

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6454281号
(P6454281)

(45) 発行日 平成31年1月16日(2019.1.16)

(24) 登録日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/10 (2006.01)

C 12 N 15/10

Z

C 12 Q 1/6806 (2018.01)

C 12 Q 1/6806

Z

C 12 P 19/34 (2006.01)

C 12 P 19/34

A

請求項の数 22 (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2015-540858 (P2015-540858)
 (86) (22) 出願日 平成25年11月5日 (2013.11.5)
 (65) 公表番号 特表2015-533296 (P2015-533296A)
 (43) 公表日 平成27年11月24日 (2015.11.24)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/068468
 (87) 國際公開番号 WO2014/071361
 (87) 國際公開日 平成26年5月8日 (2014.5.8)
 審査請求日 平成28年11月4日 (2016.11.4)
 (31) 優先権主張番号 61/722,357
 (32) 優先日 平成24年11月5日 (2012.11.5)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500481499
 タカラバイオユースエー、インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 43, マウンテンビュー, テラ ベラ
 アベニュー 1290
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】バーコード化する核酸

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

二重バーコード化核酸分子を作製する方法であって、前記方法は：

(a) ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を核酸分子の少なくとも1つの末端に連結して、第1のバーコードが連結した核酸分子を形成するステップであって、前記ステムループオリゴヌクレオチドは分子内逆方向反復およびループを含み、そして前記逆方向反復は前記第1のバーコードを含む、ステップ；

(b) 前記第1のバーコードが連結した核酸分子から前記ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を鎖置換により、またはニックトランスレーション重合により置換して、第1のバーコード化核酸分子を形成するステップ；

(c) プライマーを前記第1のバーコード化核酸分子にアニールするステップであって、前記プライマーは、前記第1のバーコード化核酸分子に相補的な第1の部分、および第2のバーコードを含む第2の部分を含む、ステップ；ならびに

(d) アニールされた前記プライマーを伸長させて、二重バーコード化核酸分子を形成するステップであって、前記二重バーコード化核酸分子は、前記第2のバーコード、前記第1のバーコード、および前記核酸分子の少なくとも一部を含む、ステップ、を包含する、方法。

【請求項2】

前記プライマーの前記第1部分が、前記第1のバーコード化核酸分子における前記第1のバーコードにアニールする、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記プライマーの前記第1部分が、前記第1のバーコード化核酸分子における前記第1のバーコードの一部にアニールする、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記プライマーの前記第1部分が、前記第1のバーコード化核酸分子における前記第1のバーコード内でアニールしない、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ(a)が、ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を前記核酸分子の各末端に連結することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記核酸分子の各末端に付着した前記ステムループオリゴヌクレオチドの前記分子内逆方向反復が同一の配列を含む、請求項5に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記核酸分子の各末端に付着した前記ステムループオリゴヌクレオチドの前記分子内逆方向反復が同一の配列を含まない、請求項5に記載の方法。

【請求項 8】

前記核酸分子が、ゲノムDNA、cDNA、増幅されたDNA、核酸ライブラリー、またはそれらの断片である、請求項1に記載の方法。

【請求項 9】

前記ステムループオリゴヌクレオチドの5'末端がホスフェートを欠く、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記ステムループオリゴヌクレオチドがステムループオリゴヌクレオチドの集団である、請求項1に記載の方法。

【請求項 11】

前記ステムループオリゴヌクレオチドのループ、または前記ステムループオリゴヌクレオチドのループに隣接した前記ステムの領域が、複製不可能な塩基または領域を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記ステムループオリゴヌクレオチドのループ、または前記ステムループオリゴヌクレオチドのループに隣接したステムの領域が、切断可能な複製停止点を含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 13】

ニックトランスレーション重合の後かつステップ(c)の前に、前記ニックが前記第1のバーコード化核酸分子から除去され、前記切断可能な複製停止点が切断される、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

前記ステムループオリゴヌクレオチドの前記ループが切断可能な塩基を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

40

前記切断可能な塩基がデオキシリジンである、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記切断可能な塩基が、ステップ(b)の前に切断されて、脱塩基部位を生じる、請求項14に記載の方法。

【請求項 17】

ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を核酸分子の少なくとも1つの末端に連結することが、前記ステムループオリゴヌクレオチドの3'末端を前記核酸分子の5'末端にライゲーションすることとさらに定義される、請求項1に記載の方法。

【請求項 18】

前記プライマーがプライマーの集団である、請求項1に記載の方法。

50

【請求項 19】

伸長することが、プライマー伸長またはポリメラーゼ連鎖反応を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 20】

前記二重バーコード化核酸分子の少なくとも部分の増幅をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 21】

前記第1のバーコードが、ランダムなバーコードまたは部分的にランダムなバーコードを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 22】

前記第1のバーコードが、既知の配列または部分的に既知の配列を含む、請求項1に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

この出願は、2012年11月5日に出願された米国仮出願第61/722,357号（この全体の内容は、参考として本明細書に援用される）の優先権の利益を主張する。

【0002】

2KB (Microsoft Windows (登録商標) で測定) であり、2013年11月5日に作成された、「RUBCP0031WO_ST25.txt」と名付けられたファイルに含有される配列表は、電子提出により添付して提出されており、参考として本明細書に援用される。

20

【0003】**1. 発明の分野**

本発明は、一般的に、分子生物学および核酸シーケンシングの分野に関する。より具体的には、それは、核酸をバーコード化する (barcoding) 方法に関係する。

【背景技術】**【0004】****2. 関連技術の説明**

バーコードは、核酸分子を同定するために用いることができ、例えば、シーケンシングは、関心対象となる核酸分子に連結されたある特定のバーコードを明らかにすることができます。ある場合では、配列特異的事象は核酸分子を同定するために用いることができ、バーコードの少なくとも一部が配列特異的事象において認識され、例えば、バーコードの少なくとも一部が、ライゲーションまたは伸長反応に関与することができる。したがって、バーコードは、それに連結されているgDNA分子の同定、選択、または増幅を可能にすることができる。

30

【0005】

関心対象となる核酸分子にバーコードを連結するための一つの方法には、Ion Torrent SystemについてLife Technologiesによって記載されているような、Ion gDNA断片ライブラリーの調製が挙げられる。この方法において、gDNAの断片がアダプターにライゲーションされ、ゲノムDNAの各断片の少なくとも1つの末端が、バーコードを含むアダプターにライゲーションされる。ライゲーションされたアダプターとgDNA断片は、ニック修復され、サイズ選択され、アダプターに指向されたプライマーでのPCRを用いて増幅されて、増幅されたライブラリーを生じ得る。例えば、16個の異なるバーコードを含むライゲーションアダプターは、16個の異なるgDNA試料を調製するために用いることができ、各試料が固有のバーコードを有し、それゆえに、各試料を、同じPCRプライマーを用いるPCRによって別々に増幅し、その後、プールする（一緒に混合する）ことができるか、または各試料を最初にプールし、その後、同じPCRプライマーを用いて同時に増幅することができる。結果として、各gDNA試料は、その付着した固有バーコードにより同定することができる。しかし

40

50

ながら、必要とされる異なるライゲーションアダプターの数は、バーコードの数に等しい。例えば、混合物としてシーケンシングされ得る 256 個の試料ライブラリーの作製は、256 個の異なるライゲーションアダプターを必要とするだろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

二重バーコード化核酸分子を作製する方法であって、前記方法は：

(a) ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を核酸分子の少なくとも1つの末端に連結して、第1のバーコードが連結した核酸分子を形成するステップであって、前記ステムループオリゴヌクレオチドは分子内逆方向反復およびループを含み、そして前記逆方向反復は前記第1のバーコードを含む、ステップ；

(b) 前記第1のバーコードが連結した核酸分子から前記ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を鎖置換により、またはニックトランスレーション重合により置換して、第1のバーコード化核酸分子を形成するステップ；

(c) プライマーを前記第1のバーコード化核酸分子にアニールするステップであって、前記プライマーは、前記第1のバーコード化核酸分子に相補的な第1の部分、および第2のバーコードを含む第2の部分を含む、ステップ；ならびに

(d) アニールされた前記プライマーを伸長させて、二重バーコード化核酸分子を形成するステップであって、前記二重バーコード化核酸分子は、前記第2のバーコード、前記第1のバーコード、および前記核酸分子の少なくとも一部を含む、ステップ、を包含する、方法。

(項目2)

前記プライマーの前記第1部分が、前記第1のバーコード化核酸分子における前記第1のバーコードにアニールする、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記プライマーの前記第1部分が、前記第1のバーコード化核酸分子における前記第1のバーコードの一部にアニールする、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記プライマーの前記第1部分が、前記第1のバーコード化核酸分子における前記第1のバーコード内でアニールしない、項目1に記載の方法。

(項目5)

ステップ(a)が、ステムループオリゴヌクレオチドの1つの鎖を前記核酸分子の各末端に連結することを含む、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記核酸分子の各末端に付着した前記ステムループオリゴヌクレオチドの前記分子内逆方向反復が同一の配列を含む、項目5に記載の方法。

(項目7)

前記核酸分子の各末端に付着した前記ステムループオリゴヌクレオチドの前記分子内逆方向反復が同一の配列を含まない、項目5に記載の方法。

(項目8)

前記核酸分子が、ゲノムDNA、cDNA、増幅されたDNA、核酸ライブラリー、またはそれらの断片である、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記ステムループオリゴヌクレオチドがステムループオリゴヌクレオチドの集団である、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記ステムループオリゴヌクレオチドの前記ループが切断可能な塩基を含む、項目1に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 1)

前記切断可能な塩基がデオキシリジンである、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記切断可能な塩基が、ステップ (b) の前に切断されて、脱塩基部位を生じる、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 3)

ステムループオリゴヌクレオチドの 1 つの鎖を核酸分子の少なくとも 1 つの末端に連結することが、前記ステムループオリゴヌクレオチドアダプターの 3 ' 末端を前記核酸分子の 5 ' 末端にライゲーションすることとさらに定義される、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 4)

10

前記プライマーがプライマーの集団である、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 5)

伸長することが、プライマー伸長またはポリメラーゼ連鎖反応を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記二重バーコード化核酸分子の少なくとも部分の增幅をさらに含む、項目 1 に記載の方法。

本発明の実施形態は、シーケンシングのための二重バーコード化核酸分子を作製する方法を提供する。核酸分子の同じ末端上に第 1 および第 2 のバーコードを有することは、シーケンシング読み取りが第 2 のバーコードから始まり、第 1 のバーコードを経て、その後、核酸分子へ続くことを可能にし得る。したがって、第 2 のバーコード、第 1 のバーコード、および核酸分子の配列の同定は、二重シーケンシングバーコードを用いる伝統的な方法における場合のような、核酸分子の遠位末端から戻って單一バーコードの配列を読み取るために核酸分子の各末端からのシーケンシング読み取りを提供しなければならないこととは対照的に、單一の読み取りで得られ得る。

20

【 0 0 0 7 】

したがって、本発明の一実施形態は、以下を含む、二重バーコード化核酸分子を作製する方法に関する：ステムループオリゴヌクレオチドの 1 つの鎖を核酸分子に連結して、第 1 のバーコードが連結した核酸分子を形成するステップであって、そのステムループオリゴヌクレオチドが分子内逆方向反復およびループを含み、その逆方向反復が第 1 のバーコードを含む、ステップ；第 1 のバーコードが連結した核酸分子からステムループオリゴヌクレオチドの 1 つの鎖を鎖置換により、またはニックトランスレーション重合により置換して、第 1 のバーコード化核酸分子を形成するステップ；プライマーを第 1 のバーコード化核酸分子にアニールするステップであって、そのプライマーが、第 1 のバーコード化核酸分子に相補的な第 1 の部分および第 2 のバーコードを含む第 2 の部分を含む、ステップ；ならびにアニールされたプライマーを伸長させて、二重バーコード化核酸分子を形成するステップであって、その二重バーコード化核酸分子が第 2 のバーコード、第 1 のバーコード、および核酸分子の少なくとも一部を含む、ステップ。いくつかの態様において、プライマーの第 1 部分は、第 1 のバーコードに、または第 1 のバーコードの一部へアニールする。他の態様において、プライマーの第 1 部分は、第 1 のバーコード内でアニールしない。伸長ステップは、ポリメラーゼを用いることにより、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応即ち P C R によって、実施されてもよい。核酸分子は、ゲノム D N A 、 c D N A 、増幅された D N A 、核酸ライブラリー、またはそれらの断片であってもよい。

30

【 0 0 0 8 】

本発明の一実施形態において、二本鎖核酸分子を提供するステップ；および逆方向反復およびループを含むステムループオリゴヌクレオチドの 1 つの鎖を二本鎖核酸分子に付着させて、オリゴヌクレオチド付着核酸分子を生じるステップを含む、核酸分子を調製する方法がある。二本鎖核酸分子は、いくつかの態様において、二本鎖 D N A 分子であってもよい。特定の実施形態において、付着させることは、オリゴヌクレオチド付着核酸分子においてニック、ギャップ、または 5 ' フラップ構造などの非共有結合性接合部を生じる条

40

50

件下で、オリゴヌクレオチドを二本鎖核酸分子に付着させることとしてさらに定義される。本発明の特別な態様において、付着させることは、ライゲーションすることとしてさらに定義される。ライゲーションすることは、ステムループオリゴヌクレオチドアダプターの3'末端を標的核酸分子の5'末端にライゲーションすることとして定義されてもよい。その方法は、オリゴヌクレオチド付着核酸分子からオリゴヌクレオチドの1つの鎖を鎖置換により、またはニックトランスレーション重合により置換するステップをさらに含んでもよい。特定の実施形態において、オリゴヌクレオチド付着核酸分子の少なくとも部分が、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、RNA転写、または鎖置換などにより、増幅される。本発明の方法は、オリゴヌクレオチド付着核酸分子を増幅するステップであって、ステムループアダプターの分子内逆方向反復の少なくとも部分が増幅されたオリゴヌクレオチド付着核酸分子から排除される、ステップをさらに含んでもよい。

【0009】

ライゲーションすることの実施形態は、以下を含むとしてさらに定義されてもよい：二本鎖核酸分子上にライゲーション可能な末端を作製するステップ；ステムループオリゴヌクレオチド上にライゲーション可能な末端を作製するステップ；およびステムループオリゴヌクレオチドのライゲーション可能な末端の1つの鎖を核酸分子の末端の1つの鎖にライゲーションし、それにより、オリゴヌクレオチド付着核酸分子においてニック、ギャップ、または5'フラップ構造などの非共有結合性接合部を作製するステップ。さらなる態様において、方法は、核酸分子上に平滑末端を作製するステップ；ステムループオリゴヌクレオチド上に平滑末端を作製するステップ；およびステムループオリゴヌクレオチドの平滑末端の1つの鎖を核酸分子の平滑末端の1つの鎖にライゲーションし、それにより、オリゴヌクレオチドがライゲーションされた核酸分子においてニックを作製するステップを含む。

【0010】

いくつかの態様において、方法は、ステムループオリゴヌクレオチドアダプターの1つの鎖を標的核酸分子の各末端に連結するステップを含んでもよい。いくつかの態様において、標的核酸分子の各末端に連結されたステムループアダプターの逆方向反復は、同一の配列を含んでもよい。この態様において、ステムループアダプターを標的核酸分子の各末端へ連結させることは、末端逆方向反復を含む核酸分子を生じ、それにより、その分子がステムループを形成することを可能にするだろう。他の態様において、標的核酸分子の各末端に連結されたステムループアダプターの逆方向反復は、同一の配列を含まなくてもよい。この態様において、ステムループアダプターを標的核酸分子の各末端へ連結させることは、末端逆方向反復を欠く核酸分子を生じ、したがって、その分子はステムループを形成することはできないだろう。

【0011】

追加の実施形態において、オリゴヌクレオチド付着核酸分子は、3'ヒドロキシ基を有するニックを含み、オリゴヌクレオチド付着核酸分子の少なくとも部分の3'ヒドロキシ基からの重合がある。

【0012】

鎖置換またはニックトランスレーション重合は、ループ、またはループに隣接したステムの領域における複製不可能な塩基または領域で終わる重合としてさらに定義されてもよい。

【0013】

本発明の特定の態様において、方法は、二本鎖DNA分子をエンドヌクレアーゼで消化して、DNA断片を生じるステップであって、オリゴヌクレオチドが、DNA断片の1つの鎖にライゲーションされるようになり、オリゴヌクレオチドがライゲーションされたDNA断片の重合が、ループ、またはループに隣接したステムの領域における塩基または配列で停止する鎖置換またはニックトランスレーション重合にオリゴヌクレオチドがライゲーションされたDNA断片を供することにより、ステムループアダプターの分子内逆方向反復の少なくとも部分を排除する、ステップをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0014】

いくつかの態様において、ステムループオリゴヌクレオチドは、切断可能な塩基を含むとしてさらに定義される。特に、場合によっては、切断可能な塩基は、オリゴヌクレオチドのループに、またはループに隣接したステムの配列に存在する。切断可能な塩基または配列は、脱塩基部位もしくは配列、ヘキサエチレングリコール、および／または糖-ホスフェートバックボーンもしくは塩基に付着したかさ高い化学的部分を含んでもよい。特定の実施形態において、脱塩基部位または配列は、単一溶液における1つまたは複数の酵素により導入される。さらなる特定の実施形態において、ステムループオリゴヌクレオチドのループは、少なくとも1つのデオキシ-ウリジンを含む。

【0015】

特定の態様において、ステムループオリゴヌクレオチドの5'末端はホスフェートを欠く。

【0016】

「バーコード」とも呼ばれる、バーコードは、特別な核酸配列を選択することに基づいて作製することができる。例えば、Illumina(商標)シーケンシングは、6個の塩基を利用して、48個の異なるバーコードを効果的に作製することができる。Ion Torrentシーケンサー(例えば、Ion Proton(商標)シーケンサーまたはIon PGM(商標)シーケンサー)は、6個の塩基を利用して、16個のバーコードを作製することができる。いくつかの実施形態において、たとえ2つのエラーがシーケンシング中に生じたとしても、別個のバーコードが正しく同定されることを可能にするルールが、バーコードの作製に適用され得る。バーコード化は、例えば、米国特許第7,902,122号および米国特許公開第2009/0098555号に記載されている。例えばPCRを用いた、プライマー伸長によるバーコード取り込みは、米国特許第5,935,793号またはUS 2010/0227329に記載された方法を用いて実施されてもよい。いくつかの実施形態において、バーコードは、ライゲーションを用いることにより核酸へ取り込まれ得、その後、続いて、増幅することができ、例えば、米国特許第5,858,656号、米国特許第6,261,782号、米国特許公開第2011/0319290号、または米国特許公開第2012/0028814号に記載された方法は、本発明と共に用いられてもよい。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のバーコードは、例えば、米国特許公開第2007/0020640号、米国特許公開第2009/0068645号、米国特許公開第2010/0273219号、米国特許公開第2011/0015096号、または米国特許公開第2011/0257031号に記載されているように、用いられてもよい。

【0017】

いくつかの実施形態は、例えば、米国特許第7,803,550号に記載された方法によって、作製されたゲノムライブラリーへ第2のバーコードを取り込むが、本発明の方法は、核酸ライブラリーを作製するための幅広い種類の技術と組み合わせて用いられてもよい。例えば、第2のバーコードは、核酸ライブラリーの断片へ取り込まれてもよく、その核酸ライブラリーが、Nextera(商標)DNA試料プレップキットなどのIlluminaシーケンシングと適合性のアプローチで作製されており、Illumina次世代シーケンシングライブラリー調製物を作製するための追加のアプローチは、例えば、Oyola(2012)に記載されている。他の実施形態において、核酸ライブラリーは、SOLID(商標)またはIon Torrentシーケンシング方法(例えば、SOLID(登録商標)Fragment Library Construction Kit、SOLID(登録商標)Mate-Paired Library Construction Kit、SOLID(登録商標)CHIP-Seq Kit、SOLID(登録商標)SAGE(商標)Kit、Ambion(登録商標)RNA-Seq Library Construction Kitなど)と適合性の方法で作製される。本発明の実施形態と共に用いられ得るライブラリー構築のための様々な方法を含む、次世代シーケンシング方法のた

10

20

30

40

50

めの追加の方法は、例えば、P a r e e k (2 0 1 1) および T h u d i (2 0 1 2) に記載されている。

【 0 0 1 8 】

追加の実施形態において、本発明の 1 つもしくは複数の組成物を含み、および / または本発明の少なくとも 1 つの方法に適した 1 つもしくは複数の組成物を含む、適切な容器に収容されたキットがある。

【 0 0 1 9 】

本発明の追加の実施形態は、本発明の方法により調製された D N A 分子のライブラリーを含む。

【 0 0 2 0 】

本明細書で用いられる場合、「1 つの (a) 」または「1 つの (a n) 」は、1 つまたは複数を意味し得る。特許請求の範囲において用いられる場合、語「含むこと」と共に用いられる時、語「1 つの (a) 」または「1 つの (a n) 」は、1 つまたは 1 つより多いことを意味し得る。

【 0 0 2 1 】

特許請求の範囲における用語「または」の使用は、選択肢のみを指すことを明確に示さない限り、またはその選択肢がお互いに排他的ではない限り、「および / または」を意味するように用いられるが、本開示は、選択肢のみを指すという定義と「および / または」を支持する。本明細書で用いられる場合、「別の」は、少なくとも第 2 の、またはそれ以上を意味し得る。

【 0 0 2 2 】

本出願を通して、用語「約」は、値が、その値を決定するために用いられることになっている装置、もしくは方法についての固有の誤差の変動、または研究対象の間に存在する変動を含むことを示すために用いられる。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の目的、特徴、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。しかしながら、詳細な説明および特定の例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、本発明の精神および範囲内の様々な変化および改変が詳細な説明から当業者に明らかになるだろうことから、例証としてのみ示されていることは理解されるべきである。

【 0 0 2 4 】

以下の図面は、本明細書の部分を形成し、本発明のある特定の態様をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書に提示された特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせて、これらの図面の 1 つまたは複数を参照することにより、より良く理解され得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 5 】

【 図 1 】 図 1 は、単一セットのバーコードの使用 対 第 1 および第 2 のセットのバーコードの使用を比較する概略図である。

【 図 2 】 図 2 は、第 1 のバーコードを付加するためのステムループアダプターの使用、さらに続いて、第 2 のバーコードを付加するための P C R 増幅を示す図である。

【 図 3 】 図 3 は、タンデム型二重バーコードを含有するが、末端逆方向反復を生じないアダプターを示す図である。

【 図 4 】 図 4 は、逆方向反復を含まないタンデム型二重バーコードを用いたリアルタイム P C R ライブラリー増幅の結果である。

【 図 5 】 図 5 は、末端逆方向反復を生じる、タンデム型二重バーコードを含有するアダプターを示す図である。

【 図 6 】 図 6 は、逆方向反復を有するタンデム型二重バーコードを用いたリアルタイム P C R ライブラリー増幅の結果である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 2 6 】

本技術は、核酸分子のバーコード化に関する。タグ、インデキシング配列、または識別

10

20

30

40

50

子コードとしても記載されるバーコードには、同定を目的として核酸分子に取り込まれる特異的な配列が挙げられる。例えば、合成核酸分子は、ライゲーションおよび／またはプライマー伸長によりゲノムDNA(gDNA)と連結することができる。本技術は、複数のバーコード、特に逐次的なバーコードまたはタンデム型バーコードを有する核酸分子を対象としている。タンデム型バーコードの例は、ライゲーション事象(例えば、合成ステムループアダプターへのライゲーション)によるgDNA分子の少なくとも1つの末端に連結された第1のバーコード、続いて、プライマー伸長(例えば、PCR)によりgDNAに連結される第2のバーコードを含み、その第1のバーコードがgDNA分子に対して近位にあり(挿入断片により近い)、かつその第2のバーコードがgDNAに対して遠位にある(挿入断片からより遠い)。追加の配列を付加するためのステムループアダプターライゲーションおよびプライマー伸長またはPCRを用いる方法は、例えば、全体として参考として本明細書に援用される、米国特許第7,803,550号に記載されている。これらの方法は、第1および／または第2のバーコードを核酸分子に付加するために本発明の実施形態において用いられてもよい。

【0027】

バーコードは、核酸分子を同定するために用いることができ、例えば、シーケンシングは、関心対象となる核酸分子に連結されたある特定のバーコードを明らかにすることができます。場合によっては、配列特異的事象は、核酸分子を同定するために用いることができ、バーコードの少なくとも一部が、配列特異的事象において認識され、例えば、バーコードの少なくとも一部が、ライゲーションまたは伸長反応に関与することができる。したがって、バーコードは、それに連結しているgDNA分子の同定、選択、または増幅を可能にすることができる。

【0028】

関心対象となる核酸分子にバーコードを連結するための一つの方法には、Ion Torrent SystemについてLife Technologiesにより記載されているような、Ion gDNA断片ライブラリーの調製が挙げられる。この方法において、gDNAの断片は、アダプターにライゲーションされ、ゲノムDNAの各断片の少なくとも1つの末端が、バーコードを含むアダプターにライゲーションされる。ライゲーションされたアダプターとgDNA断片は、ニック修復され、サイズ選択され、アダプターに指向されたプライマーでのPCRを用いて増幅され、増幅したライブラリーを生じることができる。例えば、16個の異なるバーコードを含むライゲーションアダプターを用いて、それぞれが固有のバーコードをもつ、16個の異なるgDNA試料を調製することができ、それゆえに、各試料を、同じPCRプライマーを用いるPCRによって別々に増幅し、その後、プールする(一緒に混合する)ことができ、または各試料をまずプールし、その後、同じPCRプライマーを用いて同時に増幅することができる。結果として、各gDNA試料は、その付着した固有バーコードにより同定することができる。しかしながら、このアプローチに関する一つの問題は、必要とされる異なるライゲーションアダプターの数が、バーコードの数に等しいことである。例えば、混合物としてシーケンシングされ得る256個の試料ライブラリーの作製は、256個の異なるライゲーションアダプターを必要とするだろう。

【0029】

この問題に取り組むために、ゲノムDNAの断片は、例えば米国特許第7,803,550号に記載されているようなステムループアダプターおよび方法を用いて、第1セットのバーコードを有するアダプターにライゲーションすることができる。16個の異なるバーコードを有するアダプターを作製することができ、例えば、Ion Torrentシーケンシングシステム(例えば、Ion Proton(商標)シーケンサー、またはIon PGM(商標)シーケンサー)と共に用いてもよい。その後、第1セットのバーコードを有するライゲーションされたアダプターとgDNA断片は、第2セットのバーコードを有するプライマーを用いるプライマー伸長反応またはPCRに供することができる。生じた核酸分子はそれぞれ、核酸分子の少なくとも1つの末端上に、第2セットのバーコ

10

20

30

40

50

ード由来の1つのバーコードに隣接した、第1セットのバーコード由来の1つのバーコードを有する。バーコードの正確な数は、特別な適用に基づいて決定され得る；例えば、いくつかの実施形態において、第2のバーコードは6個の塩基を利用して、例えば、16個の追加のバーコードを生じ得る。とはいえ、適用および／またはシーケンシング方法に依存して、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、もしくは16個、またはそれより多くの塩基を利用して、第2のバーコードを作製してもよい。いくつかの実施形態において、少なくとも2個、少なくとも3個、または3～16個の塩基を用いて、第2のバーコードを作製することができる。

【0030】

10

いくつかの実施形態において、第2セットのバーコードは、16個の異なるプライマーを含むことができる。この様式において、16個の異なるバーコードを有するライゲーションアダプター（第1セットのバーコード）は、（第2セットのバーコードに指向された）16個の異なるプライマーで増幅され、 16×16 個の固有の組み合わせのバーコードを生じることができ、それは、256個の試料をプールし、256倍に多重化することを可能にする。このレベルの多重化を達成するためのたった16+16個のオリゴヌクレオチドの使用は、256個の有用なライブラリーを作製することにおいて費用と時間のかなりの節約である。好ましくは、第1のバーコードおよび第2のバーコードは、gDNAの同じ側に（すなわち、同じアダプターの部分として）あってもよく、シーケンシングの時間および費用を節約するためにお互いと、かつgDNAと順次シーケンシングすることができる。

【0031】

20

追加として、第1のバーコードは、gDNAに直接付着してもよいが、第2のバーコードは、PCRによる増幅中に付着されてもよい。したがって、第1セットのバーコードは、a) gDNA試料の全メンバーに同じバーコードでタグをつけるか、またはb) gDNA試料の異なるメンバーを異なるバーコードでタグをつけるかのいずれのためにも用いることができる。例えば、ライゲーションが、単一バーコードを用いて実施される場合には、gDNAの全メンバーは一般的に同じバーコードを有するだろう。しかしながら、ライゲーションアダプターがランダムな、または部分的ランダムなバーコードで合成される場合には、gDNA試料における異なる分子は、異なるバーコードを有するだろう。極端には、バーコード領域が16個のランダムな塩基を含有する場合には、65,536個のバーコードが、ライゲーションされた核酸ライブラリー内に示され得る。バーコードは、インプットgDNAライブラリーの異なるメンバー間を区別するために用いられてもよい；例えば、これらの方法は、gDNAライブラリーにおける分子重複（それらの大部分は異なるバーコードを有するだろう）、およびPCR増幅中に生じた重複（それらの大部分は同一の第1のバーコードを有するだろう）の独立した計数に用いられてもよい。部分的ランダムな第1のバーコードは、個々の試料についての、および個々の分子についての情報を与えるために用いることができる。

【0032】

30

I. 定義

40

本明細書で用いられる場合、「増幅」は、ヌクレオチド配列または複数のヌクレオチド配列のコピーの数を増加させるための任意のインビトロ過程を指す。核酸増幅は、DNAまたはRNAへのヌクレオチドの取り込みを生じる。本明細書で用いられる場合、一つの増幅反応は、多数のラウンドのDNA複製からなってもよい。例えば、一つのPCR反応は、30～100「サイクル」の変性および複製からなり得る。

【0033】

50

本明細書で用いられる場合、「ヌクレオチド」は、塩基-糖-ホスフェートの組み合わせを指す専門用語である。ヌクレオチドは、核酸重合体、すなわち、DNAおよびRNAの単量体の単位である。その用語は、rATP、rCTP、rGTP、またはrUTPなどのリボヌクレオチド三リン酸、およびdATP、dCTP、dUTP、dGTP、また

は d T T P などのデオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む。

【 0 0 3 4 】

「ヌクレオシド」は、塩基 - 糖の組み合わせ、すなわち、ホスフェートを欠くヌクレオチドである。ヌクレオシドとヌクレオチドという用語の使用法において、特定の交換可能性があることは当技術分野において認識されている。例えば、ヌクレオチドのデオキシリジン三リン酸、d U T P は、デオキシリボヌクレオシド三リン酸である。D N Aへの取り込み後、それは、D N A 単量体としての役割を果たし、正式には、デオキシリジレート、すなわち、d U M P またはデオキシリジンーリン酸である。たとえ結果として生じたD N A に d U T P 部分がないとしても、d U T P をD N A へ取り込むと言ってもよい。同様に、たとえそれが基質分子の一部のみであるにしても、デオキシリジンをD N A へ取り込むと言ってもよい。 10

【 0 0 3 5 】

本明細書で用いられる場合、「取り込むこと」とは、核酸重合体の部分になることを意味する。

【 0 0 3 6 】

本明細書で用いられる場合、「オリゴヌクレオチド」は、2つの専門用語の「オリゴヌクレオチド」と「ポリヌクレオチド」を総称して、および交換可能に指す。オリゴヌクレオチドとポリヌクレオチドは別個の専門用語であるが、それらの間に正確な境界線があるのでなく、それらは本明細書で交換可能に用いられることは留意されたい。用語「アダプター」もまた、用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」と交換可能に用いられてもよい。 20

【 0 0 3 7 】

本明細書で用いられる場合、「プライマー」は、増幅中のヌクレオチド単量体の共有結合性付加により伸長される一本鎖オリゴヌクレオチドまたは一本鎖ポリヌクレオチドを指す。しばしば、核酸増幅は、核酸ポリメラーゼによる核酸合成に基づいている。多くのそのようなポリメラーゼは、伸長されて、核酸合成を開始することができるプライマーの存在を必要とする。

【 0 0 3 8 】

本明細書に用いられる場合、用語「ヘアピン」および「ステムループオリゴヌクレオチド」は、二本鎖システムを形成する分子内逆方向反復である5'末端領域および3'末端領域、ならびに一本鎖ループを形成する非自己相補的中央領域で構成されるオリゴヌクレオチドによって形成される構造を指す。 30

【 0 0 3 9 】

I I . 本発明の態様

本発明の実施形態は、以下の通り、1つまたは複数の利益または利点を提供し得る。核酸分子の同じ末端上に第1および第2のバーコードを有することは、シーケンシング読み取りが第2のバーコードから始まり、第1のバーコードを経て、その後、核酸分子へ続くことを可能にし得る。したがって、第2のバーコード、第1のバーコード、および核酸分子の配列の同定は、二重シーケンシングバーコードを用いる伝統的な方法における場合のような、核酸分子の遠位末端から戻って單一バーコードの配列を読み取るために核酸分子の各末端からのシーケンシング読み取りを提供しなければならないこととは対照的に、單一の読み取りで得られ得る。 40

【 0 0 4 0 】

ある特定の実施形態における別の利点は、第1および第2のバーコードが好ましくは、2つの別々のステップにおいて付加され得ることである。この付加の順序は、コードされる試料識別情報の可能な組み合わせを有意に増加させ得る。加えて、個々の試料の個々のP C R プライマーでの増幅は、いくつかの次世代シーケンシングプラットフォームにおいて現在、実施されているような、プールされた試料のユニバーサルP C R プライマーでの増幅とは対照的に、プライミングおよび増幅のアーティファクトによるバーコード間の相互汚染の確率を低下させ得る（図1）。特に、第1のバーコードの、核酸分子の少なくと 50

も1つの末端へのライゲーションは、短いアダプター、例えば、短いステムループアダプターを用いて実施されてもよい。例えば、短いアダプターは、約14個～約23個のヌクレオチドを含むステムを有し、一方、長いアダプターは約24個～約40個のヌクレオチドのステムを有する。

【0041】

定性的観察および定量的実験により、ライゲーション部位に対して近位に共通の配列を含有するように設計された単一のアダプターまたは2つの異なるアダプターのライゲーションが、制御されたサイズの標的挿入断片を含む分子を優先的に増幅し、挿入断片を有しない、またはほとんど情報価値がない、もしくは全く情報価値がない短い挿入断片を含む分子を有するアダプター二量体に対して識別する能力へ有益な効果を生じ得ることが示される。この現象は、抑制または抑制PCRと呼ばれる。抑制は、末端逆方向反復に隣接されたある特定のサイズより小さい分子が、増幅に用いられるプライマーが反復全体または反復の一部分に対応する場合の非効率的な増幅のせいで、選択的に排除されることを指す (Chenchikら、1996; Lukyanovら、1999; Siebertら、1995; Shaginら、1999)。この理由は、断片の相補的末端の生産的なPCRプライマーアニーリングと非生産的な自己アニーリングとの間の平衡にある。隣接する末端逆方向反復の固定サイズにおいて、挿入断片が短ければ短いほど、抑制効果は強く、逆もまた同様である。同じように、固定された挿入断片サイズにおいて、末端逆方向反復が長ければ長いほど、抑制効果は強い (Chenchikら、1996; Lukyanovら、1999; Siebertら、1995; Shaginら、1999)。

10

【0042】

末端逆方向反復を核酸分子の両方の末端にライゲーションおよび/またはプライマー伸長により付着させることにより、米国特許第7,803,550号により記載されているように、望ましくないアダプター二量体または短い挿入断片副産物に対して、所望の最小サイズの標的挿入断片のプライマーアニーリングおよび伸長の効率に関して正確な制御を達成し得る。第1のバーコードをアダプターライゲーションにより付着させることにおける効率は、試料における核酸分子の偏りを防ぎ、かつ表現を保存するために利用され得る。逆に、第2のバーコードをプライマー伸長によって連結することは、第2のバーコードを含む長いプライマーを効率的に用い得る。

20

【0043】

本発明のこの実施形態において、標的核酸は、3'陥凹末端、3'突出末端、または平滑末端を有するステムループオリゴヌクレオチド；3'ブルーフリーディングDNAポリメラーゼ(DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼなど)；T4 DNAリガーゼ；ATP；およびdNTPを含む例示的な混合物とインキュベートされる。以下の4つの例示的な酵素反応が同時に起こっている：DNA末端およびオリゴヌクレオチド二本鎖システム領域の「ポリッシング」；DNAの3'末端とオリゴヌクレオチド二本鎖システム領域の5'末端との間にニックを残す、オリゴヌクレオチド3'末端のDNAの5'リン酸へのライゲーション；ステムループオリゴヌクレオチドの末端へ広がる3'DNA末端のポリメラーゼ伸長；およびオリゴヌクレオチドシステム領域内の鎖置換反応。この過程は、結果として、第1のバーコード配列を含む末端に逆方向反復アダプターを有するDNA断片のライブラリーを生じる。

30

【0044】

I I I . 本発明の方法

以下の概略は、本技術の方法および組成物に関するさらなる詳細を提供する。提供される全ての特別な例は、非限定的例であると理解される。

【0045】

A . 関心対象となる核酸分子の調製

関心対象となる核酸分子は、単一の核酸分子または複数の核酸分子であり得る。また、関心対象となる核酸分子は、生物学的起源または合成起源のものであり得る。核酸分子の例には、ゲノムDNA、cDNA、RNA、増幅されたDNA、既存核酸ライブラリーな

40

50

どが挙げられる。

【0046】

関心対象となる核酸分子は、修復処理および断片化処理などの様々な処理に供してもよい。断片化処理には、機械的、音波の、化学的、酵素的処理、時間をわたっての分解などが挙げられる。修復処理には、伸長および/またはライゲーションによるニック修復、平滑末端を生じるためのポリッシング、脱アミノ、誘導体化、脱塩基、または架橋又クレオチドなどの損傷した塩基の除去が挙げられる。関心対象となる核酸分子をまた、化学修飾(例えば、亜硫酸水素塩変換、メチル化/脱メチル化)、伸長、増幅(例えば、PCR、等温性など)などに供してもよい。

【0047】

10

B. 第1のバーコードの連結

第1のバーコードまたは第1セットのバーコードは、関心対象となる核酸分子の少なくとも1つの末端に連結されてもよい。いくつかの態様において、第1のバーコードは、ステムループアダプター内に提供されてもよく、または第1セットのバーコードが、ステムループアダプターの集団として提供されてもよい。ステムループアダプターは、米国特許第7,803,550号に記載されているように、ステムループアダプターを含んでもよい。いくつかの態様において、ステムループアダプターは、ステムループアダプターのステム部分内にバーコードを含んでもよい。いくつかの態様において、ステムループアダプターのループ部分は、切断可能な複製停止点を含んでもよい。

【0048】

20

いくつかの態様において、バーコードを含むステムループアダプターは、標的核酸分子の1つの末端、または標的核酸分子の両方の末端に連結されてもよい。いくつかの態様において、標的核酸分子の各末端に連結されたステムループアダプターの分子内逆方向反復は、同一配列を含んでもよい。この態様において、ステムループアダプターの標的核酸分子の各末端への連結は、末端逆方向反復を含む核酸分子を生じ、それにより、その分子がステムループを形成することを可能にする。他の態様において、標的核酸分子の各末端に連結されたステムループアダプターの分子内逆方向反復は、同一の配列を含まなくてもよい。この態様において、ステムループアダプターの標的核酸分子の各末端への連結は、末端逆方向反復を欠く核酸分子を生じ、それゆえに、その分子は、ステムループを形成することができないだろう。

【0049】

30

いくつかの態様において、バーコードを含むステムループアダプターは、核酸分子の5'末端へのライゲーションを通して、例えば、平滑末端ライゲーションにより、核酸分子に連結されてもよい。ステムループアダプターを標的核酸分子の一方または両方の末端へライゲーションすることは、結果として、ニック形成を生じ得る。前記1つまたは複数のニックは、ライゲーションされたステムループアダプターと核酸分子から除去されてもよい。

【0050】

いくつかの態様において、伸長反応は、ステムループアダプターを通して核酸分子の3'末端を伸長してもよく、ループ部分は、切断可能な複製停止点で切断される。

40

【0051】

C. 第2のバーコードの連結

第2のバーコードまたは第2セットのバーコードは、核酸分子に連結されている第1のバーコードまたは第1セットのバーコードに連結されてもよい。この様式において、第1のバーコードは、核酸分子と第2のバーコードの中間物であり得る。いくつかの態様において、第2のバーコードは、プライマー内に提供されてもよく、または第2セットのバーコードが、プライマーの集団として提供されてもよい。いくつかの態様において、プライマー伸長またはPCRは、第2のバーコードを取り込むために用いられてもよい。いくつかの態様において、プライマーは、3'部分および5'部分を含み得、その3'部分は第1のバーコードの部分にアニールすることができ、かつその5'部分は第2のバーコード

50

を含む。

【0052】

その方法に関する追加の情報は、Ausubelら(2003)またはSambrookら(1989)に見出され得る。当業者によって認識されているように、関心対象となる核酸の調製、第2のバーコードを取り込むためのプライマー伸長、またはPCRを最適化するために様々なパラメーターが操作され得る。

【実施例】

【0053】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために挙げられる。以下に続く実施例に開示された技術が、本発明の実施においてよく機能するための、本発明者によって発見された技術を表し、したがって、その実施のための好ましいモードを構成するのみなされ得ることは、当業者によって理解されているはずである。しかしながら、当業者は、本開示を鑑みれば、開示されている特定の実施形態において多くの変化がなされ得、かつそれでもなお、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、同様の、または類似した結果を得ることができることは、理解すべきである。10

【0054】

実施例1 DNAシーケンシングのための二重直列型バーコード化アダプター配列

図1は、単一セットのバーコードの使用(例えば、Ion Torrent System)に対する本技術の実施形態における第1および第2セットのバーコードの使用を比較する概略図を提供する。プライマーは、第1のバーコードの外側の配列に結合することが示されている；しかしながら、いくつかの実施形態において、プライマーは、第1のバーコードに、またはさらにgDNA配列に結合してもよい。本発明の態様において、ライゲーションは、gDNAの両方の末端に付加される固有のアダプター分子(例えば、ステムループ)、または異なる配列を有する2つ(またはそれより多く)の別個のアダプター分子に対してであり得る。アダプタ二量体からのバックグランドを低下させることを目的として、異なるアダプター分子が用いられる場合には、それらは好ましくは、アダプタ二量体を含む、非常に短い分子のPCR增幅を抑制するだろう共通の配列を有してもよい。20

【0055】

図2は、第1のバーコードを有するアダプターを付加するために、米国特許第7,803,550号に記載されているようなステムループアダプターおよび方法を利用する、本発明の特定の実施形態を示す。その方法の後に、第2のバーコードを付加するためのPCR增幅がさらに続く。30

【0056】

本発明者らは、タンデム型二重バーコードを含有するが、末端逆方向反復を生じるための配列を欠く、Ion Torrentアダプターを試験しようと試みた。ステムループアダプターおよびPCRプライマーを、図3および表1に示されているように設計した。留意すべきこととして、本方法は、他の次世代シーケンシングプラットフォームと共に用いるのに適合させることができ、Ion Torrentプラットフォームとの使用に限定されない。40

【0057】

【表1】

表1 オリゴヌクレオチド配列

オリゴ名	配列番号	配列
Ion アダ プター P 1	1	ATCACUGACUGCCCATAUUUUUTATGGGCAGTCGGTGAT
Ion P C R プライ マー P 1	2	CCACTACGCCTCCGCTTCCTCTATGGGCAGTCGGTGAT
Ion アダ プター A	3	ATCCUGGAAUCCTCTTATCUUUUUGATA <u>AAGAGGATTCCCGAT</u>
Ion P C R プライ マー A	4	CCATCTCATCCCTGCGTGCTCCGACTCAG <u>CTAAGGTAACGATAAGAGGATTC</u> CCGGAT

下線=第1のバーコード；灰色の背景付きの下線=第2のバーコード

10

【0058】

鋳型調製。10マイクロリットルの各DNA試料(0.1ng/μL Covaris剪断化(sheared)ヒトgDNA)をPCRチューブまたはウェルに加えた。非鋳型対照(NTC)として、10μLのヌクレアーゼフリーの水をDNA試料の代わりに用いた。2μL/試料 鋳型調製緩衝液(dNTPミックス(2.5mM 各dNTP)を追加した、(以下を含む6.5×ATPフリーのリガーゼ緩衝液:325mM Tris-HCl pH 7.6@25、65mM MgCl₂、3.25mM DTT)および1μL/試料 鋳型調製酵素(End Repair Mix、Enzymatic sカタログ#Y914-LC-L)のプレミックスを、別々のチューブ内に調製し、ピペットで混合した。その後、3μLのプレミックスを、PCRチューブまたはウェル内の10μL DNA試料に加え、4~5回、8μLに設定されたピペットで混合した。反応構成要素の最終濃度は以下の通りであった:50mM Tris-HCl pH 7.6@25、10mM MgCl₂、0.5mM DTT、385μM dNTP、1×End Repair Enzymes。PCRプレートを遠心分離し、以下の条件を用いてサーマルサイクラーにおいてインキュベートした:22で25分間の1サイクル；55で20分間の1サイクル；22で保持。

20

【0059】

ライプラリー合成。1μL/試料 ライプラリー合成緩衝液(15mM ATPおよび15μM 各ステムループアダプターオリゴを追加した、以下を含む2×ATPフリーのリガーゼ緩衝液:100mM Tris-HCl pH 7.6@25、20mM MgCl₂、1.0mM DTT)および1μL/試料 ライプラリー合成酵素ミックス(1μLあたり、1.2U ウラシルDNAグリコシラーゼ(UDG、Enzymatics #G5010L)および8U T4 DNAリガーゼ(Enzymatics#L603-HC-L)を含む)の新鮮なライプラリー合成プレミックスを、別個のチューブ内で調製し、ピペットにより混合した。その後、2μLのライプラリー合成プレミックスを各試料に加え、10μLに設定されたピペットで4~5回、混合した。反応構成要素の最終濃度は以下の通りであった:50mM Tris-HCl pH 7.6@25、10mM MgCl₂、0.5mM DTT、334μM dNTP、1mM ATP、1.2U ウラシルDNAグリコシラーゼ、8U T4 DNAリガーゼ、1μM 各アダプターオリゴ。プレートを遠心分離し、以下の条件を用いてサーマルサイクラーにおいてインキュベートした:22で40分間の1サイクル；4で保持。

30

【0060】

ThruPLEX-FDライプラリー増幅。4.25μL/試料 ヌクレアーゼフリーの水、3.75μL/試料 EvaGreen:FC(9:1)、50.5μL/試料 ライプラリー増幅緩衝液(0.375μMの各PCRオリゴを追加した、150mM Tris-SO₄、pH 8.5@25、120mM TMAc、0.75mM MgCl₂)を追加した、150mM TMAc、0.75mM MgCl₂を各試料に加え、42で10分間の1サイクル；4で保持。

40

50

2、0.06% w/v ゼラチンを含む) および 1.5 μL / 試料 ライブラー増幅酵素 (1U/uL における KAPA HiFi DNA ポリメラーゼ (KK2102)) のライブラー増幅プレミックスを、使用直前に別個のチューブ内で調製した。その後、60 μL のライブラー増幅プレミックスを、各ライブラーに加え、60 μL に設定されたピペットで 3 ~ 4 回、混合した。反応構成要素の最終濃度は以下の通りであった： 100 mM Tris-SO₄、pH 8.5 @ 25、80 mM TMAC、2.5 mM MgCl₂、0.04% w/v ゼラチン、1 × EvaGreen、1 × FCD、1.5 U KAPA HiFi DNA ポリメラーゼ、0.25 μM 各 PCR オリゴ。プレートを遠心分離し、その後、以下の通り、リアルタイムサーマルサイクラーにおいてインキュベートした： 72 で 3 分間の 1 サイクル； 85 で 2 分間の 1 サイクル； 98 で 2 分間の 1 サイクル； 98 で 20 秒間、67 で 20 秒間、72 で 40 秒間の 4 サイクル； ならびに 98 で 20 秒間および 72 で 50 秒間の 4 ~ 21 サイクル。
10

【0061】

結論。アダプターニ量体の有意な増大が生じた (図 4)。これは、構築物における抑制の欠如による可能性がある；それゆえに、本発明者らは、末端逆方向反復を生じる配列を含有し、かつ近位直列型バーコードを含むバージョンを試験した。

【0062】

実施例 2 末端逆方向反復を含有する、DNA シーケンシングのための二重直列型のバーコード化するアダプター配列

本発明者らは、(ライゲーションの部位に対して近位の) 第 2 のバーコードによって表示される末端逆方向反復を有するタンデム型二重バーコードを含有する Ion アダプターを試験しようと試みた。ステムループアダプターおよび PCR プライマーを、図 5 および表 2 に示されているように設計した。
20

【0063】

【表 2】

表 2 末端逆方向反復を生じるためのオリゴヌクレオチド配列

オリゴ名	配列番号	配列
Ion PCR オリゴ P1	5	CCACTACGCCCTCGCTTCCCTCTATGGCAGTCGGTGATAAGAGGATTCCGGATTG
Ion ユニバーサルアダプター P1/A	6	CAATCCUGGAAUCCTCTTATCUUUUUUGATA <u>AAGAGGATTCCCGGATTG</u>
Ion PCR プライマー A	7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <u>TAAGGTAACGATAAGAGGAT</u> <u>TCCCGGATTG</u>

下線 = 第 1 のバーコード；灰色の背景付きの下線 = 第 2 のバーコード

【0064】

Ion ユニバーサルアダプター P1/A の T_M を、0.25 μM オリゴ、100 mM Na⁺、2.5 mM Mg²⁺、および 0.3 mM dNTP において Oligo Analyzer (IDT) を用いて計算し、61 であった。
40

【0065】

実験条件は、表 2 に示されたオリゴヌクレオチド配列が用いられ、かつ単一のユニバーサルステムループアダプター (ライブラー合成反応において 2 μM) が、末端逆方向反復を DNA 断片の両方の末端に付着させるために用いられたことを除いて、実施例 1 に記載されている通りであった。末端逆方向反復を生じるための配列を含有するステムループアダプターは、実施例 1 に記載された、逆方向反復を生じるためのそのような配列を含有しない設計 (図 4) に対して、信号雑音比の有意な改善を示した (図 6)。

【0066】

本明細書に開示され、および主張された方法の全ては、本開示を鑑みれば、過度の実験なしになされ、かつ実行することができる。この発明の組成物および方法は、好ましい実
50

施形態に関して記載されているが、本明細書に記載された方法に、および方法のステップにおいて、または一連のステップにおいて、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、バリエーションが適用され得ることは、当業者に明らかであろう。より具体的には、化学的および生理学的の両方に関連しているある特定の作用物質が、本明細書に記載された作用物質に代わって用いられてもよいが、同時に、同じまたは類似した結果が達成されるだることは、明らかであろう。当業者に明らかな全てのそのような類似した置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって定義されているような本発明の精神、範囲、および概念の範囲内にあるとみなされる。

【 0 0 6 7 】

参考文献

10

以下の参考文献は、本明細書に示されたものを補足する例示的な手順またはその他の詳細を提供する範囲において、参照により本明細書に明確に組み入れられている。

【 0 0 6 8 】

【化1】

- U.S. Pat. 5,858,656
U.S. Pat. 5,935,793
U.S. Pat. 6,261,782
U.S. Pat. 7,803,550
U.S. Pat. 7,902,122
U.S. Pat. Publn. No. 2007/0020640
U.S. Pat. Publn. No. 2009/0068645 10
U.S. Pat. Publn. No. 2010/0227329
U.S. Pat. Publn. No. 2010/0273219
U.S. Pat. Publn. No. 2011/0015096
U.S. Pat. Publn. No. 2011/0257031
U.S. Pat. Publn. No. 2011/0319290
U.S. Pat. Publn. No. 2012/0028814
- 20
Ausubel *et al.*, In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 2003.
Chenchik *et al.*, Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by
amplification of adaptor-ligated cDNA, *Biotechniques*, 21:526-534, 1996.
Lukyanov *et al.*, Selective suppression of polymerase chain reaction, *Bioorganicheskaya
Khimiya*, 25:163-170, 1999.
Oyola *et al.*, Optimizing Illumina next-generation sequencing library preparation for
extremely AT-biased genomes, *BMC Genomics*, 13:1, 2012
Parcock *et al.*, Sequencing technologies and genome sequencing, *J. Appl. Genet.*, 52(4):413-
435, 2011. 30
Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor
Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
Shagin *et al.*, Regulation of average length of complex PCR product, *Nucleic Acids Research*,
27, e23, 1999.
Siebert *et al.*, An Improved PCR Method for Walking in Uncloned Genomic DNA, *Nucleic
Acids Research*, 23:1087-1088, 1995.
Thudi *et al.*, Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research,
Brief Funct. Genomics., 11(1):3-11, 2012. 40

【図1】

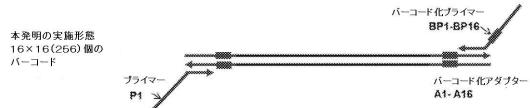
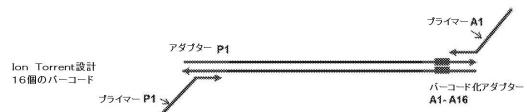


FIG. 1

【図2】

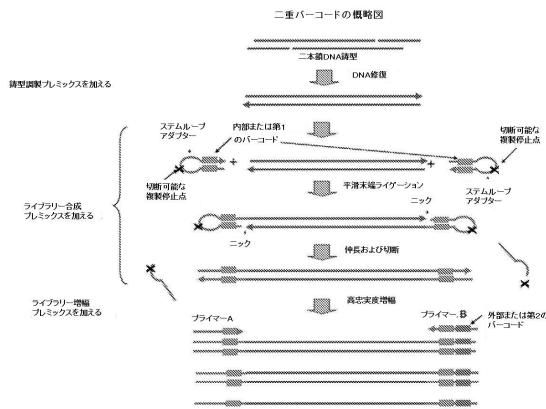


FIG. 2

【図3】

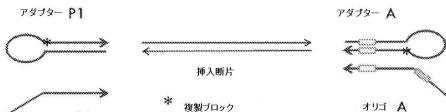


FIG. 3

【図4】

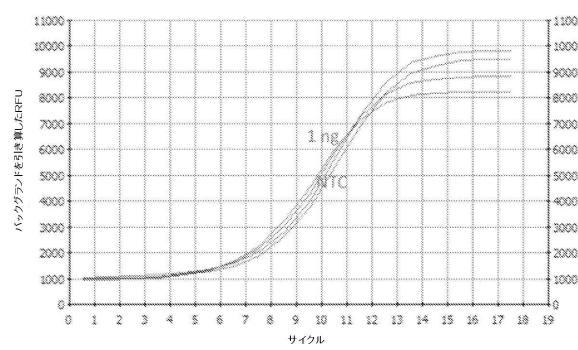


FIG. 4

【図5】

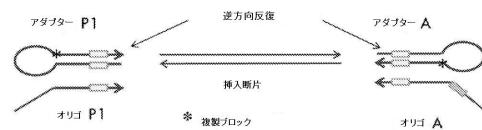


FIG. 5

【図6】

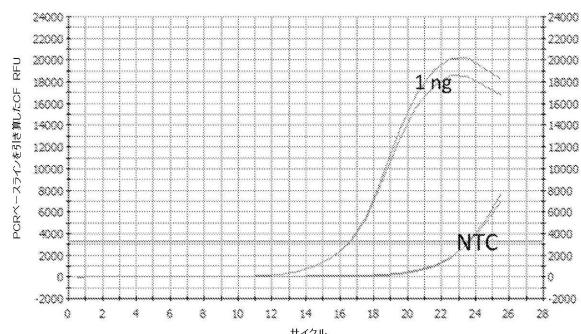


FIG. 6

【配列表】

0006454281000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 クリハラ, タカオ

アメリカ合衆国 ミシガン 48108, アン アーバー, バーシティー ドライブ 435
5, スイート イー, ルビコン ゲノミクス 気付

(72)発明者 カムプロフ, エマニュエル

アメリカ合衆国 ミシガン 48108, アン アーバー, バーシティー ドライブ 435
5, スイート イー, ルビコン ゲノミクス 気付

(72)発明者 テスマー, ティム

アメリカ合衆国 ミシガン 48108, アン アーバー, バーシティー ドライブ 435
5, スイート イー, ルビコン ゲノミクス 気付

(72)発明者 ラングモア, ジヨン

アメリカ合衆国 ミシガン 48108, アン アーバー, バーシティー ドライブ 435
5, スイート イー, ルビコン ゲノミクス 気付

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第2010/030683 (WO, A1)

米国特許第07803550 (US, B1)

米国特許出願公開第2010/0129874 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

Caplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed

Google Scholar