

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-505508

(P2024-505508A)

(43)公表日 令和6年2月6日(2024.2.6)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6834(2018.01)	C 1 2 Q 1/6834	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z Z N A
C 1 2 Q 1/6806(2018.01)	C 1 2 Q 1/6806	Z
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)	C 1 2 Q 1/6844	Z
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)	C 1 2 Q 1/6869	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全41頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-545752(P2023-545752)	(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4年1月28日(2022.1.28)	(71)出願人	502279294 イルミナ ケンブリッジ リミテッド 英国シービー21・6ディエフ、ケンブ リッジシャー、ケンブリッジ、グレート ・アピントン、グラント・パーク19番
(85)翻訳文提出日	令和5年9月20日(2023.9.20)	(74)代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
(86)国際出願番号	PCT/US2022/014329	(74)代理人	100132263 弁理士 江間 晴彦
(87)国際公開番号	WO2022/165188	(74)代理人	100221501
(87)国際公開日	令和4年8月4日(2022.8.4)		
(31)優先権主張番号	63/143,680		
(32)優先日	令和3年1月29日(2021.1.29)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ポリヌクレオチドによるフローセルの播種効率を改善するための方法、組成物、及びキット

(57)【要約】

本開示は、ポリヌクレオチドによるフローセルの播種効率を改善するための方法、組成物、及びキット、並びに配列決定のためのそれらの適用を含む適用に関する。

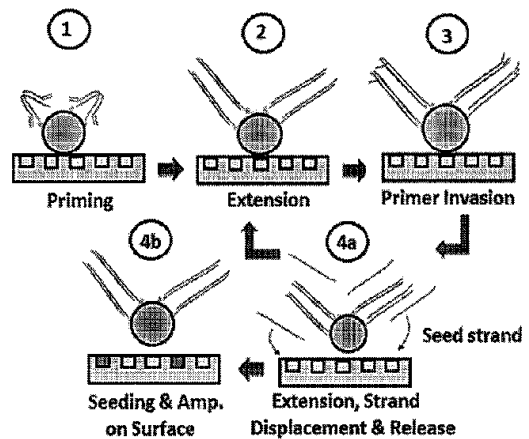


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、

(i) 第 1 のプライマーを、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることによって、前記ポリヌクレオチド鎖の 5' 末端が、第 1 の付着剤を使用して前記ビーズに結合され、前記ポリヌクレオチド鎖が、前記第 1 のプライマーの配列に相補的である配列を含むアダプタを含み、前記第 1 のプライマーが、溶液中にある、アニーリングすることと、

(i i) ポリメラーゼを使用して前記第 1 のプライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物を形成することと、

(i i i) 追加量の前記第 1 のプライマー及びリコンビナーゼを使用することによって、前記二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することと、

(i v) ポリメラーゼを使用して工程 (i i i) における前記追加の第 1 のプライマーから伸長させることによって、工程 (i i) の前記二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖を前記ビーズから置換及び放出することと、

(v) 第 2 の付着剤を使用して、工程 (i v) で放出された前記鎖をフローセルの表面に付着させることによって、フローセルに播種することと、

任意選択的に、工程 (i i i) ~ (v) を複数回繰り返すことと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記ビーズが、略球形又は略卵形の形状である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ビーズが、約 500 nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、3.6 μ M、3.7 μ M、3.8 μ M、3.9 μ M、4 μ M、4.1 μ M、4.2 μ M、4.3 μ M、4.4 μ M、4.5 μ M、4.6 μ M、4.7 μ M、4.8 μ M、4.9 μ M、5.0 μ M、5.1 μ M、5.2 μ M、5.3 μ M、5.4 μ M、5.5 μ M、5.6 μ M、5.7 μ M、5.8 μ M、5.9 μ M、6 μ M、6.1 μ M、6.2 μ M、6.3 μ M、6.4 μ M、6.5 μ M、6.6 μ M、6.7 μ M、6.8 μ M、6.9 μ M、7 μ M、7.1 μ M、7.2 μ M、7.3 μ M、7.4 μ M、7.5 μ M、7.6 μ M、7.7 μ M、7.8 μ M、7.9 μ M、8 μ M、8.1 μ M、8.2 μ M、8.3 μ M、8.4 μ M、8.5 μ M、8.6 μ M、8.7 μ M、8.8 μ M、8.9 μ M、9.0 μ M、9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M、9.9 μ M、10 μ M、又は前述の距離のうちのいずれか 2 つを含むか若しくはその間の範囲の直径を有する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ビーズが、約 500 nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、又は前述の距離のうちのいずれか 2 つを含むか若しくはその間の範囲の直径を有する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ビーズが、ポリマー材料、シリカ材料、ジルコニア材料、又は超常磁性材料から構成されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記ビーズが、超常磁性材料から構成されている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ビーズが、ビオチン、ストレプトアビジン、アミン基、カルボキシル基、エポキシ

10

20

30

40

50

基、トシル基、抗体若しくは抗原、ポリヒスチジンタグ、若しくは金属イオンを含む担体、及び受容体若しくはリガンドから選択される、コーティング又は層で官能化されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記ビーズが、前記フローセルの 1 つ以上の表面上に固定化されていない、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記ビーズが、付着剤を使用して前記フローセルの 1 つ以上の表面上に固定化されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記付着剤が、ビオチン/ストレプトアビジン結合又は 2 つの相補的配列間の塩基対合である、請求項 9 に記載の方法。

10

【請求項 11】

前記ビーズに結合した前記ポリヌクレオチド鎖が、ゲノム DNA を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記ビーズに結合した前記ポリヌクレオチド鎖が、長い鋳型 DNA を含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記ビーズに結合した前記ポリヌクレオチド鎖が、対象の試料からの DNA を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 14】

前記対象の試料が、尿、血液、唾液、組織、血清、血漿、痰、胆汁、糞便、毛、皮膚、及び/又は初代細胞試料である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチド鎖が、前記ビーズに連結されたトランスポソームの使用によって前記ビーズにタグメント化され結合される、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記ビーズに連結された前記トランスポソームが、トランスポザーゼ Tn5、又はその変異体若しくはバリエーションを含む、請求項 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチド鎖が、第 1 の付着剤によってビーズに結合された配列の第 1 の部分と、前記ビーズに連結されたトランスポソーム及びリガーゼの使用によって前記配列の前記第 1 の部分にタグメント化されライゲーションされた配列の第 2 の部分と、を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記ビーズに連結された前記トランスポソームが、トランスポザーゼ Tn5、又はその変異体若しくはバリエーションを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記配列の前記第 1 の部分が、1 つ以上のバーコード若しくはインデックス配列、1 つ以上のユニバーサルプライマー配列、及び/又はモザイク末端配列を含む、請求項 17 又は 18 に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記配列の前記第 1 の部分が、1 つ以上のバーコード又はインデックス配列、1 つ以上のユニバーサルプライマー配列、及びモザイク末端配列を含み、前記モザイク末端配列が、前記配列の前記第 1 の部分の 3' 末端に位置する、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記アダプタが、前記ポリヌクレオチド鎖の前記配列の前記第 1 の部分と相補的であり、前記第 1 の部分とハイブリダイズすることができる第 1 の配列を含み、前記アダプタが

50

、前記ポリヌクレオチド鎖の前記配列の前記第 1 の部分と相補的ではなく、前記第 1 の部分とハイブリダイズすることができない第 2 の配列を含む、請求項 17 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記アダプタの前記第 2 の配列が、前記第 1 のプライマーの前記配列に相補的である配列を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記ポリヌクレオチド鎖の配列の前記第 2 の部分が、gDNAを含む、請求項 17 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記ポリヌクレオチド鎖の配列の前記第 2 の部分が、長い鋳型DNAを含む、請求項 17 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記ポリヌクレオチド鎖の配列の前記第 2 の部分が、対象の試料からのDNAを含む、請求項 17 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記対象の試料が、尿、血液、唾液、組織、血清、血漿、痰、胆汁、糞便、毛、皮膚、及び/又は初代細胞試料である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記第 1 の付着剤及び前記第 2 の付着剤が、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体から選択される、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記第 1 の付着剤が、ビオチン/ストレプトアビジン又はアビジン結合であり、前記第 2 の付着剤が、2つの相補的配列間の塩基対合である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記ポリヌクレオチド鎖が、5'末端にビオチン残基を含み、前記ビーズが、ストレプトアビジン残基を含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 1 のプライマーが、配列番号 1 又は配列番号 2 の配列を有する、請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 のプライマーが、配列番号 2 の配列を有する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

DNAポリメラーゼを使用して、前記第 1 のプライマーから前記配列を伸長する、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記方法が、前記ポリヌクレオチド鎖の線形コピーを提供する、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、

(i) ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖を含むビーズを提供することであって、前記ポリヌクレオチド鎖の 5'末端が、第 1 の付着剤を使用して前記ビーズに結合され、前記ポリヌクレオチド鎖が、前記第 1 のプライマーの配列に相補的である配列を含むアダプタを含み、前記ビーズが、結合した第 1 の増幅プライマーも含み、前記第 1 の増幅プライマーが、第 3 の付着剤によって前記ビーズに結合され、前記第 1 の増幅プライマーが、前記第 1 のプライマーの前記配列と異なり、該配列と相補的でない配列を有し、前記ポリヌクレオチド鎖が、前記第 1 の増幅プライマーに相補的である配列を含む、提供することと

10

20

30

40

50

(i i) 前記第 1 のプライマーを、ビーズに結合した前記ポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることによって、前記第 1 のプライマーが、溶液中にある、アニーリングすることと、

(i i i) ポリメラーゼを使用して前記第 1 のプライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物を形成することと、

(i v) 追加量の前記第 1 のプライマー及び / 又は前記第 1 の増幅プライマー並びにリコンビナーゼを使用することによって、前記二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することと、

(v) ポリメラーゼを用いて工程 (i v) における前記追加の第 1 のプライマー及び / 又は前記第 1 の増幅プライマーから伸長させることによって、工程 (i i i) の前記二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖を前記ビーズから置換及び放出することと、 10

(v i) 第 2 の付着剤を使用して、工程 (v) で放出された前記鎖をフローセルの表面に付着させることによって、フローセルに播種することと、

任意選択的に、工程 (i i) ~ (v i) を複数回繰り返すことと、を含む、方法。

【請求項 3 5】

ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、

(i) ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖を含むビーズを提供することによって、前記ポリヌクレオチド鎖の 5 ' 末端が、ビオチン / ストレプトアビジン結合を使用して前記ビーズに結合され、前記ビーズが、結合した第 2 の増幅プライマーも含み、前記第 2 の増幅プライマーが、第 3 の付着剤によって前記ビーズに結合され、前記第 2 の増幅プライマーが、第 2 のプライマーの配列とは異なり、該配列と相補的でない配列を有し、前記ポリヌクレオチド鎖が、前記第 2 の増幅プライマーに相補的である配列を含み、前記第 2 のプライマーに相補的である配列を含む、提供することと、 20

(i i) 前記第 2 の増幅プライマーを、ビーズに結合した前記ポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることと、

(i i i) ポリメラーゼを使用して前記第 2 の増幅プライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物を形成することと、

次いで、工程 (a) 又は工程 (b) 及び (b ') のいずれか：

(a) 前記ビーズをフローセルに導入し、熱及び過剰なビオチンを使用して、前記ビーズから前記二本鎖ポリヌクレオチド産物を一本鎖ポリヌクレオチド産物として放出することと、 30

又は

(b) 前記第 2 のプライマー及びリコンビナーゼを使用することによって、前記二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することによって、前記第 2 のプライマーが、溶液中にある、実施することと、

(b ') ポリメラーゼを用いて前記第 2 のプライマーから伸長させることによって、前記二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖を前記ビーズから置換及び放出することと、を行うことと、

(i v) 第 2 の付着剤を使用して、工程 (a) において放出された前記一本鎖ポリヌクレオチド産物又は工程 (b ') においてビーズから放出された前記二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をフローセルの表面に播種することと、及び 40

任意選択的に、工程 (i i) ~ (i v) を複数回繰り返すことと、を含む、方法。

【請求項 3 6】

ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、

(i) ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖を含むビーズを提供することによって、前記ポリヌクレオチド鎖の 5 ' 末端が、ビオチン / ストレプトアビジン結合を使用して前記ビーズに結合され、前記ビーズが、結合した第 1 及び第 2 の増幅プライマーも含み、前記第 1 及び第 2 の増幅プライマーが、付着剤によって前記ビーズに結合され、前記第 1 の増幅プライマーが、第 1 のプライマーの配列と少なくとも 99 % 同一である配列を有し、前記第 2 の増幅プライマーが、第 2 のプライマーの配列と少なくとも 99 % 同一である配列 50

を有し、前記ポリヌクレオチド鎖が、前記第 1 の増幅プライマーに相補的である配列を含み、前記第 2 の増幅プライマーに相補的である配列を含む、提供することと、

(i i) 前記第 1 及び第 2 の増幅プライマーを、ビーズに結合した前記ポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることと、

(i i i) ポリメラーゼを使用して前記第 1 及び第 2 の増幅プライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物のクラスタを形成することと、

次いで、工程 (A) 又は工程 (B) 及び (B ') のいずれか：

(A) 前記ビーズをフローセルに導入し、熱及び過剰なピオチンを使用して、前記ビーズから前記二本鎖ポリヌクレオチド産物を一本鎖ポリヌクレオチド産物として放出することと、

又は

(B) 前記第 1 のプライマー及び / 又は前記第 2 のプライマー並びにリコンビナーゼを使用することによって、前記二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することと、前記第 1 及び第 2 のプライマーが、溶液中にある、実施することと、

(B ') ポリメラーゼを用いて前記第 1 及び / 又は第 2 のプライマーから伸長させることによって、前記二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖を前記ビーズから置換及び放出することと、を行うことと、

(i v) 付着剤を使用して、工程 (A) において放出された前記一本鎖ポリヌクレオチド産物又は工程 (B ') においてビーズから放出された前記二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をフローセルの表面に播種することと、及び

任意選択的に、工程 (i i) ~ (i v) を複数回繰り返すことと、を含む、方法。

【請求項 37】

前記ビーズが、付着剤を使用して前記フローセルの前記表面に固定化されている、請求項 35 又は 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記付着剤が、ピオチン / ストレプトアビジン結合、共有結合、2 つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体から選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記付着剤が、ピオチン / ストレプトアビジン結合又は 2 つの相補的配列間の塩基対合である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記ビーズが、付着剤を使用して前記フローセルの前記表面に固定化されていない、請求項 35 又は 36 に記載の方法。

【請求項 41】

前記フローセルが、パターン化されたフローセルである、請求項 1 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

前記ビーズから放出された前記鎖が、前記フローセル表面上の捕捉剤によって結合される、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

前記捕捉剤が、パターン化されたフローセルの特徴のアレイ上に位置し、前記捕捉剤が、前記特徴間の間隙領域上に位置しない、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記パターン化されたフローセルの特徴の前記アレイが、ウェルである、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

前記捕捉剤が、前記フローセルの前記表面に結合した捕捉核酸であり、前記ビーズから放出された前記鎖が、前記フローセルの前記表面に結合した前記プライマーとハイブリダ

10

20

30

40

50

イズすることができる配列を含む、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記捕捉核酸が、ユニバーサル捕捉配列を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記ユニバーサル捕捉配列が、P 5 5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A - 3' (配列番号 1) 若しくは P 7 (5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3' (配列番号 2))、又はそれらの断片を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記ユニバーサル捕捉配列が、抗 P 5 : 5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T - 3' (配列番号 3) 若しくは抗 P 7 : 5' - T C G T A T G C C G T C T T C T G C 10 T T G - 3' (配列番号 4))、又はその断片を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記捕捉核酸が、配列決定プライマー結合部位 (S B S)、標的特異的捕捉領域、制限部位、及び / 又はリンカー領域を更に含む、請求項 4 6 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 S B S が、S B S 3 : 5' - A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T - 3' (配列番号 5) 又は S B S 8 : 5' - C G G T C T C G G C A T T C C T G C T G A A C C G C T C T T C C G A T C T - 3' (配列番号 6) である、請求項 4 9 に記載の方法。

20

【請求項 5 1】

前記方法が、

オンフローセル線形増幅反応を実施して、前記フローセル表面に播種された前記ポリヌクレオチドのコピーを作製することと、

前記コピーされたポリヌクレオチドを変性させ、フローセル表面に播種することと、を更に含む、請求項 1 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記オンフローセル線形増幅反応が、低温 A M S 1 第 1 伸長反応を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記コピーされたポリヌクレオチドが、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液の使用によって変性される、請求項 5 1 又は 5 2 に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

前記化学変性剤が、ホルムアミドである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記ハイブリダイゼーション緩衝液が、H T 1 を含む、請求項 5 3 又は 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記パターン化されたフローセル表面上の前記アレイ特徴が、互いに流体接触するように、前記混合物が、前記パターン化されたフローセルの前記表面を浅く覆う、請求項 5 3 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

前記方法が、

各播種されたポリヌクレオチドの複数のコピーを作製するためにブリッジ増幅を使用することによって、前記パターン化されたフローセルの前記表面上にクラスタを形成することを更に含む、請求項 5 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記方法が、

前記パターン化されたフローセルの前記表面上に生成された前記クラスタを合成によって配列決定することを更に含む、請求項 5 7 に記載の方法。

50

【請求項 59】

フローセルの表面上のポリヌクレオチドの播種効率を増加させるための方法であって、
オンフローセル線形増幅反応を実施して、前記フローセル表面に播種された前記ポリヌクレオチドのコピーを作製することと、
前記コピーされたポリヌクレオチドを変性させ、前記フローセル表面に播種することとを含む、方法。

【請求項 60】

前記オンフローセル線形増幅反応が、低温 AMS 1 第 1 伸長反応を含む、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記コピーされたポリヌクレオチドが、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション溶液の使用によって変性される、請求項 59 又は 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記化学変性剤が、ホルムアミドである、請求項 61 に記載の方法。

【請求項 63】

前記ハイブリダイゼーション溶液が、HT 1 を含む、請求項 61 又は 62 に記載の方法。

【請求項 64】

前記パターン化されたフローセル表面上の前記アレイ特徴が、互いに流体接触するように、前記混合物が、前記パターン化されたフローセルの前記表面を浅く覆う、請求項 59 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 65】

前記方法が、
各播種されたポリヌクレオチドの複数のコピーを作製するためにブリッジ増幅を使用することによって、前記パターン化されたフローセルの前記表面上にクラスタを形成することを更に含む、請求項 59 ~ 64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 66】

前記方法が、
前記パターン化されたフローセルの前記表面上に生成された前記クラスタを合成によって配列決定することを更に含む、請求項 65 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、その開示が参照により本明細書に組み込まれる、2021年1月29日に提出された米国特許仮出願第 63 / 143 , 680 号に対する優先権を主張するものである。

【0002】

(発明の分野)

本開示は、ポリヌクレオチドによるフローセルの播種効率を改善するための方法、組成物、及びキット、並びに配列決定のためのそれらの適用を含む適用に関する。

【背景技術】

【0003】

DNA 配列決定は、急速に変化している期間であり、キャピラリー配列決定は、もはやほとんどの超高スループット用途に選択される技術ではない。数百万の異なる DNA 鋳型の配列を同時に得るためにフローセル内でプライム合成を利用する新世代の機器は、その分野を変えた。

【0004】

次世代配列決定 (next-generation sequencing、NGS) プラットフォームは、典型的には、核酸断片ライブラリを利用する。核酸断片ライブラリは、PCR ベースの方

10

20

30

40

50

法又はトランスポゾンベースの方法を使用して調製され得る。後者の場合、遊離トランスポゾン末端及び修飾トランスポザーゼを使用して、トランスポソーム複合体を形成する。次いで、トランスポソーム複合体は、核酸を断片化及びタグ付けして、シーケンサ対応ライブラリを生成するために使用される。トランスポソーム複合体は、溶液中で形成するか、又はビーズのような固体支持体に付着させることができる。フローセル中で固体支持体（例えば、トランスポソームビーズ）に結合したトランスポソーム複合体を使用するために、トランスポソーム複合体の核酸成分を放出し、次いで、フローセル表面に播種しなければならない。典型的には、そうするための手段は、熱、又は過剰に使用される競合的結合剤（例えば、ピオチン）の使用による。しかしながら、熱は、フローセルにおける拡散の増加をもたらし、これは、形成されたクラスタの空間的な同一場所を破壊する。

10

【発明の概要】

【0005】

本開示は、フローセルの低い播種効率の問題に対処する組成物、方法及びキットを提供する。特に、本開示の組成物、方法、及びキットは、溶液中のプライマー（「溶液プライマー」）を用いてビーズ上の転位ポリヌクレオチドをコピーする排除増幅（exclusion amplification、Ex Amp）を使用することによって、ビーズからシードフローセルへの増幅核酸の放出を提供する。より具体的には、溶液プライマーの使用による鎖侵入は、コピーされた鎖の溶液中への置換をもたらし、それによってそれらをビーズから効果的に放出し、フローセルの播種を促進する。追加の実施形態では、ビーズは、ビーズからの増幅核酸の増幅及び置換を増強するために、結合された増幅プライマーを更に含み得る。他の実施形態では、フローセルの播種効率は、オンフローセル線形増幅及び浅層液体変性/播種ワークフローの使用によって改善され得るか、又は更に改善され得る。

20

【0006】

特定の実施形態では、本開示は、ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセル（flow cell）に播種（seed）するための方法であって、（i）第1のプライマーを、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることであって、ポリヌクレオチド鎖の5'末端が、第1の付着剤（attachment agent）を使用してビーズに結合され、ポリヌクレオチド鎖が、第1のプライマーの配列に相補的である配列を含むアダプタを含み、第1のプライマーが、溶液中にある、アニーリングすることと、（ii）ポリメラーゼを使用して第1のプライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物を形成することと、（iii）追加量の第1のプライマー及びリコンビナーゼ（recombinase）を使用することによって、二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することと、（iv）ポリメラーゼを使用して工程（iii）における追加の第1のプライマーから伸長させることによって、工程（ii）の二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をビーズから置換及び放出することと、（v）第2の付着剤を使用して、工程（iv）で放出された鎖をフローセルの表面に付着させることによって、フローセルに播種することと、任意選択的に、工程（iii）～（v）を複数回繰り返すことと、を含む、方法を提供する。更なる実施形態では、ビーズは、略球形又は略卵形の形状である。別の実施形態では、ビーズは、約500nm、1µM、1.1µM、1.2µM、1.3µM、1.4µM、1.5µM、1.6µM、1.7µM、1.8µM、1.9µM、2µM、2.1µM、2.2µM、2.3µM、2.4µM、2.5µM、2.6µM、2.7µM、2.8µM、2.9µM、3µM、3.1µM、3.2µM、3.3µM、3.4µM、3.5µM、3.6µM、3.7µM、3.8µM、3.9µM、4µM、4.1µM、4.2µM、4.3µM、4.4µM、4.5µM、4.6µM、4.7µM、4.8µM、4.9µM、5.0µM、5.1µM、5.2µM、5.3µM、5.4µM、5.5µM、5.6µM、5.7µM、5.8µM、5.9µM、6µM、6.1µM、6.2µM、6.3µM、6.4µM、6.5µM、6.6µM、6.7µM、6.8µM、6.9µM、7µM、7.1µM、7.2µM、7.3µM、7.4µM、7.5µM、7.6µM、7.7µM、7.8µM、7.9µM、8µM、8.1µM、8.2µM、8.3µM、8.4µM、8.5µM、8.6µM、8.7µM、8.8µM、8.9µM、9.0µM、9.

30

40

50

1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M、9.9 μ M、10 μ M、又は前述の距離のうちのいずれか2つを含むか若しくはその間の範囲の直径を有する。更に別の実施形態では、ビーズは、約500 nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、又は前述の距離のうちのいずれか2つを含むか若しくはその間の範囲の直径を有する。ある特定の実施形態では、ビーズは、ポリマー材料、シリカ材料、ジルコニア材料、又は超常磁性材料から構成されている。更なる実施形態では、ビーズは、超常磁性材料から構成されている。なお更なる実施形態では、ビーズは、ビオチン、ストレプトアビジン、アミン基、カルボキシル基、エポキシ基、トシル基、抗体若しくは抗原、ポリヒスチジンタグ、若しくは金属イオンを含む担体、及び受容体 (receptor) 若しくはリガンド (ligand) から選択される、コーティング又は層で官能化されている (functionalized)。特定の実施形態では、ビーズは、フローセルの1つ以上の表面上に固定化されていない。

10

【0007】

代替の実施形態では、ビーズは、付着剤を使用してフローセルの1つ以上の表面上に固定化されている。別の実施形態では、付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン結合又は2つの相補的配列間の塩基対合 (base pairing) である。更に別の実施形態では、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖は、ゲノムDNAを含む。更なる実施形態では、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖は、長い鋳型DNAを含む。なお更なる実施形態では、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖は、対象の試料 (subject's sample) からのDNAを含む。ある特定の実施形態では、対象の試料は、尿、血液、唾液、組織、血清、血漿、痰、胆汁、糞便、毛(または毛髪)、皮膚、及び/又は初代細胞試料である。別の実施形態では、ポリヌクレオチド鎖は、ビーズに連結されたトランスポソームの使用によってビーズにタグメント化され結合される。更に別の実施形態では、ビーズに連結されたトランスポソームは、トランスポザーゼ Tn5、又はその突然変異体若しくはバリエーション (variant) を含む。更なる実施形態では、ポリヌクレオチド鎖は、第1の付着剤によってビーズに結合された配列の第1の部分と、ビーズに連結されたトランスポソーム及びリガーゼの使用によって配列の第1の部分にタグメント化されライゲーションされた配列の第2の部分と、を含む。なお更なる実施形態では、ビーズに連結されたトランスポソームは、トランスポザーゼ Tn5、又はその突然変異体若しくはバリエーションを含む。別の実施形態では、配列の第1の部分は、1つ以上のバーコード (barcode) 若しくはインデックス配列、1つ以上のユニバーサルプライマー配列、及び/又はモザイク末端配列を含む。更に別の実施形態では、1つ以上のバーコード又はインデックス配列、1つ以上のユニバーサルプライマー配列、及びモザイク末端配列を含み、モザイク末端配列は、配列の第1の部分の3'末端に位置する。ある特定の実施形態では、アダプタは、ポリヌクレオチド鎖の配列の第1の部分と相補的であり、第1の部分とハイブリダイズすることができる第1の配列を含み、アダプタは、ポリヌクレオチド鎖の配列の第1の部分と相補的ではなく、第1の部分とハイブリダイズできない第2の配列を含む。別の実施形態では、アダプタの第2の配列は、第1のプライマーの配列に相補的である配列を含む。更に別の実施形態では、ポリヌクレオチド鎖の配列の第2の部分は、gDNAを含む。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチド鎖の配列の第2の部分は、長い鋳型DNAを含む。更なる実施形態では、ポリヌクレオチド鎖の配列の第2の部分は、対象の試料からのDNAを含む。

20

30

40

【0008】

なお更なる実施形態では、対象の試料は、尿、血液、唾液、組織、血清、血漿、痰、胆汁、糞便、毛(または毛髪)、皮膚、及び/又は初代細胞試料である。ある特定の実施形態では、第1の付着剤及び第2の付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属

50

イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体から選択される。別の実施形態では、第1の付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン又はアビジン結合であり、第2の付着剤は、2つの相補的配列間の塩基対合である。更に別の実施形態では、ポリヌクレオチド鎖は、5'末端にビオチン残基を含み、ビーズは、ストレプトアビジン残基を含む。更なる実施形態では、第1のプライマーは、配列番号1又は配列番号2の配列を有する。なお更なる実施形態では、第1のプライマーは、配列番号2の配列を有する。ある特定の実施形態では、DNAポリメラーゼを使用して、第1のプライマーから配列を伸長する。更なる実施形態では、方法は、ポリヌクレオチド鎖の線形コピーを提供する。ある特定の実施形態では、フローセルは、パターン化されたフローセルである。更なる実施形態では、ビーズから放出された鎖は、フローセル表面上の捕捉剤によって結合される。なお更なる実施形態では、捕捉剤は、パターン化されたフローセルの特徴のアレイ上に位置し、捕捉剤は、特徴間の間隙領域上に位置しない。別の実施形態では、パターン化されたフローセルの特徴のアレイは、ウェルである。更に別の実施形態では、捕捉剤は、フローセルの表面に結合した捕捉核酸であり、鎖は、ビーズから放出し、フローセルの表面に結合したプライマーとハイブリダイズすることができる配列を含む。更なる実施形態では、捕捉核酸は、ユニバーサル捕捉配列を含む。なお更なる実施形態では、ユニバーサル捕捉配列は、P5 5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A - 3' (配列番号1)若しくはP7 (5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3' (配列番号2))、又はそれらの断片を含む。代替の実施形態では、ユニバーサル捕捉配列は、抗P5 : 5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T - 3' (配列番号203)若しくは抗P7 : 5' - T C G T A T G C C G T C T T C T G C T T G - 3' (配列番号4))、又はその断片を含む。更なる実施形態では、捕捉核酸は、配列決定プライマー結合部位 (sequencing primer binding site、SBS)、標的特異的捕捉領域、制限部位、及び/又はリンカー領域を更に含む。なお更なる実施形態では、SBSは、SBS3 : 5' - A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T - 3' (配列番号5)又はSBS8 : 5' - C G G T C T C G G C A T T C C T G C T G A A C C G C T C T T C C G A T C T - 3' (配列番号6)である。ある特定の実施形態では、方法は、オンフローセル線形増幅反応を実施して、フローセル表面に播種されたポリヌクレオチドのコピーを作製することと、コピーされたポリヌクレオチドを変性させ、フローセル表面に播種することと、を更に含む。更なる実施形態では、オンフローセル線形増幅反応は、低温AMS1第1伸長反応を含む。なお更なる実施形態では、コピーされたポリヌクレオチドは、化学変性剤 (chemical denaturant) を含むハイブリダイゼーション緩衝液の使用によって変性される。別の実施形態では、化学変性剤は、ホルムアミドである。更に別の実施形態では、混合物は、HT1を含む。更なる実施形態では、パターン化されたフローセル表面上のアレイ特徴が、互いに流体接触するように、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液は、パターン化されたフローセルの表面を浅く覆う。なお更なる実施形態では、方法は、各播種されたポリヌクレオチドの複数のコピーを作製するためにブリッジ増幅を使用することによって、パターン化されたフローセルの表面上にクラスタを形成することを更に含む。なお別の実施形態では、本方法は、パターン化されたフローセルの表面上に生成されたクラスタを合成によって配列決定することを更に含む。

【0009】

特定の実施形態では、ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、(i)ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖を含むビーズを提供することであって、ポリヌクレオチド鎖の5'末端が、第1の付着剤を使用してビーズに結合され、ポリヌクレオチド鎖が、第1のプライマーの配列に相補的である配列を含むアダプタを含み、ビーズが、結合した第1の増幅プライマーも含み、第1の増幅プライマーが、第3の付着剤によってビーズに結合され、第1の増幅プライマーが、第1のプライマーの配列と異なり、配列と相補的でない配列を有し、ポリヌクレオチド鎖が、第1の増幅プライマーに相補的である配列を含む、提供することと、(ii)第1のプライマーを、ビ

ーズに結合したポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることであって、第1のプライマーが、溶液中にある、アニーリングすることと、(iii)ポリメラーゼを使用して第1のプライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物を形成することと、(iv)追加量の第1のプライマー及び/又は第1の増幅プライマー並びにリコンビナーゼを使用することによって、二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することと、(v)ポリメラーゼを使用して工程(iv)における追加の第1のプライマー及び/又は第1の増幅プライマーから伸長させることによって、工程(iii)の二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をビーズから置換及び放出することと、(vi)第2の付着剤を使用して、工程(v)で放出された鎖をフローセルの表面に付着させることによって、フローセルに播種することと、任意選択的に、工程(ii)~(vi)を複数回繰り返すことと、を含む、方法を提供する。別の実施形態では、本開示は、ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、(i)ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖を含むビーズを提供することであって、ポリヌクレオチド鎖の5'末端が、ビオチン/ストレプトアビジン結合を使用してビーズに結合され、ビーズが、結合した第2の増幅プライマーも含み、第2の増幅プライマーが、第3の付着剤によってビーズに結合され、第2の増幅プライマーが、第2のプライマーの配列とは異なり、配列と相補的でない配列を有し、ポリヌクレオチド鎖が、第2の増幅プライマーに相補的である配列を含み、第2のプライマーに相補的な配列を含む、提供することと、(ii)第2の増幅プライマーを、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることと、(iii)ポリメラーゼを使用して第2の増幅プライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物を形成することと、次いで、工程(a)又は工程(b)及び(b'):(a)ビーズをフローセルに導入し、熱及び過剰なビオチンを使用して、ビーズから二本鎖ポリヌクレオチド産物を一本鎖ポリヌクレオチド産物として放出することと、又は(b)第2のプライマー及びリコンビナーゼを使用することによって、二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することであって、第2のプライマーが、溶液中にある、実施することと、(b')ポリメラーゼを用いて第2のプライマーから伸長させることによって、二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をビーズから置換及び放出することと、を行うことと、(iv)第2の付着剤を使用して、工程(a)において放出された一本鎖ポリヌクレオチド産物又は工程(b')においてビーズから放出された二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をフローセルの表面に播種することと、及び任意選択的に、工程(ii)~(iv)を複数回繰り返すことと、を含む、方法を提供する。更なる実施形態では、ビーズは、付着剤を使用してフローセルの表面に固定化されている。なお更なる実施形態では、付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体から選択される。なお更なる実施形態では、付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン結合又は2つの相補的配列間の塩基対合である。代替的な実施形態では、ビーズは、付着剤を使用してフローセルの表面に固定化されていない。ある特定の実施形態では、フローセルは、パターン化されたフローセルである。更なる実施形態では、ビーズから放出された鎖は、フローセル表面上の捕捉剤によって結合される。なお更なる実施形態では、捕捉剤は、パターン化されたフローセルの特徴(feature)のアレイ上に位置し、捕捉剤は、特徴間の空隙領域(interstitial region)上に位置しない。別の実施形態では、パターン化されたフローセルの特徴のアレイは、ウェルである。更に別の実施形態では、捕捉剤は、フローセルの表面に結合した捕捉核酸であり、鎖は、ビーズから放出し、フローセルの表面に結合したプライマーとハイブリダイズすることができる配列を含む。更なる実施形態では、捕捉核酸は、ユニバーサル捕捉配列を含む。なお更なる実施形態では、ユニバーサル捕捉配列は、P5'5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'(配列番号1)若しくはP7(5'-CAAGCAGAAAGACGGCATACGA-3'(配列番号2))、又はそれらの断片を含む。代替の実施形態では、ユニバーサル捕捉配列は、抗P5:5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATTT-3'(配列番号3)若しくは抗P7:5'-TCGTATGCCCGTCTTCTGCTT

10

20

30

40

50

G - 3' (配列番号4))、又はその断片を含む。更なる実施形態では、捕捉核酸は、配列決定プライマー結合部位(SBS)、標的特異的捕捉領域、制限部位、及び/又はリンカー領域を更に含む。なお更なる実施形態では、SBSは、SBS3:5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'(配列番号5)又はSBS8:5'-CGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT-3'(配列番号6)である。ある特定の実施形態では、方法は、オンフローセル線形増幅反応を実施して、フローセル表面に播種されたポリヌクレオチドのコピーを作製することと、コピーされたポリヌクレオチドを変性させ、フローセル表面に播種することと、を更に含む。更なる実施形態では、オンフローセル線形増幅反応は、低温AMS1第1伸長反応を含む。なお更なる実施形態では、コピーされたポリヌクレオチドは、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液の使用によって変性される。別の実施形態では、化学変性剤は、ホルムアミドである。更に別の実施形態では、ハイブリダイゼーション緩衝液は、HT1を含む。更なる実施形態では、パターン化されたフローセル表面上のレイ特徴が、互いに流体接触するように、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液は、パターン化されたフローセルの表面を浅く覆う。なお更なる実施形態では、方法は、各播種されたポリヌクレオチドの複数のコピーを作製するためにブリッジ増幅を使用することによって、パターン化されたフローセルの表面上にクラスタを形成することを更に含む。なお別の実施形態では、本方法は、パターン化されたフローセルの表面上に生成されたクラスタを合成によって配列決定することを更に含む。

10

【0010】

20

ある特定の実施形態では、本開示は、ビーズから放出されたポリヌクレオチドをフローセルに播種するための方法であって、(i)ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖を含むビーズを提供することであって、ポリヌクレオチド鎖の5'末端が、ビオチン/ストレプトアビジン結合を使用してビーズに結合され、ビーズが、結合した第1及び第2の増幅プライマーも含み、第1及び第2の増幅プライマーが、付着剤によってビーズに結合され、第1の増幅プライマーが、第1のプライマーの配列と少なくとも99%同一である配列を有し、第2の増幅プライマーが、第2のプライマーの配列と少なくとも99%同一である配列を有し、ポリヌクレオチド鎖が、第1の増幅プライマーに相補的である配列を含み、第2の増幅プライマーに相補的である配列を含む、提供することと、(ii)第1及び第2の増幅プライマーを、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖にアニーリングすることと、(iii)ポリメラーゼを使用して第1及び第2の増幅プライマーから伸長させて、二本鎖ポリヌクレオチド産物のクラスタを形成することと、次いで、工程(A)又は工程(B)及び(B')のいずれか:(A)ビーズをフローセルに導入し、熱及び過剰なビオチンを使用して、ビーズから二本鎖ポリヌクレオチド産物を一本鎖ポリヌクレオチド産物として放出することと、又は(B)第1のプライマー及び/又は第2のプライマー並びにリコンビナーゼを使用することによって、二本鎖ポリヌクレオチド産物のプライマー侵入を実施することであって、第1及び第2のプライマーが、溶液中にある、実施することと、(B')ポリメラーゼを用いて第1及び/又は第2のプライマーから伸長させることによって、二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をビーズから置換及び放出することと、を行うことと、(iv)付着剤を使用して、工程(A)において放出された一本鎖ポリヌクレオチド産物又は工程(B')においてビーズから放出された二本鎖ポリヌクレオチド産物の鎖をフローセルの表面に播種することと、及び任意選択的に、工程(ii)~(iv)を複数回繰り返すことと、を含む、方法を更に提供する。更なる実施形態では、ビーズは、付着剤を使用してフローセルの表面に固定化されている。なお更なる実施形態では、付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体から選択される。なお更なる実施形態では、付着剤は、ビオチン/ストレプトアビジン結合又は2つの相補的配列間の塩基対合である。代替的な実施形態では、ビーズは、付着剤を使用してフローセルの表面に固定化されていない。ある特定の実施形態では、フローセルは、パターン化されたフローセルである。

30

40

50

更なる実施形態では、ビーズから放出された鎖は、フローセル表面上の捕捉剤によって結合される。なお更なる実施形態では、捕捉剤は、パターン化されたフローセルの特徴のアレイ上に位置し、捕捉剤は、特徴間の間隙領域上に位置しない。別の実施形態では、パターン化されたフローセルの特徴のアレイは、ウェルである。更に別の実施形態では、捕捉剤は、フローセルの表面に結合した捕捉核酸であり、鎖は、ビーズから放出し、フローセルの表面に結合したプライマーとハイブリダイズすることができる配列を含む。更なる実施形態では、捕捉核酸は、ユニバーサル捕捉配列を含む。なお更なる実施形態では、ユニバーサル捕捉配列は、 $5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A - 3'$ ((配列番号1)) 若しくは $5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A - 3'$ (配列番号2))、又はそれらの断片を含む。代替の実施形態では、ユニバーサル捕捉配列は、抗 $P5 : 5' - T C G G T G G T C G C C G T A T C A T T - 3'$ (配列番号3) 若しくは抗 $P7 : 5' - T C G T A T G C C G T C T T C T G C T T G - 3'$ (配列番号4))、又はその断片を含む。更なる実施形態では、捕捉核酸は、配列決定プライマー結合部位 (SBS)、標的特異的捕捉領域、制限部位、及び/又はリンカー領域を更に含む。なお更なる実施形態では、SBSは、 $SBS3 : 5' - A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T - 3'$ (配列番号5) 又は $SBS8 : 5' - C G G T C T C G G C A T T C C T G C T G A A C C G C T C T T C C G A T C T - 3'$ (配列番号6) である。ある特定の実施形態では、方法は、オンフローセル線形増幅反応を実施して、フローセル表面に播種されたポリヌクレオチドのコピーを作製することと、コピーされたポリヌクレオチドを変性させ、フローセル表面に播種することと、を更に含む。更なる実施形態では、オンフローセル線形増幅反応は、低温AMS1第1伸長反応を含む。なお更なる実施形態では、コピーされたポリヌクレオチドは、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液の使用によって変性される。別の実施形態では、化学変性剤は、ホルムアミドである。更に別の実施形態では、ハイブリダイゼーション緩衝液は、HT1を含む。更なる実施形態では、パターン化されたフローセル表面上のアレイ特徴が、互いに流体接触するように、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション緩衝液は、パターン化されたフローセルの表面を浅く覆う。なお更なる実施形態では、方法は、各播種されたポリヌクレオチドの複数のコピーを作製するためにブリッジ増幅を使用することによって、パターン化されたフローセルの表面上にクラスタを形成することを更に含む。なお別の実施形態では、本方法は、パターン化されたフローセルの表面上に生成されたクラスタを合成によって配列決定することを更に含む。

【0011】

ある特定の実施形態では、本開示はまた、フローセルの表面上のポリヌクレオチドの播種効率を増加させるための方法であって、オンフローセル線形増幅反応を実施して、フローセル表面に播種されたポリヌクレオチドのコピーを作製することと、コピーされたポリヌクレオチドを変性させ、フローセル表面に播種することと、を含む、方法を提供する。更なる実施形態では、オンフローセル線形増幅反応は、低温AMS1第1伸長反応を含む。なお更なる実施形態では、コピーされたポリヌクレオチドは、化学変性剤を含むハイブリダイゼーション溶液の使用によって変性される。別の実施形態では、化学変性剤は、ホルムアミドである。更に別の実施形態では、ハイブリダイゼーション溶液は、HT1を含む。更なる実施形態では、パターン化されたフローセル表面上のアレイ特徴が、互いに流体接触するように、混合物は、パターン化されたフローセルの表面を浅く覆う。なお更なる実施形態では、方法は、各播種されたポリヌクレオチドの複数のコピーを作製するためにブリッジ増幅を使用することによって、パターン化されたフローセルの表面上にクラスタを形成することを更に含む。別の実施形態では、本方法は、パターン化されたフローセルの表面上に生成されたクラスタを合成によって配列決定することを更に含む。

【0012】

本開示の1つ以上の実施形態の詳細が、添付の図面及び以下の明細書に記載されている。他の特徴、目的、及び利点は、明細書及び図面、並びに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】トランスポソームビーズによるフローセルの播種効率を增強又は改善するための本開示の例示的な方法を構成する工程の概要を提供する。示されるように、工程1は、溶液中でP7又はP5のようなプライマーを用いて、ビーズ上のY型アダプタの3'末端をプライミングオフすることを提供する。工程2は、結合したプライマーからの伸長を提供して、排除増幅を使用することによって二本鎖核酸産物を作製する。次いで、工程3において、伸長産物が排除増幅を使用して形成されるので、この産物は、先にコピーされた鎖を溶液中に置換する（工程4a）。次いで、放出された鎖は、分析及び適用のために、フローセルの表面に播種する（工程4b）。

10

【図2】ビーズが、溶液中のプライマー（例えば、P7）とは異なる配列を有する増幅プライマー（例えば、P5）を含む、本開示の方法の実施形態を提供する。

【図3】ビーズが、溶液中のプライマー（例えば、P7）と同じ又はほぼ同じ配列を有する増幅プライマー（例えば、P7）を含む、本開示の方法の実施形態を提供する。

【図4】ビーズ上のライブラリを増幅し、増幅産物をフローセルの表面上に播種するためにブリッジ増幅アプローチが使用される、本開示の方法の実施形態を提供する。

【図5】2つ以上のDNAライブラリ分子が、パターン化されたフローセルの同じウェル内に播種される場合、1つの優性クラスター（青色）が生じるか、又は2つ（以上）の等価なポリクローマルクラスター（青色+ピンク色）が生じるかのいずれかであることを実証する。

20

【図6】オンフローセル線形増幅のためのワークフローを示す。（A）DNAライブラリのポリヌクレオチドをフローセルのウェル内に播種する。オンフローセル線形増幅のためのワークフローを示す。（B）Illumina（商標）AMS1を用いた1回目の伸長は、二本鎖DNA（元の鎖を有する1つのコピーされたアンカー鎖）をもたらす。（C）浅層液体変性/播種後、鎖は、元のウェルを出て、ウェルの近くに播種する。（D）ブリッジ増幅後、DNAライブラリから配列決定情報を収集するより高い可能性が存在する。

【図7A】フローセルのウェル上での線形増幅の結果を提示する。（A）標準的な播種プロトコルを使用して形成されたクラスター。

【図7B】フローセルのウェル上での線形増幅の結果を提示する。（B）本明細書に記載の線形増幅プロトコルを使用して形成されたクラスター。

30

【図8】本明細書に開示される方法を使用して、フローセルに最小量のDNAを播種することができるかどうかを評価するための、パターン化されたフローセルの底部ウェルの写真を提供する。上の写真：標準量（300pM）のDNAをロードしたフローセルの底部の写真。中央の写真：10pMのDNAをロードしたフローセルの底部の写真。下の写真：10pMのDNA及びP7オリゴヌクレオチド及びExAmpをロードしたフローセルの底部の写真。写真は、本明細書に記載される増幅プロセスを使用する場合、パターン化されたフローセルのウェルが、開始時の少量のDNA（すなわち、10pM）で完全に占有され得ることを示す。

【図9】ロードプロセス中に増幅量を制御することができるかどうかを評価するための、パターン化されたフローセルの底部ウェルの写真を提供する。写真に示されるように、増幅の量は、使用したP7オリゴの量と用量依存の関係を示した。

40

【図10】P7オリゴを使用してビーズからDNAを放出し、フローセルのウェルに播種するために本開示の方法を使用した、パターン化されたフローセルからのウェルの底部及び上部の写真を提供する。上の2つの写真に示されるように、ウェルの上面及び底面の両方が、本開示の方法を使用して播種された。全く対照的に、ウェルの上面は、ビーズのみを使用した場合に播種されなかったが（右下の写真）、ウェルの底面は、ビーズのみを使用した場合に最小限に播種された（左下の写真）。

【0014】

本明細書に組み込まれ、かつ本明細書の一部を構成する添付図面は、本開示の1つ以上の実施形態を図解し、詳細な説明と共に、本開示の原理及び実装を説明する役割を果たす

50

。【発明を実施するための形態】

【0015】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈がそうでない旨を明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「フローセル(a flow cell)」への言及は、複数のそのようなフローセルを含み、「DNAライブラリ(the DNA library)」への言及は、1つ以上のDNAライブラリへの言及などを含む。

【0016】

また、別途記載のない限り、「又は」の使用は「及び/又は」を意味する。同様に、「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、「含む(comprising)」、「含む(include)」、「含む(includes)」、「含む(including)」、「有する(have)」、「有する(haves)」、「有する(having)」は、交換可能であり、限定することを意図するものではない。

【0017】

様々な実施形態の説明が「含む(comprising)」という用語を使用する場合、当業者であれば、いくつかの具体的な事例において、ある実施形態が、「から本質的になる(consisting essentially of)」又は「からなる(consisting of)」という語句を使用して代替的に説明することができることを理解するであろうことを、更に理解されたい。

。【0018】

別途定義されない限り、本開示書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様又は同等の方法及び材料を本開示の方法及び組成物の実施に使用することができるが、例示的な方法、デバイス、及び材料が、本明細書に記載されている。

【0019】

本明細書における「増幅する」又は「増幅」という用語は、鋳型のコピーを生成することによって鋳型ポリヌクレオチド配列の数を増加させるプロセスを意味することを意図する。増幅プロセスは、線形又は指数関数的のいずれかであり得る。指数関数的増幅において、鋳型ポリヌクレオチド配列から作製されたコピーの数は、指数関数的速度で増加する。例えば、30ラウンドの理想的な指数関数的増幅反応では、鋳型DNAの1つのコピーが 2^{30} 又は1,073,741,824個のコピーを産生する。しかしながら、本明細書に記載のブリッジ増幅は、典型的には理想的な条件下では生じず、30サイクルの「指数関数的」反応は、主に表面結合プライマーの限定された局所濃度及び鋳型再ハイブリダイズとの競合に起因して、元の鋳型の数百～数千のコピーのみを産生し得る。線形増幅では、鋳型ポリヌクレオチド配列から作製されたコピーの数は、線形速度で増加する。例えば、1分当たり2000コピーのコピー速度の理想的な4時間増幅反応では、鋳型DNAの各コピーは480,000コピーを産生する。ある特定の実施形態では、本開示の組成物、方法、及びキットは、ビーズからポリヌクレオチドを放出するための線形増幅反応を提供する。

【0020】

「捕捉剤」という用語は、標的生体分子がフローセルの表面上に固定化されるように、標的生体分子、典型的には核酸系生体分子に結合することができるフローセルの表面上に存在する薬剤を指す。特に、「捕捉剤」は、標的生体分子に特異的であり、非標的生体分子又は他の化合物に結合しない。例示的な捕捉剤としては、標的核酸に結合したそれぞれの結合パートナーを有する受容体及び/又はリガンドが挙げられ、その例は本明細書において先に記載されている。特に有用な捕捉剤は、1つ以上の標的核酸の配列に相補的である捕捉核酸である。例えば、フローセルの表面上に存在する捕捉核酸は、標的核酸中に存在するユニバーサル配列に相補的であるユニバーサル捕捉配列を有することができる。いくつかの実施形態では、捕捉核酸はまた、標的核酸の増幅のためのプライマーとして機能

10

20

30

40

50

し得る（それがユニバーサル配列も含有するか否かにかかわらず）。ユニバーサル捕捉配列は、例えば、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み得る。ユニバーサル Illumina（登録商標）捕捉プライマーは、例えば、P5 5' - AATGATACGGCGACCCACCGA - 3'（（配列番号1））若しくはP7（5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGA - 3'（配列番号2））、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3））若しくはP7（「抗P7」：5' - TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG - 3'（配列番号4））、又はその断片を含み得る。他の捕捉核酸は、ユニバーサル捕捉配列及び標的特異的捕捉領域を含むことができる。捕捉核酸は、配列決定プライマー結合部位（SBS）、標的特異的捕捉領域、制限部位などの所定の切断部位、及びリンカー領域、例えば、2つ以上の制限部位を分離するリンカー領域を更に含み得る。いくつかの捕捉プライマーは、例えば、ユニバーサル捕捉領域及びSBSを含み得る。SBSは、例えば、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' - ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT - 3'（配列番号5））又はSBS8（5' - CGGTCTCGGCAATTCCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT - 3'（配列番号6））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7））若しくはSBS8（「抗SBS8」：5' - AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATGCCGAGACCG - 3'（配列番号8））の逆相補配列、又はその断片を含み得る。捕捉核酸は、領域の任意の組み合わせ、例えば、P5 - SBS3及びP7 - SBS8又はそれらの断片などの組み合わせを含む、Illumina（登録商標）P5、P7、SBS3、若しくはSBS8プライマー領域又はそれらの断片の任意の組み合わせを有することができる。

【0021】

捕捉核酸は、3'末端でブロックされ（3' - ブロックされ）ていてもよく、3'末端でブロックされていない（3' - ブロックされていない）くてもよい。ブロックされた3' - 末端を有する捕捉核酸は、例えば、3' - リン酸末端であり得る。ブロックされた3'末端を有するいくつかの捕捉核酸は、脱ブロックすることができる。脱ブロック化は、酵素的反応又は化学的反応において起こり得る。酵素的反応は、例えば、キナーゼ又はホスファターゼによって媒介され得る。例えば、3' - リン酸末端プライマーは、キナーゼ（例えば、T4キナーゼ）によって脱ブロックされ得る。

【0022】

捕捉核酸は、所定の（ランダムでない）切断部位を含み得る。可能な所定の切断部位は、例えば、米国特許第8,715,966（B2）号に開示されている。所定の部位での切断は、例えば、酵素的切断又は化学的切断などの非酵素的切断として起こり得る。制限部位などの所定の部位での酵素的切断は、例えば、制限エンドヌクレアーゼなどの制限酵素によって媒介され得る。いくつかの実施形態では、プライマー中の所定の切断部位は、ウラシル塩基を含み得る。切断は、ウラシル含有プライマーをウラシルDNAグリコシラーゼで処理してプライマー中に塩基性部位を形成し、続いてエンドヌクレアーゼ、熱、又はアルカリで処理してプライマーを塩基性部位で切断することによって起こり得る。いくつかの態様では、所定の切断部位は、ジオールリンカーを含み、これは過ヨウ素酸塩による処理によって切断することができる。いくつかの実施形態では、所定の切断部位は、8 - オキソ - グアニンを含む。

【 0 0 2 3 】

所定の切断部位は、酵素制限部位を含み得る。当業者に公知の任意の制限酵素又は任意の酵素制限部位を、本明細書において提供される方法又は組成物において使用することができる。例えば、制限エンドヌクレアーゼは、I型酵素（EC 3.1.21.3）、II型酵素（EC 3.1.21.4）、III型酵素（EC 3.1.21.5）、又はIV型酵素（EC 3.1.21.5）であり得る。制限エンドヌクレアーゼは、例えば、限定されないが、Alu I、Ava I、Bam HI、Bgl II、Eco P 15 I、Eco RI、Eco RII、Eco RV、Hae III、Hga I、Hha I、Hind III、Hinf I、Hpa I、Kpn I、Mbo I、Not I、Pst I、Pvu II、Sac I、Sal I、Sap I、Sau 3 A、Sca I、Sma I、Spe I、Sph I、Sst I、Stu I、Taq I、Xba I、又はXma Iを含み得る。制限エンドヌクレアーゼは、組換え制限酵素であり得る。組換え制限酵素としては、天然又は操作されたDNA結合ドメイン（例えば、ジンクフィンガードメイン、TALエフェクタードメイン）及びヌクレアーゼドメイン（例えば、IIS型制限酵素FokIの切断ドメイン）を含む融合タンパク質が挙げられ得るが、これらに限定されない。

10

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態では、捕捉核酸などの捕捉剤を、パターン化されたフローセルの表面上に配列された特定の特徴に付着させることができる。例えば、捕捉剤は、パターン化されたフローセル上のアレイの特徴（例えば、ウェル）の表面に付着させることができる。代替的に、捕捉剤は、ランダムな様式でフローセルの表面に結合される（すなわち、非パターン化フローセル）。付着は、ビーズ、粒子、又はゲルなどの中間構造を介するものとするることができる。ゲルの使用によるパターン化されたフローセルのアレイの特徴への捕捉核酸の付着は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2008/093098号に記載されている。本明細書に記載の方法及び装置において使用することができる例示的なゲルとしては、コロイド構造を有するもの、例えば、アガロース、ゼラチンなどのポリマーメッシュ構造、又は架橋ポリマー構造を有するもの、例えば、ポリアクリルアミド、SFA（例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2011/0059865（A1）号を参照されたい）又はPAZAM（例えば、開示が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2014/0079923（A1）号、米国特許第9,815,916（B2）号、及び米国特許第10,208,142（B2）号を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されない。PAZAMに関して、捕捉剤は、クリックケミストリを使用することによって、PAZAM表面上の残留アジドに結合され得る。

20

30

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用するとき、用語「クローン集団」は、特定のヌクレオチド配列に対して均質である核酸の集団を指す。均質な配列は、少なくとも10ヌクレオチド長であり得るか、又はより長い、例えば、少なくとも50、100、250、500又は1000ヌクレオチド長であり得る。クローン集団は、単一の標的核酸又は鋳型核酸に由来し得る。本質的には、クローン集団中の全ての核酸は、同じヌクレオチド配列を有する。クローン性から逸脱することなく、少数の変異（例えば、増幅アーチファクトによる）が生じ得ることが理解されよう。

40

【 0 0 2 6 】

「変性する」及び「変性」という用語は、主に、一本鎖ポリヌクレオチド配列及びその相補体のワトソン-クリックDNA二本鎖内で相互作用するDNA塩基の物理的分離を指す幅広い用語である。これらの用語はまた、これらの鎖の両方の物理的分離を指す。最も広い意味では、これらの用語は、二本鎖の鎖の一方又は両方への別のプライマーオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列のアニールングが可能になる状況を生み出すプロセスを指す。

【 0 0 2 7 】

50

本明細書中で使用される場合、「フローセル」という用語は、表面を有するチャンバを意味することが意図され、この表面にわたって、1つ以上の流体試薬を流すことができ、かつこの表面に対して、核酸が結合することができ、フローセルの表面に播種することができる。一般に、フローセルは、流体の流れを促進するために、進入開口部及び出口開口部を有する。本開示の方法において容易に使用することができるフローセル及び関連する流体システム及び検出プラットフォームの例は、例えば、Bentley et al., Nature 456: 53 - 59 (2008)、国際公開第04/018497号、米国特許第7057026号、国際公開第91/06678号、国際公開第07/123744号、米国特許第7329492号、米国特許第7211414号、米国特許第7,315,019号、米国特許第7,405,281号、及び米国特許出願公開第2008/0108082号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0028】

ある特定の実施形態では、フローセルは、核酸が結合することができる表面を有する固体支持体を含む。いくつかの態様では、表面は、ビーズから放出されたポリヌクレオチドに結合することができる捕捉剤のローン (lawn) を含有する。いくつかの例では、表面はパターン化された表面である。「パターン化された表面」は、固体支持体の露出された表面内又はその上の異なる領域 (増幅部位など) の配列 (アレイなど) を指し得る。例えば、領域のうち1つ以上は、1つ以上の捕捉剤が存在する特徴であり得る。この特徴は、捕捉剤が存在しない間隙領域によって分離され得る。いくつかの実施形態では、パターンは、行及び列にある特徴の x - y フォーマットであり得る。いくつかの実施形態では、パターンは、特徴及び / 又は間質領域の反復配置であり得る。いくつかの例では、パターンは、特徴及び / 又は中間部領域のランダム配置とすることができる。いくつかの実施形態では、表面は、放出されたポリヌクレオチドにビーズから結合する捕捉剤を有するウェルのアレイを含有するパターン化された表面であり、捕捉剤を欠くウェル間の中間部領域を有する。いくつかの場合では、基材は、ウェルにおいてビーズを使用する適用についてこれらの参考文献において例示されている。パターン化されたフローセルは、本開示の組成物、方法、及びキットと共に使用することができる。

20

【0029】

パターン化されたフローセルは、ガラス、シリコン、プラスチック、又は他の好適な固体支持体上に、マイクロウェル又はナノウェルなどの特徴のアレイを含む。特徴のアレイは、捕捉剤を含むことができ、捕捉剤は、一実施形態では、ウェルの表面上のゲルに共有結合される捕捉剤、例えば、ポリ (N - (5 - アジドアセトアミジルペンチル) アクリルアミド) (poly(N-(5-azidoacetamidylpentyl)acrylamide、PAZAM、例えば、各々がその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2013/184796号、国際公開第2016/066586号及び国際公開第2015/002813号を参照されたい)を含むことができる。フローセルの寿命は、ポリマーをフローセル表面上の特徴に共有結合させることによって延長することができる。しかしながら、多くの例では、ゲルは、フローセル表面上の特徴に共有結合される必要はない。例えば、シランフリーのアクリルアミド (silane free acrylamide、SFA、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,563,477号を参照) をゲル材料として使用することができる。SFAは、フローセル表面上の特徴に共有結合していない。本明細書に記載の方法及び組成物で使用することができるパターン化された表面を有するフローセルの例は、米国特許第8,778,848号、同第8,778,849号、及び同第9,079,148号、並びに米国特許出願公開第2014/0243224号に記載されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。フローセルの表面上の特徴のアレイを使用して、単一の核酸鋳型分子を捕捉して、例えば、ブリッジ増幅を介して、均質なコロニーの後続の形成を播種することができる。このようなパターン化されたアレイは、核酸配列決定用途に特に有用である。

30

40

【0030】

50

フローセル表面上の特徴のアレイは、例えば、少なくとも約10個、例えば、少なくとも約100個、少なくとも約500個、少なくとも約1,000個、少なくとも約5,000個、少なくとも約10,000個、少なくとも約50,000個、少なくとも約100,000個、又は少なくとも約5,000,000個以上の、特徴/cm²などの、様々な密度のいずれかを有することができる。

【0031】

パターン化されたフローセルの表面上の特徴のアレイ（例えば、ウェル）は、スポット又はパッチのグリッドとして現れ得る。特徴は、繰り返しパターン又は不規則な非繰り返しパターンで位置することができる。特に有用なパターンは、六角形パターン、直線パターン、グリッドパターン、鏡映対称性を有するパターン、回転対称性を有するパターンなどである。非対称パターンも有用であり得る。ピッチは、最隣接特徴の異なる対の間で同じであってもよく、又はピッチは、最隣接特徴の異なる対の間で変動してもよい。特定の実施形態では、パターン化されたフローセルのアレイの特徴（例えば、ウェル）は各々、約100nm²、250nm²、500nm²、1µm²、2.5µm²、5µm²、10µm²、100µm²、又は500µm²よりも大きい面積を有することができる。代替的に又は追加的に、アレイの特徴（例えば、ウェル）は各々、約1mm²、500µm²、100µm²、25µm²、10µm²、5µm²、1µm²、500nm²、又は100nm²よりも小さい面積を有することができる。実際に、領域は、上記に例示したもから選択される上限と下限との間の範囲内の大きさを有することができる。

【0032】

パターン化されたフローセル表面上の特徴のアレイ（例えば、ウェル）は、別個であり得、間隙領域によって分離され得る。特徴のサイズ及び/又は領域間の間隔は、アレイが高密度、中密度、又は低密度であり得るように変動し得る。高密度アレイは、約15µm未満で分離された特徴を有することを特徴とする。中密度アレイは、約15~30µmで分離された特徴を有するが、低密度アレイは、30µmよりも大きく分離された領域を有する。アレイは、100µm、50µm、10µm、5µm、1µm、又は0.5µm未満で分離された領域を有し得る。アレイの特徴と比較して、実質的に低い捕捉剤の量又は濃度を有する間隙領域が有利である。捕捉剤を欠く間隙領域が特に有利である。例えば、間隙領域における捕捉剤の比較的少量又は不存在は、標的核酸、及びその後生成されるクラスタの、所望の特徴への局在化に有利である。特定の実施形態では、特徴は、表面内の凹状特徴（例えば、ウェル）であることができ、特徴は、ゲル材料を含有することができる。ゲル含有特徴（例えば、PAZAM）は、ゲルが実質的に存在しないか、又は存在するとしてもゲルが核酸の局在化を実質的に支持することができない表面上の間隙領域によって互いに分離することができる。ウェルなどのゲル含有特徴を有する基材を作製及び使用するための方法及び組成物。

【0033】

本明細書で使用される場合、「フローセル表面」という用語は、試薬、ビーズ、又は分析物と接触するためにアクセス可能なフローセルの一部を意味する。フローセル表面は、実質的に平坦又は平面であり得る。代替的に、フローセル表面は丸みを帯びているか、又は輪郭付けられ得る。フローセル表面上に含まれ得る例示的な輪郭は、ウェル、くぼみ、柱、隆起部、チャンネルなどである。フローセル表面は、ガラス、例えば、変性又は官能化ガラス；プラスチック、例えば、アクリル、ポリスチレン、又はスチレンと別の材料とのコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、又はTeflon（商標）；多糖類又は架橋多糖類、例えば、アガロース又はセファロース；ナイロン；ニトロセルロース；樹脂；ケイ素及び変性ケイ素を含むシリカ又はシリカ系材料；炭素繊維；金属；無機ガラス；光ファイバーバンドル、又は様々な他のポリマーが挙げられる。単一の材料又はいくつかの異なる材料の混合物は、フローセルの表面を形成するために使用することができる。本開示の方法において容易に使用することができるフローセル及び関連する流体システム及び検出プラットフォームの例は、例えば、Bentley et al., Nature 456: 53-59 (2008)、国際公開第04/018

497号、米国特許第7,057,026号、国際公開第91/06678号、国際公開第07/123744号、米国特許第7,329,492号、米国特許第7,211,414号、米国特許第7,315,019号、米国特許第7,405,281号、及び米国特許出願公開第2008/0108082号に記載されており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0034】

本明細書で使用される「等温」という用語は、システム又はデバイスの温度が一定のままである、すなわち、 $T = 0$ である、プロセスを指す。これは、任意選択的に、システム/デバイスが外側の熱リザーバ（例えば、ヒータ、熱浴、熱電コントローラ（thermo electric controller、TEC）など）と接触し、システム/デバイスが熱交換を通じてリザーバの温度に継続的に調整することを可能にする速度で、システム/デバイス内で作用又は変化が生じるときに、生じる。

10

【0035】

本明細書中で使用される場合、「ポリメラーゼ」という用語は、当該技術分野におけるその使用と一致することが意図され、例えば、鋳型鎖として核酸を使用して核酸分子の相補的複製物を産生する酵素を含む。典型的には、DNAポリメラーゼは、鋳型鎖に結合し、次いで、ヌクレオチドを、成長する核酸鎖の3'末端の遊離ヒドロキシル基に連続的に付加して、鋳型鎖を下流へ移動する。DNAポリメラーゼは、典型的には、DNA鋳型から相補的DNA分子を合成し、RNAポリメラーゼは、典型的には、DNA鋳型からRNA分子を合成する（転写）。ポリメラーゼは、短いRNA又はDNA鎖（プライマーと呼ばれる）を使用して、鎖成長を開始し得る。いくつかのポリメラーゼは、それらが鎖に塩基を付加する部位の上流の鎖を置換し得る。かかるポリメラーゼは、鎖置換であるとも言われ得、これは、ポリメラーゼによって読み取られる鋳型鎖から相補鎖を除去する活性を有すると言われる。鎖置換活性を有する例示的なポリメラーゼには、Bst（パチルス・ステアロサーモフィルス）ポリメラーゼの大断片、exo-Klenowポリメラーゼ、又はシーケンシンググレードのT7 exo-ポリメラーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかのポリメラーゼは、それらの前の鎖を切断し、それを成長する鎖に効果的に置き換える（5'エキソヌクレアーゼ活性）。いくつかのポリメラーゼは、それらの後ろの鎖を分解する活性を有する（3'エキソヌクレアーゼ活性）。いくつかの有用なポリメラーゼは、3'及び/又は5'エキソヌクレアーゼ活性を低減又は排除するために変異又は他の方法で修飾されている。

20

30

【0036】

本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（deoxyribonucleic acid、DNA）を指し、しかしながら、適切な場合には、当業者は、本明細書のシステム及びデバイスをリボ核酸（ribonucleic acid、RNA）と共に利用することもできることを認識するであろう。これらの用語は、同等物として、ヌクレオチド類似体から作製されるDNA又はRNAのいずれかの類似体を含むと理解されるべきである。本明細書で使用するこの用語はまた、例えば逆転写酵素の作用によって、RNA鋳型から生成される相補的又はコピーDNAであるcDNAも包含する。

【0037】

「プライマーオリゴヌクレオチド」又は「プライマー」は、等温増幅反応の各サイクルのプライマーアニーリング工程で遭遇する条件下で増幅される一本鎖ポリヌクレオチド配列に特異的にアニーリングすることができるオリゴヌクレオチド配列である。一般に、増幅反応は、多くの場合「順方向」及び「逆方向」プライマーと表される少なくとも2つの増幅プライマーを必要とする。ある特定の実施形態では、順方向及び逆方向プライマーは、同一であり得る。プライマーオリゴヌクレオチドは、アニーリング工程中に増幅される一本鎖ポリヌクレオチド分子（又は鋳型が一本鎖とみなされるときにその相補体）中のプライマー結合配列にアニーリングすることができるヌクレオチドの配列である、「鋳型特異的部分」を含み得る。プライマー結合配列は、一般に、既知の配列であり、したがって、一本鎖ポリヌクレオチド分子の既知の配列I及び既知の配列II内の配列に特に相補的

40

50

である。プライマー結合配列の長さは、既知の配列 I 又は I I の長さと同じである必要はなく、より短くてもよく、例えば、16 ~ 50ヌクレオチド長、16 ~ 40ヌクレオチド長、又は20 ~ 30ヌクレオチド長であり得る。プライマーオリゴヌクレオチドの最適な長さは、多くの要因に依存し、プライマー結合配列以外の配列へのアニーリングの可能性が非常に低くなるように、プライマーが十分な長い(複合体)であることが一般的である。

【0038】

増幅されるポリヌクレオチド分子は、典型的には、ssDNA若しくはRNAのような一本鎖形態、又は二本鎖DNA(double-stranded DNA、dsDNA)形態である(例えば、ゲノムDNA断片、PCR、及び増幅産物など)。したがって、一本鎖ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド二重鎖のセンス鎖又はアンチセンス鎖であり得る。標準的な技術を利用することができる本開示のシステム/デバイスにおける使用に好適な一本鎖ポリヌクレオチド分子の調製方法は、当該技術分野、例えば、水酸化物での処理、その後の希釈において既知である。一次ポリヌクレオチド分子の正確な配列は、一般に、本開示に重要ではなく、既知又は不明であり得る。一本鎖ポリヌクレオチド分子は、イントロン及びエクソン配列(コード配列)の両方、並びにプロモーター及びエンハンサー配列などの非コード調節配列を含む、ゲノムDNA分子(例えば、ヒトゲノムDNA)を表し得る。特定の実施形態では、増幅されるポリヌクレオチド分子は、DNAライブラリである。更なる実施形態では、DNAライブラリは、ライブラリ調製キットを使用して生成される。また更なる実施形態では、ライブラリ調製キットは、Illumina, Inc.からのものである(例えば、Ampliseq(商標)キット、COVIDSeq(商標)キット、Illumina DNA prepキット、Illumina RNA prepキット、Nextera(商標)キット、SureCell WTA(商標)キット、TruSeq(商標)キット、及びTruSight(商標)キット)。

【0039】

本明細書中で使用される場合、「リコンビナーゼ」という用語は、当該技術分野におけるその使用と一致することが意図され、例えば、RecAタンパク質、T4 uvsXタンパク質、任意の門由来の任意の相同タンパク質若しくはタンパク質複合体、又はそれらの機能的バリエーションを含む。真核生物RecA相同体は、概して、同定されるこの群の最初のメンバーにちなんでRad51と命名されている。他の非相同リコンビナーゼ(例えば、RecT又はRecO)が、RecAの代わりに利用され得る。

【0040】

本明細書で使用される場合、「一本鎖結合タンパク質」という用語は、例えば、未成熟アニーリングを防止するため、ヌクレアーゼ消化から一本鎖核酸を保護するため、核酸から二次構造を除去するため、又は核酸の複製を促進するために、一本鎖核酸に結合する機能を有する任意のタンパク質を指すことが意図される。この用語は、国際生化学分子生物学連合の命名法委員会(Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology、NC-IUBMB)によって一本鎖結合タンパク質として正式に同定されるタンパク質を含むことが意図されるが、必ずしもこれに限定されない。例示的な一本鎖結合タンパク質としては、大腸菌SSB、T4 gp32、T7遺伝子2.5 SSB、ファージphi 29 SSB、任意の門由来の任意の相同タンパク質若しくはタンパク質複合体、又はそれらの機能的バリエーションが挙げられるが、これらに限定されない。

【0041】

本明細書で使用する「固相増幅」は、形成時に増幅産物の全て又は一部が固体支持体上に固定化されるように、フローセルのチャンネルの表面上で実行される核酸増幅反応を指す。

【0042】

ライブラリ調製は、全ての次世代配列決定(NGS)適用のための重要な第1の工程であり、概して、いくつかの共通の工程を用いる。インビトロ転位を使用して、以前の方法

10

20

30

40

50

よりも劇的な時間の節約及びインプット要件の低減を伴って、ゲノムDNA (genomic DNA、gDNA) からシーケンサ対応ライブラリが生成されている。トランスポソーム系ライブラリの構築は、別個のDNA断片化工程の必要性を排除し、DNA断片間のライゲーションの必要条件を除去することによって、DNAライブラリ調製プロセスを改善する。断片化の効率は、酵素対DNA比に高度に依存する。したがって、可変的なDNAインプット量は、ライブラリの断片サイズ分布において不一致を生じることになる。これは、配列決定カバレッジに対して下流の影響を有し得るライブラリ調製プロセスにおける変動性を導入する。

【0043】

ビーズ連結トランスポソーム技術は、全ゲノム配列決定技術 (例えば、Illumina (商標) DNA prep) 並びに標的配列決定用途 (例えば、濃縮のためのIllumina (商標) DNA prep) のためのライブラリを調製するために使用されている。この方法論は、一定量のDNAを結合するためにビーズに直接コンジュゲートされた既知の濃度のトランスポソームを利用する。したがって、これは、幅広い適用性を提供し、幅広いスペクトルのDNAインプット範囲、並びに定量化のないワークフローを促進するための配列決定のための正規化されたライブラリを生成する血液及び唾液試料の統合された抽出を支持する。ワークフローの標準パラメータ外で生成されたライブラリは、1ng未満のDNAインプットからのヒトゲノム構築及びバリエーションコーリング、インサートサイズのカスタマイゼーション、並びに短い断片及び重度に分解された試料からのライブラリの調製を含む、全ゲノム配列決定のための新規用途を強調する。大きく複雑なゲノムに関して、困難な領域を含むゲノムにわたるカバレッジは、他のライブラリ調製方法と比較して改善された。ライブラリは、種々のサイズ (50bp ~ 11kb) のアンプリコンから首尾よく生成されたが、効率の低下が、250bpよりも小さいアンプリコンについて観察された。オンビーズタグメント化学は、標的配列決定にも適用可能であり、広範囲のDNAインプット量、様々な試料タイプ、並びに固定パネル、カスタムパネル、及び全エクソーム配列決定を含む広範囲の適用を支持する。したがって、ビーズ連結トランスポソームは、全ゲノム配列決定並びに標的再配列決定に効果的に使用することができる。DNAの供給源は、環境由来、対象の試料由来などであり得る。DNAは、対象の身体の実質的に任意の部分から抽出され得る。例えば、インプットDNAは、尿、血液、唾液、組織、血清、血漿、痰、胆汁、糞便、毛 (または毛髪)、皮膚、及び/又は初代細胞試料が挙げられるが、これらに限定されない様々な試料タイプから抽出することができる。

【0044】

本明細書に提供される実施態様は、フローセルの表面上の本明細書に開示されるビーズ連結トランスポソームから放出されたポリヌクレオチドの捕捉を含む。ビーズ連結トランスポソームをフローセルにロードし、本開示の方法を使用して、ポリヌクレオチドをビーズ連結トランスポソームから放出し、フローセルの表面に播種する。

【0045】

いくつかの例では、ビーズ連結トランスポソーム又はビーズ連結トランスポソームから放出されたポリヌクレオチドは、フローセルの表面上の捕捉剤と放出されたポリヌクレオチド又はトランスポソームビーズとの相互作用によってフローセルの表面上に捕捉される。開示される方法においてフローセルの表面上にトランスポソームビーズを固定化するための捕捉剤の例としては、ビーズ上のアダプタに連結された核酸の少なくとも一部分、又はトランスポソームビーズから放出された核酸の一部分; 又は標的核酸 (又はそれに付着した連結部分) に結合し得る受容体リガンド結合対 (例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチン、レクチン、炭水化物、核酸結合タンパク質、エピトープ、抗体など) のメンバー; 又は標的核酸 (又はそれに付着した連結部分) と共有結合を形成することができる化学試薬に相補的である捕捉核酸が挙げられるが、これに限定されない。

【0046】

いくつかの例では、捕捉剤は、フローセル上に位置する特異的結合対の第1のメンバーであり、トランスポソームビーズ上に位置する特異的結合対の第2のメンバーに、又はビ

ーズから放出されたポリヌクレオチドに結合する。例えば、フローセルは、特異的結合対の第1のメンバーで官能化され、ビーズから放出されたポリヌクレオチドは、特異的結合対の第2のメンバーを含む。

【0047】

いくつかの例では、捕捉剤は、フローセル上の分離された位置に存在する。例えば、フローセルがウェルのアレイを含有するパターン化されたフローセルである例では、捕捉剤は、パターン化されたフローセルのウェルに存在することができる。

【0048】

加えて、フローセルは、フローセル内の規定された位置にビーズを固定化/捕捉するために、ピラー/ポスト、堰、カップ状構造などのビーズ捕捉構造を含んでもよい。これらのトラップ構造は、ガラス又はシリコンへのエッチングによって、又はフォトパターンニング可能な材料のフォトリソグラフィによって作製することができる。

【0049】

特定の実施形態では、本開示は、核酸をトランスポソームビーズ上に転位させる工程を含む、ビーズ連結トランスポソームによるフローセルの播種効率を増強又は改善する方法を記載する。転位後、転位された鎖の両方の5'末端は、強力なビオチン/ストレプトアビジン結合を介してビーズ連結トランスポソームに連結される。これは、これまで、ビーズから分子を放出するために過剰なビオチン及び熱の使用を必要とした。熱はまた、フローセルにおける拡散の増加をもたらし、これは、形成されたクラスタの空間的な同一場所を破壊する。本開示は、熱又は過剰なビオチンの使用を必要としない、核酸放出及びフローセル播種を改善するための改善又は強化された方法を提供する。

【0050】

別の実施形態では、本開示は、核酸をトランスポソームビーズから放出し、核酸をフローセルの1つ以上の表面上に播種して、密接に連結された核酸がフローセルの表面の選択位置上に空間的に共存するようにする工程を含む、ビーズ連結トランスポソームによるフローセルの播種効率を増強又は改善する方法を記載する。フローセル表面上の核酸の空間的な共局在化は、インデックス付けの形態として作用し、それによって、配列決定リードがコンティグへと一緒に連結されることを可能にする。

【0051】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、有利には、PCRフリーである。別の実施形態では、本開示の方法は、ほとんど全ての転位分子がフローセルの1つ以上の表面上に捕捉されるような高効率の放出/播種を呈する。典型的には、核酸分子は、熱/過剰ビオチンの使用によってビーズから放出される。しかしながら、上記技術の使用の1つの欠点は、パターン化されたフローセルが、ナノウェルに効率的に播種するために2~3個以上の分子を必要とすることであり、標準的な方法論の使用は、あまり効率的ではなく、転位された分子の捕捉効率の低下をもたらす。したがって、各コンティグに対するカバレッジにおいてより多くの「ホール」をもたらす。標準的な技術と比較して、本開示の方法は、ポリヌクレオチドを用いるフローセルの改善又は増強された放出及び播種効率を提供する。

【0052】

図1は、ビーズ連結トランスポソームによるフローセルの播種効率を増強又は改善するために使用される本開示の方法の例示的な実施形態を提供する。示されるように、この方法は、溶液プライマー（例えば、P7）を使用して、ビーズ上のY型アダプタの3'末端をプライムオフする（工程1）。排除増幅を使用して、プライマーを伸長し、工程2で見られるdsDNA構造を作製する。次いで、更なる鎖侵入が、より多くのP7プライマー及びリコンビナーゼを介して起こる（工程3）。これらはポリメラーゼによって伸長されるので、産物は、先にコピーされた鎖を溶液中に置換させ（工程4a）、次いで、これは表面上への播種及び増幅に利用可能である（工程4b）。P7/排除増幅混合物をビーズと共にインキュベートすると、追加のラウンドの伸長、プライマー侵入及び放出が実施され、ビーズからの鎖の線形コピーがもたらされる。その結果は、パターン化されたフロー

セルの各ナノウェルに播種するための複数の鎖の必要性を克服し、それは更に、典型的な 2 プライマー溶液 PCR のバイアスを受けにくい（したがって、PCR フリーライブラリの良好な GC バイアスを維持する）。

【 0 0 5 3 】

本開示の更なる実施形態が図 2 に示され、ここで、溶液プライマーとは異なる増幅プライマーがビーズ上に含まれる。例えば、ビーズは、P 5 のような増幅プライマーを含むことができる。したがって、図 1 の工程 3 において、アダプタに結合する溶液プライマー（例えば、P 7）に加えて、増幅プライマー（例えば、P 5）によるビーズ表面での追加のプライマー侵入が存在することになる。その結果、各鎖から更に多くのコピーが作製され、線形増幅よりもむしろ指数関数型増幅に近い。増幅プライマーの使用は PCR 型バイアスを導入し得るが、この方法は、バルク溶液ベースの PCR ではなく表面ベースの増幅であり、すなわち、試薬に対する競合が少ない。例えば、クラスタベースの表面増幅は、ナノライブラリ増幅よりも偏りが少ない。この概念は、図 2 に示されている。

10

【 0 0 5 4 】

本開示の方法の代替実施形態が図 3 に示されている。この実施形態では、ビーズは、溶液プライマーと同じ増幅プライマーを含む（例えば、両方とも P 7 である）。次いで、排除増幅（例えば、E x A M P）が、各転位事象を取り囲む増幅プライマー上への局在化された線形増幅のために使用される。その後、ビーズは、フローセルに導入され、（a）ストレプトアビジン / ビオチン結合から増幅ポリヌクレオチドを放出するために熱 / 過剰ビオチン手段を使用するか、又は（b）侵入 / 置換を介して増幅ポリヌクレオチドを放出するために排除増幅（例えば、E x A m p）及び第 2 の溶液プライマー手段を使用する。後者の手段は更に、ビーズの表面にわたる増幅を提供する。

20

【 0 0 5 5 】

本開示の方法の更なる代替の実施形態は、ビーズが 2 つ以上の異なるタイプの増幅プライマー（例えば、P 5 及び P 7）を含むことである。この実施形態では、転位後、ライブラリの表面ベースのクラスタ化を増幅と共に実施することができる。その後、ビーズは、フローセルに導入され、（a）ストレプトアビジン / ビオチン結合から増幅ポリヌクレオチドを放出するために熱 / 過剰ビオチン手段を使用するか、又は（b）侵入 / 置換を介して増幅ポリヌクレオチドを放出するために排除増幅（すなわち、E x A m p）及び溶液プライマー手段を使用する。後者の手段に関して、一方又は他方の増幅プライマーに相関する溶液プライマーが使用され得るか、又は複数のタイプの増幅プライマーに相関する溶液プライマーが使用される。ビーズ上の増幅プライマーは、転位に対して不活性であるか、又は一本鎖結合タンパク質などの使用によって不活性にされるべきである。

30

【 0 0 5 6 】

図 4 は、ビーズ上のライブラリを増幅し、増幅産物をナノウェルに播種するためにブリッジ増幅アプローチが使用される、本開示の方法の実施形態を提供する。このアプローチでは、可溶性プライマーをまずライブラリにハイブリダイズさせ、増幅混合物（例えば、A M S）使用して伸長させる。次いで、40%ホルムアミド / H T 1 混合物中に流した後、温度を > 80 まで上昇させることによって、ライブラリをビーズから変性させる。変性ライブラリ鎖を、温度を 20 まで下げることによって播種する。次いで、別のラウンドの伸長及び変性が、試薬を交換することによって行われる。

40

【 0 0 5 7 】

本明細書に開示される組成物、方法、及びキットは、ポリヌクレオチドの最大分子カバレッジのための読み取り可能なクラスタを提供するために、フローセルの表面上に播種され増幅されるビーズからポリヌクレオチドを効率的に放出することに関する。図 5 に図示するように、2 つ以上の DNA ライブラリ分子が、パターン化されたフローセルの同じウェル上に播種されると、それは、1 つの優性クラスタのみで終わるか、又はポリクロニ性を生じる 2 つ以上の等価なクラスタで終わるかのいずれかである。両方の場合において、熱クラスタにならなかったポリヌクレオチドからの価値ある情報の損失が存在する。

【 0 0 5 8 】

50

パターン化されたフローセルの更により広範な播種を提供するために、本開示は、クラウド領域内でより効率的かつ広範な播種を提供するオンフローセル線形増幅/浅層変性プロセスを提供する。図6A~図6Dに図示するように、フローセルの表面上にポリヌクレオチドを播種した後、Illumina(商標)AMS1による低温第1伸長を使用してポリヌクレオチドをコピーする。次いで、「浅層液体」変性及び播種工程を使用して、コピーされたポリヌクレオチドをウェルの近くに再播種する。シングルポット変性/播種に使用される試薬は、LDR(ホルムアミド)及びHT1の混合物である。次いで、ブリッジ増幅工程が使用される。前述のプロセスを使用して、ビーズから放出された全てのポリヌクレオチドからの配列決定情報が実現され得る。

【0059】

10

特定の実施形態では、パターン化されたフローセル上のビーズ連結トランスポソームからの低い播種効率の問題は、ビーズ上の転位鑄型をコピーするための溶液プライマーを用いた排除増幅(例えば、ExAmp)を使用することによって解決される。次いで、より多くの溶液プライマーによるその後の鎖侵入は、溶液中へのコピーされた鎖の置換をもたらす、それによって、それらをビーズから効果的に放出し、それらがビーズに近接したフローセルの表面に播種することを可能にする。この方法の更なる実施形態は、ビーズ結合鑄型の増幅及び置換を増強するために、ビーズ結合増幅プライマーを含み得る。

【0060】

本明細書に記載の方法を使用して、フローセル表面上に様々な密度のクラスタを生成することができる。例えば、フローセル表面は、約5、10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1050、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2500、3000、4000、5000、あるいは前述の値のいずれか2つを含むか、又はその間の密度の範囲の、クラスタ密度(K/m^2)を含むことができる。クラスタの密度は、使用されるビーズの数及びビーズのサイズに関連する。

20

【0061】

核酸は、核酸の5'末端若しくはその付近、又は核酸の3'末端若しくはその付近の表面への一点共有結合によってビーズに結合させることができる。核酸が増幅プライマーとして機能する実施形態では、付着は、プライマーの鑄型特異的部分を遊離させて、その同族鑄型にアニーリングさせ、3'ヒドロキシル基をプライマー伸長のために遊離させるように構成されている。当該技術分野において既知の任意の好適な共有付着剤をこの目的のために使用してもよい。選択された結合化学は、ビーズ表面の性質、及びそれに適用される任意の誘導体化又は官能化に依存する。付着剤の例としては、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体が挙げることができるが、これらに限定されない。ビーズに結合した増幅プライマーは、付着を促進するために非ヌクレオチド化学修飾であり得る部分を含んでもよい。ある特定の実施形態では、増幅プライマーは、ビーズの表面上のストレプトアビジン又はアビジンと結合を形成することができるビオチン残基を5'末端に含んでもよい。別の実施形態では、増幅プライマーは、例えば、5'末端に位置する、ホスホロチオエート又はチオホスフェートなど、硫黄含有求核剤を含み得る。ポリアクリルアミド系ビーズの場合、この求核試薬は、ビーズの表面に存在するプロモアセトアミド基に結合する。付着はまた、本明細書中の他の箇所に記載されるようなリガンド受容体相互作用を介して生じ得る。

30

40

【0062】

本明細書に開示されるパターン化フローセルと共に使用されるビーズは、例えば、核酸又は他の生体分子の共有結合を可能にする反応基を含む材料の層又はコーティングの適用によって「官能化」された、ポリマー材料(例えば、ポリスチレン又はポリスチレンジビ

50

ニルベンゼン、シリカ材料、ジルコニア材料、及び/又は超常磁性材料等)から構成されている。このようなコーティングの例としては、ストレプトアビジン、アミン基、カルボキシル基、エポキシ基、トシル基、又はリガンド(例えば、受容体、受容体リガンドなど)が挙げられるが、これらに限定されない。そのような実施形態では、ポリヌクレオチドは、ビーズ上の層又はコーティング中の反応性基(例えば、トシル基)に直接共有結合されてもよいが、コーティング又は層自体が、ビーズに非共有結合されてもよい。更なる実施形態では、本明細書に開示されるビーズは、いくつかの層を有することができ、それらの層は異なる組成を有することができる。本明細書に開示されるビーズは、略球形であるが、卵形であってもよい。ビーズは、概して親水性の表面又は概して疎水性の表面を含んでもよい。ビーズは、約500nm、1µM、1.1µM、1.2µM、1.3µM、1.4µM、1.5µM、1.6µM、1.7µM、1.8µM、1.9µM、2µM、2.1µM、2.2µM、2.3µM、2.4µM、2.5µM、2.6µM、2.7µM、2.8µM、2.9µM、3µM、3.1µM、3.2µM、3.3µM、3.4µM、3.5µM、3.6µM、3.7µM、3.8µM、3.9µM、4µM、4.1µM、4.2µM、4.3µM、4.4µM、4.5µM、4.6µM、4.7µM、4.8µM、4.9µM、5.0µM、5.1µM、5.2µM、5.3µM、5.4µM、5.5µM、5.6µM、5.7µM、5.8µM、5.9µM、6µM、6.1µM、6.2µM、6.3µM、6.4µM、6.5µM、6.6µM、6.7µM、6.8µM、6.9µM、7µM、7.1µM、7.2µM、7.3µM、7.4µM、7.5µM、7.6µM、7.7µM、7.8µM、7.9µM、8µM、8.1µM、8.2µM、8.3µM、8.4µM、8.5µM、8.6µM、8.7µM、8.8µM、8.9µM、9.0µM、9.1µM、9.2µM、9.3µM、9.4µM、9.5µM、9.6µM、9.7µM、9.8µM、9.9µM、10µM、又は前述の距離のうちのいずれか2つを含むか若しくはその間の範囲の直径(その端数増分も含む)を有する。ビーズは、典型的には、同じ配列を有しても有さなくてもよい複数の結合ポリヌクレオチドを含む。結合したポリヌクレオチドの数は、ビーズのサイズ、及びビーズ表面上の利用可能な反応基の数に大きく依存する。ビーズは、例えば、Bangs Laboratories, Fishers Ind.からのMicrosphere Detection Guideに記載されるような、制御孔ガラスビーズ、常磁性ビーズ、ポリスチレン、トリアゾル、セファロースビーズ、ナノ結晶、及び当該技術分野で既知の他のものを含む、種々の材料から構成され得る。ビーズは、生物学的材料又は非生物学的材料から作製され得る。磁性ビーズは、本明細書に記載される方法の様々な工程における磁石を使用した磁性ビーズの操作の容易さにより、特に有用である。

【0063】

本明細書に開示されるビーズは、典型的には、ビーズ連結トランスポソームを含む。ビーズ連結トランスポソームは、提供されたDNA鋳型(例えば、ゲノムDNA、長い鋳型DNAなど)に対してオンビーズタグメント化を実施することができる。トランスポソームは、ピオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体などの付着剤を使用して、ビーズに直接付着させることができる。代替的に、トランスポソームは、リンカーを使用することによって、ビーズに間接的に付着されてもよい。リンカーの例としては、ヌクレオチド、ポリマー、ペプチドなどが挙げられ得る。特定の実施形態では、トランスポソームは、オリゴヌクレオチドリンカーを介してビーズに間接的に連結される。そのような場合、オリゴヌクレオチドリンカーは、トランスポソームによって認識され結合される末端配列(例えば、モザイク末端配列)を含んでもよい。ビーズに連結されたトランスポザーゼは、トランスポザーゼTn5、スリーピングビューティトランスポザーゼ、Tn7トランスポゾン、又は活性及び/若しくは安定度を改善するための前述の各々における突然変異であり得る。特定の実施形態では、ビーズに連結されたトランスポソームは、トランスポザーゼTn5、又はその突然変異体若しくはパリアントを含む。トランスポソームをビーズに連結するオ

リゴヌクレオチドリンカーは、付着剤、例えば、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体を使用して、ビーズに付着させることができる。特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドリンカーは、ビオチン/ストレプトアビジン又はアビジン結合を介してビーズに結合される。オリゴヌクレオチドリンカーは、1つ以上のバーコード配列、プライマー配列、配列決定プライマー結合部位、及び/又は制限酵素認識部位を更に含んでもよい。

【0064】

固定化されたビーズからポリヌクレオチドを放出することによってフローセルの表面上に生成されるクラスタは、クラスタが生成されたビーズによって占有される表面の面積と類似しているか又はそれより小さいサイズであり得、クラスタは、典型的には、互いに類似のサイズ及び強度である。均一なサイズ、均一な強度、重複の欠如は、他のランダム堆積法から得られるものよりも高い単位面積当たりの好ましいクラスタ密度を提供することができ、なぜなら、これらの他の方法は、多くの場合、クラスタが重複し、異なるサイズ及び強度の表面を生じるからである。均一なサイズ及び強度を有する密集した重なり合わないクラスタの画像は、典型的には、クラスタのサブセットが互いに重なり合う画像よりも分析が容易である。

【0065】

特定の実施形態では、ビーズに結合したポリヌクレオチドは、ゲノムDNAを含む。更なる実施形態では、ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖は、長い鋳型DNAを含む。なお更なる実施形態では、

ビーズに結合したポリヌクレオチド鎖は、対象の試料からのDNAを含む。対象から得られる試料の例としては、尿、血液、唾液、組織、血清、血漿、痰、胆汁、糞便、毛（または毛髪）、皮膚、及び/又は初代細胞試料が挙げられるが、これらに限定されない。ポリヌクレオチドは、付着剤を使用してビーズに結合させることができる。付着剤の例としては、ビオチン/ストレプトアビジン結合、共有結合、2つの相補的配列間の塩基対合、抗原に結合する抗体、別の抗体に結合する抗体、金属イオンを含む担体に結合するポリヒスチジンタグ、及びリガンドに結合する受容体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0066】

本明細書に開示される方法を使用することによって鎖がビーズから放出されると、鎖は、ビーズに最も近いフローセルの表面上の捕捉剤に結合し、層内でのビーズの互いの近接性が、フローセル表面上に捕捉されるポリヌクレオチドの近接性を決定する。非パターン化フローセルに播種するためのビーズの使用は、使用されるビーズのサイズ及びフローセルの表面上のそれらの充填密度に基づいて、間接的な「パターン化アレイ」を提供する。代替的に、パターン化されたフローセルが、本明細書中に開示される方法と共に使用され得る。ポリヌクレオチドの鎖がフローセル表面に捕捉された後（フローセル播種）、鎖をコピーするためのポリメラーゼ及びdNTPによる伸長、その後の変性のサイクルにより、一本鎖形態の付着した核酸の所望のアレイが提供され、これを次いで等温増幅のサイクルに供することができる。代替的に、等温増幅（例えば、ブリッジ増幅）の前に、播種されたポリヌクレオチドのオンフローセル線形増幅を行い、続いて本明細書に開示される低容量変性及び播種方法を行うことによって、フローセルの播種効率を更に改善することができる。そのような実施形態では、フローセルの特徴の様々な表面は、一本鎖プライマー配列のローンを含み、「ブリッジ増幅」の発生を可能にする。ブリッジ増幅では、表面がハイブリダイズに好適な条件に曝されるとき、増幅される一本鎖核酸分子は、それらの遊離末端上のアダプタ配列がフローセルの表面に結合したその相補的な一本鎖プライマー配列とハイブリダイズするように、ブリッジを形成する。次いで、ヌクレオチド及びDNAポリメラーゼをフローセルに輸送して、増幅される核酸の相補鎖を作成する。次いで、作成された二本鎖配列は、変性試薬中に流すことによって変性され、プロセスは再び開始し、したがって、増幅サイクル中にシステムの温度を変化させることなく増幅された核酸のクラスタを作成する。典型的な実施形態では、クラスタの大部分は、モノクロナルで

10

20

30

40

50

あり、単一の元の核酸配列の増幅からもたらされる。

【0067】

一般に、DNAクラスタを作成するために使用されるプライマーオリゴヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチドである。それらはまた、天然及び非天然塩基の混合物、並びに天然及び非天然骨格連結を含有し得るが、但し、任意の非天然修飾は、プライマーとしての機能（すなわち、増幅反応の条件中に鋳型ポリヌクレオチド鎖にアニーリングする能力、及び鋳型鎖に相補的な新しいポリヌクレオチド鎖の合成の開始点として作用する能力）を排除しない。プライマーのうちの1つは、プライマーを表面から除去（切断）して一本鎖クラスタの形成を可能にする修飾を含有し得る。そのような線形化されたクラスタは、更なるプライマー鎖とのハイブリダイズを受けて、配列決定反応が生じることを可能にし得る。次いで、共有結合した一本鎖ポリヌクレオチド分子上で等温増幅のサイクルを実行することによって伸長産物を生成することができ、各コロニーが元の固定化された一本鎖ポリヌクレオチド分子（及びその相補的な配列）の複数のコピーを含むようになる。増幅の1つのサイクルは、ハイブリダイズ、伸長、及び変性の工程からなる。そのような工程は、一般に、試薬成分（例えば、緩衝液、など）の観点から、PCRなどの従来の核酸増幅手順と同等である。核酸を増幅する（例えば、ハイブリダイズ、伸長、など）ための好適な試薬は、当該技術分野において周知である。例示的な試薬は、以下により詳細に記載される。

10

【0068】

したがって、中和/ハイブリダイズ緩衝液は、表面結合した一本鎖ポリヌクレオチド分子の非結合末端が表面結合プライマーオリゴヌクレオチドにハイブリダイズして複合体を形成するように、一本鎖ポリヌクレオチド分子及び複数のプライマーオリゴヌクレオチドに適用することができる（プライマーオリゴヌクレオチドは、一本鎖ポリヌクレオチド分子の領域又は鋳型特異的部分にハイブリダイズし、それに対して相補的である）。このプロセスは、「ブリッジ」構造を作成する。また、ブリッジ増幅に関する更なる考察については、国際公開第0246456号、米国特許出願第60/783,618号、国際公開第9844151号、及び国際公開第0018957号を参照されたい。

20

【0069】

好適な中和/ハイブリダイズ緩衝液は、当該技術分野において周知である（Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Current Protocols, eds. Ausubel et al. 参照）並びに以下の増幅を説明する図解セクション。好適な緩衝液は、異なる鋳型配列の溶融温度を正規化するために、ベタイン又は有機溶媒などの添加剤と、洗剤と、を含有し得る。例示的なハイブリダイズ緩衝液は、2Mベタイン、20mMトリス、10mM硫酸アンモニウム、2mM硫酸マグネシウム、0.1%トリトン、1.3% DMSO、pH 8.8を含む。

30

【0070】

次に、ポリメラーゼ活性及びdNTPを有する酵素を含む伸長溶液をブリッジ複合体に適用することによって伸長反応を行う。複合体のプライマーオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチドを連続的に付加することによって伸長されて、一本鎖ポリヌクレオチド分子に相補的な伸長産物を生成する。好適な伸長緩衝液/溶液は、当該技術分野において周知である（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Current Protocols, eds. Ausubel et al. 参照）及び以下の実施例。

40

【0071】

本開示のシステム/デバイスで使用され得るポリメラーゼ活性を有する酵素の例としては、DNAポリメラーゼ（クレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼ）及び様々な耐熱性バクテリアからの熱安定性DNAポリメラーゼ（Taq、VENT、Pfu、Bst、及

50

び T f l DNAポリメラーゼなど)、並びにそれらの遺伝子修飾誘導体 (T a q G o l d、V E N T e x o、P f u e x oなど) が挙げられる。フローセル上で実施される増幅反応が等温であるため、追加の及び/又は代替のDNAポリメラーゼを熱サイクル増幅のためのポリメラーゼと比較して使用することができ、ほとんどの実施形態では、ポリメラーゼが熱安定性である特定の要件が存在しないことを理解されたい。また、B s t ポリメラーゼなどの鎖置換活性を有する酵素は、配列決定のための成長効果クラスタにおいて優れた性能を示すが、任意のDNAポリメラーゼを使用することができる。

【0072】

DNAクラスタを作成するために使用されるヌクレオシド三リン酸分子は、典型的には、デオキシリボヌクレオチド三リン酸、例えば d A T P、d T T P、d C T P、d G T P 10

【0073】

ハイブリダイズ工程及び伸長工程の後、支持体及び付着した核酸は、変性条件に供される。好適な変性緩衝液は、当該技術分野で周知である(例えば、S a m b r o o k e t a l . , M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , 3 r d E d , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , N Y ; C u r r e n t P r o t o c o l s , e d s . A u s u b e l e t a l . 参照)。本開示のシステム/デバイスは、等温核酸増幅を生成し、したがって、本明細書の核酸鎖は、温度上昇又は操作によって変性されないが、むしろ他の方法(例えば、化学的、物理的、など)によって変性される。例として、pHの変化及び低イオン強度 20 溶液が、実質的に等温温度で核酸を変性させ得ることが知られている。ホルムアミド及び尿素は、ワトソン-クリック塩基対合をもたらす水素結合を破壊する核酸の塩基との新しい水素結合を形成する。これらは、一本鎖核酸分子をもたらす。代替的に、鎖は、低塩及び高pH (> 12)の溶液での処理によって、又はカオトロピック塩(例えば、塩酸グアニジニウム)を使用することによって分離され得る。特定の実施形態では、水酸化ナトリウム(N a O H)溶液は、約0.25M~約0.1Mの濃度で使用される。代替の実施形態では、水中95%ホルムアミド、又は100%ホルムアミドが使用される。そのようなホルムアミドの実施形態は、水酸化物処理が表面を損傷し、いくつかの事例ではより低い強度のクラスタをもたらし得るため、追加の利点を示す。使用される他の試薬と同様に、そのような変性試薬は、流動チャンネルを通過する。 30

【0074】

変性後、2つの固定化された核酸が存在し、1つ目は、最初の固定化された一本鎖ポリヌクレオチド分子であり、2つ目は、固定化されたプライマーオリゴヌクレオチドのうちの1つから伸長するその相補体である。次いで、元の固定化された一本鎖ポリヌクレオチド分子及び固定化された伸長プライマーオリゴヌクレオチド(相補体)の両方が、支持体をハイブリダイズ、伸長、及び変性の更なるサイクルに供することによって、更なる増幅ラウンドを開始することができる。そのような更なる増幅ラウンドは、一本鎖ポリヌクレオチド配列及びその相補的な配列の複数の固定化されたコピーを含む、核酸コロニー又は「クラスタ」をもたらす。一本鎖ポリヌクレオチド分子の最初の固定化は、一本鎖ポリヌクレオチド分子が一本鎖ポリヌクレオチド分子の全長内の距離に位置するプライマーオリ 40 ゴヌクレオチドとのみハイブリダイズすることができることを意味する。したがって、形成された核酸コロニー又はクラスタの境界は、最初的一本鎖ポリヌクレオチド分子が固定化された比較的局所的な領域に限定される。「クラスタ」及び「コロニー」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、複数の同一の固定化された核酸鎖及び複数の同一の固定化された相補的核酸鎖から構成される、固体支持体上の別個の部位を指す。「クラスタ化アレイ」又は「クラスタアレイ」という用語は、そのようなクラスタ又はコロニーから形成されるアレイを指す。この文脈では、「アレイ」という用語は、クラスタの順序付けられた配置を必要とするものとして理解されるべきではない。

【0075】

典型的な実施形態では、増幅される核酸は、ビーズに結合され、フローセルの表面上に 50

固定化される。ビーズ連結トランスポソームは、フローセルの表面上に固定化することもできる。本明細書で使用される「固定化された」という用語は、明示的又は文脈によって別途示されない限り、直接的又は間接的な、共有付着又は非共有付着を包含することを意図する。本発明のある特定の実施形態では、共有付着が典型的であるが、一般に、必要とされるのは、例えば、増幅の用途において、支持体を使用することが意図される条件下で、分子（例えば、核酸）が、支持体に固定化又は付着したままであるということだけである。増幅のための固定化された核酸分子は、好適に修飾された核酸分子（一本鎖又は二本鎖のいずれか）を好適に反応性の表面に直接付着させるか、又は表面固定化プライマーへのハイブリダイズ、その後の、ポリメラーゼ及びdNTPによる伸長サイクルによってハイブリダイズした鎖をコピーすることによって得ることができる。次いで、伸長された鎖又は化学的に付着した二本鎖は、変性条件に供されて、ビーズを除去し、かつ所望の固定化された一本鎖核酸分子を生成することができ、これは、次いで、本明細書に記載の器具類によって等温増幅のサイクルに供され得る。DNAを溶液からフローセル上にハイブリダイズする最初の工程は、後続の増幅反応よりも高い温度で実施することができ、次いで、実質的に等温の温度で行うことができる。ハイブリダイズ工程はまた、増幅温度で実行され得る、但し、投入される核酸鎖は、ビーズに付着した一本鎖形態でフローセル表面に供給される。

10

【0076】

鋳型核酸を調製するいくつかの実施形態は、標的核酸を断片化することを含み得る。いくつかの実施形態では、バーコード化又はインデックス付きアダプタは、断片化された標的核酸（例えば、DNAライブラリ）に付着している。アダプタは、ライゲーション（酵素的又は化学的）、タグメンテーション、ポリメラーゼ伸長などの当該技術分野で既知の任意の数の方法を使用して付着し得る。いくつかの実施形態では、非連続的なトランスポゾン配列を含むトランスポソームの挿入は、標的核酸の断片化をもたらし得る。ループトランスポソームを含むいくつかの実施形態では、トランスポゾン配列を含む標的核酸は、トランスポゾン配列の断片化部位で断片化され得る。本明細書で提供される実施形態に有用な標的核酸を断片化するのに有用な方法の更なる例は、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号に見出すことができ、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。更なる実施形態では、タグメント化された配列は、アダプタ配列に相補的な配列、配列番号1及び配列番号2の配列、並びに任意選択的にバーコード又はインデックス配列を有するプライマーを含むサイクル制限PCR反応を使用して増幅される。更なる実施形態では、サイクル制限PCR反応を使用して増幅された配列は、DNAライブラリのノからのものである。なお更なる実施形態では、サイクル制限PCR反応を使用して増幅された配列は、一本鎖DNAに変性され、特異的配列を認識するピオチン化捕捉プローブ、及びピオチン化捕捉プローブと相互作用するストレプトアビジンを含む磁気ビーズによって選択的に結合される。更なる実施形態では、サイクル制限PCRによって増幅された配列にハイブリダイズしたピオチン化捕捉プローブを含む磁気ビーズは、本開示の方法を使用してフローセルの1つ以上の表面に固定化されている。

20

30

40

【0077】

いくつかの実施形態では、ビーズ上での線形増幅及びノ又はフローセル表面上に播種されたポリヌクレオチドの増幅は、排除増幅（Ex Amp）とも称される動的排除増幅（kinetic exclusion amplification、KEA）を使用して行うことができる。動的排除増幅反応は、選択された増幅産物（例えば、ビーズから放出された鎖）の形成を促進する成分を含む。Ex Amp成分の一例は、リコンビナーゼである。リコンビナーゼは、反復的な浸潤ノ伸長を可能にすることによって、選択された増幅産物形成を促進することができる。より具体的には、リコンビナーゼは、標的核酸を増幅産物形成の鋳型として使用するポリメラーゼによる標的核酸の浸潤及びポリメラーゼによるプライマーの伸長（プライマー侵入）を促進することができる。変性サイクル（例えば、加熱又は化学変性による）

50

は必要とされないため、このプロセスは標準的なPCRよりも迅速に発生することができる。したがって、リコンビナーゼ促進増幅は、等温的に実施することができる。一般に、増幅を促進するために、リコンビナーゼ促進増幅試薬中に、ATP、又は他のヌクレオチド（若しくは場合によってはその非加水分解性類似体）を含めることが望ましい。リコンビナーゼと一本鎖結合（single stranded binding、SSB）タンパク質との混合物は、SSBが増幅を更に促進することができるため、特に有用である。リコンビナーゼ促進増幅のための代表的な製剤としては、TwistDx（Cambridge、UK）によりTwistAmpキットとして市販されているものが挙げられる。リコンビナーゼ促進増幅試薬の有用な成分及び反応条件は、米国特許第5,223,414号及び米国特許第7,399,590号に記載されている。

10

【0078】

ヘリカーゼは、選択された増幅産物形成を促進し、場合によっては、増幅産物形成の速度を増加させる、動的排除増幅反応の成分の別の例である。変性サイクル（例えば、加熱又は化学変性による）は必要とされないため、このプロセスは標準的なPCRよりも迅速に発生することができる。したがって、ヘリカーゼ促進増幅は、等温的に実施することができる。ヘリカーゼと一本鎖結合（SSB）タンパク質との混合物は、SSBが増幅を更に促進することができるため、特に有用である。ヘリカーゼ促進増幅のための代表的な製剤としては、Biohelix（Beverly、MA）からIsoAmpキットとして市販されているものが挙げられる。更に、ヘリカーゼタンパク質を含む有用な製剤の例は、米国特許第7,399,590号及び米国特許第7,829,284号に記載されている。起点結合タンパク質は、増幅線形産物の形成を促進するためにExAmp反応に含めることができる成分の更に別の例である。ビーズは、ExAmp駆動ポリヌクレオチド放出工程の前又は後にフローセルから除去することができる。

20

【0079】

Illumina, Inc.製のフローセルデバイス（例えば、HiSeqデバイス、NovaSeqデバイス、MiSeqデバイス、及びNextSeqデバイス）F. Hoffmann - La Roche Ltd.製のフローセルデバイス（例えば、GS FLXデバイス、及びGS Juniorデバイス）、及びLife Sciences製のフローセルデバイス（例えば、SOLID/Ion Torrentデバイス）を含む、様々なフローセルデバイスを使用して、本開示の方法を実行することができる。特定の実施形態では、本開示の方法を実行するために使用されるフローセルデバイスは、Illumina Inc.製のフローセルデバイスである。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、排除増幅反応を使用して、フローセル表面上に播種されたポリヌクレオチドを増幅することができる。排除増幅反応は、それぞれの増幅部位（例えば、パターン化されたフローセルのウェル）の容量を満たすのに十分な数のアンプリコンが生成されるまで進行する。このように、既に播種された部位を容量まで満たすと、標的核酸がその部位に着地して増幅するのを阻害し、それによってその部位でアンプリコンのクローン集団を生成する。いくつかの実施形態では、第2の標的核酸がその部位に到達する前に増幅部位が容量まで満たされていなくても、見かけのクローン性を達成することができる。いくつかの条件下では、第1の標的核酸の増幅は、その部位に輸送される第2の標的核酸からのコピーの生成を有効に上回るか又は圧倒するのに十分な数のコピーが作製される点まで進行し得る。例えば、直径500nm未満の円形特徴部上でブリッジ増幅プロセスを使用する実施形態では、第1の標的核酸に対する指数関数的増幅の14サイクル後、同じ部位での第2の標的核酸からの汚染は、Illuminaシーケンシングプラットフォーム上での配列合成分析に悪影響を及ぼすのに不十分な数の汚染アンプリコンを生成することが決定された。

40

【0081】

いくつかの実施形態では、動的排除は、別の事象又はプロセスが発生することを有効に排除するために、十分に速い速度でプロセスが発生するときに発生し得る。本開示の方法

50

を使用してフローセル上の部位がビーズからの標的核酸でランダムに播種され、標的核酸のコピーが増幅プロセスで生成されて、播種部位の各々を容量まで満たす、フローセル表面上の核酸アレイの作製を例として取り上げる。本開示の動的排除方法によれば、播種及び増幅プロセスは、増幅速度が播種速度を超える条件下で同時に進行することができる。したがって、第1の標的核酸によって播種されている部位でコピーが作製される比較的早い速度は、増幅のためにその部位を播種することから、第2の核酸を有効に排除する。結合平衡除外増幅法は、米国特許出願公開第2013/0338042号の開示に詳細に記載されているように実施することができる。

【0082】

動的排除は、増幅を開始する比較的遅い速度（例えば、標的核酸の第1のコピーを作製する遅い速度）対標的核酸の後続のコピー（又は標的核酸の第1のコピー）を作製する比較的早い速度を利用し得る。前の段落の例では、動的排除は、比較的遅い速度の標的核酸播種（例えば、比較的遅い拡散又は輸送）対核酸種のコピーで部位を満たすために増幅が生じる比較的早い速度に起因して発生する。別の例示的な実施形態では、動的排除は、部位を播種した標的核酸の第1のコピーの形成の遅延（例えば、遅延又は遅い活性化）対部位を満たすために後続のコピーが作製される比較的早い速度に起因して発生し得る。本例では、個々の部位又はウェルにいくつかの異なる標的核酸が播種されている場合がある（例えば、増幅前にいくつかの標的核酸が各部位に存在し得る）。しかしながら、任意の所与の標的核酸の第1のコピー形成がランダムに活性化され得、これにより、後続のコピーが生成される速度と比較して第1のコピー形成の平均速度が比較的遅くなる。この場合、個々の部位にいくつかの異なる標的核酸が播種されている場合があるが、動的排除により、それらの標的核酸のうちの一つのみの増幅が可能になる。より具体的には、第1の標的核酸が増幅のために活性化されると、その部位又はウェルはそのコピーで急速に満たされ、これにより、第2の標的核酸のコピーがその部位で作製されるのが防止される。

【0083】

いくつかのパターン化フローセルでは、パターン化フローセルは、動的排除増幅（KEA）及びウェル内での標的特定のポリヌクレオチドのモノクロナル集団の形成に有利な範囲で選択されたサイズ寸法（例えば、直径）を有するウェルを含む。核酸ライブラリの動的排除増幅は、例えば、米国特許公開第2013/0338042号に記載されている。例えば、ウェルサイズ（例えば、直径）は、約30nm～約1µmの間、約50nm～約800nmの間、約70nm～約600nmの間、又は100nm～約400nmの間で変動し得る。いくつかの実施形態では、ウェルは、約400nmの直径を有する。いくつかの実施形態では、ウェルは、約1µm未満の直径を有する。例示的なパターン化フローセルとしては、Illumina（登録商標）HiSeq-X10パターン化フローセルが挙げられる。

【0084】

更なる実施形態では、本開示は、フローセル表面上に捕捉されたポリヌクレオチドをコピーするためにオンフローセル線形増幅を行い、次いで、「浅層液体」変性及び播種を行って、ポリヌクレオチドコピーを近くの領域に再播種させることによって、パターン化フローセルの播種効率を増加させる方法を提供する。このようなプロセスで使用され得る変性剤の例としては、熱、水酸化ナトリウム処理、高塩濃度、ホルムアミド、グアニジン、サリチル酸ナトリウム、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、及び尿素の使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0085】

オンフローセル線形増幅工程のために、本明細書で既に考察されたExAmpを含む任意の数の増幅技術を使用する可能性がある。代替的に、AMS1第1伸長を使用して、フローセル表面上に二本鎖DNA（元の鎖を有する1つのコピーされたアンカー鎖）を生成することができる。「浅層液」変性工程のために、化学変性剤（例えば、ホルムアミド）を含むハイブリダイゼーション緩衝液、例えば、Illumina（商標）からのHT1を使用することができる。ハイブリダイゼーション緩衝液は、概して、緩衝塩溶液、例え

ば、5%SSPE又は5×SSC、及び少量の非イオン性界面活性剤（例えば、0.1% Tween又は0.1%ドデシル硫酸ナトリウム）を含む。ハイブリダイゼーション緩衝液は、ホルムアミド又はグアニジンなどの化学変性剤を、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%のパーセンテージ、又は前述のパーセンテージのいずれか2つを含むか若しくはその間の範囲で含むことができる。使用されるハイブリダイゼーションの量は、パターン化されたフローセルのウェルを流動的に接続するのに十分であるべきである。ポリヌクレオチドを再播種した後、次いで、ブリッジ増幅を使用して、配列決定などの更なるプロセスのために、パターン化されたフローセルの表面上にクラスタを形成することができる。

【0086】

本明細書に記載のフローセル用途で使用するために、キット及び製品も本明細書に記載されている。そのようなキットは、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器を受容するように区画化されたキャリア、パッケージ、又は容器を含み得、容器の各々は、本明細書に記載の方法で使用される別々の要素のうちの一つを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、及び試験管が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。

【0087】

例えば、容器は、本明細書に記載の方法を実施するために使用される1つ以上のビーズ連結トランスポソーム及び試薬（例えば、可溶性プライマー、ExAmp、緩衝液など）を含むことができる。容器は、任意選択的に、滅菌アクセスポートを有する（例えば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈溶液バッグ又はバイアルであり得る）。そのようなキットは、任意選択的に、識別用の説明若しくはラベル又は本明細書に記載の方法におけるその使用に関する使用説明書と共に試薬を含む。

【0088】

キットは、典型的には、本明細書に記載のビーズ連結トランスポソームの使用のための商業的観点及びユーザ観点から望ましい、様々な材料（任意選択的に濃縮形態の追加の試薬及び/又はデバイスなど）のうちの一つ以上を各々が有する、1つ以上の追加の容器を含む。このような物質の非限定的な例としては、緩衝液、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、内容物及び/又は使用説明書を列挙したキャリア、パッケージ、容器、バイアル、及び/又はチューブラベル、並びに使用説明書を含む添付文書が挙げられるが、これらに限定されない。一セットの使用説明書もまた、典型的に含まれる。

【0089】

ラベルは、容器上にあるか、又は容器と関連付けられ得る。ラベルを形成する文字、数字、又は他の符号が容器自体に取り付けられ、成形され、又はエッチングされるとき、ラベルは容器上に存在し得、ラベルが例えば、パッケージ挿入物として、容器も保持する入れ物又はキャリア内に存在するとき、ラベルは容器と関連付けられ得る。ラベルを使用して、内容物が特定のフローセル用途に使用されることを示すことができる。ラベルはまた、本明細書に記載の方法などの内容物を使用するための指示を示し得る。

【実施例】

【0090】

オンフローセル線形化増幅法の性能の評価。オンフローセル線形化増幅法の性能をチェックするために、ワークフローをMiseqフローセル上で試験して、全ての播種/再播種DNAライブラリ分子をプロットアウトした。図7Aは、標準ワークフロー（浅層変性/再播種なし）からのクラスタクラウドであり、図7Bは、浅層液体変性/再播種を伴うビーズの同じバッチからのクラスタである。図7Bにおけるクラスタは、図7Aにおけるクラスタよりも明らかに多く、オンフローセル線形増幅ワークフローが、元のDNAライブラリ分子を首尾よく再播種して、配列決定情報を最大化することを可能にすることを示す。

【0091】

オンフローセル線形増幅の性能を確認するために複製物コピー数をチェックする：クラ

10

20

30

40

50

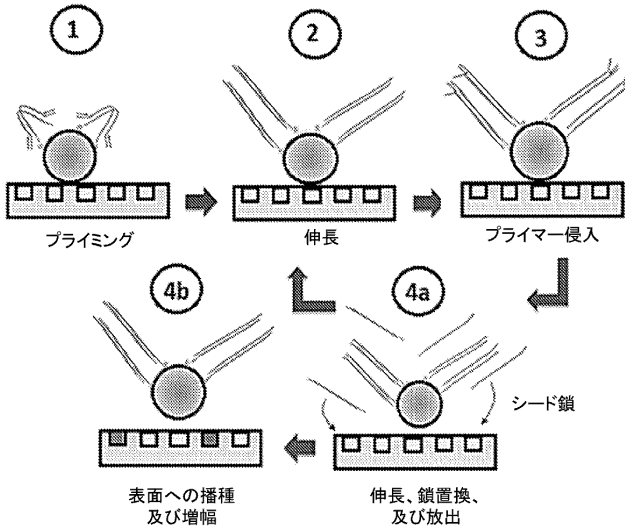
スタクラウドからの長いDNA断片アイランドの生成も、オンフローセル線形増幅ワークフローを使用して評価した。最大4コピーの複製物（Yアダプタライブラリの両方の鎖が、浅層の再播種によって倍加される）が観察された。一方、標準的なワークフローでは、最大2コピーの複製物（Yアダプタライブラリの両方の鎖）しか観察されなかった。

【0092】

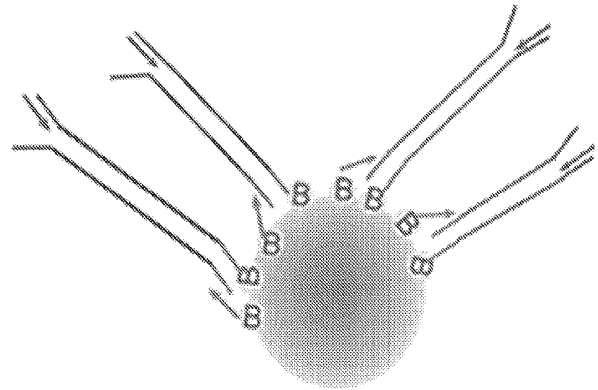
本開示の多くの実施形態を説明してきた。しかしながら、本開示の趣旨及び範囲を逸脱することなく、様々な修正が行われ得ることを理解されたい。したがって、他の実施形態は、以下の特許請求の範囲の範囲内にある。

【図面】

【図1】



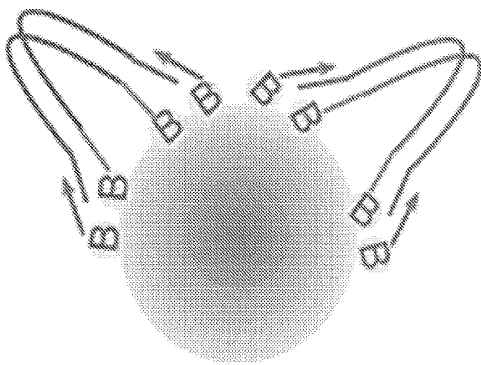
【図2】



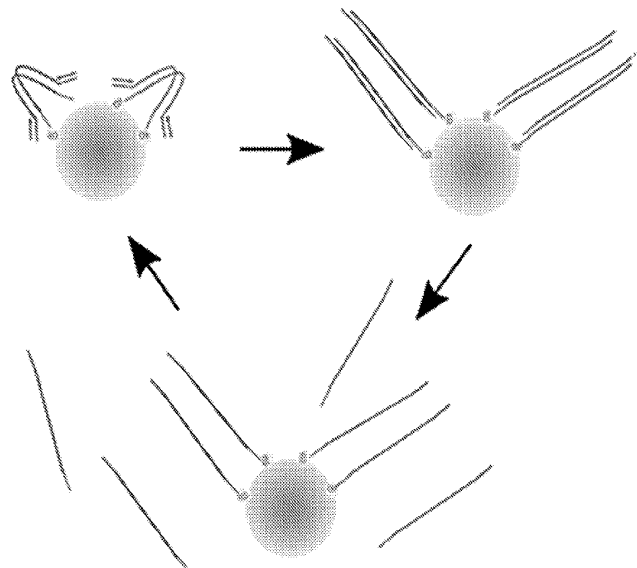
10

20

【図3】



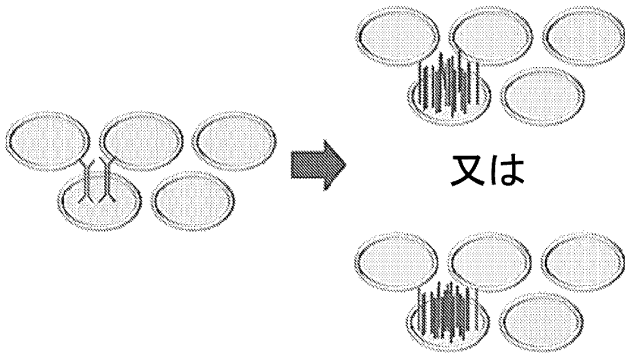
【図4】



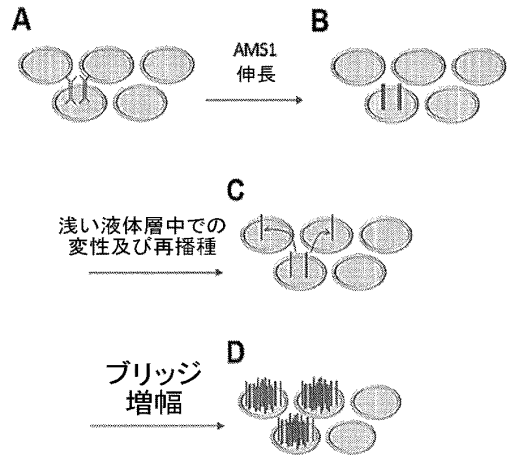
30

40

【図5】

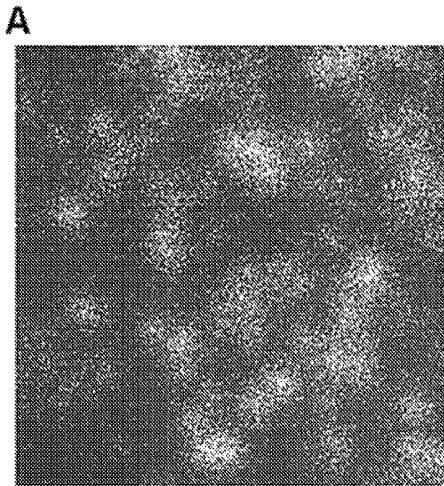


【図6】

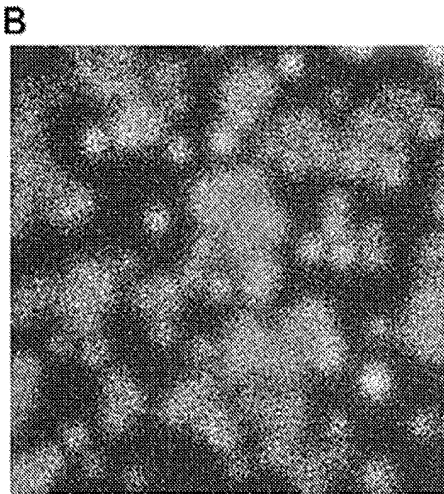


10

【図7A】



【図7B】



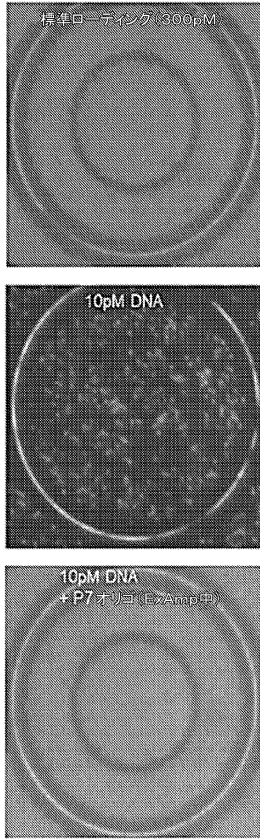
20

30

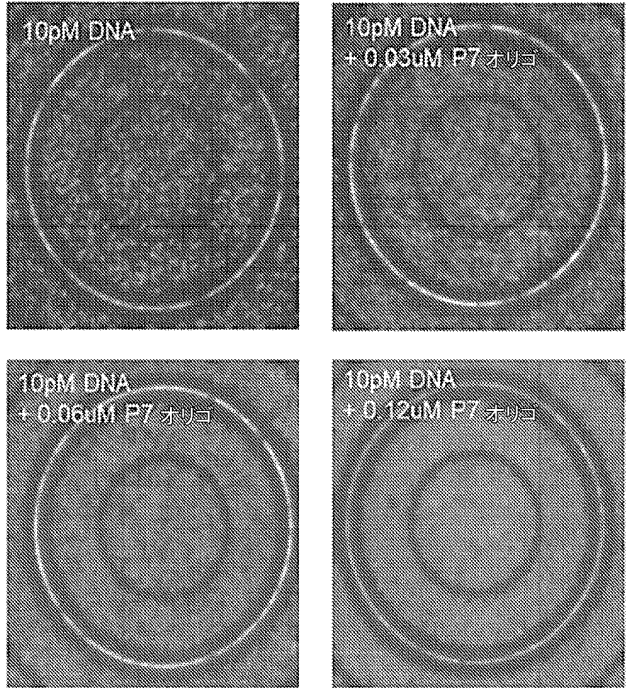
40

50

【 図 8 】



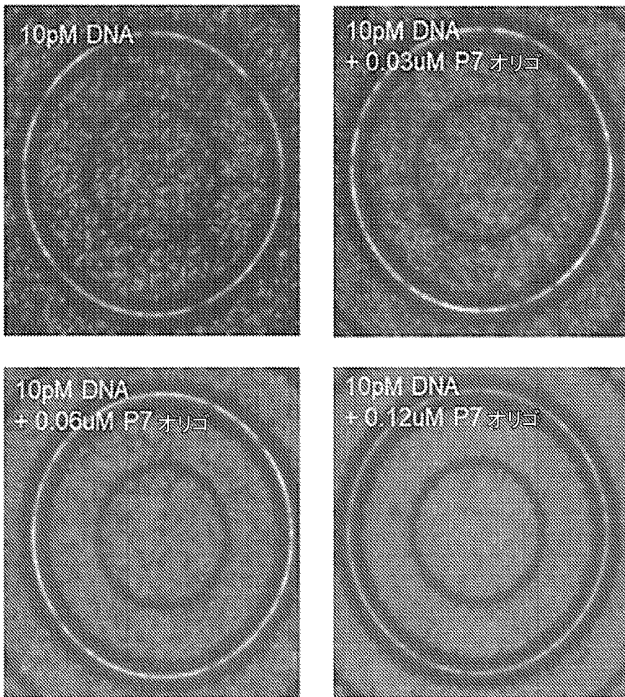
【 図 9 】



10

20

【 図 10 】



30

40

【 配列表 】

202450550800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2022/014329
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12Q1/6806 C12Q1/6834 C12Q1/6844		
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, WPI Data, CHEM ABS Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/338042 A1 (SHEN MIN-JUI RICHARD [US] ET AL) 19 December 2013 (2013-12-19) cited in the application figures; [0028]; [0087]; example 1 -----	1-58
X	WO 2019/028047 A1 (ILLUMINA INC [US]) 7 February 2019 (2019-02-07) figures; claims -----	59-66
<input 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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2022	Date of mailing of the international search report 12/05/2022	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hennard, Christophe	

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

10

20

30

40

1

50

International application No.

PCT/US2022/014329

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/014329

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 2013338042 A1	19-12-2013	AU 2013274283 A1	09-10-2014		
		AU 2018253621 A1	22-11-2018		
		AU 2021202677 A1	27-05-2021		
		CA 2867716 A1	19-12-2013		
		CN 104379766 A	25-02-2015		
		CN 107570092 A	12-01-2018		
		DK 2861756 T3	09-04-2018		
		DK 3366781 T3	01-02-2021		
		EP 2861756 A1	22-04-2015		
		EP 3366781 A1	29-08-2018		
		ES 2662098 T3	05-04-2018		
		ES 2848829 T3	12-08-2021		
		HK 1204012 A1	06-11-2015		
		HK 1253573 A1	21-06-2019		
		IL 234865 A	29-10-2020		
		IL 278008 A	01-12-2021		
		JP 6014249 B2	25-10-2016		
		JP 6339143 B2	06-06-2018		
		JP 6585767 B2	02-10-2019		
		JP 2015519084 A	09-07-2015		
		JP 2017060465 A	30-03-2017		
		JP 2018139607 A	13-09-2018		
		KR 20140140083 A	08-12-2014		
		KR 20170083643 A	18-07-2017		
		US 2013338042 A1	19-12-2013		
		US 2015080230 A1	19-03-2015		
		US 2016053310 A1	25-02-2016		
		US 2017335380 A1	23-11-2017		
		US 2020040386 A1	06-02-2020		
		WO 2013188582 A1	19-12-2013		
		WO 2019028047 A1	07-02-2019	CN 111108219 A	05-05-2020
				EP 3662083 A1	10-06-2020
SG 11201911869X A	30-01-2020				
US 2020216895 A1	09-07-2020				
WO 2019028047 A1	07-02-2019				

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 15/11 (2006.01)
C 1 2 N 9/10 (2006.01)

F I

C 1 2 N 15/11
C 1 2 N 9/10

テーマコード (参考)

Z

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,N
E,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,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,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

弁理士 式見 真行

(72)発明者

ウー, イア - シュアン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者

ゴルベ - ヤサル, フィリズ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者

クラナ, タルン クマン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 2 カリフォルニア州サンディエゴ、イルミナ・ウェイ 5 2 0 0

(72)発明者

ブーテル, ジョナサン マーク

英国シービー 2 1 ・ 6 ディエフ、ケンブリッジシャー、ケンブリッジ、グレート・アピントン、グ
ランタ・パーク 1 9

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA12 QA13 QQ02 QQ42 QQ52 QR08 QS24 QX02