

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7208230号
(P7208230)

(45)発行日 令和5年1月18日(2023.1.18)

(24)登録日 令和5年1月10日(2023.1.10)

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 Q 1/6869(2018.01) C 1 2 Q 1/6869 Z

請求項の数 20 (全27頁)

(21)出願番号	特願2020-520597(P2020-520597)	(73)特許権者	520021048 プソマーゲン、インコーポレイテッド P S O M A G E N, I N C. アメリカ合衆国、メリーランド州、ロ ックビル、ピッカードドライブ 13 30
(86)(22)出願日	平成30年10月9日(2018.10.9)		
(65)公表番号	特表2021-500879(P2021-500879 A)		
(43)公表日	令和3年1月14日(2021.1.14)	(74)代理人	100079049 弁理士 中島 淳
(86)国際出願番号	PCT/US2018/055067	(74)代理人	100084995 弁理士 加藤 和詳
(87)国際公開番号	WO2019/074960	(72)発明者	アプテ、ザッカリー アメリカ合衆国 94103 カリフォル ニア サンフランシスコ、シャープ301 ラングトン ストリート、360 ユーバ イオーム、インコーポレイテッド、内 最終頁に続く
(87)国際公開日	平成31年4月18日(2019.4.18)		
審査請求日	令和3年8月26日(2021.8.26)		
(31)優先権主張番号	62/569,853		
(32)優先日	平成29年10月9日(2017.10.9)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

(54)【発明の名称】 核酸配列を特性決定するための単一分子シーケンシング及び固有の分子識別子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

一組の標的核酸配列に関連する、固有の分子識別子(UMI)ベースの一組の分子を準備すること、

前記一組のUMIベースの分子、及び、前記一組の標的核酸配列に対応する一組の核酸分子に基づいて、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること、ここで、前記一組のタグ付き核酸分子の各タグ付き核酸分子は：

ランダムな「N」塩基セットを含むUMI領域、ここで、各ランダムな「N」塩基は、「A」塩基、「G」塩基、「T」塩基、及び「C」塩基のうちのいずれか1つから選択される、及び

前記一組の標的核酸配列のうちの標的核酸配列に相当する標的領域を含む、

単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子を用いて促進すること、ここで、前記単一分子シーケンシングを行うことは：

第一の組の配列領域と第二の組の配列領域との間の比較を決定すること、ここで、前記第一の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたあるタグ付き核酸分子の第一のUMI領域及び第一の標的領域を含み、前記第二の組の配列領域は前記一組のタグ付き核酸分子のうちのタグ付き核酸分子の第二のUMI領域及び第二の標的領域を含む、及び

前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の前記比較に基づいて前記

タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止すること、
を含む、改善された単一分子シーケンシングの方法。

【請求項 2】

前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは、前記第一の U M I 領域及び前記第一の標的領域が、前記第二の U M I 領域及び前記第二の標的領域と一致することに呼応して、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記単一分子シーケンシングを促進することが、前記シーケンシングされたタグ付き核酸分子の前記第一の組の配列領域を決定すること、及び前記第一の組の配列領域を保存することを含み、前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の前記比較を決定することが、前記第一の組の配列領域を、前記第二の組の配列領域との前記比較のために呼び出すことを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第一の組の配列領域を決定すること、前記第一の組の配列領域を保存すること、前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の前記比較を決定すること、及び前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、それぞれ、前記単一分子シーケンシングの単回シーケンシングランの間にリアルタイムで実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記比較、及び前記第一の組の配列領域と関連づけられたタグ付き核酸分子のシーケンシングについての定義された制限に基づいて、シーケンシングを停止することを含み、前記一組のタグ付き核酸分子が前記第一の組の配列領域と関連づけられた前記タグ付き核酸分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記一組の U M I ベースの分子を調製することが、前記一組の標的核酸配列及び前記タグ付き核酸分子のシーケンシングについての前記定義された制限に基づいて、前記一組のタグ付き核酸分子の生成を促進するための多数の異なる U M I 領域を決定することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記一組のタグ付き核酸分子の前記 U M I 領域の前記単一分子シーケンシングに基づいて、前記一組の核酸分子を含むサンプルから、標的核酸配列に対応する核酸分子の絶対分子数を決定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子で促進することが、前記一組の核酸分子からの過小に現れる核酸分子の検出及び絶対計数を改善するために前記単一分子シーケンシングを促進することを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記一組の標的核酸配列が、第一の組の標的及び第二の組の標的のうちの少なくとも一方を含み、前記第一の組の標的が、16S rRNA 標的及び18S rRNA 標的を含み、前記第二の組の標的が、16S rRNA 標的及びHPVに関連する標的を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子で促進することが、read until技術で前記単一分子シーケンシングを促進することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

固有の分子識別子 (U M I) ベースの一組の分子、及び一組の標的核酸配列に対応する一組の核酸分子に基づいて、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること、及び
前記一組のタグ付き核酸分子を用いた単一分子シーケンシングを促進すること、

10

20

30

40

50

を含み、前記単一分子シーケンシングを促進することは、

第一のUMI領域と第二のUMI領域との間の比較を決定すること、ここで、前記第一のUMI領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたあるタグ付き核酸分子のものであり、前記第二のUMI領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのあるタグ付き核酸分子のものである；

第一の組の配列領域と第二の組の配列領域との比較を決定すること、ここで、前記第一の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一のUMI領域を含み、前記第二の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのタグ付き核酸分子の第二のUMI領域及び第二の標的領域を含む、及び

前記第一のUMI領域と前記第二のUMI領域との間の前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止すること、

を含む、改善された単一分子シーケンシングの方法。

【請求項12】

前記比較を決定することが、前記第一のUMI領域、前記シーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一の標的領域、前記第二のUMI領域、及び前記タグ付き核酸分子の第二の標的領域の間の前記比較を決定することを含み、前記第一の標的領域及び前記第二の標的領域が前記一組の標的核酸配列のうちのある標的核酸配列と関連し、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記第一のUMI領域、前記第一の標的領域、前記第二のUMI領域、及び前記第二の標的領域の間の前記比較に基づいて前記シーケンシングを停止することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記比較、及び前記標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子のシーケンシングについての定義された制限に基づいて、前記シーケンシングを停止することを含み、前記一組のタグ付き核酸分子が前記標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子のシーケンシングについての前記定義された制限に基づいて前記標的核酸配列に関連する絶対分子数を決定することをさらに含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記第一のUMI領域が前記第二のUMI領域と一致することに基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記一組のUMIベースの分子が、複数の微生物分類群と関連する保存領域を標的とする規定された配列領域を含むUMIベースのプライマーを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項17】

前記一組のタグ付き核酸分子の生成を促進することは、前記一組の核酸分子のうちの過小に現れる核酸分子及び過大に現れる核酸分子と関連する一組のアンプリコンのバランスをとるために、前記一組のUMIベースの分子及び前記一組の核酸分子に基づいて少なくとも一つの増幅プロセスを行うことを含む、請求項11に記載の方法。

【請求項18】

前記一組のタグ付き核酸分子の生成を促進することが：

前記一組の核酸分子のうちの、核酸分子の第一のサブセットを用いてPCR増幅プロセスを行うことに基づいて、核酸分子のPCR増幅サブセットを生成すること、及び

前記一組の核酸分子のうちの核酸分子の前記PCR増幅サブセットと核酸分子のPCRとは独立したサブセットとに基づいて前記一組のタグ付き核酸分子を生成すること、

を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項19】

前記一組の標的核酸配列が、抗生物質耐性及びウイルスカプシド遺伝子のうちの少なく

10

20

30

40

50

とも1つに関連する標的核酸配列を含む、請求項11に記載の方法。

【請求項20】

前記一組のタグ付き核酸分子を用いて前記単一分子シーケンシングを促進することが、read until技術を用いて前記単一分子シーケンシングを促進することを含む、請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017年10月9日に出願された米国仮出願第62/569,853号の利益を請求する。米国仮出願第62/569,853号は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

【0002】

本開示は、概して、ゲノミクス及び分子生物学に関する。

【背景技術】

【0003】

高スループットシーケンシング技術を使用して複雑な混合物中の標的を特定する場合に依然として対処が必要な1つの重要な課題は、過大に現れる（overrepresented）核酸標的が数回シーケンシングされて、前記初期核酸プール中における過小に現れる（underrepresented）分子の検出を妨害することである。過大に現れるテンプレート分子は数回シーケンシングされるために、シーケンシングランの出力されるシーケンシングリードの大部分を占める可能性があり、このことにより、過小に現れるテンプレート分子をシーケンシングするために使用できたはずのサイクルが消費されるおそれがある。

【発明の概要】

【0004】

単一分子シーケンシング（SMS）は、（例えばシーケンシング・バイ・シンセシス法等と比較して）様々な利点を有し得る。いくつかの例では、SMSはDNA分子の直接的特性決定を可能とし得る。SMSの現行の応用例としては、Pacific Biosciences及びOxford Nanoporeによって開発された技術が挙げられる。このようなプラットフォームは、DNA分子のリアルタイムシーケンシングを可能にし得、これにより、適切なコンピュータハードウェア及びソフトウェアと組み合わせれば、シーケンシングデータのリアルタイムプロセッシングが可能となり得る。

【図面の簡単な説明】

【0005】

【図1】図1は方法のある実施形態の変形例をフローチャートに表したものを含む。

【図2】図2は方法のある実施形態の変形例をフローチャートに表したものを含む。

【図3】図3は方法のある実施形態の変形例をフローチャートに表したものを含む。

【発明を実施するための形態】

【0006】

以下の実施形態の記載は、実施形態を限定することを意図するものではなく、任意の当業者が製造及び使用を行うことを可能にすることを意図するものである。

【0007】

1. 概要

図1～3に示すように、（例えば、改善された単一分子シーケンシング等のための）方法100のいくつかの実施形態は、

一組の標的核酸配列に関連づけられた、固有の分子識別子（UMI）ベースの一組の分子を準備すること—S110；

前記UMIベースの一組の分子と、前記一組の標的核酸配列に対応する（例えば含む等）一組の核酸分子とに基づく一組のタグ付き核酸分子の生成を促進する（例えば生成する等）こと—S120；及び／又は

10

20

30

40

50

前記一組のタグ付き核酸分子を用いた単一分子シーケンシングを、促進すること（例えば実施すること等）－S 130を含んでもよい。

付加的又は代替的に、方法100のいくつかの実施形態は、前記単一分子シーケンシングに基づいて分子数を決定することS 140；及び／又は任意の他の適切なプロセスを含んでもよい。

【0008】

ある具体的な例では、（例えば、改善された単一分子シーケンシングのための）方法100は、

一組の標的核酸配列に関連づけられた一組のUMIベースの分子（例えば、標的核酸配列の標的配列領域に相補的な標的関連領域を含むUMIベースの分子群等）を準備すること；

10

前記一組のUMIベースの分子と、前記一組の標的核酸配列に対応する（例えば、含む等）一組の核酸分子とに基づく一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること、ここで、前記一組のタグ付き核酸分子に属するそれぞれのタグ付き核酸分子は、ランダムな「N」塩基のセットを含む少なくとも1つのUMI領域と、前記一組の標的核酸配列に属する標的核酸配列に対応する少なくとも1つの標的領域とを含み、ランダムな「N」塩基のそれぞれは、「A」塩基、「G」塩基、「T」塩基、及び「C」塩基から選択される；及び／又は

前記一組のタグ付き核酸分子を用いて単一分子シーケンシングを促進すること、ここで、前記単一分子シーケンシングを促進することは、

20

第一の組に属する配列領域と第二の組に属する配列領域との間の比較を決定すること（例えば、前記第一の組に属する配列領域と前記第二の組に属する配列領域との間の配列類似性を比較すること等）を含み、前記第一の組に属する配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子に属するシーケンシングされたあるタグ付き核酸分子（例えば、前記単一分子シーケンシングの同じシーケンシングランによりあらかじめシーケンシングされたタグ付き核酸分子）の第一のUMI領域と第一の標的領域とを含み、前記第二の組に属する配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子に属するあるタグ付き核酸分子の第二のUMI領域及び第二の標的領域を含む、及び、

前記第一の組に属する配列領域と前記第二の組に属する配列領域との間の比較に基づいて（例えば、前記タグ付き核酸分子が対応する分子数に寄与しないように；前記タグ付き核酸分子に対応する核酸配列が過大に現れないように；等々）、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを（例えば、前記シーケンシングラン中に；等々）停止すること、を含む、

30

を含んでもよい。

【0009】

ある具体的な例では、（例えば、改善された単一分子シーケンシングのための）方法100は、

一組のUMIベースの分子と、一組の標的核酸配列に対応する一組の核酸分子とに基づいて、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること；及び／又は

前記一組のタグ付き核酸分子を用いた単一分子シーケンシングを促進すること、ここで、前記単一分子シーケンシングを促進することは、

40

第一のUMI領域と第二のUMI領域との間の比較を決定すること、ここで、前記第一のUMI領域は、前記一組のタグ付き核酸分子に属するシーケンシングされたあるタグ付き核酸分子のUMI領域であり、前記第二のUMI領域は、前記一組のタグ付き核酸分子に属するあるタグ付き核酸分子のUMI領域であり；一組の配列領域及び第二の組の配列領域、ここで、前記第一の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子に属するシーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一のUMI領域を含み、前記第二の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子に属するタグ付き核酸分子の第二のUMI領域及び第二の標的領域を含む、及び

前記第一のUMI領域と前記第二のUMI領域との間の比較に基づいて前記タグ付き

50

核酸分子のシーケンシングを停止すること、を含む、
を含んでもよい。

【0010】

付加的又は代替的に、方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、

1又は複数のユーザー（例えば、対象；ヒト；動物；患者；植物；等々）からの1つ又は複数のサンプル（例えば、生物サンプル）を処理すること（例えば、採取すること；方法100の実施形態の一部を促進するためにサンプル調製すること；方法100の実施形態の一部を行うこと；等々）、サンプルの例としては、腸部位（例えば、便サンプル等に基づいて分析されるような）、皮膚部位、鼻部位、口部位、生殖器部位、及び／又は他の適切な生理学的部位などを含んでもよい1つ又は複数の採取部位から採取した生物サンプルが挙げられる；

10

微生物配列データセット（例えば、方法100の実施形態の一部に関連する等の、タグ付された核酸分子を用いた単一分子シーケンシングに基づいて作成された微生物配列データセット；タグ付き核酸分子のUMI領域等のシーケンシングされたUMI領域に関連づけられたバイオフィンフォーマティク分析から作成された微生物配列データセット；標的核酸配列に関連する核酸分子の分子数を含む微生物配列データセット；等々）に基づいて、マイクロバイーム特性（例えば、微生物組成特性；微生物機能特性；診断及び／又は療法に関連する等の微生物に関連する状態と関連する特性；等々）を決定すること

を含む、及び／又は別の様式で関連していてもよい。しかしながら、方法100のいくつかの実施形態は、付加的又は代替的に、任意の適切なプロセスを含んでもよい。

20

【0011】

方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、UMI分子の使用により単一分子シーケンシング（及び／又は他のシーケンシング技術）を改善する機能を果たすことができるが、これは、例えば、

過大に現れるテンプレート核酸分子及び過小に現れるテンプレート核酸分子を含むサンプルについてのシーケンシング結果を改善すること；

増幅プロセス（例えば、PCRプロセス）及び／又は濃縮（enrichment）プロセスに関連するバイアスを低減すること；

（例えば、クラスター生成プロセス中等の）DNAポリメラーゼと関連するエラーを低減すること；

30

（例えば、過大に現れるテンプレート核酸分子について用いられる、無駄に消費されるシーケンシングサイクルを低減することによる等）シーケンシング効率を改善すること；

核酸分子の直接的特性決定を可能にすること；及び／又は

他の任意の適切な改善を可能にすることによる改善。

ある具体的な例では、方法100及び／又はシステムは、シーケンシング技術（例えば、リードアンチルベース（read until-based）のシーケンシング技術、Oxford Nanopore Technologies社の技術等のナノポア技術、Pacific Biosciences社の単一分子シーケンシング技術等の単一分子シーケンシング技術等）及びUMI分子を活用して、過大に現れるテンプレート核酸分子及び過小に現れるテンプレート核酸分子をシーケンシングすることに関連する問題を克服しつつ、リアルタイムシーケンシング及び／又は処理（例えば、同じシーケンシングラン中に、シーケンシングされている現在のタグ付き核酸分子を、先にシーケンシング済のタグ付き核酸分子と比較すること等）を実施できる。

40

【0012】

付加的又は代替的に、方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、（例えば、タグ付き核酸分子のUMI領域のシーケンシング及び／又は分析から決定される分子数等に基づいて）サンプル中に存在する微生物を定量するように機能することができ、そのような定量は、例えば、微生物に関連する特性（例えば、マイクロバイーム組成；マイクロバイーム機能等に関連する特性）の決定における使用のためのものである。しかしながら、微生物定量は任意の適切な方法で行うことができる。

50

【0013】

付加的又は代替的に、方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、微生物に関連する検出（例えば、サンプルの生命体の分類学的検出及び／又は定量、並びに同じサンプル中に存在又は発現する遺伝子の検出；保存分類学的遺伝子を有する生命体の方向性のある検出及び／又は定量、及び／又は、1つ又は複数の生物サンプル中の他の真核生物、原核生物、ウイルス性生命体、及び／又は特性決定済み又はまだ特性決定されていないDNAを有する他の適切な微生物の偏りなく検出及び／又は定量；新規、未知、及び／又は未確認の潜在的な核酸標的の検出及び／又は定量；抗生物質耐性、毒性因子、分子マーカー、ウイルスカプシド遺伝子、関心のある適切な標的等に関連するもの等の、既知又は特定済みの核酸標的の偏りのない検出及び／又は定量）を促進する機能を果たすことができる。

10

【0014】

方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態の任意の適切な部分は、抗生物質耐性、毒性因子、分子マーカー、ウイルスカプシド遺伝子、関心のある適切な標的のうち1つ以上を含む、一のためのものである、一を標的とする、一を用いる、一を処理する、一に対応する、及び／又は、一にその他の形で関連するものであってもよい。ある具体的な例では、方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、以下を含むことができる：

シーケンシング、

分子数を決定すること（例えば、定量を促進するために、タグ付き核酸分子のUMI領域に基づいて絶対分子数を決定すること等）、

20

異なる標的配列を区別すること（例えば、UMI領域と、Read Until技術及び／又は適切なシーケンシング技術とを組み合わせ使用すること等により区別する）、

特異的DNAフラグメントを選択すること（例えば、16Sと18S；16SとHPV（例えば、HPVのE1遺伝子）；及び／又は分類学的若しくは分類学非依存的配列の他の適切な組み合わせ、等の2以上の異なるライブラリから；サンプル内のDNA分子の存在量を正常化するため；等々）、及び／又は

部分的及び／又は完全長の分類学的マーカー遺伝子（例えば、16S rRNA、18S rRNA、等）、部分的及び／又は完全長のマーカー遺伝子（例えば、ウイルスカプシド遺伝子；抗生物質耐性に関連する遺伝子及び／又はマーカー；等々）、及び／又は任意の適切な遺伝子、マーカー、及び／又は標的のための、他の適切なプロセス。

30

ある具体的な例では、前記一組の標的核酸配列は、第一の組の標的及び第二の組の標的のうち少なくとも一方を含んでもよく、ここで、前記第一の組の標的は、16S rRNA標的及び18S rRNA標的を含み、前記第二の組の標的は、16S rRNA標的及びHPVに関連する標的を含む。ある具体的な例では、前記一組の標的核酸配列は、抗生物質耐性及びウイルスカプシド遺伝子のうちの少なくとも一方と関連する標的核酸配列を含んでもよい。

【0015】

しかしながら、方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、任意の適切な機能性を含んでもよい。

40

【0016】

方法100（例えば、単一分子シーケンシングを促進すること—S130、等）及び／又はシステムのいくつかの実施形態の一部は、好ましくは、単一分子シーケンシングを含む、単一分子シーケンシングを行う、単一分子シーケンシングと関連する（例えば、単一分子シーケンシングのためのライブラリ調製を促進する等）、及び／又はこれら以外の様式で単一分子シーケンシングを促進する。単一分子シーケンシングは、単一分子リアルタイム（SMRT）シーケンシング（例えば、Pacific Biosciences社のSMRTシーケンシング等）、ナノポアシーケンシング（例えば、Oxfordナノポアシーケンシング等）、ロングリード（long-read）シーケンシング（例えば、Pacific Biosciences社のロングリードシーケンシング等）、Hel

50

i s c o p e 単一分子シーケンシング、単一分子シーケンシングと関連する任意の世代番号のシーケンシング技術（例えば、第二世代シーケンシング技術、第三世代シーケンシング技術、第四世代シーケンシング技術等）、及び／又は任意の他の適切な種類の単一分子シーケンシング、のうちいずれか1つ又は複数を含んでいてもよい。

【0017】

ある変形例では、単一分子シーケンシングは増幅とは独立した様式で用いることができ、これにより、P C R 増幅及び／又は他の適切な増幅プロセスの間に導入されるバイアスを除くことができる。ある変形例では、単一分子シーケンシングはDNAポリメラーゼとは独立して行うことができ、これにより、クラスター生成のステップの間にDNAポリメラーゼによって導入される可能性のある誤りを回避することができる。

【0018】

ある具体的な例においては、膜上のナノポアを用いて分子をシーケンシングし、特定のポアについてシーケンシングを停止させ、分析中のDNA分子を放出する、O x f o r d N a n o p o r e 社のシーケンシング技術及び／又は他の適切なread untilベースの技術（例えば、ある条件が満たされるまでシーケンシングリードを読み取らせること等）を用いることができる。ある具体的な例においては、O x f o r d N a n o p o r e 社のシーケンシング技術及び／又は他の適切なread untilベースの技術は、特定のDNAフラグメント（例えば、2つの異なるライブラリ）の選択を少なくとも可能にすることができ、これにより、サンプル中のDNA分子（例えば、過小に現れるDNA分子；過大に現れるDNA分子；等々）の存在量を正常化及び／又はバランス化させることができる；及び／又は、特定のDNA分子のシーケンシングをある数に限定することが可能になり、例えば、特定のDNA分子について多数のリード値を得るのではなく所与の分子がシーケンシングされる回数を制限することができ、このような制限は、例えば、タグ付き核酸分子及び／又は他の適切な分子のUMI領域、標的領域、及び／又は他の適切な領域に基づくものであってもよい。

【0019】

付加的又は代替的に、方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、好ましくは、任意の適切なシーケンシング技術－を含む、－を行う、－に関連する（例えば、該シーケンシング技術のためのライブラリ準備を促進する等）、及び／又は、－をその他の様式で促進し、ここで、該シーケンシング技術としては、次世代シーケンシング（N G S ）技術、キャピラリーシーケンシング、S a n g e r シーケンシング（例えば、マイクロ流体S a n g e r シーケンシング等）、ピロシーケンシング（p y r o s e q u e n c i n g ）、及び／又はその他の適切なシーケンシング技術のうち任意の1つ又は複数が挙げられる。N G S 技術としては、ハイスループットシーケンシング（例えば、ハイスループットシーケンシング技術；超並列シグネチャーシーケンシング（massively parallel signature sequencing）、P o l o n y シーケンシング、454ピロシーケンシング、I l l u m i n a シーケンシング、S O L i D シーケンシング、I o n T o r r e n t 半導体シーケンシング、DNAナノボールシーケンシング、H e l i s c o p e 単一分子シーケンシング等によって促進されたハイスループットシーケンシング）、任意の世代番号のシーケンシング技術（例えば、第二世代シーケンシング技術、第三世代シーケンシング技術、第四世代シーケンシング技術、等）、アンプリコン関連シーケンシング（例えば、標的化アンプリコンシーケンシング）、メタゲノム関連シーケンシング（例えば、メタトランスクリプトームシーケンシング、メタゲノムシーケンシング、等）、シーケンシング・バイ・シンセシス、トンネル電流シーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、質量分析シーケンシング、顕微鏡法に基づく技術、及び／又は任意の適切なN G S 技術のいずれか1つ又は複数を挙げることができる。

【0020】

方法100及び／又はシステムのいくつかの実施形態は、1つ又は複数の微生物に関連する状態の（例えば、タグ付き核酸分子を用いた単一分子シーケンシングに由来する微生物配列データセット等に基づいて）特性決定及び／又は療法を促進するための単一分子シ

ーケンシング及び／又は他の適切な態様（例えば、本明細書中に記載の態様）を改善することができ、この状態は、疾患、症状、原因（例えば、トリガー等）、障害、関連リスク（例えば、傾向スコア等）、関連重篤度、挙動（例えば、カフェイン摂取、習慣、食餌、等）、及び／又は微生物に関連する状態に係る、その他任意の適切な態様のうちの1つ又は複数を含んでもよい。微生物に関連する状態は、疾患に関連する1つ又は複数の状態を含んでもよく、そのような疾患関連状態は、以下のいずれか1つ又は複数を含んでもよい：

胃腸に関連する状態（例えば、過敏性腸症候群、炎症性腸疾患、潰瘍性大腸炎、セリアック病、クローン病、鼓脹、痔疾患、便秘、逆流、血便、下痢、等）；

アレルギーに関連する状態（例えば、小麦、グルテン、乳製品、大豆、ピーナッツ、貝、木の実、卵、等に関連するアレルギー及び／又は不耐性）；

皮膚に関連する状態（例えば、にきび、皮膚筋炎、湿疹、酒さ、乾燥肌、乾癬、ふけ、光過敏症、等）；

歩行運動に関連する状態（例えば、痛風、関節リウマチ、骨関節炎、反応性関節炎、多発性硬化症、パーキンソン病、等）；

がんに関連する状態（例えば、リンパ腫；白血病；芽細胞腫；胚細胞腫瘍；カルシノーマ；肉腫；乳がん；前立腺がん；基底細胞がん；皮膚がん；結腸がん；肺がん；任意の適切な生理学的領域に関連するがん状態；等々）、

心血管に関連する状態（例えば、冠動脈性心疾患、炎症性心疾患、心臓弁膜症、肥満、卒中、等）、貧血状態（例えば、サラセミア；鎌状赤血球；悪性貧血；ファンコニ；溶血性；再生不良性；鉄欠乏；等々）、

神経関連状態（例えば、注意欠陥多動障害（ADHD）、注意欠陥障害（ADD）、不安神経症、アスペルガー症候群、自閉症、慢性疲労症候群、うつ病、等）、

自己免疫に関連する状態（例えば、スプルー、AIDS、シェーグレン、紅斑性狼瘡、等）、

内分泌に関連する状態（例えば、肥満、グレーブス病、橋本甲状腺炎、代謝障害、I型糖尿病、II型糖尿病、等）、

ライム疾患状態、コミュニケーションに関連する状態、睡眠に関連する状態、代謝に関連する状態、体重に関連する状態、痛みに関連する状態、遺伝関連状態、慢性疾患、及び／又はその他任意の適切な種類の疾患関連状態。

付加的又は代替的に、微生物に関連する状態は、1つ又は複数のヒトの挙動状態を含んでもよく、該挙動状態は、カフェイン摂取、アルコール摂取、他の食品の摂取、栄養補助食品摂取、プロバイオティクス関連挙動（例えば、摂取、忌避、等）、他の食事挙動、習慣挙動（例えば、喫煙；低、中、及び／又は極端な運動状態等の運動状態、等）、閉経、他の生物学的プロセス、社会的挙動、他の挙動、及び／又はその他任意の適切なヒトの挙動状態のうち任意の1つ又は複数を含んでもよい。状態は、任意の適切な表現型（例えば、ヒト、動物、植物、菌体、等について測定可能な表現型）と関連づけることができる。

【0021】

方法100及び／又はシステムの実施形態は、単一のユーザーからの1つ又は複数の生物サンプルについて実施することができ、例えば、前記単一のユーザーからの1つ又は複数の生物サンプルからのシーケンシングライブラリの調製を促進するため、及び／又は前記シーケンシングライブラリ（例えば、タグ付き核酸分子を含むシーケンシングライブラリ等）を用いた単一分子シーケンシングを促進するために、方法100の実施形態の一部を実施することに関連して実施することができる。付加的又は代替的に、実施形態は、一組のユーザー（例えば、前記ユーザーを含む対象の集団、前記ユーザーを除外した対象の集団、等）からの生物サンプルについて実施することができ、ここで前記一組のユーザーは、任意の適切な種類の特性（例えば、微生物に関連する状態、人口統計学的特徴挙動、マイクロバイオーーム組成及び／又は機能、等に関連）について類似及び／又は非類似の対象を含んでもよい；ユーザーのサブグループ（例えば、方法100の実施形態の一部

に影響を及ぼす特性等の特性を共有するサブグループ等) について実施することができる；植物、動物、微生物（例えば、環境微生物群由来の微生物等）、及び／又はその他任意の適切な実体について実施することができる。したがって、一組のユーザー（例えば、対象の集団、対象のセット、ユーザーのサブグループ、等）に由来する情報を使用して、その後のユーザーのための追加的洞察（例えば、方法 100 の実施形態の一部を実施する際に使用される実験パラメータに関連して；あるタグ付き核酸分子についてのシーケンシングを停止させる際に使用される配列領域判定基準に関連する等の追加的洞察）を提供することができる。ある変形例では、生物サンプルの合算セットは多種多様のユーザーと関連していてもよく、それらユーザーのために処理することができるが、それらユーザーは、例えば以下のうち 1 つ又は複数についてのユーザーを含む：異なる人口構成（例えば、性別、年齢、配偶者の有無、人種、国籍、社会経済的地位、性的指向、等）、異なる微生物に関連する状態（例えば、健康及び疾患状態；異なる遺伝学的傾向；等々）、異なる生活状況（例えば、独り暮らし、ペットと同居、重要な他者と同居、子どもと同居、等）、異なる食習慣（例えば、雑食性、菜食主義、完全菜食主義、糖分摂取、酸摂取、カフェイン摂取、等）、異なる挙動上の傾向（例えば、身体活動レベル、薬物使用、アルコール使用、等）、異なる可動レベル（例えば、所与の時間内で移動する距離に関連する）、及び／又はその他任意の適切な特徴（例えば、マイクロバイオーム組成及び／又は機能等に影響を及ぼす、相関する、及び／又はその他の方法に関連している特性）。いくつかの例では、ユーザー数が増加するにつれ方法 100 の実施形態の一部で実施されるプロセスの予測力が増大し得るが、これは例えば、様々なユーザーを彼らのマイクロバイオームに基づいて特性決定することに関連して（例えば、前記ユーザーのサンプルの異なる採取部位に関連して等）予測力が増大し得、これは例えば、マイクロバイオームに関連する特性を本明細書中で記載する単一分子シーケンシングからのシーケンシング出力に基づいて決定することができる場合等であってもよい。しかしながら、方法 100 及び／又はシステムの実施形態の一部は、任意の適切な単数又は複数の実体について任意の適切な 1 つ又は複数の方法で実施及び／又は構成することができる。

【0022】

本明細書中に記載するデータ（例えば、標的核酸配列等の核酸配列；UMI 配列；UMI ベースの分子について等の分子設計データ；シーケンシング入力及び／又はシーケンシング出力等のシーケンシングデータ；例えばシーケンシングを停止するためのシーケンシングパラメータ等の、シーケンシングデータ；UMI 関連タグ付けに関連するデータ；微生物配列データセット；マイクロバイオーム特性；ユーザーデータ；補足データ；微生物に関連する状態に関連づけられたデータ；微生物に関連する特性決定；等々）は、以下のうちの 1 つ又は複数を含む任意の適切な時間の指標（例えば、秒、分、時、日、週、等）と関連付けることができる：

いつデータを収集したかを示す時間指標（例えば、いつサンプルを収集したかを示す時間指標等）、

いつデータを判定したかを示す時間指標（例えば、いつ処理操作を開始し、完了したかを示す時間指標；いつタグ付標的分子をシーケンシングしたか、及び／又は、いつ関連データが保存されたかを示す時間指標、等）、

いつ送信、受信、及び／又はその他の様式で処理したかを示す時間指標；

データによって記載されるコンテンツにコンテキストを提供する時間指標；

時間指標における変化；及び／又は

その他、時間に関連する任意の適切な指標。

本明細書中で記載する分子及び／又は任意の適切な生物学的成分は、任意の適切なサイズ（例えば、配列長さ等）を含んでいてもよい。配列領域及び／又はその他の適切な構成要素の比較は任意の適切な態様に従うものであってよく、これには、配列類似性（例えば、パーセンテージ；塩基数；UMI 領域及び／又は標的領域を含む任意の適切な配列領域に対して；等々）、完全配列一致、配列相違性、配列位置、標的の種類、配列領域の種類、関連する微生物の種類、微生物に関連する状態の種類、及び／又はその他任意の適切な

態様、のうち任意の1つ又は複数が含まれる。

【0023】

付加的又は代替的に、パラメータ、メトリクス、入力、出力、及び／又は他の適切なデータは、スコア、個々の値、合計値、二進値、相対値、等級、信頼水準、識別子、スペクトルに従った値、及び／又はその他任意の適切な種類の値のうちの、任意の1つ又は複数を含む値の種類と関連していてもよい。本明細書中に記載する任意の適切な種類のデータ、成分（例えば、生物学的成分）、（例えば、処理操作等の）生成物は、（例えば、異なるサンプル処理操作；モデル；混合物；シーケンシング技術等についての）入力として使用でき、（例えば、異なるモデル；モジュール；サンプル処理操作の生成物；等々）の出力として生成することができ、及び／又は、方法100及び／若しくはシステムに関連する任意の適切な成分について任意の適切な様式で操作することができる。

10

【0024】

本明細書中で記載する方法100及び／又はプロセスの実施形態の1つ又は複数の例及び／又は部分は、本明細書中で記載するシステム、成分、及び／又は実体の1つ又は複数の例により、及び／又はそれらを使用して、非同期的に（例えば、連続的に）、同時に（例えば、マルチレプシング；方法100の実施形態の一部における複数のサンプルの処理；シーケンシング分析に関連づけられた並行データ処理及び／又は方法100の実施形態の一部；等々）、トリガー事象（例えば、方法100の実施形態の一部の実行）と時間的に関連して（例えば、実質的に同時に、応答して、順次、前に、後に、等）、及び／又は任意の他の適切な順序で、任意の適切な時間及び頻度にて、実施することができる。

20

【0025】

しかしながら、方法100及び／又はシステムは任意の適切な様式で構成することができる。

【0026】

2.1 UMIベースの分子の調製

方法100の実施形態は、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進する際等における、1つ又は複数の標的のタグ付け（例えば、UMIベースの分子；UMI領域；リンカー領域等によるタグ付け）、増幅、及び／又は他の適切な処理を促進するために使用される分子を調製する機能を果たし得る、1つ又は複数の標的（例えば、一組の標的核酸配列；微生物に関連する標的；等々）に関連づけられたUMIベースの分子（例えば、UMIベースのプライマー等）のセットを調製すること（例えば、決定すること、生成すること等）S110を含んでいてもよい。

30

【0027】

標的（例えば、関心のある標的；既知又は特定された標的；未知又は先には未確認の標的；等々）は、バイオマーカー；遺伝子（例えば、遺伝子発現マーカー等）；配列領域（例えば、遺伝子配列；遺伝子、染色体、微生物に関連する状態、保存配列、突然変異、多型を特定する配列；アミノ酸配列；ヌクレオチド配列；等々）；核酸（例えば、ゲノムDNA、染色体DNA、染色体外DNA、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、プラスミドDNA、コスミドDNA、ファージミドDNA、合成DNA、RNAから得られるcDNA、一本鎖及び二本鎖DNA、等）細胞；小分子；タンパク質；ペプチド；1又は複数の微生物に関連する状態に関連する標的（例えば、1又は複数の微生物に関連する状態と関連する診断、予後、予測、及び／又は療法に情報を与える標的、等）；微生物組成に関連する標的（例えば、サンプル中に存在する微生物の分類学的分類を示す標的；任意の適切な分類群の微生物の存在、存在量、及び／又は不在を示すマーカー、等）及び／又は微生物機能（例えば、微生物と関連する機能的特性を示す標的等）；脂質；全核酸；全微生物；代謝産物；炭水化物；及び／又は標的の任意の適切な組み合わせ（例えば、複数のライブラリからの組み合わせ、等々）及び／又は種類、のうち任意の1つ又は複数を含んでいてもよい。ある具体的な例においては、標的は、部分的及び／又は完全長の分類学的マーカー遺伝子（例えば、16S rRNA、18S rRNA、等々）、部分的及び／又は完全長の遺伝子及び／又はマーカー（例えば、ウイルスカプシド遺伝子；抗生物質耐

40

50

性に関連する遺伝子及び／又はマーカー；等々）、及び／又は任意の適切な遺伝子及び／又はマーカーを含んでいてもよい。

【0028】

UMIベースの分子は、好ましくは、1つ又は複数の標的（例えば、微生物関連核酸標的等）に関連づけられており、そのような関連づけは、例えば、前記1つ又は複数の標的（例えば、核酸標的等）の1つ又は複数の配列領域に対し相補的である1つ又は複数の配列領域を含む標的関連領域を含む、前記標的を標的とする、前記標的により増幅可能である；前記標的によりプロセッシング可能である；前記標的をタグ付けすることができる等であるが、付加的又は代替的に、任意の適切な成分と関連づけていてもよい。

【0029】

ある変形例では、UMIベースの分子は、UMIベースのプライマー（例えば、1つ又は複数のPCRプロセス等の1つ又は複数の増幅プロセスにおける使用のためのプライマー；1つ又は複数のUMI領域を含むプライマー；等々）を含んでいてもよいが、付加的又は代替的に、任意の適切な目的のために任意の適切な種類のUMIベースの分子を含んでいてもよい。いくつかの例では、UMIベースのプライマーは、縮重プライマーを除外することができる（ここで例えば、縮重プライマーは、PCRプロセスの間にバイアスを導入し得るが、これは、例えば、前記縮重プライマーの配列に強く合致する標的の増幅が優先されてしまうことによるものであり、これによりPCR効率が様々となり、種々のテンプレートの検出の限界に影響を及ぼす；一方、minION等のプラットフォームは、プラットフォームが保存領域を標的とする定義された配列を有するプライマーと共に用いることができる場合、より長いリードの生成を可能にできる；等々）。ある具体的な例では、前記一組のUMIベースの分子は、複数の微生物分類群に関連する保存領域を標的とする既定の配列領域を含むUMIベースのプライマーを含んでいてもよい（例えば、そのようなプライマーの使用は、バイアスを低減することができ、及び／又は標的配列の選択的増幅を低減することができる、等々）。いくつかの例では、UMIベースのプライマー（例えば、複数の微生物分類群と関連する保存領域を標的とする既定の配列領域を含む等）は、様々なテンプレート標的の間で同じか又は類似した親和性を含んでもよく、これにより、タグ付き核酸分子を生成する際におけるPCRベースのUMI組み入れから生じるネガティブな効果を低減できる。いくつかの例では、UMIベースのプライマーの使用は、種々の標的についてのシーケンシングの量を制御する際に用いることができ、その例としては、生成したデータの量が、異なる微生物分類群の特定、及び／又は任意の適切な標的の特定を可能にし得るまでシーケンシングを進行することが可能とされている場合である（ここで、例えば、標的を特定するために要求されるシーケンシングされた核酸分子の数、及び／又は前記シーケンシングリードの深さ等のシーケンシングの量は、具体的な標的に応じて変わり得る；等々）。

【0030】

UMIベースの分子（及び／又はプライマー及び／又は本明細書中に記載する他の分子等の他の適切な分子）は、好ましくは、1つ又は複数のUMI領域を含む（例えば、ここで、UMIベースの分子は単一のUMI領域を含んでいてもよく；UMIベースの分子は複数のUMI領域を含んでいてもよい；等々）。UMI領域は、ランダムな「N」塩基（例えば、Nデオキシヌクレオチド塩基）のセットを含んでもよく、ここで、各々のランダムな「N」塩基は、「A」アデニン塩基、「G」グアニン塩基、「T」チミン塩基、及び「C」シトシン塩基のいずれか1つから選択される。「N」塩基は、連続に位置してもよく（例えば、「N」塩基のストリング等）、離れて（例えば、所定塩基によって；任意の適切な配列領域によって、等により離れて）位置してもよく、及び／又はUMIベースの分子の任意の適切な配列位置に位置し得る。UMI領域は、任意の適切な配列長（例えば、少なくとも2「N」塩基；21「N」塩基未満；任意の適切な数の「N」塩基；等々）を含んでいてもよい。ある具体的な例においては、UMI領域（例えば、所与の反応について；所与のタグ付けプロセスについて；等々）は、各々、一定の長さ（例えば、10ヌクレオチド長等）を含んでいてもよい。ある具体的な例では、異なる反応は、異なる長さ

10

20

30

40

50

のUMI領域に基づき得る（例えば、第一の反応について全てのUMI領域が10ヌクレオチド長を含む；第二の反応について全てのUMI領域が15ヌクレオチド長を含む；他の反応は、可変長を有するUMI領域を含み、例えば第三反応についてUMI領域は3～15ヌクレオチド長を含む；等々）。しかしながら、任意の適切な長さ（例えば、一定の長さ；可変長さ；等々）を有する、任意の数及び／又は種類のUMI領域を、1つ又は複数の反応について用いることができる。付加的又は代替的に、UMI配列領域は、一定の（例えば、非ランダム等）ヌクレオチド配列を単独で含んでもよく、一定のヌクレオチド配列とランダムなヌクレオチド配列（例えば、「ATC NNNNNN」配列、「NNATC NNNN」配列、「NNNNATC」配列、「NNATC NNGTNNN:」配列、ここで、「N」塩基はランダムな「N」塩基等）との組み合わせで含んでもよく、及び／又はランダムなヌクレオチド配列単独で含んでもよい。

10

【0031】

UMI領域配列長さは、処理（例えば、定量、分化、出発核酸材料、等）される標的の量及び／又は種類に基づいて決定することができる。ここで例えば、UMI領域が長いほど、より多数のランダムな塩基の組み合わせ及びより大きな固有の識別子セットを容易とする（これらは、例えば、分化される多数の種類の標的を分析するために使用される；多数のテンプレート、核酸材料、及び／又は遺伝子変異体を含むサンプルを分析するために使用される、等々）。一例においては、異なる長さ及び／又は配列のUMI領域を、出発核酸材料（例えば、腸、口、皮膚、性器、及び／又は鼻サンプルからの微生物から抽出された核酸等）の性質及び量に依存して使用及び／又は導入することができる。ある具体的な例においては、一組のUMIベースの分子（例えば、前記一組のUMIベースの分子のUMI領域等）の長さ及び／又は他の特性によって可能となる組み合わせの数は、出発材料中に存在するテンプレート核酸分子の数よりも少なくとも単一の分子分は多い必要があり、その上限値は任意の所与の組み合わせ数である。

20

【0032】

一例では、前記UMI領域は4NのUMI領域（例えば、4つの「N」塩基を含むUMI領域等）を含んでもよい。ある具体的な例では、前記UMI領域は8NのUMI領域を含んでもよく、これは例えば16S遺伝子の増幅プロセスのためのものであり、この際、例えば、1つ又は複数のタグ付け促進分子を添加でき、該タグ付け促進分子は、例えば、MgCl₂、ジメチルスルホキシド（DMSO）、熱安定性核酸結合タンパク質（例えば、極度熱安定性一本鎖DNA結合タンパク質等）、及び／又は他の適切な成分のうちの1つ又は複数である。ただし、UMI領域は、任意の適切な様式で構成することができる。

30

【0033】

UMIベースの分子（及び／又は他の適切な分子、例えばプライマー及び／又は本明細書中で記載する他の分子）は、好ましくは1つ又は複数の標的関連領域を含む。標的関連領域は、好ましくは配列領域（例えば、遺伝子配列等）を含むが、付加的又は代替的に、任意の適切な種類の成分（例えば、標的と関連する任意の適切な成分；これは、例えば、標的と結合可能、標的とカップリング可能、標的と連結可能、標的に影響を及ぼす、標的に情報を与える、標的を修飾する、及び／又は標的と任意の適切な関係を有する、等々）を含んでもよい。標的関連領域は、好ましくは、1つ又は複数の標的（例えば、核酸標的の配列領域；核酸標的の他の適切な成分；等々）と関連する（例えば、前記標的に対して配列相補的である；前記標的を標的とする；前記標的で増幅可能である；前記標的でプロセッシング可能である；等々）。一例において、標的関連領域は、（例えば、核酸標的）の相補的な標的DNA配列とアニーリング可能なDNA配列を含んでもよい。ある変形例では、標的関連領域は、複数の微生物分類群の間で保存されている配列と関連し得る。ある変形例では、標的関連領域は、ポリメラーゼ（例えば、DNAポリメラーゼ）が核酸標的及び／又は他の適切な成分をコピーし増幅するのを可能にするが、標的関連領域は任意の適切な機能性を含んでもよい。標的関連領域は、任意の適切な長さ（例えば、15塩基長以上；任意の適切な数の塩基；等々）を含んでもよい。あるいは、UM

40

50

Ｉベースの分子は標的関連領域を除外してもよい。しかしながら、標的関連領域（及び／又は他の適切な分子）は任意の適切な様式で構成することができる。

【００３４】

ＵＭＩベースの分子（及び／又は他の適切な分子、例えばプライマー及び／又は本明細書中に記載する他の分子）は、１つ又は複数のリンカー領域を含んでもよい（該リンカー領域は、タグ付き核酸分子の生成を改善する機能を果たし得るものであってもよく、これは例えば、核酸分子の標的配列へのプライマー結合と関連するものである；等々）。リンカー領域は、好ましくは、１つ又は複数の核酸標的（例えば、標的関連領域に関連する核酸標的等）に対する完全相補性がない（例えば、無相補性、部分相補性、等）。リンカー領域は、任意の適切な長さを含んでもよい（例えば、このリンカー領域が、例えばＵＭＩベースのプライマーセットの各ＵＭＩベースのプライマーについて、２１塩基未満の長さを含む；任意の適切な塩基数の長さを含む；等々）。リンカー領域は、好ましくは、ＵＭＩ領域と標的関連領域との間に位置する（例えば、ＵＭＩ配列領域と標的関連配列領域とを離間するように位置する、等）が、任意の適切な位置（例えば、任意の適切な配列位置等）に位置してよく、その例としては、各ＵＭＩベースの分子について（例えば、ＵＭＩベースのプライマーセットの各ＵＭＩベースのプライマーについて、等）、前記リンカー領域が前記ＵＭＩベースの分子のＵＭＩ領域と標的関連領域との間に位置する場合がある。ある具体的な例では、リンカー領域は、ＰＣＲ増幅におけるＵＭＩベースの分子の潜在的なネガティブな効果を制限する長さの配列を含んでもよい。あるいは、ＵＭＩベースの分子（及び／又は他の適切な分子）は、リンカー領域が排除されたものであってもよい。しかしながら、リンカー領域は、任意の適切な様式で構成することができる。

【００３５】

ＵＭＩベースの分子は、任意の適切なサイズ（例えば、任意の適切な配列長さ等）を含んでもよく、そして任意の適切な数及び／又は種類のＵＭＩベースの分子を方法１００の実施形態の一部で調製及び／又は使用することができる。

【００３６】

ある変形例では、ＵＭＩベースの分子を調製することは、古典的又は修正版の距離メトリクス（例えば、Hamming及び／又はLevenshtein、等）を含む計算論的アプローチ及び／又は分析技術に基づいてＵＭＩベースの分子を設計すること、及びエラー補正を許容すること、及び、種々のテンプレート分子の同定を可能にすることを含んでもよい。ある具体的な例においては、ＵＭＩベースの分子は種々のテンプレート分子の間で異なるように設計される。ある具体的な例においては、距離メトリクスの使用により、ＵＭＩ領域を別のＵＭＩ領域に変換するために必要なヌクレオチド変化の数を調整することが可能になる。ある具体的な例では、第一のＵＭＩ領域（「ＡＡＡ」）を第二のＵＭＩ領域（「ＴＩＴ」）に変換するために、少なくとも３つの変化が必要である；この具体的な例について、前記変換を完成させるための最も簡単な方法は、第一のＵＭＩ領域においてすべてのＡをＴで置換することである。ある具体的な例においては、距離メトリクスの使用により、種々の分子をカウントするために使用できる、そして付加的又は代替的に、エラー修正システムとして使用できる、異なるＵＭＩの数を調整することが可能になる。付加的又は代替的に、任意の適切な距離メトリクス及び／又は分析技術を、ＵＭＩベースの分子の数を設計及び／又は決定する際に使用することができる。ある具体的な例では、ＵＭＩベースの分子セットを調製することは、前記一組の標的核酸配列、及び前記タグ付き核酸分子のシーケンシングについての定義された制限（例えば、標的核酸配列についての所望の量のシーケンシングと関連した所定の制限、等）に基づいて、前記一組のタグ付き核酸分子の生成を促進するための異なるＵＭＩ領域の数を決定すること（例えば、調整すること）を含む。

【００３７】

ＵＭＩベースの分子を調製することは、方法１００の実施形態の任意の適切な部分の前及び／又は後に行うことができ（例えば、タグ付標的分子の生成の前又は途中；タグ付標的分子の反復生成のため、タグ付標的分子の生成後；等々に行うことができ）、及び／又

は任意の適切な時間及び頻度で行うことができる。UMIベースの分子を調製することは、一組のUMIベースの分子を任意の適切な実体（例えば、第三者的実体であり、該第三者的実体が一組のタグ付標的分子を作製し、前記一組のタグ付標的分子を用いて単一分子シーケンシングを行うことを可能にするための提供である、等々）に提供することを含んでいてもよい。

【0038】

しかしながら、UMIベースの分子S110の調製は、任意の適切なやり方で行うことができる。

【0039】

2.2 タグ付標的分子の生成の促進

方法100のいくつかの実施形態は、前記一組のUMIベースの分子、及び一組の標的核酸配列に対応する（例えば、含む、等）一組の核酸分子に基づいて、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること（例えば生成すること等）—S120—を含んでもよい。このことは、下流のシーケンシング（例えば、単一分子シーケンシング等）及び／又は微生物に関連する特性を決定するためのバイオインフォーマティクス分析（例えば、1又は複数の微生物に関連する状態についての診断及び／又は治療決定；等々）及び／又は適切な分析（例えば、分子計数）を促進するためのタグ付標的分子を得るのに機能することができる。

【0040】

核酸分子（例えば、タグ付される核酸分子；等々）は、好ましくは1つ又は複数のサンプル（例えば、1又は複数の腸部位、皮膚部位、性器部位、鼻部位、口部位、及び／又は他の適切な身体部位から収集されたサンプル；生物サンプル；等々）由来である。

【0041】

タグ付標的分子（例えば、タグ付標的核酸分子）は、好ましくは1つ又は複数のUMIベースの分子（例えば、UMI領域、リンカー領域、及び／又はUMIベースの分子の適切な領域；等々）でタグ付けされた（例えば、取り付けられた；連結された；カップリングされた；等々）1つ又は複数の標的（例えば、標的を含む成分；例えば、標的配列領域を含む全核酸及び／又は核酸フラグメント、等）を含むが、付加的又は代替的に、1つ又は複数の標的と関連し、任意の適切な分子でタグ付けされた任意の適切な成分を含んでいてもよい。前記一組のタグ付標的分子を生成することは、一組のUMIベースの分子（例えば、UMIベースのプライマー等）及び1つ又は複数の生物サンプルに基づく（例えば、これらを使用する；これらを用いて処理する；これを用いて増幅プロセスを行う；等々）（例えば、前記1つ又は複数の生物サンプルの成分を、前記一組のUMIベースの分子及び／又は前記一組のUMIベースの分子の成分でタグ付けすること；等々）が、付加的又は代替的に、任意の適切な成分に基づいてもよい。

【0042】

一組のタグ付標的分子の生成を促進することは、1つ又は複数の増幅プロセスに基づいていてもよい（例えば、該増幅プロセスを含む；該増幅プロセスからの成果を用いる；等々）。増幅プロセス（例えば、前記一組のタグ付標的分子を生成することに関連する増幅プロセス；方法100の実施形態の任意の適切な部分に関連する増幅プロセス；等々）は、1つ又は複数のPCRプロセス（例えば、固相PCR、RT-PCR、qPCR、多重PCR、タッチダウンPCR、ナノPCR、ネステッドPCR、ホットスタートPCR等）を含んでいてもよいが、付加的又は代替的に、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、ループ介在等温増幅（LAMP）、自己持続配列複製法（3SR）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、鎖置換増幅（SDA）、ローリングサークル増幅（RCA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、及び／又は任意の他の適切な増幅プロセスのうちの1つ又は複数を含んでいてもよい。ある具体的な例においては、多段階PCRプロセスをタグ付標的分子（例えば、タグ付き核酸分子等）の生成を促進する際に用いることができる、これは例えば、2018年6月20日付で出願された米国特許出願第16／013,858号に記載された及び／又は類似の任意の適切なやり方で行われる。付加的又は代替的に、方法100及

10

20

30

40

50

び／又はシステムの実施形態の任意の適切な部分は、2018年6月20日付で出願された米国特許出願第16／013,858号に記載及び／又は類似の任意の適切なアプローチを含む、適用する、使用する、及び／又は関連するものであってもよい。米国特許出願第16／013,858号は、参照により、その全体が本明細書中に取り込まれる。

【0043】

しかしながら、任意の適切なPCRプロセス及び／又は他の増幅プロセスを実施すること（例えば、前記一組のタグ付標的分子を生成することに関連して実施すること；方法100の実施形態の任意の適切な部分に関連して実施すること；等々）は、任意の適切なやり方で実施することができる。付加的又は代替的に、増幅とは独立したプロセスを、タグ付き核酸分子を生成するために使用できる。一例において、タグ付標的核酸分子の種々のサブセットを作製することができる（例えば、PCRで生成されたタグ付標的核酸分子の1つ又は複数のサブセットとPCRとは独立したタグ付標的核酸分子の1つ又は複数のサブセットとを含むタグ付標的核酸分子のセット等）。ある具体的な例では、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進することは、前記核酸分子セットに属する核酸分子の第一のサブセットを用いてPCR増幅プロセスを実施することに基づいて核酸分子のPCR増幅サブセットを生成すること；及び核酸分子のPCR増幅サブセットと前記核酸分子セットに属する核酸分子のPCRとは独立したサブセットとに基づいて一組のタグ付き核酸分子を生成することを含む。

【0044】

一組のタグ付標的分子を生成することは、付加的又は代替的に、1つ又は複数のタグ付け促進分子（例えば、核酸標的に対するUMIベースの分子の組み込み等、タグ付けに関連して効率及び／又は汎用性を改善するために使用できる分子；効率に関連して等、増幅プロセスを改善するために使用できる分子；等々）に基づいていてもよい（例えば、前記タグ付け促進分子を使用してもよく；前記タグ付け促進分子を用いて処理してもよく；前記タグ付け促進分子を用いて増幅プロセスを実施してもよい；等々）。タグ付け促進分子は、MgCl₂、ジメチルスルホキシド（DMSO）、熱安定性核酸結合タンパク質、ベタイン、ホルムアミド、トゥイーン（Tween）、トライトン（Triton）、NP-40、テトラメチルアンモニウムクロリド（TMAC）、ウシ血清アルブミン（BSA）、有機及び／又は無機エンハンサー要素、化合物、塩、小分子、生体分子、及び／又は、タグ付けを促進するように構成されたその他任意の適切な分子のうち、いずれか1つ又は複数を含んでいてもよい。

【0045】

タグ付標的分子の生成を促進すること（及び／又は任意の適切な分子をタグ付けすること）は、任意の適切な時間及び頻度で行うことができる（例えば、即シーケンシング可能な（sequencing-ready）タグ付標的分子を生成する前；Sequencing-readyタグ付標的分子を生成する間又はその後、例えば反復生成物生成アプローチにおけるSequencing-readyタグ付標的分子を生成する間又はその後、等）に実施できる）。タグ付標的分子の生成を促進することは、UMIベースの分子を第三者的実体及び／又は適切な実体（例えば、タグ付標的分子を生成するために必要なサンプル処理を行う第三者的実体及び／又は適切な実体；等々）に対して提供することに基づき得る。

【0046】

ある変形例では、一組のタグ付標的分子を生成することは、（例えば、PCRに基づくプロセスに加えて、又はPCRに基づくプロセスの代わりに、等）1つ又は複数のフラグメント化プロセス、ライゲーションプロセス、及び／又は他の適切なプロセスを実施することを含んでいてもよく、これは例えば、核酸標的（及び／又は1つ又は複数の生物サンプルの他の適切な成分等）等の1つ又は複数の標的をUMIベースの分子でタグ付けするために行われる。一例において、前記一組のタグ付標的分子を生成することは、1つ又は複数の生物サンプル（例えば、関心のある標的に対応する標的配列等の、1つ又は複数の核酸標的を含むフラグメントを生成するため；1つ又は複数の生物サンプルからフラグメントを生成するため；等々）を用いる酵素的プロセス及び機械的プロセスのうち少なくとも

も1つ（例えば、酵素的及び／又は機械的フラグメント化等）に基づいてフラグメントを生成すること；及び、前記UMIベースの分子及び前記フラグメントのためにライゲーションプロセス（例えば、リガーゼ酵素を用いたブラントエンドライゲーション等）を実施すること（例えば、前記UMIベースの分子を前記フラグメントとライゲーションすること等）を含んでいてもよく、前記ライゲーションプロセスは、例えば標的分子（例えば、標的ND A；シーケンシングライブラリ構築のため；等）を増幅する前などに実施することができる。一例において、前記一組のタグ付標的分子を生成することは、少なくとも1つの生物サンプルから核酸フラグメントを生成すること；及び前記一組のUMIベースの分子を前記核酸フラグメントにライゲーションすること、を含んでいてもよい。いくつかの例では、1つ又は複数のフラグメント化プロセス及び／又はライゲーションプロセスを実施すると、あらゆる可能な分子を無差別にタグ付けすることになり得る（例えば、溶液中の場合）が、一方、いくつかの例では、PCRプロセス（例えば、本明細書中で記載するPCRプロセス等）を用いて一組のタグ付標的分子を生成することは、UMIタグ付けのための特異的ターゲティング（例えば、標的DNA配列への特異的ターゲティング）を促進することができる。（例えば、生成したフラグメント、及び／又は他の分子をタグ付けするため；等々の）UMIタグ付けのために使用されるライゲーションプロセスにおいては、フラグメント化プロセスを実施するタグ付標的分子を生成するためのPCRプロセスにおいて使用されるUMIベースの分子の種類と同じ、類似、又は異なるUMIベースの分子を用いることができる。ある具体的な例においては、タグ付標的核酸分子の増幅（例えば、シーケンシングライブラリ構築のための増幅、等）前に、酵素的及び／又は機械的フラグメント化後にリガーゼ酵素を用いたブラントエンドライゲーションを用いて核酸分子（例えば、標的核酸配列に対応する核酸分子等）をUMIベースの分子によりタグ付けすることができる。ある変形例において、PCRベースの標識について、フラグメント化法内で、突出及び／又は粘着末端を生成する酵素は、任意の適切なライゲーションプロセスと組み合わせて付加的又は代替的に用いることができ、これには、平滑末端と粘着末端フラグメント化との任意の組み合わせ及び／又は適切なライゲーションプロセスが含まれる。ある変形例において、PCRベースの標識について、核酸分子中にDNA配列（例えば、トランスポゾン）を挿入する酵素を使用して、UMIベースの分子によるタグ付けを行うことができ、これは例えば、任意の適切なライゲーションプロセス（例えば、本明細書中で記載するもの等）との組み合わせで行われる。

【0047】

しかしながら、1つ又は複数のフラグメント化プロセス及び／又はライゲーションプロセス、及び／又はタグ付標的核酸分子の生成を促進するための任意の適切なプロセスを実施することは、任意の適切なやり方で実施することができる。

【0048】

付加的又は代替的に、タグ付き核酸分子の生成を促進することは、種々のアンプリコンからなるライブラリのバランスをとること（例えば正常化）を含んでもよく、これは例えば、2018年9月7日付で出願された米国特許出願第16／125,619号に記載されているやり方で、及び／又は類似のやりで行うことができる。米国特許出願第16／125,619号は、参照により本明細書中に組み込まれる。種々のアンプリコンからなるライブラリのバランスをとること、及び／又は方法100の実施形態の適切な部分を実施することにより、過小に現れるテンプレートのシーケンシングを妨害する過大に現れる分子を防止でき、そのような妨害としては、例えば、同定されるまでに多数のシーケンシングサイクルを必要とする過大に現れるテンプレート分子が、過小に現れる分子のシーケンシングを妨げ得る場合が挙げられる。ある具体的な例では、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進することは、一組の核酸分子における過小に現れる核酸分子及び過大に現れる核酸分子と関連する一組のアンプリコンのバランスをとるために、一組のUMIベースの分子及び一組の核酸分子に基づいて、少なくとも1つの増幅プロセスを実施することを含んでいてもよい。ある変形例では、追加のPCRプロセス（例えば、3ステップPCRプロセスによる；等々）及び／又は適切な増幅プロセスは、異なるアンプリコンからなるラ

イブラリのバランスをとることを可能にし得る。しかしながら、アンプリコンライブラリ及び／又は他の適切な成分のバランスをとることは、任意の適切なやり方で行うことができる。

【0049】

ある変形例では、一組のタグ付標的分子を生成することは、少なくとも1つのPCRプロセス及び少なくとも1つのライゲーションプロセスの組み合わせ（例えば、直列的組み合わせ；並列的組み合わせ；等々）を含んでいてもよい。例えば、一組のタグ付標的分子を生成することは、

プライマーのセット（例えば、1つ又は複数の標的関連領域、リンカー領域、及び／又は任意の他の適切な成分、等を含む）を用いてPCRプロセスを実施すること、これは、例えば、PCR効率及び標的増幅を増加させるためでもよい；及び、

1つ又は複数のUMIベースの分子（例えば、1つ又は複数のUMI領域、アダプター領域、及び／又は他の適切な成分等を含む）を用いて、ライゲーションプロセスを実施すること、これは、例えば、前記PCRプロセスの産物（例えば、増幅された核酸標的等）に対してUMIベースの分子を添加するためでもよい、

を含んでいてもよい。一例において、前記一組のタグ付標的分子を生成することは、少なくとも1つの生物サンプル、及び一組の標的のうち少なくとも1つの標的と関連する標的関連領域を含むプライマーセットに基づいてPCRプロセスを実施すること；並びに、一組のUMIベースの分子を前記PCRプロセスの産物にライゲーションすること、を含んでいてもよい。しかしながら、1つのPCRプロセス及び少なくとも1つのライゲーションプロセスの組み合わせを実行することは、任意の適切なやり方で行うことができる。

【0050】

一組のタグ付標的分子を生成すること（及び／又は方法100の実施形態の適切な部分）は、1つ又は複数の精製プロセス（例えば、任意の適切な成分を精製するため；任意の適切な成分を除去するため；等々）を実施することを含んでいてもよい。一例において、一組のタグ付標的分子を生成することは、第一の増幅プロセスの生成物に対して精製プロセスを実施して、第一の増幅プロセスの産物からUMIベースのプライマーセットのUMIベースのプライマーを除去する（及び／又は他の適切な成分を除去する、等）ことを含んでいてもよい。いくつかの例において、方法100は、本明細書中に記載する増幅プロセス（例えば、タグ付標的分子産物のプールを生成するために使用されるPCRプロセス、等）から得られる産物の精製プロセスを実施すること、例えば、UMIベースのプライマーの第一のセットを用いて実施されるPCRベースの増幅プロセスから得られる産物を精製すること、を含んでいてもよい。精製プロセスは、シリカベースのDNA結合ミニカラム、固相可逆的固定化（Solid Phase Reversible Immobilization）（SPRI）磁気ビーズ（例えば、スケールアップ及び自動化のため等）、生物サンプルからの核酸の沈殿（例えば、アルコールベースの沈殿法を使用）、液-液ベースの精製技術（例えば、フェノール-クロロホルム抽出）、クロマトグラフィーベースの精製技術（例えば、カラム吸着）、核酸と結合し溶出環境（例えば、溶出液を有する、pHシフトを提供する、温度シフトを提供する、等の溶出環境）の存在下で核酸を放出するように構成された結合部分に結合した粒子（例えば、磁気ビーズ、浮遊ビーズ、サイズ分布を有するビーズ、超音波応答性ビーズ（ultrasonically responsive beads）等）の使用を含む精製技術、及び／又は任意の適切な精製プロセスのうちのいずれか1つ又は複数を含んでいてもよい。ある具体的な例では、磁気ビーズは、少量のPCRプロセス産物の精製を可能にし得るが、これは、例えば、DNAとカルボキシルでコーティングされたビーズとの静電相互作用によるものである。付加的又は代替的に、精製プロセスは、（例えば、方法100の実施形態の任意の適切な部分に関連して、等）任意の適切なやり方で実施することができる。

【0051】

しかしながら、タグ付標的分子（例えば、タグ付き核酸分子等）を生成することS120は、任意の適切なやり方で行うことができる。

10

20

30

40

50

【0052】

2.3 単一分子シーケンシングを促進すること

方法100の実施形態は、一組のタグ付き核酸分子を用いた単一分子シーケンシングを促進することS130を含んでもよく、これは、UMIを用いた単一分子シーケンシング（例えば、read untilベースのシーケンシング等）を、過小に現れるテンプレート分子及び／又は特定の標的テンプレート分子（例えば、濃縮（enrichment）のためのもの）に対して過大に現れるテンプレート分子のシーケンシングに関連する問題を克服するために活用するように機能することができる。ある具体的な例においては、単一分子シーケンシングを促進することS130は、例えば、シーケンシングランの間にリアルタイムで、シーケンシングされている各核酸分子を同定するように機能することができる。ある具体的な例では、単一分子シーケンシングを一組のタグ付き核酸分子で促進することは、検出を改善するため、シーケンシングエラー率を減少させるため、及び／又は一組の核酸分子からの過小に現れる核酸分子の絶対計数を改善するために、単一分子シーケンシングを促進することを含む。ある具体的な例では、単一分子シーケンシングを一組のタグ付き核酸分子で促進することは、単一分子シーケンシングをread untilベースの技術（及び／又は適切なシーケンシング技術等）で促進することを含む。

10

【0053】

ある変形例では、単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子で促進することS130は、シーケンシングされたあるタグ付き核酸分子の第一の組の配列領域とあるタグ付き核酸分子の第二の組の配列領域との間の比較を決定することS132；タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することS134（例えば、前記比較に基づいて；タグ付き核酸分子を放出することによって、例えば、Oxford Nanoporeシーケンシング用膜上のナノポアの孔からタグ付き核酸分子を放出することによって；等々）；特定の標的核酸配列のシーケンシングを制限することS136（例えば、特定の標的核酸配列に関連づけられたタグ付き核酸分子について；等々）；及び／又は他の適切なプロセスを含んでもよい。

20

【0054】

単一分子シーケンシングを促進することS130は、単一分子シーケンシングを促進することS130の任意の適切な部分（例えば、S132、S134、S136に関連する部分）を、実質的にリアルタイムで、及び／又はリアルタイムで実施することを含んでもよく、例えば、シーケンシングラン中に当該実施することを含んでもよい。ある具体的な例においては、シーケンサーにより生成されたデータのバイオインフォーマティク処理をリアルタイムで実施して、配列タグ付き核酸分子のデータと現在シーケンシングされているタグ付き核酸分子のデータとの比較を可能にする。これにより、特定のタグ付き核酸分子のシーケンシングを停止すること（例えば、過大に現れる核酸分子を停止することにより、過小に現れる核酸分子のシーケンシングを可能にする；等々）を可能にできる。

30

【0055】

単一分子シーケンシングを促進することS130は、付加的又は代替的に、配列領域（例えば、異なるタグ付き核酸分子の配列領域、例えば、既シーケンシング済のタグ付き核酸分子及び現在シーケンシングされているタグ付き核酸分子の配列領域、等）間の比較を決定することS132を含んでもよい。当該比較を決定することは、1つ又は複数の核酸分子のシーケンシングを停止するか否かを決定するため及び／又は任意の適切なプロセスのための1つ又は複数の状態を評価する機能を果たすことができる。

40

【0056】

配列領域を比較することは、好ましくは、シーケンシングされたあるタグ付き核酸分子の第一のUMI領域及び／又は第一の標的領域を、あるタグ付き核酸分子（例えば、現在シーケンシングされているタグ付き核酸分子、等）の第二のUMI領域及び／又は第二の標的領域と比較することを含む。

【0057】

50

ある具体的な例では、前記第一のUMI領域の配列を前記第二のUMI領域の配列と比較することができ、前記第一の標的領域の配列を前記第二の標的領域の配列と比較することができる。ある具体的な例では、比較を決定することは、第一の組の配列領域と第二の組の配列領域との間の比較を決定することを含んでもよく、ここで、前記第一の組の配列領域は前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたあるタグ付き核酸分子の第一のUMI領域と第一の標的領域とを含み、前記第二の組の配列領域は前記一組のタグ付き核酸分子のうちのタグ付き核酸分子の第二のUMI領域と第二の標的領域とを含み；ここで、例えば、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは、前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の比較に基づくものであってもよい。

【0058】

10

ある具体的な例では、前記比較を決定することは、前記第一のUMI領域、前記シーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一の標的領域、前記第二のUMI領域、及び前記タグ付き核酸分子の第二の標的領域間の比較を決定することを含み、前記第一及び前記第二の標的領域は、前記一組の標的核酸配列のうちのある標的核酸配列（例えば、同じ標的核酸配列等）に関連し、ここで、例えば、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは、前記第一のUMI領域、前記第一の標的領域、前記第二のUMI領域、及び前記第二の標的領域間の比較に基づいて（例えば、前記第一のUMI領域と前記第二のUMI領域との間の一致、及び前記第一の標的領域と前記第二の標的領域との間の一致に基づいて；等々）シーケンシングを停止することを含んでいてもよい。

【0059】

20

ある具体的な例では、前記単一分子シーケンシングを促進することは、シーケンシングされたタグ付き核酸分子の前記第一の組の配列領域（例えば、1つ若しくは複数のUMI領域及び／又は1つ若しくは複数の標的領域等）を決定すること；及び前記第一の組の配列領域を保存すること（例えば、前記シーケンシングシステムに関連するコンピューティングシステムに；前記シーケンシングシステムのコンピューティングサブシステムに；等々）を含んでもよく、ここで、前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の比較を決定することは、前記第二の組の配列領域（例えば、現在シーケンシングされているタグ付き核酸分子の1つ若しくは複数のUMI領域及び／又は1つ若しくは複数の標的領域等）と比較するために前記第一の組の配列領域を呼び出すことを含んでいてもよい。しかしながら、配列領域間の1つ又は複数の比較を決定することS132は任意の適切なやり方で行うことができる。

30

【0060】

単一分子シーケンシングを促進することS130は、付加的又は代替的に、1つ又は複数の核酸分子（例えば、タグ付き核酸分子等）のシーケンシングを停止することを決定することS134を含んでもよく、これは、1つ又は複数の分子のシーケンシングを停止する機能を果たすことができ、例えば、過小に現れるテンプレート分子、特定の標的分子、及び／又は任意の適切な種類の分子の十分なシーケンシングを可能にする。

【0061】

図3に示すように、1つ又は複数の核酸分子のシーケンシングを停止することは、好ましくは、配列領域間の1つ又は複数の比較（例えば、S132におけるように決定される比較、等）に基づく。ある具体的な例では、UMI領域と標的領域（及び／又は適切な非UMI領域）との所与の組み合わせがすでにシーケンシングされ、シーケンシングされているUMI領域と標的領域との現在の組み合わせと一致する場合、シグナル（例えば、デジタルシグナル等）を前記シーケンサーに提供することができ、前記反応を停止させることができる（例えば、これにより、前記シーケンシングシステム自体の機能面における改善を可能にすることができる；等々）。ある具体的な例では、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは比較に基づくことができ、前記第一のUMI領域及び前記第一の標的領域が前記第二のUMI領域及び前記第二の標的領域と一致することに呼応して前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することを含む。ある具体的な例においては、read untilベースの技術は、特定のUMI領域、標的領域、及び／又はタグ付き核

40

50

酸分子の適切な領域についてスキヤニングして、特定の領域又は成分を含まない（例えば、UMI領域を含まない等）核酸分子についてシーケンシングを停止するため（例えば、シーケンシングのリード、及び／又は他の適切な出力を拒絶するため）、用いることができる。ある具体的な例では、任意の適切な領域間（例えば、シーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一のUMI領域とタグ付き核酸分子の第二のUMI領域との間；核酸分子のその他適切な種類の領域間；等々）の任意の適切な一致を、シーケンシングを停止するための条件として用いることができる。ある具体的な例では、タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは比較に基づくことができ、前記第一のUMI領域が前記第二のUMI領域と一致することに基づいてタグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することを含む。

10

【0062】

ある具体的な例においては、前記単一分子シーケンシングを促進することは、シーケンシングシステム（例えば、単一分子シーケンシングシステム等）によって生成された前記データストリームを（例えば、リアルタイムで；等々）読み取るために処理ソフトウェアを用いることを含んでもよく、前記データストリームは、その後、シーケンシング領域間の比較を決定すること（例えば、S132と同様に比較を決定すること）、及び／又は1つ又は複数の核酸分子のシーケンシングを停止すること（例えば、S134と同様に停止すること、例えば前記比較に基づく；等々）、及び／又は前記核酸分子の配列読み込みを継続すること、において分析することができる。ある具体的な例では、（例えば、シーケンシングされたタグ付き核酸分子等の）前記第一の組の配列領域を決定すること、前記第一の組の配列領域を保存すること、前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域（例えば、現在シーケンシングされているタグ付き核酸分子等のタグ付き核酸分子の第二の組の配列領域；等々）との間の比較を決定すること、及び／又は前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは、前記単一分子シーケンシングの単回のシーケンシングランの間に少なくとも実質的にリアルタイムで行うことができる。

20

【0063】

付加的又は代替的に、シーケンシングを停止することは、任意の適切な条件（例えば、シーケンシングに関連する条件）に基づいてなされてもよく、例えば、配列リード、シーケンシングされた領域、定義された制限、及び／又は任意の適切な条件に基づいてなされてもよい。しかしながら、シーケンシングを停止することS134は任意の適切なやり方で行うことができる。

30

【0064】

単一分子シーケンシングを促進することは、付加的又は代替的に、核酸分子のシーケンシングを制限することを含んでいてもよく、該制限することは、特定の核酸分子（例えば、特定のタグ付き核酸分子）のシーケンシングをある特定の量（例えば、数等）に制限する機能を果たすことができ、このような制限は、例えば、前記特定の核酸分子のUMI領域、標的領域、及び／又は適切な領域の同定に基づくものでもよい。核酸分子のシーケンシングを制限することは、核酸分子に対応する標的核酸配列についての定義された制限に基づくものであってもよく、ここで、例えば、定義された異なる制限により、所与の標的核酸配列についてシーケンシングされる核酸分子の量に対する制限を設定できる。ある具体的な例においては、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは、前記比較、及び前記第一の組の配列領域に関連した、タグ付き核酸分子のシーケンシングについての定義された制限（例えば、前記第一の組の配列領域の配列に対応する配列領域を含むタグ付き核酸分子についての制限）（例えば、前記タグ付き核酸分子に対応する標的核酸分子配列について定義された制限に達した場合；タグ付き核酸分子の当該種類について所定の制限に達した場合；等々）に基づいて前記シーケンシングを停止することを含み、ここで、前記一組のタグ付き核酸分子は、前記第一の組の配列領域に関連づけられたタグ付き核酸分子を含む。しかしながら、核酸分子のシーケンシングを制限することS136は、任意の適切なやり方で行うことができる。

40

【0065】

50

単一分子シーケンシングを促進すること S 1 3 0 は、任意の適切な時間及び頻度で行うことができる。単一分子シーケンシングを促進することは、第三者の実体及び／又は適切な実体に対して U M I ベースの分子を提供すること、及び／又はタグ付き核酸分子の生成を手助けすることに基づくことができる（前記第三者の実体及び／又は適切な実体は、例えば、前記タグ付標的分子を生成するために必要なサンプル調製を行い；前記単一分子シーケンシングの一部を行い、例えばサンプルローディングと関連する一部を行い；ここで、第一当事者は、比較決定、シーケンシングの停止、及び／又はシーケンシングの制限と関連するプロセスを実施してもよい；等々）。

【0066】

しかしながら、単一分子シーケンシングを促進すること S 1 3 0 は、任意の適切な方法で行うことができる。

10

【0067】

2. 4 分子数を決定すること

付加的又は代替的に、方法 1 0 0 の実施形態は、前記単一分子シーケンシングに基づいて分子数を決定すること S 1 4 0 を含んでもよく、これは、1 つ又は複数の標的（例えば、標的核酸配列；タグ付き核酸分子に関連づけられた標的；等々）についての分子数に関連するメトリクスを決定する機能を果たし得る。分子数は、絶対分子数；シーケンシングリード量と関連する計数；及び／又は任意の適切な分子数に関連するメトリクスのうちのいずれか 1 つ又は複数を含んでもよい。分子数を決定することは、好ましくは、タグ付き核酸分子の U M I 領域の同定及び／又は分析に基づき、ここで、例えば、U M I 領域の U M I 配列が、1 つ又は複数のサンプル中に存在する 1 つ又は複数の標的の特定及び／又は定量に用いられてもよい。

20

【0068】

ある具体的な例では、方法 1 0 0 は、一組のタグ付き核酸分子の U M I 領域の単一分子シーケンシングに基づいて、一組の核酸分子を含むサンプルから微生物と関連付けられる絶対分子数を決定することを含んでもよい。ある具体的な例では、方法 1 0 0 は、標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子のシーケンシングの定義された制限に基づいて、標的核酸配列に関連する絶対分子数を決定し、ここで、例えば、定義された制限（例えば、シーケンシングを停止する際、及び／又は核酸分子のシーケンシングを制限する際に、付加的又は代替的に使用される定義された制限；等々）が、1 つ又は複数の分子数に関連するメトリクスを決定する際に情報を与え得る、及び／又は使用できる（例えば、前記定義された制限が、分子数が前記定義された制限によって示される数よりも多いことはないことを示す；等々）。

30

【0069】

分子数を決定することは、任意の適切な時間及び頻度で行うことができる（例えば、シーケンシングラン中にリアルタイムで；実質的にリアルタイムで、例えばシーケンシングランの直後；U M I 領域のシーケンシング及び／又は分析後の任意の時間；等々で行うことができる）。

【0070】

しかしながら、分子数を決定すること S 1 4 0 は任意の適切なやり方で行うことができる。

40

【0071】

3. その他

しかしながら、方法 1 0 0 の実施形態は、対象からの生物サンプルの受領、対象からの生物サンプルの処理、生物サンプル由来のデータの分析、及び対象の特異的マイクロバイオーム組成及び／又は機能的特性にしたがってカスタマイズされた診断、及び／又はプロバイオティクスに基づく治療法を提供するために使用できるモデルを生成すること、を促進するように構成された任意の他の適切なブロック又はステップを含んでもよい。

【0072】

方法 1 0 0 及び／又はシステムの実施形態は、任意のバリエーション（例えば、実施形

50

態、変形例、例、具体例、図等)を含む様々なシステム成分及び様々な方法プロセスのあらゆる組み合わせ及びバリエーションを含んでもよく、ここで、本明細書中で記載する方法100の実施形態及び／又はプロセスの一部は、本明細書中で記載するシステム及び／又は他の実体の1つ又は複数の例、要素、成分、及び／又はその他の態様により、及び／又はそれらを用いることによって、非同期的に(例えば、連続的に)、同時に(例えば、並行して)、又はその他任意の適切な順序で行うことができる。

【0073】

本明細書中で記載するバリエーション(例えば、実施形態、変形例、例、具体例、図等)のいずれも、及び／又は本明細書中で記載する前記バリエーションのいずれの部分も、付加的又は代替的に、組み合わせ、集約、除外、使用、順次実施、並行実施、及び／又はその他の様式で適用することができる。

【0074】

方法100及び／又はシステムの実施形態の一部は、少なくとも部分的には、コンピュータ可読指令を保存するコンピュータ可読媒体を受容するように構成された機械として具体化及び／又は行うことができる。前記指令は、前記システムと一体化されていてもよいコンピュータ実行可能要素によって実行されてもよい。前記コンピュータ可読媒体は、RAM、ROM、フラッシュメモリ、EEPROM、光デバイス(CD若しくはDVD)、ハードドライブ、フロッピドライブ、又は任意の適切なデバイス等の任意の適切なコンピュータ可読媒体上に保存することができる。前記コンピュータ実行可能要素は、汎用プロセッサ又はアプリケーション特異的プロセッサであってもよいが、任意の適切な専用ハードウェア又はハードウェア／ファームウェア組み合わせデバイスが、代替的又は付加的に、前記指令を実行してもよい。

以上の詳細な説明並びに図面及びクレームから当業者が理解するように、クレームで規定される範囲から逸脱することなく方法100の実施形態、システム、及び／又はバリエーションに修正及び変更を加えることができる。

本開示に係る態様は以下の態様も含む。

<1>

一組の標的核酸配列に関連する、固有の分子識別子(UMI)ベースの一組の分子を準備すること、

前記一組のUMIベースの分子、及び、前記一組の標的核酸配列に対応する一組の核酸分子に基づいて、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること、ここで、前記一組のタグ付き核酸分子の各タグ付き核酸分子は：

ランダムな「N」塩基セットを含むUMI領域、ここで、各ランダムな「N」塩基は、「A」塩基、「G」塩基、「T」塩基、及び「C」塩基のうちのいずれか1つから選択される、及び

前記一組の標的核酸配列のうちの標的核酸配列に相当する標的領域を含む、

単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子を用いて促進すること、ここで、前記単一分子シーケンシングを行うことは：

第一の組の配列領域と第二の組の配列領域との間の比較を決定すること、ここで、前記第一の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたあるタグ付き核酸分子の第一のUMI領域及び第一の標的領域を含み、前記第二の組の配列領域は前記一組のタグ付き核酸分子のうちのタグ付き核酸分子の第二のUMI領域及び第二の標的領域を含む、及び

前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止すること、

を含む、改善された単一分子シーケンシングの方法。

<2>

前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することは、前記第一のUMI領域及び前記第一の標的領域が、前記第二のUMI領域及び前記第二の標的領

10

20

30

40

50

域と一致することに呼応して、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することを
含む、＜1＞に記載の方法。

＜3＞

前記単一分子シーケンシングを促進することが、前記シーケンシングされたタグ付き核酸
分子の前記第一の組の配列領域を決定すること、及び前記第一の組の配列領域を保存す
ることを含む、前記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の前記比較を決定
することが、前記第一の組の配列領域を、前記第二の組の配列領域との前記比較のため
に呼び出すことを含む、＜2＞に記載の方法。

＜4＞

前記第一の組の配列領域を決定すること、前記第一の組の配列領域を保存すること、前
記第一の組の配列領域と前記第二の組の配列領域との間の前記比較を決定すること、及び
前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、それぞれ、前記単一分子シー
ケンシングの単回シーケンシングランの間に少なくとも実質的にリアルタイムで実施され
る、＜3＞に記載の方法。

＜5＞

前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記比較、及び前記第一の
組の配列領域と関連づけられたタグ付き核酸分子のシーケンシングについての定義された
制限に基づいて、シーケンシングを停止することを含む、前記一組のタグ付き核酸分子が
前記第一の組の配列領域と関連づけられた前記タグ付き核酸分子を含む、＜1＞に記載の
方法。

＜6＞

前記一組のUMIベースの分子を調製することが、前記一組の標的核酸配列及び前記タ
グ付き核酸分子のシーケンシングについての前記定義された制限に基づいて、前記一組の
タグ付き核酸分子の生成を促進するための多数の異なるUMI領域を決定することを含む
、＜5＞に記載の方法。

＜7＞

前記一組のタグ付き核酸分子の前記UMI領域の前記単一分子シーケンシングに基づい
て、前記一組の核酸分子を含むサンプルから、微生物と関連する絶対分子数を決定するこ
とをさらに含む、＜1＞に記載の方法。

＜8＞

前記単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子で促進することが、前記一
組の核酸分子からの過小に現れる核酸分子の検出及び絶対計数を改善するために前記単一
分子シーケンシングを促進することを含む、＜7＞に記載の方法。

＜9＞

前記一組の標的核酸配列が、第一の組の標的及び第二の組の標的のうちの少なくとも一
方を含む、前記第一の組の標的が、16S rRNA標的及び18S rRNA標的を含む
、前記第二の組の標的が、16S rRNA標的及びHPVに関連する標的を含む、＜1
＞に記載の方法。

＜10＞

前記単一分子シーケンシングを前記一組のタグ付き核酸分子で促進することが、read u
ntilベースの技術で前記単一分子シーケンシングを促進することを含む、＜1＞に記載の
方法。

＜11＞

固有の分子識別子（UMI）ベースの一組の分子、及び一組の標的核酸配列に対応する
一組の核酸分子に基づいて、一組のタグ付き核酸分子の生成を促進すること、及び
前記一組のタグ付き核酸分子を用いた単一分子シーケンシングを促進すること、
を含む、前記単一分子シーケンシングを促進することは、

第一のUMI領域と第二のUMI領域との間の比較を決定すること、ここで、前記第一
のUMI領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたあるタグ付
き核酸分子のものであり、前記第二のUMI領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうち

10

20

30

40

50

のあるタグ付き核酸分子のものであり；一組の配列領域及び第二の組の配列領域であり、前記第一の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのシーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一のUMI領域を含み、前記第二の組の配列領域は、前記一組のタグ付き核酸分子のうちのタグ付き核酸分子の第二のUMI領域及び第二の標的領域を含む、及び

前記第一のUMI領域と前記第二のUMI領域との間の前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止すること、

を含む、改善された単一分子シーケンシングの方法。

< 1 2 >

前記比較を決定することが、前記第一のUMI領域、前記シーケンシングされたタグ付き核酸分子の第一の標的領域、前記第二のUMI領域、及び前記タグ付き核酸分子の第二の標的領域の間の前記比較を決定することを含み、前記第一の標的領域及び前記第二の標的領域が前記一組の標的核酸配列のうちのある標的核酸配列と関連し、前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記第一のUMI領域、前記第一の標的領域、前記第二のUMI領域、及び前記第二の標的領域の間の前記比較に基づいて前記シーケンシングを停止することを含む、< 1 1 >に記載の方法。

< 1 3 >

前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記比較、及び前記標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子のシーケンシングについての定義された制限に基づいて、前記シーケンシングを停止することを含み、前記一組のタグ付き核酸分子が前記標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子を含む、< 1 2 >に記載の前記方法。

< 1 4 >

前記標的核酸配列に関連するタグ付き核酸分子のシーケンシングについての前記定義された制限に基づいて前記標的核酸配列に関連する絶対分子数を決定することをさらに含む、< 1 3 >に記載の方法。

< 1 5 >

前記比較に基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することが、前記第一のUMI領域が前記第二のUMI領域と一致することに基づいて前記タグ付き核酸分子のシーケンシングを停止することを含む、< 1 1 >に記載の方法。

< 1 6 >

前記一組のUMIベースの分子が、複数の微生物分類群と関連する保存領域を標的とする規定された配列領域を含むUMIベースのプライマーを含む、< 1 1 >に記載の方法。

< 1 7 >

前記一組のタグ付き核酸分子の生成を促進することは、前記一組の核酸分子のうちの過小に現れる核酸分子及び過大に現れる核酸分子と関連する一組のアンプリコンのバランスをとるために、前記一組のUMIベースの分子及び前記一組の核酸分子に基づいて少なくとも一つの増幅プロセスを行うことを含む、< 1 1 >に記載の方法。

< 1 8 >

前記一組のタグ付き核酸分子の生成を促進することが：

前記一組の核酸分子のうちの、核酸分子の第一のサブセットを用いてPCR増幅プロセスを行うことに基づいて、核酸分子のPCR増幅サブセットを生成すること、及び

前記一組の核酸分子のうちの核酸分子の前記PCR増幅サブセットと核酸分子のPCRとは独立したサブセットとに基づいて前記一組のタグ付き核酸分子を生成すること、

を含む、< 1 1 >に記載の方法。

< 1 9 >

前記一組の標的核酸配列が、抗生物質耐性及びウイルスカプシド遺伝子のうちの少なくとも1つに関連する標的核酸配列を含む、< 1 1 >に記載の方法。

< 2 0 >

前記一組のタグ付き核酸分子を用いて前記単一分子シーケンシングを促進することが、read untilベースの技術を用いて前記単一分子シーケンシングを促進することを含む、<

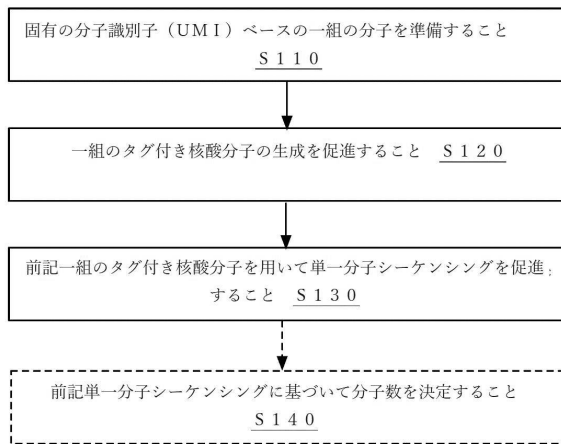
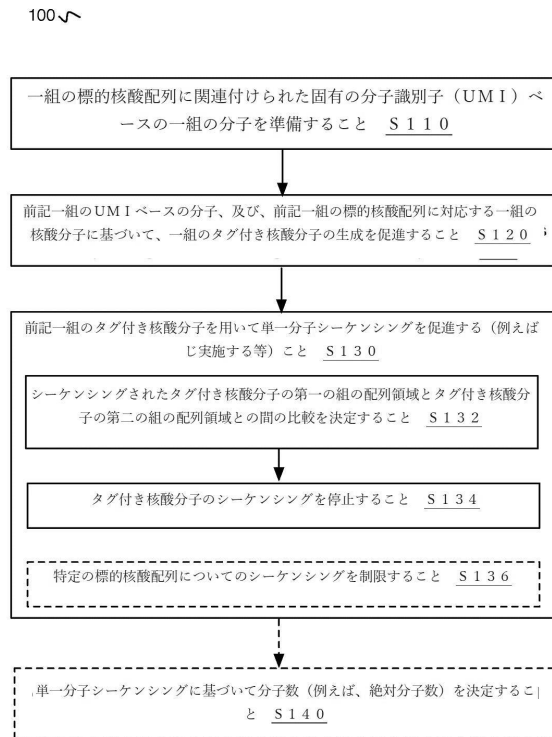
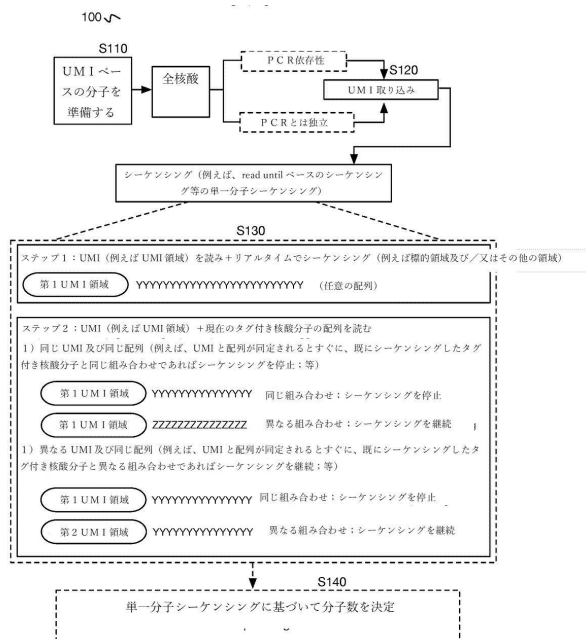
10

20

30

40

50

1 1 > に記載の方法。**【図面】****【図 1】****【図 2】****【図 3】**

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 リッチマン、ジェシカ
アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア サンフランシスコ、シャープ 3 0 1 ラングトン ス
トリート、3 6 0 ユーバイオーム、インコーポレイテッド。 内
- (72)発明者 アルモナシド、ダニエル
アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア サンフランシスコ、シャープ 3 0 1 ラングトン ス
トリート、3 6 0 ユーバイオーム、インコーポレイテッド。 内
- (72)発明者 モラレス、エドゥアルド
アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア サンフランシスコ、シャープ 3 0 1 ラングトン ス
トリート、3 6 0 ユーバイオーム、インコーポレイテッド。 内
- (72)発明者 レオン、ルイス
アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア サンフランシスコ、シャープ 3 0 1 ラングトン ス
トリート、3 6 0 ユーバイオーム、インコーポレイテッド。 内
- (72)発明者 バード、サラ ダブリュ.
アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア サンフランシスコ、シャープ 3 0 1 ラングトン ス
トリート、3 6 0 ユーバイオーム、インコーポレイテッド。 内
- (72)発明者 ウガルデ、フアン
アメリカ合衆国 9 4 1 0 3 カリフォルニア サンフランシスコ、シャープ 3 0 1 ラングトン ス
トリート、3 6 0 ユーバイオーム、インコーポレイテッド。 内

審査官 山▲崎▼ 真奈

- (56)参考文献 Loose, M. et al., Real-time selective sequencing using nanopore technology, Nat Methods.
, 2016年, 1 3 (9) , 751-754
Kivioja, T. et al., Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifie
rs, Nature Methods, 2011年, 9 (1) , 72-74
Hoshino, T. and Inagaki, F., Application of stochastic labeling with random-sequence bacod
es for simultaneous quantificaion and sequencing of environmental 16S rRNA genes, PLOS
ONE, 2017年01月04日, 1 2 (1) , e0169431
Phipson, B. et al., Gene length and detection bias in single cell RNA sequencing protocols,
F1000Research, 2017年04月28日, 6 : 5 9 5

- (58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 1 2 N

C 1 2 Q

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)