

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-512974

(P2025-512974A)

(43)公表日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6844(2018.01)	C 1 2 Q	1/6844	Z Z N A	
C 1 2 Q	1/6834(2018.01)	C 1 2 Q	1/6834	Z	
C 1 2 Q	1/6806(2018.01)	C 1 2 Q	1/6806	Z	
C 4 0 B	40/06 (2006.01)	C 4 0 B	40/06		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-559275(P2024-559275)	(71)出願人	500358711 イルミナ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 2 サンディエゴ イルミナ ウェイ 5 2 0 0
(86)(22)出願日	令和5年4月6日(2023.4.6)	(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85)翻訳文提出日	令和6年10月4日(2024.10.4)	(74)代理人	100188558 弁理士 飯田 雅人
(86)国際出願番号	PCT/US2023/017778	(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87)国際公開番号	WO2023/196528	(72)発明者	アンドリュー・スラッター イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 1 6 D F・ケンブリッジ・グレート・ア ピントン・グラント・パーク・1 9・イ
(87)国際公開日	令和5年10月12日(2023.10.12)		
(31)優先権主張番号	63/329,101		
(32)優先日	令和4年4月8日(2022.4.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/343,760		
(32)優先日	令和4年5月19日(2022.5.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/347,375		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アプタマーダイナミックレンジ圧縮及び検出技法

(57)【要約】

アプタマーベースのアッセイにおいてより多い存在量のアプタマーの一部の除去を可能にする、ダイナミックレンジ圧縮を有するアプタマー検出技法が記載される。実施形態では、ダミープローブが多い存在量のアプタマーに結合し、次に下流工程における検出のために捕捉又は増幅されないように、タグ付きプローブ及びダミープローブの混合物を使用することができる。過剰なアプタマーに結合するプローブの標的化除去又は切断を含む、他の技法も企図される。

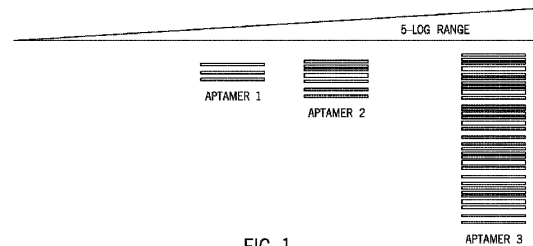


FIG. 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アプタマー検出の方法であって、

試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物 - アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることであって、前記複数のアプタマーのうちの異なるアプタマーが、前記分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する、接触させることと、

前記分析物 - アプタマー複合体のアプタマーを検出することによって前記分析物を検出することであって、前記複数のアプタマーのうちの個々のアプタマーを検出することが、

前記個々のアプタマーを第 1 のプローブの混合物と接触させることであって、前記混合物の各第 1 のプローブの第 1 の相補的領域が、前記個々のアプタマーの第 1 の領域にハイブリダイズし、前記混合物中の前記第 1 のプローブのサブセットのみが親和性タグに結合する、接触させることと、

前記個々のアプタマーを第 2 のプローブと接触させて、前記第 2 のプローブの第 2 の相補的領域を前記個々のアプタマーの第 2 の領域にハイブリダイズさせることであって、前記第 2 のプローブが、前記相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み、前記第 1 の相補的領域及び前記第 2 の相補的領域が、前記個々のアプタマーに一意的にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、

前記親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して前記混合物の第 1 のプローブを捕捉して、前記個々のアプタマー、及び前記個々のアプタマーの前記第 2 の領域にハイブリダイズした前記第 2 のプローブを捕捉することであって、前記第 1 のプローブが、前記親和性タグに結合した前記サブセット中にある、捕捉することと、

捕捉された前記第 2 のプローブの前記識別配列を検出することと、を含む検出することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 の領域及び前記第 2 の領域が、少なくとも 1 ヌクレオチド離れた間隔が空けられている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記親和性タグが、ビオチンであり、親和性タグ捕捉分子が、アビジン又はストレプトアビジンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記捕捉された第 2 のプローブの前記識別配列を検出することが、前記捕捉された第 2 のプローブをプライマーと接触させて増幅産物を生成することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記プライマーが、前記非ハイブリダイズ領域の第 1 のプライマー結合領域に結合する第 1 のプライマー及び前記非ハイブリダイズ領域の第 2 のプライマー結合領域に結合する第 2 のプライマーを含み、前記第 1 のプライマー結合領域及び前記第 2 のプライマー結合領域が、前記識別配列に隣接する、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記増幅産物が、第 1 の配列決定プライマー及び第 2 の配列決定プライマーを含むように、前記第 1 のプライマーが、前記第 1 の配列決定プライマーを含み、前記第 2 のプライマーが、前記第 2 の配列決定プライマーを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記捕捉された第 2 のプローブの前記識別配列を検出することが、前記増幅産物を配列決定することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記個々のアプタマーに関する通知を、前記識別配列を検出することに基づいて生成することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

前記識別配列を検出する前に、捕捉された前記第 1 のプローブ及び捕捉された前記個々のアダプターから、前記捕捉された第 2 のプローブを分離することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記識別配列を検出する前に、前記捕捉された第 2 のプローブの末端にオリゴヌクレオチドをライゲートすることと、ライゲートした前記オリゴヌクレオチドを伸長することと、を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

第 1 のオリゴヌクレオチド及び第 2 のオリゴヌクレオチドを前記捕捉された第 2 のプローブにハイブリダイズさせることと、前記捕捉された第 2 のプローブを鋳型として使用して前記第 1 のオリゴヌクレオチドを伸長させて、伸長ライゲーションを介して前記第 1 のオリゴヌクレオチドを前記第 2 のオリゴヌクレオチドにライゲートすることと、を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 12】

前記捕捉された第 2 のプローブから、前記第 2 のオリゴヌクレオチドに結合した第 2 の親和性タグを使用して、ライゲートした前記第 1 のオリゴヌクレオチド及び第 2 のオリゴヌクレオチドを分離することを更に含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

第 3 のオリゴヌクレオチドを前記ライゲートした第 1 のオリゴヌクレオチド及び第 2 のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせることと、前記ライゲートした第 1 のオリゴヌクレオチド及び第 2 のオリゴヌクレオチド並びにハイブリダイズした前記第 3 のオリゴヌクレオチドを伸長させて、配列決定のための 5' 及び 3' アダプターを含む第 1 及び第 2 の相補鎖を生成することと、を更に含む、請求項 12 に記載の方法。

20

【請求項 14】

前記識別配列を検出する前に、前記捕捉された第 2 のプローブから前記識別配列を含む前記非ハイブリダイズ領域の少なくとも一部を切断することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記切断することの後に、前記捕捉された第 2 のプローブの切断された部分をアダプターの末端にライゲートすることを更に含む、請求項 14 に記載の方法。

30

【請求項 16】

前記識別配列を検出する前に、未捕捉プローブを除去することを更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記未捕捉プローブが、前記サブセット中ではない混合物中にプローブを含み、前記サブセット中ではない前記プローブが、前記親和性タグに結合されていない、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

アダプター検出プローブセットであって、

40

アダプターパネルのそれぞれの異なるアダプターに相補的な複数の異なる第 1 のプローブ混合物であって、前記複数の異なる第 1 のプローブ混合物のうちの個々の第 1 のプローブ混合物が、

親和性タグに結合した第 1 のプローブの結合サブセット、

前記親和性タグに結合していない第 1 のプローブのダミーサブセットを含み、前記個々の第 1 のプローブ混合物の前記結合サブセット及び前記ダミーサブセット中の各プローブが、前記アダプターパネルの個々のアダプターの第 1 の配列に相補的である同じ結合領域を含む、複数の異なる第 1 のプローブ混合物と、

前記アダプターパネルの前記それぞれの異なるアダプターに相補的な複数の異なる第 2 のプローブであって、前記複数の異なる第 2 のプローブのうちの個々の第 2 のプローブが

50

、前記個々のアプタマーの第2の配列に相補的な第2の結合領域を含み、前記個々の第2のプローブが、非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含む、複数の異なる第2のプローブと、を含む、アプタマー検出プローブセット。

【請求項19】

前記識別配列が、前記個々のアプタマーの配列と重複していない、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項20】

前記識別配列が、20ヌクレオチド以下の長さである、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項21】

前記個々の第2のプローブが、前記非ハイブリダイズ領域と前記第2の結合領域との間に配置された切断部位を含む、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項22】

前記非ハイブリダイズ領域が、前記識別配列に隣接するプライマー領域を含む、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項23】

前記結合サブセットが、前記個々の第1のプローブ混合物の20%未満を含む、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項24】

前記結合サブセットの前記ダミーサブセットに対する比が、前記個々の第1のプローブ混合物中で1:1未満である、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項25】

複数の異なる第2の第1のプローブ混合物であって、

親和性タグに結合した第1のプローブの第2の結合サブセット、

親和性タグに結合していない第1のプローブの第2のダミーサブセットを含み、前記第2の第1のプローブ混合物の前記第2の結合サブセット及び前記第2のダミーサブセットにおける各プローブが、前記アプタマーパネルの第2のアプタマーに相補的である同じ第2の結合領域を含み、前記第2のアプタマーが、前記個々のアプタマーとは異なり、前記第2の結合領域が、前記結合領域とは異なる、複数の異なる第2の第1のプローブ混合物を含む、請求項18に記載のプローブセット。

【請求項26】

前記個々の第1のプローブ混合物における前記結合サブセットの前記ダミーサブセットに対する第1の比が、前記第2の第1のプローブ混合物における前記第2の結合サブセットの前記第2のダミーサブセットに対する第2の比と異なる、請求項25に記載のプローブセット。

【請求項27】

アプタマー検出プローブセットであって、

アプタマーパネルのそれぞれの異なるアプタマーに相補的な複数の異なる第1のプローブ混合物であって、前記複数の異なる第1のプローブ混合物の各第1のプローブ混合物が

第1のプローブの結合サブセット、

親和性タグに結合されていない第1のプローブのダミーサブセットを含み、各第1のプローブ混合物が、前記アプタマーパネルのアプタマーに相補的である結合領域を含み、前記結合領域が、各第1のプローブ混合物が、前記アプタマーパネルの異なるアプタマーに結合するように、各第1のプローブ混合物に固有であり、各第1のプローブ混合物が、前記複数のうちの他の第1のプローブ混合物と比較して、前記結合サブセットの前記ダミーサブセットに対する異なる比を有する、複数の異なる第1のプローブ混合物と、

前記アプタマーパネルの前記それぞれの異なるアプタマーに相補的な複数の異なる第2のプローブと、を含む、アプタマー検出プローブセット。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記複数の異なる第1のプローブ混合物が、少なくとも100個の異なる第1のプローブ混合物を含む、請求項27に記載のプローブセット。

【請求項 29】

アプタマー検出プローブセットであって、

アプタマーパネルのそれぞれの異なるアプタマーに相補的な複数の異なるレポータプローブ混合物であって、前記複数の異なるレポータプローブ混合物のうちの個々のレポータプローブ混合物が、

増幅可能な非ハイブリダイズ領域を含むレポータプローブの第1のサブセットであって、前記非ハイブリダイズ領域が、第1のプライマー領域及び第2のプライマー領域に隣接し、前記第1のプライマー領域及び前記第2のプライマー領域に相補的か、又はそれらに対応するプライマーを使用して増幅することができる、個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含む、第1のサブセットと、

レポータプローブの第2のサブセットであって、前記個々のレポータプローブ混合物の前記第1のサブセット及び前記第2のサブセットにおける各プローブが、前記アプタマーパネルの個々のアプタマーの第1の配列に相補的である同じ結合領域を含み、個々の第2のプローブが、前記プライマーを使用して増幅することができない非増幅性の非ハイブリダイズ領域を含む、第2のサブセットと、を含む、複数の異なるレポータプローブ混合物と、

前記アプタマーパネルの前記それぞれの異なるアプタマーに相補的な複数の異なる捕捉プローブであって、前記複数の異なる捕捉プローブのうちの個々の捕捉プローブが、前記個々のアプタマーの第2の配列に相補的な第2の結合領域を含み、前記複数のうちの各捕捉プローブが、親和性タグに結合されている、複数の異なる捕捉プローブと、を含む、アプタマー検出プローブセット。

【請求項 30】

前記非増幅性の非ハイブリダイズ領域が、前記第1のプライマー領域及び前記第2のプライマー領域の一方又は両方を含まない、請求項29に記載のプローブセット。

【請求項 31】

前記非増幅性の非ハイブリダイズ領域が、前記識別配列を含まない、請求項29に記載のプローブセット。

【請求項 32】

前記非増幅性の非ハイブリダイズ領域が、少なくとも1つの伸長ブロックを含む、請求項29に記載のプローブセット。

【請求項 33】

前記非増幅性の非ハイブリダイズ領域が、制限酵素部位を含む、請求項29に記載のプローブセット。

【請求項 34】

アプタマー検出の方法であって、

個々のアプタマーを、前記個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズするレポータプローブと接触させることであって、前記レポータプローブの第1のサブセットが、増幅可能な非ハイブリダイズ領域を含み、前記増幅可能な非ハイブリダイズ領域が、第1のプライマー領域及び第2のプライマー領域に隣接する前記個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み、第2のサブセットが、非増幅性の非ハイブリダイズ領域を含む、接触させることと、

前記個々のアプタマーを、捕捉プローブと接触させることであって、前記捕捉プローブが、前記個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズし、前記捕捉プローブが、親和性タグと会合している、接触させることと、

前記親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して前記捕捉プローブを捕捉して、前記個々のアプタマー、及び前記個々のアプタマーの前記第1の領域にハイブリダイズした前記増幅可能な非ハイブリダイズ領域を含む前記レポータプローブを捕捉することと、

捕捉された前記レポータープローブの前記識別配列を、前記識別配列の増幅を介して検出することと、を含む、方法。

【請求項 35】

前記捕捉されたレポータープローブの前記識別配列を検出することが、前記捕捉されたレポータープローブをプライマーと接触させて増幅産物を生成することを含む、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記プライマーが、非ハイブリダイズ領域の第 1 のプライマー結合領域に結合する第 1 のプライマーと、前記非ハイブリダイズ領域の第 2 のプライマー結合領域に対応する第 2 のプライマーと、を含み、前記第 1 のプライマー結合領域及び前記第 2 のプライマー結合領域が、前記非ハイブリダイズ領域に隣接している、請求項 35 に記載の方法。

10

【請求項 37】

前記捕捉されたレポータープローブの前記識別配列を検出することが、前記増幅産物を配列決定することを含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記個々のアプタマーの前記第 1 の領域にハイブリダイズした前記非増幅性の非ハイブリダイズ領域を含むレポータープローブが、検出されない、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 39】

アプタマー検出の方法であって、

アプタマーを、前記アプタマーのうちのそれぞれの異なるアプタマーにハイブリダイズするプローブと接触させることであって、各プローブの相補的領域が、前記アプタマーのうちの個々のアプタマーにハイブリダイズし、各プローブが、前記相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、各個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含む、接触させることと、

20

エキソヌクレアーゼを使用して、前記アプタマーにハイブリダイズしていない過剰なプローブを除去することと、

前記過剰なプローブを除去した後に、前記プローブにおける前記識別配列を検出することと、を含む、方法。

【請求項 40】

アプタマー検出の方法であって、

第 1 のアプタマー及び第 2 のアプタマーをレポータープローブと接触させることであって、前記レポータープローブが、前記第 1 のアプタマーにハイブリダイズする第 1 のサブセット及び前記第 2 のアプタマーにハイブリダイズする第 2 のサブセットを含み、前記第 1 のサブセットの前記レポータープローブが、前記第 1 のアプタマーについて一意的に特定する第 1 の識別配列及び第 1 のグループ捕捉配列を含む第 1 の非ハイブリダイズ領域を含み、前記第 2 のサブセットの前記レポータープローブが、前記第 2 のアプタマーについて一意的に特定する第 2 の識別配列及び前記第 1 のグループ捕捉配列を含む第 2 の非ハイブリダイズ領域を含む、接触させることと、

30

前記第 1 のアプタマー及び前記第 2 のアプタマーを捕捉プローブと接触させることであって、前記捕捉プローブが、前記第 1 のアプタマー又は前記第 2 のアプタマーにハイブリダイズし、前記捕捉プローブが、親和性タグと会合している、接触させることと、

40

前記親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して前記捕捉プローブを捕捉して、前記第 1 のアプタマー及び前記第 2 のアプタマー及び前記レポータープローブを捕捉することと、

前記第 1 のサブセットからの前記第 1 の識別配列及び前記第 1 のグループ捕捉配列を含む第 1 のオリゴヌクレオチドと、前記第 2 のサブセットからの前記第 2 の識別配列及び前記第 1 のグループ捕捉配列を含む第 2 のオリゴヌクレオチドと、を生成することと、

前記第 1 のオリゴヌクレオチド及び前記第 2 のオリゴヌクレオチドを、前記第 1 のグループ捕捉配列に相補的な配列を有する第 1 のグループのビーズを使用して捕捉することと

50

捕捉された前記第 1 のオリゴヌクレオチドにおける前記第 1 の識別配列及び前記第 2 のオリゴヌクレオチドにおける前記第 2 の識別配列を検出して、前記第 1 のアプタマー及び前記第 2 のアプタマーを検出することと、を含む、方法。

【請求項 4 1】

第 3 のアプタマーを前記レポータープローブと接触させることを含み、前記レポータープローブが、前記第 3 のアプタマーについて一意的に特定する第 3 の識別配列及び前記第 1 のグループ捕捉配列とは異なる第 2 のグループ捕捉配列を含む第 3 の非ハイブリダイズ領域を含む第 3 のサブセットを含む、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記第 3 のサブセットからの前記第 3 の識別配列及び前記第 2 のグループ捕捉配列を含む第 3 のオリゴヌクレオチドを生成することと、

前記第 2 のグループ捕捉配列に相補的な配列を有する第 2 のグループのビーズを使用して、前記第 3 のオリゴヌクレオチドを捕捉することと、

捕捉された前記第 3 のオリゴヌクレオチドにおける前記第 3 の識別配列を検出して、前記第 3 のアプタマーを検出することと、を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記第 1 のグループのビーズ及び前記第 2 のグループのビーズが、ほぼ同じ数のビーズを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

アプタマー検出の方法であって、

個々のアプタマーを、前記個々のアプタマーの第 1 の領域にハイブリダイズする第 1 のレポータープローブと接触させることであって、前記第 1 のレポータープローブが、第 1 の非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアプタマーについて一意的に特定する第 1 の識別配列を含み、前記個々のアプタマーの第 2 の領域にハイブリダイズする第 2 のレポータープローブを有し、前記第 2 のレポータープローブが、第 2 の非ハイブリダイズ領域を含み、前記第 2 の非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアプタマーについて一意的に特定する第 2 の識別配列を含む、接触させることと、

前記第 1 の識別配列及び前記第 2 の識別配列の末端を互いにライゲートして、ライゲートしたレポータープローブを生成することと、

前記第 1 のレポータープローブ又は前記第 2 のレポータープローブに結合した親和性タグを使用して、ライゲートしたレポータープローブを捕捉することと、

捕捉された前記ライゲートしたレポータープローブの増幅を介して前記第 1 の識別配列及び前記第 2 の識別配列を検出して、前記個々のアプタマーを検出することと、を含む、方法。

【請求項 4 5】

一本鎖オリゴヌクレオチドスプリントを、前記第 1 のレポータープローブ及び前記第 2 のレポータープローブにハイブリダイズさせることを含み、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

1 つ以上のエキソヌクレアーゼを使用して、前記個々のアプタマー又は他のアプタマーに結合していない他のレポータープローブを消化することを含み、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

リガーゼを使用して、前記捕捉されたライゲートしたレポータープローブを環化することを含み、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記第 1 のレポータープローブが、第 1 のプライマー領域を含み、前記第 2 のレポータープローブが、第 2 のプライマー領域を含み、前記増幅が、前記第 1 のプライマー領域及び前記第 2 のプライマー領域に相補的か、又はそれらに対応するプライマーを使用する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

10

20

30

40

50

前記第 1 のプライマー領域が、前記第 1 の識別配列と、前記第 1 のレポータープローブで前記アプタマーに結合する配列との間に位置する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記第 2 のプライマー領域が、前記第 2 の識別配列と、前記第 2 のレポータープローブで前記アプタマーに結合する配列との間に位置する、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

アプタマー検出の方法であって、

試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物 - アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることであって、前記複数のアプタマーのうちの異なるアプタマーが、前記分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する、接触させることと、

10

前記分析物 - アプタマー複合体のアプタマーを検出することによって前記分析物を検出することであって、前記複数のアプタマーのうちの個々のアプタマーを検出することが、

前記個々のアプタマーを第 1 のプローブの混合物と接触させることであって、前記混合物の各第 1 のプローブの第 1 の相補的領域が、前記個々のアプタマーの第 1 の領域にハイブリダイズすることができ、前記混合物の第 1 のプローブが、前記個々のアプタマーの前記第 1 の領域にハイブリダイズするように、前記混合物中の前記第 1 のプローブのサブセットのみが親和性タグに結合される、接触させることと、

前記個々のアプタマーを第 2 のプローブと接触させて、前記第 2 のプローブの第 2 の相補的領域を前記個々のアプタマーの第 2 の領域にハイブリダイズさせることであって、前記第 2 のプローブが、前記相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み、前記第 1 の相補的領域及び前記第 2 の相補的領域が、前記個々のアプタマーに一意的にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、

20

前記個々のアプタマーの前記第 1 の領域にハイブリダイズした前記第 1 のプローブを、前記個々のアプタマーの前記第 2 の領域にハイブリダイズした前記第 2 のプローブにライゲートすることと、

前記親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して前記第 1 のプローブを捕捉して、前記個々のアプタマー、及び前記個々のアプタマーの前記第 2 の領域にハイブリダイズされ、前記第 1 のプローブにライゲートされた前記第 2 のプローブを捕捉することであって、前記第 1 のプローブが、前記親和性タグに結合した前記サブセット中にある、捕捉することと、

30

捕捉した前記第 2 のプローブの前記識別配列を検出することと、を含む検出することと、を含む、方法。

【請求項 5 2】

アプタマー検出の方法であって、

試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物 - アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることであって、前記複数のアプタマーのうちの異なるアプタマーが、前記分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する、接触させることと、

40

前記分析物 - アプタマー複合体のアプタマーを検出することによって前記分析物を検出することであって、前記複数のアプタマーのうちの個々のアプタマーを検出することが、

前記個々のアプタマーを第 1 のプローブの混合物と接触させることであって、前記混合物の各第 1 のプローブの第 1 の相補的領域が、前記個々のアプタマーの第 1 の領域にハイブリダイズし、前記混合物中の前記第 1 のプローブのサブセットのみが親和性タグに結合する、接触させることと、

前記個々のアプタマーを第 2 のプローブと接触させて、前記第 2 のプローブの第 2 の相補的領域を前記個々のアプタマーの第 2 の領域にハイブリダイズさせることであって、前記第 2 のプローブが、前記相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み

50

、前記第1の相補的領域及び前記第2の相補的領域が、前記個々のアダプターに一意的にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、

前記親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して前記混合物の第1のプローブを捕捉して、前記個々のアダプター、及び前記個々のアダプターの前記第2の領域にハイブリダイズした前記第2のプローブを捕捉することと、前記第1のプローブが、前記親和性タグに結合した前記サブセット中にある、捕捉することと、

プライマー対を使用して、捕捉された前記第2のプローブから増幅産物を生成することと、前記プライマー対が、前記第2の相補的領域を含まず、前記識別配列を含まない前記第2のプローブの領域に相補的な第1のプライマーを含む、生成することと、

前記増幅産物を配列決定することと、を含む検出することと、を含む、方法。

10

【請求項53】

前記第2のプローブの前記非ハイブリダイズ領域が、前記識別配列に隣接する第1のアダプター配列及び第2のアダプター配列を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

前記プライマー対が、前記第1のアダプター配列若しくは前記第2のアダプター配列の一部に相補的であるか、又はそれらを含む、配列を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記増幅産物を配列決定することが、前記第1のアダプター配列又は前記第2のアダプター配列の一部に相補的であるか、又はそれらを含む、配列決定プライマーを使用することを含む、請求項53に記載の方法。

20

【請求項56】

前記第1アダプター配列が、第1インデックス配列を含み、前記第2アダプター配列が、第2インデックス配列を含む、請求項53に記載の方法。

【請求項57】

前記捕捉された第1のプローブを、前記親和性タグに結合していない前記混合物中の前記第1のプローブから、洗浄工程を介して分離することを含む、請求項52に記載の方法。

【請求項58】

前記洗浄工程が、6回以下の洗浄を含む、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

配列決定方法であって、

配列ライブラリから配列データを生成することと、前記配列ライブラリが、

試料の分析物を複数のアダプターと、分析物-アダプター複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることと、前記複数のアダプターのうちの異なるアダプターが、前記分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する、接触させることと、

レポータープローブ及びダミープローブを前記複数のアダプターのうちの個々のアダプターにハイブリダイズさせることによって、第1のタイプの第1の複数のアダプター複合体を形成することと、前記ダミープローブが、前記個々のアダプターの第1の領域にハイブリダイズする第1の相補的領域を含み、前記レポータープローブが、前記個々のアダプターの第2の領域にハイブリダイズする第2の相補的領域及び前記相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、前記非ハイブリダイズ領域が、前記個々のアダプターについて一意的に特定する識別配列を含む、形成することと、

40

前記レポータープローブ及び捕捉プローブを前記個々のアダプターにハイブリダイズさせることによって、第2のタイプの第2の複数のアダプター複合体を形成することと、前記捕捉プローブが、前記個々のアダプターの第1の領域にハイブリダイズする前記第1の相補的領域及び親和性タグを含む、形成することと、

前記第2の複数のアダプター複合体を、前記第1の複数のアダプター複合体から前記親和性タグを介して分離して、分離された第2の複数のアダプター複合体を生成することと

50

前記分離された第2の複数のアプタマー複合体の前記レポータプローブの一部を増幅させて、前記配列ライブラリを生成することと、によって調製される、生成することと、前記配列データにおける前記識別配列を特定することと、前記特定することに基づいて、前記個々のアプタマーが前記試料中に存在するという通知を生成することと、を含む、配列決定方法。

【請求項60】

前記通知が、配列決定デバイス又は前記配列決定デバイスと通信するコンピュータのディスプレイ上に表示される、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記レポータプローブの増幅された部分に相補的であるか、又はそれらを含む配列決定プライマーを使用して、配列ライブラリから配列データを生成する、請求項59に記載の方法。

【請求項62】

前記配列ライブラリが、前記複数のアプタマーのうちの前記異なるアプタマーについて前記第1のタイプ及び前記第2のタイプの追加の複数のアプタマー複合体を形成することによって形成される、請求項59に記載の方法。

【請求項63】

前記配列データにおける前記異なるアプタマーのそれぞれの識別配列を特定することと、前記特定することに基づいて、前記異なるアプタマーが、前記試料中に存在するという通知を生成することと、を含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記配列データを生成することが、第1の配列決定プライマーを使用して前記識別配列を含む配列リードを生成することと、第2の配列決定プライマーを使用して前記試料に関連するインデックスを含む配列リードを生成することと、を含む、請求項59に記載の方法。

【請求項65】

前記配列データを生成することが、配列決定デバイスを操作して、ダークサイクルを組み込むことを含む、請求項59に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2022年4月8日に出願された米国仮出願第63/329,101号の優先権及び利益を主張する。本出願はまた、2022年5月19日に出願された米国仮出願第63/343,760号の優先権及び利益を主張する。本出願はまた、2022年5月31日に出願された米国仮出願第63/347,375号の優先権及び利益を主張する。本出願はまた、2022年11月30日に出願された米国仮出願第63/385,544号の優先権及び利益を主張する。これら全ての開示は、その全体が明細書において参照により組み込まれる。

【0002】

(電子配列表の参照)

本出願は、XMLフォーマットで電子的に提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2023年4月5日に作成された当該XMLコピーは、「IP-2487-PC.T.xml」と称され、サイズは19,152バイトである。このXMLファイルに含まれる配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0003】

本開示の技術は、全般的には、アプタマーベースのアッセイと併せたダイナミックレンジ圧縮のためのアプタマー検出及び/又は特定技法に関する。特に、開示される技術は、

10

20

30

40

50

アプタマーベースのアッセイと併せた直接的又は間接的なアプタマー検出のための核酸配列決定に関する。

【0004】

本セクションで考察される主題は、単に本セクションにおける言及の結果として、先行技術であると想定されるべきではない。同様に、本セクションで言及した問題、又は背景として提供された主題と関連付けられた問題は、先行技術において以前に認識されていると想定されるべきではない。本セクションの主題は、単に異なるアプローチを表し、それ自体はまた、特許請求される技術の実施態様に対応し得る。

【0005】

タンパク質発現パターンは、細胞の同一性及び状態を定義するのに役立つ。RNA転写物は、タンパク質発現の代用物としてしばしば使用されるが、タンパク質とmRNAとの存在量の間関係は1対1ではない。転写後、翻訳、及びタンパク質の分解の調節によって引き起こされる差異が存在する。したがって、RNA転写物の直接的な核酸配列決定は、タンパク質発現の正確な推定を提供し得ない。

【0006】

アプタマーは、タンパク質などの分子標的に、高い親和性及び特異性で結合する核酸である。アプタマー選択及び設計における進歩には、指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment、SELEX)が含まれる。SELEXにおいて、異なる目的分析物に対する高親和性核酸は、コンビナトリアルライブラリから単離することができ、アプタマー-標的結合のハイスループット特性評価及び複合生体試料の分析物のための多重化アッセイを可能にする。アプタマーが分析物標的に結合すると、結合事象を検出して、生体試料中の様々な分析物の存在及び濃度を特性評価することができる。しかしながら、タンパク質又は他の分析物濃度は、異なる生体試料内及び/又はそれらの間で高度に変動し得るため、多重化アプタマーベースのアッセイにおける有用な検出範囲を特定することは困難である。

【発明の概要】

【0007】

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出の方法を提供し、試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物-アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることを含み、複数のアプタマーのうち異なるアプタマーは、分析物うちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する。方法はまた、分析物-アプタマー複合体のアプタマーを検出することによって分析物を検出することを含む。複数のアプタマーのうちの個々のアプタマーを検出することは、個々のアプタマーを第1のプロープの混合物と接触させることを含み、混合物の各第1のプロープの第1の相補的領域が、個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズし、混合物中の第1のプロープのサブセットのみが親和性タグに結合する。検出することはまた、個々のアプタマーを第2のプロープと接触させて、第2のプロープの第2の相補的領域を個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズさせることを含み、第2のプロープが、相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み、第1の相補的領域及び第2の相補的領域が、個々のアプタマーに一意的にハイブリダイズする。検出することはまた、親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して混合物の第1のプロープを捕捉して、個々のアプタマー、及び個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズした第2のプロープを捕捉することを含み、第1のプロープが、親和性タグに結合したサブセット中にある。検出することはまた、捕捉された第2のプロープの識別配列を検出することを含む。

【0008】

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出プロープセットを提供する。アプタマー検出プロープセットは、アプタマーパネルのそれぞれの異なるアプタマーに相補的な複数の異なる第1のプロープ混合物を含む。複数の異なる第1のプロープ混合物のうちの個々の第1のプロープ混合物は、親和性タグに結合した第1のプロープの結合サブセット、及び

第1のプローブのダミーサブセットを含み、個々の第1のプローブ混合物の結合サブセット及びダミーサブセット中の各プローブは、アダマーパネルの個々のアダマーの第1の配列に相補的である同じ結合領域を含む。アダマー検出プローブセットはまた、アダマーパネルのそれぞれの異なるアダマーに相補的な複数の異なる第2のプローブを含み、複数の異なる第2のプローブのうちの個々の第2のプローブが、個々のアダマーの第2の配列に相補的な第2の結合領域を含み、個々の第2のプローブが、非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアダマーについて一意的に特定する識別配列を含む。特定の実施形態では、アダマー検出プローブセットを使用して、次世代配列決定技法に好適なオリゴヌクレオチドを生成することができる。したがって、アダマー検出プローブセットを使用するアダマー検出は、次世代配列決定 (next generation sequencing、NGS) 技法を使用する、生成されたオリゴヌクレオチドにおける識別配列の配列決定を含むことができる。更に、生成されたオリゴヌクレオチドは、1つ以上のアダプター配列及び/又は試料特異的インデックス配列を含んで、単回の配列決定実行における多重化を可能にすることができる。

10

【0009】

一実施形態では、本開示は、アダマー検出プローブセットを提供する。アダマー検出プローブセットは、アダマーパネルのそれぞれの異なるアダマーに相補的な複数の異なる第1のプローブ混合物を含む。複数の異なる第1のプローブ混合物のうちの各第1のプローブ混合物は、第1のプローブの結合サブセット及び親和性タグに結合していない第1のプローブのダミーサブセットを含み、各第1のプローブ混合物が、アダマーパネルのアダマーに相補的である結合領域を含み、各第1のプローブ混合物が、アダマーパネルの異なるアダマーに結合するように、結合領域が、各第1のプローブ混合物に固有であり、それによって、各第1のプローブ混合物が、複数のうちの他の第1のプローブ混合物と比較して、結合サブセットのダミーサブセットに対する異なる比を有する。アダマー検出プローブセットはまた、アダマーパネルのそれぞれの異なるアダマーに相補的な複数の異なる第2のプローブを含む。

20

【0010】

一実施形態では、本開示は、アダマー検出プローブセットを提供する。アダマー検出プローブセットは、アダマーパネルのそれぞれの異なるアダマーに相補的な複数の異なるレポータープローブ混合物を含む。複数の異なるレポータープローブ混合物のうちの個々のレポータープローブ混合物は、増幅可能な非ハイブリダイズ領域を含むレポータープローブの第1のサブセットであって、非ハイブリダイズ領域が、第1のプライマー領域及び第2のプライマー領域に隣接し、第1のプライマー領域及び第2のプライマー領域に相補的か、又はそれらに対応する (例えば、それらと同じ配列を有する) プライマーを使用して増幅することができる、個々のアダマーについて一意的に特定する識別配列を含む、第1のサブセットと、レポータープローブの第2のサブセットであって、個々のレポータープローブ混合物の第1のサブセット及び第2のサブセットにおける各プローブが、アダマーパネルの個々のアダマーの第1の配列に相補的である同じ結合領域を含み、個々の第2のプローブが、プライマーを使用して増幅することができない非増幅性の非ハイブリダイズ領域を含む、第2のサブセットと、を含む。アダマー検出プローブセットはまた、アダマーパネルのそれぞれの異なるアダマーに相補的な複数の異なる捕捉プローブを含み、複数の異なる捕捉プローブのうちの個々の捕捉プローブが、個々のアダマーの第2の配列に相補的な第2の結合領域を含み、複数のうちの各捕捉プローブが、親和性タグに結合されている。

30

40

【0011】

一実施形態では、本開示は、アダマー検出の方法を提供し、方法は、個々のアダマーを、個々のアダマーの第1の領域にハイブリダイズするレポータープローブと接触させることであって、レポータープローブの第1のサブセットが、増幅可能な非ハイブリダイズ領域を含み、増幅可能な非ハイブリダイズ領域が、第1のプライマー領域及び第2のプライマー領域に隣接する個々のアダマーについて一意的に特定する識別配列を含み、第2

50

のサブセットが、非増幅性の非ハイブリダイズ領域を含む、接触させることと、個々のアプタマーを、捕捉プローブと接触させることと、捕捉プローブが、個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズし、捕捉プローブが、親和性タグと会合している、接触させることと、親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して捕捉プローブを捕捉して、個々のアプタマー、及び個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズした増幅可能な非ハイブリダイズ領域を含むレポータプローブを捕捉することと、捕捉されたレポータプローブの識別配列を、識別配列の増幅を介して検出することと、を含む。

【0012】

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出の方法を提供し、方法は、アプタマーを、それぞれの異なるアプタマーにハイブリダイズするプローブと接触させることと、各プローブの相補的領域が、アプタマーのうちの個々のアプタマーにハイブリダイズし、各プローブが、相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含む、接触させることと、エキソヌクレアーゼを使用して、アプタマーにハイブリダイズしていない過剰なプローブを除去することと、過剰なプローブを除去した後に、捕捉プローブにおける識別配列を検出することと、を含む。

10

【0013】

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出の方法を提供し、方法は、第1のアプタマー及び第2のアプタマーをレポータプローブと接触させることと、レポータプローブが、第1のアプタマーにハイブリダイズする第1のサブセット及び第2のアプタマーにハイブリダイズする第2のサブセットを含み、第1のサブセットのレポータプローブが、第1のアプタマーについて一意的に特定する第1の識別配列及び第1のグループ捕捉配列を含む第1の非ハイブリダイズ領域を含み、第2のサブセットのレポータプローブが、第2のアプタマーについて一意的に特定する第2の識別配列及び第1のグループ捕捉配列を含む第2の非ハイブリダイズ領域を含む。方法はまた、第1のアプタマー及び第2のアプタマーを捕捉プローブと接触させることと、捕捉プローブが第1のアプタマー又は第2のアプタマーにハイブリダイズし、捕捉プローブが親和性タグと会合している、接触させることと、親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して捕捉プローブを捕捉して、第1のアプタマー及び第2のアプタマー並びにレポータプローブを捕捉することと、第1のサブセットからの第1の識別配列及び第1のグループ捕捉配列を含む第1のオリゴヌクレオチドと、第2のサブセットからの第2の識別配列及び第1のグループ捕捉配列を含む第2のオリゴヌクレオチドと、を生成することと、第1のオリゴヌクレオチド及び第2のオリゴヌクレオチドを、第1のグループ捕捉配列に相補的な配列を有する第1のグループのビーズを使用して捕捉することと、捕捉された第1のオリゴヌクレオチドにおける第1の識別配列及び第2のオリゴヌクレオチドにおける第2の識別配列を検出して、第1のアプタマー及び第2のアプタマーを検出することと、を含む。

20

30

【0014】

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出の方法を提供し、方法は、個々のアプタマーを、個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズする第1のレポータプローブと接触させることと、第1のレポータプローブが、第1の非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアプタマーについて一意的に特定する第1の識別配列を含み、個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズする第2のレポータプローブを有し、第2のレポータプローブが、第2の非ハイブリダイズ領域を含み、第2の非ハイブリダイズ領域が、個々のアプタマーについて一意的に特定する第2の識別配列を含む、接触させることと、第1の識別配列及び第2の識別配列の末端を互いにライゲートして、ライゲートしたレポータプローブを生成することと、第1のレポータプローブ又は第2のレポータプローブに結合した親和性タグを使用して、ライゲートしたレポータプローブを捕捉することと、捕捉されたライゲートしたレポータプローブの増幅を介して第1の識別配列及び第2の識別配列を検出して、個々のアプタマーを検出することと、を含む。

40

【0015】

50

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出の方法を提供し、方法は、試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物 - アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることであって、複数のアプタマーのうちの異なるアプタマーが、分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する、接触させることと、分析物 - アプタマー複合体のアプタマーを検出することによって分析物を検出することであって、複数のアプタマーのうちの個々のアプタマーを検出することが、個々のアプタマーを第1のプローブの混合物と接触させることであって、混合物の各第1のプローブの第1の相補的領域が、個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズすることができ、混合物の第1のプローブが個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズするように、混合物中の第1のプローブのサブセットのみが親和性タグに結合される、接触させることと、個々のアプタマーを第2のプローブと接触させて、第2のプローブの第2の相補的領域を個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズさせることであって、第2のプローブが、相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み、第1の相補的領域及び第2の相補的領域が、個々のアプタマーに一意的にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズした第1のプローブを、個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズした第2のプローブにライゲートすることと、親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して第1のプローブを捕捉して、個々のアプタマー、及び個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズされ、第1のプローブにライゲートされた第2のプローブを捕捉することであって、第1のプローブが、親和性タグに結合したサブセット中にある、捕捉することと、捕捉した第2のプローブの識別配列を検出することと、を含む検出することと、を含む。

10

20

【0016】

一実施形態では、本開示は、アプタマー検出の方法を提供し、方法は、試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物 - アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることを含み、複数のアプタマーのうちの異なるアプタマーが、分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する。方法はまた、分析物 - アプタマー複合体のアプタマーを検出することによって分析物を検出することを含む。検出することは、個々のアプタマーを第1のプローブの混合物と接触させることであって、混合物の各第1のプローブの第1の相補的領域が、個々のアプタマーの第1の領域にハイブリダイズし、混合物中の第1のプローブのサブセットのみが親和性タグに結合する、接触させることと、個々のアプタマーを第2のプローブと接触させて、第2のプローブの第2の相補的領域を個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズさせることであって、第2のプローブが、相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列を含み、第1の相補的領域及び第2の相補的領域が、個々のアプタマーに一意的にハイブリダイズする、ハイブリダイズさせることと、親和性タグの親和性タグ結合剤との結合を介して混合物の第1のプローブを捕捉して、個々のアプタマー、及び個々のアプタマーの第2の領域にハイブリダイズした第2のプローブを捕捉することであって、第1のプローブが、親和性タグに結合したサブセット中にある、捕捉することと、プライマー対を使用して、捕捉された第2のプローブから増幅産物を生成することであって、プライマー対が、第2の相補的領域を含まず、識別配列を含まない第2のプローブの領域に相補的な第1のプライマーを含む、生成することと、増幅産物を配列決定することと、を含む。

30

40

【0017】

一実施形態では、本開示は、配列ライブラリから配列データを生成することを含む配列決定の方法を提供する。配列ライブラリは、試料の分析物を複数のアプタマーと、分析物 - アプタマー複合体を形成することを可能にする条件下で接触させることであって、複数のアプタマーのうちの異なるアプタマーが、分析物のうちのそれぞれの異なる分析物に対して特異的親和性を有する、接触させることと、レポータープローブ及びダミープローブを複数のアプタマーのうちの個々のアプタマーにハイブリダイズさせることによって、第1

50

のタイプの第1の複数のアダマー複合体を形成することであって、ダミープローブが、個々のアダマーの第1の領域にハイブリダイズする第1の相補的領域を含み、レポータプローブが、個々のアダマーの第2の領域にハイブリダイズする第2の相補的領域及び相補的領域から伸長する非ハイブリダイズ領域を含み、非ハイブリダイズ領域が、個々のアダマーについて一意的に特定する識別配列を含む、形成することと、レポータプローブ及び捕捉プローブを個々のアダマーにハイブリダイズさせることによって、第2のタイプの第2の複数のアダマー複合体を形成することであって、捕捉プローブが、個々のアダマーの第1の領域にハイブリダイズする第1の相補的領域及び親和性タグを含む、形成することと、第1の複数から第2の複数のアダマー複合体を、親和性タグを介して、分離された第2の複数のアダマー複合体を生成することと、分離された第2の複数のアダマー複合体のレポータプローブの一部を増幅させて、配列ライブラリを生成することと、によって調製される。方法はまた、配列データにおける識別配列を特定することと、特定することに基づいて個々のアダマーが試料中に存在するという通知を生成することと、を含む。実施形態では、本方法はまた、配列データにおける特定された識別配列を定量化して、試料中に存在するアダマーの相対量を測定することを含む。特定された識別配列の数は、アダマーの相対量を定量化することを可能にする。

10

【図面の簡単な説明】

【0018】

開示される実施形態のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、添付図面を参照して以下の詳細な説明を読むと、より深く理解され、同様の特徴は、図面にわたって同様の部分を表している。

20

【図1】実施形態による、試料内の例示的なダイナミックレンジの概略図である。

【図2】実施形態による、ダイナミックレンジ圧縮のための例示的なワークフローを示す。

【図3】実施形態による、アダマー存在量に基づく異なるプローブ混合を使用するダイナミックレンジ圧縮のための例示的なワークフローを示す。

【図4】実施形態による、捕捉プローブ及びレポータプローブ分離の概略図である。

【図5】実施形態による、ダイナミックレンジ圧縮技法と併せて使用するための三分子複合体の概略図である。

【図6】実施形態による、非ハイブリダイズ領域の例示的な配置を示す。

【図7】実施形態による、例示的なレポータプローブ直接増幅技法を示す。

30

【図8A】実施形態による、直接増幅技法からの例示的な配列決定を示す。

【図8B】図8Aのオプション1の技法を使用した配列決定の結果を示す。

【図8C】図8Bの配列決定反応の配列決定品質メトリクスを示す。

【図9A】実施形態による、例示的なレポータプローブステップアウト増幅技法を示す。

【図9B】図9Aのオプション1の技法を使用した増幅の結果を示す。

【図9C】図9Aのオプション2の増幅産物のテーブステーションを示す。

【図10】実施形態による、ステップアウト増幅技法からの例示的な配列決定を示す。

【図11】実施形態による、例示的なレポータプローブライゲーション増幅技法を示す。

【図12】実施形態による、ライゲーション増幅技法からの例示的な配列決定を示す。

【図13】実施形態による、例示的なスプリントライゲーション技法を示す。

40

【図14A】実施形態による、例示的な伸長ライゲーション技法を示す。

【図14B】伸長ライゲーション技法のPCRフリーライブラリ変換を示す。

【図14C】伸長ライゲーション技法の変換効率を示す。

【図15】実施形態による、例示的な伸長ライゲーション技法を示す。

【図16】実施形態による、例示的なスプリットレポータプローブ技法を示す。

【図17A】実施形態による、スプリントを使用した例示的なスプリットレポータプローブ技法を示す。

【図17B】実施形態による、スプリントを使用した例示的なスプリットレポータプローブ技法を示す。

【図17C】スプリットレポータプローブ技法のライゲーション生成物を示す。

50

【図 17 D】スプリットレポータプローブ技法の経時的にライゲーション生成物を生成する効率を示す。

【図 18 A】実施形態による、スプリットレポータプローブ技法と併せて使用するための例示的なエキソヌクレアーゼ消化を示す。

【図 18 B】エキソヌクレアーゼ消化の存在下でのライゲーション生成物保護を示す。

【図 19】実施形態による、環化分割レポータプローブ技法と併せて使用するための例示的なエキソヌクレアーゼ消化を示す。

【図 20 A】実施形態による、増幅可能な領域及び非増幅性の領域の混合を使用する例示的なダミーレポータ技法を示す。

【図 20 B】実施形態による、増幅可能な領域及び非増幅性の領域の混合を使用する例示的なダミーレポータ技法を示す。 10

【図 20 C】ダミーレポータの存在下での配列決定リードカウントを示す。

【図 21】実施形態による、内在性制限酵素部位を使用する例示的なダミーレポータ技法を示す。

【図 22 A】実施形態による、例示的なエキソヌクレアーゼ消化技法を示す。

【図 22 B】レポータプローブエキソヌクレアーゼ消化を示す。

【図 23】実施形態による、例示的なビーズベースの選択技法を示す。

【図 24】実施形態による、インデックス増幅を使用する例示的な合理化したワークフローを示す。

【図 25】図 24 の合理化したワークフローからの配列決定リードカウントを、ライゲーション調製ワークフローと比較するプロットである。 20

【図 26】実施形態による、低減した洗浄工程を用いる例示的なワークフローを示す。

【図 27】異なる洗浄条件における配列決定リードカウントを示す。

【図 28 A】異なるアプタマーについてダミー・ピオチンを使用した配列決定リードカウントの圧縮を示す。

【図 28 B】異なるダミーピオチン濃度を使用して捕捉されたレポータプローブの配列決定を示す。

【図 29】アプタマー結合領域間の例示的な望ましくない非特異的結合を示す。

【図 30】非特異的結合に対する異なるアプタマー結合領域の関与を示す。

【図 31】実施形態による、配列決定データを取得するように構成された配列決定デバイスのブロック図である。 30

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下の考察は、開示される技術を当業者が作製及び使用することを可能にするために提示され、特定の用途及びその要件に関連して提供される。開示される実施態様に対する様々な修正は、当業者には容易に明らかとなり、本明細書で定義される一般原理は、開示される技術の趣旨及び範囲から逸脱することなく、他の実施態様及び用途に適用され得る。したがって、開示される技術は、示される実施態様に限定されることを意図するものではなく、本明細書に開示される原理及び特徴と一致する最も広い範囲を与えられるものである。 40

【0020】

アプタマーは、それらの特異的標的分子に高親和性で結合することができる短い一本鎖核酸分子 (ssDNA 又は ssRNA) である。したがって、アプタマーは、ハイスループット手段での試料のプロテオーム特性評価などのマルチオミクス適用のために使用され得る。ハイスループットアプローチにおける複合試料中のタンパク質の評価のために、アプタマーを単一パネルにおいて高存在量タンパク質と一緒に低存在量タンパク質に組み合わせることが課題である。例えば、ヒト血清/血漿は、多くの桁で、例えば、10 - 10^g 範囲で濃度が異なり得るタンパク質を含有する。特定のアプタマー検出プラットフォームは、検出されるタンパク質のダイナミックレンジを圧縮することができる。しかしながら、圧縮後であっても、ダイナミックレンジはそれでも比較的大きい可能性がある。図 1 50

は、試料についてアプタマー検出結果内の例示的な5 - logダイナミックレンジを示し、広いダイナミックレンジに沿って陽性結合結果を有する3つの異なるアプタマーを示す。ダイナミックレンジの複雑さに対処するために、試料は前処理を受け得るか、又は標的化パネルを使用して特定の範囲にわたってタンパク質を測定する。これらのアプローチは、追加の複雑さ及び低濃度タンパク質の損失のための機会を加える。

【0021】

本明細書において、陽性の結合結果（例えば、試料中の標的分子に結合する）を有するアプタマーのダイナミックレンジを圧縮するための技法が開示され、アプタマー検出工程の前に、又はそれと併せて生じ得る。この技法は、高存在量タンパク質と一緒に評価される低存在量タンパク質に対するアプタマー結合を維持する。更に、低存在量タンパク質は、診断目的のために使用することができるバイオマーカーに対応し得るため、開示される技法は、結果を不明瞭にする高存在量タンパク質によって引き起こされるアプタマーベースのアッセイのノイズ又は偽陰性結果を防止する。加えて、ダイナミックレンジを低減することはまた、高存在量アプタマー配列で浪費されるリードの量を低減することによって、検出アッセイにおいてアプタマーを検出するために必要とされる全配列決定データの量を低減することができる。特定の実施形態では、開示される技法は、工程数における低減（例えば、単一のハイブリダイゼーション反応又は低減した数の洗浄工程）を介して、低減した装置負荷を有する合理化したワークフローを提供し得る。開示される技法は、改善されたアプタマー存在量測定を可能にする試料調製工程及び/又は試料調製を含み得る。

10

【0022】

図2は、個々のアプタマー14aのダイナミックレンジが、検出工程前にアプタマー14aのうちのいくつかの除去によって圧縮することができる、ダイナミックレンジ圧縮のための例示的なワークフローを示す。図示されるワークフローでは、単一アプタマータイプの個々のアプタマー14aにおけるダイナミックレンジ圧縮が示される。図示されるワークフローは、多重化アプタマーベースのアッセイにおける全てのアプタマーに並行して拡張され得ることが理解されるべきである。更に、アッセイ溶離液は、評価される試料中のアプタマー14aの標的分子の濃度に依存する、複数のアプタマー14aを含み得る。アプタマー14aは、固定されたか又は実質的に固定された核酸配列を有する一本鎖核酸である。したがって、個々のアプタマー14aのコピー又は多重は全て、保存配列を共有し得る。一般にアプタマー14（図3を参照）と呼ばれる異なるアプタマーは、互いに対して異なる核酸配列を有し得、それぞれの異なるアプタマー14に対して異なる標的特異性を容易にする。

20

30

【0023】

アプタマー14aの保存配列を使用して、アプタマー14aの第1の領域23に（例えば、相補的配列を介して）ハイブリダイズする第1のプロープ22と、アプタマー14aの第2の領域25にハイブリダイズする第2のプロープ24と、を含むプロープセット20を設計することができる。第1のプロープ22は、少なくとも2つの異なるタイプのプロープの混合物であり、両方とも第1の領域23にハイブリダイズする能力を共有する。図示されるように、混合物は、親和性タグ30を含む親和性タグ付きプロープ28と、親和性タグ30を欠いているダミープロープ32と、を含む。実施形態では、親和性タグ付きプロープ28及びダミープロープ32は、親和性タグ30の有無以外は同一である。親和性タグ付きプロープ28のダミープロープ32に対する比は、本明細書で一般的に考察されるように、アプタマー14aの標的の存在量に基づいて調整することができる。

40

【0024】

ワークフローは、アプタマー14aをプロープセット20、例えば、第1のプロープ22及び第2のプロープ24と接触させる工程を含む。第1のプロープ22の親和性タグ付きプロープ28からダミープロープ32まで両方とも、アプタマー14aの第1の領域23に対して同じ結合能力及び特異性を有しており、第1のプロープとアプタマー14aとの接触は、親和性タグ付きプロープ28及びダミープロープ32の両方の結合をもたらす。親和性タグ付きプロープ28が第1のプロープ22の混合物内で希少（例えば、例とし

50

て10%未満)である場合、アプタマー14aの大部分はダミープローブ32に結合される。更に、第2のプローブ24の全てが互いに同一であることができる。そのため、アプタマー14aについて2つの異なるタイプの三分子複合体が形成される。第1のタイプ33は、第2のプローブ24及びダミープローブ32を含む。第2のタイプ34は、第2のプローブ24及び親和性タグ付きプローブ28を含む。ここでも、第1のプローブ22は混合物として提供されるため、第1のタイプ33と第2のタイプ34の三分子複合体の相対比は、第1のプローブ22における親和性タグ付きプローブ28のダミープローブ32に対する比に依存する。親和性タグ付きプローブ28のダミープローブ32に対する比は、例えばNGSを介した下流検出のためのダイナミックレンジを圧縮するために、他のアプタマーに対するその相対存在量に基づいて、アッセイにおける各アプタマーについて選択することができる。

10

【0025】

ワークフローはまた、捕捉実体を介して第2のタイプ34の三分子複合体から第1のタイプ33の三分子複合体を分離する工程を含む。例えば、第2のタイプ34の三分子複合体のみが、親和性タグ結合剤38に結合した捕捉ビーズ36としてここで示されている捕捉実体を使用して捕捉され得る。しかしながら、親和性タグ30に結合する捕捉実体を使用するカラムベース、フローセルベース、又は基質ベースの分離を含む、他の配置も企図される。未結合の第1のタイプ33を洗浄又は分離して、第2のタイプ34の三分子複合体及びその成分分子、アプタマー14a、親和性タグ付きプローブ28、並びに第2のプローブ24のみを残すことができる。加えて、プローブセット20の未結合又は未捕捉プローブも除去される。ワークフローはまた、本明細書において一般に考察されるアプタマー14aの代理測定として、第2のプローブ24、又は第2のプローブ24から増幅されたか若しくは別の方法で誘導されたオリゴヌクレオチドの配列決定などを介した検出を含む。

20

【0026】

図3は、高存在量アプタマー14aを低存在量アプタマー14bと比較するダイナミックレンジ圧縮のための例示的なワークフローを示す。例えば、高存在量アプタマー14aは、アルブミン、 α -2-マクログロブリン、アポリポタンパク質A1、相補体C4、IgG、IgM、アポリポタンパク質A2、 α -1-アンチトリプシン、プラスミノゲン、又はコラーゲンなどの多い存在量が知られているタンパク質に対して特異的結合親和性を有し得る。低存在量アプタマー14bは、バイオマーカー、一過性に発現されたタンパク質、特定のタイプの細胞のみで発現されたタンパク質などに対する特異的結合親和性を有し得る。これらは例であり、タンパク質標的の同一性は、アプタマーベースのアッセイにおけるアプタマーの組成に依存することが理解されるべきである。更に、特定の実施形態では、高存在量アプタマー及び低存在量アプタマーは、絶対的な存在量又は濃度ではなく、互いに対する存在量、又はアプタマーベースのアッセイにおける他のアプタマーに基づき得ることを理解されたい。

30

【0027】

図示される例において、高存在量アプタマー14aは、例えば、経験的試験又はレトロスペクティブ分析に基づいて、低存在量アプタマー14bと比較して、アプタマーベースのアッセイ溶離液に、より高い濃度で存在することが予想され得る。したがって、ダイナミックレンジを下流の検出工程で圧縮するために、プローブセット20a、20bにおける第1のプローブの異なる混合物を、予測される存在量に基づいて使用することができる。高存在量アプタマー14aでは、比較的より多くのアプタマー結合ダミー複合体が、ダミープローブ32aとの結合を介して除去され得る。そのため、ダミープローブ32aは、第1のプローブ22aに、より高い割合で存在することができる。検出工程前にダミー結合を介してより少ないアプタマー14bを変換するために、ダミープローブ32bは、第1のプローブ22bに比較的低い割合で存在することができる。一実施形態では、ダミープローブ32bの割合は、0%であることができる。すなわち、特定のアプタマーでは、プローブ22は、タグ付きプローブ28のみを含み、ダミープローブ32を含まないこ

40

50

とができる。したがって、ダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する比は、調整することができ、異なるアプタマー14では異なることができる。ハイスループットアッセイでは、各個々のアプタマー14は、実施形態では、ダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する異なる比で会合することができる。

【0028】

実施形態では、第1のプローブ22の混合物におけるダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する比は、100, 000 : 1超、10, 000 : 1超、1000 : 1超、100 : 1超、20 : 1超、10 : 1超、5 : 1超、2 : 1超、約1 : 1、1 : 2未満、又は1 : 5未満であることができる。実施形態では、第1のプローブ22の混合物は、ダミープローブ32又は親和性タグ付きプローブ28のみを含み、他のプローブタイプを含まない。実施形態では、ダミープローブ32は、第1のプローブ22の混合物のうち少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、又は少なくとも90%である。実施形態では、第1のプローブ22の混合物は、ダミープローブ32又は親和性タグ付きプローブ28のみを含み、他のプローブタイプを含まない。実施形態では、第1のプローブ22は、親和性タグ付きプローブ28のみを含み、いずれのダミープローブ32も含まない。例えば、非常に低い存在量のタンパク質では、除去を介していずれのアプタマー14も失うことは望ましくない場合がある。

10

【0029】

ハイスループットアッセイでは、各個々のアプタマー14は、実施形態では、各個々のアプタマー14が、パネル又はアッセイと一緒に使用される他のアプタマー14と比較して固有の比を有するように、ダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する異なる比で会合することができる。実施形態では、おおよその存在量範囲で全て会合した特定のグループのアプタマー14は、互いに比較してダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する同じ比を有することができる。実施形態では、ハイスループットアッセイのために、ダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する少なくとも3つの異なる比が、少なくとも1000個の異なるアプタマー14のグループのために存在する。実施形態では、ダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する少なくとも5、10、50、100、又はそれ以上の異なる比が、アッセイのアプタマー14のために存在する。

20

【0030】

ワークフローは、アプタマー14 a、14 bをプローブセット20 a、20 b、例えば、第1のプローブ22 a、22 b、及び第2のプローブ24 a、24 bと接触させる工程を含む。第1のプローブ22 a、22 bは、異なる第1の領域23 a、23 bに対する結合能力及び特異性を有し、したがって、異なる核酸配列を有することを理解されたい。同様に、第2のプローブ24 a、24 bは、異なる第2の領域25 a、25 bに対する結合能力及び特異性を有し、したがって、異なる核酸配列を有する。プローブセット20 a、20 bとの接触は、三分子複合体の第1のタイプ33 a、33 b、及び第2のタイプ34 a、34 bの形成を引き起こす。したがって、図示される例では、互いに比較して第1のプローブ22 a、22 bにおけるダミープローブ32の親和性タグ付きプローブ28に対する異なる比のために、異なる比の第1のタイプ33 a、33 bの三分子複合体、及び第2のタイプ34 a、34 bの三分子複合体が、異なるアプタマー14 a、14 b間で形成される。アプタマー14 aがより多い存在量であるため、より大きな割合の第1のタイプ33 aが形成され、続いて、親和性タグ30及び捕捉実体、例えば、捕捉ビーズ36及び親和性タグ結合剤38を使用する捕捉工程において、除去することができる。親和性タグ30は、全ての親和性タグ付きプローブ28に対して同じタグであることができ、第2のタイプ34の三分子複合体の全ての捕捉を同じ手段で可能にする。

30

40

【0031】

実施形態では、高存在量アプタマー14 aでは、ほとんどの複合体形成が、少なくとも50%、少なくとも75%、又は少なくとも90%が除去されるような第1のタイプ33 aのものであっても、高存在量アプタマー14 aは、それにもかかわらず、低存在量アプ

50

タマー 14 b と比較してより高い全体的な開始濃度に単に起因して、検出時により多くの量で存在し得ることが理解されるべきである。すなわち、1%の高存在量アプタマー 14 a は、100%の低存在量アプタマー 14 b よりも多いものであり得る。しかしながら、開示される技法は、比の調整又は本明細書で考察される他の技法に基づいて、ダイナミックレンジを $1 \log$ 、 $2 \log$ 、又はそれ以上圧縮することができる。

【0032】

開示される技法は、三分子複合体が形成され、アプタマー 14 を捕捉するために使用される親和性タグ付きプローブ 28 が、検出される第 2 のプローブ 24 から分離されるワークフローを含む。図 4 は、レポートプローブ又は検出プローブ、例えば、第 2 のプローブ 24 b、を捕捉プローブ、例えば、親和性タグ付きプローブ 28 b、から分離する利点を示す。一例において、アプタマー 14 b は、試料組成に基づいて特定の試料中に検出されない。したがって、アプタマー 14 b は、ワークフローに存在しない。そのような例では、親和性タグ付きプローブ 28 を介した、例えばアプタマー 14 a からの他の三分子複合体の捕捉の間である。捕捉ピース 36 は、親和性タグ付きプローブ 28 b をプルダウンすることができる。しかしながら、ギャップを架橋し、第 2 のプローブ 24 b に結合するためのアプタマー 14 b が存在しないことは、検出される第 2 のプローブ 24 b がいないことを意味する。検出可能な部分が親和性タグ付きプローブ 28 b にあった場合、図示される例は偽陽性を生じる。

10

【0033】

図 5 は、本明細書で一般に考察されるように、結合された第 1 のプローブ 22 (例えば、親和性タグ付きプローブ 28 又はダミープローブ 32) のタイプに応じて、第 1 のタイプ 33 又は第 2 のタイプ 34 のものであり得る、三分子複合体の概略図である。第 1 のプローブ 22 は、第 1 の相補的領域 60、例えば、第 1 のアプタマー結合領域を介してアプタマー 14 の第 1 の領域 23 にハイブリダイズする。第 2 のプローブ 24 は、第 2 の相補的領域 62、例えば、第 2 のアプタマー結合領域を介してアプタマー 14 の第 2 の領域 25 にハイブリダイズする。第 1 の相補的領域 60 及び第 2 の相補的領域 62 は、各個々のアプタマー 14 に固有である。第 1 のプローブ 22 及び第 2 のプローブ 24 のアプタマー 14 での相対配置は、第 1 のプローブ 22 が第 2 のプローブ 24 の 5' 又は 3' であり得るように交換できることが理解されるべきである。第 1 の領域 23 及び第 2 の領域 25 は、アプタマー 14 で、例えば、少なくとも 1 ~ 2 ヌクレオチド互いに離れた間隔が空けられ得る。実施形態では、第 1 の領域 23 及び第 2 の領域 25 は、1 ~ 30 ヌクレオチド互いに離れた間隔が空けられている。間隔を提供することは、異なるアプタマー 14 のプローブセット間の融解温度を正規化すること、又は非特異的相補性を低減することなどの利益を提供し得る。

20

30

【0034】

第 1 の領域 23 及び第 2 の領域 25 は、例えば、0 ヌクレオチド離れて、互いに連続又は隣接し得る。第 1 のプローブ 22 及び第 2 のプローブ 24 の連続した配置は、第 1 のプローブ 22 及び第 2 のプローブ 24 が、アプタマー結合に続いて、互いにライゲートされている、例えば、それぞれの末端で直接的にライゲートされているワークフローを容易にし得る。実施形態では、第 1 のプローブ 22 及び / 又は第 2 のプローブ 24 は、所望のライゲーションプロトコルに応じて、マッチしたオーバーハングを含み得るか、又は平滑末端であり得る。第 1 のプローブ 22 の第 2 のプローブ 24 とのライゲーションは、ワークフローに使用される異なるプローブのセット間の融解温度の変動を低減する利点を提供することができる、 T_m 増強プローブの必要性を回避することもできる。更に、ライゲーションは、より大きなバックグラウンド除去のためのより高いストリンジェンシ洗浄及び / 又は合理化したワークフローのための低減した洗浄回数を容易にすることができる。実施形態では、ライゲーションベースのアプローチはまた、ダイナミックレンジ圧縮に寄与し得る。例えば、第 1 のプローブ 22 及び / 又は第 2 のプローブ 24 は、ダミープローブとの混合物として提供され得る。実施形態では、第 2 のプローブ 24 は、ライゲーションのための 5' リン酸を含むライゲーション可能バージョンと、ライゲーション可能バージョン

40

50

と同じ配列及びアプタマー結合能力を有するが、利用可能な5'リン酸を有しない非ライゲーション可能バージョンとの両方を含む混合物として提供され得る。非ライゲーション可能バージョンとライゲーション可能バージョンとの比は、アプタマー存在量に基づいて調整され得る。高い存在量のアプタマーは、より少ない量のアプタマーと比較して、混合物中により少ないライゲーション可能バージョンを有するプローブ混合物とともに提供され得る。利用可能な連結可能バージョンとのライゲーション後、ライゲートした生成物の融解温度及び結合はより高くなる。したがって、より高いストリンジェンシ洗浄は、ライゲートした生成物の保持、及び非リン酸化だが結合した非ライゲーション可能バージョンの喪失をもたらす。一実施形態では、ライゲートしたプローブは、ビーズでストレプトアビジンに結合したビオチンなどの5'親和性試薬を用いて、非ライゲートレポータプローブ24から保護及び分離することができ、遊離プローブは、図19で考察されるように、エキソヌクレアーゼを使用して消化することができるが、ライゲートしたプローブは、エキソヌクレアーゼ消化から保護される。

【0035】

第2のプローブはまた、第2の相補的領域62から離れて伸長し、アプタマー14にハイブリダイズしない非ハイブリダイズ領域64を含む。したがって、非ハイブリダイズ領域64の配列は、アプタマー14の配列との実質的な相補性を回避するように選択することができる。非ハイブリダイズ領域64は、アプタマー14の代用として検出に使用することができる。したがって、非ハイブリダイズ領域64は、個々のアプタマー14に固有であるバーコード又は識別配列68を含むことができる。したがって、異なるアプタマー14は、互いに全て異なり、一意的に特定しているそれぞれの異なる識別配列68と会合される。実施形態では、一意的に特定する配列は、配列決定中のバーコードエラー（例えば、1~2ヌクレオチド配列エラー）を考慮しながら一意的に特定している。更に、識別配列68は、識別配列68がアプタマー配列と異なるように設計され得る。

【0036】

検出を容易にするために、本明細書において一般に考察されるような増幅産物80を生成するためにプライマー74、76を使用する非ハイブリダイズ領域64の増幅が、識別配列68を増幅して、アプタマー14の検出を可能にするように、非ハイブリダイズ領域64は、識別配列68に隣接する第1のプライマー領域70及び第2のプライマー領域72を含むことができる。実施形態では、増幅は、配列決定のための配列決定ライブラリの調製の一部である。

【0037】

非ハイブリダイズ領域64は一本鎖であるため、第1のプライマー領域70は、第1のプライマー74の逆相補体であるプライマー結合部位を表すことができ、一方、第2のプライマー領域72は、第1のプライマー74から生成された増幅鎖に結合する第2のプライマー76の配列に対応することができる。

【0038】

図6~図15は、増幅技法、ライゲーション技法、及び/又は配列決定技法の異なる実施形態、並びに生成された増幅産物80を、配列決定ライブラリ調製のための入力に、又は実施形態では、増幅産物の配列データを生成するために配列決定され得る配列決定ライブラリに適合させるために使用され得る非ハイブリダイズ領域64の対応する配置を示す。したがって、開示される実施形態は、実施形態では、1つ以上の配列決定ライブラリ調製工程をアプタマー14の検出に組み込むという利点を提供し得る。更に、開示される実施形態は、配列決定ライブラリ調製の特定の工程が省略又は組み合わせられることを可能にし得、したがって、検出効率を増加させる。実施形態では、開示される実施形態はまた、増幅産物80の配列リードからの配列データの生成を可能にする配列決定技法に関する。

【0039】

図6は、Illumina（登録商標）配列決定反応と併せて使用することができるユニバーサル配列又は保存配列を含む非ハイブリダイズ領域64の異なる配置の概略図である。これらは例としてのものであり、開示される配置のいずれも開示される技法と併せて

10

20

30

40

50

使用され得ることを理解されたい。非ハイブリダイズ領域64は、増幅中にIllumina（登録商標）配列決定調製物A14、B15に使用されるプライマー1及びプライマー2のための配列又はそれらの相補体の例などのアダプター配列を導入するために、識別配列に隣接するプライマー領域70、72のみの最小配列を含むことができる。他の実施形態では、ユニバーサル捕捉プライマー配列及び/又は試料インデックス配列は、増幅及び/又はライゲーション並びに伸長などを介して、レポータープロンプ24から生成されたオリゴヌクレオチドに組み込むことができる。インデックスを含む特定の配置は、異なるインデックスに対応するために、配列決定中にカスタムプライマー又はブリッジプライマーを組み込むことができる。他の実施形態は、例えば、表面P5からの単一リードを使用してライブラリを配列決定するための、又は共通配列がアダプター領域に存在する合成サイクルによるダーク配列決定を追加するためのカスタムオプションを含み得る。

10

【0040】

アダプター配列A14-ME、ME、B15-ME、ME'、A14、B15、及びMEが以下に提供される：

A14-ME：5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'（配列番号1）

B15-ME：5'-GTCCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'（配列番号2）

ME'：5'-phos-CTGTCCTTATACACATCT-3'（配列番号3）

A14：5'-TCGTCGGCAGCGTC-3'（配列番号4）

20

B15：5'-GTCCTCGTGGGCTCGG-3'（配列番号5）

ME：AGATGTGTATAAGAGACAG（配列番号6）

【0041】

プライマー領域又はプライマー結合領域は、ユニバーサルIllumina（登録商標）捕捉プライマーの配列を有する領域又はユニバーサルIllumina（登録商標）捕捉プライマーと特異的にハイブリダイズする領域を含むことができる。ユニバーサルIllumina（登録商標）捕捉プライマーは、例えば、P5 5'-AATGATACGGCGACCAACCGA-3'（配列番号7）若しくはP7（5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'（配列番号8））、又はそれらの断片を含む。ユニバーサルIllumina（登録商標）捕捉プライマーと特異的にハイブリダイズする領域は、例えば、Illumina（登録商標）捕捉プライマーP5（「抗P5」：5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'（配列番号9）若しくはP7（「抗P7」：5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'（配列番号10））の逆相補的配列、又はその断片を含み得る。

30

【0042】

保存プライマー領域は、追加的又は代替的に、Illumina（登録商標）配列決定プライマー若しくはその断片の配列を有する領域、又はIllumina（登録商標）配列決定プライマー若しくはその断片と特異的にハイブリダイズする領域を含むことができる。Illumina（登録商標）配列決定プライマーは、例えば、SBS3（5'-CACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'（配列番号11））又はSBS8（5'-CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT-3'（配列番号12））を含む。Illumina（登録商標）配列決定プライマー又はその断片と特異的にハイブリダイズする領域は、例えば、Illumina（登録商標）配列決定プライマーSBS3（「抗SBS3」：5'-AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGACCG-3'（配列番号13））又はSBS8（「抗SBS8」：5'-AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGACCG-3'（配列番号14））の逆相補的配列、又はその断片を含み得る。配列決定プライマー配列のレポータープロンプへの組み込みは、直接的か、又はその後の増幅、ライゲーション、若しくは他の配列決定ライブラリ調製工程を介するいずれかであり得る。

40

50

【 0 0 4 3 】

実施形態では、開示される増幅産物 8 0 は、異なる識別配列 6 8 に基づいて互いに異なるが、保存プライマー領域又はユニバーサルプライマー領域 7 0、7 2 を有する増幅産物を含み得る。この手段では、単一プライマーセットを使用して、可変識別配列 6 8 を有するレポータプローブ 2 4 を増幅することができる。本明細書において、レポータプローブ 2 4 から増幅産物 8 0 を生成して配列決定ライブラリを生成することができるプライマー 7 4、7 6 を含むライブラリ調製キットが提供される。プライマー 7 4、7 6 の配列は、第 1 のプライマー結合領域 7 0 及び第 2 のプライマー結合領域 7 2 の配列決定に基づいている。しかしながら、これらの配置は例示であり、プライマー結合のためのプライマー領域 7 0、7 2 は、他のライブラリ調製物と適合するように選択され得ることが理解されるべきである。

10

【 0 0 4 4 】

実施形態では、配列決定は、Illumina (登録商標) NGS プライマーを使用し得る。以下のプライマーが例として示される。

リード 1 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG
G3' (配列番号 15)

リード 2 5' -GTCCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG
CAG' (配列番号 16)

対形成末端リード 1 5' ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
C (配列番号 17)

対形成末端リード 2 5' CGGTCTCGGCATTTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT
C (配列番号 18)

インデックス 1 リード 5' CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7]
GTCCTCGTGGGCTCGG (配列番号 19)

インデックス 2 リード 5' AATGATACGGCGACCCACCGAGATCTACAC
[i5]TCGTCGGCAGCGTC (配列番号 20)

インデックスリードプライマーは、アダプターベースのアッセイにおいて特定の試料と会合する特定のインデックス配列を含むように設計され得ることが理解されるべきである。そのため、インデックスプライマーは、多重化試料のうちの異なる試料間で配列が変化する、i5 又は i7 として示されるヌクレオチド領域を有し得る。実行における他の試料は、それらのそれぞれのインデックスを含むプライマーを用いて調製することができる。したがって、特定の配列リードは、ユニバーサルプライマーを用いて得ることができるが、他の配列リードは、多重化反応における 1 つ以上の試料のインデックスに特異的であるプライマー又はプライマーの混合物を用いて得られる。

20

30

【 0 0 4 5 】

実施形態では、固有分子識別子 (unique molecular identifier、UMI) が、例えばライゲーションを介して、レポータプローブ 2 4 に組み込まれ得る。UMI は、試料ライブラリ中の各分子を一意的にタグ付けして、エラー補正を提供し、配列決定バイアスを低減するために使用される短い配列である。

【 0 0 4 6 】

図 7 は、プライマー 7 4、7 6 (図 5 参照) を介した直接増幅のためのレポータプローブ 2 4 の例示的な配置を示す。オプション 1 では、レポータプローブ 2 4 は、アダプターに結合する第 2 の相補的領域 6 2 と、非ハイブリダイズ領域 6 4 との両方を含む。非ハイブリダイズ領域 6 4 は、ME 及び A14 配列を有する第 1 のプライマー領域 7 0 と、B15 配列の相補体を含む第 2 のプライマー領域 7 2 とを含み、Illumina (登録商標) 配列決定プライマーで使用することができる増幅産物を生成する。したがって、それらの包含は、標準的な Illumina (登録商標) 配列決定又は NGS 技法が行われることを可能にする。第 1 のプライマー領域 7 0 及び第 2 のプライマー領域 7 2 は、識別配列 6 8 に隣接する。オプション 2 では、第 2 のプライマー領域 7 2 は、ME' 配列を含む。オプション 3 では、ME 及び ME' 配列が排除される。オプション 1、2、及び 3 は、

40

50

レポータプローブ 24 について異なる長さの選択肢、並びに増幅産物について異なる長さの選択肢を提供する。特定の実施形態では、より小さいレポータプローブ 24 は、オプション 3 におけるように、製造及び精製するのにより低い費用であり得る。しかしながら、ME 及び ME' 配列の排除は、図 8 に関して考察されるように、非標準的な配列決定技法を含み得る。

【0047】

図 7 のレポータプローブの増幅産物 80 に基づく配列決定技法の例が、図 8 A に示される。レポータプローブ 24 は、増幅産物 80 が、Illumina (登録商標) NGS 技法に適合する P5、P7、i5、及び i7 を含む所望のアダプター配列を含むように、適切なプライマー 75、76 を用いて直接的に増幅される。そのため、調製された配列決定ライブラリ、例えば、図示される例における増幅産物 80 は、レポータプローブ 24 よりも長い。更に、増幅産物 80 は、第 2 の相補的領域 62 を除去又は排除し得る。特定の実施形態では、本明細書に提供される増幅産物 80 は、単一又は二重インデックスであり得る。アダプターベースのアッセイに供される各個々の試料は、多重化反応において他の試料に使用されない特定のインデックス (単数又は複数) と一意的に会合され得る。オプション 1 からの増幅産物 80 に基づく配列反応は、標準的な配列決定プライマーを使用することができ、リード 1 プライマーを使用して配列データを生成して、識別配列 68 並びにインデックス情報を含む配列リードを生成し得る。特定の場合において、追加のインデックス情報は、i5 又は他のインデックスプライマーを使用して、相補的鎖インデックスリードから得ることができる。同様に、オプション 2 増幅産物 80 からの配列データは、識別配列リード並びに第 1 のインデックスリードを生成することができる。オプション 2 では、第 2 のインデックスリードも行われ得る。インデックスリードは、概して、より短いサイクルリードであり得る。図示される実施形態 (例えば、図 8、図 10、図 12) では、i5 及び R1 プライマーは、それぞれ A14 - ME 及び A14' - ME' である。i7 リードプライマーは、ME - B15 である。

【0048】

オプション 3 におけるような、ME 配列の欠如は、非標準配列決定を含み得る。図示される例において、インデックス情報並びに識別配列は、例として、p5 プライマーを使用する単一配列リードから得ることができる。しかしながら、特定のサイクルは、ダークサイクル、例えば、画像が撮影及び / 又は分析されない化学のみとして実行される。したがって、特定の配列決定実施形態は、図 31 に関して考察されるように、配列決定デバイスのための特定の動作命令と併せて使用され得る。

【0049】

図 8 B は、図 8 A のオプション 1 を使用して、異なるレポータプローブを含有するオリゴヌクレオチド混合物を PCR 増幅することによって作成された配列決定ライブラリからの配列決定データを示す。384 個の別々の二重 i5 及び i7 インデックス PCR プライマーを増幅のために使用した。ライブラリを SPRI によって精製し、定量化し、90 pM 又は 100 pM のいずれかのロード濃度で、NovaSeq X で 24 プレックス (24 個の異なる i5 及び i7) 又は 192 プレックス (192 個の異なる i5 及び i7) のいずれかとして配列決定した。例示的な % ベースのプロットが示され、リード 1 (SOMA - iD)、リード 2 (i7 リード)、及びリード 3 (i5 リード) について予想されるリードを示す。PF % 及び Q30 % データを含む配列決定メトリクスが図 8 C の表に示される。

【0050】

図 9 A は、複数の増幅及びプライマーが、アダプター又は他の配列を付加するために使用することができるステップアウト PCR の例を示す。オプション 1 は、3' アダプターを付加するための第 1 のラウンドの増幅を示し、一方、5' アダプターは、第 2 の PCR ラウンドを介して完了される。オプション 2 は、逆の向きを示す。オプション 3 は、5' 及び 3' アダプター配列の両方における 2 ステップ PCR を示す。レポータプローブ 24 は、アダプター配列とともに包含されるプライマー領域 70、72 内に特定の配列を含む

。ステップアウトPCRは、インデックスPCR又は別の反応で行うことができる。図9Bは、図9Aのオプション1によるレポータープローブの増幅からのデータを示す。非増幅アダプター結合領域(P1B)を有する長いオリゴを含有する識別配列を、3つのプライマーを用いるPCR反応における鋳型として使用した。B15含有プライマーは、「fwd」プライマーとして機能し、2つのA14含有プライマーは、「rev」プライマーとして機能する。分析のために増幅産物をテーブステーションにロードした。A14-MEプライマーの濃度を低減することは、テーブステーショントレースに示されるように、全長産物(0.1x A14ME 153bp - 青色)のより多くの増幅をもたらす。図9Cは、図9Bのオプション2によるレポータープローブの増幅についてテーブステーション結果を示す。長いP1B含有オリゴを、4つのプライマーを用いたPCR反応における鋳型として使用した。2つのM13F含有プライマーは、「fwd」プライマーとして機能し、2つのM13R含有プライマーは、「rev」プライマーとして機能する。増幅産物を分析のためにテーブステーションにロードした。予想された生成物は130bpで観察され、より少ないDNA入力で減少する。プライマーダイマーは、DNA鋳型の非存在下で、98bpで生じる。

10

【0051】

図10は、ステップアウトPCRからの増幅産物80から調製されたライブラリを配列決定するための配列決定ワークフローを示す。オプション1及びオプション2からの増幅産物80に基づく配列反応は、標準的な配列決定プライマーを使用することができ、リード1プライマーを使用して配列データを生成して、識別配列68を含む配列リードを生成し得る。追加のインデックス情報は、i5又は他のインデックスプライマーを使用する相補的鎖インデックス読み出しから得ることができる。第2のインデックス情報を取得するために、第2のインデックスリードも行われ得る。オプション3では、インデックスは、第1及び第2のインデックスリードから得ることができ、カスタムプライマーを使用して、識別配列68を含む配列リードを生成する。カスタムプライマー配列読み出しは、増幅産物80の非標準領域をスキップするためにダークサイクルを含むことができる。

20

【0052】

図11は、二本鎖末端アダプターがプローブ24の3'末端で相補的鋳型にライゲートされる、PCRへのライゲーションの例を示す。開示される例において、レポータープローブ24の長さは、所望の下流検出モダリティ並びにレポーター合成効率に基づいて調整され得る。例えば、より短いレポータープローブ24は、一般的により高価でなく、より純粋であり得る。しかしながら、より短いレポータープローブ24はまた、非標準配列決定アプローチ(例えば、ダークサイクルを用いる単回読み出し)を必要とする配列決定のためにより少ない内在性アダプターを含み得る。オプション1は、第1のプライマー領域70を含むが、第2のプライマー領域72を含まない比較的短いレポータープローブ24を示す。代わりに、レポータープローブ24は、部分的に二本鎖のアダプター86をライゲートすることができる短い3ヌクレオチドテール84を有する。オプション2は、同様の配置を示すが、より長い第1のプライマー領域70を有する。次いで、得られた増幅産物は、図7及び図9で考察されるような直接増幅技法又はステップアウト増幅技法を介して、追加の配列(例えば、インデックスp5、p7)を組み込むことができる。しかしながら、図12に示されるように、オプション1の比較的短い増幅産物80からの配列決定は、カスタム配列決定プライマー又は標準プライマー(i5、i7)を含み得るが、テール84を収容するために3回のダークサイクルの組み込みを伴う。オプション2は、標準配列決定プライマーを使用して、リード1プライマーを使用する配列データを生成して、識別配列68を含む配列リードを生成することができる代替的な配置を示す。追加的なインデックス情報は、i5若しくはi7プライマーの一方若しくは両方、又はインデックスプライマーの他の組み合わせから得ることができる。

30

40

【0053】

配列決定又は他のアッセイのためのアダプターが、その後のライゲーション及び/又はPCR工程で付加され得る。比較的長いレポーターは、内在性アダプターを含み得るが、よ

50

り高価、より低い純度、及び/又は長すぎる場合、より低い収率に起因する合成の低い実行可能性であり得る。したがって、特定の実施形態では、直接的又は間接的なライゲーション工程を介したアダプター組み込みを使用して、アダプター結合に関与するが、アダプター配列（例えば、インデックス配列、プライマー結合配列、機能配列）を含まない比較的短いレポータプローブ24を修飾し得る。開示されるアダプターライゲーション技法は、例えば、ダミープローブ又はレポータを使用して、本明細書に提供されるダイナミックレンジ圧縮ワークフローと併せて使用され得る。更に、特定の実施形態では、本明細書で考察されるような開示されるアダプターライゲーション技法は、サーモサイクリングを回避するPCRフリーワークフローであり得る。実施形態では、PCRフリーワークフローは、潜在的なアンプリコン汚染の低減、及びPCR作業の前及び後のための別々の領域の必要性を除去することの利点を提供する。 10

【0054】

図13は、ライゲーション及び伸長を介して1つ以上のアダプターを付加するスプリントライゲーション技法を使用する例示的なPCRフリーワークフローを示す。捕捉されたレポータプローブ24は遊離3'末端を有するが、5'末端は結合領域62を含む。他の例において、この領域62は、領域62をカバーしないプライマーを使用する増幅産物において保持されない。しかしながら、図示される例では、レポータプローブ24は、内在性切断部位90、例えばウラシル切断部位を有する。ここでは、レポータプローブ24は、三分子複合体の一部として捕捉される。三分子複合体は、本明細書で一般的に考察されるように生成され得、未捕捉レポータプローブ24は、捕捉ビーズ36との結合を容易にするための親和性タグの非存在に基づいて捕捉されなかった異なるタイプの三分子複合体と会合され得る。 20

【0055】

捕捉されると、未捕捉成分が除去され、非ハイブリダイズ領域64が切断されて、5'末端を露出させることができる。切断は、ウラシル-DNAグリコシラーゼによるU塩基の切断によって媒介され得る。切断後、5'アダプター94ライゲーションは、ハイブリダイズした場合に部分的に二本鎖ライゲーション領域を形成する5'スプリント97によって容易にすることができ、3'アダプター96ライゲーションは、3'末端で部分的に二本鎖のライゲーション領域を形成する3'スプリント98によって容易にすることができる。図示される点線矢印は、伸長を介してインデックス相補体をレポータに付加するための、鑄型i7を使用してインデックスをコピーするB15'からのポリメラーゼ伸長である。伸長は、B15'末端から伸長することによって、ライゲーションを全体的に伴わずに、p7'を完全にコピーする伸長を含み得るか、又はp7'を付加して伸長-ライゲーションを可能にし得る。ポリメラーゼは、非鎖置換であり得、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有しない。実施形態では、Illumina伸長ライゲーションミックスが使用される。ライゲーション及びスプリント97、98の変性後、残りのオリゴヌクレオチドは、本明細書で一般的に考察される検出のために増幅され得る。 30

【0056】

図14Aは、ライゲーション及び伸長を介して1つ以上のアダプターを付加する例示的なライゲーション伸長ワークフローを示す。ワークフローは、第1の相補的領域60を介した捕捉プローブ28及び第2の相補的領域62を介したレポータプローブ24の両方の、アダプター14の対応する領域との結合を含む、本明細書で一般に考察される三分子複合体の形成を含む。レポータプローブ24は、アダプター14について一意的に特定している識別配列68を有するアダプター14にハイブリダイズしない非ハイブリダイズ領域64を含む。ワークフローはまた、捕捉プローブ28に存在する親和性タグ30に結合する親和性タグ結合剤などの捕捉実体を使用して、ダミー含有三分子複合体（図1参照）及び/又は遊離アダプター14若しくは遊離レポータプローブ24から三分子複合体を分離する工程を含む。 40

【0057】

捕捉されると、レポータプローブ24及びアダプター14は、捕捉実体及び捕捉プロー 50

ブ 2 8 から溶離することができる。このワークフローでは、レポータプローブ 2 4 は、5'アダプター配列の一部に対応する第 1 の領域 1 0 0 と、3'アダプター配列の一部に対応する第 2 の領域 1 0 2 とを有する。完全な 5'及び 3'アダプター配列は、存在する場合、オリゴヌクレオチドが、実施形態では、アダプター検出の一部として識別配列 6 8 を配列決定するために使用され得る NGS 配列決定のための配列決定ライブラリの一部として使用されることを可能にする、それぞれ末端アダプター配列を表し得る。図示されるワークフローでは、レポータプローブ 2 4 が完全な 5'及び 3'アダプター配列を有するのではなく、レポータプローブはこれらの配列の一部のみを有し、比較的短い。例えば、レポータプローブの全長は、一例では約 7 0 ヌクレオチドであり得る。実施形態では、レポータプローブ 2 4 は、5 0 ~ 8 0 ヌクレオチドであり得る。完全な 5'及び 3'配列は 1 0、図示されるように伸長ライゲーションを介して末端に組み込まれる。

【 0 0 5 8 】

図示されるように、第 1 領域相補体 1 1 1 を有するオリゴヌクレオチド 1 1 0、及び第 2 領域相補体 1 2 2 を有するオリゴヌクレオチド 1 2 0 は、レポータプローブ 2 4 にハイブリダイズする。オリゴヌクレオチド 1 1 0 は、レポータプローブ 2 4 にハイブリダイズしない、例えば、相補的領域 6 2 に相補的でないアダプター領域 1 2 4 を含む。オリゴヌクレオチド 1 1 2 は、レポータプローブ 2 4 にハイブリダイズしないアダプター領域 1 3 0 及び親和性タグ 3 0 を含む。このハイブリダイゼーションは、アダプタービーズからのアダプターの溶離後に起こり得る。オリゴヌクレオチド 1 1 2 は、鑄型として識別配列 6 8 を使用して 3'方向に伸長され得、オリゴヌクレオチド 1 1 0 にライゲートされ得る。 20 加えて、レポータプローブ 2 4 は、鑄型としてアダプター領域 1 3 0 を使用して 3'方向に伸長することができる。したがって、伸長したレポータプローブ 2 4 及び伸長ライゲートしたオリゴヌクレオチド 1 1 0、1 1 2 は、相補的領域 6 2 にハイブリダイズしない部分的な二本鎖構造を形成する。この手段で、相補的領域 6 2 は、図 1 0 でのワークフローとは対照的に、切断工程なしに下流産物から除去することができる。

【 0 0 5 9 】

保持された伸長ライゲートしたオリゴヌクレオチド 1 3 2 は、洗浄工程（例えば、熱洗浄、NaOH、又は他の変性剤）後に、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 1 3 6 を鑄型として使用して、更なる伸長を受けることができる。オリゴヌクレオチド 1 3 6 は、相補的領域 1 4 0 を介してアダプター領域 1 2 4 にハイブリダイズする。オリゴヌクレオチド 1 3 6 はまた、5'アダプター領域 1 4 2 を含む。実施形態では、伸長ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 1 3 6 は、伸長し、保持された伸長ライゲートしたオリゴヌクレオチド 1 3 2 にハイブリダイズすることができるハイブリダイズした p 7'オリゴ（図示せず）にライゲートすることができる。ワークフローは、5'アダプター領域 1 4 2 を鑄型として使用する、保持された伸長ライゲートしたオリゴヌクレオチド 1 3 2 の 3'伸長と、伸長ライゲートしたオリゴヌクレオチド 1 3 2 を鑄型として使用する、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 1 3 6 の 3'伸長と、を含むことができる。 30

【 0 0 6 0 】

伸長又は伸長ライゲーションに使用されるオリゴヌクレオチド 1 1 0、1 1 2 は、レポータプローブ 2 4 で有されるユニバーサル領域を介して任意の捕捉された（例えば、アダプター結合された）レポータプローブ 2 4 にハイブリダイズするユニバーサルオリゴヌクレオチドであることができる。オリゴヌクレオチド 1 3 6 は、ユニバーサルアダプター領域 1 2 4 にハイブリダイズする。したがって、伸長ライゲーションオリゴヌクレオチド試薬は、アダプター検出のためにパネル全体にわたって使用することができる。 40

【 0 0 6 1 】

任意選択の第 2 の捕捉工程は、伸長オリゴヌクレオチド 1 3 2 から伸長オリゴヌクレオチド 1 3 6 を分離することができる。両方のオリゴヌクレオチド 1 3 2、1 3 6 は、NGS 配列決定のための完全な 5'及び 3'アダプター又はそれらの相補体を含む。開始レポータプローブ 2 4 は、より短い（例えば、一例では約 7 0 ヌクレオチド）が、伸長ライゲーションワークフローの生成した産物は、より長い。実施形態では、オリゴヌクレオチド 1 50

32、136は、開始レポータプローブ24よりも少なくとも25%、少なくとも50%、又は少なくとも100%長くあり得る。例示のワークフローは、実施形態では、後続の増幅工程を伴って、又は伴わずに行うことができる。

【0062】

図14B及び図14Cは、PCRフリーNGS変換結果を示す。モデルシステムは、アダプターについてPCRフリーNGS変換アッセイを試験するように設計された。アダプターとのハイブリダイゼーション後、識別配列を含むレポータ分子は、PCRを使用せずにクラスタ化及び配列決定するために、インデックス及びP5/P7配列の付加を必要とする。このモデルシステムにおいて、レポータ分子は、例えば、図14Aにおけるように、3つの追加のオリゴとアニーリングさせた。B15含有オリゴは、レポータオリゴでB15'からの伸長を可能にして、i7'及びP7'を3'末端に付加する。アダプターをレポータ分子の5'末端に付加するために、「スプリント」オリゴをレポータのME部分並びにA14、i5及びP5を含む第2のインデックスオリゴにアニーリングした。アニーリングしたオリゴをELM(extension ligation mix、伸長ライゲーションミックス、リガーゼ+ポリメラーゼ、Illumina)とともにインキュベートすると、レポータ分子は、インデックスを含有する5'アダプター及び3'アダプターの両方、並びにそれぞれP5アダプター及びP7'アダプターを得る。レポータ鎖を変換することに加えて、この方法はまた、A14'「スプリント」オリゴの伸長-ライゲーション及び識別配列にわたるB15アダプターの伸長を介して反応の収率を2倍にする完全な第2の鎖を作製することができる。アダプターの付加は、レポータオリゴのfmo1入力の範囲を用いて、図14Bに示されるようにqPCRによって定量化される。出力fmo1は、図14Cに示されるように変換効率(LCE%)を計算するために使用することができ、広範囲の濃度について約30%で測定される。変換を行うためにELMを使用することに加えて、追加の方法は、ELMの後の第2の工程としてBSTポリメラーゼ伸長を加える。これは、任意の失敗した伸長ライゲーションを補償することによって収率を潜在的に増加させ、収率を高めることができる。

【0063】

図15は、切断フリー伸長ライゲーション技法の別の例を示す。図14におけるように、ワークフローは、第1の相補的領域60を介した捕捉プローブ28及び第2の相補的領域62を介したレポータプローブ24の両方の、アダプター14の対応する領域との結合を有する三分子複合体の形成を含む。レポータプローブ24は、アダプター14について一意的に特定する識別配列68を有するアダプター14にハイブリダイズしない非ハイブリダイズ領域64を含む。ワークフローはまた、捕捉プローブ28に存在する親和性タグ30に結合する親和性タグ結合剤などの捕捉実体を使用して、ダミー含有三分子複合体(図1を参照)及び/又は遊離アダプター14若しくは遊離レポータプローブ24から三分子複合体を分離する工程を含む。

【0064】

捕捉されると、レポータプローブ24及びアダプター14は、捕捉実体及び捕捉プローブ28から溶離することができる。複数のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションは、複合体を形成して、完全なアダプター配列の伸長ライゲーションを可能にする。レポータプローブ24は、5'アダプター配列の一部に対応する第1の領域100と、3'アダプター配列の一部に対応する第2の領域102とを含む。図示されるように、第1の領域相補体112を有するオリゴヌクレオチド150、及び第2の領域相補体153を有するオリゴヌクレオチド152は、両方ともレポータプローブ24にハイブリダイズする。加えて、オリゴヌクレオチド150は、レポータプローブ24にハイブリダイズせず、例えば、相補的領域62に相補的でなく、内部親和性タグ30を有する、アダプター領域155を含む。オリゴヌクレオチド152は、レポータプローブ24にハイブリダイズせず、伸長鑄型として機能するアダプター領域156を含む。オリゴヌクレオチド158は、アダプター領域155にハイブリダイズし、オリゴヌクレオチド160は、領域162を介してオリゴヌクレオチド150にハイブリダイズする。オリゴヌクレオチド158は、オリ

ゴヌクレオチド 150 及びオリゴヌクレオチド 160 のライゲーションのためのスプリットとして作用する。複合体において、オリゴヌクレオチド 152、150、160 は、伸長を介してライゲートされて、オリゴヌクレオチド 166 を形成することができる。

【0065】

オリゴヌクレオチド 166 は、親和性タグ 30 を介して捕捉することができ、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド 158 の伸長のための鋳型として使用され得る。例えば、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを使用する多重伸長は、完全な 5' 及び 3' アダプターの付加を可能にする。図 11 に関して考察されるように、伸長ライゲーションは、より短いレポータプローブ 24 を使用して、出発レポータプローブ 24 よりも長い、例えば、少なくとも 25%、少なくとも 50%、又は少なくとも 100% 長い生成物を生成することを可能にする。加えて、伸長に使用されるオリゴヌクレオチドは、レポータプローブ 24 で有されるユニバーサル領域を介して任意の捕捉された（例えば、アダマー結合した）レポータプローブ 24 にハイブリダイズするユニバーサルオリゴヌクレオチドであることができ、異なるアダマー及びそれらの会合した異なる識別配列 68 におけるアダマー検出のためにパネルにわたって使用され得る。図示されるワークフローは、実施形態では後続の増幅工程を伴って、又は伴わずに、及び追加の捕捉工程を伴って、又は伴わずに行うことができる。実施形態では、伸長は、最初のリン酸ブロッキングなしで A14 から行われ得る。

10

【0066】

図 16 は、アダマー 14 と一緒に三分子複合体を形成するスプリットレポータプローブを使用するワークフローの例を示す。識別配列 68 全体が単一プローブ 24 に提供されるワークフローとは対照的に、図示される例は、第 1 のレポータプローブ 170 及び第 2 のレポータプローブ 172 を含み、識別配列 68 は、これらのプローブ間で分割される。より短いレポータプローブを使用することは、より経済的であり、続くライゲーションは、ライブラリクリーンアップ利益を有する、より長い生成物を生成する。2つのプローブ間に分配されたスプリット識別配列を有することは、両方のプローブの成功したハイブリダイゼーションの評価を可能にする。これは、他の技法では、第 2 のプローブは読み出しの一部ではなく、ミスハイブリダイゼーションは結果の読み出しにおいて明らかにはならないので、これは利点である。

20

【0067】

第 1 のレポータプローブ 170 は、第 1 の識別配列 176 を有し、第 2 のレポータプローブ 172 は、第 2 の識別配列 178 を有する。同様に、アダマー結合領域も、プローブ間で分割される。第 1 のレポータプローブ 170 は、第 1 のアダマー結合領域 182 と、第 1 のアダマー結合領域 182 と第 1 の識別配列 176 との間に位置する第 1 のプライマー部位 183 と、を有する。第 2 のレポータプローブ 172 は、第 2 のアダマー結合領域 184 と、第 2 のアダマー結合領域 185 と第 2 の識別配列 178 との間に位置する第 2 のプライマー部位 185 と、を有する。プライマー部位は、切断されたか又は部分的なアダプター配列（A14' 及び B15）として示されている。追加のアダプター配列もまた、スプリットプローブ中に含まれ得るか、又は本明細書で一般に考察されるような増幅及び/又はライゲーションによって導入され得ることが理解されるべきである。

30

40

【0068】

第 1 のレポータプローブ 170 及び第 2 のレポータプローブ 172 のアダマー 14 との結合は、三分子複合体を生じ、第 1 のレポータプローブ 170 又は第 2 のレポータプローブ 172 のうちの 1 つは、例として第 1 のレポータプローブ 170 にあるように示される親和性タグ 30 を有することができる。識別配列及びプライマー部位は、レポータプローブ 170、172 の非ハイブリダイズ部分に有される。ダイナミックレンジ圧縮は、特定のアダマー 14 に対する親和性タグ 30 を有しないダミープローブ（例えば、ダミーの第 1 のプローブ 170 又はダミーの第 2 のプローブ 172）を含む混合物を使用することによって、スプリットプローブについて達成することができる。本明細書で考察されるように、ダミーの親和性タグ保有プローブに対する選択された比は、アダマー存在量に

50

基づいて調整することができる。

【0069】

識別配列68は、例えば、一本鎖ライゲーション、例えばCircLigaseを使用して、第1のレポータプローブ170及び第2のレポータプローブ172の末端をライゲートすることによって組み立てることができる。プローブ170、172の5'リン酸及び隣接する3'OHは、第1の識別配列176及び第2の識別配列178が連続しているように、一緒に連結される。ライゲートした鎖は、親和性タグ30を用いて分離することができる。任意のダミーレポータプローブ170及びライゲートされていない第2のレポータプローブ172は、保持されない。ライゲートされていないレポータプローブ170も捕捉されるが、第1のプライマー部位183及び第2のプライマー部位185を使用する増幅工程は、ライゲートした対のみが増幅産物を生成することを確実にする。非特異的結合又は望ましくない結合から偽陽性を排除するために、技法は、識別配列176、178に対してマッチした対を必要とし得る。すなわち、識別配列176及び識別配列178は両方とも、アダマー14について特定することができ、技法は、アダマー14の検出を検証する前に、両方の識別配列176、178について、配列決定デバイスから取得された配列決定データを使用して評価されるとき、陽性配列一致を必要とし得る。

10

【0070】

図17Aは、一本鎖スプリントオリゴヌクレオチド190がレポータプローブ170、172のライゲーションのライゲーション効率を改善するために提供される、図16の技法の実施形態である。スプリントオリゴヌクレオチド190は、第1の識別配列176及び第2の識別配列178の少なくとも一部にハイブリダイズして、二本鎖領域を作製する。アダマー14にも結合する場合、レポータプローブ170、172もまた、アダマー結合領域182、184に沿って部分的に二本鎖である。実施形態では、スプリントオリゴヌクレオチド190は、15~30ヌクレオチドの長さであり得る。図17Bに示されるように、レポータプローブ170、172は、共通のスプリントオリゴヌクレオチド配列が、アッセイされたアダマー14の完全なパネルに対する識別配列を形成する異なるレポータプローブ170、172のパネルを含む反応混合物に対するライゲーションを増強するために使用できるように、異なる識別配列176、178を有するレポータプローブに対してさえ同じであるそれぞれの末端保存配列又はユニバーサル配列192、194を含み得る。すなわち、レポータプローブ170は、第1の末端配列192を含み得、レポータプローブ172は、第1の末端配列とは異なる第2の末端配列194を含み得る。しかしながら、異なる各レポータプローブ170は、互いに対して異なる識別配列176を有し得るが、同じ末端配列192を共有する。同様に、異なる各レポータプローブ172は、互いに対して異なる識別配列178を有し得るが、同じ末端配列194を共有する。

20

30

【0071】

図17Cは、例示のアダマーと同様のサイズのDNAベースのオリゴである「ミミックマー」の存在下で、レポータプローブ(例えば、レポータプローブ170、172)のスプリントライゲーションを試験するように設計されたモデルシステムを示す。2つの異なるミミックマーを、40%及び50%のGC含量で使用した。ミミックマーオリゴ及びプローブをCy3(緑色)で標識し、レポータをCy5(赤色)で標識した。図17Cに示すように、プローブをT4 DNAリガーゼとともに5、10、30及び60分間インキュベートし、PAGEによって分析した。ライゲーションが成功すると、最大の産物が123ntで形成される。ライゲーション時間の増加とともに、最大バンドの強度が増加し(図17Dのバンド強度プロットによって示されるように)、強度はまた、ミミックマーの存在下で最高である。

40

【0072】

図18Aは、図16及び/又は図17の技法の実施形態である。特に、スプリントオリゴヌクレオチド190の使用は、アダマー結合がなくてもレポータプローブ170、172のライゲーションを促進することができる。遊離レポータプローブ170、172の

50

エキソヌクレアーゼ消化は、アプタマー結合の非存在下でのレポータープローブ170、172のライゲーションから生成されるバックグラウンドを改善することができる。例として、エキソヌクレアーゼRecJF及びExoIが示される。5'から3'、及び3'から5'のエキソヌクレアーゼの混合物を提供することは、アプタマフリーライゲーションから生成される増幅産物を排除又は著しく低減するのに十分な消化を促進することができる。図18Bは、例示のアプタマーと同様のサイズのDNAベースのオリゴである「ミミックマー」の存在下で、プローブのスプリント化ライゲーションのエキソヌクレアーゼ保護を試験するように設計されたモデルシステムを示す。プローブ配列にマッチする(相補的である、結合する)か、又はマッチしない(例えば、非相補的である、結合しない)2つの異なるミミックマーを使用した。ミミックマーオリゴ及びプローブを、Cy3(緑色)で標識し、H2オリゴをCy5(赤色)で標識した。オリゴをT4 DNAリガーゼとともに30分間インキュベートし、次いで様々なエキソヌクレアーゼ処理に供した後、PAGEによって分析した。ExoI、RecJF、又は混合物で処理すると、全長産物は、正しいマッチングミミックマーの存在下でライゲートした場合にのみ保護された(レーン6、9、12)。エキソヌクレアーゼが示されるフルオロフォアで停止するとき、エキソヌクレアーゼ消化の産物がゲルのわきに示される。

10

【0073】

図19は、アプタマー結合したレポータープローブ170、172が、図15に示されるエキソヌクレアーゼ消化からの完全な環化型保護であることができるワークフローを示す。特に、エキソヌクレアーゼ消化は、アプタマー14に結合していないが、例えばスプリントオリゴヌクレオチド190の存在下で互いにライゲートしているレポータープローブ170、172を標的とする。

20

【0074】

特定の実施形態では、本明細書で考察されるような、例えば、図16~図19におけるようなレポータープローブ及び得られたライゲーション生成物、伸長産物、又は増幅産物は、捕捉工程なしで使用され得る。

【0075】

図20Aは、例示的なダミーレポータープローブ技法を示す。図20Aにおいて、三分子複合体200は、ピース36と親和性タグ30との相互作用を介して捕捉プローブ28を使用して捕捉される。三分子構造は、アプタマー結合領域62と、識別配列68がプライマー領域70、72に隣接する活性又は増幅可能な非ハイブリダイズ領域64と、を含む会合したレポータープローブ24を含む。ここでは、ダミープローブ32と混合された捕捉プローブ28の使用の代わりに(又はそれに加えて)、レポータープローブ24はまた、活性プローブ202及びダミープローブ210の混合を含み得る。したがって、不活性ダミーレポーター210と会合する他の三分子構造が形成され得る。これらの不活性ダミーレポーター210は、アプタマー14との結合を容易にするためにアプタマー結合領域62を含む。しかしながら、これらの不活性ダミーレポーター210の非増幅性の非ハイブリダイズ領域64は、増幅可能ではない。不活性ダミーレポーター210の配置の例には、プライマー領域70、72の一方若しくは両方、又は識別配列68の欠如を含み得る。別の例において、非増幅性の非ハイブリダイズ領域64は、脱塩基伸長ブロック、スペーサ、又はウラシルなどの伸長ブロックを含み得る。別の変形例において、非リン酸化プローブが、5'リン酸を含むバージョンと、同じ配列及びアプタマー結合能力を有するが、利用可能な5'リン酸を含まないバージョンとの両方を含む混合物として提供することによって、ダイナミックレンジを調節するために添加され得る。バージョンの比は、アプタマー存在量に基づいて調整され得る。

30

40

【0076】

活性レポーター202の不活性ダミーレポーター210に対する混合比又は相対比は、捕捉プローブ混合物に関して一般に考察された通りであり得る。

【0077】

図20Bは、本明細書に提供されるような三分子アッセイにおいてダミービオチン又は

50

ダミーレポータの存在下でダイナミックレンジ圧縮を確認するように設計されたシステムを示す。ダミーピオチンアプローチは、ピオチンH1を三分子アッセイに100%、50%、20%、10%及び1%で用量設定した。ダミーレポータは、増幅可能ではない増幅プライマー(M13)を含むレポータの100%、50%、20%、10%及び1%を使用した。3つの異なるGC含量(50、60及び80)を有する3つの異なるミミックマーを使用し、全ての条件について3つの異なる対応するプローブセットを用いた。ハイブリダイゼーション、捕捉、及び洗浄に続いて、ライブラリをPCR増幅し、Illuminaシーケンサーで配列決定した後、分析し、カウントについて正規化した。結果は、ダミーピオチン「Dbio」及びダミーレポータ「Drep」の両方が、試験した3つ全てのミミックマーについてリードカウントを減少させるように作用したことを示す。

10

【0078】

図21は、非ハイブリダイズ領域64とともに配置された内在性制限エンドヌクレアーゼ(restriction endonuclease、RE)部位の混合を有するレポータプローブ(例えば、プローブ24)を示す。例えば、低存在量アプタマー14では、プローブ24のグループ222は、全て同じであり得、例えば、非ハイブリダイズ領域64内にRE部位を有し得ず、代わりに、RE部位に対応しないヌクレオチドの「ヌル」領域を有する。中存在量のアプタマー14では、プローブ24のグループ224は、非ハイブリダイズ領域64内にRE部位を有する50%のプローブと、RE部位を有さず、代わりにRE部位に対応しないヌクレオチドのヌル領域を有する50%のプローブとの混合を有し得る。高存在量アプタマー14では、プローブ24のグループ226は、非ハイブリダイズ領域64内にRE部位を有する75%のプローブと、RE部位を有さず、代わりにRE部位に対応しないヌクレオチドのヌル領域を有する25%のプローブとの混合を有し得る。これらのパーセンテージは、例によることを理解されたい。

20

【0079】

RE部位の存在は、適切なREを使用した切断を容易にする。RE部位は、非ハイブリダイズ領域64を切断するために単一のRE処理のみが必要とされるように、全てのアプタマー14にわたって保存され得る。切断部位は、ssDNA切断に特異的であり得る。そのような実施形態では、切断は、捕捉プローブ28による捕捉後、及び増幅前に生じ得る。他の実施形態では、切断は、二本鎖REを使用する増幅後に生じ得る。そのような場合、RE部位は、増幅の間保持される。そのため、切断されたプローブ24は、下流の配列決定に利用できず、したがって、増幅後に配列決定されないことによってダイナミックレンジ圧縮を達成する。実施形態では、ヌル領域は、ダミー(RE部位を有する)プローブと活性(ヌル部位、RE部位なし)プローブとの間の増幅バイアスを最小化するために、一塩基置換だけがRE部位と異なり得る。

30

【0080】

図22は、捕捉工程及び/又は洗浄工程を除去するために、単一プローブワークフロー及び/又は二重プローブワークフローと併せて使用され得る代替例を示す。すなわち、捕捉プローブ28及びレポータプローブ24の両方が使用される三分子複合体ではなく、図示される実施形態は、一般に考察されるように、レポータプローブ24のみを使用して行われ得る。遊離レポータプローブ24は、除去されるか、又はエキソヌクレアーゼで消化され得る。アプタマー14との二本鎖複合体の一部である結合されたレポータプローブは保護される。しかしながら、特定の実施形態では、開示されるエキソヌクレアーゼ消化は、本明細書で一般に考察されるようなダミー捕捉プローブ32及び/又はダミーレポータプローブ24を使用する二重プローブワークフローと用いるなどの他の開示される実施形態と併せて行うことができる。図示される実施形態は、遊離レポータの3'から5'のエキソヌクレアーゼ消化を示し、レポータプローブ24の3'末端は、アプタマー結合に関与し、したがって、3'から5'のエキソヌクレアーゼ消化から保護される。開示される実施形態は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性を有するエキソヌクレアーゼと併せて、追加的に又は代替的に使用され得る。そのような実施形態では、レポータプローブ24は、非ハイブリダイズレポータプローブ24と比較して5'末端を消化から保護するために、

40

50

5'末端がアダマー14にハイブリダイズする末端であるように設計することができる。特定の実施形態では、エキソヌクレアーゼ消化は、洗浄回数の低減及び/又は感度の改善を伴うワークフローを可能にし得る。

【0081】

図23は、捕捉されたレポータプローブ24、又は捕捉レポータプローブ24から生成された増幅若しくはライゲーション伸長オリゴヌクレオチド産物における入力ライブラリ250についてダイナミックレンジを圧縮するために、グループ特異的捕捉配列及び対応する異なる捕捉ビーズセットを使用する、ビーズベースの捕捉の実施形態を示す。一実施形態では、入力ライブラリ250は、入力ライブラリ250間で共有される特定のユニバーサル配列又は共通配列(例えば、アダプター配列254、256)、特定のアダマー14に結合する入力ライブラリ250のうちのいくつかのメンバーのみに固有である特定の識別配列68、及びまた異なるグループの間で異なっているグループ特異的捕捉配列(例えば、グループ捕捉配列260、262、264)を有する、オリゴヌクレオチド252の集団を表す。異なるグループが、高存在量グループ270、中存在量グループ272、及び低存在量グループ274として例として示されているが、より多いか又はより少ないグループも企図される。特定のアダマーベースのアッセイのアダマー14の推定存在量を使用して、アダマー14の相対存在量に基づき、アダマー14をグループに分けることができる。分けられると、各グループ(例えば、グループ270、272、274)内のアダマー14に結合するように設計されたレポータプローブ24は、グループの存在量に関連するそれぞれ共通のグループ捕捉配列を含むことができる。レポータプローブ24を使用して生成される任意の産物は、適切なグループ捕捉配列を含む。更に、特定の実施形態では、オリゴヌクレオチド252がレポータプローブ24を使用して生成された産物である場合、オリゴヌクレオチド252は、レポータプローブ24に存在し得るが、増幅されないか、又は入力ライブラリ250に含まれない、アダマー結合領域(例えば、第2の相補的領域62、図5を参照)を除外し得る。

【0082】

比較的高い存在量グループ270のオリゴヌクレオチド252は全て、高存在量グループ270と会合する同じグループ捕捉配列260を含み得る。オリゴヌクレオチド252が二本鎖である場合、比較的高い存在量グループ270のオリゴヌクレオチド252は全て、同じグループ捕捉配列260又はグループ捕捉配列260の逆相補体のいずれかを含み得ることが理解されるべきである。同様に、オリゴヌクレオチド252が二本鎖である場合、3つ全てのグループのオリゴヌクレオチド252は全て、ユニバーサルアダプター配列256、258、又はそれらの逆相補体のいずれかを含み得る。図示されるように、グループ270が高存在量として指定される異なるアダマー14a、14b、14cに対応する異なる識別配列68a、68b、68cを含むように、異なる識別配列68の混合が各グループ内に存在し得る。同様に、グループ272は、中存在量として指定される異なるアダマー14d、14e、14fに対応する異なる識別配列68d、68e、68fを含む。低存在量グループ274はまた、異なる識別配列68の混合を含み得る。実施形態では、特定の識別配列68は、識別配列68aが高存在量グループ270内にのみ存在し、グループ捕捉配列260とのみ会合するように、1つのグループのみに割り当てられる。

【0083】

アダマーベースのアッセイを行い、本明細書で一般に考察されるように試料の成分について陽性結合事象を有するアダマー14に結合したレポータプローブ24から入力ライブラリ250を生成した後、入力ライブラリ250は、ビーズプール290のうちの異なるビーズ280と接触させる。ビーズプール290は、ビーズ捕捉配列260、262、264に相補的であるそれぞれの異なる相補体領域310、312、314を有する異なるビーズ群300、302、304を含むことができる。したがって、ビーズ捕捉配列260を含む高存在量グループ270のオリゴヌクレオチド252は、第1のビーズ群300にのみ存在する一本鎖相補体領域310とのハイブリダイゼーションによって捕捉さ

10

20

30

40

50

れる。ビーズ捕捉配列 2 6 2 を含む中存在量グループ 2 7 2 のオリゴヌクレオチド 2 5 2 は、第 2 のビーズ群 3 0 2 にのみ存在する相補体領域 3 1 2 によって捕捉され、ビーズ捕捉配列 2 6 4 を含む低存在量グループ 2 7 4 のオリゴヌクレオチド 2 5 2 は、第 2 のビーズ群 3 0 4 にのみ存在する相補体領域 3 1 4 によって捕捉される。言及されるように、オリゴヌクレオチドが二本鎖である場合、一方の鎖のみが関連するビーズ捕捉配列を含み得る。したがって、捕捉は、オリゴヌクレオチド 2 5 2 を変性させて一本鎖相補体領域への結合を可能にした後に生じ得る。結合すると、捕捉されたオリゴヌクレオチド 2 5 2 を含むビーズ 2 8 0 は、本明細書で考察されるように検出することができる。実施形態では、ビーズ 2 8 0 は、各ビーズ群がほぼ同じ量を捕捉するように、ビーズ 2 8 0 当たり同じ量のオリゴヌクレオチドを一般に捕捉するように設計することができる。しかしながら、特定の
10 実施形態では、特定のビーズ群におけるビーズ 2 8 0 当たりの捕捉量又は群当たりのビーズの数を調整して、特定のアダプター 1 4 に会合した捕捉されたオリゴヌクレオチド 2 5 2 の濃度を更に調整することができる。

【 0 0 8 4 】

異なるグループ捕捉配列を各レポータープローブ 2 4 に組み込んで、ビーズ 2 8 0 に固定化された相補的領域とのハイブリダイゼーションを介したビーズベースの捕捉を可能にすることができる。対照的に、単一の共通ビーズ捕捉配列が入力ライブラリ 2 5 0 全体に対して使用された場合、高存在量グループ 2 7 0 は、ライブラリ 2 5 0 内の高存在量グループ 2 7 0 のオリゴヌクレオチド 2 5 2 の比較的より大きな割合に基づいて、利用可能なビーズ 2 8 0 により大きな割合で捕捉される傾向がある。ビーズ 2 8 0 の別個のセットを使用することによって、低存在量と高存在量との間のダイナミックレンジ圧縮を達成することができる。対応するビーズ群を有する 3 つの別個の存在量グループが例示されているが、より多いか又はより少ない基が企図されることが理解されるべきである。加えて、各個々のグループ捕捉配列に割り当てられる異なるアダプター 1 4 及び会合される識別配列 6 8 の数は、1、2、3、10、100、500、又はそれ以上であるように選択され得る。実施形態では、各グループに割り当てられる識別配列 6 8 の数は異なり得る。例えば、高存在量グループ 2 7 0 は、中存在量グループ 2 7 2 又は低存在量グループ 2 7 4 と比較して、より少ない異なる識別配列を含み得る。加えて、図示される実施形態は、単独で、又は入力ライブラリ 2 5 0 のオリゴヌクレオチド 2 5 2 の相対存在量を調整するために使用され得る本明細書で考察されるような他のダイナミックレンジ圧縮技法（例えば、ダミー
20 プローブ）と組み合わせて使用され得る。更に、ワークフローはビーズの文脈で考察され、捕捉技法は、フローセル又は他の基材などの表面を用いて使用され得る。

【 0 0 8 5 】

図 2 4 は、実施形態による、直接インデックス増幅を使用する例示的な合理化したワークフローを示す。例示的なワークフローにおいて、増幅反応、例えば、ステップアウト増幅又は直接増幅を使用して、別個のライゲーション調製ワークフロー工程を排除することができる。ワークフローの左側では、捕捉されたレポータープローブ 2 4 は、増幅反応を受けることができ、次いで、分岐したアダプターが増幅されたレポータープローブの末端にライゲートされる配列ライブラリ調製に供給される。しかしながら、配列決定アダプター配列を組み込むための増幅は、同じ最終産物を生じるために使用され得るが、介在するライゲーション工程は伴わない。したがって、ライゲーション工程を伴わないか又はアダプターのライゲーションを伴わない、直接増幅ワークフローは、ライブラリ調製時間を節約することができる。図 2 5 は、図 2 4 の合理化したワークフローからの配列決定リードカウントをライゲーション調製ワークフローと比較したプロットであり、同様の配列リードカ
40 ountを示し、ライブラリ調製における同様の効率を示す。

【 0 0 8 6 】

図 2 6 は、実施形態による、洗浄工程を伴う例示的なワークフローを示す。ワークフローの第 1 の工程で、アダプター 1 4 を、捕捉プローブ 2 8 及びレポータープローブ 2 4 と接触させる。反応は、本明細書に開示されるようなダミー及び非ダミープローブ捕捉プローブ 2 8 の混合物を含み得る。例えば、アダプターのレポータープローブとのハイブリダイゼー
50

ションを可能にするハイブリダイゼーション反応は、例として、一晚のハイブリダイゼーションであり得る。しかしながら、他の時間範囲も企図される（例えば、30分、1時間、2時間、5時間）。アプタマーベースのアッセイの一部であるアプタマー14が試料中に存在する場合、アプタマー14、捕捉プローブ28、及びレポータプローブ24を含むアプタマー複合体が形成される。プローブ及びアプタマー複合体は、親和性タグ捕捉を介して反応混合物中の未結合要素から分離され、ビーズ捕捉として示される。捕捉ビーズは、捕捉ビーズが親和性タグを有する少なくとも1つの捕捉プローブ28を捕捉し得るように、親和性タグ結合剤を含む。本明細書で考察されるように、ビーズはまた、いずれのアプタマーにもハイブリダイズされない空のプローブ又は非複合体化プローブを捕捉し得る。しかしながら、アプタマーを介してレポータプローブ24と複合体化されていない、非複合体化捕捉プローブ28は、下流工程でいかなる増幅産物も生じない。

【0087】

ビーズに捕捉されると、洗浄工程が行われて、いずれのアプタマーとも複合体化していないレポータプローブ24並びに親和性タグを有しないダミープローブと複合体化されたレポータプローブ24を含み得るダミー複合体を含む、未結合要素からビーズを分離する。分離後、試料は、PCR反応へのライゲーションとして示される、配列ライブラリ調製工程に進む。しかしながら、直接増幅、ステップアウトPCR、又は本明細書で考察されるような他の増幅及び/若しくはライゲーション調製などの他の調製ワークフローもまた企図される。ワークフローの最終生成物はオリゴヌクレオチド断片を含み、これは次に配列決定反応の一部として配列決定されて配列データを生成することができる。

【0088】

実施形態では、ワークフローは、ビーズ捕捉後で、増幅及び/又はライゲーション工程の前に、単回の洗浄工程のみを含むことができる。他の実施形態では、2回、3回又はそれ以上の洗浄工程が企図される。図27は、ビーズ捕捉工程で洗浄する異なる洗浄条件、並びに3、6、及び12回の洗浄を比較するための配列決定リードカウントを示す。洗浄工程数を12回から6回に減少させることは、再現性を改善し、アッセイ時間及び消耗品の使用を低減する。洗浄を更に6回から3回に減少させることは、シグナルを更に増加させるが、バックグラウンドもまた、いかなる入力もなく増加する（0入力fM）。

【0089】

図28Aは、異なるアプタマーについてダミー-ビオチンを使用した配列決定リードカウントの圧縮を示す。左側パネルは、アプタマー及びプローブ複合体形成を用いた実験設定を示す。2つの異なるタイプの複合体が、個々のアプタマーについて形成され得る：親和性タグを含む第1の複合体及び親和性タグを含まない第2の複合体。これらのタイプの複合体の、所与のアプタマーに対する比は、ダミープローブの捕捉プローブに対する比に依存する。図28Aは、配列リードカウントが図26のワークフローにおけるダミープローブの使用を介して減少され、除去されなければ配列リードを生成していたであろうアプタマー集団の一部を除去することを示す。図28Aは、2桁（100x）の減少したリードカウント、すなわち96個のアプタマーのパネルにわたる1%までの圧縮を示す。図28Bは、アプタマーパネルを標的とするプローブを使用して行った三分子NGS変換アッセイからの結果を示す。プールしたヒト血漿試料（10人のドナー）からの20uLのアッセイ溶離液を、三分子変換アッセイに添加した。「POS」対照については、全てのプローブが100%ビオチンを有した。「DRC（Dynamic Range Compression）」試料（ダイナミックレンジ圧縮）について、プローブを、異なる%のビオチンを使用して4つの仮想群に分けた。4つの仮想群におけるビオチンの量は、0.065%、0.63%、5.42%及び100%であった。試料はNovaSeq 6000で配列決定し、データを、アプタマー（SeqID-x軸）の各々についてカウント分析（y軸）のために正規化した。

【0090】

図29は、アプタマー結合領域間の望ましくない非特異的結合の例を示す。図29の上図は、複合体がアプタマー14、レポータプローブ24、及び捕捉プローブ28を含む、

ハイブリダイゼーション反応後の所望の複合体構造を示す。図29の下図は、レポータプローブ24が、レポータプローブ24のアプタマー結合領域及び/又は捕捉プローブ28のアプタマー結合領域を介して捕捉プローブ28と直接的に複合体を形成する望ましくない構造形成を示す。このとき、複合体は、アプタマー架橋なしで形成される。ビーズ捕捉並びにその後の増幅及び配列決定の期間中に望ましくないレポータプローブ24を引き下げると、非特異的結合によるバックグラウンドが生じる。図30は、非特異的結合に対する異なるアプタマー結合領域の関与を示す。非特異的アプタマー結合領域相互作用は、バックグラウンドに対する主要な関与因子であることが示された。非特異的結合は、アダプター配列間の低レベルの塩基対形成であり得る。

【0091】

図31は、本明細書で一般に考察されるような識別配列及び/又はインデックス配列の配列決定データを取得するための開示された実施形態と併せて使用され得る配列決定デバイス500の概略図である。配列決定デバイス500は、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許公開第2007/0166705号、同第2006/0188901号、同第2006/0240439号、同第2006/0281109号、同第2005/0100900号、米国特許第7,057,026号、国際公開第05/065814号、国際公開第06/064199号、国際公開第07/010251号に記載されているシーケンシング・パイ・シンセシス方法を組み込むものなど、任意の配列決定技法に従って実行され得る。代替的に、ライゲーション技法による配列決定が、配列決定デバイス500において使用され得る。そのような技法は、DNAリガーゼを使用して、オリゴヌクレオチドを組み込み、そのようなオリゴヌクレオチドの組み込みを特定し、米国特許第6,969,488号、同第6,172,218号、及び同第6,306,597号に記載されており、これらの特許の開示全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態は、ナノ細孔配列決定を利用することができ、それによって、標的の核酸鎖又はヌクレオチドは、標的の核酸からエキソヌクレアーゼによって除去され、ナノ細孔を通過する。標的核酸又はヌクレオチドがナノ細孔を通過する際に、各塩基種は、細孔の電気コンダクタンスの変動を測定することによって、特定され得る(米国特許第7,001,792号、Soni & Meller, Clin. Chem. 53, 1996-2001(2007年)、Healy, Nanomed. 2, 459-481(2007年)、及びCockroft, et al. J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820(2008年)、これらの開示は、その全体が本明細書に参照として組み込まれる)。更なる他の実施形態は、伸長生成物へのヌクレオチドの組み込み時に放出されるプロトンの検出を含む。例えば、放出されたプロトンの検出に基づく配列決定は、Ion Torrent (Guilford, CT, Life Technologiesの子会社)から市販されている電気検出器及び関連技法を使用し得る、又は、米国特許出願公開第2009/0026082(A1)号、同第2009/0127589(A1)号、同第2010/0137143(A1)号、同第2010/0282617(A1)号(それぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている配列決定法及びシステムを使用し得る。特定の実施形態は、DNAポリメラーゼ活性の実時間モニタリングを含む方法を利用し得る。ヌクレオチドの組み込みは、フルオロフォア担持ポリメラーゼと - リン酸標識ヌクレオチドとの間の蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence Resonance Energy Transfer、FRET)相互作用を介して、又は例えば、Levene et al. Science 299, 682-686(2003)、Lundquist et al. Opt. Lett. 33, 1026-1028(2008年)、Korlach et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181(2008)(これらの開示は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているゼロモード導波管を用いて、検出することができる。他の好適な代替的な技法としては、例えば、蛍光インサイチュ配列決定法(Fluorescent In Situ Sequencing、FISSSEQ)、及び大規模並列配列決定法(Massively Parallel Signature Sequencing、MPSS)が挙げられる。特定の実施形態で

10

20

30

40

50

は、配列決定デバイス500は、Illumina (La Jolla, CA)からのHiSeq、MiSeq、又はHiScanSQであり得る。他の実施形態では、配列決定デバイス500は、DNA堆積がそれぞれのフォトダイオードと1対1にアラインメントされるように、フォトダイオード上に作製されたナノウェルを備えたCMOSセンサを使用して動作するように構成され得る。

【0092】

配列決定デバイス500は、4つのヌクレオチドのうちのみが2つのみが標識され、任意の所与の画像について検出可能である「1チャンネル」検出デバイスであってもよい。例えば、チミンは、永久的な蛍光標識を有し得るが、アデニンは、同じ蛍光標識を分離可能な形態で使用される。グアニンは永久的に暗色であってもよく、シトシンは最初は暗色であるが、サイクル中に標識を付加することができる。したがって、各サイクルは、最初の画像及び第2の画像を含むことができ、ここで最初の画像ではチミン及びアデニンのみが検出可能であるが、第2の画像ではチミン及びシトシンのみが検出可能であるように、色素が任意のアデニンから切断され、任意のシトシンに付加される。両方の画像を通して暗色の任意の塩基はグアニンであり、及び両方の画像を通して検出可能な任意の塩基はチミンである。第1の画像で検出可能であるが第2の画像で検出可能でない塩基はアデニンであり、第1の画像で検出可能でないが第2の画像で検出可能な塩基はシトシンである。最初の画像及び第2の画像からの情報を組み合わせることにより、1つのチャンネルを使用して4つ全ての塩基を識別することができる。

10

【0093】

示された実施形態では、配列決定デバイス500は、別個の試料処理デバイス502及び関連するコンピュータ504を含む。しかしながら、上記のように、これらは単一のデバイスとして実装されてもよい。更に、関連するコンピュータ504は、試料処理デバイス502に対してローカルか、又はネットワーク化か、又はそうでなければ通信し得る。示された実施形態では、生体試料は、試料基材510、例えば、フローセル又はスライドに試料処理デバイス502内で加えられ得、これが撮像されて配列データが生成される。例えば、生体試料と相互作用する試薬は、イメージャ512によって生成された励起ビームに応答して特定の波長で蛍光を発生し、それによってイメージングのための発光を戻す。例えば、蛍光成分は、成分の相補的分子にハイブリダイズするか、又はポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドに組み込まれた蛍光タグ付きヌクレオチドにハイブリダイズする蛍光タグ付き核酸によって生成され得る。当業者には理解されるように、試料の染料が励起される波長、及びそれらが蛍光を発生する波長は、特定の色素の吸収及び発光スペクトルに依存することとなる。そのような戻された放射線は、指向光学系を通して伝播し得る。このレトロビームは、一般に、イメージャ512の検出光学系に向けられ得る。

20

30

【0094】

イメージャ検出光学系は、任意の好適な技術に基づき得、例えば、デバイス内の場所に影響を与える光子に基づいて画素化画像データを生成する荷電結合デバイス (charged coupled device、CCD) センサであり得る。しかしながら、時間遅延積分 (time delay integration、TDI) 動作のために構成された検出器アレイ、相補的金属酸化物半導体 (complementary metal oxide semiconductor、CMOS) 検出器、アバランシェフォトダイオード (avalanche photodiode、APD) 検出器、Geiger-モード光子カウンタ、又は任意の他の好適な検出器を含むがこれらに限定されない、様々な他の検出器のいずれかを使用することもできることが理解されるであろう。TDIモードの検出は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,329,860号に記載されているように、ライン走査と連動することができる。他の有用な検出器は、例えば、様々な核酸配列決定方法学の文脈において本明細書で以前に提供された参考文献に記載されている。

40

【0095】

イメージャ512は、例えば、プロセッサ514によるプロセッサ制御下であってもよく、試料受容デバイス502は、I/O制御516、内部バス518、不揮発性メモリ5

50

20、RAM 522、及びメモリが実行可能命令を記憶することができるような任意の他のメモリ構造、並びに図31に関して説明されたものと同様であり得る他の好適なハードウェア構成要素も含み得る。更に、関連付けられたコンピュータ504はまた、プロセッサ524、I/O制御526、通信回路527、並びに実行可能命令532を記憶することができるようなRAM 528及び不揮発性メモリ530を含むメモリアーキテクチャを含み得る。ハードウェア構成要素は、ディスプレイ534にも連結することができる内部バスによって連結され得る。配列決定デバイス500がオールインワンデバイスとして実装される実施形態では、特定の冗長なハードウェア要素を排除することができる。

【0096】

プロセッサ514、524は、本明細書に提供される技法に従い、関連する1つ以上のインデックス配列に基づいて個々の配列決定リードを試料に割り当てるようにプログラムされ得る。特定の実施形態では、イメージャ512によって取得された画像データに基づいて、配列決定デバイス500は、配列決定リードの各塩基に対する塩基コールを含む配列決定データを生成するように構成され得る。更に、画像データに基づいて、順次に行われる配列決定リードについても、個々のリードは、画像データを介して同じ場所、したがって同じ鑄型鎖に連結され得る。このようにして、インデックス配列決定リードは、オリジナルの試料に割り当てられる前に、インサート配列の配列決定リードと関連付けられ得る。プロセッサ514、524はまた、試料への配列決定リードの割り当てに続き、特定の試料のインサートに対応する配列に対して下流分析を実施するようにプログラムされる。

【0097】

特定の実施形態では、I/O制御516、526は、レポータープローブ24及び関連する配列ライブラリ調製技法に基づいて配列決定パラメータを自動的に選択するユーザ入力を受容するように構成され得る。例えば、カスタムプライマー又はダークサイクルが配列決定実行に組み込まれる場合、配列決定デバイスは、所望の配列パラメータに従って配列決定デバイスを動作させるために、予めプログラムされた動作命令から選択し、かつ/又はユーザ入力を受信することができる。実施形態では、ユーザ入力は、配列ライブラリ調製キットの選択、又は配列ライブラリ調製キットのバーコード若しくは識別子の読み取りであり得る。

【0098】

開示される技法の実施形態では、アプタマー検出は、配列決定デバイス500によって生成された配列決定データにおける個々のアプタマーについて一意的に特定する識別配列68の存在に基づき得る。したがって、実施形態では、配列決定デバイス500は、配列リードの分析を行って、アプタマーのパネルについて1つ以上の識別配列68を特定し得る。特定されたアプタマーに基づいて、陽性アプタマー特定の通知又は報告が生成され得る。実施形態では、通知は、ディスプレイ534上に提供されるか、又は通信回路527を介して遠隔デバイス若しくはクラウドサーバに通信される。

【0099】

本明細書で使用される場合、アプタマーは、標的分子に対する特異的結合親和性を有する天然に存在しない核酸を指し得る。標的分子とのアプタマーの結合は、標的分子を触媒的に変化させること、標的分子又は標的分子の機能的活性を修正又は変更する方式で標的分子と反応すること、標的分子に共有結合すること(自殺阻害剤におけるように)、及び標的分子と別の分子との間の反応を容易にすることをもち得る。一実施形態では、標的分子は、ワトソン/クリック塩基対合又は三重らせん結合から主に独立している機構を介してアプタマーに結合する、ポリヌクレオチド以外の三次元化学構造である。実施形態では、アプタマーは、標的分子によって結合される既知の生理学的機能を有する核酸ではない。

【0100】

アプタマーは、核酸の候補混合物から特定される核酸を含む。アプタマーのその標的に対する特異的結合親和性は、一般に、混合物又は試料中の他の非標的成分に結合するより

10

20

30

40

50

もはるかに高い程度の親和性を伴う、その標的とのアプタマー結合を指し得る。異なるアプタマーは、同じ数又は異なる数のいずれかのヌクレオチドを有し得る。アプタマーは、DNA又はRNAであり得、一本鎖、二本鎖であり得、又は二本鎖領域を含み得る。本明細書で考察されるアプタマーは、任意の診断、イメージング、ハイスループットスクリーニング、又は標的検証技法若しくは手順、あるいは限定されないが、アプタマー、オリゴヌクレオチド、抗体及びリガンドを使用することができるアッセイで、使用することができる。

【0101】

本明細書に開示されるアプタマーは、米国特許第7,855,054号及び同第7,964,356号、並びに米国特許出願公開第US/2011/0136099号及び同第US/2012/0115752号に開示されるものなど、アプタマーベースのアッセイに使用され得る。一例では、異なる標的分子に対するアプタマーのパネルが、固体支持体に付着して提供される。アプタマーの固体支持体との付着は、第1の固体支持体をアプタマーと接触させ、アプタマーに含まれる放出可能な第1のタグが、第1の固体支持体又はその一部に付着している適切な第1の捕捉剤と直接的又は間接的に会合することを可能にすることによって達成される。次いで、試験試料を調製し、試料中に存在し得るか又は存在し得ないそれらのそれぞれの標的分子に対して特異的親和性を有する固定化アプタマーと接触させる。試験試料が標的分子を含有する場合、アプタマー-標的親和性複合体が、試験試料を有する混合物中で生じる。アプタマー-標的親和性複合体に加えて、非複合体化アプタマーもまた、第1の固体支持体に付着される。次いで、固体支持体でプローブと会合しているアプタマー-標的親和性複合体及び非複合体化アプタマーを、混合物の残存物から分配し、それによって、試験試料(試料マトリックス)中の遊離標的及び全ての他の非複合体化物質、すなわち、第1の固体支持体と会合していない混合物の成分を除去する。この分配工程は、本明細書ではキャッチ1分配と呼ばれる(以下の定義を参照)。分配に続いて、アプタマー-標的親和性複合体は、任意の非複合体化アプタマーと一緒に、用いられている特定の放出可能な第1のタグに適切な方法を使用して、第1の固体支持体から放出される。

【0102】

一実施形態では、固体支持体に結合したアプタマー-標的親和性複合体は、アプタマー-標的親和性複合体の標的分子成分に第2のタグを導入する薬剤で処理される。一実施形態では、標的は、タンパク質又はペプチドであり、標的は、それをNHS-PEO4-ビオチンで処理することによってビオチン化される。標的分子に導入される第2のタグは、アプタマー捕捉タグと同じか、又は異なり得る。第2のタグが第1のタグ、又はアプタマー捕捉タグと同じである場合、第1の固体支持体上の遊離捕捉部位は、このタグ付け工程の開始前にブロックされ得る。この例示的な実施形態では、第1の固体支持体は、標的タグ付けの開始前に遊離ビオチンで洗浄される。タグ付け方法、特に、ペプチド及びタンパク質などの標的のタグ付けは、米国特許第7,855,054号に記載されている。

【0103】

分配することは、第1の固体支持体から非複合体化アプタマー及びアプタマー-標的親和性複合体を放出することによって完了する。一実施形態では、第1の放出可能タグは、第1の放出可能タグの90%を切断する条件下でUVランプを用いた照射によって切断される光切断可能部分である。他の実施形態では、放出は、第1の放出可能タグにおける選択された放出可能部分に適した方法によって達成される。アプタマー-標的親和性複合体は、アッセイにおける更なる使用のために溶解及び収集され得るか、又はアッセイの残りの工程を行うために別の固体支持体に接触され得る。

【0104】

一実施形態では、遊離アプタマーを除去するために、第2の分配が行われる(本明細書ではキャッチ2分配と称される、以下の定義を参照)。上記のように、一実施形態では、キャッチ2分配に使用される第2のタグは、アプタマー-標的親和性複合体がキャッチ0捕捉に使用された固体支持体となお接触している間に標的に添加され得る。他の実施形態

10

20

30

40

50

では、第2のタグは、キャッチ2分配の開始前のアッセイにおける別の時点で標的に添加され得る。混合物を固体支持体と接触させ、固体支持体は、好ましくは高い親和性及び特異性で標的捕捉タグ（第2のタグ）に結合することができる、その表面に付着した捕捉要素（第2の）を有する。一実施形態では、固体支持体は、マイクロタイタープレートのウェル内に含まれる磁気ビーズ（例えば、DynaBeads MyOne Streptavidin C1）であり、捕捉要素（第2の捕捉要素）はストレプトアビジンである。磁気ビーズは、混合物の分配された成分の分離のための都合がよい方法を提供する。それによって、混合物中に含有されるアプタマー-標的親和性複合体は、標的（第2の）捕捉タグと第2の固体支持体上の第2の捕捉要素との結合相互作用を介して固体支持体に結合される。次いで、アプタマー-標的親和性複合体は、例えば、グリセロールを含むがこれに限定されない有機溶媒を含む緩衝液を含む緩衝化溶液で支持体を洗浄することによって、混合物の残存物から分配される。

10

【0105】

次いで、アプタマーは、過塩素酸ナトリウム、塩化リチウム、塩化ナトリウム及び塩化マグネシウムを含むがこれらに限定されない群からのカオトロピック塩を含む緩衝液を用いて、アプタマー-標的複合体から選択的に溶離される。アプタマー/アプタマー相互作用によってキャッチ2ビーズ上に保持されたアプタマーは、この処理によって溶離されない。

【0106】

別の実施形態では、キャッチ2分配から放出されたアプタマーは、次世代配列決定技法などを介して、本明細書で考察されるような検出方法によって検出され、任意選択で定量化される。例えば、溶離されたアプタマーに結合するプローブの増幅及び/又は配列決定を介する。特定の実施形態では、検出は、検出されたアプタマーの相対濃度及び/又は推定絶対濃度を提供する検出結果を含む。検出結果は、特定のアプタマーID又はアプタマーの特定の標的について、陽性若しくは陰性の検出結果又は相対濃度若しくは推定濃度の通知又は出力を含み得る。

20

【0107】

本開示の特定の実施形態では、プローブセット20の開示されるプローブは、保存プライマー領域、例えば、第1の保存プライマー領域及び第2の保存プライマー領域などの1つ以上の保存領域を含むことができる。保存領域は、保存領域が、プローブ間で比較したときに同一又は類似のヌクレオチド配列を有するように、プローブセット20のうちの少なくともいくつかの他のプローブ間で保存されている。例えば、所与の第2のプローブ24について、全てのプローブ24は、同じ第1の保存プライマー領域及び第2の保存プライマー領域を有し得る。この手段で、第1の保存プライマー領域及び第2の保存プライマー領域に基づくプライマーは、任意の捕捉されたプローブ24を増幅するために使用することができる。

30

【0108】

本明細書で考察される1つ以上のプローブは、1つ以上の特異的アプタマーを特定するために使用することができる、1つ以上のヌクレオチド配列を含むことができる識別配列を含み得る。識別配列は、人工配列であることができる。識別配列は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含むことができる。いくつかの実施形態では、識別配列は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100又はそれ以上の連続したヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、プローブにおける識別配列の少なくとも一部が異なる。

40

【0109】

本明細書で考察される1つ以上のプローブは、親和性タグを含み得る。親和性タグは、様々な適用、例えば、ハイブリダイゼーションタグにハイブリダイズした標的核酸のバルク分離に有用であり得る。本明細書で使用される場合、「親和性タグ」という用語及び文法的な同義語は、多成分複合体の成分を指し得るが、多成分複合体の成分は、互いに特異

50

的に相互作用するか、又は特異的に結合する。例えば、親和性タグは、それぞれ、ストレプトアビジン又はニッケルに結合し得るビオチン又はポリ-Hisを含み得る。多成分親和性タグ複合体の他の例は、例えば、米国特許出願公開第2012/0208705号、米国特許出願公開第2012/0208724号、及び国際特許出願公開第2012/061832号に列挙されており、これらの各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0110】

開示される実施形態は、異なるプライマー及びプローブを提供する。開示される実施形態のプローブ及び/又はプライマーは、標的配列と本発明のプローブとのハイブリダイゼーションが起こるように、標的配列（試料の標的配列又は他のプローブ配列のいずれか）に対して相補的であるように設計される。以下に概説されるように、この相補性は完全である必要はなく、標的配列と本発明の一本鎖核酸との間のハイブリダイゼーションに干渉する任意の数の塩基対ミスマッチが存在し得る。しかしながら、変異の数が非常に多くて、最も低いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でもハイブリダイゼーションが起こり得ない場合、その配列は相補的標的配列ではない。したがって、本明細書における「実質的に相補的」とは、プローブが、通常の反応条件下でハイブリダイズするために標的配列に対して十分に相補的であることを意味する。

【0111】

高度、中度及び低度のストリンジェンシ条件を含む様々なハイブリダイゼーション条件が、本発明で使用され得る。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般に、ストリンジェントな条件は、定義されたイオン強度及びpHで特定の配列における熱融点（ T_m ）よりも低い約5～10であるように選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする（標的配列が過剰に存在する場合、 T_m で、プローブの50%が平衡状態で占有される）温度である（定義されたイオン強度、pH及び核酸濃度のもと）。ストリンジェントな条件は、塩濃度が、pH7.0～8.3で約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01～1.0Mのナトリウムイオン濃度（又は他の塩）であり、温度が、短いプローブ（例えば10～50ヌクレオチド）では少なくとも約30であり、長いプローブ（例えば50ヌクレオチド超）では少なくとも約60である。

【0112】

特定の実施形態では、プローブ接触工程は、標的の存在下でのみハイブリダイゼーション複合体の形成を可能にするストリンジェンシ条件下で実行され得る。ストリンジェンシは、温度、ホルムアミド濃度、塩濃度、カオトロピック塩濃度、pH、有機溶媒濃度などを含むがこれらに限定されない熱力学的変数である工程パラメータを変化させることによって制御することができる。プライマー核酸のサイズは、当業者によって理解されるように、一般に5～500ヌクレオチドの長さで変化し得る。プライマーは、使用及び増幅技法に応じて、10～100、15～50、及び10～35であり得る。

【0113】

開示される技法は、アダプターベースのアッセイの溶離液の分析などの1つ以上の適用におけるダイナミックレンジ圧縮に関する。ダイナミックレンジ圧縮は、下流配列決定のためにレポータープローブにアダプターをオリゴヌクレオチド化し得る配列決定ライブラリ調製の一部であることができる1つ以上の増幅工程を含み得る。アダプターは、任意の他の好適な方式で標的ポリヌクレオチドに付着し得る。いくつかの実施形態では、アダプターは、ユニバーサルプライマー配列を有する標的ポリヌクレオチドへのアダプターの一部のライゲーションを伴う、2工程プロセスなどの多工程プロセスにおいて導入される。第2の工程は、付着したユニバーサルプライマー配列に相補的な配列を有する3'末端と、アダプターの他の配列を含有する5'末端と、を含むプライマーを使用する、例えば、PCR増幅による伸長を含む。例として、そのような伸長は、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第8,053,192号に記載されているように実行され得る。追加の伸長を実行して、得られた以前の伸長されたポリヌクレオチドの5'末端に追加の配

10

20

30

40

50

列を提供してもよい。

【0114】

いくつかの実施形態では、アダプターはレポータープローブにライゲートされ得る。任意の好適なアダプターは、本明細書で考察されたものなどの任意の好適なプロセスを介して、レポータープローブなど、標的ポリヌクレオチドに付着してもよい。アダプターは、ライブラリ特異的インデックスタグ配列（例えば、i5、i7）を含むことができる。インデックスタグ配列は、試料が配列決定のために固定化される前に、各ライブラリからの標的ポリヌクレオチドに付着し得る。インデックスタグは、それ自体が標的ポリヌクレオチドの一部によって形成されていないが、増幅のための鋳型の一部になる。インデックスタグは、鋳型調製工程の一部として標的に付加されるヌクレオチドの合成配列であり得る。したがって、ライブラリ特異的インデックスタグは、特定のライブラリの標的分子の各々に付着した核酸配列タグであり、その存在は、標的分子が単離されたライブラリを示すか、又は識別するために使用される。好ましくは、インデックスタグ配列は、20ヌクレオチド長以下である。例えば、インデックスタグ配列は、1～10ヌクレオチド又は4～6ヌクレオチド長であってもよい。4つのヌクレオチドインデックスタグは、同一アレイで256個の試料を多重化する可能性をもたらし、6つの塩基インデックスタグは、同一アレイでの4,096個の試料の処理を可能にする。アダプターは、多重化可能性を増加させ得るように、2つ以上のインデックスタグを含有し得る。

10

【0115】

アダプターは、インデックスタグ配列に加えて、任意の他の好適な配列を含んでもよい。例えば、アダプターは、典型的にはアダプターの5'又は3'末端に位置するユニバーサル伸長プライマー配列及び配列決定のために得られるポリヌクレオチドを含んでもよい。ユニバーサル伸長プライマー配列は、固体基質の表面に結合した相補的プライマーにハイブリダイズし得る。相補的なプライマーは、ポリメラーゼ又は他の好適な酵素がハイブリダイズしたライブラリポリヌクレオチドを鋳型として使用して配列を伸長して、固体表面に結合しているライブラリポリヌクレオチドの逆鎖をもたらすために、ヌクレオチドを付加し得る遊離3'末端を含む。そのような伸長は、配列決定実行又はクラスタ増幅の一部であり得る。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、アダプターは、1つ以上のユニバーサル配列決定プライマー配列を含む。ユニバーサル配列決定プライマー配列は、配列決定プライマーに結合して、インデックスタグ配列、標的配列、又はインデックスタグ配列及び標的配列の配列決定を可能にし得る。いくつかの実施形態では、開示されるレポータープローブ、例えば、レポータープローブ24は、「配列決定アダプター」又は「配列決定アダプター部位」、すなわち、プライマーにハイブリダイズすることができる1つ以上の部位を含む領域を含み得る。いくつかの実施形態では、配列は、増幅、配列決定などに有用な少なくとも第1のプライマー部位を含むことができる。

30

【0117】

アダプター組み込み後、開示されるレポータープローブが配列決定され得る。一例では、配列決定は、Illuminaのシーケンシング・バイ・シンセシス及び可逆的ターミネータベースの配列決定化学を介し得る。Illuminaの配列決定技術は、断片化されたゲノムDNAの、オリゴヌクレオチドアンカーが結合されている平面的な任意選択で光学的に透明な表面への付着に依存する。鋳型DNAを末端修復して、5'リン酸化された平滑末端を生成し、クレノウ断片のポリメラーゼ活性を使用して、単一のA塩基を、平滑リン酸化DNA断片の3'末端に加える。この付加は、オリゴヌクレオチドアダプターへのライゲーションのためのDNA断片を調製し、これは、ライゲーション効率を高めるために、それらの3'末端に単一のT塩基のオーバーハングを有する。アダプターオリゴヌクレオチドは、フローセルアンカーに対して相補的である。制限希釈条件下で、アダプター修飾した単鎖鋳型DNAがフローセルに添加されて、アンカーへのハイブリダイゼーションによって固定される。付着したDNA断片を伸長させ、ブリッジを増幅して、数億

40

50

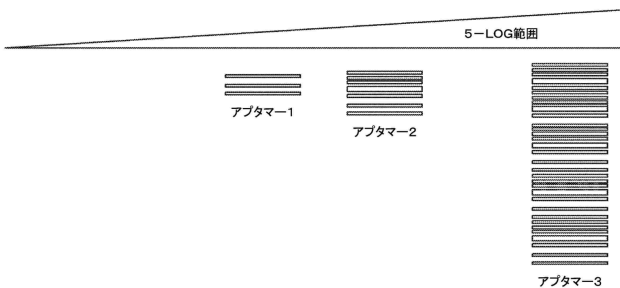
個のクラスタを有する超高密度配列決定フローセルを作製し、各々が同じ鋳型の約 1,000 コピーを含有する。一実施形態では、ランダムに断片化されたゲノム DNA は、クラスタ増幅を受ける前に PCR を使用して増幅される。代替的に、無増幅ゲノムライブラリ調製が使用され、ランダムに断片化されたゲノム DNA は、クラスタ増幅のみを使用して濃縮される。鋳型は、除去可能な蛍光色素を有する可逆的ターミネータを用いる、頑強な 4 色 DNA シーケンシング・バイ・シンスェシス技術を使用して、配列決定される。高感度蛍光検出は、レーザ励起及び内部全反射光学素子を使用して達成される。配列は、特別に開発されたデータ分析パイプラインソフトウェアを使用して、真理値表又はアダプター同一性と識別配列との間の保存された相関に対してアラインメントされる。

【 0 1 1 8 】

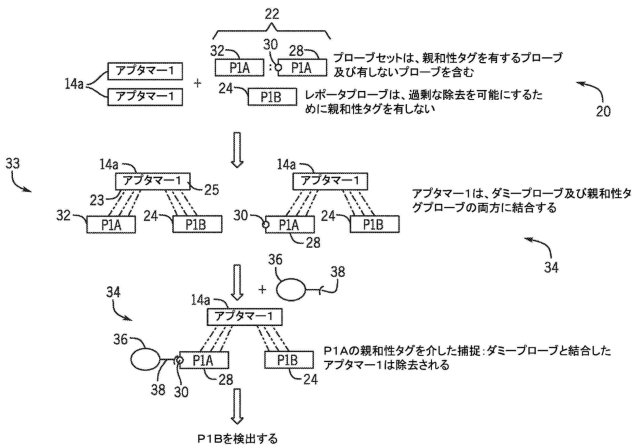
本書面による説明は、実施例を使用し、任意のデバイス又はシステムを作製及び使用し、任意の組み込まれた方法を実行することを含めて、あらゆる当業者が開示される実施形態を実践することを可能にする。特許性のある範囲は、特許請求の範囲によって定義され、当業者が想到する他の実施例を含んでもよい。そのような他の実施例は、これらが特許請求の範囲内の文字通りの言葉とは異なる構造要素を含む場合、又はこれらが、特許請求の範囲内の文字通りの言葉とのごくわずかな違いを有する等価の構造要素を含む場合、特許請求の範囲内にあることを意図する。

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

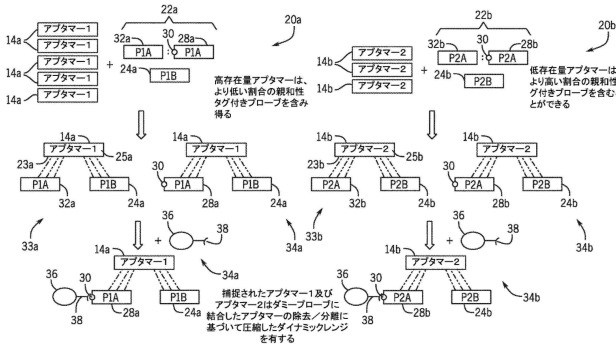
20

30

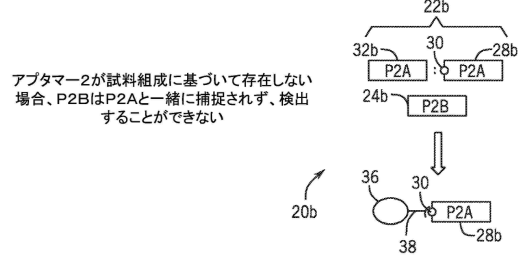
40

50

【 図 3 】

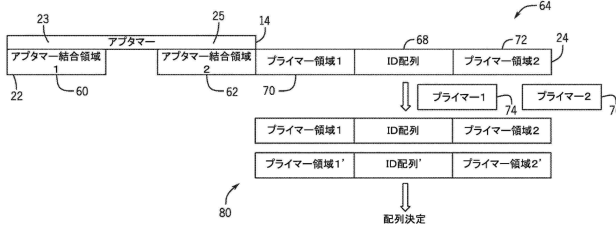


【 図 4 】

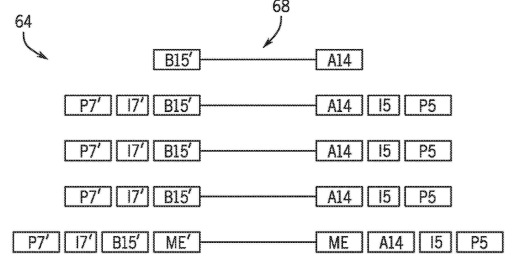


10

【 図 5 】

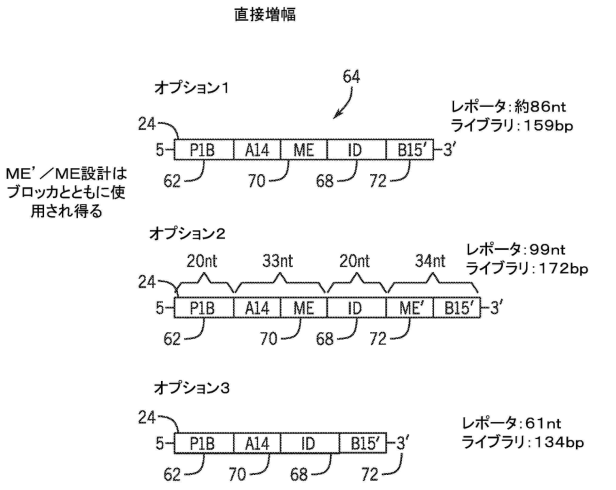


【 図 6 】

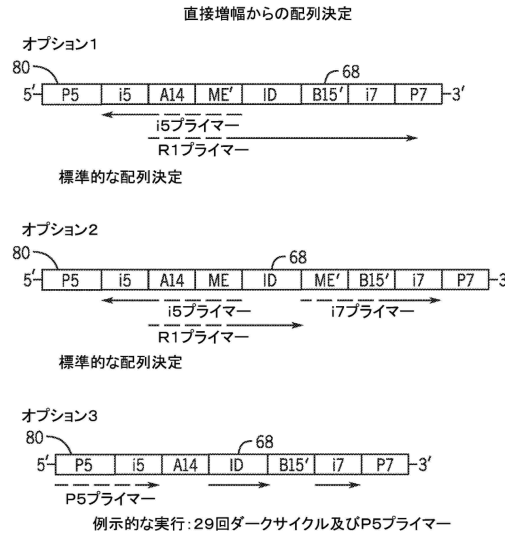


20

【 図 7 】



【 図 8 A 】

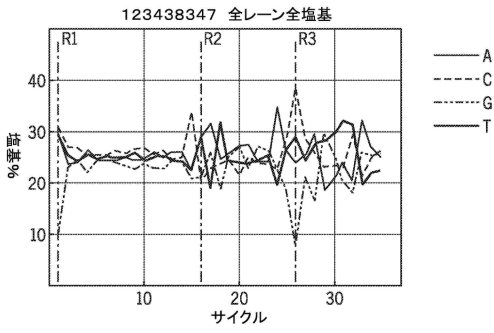


30

40

50

【 図 8 B 】

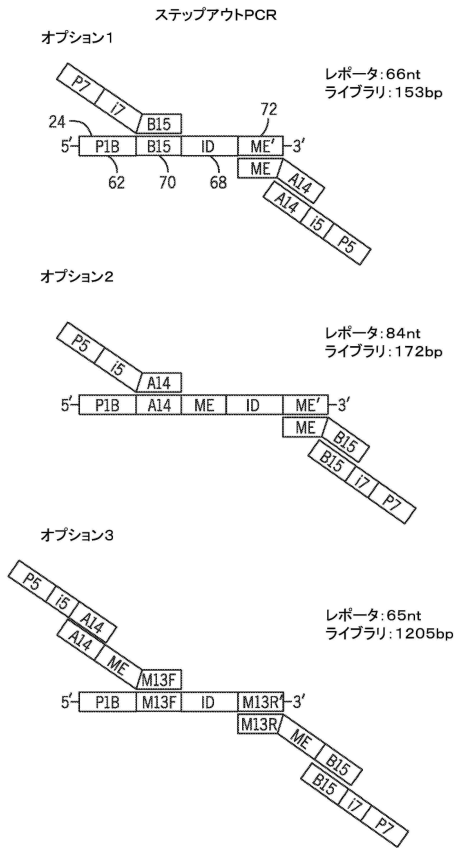


【 図 8 C 】

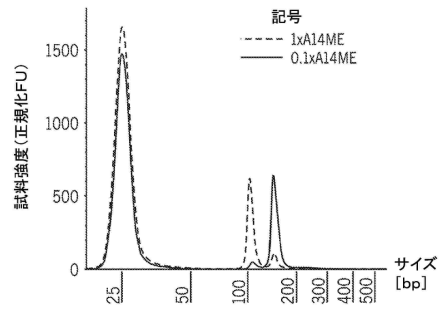
試料	PF%	収率(G)	ID		i7		i5	
			Q30%	C1強度	Q30%	C1強度	Q30%	C1強度
24プレックス 90pM	63.45±1.95	17.14	93.27	129±43	90.54	124±6	91.49	179±7
24プレックス 100pM	64.13±2.26	17.41	93.18	164±25	90.36	134±9	91.54	187±8
192プレックス 90pM	62.26±2.68	16.94	92.93	180±13	88.54	136±9	90.1	189±9

10

【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



20

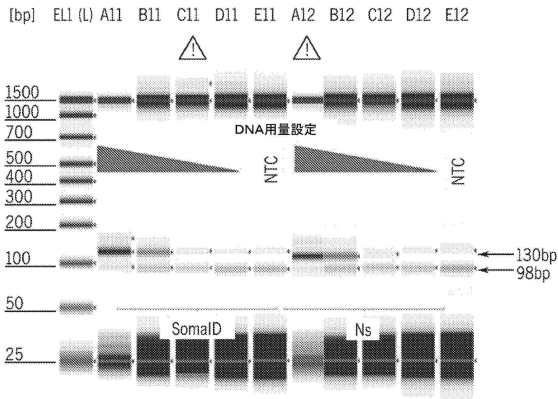
30

40

50

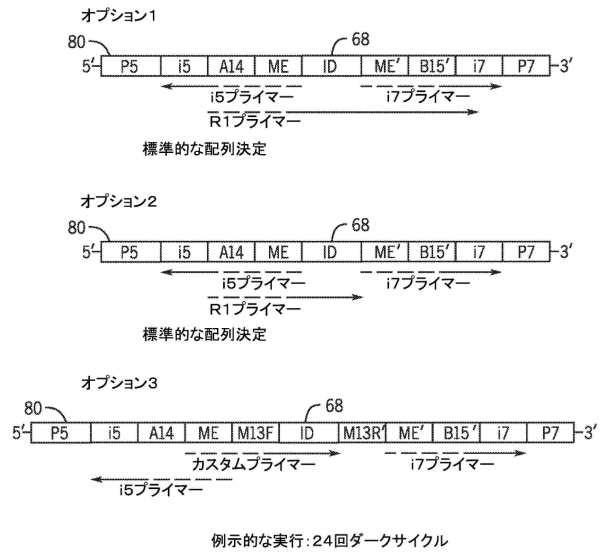
【 図 9 C 】

結果: テープステーション



【 図 1 0 】

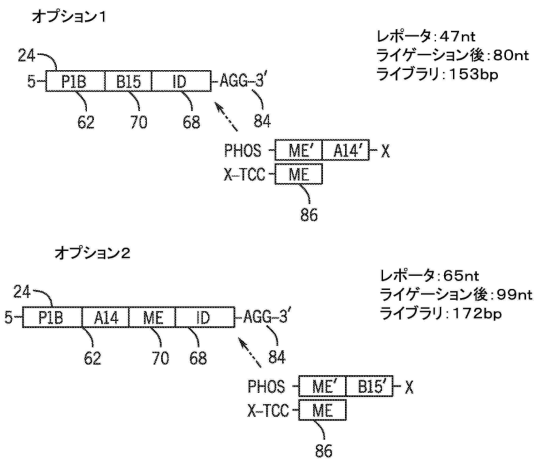
ステップアワーPCRからの配列決定



10

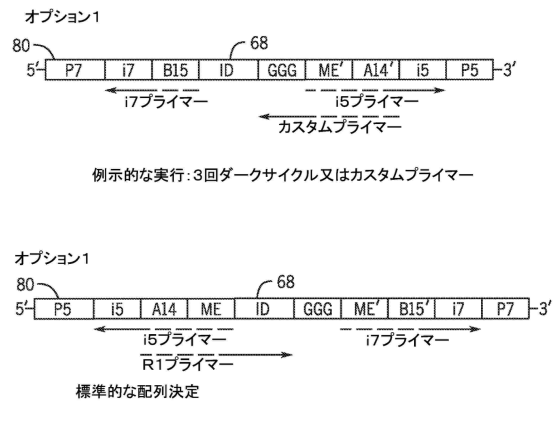
【 図 1 1 】

PCRへのライゲーション



【 図 1 2 】

ライゲーションからPCRまでの配列決定



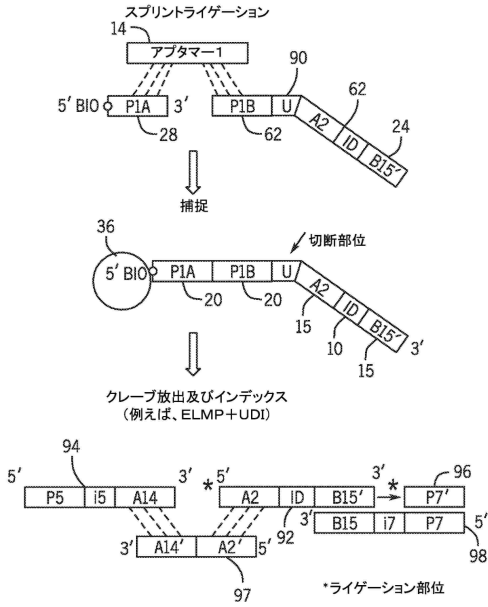
20

30

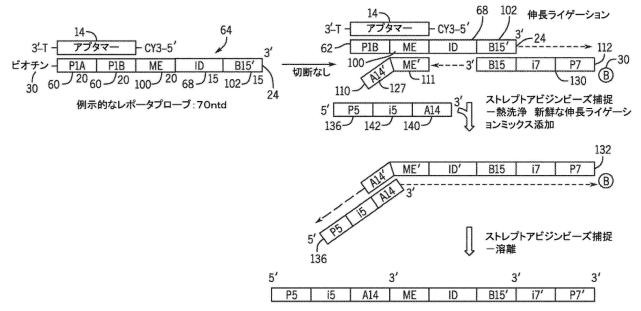
40

50

【 図 1 3 】

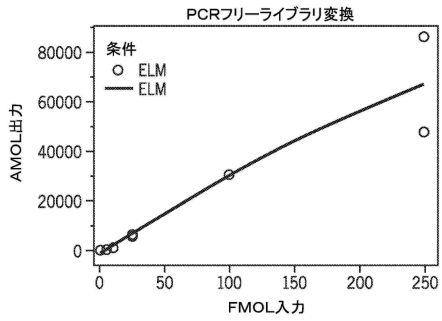


【 図 1 4 A 】

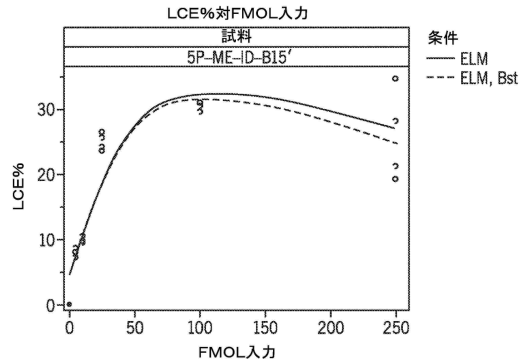


10

【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】



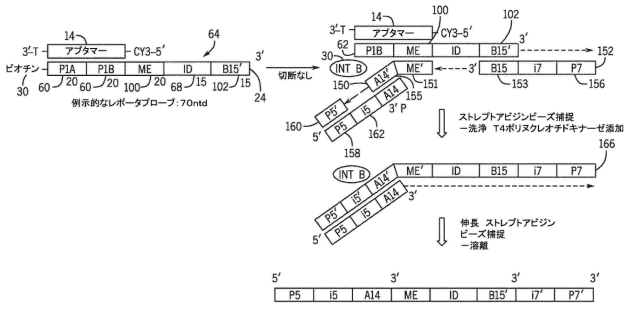
20

30

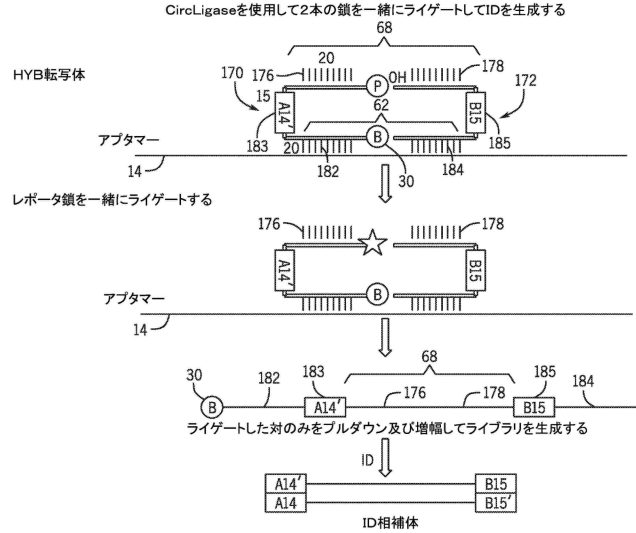
40

50

【 図 15 】

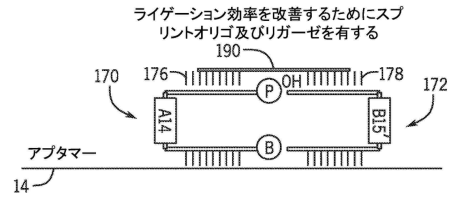


【 図 16 】

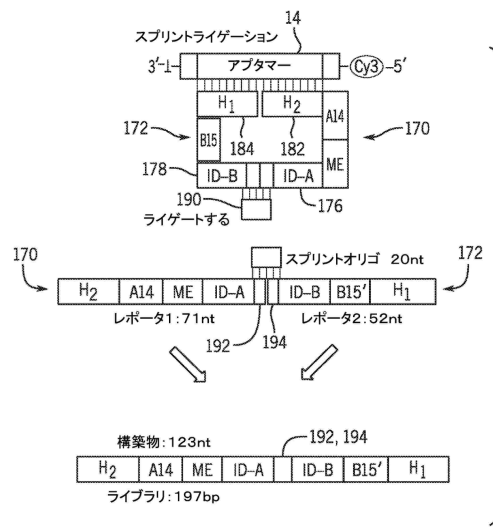


10

【 図 17 A 】



【 図 17 B 】



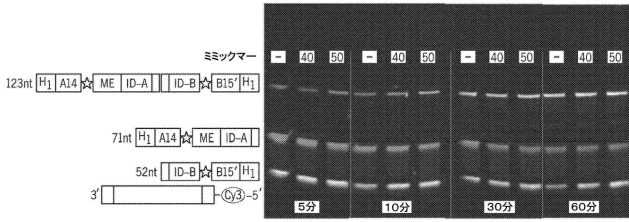
20

30

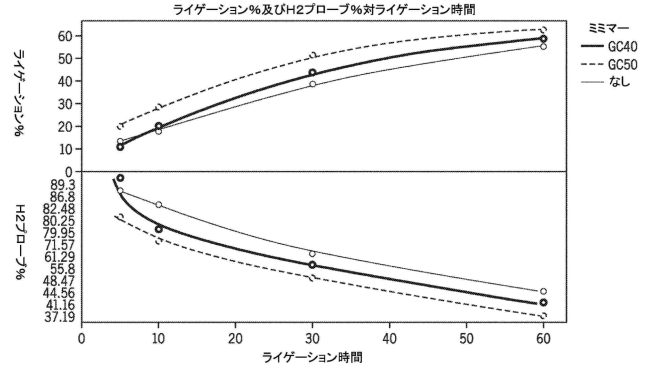
40

50

【図 17 C】

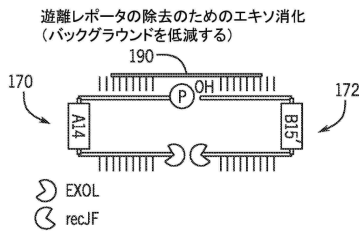


【図 17 D】

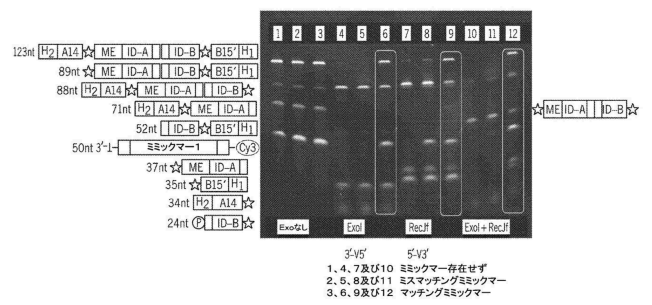


10

【図 18 A】

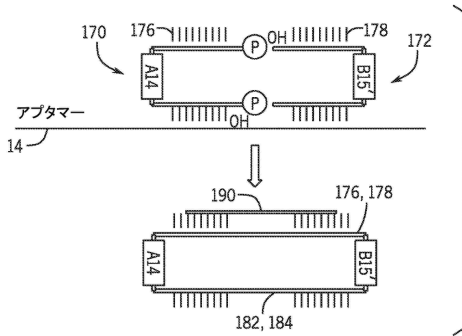


【図 18 B】

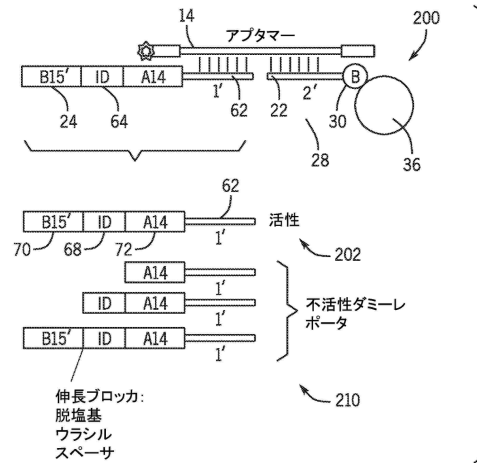


20

【図 19】



【図 20 A】

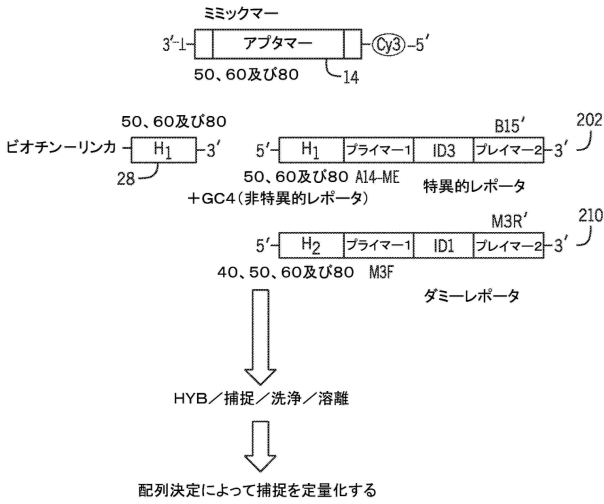


30

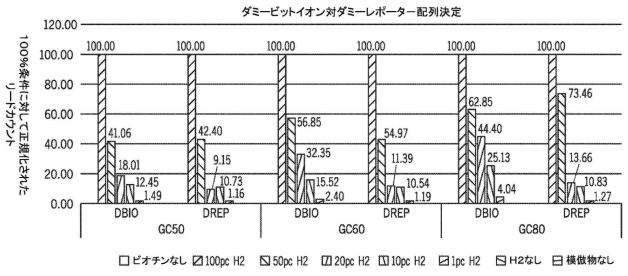
40

50

【 図 2 0 B 】

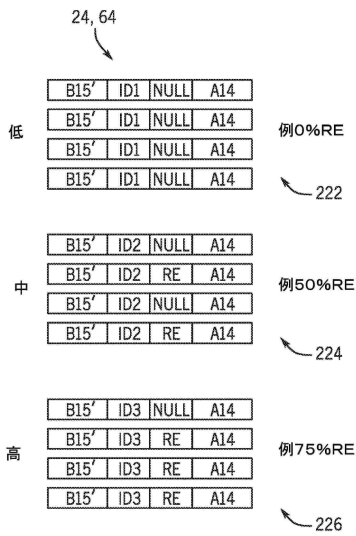


【 図 2 0 C 】

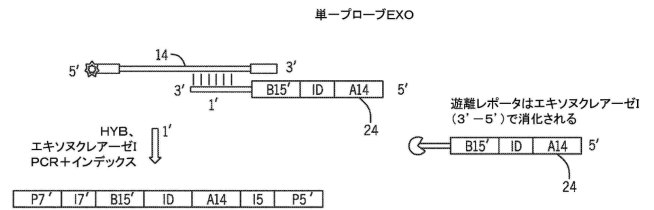


10

【 図 2 1 】



【 図 2 2 A 】



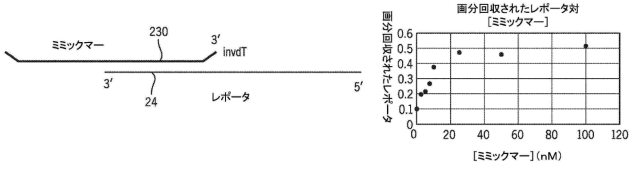
20

30

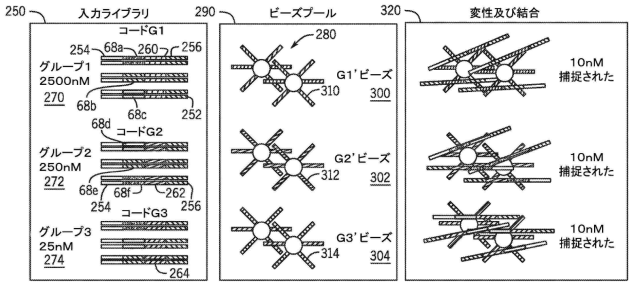
40

50

【図 2 2 B】

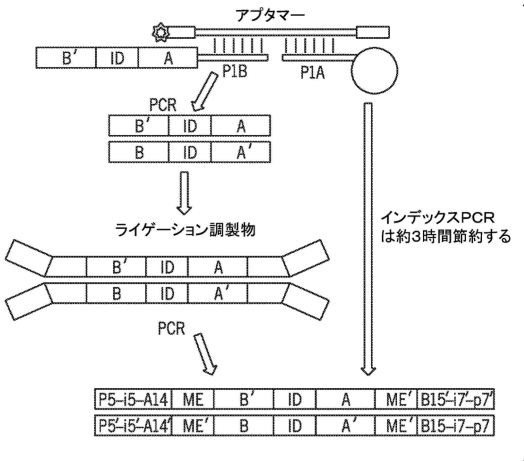


【図 2 3】

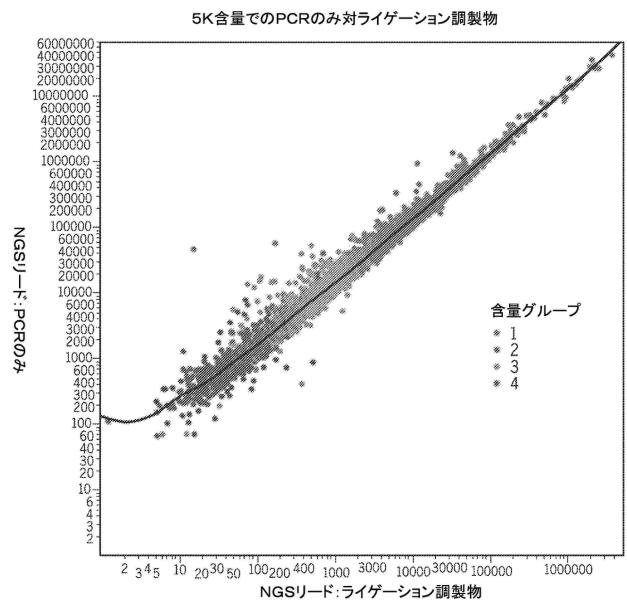


10

【図 2 4】



【図 2 5】



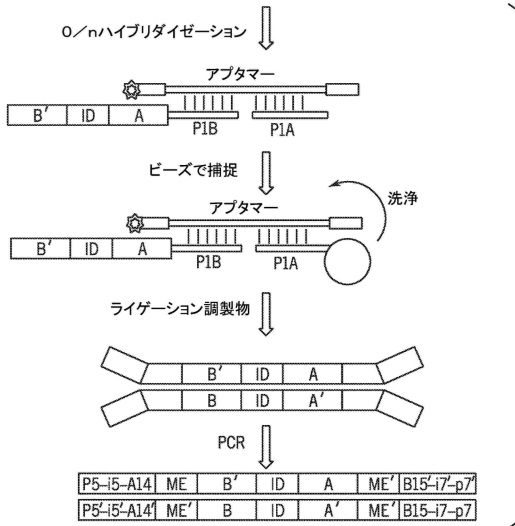
20

30

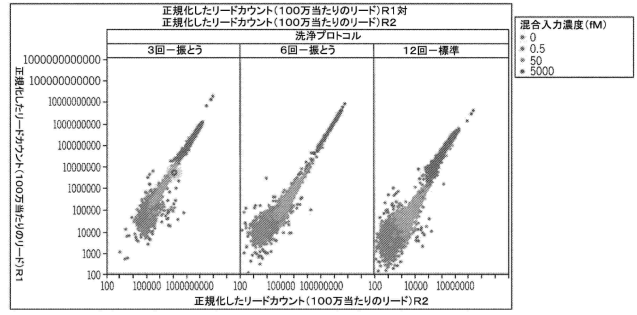
40

50

【 図 2 6 】

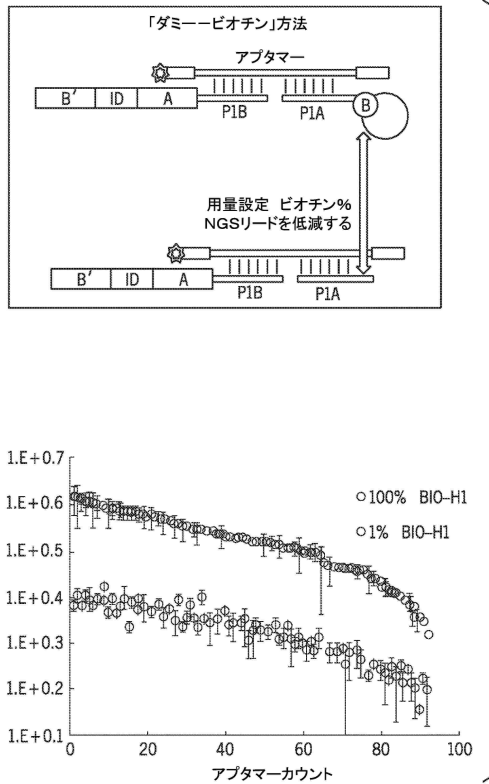


【 図 2 7 】

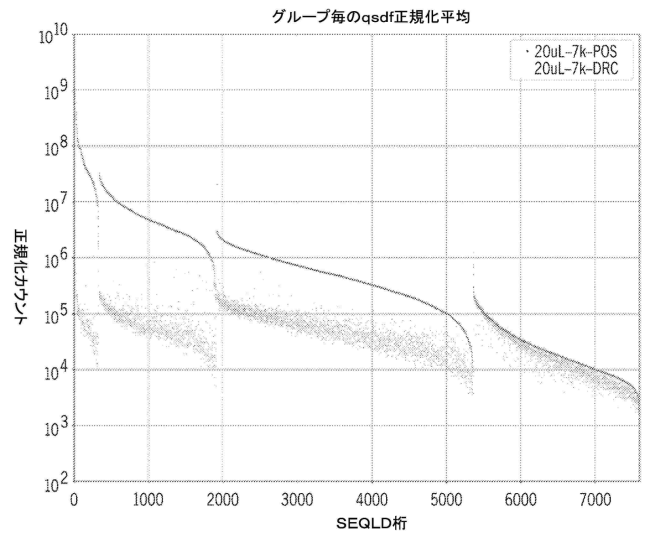


10

【 図 2 8 A 】



【 図 2 8 B 】



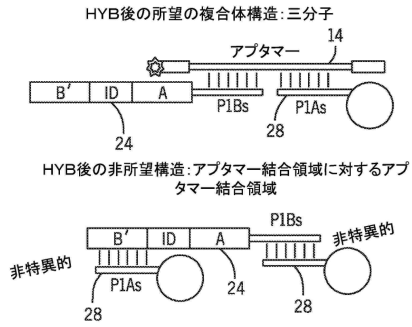
20

30

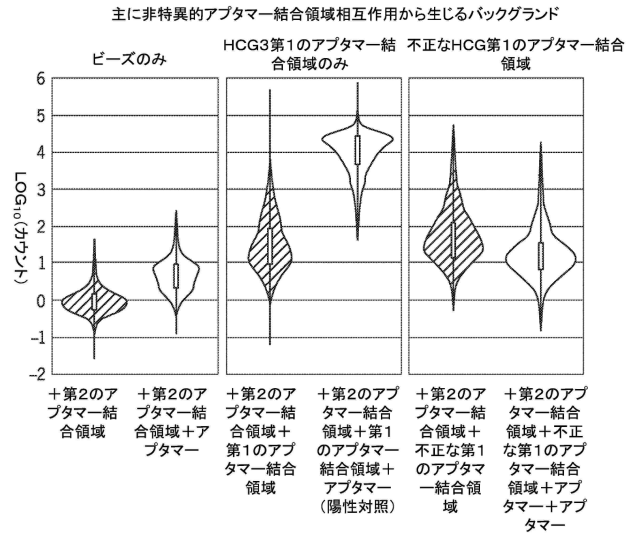
40

50

【 図 2 9 】

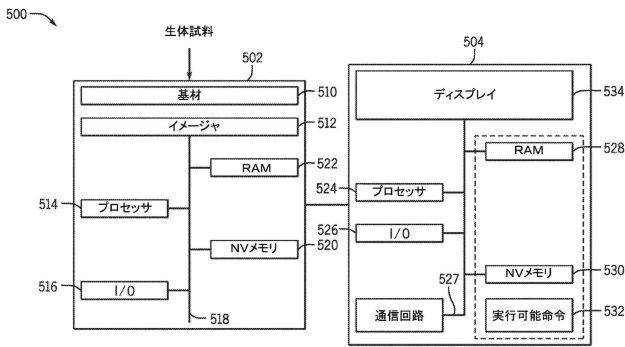


【 図 3 0 】



10

【 図 3 1 】



20

【 配列表 】

2025512974000001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2023/017778
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12Q1/6816 C12Q1/6869 C12Q1/6876		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/042206 A1 (SCHNEIDER DANIEL J [US] ET AL) 12 February 2009 (2009-02-12) see whole doc. esp. claims and Figures -----	1-65
X	WO 2017/072330 A2 (QUERDENKER APS [DK]) 4 May 2017 (2017-05-04) see whole doc. esp. claims and examples -----	1-65
X	WO 2012/158967 A1 (DXTERITY DIAGNOSTICS INC [US]; TERBRUEGGEN ROBERT [US] ET AL.) 22 November 2012 (2012-11-22) see whole doc., esp. claims and Figure 1 -----	1-65
A	WO 2013/138510 A1 (PATEL ABHIJIT AJIT [US]) 19 September 2013 (2013-09-19) see whole doc. esp. Figures ----- -/--	1-65
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 July 2023		Date of mailing of the international search report 28/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mueller, Frank

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/017778

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 02/31206 A2 (RAGLAND WILLIAM L [HR]; RENATA NOVAK [HR]) 18 April 2002 (2002-04-18) see whole doc. esp. claims, Figure 1 and p. 15, 1.20 ff</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-65

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/017778

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

10

a. forming part of the international application as filed.

b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).

accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

The sequence listing on the date of filing was not WIPO Standard ST.26 compliant, therefore not used for search purposes.

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/017778

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009042206 A1	12-02-2009	NONE	
WO 2017072330 A2	04-05-2017	DK 3368666 T3	14-12-2020
		EP 3368666 A2	05-09-2018
		US 2019144918 A1	16-05-2019
		WO 2017072330 A2	04-05-2017
WO 2012158967 A1	22-11-2012	AU 2012255121 A1	16-01-2014
		CA 2836577 A1	22-11-2012
		CN 103827317 A	28-05-2014
		CN 106434871 A	22-02-2017
		DK 2710145 T3	22-02-2016
		EP 2710145 A1	26-03-2014
		HK 1198548 A1	15-05-2015
		JP 2014513557 A	05-06-2014
		KR 20140064735 A	28-05-2014
		US 2013005594 A1	03-01-2013
		US 2014171338 A1	19-06-2014
		US 2018030520 A1	01-02-2018
		WO 2012158967 A1	22-11-2012
WO 2013138510 A1	19-09-2013	CA 2867293 A1	19-09-2013
		EP 2825675 A1	21-01-2015
		US 2015087535 A1	26-03-2015
		US 2018216173 A1	02-08-2018
		US 2021254148 A1	19-08-2021
		WO 2013138510 A1	19-09-2013
WO 0231206 A2	18-04-2002	AU 1312902 A	22-04-2002
		WO 0231206 A2	18-04-2002

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	Z
C 1 2 N 9/22 (2006.01)	C 1 2 N 9/22	
C 1 2 N 9/00 (2006.01)	C 1 2 N 9/00	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/115	Z
(32)優先日 令和4年5月31日(2022.5.31)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 63/385,544		
(32)優先日 令和4年11月30日(2022.11.30)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(81)指定国・地域 AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW)		
ルミナ・センター		
(72)発明者 カルロ・ランディーズ - ヒンチリフ アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 2 1 2 2・サン・ディエゴ・イルミナ・ウェイ・5 2 0 0		
(72)発明者 アンドリュウ・プライス アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 2 1 2 2・サン・ディエゴ・イルミナ・ウェイ・5 2 0 0		
(72)発明者 ニール・アンソニー・ゴームリー イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 1 6 D F・ケンブリッジ・グレート・アビントン・グラント・パーク・1 9・イルミナ・センター		
(72)発明者 アンドレア・マンゾ アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 2 1 2 2・サン・ディエゴ・イルミナ・ウェイ・5 2 0 0		
(72)発明者 ニティヤ・スブラマニアン イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 1 6 D F・ケンブリッジ・グレート・アビントン・グラント・パーク・1 9・イルミナ・センター		
(72)発明者 フィオナ・ケイパー アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 2 1 2 2・サン・ディエゴ・イルミナ・ウェイ・5 2 0 0		
(72)発明者 デイヴィッド・ジョーンズ イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 1 6 D F・ケンブリッジ・グレート・アビントン・グラント・パーク・1 9・イルミナ・センター		
(72)発明者 スティーブン・ノーバーグ アメリカ合衆国・カリフォルニア・9 2 1 2 2・サン・ディエゴ・イルミナ・ウェイ・5 2 0 0		
F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02		