

【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】平成30年8月2日(2018.8.2)

【公表番号】特表2017-522866(P2017-522866A)
 【公表日】平成29年8月17日(2017.8.17)
 【年通号数】公開・登録公報2017-031
 【出願番号】特願2016-575069(P2016-575069)
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 Z

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月25日(2018.6.25)

【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】

核酸における 1 つ以上の変異の特定方法であって、

(a) (i) 前記核酸の第 1 の断片および (i i) ビーズに結合する複数の核酸バーコード分子を含むビーズを含むパーティションを提供することであって、前記第 1 の断片が 10 キロベース (k b) を超える長さを有し、前記核酸バーコード分子が、各々が共通のバーコード配列を含む配列を含む、ことと、

(b) 前記パーティションにおいて、前記ビーズからの前記核酸バーコード分子からの前記配列および前記第 1 の断片を用いて、複数の第 2 の断片を生成することであって、前記複数の第 2 の断片の各々は、前記共通のバーコード配列を含む、ことと、

(c) 前記第 1 の断片の前記複数の第 2 の断片を配列決定して、複数の断片配列を提供することであって、複数の断片配列は前記共通のバーコード配列を共有する、ことと、

(d) 前記共通のバーコード配列の存在によって前記複数の断片配列を前記第 1 の断片に帰属させることと、

(e) 前記複数の断片配列を用いて前記第 1 の断片の核酸配列を決定することであって、前記核酸配列が 1 %未満の誤差率で決定される、ことと、

(f) (e) で決定された前記第 1 の断片の前記核酸配列における前記 1 つ以上の変異を特定し、それにより前記核酸内の前記 1 つ以上の変異を特定することを含む、方法。

【請求項 2】

前記パーティションがエマルジョン中の液滴である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記特定が、前記第 1 の断片の前記核酸配列から前記核酸におけるフェーズ化変異体を特定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記特定が、前記第 1 の断片の前記核酸配列から前記核酸における 1 つ以上の構造的変異を特定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 の断片が 15 k b を超える長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記第 1 の断片が 20 kb を超える長さを有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記決定が、前記複数の断片配列を参照にマッピングすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記決定が、前記共通のバーコード配列を有する前記複数の断片配列をアセンブリングすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

長さが少なくとも 10 kb である前記核酸の複数の第 1 の断片を提供することを更に含み、前記特定が、前記複数の第 1 の断片の各々から核酸配列を決定し、前記複数の第 1 の断片の各々からの前記核酸配列から前記核酸における前記 1 つ以上の変異を特定することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記 2 つ以上の核酸配列の重複する核酸配列に基づいて、推測コンティグに連結することを更に含み、最大推測コンティグ長が少なくとも 10 kb である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記複数の第 1 の断片の前記 2 つ以上の核酸配列内の重複するフェーズ化変異体に基づいて、フェーズブロックに連結することを更に含み、最大フェーズブロック長が少なくとも 10 kb である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記 2 つ以上の核酸配列の重複する核酸配列に基づいて、推測コンティグに連結し、それにより推測コンティグの集団を作ることを含む、前記推測コンティグの集団の N50 が少なくとも 10 kb である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記複数の第 1 の断片の前記 2 つ以上の核酸配列内の重複するフェーズ化変異体に基づいて、フェーズブロックに連結し、それによりフェーズブロックの集団を作ることを含む、前記フェーズブロックの集団の N50 が少なくとも 10 kb である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記複数の第 2 の断片の生成の後に、前記配列は前記ビーズに付着しない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記パーティションは複数のパーティションの中にあり、前記パーティション中の前記共通のバーコード配列は、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中の共通のバーコード配列とは異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記配列は前記ビーズから放出可能である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

(b) において、前記複数の第 2 の断片の生成の前に、前記ビーズから前記配列を放出することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記配列が、刺激の適用を介して前記ビーズから放出される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記刺激は、光刺激、熱刺激、化学刺激またはその組み合わせである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記化学刺激は、還元剤である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記核酸バーコード分子は前記第 1 の断片に相補的であるプライマー配列を含み、前記複数の第 2 の断片の生成は、前記核酸バーコード分子を前記第 1 の断片にハイブリダイズさせることおよび伸長反応を行って前記複数の第 2 の断片を生成することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ビーズは可溶性または分解性である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ビーズを分解または溶解することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記ビーズを分解または溶解することは刺激の適用を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記刺激は、光刺激、熱刺激、化学刺激またはその組み合わせである、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記化学刺激は、還元剤である、請求項 25 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】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

本発明の新規特徴は、付属の特許請求の範囲に詳細に記述される。本発明の特徴及び利点のより良い理解は、本発明の原理が利用される図示的な実施形態を記述する以下の発明を実施するための形態及び添付の図面を参照することにより得られるだろう。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

核酸における 1 つ以上の変異の特定方法であって、

(a) 前記核酸の第 1 の断片であって、10 キロベース (kb) を超える長さを有する、前記第 1 の断片を提供することと、

(b) 前記第 1 の断片の複数の第 2 の断片を配列決定して、共通のバーコード配列を共有する、複数の断片配列を提供することと、

(c) 前記共通のバーコード配列の存在により、前記複数の断片配列を前記第 1 の断片に帰属させることと、

(d) 前記複数の断片配列を用いて前記第 1 の断片の核酸配列を決定することであって、前記核酸配列が 1 % 未満の誤差率で決定される、前記決定することと、

(e) (d) で決定された前記第 1 の断片の前記核酸配列における前記 1 つ以上の変異を特定し、それにより前記核酸内の前記 1 つ以上の変異を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 2)

前記第 1 の断片が複数の別個のパーティションの中の 1 つの別個のパーティション内にある、項目 1 に記載の方法。

(項目 3)

前記別個のパーティションがエマルジョン中の液滴である、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記特定が、前記第 1 の断片の前記核酸配列から前記核酸におけるフェーズ化変異体を特定することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 5)

前記特定が、前記第 1 の断片の前記核酸配列から前記核酸における 1 つ以上の構造的変異を特定することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 6)

前記第 1 の断片が 1 5 k b を超える長さを有する、項目 1 に記載の方法。

(項目 7)

前記第 1 の断片が 2 0 k b を超える長さを有する、項目 1 に記載の方法。

(項目 8)

前記決定が、前記複数の断片配列を参照にマッピングすることを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 9)

前記決定が、前記共通のバーコード配列を有する前記複数の断片配列をアセンブリングすることを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 0)

長さが少なくとも 1 0 k b である前記核酸の複数の第 1 の断片を提供することを更に含み、前記特定が、前記複数の第 1 の断片の各々から核酸配列を決定し、前記複数の第 1 の断片の各々からの前記核酸配列から前記核酸における前記 1 つ以上の変異を特定することを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 1 1)

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記 2 つ以上の核酸配列の重複する核酸配列に基づいて、推測コンティグに連結することを更に含み、最大推測コンティグ長が少なくとも 1 0 k b である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 1 2)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 2 0 k b である、項目 1 1 に記載の方法。

(項目 1 3)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 4 0 k b である、項目 1 2 に記載の方法。

(項目 1 4)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 5 0 k b である、項目 1 3 に記載の方法。

(項目 1 5)

前記コンティグ長が少なくとも 1 0 0 k b である、項目 1 4 に記載の方法。

(項目 1 6)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 2 0 0 k b である、項目 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 5 0 0 k b である、項目 1 6 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 7 5 0 k b である、項目 1 7 に記載の方法。

(項目 1 9)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 1 メガベース (Mb) である、項目 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 1 . 7 5 Mb である、項目 1 9 に記載の方法。

(項目 2 1)

前記最大推測コンティグ長が少なくとも 2 . 5 Mb である、項目 2 0 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記複数の第 1 の断片の前記 2 つ以上の核酸配列内の重複するフェーズ化変異体に基づいて、フェーズブロックに連結することを更に含み、最大フェーズブロック長が少なくとも 1 0 k b である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 2 3)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 2 0 k b である、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 4 0 k b である、項目 2 3 に記載の方法。

(項目 2 5)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 5 0 k b である、項目 2 4 に記載の方法。

(項目 2 6)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 1 0 0 k b である、項目 2 5 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 2 0 0 k b である、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 5 0 0 k b である、項目 2 7 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 7 5 0 k b である、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 1 M b である、項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 1 . 7 5 M b である、項目 3 0 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 2 . 5 M b である、項目 3 1 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記 2 つ以上の核酸配列の重複する核酸配列に基づいて、推測コンティグに連結し、それにより推測コンティグの集団を作ることを含み、前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 1 0 k b である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 2 0 k b である、項目 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 4 0 k b である、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 5 0 k b である、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 1 0 0 k b である、項目 3 6 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 2 0 0 k b である、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 5 0 0 k b である、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 7 5 0 k b である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 1 M b である、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 1 . 7 5 M b である、項目 4 1 に記載

の方法。

(項目 4 3)

前記推測コンティグの集団の N 5 0 が少なくとも 2. 5 M b である、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記複数の第 1 の断片の 2 つ以上の核酸配列を、前記複数の第 1 の断片の前記 2 つ以上の核酸配列内の重複するフェーズ化変異体に基づいて、フェーズブロックに連結し、それによりフェーズブロックの集団を作ることを含み、前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 1 0 k b である、項目 1 0 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 2 0 k b である、項目 4 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 4 0 k b である、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 5 0 k b である、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 1 0 0 k b である、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 2 0 0 k b である、項目 4 8 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 5 0 0 k b である、項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 7 5 0 k b である、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 1 M b である、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 1. 7 5 M b である、項目 5 2 に記載の方法。

(項目 5 4)

前記フェーズブロックの集団の N 5 0 が少なくとも 2. 5 M b である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

核酸の構造的変異の存在の決定方法であって、

(a) 前記核酸の複数の第 1 の断片分子を提供することであって、前記複数の第 1 の断片分子の所与の第 1 の断片分子が前記構造的変異を含む、前記提供することと、

(b) 前記複数の第 1 の断片分子の各々の複数の第 2 の断片分子を配列決定して複数の断片配列を提供することであって、所与の第 1 の断片分子に対応する前記複数の断片配列の各々が共通のバーコード配列を共有する、前記提供することと、

(c) (i) 前記複数の断片配列を参照配列にマッピングすること、(i i) 前記共通のバーコード配列を共有する前記複数の断片配列を特定すること、及び (i i i) 前記所与の第 1 の断片分子の長さよりも更に離れている位置の前記参照配列にマッピングする、前記共通のバーコード配列を共有する上昇した量の前記複数の断片配列の存在に基づき前

記構造的変異を特定することであって、前記上昇した量が前記構造的変異を欠如する配列に対してである、前記特定することにより、前記構造的変異の存在を決定することと、を含む、前記方法。

(項目 5 6)

前記上昇した量が、前記構造的変異を有する前記核酸の領域に由来する前記第 1 の断片分子の総数に対して 1 % 以上である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記上昇した量が、前記構造的変異を有する前記核酸の領域に由来する前記第 1 の断片分子の総数に対して 2 % 以上である、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記位置が少なくとも約 1 0 0 塩基離れている、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記位置が少なくとも約 5 0 0 塩基離れている、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記位置が少なくとも約 1 キロベース (k b) 離れている、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

前記位置が少なくとも約 1 0 k b 離れている、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

前記複数の断片配列から前記所与の第 1 の断片分子のアセンブリを作ることにより前記構造的変異を特定することを更に含み、前記複数の断片配列が前記共通のバーコード配列の存在に基づいて前記アセンブリの入力として選択される、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 3)

前記アセンブリが、前記複数の断片配列からコンセンサス配列を生成することにより作られる、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 4)

前記構造的変異が転座を含む、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 5)

変異体核酸配列の特徴付け方法であって、

(a) 変異体核酸を断片化して 1 0 キロベース (k b) を超える長さを有する複数の第 1 の断片を提供することと、

(b) 前記複数の第 1 の断片を別個のパーティションに分離することと、

(c) 各第 1 の断片からそのそれぞれのパーティション内に複数の第 2 の断片を作ることであって、前記複数の第 2 の断片がそれに付加されるバーコード配列を有し、所与のパーティション内の前記バーコード配列が共通のバーコード配列である、前記作ることと、

(d) 前記複数の第 2 の断片及びそれに付加される前記バーコード配列を配列決定して複数の第 2 の断片の配列を得ることと、

(e) 少なくとも部分的に前記共通のバーコード配列の存在に基づき、前記第 2 の断片の配列を元の第 1 の断片に帰属させて、前記第 2 の断片の配列のための第 1 の断片の配列環境 (sequence context) を提供することと、

(f) 前記第 1 の断片の配列環境から前記変異体核酸の変異体部分を特定し、それにより前記変異体核酸配列を特徴付けることと、を含む、前記方法。

(項目 6 6)

前記帰属が、少なくとも部分的に前記共通のバーコード配列の存在に基づき、前記複数の第 2 の断片の配列から前記複数の第 1 の断片からの個々の断片の配列の少なくとも一部をアセンブリングすることを含む、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記帰属が、少なくとも部分的に前記共通のバーコード配列に基づき、前記複数の第 2 の断片の配列を前記複数の第 1 の断片からの個々の第 1 の断片にマッピングすることを含む、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

前記複数の第1の断片のうちの2つ以上を、前記複数の第1の断片のうちの前記2つ以上の間の重複する配列に基づき、推測コンティグに連結することを更に含む、項目65に記載の方法。

(項目69)

前記特定が、前記第1の断片の配列環境から1つ以上のフェーズ化変異体を特定することを含む、項目65に記載の方法。

(項目70)

前記複数の第1の断片のうちの2つ以上を、前記複数の第1の断片のうちの前記2つ以上の間の重複するフェーズ化変異体に基づき、フェーズブロックに連結することを更に含む、項目65に記載の方法。

(項目71)

前記特定が、前記第1の断片の配列環境から1つ以上の構造的変異を特定することを含む、項目70に記載の方法。

(項目72)

前記1つ以上の構造的変異が、挿入、欠失、転座、レトロトランスポゾン、反転、及び重複から独立して選択される、項目71に記載の方法。

(項目73)

前記構造的変異が挿入または転座を含み、前記第1の断片配列環境が前記挿入または転座の存在を示す、項目72に記載の方法。

(項目74)

核酸の配列における変異体の特定方法であって、

前記核酸の複数の個々の断片分子の核酸配列であって、各々少なくとも1キロベース(kb)の長さを有する、前記複数の個々の断片分子の核酸配列を得ることと、

前記複数の個々の断片分子のうちの1つ以上の配列を、1つ以上の推測コンティグに連結することと、

前記1つ以上の推測コンティグから1つ以上の変異体を特定することと、を含む、前記方法。

(項目75)

前記得ることが、長さが10kbを超える複数の断片分子の前記核酸配列を得ることを含む、項目74に記載の方法。

(項目76)

前記得ることが、

前記複数の個々の断片分子の各個々の断片分子の複数のバーコード化された断片を提供することであって、所与の個々の断片分子の前記バーコード化された断片が共通のバーコードを有する、前記提供することと、

前記複数の個々の断片分子の前記複数のバーコード化された断片を配列決定することであって、前記配列決定が1%未満の配列決定誤差率を提供する、前記決定することと、

前記複数のバーコード化された断片の配列及びそれらの関連バーコードから前記複数の個々の断片分子の配列を決定することと、を含む、項目75に記載の方法。

(項目77)

前記連結が、2つ以上の個々の断片分子間における1つ以上の重複配列を特定して、前記2つ以上の個々の断片分子を前記1つ以上の推測コンティグに連結することを含む、項目76に記載の方法。

(項目78)

前記連結が、2つ以上の個々の断片分子間における1つ以上の共通の変異体を特定して、前記2つ以上の個々の断片分子を前記1つ以上の推測コンティグに連結することを含む、項目77に記載の方法。

(項目79)

前記1つ以上の共通の変異体がフェーズ化変異体であり、前記1つ以上の推測コンティグが少なくとも100kbの最大フェーズブロック長を含む、項目78に記載の方法。

(項目 8 0)

前記特定において特定された前記 1 つ以上の変異体が構造的変異を含む、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 8 1)

前記構造的変異が、挿入、欠失、転座、レトロトランスポゾン、反転、及び重複から選択される、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 2)

核酸の特徴付け方法であって、

少なくとも 10 キロベース (k b) の長さを有する複数の断片分子の核酸配列を得ることと、

前記複数の断片分子の前記核酸配列における 1 つ以上のフェーズ化変異体の位置を特定することと、

少なくとも第 1 の断片分子の前記核酸配列を少なくとも第 2 の断片分子に、前記第 1 及び第 2 の断片分子内の 1 つ以上の共通のフェーズ化変異体位置の存在に基づいて連結して、少なくとも 10 k b の最大フェーズブロック長のフェーズブロックを提供することと、

前記少なくとも 10 k b の最大フェーズブロック長の前記フェーズブロックから 1 つ以上のフェーズ化変異体を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 8 3)

前記フェーズブロックから 1 つ以上の追加のフェーズ化変異体を特定することを更に含む、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記複数の断片分子が別個のパーティション内にある、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記別個のパーティションがエマルジョン中の液滴である、項目 8 4 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記複数の断片分子の前記長さが少なくとも 50 k b である、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記複数の断片分子の前記長さが少なくとも 100 k b である、項目 8 6 に記載の方法。

。

(項目 8 8)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 50 k b である、項目 8 2 に記載の方法。

(項目 8 9)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 100 k b である、項目 8 8 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 1 M b である、項目 8 9 に記載の方法。

(項目 9 1)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 2 M b である、項目 9 0 に記載の方法。

(項目 9 2)

前記最大フェーズブロック長が少なくとも 2.5 M b である、項目 9 1 に記載の方法。

(項目 9 3)

方法であって、

a) 第 1 の核酸であって、生物の第 1 の染色体に由来する標的配列を含む、前記第 1 の核酸を第 1 のパーティションに分配することと、

b) 第 2 の核酸であって、前記生物の第 2 の染色体に由来する標的配列を含む、前記第 2 の核酸を第 2 のパーティションに分配することと、

c) 前記第 1 のパーティションにおいて、第 1 のバーコード配列を前記第 1 の核酸の断片または前記第 1 の核酸の一部のコピーに付加して、第 1 のバーコード化された断片を提供することと、

d) 前記第 2 のパーティションにおいて、第 2 のバーコード配列であって、前記第 1 のバーコード配列とは異なる、前記第 2 のバーコード配列を前記第 2 の核酸の断片または前

記第 2 の核酸の一部のコピーに付加して、第 2 のバーコード化された断片を提供することと、

e) 前記第 1 及び第 2 のバーコード化された断片の前記核酸配列を決定し、前記第 1 及び第 2 の核酸の核酸配列をアセンブリングすることと、

f) 前記第 1 及び第 2 の核酸の前記核酸配列を比較して、それぞれ、第 1 及び第 2 の染色体に由来するとして前記第 1 及び第 2 の核酸を特徴付けることと、を含む前記方法。

(項目 9 4)

前記第 1 のバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドが前記第 1 の核酸と共分配され (c o o p a r t i t i o n e d)、前記第 2 のバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドが前記第 2 の核酸と共分配される、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

前記第 1 のバーコード配列を含む前記オリゴヌクレオチドが第 1 のビーズに放出可能に付加され、前記第 2 のバーコード配列を含む前記オリゴヌクレオチドが第 2 のビーズに放出可能に付加され、前記共分配が、それぞれ、前記第 1 及び第 2 のビーズを前記第 1 及び第 2 のパーティションに共分配することを含む、項目 9 4 に記載の方法。

(項目 9 6)

前記第 1 及び第 2 のパーティションがエマルジョン中の液滴を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記第 1 の染色体が父方染色体であり、前記第 2 の染色体が母方染色体である、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 8)

前記第 1 の染色体及び前記第 2 の染色体が相同染色体である、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 9)

前記第 1 の核酸及び前記第 2 の核酸が 1 つ以上の変異を含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 1 0 0)

方法であって、

a) 第 1 の核酸であって、生物の第 1 の染色体に由来する標的配列を含む、前記第 1 の核酸を第 1 のパーティションに分配することと、

b) 第 2 の核酸であって、前記生物の第 2 の染色体に由来する標的配列を含む、前記第 2 の核酸を第 2 のパーティションに分配することと、

c) 前記第 1 のパーティションにおいて、第 1 のバーコード配列を前記第 1 の核酸の断片または前記第 1 の核酸の一部のコピーに付加して、第 1 のバーコード化された断片を提供することと、

d) 前記第 2 のパーティションにおいて、第 2 のバーコード配列であって、前記第 1 のバーコード配列とは異なる、前記第 2 のバーコード配列を前記第 2 の核酸の断片または前記第 2 の核酸の一部のコピーに付加して、第 2 のバーコード化された断片を提供することと、

e) 前記第 1 及び第 2 のバーコード化された断片の前記核酸配列を決定し、前記第 1 及び第 2 の核酸の核酸配列をアセンブリングすることと、

f) 前記第 1 及び第 2 の核酸の前記核酸配列を比較して、前記第 1 及び第 2 の核酸の前記核酸配列間の任意の変異を特定することと、を含む、前記方法。

(項目 1 0 1)

前記第 1 のバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドが前記第 1 の核酸と共分配され、前記第 2 のバーコード配列を含むオリゴヌクレオチドが前記第 2 の核酸と共分配される、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記第 1 のバーコード配列を含む前記オリゴヌクレオチドが第 1 のビーズに放出可能に付加され、前記第 2 のバーコード配列を含む前記オリゴヌクレオチドが第 2 のビーズに放出可能に付加され、前記共分配が、それぞれ、前記第 1 及び第 2 のビーズを前記第 1 及び

第 2 のパーティションに共分配することを含む、項目 1 0 1 に記載の方法。

(項目 1 0 3)

前記第 1 及び第 2 のパーティションがエマルジョン中の液滴を含む、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

前記第 1 の染色体が父方染色体であり、前記第 2 の染色体が母方染色体である、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記第 1 の染色体及び前記第 2 の染色体が相同染色体である、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 6)

前記第 1 の核酸及び前記第 2 の核酸が 1 つ以上の変異を含む、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 7)

前記第 1 及び第 2 の染色体が胎児に由来する、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

前記第 1 及び第 2 の核酸が妊婦から採取した試料から得られる、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 9)

前記第 1 の染色体が染色体 2 1、1 8、または 1 3 である、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 1 0)

前記第 2 の染色体が染色体 2 1、1 8、または 1 3 である、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 1 1)

前記第 1 または第 2 の染色体の相対量を決定することを更に含む、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

参照染色体に対する前記第 1 または第 2 の染色体の量を決定することを更に含む、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記第 1 の染色体もしくは第 2 の染色体またはその両方のコピー数が増加する、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記コピー数の増加が癌または異数体の結果である、項目 1 1 3 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

前記第 1 の染色体もしくは第 2 の染色体またはその両方のコピー数が減少する、項目 9 3 または項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 1 6)

前記コピー数の減少が癌または異数体の結果である、項目 1 1 5 に記載の方法。

(項目 1 1 7)

胎児核酸配列の特徴付け方法であって、

(a) 母方核酸配列を決定することであって、前記母方核酸が、胎児の妊娠中の母親に由来し、

(i) 母方核酸を断片化して複数の第 1 の母方断片を提供すること、

(i i) 前記複数の第 1 の母方断片を母方パーティション内に分離すること、

(i i i) 前記第 1 の母方断片の各々からそれらのそれぞれの母方パーティション内に複数の第 2 の母方断片を作ることであって、前記複数の第 2 の母方断片がそれに付加される第 1 のバーコード配列を有し、前記母方パーティションの所与の母方パーティション内で

、前記第 2 の母方断片がそれに付加される第 1 の共通のバーコード配列を含む、前記作ること、

(i v) 前記複数の第 2 の母方断片を配列決定して複数の母方断片配列を提供すること、
(v) 少なくとも部分的に前記第 1 の共通のバーコード配列の存在に基づき、前記母方断片配列を元の第 1 の母方断片に帰属させて前記母方核酸配列を決定することにより、前記決定することと、

(b) 父方核酸配列を決定することであって、前記父方核酸が、前記胎児の父親に由来し、

(i) 父方核酸を断片化して複数の第 1 の父方断片を提供すること、

(i i) 前記複数の第 1 の父方断片を父方の別個のパーティション内に分離すること、

(i i i) 各第 1 の父方断片からそのそれぞれのパーティション内に複数の第 2 の父方断片を作ることであって、前記複数の第 2 の父方断片がそれに付加される第 2 のバーコード配列を有し、所与の父方パーティション内で、前記第 2 の父方断片がそれに付加される第 2 の共通のバーコード配列を含む、作ること、

(i v) 前記複数の第 2 の父方断片及びそれに付加される前記第 2 のバーコード配列を配列決定して複数の父方断片配列を提供すること、

(v) 少なくとも部分的に前記第 2 の共通のバーコード配列の存在に基づき、前記父方断片配列を元の第 1 の父方断片に帰属させて前記父方核酸配列を決定することにより、前記決定することと、

(c) 前記妊娠中の母親から胎児核酸を得、前記母方核酸配列及び前記父方核酸配列を使用して、前記胎児核酸の配列及び／または前記胎児核酸の前記配列の 1 つ以上の遺伝的変異を決定することと、を含む、前記方法。

(項目 1 1 8)

前記父方断片配列及び前記母方断片配列が各々、配列を 1 つ以上の推測コンティグに連結するために使用される、項目 1 1 7 に記載の方法。

(項目 1 1 9)

前記推測コンティグが、母方及び父方のフェーズブロックを構築するために使用される、項目 1 1 8 に記載の方法。

(項目 1 2 0)

前記胎児核酸の前記配列が、胎児フェーズブロックを構築するために前記母方及び父方のフェーズブロックと比較される、項目 1 1 9 に記載の方法。

(項目 1 2 1)

前記父方断片配列が前記複数の第 1 の父方断片の配列の少なくとも一部を生成するためにアセンブリングされ、それにより前記父方核酸配列を決定し、前記母方断片配列が前記複数の第 1 の母方断片の配列の少なくとも一部を生成するためにアセンブリングされ、それにより前記母方核酸配列を決定する、項目 1 2 0 に記載の方法。

(項目 1 2 2)

前記父方核酸配列の前記決定が前記父方断片配列を父方参照にマッピングすることを含み、前記母方核酸配列の前記決定が前記母方断片配列を母方参照にマッピングすることを含む、項目 1 1 7 に記載の方法。

(項目 1 2 3)

前記胎児核酸の前記配列が少なくとも 9 9 % の精度で決定される、項目 1 1 7 に記載の方法。

(項目 1 2 4)

前記胎児核酸の前記配列の前記 1 つ以上の遺伝的変異が少なくとも 9 9 % の精度で決定される、項目 1 1 7 に記載の方法。

(項目 1 2 5)

前記 1 つ以上の遺伝的変異が、構造的変異及び一塩基多型 (S N P) からなる群から選択される、項目 1 1 7 に記載の方法。

(項目 1 2 6)

前記1つ以上の遺伝的変異が、コピー数変異、挿入、欠失、転座、レトロトランスポゾン、反転、再編成、反復配列伸長、及び重複からなる群から選択される構造的変異である、項目117に記載の方法。

(項目127)

(c)において、前記母方核酸配列及び前記父方核酸配列について決定された1つ以上の遺伝的変異を使用して、前記胎児核酸の前記配列の前記1つ以上の遺伝的変異を決定することを更に含む、項目117に記載の方法。

(項目128)

(c)において、前記胎児核酸の1つ以上の新規突然変異を決定することを更に含む、項目117に記載の方法。

(項目129)

(c)の間または後に、前記胎児核酸に関連する異数体を決定することを更に含む、項目117に記載の方法。

(項目130)

(a)の(v)の間または後に、前記母方核酸配列をハプロタイプ分析(haplotyping)してハプロタイプが解明された母方核酸配列を提供することと、(b)の(v)の間または後に、前記父方核酸配列をハプロタイプ分析してハプロタイプが解明された父方核酸配列を提供することと、を更に含む、項目117に記載の方法。

(項目131)

(c)において、前記ハプロタイプが解明された母方核酸配列及び前記ハプロタイプが解明された父方核酸配列を使用して、前記胎児核酸の前記配列及び／または前記1つ以上の遺伝的変異を決定することを更に含む、項目130に記載の方法。

(項目132)

前記母方核酸及び前記父方核酸のうちの1つ以上がゲノムデオキシリボ核酸(DNA)である、項目117に記載の方法。

(項目133)

(c)において、前記胎児核酸が無細胞核酸を含む、項目117に記載の方法。

(項目134)

(a)において、少なくとも99%の精度で前記母方核酸配列を決定することを更に含む、項目117に記載の方法。

(項目135)

(b)において、少なくとも99%の精度で前記父方核酸配列を決定することを更に含む、項目117に記載の方法。

(項目136)

前記母方核酸配列及び／または前記父方核酸配列が10キロベース(kb)を超える長さを有する、項目117に記載の方法。

(項目137)

前記母方及び父方のパーティションがエマルジョン中の液滴を含む、項目117に記載の方法。

(項目138)

(a)において、前記第1のバーコード配列が、第1の粒子に放出可能に付加された前記所与の母方パーティションにおいて提供される、項目117に記載の方法。

(項目139)

(b)において、前記第2のバーコード配列が、第2の粒子に放出可能に付加された前記所与の父方パーティションにおいて提供される、項目138に記載の方法。

(項目140)

試料核酸の特徴付け方法であって、

(a)生物学的試料であって、無細胞試料核酸を含む、前記生物学的試料を対象から得ることと、

(b)液滴において、バーコード配列を前記無細胞試料核酸の断片または前記試料核酸

の一部のコピーに付加してバーコード化された試料断片を得ることと、

(c) 前記バーコード化された試料断片の核酸配列を決定し、前記バーコード化された試料断片の前記核酸配列に基づき試料核酸配列を提供することと、

(d) プログラム化されたコンピュータプロセッサを使用して前記試料核酸配列の参照核酸配列との比較を生成することであって、前記参照核酸配列が10キロベース(kb)を超える長さ及び少なくとも99%の精度を有する、前記生成することと、

(e) 前記比較を使用して前記試料核酸配列における1つ以上の遺伝的変異を特定し、それにより前記試料核酸を疾患と関連付けることと、を含む、前記方法。

(項目141)

前記試料核酸配列における前記1つ以上の遺伝的変異が、構造的変異及び一塩基多型(SNP)からなる群から選択される、項目140に記載の方法。

(項目142)

前記試料核酸配列の前記1つ以上の遺伝的変異が、コピー数変異、挿入、欠失、レトロトランスポゾン、転座、反転、再編成、反復配列伸長、及び重複からなる群から選択される構造的変異である、項目140に記載の方法。

(項目143)

(c)において、前記試料核酸配列が少なくとも99%の精度で提供される、項目140に記載の方法。

(項目144)

(b)において、前記バーコード配列が粒子に放出可能に付加された前記液滴に提供され、(b)が、前記バーコード配列を前記付加する前に、前記粒子から前記液滴中に前記バーコード配列を放出することを更に含む、項目140に記載の方法。

(項目145)

(b)において、前記バーコード配列が前記粒子に放出可能に付加されたプライマー配列の一部として提供され、前記プライマー配列がランダムN-mer配列も含み、(b)が、前記バーコード配列を前記付加する前に、前記粒子から前記液滴中に前記プライマー配列を放出することを更に含む、項目144に記載の方法。

(項目146)

(b)において、前記プライマーを使用して、増幅反応において、前記バーコード配列を前記無細胞試料核酸の前記断片または前記無細胞試料核酸の一部の前記コピーに付加することを更に含む、項目145に記載の方法。

(項目147)

(i)追加の液滴において、追加のバーコード配列を参照核酸の断片または前記参照核酸の一部のコピーに付加してバーコード化された参照断片を提供すること、及び(ii)前記バーコード化された参照断片の核酸配列を決定し、前記バーコード化された参照断片の前記核酸配列に基づき前記参照核酸配列を決定することを更に含む、項目140に記載の方法。

(項目148)

前記参照核酸配列の前記決定が、前記バーコード化された参照断片の前記核酸配列をアセンブリングすることを含む、項目147に記載の方法。

(項目149)

粒子に放出可能に付加された前記追加の液滴に前記追加のバーコード配列を提供することと、前記追加のバーコード配列を前記付加する前に、前記粒子から前記追加のパーティション中に前記追加のバーコード配列を放出することと、を更に含む、項目147に記載の方法。

(項目150)

前記粒子に放出可能に付加されたプライマー配列の一部として前記追加のバーコード配列を提供することであって、前記プライマー配列がランダムN-mer配列も含む、前記提供することと、前記追加のバーコード配列を前記付加する前に、前記粒子から前記追加の液滴中に前記プライマーを放出することと、を更に含む項目149に記載の方法。

(項目 1 5 1)

前記プライマーを使用して、増幅反応において、前記追加のバーコード配列を前記参照核酸の前記断片または前記参照核酸の一部の前記コピーに付加することを更に含む、項目 1 5 0 に記載の方法。

(項目 1 5 2)

前記参照核酸配列において 1 つ以上の遺伝的変異を決定することを更に含む、項目 1 4 7 に記載の方法。

(項目 1 5 3)

前記参照核酸配列における前記 1 つ以上の遺伝的変異が、構造的変異及び一塩基多型 (S N P) からなる群から選択される、項目 1 5 2 に記載の方法。

(項目 1 5 4)

前記参照核酸配列における前記 1 つ以上の遺伝的変異が、コピー数変異、挿入、欠失、レトロトランスポゾン、転座、反転、再編成、反復配列伸長、及び重複からなる群から選択される構造的変異である、項目 1 5 2 に記載の方法。

(項目 1 5 5)

前記参照核酸が生殖系列核酸配列を含む、項目 1 4 7 に記載の方法。

(項目 1 5 6)

前記参照核酸が癌核酸配列を含む、項目 1 4 7 に記載の方法。

(項目 1 5 7)

前記試料核酸配列が 1 0 k b を超える長さを有する、項目 1 4 0 に記載の方法。

(項目 1 5 8)

前記参照核酸が疾患状態の不在を示すゲノムに由来する、項目 1 4 7 に記載の方法。

(項目 1 5 9)

前記参照核酸が疾患状態を示すゲノムに由来する、項目 1 4 7 に記載の方法。

(項目 1 6 0)

前記疾患状態が癌を含む、項目 1 5 8 または 1 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6 1)

前記疾患状態が異数体を含む、項目 1 5 8 または 1 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 6 2)

前記無細胞試料核酸が腫瘍核酸を含む、項目 1 4 0 に記載の方法。

(項目 1 6 3)

前記腫瘍核酸が循環腫瘍核酸を含む、項目 1 6 2 に記載の方法。