

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6014249号  
(P6014249)

(45) 発行日 平成28年10月25日(2016.10.25)

(24) 登録日 平成28年9月30日(2016.9.30)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	A
C 12 Q 1/68	(2006.01)	C 12 Q	1/68	Z
C 40 B 40/06	(2006.01)	C 40 B	40/06	

請求項の数 36 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2015-517404 (P2015-517404)  
 (86) (22) 出願日 平成25年6月12日 (2013.6.12)  
 (65) 公表番号 特表2015-519084 (P2015-519084A)  
 (43) 公表日 平成27年7月9日 (2015.7.9)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/045491  
 (87) 國際公開番号 WO2013/188582  
 (87) 國際公開日 平成25年12月19日 (2013.12.19)  
 審査請求日 平成26年12月12日 (2014.12.12)  
 (31) 優先権主張番号 61/660,487  
 (32) 優先日 平成24年6月15日 (2012.6.15)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 61/715,478  
 (32) 優先日 平成24年10月18日 (2012.10.18)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 514202402  
 イラミーナ インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 122 サンディエゴ イラミーナ ウェ  
 イ 5200  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司  
 (74) 代理人 100136858  
 弁理士 池田 浩  
 (74) 代理人 100193437  
 弁理士 高木 義和  
 (72) 発明者 ミン ジュイ リチャード シエン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92  
 122 サンディエゴ イラミーナ ウェ  
 イ 5200

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸ライブラーの動力学排除増幅

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) (i) 増幅部位のアレイと、  
 (ii) 複数の異なる標的核酸を含む溶液と  
 を含む増幅試薬を準備するステップであって、  
 溶液中の異なる標的核酸の数は、アレイ中の増幅部位の数を超える、  
 異なる標的核酸は、複数の増幅部位への流動性アクセスを有し、  
 各増幅部位は、複数の異なる標的核酸中のいくつかの核酸に対するキャパシティーを含む、ステップ、及び

(b) 増幅試薬を反応させて、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンを含む、複数の増幅部位を製造するステップであって、  
 反応させることは、同時に、(i) 異なる標的核酸を、増幅部位に輸送することと、(ii) 異なる標的核酸の2以上が、各増幅部位で増幅されないようにする増幅速度で、増幅部位にある標的核酸を増幅することとを含む、ステップを含む、  
 核酸を増幅する方法。

## 【請求項 2】

各増幅部位が、溶液中の異なる標的核酸と結合できる複数の捕捉剤を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

増幅部位のアレイが、表面上にフィーチャを有するアレイを含み、前記フィーチャが、

10

20

表面上の介在領域から分離された区画を意味する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

各フィーチャの区域が、増幅部位に輸送される標的核酸の排除体積の直径よりも大きい、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

フィーチャが、不連続であり、捕捉剤を欠く表面の介在領域によって分離している、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

各フィーチャが、ビーズ、ウェル、チャンネル、リッジ、突起またはそれらの組合せを含む、請求項3に記載の方法。

10

【請求項7】

増幅部位のアレイが、溶液中のビーズまたは表面上のビーズを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

捕捉剤が、異なる標的核酸と相補的である捕捉核酸を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項9】

異なる標的核酸が、捕捉核酸と相補的であるユニバーサル配列を含む、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

各増幅部位が、(b)において標的核酸を増幅するために使用される複数のプライマーを含む、請求項1に記載の方法。

20

【請求項11】

増幅部位のアレイが、表面上にフィーチャを有するアレイを含み、前記フィーチャが、表面上の介在領域から分離された区画を意味する、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

フィーチャが、不連続であり、(b)においてアンプリコンを製造するために使用されるプライマーを欠く表面の介在領域によって分離される、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

増幅部位に輸送される標的核酸の増幅が、等温的に起こる、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

増幅部位に輸送される標的核酸の増幅が、変性サイクルを含まない、請求項1に記載の方法。

30

【請求項15】

(b)で生産されるアンプリコンを含む増幅部位の40%超が、アンプリコンのクローナル集団を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

十分な数のアンプリコンが、其々、個々の増幅部位で個々の標的核酸から生成され、(b)の間に其々の増幅部位のキャパシティーを満たす、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

それぞれの増幅部位のキャパシティーを満たすようアンプリコンが生成される速度が、個々の標的核酸が、個々の増幅部位にそれぞれ輸送される速度を超える、請求項16に記載の方法。

40

【請求項18】

異なる標的核酸が、電場の印加によって支援されて、増幅部位に能動的に輸送される、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

反応が経時的に進行するにつれて、電場が増大する、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

増幅部位のアレイが、表面上に不連続フィーチャを有するアレイを含み、前記フィーチャが、表面上の介在領域から分離された区画を意味する、請求項18に記載の方法。

50

**【請求項 2 1】**

異なる標的核酸が、第 2 の電場の印加によって介在領域から能動的に反発される、請求項 2 0 に記載の方法。

**【請求項 2 2】**

電場および第 2 の電場が、アレイに同時に印加される、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 3】**

電場および第 2 の電場が、交互に繰り返してアレイに印加される、請求項 2 1 に記載の方法。

**【請求項 2 4】**

第 2 の電場が、介在領域への交流電流または直流電流の印加によって形成される、請求項 2 1 に記載の方法。 10

**【請求項 2 5】**

輸送が、受動拡散である、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 6】**

増幅試薬が、ポリメラーゼ及びリコンビナーゼを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 2 7】**

(c) アレイの配列決定手順を実行し、アンプリコンの核酸配列を決定するステップを更に含む、請求項 1 に記載の方法。 15

**【請求項 2 8】**

配列決定手順により、見かけ上クローナルな増幅部位で核酸配列を決定する、請求項 2 7 に記載の方法。 20

**【請求項 2 9】**

見かけ上クローナルな増幅部位が、最大 5 % の汚染アンプリコンを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

**【請求項 3 0】**

各フィーチャがビーズを含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 3 1】**

各フィーチャがウェルを含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 3 2】**

各フィーチャがチャンネルを含む、請求項 6 に記載の方法。 30

**【請求項 3 3】**

各フィーチャがリッジを含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 3 4】**

各フィーチャが突起を含む、請求項 6 に記載の方法。

**【請求項 3 5】**

増幅部位のアレイが、溶液中のビーズを含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 3 6】**

増幅部位のアレイが、表面上のビーズを含む、請求項 7 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】**

本願は、各々、参照により本明細書に組み込まれる 2012 年 10 月 18 日に出願された米国仮出願番号第 61/715,478 号および 2012 年 6 月 15 日に出願された米国仮出願番号第 61/660,487 号の利益に基づき、それを主張する、2013 年 3 月 1 日に出願された米国特許出願番号第 13/783,043 号の優先権を主張する。 40

**【背景技術】****【0 0 0 2】**

本発明は、一般に、分子生物学、より詳しくは、核酸合成および分析に関する。

**【0 0 0 3】**

遺伝子分析は、現代社会では、重要性を増している。遺伝子分析は、2、3 例を挙げる 50

と、一部の疾患に罹患する人のリスクを予測する（診断する）ために、特定の治療（予後）を考慮している人の治療上の利益対副作用のリスクの可能性を決定するために、また行方不明者、犯罪の犯人、犯罪の犠牲者および戦争（法医学）の死傷者を同定するために有用性であるとすでに証明されている。しかし、多数の場合には、適当な遺伝子検査がまだ利用可能ではないか、または高い誤り率を抱えている。これらの問題の根源の1つは、診断、予後および法医学のために現在使用されている遺伝子検査の多くが、ヒトのゲノムの画分のみをプローブする技術に頼っていることにある。ヒトの遺伝形質は、30億を超える塩基対を含有するゲノムによってコードされているが、ほとんどの遺伝子検査は、これらの塩基対のうちいくつかのみでの突然変異を調査する。プローブされるゲノムの画分を、理想的には、ゲノム中の最大30億塩基対すべてを含めて増大することによって、遺伝子検査の正確性が改善され得、より多くの診断および予後状態のための遺伝子検査が開発され得る。10

#### 【0004】

多数の遺伝子検査の基本構成要素は、試験される予定の遺伝物質の調製である。全ゲノムを捕捉し、その完全性を維持しようとする場合には、これは、ささいなことではない。多量の遺伝物質を捕捉するために現在利用可能である2つの方法として、エマルジョンボリメラーゼ連鎖反応（ePCR）およびクラスター増幅（例えば、架橋増幅を介する）がある。臨床および診断適用におけるその使用は、現在制限されている。

#### 【0005】

ePCRについては、ゲノム断片および担体ビーズとともに油相中に水性液滴が形成される。条件は、各液滴が、個々のゲノム断片および単一の担体ビーズを単離する可能性を最適化するよう選択される。目的は、液滴については、液滴間、したがって、異なるビーズ間のゲノム断片の拡散を防ぐマイクロリアクターを形成することである。次いで、バルクエマルジョンのために、PCR増幅の数サイクルが実施され得、その結果、ビーズ中の各液滴が、現存のゲノム断片のクローンコピーでコーティングされる。増幅後、ビーズが、分析機器における評価のために検出基板に移される。ePCRを複雑化させる要因の1つは、ビーズの一部が、液滴中で、最終的にゲノム断片を含まないようになり、したがって、プランクビーズを生成するということである。分析機器において使用する前にプランクビーズを除去するために、ビーズ濃縮ステップが実施され得る：しかし、このプロセスは、一般に、厄介なものであり、非効率的なものである。ePCRを複雑化させる要因の別なものとして、一部の液滴が、最終的に2以上のゲノム断片を含むようになり、したがって、混合クローンビーズを生成することがある。混合クローンビーズは、分析の際に、同定され、次いで、無視され得ることが多いが、その存在は、効率を、いくつかの場合には、分析の正確性を低下させる。2030

#### 【0006】

クラスター増幅は、遺伝物質を捕捉および増幅するための、より合理化されたアプローチを提供する。商業的な実施形態では、ゲノム断片は、基板表面に捕捉され、無作為な位置に「シード」を形成する。過剰のゲノム断片（すなわち、捕捉されなかったもの）を洗浄除去した後、増幅の数サイクルが実施されて、各シード周囲の表面上にクラスターを形成するクローンコピーを作製する。ePCRと比較したクラスター増幅の利点として、ビーズ濃縮ステップの回避、ビーズ移動ステップ（エマルジョンから検出基板へ）の回避および乱雑な、多くの場合には、細心の注意が必要なオイルエマルジョンの回避が挙げられる。しかし、商業的なクラスター増幅技術を複雑化させる可能性ある要因として、表面上にクラスターの無作為なパターンを形成することがある。無作為に位置しているクラスターを位置決定し、区別するための画像レジストレーションプロトコールが開発されたが、このようなプロトコールは、分析装置に余分な分析負荷を課す。さらに、無作為に位置しているクラスターは、空間的に規則的なパターンのクラスターの理論上可能なものよりも、表面をあまり効率的に満たさない傾向がある。40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

## 【0007】

- 【特許文献1】US 2010/0111768 A1
- 【特許文献2】US 6,266,459
- 【特許文献3】US 6,355,431
- 【特許文献4】US 6,770,441
- 【特許文献5】US 6,859,570
- 【特許文献6】US 6,210,891
- 【特許文献7】US 6,258,568
- 【特許文献8】US 6,274,320
- 【特許文献9】US 2009/0026082 A1 10
- 【特許文献10】US 2009/0127589 A1
- 【特許文献11】US 2010/0137143 A1
- 【特許文献12】US 2010/0282617 A1
- 【特許文献13】PCT公開番号WO 00/63437
- 【特許文献14】米国仮出願番号第61/769,289号
- 【特許文献15】米国特許出願番号US 13/492,661
- 【特許文献16】WO 2008/093098
- 【特許文献17】米国特許出願公開第2011/0059865 A1号
- 【特許文献18】米国仮出願番号第61/753,833号 20
- 【特許文献19】US 7,785,790
- 【特許文献20】US 7,399,590
- 【特許文献21】WO 04/018497
- 【特許文献22】US 7,057,026
- 【特許文献23】WO 91/06678
- 【特許文献24】WO 07/123744
- 【特許文献25】US 7,329,492
- 【特許文献26】US 7,211,414
- 【特許文献27】US 7,315,019
- 【特許文献28】US 7,405,281
- 【特許文献29】US 2008/0108082 30
- 【特許文献30】US 5,223,414
- 【特許文献31】US 7,829,284
- 【特許文献32】米国特許第5,641,658号
- 【特許文献33】米国特許公開番号第2002/0055100号
- 【特許文献34】米国特許第7,115,400号
- 【特許文献35】米国特許公開番号第2004/0096853号
- 【特許文献36】米国特許公開番号第2004/0002090号
- 【特許文献37】米国特許公開番号第2007/0128624号
- 【特許文献38】米国特許公開番号第2008/0009420号
- 【特許文献39】WO 05/010145 40
- 【特許文献40】米国特許公開番号第2005/0130173号
- 【特許文献41】米国特許公開番号第2005/0064460号
- 【特許文献42】US 2007/0099208 A1
- 【特許文献43】US 5,455,166
- 【特許文献44】US 5,130,238
- 【特許文献45】US 6,214,587
- 【特許文献46】US 2009/0032401 A1
- 【特許文献47】WIPO特許出願番号PCT/US 11/57111
- 【特許文献48】US 2005/0191698 A1
- 【特許文献49】US 7,595,883 50

- 【特許文献 50】U S 7, 244, 559
- 【特許文献 51】U S 5, 599, 675
- 【特許文献 52】U S 5, 750, 341
- 【特許文献 53】WO 1989/10977
- 【特許文献 54】米国特許第7, 582420号
- 【特許文献 55】米国特許第6, 890, 741号
- 【特許文献 56】米国特許第6, 913, 884号
- 【特許文献 57】米国特許公開番号第2005/0053980A1号
- 【特許文献 58】米国特許公開番号第2009/0186349A1号
- 【特許文献 59】U S 2005/0181440A1 10
- 【特許文献 60】米国特許出願番号第13/273, 666号
- 【特許文献 61】U S 2011/0312529A1
- 【特許文献 62】米国特許出願番号第61/578, 684号
- 【特許文献 63】米国特許出願番号第61/540, 714号
- 【特許文献 64】米国特許出願番号第13/492, 661号
- 【非特許文献】
- 【0008】
- 【非特許文献 1】Bentleyら、Nature 456: 53~59頁(2008年)
- 【非特許文献 2】Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7: 239~60頁(1977年) 20
- 【非特許文献 3】Rybencovら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5307~5311頁(1993年)
- 【非特許文献 4】Zimmermannら、J. Mol. Biol. 222: 599~620頁(1991年)
- 【非特許文献 5】Sobelら、Biopolymers 31: 1559~1564頁(1991年)
- 【非特許文献 6】Dressmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8817~8822頁(2003年)
- 【非特許文献 7】Lizardiら、Nat. Genet. 19: 225~232頁(1998年) 30
- 【非特許文献 8】Deanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5261~66頁(2002年)
- 【非特許文献 9】Lageら、Genome Research 13: 294~307頁(2003年)
- 【非特許文献 10】Walkerら、Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc., 1995年
- 【非特許文献 11】Walkerら、Nucl. Acids Res. 20: 1691~96頁(1992年) 40
- 【非特許文献 12】Ronaghiら、Analytical Biochemistry 242(1)、84~9頁(1996年)
- 【非特許文献 13】Ronaghi、Genome Res. 11(1)、3~11頁(2001年)
- 【非特許文献 14】Ronaghiら、Science 281(5375)、363頁(1998年)
- 【非特許文献 15】Shendureら、Science 309: 1728~1732頁(2005年)
- 【非特許文献 16】Bainsら、Journal of Theoretical Biology 135(3)、303~7頁(1988年) 50

【非特許文献 17】Drmanacら、Nature Biotechnology 16、54~58頁(1998年)

【非特許文献 18】Fodorら、Science 251(4995)、767~773頁(1995年)

【非特許文献 19】Leveneら、Science 299、682~686頁(2003年)

【非特許文献 20】Lundquistら、Opt. Lett. 33、1026~1028頁(2008年)

【非特許文献 21】Korlachら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105、1176~1181頁(2008年)

10

### 【発明の概要】

### 【発明が解決しようとする課題】

### 【0009】

したがって、診断的、予後予測的および法医学的分析のための遺伝物質を調製するための改善された方法が必要である。本開示内容は、この必要性に対応するものであり、そのうえ、その他の利点も提供する。

### 【課題を解決するための手段】

### 【0010】

本開示内容は、核酸を増幅する方法を提供する。方法は、(a)(i)増幅部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的核酸を有する溶液とを含む増幅試薬を準備するステップと、(b)増幅試薬を反応させて、各々、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を有する複数の増幅部位を製造するステップであって、反応させることは、同時に(i)異なる標的核酸を平均輸送速度で増幅部位に輸送することと、(ii)平均増幅速度で増幅部位にある標的核酸を増幅することとを含み、平均増幅速度が平均輸送速度を超える。特定の実施形態では、溶液中の異なる標的核酸の数は、アレイ中の増幅部位の数を超える、ステップとを含み得る。通常、異なる標的核酸は、複数の増幅部位への流動性アクセスを有する。さらに、各増幅部位は、場合により、複数の異なる核酸中のいくつかの核酸に対するキャパシティーを有し得る。

20

### 【0011】

また、(a)(i)増幅部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的核酸を有する溶液とを含む増幅試薬を準備するステップと、(b)増幅試薬を反応させて、各々、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を含む複数の増幅部位を製造するステップであって、反応させることは、(i)各増幅部位で個々の標的核酸から第1のアンプリコンを製造することと、(ii)各増幅部位で個々の標的核酸から、または第1のアンプリコンからその次のアンプリコンを製造することとを含み、増幅部位でその次のアンプリコンが生成される平均速度が、その増幅部位で第1のアンプリコンが生成される平均速度を超える、ステップとを含む、核酸を増幅する方法も提供される。特定の実施形態では、溶液中の異なる標的核酸の数は、アレイ中の増幅部位の数を超える。通常、異なる標的核酸は、複数の増幅部位への流動性アクセスを有する。さらに、各増幅部位は、場合により、複数の異なる核酸中のいくつかの核酸に対するキャパシティーを有し得る。

30

### 【0012】

本開示内容は、(a)(i)増幅部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的核酸を有する溶液とを含む増幅試薬を準備するステップと、(b)増幅試薬を反応させて、各々、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を有する複数の増幅部位を製造するステップであって、反応させることは、同時に、(i)平均捕捉速度で、増幅部位で異なる標的核酸を捕捉することと、(ii)平均増幅速度で増幅部位で捕捉される標的核酸を増幅することとを含み、平均増幅速度は、平均捕捉速度を超える、ステップとを含む、核酸を増幅する方法をさらに提供する。

40

### 【0013】

50

また、(a)(i)増幅部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的核酸を有する溶液とを含む増幅試薬を準備するステップと、(b)増幅試薬を反応させて、各々、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を含む複数の増幅部位を製造するステップであって、反応させることは、(i)増幅部位で捕捉される個々の標的核酸から第1のアンプリコンを製造することと、(ii)各増幅部位で捕捉される個々の標的核酸から、または第1のアンプリコンからその次のアンプリコンを製造することとを含み、増幅部位でその次のアンプリコンが生成される平均速度が、増幅部位で第1のアンプリコンが生成される平均速度を超える、ステップとを含む、核酸を増幅する方法が提供される。

## 【0014】

10

(a)(i)表面に不連続な、表面の介在領域によって分離されているフィーチャを有するアレイと、(ii)複数の異なる標的生体分子を有する溶液とを含む試薬を準備するステップと、(b)試薬を反応させて、生体分子をフィーチャに輸送し、個々の生体分子をフィーチャの各々に付着させるステップであって、介在領域に電場が印加されて、介在領域から生体分子を取り扱う、ステップとを含み得る、生体分子のパターン化された表面を作製する方法がさらに提供される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0015】

20

【図1】動力学排除によって製造されたパターン化されたフローセルの第1の配列決定サイクル後に得られた合成画像(4色チャンネル)を示す図である(図1A)。無作為に位置しているクラスターを有する標準イルミナ(illumina)フローセルの単一配列決定サイクル後に得られた合成画像(4色チャンネル)を示す図である(図1B)。

【図2】動力学排除によって製造されたパターン化されたフローセルを使用する第1の配列決定サイクル後に得られた合成画像のPDFおよびNN機能を示す図である。

【図3】Phixゲノムの最初の5ゲノム位置にアラインされたクラスターの空間位置の散布図を示す図である。種々のゲノム位置が、エックス、アスタリスク、四角、三角および菱形によって示されている。

【図4】フローセル表面からの種の電気化学的脱着のためのフローセル構造を示す図である。電位は、(a)に示されるように一方の導電性表面および電解質にわたって、(b)に示されるように2つの導電性表面にわたって印加され得る。(b)に示されるフローセル配置はまた、(c)に示されるように、数秒で電極表面でDNAの100×を超える濃度を達成する、リアルタイムでのDNAの場支援プルダウンのために使用され得る。

30

## 【図5】生体分子パターンの電場支援形成の例示的ワークフローを示す図である。

【図6】電場の存在下(a)および電場がない場合の(b)、ITOバックグラウンドでの2μm Auフィーチャでの鋳型のシーディングおよび鋳型のクラスター増幅を示す図である。ラインプロファイルは、標識された領域にわたる蛍光強度を示す。

【図7】電場の存在下でのシーディングおよびクラスタリング後の大区域蛍光画像を示す図である。(a)2μm Auドットを含有するフローセルレーン；(b)200nm Auドットを含有するレーン。クラスターは、マイクロおよびナノパターン化されたフィーチャに大区域にわたってアラインされ、対応するフーリエ変換(FFT)によって、これらのクラスターの空間的に規則的な性質が確認される。

40

【図8】電場の存在下での700nmの直径のSiO<sub>2</sub>部位上でのDNAクラスター形成を示す図である。クラスターは、高度に規則的であり、介在区域からの蛍光はほとんどない。

【図9】(a)(1)電場支援P5およびP7プライマーをグラフティングする前の、(2)電場支援P5およびP7プライマーをグラフティングした後の、(3)電場支援P5およびP7プライマーをグラフティングし、P5およびP7プライマーを再グラフティングした後の、(4)電場支援P5およびP7プライマーをグラフティングし、SFA再コーティングし、P5およびP7プライマーを再グラフティングした後の、HiSeqフローセルにおけるハイブリダイゼーションアッセイの結果ならびに(b)各ステップ後のフ

50

ローセルレーンあたりの中程度の蛍光強度を示す図である。

【図10】(a)電場を使用する誘電性部位での直接ハイブリダイゼーションの模式図、(b)介在領域で、核酸を取り扱う電場の存在下で形成された空間的にパターン化されたクラスターおよび(c)介在領域で、核酸を取り扱う電場の不在下で形成された無作為に規則的なクラスターを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本開示内容は、核酸ライブラリーおよび核酸ライブラリーを作製する方法を提供する。特定の実施形態では、本開示内容の核酸ライブラリーは、部位のアレイの形態である。

【0017】

アレイは、特定のヌクレオチド配列に関してクローナルである部位を有し得る。したがって、アレイ中の個々の部位は、各々、単一ヌクレオチド配列の複数のコピーを有し得る。例えば、部位は、ゲノムもしくはその細画分(例えば、エキソーム)またはトランスクリプトーム(例えば、mRNAライブラリーまたはcDNAライブラリー)もしくはその細画分などの生体サンプルから得られた核酸のクローナルコピーを有し得る。

【0018】

クローナルであるアレイ中の部位の画分は、ポアソン分布によって予測される画分を超えることもある。したがって、本明細書に示される方法によって製造されるアレイは、クローナル部位のスーパーポアソン分布を有し得る。アレイの合成の際に、スーパーポアソン分布が、起こり得、その後の部位濃縮または部位精製ステップを必要としない(濃縮および精製ステップは、少なくともいくつかの実施形態では、必要に応じて実施され得るが)。

【0019】

いくつかの実施形態では、部位は、基板上(または基板中)のフィーチャとして存在し得る。このような実施形態では、フィーチャは、クローナルであり得、クローナルであるアレイ中のフィーチャの画分は、ポアソン分布を超えることがあり、フィーチャは、反復パターンで空間的に配置され得る。したがって、部位は、例えば、直線格子、六角格子またはその他の所望のパターンで空間的に規則的であり得る。

【0020】

本開示内容の核酸ライブラリーは、動力学排除を利用して作製され得る。動力学排除は、プロセスが、別の事象またはプロセスが起こるのを効果的に除外するのに十分なほど迅速な速度で起こる場合に起こり得る。核酸アレイの作製を例にとると、アレイの部位が溶液に由来する標的核酸を用いて無作為にシーディングされる場合には、増幅プロセスで標的核酸のコピーが、シーディング部位の各々をいっぱいに満たすよう作製される。本開示内容の動力学排除法と一致して、シーディングおよび増幅プロセスは、増幅速度がシーディング速度を超える条件下で同時に進行し得る。そのようなものとして、コピーが、第1の標的核酸によってシーディングされた部位で作製される比較的迅速な速度は、第2の核酸が増幅のためにその部位をシーディングするのを効果的に排除する。

【0021】

動力学排除は、標的核酸または第1のコピーのその後のコピーを作製するための比較的迅速な速度に対して、標的核酸の第1のコピーを作製するのに比較的遅い速度を利用し得る。これまでの段落の例では、動力学排除は、増幅が、部位を核酸シードのコピーで満たすために起こる比較的迅速な速度に対して標的核酸シーディングの比較的遅い速度(例えば、比較的遅い拡散または輸送)のために起こる。別の例示的実施形態では、動力学排除は、部位を満たすためにその後のコピーが作製される比較的迅速な速度に対する、部位にシーディングされた標的核酸の第1のコピーの形成の遅延(例えば、遅延された活性化または遅い活性化)のために起こり得る。この例では、個々の部位は、いくつかの異なる標的核酸(例えば、いくつかの標的核酸が、増幅の前に各部位に存在し得る)でシーディングされた可能性がある。しかし、任意の所与の標的核酸の第1のコピーの形成は、無作為に活性化され得、その結果、第1のコピー形成の平均速度は、その後のコピーが生成され

10

20

30

40

50

る速度に対して比較的遅い。この場合には、個々の部位はいくつかの異なる標的核酸でシーディングされた可能性があるが、動力学排除は、それらの標的核酸のうち1種のみが増幅されることを可能にする。より詳しくは、第1の標的核酸が、増幅のために活性化されると、部位は、そのコピーで迅速にいっぱいに埋まり、それによって、第2の標的核酸のコピーがその部位で作製されるのを妨げる。

#### 【0022】

本明細書に示される方法によって製造されるアレイの利点は、部位のクローナル性は、その後の分析において正確性を提供するというものである。これによって、検出部位が混合集団を有する場合に、そうでなければ生じるであろう困惑させる結果が避けられる。

#### 【0023】

アレイの別の利点は、それらが、クローナル部位のスーパー・ポアソン分布を有するということである。これは、そうでなければ、混合部位への隔離によって起こり得る遺伝子含量の喪失を避けることによって、ライブラリーの複雑性を増大する。

#### 【0024】

本明細書に示される方法およびアレイのさらなる利点は、基板上にフィーチャを有するアレイの提供であり、これでは、フィーチャは、反復パターンで空間的に配置される。上記に示されるように、クローナルであるフィーチャの画分は、ポアソン分布を超えることもある。ポアソン分布は、最大で37%の占有率を設定する。本明細書に示される方法に従って、クローナルであるフィーチャの相補体は、40%、50%、60%、75%またはそれ以上超えることもある。本明細書に示される方法によって製造されるアレイは、ランダムクラスターアレイと比較して、基板のより効率的な充填を提供する。このようなアレイはまた、ランダムクラスターアレイに通常使用される画像レジストレーション法の複雑性を避けることによって、分析的に評価することがより容易である。

#### 【0025】

さらに、本明細書に示される方法は、検出を容易にするようパターン化された基板上でのアレイの作製にとって有利である。例えば、いくつかの市販のシーケンシングプラットフォームは、配列検出ステップの間の検出試薬（例えば、454 Life Sciences (Roche, Basel Switzerlandの子会社) から入手可能なプラットフォーム中のピロリン酸またはIon Torrent (Life Technologies, Carlsbad Californiaの子会社) から入手可能なプラットフォーム中のプロトン）の拡散に対して障壁を提供するウェルを有する基板に頼っている。本明細書に示される方法は、制限されたポアソンであろう標準クラスター増幅法と比較して、クローナル集団を用いてロードされるウェルの数の増大にとって有利であり得る。本開示内容の方法は、さらにエマルジョンの取り扱いおよびビーズの操作を避けることによって、ePCR法を上回って有利である。

#### 【0026】

本明細書において使用される用語は、別に特定されない限り、関連技術分野における普通の意味をもつと理解される。本明細書において使用されるいくつかの用語およびその意味は、以下に示される。

#### 【0027】

本明細書において、用語 (tern) 「活性シーディング」とは、核酸を位置に向かって、または位置から離れるよう動かす、1種または複数の核酸に課される非拡散性力を指す。位置は、アレイの増幅部位であり得る。非拡散性力は、電場または磁場を生成するもののような外部供給源または反応容積内で分子密集もしくは化学勾配を強制する薬剤によって提供され得る。

#### 【0028】

本明細書において、用語「アンプリコン」は、核酸に関連して使用される場合に、核酸をコピーすることの生成物を意味し、ここで、生成物は、核酸のヌクレオチド配列の少なくとも一部と同一であるか、またはそれと相補的であるヌクレオチド配列を有する。例えば、ポリメラーゼ伸長、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ローリングサークル増幅 (R

10

20

30

30

40

50

C A )、ライゲーション伸長またはライゲーション連鎖反応を含めた、アンプリコンは、核酸またはそのアンプリコンを鋳型として使用する種々の増幅法のいずれかによって製造され得る。アンプリコンは、特定のヌクレオチド配列（例えば、P C R 産物）の單一コピーまたはヌクレオチド配列の複数のコピー（例えば、R C A のコンカテマー（concatameric）生成物）を有する核酸分子であり得る。標的核酸の第1のアンプリコンは、通常、相補的なコピーである。その次のアンプリコンは、第1のアンプリコンの生成後に、標的核酸から、または第1のアンプリコンから作製されるコピーである。その次のアンプリコンは、標的核酸と実質的に相補的であるか、または標的核酸と実質的に同一である配列を有し得る。

#### 【 0 0 2 9 】

10

本明細書において、用語「増幅部位」とは、1種または複数のアンプリコンが生成され得るアレイ中またはアレイ上の部位を指す。増幅部位は、その部位で生成される少なくとも1つのアンプリコンを含有、保持または付着するようさらに構成され得る。

#### 【 0 0 3 0 】

本明細書において、用語「アレイ」とは、相対位置に従って互いに区別され得る部位の集団を指す。アレイの異なる部位にある異なる分子は、アレイ中の部位の位置に従って互いに区別され得る。アレイの個々の部位は、特定の種類の1つまたは複数の分子を含み得る。例えば、部位は、特定の配列を有する单一の標的核酸分子を含み得るか、または部位は、同一配列（および/またはその相補配列）を有するいくつかの核酸分子を含み得る。アレイの部位は、同一基板上に位置する異なるフィーチャであり得る。例示的フィーチャとして、制限するものではないが、基板中のウェル、基板中または基板上のビーズ（またはその他の粒子）、基板からの投影、基板上のリッジまたは基板中のチャネルが挙げられる。アレイの部位は、各々異なる分子を有する別個の基板であり得る。別個の基板に付着している異なる分子は、基板が結合している表面上の基板の位置に従って、または液体もしくはゲル中の基板の位置に従って同定され得る。表面上に別個の基板が位置している例示的アレイとして、制限されるものではないが、ウェル中にビーズを有するものが挙げられる。

20

#### 【 0 0 3 1 】

30

本明細書において、部位および核酸物質に関連して使用される場合には用語「キャパシティ（capacity）」とは、部位を占有できる核酸物質の最大量を意味する。例えば、この用語は、特定の条件において部位を占有できる核酸分子の総数を示し得る。例えば、特定の条件において部位を占有できる、核酸物質の総量または特定のヌクレオチド配列の総数を含めた、その他の尺度も同様に使用され得る。通常、標的核酸の部位のキャパシティは、標的核酸のアンプリコンの部位のキャパシティと実質的に同等となる。

#### 【 0 0 3 2 】

40

本明細書において、用語「捕捉剤」とは、標的分子（例えば、標的核酸）と付着、保持または結合できる、物質、化学物質、分子またはその部分を指す。例示的捕捉剤として、制限するものではないが、標的核酸の少なくとも一部と相補的である捕捉核酸、標的核酸（またはそれに付着している連結部分）と結合できる受容体・リガンド結合対のメンバー（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、レクチン、炭水化物、核酸結合タンパク質、エピトープ、抗体など）または標的核酸（またはそれに付着している連結部分）と共有結合を形成できる化学試薬が挙げられる。

#### 【 0 0 3 3 】

本明細書において、用語「クローナル集団」とは、特定のヌクレオチド配列に関して均一である核酸の集団を指す。均一配列は、通常、少なくとも10ヌクレオチド長であるが、例えば、少なくとも50、100、250、500または1000ヌクレオチド長を含め、さらにより長い場合もある。クローナル集団は、単一の標的核酸または鋳型核酸に由来するものであり得る。通常、クローナル集団中の核酸のすべてが、同一ヌクレオチド配列を有する。クローナル集団では、クローン性から逸脱することなく、少数の突然変異（例えば、増幅アーチファクトによる）が起こり得るということは理解されよう。

50

## 【0034】

本明細書において、用語「変性サイクル」とは、相補性核酸鎖が互いに離れるようになるような増幅反応の経過を変更する核酸増幅反応の操作を指す。例示的操作として、それだけには限らないが、核酸を変性する化学試薬を導入することまたは加熱することもしくはその他の操作によって反応物を物理的に変更して、核酸を変性することが挙げられる。周期性増幅反応には、いくつかの変性サイクルが含まれ得る。プライマーが核酸鎖とハイブリダイズすることを誘導するための周期性操作などのいくつかのその他のサイクルも含まれ得る。本明細書において示される方法において、1つまたは複数の変性サイクルまたはその他のサイクルが省略され得る。そのようなものとして、本開示内容の増幅反応は、少なくともいくつかの実施形態では、周期性操作を伴わずに実施され得る。

10

## 【0035】

本明細書において、用語「異なる」とは、核酸に関連して使用される場合には、核酸が、互いに同一ではないヌクレオチド配列を有することを意味する。2種以上の核酸は、その全長に沿って異なっているヌクレオチド配列を有し得る。あるいは、2種以上の核酸は、その全長の実質的に一部に沿って異なっているヌクレオチド配列を有し得る。例えば、2種以上の核酸は、互いに異なっている標的ヌクレオチド配列部分を有するが、互いに同一であるユニバーサル配列領域も有し得る。

## 【0036】

本明細書において、用語「流動性アクセス」とは、流体中の分子および流体と接触している部位に関連して使用される場合には、分子の、流体中をまたは流体を通って移動し、部位と接触するか、部位に入る能力を指す。この用語はまた、分子の、部位から離れて、または部位から抜け出て溶液に入る能力も指す。流動性アクセスは、分子が部位に入る、部位と接触する、部位から離れる、および/または部位を抜け出るのを妨げる障壁がない場合に起こり得る。しかし、流動性アクセスは、たとえ、拡散が、遅延され、低減または変更されても、アクセスが完全に妨げられない限りは、存在すると理解される。

20

## 【0037】

本明細書において、用語「二本鎖の」とは、核酸分子に関連して使用される場合には、核酸分子中のヌクレオチドの実質的にすべてが、相補的ヌクレオチドと水素結合していることを意味する。部分的に二本鎖の核酸は、相補的ヌクレオチドと水素結合しているそのヌクレオチドの少なくとも10%、25%、50%、60%、70%、80%、90%または95%を有し得る。

30

## 【0038】

本明細書において、用語「各」とは、項目の収集物に関連して使用される場合には、収集物中の個々の項目を同定するよう意図されるが、文脈から別に明確に示されない限り、必ずしも、収集物中のどの項目も指すわけではない。

## 【0039】

本明細書において、用語「排除体積」とは、その他のこのような分子の排除のための特定の分子によって占有される空間の体積を指す。

## 【0040】

本明細書において、用語「伸長可能」または「伸長可能な状態」とは、プライマーなどの核酸に関連して使用される場合に、核酸が、ヌクレオチドの付加（例えば、ポリメラーゼ触媒作用による）またはオリゴヌクレオチドの付加（例えば、リガーゼ触媒作用）にとってコンピテントであることを意味する。「伸長可能でない」または「非伸長可能状態」にある核酸は、例えば、伸長阻止部分の存在または3'ヒドロキシルの不在のためにそのようにコンピテントではない。

40

## 【0041】

本明細書において、用語「介在領域」とは、基板または表面の他の区域を分離する、基板中または表面上の区域を指す。例えば、介在領域は、アレイの1つのフィーチャをアレイの別のフィーチャから分離できる。互いに分離される2つの領域は、互いに接触を欠く別個のものであり得る。別の例では、介在領域は、フィーチャの第1の部分を、フィ

50

ーチャの第2の部分から分離し得る。介在領域によって提供される分離は、部分分離または完全分離であり得る。介在領域は、通常、表面上のフィーチャの表面物質とは異なる表面物質を有する。例えば、アレイのフィーチャは、介在領域に存在する量または濃度を超える捕捉剤またはプライマーの量または濃度を有し得る。いくつかの実施形態では、捕捉剤またはプライマーは、介在領域に存在しない場合もある。

#### 【0042】

本明細書において、用語「ポリメラーゼ」は、当技術分野におけるその使用と一致するものとし、例えば、鋳型鎖として核酸を使用して核酸分子の相補的な複製物を生成する酵素を含む。通常、DNAポリメラーゼは、鋳型鎖と結合し、次いで、ヌクレオチドを核酸の伸びていく鎖の3'末端の遊離ヒドロキシル基に順次付加しながら鋳型鎖を下へ移動させる。DNAポリメラーゼは、通常、DNA鋳型から相補的DNA分子を合成し、RNAポリメラーゼは、通常、DNA鋳型からRNA分子を合成する（転写）。ポリメラーゼは、鎖の増殖を開始するためにプライマーと呼ばれる短いRNAまたはDNA鎖を使用し得る。一部のポリメラーゼは、それらが鎖に塩基を付加している部位の上流の鎖を置換できる。このようなポリメラーゼは、置換する鎖であるといわれ、ポリメラーゼによって読まれている鋳型鎖から相補的な鎖を除去する活性を有することを意味する。鎖置換活性を有する例示的ポリメラーゼとして、制限するものではないが、Bst (Bacillus stearothermophilus) ポリメラーゼの大断片、エキソ-クレノウポリメラーゼまたはシーケンス等級のT7エキソ-ポリメラーゼが挙げられる。一部のポリメラーゼは、それらの前の鎖を分解し、それを効率的に置換し、後ろに鎖が伸びていく（5'エキソヌクレアーゼ活性）。一部のポリメラーゼは、それらの後ろの鎖を分解する活性を有する（3'エキソヌクレアーゼ活性）。一部の有用なポリメラーゼは、突然変異によって、またはそうでなければ、3'および/または5'エキソヌクレアーゼ活性を低減もしくは排除するよう修飾されている。

#### 【0043】

本明細書において、用語「核酸」とは、当技術分野におけるその使用と一致するものとし、天然に存在する核酸またはその機能的類似体を含む。特に有用な機能的類似体は、配列特異的に核酸とハイブリダイズできるか、または特定のヌクレオチド配列の複製の鋳型として使用され得る。天然に存在する核酸は、一般に、リン酸ジエステル結合を含有する骨格を有する。類似体構造は、当技術分野で公知の種々のもののいずれかを含めた代替の骨格結合を有し得る。天然に存在する核酸は、一般に、デオキシリボース糖（例えば、デオキシリボ核酸（DNA）に見られる）またはリボース糖（例えば、リボ核酸（RNA）に見られる）を有する。

#### 【0044】

核酸は、当技術分野で公知である、これらの糖部分の種々の類似体のいずれかを含有し得る。核酸は、天然または非天然塩基を含み得る。これに関して、天然デオキシリボ核酸は、アデニン、チミン、シトシンまたはグアニンからなる群から選択される1つまたは複数の塩基を有し得、リボ核酸は、ウラシル、アデニン、シトシンまたはグアニンからなる群から選択される1つまたは複数の塩基を有し得る。核酸中に含まれ得る有用な非天然塩基は、当技術分野で公知である。用語「標的」とは、核酸に関連して使用される場合には、本明細書に示される方法または組成物との関連で核酸の意味識別子として意図され、必ずしも、核酸の構造または機能を、そうではなく明確に示されるものを超えて制限しない。

#### 【0045】

本明細書において、用語「速度」とは、輸送、增幅、捕捉またはその他の化学的プロセスに関連して使用される場合には、化学反応速度論および生化学反応速度論におけるその意味と一致するものとする。2つのプロセスの速度は、最大速度（例えば、飽和での）、前定常状態速度（例えば、平衡の前）、動力学的速度定数または当技術分野で公知のその他の尺度に関して比較され得る。特定の実施形態では、特定のプロセスの速度は、プロセスの完了の総時間に関して決定され得る。例えば、增幅速度は、完了されるべき增幅にか

10

20

30

40

50

かる時間に関して決定され得る。しかし、特定のプロセスの速度は、プロセスの完了の総時間に関して決定される必要はない。

【0046】

本明細書において、用語「リコンビナーゼ」は、当技術分野におけるその使用と一致するものとし、例えば、RecAタンパク質、T4 uvsXタンパク質、任意の門に由来する任意の相同タンパク質またはタンパク質複合体またはその機能的変異体を含む。真核細胞のRecA相同体は、一般に、同定されるべきこの群の第1のメンバーにちなんでRec51と名付けられている。その他の非相同リコンビナーゼ、例えば、RecTまたはRecOが、RecAの代わりに利用され得る。

【0047】

本明細書において、用語「一本鎖結合タンパク質」とは、例えば、未熟アニーリングを防ぐために、一本鎖核酸をヌクレアーゼ消化から保護するために、核酸から二次構造を除去するために、または核酸の複製を促進するために、一本鎖核酸との結合の機能を有する任意のタンパク質を指すよう意図される。この用語は、国際生化学分子生物学連合の命名法委員会(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)(NC-IUBMB)によって一本鎖結合タンパク質と正式に同定されるタンパク質を含むものとするが、必ずしもそれに制限されない。例示的一本鎖結合タンパク質として、それだけには限らないが、大腸菌SSB、T4 gp32、T7遺伝子2.5SSB、ファージphi29 SSB、任意の門に由来する任意の相同タンパク質またはタンパク質複合体またはその機能的変異体が挙げられる。

【0048】

本明細書において、用語「輸送」とは、流体を通る分子の動きを指す。この用語は、その濃度勾配に沿った分子の動きなどの受動輸送(例えば、受動拡散)を含み得る。この用語はまた、分子が、その濃度勾配に沿って、またはその濃度勾配に反して移動し得る能動輸送も含み得る。したがって、輸送は、1種または複数の分子を所望の方向に、または増幅部位などの所望の位置に動かすようエネルギーをかけることを含み得る。

【0049】

本明細書において、用語「ユニバーサル配列」とは、互いに異なる配列の領域も有する2種以上の核酸分子に共通である配列の領域を指す。分子の収集物の異なるメンバーに存在するユニバーサル配列は、ユニバーサル配列と相補的であるユニバーサル捕捉核酸の集団を使用して、複数の異なる核酸の捕捉を可能にする。同様に、分子の収集物の異なるメンバーに存在するユニバーサル配列は、ユニバーサル配列と相補的であるユニバーサルプライマーの集団を使用して複数の異なる核酸の複製または増幅を可能にする。したがって、ユニバーサル捕捉核酸またはユニバーサルプライマーは、ユニバーサル配列と特異的にハイブリダイズし得る配列を含む。標的核酸分子は、例えば、異なる標的配列の一方または両方の末端に、ユニバーサルアダプターを取り付けるよう修飾され得る。

【0050】

本開示内容は、核酸を増幅する方法を提供する。本方法は、(a)(i)増幅部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的核酸を有する溶液とを含む増幅試薬を準備するステップと、(b)増幅試薬を反応させて、各々、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を有する複数の増幅部位を製造するステップであって、反応させることは、同時に、(i)異なる標的核酸を、平均輸送速度で増幅部位に輸送することと、(ii)標的核酸を、平均増幅速度で増幅部位で増幅することとを含み、平均増幅速度は、平均輸送速度を超える、ステップとを含む。特定の実施形態では、溶液中の異なる標的核酸の数は、アレイ中の増幅部位の数を超える。通常、異なる標的核酸は、複数の増幅部位への流動性アクセスを有する。さらに、各増幅部位は、場合により、複数の異なる核酸中のいくつかの核酸に対するキャパシティーを有し得る。

【0051】

また、(i)増幅部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的核酸を有する溶液とを含

10

20

30

40

50

む増幅試薬を準備するステップと、(b)増幅試薬を反応させて、各々、溶液に由来する個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を有する複数の増幅部位を製造するステップであって、反応させることは、(i)各増幅部位で、個々の標的核酸から得られた第1のアンプリコンを製造することと、(ii)各増幅部位で個々の標的核酸から、または第1のアンプリコンから得られるその次のアンプリコンを製造することとを含み、増幅部位でその次のアンプリコンが生成される平均速度が、増幅部位で第1のアンプリコンが生成される平均速度を超える、ステップとを含む、核酸を増幅する方法も提供される。特定の実施形態では、溶液中の異なる標的核酸の数は、アレイ中の増幅部位の数を超える。通常、異なる標的核酸は、複数の増幅部位への流動性アクセスを有する。さらに、各増幅部位は、場合により、複数の異なる核酸中のいくつかの核酸に対するキャパシティーを有し得る。

#### 【0052】

本明細書に示される方法において使用される増幅部位のアレイは、1種または複数の基板として存在し得る。アレイに使用され得る基板物質の例示的種類として、ガラス、修飾ガラス、官能化ガラス、無機ガラス、ミクロスフェア（例えば、不活性および/または磁性粒子）、プラスチック、多糖、ナイロン、ニトロセルロース、セラミックス、樹脂、シリカ、シリカベースの物質、炭素、金属、光ファイバーまたは光ファイバー束、ポリマーおよびマルチウェル（例えば、マイクロタイマー）プレートが挙げられる。例示的プラスチックとして、アクリル、ポリスチレン、スチレンおよびその他の物質のコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタンおよびテフロン（商標）が挙げられる。例示的シリカベースの物質として、シリコンおよび種々の形態の修飾シリコンが挙げられる。特定の実施形態では、基板は、ウェル、チューブ、チャネル、キュベット、ペトリプレート、ボトルなどといった容器内であるか、またはその一部であり得る。特に有用な容器として、例えば、U.S. 2010/0111768 A1 または Bentle yら、Nature 456: 53~59頁（2008年）に記載されるようなフローセルが挙げられ、それらは各々、参照により本明細書に組み込まれる。例示的フローセルとして、 Illumina, Inc. (San Diego, CA) から市販されているものがある。別の特に有用な容器として、マルチウェルプレートまたはマイクロタイマープレート中のウェルがある。

#### 【0053】

いくつかの実施形態では、アレイの部位は、表面上のフィーチャとして構成され得る。フィーチャは、種々の所望の形式のいずれかで存在し得る。例えば、部位は、ウェル、ピット、チャネル、リッジ、高くなった領域、ペグ、ポストなどであり得る。上記で示されるように、部位は、ビーズを含有し得る。しかし、特定の実施形態では、部位は、ビーズまたは粒子を含有する必要はない。例示的部位として、454 Life Sciences (Roche, Basel Switzerlandの子会社) または Ion Torrent (Life Technologies, Carlsbad Californiaの子会社) によって販売される市販のシーケンシングプラットフォームのために使用される基板中に存在するウェルが挙げられる。ウェルを有する他の基板として、例えば、エッチングされた光ファイバーおよびU.S. 6,266,459、U.S. 6,355,431、U.S. 6,770,441、U.S. 6,859,570、U.S. 6,210,891、U.S. 6,258,568、U.S. 6,274,320、U.S. 2009/0026082 A1、U.S. 2009/0127589 A1、U.S. 2010/0137143 A1、U.S. 2010/0282617 A1 または PCT公開番号 WO 00/63437 に記載される他の基板が挙げられ、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの場合には、ウェル中でビーズを使用する適用のために、基板はこれらの参考文献において例示される。ウェルを含有する基板は、ビーズを含む場合も含まない場合もあるが、本開示内容の方法または組成物において使用され得る。いくつかの実施形態では、基板のウェルは、参照により本明細書に組み込まれる米国仮出願番号第 61/769,289 号に示されるようなゲル物質（ビーズを含むまたは含まない）を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0054】

アレイの部位は、ガラス、プラスチックまたは上記で例示されるその他の物質などの非金属表面上の金属フィーチャであり得る。金属層は、ウェットプラズマエッティング、ドライプラズマエッティング、原子層蒸着、イオンビームエッティング、化学蒸着、真空スパッタリングなどといった当技術分野で公知の方法を使用して、表面上に蒸着され得る。例えば、FlexAL(登録商標)、OpAL(登録商標)、Ionfab 300plus(登録商標)またはOptofab 3000(登録商標)システム(Oxford Instruments, UK)を含め、種々の市販の機器のいずれも必要に応じて使用してよい。金属層はまた、参照により本明細書に組み込まれる、Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7: 239~60頁(1977年)に示されるように、e-ビーム蒸発またはスパッタリングによって蒸着されてもよい。上記で例示されるものなどの金属層蒸着技術を、フォトリソグラフィー技術と組み合わせて、表面に金属領域またはパッチを作製してもよい。金属層蒸着技術およびフォトリソグラフィー技術を組み合わせるための例示的方法は、以下の実施例1および2に、また参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願番号US13/492,661に提供されている。

## 【0055】

フィーチャのアレイは、スポットまたはパッチの格子として現れ得る。フィーチャは、反復パターンで、または不規則な非反復パターンで位置し得る。特に有用なパターンとして、六角形のパターン、直線パターン、格子パターン、鏡映対称を有するパターン、回転対称を有するパターンなどがある。非対称パターンはまた、有用であり得る。ピッチは、最近接フィーチャの異なる対間で同一である場合も、またはピッチは、最近接フィーチャの異なる対間で異なる場合もある。特定の実施形態では、アレイのフィーチャは、各々、約100nm<sup>2</sup>、250nm<sup>2</sup>、500nm<sup>2</sup>、1μm<sup>2</sup>、2.5μm<sup>2</sup>、5μm<sup>2</sup>、10μm<sup>2</sup>、100μm<sup>2</sup>または500μm<sup>2</sup>より大きい区域を有し得る。あるいはまたはさらに、アレイのフィーチャは、各々、約1mm<sup>2</sup>、500μm<sup>2</sup>、100μm<sup>2</sup>、25μm<sup>2</sup>、10μm<sup>2</sup>、5μm<sup>2</sup>、1μm<sup>2</sup>、500nm<sup>2</sup>または100nm<sup>2</sup>より小さい区域を有し得る。実際、領域は、上記で例示されたものから選択される上限および下限の間の範囲にある大きさを有し得る。

## 【0056】

表面上のフィーチャのアレイを含む実施形態については、フィーチャは、別個の、介在領域によって分離されているものであり得る。フィーチャの大きさおよび/または領域間の間隔は、変わり得、その結果、アレイは、高密度、中程度の密度または低密度であり得る。高密度アレイは、約15μm未満によって分離される領域を有すると特徴づけられる。中程度の密度のアレイは、約15~30μmによって分離される領域を有するのに対し、低密度のアレイは、30μm超によって分離される領域を有する。本発明において有用なアレイは、100μm、50μm、10μm、5μm、1μmまたは0.5μm未満によって分離される領域を有し得る。

## 【0057】

特定の実施形態では、アレイは、ビーズまたはその他の粒子の収集物を含み得る。粒子は、溶液に懸濁されてもよく、または基板の表面に置かれててもよい。溶液中のビーズアレイの例として、Luminex(Austin, TX)によって商業化されたものがある。表面に置かれたビーズを有するアレイの例として、BeadChipアレイ(1llumina Inc., San Diego CA)などのビーズがウェル中に置かれているものまたは454 Life Sciences(Roche, Basel Switzerlandの子会社)もしくはIon Torrent(Life Technologies, Carlsbad Californiaの子会社)製のシーケンシングプラットフォームにおいて使用される基板が挙げられる。表面に置かれたビーズを有するその他のアレイは、US6,266,459、US6,355,431、US6,770,441、US6,859,570、US6,210,891、US6,258,568、US6,274,320、US2009/0026082A1、US2009

10

20

30

40

50

/ 0 1 2 7 5 8 9 A 1、U S 2 0 1 0 / 0 1 3 7 1 4 3 A 1、U S 2 0 1 0 / 0 2 8 2 6 1 7 A 1 または P C T 公開番号 W O 0 0 / 6 3 4 3 7 に記載され、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。上記の参考文献のうちいくつかは、アレイ基板中またはアレイ基板上にビーズをロードする前に、標的核酸をビーズに取り付ける方法を記載する。しかし、ビーズは、増幅プライマーを含むよう作製され得、次いで、ビーズは、アレイにロードし、それによって、本明細書に示される方法において使用するための増幅部位を形成するよう使用され得るということは理解されよう。本明細書において先に示されるように、基板は、ビーズを用いずに使用されてもよい。例えば、増幅プライマーは、ウェルにまたはウェル中のゲル物質に直接的に付着されてもよい。したがって、本明細書に示される方法および組成物において使用するために修飾され得る物質、組成物または装置の例示が言及される。

10

#### 【 0 0 5 8 】

アレイの増幅部位は、標的核酸と結合できる複数の捕捉剤を含み得る。例示的捕捉剤として、標的核酸に付着されたそれぞれの結合パートナーを有する受容体および / またはリガンドが挙げられ、この例は、本明細書において先に示されている。特に有用な捕捉剤として、1種または複数の標的核酸の配列と相補的である捕捉核酸がある。例えば、増幅部位に存在する捕捉核酸は、各標的核酸のアダプター配列中に存在するユニバーサル配列と相補的であるユニバーサル捕捉配列を有し得る。いくつかの実施形態では、捕捉核酸はまた、標的核酸の増幅のためのプライマーとして機能し得る（ユニバーサル配列も含有するか否かに関わらず）。

20

#### 【 0 0 5 9 】

特定の実施形態では、捕捉核酸などの捕捉剤は、増幅部位に付着され得る。例えば、捕捉剤は、アレイのフィーチャの表面に付着され得る。付着は、ビーズ、粒子またはゲルなどの中間体構造を介してもよい。ゲルを介するアレイへの捕捉核酸の付着は、以下の実施例 1 に示されており、I l l u m i n a I n c . ( S a n D i e g o , C A ) から市販されているフローセルによってさらに例示され、または参照により本明細書に組み込まれる W O 2 0 0 8 / 0 9 3 0 9 8 に記載されている。本明細書において示される方法および装置において使用され得る例示的ゲルとして、それだけには限らないが、アガロースなどのコロイド状構造を有するもの、ゼラチンなどのポリマーメッシュ構造を有するものまたはポリアクリルアミド、S F A ( 例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 5 9 8 6 5 A 1 号を参照のこと ) もしくは P A Z A M ( 例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国仮出願番号第 6 1 / 7 5 3 , 8 3 3 号を参照のこと ) などの架橋ポリマー構造を有するものが挙げられる。ビーズを介した付着は、説明および本明細書において先に示された引用された参考文献において例示されるように達成され得る。

30

#### 【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態では、アレイ基板の表面上のフィーチャは、不連続であり、表面の介在領域によって分離されている。アレイのフィーチャと比較して実質的に少量または低濃度の捕捉剤を有する介在領域は、有利である。捕捉剤を欠く介在領域は、特に有利である。例えば、介在領域に捕捉部分が比較的少量であることまたは存在しないことは、所望のフィーチャへの標的核酸の局在性およびその後に作製されるクラスターにとって有利に働く。特定の実施形態では、フィーチャは、表面中の凹面フィーチャ ( 例えば、ウェル ) であり得、フィーチャは、ゲル物質を含有し得る。ゲル含有フィーチャは、ゲルが実質的に存在しないか、存在する場合には、ゲルが、核酸の局在性を実質的に支持できない表面上の介在領域によって互いに分離され得る。ウェルなどのゲル含有フィーチャを有する基板を作製および使用するための方法および組成物は、参照により本明細書に組み込まれ、米国仮出願番号第 6 1 / 7 6 9 , 2 8 9 号に示されている。

40

#### 【 0 0 6 1 】

本開示内容の方法または組成物において使用される標的核酸は、D N A 、R N A またはその類似体から構成され得る。標的核酸の供給源は、ゲノム D N A 、メッセンジャー R N

50

Aまたは天然供給源由来のその他の核酸であり得る。いくつかの場合には、このような供給源に由来する標的核酸は、本明細書における方法または組成物において使用する前に増幅され得る。それだけには限らないが、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、ローリングサークル増幅（R C A）、多重置換増幅（M D A）またはランダムプライム増幅（R P A）を含め、種々の既知増幅技術のいずれも使用され得る。本明細書に示される方法または組成物において使用する前の標的核酸の増幅は、任意選択であるということは理解されよう。そのようなものとして、本明細書に示される方法および組成物のいくつかの実施形態では、標的核酸は、使用の前に増幅されない。標的核酸は、場合により、合成ライブラリーに由来してもよい。合成核酸は、天然D N AまたはR N A組成物を有する場合もあり、その類似体であってもよい。

10

#### 【0062】

標的核酸が由来し得る例示的生物学的サンプルとして、例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、有蹄動物、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、ネコ、イヌ、靈長類、ヒトまたは非ヒト靈長類などの哺乳動物；シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）、トウモロコシ、ソルガム、カラスムギ、コムギ、イネ、セイヨウアブラナまたはダイズなどの植物；コナミドリムシ（*Chlamydomonas reinhardtii*）などの藻類；エレガンス線虫（*Caenorhabditis elegans*）などの線虫；キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）、蚊、ショウジョウバエ、ミツバチまたはクモなどの昆虫；ゼブラフィッシュなどの魚；爬虫類；カエルまたはアフリカツメガエルなどの両生類；キイロタマホコリカビ（*dictyostelium discoideum*）；ニューモシスチス・カリニ（*pneumocystis carinii*）などの真菌、トラフグ（*Takifugu rubripes*）、酵母、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）またはシゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）；または熱帯熱マラリア原虫に由来するものが挙げられる。標的核酸はまた、細菌、大腸菌、ブドウ球菌またはマイコプラズマ・ニューモニエ（*mcoplasma pneumoniae*）などの原核生物；古細菌；C型肝炎ウイルスもしくはヒト免疫不全ウイルスなどのウイルス；またはウイロイドに由来し得る。標的核酸は、上記の生物の同種培養物もしくは集団に、あるいは、例えば、共同社会または生態系中のいくつかの異なる生物の収集物に由来し得る。

20

#### 【0063】

標的核酸は、天然供給源に由来する必要はなく、代わりに、既知技術を使用して合成されてもよい。例えば、本明細書に示される方法においてアレイを作製するために、遺伝子発現プローブまたは遺伝子型判定プローブが合成され、使用され得る。

30

#### 【0064】

いくつかの実施形態では、標的核酸は、1種または複数の大きな核酸の断片として得られてもよい。断片化は、例えば、噴霧化、音波処理、化学的切断、酵素的切断または物理的剪断を含めた当技術分野で公知の種々の技術のいずれかを使用して実施され得る。断片化はまた、大きな核酸の一部のみをコピーすることによってアンプリコンを生成する特定の増幅技術の使用に起因し得る。例えば、P C R増幅は、増幅に使用されるフランкиングプライマーの間の断片の長さによって規定される大きさを有する断片を生成する。

#### 【0065】

40

標的核酸の集団またはそのアンプリコンは、本明細書に示される方法または組成物の特定の適用のために望まれるか、または適当である平均鎖長を有し得る。例えば、平均鎖長は、約100,000ヌクレオチド、50,000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、5,000ヌクレオチド、1,000ヌクレオチド、500ヌクレオチド、100ヌクレオチドまたは50ヌクレオチド未満であり得る。あるいはまたはさらに、平均鎖長は、約10ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、500ヌクレオチド、1,000ヌクレオチド、5,000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、50,000ヌクレオチドまたは100,000ヌクレオチド超であり得る。標的核酸またはそのアンプリコンの集団の平均鎖長は上記で示される最大値と最小値の間の範囲にあり得る。増幅部位で生成した（またはそうではなく、本明細書において作製または使用される

50

) アンプリコンは、上記で例示されるものから選択される上限および下限の間の範囲にある平均鎖長を有し得るということは理解されよう。

【0066】

いくつかの場合には、標的核酸の集団は、そのメンバーの最大長を有するよう、条件下で製造され得るか、そうではなく、構成され得る。例えば、本明細書に示される方法の1つまたは複数のステップにおいて使用される、または特定の組成物中に存在するメンバーの最大長は、約100,000ヌクレオチド、50,000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、5,000ヌクレオチド、1,000ヌクレオチド、500ヌクレオチド、100ヌクレオチドまたは50ヌクレオチド未満であり得る。あるいはまたはさらに、標的核酸またはそのアンプリコンの集団は、そのメンバーの最少長を有するよう、条件下で製造され得るか、そうではなく、構成され得る。例えば、本明細書に示される方法の1つまたは複数のステップにおいて使用される、または特定の組成物中に存在するメンバーの最少長は、約10ヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、500ヌクレオチド、1,000ヌクレオチド、5,000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、50,000ヌクレオチドまたは100,000ヌクレオチド超であり得る。集団中の標的核酸の最大および最少鎖長は、上記で示される最大値と最小値の間の範囲にあり得る。增幅部位で生成した(またはそうではなく、本明細書において作製または使用される)アンプリコンは、上記で例示される上限と下限の間の範囲にある最大および/または最少鎖長を有し得るということは理解されよう。

【0067】

特定の実施形態では、標的核酸は、例えば、動力学排除を促進するために増幅部位の区域に関連した大きさである。例えば、動力学排除を達成するために、アレイの各部位の区域は、標的核酸の排除体積の直径よりも大きいものであり得る。例えば、表面上のフィーチャのアレイを利用する実施形態をとると、各フィーチャの区域は、増幅部位に輸送される標的核酸の排除体積の直径よりも大きいものであり得る。標的核酸の排除体積およびその直径は、例えば、標的核酸の長さから決定され得る。核酸の排除体積および排除体積の直径を決定する方法は、例えば、U.S.7,785,790; Rybenkovら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:5307~5311頁(1993年); Zimmermanら、J. Mol. Biol. 222:599~620頁(1991年); または Sobelら、Biopolymers 31:1559~1564頁(1991年)に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0068】

アレイの増幅部位は、標的核酸からアンプリコンを製造するために使用される複数のプライマーを含み得る。いくつかの実施形態では、増幅部位に存在するプライマーは、各標的核酸のアダプター配列中に存在するユニバーサル配列と相補的であるユニバーサル誘導配列を有し得る。特定の実施形態では、複数のプライマーが、増幅部位に付着され得る。プライマーは、捕捉核酸のために上記に示されるように増幅部位に付着され得る。

【0069】

本明細書において先に示されるように、アレイ基板の表面上のフィーチャは、不連続で、表面の介在領域によって分離され得る。特定の実施形態では、介在領域は、アレイのフィーチャと比較して実質的に少量または低濃度のプライマーを有する。プライマーを欠く介在領域は、特に有利である。例えば、介在領域にプライマーが比較的少量であることまたは存在しないことは、アレイの表面上のフィーチャへのアンプリコンの局在性にとって有利に働く。この配置によって、各アレイフィーチャの境界が生じ、それによって、フィーチャに、本明細書に示される方法におけるシーディングされた標的核酸の増幅によって製造されるアンプリコンに対する有限のキャパシティーを付与する。

【0070】

本開示内容の方法は、増幅試薬を反応させて各々、部位にシーディングされた個々の標的核酸から得られたアンプリコンのクローナル集団を含む複数の増幅部位を製造するステ

10

20

30

40

50

ップを含み得る。いくつかの実施形態では、増幅反応は、それぞれの増幅部位のキャパシティを満たすのに十分な数のアンプリコンが作製されるまで進行する。このようにして、すでにシーディングされた部位をキャパシティまで満たすことによって、その後の標的核酸がその部位にランディングすることを排除し、それによって、その部位でアンプリコンのクローナル集団を製造する。したがって、いくつかの実施形態では、増幅部位のキャパシティを満たすためにアンプリコンが生成される速度は、個々の標的核酸がそれぞれ、個々の増幅部位に輸送される速度を超えることが望ましい。

#### 【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、第 2 の標的核酸がその部位に到達する前に、増幅部位がキャパシティまで満たされない場合でさえ、見かけのクローン性が達成され得る。いくつかの条件下では、第 1 の標的核酸の増幅は、その部位に輸送される第 2 の標的核酸からのコピーの製造を有効に打ち負かすか、または圧倒するのに十分な数のコピーが作製されるというところまで進行し得る。例えば、500 nmより小さい直径である円形フィーチャでのブリッジ増幅プロセスを使用する実施形態では、第 1 の標的核酸の 14 サイクルの指數増幅後に、同一部位での第 2 の標的核酸からの汚染は、Illumina シークエンシングプラットフォームでの合成解析によるシークエンシングに悪影響を及ぼすには不十分な数の汚染アンプリコンしか製造しないということが決定されている。

#### 【 0 0 7 2 】

上記の実施例によって実証されるように、アレイ中の増幅部位は、すべての実施形態において、完全にクローナルである必要はない。むしろ、いくつかの適用については、個々の増幅部位には、第 1 の標的核酸から得られたアンプリコンが主にあり得、低レベルの第 2 の標的核酸から得られた汚染アンプリコンも有し得る。アレイは、汚染のレベルが、アレイのその後の使用に許容されない影響を有さない限り、低レベルの汚染アンプリコンを有する 1 つまたは複数の増幅部位を有し得る。例えば、アレイが、検出適用において使用される予定である場合には、許容されるレベルの汚染は、許容されない方法で検出技術の信号対雑音または分解能に影響を与えないレベルとなろう。したがって、見かけのクローン性は、一般に、本明細書に示される方法によって作製されたアレイの特定の使用または適用と関連する。特定の適用のために個々の増幅部位で許容され得る汚染の例示的レベルとして、それだけには限らないが、多くとも、0.1%、0.5%、1%、5%、10% または 25% の汚染アンプリコンが挙げられる。アレイは、これらの例示的レベルの汚染アンプリコンを有する 1 つまたは複数の増幅部位を含み得る。例えば、アレイ中の増幅部位の最大 5%、10%、25%、50%、75% またはさらに 100% が、幾つかの汚染アンプリコンを有し得る。

#### 【 0 0 7 3 】

特定の実施形態では、本開示内容の方法は、同時に、(i) 標的核酸を平均輸送速度で増幅部位に輸送し、(ii) 増幅部位にある標的核酸を平均増幅速度で増幅するために実施され、ここで、平均増幅速度は、平均輸送速度を超える。したがって、このような実施形態において、比較的遅い速度の輸送を使用することによって、動力学排除が達成され得る。例えば、所望の平均輸送速度を達成するために、十分に低い濃度の標的核酸が選択され得、低濃度ほど、遅い平均速度の輸送をもたらす。あるいはまたはさらに、輸送速度を低下させるために、高粘度溶液および/または溶液における分子密集試薬の存在が使用され得る。有用な分子密集試薬の例として、それだけには限らないが、ポリエチレングリコール (PEG)、フィコール、デキストランまたはポリビニルアルコールが挙げられる。例示的分子密集試薬および製剤は、参照により本明細書に組み込まれる U.S. 3,995,900 に示されている。所望の輸送速度を達成するために調整され得る別の因子として、標的核酸の平均の大きさがある。

#### 【 0 0 7 4 】

本方法のいくつかの実施形態では、標的核酸は、増幅の開始の前に、例えば、拡散またはその他のプロセスによって増幅部位に輸送され得る。この場合には、動力学排除は、その次のアンプリコンが作製される速度と比較して、比較的遅い速度の第 1 のアンプリコン

10

20

30

40

50

の作製を利用することによって達成され得る。例えば、増幅反応を通じて、最初に、一時的な非伸長可能状態にある、第1のアンブリコン形成のための第1のプライマーおよび伸長可能状態にある、その次のアンブリコン形成のためのその他のプライマーを使用することによって、異なる速度のアンブリコン形成が達成され得る。そのようなものとして、第1のプライマーの伸長可能状態への変換における遅れが、第1のアンブリコン形成における遅れを引き起こすのに対し、その次のアンブリコン形成は、このような遅れを起こさない。このような方法で、増幅部位でその次のアンブリコンが生成される平均速度は、増幅部位で第1のアンブリコンが生成される平均速度を超える。

#### 【0075】

異なる速度のアンブリコン形成による動力学排除のより詳細な例は、以下の通りである。増幅部位は、それに付着されたプライマーの3つの部分集団を含み得る。プライマーの第1の部分集団は、標的核酸を捕捉する（捕捉配列によって）よう、また第1のアンブリコン形成のプライマーとして機能する。プライマーの第1の部分集団は、例えば、3'末端でジデオキシヌクレオチドによって伸長から可逆的に遮断される。プライマーの第2の部分集団は、P5プライマー配列を有し得、プライマーの第3の集団は、P7プライマー配列を有し得る。第1および第2の部分集団のプライマーは、ジデオキシヌクレオチドを含まず、したがって、十分に伸長適格性である。標的核酸は、（5'から3'に）P7プライマー結合配列、いくつかの異なる標的ヌクレオチド配列のうちの1種P5プライマー結合配列および捕捉配列相補体を含むよう構築され得る。いくつかの異なる標的核酸は、プライマーの第1の部分集団とハイブリダイズされ得る（捕捉配列によって）。捕捉プライマーは、次いで、例えば、加ピロリン酸分解条件下（例えば、過剰のピロリン酸塩の存在下）でのポリメラーゼでの処理によって伸長可能状態に変換され得る。増幅部位を満たすためにその次のアンブリコンが製造される期間の間に、平均して、捕捉プライマーのうち1種のみが伸長可能形態に変換される条件が使用され得る。したがって、個々の増幅部位にいくつかの汚染する可能性がある標的核酸が存在し得るが、動力学排除は、標的核酸の1種のみからのアンブリコン形成をもたらし、それによって、増幅部位でアンブリコンのクローナル集団を作製する。例示目的で、この実施例は、単一増幅部位に関して記載されているが、反応は、増幅部位のアレイでの標的核酸付着および増幅を含み得るということは理解されよう。

#### 【0076】

本明細書に示される方法では、種々の一時的に非伸長可能なプライマーのいずれも、それらのプライマーを伸長可能な状態に変換するためのそれぞれの技術および試薬とともに使用してもよい。上記の実施例は、加ピロリン酸分解によって除去されるジデオキシヌクレオチドの使用を記載する。他の非伸長可能ヌクレオチドが、プライマー上に存在し、加ピロリン酸分解によって除去され得る。さらに、ジデオキシヌクレオチドまたは他の非伸長可能ヌクレオチドは、例えば、ポリメラーゼまたは他の適当な酵素のエキソヌクレアーゼ活性を含めた、他の既知技術によって除去され得る。他の実施形態では、プライマーは、ターミネーターベースの合成法によるシーケンシングにおいて使用されるものなどの可逆的ターミネーターを含み得る。可逆的ターミネーターおよびその除去のための技術の例は、例えば、Bentleyら、Nature 456:53~59頁（2008年）、WO04/018497；US7,057,026；WO91/06678；WO07/123744；US7,329,492；US7,211,414；US7,315,019；US7,405,281およびUS2008/0108082に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0077】

異なる速度の第1のアンブリコンおよびその次のアンブリコン形成を引き起こすための差次的に活性なプライマーの使用は、標的核酸が、増幅の前に増幅部位に存在する実施形態について上記で例示されているが、方法はまた、標的核酸が、増幅が起こっているときに増幅部位に輸送される（例えば、拡散によって）条件下でも実施され得る。したがって、動力学排除は、その次のアンブリコン形成に対して、第1のアンブリコンの比較的遅い

10

20

30

40

50

輸送速度および比較的遅い製造の両方を使用し得る。したがって、本明細書に示される増幅反応は、(i) 第1のアンプリコンの製造および(ii) アレイのその他の部位でのその次のアンプリコンの製造と同時に、標的核酸が溶液から増幅部位に輸送されるように実施され得る。特定の実施形態では、その次のアンプリコンが増幅部位で生成される平均速度は、標的核酸が溶液から増幅部位に輸送される平均速度を超える。いくつかの場合には、個々の増幅部位で単一標的核酸から、それぞれの増幅部位のキャパシティーを満たすのに十分な数のアンプリコンが生成され得る。それぞれの増幅部位のキャパシティーを満たすためにアンプリコンが生成される速度は、例えば、個々の標的核酸が溶液から増幅部位に輸送される速度を超える。

## 【0078】

10

本明細書に示される方法において使用される増幅試薬は、増幅部位で標的核酸のコピーを迅速に作製できることが好ましい。通常、本開示内容の方法において使用される増幅試薬は、ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸 (NTP) を含む。当技術分野で公知の種々のポリメラーゼのいずれも使用され得るが、いくつかの実施形態では、エキソヌクレアーゼ陰性であるポリメラーゼを使用することが好ましいことあり得る。DNAコピーが作製される実施形態については、NTPは、デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) であり得る。通常、DNA増幅試薬中には、4種の天然種、dATP、dTTP、dGTPおよびdCTPが存在するが、必要に応じて、類似体が使用され得る。NTPは、RNAコピーが作製される実施形態については、リボヌクレオチド三リン酸 (rNTP) であり得る。通常、RNA増幅試薬中には、4種の天然種、rATP、rUTP、rGTPおよびrCTPが存在するが、必要に応じて、類似体が使用され得る。

## 【0079】

20

増幅試薬は、アンプリコン形成を促進する、いくつかの場合には、アンプリコン形成の速度を増大するさらなる成分を含み得る。一例として、リコンビナーゼがある。リコンビナーゼは、反復された侵入／伸長を可能にすることによってアンプリコン形成を促進し得る。より詳しくは、リコンビナーゼは、ポリメラーゼによる標的核酸の侵入およびアンプリコン形成の鋳型として標的核酸を使用するポリメラーゼによるプライマーの伸長を促進し得る。このプロセスは、侵入／伸長の各ラウンドから製造されたアンプリコンが、その後のラウンドで鋳型として働く連鎖反応として反復され得る。このプロセスは、変性サイクル（例えば、加熱または化学変性による）が必要ではないので、標準PCRよりも迅速に起こり得る。そのようなものとして、リコンビナーゼによって促進される増幅は、等温的に実施され得る。増幅を促進するための、リコンビナーゼによって促進される増幅試薬中に、ATPまたはその他のヌクレオチド（またはいくつかの場合には、その非加水分解性類似体）を含むことが一般に望ましい。リコンビナーゼおよび一本鎖結合 (SSB) タンパク質の混合物は、SSBが増幅をさらに促進し得るので特に有用である。リコンビナーゼによって促進される増幅のための例示的製剤として、TwistDx (Cambridge, UK) によってTwistAmpキットとして市販されているものが挙げられる。リコンビナーゼによって促進される増幅試薬の有用な成分および反応条件は、US5,223,414およびUS7,399,590に示されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【0080】

40

アンプリコン形成を促進する、いくつかの場合には、アンプリコン形成の速度を増大するための増幅試薬中に含まれ得る成分の別の例として、ヘリカーゼがある。ヘリカーゼは、アンプリコン形成の連鎖反応を可能にすることによってアンプリコン形成を促進し得る。このプロセスは、変性サイクル（例えば、加熱または化学的変性による）が必要ではないので、標準PCRよりも迅速に起こり得る。そのようなものとして、ヘリカーゼによって促進される増幅は、等温的に実施され得る。ヘリカーゼおよび一本鎖結合 (SSB) タンパク質の混合物は、SSBが増幅をさらに促進し得るので特に有用である。ヘリカーゼによって促進される増幅のための例示的製剤として、Biohelix (Beverly, MA) からIsoAmpキットとして市販されているものが挙げられる。さらに、ヘ

50

リカーゼタンパク質を含む有用な製剤の例は、U.S.7,399,590およびU.S.7,829,284に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0081】

アンブリコン形成を促進する、いくつかの場合には、アンブリコン形成の速度を増大するための増幅試薬中に含まれ得る成分のさらに別の例として、開始点結合タンパク質がある。

#### 【0082】

増幅反応が起こる速度は、増幅反応の1種または複数の活性成分の濃度または量を増大することによって高めることができる。例えば、増幅速度を高めるために、ポリメラーゼ、ヌクレオチド三リン酸、プライマー、リコンビナーゼ、ヘリカーゼまたはSSBの量または濃度を高めてもよい。いくつかの場合には、量または濃度が増大する（またはそうではなく、本明細書に示される方法において操作される）、増幅反応の1種または複数の活性成分は、増幅反応の非核酸成分である。

10

#### 【0083】

増幅速度はまた、温度を調整することによって本明細書に示される方法において高めることができる。例えば、部位での温度を、反応速度が変性またはその他の有害事象のために低下する最大温度に高めることによって、1つまたは複数の増幅部位での増幅速度を高めてもよい。所与の増幅反応混合物について、最適または所望の温度は、使用における増幅成分の既知特性から、または経験的に決定され得る。増幅速度を増大するために、増幅に使用されるプライマーの特性もまた調整され得る。例えば、配列および/またはプライマーの長さを調整してもよい。このような調整は、プライマー融解温度( $T_m$ )の演繹的予測に基づいて、または経験的に行われ得る。

20

#### 【0084】

増幅部位での増幅速度を高めるための別の選択肢は、増幅部位での増幅反応の1種または複数の活性成分の局所濃度を高めることである。活性成分は、1種または複数の非核酸成分を含み得る。いくつかの実施形態では、電気泳動、等速電気泳動、電流または電圧の直接パルスなどといった電気的操作を使用して、増幅反応の1種または複数の活性成分が増幅部位に誘引され得る。あるいはまたはさらに、1種または複数の増幅成分は、それを増幅部位に補充する親和性タグを含み得る。親和性タグは、電気的操作が、適宜タグがつけられた成分を増幅部位に誘引し得るよう帶電され得る。非帶電親和性タグも同様に使用され得る。例えば、捕捉剤の例として本明細書に示されるものなどの当技術分野で公知の種々のリガンドまたは受容体のいずれも、増幅反応の成分の親和性タグとして使用され得る。核酸に使用される捕捉剤の場合と同様、増幅部位は、増幅成分の親和性タグの結合パートナーを含み得る。したがって、親和性タグがつけられた増幅成分の局所濃度は、増幅部位での適当なパートナーとの相互作用のために増大され得る。増幅部位が基板の表面である特定の実施形態では、親和性タグの結合パートナーは、表面に付着され得る。

30

#### 【0085】

さらに、磁力または光学力を使用して、増幅試薬の局所濃度を高めることができる。このような場合には、1種または複数の増幅試薬は、このような力によって操作され得る磁性タグまたは光学タグを含み得る。

40

#### 【0086】

増幅反応が起こる速度は、1種または複数の増幅試薬の活性を高めることによって高めることができる。例えば、ポリメラーゼの伸長速度を高める補因子を、ポリメラーゼが使用されている反応に付加してもよい。いくつかの実施形態では、マグネシウム、亜鉛またはマンガンなどの金属補因子を、ポリメラーゼ反応に付加してもよく、ベタインを付加してもよい。

#### 【0087】

本明細書に示される方法のいくつかの実施形態では、二本鎖である標的核酸の集団を使用することが望ましい。驚くべきことに、動力学排除条件下での部位のアレイでのアンブリコン形成は、二本鎖標的核酸にとって効率的であるということが観察された。例えば、

50

アンプリコンのクローナル集団を有する複数の増幅部位は、リコンビナーゼおよび一本鎖結合タンパク質の存在下で、二本鎖標的核酸からより効率的に製造され得る（同一濃度での一本鎖標的核酸と比較して）。それにもかかわらず、本明細書に示される方法のいくつかの実施形態では、一本鎖標的核酸は使用され得るということは理解されよう。

#### 【0088】

本明細書に示される方法は、種々の増幅技術のいずれも使用できる。使用され得る例示的技術として、それだけには限らないが、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、ローリングサークル増幅（R C A）、多重置換増幅（M D A）またはランダムプライム増幅（R P A）が挙げられる。いくつかの実施形態では、例えば、増幅部位が、アンプリコンを所望のキャパシティーを有する容量中に含有できる場合には、増幅は、溶液中で実施され得る。好ましくは、本開示内容の方法において動力学排除の条件下で使用される増幅技術は、固相で実施される。例えば、増幅に使用される1種または複数のプライマーは、増幅部位で固相に付着され得る。P C R 実施形態では、増幅に使用されるプライマーの一方または両方が、固相に付着され得る。表面に付着された2種のプライマーを利用する形式は、二本鎖アンプリコンが、コピーされた鋳型配列の両端に位置する2種の表面に付着されたプライマー間にブリッジ様構造を形成するので、ブリッジ増幅と呼ばれることが多い。ブリッジ増幅のために使用され得る例示的試薬および条件は、例えば、米国特許第5,641,658号；米国特許公開番号第2002/0055100号；米国特許第7,115,400号；米国特許公開番号第2004/0096853号；同2004/0002090号；同2007/0128624号；および同2008/0009420号に記載され、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。固相P C R 増幅はまた、固相支持体に付着された増幅プライマーの一方および溶液中の第2のプライマーを用いて実施され得る。表面に付着されたプライマーおよび可溶性プライマーの組合せを使用する例示的形式として、例えば、Dressmanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 8817~8822頁（2003年）、WO 05/010145または米国特許公開番号第2005/0130173号または同2005/0064460号に記載されるようなエマルジョンP C R があり、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。エマルジョンP C R は、この形式の例示的なものであり、本明細書に示される方法の目的上、エマルジョンの使用は任意選択であり、実際、いくつかの実施形態については、エマルジョンは使用されないということは理解されよう。上記で例示されたP C R 技術は、増幅の速度を促進または増大するために、本明細書において別の場所に例示される成分を使用する非周期性増幅（例えば、等温性増幅）のために修飾され得る。したがって、上記で例示されるP C R 技術は、動力学排除条件下で使用され得る。

#### 【0089】

R C A 技術は、本開示内容の方法における使用のために修飾され得る。R C A 反応において使用され得る例示的成分およびR C A がアンプリコンを製造する原理は、例えば、Lizardiら、Nat. Genet. 19: 225~232頁（1998年）およびU S 2007/0099208 A 1に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。R C A に使用されるプライマーは、溶液中であっても、増幅部位で固相支持体表面に付着されてもよい。上記の参考文献において例示されるR C A 技術は、例えば、特定の適用に適合するよう増幅の速度を高めるために、本明細書における教示に従って修飾され得る。したがって、R C A 技術は、動力学排除条件下で使用され得る。

#### 【0090】

M D A 技術は、本開示内容の方法における使用のために修飾され得る。M D A のいくつかの基本原理および有用な条件は、例えば、Deanら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5261~66頁（2002年）；Lageら、Genome Research 13: 294~307頁（2003年）；Walkerら、Molecular Methods for Virus Detection, Academic Press, Inc.、1995年；Walkerら、Nucl. Acids Res. 20: 1691~96頁（1992年）；U S 5,455,166；U S 5,

10

20

30

40

50

130, 238; および U S 6, 214, 587 に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。MDA に使用されるプライマーは、溶液中であっても、増幅部位で固相支持体表面に付着されてもよい。上記の参考文献において例示される MDA 技術は、例えば、特定の適用に適合するよう増幅の速度を高めるために、本明細書における教示に従って修飾され得る。したがって、MDA 技術は、動力学排除条件下で使用され得る。

#### 【0091】

特定の実施形態では、動力学排除条件下でアレイを作製するために、上記で例示される増幅技術の組合せが使用され得る。例えば、RCA および MDA が、組み合わせて使用され得、これでは、RCA は、溶液中で（例えば、溶液相プライマーを使用して）コンカーテマーアンプリコンを作製するために使用される。次いで、アンプリコンは、増幅部位で固相支持体表面に付着されているプライマーを使用する MDA の鋳型として使用され得る。この例では、組み合わされた RCA および MDA ステップ後に製造されるアンプリコンは、増幅部位の表面に付着される。

10

#### 【0092】

上記の実施形態のいくつかについて例示されるように、本開示内容の方法は、周期性増幅技術を使用する必要はない。例えば、標的核酸の増幅は、変性サイクルを欠き、増幅部位で実施され得る。例示的変性サイクルとして、増幅反応への化学的変性剤の導入および/または増幅反応の温度の増大が挙げられる。したがって、標的核酸の増幅は、増幅溶液を、標的核酸およびアンプリコンを変性する化学試薬で置換するステップを含む必要はない。同様に、標的核酸の増幅は、溶液を、標的核酸およびアンプリコンを変性する温度に加熱することを含む必要はない。したがって、増幅部位で標的核酸を増幅することは、本明細書に示される方法の期間、等温的に実施され得る。実際、本明細書に示された増幅方法は、標準条件下でいくつかの増幅技術のために実施される 1 つまたは複数の周期性操作を用いずに起こり得る。さらに、いくつかの標準固相増幅技術では、洗浄は、標的核酸が基板上にロードされた後で、増幅が開始される前に実施される。しかし、本方法の実施形態では、洗浄ステップは、反応部位への標的核酸の輸送と増幅部位での標的核酸の増幅の間で実施される必要はない。代わりに、輸送（例えば、拡散による）および増幅が同時に起こり、動力学排除を提供するよう許可される。

20

#### 【0093】

30

いくつかの実施形態では、動力学排除条件下で起こる増幅サイクルを反復することが望ましいものであり得る。したがって、周期性操作を用いずに、個々の増幅部位で標的核酸のコピーが作製され得るが、増幅部位のアレイは、各サイクル後にアンプリコンを含有する部位の数を増大するよう周期的に処理され得る。特定の実施形態では、増幅条件は、サイクルごとに修飾され得る。例えば、輸送の速度を変更するために、または増幅の速度を変更するために、上記で示される 1 種または複数の条件が、サイクルの間で調整され得る。そのようなものとして、輸送の速度は、サイクルごとに増大され得、輸送の速度は、サイクルごとに低下され得、増幅の速度は、サイクルごとに増大され得るか、または増幅の速度は、サイクルごとに低下され得る。

#### 【0094】

40

本明細書に示される方法は、アレイの増幅部位への標的核酸の電場 (e - field) 支援輸送を使用するよう修飾され得る。例えば、アレイの各増幅部位は、標的核酸を誘引する電荷を生成するよう電源に電気的に結合され得る。1 つの配置では、増幅部位での正電荷が、負に帯電した糖 - リン酸骨格を介して核酸を誘引し得る。核酸をアレイの部位へ誘引するために電場支援を使用するための例示的方法および装置は、参照により本明細書に組み込まれる U S 2 0 0 9 / 0 0 3 2 4 0 1 A 1 に記載されている。電場支援は、例えば、各増幅ステップの間に、核酸標的が、増幅部位のアレイへの流動性アクセスを有するよう複数の異なる標的核酸が溶液中にある条件下で本開示内容の方法において使用され得る。各増幅部位での電荷は、動力学排除を達成するよう調整され得る。さらにまたはあるいは、電荷を調整するために、標的核酸輸送速度を変更するために、または増幅速度を

50

変更するために本明細書に示されるその他の条件が、動力学排除を達成するよう調整され得る。したがって、増幅がアレイの種々の増幅部位で同時に起こりながら、アレイの増幅部位での電荷が標的核酸を誘引するよう調整され得、ここで、平均増幅速度は、標的核酸が増幅部位に輸送される（すなわち、電場支援輸送下）平均速度を超える。

#### 【0095】

標的核酸の増幅部位への電場支援輸送を利用する特定の実施形態では、電場は、増幅反応の過程を通じて一貫して印加され得る。あるいは、電場は、増幅反応が進むにつれ、また増幅部位がアンプリコンで満たされるにつれ、変更（例えば、増大または低減）され得る。例えば、電場を増大することは、標的核酸（すなわち、順に、各部位でアンプリコンのクローナル集団を製造するよう増幅される）を獲得する増幅部位の数を増大するという利益を提供し得る。電場が増大する速度および増大の振幅レンジは、経時的な標的核酸輸送の増大速度を、同一期間をかけて効率的に満たされた増幅部位の増大数と釣り合いをとるよう選択され得る。やはり、本方法によって製造されたアレイの適用に応じて、有効に満たすということは、増幅部位が、その部位での任意の二次標的核酸の増幅を防ぐことによって、第1の標的核酸のコピーでキャパシティーまで満たされるようになったということであり得る。あるいは、有効に満たすということは、特定の増幅部位での二次標的核酸の増幅が、無視できると考えられるか、そうではなくアレイの所望の使用のために許容される十分に低い割合の汚染アンプリコンをもたらすことであり得る。

10

#### 【0096】

一般に、電場支援は、アレイの1つまたは複数の増幅部位への標的核酸の輸送に対するさらなるレベルの制御を可能にする。電場支援の使用は、アレイの種々の部位で起こる増幅と同時の、増幅部位のアレイへの標的核酸の輸送との関連で上記に例示されているが、代替実施形態では、電場支援は、その部位での増幅の開始に先立って、標的核酸を増幅部位へ輸送するために使用され得る。電場支援は、本明細書に示される方法または組成物において、アレイのフィーチャなどの対象の部位へ標的核酸以外の標的生体分子を輸送するために使用され得る。

20

#### 【0097】

特定の実施形態では、電場は、アレイの増幅部位のすべてに、実質的に均一に印加され得る。したがって、溶液中にある標的核酸は、任意の所与の増幅部位に輸送される等しい可能性を有する。代替実施形態では、電場は、アレイ中に存在する増幅部位のサブセットのみに印加され得る。このような方法で、電場支援は、他のものを上回っていくつかの部位を選択的に満たすよう使用され得る。さらに、必要に応じて、標的核酸を部位の第1のサブセットに輸送するために、増幅部位の第1のサブセットで誘因性電荷が印加され得、一方で、標的核酸がそれらの部位に輸送されるのを阻害するために、または標的核酸を部位の第2のサブセットから除去する（例えば、脱離または分解による）ために、反発電荷が増幅部位の第2のサブセットに印加され得る。同様に、以下および実施例3にさらに詳細に示されるように、標的核酸が介在領域輸送されるのを阻害するために、または標的核酸を介在領域から除去する（例えば、脱離または分解による）ために、反発電荷が、アレイの介在領域に印加され得る。

30

#### 【0098】

特定の実施形態では、アレイの介在領域は、標的核酸またはその他の生体分子の結合を阻害するか、標的核酸またはその他の生体分子を除去する電荷を生成するよう電源に電気的に結合され得る。1つの配置では、介在領域での負電荷が、負に帯電した糖-リン酸骨格を介して核酸を反発し得る。あるいはまたはさらに、介在領域中の電荷は、核酸および生体分子を電気化学的に損傷させる表面に局在するpH電荷を生成するよう使用され得る。

40

#### 【0099】

電場反発は、例えば、核酸標的が、各増幅ステップの間に、増幅部位のアレイへの流動性アクセスを有するように、複数の異なる標的核酸が溶液中にある条件下で、本開示内容の方法において使用され得る。アレイの介在領域での電荷は、核酸が、アレイのフィーチ

50

ヤで捕捉され、場合により、動力学排除条件下でフィーチャで増幅されながら、核酸を反発するよう（例えば、除去または結合阻害によって）調整され得る。さらにまたはあるいは、電荷を調整するために、フィーチャへの標的核酸輸送速度を変更するための、または増幅速度を変更するための本明細書に示されるその他の条件が、動力学排除を達成するよう調整され得る。したがって、アレイの介在領域での電荷は、増幅がアレイの種々の増幅部位で同時に起こりながら、標的核酸を反発するよう調整され得、ここで、平均増幅速度は、標的核酸が増幅部位輸送される平均速度を超える。したがって、介在領域での電場反発は、核酸（またはその他の生体分子）をアレイのフィーチャに輸送するための、また動力学排除を達成するための本明細書に示されるその他の方法と組み合わせて使用され得る。

10

#### 【0100】

本明細書に示される方法および装置を使用する介在領域での電場反発は、介在領域の代わりにフィーチャでの核酸（またはその他の生体分子）の特異的局在性の改善という利点を提供し得る。このような利点によって、反発が、核酸および生体分子の表面に局在する電気化学的損傷によって、核酸またはその他の生体分子の結合を阻害する電荷反発の機序によって、またはその他の機序によって、働くかどうかをたどることができる。介在領域での電場反発は、特に、対象のフィーチャが、表面に局在した電気化学的損傷の範囲より高い高さを有する場合には、核酸またはその他の生体分子の対象のフィーチャへの特異的局在性を改善するために使用され得る。

#### 【0101】

20

いくつかの実施形態は、アレイのフィーチャへの核酸（またはその他の生体分子）の電場支援輸送を、アレイの介在領域からの核酸（またはその他の生体分子）の電場支援反発と組み合わせて利用できる。誘引性電場および反発的電場は、アレイに同時に印加してもよく、2つの場を別個に印加してもよい。例えば、場が交互に印加されるように、2つの場を別個に印加してもよい（例えば、反発的場がオフでありながら、誘引性場がフィーチャに印加され得、次いで、反発的場が介在領域に印加されながら、誘引性場がオフであり得、この一続きが1回または複数回反復され得る）。

#### 【0102】

電場は、アレイの領域および電解質にわたって印加され得るか、またはアレイの領域および第2の表面にわたって印加され得る。例えば、図4Aは、電場がアレイの介在領域および電解質にわたって印加され得る配置を示し、図4Bは、電場がアレイの介在領域および第2の表面にわたって印加され得る配置を示す。同様の配置が、アレイのフィーチャに誘引性場を印加するために使用され得る。さらに、電場は、フィーチャに印加されるか、介在領域に印加されるかに関わらず、アレイの適当な領域への交流電流または直流電流の印加によって形成され得る。

30

#### 【0103】

したがって、本開示内容は、生体分子のパターン化された表面を作製する方法を提供し、ここで、本方法は、(a)(i)表面上に不連続フィーチャを有するアレイであって、前記フィーチャは、表面の介在領域によって分離されている、アレイと、(ii)複数の異なる標的生体分子を有する溶液とを含む試薬を準備するステップと、(b)試薬を反応させて、生体分子をフィーチャに輸送し、個々の生体分子を、各フィーチャに付着させるステップであって、介在領域から生体分子を反発するよう、電場が介在領域に印加されるステップとを含み得る。本方法において使用するため特に有用な生体分子として、核酸がある。核酸は、本明細書において別の場所に示されるものなどの動力学排除条件下でこの方法においてフィーチャで増幅され得る。電場を使用するいくつかの実施形態では、アレイに使用される基板は、透明導電体の層を含み得る。導電体の層は、バッテリーなどの電源または信号発生器を接続する電極として使用され得る。必要に応じて、アレイのフィーチャ（例えば、ウェルのアレイ中のウェルの内表面）は、露出したまたは絶縁された導電性層を含有し得、ここで、導電性層両端の電圧は、核酸および/または増幅試薬に対する力を操作して、部位への輸送、部位での捕捉、部位からの除去および/または部位での

40

50

増幅の速度を制御するために使用され得る。特定の実施形態では、電場は、容器壁を透過する電場が、容器内の試薬に対する電気力を誘導し、輸送、捕捉、除去および／または増幅の速度にわたってある程度の制御を提供するように、ウェルの外表面に印加され得る。

#### 【0104】

例えば、本明細書に示される方法によって製造されている本開示内容のアレイは、種々の適用のいずれかのために使用され得る。特に有用な適用として、核酸シークエンシングがある。一例として、合成によるシークエンシング (SBS) がある。SBS では、鋳型中のヌクレオチドの配列を決定するために、核酸鋳型（例えば、その標的核酸またはアンプリコン）に沿った核酸プライマーの伸長がモニタリングされる。根底にある化学的プロセスは、重合（例えば、ポリメラーゼ酵素によって触媒されるような）であり得る。特定のポリメラーゼベースのSBS 実施形態では、プライマーに付加されるヌクレオチドの順序および種類検出が使用されて、鋳型の配列が決定され得るように、蛍光標識されたヌクレオチドが、鋳型依存性にプライマーに付加される（それによってプライマーを伸長する）。本明細書に示されるアレイの異なる部位で、複数の異なる鋳型が、種々の鋳型のために生じている事象が、アレイ中のその位置によって区別され得る状態下でSBS 技術に付され得る。

10

#### 【0105】

フローセルは、本開示内容の方法によって製造され、SBS またはサイクルにおいて試薬の反復された送達を含むその他の検出技術に付されるアレイを収容する好都合な形式を提供する。例えば、第1のSBS サイクルを開始するために、1種または複数の標識ヌクレオチド、DNA ポリメラーゼなどが、核酸鋳型のアレイを収容するフローセル中／フローセルを通って流され得る。プライマー伸長が標識されたヌクレオチドが組み込まれるようにするアレイのそれらの部位が、検出され得る。場合により、ヌクレオチドは、一旦、ヌクレオチドがプライマーに付加されると、さらなるプライマー伸長を終結する可逆的終結特性をさらに含み得る。例えば、可逆的ターミネーター部分を有するヌクレオチド類似体は、その部分を除去するために、デブロッキング剤が送達されるまで、その後の伸長が起こり得ないように、プライマーに付加され得る。したがって、可逆的終結を使用する実施形態について、デブロッキング試薬は、フローセルに送達され得る（検出が起こる前または後）。洗浄は、種々の送達ステップの間で実施され得る。次いで、サイクルは、プライマーをn 個のヌクレオチドだけ伸長するためにn 回反復され得、それによって、長さn の配列を検出する。本開示内容の方法によって製造されたアレイとともに使用するための、容易に適応され得る、例示的SBS 手順、流動系および検出プラットフォームは、例えば、Bentleyら、Nature 456: 53~59頁(2008年)、WO 04/018497; US 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7,329,492; US 7,211,414; US 7,315,019; US 7,405,281 および US 2008/0108082 に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0106】

ピロシークエンシングなどの周期性反応を使用するその他のシークエンシング手順が使用され得る。ピロシークエンシングは、特定のヌクレオチドが新生核酸鎖中に組み込まれる時の無機ピロリン酸 (PPi) の放出を検出する (Ronaghiら、Analytical Biochemistry 242(1)、84~9頁(1996年); Ronaghi、Genome Res. 11(1)、3~11頁(2001年); Ronaghiら、Science 281(5375)、363頁(1998年); US 6,210,891; US 6,258,568 および US 6,274,320、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる)。ピロシークエンシングでは、放出されたPPi は、ATPスルフリラーゼによってアデノシン三リン酸 (ATP) に直ちに変換されることによって検出され得、生じたATP のレベルは、ルシフェラーゼによって製造される光子を介して検出され得る。したがって、シークエンシング反応は、ルミネセンス検出系を介してモニタリングされ得る。蛍光ベースの検出システムのために使用される励起放射供給源は

30

40

50

、ピロシークエンシング手順には、必要ではない。本開示内容のアレイへのピロシークエンシングの適用のために使用され得る、有用な流動系、検出器および手順は、例えば、W I P O 特許出願番号 P C T / U S 1 1 / 5 7 1 1 1 、 U S 2 0 0 5 / 0 1 9 1 6 9 8 A 1 、 U S 7 , 5 9 5 , 8 8 3 および U S 7 , 2 4 4 , 5 5 9 に記載されており、これらの各々は、参照により本発明に組み込まれる。

#### 【 0 1 0 7 】

例えば、各々、参照により本明細書に組み込まれる、 *Shendure* ら、 *Science* 309 : 1728 ~ 1732 頁 ( 2005 年 ) ； U S 5 , 5 9 9 , 6 7 5 ；および U S 5 , 7 5 0 , 3 4 1 に記載されるものを含め、ライゲーション反応によるシークエンシングもまた有用である。いくつかの実施形態は、例えば、各々参照により本明細書に組み込まれる *Bains* ら、 *Journal of Theoretical Biology* 135 ( 3 ) 、 3 0 3 ~ 7 頁 ( 1988 年 ) ； *Drmanac* ら、 *Nature Biotechnology* 16 、 5 4 ~ 5 8 頁 ( 1998 年 ) ； *Fodor* ら、 *Science* 251 ( 4 9 9 5 ) 、 7 6 7 ~ 7 7 3 頁 ( 1995 年 ) ；および WO 1989 / 1 0 9 7 7 に記載されるような、ハイブリダイゼーション手順によるシークエンシングを含み得る。ライゲーションによるシークエンシングおよびハイブリダイゼーション手順によるシークエンシングの両方において、アレイの部位に存在する標的核酸 ( またはそのアンプリコン ) が、オリゴヌクレオチド送達および検出の反復サイクルに付される。本明細書において、または本明細書において引用される参考文献に示されるような S B S 法のための流動系を、ライゲーションによるシークエンシングまたはハイブリダイゼーション手順によるシークエンシングのための試薬の送達に、容易に適応させることができる。通常、本明細書における、または本明細書において引用される参考文献における S B S 手順に関して記載されるものと同様に、オリゴヌクレオチドが、蛍光標識され、蛍光検出器を使用して検出され得る。

#### 【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態は、 D N A ポリメラーゼ活性のリアルタイムモニタリングを含む方法を利用できる。例えば、ヌクレオチド組み込みは、フルオロフォア保有ポリメラーゼと - リン酸標識ヌクレオチド間の蛍光共鳴エネルギー移動 ( F R E T ) 相互作用によって、またはゼロモード導波管 ( Z M W ) を用いて検出され得る。 F R E T ベースのシークエンシングのための技術および試薬は、例えば、 *Levene* ら、 *Science* 299 、 6 8 2 ~ 6 8 6 頁 ( 2003 年 ) ； *Lundquist* ら、 *Opt. Lett.* 33 、 1 0 2 6 ~ 1 0 2 8 頁 ( 2008 年 ) ； *Korlach* ら、 *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105 、 1 1 7 6 ~ 1 1 8 1 頁 ( 2008 年 ) に記載されており、これらの開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【 0 1 0 9 】

いくつかの S B S 実施形態は、ヌクレオチドの伸長生成物への組み込みの際に放出されたプロトンの検出を含む。例えば、放出されたプロトンの検出に基づくシークエンシングは、 *Ion Torrent* ( *Guilford* , C T 、 *Life Technologies* の子会社 ) から市販されている電気検出器および関連技術または各々、参照により本明細書に組み込まれる、 U S 2 0 0 9 / 0 0 2 6 0 8 2 A 1 ； U S 2 0 0 9 / 0 1 2 7 5 8 9 A 1 ； U S 2 0 1 0 / 0 1 3 7 1 4 3 A 1 ；もしくは U S 2 0 1 0 / 0 2 8 2 6 1 7 A 1 に記載されるシークエンシング法およびシステムを使用できる。動力学排除を使用して標的核酸を増幅するための本明細書に示される方法は、プロトンを検出するためには使用される基板に容易に適用され得る。より詳しくは、本明細書に示される方法は、プロトンを検出するために使用されるアレイの部位でアンプリコンのクローナル集団を製造するために使用され得る。

#### 【 0 1 1 0 】

例えば、本明細書に示される方法によって製造されている、本開示内容のアレイの別の有用な適用として、遺伝子発現解析がある。遺伝子発現は、デジタル R N A シークエンシングと呼ばれるものなどの R N A シークエンシング技術を使用して検出され、定量化され

得る。RNAシークエンシング技術は、上記で示されるものなどの当技術分野で公知のシークエンシング方法論を使用して実施され得る。遺伝子発現はまた、アレイとの直接ハイブリダイゼーションによって実施されるハイブリダイゼーション技術を使用して、または生成物がアレイ上で検出されるマルチプレックスアッセイを使用して検出され、定量化され得る。例えば、本明細書に示される方法によって製造されている本開示内容のアレイはまた、1つまたは複数の個体から得たゲノムDNAサンプルの遺伝子型を決定するために使用され得る。本開示内容のアレイで実施され得るアレイベースの発現および遺伝子型判定解析のための例示的方法は、米国特許第7,582420号；同6,890,741号；同6,913,884号もしくは同6,355,431号または米国特許公開番号第2005/0053980A1号；同2009/0186349A1号またはUS2005/0181440A1に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0111】

本明細書に示される方法の利点は、それらが種々の核酸ライプラリーのいずれかからのアレイの迅速な、効率的な作製を提供するということである。したがって、本開示内容は、本明細書に示される1種または複数の方法を使用してアレイを作製できる、さらに、上記で例示されるものなどの当技術分野で公知の技術を使用してアレイ上の核酸を検出できる統合システムを提供する。したがって、本開示内容の統合システムは、ポンプ、バルブ、リザーバー、流動ラインなどといった、増幅試薬を増幅部位のアレイに送達できる流動成分を含み得る。特に有用な流動成分として、フローセルがある。フローセルは、本開示内容のアレイを作製するために、またアレイを検出するために、統合システムにおいて構成されおよび／または使用され得る。例示的フローセルは、例えば、US2010/0111768A1および米国特許出願番号第13/273,666号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。フローセルについて例示されるように、統合システムの1種または複数の流動成分は、増幅方法のために、また検出方法のために使用され得る。核酸シークエンシング実施形態を例としてとると、統合システムの1種または複数の流動成分は、本明細書に示される増幅方法のために、また、上記で例示されるものなどのシークエンシング方法におけるシークエンシング試薬の送達のために使用され得る。あるいは、統合システムは、増幅方法を実施するための、また、検出方法を実施するための別個の流動系を含み得る。核酸のアレイを作製できる、また核酸の配列を決定できる統合されたシークエンシングシステムの例として、制限するものではないが、Miseqプラットフォーム( Illumina, Inc., San Diego, CA)および参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願番号第13/273,666号に記載されたデバイスが挙げられる。このようなデバイスは、本明細書に示される案内に従って動力学排除を使用してアレイを作製するよう修飾され得る。

#### 【0112】

本明細書に示される方法を実施できるシステムは、検出デバイスと統合される必要はない。むしろ、独立型システムまたはその他のデバイスと統合されたシステムもあり得る。統合システムとの関連で上記で例示されたものと同様の流動成分は、このような実施形態で使用され得る。

#### 【0113】

本明細書に示される方法を実施できるシステムは、検出能力と統合されているかいないかに関わらず、本明細書に示される方法、技術またはプロセスの1つまたは複数のステップを実施するための一連の命令を実行できるシステムコントローラーを含み得る。例えば、命令は、動力学排除条件下でアレイを作製するためのステップの実施を指示できる。場合により、命令は、本明細書において先に示された方法を使用して核酸を検出するステップの実施をさらに指示できる。有用なシステムコントローラーは、マイクロコントローラー、縮小命令セットコンピュータ(RISC)、アプリケーション特異的統合サーキット(ASIC)、フィールドプログラマ可能なゲートアレイ(FPGA)、ロジックサーキット、および任意のその他のサーキットまたは本明細書に記載された機能を実行できるブ

10

20

30

40

50

ロセッサーを使用するシステムを含め、任意のプロセッサーベースのまたはマイクロプロセッサーベースのシステムを含み得る。システムコントローラーの一連の命令は、ソフトウェアプログラムの形態であり得る。本明細書において、用語「ソフトウェア」および「ファームウェア」は、交換可能であり、RAMメモリ、ROMメモリ、EPROMメモリ、EEPROMメモリおよび不揮発性RAM(NVRAM)メモリを含め、任意のコンピュータによる実行のためにメモリ中に保存されるコンピュータプログラムを含む。ソフトウェアは、システムソフトウェアまたはアプリケーションソフトウェアなど種々の形態であり得る。さらに、ソフトウェアは、別個のプログラムの収集物または大きなプログラム内のプログラムモジュールまたはプログラムモジュールの一部の形態であり得る。ソフトウェアはまた、オブジェクト指向プログラミングの形態のモジュラープログラミングを含み得る。

10

#### 【0114】

本開示内容のアレイのいくつかの適用は、アンサンブル検出との関連で上記で例示されており、ここで、各増幅部位に存在する複数のアンプリコンは一緒に検出される。代替実施形態では、单一核酸は、標的核酸またはそのアンプリコンかに関わらず、各増幅部位で検出され得る。例えば、増幅部位は、検出されるべき標的ヌクレオチド配列および複数のフィラー核酸を有する单一核酸分子を含有するよう構成され得る。この例では、フィラー核酸は、増幅部位のキャパシティーを満たすよう機能し、必ずしも検出されるよう意図されない。検出されるべき單一分子は、フィラー核酸のバックグラウンド中の單一分子を区別できる方法によって検出され得る。例えば、獲得を増大して、またはより感受性の標識を使用して部位を検出するための上記で示されるアンサンブル検出技術の修飾を含め、種々の單一分子検出技術のいずれも、使用され得る。使用され得る單一分子検出法のその他の例は、U.S.2011/0312529A1；米国特許出願番号第61/578,684号；および同61/540,714号に示され、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

20

#### 【0115】

單一分子核酸検出にとって有用なアレイは、本明細書に示される1種または複数の方法を使用し、以下の修飾を行って作製され得る。複数の異なる標的核酸は、検出されるべき標的ヌクレオチド配列およびフィラーアンプリコンを作製するよう増幅されるべき1種または複数のフィラーヌクレオチド配列の両方を含むよう構成され得る。本明細書において別の場所に示されるものなどの複数の異なる標的核酸が増幅試薬中に含まれ得、フィラーヌクレオチド配列が増幅部位を満たすよう、動力学排除条件下で増幅部位のアレイと反応される。標的配列の増幅を妨げながら、フィラー配列が増幅されるのを可能にするために使用され得る例示的配置として、例えば、増幅部位に存在する増幅プライマーの結合部位が両端に位置するフィラー配列を含む第1の領域と、フランкиングされた領域の外側に標的配列を有する第2の領域とを有する单一標的分子が挙げられる。別の配置では、標的核酸は、標的配列およびフィラー配列をそれぞれ保持する、別個の分子または鎖を含み得る。別個の分子または鎖は、粒子に付着され得るか、または核酸デンドリマーまたはその他の分岐構造のアームとして形成され得る。

30

#### 【0116】

特定の実施形態では、フィラー配列および標的配列の両方を各々含有する増幅部位を有するアレイは、プライマー伸長アッセイまたは合成技術によるシーケンシングを使用して検出され得る。このような場合には、多量のフィラー配列でとは対照的に標的ヌクレオチド配列で、適宜位置付けられたプライマー結合部位の使用によって特異的伸長が達成され得る。例えば、シーケンシングプライマーの結合部位は、標的配列の上流に位置付けられ、フィラー配列のいずれにも存在しないものであり得る。あるいはまたはさらに、標的配列は、標準ヌクレオチドと水素結合できない、1種または複数の非天然ヌクレオチド類似体を含み得る。非天然ヌクレオチドは、プライマー結合部位の下流に（例えば、標的配列中、または標的配列とプライマー結合部位に介在する領域中）位置付けられ得、そのようなものとして、適当なヌクレオチドパートナー（すなわち、標的配列中の非天然類似

40

50

体と水素結合できるもの)が付加されるまで、伸長または合成によるシークエンシングを妨げる。ヌクレオチド類似体イソシトシン(イソC)およびイソグアニン(イソG)は、それらが、互いに特異的に対を形成するが、ほとんどの伸長および合成技術によるシークエンシング-において使用されるその他の標準ヌクレオチドとは対を形成しないので、特に有用である。標的配列または標的配列の上流においてイソCおよび/またはイソGを使用することのさらなる利益は、增幅に使用されるヌクレオチド混合物からそれぞれのパートナーを省くことによって、增幅ステップの間の標的配列の望まない增幅を妨げることである。

#### 【0117】

例えば、本明細書に示される方法によって製造されている、本開示内容のアレイは、検出法のために使用される必要はないということは理解されよう。むしろ、アレイは、核酸ライブラリーを保存するために使用され得る。したがって、アレイは、中に核酸を保存する状態で保管され得る。例えば、アレイは、乾燥した状態で、凍結した状態で(例えば、液体窒素中)または核酸を保護する溶液中で保管され得る。あるいはまたはさらに、アレイは、核酸ライブラリーを複製するために使用され得る。例えば、アレイは、アレイ上の1つまたは複数の部位から複製物アンプリコンを作製するために使用され得る。

#### 【0118】

本発明のいくつかの実施形態は、標的核酸をアレイの増幅部位に輸送することおよび増幅部位で捕捉された標的核酸のコピーを作製することに関して本明細書において例示されている。同様の方法が、非核酸標的分子のために使用され得る。したがって、本明細書に示される方法は、例示される標的核酸の代わりに、その他の標的分子を用いて使用され得る。例えば、本開示内容の方法は、種々の標的分子の集団から個々の標的分子を輸送するために実施され得る。各標的分子は、捕捉の部位で反応を開始するために、アレイの個々の部位に輸送され得る(いくつかの場合には、捕捉される)。各部位での反応は、例えば、捕捉された分子のコピーを製造し得るか、または反応は、捕捉された分子を単離または隔離するよう部位を変更し得る。いずれかの場合には、最終結果は、種々の種類の標的分子を含有していた集団に由来して存在する標的分子の種類に関して各々純粋であるアレイの部位であり得る。

#### 【0119】

核酸以外の標的分子を使用する特定の実施形態では、種々の標的分子のライブラリーは、動力学排除を利用する方法を使用して作製され得る。例えば、標的分子アレイは、アレイの部位が溶液に由来する標的分子を用いてランダムにシーディングされ、標的分子のコピーが、シーディングされた部位の各々をキャパシティーまで満たすよう作製される条件下で作製され得る。本開示内容の動力学排除法に従って、シーディングおよびコピー作製プロセスは、コピーが作製される速度が、シーディング速度を超える条件下で同時に進行し得る。そのようなものとして、第1の標的分子によってシーディングされている部位でコピーが作製される比較的迅速な速度は、第2の標的分子が部位をシーディングするのを効果的に排除する。いくつかの場合には、標的分子のシーディングは、標的分子をコピーすること以外のプロセスによって部位をキャパシティーまで満たす反応を開始する。例えば、部位での標的分子の捕捉は、最終的に部位を第2の標的分子を捕捉できないようにする連鎖反応を開始し得る。連鎖反応は、標的分子が捕捉される速度を超える速度で起こり得、それによって、動力学排除の条件下で起こる。

#### 【0120】

標的核酸について例示されるように、動力学排除は、その他の標的分子に適用される場合には、アレイの部位で反復反応(例えば、連鎖反応)を開始するために、比較的遅い速度を、対して、一旦開始した反復反応を継続するためには比較的迅速な速度を利用し得る。これまでの段落の例では、動力学排除は、例えば、標的分子シードのコピーで部位を満たすために反応が起こる比較的迅速な速度に対する、標的分子シーディングの比較的遅い速度(例えば、比較的遅い拡散)のために起こる。別の例示的実施形態では、動力学排除は、部位を満たすためにその後のコピーが作製される比較的迅速な速度に対する、部位に

10

20

30

40

50

シーディングされた標的分子の第1のコピーの形成の遅延（例えば、遅延されたまたは遅い活性化）のために起こり得る。この例では、個々の部位は、いくつかの異なる標的分子でシーディングされた可能性がある。しかし、任意の所与の標的分子の第1のコピーの形成は、ランダムに活性化され得、その結果、第1のコピー形成の平均速度は、その後のコピーが作製される速度と比較して比較的遅い。この場合には、個々の部位は、いくつかの異なる標的分子でシーディングされた可能性があるが、動力学排除はそれらの標的分子のうち1種のみがコピーされることを可能にする。

#### 【0121】

したがって、本開示内容は、(a)(i)部位のアレイと、(ii)複数の異なる標的分子を有する溶液とを含む試薬を準備するステップであって、溶液中の標的分子の数は、アレイ中の部位の数を超える、異なる標的分子は、複数の部位への流動性アクセスを有し、部位の各々は、複数の異なる標的分子中のいくつかの標的分子に対するキャパシティーを含む、ステップと；(b)試薬を反応させて、各々、複数に由来する単一の標的分子を有する複数の部位を製造するか、または各々、溶液に由来する個々の標的分子から得られたコピーの純粋な集団を有する複数の部位を製造するステップであって、反応させることができ、同時に(i)平均輸送速度で種々の分子を部位に輸送することおよび(ii)平均反応速度で、部位をキャパシティーまで満たす反応を開始することを含み、平均反応速度が、平均輸送速度を超える、ステップとを含み得る、分子のアレイを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、ステップ(b)は、試薬を反応させて、各々、複数に由来する単一の標的分子を有する複数の部位を製造するか、または各々、溶液に由来する個々の標的分子から得られたコピーの純粋な集団を有する複数の部位を製造することによって代わりに実施され得、ここで、反応させることは、(i)反復反応（例えば、連鎖反応）を開始して、各部位で標的分子から生成物を形成すること、および(ii)各部位で反応を継続して、その後の生成物を形成することを含み、反応が部位で起こる平均速度が、反応がその部位で開始される平均速度を超える。

#### 【0122】

上記の非核酸実施形態では、標的分子は、アレイの各部位で起こる反復反応のイニシエーターであり得る。例えば、反復反応は、その他の標的分子がその部位を占有するのを妨げるポリマーを形成し得る。あるいは、反復反応は、部位に輸送された標的分子の分子コピーを構成する1種または複数のポリマーを形成し得る。

#### 【0123】

以下の実施例は、例示するよう意図されるものであって、本発明を制限するものではない。

#### 【実施例】

##### 【0124】

###### (実施例1)

###### フローセル上でのクラスターアレイのスーパーポアソン形成

本実施例は、Illumina (San Diego, CA) シークエンシングプラットフォームのためのフローセルでのクラスターアレイのスーパーポアソン形成を達成する方法を記載する。本明細書に記載される方法は、フィーチャにライブラリーエлемент（例えば、ゲノム断片）を捕捉し、ライブラリーエлементを同時にクローン的に増幅するプロセスである。この実施例では、プロセスの重要なフィーチャは、捕捉速度対増幅速度を制御することおよび同種のプロセスにおいてそのようにすることである。Illumina フローセルの高密度シーディングのために開発された多数の前処理は、ライブラリーエлементの捕捉を、クローナル増幅プロセスから分離する。この例では、フィーチャでの捕捉事象が、クローナル増殖事象を開始する。

#### 【0125】

パターン化されたフローセルは、以下のように調製する。ガラスフローセル (Illumina, Inc., San Diego, CA) を、リフトオフアプローチを使用して金パッチでコーティングする。手短には、フォトレジスト層を、ガラスフローセル

10

20

30

40

50

の表面上に均一にコーティングし、フォトリソグラフィーによってフォトレジストのパッチを除去し、ガラス表面のパッチを露出させる。次いで、金の層を表面に蒸着して、フォトレジスト領域およびガラスパッチ上に連続薄膜を形成する。金は、参照により本明細書に組み込まれる Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7: 239 ~ 60 頁 (1977 年) に示されるように、e - ビーム蒸発またはスパッタリングを使用して蒸着してもよい。次いで、アセトンリフトオフによってフォトレジスト層を除去し、丸い形であり、1ミクロン未満である直径を有し、ガラス表面の介在領域によって囲まれている金パッチを残す。次いで、WO 2008 / 093098 (本明細書に組み込まれる) に記載されるように、金パターン化されたフローセルをシラン不含アクリルアミド (SFA) でコーティングする。P5 および P7 プライマーを、ニトロベンジル UV 切断可能部分 (Glenn Research, Sterling, VA) を介して重合された SFA にグラフトする。金パッチが、パッチ上に付着されたプライマーのマスクを作製し、一方で、介在領域上に付着された任意のプライマーが、UV 光曝露によって切断されるように、フローセルを、UV (302 nm) 光源上に置く。金パッチに残る P5 および P7 プライマーは、ライプラリーのクローナル增幅を支援できる (P5 / P7)。

#### 【0126】

ライプラリーエレメントは、以下の通りに製造する。ゲノム DNA (gDNA) ライプラリーを断片化し、Illumina 市販サンプル調製プロトコールに従って、P5 および P7 プライマーと相補的であるプライマー結合部位を有するフォーク型アダプターを gDNA 断片とライゲーションする。

#### 【0127】

スーパーポアソングラスターアレイ形成は、以下の通りに実施する。ライプラリーエレメント (二本鎖形態で) および Twist Amp Basic 試薬 (Twist Dx, Cambridge UK) を含有する溶液を調製する。Twist Amp Basic 試薬は、表面での鋳型依存性增幅を支援し得る酵素混合物 (DNA ポリメラーゼ、一本鎖結合タンパク質およびリコンビナーゼ) を含有している。溶液中のライプラリーエレメントの濃度は、任意のフィーチャによるライプラリーエレメントのハイブリダイゼーション捕捉の速度が、クローナル增幅および別のライプラリーエレメントを捕捉するためにフィーチャ上で利用可能なオリゴの十分な消耗の速度よりもかなり低いように制御される。

#### 【0128】

溶液のライプラリーエレメントの最適濃度またはそうでなければ所望の濃度は、上記のスーパーポアソングラスターアレイ形成プロトコールを使用する滴定と、それに続く Illumina シークエンシングデバイス (例えば、Genome Analyzer (商標) ) 、HiSeq (商標) または MiSeq (商標) ) でのシークエンシング実施によって経験的に決定され得る。

#### 【0129】

##### (実施例 2)

###### 動力学排除条件下で作製されたパターン化されたクラスターアレイの特性決定

この実施例は、動力学排除条件を使用するパターン化されたフィーチャでのモノクローナルクラスターのスーパーポアソンローディングを実証する。

#### 【0130】

パターン化されたフローセルを以下の通りに調製した。ガラスフローセル (Illumina, Inc., San Diego, CA) を、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願番号第 13 / 492,661 号に記載されるようにリフトオフアプローチを使用して金パッドでコーティングした。手短には、フォトレジスト層を、ガラスフローセルの表面上に均一にコーティングし、フォトリソグラフィーによってフォトレジストのパッチを除去し、ガラス表面のパッチを露出させる。次いで、金の層を表面に蒸着して、フォトレジスト領域およびガラスパッチ上に連続薄膜を形成する。金は、参照により本明細書に組み込まれる Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7: 239 ~ 60 頁 (1977 年) に示されるように、e - ビーム蒸発を使用して蒸着させた

10

20

30

40

50

。次いで、アセトンリフトオフによってフォトレジスト層を除去し、金パッドの六角形のパターンを残し、これでは、金パッドの各々は、丸い形であり、500 nmの直径を有し、ガラス表面の介在領域によって囲まれていた。次いで、WO2008/093098(本明細書に組み込まれる)に記載されるように、金パターン化されたフローセルを、シラン不含アクリルアミド(SFA)でコーティングした。プライマーを、ニトロベンジルUV切断可能部分(Glenn Research, Sterling, VA)を介して重合されたSFAにグラフトした。金パッドが、パッド上に付着されたプライマーのマスクを作製し、一方で、介在領域上に付着された任意のプライマーがUV光曝露によって切断されるように、フローセルをUV(302 nm)光源上に置いた。切断されたプライマーを洗浄除去し、金パッド上に付着されたプライマーを残した。

10

#### 【0131】

TwistAmp Basicキット(TwistDx, Cambridge UK)を以下の通りに使用して、金パッド上でクラスターを増大させた。二本鎖PhiX DNAライブラーを、TwistAmp Basic Rehydrationバッファーおよび酢酸マグネシウム試薬中で種々の濃度で混合した。試験されるPhiX DNA濃度は、72 pM、144 pM、432 pMおよび864 pMとした。これらの濃度は、Illuminaフローセルの標準シーディングのために使用される9~10 pM DNAの通常の範囲を超えていた。また、PhiX DNAは、鋳型DNAが一本鎖形態にあるIlluminaフローセルの標準シーディングとは対照的に二本鎖であった。PhiX DNAを含有する混合物を使用して、TwistAmp Basic凍結乾燥ペレットを再水和し、次いで、38でパターン化されたフローセルのそれぞれのレーン中に流した。38で1時間インキュベーションを続け、その後、HT2洗浄バッファー(Illumina, Inc., San Diego CA)を用いて洗浄し、クラスターをSyBr Green染色した。次いで、クラスターを、LMX1処理によってシーケンシングのために30分間処理して、クラスター中のDNAを線状化し、0.1 N NaOH変性させ、シーケンシングプライマーをハイブリダイゼーションした。次いで、フローセルを Illumina HiSeq(登録商標)2000で26サイクル間配列決定した。

20

#### 【0132】

フローセル画像の目視検査によって、クラスターは、表面上の金パッドのパターンに対応するパターンで空間的に規則的であったということが示された。図1Aは、上記で示された動力学排除法によって製造されたフローセルを使用する第1のシーケンシングサイクル後に得られた4色チャンネルの合成画像を示す。比較のために、図1Bは、無作為に位置するクラスターを有する標準Illuminaフローセルの単一シーケンシングサイクル後に得られた合成画像を示す。

30

#### 【0133】

フローセルの合成画像の対分布関数(PDF)および最近接(NN)関数の解析もまた、高い秩序度を示した。生クラスター密度を、画像の平方ミリメートルあたり約640,000クラスターであると算出した。NN関数を使用して、画像中の最近接クラスター間の平均距離を測定した。図2に示されるように、NN関数は、およそ2.3ピクセルのシングルピークを主にもたらした。これは、予測されたパッドの1ミクロンピッチのパターンと一致し、それによって、クラスターの高度に規則的なアレイを示唆した。対照的に、ランダムクラスタリングは、かなり広いピークをもたらし、クラスターピッキングアルゴリズムの検出限界に迫る低い値を有する(1.2ピクセル)。図2におけるPDFは、規則正しい六角形のアレイの予測される構造と一致する。例えば、PDF関数は、2.66ピクセルに予測される主なピークを示し、最近接を越えて隣接に対応する高次ピークが明確に見られ、予測されるピーク比で存在していた。NNおよびPDF関数間でピーク位置のわずかなシフトしか観察されなかった。この低レベルのジターは、理論上完全な位置からの偏差は、かなり低く、十分に許容されるレベル内であるということを示した。

40

#### 【0134】

50

合成4色画像の目視検査もまた、望ましくないパッドホッピングがないことを示した。「パッドホッピング」とは、いくつかの隣接するパッドが、同一鋳型配列から増幅されるプロセスを指す。パッドホッピングは、4色画像において同一色を有するクラスターの連続パッチとして視覚的に特徴づけられる。この実施例に示されるような動力学排除条件下で製造されたフローセルについて同一色パッチがないことは、望ましくないレベルのパッドホッピングが起らなかったことを示した。図3は、クラスター色および空間位置のより定量的な表示を提供し、パッドホッピングが問題ではなかったことを示す。詳しくは、図3は、Phixゲノムの最初の5ゲノム位置にアラインされたクラスターの空間位置の散布図を示す。種々のゲノム位置が、エックス、アスタリスク、四角、三角および菱形によって示されている。5種の記号の種類は、図中で無作為に分布しており、塊になっておらず、これは、パッドホッピングが問題ではなかったことを示す。

#### 【0135】

動力学排除条件を使用して製造されたフローセルのデータの26サイクルについて配列解析を実施した。結果は、パッドの64%が占有されており、パッドの56%がクローナルであるクラスターを有していることを示した。したがって、本方法は、パッドの64%が占有される場合にはパッドの36%がクローナルであると予測したポアソンローティングから予測されるものを上回ってクローナルクラスターのほぼ2倍の増大をもたらした。これらの結果は、スーパーポアソンローディングを明確に示した。

#### 【0136】

##### (実施例3)

##### 生体分子の活性電気的脱離およびパターン形成

この実施例は、電場を使用して生体分子を空間的にパターン化する方法を実証する。この実施例に記載される方法は、標的部位のDNAを迅速にシーディングし、介在領域から生体分子を電気化学的に反発させ、DNAクラスターの高度にパターン化されたアドレス可能なアレイをもたらす。ここで示される結果は、モノクローナル核酸クラスターのパターンを有するフローセルの形成を実証する。

#### 【0137】

この実施例に記載される方法は、1つの導電性表面および電解質にわたって、または2つの導電性表面にわたって印加される電位を使用して、電気的にバイアスされた表面の一方または両方から生理吸着された(physadsorbed)か、または化学的にコンジュゲートされた分子を能動的に脱離する。この能動的な脱離法は、いずれの表面化学/表面修飾も必要とせず、分子を極めて迅速に脱離でき(5分未満)、受動的脱離法よりもプロセス条件に対してあまり感受性ではない。導電性表面は、金属(例えば、チタン、酸化インジウムスズ)であっても、本質的に半導体であってもよく、印加される電位は、電極/電解質界面で電気化学的反応をもたらすACであっても、DCであってもよい。電場を印加することは、信号(対象の部位で)対雑音(介在領域からの)を1桁改善する。この実施例に記載される方法は、また、電極の選択的脱離、選択的再機能化および種の電気化学的パターン形成のために平坦電極に適用され得る。

#### 【0138】

##### フローセル構造

生体分子の電気化学的脱離のための上記の2種の構造が、図4aおよび4bに例示されている。詳しくは、酸化インジウムスズ(ITO)を導電性透明電極物質として使用した。ITOを、高周波スパッタリングによってD263表面に蒸着させた。図4aは、導電性ITO層および電解質にわたって印加された電位を示す。図4bは、液体培地によって分離された2つの平行な導電性ITOプレートにわたって印加された電位を示す。両構造とも種をITOの表面から電気的に脱離するために使用され得る。金(Au)ナノパターン化部位は、チオール化された生体分子(例えば、チオール化アビジン)の標的化捕捉にとって有用である。Au部位は、Auに対する電気化学を防ぐために、誘電性部位スペーサー(例えば、SiO<sub>2</sub>、SiN、ダイアモンド様炭素)を使用して下層のITOから分離されている。

10

20

30

40

50

## 【0139】

図4bにおける構造はまた、図4cの経時的に画像に示されるように、電場を使用してフローセル表面でDNAを同時に迅速に濃縮するために（例えば、100倍まで）使用され得る。これらの実験では、2Vの電位（V）を2つのITO表面を分離する100μmのギャップにわたって印加した。図4cにおいて全反射照明蛍光顕微鏡（TRIF）イメージングを使用して観察されたような蛍光の経時的な増大は、フローセルの上部表面で印加された電場下でのPhix対照DNA（YOYO色素で標識された）の表面濃度の大きな上昇によるものである。したがって、ここで概説された技術は、迅速なシーディングを促進しながら、介在領域から生体分子を同時に電気化学的に脱離するために使用され得る。

10

## 【0140】

## 実験ワークフロー

能動的な脱離実験の実験ワークフローは、図5に概説されている。本方法は、フローセルの表面にアビジンをコーティングすることと、続いて、シラン不含アクリルアミド（SFA）でコーティングすることおよびプライマーをSFAにグラフトすることを含む。SFAコーティングおよびP5およびP7プライマーのグラフティングは、WO2008/093098（本明細書に組み込まれる）に記載されるように実施される。しかし、本方法では、アビジンは、SFAコーティングの前に電気的脱離ステップを使用して、フローセル表面上に存在するAuまたは誘電性部位上（ITO介在領域によって分離されている）で電気化学的にパターン化される。また、P5およびP7プライマーグラフティング後に、Auまたは誘電性部位にDNAを迅速にシーディングするため、また生体分子（DNA、アビジン、プライマー）をITO介在物から電気化学的に脱離するために、電場が印加される。通常、分子を有效地に脱離するために2Vが印加される。わずか5分の場の期間で、介在領域中の分子の大部分を効率的に脱離できる。さらに、この結果は、電場ステップ後に介在領域中のプライマー濃度も低下することを示唆する。クラスター増幅が、次いで、Bentleyら、Nature 456:53~59頁（2008年）に記載されるように実施され、続いて、dsDNA挿入色を使用するクラスター染色、次いで、顕微鏡イメージングが実施される。次いで、HiSeq 2000 DNAシーケンサー（ Illumina, Inc. San Diego）を使用して、フローセルを配列決定して、クラスタークローニング性を決定する。場支援シーディングおよび電気化学的脱離の効果を示す模式図が、図5に示されている。

20

## 【0141】

## （実験結果）

図6は、図3bからのフローセル構造を使用して、電場を用いて（図6A）および電場を用いずに（図6B）達成された結果を例示する。電場の存在下では、クラスターは2μmのAu部位に高度に限局されており、介在区域において観察される蛍光はほとんどない。2μm部位では、クラスターは、Auパッドの大きな大きさのために高度にポリクローナルである。ポリクローニ性の程度は、パッドの大きさを小さくし、立体排除によって複数の鋳型がシーディングすることを阻害することによって低下させてもよく、またはポリクローニ性は、動力学排除条件を使用して低下させてもよい。介在領域中のピクセル強度は、0に近い（図6Aのラインプロファイル）ということも留意されたい。対照的に、電場の不在下では、クラスターはAuおよび介在ITO表面の両方に存在する。図6Aのラインプロファイルにおいて観察される周期的パターンは、図6Bのラインプロファイルでは観察されず、クラスター限局が電場の結果であることが確認される。

30

## 【0142】

電場技術は、クラスターを大区域にわたるミクロンサイズの部位ならびにナノパターン化部位の両方で空間的にパターン化するために使用され得る。2μmの直径および200nmの直径のAu部位上にシーディングされたパターン化されたクラスターの大区域画像が、その対応するフーリエ変換（FFT）とともに、それぞれ図7Aおよび7Bに例示されている。クラスターは十分に規定されており、高度にパターン化されており、ITO介

40

50

在区域において非特異的結合はほとんどない。これは、FFTにおける十分に規定されたスポットによってさらに確認され、規則正しいまたはパターン化されたネットワークを示唆する。図4Bにおけるナノパターン化されたフィーチャにおけるクラスター占有率は、約40～50%であるが、高いアビジン濃度を使用することによって、または電圧波形を操作することによってさらに高めることができる。同一化学/プロセスを使用して、誘電性部位上の高い空間精密度を有するクラスターを同様に使用できる。700nmの直径のSiO<sub>2</sub>部位上の規則正しいクラスターが図8に示されている。

#### 【0143】

##### (機序)

データは、クラスターの空間スパッタリングは、電場の存在下で促進されるということを示唆する。これは、介在領域における生体分子（例えば、DNA、タンパク質およびプライマー）の電気化学的除去によるものである可能性が高い。テキサスレッド（TR）で標識されたプローブを用いるハイブリダイゼーションアッセイを使用して見られるように、電場が印加される場合には、グラフトされたプライマー強度は、低下すると思われる。図9は、電場の印加前および印加後にフローセルにおいて実施されたハイブリダイゼーションアッセイのTR蛍光強度を示すTyphoonスキャンを例示する。蛍光強度は、電場の印加後に2倍超低下し、SFAからのプライマーの除去が確認される。クラスター強度を高めるために、フローセルをSFAで再コーティングし、P5、P7プライマーを再グラフトした。これは、TR強度のはっきりと認識できる増大をもたらした。したがって、DNAをシーディングし、介在領域に非特異的に結合している分子を電気化学的に除去し、SFAを再コーティングし、プライマーを再グラフトして、高強度の空間的にパターン化されたクラスターを得ることが可能である可能性が高い。

10

#### 【0144】

##### (直接DNAハイブリダイゼーション)

phiX ssDNAのP5、P7プライマーローン（lawn）との直接ハイブリダイゼーションを含む実験において、クラスターの空間スパッタリングも観察された。このプロセスの模式図が図10Aに示されている。これらの実験は、ITO上の2μm SiO<sub>2</sub>部位で実施した。同一プロセスを、種々の誘電性物質形成部位を用いてナノスパッタリングされた部位に適用してもよい。これらの実験では、ビオチン化DNAも、アビジンも必要ではなく、わずかな化学ステップとなるが、一方で部位にクラスター特異性を維持する。特異性は、介在領域におけるプライマーの電気化学的脱離の結果である可能性が高い。図10Bは、直接ハイブリダイゼーションアプローチを使用して電場（2V、0.1Hz）の存在下で2μm SiO<sub>2</sub>部位で形成されたクラスターを示す。十分にパターン化されたクラスターが見られ、介在領域にはほとんどない。図10Cは、電場の不在下での同一実験であり、SFAおよびITO介在領域の両方でクラスターが無作為に開始していることを示し、電場の不在下では個別の秩序は存在しない。これらの結果から、電場を使用して、核酸クラスター形成の空間パターン化を支援できることが確認される。

20

30

#### 【0145】

本願を通じて、種々の刊行物、特許および特許出願が参照されている。これら刊行物の開示内容はその全文が、本発明が関係する技術分野の最先端をより十分に説明するために参照により本願に組み込まれる。

40

#### 【0146】

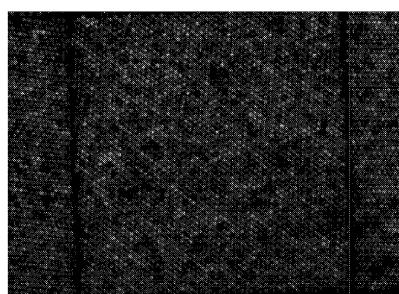
用語「含む」は、本明細書において、制約のないものであるとし、列挙された要素だけでなく、任意のさらなる要素もさらに包含する。

#### 【0147】

本発明は、上記で提供された実施例に関連して記載されているが、本発明から逸脱することなく種々の修飾が行われ得るということは理解されなければならない。したがって、本発明は特許請求の範囲のみによって制限される。

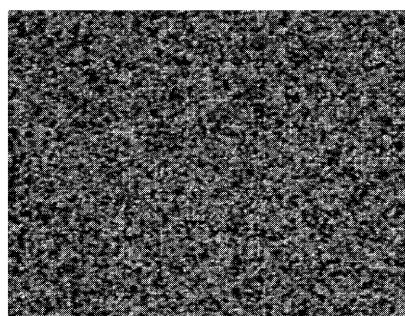
【図1A】

Figure 1A

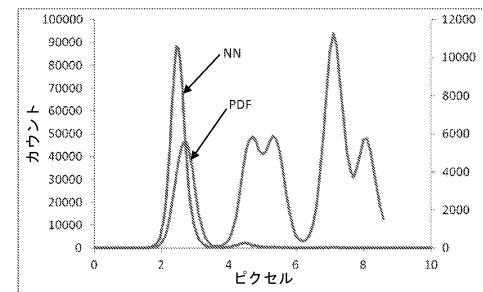


【図1B】

Figure 1B

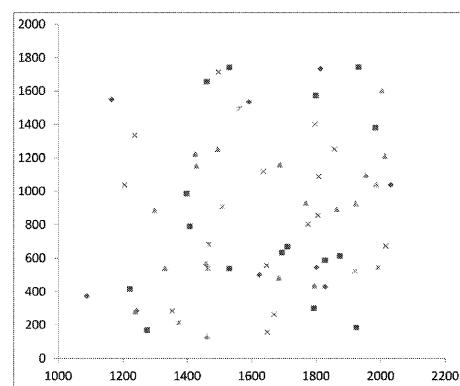


【図2】

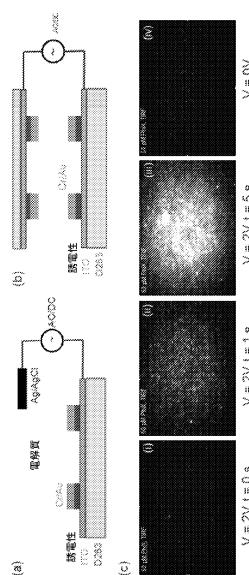


【図3】

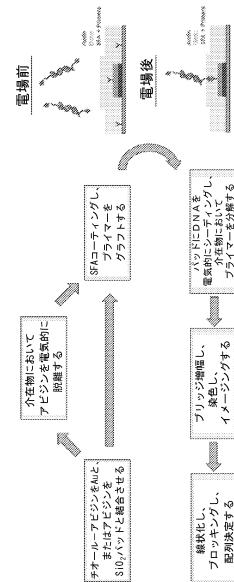
Figure 3



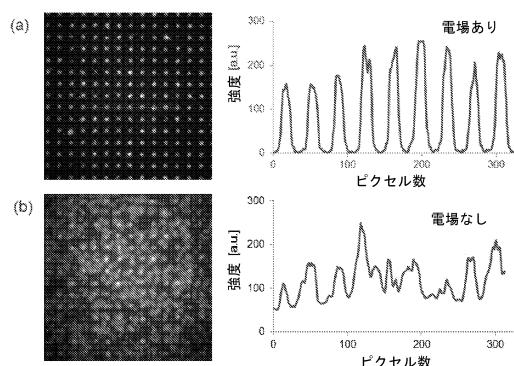
【図4】



【図5】

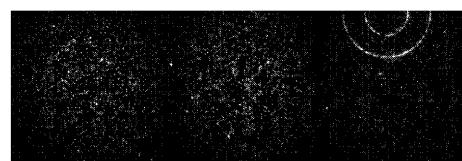


【図6】



【図8】

Figure 8



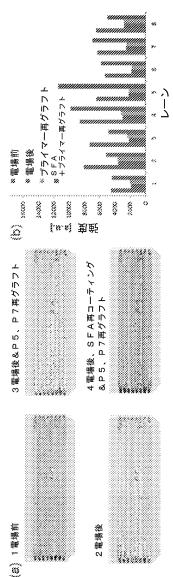
【図7(a)】



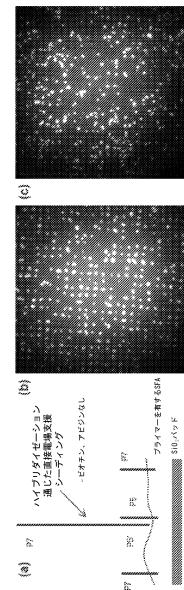
【図7(b)】



【図9】



【図10】



---

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 13/783,043

(32)優先日 平成25年3月1日(2013.3.1)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ジョナサン マーク バウテル

イギリス国 エセックス シービー 10 1エックスエル エヌアール サフロン ウェルデン  
リトル チェスター・フォード

(72)発明者 キャサリン エム スティーブンス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5200

(72)発明者 モスタファ 口ナギ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5200

(72)発明者 ケビン エル ガンダーソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5200

(72)発明者 バラ ムラリ ヴェンカテサン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5200

(72)発明者 エム シェーン ボーエン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5200

(72)発明者 カンダスワーミ ヴィジヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サンディエゴ イラミーナ ウェイ 5200

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 特表2001-525193(JP, A)

米国特許出願公開第2012/0083417(US, A1)

米国特許第05728532(US, A)

特開2010-142232(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C12Q 1/68

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

PubMed