(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2022-17453
(P2022-17453A)
(43)公開日　令和4年1月25日(2022.1.25)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12Q	*1/6876(2018.01)*	C12Q	1/6876	Z ZNA　4B063
C12Q	*1/6869(2018.01)*	C12Q	1/6869	Z
C12N	*15/11 (2006.01)*	C12N	15/11	Z

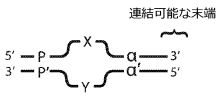
審査請求　有　請求項の数　1　OL　外国語出願　（全79頁）

(21)出願番号　特願2021-179334(P2021-179334)
(22)出願日　令和3年11月2日(2021.11.2)
(62)分割の表示　特願2018-530698(P2018-530698)の分割
原出願日　平成28年12月8日(2016.12.8)
(31)優先権主張番号　62/264,822
(32)優先日　平成27年12月8日(2015.12.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/281,917
(32)優先日　平成28年1月22日(2016.1.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)

(71)出願人　518201670
ツインストランド・バイオサイエンシズ・インコーポレイテッド
TWINSTRAND BIOSCIENCES, INC.
アメリカ合衆国、ワシントン ９８１２１、シアトル、エリオット・アベニュー ３１３１、スイート ７５０
(74)代理人　110001508
特許業務法人 津国
(72)発明者　ローブ，ローレンス・エー
アメリカ合衆国、ワシントン ９８００５、ベルビュー、ノースイースト・３６ティーエイチ・プレイス １３８０８
(72)発明者　シュミット，マイケル・ダブリュー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　二本鎖配列決定のための改善されたアダプター、方法、及び組成物

(57)【要約】　（修正有）【課題】非対称プライマー結合部位の使用を必要としない、二本鎖配列決定に対する代替的かつ優れた方法を提供する。
【解決手段】第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対であって、各アダプター核酸配列が、プライマー結合ドメインと、鎖定義要素（ＳＤＥ）と、単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインと、連結ドメインと、を含み、前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的である、前記アダプター核酸配列の対を使用する。
【選択図】図２Ａ



【特許請求の範囲】
【請求項１】
第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対であって、各アダプター核酸配列が、
プライマー結合ドメインと、
鎖定義要素（ＳＤＥ）と、
単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインと、
連結ドメインと、を含み、
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的である、前記アダプター核酸配列の対。
【請求項２】
前記２つのアダプター配列が、少なくとも部分的にともにアニールされている２つの別個のＤＮＡ分子からなる、請求項１に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３】
前記第１のアダプター核酸配列及び前記第２のアダプター核酸配列が、リンカードメインを介して結合される、請求項１に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４】
前記リンカードメインが、ヌクレオチドで構成される、請求項３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５】
前記リンカードメインが、１つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含有する、請求項３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６】
前記１つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子が、脱塩基部位；ウラシル；テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；またはイソ－グアノシンから選択される、請求項４に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７】
前記リンカードメインが、ループを形成する、請求項３～５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項８】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと非相補的である、請求項１～７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項９】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインと少なくとも部分的に相補的である、請求項１～７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインと相補的である、請求項１～９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインと少なくとも部分的に非相補的である、請求項１～７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２】
少なくとも１つのＳＭＩドメインが、内在性ＳＭＩである、請求項１～７のいずれか１項

に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３】
前記内在性ＳＭＩが、剪断点に関連付けられる、請求項１２に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４】
前記ＳＭＩドメインが、少なくとも１つの縮重または半縮重核酸を含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５】
前記ＳＭＩドメインが、非縮重である、請求項１～１１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６】
単一ＤＮＡ分子を互いに区別することができるＳＭＩ配列を得るために、前記ＳＭＩドメインの前記配列が、連結されたＤＮＡのランダムまたは半ランダムに剪断された末端に対応する前記配列と組み合わせて考慮される、請求項１～１５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１７】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと少なくとも部分的に相補的である、請求項１～１６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１８】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと相補的である、請求項１～１７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１９】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと少なくとも部分的に非相補的である、請求項１～１５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２０】
各ＳＭＩドメインが、プライマー結合部位を含む、請求項１９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２１】
各ＳＭＩドメインが、その連結ドメインに対して遠位に位置する、請求項２０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２２】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと非相補的である、請求項１９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２３】
各ＳＭＩドメインが、約１～約３０個の縮重または半縮重核酸を含む、請求項１～２２のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２４】
前記第１のアダプター核酸配列の前記連結ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記連結ドメインと少なくとも部分的に相補的である、請求項１～２３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２５】
各連結ドメインが、二本鎖標的核酸配列の一方の鎖に連結されることができる、請求項１～２４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２６】
前記連結ドメインの一方が、Ｔ－オーバーハング、Ａ－オーバーハング、ＣＧ－オーバーハング、平滑末端、または別の連結可能な核酸配列を含む、請求項１～２５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項２７】
両方の連結ドメインが、平滑末端を含む、請求項１～２６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２８】
前記連結ドメインの少なくとも一方が、修飾核酸を含む、請求項１～２６のいずれかに記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項２９】
前記修飾ヌクレオチドが、脱塩基部位；ウラシル；テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；またはイソ－グアノシンから選択される、請求項２８に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３０】
前記連結ドメインの少なくとも一方が、脱リン酸化塩基を含む、請求項１～２６のいずれかに記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３１】
前記連結ドメインの少なくとも一方が、脱ヒドロキシル化塩基を含む、請求項１～２６のいずれかに記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３２】
前記連結ドメインの少なくとも一方が、それを連結不能にするように化学的に修飾されている、請求項１～２６のいずれかに記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３３】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる、かつ／またはそこで非相補的である、請求項１～２７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３４】
少なくとも１つのヌクレオチドが、前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥまたは前記第２のアダプター核酸の前記ＳＤＥのいずれかから酵素反応によって取り除かれる、請求項１～２７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３５】
前記酵素反応が、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、グリコシラーゼ、またはリアーゼを含む、請求項３４に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３６】
前記少なくとも１つのヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドである、請求項３３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３７】
前記修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドが、脱塩基部位；ウラシル；テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；またはイソ－グアノシンから選択される、請求項３７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３８】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、ヘアピンループを形成することができる自己相補的ドメインを含む、請求項３５に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項３９】
その連結ドメインに対して遠位の第１のアダプター核酸配列の前記末端が、その連結ドメインに対して遠位である前記第２のアダプター核酸配列の前記末端に連結され、それによりループを形成する、請求項１～３８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項４０】
前記ループが、制限酵素認識部位を含む、請求項３９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４１】
少なくとも前記第１のアダプター核酸配列が、第２のＳＤＥを更に含む、請求項１～３５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４２】
前記第２のＳＤＥが、前記第１のアダプター核酸配列の終端に位置する、請求項４１に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４３】
前記第２のアダプター核酸配列が、第２のＳＤＥを更に含む、請求項４１または請求項４２に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４４】
前記第２のＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の終端に位置する、請求項４１～４３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４５】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的である、請求項４１～４４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４６】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥと少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる、かつ／またはそこで非相補的である、請求項４５に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４７】
少なくとも１つのヌクレオチドが、前記第１のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥまたは前記第２のアダプター核酸の前記第２のＳＤＥのいずれかから酵素反応によって取り除かれる、請求項４６に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４８】
前記酵素反応が、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、グリコシラーゼ、またはリアーゼを含む、請求項４７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項４９】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥと非相補的である、請求項４５または請求項４６に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５０】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記第２のＳＤＥに直接結合する、請求項４１～４５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５１】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、第１のＳＤＥに対して５’に位置する、請求項１～５０のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５２】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第１のＳＤＥが、前記ＳＭＩドメインに対して５’に位置する、請求項１～５１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５３】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第１のＳＤＥが、前記ＳＭＩドメインに対して３’に位置する、請求項１～５１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５４】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第１のＳＤＥが、前記ＳＭＩドメインに対して５’に位置し、前記プライマー結合ドメインに対して３’に位置する、請求項１～５３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項５５】
前記第１のアダプター核酸配列の前記第１のＳＤＥが、前記プライマー結合ドメインに対して３’に位置する前記ＳＭＩドメインに対して３’に位置する、請求項１～５３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５６】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記連結ドメインに対して５’に位置する、請求項１～５４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５７】
前記第１のアダプター核酸配列の前記３’終端が、前記連結ドメインを含む、請求項１～５６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５８】
前記第１のアダプター核酸配列が、５’から３’まで、前記プライマー結合ドメイン、前記第１のＳＤＥ、前記ＳＭＩドメイン、及び前記連結ドメインを含む、請求項１～５７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項５９】
前記第１のアダプター核酸配列が、５’から３’まで、前記プライマー結合ドメイン、前記ＳＭＩドメイン、前記第１のＳＤＥ、及び前記連結ドメインを含む、請求項１～５７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６０】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列のいずれかが、修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含む、請求項１～５９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６１】
前記修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子が、コリシンＥ２、Ｉｍ２、グルチチオン（Ｇｌｕｔｉｔｈｉｏｎｅ）、グルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ニッケル、ポリ－ヒスチジン、ＦＬＡＧ－タグ、ｍｙｃ－タグ、またはビオチンである、請求項６０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６２】
前記ビオチンが、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン－５’－トリホスフェート、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－７－デアザ－７－アミノアリル－２’－デオキシグアノシン－５’－トリホスフェート、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５’－ビオチン－Ｇ－モノホスフェート、５’－ビオチン－Ａ－モノホスフェート、５’－ビオチン－ｄＧ－モノホスフェート、または５’－ビオチン－ｄＡ－モノホスフェートである、請求項６１に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６３】
前記ビオチンが、基質に結合したストレプトアビジンに結合することができる、請求項６１または請求項６２に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６４】
前記ビオチンが、基質に結合したストレプトアビジンに結合するとき、前記第１のアダプター核酸配列が、前記第２のアダプター核酸配列から分離することができる、請求項６３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６５】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列のいずれかが、小分子、核酸、ペプチド、及び親和性パートナーによって結合されることができる特有に結合可能な部分から選択される、親和性標識を含む、請求項１～５９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項６６】
前記親和性パートナーが、固体基質に結合し、前記親和性標識に結合するとき、前記親和性標識を含む前記アダプター核酸配列が、前記親和性標識を含まない前記アダプター核酸配列から分離されることができる、請求項６５に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６７】
前記固体基質が、固体表面、ビーズ、または別の固定された構造である、請求項６６に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６８】
前記核酸が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはこれらの組み合わせであり、任意で、ペプチド－核酸またはロックド核酸を含む、請求項６５～６７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項６９】
前記親和性標識が、前記第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではない前記第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置する、請求項６５～６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７０】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列のいずれかが、磁気特性、電荷特性、または不溶性特性を有する物理的基を含む、請求項１～５９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７１】
前記物理的基が磁気特性を有し、磁場が適用されるとき、前記物理的基を含む前記アダプター核酸配列が、前記物理的基を含まない前記アダプター核酸配列から分離される、請求項７０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７２】
前記物理的基が電荷特性を有し、電場が適用されるとき、前記物理的基を含む前記アダプター核酸配列が、前記物理的基を含まない前記アダプター核酸配列から分離される、請求項７０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７３】
前記物理的基が不溶性特性を有し、前記アダプター核酸配列の対が前記物理的基が不溶性である溶液中に含有されるとき、前記物理的基を含む前記アダプター核酸配列が、溶液中に残る前記物理的基を含まない前記アダプター核酸配列から離れて沈殿する、請求項７０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７４】
前記物理的基が、前記第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではない前記第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置する、請求項７０～７３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７５】
前記第２のアダプター核酸配列が、少なくとも１つのホスホロチオエート結合を含む、請求項１～６４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７６】
前記二本鎖標的核酸配列が、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項１～７５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７７】
各アダプター核酸配列が、その終端の各々に連結ドメインを含む、請求項１～７６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７８】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列が、少なくとも部分的に一本鎖である、請求項１～７７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項７９】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列が、一本鎖である、

請求項７８に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項８０】
前記第１のアダプター核酸配列及び前記第２のアダプター核酸配列が、一本鎖である、請求項７９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項８１】
請求項１～８０のいずれかに記載のアダプター核酸配列の少なくとも１つの対及びアダプター核酸配列の第２の対を含む組成物であって、アダプター核酸配列の前記第２の対の各鎖が、少なくともプライマー結合部位及び連結ドメインを含む、前記組成物。
【請求項８２】
アダプター核酸配列の前記第２の対の各鎖内にＳＭＩドメインを更に含む、請求項８１に記載の組成物。
【請求項８３】
アダプター核酸配列の前記第２の対の各鎖内にプライマー結合部位を更に含む、請求項８１または請求項８２に記載の組成物。
【請求項８４】
請求項１～８３のいずれかに記載のアダプター核酸配列の少なくとも２つの対を含む組成物であって、アダプター核酸配列の第１の対からの第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、アダプター核酸配列の少なくとも第２の対からの第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥとは異なる、前記組成物。
【請求項８５】
請求項１～８０のいずれか１項のいずれかに記載のアダプター核酸配列の少なくとも２つの対を含む組成物であって、アダプター核酸分子の第１の対からの第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインが、アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインとは異なる、前記組成物。
【請求項８６】
一本鎖アダプター核酸分子の前記第１の対からの前記第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインが、一本鎖アダプター核酸分子の前記少なくとも第２の対からの前記第１の一本鎖アダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインと同一の長さである、請求項８５に記載の組成物。
【請求項８７】
一本鎖アダプター核酸分子の前記第１の対からの前記第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインが、一本鎖アダプター核酸分子の前記少なくとも第２の対からの前記第１の一本鎖アダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインとは異なる長さを有する、請求項８５に記載の組成物。
【請求項８８】
各ＳＭＩドメインが、前記ＳＭＩ内またはそれに隣接する部位に１つ以上の固定された塩基を含む、請求項８５～８７のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項８９】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された請求項１～８８のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の第１の対と、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結された請求項１～５０のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の第２の対と、を含む、少なくとも第１の二本鎖複合化核酸を含む、組成物。
【請求項９０】
アダプター核酸分子の前記第１の対が、アダプター核酸分子の前記第２の対とは異なる、請求項８９に記載の組成物。
【請求項９１】
アダプター核酸分子の前記第１の対の前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子が、第１のＳＭＩドメインを含み、アダプター核酸分子の前記第２の対の前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子が、第２のＳＭＩドメインを含む、請求項９０に記載の組成物。
【請求項９２】

少なくとも第２の二本鎖複合化核酸を含む、請求項８９～９１のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項９３】
第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対であって、各アダプター核酸配列が、
プライマー結合ドメインと、
単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインと、を含む、前記アダプター核酸配列の対。
【請求項９４】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列の少なくとも一方が、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインを更に含む、請求項９３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項９５】
前記第１のアダプター核酸配列及び前記第２のアダプター核酸配列が、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインを更に含む、請求項９３または請求項９４に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項９６】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列の少なくとも一方が、連結ドメインを更に含む、請求項９３～９５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項９７】
前記第１のアダプター核酸配列及び前記第２のアダプター核酸配列が、連結ドメインを含む、請求項９３～９５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項９８】
前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、脱塩基部位；ウラシル；テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；またはイソ－グアノシンから選択される、請求項９４～９７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項９９】
前記２つのアダプター配列が、少なくとも部分的にともにアニールされている２つの別個のＤＮＡ分子からなる、請求項９７～請求項９８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１００】
前記第１のアダプター核酸配列及び前記第２のアダプター核酸配列が、リンカードメインを介して結合される、請求項９７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０１】
前記リンカードメインが、ヌクレオチドで構成される、請求項１００に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０２】
前記リンカードメインが、１つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含有する、請求項１００に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０３】
前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子が、脱塩基部位；ウラシル；テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；またはイソ－グアノシンから選択される、請求項１０２に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項１０４】
前記リンカードメインが、ループを形成する、請求項５８～６１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０５】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインと少なくとも部分的に相補的である、請求項９７～１０４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０６】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインと相補的である、請求項９７～１０４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０７】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインと非相補的である、請求項９７～１０４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０８】
少なくとも１つのＳＭＩドメインが、内在性ＳＭＩである、請求項９７～１０７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１０９】
前記内在性ＳＭＩが、剪断点に関連付けられる、請求項１０８に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１０】
前記ＳＭＩドメインが、少なくとも１つの縮重または半縮重核酸を含む、請求項９７～１０９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１１】
前記ＳＭＩドメインが、非縮重である、請求項９７～１１０のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１２】
単一ＤＮＡ分子を互いに区別することができるＳＭＩ配列を得るために、前記ＳＭＩドメインの前記配列が、連結されたＤＮＡのランダムまたは半ランダムに剪断された末端に対応する前記配列と組み合わせて考慮される、請求項９７～１１１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１３】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと少なくとも部分的に相補的である、請求項９７～１１２のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１４】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと相補的である、請求項９７～１１３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１５】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと少なくとも部分的に非相補的である、請求項９７～１１３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１６】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインと非相補的である、請求項９７～１１３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１７】
各ＳＭＩドメインが、約１～約３０個の縮重または半縮重核酸を含む、請求項９７～１１

６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１８】
前記第１のアダプター核酸配列の前記連結ドメインが、前記第２のアダプター核酸配列の前記連結ドメインと少なくとも部分的に相補的である、請求項９７～１１７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１１９】
各連結ドメインが、二本鎖標的核酸配列の一方の鎖に連結されることができる、請求項９７～１１８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２０】
前記連結ドメインの一方が、Ｔ－オーバーハング、Ａ－オーバーハング、ＣＧ－オーバーハング、平滑末端、または別の連結可能な核酸配列を含む、請求項９７～１１９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２１】
両方の連結ドメインが、平滑末端を含む、請求項９７～１２０のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２２】
各ＳＭＩドメインが、プライマー結合部位を含む、請求項９７～１２１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２３】
少なくとも前記第１のアダプター核酸配列が、ＳＤＥを更に含む、請求項９７～１２２のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２４】
前記ＳＤＥが、前記第１のアダプター核酸配列の終端に位置する、請求項１２３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２５】
前記第２のアダプター核酸配列が、ＳＤＥを更に含む、請求項１２３または請求項１２４に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２６】
前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の終端に位置する、請求項１２３～１２４のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２７】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的である、請求項１２３～１２６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２８】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと非相補的である、請求項１２７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１２９】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥに直接結合する、請求項１２３～１２８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３０】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる、かつ／またはそこで非相補的である、請求項１２３～１２９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３１】
前記少なくとも１つのヌクレオチドが、前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥまたは前記第２のアダプター核酸の前記ＳＤＥのいずれかから酵素反応によって取り除かれる、請求項１３０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３２】

前記酵素反応が、ポリメラーゼまたはエンドヌクレアーゼを含む、請求項１３１に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３３】
前記少なくとも１つのヌクレオチドが、修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドである、請求項１３２に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３４】
前記修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドが、脱塩基部位；ウラシル；テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；またはイソ－グアノシンから選択される、請求項１３４に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３５】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、ヘアピンループを形成することができる自己相補的ドメインを含む、請求項１２３～１３５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３６】
その連結ドメインに対して遠位の第１のアダプター核酸配列の前記末端が、その連結ドメインに対して遠位である前記第２のアダプター核酸配列の前記末端に連結され、それによりループを形成する、請求項１２３～１３５のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３７】
前記ループが、制限酵素認識部位を含む、請求項１３６に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３８】
前記第１のアダプター核酸配列の前記プライマー結合ドメインが、前記ＳＭＩドメインに対して５’に位置する、請求項９３～１２９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１３９】
前記第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む前記ドメインが、前記ＳＭＩドメインに対して５’に位置する、請求項９３～１３８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４０】
前記第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む前記ドメインが、前記ＳＭＩドメインに対して３’に位置する、請求項９３～１３８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４１】
前記第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む前記ドメインが、前記ＳＭＩドメインに対して５’に位置し、前記プライマー結合ドメインに対して３’に位置する、請求項９３～１３９のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４２】
前記第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む前記ドメインが、前記プライマー結合ドメインに対して３’に位置する前記ＳＭＩドメインに対して３’に位置する、請求項９３～１３８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４３】
前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＭＩドメインが、前記連結ドメインに対して５’に位置する、請求項９３～１４１のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４４】
前記第１のアダプター核酸配列の前記３’終端が、前記連結ドメインを含む、請求項９３～１４３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項１４５】
前記第１のアダプター核酸配列が、５’から３’まで、前記プライマー結合ドメイン、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む前記ドメイン、前記ＳＭＩドメイン、及び前記連結ドメインを含む、請求項９３～１４３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４６】
前記第１のアダプター核酸配列が、５’から３’まで、前記プライマー結合ドメイン、前記ＳＭＩドメイン、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含む前記ドメイン、及び前記連結ドメインを含む、請求項９３～１３８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４７】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列のいずれかが、修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含む、請求項９３～１４６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４８】
前記修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子が、コリシンＥ２、Ｉｍ２、グルチチオン、グルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ニッケル、ポリ－ヒスチジン、ＦＬＡＧ－タグ、ｍｙｃ－タグ、またはビオチンである、請求項１４７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１４９】
前記ビオチンが、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン－５’－トリホスフェート、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－７－デアザ－７－アミノアリル－２’－デオキシグアノシン－５’－トリホスフェート、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５’－ビオチン－Ｇ－モノホスフェート、５’－ビオチン－Ａ－モノホスフェート、５’－ビオチン－ｄＧ－モノホスフェート、または５’－ビオチン－ｄＡ－モノホスフェートである、請求項１４８に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５０】
前記ビオチンが、基質に結合したストレプトアビジンに結合することができる、請求項１４８または請求項１４９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５１】
前記ビオチンが、基質に結合したストレプトアビジンに結合するとき、前記第１のアダプター核酸配列が、前記第２のアダプター核酸配列から分離することができる、請求項１５０に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５２】
前記第２のアダプター核酸配列が、少なくとも１つのホスホロチオエート結合を含む、請求項９３～１４８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５３】
前記二本鎖標的核酸配列が、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項９３～１５２のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５４】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列のいずれかが、小分子、核酸、ペプチド、及び親和性パートナーによって結合されることができる特有に結合可能な部分から選択される、親和性標識を含む、請求項９３～１５３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５５】
前記親和性パートナーが、固体基質に結合し、前記親和性標識に結合するとき、前記親和性標識を含む前記アダプター核酸配列が、前記親和性標識を含まない前記アダプター核酸配列から分離されることができる、請求項１５４に記載のアダプター核酸配列の対。

【請求項１５６】
前記固体基質が、固体表面、ビーズ、または別の固定された構造である、請求項１５５に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５７】
前記核酸が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはこれらの組み合わせであり、任意で、ペプチド－核酸またはロックド核酸を含む、請求項１５４～１５６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５８】
前記親和性標識が、前記第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではない前記第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置する、請求項１５４～１５７のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１５９】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列のいずれかが、磁気特性、電荷特性、または不溶性特性を有する物理的基を含む、請求項９３～１５８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６０】
前記物理的基が磁気特性を有し、磁場が適用されるとき、前記物理的基を含む前記アダプター核酸配列が、前記物理的基を含まない前記アダプター核酸配列から分離される、請求項１５９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６１】
前記物理的基が電荷特性を有し、電場が適用されるとき、前記物理的基を含む前記アダプター核酸配列が、前記物理的基を含まない前記アダプター核酸配列から分離される、請求項１５９に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６２】
前記物理的基が不溶性特性を有し、前記アダプター核酸配列の対が前記物理的基が不溶性である溶液中に含有されるとき、前記物理的基を含む前記アダプター核酸配列が、溶液中に残る前記物理的基を含まない前記アダプター核酸配列から離れて沈殿する、請求項１５７に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６３】
前記物理的基が、前記第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではない前記第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置する、請求項１５７～１６２のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６４】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列が、少なくとも部分的に一本鎖である、請求項９３～１６３のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６５】
前記第１のアダプター核酸配列または前記第２のアダプター核酸配列が、一本鎖である、請求項１６３に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６６】
前記第１のアダプター核酸配列及び前記第２のアダプター核酸配列が、一本鎖である、請求項１６５に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６７】
前記連結ドメインの少なくとも一方が、脱ヒドロキシル化塩基を含む、請求項９６～１６６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６８】
前記連結ドメインの少なくとも一方が、それを連結不能にするように化学的に修飾されている、請求項９６～１６６のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対。
【請求項１６９】
請求項９３～１６８のいずれか１項のいずれかに記載のアダプター核酸配列の少なくとも

２つの対を含む組成物であって、アダプター核酸分子の第１の対からの第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインが、アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインとは異なる、前記組成物。
【請求項１７０】
一本鎖アダプター核酸分子の前記第１の対からの前記第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインが、一本鎖アダプター核酸分子の前記少なくとも第２の対からの前記第１の一本鎖アダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインと同一の長さである、請求項１６９に記載の組成物。
【請求項１７１】
一本鎖アダプター核酸分子の前記第１の対からの前記第１のアダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインが、一本鎖アダプター核酸分子の前記少なくとも第２の対からの前記第１の一本鎖アダプター核酸分子の前記ＳＭＩドメインとは異なる長さを有する、請求項１６９に記載の組成物。
【請求項１７２】
各ＳＭＩドメインが、前記ＳＭＩ内またはそれに隣接する部位に１つ以上の固定された塩基を含む、請求項１６９～１７１のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１７３】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された請求項９３～１６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の第１の対と、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結された請求項９３～１６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の第２の対とを含む、少なくとも第１の二本鎖複合化核酸を含む、組成物。
【請求項１７４】
アダプター核酸分子の前記第１の対が、アダプター核酸分子の前記第２の対とは異なる、請求項１７３に記載の組成物。
【請求項１７５】
アダプター核酸分子の前記第１の対の前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子が、第１のＳＭＩドメインを含み、アダプター核酸分子の前記第２の対の前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子が、第２のＳＭＩドメインを含む、請求項１７４に記載の組成物。
【請求項１７６】
アダプター核酸分子の前記第１の対の前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子が、第１のＳＭＩドメインを含み、アダプター核酸分子の前記第２の対の前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子が、第２のＳＭＩドメインを含む、請求項１７５に記載の組成物。
【請求項１７７】
少なくとも第２の二本鎖複合化核酸を含む、請求項１７３～１７６のいずれか１項に記載の組成物。
【請求項１７８】
請求項１～８０のいずれか１項のいずれかに記載のアダプター核酸分子の少なくとも１つの対と、請求項９３～１６８のいずれか１項のいずれかに記載のアダプター核酸分子の少なくとも１つの対と、を含む、組成物。
【請求項１７９】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された請求項１～８０のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の第１の対と、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結された請求項９３～１６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の第２の対と、を含む、少なくとも第１の二本鎖複合化核酸を含む、組成物。
【請求項１８０】
二本鎖標的核酸を配列決定する方法であって、
（１）請求項１～８０のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対を、二本鎖標的核酸分子の少なくとも１つの終端に連結し、それにより第１の鎖アダプター－標的核酸配列及び第２の鎖アダプター－標的核酸配列を含む二本鎖核酸分子を形成するステップと、
（２）前記第１の鎖アダプター－標的核酸配列を増幅し、それにより複数の第１の鎖アダ

プター－標的核酸配列及び複数のその相補的分子を含む、増幅された生成物の第１の組を生成するステップと、
（３）前記第２の鎖アダプター－標的核酸配列を増幅し、それにより複数の第２の鎖アダプター－標的核酸配列及び複数のその相補的分子を含む増幅された生成物の第２の組を生成するステップであって、増幅された生成物の前記第２の組が、増幅された生成物の前記第１の組から区別可能である、生成するステップと、
（４）増幅された生成物の前記第１の組を配列決定するステップと、
（５）増幅された生成物の前記第２の組を配列決定するステップと、を含む、前記方法。
【請求項１８１】
前記少なくとも１つの終端が、２つの終端である、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８２】
増幅が、ＰＣＲによって実行される、請求項１８０または請求項１８１に記載の方法。
【請求項１８３】
増幅が、多置換増幅によって実行される、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８４】
増幅が、等温増幅によって実行される、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８５】
前記二本鎖標的核酸配列の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、前記二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対と同一の構造を有する、請求項１８０～１８４に記載の方法。
【請求項１８６】
前記第１の鎖アダプター－標的核酸配列が、５’から３’の順で、
（ａ）第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）前記二本鎖標的核酸の第１の鎖と、
（ｃ）第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項１８０または請求項１８５に記載の方法。
【請求項１８７】
前記第２の鎖アダプター－標的核酸配列が、３’から５’の順で、
（ａ）第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）前記二本鎖標的核酸の第２の鎖と、
（ｃ）第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項１８０～１８６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８８】
前記二本鎖標的核酸配列の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、前記二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対とは異なる、請求項１８０に記載の方法。
【請求項１８９】
前記二本鎖標的核酸配列の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、第１のＳＭＩドメインを有し、前記二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、第２のＳＭＩドメインを有し、
前記第１のＳＭＩドメインが、前記第２のＳＭＩドメインとは異なってもよい、請求項１８８に記載の方法。
【請求項１９０】
前記第１の鎖アダプター－標的核酸配列が、５’から３’の順で、
（ａ）前記第１のＳＤＥを含む第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）第１のＳＭＩドメインと、
（ｃ）前記二本鎖標的核酸の第１の鎖と、
（ｄ）第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項１８８または請求項１８９に記載の方法。
【請求項１９１】

前記第２の鎖アダプター－標的核酸配列が、５’から３’の順で、
（ａ）前記第１のＳＤＥを含む第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）第２のＳＭＩドメインと、
（ｃ）前記二本鎖標的核酸の第２の鎖と、
（ｄ）第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項１８８～１９０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９２】
増幅された生成物の前記第１の組のコンセンサス配列が、増幅された生成物の前記第２の組のコンセンサス配列と比較され、前記２つのコンセンサス配列間の差異が、人為産物であると見なされる、請求項１８０～１９１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９３】
二本鎖標的核酸を配列決定する方法であって、
（１）請求項９３～１６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸配列の対を、二本鎖標的核酸分子の少なくとも１つの終端に連結し、それにより第１の鎖アダプター－標的核酸配列及び第２の鎖アダプター－標的核酸配列を含む二本鎖核酸分子を形成するステップと、
（２）前記第１の鎖アダプター－標的核酸分子を増幅し、それにより複数の第１の鎖アダプター－標的核酸分子及び複数のその相補的分子を含む、増幅された生成物の第１の組を生成するステップと、
（３）前記第２の鎖アダプター－標的核酸分子を増幅し、それにより複数の第２の鎖アダプター－標的核酸分子及び複数のその相補的分子を含む、増幅された生成物の第２の組を生成するステップと、
（４）増幅された生成物の前記第１の組を配列決定し、それにより増幅された生成物の前記第１の組のコンセンサス配列を得るステップと、
（５）増幅された生成物の前記第２の組を配列決定し、それにより増幅された生成物の前記第２の組のコンセンサス配列を得るステップと、を含む、前記方法。
【請求項１９４】
増幅された生成物の前記第２の組が、増幅された生成物の前記第１の組から区別可能である、請求項１９３に記載の方法。
【請求項１９５】
増幅が、ＰＣＲによって実行される、請求項１９３または請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９６】
増幅が、多置換増幅によって実行される、請求項１９３または請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９７】
増幅が、等温増幅によって実行される、請求項１９３または請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９８】
ステップ（１）の後に、前記二本鎖核酸分子を、前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを別の化学構造に変化させる少なくとも１つの酵素と接触させるステップを更に含む、請求項１９３または請求項１９４に記載の方法。
【請求項１９９】
前記酵素が、グリコシラーゼである、請求項１９８に記載の方法。
【請求項２００】
前記二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対と同一である、請求項１９３～１９９に記載の方法。
【請求項２０１】
前記二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対とは異なる、請求項１９３～１９９に記載の方法。

【請求項２０２】
アダプター核酸配列の対が、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、前記標的ＤＮＡ分子の前記ＤＮＡ配列の一部分に対応するプライマーが、前記ＤＮＡ分子を増幅するために利用される、請求項１９３～１９９に記載の方法。
【請求項２０３】
前記第１の鎖アダプター－標的核酸配列が、５’から３’の順で、
（ａ）前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドまたは前記少なくとも１つの脱塩基部位を含む第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）前記二本鎖標的核酸の第１の鎖と、
（ｃ）第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項１９３～２００のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０４】
前記第２の鎖アダプター－標的核酸配列が、３’から５’の順で、
（ａ）第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）前記二本鎖標的核酸の第２の鎖と、
（ｃ）第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項１９３～２０３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０５】
前記二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対とは異なる、請求項１９３に記載の方法。
【請求項２０６】
前記二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、第１のＳＭＩドメインを有し、前記二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の前記対が、第２のＳＭＩドメインを有し、
前記第１のＳＭＩドメインが、前記第２のＳＭＩドメインとは異なる、請求項２０５に記載の方法。
【請求項２０７】
前記第１の鎖アダプター－標的核酸配列が、５’から３’の順で、
（ａ）前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドまたは前記少なくとも１つの脱塩基部位、及び前記第１のＳＭＩドメインを含む第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）前記二本鎖標的核酸の第１の鎖と、
（ｃ）前記第２のＳＭＩドメインを含む第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項２０５または請求項２０６に記載の方法。
【請求項２０８】
前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、８－オキソ－Ｇであるとき、前記第２のアダプター核酸配列が、前記８－オキソ－Ｇに対応する位置にシトシンを含む、請求項２０７に記載の方法。
【請求項２０９】
前記第２の鎖アダプター－標的核酸配列が、３’から５’の順で、
（ａ）前記第１のＳＭＩドメインを含む第１のアダプター核酸配列と、
（ｂ）前記二本鎖標的核酸の第２の鎖と、
（ｃ）前記第２のＳＭＩドメインを含む第２のアダプター核酸配列と、を含む、請求項２０５～２０８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１０】
前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、８－オキソ－Ｇであるとき、前記第２のアダプター核酸配列が、前記８－オキソ－Ｇに対応する位置にシチジンを含む、請求項２０９に記載の方法。
【請求項２１１】
区別可能な増幅生成物が、個々のＤＮＡ分子の前記二本の鎖の各々から得られ、増幅され

た生成物の前記第１の組の前記コンセンサス配列が、増幅された生成物の前記第２の組の前記コンセンサス配列と比較され、２つのコンセンサス配列間の差異が、人為産物と見なされ得る、方法。
【請求項２１２】
増幅された生成物が、同一のＳＭＩ配列を共有しているために、同一の初期ＤＮＡ分子から生じていることが決定される、請求項２１１に記載の方法。
【請求項２１３】
増幅された生成物が、ＳＭＩアダプターライブラリ合成の時点で、かつそれと組み合わせて生成されたデータベースに基づいて、互いに対応することが既知である、別個のＳＭＩ配列を担持しているために、同一の初期ＤＮＡ分子から生じていることが決定される、請求項２１１に記載の方法。
【請求項２１４】
増幅された生成物が、ＳＤＥによって導入された配列差異の少なくとも１つのヌクレオチドを介して、同一の初期二本鎖ＤＮＡ配列の別個の鎖から生じていることが決定される、請求項２１１～２１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１５】
区別可能な増幅生成物が、個々のＤＮＡ分子の前記二本の鎖の各々から得られ、単一ＤＮＡ分子の前記二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの一本に対応する増幅された生成物から得られる前記配列が、前記二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの二本目に対応する増幅された生成物と比較され、２つの配列間の差異が、人為産物と見なされる、方法。
【請求項２１６】
単一ＤＮＡ分子の前記二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの一本に対応する増幅された生成物から得られる前記配列が、前記二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの二本目に対応する増幅された生成物と比較され、前記２つの配列間にいかなる差異も特定されないとき、区別不可能な増幅生成物が、個々のＤＮＡ分子の前記二本の鎖から得られる、方法。
【請求項２１７】
増幅された生成物が、ＳＭＩアダプターライブラリ合成の時点で、かつそれと組み合わせて生成されたデータベースに基づいて、同一のＳＭＩ配列を共有しているために、同一の初期二本鎖ＤＮＡ分子から生じていることが決定される、請求項２１５または請求項２１６に記載の方法。
【請求項２１８】
増幅された生成物が、ＳＤＥによって導入された配列差異の少なくとも１つのヌクレオチドを介して、同一の初期二本鎖ＤＮＡ配列の別個の鎖から生じていることが決定される、請求項２１４～２１７に記載の方法。
【請求項２１９】
ＤＮＡ二本鎖のそれらの構成要素の一本鎖への熱融解または化学融解後に、単一分子希釈のステップを更に含む、請求項２１４～２１８に記載の方法。
【請求項２２０】
前記二本の元々対合した鎖が同一の容器を共有する可能性が小さいように、前記一本鎖が、複数の物理的に分離された反応チャンバ内へと希釈される、請求項２１９に記載の方法。
【請求項２２１】
前記物理的に分離された反応チャンバが、容器、管、ウェル、及び少なくとも１対の非連通液滴から選択される、請求項２２０に記載の方法。
【請求項２２２】
ＰＣＲ増幅が、好ましくは異なるタグ配列を担持する各チャンバのためのプライマーを使用して、物理的に分離された各反応チャンバに実行される、請求項２２０に記載の方法。
【請求項２２３】
各タグ配列が、ＳＤＥとして動作する、請求項２２２に記載の方法。
【請求項２２４】

同一の初期ＤＮＡの前記二本の鎖に対応する一連の対合した配列が、互いに比較され、前記一連の生成物からの少なくとも１つの配列が、前記初期ＤＮＡ分子の正確な配列を表す可能性が最も高いものとして選択される、請求項２１６～２２３に記載の方法。
【請求項２２５】
前記初期ＤＮＡ分子の正確な配列を表す可能性が最も高いものとして選択される前記生成物が、少なくとも一部には、前記二本のＤＮＡ鎖から得られる前記生成物間に最小数のミスマッチを有するために選択される、請求項２２４に記載の方法。
【請求項２２６】
前記初期ＤＮＡ分子の正確な配列を表す可能性が最も高いものとしてとして選択される前記生成物が、少なくとも一部には、前記参照配列と比較して最小数のミスマッチを有するために選択される、請求項２２４または請求項２２５に記載の方法。
【請求項２２７】
ステップ（２）またはステップ（３）の前記増幅中に、前記少なくとも１つの脱塩基部位が、前記対応する増幅された生成物中のチミジンへの増幅時に変換され、ＳＤＥの導入をもたらす、請求項２０３～２１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２８】
ステップ（２）またはステップ（３）の前記増幅中に、前記少なくとも１つの修飾ヌクレオチド部位が、前記対応する増幅された生成物中のアデノシンをコードする、請求項１９３に記載の方法。
【請求項２２９】
少なくとも２対のアダプター核酸配列を含む組成物であって、アダプター核酸配列の第１の対が、
プライマー結合ドメインと、
鎖定義要素（ＳＤＥ）と、
連結ドメインと、を含み、
アダプター核酸配列の第２の対が、
プライマー結合ドメインと、
単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインと、
連結ドメインと、を含む、前記組成物。
【請求項２３０】
二本鎖複合化核酸であって、
（１）プライマー結合ドメインと、
ＳＤＥと、を含む、アダプター核酸配列の第１の対と、
（２）二本鎖標的核酸と、
（３）プライマー結合ドメインと、
単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインと、を含む、アダプター核酸配列の第２の対と、を含み、
アダプター核酸分子の前記第１の対が、前記二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、アダプター核酸分子の前記第２の対が、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結される、前記二本鎖複合化核酸。
【請求項２３１】
アダプター核酸分子の前記第１の対及び／またはアダプター核酸分子の前記第２の対が、連結ドメインを更に含む、請求項２３０に記載の二本鎖複合化核酸。
【請求項２３２】
第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対であって、各アダプター核酸配列が、
プライマー結合ドメインと、
ＳＤＥと、
連結ドメインと、を含み、

前記第１のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥが、前記第２のアダプター核酸配列の前記ＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的である、前記アダプター核酸配列の対。
【請求項２３３】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、前記二本鎖標的核酸分子の第２の第２の終端に連結された、請求項１～８０のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の対を含む、二本鎖環状核酸。
【請求項２３４】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、前記二本鎖標的核酸分子の第２の第２の終端に連結された、請求項９３～１６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の対を含む、二本鎖環状核酸。
【請求項２３５】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された請求項１～８０のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の対と、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたプライマー結合ドメインのアニールされた対と、を含み、
プライマー結合ドメインの前記アニールされた対が、アダプター核酸分子の前記対に連結される、二本鎖環状核酸。
【請求項２３６】
二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された請求項９３～１６８のいずれか１項に記載のアダプター核酸分子の対と、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたプライマー結合ドメインのアニールされた対と、を含み、
プライマー結合ドメインの前記アニールされた対が、アダプター核酸分子の前記対に連結される、二本鎖環状核酸。
【請求項２３７】
二本鎖複合化核酸であって、
（１）プライマー結合ドメインと、
鎖定義要素（ＳＤＥ）と、
単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインと、を含む、アダプター核酸配列の対と、
（２）二本鎖標的核酸と、
（３）アニールされた対プライマー結合ドメインと、を含み、
アダプター核酸分子の前記対が、前記二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、前記アニールされた対プライマー結合ドメインが、前記二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結される、前記二本鎖複合化核酸。
【請求項２３８】
アダプター核酸分子の前記対及び／または前記アニールされた対プライマー結合ドメインが、連結ドメインを更に含む、請求項２３７に記載の二本鎖複合化核酸。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本出願は、２０１５年１２月８日出願の米国特許仮出願第６２／２６４，８２２号及び２０１６年１月２２日出願の米国特許仮出願第６２／２８１，９１７号に対する優先権及びそれらの利益を主張する。上述の出願の各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩ形式で提出されている配列表を含み、その全体がこれにより参照により組み込まれる。２０１６年１２月８日作製の該ＡＳＣＩＩのコピーは、ＴＷＩＮ－００１＿ＳＴ２５．ｔｘｔと称され、サイズは１１，７７８バイトである。
【背景技術】

【０００３】
二本鎖配列決定は、二本鎖ＤＮＡの二本の鎖を別個に増幅し、配列決定することによって、ハイスループットＤＮＡ配列決定の正確性の著しい改善を可能にし、故に、増幅及び配列決定エラーは典型的には二本の鎖のうちの一方のみに生じるため、それらを排除することができる。二本鎖配列決定は当初、ＤＮＡ断片の末端に連結されたＹ形または「ループ」アダプター内に導入される非対称（すなわち、非相補的）ＰＣＲプライマー結合部位について記載された。アダプター内に存在する非対称プライマー結合部位自体は、二本のＤＮＡ鎖とは別個の生成物をもたらし、これが、二本のＤＮＡ鎖の各々からのエラー訂正を可能にする。非対称プライマー結合部位の使用は、いくつかの状況において最適でない可能性があり、例えば、Ｙ－アダプターの遊離末端は、エキソヌクレアーゼによる分解を受け易くあり得、これらの遊離末端はまた、他の分子にもアニールし、分子の「デイジーチェーン化」をもたらし得る。更に、Ｙ形アダプターまたは「ループ」アダプターによる二本鎖配列決定は、ペアードエンド配列決定アプローチに最も容易に適用され、シングルエンド配列決定に適用可能な代替的なアプローチは、様々な配列決定プラットフォームへの二本鎖配列決定のより幅広い適用を単純化するだろう。
【０００４】
したがって、非対称プライマー結合部位の使用を伴わない、二本鎖配列決定に対するアプローチへの満たされていない必要性が存在する。
【発明の概要】
【０００５】
非対称プライマー結合部位の使用を必要としない、二本鎖配列決定に対する代替的かつ優れたアプローチが、本明細書に記載される。代わりに、配列決定されるアダプター内もしくはＤＮＡ分子内の別の場所の二本の鎖間のＤＮＡ配列内に少なくとも１つのヌクレオチドの差異を作製することによって、または他の方法（二本の鎖の物理的分離を可能にする、鎖の少なくとも一本への分子の結合など）で二本の鎖を差次的に標識することによって、二本の鎖間の非対称が導入され得る。
【０００６】
第１の態様において、本発明は、第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対に関し、各アダプター核酸配列は、プライマー結合ドメイン、鎖定義要素（ＳＤＥ）、単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメイン、及び連結ドメインを含む。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的であり得る。
【０００７】
第１の態様の実施形態において、２つのアダプター配列は、少なくとも部分的にともにアニールされている２つの別個のＤＮＡ分子を含み得る。第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列は、リンカードメインを介して結合され得る。リンカードメインは、ヌクレオチドで構成され得る。リンカードメインは、１つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含み得る。１つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子は、脱塩基部位、ウラシル、テトラヒドロフラン、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）、デオキシイノシン、５’－ニトロインドール、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、イソ－シトシン、５’－メチル－イソシトシン、またはイソ－グアノシンであり得る。リンカードメインは、ループを形成し得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第２のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインと少なくとも部分的に相補的であり得る。実施形態において、第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第２のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインと相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第２のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメ

インと少なくとも部分的に非相補的であり得る。実施形態において、少なくとも１つのＳＭＩドメインが、内在性ＳＭＩであり得、例えば、剪断点に関連付けられる（例えば、剪断点自体を使用して、剪断点の実際のマッピング位置（例えば、染色体３、１，２３４，５６７位）を使用して、剪断点にすぐ隣接したＤＮＡ内の定義された数のヌクレオチドを使用して（例えば、剪断点から１０ヌクレオチド、剪断点から７ヌクレオチド離れて開始する８ヌクレオチド、及び剪断点の後の「Ｃ」の最初の出現後に開始する６ヌクレオチド））。実施形態において、ＳＭＩドメインは、少なくとも１つの縮重または半縮重核酸を含む。実施形態において、ＳＭＩドメインは、非縮重であり得る。実施形態において、単一ＤＮＡ分子を互いに区別することができるＳＭＩ配列を得るために、ＳＭＩドメインの配列は、連結されたＤＮＡのランダムまたは半ランダムに剪断された末端に対応する配列と組み合わせて考慮され得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと少なくとも部分的に相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと少なくとも部分的に非相補的であり得る。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、プライマー結合部位を含む。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、その連結ドメインに対して遠位に位置し得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと非相補的であり得る。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、約１～約３０個の縮重または半縮重核酸を含む。第１のアダプター核酸配列の連結ドメインは、第２のアダプター核酸配列の連結ドメインと少なくとも部分的に相補的であり得る。実施形態において、各連結ドメインは、二本鎖標的核酸配列の一方の鎖に連結されることが可能であり得る。実施形態において、連結ドメインの一方は、Ｔ－オーバーハング、Ａ－オーバーハング、ＣＧ－オーバーハング、平滑末端、または別の連結可能な核酸配列を含む。実施形態において、両方の連結ドメインは、平滑末端を含む。実施形態において、連結ドメインの少なくとも一方は、修飾核酸を含む。修飾ヌクレオチドは、脱塩基部位、ウラシル、テトラヒドロフラン、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）、デオキシイノシン、５’－ニトロインドール、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、イソ－シトシン、５’－メチル－イソシトシン、またはイソ－グアノシンであり得る。実施形態において、連結ドメインの少なくとも一方は、脱リン酸化塩基を含む。実施形態において、連結ドメインの少なくとも一方は、脱ヒドロキシル化塩基を含む。実施形態において、連結ドメインの少なくとも一方は、それを連結不能にするように化学的に修飾されている。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる、かつ／またはそこで非相補的であり得る。実施形態において、少なくとも１つのヌクレオチドは、第１のアダプター核酸配列のＳＤＥまたは第２のアダプター核酸のＳＤＥのいずれかから酵素反応によって取り除かれ得る。酵素反応は、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、グリコシラーゼ、またはリアーゼを含む。少なくとも１つのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドであり得る。修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドは、脱塩基部位、ウラシル、テトラヒドロフラン、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）、デオキシイノシン、５’－ニトロインドール、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、イソ－シトシン、５’－メチル－イソシトシン、またはイソ－グアノシンであり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、ヘアピンループを形成することが可能であり得る自己相補的ドメインを含む。その連結ドメインに対して遠位の第１のアダプター核酸配列の末端は、その連結ドメインに対して遠位であり得る第２のアダプター核酸配列の末端に連結され、それによりループを形成し得る。ループは、制限酵素認識部位を含む。実施形態において、少なくとも第１のアダプター核酸配列は、第２のＳＤＥを更に含む。第２のＳＤＥは、第１のアダプター核酸配列の終端に位置し得る。第２のアダプター核酸配列は、第２のＳＤＥを更

に含む。第２のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列の終端に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥと少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる、かつ／またはそこで非相補的であり得る。実施形態において、少なくとも１つのヌクレオチドは、第１のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥまたは第２のアダプター核酸の第２のＳＤＥのいずれかから酵素反応によって取り除かれ得る。酵素反応は、ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼ、グリコシラーゼ、またはリアーゼを含む。第１のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥと非相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列の第２のＳＤＥに直接結合し得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第１のＳＤＥに対して５’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の第１のＳＤＥは、ＳＭＩドメインに対して５’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の第１のＳＤＥは、ＳＭＩドメインに対して３’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の第１のＳＤＥは、ＳＭＩドメインに対して５’に位置し得、プライマー結合ドメインに対して３’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の第１のＳＤＥは、プライマー結合ドメインに対して３’に位置し得るＳＭＩドメインに対して３’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、連結ドメインに対して５’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の３’終端は、連結ドメインを含む。第１のアダプター核酸配列は、５’から３’まで、プライマー結合ドメイン、第１のＳＤＥ、ＳＭＩドメイン、及び連結ドメインを含む。第１のアダプター核酸配列は、５’から３’まで、プライマー結合ドメイン、ＳＭＩドメイン、第１のＳＤＥ、及び連結ドメインを含む。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列のいずれかは、修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含む。修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子は、コリシンＥ２、Ｉｍ２、グルチチオン（グルチチオン（Ｇｌｕｔｉｔｈｉｏｎｅ））、グルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ニッケル、ポリ－ヒスチジン、ＦＬＡＧ－タグ、ｍｙｃ－タグ、またはビオチンであり得る。ビオチンは、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン－５’－トリホスフェート、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－７－デアザ－７－アミノアリル－２’－デオキシグアノシン－５’－トリホスフェート、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５’－ビオチン－Ｇ－モノホスフェート、５’－ビオチン－Ａ－モノホスフェート、５’－ビオチン－ｄＧ－モノホスフェート、または５’－ビオチン－ｄＡ－モノホスフェートであり得る。ビオチンは、基質に結合したストレプトアビジンに結合することが可能であり得る。実施形態において、ビオチンが、基質に結合したストレプトアビジンに結合するとき、第１のアダプター核酸配列は、第２のアダプター核酸配列から分離することができる。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列のいずれかは、小分子、核酸、ペプチド、及び親和性パートナーによって結合されることが可能であり得る特有に結合可能な部分から選択される、親和性標識を含む。実施形態において、親和性パートナーが、固体基質に結合し、親和性標識に結合するとき、親和性標識を含むアダプター核酸配列は、親和性標識を含まないアダプター核酸配列から分離されることができる。固体基質は、固体表面、ビーズ、または別の固定された構造であり得る。核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはこれらの組み合わせであってもよく、任意で、ペプチド－核酸またはロックド核酸を含む。親和性標識は、第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではなくてもよい第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置し得る。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列のいずれかは、磁気特性、電荷特性、または不溶性特性を有する物理的基を含む。実施形態において、物理的基が磁気特性を有し、磁場が適用されるとき、物理的基を含むアダ

プター核酸配列は、物理的基を含まないアダプター核酸配列から分離される。実施形態において、物理的基が電荷特性を有し、電場が適用されるとき、物理的基を含むアダプター核酸配列は、物理的基を含まないアダプター核酸配列から分離される。実施形態において、物理的基が不溶性特性を有し、アダプター核酸配列の対が物理的基が不溶性である溶液中に含有されるとき、物理的基を含むアダプター核酸配列は、溶液中に残る物理的基を含まないアダプター核酸配列から離れて沈殿する。物理的基は、第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではなくてもよい第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置し得る。第２のアダプター核酸配列は、少なくとも１つのホスホロチオエート結合を含む。二本鎖標的核酸配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。実施形態において、各アダプター核酸配列は、その終端の各々に連結ドメインを含む。第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列は、少なくとも部分的に一本鎖であり得る。第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列は、一本鎖であり得る。第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列は、一本鎖であり得る。

【０００８】

第２の態様において、本発明は、第１の態様のアダプター核酸配列の少なくとも１つの対及びアダプター核酸配列の第２の対を含む組成物に関し、アダプター核酸配列の第２の対の各鎖は、少なくともプライマー結合部位及び連結ドメインを含む。

【０００９】

第２の態様は、第１の態様の少なくとも２対のアダプター核酸配列を含む組成物に更に関し、アダプター核酸配列の第１の対からの第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、アダプター核酸配列の少なくとも第２の対からの第１のアダプター核酸配列のＳＤＥとは異なる。

【００１０】

第２の態様はまた、第１の態様の少なくとも２対のアダプター核酸分子を含む組成物にも関し、アダプター核酸分子の第１の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインは、アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインとは異なる。

【００１１】

第２の態様の実施形態において、本組成物は、アダプター核酸配列の第２の対の各鎖内にＳＭＩドメインを更に含む。本組成物は、アダプター核酸配列の第２の対の各鎖内にプライマー結合部位を更に含み得る。一本鎖アダプター核酸分子の第１の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインは、一本鎖アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１の一本鎖アダプター核酸分子のＳＭＩドメインと同一の長さであってもよい。一本鎖アダプター核酸分子第１の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインは、一本鎖アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１の一本鎖アダプター核酸分子のＳＭＩドメインとは異なる長さを有してもよい。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、ＳＭＩ内またはそれに隣接する部位に１つ以上の固定された塩基を含む。実施形態において、第１の態様のアダプター核酸分子の第１の対を含む少なくとも第１の二本鎖複合化核酸は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、第１の態様のアダプター核酸分子の第２の対は、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結される。アダプター核酸分子の第１の対は、アダプター核酸分子の第２の対とは異なってもよい。アダプター核酸分子の第１の対の第１の鎖アダプター－標的核酸分子は、第１のＳＭＩドメインを含み、アダプター核酸分子の第２の対の第１の鎖アダプター－標的核酸分子は、第２のＳＭＩドメインを含む。実施形態において、本組成物は、少なくとも第２の二本鎖複合化核酸を含む。

【００１２】

第３の態様において、本発明は、第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対に関する。第３の態様において、各アダプター核酸配列は、プライマー結合ドメイン及び単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインを含む。

【００１３】
第３の態様の実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列の少なくとも１つは、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインを更に含む。第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列は、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインを更に含む。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列の少なくとも１つは、連結ドメインを更に含む。第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列は、連結ドメインを含み得る。少なくとも１つの修飾ヌクレオチドは、脱塩基部位、ウラシル、テトラヒドロフラン、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）、デオキシイノシン、５’－ニトロインドール、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、イソ－シトシン、５’－メチル－イソシトシン、またはイソ－グアノシンであり得る。２つのアダプター配列は、少なくとも部分的にともにアニールされている２つの別個のＤＮＡ分子を含み得る。第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列は、リンカードメインを介して結合され得る。リンカードメインは、ヌクレオチドで構成され得る。リンカードメインは、１つ以上の修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含み得る。実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子は、脱塩基部位、ウラシル、テトラヒドロフラン、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）、デオキシイノシン、５’－ニトロインドール、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、イソ－シトシン、５’－メチル－イソシトシン、またはイソ－グアノシンであり得る。リンカードメインは、ループを形成し得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第２のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインと少なくとも部分的に相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第２のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインと相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、第２のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインと非相補的であり得る。実施形態において、少なくとも１つのＳＭＩドメインが、内在性ＳＭＩであり、例えば、剪断点に関連付けられる（例えば、剪断点自体を使用して、剪断点の実際のマッピング位置（例えば、染色体３、１，２３４，５６７位）を使用して、剪断点にすぐ隣接したＤＮＡ内の定義された数のヌクレオチドを使用して（例えば、剪断点から１０ヌクレオチド、剪断点から７ヌクレオチド離れて開始する８ヌクレオチド、及び剪断点の後の「Ｃ」の最初の出現後に開始する６ヌクレオチド））。ＳＭＩドメインは、少なくとも１つの縮重または半縮重核酸を含む。ＳＭＩドメインは、非縮重であり得る。単一ＤＮＡ分子を互いに区別することができるＳＭＩ配列を得るために、ＳＭＩドメインの配列は、連結されたＤＮＡのランダムまたは半ランダムに剪断された末端に対応する配列と組み合わせて考慮され得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと少なくとも部分的に相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと少なくとも部分的に非相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、第２のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインと非相補的であり得る。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、約１～約３０個の縮重または半縮重核酸を含む。第１のアダプター核酸配列の連結ドメインは、第２のアダプター核酸配列の連結ドメインと少なくとも部分的に相補的であり得る。実施形態において、各連結ドメインは、二本鎖標的核酸配列の一方の鎖に連結されることが可能であり得る。実施形態において、連結ドメインの一方は、Ｔ－オーバーハング、Ａ－オーバーハング、ＣＧ－オーバーハング、平滑末端、または別の連結可能な核酸配列を含む。実施形態において、両方の連結ドメインは、平滑末端を含む。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、プライマー結合部位を含む。実施形態において、少なくとも第１のアダプター核酸配列は、ＳＤＥを更に含む。ＳＤＥは、第１のアダプター核酸配列の終端に位置し得る。第２

のアダプター核酸配列は、ＳＤＥを更に含む。ＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列の終端に位置し得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的であり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥに直接結合し得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも１つのヌクレオチドだけ異なる、かつ／またはそこで非相補的であり得る。少なくとも１つのヌクレオチドは、第１のアダプター核酸配列のＳＤＥまたは第２のアダプター核酸のＳＤＥのいずれかから酵素反応によって取り除かれ得る。酵素反応は、ポリメラーゼまたはエンドヌクレアーゼを含み得る。少なくとも１つのヌクレオチドは、修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドであり得る。修飾ヌクレオチドまたは標識を含むヌクレオチドは、脱塩基部位、ウラシル、テトラヒドロフラン、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）、８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）、デオキシイノシン、５’－ニトロインドール、５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン、イソ－シトシン、５’－メチル－イソシトシン、またはイソ－グアノシンであり得る。第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、ヘアピンループを形成することが可能であり得る自己相補的ドメインを含み得る。その連結ドメインに対して遠位の第１のアダプター核酸配列の末端は、その連結ドメインに対して遠位である第２のアダプター核酸配列の末端に連結され、それによりループを形成し得る。ループは、制限酵素認識部位を含み得る。第１のアダプター核酸配列のプライマー結合ドメインは、ＳＭＩドメインに対して５’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインは、ＳＭＩドメインに対して５’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインは、ＳＭＩドメインに対して３’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインは、ＳＭＩドメインに対して５’に位置し得、プライマー結合ドメインに対して３’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメインは、プライマー結合ドメインに対して３’に位置し得るＳＭＩドメインに対して３’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列のＳＭＩドメインは、連結ドメインに対して５’に位置し得る。第１のアダプター核酸配列の３’終端は、連結ドメインを含み得る。実施形態において、第１のアダプター核酸配列は、５’から３’まで、プライマー結合ドメイン、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメイン、ＳＭＩドメイン、及び連結ドメインを含む。実施形態において、第１のアダプター核酸配列は、５’から３’まで、プライマー結合ドメイン、ＳＭＩドメイン、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを含むドメイン、及び連結ドメインを含む。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列のいずれかは、修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子を含む。修飾ヌクレオチドまたは非ヌクレオチド分子は、コリシンＥ２、Ｉｍ２、グルチチオン（グルチチオン）、グルタチオン－ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、ニッケル、ポリ－ヒスチジン、ＦＬＡＧ－タグ、ｍｙｃ－タグ、またはビオチンであり得る。ビオチンは、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルシチジン－５’－トリホスフェート、Ｎ４－ビオチン－ＯＢＥＡ－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－アミノアリルウリジン－５’－トリホスフェート、ビオチン－１６－７－デアザ－７－アミノアリル－２’－デオキシグアノシン－５’－トリホスフェート、デスチオビオチン－６－アミノアリル－２’－デオキシシチジン－５’－トリホスフェート、５’－ビオチン－Ｇ－モノホスフェート、５’－ビオチン－Ａ－モノホスフェート、５’－ビオチン－ｄＧ－モノホスフェート、または５’－ビオチン－ｄＡ－モノホスフェートであり得る。ビオチンは、基質に結合したストレプトアビジンに結合することが可能であり得る。実施形態において、ビオチンが、基質に結合したストレプトアビジンに結合するとき、第１のアダプター核酸配列は、第２のアダプター核酸配列から分離することができる。第２

のアダプター核酸配列は、少なくとも１つのホスホロチオエート結合を含み得る。二本鎖標的核酸配列は、ＤＮＡまたはＲＮＡであり得る。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列のいずれかは、小分子、核酸、ペプチド、及び親和性パートナーによって結合されることができる特有に結合可能な部分から選択される、親和性標識を含む。実施形態において、親和性パートナーが、固体基質に結合し、親和性標識に結合するとき、親和性標識を含むアダプター核酸配列は、親和性標識を含まないアダプター核酸配列から分離されることができる。固体基質は、固体表面、ビーズ、または別の固定された構造であり得る。核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはこれらの組み合わせであってもよく、任意で、ペプチド－核酸またはロックド核酸を含む。親和性標識は、第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではなくてもよい第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置し得る。実施形態において、第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列のいずれかは、磁気特性、電荷特性、または不溶性特性を有する物理的基を含む。実施形態において、物理的基が磁気特性を有し、磁場が適用されるとき、物理的基を含むアダプター核酸配列は、物理的基を含まないアダプター核酸配列から分離される。実施形態において、物理的基が電荷特性を有し、電場が適用されるとき、物理的基を含むアダプター核酸配列は、物理的基を含まないアダプター核酸配列から分離される。実施形態において、物理的基が不溶性特性を有し、アダプター核酸配列の対が物理的基が不溶性である溶液中に含有されるとき、物理的基を含むアダプター核酸配列は、溶液中に残る物理的基を含まないアダプター核酸配列から離れて沈殿する。物理的基は、第２のアダプター核酸配列内の対向するドメインと完全には相補的ではなくてもよい第１のアダプター核酸配列内の、アダプターの終端またはドメイン内に位置し得る。第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列は、少なくとも部分的に一本鎖であり得る。第１のアダプター核酸配列または第２のアダプター核酸配列は、一本鎖であり得る。第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列は、一本鎖であり得る。実施形態において、連結ドメインの少なくとも一方は、脱ヒドロキシル化塩基を含む。実施形態において、連結ドメインの少なくとも一方は、それを連結不能にするように化学的に修飾されている。

【００１４】

第４の態様において、本発明は、第３の態様の少なくとも２対のアダプター核酸分子を含む組成物に関し、アダプター核酸分子の第１の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインは、アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインとは異なる。

【００１５】

第４の態様の実施形態において、一本鎖アダプター核酸分子の第１の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインは、一本鎖アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１の一本鎖アダプター核酸分子のＳＭＩドメインと同一の長さであってもよい。一本鎖アダプター核酸分子第１の対からの第１のアダプター核酸分子のＳＭＩドメインは、一本鎖アダプター核酸分子の少なくとも第２の対からの第１の一本鎖アダプター核酸分子のＳＭＩドメインとは異なる長さを有してもよい。実施形態において、各ＳＭＩドメインは、ＳＭＩ内またはそれに隣接する部位に１つ以上の固定された塩基を含む。

【００１６】

第５の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された第３の態様のアダプター核酸分子の第１の対と、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結された第３の態様のアダプター核酸分子の第２の対とを含む、少なくとも第１の二本鎖複合化核酸を含む組成物に関する。

【００１７】

第５の態様の実施形態において、アダプター核酸分子の第１の対は、アダプター核酸分子の第２の対とは異なってもよい。アダプター核酸分子の第１の対の第１の鎖アダプター－標的核酸分子は、第１のＳＭＩドメインを含み得、アダプター核酸分子の第２の対の第１の鎖アダプター－標的核酸分子は、第２のＳＭＩドメインを含み得る。アダプター核酸分

子の第１の対の第１の鎖アダプター－標的核酸分子は、第１のＳＭＩドメインを含み得、アダプター核酸分子の第２の対の第１の鎖アダプター－標的核酸分子は、第２のＳＭＩドメインを含む。実施形態において、本組成物は、少なくとも第２の二本鎖複合化核酸を含む。

【００１８】

第６の態様において、本発明は、第１の態様のアダプター核酸分子の少なくとも１つの対と、第３の態様のアダプター核酸分子の少なくとも１つの対とを含む組成物に関する。

【００１９】

第７の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された第１の態様のアダプター核酸分子の第１の対と、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結された第３の態様のアダプター核酸分子の第２の対とを含む、少なくとも第１の二本鎖複合化核酸を含む組成物に関する。

【００２０】

第８の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸を配列決定する方法であって、（１）第１の態様のアダプター核酸配列の対を、二本鎖標的核酸分子の少なくとも１つの終端に連結し、それにより第１の鎖アダプター－標的核酸配列及び第２の鎖アダプター－標的核酸配列を含む二本鎖核酸分子を形成するステップと、（２）第１の鎖アダプター－標的核酸配列を増幅し、それにより複数の第１の鎖アダプター－標的核酸配列及び複数のその相補的分子を含む、増幅された生成物の第１の組を生成するステップと、（３）第２の鎖アダプター－標的核酸配列を増幅し、それにより複数の第２の鎖アダプター－標的核酸配列及び複数のその相補的分子を含む増幅された生成物の第２の組を生成するステップであって、増幅された生成物の第２の組が、増幅された生成物の第１の組から区別可能であり得る、生成するステップと、（４）増幅された生成物の第１の組を配列決定するステップと、（５）増幅された生成物の第２の組を配列決定するステップとを含む、方法に関する。

【００２１】

第８の態様の実施形態において、少なくとも１つの終端は、２つの終端であり得る。増幅は、ＰＣＲによって、多置換増幅によって、または等温増幅によって実行され得る。二本鎖標的核酸配列の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対と同一の構造を有する。第８の態様の実施形態において、第１の鎖アダプター－標的核酸配列は、５’から３’の順で、（ａ）第１のアダプター核酸配列、（ｂ）二本鎖標的核酸の第１の鎖、及び（ｃ）第２のアダプター核酸配列を含む。第８の態様の実施形態において、第２の鎖アダプター－標的核酸配列は、３’から５’の順で、（ａ）第１のアダプター核酸配列、（ｂ）二本鎖標的核酸の第２の鎖、及び（ｃ）第２のアダプター核酸配列を含む。二本鎖標的核酸配列の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対とは異なってもよい。二本鎖標的核酸配列の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、第１のＳＭＩドメインを有し、二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、第２のＳＭＩドメインを有し、第１のＳＭＩドメインは、第２のＳＭＩドメインとは異なってもよい。第８の態様の実施形態において、第１の鎖アダプター－標的核酸配列は、５’から３’の順で、（ａ）第１のＳＤＥを含む第１のアダプター核酸配列、（ｂ）第１のＳＭＩドメイン、（ｃ）二本鎖標的核酸の第１の鎖、及び（ｄ）第２のアダプター核酸配列を含み得る。第８の態様の実施形態において、第２の鎖アダプター－標的核酸配列は、５’から３’の順で、（ａ）第１のＳＤＥを含む第１のアダプター核酸配列、（ｂ）第２のＳＭＩドメイン、（ｃ）二本鎖標的核酸の第２の鎖、及び（ｄ）第２のアダプター核酸配列を含み得る。実施形態において、増幅された生成物の第１の組のコンセンサス配列は、増幅された生成物の第２の組のコンセンサス配列と比較され得、２つのコンセンサス配列間の差異は、人為産物であると見なされ得る。

【００２２】

第９の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸を配列決定する方法であって、（１）第

３の態様のアダプター核酸配列の対を、二本鎖標的核酸分子の少なくとも１つの終端に連結し、それにより第１の鎖アダプター－標的核酸配列及び第２の鎖アダプター－標的核酸配列を含む二本鎖核酸分子を形成するステップと、（２）第１の鎖アダプター－標的核酸分子を増幅し、それにより複数の第１の鎖アダプター－標的核酸分子及び複数のその相補的分子を含む、増幅された生成物の第１の組を生成するステップと、（３）第２の鎖アダプター－標的核酸分子を増幅し、それにより複数の第２の鎖アダプター－標的核酸分子及び複数のその相補的分子を含む、増幅された生成物の第２の組を生成するステップと、（４）増幅された生成物の第１の組を配列決定し、それにより増幅された生成物の第１の組のコンセンサス配列を得るステップと、（５）増幅された生成物の第２の組を配列決定し、それにより増幅された生成物の第２の組のコンセンサス配列を得るステップとを含む、方法に関する。

【００２３】

第９の態様の実施形態において、増幅された生成物の第２の組は、増幅された生成物の第１の組から区別可能であり得る。増幅は、ＰＣＲによって、多置換増幅によって、または等温増幅によって実行され得る。第９の態様の実施形態において、本方法は、ステップ（１）の後に、二本鎖核酸分子を、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを別の化学構造に変化させる少なくとも１つの酵素（例えば、グリコシラーゼ）と接触させるステップを更に含む。二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対と同一であってもよい。二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対とは異なってもよい。実施形態において、アダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され得、標的ＤＮＡ分子のＤＮＡ配列の一部分に対応するプライマーは、ＤＮＡ分子を増幅するために利用され得る。第９の態様の実施形態において、第１の鎖アダプター－標的核酸配列は、５’から３’の順で、（ａ）少なくとも１つの修飾ヌクレオチドまたは少なくとも１つの脱塩基部位を含む第１のアダプター核酸配列、（ｂ）二本鎖標的核酸の第１の鎖、及び（ｃ）第２のアダプター核酸配列を含む。第９の態様の実施形態において、第２の鎖アダプター－標的核酸配列は、３’から５’の順で、（ａ）第１のアダプター核酸配列、（ｂ）二本鎖標的核酸の第２の鎖、及び（ｃ）第２のアダプター核酸配列を含む。二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対とは異なってもよい。二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、第１のＳＭＩドメインを有し、二本鎖標的核酸配列の第２の終端に連結されたアダプター核酸配列の対は、第２のＳＭＩドメインを有し、第１のＳＭＩドメインは、第２のＳＭＩドメインとは異なってもよい。第９の態様の実施形態において、第１の鎖アダプター－標的核酸配列は、５’から３’の順で、（ａ）少なくとも１つの修飾ヌクレオチドまたは少なくとも１つの脱塩基部位、及び第１のＳＭＩドメインを含む第１のアダプター核酸配列、（ｂ）二本鎖標的核酸の第１の鎖、ならびに（ｃ）第２のＳＭＩドメインを含む第２のアダプター核酸配列を含む。実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、８－オキソ－Ｇであり得るとき、第２のアダプター核酸配列は、８－オキソ－Ｇに対応する位置にシトシンを含む。第９の態様の実施形態において、第２の鎖アダプター－標的核酸配列は、３’から５’の順で、（ａ）第１のＳＭＩドメインを含む第１のアダプター核酸配列、（ｂ）二本鎖標的核酸の第２の鎖、及び（ｃ）第２のＳＭＩドメインを含む第２のアダプター核酸配列を含む。実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドは、８－オキソ－Ｇであり得、第２のアダプター核酸配列は、８－オキソ－Ｇに対応する位置にシチジンを含む。実施形態において、ステップ（２）またはステップ（３）の増幅中に、少なくとも１つの脱塩基部位が、対応する増幅された生成物中のチミジンへの増幅時に変換され得、ＳＤＥの導入をもたらす。第９の態様の実施形態において、ステップ（２）またはステップ（３）の増幅中に、少なくとも１つの修飾ヌクレオチド部位が、対応する増幅された生成物中のアデノシンをコードする。

【００２４】
第１０の態様において、本発明は、区別可能な増幅生成物が、個々のＤＮＡ分子の二本の鎖の各々から得られ得、増幅された生成物の第１の組のコンセンサス配列が、増幅された生成物の第２の組のコンセンサス配列と比較され得、２つのコンセンサス配列間の差異が、人為産物と見なされ得る、方法に関する。
【００２５】
第１０の態様の実施形態において、増幅された生成物は、同一のＳＭＩ配列を共有しているために、同一の初期ＤＮＡ分子から生じていることが決定され得る。実施形態において、増幅された生成物は、ＳＭＩアダプターライブラリ合成の時点で、かつそれと組み合わせて生成されたデータベースに基づいて、互いに対応することが既知であり得る、別個のＳＭＩ配列を担持しているために、同一の初期ＤＮＡ分子から生じていることが決定され得る。実施形態において、増幅された生成物は、ＳＤＥによって導入された配列差異の少なくとも１つのヌクレオチドを介して、同一の初期二本鎖ＤＮＡ配列の別個の鎖から生じていることが決定され得る。
【００２６】
第１１の態様において、本発明は、区別可能な増幅生成物が、個々のＤＮＡ分子の二本の鎖の各々から得られ得、単一ＤＮＡ分子の二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの一本に対応する増幅された生成物から得られる配列が、二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの二本目に対応する増幅された生成物と比較され、２つの配列間の差異が、人為産物と見なされ得る、方法に関する。
【００２７】
第１２の態様において、本発明は、単一ＤＮＡ分子の二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの一本に対応する増幅された生成物から得られる配列が、二本の初期ＤＮＡ鎖のうちの二本目に対応する増幅された生成物と比較され、２つの配列間にいかなる差異も特定されないとき、区別不可能な増幅生成物が、個々のＤＮＡ分子の二本の鎖から得られ得る、方法に関する。
【００２８】
第１２の態様の実施形態において、増幅された生成物は、ＳＭＩアダプターライブラリ合成の時点で、かつそれと組み合わせて生成されたデータベースに基づいて、同一のＳＭＩ配列を共有しているために、同一の初期二本鎖ＤＮＡ分子から生じていることが決定され得る。実施形態において、増幅された生成物は、ＳＤＥによって導入された配列差異の少なくとも１つのヌクレオチドを介して、同一の初期二本鎖ＤＮＡ配列の別個の鎖から生じていることが決定され得る。実施形態において、本方法は、ＤＮＡ二本鎖のそれらの構成要素の一本鎖への熱融解または化学融解後に、単一分子希釈のステップを更に含む。二本の元々対合した鎖が同一の容器を共有する可能性が小さく有り得るように、一本鎖は、複数の物理的に分離された反応チャンバ内へと希釈され得る。物理的に分離された反応チャンバは、容器、管、ウェル、及び少なくとも１対の非連通液滴から選択され得る。実施形態において、ＰＣＲ増幅は、好ましくは異なるタグ配列を担持する各チャンバのためのプライマーを使用して、物理的に分離された各反応チャンバに実行され得る。実施形態において、各タグ配列は、ＳＤＥとして動作する。実施形態において、同一の初期ＤＮＡの二本の鎖に対応する一連の対合した配列は、互いに比較され得、一連の生成物からの少なくとも１つの配列が、初期ＤＮＡ分子の正確な配列を表す可能性が最も高いものとして選択され得る。初期ＤＮＡ分子の正確な配列を表す可能性が最も高いものとして選択される生成物は、少なくとも一部には、二本のＤＮＡ鎖から得られる生成物間に最小数のミスマッチを有するために選択され得る。初期ＤＮＡ分子の正確な配列を表す可能性が最も高いものとしてとして選択される生成物は、少なくとも一部には、参照配列と比較して最小数のミスマッチを有するために選択され得る。
【００２９】
第１３の態様において、本発明は、少なくとも２対のアダプター核酸配列を含む組成物に関し、アダプター核酸配列の第１の対は、プライマー結合ドメイン、鎖定義要素（ＳＤＥ

）、及び連結ドメインを含み、アダプター核酸配列の第２の対は、プライマー結合ドメイン、単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメイン、及び連結ドメインを含む。

【００３０】

第１４の態様において、本発明は、（１）プライマー結合ドメインと、ＳＤＥとを含む、アダプター核酸配列の第１の対と、（２）二本鎖標的核酸と、（３）プライマー結合ドメインと、単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインとを含む、アダプター核酸配列の第２の対とを含む、二本鎖複合化核酸に関し、アダプター核酸分子の第１の対は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され得、アダプター核酸分子の第２の対は、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結され得る。第１４の態様の実施形態において、アダプター核酸配列の第１の対及び／またはアダプター核酸分子の第２の対は、連結ドメインを更に含み得る。

【００３１】

第１５の態様において、本発明は、第１のアダプター核酸配列及び第２のアダプター核酸配列を含む、二本鎖標的核酸分子の配列決定において使用するためのアダプター核酸配列の対に関し、各アダプター核酸配列は、プライマー結合ドメイン、ＳＤＥ、連結ドメインを含み、第１のアダプター核酸配列のＳＤＥは、第２のアダプター核酸配列のＳＤＥと少なくとも部分的に非相補的であり得る。

【００３２】

第１６の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、二本鎖標的核酸分子の第２の第２の終端に連結された、第１の態様のアダプター核酸分子の対を含む、二本鎖環状核酸に関する。

【００３３】

第１７の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され、二本鎖標的核酸分子の第２の第２の終端に連結された、第３の態様のアダプター核酸分子の対を含む、二本鎖環状核酸に関する。

【００３４】

第１８の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された第１の態様のアダプター核酸分子の対と、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたプライマー結合ドメインのアニールされた対とを含む、二本鎖環状核酸に関し、プライマー結合ドメインのアニールされた対は、アダプター核酸分子の対に連結され得る。

【００３５】

第１９の態様において、本発明は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結された第３の態様のアダプター核酸分子の対と、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結されたプライマー結合ドメインのアニールされた対とを含む、二本鎖環状核酸に関し、プライマー結合ドメインのアニールされた対は、アダプター核酸分子の対に連結され得る。

【００３６】

第２０の態様において、本発明は、（１）プライマー結合ドメインと、鎖定義要素（ＳＤＥ）と、単一分子識別子（ＳＭＩ）ドメインとを含む、アダプター核酸配列の対と、（２）二本鎖標的核酸と、（３）アニールされた対プライマー結合ドメインとを含む、二本鎖複合化核酸に関し、アダプター核酸配列の対は、二本鎖標的核酸分子の第１の終端に連結され得、アニールされた対プライマー結合ドメインは、二本鎖標的核酸分子の第２の終端に連結され得る。第２０の態様の実施形態において、アダプター核酸配列の対及び／またはアニールされた対プライマー結合ドメインは、連結ドメインを更に含む。

【００３７】

二本鎖配列決定は、ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１及びＳｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ，ＰＮＡＳ２０１２に更に記載され、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００３８】

上記の態様及び実施形態のいずれも、以下の本発明の具体的、非限定的な実施例／実施形態を含む、本明細書において要約、図面、及び／または発明を実施するための形態に開示されるいかなる他の態様または実施形態とも組み合わせることができる。

【００３９】
本発明の他の特徴、利点、修正は、図面、発明を実施するための形態、及び特許請求の範囲から明らかとなるだろう。上述の記述は、説明が意図され、本開示の範囲の限定は意図されない。
【図面の簡単な説明】
【００４０】
上記及び更なる特徴は、添付の図面と組み合わせて考慮されるとき、以下の発明を実施するための形態からより明確に理解されるだろう。
【００４１】
【図１Ａ－１Ｉ】元来記載されているＹ形アダプターを使用する、二本鎖配列決定を説明する。一例示的なＹ形アダプター（図１Ａ）、そのようなアダプターに連結された二本鎖ＤＮＡ分子（図１Ｂ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図１Ｃ及び図１Ｄ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図１Ｅ～図１Ｉ）が示される。
【図２Ａ－２Ｋ】非相補的「バブル」アダプターを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。一例示的な「バブル」アダプター（図２Ａ及び図２Ｈ～図２Ｋ）、図２Ａのアダプターに連結された二本鎖ＤＮＡ分子（図２Ｂ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図２Ｃ及び図２Ｄ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図２Ｅ～図２Ｇ）が示される。
【図３Ａ－３Ｇ】共同で分子識別子及び非対称導入鎖定義要素（ＳＤＥ）としての役割を果たす非相補的「バブル」形単一分子識別子（ＳＭＩ）を有するアダプターを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。一例示的な「バブル」アダプター（図３Ａ）、図３Ａのアダプターに連結された二本鎖ＤＮＡ分子（図３Ｂ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図３Ｃ及び図３Ｄ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図３Ｅ及び図３Ｆ）が示される。図３Ｇは、特定のＳＭＩ配列及びそれらの対応する非相補的パートナーによってグループ化される図３Ｅ及び図３Ｆの配列決定読み取りを示す。
【図４Ａ－４Ｈ】最初は対合した鎖ＤＮＡを形成するが、その後、後続する生化学反応後にＤＮＡミスマッチにされる、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を有するアダプターを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）を含む一例示的なアダプター（図４Ａ）、図４Ａのアダプターに連結された二本鎖ＤＮＡ分子（図４Ｂ）が示され、図４Ｃは、８－オキソ－Ｇ塩基を置き換える脱塩基部位を作製し、それによりアダプター内にミスマッチを作製する、グリコシラーゼでの処置の後の図４Ｂの二本鎖ＤＮＡ分子、それに由来するＰＣＲ生成物（図４Ｄ及び図４Ｅ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図４Ｆ～図４Ｈ）を示す。
【図５Ａ－５Ｈ】ＤＮＡ分子の反対の末端上に異なるプライマー部位を導入するための二本鎖配列決定アダプター設計の組み合わせを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。一例示的な二本鎖配列決定アダプター（図５Ａ）及び「標準」アダプター（図５Ｂ）、図５Ａ及び図５ＢのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるとき、３種類の二本鎖ＤＮＡ分子が生成され（図５Ｃ～図５Ｅ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図５Ｆ及び図５Ｇ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図５Ｈ）が示される。
【図６Ａ－６Ｉ】非ペアードエンドプラットフォーム上での２つの読み取りを可能にする二本鎖配列決定アダプター設計の組み合わせを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。「標準」アダプター（図６Ａ）及び一例示的な二本鎖配列決定アダプター（図６Ｂ）、図６Ａ及び図６ＢのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるときに生成される好ましい二本鎖ＤＮＡ分子（図６Ｃ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図６Ｄ及び図６Ｅ、「上部」鎖（図６Ｆ）及び「下部」鎖（図６Ｇ）に由来する配列決定鋳型鎖の配置、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図６Ｈ及び図６Ｉ）が示される。
【図７Ａ－７Ｉ】非ペアードエンドプラットフォーム上での２つの読み取りを可能にする二本鎖配列決定アダプター設計の組み合わせを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。縮重または半縮重ＳＭＩ配列を更に含むアダプター（図７Ａ）及び一例示的な二本

鎖配列決定アダプター（図７Ｂ）、図７Ａ及び図７ＢのアダプターがＤＮＡ分子に連結されるときに生成される好ましい二本鎖ＤＮＡ分子（図７Ｃ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図７Ｄ及び図７Ｅ、「上部」鎖（図７Ｆ）及び「下部」鎖（図７Ｇ）から得られる配列決定鋳型鎖の配置、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図７Ｈ及び図７Ｉ）が示される。

【図８Ａ－８Ｊ】非対称ＳＭＩを有するＹ形二本鎖配列決定アダプターを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。一例示的な二本鎖配列決定アダプター（図８Ａ）、図８ＡのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるときに生成される二本鎖ＤＮＡ分子（図８Ｂ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図８Ｃ及び図８Ｄ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図８Ｅ及び図８Ｆ）が示される。図８Ｇは、特定のＳＭＩ配列及びそれらの対応する非相補的パートナーによってグループ化される図８Ｅ及び図８Ｆ配列決定読み取りを示す。図８Ｈ～図８Ｊは、この実施形態において有用である代替的なアダプター設計を示す。

【図９Ａ－９Ｇ】遊離一本鎖尾部領域内に位置する非対称ＳＭＩを有するＹ形またはループ形二本鎖配列決定アダプターを使用する、本発明の二本鎖配列決定を説明する。一例示的な二本鎖配列決定アダプター（図９Ａ）、図９ＡのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるときに生成される好ましい二本鎖ＤＮＡ分子（図９Ｂ）、それに由来するＰＣＲ生成物（図９Ｃ及び図９Ｄ）が示され、配列決定プライマー部位及びインデックスプライマー部位の配向は、図９Ｅ及び図９Ｆに示される。図９Ｇは、図９Ｅ及び図９Ｆに示される方法で得られるグループ化配列決定読み取りを示す。

【図１０Ａ－１０Ｅ】二本鎖配列決定に必要な全ての要素が２つの対合したアダプター内ではなく単一分子内に含まれる、本発明の二本鎖配列決定を説明する。図１０Ａは、二本鎖ＤＮＡ分子の連結前のそのような構成を示し、図１０Ｂは、二本鎖ＤＮＡ分子の連結後の図１０Ａの構成を示す。図１０Ｃ～図１０Ｅは、この実施形態のいくつかの代替形態を示す。

【図１１Ａ－１１Ｄ】非対称化学標識及び鎖単離を通した二本鎖配列決定を説明する。化学タグ（ここではビオチン）を有する一例示的な二本鎖配列決定アダプター（図１１Ａ）及び第２のアダプター（図１１Ｂ）、図１１Ａのアダプター及び図１１ＢのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるときに生成される好ましい二本鎖ＤＮＡ分子（図１１Ｃ）、ならびに化学タグを含む鎖が他方の鎖から分離され、各々が独立して増幅され、配列決定される、この方法の更なるステップ（図１１Ｄ）が示される。

【図１２Ａ－１２Ｍ】ニック翻訳によってＳＤＥが導入される、本発明の二本鎖配列決定を説明する。図１２Ａ～図１２Ｄは、ニック翻訳後にＳＤＥが失われる、アダプター設計を示す。この実施形態において有用であるＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）適合アダプター（図１２Ｅ及び図１２Ｆ）、図１２Ｅ及び図１２ＦのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるときに生成される好ましい二本鎖ＤＮＡ分子（図１２Ｇ）、末端ヌクレオチドの誤組み込み（図１２Ｈ）、それに由来し、ミスマッチを示す延長生成物（図１２Ｉ）、図１２Ｉの分子に由来するＰＣＲ生成物（図１２Ｊ及び図１２Ｋ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図１２Ｌ及び図１２Ｍ）が示される。

【図１３Ａ－１３Ｇ】ニック翻訳後にＳＤＥが導入される、本発明の二本鎖配列決定を説明する。脱リン酸化５’末端を含む二本鎖配列決定アダプター（図１３Ａ）、図１３ＡのアダプターがｄｓＤＮＡ分子に連結されるときに生成される二本鎖ＤＮＡ分子（図１３Ｂ）、鎖置換合成が生じた後の構造（図１３Ｃ）、いかなるミスマッチも示さない図１３Ｃの構造の延長生成物（図１３Ｄ）、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ及び適切なＡＰエンドヌクレアーゼでの処置後にギャップを含む構造（図１３Ｅ）、ギャップがミスマッチヌクレオチドで充填され、連結閉鎖された後の図１３Ｅの構造（図１３Ｆ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図１３Ｇ）が示される。

【図１４Ａ－１４Ｉ】配列決定されるＤＮＡ分子内に、ポリメラーゼ延長によってミスマッチが導入される、本発明の二本鎖配列決定を説明する。配列決定される二本鎖ＤＮＡ分子（図１４Ａ）、５’オーバーハングを残すエンドヌクレアーゼで処理されている図１４

Ａの二本鎖ＤＮＡ分子（図１４Ｂ）が示され、図１４Ｂの部分的二本鎖ＤＮＡ分子は、２つのミスマッチを導入するように処理され（図１４Ｃ）、今では各ミスマッチに「バブル」を含む図１４Ｃの構造の延長生成物（図１４Ｄ）、アダプターの対が図１４Ｅに示され、図１４Ｆの構造は、図１４Ｅのアダプターが図１４ＤのＤＮＡ分子に連結されるときに生成され、図１４Ｆの分子に由来するＰＣＲ生成物（図１４Ｇ及び図１４Ｈ）、ならびにこのようにして生成された配列決定読み取り（図１４Ｉ）が示される。

【発明を実施するための形態】

【００４２】

二本鎖配列決定は当初、二本のＤＮＡ鎖の別個の増幅のための非対称プライマー結合部位の使用について記載された。非対称プライマー結合部位の使用を必要としない、二本鎖配列決定に対する代替的かつ優れたアプローチが、本明細書に記載される。代わりに、配列決定されるアダプター内もしくはＤＮＡ分子内の別の場所の二本の鎖間のＤＮＡ配列内への少なくとも１つのヌクレオチドの差異（例えば、ミスマッチ、追加のヌクレオチド、及びヌクレオチドの取り除き）の作製、少なくとも１つのヌクレオチドの修飾ヌクレオチド（例えば、塩基を欠如するか、もしくは非定型塩基を有するヌクレオチド）での置き換え、ならびに／または二本の鎖を物理的に分離することができる少なくとも１つの標識ヌクレオチド（例えば、ビオチン化ヌクレオチド）の包含によって、二本の鎖間の非対称が導入され得る。表１は、本発明に開示される二本鎖配列決定のためのアダプターを組み立てるための、例示的な選択肢を説明する。

【表１】
表１：

鎖定義要素（ＳＤＥ）	単一分子識別子（ＳＭＩ）
少なくとも１つのヌクレオチドのミスマッチは、アダプター（すなわち、「バブルアダプター」）内の内部に存在する	バブルに隣接するＳＭＩ バブル自体内のＳＭＩ ＳＭＩは、第２のアダプター「内在性ＳＭＩ」（剪断点）内にある
「マッチした」配列は、後続するステップによってミスマッチに変換される －－ミスマッチは、酵素処理（例：８－オキソ－Ｇ）によって作製される －－ミスマッチは、ポリメラーゼによって導入される（例：ニック翻訳）	バブルに隣接するＳＭＩ バブル自体内のＳＭＩ ＳＭＩは、第２のアダプター「内在性ＳＭＩ」（剪断点）内にある
異なる配列が、アダプター内に存在する尾部（すなわち、「Ｙアダプター」）	アダプター尾部に隣接するＳＭＩ 尾部自体内のＳＭＩ ＳＭＩは、第２のアダプター「内在性ＳＭＩ」（剪断点）内にある
二本の鎖は、（例えば、他方ではなく、一方の鎖上のビオチンで）物理的に分離される	アダプター自体内のＳＭＩ ＳＭＩは、第２のアダプター「内在性ＳＭＩ」（剪断点）内にある
二本の鎖は、異なる長さである －一方のアダプター鎖内の内部「ループ」 －－追加のヌクレオチドが、他方ではなく、一方の鎖に添加される	アダプター自体内のＳＭＩ ＳＭＩは、第２のアダプター「内在性ＳＭＩ」（剪断点）内にある

注記：
（i）これらのアダプター設計の全てには、追加で任意の要素が追加されてもよい（例えば、二本のアダプター鎖がともに結合され、様々な構成でＰＣＲプライマー部位を利用する）
（ii）ＳＭＩが使用されるときは常に、それは、ランダム／縮重、半ランダム／半縮重、または事前定義されたものであってもよい。また、ＳＭＩが二本の鎖を含む場合、二本の鎖は、相補的、非相補的、または部分的に相補的のいずれであってもよい。
（iii）少なくとも１つのＳＤＥ及び少なくとも１つのＳＭＩを含有する、完全に適応した分子複合体は、結合前にアダプター及び／または連結されるＤＮＡ内に存在しても、連結後に生成されても、これらの組み合わせであってもよい。

【００４３】
本明細書に記載される、二本鎖配列決定のためのアダプター設計及びアプローチは、相補的ＳＭＩ配列を有するＹ－アダプターの使用には依存しない。
【００４４】
いくつかの設計は、シングルエンド配列決定に直接適用することができる。本明細書に開示されるアプローチは、２つの一般的な特徴を共有し、つまり、（１）個々の二本鎖ＤＮＡ分子の各単鎖の半分は、究極的には二本の鎖の各々から得られる配列が同一のＤＮＡ二本鎖に関連すると認識され得るような方法で標識され、かつ（２）個々の二本鎖ＤＮＡ分子の各単鎖は、究極的には二本の鎖の各々から得られる配列が反対の鎖から得られるものとは別個のものであると認識され得るような方法で標識される。これらのそれぞれの機能を果たす分子特徴は、本明細書では単一分子識別子（ＳＭＩ）及び鎖定義要素（ＳＤＥ）と呼ばれる。
【００４５】

これが、第１に開示される、異なるバージョンの内部非相補的「バブル」配列を介した鎖定義非対称の導入である。１つのそのような実施形態は、増幅プライマー部位内に位置しない非相補的「バブル」配列の導入を伴い、その後、「バブル」の二本の鎖から得られる別個の配列は、二本の鎖の別個の標識をもたらすだろう。

【００４６】

ＳＤＥとしての修飾ＤＮＡ塩基の使用を通して、鎖定義非対称が、適応したＤＮＡ分子内にいかに同様に導入され得るかが、本明細書に開示される。実施例において、非対称は最初は、相補的配列をもたらす１つ以上のヌクレオチド類似体を含めることによって導入されるが、これは後続して非相補的配列に変換され得る。

【００４７】

非Ｙ形非対称アダプター設計が、各ＤＮＡ分子の反対の末端上に異なるプライマー配列を必要とする配列決定プラットフォームに適用され得る方法もまた、開示される。

【００４８】

異なる種類のＳＭＩタグ及びＳＤＥが、読み取り長さ及びＳＭＩタグ付け多様性を最大化するために、アダプターを含有する２つの異なるプライマー－部位内で分布され得る代替的な方法が、本明細書に開示される。

【００４９】

ペアードエンド配列決定に容易に受け入れられるＹ形またはループ形尾部を含むが、ＳＭＩタグは相補的配列ではないため、著しい設計柔軟性を可能にする、二本鎖配列決定アダプターのための追加の設計もまた、本明細書に開示される。

【００５０】

そのような非対称のそのような導入が、二本鎖配列決定によるエラー訂正のために、二本のＤＮＡ鎖に由来する生成物の区別をいかに可能にするかが、本明細書に実証される。いくつかの実施形態が、シングルエンド読み取りプラットフォーム上での二本鎖配列決定の実行をいかに促進するかについての記述が、本明細書に更に実証される。

【００５１】

プライマー部位ならびに単一アダプターによる二本鎖配列決定のためのＳＭＩ部位及びＳＤＥ部位を導入して、環状アダプター－ＤＮＡ分子複合体を形成するための方法が、更に開示される。

【００５２】

二本の鎖の差次的な配列に基づく分子タグ付けではなく、独立した分析のための、別個の反応区画への対合した鎖の物理的／機械的分離を可能にする非対称化学タグ付けに依存する、ＳＤＥの導入に対する全く異なるアプローチが、更に開示される。

【００５３】

特にＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（登録商標））配列決定プラットフォームのためのアダプター設計の例が、本明細書に開示される。

【００５４】

二本鎖分子の各末端の両方の単鎖に連結され得るアダプターの変異形、及び最終調製分子内に必要なＳＭＩ及びＳＤＥ要素の両方を保持する「ニック翻訳」後の一本鎖連結を可能にする設計が、本明細書に開示される。

【００５５】

ＳＤＥが、アダプター連結とは独立した方法で、ＤＮＡ分子自体内にいかに組み込まれ得るかが、本明細書に開示される。

【００５６】

最後に、前述の一本鎖コンセンサス配列（ＳＳＣＳ）生成に対する必要性を排除する、いかなる二本鎖アダプター設計とも使用することができる、二本鎖配列決定のための合理化された代替的なアルゴリズムのアプローチが、本明細書に開示される。

【００５７】

いくつかの実施形態において、ヌクレオチド配列の一部分は、「縮重」であり得る。縮重配列において、各位置は、任意のヌクレオチドであり得、すなわち、「Ｘ」、「Ｎ」、ま

たは「Ｍ」によって表される各位置は、アデニン（Ａ）、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、チミン（Ｔ）、またはウラシル（Ｕ）、あるいは任意の他の天然もしくは非天然ＤＮＡもしくはＲＮＡヌクレオチドまたはヌクレオチド様物質または塩基対合特性を有する類似体（例えば、キサントシン、イノシン、ヒポキサンチン、キサンチン、７－メチルグアニン、７－メチルグアノシン、５，６－ジヒドロウラシル、５－メチルシトシン、ジヒドウリジン、イソシトシン、イソグアニン、デオキシヌクレオシド、ヌクレオシド、ペプチド核酸、ロックド核酸、グリコール核酸、及びトレオース核酸）であり得る。あるいは、ヌクレオチド配列の一部分は、配列が、少なくとも１つの事前定義されたヌクレオチド、または少なくとも１つの事前定義されたポリヌクレオチドと、任意のヌクレオチドであり得る位置、または可能性のあるヌクレオチドのサブセットの組み合わせのみを含む１つ以上の位置とを含むように、完全に縮重でなくてもよい。可能性のあるヌクレオチドのサブセットの組み合わせとしては、以下、Ａ、Ｃ、Ｇ、及びＴのうちのいずれか３つ；以下、Ａ、Ｃ、Ｇ、Ｔ、及びＵのうちのいずれか２つ；またはＵプラス、以下、Ａ、Ｃ、Ｇ、及びＴのうちのいずれか３つを挙げることができる。そのようなサブセットの組み合わせは、任意の他の天然もしくは非天然ＤＮＡもしくはＲＮＡヌクレオチドまたはヌクレオチド様物質または塩基対合特性を有する類似体を更に含んでも、それで置換されてもよい。分子の集団におけるこれらのヌクレオチドのうちのいずれかの間の化学量論比は、およそ１：１または任意の他の比率であり得、本明細書において、そのような配列は、「半縮重」と呼ばれる。特定の実施形態において、「半縮重」配列とは、２つ以上の配列の組を指し、２つ以上の配列は、少なくとも１つのヌクレオチド位置で異なる。実施形態において、半縮重配列は、全てのヌクレオチドがその隣接するヌクレオチド（すぐ隣接するか、または２つ以上のヌクレオチド以内）に関してランダムではない配列である。実施形態において、本明細書で使用される場合、縮重及び半縮重という用語は、本出願が属する当業者によって一般に理解されるもの、及び本出願が属する当該技術分野において一般に使用されるものと同一の意味を有し得、そのような当該技術分野は、その全体が参照により組み込まれる。

【００５８】

実施形態において、配列は、各位置に全ての可能性のある塩基を含有する必要はない。縮重または半縮重ｎ量体配列は、ポリメラーゼ媒介法によって生成されても、既知の配列の個々のオリゴヌクレオチドのライブラリを調製し、アニールすることによって生成されてもよい。あるいは、いかなる縮重または半縮重ｎ量体配列も、標的ＤＮＡ源とは異なる任意の代替的な供給源に由来する、ランダムまたは非ランダムに断片化された二本鎖ＤＮＡ分子であってもよい。いくつかの実施形態において、代替的な供給源は、細菌に由来するゲノムもしくはプラスミド、標的ＤＮＡの生物以外の生物、またはそのような代替的な生物もしくは供給源の組み合わせである。ランダムまたは非ランダムに断片化されたＤＮＡは、ＳＭＩアダプター内に導入されて、可変タグとしての役割を果たし得る。これは、酵素連結または当該技術分野において既知である任意の他の方法を通して達成することができる。

【００５９】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、別段文脈が明確に指示しない限り、単数形の「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、及び「その」は、複数形の参照対象を含む。

【００６０】

具体的に述べられるか、または文脈から明らかでない限り、本明細書で使用される場合、「または」という用語は、包括的であることが理解され、「または」及び「及び」の両方を網羅する。

【００６１】

「１つ以上の」、「少なくとも１つの」、及び「２つ以上の」などの用語は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０

、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、もしくは１５０、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、またはそれ以上、及びその間の任意の数を含むが、これらに限定されないことが理解される。

【００６２】

逆に、「以下」という用語は、述べられる値未満の各値を含む。例えば、「１００以下のヌクレオチド」は、１００、９９、９８、９７、９６、９５、９４、９３、９２、９１、９０、８９、８８、８７、８６、８５、８４、８３、８２、８１、８０、７９、７８、７７、７６、７５、７４、７３、７２、７１、７０、６９、６８、６７、６６、６５、６４、６３、６２、６１、６０、５９、５８、５７、５６、５５、５４、５３、５２、５１、５０、４９、４８、４７、４６、４５、４４、４３、４２、４１、４０、３９、３８、３７、３６、３５、３４、３３、３２、３１、３０、２９、２８、２７、２６、２５、２４、２３、２２、２１、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１、及び０のヌクレオチドを含む。

【００６３】

「複数の」、「少なくとも２つの」、「２つ以上の」、及び「少なくとも第２の」などの用語は、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１０１、１０２、１０３、１０４、１０５、１０６、１０７、１０８、１０９、１１０、１１１、１１２、１１３、１１４、１１５、１１６、１１７、１１８、１１９、１２０、１２１、１２２、１２３、１２４、１２５、１２６、１２７、１２８、１２９、１３０、１３１、１３２、１３３、１３４、１３５、１３６、１３７、１３８、１３９、１４０、１４１、１４２、１４３、１４４、１４５、１４６、１４７、１４８、１４９、もしくは１５０、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、またはそれ以上、及びその間の任意の数を含むが、これらに限定されないことが理解される。

【００６４】

本明細書を通して、「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語、または「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｅｓ）」もしくは「（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」などの変異形は、述べられる要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群の包含を暗示するが、いかなる他の要素、整数、もしくはステップ、または要素、整数、もしくはステップの群の排除も暗示しないことが理解されるだろう。

【００６５】

具体的に述べられるか、または文脈から明らかでない限り、本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当該技術分野の通常の許容範囲内、例えば、平均値の２標準偏差以

内にあることが理解される。約は、述べられる値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、０．０１％、または０．００１％以内にあることが理解され得る。別段文脈から明確でない限り、本明細書に提供される全ての数値は、「約」という用語によって修飾される。

【００６６】

本発明の実施または試験においては、本明細書に記載される方法及び材料と類似または同等の方法及び材料を使用することができるものの、好適な方法及び材料が後述される。本明細書に言及される全ての出版物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。本明細書に引用される参考文献は、主張される本発明に対する先行技術であるとは認められない。矛盾が生じた場合、定義を含む本明細書が制御するものとする。加えて、材料、方法、及び実施例は説明的なものに過ぎず、限定的であることは意図されない。

【００６７】

別段定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本出願が属する当業者によって一般に理解されるもの、及び本出願が属する当該技術分野において一般に使用されるものと同一の意味を有し、そのような当該技術分野は、その全体が参照により組み込まれる。

【００６８】

上記の態様及び実施形態のうちのいずれも、以下の実施例／実施形態を含む、要約、図面、及び／または発明を実施するための形態の節に開示されるいかなる他の態様または実施形態とも組み合わせることができる。

【００６９】

本発明の具体的、非限定的な実施例／実施形態

二本鎖配列決定にＹ形アダプターを使用することによる不利益

Ｙ形アダプターによる二本鎖配列決定は、元来記載されているように（ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１及びＳｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ，ＰＮＡＳ２０１２、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）、ペアードエンド配列決定読み取りによって最も容易に実行される。しかしながら、全ての配列決定プラットフォームが、ペアードエンド配列決定読み取りと適合するわけではない。以前に記載されているＹ形またはループ形アダプター（非対称プライマー部位がアダプターの連結可能な末端の反対の一本鎖領域内に位置する）を使用する場合、シングルエンド配列決定読み取りによる二本鎖配列決定は、ＤＮＡ分子を通した配列決定読み取りの完全な延長を必要とする。これは、配列決定読み取りを二本の誘導体鎖から区別するために必要とされる、分子の両末端のＳＭＩタグ配列を捕捉するために必要である。この必要性は、以下の通り説明される。

【００７０】

以前に記載されているＹ形二本鎖配列決定アダプターを、図１Ａに示す。図１Ａにおいて、特徴Ａ及びＢは、異なるプライマー結合部位を表し、α及びα’は、縮重または半縮重配列及びその逆相補体を表し、βは、異なる縮重または半縮重配列を表し、α及びβは、縮重または半縮重配列のプール内の２つの任意配列である。合わせて、これらは、単一分子識別子（ＳＭＩ）としての役割を果たす。

【００７１】

元来記載されているように（例えば、ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１）、ＳＭＩは、より大きなプール内の個々の分子を区別するために使用される。任意の２つのＤＮＡ分子が同一のＳＭＩ配列で標識される可能性が統計学的に低いように、アダプターライブラリにおいてコードされるこれらの十分に大きな集団を有することが必要である。また、以前に記載されているように、ライブラリ生成中に導入される断片化部位は、特定の状況において、独立して、またはアダプター配列内にコードされる外来性ＳＭＩとの組み合わせでのいずれかで、内在性ＳＭＩとして機能し得る。本開示において、異なるアダプター設計の実施例において外来性ＳＭＩドメインのみが示されるが、外来性ＳＭＩドメインは、内在性ＳＭＩとして作用するＤＮＡ剪断点で置換されても、またはそれによって増強されても

よいことが理解され（かつ本明細書に含まれ）る。
【００７２】
アダプターが、あるライブラリからの二本鎖ＤＮＡ断片の各末端に連結された後、図１Ｂに示される構造が現れるだろう。後続する図において誘導体を追跡する明確さのために、後続する図中の誘導体、特定のＤＮＡ挿入物の「左」末端及び「右」末端、ならびに「上部」鎖及び「下部」鎖が留意される。
【００７３】
ＰＣＲの後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物が、図１Ｃに示される。（Ｌ）及び（Ｒ）は、出発ＤＮＡ分子のそれぞれ「左」末端及び「右」末端を示す。
「上部」鎖に由来する二本鎖ＰＣＲ生成物が、図１Ｄに示される。
【００７４】
「上部」鎖生成物及び「下部」鎖生成物中、Ａ及びＢに対するα及びβの異なる配置が留意されるべきである。ペアードエンド配列決定読み取り（すなわち、各ＰＣＲ生成物のプライマー部位Ａ及びＢの両方からの読み取り）について、αタグは一方の鎖のＡ読み取りに現れ、βタグはＢ読み取りに現れ、相反の事例が他方の鎖で生じるために、各鎖に由来する生成物を区別することが可能である。図１Ｅを参照されたい。
【００７５】
上述のペアードエンド読み取りの使用は、二本鎖配列の訂正を可能にする。しかしながら、シングルエンド配列決定読み取りのみ（すなわち、特定の分子の両方の部位からではなく、プライマー部位Ａまたはプライマー部位Ｂからの読み取りのみ）の使用では、配列決定読み取りが両末端のＳＭＩ配列を捕捉するのに十分に長い場合にのみ二本鎖配列を得ることが可能である。配列決定プライマーＡを使用する場合、異なる鎖から得られる完全長の配列決定読み取り（すなわち、両方のＳＭＩ配列を含めるのに十分に長い）は、図１Ｆに示される２つの配列をもたらすだろう。同様に、完全長の配列決定読み取りを有する配列決定プライマーＢの配列決定の使用は、図１Ｇに示される以下の２つの配列を生成するだろう。上記の事例の両方において、「上部」鎖及び下部鎖由来の生成物は、反対の配向にＳＭＩを有する（一方ではα－β及び他方ではβ－α）ために、互いに区別することができる。しかしながら、両方のＳＭＩ配列を捕捉するのに十分に長い配列決定読み取りがないと、二本鎖配列決定は、シングルエンド配列決定によっては容易には実行されない。これは、２つの配列決定読み取りが各々、αタグ及びβタグの両方を含有しないためである。この問題の別の見方は、ＤＮＡ分子の末端の部分について、相補体が配列決定され得ないため、比較を行うための第２の鎖についての情報が存在しないことである。
【００７６】
これを説明するために、プライマーＡからの非完全長のシングルエンド配列決定読み取りを使用する場合に生成される２種類の配列を、図１Ｈに示す。同様に、プライマーＢからの非完全長のシングルエンド配列決定読み取りを使用する場合に生成される対応する配列を、図１Ｉに示す。図１Ｈ及び図１Ｉに示される配列決定読み取りの両方について、各ＤＮＡ断片の「左」末端及び「右」末端は、所与のプライマーで一度だけ配列決定されるため、二本鎖配列決定は達成することができないことに留意されたい。これは、それを比較するいかなる反対の鎖配列も存在しないためである。故に、増幅された分子の集団が２つの異なるプライマーの各々で配列決定された場合ですら、読み取りＡ配列及びＢ配列の特定の組が同一の誘導体分子に起源を持つことを明らかにする第２の鎖についてのいかなる情報も存在しないだろう。
【００７７】
シングルエンド配列決定の使用時、完全ＤＮＡ分子の「リードスルー」に対する必要性は、読み取り長さが限定されているいくつかの配列決定プラットフォームに技術的な課題をもたらし得る。
【００７８】
二本鎖配列決定が、シングルエンド配列決定による亜完全長の配列決定読み取りと適合するためには、代替的なアダプター設計が必要である。ペアードエンド配列決定読み取り及

びＹ形アダプター上の非対称プライマー部位の不在下では、鎖の区別を可能にするために、いくつかの他の形態の非対称が適応したＤＮＡ分子内に導入されなくてはならない。そのような設計の例を、以下に開示する。

【００７９】

非相補的「バブル」による鎖定義非対称の導入

非ペアードエンド配列決定（すなわち、「バブルアダプター」）による二本鎖配列決定を可能にする（本発明の）非Ｙ形アダプターの一例示的な設計が、図２Ａに開示される。２つのプライマー部位を有する、以前に記載されているＹ形アダプターとは異なり、逆相補体（Ｐ’）を有する単一プライマー部位（Ｐ）のみが存在する。α及び相補体α’は、縮重または半縮重単一分子識別子（ＳＭＩ）配列を表し、Ｘ及びＹは、アダプター内の隣接する相補的配列の中間に非対合の「バブル」を形成する非相補的配列のセグメントである、鎖定義要素（ＳＤＥ）の２つの半分を表す。最後に、アダプターは、連結可能な配列を有する。ＳＤＥによってこのアダプター設計内に導入される非対称は、図２Ｂ～図２Ｇに説明されるような各鎖から得られる配列決定読み取りを区別する。

【００８０】

図２Ａに示されるアダプターに類似するアダプターがＤＮＡ断片の各末端に連結した後、図２Ｂに示される構造が生成される。第２のアダプターは、第２の連結されたアダプターのＳＭＩ配列が一般に第１のアダプターのＳＭＩ配列とは異なることを説明するために、ＳＭＩ配列β及びβ’とともに示される。あるいは、同一のアダプターが、ＤＮＡ分子の両末端に連結されてもよい。

【００８１】

ＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物を図２Ｃに示し、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物を図２Ｄに示す。

【００８２】

この実施例において、プライマー部位配列は分子の両末端で同一であるため、どちらの一本鎖の半分が配列決定されるかによって、各鎖のＰＣＲ生成物のシングルエンド配列決定読み取りから、２つの異なる種類の配列の配列決定読み取りが得られるだろう。「上部」鎖のＰＣＲ生成物から得られる読み取りを図２Ｅに示し、「下部」鎖のＰＣＲ生成物から得られる読み取りを図２Ｆに示す。

【００８３】

分析のために、図２Ｇに示されるように、配列決定読み取りは、特定のＳＭＩ（この場合、αまたはβのいずれか）を含有するものによってグループ化される。ＤＮＡの所与の単一分子から生じた配列は、同一のＳＭＩ配列を有するために、ともにグループ化され得る。各ＳＭＩ群において、２種類の配列（１つはＳＤＥ　Ｘによってマークされ、１つはＳＤＥ　Ｙによってマークされる）が見られることは明らかである。これらが、反対の鎖（すなわち、「上部」及び「下部」）から得られる配列決定読み取りを定義する。例えば、ＳＭＩタグαを有する配列がともにグループ化される場合、得られる配列は、Ｘ－α－ＤＮＡ（図２Ｅ）及びＹ’－α－ＤＮＡ（図２Ｆ）である。元のＤＮＡ分子の「上部」鎖から生じる配列からなるコンセンサスは、Ｘ－α－ＤＮＡ配列をともにグループ化することによって作製することができる。同様に、「下部」鎖のコンセンサスは、Ｙ’－α－ＤＮＡ配列をともにグループ化することによって作製することができる。最後に、二本の鎖のコンセンサスは、二本の鎖から生じる配列をともに比較すること（すなわち、配列Ｘで標識されたものは、配列Ｙ’で標識されたものと比較されるだろう）によって作製することができる。合わせて、これらは、二本鎖配列決定分析の一部としての比較を可能にする。

【００８４】

ＳＭＩ配列及びＳＤＥ配列の順序を転換することによって、類似する結果を達成することができる。そのようなアダプターの一例を、図２Ｈに示す。

【００８５】

上記及びＷＯ２０１３／１４２３８９Ａに明確化されるように、いくつかの実施形態において、アダプター配列内に含有されるＳＭＩが、ＤＮＡ分子自体の剪断点配列を含む内在

性ＳＭＩ配列の代わりに取り除かれてもよい。１つのそのようなアダプター設計の構造は図２Ａに示されるものを伴うが、α及びα’は排除されるだろう。

【００８６】

いくつかの用途において、図２Ｈに示される配向が好ましい。例えば、現在Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）によって製造されているものなどのいくつかの配列決定プラットフォームにおいて、配列決定実行初期の特定の数の塩基をクラスター特定及び「不変異塩基」に使用することができ、つまり、配列決定される全ての分子内または実質的に複数の分子内で同一のものとして読み取られる塩基は、このプロセスの効率に影響を与える可能性がある。したがって、この状況において、配列決定実行の最初期の縮重または半縮重ＳＭＩ配列がより望ましくあり得る。

【００８７】

他の用途において、図２Ａに示される配向が好ましい。二本鎖配列決定についての初期の記述（すなわち、ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１）に記載されるように、相補的二本鎖ＳＭＩ配列は、一本鎖縮重もしくは半縮重配列にわたってポリメラーゼによってプライマー延長すること、または異なるＳＭＩ配列を含有するオリゴヌクレオチドを個々に合成及びアニールし、その後それらをともにプールして、多様なアダプターライブラリを作製することのいずれかによって、最も好都合に生成することができる。ポリメラーゼ延長法が選択される場合、アダプターの連結－ドメイン末端上にＳＭＩ配列を有することが、延長反応を促進するのに有利であり得る。Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）によって製造されるものなどの特定の配列決定プラットフォーム上では、アダプターの連結不可能な末端に修飾塩基を有する３’オーバーハングは、ポリメラーゼによる合成と容易には適合しない可能性があるため、ポリメラーゼ延長アプローチによるアダプターの合成は、図２Ａに示されるように、アダプターの連結可能な末端に向かって位置するＳＭＩ配列で最も容易に実行される。

【００８８】

このアプローチがいかに実施されるかについての一具体例として、以下のアダプターの対を使用し得るＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）配列決定プラットフォームを考慮する。

アダプターＰ１

【化１】

5′　　CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT 3′（配列番号１）

3′ T*T*GGTGATGCGGAGGCGAAAGGAGAGATACCCGTCAGCCACTA 5′(配列番号２）

アダプターＡ

【化２】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG 3′（配列番号３）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC 5′（配列番号４）

アスタリスク「＊」は、ホスホロチオエート結合を表す。

【００８９】

配列決定プライマーはアダプターＡにアニールし、故にアダプターの３’末端から開始するＤＮＡ断片から配列情報が読み取られる。アダプターＡは、以下の配列を使用して、図２に図示されるアプローチに適用可能な形態に変換され得る。

【化３】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **GCGC NNNN G** 3′ (配列番号５）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **ATAT MMMM C** 5′（配列番号６）

【００９０】

ＮＮＮＮとは、縮重または半縮重４ヌクレオチド配列を指し、ＭＭＭＭとは、その相補体を指し、Ｇ－Ｃ塩基対は、連結を促進するように縮重配列の下流に含まれるが、他の形態の連結ドメインが使用されてもよい。

【００９１】

この説明において、アダプターＰ１及びアダプターＡはともに、配列決定される標的ＤＮＡ分子に連結される。単純化のため、ＤＮＡ分子の両末端に連結される同一のアダプターは無視され得る。しかしながら、Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）アダプターは、分子の各末端上の異なるアダプターを利用する。初期連結時、個々のＤＮＡ分子は、様々な構成、例えば、Ａ－ＤＮＡ－Ｐ１、Ａ－ＤＮＡ－Ａ、またはＰ１－ＤＮＡ－Ｐ１で、アダプターによって連結され得る。部位Ａ及び部位Ｐ１に対して指向されたプライマーによるエマルジョンＰＣＲで増幅されるために、配列決定反応には、Ａ－ＤＮＡ－Ｐ１の正確な構成が利用され得る。あるいは、当該技術分野において既知である、２つの異なるアダプターに連結された分子のみを選択するための他の方法が、使用され得る。

【００９２】

増幅及び配列決定時、以下の生成物が得られるだろう。

【化４】

GCGC NNNN［ＤＮＡ配列］

TATA NNNN［ＤＮＡ配列］

【００９３】

これらは、図２Ｇに示される生成物Ｘ－α－ＤＮＡ及びＹ’－α－ＤＮＡに対応することに留意されたい。

【００９４】

その後、元来記載されているように（例えば、ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１を参照されたい）、二本鎖に由来する生成物は、二本鎖配列決定を介したデータ処理のためにともにマッチされ得る。具体的には、配列ＧＣＧＣ　ＮＮＮＮで始まる読み取りからコンセンサスを作製して、「上部」鎖のコンセンサスを得ることができる。配列ＴＡＴＡ　ＮＮＮＮで始まる読み取りから別個のコンセンサスを作製して、「下部」鎖のコンセンサスを得ることができる。その後、２つの一本鎖コンセンサス配列を比較して、出発ＤＮＡ分子の二本鎖コンセンサス配列を得ることができる。代替的なデータ処理アプローチを、以下に開示する。「二本鎖配列決定のための代替的なデータ処理スキーム」を参照されたい。

【００９５】

この実施形態において、ＤＮＡ配列情報はＤＮＡ断片の２つの末端のうちの一方のみから必要とされるため、上記のアプローチは、ペアードエンド読み取りが不可能な短い読み取りを利用するプラットフォーム上での二本鎖配列決定を可能にする。

【００９６】

このアプローチの代替的な一実施形態は、二本鎖で非相補的または部分的に非相補的なＳＭＩの使用を介して、ＳＭＩ配列自体内に非対称を導入することであるだろう。ＳＭＩ配列自体は相補的ではない一方で、非相補的ＳＭＩ配列から生じる生成物は、対を形成することが事前決定されているために、同一の出発二本鎖ＤＮＡ分子から生じていることが決定され得る。

【００９７】

この実施形態の一具体例として、以下の配列を有する一連のＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）「アダプターＡ」分子を考慮する。

アダプター１：

【化５】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **AAAT GCAGC** 3′（配列番号７）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **GGGC CGTCG** 5′（配列番号８）

アダプター２：
【化６】
5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **ATAT GCAGC** 3′（配列番号９）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **GCGC CGTCG** 5′（配列番号１０）

アダプター３：
【化７】
5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **TATT GCAGC** 3′（配列番号１１）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **GGCC CGTCG** 5′（配列番号１２）

アダプター４：
【化８】
5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **ATTT GCAGC** 3′（配列番号１３）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **CGGG CGTCG** 5′(配列番号１４）

【００９８】
単純化のため、４つのアダプターのみが上記に列挙されるが、実際には、そのようなアダプターのより大きなプールを有することが望ましくあり得る。この実施例において、相補的配列は非相補的配列の下流に含まれて、ＤＮＡ分子への連結を促進する二本鎖領域を形成することに留意されたい。
【００９９】
個々のＤＮＡ断片は、二本のＤＮＡ鎖の非対称標識をもたらす個々のアダプターに連結される。具体的には、配列決定時、出発ＤＮＡ分子の「上部鎖」の配列は、アダプターの「上部鎖」内の配列で標識されるだろう。出発ＤＮＡ分子の「下部鎖」の配列は、アダプターの「下部鎖」の配列の逆相補体で標識されるだろう。
【０１００】
具体的な一例として、アダプター１に連結された二本のＤＮＡ鎖は、ＡＡＡＴ（上部鎖）及びＣＣＣＧ（下部鎖）と標識される。繰り返すと、配列決定時、下部鎖は、最初はアダプターの下部鎖内に存在する配列の逆相補体をもたらすことに留意されたい。同様に、他のアダプターに連結された配列について、分子識別子は、それらの対合したタグのために、ともに対合され得る。その後、コンピュータプログラムは、そのアダプターから得られる既知のタグ配列の表を使用して、それらを単一ＤＮＡ分子の相補的鎖から生じる読み取りへと組み立てることができる。表２は、結果として得られる配列読み取りが、上記の実施例に示される特定の非相補的識別子配列に基づいていかに標識されるかを示す。
【表２】
表２.

	配列決定読み取りの最初４つのヌクレオチド	
	上部鎖	下部鎖
アダプター１	ＡＡＡＴ	ＣＣＣＧ
アダプター２	ＡＴＡＴ	ＣＧＣＧ
アダプター３	ＴＡＴＴ	ＣＣＧＧ
アダプター４	ＡＴＴＴ	ＧＣＣＣ

【０１０１】
これらは、特定の実施形態の具体例に過ぎない。当業者にとって、ＳＭＩタグはいかなる任意の長さであってもよいこと、ＳＭＩは完全にランダムであってもよいこと、全体が事

前定義された配列からなってもよいことは明らかだろう。ＳＭＩ配列が二本鎖分子の両方の鎖内にあるとき、（上記の実施例に言及される第１の例に記載されるように）２つのＳＭＩ配列は完全に相補的であっても、部分的に非相補的であっても、完全に非相補的であってもよい。いくつかの実施形態において、いかなる外来性分子識別子タグも全く必要とされない。場合によっては、二本鎖ＤＮＡの所与の単一分子の二本の独立した鎖から生じるものとして生成物を区別することを可能にする、何らかの非対称（ＳＤＥを含む）が存在する限り、特有な識別子として、ＤＮＡ分子のランダムに剪断された末端が使用されてもよい。

【０１０２】

本明細書に開示されるいかなる本発明の態様または実施形態においても（かつ現在記載されている実施形態に限定されない）、一本鎖ＳＭＩ及び二本鎖ＳＭＩの両方において、ＳＭＩタグの組は、ＳＭＩ配列の合成、増幅、または配列決定のエラーが、１つのＳＭＩ配列の別のＳＭＩ配列への変換をもたらさないような別個のタグ間の編集距離をもって設計され得る（例えば、Ｓｈｉｒｏｇｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ，１０９（４）：１３４７－１３５２）を参照されたい。ＳＭＩ配列間の編集距離の組み込みは、例えば、ハミング距離、ハミングコード、または当該技術分野において既知である別のエラー訂正法を使用することによる、ＳＭＩエラーの特定及び除去を可能にする。ある組に由来する全てのＳＭＩは同一の長さであってもよく、あるいは２つ以上の異なる長さのＳＭＩの混合物があるＳＭＩの組において用いられてもよい。混合したＳＭＩ長さの使用は、ＳＭＩ配列を使用し、かつＳＭＩ内またはそれに隣接する部位に１つ以上の固定された塩基を更に有するアダプター設計に有利であり得るが、これは、ある組における２つ以上の長さのＳＭＩの利用が、配列決定中に不変異塩基（複数可）を全て同一の読み取り位置で生じさせないためである（例えば、Ｈｕｍｍｅｌｅｎ Ｒ ｅｔ ａｌ，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，５（８）：ｅ１２０７８（２０１０）を参照されたい）。このアプローチは、特定の読み取り位置に不変異塩基が存在する状況において最適以下の性能に遭遇し得る、配列決定装置プラットフォーム上で生じ得る問題（例えば、クラスター特定に伴う困難）を回避することができる。

【０１０３】

当業者にとって、非対称を導入する配列が、例えば、上記に示される内部「バブル」配列として、ＳＭＩ配列の前後、またはそのような配列を有するアダプター設計において一本鎖「尾部」配列内を含む、配列決定アダプター内のどこに導入されてもよいこともまた明らかだろう。これらの配列及び任意の関連するＳＭＩ配列は、配列決定読み取りの一部として直接読み取ることができるか、またはあるいは独立した配列決定反応（例えば、インデックス読み取りにおいて）から決定することができる。更に、これらの配列は、Ｙ形アダプター、「ループ」アダプター、または当該技術分野において既知である任意の他のアダプター設計と組み合わせて使用することができる。

【０１０４】

実際には、ＳＭＩ配列、ＳＤＥ配列、及びプライマー結合部位の異なる相対的配向を有するアダプターが、本発明に想定され、含まれる。

【０１０５】

図２Ａ及び図２Ｈに示されるアダプター設計は、非連結末端を平滑末端として示す。しかしながら、この末端は、オーバーハングであっても、陥凹であっても、分解または所望されない連結を防止するための修飾塩基または化学基を有してもよい。

【０１０６】

更に、アダプターの二本の鎖は接続されて、いくつかの用途において分解または所望されない連結を防止するのに望ましくあり得る、閉鎖「ループ」を形成してもよい。例えば、図２Ｉを参照されたい。図２Ｉの閉鎖「ループ」結合（「Ｓ」位にマークされる）は、従来のホスホジエステル結合によって、または任意の他の天然もしくは非天然化学リンカー基によって達成することができる。この結合は、連結の実行前、実行中、または実行後に「開放」末端を達成するために、化学的または酵素的に切断され得、ループの切断は、ロ

ーリングサークル型増幅産物を防止するために、ＰＣＲ増幅前に望ましくあり得る。ここでウラシルなどの非標準塩基を使用してもよく、アダプター連結前、連結中、または連結後に、酵素的ステップの組を使用して、ホスホジエステル骨格を切断することができる。例えば、ウラシルの場合、脱塩基部位を形成するためのウラシルＤＮＡグリコシラーゼと、骨格を切断するためのエンドヌクレアーゼＶＩＩＩとの組み合わせの使用が十分だろう。あるいは、この結合部位の嵩高い化学基または他の塩基転換不可能な修飾塩基を使用して、ポリメラーゼがループの末端を超えて横断するのを防止し、同一の目的を果たすことができる。

【０１０７】

二本鎖ＳＭＩ配列を使用するアダプター設計のための、本明細書に開示されるいかなる本発明の態様または実施形態においても（かつ現在記載されている実施形態に限定されない）、それが相補的、部分的に非相補的、または完全に非相補的であるかに関わらず、「ループ」形態へとアニールされている直鎖状分子としてアダプターを合成する具体的な利点は、「上部」及び「下部」鎖ＳＭＩ配列が分子自体内に１：１の比率で存在することである。このアプローチは、個々の「上部」及び「下部」オリゴヌクレオチド対をアニールして、二本鎖ＳＭＩを形成することと比較して有利であり得るが、これは、そのようなアプローチにおいて、「上部」鎖及び「下部」鎖に使用されるオリゴヌクレオチドの濃度が完全な１：１の比率ではない場合、一方のアダプター鎖または他方のアダプター鎖の過剰な分子が存在し得、下流のステップにとって問題となり得る（例えば、追加の一本鎖オリゴヌクレオチドは、ＰＣＲ増幅中に不適切なプライミングを引き起こし得るか、または存在し得る他の一本鎖オリゴヌクレオチドとアニールし得、二本のＳＭＩ鎖が適切に都合されていないアダプター分子を作製し得る）ためである。

【０１０８】

いくつかの例において、完全なループ配列自体の複製を防止することが望ましくあり得、修飾配列位置が複製ブロックとして任意で含まれ得る。これは、酵素的に除去することができる塩基（例えば、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼによって除去され得るウラシル）であってもよく、例えば、ＤＮＡ複製を部分的または完全に阻害する領域（例えば、脱塩基部位）であってもよい。

【０１０９】

あるいはまたは更に、「開放」立体構造を達成するために使用され得る、制限エンドヌクレアーゼ部位が導入され（図２Ｉにおいて「Ｔ」位にマークされる）、小ヘアピン断片が結果として放出されてもよい。

【０１１０】

二本のアダプター鎖間の塩基非対称の異なる配置が鎖定義要素として等しく役割を果たすことは、容易に明らかだろう。さもなければ相補的な鎖に対する１つのヌクレオチドまたは２つ以上のヌクレオチドの挿入が存在するとき、バブルがアダプター鎖内に形成され得るが、図２Ｊのアダプターに示される。図２Ｋは、２つ以上のヌクレオチド挿入が自己相補的である一部分を含むアダプターを示し、この後者のアダプターは、１つ以上のヌクレオチド位置に関与する二本の鎖間の単純な差異として類似の機能性を提供する。

【０１１１】

非相補的ＳＭＩ配列を使用する鎖定義非対称の導入

図２Ａ～２Ｋに示されるアダプター設計は、タグに基づく二本鎖配列決定を可能にする２つの重要な特徴を含有する。一方は、特有な分子識別子（すなわち、ＳＭＩ）であり、他方は、二本のＤＮＡ鎖内への非対称の導入手段（すなわち、ＳＤＥ）である。二本鎖配列決定の初期の記述において、Ｙ形アダプター及びペアードエンド配列決定読み取りが利用された。二本のＤＮＡ鎖内への非対称の導入は、非対称尾部自体のために達成された。図３Ａに示されるように、別個かつ優れた二本鎖配列決定アダプター設計は、共同で分子識別子及び非対称導入ＳＤＥとしての役割を果たす非相補的「バブル」形ＳＭＩを含む。

【０１１２】

この設計において、Ｐ及びＰ’はそれぞれ、プライマー部位及びその相補体を表し、αｉ

及びαｉｉは、それらの長さの全てまたは一部分について非相補的である２つの縮重または半縮重配列を表す。この形態のアダプターの合成は、異なる縮重または半縮重配列を有するオリゴヌクレオチドの対のうちの２つ以上をともにプールして、多様なプールを形成する前に、これらを個々に合成し、ハイブリダイズすることによって、最も容易に達成される。オリゴヌクレオチドが個々に合成され、アニールされるため、所与のαｉ配列とαｉｉ配列との間の関係が既知となり、データベースに記録され、これが、配列決定後の分析中、対応するパートナーＳＭＩ配列について検索され得る。

【０１１３】

二本鎖ＤＮＡ断片へのアダプター連結後、図３Ｂに示される構造が生成される。この構造において、同一のアダプター構造ではあるが、αｉ及びαｉｉとは一般に別個である非相補的ＳＭＩ配列の対である、βｉ及びβｉｉが、両末端に連結され得る。

【０１１４】

ＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物を図３Ｃに示し、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物を図３Ｄに示す。

【０１１５】

（この実施例において）プライマー部位配列は分子の両末端で同一であるため、各鎖のＰＣＲ生成物のシングルエンド配列決定読み取りから、及びどちらの一本鎖が配列決定されるかによって、２つの異なる種類の配列読み取りが得られるだろう。「上部」鎖ＰＣＲ生成物からのシングルエンド配列決定読み取りを図３Ｅに示し、「下部」鎖からのシングルエンド配列決定読み取りを図３Ｆに示す。

【０１１６】

その後、分析中、読み取りは、ＳＭＩアダプターライブラリ合成の時点で、かつそれと組み合わせて生成されたデータベースから既知である関係に基づいて、特定のＳＭＩ配列及びそれらの対応する非相補的パートナーによってグループ化され得る。図３Ｇに示されるように、元の分子の対合した「上部」及び「下部」鎖配列は、分子の一末端に起源を持つ読み取りについてαｉ及びαｉｉで、ならびに反対の末端に起源を持つ読み取りについてβｉ及びβｉｉでタグ付けされる。

【０１１７】

修飾または非標準ヌクレオチドを使用する鎖定義非対称の導入

二本鎖配列決定アダプターに鎖非対称が導入され得る別の方法は、最初は対合した鎖ＤＮＡを形成するが、その後、更なる生化学的ステップ後にＤＮＡミスマッチをもたらす、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体による。この一例が、ＤＮＡポリメラーゼ誤組み込みである。誤組み込みは、増幅中に本質的に、または化学的もしくは酵素的ステップを介したミスマッチ領域への変換後のいずれかで生じ得る。

【０１１８】

いくつかの用途では、上記に開示される「バブル型」配列にとってこの形態のＳＤＥが好ましくあり得、これは、それらが、遊離一本鎖領域から生じ得る問題、例えば、他のＤＮＡオリゴヌクレオチドへの誤アニール及びエキソヌクレアーゼ／エンドヌクレアーゼ分解を回避するためである。

【０１１９】

当該技術分野において既知である多くの非標準ヌクレオチドが、この目的を果たすことができる。そのような修飾ヌクレオチドの非限定的な例としては、テトラヒドロフラン；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）；８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシグアノシン（８－オキソ－Ｇ）；デオキシイノシン、５’－ニトロインドール；５－ヒドロキシメチル－２’－デオキシシチジン；イソ－シトシン；５’－メチル－イソシトシン；及びイソ－グアノシン、ならびに当該技術分野において既知である他のものが挙げられる。

【０１２０】

８－オキソ－Ｇ含有二本鎖配列決定アダプターを、図４Ａに示す。８－オキソ塩基は相補的シトシン塩基の反対に対合され、バブルは形成されない。上記及び以下の実施例のよう

に、ＳＭＩ配列（この場合、α）及びＳＤＥ部位（この場合、８－オキソ－Ｇ部位）の相対的順序は、必要に応じて転換されてもよい。Ｐ及びＰ’は、プライマー部位及びその相補体を表す。

【０１２１】

二本鎖ＤＮＡ断片へのアダプター連結後、図４Ｂに示される構造が生成される。

【０１２２】

その後、オキソグアニングリコシラーゼ（ＯＧＧ１）などのグリコシラーゼによる図４Ｂの二本鎖ＤＮＡの処理が、（潜在的には、リアーゼ活性を有するグリコシラーゼによって生じ得る、結果として得られるニックを修復するために、ＤＮＡリガーゼと組み合わせて）実行され得る。この処理は、図４Ｃに示されるように、脱塩基部位の導入を有する、無傷のホスホジエステルＤＮＡ骨格をもたらすだろう。その後、二本の鎖の各々が、例えば、ポリメラーゼによってコピーされ得る。適切な反応条件下で、特定の熱安定性ポリメラーゼは、Ａの反対の脱塩基部位を優先的に挿入し（Ｂｅｌｏｕｓｏｖａ ＥＡ ｅｔ ａｌ，Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ２００６）、ＧからＴへの変異をもたらす。対照的に、相反の鎖は、連結時にアダプター内に存在していたＣヌクレオチドを保持する。この処理は、二本の鎖の生成物の区別を可能にする鎖非対称をもたらす。

【０１２３】

ＰＣＲまたは他の形態のＤＮＡ増幅中、適切な条件下で、特定のポリメラーゼによって、アデニンは、鎖のコピー時、脱塩基の反対に優先的に挿入されるだろう。コピーに引き続いて、このアデニンはチミンに対合され、究極的には元の８－オキソ－Ｇ部位のＴでの置き換えをもたらすだろう。更に、グリコシラーゼによる処理は必須ではない。適切な反応条件下で、ポリメラーゼは、示される脱塩基中間体なしで、Ａの反対の８－オキソ－Ｇを挿入することができる（Ｓｉｋｏｒｓｋｙ ＪＡ ｅｔ ａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ｒｅｓ Ｃｏｍｍｕｎ２００７）。いずれの場合も、ＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物を図４Ｄに示し、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物を図４Ｅに示す。

【０１２４】

この（非限定的な）実施例において、プライマー部位配列は分子の両末端で同一であるため、どちらの一本鎖が配列決定されるかによって、各鎖のＰＣＲ生成物のシングルエンド配列決定読み取りから、２つの異なる種類の配列読み取りが得られるだろう。「上部」鎖ＰＣＲ生成物に由来するそれらのＰＣＲ生成物は、図４Ｆに示される通りであり、「下部」鎖に由来するそれらのＰＣＲ生成物は、図４Ｇに示される通りである。

【０１２５】

分析中、配列決定読み取りは、特定のＳＭＩ（この場合、αまたはβ）を含有するものによってグループ化され得る。図４Ｈを参照されたい。各ＳＭＩグループ化内のＴ及びＧでマークされた生成物は、起源の鎖を定義し、二本鎖配列比較を可能にする。

【０１２６】

当業者にとって、修飾ヌクレオチドまたは他の類似体から得られる配列がＤＮＡ配列決定時に回収され得る限り、上述のように、修飾ヌクレオチドまたは別の類似体が、配列決定アダプター内のどこに置かれてもよいこともまた明らかだろう。

【０１２７】

当業者にとって、同一の目的を果たすために、多くの他のヌクレオチド類似体が利用され得ることは明らかだろう。他の例としては、テトラヒドロフラン及び８－オキソ－７，８－ジヒドロ－２’－デオキシアデノシン（８－オキソ－Ａ）が挙げられる。ＤＮＡポリメラーゼによる異なるヌクレオチドの誤組み込みを本質的にもたらし得るか、あるいは酵素的もしくは化学的ステップによって、または経時的に自然に、誤コード傷害またはミスマッチ塩基へと変換され得る、任意のヌクレオチド修飾が、この実施形態のアダプター内で使用され得る。

【０１２８】

更に、二本の鎖を非対称的に標識するために、非ヌクレオチド分子を組み込んでもよい。

例えば、二本のアダプター鎖のうちの一方にビオチンを組み込んでもよく、これは、ストレプトアビジンを利用して、ビオチンを欠如する鎖からビオチン含有鎖を物理的に分離することによって、二本の鎖の別個の分析を促進するだろう。この実施形態を、以下に詳細に開示する。

【０１２９】

ＤＮＡ分子の反対の末端上に異なるプライマー部位を導入するための、二本鎖配列決定アダプター設計の組み合わせの使用

非Ｙ形アダプターの前述の実施例は、ＤＮＡ分子の両末端への、同一の種類のアダプターの対称連結を示す。現在、ほとんどの配列決定プラットフォームは、例えば、表面またはビーズのいずれかの上でのクラスター増幅を可能にするために、適応したＤＮＡ分子がいずれかの末端上に異なるプライマー部位を有することを必要とする。これらの異なるプライマー部位を作製するためにＹ形アダプターを通例使用しない配列決定プラットフォーム（例えば、Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）（Ｔｈｅｒｍｏ（登録商標）Ｉｎｃ）、ＳＯＬｉＤ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（登録商標）Ｉｎｃ．、及び４５４（Ｒｏｃｈｅ（登録商標）Ｉｎｃ．））では、２つの異なるアダプターの混合物が連結され、その後、最も一般的にはビーズに基づくエマルジョンＰＣＲプロセスを通して、各プライマー部位のうちの１つを含有する分子が選択される。

【０１３０】

非Ｙ形二本鎖配列決定アダプターを使用して非対称プライマー部位を生成するための１つの類似するアプローチを、以下に説明する。

【０１３１】

このために、１つの二本鎖アダプターと１つの標準アダプターとの混合物を生成し、各アダプターは異なるＰＣＲプライマー部位を含有する。二本鎖アダプターは、本明細書に上述もしくは後述されるか、または当該技術分野において既知である、いかなる設計であってもよい。

【０１３２】

相補体Ｐ’を有するプライマー部位Ｐを有し、その後にミスマッチ配列Ｘ及びＹ（各々１つ以上のヌクレオチドを含む）で構成されるＳＤＥが続き、その後に縮重または半縮重ＳＭＩ配列αが続く、一例示的な二本鎖アダプターを図５Ａに示す。図５Ｂに示される他のアダプターは、相補体Ｏ’を有する異なるプライマー部位Ｏを含有する、「標準」アダプターである。

【０１３３】

ＤＮＡライブラリへのこのアダプター混合物の連結後、図５Ｃ～図５Ｅに示される３つの異なる種類の生成物が生成される。平均で、適応に成功した分子の半分が各末端上に異なるアダプター配列を担持し（図５Ｃ）、４分の１が２つの二本鎖アダプターを有し（図５Ｄ）、４分の１が２つの標準アダプターを有する（図５Ｅ）だろう。適切な選択条件下で、１つのプライマー部位Ｐを有する分子及びプライマー部位Ｏのみが、クラスター増幅するだろう。故に、後者の２（有用ではない）種類の生成物は今後無視され得、後続する記述においては示されない。

【０１３４】

ＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物を図５Ｆに示し、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物を図５Ｇに示す。

【０１３５】

プライマー部位Ｐからの配列決定は、「上部」鎖及び「下部」鎖から得られる以下の配列をもたらすだろう。これらは、ＳＤＥ　ＸまたはＹ標識のいずれかを担持しているために、区別することができる。図５Ｈを参照されたい。

【０１３６】

本明細書に記載されるか、または当該技術分野において既知である、任意の他の形態の非Ｙ形二本鎖アダプターが、この実施形態において使用されるものと同一の目的を果たし得ることは、容易に明らかである。例えば、１つの二本鎖アダプター及び１つの標準アダプ

ターの代わりに、異なるプライマー部位を担持する２つの二本鎖アダプターを使用することが可能である。連結及びＰＣＲ後、増幅された生成物は分けることができ、一方の部分はプライマーＰで配列決定され、他方はプライマーＯで配列決定される。これは、各適応した分子の両末端の二本鎖配列決定を可能にするだろう。異なるプライマー部位からの読み取りは、実際にはペアードエンドではないため、それらは、いかなる特定の分子についても、容易にはともに関連付けることができない。しかしながら、配列決定されるＤＮＡの量が非常に限定されている用途では、分子の両末端の二本鎖配列決定から得られる追加の配列情報が依然として有利であり得る。

【０１３７】

非ペアードエンドプラットフォーム上での２つの読み取りの使用は、二本鎖配列決定中の読み取り長さを最大化することができる

Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）機器で実行されるものなどのペアードエンド配列決定は一般に、配列決定プラットフォームが、アダプターＤＮＡ分子の一方の末端上のプライマー部位からの一方の鎖を配列決定することができ、その後、異なるプライマー部位からのその分子の他方の末端を配列決定する前に逆相補体鎖を生成することを必要とする。この技術的な課題としては、相補的鎖生成のプロセスが挙げられ、これが、全てのプラットフォームがこのペアードエンド配列決定とは容易には適合しない理由である。

【０１３８】

しかしながら、適応したＤＮＡ分子の２つの異なる部分を配列する能力は、限定的な程度までは、相補的鎖を生成する必要性なく達成することができる。これは、配列決定読み取りがＤＮＡ分子及び第１のアダプターから離れて進行し、それにより第２のアダプター自体の配列決定読み取りを生成するように、第１のアダプターに対してＤＮＡ分子の反対の末端に結合した、第２のアダプター内に含有される第２のプライマー部位を使用することによって達成することができる。いくつかの状況において、そのような能力は、望ましくあり得る。例えば、二本鎖配列決定に必要とされるＳＭＩ配列及びＳＤＥ配列は、達成され得る本質的に限定された読み取り長さの一部分を消費するため、これらの要素を、第２のより短い読み取り中に読み取られる反対のアダプターに移動させることができると、最大読み取り長さが必要とされる場合に役立ち得る。類似の利益は、試料多重化にしばしば使用されるインデックスバーコード配列を再配置することによって実現することができる。

【０１３９】

このプロセスを可能にするために、２つの異なるアダプターが使用され得る。図６Ａに示される第１のものは、その相補体Ｐ’の反対に単純なプライマー部位Ｐを含有する。

【０１４０】

図６Ｂに示される他のアダプター配列は、Ｙ形尾部を有さず、二本鎖配列決定に必要な特徴ＳＭＩ及びＳＤＥを含有する。この二本鎖アダプターは、本明細書に記載され、かつＳＭＩ及びＳＤＥが別個の配列要素であるか、非対合のＳＭＩと同一の配列要素へと組み合わされるか、またはＳＤＥが修飾塩基で構成される、設計のうちのいずれであってもよい。

【０１４１】

図６Ｂに示される実施例において、ＳＤＥは、縮重または半縮重ＳＭＩ配列αに隣接するミスマッチ配列Ｘ及びＹを伴う。相補体Ｏ’を有するＰＣＲプライマー部位Ｏは、アダプターの非連結末端上にある。連結可能な末端に隣接するが、アニールされたプライマーがＤＮＡ断片の向かってではなくアダプター分子自体内へと延長するように配向される、相補体Ｐ２’を有する第２のプライマー部位Ｐ２が、このアダプター設計に特有である。

【０１４２】

ＤＮＡライブラリへのこのアダプター混合物の連結後、３つの異なる生成物が生成される。各アダプターのうちの１つを有する（図６Ｃに示される両方のプライマー部位Ｐ及びＯを含有する）生成物のみがクラスター増幅及び配列決定に成功するため、反対の末端上に同一のアダプターの種類のうちの２つを有するものは無視され得る。

【０１４３】
ＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物を図６Ｄに示し、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物を図６Ｅに示す。
【０１４４】
アニールされた配列決定プライマーＰ１及びＰ２、ならびに各々によって配列決定され得る領域の配向を、以下に示す。これらの読み取りは、一方よりも配列決定で最も好都合に配列決定されるだろう。これは、１つの配列決定プライマーを導入し、第１の配列決定読み取りを受け、その後、第１の配列決定読み取りの完了後、第２の配列決定プライマーを導入することによって達成されるだろう。「読み取り番号２」（図６Ｆ及び図６Ｇに示される）が最初に実行される場合、配列決定は、分子の末端に到達し、配列決定を自己終結するまで実行され得る。「読み取り番号１」が最初に実行される場合、プライマーＰ２を添加して「読み取り番号２」を開始する前に、この配列決定反応を中断させることが必要であるだろう。これは、組み込み後に更なる延長が不可能な修飾ｄＮＴＰを導入することによって、または初期配列決定反応中に合成された鎖を、鋳型鎖から離して（熱的もしくは化学的にのいずれか）融解し、それを洗い流してから、次の配列決定プライマーを添加することによってのいずれかによって達成することができる。
【０１４５】
「上部」鎖に由来する鋳型鎖を配列決定するための配置を図６Ｆに示し、「下部」鎖に由来する鋳型鎖を配列決定するための配置を図６Ｇに示す。
【０１４６】
「上部」鎖由来鋳型からの配列決定読み取りは、図６Ｈに示される通りであり、「下部」鎖由来鋳型からの配列決定読み取りは、図６Ｉに示される通りである。
【０１４７】
異なる元の鎖分子からの配列決定読み取りの対が、ＳＤＥ　Ｘ標識またはＳＤＥ　Ｙ標識のいずれかを担持しているために、区別可能であることは、容易に明らかである。
【０１４８】
非ペアードエンドプラットフォーム上での２つの読み取りの使用は、二本鎖配列決定のタグ多様性を最大化する。
上記に開示される形態の二重読み取りの使用から生じる潜在的な利点は、読み取り長さの単純な保存を超えて拡張する。Ｙ形アダプターによるタグに基づく二本鎖配列決定についての初期の記述において、１つのＳＭＩ配列が、適応したＤＮＡ分子の各末端に付加された。この設計は、多様なＳＭＩ含有アダプターの十分に大きな集団を効率的に生成して、全てのＤＮＡ分子が特有に標識され得ることを確実にするために、特定の状況において、実用的利点を有する。
【０１４９】
一説明として、完全縮重４ヌクレオチドＳＭＩ配列が元のＹ形アダプター設計に導入され、（図１Ｂに示される）ＤＮＡ断片ライブラリに連結され、ペアードエンド読み取りで配列決定される場合、分子が標識され得る可能性のある方法の総数は、$４^{４}$＊$４^{４}$＝６５，５３６である。完全縮重８塩基対ＳＭＩ配列が二本鎖アダプターに組み込まれ、（図５Ｃに示される）シングルエンド読み取りのためにＤＮＡライブラリに連結された場合、同一の６５，５３６の標識の組み合わせが達成され得る。ポリメラーゼ延長法で相補的ＳＭＩタグを生成するとき、６５，５３６の標識を達成するこれら２つの手段は等しく実行可能であるが、個々に合成されたオリゴヌクレオチドを有するアダプタープールを生成する場合は、この限りではない。第１のシナリオにおいて、合計$４^{４}$×２＝５１２のオリゴヌクレオチドが生成される必要があるだろう。後者のシナリオにおいて、$４^{８}$×２＝１３１，０７２が生成され、個々にアニールされる必要があり、これは必要とされる財務費用及び労力を大いに増加させるだろう。
【０１５０】
二本鎖配列決定のいくつかの実施形態について、ＳＭＩアダプター生成のオリゴヌクレオチド合成法が好ましく、上記に開示されるように、十分に多様なＳＭＩ含有アダプター集

団は、分子の一方の末端上の単一ＳＭＩのみでは実用的には達成できない可能性がある。
【０１５１】
同一の反応の２つのステップで配列決定するために、両方のアダプター内にＳＭＩ配列が含まれることを可能にすることによって、非ペアードエンド適合プラットフォーム上での二重読み取りの上述の方法を使用して、この限界を克服することができる。これを以下に説明する。
【０１５２】
このために、各々が異なる増幅プライマー部位を有する２種類のアダプターが必要とされる。少なくとも１つはＳＤＥを含有する必要があり、実施例において、両方が縮重または半縮重ＳＭＩ配列を含有するだろう。図７Ａに示されるように、第１のアダプターは、それがＳＭＩ配列（ここでは「β」と特定される）を更に含むことを除いて、図６Ａのアダプターに類似している。図７Ｂに示される第２のアダプターは、図６Ｂに示されるアダプターに類似し、ＳＭＩ配列（ここでは「α」と特定される）を含有する。
【０１５３】
当業者にとって、２つのアダプターのＳＭＩ特徴及びＳＤＥ特徴の相対的配置を相互変換して、同一の結果を達成することができることは明らかだろう。後者のアダプター内に上記に示されるＳＤＥは、代わりに前者のアダプター内に置かれてもよい。以前に記載されているいかなる形態のＳＤＥまたはＳＭＩも、同等の効果をもって、この実施例において使用されるものと置換することができる。
【０１５４】
ＤＮＡライブラリへのこのアダプター混合物の連結後、各アダプターの種類のうちの１つへの結合に成功した生成物は、図７Ｃに示される通りである。
【０１５５】
ＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物を図７Ｄに示し、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物を図７Ｅに示す。
【０１５６】
以前の実施形態において記載されるように、配列決定プライマー部位Ｐ１及びＰ２、ならびに各々によって配列決定される領域の配向を、「上部」鎖については図７Ｆに示し、下部鎖については図７Ｇに示す。
【０１５７】
「上部」鎖由来鋳型からの配列決定読み取りは、図７Ｈに示される通りであり、「下部」鎖由来鋳型から得られる読み取りは、図７Ｉに示される通りである。
【０１５８】
繰り返すと、二本の鎖の生成物は、それらの異なるＸ及びＹ　ＳＤＥ標識のために、容易に区別可能である。二本鎖配列決定分析のために、ＳＭＩ　α及びＳＭＩ　βの配列は、単一特定タグ配列へと組み合わされてもよい。
【０１５９】
Ｙ形二本鎖配列決定アダプター内の非対称ＳＭＩ
いくつかの現在入手可能な配列決定プラットフォームは、クラスター増幅及び配列決定を可能にするために、ＤＮＡ分子の反対の末端上に異なるプライマー部位を必要とする。これは、非対称プライマー結合部位を有するＹ形またはバブル形アダプターによって、または直前の３つの実施形態において説明される２つのアダプターの連結法を通して達成することができる。Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）によって製造されているものなどのＹ形アダプターが、ペアードエンド配列決定適合プラットフォーム上では最も一般的に使用されているが、それらは、他のプラットフォーム上でも使用することができる。
【０１６０】
ライブラリ調製のためのＹ形または「バブル形」アダプターの１つの一般的利点は、理論上、全ての二重適応したＤＮＡ分子が配列決定可能であることである。しかしながら、２つの異なるアダプターを使用する方法では、生成される分子の半分のみが配列決定可能であり、それらは各アダプターの種類のうちの１つを有する一方で、生成される分子の他方

の半分は同一のアダプターの２つのコピーを有するだろう。特定の状況において、例えば、入力ＤＮＡが限定的である場合、Ｙ形アダプターのより高い変換が望ましくあり得る。

【０１６１】

しかしながら、上述の第１の実施形態（元来記載されている二本鎖配列決定法）において説明されるように、ペアードエンド読み取りまたは完全なリードスルーを行う能力がないと、元来記載されているＹ形二本鎖アダプターは、シングルエンド読み取りによる二本鎖配列決定を容易には許容しない。

【０１６２】

しかしながら、Ｙ形アダプターの相補的「ステム」配列における配列決定プライマー部位の使用は、二本鎖配列決定のためのシングルエンド読み取りを可能にするが、これはアダプター配列内の別の場所に少なくとも１つのＳＤＥによって非対称が導入される場合のみである。簡潔な説明を続ける。

【０１６３】

図８Ａにおいて、αｉ及びαｉｉ配列を含む非対合のＳＭＩを含有するＹ形アダプターが示される。この設計におけるこの配列はまた、ＳＤＥとしての役割も果たすだろう。３つのプライマー部位、つまり、遊離尾部上のＰＣＲプライマーであるＡ及びＢ、ならびに配列決定プライマー部位（及びその相補体）を含むＣ（及びＣ’）が存在する。

【０１６４】

ＤＮＡ断片へのアダプター連結後、図８Ｂに示される構造が生成され、２つの別個の非相補的ＳＭＩを有する２つのアダプターがいずれかの末端に添付される。

【０１６５】

部位Ａ及びＢと相補的なプライマーを使用するＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物は、図８Ｃに示される通りであり、「下部」鎖に由来する二本鎖ＰＣＲ生成物は、図８Ｄに示される通りである。

【０１６６】

プライマー部位Ｃからの配列決定後、どちらの一本鎖の半分が配列決定されるかによって、各鎖のＰＣＲ生成物のシングルエンド読み取りから、２つの異なる種類の配列決定読み取りが得られるだろう。「上部」鎖のＰＣＲ生成物からの配列決定読み取りは、図８Ｅに示される通りであり、「下部」鎖のＰＣＲ生成物から得られる配列決定読み取りは、図８Ｆに示される通りである。

【０１６７】

分析中、配列決定読み取りは、ＳＭＩアダプターライブラリ合成の時点で、かつそれと組み合わせて生成されたデータベースから既知である関係に基づいて、特定のＳＭＩ配列及びそれらの対応する非相補的パートナーによってグループ化され得る。ここで、図８Ｇに示されるように、元の分子の対合した「上部」及び「下部」鎖配列は、分子の一末端に起源を持つ読み取りについてαｉ及びαｉｉで、ならびに反対の末端に起源を持つ読み取りについてβｉ及びβｉｉでタグ付けされる。

【０１６８】

したがって、二本鎖配列分析が実行され得る。分析は、「非相補的ＳＭＩ配列を使用する鎖定義非対称の導入」と題する実施形態において上述される分析と類似している。

【０１６９】

図８Ｈに例証されるように、この種類のＹ形アダプターの一代替的な設計は、遊離腕の「デイジーチェーン化」だけでなく、エキソヌクレアーゼ消化または潜在的にはＹの遊離腕への非特異的連結を防止するのにも有利である、閉鎖ループを含む。閉鎖「ループ」結合（矢印によってマークされる）は、従来のホスホジエステル結合によって、または任意の他の天然もしくは非天然化学リンカー基によって達成することができる。ローリングサークル型増幅産物を防止するために、ＰＣＲ増幅前にしばしば望ましくあるように、この結合は、連結の実行後に「開放」末端を達成するために、化学的または酵素的に切断可能であり得る。あるいは、この結合部位の嵩高い化学基または修飾ヌクレオチドを使用して、ポリメラーゼがループの末端を超えて横断するのを防止し、同一の目的を果たすことがで

きる。あるいは、図８Ｉに例証されるように、ループ内のヘアピン相補性領域（矢印によってマークされる）に制限エンドヌクレアーゼ認識部位が導入され、これを使用して「開放」立体構造が達成され、小ヘアピン断片が結果として放出されてもよい。

【０１７０】

いくつかの状況において、アダプター連結後、ＰＣＲ前に追加の酵素的ステップの実行が必要とされないことが好ましい。図８Ｊに例証されるように、アダプターの尾部が相補的であるが、共有結合はしていないアダプター設計は、追加のステップの必要性の不在下でも、遊離非対合のＤＮＡ尾部によって引き起こされる問題を依然として克服することができる。

【０１７１】

Ｙ形二本鎖配列決定アダプター内の非対称ＳＭＩ

Ｙ形またはループ形アダプターにおける非対合のＳＭＩの概念の別の変異形は、ＰＣＲプライマー部位と相補的ステムとの間の遊離一本鎖尾部領域内に位置するこれらの非対合のＳＭＩを含む。この設計の１つの利点は、それが、選ばれたＩｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）配列決定システム上で利用可能であるように、「二重インデックス」読み取りの一部としてＳＭＩが完全に配列決定されることを可能にすることである（Ｋｉｒｃｈｅｒ ｅｔａｌ（２０１２）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．Ｖｏｌ．４０，Ｎｏ．１，ｅ３）。長い読み取りが特に好ましい用途では、主要配列決定読み取りにＳＭＩが含まれないことによって、ＤＮＡ挿入物の読み取り長さが最大化されるだろう。一例を続ける。

【０１７２】

図９Ａは、非対合のＰＣＲプライマー部位Ａ及びＢを含有するＹ形二本鎖－配列決定アダプターを示す。αｉ及びαｉｉは、少なくとも部分的に非相補的な縮重または半縮重ＳＭＩの対を表す。Ｐ及びＰ’は、配列決定プライマー部位及びその相補体である。

【０１７３】

ＤＮＡ断片へのアダプター連結後、図９Ｂに示される構造が生成され、それにより、２つの少なくとも部分的に非相補的なＳＭＩを有する２つのアダプターがいずれかの末端に添付される。

【０１７４】

部位Ａ及びＢと相補的なプライマーを使用するＰＣＲ増幅後、「上部」鎖に由来する二本鎖生成物は、図９Ｃに示される通りであり、「下部」鎖に由来する二本鎖生成物は、図９Ｄに示される通りである。

【０１７５】

一例として、二重インデックスによるペアードエンド配列決定を使用する場合、Ｉｌｌｕｍｉｎａ（登録商標）プラットフォーム上では、１つの配列決定読み取り及び１つのインデックス読み取りの完了後、相補的鎖が生成され得、他方の鎖の対応する配列決定及びインデックス読み取りが実行され得る。

【０１７６】

しかしながら、ペアードエンド配列決定または二重インデックスのいずれも、それ自体、技術としては二本鎖配列決定を許容しないことに留意されたい。所与のＰＣＲ生成物の両方の一本鎖がともに効果的に配列決定される一方で、各ＰＣＲ生成物は、元のＤＮＡ二本鎖の二本の鎖のうちの一方のみに由来し、故にＰＣＲ生成物の両方の鎖の配列決定は、元のＤＮＡ二本鎖の両方の鎖の配列決定と同等ではない。

【０１７７】

配列決定プライマー及びインデックスプライマー、ならびにそれらが配列決定する領域の可能性のある相対的配向を、「上部」鎖に由来するＰＣＲ生成物からの両方向の読み取りについては図９Ｅに示し、「下部」鎖に由来するＰＣＲ生成物からの両方向の読み取りについては図９Ｆに示す。

【０１７８】

２つの別個の読み取りではなく、単一の配列決定読み取りで、ＳＭＩ及び配列自体の両方を配列決定することもまた十分だろう。多くの異なる構成及びプライマーの数を利用して

、ＳＭＩ及び読み取り配列を配列決定することができることは、明らかである。ナノポア配列決定などのいくつかの実施形態において、ＳＭＩ及び／またはＤＮＡ配列の配列決定は、いかなる特定のプライマー部位も全く必要としない可能性がある。更に、この実施例はＰＣＲの使用を記載する一方で、この及び他の実施形態は、ローリングサークル型増幅及び他のアプローチを含む、当該技術分野において既知である任意の他の方法によって増幅することができる。Ｋｉｒｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ（２０１２）を参照されたい。

【０１７９】

（図９Ｇに示される）「上部」鎖及び「下部」鎖から得られるものに関して、４つ全ての読み取りの配列の異なるパターンを比較するとき、一方はＳＭＩタグαｉ’及びβｉを担持し、他方はタグ及びαｉｉ及びβｉｉ’を担持するため、それらを互いに区別することができることは明らかである。この非限定的な実施例において、二本の鎖はいかなるタグも共有しないものの、αｉとαｉｉとの間の関係及びβｉとβｉｉとの間の関係がアダプター調製時から既知であり、故に分析の構成要素としてデータベースから検索され得るため、それらは依然として互いに関連付けられ得る。

【０１８０】

二本鎖配列決定のためのプライマー部位、ＳＭＩ、及びＳＤＥを導入するための、単一環状ベクターの使用

二本鎖配列決定に必要な全ての要素を、２つの対合したアダプターではなく、単一分子内に導入する代替的な構造が、図１０に説明される。

【０１８１】

この実施形態において、環状構造は、（二本鎖配列決定に必要な要素を含む）直鎖状二本鎖分子の２つの末端を、適合連結部位を有するＤＮＡ断片の２つの末端と結合させることによって形成される。

【０１８２】

図１０Ａにおいて、Ａ／Ａ’及びＢ／Ｂ’は、２つの異なるプライマー部位及びそれらの逆相補体を表し、α及びα’は、縮重または半縮重ＳＭＩ配列を伴い、Ｘ及びＹは、それぞれＳＤＥの非相補的な半分である。

【０１８３】

図１０Ａの二本鎖分子への二本鎖ＤＮＡ断片の連結後、図１０Ｂに示される閉鎖ループが生成される。

【０１８４】

図１０Ｂの連結された生成物の生成後、ＰＣＲを使用して、プライマー部位から増幅が実行される。あるいは、ローリングサークル型増幅が最初に実行されてもよい。未連結のライブラリ及びアダプターの選択的破壊が有利であり、５’－３’または３’－５’エキソヌクレアーゼによって達成され得る。環状設計はこれらの機会を特有に提供し、これは多くの他の設計では容易には可能ではない。

【０１８５】

上述及び後述のＳＭＩ及びＳＤＥの形態のうちのいずれも、示される形態と置換されても、それらの順序が再配置されてもよいことは、容易に明らかだろう。

【０１８６】

別の実施形態の一例として、図１０Ｃに示されるように、「非相補的ＳＭＩ配列を使用する鎖定義非対称の導入」と題する実施形態において論じられるものなどの、ＳＭＩ及びＳＤＥの両方としての役割を果たす１つの連結部位付近の単一の要素が使用されてもよい。

【０１８７】

あるいは、図１０Ｄ及び図１０Ｅに示されるように、ＳＤＥ及びＳＭＩをアダプター連結部位の各々付近の配列内に設計して、ペアードエンド配列決定を促進してもよい。

【０１８８】

この設計において、対応する配列（すなわち、αｉ及びαｉｉ）間の関係が既知であり、分析中にデータベースで検索され得る限り、反対の鎖上のＳＭＩ配列が（図１０Ｅに示されるように）相補的であることは必須ではないことに留意されたい。

【０１８９】
非対称化学標識及び鎖単離を通した二本鎖配列決定
上記に論じられるように、二本鎖配列決定は基本的に、ＤＮＡ二本鎖の両方の鎖の区別が可能であるような、それらの配列決定に依存する。二本鎖配列決定の元来記載されている一実施形態（ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１）において、両方の鎖をヘアピン配列でともに結合して、対合した鎖をともに配列決定することができる。開示に開示される実施形態においてだけでなく、ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１も、特有なＤＮＡ二本鎖の二本の鎖が、ＤＮＡタグ付けを使用して区別され得る方法を記載する。この後者のアプローチは、特有なＤＮＡ配列（ＤＮＡ断片の一末端もしくは両末端の座標を含む内在性ＳＭＩ、または縮重もしくは半縮重配列を含む外来性ＳＭＩ）で各ＤＮＡ分子を標識付けし、少なくとも１つの形態のＳＤＥ（例えば、ペアードエンド読み取りによる非対称プライマー部位、「バブル」配列、非相補的ＳＭＩ配列、及び天然または化学的のいずれかでミスマッチへと変換される非標準ヌクレオチド）を通して鎖定義非対称を導入することを伴う。
【０１９０】
二本の鎖が、独立した反応において配列決定のために物理的に分離され得るように、二本鎖内にそれらの非対称化学標識を含む、二本鎖配列決定を実行するための別のアプローチが、以下に開示される。この一例を続ける。
【０１９１】
図１１Ａに示されるように、２つの異なるアダプターが使用される。第１のアダプターは、相補体Ｐ’を有するプライマー部位Ｐ、及び相補体α’を有するＳＭＩ配列αを含有する。第１のアダプターの一方の鎖は、他方のＤＮＡ鎖にはできないように、既知の物質（例えば、固体表面、ビーズ、固定された構造、及び結合パートナー）に結合するか、またはそれによって結合されることができる化学タグを更に担持する。図１１Ａに示されるように、化学タグは、ストレプトアビジンの結合パートナー及びそれに対する親和性を有するビオチンである。
【０１９２】
好ましくは小分子、ペプチド、または任意の他の特有に結合可能な部分の形態の、当該技術分野において既知である他の結合パートナー対が使用されてもよい。この標識はまた、核酸配列（例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはこれらの組み合わせ、及びペプチド－核酸もしくはロックド核酸などの修飾核酸）の形態、好ましくは一本鎖の形態であってもよく、固体基質（例えば、固体表面、ビーズ、または類似する固定された構造）に添付される実質的に相補的な「ベイト」配列を使用して、アダプター－連結分子の一方の鎖に結合し、それを選択的に捕捉し、他方の鎖から単離してもよい。
【０１９３】
この非限定的な実施例において、第２のアダプターは化学タグを担持しない。図１１Ｂに示されるように、第２のアダプターは、相補体Ｏ’を有する異なるプライマー部位Ｏを有する。
【０１９４】
図１１Ａ及び図１１ＢのアダプターがＤＮＡ断片に連結した後、図１１Ｃに示される（好ましい）構造が生成される。
【０１９５】
加えて、２つの他の種類の構造が生成され、１つの構造はアダプターを含有する２つのプライマー部位Ｐを有し、別の構造はアダプターを含有する２つのプライマー部位Ｏに連結される。「ＤＮＡ分子の反対の末端上に異なるプライマー部位を導入するための、二本鎖配列決定アダプター設計の組み合わせの使用」と題する実施形態において上記に論じられるように、他の２種類の構造に対する好ましい構造の富化は、他の２種類の構造が無視され得るような配列決定前の特定の増幅条件をもって、通例達成することができる。
【０１９６】
図１１Ｄに示されるように、連結後、ＤＮＡ鎖は、熱融解または化学融解で分けることができ、その後、特定の結合パートナーに対する選択的親和性を有する化学タグを有する鎖

（この場合、例えば、常磁性ビーズに結合するストレプトアビジン）を他方の鎖から分離することができる。今では分離された２つの鎖は、任意で２つの分離された鎖が独立して増幅される前述のステップをもって、独立して配列決定され得る（配列決定は、物理的に異なる反応において、または例えば、標識ＰＣＲプライマーで各々に異なるインデックスを適用し、組み換えた後、同一の反応において生じ得る）。

【０１９７】

あるいは、両方の鎖は、２つの異なる種類のベイトに対する親和性を有する異なる化学タグで標識されてもよい。その後、一方の配列決定反応またはインデックス群に見出されるタグを、他方の集団の対応するタグと比較し、二本鎖配列決定を実行することができる。この実施例において、ＳＤＥが依然として使用されるが、それは、鎖を物理的に分離するために使用され得る非対称的に添付された化学タグを伴う。それらの物理的に異なる区画化は、二本の鎖が個々に配列決定されるか、またはプール前に後続する差次的標識ステップ（例えば、それらの尾部に異なるインデックス配列を担持するプライマーによるＰＣＲ）、及び後に情報学的にデコンヴォルーションすることができる組み合わせ配列決定を受けるかのいずれかを可能にする。

【０１９８】

この概念の別の実施形態は、化学的親和性以外の手段による鎖分離を可能にする、他の特性を有する標識（すなわち、物理的基）を使用することだろう。例として、強い正電荷を有する分子（例えば、電荷特性を有する物理的基）を含む核酸鎖は、（例えば、電気泳動法による）電場の適用を通して、その対合した未標識の対合した鎖から優先的に分離され得、または強い磁気能力を有する分子（例えば、磁気特性を有する物理的基）を含む核酸鎖は、磁場の適用を通して、その対合した未標識の対合した鎖から優先的に分離され得る。沈殿に対して感受性である化学基（例えば、不溶性特性を有する物理的基）を含む核酸鎖は、ＤＮＡ自体は可溶性であるが、物理的基を含むＤＮＡが不溶性であるような、特定の適用される条件下で溶液中にあるときに、その対合した未標識の対合した鎖から優先的に分離され得る。

【０１９９】

（連結されたアダプター配列決定装置内の外来性タグとして、またはＤＮＡ断片の特有な剪断点を含む内在性ＳＭＩとしてのいずれかで）ＳＭＩが適用された後の、対合した鎖の物理的分離の概念についての更に別の変異形は、ＤＮＡ二本鎖をそれらの構成要素の一本鎖へと熱融解または化学融解した後に、希釈を使用することである。精製可能な化学標識を一方の鎖に適用して、それを他方の鎖から分離する代わりに、二本の元々対合した鎖が同一の容器を共有する可能性が小さいように、一本鎖を複数（すなわち、２つ以上）の物理的に分離された反応チャンバ内に希釈する。例えば、混合物が１００個の容器に分けられる場合、偶然に、約１％のパートナー鎖のみが同一の容器内に置かれるだろう。容器は、容器、試験管、もしくはマイクロウェルプレート内のウェル、または物理的に分離された非連通液滴（例えば、疎水性相内水相エマルジョン）などの物理的容器の組を伴う。核酸分子を含有する、２つ以上の空間的に別個の体積の液体または固体の内容物において、核酸分子な実質的の混合が防止される、任意の他の方法が使用され得る。各容器内で、好ましくは各々内に異なるタグ配列を担持するプライマーを使用して、ＰＣＲ増幅が実行されてもよい。異なるプライマーによって全ての容器内に添加されるこの特有なタグ配列は、それが配列決定インデックス読み取り中に記録され得る場所に最も好都合に位置するだろう（例えば、図９Ｅを参照されたい）。これらの標識は、ＳＤＥとしての役割を果たす。この実施例において、同一のＳＭＩ標識を担持する約９９％のパートナー鎖に、それらのパートナー鎖とは異なるＳＤＥ標識が割り当てられるだろう。約１％のみに、同一の標識が割り当てられるだろう。二本鎖配列決定分析及びコンセンサス作製は、ＳＭＩ及びこれらのＳＤＥを使用して、通常通り進行し得る。パートナー鎖が偶然に同一のＳＤＥを取得する少数の場合において、これらの分子は、二本鎖分析中には本質的に無視され、偽変異には寄与しないだろう。

【０２００】

ニック翻訳中のＳＤＥの導入
Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）プラットフォームのアダプター連結に使用される市販のキットにおけるものなどのいくつかの状況において、二本鎖アダプターは、配列決定される二本鎖標的ＤＮＡ分子に連結される。しかしながら、ここでは標的ＤＮＡ分子の二本の鎖のうちの一方のみが、アダプターに連結される。この一般的な実施形態は、連結ドメインの５’鎖がリン酸化されていない場合である。その後、鎖置換活性を有するポリメラーゼを使用して、一般的に「ニック翻訳」として知られるプロセスにおいて、連結された鎖からの配列を未連結の鎖にコピーする。本明細書に開示されるアダプター設計が、この方法で、かつ修飾なしで使用されるとき、多くの場合、ＳＤＥはニック翻訳ステップ中に失われ、それにより二本鎖配列決定を防止するだろう。これを以下に例証する。

【０２０１】
１種類の二本鎖配列決定アダプターが、図１２Ａに示される。Ｎ’は、縮重または半縮重ＳＭＩ配列を表し、ＧＧの反対のＴＴは、非相補的ＳＤＥ領域であり、アスタリスクは、連結不可能な脱リン酸化５’塩基を表す。

【０２０２】
二本鎖ＤＮＡ分子への図１２Ａのアダプターの連結後、図１２Ｂに示されるように、１つの未連結のニックが残る。

【０２０３】
標準的な「ニック翻訳」アプローチでは、鎖置換ポリメラーゼを使用してライブラリＤＮＡ分子の３’末端を延長し、アダプターの未連結の鎖を置換する。これを図１２Ｃに示す。延長後、図１２Ｄに示されるように、非相補的ＳＤＥは失われる。ＳＤＥが失われると、鎖が区別不可能となるため、二本鎖配列決定は生じることができない。

【０２０４】
アダプター連結のニック翻訳法の使用を可能にし、ＳＤＥを保持する１つのアプローチは、以下の通りである。

【０２０５】
縮重または半縮重ＳＭＩ配列を含むように修飾されているＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）アダプター「Ａ」の一例が、図１２Ｅに示される。いかなるＳＤＥも存在しないことに留意されたい。「Ａ」は、プライマー部位である。アスタリスクは、非脱リン酸化５’塩基を表す。Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）Ｐ１プライマーの一例が、図１２Ｆに示される。Ｐ１は、プライマー部位を表す。アスタリスクは、脱リン酸化５’塩基を示す。

【０２０６】
二本鎖ＤＮＡへの図１２Ｅ及び図１２Ｆの各アダプターの連結後、図１２Ｇの構造が作製される。２つのＰ１または２つのＡプライマー部位を有する生成物はクラスター増幅しないため、それらは示されない。明確さのために、非連結アダプター鎖も示されない。

【０２０７】
次に、典型的なニック翻訳プロトコルに従って、鎖置換ポリメラーゼ（例えば、その強い鎖置換活性のためにいくつかの市販のキットにおいて使用される、Ｂｓｔポリメラーゼ）が添加される。しかしながら、図１２Ｈに示されるように、４つのｄＮＴＰのうちの１つのみ（この実施例ではｄＧＴＰ）が最初に添加され、故にＴ－ｄＧＴＰ誤組み込みが生じるだろう（注目すべきことに、この誤組み込み事象は、適切な反応条件下でいくつかのＤＮＡポリメラーゼについて生じさせられ得る。例えば、ＭｃＣｕｌｌｏｃｈ　ａｎｄ　Ｋｕｎｋｅｌ，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ１８：１４８－１６１（２００８）及びその中で引用される参考文献を参照されたい）。

【０２０８】
ミスマッチ組み込みは、特定の条件下でかなり効率的であり得る一方で、ミスマッチ延長及び第２のミスマッチの作製はかなり非効率的である（ＭｃＣｕｌｌｏｃｈ　ａｎｄ　Ｋｕｎｋｅｌ，２００８）。故に、適切な条件をもって、ヌクレオチド組み込みはミスマッチが生じた後に停止するだろう。この時点で、ポリメラーゼが４つ全てのｄＮＴＰに対するアクセスを有するように、残りの３つのｄＮＴＰが添加され得る。「上部」鎖の増幅生

成物が「下部」鎖の増幅生成物から区別可能であるような非相補的位置を有する、図１２Ｉに示される構造を作製するために、残りのアダプター配列がコピーされるだろう。

【０２０９】

ＰＣＲ後、元の「上部」鎖から生じる生成物は、図１２Ｊに示される通りであり、元の「下部」鎖から生じるＰＣＲ生成物は、図１２Ｋに示される通りである。

【０２１０】

「上部」鎖生成物の配列決定は、図１２Ｌに示される構造をもたらし、「下部」鎖生成物の配列決定は、図１２Ｍに示される構造をもたらすだろう。

【０２１１】

配列決定生成物は、導入されるミスマッチに基づいて、互いに区別することができることに留意されたい。

【０２１２】

この概念をＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）アダプターで実施する具体的な一例を、以下に示す。

【０２１３】

Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）アダプターは、以下の配列を使用し得る。

アダプターＰ１

【化９】

5′　　CCACTACGCCTCCGCTTTCCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT 3′（配列番号１５）

3′ T*T*GGTGATGCGGAGGCGAAAGGAGAGATACCCGTCAGCCACTA 5′(配列番号１６）

アダプターＡ

【化１０】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG 3′（配列番号１７）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC 5′（配列番号１８）

アスタリスク「＊」は、ホスホロチオエート結合を表す。

【０２１４】

アダプターＡの配列は、以下のように修飾され得る。ＮＮＮＮは、縮重または半縮重ＳＭＩ配列（４つのヌクレオチドが示されるが、この配列の長さは任意である）を示し、ＭＭＭＭは、ＮＮＮＮの相補体を示す。以前に記載されているように、二本鎖配列決定は、ＳＭＩ配列なしで実行することができるが、ここでは、ＳＭＩは、この概念を二本鎖分子タグ付けによって適用する具体的な一例として示される。

【０２１５】

修飾アダプターＡ

【化１１】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **NNNN AAC** 3′（配列番号１９）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **MMMM TTG** 5′(配列番号２０）

【０２１６】

アダプターＡ及びＰ１は、配列決定されるＤＮＡ分子の反対の末端に結合する。単純化のため、分子のアダプターＡ末端のみが示され、同様に単純化のため、二本の鎖はそれぞれＸ’及びＹ’として示される。配列決定される断片の長さが使用される配列決定プロセスと適合する限り、任意の長さの任意のＤＮＡ配列を使用することができる。

【０２１７】

「上部」鎖は連結されるが、「下部」鎖は連結されず、ニック（｜として示される）を残す

【化１２】

5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG**NNNNAAC**XXXXXXXXX 3′（配列番号２１）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC**MMMMTTG**|YYYYYYYYY 5′(配列番号２２）

【０２１８】

鎖置換ポリメラーゼがｄＧＴＰとともに添加される。Ｇは、５’－３’方向において遭遇される第１の位置（Ｃの反対のＧの正確な組み込み）、及び遭遇される第２の位置（Ａの反対のＧの不正確な組み込み）に組み込まれる。ミスマッチ後の不正確な塩基の延長は非効率的であるため、ポリメラーゼ濃度、反応時間、及び緩衝剤条件の適切な条件下で、ポリメラーゼは失速し、更なる組み込みは生じない。「下部」アダプター鎖の最初２つのヌクレオチドはこの反応中に置換され、以下の略図にアダプター－ＤＮＡ構築物に以下に示されることに留意されたい。新たに組み込まれた塩基を太字で示す。

【化１３】

5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNAACXXXXXXXXX 3′

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTCMMMMT**GG**YYYYYYYYY 5′

\

TG

（上：配列番号２３及び下：配列番号２４）

【０２１９】

ここで、４つ全てのヌクレオチドがポリメラーゼにとって利用可能であるように、ｄＣＴＰ、ｄＡＴＰ、及びｄＴＴＰが反応に添加される。鎖置換合成が進行し得、中間体生成物が説明目的で以下に示される。

【化１４】

5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNAACXXXXXXXXX 3′

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAG**GCTGAGTCMMMMTGG**YYYYYYYYY 5′

\

GCTGAGTCMMMMTTG

（上：配列番号２５、中間：配列番号２６、及び下：配列番号２７）

【０２２０】

鋳型の末端に到達した後、アダプターの元の「下部」鎖は完全に置換され（示さず）、相補的ではない単一の塩基対（Ａ：Ｇ塩基対、下線）を有する、完全に合成された「下部」鎖が存在する。

【化１５】

5′ CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGNNNNAACXXXXXXXXX 3′（配列番号２８）

3′ **GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTCMMMMTGG**YYYYYYYYY 5′（配列番号２９）

【０２２１】

その後、この構築物を、典型的なＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）プロトコルに従って、ＰＣＲ増幅及び配列決定に使用することができる。注目すべきことに、ＰＣＲ増幅は、「上部」鎖及び「下部」鎖の両方に由来する生成物をもたらし、これらの生成物は、ニック翻訳中に導入される非相補的塩基対のために、互いに区別することができる。

【０２２２】

「上部」鎖から生じる生成物は、以下の形態のものであるだろう（塩基ミスマッチの位置に下線を引く）。

【化１６】

TCAGNNNNAACXXXXXXXXX（配列番号３０）

【０２２３】

対照的に、「下部」鎖から生じる生成物は、以下の形態のものであるだろう（塩基ミスマッチの位置に下線を引く）。

【化１７】

TCAGNNNNACCXXXXXXXXX（配列番号３１）

【０２２４】

「下部」鎖生成物は、アダプター－連結されたＤＮＡの「下部」鎖内に最初に存在した配列の逆相補体である（故にニック翻訳中に導入される塩基誤挿入であるＧヌクレオチドは、配列決定中にＣヌクレオチドとして読み取られる）ことに留意されたい。

【０２２５】

ここで、エラー訂正のために、二本の鎖の各々から生じる増幅重複を互いに比較することができる。二本鎖ＤＮＡの所与の分子から生じる「上部鎖」生成物は、タグ配列ＮＮＮＮＡＡＣを有するだろう。対照的に、「下部」鎖生成物は、タグ配列ＮＮＮＮＡＣＣを有するだろう。故に、以前に記載されているように、二本の鎖からの重複は、エラー訂正の目的で分解され得る（Ｓｃｈｍｉｔｔ　ｅｔ　ａｌ，ＰＮＡＳ２０１２）。

【０２２６】

ニック翻訳後のミスマッチの導入

上記に対する代替的なアプローチは、存在する４つ全てのヌクレオチドについてニック翻訳を完了し、その後、鋳型鎖内の塩基を異なる塩基に変化させることだろう。

【０２２７】

プライマー配列及びその相補体（Ｐ／Ｐ’）、Ｕ－Ａ塩基対（Ｕ＝ウラシル）、ならびに一本鎖ＳＭＩ配列及びその相補体（α／α’）を含有するアダプターを図１３Ａに示し、アスタリスクは、脱リン酸化５’末端を表す。

【０２２８】

図１３Ａのアダプターが、配列決定される二本鎖ＤＮＡ分子に連結された後、図１３Ｂに示されるように、単一鎖ニックが脱リン酸化部位に残る。ここでは、「上部」鎖は、標的ＤＮＡ分子内の５’リン酸のために連結するが、「下部」鎖は、アダプター内の５’リン酸の欠如のために標的ＤＮＡには連結せず、ニックを残す。

【０２２９】

鎖置換合成は、ポリメラーゼ（例えば、Ｂｓｔポリメラーゼ）及び４つ全てのｄＮＴＰで実行することができ、図１３Ｃに示される構造をもたらす。

【０２３０】

結果として得られる延長された生成物は、元のアダプター内で現れたように、ここで再度現れる。図１３Ｄに示されるように、非対称のいかなる部位もまだ存在しない。

【０２３１】

ポリメラーゼ及びｄＮＴＰを除去するために、精製ステップが実行され得る。その後、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ及び適切なＡＰエンドヌクレアーゼを添加することによって、（図１３Ｄに示される構造の）「上部」鎖からウラシルを除去し、図１３Ｅに示される単一ヌクレオチドギャップをもたらすことができる。

【０２３２】

次に、非鎖置換ポリメラーゼ（例えば、高度にエラーを受け易く、塩基誤組み込みを促進するスルホロブスＤＮＡポリメラーゼＩＶ）が、単一ヌクレオチド（例えば、他のヌクレオチドではなくｄＧＴＰ）とともに添加される。この実施例において、これは、Ａの反対のＧの誤組み込みをもたらすだろう。結果として得られるニックはＤＮＡリガーゼで封鎖

され、図１３Ｆに示されるアダプター内にミスマッチを有する生成物をもたらし得る。

【０２３３】

図１３Ｇに示されるように、増幅及び配列決定後、「上部」鎖から生じる生成物は、同一のＳＭＩ配列を担持する配列決定読み取り上にＧまたはＴ塩基のいずれかを有しているために、「下部」鎖から生じる生成物から区別可能である。

【０２３４】

この実施例は、Ｇ－Ａミスマッチの作製によって説明されるが、分子内のいかなる位置の１つ以上の塩基のいかなる他のミスマッチも同一の効果を有することは、明らかだろう

【０２３５】

この概念をＩｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ（商標）プラットフォームに適用する具体的な一例を、以下に示す。

【０２３６】

太字の標準配列への付加（Ｕ＝ウラシル）を有する以下の「修飾アダプターＡ」を考慮する。

【化１８】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG **U NNNN C** 3′（配列番号３２）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTC **A MMMM G** 5′（配列番号３３）

【０２３７】

アダプターは上記のように標的ＤＮＡ分子に連結され、ニックの位置は「｜」として示される。

【化１９】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGUNNNNCXXXXXXXXX 3′（配列番号３４）

3′ T*T*GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTCAMMMMG|YYYYYYYYY 5′（配列番号３５）

【０２３８】

ここで、４つ全てのｄＮＴＰの存在下で鎖置換ポリメラーゼを使用して、アダプターの「下部鎖」の完全な鎖置換を可能にする（新たに組み込まれた塩基は太字、元の下部アダプター鎖は置換されており、示されない）。

【化２０】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGUNNNNCXXXXXXXXX 3′（配列番号３６）

3′　　**GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTCAMMMMG**YYYYYYYYY 5′（配列番号３７）

【０２３９】

生成物を精製して、ｄＮＴＰを除去し、その後、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ及びＡＰエンドヌクレアーゼを添加して、「上部」鎖からウラシルを除去し、単一ヌクレオチドギャップを残す。

【化２１】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG NNNNCXXXXXXXXX 3′（配列番号３８）

3′　　GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTCAMMMMGYYYYYYYYY 5′（配列番号３９）

【０２４０】

次に、非鎖置換エラープローンポリメラーゼ（例えば、スルホロブスＤＮＡポリメラーゼＩＶ）をｄＧＴＰとともに添加し、これは、単一ヌクレオチドギャップのＡの反対のＧの組み込みをもたらす。その後、リガーゼを添加して、「上部」鎖に無傷アダプター－ＤＮＡ生成物をもたらし得る。これは、非相補的塩基対（下線を引いた位置）をもたらす。

【化２２】

5′　　CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGGNNNNCXXXXXXXXX 3′（配列番号４０）

3′　　GGTAGAGTAGGGACGCACAGAGGCTGAGTCAMMMMGYYYYYYYYY 5′（配列番号４１）

【０２４１】

この生成物は、直前の実施形態に記載される方法に類似する方法で、エラー訂正に使用することができる。

【０２４２】

ニック翻訳後のミスマッチの導入

「ニック翻訳中のＳＤＥの導入」と題する実施形態は、アダプター配列内でニック翻訳中に非対称ＳＤＥがいかに導入され得るかを示した。可能性としてはアダプターが添加される前にすら、非対称部位（ＳＤＥ）がライブラリ分子内に組み込まれるように、同一の原理がＤＮＡ分子ライブラリ自体に適用され得る。これは、様々な方法で達成することができる。以下は単なる一例に過ぎない。

【０２４３】

「上部」鎖及び「下部」鎖を有する二本鎖ＤＮＡ分子を、図１４Ａに示す。ＤＮＡ分子は、ライブラリ調製のために、様々な方法で断片化され得る。血漿中の無細胞ＤＮＡなどのいくつかのＤＮＡ源は既に小片であり、いかなる別個の断片化ステップも必要とされない。音響剪断は、しばしば使用される方法である。半ランダム酵素的剪断法が使用されてもよい。定義された認識部位で切断する非ランダムエンドヌクレアーゼは、別の方法である。この実施例において、５’オーバーハングを残すエンドヌクレアーゼを使用して、図１４Ｂに示されるように、同様に５’オーバーハングした断片のライブラリを作製する。

【０２４４】

この非対称状態は、ポリメラーゼによってコピーされる第１のヌクレオチドと相補的ではない単一ヌクレオチドのみの存在下でポリメラーゼを使用することによって、配列非対称へと変換され得る。この実施例において、ｄＧＴＰが使用され、これはＴ－ｄＧＴＰ誤組み込みをもたらすだろう（そのような誤組み込みは、適切な反応条件下でいくつかのＤＮＡポリメラーゼについて生じさせられ得る。ＭｃＣｕｌｌｏｃｈ　ａｎｄ　Ｋｕｎｋｅｌ，Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ１８：１４８－１６１（２００８）及びその中で引用される参考文献を参照されたい）。２つのミスマッチを有する部分的二本鎖ＤＮＡ分子を、図１４Ｃに示す。

【０２４５】

次に、４つ全てのヌクレオチドが反応に添加され、コピーはＤＮＡ分子が二本鎖になるまでＤＮＡ分子の末端を延長し続ける。各断片末端上にミスマッチバブルが生成され、図１４Ｄに示される２つのＳＤＥを形成する。

【０２４６】

その後、二本鎖配列決定アダプターがＤＮＡ分子に連結され得る。図１４Ｅに示される例示的なアダプターは、相補体Ｐ’を有するプライマー部位Ｐ、相補体Ｏ’を有する異なるプライマー部位Ｏ、及び相補体α’を有する縮重または半縮重ＳＭＩを有する。

【０２４７】

図１４Ｄの二本鎖ＤＮＡ分子と図１４Ｅのアダプターとの間に連結が実行されて、図１４Ｆの構造が生成される。以前の実施形態において論じられるように、同一のアダプター配列のうちの２つに連結される生成物は無視され得るが、これは、それらが適切な条件下では増幅しないためである。

【０２４８】

ＰＣＲ後、「上部」鎖に由来する生成物は、図１４Ｇに示される通りであり、「下部」鎖に由来する生成物は、図１４Ｈに示される通りである。

【０２４９】

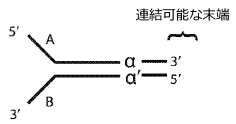
プライマーＰを使用する配列決定は、図１４Ｉに示されるそれぞれの鎖から以下の配列を

もたらすだろう。
【０２５０】
ＳＭＩ配列後のＣ対Ｔの存在は、「上部」鎖の読み取りと、「下部」鎖から得られる読み取りとの区別を可能にすることに留意されたい。
【０２５１】
類似するＳＤＥ標識は、変異原性ヌクレオチド類似体を使用して３’陥凹末端ギャップを充填すること、または他の方法によって、同様に達成することができる。
【０２５２】
他の剪断方法が使用され、ＳＤＥを作製するように、充填前にエキソヌクレアーゼによって３’陥凹末端が作製されてもよい。
【０２５３】
広義には、この実施例は、アダプター自体とは独立した方法で、ＳＤＥが導入され得ることを説明する。二本鎖配列決定が生じるためには、各最終適応した分子内のいくつかの形態のみのＳＭＩ及びＳＤＥが、二本鎖の各鎖から得られた配列が互いに遡って関連付けられ、しかし同時に互いに決定的に区別されることを可能にする。これらの要素は、上記に考慮されるように様々な形態を取り、アダプター連結前、連結中、または連結後に導入され得る。
【０２５４】
二本鎖配列決定に適切な分子の組み立ての変異形
上記に開示される実施形態は、二本鎖配列決定のための改善された方法を説明し、組み立てられる最終分子は、少なくとも１つの鎖定義要素（ＳＤＥ）及び少なくとも１つの単一分子識別子（ＳＭＩ）配列を含み、ＳＤＥ及びＳＭＩの両方は、配列決定されるＤＮＡの二本鎖または部分二本鎖分子に結合する。しかしながら、ＳＭＩ及びＳＤＥは単一アダプター内に含まれている必要はなく、それらは単純に、理想的には任意の増幅及び／もしくは配列決定ステップ前またはステップ中に、最終分子内に存在する必要がある。
【０２５５】
例えば、ＳＤＥは、図４Ｄに示されるように、酵素反応を介した連結後にアダプター内に作製されてもよい。同様に、（ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１に）元来記載されているように、いくつかの実施形態において、個々のＤＮＡライブラリ断片の剪断点の特定の配列が、アダプター内に含まれる外来性ＳＭＩの添加の必要性なく、内在性ＳＭＩ配列としての役割を果たし得る。断片が参照ゲノムに整列されるとき、「剪断点」は、ＤＮＡ断片のいずれかの末端のマッピング座標と見なされ得る。いずれか一方の末端または両末端の座標を「内在性ＳＭＩ」として使用して、単独、または１つ以上の外来性ＳＭＩ配列の配列との組み合わせのいずれかで、別個のＤＮＡ分子を互いに区別することができる。
【０２５６】
以下の一覧表は、そのようなアダプターの非限定的な変異形を含む。
【０２５７】
－－ＳＤＥは両方の鎖内に存在するが、ＳＭＩ及びプライマー結合部位は一方のアダプター鎖内のみに存在する。その後、これらの要素は、ポリメラーゼによって他の鎖にコピーされる。
【０２５８】
－－いかなるＳＤＥも存在しない。ＳＭＩ及びプライマー結合部位は、一本の鎖内のみにある。存在する１つの不正確なｄＮＴＰのみについてポリメラーゼを使用して、ＳＤＥを作製し、その後、残りのｄＮＴＰを添加して、ポリメラーゼによるＳＭＩ及びプライマー結合部位の二本鎖化を可能にする。
【０２５９】
－－連結ドメインは、（第２のアダプター鎖が結合しないように）一方のアダプター鎖内にしか存在しない。その後、新たな第２のアダプター鎖が、ポリメラーゼによって第１のアダプター鎖からコピーされる。これが、ＳＭＩ及びプライマー結合ドメインを作製する。上記の通り、１つの不正確なｄＮＴＰのみを最初に添加して、ＳＤＥを作製し、その後

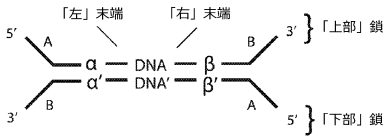
、残りのｄＮＴＰを添加する。このアプローチを、上記に開示される実施形態に示す。
【０２６０】
－－連結ドメインは、（第２のアダプター鎖が結合しないように）一方のアダプター鎖内のみに存在し、このアダプター鎖は、ウラシルを含む。その後、新たな第２のアダプター鎖が、４つ全てのヌクレオチドについて、ポリメラーゼによって第１のアダプター鎖からコピーされる。その後、元のアダプター鎖内のウラシル塩基を、ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ及び適切なＡＰエンドヌクレアーゼによって酵素的に除去する。その後、存在する不正確な単一ヌクレオチドとともにＤＮＡポリメラーゼを使用して、ＤＮＡ内のギャップにミスマッチを挿入し、その後、ギャップをＤＮＡリガーゼによって連結する。図４に関連する上記に開示される実施形態において、このアプローチをより詳細に示す。
【０２６１】
－－第１の結合したアダプターは、両方の鎖内に単独でＳＭＩドメインを有する。その後、同様に両方の鎖内にプライマー結合ドメイン及びＳＤＥを有する第２のアダプターが、これに結合する。
【０２６２】
－－第１の結合したアダプターは、両方の鎖内にＳＭＩ及びＳＤＥドメインを有する。両方の鎖内にプライマー結合ドメインを有する第２のアダプターが、結合する。
【０２６３】
－－第１の結合したアダプターは、両方の鎖内にＳＭＩドメインを有する。その後、２つの非相補的または部分的非相補的プライマー結合ドメインを有する第２の「Ｙアダプター」が、結合する。
【０２６４】
－－第１の結合したアダプターは、両方の鎖及び一本鎖領域内に、連結ドメインとともにＳＭＩを有する。オリゴヌクレオチドは、一本鎖領域内にアニールされ、連結されており、ミスマッチは、ＳＤＥドメインを作製するオリゴヌクレオチド内に含まれる。
【０２６５】
－－他の実施形態において、バブルの位置は変更されてもよく、ｎ量体の長さは変化してもよく、ｎ量体は完全に排除され、ＤＮＡ分子の末端の剪断点から、各鎖からの重複が代わりに特定されてもよい。変異形ヌクレオチドまたはヌクレオチド様分子が、ＤＮＡ（例えば、ロックド核酸（ＬＮＡ）及びペプチド核酸（ＰＮＡ）ならびにＲＮＡ）内で使用されてもよい。
【０２６６】
本明細書に開示される変異形の各々が、本発明に含まれる。
【０２６７】
これらの変異形の各々において、同一の一般的概念が適用され、二本鎖配列決定のための最終分子は、配列決定されるＤＮＡのセグメントに接続されたＳＤＥ及びＳＭＩのコア要素を含む。この場合ＳＤＥとしての役割を果たす、（例えば、「Ｙ」構成の）２つの非対称プライマー結合部位と、二本鎖ＤＮＡ分子に結合したＳＭＩ配列とを含むアダプターによって二本鎖配列決定が実行される、（ＷＯ２０１３／１４２３８９Ａ１における）二本鎖配列決定の初期の記述にも、同一の一般的概念が適用されることにもまた留意されたい。これらの構成要素は、必要な構成要素が、理想的には任意の増幅もしくは配列決定ステップ前またはステップ中に最終分子内に存在する限り、様々な方法で標的ＤＮＡ分子上に組み立てることができる。
【０２６８】
二本鎖配列決定のための代替的なデータ処理スキーム
二本鎖配列決定は、２つの個々のＤＮＡ鎖の各々から生じる増幅された重複の「コンセンサス」を得て、２つの一本鎖コンセンサス配列を得、その後、結果として得られる一本鎖コンセンサスを比較して、二本鎖コンセンサス配列を得ることによって実行することができる。単一分子の増幅された重複の配列を位置毎に「平均化」するこのアプローチは、いくつかの設定（例えば、重度に損傷したＤＮＡ内の所与の位置で反復増幅エラーが生じ得

る場合）においては望ましくない可能性があり、故に異なるデータ処理キームを有するいくつかの設定において、より信頼できる結果を得ることができる。
【０２６９】
代替的なアプローチとしては、以下のものが挙げられる。
【０２７０】
－－「上部」鎖及び「下部」鎖に対応する所与のタグ配列を有する分子内、１つの「上部」鎖及び１つの「下部」鎖を任意で選び、二本の鎖の配列を比較する。両方の鎖が一致する位置は維持し、一致しない位置を未定義としてマークする。結果として得られる配列読み取りを、二本鎖読み取りと呼ぶ。
【０２７１】
－－同一のタグ配列を共有する、任意で選択された「上部」鎖及び「下部」鎖のためのこのプロセスを繰り返して、一連の「二本鎖読み取り」を得る。
【０２７２】
－－所与のタグ配列を有する結果として得られる「二本鎖読み取り」内、例えば、参照配列と比較して、読み取り内に最少の配列変化及び／または最少の未定義位置を有する二本鎖読み取りを選択する。その後、この読み取りを、出発ＤＮＡ二本鎖の正しい配列を表す可能性が最も高い読み取りと見なすことができる。
【０２７３】
一実施形態において、そのようなアプローチは、後述のアルゴリズムによって特に可能となり得る。これは、説明目的の単一の例に過ぎず、多くの他のアルゴリズムを使用して、二本鎖コンセンサス読み取りを形成することができることが理解される。更に、二本鎖配列決定の具体的な一実施形態のための実施例を示すが、二本鎖配列決定の多くの他の実施形態のための類似の例を適切に準備することができる。
【０２７４】
「バブル」配列を使用して、各二本鎖の「上部」鎖がＧＣＧＣと標識されること、及び「下部」鎖がＴＡＴＡと標識されること（両方の鎖は同一の単一分子識別子（ＳＭＩ）配列を共有する）をもたらす、本明細書に開示される一実施形態において、以下のステップを使用することができる。
１．実験からの全ての配列決定読み取りを含有するファイルを準備する。
２．このファイルを２つのファイル（ＧＣＧＣと標識される読み取りを含有する１つのファイルは「ＧＣＧＣ」と呼ばれ、ＴＡＴＡと標識される読み取りを含有する第２のファイルは「ＴＡＴＡ」と呼ばれる）に分ける。
３．「ＧＣＧＣ」ファイル内の任意の読み取りを選び、そのＳＭＩタグを読み取り、「ＴＡＴＡ」ファイル内でマッチするＳＭＩタグを検索する。
４．マッチが見出される場合、これらの２つの配列から新たな配列を作製する。新たな配列内では、一致する読み取り内の全ての配列位置は維持し、２つの読み取り内の全ての一致しない位置を未定義としてマークする。この新たな配列を、「二本鎖」と呼ばれるファイルに書き込み、「ＧＣＧＣ」ファイル及び「ＴＡＴＡ」ファイルからの２つの配列を除去する。
マッチが見出されない場合、「ＧＣＧＣ」ファイルからの配列を除去し、それを「非対応」と呼ばれるファイルに書き込む。
５．「ＧＣＧＣ」ファイルから別の任意の読み取りを選び、ステップ３～４を再度実行する。
６．「ＧＣＧＣ」ファイル内にいかなる読み取りも残らなくなるまで続ける。
【０２７５】
結果として得られる「二本鎖」ファイル内で、マッチするＳＭＩタグ配列を有する全ての読み取りを考慮する。場合によっては、同一のＳＭＩタグを有する複数の「二本鎖」読み取りが存在し得る（これは、例えば、単一の出発ＤＮＡ分子の複数のＰＣＲ重複が原因であり得る）。これらは、以下のアプローチのうちのいずれかによって単一の二本鎖読み取りに変換することができる。

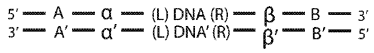
【０２７６】
－－これらの読み取り内で、参照ゲノム配列と比較して、最少のミスマッチを有する読み取りを選択し、残りの読み取りを処分する。
【０２７７】
－－あるいは、参照ゲノム配列と比較して、最少の未定義位置を有する読み取りを選択し、残りの読み取りを処分する。
【０２７８】
－－あるいは、共有されたＳＭＩタグ配列を有する読み取り内でコンセンサスを作製して、二本鎖コンセンサス読み取りを作製する。
【０２７９】
当業者にとって、上記の選択肢の組み合わせを使用して、二本鎖コンセンサス読み取りが開発され得ること、及び上述されていないいくつかの他の方法が使用され得ることは明らかだろう。
【０２８０】
他の実施形態
本発明が、その発明を実施するための形態と組み合わせて記載されている一方で、上述の記述は、説明が意図され、本発明の範囲の限定は意図されず、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定義される。他の態様、利点、及び修飾が、以下の特許請求の範囲内である。
【図面】
【図１Ａ】



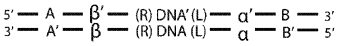
【図１Ｂ】



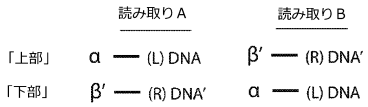
【図１Ｃ】



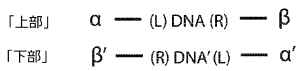
【図１Ｄ】



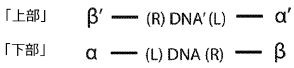
【図１Ｅ】



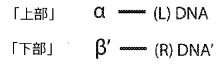
【図１Ｆ】



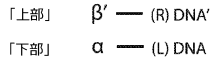
【図１Ｇ】



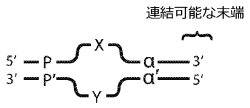
【図１Ｈ】



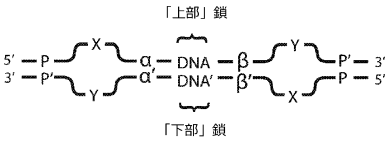
【図１Ｉ】



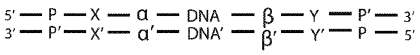
【図２Ａ】



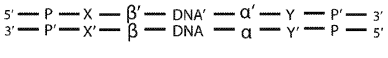
【図２Ｂ】



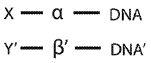
【図２Ｃ】



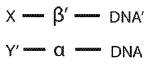
【図２Ｄ】



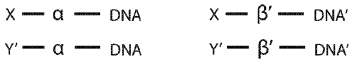
【図２Ｅ】



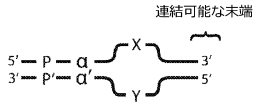
【図２Ｆ】



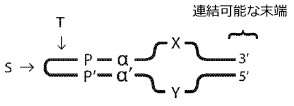
【図２Ｇ】



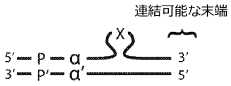
【図２Ｈ】



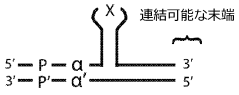
【図２Ｉ】



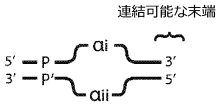
【図２Ｊ】



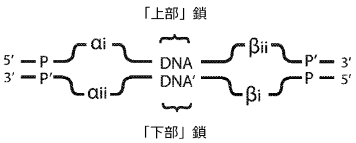
【図２Ｋ】



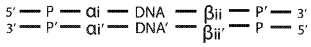
【図３Ａ】



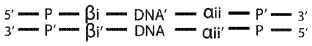
【図３Ｂ】



【図３Ｃ】



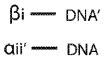
【図３Ｄ】



【図３Ｅ】



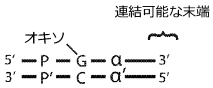
【図３Ｆ】



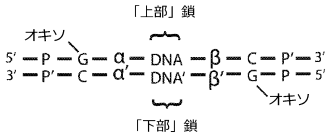
【図３Ｇ】



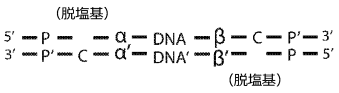
【図４Ａ】



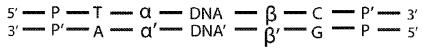
【図４Ｂ】



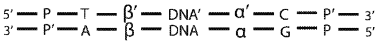
【図４Ｃ】



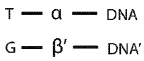
【図４Ｄ】



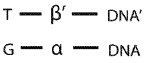
【図４Ｅ】



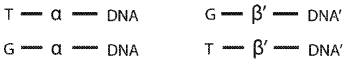
【図４Ｆ】



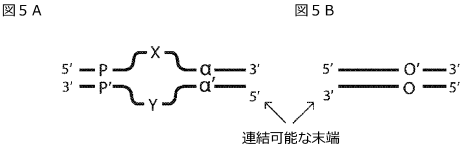
【図４Ｇ】



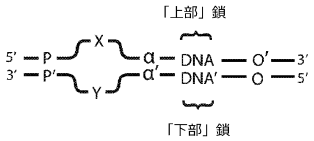
【図４Ｈ】



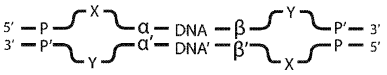
【図５Ａ－５Ｂ】



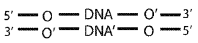
【図５Ｃ】



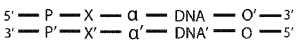
【図５Ｄ】



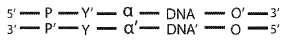
【図５Ｅ】



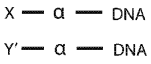
【図５Ｆ】



【図５Ｇ】

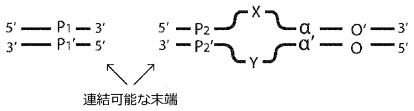


【図５Ｈ】

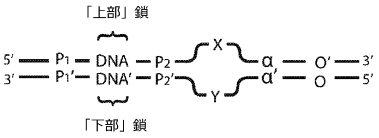


【図６Ａ－６Ｂ】

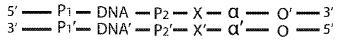
図６Ａ　　図６Ｂ



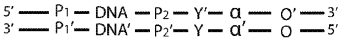
【図６Ｃ】



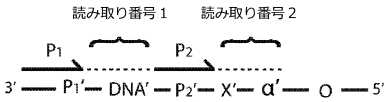
【図６Ｄ】



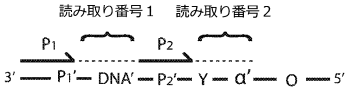
【図６Ｅ】



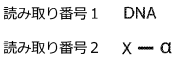
【図６Ｆ】



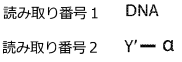
【図６Ｇ】



【図６Ｈ】

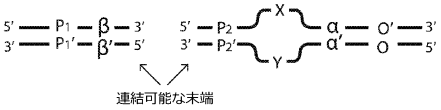


【図６Ｉ】

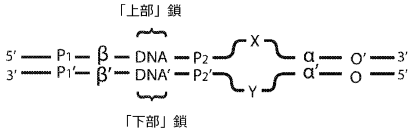


【図７Ａ－７Ｂ】

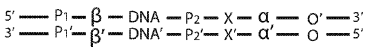
図７Ａ　　図７Ｂ



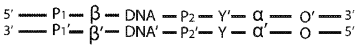
【図７Ｃ】



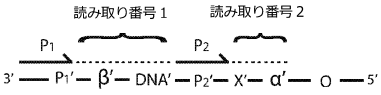
【図７Ｄ】



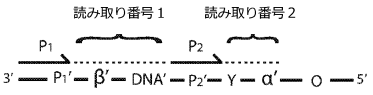
【図７Ｅ】



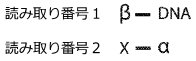
【図７Ｆ】



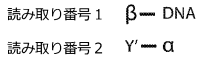
【図７Ｇ】



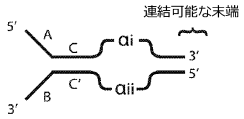
【図７Ｈ】



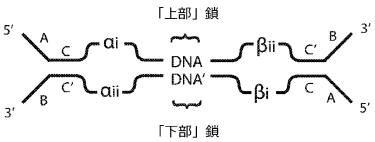
【図７Ｉ】



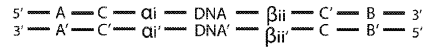
【図８Ａ】



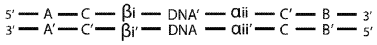
【図８Ｂ】



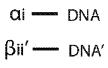
【図８Ｃ】



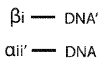
【図８Ｄ】



【図８Ｅ】



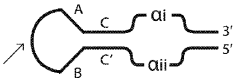
【図８Ｆ】



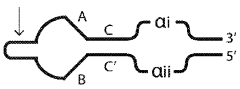
【図８Ｇ】



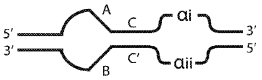
【図８Ｈ】



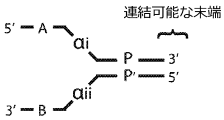
【図８Ｉ】



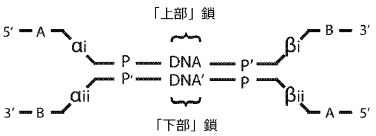
【図８Ｊ】



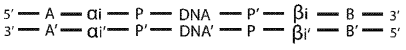
【図９Ａ】



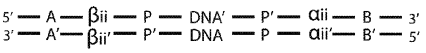
【図９Ｂ】



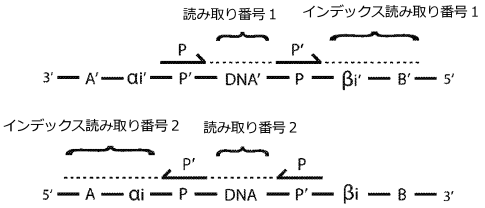
【図９Ｃ】



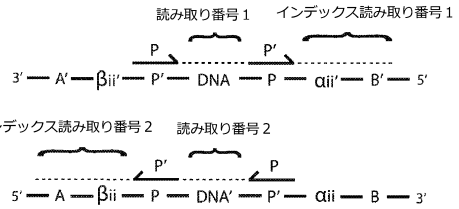
【図９Ｄ】



【図９Ｅ】



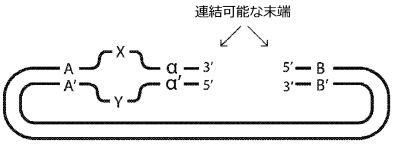
【図９Ｆ】



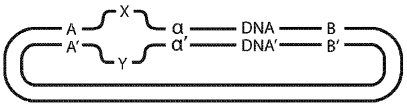
【図９Ｇ】

「上部」鎖に由来		「下部」鎖に由来	
読み取り番号１	DNA	読み取り番号１	DNA′
読み取り番号２	DNA′	読み取り番号２	DNA
インデックス番号１	βi	インデックス番号１	αii
インデックス番号２	αi′	インデックス番号２	βii′

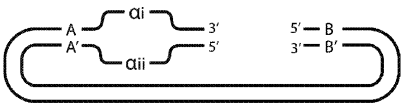
【図１０Ａ】



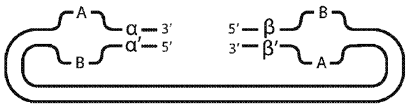
【図１０Ｂ】



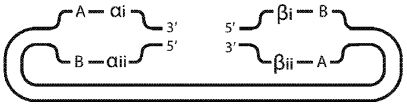
【図１０Ｃ】



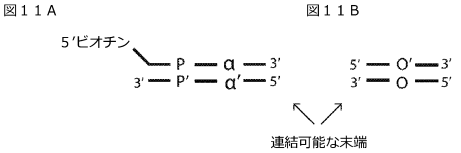
【図１０Ｄ】



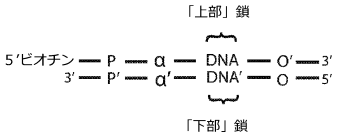
【図１０Ｅ】



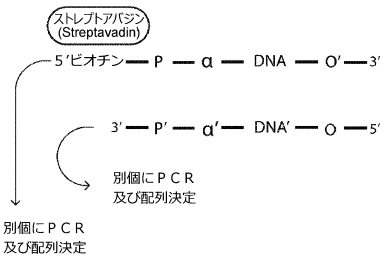
【図１１Ａ－１１Ｂ】



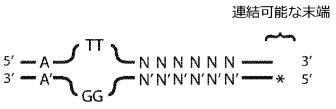
【図１１Ｃ】



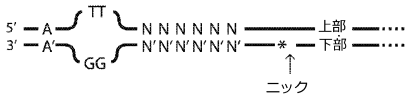
【図１１Ｄ】



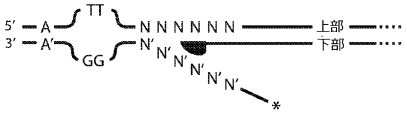
【図１２Ａ】



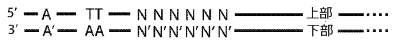
【図１２Ｂ】



【図１２Ｃ】



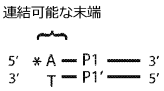
【図１２Ｄ】



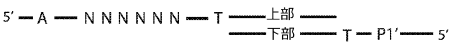
【図１２Ｅ】



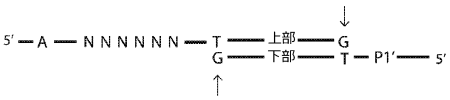
【図１２Ｆ】



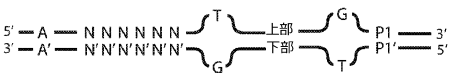
【図１２Ｇ】



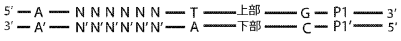
【図１２Ｈ】



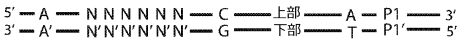
【図１２Ｉ】



【図１２Ｊ】



【図１２Ｋ】

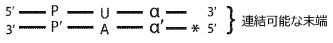


【図１２Ｌ】

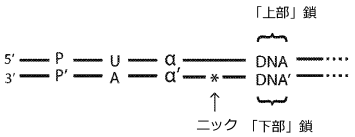
【図１２Ｍ】



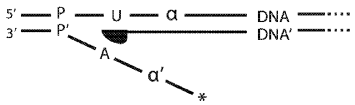
【図１３Ａ】



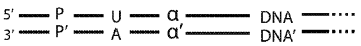
【図１３Ｂ】



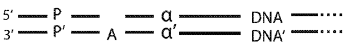
【図１３Ｃ】



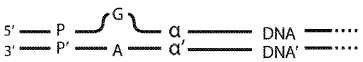
【図１３Ｄ】



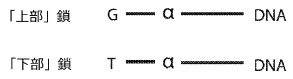
【図１３Ｅ】



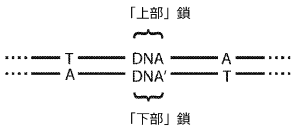
【図１３Ｆ】



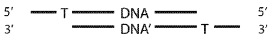
【図１３Ｇ】



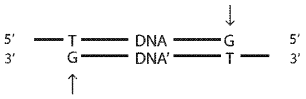
【図１４Ａ】



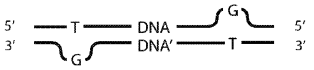
【図１４Ｂ】



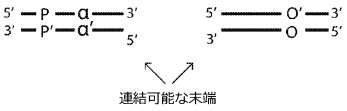
【図１４Ｃ】



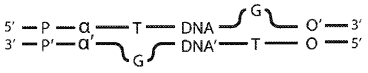
【図１４Ｄ】



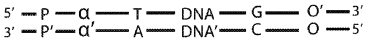
【図１４Ｅ】



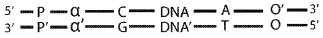
【図１４Ｆ】



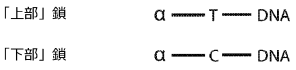
【図１４Ｇ】



【図１４Ｈ】



【図１４Ｉ】



【配列表】

2022017453000001.app

【手続補正書】
【提出日】令和３年１２月１日(２０２１.１２.１)
【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】
本明細書に記載の発明。
【外国語明細書】
20220174530001３８.pdf

フロントページの続き

アメリカ合衆国、ワシントン ９８１１２、シアトル、２６ティーエイチ・アベニュー・イースト２０２７
(72)発明者 ソーク，ジェシー・ジェイ
アメリカ合衆国、ワシントン ９８１２５、シアトル、ダーランド・アベニュー・ノースイースト１０７０４

Ｆターム（参考） 4B063 QA01 QA13 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62 QS34