句「少なくとも」は、請求項のプリアンブルにおいて移行語(transition term)として用いられる場合、用語「含む(comprising)」がオープンエンドであるのと同様に、オープンエンドである。したがって、移行語として「少なくとも」をプリアンブルにおいて用いる請求項は、請求項で明示的に列挙される要素の他に、要素を含んでよい。

【0087】

図3は、核酸を配列決定する方法300を示す。例となる方法300は、例えば、マイクロトランスポンダ（例えば、図1のマイクロトランスポンダ100）の表面上への、ターゲット核酸配列のキャプチャ（ブロック302）を含む。例となる方法300はまた、例えば、（例えば、図2の増幅ステーション206での）ポリメラーゼ連鎖反応を介して、ターゲット核酸配列を増幅すること（ブロック304）を含む。

【0088】

また、例となる方法300は、例えば、標識ヌクレオチド塩基等の加えられたヌクレオチド塩基との、ターゲット配列の反応（ブロック306、ブロック308）を含む。反応は、例えばSBS等の重合反応（ブロック306）であってもよいし、例えばSBL等のライゲーション反応（ブロック308）であってもよい。反応は、例えば、図2の反応ステーション208にて起こり得る。先に開示されるように、反応により、標識ヌクレオチド塩基が、ターゲット核酸配列のヌクレオチド塩基と結合して、ターゲット核酸鎖の隣の塩基対を形成することができる。反応が重合反応である場合、例となる方法300は、無関係な重合試薬を取り除くこと（ブロック310）を含み、そして反応がライゲーション反応である場合、例となる方法300は、無関係なライゲーション試薬を取り除くこと（ブロック312）を含む。無関係な試薬の除去は、例えば、図2の洗浄ステーション212にて起こり得る。

【0089】

例となる方法300はまた、ターゲット配列内のヌクレオチド塩基を識別すること（ブロック314）を含む。識別は、付加されたヌクレオチド塩基の検出された標識、および識別/マイクロトランスポンダ番号に基づいて、どのヌクレオチド塩基がどのマイクロトランスポンダ表面に付加されたかを決定する。塩基対形成の制限的な性質（各タイプのヌクレオチド塩基が、1タイプのヌクレオチド塩基とのみ結合する）のため、どのヌクレオチド塩基がマイクロトランスポンダに付加されたかを知ることが、ターゲット核酸配列内のヌクレオチド塩基の識別に至る。記録が（例えば、図2の例となるデータベース216中に）維持されて、どのヌクレオチド塩基が、ターゲット配列のどの鎖に付加されているかをチャートにすることができ、そしてどのヌクレオチド塩基が付加されているかの結果は、操作者にリアルタイムに、すなわち、付加されたヌクレオチド塩基およびターゲット配列の塩基対の鎖が構築されるに従い、示され得る。

【0090】

例となる方法300は、ターゲット内に付加的なヌクレオチド塩基が付加されるべきかを決定する（ブロック316）。付加的なヌクレオチド塩基が配列にあれば、例となる方法300は、ブロック306（重合用）またはブロック308（ライゲーション用）のいずれかでの反応に戻る。例となる方法300は、配列内の隣のヌクレオチドを付加し、かつ識別し続ける。方法300は、ターゲット配列の全てまたは実質的に全てが識別されるまで、必要に応じてn回繰り返される。続いて、もはやヌクレオチド塩基が配列になれば（ブロック316）、例となるプロセスは終わる（ブロック318）。方法300のエンドにて、ターゲット核酸の全てまたは実質的に全てが識別されている。

【0091】

図4は、核酸を配列決定する別の例となる方法400を示す。例となる方法400は、1つ以上のマイクロトランスポンダ上にキャプチャされたターゲットヌクレオチド塩基の配列がかけられる複数の配列決定反応（ブロック402）を含む。この例において、マイクロトランスポンダは、例えば、図1および図2のマイクロトランスポンダ100であってもよい。また、配列決定反応は、例えば、先に開示されるように、SBSであってもSBLであってもよく、そして、例えば、図2の反応ステーション208にて起こり得る。例となる方法400において、配列決定反応は、ターゲットヌクレオチド塩基の配列に相補的であり、かつこの配列に結合する標識ヌクレオチド塩基の配列を構築する。

【0092】

例となる方法400はまた、標識ヌクレオチド塩基の配列の各標識ヌクレオチド塩基（すなわち、付加された標識ヌクレオチド塩基）、および各配列決定反応の後に標識ヌクレ

10

20

30

40

50

オチド塩基が結合されるターゲットヌクレオチド塩基の配列の相補的な各ターゲットヌクレオチド塩基を識別すること（ブロック404）を含む。例となる方法400の識別部分はまた、マイクロトランスポンダの識別番号を読む（ブロック404）。この例では、ブロック404での識別は、図2の識別ステーション214において起こり得、そしてマイクロトランスポンダの識別番号は、図1のマイクロトランスポンダ100の識別タグ102から読まれ得る。また、標識ヌクレオチド塩基の配列の各標識ヌクレオチド塩基、および標識ヌクレオチド塩基が結合されるターゲットヌクレオチド塩基の配列の相補的な各ターゲットヌクレオチド塩基が、マイクロトランスポンダの識別番号と関連付けられ得る。識別は、先に開示されるように、操作者へアウトプットされ得る。

【0093】

10

図4の例となる方法400はまた、付加的なターゲットヌクレオチド塩基が配列にあるかを決定する（ブロック406）。付加的なターゲットヌクレオチド塩基が配列にあれば、制御により、続く配列決定反応のブロック402に戻って、付加的な標識ヌクレオチド塩基を付加する。続いて、方法400は、続く識別（ブロック404）を通して続く。一部の例において、付加された各標識ヌクレオチド塩基が、続くそれぞれの配列決定反応間で識別される。付加的なターゲットヌクレオチド塩基が配列になれば（ブロック406）、例となる方法は終わる（ブロック408）。

【0094】

図5は、図3および図4の方法を履行して、図2の系200を実施することができる例となるコンピュータ500のブロック図である。コンピュータ500は、例えば、サーバ、パーソナルコンピュータ、または他の任意のタイプのコンピューティングデバイスであってよい。

20

【0095】

実例（instant example）のコンピュータ500は、プロセッサ512を備える。例えば、プロセッサ512は、任意の所望のファミリーまたは製造者から、1つ以上のマイクロプロセッサまたはコントローラによって実施されてよい。

【0096】

プロセッサ512は、ローカルメモリ513（例えば、キャッシュ）を備え、そして揮発性メモリ514および不揮発性メモリ516を含むメインメモリと、バス518を介して通信する。揮発性メモリ514は、同期ダイナミックランダムアクセスメモリ（SDRAM）、ダイナミックランダムアクセスメモリ（DRAM）、RAMBUSダイナミックランダムアクセスメモリ（RDRAM）および/または任意の他のタイプのランダムアクセスメモリデバイスによって実施されてよい。不揮発性メモリ516は、フラッシュメモリ、および/または任意の他の所望のタイプのメモリデバイスによって実施されてよい。メインメモリ514、516へのアクセスは、メモリコントローラによって制御される。

30

【0097】

コンピュータ500はまた、インターフェース回路520を備える。インターフェース回路520は、イーサネット（登録商標）インターフェース、ユニバーサルシリアルバス（USB）および/またはPCI expressインターフェース等の任意のタイプのインターフェース規格によって実施されてよい。

40

【0098】

1つ以上のインプットデバイス522が、インターフェース回路520に接続される。インプットデバイス522により、ユーザは、データおよびコマンドをプロセッサ512に入力することができる。インプットデバイスは、例えば、キーボード、マウス、タッチスクリーン、トラックパッド、トラックボール、アイソポイント（isopoint）および/または音声認識系によって実施されてよい。

【0099】

また、1つ以上のアウトプットデバイス524が、インターフェース回路520に接続される。アウトプットデバイス524は、例えば、ディスプレイデバイス（例えば、液晶ディスプレイ、ブラウン管ディスプレイ（CRT）、プリンタおよび/またはスピーカ）

50

によって実施されてよい。したがって、インターフェース回路 520 は一般的に、グラフィックスドライバカードを備える。

【0100】

インターフェース回路 520 はまた、モデムまたはネットワークインターフェースカード等の通信デバイスを備えて、外部のコンピュータとのデータ交換を、ネットワーク 526 (例えば、イーサネット接続、デジタル加入者回線 (DSL)、電話線、同軸ケーブル、携帯電話系等) を介して促進する。

【0101】

コンピュータ 500 はまた、ソフトウェアおよびデータを保存する 1 つ以上の質量ストレージデバイス 528 を備える。そのような質量ストレージデバイス 528 の例として、フロッピーディスクドライブ、ハードドライブディスク、コンパクトディスクドライブおよびデジタル多用途ディスク (DVD) ドライブが挙げられる。

10

【0102】

図 5 のコード化された命令 532 は、質量ストレージデバイス 528、揮発性メモリ 514、不揮発性メモリ 516、および / または CD もしくは DVD 等のリムーバブル記憶媒体に保存されてよい。

【0103】

前述のことから、先に開示された方法、装置、系および製造品は、例えば、病原体または遺伝的疾患の DNA に関連する、疾患の診断に用いられ得る配列等の、未知の核酸配列を識別するために用いられてよいことが理解されよう。ここで開示される例は、複数のターゲットの核酸配列を、速いスループット速度にて、低いプロセッシングおよびストレージ要件で、同時に決定するために用いられ得る。また、本明細書中に開示される例は、核酸が配列決定されるに従い、未知のターゲットのリアルタイム識別を操作者に提供する。

20

【0104】

ある例となる方法、装置および製造品が本明細書中に記載されてきたが、本特許の適用範囲は、これらに限定されない。反対に、本特許は、特許請求の範囲内に適正に入る方法、装置および製造品を全て包含する。

【図 1】

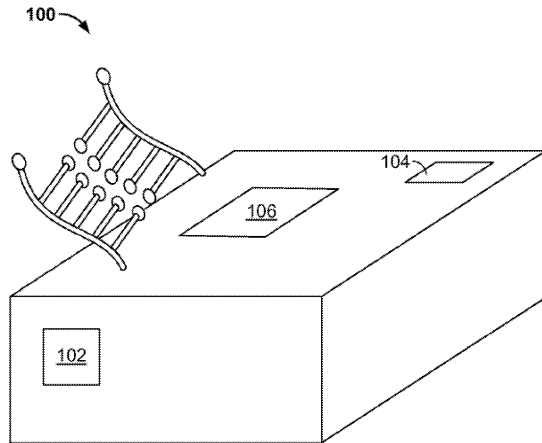


FIG. 1

【図 2】

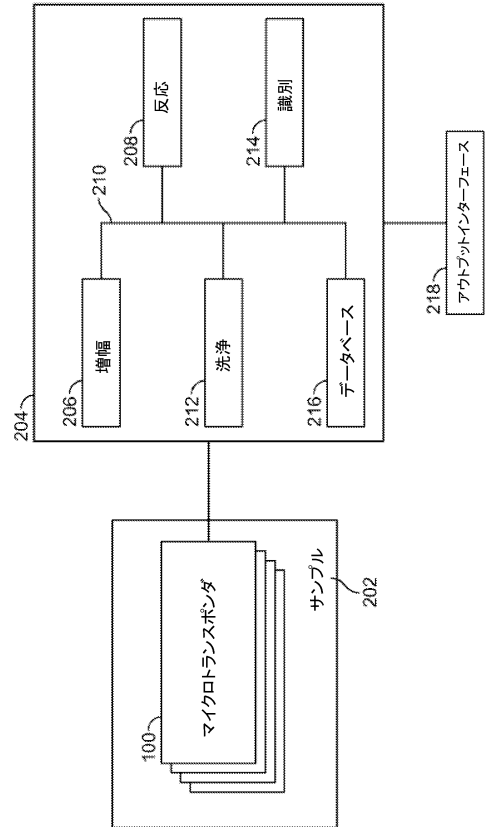


FIG. 2

【図 3】

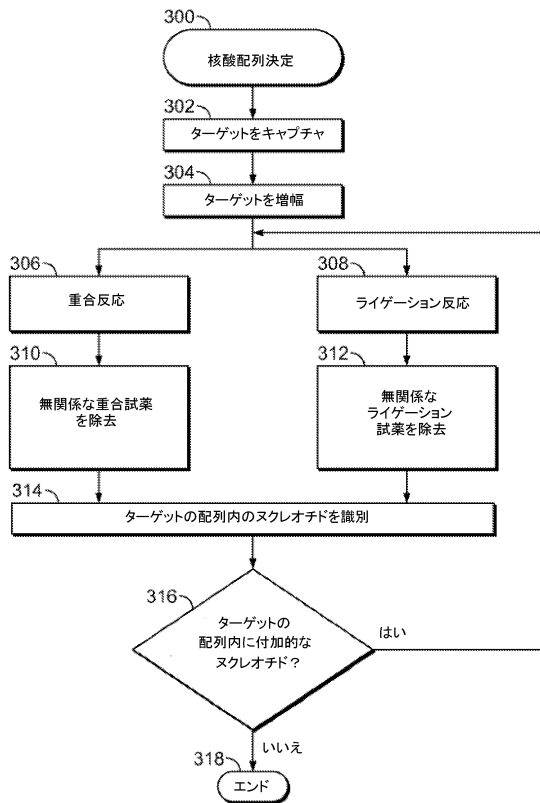


FIG. 3

【図 4】

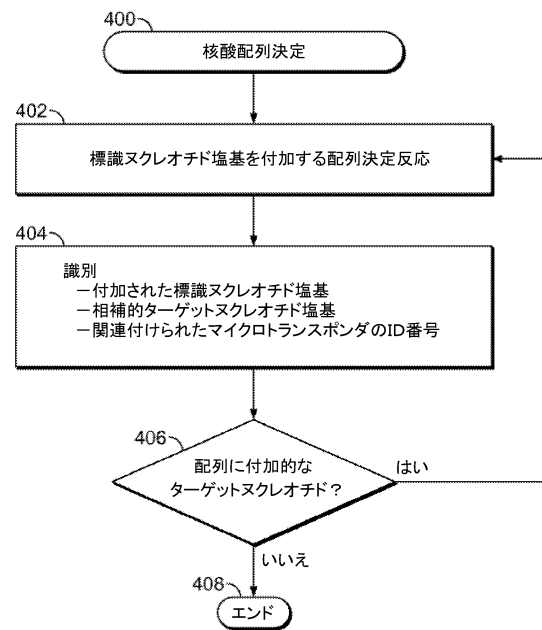


FIG. 4

【図 5】

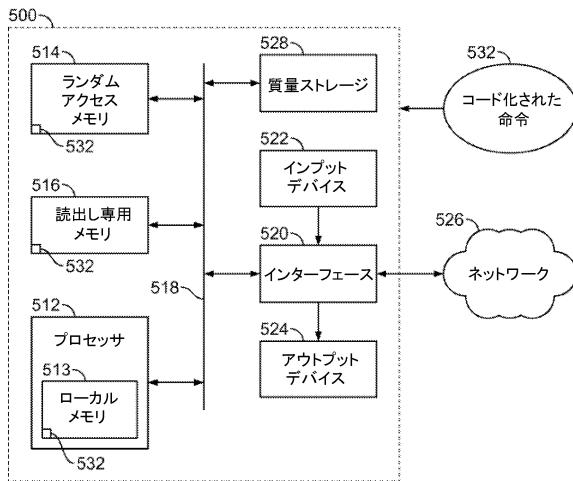


FIG. 5

フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2000-502886(JP,A)
国際公開第2010/097775(WO,A1)
特表2012-501643(JP,A)
Bioessays, 2010, Vol. 32, pp.524-536

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)