

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載
【部門区分】第 1 部門第 1 区分
【発行日】令和 5 年 2 月 15 日(2023.2.15)

【国際公開番号】WO2020/167656
【公表番号】特表 2022-519324(P2022-519324A)
【公表日】令和 4 年 3 月 22 日(2022.3.22)
【年通号数】公開公報(特許)2022-050
【出願番号】特願 2021-546249(P2021-546249)
【国際特許分類】

10

C 1 2 Q 1/6874(2018.01)
C 1 2 Q 1/6851(2018.01)
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)
C 1 2 M 1/00(2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6874 Z
C 1 2 Q 1/6851 Z
C 1 2 Q 1/6876 Z
C 1 2 M 1/00 A

20

【手続補正書】
【提出日】令和 5 年 2 月 7 日(2023.2.7)
【手続補正 1】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項 1】

核酸処理のための方法であって、

30

(a) 複数のパーティションを与えるステップであって、前記複数のパーティションのうちの 1 つのパーティションが、(i) 複数のビーズのうちの、第 1 のビーズ及び第 2 のビーズを含む少なくとも 2 つのビーズであって、前記第 1 のビーズが第 1 のプライマーを含み、前記第 2 のビーズが第 2 のプライマーを含み、前記第 1 のプライマーと第 2 のプライマーが異なる配列を含む少なくとも 2 つのビーズ、(ii) 複数の核酸分子のうちの、第 1 の核酸分子及び第 2 の核酸分子を含む少なくとも 2 つの核酸分子であって、前記第 1 の核酸分子と第 2 の核酸分子が異なる核酸配列を含み、前記第 1 の核酸分子が第 1 のアダプターを含み、前記第 2 の核酸分子が第 2 のアダプターを含み、前記第 1 のアダプターと第 2 のアダプターが異なる配列を有し、前記第 1 のプライマーは、前記第 1 のアダプターに対して配列相補性を有し、前記第 2 のプライマーは、前記第 2 のアダプターに対して配列相補性を有する、少なくとも 2 つの核酸分子、及び、(iii) 1 つ以上の試薬を含む、ステップと、

40

(b) 前記第 1 のプライマーが前記第 1 のアダプターとハイブリダイズし、前記第 2 のプライマーが前記第 2 のアダプターとハイブリダイズする前記パーティションにおいて、(i) 前記第 1 の核酸分子及び前記 1 つ以上の試薬を使用して、前記第 1 の核酸分子の 1 つ以上の増幅産物を生成するステップであって、前記 1 つ以上の増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが、前記第 1 のビーズに付着されるステップ、及び(ii) 前記第 2 の核酸分子及び前記 1 つ以上の試薬を使用して、前記第 2 の核酸分子の 1 つ以上の増幅産物を生成するステップであって、前記 1 つ以上の増幅産物の少なくとも 1 つのサブセットが、前記第 2 のビーズに付着されるステップと、

50

(c) 前記パーティションから前記第 1 のビーズと第 2 のビーズを回収するステップと

(d) (i) 前記第 1 のビーズに付着される 1 つ以上の第 1 の増幅産物のうちの 1 つの増幅産物をアッセイして、前記第 1 の核酸分子の配列を同定するステップ、及び (i i) 前記第 2 のビーズに付着される 1 つ以上の第 2 の増幅産物のうちの 1 つの増幅産物をアッセイして、前記第 2 の核酸分子の配列を同定するステップと、

を含む方法。

【請求項 2】

(a) は、(i) 前記複数の核酸分子を含む第 1 の溶液、及び、(i i) 前記複数のビーズを含む第 2 の溶液を、前記第 1 の溶液及び前記第 2 の溶液と混和しない流体と接触させて、前記複数のパーティションを生成するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記第 1 のビーズには、前記第 1 の核酸分子を使用して 1 つ以上の増幅反応を行なうための前記第 1 のプライマーを含む複数のプライマー分子が付着しており、(b) は、前記第 1 のプライマーを含む前記複数のプライマー分子のうちのプライマー分子を使用して、前記 1 つ以上の増幅反応を行なって、前記第 1 のビーズに付着した 1 つ以上の増幅産物のうちの少なくとも前記サブセットを生成するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記複数のパーティションの少なくとも 80 % のそれぞれが、前記複数のビーズのうちの 2 つ以上のビーズを含む、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記複数のパーティションの少なくとも 80 % のそれぞれが、前記複数のビーズのうちの 3 つ以上のビーズを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

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

【請求項 7】

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

【請求項 8】

前記プライミング配列を含む前記核酸分子がバーコード配列を更に含む、請求項 6 に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記 1 つ以上の試薬が 1 つ以上の重合酵素を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記第 1 のプライマーは前記第 2 のアダプターと配列相補性を有しなく、前記第 2 のプライマーは前記第 1 のアダプターと配列相補性を有しない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複数のパーティションが複数の液滴である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

(d) は、前記第 1 のビーズに付着した前記 1 つ以上の第 1 の増幅産物の少なくとも前記サブセットの前記第 1 の増幅産物、及び前記第 2 のビーズに付着した前記 1 つ以上の第 2 の増幅産物の少なくとも前記サブセットの前記第 2 の増幅産物を配列決定するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 13】

(a) において、前記第 1 のビーズが、前記第 1 のビーズに付着した前記第 1 のプライマーを含む複数の第 1 のプライマーを含み、前記第 2 のビーズが、前記第 2 のビーズに付着した前記第 2 のプライマーを含む複数の第 2 のプライマーを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 (b) が、

(1) 前記第 1 の複数のプライマーの前記第 1 のプライマーに対して第 1 の配列相補性を有する前記第 1 の核酸分子の第 1 の伸長産物を生成し、前記第 1 の伸長産物を前記第 1 のビーズ上の前記第 1 のプライマーに結合させ、前記第 1 のプライマーを伸長して前記第 1 のビーズに付着した前記 1 つ以上の第 1 の増幅産物の前記少なくとも前記サブセットの前記第 1 の増幅産物を生成するステップ、及び

(2) 前記第 2 の複数のプライマーの前記第 2 のプライマーに対して第 2 の配列相補性を有する前記第 2 の核酸分子の第 2 の伸長産物を生成し、前記第 2 の伸長産物を前記第 2 のビーズ上の前記第 2 のプライマーに結合させ、前記第 2 のプライマーを伸長して前記第 2 のビーズに付着した前記 1 つ以上の第 2 の増幅産物の前記少なくとも前記サブセットの前記第 2 の増幅産物を生成するステップ

を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記複数の核酸分子が単離された核酸分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記複数のパーティションを生成することをさらに含み、前記複数のパーティションの少なくとも 5 0 % のそれぞれが、少なくとも 1 つのビーズおよび少なくとも 1 つの核酸テンプレートを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記複数のパーティションを生成することをさらに含み、前記複数のパーティションの少なくとも 8 0 % のそれぞれが、少なくとも 1 つのビーズおよび少なくとも 1 つの核酸テンプレートを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記 (c) 以降において、前記第 1 のビーズはモノクロールであり、前記第 2 のビーズはモノクロールである、請求項 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【0 3 7 9】

本発明の好ましい実施形態について図示して本明細書中で説明してきたが、当業者に明らかかなように、そのような実施形態は単なる一例として与えられる。本発明が、明細書中で提供される特定の例によって限定されることは意図されていない。前述の明細書を参照して本発明を説明してきたが、本明細書の実施形態の説明及び例示は、限定的な意味で解釈されることを意図していない。この時点では、本発明から逸脱することなく、数多くの変形、変更、及び、置換が当業者に想起される。更に、本発明の全ての態様は、様々な条件及び変数に依存する、本明細書中に記載された特定の描写、形態、又は、相対的比率に限定されないことが理解されるものとする。本明細書に記載された本発明の実施形態に対する様々な代替案が、本発明を実施する際に使用されてもよいことが理解されるべきである。したがって、本発明は、そのような代替、修正、変形、又は同等物もカバーするものとするのが企図されている。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法及び構造並びにそれらの均等物がそれによってカバーされることが意図されている。

40

本発明は一態様において、以下を提供する。

[項目 1]

核酸処理のための方法であって、

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

50

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

（c）前記パーティションから前記ビーズを回収するステップと、

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

[項目 2]

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

10

[項目 3]

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

[項目 4]

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

20

[項目 5]

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

[項目 6]

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

30

[項目 7]

（d）は、前記１つ以上の増幅産物又はその誘導体の配列と会合されるペアエンド配列決定リードを生成するステップを含む、項目 6 に記載の方法。

[項目 8]

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

40

[項目 9]

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

（f）前記パーティションから前記更なるビーズを回収するステップと、

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

を更に含む項目 8 に記載の方法。

50

[項目 1 0]

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

[項目 1 1]

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

[項目 1 2]

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

[項目 1 3]

前記少なくとも 2 つのビーズは、化学リンカー及びスプリントオリゴヌクレオチドの少なくとも一方を介して互いに付着される、項目 1 2 に記載の方法。

[項目 1 4]

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

[項目 1 5]

分離する前記ステップは、それぞれが少なくとも 2 つのビーズを含む前記パーティション又はそれぞれが多くとも 1 つのビーズを含む前記他のパーティションを光学的に検出するステップと、光学的に検出する前記ステップに少なくとも基づき、流体装置内の流体の流れの方向を調整して、前記流体装置の第 1 のチャンネル内に少なくとも 2 つのビーズをそれぞれが含む前記パーティションと、前記流体装置の第 2 のチャンネル内に多くとも 1 つのビーズをそれぞれが含む前記他のパーティションとを与えるステップとを含む、項目 1 4 に記載の方法。

[項目 1 6]

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

[項目 1 7]

前記プライミング配列を含む前記核酸分子が固有分子識別子配列を更に含む、項目 1 6 に記載の方法。

[項目 1 8]

前記プライミング配列を含む前記核酸分子がバーコード配列を更に含む、項目 1 6 に記載の方法。

[項目 1 9]

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

[項目 2 0]

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

[項目 2 1]

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

[項目 2 2]

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

[項目 2 3]

核酸処理のための方法であって、

(a) 複数のパーティションを与えるステップであって、前記複数のパーティションのうちの 1 つのパーティションが、(i) 複数のビーズのうちの少なくとも 2 つのビーズで

10

20

30

40

50

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

[項目 2 4]

(c) 前記パーティションから前記ビーズを回収するステップと、
(d) 前記ビーズに付着される前記1つ以上の増幅産物のうちの1つの増幅産物又はそ
の誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップと、
を更に含む項目 2 3 に記載の方法。

10

[項目 2 5]

(a) は、(i) 前記核酸分子を含む複数の核酸分子を含む第1の溶液、及び、(i i)
前記少なくとも2つのビーズを含む前記複数のビーズを含む第2の溶液を、前記第1の
溶液及び前記第2の溶液と混和しない流体と接触させて、前記複数のパーティションを生
成するステップを含む、項目 2 3 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 6]

前記ビーズには、前記核酸分子を使用して1つ以上の増幅反応を行なうための複数のプ
ライマー分子が付着されてしまっており、(b) は、前記複数のプライマー分子のうちの
プライマー分子を使用して、前記1つ以上の増幅反応を行なって、前記1つ以上の増幅産
物のうちの前記増幅産物を生成するステップを含む、項目 2 4 又は 2 5 に記載の方法。

20

[項目 2 7]

前記ビーズには、前記核酸分子を使用して1つ以上の更なる増幅反応を行なうための複
数の更なるプライマー分子が付着してしまっており、前記複数の更なるプライマー分子が
前記複数のプライマー分子とは異なり、(b) は、前記複数の更なるプライマー分子のう
ちの更なるプライマー分子を使用して、前記1つ以上の更なる増幅反応を行なって、前記
1つ以上の増幅産物のうちの更なる増幅産物を生成するステップであって、前記更なる増
幅産物の少なくとも1つのサブセットが前記ビーズに付着される、ステップを更に含み、
(d) は、前記ビーズに付着される前記更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイして前
記核酸分子の配列を同定するステップを更に含む、項目 2 6 に記載の方法。

30

[項目 2 8]

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

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

40

(f) 前記パーティションから前記更なるビーズを回収するステップと、
(g) 前記更なるビーズに付着される前記更なる増幅産物又はその誘導体をアッセイし
て、前記核酸分子の配列を同定するステップと、
を更に含む項目 2 6 に記載の方法。

[項目 2 9]

核酸分子を処理するための方法であって、
(a) (i) 複数の第1のプライマーが固定化されて成る表面であって、前記複数の第
1のプライマーが第1の配列に対して配列同一性を有する表面と、(i i) 前記核酸分子
であって、前記核酸分子が前記第1の配列の相補体とは異なる末端配列を含む、前記核酸
分子と、(i i i) 第1の部分及び第2の部分を含む第2のプライマーであって、前記第

50

1の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第2の部分が伸長配列を含み、前記伸長配列又はその相補体が前記第1の配列とハイブリダイズするように構成される、第2のプライマーと、を含む反応混合物を与えるステップと、

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

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

を含む方法。

[項目30]

前記第2のプライマーが前記表面に固定化される、項目29に記載の方法。

10

[項目31]

前記核酸分子は、(b)の前に前記複数の第1のプライマーとハイブリダイズしない、項目29から30のいずれか一項に記載の方法。

[項目32]

前記表面が増幅部位のアレイを含み、増幅部位の前記アレイは、それに固定化される第1のプライマーの複数のセットを含み、第1のプライマーの前記複数のセットが前記第1の配列に対して配列同一性を有する、項目29から31のいずれか一項に記載の方法。

[項目33]

前記核酸分子は、前記反応混合物中の増幅部位の前記アレイに流体アクセスできる、項目32のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目34]

前記表面がビーズである、項目29から33のいずれか一項に記載の方法。

[項目35]

前記反応混合物がエマルジョンのある量の分散相中に与えられる、項目29から34のいずれか一項に記載の方法。

[項目36]

前記エマルジョンは、第2の表面を含む第2の反応混合物を含む第2の量の前記分散相を含む、項目35のいずれか一項に記載の方法。

[項目37]

(b)及び(c)が前記反応混合物中で行なわれる、項目29から36のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目38]

前記反応混合物が複数の核酸分子を含み、前記複数の核酸分子が異なる核酸配列を含む核酸分子を含み、前記複数の核酸分子のそれぞれは、前記伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するべく前記第2のプライマーに結合するように構成される、項目29から37のいずれか一項に記載の方法。

[項目39]

複数の反応混合物を含む複数のパーティションを与えるステップを更に含み、前記複数のパーティションは、(i)前記核酸分子を含む複数の核酸分子と、(ii)前記表面を含む複数の表面とを含み、前記複数のパーティションのうちの第1のパーティションが前記反応混合物を含み、前記複数のパーティションのうちの第2のパーティションは、前記複数の核酸分子のうちの第2の核酸分子と前記複数の表面のうちの第2の表面とを含む、項目29から38のいずれか一項に記載の方法。

40

[項目40]

前記複数の核酸分子は、前記複数のパーティション間において、前記複数のパーティションにおける1パーティション当たり平均1核酸分子よりも大きい密度で分布される、項目39のいずれか一項に記載の方法。

[項目41]

前記反応混合物が第3の核酸分子及び更なる第2のプライマーを含み、前記第3の核酸分子が前記更なる第2のプライマーに結合する前に、前記核酸分子又はその誘導体が前記

50

複数の第 1 のプライマーの少なくとも 99 % に結合される、項目 29 から 40 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 2]

(c) は、(b) の速度よりも少なくとも 10 倍速い速度で行なわれる、項目 29 から 41 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 3]

前記第 2 のプライマーは、(c) の速度に対して (b) の速度を制限する所定の濃度を前記反応混合物において有する、項目 29 から 42 のいずれか一項に記載の方法。[項目 4 4]

前記反応混合物は、前記表面に固定化されない更なる第 1 のプライマーを更に含み、前記更なる第 1 のプライマーが前記第 1 の配列に対して配列同一性を有する、項目 29 から 43 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 4 5]

前記反応混合物は、前記第 1 のプライマー又は前記第 2 のプライマーとのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 反応で使用されるときに前記核酸分子を指数関数的に増幅するように構成される複数の第 3 のプライマーを更に含む、項目 29 から 44 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 6]

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

20

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

(e) 前記複数の第 3 のプライマーを用いて前記第 2 の伸長産物を増幅するステップと、を更に含む、項目 45 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 7]

(b) 又は (c) が等温条件下で行なわれる、項目 29 から 46 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 8]

前記表面を回収するとともに、前記核酸分子の増幅産物又はその誘導体をアッセイして、前記核酸分子の配列を同定するステップを更に含む、項目 29 から 47 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 4 9]

前記核酸分子は、前記核酸分子の 5' 末端に付着される第 1 のアダプターと、前記核酸分子の 3' 末端に付着される第 2 のアダプターとを含む、項目 29 から 48 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 5 0]

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

40

[項目 5 1]

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

[項目 5 2]

核酸分子を処理するためのシステムであって、(i) 複数の第 1 のプライマーが固定化されて成る表面であって、前記複数の第 1 のプライマーが第 1 の配列に対して配列同一性を有する表面と、(i i) 前記核酸分子であって、前記核酸分子が前記第 1 の配列の相補体とは異なる末端配列を含む、前記核酸分子と、(i i i) 第 1 の部分及び第 2 の部分を含む第 2 のプライマーであって、前記第 1 の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第 2 の部分が伸長配列を含み、前記伸長配列又はその相補体が前記第 1 の配

50

列とハイブリダイズするように構成される、第 2 のプライマーと、(i v) 前記核酸分子を使用して核酸伸長反応を行なうように構成される試薬とを含む反応混合物を含む、システム。

[項目 5 3]

前記第 2 のプライマーは、前記核酸分子に結合して、前記伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するように構成される、項目 5 2 に記載のシステム。

[項目 5 4]

前記反応混合物は、第 2 の核酸分子及び更なる第 2 のプライマーを含み、前記核酸分子又はその誘導体は、前記第 2 の核酸分子が前記更なる第 2 のプライマーに結合する前に前記複数の第 1 のプライマーの少なくとも 99 % に結合するように構成される、項目 5 3 に記載のシステム。

10

[項目 5 5]

前記第 2 のプライマーは、前記核酸分子が前記第 2 のプライマーに結合して伸長産物を生成する速度を、前記伸長産物が前記表面上で増幅される速度に対して制限する所定の濃度を前記反応混合物において有する、項目 5 3 から 5 4 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 5 6]

前記第 2 のプライマーが前記表面に固定化される、項目 5 2 から 5 5 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 5 7]

20

前記表面が増幅部位のアレイを含み、増幅部位の前記アレイは、それに固定化される第 1 のプライマーの複数のセットを含み、第 1 のプライマーの前記複数のセットが前記第 1 の配列に対して配列同一性を有し、前記核酸分子は、前記反応混合物における増幅部位の前記アレイに流体アクセスできる、項目 5 2 から 5 6 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 5 8]

前記表面がビーズである、項目 5 2 から 5 7 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 5 9]

エマルジョンを更に含み、前記反応混合物が前記エマルジョンのある量の分散相に与えられ、前記エマルジョンは、第 2 の表面を含む第 2 の反応混合物を含む第 2 の量の前記分散相を含む、項目 5 2 から 5 8 のいずれか一項に記載のシステム。

30

[項目 6 0]

前記反応混合物が複数の核酸分子を含み、前記複数の核酸分子が異なる核酸配列を含む核酸分子を含み、前記複数の核酸分子のそれぞれは、前記第 2 のプライマーに結合して、前記伸長配列又はその相補体を含む伸長産物を生成するように構成される、項目 5 2 から 5 9 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 6 1]

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

40

[項目 6 2]

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

[項目 6 3]

前記反応混合物は、(i) 前記第 1 のプライマー又は前記第 2 のプライマーとのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 反応で使用されるときに前記核酸分子を指数関数的に増幅する

50

ように構成される複数の第 3 のプライマー、(i i) 及び第 4 のプライマーを更に含み、前記第 4 のプライマーが第 3 の部分及び第 4 の部分を含み、前記第 3 の部分が前記核酸分子にアニールするように構成され、前記第 4 の部分が第 2 の伸長配列を含む、項目 5 2 から 6 2 のいずれか一項に記載のシステム。

[項目 6 4]

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

[項目 6 5]

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

[項目 6 6]

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

[項目 6 7]

核酸サンプルをクローン的に増幅するための方法であって、

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

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

を含み、

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

方法。

[項目 6 8]

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

[項目 6 9]

核酸分子に付着するように構成される担体を調製するための方法であって、

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

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

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

10

20

30

40

50

—

を含む方法。

[項目 7 0]

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

[項目 7 1]

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

[項目 7 2]

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

[項目 7 3]

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

[項目 7 4]

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

[項目 7 5]

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

[項目 7 6]

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

[項目 7 7]

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

[項目 7 8]

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

[項目 7 9]

(c) は、

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

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

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

を含む項目 6 9 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 0]

核酸分子に付着するように構成される担体を調製するための方法であって、

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

10

20

30

40

50

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

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

[項目 8 1]

担体を調製するための方法であって、

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

（b）前記担体の前記プライマーを前記鋳型核酸分子の前記アダプターに付着させるのに十分な条件に前記混合物を供して、（i）前記複数の鋳型核酸分子と会合されない非伸長担体と、（ii）前記鋳型核酸分子に結合されるキャプチャエンティティと会合される伸長担体とを含む結果として生じる混合物を生成するステップであって、前記キャプチャエンティティがキャプチャリングエンティティによって捕捉するように構成され、前記伸長担体が、前記鋳型核酸分子の配列に対して相補的な配列を含む核酸分子を含み、前記伸長担体上の前記複数のプライマーの少なくとも 50 % が前記複数の鋳型核酸分子と会合されない、ステップと、

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

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

を含む方法。

[項目 8 2]

前記伸長担体上の前記複数のプライマーの少なくとも 80 % が前記複数の鋳型核酸分子と会合されない、項目 8 1 に記載の方法。

[項目 8 3]

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

[項目 8 4]

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

[項目 8 5]

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

[項目 8 6]

（c）は、

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

10

20

30

40

50

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

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

を含む項目 8.1 から 8.5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8.7]

(a)において、前記鋳型核酸分子が前記キャプチャエンティティを含む、項目 8.1 から 8.6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8.8]

(b)は、前記キャプチャエンティティを含むヌクレオチドを組み込むために前記プライマーを使用して伸長反応を行なうステップを含む、項目 8.1 から 8.6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8.9]

前記液滴は、前記複数の伸長担体のうちの単一の伸長担体を含み、前記単一の伸長担体が前記伸長担体である、項目 8.1 から 8.8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9.0]

前記複数の液滴の占有液滴の大部分が、前記複数の伸長担体のうちの単一の伸長担体を含む、項目 8.1 から 8.9 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9.1]

前記複数の液滴が非占有液滴を含み、前記非占有液滴が前記複数の伸長担体のいずれの伸長担体も含まない、項目 8.1 から 9.0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9.2]

(d)は、混合物を分割するステップであって、前記混合物が前記複数の伸長担体を含み、前記混合物が非伸長担体よりも多くの伸長担体を含む、ステップを含む、項目 8.1 から 9.1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9.3]

前記混合物中の実質的に全ての担体が伸長担体である、項目 9.2 に記載の方法。

10

20

30

40

50