

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6068517号
(P6068517)

(45) 発行日 平成29年1月25日(2017.1.25)

(24) 登録日 平成29年1月6日(2017.1.6)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A

請求項の数 32 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2014-560354 (P2014-560354)	(73) 特許権者	502279294
(86) (22) 出願日	平成25年3月6日(2013.3.6)		イルミナ ケンブリッジ リミテッド
(65) 公表番号	特表2015-509371 (P2015-509371A)		イギリス, シービー 101 エック
(43) 公表日	平成27年3月30日(2015.3.30)		クスエル, エセックス, サッフロン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/054517		ウォルデン, リトル チェスターフォード,
(87) 国際公開番号	W02013/131962		チェスターフォード リサーチ
(87) 国際公開日	平成25年9月12日(2013.9.12)	(74) 代理人	100147485
審査請求日	平成27年5月25日(2015.5.25)		弁理士 杉村 憲司
(31) 優先権主張番号	61/607, 418	(74) 代理人	100136858
(32) 優先日	平成24年3月6日(2012.3.6)		弁理士 池田 浩
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100193437
			弁理士 高木 義和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 向上した核酸配列決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) トランスポサゼおよびトランスポゾン組成物を提供するステップ；
 (b) 支持体上に固定された1つ以上の核酸二本鎖を提供するステップ；ならびに
 (c) 前記1つ以上の核酸二本鎖およびトランスポゾン組成物が、1つ以上のタグ付き核酸二本鎖を生成する転移反応を起こす条件下で、前記トランスポサゼおよびトランスポゾン組成物を前記1つ以上の核酸二本鎖と接触させるステップを含む、
 核酸二本鎖のタグ付け方法であって、前記トランスポゾン組成物が、転移鎖および非転移鎖を含む二本鎖核酸分子を含む、方法。

【請求項 2】

前記1つ以上の核酸二本鎖が、DNA：RNA二本鎖であり、前記DNA：RNA二本鎖が、前記RNA鎖の5'末端上でタグ付けされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記核酸二本鎖が、DNA：DNA二本鎖であり、前記DNA：DNA二本鎖の鎖の1つが、前記DNA鎖の5'末端でタグ付けされる、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記支持体が、複数の固定化プライマーを含む、請求項1～3に記載の方法。

【請求項 5】

前記1つ以上のDNA：RNA二本鎖のRNA鎖または前記1つ以上のDNA：DNA二本鎖のDNA鎖が、前記固定化プライマーの1つ以上の少なくとも一部分に相補的な配

10

20

列を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 DNA : RNA 二本鎖または前記 DNA : DNA 二本鎖が、1 つ以上の RNA 分子または 1 つ以上の一本鎖 DNA 分子を前記支持体上の前記固定化プライマーにハイブリダイズし、前記 RNA 分子または一本鎖 DNA 分子にハイブリダイズされた前記プライマーを前記 RNA 分子または一本鎖 DNA 分子をテンプレートとして用いて伸長し、前記 1 つ以上の DNA : RNA 二本鎖または前記 1 つ以上の DNA : DNA 二本鎖を生成する、ことにより提供される、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

複数の DNA : RNA 二本鎖または複数の DNA : DNA 二本鎖が、複数の RNA 分子または複数の一本鎖 DNA 分子を、前記支持体上の前記固定化プライマーにハイブリダイズし、前記 RNA 分子または一本鎖 DNA 分子にハイブリダイズされた前記プライマーを前記 RNA 分子または一本鎖 DNA 分子をテンプレートとして用いて伸長し、前記複数の DNA : RNA 二本鎖または前記複数の DNA : DNA 分子を生成することにより提供される、請求項 4 または 5 に記載の方法。

10

【請求項 8】

前記固定化プライマーが、ポリ T 配列を含む、請求項 4 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記複数の固定化プライマーが、第 1 配列を有するプライマーの第 1 サブセットおよび第 2 配列を有するプライマーの第 2 サブセットを含む、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記プライマーの第 1 サブセットが、ポリ T 配列を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複数の固定化プライマーが、前記複数の RNA 分子中の前記 RNA 分子の 1 つ以上にハイブリダイズすることができる標的特異的プライマーを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 12】

3' アダプターを前記複数の RNA 分子または前記複数の一本鎖 DNA 分子に付加するステップであり、前記 3' アダプターが前記複数の固定化プライマーまたはそのサブセットに相補的な配列を含む、ステップ；ならびに、RNA 分子または一本鎖 DNA 分子がライゲートされた前記 3' アダプターを、前記固定化プライマーにハイブリダイズするステップをさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

30

【請求項 13】

前記転移反応が、(i) 前記トランスポゾン組成物の前記転移鎖を含む 5' タグ付き RNA 鎖または 5' タグ付き DNA 鎖、および (ii) 前記 5' タグ付き RNA 鎖または前記 5' タグ付き DNA 鎖に相補的な DNA 鎖の 3' 末端と前記トランスポゾン組成物の前記非転移鎖との間のギャップをもたらす、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 1 つ以上のタグ付き核酸二本鎖を生成する転移反応が、請求項 13 に記載の方法でもたらされる核酸二重鎖を、前記 5' タグ付き RNA 鎖または前記 5' タグ付き DNA 鎖に相補的な DNA 鎖の 3' 末端を伸長する条件下で、核酸修飾酵素と接触させるステップをさらに含む、

40

前記請求項 13 に記載の方法でもたらされる核酸二重鎖が、前記トランスポゾン組成物の前記転移鎖を含む 5' タグ付き RNA 鎖または 5' タグ付き DNA 鎖と、前記 5' タグ付き RNA 鎖または前記 5' タグ付き DNA 鎖に相補的な DNA 鎖の 3' 末端と前記トランスポゾン組成物の前記非転移鎖との間のギャップを有する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つ以上のタグ付き核酸二本鎖が、タグ付き DNA : RNA 二本鎖またはタグ付き DNA : DNA 二本鎖である、請求項 14 に記載の方法。

50

【請求項 16】

前記核酸修飾酵素が、前記トランスポゾン組成物の前記非転移鎖を置換する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

RNA 鎖を前記タグ付き DNA : RNA 二本鎖から除去するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

前記タグ付き DNA : RNA 二本鎖からの DNA 鎖の少なくとも一部分を配列決定するステップをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 DNA 鎖の少なくとも一部分をコピーし、前記タグ付き DNA : RNA 二本鎖の DNA 鎖に相補的な第 2 DNA 鎖を生成するステップをさらに含む、請求項 17 または 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

前記第 2 相補的 DNA 鎖を配列決定するステップをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記第 2 相補的 DNA 鎖を配列決定する前に前記タグ付き DNA : RNA 二本鎖の DNA 鎖が除去される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

DNA 鎖を増幅し、第 1 および第 2 増幅鎖を含む複数の二本鎖 DNA 分子を生成するステップをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 23】

前記第 1 増幅鎖を除去するステップをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記第 2 増幅鎖の少なくとも一部分を配列決定するステップをさらに含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記第 2 増幅鎖の少なくとも一部分をコピーし、前記第 1 増幅鎖を再生するステップをさらに含む、請求項 24 に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記第 2 増幅鎖を除去するステップをさらに含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 増幅鎖の少なくとも一部分を配列決定するステップをさらに含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記支持体が、ビーズまたは複数のビーズである、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記支持体が平坦な支持体である、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 30】

複数の二本鎖が提供され、各二本鎖が単一のビーズ上に配置される、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

前記増幅が、アンプリコンのクラスターを生成する、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 32】

前記転移鎖が鎖情報を保存するタグを含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本出願は、その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、2012年3月6日出願された米国仮特許出願第61/607,418号の優先権を主張する。

【背景技術】

【0002】

RNAを含む核酸の配列決定のための配列決定技術が開発された。配列決定技術としては、例えば、合成による配列決定が挙げられる。合成による配列決定またはサイクル配列決定は、例えば、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、例えば、米国特許第7,427,673号；第7,414,116号；国際公開第WO04/018497号；第WO91/06678号；第WO07/123744号；および米国特許第7,057,026号に記載されるような切断性または光退色性色素標識を含有する、ヌクレオチドの段階的付加により達成することができる。あるいは、ピロ配列決定技術を用いてもよい。ピロ配列決定は、特定のヌクレオチドが新生鎖に組み込まれる際の無機ピロリン酸 (P_{Pi}) の放出を検出する (それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Ronaghi et al., (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release," *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing," *Genome Res.* 11(1), 3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate," *Science* 281(5375), 363; 米国特許第6,210,891号；第6,258,568号；および第6,274,320号)。ピロ配列決定では、放出されたP_{Pi}はアデノシン三リン酸 (ATP) にATPスルフィラーゼによりすぐに変換されることにより検出することができ、生成されたATPのレベルはルシフェラーゼにより生成される光子によって検出される。

【0003】

配列決定技術としては、ライゲーション技術による配列決定も挙げられる。こうした技術はDNAリガーゼを用いてオリゴヌクレオチドを組み込み、こうしたヌクレオチドの組み込みを同定し、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、米国特許第6,969,488号；第6,172,218号；および第6,306,597号に記載される。他の配列決定技術としては、例えば、蛍光インシチュ配列決定 (FISSSEQ)、および大規模並列シグネチャー配列決定 (MPSS) が挙げられる。

【0004】

配列決定のためのDNA試料の調製は比較的簡単であり得、試料調製プロセスを単純化する、アダプター配列をフラグメント化してDNAフラグメントに付加する転移反応の使用を含むことができる。例えば、その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、国際公開第WO2010/048605号を参照されたい。対照的に、RNA試料の配列決定のための現在のプロトコルは、配列決定前に試料中のRNAを二本鎖cDNA型に変換する試料調製方法を用いる。よって、配列決定のためのRNA試料の調製はより労働集約的である。また、現在のプロトコルは鎖特異的情報を保存するそれらの能力において最適ではない。より具体的には、ほとんどの方法は、二本鎖cDNAに変換された後、もとの一本鎖RNA分子の方向についての鎖情報を保存することができない。鎖特異的情報の保存は、新しい遺伝子のアノテーションおよび遺伝子発現レベルの決定のために重要である。いくつかの方法は、アダプターを一本鎖RNA分子の末端にライゲートすることにより鎖特異的情報の保存を試みる。アダプターはRNA分子から生成される二本鎖cDNAの両端について識別可能な情報を提供する配列を有し得る。しかしながら、この方法は不利点を有する。例えば、RNA分子がフラグメント化される場合、フラグメント化後、分子の内部部分はそれらの方向 (すなわち、鎖特異的) 情報を失う。

【発明の概要】

【 0 0 0 5 】

本明細書ではDNA：RNA二本鎖のタグ付け方法を提供する。本方法は、トランスポサーゼおよびトランスポゾン組成物を提供するステップ、支持体上に固定された1つ以上のDNA：RNA二本鎖を提供するステップ、ならびにトランスポサーゼおよびトランスポゾン組成物を1つ以上のDNA：RNA二本鎖と、1つ以上のDNA：RNA二本鎖およびトランスポゾン組成物に1つ以上のタグ付きDNA：RNA二本鎖を生成する転移反応が起こる条件下で接触させるステップを含み、トランスポゾン組成物は転移鎖および非転移鎖を含む二本鎖核酸分子を含む。本方法を行い、固体支持体上に固定されたDNA：DNA二本鎖をタグ付けすることもできる。

【 0 0 0 6 】

1つ以上の実施形態の詳細を添付の図面および以下の説明に記載する。他の特徴、目的、および利点は説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明らかとなるだろう。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 7 】

【図1】本明細書において提供される方法の例を示す概略である。ポリAテール化mRNAは、支持体の表面に結合したポリT DNA捕捉プローブまたはプライマーとのハイブリダイゼーションによって支持体上で捕捉される。ポリT鎖は次に逆転写酵素ポリメラーゼで伸長され、DNA：RNA二本鎖を含む二本鎖分子を生成する。次に、トランスポソーム複合体（例えば、モザイク末端（ME）配列および表面増幅プライマーに相補的な配列と結合したTn5トランスポサーゼ）は支持体に付加され、DNAアダプターオリゴをRNA鎖の5'末端にライゲートして二本鎖と転移反応を行い、これをフラグメントする。鎖置換ポリメラーゼ（例えば、Bstポリメラーゼ）を次に用い、トランスポソーム複合体の非転移鎖を置換し、RNA鎖をその5' DNAキメラ末端にコピーしてDNA鎖の3'末端を伸長することができる。二本鎖分子を次に増幅（例えば、クラスター増幅）、および配列決定プライマーで配列決定することができる。プライマーは部分的にME配列および上流アダプター配列を含む。あるいは、分子の他端（ポリT末端）は、合成による配列決定（SBS）化学のサイクルを開始する前に、ポリT配列の上流にアニールし、天然dATPヌクレオチドで伸長されるプライマーで配列決定することができる。

【図2】本明細書において提供される方法の例を示す概略である。RNAはフラグメント化され、ホスファターゼで処理される。一本鎖アダプター分子は表面結合プライマーの補体を含む各RNAフラグメントの3'末端にライゲートされる。フラグメントは次に支持体に付加され、ハイブリダイゼーションによって捕捉される。ハイブリダイズされたRNA分子は逆転写酵素ポリメラーゼでDNA：RNA二本鎖に変換される。二本鎖をタグメントするのにトランスポサーゼおよびP5を有するMEのアダプター二本鎖（すなわち、トランスポゾン）を含むトランスポソーム複合体または組成物が用いられる。鎖置換ポリメラーゼでのDNA鎖の末端までの伸長後、分子を増幅（例えば、クラスター増幅）および配列決定することができる。

【図3】本明細書において提供される方法の例を示す概略である。2つの表面グラフトプライマー：標準的なグラフトプライマー（例えば、P5）およびその下流（3'）側に標的的特異的捕捉配列を有する修飾グラフトプライマー（例えば、P7）を含有する支持体が用いられる。標的的特異的配列の一例はレトロウイルス逆転写酵素（例えば、HIVポリメラーゼ）に相補的なオリゴ配列である。精製ウイルスRNAは支持体に付加され、ハイブリダイゼーションによって捕捉され、逆転写酵素でコピーされ、タグメントされる。配列決定は、タグメントされたアダプターまたは他端では捕捉プローブにアニールされたプライマーで達成することができる。

【図4】本明細書において提供される方法の例を示す概略である。RNA転写物はグリーン蛍光タンパク質（GFP）転写物配列および表面結合プライマーに相補的な配列（例えば、P7'配列）を含有するプラスミドから生成される。転写物は、例えば、P7配列を含む、プライマーを含む支持体にハイブリダイズされる。ハイブリダイズされたRNA分子は逆転写酵素ポリメラーゼでDNA：RNA二本鎖に変換される。二本鎖をタグメント

10

20

30

40

50

するのにトランスポソーム複合体が用いられる。鎖置換ポリメラーゼでのDNA鎖の末端までの伸長およびRNA鎖の除去後、分子を増幅（例えば、クラスター増幅）および配列決定することができる。

【図5】グリーン蛍光タンパク質（GFP）を含有するプラスミドから生成し、任意で、DNアーゼで処理され、DNA（すなわち、プラスミド）を除去したRNA転写物を示すゲルの画像である。RNA転写物のDNアーゼ処理後、残留DNA（すなわち、プラスミド）は見られなかった。

【図6】SYBRグリーンで染色されたクラスターの画像を示す。レーン1～4はPhiX DNAを含有し、レーン5～8はGFP RNAを含有した。レーン5および6は、DNアーゼで予め処理され、DNAを除去したRNAを含有した。レーン7および8は、DNアーゼで予め処理され、追加の対照としてRNAアーゼで処理されたRNAを含有した。第1伸長は、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素（AMV-RT）（レーン2、4、6および8）またはPhusion DNAポリメラーゼ（レーン1、3、5および7）のいずれかを用いて行われた。レーン3～8はP5アダプターでタグメントされた。等温クラスター増幅は基準として行われ、クラスターはSYBRグリーンで染色された。

【図7A】図6に記載されたレーン1～8の配列決定からのアライン配列決定データのカバレッジプロットのグラフを示す。

【図7B】図6に記載されたレーン1～8の配列決定からのアライン配列決定データのカバレッジプロットのグラフを示す。

【図8】本明細書において提供されるDNA：DNA二本鎖のタグ付け方法の例を示す概略である。一本鎖DNA（ssDNA）はフラグメント化され、フラグメントは末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによりポリヌクレオチドで標識される。フラグメントは次に支持体に付加され、ポリTテールと固体支持体上に固定されたその補体とのハイブリダイゼーションによって捕捉される。ハイブリダイズされたssDNA分子はDNAポリメラーゼでDNA：DNA二本鎖に変換される。二本鎖をタグメントするのにトランスポサゼおよびP5-seq配列を有するアダプター二本鎖（すなわち、トランスポゾン）を含むトランスポソーム複合体または組成物が用いられる。鎖置換ポリメラーゼでのDNA鎖の末端までの伸長後、分子を増幅（例えば、クラスター増幅）および配列決定することができる。

【図9】全mRNA転写物試料を用いてデータを生成するように設計された実験からのSYBRグリーンで染色されたクラスターの画像を示す。レーン1はタグメンテーションのないPhiX標準ライブラリーである。レーン2はテーリングが行われなかった負の対照であり、レーン8はdsDNAの負の対照である。レーン3およびレーン4は、レーン4についてプライマーが希釈された以外、同じ実験である。レーン5および6は、レーン6についてプライマーが希釈された以外、同じ実験である。レーン7は、ランダムDNAヘキサマーの代わりにランダムRNAヘキサマーを用いる。

【図10】図1の方法に従ったGAPDHのアライン配列決定リードのカバレッジの画像を示す。上の3'捕捉は、対照ポリAテール化mRNA試料からの捕捉、タグメンテーション、クラスターおよび配列アラインメントを示す。下の全転写物は、本開示の方法を用いて全mRNA転写物カバレッジを示すため複合総UHR RNA試料から濃縮され、酵素的にフラグメント化され、ポリアデニル化されたmRNA試料からのmRNAアラインメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

RNA試料の配列決定のための現在のプロトコルはすべて、配列決定前に試料中のRNAを二本鎖cDNA型に変換する試料調製を用いる。本明細書では、二本鎖cDNA中間体の溶液相調製を回避するRNA試料の配列決定方法を提供する。提供される方法は配列決定中の鎖性情報の保存ももたらす。しかしながら、本明細書に記載される方法は、DNAの標識および配列決定にも用いられ得る。

【0009】

本明細書ではDNA：RNA二本鎖のタグ付け方法を提供する。本方法は、トランスポサーゼおよびトランスポゾン組成物を提供するステップ、支持体上に固定された1つ以上のDNA：RNA二本鎖を提供するステップ、ならびにトランスポサーゼおよびトランスポゾン組成物を1つ以上のDNA：RNA二本鎖と、1つ以上のDNA：RNA二本鎖およびトランスポゾン組成物に1つ以上のタグ付きDNA：RNA二本鎖を生成する転移反応が起こる条件下で接触させるステップを含む。トランスポゾン組成物は、転移鎖および非転移鎖を含む二本鎖核酸分子を含む。下記の例はDNA：RNA二本鎖を用いて示されるが、それらは適切な場合DNA：DNA二本鎖にも変更可能であり得る（図8参照）。

【0010】

任意で、1つ以上のDNA：RNA二本鎖はRNA鎖の5'末端上でタグ付けされる。任意で、転移鎖は鎖情報を保存するタグを含む。転移反応は、トランスポゾン組成物の転移鎖を含む5'タグ付きRNA鎖、およびDNA鎖の3'末端とトランスポゾン組成物の非転移鎖との間のギャップをもたらす。任意で、本方法は、1つ以上のタグ付きDNA：RNA二本鎖を核酸修飾酵素と、DNA鎖の3'末端を伸長し、RNA鎖をそれらの5'末端にコピーする条件下で接触させるステップをさらに含む。核酸修飾酵素はトランスポゾン組成物の非転移鎖を置換することができる。

【0011】

図1は本明細書において提供される方法の例を示す概略である。簡潔に、ポリAテール化mRNAは支持体（例えば、フローセル）上で、支持体の表面に結合したポリT DNA捕捉プローブ（またはプライマー）とのハイブリダイゼーションによって捕捉される。ポリT鎖は次に逆転写酵素ポリメラーゼで伸長され、DNA：RNA二本鎖を含む二本鎖分子を生成する。次に、トランスポソーム複合体（例えば、トランスポゾン（例えば、モザイク末端（ME））配列および表面増幅プライマーに相補的な配列と結合したTn5）は支持体に付加され、これはDNAアダプターオリゴをRNA鎖の5'末端にライゲートして二本鎖を「タグメント」する。鎖置換ポリメラーゼ（例えば、Bstポリメラーゼ）を次に用い、トランスポソームの「非転移鎖」を置換し、RNA鎖をその5' DNAキメラ末端にコピーしてDNA鎖の3'末端を伸長することができる。二本鎖分子を次に増幅（例えば、クラスター化）、ならびに部分的にME配列および上流アダプター配列を含む配列決定プライマーで配列決定することができる。あるいは、分子の他端（ポリT末端）は、SBS化学のサイクルを開始する前に、ポリT配列の上流にアニールし、天然dATPヌクレオチドで伸長されるプライマーで配列決定することができる。この方法によりペアエンド配列決定も可能となる。

【0012】

配列決定のためにssDNAを提供する場合、同様のアプローチが用いられ得る。例えば、一本鎖DNAポリヌクレオチドの3'末端には、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）およびdATPまたはdTTPのようないずれかのdNTPを用いることにより、ヌクレオチドが付加され得る。一連のヌクレオチドをssDNA分子の末端に付加するためのいずれかの方法が用いられ得る。図8は、ポリA含有捕捉プローブが支持体表面上に固定され、ssDNA-ポリAテール化分子が捕捉される例である。ハイブリダイゼーションが起こり得るように支持体上の捕捉プローブおよびssDNA上のヌクレオチドにより相補的な配列が提供される限り、ssDNA末端のものを含む、いずれかの捕捉配列が用いられ得る。前述したようなDNA：DNA二本鎖を作製するDNAポリメラーゼによるdsDNAを作製する捕捉プローブの伸長、アダプターオリゴの転移ライゲーションおよび鎖置換増幅が行われ、クラスター形成のための二本鎖分子を提供し得る。二本鎖分子は次に増幅（例えば、クラスター増幅）および配列決定され得る。

【0013】

別の例（図2）として、RNA（総またはポリA濃縮）はフラグメント化され、ホスファターゼで処理された後、一本鎖アダプター分子はP7表面結合プライマーの補体を含む各フラグメントの3'末端にライゲートされる。フラグメントは次に支持体（例えば、フ

10

20

30

40

50

ローセル)に付加され、ハイブリダイゼーションによって捕捉される。ハイブリダイズされたRNA分子は逆転写酵素ポリメラーゼでDNA:RNA二本鎖に変換される。二本鎖をタグメントするのにトランスポサーゼおよびP5プライマー配列を有するME配列のアダプター二本鎖(例えば、トランスポゾン)を含むトランスポソーム複合体を用いることができる。鎖置換ポリメラーゼでのDNA鎖の末端までの伸長後、分子を増幅および配列決定することができる。

【0014】

さらなる例(図3)として、2つの表面グラフトプライマー:標準的なグラフトプライマー(例えば、P5)およびその下流(3')側に標的的特異的捕捉プローブを有する修飾グラフトプライマー(例えば、P7)を含有する特別な支持体(例えば、フローセル)が用いられる。標的的特異的プローブの一例はレトロウイルス逆転写酵素(例えば、HIVポリメラーゼ)に相補的なオリゴ配列である。精製ウイルスRNAは支持体に付加され、ハイブリダイゼーションによって捕捉され、逆転写酵素でコピーされ、タグメントされる。配列決定は、タグメント化されたアダプターまたは他端では捕捉プローブにアニールされたプライマーで達成することができる。任意で、特別な支持体は、多くの異なるRNA標的の同時捕捉を可能にする複数の異なる標的的特異的捕捉プローブを含有する。

10

【0015】

標的DNA:DNAまたはDNA:RNA二本鎖をタグ付けし、タグ付きDNA:DNAまたはDNA:RNA二本鎖を生成するインビトロ転移反応の使用は、トランスポサーゼ、トランスポゾン配列組成物、および適切な反応条件を含む。

20

【0016】

本明細書を通して用いられる場合、トランスポゾンの語は、インビトロ転移反応において機能的であるトランスポサーゼまたはインテグラーゼ酵素と複合体を形成するのに必要なヌクレオチド配列を含有する二本鎖DNAを指す。トランスポゾンは、複合体、シナプス複合体またはトランスポソーム複合体を形成する。トランスポゾンは、トランスポゾン配列を認識し、これに結合するトランスポサーゼまたはインテグラーゼとトランスポソーム組成物を形成することもでき、インビトロ転移反応においてこれとインキュベートされ、この複合体はトランスポゾンを標的DNAに挿入または転移することができる。トランスポゾンは、転移トランスポゾン配列または転移鎖および非転移トランスポゾン配列または非転移鎖で構成される2つの相補的配列を示す。例えば、インビトロ転移反応において活性である高活性Tn5トランスポサーゼ(例えば、EZ-Tn5(商標)トランスポサーゼ、EPICENTRE Biotechnologies、米国ウィスコンシン州マディソン)と複合体を形成する1つのトランスポゾンは、5'AGATGTGTATAAGAGACAG3'(SEQ ID NO:1)の転移トランスポゾン配列を示す転移鎖および5'CTGTCCTTATACACATCT3'(SEQ ID NO:2)の非転移トランスポゾン配列を示す非転移鎖を含む。転移鎖の3'末端はインビトロ転移反応において標的核酸に結合または転移される。転移トランスポゾン末端配列に相補的なトランスポゾン末端配列を示す非転移鎖は、インビトロ転移反応において標的核酸に結合または転移されない。トランスポゾン組成物とは、本明細書において用いられる場合、任意で追加配列を含む、トランスポゾン(すなわち、トランスポサーゼと作用し、転移反応を行うことができる最小二本鎖DNAセグメント)を含む組成物を指す。例えば、トランスポゾン組成物は、組み合わせられてトランスポゾンの配列を示す、転移トランスポゾンオリゴヌクレオチドまたは転移鎖および非転移トランスポゾンオリゴヌクレオチドまたは非転移鎖を含有する2つのトランスポゾンオリゴヌクレオチドを含む。一方または両方の鎖は追加配列を含むことができる。トランスポゾンは天然発生および/または非天然発生ヌクレオチドならびに天然または非天然骨格結合を含むことができる。任意で、トランスポゾンはトランスポゾンを構成する1つ以上のヌクレオチドに付着した1つ以上の部分も含むことができる。例えば、トランスポゾンの一方または両方の鎖はビオチン化してもよく、または標識、例えば蛍光標識を含有してもよい。

30

40

【0017】

50

転移トランスポゾンオリゴヌクレオチドおよび転移鎖の語は互換的に用いられ、トランスポゾンおよびトランスポゾン組成物の、すなわち、トランスポゾン末端がタグまたは他の配列もしくは部分に付着しているかにかかわらず、両方の転移部分を指す。同様に、非転移トランスポゾンオリゴヌクレオチドおよび非転移鎖の語は互換的に用いられ、トランスポゾンおよびトランスポゾン組成物の両方の非転移部分を指す。

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態では、トランスポゾン組成物は、トランスポゾン配列に加えて1つ以上の他のヌクレオチド配列を有する少なくとも1つのトランスポゾンを含む、またはこれで構成される。よって、いくつかの実施形態では、トランスポゾン組成物は、転移トランスポゾン配列の1つ以上の他のヌクレオチド配列5'、例えば、タグ配列を有する転移鎖を含む。転移トランスポゾン配列に加えて、タグは1つ以上の他のタグ部分またはタグ領域を有することができる。

10

【 0 0 1 9 】

本明細書において用いられる場合、「タグ」とは、結合する核酸フラグメントを同定またはアドレス指定する手段を提供する核酸成分、一般的にはDNAを指す。例えば、タグは、(例えば、DNAポリメラーゼによる伸長のためのプライマーのような、オリゴヌクレオチドをアニールする部位を提供すること、捕捉もしくはライゲーション反応のためのオリゴヌクレオチドを提供すること、または核酸の特定の供給源に由来するとの同定を提供すること、等により)タグが付着しているDNAの同定、認識、および/または分子もしくは化学操作を可能にするヌクレオチド配列を含む。タグを核酸分子に結合するプロセスは本明細書では「タグ付け」と称されることがあり、タグ付けが行われた、またはタグを含有する核酸は「タグ付き」(例えば、「タグ付きRNA」と称される。

20

【 0 0 2 0 】

本明細書を通して用いられる場合、鎖性または鎖特異的情報の語は、もとの一本鎖分子の方向についての知識の保存を指す。DNA:RNA二本鎖においてDNA鎖はRNA鎖に相補的であることが知られているので、これは提供される方法において保存される。よって、DNA鎖を配列決定する場合、配列は、鎖特異的情報を保存し、RNA分子および/またはその発現レベルの正しい同定を可能にするRNA鎖の配列であるだろう。鎖特異的情報の保存方法は、その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、国際公開第WO 2011/003630号にも記載される。しかしながら、国際公開第WO 2011/003630号に記載される方法は依然として、RNA分子の二本鎖cDNA分子への変換を必要とし、これは、本明細書に記載されるように、本出願において提供される方法ほど効率的ではない。さらに、国際公開第WO 2011/003630号に記載される方法は、鎖情報を保存するためのタグを必要とする。本明細書において提供される方法では、鎖特異的情報または鎖性を保存するのにタグは必要ない。DNA:RNA二本鎖のDNA鎖(すなわち、第1DNA鎖)が増幅され、第1および第2増幅DNA鎖を生成する実施形態では、鎖性は第1DNA鎖がもとのRNA鎖に相補的であり、第2DNA鎖が(配列中のUsに代わるTs以外)もとのRNA鎖と同じ配列であるという知識により維持される。よって、タグ(例えば、タグ配列はトランスポゾンの転移鎖に含むことができる)は鎖性を保存するのに用いることができるが、必要ではない。

30

40

【 0 0 2 1 】

本明細書において用いられる場合、タグ部分またはタグ領域とは、所望の意図する目的または用途の配列を示すタグの部分または領域を意味する。1つのタグ部分またはタグ領域はトランスポゾン領域であり、このタグ部分またはタグ領域は転移トランスポゾン配列を示す。転移鎖が1つ以上の他のヌクレオチド配列も示すいくつかの実施形態では、タグは1つ以上の他のタグ領域も有し、このタグ領域のそれぞれはいずれかの所望の目的のために提供される。例えば、トランスポゾン組成物は、(i)(トランスポゾン配列に加えて)制限部位タグ領域、捕捉タグ領域、配列決定タグ領域、増幅タグ領域、検出タグ領域、アドレスタグ領域、および転写プロモーター領域の1つ以上から選択されるタグ領域を含むことができる1つ以上の追加配列を示す転移鎖;ならびに(ii)非転移トランスポ

50

ゾン配列を示す非転移鎖を含むことができる。

【0022】

タグ領域が説明される場合、異なるタグ領域の名称および説明は、異なる実施形態においてタグの異なる部分または領域の意図する目的および用途を理解および議論することをより容易にするような、便宜上のものである。しかしながら、これらの名称および説明は、タグまたはそのタグ領域のいずれかの使用または用途をいずれの方法でも限定することを意図していない。よって、いずれかの特定のタグまたはタグ領域は、主な目的もしくは用途に加えた、またはその代わりに、いずれかの目的に用いることができる。また、1つのタグ領域は2つ以上の他のタグ領域を含むことができ（例えば、配列決定タグ領域は捕捉タグ領域および増幅タグ領域の両方を含むことができ）、または1つのタグ領域は2つ以上の異なるタグ領域の機能、目的もしくは用途を提供することができる（例えば、捕捉タグ領域は特定の用途の配列決定タグ領域および/または増幅タグ領域の機能または目的を提供することもできる）。またさらに、タグは、いずれかの特定の目的、用途または機能に用いるための1つ以上の異なる領域について説明される必要はない。

10

【0023】

本明細書を通して用いられる場合、トランスポサーゼの語は、トランスポゾン含有組成物（例えば、トランスポゾン、トランスポゾン組成物）と機能的複合体を形成し、インビトロ転移反応においてこれとインキュベートされ、トランスポゾン含有組成物の二本鎖標的核酸への挿入または転移を触媒することができる酵素を指す。提供される方法のトランスポサーゼはレトロトランスポゾンおよびレトロウイルスからのインテグラーゼも含む。提供される方法において用いることができるトランスポサーゼの例としては、Tn5トランスポサーゼおよびMuAトランスポサーゼの野生型または変異型が挙げられる。

20

【0024】

「転移反応」とは、1つ以上のトランスポゾンが標的核酸にランダムな部位またはほぼランダムな部位で挿入される反応である。転移反応における必須成分は、トランスポサーゼならびに転移トランスポゾン配列およびその補体（すなわち、非転移トランスポゾン末端配列）を含むトランスポゾンのヌクレオチド配列を示すDNAオリゴヌクレオチド、ならびに機能的転移またはトランスポソーム複合体を形成するのに必要な他の成分である。本発明の方法は、高活性Tn5トランスポサーゼおよびTn5型トランスポゾン末端により、またはMuAもしくはHYPERMuトランスポサーゼならびにR1およびR2末端配列を含むMuトランスポゾン末端により形成される転移複合体を用いることにより例示される（例えば、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Goryshin, I. and Reznikoff, W. S., J. Biol. Chem., 273: 7367, 1998; および Mizuuchi, K., Cell, 35: 785, 1983; Savilahi, H, et al., EMBO J., 14: 4893, 1995参照）。しかしながら、提供される方法では、トランスポゾン末端をランダムまたはほぼランダムに十分な効率で挿入し、その意図する目的のための標的核酸をタグ付けすることができるいずれかの転移システムを用いることができる。提供される方法において用いられ得る既知の転移システムの他の例としては、これらに限定されないが、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) Tn552、Ty1、トランスポゾンTn7、Tn/OおよびIS10、マリナートランスポサーゼ、Tc1、Pエレメント、Tn3、細菌挿入配列、レトロウイルス、および酵母のレトロトランスポゾンが挙げられる（例えば、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Colegio Oretal., J. Bacteriol., 183: 2384-8, 2001; Kirby C et al., Mol. Microbiol., 43: 173-86, 2002; Devine S E, and Boeke J D., Nucleic Acids Res., 22: 3765-72, 1994; 国際公開第WO95/23875号; Craig, N L, Science. 271: 1512, 1996; Craig, N L, Review in: Curr Top Microbiol Immunol., 204: 27-48, 1996; Kleckner N, et al., Curr

30

40

50

Top Microbiol Immunol., 204:49-82, 1996; Lampe D J, et al., EMBO J., 15:5470-9, 1996; Plasterk R H, Curr Top Microbiol Immunol, 204:125-43, 1996; Gloor, G B, Methods Mol. Biol., 260:97-114, 2004; Ichikawa H, and Ohtsubo E., J Biol. Chem. 265:18829-32, 1990; Ohtsubo, F and Sekine, Y, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:1-26, 1996; Brown P O, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86:2525-9, 1989; Boeke J D and Corces V G, Annu Rev Microbiol. 43:403-34, 1989参照)。

【0025】

トランスポゾンを経的配列に挿入する方法は、いずれかの適切なトランスポゾンシステムを用いてインビトロで行うことができ、これには適切なインビトロ転移システムが入手可能であり、またはこれは当技術分野における知識に基づき開発することができる。一般的には、本発明の方法において用いられる適切なインビトロ転移システム、少なくとも、十分な純度、十分な濃度、および十分なインビトロ転移活性のトランスポサゼ酵素ならびに転移反応を触媒することができる各トランスポサゼと機能的複合体を形成するトランスポゾンを必要とする。本発明において用いることができる適切なトランスポサゼトランスポゾン配列としては、これらに限定されないが、トランスポサゼの野生型、誘導体または変異型から選択されるトランスポサゼと複合体を形成する野生型、誘導体または変異型トランスポゾン配列が挙げられる。

【0026】

提供される方法では、DNA:RNA二本鎖はさまざまな方法で提供することができる。例として、支持体は複数のプライマーを含むことができ、DNA:RNA二本鎖は、1つ以上のRNA分子を支持体上の固定化プライマーにハイブリダイズし、RNA分子にハイブリダイズされたプライマーをRNA分子をテンプレートとして用いて伸長し、1つ以上のDNA:RNA二本鎖を生成することにより提供される。任意で、複数のDNA:RNA二本鎖は、複数のRNA分子を支持体上の固定化プライマーにハイブリダイズし、RNA分子にハイブリダイズされたプライマーをRNA分子をテンプレートとして用いて伸長し、複数のDNA:RNA二本鎖を生成することにより提供される。

【0027】

上述したように、本方法は、複数のプライマーを有する支持体を提供するステップを含むことができ；プライマーまたはそのサブセットは1つ以上のRNA分子に結合することができる配列を含む。例えば、固定化プライマーはポリT配列を含んでもよく、RNAはポリT配列にハイブリダイズすることができるポリA配列を含んでもよい。あるいはまたはさらに、複数の固定化プライマーは、複数のRNA分子中の1つ以上のRNA分子にハイブリダイズすることができる標的・特異的プライマーを含むことができる。よって、1つ以上のDNA:RNA二本鎖のRNA鎖は、1つ以上の固定化プライマーの少なくとも一部分に相補的な配列を含む。任意で、複数の固定化プライマーは、第1配列を有するプライマーの第1サブセットおよび第2配列を有するプライマーの第2サブセットを含む。プライマーの第1または第2サブセットはポリT配列を含んでもよい。

【0028】

任意で、3'アダプターは複数のRNA分子に付加することができる、3'アダプターは複数の固定化プライマーまたはそのサブセットに相補的な配列を含む。RNA分子にライゲートされたこうした3'アダプターは次に固定化プライマーにハイブリダイズすることができる。

【0029】

よって、固定化プライマーまたはそのサブセットは、ポリT配列、RNA標的・特異的配列またはRNA分子にライゲートされたアダプターに相補的な配列を含むことができる。

任意で、複数のプライマーは少なくとも2つのプライマーのサブセットを含み、第1サブセットはポリT配列、RNA標的特異的配列またはRNA分子にライゲートされたアダプターに相補的な配列を含み、プライマーの第2サブセットはDNA:RNA二本鎖のDNA鎖上の配列に結合することができる配列を含む。こうした配列は、例えば、トランスポゾンの転移鎖の配列と同じ配列であり得る。本明細書を通して記載されるように、転移後、DNA鎖の末端とトランスポゾンの非転移鎖との間にはギャップがあるだろう。DNA鎖を次に伸長し、RNA鎖をコピーすることができる。コピーはトランスポゾンの転移鎖の配列のコピーを含むだろう。DNA鎖はトランスポゾンの転移鎖の配列に相補的な配列および、よって支持体の表面上のプライマーまたはそのサブセットを含むだろう。換言すると、1つ以上のプライマーがトランスポゾンの転移鎖と同じまたは類似の配列を含む場合、DNA鎖はプライマーに相補的な配列を含有するので、DNA:RNA二本鎖中のDNA鎖はプライマーにハイブリダイズすることができるだろう。

10

【0030】

DNA鎖の3'末端を伸長し、RNA鎖をそれらの5'末端にコピーし、トランスポゾンの非転移鎖を置換することができる適切な核酸修飾酵素が知られている。簡潔に、いくつかのDNAポリメラーゼは、新しいDNA鎖がポリメラーゼにより合成される際、テンプレート鎖に相補的な鎖を置換することができる。このプロセスは鎖置換と称され、この活性を有するDNAポリメラーゼは本明細書では鎖置換DNAポリメラーゼと称される。一般的には、提供される方法に用いられるDNAテンプレート特異的DNAポリメラーゼは、テンプレートから解離する(またはDNAの合成を終了する)ことなく、意図する目的に適切な長さのDNAを効率的に合成し、これは酵素のプロセッシビティと称される。DNAポリメラーゼの鎖置換する能力は、その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Fire and Xu (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4641-4645, 1995)により記載されるローリングサークル複製アッセイにおいてポリメラーゼを用いて容易に決定することができる。鎖置換およびDNAポリメラーゼプロセッシビティも、その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Kong et al. (J Biol. Chem. 268: 1965-1975, 1993)に記載される方法を用いて試験することができる。本明細書では末端トランスフェラーゼもDNAポリメラーゼとして定義され、このDNAポリメラーゼは提供される方法のいくつかの実施形態では組成物として用いられる。DNAの3'-ヒドロキシル末端へのdNTPのテンプレート依存性付加を触媒するので、末端トランスフェラーゼを用いることができる。

20

30

【0031】

本明細書において提供される方法では、本方法は、DNA鎖の少なくとも一部分を配列決定するステップおよび/またはDNA鎖の少なくとも一部分を増幅するステップをさらに含むことができる。任意で、RNA鎖は配列決定および/または増幅前にDNA:RNA二本鎖から除去することができる。例として、本方法は、RNA鎖をDNA:RNA二本鎖から除去するステップおよびDNA鎖(すなわち、第1DNA鎖)の少なくとも一部分を配列決定するステップをさらに含む。本方法は、DNA鎖の少なくとも一部分をコピーし、DNA:RNA二本鎖のDNA鎖(すなわち、第1DNA鎖)に相補的な第2DNA鎖を生成するステップも含むことができる。第2相補的DNA鎖は次に所望に応じて配列決定することができる。任意で、DNA:RNA二本鎖の第1DNA鎖は第2相補的DNA鎖の配列決定前に除去することができる。

40

【0032】

提供される方法では、任意で、RNA鎖のDNA:RNA二本鎖からの除去後、DNA鎖を増幅し、第1および第2増幅鎖を含む複数の二本鎖DNA分子を生成してもよい。任意で、増幅は、以下でより詳細に記載される、クラスターを生成する。

【0033】

いくつかの実施形態では、DNA鎖が増幅され、複数の二本鎖DNA分子を生成した場合、鎖の一方または両方のいずれかを配列決定することができる。例として、本方法は、第1増幅鎖を除去するステップ、その後第2増幅鎖の少なくとも一部分を配列決定するス

50

トップを含むことができる。任意で、第1増幅鎖は第2増幅鎖の少なくとも一部分をコピーすることにより再生することができる。第2増幅鎖はその後、第1増幅鎖の少なくとも一部分を配列決定するため除去することができる。任意で、第1および第2増幅鎖の一方または両方の一部または全部の配列リードは、いずれの鎖の全部または一部も除去することなく行うことができる。

【0034】

さまざまなプロトコルを用い、増幅核酸、例えば、支持体上で増幅された核酸を生成することができる。例えば、核酸はエマルジョンPCR、またはブリッジPCRにより増幅することができる(それぞれ本明細書に参照により組み込まれる、Mitra & Church *Nucleic Acids Res.* 27, e34 (1999); Dresman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 8817-8822 (2003); Adessi, C. et al. *Nucleic Acids Res.* 28, e87 (2000); Fedurco et al. *Nucleic Acids Res.* 34, e22 (2006))。

10

【0035】

エマルジョンPCRを用いる実施形態では、核酸は油中水型エマルジョン中でPCR増幅することができる。1つの実施形態では、単一のプライマー対が用いられる。PCRプライマーの1つは支持体(例えば、ミクロンスケールのビーズ)の表面に係留(5'付着)され、他のプライマーは溶液中にある。任意で、支持体は2つ以上の配列のプライマーを含み、プライマーは1つ以上の標的RNA分子にハイブリダイズすることができる標的 20 特異的プライマーであり、溶液中のプライマーは同じ配列(例えば、タグ付きRNA鎖をその5'末端にコピーすることによりDNA鎖に付加された配列に相補的な配列)を有する。一般的には、低テンプレート濃度の場合、ほとんどのビーズ含有コンパートメントには0個または1個のテンプレート分子が存在する。(ビーズおよびテンプレート分子の両方が存在する)有効なエマルジョンコンパートメントでは、RNA分子を捕捉することができる。エマルジョンを破壊した後、増幅産物を有するビーズは選択的に濃縮することができる。各クローン増幅ビーズはその表面上にテンプレートライブラリーからの単一分子の増幅に対応するPCR産物を有するだろう。有用なエマルジョンPCR法のさまざまな 30 実施形態は、それぞれ本明細書に参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2005/0042648A1号;第2005/0079510A1号および第2005/0130173A1号、ならびに国際公開第WO05/010145号に記載される。

20

30

【0036】

クラスター形成としても知られるブリッジPCRを用いる実施形態では、テンプレートライブラリーからの核酸は、支持体の表面上にコーティングされたプライマーを用いて増幅することができる。プライマーは柔軟なリンカーによりそれらの5'末端に付着させることができる。テンプレートライブラリーのいずれかの所定のメンバーに由来する増幅産物は起源点の近くに局所的に係留されたままである。PCRの終了時、各クローンクラスターはテンプレートライブラリーの単一のメンバーのいくつかのコピーを含有する。提供 40 される方法では、各DNA:RNA二本鎖はクローンクラスターの起源を形成する。RNA鎖の除去後、DNA鎖は支持体に付着したプライマーを用いてコピーし、DNA鎖の増幅コピーを生成し、クローンクラスターを生成することができる。有用なブリッジPCR法のさまざまな実施形態は、それぞれ本明細書に参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2007/0128624A1号、国際公開第WO07/010251号、米国特許第6,090,592号および第5,641,658号に記載される。増幅を行う方法も、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2009/0226975号、国際公開第WO98/44151号、第WO00/18957号、第WO02/46456号、第WO06/064199号、および第WO07/010251号に記載される。

40

【0037】

50

本明細書に記載される方法は、例えば、少なくとも約10フィーチャー/cm²、約100/cm²、500フィーチャー/cm²、1,000フィーチャー/cm²、5,000フィーチャー/cm²、10,000フィーチャー/cm²、50,000フィーチャー/cm²、100,000フィーチャー/cm²、1,000,000フィーチャー/cm²以上を含む、さまざまな密度のいずれかでフィーチャーを有するアレイを生成または使用することができる。

【0038】

本明細書において用いられる場合、「核酸」の語は、連結した少なくとも2つのヌクレオチドアナログモノマーを指すのに用いることができる。核酸はホスホジエステル結合を含有することができるが、いくつかの実施形態では、核酸は、例えば、ホスホラミド、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ペプチド核酸骨格および結合、陽性骨格、または非イオン性骨格を含む、他のタイプの骨格を有するアナログであり得る。核酸は、(天然発生RNA中に存在する)リボース、(天然発生DNA中に存在する)デオキシリボースまたはジデオキシリボースのような、ペントース部分を含むことができる。核酸は、これらに限定されないが、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、ウラシル(U)、シトシン(C)、イノシン、キサントニン、ヒポキサントニン、イソシトシン、イソグアニン、ニトロピロール(3-ニトロピロールを含む)および/またはニトロインドール(5-ニトロインドールを含む)を含む1つ以上の異なる塩基部分を有することができる。本明細書において用いられる核酸は天然または非天然塩基を含むことができる。よって、核酸は天然発生および/または非天然発生ヌクレオチドならびに天然または非天然骨格結合を含むことができる。核酸は、指定のとおり、一本鎖もしくは二本鎖であってもよく、または二本鎖および一本鎖配列の両方の部分を含有してもよい。核酸はDNA(例えばゲノムDNAまたはcDNA)、RNAまたはハイブリッドであってもよい。

【0039】

本明細書において用いられる場合、「アレイ」の語は、異なる分子をそれらの相対位置に応じて互いに識別することができるように、1つ以上の支持体に付着した異なる分子の集合体を意味する。アレイはそれぞれ支持体上の異なるアドレス指定可能な位置(例えばフィーチャー)に位置する異なる分子を含むことができる。あるいは、アレイはそれぞれ異なる分子を有する別の支持体を含むことができ、異なるプローブ分子を流体流のような液体中の支持体の位置に応じて支持体が付着した表面上の支持体の位置に応じて同定することができる。アレイの分子は、例えば、核酸プライマー、核酸プローブ、核酸テンプレートまたはポリメラーゼのような核酸酵素であり得る。例えば、特定の実施形態では、標的核酸は検出器の表面または支持体の表面に存在する層(例えばアクリルアミド層)に付着させることができる。本明細書に参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2011/0059865A1号に記載されるもののような、ヒドロゲルがとくに有用である。

【0040】

本明細書において用いられる場合、「核酸のアレイ」の語は、その上またはその中に配置された複数の空間的に識別可能な核酸を有する固体支持体を意味する。核酸はフィーチャーの整列またはランダムパターンで配置することができる。個別のフィーチャーは、例えば、空間的に分離した核酸分子、クラスターのような核酸分子の集合であり得る。アレイは、複数の試料の処理を可能にするように構成された複数の個別のアレイを含む、複合アレイであり得る。個別のアレイは、本明細書において「サブアレイ」と称され、核酸フィーチャーの群を含む。サブアレイはより大きなアレイ内の異なる領域に見られる。サブアレイそのものは整列化または非整列化することができる。こうしたサブアレイは任意で空間的にアドレス指定可能であり得る。サブアレイは同一核酸のクラスターを含むことができる。個別のサブアレイで構成された複合アレイの一例は、プレートが全体として核酸のアレイ(または複合アレイ)であり、各個別ウェルがより大きな複合アレイ内のサブアレイである、ウェルを有するマイクロタイタープレートである。

【0041】

本明細書において用いられる場合、「支持体」の語は、核酸のアレイを固定化するため

10

20

30

40

50

の基板を指す。「支持体」は、核酸アレイを付着させることができ、またはその上で核酸を合成および/もしくは修飾することができる、剛性または半剛性表面を有する材料である。支持体としては、いずれかの樹脂、マイクロビーズ、ガラス、制御孔ガラス(CPG)、ポリマー支持体、膜、紙、プラスチック、プラスチックチューブまたはタブレット、プラスチックビーズ、ガラスビーズ、スライド、セラミック、シリコンチップ、マルチウェルプレート、ナイロン膜、光ファイバー、およびPVD F膜を挙げることができる。

【0042】

支持体としては、いずれかの平坦なウェーハ状の基板、および96ウェルプレートを含む、マイクロタイプレートのような、ウェルを有する平坦な基板を挙げることができる。平坦な基板の例としては、チップ、スライド、エッチング基板、マイクロタイプレート、およびcBot配列決定ワークステーションにおいて用いられる8チャンネルフローセルのような、複数のマイクロ流体チャンネルを有するマルチレーンフローセルリアクター(Illumina, Inc., カリフォルニア州サンディエゴ)を含む、フローセルリアクターが挙げられる。用いることができるフローセルの例は、その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、国際公開第WO2007/123744号にも記載される。

【0043】

支持体としては、磁気ビーズ、中空ビーズ、および固体ビーズを含む、ビーズを挙げることもできる。ビーズは平坦な支持体と併せて用いることができ、こうした平坦な支持体は任意でウェルも含有する。ビーズ、またはあるいはマイクロスフェアとは、一般的には剛性または半剛性材料からなる小体を指す。小体は、例えば、規則的または変則的な寸法を有するかにかわらず、球形、卵形、小球形、または他の認識される粒子形状として特徴づけられる形状を有することができる。ビーズのサイズとしては、とくに、限定なく、直径約1 μ m、約2 μ m、約3 μ m、約5 μ m、約10 μ m、約20 μ m、約30 μ m、約40 μ m、約60 μ m、約100 μ m、約150 μ mまたは約200 μ mが挙げられる。他の粒子は本明細書においてビーズおよびマイクロスフェアについて記載されたものと同様の方法で用いることができる。

【0044】

支持体の組成は、例えば、型、化学性質、付着方法および/または核酸合成方法に応じて変わり得る。本開示に従って用いることができる支持体材料としては、これらに限定されないが、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、ナイロン、金属、および他の適切な材料が挙げられる。例となる組成物は、支持体、ならびにこれに与えられた、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/または有機部分合成に用いられる、化学官能基を含む。こうした組成物は、例えば、プラスチック、セラミック、ガラス、ポリスチレン、メラミン、メチルスチレン、アクリルポリマー、常磁性材料、トリアゾル、カーボングラファイト、二酸化チタン、ラテックスまたはSephacryl(商標)のような架橋デキストラン、セルロース、ナイロン、架橋ミセルおよびTeflon(商標)、ならびに、例えば、本明細書に参照により組み込まれる、Bangs Laboratories、インディアナ州フィッシャーズからの「マイクロスフェア検出ガイド」に記載されるいずれかの他の材料を含む。支持体粒子は、架橋デンプン、デキストラン、セルロース、タンパク質、ポリスチレンおよびメチルスチレンを含むスチレンポリマーを含む有機ポリマー、ならびに他のスチレンコポリマー、プラスチック、ガラス、セラミック、アクリルポリマー、磁気応答性材料、コロイド、トリアゾル、カーボングラファイト、二酸化チタン、ナイロン、ラテックスまたはTEFLON(登録商標)から製造することができる。その全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Bangs Laboratories, Inc.、インディアナ州フィッシャーズからの「マイクロスフェア検出ガイド」は有用なガイドである。本開示の範囲内の支持体のさらなる例としては、例えば、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、米国特許出願公開第2002/0102578号および米国特許第6,429,027号に記載されるものが挙げられる。

【0045】

核酸の支持体への付着は、剛性または非剛性にかかわらず、共有または非共有結合によって起こり得る。例となる結合は、それぞれ本明細書に参照により組み込まれる、米国特許第6,737,236号、第7,259,258号、第7,375,234号および第7,427,678号、ならびに米国特許出願公開第2011/0059865A1号に記載される。いくつかの実施形態では、核酸または他の反応成分は、その後固相支持体に付着または接着させるゲルまたは他の半固体支持体に付着させることができる。こうした実施形態では、核酸または他の反応成分は固相であると理解されるだろう。

【0046】

任意で、支持体はビーズまたは複数のビーズである。任意で、支持体は平坦な支持体である。任意で、複数のビーズが提供され、各ビーズは1つ以上のDNA:RNA二本鎖を含む。ビーズが2つ以上のDNA:RNA二本鎖を含む場合、二本鎖は同じ配列または異なる配列を有することができる。任意で、複数のビーズが提供され、各ビーズはDNA:RNA二本鎖を含む。複数のビーズ中のビーズは同じまたは異なるDNA:RNA二本鎖を含むことができる。例えば、複数のビーズ中のビーズの第1サブセットは第1配列を有するDNA:RNA二本鎖を含むことができ、複数のビーズ中のビーズの第2サブセットは第2配列を有するDNA:RNA二本鎖を含むことができる。

10

【0047】

さまざまな配列決定プロトコルのいずれかおよび各試薬は、本明細書に記載されるいずれかの方法またはデバイスにおいて用いることができる。合成による配列決定(SBS)技術は一般的には、テンプレート鎖に対するヌクレオチドの反復付加による新生核酸鎖の酵素伸長を含む。SBSは、ターミネーター部分を有するヌクレオチドモノマーまたはいずれのターミネーター部分も有さないものを用いることができる。ターミネーターを有するモノマーを用いる方法としては、例えば、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、国際公開第04/018497号、米国特許第7,057,026号明細書、国際公開第91/106678号、国際公開第07/123744号、米国特許出願公開第2007/0166705号明細書、米国特許出願公開第2006/0188901号明細書、米国特許出願公開第2006/0240439号明細書、米国特許出願公開第2006/0281109号明細書、国際公開第05/065814号、米国特許出願公開第2005/0100900号明細書、国際公開第06/064199号または国際公開第07/010251号に記載されるものが挙げられる。Illumina, Inc.、カリフォルニア州サンディエゴから商業的に利用可能なSBS法も有用である。

20

30

【0048】

SBS技術は、標識部分を有するヌクレオチドモノマーまたは標識部分を有さないものを用いることができる。従って、組み込み事象は、標識の蛍光のような標識の特徴；分子量または電荷のようなヌクレオチドモノマーの特徴；ピロリン酸または光子の放出のようなヌクレオチドの組み込みの副産物；等に基づき検出することができる。異なるヌクレオチドは互いに識別可能であり得、またはあるいは、2つ以上の異なる標識は用いられる検出技術下で識別不能であり得る。例えば、配列決定試薬中に存在する異なるヌクレオチドは異なる標識を有することができ、それらはSolexa(現Illumina, Inc.)により開発された配列決定方法により例示されるような適切な光学系を用いて識別することができる。しかしながら、配列決定試薬中に存在する2つ以上の異なるヌクレオチドに同じ標識を用いる、または異なる標識を必ずしも識別しない検出光学系を用いることも可能である。

40

【0049】

例えば、ピロ配列決定を含む、ターミネーターを有さないヌクレオチドモノマーを用いる方法も有用である。ピロ配列決定は、特定のヌクレオチドが新生鎖に組み込まれる際の無機ピロリン酸(PPi)の放出を検出する(それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. and Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of py

50

rophosphate release," *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing," *Genome Res.* 11(1), 3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate," *Science* 281(5375), 363; 米国特許第6,210,891号; 第6,258,568号; および第6,274,320号)。ピロ配列決定では、放出されたPPiはアデノシン三リン酸(ATP)にATPスルフィラーゼによりすぐに変換されることにより検出ことができ、生成されたATPのレベルはルシフェラーゼにより生成される光子によって検出される。

10

【0050】

いくつかの実施形態はライゲーション技術による配列決定を用いることができる。こうした技術はDNAリガーゼを用い、オリゴヌクレオチドを組み込む。本明細書に記載される方法およびシステムと用いることができるSBSシステムおよび方法の例は、それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、米国特許第6,969,488号、第6,172,218号、および第6,306,597号に記載される。

【0051】

いくつかの実施形態は、DNAポリメラーゼ活性のリアルタイムモニタリングを含む方法を用いることができる。ヌクレオチド組み込みは、例えば、(それぞれ本明細書に参照により組み込まれる)米国特許第7,329,492号および第7,211,414号に記載されるフルオロフォア含有ポリメラーゼとγ-リン酸標識ヌクレオチドとの間の蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)相互作用によって検出することができ、またはヌクレオチド組み込みは、例えば、(本明細書に参照により組み込まれる)米国特許第7,315,019号に記載されるゼロモード導波管で、ならびに例えば、(それぞれ本明細書に参照により組み込まれる)米国特許第7,405,281号および米国特許出願公開第2008/0108082号に記載される蛍光ヌクレオチドアナログおよび遺伝子操作ポリメラーゼを用いて検出することができる。照射は、蛍光標識ヌクレオチドを低バックグラウンドで観察できるように、表面係留ポリメラーゼの周りのzeptorリットルスケールの体積に制限することができる(それらの全開示が本明細書に参照により組み込まれる、Levene, M. I. et al. "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations." *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist, P. M. et al. "Parallel confocal detection of single molecules in real time." *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach, J. et al. "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures." *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008))。

20

30

40

【0052】

開示される方法および組成物に用いることができ、これらと併せて用いることができ、これらの調製に用いることができ、またはこれらの産物である材料、組成物、および成分が開示される。これらおよび他の材料が本明細書に開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、群、等が開示される場合、それぞれのさまざまな個別および集合的な組み合わせおよび順列の特定の参照は明示的に開示されない場合があり得るが、それぞれは本明細書において具体的に考慮および説明されていると理解される。例えば、ある方法が開示および議論され、方法ステップに行うことができる多数の変更が議論される場合、方法ステップのそれぞれすべての組み合わせおよび順列、ならびに可能な変更は、

50

とくに逆の指定のない限り、具体的に考慮されている。同様に、これらのいずれかのサブセットまたは組み合わせも具体的に考慮および開示される。この概念は本開示のすべての態様に適用される。よって、行うことができるさまざまな追加ステップがある場合、これらの追加ステップのそれぞれは開示される方法のいずれかの特定の方法ステップまたは方法ステップの組み合わせで行うことができ、こうした組み合わせまたは組み合わせのサブセットのそれぞれは具体的に考慮され、開示されているとみなされるべきであると理解される。

【0053】

本出願を通して、さまざまな刊行物が参照される。これらの刊行物の全開示は本出願に参照により組み込まれる。

10

【0054】

多数の実施形態が記載された。それにもかかわらず、さまざまな変更を行ってもよいことが理解されるだろう。従って、他の実施形態は下記の特許請求の範囲内である。

【実施例】

【0055】

(実施例1. DNA:RNA二本鎖のタグメンテーション反応を用いるRNA配列決定)
P7'適合RNA転写物での例となる実験を行い、その概略を図4に示す。RNA転写物を、Promega(ウィスコンシン州マディソン)からのRiboprobe(登録商標)インビトロ転写システムキットを製造業者のプロトコルに従って使い、グリーン蛍光タンパク質(GFP)を含有するプラスミドから生成した。

20

【0056】

GFP発現カセットの配列を以下に示す(SEQ ID NO:3)。

aatgatacggcgaccaccgagatctacactctttccctacacgacgctctccgatcttaatacgactcactataggcaatttaa
cttactaaggagaattcaccaatgaaacatcaccaatcacacacGACTACAAAGACGATGACGACAAGg
cgatcgtgagcaaggcgaggagctgtcaccggggtggtgccatcctggtcagctggacggcgacgtaaaccggccaca
agttcagcgtgtccggcggggcgaggcgatgccacctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggaagctg
cccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgttcagccgctaccggaccacatgaagcagcac
gacttctcaagtcgccatgccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagacccg
cgccgaggtgaagttcagggcggaaccctggtgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgactcaaggaggacggcaacatc
ctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacgcatcaaggtgaa
ctcaagatccgcacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcggcaccactaccagcagaacacccccatcggcgacgg
ccccgtgctgctcccgacaaccactacctgagccccagtcggcctgagcaaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatgg
tctgctggagttcgtgaccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaagtaactgctgccaccgctgagaataa
ctagcatancccctggggccttaaacgggcttgagggtttttgagatcgggaagagcgggtcagcaggaatgccgagac
cgatcTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG (SEQ ID NO:3)

30

40

【0057】

pMA-T系プラスミドはP5(下線)、T7ポリメラーゼプロモーター(太字)、開始コドン(太字および斜体)、Hisタグ(斜体および下線)、FLAGタグ(大文字)、GFP配列、TAA終止コドン(下線および太字)、T7ターミネーター(太字、斜体および下線)およびP7'(大文字および太字)を含有する。

【0058】

RNA転写物はプロモーター配列からT7終了配列まで伸長するはずである。しかしながら、T7ターミネーターは転写を完全には停止せず、よって得られるRNA転写物のい

50

くつかはH i s _ F L A G _ G F P _ P 7 'である。RNA転写物はDNアーゼで処理し、そうしなければクラスターを形成するだろうDNAを除去した。DNアーゼ処理が効果的だったことを確認するため、反応を行い、ゲル上で分析し、DNアーゼ処理がDNAの除去に効果的だったことを示した。RNA転写物のDNアーゼ処理後、残留DNA(すなわち、プラスミド)は見られなかった(図5)。

【0059】

Ph i X DNAライブラリーおよびDNアーゼ処理GFP-P7' RNA転写物を、テンプレートハイブリダイゼーションの標準的なクラスタープロトコルに従って、フローセルの異なるレーンにハイブリダイズした。レーン1~4はPh i X DNAを含有し、レーン5~8はGFP RNAを含有した。レーン5および6は、DNアーゼで予め処理され、DNAを除去したRNAを含有した。レーン7および8は、DNアーゼで予め処理され、追加の対照としてフローセル上でRNAアーゼで処理されたRNAを含有した。両方の配列およびそれらの補体がテンプレート中に存在するので、Ph i X DNAライブラリーはP5またはP7によってハイブリダイズすることができる。対照的に、GFP-P7' RNAテンプレートは、それらの「鎖性」およびP5配列の欠如のため、P7表面プライマーのみにハイブリダイズする。

10

【0060】

第1伸長を、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素(AMV-RT)(レーン2、4、6および8)またはPhusion DNAポリメラーゼ(レーン1、3、5および7)のいずれかを用いて行った。AMV-RTはRNAまたはDNAテンプレートのいずれかからcDNA鎖を生成することができ、PhusionはDNAテンプレートからのみDNA鎖を生成することができる。

20

【0061】

いくつかのレーンを、トランスポゾン配列P5アダプター配列を含有するトランスポゾーム複合体を用いて転移した(レーン3~8)。転移事象後に残ったDNA配列中のギャップを、Bst DNAポリメラーゼを含有する鎖置換伸長反応を用いて埋めた。GFP-P7' RNAを含有するレーンにおいて、P5アダプターを付加し、クラスターを生成することができるテンプレートを生成するには、転移事象が必要である。等温クラスター増幅を標準として行い、クラスターをSYBRグリーンで染色した。クラスターの画像は図6に示す。

30

【0062】

レーン1は、PHUSION DNAポリメラーゼで伸長された標準型DNA試料を含有するので、クラスター生成の対照だった。図6に示されるように、クラスター生成は成功した。

【0063】

レーン2は、DNAテンプレートを逆転写酵素によりうまく伸長し(DNA:DNA二本鎖を生成し)、標準的な条件下でクラスターを生成することができることを示した(図6)。

【0064】

レーン3および4は、(PHUSION DNAポリメラーゼまたはAMV-RTのいずれかで伸長された)DNA:DNA二本鎖をTn5アダプターでタグメントし、クラスターを生成することができることを示した(図6)。

40

【0065】

レーン5は、PHUSION DNAポリメラーゼがRNA鎖に対向して伸長しないことが以前報告されているため、クラスターを生成するとは予想されないだろう。観察された少数のクラスターは、DNアーゼ処理にもかかわらず残留したDNAテンプレートが用いられてRNAを生成したため、またはPHUSION DNAポリメラーゼによるDNAのRNAに対向するある程度の伸長のためであり得る(図6)。

【0066】

レーン7および8は、テンプレートがRNAアーゼおよびDNアーゼ処理されたため、い

50

ずれのクラスター形成を示すことも予想されないだろう。レーン5において見られたように、観察された少数のクラスターは、DNアーゼ処理にもかかわらず残留したDNAテンプレートが用いられてRNAを生成したためであり得る(図6)。

【0067】

図6のレーン6は、予想どおりRNAテンプレートに対するDNA鎖の伸長を示す。これらの伸長テンプレートは、P5配列を有さないので、クラスターを形成するとは予想されなかった。しかしながら、(レーン6に示される)P5アダプターでのタグメンテーション後、それらはクラスターを形成する。レーン5、7および8における少数のクラスターはRNA試料中に低レベルのDNA汚染があることを示すが、レーン6におけるクラスターのほとんどはRNAから生成されることを示す。

10

【0068】

フローセル上のクラスターを次に配列決定した。表1は配列決定の結果を示す。

【0069】

配列決定概要

【 表 1 】

	レーン	レーン収率	クラスター(生)	クラスター(PF)	第1サイクル後の強度(PF)	% 20 サイクル後の強度(PF)	%PF クラスター	%アライン(PF)	アラインメントスコア(PF)	%エラー率(PF)
PhiX	1	116	177455+/- 11971	161186+/- 10237	289+/-9	86.80+/- 0.97	90388+/- 1.64	98.28+/- 0.22	166.43+/- 0.00	0.04+/- 0.00
PhiX	2	78	116338+/- 3547	108649+/- 3484	282+/-8	86.4+/- 0.75	93.39+/- 0.37	98.11+/- 0.07	166.03+/- 0.11	0.05+/- 0.01
PhiX+Tn	3	40	63725+/- 1557	55752+/- 1477	289+/-4	87.78+/- 1.13	87.49+/- 0.34	58.26+/- 0.25	96.55+/- 0.39	0.28+/- 0.00
PhiX+Tn	4	23	42441+/- 1497	32075+/- 1307	267+/-16	88.48+/- 1.77	75.56+/- 0.76	35.54+/- 0.63	57.81+/- 0.99	0.49+/- 0.02
RNA+Tn	5	3	13608+/- 731	4332+/- 510	295+/-54	121.18+/- 17.78	32.00+/- 4.62	55.95+/- 15.91	49.00+/- 24.03	2.76+/- 0.37
RNA+Tn	6	4	20916+/- 1519	5701+/- 1642	179+/-35	219.02+/- 82.12	26.98+/- 6.47	25.45+/- 8.27	19.48+/- 13.01	2.77+/- 0.70
RNA+Tn+ RNアーン	7	1	22597+/- 4274	1627+/- 317	190+/-65	104.24+/- 35.64	7.43+/- 1.99	12.12+/- 6.14	3.69+/- 2.40	3.45+/- 0.83
RNA+Tn+ RNアーン	8	1	45904+/- 10022	1033+/- 156	178+/-22	108.42+/- 12.14	2.26+/- 0.35	41.32+/- 9.19	46.18+/- 19.94	1.47+/- 0.72

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

レーン 1、3、5 および 7 は RNA を増幅するとは考えられない P h u s i o n で増幅した。

レーン 2、4、6 および 8 は DNA および RNA を増幅する AMV - R T で増幅した。

非転移レーン 1 および 2 は S B S 3 + T で、転移レーン 3 ~ 8 は N x R 1 プライマーで配列決定した。

マトリックスおよび移相を調節し、レーン 5 ~ 8 を G F P にアラインした。

【 0 0 7 1 】

予想どおり、レーン 1 および 2 について 9 0 % 超のクラスターが純度フィルターを通り、これらの 9 8 % 超が予想どおり P h i X にアラインした (表 1)。タグメント DNA : DNA 二本鎖を含有したレーン 3 および 4 は、フィルターを通るクラスターの 1 0 ~ 2 0 % の低減を示し、そのうち 7 5 ~ 8 7 % のクラスターが P h i X にアラインした。タグメンテーションはテンプレートの長さを、いくつかの例では効果的にアラインするには短すぎる長さまで低減し得るため、フィルターを通り、アラインするクラスターの低減は予想外ではない。レーン 7 および 8 におけるクラスターは、(汚染 DNA テンプレートまたは未消化 RNA 断片は例外として) いずれのテンプレートも存在するはずがないため、十分に配列決定するはずがない。予想どおりフィルターを通るクラスターは非常に少なかった : 7 % 未満のクラスターがフィルターを通り、そのうち P H U S I O N DNA ポリメラーゼ伸長テンプレートについて 1 2 % のみがアラインし、AMV - R T 伸長テンプレートについて 4 1 % がアラインした。DNアーゼのみで、RNアーゼ処理が行われず、RNA が P h u s i o n で伸長された場合、クラスターの 3 2 % がフィルターを通り、そのうち 5 6 ± 1 6 % がアラインした (レーン 5、表 1)。これは、残留 DNA テンプレートおよび P H U S I O N DNA ポリメラーゼによる DNA の RNA に対向するいくらかの伸長の組み合わせのためであり得る。対照的に、DNアーゼ処理 RNA テンプレートが AMV - R T で伸長されたレーン 6 では約 5 0 % 多いクラスターが観察され、そのうちレーン 6 と同様の % (~ 2 7 %) がフィルターを通り、2 5 % がアラインした。

【 0 0 7 2 】

アラインデータを用い、カバレッジプロットを作成した (図 7)。レーン 1 ~ 4 は、予想どおり P h i X の完全なゲノムカバレッジをもたらした。タグメント DNA を含有するレーン (レーン 3 および 4) はより不均一なカバレッジをもたらした。タグメント RNA 試料を含有するレーン 5 ~ 8 はすべて G F P の部分カバレッジを示し、テンプレートのタグメンテーションがクラスターを生成したことを示した。このいくつかは残留 DNA テンプレートに由来し得るので、レーン 6 は G F P テンプレートのもっとも広範なカバレッジを示し、AMV - R T 伸長 RNA 分子がうまくタグメントされたことを示す。

【 0 0 7 3 】

(実施例 2 . ヒト試料のタグメンテーション反応を用いる RNA 配列決定)

下記のように、ポリ A テールを含む RNA 分子にハイブリダイズすることができるプライマーを含む、8 つのレーンを有するフローセルを調製した。レーン 1 は P 5 および P 7 オリゴのみを含む標準的なオリゴ混合物でグラフトし、レーン 2 ~ 8 は標準混合物 (P 5 および P 7 オリゴ) および捕捉オリゴ (すなわち、ポリ A テールを含む RNA 分子に結合するためのポリ T 配列を含むプライマー) でグラフトした。プライマーグラフト化後、フローセルは使用されるまで 4 で保存した。

【 0 0 7 4 】

レーン 1 および 2 について、5 p M の P h i X 対照ライブラリー試料を調製し、ハイブリダイゼーションのためフローセルに添加した。各レーン 3 ~ 8 について、4 0 0 n g の RNA 試料を調製し、ハイブリダイゼーションのためフローセルに添加した。レーン 3 および 4 は C l o n t e c h (カリフォルニア州マウンテンビュー) からのヒト RNA を含有した。レーン 5 および 6 は脳からのヒト RNA を含有した。レーン 7 および 8 はユニバーサルヒト参照 (U H R) RNA を含有した。テンプレートハイブリダイゼーション後、ハイブリダイズされていないテンプレートの除去のため洗浄バッファーをフローセルに通した。すべてのレーンにおいて、ハイブリダイズされたテンプレートを AMV - R T (N

E B、マサチューセッツ州イプスウィッチ)を用いて伸長し、これはレーン3～8においてDNA:RNA二本鎖を生成した。

【0075】

レーン3～8をトランスポソーム複合体と接触させ、レーン1および2を当量の洗浄バッファーと接触させた。2つの異なる濃度のトランスポソーム複合体混合物を調製した。レーン3、5および7の混合物を、1.25 μlのトランスポソーム複合体、100 μlのバッファーおよび400 μlの水で調製した。レーン4、6および8の混合物を、0.625 μlのトランスポソーム複合体、100 μlのバッファーおよび400 μlの水で調製した。95 μlのトランスポソーム複合体混合物をタグメンテーションのためフローセルのレーン3～8に添加した。タグメンテーション後トランスポサーゼを除去するため、カオトロピックバッファーをフローセルのレーン3～8に添加し、2分間インキュベートした。フローセルのレーンを次に2回洗浄した。洗浄後、Bst酵素をタグメントDNA:RNA二本鎖の鎖置換伸長に用い、トランスポソンの非転移鎖を除去し、クラスター化のためDNA:RNA二本鎖のDNA鎖を全長にした。RNA鎖を除去し、クラスターを次に等温増幅を用いて生成した。クラスターを次に配列決定した。表2は配列決定の結果を示す。

【0076】

配列決定概要

【表 2】

レーン	試料	クラスター (生)	クラスター (PF)	第1サイクル の強度 (PF)	% 20 サイク ル後の強度 (PF)	%PF クラス ター	%アライン (PF)	%エラー 率 (PF)
1	PhiX DNA 2 プライマー	73569+/- 8007	68422+/- 7981	284+/-13	87.51+/- 2.89	92.94+/- 0.77	97.99+/- 0.23	0.06+/- 0.00
2	PhiX DNA 3 プライマー	18553+/- 2932	11200+/- 2451	206+/-10	99.83+/- 6.39	60.00+/- 4.34	1.55+/- 1.36	8.78+/- 1.60
3	Clontech 1x Tn5	187046+/- 29545	164971+/- 26054	209+/-13	85.35+/- 2.94	88.23+/- 1.30	73.27+/- 0.46	0.30+/- 0.00
4	Clontech 0.5x Tn5	109889+/- 13109	99558+/- 13108	211+/-10	87.58+/- 4.32	90.49+/- 1.19	73.91+/- 0.56	0.27+/- 0.02
5	脳 1x Tn5	226164+/- 31941	198031+/- 28192	218+/-6	84.55+/- 2.36	87.55+/- 0.97	75.27+/- 0.36	0.36+/- 0.20
6	脳 0.5x Tn5	125939+/- 21818	113273+/- 18279	212+/-12	86.85+/- 3.09	90.06+/- 1.20	75.91+/- 0.13	0.24+/- 0.00
7	UHR 1x Tn5	310276+/- 21976	269047+/- 17778	195+/-7	86.77+/- 2.14	86.75+/- 1.68	67.70+/- 0.38	0.27+/- 0.04
8	UHR 0.5x Tn5	195323+/- 16530	172838+/- 15327	211+/-16	86.70+/- 1.77	86.47+/- 0.67	68.14+/- 0.52	0.36+/- 0.30

【0077】

配列決定結果を、標準的なIllumina配列決定方法に従い、標準的なIllumina配列決定試薬を用いて行われたヒト脳RNAおよびユニバーサルヒト参照RNAの標準的なRNA配列決定について得られた結果と比較した。こうした方法はTruSeq RNA試料調製ガイドおよびHiSeq2000ユーザーガイドに記載される。ガイドおよび試薬はIllumina, Inc. (カリフォルニア州サンディエゴ) から入手可能

10

20

30

40

50

である。結果は表3に示す。

【0078】

タグメンテーション方法と標準的なRNA配列決定方法の比較

【表3】

	Clontech RNA		UHR RNA		脳 RNA		標準 RNA 配列決定				
	リード1	リード2	リード1	リード2	リード1	リード2	UHR	UHR	脳	脳	
総クラスター	16,000,000		16,000,000		16,000,000						
PFクラスター	14,113,235	100%	14,008,505	100%	13,957,990	100%	100%	78,895,928	100%	80,670,795	100%
使用不能クラスター	9,005,973	63.8%	8,756,482	62.5%	8,956,350	64.2%	61.1%	59,010,700	74.8%	59,821,123	74.2%
マッチなし	622,294	4.4%	600,138	4.3%	484,158	3.5%	3.1%	1,352,439	1.7%	1,503,346	1.9%
反復マスク	4,484,041	31.8%	4,651,421	33.2%	4,517,061	32.4%	35.7%	18,525,758	23.5%	19,342,556	24%
使用可能サブライズ	9,058	0.1%	6,427	0%	22,719	0.2%	7.0%	9,357,715	11.9%	6,959,693	8.6%
使用可能ゲノム	8,996,915	63.7%	8,750,055	62.5%	8,933,631	64%	54.1%	49,652,985	62.9%	52,861,430	65.5%
chrM.fa	2,045,187	14.5%	2,570,314	18.3%	737,706	5.3%	5.3%	5,710,330	7.2%	10,414,460	12.9%
ヒトリボソームfa	9,409	0.1%	7,248	0.1%	8,839	0.1%	0.1%	1,789,882	2.3%	2,349,250	2.9%

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

結果は、本明細書において提供されるタグメンテーション方法を用いて配列決定されたRNA試料の正常なアラインメント分布を示す。結果は、タグメンテーション方法により分析されたRNA試料の3'UTR領域において、おそらくより多数のポリA配列および反復のため、より多数の反復マスククラスターを示す。使用可能なリードは、同様におそらくの分析されたRNAにおけるより多数の反復のため、標準的なRNA配列決定プロトコルより約10%低かった。リボソームRNAの量は、mRNAが本明細書において提供されるタグメンテーション方法で単離および配列決定されたので、予想どおり低い。ミトコンドリアRNAは正常の範囲内である。

【 0 0 8 0 】

(実施例3．タグメンテーション反応および細胞ライセートを用いるRNA配列決定)

この実施例は、核酸テンプレートは粗細胞ライセートを用いて固体支持体上で捕捉、タグメントおよび配列決定することができることを示す。簡潔に、マウス細胞をTriton-XおよびプロテイナーゼK溶液を用いて溶解した。ライセートをフローセルに塗布し、mRNAを捕捉およびタグメントし、クラスターを形成および配列決定した。対照としておよび比較のため、ユニバーサルヒト参照総RNA(UHR)も捕捉、タグメント、クラスター化および配列決定した。表4は各試料タイプの二本鎖リードの結果をまとめる。

【 0 0 8 1 】

UHR及びライセートmRNA間の配列比較

【表4】

	UHR		マウス細胞ライセート	
	R1	R2	R1	R2
総リード	4,726,081		1,905,434	
PF%	86.89%	84.59%	83.94%	84.79%
アライン (%PF リード中)	61.14%	73.97%	49.17%	68.16%
非アライン (%PF リード中)	28.42%	12.00%	34.17%	8.45%
アバンダント (%PF リード中)	10.44%	14.03%	16.82%	23.39%
スプライスアラインメント (アライン塩基中%)	0.80%	11.14%	0.62%	10.73%
スプライスアラインメント (%PF リード中)	0.4893	8.2435	0.3054	7.3138
ヒトリボソーム	0.21%	0.04%	3.98%	4.88%
ヒト5Sr	0.01%	0.01%	0.02%	0.17%
中間インサート	135		129	
SDインサート	67.99		66.97	
二本鎖	41.66%		45.54%	

【 0 0 8 2 】

表4は配列が粗マウス細胞ライセートから捕捉されたmRNAから直接得られたことを示す。mRNAが粗細胞ライセートから直接捕捉された場合、アラインリードのパーセントはUHR RNA試料(PFリード中のアライン%)と比較して約10%のみ低下した。UHR対照をマウスライセート由来のmRNAと比較するさらなる配列決定データは、正しい鎖が捕捉され、UHRおよびマウスライセートからのmRNAの両方について>97%でアラインしたことを報告した。さらに、カバレッジはUHR対照とライセートからのmRNAとの間で同程度であり;約65%は非翻訳領域(UTR)、約16%はコード領域、約13%は遺伝子間領域、わずか数パーセントはイントロンリードだった。よって、粗ライセートからのmRNAを捕捉、タグメント、クラスター化および配列決定するのに本方法を用いることができる。

【 0 0 8 3 】

(実施例4．全mRNA転写物からのタグメンテーション反応を用いるRNA配列決定)

この実験を行い、本明細書に開示される方法に従って全転写物からのmRNA試料を固

体支持体上で捕捉およびタグメントし、配列情報を提供することができたことを示した。簡潔に、ポリA RNA濃縮を50 µgのUHR総RNA (Agilent) から PolyA Purist Kit (Ambion) を用いて行った。濃縮ポリA mRNAのRNAフラグメンテーションを、100 ngのポリA RNAを有する25 µlの1倍T4 PNKバッファー (Epicentre) 中で行い、試料を95 °Cまで5分間加熱し、氷上で冷却した。フラグメント化RNAをT4 PNKでリン酸化し、フラグメントを2 mMのATPを含有する50 µlの2倍ポリAポリメラーゼバッファー (Epicentre) 中の4ユニットの大腸菌ポリAポリメラーゼを用いてポリAテール化した。ポリAデニル化したフラグメント化mRNAを、RNA精製・濃縮キット (Zymo Research) を用いて精製した。対照は、配列決定化学性能を確認するPhi X対照、ならびに複合総RNA UHRプールから捕捉されたmRNA全転写物と比較するため捕捉およびタグメントされた非総mRNA由来のポリAデニル化試料を含む。

10

【0084】

2つのうちの複製物1 (R1) からの配列決定データを、Phi X対照 (ctrl)、対照mRNA試料 (3'捕捉) および総RNA試料に由来するmRNA (全転写物) について表5に報告する。

【0085】

全mRNA転写物の複製物配列概要

【 表 5 】

R1	試料収率 (Mb)	クラスター (生)	クラスター (PF)	第1サイ クル強度 (PF)	% 20 サイ クル後の強度 (PF)	%PF クラ スター	%アライ ン (PF)	アライ ンメン コア (PF)	%ミス マッチ 率 (PF)	%>=Q30 塩 基 (PF)	平均品質 スコア (PF)
ctrl	317	7,079,810	6,343,692	268	86.78	89.6	97.89	251.82	0.15	98.35	39.12
3' 捕捉	1,077	28,753,789	21,543,617	290	85.17	74.92	57.15	75.08	0.74	92.34	36.58
全転写物	752	19,474,750	15,040,807	323	83.03	77.23	49.85	70.27	1.63	91.89	36.51

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

表5は、アラインリードのパーセント(%アライン(PF))は、高いクラスター生成

50

を有する mRNA 供給源にかかわらず同程度だったと報告する。また、配列データは、対照 mRNA (3' 捕捉) の転写物カバレッジが、約 70% は UTR、19% はコード領域、次に遺伝子間およびイントロン領域カバレッジだったことを示した。複合総 RNA に由来する mRNA の転写物カバレッジは、約 43% は UTR、37% はコードならびに遺伝子間およびイントロン領域については比較的同様だった。図 10 は、代表的な遺伝子、GAPDH のアライン転写物カバレッジを示し；対照 mRNA (3' 捕捉) は予想どおり主に遺伝子の 3' 領域におけるカバレッジを示すが、総 RNA に由来する mRNA (全転写物) からのカバレッジは、エクソンおよび UTR 領域の両方のより完全なカバレッジを示す。従って、対照 mRNA 配列は転写物の 3' 末端に関連する領域 (ポリ A テール領域) にアラインしたが、総 RNA 由来の mRNA からのカバレッジはより完全な全転写物リードを示し、これにより試料から全転写物情報を得る方法の有用性を示した。

10

【0087】

全転写物配列決定のため UHR 総 RNA 試料から mRNA を濃縮する代替ワークフローも行った。二本鎖 cDNA を 500 ng の UHR 総 RNA および 50 ng のランダム DNA ヘキサマーから調製した。過剰なプライマーを、20 ユニットのエキソヌクレアーゼ I (Epicentre) を添加し、37 °C で 30 分間インキュベートした後、酵素熱不活性化を行うことにより分解した。RNA を 1 U の RNAアーゼおよび 1/10 U のハイブリダーゼ (RNAアーゼ H、Epicentre) の酵素混合物により 55 °C で 10 分間除去した。反応物を当量の AMPure ビーズ (Agencourt) を用いて精製し、DNA を 10 mM のトリス HCl (pH 8.0) バッファー中に溶離した。cDNA を、20 U の末端トランスフェラーゼ (New England Biolabs)、1 mM の ATP および 1 倍トランスフェラーゼバッファーを用い、37 °C で 10 分間インキュベートした後、熱不活性化を行ってポリ A テール化した。試料のいくつかについて、ランダム DNA ヘキサマーの 1:10 希釈物を用いた。さらに、試料のいくつかについて、エキソヌクレアーゼ I ステップを省略した。試料を次にフローセルに塗布し、捕捉、タグメント、クラスター化および配列決定した。対照は、PhiX 対照 (ctrl)、非テール化 cDNA (非テール化 ctrl)、dsDNA 陰性対照、およびランダム RNA ヘキサマーを用い、エキソヌクレアーゼ I ステップを省略した以外、上述した同じ方法に従った精製 mRNA 試料を含んだ。

20

【0088】

表 6 は 2 つの複製物のうち第 1 の配列決定ランをまとめる。

30

【0089】

代替全 mRNA 転写物の複製物配列決定概要

【表 6】

R1	収率 (Mb)	クラスタ (生)	クラスタ (PF)	第1 サイクル 強度 (PF)	%20 サイクル 後の強度 (PF)	%PF クラスタ ター	%アライ ン (PF)	アライ メントスコア (PF)	%ミス マッチ率 (PF)	% >=Q30 塩基 (PF)	平均品質 スコア (PF)
レーン 1- PhiX ctrl	227	7,040,939	6,480,317	317	89.58	92.04	98.16	165.52	0.08	98.25	38.88
レーン 2- テールなし ctrl	3	773,384	76,281	246	84.82	9.86	0.15	0.05	5.04	42.11	20.13
レーン 3- RNアーゼ、AMP、 テール	62	3,504,536	1,783,482	420	75.32	50.89	20.14	13.65	1.29	85.96	34.57
レーン 4- 1:10	15	1,353,520	429,352	339	91.53	31.72	8.37	6.38	1	62.02	27.88
レーン 5- Exo、RNアーゼ、 AMP、テール	97	4,922,187	2,774,812	373	83.4	56.37	40.74	27.62	1.47	86.68	34.8
レーン 6- 1:10	7	844,731	198,052	317	79.07	23.45	13.09	6.81	1.38	42.76	21.15
レーン 7- RNA プライマー	29	2,164,633	840,373	377	92.34	38.82	17.28	13.89	0.7	79.14	32.88
レーン 8- ds cDNA	8	852,450	219,356	311	97.61	25.73	1.3	0.32	2.61	48.15	23.6

【0090】

表 6 は、試料をヌクレアーゼ、Exo I ならびに RNアーゼ H および I で処理した後、

10

20

30

40

50

ビーズ精製およびポリAテーリングを行う調製方法を用い、配列決定のため全mRNA転写物試料を提供することができることを示す。図9は、表6において同定される異なる条件についてのフローセル上でのクラスター化の画像を示す。表1におけるレーン1～8は図9におけるレーン1～8に対応する。PhiX陽性対照は、配列決定データ中のもっとも高い収率およびクラスター数に対応する多数のクラスターを示す。少数のクラスターを示す陰性対照レーン2および8も、配列決定データ中のもっとも低い収率およびクラスター数の3つのうちの2つに対応する。ランダムDNAヘキサマープライマーを1:10に希釈することは、調製方法におけるエキソヌクレアーゼ消化にかかわらず、配列決定には最適ではなく、表6において低いクラスター数を示し、これは表9で見られるより少ないクラスターによって裏付けられた。全mRNA転写物の試料調製中にRNAアーゼHおよびIをエキソヌクレアーゼIと用いる方法は、エキソヌクレアーゼI消化を行わない調製方法に従ったPhiX陽性対照の次に、もっとも大きな数のクラスター生成およびアラインメント%をもたらした。さらに、アラインリードのパーセント(アライン%(PF))は、試験レーンのなかでもそれぞれレーン5およびレーン3についてもっとも高い。結果は、本出願に記載される捕捉およびタグメンテーション方法を用いて配列決定することにより、この実施例に記載されるcDNAを生成するための代替方法を用いて全mRNA転写物情報を提供することができることを示す。

10

【0091】

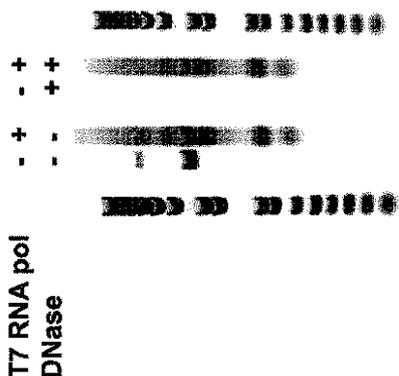
試料調製の追加の選択肢としては、これに限定されないが、開示される方法の細菌mRNAのようなポリアデニル化RNAを有さない種からのRNAの配列決定のための使用が挙げられる。この場合、リボソームRNAがまず除去され得、残ったmRNAが前述したようにフラグメント化およびポリAテール化され得る。mRNAは次に上述したように捕捉、タグメント、クラスター増幅および配列決定され得る。

20

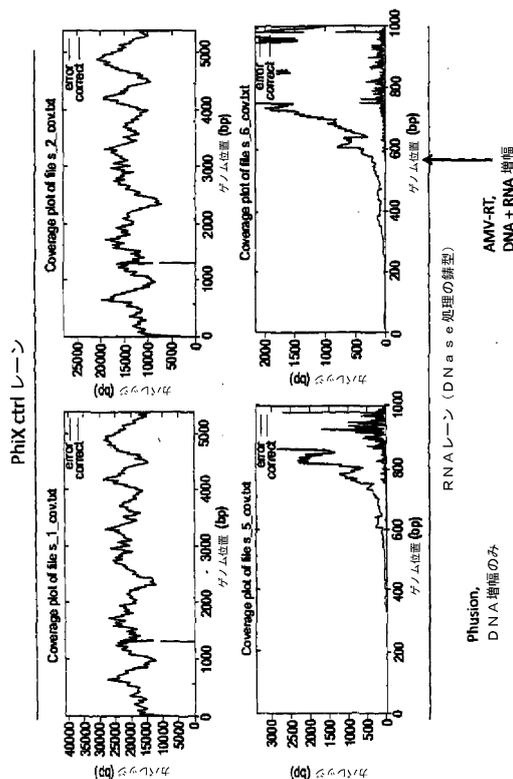
【0092】

これらの結果は、さまざまな異なるタイプのRNA試料およびRNA試料に由来するDNA試料を本明細書において提供される方法を用いて配列決定することができ、本明細書において提供される方法が現在の標準的なRNA配列決定プロトコルとほぼ同等の配列決定結果を提供することを示す。

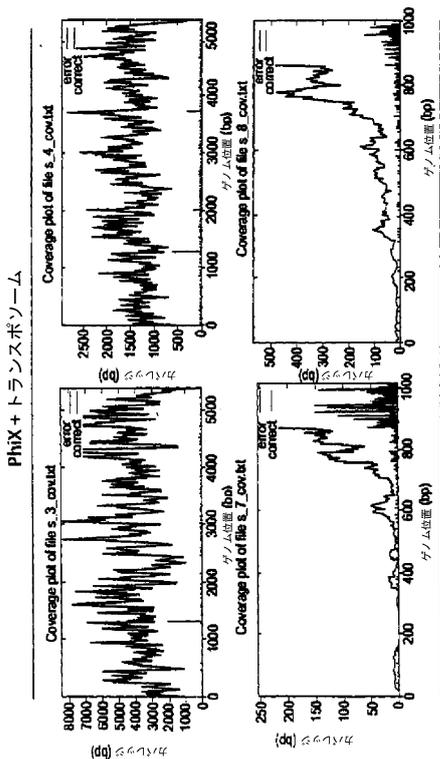
【 図 5 】



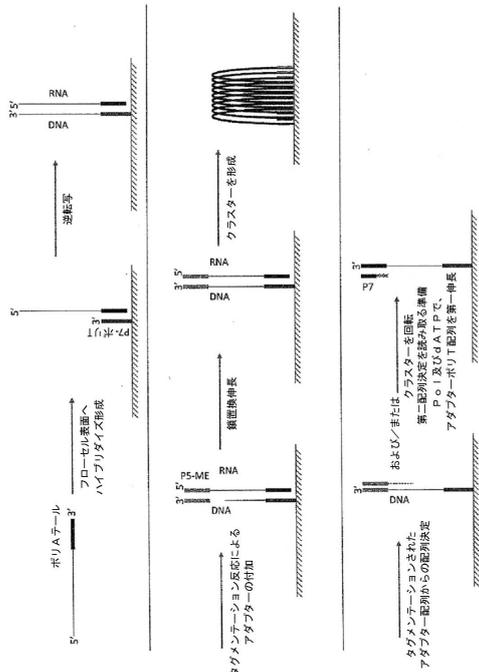
【 図 7 A 】



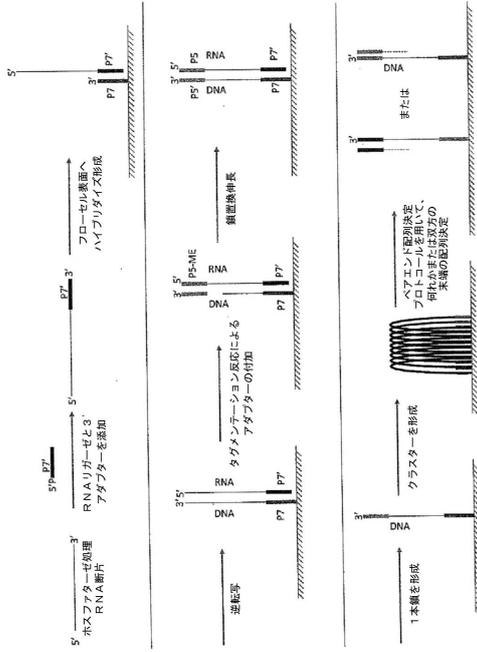
【 図 7 B 】



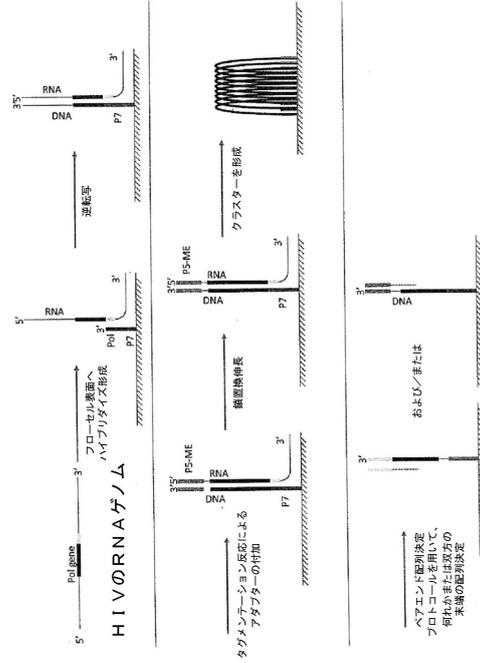
【 図 1 】



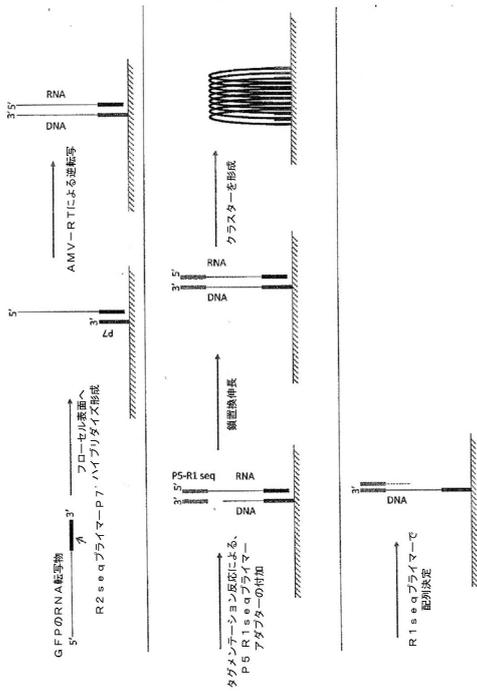
【図2】



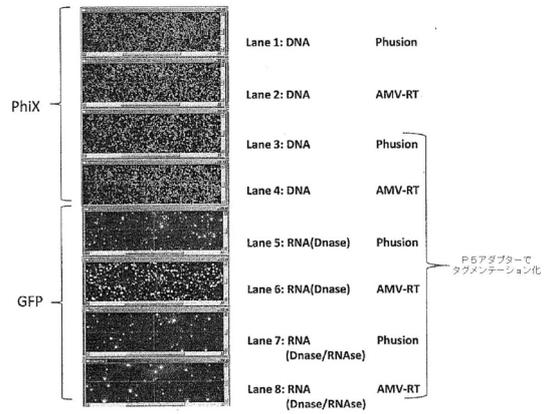
【図3】



【図4】



【図6】



【配列表】

0006068517000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ナイル アンソニー ゴームリー
イギリス国 エセックス シービー10 1エックスエル エヌアール サフロン ワルデン リ
トル チェスターフォード チェスターフォード リサーチ パーク
- (72)発明者 ルイズ フレイザー
イギリス国 エセックス シービー10 1エックスエル エヌアール サフロン ワルデン リ
トル チェスターフォード チェスターフォード リサーチ パーク
- (72)発明者 ポーラ コッコ・ゴンザレス
イギリス国 エセックス シービー10 1エックスエル エヌアール サフロン ワルデン リ
トル チェスターフォード チェスターフォード リサーチ パーク

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 国際公開第2010/048605(WO, A1)
米国特許出願公開第2012/0053063(US, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00-90
CAplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)