

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7628078号
(P7628078)

(45)発行日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(24)登録日 令和7年1月30日(2025.1.30)

(51)国際特許分類 F I
C 1 2 Q 1/682(2018.01) C 1 2 Q 1/682 Z Z N A

請求項の数 26 (全37頁)

(21)出願番号	特願2021-537767(P2021-537767)	(73)特許権者	500358711 イルミナ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イルミナ ウェイ 5 2 0 0
(86)(22)出願日	令和2年8月18日(2020.8.18)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(65)公表番号	特表2022-545307(P2022-545307 A)	(74)代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
(43)公表日	令和4年10月27日(2022.10.27)	(72)発明者	ビンセント, ルドビック アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニ ア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0
(86)国際出願番号	PCT/US2020/046854	(72)発明者	ブラブ, アンミヴ アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニ ア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0
(87)国際公開番号	WO2021/034856		
(87)国際公開日	令和3年2月25日(2021.2.25)		
審査請求日	令和5年8月2日(2023.8.2)		
(31)優先権主張番号	62/890,064		
(32)優先日	令和1年8月21日(2019.8.21)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヌクレオチドのポリメラーゼ組み込みを検出する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

方法であって、

試験プライマーを固定化プライマーにハイブリダイズさせること、ここで前記固定化プライマーが、所定のヌクレオチド配列を含み、かつその 5' 末端を介して基板に結合し、個々の試験プライマーが、前記固定化プライマーのうちの少なくともいくつかの一部分に対して相補的であり、1つ以下の試験プライマー分子が、固定化プライマー分子にハイブリダイズする、

1つのヌクレオチドを使用して、前記試験プライマーのうちの少なくともいくつかをテンプレートに従ってポリメラーゼを用いて伸長させること、ここで前記テンプレートが、前記試験プライマーのうちの前記少なくともいくつかにハイブリダイズする固定化プライマーを含み、前記伸長により前記試験プライマーのうちの前記少なくともいくつかに組み込まれたヌクレオチドが、複数の蛍光タグのうちの1つを含む、

試験プライマーから放出された蛍光を測定すること、および

固定化プライマーにハイブリダイズした試験プライマーを脱ハイブリダイズさせることを含む方法。

【請求項 2】

第1の複数の前記固定化プライマーのヌクレオチド配列が、第2の複数の前記固定化プライマーのヌクレオチド配列とは異なる、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

第 1 の複数の前記試験プライマーが、前記第 1 の複数の固定化プライマーの一部に対して相補的であり、第 2 の複数の前記試験プライマーが、前記第 2 の複数の固定化プライマーの一部に対して相補的である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の複数の前記試験プライマーに組み込まれた第 1 のヌクレオチドが、複数の蛍光タグのうちの第 1 のものを含み、前記第 2 の複数の前記試験プライマーに組み込まれた第 2 のヌクレオチドが、前記複数の蛍光タグのうちの第 2 のものを含み、また、前記複数の蛍光タグのうちの前記第 1 のものによって放出される蛍光が、前記複数の蛍光タグのうちの前記第 2 のものによって放出される蛍光とは異なる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記基板が、金属酸化物を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記基板が、金属酸化物を含み、前記金属酸化物が、二酸化ケイ素、石英ガラス、五酸化タンタル、二酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化ハフニウム、及びグラフェンオキシドからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記基板が、ポリマーを更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

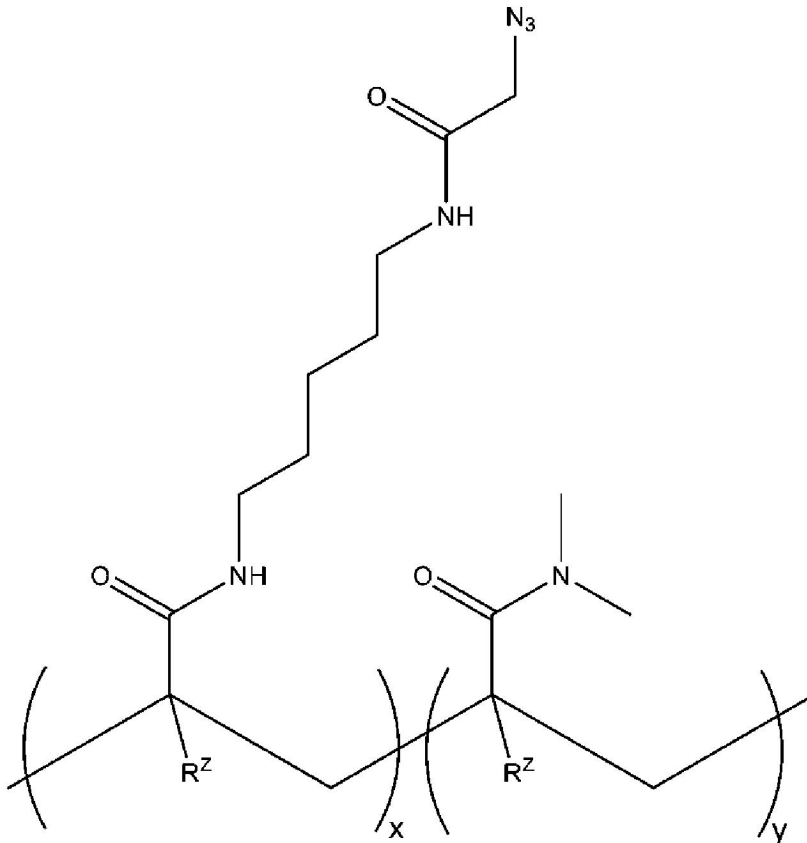
【請求項 8】

前記固定化プライマーのうちの少なくともいくつかは、前記ポリマーに結合する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記ポリマーが、

【化 1】



(式中、x 及び y は、モノマーの数を表す整数であり、x : y の比は、約 5 : 85 ~ 約 1 : 99 であってよい)、及び

10

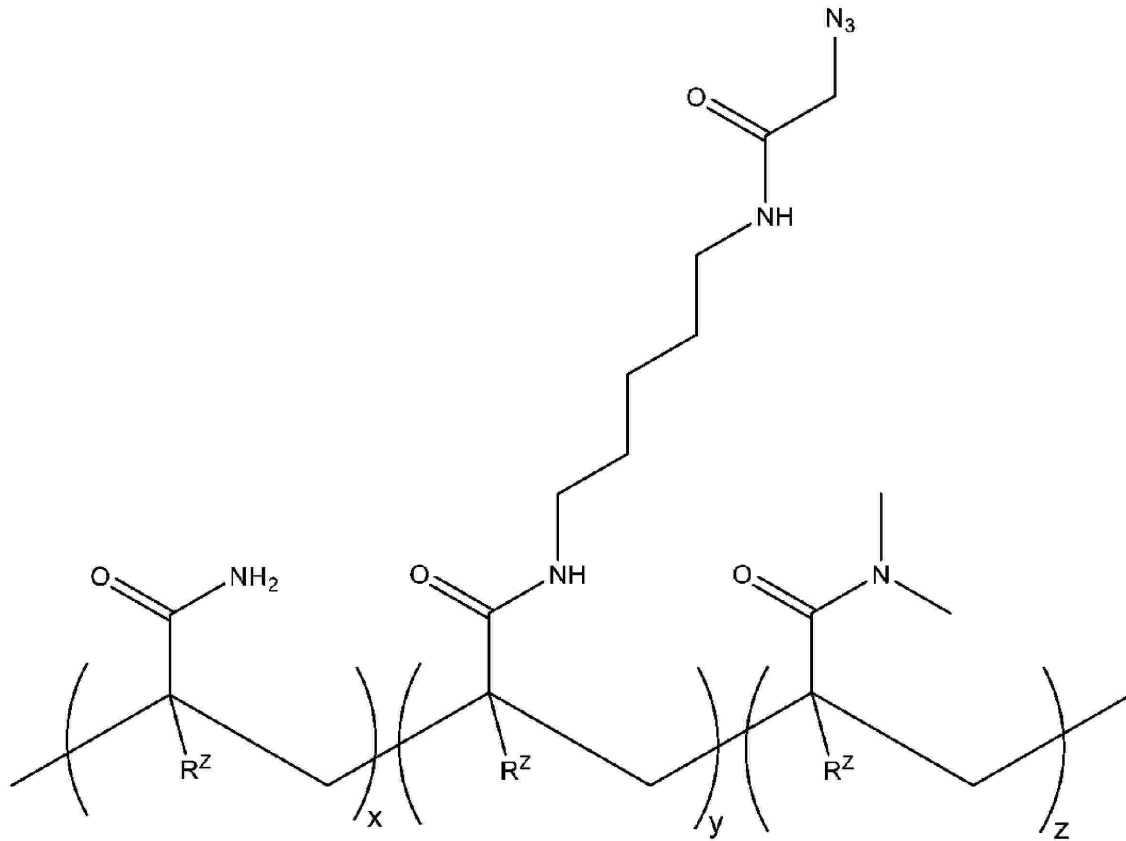
20

30

40

50

【化 2】



(式中、 x 、 y 、及び z は、モノマーの数を表す整数であり、 $(x : y) : z$ の比は、約 $(85) : 15 \sim$ 約 $(95) : 5$ であってよく、各 R^Z は、独立して、H又は C_{1-4} アルキルである)

から選択されるヘテロポリマーである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記ヘテロポリマーが、

10

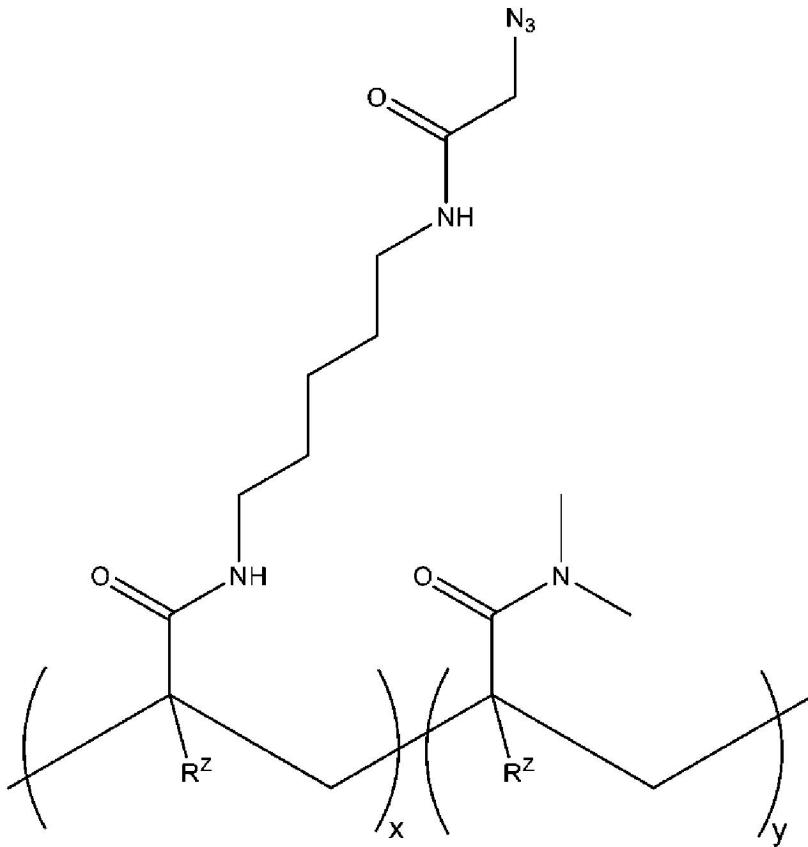
20

30

40

50

【化 3】



(式中、 $x : y$ の比は、約10 : 90である)
を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

前記ヘテロポリマーが、

10

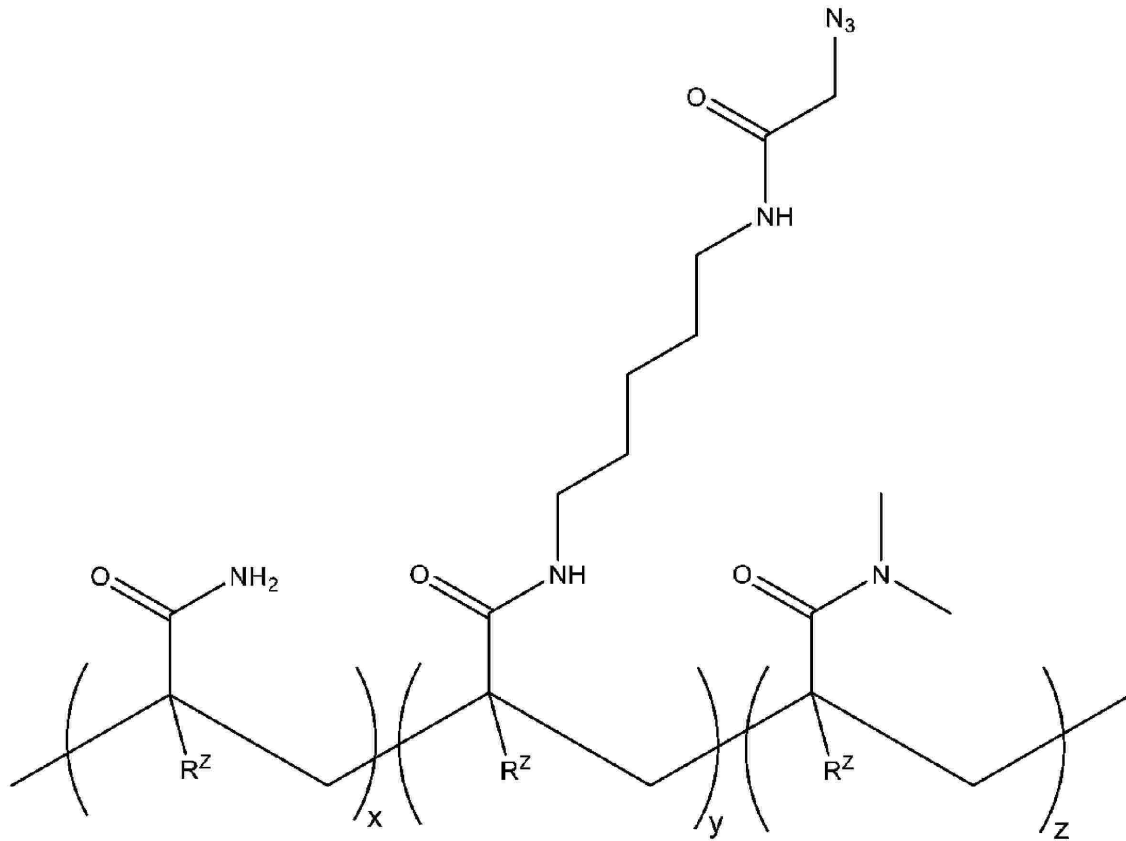
20

30

40

50

【化 4】



10

20

(式中、 $x : y : z$ の比は、約 5 : 85 : 10である)

を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記ポリメラーゼが、クレノー断片及び Phi 29 ポリメラーゼから選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ポリメラーゼが、前記基板に結合する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 14】

前記ポリメラーゼが、前記基板に結合しない、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記ポリメラーゼが、クレノー断片及び Phi 29 ポリメラーゼから選択される、請求項 7 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記ポリメラーゼが、前記ポリマーに結合する、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 17】

前記ポリメラーゼが、前記ポリマーに結合しない、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 18】

試験プライマーが、前記測定中に固定化プライマーにハイブリダイズする、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記測定前に前記固定化プライマーから前記試験プライマーを脱ハイブリダイズさせる、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

刺激に応答して前記試験プライマーから放出される蛍光を測定する、請求項 1 ~ 17 の

50

いずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記複数の蛍光タグのうちの前記第 1 のものの検出された量を、前記複数の蛍光タグのうちの前記第 2 のものの検出された量と比較することを更に含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記試験プライマーのうち少なくともいくつかの 5' 末端が、前記固定化プライマーの 3' 末端に突出しない、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記試験プライマーのうち少なくともいくつかの 5' 末端が、5' 蛍光タグスペクトルを有する 5' 蛍光タグを含み、前記 5' 蛍光スペクトルが、前記伸長により前記試験プライマーに組み込まれた前記ヌクレオチドの前記蛍光タグの前記蛍光スペクトルとは異なり、検出が、5' 蛍光タグの量及びヌクレオチド蛍光タグの量の検出を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法であって、前記試験プライマーのうち少なくともいくつかは、突出固定化プライマーに対して相補的な突出試験プライマーを含み、前記突出試験プライマーの 5' 末端が、前記伸長前にそれにハイブリダイズするとき、前記突出固定化プライマーの 3' 末端に突出し、更に、

1 つのヌクレオチドを使用して、突出固定化プライマーを伸長させることここで前記伸長により突出固定化プライマーに組み込まれるヌクレオチドが、前記伸長により前記突出試験プライマーに組み込まれる複数の蛍光タグのうちの前記 1 つの発光スペクトルとは検出可能に異なる発光スペクトルを有する突出蛍光タグを含む、

20

蛍光固定化プライマーの量を検出すること、および

蛍光試験プライマーの量を蛍光固定化プライマーの量と比較すること、を含む方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法であって、前記試験プライマーのうち少なくともいくつかは、突出固定化プライマーに対して相補的な突出試験プライマーを含み、前記突出試験プライマーの 5' 末端が、前記伸長前にそれにハイブリダイズするとき、前記突出固定化プライマーの 3' 末端に突出し、かつ試験プライマー 5' 蛍光タグを含み、更に、

30

1 つのヌクレオチドを使用して、突出固定化プライマーを伸長させることを含み、前記伸長により突出固定化プライマーに組み込まれるヌクレオチドが、突出蛍光タグを含み、前記試験プライマー 5' 蛍光タグ及び前記突出蛍光タグは、前記突出固定化プライマーの前記伸長後に前記突出試験プライマーが突出固定化プライマーにハイブリダイズするとき、蛍光タグ対を含み、そして、前記蛍光タグ対によって放出される複合蛍光が、前記試験プライマー 5' 蛍光タグから放出される蛍光及び前記突出蛍光タグから放出される蛍光とは異なる、方法。

【請求項 2 6】

蛍光試験プライマーの量の検出が、前記蛍光タグ対によって放出される複合蛍光の検出を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2019年8月21日出願の「Method for Detecting Polymerase Incorporation of Nucleotides」と題された米国特許出願第62/890,064号の利益を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

(配列表)

50

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2020年8月7日に作成された上記ASCIIコピーは、IP-1854-PC_TSL.txtと命名され、サイズは715バイトである。

【背景技術】

【0003】

現在のシーケンシングプラットフォームの大部分は、「合成時解読」(sequencing by synthesis、SBS)技術、及び検出のための蛍光ベースの方法を使用する。方法では、基板又は表面は、それに直接的又は間接的に結合したプライマーの1つ以上の集団を含み、このプライマーは、既知のヌクレオチド配列を有する。シーケンシングされるポリヌクレオチドを含有するライブラリ又はサンプルをそれに添加してよく、当該ライブラリのポリヌクレオチドは、基板に結合したプライマーに対して相補的であり、それによって、当該プライマーにハイブリダイズ可能であるヌクレオチドのストレッチのセグメントを含有する。

10

【0004】

ハイブリダイズしたサンプルポリヌクレオチドをテンプレートとして使用して、表面又は基板に結合したものである固定化プライマーを伸長させるように、ポリメラーゼ酵素を遊離単一ヌクレオチドと共に添加してよい。一連の工程では、テンプレートのコピー、サンプルポリヌクレオチドは、それにより、表面又は基板上に固定化されたプライマーの遊離末端から伸長するコピーとして基板に付加される。その後の工程では、このようなコピー及び伸長を反復的に繰り返して、最初に固定化プライマーであるものから伸長する、サンプルテンプレートポリヌクレオチドの複数又は菌叢(lawn)のコピーを生成させる。その後の工程では、その時点で蛍光標識されたヌクレオチドの存在下において、組み込まれる所与のヌクレオチドの同一性を示すようにその新生鎖への付加が可視化されて、新生鎖の配列の検出、最終的には、サンプルポリヌクレオチドのシーケンシングを可能にする条件下で、このようなサンプルテンプレートヌクレオチドと会合したポリメラーゼを用いて、新生鎖を再度生成することができる。

20

【0005】

いくつかの例では、前述のハイブリダイゼーション、重合、及びシーケンシングを行う前に、基板に結合した所与の配列のプライマーの量を求めて、シーケンシングに使用される基板又は表面上に存在する条件に関する情報を提供することができる。このような情報は、結果を解釈し、生成された生データから配列を組み立てる際に有用であり得る。また、立体障害又は酵素活性に影響を及ぼし得る他の効果を考慮して、基板に結合している箇所付近のプライマーに対してポリメラーゼがどの程度良好に又は効率的に重合を行うことができるかを検出するための方法も有益であり得る。しかしながら、蛍光ヌクレオチドとの重合反応において固定化プライマーの末端を伸長させ、固定化プライマーへの蛍光の付加を検出する実務に従ってこのように行うことにより、プライマーが修飾され、その配列を求めている試験サンプルポリヌクレオチドとの後続のハイブリダイズ、重合、及びシーケンシングが変化する可能性がある。本開示は、その後SBS法において使用できるようにするために、固定化プライマーの共有結合的修飾を必要とすることなく表面上に固定化された1つ以上のプライマーのポリメラーゼによる表面上伸長を測定するための方法を提供することを含む。

30

40

【発明の概要】

【0006】

一態様では、固定化プライマーに試験プライマーをハイブリダイズさせることであって、当該固定化プライマーが、所定のヌクレオチド配列を含み、かつその5'末端を介して基板に結合し、個々の試験プライマーが、当該固定化プライマーのうちの少なくともいくつかの一部分に対して相補的であり、1つ以下の試験プライマー分子が、固定化プライマー分子にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、1つのヌクレオチドを使用して、当該試験プライマーのうちの少なくともいくつかをテンプレートに従ってポリメラーゼを用いて伸長させることであって、当該テンプレートが、当該試験プライマーのうちの

50

当該少なくともいくつかはハイブリダイズする固定化プライマーを含み、当該伸長により当該試験プライマーのうちの当該少なくともいくつかに組み込まれたヌクレオチドが、複数の蛍光タグのうちの1つを含む、伸長させることと、蛍光試験プライマーの量を検出することと、を含む方法が提供される。

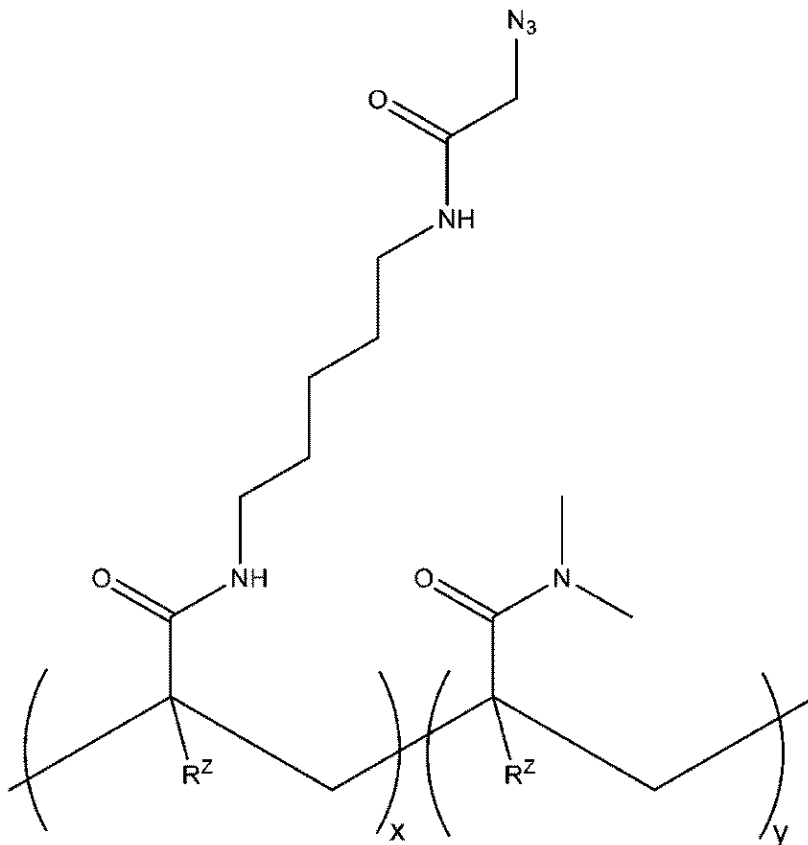
【0007】

例では、第1の複数の固定化プライマーのヌクレオチド配列は、第2の複数の固定化プライマーのヌクレオチド配列とは異なる。別の例では、第1の複数の試験プライマーは、第1の複数の固定化プライマーの一部に対して相補的であり、第2の複数の試験プライマーは、第2の複数の固定化プライマーの一部に対して相補的である。更に別の例では、第1の複数の試験プライマーに組み込まれる第1のヌクレオチドは、複数の蛍光タグのうちの第1のものを含み、第2の複数の試験プライマーに組み込まれる第2のヌクレオチドは、複数の蛍光タグのうちの第2のものを含み、また、複数の蛍光タグのうちの第1のものによって放出される蛍光は、複数の蛍光タグのうちの第2のものによって放出される蛍光とは異なる。

【0008】

更に別の例では、基板は、金属酸化物を含む。更なる例では、基板は、金属酸化物を含み、金属酸化物は、二酸化ケイ素、石英ガラス、五酸化タンタル、二酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化ハフニウム、及びグラフェンオキシドからなる群から選択される。更なる例では、基板は、ポリマーを更に含む。更なる例では、固定化プライマーのうちの少なくともいくつかは、ポリマーに結合する。一例では、ポリマーは、以下から選択されるヘテロポリマーである：

【化1】



(式中、x及びyは、モノマーの数を表す整数であり、x:yの比は、約15:85~約1:99、例えば、約10:90~約1:99、例えば約10:90~約5:99であってよい)、及び

10

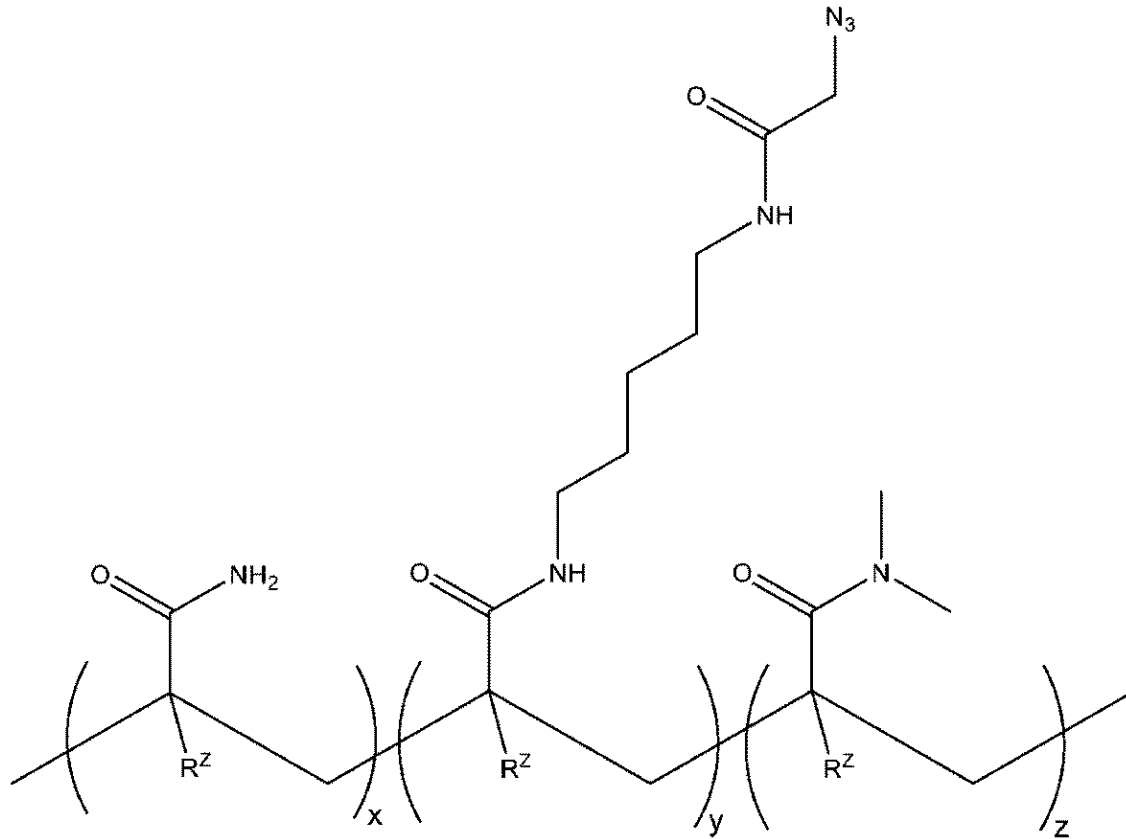
20

30

40

50

【化 2】



10

20

(式中、 x 、 y 、及び z は、モノマーの数を表す整数であり、 $(x : y) : z$ の比は、約(85) : 15 ~ 約(95) : 5であってよく、各 R^Z は、独立して、H又は C_{1-4} アルキルである)。いくつかの例では、 $x : y : z$ の比は、約0 : 15 : 85 ~ 約0 : 5 : 95であってよい。例では、 $x : y$ は、5 : 95である。別の例では、 $x : y : z$ の比は、5 : 85 : 10である。

【0009】

30

別の例では、ポリマーゼは、クレノー断片及びPhi 29ポリマーゼから選択される。更に別の例では、ポリマーゼは、基板に結合する。更に別の例では、ポリマーゼは、基板に結合しない。例では、ポリマーゼは、クレノー断片及びPhi 29ポリマーゼから選択される。更なる例では、ポリマーゼは、基板に結合する。より更なる例では、ポリマーゼは、基板に結合しない。

【0010】

別の例では、検出は、刺激にตอบสนองして試験プライマーから放出される蛍光を測定することを含む。更に別の例では、試験プライマーは、測定中に固定化プライマーにハイブリダイズする。更なる例は、測定前に固定化プライマーから試験プライマーを脱ハイブリダイズすることを含む。

40

【0011】

例では、検出は、試験プライマーから放出される蛍光を測定することを含む。例えば、試験プライマーは、測定中に固定化プライマーにハイブリダイズし得る。更なる例は、測定前に固定化プライマーから試験プライマーを脱ハイブリダイズすることを含む。より更なる例は、複数の蛍光タグのうちの第1のものの検出された量を、複数の蛍光タグのうちの第2のものの検出された量と比較することを含む。

【0012】

例では、試験プライマーのうちの少なくともいくつかの5'末端は、固定化プライマーの3'末端に突出しない。別の例では、試験プライマーのうちの少なくともいくつかの5'末端は、5'蛍光タグスペクトルを有する5'蛍光タグを含み、5'蛍光スペクトルは、伸長に

50

より試験プライマーに組み込まれるヌクレオチドの蛍光タグの蛍光スペクトルと異なり、検出は、5' 蛍光タグの量及びヌクレオチド蛍光タグの量を検出することを含む。

【0013】

更に別の例では、試験プライマーのうちの少なくともいくつかは、突出固定化プライマーに対して相補的な突出試験プライマーを含み、当該突出試験プライマーの5'末端は、当該伸長前にそれにハイブリダイズするとき、当該突出固定化プライマーの3'末端に突出し、更に、1つのヌクレオチドを使用して、突出固定化プライマーを伸長させることであって、当該伸長により突出固定化プライマーに組み込まれるヌクレオチドが、当該伸長により当該突出試験プライマーに組み込まれる複数の蛍光タグのうちの1つの発光スペクトルとは検出可能に異なる発光スペクトルを有する突出蛍光タグを含む、伸長させることと、
10
蛍光固定化プライマーの量を検出することと、蛍光試験プライマーの量を蛍光固定化プライマーの量と比較することと、を含む。

【0014】

更に別の例では、試験プライマーのうちの少なくともいくつかは、突出固定化プライマーに対して相補的な突出試験プライマーを含み、当該突出試験プライマーの5'末端は、当該伸長前にそれにハイブリダイズするとき、当該突出固定化プライマーの3'末端に突出し、かつ試験プライマー5' 蛍光タグを含み、更に、1つのヌクレオチドを使用して、突出固定化プライマーを伸長させることを含み、当該伸長により突出固定化プライマーに組み込まれるヌクレオチドが、突出蛍光タグを含み、当該試験プライマー5' 蛍光タグ及び当該突出蛍光タグは、当該突出固定化プライマーの伸長後に当該突出試験プライマーが突出固定化プライマーにハイブリダイズするとき、蛍光タグ対を含み、そして、当該蛍光タグ対によって放出される複合蛍光は、試験プライマー5' 蛍光タグから放出される蛍光及び当該突出蛍光タグから放出される蛍光とは異なる。より更なる例では、蛍光試験プライマーの量の検出は、蛍光タグ対によって放出される複合蛍光を検出することを含む。
20

【0015】

以下でより詳細に考察される前述の概念及び追加の概念の全ての組み合わせは（このような概念が相互に矛盾しない限り）、本明細書に開示される発明主題の一部であると考えられ、本明細書に記載する利点及び利益に寄与することを理解すべきである。

【図面の簡単な説明】

【0016】

本開示のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、添付図面を参照して以下の詳細な説明を読むと、より深く理解されるであろう。
30

【0017】

【図1】本開示の態様による方法の例のフロー図を示す。

【0018】

【図2】本開示の態様による方法の例のフロー図を示す。

【0019】

【図3】表面にプライマーをグラフトさせる反応において使用したプライマーの3つの合計濃度のそれぞれ（左、中間、及び右のパネル）について、表面にプライマーをグラフトさせる反応に含まれるP5プライマーのP7プライマーに対する比（x軸）の関数として、それにハイブリダイズした蛍光タグ付き試験プライマーの量を定量することによって評価したときの、表面に結合した2つの異なるプライマー（P5及びP7）のそれぞれの量（y軸）のグラフ表示である。
40

【0020】

【図4】表面にプライマーをグラフトさせる反応において使用したプライマーの3つの合計濃度のそれぞれについて、表面にてプライマーをグラフトさせる反応に含まれるP5プライマーのP7プライマーに対する比（x軸）の関数として、P7プライマーと比較したP5プライマーにハイブリダイズした蛍光タグ付き試験プライマーの量の比を定量することによって評価したときの、表面に結合した2つの異なるプライマー（P5及びP7）の量の測定値（y軸）のグラフ表示である。
50

【 0 0 2 1 】

【図 5】表面にプライマーをグラフトさせる反応において使用したプライマーの 3 つの合計濃度のそれぞれ（左、中間、及び右のパネル）について、表面にプライマーをグラフトさせる反応に含まれる P 5 プライマーの P 7 プライマーに対する比（x 軸）の関数として、本開示の態様によるこのような試験プライマーに組み込まれた蛍光の量を定量することによって評価したときの、表面に結合したプライマー（P 5 及び P 7）に対して相補的な 2 つの異なるポリヌクレオチドであって、ポリメラーゼによって伸長されたポリヌクレオチドのそれぞれの量（y 軸）のグラフ表示である。

【 0 0 2 2 】

【図 6】表面にプライマーをグラフトさせる反応において使用したプライマーの 3 つの合計濃度のそれぞれについて、表面にプライマーをグラフトさせる反応に含まれる P 5 プライマーの P 7 プライマーに対する比（x 軸）の関数として、P 7 プライマーと比較した P 5 プライマーにハイブリダイズした蛍光タグ付き試験プライマーの量の比を定量することによって評価したときの、表面に結合したプライマー（P 5 及び P 7）に対して相補的な 2 つのポリヌクレオチドの量の測定値（y 軸）のグラフ表示である。

10

【 0 0 2 3 】

【図 7】本開示の態様による、関連するポリメラーゼ活性を有するハイブリダイズ可能な固定化ポリヌクレオチドの百分率を示す。

【 0 0 2 4 】

【図 8 A】表面に結合したプライマーに対して相補的なポリヌクレオチドにポリメラーゼによって蛍光ヌクレオチドが付加される、本開示による方法の例を示す。

20

【図 8 B】表面に結合したプライマーに対して相補的なポリヌクレオチドにポリメラーゼによって蛍光ヌクレオチドが付加される、本開示による方法の例を示す。

【図 8 C】表面に結合したプライマーに対して相補的なポリヌクレオチドにポリメラーゼによって蛍光ヌクレオチドが付加される、本開示による方法の例を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 5 】

ポリメラーゼ活性について表面又は基板に結合した又は固定されたポリヌクレオチドプライマーの利用能を評価する方法が提供される。現在の S B S 及び関連技術は、当該表面に適用されたサンプル中のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定するための、ポリメラーゼ反応の起点として機能する多数のこのようなプライマーを用いる。このような方法の一部は、表面固定化プライマーに対するサンプルオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを含む。有利なことに、サンプルオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションに利用可能なプライマーの合計量の理解が判定され得る。このような情報は、このような表面を用いる S B S 又は関連する方法におけるこのような役務において使用するためのパラメータを決定するために有用であり得る。このような方法は、更に、固定化プライマーを有する表面、又は所与のポリメラーゼ酵素、又は表面に結合した様々なプライマー配列、又は前述の任意の組み合わせの様々な特徴が、例えば S B S 又は関連する方法において使用するための、このようなプライマーでの重合に影響を及ぼすかどうかを評価するのに有用であり得る。

30

40

【 0 0 2 6 】

S B S 法は、更に、それに適用されたサンプルポリヌクレオチドの様々な部分にハイブリダイズするための、表面にハイブリダイズする異なる種のプライマーを含んでもよい。例では、組織サンプル又は他のポリヌクレオチド源などのサンプルから得られるポリヌクレオチドは、既知のプライマー配列にハイブリダイズするための既知の配列を含むように、その末端で修飾されていてもよい。例えば、このようなポリヌクレオチドは、第 1 のプライマー配列にハイブリダイズし得る一方の末端に追加（appended）されたヌクレオチド配列、及び第 2 のプライマー配列にハイブリダイズし得る他方の末端に追加されたヌクレオチド配列を有し得る。更に、S B S 又は関連する方法で使用するための表面は、第 1 のプライマー配列及び第 2 のプライマー配列を含む 2 つのプライマー集団がそれに固

50

定 (affixed) されていてもよく、その配列は、前述の修飾を有するサンプルポリヌクレオチドの一方又は他方の末端にハイブリダイズ可能である。したがって、このようなサンプルポリヌクレオチドは、一方若しくは他方の固定化プライマー、又はいくつかの場合では両方にハイブリダイズし得る。いくつかの例では、表面は、それに固定された2つを超えるプライマーの集団を有していてもよく、ポリヌクレオチドのサンプルは、例えばこのような表面に固定されたプライマーにハイブリダイズするための、ある又は別の末端のそれぞれに固定された、それに対して相補的な2つを超えるヌクレオチド配列を有してよい。他の例では、サンプル中の個々のポリヌクレオチドは、互いに同じである各末端に追加された配列を有していてもよく、したがって、それぞれに互いに異なる配列を有するのではなく、表面に固定された同じ種のプライマーにそれぞれハイブリダイズする。他の例では、サンプルは、そのうちのいくつかに互いに異なる末端配列が追加されているポリヌクレオチド、互いに同じ末端追加配列を有する他のポリヌクレオチド、末端追加配列とは異なる末端追加配列を有するポリヌクレオチド、若しくはサンプル中のいくつかの他のポリヌクレオチド、又は前述のものの様々な組み合わせを含んでいてよい。

10

【0027】

例えば、2つ以上のこのようなプライマーの集団が固定されている表面におけるSBS又は関連する方法の実施については、有利なことに、表面に固定された他方に対する各集団の相対量を求めることができる。例えば、等しい比率の第1及び第2のプライマーが固定されている表面を作製又は使用することが望ましい場合がある。例えば、第1及び第2の末端に第1及び第2の配列を含むように修飾されたサンプルポリヌクレオチドが、一方の末端又は他方によって表面固定プライマーにハイブリダイズする可能性が等しく高くなることを望ましい場合がある。あるいは、このようなサンプル中のポリヌクレオチドが、表面上の一方のプライマーに他方よりも高度にハイブリダイズすることが望ましい場合もあり、逆も同様である。更に、サンプル中のポリヌクレオチド分子は、末端追加ヌクレオチド配列の不均等な部分を有してもよく、これは、所与のポリヌクレオチド分子が、ある又は別の表面固定化プライマーにハイブリダイズする可能性に影響を与える。表面固定化プライマーに対するポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを、SBS又はヌクレオチド鎖のポリメラーゼが触媒する伸長のための類似の若しくは他の方法に使用する場合、表面に固定される様々なプライマーの合計量及び相対量を制御及び/又は決定する能力が有益であり得る。

20

30

【0028】

いくつかの例では、驚くべきことに本明細書に開示されるように、表面に固定された、プライマーの合計量、又はプライマーの1つ以上の種の合計量、又はプライマーの相対量若しくは比は、有用な情報ではあるが、表面上に固定化されたこのようなプライマーに対するポリメラーゼ活性の活性についての完全な予測因子ではない場合がある。いくつかの場合では、例えば、所与のプライマーが、同じ表面にハイブリダイズする別のプライマー配列と比べて、ポリメラーゼ反応のより効率的な起点として機能可能であり得る。別の例では、プライマーが固定される表面に様々な変異を導入することにより、別のプライマーと比べて所与のプライマーにおけるポリメラーゼ活性が不均衡に増加又は減少し得る。他の例では、あるポリメラーゼ分子は、異なる配列の表面固定化プライマーと比べて、所与の表面固定化プライマーから重合を開始する際に、より効率的又はより前進的であり得る。他の例では、それに固定されたプライマーがそこから伸長する表面若しくは修飾表面からの距離、又はポリメラーゼが相互作用して重合反応を開始させるプライマーの部分の距離は、重合が開始される可能性に影響を及ぼし得、恐らく別のプライマー配列とは反対に、あるプライマー配列について不均衡である。前述の例の全て及び他の例について、効果はプライマー配列特異的であってもよく、すなわち、ある配列の表面固定プライマーに関してポリメラーゼが重合反応をどのように開始するか、開始するか否か、又はどの程度効率的に開始するかに影響を与え得るある変数又は別の変数の変更は、異なる配列の表面固定プライマーについての比較可能な影響とは異なっていてよい。

40

【0029】

50

このような場合、表面に固定されているあるプライマーの別のプライマーに対する数又は相対比率を単に決定するのではないことが有利である。いくつかの例では、あるプライマーの別のプライマーに対する所与の比は、所与のプライマーにおいてどの程度のポリメラーゼ活性が開始され得るかに対して1対1の対応を有していなくてもよい。重合開始の確率、効率、処理能力、若しくは他のパラメータが、プライマー配列対プライマー配列基準で、又は、プライマーが表面から伸長する推測距離、若しくはポリメラーゼが結合して重合を開始させる部分が表面から伸長する距離などの表面上のプライマーの種間の他の差において異なる場合、表面に固定されたプライマーの相対量を単に特定するだけでは、各プライマーの種で開始される相対的な重合を正確には反映しない場合がある。

【0030】

表面に固定されたプライマーでの重合は、1つ以上のヌクレオチドがプライマーの遠位端に結合し、表面に近位でありかつ結合している末端から離れて配向されている試験重合反応をポリメラーゼによって実施することによって決定することができる。しかしながら、このような方法は、すなわち、遊離末端にヌクレオチドを共有結合させることによって、表面固定プライマーを共有結合修飾することを伴う。いくつかの例では、本開示で提供されるように、表面固定化プライマーに対する共有結合修飾の作製を含むことなく、表面固定化プライマーで開始される重合を測定することが望ましい場合がある。例えば、このような表面をSBS法又は同様の方法を使用する前に、プライマーの種又は表面に固定されたプライマーの種のポリメラーゼ活性のレベル又は相対レベルを試験又は確認することが望ましい場合がある。あるいは、逐次アッセイは、プライマーが固定されている所与の表面上で実行することが望ましい場合があり、1つ以上の逐次アッセイによってプライマーに施された共有結合修飾を混同することなく、このような逐次アッセイのアウトプット同士を直接比較することが望ましい場合がある。

【0031】

ポリヌクレオチドは、鎖の各末端におけるヌクレオチドの糖環上の付番された炭素を指す、いわゆる3'及び5'末端を有し、このような炭素を介して配列中の隣接するヌクレオチドに直接は結合しない。ポリメラーゼは、5'→3'方向に成長する鎖にヌクレオチドを付加する。すなわち、遊離ヌクレオチドの糖の5'炭素は、ポリメラーゼ酵素により触媒される反応によって、ポリヌクレオチドのいわゆる3'末端におけるヌクレオチドの3'糖に、介在するリン酸基を介して結合する。SBS又は他の関連する方法の実施において使用するためにプライマーが固定されている表面のいくつかの例では、プライマーは、5'末端が表面又は基板に向かってかつ近位に配向されており、3'末端が遠位かつ遊離している基板にプライマーを結合又は固定化してもよい。このような例では、サンプルポリヌクレオチドは、このようなプライマーにハイブリダイズし得る。したがって、ポリヌクレオチド及び遊離ヌクレオチドの存在下では、ハイブリダイズしたサンプルポリヌクレオチドをテンプレートとして使用して、遊離の3'末端にヌクレオチドを付加することで始まって、プライマーが伸長され得る。重合は、表面固定プライマーの初期遊離3'末端から伸長する新生ヌクレオチドの伸長を続け得る。従来は、SBS及び関連技術は、サンプルポリヌクレオチド配列を最終的に決定するプロセスの一部としてこのような方法を使用することができる。

【0032】

上で説明したように、いくつかの場合では、どの程度の量の所与のプライマー種が表面に固定されて存在しているか、又は様々な種のプライマーの相対量を定量することが有利であり得る。従来、そのようにする1つの方法は、表面固定プライマーを有する表面にポリヌクレオチドを付加する第1の試験を実施することであり、当該ポリヌクレオチドは、プライマー又はプライマーのうちのいくつかの内の少なくとも一部分又は配列に対して相補的である。このようなポリヌクレオチドは、その検出を可能にするマーカースを含んでよい。従来、例えば、表面に固定されたプライマー内の一部分又は配列に対して相補的な一定の長さの短いポリヌクレオチド、例えば10~60ヌクレオチドを、プライマーにハイブリダイズするように表面に付加してよい。ポリヌクレオチドは、例えば蛍光プロ-

10

20

30

40

50

ブ又は分子を含めることによって修飾されてもよい。1種超のプライマー、例えば2種のプライマーを表面に固定する場合、一方が1種のプライマーにハイブリダイズ可能であり、他方が他の種のプライマーにハイブリダイズ可能である、2つの異なるポリヌクレオチドを表面に付加し、それと共にインキュベートしてよい。

【0033】

各種のポリヌクレオチドは、フルオロフォアを含んでいてもよく、各フルオロフォアは、互いに異なる発光スペクトルを有することなどによって、一方のフルオロフォアを他方と区別することができる方法で蛍光を発し得る。それぞれの相補的なプライマーにハイブリダイズさせるためにこのようなポリヌクレオチドと共に表面をインキュベートした後、ハイブリダイズしていないポリヌクレオチドを洗い流してよく、表面上に残存するフルオロフォアは、存在するポリヌクレオチドの一方若しくは他方の種又は両方の種の量、ひいては、表面に固定された相補的プライマーを反映する。次いで、ハイブリダイズした蛍光ポリヌクレオチドを、表面固定プライマーから脱ハイブリダイズしてよく、その結果、蛍光ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーション前のその状態から共有結合修飾されない表面が得られるが、後で参照するために得られた、プライマー及び/又はそれにハイブリダイズした様々な種のプライマーの量及び/又は相対量に関する情報が得られる。

10

【0034】

表面に固定されたプライマー及び/又はプライマーの種に対するポリメラーゼ活性を決定するために、いくつかの例では、表面固定プライマーを共有結合的に修飾することなく、本明細書に開示される態様に従って、異なる又は追加の方法を用いてもよい。例を図1に示す。この例では、固定化プライマーが表面に固定される。この例では、固定化プライマーはP5として特定され、その3'末端は表面に対して遠位の矢尻によって示されており、その5'末端は、固定化プライマーが固定又は固定化された表面又は基板に近位であり、かつそれに向かって配向されている。固定化プライマーの配列は既知であるか若しくは所定のものであるか、又はその少なくとも一部分が既知であるか若しくは所定のものであり、その結果、ポリヌクレオチドがプライマー又はプライマーの少なくとも一部分にハイブリダイズし得るように、それに対して相補的なヌクレオチド配列を有するようにポリヌクレオチドを設計することができる。したがって、更に、相補的ヌクレオチドがハイブリダイズし得る固定化プライマーヌクレオチドに対して、ポリヌクレオチドが直接ハイブリダイズしない場合があるが、1つ以上のヌクレオチドによって隣接している同一性ヌクレオチドが既知であるように、ヌクレオチド又は部分のプライマーの配列は既知であり得る。

20

30

【0035】

再び図1を参照すると、例えばハイブリダイゼーション溶液中において表面に試験プライマーを付加することを含むハイブリダイゼーションを実施し、ここでは、このような試験プライマーは、それが相補的である固定化プライマーの部分にハイブリダイズし得る。図1に示す例では、cP5によって示されるP5固定化プライマーに対して相補的なポリヌクレオチドが、P5固定化プライマーの一部分にハイブリダイズして示されている。この例では、cP5ポリヌクレオチド上の矢尻は、cP5試験プライマーの3'末端を示す。P5固定化プライマーの5'末端は表面の近位にあるが、塩基対形成相補性に従って、相補的cP5ポリヌクレオチドの3'末端は、相補的cP5プライマーが固定化P5プライマーにハイブリダイズしたときに表面及びそれに対して遠位の5'末端に対して近位である。また、この例では、相補的cP5プライマーの5'末端は、P5固定化プライマーの3'末端に突出しない。すなわち、P5固定化プライマーの3'末端は、相補的cP5ポリヌクレオチドのヌクレオチドに対して相補的であり、ハイブリダイズする。

40

【0036】

この構成では、ポリメラーゼは、相補的cP5ポリヌクレオチドにヌクレオチドを付加し得るが、P5固定化プライマーには付加しない。すなわち、ポリメラーゼは、伸長により付加される次のヌクレオチドを付加するためのテンプレートとして、ポリメラーゼによって伸長されるポリヌクレオチドにハイブリダイズするテンプレートポリヌクレオチドの最も5'側のヌクレオチドに対して5'側のハイブリダイズしていないヌクレオチドを使用

50

する。図 1 に示す例では、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドのこのような 5' 側ヌクレオチドは存在しない。すなわち、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドの最も 5' 側のヌクレオチドは、P 5 固定化プライマーのヌクレオチドにハイブリダイズする。したがって、ポリメラーゼによって固定化プライマーの 3' 末端に別のヌクレオチドを付加するためのテンプレートとして使用することができる相補的 c P 5 ポリヌクレオチドのヌクレオチドは存在しない。しかしながら、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドは、ポリメラーゼによって伸長され得る。相補的 c P 5 プライマーの最も 3' 側のヌクレオチドにハイブリダイズする P 5 固定化プライマーのヌクレオチドに隣接する 5' は、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドのヌクレオチドにハイブリダイズしない P 5 固定化プライマーのヌクレオチドである。ハイブリダイズした P 5 固定化プライマー及び相補的 c P 5 ポリヌクレオチドと接触したポリメラーゼは、相補的 c P 5 ヌクレオチドの 3' 末端を少なくとも 1 ヌクレオチド伸長させることができ、当該 1 ヌクレオチドは、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドの 3' 末端にハイブリダイズする P 5 プライマーのヌクレオチドに対して 1 ヌクレオチド 5' 側である P 5 固定化プライマーのヌクレオチドに対して相補的である。この例では、1 つの相補的 c P 5 ポリヌクレオチドのみが、所与の P 5 固定化プライマーにハイブリダイズする。

【 0 0 3 7 】

図 1 の場合を続けると、相補的 c P 5 ヌクレオチドが P 5 固定化プライマーにハイブリダイズした後、ハイブリダイズしていない相補的 c P 5 ポリヌクレオチドを洗い流してよい。次に、例えば重合溶液中において表面をポリメラーゼ酵素と接触させてよい。同様に、溶液中には、前述に従い、ポリメラーゼによって相補的 c P 5 ポリヌクレオチドの 3' 末端に付加され得るヌクレオチドも含まれていてよい。例では、重合溶液に含まれる唯一のポリヌクレオチドは、P 5 固定化プライマーの 5' 側の次のハイブリダイズしていないヌクレオチドに対して相補的であってよく、その結果、ポリメラーゼは、テンプレートとして P 5 固定化プライマーを使用して、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドの 3' 末端へのその付加を触媒し得る。いくつかの例では、P 5 固定化プライマーの以下の 5' ヌクレオチドは、相補的 c P 5 ポリヌクレオチドの 3' 末端にヌクレオチドを付加するためのテンプレートとして機能する P 5 ヌクレオチドとは異なることが知られている。このような例では、P 5 固定化プライマーをテンプレートとして使用してポリメラーゼによって c P 5 ポリヌクレオチドに対して相補的な 3' 末端に結合可能である、1 種のヌクレオチドのみが重合溶液に含まれる場合、それに応じて、1 つのヌクレオチドのみが相補的 c P 5 ポリヌクレオチドに結合する。

【 0 0 3 8 】

図 1 に示す例では、ハイブリダイゼーション重合プロセスは、互いに別々に実施されるものとして示される。しかしながら、他の例では、固定化プライマーに対して相補的な試験ポリヌクレオチド、ポリメラーゼ酵素、及びポリメラーゼによる組み込みのためのヌクレオチドは全て、ハイブリダイゼーション及び重合が同じ溶液中で生じるように、単一の溶液中で表面に付加されてよい。

【 0 0 3 9 】

他の例では、更なる介入なしに、重合反応において 1 つだけ新生鎖に付加され得るように、重合反応におけるヌクレオチドを修飾してもよい。例えば、ヌクレオチド又は関連分子の 3' 末端での修飾は、ポリメラーゼによって成長している鎖の 3' 末端にヌクレオチドが付加されると、別のヌクレオチドがそれに付加される能力を防ぐことができる。例えば、ヌクレオチドは、アジドメチル又は当該ヌクレオチドが付加された後に鎖が更に伸長するのを防ぐことができる他の基の付加などの、その 3' 炭素における化学修飾を有し得る。他の例では、重合溶液中のヌクレオチドは、3 炭素上にヒドロキシル基を有さず、したがって、次のヌクレオチドの 5' リン酸 - 炭素についての結合部位がない、ジデオキシヌクレオチドであってもよい。他の例では、2 個のみ、3 個のみ、4 個のみ、5 個のみ、6 個のみ、7 個のみ、8 個のみ、9 個のみ、10 個のみ、11 個のみ、12 個のみ、13 個のみ、14 個のみ、15 個のみ、15 個のみ、15 個 ~ 20 個のみ、又はそれ以上のヌクレオチドが相補的 c P 5 ポリヌクレオチドの 3' 末端に付加され得る。このような付加されるヌ

10

20

30

40

50

クレオチドの量は、例えば、c P 5 ポリヌクレオチドの3'末端を伸長するためのテンプレートとして機能することが意図される最後のP 5 固定化プライマーに対して1ヌクレオチド5'側であるP 5 固定化プライマーを除いて、利用可能なテンプレートP 5 固定化プライマーヌクレオチドに対して相補的な全てのヌクレオチドを含めることによって、どの種のヌクレオチドが重合反応に含まれるかを制御することによって制御することができる。あるいは、上記又は他の例に従ってそれから更に伸長するのを防ぐために、相補的c P 5 ポリヌクレオチドの伸長した3'末端に付加するための最後のヌクレオチドを修飾してもよい。

【0040】

別の例では、1種を超える固定化プライマーを、互いに異なる配列を有する表面又は基板に結合させることができる。更に、ある種の固定化プライマーに対して相補的な試験プライマーの種が、その種の固定化プライマーにハイブリダイズし、第2の種のテキストプライマーに対して相補的なポリヌクレオチドが当該第2の種の固定化プライマーにハイブリダイズすることができるように、異なる種の試験プライマーを表面又は基板と共にインキュベートしてもよい。例では、ある種又は各種の試験プライマーは、ある種の固定化プライマーにのみハイブリダイズ可能であり、他の種又は別の種の試験プライマーは、別の種の固定化プライマーに対してのみ相補的であり、その結果、ある種の試験プライマーのみが、所定の種の固定化プライマーにハイブリダイズする。別の例では、試験プライマーの種は、基板又は表面に固定された固定化プライマーの両方又は全ての種にハイブリダイズ可能であってもよい。

【0041】

別の例では、表面と共にインキュベートされる1種以上の試験プライマーが、1種のみ又は1種を超える表面固定化プライマーにハイブリダイズ可能であろうとなかろうと、1種のヌクレオチドのみが、1種の試験プライマーにハイブリダイズした試験プライマーの3'末端にポリメラーゼによって付加され得、別の種のヌクレオチドのみが、別の種の固定化プライマーにハイブリダイズした別の試験プライマーの3'末端にポリメラーゼによって付加され得るように、試験プライマーを設計してよい。例えば、いずれか又は両方の場合において、それがハイブリダイズする試験プライマーの3'末端にハイブリダイズした最も5'側の固定化プライマーヌクレオチドの直ぐ5'側の各種の固定化プライマーの5'側の次のヌクレオチドは、他の種の、又は合計2種超が存在する場合は別の種の固定化プライマーの比較可能なヌクレオチドとは異なっていてよい。このような場合、ポリメラーゼは、ある種の固定化プライマーにハイブリダイズしたある種の試験プライマーの3'末端へのある種の相補的ヌクレオチドの付加を触媒し得、別の種の固定化プライマーにハイブリダイズした別の試験プライマーの3'末端への異なる種の相補的ヌクレオチドの付加を触媒し得る。

【0042】

したがって、異なるヌクレオチドを、異なる固定化プライマーにハイブリダイズした試験プライマーに付加し得る。例では、異なる種のヌクレオチドは、異なるヌクレオチド間の区別を可能にする方法で同定可能である。例えば、異なる種のヌクレオチドは、それらが共有結合する異なるマーカを保有し得る。例では、ヌクレオチドは、蛍光イメージングによって観察可能な蛍光マーカを有し得る。2種のヌクレオチドは、それぞれが、他方と比較して異なる波長の光若しくは他の電磁放射線によって励起可能である、及び/又は励起時に他方とは検出可能に異なる波長を放出するなど、他方とは異なる発光スペクトルを有する、2つの異なる種のフルオロフォアを有してよい。SBS及び関連する方法の様々な例を含む、異なるヌクレオチド間を区別するための関連する分野において、多数のフルオロフォアが使用される。この例によれば、異なる種のヌクレオチドが、表面に固定された異なる種の固定化プライマーに対して相補的な試験プライマーに付加され、例えば異なるヌクレオチドに結合した異なるフルオロフォア、異なる種の固定化プライマーに関連したポリメラーゼ活性を決定することができる。試験プライマーが固定化プライマーにハイブリダイズする表面上で、ある種の蛍光又は他のマーカを検出することができ

る。

【0043】

重合溶液中でヌクレオチド及びポリメラーゼの存在下において固定化プライマーにハイブリダイズしたときに所与の試験プライマーに付加され得るヌクレオチドの種、並びに異なる種のヌクレオチドに固定されたフルオロフォアなどのマーカの検出特性も既知であるように設計された試験プライマー及び固定化プライマーを用いると、所与のマーカの検出は、ポリメラーゼによって重合反応が触媒されるプライマーの種を示し得る。1種を超える固定化プライマー及び/又は1種を超える試験プライマーを、基板上に固定化されたプライマーにおけるポリメラーゼ活性を評価するための開示された方法に従って使用する場合、2種の異なる種の試験プライマーを、表面上に固定化された固定化プライマーと共に同時にインキュベートし、ハイブリダイズさせてもよく、試験プライマーの種は、互いに同じ重合反応中に同時に伸長される。他の例では、1種の試験プライマーを一度にインキュベートしてもよい、及び/又は複数の固定化プライマーのうちの1つのみにハイブリダイズしたときに試験プライマーに付加され得るヌクレオチドの種が、所与のポリメラーゼ反応中に存在してもよい。その後、当該種の若しくは別の種の試験プライマーとの第2のインキュベーションプロセスを実施してもよく、及び/又は第2の種の固定化プライマーにハイブリダイズしたときにポリヌクレオチドに結合可能なヌクレオチドの種との別の重合反応を実施してもよい。

10

【0044】

例では、1つ以上の重合反応により組み込まれたヌクレオチドの種を検出することができ、一方、試験プライマーは固定化プライマーにハイブリダイズしたままで、本明細書に開示される検出可能なヌクレオチドの付加によって伸長された試験プライマーを検出することができる。例えば、図1を参照すると、重合反応は、固定化プライマーにハイブリダイズした試験プライマーの、ヌクレオチド(星形として示される)及びポリメラーゼ(4分の3円形状として表される)とのインキュベーションによって示される。この例では、ポリメラーゼは溶液中に存在するものとして示されている。しかし、別の例では、ポリメラーゼは基板に結合していてもよい。重合反応後、結合していないポリメラーゼ、結合していない試験プライマー、及び/又は遊離ヌクレオチドは、固定化プライマーに対する試験プライマーのハイブリダイゼーションを継続させることができるハイブリダイゼーション条件下で洗い流してよい。次いで、表面上の検出可能なヌクレオチドを検出するために、既知の方法に従って表面をスキャンしてよい。組み込まれていないヌクレオチド及びハイブリダイズしていない試験プライマーを表面から洗浄した後に存在する各種のヌクレオチドの位置及び/又は全体的な量が、所与の固定化プライマーで生じた重合を示す。いくつかの例では、重合反応中に伸長した試験プライマーが、再ハイブリダイゼーション溶液中でインキュベートした後など、固定化プライマーから脱ハイブリダイズされた後に、組み込まれたヌクレオチドの検出、測定、又は定量を行ってよい。このような例では、伸長した試験プライマーが固定化プライマーにハイブリダイズしたままであるときに、組み込まれたヌクレオチドの量及び/又は位置を測定するのではなく、又は測定した後に、例えば、ポリメラーゼにより触媒されたヌクレオチドの組み込み後に固定化プライマーから脱ハイブリダイズされた、伸長した試験プライマーを含有する脱ハイブリダイゼーション溶液中で、組み込まれたヌクレオチドの量を測定してよい。

20

30

40

【0045】

図1に示す例は、1つにすぎない、非限定的な例である。上の段落に記載したものなどを含む、図1に例示される例の多くの改変例又は変形例も本開示に含まれる。更に、1種の固定化プライマーのみ及び1種の試験プライマーのみ及び1種の検出可能なヌクレオチドのみを図1に示す。上記例と一致して、例は、複数種の固定化プライマーを含んでもよい。例は、複数種の試験プライマーを含んでもよい。例は、ポリメラーゼによって試験プライマーに組み込むための、複数の種の標識された検出可能なヌクレオチドを含んでもよい。更に理解され得るように、表面の表面1mm²当たり最大約1×10¹¹種プライマーを含む、数千又は数十万又は数百万又は数千万又はそれ以上のケタの、1種

50

以上の固定化試験プライマーの多くのコピーを表面に結合させることができる。例示目的のために、1分子の固定化プライマーのみが図1に示されている。

【0046】

例では、1種の固定化プライマーにハイブリダイズ可能な1種の試験プライマーは、本明細書に開示される方法が使用される表面を使用したSBSの実行においてその配列が決定されるサンプル中のヌクレオチド末端における又は当該末端に付加される配列に対応していてもよい。別の種の固定化プライマーにハイブリダイズ可能な別の種の試験プライマーは、本明細書に開示される方法が使用される表面を使用したSBSの実行においてその配列が決定されるサンプル中のヌクレオチドの他の末端における又は当該末端に付加される配列に対応していてもよい。したがって、例えば、P5プライマー及びP7プライマーなどの固定化プライマーは、表面上に固定化されたプライマーであってもよい。更に、本明細書に開示される方法で使用される試験プライマーは、P5及びP7固定化プライマーに対して相補的な配列を有してよく、また、表面又は基板を使用した後続のSBSの実行中にその配列が調べられるサンプルポリヌクレオチドは、このような後続のSBS又は類似の処理の一部としてその一方及び/又は他方の末端に付加されるこのような試験プライマーに対応する配列を有してよい。

10

【0047】

使用される1つ以上の試験プライマー配列が、サンプルポリヌクレオチドの末端に付加されるポリヌクレオチドの配列に対応する例において本明細書に開示される方法に従って決定されるポリメラーゼ活性は、このような固定化プライマーに対するこのようなサンプルポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション及び/又はこのようなハイブリダイゼーションの点で予測されるポリメラーゼ活性に関する予測情報を提供することができる。より全般的には、本明細書に開示される方法が使用された基板上で実施される任意の後続のSBS又は関連する方法に関係なく、本明細書に開示される方法で得られた情報は、所与の固定化プライマーに応じて、表面におけるポリメラーゼ活性及び場合により区別可能なポリメラーゼ活性を示す。驚くべきことに、本明細書に開示されるように、試験プライマーがハイブリダイズすることができる固定化プライマーの定量は、それだけのものであり、異なる固定化プライマー部位での重合に対して1対1の対応を有さない。

20

【0048】

本開示によるポリメラーゼ反応により組み込まれるヌクレオチドを定量するための方法の非限定的な例を図2に示す。上に開示したように、いくつかの例では、例えば既知の蛍光発光スペクトルによって検出可能な組み込まれたヌクレオチドの量を検出することができるが、重合反応中に組み込まれた試験プライマーは、図2の左側のプレート1に示されるように、表面に結合した固定化プライマーに依然としてハイブリダイズしている。別の例では、組み込まれたヌクレオチドに関連するマーカーが、固定化プライマーから放出され得る。例えば、固定化プライマーにハイブリダイズし、フルオロフォアなどの検出可能マーカーを有する組み込まれたヌクレオチドを含有する試験プライマーを、固定化プライマーから脱ハイブリダイズさせてもよい。あるいは、フルオロフォアなどの検出可能マーカーは、試験プライマーから化学的に切断され、それによって、溶液中に放出され得る。このようないずれかの場合において、蛍光又は溶液中の関連する他のマーカーの指示は、固定化プライマーからマーカーが放出される前に、表面上での検出ではなく（又は検出後に）検出されてもよい。このような例は、図2中の中央プレート1パネルに示されている。

30

40

【0049】

更に別の例では、固定化プライマーからの放出後にフルオロフォア又は他のマーカーを含有する溶液を、表面上の溶液から取り出し、蛍光などの異なるマーカー、検出システム、又は装置において測定するために別の検出容器に移してもよい。このような例は図2の右側パネルに示されており、ここでは、プレート1からの溶液の一部が取り出され、この例ではプレート2に配置されている。しかしながら、測定のための第2の容器がプレートである必要はなく、検出のための任意の既知の装置又はシステム又は方法であってもよい。

50

例では、ゲル電気泳動を使用して、記載のとおりポリメラーゼ反応においてマーカ結合ヌクレオチドが付加された試験プライマーを分離し、次いで、可視化することができる。ゲル電気泳動を使用して、開示されているようにポリメラーゼ反応に組み込まれたヌクレオチドを含む試験プライマーを分割する他の例では、ある種の固定化プライマー - 試験プライマーハイブリダイズ対に関連するポリメラーゼ活性と、別の種の固定化プライマー - 試験プライマーハイブリダイズ対との間の区別は、ポリメラーゼにより触媒されたヌクレオチドの組み込み後の、それぞれの試験プライマーの長さの差に基づいてよい。例えば、一方の試験プライマー種は、他方よりも長くてもよく、一方、同じ量のヌクレオチドをそれぞれ（1つなど）に付加してもよく、又はいずれの事象でも、ポリメラーゼにより触媒されたヌクレオチドの付加後のそれぞれの全長がゲル電気泳動による分離を可能にするのに十分な程度異なり得るような量をそれぞれに付加してもよい。これは、各種の試験プライマーに組み込まれたヌクレオチドが、互いに検出可能に区別可能なマーカを含んでいなかった場合であっても可能であり得る。いくつかの例では、ゲル電気泳動又は他のサイズベースの分割法を使用し得る場合、組み込まれたヌクレオチド又はそのうちの1つは、独立して検出可能なマーカを全く含んでいなくてもよい。

10

【0050】

驚くべきことに、本明細書に開示されるように、固定化プライマーに対する試験プライマーのハイブリダイゼーションの測定は、異なる種の固定化プライマー - 試験プライマーハイブリダイゼーション対でのポリメラーゼ活性が同等である若しくは同等であるかどうか、又はそうでない場合、どのように互いに異なるかを示すことはできない。このようなポリメラーゼ活性における可能性のある差の例は、必ずしも図3～6に反映されていない場合がある。図3は、1ウェルあたりの鎖の量として表される、表面上の固定化プライマーにハイブリダイズした試験プライマーの量（Y軸）を示し、ここで、鎖は、検出された蛍光の量からの固定化プライマーの量の外挿を示し、測定が行われた表面の一部分をよく示す。蛍光は、フルオロフォアを含む試験プライマーから検出された蛍光である。この例では、2種の固定化プライマーP5及びP7を使用し、したがって、使用されるこれらに対して相補的な2種の試験プライマーcP5及びcP7を使用した。cP5及びcP7は、互いに異なって検出され得る蛍光マーカを含んでいた。3つのパネルを示す。各パネルは、既知の方法に従って、プライマーが表面又は基板に結合して固定化プライマーとなる反応で使用されるプライマーの異なる合計濃度を反映している。合計濃度は、左パネルから右パネルに向かって μM （ $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、及び $2\mu\text{M}$ ）で示される。X軸上には、既知の方法に従って、プライマーが表面又は基板に結合して固定化プライマーとなる反応に含まれるP5プライマーのP7プライマーに対する相対比を示す。したがって、図3は、プライマーを表面に固定するための反応に含まれるプライマーの様々な合計濃度について、及びこのような合計プライマー濃度が与えられた各プライマーの異なる相対濃度について、固定化プライマーが、それにハイブリダイズするように設計された相補的な試験プライマーに対してハイブリダイズし得る数を示す。

20

30

【0051】

これらのデータを、図4において異なるフォーマットで表す。図4中、X軸は、図3中のX軸のように、既知の方法に従って、プライマーが表面又は基板に結合して固定化プライマーとなる反応に含まれるP5プライマーのP7プライマーに対する相対比である。P5及びP7固定化プライマーのそれぞれに対応する表面上で検出された蛍光の量を求め（図3のY軸を参照）、固定化プライマーを基板に固定するために使用される固定化プライマー固定化反応に含まれるP5のP7に対する各相対比について、P5関連蛍光のP7関連蛍光に対する比を算出した。このP5関連蛍光のP7関連蛍光に対する比を、図4のY軸に与える。3本のプロット線は、既知の方法に従って、プライマーが表面又は基板に結合して固定化プライマーとなる反応で使用されるプライマーの3つの異なる合計濃度（図3に示される3つのパネルにおけるように、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 、及び $2\mu\text{M}$ ）のプライマーを示す。1:1対応線は、プライマーを表面に固定化する際の反応で使用される等モル濃度のプライマーで予想され得、表面にハイブリダイズする等モル量の蛍光試験プライ

40

50

マーが得られるプロットの予測として示されている。しかしながら、図示のように、実際の値は、予測される 1 : 1 線よりも低い。換言すれば、これらの合計濃度では、固定化反応において P 5 の P 7 に対する比を増加させることは、P 7 固定化プライマーに対する試験プライマーによるハイブリダイゼーションに利用可能な P 5 の量の同等の増加には対応していなかった（例えば、表面にグラフト化する P 5 の P 7 に対する比率より小さい）。

【 0 0 5 2 】

図 5 及び 6 は、y 軸が、固定化プライマーにハイブリダイズした蛍光試験プライマーの量を報告するのではなく、本明細書に開示される方法（例えば、図 1 を参照）に従って、P 5 又は P 7 に対して相補的なポリヌクレオチドの 3' 末端に結合した蛍光ヌクレオチドの量を示すことを除いて、図 3 及び 4 と比較可能である。図 3 及び 4 の他の態様は、図 5 及び 6 に適用可能である。図 5 中の 3 つのパネルは、プライマーを表面に固定化する際に使用されるプライマーの合計濃度に対応し、x 軸は、当該反応における P 5 の P 7 に対する相対濃度を示す。図 6 では、x 軸は、図 4 に記載されているとおりである。y 軸は、比が P 5 ハイブリダイゼーションの P 7 ハイブリダイゼーションに対する比ではなく、P 5 関連ポリメラーゼ活性の P 7 関連ポリメラーゼ活性に対する比であることを除いて、図 4 に記載したものと同様である。ここでも、プライマーが表面に固定化される反応において、P 5 の P 7 に対する相対濃度を増加させると、P 7 固定化プライマーに関連する重合と比較して、P 5 固定化プライマーに関連する重合において相応の増加が生じる場合に結果が入り得る 1 : 1 プロットが描かれている。

【 0 0 5 3 】

この場合、驚くべきことに、P 5 相対濃度を増加させると、P 5 関連ポリメラーゼ活性も相応に増加した。しかしながら、図 4 に示されるように、P 5 の相対濃度を増加させることは、試験プライマーに対する P 5 ハイブリダイゼーションの相応の増加には繋がらなかったことに留意されたい。別の言い方をすれば、組み合わせると、図 4 及び 6 は、P 5 プライマーに関連するポリメラーゼ活性が、単独で P 5 のハイブリダイゼーション利用能の測定値が予測し得るよりも多く増加し得ることを示している。むしろ、予想外に、そして、驚くべきことに本明細書に開示されているように、P 5 : P 7 比を増加させると、P 5 : P 7 のハイブリダイゼーション利用能の増加が比例よりも小さいにもかかわらず、P 5 : P 7 関連ポリメラーゼ活性を比例的に増加させた。これらの差を図 6 に示す。図 6 は、プライマーを表面に固定化するための反応において使用される P 5 プライマーの P 7 に対する 3 つの異なる相対濃度について、ハイブリダイゼーションにアクセス可能なプライマー（例えば、グラフト化プライマー）の合計量に対する、ポリメラーゼがアクセス可能なプライマーの割合を示す。図示されるように、この例では、P 5 プライマーの割合が高いほど、P 7 プライマーに対してアクセス可能なポリメラーゼ活性になる。

【 0 0 5 4 】

このような情報は有益であり得る。所定のハイブリダイゼーションアクセス可能性及びポリメラーゼ活性アクセス可能性に達するようにプライマーが表面に固定される間グラフト反応に適用される条件を決定するために使用することができる。他の例では、任意の所望の配列の異なるプライマーの比較ポリメラーゼアクセス可能性をアッセイすることができる。異なる長さのプライマーをアッセイすることができる。表面上の異なる濃度の固定化プライマーを試験することができる。試験プライマーをアッセイすることができる。異なるポリメラーゼ、並びに異なる基板をアッセイすることができる。いくつかの例では、基板の表面は、異なる表面修飾を有し得る。本明細書に開示される方法は、表面に対する様々な変形、及びそれらが異なる固定化プライマーポリメラーゼ活性の利用能に対して有し得る効果をアッセイするために使用され得る。

【 0 0 5 5 】

例えば、生物系及びその機能的変異体から単離されたタンパク質系酵素を含む様々なポリメラーゼのいずれも、本明細書に記載の方法において使用することができる。以下に例示されるものなどの特定のポリメラーゼへの言及は、別途記載のない限り、その機能的変異体を含むと理解されるであろう。ポリメラーゼの特に有用な機能は、テンプレートとし

10

20

30

40

50

て既存の核酸を使用する核酸鎖の重合を触媒することである。有用な他の機能は、本明細書の他の箇所に記載されている。有用なポリメラーゼの例としては、DNAポリメラーゼ及びRNAポリメラーゼ、これらの機能断片、並びにこれらを含む組換え融合ペプチドが挙げられる。例示的なDNAポリメラーゼとしては、構造相同性によってA、B、C、D、X、Y、及びRTとして同定されるファミリーに分類されているものが挙げられる。ファミリーAのDNAポリメラーゼとしては、例えば、T7 DNAポリメラーゼ、真核生物ミトコンドリアDNAポリメラーゼガンマ、大腸菌 (*E. coli*) DNA Pol I (クレーノー断片を含む)、サーマス・アクアチクス (*Thermus aquaticus*) Pol I、及びバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*) Pol Iが挙げられる。ファミリーBのDNAポリメラーゼとしては、例えば、真核生物DNAポリメラーゼa、6、及びE；DNAポリメラーゼC；T4 DNAポリメラーゼ、Phi 29 DNAポリメラーゼ、サーモコッカス属 (*Thermococcus*) 種9°N-7古細菌ポリメラーゼ(9°N(商標)としても知られる)及びその変異体、例えば、米国特許出願公開第2016/0032377(A1)号に開示されている例、並びにRB69バクテリオファージDNAポリメラーゼが挙げられる。ファミリーCとしては、例えば、大腸菌DNAポリメラーゼIIIIアルファサブユニットが挙げられる。ファミリーDとしては、例えば、古細菌のユリ古細菌門のサブドメインに由来するポリメラーゼが挙げられる。ファミリーXのDNAポリメラーゼとしては、例えば、真核生物ポリメラーゼPolベータ、Polシグマ、Polラムダ、及びPolミュー、及び出芽酵母 (*S. cerevisiae*) Pol4が挙げられる。ファミリーYのDNAポリメラーゼとしては、例えば、Polエータ、Polイオタ、Pol kappa、大腸菌Pol IV (DINB)、及び大腸菌Pol V (UmuD'2C)が挙げられる。DNAポリメラーゼのRT(逆転写酵素)ファミリーとしては、例えば、レトロウイルス逆転写酵素及び真核生物テロメラーゼが挙げられる。例示的なRNAポリメラーゼとしては、T7 RNAポリメラーゼなどのウイルスRNAポリメラーゼ；RNAポリメラーゼI、RNAポリメラーゼII、RNAポリメラーゼIII、RNAポリメラーゼIV、及びRNAポリメラーゼVなどの真核生物RNAポリメラーゼ；並びに古細菌RNAポリメラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、米国特許第8,460,910号に開示されているような他のポリメラーゼも、単に非限定的な例の一覧として提供される上記のポリメラーゼ酵素のいずれかと比較することにより改変された配列を有するものを含む任意の他の機能的ポリメラーゼと同様に、本明細書において言及するときポリメラーゼの中に含まれる。

【0056】

用語「表面」又は「基板」は、試験プライマーが結合し得る支持体又は基板を指す。表面は、ウェハ、パネル、矩形シート、ダイ、又は任意の他の好適な構成であってよい。表面は、概して、剛性であり、水性液体に不溶性であってよい。好適な表面の例としては、エポキシシロキサン、ガラス、及び修飾又は官能化ガラス、多角体オリゴマーシルセスキオキサン(POSS)及びその誘導体、プラスチック(アクリル、ポリスチレン、及びスチレンと他の材料とのコポリマー、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、ポリテトラフルオロエチレン(Chemours製のTEFLON(登録商標)など)、環状オレフィン/シクロオレフィンポリマー(COP)(Zeon製のZENONOR(登録商標)など)、ポリイミドなどを含む)、ナイロン、セラミック/セラミック酸化物、シリカ、石英ガラス、又はシリカ系材料、ケイ酸アルミニウム、ケイ素及び性改質ケイ素(例えば、ホウ素ドーピングケイ素)、窒化ケイ素(Si₃N₄)、酸化ケイ素(SiO₂)、五酸化タンタル(TaO₅)、又は他のタンタル酸化物(TaO_x)、酸化ハフニウム(HfO₂)、酸化アルミニウム、グラフェンオキシド、二酸化チタン、炭素、金属、無機ガラスなどが挙げられる。表面はまた、ガラス、又はケイ素、又はケイ素系ポリマー、例えばPOSS材料であってもよく、任意選択で、酸化タンタル又は別のセラミック酸化物のコーティング層を表面に有していてもよい。表面又は基板は、ケイ素又は1つ以上の他の遷移金属を含んでいてもよく、又はこれらであってもよい。

【0057】

10

20

30

40

50

固定化プライマー配列及び試験プライマー配列は、上記の開示による任意の好適な配列であってよい。例では、本明細書に開示されるP5固定化プライマーの配列は、配列番号1(CAAGCAGAAAGACGGCATACGAGAT)によって表され、本明細書に開示されるP7固定化プライマーの配列は、配列番号2(AATGATACGGCGAC CACCGAGATCTACAC)によって表される。ハイブリダイゼーションのための試験プライマーは、これらの配列の部分に対して相補的な配列であってよい。

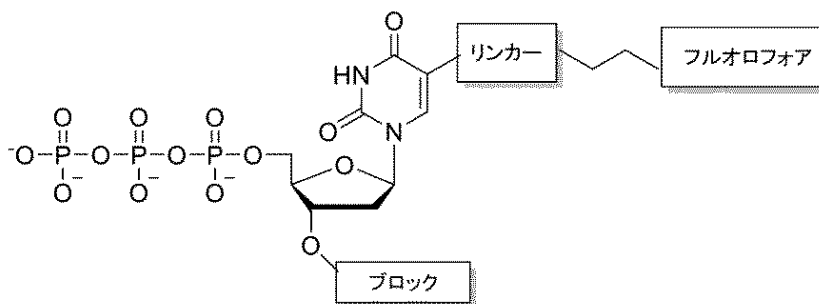
【0058】

蛍光は、任意の好適な方法によって検出することができる。例えば、既知の光学的蛍光検出方法を用いて表面上で蛍光を検出することができ、この場合、蛍光は、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドがテンプレートにハイブリダイズしたままである表面において励起され、そこから検出される。別の例では、ハイブリダイズした試験プライマーは、固定化プライマーから脱ハイブリダイズし、溶液中に溶出され得、蛍光は、表面上ではなく、当該溶出溶液中で検出される。開示される方法で使用するための一般にヌクレオチドに結合しているフルオロフォアを測定するための様々な既知の方法のいずれかを、表面上、溶液中、又はその他で用いてよい。

【0059】

検出は、蛍光分光法を含む任意の好適な方法によって又は他の光学手段によって実施することができる。蛍光標識はフルオロフォアであってもよく、これは、エネルギーの吸収後、規定の波長で放射線を放射する。多くの好適な蛍光標識が知られている。例えば、Welchら(Chem. Eur. J. 5(3):951-960, 1999)は、本発明で使用することができるダンシル官能化蛍光部分を開示している。Zhuら(Cytometry 28:206-211, 1997)は、蛍光標識Cy3及びCy5の使用について記載しており、これらも本開示の態様に従って使用することができる。使用に好適な標識は、Proberら(Science 238:336-341, 1987); Connell et al. (BioTechniques 5(4):342-384, 1987)、Ansoergeら(Nucl. Acids Res. 15(11):4593-4602, 1987)、及びSmithら(Nature 321:674, 1986)にも開示されている。他の市販の蛍光標識としては、フルオレセイン、ローダミン(TM R、テキサスレッド、及びRoxなど)、アレクサ、ボディパイ、アクリジン、クマリリン、ピレン、ベンズアントラセン、及びシアニンが挙げられるが、これらに限定されない。前述のいずれかの任意の好適な修飾を、本明細書に開示される方法に従って使用するために採用し、使用してもよい。蛍光ヌクレオチドは、例えば、このような結合を含んでもよい。市販の蛍光タグ付きヌクレオチドを、本開示に従って使用することができる。蛍光ヌクレオチドの非限定的な一般化した例は、以下のように示すことができる。

【化3】



実施例

【0060】

本明細書で使用するとき、用語「ヌクレオチド」は、天然ヌクレオチド、その類似体、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ジデオキシリボヌクレオチド、及びヌクレオチドとして知られている他の分子を含むことが意図される。この用語は、例えばDNA又はRNA鎖中に存在するサブユニットを同定するために、ポリマー中に存在するモノ

マー単位に言及するために使用され得る。この用語はまた、ポリマー中に必ずしも存在しない分子、例えば、ポリメラーゼによってテンプレート依存的にポリヌクレオチドに組み込まれ得る分子に言及するために使用することもできる。この用語は、例えば、5'炭素上に0、1、2、3個又はそれ以上のリン酸を有するヌクレオチド単位を指す場合もある。例えば、四リン酸ヌクレオチド、五リン酸ヌクレオチド、及び、六リン酸ヌクレオチドは、5'炭素上に6個を超えるリン酸、例えば7、8、9、10個又はそれ以上のリン酸を有するヌクレオチドであり得るため、特に有用であり得る。例示的な天然ヌクレオチドとしては、ATP、UTP、CTP、及びGTP(まとめてNTP)、並びにADP、UDP、CDP、及びGDP(まとめてNDP)、又はAMP、UMP、CMP、又はGMP(まとめてNMP)、又はdATP、dTTP、dCTP、及びdGTP(まとめてdNTP)、並びにdADP、dTDP、dCDP、及びdGDP(まとめてdNDP)、並びにdAMP、dTMP、dCMP、及びdGMP(dNMP)が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なヌクレオチドとしては、任意のNMP、dNMP、NDP、dNDP、NTP、dNTP、並びに他のNX P及びdNX P(式中、Xは2~10の数を表す)(まとめてNPP)をもれなく挙げるができる。

【0061】

本明細書でヌクレオチド類似体とも称される非天然ヌクレオチドとしては、天然生物系中に存在しないか又はその天然の環境、例えば、ポリメラーゼを発現する非組み換え細胞内においてポリメラーゼによってポリヌクレオチドに実質的に組み込まれないものが挙げられる。特に有用な非天然ヌクレオチドとしては、同じワトソン-クリック相補的塩基と塩基対をなす天然ヌクレオチドなどの別のヌクレオチドがポリメラーゼによって鎖に組み込まれる速度よりも実質的に速い又は遅い速度でポリメラーゼによってポリヌクレオチド鎖に組み込まれるものが挙げられる。例えば、非天然ヌクレオチドは、天然ヌクレオチドの取り込み速度と比較して、少なくとも2倍異なる、例えば、少なくとも5倍異なる、10倍異なる、25倍異なる、50倍異なる、100倍異なる、1000倍異なる、10000倍異なる速度、又はそれ以上異なる速度で組み込まれてよい。非天然ヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに組み込まれた後に更に伸長することができる。例としては、ヌクレオチド類似体を組み込んだポリヌクレオチドを更に伸長させることができるように除去することができる、3'位に可逆的ターミネーター部分を有する3'ヒドロキシル又はヌクレオチド類似体を有するヌクレオチド類似体が挙げられる。使用することができる可逆的ターミネーター部分の例は、例えば、米国特許第7,427,673号、同第7,414,116号、及び同第7,057,026号、並びに国際公開第91/06678号及び同第07/123744号に記載されている。いくつかの例では、3'ターミネーター部分を有する又は3'ヒドロキシルを有さないヌクレオチド類似体(ジデオキシリヌクレオチド類似体など)は、ヌクレオチド類似体を組み込んだポリヌクレオチドが更に伸長しない条件下で使用できることが理解されるであろう。いくつかの例では、ヌクレオチドは、可逆的ターミネーター部分を含んでいなくてもよく、又はヌクレオチドは、非可逆的ターミネーター部分を含まない、又はヌクレオチドはいかなるターミネーター部分も全く含まない。5'位に修飾を有するヌクレオチド類似体も有用である。

【0062】

「プライマー」は、DNA又はRNA合成の開始点として、又は固定化プライマーの場合、試験プライマーの伸長のためのテンプレートとして機能する一本鎖核酸配列(例えば、一本鎖DNA又は一本鎖RNA)として定義される。表面に固定するためのプライマーの5'末端は、表面上の官能化層又は官能化ポリマー層とのカップリング反応を可能にするように修飾されてもよい。プライマーの長さは、任意の数の塩基長であってよく、様々な非天然ヌクレオチドを含み得る。例では、プライマーは、20~40塩基又は10~20塩基の範囲の短鎖である。

【0063】

いくつかの例では、固定化プライマーは、表面若しくは基板、又は表面若しくは基板の官能化表面に直接結合し得る。他の例では、表面又は基板は、表面又は基板に結合したポ

10

20

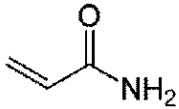
30

40

50

リマー、及びこのようなポリマーへの結合を介して表面又は基板に結合した固定化プライマーを付加することによって更に修飾されてもよい。このようなポリマーは、任意の順序又は構成で2つ以上の繰り返しモノマー単位を含むランダム、ブロック、直鎖、及び/又は分枝状コポリマーであってもよく、直鎖、架橋、若しくは分枝状、又はこれらの組み合わせであってもよい。例では、使用されるポリマーとしては、PAZAMとしても知られているポリ(N-(5-アジドアセトアミジルペンチル)アクリルアミド-コ-アクリルアミド)などの例を挙げることができる。例では、ポリマーはヘテロポリマーであってもよく、ヘテロポリマーは、

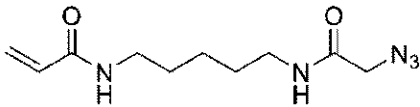
【化4】



10

又はその置換された類似体などのアクリルアミドモノマーを含んでもよい(「置換された」とは、指定の基における1つ以上の水素原子の別の原子又は基による置換を指す)。いくつかの例では、アクリルアミドモノマーは、アジドアセトアミドペンチルアクリルアミドモノマー

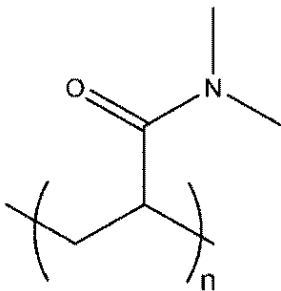
【化5】



20

を含んでもよい。いくつかの例では、アクリルアミドモノマーは、N,N-ジメチルアクリルアミド

【化6】



30

を含んでもよい(式中、x-yコポリマーを含む例では、nはyに対応し、x-y-zコポリマーを含む例では、nはzに対応する)。

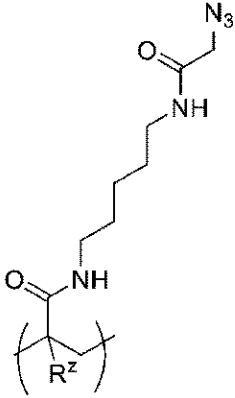
【0064】

例では、ポリマーはヘテロポリマーであり、アジド含有アクリルアミドモノマーを更に含んでもよい。いくつかの態様では、ヘテロポリマーは、

40

50

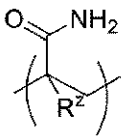
【化 7】



10

及び任意選択で

【化 8】



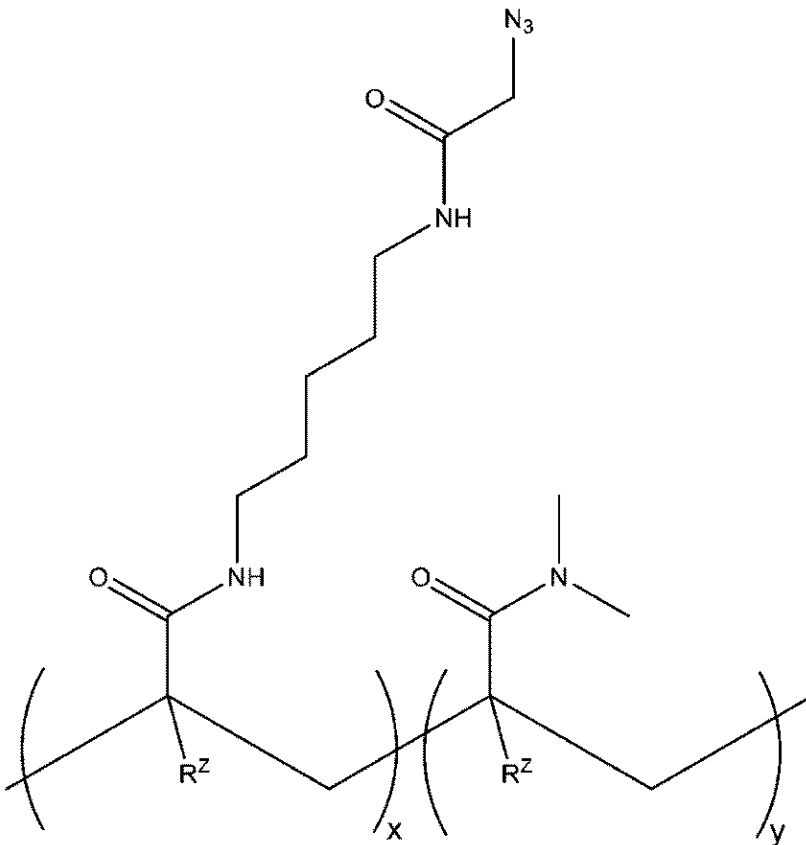
20

を含む。

【0065】

いくつかの態様では、ヘテロポリマーは、以下の構造：

【化 9】



30

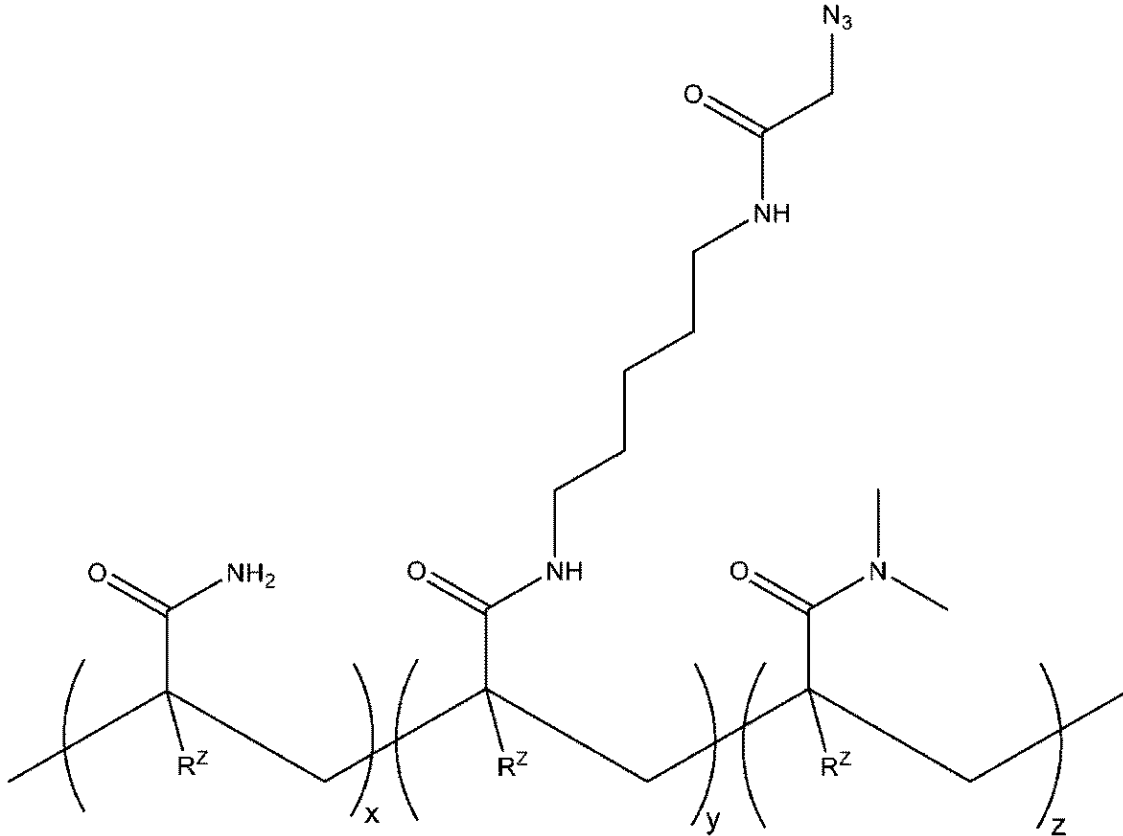
40

(式中、各 R^Z は、独立して、H又は $C_1 \sim 4$ アルキルである) を含み得、この構造は、本明細書では「 $x - y$ コポリマー」と称され得る。いくつかの例では、 $x : y$ の比は、約 $15 : 85 \sim$ 約 $1 : 99$ 、例えば、約 $10 : 90 \sim$ 約 $1 : 99$ 、例えば約 $10 : 90 \sim$ 約

50

5 : 99 であってよく、又は約 5 : 95 であってよい。他の態様では、ヘテロポリマーは、以下の構造：

【化 10】

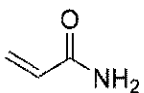


(式中、各 R^Z は、独立して、H 又は $C_1 \sim 4$ アルキルである) を含み得、この構造は、本明細書では「 $x - y - z$ コポリマー」と称され得る。いくつかの例では、 $(x : y) : z$ の比は、約 85 : 15 ~ 約 95 : 5 であってよく、又は約 90 : 10 であってよい ($x : (y : z)$ の比は、約 1 : (99) ~ 約 10 : (90) であってよく、又はそれぞれ約 5 : (95) であってよい)。いくつかの例では、 $x : y : z$ の比は、約 0 : 15 : 85 ~ 約 0 : 5 : 95 であってよい。例では、 $x : y$ は、5 : 95 である。別の例では、 $x : y : z$ の比は、5 : 85 : 10 である。これらの例では、「約」は、あるものの相対量が、列挙された比で記載された量と最大 5% 異なってもよいことを意味する。

【0066】

「ヘテロポリマー」は、少なくとも 2 つの異なる繰り返しサブユニット (モノマー) の大分子である。「アクリルアミドモノマー」は、構造

【化 11】



又はその置換された類似体 (例えば、メタクリルアミド又は N, N -ジメチルアクリルアミド) を有するモノマーである。アクリルアミド基及びアジド基を含むモノマーの例は、上に示すアジドアセトアミドペンチルアクリルアミドである。「アルキル」は、完全に飽和している (すなわち、二重結合も三重結合も含有しない) 直鎖又は分枝状炭化水素鎖を指す。例示的なアルキル基としては、メチル、エチル、ジメチルアクリルアミド、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、及び三級ブチルが挙げられる。例として、表記「 $C_1 \sim 4$ アルキル」は、アルキル鎖中に 1 ~ 4 個の炭素原子が存在すること、すなわち、アルキル鎖が、メチル、エチル、ジメチル、プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イ

ソブチル、sec-ブチル、及びt-ブチルからなる群から選択されることを示す。

【0067】

いくつかの例では、基板上のハイブリダイズ可能な固定化プライマーの量と、更に本明細書に開示される方法においてポリメラーゼがアクセス可能な固定化プライマーとを両方測定することが望ましい場合がある。このような方法の例を図8Aに簡単に示す。ここでは、その3'末端が、それが共有結合している表面から遠位に伸長している固定化プライマーが示されている。それにハイブリダイズする相補的な試験プライマーも示されている。この例では、濃い星印で示されたあるフルオロフォアが、試験プライマーの5'プロム末端に示されており、別のフルオロフォアは、より薄い星印として、試験プライマーの3'プロム末端に示されている。この例では、試験プライマーは、インキュベーション及びハイブリダイゼーション中に表面に付加されたとき、5'フルオロフォアを保有していた。その時点で、この方法は、ハイブリダイゼーションアクセス可能な固定化プライマーを測定するための従来の方法に類似している。その5'末端に既に結合しているフルオロフォアを有するこのような試験プライマーと共にインキュベートした後に表面から放出された蛍光を測定することにより、ハイブリダイゼーションアクセス可能な固定化プライマーを決定することができる。

10

【0068】

しかしながら、更にこの例では、試験プライマー-固定化プライマー対は、更に、結合しているフルオロフォアを有するポリメラーゼ及びヌクレオチドと共に更にインキュベートされ、蛍光タグ付きヌクレオチドは、上記のとおり、テンプレートとして固定化プライマーを使用して、ポリメラーゼによって試験プライマーの3'末端に結合可能である。結果は、図8Aに示される試験プライマー-固定化プライマー対 (immobilized primed pair) である。そこには、最初に結合した5'フルオロフォア、並びにポリメラーゼによってそれに結合した3'フルオロフォアを有する試験プライマーが示されている。第1のフルオロフォアの量を測定することにより、表面上に存在するハイブリダイゼーションアクセス可能な固定化プライマーの量を求めることができる。しかし、(上記の例に従って)存在する最も3'側のヌクレオチドに結合したフルオロフォアの量を測定する、ポリメラーゼがアクセス可能な固定化プライマーの量を求めることができる。この例に従ってあるアッセイにおいて両方の測定値を組み合わせることにより、より効率的により多くの情報を得ることができる。この例では、ポリメラーゼによって付加される5'フルオロフォア及び3'フルオロフォアは、互いに検出可能に異なる。

20

30

【0069】

上記の例としては、固定化プライマーが共有結合的に修飾されない方法の例が挙げられる。このような例は、例えば、固定化プライマーを有する基板が、本明細書に開示される方法によるアッセイが完了した後に使用されることが意図されており、固定化プライマーに対する共有結合修飾がないことが望まれる特定の使用のためのものであり得る。しかしながら、他の例では、本明細書に開示される方法は、固定化プライマーの共有結合修飾を含んでいてもよい。このような3つの例を図8B及び8Cに示す。図8Bでは、5'突出を有する試験プライマーが示されており、これは、上記の開示による3'末端における試験プライマーだけではなく、表面の遠位にある固定化プライマーの3'末端の伸長のためのテンプレートとしても機能し得る。このような例では、試験プライマー及び固定化プライマーは、検出可能に異なるヌクレオチドがそれぞれの3'末端に組み込まれ得るように設計されてもよい。

40

【0070】

図8Cに示すものなどの別の例では、試験プライマーの5'末端は、蛍光標識ヌクレオチドを含んでもよい。このような蛍光標識ヌクレオチドは、固定化プライマーを突出させることができ、それによって、その伸長のためのテンプレートとして機能する。この例では、試験プライマーの5'末端に結合したフルオロフォアと、テンプレートとして試験プライマーの5'突出を使用して固定化プライマーの3'末端に付加されたヌクレオチドに結合したフルオロフォアとは、互いに検出可能に異なる。いくつかの例では、これらの2つのフ

50

フルオロフォアの互いに対する近接は、蛍光出力に影響を及ぼし得る。例えば、蛍光消光によれば、フルオロフォアは、テンプレートとして試験プライマーを使用して固定化プライマーの3'末端に標識ヌクレオチドを付加するときに生じ得るように、フルオロフォアがこのように互いに近接しているとき、対のいずれか又は両方からの発光が消光によって鈍化するように選択されてもよい。

【0071】

このような状況下では、例えば、3'側に付加された蛍光ヌクレオチドが、試験プライマーの5'側に結合したフルオロフォアからの蛍光発光を消光する場合、5'試験プライマーフルオロフォアから放出される蛍光の減少は、ポリメラーゼなどによって、固定化プライマーの3'末端にヌクレオチドが付加されたという指標として解釈され得る。あるいは、試験プライマーの脱ハイブリダイゼーション時の固定化プライマーからの蛍光発光の増加の測定は、ポリメラーゼが固定化プライマーの3'末端への蛍光ヌクレオチドの付加を触媒したことを示し得る。あるいは、この例のフルオロフォアは、蛍光共鳴エネルギー移動を受けるように選択されてもよく、その結果、ポリメラーゼが固定化プライマーの3'末端への蛍光タグ付きヌクレオチドの付加を触媒するとき起こり得るように、このように互いに近接しているときに他方による蛍光を刺激するように、一方が他方に対する供与体として機能する。その場合、フルオロフォア間の蛍光共鳴エネルギー移動の発生の放出特性の検出は、ポリメラーゼによって固定化プライマーの3'末端にヌクレオチドが付加されたことを示し得る。あるいは、試験プライマーの脱ハイブリダイゼーション時のこのような放出の減少は、ポリメラーゼによって固定化プライマーにヌクレオチドが付加されたことを示し得る。一對の蛍光ヌクレオチドによって放出された複合蛍光を検出することを含む蛍光試験プライマーの量の検出の例としては、検出が消光又は蛍光共鳴エネルギー移動の検出を含む場合のこのような例が挙げられる。

【0072】

前述の実施例の他の変形、組み合わせ、又は改変もまた、本開示の範囲内である。前述の実施例は、本開示の例を例示することを意図したものであるが、決してその範囲を限定することを意図するものではない。本明細書で詳細に例を図示及び説明してきたが、様々な改変、追加、置換などを本開示の趣旨から逸脱することなく行うことができ、したがって、これらは本開示の範囲内であると考えられることは、当業者には明らかであろう。

本開示は、例えば、以下に関する。

[1]

方法であって、

試験プライマーを固定化プライマーにハイブリダイズさせることであって、前記固定化プライマーが、所定のヌクレオチド配列を含み、かつその5'末端を介して基板に結合し、個々の試験プライマーが、前記固定化プライマーのうちの少なくともいくつかの一部分に対して相補的であり、1つ以下の試験プライマー分子が、固定化プライマー分子にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、

1つのヌクレオチドを使用して、前記試験プライマーのうちの少なくともいくつかをテンプレートに従ってポリメラーゼを用いて伸長させることであって、前記テンプレートが、前記試験プライマーのうちの前記少なくともいくつかにハイブリダイズする固定化プライマーを含み、前記伸長により前記試験プライマーのうちの前記少なくともいくつかに組み込まれたヌクレオチドが、複数の蛍光タグのうちの1つを含む、伸長させることと、
蛍光試験プライマーの量を検出することと、を含む方法。

[2]

第1の複数の前記固定化プライマーのヌクレオチド配列が、第2の複数の前記固定化プライマーのヌクレオチド配列とは異なる、請求項1に記載の方法。

[3]

第1の複数の前記試験プライマーが、前記第1の複数の固定化プライマーの一部分に対して相補的であり、第2の複数の前記試験プライマーが、前記第2の複数の固定化プライマーの一部分に対して相補的である、請求項2に記載の方法。

10

20

30

40

50

[4]

前記第 1 の複数の前記試験プライマーに組み込まれた第 1 のヌクレオチドが、複数の蛍光タグのうちの第 1 のものを含み、前記第 2 の複数の前記試験プライマーに組み込まれた第 2 のヌクレオチドが、前記複数の蛍光タグのうちの第 2 のものを含み、また、前記複数の蛍光タグのうちの前記第 1 のものによって放出される蛍光が、前記複数の蛍光タグのうちの前記第 2 のものによって放出される蛍光とは異なる、請求項 3 に記載の方法。

[5]

前記基板が、金属酸化物を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

[6]

前記基板が、金属酸化物を含み、前記金属酸化物が、二酸化ケイ素、石英ガラス、五酸化タンタル、二酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化ハフニウム、及びグラフェンオキシドからなる群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

[7]

前記基板が、ポリマーを更に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

[8]

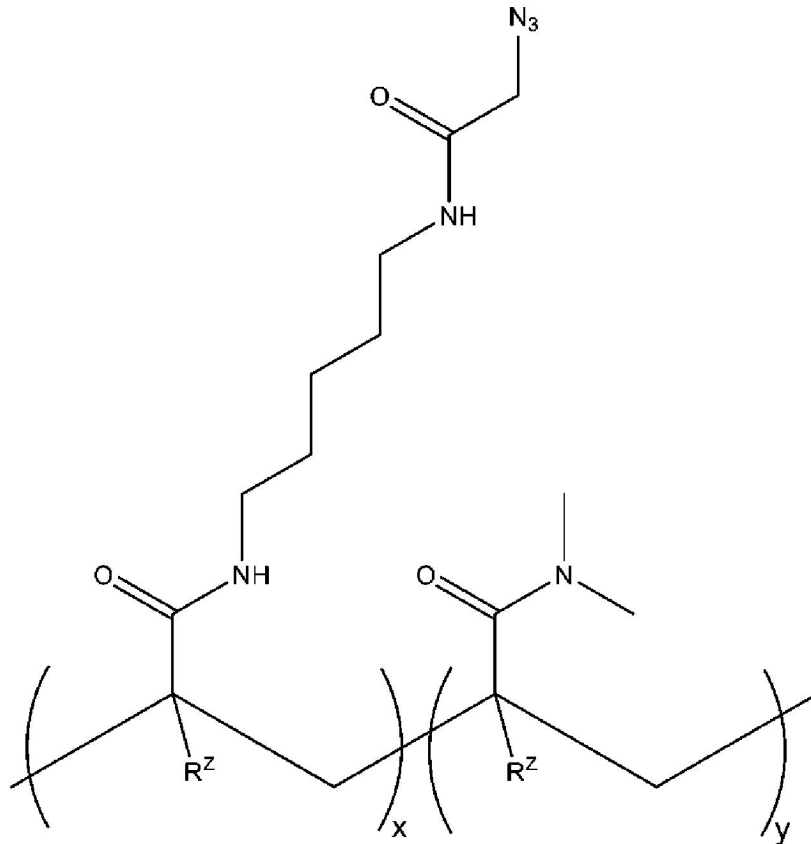
前記固定化プライマーのうちの少なくともいくつかは、前記ポリマーに結合する、請求項 7 に記載の方法。

[9]

前記ポリマーが、

【化 1】

20



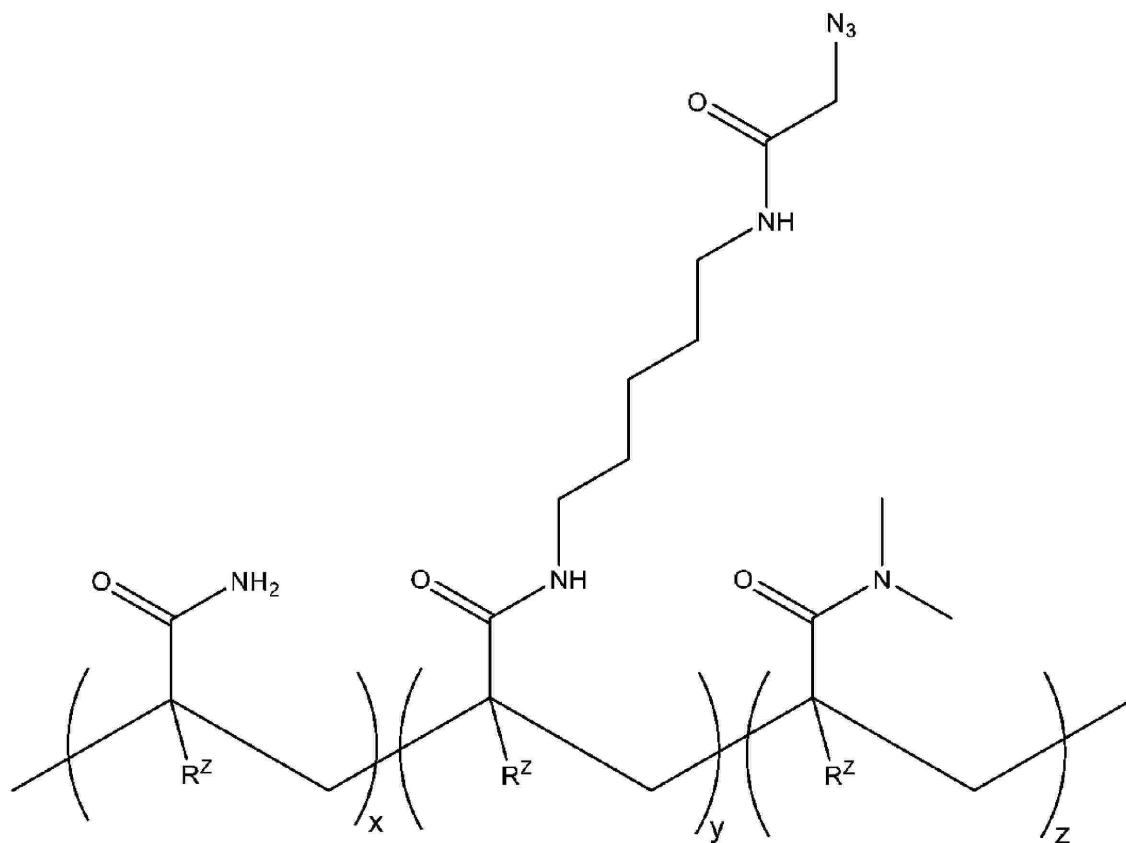
30

40

(式中、x 及び y は、モノマーの数を表す整数であり、x : y の比は、約 5 : 85 ~ 約 1 : 99 であってよい)、及び

50

【化 2】



(式中、 x 、 y 、及び z は、モノマーの数を表す整数であり、 $(x : y) : z$ の比は、約 $(85) : 15 \sim$ 約 $(95) : 5$ であってよく、各 R^Z は、独立して、H又は C_{1-4} アルキルである)

から選択されるヘテロポリマーである、請求項8に記載の方法。

[1 0]

前記ヘテロポリマーが、

10

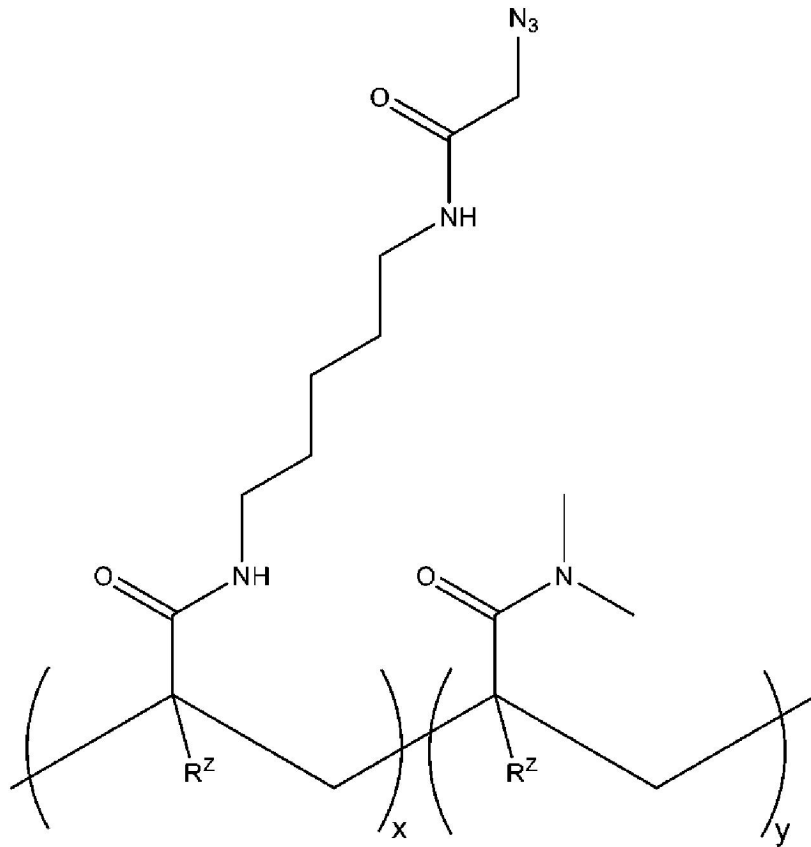
20

30

40

50

【化3】



(式中、x : y の比は、約 10 : 90 である)
を含む、請求項 9 に記載の方法。

[1 1]

前記ヘテロポリマーが、

10

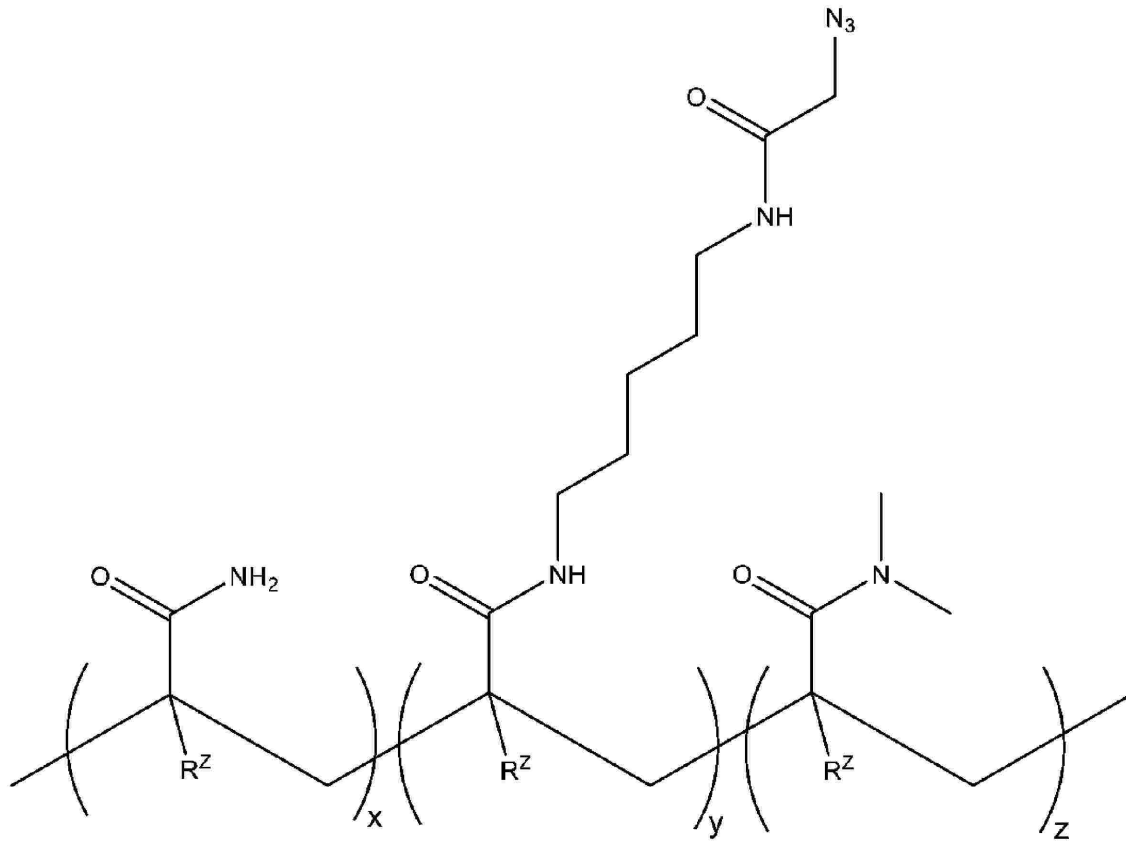
20

30

40

50

【化 4】



10

20

(式中、 $x : y : z$ の比は、約 $5 : 85 : 10$ である)

を含む、請求項 9 に記載の方法。

[1 2]

前記ポリメラーゼが、クレノー断片及び P h i 2 9 ポリメラーゼから選択される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

[1 3]

前記ポリメラーゼが、前記基板に結合する、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

[1 4]

前記ポリメラーゼが、前記基板に結合しない、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

[1 5]

前記ポリメラーゼが、クレノー断片及び P h i 2 9 ポリメラーゼから選択される、請求項 7 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

[1 6]

前記ポリメラーゼが、前記ポリマーに結合する、請求項 1 5 に記載の方法。

40

[1 7]

前記ポリメラーゼが、前記ポリマーに結合しない、請求項 1 5 に記載の方法。

[1 8]

前記検出が、試験プライマーから放出された蛍光を測定することを含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

[1 9]

試験プライマーが、前記測定中に固定化プライマーにハイブリダイズする、請求項 1 8 に記載の方法。

[2 0]

前記測定前に前記固定化プライマーから前記試験プライマーを脱ハイブリダイズするこ

50

とを更に含む、請求項 18 に記載の方法。

[21]

前記検出が、刺激に应答して前記試験プライマーから放出される蛍光を測定することを
含む、請求項 4 に記載の方法。

[22]

試験プライマーが、前記測定中に固定化プライマーにハイブリダイズする、請求項 21
に記載の方法。

[23]

前記測定前に前記固定化プライマーから前記試験プライマーを脱ハイブリダイズするこ
とを更に含む、請求項 21 に記載の方法。

[24]

前記複数の蛍光タグのうちの前記第 1 のものの検出された量を、前記複数の蛍光タグの
うちの前記第 2 のものの検出された量と比較することを更に含む、請求項 21 ~ 23 のい
ずれか一項に記載の方法。

[25]

前記試験プライマーのうちの少なくともいくつかの 5' 末端が、前記固定化プライマーの
3' 末端に突出しない、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

[26]

前記試験プライマーのうちの少なくともいくつかの 5' 末端が、5' 蛍光タグスペクトルを
有する 5' 蛍光タグを含み、前記 5' 蛍光スペクトルが、前記伸長により前記試験プライマ
ーに組み込まれた前記ヌクレオチドの前記蛍光タグの前記蛍光スペクトルとは異なり、検
出が、5' 蛍光タグの量及びヌクレオチド蛍光タグの量の検出を含む、請求項 1 ~ 24 のい
ずれか一項に記載の方法。

[27]

請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法であって、前記試験プライマーのうちの少
なくともいくつかは、突出固定化プライマーに対して相補的な突出試験プライマーを含み
、前記突出試験プライマーの 5' 末端が、前記伸長前にそれにハイブリダイズするとき、前
記突出固定化プライマーの 3' 末端に突出し、更に、

1つのヌクレオチドを使用して、突出固定化プライマーを伸長させることであって、前
記伸長により突出固定化プライマーに組み込まれるヌクレオチドが、前記伸長により前記
突出試験プライマーに組み込まれる複数の蛍光タグのうちの前記 1つの発光スペクトルと
は検出可能に異なる発光スペクトルを有する突出蛍光タグを含む、伸長させることと、
蛍光固定化プライマーの量を検出することと、

蛍光試験プライマーの量を蛍光固定化プライマーの量と比較することと、を含む方法。

[28]

請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法であって、前記試験プライマーのうちの少
なくともいくつかは、突出固定化プライマーに対して相補的な突出試験プライマーを含み
、前記突出試験プライマーの 5' 末端が、前記伸長前にそれにハイブリダイズするとき、前
記突出固定化プライマーの 3' 末端に突出し、かつ試験プライマー 5' 蛍光タグを含み、更
に、

1つのヌクレオチドを使用して、突出固定化プライマーを伸長させることを含み、前記
伸長により突出固定化プライマーに組み込まれるヌクレオチドが、突出蛍光タグを含み、
前記試験プライマー 5' 蛍光タグ及び前記突出蛍光タグは、前記突出固定化プライマーの前
記伸長後に前記突出試験プライマーが突出固定化プライマーにハイブリダイズするとき、
蛍光タグ対を含み、そして、前記蛍光タグ対によって放出される複合蛍光が、前記試験プ
ライマー 5' 蛍光タグから放出される蛍光及び前記突出蛍光タグから放出される蛍光とは異
なる、方法。

[29]

蛍光試験プライマーの量の検出が、前記蛍光タグ対によって放出される複合蛍光の検出
を含む、請求項 28 に記載の方法。

10

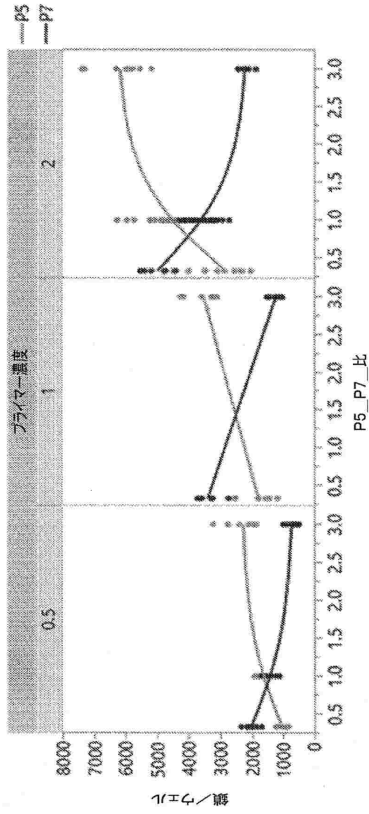
20

30

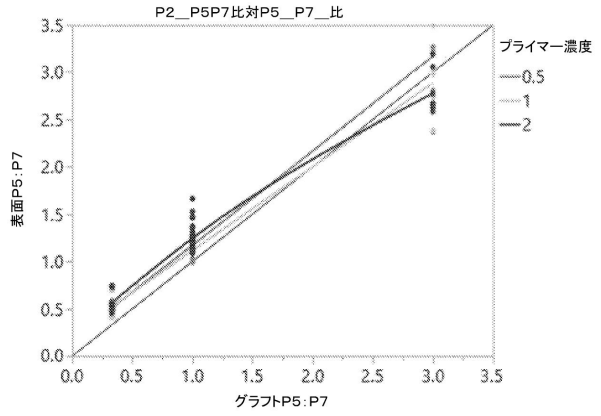
40

50

【 図 5 】



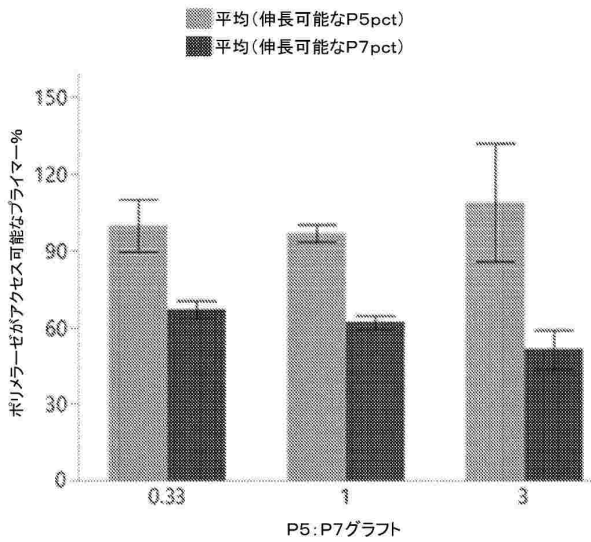
【 図 6 】



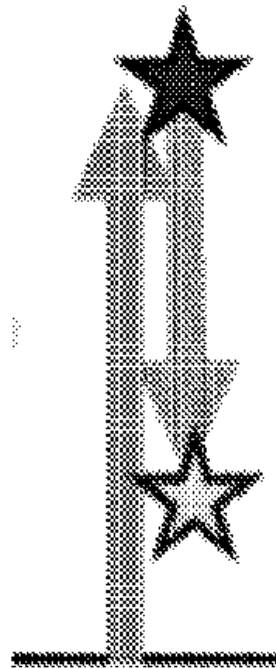
10

20

【 図 7 】



【 図 8 A 】



30

40

FIG. 8A

50

【 図 8 B 】



FIG. 8B

【 図 8 C 】

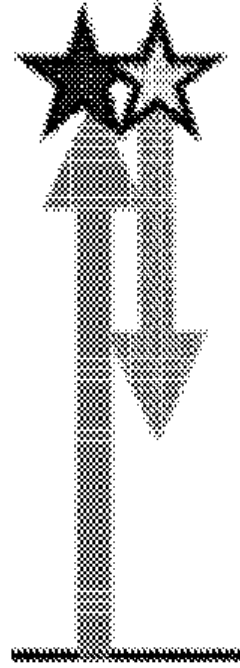


FIG. 8C

10

20

【 配列表 】

0007628078000001.app

30

40

50

フロントページの続き

ア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5200

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 特開 2009 - 124957 (JP, A)

特表 2004 - 523243 (JP, A)

特表 2017 - 533710 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q、C12N

CAplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)