

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7393351号
(P7393351)

(45)発行日 令和5年12月6日(2023.12.6)

(24)登録日 令和5年11月28日(2023.11.28)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10

Z Z N A

C 1 2 P 19/34 (2006.01)

C 1 2 P 19/34

A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/09

2 0 0

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A

請求項の数 34 (全189頁)

(21)出願番号 特願2020-564936(P2020-564936)

(86)(22)出願日 令和1年5月23日(2019.5.23)

(65)公表番号 特表2021-524246(P2021-524246
A)

(43)公表日 令和3年9月13日(2021.9.13)

(86)国際出願番号 PCT/GB2019/051423

(87)国際公開番号 WO2019/224544

(87)国際公開日 令和1年11月28日(2019.11.28)

審査請求日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(31)優先権主張番号 1808474.9

(32)優先日 平成30年5月23日(2018.5.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)

(73)特許権者 511252899

オックスフォード ナノポール テクノロ

ジーズ ピーエルシー

イギリス国 オックスフォード オーエッ

クス4 4ディーキュー オックスフォー

ド サイエンس パーク エドモンド ハレ

ー ロード ゴズリング ビルディング

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチドの合成法、システム、およびキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドをインビトロで合成する方法であって、前記方法が、合成サイクルを行うことを含み、各サイクルが、二本鎖ポリヌクレオチドを切断すること、およびヌクレオチド対を組み込むことによって前記切断された二本鎖ポリヌクレオチドを伸長することを含み、前記切断された二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖の末端が、前記所定の配列のヌクレオチドの付加によって伸長され、前記第1の鎖にハイブリダイズされる前記切断された二本鎖ポリヌクレオチドの第2の鎖の末端が、パートナーヌクレオチドの付加によって伸長され、それにより前記第1の鎖の前記組み込まれたヌクレオチドとヌクレオチド対を形成する、方法。

【請求項2】

(i) 各サイクルが、前記所定の配列の前記ヌクレオチドを、付着した可逆的ブロッキング基と一緒に付加することによって前記第1の鎖を伸長し、続いて前記第2の鎖を伸長することを含み、前記可逆的ブロッキング基が、前記第2の鎖が伸長される前または後に除去される、および／または

(ii) 各サイクルにおいて、前記ヌクレオチドが、切断された足場ポリヌクレオチドに組み込まれる、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

各サイクルが、

(1) 足場ポリヌクレオチドを提供することと、

(2) 前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することと、

(3) 前記所定の配列のヌクレオチドを、ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって前記切断された足場ポリヌクレオチドに付加することであって、前記ヌクレオチドが、前記酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、付加することと、

(4) 前記所定の配列の前記ヌクレオチドから前記可逆的ターミネーター基を除去する除去工程と、

(5) 連結ポリヌクレオチドを前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結する連結工程であって、前記連結ポリヌクレオチドが、前記所定の配列の前記ヌクレオチドに対するパートナーヌクレオチドを含み、連結時に、前記所定の配列の前記ヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドと対合する、連結工程と、を含む、請求項2に記載の方法。

10

【請求項4】

工程(1)が、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することを含み、前記合成鎖が、プライマー鎖部分を含み、前記支持鎖が、ユニバーサルヌクレオチドを含み、工程(2)が、前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断する切断工程を含み、前記部位が、前記支持鎖中の前記ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、前記切断工程が、前記支持鎖を切断すること、および前記足場ポリヌクレオチドから前記ユニバーサルヌクレオチドを除去することを含み、工程(5)において、前記連結ポリヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドおよび次のサイクルで使用するための切断部位を定義するユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖を含み、前記連結ポリヌクレオチドが、前記切断された足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖に連結され、それにより前記ヌクレオチド対を形成する、請求項3に記載の方法。

20

【請求項5】

前記方法が、第1のサイクル、第2のサイクル、及び繰り返し工程を含み、前記第1のサイクルが、

(1) 合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することであって、前記合成鎖が、プライマー鎖部分および一本鎖切断によって分離されたヘルパー鎖部分を含み、前記支持鎖が、ユニバーサルヌクレオチドを含む、提供することと、

(2) 前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断する切断工程であって、前記部位が、前記支持鎖中の前記ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、前記支持鎖を切断すること、および前記足場ポリヌクレオチドから前記ユニバーサルヌクレオチドを除去して、支持鎖と、前記プライマー鎖部分を含む合成鎖とを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを提供することを含む、切断工程と、

30

(3) ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって、前記切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの前記合成鎖の前記プライマー鎖部分の末端を、前記所定の配列の第1のヌクレオチドで伸長することであって、前記第1のヌクレオチドが、前記酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、伸長することと、

(4) 前記第1のヌクレオチドから前記可逆的ターミネーター基を除去する除去工程と、

40

(5) 二本鎖連結ポリヌクレオチドを、前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結する連結工程であって、前記連結ポリヌクレオチドが、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含み、相補的連結末端をさらに含み、前記相補的連結末端が、

(i) 前記支持鎖において、ユニバーサルヌクレオチドおよび第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドであって、前記第1のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖に突出している、ユニバーサルヌクレオチドおよび第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および前記ヘルパー鎖において、リン酸基を欠く末端ヌクレオチドを含み、

(ii) 前記支持鎖の連結時に、前記第1のヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドと対合する、連結工程と、

50

を含み、前記第2のサイクルが、

(6) 前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断する切断工程であって、前記部位が、前記支持鎖中の前記ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、前記支持鎖を切断すること、および前記足場ポリヌクレオチドから前記ユニバーサルヌクレオチドを除去して、支持鎖と、プライマー鎖部分を含む合成鎖とを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを提供することを含む、切断工程と、

(7) ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって、前記切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの前記合成鎖の前記プライマー鎖部分の末端を、前記所定のヌクレオチド配列の隣のヌクレオチドで伸長することであって、前記隣のヌクレオチドが、前記酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、伸長すること、

(8) 前記隣のヌクレオチドから前記ターミネーター基を除去する除去工程と、

(9) 二本鎖連結ポリヌクレオチドを、前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結する連結工程であって、前記連結ポリヌクレオチドが、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含み、相補的連結末端をさらに含み、前記相補的連結末端が、

(i) 前記支持鎖において、ユニバーサルヌクレオチドおよび隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドであって、前記隣のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖に突出している、ユニバーサルヌクレオチドおよび次のヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および前記ヘルパー鎖において、リン酸基を欠く末端ヌクレオチドを含み、

(ii) 前記支持鎖の連結時に、前記隣のヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドと対合する、連結工程と、

を含み、前記繰り返し工程が、

(10) 工程6~9を複数回繰り返して、所定のヌクレオチド配列を有する前記二本鎖ポリヌクレオチドを提供すること

を含む、請求項3または請求項4に記載の方法。

【請求項6】

(I) a) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置nを占め、位置nが、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置nの前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置nとn-1との間で切断され、位置n-1が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチド位置であり、

c) 前記第1サイクルの連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置nを占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置n+1を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置nが、工程5での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置nを占め、位置nが、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣のヌクレオチドによって占められる

10

20

30

40

50

前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、

i i . 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、 $n - 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣の前記ヌクレオチド位置であり、

e) 前記第 2 サイクルの連結工程 (工程 9) および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣の前記ヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル (工程 7) において組み込まれた前記所定の配列の前記隣の前記ヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であるか、または

(I I) a) 前記第 1 のサイクルの前記切断工程 (工程 2) の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n + 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣の前記ヌクレオチド位置であり、

b) 前記第 1 のサイクルの前記切断工程 (工程 2) において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、位置 $n - 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣の前記ヌクレオチド位置であり、

c) 前記第 1 サイクルの連結工程 (工程 5) において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 2$ を占め、前記ヘルパー鎖の最後から 2 番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n が、工程 5 での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 2 の位置であり、

d) 第 2 のサイクルの前記切断工程 (工程 6) および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i . 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第 1 の前記隣の前記ヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、 $n + 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣の前記ヌクレオチド位置であり、

i i . 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、 $n - 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣の前記ヌクレオチド位置であり、

e) 前記第 2 サイクルの連結工程 (工程 9) および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣の前記ヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 2$ を占め、前記ヘルパー鎖の最後から 2 番目のヌク

10

20

30

40

50

レオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程 7）において組み込まれた前記所定の配列の前記隣のアクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 2 の位置であるか、または

（ⅠⅠⅠ） a）前記第 1 のサイクルの前記切断工程（工程 2）の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 n を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、

10

b）前記第 1 のサイクルの前記切断工程（工程 2）において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断され、位置 $n - 1$ および $n - 2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチドおよび後続のアクレオチド位置であり、

c）前記第 1 サイクルの連結工程（工程 5）において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から 2 番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、工程 5 での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチド位置であり、

20

d）第 2 のサイクルの前記切断工程（工程 6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i．前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 n を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第 1 の前記隣のアクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、

30

ii．前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断され、位置 $n - 1$ および $n - 2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチドおよび後続のアクレオチド位置であり、

e）前記第 2 サイクルの連結工程（工程 9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣のアクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から 2 番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程 7）において組み込まれた前記所定の配列の前記隣のアクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチド位置であるか、または

40

（ⅠⅤ） a）前記第 1 のサイクルの前記切断工程（工程 2）の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 2$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖にお

50

ける位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 2 のヌクレオチド位置であり、

b) 前記第 1 のサイクルの前記切断工程（工程 2）において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、位置 $n - 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

c) 前記第 1 サイクルの連結工程（工程 5）において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、工程 5 での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第 1 のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 3 の位置であり、

d) 第 2 のサイクルの前記切断工程（工程 6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 2$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第 1 の前記隣接のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 2 のヌクレオチド位置であり、

ii. 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、位置 $n - 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

e) 前記第 2 サイクルの連結工程（工程 9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣接のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程 7）において組み込まれた前記所定の配列の前記隣接のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第 3 の位置である、

請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

(i) a) 前記第 1 サイクルの前記切断工程（工程 2）において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 3 のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

b) 前記第 1 のサイクルの前記連結工程（工程 5）において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖にお

10

20

30

40

50

ける位置 $n + 4$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された3つの位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置 4 であり、

c) 前記第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 3$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

d) 前記第2のサイクルの前記連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 4$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから2つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合するように構造化されるか、または

(i i) a) 前記第1サイクルの前記切断工程(工程2)において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第3のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

b) 前記第1のサイクルの前記連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $3 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置 4 であり、

c) 前記第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 3 + x$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

d) 前記第2のサイクルの前記連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、

e) x が、1～10以上の間の整数であり、 x が、工程(2)、(5)、(6)、および(9)で同じ整数である、請求項6(i v)に記載の方法。

【請求項8】

a) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n + 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断され、位置 $n - 1$ および $n - 2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

10

20

30

40

50

c) 前記第1サイクルの連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置nを占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置n+2を占め、前記ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置nが、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置n+2が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置nに対する前記支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置n+1を占め、位置nが、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、n+1が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチド位置であり、

ii. 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置n-1とn-2との間で切断され、位置n-1およびn-2が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

e) 前記第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置nを占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置n+2を占め、前記ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置nが、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた前記所定の配列の前記隣のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置n+2が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置nに対する前記支持鎖における第2のヌクレオチド位置である、請求項5に記載の方法。

【請求項9】

(i) a) 前記第1サイクルの前記切断工程(工程2)において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置n+2を占め、n+2が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置nに対する前記支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置nとn-1との間で切断され、

b) 前記第1のサイクルの前記連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置n+3を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから2つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置n+3が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置nに対して前記支持鎖における位置3であり、

c) 前記第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置n+2を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置nとn-1との間で切断され、

d) 前記第2のサイクルの前記連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサル

10

20

30

40

50

ヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合するように構造化されるか、または

(i i) a) 前記第 1 サイクルの前記切断工程 (工程 2) において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 2 + x$ を占め、 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第 2 のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

b) 前記第 1 のサイクルの前記連結工程 (工程 5) において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置 3 であり、

c) 前記第 2 のサイクルの前記切断工程 (工程 6) および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 2 + x$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

d) 前記第 2 のサイクルの前記連結工程 (工程 9) および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、

e) x が、 $1 \sim 10$ 以上の間の整数であり、 x が、工程 (2) 、 (5) 、 (6) 、および (9) で同じ整数である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

(i) 工程 (2) および／または (6) の前に、任意の 1 つ以上の合成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む前記足場ポリヌクレオチドが提供され、前記合成鎖が、ヘルパー鎖なしで提供される、および／または

工程 (2) および／または (6) の前に、任意の 1 つ以上の合成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、前記合成鎖が、前記足場ポリヌクレオチドから除去される、

請求項 5 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

(a) 各切断工程が、2 工程切断プロセスを含み、各切断工程が、前記ユニバーサルヌクレオチドを除去し、よって脱塩基部位を形成することを含む第 1 の工程と、前記支持鎖を前記脱塩基部位で切断することを含む第 2 の工程とを含む、または

(b) 各切断工程が、切断酵素を用いてユニバーサルヌクレオチドを除去することを含む 1 工程切断プロセスを含み、前記酵素が

(i) エンドヌクレアーゼ I I I 、

(i i) エンドヌクレアーゼ V I I I 、

(i i i) ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ (F p g) 、または

(i v) 8 - オキシグアニン DNA グリコシラーゼ (h O G G 1) である、

請求項 4 ～ 6 (i) 、および請求項 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記第 1 の工程が、ヌクレオチド除去酵素を用いて行われ、および／または

前記第 2 の工程が、脱塩基部位リナーゼ活性を有する酵素を用いて行われる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

脱塩基部位リアーゼ活性を有する前記酵素が、

(i) A P エンドヌクレアーゼ 1、

(i i) エンドヌクレアーゼ I I I (N 番目)、または

(i i i) エンドヌクレアーゼ V I I I である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記切断工程が、前記支持鎖を酵素で切断することを含む、請求項 4 ～ 5、請求項 6 (i i) および、請求項 6 (i i i) のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

(a) 前記酵素が、前記ユニバーサルヌクレオチドの隣にある前記ヌクレオチドの後の前記支持鎖を切断し、それにより前記合成鎖中に突出端を作成する、および／または

(b) 前記酵素が、エンドヌクレアーゼ V である、

請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

工程 (1)、(5)、および／または (9) において、

a) 前記ヘルパー鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されており、

b) 前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されている、

請求項 5 ～ 1 0、及び請求項 5 を引用する請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記連結ポリヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つが、前記相補的連結末端と反対の末端で、前記支持鎖および前記ヘルパー鎖を接続するヘアピンループを含む単一分子として提供される、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

各合成サイクルの前記連結ポリヌクレオチドが、前記相補的連結末端と反対の末端で、前記支持鎖および前記ヘルパー鎖を接続するヘアピンループをそれぞれ含む単一分子として提供される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、前記共通の表面に繫留されている、請求項 4 ～ 1 0 及び 1 6 ～ 1 8、並びに請求項 5 に従属する請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、1 つ以上の共有結合を介して、前記共通の表面に繫留されている、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 1 つ以上の共有結合が、前記共通の表面上の官能基と足場分子上の官能基との間に形成され、前記足場分子上の前記官能基が、アミン基、チオール基、チオリン酸基、またはチオアミド基である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記共通の表面上の前記官能基が、プロモアセチル基である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記プロモアセチル基が、N - (5 - プロモアセトアミジルペンチル) アクリルアミド (B R A P A) を使用して得られるポリアクリルアミド表面上に提供される、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記所定の配列のヌクレオチドから前記可逆的ターミネーター基を除去する前記除去工程が、前記連結工程の前または後に行われる、請求項 3 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記所定の配列の第 1 の／隣のヌクレオチドと対合するパートナーヌクレオチドが、前記第 1 の／隣のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドである、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記所定の配列の第 1 の／隣のヌクレオチドと対合するパートナーヌクレオチドが、前記第 1 の／隣のヌクレオチドと天然に相補的なヌクレオチドである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

(a) 合成サイクルが、微小流体システム内の液滴中で行われ、および／または

(b) 合成後、前記二本鎖ポリヌクレオチドの前記鎖が分離されて、所定の配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを提供する、および／または

(c) 合成後、前記二本鎖ポリヌクレオチドまたはその領域が増幅される、

請求項 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記微小流体システムが、エレクトロウェットティングシステムである、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記微小流体システムが、エレクトロウェットティングオン誘電体システム（EWOD）である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

合成後、前記二本鎖ポリヌクレオチドまたはその領域が、PCRによって増幅される、請求項 2 7 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

所定の配列を有するポリヌクレオチドをアセンブリする方法であって、所定の配列を有する第 1 のポリヌクレオチドおよび所定の配列を有する 1 つ以上の追加のポリヌクレオチドを合成するために、請求項 1 ～ 3 0 のいずれか一項に記載の方法を行うことと、前記第 1 および 1 つ以上の追加のポリヌクレオチドと一緒に接合することと、を含む、方法。

【請求項 3 2】

前記第 1 のポリヌクレオチドおよび前記 1 つ以上の追加のポリヌクレオチドが、適合する末端を作成するために切断され、一緒に接合される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記第 1 のポリヌクレオチドおよび前記 1 つ以上の追加のポリヌクレオチドが、適合する末端を作成するために切断され、連結によって一緒に接合される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記第 1 のポリヌクレオチドおよび前記 1 つ以上の追加のポリヌクレオチドが、切断部位で制限酵素によって切断される、請求項 3 1 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、所定のヌクレオチド配列に従ってポリヌクレオチド分子を合成するための新たな方法に関する。本発明はまた、合成後の合成ポリヌクレオチドのアセンブリ方法、ならびに合成および／またはアセンブリ方法を行うためのシステムおよびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

ポリヌクレオチド分子、特に DNA の合成およびアセンブリのための 2 つの主な方法が存在する。

【0003】

ホスホルアミダイト化学は、化学的に活性化された T、C、A、または G のモノマーを段階的なプロセスによって長さ約 100 / 150 塩基のオリゴヌクレオチドにアセンブリ

10

20

30

40

50

する合成手法である。化学反応工程は高度に感受性であり、条件は完全に無水の（水が完全に存在しない）、水性の酸化的と酸性との間で変わる（Roy and Caruthers, Molecules, 2013, 18, 14268–14284）。前の反応工程からの試薬が完全に除去されていない場合、これは将来の合成工程にとって有害となるであろう。したがって、この合成方法は、長さ約100ヌクレオチドのポリヌクレオチドの生成に限定されている。

【0004】

ポリメラーゼ合成手法は、T、C、A、およびG三リン酸を使用してDNA鋳型に対する相補鎖を合成するためにポリメラーゼを使用する。反応条件は水性かつ温和であり、この手法は、長さが数千塩基のDNAポリヌクレオチドを合成するのに使用することができる。この方法の主な欠点は、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAをこの方法ではデノボ合成することができず、それから複製が作られるDNA鋳型を必要とすることである。（Kosuri and Church, Nature Methods, 2014, 11, 499–507）。

【0005】

したがって、以前の方法は、複製される既存の鋳型分子の助けなしには二本鎖DNAをデノボ合成するために使用することができない。

【0006】

本発明者らは、既存の鋳型分子を複製する必要なく、一本鎖および二本鎖ポリヌクレオチド分子を段階的にデノボ合成することができる新たな方法論を開発した。そのような方法はまた、ホスホルアミダイト化学技術に関連する極端な条件を回避し、対照的に、中性pH付近の温和な水性条件下で実施される。このような方法はまた、合成生物学の広範囲の適用可能性を提供し、完全なゲノムの>100merのヌクレオチド長を有する現在の合成方法に対する電位 10^8 改善による一本鎖または二本鎖ポリヌクレオチド分子のデノボ合成を可能にする。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドをインビトロで合成する方法を提供し、方法は、合成サイクルを行うことを含み、各サイクルが、二本鎖ポリヌクレオチドを切断すること、およびヌクレオチド対を組み込むことによって切断された二本鎖ポリヌクレオチドを伸長することを含み、切断された二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖の末端が、所定の配列のヌクレオチドの付加によって伸長され、第1の鎖にハイブリダイズされる切断された二本鎖ポリヌクレオチドの第2の鎖の末端が、パートナーヌクレオチドの付加によって伸長され、それにより第1の鎖の組み込まれたヌクレオチドとヌクレオチド対を形成する。好ましくは、本方法は、DNAを合成するためのものである。

【0008】

本明細書に記載される本発明の方法のうちのいずれにおいても、方法は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチド分子の合成に続いて、二本鎖ポリヌクレオチド分子の一方の鎖が除去、または複製および／もしくは増幅される一本鎖ポリヌクレオチド分子の合成を提供し得る。

【0009】

本明細書に記載される本発明の方法のうちのいずれにおいても、方法は、二本鎖または一本鎖オリゴヌクレオチドの合成を提供し得る。したがって、本発明の方法のうちのいずれかを使用した二本鎖または一本鎖ポリヌクレオチドの合成に関する本明細書における全ての参照は、必要な変更を加えて二本鎖または一本鎖オリゴヌクレオチドの合成に適用される。

【0010】

上に記載される本発明の方法において、各サイクルは、所定の配列のヌクレオチドを、付着した可逆的ブロッキング基と一緒に付加することによって第1の鎖を伸長し、続いて第2の鎖を伸長することを含み得、可逆的ブロッキング基は、第2の鎖が伸長される前ま

たは後に除去される。いかなるそのような方法においても、各サイクルにおいて、ヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに組み込まれ得る。

【0011】

本発明は、上記および本明細書に記載される方法を提供し、各サイクルは、

(1) 足場ポリヌクレオチドを提供することと、

(2) 足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することと、

(3) 所定の配列のヌクレオチドを、ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって切断された足場ポリヌクレオチドに付加することであって、ヌクレオチドが、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、付加することと、

(4) 所定の配列のヌクレオチドから可逆的ターミネーター基を除去することと、

(5) 連結ポリヌクレオチドを切断された足場ポリヌクレオチドに連結することであって、連結ポリヌクレオチドが、所定の配列のヌクレオチドに対するパートナーヌクレオチドを含み、連結時に、所定の配列のヌクレオチドが、パートナーヌクレオチドと対合する、連結することと、を含む。

【0012】

足場ポリヌクレオチドを伴う方法では、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドが提供され得、合成鎖は、プライマー鎖部分およびヘルパー鎖部分を含む。いかなるそのような方法においても、ヘルパー鎖部分は、任意の1つ以上または全ての工程の前に、足場ポリヌクレオチドから除去され得る。

【0013】

足場ポリヌクレオチドを伴ういかなるそのような方法においても、合成鎖は、第1の鎖であり得、支持鎖は、第2の鎖であり得る。

【0014】

いかなるそのような方法においても、支持鎖は、連結ポリヌクレオチドを支持鎖に連結することによって伸長され得、各合成サイクルにおいて、連結ポリヌクレオチドは、そのサイクルにおいて第1の鎖に組み込まれた所定のヌクレオチドとヌクレオチド対を形成するヌクレオチドを含む。

【0015】

連結ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であり得る。好ましくは、連結ポリヌクレオチドは、二本鎖である。

【0016】

連結ポリヌクレオチドが二本鎖である方法では、連結ポリヌクレオチドは、好ましくは、支持鎖およびヘルパー鎖を含み得る。ヘルパー鎖は、次の合成サイクルにおいて切断工程の前に足場ポリヌクレオチドから除去され得、そのような方法では、ヘルパー鎖は、連結工程の後に除去される。

【0017】

本発明は、上に記載されるような方法を提供し、工程(1)は、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することを含み、合成鎖は、プライマー鎖部分を含み、支持鎖は、ユニバーサルヌクレオチドを含み、工程(2)は、足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することを含み、部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断は、支持鎖を切断すること、および足場ポリヌクレオチドからユニバーサルヌクレオチドを除去することを含み、工程(5)において、連結ポリヌクレオチドは、パートナーヌクレオチドおよび次のサイクルで使用するための切断部位を定義するユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖を含み、連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖に連結され、それによりヌクレオチド対を形成する。

【0018】

本発明は、上に記載されるような方法を提供し、

(1) 合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提

供することであって、合成鎖が、プライマー鎖部分および一本鎖切断によって分離されたヘルパー鎖部分を含み、支持鎖が、ユニバーサルヌクレオチドを含む、提供することと、

(2) 足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、部位が、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、支持鎖を切断すること、および足場ポリヌクレオチドからユニバーサルヌクレオチドを除去して、支持鎖と、プライマー鎖部分を含む合成鎖とを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを提供することを含む、切断することと、

(3) ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの合成鎖のプライマー鎖部分の末端を、所定の配列の第1のヌクレオチドで伸長することであって、第1のヌクレオチドが、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、伸長することと、

(4) 第1のヌクレオチドからターミネーター基を除去することと、

(5) 二本鎖連結ポリヌクレオチドを、切断された足場ポリヌクレオチドに連結することであって、連結ポリヌクレオチドが、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含み、相補的連結末端をさらに含み、連結末端が、

(i) 支持鎖において、ユニバーサルヌクレオチドおよび第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドであって、第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが、ヘルパー鎖に突出している、ユニバーサルヌクレオチドおよび第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および

(ii) ヘルパー鎖において、リン酸基を欠く末端ヌクレオチドを含み、

支持鎖の連結時に、第1のヌクレオチドが、パートナーヌクレオチドと対合する、連結することと、

(6) 足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、部位が、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、支持鎖を切断すること、および足場ポリヌクレオチドからユニバーサルヌクレオチドを除去して、支持鎖と、プライマー鎖部分を含む合成鎖とを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを提供することを含む、切断することと、

(7) ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの合成鎖のプライマー鎖部分の末端を、所定のヌクレオチド配列の隣のヌクレオチドで伸長することであって、隣のヌクレオチドが、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、伸長することと、

(8) 隣のヌクレオチドからターミネーター基を除去することと、

(9) 二本鎖連結ポリヌクレオチドを、切断された足場ポリヌクレオチドに連結することであって、連結ポリヌクレオチドが、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含み、相補的連結末端をさらに含み、連結末端が、

(i) 支持鎖において、ユニバーサルヌクレオチドおよび隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドであって、隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが、ヘルパー鎖に突出している、ユニバーサルヌクレオチドおよび次のヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および

(ii) ヘルパー鎖において、リン酸基を欠く末端ヌクレオチドを含み、

支持鎖の連結時に、隣のヌクレオチドが、パートナーヌクレオチドと対合する、連結することと、

(10) 工程6~9を複数回繰り返して、所定のヌクレオチド配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを提供することと、を含む。

【0019】

上に記載されるような任意のそのような方法は、本発明で指定された合成方法のバージョン1の方法に従って行うことができ、

a) 第1のサイクルの切断工程(工程2)の前およびその時点で、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置nを占め、位置nは、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1のヌクレオチド

10

20

30

40

50

によって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、支持鎖における位置 n のヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、

b) 第1のサイクルの切断工程(工程2)において、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、位置 $n-1$ は、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

c) 第1サイクルの連結工程(工程5)において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、所定の配列の第1ヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+1$ を占め、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n は、工程5での切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、所定の配列の第1のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、

d) 第2のサイクルの切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 n を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1の隣のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、

ii. 足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、 $n-1$ は、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

e) 第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、そのサイクルにおける所定の配列の隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+1$ を占め、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n は、切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた所定の配列の隣のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置である。

【0020】

あるいは、上に記載されるような任意のそのような方法は、本発明で指定された合成方法のバージョン2の方法に従って行うことができ、

a) 第1のサイクルの切断工程(工程2)の前およびその時点で、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+1$ を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、支持鎖における位置 n のヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n+1$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

b) 第1のサイクルの切断工程(工程2)において、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、位置 $n-1$ は、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

c) 第1サイクルの連結工程(工程5)において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、所定の配列の第1ヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+2$ を占め、ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n は、工程5での切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、所定の配列の第1のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 n

10

20

30

40

50

+ 2 は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第 2 の位置であり、

d) 第 2 のサイクルの切断工程（工程 6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i . ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第 1 の隣のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、 $n + 1$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

ii . 足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、 $n - 1$ は、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

e) 第 2 サイクルの連結工程（工程 9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、そのサイクルにおける所定の配列の隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n + 2$ を占め、ヘルパー鎖の最後から 2 番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n は、切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程 7）において組み込まれた所定の配列の隣のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n + 2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第 2 の位置である。

【0021】

あるいは、上に記載されるような任意のそのような方法は、本発明で指定された合成方法のバージョン 3 の方法に従って行うことができ、

a) 第 1 のサイクルの切断工程（工程 2）の前およびその時点で、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 n を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第 1 のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、支持鎖における位置 n のヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、

b) 第 1 のサイクルの切断工程（工程 2）において、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断され、位置 $n - 1$ および $n - 2$ は、それぞれ、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

c) 第 1 サイクルの連結工程（工程 5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、所定の配列の第 1 ヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の最後から 2 番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n は、工程 5 での切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、所定の配列の第 1 のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n + 1$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

d) 第 2 のサイクルの切断工程（工程 6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i . ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 n を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第 1 の隣のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、

ii . 足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断され、位

10

20

30

40

50

置 $n-1$ および $n-2$ は、それぞれ、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

e) 第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、そのサイクルにおける所定の配列の隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+1$ を占め、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n は、切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた所定の配列の隣のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n+1$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置である。

【0022】

あるいは、上に記載されるような任意のそのような方法は、本発明で指定された合成方法のバージョン4の方法に従って行うことができ、

a) 第1のサイクルの切断工程(工程2)の前およびその時点で、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+2$ を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、支持鎖における位置 n のヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、

b) 第1のサイクルの切断工程(工程2)において、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、位置 $n-1$ は、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

c) 第1サイクルの連結工程(工程5)において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、所定の配列の第1ヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+3$ を占め、プライマー鎖部分に対する遠位方向において、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された2つの位置であるヌクレオチドと対合しており、位置 n は、工程5での切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、所定の配列の第1のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n+3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第3の位置であり、

d) 第2のサイクルの切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+2$ を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1の隣のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、

ii. 足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、位置 $n-1$ は、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

e) 第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、そのサイクルにおける所定の配列の隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の末端ヌクレオチドであり、位置 n を

10

20

30

40

50

占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、プライマー鎖部分に対する遠位方向において、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去されたヌクレオチドと対合しており、位置 n は、切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程 7）において組み込まれた所定の配列の隣のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n + 3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第 3 の位置である。

【0023】

任意のそのような方法は、合成方法のバージョン 4 の変形例である本発明の方法に従って行うことができ、

(i) 第 1 サイクルの切断工程（工程 2）において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、 $n + 3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第 3 のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(ii) 第 1 のサイクルの連結工程（工程 5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、支持鎖における位置 $n + 4$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された 3 つの位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置 4 であり、

(iii) 第 2 のサイクルの切断工程（工程 6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n + 3$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(iv) 第 2 のサイクルの連結工程（工程 9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n + 4$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去されたヌクレオチドと対合するように構造化される。

【0024】

任意のそのような方法は、合成方法のバージョン 4 のさらなる変形例である本発明の方法に従って行うことができ、

(i) 第 1 サイクルの切断工程（工程 2）において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、 $n + 3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第 3 のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(ii) 第 1 のサイクルの連結工程（工程 5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $3 + x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置 4 であり、

(iii) 第 2 のサイクルの切断工程（工程 6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n + 3 + x$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(iv) 第 2 のサイクルの連結工程（工程 9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、

(v) x は、1 ～ 10 以上の間の整数であり、 x は、工程（2）、（5）、（6）、および（9）で同じ整数である。

10

20

30

40

50

【0025】

あるいは、上に記載されるような任意のそのような方法は、本発明で指定された合成方法のバージョン5の方法に従って行うことができ、

a) 第1のサイクルの切断工程(工程2)の前およびその時点で、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+1$ を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、支持鎖における位置 n のヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n+1$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

10

b) 第1のサイクルの切断工程(工程2)において、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、位置 $n-1$ および $n-2$ は、それぞれ、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

c) 第1サイクルの連結工程(工程5)において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、所定の配列の第1ヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+2$ を占め、ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n が、切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、所定の配列の第1のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、

20

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+1$ を占め、位置 n は、そのサイクルにおいてプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列の第1の隣のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置であり、 $n+1$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置であり、

30

ii. 足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、位置 $n-1$ および $n-2$ は、それぞれ、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

e) 第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、そのサイクルにおける所定の配列の隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドが支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+2$ を占め、ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n は、切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた所定の配列の隣のヌクレオチドと反対であるヌクレオチド位置であり、位置 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第2のヌクレオチド位置である。

40

【0026】

任意のそのような方法は、合成方法のバージョン5の変形例である本発明の方法に従って行うことができ、

(i) 第1サイクルの切断工程(工程2)において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+2$ を占め、 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖

50

における第2のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、

(i i) 第1のサイクルの連結工程(工程5)において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、支持鎖における位置 $n+3$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから2つの位置が除去されたヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n+3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置3であり、

(i i i) 第2のサイクルの切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n+2$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、

(i v) 第2のサイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n+3$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから2つの位置が除去されたヌクレオチドと対合するように構造化される。

【0027】

任意のそのような方法は、合成方法のバージョン5のさらなる変形例である本発明の方法に従って行うことができ、

(i) 第1サイクルの切断工程(工程2)において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+2+x$ を占め、 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、

(i i) 第1のサイクルの連結工程(工程5)において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、支持鎖における位置 $n+3+x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $2+x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n+3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置3であり、

(i i i) 第2のサイクルの切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n+2+x$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、

(i v) 第2のサイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n+3+x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $2+x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、

(v) x は、1～10以上の間の整数であり、 x は、工程(2)、(5)、(6)、および(9)で同じ整数である。

【0028】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいて、所定の配列の第1／隣のヌクレオチドと対合するパートナーヌクレオチドは、第1／隣のヌクレオチドと相補的な、好ましくは天然に相補的なヌクレオチドであり得る。

【0029】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、工程(2)および／または(6)の前に、任意の1つ以上の合成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドが提供され得、合成鎖は、ヘルパー鎖なしで提供される。工程(2)および／または(6)の前に、任意の1つ以上の合成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、合成鎖は、足場ポリヌクレオチドから除去され得る。

【0030】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、任意の1つ以上の合

10

20

30

40

50

成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、二本鎖連結ポリヌクレオチドを切断された足場ポリヌクレオチドに連結する工程の後で、かつ隣のを所定のヌクレオチド配列の隣のヌクレオチドを足場ポリヌクレオチドの合成鎖に組み込む工程の前に、合成鎖のヘルパー鎖部分は、足場ポリヌクレオチドから除去され得る。いかなるそのような方法においても、合成鎖のヘルパー鎖部分は、(i) 足場ポリヌクレオチドを約 80℃～約 95℃の温度に加熱し、足場ヌクレオチドからヘルパー鎖部分を分離すること、(ii) 足場ポリヌクレオチドを 8 M 尿素などの尿素溶液で処理し、足場ポリヌクレオチドからヘルパー鎖部分を分離すること、(iii) 足場ポリヌクレオチドをホルムアミドまたは 100%ホルムアミドなどのホルムアミド溶液で処理し、足場ポリヌクレオチドからヘルパー鎖部分を分離すること、または (iv) 足場ポリヌクレオチドを、ヘルパー鎖部分の配列と相補的であるヌクレオチド配列の領域を含む一本鎖ポリヌクレオチド分子と接触させ、それによってヘルパー鎖部分の足場ポリヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを競合的に阻害することによって、足場ポリヌクレオチドから除去することができる。

【0031】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 n を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖が位置 n と $n-1$ との間で切断される上記および本明細書に記載されるいかなるそのような方法においても、各切断工程は、2 工程切断プロセスを含み得、各切断工程は、ユニバーサルヌクレオチドを除去し、それによって脱塩基部位を形成することを含む第 1 の工程と、支持鎖を脱塩基部位で切断することを含む第 2 の工程と、を含み得る。いかなるそのような方法においても、第 1 の工程は、ヌクレオチド除去酵素を用いて行われ得る。ヌクレオチド除去酵素は、3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ酵素であり得る。ヌクレオチド除去酵素は、ヒトアルキルアデニン DNA グリコシラーゼ (hAAG) またはウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) であり得る。いかなるそのような方法においても、第 2 の工程は、塩基である化学物質を用いて行われ得る。塩基は NaOH であり得る。いかなるそのような方法においても、第 2 の工程は、脱塩基部位切断活性を有する有機化学物質を用いて行われ得る。有機化学物質は、N, N'-ジメチルエチレンジアミンであり得る。いかなるそのような方法においても、第 2 の工程は、AP エンドヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ III (Nth)、またはエンドヌクレアーゼ V III などの脱塩基部位リアーゼ活性を有する酵素を用いて行われ得る。

【0032】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 n を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖が位置 n と $n-1$ との間で切断される上記および本明細書に記載されるいかなるそのような方法においても、各切断工程は、ユニバーサルヌクレオチドを切断酵素で除去することを含む 1 工程切断プロセスを含み得、酵素は、エンドヌクレアーゼ III、エンドヌクレアーゼ V III、ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ (Fpg)、または 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ (hOGG1) である。

【0033】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 $n+1$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖が位置 n と $n-1$ との間で切断される上記および本明細書に記載されるいかなるそのような方法においても、またはユニバーサルヌクレオチドが位置 n を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖が位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断されるそのような方法のうちのいずれにおいても、切断工程は、酵素で支持鎖を切断することを含み得る。酵素は、プライマー鎖部分に対する近位方向においてユニバーサルヌクレオチドの隣のヌクレオチドの後で支持鎖を切断し、それによって第 1/隣のヌクレオチドを含む合成鎖中に突出末端を作成し得る。そのような酵素はエンドヌクレアーゼ V であり得る。

【0034】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、合成二本鎖ポリヌクレオチドの両方の鎖は、DNA 鎖であり得る。合成鎖および支持鎖は DNA 鎖であり得る。そのような場合、組み込まれたヌクレオチドは、好ましくは dNTP、好ましくは可逆的ターミネーター基を含む dNTP である。いかなるそのような方法においても、可逆的

ターミネーター基を含む組み込まれたヌクレオチドのうちのいずれか1つ以上または全てが、3'-O-アリル-dNTPまたは3'-O-アジドメチル-dNTPを含み得る。

【0035】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、合成二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖はDNA鎖であり得、合成二本鎖ポリヌクレオチドの第2の鎖はRNA鎖であり得る。合成鎖はRNA鎖であり得、支持鎖はDNA鎖であり得る。そのような場合、組み込まれたヌクレオチドは、好ましくはNTP、好ましくは可逆的ターミネーター基を含むNTPである。いかなるそのような方法においても、可逆的ターミネーター基を含む組み込まれたヌクレオチドのうちのいずれか1つ以上または全てが、3'-O-アリル-NTPまたは3'-O-アジドメチル-NTPであり得る。

10

【0036】

DNAを含む合成鎖へのヌクレオチドの組み込み、例えば、1つ以上のdNTPの組み込みを伴う上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、酵素は、ポリメラーゼ、好ましくはDNAポリメラーゼ、より好ましくは非修飾ポリメラーゼと比較して、可逆的ターミネーター基を含むdNTPを組み込む能力が増強された修飾DNAポリメラーゼであり得る。ポリメラーゼは、*Thermococcus* 種9°N、好ましくは種9°N-7由来の天然DNAポリメラーゼのバリエーションであり得る。

【0037】

RNAを含む合成鎖へのヌクレオチドの組み込み、例えば、1つ以上のNTPの組み込みを伴う上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、酵素は、ポリメラーゼ、好ましくはT3またはT7 RNAポリメラーゼなどのRNAポリメラーゼ、より好ましくは非修飾ポリメラーゼと比較して、可逆的ターミネーター基を含むNTPを組み込む能力が増強された修飾RNAポリメラーゼであり得る。

20

【0038】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、合成二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖はDNA鎖であり得、合成二本鎖ポリヌクレオチドの第2の鎖はRNA鎖であり得る。代替的に、合成二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖はRNA鎖であり得、合成二本鎖ポリヌクレオチドの第2の鎖はDNA鎖であり得る。

【0039】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、酵素は、末端トランスフェラーゼ活性を有し、任意に、酵素が、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)、polラムダ、polマイクロ、またはΦ29 DNAポリメラーゼである。

30

【0040】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、第1/隣のヌクレオチドから可逆的ターミネーター基を除去する工程は、トリス(カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を用いて行われ得る。

【0041】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、二本鎖連結ポリヌクレオチドを切断された足場ポリヌクレオチドに連結する工程は、好ましくはリガーゼ酵素を用いて行われる。リガーゼ酵素は、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼであり得る。

40

【0042】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、工程(1)、(5)、および/または(9)において、ヘルパー鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、ヘアピンループによって接続され得る。

【0043】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、工程(1)において、プライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、ヘアピンループに

50

よって接続され得る。

【0044】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、工程（１）、（５）、および／または（９）において、

a) ヘルパー鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、ヘアピンループによって接続され得、

b) プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、ヘアピンループによって接続され得る。

【0045】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、連結ポリヌクレオチドのうちの少なくとも１つまたは全ては、相補的連結末端と反対の末端で、支持鎖およびヘルパー鎖を接続するヘアピンループを含む単一分子として提供され得る。上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、各合成サイクルの連結ポリヌクレオチドは、相補的連結末端と反対の末端で、支持鎖およびヘルパー鎖を接続するヘアピンループをそれぞれ含む単一分子として提供され得る。

【0046】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、工程（１）において、プライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、共通の表面に繋留され得る。プライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とがそれぞれ、切断可能なリンカーを含み得、リンカーは、合成後に表面から二本鎖ポリヌクレオチドを切り離すために切断され得る。

【0047】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、工程（１）において、合成鎖のプライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とがヘアピンループによって接続され、ヘアピンループは、表面に繋留されている。

【0048】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、ヘアピンループは、切断可能なリンカーを介して表面に繋留され得、リンカーは、合成後に表面から二本鎖ポリヌクレオチドを切り離すために切断され得る。切断可能なリンカーは、UV切断可能なリンカーであり得る。

【0049】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、ポリヌクレオチドが付着している表面は、微粒子の表面または平坦な表面であり得る。

【0050】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、ポリヌクレオチドが付着している表面は、ゲルを含み得る。表面は、約２％のポリアクリルアミドなどのポリアクリルアミド表面を含み、好ましくは、ポリアクリルアミド表面は、ガラスなどの固体支持体に結合されている。

【0051】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、１つ以上の共有結合を介して共通の表面に繋留され得る。１つ以上の共有結合は、共通の表面上の官能基と足場分子上の官能基との間に形成され得、足場分子上の官能基は、アミン基、チオール基、チオリン酸基、またはチオアミド基であり得る。共通の表面上の官能基は、ブロモアセチル基であり得、任意に、ブロモアセチル基は、N-（５-ブロモアセトアミジルペンチル）アクリルアミド（BRAPA）を使用して得られるポリアクリルアミド表面上に提供される。

【0052】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、所定の配列のヌクレオチドから可逆的ターミネーター基を除去する工程は、切断工程の前、または連結工程の前に行われ得る。

【0053】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、上記および本明細書に記載される合成サイクルのうちのいずれかに関する反応は、微小流体システム内の液滴中で行われ得る。微小流体システムは、エレクトロウェットティングシステムであり得る。微小流体システムは、エレクトロウェットティングオン誘電体システム（EWOD）であり得る。

【0054】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、合成後、二本鎖ポリヌクレオチドの鎖を分離して、所定の配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。

【0055】

上記および本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、合成後、二本鎖ポリヌクレオチドまたはその領域は、好ましくはPCRによって増幅される。

【0056】

本発明はまた、所定の配列を有するポリヌクレオチドをアセンブリする方法を提供し、方法は、所定の配列を有する第1のポリヌクレオチドと所定の配列を有する1つ以上の追加のポリヌクレオチドとを合成するために、上記および本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを行うことと、第1および1つ以上の追加のポリヌクレオチドと一緒に接合することと、を含む。第1および1つ以上の追加のポリヌクレオチドは、好ましくは異なる所定の配列を含み得る。第1のポリヌクレオチドおよび1つ以上の追加のポリヌクレオチドは、二本鎖であり得るか、または一本鎖であり得る。第1のポリヌクレオチドおよび1つ以上の追加のポリヌクレオチドを最初に切断して、適合する末端を作成し、次に、例えば、連結によって一緒に接合することができる。第1のポリヌクレオチドおよび1つ以上の追加のポリヌクレオチドは、切断部位で制限酵素によって切断されて、適合する末端を作成することができる。

【0057】

上記および本明細書に記載されるような所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドをインビトロで合成するための方法のうちのいずれか、ならびに／または上記および本明細書に記載されるような所定の配列を有するポリヌクレオチドをインビトロでアセンブリする方法のうちのいずれかは、微小流体システム内の液滴中で行われ得る。いかなるそのような方法においても、アセンブリ方法は、所定の配列を有する第1の合成ポリヌクレオチドを含む第1の液滴と、所定の配列を有する追加の1つ以上の合成ポリヌクレオチドを含む第2の液滴とを提供することを含むアセンブリ工程を含み得、液滴は、互いに接触し、合成ポリヌクレオチドは、一緒に接合され、それにより第1のポリヌクレオチドおよび追加の1つ以上のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドをアセンブリする。いかなるそのような方法においても、合成工程は、各液滴が合成サイクルの工程に対応する反応試薬を含む、複数の液滴を提供することと、合成サイクルの工程に従って足場ポリヌクレオチドに液滴を順次送達することと、によって行われ得る。いかなるそのような方法においても、液滴の送達後かつ次の液滴の送達前に、過剰の反応試薬を除去するために洗浄工程が実施され得る。いかなるそのような方法においても、微小流体システムは、エレクトロウェットティングシステムであり得る。いかなるそのような方法においても、微小流体システムは、エレクトロウェットティングオン誘電体システム（EWOD）であり得る。いかなるそのような方法においても、合成工程およびアセンブリ工程は、同じシステム内で行われ得る。

【0058】

関連する態様では、本発明は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドをインビトロで合成する方法におけるユニバーサルヌクレオチドの使用をさらに提供し、ユニバーサルヌクレオチドを使用して、各合成サイクル中にポリヌクレオチド切断部位を作成し、各合成サイクルにおいて、当該使用は、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することであって、合成鎖が、プライマー鎖部分および任

10

20

30

40

50

意に一本鎖切断によってプライマー鎖部分から分離されたプライマー鎖部分からヘルパー鎖部分を含み、ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖中に提供されて、切断部位を提供する、提供することと、足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、そのときにユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドから除去され、切断末端が足場ポリヌクレオチド中に作成される、切断することと、可逆的ターミネーター基を含む所定の配列の新たなヌクレオチドを、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素によって足場ポリヌクレオチドの切断末端で合成鎖の末端に付加することと、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを有する連結ポリヌクレオチドを、足場ポリヌクレオチドの切断末端に連結することと、を含み、支持鎖は、足場ポリヌクレオチドの合成鎖中の新たなヌクレオチドと対合するためのヌクレオチドを含み、かつ次の合成サイクルで使用するための新たなポリヌクレオチド切断部位を作成することにおいて使用するための新たなユニバーサルヌクレオチドをさらに含み、可逆的ターミネーター基は、切断または連結工程後に新たなヌクレオチドから除去され、任意にヘルパー鎖は、連結工程後および次のサイクルの切断工程前に除去される。所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成する方法におけるユニバーサルヌクレオチドのそのような使用は、上記および本明細書に定義および記載されたる特定の方法のうちのいずれかを使用して実施され得る。

【0059】

関連する態様では、本発明はさらに、所定のヌクレオチドを有するポリヌクレオチドの合成鎖をインビトロで伸長する方法をさらに提供し、方法は、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することであって、合成鎖が、プライマー鎖部分、および任意に一本鎖切断によってプライマー鎖部分から分離されたヘルパー鎖部分を含み、ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖中に提供される、ポリヌクレオチド切断部位を定義する、提供することと、足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、そのときにユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドから除去され、切断末端が足場ポリヌクレオチド中に作成される、切断することと、可逆的ターミネーター基を含む所定の配列の新たなヌクレオチドを、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素によって足場ポリヌクレオチドの切断末端で合成鎖の末端に付加することと、を含み、足場ポリヌクレオチドの切断末端は、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを有する連結ポリヌクレオチドの連結アクセプター部位として作用し、支持鎖は、足場ポリヌクレオチドの合成鎖中の所定のヌクレオチドと対合するためのヌクレオチドを含み、かつ次の合成サイクルで使用するための新たなポリヌクレオチド切断部位を作成することにおいて使用するための新たなユニバーサルヌクレオチドをさらに含み、可逆的ターミネーター基は、切断または連結工程後に新たなヌクレオチドから除去され、任意にヘルパー鎖は、連結工程後および次のサイクルの切断工程前に除去される。ポリヌクレオチド分子の合成鎖を所定のヌクレオチドで伸長させるいかなるそのような方法においても、本方法は、上記および本明細書に定義および記載される任意の特定の方法のうちのいずれかを使用して実施され得る。

【0060】

関連する態様では、本発明は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドをインビトロで合成する方法をさらに提供し、方法は、合成のサイクルを含み、各合成サイクルは、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖を含む足場ポリヌクレオチドを提供することであって、合成鎖が、プライマー鎖部分および任意に一本鎖切断によってプライマー鎖部分から分離されたヘルパー鎖部分を含み、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖中に提供され、かつポリヌクレオチド切断部位を定義する、提供することと、足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、そのときにユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドから除去され、切断末端が足場ポリヌクレオチド中に作成される、切断することと、可逆的ターミネーター基を含む所定の配列の新たなヌクレオチドを、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素によって足場ポリヌクレオチドの切断末端で合成鎖の末端に付加すること、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを有する連結ポリヌクレオチドを、足場ポリヌクレオチドの切断末端に連結することであって、支持鎖が、

足場ポリヌクレオチドの合成鎖中の新たなヌクレオチドと対合するためのヌクレオチドを含み、かつ次の合成サイクルで使用するための新たなポリヌクレオチド切断部位を作成することにおいて使用するための新たなユニバーサルヌクレオチドをさらに含む、付加および連結することと、可逆的ターミネーター基を、切断または連結工程後に新たなヌクレオチドから除去することと、任意に、ヘルパー鎖を、連結工程後および次のサイクルの切断工程前に除去することと、を含む。所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するいかなるそのような方法においても、本方法は、上記および本明細書に定義および記載される特定の方法のうちのいずれかを使用して実施され得る。

【0061】

関連する態様では、本発明は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するサイクル中に、ユニバーサルヌクレオチドを含む連結ポリヌクレオチドを二本鎖ポリヌクレオチドにインビトロで連結する方法をさらに提供し、合成サイクル中に、二本鎖ポリヌクレオチドは、所定のヌクレオチドおよびそのパートナーで伸長され、方法は、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖を含む足場ポリヌクレオチドを提供することであって、合成鎖が、プライマー鎖部分および任意に一本鎖切断によってプライマー鎖部分から分離されたヘルパー鎖部分を含み、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖中に提供され、かつポリヌクレオチド切断部位を定義する、提供することと、足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、そのときにユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドから除去され、切断末端が足場ポリヌクレオチド中に作成される、切断することと、可逆的ターミネーター基を含む所定の配列の新たなヌクレオチドを、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素によって足場ポリヌクレオチドの切断末端で合成鎖の末端に付加すること、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを有する連結ポリヌクレオチドを、足場ポリヌクレオチドの切断末端に連結することであって、支持鎖が、足場ポリヌクレオチドの合成鎖中の新たなヌクレオチドと対合するためのヌクレオチドを含み、かつ次の合成サイクルで使用するための新たなポリヌクレオチド切断部位を作成することにおいて使用するための新たなユニバーサルヌクレオチドをさらに含む、付加および連結することと、それにより、次の合成サイクルで使用するための新たな足場ポリヌクレオチドを作成することと、可逆的ターミネーター基を、切断または連結工程後に新たなヌクレオチドから除去することと、任意に、ヘルパー鎖を、連結工程後および次のサイクルの切断工程前に除去することと、を含む。所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するサイクル中に、ユニバーサルヌクレオチドを含む連結ポリヌクレオチドを二本鎖ポリヌクレオチドに連結するいかなるそのような方法においても、方法は、上記および本明細書に定義および記載される特定の方法のうちのいずれかを使用して実施され得る。

【0062】

本発明は追加的に、上記および本明細書に記載される合成および／またはアセンブリ方法のうちのいずれかを実施するためのポリヌクレオチド合成システムを提供し、(a) 各反応領域が少なくとも1つの足場ポリヌクレオチドを含む、反応領域のアレイと、(b) 反応試薬を反応領域に送達するための手段と、任意に(c) 足場ポリヌクレオチドからの合成二本鎖ポリヌクレオチドを切断するための手段と、を含む。そのようなシステムは、反応試薬を液滴で提供するための手段と、合成サイクルに従って足場ポリヌクレオチドに液滴を送達するための手段と、をさらに含む得る。

【0063】

本発明は、上記および本明細書に記載されるシステムのうちのいずれかと共に使用するため、ならびに上記および本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを実施するためのキットをさらに提供し、キットは、合成サイクルの工程に対応する反応試薬の容量を含む。

【0064】

本発明はまた、ポリヌクレオチドマイクロアレイを作成する方法を提供し、マイクロアレイは、複数の反応領域を含み、各領域は、所定の配列を有する1つ以上のポリヌクレオチドを含み、方法は、

a) 複数の反応領域を含む表面を提供することであって、各領域が1つ以上の二本鎖アンカーまたは足場ポリヌクレオチドを含む、提供することと、

b) 各反応領域で上記および本明細書に記載される方法のいずれかに従って合成サイクルを行い、それにより所定の配列を有する1つ以上の二本鎖ポリヌクレオチドを各領域で合成することと、を含む。

【0065】

そのような方法では、合成後、二本鎖ポリヌクレオチドの鎖を分離して、マイクロアレイを提供することができ、各領域は、所定の配列を有する1つ以上の一本鎖ポリヌクレオチドを含む。

【発明を実施するための形態】

【0066】

本明細書に提示され、以下に記載される関連図は、本発明の方法を含む方法を使用する合成サイクルの工程のうちのいくつかまたは全て、ならびにオリゴヌクレオチド、表面、表面付着化学、リンカーなどの方法の態様を行うための手段を示す。これらの図ならびにその全ての説明および全ての関連方法、試薬、およびプロトコルは、例示のみのために掲示され、限定するものとして解釈されるべきではない。

【0067】

例えば、図6、7、8、9、10、13a、14a、15a等の関連図は、ヌクレオチド（例えば、可逆的ターミネーター基を含むヌクレオチド）の組み込み、切断（例えば、足場ポリヌクレオチドを第1の部分と第2の部分とに切断し、第1の部分はユニバーサルヌクレオチドを含み、第2の部分は組み込まれたヌクレオチドを含む）、連結（例えば、一本鎖部分を含むポリヌクレオチド構築物を、組み込まれたヌクレオチドを含む切断された足場ポリヌクレオチドの第2の部分に連結し、一本鎖部分は、組み込まれたヌクレオチドに相補的なパートナーヌクレオチドを含む）、および脱保護（例えば、組み込まれたヌクレオチドからの可逆的ターミネーター基の除去）を含む合成サイクルの工程のうちのいくつかまたは全てを示す。これらの方法は、例示的な支持のためにのみ提供されており、特許請求される発明の範囲内ではない。図1～5に示される方法スキームは、本発明の方法である。図51に示されるデータは、実施例13に記載されるように、本明細書に記載される図1、2、および4に示される合成方法のバージョン1、2、および4と一致する本発明の方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0068】

【図1】本発明の例示的な方法のバージョン1のスキーム。 本発明の例示的な方法のバージョン1による第1の合成サイクルを示すスキーム。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、切断、組み込み、脱保護、および連結のサイクルを含む。スキームは、ポリヌクレオチド切断部位を定義する支持鎖にユニバーサルヌクレオチドを含み、合成鎖に一本鎖切断（「ニック」）を含む足場ポリヌクレオチド（101）の提供を示している。このスキームは、支持鎖（102）に一本鎖切断を作成し、続いて足場ポリヌクレオチド（103）の切断末端で合成鎖の末端にチミンヌクレオチドを付加することによる支持鎖の切断、および保護工程（104）中の可逆的ブロッキング基の除去を示す。切断された足場ポリヌクレオチド（105）への連結ポリヌクレオチドの連結に続いて、新たに組み込まれたチミンヌクレオチドは、そのパートナーヌクレオチドアデニン（104）の反対で対合される。連結工程に続いて、再構築された足場ポリヌクレオチドは、次の合成サイクルで使用するために、新たに組み込まれたヌクレオチドの対（106）と共に提供される。このA-T対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。位置H-Iのヌクレオチド対は、任意の対であり得る。ヌクレオチドXは、任意のヌクレオチドであり得る。図はまた、第2の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

【図2】本発明の例示的な方法のバージョン2のスキーム。 本発明の例示的な方法のバージョン2による第1の合成サイクルを示すスキーム。方法は、足場ポリヌクレオチドの

10

20

30

40

50

提供、切断、組み込み、脱保護、および連結のサイクルを含む。スキームは、ポリヌクレオチド切断部位を定義する支持鎖にユニバーサルヌクレオチドを含み、合成鎖に一本鎖切断（「ニック」）を含む足場ポリヌクレオチド（１０１）の提供を示している。このスキームは、支持鎖（１０２）に一本鎖切断を作成し、続いて足場ポリヌクレオチド（１０３）の切断末端で合成鎖の末端にチミンヌクレオチドを付加することによる支持鎖の切断、および保護工程（１０４）中の可逆的ブロッキング基の除去を示す。切断された足場ポリヌクレオチド（１０５）への連結ポリヌクレオチドの連結に続いて、新たに組み込まれたチミンヌクレオチドは、そのパートナーヌクレオチドアデニン（１０４）の反対で対合される。連結工程に続いて、再構築された足場ポリヌクレオチドは、次の合成サイクルで使用するために、新たに組み込まれたヌクレオチドの対（１０６）と共に提供される。このＡ－Ｔ対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。位置Ｈ－ＩおよびＪ－Ｋのヌクレオチド対は、任意の対であり得る。ヌクレオチドＸは、任意のヌクレオチドであり得る。図はまた、第２の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

10

【図３】本発明の例示的な方法のバージョン３のスキーム。 本発明の例示的な方法のバージョン３による第１の合成サイクルを示すスキーム。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、切断、組み込み、脱保護、および連結のサイクルを含む。スキームは、ポリヌクレオチド切断部位を定義する支持鎖にユニバーサルヌクレオチドを含み、合成鎖に一本鎖切断（「ニック」）を含む足場ポリヌクレオチド（１０１）の提供を示している。このスキームは、支持鎖（１０２）に一本鎖切断を作成し、続いて足場ポリヌクレオチド（１０３）の切断末端で合成鎖の末端にチミンヌクレオチドを付加することによる支持鎖の切断、および保護工程（１０４）中の可逆的ブロッキング基の除去を示す。切断された足場ポリヌクレオチド（１０５）への連結ポリヌクレオチドの連結に続いて、新たに組み込まれたチミンヌクレオチドは、そのパートナーヌクレオチドアデニン（１０４）の反対で対合される。連結工程に続いて、再構築された足場ポリヌクレオチドは、次の合成サイクルで使用するために、新たに組み込まれたヌクレオチドの対（１０６）と共に提供される。このＡ－Ｔ対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。位置Ｈ－ＩおよびＪ－Ｋのヌクレオチド対は、任意の対であり得る。ヌクレオチドＸは、任意のヌクレオチドであり得る。図はまた、第２の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

20

30

【図４】本発明の例示的な方法のバージョン４のスキーム。 本発明の例示的な方法のバージョン４による第１の合成サイクルを示すスキーム。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、切断、組み込み、脱保護、および連結のサイクルを含む。スキームは、ポリヌクレオチド切断部位を定義する支持鎖にユニバーサルヌクレオチドを含み、合成鎖に一本鎖切断（「ニック」）を含む足場ポリヌクレオチド（１０１）の提供を示している。このスキームは、支持鎖（１０２）に一本鎖切断を作成し、続いて足場ポリヌクレオチド（１０３）の切断末端で合成鎖の末端にチミンヌクレオチドを付加することによる支持鎖の切断、および保護工程（１０４）中の可逆的ブロッキング基の除去を示す。切断された足場ポリヌクレオチド（１０５）への連結ポリヌクレオチドの連結に続いて、新たに組み込まれたチミンヌクレオチドは、そのパートナーヌクレオチドアデニン（１０４）の反対で対合される。連結工程に続いて、再構築された足場ポリヌクレオチドは、次の合成サイクルで使用するために、新たに組み込まれたヌクレオチドの対（１０６）と共に提供される。このＡ－Ｔ対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。位置Ｈ－Ｉ、Ｊ－Ｋ、およびＬ－Ｍのヌクレオチド対は、任意の対であり得る。ヌクレオチドＸは、任意のヌクレオチドであり得る。図はまた、第２の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

40

【図５】本発明の例示的な方法のバージョン５のスキーム。 スキームは、ポリヌクレオチド切断部位を定義する支持鎖にユニバーサルヌクレオチドを含み、合成鎖に一本鎖切断（「ニック」）を含む足場ポリヌクレオチド（１０１）の提供を示している。このスキームは、支持鎖（１０２）に一本鎖切断を作成し、続いて足場ポリヌクレオチド（１０３）

50

の切断末端で合成鎖の末端にチミンヌクレオチドを付加することによる支持鎖の切断、および保護工程（１０４）中の可逆的ブロッキング基の除去を示す。切断された足場ポリヌクレオチド（１０５）への連結ポリヌクレオチドの連結に続いて、新たに組み込まれたチミンヌクレオチドは、そのパートナーヌクレオチドアデニン（１０４）の反対で対合される。連結工程に続いて、再構築された足場ポリヌクレオチドは、次の合成サイクルで使用するために、新たに組み込まれたヌクレオチドの対（１０６）と共に提供される。このＡ－Ｔ対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。位置Ｈ－Ｉ、Ｊ－Ｋ、およびＬ－Ｍのヌクレオチド対は、任意の対であり得る。ヌクレオチドＸは、任意のヌクレオチドであり得る。図はまた、第２の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

10

【図６】例示的な方法のバージョン１のスキーム。実施例部分の例示的な方法のバージョン１による第１の合成サイクルを示すスキーム。この方法は、例示的な支持のためにのみ提供されており、特許請求される発明の範囲内ではない。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、組み込み、切断、連結、および脱保護のサイクルを含む。スキームは、第１の合成サイクル（１０１、１０２）におけるチミンヌクレオチドの組み込み、およびパートナーアデニンヌクレオチド（１０４）と反対のその対合、ならびに次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチド（１０６）の提供を示す。この対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。ヌクレオチドＺは、任意のヌクレオチドであり得る。ヌクレオチドＸは、任意の適切なヌクレオチドであり得る。図はまた、第２の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

20

【図７】例示的な方法のバージョン２のスキーム。実施例部分の例示的な方法のバージョン２による第１の合成サイクルを示すスキーム。この方法は、例示的な支持のためにのみ提供されており、特許請求される発明の範囲内ではない。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、組み込み、切断、連結、および脱保護のサイクルを含む。このスキームは、第１のサイクル（２０１、２０２）におけるチミンヌクレオチドおよびパートナーアデニンヌクレオチド（２０４）と反対のその対合の組み込み、ならびに次の合成サイクルにおいてシトシンと対合するためのグアニンを含む足場ポリヌクレオチド（２０６）の提供を示す。これらの対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。ヌクレオチドＺは、任意のヌクレオチドであり得る。ヌクレオチドＸは、任意の適切なヌクレオチドであり得る。図はまた、第２の合成サイクルに対応する参照符号を示す。

30

【図８】例示的な方法のバージョン３のスキーム。実施例部分の例示的な方法のバージョン３による第１の合成サイクルを示すスキーム。この方法は、例示的な支持のためにのみ提供されており、特許請求される発明の範囲内ではない。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、組み込み、切断、連結、および脱保護のサイクルを含む。スキームは、第１のサイクル（３０１、３０２）におけるチミンヌクレオチドおよびパートナーアデニンヌクレオチド（３０４）と反対のその対合の組み込み、ならびに次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチド（３０６）の提供を示す。この対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。スキームはまた、足場ポリヌクレオチドの構成成分としてのシトシン－グアニン対を示し、これは所定の配列の一部ではない。この対はまた、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、任意の対であり得る。ヌクレオチドＺは、任意のヌクレオチドであり得る。ヌクレオチドＸは、任意の適切なヌクレオチドであり得る。

40

【図９】例示的な方法のバージョン４のスキーム。実施例部分の例示的な方法のバージョン４による第１の合成サイクルを示すスキーム。この方法は、例示的な支持のためにのみ提供されており、特許請求される発明の範囲内ではない。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、組み込み、切断、連結、および脱保護のサイクルを含む。スキームは、第１のサイクル（４０１、４０２）におけるチミンヌクレオチドおよびパートナーユニバーサルヌクレオチド（４０４）と反対のその対合の組み込み、ならびに次の合成サイクルにおい

50

てシトシンと対合するためのグアニンを含む足場ポリヌクレオチド（406）の提供を示す。これらの対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。ヌクレオチドX、Y、およびZは、任意のヌクレオチドであり得る。

【図10】例示的な方法のバージョン5のスキーム。実施例部分の例示的な方法のバージョン5による第1の合成サイクルを示すスキーム。この方法は、例示的な支持のためにのみ提供されており、特許請求される発明の範囲内ではない。方法は、足場ポリヌクレオチドの提供、組み込み、切断、連結、および脱保護のサイクルを含む。スキームは、第1のサイクル（501、502）におけるチミンヌクレオチドおよびパートナーアデニンヌクレオチド（504）と反対のその対合の組み込み、ならびに次の合成サイクルにおいてシトシンと対合するためのグアニンを含む足場ポリヌクレオチド（506）の提供を示す。スキームはまた、足場ポリヌクレオチドの構成成分としてのシトシン-グアニン対（位置n-2）を示し、これは所定の配列の一部ではない。これらの対は、例示の目的のみのために示されており、限定するものではなく、必要とされる所定の配列に応じた任意の対であり得る。ヌクレオチドX、Y、およびZは、任意のヌクレオチドであり得る。

【図11】足場ポリヌクレオチドの表面固定化を示すスキーム。スキームは、足場ポリヌクレオチドの可能な例示的なヘアピンループ構成およびそれらの表面への固定化を示す（a~h）。スキーム（iおよびj）は、ポリヌクレオチドを表面に付着させるための表面化学の例を示す。実施例は、両方の鎖がヘアピンを介して接続されている二本鎖の実施形態を示しているが、非接続二本鎖ポリヌクレオチドの一方または両方の鎖を付着させるために同じ化学を使用することができる。

【図12】ヘルパー鎖の不在-組み込み。a) 破線枠で強調表示されている組み込み工程を示すスキーム。b) イノシンと反対の3'-O-修飾-ddTTPの組み込みについてのDNAポリメラーゼの評価。図は、50℃のMn²⁺イオンの存在下での様々なDNAポリメラーゼ（Bst、Deep Vent（エキソ）、Therminator IおよびTherminator IX）による3'-O-修飾-ddTTPの組み込みの結果を示すゲルを示す。レーン1：Bst DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン2：Bst DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。レーン3：Deep vent（エキソ）DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン4：Deep vent（エキソ）DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。レーン5：Therminator I DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン6：Therminator I DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。レーン7：Therminator IX DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン8：Therminator IX DNAポリメラーゼを使用した3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。c) イノシンと反対の3'-O-修飾-ddTTPの組み込みについてのDNAポリメラーゼの評価。様々なDNAポリメラーゼを使用した組み込みの結果。d) Therminator IX DNAポリメラーゼを使用した組み込みについての温度の評価。図は、様々な温度でTherminator IX DNAポリメラーゼを使用したMn²⁺イオンの存在下でのイノシンと反対の3'-修飾-ddTTPの組み込みの結果を示すゲルを示す。レーン1：37℃での3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン2：37℃での3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。レーン3：50℃での3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン4：50℃での3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。レーン5：65℃での3'-O-アリル-ddTTPの組み込み。レーン6：65℃での3'-O-アジドメチル-ddTTPの組み込み。e) Therminator IX DNAポリメラーゼを使用した組み込みについての温度の評価。異なる温度で行われた組み込みの結果。f) Therminator IX DNAポリメラーゼを使用した組み込みについてのMn²⁺の存在の評価。図は、65℃でのイノシンと反対の3'-O-修飾-ddTTPの組み込みの結果を示すゲルを示す。レーンS：標準。レーン1：M

10

20

30

40

50

n^{2+} イオンを含まない3'-O-アリル-dTTPの組み込み。レーン2： Mn^{2+} イオンを含まない3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み。レーン3： Mn^{2+} イオンの存在下での3'-O-アリル-dTTPの組み込み。レーン4： Mn^{2+} イオンの存在下での3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み。g) Terminator EX DNAポリメラーゼを使用した組み込みについての Mn^{2+} の存在の評価。 Mn^{2+} イオンの存在下および不在下での組み込みの結果。h) 組み込み工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図13】ヘルパー鎖の不在-切断。a) ヘルパー鎖の不在下でのハイブリダイズされたポリヌクレオチド鎖の切断を示すスキーム。切断工程は、破線枠で強調表示されている。b) 37℃および室温24℃でのそれぞれhAAGおよび0.2M NaOH（強塩基）によるオリゴヌクレオチドの切断を示すゲル。レーン1．開始オリゴヌクレオチド。両方の全長鎖を含んだ陽性対照であったレーン2は、90%：10%の切断対未切断DNA比のより高い収率を示した。ヘルパー鎖によらない切断反応を含んだレーン3は、10%：90%の切断対未切断DNA比の低い収率パーセンテージを示した。c) 37℃でのhAAGおよびEndo V IIIによるオリゴヌクレオチドの切断を示すゲル。両方の全長鎖を含んだ陽性対照であったレーン2は、約90%：10%の切断対未切断DNA比のより高い収率を示した。ヘルパー鎖によらない切断反応を含んだレーン3は、約7%：93%の切断対未切断DNA比の低い収率パーセンテージを示した。d) hAAG/Endo V IIIおよびhAAG/化学塩基によるオリゴヌクレオチドの切断の要約。e) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図14】ヘルパー鎖の不在-連結。a) ヘルパー鎖の不在下でのハイブリダイズされたポリヌクレオチド鎖の連結を示すスキーム。破線枠で強調表示されている連結工程。b) ヘルパー鎖の不在下で室温（24℃）でのQuick T4 DNAリガーゼによるオリゴヌクレオチドの連結を示すゲル。レーン1は、36merのTAMRA一本鎖オリゴと18merのTAMRA一本鎖オリゴとの混合物を含んだ。これらのオリゴは参照バンドを提供した。c) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図15】ヘルパー鎖によるバージョン1化学-組み込み。a) 破線枠で強調表示されている組み込み工程を示すスキーム。b) 組み込み工程の研究に適用可能なオリゴヌクレオチド。

【図16】ヘルパー鎖によるバージョン1化学-切断。a) ヘルパー鎖の不在下でのハイブリダイズされたポリヌクレオチド鎖の切断を示すスキーム。切断工程は、破線枠で強調表示されている。b) 37℃および室温24℃でのそれぞれhAAGおよび0.2M NaOH（強塩基）によるオリゴヌクレオチドの切断を示すゲル。レーン1．開始オリゴヌクレオチド。両方の全長鎖を含んだ陽性対照であったレーン2は、90%：10%の切断対未切断DNA比のより高い収率を示した。ヘルパー鎖によらない切断反応を含んだレーン3は、10%：90%の切断対未切断DNA比の低い収率パーセンテージを示した。ヘルパー鎖による切断反応を含んだレーン4は、50%：50%の切断対未切断DNA比の等しい収率パーセンテージを示した。c) 脱塩基部位の切断についてのエンドヌクレアーゼV IIIの評価。ゲルは、37℃でのhAAGおよびEndo V IIIによるオリゴヌクレオチドの切断を示す。両方の全長鎖を含んだ陽性対照であったレーン2は、約90%：10%の切断対未切断DNA比のより高い収率を示した。ヘルパー鎖によらない切断反応を含んだレーン3は、約7%：93%の切断対未切断DNA比の低い収率パーセンテージを示した。ヘルパー鎖による切断反応を含んだレーン4は、10%：90%の切断対未切断DNA比の低い収率パーセンテージを示した。d) 脱塩基部位の切断についてのN, N'-ジメチルエチレンジアミンの評価。ゲルは、37℃でのhAAGおよび100mMのN, N'-ジメチルエチレンジアミンによるオリゴヌクレオチドの切断を示す。レーン1．開始オリゴヌクレオチド。両方の全長鎖を含んだ陽性対照であるレーン2は、100%の切断DNAを示した。ヘルパー鎖による切断反応を含んだレーン3は、90%：10%の切断対未切断DNA比のより高い収率パーセンテージを示した。e) hAAG/Endo V III、hAAG/化学塩基およびhAAG/代替化学塩基によるオリゴ

ヌクレオチドの切断の要約。 f) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図17】ヘルパー鎖によるバージョン1化学ー連結。 a) ヘルパー鎖の存在下でハイブリダイズされたポリヌクレオチド鎖の連結を示すスキーム。破線枠で強調表示されている連結工程。 b) ヘルパー鎖の存在下での室温(24℃)でのQuick T4 DNAリガーゼによるオリゴヌクレオチドの連結を示すゲル。レーン1は、36merのTAMRA一本鎖オリゴと18merのTAMRA一本鎖オリゴとの混合物を含んだ。これらのオリゴは参照バンドを提供した。レーン2では、20分後に予想されるバンドサイズ36merの観察可能な連結生産物があった。 c) ヘルパー鎖の存在下で一晩インキュベートした後の、室温(24℃)でのQuick T4 DNAリガーゼによるオリゴヌクレオチドの連結を示すゲル。レーン1は、36merのTAMRA一本鎖オリゴと18merのTAMRA一本鎖オリゴとの混合物を含んだ。これらのオリゴは参照バンドとして機能した。レーン2では、36merの予想されるバンドサイズの観察可能な完全連結生産物があった。 d) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図18】ヘルパー鎖によるバージョン2化学ー組み込み。 a) オレンジ色の破線枠で強調表示されている組み込み工程を示すスキーム b) 27℃でのTerminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dTTPの組み込みの結果を示すゲル。レーン1：開始材料。レーン2：1分後の組み込み、転化率5%。レーン3：2分後の組み込み、転化率10%。レーン4：5分後の組み込み、転化率20%。レーン5：10分後の組み込み、転化率30%。レーン6：20分後の組み込み、転化率35%。 c) 図は、37℃でのTerminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dTTPの組み込みの結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始材料。レーン2：1分後の組み込み、転化率30%。レーン3：2分後の組み込み、転化率60%。レーン4：5分後の組み込み、転化率90%。レーン5：10分後の組み込み、転化率90%。レーン6：20分後の組み込み、転化率90%。 d) 47℃でのTerminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dTTPの組み込みの結果を示すゲル。レーン1：開始材料。レーン2：1分後の組み込み、転化率30%。レーン3：2分後の組み込み、転化率65%。レーン4：5分後の組み込み、転化率90%。レーン5：10分後の組み込み、転化率90%。レーン6：20分後の組み込み、転化率90%。 e) 27℃でTerminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dTTPの組み込みの結果を示すゲル。レーン1：開始材料。レーン2：1分後の組み込み、転換率70%。レーン3：2分後の組み込み、転化率85%。レーン4：5分後の組み込み、転化率92%。レーン5：10分後の組み込み、転化率96%。レーン6：20分後の組み込み、転化率96%。 f) 37℃でのTerminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dTTPの組み込みの結果を示すゲル。レーン1：開始材料。レーン2：1分後の組み込み、転化率85%。レーン3：2分後の組み込み、転化率95%。レーン4：5分後の組み込み、転化率96%。レーン5：10分後の組み込み、転化率96%。レーン6：20分後の組み込み、転化率96%。 g) 47℃でのTerminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dTTPの組み込みの結果を示すゲル。レーン1：開始材料。レーン2：1分後の組み込み、転化率85%。レーン3：2分後の組み込み、転化率90%。レーン4：5分後の組み込み、転化率96%。レーン5：10分後の組み込み、転化率96%。レーン6：20分後の組み込み、転化率96%。 h) 様々な温度での3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込みおよびMn²⁺イオンの存在の要約。 i) 37℃でのMn²⁺の存在下でのTerminator IX DNAポリメラーゼによる相補的塩基と反対の3'-O-修飾-dNTPの組み込みの結果を示すゲル。レーン1：開始材料。レーン2：5分間の3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み。レーン3：5分間の3'-O-アジドメチル-dATPの組み込み。レーン4：5分間の3'-O-アジドメチル-dCTPの組み込み。レーン5：5分間の3'-O-アジドメチル-dGTPの組み込み。 j) 組み込み工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【図19】ヘルパー鎖によるバージョン2化学切断。 a) ヘルパー鎖の存在下でのハイブリダイズされたポリヌクレオチド鎖の切断を示すスキーム。切断工程はオレンジ色の破線枠で強調表示されている。 b) ゲルは、37℃でのEndo Vによるオリゴヌクレオチドの切断を示す。レーン1：開始オリゴヌクレオチド。両方の全長鎖を含んだ陽性対照であったレーン2は、80%：20%の切断対未切断DNA比の収率を示した。ヘルパー鎖によらない切断反応を含むレーン3は、>99%の切断DNAのはるかに高い収率を示した。ヘルパー鎖による切断反応を含むレーン4も、>99%のDNA切断収率を示した。 c) エンドヌクレアーゼVによる切断研究の要約。 d) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図20】ヘルパー鎖によるバージョン2化学連結。 a) ヘルパー鎖の不在下でのハイブリダイズされたポリヌクレオチド鎖の連結を示すスキーム。オレンジ色の破線枠で強調表示されている連結工程。 b) 切断工程の研究のためのオリゴヌクレオチド。

【図21】ヘルパー鎖によるバージョン2化学脱保護。 a) オレンジ色の破線枠で強調表示されている脱保護工程を示すスキーム。 b) 図は、3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み後の50mMのTCPEによる3'-O-アジドメチル基の脱保護の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始プライマーレーン2：Mn²⁺の存在下での3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み。レーン3：全ての天然dNTPの付加によるレーン2の生産物の伸長。レーン4：50mMのTCPEによるレーン2の生産物(0.5μM)の脱保護。レーン5：全ての天然dNTPの付加によるレーン4の生産物の伸長。 c) 図は、3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み後の300mMのTCPEによる3'-O-アジドメチル基の脱保護の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始プライマー。レーン2：Mn²⁺の存在下での3'-O-アジドメチル-dTTPの組み込み。レーン3：全ての天然dNTPの付加によるレーン2の生産物の伸長。レーン4：300mMのTCPEによるレーン2の生産物(0.5μM)の脱保護。レーン5：全ての天然dNTPの付加によるレーン4の生産物の伸長。 d) 図は、3'-O-アジドメチル-dCTPの組み込み後の50mMのTCPEによる3'-O-アジドメチル基の脱保護の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始プライマー。レーン2：Mn²⁺の存在下での3'-O-アジドメチル-dCTPの組み込み。レーン3：全ての天然dNTPの付加によるレーン2の生産物の伸長。レーン4：300mMのTCPEによるレーン2の生産物(0.5μM)の脱保護。レーン5：全ての天然dNTPの付加によるレーン4の生産物の伸長。 e) 図は、3'-O-アジドメチル-dCTPの組み込み後の300mMのTCPEによる3'-O-アジドメチル基の脱保護の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始プライマーレーン2：Mn²⁺の存在下での3'-O-アジドメチル-dCTPの組み込み。レーン3：全ての天然dNTPの付加によるレーン1の生産物の伸長。レーン4：300mMのTCPEによるレーン1の生産物(0.5μM)の脱保護。レーン5：全ての天然dNTPの付加によるレーン3の生産物の伸長。 f) 図は、3'-O-アジドメチル-dATPの組み込み後の300mMのTCPEによる3'-O-アジドメチル基の脱保護の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始プライマーレーン2：Mn²⁺の存在下での3'-O-アジドメチル-dATPの組み込み。レーン3：全ての天然dNTPの付加によるレーン2の生産物の伸長。レーン4：300mMのTCPEによるレーン2の生産物(0.5μM)の脱保護。レーン5：全ての天然dNTPの付加によるレーン4の生産物の伸長。 g) 図は、3'-O-アジドメチル-dGTPの組み込み後の300mMのTCPEによる3'-O-アジドメチル基の脱保護の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始プライマー。レーン2：Mn²⁺の存在下での3'-O-アジドメチル-dGTPの組み込み。レーン3：全ての天然dNTPの付加によるレーン2の生産物の伸長。レーン4：300mMのTCPEによるレーン2の生産物(0.5μM)の脱保護。レーン5：全ての天然dNTPの付加によるレーン4の生産物の伸長。 h) 0.2μMのDNAに対するTCPEによる脱保護の効率。 i) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図22】二重ヘアピンモデルによるバージョン2化学組み込み。 a) 破線枠で強調表示されている組み込み工程を示すスキーム。 b) その天然対応物と反対の3'-O-修

10

20

30

40

50

飾-d T T Pの組み込みについてのDNAポリメラーゼの評価。図は、37℃でのTherminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-d T T Pの組み込みの結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始材料。レーン2：天然d N T P混合物の組み込み。レーン3：Therminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-アジドメチル-d T T Pの組み込み。レーン4：全ての天然d N T Pの付加によるレーン3の生産物の伸長。c) その天然対応物と反対の3'-O-修飾-d T T Pの組み込みについてのDNAポリメラーゼの評価。組み込み工程の研究に適用可能なオリゴヌクレオチド。

【図23】二重ヘアピンモデルによるバージョン2化学-切断。a) ヘアピンオリゴヌクレオチドの切断を示すスキーム。切断工程は破線枠で強調表示されている。b) 37℃でのEndo Vによるヘアピンオリゴヌクレオチドの切断を示すゲル。レーン1. 開始ヘアピンオリゴヌクレオチド。5分後に切断されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン2は、約98%の割合で高収率の消化DNAを示した。10分後に切断されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン3は、約99%の割合で高収率の消化DNAを示した。30分後に切断されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン4は、約99%の割合で高収率の消化DNAを示し、1時間後に切断されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン5は、約99%の割合で高収率の消化DNAを示した。c) 切断工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図24】二重ヘアピンモデルによるバージョン2化学-連結。a) ハイブリダイズされたヘアピンの連結を示すスキーム。破線枠で強調表示されている連結工程。b) ヘルパー鎖の存在下での室温(24℃)での平滑/T A DNAリガーゼによるヘアピンオリゴヌクレオチドの連結を示すゲル。レーン1は開始ヘアピンオリゴヌクレオチドを含んでいた。1分後の連結されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン2は、約85%の割合で高収率の連結DNA生産物を示した。2分後の連結されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン3は、約85%の割合で高収率の消化DNAを示した。3分後の連結されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン4は、約85%の割合で高収率の連結DNA生産物を示した。4分後の連結されたヘアピンオリゴヌクレオチドであるレーン5は、>約85%の割合で高収率の連結DNA生産物を示した。c) 連結工程の研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

【図25】バージョン2化学-二重ヘアピンモデルについての完全サイクル。a) 酵素的組み込み、切断、連結、および脱保護工程を伴う完全サイクルを示すスキーム。b) その天然対応物と反対の3'-O-修飾-d T T Pの組み込みについてのDNAポリメラーゼの評価。図は、37℃でのTherminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-d T T Pの組み込みの結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始材料。レーン2：Therminator IX DNAポリメラーゼによる3'-O-アジドメチル-d T T Pの組み込み。レーン3：全ての天然d N T Pの付加によるレーン2の生産物の伸長。レーン4：エンドヌクレアーゼVによるレーン2の生産物の切断。レーン5：平滑T Aリガーゼキットによるレーン4の生産物の連結。c) 組み込み工程の研究に適用可能なオリゴヌクレオチド。

【図26】バージョン2化学-ヘルパー鎖を使用した単一ヘアピンモデルについての完全サイクル。a) 酵素的組み込み、切断、連結、および脱保護工程を伴う完全サイクルを示すスキーム。b) 組み込み工程の研究に適用可能なオリゴヌクレオチド。

【図27】バージョン3化学-二重ヘアピンモデルについての完全サイクル。a) 酵素的組み込み、切断、連結、および脱保護工程を伴う完全サイクルを示すスキーム。b) 組み込み工程の研究に適用可能なオリゴヌクレオチド。

【図28】バージョン2化学-二重ヘアピンモデルについての完全2サイクル。a) 酵素的組み込み、脱保護、切断、および連結工程を伴う第1の完全サイクルを示すスキーム。b) 酵素的組み込み、脱保護、切断、および連結工程を伴う第1の完全サイクルに続く第2の完全サイクルを示すスキーム。c) 図は、組み込み、脱保護、切断、および連結工程を含む完全2サイクル実験を示すゲルを図示する。レーン1. 開始材料。レーン2

10

20

30

40

50

・天然dNTPによる開始材料の伸長。レーン3．Therminator IX DNAポリメラーゼによる3'－O－アジドメチル－dTTPの組み込み。レーン4．全ての天然dNTPの付加によるレーン3の生産物の伸長。レーン5．TCEPによるレーン3の生産物の脱保護。レーン6．全ての天然dNTPの付加によるレーン5の生産物の伸長。レーン7．エンドヌクレアーゼVによるレーン5の生産物の切断。レーン8．平滑Tアリガーゼキットによるレーン7の生産物の連結。レーン9．ラムダエキソヌクレアーゼによるレーン8の生産物の切断。レーン10．第2のサイクルのための開始材料－レーン9と同じ材料。レーン11．Therminator IX DNAポリメラーゼによる3'－O－アジドメチル－dTTPの組み込み。レーン12．全ての天然dNTPの付加によるレーン11の生産物の伸長。レーン13．TCEPによるレーン11の生産物の脱保護。レーン14．全ての天然dNTPの付加によるレーン13の生産物の伸長。レーン15．エンドヌクレアーゼVによるレーン13の生産物の切断。レーン16．平滑Tアリガーゼキットによるレーン15の生産物の連結。d) 研究のために使用されるオリゴヌクレオチド。

10

【図29】本明細書に記載される方法により合成されるような所定の配列のポリヌクレオチドの足場ヌクレオチドからの放出の機構を示す例。

【図30】本発明によるRNAの合成のための例示的な方法の概略図。例示的な方法は、ヘルパー鎖の不在下での合成を示す。

【図31】本発明によるRNAの合成のための例示的な方法の概略図。例示的な方法は、ヘルパー鎖の存在下での合成を示す。

20

【図32】本発明によるRNAの合成のための例示的な方法の概略図。例示的な方法は、ヘルパー鎖の存在下での合成を示す。

【図33】組み込み工程の前にヘルパー鎖を変性する工程を伴う、単一ヘアピンモデルによる合成方法のバージョン2によるDNA合成のための例示的な方法の第1の完全サイクルの概略図。

【図34】組み込み工程の前にヘルパー鎖を変性する工程を伴う、単一ヘアピンモデルによる合成方法のバージョン2によるDNA合成のための例示的な方法の第2の完全サイクルの概略図。

【図35】組み込み工程の前にヘルパー鎖を変性する工程を伴う、単一ヘアピンモデルによる合成方法のバージョン2によるDNA合成のための例示的な方法の第3の完全サイクルの概略図。

30

【図36】実施例9に詳述される実験に使用されるオリゴヌクレオチド。

【図37】実施例9に詳述されるような完全3サイクル実験に対応する反応生産物を示すゲル。図は、組み込み、脱ブロック、切断、および連結工程を含む完全3サイクル実験の結果を示すゲルを図示する。レーン1：開始材料。レーン2．天然dNTPによる開始材料の伸長レーン3：Therminator X DNAポリメラーゼによる3'－O－アジドメチル－dTTPの組み込み。レーン4：全ての天然dNTPの付加によるレーン3の生産物の伸長。レーン5：TCEPによるレーン3の生産物の脱ブロックレーン6：全ての天然dNTPの付加によるレーン5の生産物の伸長。レーン7：エンドヌクレアーゼVによるレーン5の生産物の切断。レーン8：T3 DNAリガーゼによるレーン7の生産物の連結レーン9：第2のサイクルの開始材料－レーン9と同じ材料レーン10：全ての天然dNTPの付加によるレーン9の生産物の伸長。レーン11：Therminator X DNAポリメラーゼによる3'－O－アジドメチル－dTTPの組み込み。レーン12：全ての天然dNTPの付加によるレーン11の生産物の伸長。レーン13：TCEPによるレーン11の生産物の脱ブロックレーン14：全ての天然dNTPの付加によるレーン13の生産物の伸長。レーン15：エンドヌクレアーゼVによるレーン13の生産物の切断レーン16：T3 DNAリガーゼによるレーン15の生産物の連結レーン17：第3のサイクルのための開始材料－レーン16と同じ材料レーン18：全ての天然dNTPの付加によるレーン17の生産物の伸長。レーン19：Therminator X DNAポリメラーゼによる3'－O－アジドメチル－dTTPの組み込み。レーン20

40

50

：全ての天然 d N T P の付加によるレーン 19 の生産物の伸長。レーン 21：T C E P によるレーン 19 の生産物の脱ブロックレーン 22：全ての天然 d N T P の付加によるレーン 21 の生産物の伸長。レーン 23：エンドヌクレアーゼ V によるレーン 21 の生産物の切断レーン 24：T3 DNA リガーゼによるレーン 23 の生産物の連結

【図 38】F I T C - P E G - S H および F I T C - P E G - C O O H に曝露された異なる量の B R A P A を添加したポリアクリルアミドゲル表面からの蛍光シグナル。

【図 39】F I T C - P E G - S H および F I T C - P E G - C O O H に曝露された異なる量の B R A P A を添加したポリアクリルアミドゲル表面上のフルオレセインチャンネルから測定された蛍光シグナル。

【図 40】(a) 異なる試料に固定化されたリンカーを有しないヘアピン DNA の配列を示す。(b) 異なる試料に固定化されたリンカーを有するヘアピン DNA の配列を示す。

【図 41】プロモアセチル官能化ポリアクリルアミド表面に固定化されたリンカーを有するおよび有しないヘアピン DNA オリゴマーからの蛍光シグナル。

【図 42】プロモアセチル官能化ポリアクリルアミド表面に固定化されたリンカーを有するおよび有しないヘアピン DNA オリゴマーから測定された蛍光。

【図 43】三リン酸の組み込み後のプロモアセチル官能化ポリアクリルアミド表面に固定化されたリンカーを有するおよび有しないヘアピン DNA オリゴマーからの蛍光シグナル。

【図 44】三リン酸の組み込み後のプロモアセチル官能化ポリアクリルアミド表面に固定化されたリンカーを有するおよび有しないヘアピン DNA オリゴマーから測定された蛍光。

【図 45】(a) 実施例 12 に詳述されるような各反応工程についての実験的概観および結果。(b) 実施例 12 に詳述される実験に使用されるオリゴヌクレオチド。

【図 46】切断反応の前および後のヘアピン DNA オリゴマーからの蛍光シグナルを示す(実施例 12)。

【図 47】切断反応の前および後のヘアピン DNA オリゴマーから測定された蛍光シグナルを示す(実施例 12)。

【図 48】連結反応のためのイノシン含有鎖および相補的「ヘルパー」鎖のための配列を示す(実施例 12)。

【図 49】連結反応のモニタリングに対応するヘアピン DNA オリゴマーからの蛍光シグナルに関する結果(実施例 12)。

【図 50】連結反応のモニタリングに対応するヘアピン DNA オリゴマーから測定された蛍光に関する結果(実施例 12)。

【図 51】本発明の方法、例えば、本発明の合成方法のバージョン 1、2、および 4 (それぞれ図 1、2、および 4 ならびに実施例 13) による組み込み工程を使用した、T h e r m i n a t o r X DNA ポリメラーゼによる 3' - O 修飾 - d N T P の組み込みに関する結果。図 51 a は、プライマー鎖(合成鎖のプライマー鎖部分; 配列番号 68) およびテンプレート鎖(支持鎖; 配列番号 69) の核酸配列を提供する。図 51 b は、37°C の M n 2 + イオンの存在下での T h e r m i n a t o r X DNA ポリメラーゼによる 3' - O 修飾 - d N T P の組み込みの結果を示すゲルを示す。レーン 1: 開始オリゴヌクレオチド。レーン 2: 3' - O - アジドメチル - d T T P の組み込み(効率 > 99%)。レーン 3: 3' - O - アジドメチル - d A T P の組み込み(効率 > 99%)。レーン 4: 3' - O - アジドメチル - d C T P の組み込み(効率 > 90%)。レーン 5: 3' - O - アジドメチル - d G T P の組み込み(効率 > 99%)。

【0069】

付加すると、新たに付加された 3' - O - 修飾 - d N T P はプライマー鎖部分の位置 n を占める。したがって、プライマー鎖部分の隣のヌクレオチド位置は、例えば、それぞれ図 1、2、および 4 に示されるように、本発明の方法バージョンの 1、2、および 4 の工程 3 に従って、n - 1 と指定される。

【0070】

図の解釈。

図 11、12 a、13 a、14 a、15 a、16 a、17 a、18 a、19 a、20 a

10

20

30

40

50

、21a、22a、23a、24a、25a、26a、27a、28a、28b、29、30、31、32、33、34、および35に示される構造は、図6、7、8、9、および10に示されるものと一貫して解釈されるべきである。したがって、これらの図では、二本鎖足場ポリヌクレオチド分子の各左手鎖は、支持鎖（図6～10の鎖「a」に対応する）に関し、二本鎖足場ポリヌクレオチド分子の各右手鎖は、合成鎖（図6～10の鎖「b」に対応する）に関し、全ての足場ポリヌクレオチド分子は、プライマー鎖部分（図6～10の鎖「b」の実線および点線に対応する）を含む鎖に対応するより低い合成鎖を含み、ヘルパー鎖部分（図6～10の鎖「b」の破線に対応する）を含む鎖に対応する上部合成鎖を有する、新たなヌクレオチドの組み込みの前の特定の足場ポリヌクレオチド分子（例えば、図15aおよび23a）が示され、ヘルパー鎖部分（図6～10の鎖「b」の破線の欠如に対応する）を含まない、ある特定の足場ヌクレオチド分子（例えば、図12a、13a、および14aの）が示され、ヘルパー鎖部分（図6～10の鎖「b」の破線に対応する）を含む鎖に対応する上部合成鎖を有する、連結工程後の特定の足場ポリヌクレオチド分子（例えば、図33、34、および35の）が示され、ヘルパー鎖部分は、次の合成サイクルにおいて新たなヌクレオチドの組み込みの前に除去される。

【0071】

加えて、これらの図では、関連する場合、各新たなヌクレオチドは、rtNTPと標識され、かつ小さな円形構造（図6～10の小さな三角形構造に対応する）として示される、可逆的ターミネーター基と一緒に組み込まれるように示され、末端リン酸基は、「p」と標識され、小さな楕円形構造として示される。

【0072】

図11c、11d、11g、11h、22a、23a、24a、25a、27a、28a、28b、および29は、ヘルパー鎖部分を含む鎖と支持鎖とがヘアピンループによって接続されている足場ポリヌクレオチド分子を示す。図11b、22a、23a、24a、25a、26a、27a、28a、28b、29、33、34、および35は、ヘルパー鎖部分を含む鎖と支持鎖とがヘアピンループによって接続されている足場ポリヌクレオチド分子を示す。

【0073】

図27aおよび28aなどの図は、ヘルパー鎖部分を含む鎖（右上の鎖）と支持鎖（左上の鎖）とがヘアピンループによって接続されている足場ポリヌクレオチド分子を示し、同じ分子において、プライマー鎖部分を含む鎖（右下の鎖）と支持鎖（左下の鎖）とが、ヘアピンループによって接続されている。

【0074】

図51に示されるデータは、例えば、本発明の合成方法バージョンの1、2、および4（それぞれ図1、2、および4）と一致する、本発明の方法による組み込み工程を含むものとして解釈されるべきである。

【0075】

本発明は、所定のヌクレオチド配列によるポリヌクレオチド分子のデノボ合成のための方法を提供する。合成されるポリヌクレオチドは、好ましくはDNAであり、好ましくは二本鎖ポリヌクレオチド分子である。本発明は、既存の合成方法と比較して利点を提供する。例えば、全ての反応工程を穏やかなpHの水性条件で行うことができ、広範囲の保護および脱保護手順は必要ではない。さらに、合成は、所定のヌクレオチド配列を含む既存の鋳型鎖の複製に依存しない。

【0076】

本発明者らは、本明細書に定義されるようなユニバーサルヌクレオチドの使用が、各合成サイクル中に新たに組み込まれたヌクレオチドがその所望のパートナーヌクレオチドと正しく対合されることを可能にすると判定した。ユニバーサルヌクレオチドの使用は、切断および繰り返しの合成サイクルを促進する合成された領域内の切断部位の作成を可能にする。本発明は、ポリヌクレオチドを合成するための、およびそのような合成されたポリヌクレオチドを含む大きな断片をアセンブリするための多用途の方法を提供する。

【0077】

本発明の合成方法のある特定の実施形態は、本発明の5つの例示的な方法のバージョン（図1～5）およびある特定の變形例を含む例示的な方法を参照することによって、本明細書により一般的に詳細に記載されるであろう。本発明の5つの例示的な方法のバージョンを含む全ての例示的な方法が、本発明を限定することを意図するものではないことが理解されるべきである。本発明は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチド分子をインビトロで合成する方法を提供し、方法は、合成サイクルを行うことを含み、各サイクルにおいて、第1のポリヌクレオチド鎖は、所定の配列のヌクレオチドの組み込みによって伸長され、次に、第1の鎖にハイブリダイズされる第2のポリヌクレオチド鎖は、ヌクレオチドの組み込みによって伸長され、それにより第1の鎖の組み込まれたヌクレオチドとヌクレオチド対を形成する。好ましくは、方法は、DNAを合成するためのものである。本明細書に記載される特定の方法は、本発明の実施形態として提供される。

10

【0078】

反応条件

一態様では、本発明は、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するための方法を提供する。

【0079】

いくつかの実施形態では、合成は、二本鎖ポリヌクレオチド内のヌクレオチドのハイブリダイゼーションに好適な条件下で実施される。ポリヌクレオチドは、典型的には、ヌクレオチドの相補的ヌクレオチドへのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で試薬と接触される。ハイブリダイゼーションを可能にする条件は、当該技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)）。

20

【0080】

ポリヌクレオチドへのヌクレオチドの組み込みは、例えば、好適な緩衝溶液の存在下で、好適な温度（例えば、約65℃）で修飾ヌクレオチド（例えば、3'-O-修飾-dNTP）を組み込むために、ポリメラーゼ（例えば、Therminator EXポリメラーゼ）または末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）酵素またはその機能的バリエーションを使用して、好適な条件下で実施され得る。一実施形態では、緩衝溶液は、2mMのトリス-HCl、1mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1mMのKCl、0.2mMの MgSO_4 、および0.01%のTriton（登録商標）X-100を含み得る。

30

【0081】

ポリヌクレオチドの切断は、例えば、好適な緩衝溶液の存在下で、酵素と適合する温度（例えば、37℃）でポリヌクレオチド切断酵素（例えば、エンドヌクレアーゼ）を使用して、好適な条件下で実施され得る。一実施形態では、緩衝溶液は、5mMの酢酸カリウム、2mMのトリス-酢酸、1mMの酢酸マグネシウム、および0.1mMのDTTを含み得る。

40

【0082】

ポリヌクレオチドの連結は、例えば、好適な緩衝溶液の存在下で、酵素と適合する温度（例えば、室温）でリガーゼ（例えば、T4 DNAリガーゼ）を使用して、好適な条件下で実施され得る。一実施形態では、緩衝溶液は、4.4mMのトリス-HCl、7mMの MgCl_2 、0.7mMのジチオスレイトール、0.7mMのATP、5%のポリエチレングリコール（PEG6000）を含み得る。

【0083】

脱保護は、例えば還元剤（例えば、TCEP）を使用して、好適な条件下で実施され得る。例えば、脱保護は、トリス緩衝液中のTCEPを使用して（例えば、最終濃度300

50

mMで)行われ得る。

【0084】

アンカーポリヌクレオチドおよび足場ポリヌクレオチド

所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドは、本明細書で足場ポリヌクレオチドと呼ばれる、本明細書に記載されるような表面に付着し得るか、または付着することができる、既存のポリヌクレオチドへの所定のヌクレオチドの組み込みによる本発明の方法によって合成される。本明細書により詳細に記載されるように、足場ポリヌクレオチドは、新たに合成されたポリヌクレオチドを収容するための支持構造を形成し、本明細書の記載から明らかになるように、従来の合成方法におけるように複製される既存の鋳型鎖を含まない。足場ポリヌクレオチドが表面に付着している場合、足場ポリヌクレオチドは、アンカーポリヌクレオチドと呼ばれることがある。足場ポリヌクレオチドを表面に付着させてアンカーポリヌクレオチドを形成するための表面付着化学は、本明細書により詳細に記載されている。

【0085】

一実施形態では、足場ポリヌクレオチドは、相補的支持鎖にハイブリダイズされた合成鎖を含む。合成鎖は、プライマー鎖部分および任意に一本鎖切断または「ニック」(例えば、図1~5)によって分離されたヘルパー鎖部分を含む。合成鎖のプライマー鎖部分とヘルパー鎖部分との両方が、相補的支持鎖にハイブリダイズされて提供され得る。代替的に、合成鎖のヘルパー鎖部分は別々に提供され得る。合成鎖のヘルパー鎖部分が最初に提供され得、続いて支持鎖およびヘルパー鎖が提供され得る。代替的に、足場ポリヌクレオチドの成分は別々に提供され得る。例えば、支持鎖が最初に提供され得、続いて合成鎖のプライマー鎖部分、次に、ヘルパー鎖が提供され得る。支持鎖が最初に提供され得、続いて合成鎖のヘルパー鎖部分、次に、プライマー鎖が提供され得る。合成鎖のヘルパー鎖部分は、切断工程の前に提供され得る。ヘルパー鎖部分は、新たな所定のヌクレオチドの切断および組み込みの前に足場ポリヌクレオチドから削除され得る。ヘルパー鎖部分は、本明細書により詳細に記載されるように、新たな所定のヌクレオチドの切断および組み込みの前に、例えば、変性によって足場ポリヌクレオチドから除去され得る。好適な条件下で成分を混合すると、足場ポリヌクレオチドが別々の成分のハイブリダイゼーション時に形成される。

【0086】

新たな合成は、一本鎖切断部位でポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素によって開始される。したがって、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素は、一本鎖切断部位でプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドを伸長させるように作用するであろう。合成鎖のヘルパー鎖部分と合成鎖のプライマー鎖部分との間の一本鎖切断または「ニック」は、典型的には、最初に支持鎖とのハイブリダイゼーション後に整列することになる別々の分子として合成鎖の両方の部分を提供することによって達成される。一本鎖切断部位におけるヘルパー鎖の(5')末端ヌクレオチドは、典型的には、リン酸基を欠いて提供される。末端リン酸基の欠如は、ヘルパー鎖部分の末端ヌクレオチドが一本鎖切断部位におけるプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドと連結するのを防止し、よって一本鎖切断を維持する。一本鎖切断の作成および維持は他の手段によっても達成され得る。例えば、ヘルパー鎖部分の末端ヌクレオチドには、プライマー鎖部分との連結を防止する好適なブロッキング基が提供され得る。好ましくは、ヘルパー鎖は、一本鎖切断部位において末端リン酸基を欠いて提供される。

【0087】

足場ポリヌクレオチドには、隣接する末端で接続されていない支持鎖および合成鎖のそれぞれが提供され得る。足場ポリヌクレオチドには、足場ヌクレオチドの両方の末端でヘアピンループなどを介して、隣接する末端で接続されている支持鎖および合成鎖の両方が提供され得る。足場ポリヌクレオチドには、足場ヌクレオチドの一方の末端または任意の他の好適なリンカーでヘアピンループなどを介して、隣接する末端で接続されている支持鎖および合成鎖の両方が提供され得る。

【0088】

ヘアピンを有するまたは有しない足場ポリヌクレオチドは、本明細書により詳細に記載されるような固体支持体または表面に固定化され得る（図11を参照されたい）。

【0089】

「ヘアピン」または「ヘアピンループ」という用語は、現在の技術分野において一般的に使用されている。「ヘアピンループ」という用語は、「ステムループ」とも呼ばれることが多い。そのような用語は、ポリヌクレオチド分子の一方の鎖が分子内塩基対合のために同じ鎖の別の区分にハイブリダイズしたときに形成される、不対合核酸塩基のループを含むポリヌクレオチド中の二次構造の領域を指す。したがって、ヘアピンはU字型の構造に似ている場合がある。そのような構造の例を図11に示す。

10

【0090】

ヌクレオチドおよびユニバーサルヌクレオチド

本明細書に記載される方法のうちのいずれかによって合成ポリヌクレオチドに組み込まれ得るヌクレオチドは、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、および修飾ヌクレオチドであり得る。

【0091】

本明細書に定義および記載される本発明の合成方法のうちのいずれにおいても、ヌクレオチドは、好ましくは、本明細書に記載されるような可逆的ターミネーター基を含むヌクレオチドとして組み込まれる。

【0092】

ヌクレオチドは、天然核酸塩基または非天然核酸塩基を含み得る。ヌクレオチドは、天然核酸塩基、糖、およびリン酸基を含み得る。天然核酸塩基は、アデノシン（A）、チミン（T）、ウラシル（U）、グアニン（G）、およびシトシン（C）を含む。ヌクレオチドの成分のうちの1つは、さらに修飾され得る。

20

【0093】

ヌクレオチド類似体は、塩基、糖、もしくはリン酸、またはそれらの組み合わせのいずれかにおいて構造的に修飾され、オリゴヌクレオチド鎖への組み込みのための基質としてのポリメラーゼ酵素になお許容可能なヌクレオチドである。

【0094】

非天然核酸塩基は、標的ポリヌクレオチド中の核酸塩基のうちの全てにある程度結合する、例えば、水素結合するものであり得る。非天然核酸塩基は、好ましくは、ヌクレオシドアデノシン（A）、チミン（T）、ウラシル（U）、グアニン（G）、およびシトシン（C）を含むヌクレオチドにある程度結合する、例えば水素結合するものである。

30

【0095】

非天然ヌクレオチドは、ペプチド核酸（PNA）、ロックド核酸（LNA）、およびアンロックド核酸（UNA）、架橋核酸（BNA）またはモルホリノ、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートであり得る。

【0096】

非天然ヌクレオチドは、修飾糖および／または修飾核酸塩基を含み得る。修飾糖としては、2'-O-メチルリボース糖が挙げられるが、これに限定されない。修飾核酸塩基としては、メチル化核酸塩基が挙げられるが、これに限定されない。核酸塩基のメチル化は、遺伝子およびマイクロRNAなどの他の要素の発現を改変させる能力を有する認識された形態のエピジェネティック修飾である。核酸塩基のメチル化は、主にCpGモチーフからなるジヌクレオチドである別々の遺伝子座で起こるが、CHHモチーフ（HはA、C、またはTである）でも起こり得る。典型的には、メチル化中に、メチル基がシトシン塩基の第5の炭素に付加されてメチルシトシンを作成する。したがって、修飾核酸塩基としては、5-メチルシトシンが挙げられるが、これに限定されない。

40

【0097】

所定の配列のヌクレオチドは、ヌクレオチド対を形成するために反対のパートナーヌクレオチドに組み込まれ得る。パートナーヌクレオチドは相補的ヌクレオチドであり得る。

50

相補的ヌクレオチドは、所定の配列のヌクレオチドにある程度結合する、例えば水素結合することができるヌクレオチドである。

【0098】

典型的には、所定の配列のヌクレオチドは、天然に相補的なパートナー核酸塩基と反対のポリヌクレオチドに組み込まれる。したがって、アデノシンは、チミンとは反対に組み込まれ得、逆もまた同様である。グアニンは、シトシンとは反対に組み込まれ得、逆もまた同様である。代替的に、所定の配列のヌクレオチドは、それがあつて結合する、例えば水素結合する、パートナー核酸塩基とは反対に組み込まれ得る。

【0099】

代替的に、パートナーヌクレオチドは、非相補的ヌクレオチドであり得る。非相補的ヌクレオチドは、所定の配列のヌクレオチドに結合する、例えば水素結合することができないヌクレオチドである。したがって、合成されたポリヌクレオチドが全体として二本鎖であり、かつ第1の鎖がハイブリダイゼーションによって第2の鎖に付着しているという条件で、所定の配列のヌクレオチドがパートナーヌクレオチドと反対に組み込まれて、ミスマッチを形成する場合がある。

【0100】

「反対の」という用語は、核酸生化学の分野におけるこの用語の通常の使用、具体的には従来のワトソン-クリック塩基対合に関するものとして理解されるべきである。したがって、配列5'-ACGA-3'の第1の核酸分子は、配列5'-TCGT-3'の第2の核酸分子と二本鎖を形成することができ、第1の分子のGは、第2のCと反対に位置付けられ、それと水素結合するであろう。配列5'-ATGA-3'の第1の核酸分子は、配列5'-TCGT-3'の第2の核酸分子と二本鎖を形成し得、第1の分子のTは、第2の分子のGとミスマッチであるが、それでもなおそれと反対に位置付けられ、パートナーヌクレオチドとして作用するであろう。この原理は、ユニバーサルヌクレオチドを含むパートナー対を含む、本明細書に開示される任意のヌクレオチドパートナー対関係に当てはまる。

【0101】

本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、支持鎖における位置および合成鎖における反対の位置は、位置番号「n」を割り当てられる。この位置は、任意の所与の合成サイクルにおいて、工程(3)でのサイクルまたはその後のサイクルの組み込み工程でのプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所与の配列の第1/隣のヌクレオチドによって占められるか、または占められることになる合成鎖中のヌクレオチド位置の反対である足場ポリヌクレオチドの支持鎖中のヌクレオチドの位置を指す。位置「n」はまた、連結工程(5)またはその後のサイクルの連結工程における連結ポリヌクレオチドの支持鎖における位置を指し、この位置は、第1のサイクルの工程(5)またはその後のサイクルの連結工程での切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結時に、所定の配列の第1/その後のヌクレオチドと反対となるヌクレオチド位置である。

【0102】

支持鎖における位置および合成鎖における反対の位置の両方が、ポジトンnと呼ばれ得る。

【0103】

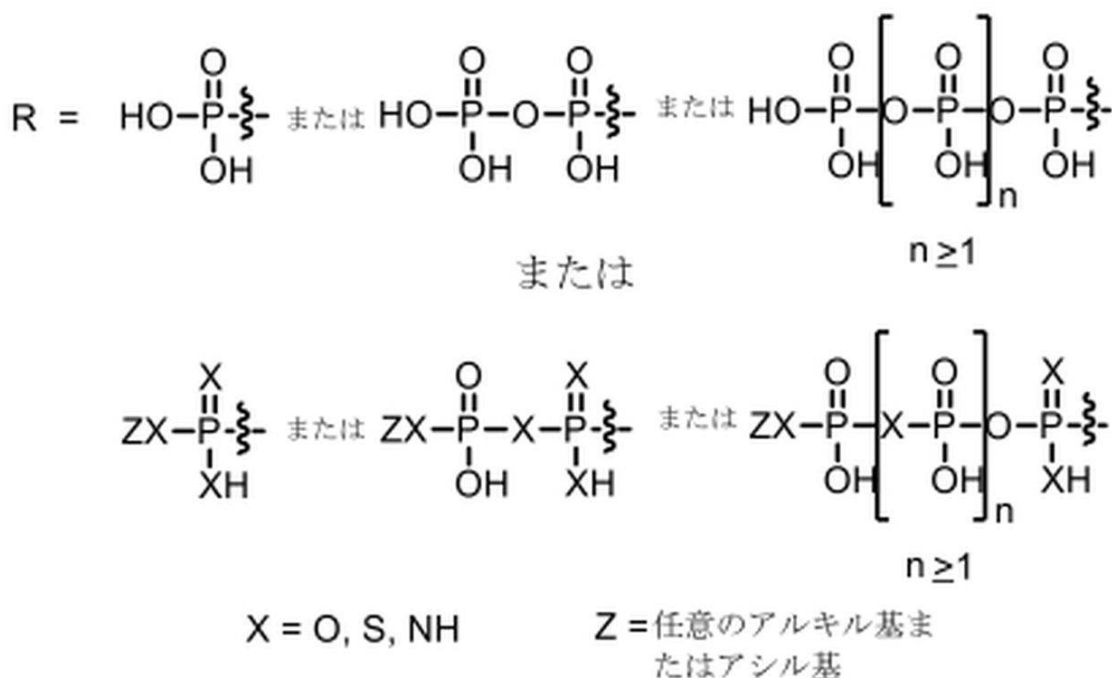
位置「n」の定義に関するさらなる詳細は、図1~5、および本明細書でより詳細に記載される5つの例示的な合成方法のバージョン1~5に関連するその説明を参照して提供される。

【0104】

ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体は、好ましくは、ヌクレオシド三リン酸として提供され得る。したがって、DNAポリヌクレオチドを合成するための本発明の方法のうちのいずれにおいても、ヌクレオチドは、例えば、DNAポリメラーゼ酵素の作用を介して、または例えば、デオキシヌクレオチジル末端トランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用を介して、2'-デオキシリボヌクレオシド-5'-O-三リン酸(dNTP)から組み込まれ得る。RNAポリヌクレオチドを合成するための本発明の方法のうちのいずれに

においても、ヌクレオチドは、例えば、RNAポリメラーゼ酵素の作用を介して、または例えば、ヌクレオチジル末端トランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用を介して、リボヌクレオシド-5'-O-三リン酸（NTP）から組み込まれ得る。三リン酸は、四リン酸または五リン酸（一般的には、オリゴリン酸）で置換することができる。これらのオリゴリン酸は、他のアルキル基またはアシル基で置換することができる。

【化1】



およびそれらの塩

【0105】

本発明の方法は、ユニバーサルヌクレオチドを使用することができる。ユニバーサルヌクレオチドを足場分子の支持鎖の構成成分として使用して、各合成サイクル中に新たに組み込まれたヌクレオチドがその所望のパートナーヌクレオチドと正しく対合されることを促進することができる。必要に応じて、ユニバーサルヌクレオチドも、所定のヌクレオチド配列の成分として合成鎖に組み込まれ得る。

【0106】

ユニバーサルヌクレオチドは、核酸塩基が所定の配列の任意のヌクレオチドの核酸塩基にある程度結合する、すなわち水素結合するものである。ユニバーサルヌクレオチドは、好ましくは、ヌクレオシドアデノシン（A）、チミン（T）、ウラシル（U）、グアニン（G）、およびシトシン（C）を含むヌクレオチドにある程度結合する、例えば水素結合するものである。ユニバーサルヌクレオチドは、他のヌクレオチドよりもいくつかのヌクレオチドにより強く結合し得る。例えば、ヌクレオシド、2'-デオキシイノシンを含むユニバーサルヌクレオチド（I）は、 $I-C > I-A > I-G$ の優先的な対合順序がおおよそ $I-T$ であることを示すであろう。

【0107】

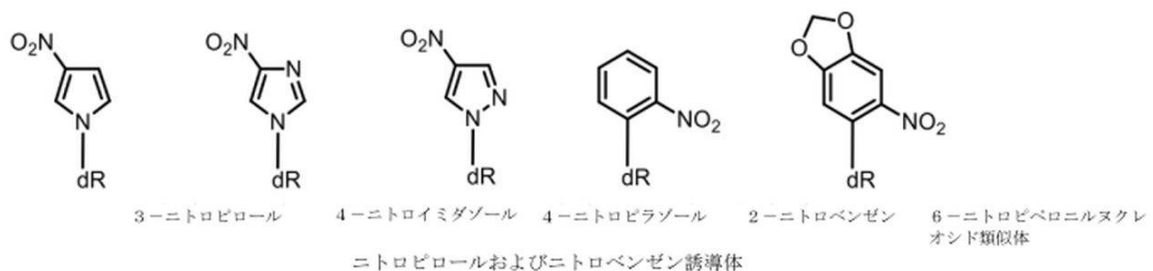
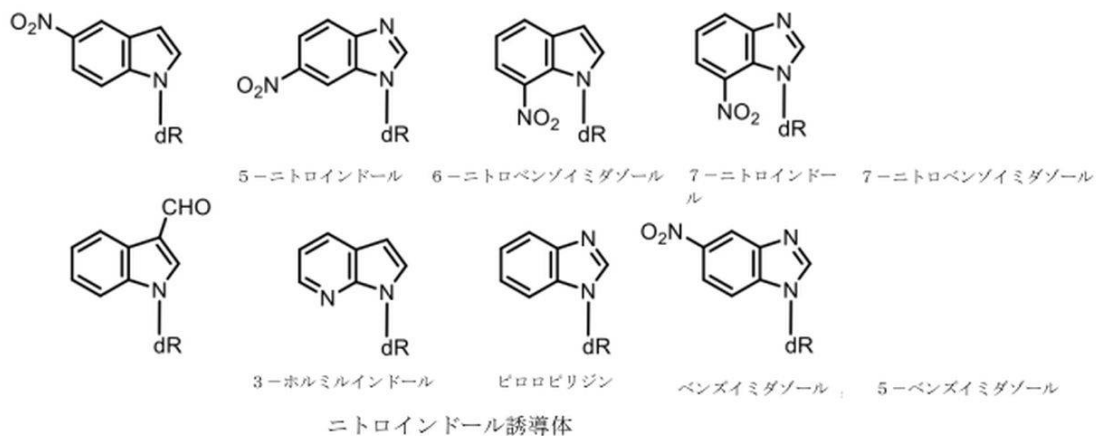
可能なユニバーサルヌクレオチドの例は、イノシンまたはニトロインドールである。ユニバーサルヌクレオチドは、好ましくは、以下の核酸塩基、ヒポキサンチン、4-ニトロインドール、5-ニトロインドール、6-ニトロインドール、3-ニトロピロール、ニトロイミダゾール、4-ニトロピラゾール、4-ニトロベンゾイミダゾール、5-ニトロインダゾール、4-アミノベンゾイミダゾール、またはフェニル（C6芳香族環のうちの1

つを含む。ユニバーサルヌクレオチドは、より好ましくは、以下のヌクレオシド：2'-デオキシイノシン、イノシン、7-デアザ-2'-デオキシイノシン、7-デアザ-イノシン、2-アザ-デオキシイノシン、2-アザ-イノシン、4-ニトロインドール2'-デオキシシリボヌクレオシド、4-ニトロインドールリボヌクレオシド、5-ニトロインドール2'-デオキシシリボヌクレオシド、5-ニトロインドールリボヌクレオシド、6-ニトロインドール2'-デオキシシリボヌクレオシド、6-ニトロインドールリボヌクレオシド、3-ニトロピロール2'-デオキシシリボヌクレオシド、3-ニトロピロールリボヌクレオシド、ヒポキサンチンの非環状糖類似体、ニトロイミダゾール2'-デオキシシリボヌクレオシド、ニトロイミダゾールリボヌクレオシド、4-ニトロピラゾール2'-デオキシシリボヌクレオシド、4-ニトロピラゾールリボヌクレオシド、4-ニトロベンゾイミダゾール2'-デオキシシリボヌクレオシド、4-ニトロベンゾイミダゾールリボヌクレオシド、5-ニトロインダゾール2'-デオキシシリボヌクレオシド、5-ニトロインダゾールリボヌクレオシド、4-アミノベンゾイミダゾール2'-デオキシシリボヌクレオシド、4-アミノベンゾイミダゾールリボヌクレオシド、フェニルC-リボヌクレオシド、またはフェニルC-2'-デオキシシリボシルヌクレオシドのうちの1つを含む。

【0108】

ユニバーサル塩基のいくつかの例を以下に示す。

【化2】

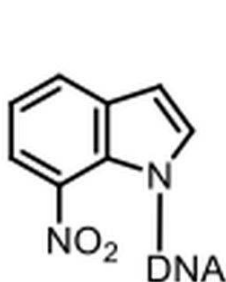


【0109】

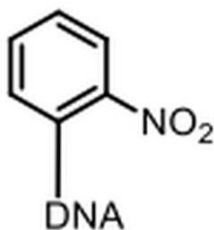
光切断可能な塩基および酵素切断可能な塩基を含む切断可能な塩基を組み込むユニバーサルヌクレオチドも使用することができ、それらのいくつかの例を以下に示す。

光切断可能な塩基：

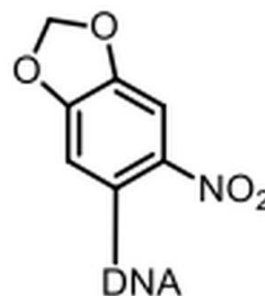
【化 3】



7-ニトロインドール



2-ニトロフェノール

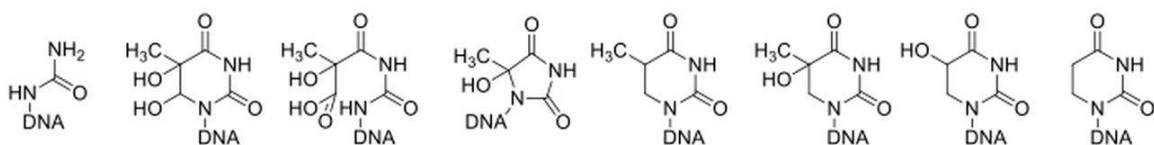


6-ニトロピペロニルスク
レオシド類似体

10

エンドヌクレアーゼ I I I により切断可能な塩基類似体：

【化 4】



尿素

チミングリコール (シ
スおよびトランス)

メチルタルトニル
尿素

5-ヒドロキシ-5-
メチルヒダントイン

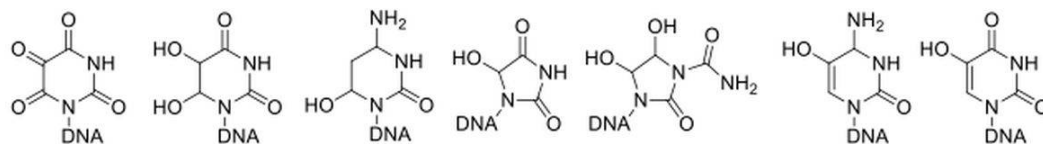
5, 6-ジヒ
ドロチミン

5-ヒドロキシ-
6-ヒドロチミン

5-ヒドロキシ-
6-ヒドロウラシ
ル

5, 6-ジヒド
ロウラシル

20



アロキサン

ウラシルグリコー
ル (シスおよびト
ランス)

6-ヒドロキシ-5
, 6-ジヒドロシ
ン

5-ヒドロキ
シヒダントイ
ン

トランス-1-カラモイ
ル-2-オキソ-4, 5
-ジヒドロキシイミダ
ゾリジン

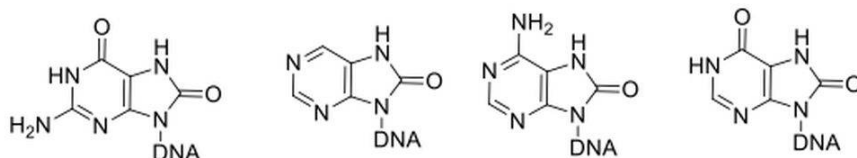
5-ヒドロキ
シーシトシン

5-ヒドロキ
シーウラシル

30

ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ (F p g) によって切断可能な塩基類似体：

【化 5】



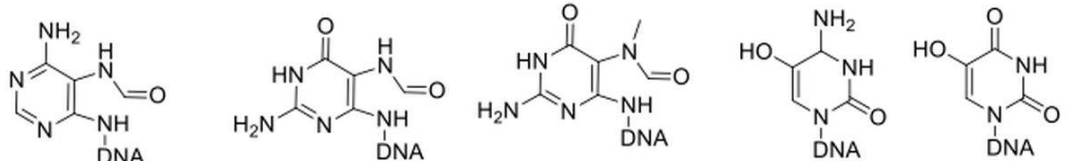
7, 8-ジヒドロ-8-オ
キソグアニン

7, 8-ジヒドロ-8-オ
キソイノシン

7, 8-ジヒドロ-8-オ
キソアデニン

7, 8-ジヒドロ-8-オ
キソネブラリン

40



4, 6-ジアミノ-5-ホル
ムアミドピリミジン (F a p
y-アデニン)

2, 6-ジアミノ-4-ヒドロ
キシ-5-ホルムアミドピリミ
ジン (F a p y-グアニン)

2, 6-ジアミノ-4-ヒドロ
キシ-5-N-メチルホルムア
ミドピリミジン

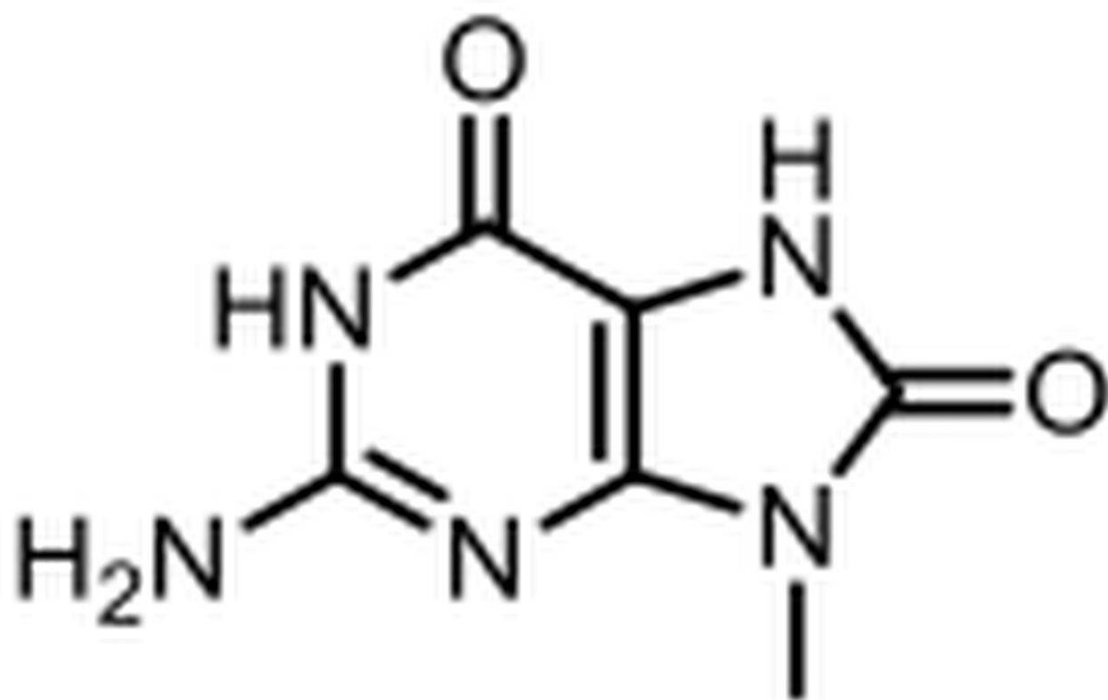
5-ヒドロキシシトシン

5-ヒドロキシウラシ
ル

8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ (h O G G 1) によって切断可能な塩基類似体：

50

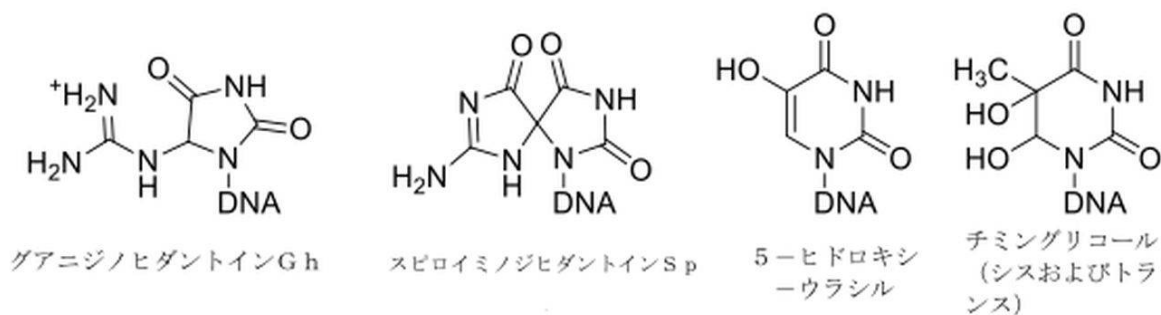
【化 6】



8-オキソグアニン

hNei1によって切断可能な塩基類似体：

【化 7】



チミンDNAグリコシラーゼ (TDG) によって切断可能な塩基類似体：

10

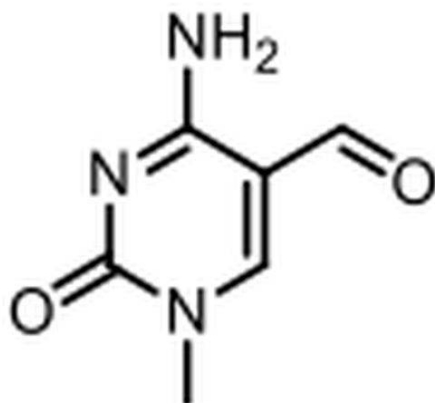
20

30

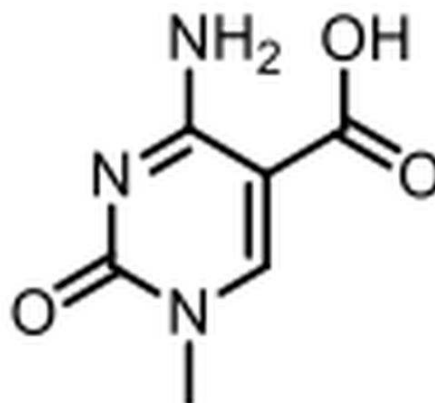
40

50

【化 8】

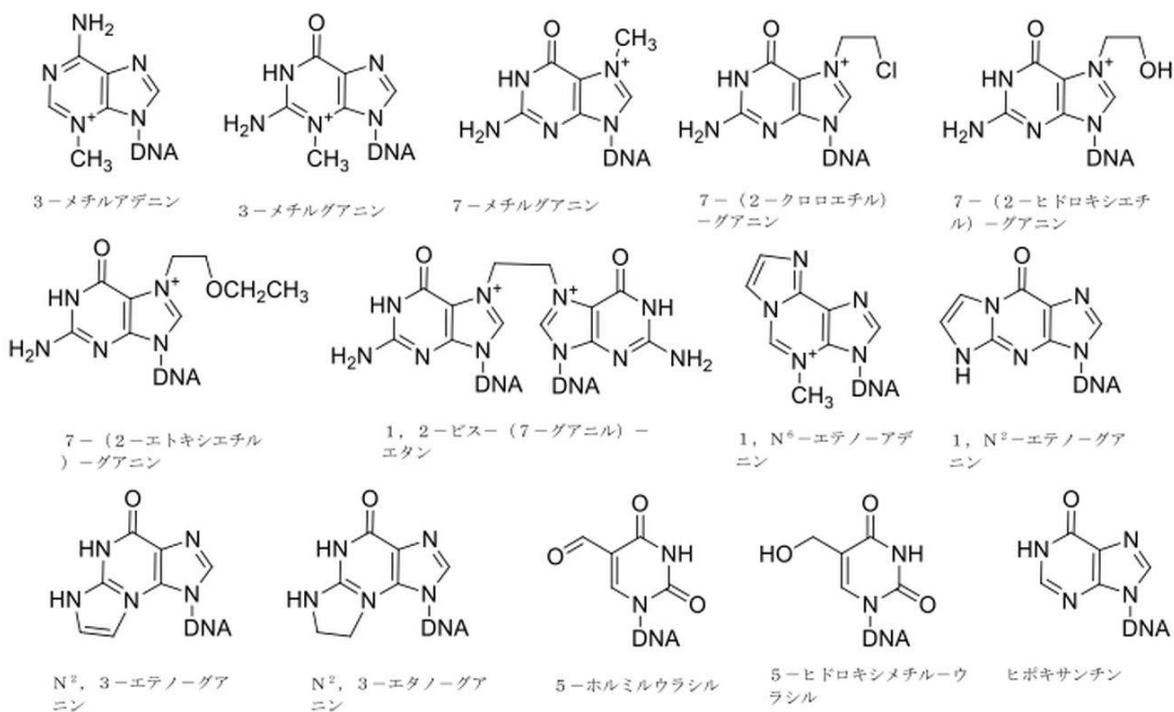


5-ホルミルシトシン



5-カルボキシシトシン

ヒトアルキルアデニンDNAグリコシラーゼ（hAAG）によって切断可能な塩基類似体：
【化 9】



ウラシルDNAグリコシラーゼによって切断可能な塩基：

10

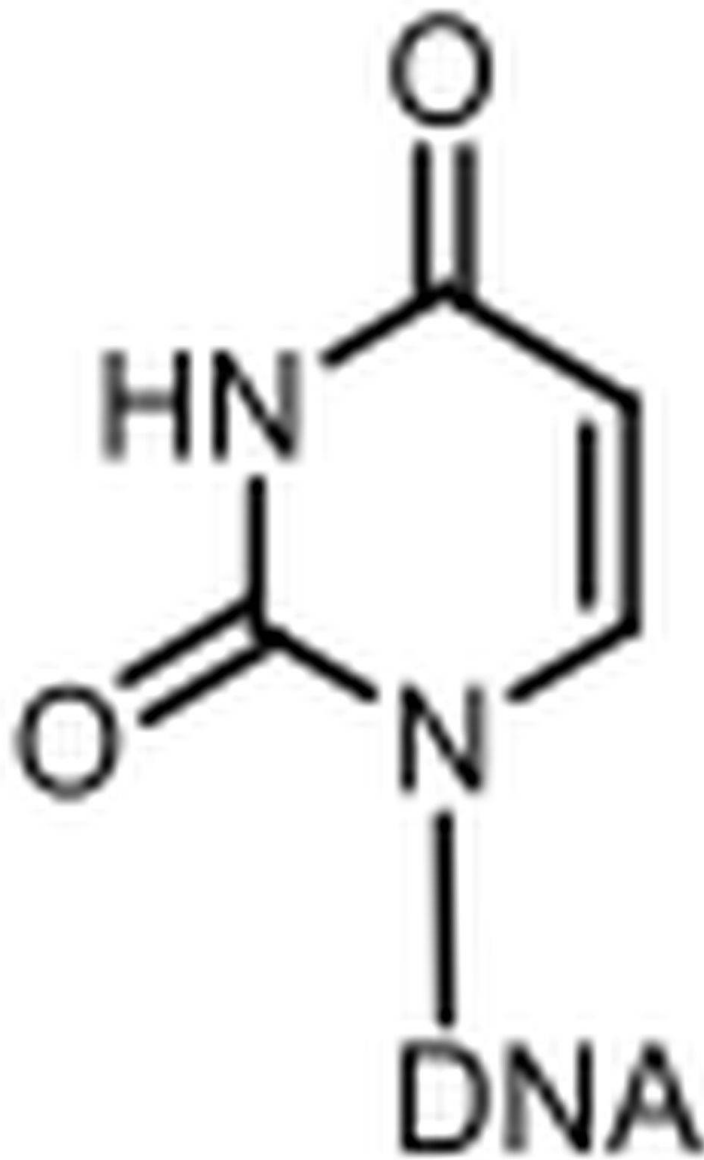
20

30

40

50

【化 10】



ウラシル

ヒト一本鎖選択的単官能性ウラシルDNAグリコシラーゼ（SMUG1）によって切断可能な塩基

10

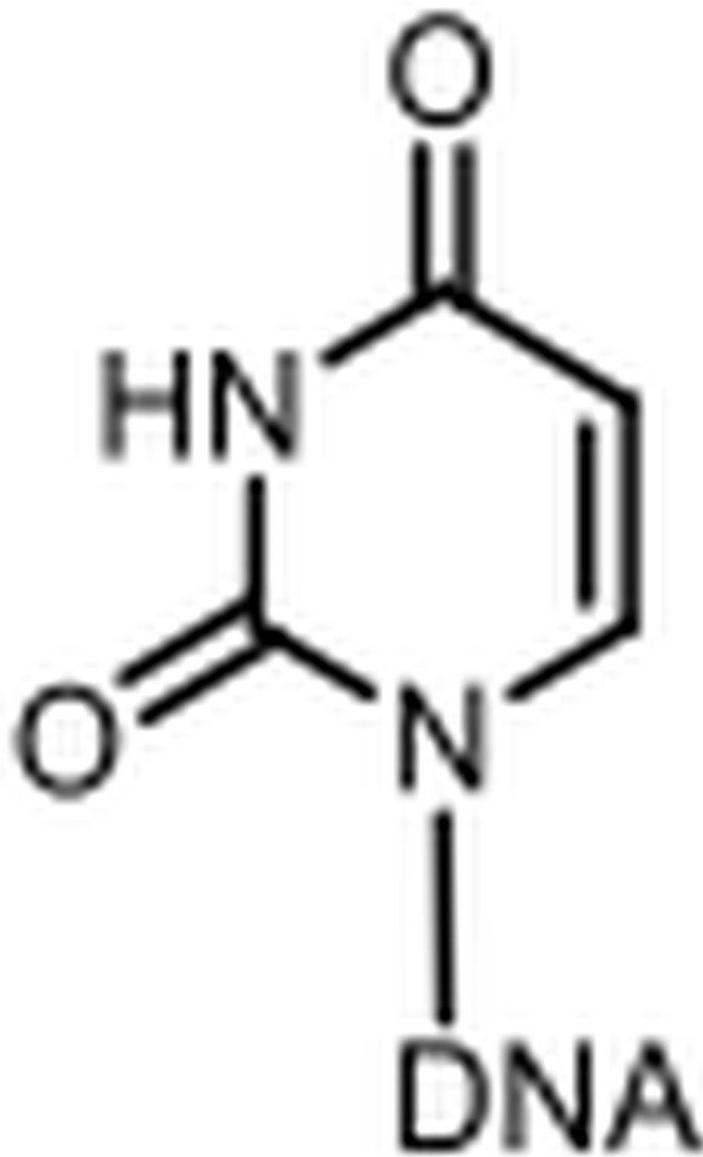
20

30

40

50

【化 1 1】



ウラシル

5-メチルシトシンDNAグリコシラーゼ（ROS1）によって切断可能な塩基：

10

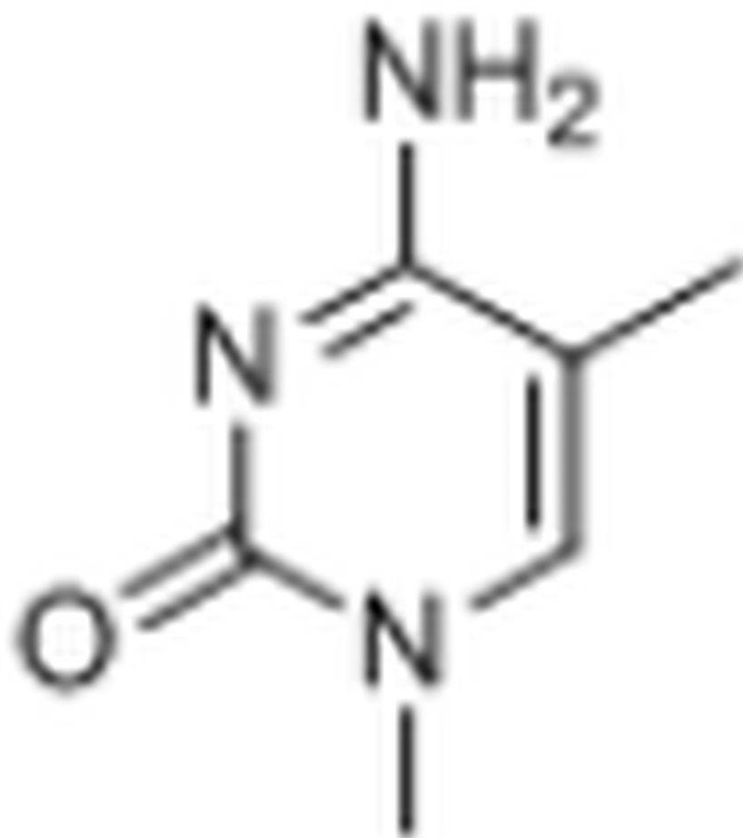
20

30

40

50

【化 1 2】



5-メチルシトシン

(S. S. David, S. D. Williams Chemical reviews 1998, 98, 1221-1262およびM. I. Ponferrada-Marin, T. Roldan-Arjona, R. R. Ariza, Nucleic Acids Res 2009, 37, 4264-4274を参照されたい)。

【0110】

足場ポリヌクレオチドを伴う方法のうちのいずれにおいても、ユニバーサルヌクレオチドは、最も好ましくは2'-デオキシイノシンを含む。

【0111】

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができるエピジェネティック塩基の例には、以下のものが含まれる。

10

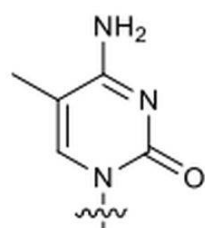
20

30

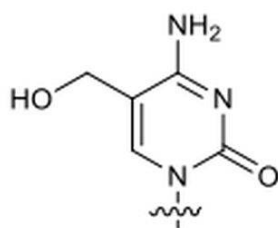
40

50

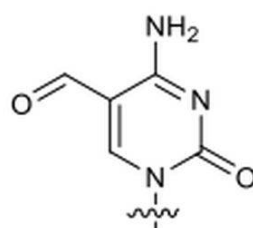
【化 1 3】



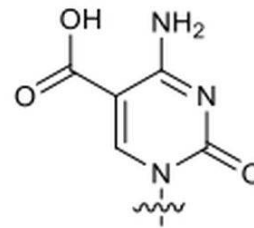
5-メチル-dC



5-ヒドロキシメチル-dC



5-ホルミル-dC



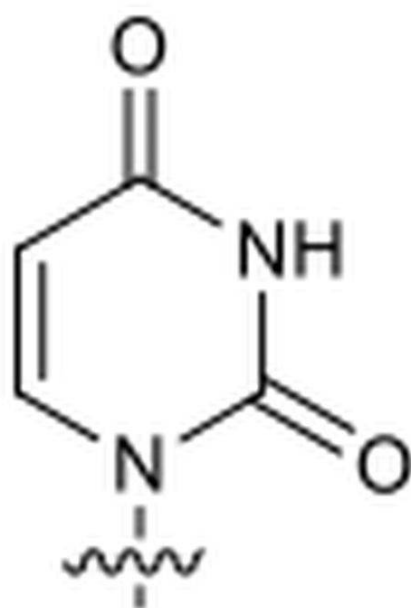
5-カルボキシー-dC

10

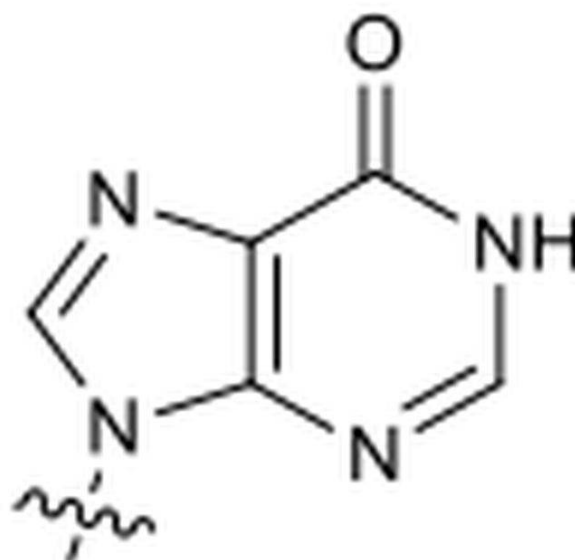
【0 1 1 2】

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができる修飾塩基の例には、以下のものが含まれる。

【化 1 4】



dU



dI

20

30

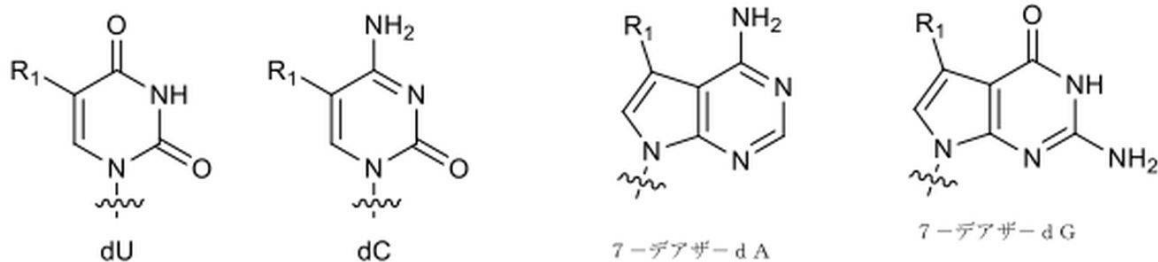
【0 1 1 3】

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができるハロゲン化塩基の例には、以下のものが含まれる。

40

50

【化 1 5】

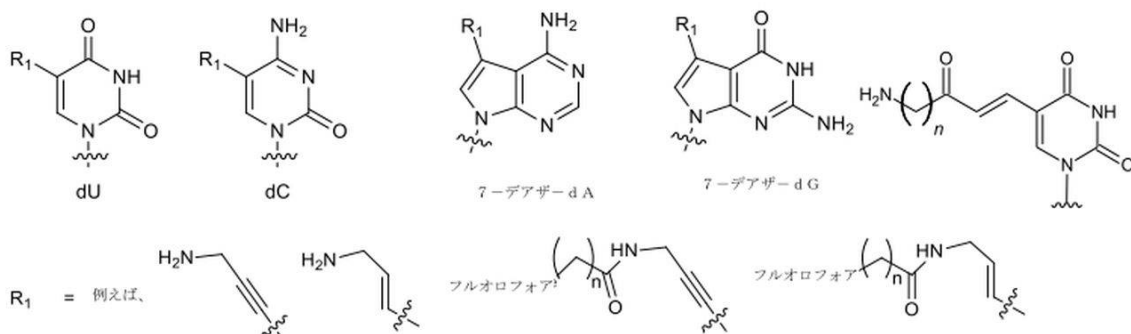


R1 = F、Cl、Br、I、アルキル、アリール、蛍光標識、アミノプロパルギル、アミノアリルである。

【 0 1 1 4 】

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができる、例えば付着／リンカー化学において有用であり得るアミノ修飾塩基の例には、以下のものが含まれる。

【化 1 6】

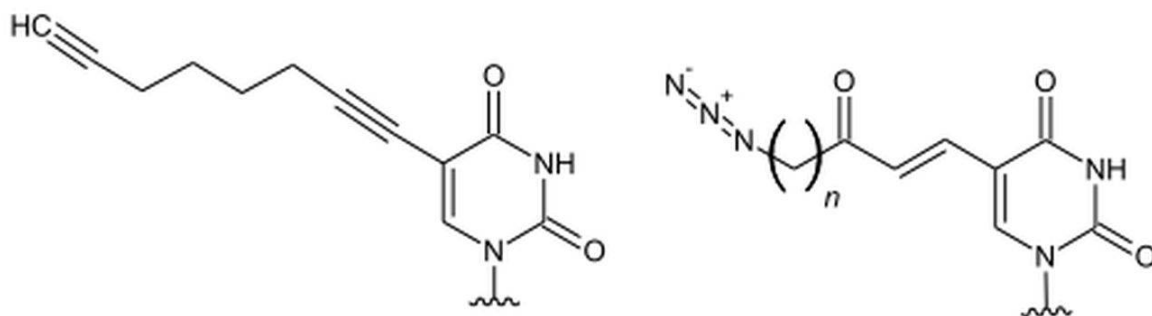


塩基＝アルキンまたはアルケンリンカーを有する A、T、G、または C である。

【 0 1 1 5 】

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができる、例えばクリック化学において有用であり得る修飾塩基の例には、以下のものが含まれる。

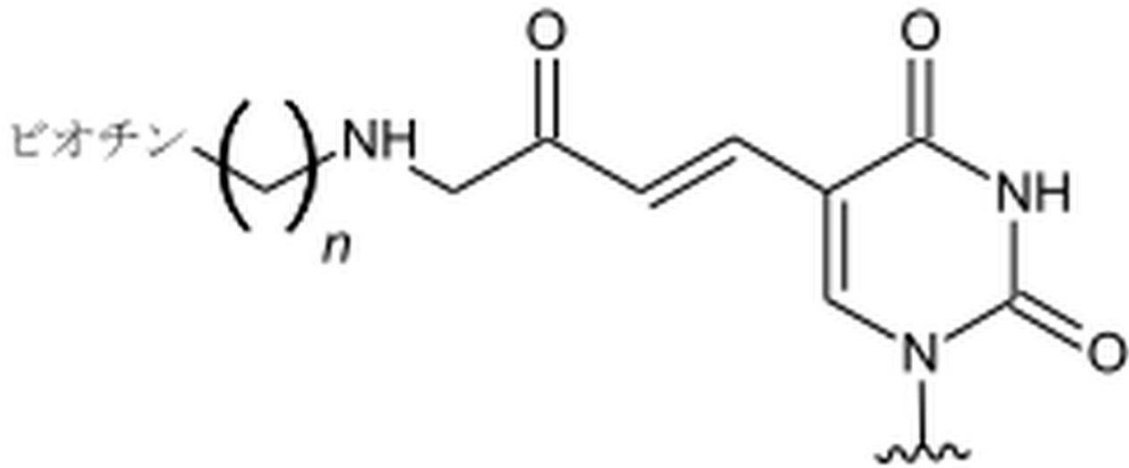
【化 1 7】



【 0 1 1 6 】

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができるピオチン修飾塩基の例には、以下のものが含まれる。

【化 18】



10

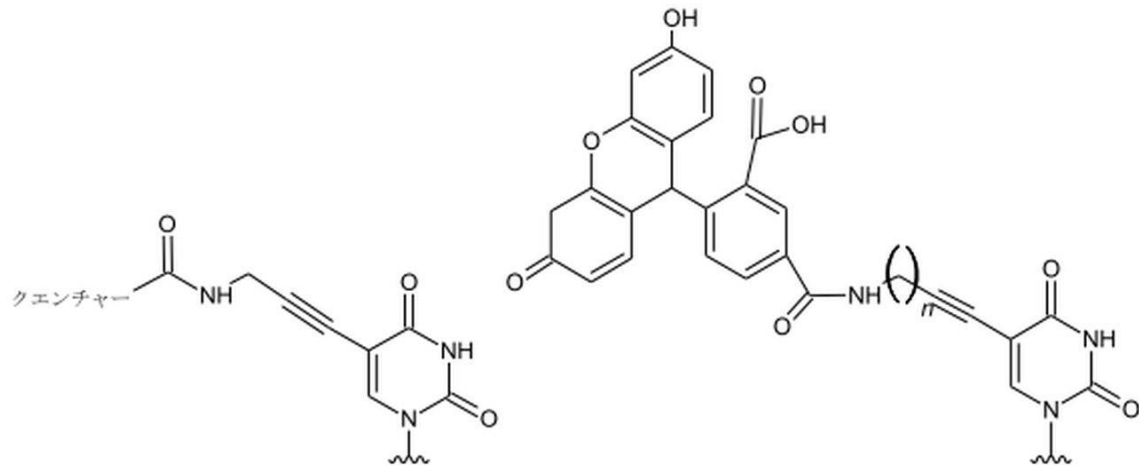
塩基＝アルキンまたはアルケンリンカーを有する A、T、G、または C である。

【0117】

20

本明細書に記載される合成方法のうちのいずれかを使用して組み込むことができるフルオロフォアおよびクエンチャーを担持する塩基の例には、以下のものが含まれる。

【化 19】



30

【0118】

ヌクレオチド組み込み酵素

40

ヌクレオチドの付加により、二本鎖ポリヌクレオチド分子の一本鎖ポリヌクレオチド部分を伸長することができる、かつ／または平滑末端二本鎖ポリヌクレオチド分子の一本鎖を伸長することができる酵素が利用可能である。これには、鋳型非依存性ポリメラーゼまたは鋳型非依存性トランスフェラーゼ活性など、鋳型非依存性酵素活性を有する酵素が含まれる。

【0119】

したがって、本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、例えば、足場ポリヌクレオチドの合成鎖の末端への、所定の配列のヌクレオチドの付加に使用される酵素は、鋳型非依存性ポリメラーゼまたは鋳型非依存性トランスフェラーゼ活性などの鋳型非依存性酵素活性を有する。

【0120】

50

本明細書に記載される方法を使用して、所定のヌクレオチドを付加するために任意の好適な酵素を用いることができる。したがって、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素の使用に関して本明細書に定義および記載される全ての方法において、ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素は、本発明の方法の文脈においてポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素と同じ機能を果たすことができる別の酵素と置換され得る。

【0121】

ポリメラーゼ酵素を、本明細書に記載される方法に用いることができる。ポリメラーゼ酵素は、本明細書に記載されるように、修飾ヌクレオチド、具体的には、付着した可逆的ターミネーター基を有するヌクレオチドを組み込むそれらの能力に基づいて選択され得る。本明細書に記載される例示的な方法において、DNAに作用する全てのポリメラーゼは、3'～5'のエキソヌクレアーゼ活性を有してはならない。ポリメラーゼは、鎖置換活性を有し得る。

10

【0122】

したがって、好ましくは、ポリメラーゼは、未修飾ポリメラーゼと比較して、可逆的ターミネーター基を含むヌクレオチドを組み込む能力が増強された修飾ポリメラーゼである。ポリメラーゼは、より好ましくは、*Thermococcus* 種 9°N、好ましくは種 9°N-7 由来の天然DNAポリメラーゼの遺伝子操作されたバリエーションである。修飾されたポリメラーゼの例は、New England Biolabs から入手可能な *Therminator IX* DNAポリメラーゼおよび *Therminator X* DNAポリメラーゼである。この酵素は、3'-O修飾dNTPを組み込む能力が向上している。

20

【0123】

本発明の方法のうちのいずれにおいても可逆的ターミネーターdNTPの組み込みに使用することができる他のポリメラーゼの例は、*Deep Vent* (エキソ)、*Vent* (エキソ)、9°N DNAポリメラーゼ、*Therminator* DNAポリメラーゼ、*Therminator IX* DNAポリメラーゼ、*Therminator X* DNAポリメラーゼ、*Klenow* 断片 (エキソ)、*Bst* DNAポリメラーゼ、*Bsu* DNAポリメラーゼ、*Sulfolobus* DNAポリメラーゼI、および *Taq* ポリメラーゼである。

【0124】

本発明の方法のうちのいずれにおいても可逆的ターミネーターNTPの組み込みに使用することができる他のポリメラーゼの例は、*T3* RNAポリメラーゼ、*T7* RNAポリメラーゼ、*SP6* RNAポリメラーゼ、*pol* ラムダ、*pol* マイクロ、または $\Phi 29$ DNAポリメラーゼである。

30

【0125】

DNAを含むそのようなポリヌクレオチド合成分子の伸長のために、DNAポリメラーゼを使用することができる。任意の好適なDNAポリメラーゼを使用することができる。

【0126】

DNAポリメラーゼは、例えば、*Bst* DNAポリメラーゼ全長、*Bst* DNAポリメラーゼ大断片、*Bsu* DNAポリメラーゼ大断片、*E. coli* DNAポリメラーゼ DNA Pol I 大 (*Klenow*) 断片、*M-MuLV* 逆転写酵素、*phi29* DNAポリメラーゼ、*Sulfolobus* DNAポリメラーゼIV、*Taq* DNAポリメラーゼ、*T4* DNAポリメラーゼ、*T7* DNAポリメラーゼ、および逆転写酵素活性を有する酵素、例えば、*M-MuLV* 逆転写酵素であり得る。

40

【0127】

DNAポリメラーゼは、3'～5'のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている場合がある。任意のそのような好適なポリメラーゼ酵素を使用することができる。そのようなDNAポリメラーゼは、例えば、*Bst* DNAポリメラーゼ全長、*Bst* DNAポリメラーゼ大断片、*Bsu* DNAポリメラーゼ大断片、DNA Pol I 大 (*Klenow*) 断片 (3'→5' エキソ)、*M-MuLV* 逆転写酵素、*Sulfolobus* DNAポリメラーゼIV、*Taq* DNAポリメラーゼであり得る。

50

【0128】

DNAポリメラーゼは、鎖置換活性を保有し得る。任意のそのような好適なポリメラーゼ酵素を使用することができる。そのようなDNAポリメラーゼは、例えば、Bst DNAポリメラーゼ大断片、Bsu DNAポリメラーゼ大断片、DNA Pol I大 (Klenow) 断片 (3' → 5' エキソ)、M-MuLV逆転写酵素、phi29 DNAポリメラーゼであり得る。

【0129】

DNAポリメラーゼは、3' ~ 5' のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている場合があり、鎖置換活性を保有し得る。任意のそのような好適なポリメラーゼ酵素を使用することができる。そのようなDNAポリメラーゼは、例えば、Bst DNAポリメラーゼ大断片、Bsu DNAポリメラーゼ大断片、E. coli DNAポリメラーゼDNA Pol I大 (Klenow) 断片、M-MuLV逆転写酵素であり得る。

10

【0130】

DNAポリメラーゼは、5' ~ 3' のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている場合がある。任意のそのような好適なポリメラーゼ酵素を使用することができる。このようなDNAポリメラーゼは、例えば、Bst DNAポリメラーゼ大断片、Bsu DNAポリメラーゼ大断片、DNA Pol I大 (Klenow) 断片、DNA Pol I大 (Klenow) 断片 (3' → 5' エキソ)、M-MuLV逆転写酵素、phi29 DNAポリメラーゼ、Sulfolobus DNAポリメラーゼIV、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼであり得る。

20

【0131】

DNAポリメラーゼは、3' ~ 5' および5' ~ 3' の両方のエキソヌクレアーゼ活性を欠いている場合があり、鎖置換活性を保有し得る。任意のそのような好適なポリメラーゼ酵素を使用することができる。そのようなDNAポリメラーゼは、例えば、Bst DNAポリメラーゼ大断片、Bsu DNAポリメラーゼ大断片、DNA Pol I大 (Klenow) 断片 (3' → 5' エキソ)、M-MuLV逆転写酵素であり得る。

【0132】

DNAポリメラーゼはまた、遺伝子操作されたバリエーションであり得る。例えば、DNAポリメラーゼは、種9°N-7などのThermococcus種9°N由来の天然DNAポリメラーゼの遺伝子操作されたバリエーションであり得る。そのような修飾ポリメラーゼの一例は、New England Biolabsから入手可能なTherminator IX DNAポリメラーゼまたはTherminator X DNAポリメラーゼである。他の操作またはバリエーションDNAポリメラーゼには、Deep Vent (エキソ)、Vent (エキソ)、9°N DNAポリメラーゼ、Therminator DNAポリメラーゼ、Klenow断片 (エキソ)、Bst DNAポリメラーゼ、Bsu DNAポリメラーゼ、Sulfolobus DNAポリメラーゼI、およびTaqポリメラーゼが含まれる。

30

【0133】

RNAを含むそのようなポリヌクレオチド合成分子の伸長のために、任意の好適な酵素を使用することができる。例えば、RNAポリメラーゼを使用することができる。任意の好適なRNAポリメラーゼを使用することができる。

40

【0134】

RNAポリメラーゼは、T3 RNAポリメラーゼ、T7 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼ、E. coli RNAポリメラーゼホロ酵素であり得る。

【0135】

酵素は、末端トランスフェラーゼ活性を有し得、例えば、酵素は、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、または末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼであり得、ポリヌクレオチド合成分子は、DNAまたはRNA、好ましくはDNAを含むポリヌクレオチド分子を形成するように伸長される。これらの酵素のうちのいずれも、ポリヌクレオチド合成分子の伸長が必要とされる本発明の方法で使用され得る。

50

【0136】

そのような酵素の1つは、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) などの末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素である (例えば、Motea et al., 2010; Minhaz Ud-Dean, Syst. Synth. Biol., 2008, 2 (3-4), 67-73を参照されたい)。TdTは、ヌクレオシド三リン酸基質 (NTPまたはdNTP) からのヌクレオチド分子 (ヌクレオシドーリン酸) のポリヌクレオチド合成分子への付加を触媒することができる。TdTは、天然および非天然ヌクレオチドの付加を触媒することができる。また、ヌクレオチド類似体の付加を触媒することもできる (Motea et al., 2010)。Φ29 DNAポリメラーゼと同様に、PolラムダおよびPolマイクロ酵素も使用することができる (Ramadan K, et al., J. Mol. Biol., 2004, 339 (2), 395-404)。

10

【0137】

末端トランスフェラーゼ酵素 (例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ; TdT) の作用による鑄型の非存在下での一本鎖ポリヌクレオチド分子 (DNAおよびRNAの両方) を伸長して、人工的に合成された一本鎖ポリヌクレオチド分子を作成するための技術は、当該技術分野で広く議論されている。そのような技術は、例えば、特許出願公開WO2016/034807、WO2016/128731、WO2016/139477、およびWO2017/009663、ならびにUS2014/0363852、US2016/0046973、US2016/0108382、およびUS2016/0168611に開示されている。これらの文書は、人工的に合成された一本鎖ポリヌクレオチド分子を作成するためのTdTの作用による一本鎖ポリヌクレオチド合成分子の制御された伸長を記載している。そのような酵素を使用する天然および非天然/人工ヌクレオチドによる伸長は、修飾ヌクレオチド、例えば、ブロッキング基を組み込んだヌクレオチドによる伸長と同様に記載されている。これらの文書に開示されている末端トランスフェラーゼ酵素のうちのいずれも、その任意の酵素断片、誘導体、類似体、または機能的等価物と同様に、末端トランスフェラーゼ機能が酵素に保存されているという条件で、本発明の方法に適用することができる。

20

【0138】

指向進化技術、従来のスクリーニング、合理的または半合理的な工学/突然変異誘発法または任意の他の適切な方法を使用して、必要な機能を提供および/または最適化するために任意のそのような酵素を変更することができる。鑄型を使用せずに、ヌクレオチドを用いて、DNAまたはRNAを含む分子などの一本鎖ポリヌクレオチド分子部分を伸長することができる任意の他の酵素を使用することができる。

30

【0139】

したがって、本明細書で定義される方法のうちのいずれにおいても、DNAを含む一本鎖ポリヌクレオチド合成分子部分、またはDNAを含む平滑末端二本鎖ポリヌクレオチドは、鑄型非依存性ポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ活性などの鑄型非依存性酵素活性を有する酵素によって伸長され得る。酵素は、ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素活性、例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) などのデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素、またはその酵素断片、誘導体、類似体、もしくは機能的等価物を有し得る。そのような酵素の作用によって伸長されたポリヌクレオチド合成分子は、DNAを含む。

40

【0140】

本明細書で定義される方法のうちのいずれにおいても、RNAを含むポリヌクレオチド合成分子の一本鎖部分、またはRNAを含む平滑末端二本鎖ポリヌクレオチドは、ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素 (例えば、TdTを含む) を有する酵素、またはその酵素断片、誘導体、類似体、もしくは機能的等価物によって伸長され得る。そのような酵素の作用によって伸長されたポリヌクレオチド合成分子は、RNAを含み得る。RNAを含む一本鎖ポリヌクレオチド合成分子、またはRNAを含むポリヌクレオチド合成分子の一本鎖部分の合成には、任意の好適なヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素を使用するこ

50

とができる。ポリ（U）ポリメラーゼおよびポリ（A）ポリメラーゼ（例えば、E．coli由来）などのヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素は、ポリヌクレオチド合成分子へのヌクレオシドリン酸ユニットの鋳型非依存性付加が可能である。これらの酵素のうちのいずれも、その任意の酵素断片、誘導体、類似体、または機能的等価物と同様に、ヌクレオチジルトランスフェラーゼ機能が酵素に保存されているという条件で、本発明の方法に適用することができる。指向進化技術、従来のスクリーニング、合理的または半合理的な工学／突然変異誘発法または任意の他の適切な方法を使用して、必要な機能を提供および／または最適化するために任意のそのような酵素を変更することができる。

【0141】

可逆的ブロッキング基

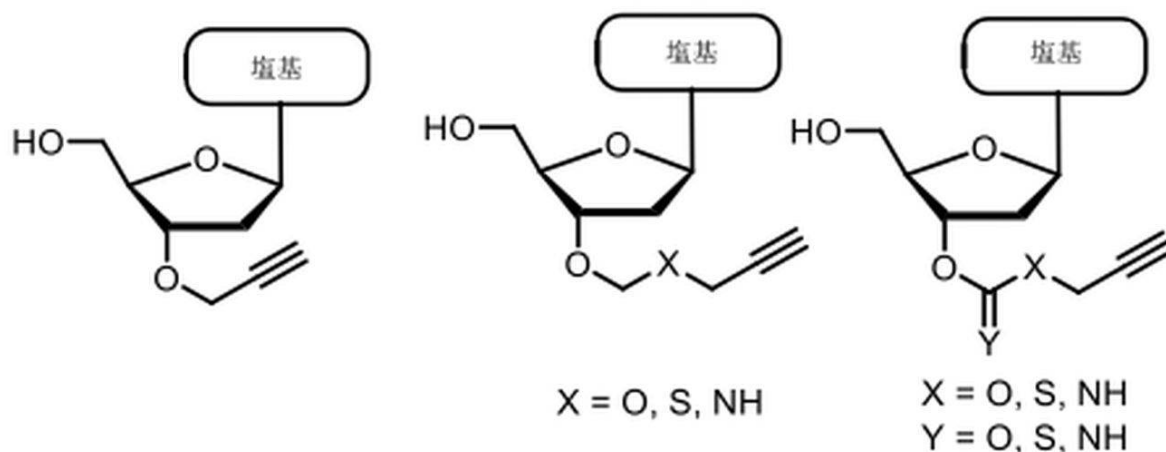
本明細書に定義および記載される全ての方法は、可逆的ブロッキング基または可逆的ターミネーター基を指す。そのような基は、所与の合成サイクルにおいて酵素によるさらなる伸長を防止するように作用し、その結果、所定の配列のヌクレオチドのみが合成鎖を伸長させるために制御可能に使用され得、したがって非特異的ヌクレオチドの組み込みが防止される。この効果を達成する任意の機能性は、本明細書に定義および記載される方法のうちのいずれにおいても使用され得る。ヌクレオチドに付着した可逆的ブロッキング基／可逆的ターミネーター基および脱ブロッキング工程は、この効果を達成するための好ましい手段である。しかしながら、この効果は、必要に応じて代替的な手段によっても達成され得る。

【0142】

所与のサイクルにおけるヌクレオチドの組み込み後の酵素によるさらなる伸長を防止し、サイクル当たり1つのヌクレオチドへの組み込みを制限するために、任意の好適な可逆的ブロッキング基がヌクレオチドに付着し得る。本発明のうちのいずれの方法においても、可逆的ブロッキング基は、好ましくは、ポリメラーゼ酵素によるさらなる伸長を防止するように作用する可逆的ターミネーター基である。可逆的ターミネーターの例を以下に提供する。

プロパルギル可逆的ターミネーター：

【化20】



アリル可逆的ターミネーター：

10

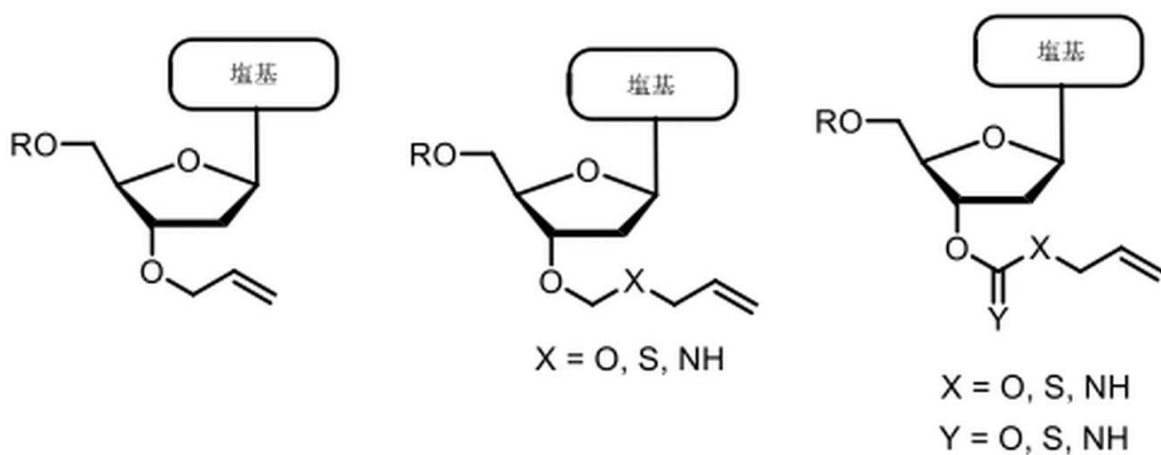
20

30

40

50

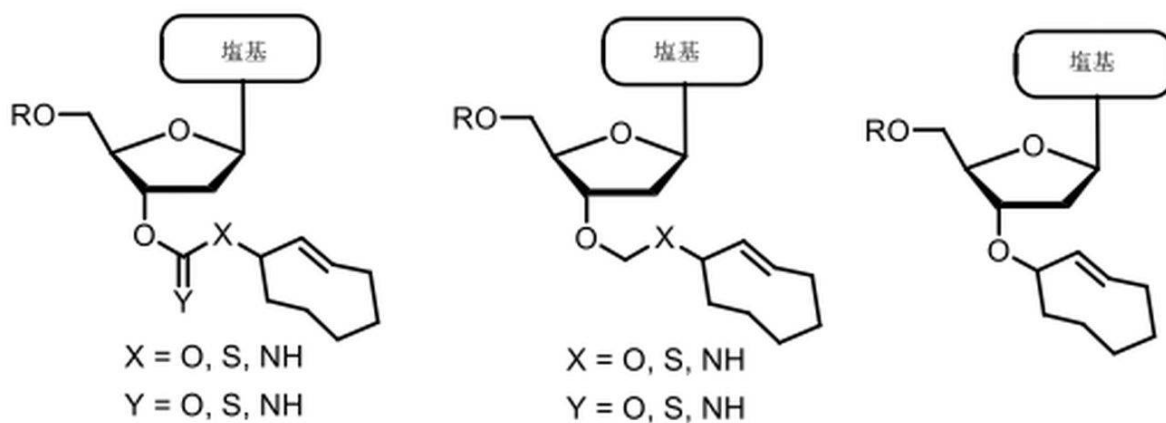
【化 2 1】



10

シクロオクテン可逆的ターミネーター：

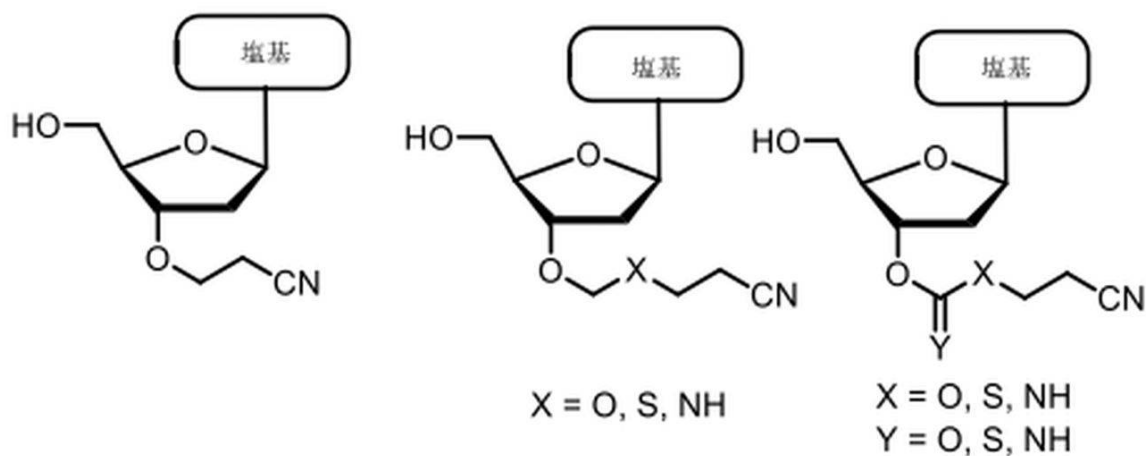
【化 2 2】



20

シアノエチル可逆的ターミネーター：

【化 2 3】

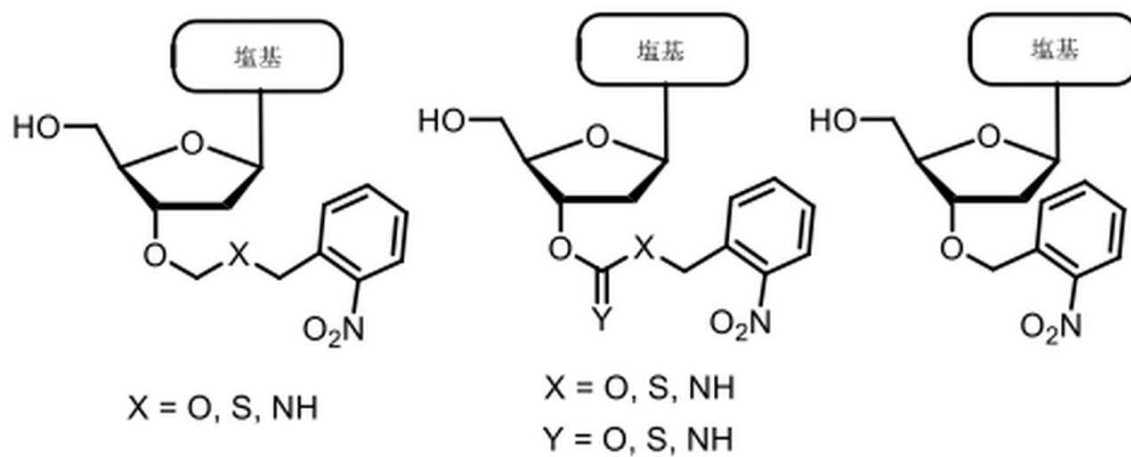


40

ニトロベンジル可逆的ターミネーター：

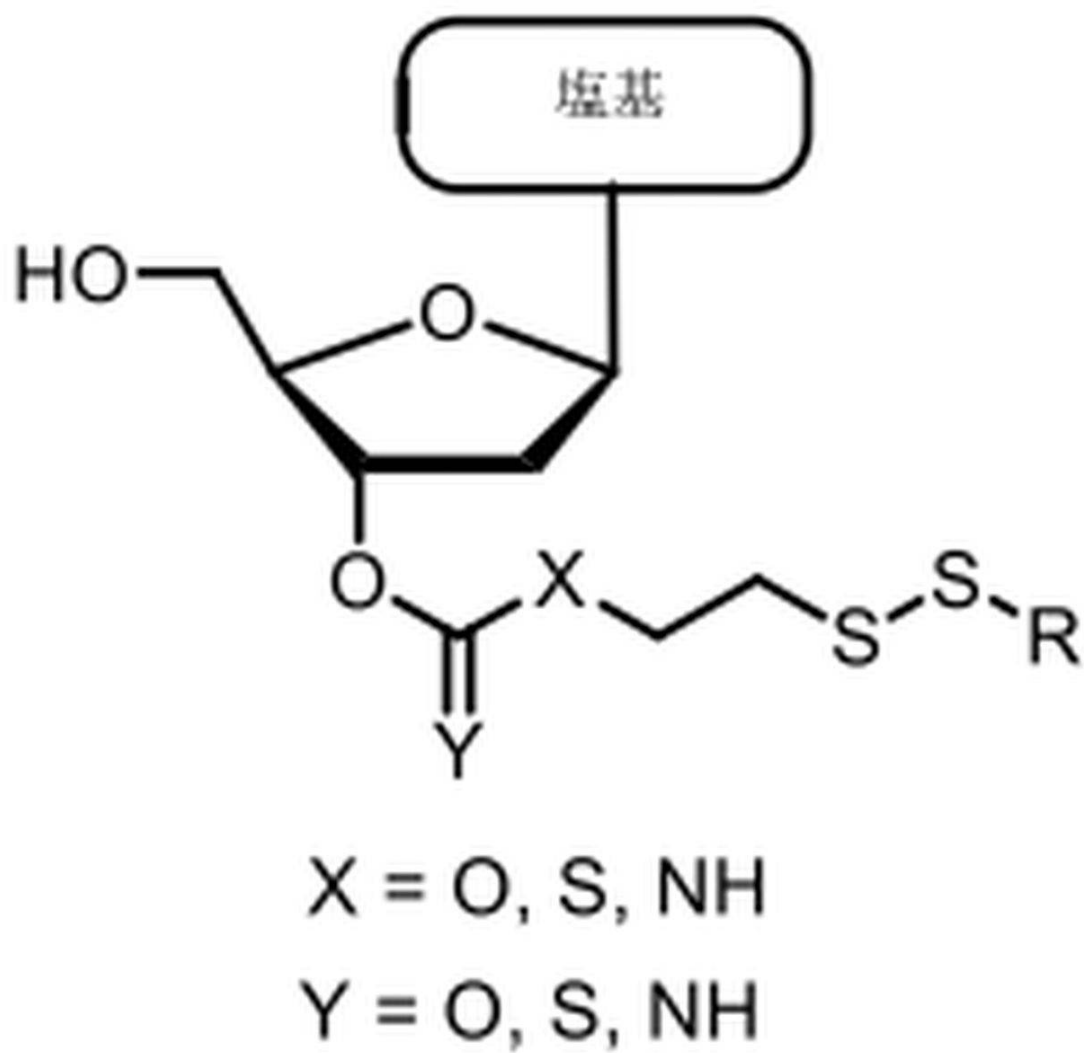
50

【化 2 4】



ジスルフィド可逆的ターミネーター：

【化 2 5】



アジドメチル可逆的ターミネーター：

10

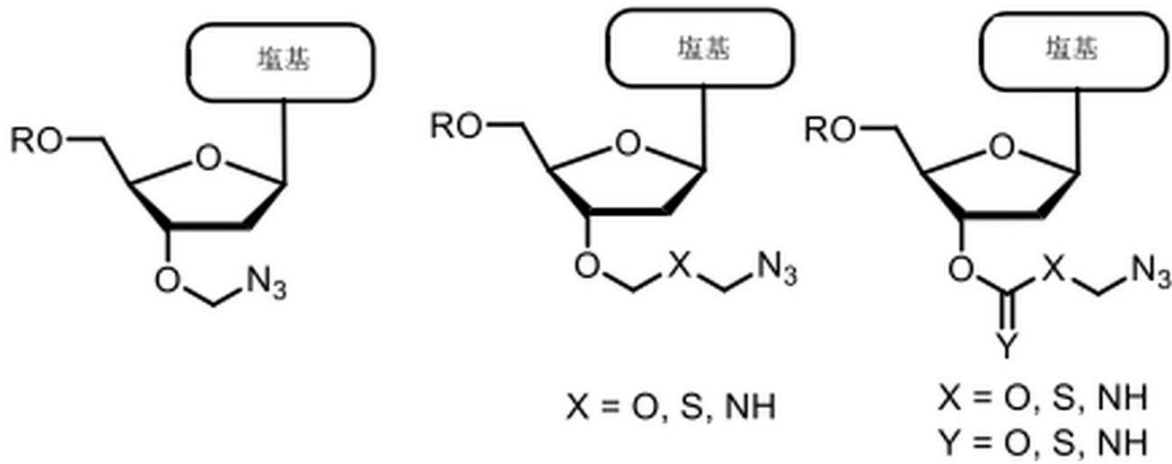
20

30

40

50

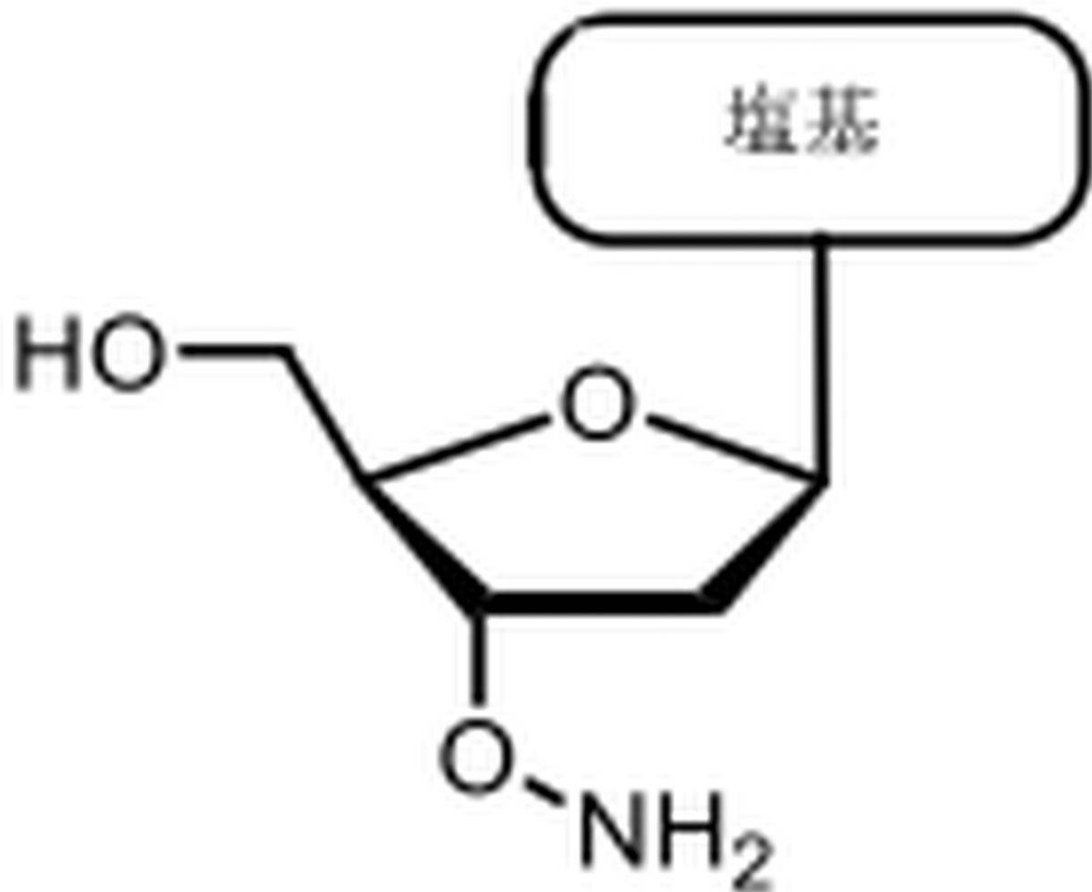
【化 2 6】



10

アミノアルコキシ可逆的ターミネーター：

【化 2 7】



20

30

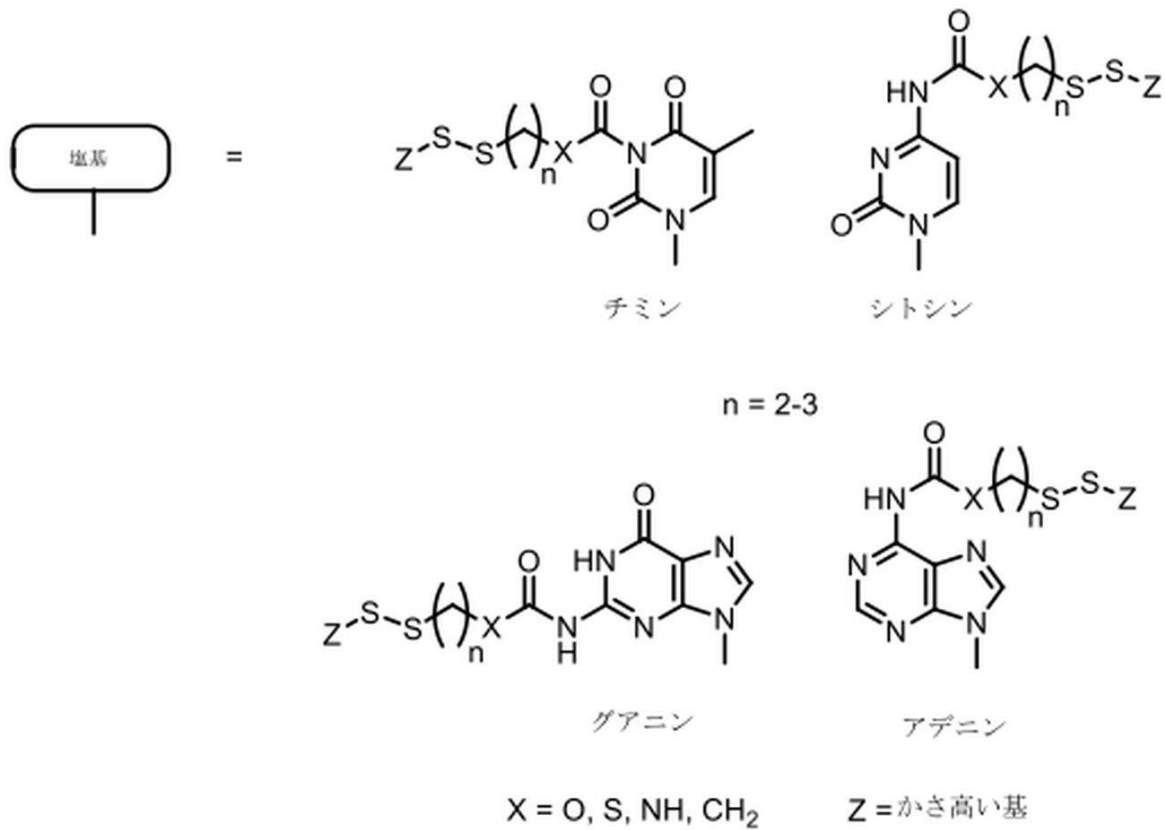
40

【0 1 4 3】

塩基に付着したかさ高い基を有するヌクレオシド三リン酸は、3'-ヒドロキシ基上の可逆的ターミネーター基の代替物として機能し得、さらなる組み込みをブロックすることができる。この基は、TCEPまたはDTT生産天然ヌクレオチドによって脱保護することができる。

50

【化 2 8】



10

20

【0144】

本発明の方法のうちのいずれかに従ってDNAポリヌクレオチドを合成するために、好ましい修飾ヌクレオシドは、3'-O-修飾-2'-デオキシリボヌクレオシド-5'-O-三リン酸である。本発明の方法のうちのいずれかに従ってRNAポリヌクレオチドを合成するために好ましい修飾ヌクレオシドは、3'-O-修飾リボヌクレオシド-5'-O-三リン酸である。

30

【0145】

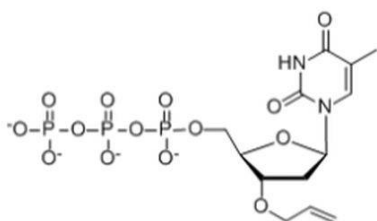
好ましい修飾dNTPは、3'-O-アリル-dNTPおよび3'-O-アジドメチル-dNTPである修飾dNTPである。
3'-O-アリル-dNTPを以下に示す。

40

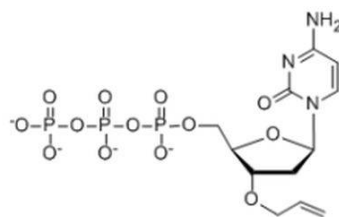
50

【化 2 9】

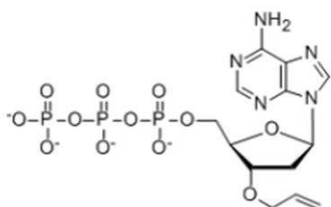
3' -O-アリル-d TTP :



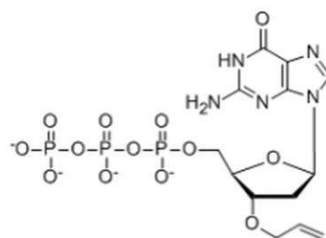
3' -O-アリル-d CTP :



3' -O-アリル-d ATP :



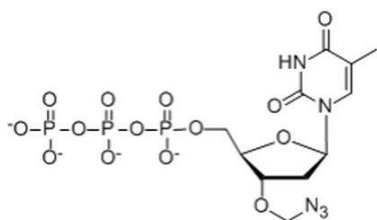
3' -O-アリル-d GTP :



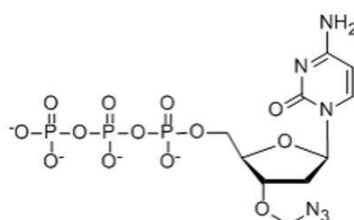
3' -O-アジドメチル-d NTP を以下に示す。

【化 3 0】

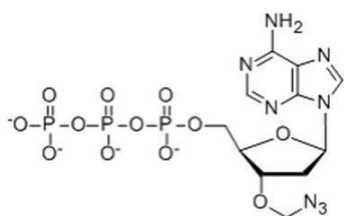
3' -O-アジドメチル-d TTP :



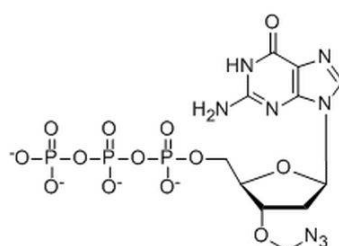
3' -O-アジドメチル-d CTP :



3' -O-アジドメチル-d ATP :



3' -O-アジドメチル-d GTP :



【0146】

本明細書に記載および定義される本発明の方法は、脱保護または脱ブロッキング工程を指す場合がある。そのような工程は、任意の好適な手段による可逆的ブロッキング基（例えば、可逆的ターミネーター基）の除去、または別様に、酵素／ポリメラーゼによるさらなる伸長を阻害するためにブロッキング基／ターミネーター基の機能性を逆転させることを伴う。

【0147】

脱保護工程において、任意の好適な試薬を使用して可逆的ターミネーター基を除去することができる。

【0148】

好ましい脱保護剤は、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）である。T

10

20

30

40

50

C E Pを使用して、組み込み後に（ Pd^0 と共に）3'-O-アリル-ヌクレオチドおよび3'-O-アジドメチル-ヌクレオチドから可逆的ターミネーター基を除去することができる。

【0149】

脱保護試薬の例を以下に提供する。

プロパルギル可逆的ターミネーター：

Pd 触媒による処理— Na_2PdCl_4 、 PdCl_2 。

リガンド、例えば、トリフェニルホスフィン-3, 3', 3''-トリスルホン酸三ナトリウム塩を使用することができる。

アリル可逆的ターミネーター：

Pd 触媒による処理— Na_2PdCl_4 、 PdCl_2 。

リガンド、例えば、トリフェニルホスフィン-3, 3', 3''-トリスルホン酸三ナトリウム塩を使用することができる。

アジドメチル可逆的ターミネーター：

チオール（メルカプトエタノールまたはジチオトレイトール）、またはトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン—T C E Pによる処理。

シアノエチル可逆的ターミネーター：

フッ化物—フッ化アンモニウム、フッ化テトラブチルアンモニウム（T B A F）による処理。

ニトロベンジル可逆的ターミネーター：

UV光への曝露

ジスルフィド可逆的ターミネーター：

チオール（メルカプトエタノールまたはジチオトレイトール）、またはトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン—T C E Pによる処理。

アミノアルコキシ可逆的ターミネーター：

亜硝酸塩（ NO_2^- 、 HNO_2 ）による処理 $\text{pH} = 5.5$

【0150】

可逆的ブロッキング基（例えば、可逆的ターミネーター基）は、可逆的ターミネーター基の除去後のさらなる組み込みを防止するために組み込み工程からの不要な試薬が除去されるという条件で、組み込み工程の直後に、かつ切断工程の前に行われる工程によって除去することができる。可逆的ブロッキング基（例えば、可逆的ターミネーター基）は、切断工程の直後に、かつ連結工程の前に行われる工程によって除去することができる。可逆的ブロッキング基（例えば、可逆的ターミネーター基）は、連結工程の直後に行われる工程によって除去することができる。

【0151】

合成ポリヌクレオチド

本明細書に記載される方法に従って合成された所定の配列を有するポリヌクレオチドは二本鎖である。合成されたポリヌクレオチドは全体として二本鎖であり、第1の鎖は、ハイブリダイゼーションによって第2の鎖に付着している。第1の鎖が全体としてハイブリダイゼーションによって第2の鎖に付着しているという条件で、非ハイブリダイゼーションのミスマッチおよび領域は許容され得る。

【0152】

ハイブリダイゼーションは、中程度にストリンジェントまたはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件によって定義され得る。中程度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件では、5倍塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（SSC）、0.5% SDS、1.0mM EDTA（ $\text{pH} 8.0$ ）、約50%ホルムアミドのハイブリダイゼーション緩衝液、6倍SSC、および55℃のハイブリダイゼーション温度（または、約50%ホルムアミドを含み、ハイブリダイゼーション温度が42℃のような他の同様のハイブリダイゼーション溶液）を含む事前洗浄溶液、ならびに0.5倍SSC、0.1% SDSで、60℃の洗浄条件を使用する。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件

は、45℃で、6 x SSCでハイブリダイズし、続いて68℃で、0.1 x SSC、0.2 % SDSで1回以上洗浄する。

【0153】

本明細書に記載される方法に従って合成された所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドは、二本鎖ポリヌクレオチドとして保持され得る。代替的に、二本鎖ポリヌクレオチドの二本鎖を分離して、所定の配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを得ることができる。二本鎖ポリヌクレオチドの2つの鎖の分離（溶解）を可能にする条件は、当該技術分野においてよく知られている（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)）。

【0154】

本明細書に記載される方法に従って合成された所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドは、合成後に増幅され得る。二本鎖ポリヌクレオチドのいかなる領域も増幅され得る。二本鎖ポリヌクレオチドの全体またはいかなる領域も、足場ポリヌクレオチドの全体またはいかなる領域と一緒に増幅され得る。二本鎖ポリヌクレオチドの増幅を可能にする条件は、当該技術分野においてよく知られている（例えば、Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: a laboratory manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press、およびCurrent Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)）。したがって、本明細書に記載される合成方法のうちのいずれも、所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドまたはその任意の領域が上記に記載されるように増幅される増幅工程をさらに含み得る。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ポリメラーゼらせん反応（PSR）、ループ媒介等温増幅（LAMP）、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、自立配列複製（3SR）、ローリングサークル増幅（RCA）、鎖置換増幅（SDA）、多重置換増幅（MDA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ヘリカーゼ依存性増幅（HDA）、分岐増幅法（RAM）などの任意の好適な方法によって行われ得る。好ましくは、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって行われる。

【0155】

本明細書に記載される方法に従って合成された所定の配列を有する二本鎖または一本鎖ポリヌクレオチドは、任意の長さであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、少なくとも10個、少なくとも50個、少なくとも100個、少なくとも150個、少なくとも200個、少なくとも250個、少なくとも300個、少なくとも350個、少なくとも400個、少なくとも450個、または少なくとも500個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対の長さであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、約10～約100個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対、約10～約200個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対、約10～約300個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対、約10～約400個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対、および約10～約500個のヌクレオチドまたはヌクレオチド対の長さであり得る。ポリヌクレオチドは、最大1000個以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド対、最大5000個以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド対の長さ、または約100000以上のヌクレオチドもしくはヌクレオチド対の長さであり得る。

【0156】

足場ポリヌクレオチドの切断

足場ポリヌクレオチドの存在および連結前の切断工程を必要とする方法において、切断工程を行うための試薬の選択は、用いられる具体的な方法に依存するであろう。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドの特定の位置、および一旦切断された平滑末端

足場ポリヌクレオチドの必要性または一旦切断された足場ポリヌクレオチド中の突出の必要性によって定義される。したがって、本明細書に記載される例示的な方法を参照することによって容易に明らかになるように、所望の切断部位の構成および適切な切断試薬の選択は、その方法で用いられる特定の化学に依存するであろう。

【 0 1 5 7 】

修飾塩基を認識する DNA 切断酵素のいくつかの例を以下の表に示す。

【表 1】

DNA グリコシラーゼ ／エンドヌクレアーゼ	主な基質	切断部位	切断から作成された末端	
			5'末端	3'末端
APE1	AP 部位	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 5'	デオキシリボ ース-5'-リン酸	OH
エンドヌクレアーゼ III	AP 部位、チミ ングリコール	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 3'	リン酸塩	3'-ホスホ- α 、 β - 不飽和アルデヒ ド
エンドヌクレアーゼ IV	AP 部位	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 5'	デオキシリボ ース-5'-リン酸	OH
エンドヌクレアーゼ V	イノシン	病変に対する第 2 のホスホジエステル結合 3'	リン酸塩	OH
エンドヌクレアーゼ VIII	AP 部位、チミ ングリコール	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 5'および 3'	リン酸塩	リン酸塩
FpG	8-オキソグアニ ン	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 5'および 3'	リン酸塩	リン酸塩
hOGG1	8-オキソグアニ ン	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 3'	リン酸塩	3'-ホスホ- α 、 β - 不飽和アルデヒ ド
hNeiI	酸化プリン	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 5'および 3'	リン酸塩	リン酸塩
ROS1	5-メチルシトシ ン	病変に対する第 1 のホスホジエステル結合 5'および 3'	リン酸塩	リン酸塩
ウラシル DNA グリコ シラーゼ	ウラシル	N-グリコシド結合	AP 部位（切断なし）	
hSMUG	ウラシル	N-グリコシド結合	AP 部位（切断なし）	
hAAG	イノシン	N-グリコシド結合	AP 部位（切断なし）	

【 0 1 5 8 】

連結ポリヌクレオチド

足場ポリヌクレオチドの存在および切断後の連結工程を必要とする方法において、連結

ポリヌクレオチドの構成および構造の選択はまた、用いられる具体的な方法に依存するであろう。連結ポリヌクレオチドは、一般に、本明細書に記載される支持鎖および本明細書に記載されるヘルパー鎖を含む。連結ポリヌクレオチドにおいて使用される支持鎖およびヘルパー鎖は、最初の足場ポリヌクレオチド構築物において使用されるものと同じでもまたは異なっているもよい。例えば、連結ポリヌクレオチドの連結端の支持鎖における一重塩基突出または二塩基突出の必要性は、用いられる方法に依存するであろう。適切な構造は、本明細書に記載される例示的な方法を参照することによって容易に達成することができる。

【0159】

連結ポリヌクレオチドの相補性連結末端には、典型的に、突出に隣接するヘルパー鎖中に非リン酸化末端ヌクレオチドが提供される。これにより、合成鎖のヘルパー鎖部分と合成鎖のプライマー鎖部分との連結が防止され、よって合成鎖中の一本鎖切断が維持される。合成鎖における連結を防止するための代替的な手段を使用することもできる。例えば、ブロッキング部分は、ヘルパー鎖中の末端ヌクレオチドに付着し得る。さらに、本明細書にさらに記載されるように、ヘルパー鎖は、次の合成サイクルにおける隣の所定のヌクレオチドの切断および組み込みの前に、例えば、変性によって足場分子から除去され得る。

【0160】

連結

連結工程を伴う本発明の方法において、連結は、任意の好適な手段を使用して達成され得る。好ましくは、連結工程は、リガーゼ酵素によって行われるであろう。リガーゼは、一塩基突出基質に対する活性が増強された修飾リガーゼであり得る。リガーゼは、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼであり得る。リガーゼは平滑TARリガーゼであり得る。例えば、平滑TARリガーゼは、New England Biolabs (NEB) から入手可能である。これは、T4 DNAリガーゼと、連結エンハンサーと、平滑末端および一塩基突出基質の両方の連結および形質転換を改善するために特別に調製された最適化反応緩衝液との、すぐに使用できるマスターミックス溶液である。一本鎖および二本鎖ポリヌクレオチドを連結（接合）するための分子、酵素、化学物質、および方法は、当業者に周知である。

【0161】

固相合成

本発明の合成方法に従って生産された合成ポリヌクレオチドは、好ましくは固相または可逆的固相技術を使用して合成することができる。様々なそのような技術が当該技術分野において知られており、また、使用され得る。所定の配列の新たな二本鎖ポリヌクレオチドの合成を開始する前に、足場ポリヌクレオチドを表面、例えば、ガラスなどの平坦な表面、ゲル系材料、またはビーズもしくは官能化量子ドットなどの微粒子の表面に固定化し得る。表面を構成する材料自体が基質に結合され得る。例えば、足場ポリヌクレオチドは、例えばポリアクリルアミドなどのゲル系材料に固定化され得、ゲル系材料は、ガラスなどの支持基質に結合されている。

【0162】

ポリヌクレオチドは、直接または間接的に表面に固定化または繫留され得る。例えば、それらは化学結合によって表面に直接取り付けられ得る。それらは、以下に記載されるように、例えば、SPRIにおけるような、またはエレクトロウェットティングシステムにおけるような、微粒子もしくはビーズの表面などの中間表面を介して表面に間接的に繫留され得る。次に、新たに合成されたポリヌクレオチドを組み込んでいる足場ポリヌクレオチドが固定化されている間に、合成サイクルを開始し、完了させることができる。

【0163】

そのような方法において、二本鎖足場ポリヌクレオチドは、所定の配列の第1のヌクレオチドの組み込みの前に表面に固定化され得る。したがって、そのような固定化された二本鎖足場ポリヌクレオチドは、合成中および合成後に、所定の配列の二本鎖ポリヌクレオチドを表面に繫留するためのアンカーとして作用し得る。

【0164】

そのような二本鎖アンカー／足場ポリヌクレオチドの一方の鎖のみが、分子の同じ末端の表面に固定化され得る。代替的に、二本鎖アンカー／足場ポリヌクレオチドの両方の鎖が、それぞれ分子の同じ末端で表面に固定化され得る。二本鎖アンカー／足場ポリヌクレオチドには、新たな合成の開始部位と反対の末端のヘアピンループなどを介して、隣接する末端で接続された各鎖が提供され得、接続された末端は、表面上に固定化され得る（例えば、図11に概略的に示されるように）。

【0165】

足場ポリヌクレオチドを伴う方法において、本明細書に記載されるように、足場ポリヌクレオチドは、所定の配列における第1のヌクレオチドの組み込みの前に表面に付着し得る。したがって、図11(a)および(c)に示されるように、プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とを、両方とも別々に表面に付着させることができる。図11(b)および(d)に示されるように、プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが、ヘアピンループなどを介して、隣接する末端で、例えば、新たな合成の開始部位と反対の末端で接続され得、接続された末端は表面に繫留され得る。図11(e)～(h)に示されるように、プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分との一方または他方を、別々に表面に付着させることができる。好ましくは、プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とが表面に付着している。

【0166】

平坦な表面上での固相合成

所定の配列の新たな二本鎖ポリヌクレオチドの合成を開始する前に、合成アンカー／足場ポリヌクレオチドを、本明細書に記載されるものを含む当該技術分野で既知の方法によって合成し、表面に繫留させることができる。

【0167】

予め形成されたポリヌクレオチドを、平坦な表面に付着した核酸マイクロアレイを作成するために一般的に用いられる方法によって表面に繫留させることができる。例えば、アンカー／足場ポリヌクレオチドを作成し、次に、平坦な表面上にスポットまたは印刷することができる。アンカー／足場ポリヌクレオチドは、接触印刷技術を使用して表面上に堆積させることができる。例えば、中実または中空のチップまたはピンを、予め形成された足場ポリヌクレオチドを含む溶液に浸漬し、平坦な表面と接触させることができる。代替的に、オリゴヌクレオチドをマイクロスタンプ上に吸着させ、次に、物理的接触によって平坦な表面に転写することができる。非接触印刷技術としては、サーマル印刷または圧電印刷が挙げられ、予め形成された足場ポリヌクレオチドを含むサブナノリットルサイズの微小液滴を、インクジェットおよびバブルジェット印刷に使用される方法と同様の方法を使用して印刷チップから射出することができる。

【0168】

一本鎖オリゴヌクレオチドは、マイクロアレイを作成するために用いられる、いわゆる「オンチップ」方法を使用するなど、平坦な表面上で直接合成することができる。次に、そのような一本鎖オリゴヌクレオチドは、予め形成されたアンカー／足場ポリヌクレオチドを固定化するための付着部位として作用し得る。

【0169】

一本鎖オリゴヌクレオチドを生成するためのオンチップ技術は、保護されたヌクレオチドを選択的に活性化して、その後の新たな保護されたヌクレオチドの組み込みを可能にするためのフォトリソグラフィマスクを通して向けられるUV光の使用を伴うフォトリソグラフィを含む。UV媒介脱保護および予め判定されたヌクレオチドの結合のサイクルは、所望の配列を有するオリゴヌクレオチドのインサイチュ生成を可能にする。フォトリソグラフィマスクの使用に対する代替物として、インクジェット印刷技術を使用した核酸塩基の逐次堆積、ならびに所望の配列を有するオリゴヌクレオチドを生成するための結合、酸化、および脱保護のサイクルの使用によって、オリゴヌクレオチドを平坦な表面上に作成

し得る（レビューのために、Kosuri and Church, Nature Methods, 2014, 11, 499–507を参照されたい）。

【0170】

以下に記載されるような可逆的固定化を伴う方法を含む、本明細書に記載される合成方法のうちのいずれにおいても、表面は任意の好適な材料で作成され得る。典型的には、表面は、シリコン、ガラス、またはポリマー材料を含み得る。表面は、約2%のポリアクリルアミドなどのポリアクリルアミド表面、任意にN-(5-ブロモアセトアミジルペンチル)アクリルアミド(BRAPA)を使用して得られるポリアクリルアミド表面などのゲル表面を含むことができ、好ましくはポリアクリルアミド表面は、ガラスなどの固体支持体に結合されている。

10

【0171】

可逆的固定化

所定の配列を有する合成ポリヌクレオチドは、可逆的固定化を促進する、微粒子およびビーズなどの結合表面および結合構造を使用して本発明に従って合成することができる。固相可逆的固定化(SPRI)方法または改良された方法が、当該技術分野において既知であり、用いることができる（例えば、DeAngelis M. M. et al. (1995) Solid-Phase Reversible Immobilization for the Isolation of PCR Products, Nucleic Acids Research, 23 (22): 4742–4743を参照されたい）。

【0172】

表面は、常磁性ビーズなどの微粒子の形態で提供され得る。常磁性ビーズは磁場の影響下で凝集する場合がある。例えば、常磁性表面には、化学基、例えばカルボキシル基が提供され得、これは、以下により詳細に記載されるように、適切な付着条件下で、核酸に対する結合部分として作用するであろう。核酸は、そのような表面から適切な溶出条件下で溶出され得る。微粒子およびビーズの表面には、UV感受性ポリカーボネートが提供され得る。核酸は、好適な固定化緩衝液の存在下で活性化表面に結合され得る。

20

【0173】

微粒子およびビーズを反応溶液内で自由に移動させ、次に、例えば、ビーズを表面にエッチングしたマイクロウェルまたはピット内に保持することによって可逆的に固定化することができる。ビーズは、例えば、ビーズに付着した固有の核酸「バーコード」の使用によって、または色分けの使用によって、アレイの一部として局在化され得る。

30

【0174】

したがって、所定の配列の新たな二本鎖ポリヌクレオチドの合成を開始する前に、本発明によるアンカー／足場ポリヌクレオチドを合成し、次に、そのような結合表面に可逆的に固定化することができる。本発明の方法によって合成されたポリヌクレオチドは、そのような結合表面に可逆的に固定化される間に合成することができる。

【0175】

微小流体技術およびシステム

表面は、エレクトロウェットティングオン誘電体システム(EWOD)であり得る。EWODシステムは、微小液滴の形態での非常に小さい液体容量の微小流体操作を促進する誘電体被覆表面を提供する（例えば、Chou, W-L., et al. (2015) Recent Advances in Applications of Droplet Microfluidics, Micromachines, 6:1249–1271）。液滴容量は、エレクトロウェットティング技術によってチップ上でプログラム可能に作成、移動、区分化、および組み合わせることができる。したがって、エレクトロウェットティングシステムは、合成中および合成後にポリヌクレオチドを可逆的に固定化するための代替的な手段を提供する。

40

【0176】

所定の配列を有するポリヌクレオチドは、本明細書に記載される方法によって固相で合成ことができ、ポリヌクレオチドは、EWOD表面上に固定化され、各サイクルにお

50

ける必要な工程はエレクトロウェットティング技術によって促進される。例えば、足場ポリヌクレオチドを伴い、組み込み、切断、連結、および脱保護工程を必要とする方法において、各工程に必要な試薬、ならびに使用済みかつ不要な試薬を除去するために必要な任意の洗浄工程に必要な試薬は、エレクトロウェットティング技術を介した電場の影響下で輸送される微小液滴の形態で提供され得る。

【0177】

本発明の合成方法において使用され得る他の微小流体プラットフォームが利用可能である。例えば、核酸操作のために一般的に用いられているエマルジョンベースの微小液滴技術を使用することができる。そのようなシステムでは、微小液滴は、2つの不混和性流体、典型的には水と油との混合によって作成されるエマルジョン中に形成される。エマルジョン微小液滴は、微小流体網内でプログラム可能に作成、移動、区分化、および組み合わせることができる。ヒドロゲル系もまた利用可能である。本明細書に記載される合成方法のうちのいずれにおいても、微小液滴は、上記に記載されるEWODシステムおよび他の微小流体システム、例えば、エラストマー材料を含む成分に基づくアーキテクチャを含む微小流体システムなどの任意の好適な適合システムで操作することができる。

【0178】

微小液滴は、それらが本明細書の合成方法と適合するという条件で、任意の好適なサイズのものであり得る。微小液滴のサイズは、用いられる具体的なシステムおよびシステムの関連するアーキテクチャに応じて変化するであろう。したがって、サイズは必要に応じて適応され得る。本明細書に記載される合成方法のうちのいずれにおいても、液滴直径は、約150nm〜約5mmの範囲であり得る。1μm未満の液滴直径は、例えば、Ganan-Calvo et al. (Nature Physics, 2007, 3, pp 737-742)に記載されているような、キャピラリージェット法を伴う技術などによって、当該技術分野において既知の手段によって検証することができる。

【0179】

中間または最終合成生産物の配列決定。

合成もしくはアセンブリの中間生産物、または最終的なポリヌクレオチド合成生産物は、所望のポリヌクレオチドまたは複数のポリヌクレオチドが正しく合成またはアセンブリされているかどうかを決定するための品質管理チェックとして配列決定され得る。目的のポリヌクレオチドまたは複数のポリヌクレオチドを、固相合成プラットフォームから除去し、Oxford Nanopore Technologies Ltdによって販売されているMinION (商標) デバイスを使用したナノポアシーケンシングなど、いくつかの既知の市販の配列決定技術のうちのいずれか1つによって配列決定することができる。特定の実施例では、配列決定は、固相プラットフォーム自体で実施され得、ポリヌクレオチドを別の合成デバイスに移す必要がなくなる。配列決定は、合成に使用されるEWODデバイスなどの同じエレクトロウェットティングデバイス上で都合よく実施することができる。それにより、合成デバイスは、1つ以上の測定電極対を含む。目的のポリヌクレオチドを含む液滴は、電極対の電極のうちの1つと接触することができ、液滴は、電極対の第2の電極と接触する第2の液滴と液滴界面二重層を形成し、液滴二重層界面は、両親媒性膜中にナノポアを含む。ポリヌクレオチドは、例えば、酵素制御下でナノポアを移動させることができ、ナノポアを通るイオン電流の流れは、ポリヌクレオチドがナノポアを通過する間の電極対間の電位差の下で測定することができる。経時的なイオン電流測定値を記録し、ポリヌクレオチド配列を決定するために使用することができる。配列決定の前に、ポリヌクレオチドは、特許出願第PCT/GB2015/050140号に開示されるような配列決定のためにそれを最適化するために、1つ以上の試料調製工程に供され得る。好適に用いられ得る酵素、両親媒性膜、およびナノポアの例は、特許出願第PCT/GB2013/052767およびPCT/GB2014/052736に開示されている。ポリヌクレオチド、ナノポア、両親媒性膜などの試料調製に必要な試薬は、試料注入口を介してEWODデバイスに供給することができる。試料注入口は、試薬チャンバーに接続され得る。

【0180】

表面付着化学

オリゴヌクレオチドは典型的には化学的に付着するが、それらはまた、親和性相互作用などを介して間接的な手段によって表面に付着し得る。例えば、オリゴヌクレオチドをビオチンで官能化し、アビジンまたはストレプトアビジンで被覆された表面に結合させることができる。

【0181】

ポリヌクレオチドを表面（例えば、平坦な表面）、微粒子、およびビーズなどに固定化するために、様々な表面付着方法および化学が利用可能である。付着を促進するために、表面を官能化または誘導体化することができる。そのような官能化は、当該技術分野において知られている。例えば、表面は、ポリヒスチジンタグ（ヘキサヒスチジンタグ、6×Hisタグ、His6タグ、またはHisタグ（登録商標））、Ni-NTA、ストレプトアビジン、ビオチン、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド（DNA、RNA、PNA、GNA、TNA、またはLNAなど）、カルボキシル基、第4級アミン基、チオール基、アジド基、アルキン基、DIBO、脂質、FLAGタグ（FLAGオクタペプチド）、ポリヌクレオチド結合タンパク質、ペプチド、タンパク質、抗体、または抗体断片で官能化され得る。表面は、アンカー／足場ポリヌクレオチドに特異的に結合する分子または基で官能化され得る。

【0182】

ポリヌクレオチドを表面に付着させるのに好適な化学のいくつかの例を、図11iおよび図11jに示す。

【0183】

本明細書に記載される方法のうちのいずれにおいても、プライマー鎖部分を含む合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分とを含む足場ポリヌクレオチドは、1つ以上の共有結合を介して共通の表面に繋留され得る。1つ以上の共有結合は、共通の表面上の官能基と足場分子上の官能基との間に形成され得る。足場分子上の官能基は、例えば、アミン基、チオール基、チオリン酸基、またはチオアミド基であり得る。共通の表面上の官能基は、プロモアセチル基であり得、任意に、プロモアセチル基は、N-（5-プロモアセトアミジルペンチル）アクリルアミド（BRAPA）を使用して得られるポリアクリルアミド表面上に提供される。

【0184】

本発明の方法のうちのいずれにおいても、足場ポリヌクレオチドは、リンカーを介して直接または間接的のいずれかで表面に付着し得る。生体適合性および親水性の性質を有する任意の好適なリンカーを使用することができる。

【0185】

リンカーは、直鎖状リンカーであってもまたは分岐状リンカーであってもよい。

【0186】

リンカーは炭化水素鎖を含み得る。炭化水素鎖は、2～約2000個以上の炭素原子を含み得る。炭化水素鎖は、アルキレン基、例えば、C2～約2000個以上のアルキレン基を含み得る。炭化水素鎖は、 $-(CH_2)_n-$ の一般式を有し得、式中、 n は2～2000以上である。炭化水素鎖は、1つ以上のエステル基（すなわち、 $-C(O)-O-$ ）または1つ以上のアミド基（すなわち、 $-C(O)-N(H)-$ ）によって任意に中断され得る。

【0187】

PEG、ポリアクリルアミド、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、ポリ（2-メチル-2-オキサゾリン）（PMOXA）、双性イオンポリマー、例えばポリ（メタクリル酸カルボキシベタイン）（PCBMA）、ポリ[N-（3-スルホプロピル）-N-メタクリロキシエチル-N、N-ジメチルアンモニウムベタイン]（PSBMA）、グリコポリマー、およびポリペプチドを含む群から選択される任意のリンカーを使用することができる。

【0188】

リンカーは、 $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ の一般式を有するポリエチレングリコール (PEG) を含み得、式中、 n は1～約600以上である。

【0189】

リンカーは、 $-\left[(CH_2-CH_2-O)_n-PO_2^-O\right]_m-$ の一般式を有するオリゴエチレングリコールリン酸単位を含み得、式中、 n は1～約600以上であり、 m は1～200以上であり得る。

【0190】

上記に記載されるリンカーのうちのいずれも、リンカーの一末端で本明細書に記載される足場分子に付着することができ、リンカーの他方の末端で第1の官能基に付着することができ、第1の官能基は、表面に共有結合を提供し得る。第1の官能基は、本明細書にさらに記載されるように、例えば、アミン基、チオール基、チオリン酸基、またはチオアミド基であり得る。表面をさらなる官能基で官能化して、第1の官能基と共有結合を提供し得る。さらなる官能基は、本明細書にさらに記載されるように、例えば、2-ブロモアセトアミド基であり得る。任意に、ブロモアセチル基は、 $N-(5-ブロモアセトアミジルペンチル)$ アクリルアミド (BRAPA) を使用して得られるポリアクリルアミド表面上に提供される。表面上のさらなる官能基は、ブロモアセチル基であり得、任意に、ブロモアセチル基は、 $N-(5-ブロモアセトアミジルペンチル)$ アクリルアミド (BRAPA) を使用して得られるポリアクリルアミド表面上に提供され、第1の官能基は、必要に応じて、例えば、アミン基、チオール基、チオリン酸基、またはチオアミド基であり得る。ポリヌクレオチドが付着している表面は、ゲルを含み得る。表面は、約2%のポリアクリルアミドなどのポリアクリルアミド表面を含み、好ましくはポリアクリルアミド表面は、ガラスなどの固体支持体に結合されている。

【0191】

本発明の方法のうちのいずれにおいても、足場ポリヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドに組み込まれた分岐ヌクレオチドを介してリンカーに任意に付着し得る。任意の好適な分岐ヌクレオチドを、任意の好適な適合するリンカーと共に使用することができる。

【0192】

本発明の合成サイクルを開始する前に、足場ポリヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドに組み込まれた1つ以上の分岐ヌクレオチドを用いて合成することができる。1つ以上の分岐ヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドに組み込まれる正確な位置、したがってリンカーが付着し得る正確な位置は変化してもよく、所望に応じて選択され得る。位置は、例えば、支持鎖および／または合成鎖の末端にあり得るか、または例えば、ヘアピンループを含む実施形態では、支持鎖を合成鎖に接続するループ領域内にあり得る。

【0193】

足場ポリヌクレオチドの合成中に、1つ以上の分岐ヌクレオチドは、分岐部分の反応基をブロックするブロッキング基と共に足場ポリヌクレオチドに組み込まれ得る。次に、ブロッキング基は、リンカーの分岐部分、またはリンカーが複数の単位を含む場合はリンカーの第1の単位 (分子) への結合の前に除去 (脱ブロック) され得る。

【0194】

足場ポリヌクレオチドの合成中に、1つ以上の分岐ヌクレオチドを、その後の「クリック化学」反応において使用するのに好適な基で足場ポリヌクレオチドに組み込んで、リンカー、またはリンカーが複数の単位を含む場合にはリンカーの第1の単位を分岐部分に結合することができる。そのような基の例はアセチレン基である。

【0195】

いくつかの非限定的で例示的な分岐ヌクレオチドを以下に示す。

10

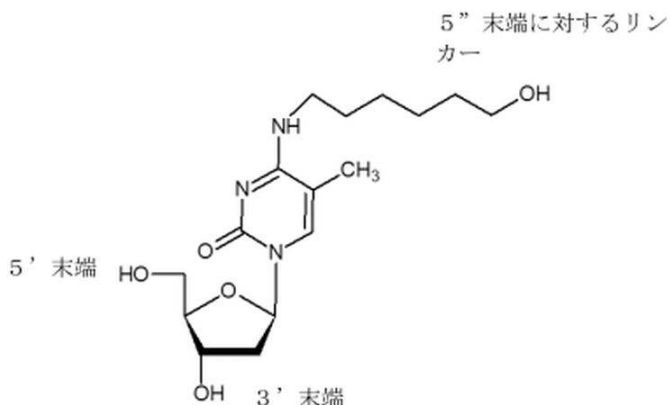
20

30

40

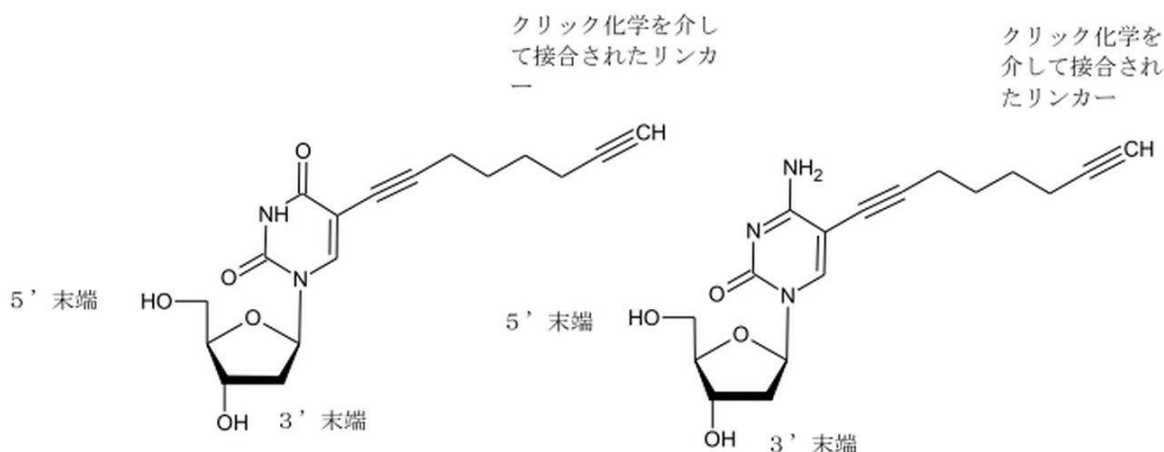
50

【化 3 1】



5-メチルC分岐ヌクレオチド

10



オクタジニル d C分岐ヌクレオチド

20

30

【0196】

リンカーは、任意に、例えば、Sp9スパーサーなどの1つ以上のスパーサー分子（単位）を含み得、第1のスパーサー単位は、分岐ヌクレオチドに付着している。

【0197】

リンカーは、第1のスパーサー基に付着した1つ以上のさらなるスパーサー基を含み得る。例えば、リンカーは、複数の、例えばSp9スパーサー基を含み得る。第1のスパーサー基は分岐部分に付着し、次に、1つ以上のさらなるスパーサー基が、順次付加されて、それらの間にリン酸基で接続されている複数のスパーサー単位を含むスパーサー鎖を伸長させる。

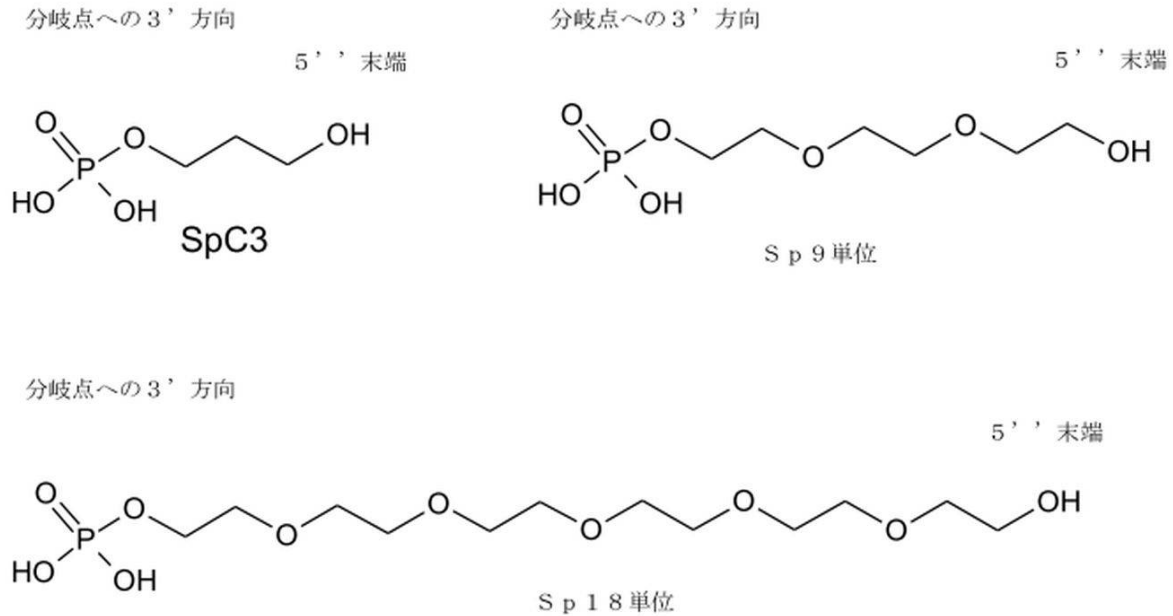
40

【0198】

分岐ヌクレオチドに付着した第1のスパーサー単位、または分岐鎖に既に付着した既存のスパーサー単位に付着するさらなるスパーサー単位を含むことができるスパーサー単位（Sp3、Sp9、およびSp13）のいくつかの非限定的な例を以下に示す。

50

【化 3 2】



10

【0199】

リンカーは、1つ以上のエチレングリコール単位を含み得る。

20

【0200】

リンカーは、複数の単位がヌクレオチドであるオリゴヌクレオチドを含み得る。

【0201】

上記に図示される構造では、5' ' という用語は、分岐部分が付着しているヌクレオチドの 5' 末端と示差するために使用され、5' は当該技術分野におけるその通常の意味を有する。5' ' とは、そこからリンカーが伸長され得るヌクレオチド上の位置を意味することが意図される。5' ' 位置は異なる場合がある。5' ' 位置は、典型的には、ヌクレオチドの核酸塩基における位置である。核酸塩基中の 5' ' 位置は、上記の構造に図示されるように、所望の分岐部分の性質に応じて変化し得る。

30

【0202】

マイクロアレイ

本明細書に記載されるポリヌクレオチド合成方法のうちのいずれかを使用して、ポリヌクレオチドマイクロアレイを製造することができる (Trevino, V. et al., J. Mol. Med. 2007 13, pp 527-541)。したがって、アンカーまたは足場ポリヌクレオチドは、表面上の複数の個々にアドレス可能な反応部位に繋留され得、所定の配列を有するポリヌクレオチドは、マイクロアレイ上にインサイチュで合成され得る。

【0203】

合成後、各反応領域において、所定の配列のポリヌクレオチドに、固有の配列を付与することができる。アンカーまたは足場ポリヌクレオチドに、同定を促進するためのバーコード配列が提供され得る。

40

【0204】

所定の配列のポリヌクレオチドを合成する方法以外に、本明細書に記載される技術を含む、この技術分野で一般的に使用される技術を使用して、マイクロアレイ製造を行うことができる。例えば、アンカーまたは足場ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるものを含む既知の表面付着方法および化学を使用して表面に繋留され得る。

【0205】

所定の配列のポリヌクレオチドの合成後に、非繋留末端からあらゆる望ましくないポリヌクレオチド配列を除去するための最終切断工程が提供され得る。

50

【0206】

所定の配列のポリヌクレオチドは、二本鎖形態で反応部位に提供され得る。代替的に、合成後に、二本鎖ポリヌクレオチドを分離し、一本鎖を除去して、反応部位に一本鎖ポリヌクレオチドを残してもよい。このプロセスを促進するために、鎖の選択的繫留が提供され得る。例えば、足場ポリヌクレオチドを伴う方法において、合成鎖は表面に繫留され得、支持鎖は繫留されない場合があるか、またはその逆でもよい。合成鎖に、切断不能なリンカーが提供され得、支持鎖に、切断可能なリンカーが提供され得るか、またはその逆でもよい。鎖の分離は、熱処理などの従来の方法によって行われ得る。

【0207】

合成ポリヌクレオチドのアセンブリ

本明細書に記載される方法によって合成され、任意に本明細書に記載される方法によって増幅される所定の配列を有するポリヌクレオチドは、より大きな合成ポリヌクレオチドを作成するために1つ以上の他のそのようなポリヌクレオチドに接合され得る。

【0208】

複数のポリヌクレオチドの接合は、当該技術分野において一般的に知られている技術によって達成することができる。本明細書に記載される方法によって合成された第1のポリヌクレオチドおよび1つ以上の追加のポリヌクレオチドを切断して適合する末端を作成し、次に、ポリヌクレオチドを連結によって一緒に接合することができる。切断は任意の好適な手段によって達成することができる。典型的には、制限酵素切断部位をポリヌクレオチド中に作成し得、次に、制限酵素を使用して切断工程を行い、それにより合成されたポリヌクレオチドを任意のアンカー／足場ポリヌクレオチドから放出し得る。切断部位は、アンカー／足場ポリヌクレオチドの一部として設計され得る。代替的に、切断部位は、所定のヌクレオチド配列の一部として、新たに合成されたポリヌクレオチド内に作成され得る。

【0209】

ポリヌクレオチドのアセンブリは、好ましくは固相法を使用して行われる。例えば、合成後、第1のポリヌクレオチドは、表面固定化部位に対して遠位の好適な位置で単一の切断に供され得る。したがって、第1のポリヌクレオチドは表面に固定化されたままであり、単一の切断は別のポリヌクレオチドへの接合に対して適合する末端を生成するであろう。追加のポリヌクレオチドを2つの好適な位置で切断に供して、他のポリヌクレオチドに結合するための適合する末端を各末端に生成し得、同時に追加のポリヌクレオチドを表面固定化から放出し得る。追加のポリヌクレオチドは、第1のポリヌクレオチドと適合的に接合され得、したがって、所定の配列を有し、さらに別の追加のポリヌクレオチドへの接合に適合する末端を有する、より大きな固定化ポリヌクレオチドを作成し得る。したがって、予め選択された切断合成ポリヌクレオチドの接合の反復サイクルが、はるかに長い合成ポリヌクレオチド分子を作成し得る。追加のポリヌクレオチドの接合の順序は、必要な所定の配列によって決定されるだろう。

【0210】

したがって、本発明のアセンブリ方法は、1つ以上のMb程度の長さを有する合成ポリヌクレオチド分子の作成を可能にし得る。

【0211】

本発明のアセンブリおよび／または合成方法は、当該技術分野において知られている装置を使用して行うことができる。上記に記載されるように、非常に少量の試薬を、典型的にはエレクトロウェットティングオン誘電体（EWOD）などの液滴エレクトロウェットティング技術の形態で、アレイの異なる場所で他の容量と選択的に移動、区分化、および組み合わせることを可能にする技術および装置を用いることができる。液滴を操作することができる、本発明に用いられ得る好適なエレクトロウェットティング技術およびシステムは、例えば、US8653832、US8828336、US2014/0197028、およびUS2014/0202863に開示されている。

【0212】

固相からの切断は、プライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた支持鎖の部分との一方または両方で切断可能なリンカーを提供することによって達成され得る。切断可能なリンカーは、例えば、UV切断可能なリンカーであり得る。

【0213】

酵素的切断を伴う切断方法の例を図29に示す。概略図は、（黒菱形構造を介して）表面に付着し、所定の配列のポリヌクレオチドを含む足場ポリヌクレオチドを示す。足場ポリヌクレオチドは上部ヘアピンおよび下部ヘアピンを含む。いずれの場合も、上部ヘアピンは、ユニバーサルヌクレオチドを利用して切断部位を定義する切断工程を使用して切断することができる。下部ヘアピンは、足場ポリヌクレオチドに操作されるか、または所定の配列の新たに合成されたポリヌクレオチドに操作される部位を介して制限エンドヌクレアーゼによって除去することができる。

10

【0214】

したがって、上記に記載されるように、所定の配列を有するポリヌクレオチドは、エレクトロウェットティング表面に固定化されながら合成され得る。合成されたポリヌクレオチドは、エレクトロウェットティング表面から切断され得、液滴の形態で電場の影響下で移動され得る。液滴は、それらが他の切断合成ポリヌクレオチドとの連結のための切断された合成ポリヌクレオチドを送達することができる表面上の特定の反応部位で組み合わせることができる。次に、ポリヌクレオチドを、例えば連結によって接合することができる。そのような技術を使用して、所望の所定の配列に従って順番に異なるポリヌクレオチドの集団を合成し、付着させることができる。そのようなシステムを使用して、完全自動化ポリヌクレオチド合成およびアセンブリシステムを設計することができる。このシステムは、所望の所定の配列に従って、所望の配列を受け取り、試薬を供給し、合成サイクルを行い、続いて所望のポリヌクレオチドをアセンブリするようにプログラムすることができる。

20

【0215】

システムおよびキット

本発明はまた、本明細書に記載および定義される合成方法のうちのいずれか、ならびに本明細書に記載および定義されるその後の増幅およびアセンブリ工程のうちのいずれかを実施するためのポリヌクレオチド合成システムも提供する。

【0216】

典型的には、合成サイクル反応は、本明細書に記載および定義される手段によって表面に繫留されている足場ポリヌクレオチド分子に所定の配列のヌクレオチドを組み込むことによって実施されるであろう。表面は、本明細書に記載および定義されるような任意の好適な表面であり得る。

30

【0217】

一実施形態では、所定の配列のヌクレオチドを足場ポリヌクレオチド分子に組み込むための反応は、反応領域内の足場ポリヌクレオチドに対して合成方法のうちのいずれかを行うことを伴う。

【0218】

反応領域は、足場ポリヌクレオチド分子が付着しており、合成方法を行うための試薬を送達することができる好適な基質の任意の領域である。

40

【0219】

一実施形態では、反応領域は、一本鎖足場ポリヌクレオチド分子を含む表面の単一の領域であり得、一本鎖足場ポリヌクレオチド分子は試薬でアドレス指定され得る。

【0220】

別の実施形態では、反応領域は、複数の足場ポリヌクレオチド分子を含む表面の単一の領域であり得、足場ポリヌクレオチド分子は、互いに単離して試薬で個別にアドレス指定することはできない。したがって、そのような実施形態では、反応領域内の複数の足場ポリヌクレオチド分子は同じ試薬および条件に曝露され、したがって、同じまたは実質的に同じヌクレオチド配列を有する合成ポリヌクレオチド分子を生じさせることができる。

【0221】

50

一実施形態では、本明細書に記載および定義される合成方法のうちのいずれかを実施するための合成システムは、複数の反応領域を含み得、各反応領域は1つ以上の付着した足場ポリヌクレオチドを含み、各反応領域は、他の反応領域のそれぞれから単離して試薬で個別にアドレス指定することができる。そのようなシステムは、例えば反応領域が基質、典型的には平坦な基質上に形成される場合には、例えばアレイの形態で構成され得る。

【0222】

単一の反応領域を含むか、または複数の反応領域を含む基質を有するシステムは、例えば、EWODシステムもしくは微小流体システム内に含まれ得、システムは、試薬を反応部位に送達するように構成され得る。EWODおよび微小流体システムは、本明細書により詳細に記載されている。例えば、EWODシステムは、電気的制御下で試薬を反応部位（複数可）に送達するように構成され得る。例えばエラストマー材料もしくは同様の材料から形成される微細加工アーキテクチャを含むような微小流体システムは、流体圧力および／もしくは吸引制御下で、または機械的手段によって試薬を反応部位（複数可）に送達するように構成され得る。試薬は、例えば試薬送達用の導管として作用するカーボンナノチューブを介して、任意の好適な手段によって送達され得る。任意の好適なシステムが想定され得る。

【0223】

EWOD、微小流体システムおよび他のシステムは、合成後に足場ポリヌクレオチドから合成二本鎖ポリヌクレオチドを切断するための酵素、および／または基質から足場ポリヌクレオチド全体を放出するためにリンカーを切断するための試薬、および／または合成後のポリヌクレオチド分子またはその任意の領域もしくは部分を増幅するための試薬、および／または本発明の合成方法に従って合成されたより小さなポリヌクレオチド分子からより大きなポリヌクレオチド分子をアセンブリするための試薬などの任意の他の所望の試薬を反応部位に送達するように構成され得る。

【0224】

本発明はまた、本明細書に記載および定義される合成方法のうちのいずれかを実施するためのキットも提供する。キットは、本明細書に記載および定義される本発明の合成および／またはアセンブリ方法のうちのいずれかを行うための試薬の任意の所望の組み合わせを含み得る。例えば、キットは、足場ポリヌクレオチドを含む任意の1つ以上の容量（複数可）の反応試薬、本明細書に記載および定義される合成サイクルの任意の1つ以上の工程に対応する容量（複数可）の反応試薬、可逆的ブロッキング基もしくは可逆的ターミネーター基を含むヌクレオチドを含む容量（複数可）の反応試薬、合成後の1つ以上のポリヌクレオチド分子またはその任意の領域もしくは部分を増幅するための容量（複数可）の反応試薬、本発明の合成方法に従って合成されたより小さいポリヌクレオチド分子からより大きいポリヌクレオチド分子をアセンブリするための容量（複数可）の反応試薬、合成後に足場ポリヌクレオチドから合成二本鎖ポリヌクレオチドを切断するための容量（複数可）の反応試薬、および1つ以上のリンカーを切断して基質から足場ポリヌクレオチド全体を放出するための容量（複数可）の反応試薬を含み得る。

【0225】

合成鎖

これらに限定されないが、図1～5およびさらに本明細書に記載されるような本発明の方法の合成方法バージョンの1～5を含む、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを合成する方法において、足場ポリヌクレオチドには、合成鎖が提供される。合成サイクル中に、所定の配列の各新たなヌクレオチドが合成鎖に組み込まれる。ポリメラーゼ酵素または末端トランスフェラーゼ活性を有する酵素などの酵素を使用して、各新たなヌクレオチド、ヌクレオチド類似体／誘導体、または非ヌクレオチドの組み込み／付加を触媒することができる。合成鎖はプライマー鎖部分を含み、好ましくはヘルパー鎖部分を含む。

【0226】

ヘルパー鎖

切断工程で切断酵素（複数可）の結合を促進するために、足場ポリヌクレオチドにヘルパー鎖が提供され得る。ヘルパー鎖は、連結工程で切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結を容易にするために、連結ポリヌクレオチドに提供され得る。必要に応じて、切断工程での切断酵素（複数可）の結合を確実にし、連結工程での連結を確実にするために代替的な手段が提供されるという条件で、ヘルパー鎖が削除され得る。本発明の好ましい方法において、合成鎖にヘルパー鎖が提供される。好ましくは、連結ポリヌクレオチドには、ヘルパー鎖が提供され、ヘルパー鎖は、図1～5に示されるように、切断工程で足場ポリヌクレオチドに保持される。

【0227】

ヘルパー鎖が切断工程における切断酵素（複数可）の結合を促進するのに好適であるという条件で、ヘルパー鎖の長さ、配列、および構造のパラメーターに関する特別な要件はない。

【0228】

ヘルパー鎖は、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体／誘導体および／または非ヌクレオチドを含み得る。

【0229】

好ましくは、ヘルパー鎖の配列の領域内で、支持鎖とのミスマッチは回避されるべきであり、GCおよびATに富む領域は回避されるべきであり、加えて、ヘアピンまたはバルジなどの二次構造の領域は回避されるべきである。

【0230】

ヘルパー鎖の長さは10塩基以上であり得る。任意に、ヘルパー鎖の長さは、15塩基以上、好ましくは30塩基以上であり得る。しかしながら、ヘルパー鎖が切断および／または連結を促進することができるという条件で、ヘルパー鎖の長さは変化し得る。

【0231】

ヘルパー鎖は支持鎖の対応する領域にハイブリダイズされなければならない。ヘルパー鎖が切断工程における切断酵素（複数可）の結合および／または連結工程におけるリガーゼ酵素の結合を促進することができるという条件で、ヘルパー鎖の全体が支持鎖の対応する領域にハイブリダイズされることは必須ではない。したがって、ヘルパー鎖と支持鎖の対応する領域との間のミスマッチは許容され得る。ヘルパー鎖は支持鎖の対応する領域よりも長い場合がある。支持鎖は、プライマー鎖に対して遠位方向において、ヘルパー鎖に対応する領域を越えて伸長し得る。ヘルパー鎖は、例えばヘアピンを介して、支持鎖の対応する領域に接続され得る。

【0232】

ヘルパー鎖は、好ましくは、ニックの部位のヘルパー鎖の末端ヌクレオチドがニックの部位のプライマー鎖の末端ヌクレオチドに対して合成鎖中の隣の連続したヌクレオチド位置を占めるように支持鎖にハイブリダイズされる。したがって、この構成では、ヘルパー鎖とプライマー鎖との間にヌクレオチド位置ずれはない。それにもかかわらず、ヘルパー鎖およびプライマー鎖は、一本鎖の切断またはニックの存在のために物理的に分離されるであろう。好ましくは、ニックの部位におけるヘルパー鎖の末端核酸塩基は、支持鎖中のそのパートナーヌクレオチドにハイブリダイズされる。

【0233】

ユニバーサルヌクレオチドと対合するヘルパー鎖中のヌクレオチドは、任意の好適なヌクレオチドであり得る。好ましくは、分子のらせん構造を歪める可能性がある対合は回避されるべきである。好ましくは、シトシンはユニバーサルヌクレオチドに対するパートナーとして作用する。特に好ましい実施形態では、ユニバーサルヌクレオチドは、イノシン、またはその類似体、バリエーション、もしくは誘導体であり、ヘルパー鎖中のユニバーサルヌクレオチドに対するパートナーヌクレオチドはシトシンである。

【0234】

ヘルパー鎖の除去

合成工程中にヘルパー鎖が保持されることが好ましいが、例示的な方法のバージョン1

10

20

30

40

50

～5を含む、本明細書に記載される本発明の合成方法のうちのいずれにおいても、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供する工程（1）（すなわち、第1のサイクルにおいて）（101、201、301、401、501）において、合成鎖は、ヘルパー鎖なしで提供され得る。

【0235】

さらに、任意の1つ以上の合成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、二本鎖連結ポリヌクレオチドを切断された足場ポリヌクレオチドに連結する工程の後、および足場ヌクレオチドの切断の工程の前に（106、206、306、406、506）、合成鎖のヘルパー鎖部分は、足場ポリヌクレオチドから除去され得る。

【0236】

合成鎖のヘルパー鎖部分は、これらに限定されないが、（i）足場ポリヌクレオチドを約80℃～約95℃の温度に加熱し、足場ポリヌクレオチドからヘルパー鎖部分を分離すること、（ii）足場ポリヌクレオチドを8M尿素などの尿素溶液で処理し、足場ポリヌクレオチドからヘルパー鎖部分を分離すること、（iii）足場ポリヌクレオチドを100%ホルムアミドなどのホルムアミドまたはホルムアミド溶液で処理し、足場ポリヌクレオチドからヘルパー鎖部分を分離すること、または（iv）足場ポリヌクレオチドを、ヘルパー鎖部分の配列と相補的であるヌクレオチド配列の領域を含む一本鎖ポリヌクレオチド分子と接触させて、それによりヘルパー鎖部分と足場ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを競合的に阻害することを含む任意の手段によって、足場ポリヌクレオチドから除去され得る。

【0237】

二本鎖連結ポリヌクレオチドを切断された足場ポリヌクレオチドに連結する工程の後、および足場ポリヌクレオチドの切断の工程の前に、ヘルパー鎖部分を足場ポリヌクレオチドから除去する方法において、切断工程は、ヘルパー鎖によって提供される二本鎖領域の不在下で支持鎖を切断することを含むであろう。本明細書に開示される任意の好適な酵素から選択されるものなど、任意の好適な酵素を、そのような切断工程を行うために選択することができる。

【0238】

プライマー鎖

プライマー鎖部分は、ポリメラーゼ酵素または末端トランスフェラーゼ活性を有する酵素などの酵素が合成を開始できるようにする、すなわち、ニックの部位でのプライマー鎖の末端での新たなヌクレオチドの付加を触媒するのに好適であるべきである。

【0239】

プライマー鎖は、新たなポリヌクレオチド合成を開始するように作用し得る（例えば、図1～5の各々に示される構造において点線で示されるような）配列の領域を含み得る。プライマー鎖は、新たなポリヌクレオチド合成を開始するように作用し得る配列の領域からなる場合があり、したがって、プライマー鎖の全体は、本明細書に記載されるような新たなポリヌクレオチド合成を開始するように作用し得る配列であり得る。

【0240】

プライマー鎖が新たなポリヌクレオチド合成を開始するのに好適であるという条件で、プライマー鎖の長さ、配列、および構造のパラメーターについて特別な要件はない。

【0241】

プライマー鎖は、ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体／誘導体および／または非ヌクレオチドを含み得る。

【0242】

当業者は、新たなポリヌクレオチド合成を開始することができるプライマー鎖を容易に構築することができる。したがって、新たなポリヌクレオチド合成を開始するように作用し得るプライマー鎖の配列領域内では、支持鎖とのミスマッチは回避されるべきであり、GCおよびATに富む領域は回避されるべきであり、加えて、ヘアピンまたはバルジなどの二次構造の領域は回避されるべきである。

【0243】

新たなポリヌクレオチド合成を開始するように作用し得るプライマー鎖の配列領域の長さは、好みおよび使用されるポリメラーゼ酵素に応じて当業者が選択することができる。この領域の長さは、7塩基以上、8塩基以上、9塩基以上、または10塩基以上であり得る。任意に、この領域の長さは、15塩基以上、好ましくは30塩基以上であろう。

【0244】

プライマー鎖は支持鎖の対応する領域にハイブリダイズされなければならない。プライマー鎖が新たなポリヌクレオチド合成を開始することができるという条件で、プライマー鎖の全体が支持鎖の対応する領域にハイブリダイズされることは必須ではない。したがって、ヘルパー鎖と支持鎖の対応する領域との間のミスマッチは、ある程度許容され得る。好ましくは、新たなポリヌクレオチド合成を開始するように作用し得るプライマー鎖の配列領域は、支持鎖中の対応する核酸塩基に相補的な核酸塩基を含むべきである。

10

【0245】

プライマー鎖は支持鎖の対応する領域よりも長い場合がある。支持鎖は、ヘルパー鎖に対して遠位方向において、プライマー鎖に対応する領域を越えて伸長し得る。ヘルパー鎖は、例えばヘアピンを介して、支持鎖の対応する領域に接続され得る。

【0246】

支持鎖

これらに限定されないが、本発明の合成方法のバージョン1～5を含む本発明の方法では、上に記載されるように、足場ポリヌクレオチドに支持鎖が提供される。支持鎖は合成鎖にハイブリダイズされる。上記に記載されるように、支持鎖がプライマー鎖部分と適合し、含まれる場合、合成鎖のヘルパー鎖部分と適合するという条件で、支持鎖の長さ、配列、および構造のパラメーターについて特別な要件はない。

20

【0247】

RNA合成

DNA合成について記載される方法はRNAの合成に適応され得る。1つの適応において、本発明の合成方法のバージョン1～5について記載された合成工程が適応され得る。したがって、合成方法のバージョン1～5の各々において、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、上に記載されるように、DNA鎖である。足場ポリヌクレオチドの合成鎖のプライマー鎖部分はRNA鎖である。ヘルパー鎖は、存在する場合、好ましくはRNA鎖である。ヘルパー鎖は、存在する場合、DNA鎖であり得る。

30

【0248】

ヌクレオチドは、上記に記載されるように、可逆的ターミネーター基を含むように修飾され得るリボヌクレオシド-5'-O-三リン酸(NTTP)から組み込まれ得る。好ましくは3'-O-修飾リボヌクレオシド-5'-O-三リン酸が使用される。修飾ヌクレオチドはRNAポリメラーゼの作用によって組み込まれる。

【0249】

したがって、本発明の合成方法のバージョン1～5に関する説明は、RNA合成に必要な変更を加えて適用することができるが、説明されるように適応され得る。

【0250】

図31および32は、それぞれ図6および7に示されるような実施例のDNA合成法のバージョン1、2の適応であるRNA合成のための反応スキームを説明する。図1～5にそれぞれ示されるように、本発明の方法のバージョン1～5は、同じ方法で適応され得る。

40

【0251】

RNA合成のために適応される方法のうちのいずれにおいても、支持鎖、プライマー鎖、ヘルパー鎖、連結ポリヌクレオチド、およびユニバーサルヌクレオチドの上記の記載は、必要な変更を加えて適用することができるが、記載されるように適応され得る。ユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖はDNA鎖であるため、以前に記載されるような切断工程および切断位置は、必要な変更を加えて適用することができる。好ましい実施形態では、SplintR DNAリガーゼが連結工程において使用される。

50

【0252】

例示的な方法

本発明によるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド分子を合成する例示的な方法は、添付の特許請求の範囲を含む本明細書に記載されている。

【0253】

本発明に従ってポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド分子を合成する以下の5つの例示的な方法において、合成方法のバージョン1、2、3、4、および5への言及は、それぞれ図1、2、3、4、および5に示される反応の概略図に従って解釈されるべきであり、図6～10のうちのいずれかに示される反応の概略図、または実施例の部分における同じ説明には従わない。図6～10のうちのいずれかに示される反応の概略図および以下の実施例部分における同じ説明は、本発明の方法と比較して修正された反応スキームに基づく本発明の方法の例示的な支持を提供する。以下の文中の参照符号は、図1～5のものに対応している。

10

【0254】

以下に記載される各例示的な方法において、各工程に記載される構造は、必要に応じて参照符号の助けを借りて特定の図を参照することによって参照され得る。しかしながら、そのような参照は、図に示される構造に限定されることを意図しておらず、関連する構造の記載は、これらに限定されないが、例示されているものも含めて、その全体が本明細書に提供されるようなその記載に対応している。

【0255】

5つの非限定的で例示的な方法、方法のバージョン1～5を以下に記載する（例えば、それぞれ図1～5を参照されたい）。これらの例示的な方法の各々の工程（1）において、相補的支持鎖（図1～5の各々の工程1に示される構造において「a」と標識された鎖を参照されたい）にハイブリダイズされた合成鎖（図1～5の各々の工程1に示される構造において「b」と標識された鎖を参照されたい）を含む足場ポリヌクレオチド（図1～5の各々の工程1に示される構造を参照されたい）が提供される（101、201、301、401、501）。

20

【0256】

足場ポリヌクレオチドは二本鎖であり、デノボ合成されるので合成ポリヌクレオチドの領域を収容するための支持構造を提供する。足場ポリヌクレオチドは、一本鎖切断または「ニック」によって分離された、プライマー鎖部分鎖（図1～5の各々の工程1に示される構造において「b」と標識された鎖の点線部分を参照されたい）およびヘルパー鎖部分（図1～5の各々の工程1に示される構造において「b」と標識された鎖の破線部分を参照されたい）を含む合成鎖を含む。本明細書により詳細に記載されるように、本明細書に記載される特定の例示的な方法のバージョン1～5およびその変形例において、ヘルパー鎖は、切断工程（2）の前に、例えば、変性によって除去され得る。

30

【0257】

プライマー鎖部分および合成鎖のヘルパー鎖部分の両方が、相補的支持鎖にハイブリダイズされて提供される。

【0258】

5つの方法の各々において、ユニバーサルヌクレオチド（図1～5の各々に示される構造において「Un」と標識される）が支持鎖中に提供され、これは足場ポリヌクレオチドの切断を促進する（102、202、302、402、502）。ユニバーサルヌクレオチドの役割は、以下の各方法の詳細な説明から明らかになるであろう。

40

【0259】

足場ポリヌクレオチドの切断（工程2）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。

【0260】

50

合成鎖のプライマー鎖部分の末端は、トランスフェラーゼ活性を有する酵素による合成の開始に使用するためのプライマー部位を提供する。したがって、酵素は、プライマー鎖部分の末端ヌクレオチドを伸長するように作用するであろう。したがって、この末端ヌクレオチドは、典型的には、例えば、5'～3'方向の伸長を触媒するポリメラーゼまたはトランスフェラーゼ酵素による伸長を可能にするために、プライマー鎖部分の3'末端を定義するであろう。プライマー鎖部分を含む合成鎖と反対の末端は、結果的に典型的には、合成鎖の5'末端を定義し、合成鎖の5'末端に隣接する支持鎖の末端ヌクレオチドは、結果的に典型的には、支持鎖の3'末端を定義するであろう。

【0261】

一本鎖切断の部位に位置付けられた合成鎖のヘルパー鎖部分の末端ヌクレオチドは、典型的には、ヘルパー鎖部分の5'末端を定義し、結果的に、合成鎖のヘルパー鎖部分と反対の末端が、典型的には合成鎖の3'末端を定義するであろう。

【0262】

合成鎖のヘルパー鎖部分とプライマー鎖部分との間の一本鎖切断または「ニック」は、典型的には、連結工程でプライマー鎖への連結からそれを防止するような形態で、ヘルパー鎖の(5')末端ヌクレオチドを提供することによって達成される。これは、典型的には、リン酸基を含まないヘルパー鎖の(5')末端ヌクレオチドを提供することによって達成され得る。切断は、典型的には、(i)支持鎖、(ii)典型的には非リン酸化を(5')末端ヌクレオチドを有する合成鎖のヘルパー鎖部分、および(iii)プライマー鎖部分を含む合成鎖部分を含む別々の構成成分から足場ヌクレオチドをアセンブリすることによって達成される。好適な条件下で成分を混合すると、足場ポリヌクレオチドが別々の成分のハイブリダイゼーション時に形成される。

【0263】

本明細書に記載されるある特定の方法において、ヘルパー鎖は、例えば、それが以前にハイブリダイズされた支持鎖からの変性および放出によって、切断の工程の前に足場ポリヌクレオチドから任意に除去され得る。

【0264】

切断により、切断の直前に存在する場合、ユニバーサルヌクレオチドと支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む支持鎖の除去がもたらされる。

【0265】

方法の工程(3)において、所定のヌクレオチド配列中の第1のヌクレオチドは、ポリメラーゼまたは末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素などのトランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によって合成鎖に組み込まれる(102、202、302、402、502)。第1のヌクレオチドには、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基(図1～5の各々の工程3において組み込まれたヌクレオチドの小さな三角形として示される)が提供される。したがって、工程(3)において、一塩基のみが組み込まれる。

【0266】

任意の好適な可逆的ターミネーター基を含むヌクレオチドを使用することができる。可逆的ターミネーター基を有する好ましいヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、3'-O-アリル-dNTPおよび/または3'-O-アジドメチル-dNTPである。

【0267】

方法の工程(4)において、脱保護工程が行われ、所定のヌクレオチド配列の組み込まれた第1のヌクレオチドから可逆的ターミネーター基が除去される(104、204、304、404、504)。あるいは、脱保護ステップは、以下に記載される連結工程(5)の後に行われ得る。

【0268】

方法の工程(5)において、連結工程が行われ(105、205、305、405、505)、連結ポリヌクレオチドは、所定のヌクレオチド配列の第1のヌクレオチドを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに連結される。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖

10

20

30

40

50

と支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む。連結ポリヌクレオチドは、第1のヌクレオチドを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの切断された末端と相補的である相補的連結末端を含む。連結ポリヌクレオチドの支持鎖は、相補的連結末端において所定のヌクレオチド配列の第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドを含み、連結時に、パートナーヌクレオチドは、所定のヌクレオチド配列の第1のヌクレオチドの反対に位置付けられ、ヌクレオチド対を形成する。連結ポリヌクレオチドの支持鎖はまた、次の合成サイクルにおける切断を容易にするであろう相補的連結末端にユニバーサルヌクレオチドを含む。相補的連結末端の連結ポリヌクレオチドのヘルパー鎖の末端ヌクレオチドは、ヘルパー鎖がプライマー鎖に連結され得ないように提供される。これは、典型的には、リン酸基を含まないヘルパー鎖の末端ヌクレオチドを提供することによって達成される。したがって、連結ポリヌクレオチドの支持鎖および切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの支持鎖の連結時に、一本鎖切断または「ニック」が、プライマー鎖部分とヘルパー鎖との間の合成鎖に提供される。

10

【0269】

連結ポリヌクレオチドを切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに連結すると、次の合成サイクルにおいて切断を促進するのに使用するために、新たに組み込まれたヌクレオチド対およびユニバーサルヌクレオチドを含む無傷の二本鎖足場ポリヌクレオチドが再形成される。

【0270】

合成ポリヌクレオチドを生成するために、上に記載されるのと同じ工程を含む合成の反復サイクルが行われる。

20

【0271】

特定の方法を、以下でより詳細に説明する。

【0272】

合成方法のバージョン1

本発明の合成方法の第1の例示的なバージョンでは、支持鎖中に位置付けられたユニバーサルヌクレオチドを含む、二本鎖足場ポリヌクレオチドが提供される（図1の工程1；101）。各合成サイクルにおいて、足場ポリヌクレオチドは、ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される切断部位で切断される（図1の工程2；102、107）。

30

【0273】

足場ポリヌクレオチドの切断（工程2）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断は、突出のない、切断部位での平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドをもたらす。

【0274】

方法の工程（3）において、所定のヌクレオチド配列中の第1のヌクレオチドは、ポリメラーゼまたは末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素などのトランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によって合成鎖のプライマー鎖部分の末端に付加される（103）。第1のヌクレオチドには、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基が提供される。したがって、工程（3）において、一塩基のみが組み込まれる。

40

【0275】

方法の工程（4）において、脱保護工程が行われ、新たに組み込まれたヌクレオチドからターミネーター基が除去される。原則として、脱保護工程は、連結工程（5）の後に行われ得る。工程（4）としての脱保護工程の実施が好ましい。

【0276】

方法の工程（5）において、連結ポリヌクレオチド（図1の上部の左上に示される構造を参照されたい）は、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される。連結は、パートナ

50

ーヌクレオチドを足場ポリヌクレオチドへ組み込み、新たに組み込まれたヌクレオチドがパートナーヌクレオチドと対合することを可能にし（図1の工程5；105）、これにより合成サイクルを完了させる。

【0277】

本発明の合成方法の第1の例示的なバージョンでは、足場ポリヌクレオチドは、上に記載されるように工程（1）で提供される（101）。この方法では、足場ポリヌクレオチドの支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、一本鎖切断部位でヘルパー鎖の末端ヌクレオチド（図1の構造中に「X」と標識される）と反対に位置付けられ、それと対合される（図1の工程1に図示される構造を参照されたい）。

【0278】

方法の工程（2）において、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（102）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断（工程2）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。

【0279】

この例示的な方法では、合成鎖にすでに一本鎖切断または「ニック」が提供されており、したがって足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断を提供するためには支持鎖の切断のみが必要である。

【0280】

この例示的な方法のバージョンでは、切断により、合成鎖または支持鎖のいずれにも突出のない、平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドが生成される。

【0281】

この方法では、ユニバーサルヌクレオチドは、切断工程の前に支持鎖における位置「n」を占める。ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置「n」を占めるときにそのような平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを得るために、支持鎖は、ユニバーサルヌクレオチドに対して特定の位置で切断される。足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、ヌクレオチド位置nとn-1との間で切断される。

【0282】

「n」とは、その合成サイクルにおける切断された合成鎖の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「n」とはまた、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。したがって、切断工程では、支持鎖の位置nのユニバーサルヌクレオチドは、その合成サイクルに組み込まれた所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう位置の反対にある。工程（1）および（2）で、その合成サイクルに組み込まれた所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう位置は、合成鎖のヘルパー鎖部分の末端ヌクレオチドに対応する（図1で「X」として示される）。

【0283】

「n-1」とは、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、ユニバーサルヌクレオチドによって占められるか、または占められている位置に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図1の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置n-1で「H」と標識されたヌクレオチド）。n-1はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る。したがって、切断工程では、支持鎖における位置n-1は、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドによって占められる位置と反対である（すなわち、図1の工程（2）に概略的に示されるように、位置n-1で「I」と標識されたヌクレオチド）。バージョン1による方法では、位置HおよびIを占める

10

20

30

40

50

ヌクレオチド対は、任意のヌクレオチド対であり得る。

【0284】

ヌクレオチド位置 n と $n-1$ の間の支持鎖の切断時に、ユニバーサルヌクレオチド、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖、およびヘルパー鎖とハイブリダイズされるまたはハイブリダイズされた支持鎖の部分は、残りの切断された足場ポリヌクレオチドから除去される（図1の上部の右上に示される構造を参照されたい）。

【0285】

リン酸基は、切断部位で切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドに付着し続けるべきである（図1の下部の中央に示される構造に示されるように）。これにより、連結工程において、連結ポリヌクレオチドの支持鎖を切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖に確実に連結することができる。

10

【0286】

したがって、方法のバージョン1では、ユニバーサルヌクレオチドは、工程（1）および（2）で支持鎖における位置 n を占め、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0287】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間のホスホジエステル結合（ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、ユニバーサルヌクレオチドの位置に対する支持鎖の第1のホスホジエステル結合）の切断によって切断される。

20

【0288】

支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間のホスホジエステル結合の一方のエステル結合の切断によって切断され得る。

【0289】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n に対する第1のエステル結合の切断によって切断される。これは、切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖上の切断位置で末端リン酸基を保持する効果を有するであろう。

【0290】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 n を占める場合、任意の好適な機構を用いて、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ の間の支持鎖の切断をもたらし得る。

30

【0291】

上記に記載されるようなヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間の支持鎖の切断は、酵素の作用によって行われ得る。

【0292】

上に記載されるようなヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間の支持鎖の切断は、2工程プロセスとして行われ得る。

【0293】

2工程切断プロセスの第1の切断工程は、支持鎖からユニバーサルヌクレオチドを除去し、それによって位置 n に脱塩基部位を形成することを含み得、第2の切断工程は、位置 n と $n-1$ との間の脱塩基部位で支持鎖を切断することを含み得る。

40

【0294】

支持鎖における位置 n を占めるユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される切断部位で支持鎖を切断する1つの機構は、実施例2に記載されている。実施例2に記載される切断機構は例示的なものであり、上に記載される平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドが達成されるという条件で、他の機構を用いることができる。

【0295】

2工程切断プロセスの第1の切断工程では、糖-リン酸足場を無傷のままにしながら、ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖から除去される。これは、二本鎖ポリヌクレオチドから一本鎖ユニバーサルヌクレオチドを特異的に除去ことができる酵素の作用によって達成することができる。例示された切断方法では、ユニバーサルヌクレオチドは、イノシンで

50

あり、イノシンは、酵素の作用によって支持鎖から除去され、よって脱塩基部位を形成する。例示された切断方法では、酵素は、3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼ酵素、具体的にはヒトアルキルアデニンDNAグリコシラーゼ（hAAG）である。無塩基部位が形成されるという条件で、他の酵素、分子、または化学物質を使用することができる。ヌクレオチド除去酵素は、UDG DNAグリコシラーゼであり得る。

【0296】

2工程切断プロセスの第2の切断工程では、支持鎖は、一本鎖切断を作成することによって脱塩基部位で切断される。例示された方法では、支持鎖は、NaOHなどの塩基である化学物質の作用によって切断される。代替的に、N，N'-ジメチルエチレンジアミンなどの有機化学物質を使用してもよい。あるいは、APエンドヌクレアーゼ1、エンドヌクレアーゼIII（Nth）、またはエンドヌクレアーゼVIIなどの脱塩基部位リアーゼ活性を有する酵素を使用してもよい。記載されるような脱塩基部位で支持鎖が切断されるという条件で、他の酵素、分子、または化学物質を使用することができる。

【0297】

したがって、ユニバーサルヌクレオチドが工程（1）および（2）で支持鎖の位置nにあり、支持鎖が位置nとn-1との間で切断される実施形態では、第1の切断工程は、ヌクレオチド除去酵素を用いて行われ得る。そのような酵素の例は、ヒトアルキルアデニンDNAグリコシラーゼ（hAAG）などの3-メチルアデニンDNAグリコシラーゼ酵素である。第2の切断工程は、NaOHなどの塩基である化学物質を用いて行われ得る。第2の工程は、N，N'-ジメチルエチレンジアミンなどの脱塩基部位切断活性を有する有機化学物質を用いて行われ得る。第2の工程は、エンドヌクレアーゼVIIなどの脱塩基部位リアーゼ活性を有する酵素を用いて行われ得る。

【0298】

上に記載されるようなヌクレオチド位置nとn-1との間の支持鎖の切断はまた、1工程切断プロセスとして行われ得る。そのようなプロセスで使用され得る酵素の例には、エンドヌクレアーゼIII、エンドヌクレアーゼVII、ホルムアミドピリミジンDNAグリコシラーゼ（Fpg）、および8-オキソグアニンDNAグリコシラーゼ（hOGG1）が含まれる。

【0299】

本発明のこの例示的な方法のバージョンでは、全てのバージョンと同様に、隣のヌクレオチドを次の合成サイクルに組み込むことを可能にするために、可逆的ターミネーター基を第1のヌクレオチドから除去しなければならない（脱保護工程；104）。これは、第1のサイクルの様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、図1の工程4に示されるように、連結工程（5）の前に、方法の工程（4）として行われるであろう（104）。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（5）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。どの段階で脱保護工程が行われるかにかかわらず、第1のヌクレオチドの多重組み込みを防止するために、酵素および残りの組み込まれていない第1のヌクレオチドが最初に除去されるべきである。酵素および組み込まれていない第1のヌクレオチドは、好ましくは、連結工程（工程（5））の前に除去される。

【0300】

第1のヌクレオチドからの可逆的ターミネーター基の除去は、任意の好適な手段によって行われ得る。例えば、除去は、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）などの化学物質の使用によって行われ得る。

【0301】

方法の工程（5）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（105）。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖およびヘルパー鎖を含む。連結ポリヌクレオチドは、ユニバーサルヌクレオチドと、所定の配列の第1のヌクレオチドに対するパートナーヌクレオチドであるヘルパー鎖の末端ヌクレオチドを突出する単一の突出ヌクレオチドとを支持鎖中に含む相補的連結末端をさらに含む。連結ポリヌ

クレオチドは、突出に隣接するヘルパー鎖中に別のポリヌクレオチド鎖に連結することができないように構成された末端ヌクレオチドをさらに含む（図1の上部の左上に示される構造において「X」と標識された位置）。典型的には、この末端ヌクレオチドは、リン酸基を欠いているであろう。典型的には、上に記載されるように、ヘルパー鎖のこの非リン酸化末端ヌクレオチドは、ヘルパー鎖の5'末端を定義するであろう。

【0302】

相補的連結末端は、好適な連結条件に供されたときに、それが組み込み工程（3）後に切断された足場ポリヌクレオチド生産物の突出末端と適合的に接合するように構成される。支持鎖の連結時に、第1のヌクレオチドはそのパートナーヌクレオチドと対合される。

【0303】

支持鎖の連結は、任意の好適な手段によって行われ得る。連結は、合成鎖中、すなわちプライマー鎖部分中の第1のヌクレオチドと、第1のヌクレオチドに隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドとの間の一本鎖切断を維持しながら、支持鎖のみの接合をもたらすであろう。

【0304】

連結は、典型的には、リガーゼ活性を有する酵素によって行われ得る。例えば、連結は、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼまたはその機能的バリエーションもしくは等価物を用いて行われ得る。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドは、例えば、末端リン酸基がないために、リガーゼに対する基質として作用することができないように提供されるため、そのような酵素の使用は、合成鎖における一本鎖切断の維持をもたらすであろう。

【0305】

切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結は、第1の合成サイクルを完了し、そのときに、所定のヌクレオチド配列の第1のヌクレオチドがそのパートナーヌクレオチドと反対の足場ポリヌクレオチドに組み込まれることを除いて、工程（1）の足場ポリヌクレオチドが効果的に再構築される。

【0306】

この例示的な方法（105）の工程（5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対に位置付けられ、それと対合される。連結ポリヌクレオチドの文脈において、ユニバーサルヌクレオチドは、位置 $n+1$ 、および支持鎖の末端ヌクレオチドの隣の位置（位置 n ）に位置付けられることに留意されたい。連結ポリヌクレオチドの文脈における位置 n は、工程（1）および（2）での足場ポリヌクレオチドの文脈において上に記載されるのと同じ意味を有する。したがって、工程（5）において、「 n 」とは、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。

【0307】

工程（1）および（2）（図1の101および102）の間、ユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドの位置 n を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクル（図1の105）において連結ポリヌクレオチドの位置 $n+1$ を占めることに留意されたい。これは、工程（5）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（5）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+1$ とな

10

20

30

40

50

り、 n から移動し、工程（１）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（５）の生産物（図１で「連結生産物」と標識された構造）は、次の合成サイクル（１０６）で使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクル（１０６）で使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、次の合成サイクル（１０６）でのユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置が、次のサイクル（１０８）において切断された合成鎖の末端へのその付加時に、所定の配列の隣のヌクレオチドによって占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置となるため、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+1$ （１０５）ではなく、ここでも位置 n （１０６）と呼ばれることが理解されるべきである。したがって、方法のバージョン１では、任意の所与の合成サイクル（１０１、１０６など）の開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、常に位置 n と呼ばれ、そのサイクルに新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に位置 n と呼ばれる位置を占める。

【０３０８】

第１の合成サイクルの完了後、第２のサイクルおよびその後のサイクルは、同じ方法の工程を使用して行われる。

【０３０９】

方法のバージョン１の第１の合成サイクルの工程（２）と同様に、工程（６）では、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（１０７）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断により、切断の直前に存在する場合、ユニバーサルヌクレオチドと支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む支持鎖の除去がもたらされる。

【０３１０】

切断工程は、第１のサイクルの工程（２）について上に記載されるように行われ得る。

【０３１１】

工程（７）では、隣のヌクレオチドは、第１のサイクルの工程（３）のように、合成鎖の切断されたプライマー鎖部分の末端に付加される。

【０３１２】

工程（８）では、可逆的ターミネーター基は、隣のヌクレオチドから除去される（脱保護ステップ；１０９）。第１のサイクルについて上に記載されるように、これは様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、連結工程（９）の前に、方法の工程（８）として行われるであろう。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（９）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。

【０３１３】

次のサイクル（１０９）およびその後のサイクルにおける可逆的ターミネーター基の脱保護は、第１の合成サイクルに関して上に記載されるように行われ得る。

【０３１４】

次のサイクルの工程（９）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（１１０）。次の合成サイクルおよびその後の合成サイクルの工程（９）の連結ポリヌクレオチドが構成される場合があり、連結工程は、第１の合成サイクルの工程（５）について上に記載されるように行われ得る。

【０３１５】

合成サイクルは、上に記載されるように、所定のヌクレオチド配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するのに必要な回数だけ繰り返される。

【０３１６】

合成方法のバージョン２

本発明の合成方法の第２の例示的なバージョンは、所与の合成サイクルにおいて組み込まれる新たなヌクレオチドによって占められる位置に対する、かつニックおよび切断部位

10

20

30

40

50

に対するユニバーサルヌクレオチドの位置付けのための修飾された構造配置を除いて、第1のバージョンと類似の内容で行われる。

【0317】

したがって、バージョン1のように、バージョン2では、足場ポリヌクレオチドの切断（工程2、202）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断は、突出のない、切断部位での平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドをもたらす。

【0318】

方法の工程（3）において、所定のヌクレオチド配列中の第1のヌクレオチドは、ポリメラーゼまたは末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素などのトランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によって合成鎖のプライマー鎖部分の末端に付加される（203）。第1のヌクレオチドには、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基が提供される。したがって、工程（3）において、一塩基のみが組み込まれる。

【0319】

方法の工程（4）において、脱保護工程が行われ（204）、新たに組み込まれたヌクレオチドからターミネーター基が除去される。原則として、脱保護工程は、連結工程（5）の後に行われ得る。工程（4）としての脱保護工程の実施が好ましい。

【0320】

方法の工程（5）において、連結ポリヌクレオチド（図2の上部の左上に示される構造を参照されたい）は、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される。連結は、パートナーヌクレオチドを足場ポリヌクレオチドへ組み込み、新たに組み込まれたヌクレオチドがパートナーヌクレオチドと対合することを可能にし（図2の工程5；205）、これにより合成サイクルを完了させる。

【0321】

本発明の合成方法の第2の例示的なバージョンでは、足場ポリヌクレオチドは、上に記載されるように工程（1）で提供される（201）。この方法では、足場ポリヌクレオチドの支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと反対の位置であり（図2の構造中に「X」と標識される）、それと対合される（図2の工程1に示される構造を参照されたい）。

【0322】

方法の工程（2）において、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（202）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断（工程2）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。

【0323】

この例示的な方法では、合成鎖にすでに一本鎖切断または「ニック」が提供されており、したがって足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断を提供するためには支持鎖の切断のみが必要である。

【0324】

この例示的な方法のバージョンでは、切断により、合成鎖または支持鎖のいずれにも突出のない、平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドが生成される。

【0325】

この方法では、ユニバーサルヌクレオチドは、切断工程の前に支持鎖における位置「n+1」を占める。ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置n+1を占めるときにそのような平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを得るために、支持鎖は、

10

20

30

40

50

ユニバーサルヌクレオチドに対して特定の位置で切断される。足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0326】

「 n 」とは、その合成サイクルにおける切断された合成鎖の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。したがって、切断工程では、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+1$ にあり、これはニック部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドによって占められる位置と反対である（図2の位置「X」に示される）。

10

【0327】

工程（1）および（2）で、その合成サイクルに組み込まれた所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう位置は、合成鎖のヘルパー鎖部分の末端ヌクレオチドに対応する（図2で位置「I」として示される）。

【0328】

「 $n+1$ 」とは、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図2の工程（1）および（2）で概略的に示されるように、プライマー鎖に対する遠位方向において、位置 n で「H」と標識された位置の隣の位置を占める、位置 $n+1$ で「Un」と標識されたヌクレオチド）。 $n+1$ はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（図2の工程（1）および（2）で、位置 $n+1$ で「X」と標識される）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置 $n+1$ は、ニック部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドによって占められる位置の反対にある。

20

【0329】

「 $n-1$ 」とは、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図2の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置 $n-1$ で「J」と標識された位置）。 $n-1$ はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（すなわち、図2の工程（2）に概略的に示されるように、位置 $n-1$ で「K」と標識された位置）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置 $n-1$ は、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドによって占められている位置と反対である。

30

【0330】

バージョン2による方法では、位置HおよびI、ならびにJおよびKを占めるヌクレオチド対は、任意のヌクレオチド対であり得る。

【0331】

ヌクレオチド位置 n と $n-1$ の間の支持鎖の切断時に、ユニバーサルヌクレオチド、ヘルパー鎖（存在する場合）、およびヘルパー鎖とハイブリダイズされるまたはハイブリダイズされた支持鎖の部分は、残りの切断された足場ポリヌクレオチドから除去される（図2の上部の右上に示される構造を参照されたい）。

40

【0332】

リン酸基は、切断部位で切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドに付着し続けるべきである（図2の下部の中央に示される構造に示されるように）。これにより、連結工程において、連結ポリヌクレオチドの支持鎖を切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖に確実に連結することができる。

【0333】

したがって、方法のバージョン2では、ユニバーサルヌクレオチドは、工程（1）および（2）で支持鎖における位置 $n+1$ を占め、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0334】

50

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間のホスホジエステル結合（ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、ユニバーサルヌクレオチドの位置に対する支持鎖の第2のホスホジエステル結合）の切断によって切断される。

【0335】

支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間のホスホジエステル結合の一方のエステル結合の切断によって切断され得る。

【0336】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n に対する第1のエステル結合の切断によって切断される。これは、切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖上の切断位置で末端リン酸基を保持する効果を有するであろう。

10

【0337】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 $n+1$ を占める場合、任意の好適な機構を用いて、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ の間の支持鎖の切断をもたらす得る。

【0338】

上記に記載されるようなヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間の支持鎖の切断は、酵素の作用によって行われ得る。

【0339】

上に記載されるように、ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置 $n+1$ を占めるときの、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間の支持鎖の切断は、エンドヌクレアーゼ V などの酵素の作用によって行われ得る。

20

【0340】

支持鎖における位置 $n+1$ を占めるユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される切断部位で、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で支持鎖を切断する1つの機構は、実施例3に類似の方法で記載されている。記載される機構は例示的であり、上に記載される切断配置が達成されるという条件で、他の機構を用いることができる。

【0341】

この例示的な機構では、エンドヌクレアーゼ酵素が用いられる。例示された方法では、酵素は、エンドヌクレアーゼ V である。ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n+1$ を占めるときに支持鎖がヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で切断されるという条件で、他の酵素、分子、または化学物質を使用することができる。

30

【0342】

本発明のこの例示的な方法のバージョンでは、全てのバージョンと同様に、隣のヌクレオチドを次の合成サイクルに組み込むことを可能にするために、可逆的ターミネーター基を第1のヌクレオチドから除去しなければならない（脱保護工程；204）。これは、第1のサイクルの様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、図2の工程4に示されるように、連結工程（5）の前に、方法の工程（4）として行われるであろう（204）。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（5）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。どの段階で脱保護工程が行われるかにかかわらず、第1のヌクレオチドの多重組み込みを防止するために、酵素および残りの組み込まれていない第1のヌクレオチドが最初に除去されるべきである。酵素および組み込まれていない第1のヌクレオチドは、好ましくは、連結工程（工程（5））の前に除去される。

40

【0343】

第1のヌクレオチドからの可逆的ターミネーター基の除去は、任意の好適な手段によって行われ得る。例えば、除去は、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）などの化学物質の使用によって行われ得る。

【0344】

方法の工程（5）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（205）。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖およびヘルパー鎖を

50

含む。連結ポリヌクレオチドはさらに、ユニバーサルヌクレオチドと、所定の配列の第1のヌクレオチドに対するパートナーヌクレオチドである単一の突出ヌクレオチドとを支持鎖中に含む相補的連結末端を含む。連結ポリヌクレオチドは、突出に隣接するヘルパー鎖中に別のポリヌクレオチド鎖に連結することができないように構成された末端ヌクレオチドをさらに含む（図2の上部の左上に示される構造において「I」と標識された位置）。典型的には、この末端ヌクレオチドは、リン酸基を欠いているであろう。典型的には、上に記載されるように、ヘルパー鎖のこの非リン酸化末端ヌクレオチドは、ヘルパー鎖の5'末端を定義するであろう。

【0345】

連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと反対に位置付けられ（図2の工程（5）で「X」と標識された位置）、それと対合される。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチド（位置 $n+1$ で、図2の工程（5）で「I」と標識された位置）は、位置 $n+2$ でのユニバーサルヌクレオチドと位置 n でのパートナーヌクレオチドとの間にある位置（位置 $n+1$ で、図2の工程（5）で「H」と標識された位置）を占める支持鎖におけるヌクレオチドと対合される。

【0346】

相補的連結末端は、好適な連結条件に供されたときに、それが組み込み工程（3）後に切断された足場ポリヌクレオチド生産物の突出末端と適合的に接合するように構成される。支持鎖の連結時に、第1のヌクレオチドはそのパートナーヌクレオチドと対合される。

【0347】

支持鎖の連結は、任意の好適な手段によって行われ得る。連結は、合成鎖中、すなわちプライマー鎖部分中の第1のヌクレオチドと、第1のヌクレオチドに隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドとの間の一本鎖切断を維持しながら、支持鎖のみの接合をもたらすであろう。

【0348】

連結は、典型的には、リガーゼ活性を有する酵素によって行われ得る。例えば、連結は、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼまたはその機能的バリエーションもしくは等価物を用いて行われ得る。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドは、例えば、末端リン酸基がないために、リガーゼに対する基質として作用することができないように提供されるため、そのような酵素の使用は、合成鎖における一本鎖切断の維持をもたらすであろう。

【0349】

切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結は、第1の合成サイクルを完了し、そのときに、所定のヌクレオチド配列の第1のヌクレオチドがそのパートナーヌクレオチドと反対の足場ポリヌクレオチドに組み込まれることを除いて、工程（1）の足場ポリヌクレオチドが効果的に再構築される。

【0350】

この例示的な方法（205）の工程（5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと反対に位置付けられ（「X」と標識された位置）、それと対合される。連結ポリヌクレオチドの文脈において、ユニバーサルヌクレオチドは、位置 $n+2$ 、すなわち支持鎖の末端ヌクレオチドから除去される2つの位置（位置 n ）に位置付けられることに留意されたい。連結ポリヌクレオチドの文脈における位置 n は、工程（1）および（2）での足場ポリヌクレオチドの文脈において上に記載されるのと同じ意味を有する。したがって、工程（5）において、「 n 」とは、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。

【0351】

工程（１）および（２）（図２の２０１および２０２）の間、ユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドの位置 $n+1$ を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクル（図２の２０５）において連結ポリヌクレオチドの位置 $n+2$ を占めることに留意されたい。これは、工程（５）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（５）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+2$ となり、 $n+1$ から移動し、工程（１）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（５）の生産物（図２で「連結生産物」と標識された構造）は、次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクル（２０６）で使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+2$ （２０５）ではなく、ここでも位置 $n+1$ （２０６）と呼ばれることが理解されるべきである。したがって、方法のバージョン２では、任意の所与の合成サイクル（２０１、２０６など）の開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、常に位置 $n+1$ と呼ばれ、そのサイクルに新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に位置 n と呼ばれる位置を占める。

10

20

【0352】

第１の合成サイクルの完了後、第２のサイクルおよびその後のサイクルは、同じ方法の工程を使用して行われる。

【0353】

方法のバージョン２の第１の合成サイクルの工程（２）と同様に、工程（６）では、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（２０７）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断により、切断の直前に存在する場合、ユニバーサルヌクレオチドと支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む支持鎖の除去がもたらされる。

30

【0354】

切断工程は、第１のサイクルの工程（２）について上に記載されるように行われ得る。

【0355】

工程（７）では、隣のヌクレオチドは、第１のサイクルの工程（３）のように、合成鎖の切断されたプライマー鎖部分の末端に付加される。

【0356】

工程（８）では、可逆的ターミネーター基は、隣のヌクレオチドから除去される（脱保護ステップ；２０９）。第１のサイクルについて上に記載されるように、これは様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、連結工程（９）の前に、方法の工程（８）として行われるであろう。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（９）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。

40

【0357】

次のサイクル（２０９）およびその後のサイクルにおける可逆的ターミネーター基の脱保護は、第１の合成サイクルに関して上に記載されるように行われ得る。

【0358】

次のサイクルの工程（９）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（２１０）。次の合成サイクルおよびその後の合成サイク

50

ルの工程（９）の連結ポリヌクレオチドが構成される場合があり、連結工程は、第１の合成サイクルの工程（５）について上に記載されるように行われ得る。

【０３５９】

合成サイクルは、上に記載されるように、所定のヌクレオチド配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するのに必要な回数だけ繰り返される。

【０３６０】

合成方法のバージョン３

本発明の合成方法の第３の例示的なバージョンは、切断部位に対するユニバーサルヌクレオチドの位置付けのための修飾された構造的配置を除いて、第１のバージョンと類似の内容で行われる。

【０３６１】

したがって、バージョン１のように、バージョン３では、足場ポリヌクレオチドの切断（工程２、３０２）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断は、切断部位で一塩基突出を有する切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドをもたらす。

【０３６２】

方法の工程（３）において、所定のヌクレオチド配列中の第１のヌクレオチドは、ポリメラーゼまたは末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素などのトランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によって合成鎖のプライマー鎖部分の末端に付加される（３０３）。第１のヌクレオチドには、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基が提供される。したがって、工程（３）において、一塩基のみが組み込まれる。

【０３６３】

方法の工程（４）において、脱保護工程が行われ（３０４）、新たに組み込まれたヌクレオチドからターミネーター基が除去される。原則として、脱保護工程は、連結工程（５）の後に行われ得る。工程（４）としての脱保護工程の実施が好ましい。

【０３６４】

方法の工程（５）において、連結ポリヌクレオチド（図３の上部の左上に示される構造を参照されたい）は、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される。連結は、パートナーヌクレオチドを足場ポリヌクレオチドへ組み込み、新たに組み込まれたヌクレオチドがパートナーヌクレオチドと対合することを可能にし（図３の工程５；３０５）、これにより合成サイクルを完了させる。

【０３６５】

本発明の合成方法の第３の例示的なバージョンでは、足場ポリヌクレオチドは、上に記載されるように工程（１）で提供される（３０１）。この方法では、足場ポリヌクレオチドの支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対の位置であり（図３の構造中に「X」と標識される）、それと対合される（図３の工程１に示される構造を参照されたい）。

【０３６６】

方法の工程（２）において、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（３０２）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断（工程２）は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。

【０３６７】

この例示的な方法では、合成鎖にすでに一本鎖切断または「ニック」が提供されており、したがって足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断を提供するためには支持鎖の切断のみ

10

20

30

40

50

が必要である。

【0368】

この例示的な方法のバージョンでは、切断により、一塩基突出を有する切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドが生成される。したがって、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドは、支持鎖の末端ヌクレオチドに突出する。

【0369】

この方法では、ユニバーサルヌクレオチドは、切断工程の前に支持鎖における位置「n」を占める。ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置nを占めるときに、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドが、支持鎖の末端ヌクレオチドに突出する、そのような切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを得るために、支持鎖は、ユニバーサルヌクレオチドおよびニック部位に対する特定の位置で切断される。足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、ヌクレオチド位置n-1とn-2との間で切断される。

【0370】

「n」とは、その合成サイクルにおける切断された合成鎖の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「n」とはまた、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。したがって、切断工程では、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置nにあり、これはニック部位に隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドによって占められる位置と反対である（図3の位置「X」に示される）。

【0371】

工程（1）および（2）で、その合成サイクルに組み込まれた所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう位置は、合成鎖のヘルパー鎖部分の末端ヌクレオチドに対応する（図3で位置「X」として示される）。

【0372】

「n-1」とは、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、位置nに対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図3の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置n-1で「H」と標識された位置）。n-1はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（すなわち、図3の工程（2）に概略的に示されるように、位置n-1で「I」と標識された位置）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置n-1は、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドによって占められている位置と反対である。したがって、図3の工程（1）および（2）では、位置「J」および「K」のヌクレオチドが位置n-2を占める。

【0373】

バージョン3による方法では、位置HおよびI、ならびにJおよびKを占めるヌクレオチド対は、任意のヌクレオチド対であり得る。

【0374】

ヌクレオチド位置n-1とn-2との間の支持鎖の切断時に、ユニバーサルヌクレオチド、ヘルパー鎖（存在する場合）、およびヘルパー鎖とハイブリダイズされるまたはハイブリダイズされた支持鎖の部分は、残りの切断された足場ポリヌクレオチドから除去される（図3の上部の右上に示される構造を参照されたい）。

【0375】

リン酸基は、切断部位で切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドに付着し続けるべきである（図3の下部の中央に示される構造に示されるように）。これにより、連結工程において、連結ポリヌクレオチドの支持鎖を切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖に確実に連結することができる。

【0376】

したがって、方法のバージョン3では、ユニバーサルヌクレオチドは、工程（1）および（2）で支持鎖における位置nを占め、支持鎖は、ヌクレオチド位置n-1とn-2と

10

20

30

40

50

の間で切断される。

【0377】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間のホスホジエステル結合（ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、ユニバーサルヌクレオチドの位置に対する支持鎖の第2のホスホジエステル結合）の切断によって切断される。

【0378】

支持鎖は、ヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間のホスホジエステル結合の一方のエステル結合の切断によって切断され得る。

【0379】

好ましくは、支持鎖はヌクレオチド位置 $n-1$ に対する第1のエステル結合の切断により切断される。これは、切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖上の切断位置で末端リン酸基を保持する効果を有するであろう。

【0380】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 n を占める場合、任意の好適な機構を用いて、ヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間の支持鎖の切断をもたらす得る。

【0381】

上に記載されるようなヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間の支持鎖の切断は、酵素の作用によって行われ得る。

【0382】

上に記載されるように、ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置 n を占めるときの、ヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間の支持鎖の切断は、エンドヌクレアーゼ V などの酵素の作用によって行われ得る。

【0383】

支持鎖における位置 n を占めるユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される切断部位で、ヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間で支持鎖を切断する1つの機構は、実施例3に類似の方法で記載されている。記載される機構は例示的であり、上に記載される切断配置および一塩基突出が達成されるという条件で、他の機構を用いることができる。

【0384】

この例示的な機構では、エンドヌクレアーゼ酵素が用いられる。例示された方法では、酵素は、エンドヌクレアーゼ V である。ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 n を占めるときに支持鎖がヌクレオチド位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断されるという条件で、他の酵素、分子、または化学物質を使用することができる。

【0385】

本発明のこの例示的な方法のバージョンでは、全てのバージョンと同様に、隣のヌクレオチドを次の合成サイクルに組み込むことを可能にするために、可逆的ターミネーター基を第1のヌクレオチドから除去しなければならない（脱保護工程；304）。これは、第1のサイクルの様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、図3の工程4に示されるように、連結工程（5）の前に、方法の工程（4）として行われるであろう（304）。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（5）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。どの段階で脱保護工程が行われるかにかかわらず、第1のヌクレオチドの多重組み込みを防止するために、酵素および残りの組み込まれていない第1のヌクレオチドが最初に除去されるべきである。酵素および組み込まれていない第1のヌクレオチドは、好ましくは、連結工程（工程（5））の前に除去される。

【0386】

第1のヌクレオチドからの可逆的ターミネーター基の除去は、任意の好適な手段によって行われ得る。例えば、除去は、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）などの化学物質の使用によって行われ得る。

10

20

30

40

50

【0387】

方法の工程（５）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（３０５）。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖およびヘルパー鎖を含む。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖にユニバーサルヌクレオチドと、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドを突出する２つの突出ヌクレオチドとを含む相補的連結末端をさらに含む。相補的連結末端の連結ポリヌクレオチドの支持鎖の最後から２番目のヌクレオチドは、所定の配列の第１のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドである。連結ポリヌクレオチドは、突出に隣接するヘルパー鎖中に別のポリヌクレオチド鎖に連結することができないように構成された末端ヌクレオチドをさらに含む（図３の上部の左上に示される構造において「X」と標識された位置）。典型的には、この末端ヌクレオチドは、リン酸基を欠いているであろう。典型的には、上に記載されるように、ヘルパー鎖のこの非リン酸化末端ヌクレオチドは、ヘルパー鎖の５'末端を定義するであろう。

10

【0388】

連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対に位置付けられ（ $n+1$ ）（図３の工程（５）で「X」と標識された位置）、それと対合される。所定の配列の第１のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドは、ヘルパー鎖に対する遠位方向において、ユニバーサルヌクレオチドに対して隣のヌクレオチド位置を占め（位置 n ）、ユニバーサルヌクレオチドと、連結ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドとの間に位置付けられる（位置 $n-1$ で、図３の工程（５）で「H」と標識された位置）。

20

【0389】

相補的連結末端は、好適な連結条件に供されたときに、それが組み込み工程（３）後に切断された足場ポリヌクレオチド生産物の突出末端と適合的に接合するように構成される。支持鎖の連結時に、第１のヌクレオチドはそのパートナーヌクレオチドと対合される。

【0390】

支持鎖の連結は、任意の好適な手段によって行われ得る。連結は、合成鎖中、すなわちプライマー鎖部分中の第１のヌクレオチドと、第１のヌクレオチドに隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドとの間の一本鎖切断を維持しながら、支持鎖のみの接合をもたらすであろう。

【0391】

連結は、典型的には、リガーゼ活性を有する酵素によって行われ得る。例えば、連結は、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼまたはその機能的バリエーションもしくは等価物を用いて行われ得る。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドは、例えば、末端リン酸基がないために、リガーゼに対する基質として作用することができないように提供されるため、そのような酵素の使用は、合成鎖における一本鎖切断の維持をもたらすであろう。

30

【0392】

切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結は、第１の合成サイクルを完了し、そのときに、所定のヌクレオチド配列の第１のヌクレオチドがそのパートナーヌクレオチドと反対の足場ポリヌクレオチドに組み込まれることを除いて、工程（１）の足場ポリヌクレオチドが効果的に再構築される。

40

【0393】

この例示的な方法（３０５）の工程（５）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドと反対に位置付けられ（「X」と標識された位置）、それと対合される。連結ポリヌクレオチドの文脈において、ユニバーサルヌクレオチドは、位置 $n+1$ 、および支持鎖の末端ヌクレオチドから除去される２つの位置（位置 $n-1$ ）に位置付けられることに留意されたい。連結ポリヌクレオチドの文脈における位置 n は、工程（１）および（２）での足場ポリヌクレオチドの文脈において上に記載されるのと同じ意味を有する。したがって、工程（５）において、「 n 」とは、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成

50

鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。

【0394】

工程（１）および（２）（図３の３０１および３０２）の間、ユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドの位置 n を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクル（図３の３０５）において連結ポリヌクレオチドの位置 $n+1$ を占めることに留意されたい。これは、工程（５）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（５）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+1$ となり、 n から移動し、工程（１）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（５）の生産物（図３で「連結生産物」と標識された構造）は、次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクル（３０６）で使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+1$ （３０５）ではなく、ここでも位置 n （３０６）と呼ばれることが理解されるべきである。したがって、方法のバージョン３では、任意の所与の合成サイクル（３０１、３０６など）の開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、常に位置 n と呼ばれ、そのサイクルに新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に位置 n と呼ばれる位置を占める。

【0395】

第１の合成サイクルの完了後、第２のサイクルおよびその後のサイクルは、同じ方法の工程を使用して行われる。

【0396】

方法のバージョン３の第１の合成サイクルの工程（２）と同様に、工程（６）では、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（３０７）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断により、切断の直前に存在する場合、ユニバーサルヌクレオチドと支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む支持鎖の除去がもたらされる。

【0397】

切断工程は、第１のサイクルの工程（２）について上に記載されるように行われ得る。

【0398】

工程（７）では、隣のヌクレオチドは、第１のサイクルの工程（３）のように、合成鎖の切断されたプライマー鎖部分の末端に付加される。

【0399】

工程（８）では、可逆的ターミネーター基は、隣のヌクレオチドから除去される（脱保護ステップ；３０９）。第１のサイクルについて上に記載されるように、これは様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、連結工程（９）の前に、方法の工程（８）として行われるであろう。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（９）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。

【0400】

次のサイクル（３０９）およびその後のサイクルにおける可逆的ターミネーター基の脱

保護は、第1の合成サイクルに関して上に記載されるように行われ得る。

【0401】

次のサイクルの工程(9)において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される(310)。次の合成サイクルおよびその後の合成サイクルの工程(9)の連結ポリヌクレオチドが構成される場合があり、連結工程は、第1の合成サイクルの工程(5)について上に記載されるように行われ得る。

【0402】

合成サイクルは、上に記載されるように、所定のヌクレオチド配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するのに必要な回数だけ繰り返される。

【0403】

合成方法のバージョン4

本発明の合成方法の第4の例示的なバージョンは、所与の合成サイクルにおいて組み込まれる新たなヌクレオチドによって占められる位置に対する、かつニックおよび切断部位に対するユニバーサルヌクレオチドの位置付けのための修飾された構造配置を除いて、第1のバージョンと類似の内容で行われる。

【0404】

したがって、バージョン1のように、バージョン4では、足場ポリヌクレオチドの切断(工程2、402)は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断は、突出のない、切断部位での平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドをもたらす。

【0405】

方法の工程(3)において、所定のヌクレオチド配列中の第1のヌクレオチドは、ポリメラーゼまたは末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素などのトランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によって合成鎖のプライマー鎖部分の末端に付加される(403)。第1のヌクレオチドには、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基が提供される。したがって、工程(3)において、一塩基のみが組み込まれる。

【0406】

方法の工程(4)において、脱保護工程が行われ(404)、新たに組み込まれたヌクレオチドからターミネーター基が除去される。原則として、脱保護工程は、連結工程(5)の後に行われ得る。工程(4)としての脱保護工程の実施が好ましい。

【0407】

方法の工程(5)において、連結ポリヌクレオチド(図4の上部の左上に示される構造を参照されたい)は、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される。連結は、パートナーヌクレオチドを足場ポリヌクレオチドへ組み込み、新たに組み込まれたヌクレオチドがパートナーヌクレオチドと対合することを可能にし(図4の工程5; 405)、これにより合成サイクルを完了させる。

【0408】

本発明の合成方法の第4の例示的なバージョンでは、足場ポリヌクレオチドは、上に記載されるように工程(1)で提供される(401)。この方法では、足場ポリヌクレオチドの支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去される2つの位置(図4の工程(1)に示される構造中に「K」と標識される)であるヌクレオチドと反対に位置付けられ(図4の構造中に「X」と標識される)、それと対合される。

【0409】

方法の工程(2)において、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される(402)。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断(工程2)は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。

【0410】

この例示的な方法では、合成鎖にすでに一本鎖切断または「ニック」が提供されており、したがって足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断を提供するためには支持鎖の切断のみが必要である。

【0411】

この例示的な方法のバージョンでは、切断により、突出のない平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドが生成される。

【0412】

この方法では、ユニバーサルヌクレオチドは、切断工程の前に支持鎖における位置「 $n+2$ 」を占める。ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置 $n+2$ を占めるときにそのような平滑末端で切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを得るために、支持鎖は、ユニバーサルヌクレオチドに対して、かつニック部位に対して特定の位置で切断される。足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0413】

「 n 」とは、その合成サイクルにおける切断された合成鎖の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。したがって、切断工程では、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n+2$ にあり、これは一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから2つの位置が除去されたヌクレオチドと反対である（図4の工程（2）で位置「X」と示される）。

【0414】

工程（1）および（2）で、その合成サイクルに組み込まれた所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう位置は、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから2つの位置が除去されたヌクレオチドに対応する（図4の工程（2）で、位置「X」で示される）。

【0415】

「 $n+1$ 」とは、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図4の工程（1）および（2）で概略的に示されるように、プライマー鎖に対する遠位方向において、位置 n で「J」と標識された位置の隣の位置を占める、位置 $n+1$ で「H」と標識されたヌクレオチド）。 $n+1$ はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（図4の工程（1）および（2）で、位置 $n+1$ で「I」と標識される）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置 $n+1$ は、ニック部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドによって占められる位置の反対にある。

【0416】

「 $n-1$ 」とは、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図4の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置 $n-1$ で「L」と標識された位置）。 $n-1$ はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（すなわち、図4の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置 $n-1$ で「M」と標識された位置）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置 $n-1$ は、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドによって占められている位置と反対である。したがって、図4の工程（1）および（2）では、位置「J」および「K」のヌクレオチドが位置 n を占める。

【0417】

バージョン4による方法では、位置HおよびI、JおよびK、ならびにLおよびMを占

10

20

30

40

50

めるヌクレオチド対は、任意のヌクレオチド対であり得る。

【0418】

ヌクレオチド位置 n と $n-1$ の間の支持鎖の切断時に、ユニバーサルヌクレオチド、ヘルパー鎖（存在する場合）、およびヘルパー鎖とハイブリダイズされるまたはハイブリダイズされた支持鎖の部分は、残りの切断された足場ポリヌクレオチドから除去される（図4の上部の右上に示される構造を参照されたい）。

【0419】

リン酸基は、切断部位で切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドに付着し続けるべきである（図4の下部の中央に示される構造に示されるように）。これにより、連結工程において、連結ポリヌクレオチドの支持鎖を切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖に確実に連結することができる。

10

【0420】

したがって、方法のバージョン4では、ユニバーサルヌクレオチドは、工程（1）および（2）で支持鎖における位置 $n+2$ を占め、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0421】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間のホスホジエステル結合（ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、ユニバーサルヌクレオチドの位置に対する支持鎖の第3のホスホジエステル結合）の切断によって切断される。

20

【0422】

支持鎖は、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間のホスホジエステル結合の一方のエステル結合の切断によって切断され得る。

【0423】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 n に対する第1のエステル結合の切断によって切断される。これは、切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖上の切断位置で末端リン酸基を保持する効果を有するであろう。

【0424】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 $n+2$ を占める場合、任意の好適な機構を用いて、ヌクレオチド位置 n と $n-1$ の間の支持鎖の切断をもたらす得る。

30

【0425】

上記に記載されるようなヌクレオチド位置 n と $n-1$ との間の支持鎖の切断は、酵素の作用によって行われ得る。

【0426】

本発明のこの例示的な方法のバージョンでは、全てのバージョンと同様に、隣のヌクレオチドを次の合成サイクルに組み込むことを可能にするために、可逆的ターミネーター基を第1のヌクレオチドから除去しなければならない（脱保護工程；404）。これは、第1のサイクルの様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、図4の工程4に示されるように、連結工程（5）の前に、方法の工程（4）として行われるであろう（404）。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（5）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。どの段階で脱保護工程が行われるかにかかわらず、第1のヌクレオチドの多重組み込みを防止するために、酵素および残りの組み込まれていない第1のヌクレオチドが最初に除去されるべきである。酵素および組み込まれていない第1のヌクレオチドは、好ましくは、連結工程（工程（5））の前に除去される。

40

【0427】

第1のヌクレオチドからの可逆的ターミネーター基の除去は、任意の好適な手段によって行われ得る。例えば、除去は、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）などの化学物質の使用によって行われ得る。

【0428】

50

方法の工程（５）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（４０５）。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖およびヘルパー鎖を含む。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖にユニバーサルヌクレオチドと、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドを突出する単一の突出ヌクレオチドとを含む相補的連結末端をさらに含む。突出ヌクレオチドは、所定の配列の第１のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドである。連結ポリヌクレオチドは、突出に隣接するヘルパー鎖中に別のポリヌクレオチド鎖に連結することができないように構成された末端ヌクレオチドをさらに含む（図４の上部の左上に示される構造において「Ｋ」と標識された位置）。典型的には、この末端ヌクレオチドは、リン酸基を欠いているであろう。典型的には、上に記載されるように、ヘルパー鎖のこの非リン酸化末端ヌクレオチドは、ヘルパー鎖の５'末端を定義するであろう。

10

【０４２９】

連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから２つの位置が除去されたヌクレオチドと反対に位置付けられ（ $n+3$ ）（図４の工程（５）で「Ｘ」と標識された位置）、それと対合される。所定の配列の第１のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドは、連結ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドとしての位置（位置 n ）を占める。連結ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドから１つの位置が除去されたヌクレオチドは、位置 $n+1$ で、図４の工程（５）で「Ｊ」と標識される。連結ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドから２つの位置が除去されたヌクレオチドは、位置 $n+2$ で、図４の工程（５）で「Ｈ」と標識される。

20

【０４３０】

相補的連結末端は、好適な連結条件に供されたときに、それが組み込み工程（３）後に切断された足場ポリヌクレオチド生産物の突出末端と適合的に接合するように構成される。支持鎖の連結時に、第１のヌクレオチドはそのパートナーヌクレオチドと対合される。

【０４３１】

支持鎖の連結は、任意の好適な手段によって行われ得る。連結は、合成鎖中、すなわちプライマー鎖部分中の第１のヌクレオチドと、第１のヌクレオチドに隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドとの間の一本鎖切断を維持しながら、支持鎖のみの接合をもたらすであろう。

【０４３２】

連結は、典型的には、リガーゼ活性を有する酵素によって行われ得る。例えば、連結は、 $T3$ DNAリガーゼまたは $T4$ DNAリガーゼまたはその機能的バリエーションもしくは等価物を用いて行われ得る。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドは、例えば、末端リン酸基がないために、リガーゼに対する基質として作用することができないように提供されるため、そのような酵素の使用は、合成鎖における一本鎖切断の維持をもたらすであろう。

30

【０４３３】

切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結は、第１の合成サイクルを完了し、そのときに、所定のヌクレオチド配列の第１のヌクレオチドがそのパートナーヌクレオチドと反対の足場ポリヌクレオチドに組み込まれることを除いて、工程（１）の足場ポリヌクレオチドが効果的に再構築される。

40

【０４３４】

この例示的な方法（３０５）の工程（５）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから２つの位置が除去されたヌクレオチドと反対に位置付けられる（図４の工程（５）で、位置「Ｘ」で示される）。連結ポリヌクレオチドの文脈において、ユニバーサルヌクレオチドは、位置 $n+3$ 、および支持鎖の末端ヌクレオチドから除去される３つの位置（位置 n ）に位置付けられることに留意されたい。連結ポリヌクレオチドの文脈における位置 n は、工程（１）および（２）での足場ポリヌクレオチドの文脈において上に記載されるのと同じ意味を有する。したがって、工程（５）において、「 n 」とは、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付

50

加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。

【0435】

工程（1）および（2）（図4の401および402）の間、ユニバーサルヌクレオチドが足場ポリヌクレオチドにおける位置 $n+2$ を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクル（図4の405）において連結ポリヌクレオチドの位置 $n+3$ を占めることに留意されたい。これは、工程（5）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（5）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+3$ となり、 $n+2$ から移動し、工程（1）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（5）の生産物（図4で「連結生産物」と標識された構造）は、次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクル（406）で使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+3$ （405）ではなく、ここでも位置 $n+2$ （406）と呼ばれることが理解されるべきである。したがって、方法のバージョン4では、任意の所与の合成サイクル（401、406など）の開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、常に位置 $n+2$ と呼ばれ、そのサイクルに新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に位置 n と呼ばれる位置を占める。

【0436】

第1の合成サイクルの完了後、第2のサイクルおよびその後のサイクルは、同じ方法の工程を使用して行われる。

【0437】

方法のバージョン4の第1の合成サイクルの工程（2）と同様に、工程（6）では、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（407）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断により、切断の直前に存在する場合、ユニバーサルヌクレオチドと支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む支持鎖の除去がもたらされる。

【0438】

切断工程は、第1のサイクルの工程（2）について上に記載されるように行われ得る。

【0439】

工程（7）では、隣のヌクレオチドは、第1のサイクルの工程（3）のように、合成鎖の切断されたプライマー鎖部分の末端に付加される。

【0440】

工程（8）では、可逆的ターミネーター基は、隣のヌクレオチドから除去される（脱保護ステップ；409）。第1のサイクルについて上に記載されるように、これは様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、連結工程（9）の前に、方法の工程（8）として行われるであろう。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（9）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。

【0441】

次のサイクル（409）およびその後のサイクルにおける可逆的ターミネーター基の脱

保護は、第1の合成サイクルに関して上に記載されるように行われ得る。

【0442】

次のサイクルの工程（9）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（410）。次の合成サイクルおよびその後の合成サイクルの工程（9）の連結ポリヌクレオチドが構成される場合があり、連結工程は、第1の合成サイクルの工程（5）について上に記載されるように行われ得る。

【0443】

合成サイクルは、上に記載されるように、所定のヌクレオチド配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するのに必要な回数だけ繰り返される。

【0444】

合成方法のバージョン4に基づく変形例の方法

合成方法のバージョン4は、合成方法のバージョン2の変形例であることが理解される。両方の方法は、位置 n と $n-1$ との間の足場ポリヌクレオチドの支持鎖の切断を必要とする。第1および第2のサイクルの切断工程（工程2および6）の前およびその切断工程でのバージョン2において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+1$ を占める。第1および第2のサイクルの切断工程（工程2および6）の前およびその切断工程でのバージョン4とは対照的に、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+2$ を占める。したがって、合成方法のバージョン4は、合成方法のバージョン4において、ユニバーサルヌクレオチドが、プライマー鎖部分に対する遠位方向において位置 n からさらに除去された1つの位置を占めることを除いて、合成方法のバージョン2と同じである。

【0445】

合成方法のバージョン4のさらなる変形例が想定され、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断され、各さらなる変形例の方法において、ユニバーサルヌクレオチドは、プライマー鎖部分に対する遠位方向において位置 n からさらに除去された1つの位置を徐々に占め、位置 $n+3$ で始まり、式 $n+3+x$ に従って徐々に増加し、 x は1~10以上の整数である。

【0446】

したがって、合成方法のバージョン4の「 $n+3$ 」の変形例が提供され、方法は、以下の変形例を除いて、上に記載される合成方法のバージョン4と同じ方法で行われる。

【0447】

第1サイクルの切断工程（工程1および2）の前およびその切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+3$ を占め、 $n+3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第3のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0448】

第1のサイクルの連結工程（工程5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、支持鎖における位置 $n+4$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された3つの位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n+4$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置4である。

【0449】

第2のサイクルの切断工程（工程5および6）の前およびその切断工程において、ならびに全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n+3$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【0450】

最後に、第2のサイクルの連結工程（工程9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドは、

10

20

30

40

50

支持鎖における位置 $n + 4$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去されたヌクレオチドと対合するように構造化される。

【0451】

上に記載される「 $n + 3$ 」の方法に加えて、合成方法のバージョン 4 の「 $n + 3 + x$ 」の変形例が提供され、方法は、以下の変形例を除いて、上に記載される合成方法のバージョン 4 と同じ方法で行われる。

【0452】

第 1 サイクルの切断工程（工程 1 および 2）の前およびその切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、 $n + 3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第 3 のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断される。

【0453】

第 1 のサイクルの連結工程（工程 5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $3 + x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置 4 である。

【0454】

第 2 のサイクルの切断工程（工程 6）の前およびその切断工程において、ならびに全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n + 3 + x$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

【0455】

最後に、第 2 のサイクルの連結工程（工程 9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化される。

【0456】

これらの方法の全てにおいて、 x は、1 ～ 10 以上の間の整数であり、 x は、工程（1）、（2）、（5）、（6）、および（9）で同じ整数である。

【0457】

合成方法のバージョン 4 と同様に、バージョン 4 に基づく変形例の方法では、ユニバーサルヌクレオチドが工程（1）および（2）の間、足場ポリヌクレオチドにおける位置 $n + 3$ （または特定の変形例の方法によっては $n + 3 + x$ ）を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクルにおいて連結ポリヌクレオチドにおける位置 $n + 4$ （または特定の変形例の方法によっては $n + 4 + x$ ）を占める。これは、工程（5）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（5）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n + 4$ （または $n + 4 + x$ ）となり、 $n + 3$ （または相応して、 $n + 3 + x$ から）から移動し、工程（1）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（5）の生産物（図 4 で「連結生産物」と標識された構造に対応する）は、次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n + 4$ （または $n + 4 + x$ ）（405 を参照

10

20

30

40

50

されたい)ではなく、ここでも位置 $n + 3$ (または $n + 3 + x$) (406を参照されたい)と呼ばれる。したがって、合成方法のバージョン4の変形例では、任意の所与の合成サイクルの開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置(401、406などを参照されたい)は、常に位置 $n + 3$ (または x が1~10以上の整数である、特定の変形例の方法に応じて $n + 3 + x$)であり、そのサイクルで新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に n と呼ばれる位置を占める。

【0458】

合成方法のバージョン5

本発明の合成方法の第5の例示的なバージョンは、所与の合成サイクルにおいて組み込まれる新たなヌクレオチドによって占められる位置に対する、かつニックおよび切断部位に対するユニバーサルヌクレオチドの位置付けのための修飾された構造配置を除いて、第1のバージョンと類似の内容で行われる。

【0459】

したがって、バージョン1のように、バージョン5では、足場ポリヌクレオチドの切断(工程2、502)は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断は、切断部位で一塩基突出を有する切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドをもたらす。

【0460】

方法の工程(3)において、所定のヌクレオチド配列中の第1のヌクレオチドは、ポリメラーゼまたは末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ酵素などのトランスフェラーゼ活性を有する酵素の作用によって合成鎖のプライマー鎖部分の末端に付加される(503)。第1のヌクレオチドには、酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基が提供される。したがって、工程(3)において、一塩基のみが組み込まれる。

【0461】

方法の工程(4)において、脱保護工程が行われ(504)、新たに組み込まれたヌクレオチドからターミネーター基が除去される。原則として、脱保護工程は、連結工程(5)の後に行われ得る。工程(4)としての脱保護工程の実施が好ましい。

【0462】

方法の工程(5)において、連結ポリヌクレオチド(図5の上部の左上に示される構造を参照されたい)は、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される。連結は、パートナーヌクレオチドを足場ポリヌクレオチドへ組み込み、新たに組み込まれたヌクレオチドがパートナーヌクレオチドと対合することを可能にし(図5の工程5; 505)、これにより合成サイクルを完了させる。

【0463】

本発明の合成方法の第5の例示的なバージョンでは、足場ポリヌクレオチドは、上に記載されるように工程(1)で提供される(501)。この方法では、足場ポリヌクレオチドの支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、反対に位置付けられ、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドであるヌクレオチド(図5の工程(1)の構造中に「X」と標識される)と対合される。

【0464】

方法の工程(2)において、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される(502)。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は、足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断(工程2)は、切断の直前に存在する場合、ヘルパー鎖の喪失、およびユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖の喪失をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。

【0465】

この例示的な方法では、合成鎖にすでに一本鎖切断または「ニック」が提供されており、したがって足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断を提供するためには支持鎖の切断のみが必要である。

【0466】

この例示的な方法のバージョンでは、切断により、一塩基突出を有する切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドが生成される。したがって、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドは、支持鎖の末端ヌクレオチドに突出する。

【0467】

この方法では、ユニバーサルヌクレオチドは、切断工程の前に支持鎖における位置「 $n + 1$ 」を占める。ユニバーサルヌクレオチドが支持鎖における位置 $n + 1$ を占めるときに、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドが、支持鎖の末端ヌクレオチドに突出する、そのような切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを得るために、支持鎖は、ユニバーサルヌクレオチドおよびニック部位に対する特定の位置で切断される。足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、ヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断される。

【0468】

「 n 」とは、その合成サイクルにおける切断された合成鎖の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加時に、所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。したがって、切断工程では、ユニバーサルヌクレオチドは、支持鎖における位置 $n + 1$ にあり、これは一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと反対である（図5の工程（2）で、位置「X」で示される）。

【0469】

工程（1）および（2）で、その合成サイクルに組み込まれた所定の配列のヌクレオチドによって占められるであろう位置は、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドに対応する（図5の工程（2）で、位置「X」で示される）。

【0470】

「 $n + 1$ 」とは、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図5の工程（1）および（2）で概略的に示されるように、プライマー鎖に対する遠位方向において、位置 n で「H」と標識された位置の隣の位置を占める、位置 $n + 1$ で「 U_n 」と標識されたヌクレオチド）。 $n + 1$ はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（図5の工程（1）および（2）で、位置 $n + 1$ で「X」と標識される）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置 $n + 1$ は、ニック部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドによって占められる位置の反対にある。

【0471】

「 $n - 1$ 」とは、ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、位置 n に対する支持鎖における隣のヌクレオチド位置を意味する（図5の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置 $n - 1$ で「J」と標識された位置）。 $n - 1$ はまた、合成鎖における対応する位置を指し得る（すなわち、図5の工程（1）および（2）に概略的に示されるように、位置 $n - 1$ で「K」と標識された位置）。したがって、切断工程では、支持鎖における位置 $n - 1$ は、合成鎖のプライマー鎖部分の末端ヌクレオチドによって占められている位置と反対である。したがって、図5の工程（1）および（2）では、位置「L」および「M」のヌクレオチドが位置 $n - 2$ を占める。

【0472】

バージョン5による方法では、位置HおよびI、JおよびK、ならびにLおよびMを占めるヌクレオチド対は、任意のヌクレオチド対であり得る。

【0473】

ヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間の支持鎖の切断時に、ユニバーサルヌクレオチ

ド、ヘルパー鎖（存在する場合）、およびヘルパー鎖とハイブリダイズされるまたはハイブリダイズされた支持鎖の部分は、残りの切断された足場ポリヌクレオチドから除去される（図5の上部の右上に示される構造を参照されたい）。

【0474】

リン酸基は、切断部位で切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドに付着し続けるべきである（図5の下部の中央に示される構造に示されるように）。これにより、連結工程において、連結ポリヌクレオチドの支持鎖を切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖に確実に連結することができる。

【0475】

したがって、方法のバージョン5では、ユニバーサルヌクレオチドは、工程（1）および（2）で支持鎖における位置 $n + 1$ を占め、支持鎖は、ヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間で切断される。

【0476】

好ましくは、支持鎖は、ヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間のホスホジエステル結合（ヘルパー鎖に対する遠位方向／プライマー鎖に対する近位方向において、ユニバーサルヌクレオチドの位置に対する支持鎖の第3のホスホジエステル結合）の切断によって切断される。

【0477】

支持鎖は、ヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間のホスホジエステル結合の一方のエステル結合の切断によって切断され得る。

【0478】

好ましくは、支持鎖はヌクレオチド位置 $n - 1$ に対する第1のエステル結合の切断により切断される。これは、切断された足場ポリヌクレオチドの支持鎖上の切断位置で末端リン酸基を保持する効果を有するであろう。

【0479】

ユニバーサルヌクレオチドが位置 $n + 1$ を占める場合、任意の好適な機構を用いて、ヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間の支持鎖の切断をもたらす得る。

【0480】

上に記載されるようなヌクレオチド位置 $n - 1$ と $n - 2$ との間の支持鎖の切断は、酵素の作用によって行われ得る。

【0481】

本発明のこの例示的な方法のバージョンでは、全てのバージョンと同様に、隣のヌクレオチドを次の合成サイクルに組み込むことを可能にするために、可逆的ターミネーター基を第1のヌクレオチドから除去しなければならない（脱保護工程；504）。これは、第1のサイクルの様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、図5の工程4に示されるように、連結工程（5）の前に、方法の工程（4）として行われるであろう（504）。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（5）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。どの段階で脱保護工程が行われるかにかかわらず、第1のヌクレオチドの多重組み込みを防止するために、酵素および残りの組み込まれていない第1のヌクレオチドが最初に除去されるべきである。酵素および組み込まれていない第1のヌクレオチドは、好ましくは、連結工程（工程（5））の前に除去される。

【0482】

第1のヌクレオチドからの可逆的ターミネーター基の除去は、任意の好適な手段によって行われ得る。例えば、除去は、トリス（カルボキシエチル）ホスフィン（TCPEP）などの化学物質の使用によって行われ得る。

【0483】

方法の工程（5）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（505）。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖およびヘルパー鎖を含む。連結ポリヌクレオチドは、支持鎖にユニバーサルヌクレオチドと、ヘルパー鎖の末

10

20

30

40

50

端ヌクレオチドを突出する2つの突出ヌクレオチドとを含む相補的連結末端をさらに含む。相補的連結末端の連結ポリヌクレオチドの支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドは、所定の配列の第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドである。連結ポリヌクレオチドは、突出に隣接するヘルパー鎖中に別のポリヌクレオチド鎖に連結することができないように構成された末端ヌクレオチドをさらに含む（図5の上部の左上に示される構造において「I」と標識された位置）。典型的には、この末端ヌクレオチドは、リン酸基を欠いているであろう。典型的には、上に記載されるように、ヘルパー鎖のこの非リン酸化末端ヌクレオチドは、ヘルパー鎖の5'末端を定義するであろう。

【0484】

連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドであるヌクレオチドと反対に位置付けられ（ $n+2$ ）（図5の工程（5）で「X」と標識された位置）、それと対合される。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチド（図5の工程（5）で「I」と標識された位置）は、位置 $n+1$ を占め、支持鎖における「H」と標識された位置でヌクレオチドと対合されて示され、またそれは位置 $n+1$ である。所定の配列の第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドは、位置 n で、連結ポリヌクレオチドの支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドとしての位置を占める。最後に、連結ポリヌクレオチドの支持鎖の末端ヌクレオチドは、位置 $n-1$ で、図5の工程（5）で「J」と標識される。

【0485】

相補的連結末端は、好適な連結条件に供されたときに、それが組み込み工程（3）後に切断された足場ポリヌクレオチド生産物の突出末端と適合的に接合するように構成される。支持鎖の連結時に、第1のヌクレオチドはそのパートナーヌクレオチドと対合される。

【0486】

支持鎖の連結は、任意の好適な手段によって行われ得る。連結は、合成鎖中、すなわちプライマー鎖部分中の第1のヌクレオチドと、第1のヌクレオチドに隣接するヘルパー鎖の末端ヌクレオチドとの間の一本鎖切断を維持しながら、支持鎖のみの接合をもたらすであろう。

【0487】

連結は、典型的には、リガーゼ活性を有する酵素によって行われ得る。例えば、連結は、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼまたはその機能的バリエーションもしくは等価物を用いて行われ得る。ヘルパー鎖の末端ヌクレオチドは、例えば、末端リン酸基がないために、リガーゼに対する基質として作用することができないように提供されるため、そのような酵素の使用は、合成鎖における一本鎖切断の維持をもたらすであろう。

【0488】

切断された足場ポリヌクレオチドへの連結ポリヌクレオチドの連結は、第1の合成サイクルを完了し、そのときに、所定のヌクレオチド配列の第1のヌクレオチドがそのパートナーヌクレオチドと反対の足場ポリヌクレオチドに組み込まれることを除いて、工程（1）の足場ポリヌクレオチドが効果的に再構築される。

【0489】

この例示的な方法（505）の工程（5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端では、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドは、一本鎖切断部位に隣接するヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドであるヌクレオチドと反対に位置付けられる（図5の工程（5）で、位置「X」で示される）。連結ポリヌクレオチドの文脈において、ユニバーサルヌクレオチドは、位置 $n+2$ 、および支持鎖の末端ヌクレオチドから除去される3つの位置（位置 $n-1$ ）に位置付けられることに留意されたい。連結ポリヌクレオチドの文脈における位置 n は、工程（1）および（2）での足場ポリヌクレオチドの文脈において上に記載されるのと同じ意味を有する。したがって、工程（5）において、「 n 」とは、連結後、その合成サイクルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖における位置と反対である支持鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。「 n 」とはまた、連結後、その合成サイ

10

20

30

40

50

クルにおける合成鎖のプライマー鎖部分の末端へのその付加後に、所定の配列のヌクレオチドによってここで占められる合成鎖におけるヌクレオチド位置を意味する。

【0490】

工程（１）および（２）（図５の５０１および５０２）の間、ユニバーサルヌクレオチドは足場ポリヌクレオチドの位置 $n+1$ を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクル（図５の５０５）において連結ポリヌクレオチドの位置 $n+2$ を占めることに留意されたい。これは、工程（５）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（５）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+2$ となり、 $n+1$ から移動し、工程（１）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（５）の生産物（図５で「連結生産物」と標識された構造）は、次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクル（５０６）で使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n+2$ （５０５）ではなく、ここでも位置 $n+1$ （５０６）と呼ばれることが理解されるべきである。したがって、方法のバージョン５では、任意の所与の合成サイクル（５０１、５０６など）の開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、常に位置 $n+1$ と呼ばれ、そのサイクルに新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に位置 n と呼ばれる位置を占める。

【0491】

第１の合成サイクルの完了後、第２のサイクルおよびその後のサイクルは、同じ方法の工程を使用して行われる。

【0492】

方法のバージョン５の第１の合成サイクルの工程（２）と同様に、工程（６）では、足場ポリヌクレオチドは、切断部位で切断される（５０７）。切断部位は、支持鎖中のユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義される。切断は足場ポリヌクレオチド中に二本鎖切断をもたらす。足場ポリヌクレオチドの切断は、切断部位に、切断前のニック部位を含んだ合成鎖の支持鎖の切断された末端およびプライマー鎖部分の末端を含む、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを所定の位置に残す。切断により、切断の直前に存在する場合、ユニバーサルヌクレオチドと支持鎖にハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含む支持鎖の除去がもたらされる。

【0493】

切断工程は、第１のサイクルの工程（２）について上に記載されるように行われ得る。

【0494】

工程（７）では、隣のヌクレオチドは、第１のサイクルの工程（３）のように、合成鎖の切断されたプライマー鎖部分の末端に付加される。

【0495】

工程（８）では、可逆的ターミネーター基は、隣のヌクレオチドから除去される（脱保護ステップ；５０９）。第１のサイクルについて上に記載されるように、これは様々な段階で行われ得る。典型的には、かつ好ましくは、それは、連結工程（９）の前に、方法の工程（８）として行われるであろう。しかしながら、脱保護工程は、連結工程（９）の後など、新たなヌクレオチドの組み込み後の任意の工程で行われ得る。

【0496】

次のサイクル（５０９）およびその後のサイクルにおける可逆的ターミネーター基の脱保護は、第１の合成サイクルに関して上に記載されるように行われ得る。

【0497】

次のサイクルの工程（９）において、二本鎖連結ポリヌクレオチドは、切断された足場ポリヌクレオチドに連結される（５１０）。次の合成サイクルおよびその後の合成サイクルの工程（９）の連結ポリヌクレオチドが構成される場合があり、連結工程は、第１の合成サイクルの工程（５）について上に記載されるように行われ得る。

【０４９８】

合成サイクルは、上に記載されるように、所定のヌクレオチド配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドを合成するのに必要な回数だけ繰り返される。

【０４９９】

合成法のバージョン５に基づく変形例の方法

合成方法のバージョン５は、合成方法のバージョン３の変形例であることが理解される。両方の方法は、位置 $n-1$ と $n-2$ との間の足場ポリヌクレオチドの支持鎖の切断を必要とする。第１および第２のサイクルの切断工程（工程２および６）の前およびその切断工程でのバージョン３において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 n を占める。第１および第２のサイクルの切断工程（工程２および６）の前およびその切断工程でのバージョン５とは対照的に、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+1$ を占める。したがって、合成方法のバージョン５は、合成方法のバージョン５において、ユニバーサルヌクレオチドが、プライマー鎖部分に対する遠位方向において位置 n からさらに除去されら１つの位置を占めることを除いて、合成方法のバージョン３と同じである。

【０５００】

合成方法のバージョン５のさらなる変形例が想定され、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、各さらなる変形例の方法において、ユニバーサルヌクレオチドは、プライマー鎖部分に対する遠位方向において位置 n からさらに除去された１つの位置を徐々に占め、位置 $n+2$ で始まり、式 $n+2+x$ に従って徐々に増加し、 x は $1 \sim 10$ 以上の整数である。

【０５０１】

したがって、合成方法のバージョン５の「 $n+2$ 」の変形例が提供され、方法は、以下の変形例を除いて、上に記載される合成方法のバージョン５と同じ方法で行われる。

【０５０２】

第１サイクルの切断工程（工程２）において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n+2$ を占め、 $n+2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第２のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【０５０３】

第１のサイクルの連結工程（工程５）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、支持鎖における位置 $n+3$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから２つの位置が除去されたヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n+3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置３である。

【０５０４】

第２のサイクルの切断工程（工程６）および全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n+2$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n-1$ との間で切断される。

【０５０５】

最後に、第２のサイクルの連結工程（工程９）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n+3$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから２つの位置が除去されたヌクレオチドと対合するように構造化される。

【０５０６】

10

20

30

40

50

上に記載される方法に加えて、合成方法のバージョン5の「 $n + 2 + x$ 」の変形例が提供され、方法は、以下の変形例を除いて、上に記載される合成方法のバージョン5と同じ方法で行われる。

【0507】

第1サイクルの切断工程（工程2）において、ユニバーサルヌクレオチドは代わりに、足場ポリヌクレオチドの支持鎖における位置 $n + 2 + x$ を占め、 $n + 2$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する支持鎖における第2のヌクレオチド位置であり、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断される。

【0508】

第1のサイクルの連結工程（工程5）において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 3$ は、ヘルパー鎖に対する近位方向／プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して支持鎖における位置3である。

【0509】

第2のサイクルの切断工程（工程6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、ユニバーサルヌクレオチドは、足場ポリヌクレオチドの支持鎖の位置 $n + 2 + x$ を占め、足場ポリヌクレオチドの支持鎖は、位置 n と $n - 1$ との間で切断される。

【0510】

最後に、第2のサイクルの連結工程（工程9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、連結ポリヌクレオチドの相補的連結末端は、ユニバーサルヌクレオチドが、支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、相補的連結末端でヘルパー鎖の末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置であるヌクレオチドと対合するように構造化される。

【0511】

これらの方法の全てにおいて、 x は、1～10以上の間の整数であり、 x は、工程（2）、（5）、（6）、および（9）で同じ整数である。

【0512】

合成方法のバージョン5と同様に、バージョン5に基づく変形例の方法では、ユニバーサルヌクレオチドが工程（1）および（2）の間、足場ポリヌクレオチドにおける位置 $n + 2$ （または特定の変形例の方法によっては $n + 2 + x$ ）を占めるのに対し、ユニバーサルヌクレオチドは、同じ合成サイクルにおいて連結ポリヌクレオチドにおける位置 $n + 3$ （または特定の変形例の方法によっては $n + 3 + x$ ）を占める。これは、工程（5）で、切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドに、その合成サイクルでのその付加に続いて、所定の配列のヌクレオチドがここで提供され、連結ポリヌクレオチドに、所定の配列のヌクレオチドとパートナーを組むヌクレオチドが提供されるためであり、さらに、本明細書で定義されるように、「 n 」は常に、そのサイクルに組み込まれる所定の配列のヌクレオチドによって占められる（または占められることになる）合成鎖のヌクレオチド位置を指すか、または支持鎖におけるその反対のヌクレオチド位置を指すためである。したがって、任意の所与の合成サイクルの終了時に、連結工程（5）の直後に、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n + 3$ （または $n + 3 + x$ ）となり、 $n + 2$ （または相応して、 $n + 2 + x$ から）から移動し、工程（1）でユニバーサルヌクレオチドが占める位置となる。連結工程（5）の生産物（図5で「連結生産物」と標識された構造に対応する）は、次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドとなる。連結生産物が次の合成サイクルで使用するための足場ポリヌクレオチドと見なされる場合、ユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置は、 $n + 3$ （または $n + 3 + x$ ）（505を参照されたい）ではなく、ここでも位置 $n + 2$ （または $n + 2 + x$ ）（506を参照されたい）と呼ばれる。したがって、合成方法のバージョン5の変形例では、任意の所与の合成サイクルの開始時にユニバーサルヌクレオチドによって占められる位置（501、506などを参照されたい）は、常に位置 $n + 2$ （または x が1～10以上の整数である、特定の

10

20

30

40

50

変形例の方法に応じて $n + 2 + x$) であり、そのサイクルで新たに組み込まれるヌクレオチドは、常に n と呼ばれる位置を占める。

【実施例】

【0513】

以下の実施例は、本発明によるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを合成するための方法、ならびにその方法において使用される例示的な構築物の支持を提供する。実施例は本発明を限定しない。

【0514】

実施例13以外に、以下の実施例は、本発明による合成方法に関連するが、その範囲内にはない反応スキームによる合成方法を説明する。

【0515】

実施例は、足場ポリヌクレオチドの合成鎖への所定の配列のヌクレオチドの付加、ユニバーサルヌクレオチドによって定義される切断部位での足場ポリヌクレオチドの切断、ならびに所定の配列の付加されたヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および次の合成サイクルで使用するための切断部位の作成に使用するための新たなユニバーサルヌクレオチドを含む連結ポリヌクレオチドの連結の工程を含む合成反応を行う能力を示す。本発明の方法は、これらの工程を修正された内容で組み込む。したがって、実施例13以外に、以下の実施例は、本明細書で定義される本発明の方法の例示的な支持を提供する。実施例13は、本発明の方法、例えば、本発明の合成方法のバージョン1、2、および4（それぞれ図1、2、および4）による組み込み工程を使用した、Terminator X DNAポリメラーゼによる3'-O修飾-dNTPの組み込みに関するデータを提供する。

【0516】

以下の実施例および対応する図12～50では、合成方法の「バージョン1、2、および3」または「バージョン1、2、または3の化学」などへの言及は、それぞれ図6、7、および8に記載される反応の概略図に従って解釈されるべきであり、図1～5のうちのいずれかに示される反応の概略図または本明細書の同じ説明には従わない。実施例13および図51は、本発明の合成方法に従って解釈されるべきである。特に、本発明1、2、および4の合成方法ならびに図1、2、および4に示される関連する反応の概略図、より具体的には、そのような方法の組み込み工程3による。

【0517】

実施例1. ヘルパー鎖の不在下での合成。

この実施例は、4つの工程：部分二本鎖DNA上への3'-O修飾dNTPの組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、第1の工程は、ユニバーサルヌクレオチド、この特定の場合はイノシンと反対で起こる。

【0518】

工程1：組み込み

第1の工程は、DNAポリメラーゼによる酵素的組み込みによるオリゴヌクレオチドへの3'-O保護一塩基の制御された付加を記載する（図12a）。

【0519】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis, Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開：J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

10

20

30

40

50

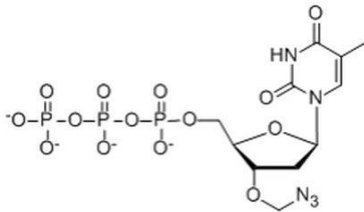
2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した(図12h)。原液を100 μMの濃度で調製した。

3. 3'-O-修飾dNTPを組み込む能力が増強された、New England Bio Labsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼを使用した。しかしながら、修飾dNTPを組み込むことができる任意のDNAポリメラーゼを使用することができる。

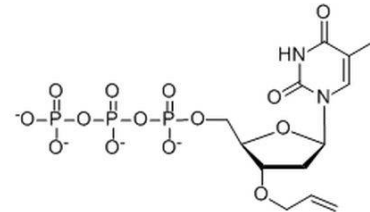
2種類の可逆的ターミネーターを試験した。

【化33】

3'-O-アジドメチル-dTTP:



3'-O-アリル-dTTP:



10

【0520】

方法

1. 2 μlの10×Thermopol (登録商標) 緩衝液(20mMのトリス-HCl、10mMの(NH₄)₂SO₄、10mMのKCl、2mMのMgSO₄、0.1%のTriton (登録商標) X-100、pH8.8、New England Bio Labs)を、1.5mlのエッペンドルフチューブ中の12.25 μlの滅菌脱イオン水(ELGA VEOLIA)と混合した。

20

2. 0.5 μlの10 μMプライマー(合成鎖)(5 pmol、1当量)(配列番号1、図12h)および0.75 μlの10 μM鋳型(支持鎖)(6 pmol、1.5当量)(配列番号2、図12h)を反応混合物に加えた。

3. 3'-O-修飾-dTTP(2 μlの100 μM)およびMnCl₂(1 μlの40 mM)を加えた。

4. 次に、1.5 μlのTherminator IX DNAポリメラーゼ(15 U、New England Bio Labs)を加えた。しかしながら、修飾dNTPを組み込むことができる任意のDNAポリメラーゼを使用することができる。

30

5. 反応物を65℃で20分間インキュベートした。

6. TBE-尿素試料緩衝液(Novex)を加えて反応を停止させた。

7. 反応物を、TBE緩衝液を含むポリアクリルアミドゲル(15%)上で分離し、Chemidoc MP撮像システム(BioRad)によって可視化した。

【0521】

ゲル電気泳動およびDNAの可視化

1. 5 μlの反応混合物を滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブ中の5 μlのTBE-尿素試料緩衝液(Novex)に加え、熱サーモミキサー(エッペンドルフ)を使用して5分間95℃まで加熱した。

40

2. 次に、5 μlの試料を、予熱した1×TBE緩衝液Thermo Scientific(89mMのトリス、89mMのホウ酸、および2mMのEDTA)を含んだ15%のTBE-尿素ゲル1.0mm×10ウェル(Invitrogen)のウェルに入れた。

3. X-cell sure lockモジュール(Novex)を適所に固定し、以下の条件、室温で40分間、260V、90Aで電気泳動を行った。

4. ゲルを、Cy3 LEDを使用してChemidoc MP(BioRad)によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0プラットフォーム上で実施した。

【0522】

50

結果

New England BioLabs製のカスタマイズされて操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼは、ユニバーサルヌクレオチド、例えばノシンと反対に3'-O-修飾-dNTPを組み込むことができる効率的なDNAポリメラーゼである(図12b~c)。

イノシンと反対の効率的な組み込みは、65℃の温度で起こった(図12d~e)。

イノシンと反対の3'-O-修飾-dTTPの組み込みは、 Mn^{2+} イオンの存在を必要とする(図12f~g)。成功した転化は、図12c、e、g、およびhにおいて太字でマークされている。

【0523】

結論

イノシンと反対の3'-O-修飾-dTTPの組み込みは、 Mn^{2+} イオンの存在下で65℃の温度で、New England BioLabs製のカスタマイズされて操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼを使用して特に高い効率で達成され得る。

【0524】

工程2：切断

第2の工程は、hAAG/Endo VIIIIまたはhAAG/化学塩基のいずれかによるポリヌクレオチドの2工程切断を記載する(図13a)。

【0525】

材料および方法

材料

1. 実施例1で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrichによって合成した(配列については図13(e)の表を参照されたい)。

2. 滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を使用して、オリゴヌクレオチドを100 μ Mのストック濃度に希釈した。

【0526】

方法

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の切断反応を実施した。

1. ピペット(Gilson)を使用して、41 μ Lの滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を1.5mLのエッペンドルフチューブに移した。

2. 次に、5 μ Lの10×ThermoPol(登録商標)反応緩衝液NEB(20mMのトリス-HCl、10mMの $(NH_4)_2SO_4$ 、10mMのKCl、2mMの $MgSO_4$ 、0.1%のTriton(登録商標)X-100、pH8.8)を同じエッペンドルフチューブに加えた。

3. 各1 μ Lのオリゴヌクレオチド(図13e)、鑄型(配列番号3)または任意の蛍光タグ付きの長オリゴ鎖、Tを有するプライマー(配列番号4)、および対照(配列番号5)を全て5 pmolで同じチューブに加えた。

4. 1 μ LのヒトアルキルアデニンDNAグリコシラーゼ(hAAG)NEB(10単位/ μ L)を同じチューブに加えた。

5. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000 rpmで遠心分離し、37℃で1時間インキュベートした。

6. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化(すなわち、65℃で20分間)によって反応を終了させた。

【0527】

周囲条件下での精製試料混合物を以下に概説されたプロトコルを使用して精製した。

1. 500 μ Lの緩衝液PNI QIAGEN(5Mの塩化グアニジニウム)を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

2. 混合物をQIAquickスピンカラム(QIAGEN)に移し、6000 rpmで1分間遠心分離した。

10

20

30

40

50

3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750 μ lの緩衝液PE QIAGEN (10 mMのトリス-HCl、pH 7.5および80%のエタノール)をスピнкаラムに加え、6000 rpmで1分間遠心分離した。
4. フロースルーを廃棄し、スピнкаラムを13000 rpmでさらに1分間遠心分離して、残留PE緩衝液を除去した。
5. 次に、スピнкаラムを滅菌1.5 mlのエッペンドルフチューブに入れた。
6. DNA溶出について、50 μ lの緩衝液EB QIAGEN (10 mMのトリス・CL、pH 8.5)をカラム膜の中央に加え、室温で1分間放置した。
7. 次に、チューブを13000 rpmで1分間遠心分離した。溶出したDNA濃度を測定し、その後の使用のために-20℃で保存した。

10

【0528】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2 μ lの滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を台座に加えることによって、NanoDrop one (Thermo Scientific)を平衡化した。
2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ(Whatman)を使用して、水をやさしく拭き取った。
3. 2 μ lの緩衝液EB QIAGEN (10 mMのトリス・CL、pH 8.5)を加えることによって、NanoDrop oneをブランクにした。ブランクの後に、工程2を繰り返した。
4. 2 μ lの試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA濃度を測定した。

20

【0529】

生成された脱塩基部位の切断を以下の手順を使用して実施した。

1. 2 μ l (10~100 ng/ μ l)のDNAを滅菌1.5 mlのエッペンドルフチューブに加えた。
2. 40 μ l (0.2 M)のNaOHまたは1.5 μ lのEndo VII NEB (10単位/ μ l)および5 μ lの10×反応緩衝液NEB (10 mMのトリス-HCl、75 mMのNaCl、1 mMのEDTA、25℃でpH 8)も同じチューブに加え、再懸濁して13000 rpmで5秒間遠心分離することによって穏やかに混合した。
3. 得られた混合物をNaOH処理試料について室温で5分間インキュベートし、その間にEndo VII反応混合物を37℃で1時間インキュベートした。
4. インキュベーション時間が経過した後、上記に概説されるような精製プロトコルの工程1~7を使用して、反応混合物を精製した。

30

【0530】

ゲル電気泳動およびDNAの可視化

1. 5 μ lのDNAおよびTBE-尿素試料緩衝液(Novex)を滅菌1.5 mlのエッペンドルフチューブに加え、熱サーモブロック(エッペンドルフ)を使用して2分間95℃まで加熱した。
2. 次に、DNA混合物を、予熱した1×TBE緩衝液Thermo Scientific (89 mMのトリス、89 mMのホウ酸、および2 mMのEDTA)を含んだ15%のTBE-尿素ゲル1.0 mm×10ウェル(Invitrogen)のウェルに入れた。
3. X-cell sure lockモジュール(Novex)を適所に固定し、以下の条件、室温で40分間、260 V、90 Aで電気泳動を行った。
4. ゲル中のDNAの検出および可視化は、Cy3 LEDを使用してChemidoc MP (BioRad)で実施した。可視化および分析は、Image Lab 2.0プラットフォーム上で実施した。

40

【0531】

結果および結論

ヘルパー鎖によらない切断反応は、約7%:93%の切断対未切断DNA比の低い収率パーセンテージを示した(図13b~d)。

50

切断結果は、この特定の実施例において、使用された特定の試薬に基づいて、陽性対照と比較して、ヘルパー鎖の不在下で低い収率の切断DNAが得られることを示した。加えて、脱塩基部位の切断のための化学塩基の使用は、EndoV I I I切断と比較して時間がかからなかった。

【0532】

工程3：連結

第3の工程は、ヘルパー鎖の不在下でのDNAリガーゼとのポリヌクレオチドの連結を記載する。概略図を図14に示す。

【0533】

材料および方法

材料

1. 実施例1で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrichによって合成した（配列については図14cの表を参照されたい）。
2. 滅菌蒸留水（ELGA VEOLIA）を使用して、オリゴヌクレオチドを100 μMのストック濃度に希釈した。

【0534】

方法

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の連結反応を実施した。

1. ピペット（Gilsen）を使用して、16 μlの滅菌蒸留水（ELGA VEOLIA）を1.5 mlのエッペンドルフチューブに移した。
2. 次に、10 μlの2×Quick Ligation Reaction緩衝液NEB（132 mMのトリス-HCl、20 mMのMgCl₂、2 mMのジチオトレイトール、2 mMのATP、15%のポリエチレングリコール（PEG6000）および25℃でpH 7.6）を同じエッペンドルフチューブに加えた。
3. 各1 μlのオリゴヌクレオチド（図14c）、TAMRAまたは任意の蛍光タグ付きリン酸鎖（配列番号7）、Tを有するプライマー（配列番号8）、およびイノシン鎖（配列番号9）を全て5 pmolで同じチューブに加えた。
4. 1 μlのQuick T4 DNAリガーゼNEB（400単位/μl）を同じチューブに加えた。
5. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することにより穏やかに混合し、5秒間13,000 rpmで遠心分離し、室温で20分間インキュベートした。
6. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液（Novex）を加えて反応を終了させた。
7. 上記に記載されるような精製工程1～7に概説されるプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

【0535】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2 μlの滅菌蒸留水（ELGA VEOLIA）を台座に加えることによって、NanoDrop one（Thermo Scientific）を平衡化した。

【0536】

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ（Whatman）を使用して、水をやさしく拭き取った。
3. 2 μlの緩衝液EB QIAGEN（10 mMのトリス・Cl、pH 8.5）を加えることによって、NanoDrop oneをブランクにし、次に、ブランクの後に工程2を繰り返した。
4. 2 μlの試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA濃度を測定した。
5. 精製されたDNAをポリアクリルアミドゲルに流し、上記に記載される工程5～8の手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0537】

結果および結論

この特定の実施例において、使用される特定の試薬に基づいて、ヘルパー鎖の不在下で室温（24℃）でのDNAリガーゼ、この特定の場合はクイックT4 DNAリガーゼとのオリゴヌクレオチドの連結は、低減された量の連結生産物をもたらす（図14b）。

【0538】

実施例2．ヘルパー鎖によるバージョン1の化学。

この実施例は、4つの工程：ニック部位からの3'-O-修飾dNTPの組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、第1の工程は、ユニバーサルヌクレオチド、この特定の場合はイノシンと反対で起こる。方法は、連結および切断工程の効率を改善するヘルパー鎖を使用する。

10

【0539】

工程1：組み込み

第1の工程は、DNAポリメラーゼを使用した酵素的組み込みによるオリゴヌクレオチドへの3'-O-保護一塩基の制御された付加を記載する（15a）。

【0540】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開：J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

20

2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した。原液を100μMの濃度で調製した。オリゴヌクレオチドを図15bに示す。

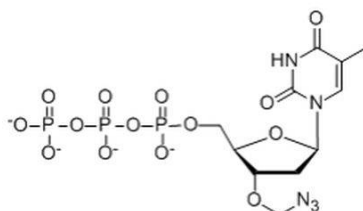
3. 3'-O-修飾dNTPを組み込む能力が増強された、New England BioLabsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼを使用した。

30

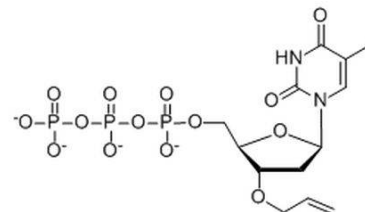
2種類の可逆的ターミネーターを試験した。

【化34】

3'-O-アジドメチル-dTTP:



3'-O-アリル-dTTP:



40

【0541】

方法

1. 2μlの10×Thermopol（登録商標）緩衝液（20mMのトリス-HCl、10mMの(NH₄)₂SO₄、10mMのKCl、2mMのMgSO₄を、0.1%のTriton（登録商標）X-100、pH8.8、New England BioLabs）を、1.5mlのエッペンドルフチューブ中の10.25μlの滅菌脱イオン水（ELGA VEOLIA）と混合した。

2. 0.5μlの10μMプライマー（5pmol、1当量）（配列番号10、図15（

50

b) の表)、 $0.75\text{ }\mu\text{L}$ の $10\text{ }\mu\text{M}$ 鋳型 (6 pmol 、 1.5 当量) (配列番号 11、図 15 (b) の表)、 $2\text{ }\mu\text{L}$ の $10\text{ }\mu\text{M}$ のヘルパー鎖 (配列番号 12、図 15 (b) の表) を反応混合物に加えた。

3. $3'-\text{O}$ -修飾-dTTP ($2\text{ }\mu\text{L}$ の $100\text{ }\mu\text{M}$) および MnCl_2 ($1\text{ }\mu\text{L}$ の 40 mM) を加えた。

4. 次に、 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ の Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U 、New England Biolabs) を加えた。

5. 反応物を 65°C で 20 分間インキュベートした。

6. TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を停止させた。

7. 反応物をポリアクリルアミドゲル (15%) TBE 緩衝液上で分離し、Chemidoc MP 撮像システム (BioRad) によって可視化した。

10

【0542】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. $5\text{ }\mu\text{L}$ の反応混合物を、滅菌 1.5 mL のエッペンドルフチューブ中の $5\text{ }\mu\text{L}$ の TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) に加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 5 分間 95°C まで加熱した。

2. 次に、 $5\text{ }\mu\text{L}$ の試料を、予熱した $1\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM のトリス、 89 mM のホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15% の TBE-尿素ゲル $1.0\text{ mm}\times 10$ ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、 260 V 、 90 A で電気泳動を行った。

20

4. ゲルを、Cy3 LED を使用して Chemidoc MP (BioRad) によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

組み込み工程は、上記に記載されるプロトコルに従って研究することができる。

【0543】

工程 2：切断

第 2 の工程は、hAAG/Endo VIIII または hAAG/化学塩基 ($\times 2$) のいずれかによるポリヌクレオチドの 2 工程切断を記載する (図 16 a)。

【0544】

30

材料および方法

材料

1. 実施例 2 で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrich によって合成した (配列については図 16 f を参照されたい)。

2. 滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を使用して、オリゴヌクレオチドを $100\text{ }\mu\text{M}$ のストック濃度に希釈した。

【0545】

方法

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の切断反応を実施した。

1. ピペット (Gibson) を使用して、 $41\text{ }\mu\text{L}$ の滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を 1.5 mL のエッペンドルフチューブに移した。

40

2. $5\text{ }\mu\text{L}$ の $10\times$ ThermoPol (登録商標) 反応緩衝液 NEB (20 mM のトリス-HCl、 10 mM の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 10 mM の KCl、 2 mM の MgSO_4 、 0.1% の Triton (登録商標) X-100、 $\text{pH } 8.8$) を同じエッペンドルフチューブに加えた。

3. 各 $1\text{ }\mu\text{L}$ のオリゴヌクレオチド (図 16 f)、鋳型 (配列番号 13) または任意の蛍光タグ付き長オリゴ鎖、T を有するプライマー (配列番号 14)、対照 (配列番号 15)、およびヘルパー鎖 (配列番号 16) を全て 5 pmol で同じチューブに加えた。

4. $1\text{ }\mu\text{L}$ のヒトアルキルアデニン DNA グリコシラーゼ (hAAG) NEB (10 単位/ μL) を同じチューブに加えた。

50

5. 代替塩基を使用する反応では、 $1\mu\text{l}$ のヒトアルキルアデニンDNAグリコシラーゼ(hAAG)NEB(100単位/ μl)を加えた。

6. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、37℃で1時間インキュベートした。

7. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化(すなわち、65℃で20分間)によって反応を終了させた。

【0546】

周囲条件下での精製試料混合物を以下に概説されたプロトコルを使用して精製した。

1. $500\mu\text{l}$ の緩衝液PNI QIAGEN(5Mの塩化グアニジニウム)を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

2. 混合物をQIAquickスピンカラム(QIAGEN)に移し、6000rpmで1分間遠心分離した。

3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、 $750\mu\text{l}$ の緩衝液PE QIAGEN(10mMのトリス-HCl、pH7.5および80%のエタノール)をスピンカラムに加え、6000rpmで1分間遠心分離した。

4. フロースルーを廃棄し、スピンカラムを13000rpmでさらに1分間遠心分離して、残留PE緩衝液を除去した。

5. 次に、スピンカラムを滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブに入れた。

6. DNA溶出のために、 $50\mu\text{l}$ の緩衝液EB QIAGEN(10mMのトリス-CL、pH8.5)をカラム膜の中央に加え、室温で1分間放置した。

7. 次に、チューブを13000rpmで1分間遠心分離した。溶出したDNA濃度を測定し、その後の使用のために-20℃で保存した。

【0547】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. $2\mu\text{l}$ の滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を台座に加えることによって、NanoDrop one(Thermo Scientific)を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ(Whatman)を使用して、水をやさしく拭き取った。

3. $2\mu\text{l}$ の緩衝液EB QIAGEN(10mMのトリス-CL、pH8.5)を加えることによって、NanoDrop oneをブランクにした。ブランクの後に、工程2を繰り返した。

4. $2\mu\text{l}$ の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA濃度を測定した。

【0548】

以下の手順を使用して、生成された脱塩基部位の切断を実施した。

1. $2\mu\text{l}$ (10~100ng/ μl)のDNAを滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブに加えた。

2. $40\mu\text{l}$ (0.2M)のNaOHまたは $1.5\mu\text{l}$ のEndo VII NEB(10単位/ μl)および $5\mu\text{l}$ の10×反応緩衝液NEB(10mMのトリス-HCl、75mMのNaCl、1mMのEDTA、25℃でpH8)も同じチューブに加え、再懸濁して13000rpmで5秒間遠心分離することによって穏やかに混合した。

3. 得られた混合物を、0.2MのNaOH処理試料について室温で5分間インキュベートし、その間にEndo VII 反応混合物を37℃で1時間インキュベートした。

4. インキュベーション時間が経過した後、反応混合物を上述の精製プロトコルの工程1~7を使用して精製した。

【0549】

以下の手順を使用して、代替の塩基性化学物質を使用して生成された脱塩基部位の切断を実施した。

1. $1\mu\text{l}$ (10~100ng/ μl)のDNAを滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブに加えた。次に、酢酸溶液シグマ(99.8%)で、室温でpH7.4に緩衝化され

10

20

30

40

50

た2 μ lのN, N' ジメチルエチレンジアミンシグマ (100 mM) を同じチューブに加えた。

2. 20 μ lの滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) をチューブに加え、再懸濁して13000 rpmで5秒間の遠心分離することによって穏やかに混合した。

3. 得られた試料を37℃で20分間インキュベートした。

4. インキュベーション時間が経過した後、反応混合物を上述の精製プロトコルの工程1～7を使用して精製した。

【0550】

ゲル電気泳動およびDNAの可視化

1. 5 μ lのDNAおよびTBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を滅菌1.5 mlのエッペンドルフチューブに加え、熱サーモブロック (エッペンドルフ) を使用して2分間95℃まで加熱した。

2. 次に、DNA混合物を、予熱した1×TBE緩衝液Thermo Scientific (89 mMのトリス、89 mMのホウ酸、および2 mMのEDTA) を含んだ15%のTBE-尿素ゲル1.0 mm×10ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lockモジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で40分間、260 V、90 Aで電気泳動を行った。

4. ゲル中のDNAの検出および可視化は、Cy3 LEDを使用してChemidoc MP (BioRad) で実施した。可視化および分析は、Image Lab 2.0プラットフォーム上で実施した。

【0551】

結果

hAAG DNAグリコシラーゼによるユニバーサルヌクレオチド、この場合はイノシンを含む切断部位での切断効率は、ヘルパー鎖の不在下での10%からヘルパー鎖の存在下での50%まで有意に増加した (図16b)。hAAGおよびエンドヌクレアーゼV I I Iは、hAAGおよびNaOH (50%) よりも低い効率 (10%) でイノシンを切断する。ニックの入ったDNAを使用した記載されるシステムでは、0.2 MのNaOHを使用した化学的切断が、エンドヌクレアーゼV I I IよりもAP部位の切断に好ましいことが示された (図16c)。中性pHでの穏やかなN, N' -ジメチルエチレンジアミンは、0.2 MのNaOHのような脱塩基部位を切断するのに高い効率を有し、それゆえ、エンドヌクレアーゼV I I IおよびNaOHと比較して好ましい (図16d～e)。

【0552】

結論

イノシンを含むDNAの切断について、3つの方法を評価した。1つの完全酵素法—hAAG/エンドヌクレアーゼV I I I、ならびに化学的および酵素的切断を組み合わせた2つの方法—hAAG/NaOHおよびhAAG/ジメチルエチルアミンを、実施例2においてDNA切断について研究した。

【0553】

hAAG/NaOHの結果は、ヘルパー鎖の不在下 (10%) と比較して、ヘルパー鎖の存在下で切断DNAのはるかに高い収率 (50%) を示した。これらの特定の実施例では、使用される特定の試薬に基づいて、ヘルパー鎖はDNA切断の収率を増加させる。

【0554】

NaOHに対する代替物としてエンドヌクレアーゼV I I Iを使用した酵素的切断は、ヘルパー鎖の存在下でのNaOH (50%) と比較して、効率が悪かった (10%)。

【0555】

代替の穏やかな化学塩基N, N' -ジメチルエチレンジアミンを含めると、NaOHと同じくらい効率的にAP部位の高い切断効率を得られ、10×hAAG酵素の付加と一緒に、切断DNAが有意に増加した (図16eを参照されたい)。

【0556】

工程3：連結

10

20

30

40

50

第3の工程は、ヘルパー鎖の存在下でのポリヌクレオチドとDNAリガーゼとの連結を記載する。概略図を図17aに示す。

【0557】

材料および方法

材料

1. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrichによって合成した（配列については図17dを参照されたい）。
2. 滅菌蒸留水（ELGA VEOLIA）を使用して、オリゴヌクレオチドを100 μMのストック濃度に希釈した。

【0558】

方法

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の連結反応を実施した。

1. ピペット（Gilson）を使用して、16 μlの滅菌蒸留水（ELGA VEOLIA）を1.5 mlのエッペンドルフチューブに移した。
2. 次に、10 μlの2×Quick Ligation Reaction緩衝液NEB（132 mMのトリス-HCl、20 mMのMgCl₂、2 mMのジチオトレイトール、2 mMのATP、15%のポリエチレングリコール（PEG 6000）および25℃でpH 7.6）を同じエッペンドルフチューブに加えた。
3. 各1 μlのオリゴヌクレオチド（図17d）、TAMRAまたは任意の蛍光タグ付きリン酸鎖（配列番号18）、Tを有するプライマー（配列番号19）およびイノシン鎖（配列番号20）およびヘルパー鎖（配列番号21）を全て5 pmolで同じチューブに加えた。
4. 1 μlのQuick T4 DNAリガーゼNEB（400単位/μl）を同じチューブに加えた。
5. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000 rpmで遠心分離し、20分間室温でインキュベートした。
6. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液（Novex）を加えて反応を終了させた。
7. 上記に記載されるような精製工程1～7に概説されるプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

【0559】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2 μlの滅菌蒸留水（ELGA VEOLIA）を台座に加えることによって、NanoDrop one（Thermo Scientific）を平衡化した。
2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ（Whatman）を使用して、水をやさしく拭き取った。
3. 2 μlの緩衝液EB QIAGEN（10 mMのトリス・Cl、pH 8.5）を加えることによって、NanoDrop oneをブランクにした。ブランクの後に、工程2を繰り返した。
4. 2 μlの試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA濃度を測定した。
5. 精製されたDNAをポリアクリルアミドゲルに流し、上記の工程5～8の手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0560】

結果および結論

この特定の実施例では、使用される特定の試薬に基づいて、ヘルパー鎖の不在下では連結活性の低下が観察され（図17b）、ヘルパー鎖の存在下では連結が高い効率で進行し（図17c）、生産物が高効率で形成された。

【0561】

実施例3. ヘルパー鎖によるバージョン2化学

10

20

30

40

50

この実施例は、4つの工程：部分二本鎖DNA上への3'-O-修飾dNTPの組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、組み込みの第1の工程は、ユニバーサルヌクレオチド、この特定の場合はイノシンに隣接して支持鎖中に位置付けられた天然に相補的なヌクレオチドと反対で起こる。

【0562】

工程1：組み込み

材料および方法

材料

第1の工程は、DNAポリメラーゼによる酵素的組み込みによるオリゴヌクレオチドへの3'-O-保護一塩基の制御された付加を記載する(図18a)。

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開：J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

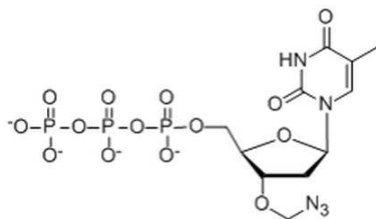
2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した(図18j)。原液を100μMの濃度で調製する。

3. 3'-O-修飾dNTPを組み込む能力が増強された、New England BioLabsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼを使用した。

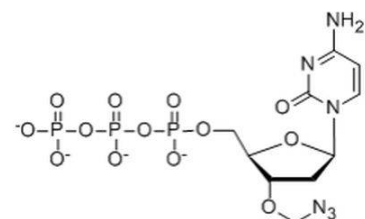
全てのdNTPの3'-O-アジドメチル可逆的ターミネーターを、組み込みについて独立して試験した。

【化35】

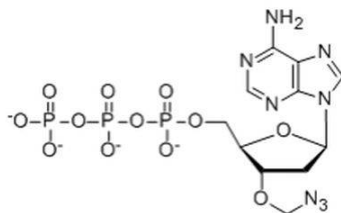
3'-O-アジドメチル-dTTP:



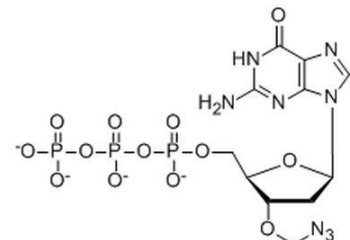
3'-O-アジドメチル-dCTP:



3'-O-アジドメチル-dATP:



3'-O-アジドメチル-dGTP:



【0563】

方法

1. 2μlの10×Thermopol (登録商標) 緩衝液(20mMのトリス-HCl、10mMの(NH₄)₂SO₄、10mMのKCl、2mMのMgSO₄、0.1%のTriton (登録商標) X-100、pH8.8、New England BioLab

s) を、1.5 ml のエッペンドルフチューブ中の 12.25 μ l の滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。

2. 0.5 μ l の 10 μ M プライマー (5 pmol、1 当量) (配列番号 22、図 18 j) および 0.75 μ l の 10 μ M 鋳型-A/G/T/C (6 pmol、1.5 当量) (配列番号 23~26、図 18 j) および 1 μ l の 10 μ M のヘルパー鎖 T/C/A/G (10 pmol、2 当量) (配列番号 27~30、図 18 j) を反応混合物に加えた。

3. 3'-O 修飾-dTTP/dCTP/dATP/dGTP (2 μ l の 100 μ M) および MnCl₂ (1 μ l の 40 mM) を加えた。

4. 次に、1.5 μ l の Thermo Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、New England Biolabs) を加えた。

5. 反応物を 65℃ で 20 分間インキュベートした。

6. TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を停止させた。

7. 反応物をポリアクリルアミドゲル (15%) TBE 緩衝液上で分離し、Chemidoc MP 撮像システム (BioRad) によって可視化した。

【0564】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の反応混合物を、滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブ中の 5 μ l の TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) に加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 5 分間 95℃ まで加熱した。

2. 次に、5 μ l の試料を、予熱した 1×TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM のトリス、89 mM のホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15% の TBE-尿素ゲル 1.0 mm×10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260 V、90 A で電気泳動を行った。

4. ゲルを、Cy3 LED を使用して Chemidoc MP (BioRad) によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0565】

結果および結論

Thermo Terminator IX DNA ポリメラーゼを使用した 3'-O-アジドメチル-dTTP の組み込み時の温度の評価に関して、結果は、連結のためのヘルパー鎖の存在下での 3'-O-アジドメチル-dTTP の組み込みが 5 分後に 90% に達することを示す。37℃ および 47℃ で 20 分後には、10% のプライマーが未伸長のままである。

2 mM の Mn²⁺ イオンおよび 37℃ の温度での Thermo Terminator IX DNA ポリメラーゼは、ヘルパー鎖 (前のサイクルによる連結工程からの) の存在下で高い効率で DNA 中の相補的塩基と反対に 3'-O-修飾-dNTP を組み込むための良好な条件を提供する。

【0566】

工程 2: 切断

第 2 の工程は、エンドヌクレアーゼ V によるポリヌクレオチドの 1 工程切断を記載する (図 19 a)。

【0567】

材料および方法

材料

1. 実施例 3 で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrich によって合成した (配列については図 19 d の表を参照されたい)。

2. 滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を使用して、オリゴヌクレオチドを 100 μ M のストック濃度に希釈した。

【0568】

方法

10

20

30

40

50

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の切断反応を実施した。

1. ピペット (G i l s o n) を使用して、 $41\mu\text{l}$ の滅菌蒸留水 (E L G A V E O L I A) を 1.5ml のエッペンドルフチューブに移した。
2. 次に、 $5\mu\text{l}$ の $10\times$ R e a c t i o n b u f f e r (登録商標) N E B (50mM の酢酸カリウム、 20mM のトリス-酢酸、 10mM の酢酸マグネシウム、 1mM の D T T、 25°C で $\text{pH}7.9$) を同じエッペンドルフチューブに加えた。
3. 各 $1\mu\text{l}$ のオリゴヌクレオチド (図 19 d)、鑄型 (配列番号 31) または任意の蛍光タグ付き長オリゴ鎖、T を有するプライマー (配列番号 32) および対照 (配列番号 33) およびヘルパー鎖 (配列番号 34) を全て 5pmol で同じチューブに加えた。
4. $1\mu\text{l}$ のヒトエンドヌクレアーゼ V (E n d o V) N E B (10 単位/ μl) を同じチューブに加えた。
5. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、 5 秒間 $13,000\text{rpm}$ で遠心分離し、 37°C で 1 時間インキュベートした。
6. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化 (すなわち、 65°C で 20 分間) によって反応を終了させた。

【0569】

試料混合物を以下に概説されたプロトコルを使用して精製した。

1. $500\mu\text{l}$ の緩衝液 P N I Q I A G E N (5M の塩化グアニジニウム) を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。
2. 混合物を Q I A q u i c k スピнкаラム (Q I A G E N) に移し、 6000rpm で 1 分間遠心分離した。
3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、 $750\mu\text{l}$ の緩衝液 P E Q I A G E N (10mM のトリス-H C l、 $\text{pH}7.5$ および 80% のエタノール) をスピнкаラムに加え、 6000rpm で 1 分間遠心分離した。
4. フロースルーを廃棄し、スピнкаラムを 13000rpm でさらに 1 分間遠心分離して、残留 P E 緩衝液を除去した。
5. 次に、スピнкаラムを滅菌 1.5ml のエッペンドルフチューブに入れた。
6. DNA 溶出のために、 $50\mu\text{l}$ の緩衝液 E B Q I A G E N (10mM のトリス・C L、 $\text{pH}8.5$) をカラム膜の中央に加え、室温で 1 分間放置した。
7. 次に、チューブを 13000rpm で 1 分間遠心分離した。溶出した DNA 濃度を測定し、その後の使用のために -20°C で保存した。

【0570】

以下のプロトコルを使用して、精製された DNA 濃度の測定値を判定した。

1. $2\mu\text{l}$ の滅菌蒸留水 (E L G A V E O L I A) を台座に加えることによって、N a n o D r o p o n e (T h e r m o S c i e n t i f i c) を平衡化した。
2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (W h a t m a n) を使用して、水をやさしく拭き取った。
3. $2\mu\text{l}$ の緩衝液 E B Q I A G E N (10mM のトリス・C L、 $\text{pH}8.5$) を加えることによって、N a n o D r o p o n e をブランクにした。ブランクングの後に、工程 2 を繰り返した。
4. $2\mu\text{l}$ の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

【0571】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. $5\mu\text{l}$ の DNA および T B E - 尿素試料緩衝液 (N o v e x) を滅菌 1.5ml のエッペンドルフチューブに加え、熱サーモブロック (エッペンドルフ) を使用して 2 分間 95°C まで加熱した。
2. 次に、DNA 混合物を、予熱した $1\times$ T B E 緩衝液 T h e r m o S c i e n t i f i c (89mM のトリス、 89mM のホウ酸、および 2mM の E D T A) を含んだ 15% の T B E - 尿素ゲル $1.0\text{mm}\times 10$ ウェル (I n v i t r o g e n) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lockモジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で40分間、260V、90Aで電気泳動を行った。

4. ゲル中のDNAの検出および可視化は、Cy3 LEDを使用してChemidoc MP (BioRad) で実施した。可視化および分析は、Image Lab 2.0プラットフォーム上で実施した。

【0572】

結果および結論

実施例3からの切断結果は、ヘルパー鎖の存在下または不在下でエンドヌクレアーゼVを用いて有意に高収率の切断DNAを得ることができることを示した (図19c)。

【0573】

工程3：連結

第3の工程は、ヘルパー鎖の存在下でのポリヌクレオチドとDNAリガーゼとの連結を記載する。概略図を図20aに示す。

【0574】

材料および方法

材料

1. 実施例3で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrichによって合成した (配列については図20bの表を参照されたい)。

2. 滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を使用して、オリゴヌクレオチドを100μMのストック濃度に希釈した。

【0575】

方法

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の連結反応を実施した。

1. ピペット (Gilsen) を使用して、16μlの滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を1.5mlのエッペンドルフチューブに移した。

2. 次に、10μlの2×Quick Ligation Reaction緩衝液NEB (132mMのトリス-HCl、20mMのMgCl₂、2mMのジチオスレイトール、2mMのATP、15%のポリエチレングリコール (PEG6000)、25℃でpH7.6) を同じエッペンドルフチューブに加えた。

3. 各1μlのオリゴヌクレオチド (図20b)、TAMRAまたは任意の蛍光タグ付きリン酸鎖 (配列番号35)、Tを有するプライマー (配列番号36) およびイノシン鎖 (配列番号37) およびヘルパー鎖 (配列番号38) を全て5pmolの量を有して同じチューブに加えた。

4. 1μlのQuick T4 DNAリガーゼNEB (400単位/μl) を同じチューブに加えた。

5. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、室温で20分間インキュベートした。

6. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を終了させた。

7. 上記に記載されるような精製工程1~7に概説されるプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

【0576】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2μlの滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を台座に加えることによって、NanoDrop one (Thermo Scientific) を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (Whatman) を使用して、水をやさしく拭き取った。

3. 2μlの緩衝液EB QIAGEN (10mMのトリス・CL、pH8.5) を加えることによって、NanoDrop oneをブランクにした。ブランクングの後に、工程2を繰り返した。

10

20

30

40

50

4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

5. 精製された DNA をポリアクリルアミドゲルに流し、上記に記載される工程 5 ~ 8 の手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0577】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の DNA および TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブに加え、熱サーモブロック (エッペンドルフ) を使用して 2 分間 95 $^{\circ}$ C まで加熱した。

2. 次に、DNA 混合物を、予熱した 1 $\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM のトリス、89 mM のホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15 % の TBE-尿素ゲル 1.0 mm $\times$ 10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260 V、90 A で電気泳動を行った。

4. ゲル中の DNA の検出および可視化は、Cy3 LED を使用して ChemiDoc MP (BioRad) で実施した。可視化および分析は、Image Lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0578】

工程 4: 脱保護

Therminator IX DNA ポリメラーゼによる 3'-O-アジドメチル-dNTP の組み込みによって DNA に導入された 3'-O-アジドメチル基を担持する DNA モデルについて、脱保護工程 (図 21a) を研究した。脱保護をトリス (カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) によって実施し、全ての天然 dNTP の混合物を精製された脱保護 DNA の溶液に加えたときの伸長反応によってモニタリングした。

【0579】

材料および方法

材料

1. 実施例 3 で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrich によって合成した (配列については図 21i を参照されたい)。

2. 滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を使用して、オリゴヌクレオチドを 100 μ M のストック濃度に希釈した。

3. 酵素は、New England BioLabs から購入した。

【0580】

方法

1. 2 μ l の 10 $\times$ Thermopol (登録商標) 緩衝液 (20 mM のトリス-HCl、10 mM の (NH₄)₂SO₄、10 mM の KCl、2 mM の MgSO₄、0.1 % の Triton (登録商標) X-100、pH 8.8、New England BioLabs) を、1.5 ml のエッペンドルフチューブ中の 12.25 μ l の滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。

2. 1 μ l の 10 μ M プライマー (10 pmol、1 当量) (配列番号 39、図 21i) および 1.5 μ l のいずれかの 10 μ M 鋳型-A/G/T/C (15 pmol、1.5 当量) (配列番号 40 ~ 43、図 21i) を反応混合物に加えた。

3. 3'-O 修飾-dTTP/dCTP/dATP/dGTP (2 μ l の 100 μ M) および MnCl₂ (1 μ l の 40 mM) を加えた。

4. 次に、1.5 μ l の Therminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、New England BioLabs) を加えた。

5. 反応物を 37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。

6. 4 μ L の試料を取り出し、0.5 μ l の 5 mM の dNTP 混合物と混合し、制御反応のために 10 分間反応させた。

7. pH 7.4 の 1 M のトリス緩衝液中の 40 μ L の 500 mM の TCEP を反応混合物

10

20

30

40

50

に加え、37℃で10分間反応させた。

8. 20 μ Lの1×Thermopol (登録商標) 緩衝液によって溶出するQIAGENヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。

9. 1 μ Lの5mMのdNTP混合物および1 μ LのDeepVent (エキソ) DNAポリメラーゼを精製された反応混合物に加え、10分間反応させた。

10. TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を停止させた。

11. 反応物をポリアクリルアミドゲル (15%) TBE緩衝液上で分離し、Chemidoc MP撮像システム (BioRad) によって可視化した。

【0581】

結果および結論

50mMのTCEPは、0.2 μ MのDNAモデル上で3'-O-アジドメチル基を高い効率で切断するのに十分ではなかった (図21h)。対照的に、300mMのTCEPは、0.2 μ MのDNAモデル上で3'-O-アジドメチル基を95%の効率で首尾よく切断した (図21h)。

【0582】

実施例4. 二重ヘアピンモデルによるバージョン2化学

この実施例は、2つのヘアピンモデル上での4つの工程：ニック部位からの3'-O-修飾dNTPの組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、第1の工程は、ユニバーサルヌクレオチド、この特定の場合はイノシンに隣接する支持鎖中に位置付けられた天然に相補的なヌクレオチドと反対で起こる。

【0583】

工程1：組み込み

第1の工程は、DNAポリメラーゼによる酵素的組み込みによるオリゴヌクレオチドへの3'-O-保護一塩基の制御された付加を記載する (図22a)。

【0584】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開: J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した (図22c)。原液を100 μ Mの濃度で調製した。

3. 3'-O-修飾dNTPを組み込む能力が増強された、New England Biolabsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼを使用した。

3'-O-アジドメチル-dTTPを組み込みについて試験した。

10

20

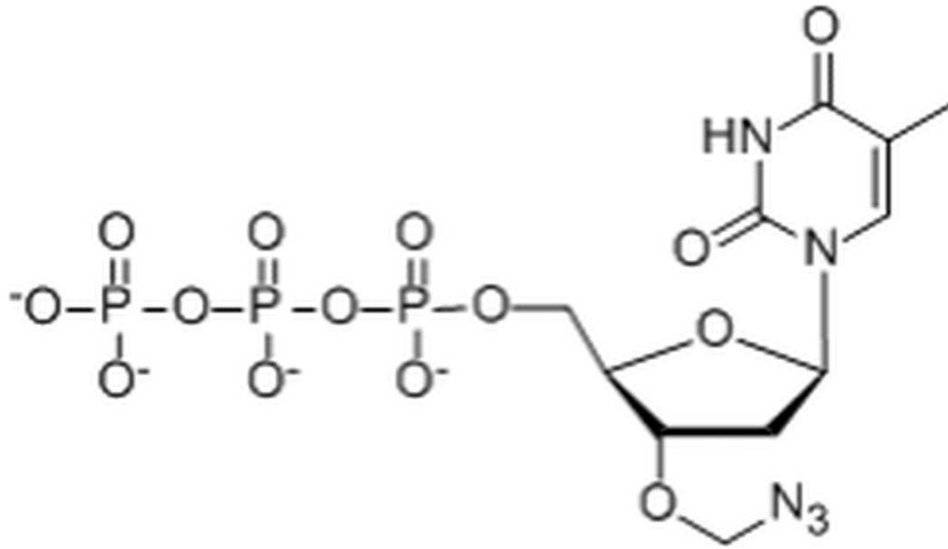
30

40

50

【化 3 6】

3' -O-アジドメチル-dTTP :



【0585】

方法

1. 2 μ l の 10 $\times$ Thermopol (登録商標) 緩衝液 (20 mM の トリス-HCl、10 mM の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10 mM の KCl、2 mM の MgSO_4 を、0.1% の Triton (登録商標) X-100、pH 8.8、New England Biolabs) を、1.5 ml の エッペンドルフチューブ中の 10.25 μ l の 滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。
2. 0.5 μ l の 10 μ M ヘアピンオリゴヌクレオチド (5 pmol、1 当量) (配列番号 44、図 22c) を反応混合物に加えた。
3. 3' -O-修飾-dTTP (2 μ l の 100 μ M) および MnCl_2 (1 μ l の 40 mM) を加えた。
4. 次に、1.5 μ l の Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、New England Biolabs) を加えた。
5. 反応物を 65 $^\circ\text{C}$ で 20 分間インキュベートした。
6. TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を停止させた。
7. 反応物をポリアクリルアミドゲル (15%) TBE 緩衝液上で分離し、Chemidoc MP 撮像システム (BioRad) によって可視化した。

【0586】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の反応混合物を滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブ中の 5 μ l の TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) に加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 5 分間 95 $^\circ\text{C}$ まで加熱した。
2. 次に、5 μ l の試料を、予熱した 1 $\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM の トリス、89 mM の ホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15% の TBE-尿素ゲル 1.0 mm $\times$ 10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。
3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260 V、90 A で電気泳動を行った。
4. ゲルを、Cy3 LED を使用して Chemidoc MP (BioRad) によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0587】

結果

DNAポリメラーゼは、ヘアピン構築物中のその天然に相補的な塩基と反対に3'-O-修飾-dTTPを組み込む。

【0588】

工程2：切断

第2の工程は、この特定の場合におけるエンドヌクレアーゼVによるヘアピンモデルの1工程切断を記載する(図23a)。

【0589】

材料および方法

材料

1. 実施例4で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrichによって合成した(配列については図23cを参照されたい)。
2. 滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を使用して、オリゴヌクレオチドを100μMのストック濃度に希釈した。

【0590】

方法

以下の手順を使用して、ヘアピンオリゴヌクレオチド上の切断反応を実施した。

1. ピペット(Gilson)を使用して、43μlの滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を1.5mlのエッペンドルフチューブに移した。
2. 次に、5μlの10×Reaction buffer(登録商標)NEB(50mMの酢酸カリウム、20mMのトリス-酢酸、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25℃でpH7.9)を同じエッペンドルフチューブに加えた。
3. 5pmolの量を有する1μlのヘアピンオリゴヌクレオチド(配列番号45、図23c)を同じチューブに加えた。
4. 1μlのヒトエンドヌクレアーゼV(Endo V)NEB(30単位/μl)を同じチューブに加えた。
5. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、37℃で1時間インキュベートした。
6. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化(すなわち、65℃で20分間)によって反応を終了させた。

【0591】

試料混合物を以下に概説されたプロトコルを使用して精製した。

1. 500μlの緩衝液PNI QIAGEN(5Mの塩化グアニジニウム)を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。
2. 混合物をQIAquickスピンカラム(QIAGEN)に移し、6000rpmで1分間遠心分離した。
3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750μlの緩衝液PE QIAGEN(10mMのトリス-HCl、pH7.5および80%のエタノール)をスピンカラムに加え、6000rpmで1分間遠心分離した。
4. フロースルーを廃棄し、スピンカラムを13000rpmでさらに1分間遠心分離して、残留PE緩衝液を除去した。
5. 次に、スピンカラムを滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブに入れた。
6. DNA溶出のために、50μlの緩衝液EB QIAGEN(10mMのトリス・CL、pH8.5)をカラム膜の中央に加え、室温で1分間放置した。
7. 次に、チューブを13000rpmで1分間遠心分離した。溶出したDNA濃度を測定し、その後の使用のために-20℃で保存した。

【0592】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2μlの滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を台座に加えることによって、Na

noDrop One (Thermo Scientific) を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (Whatman) を使用して、水をやさしく拭き取った。

3. 2 μ l の緩衝液 EB QIAGEN (10 mM のトリス・CL、pH 8.5) を加えることによって、NanoDrop One をブランクにした。ブランクの後に、工程 2 を繰り返した。

4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

【0593】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の DNA および TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブに加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 2 分間 95 $^{\circ}$ C まで加熱した。

2. 次に、DNA 混合物を、予熱した 1 $\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM のトリス、89 mM のホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15 % の TBE-尿素ゲル 1.0 mm $\times$ 10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260 V、90 A で電気泳動を行った。

4. ゲル中の DNA の検出および可視化は、Cy3 LED を使用して ChemiDoc MP (BioRad) で実施した。可視化および分析は、Image Lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0594】

結果および結論

実施例 4 からの切断結果は、エンドヌクレアーゼ V を用いて 37 $^{\circ}$ C で著しく高収率の消化されたヘアピン DNA が得られることを示した (図 23b)。

【0595】

工程 3：連結

第 3 の工程は、ヘアピンモデルと DNA リガーゼとの連結を記載する。概略図を図 24a に示す。

【0596】

材料および方法

材料

1. 実施例 4 で利用されたオリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrich によって合成した (配列については図 24c を参照されたい)。

2. 滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を使用して、オリゴヌクレオチドを 100 μ M のストック濃度に希釈した。

【0597】

方法

以下の手順を使用して、オリゴヌクレオチド上の連結反応を実施した。

1. ピペット (Gibson) を使用して、1 μ l (5 pmol) の TAMRA または任意の蛍光タグ付きリン酸ヘアピンオリゴ (配列番号 46) を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移した。

2. 次に、15 μ l (100 pmol) のイノシン含有ヘアピン構築物 (配列番号 47) を同じチューブに加え、ピペットで 3 秒間再懸濁することによって穏やかに混合した。

3. 40 μ l の平滑 / TA DNA リガーゼ NEB (180 単位 / μ l) を同じチューブに加えた。

4. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5 秒間 13,000 rpm で遠心分離し、室温で 20 分間インキュベートした。

5. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を終了させた。

6. 上記の精製工程 1～7 に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。
【0598】

以下のプロトコルを使用して、精製された DNA 濃度の測定値を判定した。

1. 2 μ l の滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を台座に加えることによって、NanoDrop One (Thermo Scientific) を平衡化した。
2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (Whatman) を使用して、水をやさしく拭き取った。
3. 2 μ l の緩衝液 EB QIAGEN (10 mM のトリス・CL、pH 8.5) を加えることによって、NanoDrop One をブランクにした。ブランクの後に、工程 2 を繰り返した。
4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。
5. 精製された DNA をポリアクリルアミドゲルに流し、上記に記載されるような工程 5～8 の手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0599】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の DNA および TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブに加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 2 分間 95 $^{\circ}$ C まで加熱した。
2. 次に、DNA 混合物を、予熱した 1 $\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM のトリス、89 mM のホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15 % の TBE-尿素ゲル 1.0 mm $\times$ 10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。
3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260 V、90 A で電気泳動を行った。
4. ゲル中の DNA の検出および可視化は、Cy3 LED を使用して ChemiDoc MP (BioRad) で実施した。可視化および分析は、Image lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0600】

結果

ヘルパー鎖の存在下で室温 (24 $^{\circ}$ C) での平滑 / TA DNA リガーゼとヘアピンオリゴヌクレオチドとの連結は、高収率の連結生産物をもたらした。1 分後の連結ヘアピンオリゴヌクレオチドは、約 85 % の比率で、高収率の連結 DNA 生産物を示した。2 分後の連結ヘアピンオリゴヌクレオチドは、約 85 % の比率で、高収率の連結 DNA 生産物を示した。3 分後の連結ヘアピンオリゴヌクレオチドは、約 85 % の比率で、高収率の連結 DNA 生産物を示した。4 分後の連結ヘアピンオリゴヌクレオチドは、約 > 85 % の比率で、高収率の連結 DNA 生産物を示した (図 24b)。

【0601】

実施例 5. バージョン 2 化学-二重ヘアピンモデルの完全サイクル。

この実施例は、二重ヘアピンモデル上での 4 つの工程：ニック部位からの 3' -O-修飾 dNTP の組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、第 1 の工程は、ユニバーサルヌクレオチド、この特定の場合はイノシンに隣接して支持鎖中に位置付けられた天然に相補的なヌクレオチドと反対で起こる。ヘアピンの一端は付着アンカーとして機能する。

【0602】

方法は、DNA ポリメラーゼによる酵素的組み込み、その後のイノシン切断、連結、および脱保護によるオリゴヌクレオチドへの 3' -O-保護一塩基の制御された付加によって開始する (図 25a)。

【0603】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開：J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

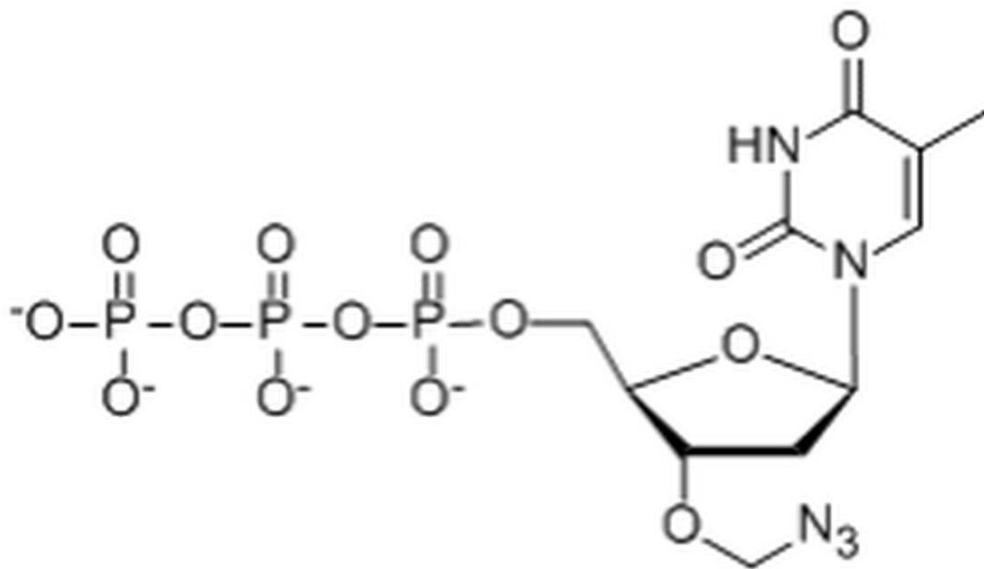
2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した（図25c）。原液を100μMの濃度で調製する。

3. 3'-O-修飾dNTPを組み込む能力が増強された、New England BioLabsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼを使用した。

3'-O-アジドメチル-dTTPを組み込みについて試験した。

【化37】

3'-O-アジドメチル-dTTP :



方法

1. 2μlの10×Thermopol（登録商標）緩衝液（20mMのトリス-HCl、10mMの(NH₄)₂SO₄、10mMのKCl、2mMのMgSO₄、0.1%のTriton（登録商標）X-100、pH8.8、New England BioLabs）を、1.5mlのエッペンドルフチューブ中の12.5μlの滅菌脱イオン水（ELGA VEOLIA）と混合した。

2. 2μlの10μMの二重ヘアピンモデルオリゴヌクレオチド（20pmol、1当量）（配列番号48、図25c）を反応混合物に加えた。

3. 3'-O-修飾-dTTP（2μlの100μM）およびMnCl₂（1μlの40mM）を加えた。

4. 次に、1.5μlのTherminator IX DNAポリメラーゼ（15U、New England BioLabs）を加えた。

5. 反応物を37℃で10分間インキュベートした。

6. アリコート（5μl）を反応混合物から取り出し、0.5μlの天然dNTP混合物

を加え、10分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

7. 精製工程1～7に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

8. 20 μ lのNEB reaction buffer (登録商標) (50mMの酢酸カリウム、20mMのトリス-酢酸、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25℃でpH7.9)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

9. 1 μ lのヒトエンドヌクレアーゼV (Endo V) NEB (30単位/ μ l)を同じチューブに加えた。

10. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、37℃で1時間インキュベートした。

11. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化 (すなわち、65℃で20分間)によって反応を終了させた。

12. アリコート (5 μ l)を反応混合物から取り出し、TBE緩衝液を使用してポリアクリルアミドゲル (15%)上で分析し、Chemidoc MP撮像システム (BioRad)によって可視化した。

13. 上記の精製工程1～7に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

14. 20 μ lのNEB Reaction buffer (登録商標) (50mMの酢酸カリウム、20mMのトリス-酢酸、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25℃でpH7.9)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

15. 10 μ lの連結のための100 μ Mの鎖 (1nmol) (配列番号49、図25c)を反応混合物に加えた。

16. 40 μ lの平滑/TA DNAリガーゼNEB (180単位/ μ l)を精製されたDNA試料に加えた。

17. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、室温で20分間インキュベートした。

18. pH7.4の1Mのトリス緩衝液中の40 μ lの500mMのTCEPを反応混合物に加え、37℃で10分間反応させた。

19. 20 μ lの1 $\times$ Thermopoll (登録商標)緩衝液によって溶出するQIAGENヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。

【0604】

ゲル電気泳動およびDNAの可視化

1. 5 μ lの反応混合物を滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブ中の5 μ lのTBE-尿素試料緩衝液 (Novex)に加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ)を使用して5分間95℃まで加熱した。

2. 次に、5 μ lの試料を、予熱した1 $\times$ TBE緩衝液Thermo Scientific (89mMのトリス、89mMのホウ酸、および2mMのEDTA)を含んだ15%のTBE-尿素ゲル1.0mm $\times$ 10ウェル (Invitrogen)のウェルに入れた。

3. X-cell sure lockモジュール (Novex)を適所に固定し、以下の条件、室温で40分間、260V、90Aで電気泳動を行った。

4. ゲルを、Cy3 LEDを使用してChemidoc MP (BioRad)によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0プラットフォーム上で実施した。

【0605】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2 μ lの滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA)を台座に加えることによって、NanoDrop One (Thermo Scientific)を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (Whatman)を使用して、水をやさしく拭き取った。

3. 2 μ lの緩衝液EB QIAGEN (10mMのトリス・CL、pH8.5)を加えることによって、NanoDrop Oneをブランクにした。ブランクの後に、工程2を繰り返した。

10

20

30

40

50

4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

5. 精製された DNA をポリアクリルアミドゲルに流し、第 2 節の工程 5 ~ 8 の手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0606】

以下に概説されたプロトコルを使用した各工程後に、試料混合物を精製した。

1. 500 μ l の緩衝液 PNI QIAGEN (5 M の塩化グアニジニウム) を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

2. 混合物を QIAquick スピнкаラム (QIAGEN) に移し、6000 rpm で 1 分間遠心分離した。

3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750 μ l の緩衝液 PE QIAGEN (10 mM のトリス-HCl、pH 7.5 および 80 % のエタノール) をスピнкаラムに加え、6000 rpm で 1 分間遠心分離した。

4. フロースルーを廃棄し、スピнкаラムを 13000 rpm でさらに 1 分間遠心分離して、残留 PE 緩衝液を除去した。

5. 次に、スピнкаラムを滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブに入れた。

6. DNA 溶出のために、反応のための 20 μ l の適切な緩衝液をカラム膜の中心に加え、室温で 1 分間放置した。

7. 次に、チューブを 13000 rpm で 1 分間遠心分離した。溶出した DNA 濃度を測定し、その後の使用のために -20 °C で保存した。

【0607】

結果

DNA ポリメラーゼは、二重ヘアピン構築物中のその天然に相補的な塩基と反対に 3' -O-修飾-dNTP を組み込む (図 25b)。

【0608】

実施例 6 バージョン 2 化学ヘルパー鎖を使用した単一ヘアピンモデルの完全サイクル

この実施例は、単一ヘアピンモデル上での 4 つの工程：ニック部位からの 3' -O-修飾 dNTP の組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、第 1 の工程は、天然に相補的な塩基と反対で起こる。DNA 合成は、その過程においてヘルパー鎖を使用する。

【0609】

方法は、DNA ポリメラーゼによる酵素的組み込み、その後のイノシン切断、連結、および脱保護によるオリゴヌクレオチドへの 3' -O-保護塩基の制御された付加によって開始する (図 26a)。

【0610】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008 の PhD 論文に記載されるプロトコルに従って、3' -O-修飾 dNTP を社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開: J. William Efcavitch, Juliasta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1 にも記載されている。

2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma Aldrich から入手した (図 26b)。原液を 100 μ M の濃度で調製する。

3. 3' -O-修飾 dNTP を組み込む能力が増強された、New England Biolabs によって操作された Terminator IX DNA ポリメラーゼを使用し

10

20

30

40

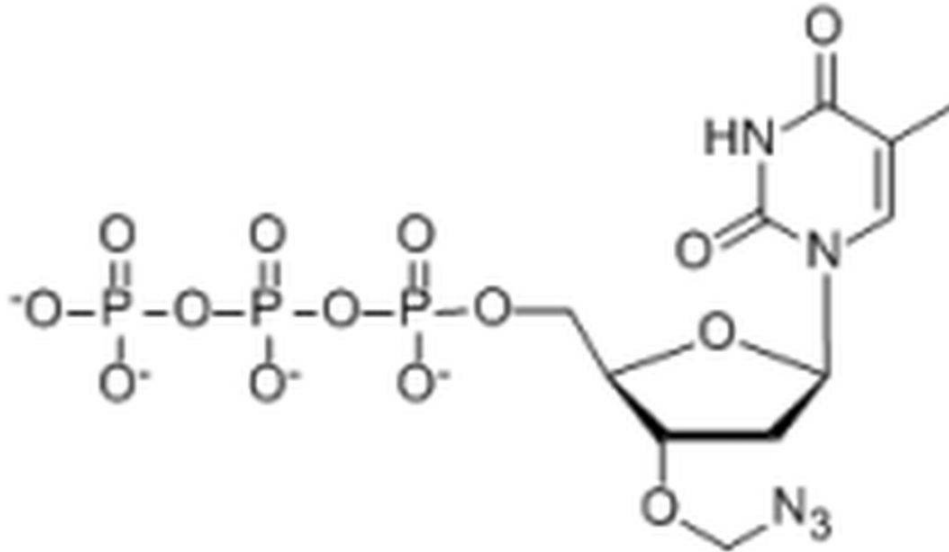
50

た。

3'-O-アジドメチル-dTTPを組み込みについて試験した。

【化38】

3'-O-アジドメチル-dTTP :



【0611】

方法

1. 2 μ l の 10 $\times$ Thermopol (登録商標) 緩衝液 (20 mM の トリス-HCl、10 mM の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10 mM の KCl、2 mM の MgSO_4 、0.1% の Triton (登録商標) X-100、pH 8.8、New England BioLabs) を、1.5 ml の エッペンドルフチューブ中の 12.5 μ l の 滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。

2. 2 μ l の 10 μ M の 単一ヘアピンモデルオリゴヌクレオチド (20 pmol、1 当量) (配列番号 50、図 26b) および ヘルパー鎖 (30 pmol、1.5 当量) (配列番号 51、図 26b) を 反応混合物に加えた。

3. 3'-O 修飾-dTTP (2 μ l の 100 μ M) および MnCl_2 (1 μ l の 40 mM) を加えた。

4. 次に、1.5 μ l の Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、New England BioLabs) を加えた。

5. 反応物を 37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間 インキュベートした。

6. アリコート (5 μ l) を 反応混合物から取り出し、0.5 μ l の 天然 dNTP 混合物を加え、10 分間 反応させた。ゲル電気泳動によって 反応物を分析した。

7. 上記の精製工程 1~7 に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

8. 20 μ l の NEB reaction buffer (登録商標) (50 mM の 酢酸カリウム、20 mM の トリス-酢酸、10 mM の 酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25 $^{\circ}\text{C}$ で pH 7.9) によって、DNA 試料を 清浄な エッペンドルフチューブに溶出した。

9. 1 μ l の ヒトエンドヌクレアーゼ V (Endo V) NEB (30 単位/ μ l) を 同じチューブに加えた。

10. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって 穏やかに混合し、5 秒間 13,000 rpm で遠心分離し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間 インキュベートした。

11. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化 (すなわち、65 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間) によって 反応を終了させた。

12. アリコート (5 μ l) を反応混合物から取り出し、TBE 緩衝液を使用してポリアクリルアミドゲル (15%) 上で分析し、Chemidoc MP 撮像システム (BioRad) によって可視化した。

13. 上記の精製工程 1~7 に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

14. 20 μ l の NEB reaction buffer (登録商標) (50mM の酢酸カリウム、20mM のトリス-酢酸、10mM の酢酸マグネシウム、1mM の DTT、25°C で pH 7.9) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

15. 10 μ l の連結のための 100 μ M の鎖 (1 nmol) (配列番号 52、図 26b) および 10 μ l の連結のための 100 μ M のヘルパー鎖 (1 nmol) (配列番号 53、図 26b) を反応混合物に加えた。

16. 40 μ l の平滑/TA DNA リガーゼ NEB (180 単位/ μ l) を同じチューブに加えた。

17. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5 秒間 13,000 rpm で遠心分離し、室温で 20 分間インキュベートした。

18. pH 7.4 の 1M のトリス緩衝液中の 40 μ l の 500mM の TCEP を反応混合物に加え、37°C で 10 分間反応させた。

19. 20 μ l の 1 $\times$ NEB Thermopoll (登録商標) 緩衝液によって溶出する QIAGEN ヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。

20. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を終了させた。

【0612】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の反応混合物を、滅菌 1.5ml のエッペンドルフチューブ中の 5 μ l の TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) に加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 5 分間 95°C まで加熱した。

2. 次に、5 μ l の試料を、予熱した 1 $\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89mM のトリス、89mM のホウ酸、および 2mM の EDTA) を含む 15% の TBE-尿素ゲル 1.0mm $\times$ 10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260V、90A で電気泳動を行った。

4. ゲルを、Cy3 LED を使用して Chemidoc MP (BioRad) によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0613】

以下のプロトコルを使用して、精製された DNA 濃度の測定値を判定した。

1. 2 μ l の滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を台座に加えることによって、NanoDrop One (Thermo Scientific) を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (Whatman) を使用して、水をやさしく拭き取った。

3. 2 μ l の緩衝液 EB QIAGEN (10mM のトリス、CL、pH 8.5) を加えることによって、NanoDrop One をブランクにした。ブランキングの後に、工程 2 を繰り返した。

4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

5. 精製された DNA をポリアクリルアミドゲルに流し、工程 5~8 において上記した手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0614】

以下に概説されたプロトコルを使用した各工程後に、試料混合物を精製した。

1. 500 μ l の緩衝液 PNI QIAGEN (5M の塩化グアニジニウム) を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

10

20

30

40

50

2. 混合物をQIAquickスピнкаラム (QIAGEN) に移し、6000rpmで1分間遠心分離した。
3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750μlの緩衝液PE QIAGEN (10mMのトリス-HCl、pH7.5および80%のエタノール) をスピнкаラムに加え、6000rpmで1分間遠心分離した。
4. フロースルーを廃棄し、スピнкаラムを13000rpmでさらに1分間遠心分離して、残留PE緩衝液を除去した。
5. 次に、スピнкаラムを滅菌1.5mlのエピENDORフチューブに入れた。
6. DNA溶出のために、反応のための20μlの適切な緩衝液をカラム膜の中央に加え、室温で1分間放置した。
7. 次に、チューブを13000rpmで1分間遠心分離した。溶出したDNA濃度を測定し、その後の使用のために-20℃で保存した。

【0615】

実施例7. バージョン3化学-二重ヘアピンモデルの完全サイクル。

この実施例は、二重ヘアピン構築物モデルについての4つの工程：ニック部位からの3'-O-修飾dNTPの組み込み、切断、連結、および脱保護を使用したポリヌクレオチドの合成を記載しており、第1の工程は、ユニバーサルヌクレオチド、この特定の場合はイノシン塩基と反対で起こる。

【0616】

方法は、DNAポリメラーゼによる酵素的組み込み、その後のイノシン切断、連結、および脱保護によるオリゴヌクレオチドへの3'-O-保護一塩基の制御された付加によって開始する(図27a)。

【0617】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開: J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。
2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した(図27b)。原液を100μMの濃度で調製する。
3. New England BioLabsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼは、3'-O-修飾dNTPを組み込む能力を高めた。
- 3'-O-アジドメチル-dTTPを組み込みについて試験した。

10

20

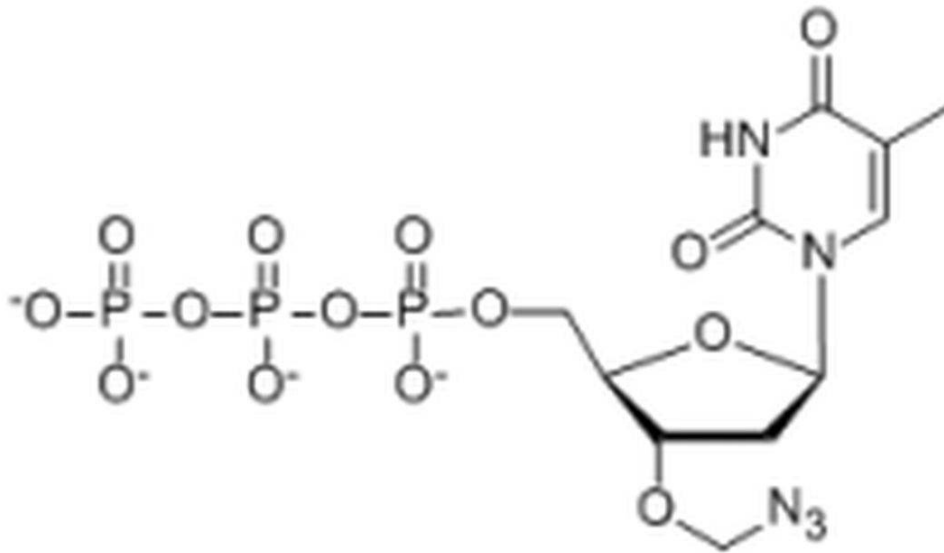
30

40

50

【化 3 9】

3' -O-アジドメチル-dTTP :



【0618】

方法

1. 2 μ l の 10 $\times$ Thermopol (登録商標) 緩衝液 (20 mM の トリス-HCl、10 mM の (NH₄)₂SO₄、10 mM の KCl、2 mM の MgSO₄、0.1% の Triton (登録商標) X-100、pH 8.8、New England BioLabs) を、1.5 ml の エッペンドルフチューブ 中の 12.5 μ l の 滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。

2. 2 μ l の 10 μ M の 二重ヘアピンモデルオリゴヌクレオチド (20 pmol、1 当量) (配列番号 54、図 27b) を 反応混合物 に加えた。

3. 3' -O-修飾-dTTP (2 μ l の 100 μ M) および MnCl₂ (1 μ l の 40 mM) を加えた。

4. 次に、1.5 μ l の Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、New England BioLabs) を加えた。

5. 反応物を 37 $^{\circ}$ C で 10 分間 インキュベートした。

6. アリコート (5 μ l) を 反応混合物 から取り出し、0.5 μ l の 天然 dNTP 混合物 を加え、10 分間 反応させた。ゲル電気泳動によって 反応物を 分析した。

7. 精製工程 1 ~ 7 に 概説された プロトコル を使用して、反応混合物 を 精製した。

8. 20 μ l の NEB Reaction buffer (登録商標) (50 mM の 酢酸カリウム、20 mM の トリス-酢酸、10 mM の 酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25 $^{\circ}$ C で pH 7.9) によって、DNA 試料 を 清浄な エッペンドルフチューブ に 溶出した。

9. 1 μ l の ヒトエンドヌクレアーゼ V (Endo V) NEB (30 単位/ μ l) を 同じチューブ に加えた。

10. 次に、反応混合物 を ピペット で 再懸濁 することによって 穏やかに 混合し、5 秒間 13,000 rpm で 遠心分離し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間 インキュベートした。

11. インキュベーション 時間が 経過した 後、酵素的熱不活性化 (すなわち、65 $^{\circ}$ C で 20 分間) によって 反応を 終了させた。

12. アリコート (5 μ l) を 反応混合物 から取り出し、TBE 緩衝液 を使用して ポリアクリルアミドゲル (15%) 上で 分析し、Chemidoc MP 撮像システム (BioRad) によって 可視化した。

13. 上記の 精製工程 1 ~ 7 に 概説された プロトコル を使用して、反応混合物 を 精製した。

14. 20 μ l の NEB Reaction buffer (登録商標) (50 mM の酢酸カリウム、20 mM のトリス-酢酸、10 mM の酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25 $^{\circ}$ C で pH 7.9) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

15. 10 μ l の連結のための 100 μ M の鎖 (1 nmol) (配列番号 55、図 27b) を反応混合物に加えた。

16. 40 μ l の平滑/TA DNA リガーゼ NEB (180 単位/ μ l) を同じチューブに加えた。

17. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5 秒間 13,000 rpm で遠心分離し、室温で 20 分間インキュベートした。

18. pH 7.4 の 1 M のトリス緩衝液中の 40 μ l の 500 mM の TCEP を反応混合物に加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。

19. 20 μ l の 1 $\times$ NEB Thermopoll (登録商標) 緩衝液によって溶出する QIAGEN ヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。

20. 典型的には、インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を終了させた。

【0619】

ゲル電気泳動および DNA の可視化

1. 5 μ l の反応混合物を滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブ中の 5 μ l の TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) に加え、熱サーモミキサー (エッペンドルフ) を使用して 5 分間 95 $^{\circ}$ C まで加熱した。

2. 次に、5 μ l の試料を、予熱した 1 $\times$ TBE 緩衝液 Thermo Scientific (89 mM のトリス、89 mM のホウ酸、および 2 mM の EDTA) を含んだ 15% の TBE-尿素ゲル 1.0 mm $\times$ 10 ウェル (Invitrogen) のウェルに入れた。

3. X-cell sure lock モジュール (Novex) を適所に固定し、以下の条件、室温で 40 分間、260 V、90 A で電気泳動を行った。

4. ゲルを、Cy3 LED を使用して ChemiDoc MP (BioRad) によって可視化した。可視化および分析は、Image Lab 2.0 プラットフォーム上で実施した。

【0620】

以下のプロトコルを使用して、精製された DNA 濃度の測定値を判定した。

1. 2 μ l の滅菌蒸留水 (ELGA VEOLIA) を台座に加えることによって、NanoDrop One (Thermo Scientific) を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ (Whatman) を使用して、水をやさしく拭き取った。

3. 2 μ l の緩衝液 EB QIAGEN (10 mM のトリス、CL、pH 8.5) を加えることによって、NanoDrop One をブランクにした。次に、ブランクの後、工程 2 を繰り返した。

4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

5. 精製された DNA をポリアクリルアミドゲルに流し、第 2 節の工程 5 ~ 8 の手順に従って可視化した。条件または試薬に変更はなかった。

【0621】

以下に概説されたプロトコルを使用した各工程後に、試料混合物を精製した。

1. 500 μ l の緩衝液 PNI QIAGEN (5 M の塩化グアニジニウム) を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

2. 混合物を QIAquick スピнкаラム (QIAGEN) に移し、6000 rpm で 1 分間遠心分離した。

3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750 μ l の緩衝液 PE QIAGEN (10 mM のトリス-HCl、pH 7.5 および 80% のエタノール) をスピнкаラムに加え、6000 rpm で 1 分間遠心分離した。

10

20

30

40

50

4. フロースルーを廃棄し、スピncラムを13000rpmでさらに1分間遠心分離し、残留PE緩衝液を除去した。

5. 次に、スピncラムを滅菌1.5mLのエppendorfチューブに入れた。

6. DNA溶出のために、反応のための20μLの適切な緩衝液をカラム膜の中心に加え、室温で1分間放置した。

7. 次に、チューブを13000rpmで1分間遠心分離した。溶出したDNA濃度を測定し、その後の使用のために-20℃で保存した。

【0622】

実施例8 バージョン2 化学-二重ヘアピンモデルについての完全な2サイクル実験

この実施例は、二重ヘアピンモデル上で4つの工程：ニック部位からの3'-O-修飾dNTPの組み込み、脱保護、切断、および連結を使用したポリヌクレオチドの合成のための完全な2サイクル実験を記載しており、第1の工程は、相補的塩基と反対で起こる。

【0623】

方法は、図28aに示される第1のサイクルの反応の概略図に示されるように、DNAポリメラーゼによる酵素的組み込み、その後の脱保護、イノシン切断、および連結によるオリゴヌクレオチドへの3'-O-保護塩基の制御された付加によって開始する。図28bは、第2のサイクルの反応の概略図を示す。

【0624】

材料および方法

材料

1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis. Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開：J. William Efcavitch, Juliasta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

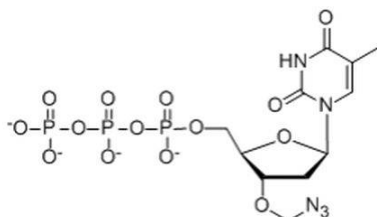
2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Sigma-Aldrichから入手した(図28d)。原液を100μMの濃度で調製する。

3. New England BioLabsによって操作されたTherminator IX DNAポリメラーゼは、3'-O-修飾dNTPを組み込む能力を高めた。

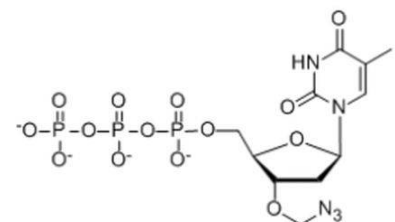
3'-O-アジドメチル-dTTPおよび3'-O-アジドメチル-dCTPを組み込みのために使用した。

【化40】

3'-O-アジドメチル-dTTP:



3'-O-アジドメチル-dCTP:



【0625】

方法

第1のサイクル:

1. 2μLの10×Thermopol (登録商標) 緩衝液(20mMのトリス-HCl、10mMの(NH4)2SO4、10mMのKCl、2mMのMgSO4、0.1%のT

riton (登録商標) X-100、pH 8.8、New England BioLabs) を、1.5 ml のエッペンドルフチューブ中の 12.5 μ l の滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。

2. 2 μ l の 10 μ M の二重ヘアピンモデルオリゴヌクレオチド (20 pmol、1 当量) (配列番号 56、図 28d) を反応混合物に加えた。

3. 3'-O-修飾-dTTP (2 μ l の 100 μ M) および $MnCl_2$ (1 μ l の 40 mM) を加えた。

4. 次に、1.5 μ l の Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、New England BioLabs) を加えた。

5. 反応物を 37°C で 10 分間インキュベートした。

6. アリコート (5 μ l) を反応混合物から取り出し、0.5 μ l の天然 dNTP 混合物を加え、10 分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

7. pH = 7.4 の 1 M のトリス緩衝液中の 40 μ l の 500 mM の TCEP を反応混合物に加え、37°C で 10 分間反応させた。

8. 精製工程 1~7 に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

9. 20 μ l の NEB Reaction buffer (登録商標) (50 mM の酢酸カリウム、20 mM のトリス-酢酸、10 mM の酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25°C で pH 7.9) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

10. 1 μ l のヒトエンドヌクレアーゼ V (Endo V) NEB (30 単位/ μ l) を同じチューブに加えた。

11. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5 秒間 13,000 rpm で遠心分離し、37°C で 1 時間インキュベートした。

12. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化 (すなわち、65°C で 20 分間) によって反応を終了させた。

13. アリコート (5 μ l) を反応混合物から取り出し、TBE 緩衝液を使用してポリアクリルアミドゲル (15%) 上で分析し、Chemidoc MP 撮像システム (BioRad) によって可視化した。

14. 精製工程 1~7 に概説されたプロトコルを使用して、QIAGEN ヌクレオチド除去キットによって、反応混合物を精製した。

15. 20 μ l の NEB Reaction buffer (登録商標) (50 mM の酢酸カリウム、20 mM のトリス-酢酸、10 mM の酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25°C で pH 7.9) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

16. 10 μ l の連結のための 100 μ M の鎖 (1 nmol) (配列番号 57、図 28d) を反応混合物に加えた。

17. 40 μ l の平滑/TA DNA リガーゼ NEB (180 単位/ μ l) を同じチューブに加えた。

18. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5 秒間 13,000 rpm で遠心分離し、室温で 20 分間インキュベートした。

19. 精製工程 1~5 に概説されたプロトコルを使用して、ストレプトアビジン磁気ビーズキットによって、反応混合物を精製した。

20. 非連結オリゴヌクレオチドをラムダエキソヌクレアーゼによって消化した。

21. 精製工程 1~7 に概説されたプロトコルを使用して、QIAGEN ヌクレオチド除去キットによって、反応混合物を精製した。

22. 20 μ l の NEB Reaction buffer (登録商標) (50 mM の酢酸カリウム、20 mM のトリス-酢酸、10 mM の酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25°C で pH 7.9) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

第 2 のサイクル:

23. 3'-O-修飾-dCTP (2 μ l の 100 μ M) および $MnCl_2$ (1 μ l の 40 mM) を加えた。

24. 次に、1.5 μ l の Terminator IX DNA ポリメラーゼ (15 U、

10

20

30

40

50

New England BioLabs)を加えた。

25. 反応物を37℃で10分間インキュベートした。

26. アリコート(5μl)を反応混合物から取り出し、0.5μlの天然dNTP混合物を加え、10分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

27. pH=7.4の1Mのトリス緩衝液中の40μlの500mMのTCEPを反応混合物に加え、37℃で10分間反応させた。

28. 精製工程1~7に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

29. 20μlのNEB Reaction buffer (登録商標)(50mMの酢酸カリウム、20mMのトリス-酢酸、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25℃でpH7.9)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

30. 1μlのヒトエンドヌクレアーゼV(Endo V)NEB(30単位/μl)を同じチューブに加えた。

31. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、37℃で1時間インキュベートした。

32. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化(すなわち、65℃で20分間)によって反応を終了させた。

33. アリコート(5μl)を反応混合物から取り出し、TBE緩衝液を使用してポリアクリルアミドゲル(15%)上で分析し、Chemidoc MP撮像システム(BioRad)によって可視化した。

34. 精製工程1~7に概説されたプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

35. 20μlのNEB Reaction buffer (登録商標)(50mMの酢酸カリウム、20mMのトリス-酢酸、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、25℃でpH7.9)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

36. 10μlの連結のための100μMの鎖(1nmol)(配列番号58、図28d)を反応混合物に加えた。

37. 40μlの平滑/TA DNAリガーゼNEB(180単位/μl)を同じチューブに加えた。

38. 次に、反応混合物をピペットで再懸濁することによって穏やかに混合し、5秒間13,000rpmで遠心分離し、室温で10分間インキュベートした。

39. インキュベーション時間が経過した後、TBE-尿素試料緩衝液(Novex)を加えて反応を終了させた。

【0626】

ゲル電気泳動およびDNAの可視化

1. 5μlの反応混合物を、滅菌1.5mlのエッペンドルフチューブ中の5μlのTBE-尿素試料緩衝液(Novex)に加え、熱サーモミキサー(エッペンドルフ)を使用して5分間95℃まで加熱した。

2. 次に、5μlの試料を、予熱した1×TBE緩衝液Thermo Scientific(89mMのトリス、89mMのホウ酸、および2mMのEDTA)を含んだ15%のTBE-尿素ゲル1.0mm×10ウェル(Invitrogen)のウェルに入れた。

3. X-cell sure lockモジュール(Novex)を適所に固定し、以下の条件、室温で40分間、260V、90Aを適用することによって、電気泳動に供した。

4. ゲルを、Cy3 LEDを使用してChemidoc MP(BioRad)によって可視化した。可視化および分析は、Image lab 2.0プラットフォーム上で実施した。

【0627】

以下のプロトコルを使用して、精製されたDNA濃度の測定値を判定した。

1. 2μlの滅菌蒸留水(ELGA VEOLIA)を台座に加えることによって、NanoDrop One(Thermo Scientific)を平衡化した。

2. 平衡化の後、糸くずの出ないレンズ洗浄用ティッシュ(Whatman)を使用して、水をやさしく拭き取った。

10

20

30

40

50

3. 2 μ l の緩衝液 EB QIAGEN (10 mM のトリス・CL、pH 8.5) を加えることによって、NanoDrop One をブランクにした。ブランキングの後に、工程 2 を繰り返した。

4. 2 μ l の試料を台座に加え、タッチスクリーン上の測定アイコンを選択することによって、DNA 濃度を測定した。

【0628】

以下に概説されたプロトコルを使用して、QIAGEN ヌクレオチド除去キットによって、試料混合物を精製した。

1. 500 μ l の緩衝液 PNI QIAGEN (5 M の塩化グアニジニウム) を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

2. 混合物を QIAquick スピнкаラム (QIAGEN) に移し、6000 rpm で 1 分間遠心分離した。

3. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750 μ l の緩衝液 PE QIAGEN (10 mM のトリス-HCl、pH 7.5 および 80% のエタノール) をスピнкаラムに加え、6000 rpm で 1 分間遠心分離した。

4. フロースルーを廃棄し、スピнкаラムを 13000 rpm でさらに 1 分間遠心分離して、残留 PE 緩衝液を除去した。

5. 次に、スピнкаラムを滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブに入れた。

6. DNA 溶出のために、反応のための 20 μ l の適切な緩衝液をカラム膜の中心に加え、室温で 1 分間放置した。

7. 次に、チューブを 13000 rpm で 1 分間遠心分離した。

【0629】

連結工程の後に、ストレプトアビジン磁気ビーズを使用して、以下に概説されたプロトコルを介して、試料混合物を精製した。

1. 200 μ l の結合緩衝液 (20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4) によって、100 μ l のストレプトアビジン磁気ビーズ (New England Biolabs) を 3 回洗浄した。

2. 連結工程後の反応混合物を 10 容量の結合緩衝液 (20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4) と混合し、ストレプトアビジン磁気ビーズと共に 20°C で 15 分間インキュベートする。

3. 200 μ l の結合緩衝液 (20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4) によって、ストレプトアビジン磁気ビーズを 3 回洗浄した。

4. 脱イオン水によって、ストレプトアビジン磁気ビーズを 3 回洗浄した。

5. 95°C で 3 分間加熱することによる 40 μ l の脱イオン水によって、オリゴヌクレオチドを溶出した。

【0630】

図 28c に示される結果は、本発明の例示的な方法を使用した 2 つの完全な合成サイクルの実行を示す。

【0631】

実施例 9. バージョン 2 化学-単一ヘアピンモデル上での完全な 3 サイクル実験。

この実施例は、二重ヘアピンモデル上での 5 つの工程：ニック部位からの 3'-OH 修飾 dNTP の組み込み、脱保護、切断、連結、および変性工程を使用したポリヌクレオチドの合成のための完全な 3 サイクル実験を記載しており、第 1 の工程は、相補的塩基と反対で起こる。

【0632】

方法の例示的な概略図を図 33、34、および 35 に示す。

【0633】

方法は、DNA ポリメラーゼによる酵素的組み込み、その後の脱保護、切断、連結、およびヘルパー鎖の変性によるオリゴヌクレオチドへの 3'-OH 保護塩基の制御された付加によって開始する。図 33 は、酵素的組み込み、脱保護、切断、連結、および変性工程

10

20

30

40

50

を伴う第1の完全サイクルを示す。この実施例では、オリゴヌクレオチドはTヌクレオチドによって伸長される。図34は、酵素的組み込み、脱保護、切断、連結工程、および変性工程を伴う第1のサイクルに続く第2の完全サイクルを示す。この実施例では、オリゴヌクレオチドはTヌクレオチドだけ伸長されている。図35は、酵素的組み込み、脱保護、切断、連結、および変性工程を伴う第2のサイクルに続く第3の完全サイクルを示す。この実施例では、オリゴヌクレオチドはTヌクレオチドによって伸長される。

【0634】

材料および方法

材料

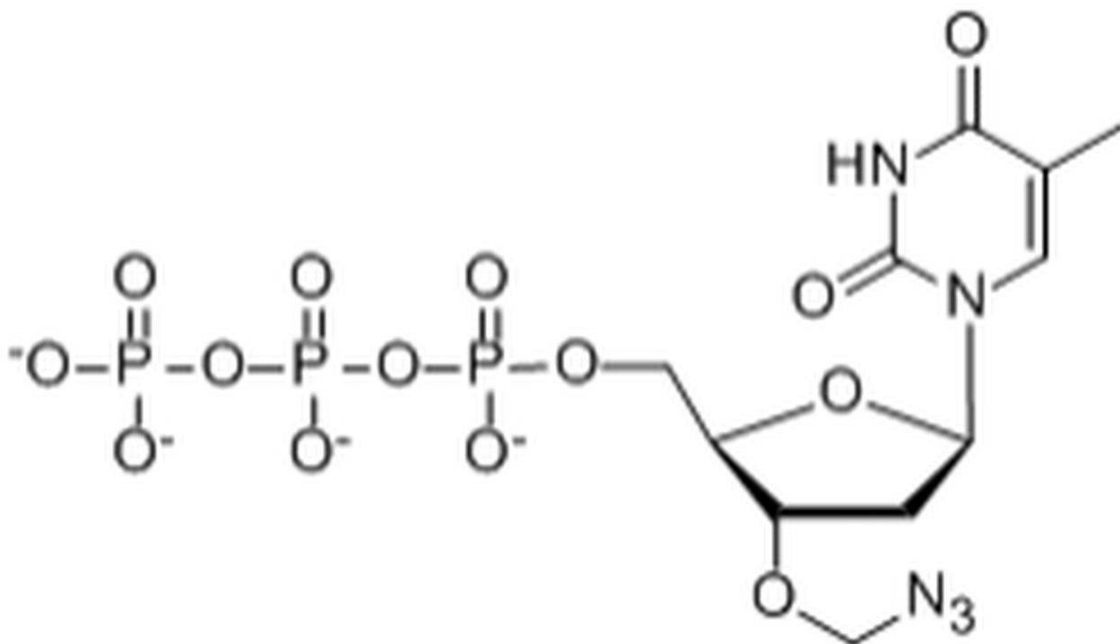
1. Jian Wu: Molecular Engineering of Novel Nucleotide Analogues for DNA Sequencing by Synthesis, Columbia University, 2008のPhD論文に記載されるプロトコルに従って、3'-O-修飾dNTPを社内で合成した。合成のためのプロトコルはまた、米国特許出願公開: J. William Efcavitch, Julieta E. Sylvester, Modified Template-Independent Enzymes for Polydeoxynucleotide Synthesis, Molecular Assemblies US2016/0108382A1にも記載されている。

2. オリゴヌクレオチドを社内で設計し、Integrated DNA Technologies, Sigma-Aldrichから入手した(図36)。原液を100μMの濃度で調製する。

3. 3'-O-修飾dNTPを組み込む能力が増強された、New England Bio Labsによって操作されたTherminator X DNAポリメラーゼを使用した。代替的に、任意のDNAポリメラーゼまたは修飾dNTPを組み込むことができる他の酵素を使用することができる。

3'-O-アジドメチル-dTTPを組み込みのために使用した。

【化41】



【0635】

方法

第1のサイクル：

1. 20 μ l の 10 $\times$ Thermopol (登録商標) 緩衝液 (20 mM の トリス-HCl、10 mM の (NH₄)₂SO₄、10 mM の KCl、2 mM の MgSO₄、0.1% の Triton (登録商標) X-100、pH 8.8、New England Biolabs) および MnCl₂ 溶液 (10 μ l の 40 mM) を、1.5 ml の エッペンドルフチューブ中の 139 μ l の 滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。
2. 20 μ l の 100 μ M の 単一ヘアピンモデルオリゴヌクレオチド (2 nmol、1 当量) (配列番号 59、図 36) を反応混合物に加えた。
3. アリコート (4 μ l) を反応混合物から取り出し、0.5 μ l の天然 dNTP 混合物 (4 mM) および 0.5 μ l の Bst DNA ポリメラーゼならびに 0.5 μ l の Sulfolobus DNA ポリメラーゼ IV を追加し、10 分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。
4. 3'-O-修飾-dTTP (10 μ l の 2 mM) を加えた。
5. 次に、5 μ l の Terminator X DNA ポリメラーゼ (50 U、New England Biolabs) を加えた。しかしながら、修飾 dNTP を組み込むことができる任意の DNA ポリメラーゼまたは他の酵素を使用することができる。
6. 反応物を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。
7. 精製工程 66 ~ 72 に概説された QIAGEN ヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。
8. 200 μ l の TE 緩衝液によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。
9. アリコート (4 μ l) を反応混合物から取り出し、0.5 μ l の天然 dNTP 混合物 (4 mM) および 0.5 μ l の Bst DNA ポリメラーゼならびに 0.5 μ l の Sulfolobus DNA ポリメラーゼ IV を追加し、10 分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。
10. 400 μ l の 500 mM の TCEP を反応混合物に加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。
11. 精製工程 66 ~ 72 に概説された QIAGEN ヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。
12. 150 μ l の NEB Reaction buffer (登録商標) (50 mM の 酢酸カリウム、20 mM の トリス-酢酸、10 mM の 酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、25 $^{\circ}$ C で pH 7.9) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。
13. アリコート (4 μ l) を反応混合物から取り出し、0.5 μ l の天然 dNTP 混合物 (4 mM) および 0.5 μ l の Bst DNA ポリメラーゼならびに 0.5 μ l の Sulfolobus DNA ポリメラーゼ IV を追加し、10 分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。
14. 5 μ l の ヒトエンドヌクレアーゼ V (Endo V) NEB (30 単位/ μ l) を溶出液に加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。任意の好適な代替エンドヌクレアーゼを使用することができる。
15. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化 (すなわち、65 $^{\circ}$ C で 20 分間) によって反応を終了させた。
16. アリコート (5 μ l) を反応混合物から取り出し、ポリアクリルアミドゲル上で分析した。
17. 精製工程 66 ~ 72 に概説されたプロトコルを使用して、QIAGEN ヌクレオチド除去キットによって、反応混合物を精製した。
18. 100 μ l の T3 DNA リガーゼ緩衝液 (2 倍濃縮) によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。
19. 20 μ l の 連結のための 100 μ M の イノシン鎖 (2 nmol) および 20 μ l の

10

20

30

40

50

連結のための100 μMのヘルパー鎖(2 nmol) (配列番号60、51、図36)、
ならびに40 μlの水を反応物に加えた。

20. 20 μlのT3 DNAリガーゼNEB(3000単位/μl)を同じチューブに
加え(これは任意のDNA連結酵素を含み得る)、室温で30分間インキュベートした。
精製工程73~78に概説された変性工程を含むストレプトアビジン磁気ビーズキットの
ためのプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

21. 精製工程66~72に概説されたQIAGENヌクレオチド除去キットのためのプ
ロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

22. 100 μlのTE緩衝液によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに
溶出した。

第2のサイクル:

23. 15 μlの10×Thermopol(登録商標)緩衝液(20mMのトリス-H
Cl、10mMの(NH₄)₂SO₄、10mMのKCl、2mMのMgSO₄、0.1%
のTriton(登録商標)X-100、pH8.8、New England Biolabs)、MnCl₂溶液(7.5 μlの40mM)、および19 μlの脱イオン水を加
えた。

24. アリコート(4 μl)を反応混合物から取り出し、0.5 μlの天然dNTP混合
物(4mM)および0.5 μlのBst DNAポリメラーゼならびに0.5 μlのSu
lfolobus DNAポリメラーゼIVを追加し、10分間反応させた。ゲル電気泳
動によって反応物を分析した。

25. 3'-O-修飾-dTTP(7.5 μlの2mM)を加えた。

26. 次に、5 μlのTherminator X DNAポリメラーゼ(50U、New
England Biolabs)を加えた。修飾dNTPを組み込むことができる任意
のDNAポリメラーゼを使用することができる。

27. 反応物を37℃で30分間インキュベートした。

28. 精製工程66~72に概説されたQIAGENヌクレオチド除去キットを使用して
、反応混合物を精製した。

29. 100 μlのTE緩衝液によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに
溶出した。

30. アリコート(4 μl)を反応混合物から取り出し、0.5 μlの天然dNTP混合
物(4mM)および0.5 μlのBst DNAポリメラーゼならびに0.5 μlのSu
lfolobus DNAポリメラーゼIVを追加し、10分間反応させた。ゲル電気泳
動によって反応物を分析した。

31. 200 μlの500mMのTCEPを反応混合物に加え、37℃で10分間反応さ
せた。

32. 精製工程66~72に概説されたQIAGENヌクレオチド除去キットを使用して
、反応混合物を精製した。

33. 100 μlのNEB Reaction buffer(登録商標)(50mMの酢
酸カリウム、20mMのトリス-酢酸、10mMの酢酸マグネシウム、1mMのDTT、
25℃でpH7.9)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

34. アリコート(4 μl)を反応混合物から取り出し、0.5 μlの天然dNTP混合
物(4mM)および0.5 μlのBst DNAポリメラーゼならびに0.5 μlのSu
lfolobus DNAポリメラーゼIVを追加し、10分間反応させた。ゲル電気泳
動によって反応物を分析した。

35. 5 μlのヒトエンドヌクレアーゼV(Endo V)NEB(30単位/μl)を
溶出液に加え、37℃で30分間インキュベートした。任意の好適な代替エンドヌクレ
アーゼを使用することができる。

36. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化(すなわち、65℃で2
0分間)によって反応を終了させた。

37. アリコート(5 μl)を反応混合物から取り出し、ポリアクリルアミドゲル上で分

10

20

30

40

50

析した。

38. 精製工程66～72に概説されたプロトコルを使用して、QIAGENヌクレオチド除去キットによって、反応混合物を精製した。

39. 60 μ lのT3 DNAリガーゼ緩衝液(2倍濃縮)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

40. 20 μ lの連結のための100 μ Mのイノシン鎖(2 nmol)および20 μ lの連結のための100 μ Mのヘルパー鎖(2 nmol)(配列番号60、51、図36)、ならびに10 μ lの脱イオン水を反応混合物に加えた。

41. 10 μ lのT3 DNAリガーゼNEB(3000単位/ μ l)を同じチューブに加え、室温で30分間インキュベートした。任意の好適なDNAリガーゼを使用することができる。

10

42. 精製工程73～78に概説された変性工程を含むストレプトアビジン磁気ビーズキットのためのプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

43. 精製工程66～72に概説されたQIAGENヌクレオチド除去キットのためのプロトコルを使用して、反応混合物を精製した。

44. 46 μ lのTE緩衝液によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

第3のサイクル:

45. 6 μ lの10 $\times$ Thermopol(登録商標)緩衝液(20 mMのトリス-HCl、10 mMの(NH₄)₂SO₄、10 mMのKCl、2 mMのMgSO₄、0.1%のTriton(登録商標)X-100、pH 8.8、New England Biolabs)、MnCl₂溶液(3 μ lの40 mM)を加えた。

20

46. アリコート(4 μ l)を反応混合物から取り出し、0.5 μ lの天然dNTP混合物(4 mM)および0.5 μ lのBst DNAポリメラーゼならびに0.5 μ lのSulfolobus DNAポリメラーゼIVを追加し、10分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

47. 3'-O-修飾-dTTP(6 μ lの200 μ M)を加えた。

48. 次に、3 μ lのTherminator X DNAポリメラーゼ(30 U、New England Biolabs)を加えた。修飾dNTPを組み込むことができる任意のDNAポリメラーゼまたは他の好適な酵素を使用することができる。

30

49. 反応物を37℃で30分間インキュベートした。

50. 精製工程66～72に概説されたQIAGENヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。

51. 50 μ lのTE緩衝液によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

52. アリコート(4 μ l)を反応混合物から取り出し、0.5 μ lの天然dNTP混合物(4 mM)および0.5 μ lのBst DNAポリメラーゼならびに0.5 μ lのSulfolobus DNAポリメラーゼIVを追加し、10分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

53. 100 μ lの500 mMのTCEPを反応混合物に加え、37℃で10分間反応させた。

40

54. 精製工程66～72に概説されたQIAGENヌクレオチド除去キットを使用して、反応混合物を精製した。

55. 49 μ lのNEB Reaction buffer(登録商標)(50 mMの酢酸カリウム、20 mMのトリス-酢酸、10 mMの酢酸マグネシウム、1 mMのDTT、25℃でpH 7.9)によって、DNA試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

56. アリコート(4 μ l)を反応混合物から取り出し、0.5 μ lの天然dNTP混合物(4 mM)および0.5 μ lのBst DNAポリメラーゼならびに0.5 μ lのSulfolobus DNAポリメラーゼIVを追加し、10分間反応させた。ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

50

57. 5 μ l のヒトエンドヌクレアーゼ V (Endo V) NEB (30 単位/ μ l) を溶出液に加え、37℃で30分間インキュベートした。代替的に、任意の好適なエンドヌクレアーゼを使用することができる。

58. インキュベーション時間が経過した後、酵素的熱不活性化（すなわち、65℃で20分間）によって反応を終了させた。

59. アリコート（5 μ l）を反応混合物から取り出し、ポリアクリルアミドゲル上で分析した。

60. 精製工程66～72に概説されたプロトコルを使用して、QIAGENヌクレオチド除去キットによって、反応混合物を精製した。

61. 30 μ l の T3 DNA リガーゼ緩衝液（2倍濃縮）によって、DNA 試料を清浄なエッペンドルフチューブに溶出した。

62. 10 μ l の連結のための100 μ M のイノシン鎖（2 nmol）、10 μ l の連結のための100 μ M のヘルパー鎖（2 nmol）（配列番号60、51、図36）、および5 μ l の水を反応混合物に加えた。

63. 5 μ l の T3 DNA リガーゼ NEB (3000 単位/ μ l) を同じチューブに加えた。（これは任意のDNA連結酵素を含み得）、室温で30分間インキュベートした。

64. ゲル電気泳動によって反応物を分析した。

以下に概説されたプロトコルを使用した、組み込み、脱ブロック、および切断工程の後のQIAGENヌクレオチド除去キットによる反応混合物の精製。

65. 10 容量の緩衝液 PNI QIAGEN (5M の塩化グアニジニウム) を試料に加え、ピペットで穏やかに再懸濁することによって混合した。

66. 混合物を QIAquick スピнкаラム (QIAGEN) に移し、6000 rpm で1分間遠心分離した。

67. 遠心分離後、フロースルーを廃棄し、750 μ l の緩衝液 PE QIAGEN (10 mM のトリス-HCl、pH 7.5 および 80% のエタノール) をスピнкаラムに加え、6000 rpm で1分間遠心分離した。

68. フロースルーを廃棄し、スピнкаラムを13000 rpm でさらに1分間遠心分離して、残留 PE 緩衝液を除去した。

69. 次に、スピнкаラムを滅菌 1.5 ml のエッペンドルフチューブに入れた。

70. DNA 溶出のために、反応のための20～200 μ l の適切な緩衝液をカラム膜の中心に加え、室温で1分間放置した。

71. 次に、チューブを13000 rpm で1分間遠心分離した。

変性工程を伴うストレプトアビジン磁気ビーズを使用した連結工程後の反応物の精製を、以下に概説されたプロトコルを介して行った。

72. 200 μ l の結合緩衝液（20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4）によって、100 μ l のストレプトアビジン磁気ビーズ（New England Biolabs）を3回洗浄した。

73. 連結工程後の反応混合物を10 容量の結合緩衝液（20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4）と混合し、ストレプトアビジン磁気ビーズと共に20℃で15分間インキュベートさせた。

74. 200 μ l の結合緩衝液（20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4）によって、ストレプトアビジン磁気ビーズを3回洗浄した。

75. ヘルパー鎖を除去するために、ストレプトアビジン磁気ビーズを200 μ l の結合緩衝液（20 mM のトリス、500 mM の NaCl、pH = 7.4）中で80℃まで加熱し、磁石にかけ、上清を迅速に廃棄した。

76. 脱イオン水を用いて、ストレプトアビジン磁気ビーズを3回洗浄した。

77. 95℃で3分間加熱することによる50～100 μ l の脱イオン水によって、オリゴヌクレオチドを溶出した。

【0636】

結果および結論

10

20

30

40

50

図37は、組み込み、脱ブロック、切断、および連結工程を含む完全3サイクル実験に対応する反応生産物を示すゲルを示す。示されている結果は、本発明の例示的な方法を使用した3つの完全合成サイクルの実行を実証している。

【0637】

実施例10．ポリアクリルアミド表面の誘導体化およびその後の分子の固定化

この実施例は、N-(5-ブロモアセトアミジルペンチル) アクリルアミド (BRAPA) を使用したポリアクリルアミド表面上のブロモアセチル基の提示、およびその後のブロモアセチル基へのそれらの共有結合によるチオール化分子の表面固定化を記載する。

【0638】

材料および方法

顕微鏡用スライドガラスおよびカバーガラスを、アセトン、エタノール、および水中でそれぞれ10分間ずつ順次超音波処理することによって洗浄し、アルゴンで乾燥させた。清浄なガラス製のカバーガラスを、ポリスチレン製ペトリ皿中で、気相でトリクロロ(1H、1H、2H、2H-ペルフルオロオクチル) シランでシラン化し、エタノール中で2回超音波処理し、Arで乾燥させた(以後、「フッ素化カバーガラス」)。顕微鏡用スライドガラス上で、4%アクリルアミド/N,N'-メチレンビスアクリルアミド(19:1)溶液を、100μlの10%(w/v)過硫酸アンモニウム(APS)、10μlのテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)と混合し、0、0.1、0.2、および0.3%(w/v)でN-(5-ブロモアセトアミジルペンチル) アクリルアミド(BRAPA)を添加し、直径4mmのゴム製ガスケットに素早く分配し、続いてアクリルアミド溶液に向かって面するフッ素化側を含むフッ素化カバーガラスで挟み、10分間重合した。10分後、表面を脱イオン水に浸し、合計4時間浸したままにし、その間にフッ素化カバーガラスを注意深く取り除いた。重合されたポリアクリルアミド表面をアルゴンで乾燥させた。

【0639】

続いてポリアクリルアミド表面を、リン酸ナトリウム緩衝液(10mM、pH8)中の陰性対照として、チオール化ポリエチレングリコール(1kDa)フルオレセイン(FITC-PEG-SH)、およびカルボキシル化ポリエチレングリコール(1kDa)フルオレセイン(FITC-PEG-COOH)に1時間曝露し、続いてリン酸ナトリウム緩衝液(10mM、pH7)および0.05%Tween20/0.5MのNaClを含む同じ緩衝液で順次洗浄して、非特異的に吸着されたチオール化およびカルボキシル化フルオロフォアを除去した。続いて表面を、フルオレセインチャンネルのChemIDoc(Bio-Rad)によって撮像した。

【0640】

結果および結論

図38は蛍光シグナルを示し、図39は、FITC-PEG-SHおよびFITC-PEG-COOHに曝露された異なる量のBRAPAを添加したポリアクリルアミドゲル表面からの測定された蛍光を示す。フルオレセインの固定化は、カルボキシル化フルオレセインのゼロに近い非特異的吸着を伴って、BRAPAおよびチオール化フルオレセインのみを添加したポリアクリルアミド表面でのみ成功した。

【0641】

BRAPAを含まないポリアクリルアミド表面(BRAPA 0%)ならびにBRAPAおよびカルボキシル化分子(FITC-PEG-COOH)を含むポリアクリルアミド表面と比較して、BRAPAを含むポリアクリルアミド表面(BRAPA 0.1、0.2、および0.3%)、およびチオール化分子(FITC-PEG-SH)のみから、有意に高い陽性蛍光シグナルが得られた。結果は、表面からのブロモアセチル部分とフルオレセインタグ付き分子からのチオール部分との間に、特異的共有結合が起こったことを示す。

【0642】

結果は、本発明の方法で使用するための支持鎖および合成鎖を含む分子などの分子が、

10

20

30

40

50

本明細書に記載されるポリヌクレオチド合成反応に適合する表面基質上に容易に固定化され得ることを実証する。

【0643】

実施例11. ヘアピンDNAオリゴマーの表面固定化、およびその後の蛍光標識されたデオキシヌクレオシド三リン酸の組み込み。

この実施例は以下を記載する。

(1) 薄いポリアクリルアミド表面上にブロモアセチル基を提示する方法、

(2) チオリン酸官能化ヘアピンDNAのリンカーを有するか、または有しない共有結合を介したヘアピンDNAのその後の固定化、および

(3) ヘアピンDNAへの2'-デオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)の組み込み。

【0644】

本方法は、実質的にあらゆる種類の材料表面(例えば、金属、ポリマーなど)と適合する。

【0645】

(1): ブロモアセチル官能化された薄いポリアクリルアミド表面の加工

材料および方法

最初に、顕微鏡用スライドガラスを、純粋なDecon 90(30分)、水(30分)、1MのNaOH(15分)、水(30分)、0.1MのHCl(15分)、水(30分)中で超音波処理によって洗浄し、最後にアルゴンで乾燥させた。

【0646】

最初に、2%(w/v)のアクリルアミドモノマー溶液を、1gのアクリルアミドモノマーを50mlの水に溶解することによって作成した。アクリルアミドモノマー溶液をボルテックスし、アルゴン中で15分間脱気した。N-(5-ブロモアセトアミジルペンチル)アクリルアミド(BRAPA、82.5mg)を、825μlのDMFに溶解し、アクリルアミドモノマー溶液に加え、さらにボルテックスした。最後に、1mlの5%(w/v)過硫酸カリウム(KPS)および115μlの純粋なテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)を、アクリルアミド溶液に加え、ボルテックスし、清浄な顕微鏡用スライドガラスを、このアクリルアミド重合混合物に90分間曝露した。90分後、表面を脱イオン水で洗浄し、アルゴンで乾燥させた。これらの表面は、この実施例では、以後「BRAPA修飾表面」と呼ぶことにする。陰性対照として、BRAPAを含まないポリアクリルアミド表面もまた、アクリルアミドモノマー溶液へのBRAPA溶液の添加を除外することによって、上記に記載されるものと同様の方法で作成した。これらの表面は、この実施例では、以後「BRAPA制御表面」と呼ぶことにする。

【0647】

(2): ポリアクリルアミド表面へのチオリン酸官能化ヘアピンDNAの共有結合

材料および方法

直径4mmの円形開口部を有するゴム製ガasketを、BRAPA修飾表面およびBRAPA制御表面上に置いて固定した。最初に、表面をリン酸ナトリウム緩衝液(10mM、pH7)で10分間下塗りした。続いて緩衝液を除去し、表面を、それぞれ1μMの濃度の6個の単一のチオリン酸で修飾されたリンカーを含み、かつ含まない5'-蛍光標識された(Alexa 647)ヘアピンDNAオリゴマーに曝露し、暗所で1時間インキュベートした。対照として、リンカーを有するおよび有しないが、チオリン酸を有しないDNAオリゴマーと共に、BRAPA修飾表面をインキュベートした(この実施例では、以後「オリゴマー制御表面」と呼ばれる)。インキュベーション後、リン酸ナトリウム(100mM、pH7)、続いてトリス-EDTA緩衝液(10mMのトリス、10mMのEDTA、pH8)で表面をすすぎ、最後に水ですすいだ。任意の非特異的に吸着されたDNAオリゴマーを除去するために、続いて1Mの塩化ナトリウムおよび0.05%(v/v)のTween 20を含む水で表面を洗浄し、水で洗浄し、アルゴンで乾燥させた。Alexa 647チャンネルのChemIDoc撮像装置上で表面をスキャンした。

【0648】

10

20

30

40

50

図40aは、リンカーが異なる試料に固定化されていないヘアピンDNAの配列を示す。図40bは、リンカーが異なる試料に固定化されたヘアピンDNAの配列を示す。

【0649】

結果

結果を図41および42に示す。図41は、ブromoアセチル官能化ポリアクリルアミド表面に固定化されたリンカーを有するおよび有しないヘアピンDNAオリゴマーから生じるが、BRAPAまたはオリゴマー対照からは生じない蛍光シグナルを示す。

【0650】

図42は、ポリアクリルアミド表面へのDNA固定化の後に測定された蛍光強度を示す。この図は、様々なポリアクリルアミド表面から得られた表面蛍光シグナルを示し、ブromoアセチル官能化ポリアクリルアミド表面へのDNAの共有結合固定化の成功のために、（（2）に記載されるような）BRAPAおよびオリゴマー制御表面と比較して、有意に高いシグナルが、BRAPA修飾表面に固定化されたヘアピンDNAオリゴマーから得られたことを示す。

【0651】

結論

DNAからの蛍光シグナルは、BRAPAを添加したBRAPA修飾表面からのみ顕著に存在し、チオリン酸官能基を介した表面へのDNAの共有結合の成功を示している。リンカーを有しないDNAと比較して、リンカーを有するDNAから、均一かつより高いシグナルが得られた。

【0652】

（3）：リンカーを有するヘアピンDNAオリゴマーへの三リン酸の組み込み

材料および方法

直径9mmの円形開口部を有するゴム製ガasketを、リンカーを有するDNAオリゴマーで固定化されたBRAPA修飾表面上に置き、組み込み緩衝液（50mMのトリス、pH8、1mMのEDTA、6mMのMgSO₄、0.05%のtween20、および2mMのMnCl₂）で10分間下塗りした。続いて表面を、DNAポリメラーゼ（0.5U/μlのTherminator X DNAポリメラーゼ）および三リン酸（20μMのAlexa 488標識dUTP）を含む組み込み緩衝液に曝露し、1時間インキュベートした（この実施例では、以後「ポリメラーゼ表面」と呼ばれる）。陰性対照として、追加の表面の組み込み、Therminator X DNAポリメラーゼを含まない組み込み緩衝液に1時間曝露した（この実施例では、以後「陰性表面」と呼ばれる）。1時間後、両方の種類の試料を水中で洗浄し、続いて1Mの塩化ナトリウムおよび0.05%（v/v）のTween20を含む水に曝露し、再び水で洗浄した。表面からの蛍光シグナルを、Alexa 647およびAlexa 488チャンネルのChemIDocを使用して測定し、ヘアピンDNAの存在（Alexa 647）およびdUTPの組み込み（Alexa 488）の両方をモニタリングした。

【0653】

結果

図43は、Alexa 488標識dUTPの組み込み前および後のAlexa 647およびAlexa 488チャンネルから検出された蛍光シグナルを示す。組み込み前および後のAlexa 647からの不変の陽性シグナルは、表面固定化ヘアピンDNAが組み込み反応中に安定的であることを示し、Alexa 488からの陽性シグナルは、ポリメラーゼの存在によってのみ、dUTPの組み込みの成功を示す、組み込み反応後のポリメラーゼ表面からのみ観察された。

【0654】

図44は、（3）に記載されるようなAlexa 488標識dUTPの組み込み前および後の「ポリメラーゼ表面」および「陰性表面」から得られたAlexa 647（ヘアピンDNA）およびAlexa 488（dUTP）チャンネルにおいて測定された測定蛍光シグナルを示す。組み込みが成功した結果、ポリメラーゼ表面からの組み込み反応後

10

20

30

40

50

に、A l e x a 488 蛍光シグナルの有意な増加が得られたが、陰性表面からのシグナルは、ポリメラーゼの不在のために、組み込み反応後も同じままであった。A l e x a 647 チャンネルの蛍光シグナルは、組み込み反応後に実質的に変化しないままであり、これは表面上のヘアピン DNA の存在を示している。蛍光シグナルのわずかな減少は、2 回目の露光による光退色の効果によるものと思われる。

【0655】

結論

結果は、本発明の方法において使用するための支持鎖および合成鎖を含む分子が、本明細書に記載されるポリヌクレオチド合成反応と適合する表面基質上に容易に固定化され得ることを実証する。結果はさらに、そのような分子が、合成鎖を伸長させるために新たな

10

【0656】

実施例 12. リンカーおよびチオリン酸共有結合を介して誘導体化表面に固定化されたヘアピン DNA オリゴマーの切断および連結。

この実施例は、リンカーを有するチオリン酸官能化ヘアピン DNA の誘導体化表面への共有結合、その後の切断および連結反応を記載する。基質調製およびヘアピン DNA の結合を、実施例 11 に記載されるように実施した。

【0657】

(1) : リンカーを有する固定化ヘアピン DNA オリゴマーの切断

20

材料および方法

実施例 11 に記載されるような表面 BRAPA 修飾表面上に、ヘアピン DNA を固定化した。切断および連結反応のための全ての実験対照を含む 4 組の三重表面を調製した。実験条件を図 45a に記載する。図 45b は、異なる試料に固定化されたヘアピン DNA の配列を示す。

【0658】

DNA 固定化工程の後に、直径 9 mm の円形開口部を有するゴム製ガスケットを、5' 末端で A l e x a 647 で標識された DNA で固定化された全ての表面上に置き、1×NE 緩衝液 4 (50 mM の酢酸カリウム、20 mM のトリス-酢酸、10 mM の酢酸マグネシウム、1 mM の DTT、pH 7.9) で 10 分間下塗りした。試料 D については、固定化ヘアピン DNA はイノシンを含まず、イノシンはグアニンによって置換されることに留意されたい。続いて全ての試料を、1.5 U/μl のエンドヌクレアーゼ V を含む NE Buffer 4 (試料 A、B、および D) またはエンドヌクレアーゼ V を含まない NE Buffer 4 (試料 C) のいずれかに 1 時間曝露した。続いて全ての試料を、1×T3 DNA リガーゼ緩衝液 (66 mM のトリス-HCl、10 mM の MgCl₂、1 mM の ATP、7.5% の PEG 6000、1 mM の DTT、pH 7.6)、1 M の塩化ナトリウムおよび 0.05% の (v/v) Tween 20 を含む 1×T3 DNA リガーゼ緩衝液で洗浄し、1×T3 DNA リガーゼ緩衝液で再び洗浄し、A l e x a 647 チャンネルの ChemiDoc 撮像装置上でスキャンした。

30

【0659】

結果

図 46 は、切断反応前および後のヘアピン DNA オリゴマーからの蛍光シグナルを示す。

【0660】

図 47 は、上に記載されるような DNA 固定化表面から得られた切断反応の前および後に測定された蛍光シグナルを示す。切断反応の成功は、試料 A および B からのみ観察されたが、エンドヌクレアーゼ V (試料 C) または配列中のイノシン (試料 D) のいずれも存在しないため、蛍光シグナル強度は、試料 C および D について略同じままであった。

【0661】

エンドヌクレアーゼ V の存在を伴う DNA 鎖内のイノシン部位での成功した切断反応の結果として、試料 A および B から蛍光シグナルの有意な低減が観察された。試料 C および

50

Dについて、DNA中のエンドヌクレアーゼVの不在およびイノシンの欠如は、それぞれ蛍光シグナルをもたらし、DNA固定化後に得られた初期シグナルとほぼ同じレベルを維持した。

【0662】

(2)：連結反応

材料および方法

(1)に記載されるような切断反応の後、試料AおよびB(図45aに記載されるような)を、試料AについてはT3 DNAリガーゼ(250U/μl)を用い、試料Bについては陰性対照としてT3 DNAリガーゼを用いずに、MnCl₂を含む1×T3 DNAリガーゼ緩衝液(2mM)、5'末端でAlexa 647で標識されたイノシン鎖(16μM)、および相補的「ヘルパー」鎖(16μM)(配列を以下の図48に示す)に曝露した。試料を、それぞれの溶液中で1時間インキュベートした。1時間後、表面を水中で洗浄し、続いて1Mの塩化ナトリウムおよび0.05%(v/v)のTween 20を含む水に曝露し、再び水で洗浄した。Alexa 647チャネルのChemIDocを使用して、表面からの蛍光シグナルを測定した。図48は、連結反応のためのイノシン含有鎖および相補的「ヘルパー」鎖についての配列を示す。

【0663】

結果

図49は、連結反応のモニタリングに関する結果を示す。連結反応の前および後に、Alexa 647チャネルから検出された蛍光シグナル。連結後のAlexa 647チャネルにおける蛍光シグナルの増加は、T3 DNAリガーゼを有する試料Aからのみ得られたが、T3 DNAリガーゼの不在のため、試料Bについては連結反応後、蛍光シグナルは同じレベルのままであった。

【0664】

図50は、連結の成功の結果として試料Aからの連結反応後に、Alexa 647蛍光シグナルの有意な増加が得られたことを示し、ここで、シグナルレベルは、DNA固定化の後、および図47に示されるような切断反応の前に、初期シグナルレベルに回復する。試料Bからの蛍光シグナルは、T3 DNAリガーゼの不在のため、連結反応後も同じままであった。

【0665】

結論

この実施例の結果は、本発明の方法で使用するための支持鎖および合成鎖を含む分子が、本明細書に記載されるポリヌクレオチド合成反応に適合する表面基質上に容易に固定化でき、同時に安定的で基質に付着したままでありながら、切断および連結に曝露され得ることを実証する。

【0666】

実施例13. 平滑末端DNAの3'末端への3'-O-アジドメチル-dNTPの組み込み。

この実施例は、平滑末端二本鎖DNAの3'末端への3'-O-アジドメチル-dNTPの組み込みを記載する。

【0667】

以下の工程は、DNAポリメラーゼによる酵素的組み込みによる平滑末端二本鎖オリゴヌクレオチドへの3'-O-保護一塩基の制御された付加を示す。これらの工程は、図1および2(103、108、203、208)の各々に示されるように組み込み工程3に従う。

【0668】

材料および方法

材料

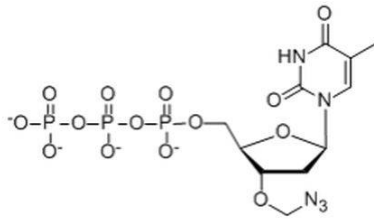
1. 社内で合成された3'-O-アジドメチル-dNTP。

2. 3'-O-修飾dNTPを組み込む増強された能力を有する、New England Biolabsによって操作されたTherminator X DNAポリメラーゼ。

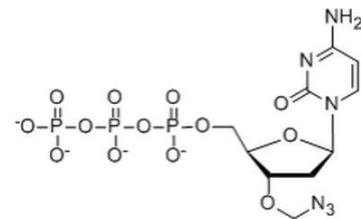
3. 平滑末端二本鎖DNAオリゴヌクレオチド。
4種類の可逆的ターミネーターを試験した。

【化42】

3'-O-アジドメチル-dTTP:

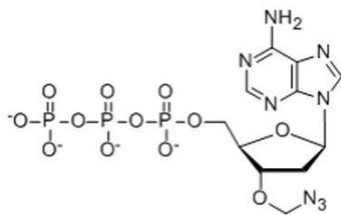


3'-O-アジドメチル-dCTP:

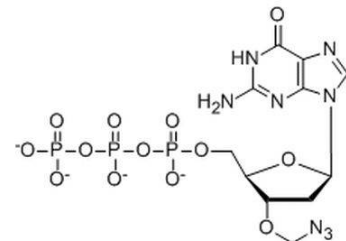


10

3'-O-アジドメチル-dATP:



3'-O-アジドメチル-dGTP:



20

【0669】

方法

1. 5 μ lの10 $\times$ Thermopol (登録商標) 緩衝液 (20mMのトリス-HCl、10mMの(NH₄)₂SO₄、10mMのKCl、2mMのMgSO₄、0.1%のTriton (登録商標) X-100、pH8.8、New England Biolabs) を、1.5mlのエッペンドルフチューブ中の33.5 μ lの滅菌脱イオン水 (ELGA VEOLIA) と混合した。
2. 2 μ lの20 μ Mプライマー (40 pmol、1当量) (配列番号68、図51a) および3 μ lの20 μ M鋳型 (60 pmol、1.5当量) (配列番号69、図51a) を反応混合物に加えた。
3. 3'-O-修飾-dTTP (2 μ lの100 μ M) およびMnCl₂ (2.5 μ lの40mM) を加えた。
4. 次に、2 μ lのTherminator X DNAポリメラーゼ (20U、New England Biolabs) を加えた。
5. 反応物を37°Cで30分間インキュベートした。
6. TBE-尿素試料緩衝液 (Novex) を加えて反応を停止させた。
7. 反応物をポリアクリルアミドゲル (15%) TBE緩衝液上で分離し、Chemidoc MP撮像システム (BioRad) によって可視化した。

30

【0670】

結果

図51bは、37°CでMn²⁺イオンの存在下で、Therminator X DNAポリメラーゼによる3'-O-修飾-dNTPの組み込みの結果を示すゲルを示す。データは、Therminator X DNAポリメラーゼが、3'-O-修飾-dNTPを平滑末端DNAオリゴヌクレオチドの3'末端に首尾よく組み込んで単一塩基突出を作成できたことを示す。

40

【0671】

上記の実施例では、配列番号1~69に提示される全てのオリゴヌクレオチドは、3'末端にヒドロキシル基を有する。配列番号1~69に提示される全てのオリゴヌクレオチドは、配列番号7、配列番号18、および配列番号35を除いて、5'末端でリン酸基を欠い

50

ている。

【0672】

開示される方法および生産物の異なる適用が、当該技術分野における特定の必要性に合わせられ得ることが理解されるべきである。本明細書で使用される専門用語は、本発明の特定の実施形態のみを説明する目的のためのものであり、限定的であることは意図されないことも理解されたい。

【0673】

さらに、この明細書および添付の特許請求の範囲に使用される場合、単数形「1つ (a)」、「1つ (an)」、および「その (the)」は、文脈が別途明確に示さない限り、複数の指示物を含む。したがって、例えば、「連結ポリヌクレオチド」への言及は、2つ以上のそのようなポリヌクレオチドを含み、「足場ポリヌクレオチド」への言及は、2つ以上のそのような足場ポリヌクレオチドを含むなどである。

【0674】

本明細書に引用される全ての刊行物、特許、および特許出願は、それらの全体において参照により本明細書に組み込まれる。

本発明の様々な実施形態を以下に示す。

1. 所定の配列を有する二本鎖ポリヌクレオチドをインビトロで合成する方法であって、前記方法が、合成サイクルを行うことを含み、各サイクルが、二本鎖ポリヌクレオチドを切断すること、およびヌクレオチド対を組み込むことによって前記切断された二本鎖ポリヌクレオチドを伸長することを含み、前記切断された二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖の末端が、前記所定の配列のヌクレオチドの付加によって伸長され、前記第1の鎖にハイブリダイズされる前記切断された二本鎖ポリヌクレオチドの前記第2の鎖の末端が、パートナーヌクレオチドの付加によって伸長され、それにより前記第1の鎖の前記組み込まれたヌクレオチドとヌクレオチド対を形成する、方法。

2. 各サイクルが、前記所定の配列の前記ヌクレオチドを、付着した可逆的ブロッキング基と一緒に付加することによって前記第1の鎖を伸長し、続いて前記第2の鎖を伸長することを含み、前記可逆的ブロッキング基が、前記第2の鎖が伸長される前または後に除去される、上記1に記載の方法。

3. 各サイクルにおいて、前記ヌクレオチドが、切断された足場ポリヌクレオチドに組み込まれる、上記1または上記2に記載の方法。

4. 各サイクルが、

(1) 足場ポリヌクレオチドを提供することと、

(2) 前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することと、

(3) 前記所定の配列のヌクレオチドを、ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって前記切断された足場ポリヌクレオチドに付加することであって、前記ヌクレオチドが、前記酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、付加することと、

(4) 前記所定の配列の前記ヌクレオチドから前記可逆的ターミネーター基を除去することと、

(5) 連結ポリヌクレオチドを前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結することであって、前記連結ポリヌクレオチドが、前記所定の配列の前記ヌクレオチドに対するパートナーヌクレオチドを含み、連結時に、前記所定の配列の前記ヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドと対合する、連結することと、を含む、上記3に記載の方法。

5. 工程(1)が、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することを含み、前記合成鎖が、プライマー鎖部分を含み、前記支持鎖が、ユニバーサルヌクレオチドを含み、工程(2)が、前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することを含み、前記部位が、前記支持鎖中の前記ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、前記支持鎖を切断すること、および前記足場ポリヌクレオチドから前記ユニバーサルヌクレオチドを除去することを含み、工程(5)において、前記連結ポリヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドおよび次のサイクルで使用

10

20

30

40

50

するための切断部位を定義するユニバーサルヌクレオチドを含む支持鎖を含み、前記連結ポリヌクレオチドが、前記切断された足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖に連結され、それにより前記ヌクレオチド対を形成する、上記4に記載の方法。

6. 前記方法が、

(1) 合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む足場ポリヌクレオチドを提供することであって、前記合成鎖が、プライマー鎖部分および一本鎖切断によって分離されたヘルパー鎖部分を含み、前記支持鎖が、ユニバーサルヌクレオチドを含む、提供することと、

(2) 前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、前記部位が、前記支持鎖中の前記ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、前記支持鎖を切断すること、および前記足場ポリヌクレオチドから前記ユニバーサルヌクレオチドを除去して、支持鎖と、前記プライマー鎖部分を含む合成鎖とを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを提供することを含む、切断することと、

(3) ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって、前記切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの前記合成鎖の前記プライマー鎖部分の末端を、前記所定の配列の第1のヌクレオチドで伸長することであって、前記第1のヌクレオチドが、前記酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、伸長することと、

(4) 前記第1のヌクレオチドから前記ターミネーター基を除去することと、

(5) 二本鎖連結ポリヌクレオチドを、前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結することであって、前記連結ポリヌクレオチドが、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含み、相補的連結末端をさらに含み、前記連結末端が、

(i) 前記支持鎖において、ユニバーサルヌクレオチドおよび第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドであって、前記第1のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖に突出している、ユニバーサルヌクレオチドおよび第1のヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および

(ii) 前記ヘルパー鎖において、リン酸基を欠く末端ヌクレオチドを含み、前記支持鎖の連結時に、前記第1のヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドと対合する、連結することと、

(6) 前記足場ポリヌクレオチドを切断部位で切断することであって、前記部位が、前記支持鎖中の前記ユニバーサルヌクレオチドを含む配列によって定義され、切断が、前記支持鎖を切断すること、および前記足場ポリヌクレオチドから前記ユニバーサルヌクレオチドを除去して、支持鎖と、プライマー鎖部分を含む合成鎖とを含む切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドを提供することを含む、切断することと、

(7) ヌクレオチドトランスフェラーゼまたはポリメラーゼ酵素の作用によって、前記切断された二本鎖足場ポリヌクレオチドの前記合成鎖の前記プライマー鎖部分の末端を、前記所定のヌクレオチド配列の隣のヌクレオチドで伸長することであって、前記隣のヌクレオチドが、前記酵素によるさらなる伸長を防止する可逆的ターミネーター基を含む、伸長することと、

(8) 前記隣のヌクレオチドから前記ターミネーター基を除去することと、

(9) 二本鎖連結ポリヌクレオチドを、前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結することであって、前記連結ポリヌクレオチドが、支持鎖とそれにハイブリダイズされたヘルパー鎖とを含み、相補的連結末端をさらに含み、前記連結末端が、

(i) 前記支持鎖において、ユニバーサルヌクレオチドおよび隣のヌクレオチドのパートナーヌクレオチドであって、前記隣のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖に突出している、ユニバーサルヌクレオチドおよび次のヌクレオチドのパートナーヌクレオチド、および

(ii) 前記ヘルパー鎖において、リン酸基を欠く末端ヌクレオチドを含み、前記支持鎖の連結時に、前記隣のヌクレオチドが、前記パートナーヌクレオチドと対合する、連結することと、

10

20

30

40

50

(10) 工程6～9を複数回繰り返して、所定のヌクレオチド配列を有する前記二本鎖ポリヌクレオチドを提供することと、を含む、上記4または上記5に記載の方法。

7. a) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置nを占め、位置nが、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置nの前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置nとn-1との間で切断され、位置n-1が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

c) 前記第1サイクルの連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1ヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置nを占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置n+1を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置nが、工程5での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置nを占め、位置nが、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣接のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、

ii. 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置nとn-1との間で切断され、n-1が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

e) 前記第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣接のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置nを占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置n+1を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置nが、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた前記所定の配列の前記隣接のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置である、上記6に記載の方法。

8. a) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置n+1を占め、位置nが、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置nの前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、n+1が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置nとn-1との間で切断され、位置n-1が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置nに対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

c) 前記第1サイクルの連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1ヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+2$ を占め、前記ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n が、工程5での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n+2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第2の位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n+1$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣接のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、 $n+1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

ii. 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n-1$ との間で切断され、 $n-1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチド位置であり、

e) 前記第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣接のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+2$ を占め、前記ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた前記所定の配列の前記隣接のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n+2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第2の位置である、上記6に記載の方法。

9. a) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 n を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、位置 $n-1$ および $n-2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣接のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

c) 前記第1サイクルの連結工程(工程5)において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1ヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+1$ を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、工程5での前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n+1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対

10

20

30

40

50

する前記支持鎖における前記隣のアクレオチド位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルアクレオチドが、前記足場ポリアクレオチドの前記支持鎖における位置 n を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣のアクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記アクレオチド位置であり、

ii. 前記足場ポリアクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、位置 $n-1$ および $n-2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチドおよび後続のアクレオチド位置であり、

e) 前記第2サイクルの連結工程(工程9)および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリアクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣のアクレオチドの前記パートナーアクレオチドが前記支持鎖の最後から2番目のアクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルアクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+1$ を占め、前記ヘルパー鎖の前記末端アクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリアクレオチドへの前記連結ポリアクレオチドの連結時に、そのサイクル(工程7)において組み込まれた前記所定の配列の前記隣のアクレオチドと反対である前記アクレオチド位置であり、位置 $n+1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチド位置である、上記6に記載の方法。

10. a) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)の前およびその時点で、前記ユニバーサルアクレオチドが、前記足場ポリアクレオチドの前記支持鎖における位置 $n+2$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のアクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記アクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記アクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端アクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n+2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第2のアクレオチド位置であり、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程(工程2)において、前記足場ポリアクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n-1$ との間で切断され、位置 $n-1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向/前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のアクレオチド位置であり、

c) 前記第1サイクルの連結工程(工程5)において、前記連結ポリアクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1アクレオチドの前記パートナーアクレオチドが前記支持鎖の前記末端アクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルアクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+3$ を占め、前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、前記ヘルパー鎖の前記末端アクレオチドから2つの位置が除去された前記アクレオチドと対合しており、位置 n が、工程5での前記切断された足場ポリアクレオチドへの前記連結ポリアクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のアクレオチドと反対である前記アクレオチド位置であり、位置 $n+3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向/前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における第3の位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程(工程6)および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルアクレオチドが、前記足場ポリアクレオチドの前記支持鎖における位置 $n+2$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣のアクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記アクレオチド位置であり

10

20

30

40

50

、 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第2のヌクレオチド位置であり、

i i . 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、位置 $n - 1$ が、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチド位置であり、

e) 前記第2サイクルの連結工程（工程9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の前記末端ヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから2つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程7）において組み込まれた前記所定の配列の前記隣のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第3の位置である、上記6に記載の方法。

11. (i) 前記第1サイクルの前記切断工程（工程2）において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第3のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i i) 前記第1のサイクルの前記連結工程（工程5）において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置 $n + 4$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された3つの位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置4であり、

(i i i) 前記第2のサイクルの前記切断工程（工程6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 3$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i v) 前記第2のサイクルの前記連結工程（工程9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 4$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから2つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合するように構造化される、上記10に記載の方法。

12. (i) 前記第1サイクルの前記切断工程（工程2）において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第3のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i i) 前記第1のサイクルの前記連結工程（工程5）において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置 $n + 4 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $3 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 4$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置4であり、

(i i i) 前記第2のサイクルの前記切断工程（工程6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 3 + x$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n

10

20

30

40

50

と $n-1$ との間で切断され、

(i v) 前記第2のサイクルの前記連結工程（工程9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+4+x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $2+x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、

(v) x が、1～10以上の間の整数であり、 x が、工程（2）、（5）、（6）、および（9）で同じ整数である、上記10に記載の方法。

13. a) 前記第1のサイクルの前記切断工程（工程2）の前およびその時点で、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n+1$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、前記支持鎖における位置 n の前記ヌクレオチドが、前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドと反対であり、かつそれと対合しており、 $n+1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチド位置であり、

b) 前記第1のサイクルの前記切断工程（工程2）において、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、位置 $n-1$ および $n-2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

c) 前記第1サイクルの連結工程（工程5）において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記所定の配列の前記第1ヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+2$ を占め、前記ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、前記所定の配列の前記第1のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n+2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第2のヌクレオチド位置であり、

d) 第2のサイクルの前記切断工程（工程6）および全てのその後のサイクルの切断工程において、

i. 前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n+1$ を占め、位置 n が、そのサイクルにおいて前記プライマー鎖部分の前記末端へのその付加時に、前記所定の配列の前記第1の前記隣のヌクレオチドによって占められる前記合成鎖における位置と反対である前記支持鎖における前記ヌクレオチド位置であり、 $n+1$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチド位置であり、

ii. 前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 $n-1$ と $n-2$ との間で切断され、位置 $n-1$ および $n-2$ が、それぞれ、前記ヘルパー鎖に対する遠位方向／前記プライマー鎖部分に対する近位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記隣のヌクレオチドおよび後続のヌクレオチド位置であり、

e) 前記第2サイクルの連結工程（工程9）および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、そのサイクルにおける前記所定の配列の前記隣のヌクレオチドの前記パートナーヌクレオチドが前記支持鎖の最後から2番目のヌクレオチドであり、位置 n を占めるように構造化され、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n+2$ を占め、前記ヘルパー鎖の最後から2番目のヌクレオチドと対合しており、位置 n が、前記切断された足場ポリヌクレオチドへの前記連結ポリヌクレオチドの連結時に、そのサイクル（工程7）において組み込まれた前

10

20

30

40

50

記所定の配列の前記隣のヌクレオチドと反対である前記ヌクレオチド位置であり、位置 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第 2 のヌクレオチド位置である、上記 6 に記載の方法。

14. (i) 前記第 1 サイクルの前記切断工程 (工程 2) において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 2$ を占め、 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第 2 のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i i) 前記第 1 のサイクルの前記連結工程 (工程 5) において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置 3 であり、

(i i i) 前記第 2 のサイクルの前記切断工程 (工程 6) および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 2$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i v) 前記第 2 のサイクルの前記連結工程 (工程 9) および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから 2 つの位置が除去された前記ヌクレオチドと対合するように構造化される、上記 13 に記載の方法。

15. (i) 前記第 1 サイクルの前記切断工程 (工程 2) において、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖における位置 $n + 2 + x$ を占め、 $n + 2$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対する前記支持鎖における前記第 2 のヌクレオチド位置であり、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i i) 前記第 1 のサイクルの前記連結工程 (工程 5) において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが代わりに、前記支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、位置 $n + 3$ が、前記ヘルパー鎖に対する近位方向／前記プライマー鎖部分に対する遠位方向において、位置 n に対して前記支持鎖における位置 3 であり、

(i i i) 前記第 2 のサイクルの前記切断工程 (工程 6) および全てのその後のサイクルの切断工程において、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖の位置 $n + 2 + x$ を占め、前記足場ポリヌクレオチドの前記支持鎖が、位置 n と $n - 1$ との間で切断され、

(i v) 前記第 2 のサイクルの前記連結工程 (工程 9) および全てのその後のサイクルの連結工程において、前記連結ポリヌクレオチドの前記相補的連結末端が、前記ユニバーサルヌクレオチドが、前記支持鎖における位置 $n + 3 + x$ を占め、前記相補的連結末端で前記ヘルパー鎖の前記末端ヌクレオチドから除去された $2 + x$ 個の位置である前記ヌクレオチドと対合するように構造化され、

(v) x が、1 ～ 10 以上の間の整数であり、 x が、工程 (2)、(5)、(6)、および (9) で同じ整数である、上記 13 に記載の方法。

16. 前記所定の配列の第 1 の／隣のヌクレオチドと対合するパートナーヌクレオチドが、前記第 1 の／隣のヌクレオチドと相補的な、好ましくは天然に相補的なヌクレオチドである、上記 1 ～ 15 のいずれかに記載の方法。

17. 工程 (2) および／または (6) の前に、任意の 1 つ以上の合成サイクルにおいて

10

20

30

40

50

、または全ての合成サイクルにおいて、合成鎖とそれにハイブリダイズされた支持鎖とを含む前記足場ポリヌクレオチドが提供され、前記合成鎖が、ヘルパー鎖なしで提供される、上記 6 ～ 16 のいずれかに記載の方法。

18. 工程 (2) および／または (6) の前に、任意の 1 つ以上の合成サイクルにおいて、または全ての合成サイクルにおいて、前記合成鎖が、前記足場ポリヌクレオチドから除去される、上記 6 ～ 17 のいずれかに記載の方法。

19. 前記合成鎖の前記ヘルパー鎖部分が、(i) 前記足場ポリヌクレオチドを約 80℃ ～ 約 95℃ の温度に加熱し、前記足場ポリヌクレオチドから前記ヘルパー鎖部分を分離すること、(ii) 前記足場ポリヌクレオチドを 8 M 尿素などの尿素溶液で処理し、前記足場ポリヌクレオチドから前記ヘルパー鎖部分を分離すること、(iii) 前記足場ポリヌクレオチドを 100% ホルムアミドなどのホルムアミドまたはホルムアミド溶液で処理し、前記足場ポリヌクレオチドから前記ヘルパー鎖部分を分離すること、または (iv) 前記足場ポリヌクレオチドを、前記ヘルパー鎖部分の配列と相補的であるヌクレオチド配列の領域を含む一本鎖ポリヌクレオチド分子と接触させて、それにより前記ヘルパー鎖部分と前記足場ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを競合的に阻害することによって、前記足場ポリヌクレオチドから除去される、上記 18 に記載の方法。

20. 各切断工程が、2 工程切断プロセスを含み、各切断工程が、前記ユニバーサルヌクレオチドを除去し、よって脱塩基部位を形成することを含む第 1 の工程と、前記支持鎖を前記脱塩基部位で切断することを含む第 2 の工程と、を含む、上記 4 ～ 7 および上記 16 ～ 19 のいずれかに記載の方法。

21. 前記第 1 の工程が、ヌクレオチド除去酵素を用いて行われる、上記 20 に記載の方法。

22. 前記ヌクレオチド除去酵素が、3-メチルアデニン DNA グリコシラーゼ酵素である、上記 21 に記載の方法。

23. 前記ヌクレオチド除去酵素が、

i. ヒトアルキルアデニン DNA グリコシラーゼ (hAAG)、または

ii. ウラシル DNA グリコシラーゼ (UDG) である、上記 22 に記載の方法。

24. 前記第 2 の工程が、塩基である化学物質を用いて行われる、上記 20 ～ 23 のいずれかに記載の方法。

25. 前記塩基が、NaOH である、上記 24 に記載の方法。

26. 前記第 2 の工程が、脱塩基部位切断活性を有する有機化学物質を用いて行われる、上記 20 ～ 23 のいずれかに記載の方法。

27. 前記有機化学物質が、N, N'-ジメチルエチレンジアミンである、上記 26 に記載の方法。

28. 前記第 2 の工程が、脱塩基部位リアーゼ活性を有する酵素を用いて行われ、任意に、脱塩基部位リアーゼ活性を有する前記酵素が、

(i) AP エンドヌクレアーゼ 1、

(ii) エンドヌクレアーゼ III (N 番目)、または

(iii) エンドヌクレアーゼ V III である、上記 20 ～ 23 のいずれかに記載の方法。

29. 各切断ステップが、切断酵素を用いてユニバーサルヌクレオチドを除去することを含む 1 工程切断プロセスを含み、前記酵素が

(i) エンドヌクレアーゼ III、

(ii) エンドヌクレアーゼ V III、

(iii) ホルムアミドピリミジン DNA グリコシラーゼ (Fpg)、または

(iv) 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ (hOGG1) である、上記 4 ～ 7

および上記 16 ～ 19 のいずれかに記載の方法。

30. 前記切断工程が、前記支持鎖を酵素で切断することを含む、上記 4 ～ 6、上記 8 および上記 9 のいずれかに記載の方法。

31. 前記酵素が、前記ユニバーサルヌクレオチドの隣にある前記ヌクレオチドの後の前

10

20

30

40

50

- 記支持鎖を切断し、それにより前記合成鎖中に突出端を作成する、上記30に記載の方法。
32. 前記酵素が、エンドヌクレアーゼVである、上記30または上記31に記載の方法。
33. 前記切断工程が、前記支持鎖を酵素で切断することを含む、上記4～6、上記8および上記9のいずれかに記載の方法。
34. 前記酵素が、前記ユニバーサルヌクレオチドの隣にある前記ヌクレオチドの後の前記支持鎖を切断し、それにより前記合成鎖中に突出端を作成する、上記33に記載の方法。
35. 前記酵素が、エンドヌクレアーゼVである、上記33または上記34に記載の方法。
36. 前記合成二本鎖ポリヌクレオチドの両方の鎖が、DNA鎖である、上記1～35のいずれかに記載の方法。
37. 前記合成鎖および前記支持鎖が、DNA鎖である、上記5～36のいずれかに記載の方法。
38. 組み込まれたヌクレオチドが、dNTPである、上記36または上記37に記載の方法。
39. 組み込まれたヌクレオチドが、可逆的ターミネーター基を含むdNTPである、上記38に記載の方法。
40. 可逆的ターミネーター基を含む前記組み込まれたヌクレオチドのうちの1つ以上が、3'-O-アリル-dNTPである、上記39に記載の方法。
41. 可逆的ターミネーター基を含む前記組み込まれたヌクレオチドのうちの1つ以上が、3'-O-アジドメチル-dNTPである、上記39に記載の方法。
42. 前記合成二本鎖ポリヌクレオチドの第1の鎖が、DNA鎖であり、前記合成二本鎖ポリヌクレオチドの前記第2の鎖が、RNA鎖である、上記1～35のいずれかに記載の方法。
43. 前記合成鎖が、RNA鎖であり、前記支持鎖が、DNA鎖である、上記1～35および上記42のいずれかに記載の方法。
44. 組み込まれたヌクレオチドが、NTPである、上記43に記載の方法。
45. 組み込まれたヌクレオチドが、可逆的ターミネーター基を含むNTPである、上記44に記載の方法。
46. 可逆的ターミネーター基を含む組み込まれたヌクレオチドが、3'-O-アリル-NTPである、上記45に記載の方法。
47. 可逆的ターミネーター基を含む組み込まれたヌクレオチドが、3'-O-アジドメチル-NTPである、上記45に記載の方法。
48. 前記酵素が、DNAポリメラーゼ、好ましくは未修飾ポリメラーゼと比較して可逆的ターミネーター基を含むdNTPを組み込む増強された能力を有する修飾DNAポリメラーゼである、上記1～41のいずれかに記載の方法。
49. 前記ポリメラーゼが、*Thermococcus*種9°N、好ましくは種9°N-7由来の天然DNAポリメラーゼのバリエーションである、上記48に記載の方法。
50. 前記酵素が、T3またはT7 RNAポリメラーゼなどのRNAポリメラーゼ、任意に、未修飾ポリメラーゼと比較して可逆的ターミネーター基を含むNTPを組み込む増強された能力を有する修飾RNAポリメラーゼである、上記1～32および42～47のいずれかに記載の方法。
51. 前記酵素が、末端トランスフェラーゼ活性を有し、任意に、前記酵素が、末端ヌクレオチジルトランスフェラーゼ、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)、polラムダ、polマイクロ、またはΦ29 DNAポリメラーゼである、上記1～47のいずれかに記載の方法。
52. 前記第1/隣のヌクレオチドから前記可逆的ターミネーター基を除去する前記工程が、トリス(カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を用いて行われる、上記4～50のいずれかに記載の方法。
53. 二本鎖連結ポリヌクレオチドを前記切断された足場ポリヌクレオチドに連結する前記工程が、リガーゼ酵素を用いて行われる、上記4～51のいずれかに記載の方法。
54. 前記リガーゼ酵素が、T3 DNAリガーゼまたはT4 DNAリガーゼである、上

10

20

30

40

50

記53に記載の方法。

55. 工程(1)、(5)および/または(9)において、前記ヘルパー鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されている、上記6～54のいずれかに記載の方法。

56. 工程(1)において、前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されている、上記4～54のいずれかに記載の方法。

57. 工程(1)、(5)、および/または(9)において、

a) 前記ヘルパー鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されており、

b) 前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されている、上記6～54のいずれかに記載の方法。

58. 前記連結ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つが、前記相補的連結末端と反対の末端で、前記支持鎖および前記ヘルパー鎖を接続するヘアピンループを含む単一分子として提供される、上記6～57のいずれかに記載の方法。

59. 各合成サイクルの前記連結ポリヌクレオチドが、前記相補的連結末端と反対の末端で、前記支持鎖および前記ヘルパー鎖を接続するヘアピンループをそれぞれ含む単一分子として提供される、上記6～58のいずれかに記載の方法。

60. 工程(1)において、前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、共通の表面に繋留されている、上記6～59のいずれかに記載の方法。

61. 前記プライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とがそれぞれ、切断可能なリンカーを含み、前記リンカーが、合成後に前記表面から前記二本鎖ポリヌクレオチドを切り離すために切断され得る、上記60に記載の方法。

62. 工程(1)において、前記合成鎖の前記プライマー鎖部分とそれにハイブリダイズされた前記合成鎖の前記部分とが、ヘアピンループによって接続されており、前記ヘアピンループが、表面に繋留されている、上記4～59のいずれかに記載の方法。

63. 前記ヘアピンループが、切断可能なリンカーを介して表面に繋留され、前記リンカーが、合成後に前記表面から前記二本鎖ポリヌクレオチドを切り離すために切断され得る、上記62に記載の方法。

64. 前記切断可能なリンカーが、UV切断可能なリンカーである、上記61または63に記載の方法。

65. 前記表面が、微粒子である、上記60～64のいずれかに記載の方法。

66. 前記表面が、平坦な表面である、上記60～64のいずれかに記載の方法。

67. 前記表面が、ゲルを含む、上記66に記載の方法。

68. 前記表面が、約2%のポリアクリルアミドなどのポリアクリルアミド表面を含み、好ましくは、前記ポリアクリルアミド表面が、ガラスなどの固体支持体に結合されている、上記67に記載の方法。

69. 前記プライマー鎖部分を含む前記合成鎖とそれにハイブリダイズされた前記支持鎖の前記部分とが、1つ以上の共有結合を介して前記共通の表面に繋留されている、上記60～68のいずれかに記載の方法。

70. 前記1つ以上の共有結合が、前記共通の表面上の官能基と足場分子上の官能基との間に形成され、前記足場分子上の前記官能基が、アミン基、チオール基、チオリン酸基、またはチオアミド基である、上記69に記載の方法。

71. 前記共通の表面上の前記官能基が、プロモアセチル基であり、任意に、前記プロモアセチル基が、N-(5-プロモアセトアミジルペンチル)アクリルアミド(BRAPA)を使用して得られるポリアクリルアミド表面上に提供される、上記70に記載の方法。

72. 前記所定の配列のヌクレオチドから前記可逆的ターミネーター基を除去する前記工程が、前記連結工程の前または後に行われる、上記4～71のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

73. 合成サイクルが、微小流体システム内の液滴中で行われる、上記1～72のいずれかに記載の方法。

74. 前記微小流体システムが、エレクトロウェットティングシステムである、上記73に記載の方法。

75. 前記微小流体システムが、エレクトロウェットティングオン誘電体システム（EWOD）である、上記74に記載の方法。

76. 合成後、前記二本鎖ポリヌクレオチドの前記鎖が分離されて、所定の配列を有する一本鎖ポリヌクレオチドを提供する、上記1～75のいずれかに記載の方法。

77. 合成後、前記二本鎖ポリヌクレオチドまたはその領域が、好ましくはPCRによって増幅される、上記1～76のいずれかに記載の方法。

78. 所定の配列を有するポリヌクレオチドをアSEMBリする方法であって、所定の配列を有する第1のポリヌクレオチドおよび所定の配列を有する1つ以上の追加のポリヌクレオチドを合成するために、上記1～77のいずれかに記載の方法を行うことと、前記第1および1つ以上の追加のポリヌクレオチドと一緒に接合することと、を含む、方法。

79. 前記第1のポリヌクレオチドおよび前記1つ以上の追加のポリヌクレオチドが、二本鎖である、上記78に記載の方法。

80. 前記第1のポリヌクレオチドおよび前記1つ以上の追加のポリヌクレオチドが、一本鎖である、上記78に記載の方法。

81. 前記第1のポリヌクレオチドおよび前記1つ以上の追加のポリヌクレオチドが、適合する末端を作成するために切断され、好ましくは連結によって一緒に接合される、上記78～80のいずれかに記載の方法。

82. 前記第1のポリヌクレオチドおよび前記1つ以上の追加のポリヌクレオチドが、切断部位で制限酵素によって切断される、上記81に記載の方法。

83. 前記合成および／またはアSEMBリ工程が、微小流体システム内の液滴中で行われる、上記74～82のいずれかに記載の方法。

84. 前記アSEMBリ工程が、所定の配列を有する第1の合成ポリヌクレオチドを含む第1の液滴と、所定の配列を有する追加の1つ以上の合成ポリヌクレオチドを含む第2の液滴と、を提供することを含み、前記液滴が、互いに接触し、前記合成ポリヌクレオチドが、一緒に接合され、それにより前記第1および追加の1つ以上のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドをアSEMBリする、上記83に記載の方法。

85. 前記合成工程が、各液滴が前記合成サイクルの工程に対応する反応試薬を含む、複数の液滴を提供することと、前記合成サイクルの前記工程に従って前記足場ポリヌクレオチドに前記液滴を順次送達することと、によって行われる、上記84に記載の方法。

86. 液滴の送達後かつ次の液滴の送達の前に、過剰の反応試薬を除去するために洗浄工程が実施される、上記85に記載の方法。

87. 前記微小流体システムが、エレクトロウェットティングシステムである、上記85および86に記載の方法。

88. 前記微小流体システムが、エレクトロウェットティングオン誘電体システム（EWOD）である、上記87に記載の方法。

89. 合成工程およびアSEMBリ工程が、同じシステム内で行われる、上記85～88のいずれかに記載の方法。

90. 上記1～89のいずれかに記載の方法を実施するためのポリヌクレオチド合成システムであって、（a）各反応領域が少なくとも1つの足場ポリヌクレオチドを含む、反応領域のアレイと、（b）前記反応試薬を前記反応領域に送達するための手段と、任意に（c）前記足場ポリヌクレオチドからの前記合成二本鎖ポリヌクレオチドを切断するための手段と、を含む、ポリヌクレオチド合成システム。

91. 前記反応試薬を液滴で提供するための手段と、前記合成サイクルに従って前記足場ポリヌクレオチドに前記液滴を送達するための手段と、をさらに含む、上記90に記載のシステム。

92. 上記90または91に記載のシステムと共に使用するため、かつ上記1～89のい

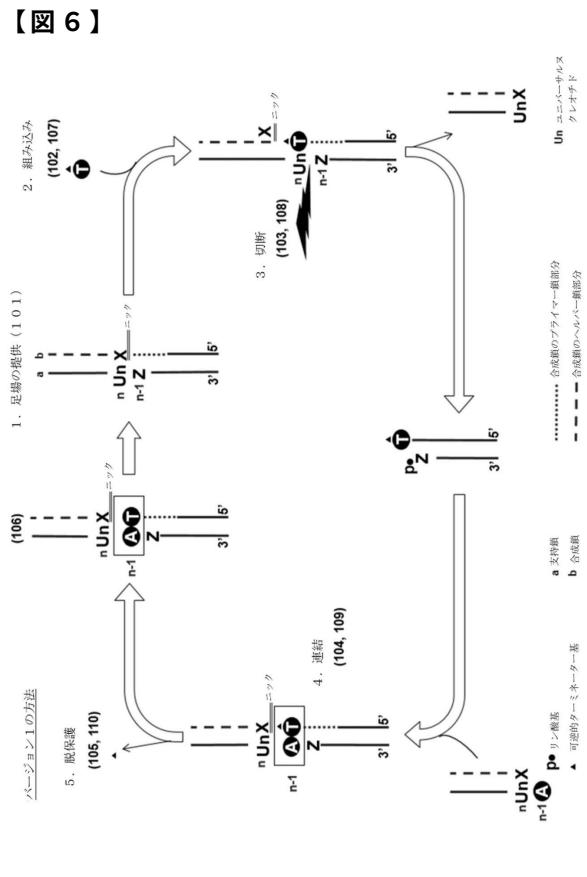
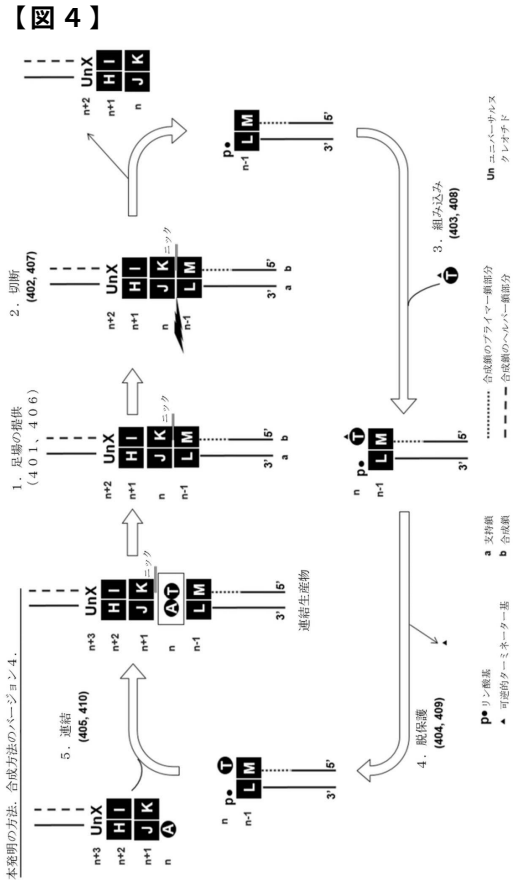
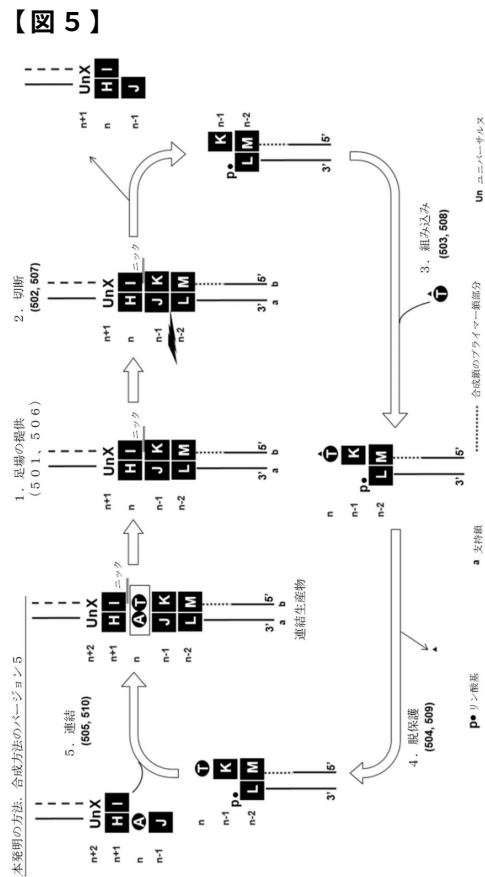
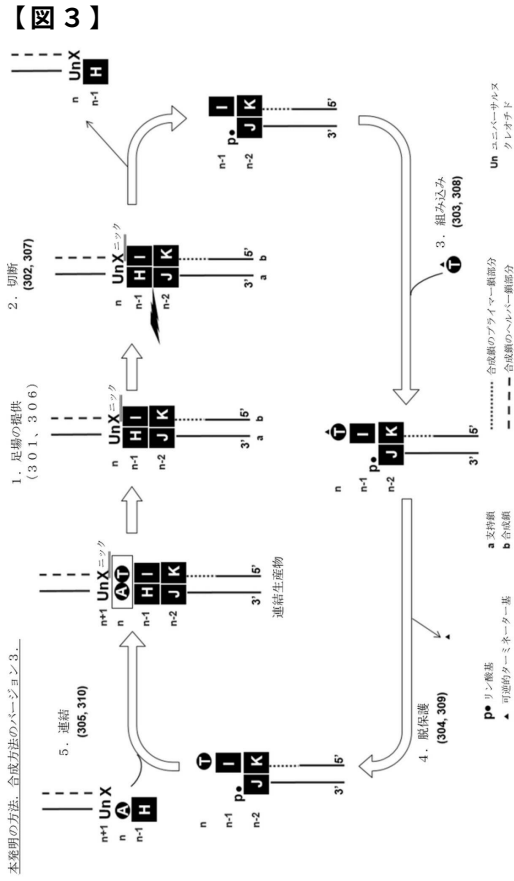
10

20

30

40

50



10

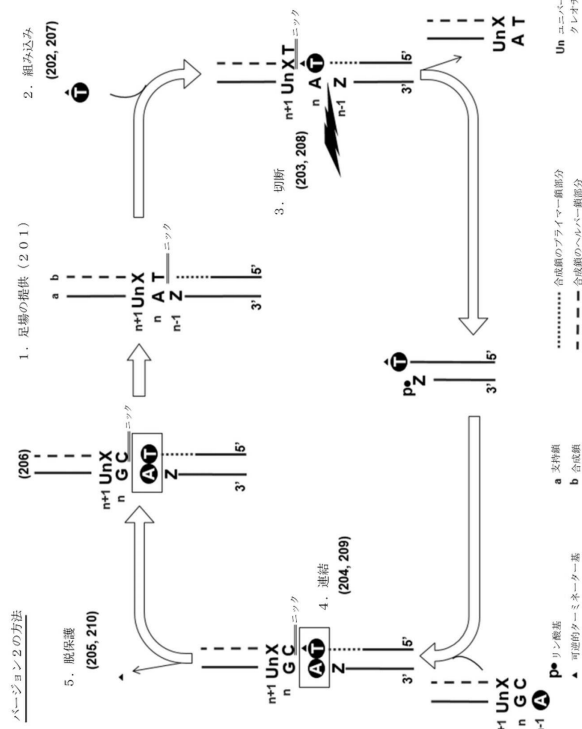
20

30

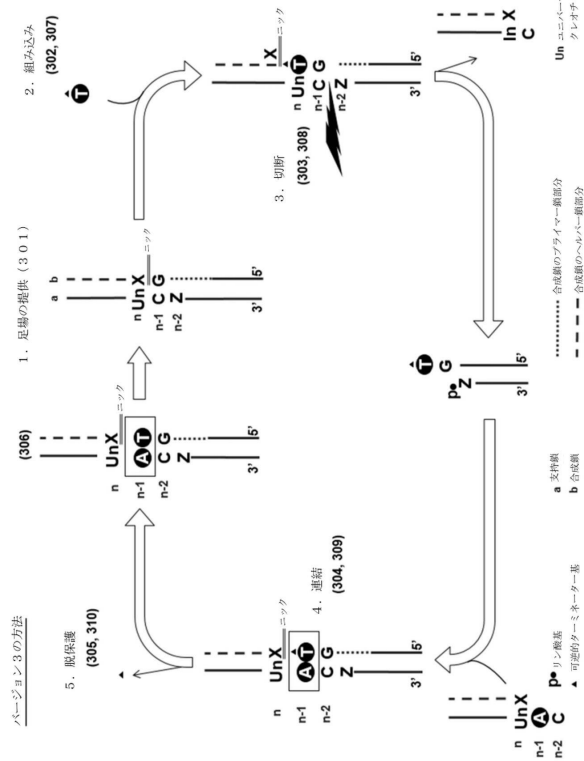
40

50

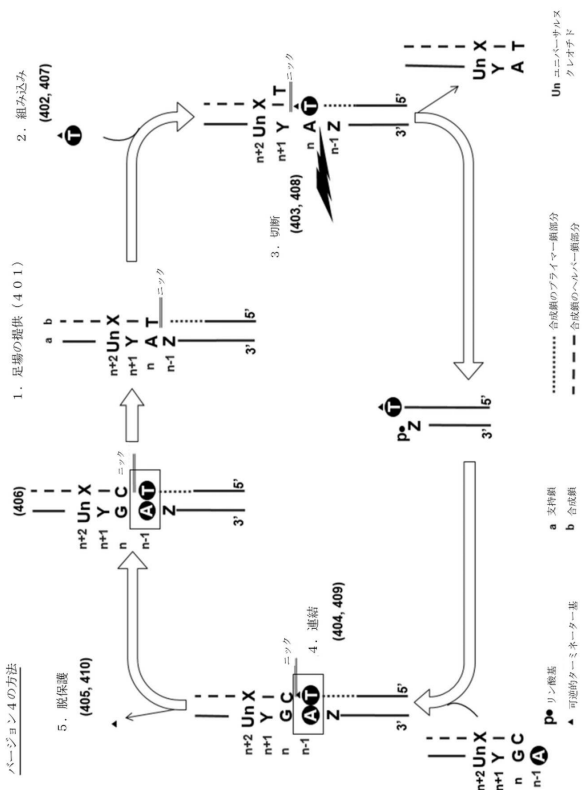
【図 7】



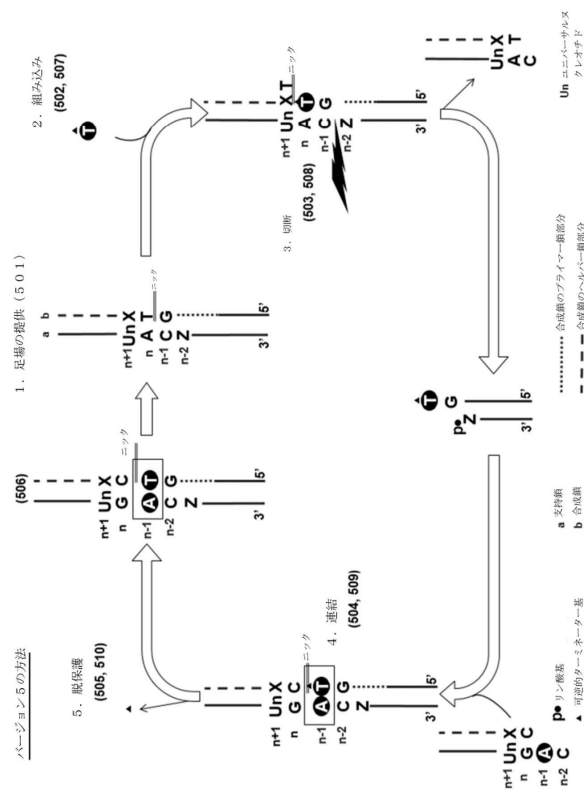
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

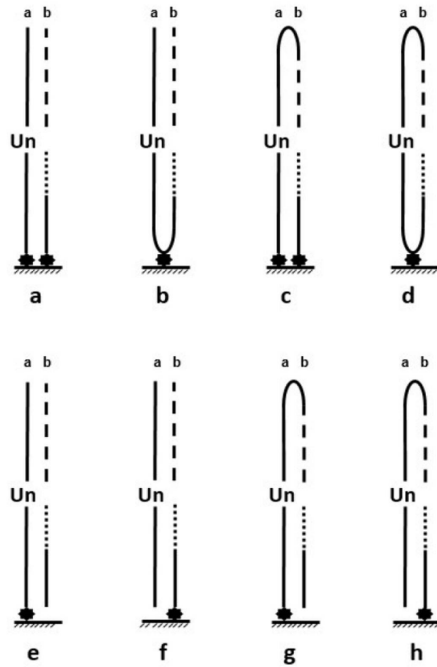
20

30

40

50

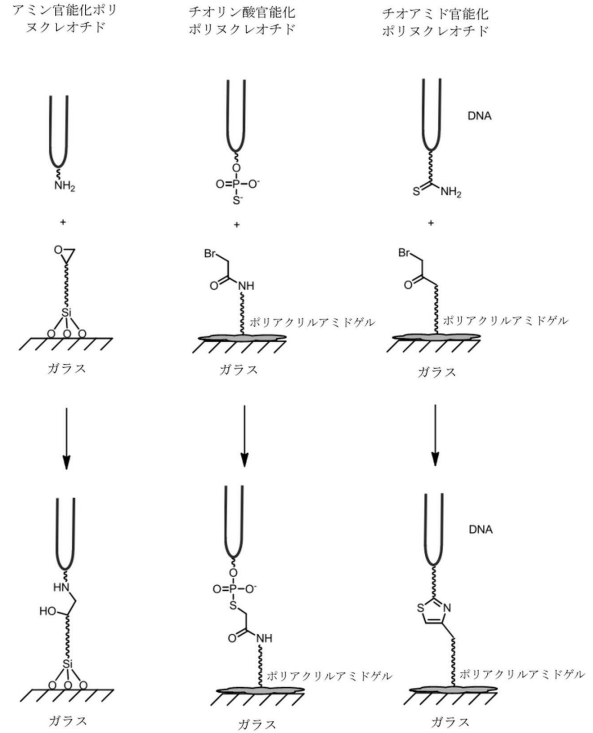
【図 1 1】



a 支持鎖
b 合成鎖
Un ユニバーサルヌクレオチド

..... 合成鎖のプライマー鎖部分
- - - 合成鎖のヘルパー鎖部分

【図 1 1 i】

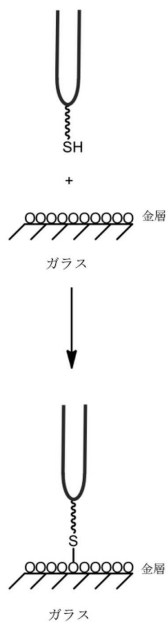


10

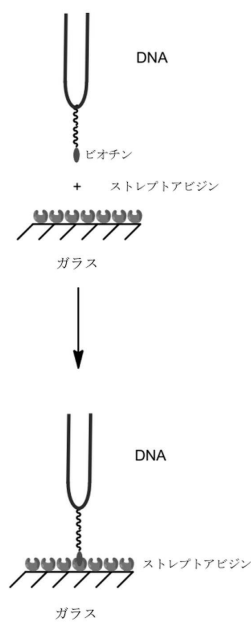
20

【図 1 1 j】

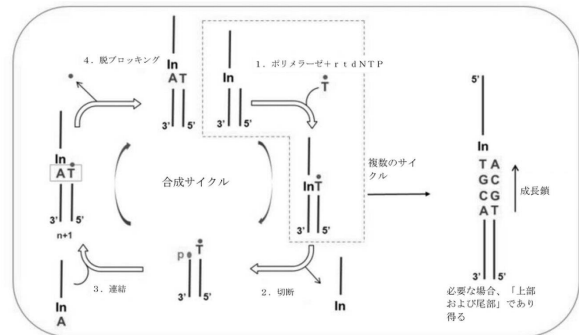
金表面にポリヌクレオチドを
付着させるための例の方法



ビオチン-ストレプトアビジン
結合によってポリヌクレオチドを
付着させるための例の方法



【図 1 2 a】

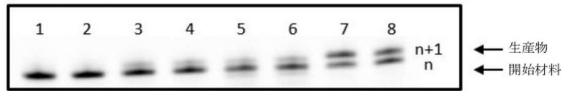


30

40

50

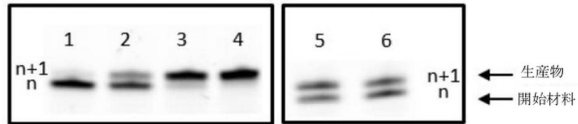
【図 1 2 b】



【図 1 2 c】

レーン番号	50℃での組み込み	DNAポリメラーゼ	転化
1	3'-O-アリル-dTTP	Bst	<1%
2	3'-O-アジドメチル-dTTP	Bst	<1%
3	3'-O-アリル-dTTP	Deep Vent (エキソ)	5%
4	3'-O-アジドメチル-dTTP	Deep Vent (エキソ)	5%
5	3'-O-アリル-dTTP	Therminator I	8%
6	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator I	8%
7	3'-O-アリル-dTTP	Therminator IX	55%
8	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator IX	48%

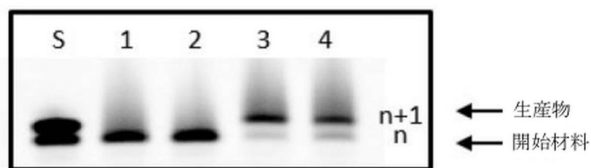
【図 1 2 d】



【図 1 2 e】

レーン番号	組み込み	酵素	温度	転化
1	3'-O-アリル-dTTP	Therminator IX	37℃	<5%
2	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator IX	37℃	15%
3	3'-O-アリル-dTTP	Therminator IX	50℃	55%
4	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator IX	50℃	48%
5	3'-O-アリル-dTTP	Therminator IX	65℃	>90%
6	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator IX	65℃	>90%

【図 1 2 f】



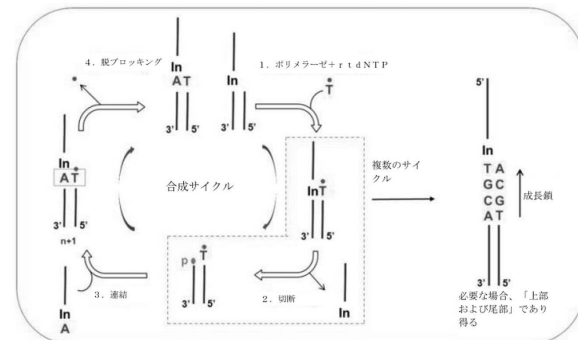
【図 1 2 g】

レーン番号	組み込み	酵素	温度	2mM Mn ²⁺	転化
1	3'-O-アリル-dTTP	Therminator IX	65℃	いいえ	<1%
2	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator IX	65℃	いいえ	<1%
3	3'-O-アリル-dTTP	Therminator IX	65℃	はい	>90%
4	3'-O-アジドメチル-dTTP	Therminator IX	65℃	はい	>90%

【図 1 2 h】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
1	プライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	5' 末端でのTAMRA (末端グアニンに付着した)
2	鋳型	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X=2'-デオキシイノシン

【図 1 3 a】



10

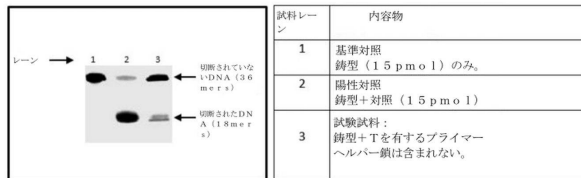
20

30

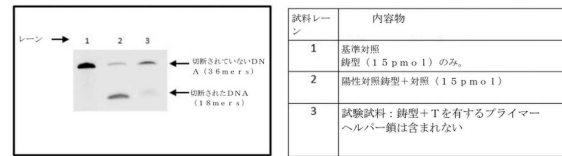
40

50

【図 13 b】



【図 13 c】



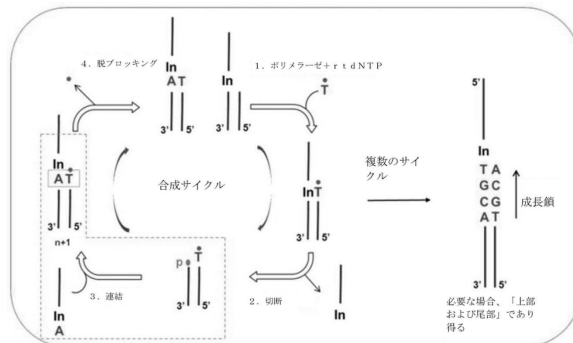
【図 13 d】

ゲル	切断反応の組み合わせ	ヘルパー鎖を有さない切断されたDNAの転化%
A	hAAG/化学塩基	< 10
B	hAAG/Endo VIII	< 7

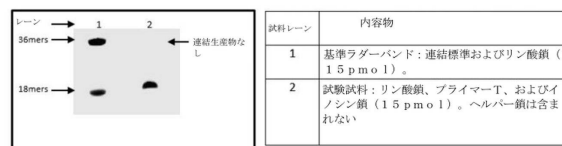
【図 13 e】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
3	鋳型	5'-CACATCAGTCGTAAGTCGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	5'末端でのTAMRA X=2'デオキシキノリン
4	Tを有するプライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	なし
5	対照	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCTGA CTACGCTGATGTG-3'	なし

【図 14 a】



【図 14 b】



10

20

30

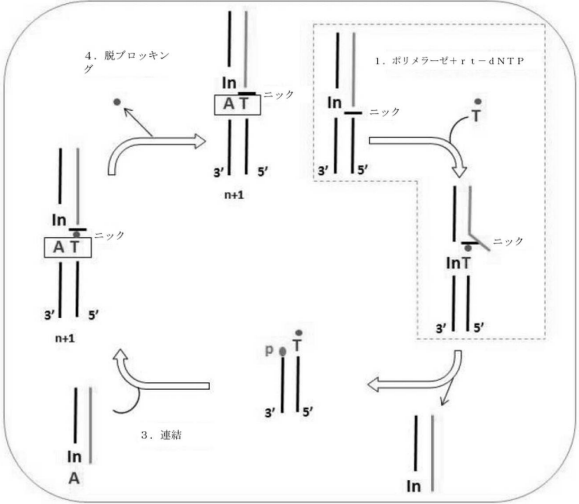
40

50

【図 1 4 c】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
6	連結標準	5'-CACATCACGTCGTAGT X A GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X = 2' -デオキシイノシン
7	リン酸鎖	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	3' 末端でのT AMRA (末端グアニンに付着した)、5' 末端でのリン酸
8	Tを有するプライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	なし
9	イノシン鎖	5'-CACATCACGTCGTAGT X A-3'	X = 2' -デオキシイノシン

【図 1 5 a】

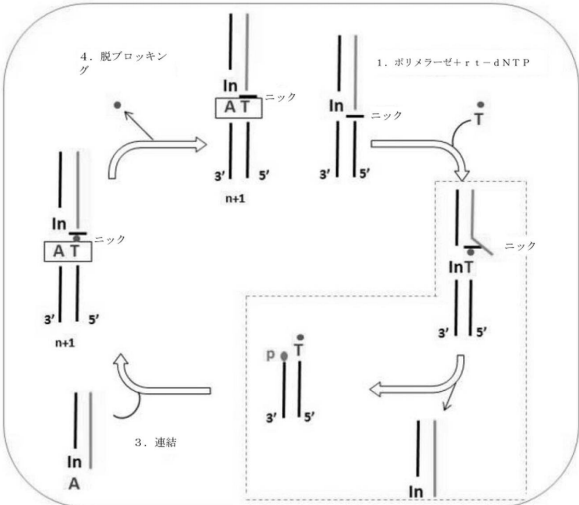


10

【図 1 5 b】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
10	プライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	5' 末端でのT AMRA (末端グアニンに付着した)
11	鋳型	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGCTGCAG TCACCTGTCGC-3'	X = 2' -デオキシイノシン
12	ヘルパー鎖	5'-CGACTACGACGTGATGTG-3'	なし

【図 1 6 a】



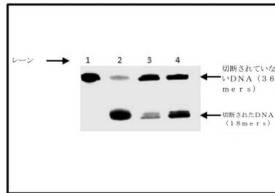
20

30

40

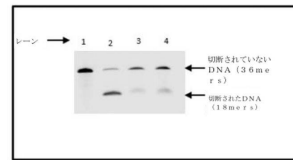
50

【図 16 b】



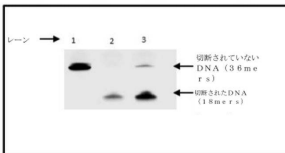
試料レーン	内容物
1	基準参照 鋳型 (15 pmol) のみ。
2	陽性対照 鋳型 + 対照 (15 pmol)
3	試験試料 I : 鋳型 + T を有するプライマー ヘルパー鎖は含まれない (15 pmol)
4	試験試料 I I : 鋳型 + T を有するプライマー + ヘルパー鎖 (15 pmol)

【図 16 c】



試料レーン	内容物
1	基準参照 鋳型 (15 pmol) のみ。
2	陽性対照 鋳型 + 対照 (15 pmol)
3	試験試料 I : 鋳型 + T を有するプライマー、 ヘルパー鎖は含まれない。 (15 pmol)
4	試験試料 I I : 鋳型 + T を有するプライマー + ヘルパー鎖 (15 pmol)。

【図 16 d】



試料レーン	内容物
1	基準参照 鋳型 (15 pmol) のみ。
2	陽性対照 鋳型 + 対照 (15 pmol)
3	試験試料 I : 鋳型 + T を有するプライマー + ヘルパー鎖 (15 pmol)。

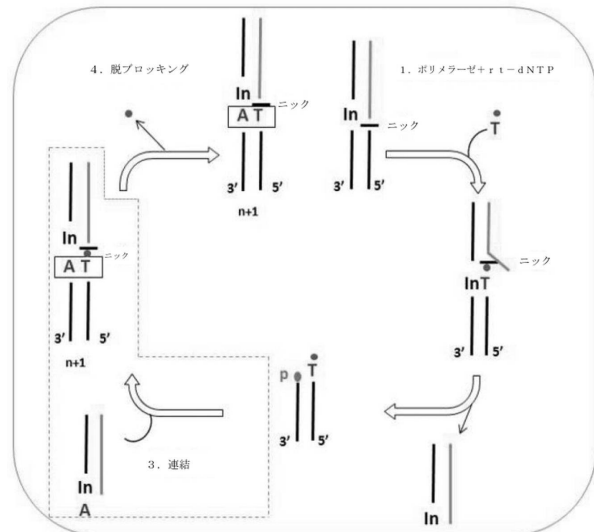
【図 16 e】

ゲル	切断反応の組み合わせ	ヘルパー鎖を有する切断されたDNAの転化%
A	hAAG / 化学塩基	50
B	hAAG / Endo VII	< 10
C	hAAG / 代替的な化学塩基	90*

【図 16 f】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
13	鋳型	5'-CACATCACGTCGATGCTGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	5' 末端での TAMRA (末端シトシンに付着した) X = デオキシイノシン
14	T を有するプライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	なし
15	対照	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCTGACTACGACGTGATGTG-3'	なし
16	ヘルパー鎖	5'-TGACTACGACGTGATGTG-3'	なし

【図 17 a】



10

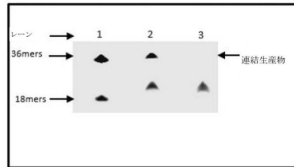
20

30

40

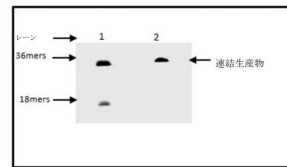
50

【図 17 b】



試料レーン	内容物
1	基準ラダーバンド：連結標準およびリン酸鎖 (15 pmol)
2	試験試料 I：リン酸鎖、プライマー-T、およびイノシン鎖+ヘルパー鎖を有する (15 pmol)
3	試験試料 II：リン酸鎖、プライマー-T、およびイノシン鎖+ヘルパー鎖を有さない (15 pmol) (1時間のインキュベーション後の試料)

【図 17 c】

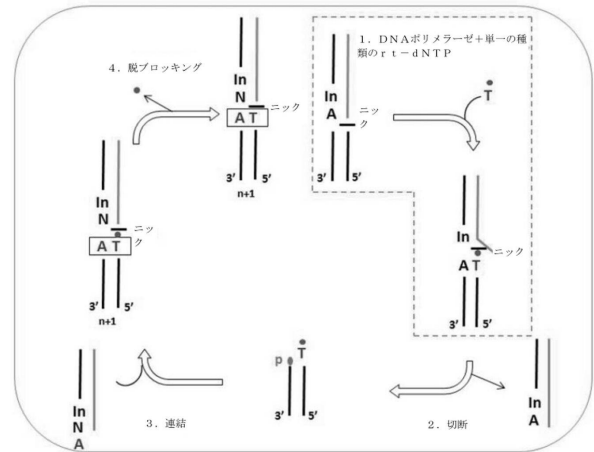


試料レーン	内容物
1	基準ラダーバンド：連結標準およびリン酸鎖 (15 pmol)
2	試験試料 I：リン酸鎖、プライマー-T、およびイノシン鎖+ヘルパー鎖を有する (15 pmol)

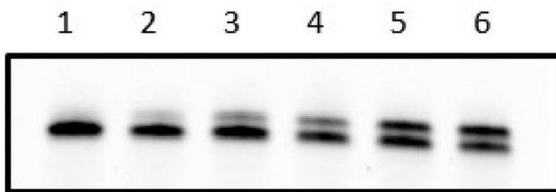
【図 17 d】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
17	連結標準	5'-CACATCACGTCGTAGTXA GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X=2'-デオキシイノシン
18	リン酸鎖	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	3' 末端での TAMRA (末端シトシンに付着した)、5' 末端でのリン酸
19	Tを有するプライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	なし
20	イノシン鎖	5'-CACATCACGTCGTAGTXA-3'	X=2'-デオキシイノシン
21	ヘルパー鎖	5'-CACTACGACGTGATGTG-3'	なし

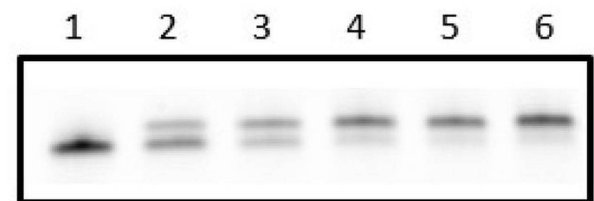
【図 18 a】



【図 18 b】



【図 18 c】



10

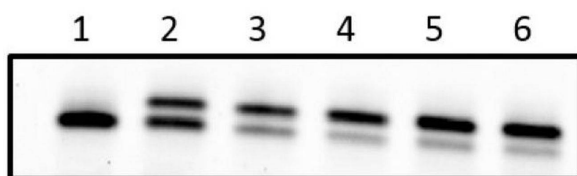
20

30

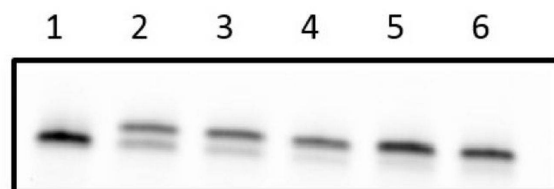
40

50

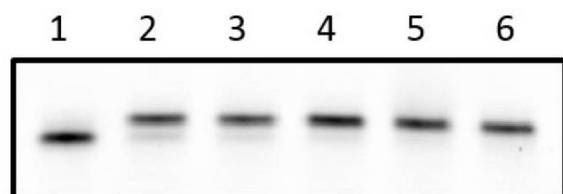
【図 18 d】



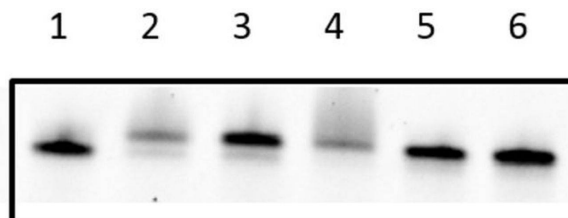
【図 18 e】



【図 18 f】



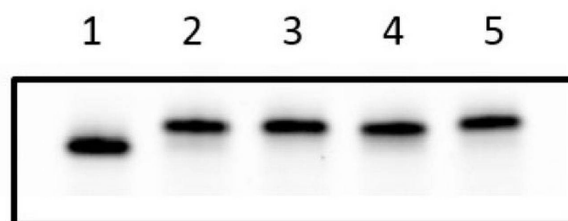
【図 18 g】



【図 18 h】

	0分	1分	2分	5分	10分	20分
Mn ²⁺ なしで27℃	0	5	10	20	35	40
Mn ²⁺ なしで37℃	0	30	58	90	90	90
Mn ²⁺ なしで47℃	0	30	65	90	90	90
Mn ²⁺ で27℃	0	70	85	92	95	95
Mn ²⁺ で37℃	0	85	90	>96	>96	>96
Mn ²⁺ で47℃	0	85	90	>96	>96	>96

【図 18 i】



10

20

30

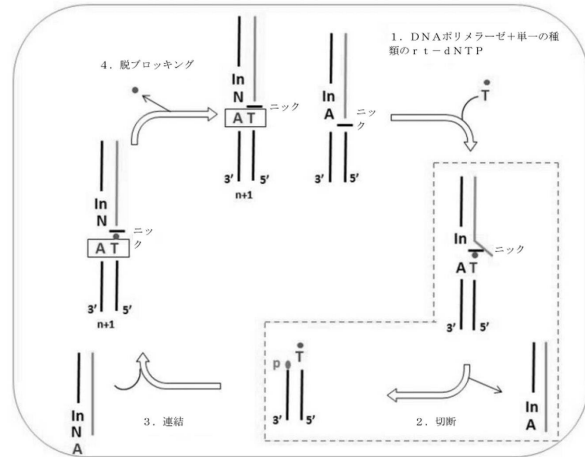
40

50

【図18j】

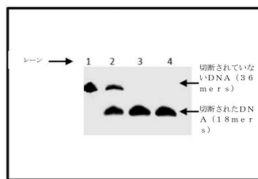
配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
22	プライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	5' 末端でのT-AMRA (末端グアニンに付着した)
23	鈍型A	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X=2' -デオキシノシン
24	鈍型G	5'-CACATCACGTCGTAGTCXGGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X=2' -デオキシノシン
25	鈍型T	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X=2' -デオキシノシン
26	鈍型C	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	X=2' -デオキシノシン
27	ヘルパー鎖T	5'-TCGACTACGACGTGATGTG-3'	なし
28	ヘルパー鎖C	5'-CCGACTACGACGTGATGTG-3'	なし
29	ヘルパー鎖A	5'-ACGACTACGACGTGATGTG-3'	なし
30	ヘルパー鎖G	5'-GCGACTACGACGTGATGTG-3'	なし

【図19a】



10

【図19b】



試料レーン	内容物
1	基準対照: 鈍型 (15 pmol) のみ。
2	陽性対照: 鈍型+対照 (15 pmol)
3	試験試料 I: 鈍型+Tを有するプライマー (15 pmol) ヘルパー鎖は含まれない
4	試験試料 II: 鈍型+Tを有するプライマー ヘルパー鎖が含まれる (15 pmol)

【図19c】

切断反応の組み合わせ	切断されたDNAの転化%
全長陽性対照	80
ヘルパー鎖の存在	>99
ヘルパー鎖の不在	>99

20

30

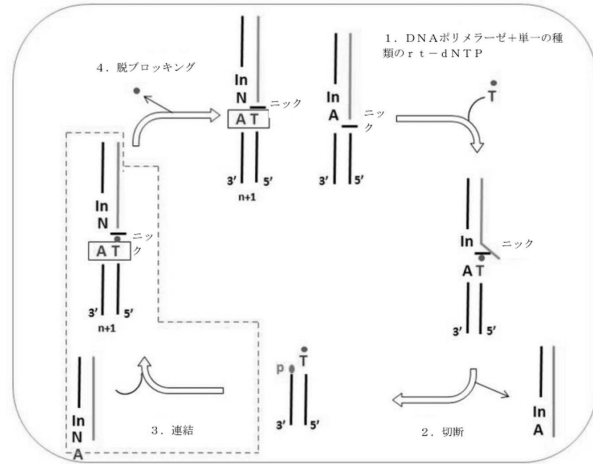
40

50

【図 19 d】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
31	鈍型	5'-CACATCACGTCGTAGTCXAGCT GCAGTCACCTGTCGC-3'	5' 末端での T AMRA (末端シトシンに付着した) X=デオキシイノシン
32	Tを有するプライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	なし
33	対照	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCTGA CTACGACGTGATGTG-3'	なし
34	ヘルパー鎖	5'-TCGACTACGACGTGATGTG-3'	なし

【図 20 a】

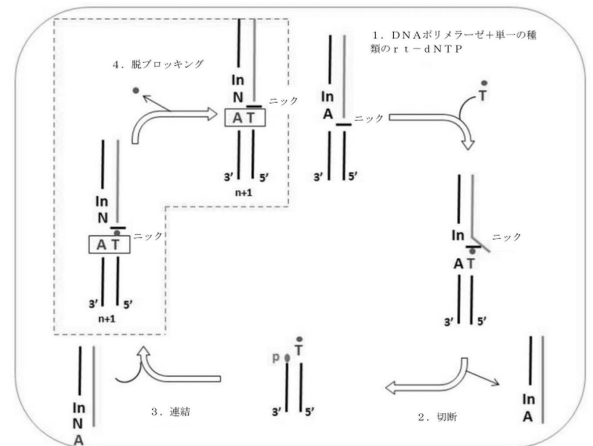


10

【図 20 b】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
35	リン酸鎖	5'-GCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	3' 末端での T AMRA (末端グアニンに付着した)、5' 末端でのリン酸
36	Tを有するプライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGCT-3'	なし
37	イノシン鎖	5'-CACATCACGTCGTAGTXGA-3'	X=2'-デオキシイノシン
38	ヘルパー鎖	5'-CCACTACGACGTGATGTG-3'	なし

【図 21 a】



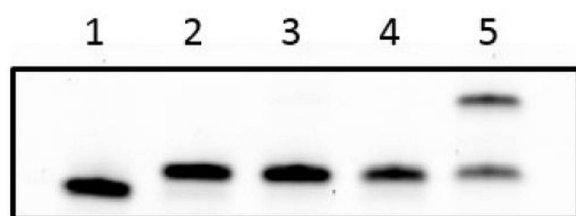
20

30

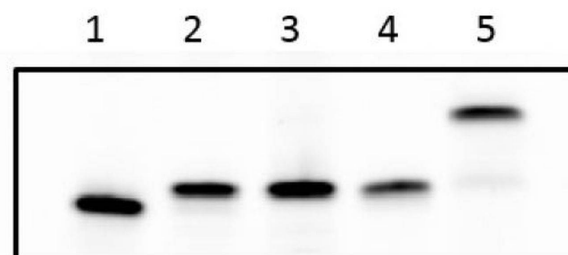
40

50

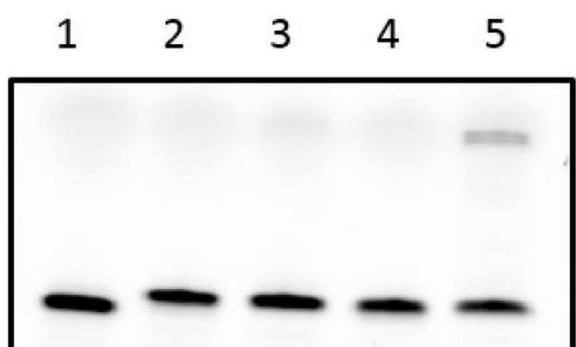
【図 2 1 b】



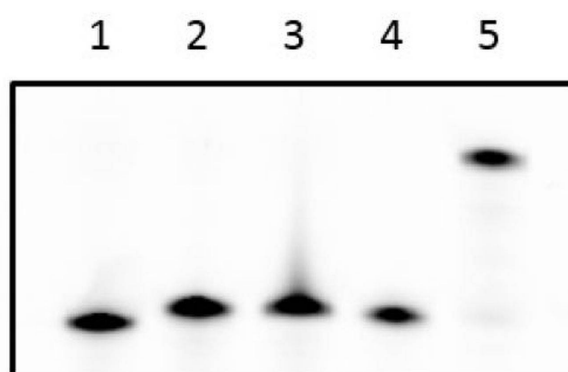
【図 2 1 c】



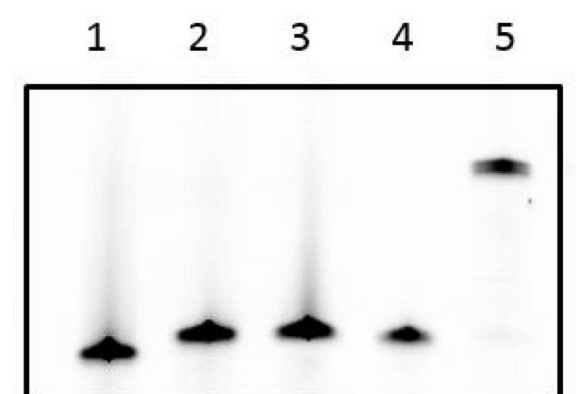
【図 2 1 d】



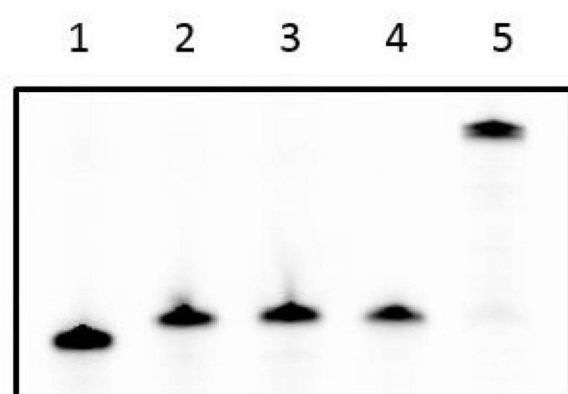
【図 2 1 e】



【図 2 1 f】



【図 2 1 g】



10

20

30

40

50

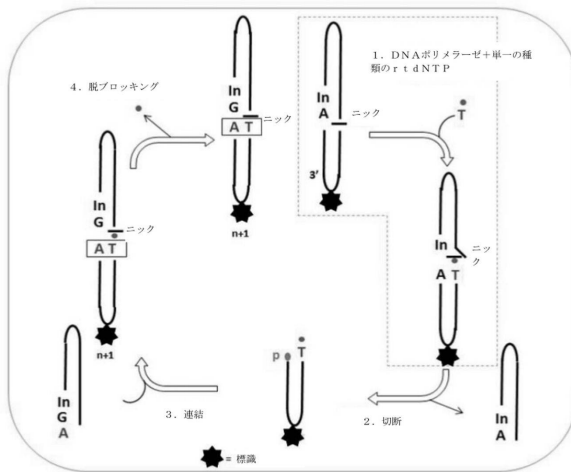
【図 2 1 h】

組み込み	5 0 mM TCEPによる脱保護	3 0 0 mM TCEPによる脱保護
3'-O-アジドメチル-d TTP	50%	95%
3'-O-アジドメチル-d CTP	20%	95%
3'-O-アジドメチル-d ATP	未試験	95%
3'-O-アジドメチル-d GTP	未試験	95%

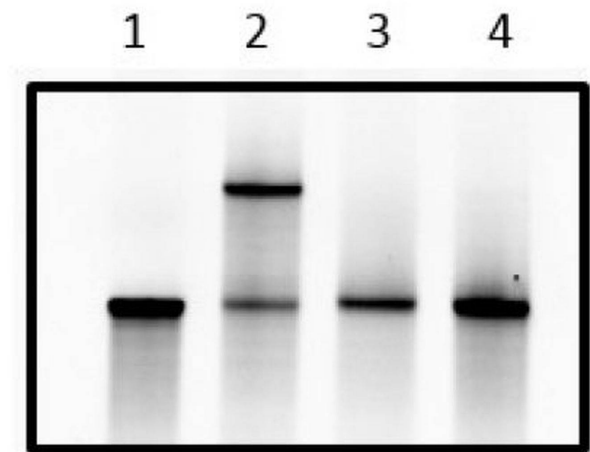
【図 2 1 i】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
39	プライマー	5'-GCGACAGGTGACTGCAGC-3'	5' 末端でのT AMRA (末端シトシンに付着した)
40	鋳型A	5'-CACATCACGTCGTAGTCAGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	なし
41	鋳型G	5'-CACATCACGTCGTAGTCGGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	なし
42	鋳型T	5'-CACATCACGTCGTAGTCTGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	なし
43	鋳型C	5'-CACATCACGTCGTAGTCCGCTGCAGTCACCTGTCGC-3'	なし

【図 2 2 a】



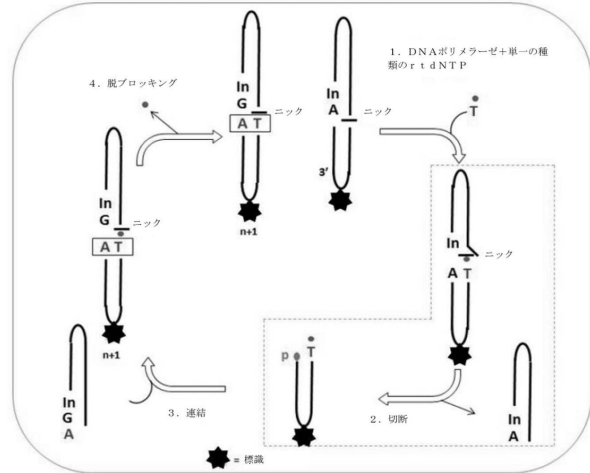
【図 2 2 b】



【図 2 2 c】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
44	組み込みのための二重ヘアピンモデル	5'-TCGACTACGACGTGACTTTTAGTCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTYTTGACGACAGGTGACTGCAGC-3'	X = 2'-デオキシシイノシン Y = T a m r a -d T

【図 2 3 a】



10

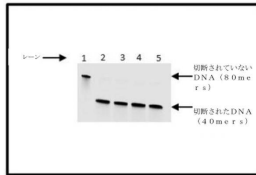
20

30

40

50

【図 2 3 b】

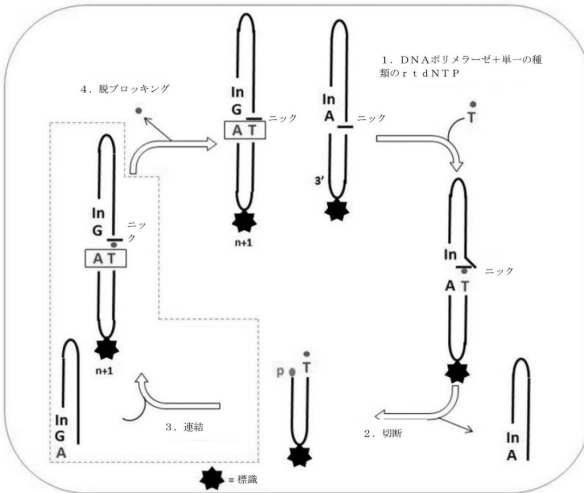


試料レーン	内容物
1	基準対照：リン酸型 (1.5 pmol) のみ。
2	試験試料 1：5 分のインキュベーション後の切断されたヘアピン型 (1.5 pmol)
3	試験試料 1：10 分のインキュベーション後の切断されたヘアピン型 (1.5 pmol)
4	試験試料 1：30 分のインキュベーション後の切断されたヘアピン型 (1.5 pmol)
5	試験試料 1：1 時間のインキュベーション後の切断されたヘアピン型 (1.5 pmol)

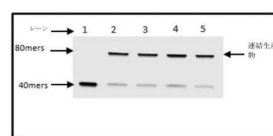
【図 2 3 c】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
45	組み込みのための二重ヘアピンモデル	5'-TCGACTACGACGTGACTTTTAGTCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGCTTTTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	X=2'-デオキシイノシン Y=Tamra-dT

【図 2 4 a】



【図 2 4 b】

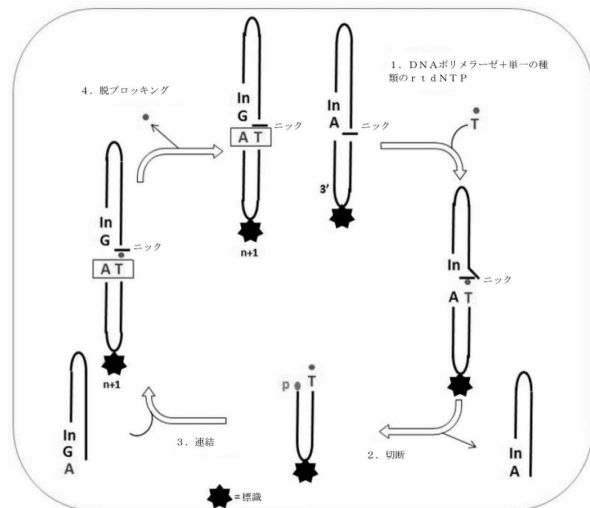


試料レーン	内容物
1	基準対照：リン酸型 (1.5 pmol) のみ。
2	試験試料 1：1 分のインキュベーション後の連結されたヘアピン生成物 (1.5 pmol)
3	試験試料 1：2 分のインキュベーション後の連結されたヘアピン生成物 (1.5 pmol)
4	試験試料 1：3 分のインキュベーション後の連結されたヘアピン生成物 (1.5 pmol)
5	試験試料 1：4 分のインキュベーション後の連結されたヘアピン生成物 (1.5 pmol)

【図 2 4 c】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
46	リン酸ヘアピン	5'-GCTGCAGTCACCTGCTGCTTTTTCGAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	Y=Tamra-dT リン酸
47	イノシンヘアピン	5'-CCGACTACGACGTGACTTTTAGTCACGTCGTAGTCXGA-3'	X=2'-デオキシイノシン

【図 2 5 a】



10

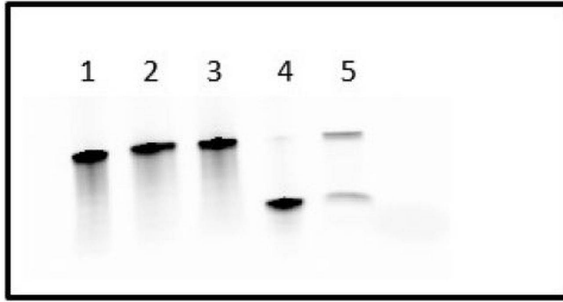
20

30

40

50

【図 25 b】

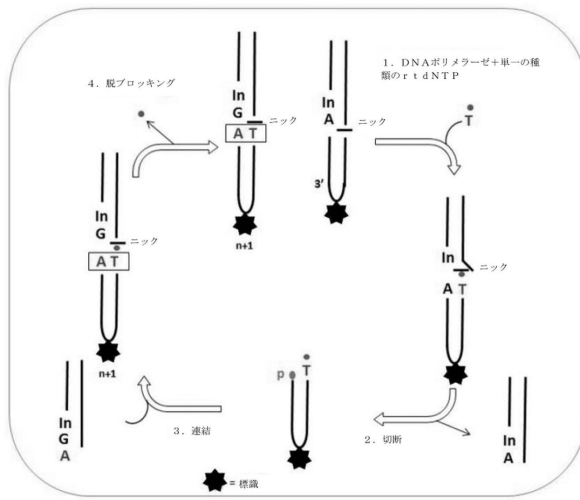


【図 25 c】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
48	二重ヘアピンモデル	5'-TCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGC TTTTCGAGCAGGTGACTGCAGC-3'	X=2' -デオキシ シイノシン Y=T a m r a -d T
49	連結のための鎖	5'-CCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXGA-3'	X=2' -デオキシ シイノシン

10

【図 26 a】

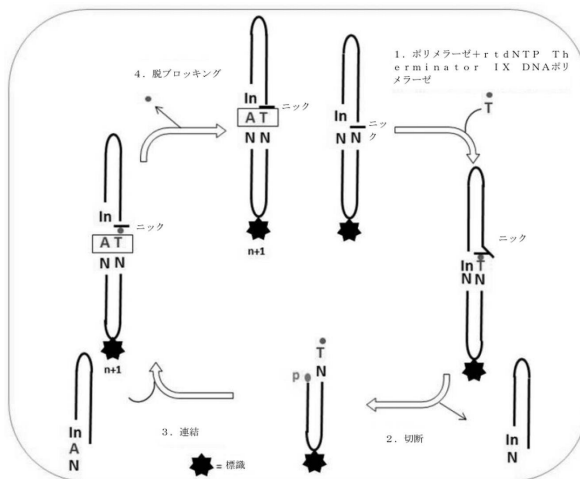


【図 26 b】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
50	組み込みのための単一ヘアピンモデル	5'-AGTCACGTCGTAGTCAGCTGCAGTC ACCTGCTGCTTTTCGAGCAGGTGACTGCAG C-3'	X=2' -デオキシイ ノシン Y=T a m r a -d T
51	ヘルパー鎖	5'-TCGACTACGACGTGACT-3'	
52	連結のための鎖	5'-AGTCACGTCGTAGTCXGA	X=2' -デオキシイ ノシン
53	連結のためのヘルパー鎖	5'-CCGACTACGACGTGACT-3'	

20

【図 27 a】



【図 27 b】

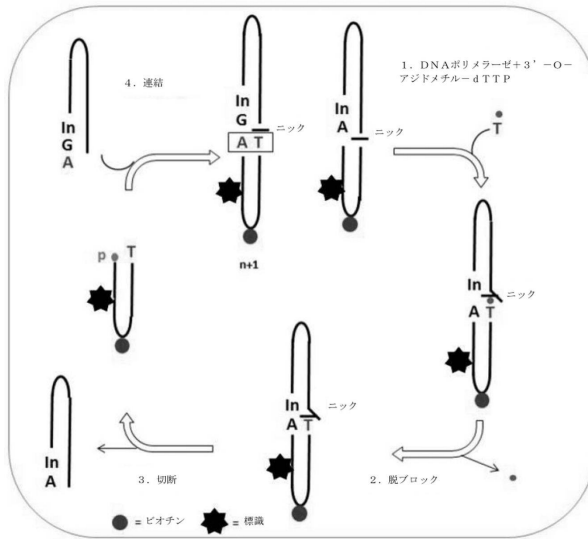
配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
54	二重ヘアピンモデル	5'-CGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCTGC TTTTCGAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	X=2' -デオキシイ ノシン Y=T a m r a -d T
55	連結のための鎖	5'-CGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAA-3'	X=2' -デオキシイ ノシン

30

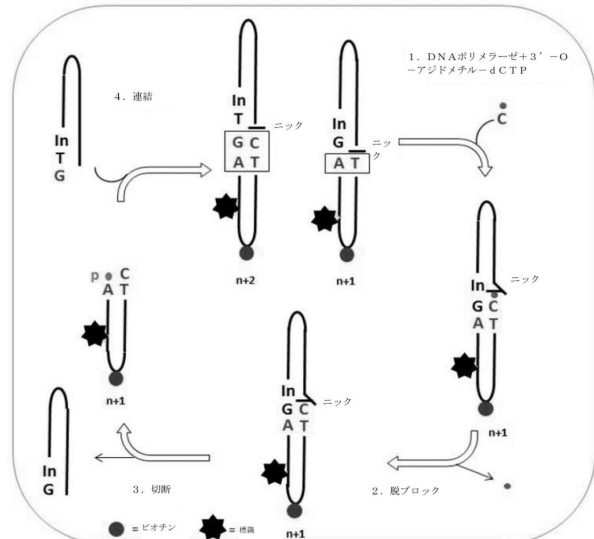
40

50

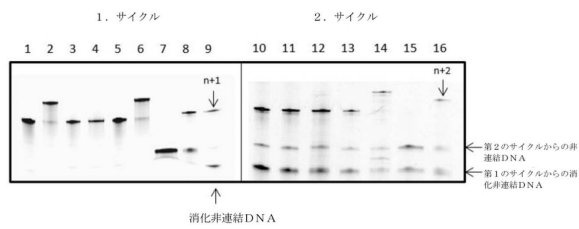
【図 28 a】



【図 28 b】



【図 28 c】



【図 28 d】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
56	二重ヘアピンモデル	5'-CGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXAGCTGACGTACCTGCGY CTTATTGCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	X=2'-デオキシ ノシン Y=T a m r a -d T Z=ピオチン-d T
57	第1のサイクルでの連結 のための鎖	5'-CCGACTACGACGTGACTTTTAGTCAC GTCGTAGTCXGA-3'	X=2'-デオキシ ノシン
58	第2のサイクルでの連結 のための鎖	5'-ACGAGTGACCTGGTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTACAGGTCAC CTTG-3'	X=2'-デオキシ ノシン

10

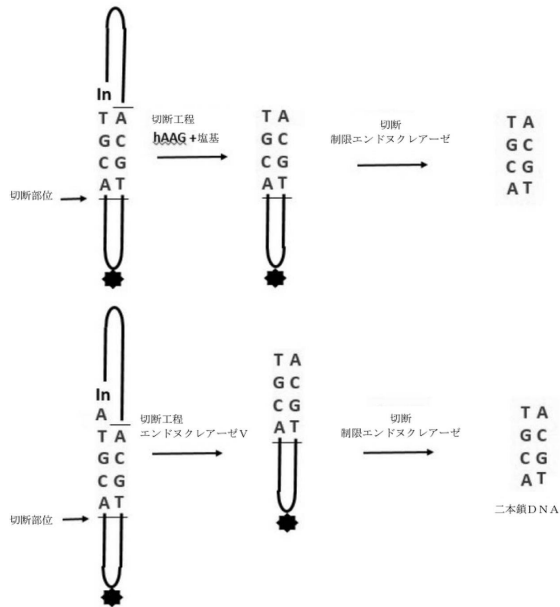
20

30

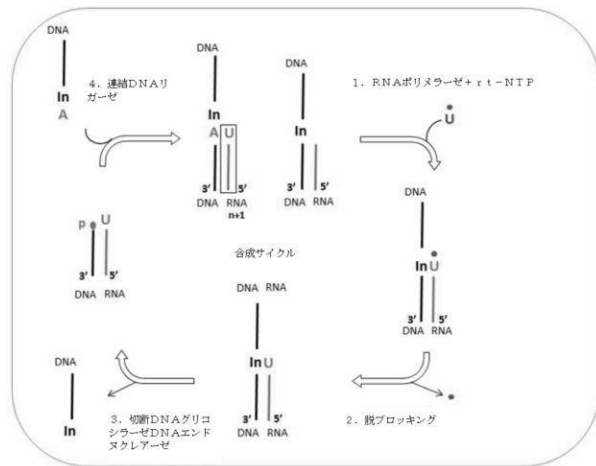
40

50

【図 29】

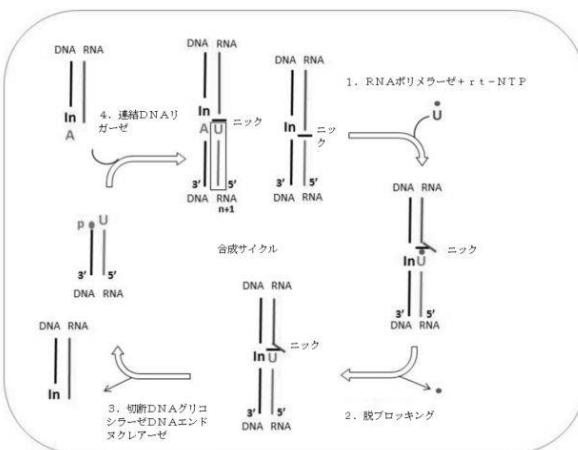


【図 30】

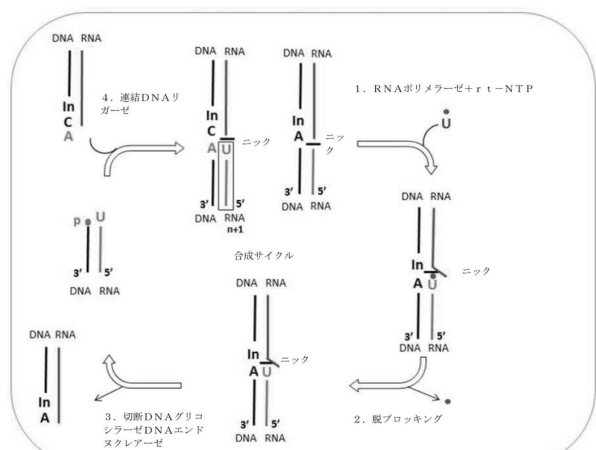


10

【図 31】



【図 32】



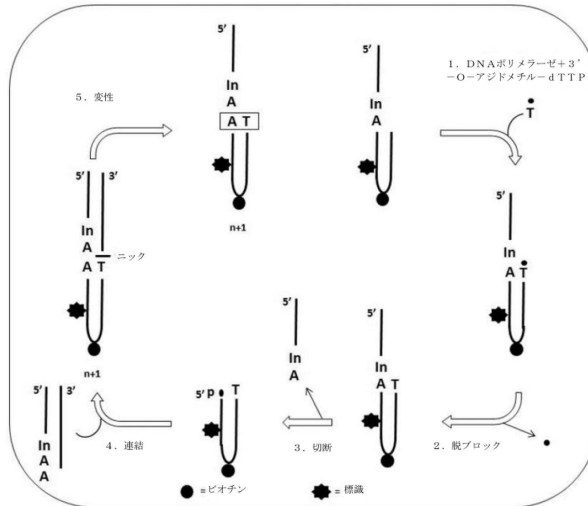
20

30

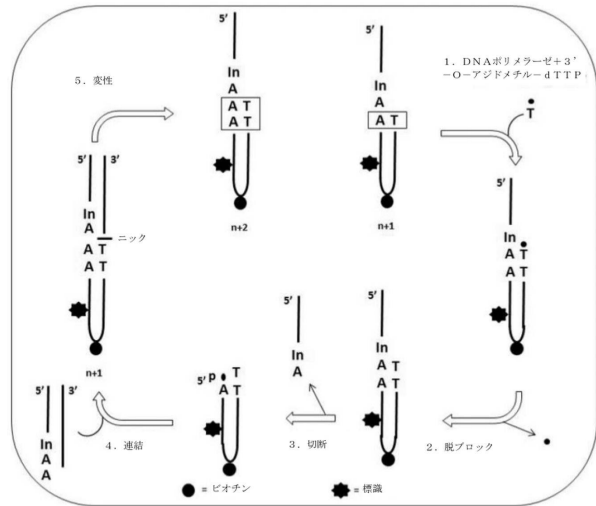
40

50

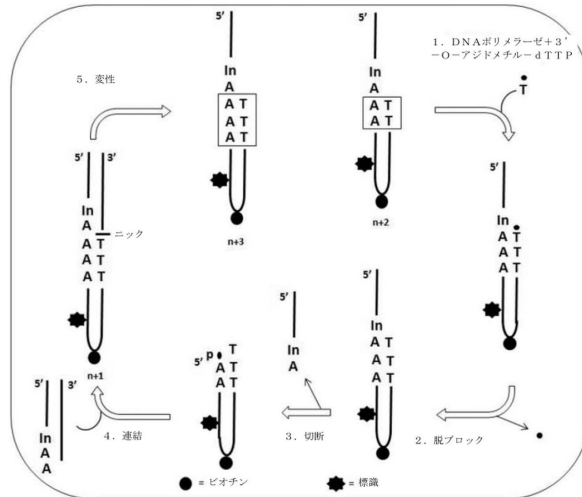
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



【図 3 6】

配列番号	オリゴヌクレオチドの名前	配列	修飾
59	単一ヘアピンモデル	5'-AGTCACGTCGTAGTCXAGCTGCAGTCACCTGCGCTTZZTTCAGCAGGTGACTGCAGC-3'	X=2'-デオキシイノシン Y=Tamra-dT Z=ビオチン-dT
60	連結のためのイノシン鎖	5'-AGTCACGTCGTAGTCXAA-3'	X=2'-デオキシイノシン
51	連結のためのヘルパー鎖	5'-TCGACTACGACGTGACT-3'	

10

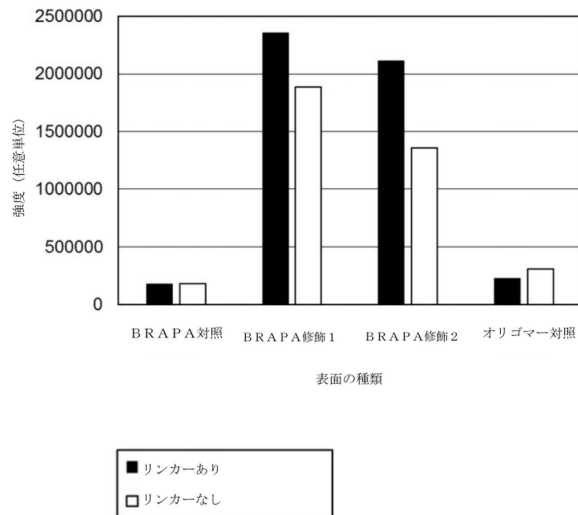
20

30

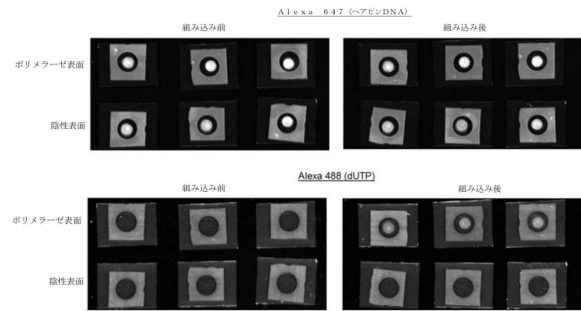
40

50

【図 4 2】

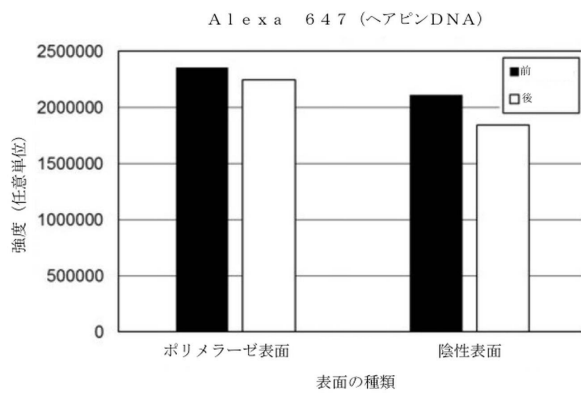


【図 4 3】

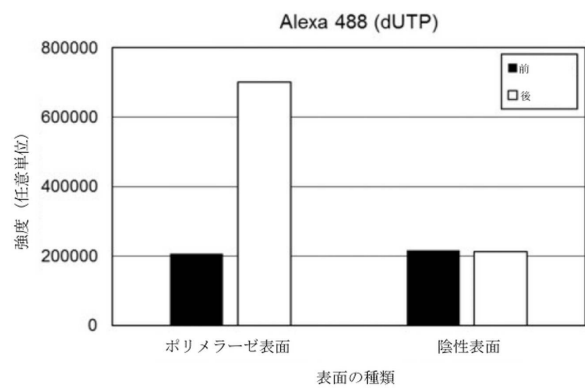


10

【図 4 4 a】



【図 4 4 b】



20

30

40

50

【図 4 5 a】

試料番号	試料説明 (実験結果)	切断工程	連結工程
A (陽性)	切断 (+) 連結 (+)	+イノシン +エンドヌクレアーゼ V	+ヘルパー鎖 +リガーゼ
B (連結陰性対照)	切断 (+) 連結 (-)	+イノシン +エンドヌクレアーゼ V	+ヘルパー鎖 -リガーゼ
C (切断陰性対照 1)	切断 (-) 連結 (N/A)	+イノシン -エンドヌクレアーゼ V	N/A
D (切断陰性対照 2)	切断 (-) 連結 (N/A)	-イノシン +エンドヌクレアーゼ V	N/A

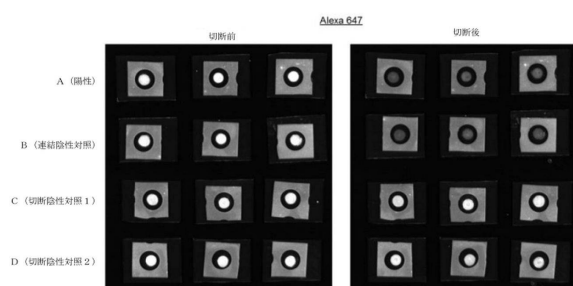
【図 4 5 b】

試料番号	配列	配列番号
A (陽性試料)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAGTCGAGTCACCTGCTGCTTZZTTCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	配列番号 6 5
B (連結陰性対照)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAGTCGAGTCACCTGCTGCTTZZTTCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	配列番号 6 5
C (切断陰性対照 1)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAGTCGAGTCACCTGCTGCTTZZTTCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	配列番号 6 5
D (切断陰性対照 2)	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCGAGTCGAGTCACCTGCTGCTTZZTTCAGCAGGTGACTGCAGCT-3'	配列番号 6 6

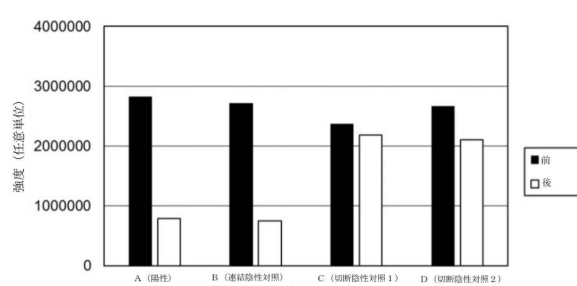
Z = 5' - 3' - チオリン酸-S p 9 - S p 9 - S p 9 - S p 9 - 5 - メチル C ; S p 9 = スーパー 9 ;
I = 2' - デオキシイノシン

10

【図 4 6】



【図 4 7】



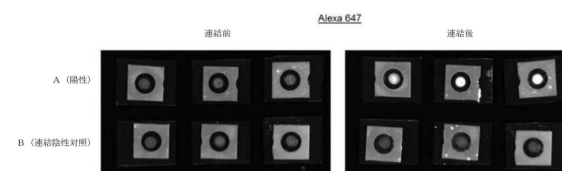
20

【図 4 8】

DNA	配列	配列番号
イノシン鎖	5'-Alexa647-AGTCACGTCGTAGTCIAA-3'	配列番号 6 7
ヘルパー鎖	5'-TCGACTACGACGTGACT-3'	配列番号 5 1

I = 2' - デオキシイノシン

【図 4 9】

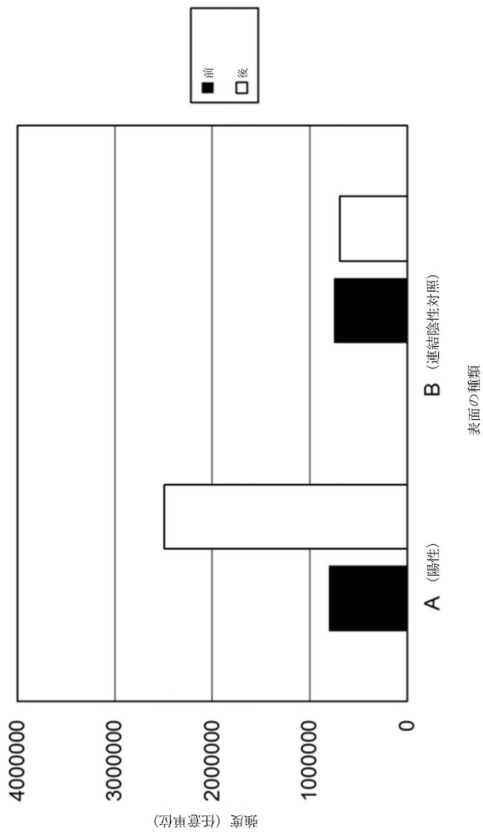


30

40

50

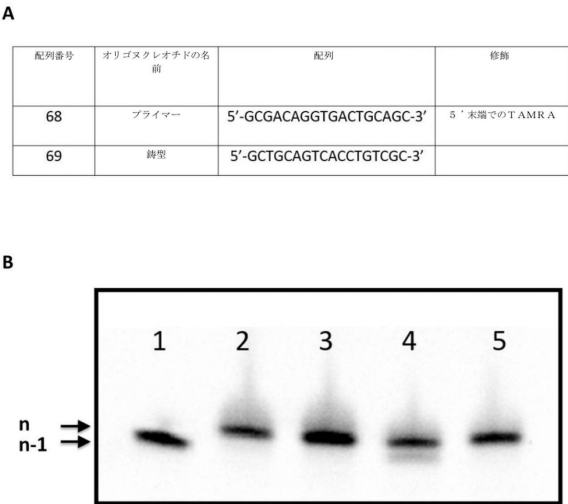
【図 5 0】



【配列表】

0007393351000001.app

【図 5 1】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (72)発明者 ミルトン, ジョン
イギリス国 ケンブリッジシャー シービー10 1エックスエル, ケンブリッジ, チェスターフォード リサーチ パーク, サイエンス ヴィレッジ, スイート 14, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 ネイヤール, ソビア
イギリス国 ケンブリッジシャー シービー10 1エックスエル, ケンブリッジ, チェスターフォード リサーチ パーク, サイエンス ヴィレッジ, スイート 14, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 リードル, ジャン
イギリス国 ケンブリッジシャー シービー10 1エックスエル, ケンブリッジ, チェスターフォード リサーチ パーク, サイエンス ヴィレッジ, スイート 14, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド内
- (72)発明者 大柿 亮祐
イギリス国 ケンブリッジシャー シービー10 1エックスエル, ケンブリッジ, チェスターフォード リサーチ パーク, サイエンス ヴィレッジ, スイート 14, オックスフォード ナノボール テクノロジーズ リミテッド内
- 審査官 太田 雄三
- (56)参考文献 特表2014-504153 (JP, A)
特表2020-506687 (JP, A)
特表2021-529548 (JP, A)
特表2021-529549 (JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00
C12P 19/00
C12M 1/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)