

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6716465号
(P6716465)

(45) 発行日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(24) 登録日 令和2年6月12日(2020.6.12)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/11 (2006.01)
 C 40 B 40/06 (2006.01)
 C 12 P 19/34 (2006.01)
 C 12 Q 1/6837 (2018.01)

C 12 N 15/11
 C 40 B 40/06
 C 12 P 19/34
 C 12 Q 1/6837

Z
 A
 Z

請求項の数 6 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2016-564984 (P2016-564984)
 (86) (22) 出願日 平成27年5月8日(2015.5.8)
 (65) 公表番号 特表2017-514478 (P2017-514478A)
 (43) 公表日 平成29年6月8日(2017.6.8)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2015/029986
 (87) 國際公開番号 WO2015/172080
 (87) 國際公開日 平成27年11月12日(2015.11.12)
 審査請求日 平成30年4月17日(2018.4.17)
 (31) 優先権主張番号 61/990,598
 (32) 優先日 平成26年5月8日(2014.5.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 62/079,495
 (32) 優先日 平成26年11月13日(2014.11.13)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73) 特許権者 511237575
 フリューダイム・コーポレイション
 アメリカ合衆国・カリフォルニア・940
 80・サウス・サン・フランシスコ・ショ
 アライン・コート・7000・スイート・
 100
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 100181272
 弁理士 神 紘一郎
 (74) 代理人 100193437
 弁理士 高木 義和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】集積した単一細胞の配列決定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

タグ付き核酸配列を形成する方法であって、

(i) 標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定するステップであって、

(a) 固体支持体にRNA分子を捕捉することにより捕捉RNAを形成するステップと；

(b) 前記捕捉RNAを逆転写し、その後、捕捉RNAを取り除くことにより、前記固体支持体に固定された標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；
 を含み、これにより、固定化標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；

(ii) 前記固定化標的ポリヌクレオチドに認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド-標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(iii) 前記認識オリゴヌクレオチド-標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み標的ポリヌクレオチドを含む、切断済み認識オリゴヌクレオチド-切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(iv) 前記切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、タグ付き核酸配列を形成するステップであって、前記アダプター核酸配列は、前記固体支持体に共有結合的に結合する第1アンカーポリヌクレオチドの第1増幅核酸配列相補体を含むステップと；
 を含む、方法。

10

20

【請求項 2】

前記固体支持体はビーズ構造を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 増幅核酸配列相補体を、 P C R 増幅を可能とする条件下で前記第 1 増幅核酸配列にハイブリダイズすることにより、前記タグ付き核酸配列を増幅する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成する方法であって、

(i) 複数の不均一な標的ポリヌクレオチドを、請求項 1 に記載のステップ(a)および(b)を行うことにより固体支持体に固定し、複数の不均一な固定化標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；

(i i) 前記不均一な固定化標的ポリヌクレオチドに複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、複数の認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断剤で切断することにより、複数の切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；

(i v) 前記複数の切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成するステップであって、前記アダプター核酸配列は、前記固体支持体に共有結合的に結合する第 1 アンカーポリヌクレオチドの第 1 増幅核酸配列相補体を含むステップと；
を含む、方法。

【請求項 5】

複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドを含む認識オリゴヌクレオチドのライプラリであって、該不均一な認識オリゴヌクレオチドはそれぞれ、請求項 1 に記載の方法における使用のための縮重核酸配列が隣接する制限酵素認識配列を含む、ライプラリ。

【請求項 6】

c D N A 配列を増幅する方法であって、

(i) 单離細胞から抽出した R N A 分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列を形成するステップと；

(i i) 前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化 R N A : D N A ハイブリッドを形成するステップと；

(i i i) 前記リボ核酸配列を前記 R N A : D N A ハイブリッドから取り除くことにより、固定化 c D N A 配列を形成するステップと；

(i v) 前記固定化 c D N A 配列に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド : D N A ハイブリッドを形成するステップと；

(v) 前記認識オリゴヌクレオチド : c D N A ハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド : 切断済み c D N A ハイブリッドを形成するステップと；

(v i) 前記切断済み c D N A にアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、タグ付き c D N A 配列を形成するステップであって、前記アダプター核酸配列は、前記固体支持体に共有結合的に結合する第 1 アンカーポリヌクレオチドの第 1 増幅核酸配列相補体を含むステップと；

(v i i) 前記 c D N A 配列をクローン増幅により増幅するステップと；
を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

〔関連出願〕

10

20

30

40

50

本出願は、2014年5月8日出願の米国仮特許出願第61/990,598号および2014年11月13日出願の同第62/079,495号の優先権を主張する。前記2つの優先権出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【0002】

本発明は、核酸アッセイに関し、本出願は遺伝学、医学、および農学の分野に属する。本明細書で提供する方法および組成物は、不均一な細胞集団における核酸配列決定および遺伝子発現分析に有用である。

【背景技術】

【0003】

10

核酸配列決定は、所定の核酸断片のヌクレオチドの並び順を求めるプロセスである。元のチェインターミネーション配列決定法は、修飾ヌクレオチド基質を用いたDNA合成反応の配列特異的な停止を利用する。ゲノムまたは発現ライプラリといった生体試料の核酸配列を求めるスピードを改善し、そのコストを低減するため、新しい配列決定技法の開発が進められている。このような方法を商業的に適用して、例えば、遺伝性または伝染性の疾患を特定および診断することが可能であり、そして、その治療法を開発できる可能性がある。

【発明の概要】

【0004】

20

本開示は、タグ付き核酸配列を形成する方法を提供する。標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定し；認識オリゴヌクレオチドをそれにハイブリダイズし；認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断し；そして、切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸をライゲーションすることにより、タグ付き核酸配列を形成する。タグ付き一本鎖cDNAを形成する方法；複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成する方法；認識オリゴヌクレオチドのライプラリ；および、固体支持体に固定したcDNA配列を增幅する方法も提供する。これらの方法および生成物は、集積した単一細胞の配列決定に、単独で、または、組み合わせて用いることが可能であり、そして、マイクロ流体装置またはマイクロ流体デバイスでの使用に適応させることができる。

【0005】

本発明に記載のタグ付き核酸配列を形成する方法は、(i) 標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定することにより、固定化標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；(ii) 前記固定化標的ポリヌクレオチドに認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；(iii) 前記認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み標的ポリヌクレオチドを含む切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；(iv) 前記切断物にアダプター核酸配列をライゲーションするステップと、を含み得る。

【0006】

30

複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成する方法も提供する。これは、(i) 複数の不均一な標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定することにより、複数の不均一な固定化標的ポリヌクレオチドを形成するステップと；(ii) 前記不均一な固定化標的ポリヌクレオチドに複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、複数の認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；(iii) 前記認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを切断剤で切断することにより、複数の切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成するステップと；(iv) 前記複数の切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成するステップと、を含み得る。

【0007】

タグ付き一本鎖cDNAを形成する方法も提供する。これは、(i) 標的cDNAを固

40

50

体支持体に固定することにより、固定化標的 c DNA を形成するステップと；(i i) 前記固定化標的 c DNA に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - c DNA ハイブリッドを形成するステップと；(i i i) 前記認識オリゴヌクレオチド - c DNA ハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み c DNA ハイブリッドを形成するステップと；(i v) 前記切断済み c DNA にアダプター核酸をライゲーションすることにより、タグ付き一本鎖 c DNA を形成するステップと、を含み得る。

【 0 0 0 8 】

本発明はさらに、タグ付き核酸配列を形成する方法を提供する。これは、(i) 標的リボ核酸を固体支持体に固定することにより、固定化標的リボ核酸(RNA)を形成するステップと；(i i) 相補的 DNA (c DNA)鎖を合成することにより、RNA : c DNA ハイブリッドを形成するステップと；(i i i) 前記 RNA : c DNA ハイブリッドを RNA : c DNA 切断剤で切断して切断済み RNA : c DNA ハイブリッドを生成するステップであって、該 c DNA はライゲーション可能な末端を含む、ステップと；(i v) 前記ライゲーション可能な末端にアダプターオリゴヌクレオチドをライゲーションするステップと；(v) 前記リボ核酸配列を前記 RNA : c DNA ハイブリッドから取り除くことにより、タグ付き核酸配列を形成するステップと、を含み得る。

【 0 0 0 9 】

複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成する方法も提供する。これは、(i) 複数の不均一な標的リボ核酸配列を固体支持体に固定することにより、複数の不均一な固定化標的リボ核酸配列を形成するステップと；(i i) 前記不均一な固定化標的リボ核酸配列を逆転写することにより、複数の不均一な RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；(i i i) 前記複数の不均一な RNA : DNA ハイブリッドを RNA : DNA 切断剤で切断することにより、複数の切断済み RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；(i v) 前記複数の切断済み RNA : DNA ハイブリッドにアダプター核酸配列をライゲーションするステップと；(v) 前記リボ核酸配列を前記切断済み RNA : DNA ハイブリッドから取り除くことにより、複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成するステップと、を含み得る。

【 0 0 1 0 】

このような方法を用いて、複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドを含む認識オリゴヌクレオチドライブリーリを調製することが可能であり、該複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドはそれぞれ、縮重核酸配列が隣接する制限酵素認識配列を備える。切断剤は制限酵素とすることことができ、ライブリーリはマイクロ流体装置の一部として含めることができる。

【 0 0 1 1 】

本発明はさらに、 c DNA 配列を増幅する方法を提供する。これは、(i) 単離細胞から抽出した RNA 分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列を形成するステップと；(i i) 前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化 RNA : DNA ハイブリッドを形成するステップと；(i i i) 前記リボ核酸配列を前記 RNA : DNA ハイブリッドから取り除くことにより、固定化 c DNA 配列を形成するステップと；(i v) 前記固定化 c DNA 配列に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド : DNA ハイブリッドを形成するステップと；(v) 前記認識オリゴヌクレオチド : c DNA ハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド : 切断済み c DNA ハイブリッドを形成するステップと；(v i) 前記切断済み c DNA にアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、タグ付き c DNA 配列を形成するステップと；(v i i) 前記タグ付き c DNA 配列を、 PCR 増幅を可能とする条件下で増幅核酸配列にハイブリダイズすることにより、 c DNA 配列を増幅するステップと、を含み得る。

【 0 0 1 2 】

本開示で提供する別の方法は、 c DNA 配列を増幅する方法である。これは、(i) 単離細胞から抽出した RNA 分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列

10

20

30

40

50

を形成するステップと；(i i)前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化RNA:DNAハイブリッドを形成するステップと；(i i i)前記RNA:DNAハイブリッドをRNA:DNA切断剤で切断することにより、切断済みRNA:DNAハイブリッドを形成するステップと；(i v)前記切断済みRNA:DNAハイブリッドにアダプター核酸配列をライゲーションするステップと；(v)前記リボ核酸を前記切断済みRNA:DNAハイブリッドから取り除くことにより、タグ付きcDNA配列を形成するステップと、(v i)前記タグ付きcDNA配列を、PCR增幅を可能とする条件下で増幅核酸配列に接触させることにより、前記cDNA配列を増幅するステップと、を含み得る。

【0013】

10

一態様では、タグ付き核酸配列を形成する方法を提供する。該方法は、(i)標的リボ核酸を固体支持体に固定することにより、固定化標的リボ核酸(RNA)を形成するステップと；(i i)相補的DNA(cDNA)鎖を合成することにより、RNA:cDNAハイブリッドを形成するステップと；(i i i)前記RNA:cDNAハイブリッドをRNA:cDNA切断剤で切断して、切断済みRNA:cDNAハイブリッドを生成するステップであって、該cDNAはライゲーション可能な末端を含む、ステップと；(i v)前記ライゲーション可能な末端にアダプターオリゴヌクレオチドをライゲーションするステップと；(v)前記リボ核酸配列を前記RNA:cDNAハイブリッドから取り除くことにより、タグ付き核酸配列を形成するステップと、を含む。このアプローチの一実施形態を図1～7に示す。

20

【0014】

さらなる態様において、タグ付き核酸配列を形成する方法を提供する。該方法は、(i)標的リボ核酸を固体支持体に固定することにより、固定化標的リボ核酸(RNA)を形成するステップと；(i i)相補的DNA(cDNA)鎖を合成し、前記標的RNAを取り除くステップと；(i i i)前記固定化標的cDNAに認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド:cDNAハイブリッドを形成するステップと；(i i i)前記認識オリゴヌクレオチド:cDNAハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド:切断済みcDNAハイブリッドを形成するステップであって、該cDNAはライゲーション可能な末端を含む、ステップと；(i v)前記ライゲーション可能な末端にアダプターオリゴヌクレオチドをライゲーションすることにより、タグ付き核酸配列を形成するステップとを含む。このアプローチの一実施形態を図8および9に示す。

30

【0015】

単独で、または、前記生成物および方法と組み合わせて用いることが可能な他の発明の生成物、方法、および特徴を、以下の記載および実施例により明らかにする。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】固定化核酸配列にタグを付ける方法を段階的に描寫した図である。

【図2】アンカーポリヌクレオチドにアニールしたRNAを示す図である。

【図3】第1鎖cDNAおよびRNA:cDNAハイブリッドを示す図である。

40

【図4】制限エンドヌクレアーゼでRNA:cDNAハイブリッドを切断した結果を示す図である。

【図5】切断済みcDNA分子の自由3'末端にライゲーションしたアダプターオリゴヌクレオチドを示す図である。

【図6A】RNA:cDNAハイブリッドの一本鎖オーバーハングをcDNA分子によりもたらす、関連アプローチを示す図である。

【図6B】RNA:cDNAハイブリッドの一本鎖オーバーハングをRNA分子によりもたらす、別のアプローチを示す図である。

【図7】RNAを、RNA:cDNAハイブリッドから取り除いた結果を示す図である。

【図8】固定化核酸配列をタグ付けする別 の方法であって、その際cDNA:オリゴヌク

50

レオチドハイブリッドを切斷する方法を、段階的に描写した図である。

【図9】固定化核酸配列をタグ付けする別の方法であって、その際cDNAを表面で増幅する方法を、段階的に描写した図である。

【図10】cDNA第2鎖をブリッジ増幅により合成する際の異なるステップを示す図である。

【図11】cDNA第2鎖をブリッジ増幅により合成する際の異なるステップを示す図である。

【図12】cDNA第2鎖をブリッジ増幅により合成する際の異なるステップを示す図である。

【図13】cDNA第2鎖をブリッジ増幅により合成する際の異なるステップを示す図である。 10

【図14】配列決定の前に如何に鎖の一つを取り除き、配列決定する一本鎖ローン (a lawn of single strands) をもたらすかを示す図である。

【図15】ポリアデニル化mRNAを、固定化ポリ(T)配列にハイブリダイズすることにより調製する、いわゆるwildfire増幅を示す図である。

【図16】ポリアデニル化mRNAを、固定化ポリ(T)配列にハイブリダイズすることにより調製する、いわゆるwildfire増幅を示す図である。

【図17】ビーズベース配列決定反応を用いたオンチップ (on-chip) 配列決定を示す図である。

【図18】配列決定ビーズ(またはサロゲート)をフィラービーズにより分離すると、個々のビーズからのシグナルを識別可能であることを示す蛍光画像である。 20

【図19】フィラービーズがない場合に個々の配列決定ビーズを如何に識別するかを示す、別の蛍光画像である。

【図20】mRNAおよびビーズを、第1チャンバに入る前に組み合わせ、その後、増幅および配列画像作成を第2チャンバで行うことを示す図である。

【図21】核酸の表面への取付けに際し起こり得る化学反応を示すチャートである。

【図22】ガラス表面へのオリゴヌクレオチド結合を段階的に描写した図である。

【図23】第2チャンバからのシグナルを、カメラを用いて収集する装置の例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

30

【0017】

本明細書では、核酸配列をタグ付けし増幅するための方法および組成物を提供する。提供する方法および組成物は、特に単一細胞の配列決定手順に有用であり、該方法および組成物を用いて不均一な細胞集団の個々の細胞のRNA発現プロファイルを決定することができる。

【0018】

Part 1は、固定化核酸配列にタグ付けする方法について記載する。

【0019】

Part 2は、タグ付き核酸配列の増幅および配列決定について記載する。

【0020】

Part 3は、配列決定およびデータ収集のための方法について記載する。 40

【0021】

Part 4は、集積マイクロ流体装置について記載する。

【0022】

Part 5は、Part 1～4に記載の、ある要素についての追加説明を記載する。

【0023】

Part 1：固定化核酸配列にタグ付けする方法

一態様において、本発明は、標的RNAの固定化、該標的RNAの少なくとも一部分に対し相補的なcDNA配列の生成、該cDNA配列を切斷することによる新しい自由末端の生成、および、アダプター配列を該新しい自由末端にライゲーションすることによるc 50

D N A のタグ付けに関する。

【 0 0 2 4 】

1 . 第 1 アプローチ - c D N A : R N A ハイブリッドの切断

1 . 1 . c D N A の生成

第 1 アプローチは図 1 に概要を示し、図 2 ~ 6 B に図示する。図 1 ~ 6 は、例示的実施形態であり、発明はこれに限定されることはなく、様々な変形が本明細書の下記で論じられるか、または、読者にとって明らかであろうことが理解されよう。図示する実施形態では、R N A 2 0 0、典型的には m R N A を表面 1 0 0 に固定化（または「捕捉」）する（図 2 を参照）。一部の実施形態において、表面 1 0 0 はビーズである。他の実施形態では、表面は実質的に平面とすることができる。図示するように、R N A は、表面に固定したアンカーポリヌクレオチド 5' にアニールすることにより捕捉することができる。アプローチでは、m R N A のポリ A テール 5 5 を、アンカーポリヌクレオチドのオリゴ d (T) 部分 5 1 にアニールする。オリゴ d (T) 部分 5 1 は、ポリメラーゼ（例えば、逆転写酵素）反応などを準備するのに適切であり、自由 5' 末端を含む（図 2）。一部の実施形態では、R N A を、オリゴ d (T) 以外のアンカーポリヌクレオチドの配列、例えば、転写産物特異的配列にアニールする。一部の実施形態では、R N A はポリ (A) テールを含まない。簡単にするために、R N A は m R N A と呼び、R N A をアニールする捕捉配列は、オリゴ d (T) 捕捉配列と呼ぶこととする。

【 0 0 2 5 】

以下でさらに詳細に述べるように、一部の実施形態では、アンカーポリヌクレオチドは、オリゴ d (T) 捕捉配列に加え、増幅プライマー配列 (A P 1 ') 5 3 を含む。アンカーポリヌクレオチドはまた、切断部位配列 (C S 2) 5 2 を含み得る。切断部位配列は、制限エンドヌクレアーゼ認識配列とすることができます。

【 0 0 2 6 】

固定化 m R N A をオリゴ d (T) プライマーから逆転写し、表面に固定した第 1 鎖 c D N A 3 0 1 および R N A : c D N A ハイブリッド 3 0 0 (図 3) を生成する。重合反応の後、逆転写酵素は任意で、例えば加熱により不活性化してよい。

【 0 0 2 7 】

1 . 2 . R N A : c D N A ハイブリッドの切断

R N A : c D N A ハイブリッドを、制限エンドヌクレアーゼ (R E) を用いて切斷して、自由 R N A 5' 末端および自由 D N A 3' 末端を生成する（図 4）。R E は、c D N A : R N A ハイブリッドの制限部位 (R S T 1 : R S T 1 ') で切斷する。一実施形態では、切斷により生じた末端を互い違いにし、粘着末端を生成する（図 4）。一実施形態では、R E は平滑末端を生成する。R E の特徴を以下で述べる。切斷ステップ後、R E は不活性化（例えば、加熱不活性化）してよい。

【 0 0 2 8 】

1 . 3 . アダプターオリゴヌクレオチドのライゲーション

アダプターオリゴヌクレオチド 3 1 0 を、例えば D N A リガーゼを用いて、切斷済み c D N A 分子の自由 3' 末端にライゲーションする。任意の適切なライゲーション方法を用いることができる。図 5 に示すように、アダプターオリゴヌクレオチドは、増幅プライマー配列 (A P 1 ') 5 3 の第 2 コピーを含む。

【 0 0 2 9 】

アプローチにおいて、アダプターオリゴヌクレオチドのライゲーションは、部分的に二本鎖であるポリヌクレオチド 3 2 0 (その一方の鎖がアダプターオリゴヌクレオチドである) を、R E 切断により生成した粘着末端にアニールするステップを含む。粘着末端の性質は、典型的には、R E の選択により決まるだろう。アプローチでは、切斷済み R N A : c D N A ハイブリッドの一本鎖オーバーハングを、図 4 に示すように m R N A 分子テンプレートによりもたらす。このアプローチでは、部分的に二本鎖であるアダプターコンポーネントによりもたらす。アダプターコンポーネントでは、突出鎖が R N A 分子の一本鎖オーバーハングに対し相補的である。アダプターの突出鎖の 5' 末端を切斷済み c D N A の 3' 末端に

ライゲーションすることにより、タグ付き核酸分子を生成する。

【0030】

関連アプローチでは、RNA : cDNAハイブリッドの一本鎖オーバーハングを、図6Aに示すようにcDNA分子によりもたらす。本アプローチでは、部分的に二本鎖であるアダプター構成をcDNAにアニールする。該アダプター構成では、突出鎖がcDNA分子の一本鎖オーバーハングに対し相補的である。アダプターの非突出鎖の5'末端を、切斷済みcDNAの3'末端にライゲーションすることにより、タグ付き核酸分子を生成する。

【0031】

RNA : cDNAハイブリッドの一本鎖オーバーハングをRNA分子によりもたらす別のアプローチでは、図6Bに示すように、(部分的に二本鎖の分子ではなく)一本鎖アダプターオリゴヌクレオチドの、RNA分子の一本鎖オーバーハングに対し相補的な5'領域を、RNAにアニールする。一本鎖アダプターオリゴヌクレオチドの5'末端を、切斷済みcDNAの3'末端にライゲーションすることにより、タグ付き核酸分子を生成する。

10

【0032】

別の実施形態では、アダプターをcDNAに直接隣接させてアニールせず、ライゲーションの前にポリメラーゼをギャップ埋めに用いる。

【0033】

別のアプローチでは、cDNA : RNAハイブリッドの切斷により平滑末端を生成する。アダプターオリゴヌクレオチドのライゲーションは、アダプターオリゴヌクレオチド3
10を含む二本鎖ポリヌクレオチドを、平滑末端にライゲーションすることにより達成することが可能である。これは、同様にタグ付けされたcDNA分子の不均一な混合物をもたらす。

20

【0034】

オリゴヌクレオチドを一本鎖cDNAにライゲーションするための例示的リガーゼは、任意でヘキサミン塩化コバルトが存在するところのT4RNAリガーゼ1 (Troutt et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:9823-25) である。

【0035】

ライゲーションステップの後、リガーゼは不活性化(例えば、加熱不活性化)してよい。

【0036】

30

1.4. RNAの除去

RNAをRNA : cDNAハイブリッドから取り除く。RNAは、酵素的、化学的、または熱的に取り除くことができる。一部の実施形態では、RNAを分解する。結果は、アダプターをタグ付けされた固定化結合一本鎖cDNA(図7)、つまり、タグ付き核酸分子である。一実施形態では、RNAを、RNアーゼHなどのリボヌクレアーゼを用いてハイブリッドから取り除く。

【0037】

1.5. 多数のアダプターオリゴヌクレオチド

しばしば、図面に示すように、單一アダプターオリゴヌクレオチド310を用いる。しかしながら、一部の実施形態では、2つ以上の異なるアダプターオリゴヌクレオチドを用いる。アプローチでは、異なるアダプターオリゴヌクレオチドは、異なるRE部位に適合し、RNAを異なるRE部位と共に同一反応で処理することを可能にする。

40

【0038】

別の例では、異なるアダプターオリゴヌクレオチドを、異なるAP1'配列を用いることにより識別する。例えば、第1AP1'配列53、第1配列特異的捕捉配列、および第1制限部位を含む第1cDNAオリゴヌクレオチドアンカー50、ならびに第1AP1'配列を含むアダプターオリゴヌクレオチドを、第2AP1'配列53、第1とは異なる第2配列特異的捕捉配列、および第2制限部位を含む第2アンカーオリゴヌクレオチド50、ならびに第1AP1'配列を含むアダプターオリゴヌクレオチドと組み合わせて用いることができる。このやり方では、多数の配列特異的捕捉配列を用いて不均一な混合物を生

50

成することが可能であり、ここでは一部の核酸種（例えば c DNA）はあるタグでタグ付けされ、一部の核酸種（例えば、c DNA）は別のタグでタグ付けされる。

【0039】

1.6. 追加の処理ステップ

固定化タグ付き核酸分子は、典型的には、以下で記載するように、表面でのクローン増幅および配列決定といった追加の処理ステップにかける。

【0040】

2. 第2アプローチ - c DNA：オリゴヌクレオチドハイブリッドの切断

第2タグ付けアプローチを図8および9に示す。図8および9はある実施形態を示すが発明はこれに限定されることではなく、様々な変形が本明細書の下記で論じられるか、または、読者にとって明らかであろうことが理解されよう。

10

【0041】

2.1. c DNAの生成

この実施形態では、ポリAテールを固定化オリゴd (T) 含有アンカーポリヌクレオチドにアニールすることにより、m RNA 60を、上記セクション1.1にも記載するように表面（例えばビーズ）61に固定する。固定化m RNAを上記セクション1.1に記載するように逆転写して、第1鎖c DNA 63が表面に固定されているRNA : c DNAハイブリッド62を生成する。

【0042】

2.2. RNAの除去

20

RNAを、例えば、RNアーゼHなどのリボヌクレアーゼで処置するといった、化学的、熱的、または酵素的な方法を用いてハイブリッドから取り除き、一本鎖固定化c DNAを残す。

【0043】

2.3. c DNA：認識オリゴヌクレオチドハイブリッドの生成

固定化c DNAを、次に、認識オリゴヌクレオチド64にハイブリダイズする。該認識オリゴヌクレオチド64はc DNAの一部に対し少なくとも部分的に相補的であり、c DNAの一部を二本鎖にし、制限酵素で消化しやすくする。c DNAと認識オチゴヌクレオチドとの間の相補度は、二本鎖領域（例えば、c DNA : オリゴハイブリッド）をもたらすのに十分な程度であり、該二本鎖領域は、オリゴヌクレオチド : c DNAハイブリッドを認識しc DNAを切断する、特異的制限エンドヌクレアーゼにより認識することが可能である。認識オリゴヌクレオチドの長さは典型的には、少なくとも12塩基、通常は少なくとも15塩基、時には少なくとも25塩基であろう。

30

【0044】

一部の実施形態では、単一認識オリゴヌクレオチドを用いてアッセイを実行する。一部の実施形態では、多数の異なる認識オリゴヌクレオチドを用いる。異なる認識オリゴヌクレオチドを用いる場合、それらを異なるc DNA配列にアニールして、異なる制限エンドヌクレアーゼにより認識される二本鎖領域を生成する。あるいは、それらを異なるc DNA配列にアニールして、同一の制限エンドヌクレアーゼにより認識されるものの、（例えば）オリゴ : c DNAハイブリッドの安定性を増大する隣接配列を有する、二本鎖領域を生成することができる。これは、非常に不均一な配列集団とともに作用する場合、高い自由度を提供する。これは、ライゲーション可能な末端を生成する異なる制限エンドヌクレアーゼの組み合わせ、または単一の制限エンドヌクレアーゼを用いて、種々の制限部位または隣接配列を有する基質から、ライゲーション可能な末端を生成することができるためである。

40

【0045】

一部の場合では、セクション4.2で記載するように、認識オリゴヌクレオチドの縮重集団を用いて、不均一集団のライゲーション可能な末端を生成する。

【0046】

2.4. c DNA：オリゴヌクレオチドハイブリッドの切断

50

制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含むオリゴヌクレオチド：cDNAハイブリッドを、固定化cDNAを切断する特異的な制限エンドヌクレアーゼにより認識する。REの作用により自由3'cDNA末端を生成する。認識オリゴヌクレオチドおよび制限エンドヌクレアーゼの選択に応じて、固定化切断生成物は平滑末端または粘着末端は有することが可能である。粘着末端は、RNA:cDNAハイブリッドについての上記セクション1.3で述べたcDNA:RNA切断生成物に似て、cDNAまたは認識オリゴヌクレオチドによりもたらされる一本鎖オーバーハングを含むことが可能である。

【0047】

2.5.アダプターオリゴヌクレオチドのライゲーション

アダプターオリゴヌクレオチドは、RNA:cDNAハイブリッドについての上記セクション1.3の記載に類似して、切断済みcDNA分子の自由3'末端にライゲーションすることができ、これは、タグ付きcDNA、または、より一般的には、不均一なタグ付き固定化cDNA集団を含む一つもしくは複数の表面をもたらす。

【0048】

2.6.追加の処理ステップ

典型的には、固定化タグ付き核酸分子は、以下で記載するように、表面でのクローン増幅および配列決定といった追加の処理ステップにかける。

【0049】

3.制限エンドヌクレアーゼ/制限エンドヌクレアーゼ認識部位の選択

3.1.一般的な特性

上記のように、アダプターオリゴヌクレオチドの添加の前に、cDNA:RNAハイブリッドまたはcDNA:認識オリゴヌクレオチドハイブリッドを、制限エンドヌクレアーゼで切断する。本明細書で用いる場合、制限エンドヌクレアーゼは、特異的認識ヌクレオチド配列(制限部位)において、またはその近くで、DNAを切断する酵素である。例えば、Roberts et al., 2007 "REBASE-enzymes and genes for DNA restriction and modification," Nucleic Acids Res35 (Database issue): D269-70; <http://site.rebase.neb.com>を参照のこと。限定ではなく例示として、本発明で用いる制限酵素には、タイプI酵素(EC 3.1.21.3)、タイプIIおよびタイプIIPなどのタイプII酵素(EC 3.1.21.4)、ならびに、タイプIII酵素(EC 3.1.21.5)が含まれる。制限酵素は天然で発生し、組み換え生成することができ、そして、(多数の異なるタンパク質に由来する配列を含むような)人工的とすることができる。

【0050】

一部の実施形態で、REは3'突出粘着末端を生成する。一部の実施形態では、REは5'突出粘着末端を生成する。一部の実施形態では、REは平滑末端を生成する。

【0051】

一部の実施形態で、REはRNA:DNAハイブリッドのDNA鎖およびRNA鎖を切断する。

【0052】

一部の実施形態では、REはBaeG1であり、これは、次の制限部位を認識する。

【0053】

【化1】



【0054】

一部の実施形態で、REはタイプII制限エンドヌクレアーゼであり、これは2~30のヌクレオチドを認識部位から切り離す。いくつかのタイプIIエンドヌクレアーゼは「カッターそのもの」であり、既知の数の塩基をその認識部位から切り出す。一部の実施形態では、粘着末端のオーバーハングの長さは少なくとも2塩基、少なくとも最低2塩基、

10

20

30

40

50

少なくとも 3 塩基、少なくとも 4 塩基、少なくとも 5 塩基、少なくとも 6 塩基、または、少なくとも 6 超の塩基である。

【 0 0 5 5 】

制限エンドヌクレアーゼの選択、および、c DNA : 認識オリゴヌクレオチドハイブリッドの場合、認識オリゴヌクレオチド配列の設計には、いくつかの所望の目標を考慮する。

(i) c DNA : RNAハイブリッドを切断する第1アプローチでは、酵素はそのようなハイブリッドを切断可能であるべきである。

(i i) 部位は、多数の異なる RNA 種に存在し、その結果、十分な数の c DNA がタグ付けされるべきである。「十分な数」とは、大部分、ほぼ全て、大多数、または、大多数より少ないサブセットとすることができます。

(i i i) 固定化切断済み c DNA の長さは、配列決定目標に十分であり（通常、少なくとも 15 ~ 20 塩基）、配列決定反応を起こすためにそれを固定する基質から十分に離れているべきである。以下で論じるように、多くの RNA またはゲノム DNA の配列を特定するのに必要なのは、c DNA またはゲノム配列の一部のみである（例えば、既知の配列データベースを参照することにより特異的 RNA を特定するには、部分配列で十分である）。

(i v) 固定化切断済み c DNA の長さは、使用する增幅方法と適合すべきである。

【 0 0 5 6 】

3 . 2 . DNA : RNAハイブリッドの切断

c DNA : RNAハイブリッドを切断する方法では、適切な酵素がそのようなハイブリッドを認識しよう。例えば、適切な酵素には、Avall、AvrII、BanI、HaeIII、HinfI、およびTaqlIが含まれる（Murray et al., 2010, Sequence-specific cleavage of RNA by Type II restriction enzymes ” Nucleic Acids Res. 38:8257-68を参照）が、これらに限定されない。

【 0 0 5 7 】

3 . 3 . 切断頻度

一アプローチでは、制限酵素部位は、平均長さが約 250 塩基対、例えば、50 ~ 500 塩基対、または、150 ~ 350 塩基対の標的ポリヌクレオチドの形成を可能にする頻度で、ソースである生物の RNA (c DNA) に発生する。好適には、固定化 c DNA のほとんど（例えば、50 % 超、75 % 超、80 % 超、90 % 超、または 95 % 超）が切断およびタグ付けされ、ほとんど（例えば、50 % 超、75 % 超、80 % 超、90 % 超、または 95 % 超）の固定化タグ付き c DNA の長さが、少なくとも 25 塩基、または少なくとも 40 塩基、または少なくとも 50 塩基、または少なくとも 75 塩基、または少なくとも 100 塩基、または少なくとも 150 塩基である。

【 0 0 5 8 】

下記の表 1 は、RE 選択の特異性を提供し、ヒトゲノム DNA に基づく計算済み均断片長さを提供する（出所：New England BioLabs、www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/frequencies-of-restriction-sites）。ほとんどの RNA サンプルが、ゲノム配列について計算した頻度および長さより逸脱すると予想され得るが、表 1 は、（個々の、または組み合わせた）酵素が上記 (i) ~ (i i i) の目標を達成するために選択され得ることを示す。表 1 の酵素のすべてが有用というわけではないであろうこと（例えば、BstEII 認識部位は、ほとんどのサンプルで非常に稀な可能性がある）、そして、有用な酵素のすべてが表 1 に含まれているわけではないこと（例えば、BaeG1 は表 1 にない）は、明確に理解されたい。

【 0 0 5 9 】

あるいは、酵素は、該酵素で消化することにより生成した c DNA の長さについての実証的分析に基づいて選択することが可能である。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

【表 1 - 1】

切断剤およびヒトゲノムの制限部位の頻度

酵素	特異性	部位数	メガ塩基ごとの部位	平均断片長 (bp)
BstEII	GGTNACC	335865	114	8746
BamHI	GGATCC	365999	124	8026
SmaI	CCCGGG	376939	128	7793
XmaI	CCCGGG	376939	128	7793
SapI	GCTCTTC	377161	128	7789
SpeI	ACTAGT	400286	136	7339
EcoRV	GATATC	446473	151	6580
ApaI	GGGCC	460339	156	6381
ApaLI	GTGCAC	496255	168	5920
ScaI	AGTACT	543793	185	5402
SphI	GCATGC	550951	187	5332
MfeI	CAATTG	564303	192	5206
EciI	GGCGGA	571273	194	5142
HgaI	GACGC	571889	194	5137
AvrII	CCTAGG	594956	202	4938
BciVI	GTATCC	696093	236	4220
BceAI	ACGGC	705176	240	4166
BsaAI	YACGTR	713800	242	4115
FnuDII	CGCG	733938	249	4003
BclI	TGATCA	738785	251	3976
NcoI	CCATGG	759594	258	3867
BglII	AGATCT	774732	263	3792

10

20

30

【表 1 - 2】

EcoRI	GAATTC	847341	288	3467
XbaI	TCTAGA	850998	289	3452
HindIII	AAGCTT	860361	292	3414
NdeI	CATATG	903360	307	3252
StuI	AGGCCT	925728	315	3173
AvaIII	ATGCAT	933357	317	3147
BspHI	TCATGA	978289	333	3003
PvuII	CAGCTG	1084260	369	2709
PpuMI	RGGWCCY	1085138	369	2707
AccI	GTMKAC	1101063	374	2668
BscGI	CCCGT	1231061	419	2386
PstI	CTGCAG	1321469	449	2223
BspMI	ACCTGC	1438128	489	2043
FauI	CCCGC	1439772	490	2040
Af1III	ACRYGT	1485394	505	1978
BsmI	GAATGC	1549349	527	1896
HgiCI	GGYRCC	1550876	527	1894
EsaBC3I	TCGA	1603339	545	1832
TaqI	TCGA	1603339	545	1832
PsiI	TTATAA	1647911	560	1783
BfiI	ACTGGG	1706593	580	1721
HhaI	GCGC	1756498	597	1672
HinP1I	GCGC	1756498	597	1672
HpaII	CCGG	2317719	788	1267
SspI	AATATT	2377267	809	1236
SmlI	CTYRAG	2727866	928	1077
NspI	RCATGY	3104357	1056	946
StyI	CCWWGG	3114107	1060	943
SfeI	CTRYAG	3531009	1201	832
BscAI	GCATC	3652924	1243	804
SfaNI	GCATC	3652924	1243	804
MlyI	GAGTC	3931690	1338	747
PleI	GAGTC	3931690	1338	747
Tsp45I	GTSAC	4021757	1369	730
AciI	CCGC	4206123	1431	698
TfiI	GAWTC	4984358	1696	589
CviQI	GTAC	5115077	1741	574
PabI	GTAC	5115077	1741	574
RsaI	GTAC	5115077	1741	574
FokI	GGATG	5201113	1770	565

10

20

30

40

【表1-3】

BbvI	GCAGC	5290042	1800	555	
R1.BceSIV	GCAGC	5290042	1800	555	
TseI	GCWGC	5290042	1800	555	
Cac8I	GCNNGC	5461330	1859	538	
BsrI	ACTGG	5741305	1954	512	
HphI	GGTGA	6007328	2044	489	
BccI	CCATC	6170919	2100	476	10
BthCI	GCNGC	6209919	2113	473	
Fnu4HI	GCNGC	6209919	2113	473	
ApoI	RAATTY	6382371	2172	460	
MjaIV	GTNNAC	6385575	2173	460	
BsmAI	GTCTC	6631583	2257	443	
Hin4II	CCTTC	7059911	2403	416	
NlaIV	GGNNCC	7118874	2423	413	
BspKT6I	GATC	7199381	2450	408	
BspNCI	CCAGA	7282435	2479	403	20
HaeIII	GGCC	8562227	2914	343	
TspRI	CASTG	8765234	2983	335	
HinfI	GANTC	8916048	3035	329	
Hpy188I	TCNGA	8942142	3043	329	
MboII	GAAGA	9199487	3131	319	
BstNI	CCWGG	9855638	3354	298	
ScrFI	CCNGG	11805089	4018	249	
SsoII	CCNGG	11805089	4018	249	
AluI	AGCT	13027766	4434	225	30
CviAII	CATG	13815688	4702	213	
FatI	CATG	13815688	4702	213	
NlaIII	CATG	13815688	4702	213	
DdeI	CTNAG	14312039	4871	205	
MseI	TTAA	19214668	6540	153	
MnlI	CCTC	27739484	9442	106	

B = CまたはGまたはT ; D = AまたはGまたはT ; H = AまたはCまたはT ; K = GまたはT ;
 M = AまたはC ; N = AまたはCまたはGまたはT ; R = AまたはG ; S = CまたはG ; V = AまたはCまたはG ; W = AまたはT ; Y = CまたはT。

【0061】

4. 認識オリゴヌクレオチドの設計

本明細書で提供する方法では、認識オリゴヌクレオチドを固定化標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - 標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成する。ハイブリッドの形成は、制限酵素による切断と、それに続く、二本鎖「アダプター」構成をライゲーションする自由DNA末端の形成を可能にする。

【0062】

4.1. 認識オリゴヌクレオチドの構造

認識オリゴヌクレオチドは、上記セクション3(a)(i)～(iv)の考察を考慮して設計すべきであることが理解されよう。これは、認識オリゴヌクレオチドおよびREは組み合わさって、cDNAのうちどの位置を切断するかを決定するためである。

【0063】

認識オリゴヌクレオチドは、一本鎖核酸であり、典型的には、一本鎖DNAである。認識オリゴヌクレオチドの長さは通常、300塩基未満であり、より頻繁には、認識オリゴヌクレオチドの長さは約10～約90塩基である。例えば実施形態において、認識オリゴヌクレオチドの長さは約15～約85塩基である。実施形態において、認識オリゴヌクレオチドの長さは、35～65塩基、40～60塩基、15～55塩基、50～55塩基の範囲である。実施形態において、認識オリゴヌクレオチドの長さは、約12、約15、約18、約20、約22、約25、約26、約28、約30、約35、約40、約45、約50、約55、約60塩基、約65塩基、約70塩基、約75塩基、または約80塩基である。実施形態では、認識オリゴヌクレオチドの長さは26塩基である。

【0064】

一部の実施形態では、認識オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドがハイブリダイズするcDNAの配列の一部に対し厳密に相補的である。しかしながら、認識オリゴヌクレオチドと固定化cDNAの間でのハイブリダイズは、100%相補的であることを必要とはしない。特定の結合が望まれる条件下、例えば、部位特異的制限酵素の消化を可能とする条件下で、認識オリゴヌクレオチドが非標的配列に非特異的に結合することを避けるのに十分なほどの相補性がある場合、認識オリゴヌクレオチドおよび固定化標的ポリヌクレオチドはハイブリダイズすることが可能である。典型的には、RE認識部位で厳密な相補性がある。一部の実施形態では、認識オリゴヌクレオチドは(i)構造5'-A_n-X_m-B_n-3' (各nは独立して5～40の整数であり、XはRE認識配列であり、mは4～10の整数である)を有し、(ii)cDNA配列構造5'-A''_n-X'_m-B''_n-3' (AおよびBは配列A''およびB''に相補的または部分的に相補的なヌクレオチド配列であり、XはX'に対し厳密に相補的である)にハイブリダイズする。

【0065】

4.2 認識オリゴヌクレオチドの縮重

一部の実施形態では、認識オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチドのライプラリまたは集団であり、ここでは、ある部分が完全に縮重する(つまり、A、T、G、およびCを有するオリゴヌクレオチドが示される)、部分的に縮重する(つまり、塩基A、T、G、およびCのうち2つか3つを有するオリゴヌクレオチドが示される)、および/または、デオキシイノシンなどの「ユニバーサル」塩基により示される。

【0066】

2つのタイプの縮重が考えられる。まず、RE認識部位の位置における縮重があり得、これは2つ以上の切断配列を有するREの原因を説明する。例えば、BaeG1は、5'-GKGCMC-3' (K=GまたはT、および、M=AまたはC)を認識する。BaeG1の場合、図示のため、ライプラリは4つの異なるRE認識部位: 5'-GGGCAC-3' ; 5'-GGGCC-3' ; 5'-GTGCAC-3' ; 5'-およびGTGCC-3'を有する認識オリゴヌクレオチドを含み得るが、これらに限定されない。

【0067】

第2のタイプの縮重は、RE認識部位に隣接する配列における縮重である。一実施形態では隣接配列は完全に縮重し、その結果、認識オリゴヌクレオチドのライプラリからの一部のオリゴヌクレオチドは、適切なRE認識部位を含む任意のcDNAにハイブリダイズすることが可能である。

【0068】

4.3 多数の認識オリゴヌクレオチド

一部の実施形態において、ライプラリは、2つ、3つ、または4つの異なる配列といった2つ以上の切断剤認識配列を含む。実施形態において、異なる切断剤認識配列は、異なる切断剤により認識される。

10

20

30

40

50

【0069】

4.4 特異的標的

一部の実施形態では、1つまたは複数の特異的な配列サブセットのみに結合するように認識オリゴヌクレオチドを選択する。例えば、アクチンをコードする cDNA のみをタグ付けするように認識オリゴヌクレオチドを選択することが可能である。

【0070】

4.5 ゲノムDNAまたはミトコンドリアDNAの配列決定

本明細書において、RNA の特徴を描写する文脈で記載する方法、系、および装置は、本明細書に誘導された当業者には明確であろう修正（例えば、ゲノムDNAを断片化し、個々の断片を配列決定する、一本鎖DNAをDNA依存DNAポリメラーゼを用いて二本鎖にする）をもって、DNA配列決定に用いることが可能であることが理解されよう。

10

【0071】

Part 2：タグ付き核酸配列の増幅および配列決定

下記に示す追加の処理ステップを用いて、タグ付き分子を配列決定することができる。

【0072】

5.1 表面でのクローン増幅

ある実施形態では、タグ付き cDNA テンプレートを配列決定の前に増幅し、表面（例えば、個々のビーズ上、表面の特定位置など）にテンプレート分子のクローン（二クローン性またはオリゴクローン性の）集団を生成する。クローン増幅法の例には、ブリッジ増幅およびwildfire増幅が含まれる。しかしながら、本発明は、任意の特定の増幅法に限定されることはない。さらに、増幅は必要ではない。例えば、単一のポリヌクレオチドを特徴付けることができる。

20

【0073】

下記に述べるように、個々のタグ付き cDNA 分子を増幅して同一分子のコピーのクラスタを生成することができ、これはある配列決定方法に有用なアプローチである。一実施形態では、mRNA は物理的に異なる表面または表面上の領域（例えば、ビーズ上、ウェル中、アレイ上の位置）に捕捉する。一実施形態では、mRNA を捕捉し、その結果、少なくとも一部の物理的に異なる領域は単一の mRNA（例えば、1ビーズにつき 1 つの mRNA、または、1 ウェルにつき 1 つの mRNA）を捕捉する。一実施形態では、いくつかの物理的に異なる領域はそれぞれ、平均して 1 つの mRNA（物理的に異なる領域 1 つにつき、平均して 0.5 ~ 1.5 個の mRNA）を含む。

30

【0074】

5.1.1. ブリッジ増幅

図 10 は、cDNA 第 2 鎮の合成を示す。第 2 鎮を合成するためのプライマーとして作用する相補的な配列（AP1）を含む固定化オリゴヌクレオチドに、第 1 鎮の AP1' タグ配列をハイブリダイズする。ブリッジ増幅の周知のプロセスが、図 11 ~ 13 に示すように続く。図 12 は増幅後の表面を示し、これは配列決定用クローンテンプレートをもたらす。図 13 は、AP1' に対し相補的なプライマーを用いた sequencing by synthesis 法を示す。図 14 は、鎮（つまり、フォワード鎮の集団またはリバース鎮の集団）のうち一つを配列決定前に取り除き、配列決定できる一本鎮のローンをもたらすことができることを示す。

40

【0075】

本明細書で以下に示すように、上記ステップは、少数細胞のうちの単一細胞に由来する、mRNA 分子集団などの大きくて不均一な mRNA 分子混合物で実行することができる。

【0076】

5.1.2 Wildfire増幅

「Wildfire」増幅（Ma et al., 2013, Isothermal amplification method for next-generation sequencing” Proc Nat Acad Sci 10:14320-23）は、固相クローン増幅に用いることが可能である。米国特許出願公開第 2012 / 0156728 号明細書（Wildfire

50

amplification) および同第 2013 / 0203607 号明細書 (WildFirePaired-End sequencing) を参照のこと。このアプローチの修正版では、図 15 および 16 に示すように、ポリアデニル化 mRNA を固定化ポリ (T) 配列にハイブリダイズし、第 1 鎖 cDNA 合成を実行し、そして、RNA テンプレートを取り除いて固定化第 1 鎖 cDNA を残す。cDNA は上記のようにタグ付し、その後 Wildfire 法を用いて増幅する。

【0077】

5.2 配列決定

個々の分子の配列決定 (單一分子配列決定) またはクローン集団の配列決定は、Solexa (Illumina) シーケンス法、パイロシーケンス (pyrosequencing) (454) 法、SOLiD シーケンス法、および Polonator シーケンス法などの既知の方法を用いて実行することが可能である。例えば、Shendure and Ji, 2008, "Next-generation DNA sequencing" Nature Biotechnology 26:1135-45、特に、図 3 およびその中で言及された参考文献を参考のこと。Shendure および前記参考文献は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。一部の実施形態では、sequencing-by-synthesis 法を用いる。一部の実施形態において、配列決定方法は sequencing-by-synthesis 法である。一部の実施形態では、可逆的ターミネーター法を用いる。

10

【0078】

5.3 クローン増幅なしの配列決定

一部の実施形態では、mRNA を直接的に配列決定するか、または、クローン増幅のない cDNA 合成の後もしくはそれと同時に配列決定する。例えば、Causey et al., 米国特許出願公開第 20110129827 号明細書 "Methods For Transcript Analysis" ; Ozsolak et al., 2010 "Amplification-free digital gene expression profiling from minute cell quantities" Nature Methods 7:619-21 ; Ozsolak et al., 2011 "Single-molecule direct RNA sequencing without cDNA synthesis" Wiley Interdiscip Rev RNA. 2011 Jul-Aug; 2(4): 565-570 ; Hebenstreit, 2012, "Methods, Challenges and Potentials of Single Cell RNA-seq" Biology (Basel). 1(3):658-667 ; Saliba et al., 2014, "Single-cell RNA-seq: advances and future challenges," Nucleic Acids Res. 42:8845-60 を参考のこと。

20

【0079】

Part 3 : 配列決定およびデータ収集の方法

30

6. 配列決定

ハイスループット配列決定法が既知であり、ここでは、配列決定する核酸テンプレートをビーズ、フローセル表面、または半導体などの固体支持体に固定または位置付けする。さまざまな異なる配列決定アプローチを用いることができる。蛍光または他の光を検出する配列決定法では、異なるテンプレート分子またはクローン集団 (例えば、増幅クラスタ) を物理的に分離して配置し、その結果、異なるテンプレートに対応するシグナルを光学的に識別可能であるようにすることができる。本発明のタグ付き核酸分子の配列は、このような方法を用いて決定することができる。配列決定についての例示的アプローチには、ビーズ上での配列決定および平面基質上での配列決定が含まれる。

40

【0080】

6.0. ビーズ上での配列決定

一部のアプローチでは、Part 1 に記載の、調製したクローン集団を備えるビーズを含め、ビーズ上のテンプレートを配列決定する。

【0081】

図 17 は、ビーズベース配列決定反応を用いる、別のオンチップ配列決定を示す。本明細書で用いる場合、標的核酸またはその増幅生成物を固定する、または、固定し得るビーズを、「配列決定ビーズ」と言う。図 17 に示す実施形態では、1 つまたは複数の配列決定前ステップ (例えば、逆転写、切断、ライゲーション、増幅) は、第 1 チャンバ (左) の配列決定ビーズ上で行うことができ、該配列決定ビーズは、配列決定反応のために第 2 チャンバ (右) に写し、任意で、追加の配列決定前反応 (例えば、増幅) を行う。本文脈

50

では、「配列決定反応」とは、核酸配列情報を提供するシグナルの生成および検出（典型的には、可視光または蛍光放射の検出）を意味する。例えば、Illumina社/Solexaタイプの配列決定の場合、プリッジ増幅が配列決定前ステップと考えられ、いずれかのチャンバで行うことが可能である。多数の配列決定前チャンバが存在する場合もあり得る。

【0082】

6.1. 光学的に識別可能なシグナルを生成するためのフィラービーズの使用

図17に示すアプローチでは、配列決定ビーズを第1チャンバから第2チャンバに移す際、それを「フィラービーズ」の導入により「希釈」する。テンプレート核酸がフィラービーズに固定されず、配列決定プロセス中に検出可能なシグナルを生成しないという意味で、フィラービーズは「不活性」である。フィラービーズの添加の効果は、配列決定ビーズを互いに空間的に分離し、その結果、個々の配列決定ビーズからのシグナルを光学的に識別可能にすることである。

10

【0083】

通常、配列決定ビーズおよびフィラービーズは略球状である。球形は必要ではないが、限定ではなく単純化のため、ビーズは「直径」を有するものとみなす。ただし、他の形の（球体と同じ体積を有する）ビーズについても検討する。典型的には、フィラービーズは配列決定ビーズよりも小さく、例えば、その直径は配列決定ビーズの直径の約1/3～1/40である。一実施形態では、配列決定ビーズの直径は約1～約3ミクロン（例えば、2.02ミクロンなど、約2）であり、フィラービーズの直径は約0.05～約0.4ミクロン（例えば、0.28ミクロンなど、約0.3）である。限定ではなく例として、配列決定チャンバにおける、配列決定ビーズのフィラービーズに対する比率は、1:10⁶～1:10³（ビーズ数）の範囲、および/または、1:2～1:20（ビーズ体積）の範囲とすることができる。

20

【0084】

一部の実施形態では、配列決定ビーズにより満たされる充填密度（総ビーズ体積またはチャンバ体積の比）は、20%～85%、例えば40～70%、例えば55%～65%の範囲、例えば約60%である。説明のため、幅1mm長さ5mmのチャンバ（5×10⁶平方ミクロン領域）は60%充填密度で、150万個の配列決定ビーズを収容する。

【0085】

他のアプローチでは、配列決定ステップおよび検出ステップを同一のチャンバで行い、少なくとも1つの配列決定前ステップの後および検出ステップの前に、フィラービーズを該チャンバに導入して配列決定ビーズを希釈および分離する。

30

【0086】

一態様では、本発明はマイクロ流体装置を提供し、該装置は、（1つまたは複数の配列決定前反応を行う）第1チャンバまたは「配列決定前」チャンバ、および、（配列決定反応および検出反応に適した）第2チャンバまたは「配列決定」チャンバを含み、該チャンバは、配列決定ビーズが第1チャンバから第2チャンバへ移動できるように十分大きい直径を有するチャネルで連結している。一実施形態では、チャネルの寸法（例えば、直径、幅、深さ）は1ミクロンより小さいことはなく（例えば、直径は1ミクロン以上）、好適には、寸法は2ミクロンより小さいことはなく、より好適には、3ミクロンより小さいことはない。一実施形態では、第1チャネルの寸法は、配列決定ビーズが「単一ファイル」のみで、または、主に「単一ファイル」で流れることができるように、選択する。

40

【0087】

一部の実施形態では、図に示すように、フィラービーズは、配列決定チャンバに入る前に配列決定ビーズと組み合わせる。したがって、一実施形態では、装置は、（a）第1チャネルまたは第2チャンバ、および（b）フィラービーズ源と流体連通する、第2マイクロ流体チャネルを含む。第2チャネルの寸法は、フィラービーズの通過が可能であるように選択し、第1チャネルの寸法より小さくてよい。他の実施形態では、フィラービーズおよび配列決定ビーズは、（i）別々の口を通して、および/または、（ii）別々の回で、配列決定チャンバに入る。一実施形態では、フィラービーズをまず加え、配列決定

50

ビーズを加えた際に混ぜ合わせる。

【0088】

図18は、チャンバからの蛍光シグナルの検出を示す蛍光画像であり、これは、配列決定ビーズ（または、サロゲート）をフィラービーズにより分離すると、個々のビーズからのシグナルを識別可能であることを示す。蛍光ビーズの直径は 2.02ミクロン （ $1.05 \times 10^5\text{ビーズ/マイクロリットル}$ ）である。フィラービーズの直径は 0.28ミクロン （ $3.98 \times 10^9\text{ビーズ/マイクロリットル}$ ）である。

【0089】

図19は、フィラービーズ（ $3.14 \times 10^5\text{ビーズ/マイクロリットル}$ ）がない場合に個々の配列決定ビーズを識別することはより難しいが、可能であることを示す。

10

【0090】

第1チャンバおよび第2チャンバの寸法は、作業主の要望、選択した配列決定法、および、シグナル検出法により変更することができる。第1チャンバのサイズおよび寸法は、ある程度、増幅前ステップを実行するのに望ましい容量に基づいて選択されよう。

【0091】

第2（配列決定）チャンバのサイズおよび寸法は、3つの要素を考慮に入れるだろう。第1に、通常、第2チャンバは第1チャンバの反応生成物を処理するのに十分な大きさとなる。つまり、第2チャンバのサイズは第1チャンバのサイズとともに大きくなる傾向にあろう。第2に、第2チャンバは、フィラービーズを用いる場合にはそれを収容するのに十分なほど大きく、ならびに／または、配列決定テンプレートを物理的（および光学的）に分離するのに十分なほど大きくすべきである。理解されるように、光学的分離では通常、ビーズを、単にZ次元で分離するのではなく、X-Y次元で分離することが必要である（ここでシグナル検出はおよそ直角であり、つまりX-Y次元に付随する）。簡単に言うと、例えば、Z平面で上下に積み重ねた2つのビーズからシグナルを識別することは難しい。「光学的に識別可能」であるビーズへの言及は、この事実をとらえたものである。

20

【0092】

一アプローチでは、配列決定チャンバは、単一ビーズ層のみを収容する。例えば、配列決定チャンバの深さは、配列決定ビーズの直径とほぼ同じとすることができます。

【0093】

チャンバの表面領域（つまり、X-Y次元）は、 $0.1\text{mm}^2 \sim 50\text{mm}^2$ などの、任意の適切な領域とすることができます。一アプローチでは（例えば、単一細胞mRNAの配列決定では、5Mリードに対し約200000個が適切なカバレッジには必要であると想定し、該領域を $0.3\text{mm}^2 \sim 6\text{mm}^2$ とすることができる。）一部の実施形態では、単一細胞由来のmRNAを配列決定するため、該領域は $1 \sim 2\text{mm}^2$ の範囲とする。

30

【0094】

1細胞につき $100 \sim 300 \times 10^5$ 転写産物があると想定した場合、少なくとも100万～300万個のビーズが必要となろう。しかしながら、ある適用例では、必要となるリードおよびビーズはより少ない。例えば、細胞表現型を区別するには、200000個のリードで十分である（そして、場合により不均一性を検出する）。AA Pollen et al., Nat Biotechnol. 2014 Oct;32(10):1053-8。

40

【0095】

6.2 第2チャンバにおけるビーズの移動の最小化

一部の実施形態では、配列決定ビーズおよびフィラービーズを、第2チャンバに密に充填し、配列決定反応中（例えば、配列決定サイクル間の洗浄ステップ中）の移動を最小化する。ビーズの移動は、シグナルの解釈をより計算的に困難にする。

【0096】

一アプローチでは、配列決定ビーズおよびフィラービーズを第2チャンバに導入した後、ビーズを（例えば、化学的または物理的な薬剤にさらすことにより）架橋して定位置に固定する。一実施形態では、フィラービーズのみを互いに架橋する。配列決定ステップおよび検出ステップを妨害しない、リンカー、架橋剤、および架橋条件を用いるべきである

50

。

【0097】

ビーズの移動を最小化する他の方法は、ビーズをナノウェルに導入するか、または、それをチャンバ内の基質に固定することである。

【0098】

6.3 光学的に認識可能なシグナルを生成する他の方法

上記のように、あるビーズベース法では、配列決定チャンバは單一ビーズ層のみを収容する。これはチャンバの深さが理由である。他のビーズベースアプローチでは、(i)ビーズは、チャンバの底にある間隔の空いたコンパートメントまたはパッドに固定することができ；(ii)リガンド-抗リガンドベースの相互作用によりチャンバ底に束縛することができ(例えば、チャンバ底の別々の位置に点在する抗リガンドが、ビーズのリガンドと相互作用する)；(iii)物理的相互作用により底に束縛することができる(例えば、底に、疎水性表面または不活性表面により分離した、負に帯電した点でパターンを形成し、その結果、核酸に覆われたビーズをその分離した点に固定することができる)。一部の実施形態では、ビーズを、光学的に分離されたシグナルを実現するのに十分なほどの低密度で、チャンバ底にランダムに配置する。これには容量を減少させるという明確な短所がある。

10

【0099】

一アプローチでは、ビーズを、基質を含むチャンバに導入する。該チャンバは、單一ビーズを収容できるサイズの反応チャンバ(空所またはウェル)を少なくとも10000個有する(例えば、Picotiter Plate(登録商標)に類似する。国際公開第2005/003375号を参照)。ビーズはウェル内で物理的に分離する。

20

【0100】

6.4 配列決定モジュール

第1チャンバ、第2チャンバ、任意でフライービーズ源、および連結チャネルの組み合わせを、「配列決定モジュール」ということができる。図示するように、細胞を、配列決定モジュールの外にあるマイクロ流体装置で捕捉、洗浄、および溶解し、その後、細胞溶解物(つまり、RNA含有部分)をモジュールの第1チャンバに導入する。第1鎖cDNA合成、ならびに、アダプターオリゴヌクレオチドの切断およびライゲーションを、第1チャンバで実行することができる。

30

【0101】

一実施形態では、mRNAとビーズを「第1」チャンバに入る前に組み合わせる。例えば、RNAをビーズカラムまたは「プレチャンバ」に捕捉し、ビーズをその後「第1チャンバ」に移す。

【0102】

図20に示すように、増幅および配列決定/画像作成は、第2チャンバで実行することができる。

【0103】

6.5 ビーズを用いない実施形態

一部の実施形態では、ビーズに固定していないRNAまたはDNAのテンプレートを、配列決定チャンバに移し、実質的に平面の基質に固定する。実施形態では、それは、チャンバ底の上のガラスもしくはPDMSであるか、または、チャンバ底からなる。このような固定化に対し多数のアプローチが知られ、それを本発明に適用することが可能であろう。一アプローチでは、細胞溶解物をpolyd(T)でコーティングした表面に接触させ、その後、逆転写およびcDNA配列決定を行う。図21および22は、オリゴヌクレオチドを表面に固定する例示的方法を示すが、他の方法も当技術分野で知られている。一アプローチでは、個々のRNA分子を(そして、結果として、RNAに由来するクローン集団を)物理的に分離し、そこから生じるシグナルを光学的に識別するのに十分に低密度で捕捉オリゴヌクレオチドのローンを含むチャンバに、RNAを導入する。配列決定用に、ランダムな、または規則正しいテンプレートアレイを作成する方法は周知である。例えば、米

40

50

国特許出願公開第2013/0116153号明細書；C. Adessi et al., Nucleic Acids Res. 2000 Oct 15;28(20):E87; M. Fedurco et al., Nucleic Acids Res. 2006 Feb 9; 34(3):e22を参照のこと。

【0104】

一実施形態では、細胞溶解およびRNA捕捉は、同一のチャンバ内で起こる。

【0105】

6.6 多数サイクルの実行

sequencing-by-synthesis反応には、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似物を組み込みシグナルを検出する、多数のサイクルが含まれる。これは、典型的には、反応物をサイクルのある時点で配列決定チャンバに導入し、次のサイクルの開始前に該反応物およびを生成物を取り除くことにより行う。これは、反応物、反応物溶液、および洗浄溶液等をチャンバに導入し、標準的なマイクロ流体法を用いてそれらを取り除くことにより達成される。一部の実施形態では、マイクロ流体装置には、配列決定前に、配列決定反応物および/または洗浄溶液を予め装填する。

10

【0106】

6.7 画像作成および分析

第2チャンバからのシグナルは、カメラ（例えば、CCDカメラ）ならびにFluidigm社により開発された光学系、および、当技術分野で既知の光学系を用いて収集することが可能である。例えば、図23を参照のこと。このような実施形態では、カメラとシグナル源との間の物質は、シグナルに対し透過的であろう。

20

【0107】

他の実施形態では、シグナル検出は、特定のビーズまたはウェルと関連する、光ファイバセンサまたは他のセンサに依存し得る。

【0108】

Part 4：集積マイクロ流体装置

7. 集積装置

図20は、配列決定カセットをマイクロ流体チップに集積可能であることを示す。表示するアプローチでは以下のステップを実行することができ、ステップ2～9（および、任意でステップ1）は、マイクロ流体装置において実行し、ステップ6～9は配列決定モジュールにおいて実行する。

30

【0109】

【表2】

ステップ	
1	濃縮
2	単一細胞の装填および捕捉
3	細胞洗浄および、任意で細胞染色
4	任意で捕捉細胞の画像作成
5	細胞の溶解
6	基質（例えばビーズ）でのmRNA捕捉
7	cDNAの合成（例えば、cDNA合成、切断、アダプターライゲーション）
8	クローン増幅
9	配列決定（例えば、SBS）
10	分析

40

【0110】

図20および表2は、限定ではなく説明のためであり、多種類のプロセスが可能であることが理解されよう。

50

【0111】

7.1 細胞濃縮

細胞濃縮は、マイクロ流体装置、「オフ - チップ (off-chip)」、またはその両方で起き得る。濃縮パラメータには、物理的特性（例えば、サイズ、変形、密度、電荷）および生物学的特性（例えば、マーカータンパク質の発現）が含まれる。

【0112】

7.2 単一細胞の捕捉

単一細胞の捕捉は、様々な方法を用いて実行することができる。アプローチでは国際公開第2013/130714号 ("Methods, systems, and devices for multiple single-cell capturing and processing using microfluidics") に記載の特徴を有する单一細胞捕捉マイクロ流体装置を用いて、個々の細胞を単離し、核酸を処理し、該核酸の配列決定をする。所望により、例えば、上記の配列決定モジュールを組み込むといったある修正を所望により加えることは、本明細書に誘導された当業者の技量の内にあるだろう。国際公開第2013/130714号および同第2014/144789号は、チャネル、ポンプなどのマイクロ流体要素についての記載を含め、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれるものとする。

10

【0113】

Part 5 : 追加特徴

8. 追加特徴

本セクションは、上記のある要素についての追加の記載を提供する。

20

【0114】

8.1 アンカーポリヌクレオチド

本明細書で提供するアンカーポリヌクレオチドを用いて、mRNA分子を固体支持体に捕捉する。そのため、アンカーポリヌクレオチドは、mRNA分子を捕捉するためにオリゴd (T) プライマーを含み得る。アンカーポリヌクレオチドはさらに、標的ポリヌクレオチド（例えば、cDNA）をアダプター核酸でタグ付けした後、該標的ポリヌクレオチドを増幅する手段を提供する。アンカーポリヌクレオチドは、さらに、制限酵素認識配列を含み、固定化標的ポリヌクレオチドを、増幅および/または配列決定の後に固体支持体から取り除くための手段を提供する。限定ではなく説明のため、アンカーポリヌクレオチドの例を図2に示す。この実施形態では、固体支持体（ビーズ）に付着した2つのアンカーポリヌクレオチドを示す。一方のアンカーポリヌクレオチドを本明細書では「第1アンカーポリヌクレオチド」というが、これは増幅プライマー（AP1）および制限認識部位（例えば、切断部位1またはCS1）を含む。オリゴd (T) プライマー、AP1に対し相補的な増幅プライマー（AP1'）、および制限認識部位（例えば、切断部位2またはCS2）を含むアンカーポリヌクレオチドを、本明細書では「第2アンカーポリヌクレオチド」という。アンカーポリヌクレオチドのさらなる例を図3に示す。図3は、第1アンカーポリヌクレオチドおよび第2アンカーポリヌクレオチドを示し、ここでは、mRNAテンプレートが、そのポリAテールを介して第2アンカーポリヌクレオチドのオリゴd (T) にアニールされている。

30

【0115】

8.2 第1アンカーポリヌクレオチド

実施形態では、第1アンカーポリヌクレオチドを固体支持体に固定する。実施形態では、第1アンカーポリヌクレオチドは第1増幅核酸配列を含み、増幅プライマー（「増幅プライマー1」または「AP1」ともいう）として機能する。実施形態では、第1アンカーポリヌクレオチドは、制限酵素認識部位（「切断部位1」または「CS1」ともいう）などの第1放出核酸配列を含む。実施形態では、第1放出核酸配列（例えば、CS1）が、第1増幅核酸配列（例えば、AP1）を固体支持体に連結する。

40

【0116】

8.3 第2アンカーポリヌクレオチド

一部の実施形態では、第2アンカーポリヌクレオチドを固体支持体に固定する。実施形

50

態では、第2アンカーポリヌクレオチドは、第2增幅核酸配列（增幅プライマー2またはA P 2ともいう）を含む。実施形態では、第2アンカーポリヌクレオチドは、制限酵素認識部位（切断部位2またはC S 2ともいう）などの第2放出核酸配列を含む。実施形態では、第2放出核酸配列（例えば、C S 2）は、第2增幅核酸配列（例えば、A P 2）を固体支持体に連結する。実施形態では、第2增幅核酸配列（例えば、A P 2）は、第2放出核酸配列（例えば、C S 2）を、標的ポリヌクレオチド捕捉配列（例えば、オリゴd T T₂₀）に連結する。したがって、本明細書で提供する一本鎖c D N Aは、デオキシチミン配列（例えば、オリゴd T T₂₀）に共有結合的に付着させることにより、固体支持体に固定することができ、ここで、該デオキシチミン配列は第2增幅核酸配列（例えば、A P 2）に連結し、これは、第2放出核酸配列（例えば、C S 2）を通じて固定支持体に結合する。

【0117】

上記のように、標的ポリヌクレオチドは一本鎖D N A（例えば、c D N A）とすることができる。標的ポリヌクレオチドがc D N Aである場合、該標的ポリヌクレオチドは第2アンカーポリヌクレオチドを通じて固体支持体に連結することができる。第2アンカーポリヌクレオチドは、標的ポリヌクレオチド捕捉配列を含む。実施形態では、標的ポリヌクレオチド捕捉配列は、デオキシチミン配列であり、これは本明細書ではオリゴd (T)₂₀ともいう。

【0118】

標的ポリヌクレオチドがR N A（標的リボ核酸）である場合、該標的リボ核酸は、標的ポリヌクレオチド捕捉配列（例えば、オリゴd (T)₂₀）へのハイブリダイズを通して固体支持体に固定することができる。上記のように、標的ポリヌクレオチド捕捉配列は、本明細書で提供する第2アンカーポリペプチドの一部を形成し得る。標的ポリヌクレオチド捕捉配列がオリゴd (T)₂₀である場合、標的リボ核酸は、そのポリアデニル化3'末端を通じて標的ポリヌクレオチド捕捉配列にハイブリダイズする。

【0119】

8.4 アダプター核酸

本明細書に提供する方法では、アダプター核酸配列を、切断済み標的ポリヌクレオチドにライゲーションすることにより、タグ付き核酸配列を形成する。本明細書で提供するアダプター核酸配列は、切断済み標的ポリヌクレオチド（例えば、c D N A）にライゲーションすることが可能な任意の核酸とすることができる。アダプター核酸配列は、プライマー増幅配列を含むため、標的ポリヌクレオチドの増幅手段を提供する。一実施形態では、アダプター核酸は増幅プライマー相補体（A P 1'）を含み、これを用いて、第1アンカーポリヌクレオチドの増幅プライマー（A P 1）にアニールすることにより、例えばブリッジP C Rにより標的ポリヌクレオチドを増幅する方法を提供する。

【0120】

実施形態では、アダプター核酸は、増幅プライマー相補体（A P 1'）を含み、これは増幅プライマー（A P 1）にアニールすることができる。これは固体支持体には付着しないが、反応溶液に加えることにより、本明細書でwildfireP C Rともいう等温テンプレートによる標的ポリヌクレオチドの増幅を可能にする。

【0121】

実施形態では、アダプター核酸配列は二本鎖核酸である。実施形態では、アダプター核酸配列は一本鎖核酸である。実施形態では、アダプター核酸配列は第1増幅核酸配列相補体を含む。第1増幅核酸配列相補体は、上記の第1増幅核酸配列に対し特異的に相補的な核酸配列である。本明細書で提供する用語の「第1増幅核酸配列」および「第2増幅核酸配列」は、標的核酸配列を認識する单離核酸（第1増幅核酸配列相補体および第2増幅核酸配列相補体）を意味する。第1増幅核酸配列および第2増幅核酸配列は短い核酸分子、例えば、長さが10ヌクレオチド以上のD N Aオリゴヌクレオチドである。連続相補的オリゴヌクレオチド（例えば、第1増幅核酸配列相補体または第2増幅核酸配列相補体）は、ハイブリダイズを通して第1増幅核酸配列および第2増幅核酸配列へアニールすること

10

20

30

40

50

ができる。P C R または他の当技術分野で既知の核酸増幅法を用いることにより標的ポリヌクレオチドを増幅しながら、D N A ポリメラーゼ酵素により、連続相補的オリゴヌクレオチドを標的ポリヌクレオチドに沿って伸長することができる。実施形態では、第1増幅核酸配列および第2増幅核酸配列の長さは、独立して、約15、20、25、30、または50以上のヌクレオチドである。実施形態において、第1増幅核酸配列および第2増幅核酸配列の長さは、独立して、約10～約100ヌクレオチドである。実施形態において、第1増幅核酸配列および第2増幅核酸配列の長さは、独立して、約15～約95ヌクレオチドである。

【0122】

アダプター核酸配列が第1増幅核酸配列相補体を含む場合、第1増幅核酸配列相補体は、第1増幅核酸配列にハイブリダイズすることができる。上記のように、第1増幅核酸配列は本明細書では増幅プライマー1またはA P 1ともいい、第1アンカーポリヌクレオチドの一部を形成し、これは固体支持体に固定する。本明細書で提供する方法では、第1アンカーポリヌクレオチドは固体支持体に共有結合的に結合することができる。実施形態では、第1増幅核酸配列相補体を、P C R 増幅を可能とする条件下で第1増幅核酸配列にハイブリダイズし、それにより標的ポリヌクレオチド（つまり、タグ付き核酸配列）を増幅する。実施形態では、ステップ（i v）のライゲーションの後、タグ付き核酸配列を、P C R 增幅を可能とする条件下で、第1増幅核酸配列に接触させる。実施形態では、第1増幅核酸配列は、第1増幅核酸配列相補体に対し少なくとも部分的に相補的である。実施形態では、第1増幅核酸は固体支持体に付着しない。さらなる実施形態では、第1増幅核酸を第1増幅核酸にハイブリダイズする。

10

【0123】

8.5 タグ付きポリヌクレオチドのアレイ

当業者は、本明細書で提供する核酸配列にタグ付けする方法は、複数の核酸配列のタグ付けに適用可能であることを即座に認識しよう。本明細書で提供する方法が、複数の核酸配列にタグ付けするステップを含む場合、標的ポリヌクレオチドはそれぞれ独立して異なる。そのため、標的ポリヌクレオチドは不均一となり得る。実施形態では、該複数の標的ポリヌクレオチドは複数のc D N A 配列である。実施形態では、該複数の標的ポリヌクレオチドは複数のリボ核酸配列である。該複数の標的ポリヌクレオチドは、単離細胞に由来し得る。本明細書で提供する単離細胞は、該細胞が事前に発生した細胞培養物、組織、臓器、または有機体中のほかの構成要素（細胞）から実質的に分離した、または、精製した細胞である。「単離」した細胞には、標準的な精製方法により精製した細胞が含まれる。

20

【0124】

一態様では、複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成する方法を提供する。該方法によると、（i）複数の不均一な標的ポリヌクレオチドを固体支持体に固定することにより、複数の不均一な固定化標的ポリヌクレオチドを形成する。（i i）複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドを、前記不均一な固定化標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることにより、複数の認識オリゴヌクレオチド-標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成する。（i i i）前記認識オリゴヌクレオチド-標的ポリヌクレオチドハイブリッドを、切断剤で切断することにより、複数の切断済み認識オリゴヌクレオチド-切断済み標的ポリヌクレオチドハイブリッドを形成する。（i v）前記複数の切断済み標的ポリヌクレオチドにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成する。上記のように、同一の定義を、複数の不均一なタグ付きポリヌクレオチドを形成する態様（その実施形態を含む）に適用する。例えば、固体支持体はビーズ構造とすることができます。複数の不均一な標的ポリヌクレオチドは一本鎖c D N A 配列とすることができます。切断剤は制限酵素とすることができます。

30

【0125】

8.6 c D N A タグ付けの実施形態

上記のように、標的ポリヌクレオチドはc D N A とすることができます。したがって、一態様において、タグ付き一本鎖c D N A を形成する方法を提供する。該方法によると、（

40

50

i) 標的 c DNA を固体支持体に固定することにより、固定化標的 c DNA を形成する。
 (i i) 前記固定化標的 c DNA に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - c DNA ハイブリッドを形成する。
 (i i i) 前記認識オリゴヌクレオチド - c DNA ハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み c DNA ハイブリッドを形成する。
 (i v) 前記切断済み c DNA にアダプター核酸をライゲーションすることにより、タグ付き一本鎖 c DNA を形成する。標的ポリヌクレオチドが c DNA である場合、該 c DNA は、当技術分野で一般的に知られる固定化方法、および上記の固定化方法を用いて、固体支持体に固定することができる。例えば、該 c DNA は、共有結合により、化学的に修正した(官能化した)固体支持体に直接的に固定することができる。他の実施形態では、該 c DNA は、上記のように第 2 アンカーポリヌクレオチドを通じて固体支持体に付着する場合、m RNA 分子を、該 m RNA のポリアデニル化 3' 末端と標的ポリヌクレオチド捕捉配列の核酸配列(例えば、デオキシチミン配列またはオリゴ d T T²⁰)との間の水素結合により固体支持体にハイブリダイズすることで、固定化 m RNA を形成する。上記のように、標的ポリヌクレオチド捕捉配列は、第 2 アンカーポリペプチドの一部を形成する。固定化 m RNA をその次に逆転写することにより、RNA : DNA ハイブリッドを形成する。RNA : DNA ハイブリッドをエンドリボヌクレアーゼ酵素(例えば RNase H)に接触させることにより該 RNA : DNA ハイブリッドの m RNA を分解することで、標的ポリヌクレオチド捕捉配列を通じて固体支持体に付着した一本鎖 c DNA を形成することができる。固定化一本鎖 c DNA (標的 c DNA) を、上記のように認識オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド - c DNA ハイブリッドを形成することができる。上記のように、認識オリゴヌクレオチドは、縮重核酸配列が隣接する切断剤認識配列(例えば、Bae G 1 認識配列)を含むことができる。認識オリゴヌクレオチド - c DNA ハイブリッドを切断剤(例えば Bae G 1)で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み c DNA ハイブリッドを形成することができる。上記のように、切断済み認識オリゴヌクレオチド - 切断済み c DNA ハイブリッドは、5' オーバーハングを含み得る。上記のアダプター核酸を切断済み c DNA にライゲーションすることにより、タグ付き一本鎖 c DNA を形成する。当技術分野で一般的に知られている任意のライゲーション方法および DNA リガーゼを用いて、アダプター核酸を切断済み c DNA にライゲーションすることができる。
 10
 20
 30
 40

【 0126 】

8.7 RNA タグ付けの実施形態

上記のように、標的ポリヌクレオチドはリボ核酸とすることができます。したがって、別の態様において、タグ付き核酸配列を形成する方法を提供する。該方法によると、(i) 標的リボ核酸を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸を形成する。
 (i i) 前記固定化標的リボ核酸を逆転写することにより、RNA : DNA ハイブリッドを形成する。
 (i i i) 前記 RNA : DNA ハイブリッドを RNA : DNA 切断剤で切断することにより、切断済み RNA : DNA ハイブリッドを形成する。
 (i v) 前記切断済み RNA : DNA ハイブリッドにアダプター核酸をライゲーションする。
 (v) 前記リボ核酸配列を前記 RNA : DNA ハイブリッドから取り除くことにより、タグ付き核酸配列を形成する。標的リボ核酸を固体支持体に固定する場合、前記標的リボ核酸は m RNA とすることができます、固定化は、上記のように、前記 m RNA のポリアデニル化配列と、本明細書に記載のポリヌクレオチド捕捉配列との間の水素結合を通して実行することができる。m RNA の逆転写により RNA : DNA ハイブリッドを形成し、前記 RNA : DNA ハイブリッドは切断剤を用いて切断することができる。前記切断剤は、一方の鎖は DNA であり、もう一方の鎖は RNA である、DNA および RNA の二本鎖ハイブリッドを切断することができる制限エンドヌクレアーゼとすることができます。RNA : DNA ハイブリッドを切断する際、5' オーバーハング、3' オーバーハング、または、オーバーハングなしの平滑末端を生成することができる。そのため、切断済み RNA : DNA ハイブリッドは、5' オーバ
 50

ーハング、3'オーバーハング、または、平滑末端を含むことができ、その後、アダプターナуклеин酸にライゲーションすることができる。アダプターナуклеин酸をRNA:DNAハイブリッドにライゲーションしたら、前記RNAは、上記のようにエンドリボヌクレアーゼを用いて消化することにより取り除くことができ、これはタグ付き核酸配列の形成をもたらす。

【0127】

当業者は、即座に、本明細書で提供する核酸配列にタグ付けする方法は、複数の核酸配列のタグ付けに適用可能であると認識しよう。したがって、別の態様では、複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成する方法を提供する。該方法によると、(i)複数の不均一な標的リボ核酸配列を固体支持体に固定することにより、複数の不均一な固定化標的リボ核酸配列を形成する。(ii)前記不均一な固定化標的リボ核酸配列を逆転写することにより、複数の不均一なRNA:DNAハイブリッドを形成する。(iii)前記複数の不均一なRNA:DNAハイブリッドをRNA:DNA切断剤で切断することにより、複数の切断済みRNA:DNAハイブリッドを形成する。(iv)前記複数の切断済みRNA:DNAハイブリッドにアダプターナуклеин酸配列をライゲーションし、(v)前記リボ核酸配列を前記切断済みRNA:DNAハイブリッドから取り除くことにより、複数の不均一なタグ付き核酸配列を形成する。

【0128】

8.8 認識オリゴヌクレオチドライブリ

別の態様では、複数の不均一な認識オリゴヌクレオチドを含む認識オリゴヌクレオチドライブリであって、該不均一な認識オリゴヌクレオチドはそれぞれ、縮重核酸配列が隣接した制限酵素認識配列を含むライブリを提供する。本明細書で提供する縮重核酸配列は、制限酵素認識配列（本明細書では切断剤認識配列ともいう）に隣接し、縮重ヌクレオチドを含む。縮重ヌクレオチドは、異なる標的ポリヌクレオチド（例えば、一本鎖cDNA）に対し相補的、または部分的に相補的とすることができます。用語「部分的に相補的」とは、異なる標的ポリヌクレオチド（各標的ポリヌクレオチドは異なっている）以外にハイブリダイズすることが可能な認識オリゴヌクレオチドを意味する。実施形態では、切断剤認識配列には、縮重核酸配列が隣接する。実施形態では、縮重核酸配列は標的ポリヌクレオチド（例えば、cDNA）に対し部分的に相補的である。実施形態では、縮重核酸配列は標的ポリヌクレオチドに対し特異的に相補的である。実施形態では、認識オリゴヌクレオチドは5' A_n-X_m-B_n 3'の構造を有し、ここにおいて、AおよびBは、標的ポリヌクレオチドを含む配列に対し相補的、または部分的に相補的であるヌクレオチド配列であり、nは独立して10～40の整数である。Xは切断剤認識配列であり、mは4～10の整数である。切断剤は、上記のように制限酵素（例えば、BaeG1）である。実施形態では、ライブリはマイクロ流体装置の一部を形成する。

【0129】

8.9 PCR增幅

本明細書で提供するタグ付きポリヌクレオチドを增幅し、続いて配列決定することができる。当技術分野で既知の任意の核酸增幅法を用いることができる。特異的で非限定的な一例では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて、本明細書で提供するタグ付きポリヌクレオチドを增幅する。実施形態では、本明細書で提供するタグ付きポリヌクレオチドを、ブリッジPCRを用いて増幅する。したがって、実施形態では、PCR增幅はブリッジPCRである。ブリッジPCRの技法は当技術分野で周知であり、例えば、国際公開第2013/131962号に記載されており、これはあらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。実施形態では、本明細書で提供するタグ付きポリヌクレオチドを、等温テンプレートウォーキング（isothermal template walking）法を用いて増幅する。等温テンプレートウォーキング法は当技術分野で周知の増幅法であり、例えば、Ma Z et al., PNAS 2013;110:14320-14323に記載されており、これはあらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。実施形態において、該方法は、接触ステップの後、増幅したcDNAを配列決定するステップを含む。実施形態において、各ステップはマイクロ流体装置で行われる。提供する本発明に有用

10

20

30

40

50

なマイクロ流体装置の例は、米国特許出願公開第2013/0302883号明細書、同第2013/0302884号明細書、同第2013/0296196号明細書、同第2013/0295602号明細書、および同第2013/0302807号明細書に公開されており、これらはあらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【0130】

別の態様では、cDNA配列を増幅する方法を提供する。該方法によると、(i) 単離細胞から抽出したRNA分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列を形成する。(ii) 前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化RNA:DNAハイブリッドを形成する。(iii) 前記リボ核酸配列を、RNA:DNAハイブリッドから取り除くことにより、固定化cDNA配列を形成する。(iv) 前記固定化cDNA配列に認識オリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることにより、認識オリゴヌクレオチド-cDNAハイブリッドを形成する。(v) 前記認識オリゴヌクレオチド-cDNAハイブリッドを切断剤で切断することにより、切断済み認識オリゴヌクレオチド-切断済みcDNAハイブリッドを形成する。(vi) 前記切断済みcDNAにアダプター核酸配列をライゲーションすることにより、タグ付きcDNA配列を形成する。(vii) 前記タグ付きcDNA配列を、PCR増幅を可能とする条件下で増幅核酸配列にハイブリダイズすることにより、cDNA配列を増幅する。実施形態では、増幅核酸配列を前記固体支持体に共有結合的に結合させる。実施形態では、前記増幅cDNAを、ステップ(vi)でハイブリダイズした後、配列決定する。当技術分野で既知である任意の配列決定方法を、前記増幅cDNAの配列決定に用いることができる。

【0131】

別の態様では、cDNA配列を増幅する方法を提供する。該方法によると、(i) 単離細胞から抽出したRNA分子を固体支持体に固定することにより、固定化リボ核酸配列を形成する。(ii) 前記固定化リボ核酸配列を逆転写することにより、固定化RNA:DNAハイブリッドを形成する。(iii) 前記RNA:DNAハイブリッドをRNA:DNA切断剤で切断することにより、切断済みRNA:DNAハイブリッドを形成する。(iv) 前記切断済みRNA:DNAハイブリッドに、アダプター核酸配列をライゲーションする。(v) 前記リボ核酸を前記切断済みRNA:DNAハイブリッドから取り除くことによりタグ付きcDNA配列を形成し、(vi) 前記タグ付きcDNA配列を、PCR増幅を可能とする条件下で増幅核酸配列に接触させることにより、前記cDNA配列を増幅する。実施形態では、前記増幅核酸配列を前記固体支持体(例えば、AP1)に共有結合的に結合させる。実施形態では、前記増幅cDNAを、ステップ(vi)で接触させた後に配列決定する。実施形態では、PCR増幅はPCRブリッジ増幅である。実施形態では、PCR増幅は等温テンプレートウォーキングである。実施形態では、単一細胞は、単離細胞の不均一な集団から単離する。実施形態では、本明細書で提供する方法の各ステップは、マイクロ流体装置において行う。

【0132】

前記発明を明確にし、理解する目的のために、該発明を詳細に記載してきたが、当業者は、いったん本開示に精通したら、添付の特許請求の範囲の発明の範囲から逸脱することなく、形および詳細について様々な変更を施すことが可能であることを理解しよう。したがって、本発明は、上記の方法論および構成の、厳密な構成要素または詳細に限定されない。プロセス自体に必要な、または固有の範囲を除き、図面を含む本開示に記載の方法またはプロセスのステップまたは段階に対し、特定の順番が意図される、または含意されることはない。多くの場合、記載の方法の目的、効果、または趣旨を変えることなく、プロセスステップの順番を変えることができる。

【0133】

本明細書で言及したすべての刊行物および特許文献は、それぞれの刊行物または文献が参照により本明細書に組み込まれることを個別的かつ具体的に意味するように、参照により本明細書に組み込まれるものとする。刊行物および特許文献(特許、公開特許出願、お

10

20

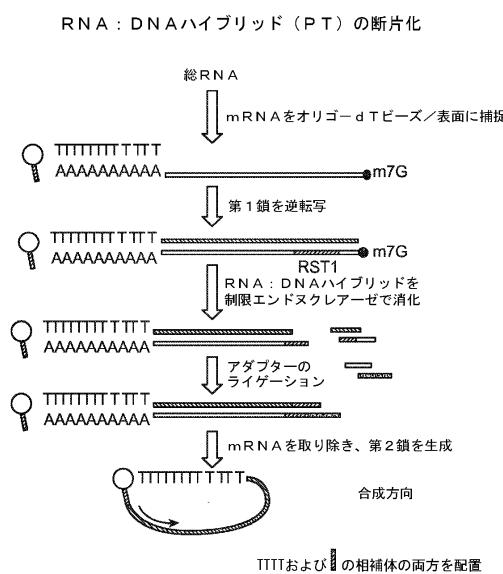
30

40

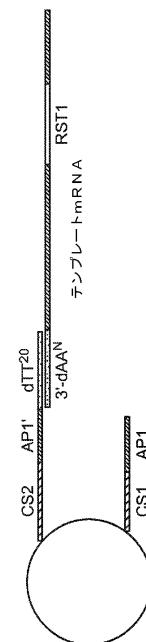
50

より未公開特許出願)についての言及は、これらのいずれかの文献が関連先行技術であることの承認として意図されるものではなく、同文献の内容または日付についての承認を構成するものでもない。

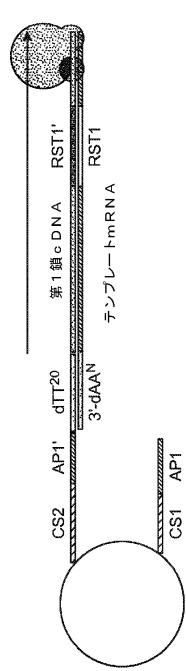
【図1】



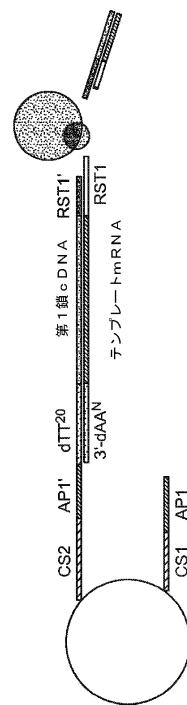
【図2】



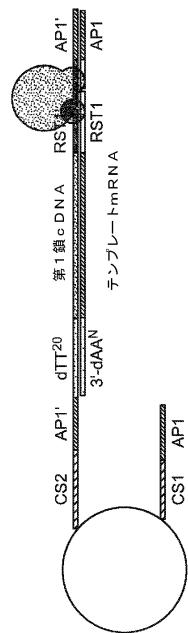
【図3】



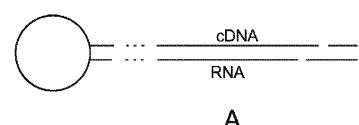
【図4】



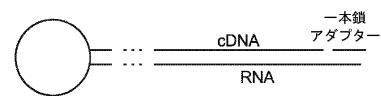
【図5】



【図6】



A

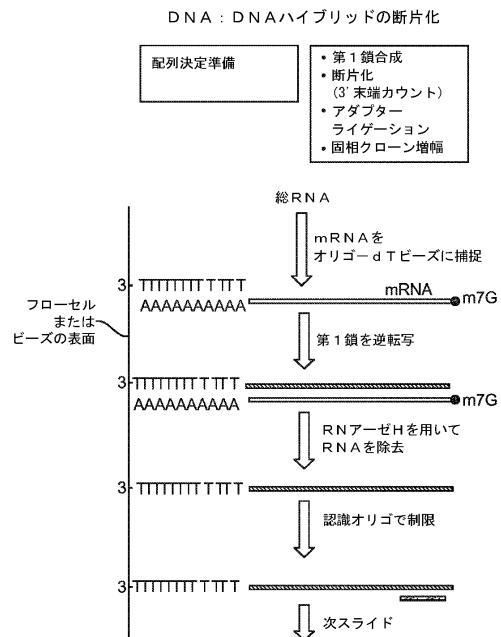


B

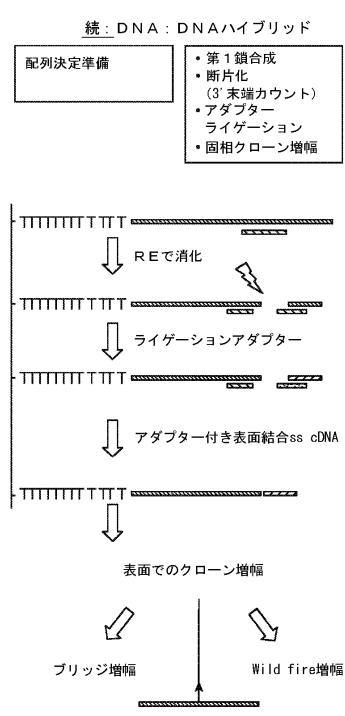
【図7】



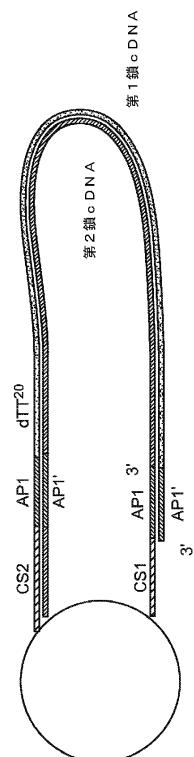
【図8】



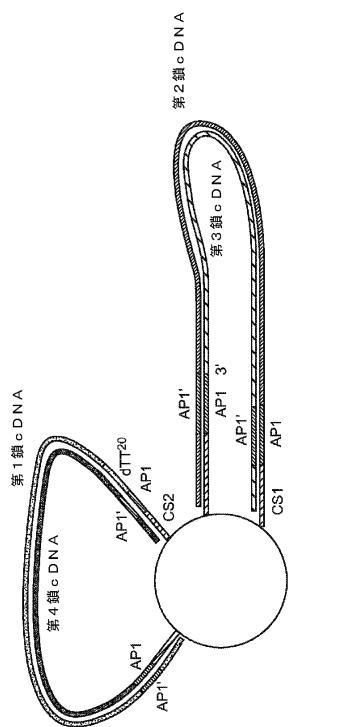
【図9】



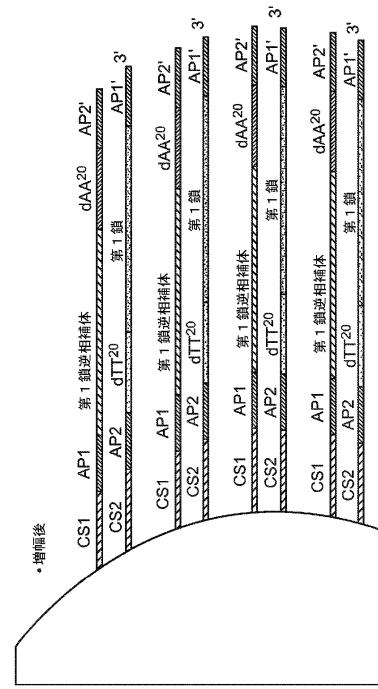
【図10】



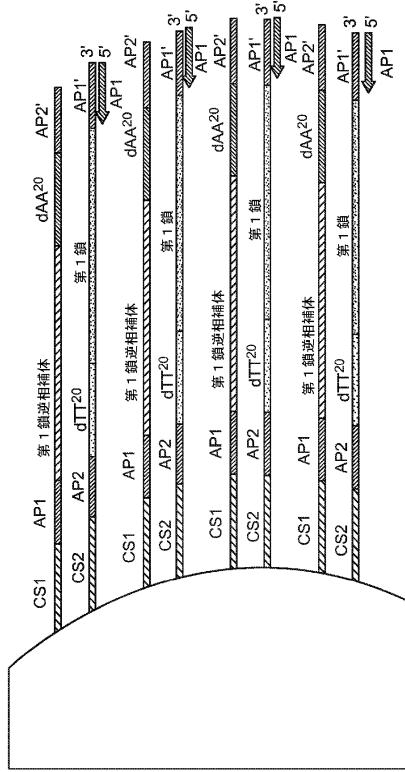
【図11】



【図12】



【図13】



【図14】

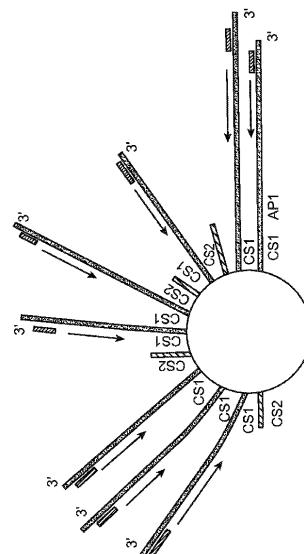
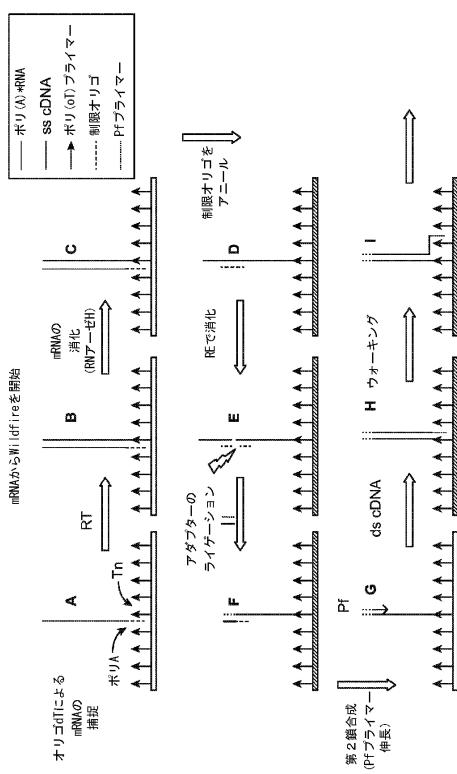
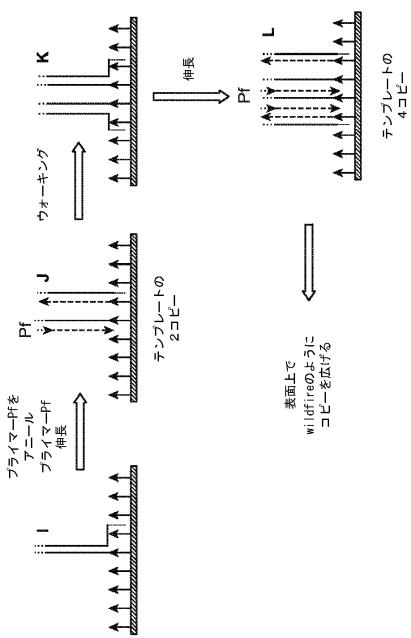


FIG. 14

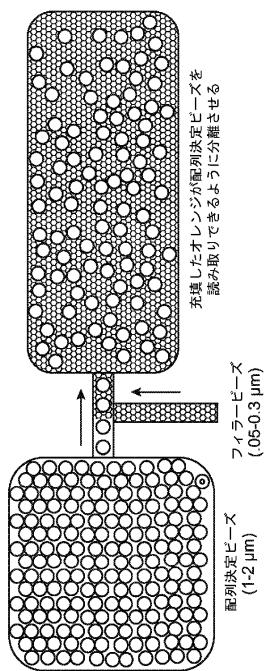
【図 15】



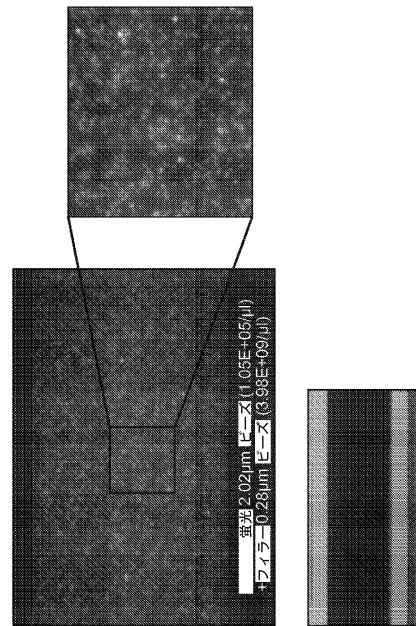
【図 16】



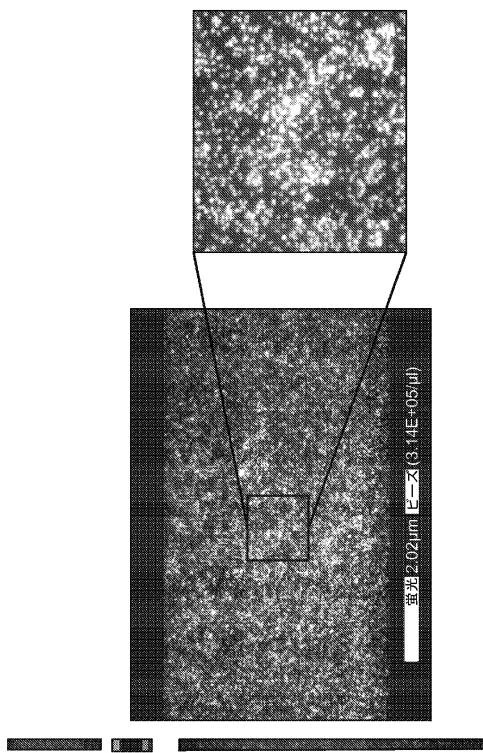
【図 17】



【図 18】



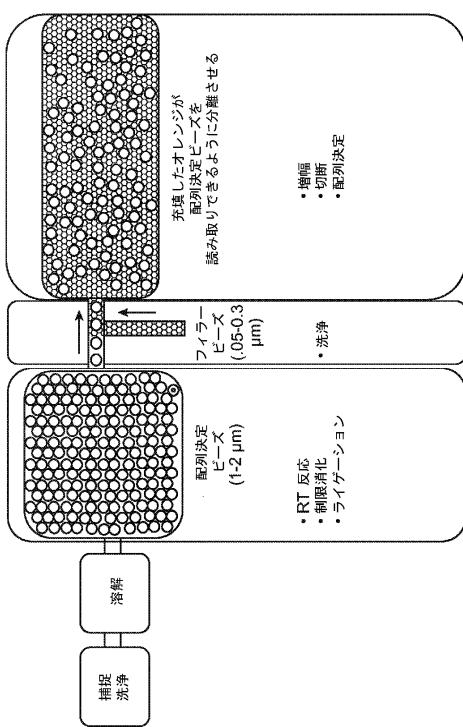
【図19】



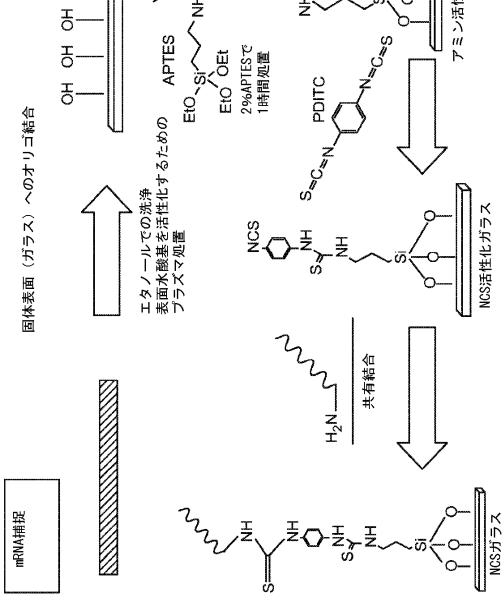
【図21】

表面官能化CPG					
		化学反応	表面処置	5' オリゴ修正	架橋剤/活性剤
1	イソチオシアネット	アミノプロピリルトリエトキシラジン		1,4フェニレンジンチオシアナート	
2	エポキシド	エポキシシラン		アミン	なし
3	チオール	アミノプロピリルトリエトキシラジン		チオール	s-HMS (m-マレイイドベンゾイル- ヒドロキシスルホン酸ジエチル)
4	ホスホロチオエート	誘導体化アクリルアミドデル・ BRAPA (M- プロモセトアミジベンチル アクリラミド)		ホスホロチオエート (PS)	なし
					BRAPA、TEMED、およびペルオキソ 二酸化カリウムを有する 2%アクリラミドゲル

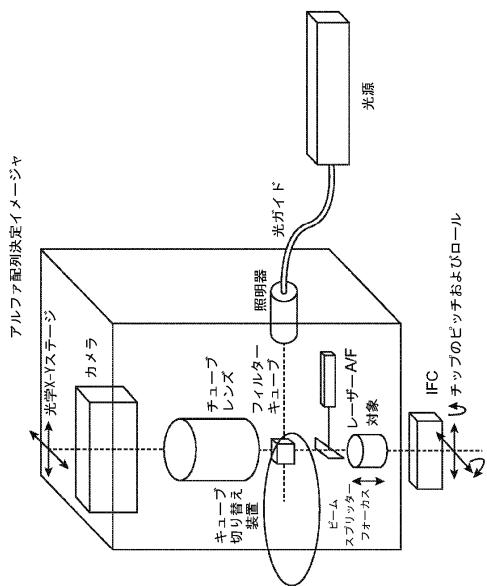
【 図 2 0 】



【図22】



【図23】



フロントページの続き

(72)発明者 ジェイソン エイ エイ ウエスト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ ショアライン コ
ート 7000 スイート 100

(72)発明者 ブライアン ファウラー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ ショアライン コ
ート 7000 スイート 100

(72)発明者 ズー・ホウエイ チャーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ ショアライン コ
ート 7000 スイート 100

(72)発明者 ク里斯チャン エフ ジョンソン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ ショアライン コ
ート 7000 スイート 100

(72)発明者 マーク エー アンガー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94080 サウス サンフランシスコ ショアライン コ
ート 7000 スイート 100

審査官 山本 匠子

(56)参考文献 特表2002-503954 (JP, A)
米国特許出願公開第2010/0035249 (US, A1)
特表2003-530853 (JP, A)
特開2004-097158 (JP, A)
Nucleic Acids Research, 2005年, Vol.33, No.9, e81

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
C12Q 1/00-3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIIDS
(STN)