(19)日本国特許庁(JP)　(12)特 許 公 報(B2)　(11)特許番号
特許第6181751号
(P6181751)
(45)発行日 平成29年8月16日(2017.8.16)　(24)登録日 平成29年7月28日(2017.7.28)

(51)Int.Cl.			F I		
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZCCA
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
C40B	40/06	(2006.01)	C40B	40/06	
C12P	19/34	(2006.01)	C12P	19/34	A

請求項の数 30　(全 82 頁)

(21)出願番号　特願2015-517246 (P2015-517246)
(86)(22)出願日　平成25年3月15日 (2013.3.15)
(65)公表番号　特表2015-521468 (P2015-521468A)
(43)公表日　平成27年7月30日 (2015.7.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/032606
(87)国際公開番号　WO2013/191775
(87)国際公開日　平成25年12月27日 (2013.12.27)
審査請求日　平成28年3月14日 (2016.3.14)
(31)優先権主張番号　61/661,293
(32)優先日　平成24年6月18日 (2012.6.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(73)特許権者　501430467
ニューゲン　テクノロジーズ,　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０７０,　サン　カルロス,　インダストリアル　ロード　２０１,　スイート　３１０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　アーマー,　クリストファー
アメリカ合衆国　ワシントン　９８０３４,　カークランド,　１０４ティーエイチ　プレイス　エヌイー　１３５３１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】望まれない核酸配列のネガティブ選択のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
　核酸ライブラリーから非所望の核酸配列を排除するまたは低下させるための方法であって：
　ａ．非所望のＤＮＡ断片と所望のＤＮＡ断片とを含む核酸ライブラリー中の前記非所望のＤＮＡ断片における非所望の一本鎖核酸配列に対して配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブをアニールするステップであって、前記非所望のＤＮＡ断片と前記所望のＤＮＡ断片がアダプターを各末端に含み、前記配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブの３’末端が、前記非所望の一本鎖核酸配列の一部分に対して完全な相補性を含み、それによって、部分的な二重鎖を有する非所望のＤＮＡ断片を産生するステップ；
　ｂ．前記部分的な二重鎖を有する前記非所望のＤＮＡ断片を、前記部分的な二重鎖中の二本鎖部分において切断するヌクレアーゼで処理するステップ；および
　ｃ．前記所望のＤＮＡ断片の各末端における前記アダプターにアニールするプライマーのセットによりポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を実行することにより、前記所望のＤＮＡ断片における所望の核酸配列を増幅し、それによって、増幅された所望のＤＮＡ断片を生成するステップ；
　を含む、方法。
【請求項２】
　前記ヌクレアーゼが、エンドヌクレアーゼを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】

前記ヌクレアーゼが、制限エンドヌクレアーゼを含む、請求項１に記載の方法。

【請求項４】

前記ヌクレアーゼが、前記二本鎖ＤＮＡの破壊を誘発する、請求項１に記載の方法。

【請求項５】

ステップ（ａ）の前記核酸ライブラリーを構築するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項６】

ステップ（ａ）の前記核酸ライブラリーが、偏りがない核酸鋳型集団を保持しながら、対象のサンプルから構築される、請求項５に記載の方法。

【請求項７】

ステップ（ａ）の前記非所望のＤＮＡ断片と前記所望のＤＮＡ断片がそれぞれ、ｃＤＮＡ断片である、請求項５に記載の方法。

【請求項８】

ステップ（ａ）の前記核酸ライブラリーを構築するステップが、ＲＮＡサンプル中のＲＮＡを逆転写して、ｃＤＮＡ断片の第一のｃＤＮＡ鎖を形成するステップを含む、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

前記ＲＮＡサンプルが、生物学的な供給源からの全ＲＮＡを含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

前記生物学的な供給源がヒトである、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記ＲＮＡサンプルを精製するステップをさらに含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１２】

前記ＲＮＡサンプルが、２０ｎｇ未満の核酸を含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１３】

前記ＲＮＡが、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）を含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１４】

ＲＮＡを逆転写するステップが、ランダムプライマーを前記ＲＮＡに対してアニールするステップを含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１５】

前記ランダムプライマーが、ランダムヘキサマーを含む、請求項１４に記載の方法。

【請求項１６】

前記第一のｃＤＮＡ鎖の３’末端を末端トランスフェラーゼにより伸長させるステップをさらに含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１７】

第二の鎖のｃＤＮＡ合成を行って、前記ｃＤＮＡ断片の第二の鎖を形成するステップをさらに含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１８】

前記非所望の一本鎖核酸配列が、ｒＲＮＡ配列である、請求項１に記載の方法。

【請求項１９】

前記非所望の一本鎖核酸配列が、ミトコンドリア配列である、請求項１に記載の方法。

【請求項２０】

前記ミトコンドリア配列が、ミトコンドリアＲＮＡ配列である、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記ミトコンドリアＲＮＡ配列が、ミトコンドリアｒＲＮＡ配列である、請求項２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブが、前記非所望の一本鎖核酸配列に相補

的であるように設計される、請求項１に記載の方法。
【請求項２３】
前記所望のＤＮＡ断片の各末端における前記アダプターの少なくとも一つが、バーコードを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
前記増幅された所望のＤＮＡ断片をシークエンシングするステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２５】
前記シークエンシングが、超並列シークエンシングを含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
前記超並列シークエンシングが、ペアエンドシークエンシングを含む、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記プライマーのセットが、バーコードを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２８】
前記核酸ライブラリーが、方向性をもつｃＤＮＡライブラリーである、請求項１に記載の方法。
【請求項２９】
ステップ（ａ）の前に、ステップ（ａ）における前記核酸ライブラリー中の前記所望のＤＮＡ断片と前記非所望のＤＮＡ断片を精製するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】
ステップ（ｃ）の前記増幅された所望のＤＮＡ断片を精製するステップをさらに含む、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
これは、２０１２年6月１８日に出願された米国仮特許出願第６１／６６１，２９３号（この全ては、その全体が参考として本明細書に援用される）の優先権の利益を主張する。
【背景技術】
【０００２】
次世代シークエンシング（ＮＧＳ）ライブラリーは、ヌクレオチド配列が決定されるであろうＤＮＡ断片の集合体である。これらのライブラリーへの挿入のためのＤＮＡの供給源は、典型的に、所望の長さに断片化されたゲノムＤＮＡまたは所定の細胞集団由来のトランスクリプトームのコピーである。トランスクリプトームライブラリーは、ＲＮＡ集団からｃＤＮＡコピーを作製し、それぞれのＤＮＡ鎖に対する相補体（ｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔ）を作り、それによって二本鎖ＤＮＡを生成し、次いで、二本鎖ＤＮＡを、ライブラリー特異的アダプターに対してライゲーションすることによって生成される。ｃＤＮＡは、ランダムプライマー、配列特異的プライマー、またはポリアデニル化されている転写物の集団をプライミングする（ｐｒｉｍｅ）ためにオリゴｄＴテイルを含有するプライマーを使用することによって合成することができる。頻繁に、これらの断片集団は、特定の研究に対して関心のないＤＮＡを含有し、ある場合には、これらの非所望のＤＮＡ配列が、ＤＮＡ集団全体のかなりのパーセンテージに相当する。たとえば、全トランスクリプトーム研究において、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）配列は、典型的なｃＤＮＡライブラリーにおいて、サンプルからｒＲＮＡを除去するためのステップがないので、すべての断片のうちの大多数（６０～９０％）を構成する。他の例において、末梢血からの遺伝子発現解析は、主として、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）由来のｍＲＮＡを対象にし、これは、全血サンプルの０．１％未満を構成する。血液サンプルにおいて大多数の細胞を構成する赤血球

由来のグロビンＲＮＡの低下は、そのようなアッセイにおいて望ましい。

【０００３】

　ｒＲＮＡ除去または排除の場合には、３つの一般的な方法が記載されている：１）出発集団からのｒＲＮＡの除去；２）オリゴｄＴプライマーを使用する差別的なプライミング（つまりポリアデニル化された転写物のみをプライミングする）；および３）ｒＲＮＡ配列に対して相補的なプライマーがプライマープールにおいて特異的に排除される（または比率的に少ない）差別的なプライミング（Ｎｏｔ－Ｓｏ－ＲａｎｄｏｍまたはＮＳＲプライマーアプローチ；Ａｒｍｏｕｒら、２００９を参照されたい）。ポリ（Ａ）配列のみを認識するプライマーにより全ＲＮＡ集団をプライミングすることは、２つの理由で問題である。第１に、原核生物のｍＲＮＡがそれらの３’末端にポリ（Ａ）配列を含有していないので、それは原核生物で使用することができない。第２に、真核生物のＲＮＡサンプルでさえ、調節転写物などのような多くの生物学的に重要なエレメントがポリアデニル化されておらず、そのため、オリゴｄＴプライミングによりライブラリーから失われる。特定の生物に対して設計される場合、ＮＳＲプライミング戦略は有効になり得るが、プライマーのそれほど最適化されていないセットが広範囲のサンプルタイプにわたって用いられる場合、ＮＳＲプライミングは、サンプル集団において歪みを引き起こし得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００４】

　ＮＧＳライブラリーから特定の非所望のＤＮＡ断片を除去するための改善された方法についての必要性がある。そのような方法は、理想としては、偏りがない鋳型集団から始まり、ＮＧＳライブラリーが生成された後に、配列特異的な形で非所望のＤＮＡ断片を排除することを可能にするであろう。本明細書において記載される本発明は、この必要性を満たす。

【課題を解決するための手段】

【０００５】

　本発明は、非所望の核酸配列が排除されたまたは実質的に低下したＮＧＳライブラリーの構築のための新規な方法、組成物、およびキットを提供する。詳細には、本発明の重要な態様は、出発核酸配列集団（たとえばトランスクリプトーム）の配列がすべて、歪みがなく偏りがない形で示されるＮＧＳライブラリーの生成後に、配列特異的な形で非所望のＤＮＡ配列の排除または低下を可能にする方法および組成物である。本発明の方法は、核酸ライブラリーからの、リボソームＲＮＡなどのような非所望の核酸配列の排除のために、また、結果的に、ライブラリーにおける関心のある核酸配列の濃縮のために、用いることができる。

【０００６】

　一態様において、本発明は、一本鎖ＤＮＡ鋳型を有する核酸ライブラリーからの配列特異的な形での非所望の核酸配列の選択的な除去のための方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、ａ）配列特異的なオリゴヌクレオチドプライマーまたは配列特異的なオリゴヌクレオチドプライマーのセットを、それぞれの末端に付加された方向が固定されたアダプターを有する一本鎖ＤＮＡ鋳型に対してアニールするステップであって、配列特異的なオリゴヌクレオチドが、非所望の核酸配列または非所望の核酸配列に隣接している領域に対して相補的となるように設計され、２つのアダプター配列のうちの１つが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含有するステップ、ｂ）アダプター－ＤＮＡ鋳型ジャンクションを越えて、ＤＮＡポリメラーゼにより配列特異的なプライマーを伸長させ、それによって、二本鎖ＤＮＡ断片を作るステップであって、オリゴヌクレオチドプライマーが、一本鎖ＤＮＡ鋳型に対して相補的であるステップ、ｃ）二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより、ＤＮＡ断片（一本鎖および二本鎖の両方）の集団を処理し、それによって、アダプター制限エンドヌクレアーゼ部位で二本鎖ＤＮＡ断片のみを切断し、したがって、非所望の核酸配列を含有する断片の一方の末端からアダプターを除去するステップ、ならびにｄ）それぞれのアダ

プターに対して特異的なプライマーを使用してＰＣＲを実行し、それによって、断片が同じ鋳型上に両方のＰＣＲプライミング部位を有する場合のみ、指数関数的な増幅が生じ、それによって、所望の核酸配列のみを増幅するステップを含む。

【０００７】

他の態様において、本発明は、出発核酸配列集団のすべての配列が示される偏りがない核酸鋳型集団を保持しながら、関心のあるサンプルから核酸ライブラリーを構築するための方法を提供する。

【０００８】

いくつかの実施形態において、本発明は、方向性をもつ（つまり鎖特異的な）核酸ライブラリーの構築のための方法であって、ａ）ＲＮＡサンプルを逆転写するステップ、ｂ）逆転写されたＲＮＡサンプルから二本鎖ｃＤＮＡを生成するステップであって、第２の鎖のｃＤＮＡ合成の間に、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、鎖の全長に沿ってｃＤＮＡの第２の鎖の中に組み込まれるステップ、ｃ）二本鎖ｃＤＮＡ上で末端修復を実行するステップ、ｄ）二本鎖ｃＤＮＡに対してアダプターをライゲーションするステップであって、２つのアダプターのうちの１つが、アダプターのライゲーション鎖の中に組み込まれる修飾ヌクレオチドを有するステップ、ｅ）ギャップ修復を実行するステップ、ｆ）適した分解剤によってｃＤＮＡの第２の鎖を選択的に除去するステップ、およびｇ）サンプルから分解産物を除去し、それによって、それぞれの末端に付加された方向が固定されたアダプターを有する一本鎖ＤＮＡ鋳型のライブラリーをもたらすステップを含む方法を提供する。

【０００９】

好ましい実施形態において、ｃＤＮＡの第２の鎖の中に組み込まれる修飾ヌクレオチドが、デオキシウリジン三リン酸（ｄＵＴＰ）であり、分解剤が、ヌクレアーゼウラシル－Ｎ－グリコシラーゼ（ＵＮＧ）である。

【００１０】

他の実施形態において、構築されている核酸ライブラリーが、鎖特異的ではない。

【００１１】

いくつかの実施形態において、関心のある核酸サンプルが、全ＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、関心のある核酸サンプルが、ランダムプライマー集団を使用してプライミングされる。他の実施形態において、関心のある核酸サンプルが、部分的に選択的なプライマー集団を使用してプライミングされる。

【００１２】

様々な態様において、本発明は、核酸のプールから望まれない核酸を排除するための方法に関する。ライブラリーは、残りの核酸により調製されてもよい。核酸排除およびライブラリー生成は、鎖特異的な形で実行されてもよい。第１の態様によれば、本発明は、核酸ライブラリーから特異的な非所望の核酸配列を排除するまたは低下させるための方法であって、（ａ）それぞれのＤＮＡ断片のそれぞれの末端に対して付加された方向が固定されたアダプターを有する一本鎖ＤＮＡ断片を含む核酸ライブラリーを生成するステップ、（ｂ）それぞれの末端に付加された方向が固定されたアダプターを有する一本鎖ＤＮＡ断片に対して配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブをアニールするステップであって、配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブが、非所望の核酸配列に対して相補的となるように設計され、２つのアダプターの少なくとも１つが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含むステップ、（ｃ）ＤＮＡポリメラーゼにより配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブを伸長させ、それによって、非所望の核酸配列の少なくとも１つの一部分を含む二本鎖ＤＮＡ断片を作るステップ、（ｄ）二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより、二本鎖および一本鎖ＤＮＡを含むＤＮＡ断片の集団を処理し、それによって、制限エンドヌクレアーゼ部位で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップ、および（ｅ）アダプター配列に対して特異的なプライマーのセットによりＰＣＲを実行し、それによって、所望の核酸配列を含むＤＮＡ断片を増幅するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態において、方法は、増幅された産物を

シークエンシングするステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリーが、ソートされた細胞の集団に由来する。いくつかの実施形態において、核酸ライブラリーが、単一細胞に由来する。いくつかの実施形態において、方法は、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の集団を生成するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞表面マーカーに従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞の光学的特性に従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞サイズに従って実行される。いくつかの実施形態において、非所望の核酸配列が、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、ステップｄ．の制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである。いくつかの実施形態において、ＤＮＡポリメラーゼが、ホットスタートポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、ＤＮＡポリメラーゼが、ＭｙＴａｑポリメラーゼである。いくつかの実施形態において、ステップ（ａ）が、ｉ．ＲＮＡサンプルを逆転写するステップ、ｉｉ．逆転写されたＲＮＡサンプルから二本鎖ｃＤＮＡを生成するステップであって、４つのｄＮＴＰ　ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、またはｄＴＴＰのうちの少なくとも１つが、第２の鎖の合成の間に非標準ｄＮＴＰと交換され、第２の鎖の中に組み込まれるステップ、ｉｉｉ．二本鎖ｃＤＮＡ上で末端修復を実行するステップ、ｉｖ．二本鎖ｃＤＮＡの５’末端に対してアダプターをライゲーションするステップであって、アダプター鎖のうちの１つが、アダプターのライゲーション鎖の中に組み込まれる非標準ヌクレオチドを有するステップ、ｖ．ギャップ修復を実行するステップ、およびｉｖ．切断剤によって第２の鎖を選択的に除去するステップを含む。いくつかの実施形態において、非標準ヌクレオチドが、ウリジンまたはイノシンを含む。いくつかの実施形態において、ステップｖｉが、１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位（ａｂａｓｉｃ　ｓｉｔｅ）を形成するステップを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、切断剤が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む。

【００１３】

第２の態様において、本発明は、核酸のプールに対するアダプターライゲーションの方法であって、（ａ）５’リン酸を含む第１の核酸鎖、５’リン酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む第２の核酸鎖を含む核酸を、５’リン酸を欠く第１のアダプター鎖ならびに５’リン酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠く第２のアダプター鎖を含む、少なくとも１つの第１のアダプターとライゲーションするステップ、（ｂ）３’伸長反応を実行するステップ、ならびに（ｃ）１つ以上の切断試薬を含む作用物質により切断反応を実行し、それによって、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む少なくとも１つの核酸鎖を切断するステップであって、１つ以上の切断剤のうちの１つが、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む核酸鎖に対して特異的であるステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態において、方法は、核酸を、５’リン酸を欠く第３のアダプター鎖ならびに５’リン酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠く第４のアダプター鎖を含む第２のアダプターとライゲーションするステップを含み、第１および第２のアダプターが、異なる。いくつかの実施形態において、核酸が、それぞれの末端で第１のアダプターまたは第２のアダプターとライゲーションされる。いくつかの実施形態において、非標準ヌクレオチドが、ウラシルおよびイノシンから選択される。いくつかの実施形態において、ステップｃが、１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の切断試薬が、グリコ

シラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、１つ以上の切断試薬が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の切断試薬が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、１つ以上の切断試薬が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の切断試薬が、エンドヌクレアーゼＶを含む。いくつかの実施形態において、方法は、第１のプライマーおよび第２のプライマーを含む増幅反応を実行するステップをさらに含み、第１のプライマーが、第１のアダプター鎖に対してハイブリダイズすることができ、第２のプライマーが、第４のアダプター鎖に対してハイブリダイズすることができ、それによって、増幅産物を生成する。いくつかの実施形態において、第１のアダプターが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む。いくつかの実施形態において、方法は、（ｄ）第１の核酸鎖上の配列に対してプローブをハイブリダイズするステップ、（ｅ）ＤＮＡポリメラーゼによりプローブを伸長させ、それによって、部分的な二重鎖核酸を産生するステップ、および（ｆ）二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより部分的な二重鎖核酸を処理し、それによって、認識配列で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、アダプター配列に対して特異的なプライマーのセットによりＰＣＲを実行し、それによって、核酸のプールにおいて少なくとも１つの第２の核酸を増幅するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、第２の核酸が、ステップｄにおける配列を欠く。いくつかの実施形態において、方法は、第２の核酸の一部分をシークエンシングするステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、核酸が、ｉ．ＲＮＡ上で第１の鎖の合成を実行し、それによって、第１の鎖の合成産物を形成し、ｉｉ．非標準ヌクレオチドの存在下において第１の鎖上で第２の鎖の合成を実行し、それによって、第２の鎖の合成産物を形成することによって生成される。いくつかの実施形態において、方法は、ＲＮＡを選択的に切断するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡを選択的に切断するステップが、ＲＮアーゼＨによる処理を含む。いくつかの実施形態において、方法は、ｉｉｉ．第１の鎖の合成産物および第２の鎖の合成産物を断片化し、それによって、断片化された第１の鎖の合成産物および第２の鎖の合成産物を生成するステップ、ｉｖ．末端修復を実行するステップ、ならびにｖ．５’リン酸化を実行するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、核酸のプールが、ソートされた細胞の集団に由来する。いくつかの実施形態において、核酸のプールが、単一細胞に由来する。いくつかの実施形態において、方法は、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の集団を生成するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞表面マーカーに従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞の光学的特性に従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞サイズに従って実行される。いくつかの実施形態において、核酸のプールが、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである。いくつかの実施形態において、３’伸長反応が、ホットスタートポリメラーゼを使用して実行される。いくつかの実施形態において、３’伸長反応が、ＭｙＴａｑポリメラーゼを使用して実行される。

【００１４】

　第３の態様において、本発明は、所望の核酸および望まれない核酸を含む核酸の鎖保持ライブラリーを作るためのアダプターライゲーションのための方法であって、（ａ）１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む望まれない核酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む所望の核酸を含む鋳型のプールを、それぞれ３’オーバーハングを含む複数の部分的二重鎖プライマーと混合するステップ、（ｂ）複数の部分的二重鎖プライマーを鋳型に対してアニールするステップ、（ｃ）鋳型に沿ってプライマー伸長反応を実行し、それによ

って、それぞれプライマー伸長産物を含む二本鎖核酸を形成するステップ、（ｄ）プライマー伸長産物の少なくとも１つの５’末端に対してアダプターをライゲーションするステップ、ならびに（ｅ）１つ以上のヌクレオチドを含む核酸に対して特異的な切断剤により二本鎖核酸から鋳型を切断するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態において、複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む。いくつかの実施形態において、複数の部分的二重鎖プライマーが、二本鎖部分内に共有配列を含む。いくつかの実施形態において、方法は、アダプターに沿ってプライマー伸長反応を実行することを含むステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ステップｅが、１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、切断剤が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルおよびイノシンを含む。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、ｉ．１つ以上の非標準ヌクレオチドの存在下においてＲＮＡ上で第１の鎖合成を実行し、それによって、第１の鎖の合成産物を形成し、ｉｉ．断片化反応を実行することによって生成される。いくつかの実施形態において、方法は、ＲＮＡを選択的に切断するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡを選択的に切断するステップが、ＲＮアーゼＨによる処理を含む。いくつかの実施形態において、断片化反応が、１つ以上の非標準ヌクレオチドを標的にする切断剤を利用するステップを含む。いくつかの実施形態において、断片化反応が、１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、切断剤が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む。いくつかの実施形態において、アダプターが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む。いくつかの実施形態において、方法は、（ｆ）プライマー伸長産物の配列に対してプローブをハイブリダイズするステップ、（ｇ）ＤＮＡポリメラーゼによりプローブを伸長させ、それによって、部分的な二重鎖核酸を産生するステップ、および（ｈ）二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより部分的な二重鎖核酸を処理し、それによって、認識配列で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、アダプターに対して逆相補的な配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーによりＰＣＲを実行し、それによって、鋳型のプールにおいて所望の核酸を増幅するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、所望の核酸の一部分をシークエンシングするステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、ソートされた細胞の集団に由来する。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、単一細胞に由来する。いくつかの実施形態において、方法は、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の集団を生成するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞表面マーカーに従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞の光学的特性に従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞サイズに従って実行される。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒ

ＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである。いくつかの実施形態において、プライマー伸長反応が、ホットスタートポリメラーゼを使用して実行される。いくつかの実施形態において、プライマー伸長反応が、ＭｙＴａｑポリメラーゼを使用して実行される。

【００１５】

第４の態様において、本発明は、所望の核酸および望まれない核酸を有する核酸の鎖保持ライブラリーを作るためのアダプターライゲーションのための方法であって、（ａ）望まれない核酸および所望の核酸を含む鋳型のプールを、それぞれ３’オーバーハングを含む複数の部分的二重鎖プライマーと混合するステップ、（ｂ）複数の部分的二重鎖プライマーを鋳型に対してアニールするステップ、（ｃ）鋳型に沿ってプライマー伸長反応を実行し、それによって、それぞれプライマー伸長産物を含む二本鎖核酸を形成するステップ、（ｄ）プライマー伸長産物の少なくとも１つの５’末端に対してアダプターをライゲーションするステップ、ならびに（ｅ）１つ以上のヌクレオチドを含む核酸に対して特異的な切断剤により二本鎖核酸からプライマー伸長産物を切断するステップを含む方法に関する。いくつかの実施形態において、複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む。いくつかの実施形態において、複数の部分的二重鎖プライマーが、二本鎖部分内に共有配列を含む。いくつかの実施形態において、３’オーバーハングを有する複数の部分的二重鎖プライマーの鎖が、二本鎖部分内の共有配列においてアデニンを欠く。いくつかの実施形態において、方法は、アダプターに沿ってプライマー伸長反応を実行することを含むステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、プライマー伸長反応が、１つ以上の非標準ヌクレオチドの存在下において実行される。いくつかの実施形態において、ステップｅが、１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、切断剤が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含む。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、ｉ．１つ以上の非標準ヌクレオチドの存在下においてＲＮＡ上で第１の鎖合成を実行し、それによって、第１の鎖の合成産物を形成し、ｉｉ．断片化反応を実行することによって生成される。いくつかの実施形態において、方法は、ＲＮＡを選択的に切断するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ＲＮＡを選択的に切断するステップが、ＲＮアーゼＨによる処理を含む。いくつかの実施形態において、断片化反応が、１つ以上の非標準ヌクレオチドを標的にする切断剤を利用するステップを含む。いくつかの実施形態において、断片化反応が、１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、切断剤が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む。いくつかの実施形態において、アダプターが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む。いくつかの実施形態において、方法は、（ｆ）望まれない核酸の配列に対してプローブをハイブリダイズするステップ、（ｇ）ＤＮＡポリメラーゼによりプローブを伸長させ、それによって、部分的な二重鎖核酸を産生するステップ、および（ｈ）二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより部分的な二重鎖核酸を処理し、それによっ

て、認識配列で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、アダプターに対して逆相補的な配列および３’オーバーハングと対向する部分的二重鎖プライマーの共有配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーのセットによりＰＣＲを実行し、それによって、鋳型のプールにおいて所望の核酸を増幅するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、所望の核酸の一部分をシークエンシングするステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、ソートされた細胞の集団に由来する。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、単一細胞に由来する。いくつかの実施形態において、方法は、マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の集団を生成するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞表面マーカーに従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞の光学的特性に従って実行される。いくつかの実施形態において、ソートが、細胞サイズに従って実行される。いくつかの実施形態において、鋳型のプールが、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む。いくつかの実施形態において、制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである。いくつかの実施形態において、プライマー伸長反応が、ホットスタートポリメラーゼを使用して実行される。いくつかの実施形態において、プライマー伸長反応が、ＭｙＴａｑポリメラーゼを使用して実行される。

【００１６】

態様のいずれかによれば、本発明は、望まれない配列を部分的に、実質的に、または完全に排除することに関し、少なくとも２、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、９８、９９、９９．５、９９．８、９９．９、９９．９９パーセント、もしくはそれ以上のいくつかのまたはすべての望まれない配列が、排除され、任意選択で、部分的に、実質的に、または完全に所望の配列を保持することに関し、９８、９５、９０、８５、８０、７５、７０、６５、６０、５５、５０、４５、４０、３５、３０、２５、２０、１５、１０、５、２、１、０．５、０．２、０．１、０．０５、０．０１パーセント未満、もしくはそれより少ないいくつかのまたはすべての所望の配列が排除される。いくつかの実施形態において、態様のいずれかにおける方法は、望まれない配列のいくつかまたはすべてを完全に排除する。いくつかの実施形態において、態様のいずれかにおける方法は、所望の配列のうちのいくつかまたはすべてを完全に保持する。態様のいずれかにおいて、本明細書において記載される方法は、望まれないおよび所望の核酸配列の間の、いくつかの望まれないおよびいくつかの所望の核酸配列の間の、またはすべての望まれないおよびすべての所望の核酸配列の間の存在比を、１．１、１．２、１．５、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、５０、６０、７５、１００、２００、５００、１０００、５０００、１００００、１０００００、１００００００倍、またはそれ以上、減少させてもよい。

【００１７】

様々な態様において、本発明は、キットに関する。第１の態様において、本発明は、制限エンドヌクレアーゼ、一方の鎖上に１つ以上の非標準ヌクレオチドを含み、５’リン酸を欠く第１のアダプター、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠き、５’リン酸を欠く第２のアダプター、リガーゼ、ポリメラーゼ、切断剤、プローブのライブラリー、アダプター配列に対して特異的なプライマーのセットを含むキットであって、第２のアダプターが、制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含むキットに関する。

【００１８】

第２の態様において、本発明は、制限エンドヌクレアーゼ、５’リン酸を欠く第１のアダプター、それぞれ３’オーバーハングを含み、かつ二本鎖部分内に共有配列を含む、複数の部分的二重鎖プライマー、リガーゼ、ポリメラーゼ、切断剤、プライマー伸長反応のためにプライマーとして作用することができるプローブのライブラリー、およびアダプタ

ーに対して逆相補的な配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーを含み、第１のアダプターが、制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含み、複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含むキットに関する。

【００１９】

第３の態様において、本発明は、制限エンドヌクレアーゼ、５’リン酸を欠く第１のアダプター、それぞれ３’オーバーハングを含み、二本鎖部分内に共有配列を含み、かつ３’オーバーハングを有する複数の部分的二重鎖プライマーの鎖が二本鎖部分内の共有配列においてアデニンを欠く複数の部分的二重鎖プライマー、リガーゼ、ポリメラーゼ、切断剤、プライマー伸長反応のためにプライマーとして作用することができるプローブのライブラリー、およびアダプターに対して逆相補的な配列および３’オーバーハングの反対の部分的二重鎖プライマーの共有配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーのセットを含み、第１のアダプターが、制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含み、複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含むキットに関する。

【００２０】

態様のいずれかにおいて、制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩであってもよい。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼが、ホットスタートポリメラーゼ、たとえばＭｙＴａｑである。いくつかの実施形態において、キットが、１つ以上の非標準ヌクレオチドをさらに含む。いくつかの実施形態において、１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼを含む。いくつかの実施形態において、グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである。いくつかの実施形態において、切断剤が、第一級アミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、ポリアミンが、ＤＭＥＤである。いくつかの実施形態において、切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む。

【００２１】

本明細書において記載される方法のいずれかを実行するためのキットは、本発明の他の特色である。そのようなキットは、核酸の選択的な濃縮、増幅、およびシークエンシングのための試薬、酵素、およびプラットフォームを含んでいてもよい。一実施形態において、ａ）１つのアダプターまたはいくつかのアダプター、ｂ）１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー、およびｃ）増幅のための試薬を含むキットが、提供される。他の実施形態において、キットが、制限酵素などのような配列およびｄｓＤＮＡ特異的核酸修飾酵素をさらに含む。他の実施形態において、キットが、シークエンシングのための試薬をさらに含む。キットは、キット構成成分を用いるためのおよびキット中に含まれない任意の他の試薬の使用のための説明書を好ましくは含むであろう。

【００２２】

態様のいずれかにおいて、本発明の方法、組成物、およびキットが、望まれない核酸上の配列を標的にするプライマーとして作用することができるプライマープローブに関する。

【００２３】

態様のいずれかにおいて、本発明は、望まれない核酸配列を集め、任意選択で所望の核酸配列を集め、それぞれの望まれない核酸配列において１つ以上の鎖を選び、それぞれの望まれない核酸配列を、選択される長さ、たとえば４０～２００、５０～１８０、６０～１５０、７０～１２０、８０～１１０、および９０～１００塩基長のストレッチにコンピューターで断片化し、増幅プライマーについて、目標融解温度範囲、たとえば４０～９０、４５～８５、５０～８０、５５～７５、６０～７０、５５～６５℃などを選択し、任意選択で、増幅プライマーについて、目標長さ範囲、たとえば１０～８０、１１～７０、１２～６５、１３～６０、１４～５５、１５～５０、１６～４５、１７～４０、１８～３５、１９～３０、１０～３０、１１～２８、１２～２６、１３～２４、１４～２２、１５～

２０、１０～２０、１１～１９、１２～１８、１３～１７、１４～１６ヌクレオチド長などを選択し、目標温度範囲内の予測される融解温度を有し、かつ任意選択で目標長さ範囲内の長さを有する、それぞれの望まれない核酸配列における１つ以上の鎖における部分を標的にする適する増幅プライマーを設計し、任意選択で、１つ以上の設計された増幅プライマーが、１つ以上の所望の核酸配列に対してハイブリダイズすることができるかどうかを決定し、任意選択で、適する増幅プライマーのリストからあらゆるそのような設計された増幅プライマーを除去し、適する増幅プライマーのリストからオリゴヌクレオチドを合成することによって生成されるプライマープローブのセットに関する。当業者らは、目標融解温度範囲および目標長さ範囲が、これらの値のいずれかによって制限される任意の範囲内にあってもよいことを十分に理解する（たとえば４５～５５℃または１～１２ヌクレオチド長など）。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチド合成が、当技術分野において知られている標準的なホスホラミダイト（ｐｈｏｓｐｏｒａｍｉｄｉｔｅ）成分を使用して実行される。いくつかの実施形態において、合成されたオリゴヌクレオチドが、プールされる。

【００２４】

態様のいずれかにおいて、望まれない核酸配列を標的にするプライマープローブのセットが、５０～１００００、５５～５０００、６０～１０００、７０～５００、８０～２５０、９０～２００、１００～１８０、１１０～１７０、１２０～１８０、１３０～１７０、１４０～１６０、１００～１５０、２５０～１０００の別個のオリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。したがって、本発明の組成物は、少なくとも５０、１００、１５０、２００、２５０の異なるオリゴヌクレオチドのセットを含み、それから本質的になり、またはそれからなり、前記オリゴヌクレオチドは、ミトコンドリアＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトｒＲＮＡ、ミトコンドリアｒＲＮＡ、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡに対して選択的にハイブリダイズする。そのような組成物は、バイアル中に単離することができる（たとえば試薬）。それぞれのオリゴヌクレオチドは、本明細書において記載される特性（たとえばサイズおよびＴｍ）を有することができる。当業者らは、目標融解温度範囲および目標長さ範囲が、これらの値のいずれかによって制限される任意の範囲内にあってもよいことを十分に理解する（たとえば６０～７０、１６０～２００、または１５０～２５０など）。

【００２５】

（参照による組み込み）

本明細書において言及される刊行物、特許、および特許出願はすべて、それぞれの個々の刊行物、特許、または特許出願が、参照によって組み込まれるように明確にかつ個々に示されるのと同じ程度まで、参照によって本明細書において組み込まれる。

【００２６】

本発明の新規な特色は、添付の特許請求の範囲において詳細に記載される。本発明の特色および利点についてのよりよい理解は、本発明の本質が利用されている、例証となる実施形態について記載する以下の説明および添付の図面に対する参照によって得られるであろう。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目１）

核酸ライブラリーから特異的な非所望の核酸配列を排除するまたは低下させるための方法であって、

ａ．それぞれのＤＮＡ断片のそれぞれの末端に対して付加された方向が固定されたアダプターを有する一本鎖ＤＮＡ断片を含む核酸ライブラリーを生成するステップ、

ｂ．それぞれの末端に付加された方向が固定されたアダプターを有する前記一本鎖ＤＮＡ断片に対して配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブをアニールするステップであって、前記配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブが、前記非所望の核酸配列に対して相

補的となるように設計され、２つの前記アダプターの少なくとも１つが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む、ステップ、
　ｃ．ＤＮＡポリメラーゼにより前記配列特異的なオリゴヌクレオチドプローブを伸長させ、それによって、前記非所望の核酸配列の少なくとも１つの一部分を含む二本鎖ＤＮＡ断片を作るステップ、
　ｄ．二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより、二本鎖および一本鎖ＤＮＡを含むＤＮＡ断片の集団を処理し、それによって、制限エンドヌクレアーゼ部位で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップ、ならびに
　ｅ．前記アダプターの配列に対して特異的なプライマーのセットによりＰＣＲを実行し、それによって、所望の核酸配列を含む前記ＤＮＡ断片を増幅するステップ
を含む、方法。
（項目２）
　増幅された産物をシークエンシングする追加のステップをさらに含む、項目１に記載の方法。
（項目３）
　前記核酸ライブラリーが、ソートされた細胞の集団に由来する、項目１に記載の方法。
（項目４）
　前記核酸ライブラリーが、単一細胞に由来する、項目３に記載の方法。
（項目５）
　マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の前記集団を生成するステップをさらに含む、項目３に記載の方法。
（項目６）
　前記ソートするステップが、細胞表面マーカーに従って実行される、項目５に記載の方法。
（項目７）
　前記ソートするステップが、前記細胞の光学的特性に従って実行される、項目５に記載の方法。
（項目８）
　前記ソートするステップが、細胞サイズに従って実行される、項目５に記載の方法。
（項目９）
　前記非所望の核酸配列が、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む、項目１に記載の方法。
（項目１０）
　ステップｄ．の制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである、項目１に記載の方法。
（項目１１）
　前記ＤＮＡポリメラーゼが、ホットスタートポリメラーゼを含む、項目１に記載の方法。
（項目１２）
　前記ＤＮＡポリメラーゼが、ＭｙＴａｑポリメラーゼである、項目１１に記載の方法。
（項目１３）
　ステップａ．が、以下のステップ：
　ｉ．ＲＮＡサンプルを逆転写するステップ、
　ｉｉ．逆転写された前記ＲＮＡサンプルから二本鎖ｃＤＮＡを生成するステップであって、４つのｄＮＴＰ　ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、またはｄＴＴＰのうちの少なくとも１つが、第２の鎖の合成の間に非標準ｄＮＴＰと交換され、そして前記第２の鎖の中に組み込まれる、ステップ、
　ｉｉｉ．前記二本鎖ｃＤＮＡ上で末端修復を実行するステップ、

　ｉｖ．前記二本鎖ｃＤＮＡの５’末端に対してアダプターをライゲーションするステップであって、前記アダプター鎖のうちの１つが、前記アダプターのライゲーション鎖の中に組み込まれる前記非標準ヌクレオチドを有する、ステップ、
　ｖ．ギャップ修復を実行するステップ、および
　ｖｉ．切断剤によって前記第２の鎖を選択的に除去するステップ
を含む、項目１に記載の方法。
（項目１４）
　前記非標準ヌクレオチドが、ウリジンまたはイノシンを含む、項目５に記載の方法。
（項目１５）
　ステップｖｉが、１つ以上の前記非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成することを含む、項目１３に記載の方法。
（項目１６）
　前記切断剤が、グリコシラーゼを含む、項目１３に記載の方法。
（項目１７）
　前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目１６に記載の方法。
（項目１８）
　前記切断剤が、第一級アミンを含む、項目１３に記載の方法。
（項目１９）
　前記切断剤が、ポリアミンを含む、項目１３に記載の方法。
（項目２０）
　前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目１９に記載の方法。
（項目２１）
　前記切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目１３に記載の方法。
（項目２２）
　前記切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目１３に記載の方法。
（項目２３）
　核酸のプールに対するアダプターライゲーションの方法であって、
　ａ．５’リン酸を含む第１の核酸鎖、５’リン酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む第２の核酸鎖を含む核酸を、５’リン酸を欠く第１のアダプター鎖ならびに５’リン酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠く第２のアダプター鎖を含む、少なくとも１つの第１のアダプターとライゲーションするステップ、
　ｂ．３’伸長反応を実行するステップ、ならびに
　ｃ．１つ以上の切断試薬を含む作用物質により切断反応を実行し、それによって、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む少なくとも１つの核酸鎖を切断するステップであって、前記１つ以上の切断剤のうちの１つが、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む核酸鎖に対して特異的である、ステップ
を含む方法。
（項目２４）
　前記核酸を、５’リン酸を欠く第３のアダプター鎖ならびに５’リン酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠く第４のアダプター鎖を含む第２のアダプターとライゲーションするステップをさらに含み、前記第１のアダプターおよび前記第２のアダプターが、異なる、項目２３に記載の方法。
（項目２５）
　前記核酸が、それぞれの末端で第１のアダプターまたは第２のアダプターとライゲーションされる、項目２３または２４に記載の方法。
（項目２６）
　前記非標準ヌクレオチドが、ウラシルおよびイノシンから選択される、項目２３に記載の方法。
（項目２７）
　ステップｃが、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって

、塩基脱落部位を形成することを含む、項目２３に記載の方法。
（項目２８）
前記１つ以上の切断試薬が、グリコシラーゼを含む、項目２３に記載の方法。
（項目２９）
前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目２８に記載の方法。
（項目３０）
前記１つ以上の切断試薬が、第一級アミンを含む、項目２３に記載の方法。
（項目３１）
前記１つ以上の切断試薬が、ポリアミンを含む、項目２３に記載の方法。
（項目３２）
前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目３１に記載の方法。
（項目３３）
前記１つ以上の切断試薬が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目２３に記載の方法。
（項目３４）
前記１つ以上の切断試薬が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目２３に記載の方法。
（項目３５）
第１のプライマーおよび第２のプライマーを含む増幅反応を実行するステップをさらに含み、前記第１のプライマーが、前記第１のアダプター鎖に対してハイブリダイズすることができ、そして前記第２のプライマーが、前記第４のアダプター鎖に対してハイブリダイズすることができ、それによって増幅産物を生成する、項目２４に記載の方法。
（項目３６）
前記第１のアダプターは、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む、項目２３～３５のいずれか一項に記載の方法。
（項目３７）
ｄ．前記第１の核酸鎖上の配列に対してプローブをハイブリダイズするステップ、
ｅ．ＤＮＡポリメラーゼにより前記プローブを伸長させ、それによって、部分的な二重鎖核酸を産生するステップ、および
ｆ．二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより前記部分的な二重鎖核酸を処理し、それによって、前記認識配列で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップ
をさらに含む、項目３６に記載の方法。
（項目３８）
前記アダプターの配列に対して特異的なプライマーのセットによりＰＣＲを実行し、それによって、核酸の前記プールにおいて少なくとも１つの第２の核酸を増幅するステップをさらに含む、項目３７に記載の方法。
（項目３９）
前記第２の核酸が、ステップｄにおける配列を欠く、項目３８に記載の方法。
（項目４０）
前記第２の核酸の一部分をシークエンシングするステップをさらに含む、項目３８に記載の方法。
（項目４１）
前記核酸が、以下：
ｉ．ＲＮＡ上で第１の鎖の合成を実行し、それによって、第１の鎖の合成産物を形成し、そして
ｉｉ．非標準ヌクレオチドの存在下において前記第１の鎖上で第２の鎖の合成を実行し、それによって、第２の鎖の合成産物を形成すること
によって生成される、項目２３に記載の方法。
（項目４２）
前記ＲＮＡを選択的に切断するステップをさらに含む、項目４１に記載の方法。
（項目４３）

前記ＲＮＡを選択的に切断するステップが、ＲＮアーゼＨによる処理を含む、項目４２に記載の方法。
（項目４４）
ｉｉｉ．前記第１の鎖の合成産物および前記第２の鎖の合成産物を断片化し、それによって、断片化された第１の鎖の合成産物および第２の鎖の合成産物を生成するステップ、
ｉｖ．末端修復を実行するステップ、ならびに
ｖ．５’リン酸化を実行するステップ
をさらに含む、項目４１に記載の方法。
（項目４５）
核酸の前記プールが、ソートされた細胞の集団に由来する、項目２３に記載の方法。
（項目４６）
核酸の前記プールが、単一細胞に由来する、項目４５に記載の方法。
（項目４７）
マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の前記集団を生成するステップをさらに含む、項目４５に記載の方法。
（項目４８）
前記ソートするステップが、細胞表面マーカーに従って実行される、項目４７に記載の方法。
（項目４９）
前記ソートするステップが、前記細胞の光学的特性に従って実行される、項目４７に記載の方法。
（項目５０）
前記ソートするステップが、細胞サイズに従って実行される、項目４７に記載の方法。
（項目５１）
核酸の前記プールが、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む、項目２３に記載の方法。
（項目５２）
前記制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである、項目３６に記載の方法。
（項目５３）
前記３’伸長反応が、ホットスタートポリメラーゼを使用して実行される、項目２３に記載の方法。
（項目５４）
前記３’伸長反応が、ＭｙＴａｑポリメラーゼを使用して実行される、項目５３に記載の方法。
（項目５５）
所望の核酸および望まれない核酸を含む核酸の鎖保持ライブラリーを作るためのアダプターライゲーションの方法であって、
ａ．１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む望まれない核酸および１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む所望の核酸を含む鋳型のプールを、それぞれ３’オーバーハングを含む複数の部分的二重鎖プライマーと混合するステップ、
ｂ．前記複数の部分的二重鎖プライマーを前記鋳型に対してアニールするステップ、
ｃ．前記鋳型に沿ってプライマー伸長反応を実行し、それによって、それぞれプライマー伸長産物を含む二本鎖核酸を形成するステップ、
ｄ．前記プライマー伸長産物の少なくとも１つの５’末端に対してアダプターをライゲーションするステップ、ならびに
ｅ．前記１つ以上のヌクレオチドを含む核酸に対して特異的な切断剤により前記二本鎖核酸から前記鋳型を切断するステップ

を含む、方法。
（項目５６）
　前記複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む、項目５５に記載の方法。
（項目５７）
　前記複数の部分的二重鎖プライマーが、二本鎖部分内に共有配列を含む、項目５５または５６に記載の方法。
（項目５８）
　前記アダプターに沿ってプライマー伸長反応を実行することを含むステップをさらに含む、項目５５に記載の方法。
（項目５９）
　ステップｅが、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成することを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６０）
　前記切断剤が、グリコシラーゼを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６１）
　前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目６０に記載の方法。
（項目６２）
　前記切断剤が、第一級アミンを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６３）
　前記切断剤が、ポリアミンを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６４）
　前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目６３に記載の方法。
（項目６５）
　前記切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６６）
　前記切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６７）
　前記１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６８）
　前記１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルおよびイノシンを含む、項目５５に記載の方法。
（項目６９）
　鋳型の前記プールが、
　ｉ．前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの存在下においてＲＮＡ上で第１の鎖合成を実行し、それによって、第１の鎖の合成産物を形成し、そして
　ｉｉ．断片化反応を実行すること
によって生成される、項目５５に記載の方法。
（項目７０）
　前記ＲＮＡを選択的に切断するステップをさらに含む、項目６９に記載の方法。
（項目７１）
　前記ＲＮＡを選択的に切断するステップが、ＲＮアーゼＨによる処理を含む、項目７０に記載の方法。
（項目７２）
　前記断片化反応が、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドを標的にする切断剤を利用することを含む、項目６９に記載の方法。
（項目７３）
　断片化反応が、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む、項目７２に記載の方法。

（項目７４）
前記切断剤が、グリコシラーゼを含む、項目７２に記載の方法。
（項目７５）
前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目７４に記載の方法。
（項目７６）
前記切断剤が、第一級アミンを含む、項目７２に記載の方法。
（項目７７）
前記切断剤が、ポリアミンを含む、項目７２に記載の方法。
（項目７８）
前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目７７に記載の方法。
（項目７９）
前記切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目７２に記載の方法。
（項目８０）
前記切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目７２に記載の方法。
（項目８１）
前記アダプターが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む、項目５５～８０のいずれか一項に記載の方法。
（項目８２）
ｆ．前記プライマー伸長産物の配列に対してプローブをハイブリダイズするステップ、
ｇ．ＤＮＡポリメラーゼにより前記プローブを伸長させ、それによって、部分的な二重鎖核酸を産生するステップ、
ｈ．二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより前記部分的な二重鎖核酸を処理し、それによって、前記認識配列で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップ
をさらに含む、項目８１に記載の方法。
（項目８３）
前記アダプターに対して逆相補的な配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーによりＰＣＲを実行し、それによって、鋳型の前記プールにおいて所望の核酸を増幅するステップをさらに含む、項目８２に記載の方法。
（項目８４）
前記所望の核酸の一部分をシークエンシングするステップをさらに含む、項目８３に記載の方法。
（項目８５）
鋳型の前記プールが、ソートされた細胞の集団に由来する、項目５５に記載の方法。
（項目８６）
鋳型の前記プールが、単一細胞に由来する、項目８５に記載の方法。
（項目８７）
マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の前記集団を生成するステップをさらに含む、項目８５に記載の方法。
（項目８８）
前記ソートするステップが、細胞表面マーカーに従って実行される、項目８７に記載の方法。
（項目８９）
前記ソートするステップが、前記細胞の光学的特性に従って実行される、項目８７に記載の方法。
（項目９０）
前記ソートするステップが、細胞サイズに従って実行される、項目８７に記載の方法。
（項目９１）
鋳型の前記プールが、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ

、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む、項目５５に記載の方法。
（項目９２）
　前記制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである、項目８１に記載の方法。
（項目９３）
　前記プライマー伸長反応が、ホットスタートポリメラーゼを使用して実行される、項目５５に記載の方法。
（項目９４）
　前記プライマー伸長反応が、ＭｙＴａｑポリメラーゼを使用して実行される、項目９３に記載の方法。
（項目９５）
　所望の核酸および望まれない核酸を有する核酸の鎖保持ライブラリーを作るためのアダプターライゲーションの方法であって、
　ａ．望まれない核酸および所望の核酸を含む鋳型のプールを、それぞれ３’オーバーハングを含む複数の部分的二重鎖プライマーと混合するステップ、
　ｂ．前記複数の部分的二重鎖プライマーを前記鋳型に対してアニールするステップ、
　ｃ．前記鋳型に沿ってプライマー伸長反応を実行し、それによって、それぞれプライマー伸長産物を含む二本鎖核酸を形成するステップ、
　ｄ．前記プライマー伸長産物の少なくとも１つの５’末端に対してアダプターをライゲーションするステップ、ならびに
　ｅ．前記１つ以上のヌクレオチドを含む核酸に対して特異的な切断剤により前記二本鎖核酸から前記プライマー伸長産物を切断するステップ
を含む、方法。
（項目９６）
　前記複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む、項目９５に記載の方法。
（項目９７）
　前記複数の部分的二重鎖プライマーが、二本鎖部分内に共有配列を含む、項目９５または９６に記載の方法。
（項目９８）
　前記３’オーバーハングを有する前記複数の部分的二重鎖プライマーの鎖が、前記二本鎖部分内の前記共有配列においてアデニンを欠く、項目９７に記載の方法。
（項目９９）
　前記アダプターに沿ってプライマー伸長反応を実行することを含むステップをさらに含む、項目９５に記載の方法。
（項目１００）
　前記プライマー伸長反応が、１つ以上の非標準ヌクレオチドの存在下において実行される、項目９９に記載の方法。
（項目１０１）
　ステップｅが、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成することを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１０２）
　前記切断剤が、グリコシラーゼを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１０３）
　前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目１０２に記載の方法。
（項目１０４）
　前記切断剤が、第一級アミンを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１０５）
　前記切断剤が、ポリアミンを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１０６）

前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目１０５に記載の方法。
（項目１０７）
前記切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１０８）
前記切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１０９）
前記１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含む、項目９５または１００に記載の方法。
（項目１１０）
鋳型の前記プールが、以下：
ｉ．前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの存在下においてＲＮＡ上で第１の鎖合成を実行し、それによって、第１の鎖の合成産物を形成し、そして
ｉｉ．断片化反応を実行すること
によって生成される、項目９５に記載の方法。
（項目１１１）
前記ＲＮＡを選択的に切断するステップをさらに含む、項目１１０に記載の方法。
（項目１１２）
前記ＲＮＡを選択的に切断するステップが、ＲＮアーゼＨによる処理を含む、項目１１１に記載の方法。
（項目１１３）
前記断片化反応が、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドを標的にする切断剤を利用することを含む、項目１１０に記載の方法。
（項目１１４）
前記断片化反応が、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断し、それによって、塩基脱落部位を形成するステップを含む、項目１１３に記載の方法。
（項目１１５）
前記切断剤が、グリコシラーゼを含む、項目１１３に記載の方法。
（項目１１６）
前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目１１５に記載の方法。
（項目１１７）
前記切断剤が、第一級アミンを含む、項目１１３に記載の方法。
（項目１１８）
前記切断剤が、ポリアミンを含む、項目１１３に記載の方法。
（項目１１９）
前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目１１８に記載の方法。
（項目１２０）
前記切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目１１３に記載の方法。
（項目１２１）
前記切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目１１３に記載の方法。
（項目１２２）
前記アダプターが、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む、項目９５～１２１のいずれか一項に記載の方法。
（項目１２３）
ｆ．前記望まれない核酸の配列に対してプローブをハイブリダイズするステップ、
ｇ．ＤＮＡポリメラーゼにより前記プローブを伸長させ、それによって、部分的な二重鎖核酸を産生するステップ、
ｈ．二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼにより前記部分的な二重鎖核酸を処理し、それによって、前記認識配列で二本鎖ＤＮＡ断片を切断するステップ
をさらに含む、項目１２２に記載の方法。
（項目１２４）

前記アダプターに対して逆相補的な配列および前記３’オーバーハングと対向する前記部分的二重鎖プライマーの前記共有配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーのセットによりＰＣＲを実行し、それによって、鋳型の前記プールにおいて所望の核酸を増幅するステップをさらに含む、項目１２３に記載の方法。
（項目１２５）
前記所望の核酸の一部分をシークエンシングするステップをさらに含む、項目１２４に記載の方法。
（項目１２６）
鋳型の前記プールが、ソートされた細胞の集団に由来する、項目９５に記載の方法。
（項目１２７）
鋳型の前記プールが、単一細胞に由来する、項目１２６に記載の方法。
（項目１２８）
マルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に細胞をソートし、それによって、ソートされた細胞の前記集団を生成するステップをさらに含む、項目１２６に記載の方法。
（項目１２９）
前記ソートするステップが、細胞表面マーカーに従って実行される、項目１２８に記載の方法。
（項目１３０）
前記ソートするステップが、前記細胞の光学的特性に従って実行される、項目１２８に記載の方法。
（項目１３１）
前記ソートするステップが、細胞サイズに従って実行される、項目１２８に記載の方法。
（項目１３２）
鋳型の前記プールが、細菌リボソームＲＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ヒト細胞質内ｒＲＮＡ、ヒトミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ細胞質内ｒＲＮＡ、ブドウミトコンドリアｒＲＮＡ、またはブドウ葉緑体ｒＲＮＡを含む、項目９５に記載の方法。
（項目１３３）
前記制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである、項目１２２に記載の方法。
（項目１３４）
前記プライマー伸長反応が、ホットスタートポリメラーゼを使用して実行される、項目９５に記載の方法。
（項目１３５）
前記プライマー伸長反応が、ＭｙＴａｑポリメラーゼを使用して実行される、項目１３４に記載の方法。
（項目１３６）
ａ．制限エンドヌクレアーゼ、
ｂ．一方の鎖上に１つ以上の非標準ヌクレオチドを含み、５’リン酸を欠く第１のアダプター、
ｃ．前記１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠き、５’リン酸を欠く第２のアダプター、
ｄ．リガーゼ、
ｅ．ポリメラーゼ、
ｆ．切断剤、
ｇ．プローブのライブラリー、および
ｈ．前記アダプターの配列に対して特異的なプライマーのセット
を含むキットであって、前記第２のアダプターが、前記制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む、キット。
（項目１３７）

　ａ．制限エンドヌクレアーゼ、
　ｂ．５’リン酸を欠く第１のアダプター、
　ｃ．それぞれ３’オーバーハングを含み、かつ二本鎖部分内に共有配列を含む、複数の部分的二重鎖プライマー、
　ｄ．リガーゼ、
　ｅ．ポリメラーゼ、
　ｆ．切断剤、
　ｇ．プライマー伸長反応のためにプライマーとして作用することができるプローブのライブラリー、および
　ｈ．前記アダプターに対して逆相補的な配列にハイブリダイズすることができるプライマー
を含むキットであって、前記第１のアダプターが、前記制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含み、前記複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む、キット。
（項目１３８）
　ａ．制限エンドヌクレアーゼ、
　ｂ．５’リン酸を欠く第１のアダプター、
　ｃ．複数の部分的二重鎖プライマーであって、それぞれ３’オーバーハングを含み、二本鎖部分内に共有配列を含み、かつ前記３’オーバーハングを有する前記複数の部分的二重鎖プライマーの鎖が前記二本鎖部分内の前記共有配列においてアデニンを欠く、複数の部分的二重鎖プライマー、
　ｄ．リガーゼ、
　ｅ．ポリメラーゼ、
　ｆ．切断剤、
　ｇ．プライマー伸長反応のためにプライマーとして作用することができるプローブのライブラリー、および
　ｈ．前記アダプターに対して逆相補的な配列および前記３’オーバーハングと対向する前記部分的二重鎖プライマーの前記共有配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーのセット
を含むキットであって、前記第１のアダプターが、前記制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含み、前記複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む、キット。
（項目１３９）
　前記制限エンドヌクレアーゼが、ＢｓｐＱＩである、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４０）
　前記ポリメラーゼが、ホットスタートポリメラーゼである、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４１）
　前記ポリメラーゼが、ＭｙＴａｑである、項目１４０に記載のキット。
（項目１４２）
　１つ以上の非標準ヌクレオチドをさらに含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４３）
　前記１つ以上の非標準ヌクレオチドが、ウラシルまたはイノシンを含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４４）
　前記切断剤が、グリコシラーゼを含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４５）

前記グリコシラーゼが、ＵＮＧまたはＵＤＧである、項目１４４に記載のキット。
（項目１４６）
前記切断剤が、第一級アミンを含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４７）
前記切断剤が、ポリアミンを含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１４８）
前記ポリアミンが、ＤＭＥＤである、項目１４７に記載のキット。
（項目１４９）
前記切断剤が、グリコシラーゼおよびポリアミンを含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。
（項目１５０）
前記切断剤が、エンドヌクレアーゼＶを含む、項目１３６～１３８のいずれか一項に記載のキット。

【図面の簡単な説明】
【００２７】
【図１】図１は、ｉｎｓｅｒｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｄａｐｔｏｒ　ｃｌｅａｖａｇｅ（ＩｎＤＡ－Ｃ）を使用する、一本鎖ＤＮＡ断片の核酸ライブラリーからの非所望の核酸配列の排除を示す図である。遺伝子特異的プライマー（ＧＳＰ）は、その相補的配列のみに対してアニールし、ポリメラーゼベースの伸長の後に二本鎖または部分的二本鎖分子の集団を作る。アダプター特異的制限エンドヌクレアーゼによる続く処理は、ＧＳＰ伸長反応によって活性化された断片のみを切断し、それによって、非所望の断片からＰＣＲプライミング部位のうちの１つを除去する。ＰＣＲ増幅は、関心のある核酸配列について濃縮されるライブラリーを生成する。
【図２】図２は、実施例１において概説されるように、鎖特異的全トランスクリプトームｃＤＮＡライブラリーから細菌ｒＲＮＡ断片を排除する実験からの結果の概要を示す図である。
【図３】図３は、実施例１において記載される４つの試験ライブラリーからの発現プロファイルの比較を示す図である。
【図４】図４は、実施例１における汎用原核生物ＩｎＤＡ－Ｃプローブによる１６Ｓ　ｒＲＮＡ部位の標的排除を示す図である。
【図５Ａ】図５は、方向性をもつライブラリー構築の方法を示す図である。
【図５Ｂ】図５は、方向性をもつライブラリー構築の方法を示す図である。
【図６】図６は、二重ｃＤＮＡ加水分解を含む、ＩｎＤＡ－Ｃプローブを使用する、核酸排除の方法を示す図である。
【図７Ａ】図７は、ＩｎＤＡ－Ｃプローブを使用する、核酸排除の他の方法を示す図である。
【図７Ｂ】図７は、ＩｎＤＡ－Ｃプローブを使用する、核酸排除の他の方法を示す図である。
【図８】図８は、２つの部分的二重鎖プライマーについての設計を示す図である。
【図９】図９は、汎用原核生物ＩｎＤＡ－Ｃプローブによる望まれない核酸についての方法を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
概要
本発明の方法は、非所望の核酸配列が排除されたまたは実質的に低下した次世代シークエンシング（ＮＧＳ）ライブラリーの生成のために使用することができる。そのような方法は、たとえば、リボソームＲＮＡの低下を示すシークエンシングライブラリーの生成お

よび核酸ライブラリーにおける関心のある核酸配列の濃縮に有用である。概して言えば、本発明の方法は、非所望の核酸配列の排除が核酸ライブラリーの生成の後に生じ、それによって、歪みがなく偏りがない核酸鋳型集団からの始まりを可能にするので、非所望の核酸配列が排除されるＮＧＳライブラリーを作るための既存の方法に対する改善を提供する。

【００２９】

本発明の方法および組成物は、方向性をもつライブラリー構築のために使用することができる。本発明の方法は、アダプターライゲーション一本鎖ＤＮＡサンプルを生成するためにさらに使用することができ、アダプターの方向が、固定されている。

【００３０】

本明細書において使用される場合、別段の指示がない限り、本明細書におけるいくつかの本発明の実施形態は、数的な範囲を企図する。本発明の様々な態様は、範囲のフォーマットで提示することができる。範囲のフォーマットでの記載は、単に便宜および簡潔さのためのものであり、本発明の範囲に対する変更できない制限として解釈されるべきではないことを理解されたい。したがって、範囲の記載は、あたかも明示的に書かれるかのように、詳細に開示されるすべての可能な部分範囲およびその範囲内の個々の数的な値を有すると考えられるべきである。たとえば、１～６などのような範囲の記載には、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６などのような詳細に開示される部分範囲ならびにその範囲内の個々の数、たとえば１、２、３、４、５、および６が含まれると考えられるべきである。これは、範囲の幅にかかわらず適用される。範囲が存在する場合、範囲は、範囲の終点を含む。

【００３１】

ここで、本発明の例示的な実施形態について詳細に言及する。開示される方法および組成物は、例示的な実施形態に関連して記載されるであろうが、これらの例示的な実施形態が本発明を限定するように意図されないことが理解されるであろう。それどころか、本発明は、代替物、修飾体、および等価物を包含することが意図され、これらは、本発明の精神および範囲に含まれてもよい。

【００３２】

別段の定めがない限り、本明細書において使用される遺伝学、分子生物学、生化学、および核酸の用語および記号は、当分野における標準的な論文およびテキスト、たとえばＫｏｒｎｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｂａｋｅｒ、ＤＮＡ　Ｒｅｐｌｉｃａｔｉｏｎ、Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９９２）；Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｗｏｒｔｈ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９７５）；Ｓｔｒａｃｈａｎ　ａｎｄ　Ｒｅａｄ、Ｈｕｍａｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９９９）；Ｅｃｋｓｔｅｉｎ編、Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ａｎａｌｏｇｓ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、１９９１）；Ｇａｉｔ編、Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ：Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ（ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、１９８４）；およびその他同種のものの用語および記号に従う。

【００３３】

本発明のオリゴヌクレオチド

本発明内で使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、典型的には２００残基長未満、より典型的には１５～１００ヌクレオチド長のポリヌクレオチド鎖を指すが、より長いポリヌクレオチド鎖を包含することもまた意図される。オリゴヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってもよい。本発明において使用される用語「オリゴヌクレオチドプローブ」または「プローブ」は、相補的なヌクレオチド配列に対してハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドを指す。本発明において使用される場合、用語「オリゴヌクレオチド」は、用語「プライマー」、「アダプター」、および「プローブ」と区別な

く使用されてもよい。

【００３４】

本明細書において使用される場合、用語「ハイブリダイゼーション」／「ハイブリダイジング」および「アニーリング」は、区別なく使用され、相補的な核酸の対形成を指す。

【００３５】

本明細書において使用される用語「プライマー」は、鋳型（標的ポリヌクレオチド、標的ＤＮＡ、標的ＲＮＡ、またはプライマー伸長産物など）とハイブリダイズすることができ、また、鋳型に対して相補的なポリヌクレオチドの重合を促進することもできる、一般に遊離３’ヒドロキシル基を有するオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、プライマーのテイルを構成する、非ハイブリダイズ配列を含有してもよい。プライマーは、たとえその配列が標的に対して完全に相補的ではなくても、標的に対してなおハイブリダイズしてもよい。

【００３６】

本発明のプライマーは、一般に、たとえばＰＣＲまたはｃＤＮＡ合成においてなどのように、ポリヌクレオチド鋳型に沿ったポリメラーゼによる伸長反応において用いられるオリゴヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドプライマーは、標的ポリヌクレオチドの配列とハイブリダイズすることができるその３’末端の配列を含有する、一本鎖である合成ポリヌクレオチドであることが多い。通常、標的核酸とハイブリダイズするプライマーの３’領域は、配列またはプライマー結合部位に対して、少なくとも８０％、好ましくは９０％、より好ましくは９５％、最も好ましくは１００％の相補性を有する。

【００３７】

本明細書において使用される「相補的な」は、配列のすべてまたは一部分のみに対する相補性を指す。特異的なオリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズすることができる配列におけるヌクレオチドの数は、オリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズするために使用されるストリンジェンシー条件が、過度のランダムな非特異的ハイブリダイゼーションを予防するような数であるべきである。普通、オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズ部分におけるヌクレオチドの数は、少なくとも、オリゴヌクレオチドプライマーがハイブリダイズする標的ポリヌクレオチド上で定められる配列程度のものであろう、すなわち、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも約２０、および一般に約６～約１０または６～約１２または１２～約２００ヌクレオチド、普通約１０～約５０ヌクレオチドであろう。一般に、標的ポリヌクレオチドは、前に記載されるオリゴヌクレオチドプライマー（複数可）よりも大きい。

【００３８】

相補的とは、一般に、２つのヌクレオチドの間の正確な対形成についての能力を指してもよい。すなわち、核酸の所定の位置のヌクレオチドが他の核酸のヌクレオチドと水素結合することができる場合、２つの核酸は、その位置で互いに相補的であると考えられる。「相補体」は、全くまたは部分的に相補的な配列であってもよい。２つの一本鎖核酸分子の間の相補性は、いくつかのヌクレオチドのみが結合する「部分的」なものであってもよく、またはそれは、全体としての相補性が一本鎖分子の間で存在する場合、完全であってもよい。核酸鎖の間の相補性の程度は、核酸鎖の間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して著しい効果を有する。部分的に相補的な２つの配列は、たとえば、少なくとも９０％同一性または少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％同一性の配列を、少なくとも７ヌクレオチドの配列、より典型的には１０～３０ヌクレオチドの範囲にわたって、また多くの場合、少なくとも１４～２５ヌクレオチドの配列にわたって、有していてもよい。プライマー配列の３’塩基は、望ましくは、プライミングが生じるのを可能にするために、標的核酸配列の対応する塩基に対して完全に相補的になることが理解されるであろう。

【００３９】

「特異的なハイブリダイゼーション」は、定められたストリンジェンシー条件下での、ハイブリダイゼーション混合物中に存在する他のヌクレオチド配列に対する実質的な結合の非存在下における、標的ヌクレオチド配列に対する核酸の結合を指す。当業者らは、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーを緩めることが、配列ミスマッチが許容されるのを可能にすることを認識する。特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で実行される。

【００４０】

「Ｔｍ」は、「融解温度」を指し、これは、二本鎖核酸分子の集団が半分に解離して（ｈａｌｆ－ｄｉｓｓｏｃｉａｔｅ）、単鎖になる温度である。本明細書において使用される一本鎖オリゴヌクレオチドのＴｍは、オリゴヌクレオチドおよびその厳密な相補体を含む二本鎖分子のＴｍを指す。Ｔｍは、計算によって決定されてもよい。詳細には、オリゴヌクレオチドのＴｍは、式：「Ｔｍ（℃．）＝４（Ｇ＋Ｃ）＋２（Ａ＋Ｔ）」に従って計算されるＴｍであってもよい（参照によって本明細書において組み込まれるＴｈｅｉｎ　ａｎｄ　Ｗａｌｌａｃｅ、１９８６、Ｈｕｍａｎ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ｄｉｓｏｒｄｅｒｓ中ｐ３３－５０、ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ　ＵＫ）。

【００４１】

ある場合には、調査される標的ポリヌクレオチド配列の特徴が知られており、ハイブリダイズすることができるプライマーは、前述の標的ポリヌクレオチド配列のアンチセンス配列に従って正確に合成することができる。他の場合において、標的ポリヌクレオチド配列が未知の場合、オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズすることができる配列は、ランダム配列となる。ランダム配列を含むオリゴヌクレオチドプライマーは、下記に記載されるように、「ランダムプライマー」と呼ばれてもよい。他の場合において、第１のプライマーまたは第２のプライマーなどのようなオリゴヌクレオチドプライマーは、たとえば第１のプライマーのセットまたは第２のプライマーのセットなどのようなプライマーのセットを含む。ある場合には、第１または第２のプライマーのセットは、複数（たとえば2、３、４、約６、８、１０、２０、４０、８０、１００、１２５、１５０、２００、２５０、３００、４００、５００、６００、８００、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、１０，０００、２０，０００、２５，０００、またはそれ以上）の標的配列に対してハイブリダイズするように設計されたプライマーの混合物を含んでいてもよい。ある場合には、複数の標的配列は、関係する配列、ランダム配列、全トランスクリプトーム、もしくはその画分（たとえば実質的な画分）のグループまたはｍＲＮＡなどのような配列の任意のグループを含んでいてもよい。

【００４２】

本発明のいくつかの実施形態において、ランダムプライミングが使用される。本明細書において使用される「ランダムプライマー」は、サンプル中の特定のまたは特異的な配列に基づいてではなく、ランダムプライマーの配列がサンプル中の１つ以上の配列に対してある所定の条件下でハイブリダイズすることができるという統計的な期待（または経験的観察）に基づいて設計される配列を一般に含むプライマーである。ランダムプライマーは、一般に、オリゴヌクレオチド上の所定の位置のヌクレオチドが４つのヌクレオチドＡ、Ｔ、Ｇ、Ｃのいずれかもしくはそれらのアナログのいずれかとなり得るランダム配列（複数可）を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの集団となるであろう。ランダムプライマーは、特異的な非ランダム配列である５’または３’領域を含んでいてもよい。本発明のいくつかの実施形態において、ランダムプライマーが、３’ランダム配列領域および特異的で共通するアダプター配列を含む５’非ハイブリダイズ領域を有するテイルドプライマー（ｔａｉｌｅｄ　ｐｒｉｍｅｒ）を含む。ランダムプライマーまたはその相補体の配列は、天然に存在してもよくまたは天然に存在しなくてもよく、関心のあるサンプル中の配列のプール中に存在してもよくまたは存在しなくてもよい。「ランダムプライマー」はまた、所望の標的配列（複数可）に対してハイブリダイズするようにひとまとめにして設計される、プライマーの集団（複数のランダムプライマー）のうちのメンバー

であるプライマーを指すこともできる。

【００４３】

本明細書において使用される用語「アダプター」は、配列が知られているオリゴヌクレオチドを指し、関心のある標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチド鎖に対するそのライゲーションまたは組み込みが、関心のある標的ポリヌクレオチドまたは標的ポリヌクレオチド鎖の増幅対応の産物の生成を可能にする。様々なアダプター設計が、想像される。様々なライゲーションプロセスおよび試薬が、当技術分野において知られており、本発明の方法を実行するのに有用となり得る。たとえば、ブラントライゲーションを用いることができる。同様に、単一のｄＡヌクレオチドは、３’エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼによって二本鎖ＤＮＡ産物の３’末端に追加することができ、ｄＴオーバーハングを含むアダプターに対してアニールすることができる（またはその逆）。この設計は、ハイブリダイズした構成成分が続いてライゲーションされるのを可能にする（たとえばＴ４　ＤＮＡリガーゼによって）。他のライゲーション戦略および対応する試薬は、当技術分野において知られており、効率的なライゲーション反応を実行するためのキットおよび試薬は、市販で入手可能である（たとえばＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ、Ｒｏｃｈｅから）。

【００４４】

本明細書において使用される用語「ｉｎｓｅｒｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｄａｐｔｏｒ　ｃｌｅａｖａｇｅ」（ＩｎＤＡ－Ｃ）は、ヌクレオチドライブラリーから特異的なヌクレオチド配列を排除するまたは除去するための多段階プロセスを指す。第１のステップは、非所望の核酸配列または非所望の配列の領域に直接隣接している配列に対して相補的となるように設計された配列特異的なオリゴヌクレオチドを、それぞれの末端に付加された方向が固定されたアダプターを有する一本鎖核酸鋳型に対してアニールするステップを含む。それぞれの断片の５’末端のアダプターは、二本鎖ＤＮＡに対して特異的な制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含有する。配列特異的なオリゴヌクレオチドのアニーリングの後に、プライマー伸長が実行され、それによって、オリゴヌクレオチドが一本鎖核酸鋳型に対して相補的である領域において二本鎖ＤＮＡ断片を作る。一本鎖および二本鎖断片の両方を含有する、結果として生じる核酸ライブラリーは、制限エンドヌクレアーゼにより処理され、二本鎖断片の制限エンドヌクレアーゼ部位でのみの切断、したがって、非所望の核酸配列を含有する断片の一方の末端のアダプターの除去をもたらす。アダプター切断後に、ＰＣＲは、それぞれのアダプターに対して特異的なプライマーを使用して実行され、所望の核酸断片のみの増幅をもたらしてもよい（すなわち、同じ鋳型上に両方のＰＣＲプライミング部位を含有する断片の増幅）。ｉｎｓｅｒｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｄａｐｔｏｒ　ｃｌｅａｖａｇｅは、図１において示される。

【００４５】

配列の選択されたリストに対してハイブリダイズすることができるまたはハイブリダイズすることから除外される様々な長さおよび融解温度のオリゴヌクレオチドを設計するための方法は、当技術分野においてよく知られており、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる欧州特許第１９５７６４５Ｂ１号においてさらに詳細に記載される。

【００４６】

核酸修飾酵素

本発明の方法は、核酸（ＮＡ）修飾酵素を使用する。核酸修飾酵素は、ＤＮＡ特異的な修飾酵素とすることができる。ＮＡ修飾酵素は、二本鎖ＤＮＡに対する特異性について選択することができる。酵素は、二重鎖特異的なエンドヌクレアーゼ、平滑末端高頻度カッター制限酵素（ｂｌｕｎｔ－ｅｎｄ　ｆｒｅｑｕｅｎｔ　ｃｕｔｔｅｒ　ｒｅｓｔｒｉｃｔｉｏｎ　ｅｎｚｙｍｅ）、または他の制限酵素とすることができる。平滑末端カッターの例は、ＤｒａＩまたはＳｍａＩを含む。ＮＡ修飾酵素は、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓによって提供される酵素とすることができる。ＮＡ修飾酵素は、ホーミングエンドヌクレアーゼとすることができる（ホーミングエンドヌクレアーゼは、厳密に定められた認識配列を有していないエンドヌクレアーゼとすることができる）。ＮＡ修飾酵素

は、高忠実度エンドヌクレアーゼとすることができる（高忠実度エンドヌクレアーゼは、エンドヌクレアーゼの野生型バージョンよりも少ない「スター活性」を有する、遺伝子操作されたエンドヌクレアーゼとすることができる）。

【００４７】

いくつかの実施形態において、ＮＡ修飾酵素が、配列特異的および二重鎖特異的ＤＮＡ修飾制限エンドヌクレアーゼである。好ましい実施形態において、ＮＡ酸修飾酵素が、酵素ＢｓｐＱＩ、ＩＩＳ型制限エンドヌクレアーゼである。

【００４８】

アダプターの付加

ライゲーション

ステムループアダプター／プライマーオリゴヌクレオチドおよび標的ポリヌクレオチドなどのような、２つのポリヌクレオチドに関して本明細書において使用される用語「連結」および「ライゲーション」は、連続した主鎖を有する単一のより大きなポリヌクレオチドを生成するための２つの個別のポリヌクレオチドの共有結合を指す。２つのポリヌクレオチドを連結するための方法は、当技術分野において知られており、限定を伴うことなく、酵素的および非酵素的（たとえば化学的）方法を含む。非酵素的であるライゲーション反応の例は、参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第５，７８０，６１３号および米国特許第５，４７６，９３０号において記載される非酵素的ライゲーション技術を含む。いくつかの実施形態において、アダプターオリゴヌクレオチドが、リガーゼ、たとえばＤＮＡリガーゼまたはＲＮＡリガーゼによって標的ポリヌクレオチドに対して連結される。それぞれ特徴付けられる反応条件を有する複数のリガーゼが、当技術分野において知られており、限定を伴うことなく、ｔＲＮＡリガーゼ、Ｔａｑ　ＤＮＡリガーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｆｉｌｉｆｏｒｍｉｓ　ＤＮＡリガーゼ、大腸菌ＤＮＡリガーゼ、Ｔｔｈ　ＤＮＡリガーゼ、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ｓｃｏｔｏｄｕｃｔｕｓ　ＤＮＡリガーゼ（ＩおよびＩＩ）、耐熱性リガーゼ、Ａｍｐｌｉｇａｓｅ耐熱性ＤＮＡリガーゼ、ＶａｎＣ型リガーゼ、９°Ｎ　ＤＮＡリガーゼ、Ｔｓｐ　ＤＮＡリガーゼ、ならびにバイオプロスペクティングによって発見された新規なリガーゼを含むＮＡＤ$^{+}$依存性リガーゼ；Ｔ４　ＲＮＡリガーゼ、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ、Ｔ３　ＤＮＡリガーゼ、Ｔ７　ＤＮＡリガーゼ、Ｐｆｕ　ＤＮＡリガーゼ、ＤＮＡリガーゼ１、ＤＮＡリガーゼＩＩＩ、ＤＮＡリガーゼＩＶ、およびバイオプロスペクティングによって発見された新規なリガーゼを含むＡＴＰ依存性リガーゼ；ならびにその野生型、突然変異アイソフォーム、および遺伝的に操作された変異体が挙げられる。ライゲーションは、相補的なオーバーハングなどのようなハイブリダイズすることができる配列を有するポリヌクレオチドの間のものとすることができる。ライゲーションはまた、２つの平滑末端の間のものとすることもできる。一般に、５’リン酸が、ライゲーション反応において利用される。５’リン酸は、標的ポリヌクレオチド、アダプターオリゴヌクレオチド、またはその両方によって提供することができる。５’リン酸は、必要に応じて、連結されることになっているポリヌクレオチドに追加するまたはそれから除去することができる。５’リン酸の追加または除去のための方法は、当技術分野において知られており、限定を伴うことなく酵素的および化学的プロセスを含む。５’リン酸の追加および／または除去において有用な酵素は、キナーゼ、ホスファターゼ、およびポリメラーゼを含む。いくつかの実施形態において、ライゲーション反応において連結される２つの末端の両方（たとえばアダプター末端および標的ポリヌクレオチド末端）が、２つの共有結合が２つの末端を連結する際に作製されるように、５’リン酸を提供する。いくつかの実施形態において、ライゲーション反応において連結される２つの末端の１つのみ（たとえばアダプター末端および標的ポリヌクレオチド末端の１つのみ）が、１つのみの共有結合が２つの末端を連結する際に作製されるように、５’リン酸を提供する。いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドの１つまたは両方の末端の１つの鎖のみが、アダプターオリゴヌクレオチドに対して連結される。いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドの１つまたは両方の末端の両方の鎖が、アダプターオリゴヌクレオチドに対して連結される。いくつかの実施形態において、３’リン酸が、ライゲ

ーションの前に除去される。いくつかの実施形態において、アダプターオリゴヌクレオチドが、標的ポリヌクレオチドの両方の末端に対して追加され、それぞれの末端の１つまたは両方の鎖が、１つ以上のアダプターオリゴヌクレオチドに対して連結される。両方の末端の両方の鎖が、アダプターオリゴヌクレオチドに対して連結される場合、連結は、対応する３’末端の伸長のための鋳型となり得る５’オーバーハングを残す切断反応の後に続くことがあり、３’末端は、アダプターオリゴヌクレオチドに由来する１つ以上のヌクレオチドを含んでいてもよくまたは含んでいなくてもよい。いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドが、一方の末端上で第１のアダプターオリゴヌクレオチドに対してなおよび他方の末端上で第２のアダプターオリゴヌクレオチドに対して連結される。いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドおよびそれが連結されるアダプターが、平滑末端を含む。いくつかの実施形態において、個別のライゲーション反応が、１つを超えるサンプルの標的ポリヌクレオチドに対してバーコード配列が連結されないように、それぞれのサンプルについて少なくとも１つのバーコード配列を含む異なる第１のアダプターオリゴヌクレオチドを使用して、それぞれのサンプルについて実行される。アダプター／プライマーオリゴヌクレオチドが連結された標的ポリヌクレオチドは、連結されたアダプターによって「タグ付けされている」と考えられる。

【００４９】

いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドに対するアダプター／プライマーの連結が、アダプター／プライマーに由来するヌクレオチド配列を含む３’オーバーハングを有する、連結された産物であるポリヌクレオチドを産生する。いくつかの実施形態において、３’オーバーハングのすべてまたは一部分に対して相補的な配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドが、オーバーハングに対してハイブリダイズされ、ＤＮＡポリメラーゼを使用して伸長されて、連結された産物であるポリヌクレオチドの一方の鎖に対してハイブリダイズした、プライマー伸長産物を産生する。ＤＮＡポリメラーゼは、連結された産物であるポリヌクレオチドの一方の鎖がプライマー伸長の間に置き換えられるような鎖置き換え活性を含んでいてもよい。

【００５０】

鎖特異的な選択の方法

本明細書において提供される組成物および方法は、二本鎖ＤＮＡにおいて方向性をもつ情報を保持するのに有用である。

【００５１】

本明細書において使用される用語「鎖特異的な」または「方向性をもつ」は、もとの鋳型鎖と、もとの鋳型鎖に対して相補的な鎖との間で二本鎖ポリヌクレオチドを区別するための能力を指してもよい。さらに、本発明の方法および組成物は、様々な実施形態において、鎖特異的な形でアダプターライゲーションを可能にする。様々な実施形態において、アダプターが、鎖、好ましくは選択された鎖の選ばれた末端に組み込まれる。さらに、アダプターは、選ばれた方向で組み込まれてもよい。様々な実施形態において、鎖特異性、指向性、および方向が、所望の構成または鎖を選択するまたは濃縮することによって達成される。

【００５２】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、分子クローニングの適用により適した二本鎖ポリヌクレオチドを生成しながら、一本鎖核酸分子の方向性についての情報を保存するために使用される。二本鎖ポリヌクレオチドの鎖のうちの１つは、それが鎖の全長に沿ってその中に組み込まれる少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを有するように合成される。いくつかの実施形態において、修飾ヌクレオチドの組み込みが、分解または除去のために鎖をマークする。

【００５３】

用語「第１の鎖の合成」は、ポリメラーゼ反応のための出発鋳型としてもとの核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ）を使用する、第１の鎖の合成を指す。第１の鎖のヌクレオチド配列は、相補鎖の配列に対応する。

【００５４】
用語「第２の鎖の合成」は、ポリメラーゼ反応のための鋳型として第１の鎖を使用する第２の鎖の合成を指す。第２の鎖のヌクレオチド配列は、もとの核酸鋳型の配列に対応する。

【００５５】
用語「未修飾ｄＮＴＰ」または「典型ｄＮＴＰ」は、通常、ＤＮＡの合成において基本単位として使用される４つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、ｄＡＴＰ（デオキシアデノシン三リン酸）、ｄＣＴＰ（デオキシシチジン三リン酸）、ｄＧＴＰ（デオキシグアノシン三リン酸）、およびｄＴＴＰ（デオキシチミジン三リン酸）を指す。同様に、用語「標準ｄＮＴＰ」は、ＤＮＡ中に通常見つけられる４つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、およびｄＴＴＰを指すために使用される。一般に、ヌクレオチドは、プライマー伸長反応のために溶液中にヌクレオシド三リン酸の形態で存在する。プライマー伸長反応の間に、それらは、典型的に、ヌクレオシド、たとえばアデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジンなどの形態でポリヌクレオチドの中に組み込まれ、２つのリン酸を失うが、リン酸のうちの１つがポリヌクレオチド主鎖の一部を形成する。ヌクレオチドの核酸塩基、たとえばアデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシルなどは、本発明の様々な実施形態に従って除去されて、塩基脱落部位を形成してもよい。ポリヌクレオチドから核酸塩基を除去して、塩基脱落部位を形成するための様々な方法は、本明細書において詳細に説明され、当技術分野において知られている。

【００５６】
本明細書において使用される用語「標準」は、ＤＮＡまたはそれらのデオキシリボヌクレオチドアナログもしくはデオキシリボヌクレオシドアナログにおいて共通して見つけられる核酸塩基アデニン、シトシン、グアニン、およびチミンを指す。用語「非標準」は、ＤＮＡまたはそれらのデオキシリボヌクレオチドアナログもしくはデオキシリボヌクレオシドアナログにおける４つの標準塩基以外のＤＮＡにおける核酸塩基を指す。ウラシルは、ＲＮＡにおいて一般的な核酸塩基であるが、ウラシルは、ＤＮＡにおいて非標準塩基となる。

【００５７】
本明細書において使用される用語「修飾ヌクレオチド」または「修飾ｄＮＴＰ」は、１つの対応する未修飾または典型ｄＮＴＰを置換するのに適した任意の分子を指す。そのような修飾ヌクレオチドは、それと交換される典型または未修飾ｄＮＴＰと同一であるまたは類似する塩基対マッチングを起こすことができるに違いない。修飾ヌクレオチドまたはｄＮＴＰは、それが、適した分解剤によって選択的に分解され、したがって、少なくとも１つの修飾されおよび分解されたｄＮＴＰを含有するＤＮＡ鎖を、増幅および／またはハイブリダイゼーションに本質的に適さないものにする、特異的な分解に適し得る。あるいは、修飾ヌクレオチドは、選択的な除去にふさわしいまたはポリヌクレオチド鎖の分離を促進する修飾ヌクレオチドを含有するＤＮＡ鎖をマークするに違いない。そのような除去または分離は、修飾ヌクレオチドと選択的に相互作用し、したがって、一方のポリヌクレオチド鎖のみを選択的に除去する、または除去のためにマークする分子、粒子、または酵素によって実現することができる。

【００５８】
本出願において使用される場合、用語「鎖マーキング」は、二本鎖ポリヌクレオチドの２つの鎖を識別するための任意の方法を指す。用語「選択」は、二本鎖ポリヌクレオチドの２つの鎖を選択するための任意の方法を指す。用語「選択的な除去」または「除去のための選択的なマーキング」は、そのポリヌクレオチド鎖を増幅またはハイブリダイゼーションなどのような下流の適用に適さないものにする、ポリヌクレオチド鎖に対する任意の修飾を指す。

【００５９】
一実施形態において、選択が、合成されたポリヌクレオチドの一方の鎖への、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドの組み込みによって行われ、選択的な除去が、少なくとも１つ

の修飾ヌクレオチドに対して特異的活性を示す酵素による処理によるものである。好ましい実施形態において、合成されたポリヌクレオチドの一方の鎖の中に組み込まれる修飾ヌクレオチドが、ｄＮＴＰミックスにおいてｄＴＴＰの代わりとなるデオキシウリジン三リン酸（ｄＵＴＰ）であり、下流の適用によるマークされた鎖の選択的な除去は、ヌクレアーゼウラシル－Ｎ－グリコシラーゼ（ＵＮＧ）によって実行される。ＵＮＧは、ｄＵＴＰを選択的に分解するが、それは、他のｄＮＴＰおよびそれらのアナログに対して中性である。ＵＮＧによる処理は、Ｎ－グリコシル結合の切断およびｄＵ残基の塩基部分の除去をもたらし、塩基脱落部位を形成する。好ましい実施形態において、ＵＮＧ処理が、脱プリン／脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ（ＡＰＥ）の存在下において行われ、塩基脱落部位にニックを作る。結果的に、ＵＮＧ／ＡＰＥにより処理される、組み込まれたｄＵＴＰを有するポリヌクレオチド鎖は、切断され、ポリメラーゼによる増幅を受けることができない。他の実施形態において、ニック生成および切断が、Ｎ，Ｎ’－ジメチルエチレンジアミン（ＤＭＥＤ）などのようなポリアミンによる処理によってまたは熱処理によって実現される。好ましい実施形態において、ＵＮＧ処理が、約３２ｍＭ　ＤＭＥＤを含有する反応バッファー中で行われる。

【００６０】

本出願において使用される場合、用語「少なくとも１つのヌクレオチド」または「少なくとも１つの修飾ヌクレオチド」は、同じ種類または種の複数のｄＮＴＰ分子を指す。したがって、「１つの修飾ヌクレオチド」の使用は、典型ｄＮＴＰ　ｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、またはｄＴＴＰのうちの１つの、対応する修飾ヌクレオチド種とのｄＮＴＰミックス中での交換を指す。

【００６１】

好ましい実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、ｄＮＴＰミックスにおいてｄＴＴＰの代わりとなるｄＵＴＰである。他の実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、ビオチン化ｄＮＴＰである。他の実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、チオ基を含有する。他の実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、アミノアリルｄＮＴＰである。他の実施形態において、少なくとも１つの修飾ヌクレオチドが、ｄＮＴＰミックスにおいてｄＧＴＰの代わりとなるイノシンである。

【００６２】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、方向性をもつｃＤＮＡライブラリーの構築のために使用される。鎖マーキングは必要であるが、極性特異的ではないアダプター、すなわち２つのアダプター方向を有するライゲーション産物を生成するアダプターを使用する場合、方向性をもつｃＤＮＡライブラリーの構築に十分ではない。本発明の方法による方向性をもつｃＤＮＡライブラリーの構築は、ｃＤＮＡインサートおよびアダプターのライゲーション鎖の２つのアダプターのうちの１つの両方の鎖マーキングを必要とする。本発明の有用な特徴は、アダプター方向を入れ替える能力である。たとえば、Ｐ１／Ｐ２がアダプターの方向を指定して、センス鎖選択および（任意選択の）シークエンシングをもたらし、Ｐ２アダプターが、アダプターのライゲーション鎖に沿って組み込まれた少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを有する二重鎖アダプター系において、Ｐ１アダプター（Ｐ２アダプターに対立するものとして）がライゲーション鎖に沿って組み込まれた少なくとも１つの修飾ヌクレオチドを有するようなプロトコールの修飾は、アンチセンス鎖選択および（任意選択の）シークエンシングを可能にする。

【００６３】

本発明の方法は、インプット核酸鋳型を切断するステップをさらに含み得る。ある場合には、インプット核酸鋳型は、酵素などのような作用物質により切断されてもよい。ポリヌクレオチドが非標準ヌクレオチドを含む実施形態において、ポリヌクレオチドが、非標準デオキシリボヌクレオシドの塩基部分を全般的に、特異的に、または選択的に切断して、塩基脱落部位を作ることができる酵素などのような作用物質により処理されてもよい。本明細書において使用される場合、「塩基脱落部位」は、ヌクレオチドの塩基部分を切断

することができる作用物質による、たとえば、非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断に影響を及ぼすことができる作用物質（たとえば酵素、酸性条件、または化学試薬）による非標準ヌクレオチド（ポリヌクレオチド鎖中に存在する）の処理による、塩基部分（塩基全体を含む）の除去後に残る任意の化学構造を包含する。いくつかの実施形態において、作用物質（酵素など）が、非標準ヌクレオチドにおける非標準ヌクレオチドの塩基部分と糖の間の結合の加水分解を触媒して、ヘミアセタール環を含み、かつ塩基（区別なく「ＡＰ」部位と呼ばれる）を欠く塩基脱落部位を生成するが、他の切断産物も、本発明の方法において使用するために企図される。非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断に適した作用物質および反応条件は、ウラシルＮ－グリコシラーゼ（「ＵＮＧ」；ｄＵＴＰを特異的に切断する）（「ウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ｇｌｙｏｓｙｌａｓｅ）」と区別なく称される）、ヒポキサンチン－Ｎ－グリコシラーゼ、およびヒドロキシ－メチルシトシン－Ｎ－グリコシラーゼを含むＮ－グリコシラーゼ（「ＤＮＡグリコシラーゼ」または「グリコシダーゼ」とも呼ばれる）；３－メチルアデニンＤＮＡグリコシラーゼ、３－または７－メチルグアニンＤＮＡグリコシラーゼ、ヒドロキシメチルウラシルＤＮＡグリコシラーゼ；Ｔ４エンドヌクレアーゼＶ、たとえばＬｉｎｄａｈｌ、ＰＮＡＳ（１９７４）７１（９）：３６４９－３６５３；Ｊｅｎｄｒｉｓａｋ、米国特許第６，１９０，８６５Ｂ１号参照、または表１において提供されるグリコシダーゼのいずれか、または本明細書において提供されるグリコシダーゼ（ｇｌｙｃｏｓｙｄａｓｅ）のいずれかとアミノ酸もしくはヌクレオチドレベルで約５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９９％、９９．５％、もしくはそれ以上を超える相同性もしくは同一性を有する酵素などのようなそのホモログを含む。一実施形態において、ウラシル－Ｎ－グリコシラーゼが、非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断するために使用される。他の実施形態において、非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断する作用物質が、塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を切断するのと同じ作用物質である。

【００６４】

【表１】

表１：細菌、酵母、およびヒトにおけるグリコシラーゼ

大腸菌	酵母（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）	ヒト	タイプ	基質
AlkA	Mag1		単機能性	3-meA, ヒポキサンチン
UDG	Ung1	UNG	単機能性	ウラシル
Fpg	Ogg1	hOGG1	二機能性	8-oxoG, FapyG
Nth	Ntg1 Ntg2	hNTH1	二機能性	Tg, hoU, hoC, 尿素, FapyG
Nei		hNEIL1	二機能性	Tg, hoU, hoC, 尿素, FapyG, FapyA
		hNEIL2		ＡＰ部位, hoU
		hNEIL3		知られていない
MutY		hMYH	単機能性	A:8-oxoG
		hSMUG1	単機能性	U, hoU, hmU, fU
		TDG	単機能性	Ｔ：Ｇミスペア
		MBD4	単機能性	Ｔ：Ｇミスペア

【００６５】

非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断は、全般的な、特異的な、または選択的な切断をもたらしてもよく（非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる作用物質（酵

素など）が、特定の非標準ヌクレオチドの塩基部分を全般的に、特異的に、または選択的に切断するという意味で）、それによって、実質的にすべてのまたは約９９．９％、９９．５％、９９％、９８．５％、９８％、約９５％、約９０％、約８５％、約８０％、約７５％、約７０％、約６５％、約６０％、約５５％、約５０％、約４５％、もしくは約４０％を超える切断された塩基部分が、非標準ヌクレオチドの塩基部分となる。しかしながら、切断の程度は、より少なくすることができる。したがって、特異的な切断に対する言及は、例示的なものである。全般的な、特異的な、または選択的な切断は、本発明の鋳型ポリヌクレオチド断片（すなわち、塩基脱落部位での主鎖の切断によって生成される断片）を生成する方法における断片サイズのコントロールに望ましい。反応条件は、塩基脱落部位（複数可）が作られる反応が終了に達し得るように選択されてもよく、または反応は、非標準ヌクレオチドの１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、もしくは約１００％が、塩基脱落部位に変換されるまで、実行されてもよい。ある場合には、反応条件は、塩基脱落部位（複数可）が作られる反応が、鋳型核酸中に存在する１つ以上の非標準ヌクレオチドの約１０％～約１００％、鋳型核酸中の非標準ヌクレオチドの約２０％～約９０％、約３０％～約９０％、約５０％～約９０％、９５％、９９％、または１００％となるように選択されてもよい。

【００６６】

いくつかの実施形態において、非標準ヌクレオチドを含む鋳型ポリヌクレオチドが、鋳型ポリヌクレオチドの合成後に精製される（たとえば、反応混合物中に存在する残存している遊離非標準ヌクレオチドを除くために）。他の実施形態において、中間の精製が、非標準ヌクレオチドを含む鋳型ポリヌクレオチドの合成と、続くステップ（プライマーのハイブリダイゼーション、非標準ヌクレオチドを含まないまたは鋳型核酸と同じ非標準ヌクレオチドを含まないプライマー伸長産物を産生するプライマーの伸長、非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断、および塩基脱落部位でのホスホジエステル主鎖の切断など）の間にない。

【００６７】

非標準ヌクレオチドの選択は、特定の非標準ヌクレオチドが、非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる特定の酵素によって認識される程度まで、その非標準酵素の塩基部分を切断するために使用されることになっている酵素の選択を指示し得ることが理解される。ある場合には、酵素は、グリコシラーゼである。グリコシラーゼによって切断されてもよい、たとえば、ｄＵＴＰ、８－オキソグアニン、またはメチル化プリンなどのような非標準ヌクレオチドを含む鋳型核酸は、本発明の方法において使用されてもよい。他の適した非標準ヌクレオチドは、デオキシイノシン三リン酸（ｄＩＴＰ）、５－ヒドロキシメチルデオキシシチジン三リン酸（５－ＯＨ－Ｍｅ－ｄＣＴＰ）、または表１において提供される非標準ヌクレオチドのいずれかを含む。たとえばＪｅｎｄｒｉｓａｋ、米国特許第６，１９０，８６５号を参照されたい。ｄＵＴＰに作用して、塩基脱落部位を提供してもよいウラシルＤＮＡグリコシラーゼ（ＵＮＧまたはＵＤＧとして知られている）、８－オキソグアニンに作用して、塩基脱落部位を提供してもよいＯｇｇ１、またはメチル化プリンに作用して、塩基脱落部位を提供してもよいＮ－メチルプリンＤＮＡグリコシラーゼなどのようなグリコシラーゼは、次いで、非標準ヌクレオチドを含むインプット核酸鋳型に作用して、インプット核酸鋳型を切断するステップを開始するために本発明の方法において使用されてもよい。本明細書において提供される酵素は、１つ以上の塩基脱落（脱プリンまたは脱ピリミジン）部位を産生するために、本明細書において提供される１つ以上の非標準ヌクレオチドでのインプット核酸鋳型のＮ－グリコシド結合切断をもたらしてもよい。

【００６８】

本発明の方法において使用されてもよいさらなるグリコシラーゼおよびそれらの非標準ヌクレオチド基質は、ＤＮＡ主鎖から５－メチルシトシン（５－ＭｅＣ）の塩基部分を切断する５－メチルシトシンＤＮＡグリコシラーゼ（５－ＭＣＤＧ）（Ｗｏｌｆｆｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９６：５８９４－５８９６、１９９９）；

ＤＮＡ主鎖から３－メチルアデノシンの塩基部分を切断する３－メチルアデノシンＤＮＡグリコシラーゼＩ（たとえばＨｏｌｌｉｓら（２０００）Ｍｕｔａｔｉｏｎ　Ｒｅｓ．４６０：２０１－２１０を参照されたい）；ならびに／またはＤＮＡ主鎖から３－メチルアデノシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデノシン、および３－メチルグアニンの塩基部分を切断する３－メチルアデノシンＤＮＡグリコシラーゼＩＩを含む。ＭｃＣａｒｔｈｙら（１９８４）ＥＭＢＯ　Ｊ．３：５４５－５５０を参照されたい。５－ＭＣＤＧの多機能性および単機能性形態が、記載されている。Ｚｈｕら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９８：５０３１－６、２００１；Ｚｈｕら、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．２８：４１５７－４１６５、２０００；Ｎｅｄｄｅｒｒｎａｎｎら、Ｊ．Ｂ．Ｃ．２７１：１２７６７－７４、１９９６（二機能性５－ＭＣＤＧを記載；Ｖａｉｒａｐａｎｄｉ＆Ｄｕｋｅｒ、Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１３：９３３－９３８、１９９６；Ｖａｉｒａｐａｎｄｉら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．７９：２４９－２６０、２０００（５－ＭＣＤＧ活性を含む単機能性酵素を記載）を参照されたい。いくつかの実施形態において、５－ＭＣＤＧが、完全にメチル化されたポリヌクレオチド部位（たとえばＣｐＧジヌクレオチド）を優先的に切断し、他の実施形態において、５－ＭＣＤＧが、ヘミメチル化されたポリヌクレオチドを優先的に切断する。たとえば、単機能性ヒト５－メチルシトシンＤＮＡグリコシラーゼは、完全にメチル化されたＣｐＧ部位で特異的にＤＮＡを切断し、ヘミメチル化されたＤＮＡに対して比較的不活性である（Ｖａｉｒａｐａｎｄｉ＆Ｄｕｋｅｒ、前掲；Ｖａｉｒａｐａｎｄｉら、前掲）。対照的に、ヒヨコ胚５－メチルシトシンＤＮＡグリコシラーゼは、ヘミメチル化されたメチル化部位に対して向けられるより大きな活性を有する。いくつかの実施形態において、５－ＭＣＤＧの活性が、組換えＣｐＧリッチＲＮＡ、ＡＴＰ、ＲＮＡヘリカーゼ酵素、および増殖細胞核抗原（ＰＣＮＡ）などのようなアクセサリー因子により強化される（増加するまたは増強する）。米国特許出願公開第２００２０１９７６３９Ａ１号を参照されたい。１つ以上の作用物質が、使用されてもよい。いくつかの実施形態において、１つ以上の作用物質が、同じメチル化ヌクレオチドの塩基部分を切断する。他の実施形態において、１つ以上の作用物質が、異なるメチル化ヌクレオチドの塩基部分を切断する。２つ以上の作用物質による処理は、順次または同時であってもよい。

【００６９】

本発明の方法による非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断を実行するための適切な反応培地および条件は、非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断を可能にするものである。そのような培地および条件は、当業者らに知られており、Ｌｉｎｄａｈｌ、ＰＮＡＳ（１９７４）７１（９）：３６４９－３６５３；ならびにＪｅｎｄｒｉｓａｋ、米国特許第６，１９０，８６５Ｂ１号；米国特許第５，０３５，９９６号；および米国特許第５，４１８，１４９号などのような様々な刊行物において記載される。たとえば、バッファー条件は、ポリヌクレオチド合成に関して上記に記載されるとおりとすることができる。一実施形態において、ＵＤＧ（Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｍａｄｉｓｏｎ　Ｗｉｓ．）が、核酸合成反応混合物に対して追加され、２０分間、３７℃でインキュベートされる。一実施形態において、反応条件が、非標準ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドの合成および非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断について同じである。他の実施形態において、異なる反応条件が、これらの反応に使用される。いくつかの実施形態において、キレート試薬（たとえばＥＤＴＡ）が、ポリメラーゼが切断産物の末端を伸長させるのを予防するためにＵＮＧの前にまたはそれと同時に追加される。

【００７０】

塩基脱落部位を含むポリヌクレオチドは、塩基脱落部位を標識することができる作用物質を使用して標識されてもよく、断片化を伴う実施形態において、塩基脱落部位を含むポリヌクレオチドのホスホジエステル主鎖は、非標準ヌクレオチドの組み込みの部位で切断されてもよい（すなわち、２つ以上の断片が産生されるような、塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を切断することができる作用物質による塩基脱落部位）。断片化を伴う実施形態において、標識が断片化の前に生じてもよく、断片化が標識の前に生じてもよく、ま

たは断片化および標識が同時に生じてもよい。
【００７１】
　塩基脱落部位を標識する（たとえば、全般的にまたは特異的に標識する）ことができ、それによって、標識された塩基脱落部位を含むポリヌクレオチド（またはポリヌクレオチド断片）が生成される作用物質は、本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、検出可能な成分（標識）が、共有結合でまたは非共有結合で塩基脱落部位と結びつく。いくつかの実施形態において、検出可能な成分が、直接または間接的に塩基脱落部位と結びつく。いくつかの実施形態において、検出可能な成分（標識）が、直接または間接的に検出可能である。いくつかの実施形態において、検出可能なシグナルが、増幅される。いくつかの実施形態において、検出可能な成分が、発色団、フルオロフォア、ビオチン、またはその誘導体などのような有機分子を含む。他の実施形態において、検出可能な成分が、核酸、アプタマー、ペプチド、または酵素もしくは抗体などのようなタンパク質などのような巨大分子を含む。他の実施形態において、検出可能なシグナルが、蛍光である。他の実施形態において、検出可能なシグナルが、酵素的に生成される。いくつかの実施形態において、標識が、フルオレセイン、ローダミン、シアニン色素、インドシアニン色素、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ色素、フィコエリトリン、５－（（（２－（カルボヒドラジノ）－メチル）チオ）アセチル）アミノフルオレセイン、アミノオキシアセチルヒドラジド（「ＦＡＲＰ」）、またはＮ－（アミノオキシアセチル）－Ｎ’－（Ｄ－ビオチノイル）ヒドラジン、トリフルオロ酢酸塩（ＡＲＰ）から選択される。
【００７２】
　１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型の切断は、酵素的もしくは化学的手段の使用によってまたは熱の適用によってまたはその組み合わせによってさらに提供されてもよい。たとえば、１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型は、求核剤または塩基により処理されてもよい。ある場合には、求核剤は、第１級アミン、第２級アミン、または第３級アミンなどのようなアミンである。たとえば、塩基脱落部位は、ピペリジン、モルホリン（ｍｏｒｏｐｈｏｌｉｎｅ）、またはその組み合わせにより処理されてもよい。ある場合には、熱いピペリジン（たとえば９０℃で１Ｍ）が、１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型を切断するために使用されてもよい。ある場合には、モルホリン（たとえば３７℃または６５℃で３Ｍ）が、１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型を切断するために使用されてもよい。あるいは、ポリアミンが、１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型を切断するために使用されてもよい。適したポリアミンは、たとえばスペルミン、スペルミジン、１，４－ジアミノブタン、リシン、トリペプチドＫ－Ｗ－Ｋ、Ｎ，Ｎ－ジメチルエチレンジアミン（ＤＭＥＤ）、ピペラジン、１，２－エチレンジアミン、またはその任意の組み合わせを含む。ある場合には、１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型は、ベータ脱離反応、デルタ脱離反応、またはその組み合わせを実行するのに適した試薬により処理されてもよい。ある場合には、化学的手段による１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型の切断は、インプット核酸鋳型の断片をもたらしてもよく、その断片は、遮断３’末端を含む。ある場合には、遮断３’末端は、末端の水酸基を欠く。他の場合において、遮断３’末端は、リン酸化されている。さらに他の場合において、化学的手段による１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型の切断は、遮断されていないインプット核酸鋳型の断片をもたらしてもよい。ある場合には、本発明の方法は、標準ヌクレオチドに影響を与えず、そのため、方法の産物の配列の完全性を維持し得る単一の反応混合物における穏やかな条件下での酵素または酵素の組み合わせおよびＤＭＥＤなどのようなポリアミンの使用を提供する。適した穏やかな条件は、中性のｐＨまたはほぼ中性のｐＨの条件を含んでいてもよい。他の適した条件は、約４．５もしくはそれ以上、５もしくはそれ以上、５．５もしくはそれ以上、６もしくはそれ以上、６．５もしくはそれ以上、７もしくはそれ以上、７．５もしくはそれ以上、８もしくはそれ以上、８．５もしくはそれ以上、９もしくはそれ以上、９．５もしくはそれ以上、１０もしくはそれ以上、または約１０．５もしくはそれ以上のｐＨを含む。さらに他の適した条件は、約４．５～１０．５、約５～１０．０、約５．５～９．５

、約６～９、約６．５～８．５、約６．５～８．０、または約７～８．０を含む。適した穏やかな条件はまた、室温またはほぼ室温の条件を含んでいてもよい。他の適した条件は、約１０℃、１１℃、１２℃、１３℃、１４℃、１５℃、１６℃、１７℃、１８℃、１９℃、２０℃、２１℃、２２℃、２３℃、２４℃、２５℃、２６℃、２７℃、２８℃、２９℃、３０℃、３１℃、３２℃、３３℃、３４℃、３５℃、３６℃、３７℃、３８℃、３９℃、４０℃、４１℃、４２℃、４３℃、４４℃、４５℃、４６℃、４７℃、４８℃、４９℃、５０℃、５１℃、５２℃、５３℃、５４℃、５５℃、５６℃、５７℃、５８℃、５９℃、６０℃、６１℃、６２℃、６３℃、６４℃、６５℃、６６℃、６７℃、６８℃、６９℃、もしくは７０℃またはそれ以上の温度を含む。さらに他の適した条件は、約１０℃～約７０℃、約１５℃～約６５℃、約２０℃～約６０℃、約２０℃～約５５℃、約２０℃～約５０℃、約２０℃～約４５℃、約２０℃～約４０℃、約２０℃～約３５℃、または約２０℃～約３０℃を含む。ある場合には、穏やかな切断条件の使用は、本発明の方法によって産生されるプライマー伸長産物に対するより少ない損傷をもたらしてもよい。ある場合には、損傷を受けた塩基が少ないほど、プライマー伸長産物は、シークエンシングまたはハイブリダイゼーションなどのような下流の分析により適し得る。他の場合において、穏やかな切断条件の使用は、最終産物の収率を増加させてもよく、配列の完全性を維持してもよく、または本発明の方法を自動化のためにより適したものにしてもよい。

【００７３】

断片化を伴う実施形態において、塩基脱落部位を含む鋳型ポリヌクレオチドの主鎖が、塩基脱落部位で切断され、それによって、ポリヌクレオチドの２つ以上の断片が生成される。断片の少なくとも１つは、本明細書において記載されるように、塩基脱落部位を含む。塩基脱落部位でポリヌクレオチドのホスホジエステル主鎖を切断する作用物質は、本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、作用物質が、大腸菌ＡＰエンドヌクレアーゼＩＶなどのようなＡＰエンドヌクレアーゼである。他の実施形態において、作用物質が、Ｎ，Ｎ’－ジメチルエチレンジアミン（「ＤＭＥＤ」と称される）である。他の実施形態において、作用物質が、熱、塩基性条件、酸性条件、またはアルキル化剤である。さらに他の実施形態において、塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を切断する作用物質が、塩基脱落部位を形成するためにヌクレオチドの塩基部分を切断するものと同じ作用物質である。たとえば、本発明のグリコシダーゼは、グリコシダーゼ活性およびリアーゼ活性の両方を含んでいてもよく、それによって、グリコシダーゼ活性は、ヌクレオチド（たとえば非標準ヌクレオチド）の塩基部分を切断して、塩基脱落部位を形成し、リアーゼ活性は、そのように形成された塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を切断する。ある場合には、グリコシダーゼは、グリコシダーゼ活性およびＡＰエンドヌクレアーゼ活性の両方を含む。

【００７４】

鋳型ポリヌクレオチドの塩基脱落部位で切断するのに用いられる作用物質に依存して、主鎖は、塩基脱落部位に対して５’で切断することができ（たとえば、遊離３’ヒドロキシル基を生成する、塩基脱落残基の５’リン酸基と、隣接するヌクレオチドのデオキシリボース環の間の切断）、塩基脱落部位は、結果として生じる断片の５’末端に位置する。他の実施形態において、切断はまた、塩基脱落部位に対して３’とすることができ（たとえば、隣接するヌクレオチドのデオキシリボース環上に遊離５’リン酸基を生成する、塩基脱落残基のデオキシリボース環および３’リン酸基と、隣接するヌクレオチドのデオキシリボース環の間の切断）、塩基脱落部位は、結果として生じる断片の３’末端に位置する。さらに他の実施形態において、切断のより複雑な形態、たとえば、ホスホジエステル主鎖の切断および塩基脱落ヌクレオチドの一部分の切断が結果として生じるような切断が、可能である。断片化剤の選択は、したがって、たとえば、結果として生じる断片の３’末端または結果として生じる断片の５’末端の、ポリヌクレオチド断片内の塩基脱落部位の方向のコントロールを可能にする。反応条件の選択はまた、断片化反応の程度、レベル、または完全さのコントロールをも可能にする。いくつかの実施形態において、反応条件は、切断反応が、過剰な試薬の存在下において実行され、本発明のプライマー伸長産物の

切断に関する最小限の懸念で終了に達するのを可能にするように選択することができる。対照的に、当技術分野において知られている他の方法、たとえば機械的な剪断、ＤＮアーゼ切断は、鋳型ポリヌクレオチドとプライマー伸長産物を識別することができない。他の実施形態において、反応条件は、断片化が完全ではないように選択され（いくつかの塩基脱落部位の主鎖が切断されてない（断片化されていない）ままであるという意味で）、１つを超える塩基脱落部位を含むポリヌクレオチド断片が、生成される。そのような断片は、内部にある（断片化されていない）塩基脱落部位を含む。

【００７５】

非標準ヌクレオチドがポリヌクレオチド中に存在する場合、非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断による塩基脱落部位の生成の後に、ポリヌクレオチドの主鎖は、塩基脱落部位で主鎖の切断に影響を及ぼすことができる作用物質により、非標準ヌクレオチドの組み込みの部位（非標準ヌクレオチドの塩基部分の切断後、塩基脱落部位とも称される）で、切断される。主鎖での切断（「断片化」とも称される）は、少なくとも２つの断片をもたらす（塩基脱落部位を含むポリヌクレオチド中に存在する塩基脱落部位の数および切断の程度に依存）。

【００７６】

塩基脱落部位での主鎖の切断が可能な適切な作用物質（たとえば酵素、化学物質、および／または熱などのような反応条件）は、熱処理および／または化学処理（塩基性条件、酸性条件、アルキル化条件、または塩基脱落部位のアミン媒介性の切断を含む（たとえばＭｃＨｕｇｈ　ａｎｄ　Ｋｎｏｗｌａｎｄ、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９５）２３（１０）：１６６４−１６７０；Ｂｉｏｏｒｇａｎ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ（１９９１）７：２３５１；Ｓｕｇｉｙａｍａ、Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．（１９９４）７：６７３−８３；Ｈｏｒｎ、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．（１９８８）１６：１１５５９−７１を参照されたい）ならびに塩基脱落部位でのポリヌクレオチドの切断を触媒する酵素、たとえばＡＰエンドヌクレアーゼ（「脱プリン、脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ」とも呼ばれる）（たとえばＥｐｉｃｅｎｔｒｅ　Ｔｅｃｈ．，Ｉｎｃ、Ｍａｄｉｓｏｎ　Ｗｉｓ．から入手可能な大腸菌エンドヌクレアーゼＩＶ）、大腸菌エンドヌクレアーゼＩＩＩまたはエンドヌクレアーゼＩＶ、カルシウムイオンの存在下における大腸菌エキソヌクレアーゼＩＩＩの使用を含む。たとえばＬｉｎｄａｈｌ、ＰＮＡＳ（１９７４）７１（９）：３６４９−３６５３；Ｊｅｎｄｒｉｓａｋ、米国特許第６，１９０，８６５Ｂ１号；Ｓｈｉｄａ、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９６）２４（２２）：４５７２−７６；Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ、Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．（１９９８）２７３（１３）：２１２０３−２０９；Ｃａｒｅｙ、Ｂｉｏｃｈｅｍ．（１９９９）３８：１６５５３−６０；Ｃｈｅｍ　Ｒｅｓ　Ｔｏｘｉｃｏｌ（１９９４）７：６７３−６８３を参照されたい。本明細書において使用される場合、「作用物質」は、熱などのような反応条件を包含する。一実施形態において、ＡＰエンドヌクレアーゼ、大腸菌エンドヌクレアーゼＩＶが、塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を切断するために使用される。他の実施形態において、切断が、Ｎ，Ｎ’−ジメチルエチレンジアミンなどのようなアミンによるものである。たとえばＭｃＨｕｇｈ　ａｎｄ　Ｋｎｏｗｌａｎｄ、前掲を参照されたい。

【００７７】

塩基脱落部位の切断は、塩基脱落残基に対して５’に接するヌクレオチドとその塩基脱落残基の間でまたは塩基脱落残基に対して３’に接するヌクレオチドとその塩基脱落残基の間で生じてもよい（しかしながら、本明細書において説明されるように、ホスホジエステル主鎖の５’または３’切断は、使用される断片化剤に依存して、それぞれ、塩基脱落部位に対して５’または３’のリン酸基の保持をもたらしてもよくまたはもたらさなくてもよい）。切断は、塩基脱落部位に対して５’とすることができ（一般に、塩基脱落残基の５’リン酸基と、隣接するヌクレオチドのデオキシリボース環の間で、塩基脱落部位に対して５’に接する場所で主鎖の切断をもたらして、隣接するヌクレオチド上に遊離３’ヒドロキシル基を生成するエンドヌクレアーゼＩＶ処理などのように）、塩基脱落部位は

、結果として生じる断片の５’末端に位置する。切断はまた、塩基脱落部位に対して３’とすることができ（たとえば、隣接するヌクレオチドのデオキシリボース環上に遊離５’リン酸基を生成する塩基脱落残基のデオキシリボース環および３’リン酸基と、隣接するヌクレオチドのデオキシリボース環の間の切断）、塩基脱落部位は、結果として生じる断片の３’末端に位置する。塩基性条件下でのまたはアミン（Ｎ，Ｎ’－ジメチルエチレンジアミンなど）による処理は、塩基脱落部位に対して３’に接して、ホスホジエステル主鎖の切断をもたらす。そのうえ、切断のより複雑な形態、たとえば、ホスホジエステル主鎖の切断および塩基脱落ヌクレオチド（の一部分）の切断が結果として生じるような切断もまた、可能である。たとえば、ある条件下で、化学処理および／または熱処理を使用する切断は、塩基脱落部位デオキシリボース環とその３’リン酸の間の結合の切断をもたらして、標識することができるまたはさらなる切断および環化反応を受けることができる反応性α，β－不飽和アルデヒドを生成するβ－脱離ステップを含んでいてもよい。たとえばＳｕｇｉｙａｍａ、Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．（１９９４）７：６７３－８３；Ｈｏｒｎ、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．（１９８８）１６：１１５５９－７１を参照されたい。複数の異なる種の切断産物（たとえば、３’末端に塩基脱落部位を含む断片および５’末端に塩基脱落部位を含む断片）をもたらす、２つ以上の異なる方法を含む、１つを超える切断方法を使用することができることが理解される。

【００７８】

塩基脱落部位での主鎖の切断は、全般的、特異的、または選択的であってもよく（塩基脱落部位で主鎖を切断することができる作用物質（酵素など）が、特定の非標準ヌクレオチドの塩基部分を特異的にまたは選択的に切断するという意味で）、それによって、約９８％、約９５％、約９０％、約８５％、または約８０％を超える切断が、塩基脱落部位でのものとなる。しかしながら、切断の程度は、より少なくすることができる。したがって、特異的な切断に対する言及は、例示的なものである。全般的な、特異的な、または選択的な切断は、本発明の標識ポリヌクレオチド断片を生成する方法における断片サイズのコントロールに望ましい。いくつかの実施形態において、反応条件は、切断反応が、過剰な試薬の存在下において実行され、ポリヌクレオチドの過度の切断に関する最小限の懸念で（すなわち、上記の合成ステップの間に組み込まれた非標準ヌクレオチドの間隔によって決定される所望の断片サイズを保持しながら）終了に達するのを可能にするように選択することができる。他の実施形態において、切断の程度は、より少なくすることができ、末端に塩基脱落部位およびポリヌクレオチド断片内にまたはそれに対して内部にある（すなわち末端でではない）塩基脱落部位（複数可）を含むポリヌクレオチド断片が、生成される。

【００７９】

ホスホジエステル主鎖の切断を伴う実施形態において、本発明の方法に従って塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖の切断を実行するための適切な反応培地および条件が、塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖の切断を可能にするものである。そのような培地および条件は、当業者らに知られており、Ｂｉｏｏｒｇａｎ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ（１９９１）７：２３５１；Ｓｕｇｉｙａｍａ、Ｃｈｅｍ．Ｒｅｓ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．（１９９４）７：６７３－８３；Ｈｏｒｎ、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．（１９８８）１６：１１５５９－７１）；Ｌｉｎｄａｈｌ、PNAS（１９７４）７１（９）：３６４９－３６５３；Ｊｅｎｄｒｉｓａｋ、米国特許第６，１９０，８６５Ｂ１号；Ｓｈｉｄａ、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．（１９９６）２４（２２）：４５７２－７６；Ｓｒｉｖａｓｔａｖａ、Ｊ．Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ．（１９９８）２７３（１３）：２１２０３－２０９；Ｃａｒｅｙ、Ｂｉｏｃｈｅｍ．（１９９９）３８：１６５５３－６０；Ｃｈｅｍ　Ｒｅｓ　Ｔｏｘｉｃｏｌ（１９９４）７：６７３－６８３などのような様々な刊行物において記載される。

【００８０】

ある場合には、塩基脱落部位を含有する核酸は、７０℃～９５℃で、１０～３０分間、アミン、たとえば２５ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌおよび１～５ｍＭマグネシウムイオンを含

有するバッファー溶液中で加熱される。あるいは、１．０Ｍピペリジン（塩基）が、エタノールにより沈殿させ、かつ真空乾燥させた塩基脱落部位を含むポリヌクレオチドに対して追加される。次いで、その溶液は、９０℃で３０分間、加熱され、ピペリジンを除去するために凍結乾燥される。他の例において、切断が、１５分間、３７℃で、塩基性溶液、たとえば０．２Ｍ水酸化ナトリウムによる処理によって達成される。Ｎａｋａｍｕｒａ（１９９８）Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５８：２２２－２２５を参照されたい。他の例において、１００ｍＭ　Ｎ，Ｎ’－ジメチルエチレンジアミン酢酸、ｐＨ７．４との３７℃でのインキュベーションが、切断するために使用される。ＭｃＨｕｇｈ　ａｎｄ　Ｋｎｏｗｌａｎｄ（１９９５）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２３（１０）１６６４－１６７０を参照されたい。

【００８１】

１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型の切断はまた、酵素的手段によって実行されてもよい。たとえば、脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼまたは脱プリン部位エンドヌクレアーゼ（総称してＡＰエンドヌクレアーゼとして知られている）は、１つ以上の塩基脱落部位でインプット核酸鋳型を切断するために使用されてもよい。ある場合には、１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型は、クラスＩ、クラスＩＩ、クラスＩＩＩ、もしくはクラスＩＶ　ＡＰエンドヌクレアーゼまたはその組み合わせにより切断されてもよい。ある場合には、酵素的手段による１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型の切断は、インプット核酸鋳型の断片をもたらしてもよく、その断片は、遮断３’末端を含む。ある場合には、遮断３’末端は、末端の水酸基を欠く。他の場合において、遮断３’末端は、リン酸化されている。さらに他の場合において、酵素的手段による１つ以上の塩基脱落部位を含むインプット核酸鋳型の切断は、遮断されていないインプット核酸鋳型の断片をもたらしてもよい。

【００８２】

ある場合には、切断は、同時に、たとえばＵＤＧおよびＤＭＥＤまたはＵＤＧおよびＡＰエンドヌクレアーゼなどのように、グリコシラーゼおよび求核剤またはグリコシラーゼおよびアミンまたはグリコシラーゼおよびＡＰエンドヌクレアーゼの使用によって実行されてもよい。あるいは、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含むインプット核酸鋳型は、最初に、１つ以上の塩基脱落部位を産生するためにグリコシラーゼにより処理され、次いで、ＡＰエンドヌクレアーゼにより処理されるかまたは化学的手段によって切断されてもよい。ある場合には、ハイブリダイゼーション反応および伸長反応が、最初に実行され、次いで、切断反応が、十分な時間の後に実行される。他の場合において、ハイブリダイゼーションおよび伸長反応が、切断反応と同時に実行される。さらに他の場合において、ハイブリダイゼーション反応および伸長反応が、開始され、一定期間、進められ（たとえば１分間、２分間、３分間、５分間、１０分間、１５分間、３０分間、１時間、２時間、３時間など）、次いで、切断反応が、開始される。ある場合には、切断反応の開始が、伸長反応を停止してもよく、他の場合において、切断反応および伸長反応が、次いで、同時に進んでもよい。

【００８３】

たとえば、大腸菌ＡＰエンドヌクレアーゼＩＶは、上記に記載されるように、反応条件に対して追加されてもよい。ＡＰエンドヌクレアーゼＩＶは、非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる作用物質（酵素など）と同じまたは異なる時間に追加することができる。たとえば、ＡＰエンドヌクレアーゼＩＶは、ＵＮＧと同時にまたは異なる時間に追加することができる。あるいは、鋳型核酸または鋳型核酸を含む反応混合物は、同時に、ＵＮＧおよびアミンにより処理されてもよい。同時のＵＮＧ処理およびＮ，Ｎ’－ジメチルエチレンジアミン処理に適した反応混合物は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、または約５０ｍＭ　ＤＭＥＤを含んでいてもよい。あるいは、グリコシダーゼおよびリアーゼ活性の両方を含む作用物質の使用は、インプット核酸鋳型を切断するために、反応混合物において利

用されてもよい。

【００８４】

化学的手段、酵素的手段、またはその組み合わせによるインプット核酸鋳型の切断は、二本鎖産物、一本鎖産物、および部分的な二重鎖の混合物をもたらしてもよい。ある場合には、切断反応の切断産物は、本発明の１つ以上の方法によって除去されてもよい。ある場合には、切断反応の切断産物は、精製によって除去されてもよい。たとえば、切断反応の切断産物は、サイズ依存性の精製方法または親和性に基づく精製方法によって除去されてもよい。たとえば、一本鎖核酸は、捕捉プローブへの親和性ハイブリダイゼーションステップによって除去されてもよい。ある場合には、捕捉プローブは、固体の基質に対してハイブリダイズされてもよい。他の場合において、切断反応の切断核酸産物は、切断反応の切断産物の中に組み込まれた標識に対して親和性を有するリガンドを使用して、親和性捕捉ステップによって除去されてもよい。標識またはリガンドは、切断の前に（たとえば鋳型核酸の合成の間に）、切断の間に、または切断ステップの後に組み込まれてもよい。ある場合には、標識は、塩基脱落部位で組み込まれてもよい。他の場合において、切断反応の切断核酸産物は、切断反応の切断核酸産物の塩基脱落部位に存在する反応性のα，β－不飽和アルデヒドと反応する固定された反応性成分などのような反応性成分（たとえばアミンまたはヒドラジン）を使用して、捕捉ステップによって除去されてもよい。ある場合には、切断反応の切断核酸産物は、電気泳動法または限外濾過によって除去されてもよい。

【００８５】

他の場合において、一本鎖産物は、酵素的手段によって除去されてもよい。たとえば、一本鎖特異的エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼは、一本鎖ＤＮＡを切断するために使用することができる。様々な適した一本鎖ＤＮＡ特異的エキソヌクレアーゼは、たとえばエキソヌクレアーゼ１およびエキソヌクレアーゼ７などのように、本発明の方法に適している。同様に、様々な適した一本鎖ＤＮＡ特異的エンドヌクレアーゼは、たとえば一本鎖ＤＮＡ特異的エンドヌクレアーゼであるＳ１エンドヌクレアーゼまたはマングビーンヌクレアーゼなどのように、本発明の方法に適している。ある場合には、本明細書において提供されるものなどのような、当技術分野において知られている単鎖特異的エンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼの任意の組み合わせは、一本鎖断片化産物または一本鎖プライマー伸長産物またはその組み合わせなどのような一本鎖産物を分解するまたは除去するために利用されてもよい。

【００８６】

ある場合には、本発明の方法において生成されたプライマー伸長反応の産物は、断片化された標的核酸およびプライマー伸長産物を含む反応混合物から精製されてもよい。たとえば、プライマー伸長ステップは、たとえばビオチン／アビジンまたは任意の他の適した標識（たとえばジゴキシン、フルオレセイン、抗原、リガンド、受容体、もしくは本明細書において提供される任意のヌクレオチド標識）などのような精製標識を含むヌクレオチドの使用を含んでいてもよい。そのため、プライマー伸長産物は、ビオチン／アビジンリガンド受容体ペアまたは他の精製標識のメンバーを含有するのに対して、プライマーおよび鋳型核酸は含有しなくてもよいことが理解されてもよい。単純な精製ステップは、アルコールまたはポリエチレングリコール沈殿、イオン交換精製、限外濾過、シリカ吸収、または逆相方法などのように、組み込まれなかったヌクレオチドを除去するために実行されてもよく、次いで、プライマー伸長産物は、粒子、ビーズ、膜、またはカラムの形態をした、ビオチンもしくはその誘導体、アビジンもしくはその誘導体、ストレプトアビジンもしくはその誘導体、抗体またはその誘導体もしくは断片、抗原、リガンド、または受容体を含むマトリックスなどのような適切な親和性マトリックスを使用して回収されてもよい。あるいは、組み込まれなかったヌクレオチドを除去する単純な精製ステップは、省略されてもよくまたはアフィニティー精製ステップの後に実行されてもよい。

【００８７】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、１つ以上の平滑末端の二本鎖産物の生

成をさらに提供する。いくつかの実施形態において、平滑末端の二本鎖産物が、任意の非標準ヌクレオチドを含有していない鋳型から産生される。他の実施形態において、二本鎖産物が、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含有する鋳型から産生される。ある場合には、本発明の伸長ステップが、平滑末端の二本鎖産物を直接提供する。他の場合において、本発明の伸長ステップは、平滑末端および非平滑末端の二本鎖産物の混合物を提供する。さらに他の場合において、伸長ステップは、平滑末端の二本鎖産物をもたらさないかまたは実質的な程度または量の平滑末端の二本鎖産物をもたらさない。ある場合には、プライマー伸長反応の非平滑末端の産物は、平滑末端の二本鎖産物を産生するためにまたは実質的な割合の非平滑末端の産物を平滑末端の産物に変換するために、本発明の方法によってさらに処理しなければならない。

【００８８】

ある場合には、本発明の方法によって生成される二本鎖産物は、平滑末端ｄｓＤＮＡが、高度並列シークエンシング（ｈｉｇｈｌｙ　ｐａｒａｌｌｅｌ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ）または他のクローニングもしくはアダプターライゲーションの適用などのような、下流の分析にとって望ましい場合、二本鎖産物のオーバーハング一本鎖末端を分解するために、たとえばエキソヌクレアーゼ１、エキソヌクレアーゼ７、またはその組み合わせなどのような単鎖特異的ＤＮＡエキソヌクレアーゼの使用によって、平滑末端にされてもよい。あるいは、二本鎖産物は、一本鎖特異的ＤＮＡエンドヌクレアーゼ、たとえばこれらに限定されないが、マングビーンエンドヌクレアーゼまたはＳ１エンドヌクレアーゼの使用によって平滑末端にされてもよい。あるいは、二本鎖断片産物は、二本鎖産物のオーバーハング一本鎖末端を分解するために、たとえばＴ４　ＤＮＡポリメラーゼなどのような一本鎖エキソヌクレアーゼ活性を含むポリメラーゼ、一本鎖エキソヌクレアーゼ活性を含む任意の他のポリメラーゼ、またはその組み合わせの使用によって、平滑末端にされてもよい。ある場合には、一本鎖エキソヌクレアーゼ活性を含むポリメラーゼは、１つ以上のｄＮＴＰを含むまたは含まない反応混合物においてインキュベートされてもよい。他の場合において、一本鎖核酸特異的エキソヌクレアーゼおよび１つ以上のポリメラーゼの組み合わせは、プライマー伸長反応の二本鎖産物を平滑末端にするために使用されてもよい。さらに他の場合において、伸長反応の産物は、二本鎖産物のオーバーハング一本鎖末端を充填することによって平滑末端にしてもよい。たとえば、断片は、二本鎖産物の一本鎖部分を充填するために、１つ以上のｄＮＴＰの存在下において、Ｔ４　ＤＮＡポリメラーゼまたはＫｌｅｎｏｗポリメラーゼまたはその組み合わせなどのようなポリメラーゼと共にインキュベートされてもよい。あるいは、二本鎖産物は、エキソヌクレアーゼおよび／またはポリメラーゼを使用する一本鎖オーバーハング分解反応ならびに１つ以上のｄＮＴＰの存在下において１つ以上のポリメラーゼを使用する充填反応の組み合わせによって、ブラントにしてもよい。

【００８９】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、あらゆる非標準ヌクレオチドを含まない鋳型からのまたは１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む鋳型核酸からの、二本鎖核酸、一本鎖核酸、ならびに部分的二本鎖部分および部分的一本鎖部分を含む核酸を含むプライマー伸長産物の生成；鋳型核酸の断片化；プライマー伸長産物の任意選択の精製；ならびに一本鎖核酸プライマー伸長産物からのならびに／または部分的二本鎖部分および部分的一本鎖部分を含むプライマー伸長産物からの二本鎖産物の生成をもたらす。部分的二本鎖産物からの二本鎖産物の生成のための方法は、二本鎖プライマー伸長産物を平滑末端にするための方法を含めて、本明細書において提供される。一本鎖プライマー伸長産物からの二本鎖プライマー伸長産物の生成のための方法は、たとえば、本明細書において提供されるプライマーのいずれかなどのような１つ以上のプライマーを、一本鎖プライマー伸長産物に対してアニールするステップおよび標識ｄＮＴＰ、標準ｄＮＴＰ、非標準ｄＮＴＰ、またはその組み合わせを含む、１つ以上のｄＮＴＰから構成される反応混合物において、１つ以上のアニールされたプライマーを、本明細書において提供されるポリメラーゼまたは任意の適したポリメラーゼのいずれかなどのようなポリメラーゼにより伸長させるステ

ップを含む。ある場合には、一本鎖プライマー伸長産物または部分的二本鎖産物から二本鎖産物を生成するために反応混合物において利用される非標準ヌクレオチドは、鋳型ポリヌクレオチド中に存在する少なくとも１つの非標準ヌクレオチドとは異なる。一本鎖プライマー伸長産物からの二本鎖プライマー伸長産物の生成のための方法は、たとえば、ランダムプライマー（たとえば、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、十一量体、十二量体、十三量体など）を含む、本明細書において提供されるプライマーのいずれかなどのような２つ以上の隣接するプライマーを、一本鎖プライマー伸長産物に対してアニールするステップおよび隣接するプライマーをライゲーションするステップをさらに含んでいてもよい。一本鎖プライマー伸長産物からの二本鎖プライマー伸長産物を生成するための方法は、たとえば、ランダムハイブリダイズ部分（たとえばランダムな五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、十一量体、十二量体、十三量体など）を含むプライマーを含む、本明細書において提供されるプライマーのいずれかなどのような１つ以上のプライマーを、一本鎖プライマー伸長産物に対してアニールするステップおよびアニールされたプライマーを伸長させるステップをさらに含んでいてもよい。ある場合には、伸長ステップは、鎖置き換え活性を含む酵素（たとえばＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ）を使用して実行されてもよい。

【００９０】

　いくつかの実施形態において、本発明の方法は、プライマー伸長反応の二本鎖ＤＮＡ産物またはプライマー伸長反応の一本鎖もしくは部分的二本鎖産物から生成された二本鎖産物に対するアダプター分子の付加（たとえばライゲーション）を提供する。アダプター分子は、単一、二重、三重、四重、五重、六重、七重、八重、もしくはそれ以上の塩基のオーバーハングを含むが、これらに限定されない、一本鎖オーバーハングを含む二本鎖ＤＮＡ断片分子に対してまたは平滑末端を含む二本鎖ＤＮＡ断片分子に対してライゲーションされてもよい。ある場合には、アダプター分子は、５’リン酸化によって修飾された平滑末端二本鎖ＤＮＡ断片分子に対してライゲーションされる。ある場合には、アダプター分子は、５’リン酸化によって修飾された平滑末端二本鎖ＤＮＡ断片分子に対してライゲーションされ、その後、１つ以上のヌクレオチドによる３’末端の伸長が続けられる。ある場合には、アダプター分子は、５’リン酸化によって修飾された平滑末端二本鎖ＤＮＡ断片分子に対してライゲーションされ、その後、たとえばアデニン、グアニン、シトシン、またはチミンなどのような単一のヌクレオチド（または2、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、もしくはそれ以上）による３’末端の伸長が続けられる。さらに他の場合において、アダプター分子は、１つ以上のヌクレオチドによる３’末端の伸長、その後に続く５’リン酸化によって修飾された平滑末端二本鎖ＤＮＡ断片分子に対してライゲーションすることができる。ある場合には、３’末端の伸長は、マグネシウムを含有する適したバッファーにおいて、１つ以上のｄＮＴＰの存在下において、たとえばＫｌｅｎｏｗポリメラーゼもしくは本明細書において提供される適したポリメラーゼのいずれかなどのようなポリメラーゼによりまたは末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼの使用によって、実行されてもよい。ＤＮＡ断片分子の５’末端のリン酸化は、たとえば、ＡＴＰおよびマグネシウムを含有する適したバッファーにおいてＴ４ポリヌクレオチドキナーゼにより実行されてもよい。

【００９１】

　アダプター分子は、一本鎖核酸または二本鎖核酸またはその組み合わせを含んでいてもよい。ある場合には、アダプター分子は、それらの５’末端に、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれよりも長い塩基長の一本鎖オーバーハングを含む。たとえば、アダプター分子は、それらの５’末端に、１塩基長のチミン、アデニン、シトシン、またはグアニンオーバーハングを含んでいてもよい。アダプター分子組成物は、本明細書において提供される。

【００９２】

　いくつかの実施形態において、本発明の方法は、伸長反応の一本鎖ＤＮＡ産物に対する

アダプター分子のライゲーションまたは付加を提供する。アダプター分子は、一本鎖核酸または二本鎖核酸またはその組み合わせを含んでいてもよい。アダプター分子は、鋳型の非存在下において２つの一本鎖核酸（ＲＮＡまたはＤＮＡ）を互いにライゲーションすることができるＴ４　ＲＮＡリガーゼを使用して、伸長反応の一本鎖ＤＮＡ産物に対してライゲーションされてもよい。あるいは、たとえばＣｉｒｃＬｉｇａｓｅ（登録商標）などのような一本鎖ＤＮＡ特異的リガーゼが、本発明の方法において利用されてもよい。

【００９３】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、反応混合物と、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含むインプット核酸鋳型を接触させることを提供する。ある場合には、反応混合物は、本明細書において提供される１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいてもよい。たとえば、反応混合物は、ランダムハイブリダイズ部分を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいてもよい。そのうえ、反応混合物は、ランダムハイブリダイズ部分を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよびｐｏｌｙＴ配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーを含んでいてもよい。

【００９４】

ある場合には、反応混合物は、本明細書において提供される１つ以上のポリメラーゼを含んでいてもよい。たとえば、反応混合物は、たとえばＫｌｅｎｏｗポリメラーゼ、エキソーＫｌｅｎｏｗポリメラーゼ、５’－３’エキソーＫｌｅｎｏｗポリメラーゼ、Ｂｓｔポリメラーゼ、Ｂｓｔ大断片ポリメラーゼ（ｌａｒｇｅ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ）、Ｖｅｎｔポリメラーゼ、Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔ（エキソー）ポリメラーゼ、９°Ｎｍポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒポリメラーゼ、Ｔｈｅｒｍｉｎａｔｏｒ　ＩＩポリメラーゼ、ＭＭｕｌＶ逆転写酵素、ｐｈｉ２９ポリメラーゼ、もしくはＤｙＮＡｚｙｍｅ　ＥＸＴポリメラーゼまたはその組み合わせなどのような、鎖置き換え活性を含む１つ以上のポリメラーゼを含んでいてもよい。ある場合には、反応混合物は、インプット核酸鋳型、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー、および鎖置き換え活性を含む１つ以上のポリメラーゼの存在下において、二本鎖産物を提供するように構成されてもよい。本発明の組成物、方法、およびキットで使用される酵素は、逆転写酵素活性を有する任意の酵素をさらに含んでいてもよい。そのような酵素は、レトロウイルス逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、Ｂ型肝炎逆転写酵素、カリフラワーモザイクウイルス逆転写酵素、細菌逆転写酵素、大腸菌ＤＮＡポリメラーゼおよびｋｌｅｎｏｗ断片、Ｔｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｓａｉｋｉ，Ｒ．Ｋ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：４８７－４９１（１９８８）；米国特許第４，８８９，８１８号および米国特許第４，９６５，１８８号）、Ｔｎｅ　ＤＮＡポリメラーゼ（国際公開第９６／１０６４０号パンフレット）、Ｔｍａ　ＤＮＡポリメラーゼ（米国特許第５，３７４，５５３号）、Ｃａｒｂｏｘｙｄｏｔｈｅｒｍｕｓ　ｈｙｄｒｏｇｅｎｏｆｏｒｍａｎｓ由来のＣ．　Ｔｈｅｒｍ　ＤＮＡポリメラーゼ（欧州特許公開第０９２１１９６Ａ１号、Ｒｏｃｈｅ、Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ、Ｃａｌｉｆ．、Ｃａｔ．Ｎｏ．２０１６３３８）、ＴｈｅｒｍｏＳｃｒｉｐｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｓｂａｄ、Ｃａｌｉｆ．Ｃａｔ．Ｎｏ．１１７３１－０１５）、ならびにその突然変異体、断片、変異体、または誘導体を含むが、これらに限定されない。当業者によって理解されるように、修飾逆転写酵素は、当技術分野においてルーチン的で、よく知られている組換え技術または遺伝子工学技術によって得られてもよい。突然変異逆転写酵素は、たとえば、部位指向性またはランダム突然変異誘発によって、関心のある逆転写酵素をコードする遺伝子（複数可）を突然変異させることによって得ることができる。そのような突然変異は、点突然変異、欠失変異、および挿入突然変異を含んでいてもよい。好ましくは、１つ以上の点突然変異（たとえば１つ以上の異なるアミノ酸との１つ以上のアミノ酸の置換）は、本発明の突然変異逆転写酵素を構築するために使用される。逆転写酵素の断片は、当技術分野においてルーチン的で、よく知られている組換え技術によって欠失変異によってまたは多くのよく知られているタンパク質分解酵素のいずれかを使用する関心のある逆転写酵素（複数可）の酵素的消化によって得られてもよい。逆転写酵素活性を含有する突然変異体ＤＮＡポリメラーゼは

また、参照によって本明細書において組み込まれる米国特許出願第１０／４３５，７６６号において記載されるように使用することもできる。

【００９５】

ある場合には、反応混合物は、塩基脱落部位を生成するために非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる１つ以上の作用物質を含んでいてもよい。ある場合には、反応混合物は、伸長反応の開始時に、塩基脱落部位を生成するために非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる１つ以上の作用物質を含有していてもよい。ある場合には、反応混合物は、適した期間（たとえば約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４５、６０、９０、１２０、１８０、２４０、３００、４００、５００、６００分間）が、プライマー伸長産物の生成で経過した後に、塩基脱落部位を生成するために非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる１つ以上の作用物質が補足されてもよい。塩基脱落部位を生成するために非標準ヌクレオチドの塩基部分を切断することができる適した作用物質は、ＵＤＧおよびＭＰＧを含むが、これらに限定されない。

【００９６】

ある場合には、反応混合物は、インプット核酸鋳型を断片化するために塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を断片化することができる１つ以上の作用物質を含んでいてもよい。ある場合には、反応混合物は、伸長反応の開始時に、インプット核酸鋳型を断片化するために塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を断片化することができる１つ以上の作用物質を含有していてもよい。ある場合には、反応混合物は、適した期間（たとえば約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、４５、６０、９０、１２０、１８０、２４０、３００、４００、５００、６００分間）が、プライマー伸長産物の生成で経過した後に、インプット核酸鋳型を断片化するために塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を断片化することができる１つ以上の作用物質が補足されてもよい。インプット核酸鋳型を断片化するために塩基脱落部位でホスホジエステル主鎖を断片化することができる適した作用物質は、アミン、第１級アミン、第２級アミン、本明細書において提供されるポリアミン、求核剤、塩基（たとえばＮａＯＨ）、ピペリジン、熱いピペリジン、および１つ以上のＡＰエンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。

【００９７】

本発明の方法は、本発明の方法において生成されるプライマー伸長産物の下流の分析を提供する。前記下流の分析は、たとえばパイロシークエンシング、合成によるシークエンシング、ハイブリダイゼーションによるシークエンシング、単一分子シークエンシング、ナノポアシークエンシング、ならびにライゲーション、高密度ＰＣＲ、マイクロアレイハイブリダイゼーション、ＳＡＧＥ、デジタルＰＣＲ、および超並列Ｑ－ＰＣＲ（ｍａｓｓｉｖｅｌｙ　ｐａｒａｌｌｅｌ　Ｑ－ＰＣＲ）によるシークエンシング；サブトラクティブハイブリダイゼーション；差次的増幅（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）；比較ゲノムハイブリダイゼーション、ライブラリー（ｃＤＮＡライブラリーおよび差次的発現ライブラリー（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｌｉｂｒａｒｙ）を含む）の調製；固定された核酸の調製（マイクロアレイ上に固定された核酸であってもよい）、本発明の方法によって生成された増幅核酸産物の特徴付け、またはその組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【００９８】

単一細胞に対する適用

単一細胞シークエンシングおよび遺伝子発現解析は、疾患診断または予診の適用およびたとえば新規な薬剤標的を同定するための研究道具などのような、当技術分野において知られている様々な適した方法のために提供される。関心のある疾患は、限定を伴うことなく、免疫媒介性機能不全、癌、およびその他同種のものを含む。本発明の方法において、不均質な細胞混合物、たとえば腫瘍針生検、炎症性病変生検、滑液、脊髄穿刺などは、たとえばマルチウェルプレート、マイクロアレイ、マイクロ流体デバイス、またはスライドの中に、空間的に分離された単一細胞にランダムにまたはある順序で分けられる。次いで、細胞は溶解され、内容物は増幅され、関心のある遺伝子のシークエンシングまたは発現

について個々に分析される。このように分析された細胞は、個々の細胞の遺伝的特色に従って分類することができる。そのような分類は、試験サンプルの細胞組成の正確な評価を可能にし、その評価は、たとえば、腫瘍中の癌幹細胞の特徴および数を決定する際に；Ｔ細胞、樹状細胞、Ｂ細胞、およびその他同種のものの数および特異性などのような免疫関連細胞の特徴および数を決定する際に、使用を見出してもよい。

【００９９】

いくつかの実施形態において、分析されることになっている細胞サンプルが、新たに単離され、凍結させせられてもよいなどの一次サンプルである。しかしながら、分析されることになっている細胞は、培養細胞とすることができる。普通、サンプルは、複数の別個の細胞型、別個の集団、または別個の亜集団、たとえば２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上の細胞型、集団、または亜集団を含む、細胞の不均質な混合物である。いくつかの実施形態において、サンプルが、固形腫瘍、白血病、リンパ腫など由来の癌サンプルであり、これは、生検、たとえば針生検など、播種性腫瘍および白血病についての血液サンプル、およびその他同種のものであってもよい。サンプルは、診断前に得られてもよく、処理の過程を通して得られてもよいなどである。

【０１００】

組織由来の細胞の単離のために、適切な溶液は、分散または懸濁のために使用することができる。そのような溶液は、一般に、平衡塩類溶液、たとえば一般に５～２５ｍＭの低濃度の許容され得るバッファーと共に、ウシ胎仔血清または他の天然に存在する因子が好都合に補足された、通常生理食塩溶液、ＰＢＳ、ハンクス平衡塩類溶液などとなるであろう。好都合なバッファーは、ＨＥＰＥＳ、リン酸バッファー、乳酸バッファーなどを含む。分離された細胞は、収集チューブの底に血清のクッションを普通有する、細胞の生存能力を維持する任意の適切な培地中に収集することができる。様々な培地は、市販で入手可能であり、細胞の性質に従って使用されてもよく、多くはウシ胎仔血清が補足されたｄＭＥＭ、ＨＢＳＳ、ｄＰＢＳ、ＲＰＭＩ、Ｉｓｃｏｖｅの培地などを含む。

【０１０１】

Ｂｅｃｋｍａｎ　ＭｏＦｌｏセルソーター、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ　Ｉｎｆｌｕｘ、またはＢｉｏ－Ｒａｄ　Ｓ３などのようなシステムは、表面マーカー、サイズなどに基づいて、細胞の不均質な混合物を別個の集団にソートするために使用することができる。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、サンプル中の細胞が、マイクロアレイ上で分離される。たとえば、高度に統合された生細胞マイクロアレイシステムは、それぞれが単一細胞にフィットするのにちょうど十分な大きさのマイクロウェルを利用してもよい。（Ｔｏｋｉｍｉｔｓｕら（２００７）Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｐａｒｔ　Ａ　７１ｋ　１００３：１０１０；およびＹａｍａｍｕｒａら（２００５）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　７７：８０５０を参照されたい；それぞれ詳細に本明細書において参照によって組み込まれる）。ＦＡＣＳまたは他のソートなどのような、関心のある細胞の事前の濃縮は、任意選択であり、いくつかの実施形態において、サンプル由来の細胞が、あらゆる事前のソートまたは濃縮を伴うことなく個別の場所に分けられる。たとえば、サンプル（たとえば血液サンプル、生検、固形腫瘍）由来の細胞は、別個の位置に個々に単離することができる。典型的に、固体組織サンプルについては、サンプルは、機械的に、化学的に、および／または酵素的に分離される（たとえばトリプシンまたは超音波処理による処理によって）。サンプル由来の細胞は、平面の表面上のアドレス指定可能な位置になどのように、個々の細胞が単離されるように、任意のセルソーティングデバイス（たとえばマイクロ流体セルソーター）に配置することができる。平面の表面は、ぎざぎざ、バリア、または他の特色を有し、個々の細胞の単離を確かにすることができる。次いで、単離された細胞は、本明細書における方法に従って分析することができる。好ましくは、細胞は、別個の位置に分離され、それぞれの位置は、１つまたは０の細胞を含有する。

【０１０３】
細胞は、分離前に、たとえばフローサイトメトリーによって、任意選択でソートされる。たとえばＦＡＣＳソーティングまたはサイズディファレンシャル（ｓｉｚｅ−ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ）ソーティングは、細胞表面上に存在する１つ以上のマーカーに従って、少なくとも１，０００、１０，０００、１００，０００倍、またはそれ以上、関心のある細胞の最初の濃度を増加させるために使用することができる。そのような細胞は、細胞表面マーカー、特に、関心のある集団または亜集団のマーカーの存在および／または非存在に従って任意選択でソートされる。

【０１０４】
セルソーター

細胞が分析のために別個の位置に単離される場合、細胞は、マイクロ流体ソーターにより、フローサイトメトリー、顕微鏡検査法によってなどでソートされてもよい。微細加工蛍光活性化セルソーター（ｍｉｃｒｏｆａｂｒｉｃａｔｅｄ　ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ−ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｃｅｌｌ　ｓｏｒｔｅｒ）は、それぞれ詳細に本明細書において参照によって組み込まれるＦｕら（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１７：１１０９およびＦｕら（２００２）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．７４：２４５１−２４５７によって記載される。サンプルは、多層ソフトリソグラフィーを使用する統合された微細加工セルソーターによりソートすることができる。この統合されたセルソーターは、連係した自動式の様式でセルソーティングを実行するために、蠕動ポンプ、ダンパー、スイッチバルブ、および入力および出力ウェルを含む、様々なマイクロ流体の機能性を組み込んでいてもよい。この統合されたセルソーター上で駆動されたバルブの活動容積（ａｃｔｉｖｅ　ｖｏｌｕｍｅ）は、１ｐＬほどの大きさとすることができ、光学インターロゲーション（ｏｐｔｉｃａｌ　ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ）の容積は、１００ｆＬほどの大きさとすることができる。従来のＦＡＣＳマシンと比較して、マイクロ流体ＦＡＣＳは、高感度、相互汚染なし、および低費用を提供する。

【０１０５】
個々の細胞は、さらなる分析および／または操作のために別個の位置（たとえば９６ウェルプレートまたはマイクロアレイアドレス）に単離することができる。たとえば、造血幹細胞（ＨＳＣ）などのような、所望の細胞型を含有する細胞集団は、ＨＳＣと成熟細胞を区別することができる抗体を利用するＦＡＣＳ分析によってソートされる。細胞は、９６ウェルプレートにソートされ、適切な方法によって溶解され、溶解物は、ｑＰＣＲ、マイクロアレイ分析、および／またはシークエンシングによって分析される。

【０１０６】
単一細胞単離のためのデバイスは、マイクロ流体セルソーターを含み、これは、細胞破片から生細胞を単離し、単一細胞浮遊液由来の細胞をソートする。マイクロ流体デバイスは、１、２、３、４、５、またはそれ以上の異なる表面マーカー由来の蛍光シグナル（たとえば標的集団または亜集団についてのマーカーに対する標識抗体）と組み合わせて使用することができ、続く遺伝学研究のために個々のビン（ｂｉｎ）にそれらを配置する。細胞浮遊液を得るための腫瘍または細胞培養物の消化および蛍光表面マーカーによる細胞の染色などのような他の上流のステップは、このシステムに組み込まれてもよい。分析される細胞の数は、サンプルの不均一性およびサンプル中の関心のある細胞の期待される頻度に依存する。普通、少なくとも約$１０^{２}$細胞が分析され、少なくとも約$１０^{３}$、少なくとも$５×１０^{３}$、少なくとも約$１０^{４}$、少なくとも約$１０^{５}$、少なくとも約$１０^{６}$、少なくとも約$１０^{７}$、少なくとも約$１０^{８}$、少なくとも約$１０^{９}$、少なくとも約$１０^{１０}$、少なくとも約$１０^{１１}$、少なくとも約$１０^{１２}$、少なくとも約$１０^{１３}$、少なくとも約$１０^{１４}$、少なくとも約$１０^{１５}$、またはそれ以上の細胞が、分析される。

【０１０７】
いくつかの事例において、単一細胞分析デバイス（ＳＣＡＤ）は、モジュール型であり、統合された完全に自動式の様式で、組織の消化、砕片からの生細胞の分離、染色、またはソートなどのような複数のステップを実行することができる。

【０１０８】
ソートされた細胞は、細胞の遺伝的（ＲＮＡ、ＤＮＡ）および／またはタンパク質組成の分析を実行するために個々に溶解することができる。ｍＲＮＡは、オリゴｄＴビーズのカラム上に捕捉する、ビーズ上で逆転写する、プロセシングしてチップから離す、巨視的なウェルに移動させるなどすることができる。任意選択で、ＤＮＡまたはＲＮＡは、分析の前にあらかじめ増幅する。あらかじめの増幅は、全ゲノムまたはトランスクリプトームまたはその一部分（たとえば関心のある遺伝子／転写物）とすることができる。ポリヌクレオチドサンプルは、発現プロファイルの分析（たとえばｑＲＴ－ＰＣＲによる）および決定のためにチップに移動させることができる。

【０１０９】
核酸サンプルは、個々の細胞の関心のある表現型確定的遺伝子の発現情報を含むことができる、複数または集団の別個の核酸を含む。核酸サンプルは、ＲＮＡまたはＤＮＡ核酸、たとえばｍＲＮＡ、ｃＲＮＡ、ｃＤＮＡなどを含むことができる。発現プロファイルは、２つのサンプルの間の差次的遺伝子発現を決定するための任意の好都合な手段、たとえばｍＲＮＡ、標識ｍＲＮＡ、増幅されたｍＲＮＡ、ｃＲＮＡなどの定量的ハイブリダイゼーション、定量的ＰＣＲ、およびその他同種のものによって生成することができる。対象または患者サンプル、たとえば細胞またはその収集物、たとえば組織が、アッセイされる。サンプルは、当技術分野において知られている、任意の好都合な方法によって収集される。

【０１１０】
サンプルは、当技術分野において知られているように、多くの異なる方法において、たとえば単一細胞由来のｍＲＮＡ単離によって、調製することができ、単離されたｍＲＮＡは、差次的発現の技術分野において知られているように、増幅され、ｃＤＮＡ、ｃＲＮＡを調製するなどのために用いられるように、使用される。（たとえばＭａｒｃｕｓら、Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．（２００６）；７８（９）：３０８４－８９を参照されたい）。サンプルは、対象から採取された任意の組織（たとえば病変または腫瘍組織）から調製することができる。サンプルの分析は、任意の目的（たとえば診断、予後診断、分類、追跡、および／または療法の開発）のために使用することができる。細胞は、分析の前に培養されてもよい。

【０１１１】
発現プロファイルは、任意の従来のプロトコールを使用して、最初の核酸サンプルから生成されてもよい。差次的遺伝子発現分析の分野において用いられるものなどのように、発現プロファイルを生成する様々な異なる形が知られているが、発現プロファイルを生成するための代表的で好都合な１つのタイプのプロトコールは、定量的ＰＣＲ（ＱＰＣＲまたはＱＴ－ＰＣＲ）である。たとえば、ＱＰＣＲを実行するための任意の利用可能な方法論を、Ｖａｌｅｒａら、／．Ｎｅｕｒｏｏｎｃｏｌ．（２００７）８５（１）：１－１０において記載されるように、利用することができる。

【０１１２】
細胞のソート
選択された特性を有する細胞、たとえば、選択された表面タンパク質を有する細胞、破壊された細胞膜を有する細胞、病原体に感染した細胞、死にかかっている細胞、または死細胞は、セルソーティング、とりわけ蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）を含む、当技術分野においてよく知られている様々な技術によって、基体（たとえばパニングにおいてのようにプラスチック表面）に対して結合された親和性試薬を使用することによってまたはビーズ（たとえば有色ラテックスビーズもしくは磁性粒子）の特性に基づいて単離することができる固相粒子に対して結合された親和性試薬を使用することによって、サンプル中で検出することができる。もちろん、細胞を検出するために使用される手順は、細胞がどのように標識されたかに依存するであろう。一例において、セルソーターに対して適切な特質を有する任意の検出可能な物質が、使用されてもよい（たとえば蛍光色素の場合には、ソーターの発光源によって励起することができる色素およびセルソーターの検出

装置によって検出することができる放出スペクトル）。フローサイトメトリーにおいて、レーザー光線のビームは、細胞または他の粒子を含有する液体ストリームに投射され、これらは、集束した光がぶつかった場合に、検出装置によって拾われるシグナルを発する。次いで、これらのシグナルは、コンピューター記憶およびデータ分析のために変換され、様々な細胞の特性に関する情報を提供することができる。適した色素により標識された細胞は、レーザービームによって励起され、特徴的な波長で光を放射する。この放射された光は、検出装置によって拾われ、これらのアナログシグナルは、デジタルシグナルに変換されて、それらの記憶、分析、およびディスプレイを可能にする。

【０１１３】

多くのより大きなフローサイトメーターはまた、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）などのような「セルソーター」でもあり、チューブまたは他の収集容器の中に特定の集団由来の細胞を選択的に堆積させる能力を有する機器である。特に好ましい実施形態において、細胞が、ＦＡＣＳを使用して単離される。この手順は、当技術分野においてよく知られており、たとえばＭｅｌａｍｅｄら、Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　ａｎｄ　Ｓｏｒｔｉｎｇ、Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．（１９９０）；Ｓｈａｐｉｒｏ、Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ、４ｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ、Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．（２００３）；およびＲｏｂｉｎｓｏｎら、Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｏｆ　Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ　Ｍｅｔｈｏｄｓ、Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．（１９９３）によって記載される。

【０１１４】

細胞をソートするために、機器の電子技術は、細胞がレーザービームによって調べられるときにそれぞれの細胞について収集されたシグナルを判断し、コンピューター上に設定されたソート基準とシグナルを比較する。細胞が必要とされる基準を満たす場合、電荷が、細胞を含有する液滴に的確に切断されている液体ストリームに対してかけられる。この電荷は、関心のある細胞がストリームから切断され離れようとしているちょうどその瞬間にストリームに対してかけられ、次いで、荷電液滴がストリームから切断された場合に、取り出される。液滴が落下するとき、それらは、強く正にまたは負に荷電している２つの金属板の間を通過する。荷電液滴は、反対の極性の金属板に向かって引かれ、さらなる試験のために収集容器中にまたは顕微鏡用スライド上に堆積する。細胞は、たとえば、レーザー、たとえばアルゴンレーザー（４８８ｎｍ）を使用し、かつたとえば、Ａｕｔｏｃｌｏｎｅユニットが取り付けられたフローサイトメーター（Ｃｏｕｌｔｅｒ　ＥＰＩＣＳ　Ａｌｔｒａ、Ｂｅｃｋｍａｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ、Ｍｉａｍｉ、ＦＩａ．、ＵＳＡ）により、単一細胞としてまたは複数の細胞として、収集容器中に自動的に堆積させることができる。適した／本発明の方法に有用なＦＡＣＳマシンの他の例は、ＭｏＦｌｏ（商標）Ｈｉｇｈｓｐｅｅｄセルソーター（Ｄａｋｏ－Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ　ｌｔｄ）、ＦＡＣＳ　Ａｒｉａ（商標）（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＦＡＣＳ　Ｄｉｖａ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）、ＡＬＴＲＡ（商標）Ｈｙｐｅｒ　ｓｏｒｔ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）、およびＣｙ　Ｆｌｏｗ（商標）ソーティングシステム（Ｐａｒｔｅｃ　ＧｍｂＨ）を含むが、これらに限定されない。

【０１１５】

所望の細胞および／または（ａｎｄ／ｏｒ　ｏｒ）そのサンプル由来の前駆物質の濃縮またはソートは、固相粒子を使用して達成されてもよい。所望の特性を有する任意の粒子が、利用されてもよい。たとえば、大きな粒子（たとえば、直径が約９０～１００μｍを超える）は、沈降を促進するために使用されてもよい。ある場合には、粒子は、「磁性粒子」（すなわち磁場を使用して収集することができる粒子）である。標識された細胞は、カラム中で保持されてもよく（磁場によって保持される）、一方、非標識細胞は、真っすぐに通過し、他の末端に溶出される。磁性粒子は、現在、Ｄｙｎａｌ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｏｓｌｏ、Ｎｏｒｗａｙ）およびＭｉｌｔｅｎｉ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＧｍｂＨ（Ｇｅｒｍａｎｙ）を含む様々なメーカーから一般に入手可能である。磁性セルソーティング（ＭＡＣＳ）の例は、Ａｌ－Ｍｕｆｔｉら（１９９９）によって提供される。

【０１１６】

　レーザーキャプチャーマイクロダイセクションもまた、本発明の方法を使用して、スライド上で標識樹状細胞またはその前駆物質を選択的に濃縮するために使用することができる。レーザーキャプチャーマイクロダイセクションを使用する方法は、当技術分野において知られている（たとえば米国特許出願公開第２００３０２２７６１１号およびＢａｕｅｒら、２００２を参照されたい）。

【０１１７】

　標的ポリヌクレオチド

　本発明の様々な実施形態において、核酸が、さらなる操作のための基質として使用される。インプット核酸は、ＤＮＡまたは複雑なＤＮＡ、たとえばゲノムＤＮＡとすることができる。インプットＤＮＡはまた、ｃＤＮＡであってもよい。ｃＤＮＡは、ＲＮＡ、たとえばｍＲＮＡから生成することができる。インプットＤＮＡは、特定の種、たとえばヒト、ブドウ、ラット、マウス、他の動物、植物、細菌、藻、ウイルスなどのものとすることができる。インプット核酸はまた、宿主病原体、細菌集団などのような、様々な種のゲノムの混合物由来のものとすることもできる。インプットＤＮＡは、様々な種のゲノムの混合物から作製されたｃＤＮＡとすることができる。あるいは、インプット核酸は、合成供給源由来のものとすることができる。インプットＤＮＡは、ミトコンドリアＤＮＡまたは葉緑体ＤＮＡとすることができる。インプットＤＮＡはまた、１つ以上の細胞質内、ミトコンドリア、または葉緑体ｍＲＮＡ、ｒＲＮＡ、またはｔＲＮＡから生成されたｃＤＮＡを含むことができる。インプットＤＮＡは、無細胞ＤＮＡとすることができる。無細胞ＤＮＡは、たとえば血清または血漿サンプルから得ることができる。インプットＤＮＡは、１つ以上の染色体を含むことができる。たとえば、インプットＤＮＡがヒト由来のものである場合、ＤＮＡは、染色体１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、Ｘ、またはＹの１つ以上を含むことができる。ＤＮＡは、直鎖または環状ゲノム由来のものとすることができる。ＤＮＡは、プラスミドＤＮＡ、コスミドＤＮＡ、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、または酵母人工染色体（ＹＡＣ）とすることができる。インプットＤＮＡは、１つを超える個体または生物由来のものとすることができる。インプットＤＮＡは、二本鎖または一本鎖であってもよい。インプットＤＮＡは、染色質の一部とすることができる。インプットＤＮＡは、ヒストンに関連していてもよい。本明細書において記載される方法は、たとえば組織もしくは細胞培養物から単離されるなどのような高分子量ＤＮＡ、血液および尿由来の無細胞ＤＮＡなどのような高度に分解されたＤＮＡならびに／またはたとえばホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたＤＮＡに対して適用することができる。

【０１１８】

　標的ポリヌクレオチドが由来する様々なサンプルは、同じ個体由来の複数のサンプル、様々な個体由来のサンプル、またはその組み合わせを含むことができる。いくつかの実施形態において、サンプルが、１つの個体由来の複数のポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、サンプルが、２つ以上の個体由来の複数のポリヌクレオチドを含む。個体は、標的ポリヌクレオチドが由来することができる任意の生物またはその一部分であり、この非限定的な例は、植物、動物、真菌、原生生物、モネラ界の生物、ウイルス、ミトコンドリア、および葉緑体を含む。サンプルポリヌクレオチドは、対象に由来する細胞サンプル、組織サンプル、または器官サンプルなどのように、対象から単離することができ、たとえば培養細胞株、生検、血液サンプル、または細胞を含有する液体サンプルを含む。対象は、雌ウシ、ブタ、マウス、ラット、ニワトリ、ネコ、イヌなどのような動物を含むが、これらに限定されない動物であってもよく、普通、ヒトなどのような哺乳動物である。サンプルはまた、化学合成によってなどのように、人工的に誘導することもできる。いくつかの実施形態において、サンプルが、ＤＮＡを含む。いくつかの実施形態において、サンプルが、ゲノムＤＮＡを含む。いくつかの実施形態において、サンプルが、ミトコンドリアＤＮＡ、葉緑体ＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、細菌人工染色体、酵母人工染色体、オリゴヌクレオチドタグ、またはその組み合わせを含む。いくつかの実施形態におい

て、サンプルが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）、逆転写、およびその組み合わせを含むが、これらに限定されない、プライマーおよびＤＮＡポリメラーゼの任意の適した組み合わせを使用した、プライマー伸長反応によって生成されたＤＮＡを含む。プライマー伸長反応のための鋳型がＲＮＡである場合、逆転写の産物は、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）と呼ばれる。プライマー伸長反応において有用なプライマーは、１つ以上の標的に対して特異的な配列、ランダム配列、部分的ランダム配列、およびその組み合わせを含むことができる。プライマー伸長反応に適した反応条件は、当技術分野において知られている。一般に、サンプルポリヌクレオチドは、サンプル中に存在する任意のポリヌクレオチドを含み、これは、標的ポリヌクレオチドを含んでいてもよくまたは含んでいなくてもよい。

【０１１９】

核酸の抽出および精製のための方法は、当技術分野においてよく知られている。たとえば、核酸は、フェノール、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール、またはＴＲＩｚｏｌおよびＴｒｉＲｅａｇｅｎｔを含む類似する製剤による有機抽出によって精製することができる。抽出技術の他の非限定的な例は、（１）自動式の核酸抽出装置、たとえばＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、Ｃａｌｉｆ．）から入手可能なＭｏｄｅｌ　３４１　ＤＮＡ　Ｅｘｔｒａｃｔｏｒの使用を伴うまたは伴わない、たとえばフェノール／クロロホルム有機試薬を使用する、有機抽出、その後に続くエタノール沈殿（Ａｕｓｕｂｅｌら、１９９３）；（２）固定相吸着法（ｓｔａｔｉｏｎａｒｙ　ｐｈａｓｅ　ａｄｓｏｒｐｔｉｏｎ　ｍｅｔｈｏｄ）（米国特許第５，２３４，８０９号；Ｗａｌｓｈら、１９９１）；および（３）塩誘発性の核酸沈殿方法（Ｍｉｌｌｅｒら、（１９８８）、そのような沈殿方法は、典型的に、「塩析」方法と呼ばれる、を含む。核酸単離および／または精製の他の例は、核酸が特異的にまたは非特異的に結合することができる磁性粒子の使用、その後に続く磁石を使用するビーズの単離および洗浄およびビーズからの核酸の溶出を含む。（たとえば米国特許第５，７０５，６２８号を参照されたい）。いくつかの実施形態において、上記の単離方法に、サンプルから望まれないタンパク質を除くのを支援する酵素消化ステップ、たとえばプロテイナーゼＫまたは他の同様のプロテアーゼによる消化が先行してもよい。たとえば米国特許第７，００１，７２４号を参照されたい。所望の場合、ＲＮアーゼ阻害剤が、溶解バッファーに対して追加されてもよい。ある細胞またはサンプルタイプについては、プロトコールに対してタンパク質変性／消化ステップを追加することは望ましいかもしれない。精製方法は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはその両方を単離するように指示されてもよい。ＤＮＡおよびＲＮＡの両方が、抽出手順の間にまたはそれに続いて一緒に単離される場合、さらなるステップは、一方または両方を他方から別々に精製するために用いられてもよい。抽出された核酸の細画分もまた、たとえばサイズ、配列、または他の物理的もしくは化学的特質による精製で生成することができる。最初の核酸単離ステップに加えて、核酸の精製は、過剰なまたは望まれない試薬、反応物、または産物を除去するなどのために本発明の方法における任意のステップの後に、実行することができる。

【０１２０】

分析に適した単一細胞

核酸または単一細胞を含有するサンプルは、生物学的な供給源から得、当技術分野において知られている従来の方法を使用して調製することができる。特に、本明細書において記載される方法において有用なＤＮＡまたはＲＮＡは、細菌、原生動物、真菌、ウイルス、細胞小器官、同様に、植物または動物、たとえば哺乳動物、特にヒトなどのような高等生物を含む任意の供給源から抽出するおよび／または増幅することができる。適した核酸はまた、環境的な供給源（たとえば池の水）から、人工的な製品（たとえば食品）から、法医学的サンプル、およびその他同種のものから得ることができる。核酸は、様々な標準的な技術のいずれかによって、細胞、体液（たとえば血液、血液画分、尿など）または組織サンプルから抽出するまたは増幅することができる。細胞は、培養されてもよくまたは臨床サンプルなどのような初代単離物由来であってもよい。例証となるサンプルは、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、腹水、胸水、口腔液、および皮膚の外部の切片のサンプル；

呼吸器系、消化器系、生殖器系、および泌尿器系由来のサンプル；涙、唾液、血球、幹細胞、または腫瘍のサンプルを含む。たとえば、胎児ＤＮＡのサンプルは、胚から（たとえば１つもしくは少数の胚細胞もしくは胎児細胞から）または母親の血液から得ることができる。サンプルは、生きているもしくは死んでいる生物またはインビトロ培養物から得ることができる。例証となるサンプルは、単一細胞、パラフィン包埋された組織サンプル、および針生検を含むことができる。本明細書において記載される方法において有用な核酸はまた、ｃＤＮＡ、コスミド、ＹＡＣ、ＢＡＣ、Ｐ１、ＰＡＣライブラリー、およびその他同種のものを含む１つ以上の核酸ライブラリーに由来することができる。

【０１２１】

サンプルは、特定の状態、たとえば細胞増殖、細胞分化、細胞死、疾患、刺激に対する曝露、および／またはステージ、たとえば発生のステージを反映し得る。

【０１２２】

特定の実施形態において、本明細書において記載される方法は、着床前の胚由来の単一細胞、幹細胞、癌が疑われる細胞、病原生物由来の細胞、および／または犯罪現場から得られた細胞に対して実行することができる。たとえば、ヒト卵割球（たとえば８細胞期の胚由来またはそれ以降）は、ゲノムが１つ以上の遺伝的欠陥を含むかどうかを決定するために分析することができる。

【０１２３】

関心のある核酸は、供給源、核酸の性質、および類似する因子に依存して特定の方法を選択することにより、当技術分野においてよく知られている方法を使用して単離することができる。サンプル核酸は、純粋な形態をしている必要はないが、典型的に、実行されることとなる本明細書において記載される方法の増幅ステップを可能にするのに十分に純粋である。標的核酸がｍＲＮＡである場合、ＲＮＡは、当技術分野において知られており、たとえばＳａｍｂｒｏｏｋ，Ｊ．、Ｆｒｉｔｓｃｈ，Ｅ．Ｆ．、およびＭａｎｉａｔｉｓ，Ｔ．、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ．Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、ＮＹ、Ｖｏｌ．１、２、３（１９８９）において記載される標準的な方法によってｃＤＮＡに逆転写することができる。次いで、ｃＤＮＡは、本明細書において記載される方法に従って分析することができる。

【０１２４】

ある実施形態において、単一細胞を、適したＷＧＡ反応混合物に対して直接追加し、ＷＧＡを実行することができる。他の実施形態において、単一細胞のＲＮＡを、ＤＮＡ（たとえばｃＤＮＡ）に変換することができ、またはＲＮＡを直接増幅させることができる。

【０１２５】

断片化方法

いくつかの実施形態において、サンプルポリヌクレオチドが、１つ以上の特定のサイズ範囲（複数可）の断片化インサートＤＮＡ分子の集団に断片化される。いくつかの実施形態において、断片が、出発ＤＮＡの少なくとも約１、１０、１００、１０００、１００００、１０００００、３０００００、５０００００、またはそれ以上のゲノム等価物から生成される。断片化は、化学的、酵素的、および機械的な断片化を含む、当技術分野において知られている方法によって達成されてもよい。いくつかの実施形態において、断片が、約１０～約１０，０００ヌクレオチドの平均長を有する。いくつかの実施形態において、断片が、約５０～約２，０００ヌクレオチドの平均長を有する。いくつかの実施形態において、断片が、約１００～２，５００、１０～１，０００、１０～８００、１０～５００、５０～５００、５０～２５０、または５０～１５０ヌクレオチドの平均長を有する。いくつかの実施形態において、断片が、４００ヌクレオチド未満、３００ヌクレオチド未満、２００ヌクレオチド未満、または１５０ヌクレオチド未満などのような５００ヌクレオチド未満の平均長を有する。いくつかの実施形態において、断片化が、機械的に達成され、音波による超音波処理にサンプルポリヌクレオチドをかけることを含む。いくつかの実施形態において、断片化が、二本鎖核酸破壊を生成するために、１つ以上の酵素に適した

条件下で１つ以上の酵素によりサンプルポリヌクレオチドを処理することを含む。ポリヌクレオチド断片の生成において有用な酵素の例は、配列特異的および非配列特異的ヌクレアーゼを含む。ヌクレアーゼの非限定的な例は、ＤＮアーゼＩ、Ｆｒａｇｍｅｎｔａｓｅ、制限エンドヌクレアーゼ、その変異体、およびその組み合わせを含む。たとえば、ＤＮアーゼＩによる消化は、Ｍｇ＋＋の非存在下においておよびＭｎ＋＋の存在下において、ＤＮＡにおいてランダムな二本鎖の切れ目を誘発することができる。いくつかの実施形態において、断片化が、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼによりサンプルポリヌクレオチドを処理することを含む。断片化は、５’オーバーハング、３’オーバーハング、平滑末端、またはその組み合わせを有する断片を産生することができる。いくつかの実施形態において、断片化が、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼの使用を含む場合などのように、サンプルポリヌクレオチドの切断が、予測可能な配列を有するオーバーハングを残す。いくつかの実施形態において、方法が、カラム精製またはアガロースゲルからの単離などのような標準的な方法を介して断片をサイズ選択するステップを含む。酵素的および化学的方法の組み合わせなどのような断片化方法の組み合わせを利用することができる。特定の例において、塩基脱落部位が、たとえばグリコシラーゼ（ウラシル－ＤＮＡグリコシラーゼ、チミン－ＤＮＡグリコシラーゼなど）を使用して生成することができ、塩基脱落部位は、ジメチルエチレンジアミン（ＤＭＥＤ）と塩基脱落部位を接触させることによってなどのような化学的方法を使用して切断することができる。

【０１２６】

いくつかの実施形態において、断片化されたＤＮＡの５’および／または３’末端ヌクレオチド配列が、１つ以上のアダプターオリゴヌクレオチドとのライゲーション前に修飾されない。たとえば、制限エンドヌクレアーゼによる断片化は、予測可能なオーバーハングを残すために使用し、その後、ＤＮＡ断片上の予測可能なオーバーハングに対して相補的であるオーバーハングを含む１つ以上のアダプターオリゴヌクレオチドとのライゲーションを続けることができる。他の例において、予測可能な平滑末端を残す酵素による切断の後に、平滑末端を含むアダプターオリゴヌクレオチドに対する平滑末端のＤＮＡ断片のライゲーションを続けることができる。いくつかの実施形態において、断片化されたＤＮＡ分子が、アダプターに対して連結される前に、平滑末端を有するＤＮＡ断片を産生するために、平滑末端をポリッシュされる（ｂｌｕｎｔ－ｅｎｄ　ｐｏｌｉｓｈｅｄ）（または「末端修復される（ｅｎｄ　ｒｅｐａｉｒｅｄ）」）。平滑末端をポリッシュするステップは、３’→５’エキソヌクレアーゼ活性および５’→３’ポリメラーゼ活性の両方を有するＤＮＡポリメラーゼ、たとえばＴ４ポリメラーゼなどのような適した酵素とのインキュベーションによって達成されてもよい。いくつかの実施形態において、末端修復の後に、オーバーハングを産生するための、１つ以上のアデニン、１つ以上のチミン、１つ以上のグアニン、または１つ以上のシトシンなどのような、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上のヌクレオチドの追加が続く。オーバーハングを有するＤＮＡ断片は、ライゲーション反応においてなどのように、相補的なオーバーハングを有する１つ以上のアダプターオリゴヌクレオチドに対して連結することができる。たとえば、単一のアデニンを、鋳型非依存性のポリメラーゼを使用して、末端修復されたＤＮＡ断片の３’末端に対して追加し、その後、それぞれ３’末端にチミンを有する１つ以上のアダプターに対してライゲーションを続けることができる。いくつかの実施形態において、アダプターオリゴヌクレオチドを、１つ以上のヌクレオチドによる３’末端の伸長、その後に続く５’リン酸化によって修飾された平滑末端二本鎖ＤＮＡ断片分子に対して連結することができる。ある場合には、３’末端の伸長は、マグネシウムを含有する適したバッファーにおいて、１つ以上のｄＮＴＰの存在下において、たとえばＫｌｅｎｏｗポリメラーゼもしくは本明細書において提供される適したポリメラーゼのいずれかなどのようなポリメラーゼによりまたは末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼの使用によって、実行されてもよい。いくつかの実施形態において、平滑末端を有する標的ポリヌクレオチドが、平滑末端を含む１つ以上のアダプターに対して連結される。ＤＮＡ断片分子の５’末端のリン酸化は、たと

えば、ＡＴＰおよびマグネシウムを含有する適したバッファーにおいてＴ４ポリヌクレオチドキナーゼにより実行されてもよい。断片化されたＤＮＡ分子は、たとえば、ホスファターゼなどのような当技術分野において知られている酵素の使用によって、５’末端または３’末端を脱リン酸化するために任意選択で処理されてもよい。

【０１２７】

いくつかの実施形態において、それぞれの複数の独立したサンプルが、少なくとも約１ｐｇ、１０ｐｇ、１００ｐｇ、１ｎｇ、１０ｎｇ、２０ｎｇ、３０ｎｇ、４０ｎｇ、５０ｎｇ、７５ｎｇ、１００ｎｇ、１５０ｎｇ、２００ｎｇ、２５０ｎｇ、３００ｎｇ、４００ｎｇ、５００ｎｇ、１μｇ、１．５μｇ、２μｇ、またはそれ以上の核酸物質を含む。いくつかの実施形態において、それぞれの複数の独立したサンプルが、約１ｐｇ、１０ｐｇ、１００ｐｇ、１ｎｇ、１０ｎｇ、２０ｎｇ、３０ｎｇ、４０ｎｇ、５０ｎｇ、７５ｎｇ、１００ｎｇ、１５０ｎｇ、２００ｎｇ、２５０ｎｇ、３００ｎｇ、４００ｎｇ、５００ｎｇ、１μｇ、１．５μｇ、２μｇ、またはそれ以上より少ない核酸を含む。

【０１２８】

いくつかの実施形態において、それぞれの個々のまたは複数のサンプルが、単一のポリヌクレオチド標的または単一のゲノムを含む。

【０１２９】

他の態様において、本発明は、上記に記載される方法において使用することができる組成物を提供する。本発明の組成物は、本明細書において記載される、任意の１つ以上のエレメントを含むことができる。一実施形態において、組成物が、複数の標的ポリヌクレオチドを含み、それぞれの標的ポリヌクレオチドが、複数のバーコード配列から選択される１つ以上のバーコード配列を含み、前記標的ポリヌクレオチドが、２つ以上の異なるサンプル由来のものであり、さらに、それぞれの前記ポリヌクレオチドが由来するサンプルを、前記標的ポリヌクレオチドの配列中に含有される単一のバーコードに基づいて、少なくとも９５％の精度で、組み合わせられたシークエンシング反応において同定することができる。いくつかの実施形態において、組成物が、複数の第１のアダプター／プライマーオリゴヌクレオチドを含み、それぞれの前記第１のアダプター／プライマーオリゴヌクレオチドが、複数のバーコード配列のうちの少なくとも１つを含み、複数のバーコード配列のそれぞれのバーコード配列が、少なくとも３つのヌクレオチド位置で、前記複数のバーコード配列においてすべての他のバーコード配列と異なる。

【０１３０】

増幅の方法

本明細書において記載される方法、組成物、およびキットは、超並列シークエンシングプラットフォームまたはハイブリダイゼーションプラットフォームなどのような下流の適用のための増幅対応の産物を生成するのに有用になり得る。増幅の方法は、当技術分野においてよく知られている。いくつかの実施形態において、増幅が、たとえばポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によるＤＮＡの特異的二本鎖配列の酵素的増幅において指数関数的である。他の実施形態において、増幅方法が、線形である。他の実施形態において、増幅方法が、等温である。

【０１３１】

したがって、本明細書において記載される方法、組成物、およびキットは、高密度ｑＰＣＲアレイおよび他の高度並列定量化プラットフォーム（選択的超並列標的予備増幅）によってなどのように、超並列シークエンシング（次世代シークエンシング方法）、関心のある配列領域の大きなセットの多重定量化などのような、下流の適用のためのゲノムＤＮＡまたは全もしくは部分的トランスクリプトームＲＮＡから直接、増幅対応の産物を生成するのに、ならびに関心のある配列領域の濃縮された集団を有するライブラリーの生成に有用になり得ることが理解される。本明細書において記載される方法は、複数のオリゴヌクレオチドを使用して、複雑なＤＮＡのサンプルから直接、少なくとも２５、５０、７５、１００、５００、１０００、２５００、５０００、１０，０００、２５，０００、５０，０００、１００，０００、５００，０００、または１，０００，０００の関心のある増

幅対応の標的配列領域の集合体を生成するために使用することができる。
【０１３２】
核酸増幅の方法は、当技術分野においてよく知られている。いくつかの実施形態において、増幅方法が、等温である。他の実施形態において、増幅方法が、線形である。他の実施形態において、増幅が、指数関数的である。
【０１３３】
増幅
いくつかの実施形態において、増幅方法が、当業者によって認識されるように、固相増幅、ポロニー増幅、コロニー増幅、エマルションＰＣＲ、ビーズＲＣＡ、表面ＲＣＡ、表面ＳＤＡなどとすることができる。いくつかの実施形態において、溶液中のまたはＤＮＡ分子の一方の末端のみによって適したマトリックスに対してつながれた遊離ＤＮＡ分子の増幅をもたらす増幅方法を、使用することができる。両方のＰＣＲプライマーが表面に対して付加されるブリッジＰＣＲに依存する方法（たとえば国際公開第２０００／０１８９５７号パンフレットおよびＡｄｅｓｓｉら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２０００）：２８（２０）：Ｅ８７を参照されたい）を、使用することができる。ある場合には、本発明の方法は、同一のアンプリコンの空間的なクラスタリングを維持するマルチプレックス増幅に適用される「ポリメラーゼコロニー技術」または「ポロニー」を作ることができる（Ｈａｒｖａｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ ａｎｄ Ｌｉｐｐｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｇｅｎｅｔｉｃｓのウェブサイトを参照されたい）。これらは、たとえばインサイツポロニー（Ｍｉｔｒａ ａｎｄ Ｃｈｕｒｃｈ、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２７、ｅ３４、Ｄｅｃ．１５、１９９９）、インサイツローリングサークル増幅（ｒｏｌｌｉｎｇ ｃｉｒｃｌｅ ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）（ＲＣＡ）（Ｌｉｚａｒｄｉら、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １９、２２５、Ｊｕｌｙ １９９８）、ブリッジＰＣＲ（米国特許第５，６４１，６５８号）、ピコタイターＰＣＲ（ｐｉｃｏｔｉｔｅｒ ＰＣＲ）（Ｌｅａｍｏｎら、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ ２４、３７６９、Ｎｏｖｅｍｂｅｒ ２００３）、およびエマルションＰＣＲ（Ｄｒｅｓｓｍａｎら、ＰＮＡＳ １００、８８１７、Ｊｕｌ．２２、２００３）を含む。
【０１３４】
本発明の方法は、インプット核酸鋳型に対して１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせるステップをさらに含み得る。鋳型は、１つ以上の非標準ヌクレオチドを任意選択で含むことができる。ある場合には、オリゴヌクレオチドプライマーは、たとえば、ランダムな二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、十一量体、十二量体、十三量体、十四量体、またはそれ以上などのような、ランダムヌクレオチドを含むハイブリダイズ部分を含んでいてもよい。他の場合において、ハイブリダイズ部分は、ｐｏｌｙＴ配列などのような非ランダム配列を含んでいてもよい。さらに他の場合において、オリゴヌクレオチドプライマーのうちのいくつかのハイブリダイズ部分は、ランダムヌクレオチドを含んでいてもよいが、ヌクレオチドのうちのいくつかのハイブリダイズ部分は、ｐｏｌｙＴまたは「それほどランダムではない配列」などのような非ランダム配列を含んでいてもよい。ある場合には、オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズ部分は、たとえば、全ｍＲＮＡまたはその実質的な画分などのような所望の配列にランダムにまたは擬似ランダムに（ｐｓｅｕｄｏ－ｒａｎｄｏｍｌｙ）プライミングするが、ｒＲＮＡなどのような望まれない配列にプライミングしない配列のプールなどのような、「それほどランダムではない配列」を含んでいてもよい。
【０１３５】
本明細書において使用される「ランダムプライマー」は、必ずしもサンプル中の特定のまたは特異的な配列に基づいてではなく、ランダムプライマーの配列がサンプル中の１つ以上の配列に対して（ある所定の条件下で）ハイブリダイズすることができるという統計的な期待（または経験的観察）に基づいて設計される配列を一般に含むプライマーとすることができる。ランダムプライマーは、一般に、オリゴヌクレオチド上の所定の位置のヌ

クレオチドが４つのヌクレオチドのいずれかまたは４つのヌクレオチドの選択されるグループのいずれかとすることができるランダム配列（複数可）を含むオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの集団とすることができる（たとえば４つのヌクレオチドの３つのみまたは４つのヌクレオチドのうちの２つのみ）。ある場合には、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの集団の位置のすべてを、４つのヌクレオチドのいずれかとすることができ、他の場合において、オリゴヌクレオチドの、位置の一部分のみ、たとえば特定の領域が、４つの塩基のいずれかとすることができる位置を含むであろう。ある場合には、４つの塩基のいずれかとすることができる位置を含むオリゴヌクレオチドの一部分は、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、または約１５～２０ヌクレオチド長である。ある場合には、４つの塩基のいずれかとすることができる位置を含むオリゴヌクレオチドの一部分は、約５～２０、５～１５、５～１０、４～８、１０～２０、１５～２０、または１０～１５ヌクレオチド長である。ある場合には、ランダムプライマーは、ランダム配列を含む３’領域および特異的な非ランダム配列を含む非ハイブリダイズ配列である５’領域を有するテイルドプライマーを含んでいてもよい。３’領域はまた、ｐｏｌｙ－Ｔ配列を含む領域と組み合わせたランダム配列を含んでいてもよい。ランダムプライマー（またはその相補体）の配列は、天然に存在してもよくもしくは天然に存在しなくてもよくまたは関心のあるサンプル中の配列のプール中に存在してもよくもしくは存在しなくてもよい。単一の反応混合物における複数のＲＮＡ種の増幅は、必ずではないが、一般に、多数のまたは非常に多数のランダムプライマーを用いるであろう。当技術分野において十分に理解されるように、「ランダムプライマー」はまた、所望のおよび／またはかなりの数の標的配列に対してハイブリダイズするようにひとまとめにして設計される、プライマーの集団（複数のランダムプライマー）のうちのメンバーであるプライマーを指すこともできる。ランダムプライマーは、核酸配列上の複数の部位でハイブリダイズしてもよい。ランダムプライマーの使用は、標的の厳密な配列の予備的知識を必要としない標的ポリヌクレオチドに対して相補的なプライマー伸長産物を生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、プライマーのある部分が、ランダムであり、プライマーの他の部分が、定められた配列を含む。たとえば、いくつかの実施形態において、プライマーの５’部分が、定められた配列を含むが、プライマーの３’部分が、ランダム配列を含むであろう。いくつかの実施形態において、プライマーの３’ランダム部分が、ＤＮＡを含むであろう、また、プライマーの５’部分の定められた部分が、ＲＮＡを含むであろう；他の実施形態において、３’および５’部分の両方が、ＤＮＡを含むであろう。いくつかの実施形態において、５’部分が、定められた配列を含有するであろう、また、３’部分が、サンプル（すべてのｍＲＮＡなど）における多数のＲＮＡに対してハイブリダイズすることができるｐｏｌｙ－ｄＴ配列を含むであろう。

【０１３６】

オリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズ部分は、たとえば１；２；３；４；５；６；７；８；９；１０；１１；１２；１３；１４；１５；１６；１７；１８；１９；２０；２５；３０；３５；４０；４５；５０；５５；６０；７５；１００；１５０；２００；２５０；３００；４００；５００；６００；７５０；１０００；１０，０００；１５，０００；２０，０００；２５，０００；３０，０００；４０，０００；５０，０００；６０，０００；７５，０００；１００，０００；１５０，０００；２００，０００；２５０，０００、またはそれ以上の配列または断片などのような、分析されることとなる多くの配列または断片に対してハイブリダイズする、ハイブリダイズ部分のプールを含んでいてもよい。ある場合には、それぞれの断片は、１つのプライマーに対してハイブリダイズされてもよく、他の場合において、それぞれの断片は、平均して、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、またはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーに対してハイブリダイズされる。本発明の方法に適したオリゴヌクレオチドプライマーは、本明細書において提供される。

【０１３７】

オリゴヌクレオチドプライマーは、それらがハイブリダイズするインプット核酸鋳型に

沿って伸長されてもよい。ある場合には、伸長は、たとえば、鎖置き換え活性を含むポリメラーゼを含む、本明細書において提供されるポリメラーゼのいずれかなどのようなポリメラーゼにより実行されてもよい。本発明の方法に適した例示的なＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼは、３’エキソヌクレアーゼを有するまたは有していないＫｌｅｎｏｗポリメラーゼ、Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｂｃａポリメラーゼ、φ２９　ＤＮＡポリメラーゼ、Ｖｅｎｔポリメラーゼ、Ｄｅｅｐ　Ｖｅｎｔポリメラーゼ、Ｔａｑポリメラーゼ、Ｔ４ポリメラーゼ、および大腸菌ＤＮＡポリメラーゼ１、その誘導体、またはポリメラーゼの混合物を含むが、これらに限定されない。ある場合には、ポリメラーゼは、５’エキソヌクレアーゼ活性を含まない。他の場合において、ポリメラーゼは、５’エキソヌクレアーゼ活性を含む。ある場合には、本発明のプライマー伸長は、たとえばＢｓｔポリメラーゼなどのような強い鎖置き換え活性を含むポリメラーゼを使用して実行されてもよい。他の場合において、本発明のプライマー伸長は、弱い鎖置き換え活性を含むまたは鎖置き換え活性を含まないポリメラーゼを使用して実行されてもよい。当業者は、プライマー伸長ステップの間の鎖置き換え活性の使用の利点および不利ならびにどのポリメラーゼが鎖置き換え活性を提供することが期待され得るか（たとえばＮｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅｓを参照されたい）を認識してもよい。たとえば、鎖置き換え活性は、ランダムプライミングおよび伸長ステップの間に全ゲノムまたは全トランスクリプトームカバー度を確かめるのに有用であってもよい。鎖置き換え活性は、プライミングおよび伸長ステップの間の二本鎖増幅産物の生成においてさらに有用であり得る。あるいは、弱い鎖置き換え活性を含むまたは鎖置き換え活性を含まないポリメラーゼは、鋳型核酸に対してハイブリダイズするプライマーハイブリダイゼーションおよび伸長の間の一本鎖核酸産物の生成において有用であってもよい。

【０１３８】

「ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼ」または「逆転写酵素」（「ＲＴ」）は、ＲＮＡ鋳型から相補的ＤＮＡコピーを合成する酵素である。すべての知られている逆転写酵素はまた、ＤＮＡ鋳型から相補的ＤＮＡコピーを作製する能力をも有し、したがって、それらは、ＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼでもあり、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼでもある。逆転写酵素はまた、ＲＮアーゼ　Ｈ活性を有していてもよい。逆転写酵素のいくつかの例は、マローニマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ－ＲＴ）、トリ骨髄芽球症ウイルス、レトロウイルス逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、Ｂ型肝炎逆転写酵素、カリフラワーモザイクウイルス逆転写酵素、細菌逆転写酵素、大腸菌ＤＮＡポリメラーゼおよびｋｌｅｎｏｗ断片、ならびにＴｔｈ　ＤＮＡポリメラーゼに由来する逆転写酵素である。プライマーは、ＲＮＡおよびＤＮＡ鋳型の両方により合成を開始するために使用することができる。他の例において、ＤＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼがまた、Ｋｌｅｎｏｗポリメラーゼ、Ｂｓｔ　ＤＮＡポリメラーゼ、およびその他同種のものなどのようなＲＮＡ依存性ＤＮＡポリメラーゼを含んでいてもよい。

【０１３９】

少なくとも一部分が、ランダムハイブリダイズ部分、非ランダムハイブリダイズ部分、それほどランダムではないハイブリダイズ部分、またはその組み合わせを含んでいてもよい、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーの、鎖置き換え活性を含むポリメラーゼによる伸長は、二本鎖核酸産物断片の生成をもたらしてもよい。いくつかの場合において、鎖置き換え活性を含むポリメラーゼによる、少なくとも一部分がランダムハイブリダイズ部分を含む、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長は、重合反応において産生された二本鎖核酸断片産物および１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーにハイブリダイズした鋳型核酸を含む二本鎖分子の混合物を含む二本鎖核酸産物を産生してもよい。

【０１４０】

鋳型が１つ以上の非標準ヌクレオチドを含有する実施形態において、プライマー伸長反応の産物、たとえば一本鎖もしくは二本鎖、部分的二本鎖、またはその混合物は、鋳型核酸が１つ以上の非標準ヌクレオチドを含むのに対して、プライマー伸長反応の産物が非標

準ヌクレオチドを含まないまたは同じ１つ以上の非標準ヌクレオチドを含まないという点で、鋳型核酸と識別されてもよい。ある場合には、プライマー伸長反応の二本鎖産物は、１つ以上の非標準ヌクレオチドを含む鋳型核酸の単鎖および１つ以上の非標準ヌクレオチドを含まないまたは同じ１つ以上の非標準ヌクレオチドを含まないプライマー伸長産物の単鎖のハイブリッド二重鎖を含む。他の場合において、プライマー伸長反応の二本鎖産物は、どちらの鎖も１つ以上の非標準ヌクレオチドを含まないまたはどちらの鎖も鋳型核酸と同じ１つ以上の非標準ヌクレオチドを含まない２つの鎖を含む。

【０１４１】

ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長は、適した期間、実行されてもよい。伸長反応についての期間は、概して、数秒間～数分間～数時間であってもよい。たとえば、伸長ステップは、約５分間～約２４時間の期間、伸長反応に適した温度（たとえば１５℃～８０℃）での、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーとの、本明細書において提供される反応混合物などのような反応混合物中でのインプット核酸鋳型のインキュベーションを含んでいてもよい。他の適した伸長時間は、約１分間～約８時間、約２分間～約７時間、約３分間～約６時間、約４分間～約５時間、約５分間～約４時間、約５分間～約３時間、約５分間～約２時間、約１０分間～約２時間、約１５分間～約２時間、約２０分間～約２時間、約３０分間～約２時間、または約３０分間～約１時間を含む。さらに他の適した伸長時間は、１分間、２分間、３分間、４分間、５分間、６分間、７分間、８分間、９分間、１０分間、１２分間、１５分間、２０分間、３０分間、４５分間、６０分間、１時間、１．５時間、２時間、２．５時間、３時間、３．５時間、４時間、またはそれ以上を含む。さらに他の適した伸長時間は、約１分間、２分間、３分間、４分間、５分間、６分間、７分間、８分間、９分間、１０分間、１２分間、１５分間、２０分間、３０分間、４５分間、６０分間、１時間、１．５時間、２時間、２．５時間、３時間、３．５時間、４時間、またはそれ以上を含む。

【０１４２】

伸長ステップは、ヌクレオチド、標識ヌクレオチド、またはその組み合わせを含む反応混合物において実行されてもよい。たとえば、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドは、ｄＮＴＰおよびアミノアリルｄＮＴＰの混合物の存在下において、インプット核酸鋳型に沿って、鎖置き換え活性を含むポリメラーゼまたは弱い鎖置き換え活性を含むもしくは鎖置き換え活性を含まないポリメラーゼなどのような、１つ以上のポリメラーゼによって伸長されてもよい。アミノアリルｄＮＴＰの使用は、二本鎖ＤＮＡ断片産物などのような伸長反応の産物のさらなる標識および修飾を可能にしてもよい。たとえば、アミノアリルｄＮＴＰは、ビオチン化、フルオレセイン化（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎａｔｉｏｎ）、Ｃｙ色素による標識（たとえばＣｙ３もしくはＣｙ５）、または当技術分野において知られている任意の他の核酸修飾を提供してもよい。標識（たとえばフルオロフォア、発色団、ビオチン、抗体、抗原、またはアルカリ性ホスファターゼもしくはホースラディッシュペルオキシダーゼなどのような酵素）の共有結合または非共有結合による増幅後標識に適している他の修飾ヌクレオチドもまた、適用可能であり、たとえば、米国特許第６１７２２０９号、米国特許第５６７９７８５号、および米国特許第５６２３０７０号において記載されるチオ、ホスホロチオ、およびアミノ修飾ヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドまたは本明細書において提供される任意の他の修飾ヌクレオチドを含む。

【０１４３】

ＳＰＩＡ増幅

単一プライマー等温増幅（ＳＰＩＡ）などのような線形増幅方法を用いる関心のある配列領域の増幅を使用することができる。ＳＰＩＡは、関心のある鎖特異的配列領域の複数のコピーの生成を可能にし、単一増幅プライマーを用い、複数のオリゴヌクレオチド設計および製造に関連する複雑さを低下させ、一般的な増幅プライマーの使用を可能にし、線形となり得る。複雑なゲノムのＮＡサンプルにおける関心のある配列領域のコピー数の定量化の忠実度は、本発明の提起される方法の非常に望ましい特色である。

【０１４４】

ＳＰＩＡによる増幅は、複合プライマーハイブリダイゼーション、鎖置き換え活性を有するＤＮＡポリメラーゼによるプライマー伸長、ＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二重鎖からのＲＮＡの切断、および鎖置き換えを可能にする条件下で生じ得る。複合増幅プライマーが、複合増幅プライマー配列の少なくとも１つの部分の相補体を一般に含む３’一本鎖部分（ＲＮＡ／ＤＮＡ部分的ヘテロ二重鎖を含む複合体におけるＲＮＡの切断によって形成される部分的に二本鎖ポリヌクレオチドの）にハイブリダイズする限り、複合プライマーハイブリダイゼーションは、特異的なハイブリダイゼーションを可能にする条件下にあり得る。ＳＰＩＡにおいて、ステップはすべて、等温である（熱サイクルが必要とされないという意味で）が、ステップのそれぞれについての温度は、同じであってもよくまたは同じでなくてもよい。様々な他の実施形態が、上記に提供される一般的な説明を考慮して、実施することができることが理解される。たとえば、本明細書において記載され、例証されるように、あるステップは、温度を変化させて（たとえば上げてまたは低くして）、実行されてもよい。

【０１４５】

一般に、１つの複合増幅プライマーのみが上記に記載されるが、ＳＰＩＡ増幅方法は、鋳型ポリヌクレオチドにランダムにプライミングする２つ以上の異なる第１のおよび／または第２の複合プライマーの存在下において実行することができることがさらに理解される。そのうえ、鋳型ポリヌクレオチドにランダムにプライミングする、２つ以上の異なる第１のおよび／または第２の複合プライマーを使用して行われた２つ以上の個別の増幅反応の増幅ポリヌクレオチド産物は、組み合わせることができる。

【０１４６】

複合増幅プライマーは、ＲＮＡおよびＤＮＡ部分から構成されるプライマーである。増幅複合プライマーにおいて、ＲＮＡおよびＤＮＡ部分の両方は、一般に、コピーされるまたは増幅されることとなる、増幅対応の産物中の配列に対して相補的であり、ハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、増幅複合プライマーの３’部分が、ＤＮＡであり、複合増幅プライマーの５’部分が、ＲＮＡである。複合増幅プライマーは、プライマーが、３’ＤＮＡ部分から伸長されて、プライマー伸長産物を作るように設計される。ＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二重鎖におけるこのプライマー伸長産物の５’ＲＮＡ部分は、ＲＮアーゼ　Ｈによる切断に対して弱く、したがって、さらなる複合増幅プライマーのハイブリダイゼーションに対してポリヌクレオチドの一部分を解放する。鎖置き換え活性を有するＤＮＡポリメラーゼによる増幅複合プライマーの伸長は、もとのプライマーからプライマー伸長産物を放出させ、ポリヌクレオチドの配列の他のコピーを作る。プライマーハイブリダイゼーション、鎖置き換えＤＮＡ合成によるプライマー伸長、およびＲＮＡ切断の繰り返しにより、ポリヌクレオチドの鎖特異的配列の複数のコピーを作る。

【０１４７】

いくつかの実施形態において、複合増幅プライマーが、ステムループキメラプロプライマー（ｐｒｏ－ｐｒｉｍｅｒ）から増幅反応混合物において生成される。増幅反応混合物は、標的部分的二重鎖核酸、たとえば、標的部分的二重鎖ＤＮＡ、キメラステムループプロプライマー、鎖置き換え活性を有するＤＮＡポリメラーゼ、およびＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二重鎖におけるＲＮＡを標的にするＲＮアーゼ、たとえばＲＮアーゼ　Ｈを含むことができる。キメラステムループプロプライマーのステムのＲＮＡ／ＤＮＡヘテロ二重鎖のＲＮＡ部分は、ＲＮアーゼ　Ｈによって切断し、たとえば、３’ＤＮＡおよび５’ＲＮＡを含む線形複合プライマーを生成することができる。線形化された増幅プライマーは、標的部分的二重鎖の３’一本鎖ＤＮＡ部分（オーバーハング）に対してハイブリダイズすることができ、鎖置き換え活性を有するＤＮＡポリメラーゼによって伸長させることができる。ヘテロ二重鎖におけるハイブリダイズしたプライマーのＲＮＡ部分は、ＲＮアーゼ　Ｈによって切断し、プライマー結合部位の一部分を解放することができる。第２の線形複合増幅プライマーは、解放されたプライマー結合部位にハイブリダイズすることができ、標的ＤＮＡ鎖に沿って伸長させることができる。以前に合成されたプライマー伸長産物（増幅産物）は、新しく伸長されるプライマーによって置き換えることができる。プライマー

ハイブリダイゼーション、鎖置き換えＤＮＡポリメラーゼによるプライマー伸長、およびハイブリダイズしたプライマーのＲＮＡ部分の切断のサイクルの繰り返しにより、標的核酸の複数のコピーを生成することができる。

【０１４８】

他の増幅方法

本発明のいくつかの態様は、ポリヌクレオチド分子またはポリヌクレオチド分子内の配列の増幅を含む。増幅は、一般に、核酸もしくはポリヌクレオチド分子の１つ以上のコピーの形成または核酸もしくはポリヌクレオチド分子の相補体の１つ以上のコピーの形成をもたらすことができる方法を指す。たとえば、増幅は、固体表面に対して結合されたポリヌクレオチドを増幅するまたは分析するために本発明において使用することができる。たとえば、アーカイブに保存されたポリヌクレオチドを分析するために、サンプルをアーカイブに保存した後に、増幅を実行することができる。

【０１４９】

本発明のいくつかの態様において、核酸またはポリヌクレオチドの指数関数的な増幅が、使用される。これらの方法は、多くの場合、核酸またはポリヌクレオチド分子またはその相補体の複数のコピーの産物触媒形成に依存する。増幅産物は、時に、「アンプリコン」と呼ばれる。ＤＮＡの特異的二本鎖配列の酵素的増幅のためのそのような１つの方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）である。このインビトロ増幅手順は、変性、オリゴヌクレオチドプライマーアニーリング、および好熱性鋳型依存性ポリヌクレオチドポリメラーゼによるプライマー伸長のサイクルの繰り返しに基づき、プライマーが側面に位置するポリヌクレオチド分析物の所望の配列のコピーにおける指数関数的な増加をもたらす。ＤＮＡの反対の鎖に対してアニールする２つの異なるＰＣＲプライマーは、一方のプライマーのポリメラーゼ触媒伸長産物が、他方のための鋳型鎖となり得、長さがオリゴヌクレオチドプライマーの５’末端の間の距離によって定められる個別の二本鎖断片の蓄積に至るように、位置する。提供される本発明の方法において使用することができる他の増幅技術は、たとえば、ＡＦＬＰ（増幅断片長多型）ＰＣＲ（たとえばＶｏｓら　１９９５．ＡＦＬＰ：ａ　ｎｅｗ　ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ　ｆｏｒ　ＤＮＡ　ｆｉｎｇｅｒｐｒｉｎｔｉｎｇ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２３：４４０７－１４を参照されたい）、対立遺伝子特異的ＰＣＲ（たとえばＳａｉｋｉ　Ｒ　Ｋ、Ｂｕｇａｗａｎ　Ｔ　Ｌ、Ｈｏｒｎ　Ｇ　Ｔ、Ｍｕｌｌｉｓ　Ｋ　Ｂ、Ｅｒｌｉｃｈ　Ｈ　Ａ（１９８６）．Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｅｎｚｙｍａｔｉｃａｌｌｙ　ａｍｐｌｉｆｉｅｄ　ｂｅｔａ－ｇｌｏｂｉｎ　ａｎｄ　ＨＬＡ－ＤＱ　ａｌｐｈａ　ＤＮＡ　ｗｉｔｈ　ａｌｌｅｌｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　ｐｒｏｂｅｓ　Ｎａｔｕｒｅ　３２４：１６３－１６６を参照されたい）、Ａｌｕ　ＰＣＲ、アセンブリーＰＣＲ（たとえばＳｔｅｍｍｅｒ　Ｗ　Ｐ、Ｃｒａｍｅｒｉ　Ａ、Ｈａ　Ｋ　Ｄ、Ｂｒｅｎｎａｎ　Ｔ　Ｍ、Ｈｅｙｎｅｋｅｒ　Ｈ　Ｌ（１９９５）．Ｓｉｎｇｌｅ－ｓｔｅｐ　ａｓｓｅｍｂｌｙ　ｏｆ　ａ　ｇｅｎｅ　ａｎｄ　ｅｎｔｉｒｅ　ｐｌａｓｍｉｄ　ｆｒｏｍ　ｌａｒｇｅ　ｎｕｍｂｅｒｓ　ｏｆ　ｏｌｉｇｏｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ　Ｇｅｎｅ　１６４：４９－５３を参照されたい）、非対称ＰＣＲ（たとえばＳａｉｋｉ　Ｒ　Ｋ前掲を参照されたい）、コロニーＰＣＲ、ヘリカーゼ依存性ＰＣＲ（たとえばＭｙｒｉａｍ　Ｖｉｎｃｅｎｔ、Ｙａｎ　Ｘｕ　ａｎｄ　Ｈｕｉｍｉｎ　Ｋｏｎｇ（２００４）．Ｈｅｌｉｃａｓｅ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ｉｓｏｔｈｅｒｍａｌ　ＤＮＡ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ＥＭＢＯ　ｒｅｐｏｒｔｓ　５（８）：７９５－８００を参照されたい）、ホットスタートＰＣＲ、インバースＰＣＲ（たとえばＯｃｈｍａｎ　Ｈ、Ｇｅｒｂｅｒ　Ａ　Ｓ、Ｈａｒｔｌ　Ｄ　Ｌ．Ｇｅｎｅｔｉｃｓ．１９８８　Ｎｏｖｅｍｂｅｒ；１２０（３）：６２１－３を参照されたい）、インサイツＰＣＲ、配列間特異的ＰＣＲ（ｉｎｔｅｒｓｅｑｕｅｎｃｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ＰＣＲ）もしくはＩＳ　ＳＲ　ＰＣＲ、デジタルＰＣＲ、線形後指数関数的ＰＣＲ（ｌｉｎｅａｒ－ａｆｔｅｒ－ｔｈｅ－ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ－ＰＣＲ）もしくはＬａｔｅ　ＰＣＲ（たとえばＰｉｅｒｃｅ　Ｋ　Ｅ　ａｎｄ　Ｗａｎｇｈ　Ｌ　Ｔ（２００７）．Ｌｉｎｅａｒ－ａｆｔｅｒ－ｔｈｅ－

ｅｘｐｏｎｅｎｔｉａｌ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｃｈａｉｎ　ｒｅａｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　ａｌｌｉｅｄ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ　ｆｏｒ　ｒａｐｉｄ，ｒｅｌｉａｂｌｅ　ｄｉａｇｎｏｓｉｓ　ｆｒｏｍ　ｓｉｎｇｌｅ　ｃｅｌｌｓ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．１３２：６５－８５を参照されたい）、ロングＰＣＲ（ｌｏｎｇ　ＰＣＲ）、ネステッドＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、二重鎖ＰＣＲ、マルチプレックスＰＣＲ、定量的ＰＣＲ、または単一細胞ＰＣＲを含む。

【０１５０】

　増幅のための他の方法は、単一のオリゴヌクレオチドプライマーを使用する、一本鎖ポリヌクレオチドの増幅を含む。増幅されることとなる一本鎖ポリヌクレオチドは、互いに実質的にまたは完全に相補的であり、したがって、互いにハイブリダイズすることができ、ステムループ構造を形成する２つの非隣接配列を含有する。この一本鎖ポリヌクレオチドは、既にポリヌクレオチド分析物の一部であってもよくまたはポリヌクレオチド分析物の存在の結果として作られてもよい。

【０１５１】

　核酸の増幅の結果を実現する他の方法は、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）として知られている。この方法は、あらかじめ形成された核酸プローブのペアを連結するためにリガーゼ酵素を使用する。プローブは、核酸分析物が存在する場合、核酸分析物のそれぞれの相補鎖とハイブリダイズし、リガーゼは、プローブのそれぞれの対を互いに結合するために用いられ、次のサイクルにおいて特定の核酸配列を反復するのに役立ち得る２つの鋳型をもたらす。

【０１５２】

　核酸増幅を実現する他の方法は、核酸配列ベースの増幅（ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ　ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ｂａｓｅｄ　ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ）（ＮＡＳＢＡ）である。この方法は、特異的な核酸のインビトロにおける連続の、均質な等温増幅を誘発して、核酸のＲＮＡコピーをもたらす、プロモーター指向性の酵素的プロセスである。ＮＡＳＢＡを行うための試薬は、プロモーターを含む５’テイルを有する第１のＤＮＡプライマー、第２のＤＮＡプライマー、逆転写酵素、ＲＮアーゼーＨ、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼ、ＮＴＰ、およびｄＮＴＰを含む。

【０１５３】

　核酸の特異的なグループを増幅する他の方法は、Ｑベータレプリカーゼ方法であり、これは、Ｑベータレプリカーゼがその ＲＮＡ基質を指数関数的に増幅する能力に依存する。そのような増幅を行うための試薬は、「ミディ変異ＲＮＡ（ｍｉｄｉ－ｖａｒｉａｎｔ　ＲＮＡ）」（増幅可能なハイブリダイゼーションプローブ）、ＮＴＰ、およびＱベータレプリカーゼを含む。

【０１５４】

　核酸を増幅するための他の方法は、３ＳＲとして知られており、ＲＮアーゼーＨ活性が逆転写酵素中に存在するという点を除いて、ＮＡＳＢＡに類似する。３ＳＲによる増幅は、ＲＮＡ特異的標的方法であり、それによって、ＲＮＡは、プロモーター指向性ＲＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、およびＲＮアーゼ　Ｈを標的ＲＮＡと組み合わせる等温プロセスにおいて増幅される。たとえばＦａｈｙら　ＰＣＲ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ａｐｐｌ．１：２５－３３（１９９１）を参照されたい。

【０１５５】

　核酸を増幅する他の方法は、Ｇｅｎ－Ｐｒｏｂｅによって使用される転写媒介性増幅（ＴＭＡ）である。方法は、自立した配列複製において２つの酵素を利用する点でＮＡＳＢＡに類似する。参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第５，２９９，４９１号を参照されたい。

【０１５６】

　核酸の増幅のための他の方法は、鎖置き換え増幅（ＳＤＡ）であり（Ｗｅｓｔｉｎら　２０００、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１８、１９９－２０２；Ｗａｌ

ｋｅｒら　１９９２、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ、２０、７、１６９１−１６９６）、これは、ＨｉｎｃＩＩまたはＢｓｏＢＩなどのような制限エンドヌクレアーゼがその認識部位のヘミホスホロチオエート（ｈｅｍｉｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅ）形態の未修飾鎖にニックを入れる能力およびＫｌｅｎｏｗエキソマイナスポリメラーゼまたはＢｓｔポリメラーゼなどのようなエキソヌクレアーゼ欠損ＤＮＡポリメラーゼがニックで３’末端を伸長させ、下流のＤＮＡ鎖を置き換える能力に基づく等温増幅技術である。指数関数的な増幅は、センス反応から置き換えられた鎖がアンチセンス反応のための標的となり、逆もまた同様である、センス反応およびアンチセンス反応のカップルから結果として生じる。

【０１５７】

核酸の増幅のための他の方法は、ローリングサークル増幅（ＲＣＡ）である（Ｌｉｚａｒｄｉら　１９９８、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ、１９：２２５−２３２）。ＲＣＡは、核酸の環の形をしている一本鎖分子を増幅するために使用することができる。その最も単純な形態において、ＲＣＡは、環状核酸に対する単一プライマーのハイブリダイゼーションを含む。鎖置き換え活性を有するＤＮＡポリメラーゼによるプライマーの伸長は、単一ＤＮＡ鎖とひとつながりの環状核酸の複数のコピーの生成をもたらす。

【０１５８】

本発明のいくつかの実施形態において、ＲＣＡが、ライゲーションとカップルされる。たとえば、単一のオリゴヌクレオチドは、ライゲーションのためにも、ＲＣＡのための環状鋳型としても使用することができる。この種のポリヌクレオチドは、「パドロックプローブ」または「ＲＣＡプローブ」と呼ぶことができる。パドロックプローブについては、オリゴヌクレオチドの両方の末端は、関心のある核酸配列内のドメインに対して相補的な配列を含有する。パドロックプローブの第１の末端は、関心のある核酸配列上の第１のドメインに対して実質的に相補的であり、パドロックプローブの第２の末端は、第２のドメインに対して実質的に相補的であり、第１のドメインの近くで第１のドメインに対して隣接している。標的核酸に対するオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション複合体の形成をもたらす。パドロックプローブの末端のライゲーションは、環状ポリヌクレオチドを含有する修飾ハイブリダイゼーション複合体の形成をもたらす。ある場合には、ライゲーション前に、ポリメラーゼがパドロックプローブの一方の末端を伸長させることによってギャップを充填することができる。このように形成された環状ポリヌクレオチドは、ポリメラーゼの追加により、増幅された産物核酸の形成をもたらすＲＣＡのための鋳型となり得る。本明細書において記載される本発明の方法は、５’末端および３’末端の両方に定められた配列を有する増幅産物を産生することができる。そのような増幅産物は、パドロックプローブとして使用することができる。

【０１５９】

本発明のいくつかの態様は、核酸またはポリヌクレオチドの線形増幅を利用する。線形増幅は、一般に、核酸またはポリヌクレオチド分子、普通、核酸またはポリヌクレオチド分析物の一方の鎖のみの相補体の１つ以上のコピーの形成を含む方法を指す。したがって、線形増幅および指数関数的増幅の間の主要な差異は、後者のプロセスにおいて、産物がより多くの産物の形成のための基質となるのに対して、前者のプロセスにおいて、出発配列が産物の形成のための基質となるが、反応の産物、すなわち出発鋳型の複製は、産物の生成のための基質とならないということである。線形増幅において、形成される産物の量は、形成される産物の量が時間の指数関数となる指数関数的増幅とは対照的に、時間の一次関数として増加する。

【０１６０】

いくつかの実施形態において、増幅方法が、当業者によって認識されるように、固相増幅、ポロニー増幅、コロニー増幅、エマルションＰＣＲ、ビーズＲＣＡ、表面ＲＣＡ、表面ＳＤＡなどとすることができる。いくつかの実施形態において、溶液中のまたはＤＮＡ分子の一方の末端のみによって適したマトリックスに対してつながれた遊離ＤＮＡ分子の増幅をもたらす増幅方法を、使用することができる。両方のＰＣＲプライマーが表面に対

して付加されるブリッジＰＣＲに依存する方法（たとえば国際公開第２０００／０１８９５７号パンフレットおよびＡｄｅｓｓｉら、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２０００）：２８（２０）：Ｅ８７を参照されたい）を、使用することができる。ある場合には、本発明の方法は、同一のアンプリコンの空間的なクラスタリングを維持するマルチプレックス増幅に適用される「ポリメラーゼコロニー技術」または「ポロニー」を作ることができる（Ｈａｒｖａｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ　ａｎｄ　Ｌｉｐｐｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓのウェブサイトを参照されたい）。これらは、たとえばインサイツポロニー（Ｍｉｔｒａ　ａｎｄ　Ｃｈｕｒｃｈ、Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２７、ｅ３４、Ｄｅｃ．１５、１９９９）、インサイツローリングサークル増幅（ＲＣＡ）（Ｌｉｚａｒｄｉら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　１９、２２５、Ｊｕｌｙ　１９９８）、ブリッジＰＣＲ（米国特許第５，６４１，６５８号）、ピコタイターＰＣＲ（Ｌｅａｍｏｎら、Ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ　２４、３７６９、Ｎｏｖｅｍｂｅｒ　２００３）、およびエマルションＰＣＲ（Ｄｒｅｓｓｍａｎら、ＰＮＡＳ　１００、８８１７、Ｊｕｌ．２２、２００３）を含む。本発明の方法は、ポロニーを生成し、使用するための新しい方法を提供する。

【０１６１】

　全トランスクリプトーム分析のための下流の適用

　本発明の重要な側面は、本明細書において開示される方法および組成物が、関心のある生体物質の最小限の損失で、次世代シークエンシングまたはハイブリダイゼーションプラットフォームなどのような下流の分析のために効率的にかつ費用効果的に利用することができることである。詳細には、本発明の方法は、排除されたまたは低下したｒＲＮＡ内容物を有するＮＧＳライブラリーから全トランスクリプトームをシークエンシングするのに有用である。

【０１６２】

　シークエンシング

　一実施形態において、本発明は、シークエンシングのための調製において増幅に対応している産物を提供する。いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドが、プールされ、その後、プール中の１つ以上のポリヌクレオチドのシークエンシングが続く。アダプター組み込み配列を利用するシークエンシング方法は、当技術分野においてよく知られており、たとえば、米国特許第８，０５３，１９２号および米国特許第８，０１７，３３５号においてさらに記載される。

【０１６３】

　シークエンシングプロセスは、一般に、鋳型依存性である。鋳型依存性合成を用いる核酸配列分析は、個々の塩基または塩基のグループを、それらがプライマー伸長反応などのような鋳型媒介性の合成反応の間に追加されるときに同定し、塩基の特徴は、プライマー配列が合成の間にハイブリダイズされる鋳型配列に対して相補的である。他のそのようなプロセスは、ライゲーションにより駆動されるプロセスを含み、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドが、その配列におけるヌクレオチドの配列を同定するために、基礎をなす鋳型配列と複合体を形成する。典型的に、そのようなプロセスは、ＤＮＡポリメラーゼ、ＲＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、およびその他同種のものなどのような核酸ポリメラーゼまたはライゲーションで駆動されるプロセスの場合、たとえばリガーゼなどのような他の酵素を使用して酵素的に媒介される。

【０１６４】

　鋳型依存性合成を使用する配列分析は、多くの異なるプロセスを含むことができる。たとえば、普遍的に実施される４色サンガーシークエンシング方法において、鋳型分子の集団は、相補的な断片配列の集団を作るために使用される。プライマー伸長は、４つの天然に存在するヌクレオチドの存在下において、色素標識ターミネーターヌクレオチド、たとえばジデオキシリボヌクレオチドのサブ集団と共に実行され、それぞれのタイプのターミネーター（ｄｄＡＴＰ、ｄｄＧＴＰ、ｄｄＴＴＰ、ｄｄＣＴＰ）は、異なる検出可能な標

識を含む。その結果、断片のネステッドセットが作られ、断片は、プライマーを越えた配列中のそれぞれのヌクレオチドで終結し、終結ヌクレオチドの同定を可能にする形で標識される。次いで、ネステッド断片集団は、たとえばキャピラリー電気泳動を使用して、サイズに基づく分離にかけられ、それぞれの異なるサイズの断片に関連する標識は、終結ヌクレオチドを同定するために同定される。その結果として、分離システムにおける検出装置を通過する標識の配列は、合成断片の、および相補性によって、基礎をなす鋳型の配列情報の直接的な読み取り値を提供する（たとえば、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第５，１７１，５３４号を参照されたい）。

【０１６５】

鋳型依存性シークエンシング方法の他の例は、合成プロセスによる配列決定を含み、個々のヌクレオチドは、それらが成長中のプライマー伸長産物に対して追加されるとき、反復して同定される。

【０１６６】

パイロシークエンシングは、シークエンシング反応の副産物、すなわちピロリン酸の存在について結果として生じる合成混合物をアッセイすることによってヌクレオチドの組み込みを同定する合成プロセスによる配列決定の例である。特に、プライマー／鋳型／ポリメラーゼ複合体は、単一のタイプのヌクレオチドと接触する。そのヌクレオチドが組み込まれる場合、重合反応は、三リン酸鎖のαおよびβリン酸の間でヌクレオシド三リン酸を切断して、ピロリン酸を放出する。次いで、放出されたピロリン酸の存在は、ＡＭＰによりピロリン酸を変換して、ＡＴＰにし、次いで、測定可能な光シグナルを産生するためにルシフェラーゼ酵素を使用してＡＴＰを測定する化学発光酵素レポーターシステムを使用して同定される。光が検出される場合、塩基は組み込まれており、光が検出されない場合、塩基は組み込まれていない。適切な洗浄ステップの後に、鋳型配列において続く塩基を連続して同定するために、様々な塩基を、複合体と周期的に接触させる。たとえば、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第６，２１０，８９１号を参照されたい）。

【０１６７】

関係するプロセスにおいて、プライマー／鋳型／ポリメラーゼ複合体は、基体上に固定され、複合体は、標識ヌクレオチドと接触させられる。複合体の固定は、プライマー配列、鋳型配列、および／またはポリメラーゼ酵素を通してのものであってもよく、共有結合であってもよくまたは非共有結合であってもよい。たとえば、複合体の固定は、ポリメラーゼまたはプライマーおよび基体表面の間の連結を介してのものとすることができる。様々なタイプの連結は、この付加に有用であり、たとえば、固定されることとなる分子のビオチン化およびたとえばストレプトアビジンブリッジを通しての続く連結が後続する、たとえばビオチン－ＰＥＧ－シラン連結化学作用を使用する、ビオチン化表面構成成分の供給を含む。他の合成カップル化学作用および非特異的タンパク質吸着もまた、固定のために用いることができる。代替の構成において、ヌクレオチドは、除去可能なターミネーターグループありおよびなしで提供される。組み込みに際して、標識は、複合体とカップルされ、したがって検出可能となる。ターミネーターを持つヌクレオチドの場合には、個々に同定可能な標識を持つ４つの異なるヌクレオチドがすべて、複合体と接触されられる。標識ヌクレオチドの組み込みは、ターミネーターの存在によって伸長を阻止し、複合体に対して標識を追加する。次いで、標識およびターミネーターは、組み込まれたヌクレオチドから除去され、適切な洗浄ステップの後に、プロセスが繰り返される。ターミネーターなしのヌクレオチドの場合には、単一のタイプの標識ヌクレオチドが、パイロシークエンシングと同様に、それが組み込まれるかどうかを決定するために複合体に対して追加される。ヌクレオチド上の標識グループの除去および適切な洗浄ステップの後に、様々な異なるヌクレオチドが、同じプロセスにおいて反応混合物を循環する。たとえば、その全体が参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第６，８３３，２４６号を参照されたい）。たとえば、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ Ｓｙｓｔｅｍは、参照によってここに組み込まれる国際公開第９８／４４１５１号パンフレットにおい

て記載される技術に基づき、ＤＮＡ分子は、アンカープローブ結合部位（他の場合にはフローセル結合部位と呼ばれる）を介してシークエンシングプラットフォーム（フローセル）に対して結合され、スライドガラス上でインサイツで増幅される。次いで、ＤＮＡ分子は、シークエンシングプライマーに対してアニールされ、可逆的ターミネーターアプローチを使用して、並行して１塩基ずつシークエンシングされる。典型的に、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｎａｌｙｚｅｒ Ｓｙｓｔｅｍは、８チャネルを有するフローセルを利用し、１８～３６塩基長のシークエンシングリードを生成し、実行当たり＞１．３Ｇｂｐの高品質データを生成する。したがって、本発明の方法は、米国特許第５，７５０，３４１号；米国特許第６，３０６，５９７号；および米国特許第５，９６９，１１９号において記載されるように、Ｉｌｌｕｍｉｎａによって市販化される方法によってシークエンシングするのに有用である。方向性をもつ（鎖特異的）ｃＤＮＡライブラリーは、本発明の方法を使用して調製され、選択された一本鎖核酸は、たとえばＰＣＲによって増幅される。次いで、結果として生じる核酸は、変性させられ、一本鎖増幅ポリヌクレオチドは、フローセルチャネルの内側の表面に対してランダムに付加される。非標識ヌクレオチドが、二本鎖ＤＮＡの高密度のクラスターを産生するために、固相ブリッジ増幅を開始するために追加される。第１の塩基シークエンシングサイクルを開始するために、４つの標識可逆的ターミネーター、プライマー、およびＤＮＡポリメラーゼが追加される。レーザー励起の後に、フローセル上のそれぞれのクラスターからの蛍光が、画像化される。次いで、それぞれのクラスターについての第１の塩基の特徴が、記録される。シークエンシングのサイクルは、一度に１塩基、断片配列を決定するために実行される。

【０１６８】

合成プロセスによるさらなる配列において、異なって標識されたヌクレオチドの組み込みは、鋳型依存性合成が実行されるときに、リアルタイムで観察される。特に、個々の固定プライマー／鋳型／ポリメラーゼ複合体は、蛍光標識されたヌクレオチドが組み込まれるときに観察され、塩基が追加されるときに、それぞれの追加される塩基のリアルタイム同定を可能にする。このプロセスにおいて、標識グループは、組み込みの間に切断されるヌクレオチドの一部分に対して付加される。たとえば、組み込みの間に除去されるリン酸鎖、すなわちヌクレオシドポリリン酸上のβ、γ、または他の末端のリン酸基の一部分に対して標識グループを付加することによって、標識は新生鎖に組み込まれず、その代わりに、天然のＤＮＡが産生される。個々の分子の観察は、典型的に、非常に小さなイルミネーションボリューム内の複合体の光学的閉じ込めを伴う。複合体を光学的に閉じ込めることによって、ランダムに拡散するヌクレオチドが非常に短い期間存在するモニター領域を作り、組み込まれたヌクレオチドを、それらが組み込まれているときに、観察ボリューム内で長持ちさせる。これは、組み込み事象に関連する特徴的なシグナルをもたらし、これはまた、追加されている塩基の特質であるシグナルプロファイルによっても特徴付けられる。関係する態様において、蛍光共鳴エネルギー伝達（ＦＲＥＴ）色素ペアなどのような相互作用標識構成成分は、複合体のポリメラーゼまたは他の部分および組み込まれるヌクレオチド上に提供され、組み込み事象が標識構成成分を相互作用的に接近させ、同様に、組み込まれている塩基の特質でもある特徴的なシグナルが、結果として生じる（たとえば米国特許第６，０５６，６６１号、米国特許第６，９１７，７２６号、米国特許第７，０３３，７６４号、米国特許第７，０５２，８４７号、米国特許第７，０５６，６７６号、米国特許第７，１７０，０５０号、米国特許第７，３６１，４６６号、米国特許第７，４１６，８４４号、および米国特許出願公開第２００７－０１３４１２８号を参照されたい、これらの完全な開示は、それらの全体が参照によって本明細書において組み込まれる）。

【０１６９】

いくつかの実施形態において、サンプル中の核酸は、ライゲーションによってシークエンシングすることができる。この方法は、たとえば、ポロニー方法およびＳＯＬｉＤ技術（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、現在Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）において使用されるように、標的配列を同定するためにＤＮＡリガーゼ酵素を使用する。一般に、固定長

のすべての可能なオリゴヌクレオチドのプールが提供され、シークエンシングされる位置に従って標識される。オリゴヌクレオチドは、アニールされ、ライゲーションされ、マッチする配列についてのＤＮＡリガーゼによる優先的なライゲーションは、その位置の相補的配列に対応するシグナルをもたらす。

【０１７０】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓによって市販化されるライゲーション方法によるシークエンシング（たとえばＳＯＬｉＤシークエンシング）によるシークエンシングのための標的ポリヌクレオチドを調製するのに有用である。他の実施形態において、方法は、Ｍａｒｇｕｌｉｅｓら、Ｎａｔｕｒｅ（２００５）４３７：３７６－３８０（２００５）ならびに米国特許第７，２４４，５５９号；米国特許第７，３３５，７６２号；米国特許第７，２１１，３９０号；米国特許第７，２４４，５６７号；米国特許第７，２６４，９２９号；および米国特許第７，３２３，３０５号において記載される方法および装置を含むが、これらに限定されない、４５４／Ｒｏｃｈｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓによって市販化される方法を使用する合成によるシークエンシングのための標的ポリヌクレオチドを調製するのに有用である。他の実施形態において、方法は、米国特許出願第１１／１６７，０４６号ならびに米国特許第７，５０１，２４５号；米国特許第７，４９１，４９８号；米国特許第７，２７６，７２０号；ならびに米国特許出願公開第２００９００６１４３９号；米国特許出願公開第２００８００８７８２６号；米国特許出願公開第２００６０２８６５６６号；米国特許出願公開第２００６００２４７１１号；米国特許出願公開第２００６００２４６７８号；米国特許出願公開第２００８０２１３７７０号；および米国特許出願公開第２００８０１０３０５８号において記載されるように、Ｈｅｌｉｃｏｓ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓ．）によって市販化される方法によるシークエンシングのための標的ポリヌクレオチド（複数可）を調製するのに有用である。他の実施形態において、方法は、米国特許第７，４６２，４５２号；米国特許第７，４７６，５０４号；米国特許第７，４０５，２８１号；米国特許第７，１７０，０５０号；米国特許第７，４６２，４６８号；米国特許第７，４７６，５０３号；米国特許第７，３１５，０１９号；米国特許第７，３０２，１４６号；米国特許第７，３１３，３０８号；ならびに米国特許出願公開第２００９００２９３８５号；米国特許出願公開第２００９００６８６５５号；米国特許出願公開第２００９００２４３３１号；および米国特許出願公開第２００８０２０６７６４号において記載されるように、Ｐａｃｉｆｉｃ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓによって市販化される方法によるシークエンシングのための標的ポリヌクレオチド（複数可）を調製するのに有用である。一般に、二本鎖断片ポリヌクレオチドは、本発明の方法によって調製することができる。次いで、ポリヌクレオチドは、ゼロモード導波路アレイ中に固定することができる。方法は、導波路アレイに対して結合した核酸を一本鎖または部分的に一本鎖にするステップを含んでいてもよい。ポリメラーゼおよび標識ヌクレオチドが、反応混合物中に追加され、ヌクレオチド組み込みは、ヌクレオチドの末端のリン酸基に対して付加された蛍光標識を介して視覚化される。蛍光標識は、ヌクレオチド組み込みの一部として切り取られる。ある場合には、環状鋳型が、単一の分子に対して複数のリードを可能にするために利用される。

【０１７１】

提供される本発明の方法において使用することができるシークエンシング技術の他の例は、ナノポアシークエンシングである（たとえばＳｏｎｉ Ｇ Ｖ ａｎｄ Ｍｅｌｌｅｒ Ａ．（２００７）Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍ ５３：１９９６－２００１を参照されたい）。ナノポアは、およそ直径１ナノメートルの小さな穴とすることができる。導電性流体中へのナノポアの浸漬およびそれを横切る電位の適用は、ナノポアを通るイオンの伝導のためにわずかな電流をもたらし得る。流れる電流の量は、ナノポアのサイズに対して感受性である。ＤＮＡ分子がナノポアを通り抜けるとき、ＤＮＡ分子上のそれぞれのヌクレオチドは、様々な程度までナノポアを遮る。したがって、ＤＮＡ分子がナノポアを通り抜けるときのナノポアを通り抜ける電流の変化は、ＤＮＡ配列を読むことに相当し得る。

【０１７２】
　提供される本発明の方法において使用することができるシークエンシング技術の他の例は、Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔによって提供される半導体シークエンシングである（たとえばＩｏｎ　Ｐｅｒｓｏｎａｌ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｍａｃｈｉｎｅ（ＰＧＭ）を使用）。Ｉｏｎ　Ｔｏｒｒｅｎｔ技術は、複数の層、たとえば微細加工されたウェルを有する層、イオン感応性の層、およびイオンセンサー層を有する半導体チップを使用することができる。核酸は、ウェルの中に導入することができ、たとえば、単一の核酸のクローン集団は、単一のビーズに対して付加することができ、ビーズをウェルの中に導入することができる。ビーズ上の核酸のシークエンシングを開始するために、１つのタイプのデオキシリボヌクレオチド（たとえばｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、ｄＧＴＰ、またはｄＴＴＰ）を、ウェルの中に導入することができる。１つ以上のヌクレオチドがＤＮＡポリメラーゼによって組み込まれる場合、プロトン（水素イオン）がウェル中に放出され、これをイオンセンサーによって検出することができる。次いで、半導体チップは、洗浄することができ、プロセスを様々なデオキシリボヌクレオチドで繰り返すことができる。複数の核酸を、半導体チップのウェルにおいてシークエンシングすることができる。半導体チップは、ＤＮＡをシークエンシングするために、化学的感受性電界効果トランジスター（ｃｈｅｍＦＥＴ）アレイを含むことができる（たとえば米国特許出願公開第２００９００２６０８２号において記載されるように）。シークエンシングプライマーの３’末端での新しい核酸鎖への１つ以上の三リン酸の組み込みは、ｃｈｅｍＦＥＴによって電流の変化によって検出することができる。アレイは、複数のｃｈｅｍＦＥＴセンサーを有することができる。

【０１７３】
　いくつかの実施形態において、シークエンシングが、第１のアダプターオリゴヌクレオチドの相補体の少なくとも１つの部分に対してハイブリダイズすることができる配列を含むシークエンシングプライマーの伸長を含む。いくつかの実施形態において、シークエンシングが、第２のアダプターオリゴヌクレオチドの相補体の少なくとも１つの部分に対してハイブリダイズすることができる配列を含むシークエンシングプライマーの伸長を含む。シークエンシングプライマーは、約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、９０、１００、もしくはそれ以上の、約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、９０、１００、もしくはそれ以上より少ない、または約１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、９０、１００、もしくはそれ以上を超えるヌクレオチドなどのような、任意の適した長さであってよく、その任意の部分またはすべてが、対応する標的配列に対して相補的であってもよい。（たとえば約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、もしくはそれ以上の、約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、もしくはそれ以上より少ない、または約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、もしくはそれ以上を超えるヌクレオチド）。いくつかの実施形態において、シークエンシングが、較正ステップを含み、較正が、バーコード配列における１つ以上のヌクレオチド位置でのそれぞれのヌクレオチドに基づく。較正は、たとえば、配列における所定の位置の塩基を同定する精度を促進するまたは増加させることによって、シークエンシングデータをプロセシングするのに有用になり得る。

【０１７４】
　いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドが由来するサンプルの正確な同定が、標的ポリヌクレオチドについて得られた配列の少なくとも１つの部分に基づき、少なくとも９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．５％、９９．８％、９９．８５％、９９．９％、９９．９５％、９９．９９％、またはそれ以上正確である。いくつかの実施形態において、標的ポリヌクレオチドのサンプル供給源が、配列中に含有される単一のバーコードに基づいて同定される。いくつかの実施形態において、精度が、配列中に含有される２つ以上のバーコードを使用して、標的ポリヌクレオチドの供給源を同定することによって増加させることができる。複数のバーコードは、標的ポリヌクレオチ

ドが連結される単一のアダプター／プライマーへの複数のバーコードの組み込みによってチおよび／または標的ポリヌクレオチドに対する１つ以上のバーコードを有する２つ以上のアダプター／プライマーの連結によって、標的ポリヌクレオチドに対して連結することができる。いくつかの実施形態において、２つ以上のバーコード配列を含む標的ポリヌクレオチドのサンプル供給源の特徴が、それが含むバーコード配列の１つのみを使用して、正確に決定されてもよい。一般に、標的ポリヌクレオチドが由来するサンプルの正確な同定は、プール中の約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２８、１９２、３８４、５００、１０００、もしくはそれ以上の、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２８、１９２、３８４、５００、１０００、もしくはそれ以上より少ない、または約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１６、２０、２４、２８、３２、３６、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１２８、１９２、３８４、５００、１０００、もしくはそれ以上を超えるサンプルなどのように、プール中の２つ以上のサンプルの中からのサンプル供給源の適正な同定を含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態において、方法は、当技術分野においてよく知られており、かつ下記にさらに記載される方法によるシークエンシングのために、鎖特異的な形で関心のある特異的な配列領域の選択的に濃縮された集団から標的ポリヌクレオチド（複数可）を調製するのに有用である。

【０１７６】

たとえば、方法は、米国特許第５，７５０，３４１号；米国特許第６，３０６，５９７号；および米国特許第５，９６９，１１９号において記載されるように、Ｉｌｌｕｍｉｎａによって市販化される方法によるシークエンシングに有用である。一般に、二本鎖断片ポリヌクレオチドは、一方（たとえば（Ａ）／（Ａ’）または両方の末端（たとえば（Ａ）／（Ａ’）および（Ｃ）／（Ｃ’））でタグ付けされた増幅核酸配列を産生するために、本発明の方法によって調製することができる。ある場合には、一方または両方の末端でタグ付けされた一本鎖核酸は、本発明の方法（たとえばＳＰＩＡまたは線形ＰＣＲによって）によって増幅される。次いで、結果として生じる核酸は、変性させられ、一本鎖増幅ポリヌクレオチドは、フローセルチャネルの内側の表面に対してランダムに付加される。非標識ヌクレオチドが、二本鎖ＤＮＡの高密度のクラスターを産生するために、固相ブリッジ増幅を開始するために追加される。第１の塩基シークエンシングサイクルを開始するために、４つの標識可逆的ターミネーター、プライマー、およびＤＮＡポリメラーゼが追加される。レーザー励起の後に、フローセル上のそれぞれのクラスターからの蛍光が、画像化される。次いで、それぞれのクラスターについての第１の塩基の特徴が、記録される。シークエンシングのサイクルは、一度に１塩基、断片配列を決定するために実行される。たとえば、ポリヌクレオチドが本発明の方法によって両方の末端で標識される場合などのような、ペアエンドシークエンシングについては、シークエンシング鋳型は、インサイツで再生することができ、断片の反対の末端もシークエンシングすることができる。

【０１７７】

キット

本明細書において記載される組成物のいずれかは、キット中に含まれていてもよい。非限定的な例において、キットが、適した容器中に、１つのアダプターまたはいくつかのアダプター、１つ以上のオリゴヌクレオチドプライマー、ならびにライゲーション、プライマー伸長、および増幅のための試薬を含む。キットはまた、ビーズ懸濁液などのような精製のための手段および核酸修飾酵素を含んでいてもよい。

【０１７８】

キットの容器は、構成成分が置かれてもよい、好ましくは適切に分注されてもよい少なくとも１つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器、または他の容器を一般に含むであろう。キット中に１つを超える構成成分がある場合、キットはまた、さらなる構成

成分が別々に置かれてもよい、第２、第３、または他のさらなる容器を一般に含有するであろう。しかしながら、様々な組み合わせの構成成分が、１つの容器中に含まれてもよい。

【０１７９】

キットの構成成分が１つ以上の液体溶液中に提供される場合、液体溶液は、水溶液とすることができる。しかしながら、キットの構成成分は、乾燥した粉末（複数可）として提供されてもよい。試薬および／または構成成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は、適した溶媒の追加によって還元することができる。

【０１８０】

様々な実施形態において、本発明によるキットが、１つ以上の制限エンドヌクレアーゼ、たとえばＢｓｐＱＩ、リガーゼ、ポリメラーゼ、たとえば、ＭｙＴａｑなどのようなホットスタートポリメラーゼ、切断剤、プライマー伸長反応のためのプライマーとして作用することができるプローブのライブラリー、および１つ以上の非標準ヌクレオチド、たとえばウラシル、イノシンを含む。いくつかの実施形態において、切断剤が、１つ以上のグリコシラーゼ、たとえばＵＮＧまたはＵＤＧ、第１級アミン、ポリアミン、たとえばＤＭＥＤ、およびエンドヌクレアーゼＶを含む。

【０１８１】

いくつかの実施形態において、キットが、一方の鎖上に１つ以上の非標準ヌクレオチドを含み、５’リン酸を欠く、１つ以上の第１のアダプター、前記１つ以上の非標準ヌクレオチドを欠き、５’リン酸を欠く第２のアダプター、およびアダプター配列に対して特異的なプライマーのセットを含む。いくつかの実施形態において、第２のアダプターが、制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む。

【０１８２】

いくつかの実施形態において、キットが、５’リン酸を欠く、１つ以上の第１のアダプター、それぞれ３’オーバーハングを含み、かつ二本鎖部分内に共有配列を含む、複数の部分的二重鎖プライマー、およびアダプターに対して逆相補的な配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーを含む。いくつかの実施形態において、第１のアダプターが、制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む。いくつかの実施形態において、複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む。

【０１８３】

いくつかの実施形態において、キットが、５’リン酸を欠く、１つ以上の第１のアダプター、それぞれ３’オーバーハングを含み、二本鎖部分内に共有配列を含む、複数の部分的二重鎖プライマーおよび二本鎖部分内の共有配列においてアデニンを欠く、３’オーバーハングを有する複数の部分的二重鎖プライマーの鎖およびアダプターに対して逆相補的な配列および３’オーバーハングと対向する部分的二重鎖プライマーの共有配列に対してハイブリダイズすることができるプライマーのセットを含む。いくつかの実施形態において、第１のアダプターが、制限エンドヌクレアーゼについての認識配列を含む。いくつかの実施形態において、複数の部分的二重鎖プライマーが、相違する３’オーバーハング配列を有する少なくとも２つの部分的二重鎖プライマーを含む。

【０１８４】

キットは、キット構成成分を用いるためのおよびキット中に含まれない任意の他の試薬の使用のための説明書を好ましくは含むであろう。説明書は、実行することができるバリエーションを含んでいてもよい。

【０１８５】

一態様において、本発明は、上記の方法および組成物において開示される任意の１つ以上のエレメントを含有するキットを提供する。いくつかの実施形態において、キットが、１つ以上の容器中に本発明の組成物を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、本明細書において記載されるアダプター、プライマー、および／または他のオリゴヌクレオチドを含むキットを提供する。アダプター、プライマー、他のオリゴヌクレオチド、およ

び試薬は、限定を伴うことなく、上記に記載されるもののいずれかとすることができる。キットのエレメントは、限定を伴うことなく、任意の適した量でおよび／または上記に記載される組み合わせのいずれか（同じキットもしくは同じ容器においてなどのように）または当技術分野において知られている任意の他の適した組み合わせを使用して、さらに提供することができる。キットは、本発明の方法による使用のための、上記に記載されるものなどのような、さらなる作用物質をさらに含んでいてもよい。キットのエレメントは、試験管、バイアル、フラスコ、ボトル、アンプル、注射器、またはその他同種のものを含むが、これらに限定されない、任意の適した容器において提供することができる。作用物質は、本発明の方法において直接使用されてもよい形態でまたは凍結乾燥された作用物質の還元においてなどのように、使用前に調製を必要とする形態で提供することができる。作用物質は、使い捨てのために一定分量でまたは多くの反応においてなどのように複数回の使用分が得られてもよいストックとして提供されてもよい。

【０１８６】

本発明の方法に基づく産物

本発明の方法に基づく製品は、商品名Ｅｎｃｏｒｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ Ｐｒｏｋａｒｙｏｔｉｃ ＲＮＡ－Ｓｅｑ（商標）の下で、出願人によって市販化されてもよい。Ｅｎｃｏｒｅは、ＮｕＧＥＮ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ， Ｉｎｃ．の商標である。

【実施例】

【０１８７】

実施例１－方向性をもつ（つまり鎖特異的）全トランスクリプトームライブラリーからの細菌リボソームＲＮＡ断片の排除

この実施例は、高度に保存された原核生物１６Ｓおよび２３Ｓ ｒＲＮＡ転写領域を標的にするｉｎｓｅｒｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ａｄａｐｔｏｒ ｃｌｅａｖａｇｅ（ＩｎＤＡ－Ｃ）プローブを使用する、大腸菌全ＲＮＡから生成された、４つの方向性をもつｃＤＮＡライブラリーからの細菌ｒＲＮＡ断片の排除を記載する。

【０１８８】

プローブ設計および合成

原核生物ｒＲＮＡ転写物を標的にするＩｎＤＡ－Ｃプローブは、ＣｌｕｓｔａｌＷマルチプル配列アライメントプログラム（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を使用して４０の細菌株および１０の古細菌株の系統発生学的に多様なセット由来のリボソームオペロンを比較することによって設計した。候補プライマー配列は、１６Ｓ ｒＲＮＡ（９つの部位）および２３Ｓ ｒＲＮＡ（７つの部位）サブユニットにおいて同定された高度に保存された配列から最初に選択した。これらの保存領域は、Ｐｒｉｍｅｒ３によってコンピューターで断片化し、分析した（Ｓｔｅｖｅ Ｒｏｚｅｎ ａｎｄ Ｈｅｌｅｎ Ｊ． Ｓｋａｌｅｔｓｋｙ（２０００）Ｐｒｉｍｅｒ３ ｏｎ ｔｈｅ ＷＷＷ ｆｏｒ ｇｅｎｅｒａｌ ｕｓｅｒｓ ａｎｄ ｆｏｒ ｂｉｏｌｏｇｉｓｔ ｐｒｏｇｒａｍｍｅｒｓ． Ｉｎ：Ｋｒａｗｅｔｚ Ｓ、Ｍｉｓｅｎｅｒ Ｓ（ｅｄｓ）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ． Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ、ｐｐ３６５－３８６）。次いで、これらの配列は、５５～６５℃の範囲にわたる最適な予測される融解温度および長さに対してフィルターにかけた。ｒＲＮＡセンス鎖に対応するオリゴヌクレオチドを個々に合成し、等モルの割合でプールした。最終のプライマープールは、長さが１４～１８ｎｔの範囲にわたる２０５オリゴヌクレオチドから構成された。いくつかのプライマーは、それぞれの融解温度を増加させるために、ロックド核酸（ＬＮＡ）塩基などのような１つ以上のヌクレオチド類似体により合成した。プローブミックスは、２５倍に希釈して、ＩｎＤＡ－Ｃ排除反応において使用する最終濃度にした（種当たり３７５ｎＭ、最終１５ｎＭ）。

【０１８９】

鎖特異的ｃＤＮＡライブラリーの生成

Ｅｎｃｏｒｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ ＲＮＡ－Ｓｅｑ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｓｙｓｔｅｍ（

ＮｕＧＥＮ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ｐ／ｎ　０３１１）は、富栄養培地における増殖の対数中期に収集された液体培養物から抽出された１００ｎｇの大腸菌全ＲＮＡ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ｐ／ｎ　ＡＭ７９４０）から４つの鎖特異的ｃＤＮＡライブラリーを生成するために使用した。逆転写反応は、キット中に供給されるプライマーをＯｖａｔｉｏｎ　Ｐｒｏｋａｒｙｏｔｉｃ　ＲＮＡ－Ｓｅｑ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＮｕＧＥＮ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ｐ／ｎ　９０３０）からの第１の鎖のプライマーと交換したという点を除いて、メーカーの指示に従って実行した。第２の鎖のＤＮＡ合成は、キットにおいて推奨されるように実行し、二本鎖ｃＤＮＡは、機器により提供される２００ｂｐ超音波処理プロトコールを使用して、Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｓ－ｓｅｒｉｅｓデバイスにより剪断した（１０％デューティーサイクル（ｄｕｔｙ　ｃｙｃｌｅ）、２００サイクル／バースト、５強度、１８０秒）。断片化されたｃＤＮＡの精製は、２容量のＡｍｐｕｒｅ　ＸＰビーズ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）を追加することによって達成し、７０％エタノールにより２度洗浄し、１５μＬの水により溶出した。１０マイクロリットルのそれぞれのサンプルを、キット中に記載されるように、末端修復反応を使用してライゲーションのために調製した。ライゲーションは、キット中に提供されるリバースアダプターならびにＢｓｐＱＩ認識部位中にデオキシウリジンおよび単一塩基置換を含有するカスタムフォワードアダプター（５’－ＴＡＣＡＣＴＣＵＴＴＣＣＣＵＡＣＡＣＧＡＣＧＡＵＣＴＴＣＣＧＡＵＣＴ－３’）により実行した。Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　Ｉ反応後に、サンプルは、溶出容量を２５μＬとし、そのうちの１８μＬを採取したという点を除いて、ビーズにより前のとおりに精製した。

【０１９０】

リボソームＲＮＡ排除

リボソームＤＮＡ断片は、別個の３つのステップにおいてライブラリーから選択的に排除した：１）塩基切り取り／ｒＲＮＡ特異的プライマー伸長、２）リバースアダプター切断、および３）ＰＣＲ濃縮。第１のステップは、それぞれの１８μＬサンプルを、１μＬのＩｎＤＡ－Ｃ　ｒＲＮＡプローブ、５μＬの５×ＭｙＴａｑポリメラーゼバッファー、Ｅｎｃｏｒｅ　Ｃｏｍｐｌｅｔｅ　ＲＮＡ－Ｓｅｑ　ｓｙｓｔｅｍからの０．５μＬのＳｔｒａｎｄ　Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ　ＩＩ酵素（ＳＳ４）、および０．５μＬのＨＳ　ＭｙＴａｑポリメラーゼ（Ｂｉｏｌｉｎｅ　ｐ／ｎ　ＢＩＯ－２１１１１）を含有する７μＬのマスターミックスと組み合わせることによって実行した。この溶液を、サーマルサイクラー中に配置し、１０分間３７℃まで加熱して、鎖選択を終了させ、一本鎖ライブラリー断片を生成し、２分間９５℃まで加熱して、ホットスタートポリメラーゼを活性化し、３０秒間５０℃まで冷却して、ｒＲＮＡプローブをアニールし、５分間６５℃まで加熱して、インサートからリバースアダプター配列へのプライマー伸長を可能にした。サンプルは、１×ＭｙＴａｑポリメラーゼバッファーおよび２．５ユニットのＢｓｐＱＩ制限酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ｐ／ｎ　Ｒ０７１２）を含有する２５μＬのアダプター切断マスターミックスを追加する前に、４℃まで冷却した。反応は、４℃まで冷却する前に５分間５５℃および５分間９５℃まで加熱することによってサーマルサイクラーにおいて実行した。非ｒＲＮＡ断片の濃縮は、キット中に提供される１×ＭｙＴａｑポリメラーゼバッファー、２．５ユニットのＨＳ　ＭｙＴａｑポリメラーゼ、および８μＬのＰ２プライマーミックスを含有する５０μＬの２×ＰＣＲマスターミックスを追加することによって達成した。サンプルは、サーマルサイクラー中に配置し、２分間９５℃まで加熱して、ポリメラーゼを活性化し、２ステップの温度ルーチンを使用して増幅した：３０秒間９５℃、９０秒間６０℃の２サイクルおよび３０秒間９５℃、９０秒間６５℃の１８サイクル。ＰＣＲ産物は、ＡＭＰｕｒｅ　ＸＰビーズを使用して精製し、２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により分析した。ライブラリーは、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＧＡ２Ｘ機器で単一末端フォーマット（ｓｉｎｇｌｅ　ｅｎｄ　ｆｏｒｍａｔ）でシークエンシングした。生データは、Ｉｌｌｕｍｉｎａベースコーリングソフトウェアを使用してプロセシングし、大腸菌Ｋ－１２（亜株ＭＧ１６５５）参照ゲノム（Ｇｅｎｂａｎｋ　Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ＃ＡＰ００９０４８）にマッ

ピングした。リードの方向は、ＲＮＡ鋳型に関してセンス鎖の方向にあることが期待される。

【０１９１】

４つのｃＤＮＡ一定分量のうちの１つのみを、ＩｎＤＡ－Ｃ構成成分の全相補体を使用して、ライブラリーに変換した（Ｔｅｓｔ４）。他の３つのライブラリーは、１つ以上のＩｎＤＡ－Ｃ試薬を欠乏させて構築した（Ｔｅｓｔ１、Ｔｅｓｔ２、およびＴｅｓｔ３）。同じＲＮＡからランダムプライマーにより生成したコントロールライブラリーは、非排除インプットサンプルについてのベンチマークとして使用した（ｃｔｒｌ）。コントロールおよび試験ライブラリーのそれぞれについてのマッピング統計を図２に示す。４つの試験ライブラリーからの発現プロファイルの比較を図３に示す。汎用原核生物ＩｎＤＡ－Ｃプローブによる１６Ｓ　ｒＲＮＡ部位の標的排除を図４に示す。

【０１９２】

実施例２－ゲノムＤＮＡライブラリーからのミトコンドリアＤＮＡ断片の排除

この実施例は、ミトコンドリアゲノムを標的にするｉｎｓｅｒｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ　ａｄａｐｔｏｒ　ｃｌｅａｖａｇｅ（ＩｎＤＡ－Ｃ）プローブを使用する、ゲノムＤＮＡライブラリーからのミトコンドリアＤＮＡ断片の排除を記載する。

【０１９３】

プローブ設計および合成

ヒトミトコンドリアゲノム配列のｈｇ１９バージョンの両方の鎖に対してアニールするＩｎＤＡ－Ｃプローブは、ＵＣＳＣ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｒｏｗｓｅｒによって提供される「Ｄｕｋｅ　２０ｂｐユニークネス（ｕｎｉｑｕｅｎｅｓｓ）」トラックによって同定されたミトコンドリア特異的セグメント内で選択した。次いで、これらの配列は、最適な予測される融解温度および長さに対してフィルターにかけた。長さが２０～２５ｎｔの範囲にわたるオリゴヌクレオチドを個々に合成し、等モルの割合でプールした。結果として生じるプローブミックスは、２５倍に希釈して、ＩｎＤＡ－Ｃ排除反応において使用する最終濃度にした（種当たり３７５ｎＭ、最終１５ｎＭ）。

【０１９４】

ゲノムＤＮＡライブラリーの生成

Ｏｖａｔｉｏｎ　Ｕｌｔｒａｌｏｗ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（ＮｕＧＥＮ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｓａｎ　Ｃａｒｌｏｓ、ＣＡ）は、１０ｎｇのヒト男性ＤＮＡ（Ｐｒｏｍｅｇａ）からＤＮＡライブラリーを生成するために使用した。ＤＮＡは、機器により提供される２００ｂｐ超音波処理プロトコールを使用して、Ｃｏｖａｒｉｓ　Ｓ－ｓｅｒｉｅｓデバイスにより剪断した（１０％デューティーサイクル、２００サイクル／バースト、５強度、１８０秒）。断片化されたＤＮＡの精製は、２容量のＡｍｐｕｒｅ　ＸＰビーズ（Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）を追加することによって達成し、７０％エタノールにより２度洗浄し、１５μＬの水により溶出した。１０マイクロリットルのそれぞれのサンプルを、キット中に記載されるように、末端修復反応を使用してライゲーションのために調製した。ライゲーションは、カスタムフォワードアダプターおよびＩｌｌｕｍｉｎａ　ＴｒｕＳｅｑリバースアダプターにより実行した。フォワードアダプターは、ライゲーションジャンクション（５’－ＡＡＴＧＡＴＡＣＧＧＣＧＡＣＣＡＣＣＧＡＧＡＴＡＡＧＡＡＧＡａＴＧＡｃＧＴｃＡＡｇＴＧＣＧＡＴＣＧＣＡＧＧＡＴＡＧＡＴ－３’）の近くにＡｓｉＳＩ認識部位（５’－ＧＣＧＡＴＣＧＣ－３’）を含有した。リバースアダプターは、ライゲーションジャンクション（５’－ＣＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＣＧＧＣＡＴＡＣＧＡＧＡＴＧＴＧＡＣＴＧＧＡＧＴＴＣＡＧＡＣＧＴＧＴＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴ－３’）の近くにＢｓｐＱ１認識部位（５’－ＧＣＴＣＴＴＣ－３’）を含有した。サンプルは、溶出容量を２５μＬとし、そのうちの１８μＬを採取したという点を除いて、ビーズにより前のとおりに精製した。

【０１９５】

ミトコンドリアＤＮＡ排除

ミトコンドリアＤＮＡ断片は、別個の３つのステップにおいてライブラリーから選択的

に排除した：１）変性／ミトコンドリア特異的プライマー伸長、２）アダプター切断、および３）ＰＣＲ濃縮。第１のステップは、それぞれの１８μＬサンプルを、１μＬのＩｎＤＡ－Ｃミトコンドリアプローブ、５μＬの５×ＭｙＴａｑポリメラーゼバッファー、および０．５μＬのＨＳ　ＭｙＴａｑポリメラーゼ（Ｂｉｏｌｉｎｅ　ｐ／ｎ　ＢＩＯ－２１１１１）を含有する７μＬのマスターミックスと組み合わせることによって実行した。この溶液を、サーマルサイクラー中に配置し、１０分間９５℃まで加熱して、鎖分離を終了させ、一本鎖ライブラリー断片を生成し、かつホットスタートポリメラーゼを活性化し、３０秒間５０℃まで冷却して、ｒＲＮＡプローブをアニールし、５分間６５℃まで加熱して、インサートからリバースアダプター配列へのプライマー伸長を可能にした。サンプルは、１×ＭｙＴａｑポリメラーゼバッファー、２．５ユニットのＢｓｐＱＩ制限酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ｐ／ｎ　Ｒ０７１２）、および２．５ユニットのＡｓｉＳＩ制限酵素（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ｐ／ｎ　Ｒ０６３０）を含有する２５μＬのアダプター切断マスターミックスを追加する前に、４℃まで冷却した。反応は、４℃まで冷却する前に５分間４０℃および５分間９５℃まで加熱することによってサーマルサイクラーにおいて実行した。非ミトコンドリア断片の濃縮は、１×ＭｙＴａｑポリメラーゼバッファー、２．５ユニットのＨＳ　ＭｙＴａｑポリメラーゼ、ならびに１０μＭフォワードプライマー（５’－ＡＡＴＧＡＴＡＣＧＧＣＧＡＣＣＡＣＣＧＡ－３’）および１０μＭリバースプライマー（５’－　ＣＡＡＧＣＡＧＡＡＧＡＣＧＧＣＡＴＡＣＧ－３’）を含有する８μＬの１０×ＰＣＲプライマーミックスを含有する５０μＬの２×ＰＣＲマスターミックスを追加することによって達成した。サンプルは、サーマルサイクラー中に配置し、２分間９５℃まで加熱して、ポリメラーゼを活性化し、２ステップの温度ルーチンを使用して増幅した：３０秒間９５℃、９０秒間６０℃の２サイクルおよび３０秒間９５℃、９０秒間６５℃の１８のサイクル。ＰＣＲ産物は、ＡＭＰｕｒｅ　ＸＰビーズを使用して精製し、２１００　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）により分析した。ライブラリーは、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＧＡ２Ｘ機器で単一末端フォーマットでシークエンシングした。生データは、Ｉｌｌｕｍｉｎａベースコーリングソフトウェアを使用してプロセシングし、ヒト参照ゲノムに対してマッピングした。

【０１９６】

実施例３－方向性をもつｃＤＮＡライブラリーの生成（図５）

この実施例は、出発物質として修飾二重鎖アダプターおよび５０ｎｇのｐｏｌｙ（Ａ）＋選択メッセンジャーＲＮＡによる従来の平滑末端ライゲーションを使用する、方向性をもつｃＤＮＡライブラリーの生成を記載する。

【０１９７】

第１の鎖の合成

第１の鎖のｃＤＮＡは、ランダムヘキサマープライミングを使用して生成した。第１の鎖の合成反応は、１０μＭのランダムヘキサマー、３．０ｍＭ　$MgCl_2$、および１．０ｍＭ　ｄＮＴＰと共に、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　ｋｉｔを使用して行った。ｃＤＮＡ合成反応は、１０μＬ容量で実行し、６０分間摂氏４０度でインキュベートし、摂氏４度まで冷やした。

【０１９８】

ｄＵＴＰ組み込みによる第２の鎖の合成

第２の鎖合成は、Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ　ＮＥＢＮｅｘｔ　Ｓｅｃｏｎｄ　Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｍｏｄｕｌｅを使用して実行し、Ｓｅｃｏｎｄ　Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（ｄＮＴＰ－ｆｒｅｅ）Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒに、０．２ｍＭのｄＡＴＰ、ｄＣＴＰ、およびｄＧＴＰならびに０．５４ｍＭ　ｄＵＴＰを含有するｄＮＴＰミックスを補足した。ＲＮアーゼＨ媒介性ニックトランスレーションは、６５μＬの第２の鎖の合成マスターミックスを追加し、摂氏１６度で１時間インキュベートすることによって実行した。反応は、４５μＬの２５ｍＭ　ＥＤＴＡを

追加することによって停止させた。
【０１９９】
断片化およびｃＤＮＡ断片の精製
１２０μＬの第２の鎖の合成反応液は、メーカーの指示に従ってＣｏｖａｒｉｓ　Ｓ－ｓｅｒｉｅｓ　Ｓｙｓｔｅｍを使用し、メーカー推奨の設定を使用して、音波断片化にかけ、１５０～２００塩基の平均断片サイズを有する断片化ＤＮＡを産生した。断片化ＤＮＡは、メーカーの指示に従って、ＱＩＡｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キットを使用して濃縮した。断片化し、濃縮したＤＮＡは、定量化し、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ　ＤＮＡ　１０００チップ上に流して、１５０～２００ｂｐ長の断片分布を確保した。
【０２００】
末端修復
断片化ｃＤＮＡの末端を修復して、５’リン酸および３’水酸基を有する平滑末端を生成した。断片化ＤＮＡの末端修復は、Ｅｎｄ　Ｒｅｐａｉｒ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘを使用し、Ｅｎｃｏｒｅ（商標）Ｕｌｔｒａ　Ｌｏｗ　Ｉｎｐｕｔ　ＮＧＳ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｉ　Ｕｓｅｒ　Ｇｕｉｄｅの指示に従って実行した。
【０２０１】
ｄＵマークアダプターとのライゲーション
二重鎖アダプターは、Ｌｉｇａｔｉｏｎ　Ａｄａｐｔｏｒ　Ｍｉｘが１つのアダプターを含有し、そのアダプターのライゲーション鎖がその中に組み込まれた少なくとも１つのｄＵを有したことを除いて、Ｅｎｃｏｒｅ（商標）Ｕｌｔｒａ　Ｌｏｗ　Ｉｎｐｕｔ　ＮＧＳ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｉ　Ｕｓｅｒ　Ｇｕｉｄｅの指示に従って平滑末端ｃＤＮＡ断片に対してライゲーションした。
【０２０２】
ニック修復／アダプター充填
非リン酸化アダプターのライゲーションは、鎖選択および増幅の前に修復されなければならない単鎖ニックを残す。アダプター配列を充填し、完全長二本鎖ＤＮＡ（ｄｓＤＮＡ）を生成するために、反応ミックスを摂氏７２度で加熱し、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼによるｃＤＮＡインサートの３’末端の伸長（それによってアダプター配列を充填）およびライゲーションされていないアダプター鎖の融解がもたらされた。次いで、ライゲーションされたアダプターを有する修復ｄｓＤＮＡ断片は、Ｅｎｃｏｒｅ（商標）Ｕｌｔｒａ　Ｌｏｗ　Ｉｎｐｕｔ　ＮＧＳ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｉ　Ｕｓｅｒ　Ｇｕｉｄｅの指示に従って、Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　ＲＮＡＣｌｅａｎ　ＸＰ　Ｂｅａｄｓを使用して精製した。
【０２０３】
ＵＤＧ／ＡＰＥ　Ｉ処理による鎖選択
ウリジン消化は、２０分間、３７℃で１ユニットのＵＮＧおよび１，０００ユニットのＡＰＥ　Ｉにより実行した。ｃＤＮＡインサートの一方の鎖および２つのアダプターのうちの１つのライゲーション鎖へのｄＵＴＰの組み込みは、望まれないアダプター方向を有する産物の選択的な除去を可能にした。結果的に、ＵＮＧ／ＡＰＥ　Ｉにより処理される、組み込まれたｄＵＴＰを有するポリヌクレオチド鎖は、ポリメラーゼによる増幅を受けることができなかった。
【０２０４】
ライブラリー増幅
最終の方向性をもつｃＤＮＡライブラリーを産生するために、ＵＮＧ選択断片は、Ｅｎｃｏｒｅ（商標）Ｕｌｔｒａ　Ｌｏｗ　Ｉｎｐｕｔ　ＮＧＳ　Ｌｉｂｒａｒｙ　Ｓｙｓｔｅｍ　Ｉ　Ｕｓｅｒ　ＧｕｉｄｅにおけるＬｉｂｒａｒｙ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌに従ってＰＣＲによって増幅した。
【０２０５】
実施例４－サイズによってソートされた細胞由来のゲノムＤＮＡライブラリーからのリボソームＲＮＡ断片の排除

ヒト血液サンプル由来の細胞を、表面マーカーに基づいて、別個の集団に、Ｂｅｃｋｍａｎ ＭｏＦｌｏセルソーターでソートし、それらの集団内の個体を、メーカーの推奨に従ってＮｕＧＥＮのＰｒｅｌｕｄｅ Ｄｉｒｅｃｔ Ｌｙｓｉｓ Ｍｏｄｕｌｅを使用して分離し、溶解する。

【０２０６】

結果として生じるＲＮＡ含有溶液は、核の溶解を回避するために注意しながら、ＮｕＧＥＮのＥｎｃｏｒｅ（登録商標）Ｗｈｏｌｅ Ｂｌｏｏｄ ＲＮＡ－Ｓｅｑへのインプットとして使用する。第１の鎖の合成の後に、第２の鎖の合成を、ｄＵＴＰの存在下において実行し、制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含むアダプターをライゲーションし、充填する。第２の鎖をＵＮＧ処理によって分解する。反応混合物は、ｃＤＮＡに変換されるｒＲＮＡ転写物中の配列に対してアニールするように設計されたプローブのセットと共にインキュベートする。

【０２０７】

ハイブリダイズされたプローブは、ＤＮＡポリメラーゼを使用して、アダプター配列までずっと伸長させ、制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、望まれない核酸上に二本鎖アダプターを生成する。プローブ標的ではない核酸上のアダプターは、一本鎖のままである。二本鎖アダプター配列は、制限酵素により消化されて、アダプターを除去し、それらを、ＰＣＲ濃縮ステップの間に増幅することができないようにする。アダプターを標的にするＰＣＲプライマー、マスターミックス、および好熱性ポリメラーゼを追加し、２０サイクルの熱サイクルにかける。結果として生じたライブラリーは、定量化し、シークエンシングのためにＩｌｌｕｍｉｎａフローセルに適用する。

【０２０８】

実施例５－マイクロ流体システムでのゲノムＤＮＡライブラリーからのリボソームＲＮＡ断片の排除

ＣＤ４＋ＣＤ２５＋細胞は、表面マーカーに基づいて、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ Ｉｎｆｌｕｘセルソーターを使用して、血液サンプルからプールへソートし、メーカーの推奨に従って、ＮｕＧＥＮのＰｒｅｌｕｄｅ Ｄｉｒｅｃｔ Ｌｙｓｉｓ Ｍｏｄｕｌｅを使用して溶解した。

【０２０９】

結果として生じるＲＮＡ含有溶液は、ＲＮＡ対ＤＮＡ結合に好都合であった条件下で５０ｕｌの最終容量までＡｇｅｎｃｏｕｒｔ磁気ビーズに穏やかに導入する。細胞核の溶解を回避するように注意する。次いで、ビーズ含有溶液を、ＮｕＧＥＮのＭｏｎｄｒｉａｎ（商標）デジタルマイクロ流体システムＥｎｃｏｒｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ ＳＰカートリッジにロードし、カートリッジをワークステーションに適用し、適切なスクリプトを選択する。第１の鎖の合成の後に、第２の鎖の合成は、メーカーの指示に従って適したヌクレオチドアナログの存在下において実行し、メーカーの指示に、断片化、ヌクレオチドアナログおよび制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む適したアダプターとのライゲーション、ならびに鎖選択の終わりまで従う。産物は、鎖選択の後かつＰＣＲ濃縮ステップの前にシステムから回収する。１９ｕｌのカートリッジ充填液中のサンプル約１ｕｌは、ヒトｒＲＮＡ転写物中の配列に対してアニールするように設計されたＩｎＤＡ－Ｃプローブを含有する溶液中で、１０ｕｌに希釈した。

【０２１０】

ハイブリダイズされたプローブは、ＤＮＡポリメラーゼを使用して、アダプター配列までずっと伸長させ、制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、望まれない核酸上に二本鎖アダプターを生成する。プローブ標的ではない核酸上のアダプターは、一本鎖のままである。二本鎖アダプター配列は、制限酵素により消化されて、アダプターを除去し、それらを、ＰＣＲ濃縮ステップの間に増幅することができないようにする（図５）。アダプターを標的にするＰＣＲプライマー、マスターミックス、および好熱性ポリメラーゼを追加し、２０サイクルの熱サイクルにかける。結果として生じたライブラリーは、定量化し、シークエンシングのためにＩｌｌｕｍｉｎａフローセルに適用する。

【０２１１】
実施例６－ＧＦＰを発現する単一細胞由来のゲノムＤＮＡライブラリーからのリボソームＲＮＡ断片の排除
ヒト血液サンプル由来のＧＦＰを発現する細胞は、ＦＡＣＳ Ｖａｎｔａｇｅ ＳＥ Ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｅｒ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｄｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．ｃｏｍ）で、色に基づいて、別個の集団へソートする。閾値ＧＦＰ発現より高い細胞は、メーカーの推奨に従って、ＮｕＧＥＮのＰｒｅｌｕｄｅ Ｄｉｒｅｃｔ Ｌｙｓｉｓ Ｍｏｄｕｌｅを使用して、個々のマイクロウェルに分離し、溶解する。

【０２１２】
結果として生じるＲＮＡ含有溶液は、Ｎ６またはＵＳＰプライマー（ＮｕＧＥＮ Ｅｎｃｏｒｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ第１の鎖プライマーミックス）により第１の鎖の合成のためにプライミングする。プライマーは、逆転写酵素ならびに所望のサイズ範囲への断片化を可能にするための標準対非標準ヌクレオチドの比でｄＵＴＰおよびｄＩＴＰを含有するヌクレオチド溶液により伸長させる。合成の後に、ｃＤＮＡは、ＵＮＧによる処理によって断片化して（図６）、遮断３’末端を含む所望のサイズ範囲の断片を生成する。

【０２１３】
イノシンを有する結果として生じるｃＤＮＡ産物は、一方の３’末端に一本鎖ＤＮＡの８つのランダムヌクレオチドが加えられた３３塩基の二本鎖構造を含む部分的二重鎖オリゴヌクレオチド複合体によりプライミングする（図８）。３’伸長反応は、鋳型としてイノシンを含むｃＤＮＡ産物を使用して続けられる。二本鎖分子の末端への制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含むアダプターのライゲーションおよび平滑末端を産生するための充填の後に、ライブラリーは、エンドヌクレアーゼＶにより処理して、イノシン残基を除去し、かつｃＤＮＡ産物を断片化する。それぞれの末端に加えられたアダプター配列を有する結果として生じる一本鎖ＤＮＡは、ｒＲＮＡ配列に対応するｃＤＮＡ内の配列に対してアニールするように設計されたプローブのセットと共にインキュベートする。

【０２１４】
ハイブリダイズされたプローブは、ＤＮＡポリメラーゼを使用して、アダプター配列までずっと伸長させ、制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、望まれない核酸上に二本鎖アダプターを生成する。プローブ標的ではない核酸上のアダプターは、一本鎖のままである。二本鎖アダプター配列は、制限酵素により消化されて、アダプターを除去し、それらを、ＰＣＲ濃縮ステップの間に増幅することができないようにする（図９）。アダプターを標的にするＰＣＲプライマー、マスターミックス、および好熱性ポリメラーゼを追加し、２０サイクルの熱サイクルにかける。結果として生じたライブラリーは、定量化し、シークエンシングのためにＩｌｌｕｍｉｎａフローセルに適用する。

【０２１５】
実施例７－ＣＦＰ－ＹＦＰ ＦＲＥＴ系を発現する単一細胞由来のゲノムＤＮＡライブラリーからのリボソームＲＮＡ断片の排除
ＣＦＰ－ＹＦＰ ＦＲＥＴ系を発現する細胞は、ＦＡＣＳ Ｖａｎｔａｇｅ ＳＥ Ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｅｒ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｂｄｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ．ｃｏｍ）で、ＦＲＥＴ放出シグナルに基づいて、別個の集団へソートする。閾値ＦＲＥＴ放出より高い細胞は、メーカーの推奨に従って、ＮｕＧＥＮのＰｒｅｌｕｄｅ Ｄｉｒｅｃｔ Ｌｙｓｉｓ Ｍｏｄｕｌｅを使用して、個々のマイクロウェルに分離し、溶解する。

【０２１６】
結果として生じるＲＮＡ含有溶液は、Ｎ６またはＵＳＰプライマー（Ｅｎｃｏｒｅ Ｃｏｍｐｌｅｔｅ第１の鎖プライマーミックス、ＮｕＧＥＮ）により第１の鎖の合成のためにプライミングする。プライマーは、逆転写酵素およびｄＵＴＰを含有するヌクレオチド溶液により伸長させる。合成の後に、ｃＤＮＡは、ＵＮＧによる処理によって断片化して（図７）、所望のサイズ範囲の断片を生成する。このｃＤＮＡ産物は、部分的二重鎖オリ

ゴヌクレオチド複合体ライブラリーによりプライミングし、それぞれの複合体は、３’オーバーハングとして一本鎖ＤＮＡの８つのランダムヌクレオチドが加えられた３３塩基の二本鎖構造を含む（図８）。オリゴ複合体は、それぞれ、短い鎖上に３３ヌクレオチドおよび長い鎖上に４１ヌクレオチドを含む２つの鎖から構成される。二本鎖部分内にあるリング鎖の３３の塩基は、アデニンヌクレオチドを欠く。

【０２１７】

８塩基ランダム配列を、断片化ｃＤＮＡにアニールし、ｄＵＴＰの存在下においてＤＮＡポリメラーゼにより伸長させる。同時に、３３塩基オリゴは、ＤＮＡポリメラーゼによって置き換えられ、平滑末端分子を産生する。オリゴ複合体の長い鎖の二本鎖部分中にアデニンを欠くことによって、短い鎖を置き換える伸長産物は、ウラシルを組み込まない。二本鎖分子の末端への制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含むアダプターのライゲーションおよび平滑末端を産生するための充填の後に、ライブラリーは、ＵＮＧにより処理して、ｄＵ残基が組み込まれているＤＮＡを断片化する。それぞれの末端に加えられたアダプター配列を有する結果として生じる一本鎖ＤＮＡは、ｒＲＮＡ配列に対応するｃＤＮＡ内の配列に対してアニールするように設計されたプローブのセットと共にインキュベートする。

【０２１８】

ハイブリダイズされたプローブは、ＤＮＡポリメラーゼを使用して、アダプター配列までずっと伸長させ、制限エンドヌクレアーゼ認識配列を含む、望まれない核酸上に二本鎖アダプターを生成する。プローブ標的ではない核酸上のアダプターは、一本鎖のままである。二本鎖アダプター配列は、制限酵素により消化されて、アダプターを除去し、それらを、ＰＣＲ濃縮ステップの間に増幅することができないようにする（図９）。アダプターを標的にするＰＣＲプライマー、マスターミックス、および好熱性ポリメラーゼを追加し、２０サイクルの熱サイクルにかける。結果として生じたライブラリーは、定量化し、シークエンシングのためにＩｌｌｕｍｉｎａフローセルに適用する。

【０２１９】

実施例８－ライブラリーからの望まれない核酸断片の排除のためのプローブ設計

この実施例は、望まれない核酸断片を標的にするｉｎｓｅｒｔ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ａｄａｐｔｏｒ ｃｌｅａｖａｇｅ（ＩｎＤＡ－Ｃ）プローブを使用する、様々な起源のライブラリーからの望まれない核酸断片の排除を記載する。

【０２２０】

プローブ設計および合成

排除のための標的配列は、所定のサンプルタイプ内に頻繁に大量に見つけられるかもしれない転写物について集められる。そのような転写物の例は、ほとんどのサンプルタイプ中のリボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）およびミトコンドリアＲＮＡ、血液サンプル内のグロビン、ならびに植物サンプル内の葉緑体ＲＮＡである。これらの配列は、入手可能な場合、ＲｅｆＳｅｑなどのような公的なデータからまたは十分にアノテートされたもしくは完全な参照ゲノムを有していないブドウの場合のように、実験によるデータの供給源から（Ｇｒａｐｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｒｏｗｓｅｒ ａｖａｉｌａｂｌｅ ｏｎｌｉｎｅ ｆｒｏｍ Ｇｅｎｏｓｃｏｐｅ、Ｄｅｎｏｅｕｄら Ａｎｎｏｔａｔｉｎｇ ｇｅｎｏｍｅｓ ｗｉｔｈ ｍａｓｓｉｖｅ－ｓｃａｌｅ ＲＮＡ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ．Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２００８、９：Ｒ１７５ ｄｏｉ：１０．１１８６／ｇｂ－２００８－９－１２－ｒ１７５：ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｇｅｎｏｓｃｏｐｅ．ｃｎｓ．ｆｒ／ｅｘｔｅｒｎｅ／ＧｅｎｏｍｅＢｒｏｗｓｅｒ／Ｖｉｔｉｓ／）集められる。プローブの方向は、鋳型のどちらの鎖がアダプターライゲーション後に保持されるべきかに基づいて決定される。それぞれの望まれない転写物は、コンピューターで７０塩基領域に「断片化され」、これらの領域は、Ｐｒｉｍｅｒ３などのようなＰＣＲプライマー設計ソフトウェアを使用して照会される（Ｓｔｅｖｅ Ｒｏｚｅｎ ａｎｄ Ｈｅｌｅｎ Ｊ．Ｓｋａｌｅｔｓｋｙ（２０００）Ｐｒｉｍｅｒ３ ｏｎ ｔｈｅ ＷＷＷ ｆｏｒ ｇｅｎｅｒａｌ ｕｓｅｒｓ ａｎｄ ｆｏｒ ｂｉｏｌｏｇｉｓｔ ｐｒｏｇｒａｍｍｅｒｓ．Ｉｎ

：Ｋｒａｗｅｔｚ　Ｓ、Ｍｉｓｅｎｅｒ　Ｓ（ｅｄｓ）Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ．Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ、ｐｐ３６５－３８６）。標的融解温度は、ヒト細胞質内およびミトコンドリアｒＲＮＡならびにヒトグロビンメッセージについては６０℃に、また、ブドウ細胞質内およびミトコンドリアｒＲＮＡならびにブドウ葉緑体ｒＲＮＡに対しては６５℃に設定される。

【０２２１】

Ｐｒｉｍｅｒ３によって提示されたプライマー配列は、同じ生物由来の知られている転写物配列に対してＢＬＡＳＴされ、オフターゲットの相互作用を制限または排除する。オフターゲットの相互作用を有することが決定されたプローブは、プールから除去される。プライマープローブオリゴヌクレオチドは標準的なホスホラミダイト（ｐｈｏｓｐｏｒａｍｉｄｉｔｅ）成分を使用して産生される。

【０２２２】

ＲＮＡ配列およびＤＮＡ配列の排除

ヒト細胞質内およびミトコンドリアｒＲＮＡ、ヒトグロビンｍＲＮＡ、ブドウ細胞質内およびミトコンドリアｒＲＮＡ、ブドウ葉緑体ｒＲＮＡなどのような、望まれない核酸配列に対して特異的な設計されたプライマープローブは、実施例１、２、４、５、６、または７（図１、５～７、および９）において例証される方法のうちの１つなどのような、本明細書において記載されたやり方のうちの１つにおいて、望まれない配列を排除する際に利用される。より低いアニーリング温度および伸長温度は、より積極的な鎖排除条件のために使用されてもよい。手短かに言えば、様々なアダプター構成における一本鎖核酸は、設計されたプライマープローブのセットとハイブリダイズし、望まれない核酸を排除する。核酸は、５’末端上に供給される制限エンドヌクレアーゼ認識配列と共に調製される。プライマープローブは、伸長し、制限エンドヌクレアーゼ認識配列のまわりに二本鎖構造をもたらす。制限エンドヌクレアーゼ認識部位での核酸の切断は、続く増幅反応、たとえばＰＣＲによって標的にされるプライマーアニーリング配列をさらに破壊する。したがって、プライマープローブによって標的にされる核酸は、増幅に利用不可能であり、サンプル中に残りの核酸を濃縮する。

【図１】

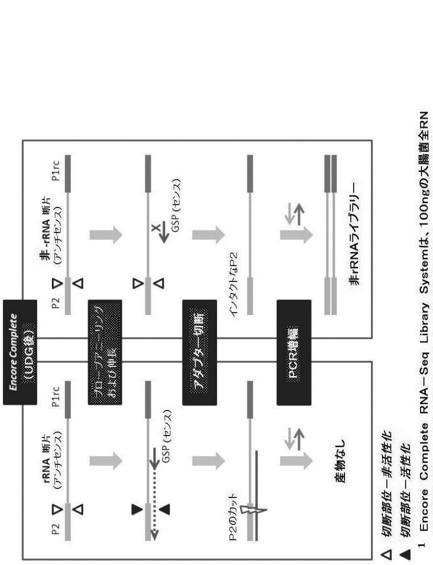


Figure 1. インサート非依存性アダプター切断(insert−dependent adaptor cleavage)(InDA−C)を使用する核酸ライブラリーからのrRNA排除

△ 切断部位－非活性化
▲ 切断部位－活性化
1 Encore Complete RNA−Seq Library Systemは、100ngの大腸菌全RNAから鎖特異的cDNAライブラリーを生成するために使用する。

【図２】

Figure 2. 結果の概要－実施例1

ライブラリー	プローブ	BspQ1	リードの全数	参照に対してマッピングされるリードの%	ORFにおけるマッピングされたリードの%	rRNAにおけるマッピングされたリードの%	センス鎖に対してマッピングされるrRNAリードの%	アンチセンス鎖に対してマッピングされるrRNAリードの%
ctrl	-	-	27,161,879	99.3	1.0	99.0	99.7	0.3
test1	-	-	7,510,963	97.3	5.6	92.9	99.1	0.9
test2	+	-	8,679,815	97.5	5.6	92.9	99.1	0.9
test3	-	+	9,331,682	97.4	5.2	93.4	99.2	0.8
test4	+	+	9,355,578	95.1	11.7	86.1	98.1	1.9

【図３】

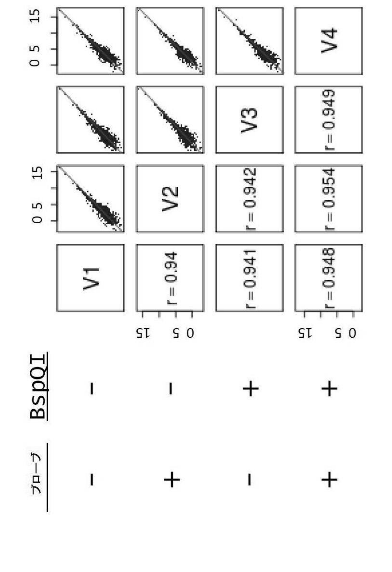


Figure 3. 実施例1における試験ライブラリー1～4からの発現プロファイルの比較。InDA−Cは転写物存在量を乱さない。

【図４】

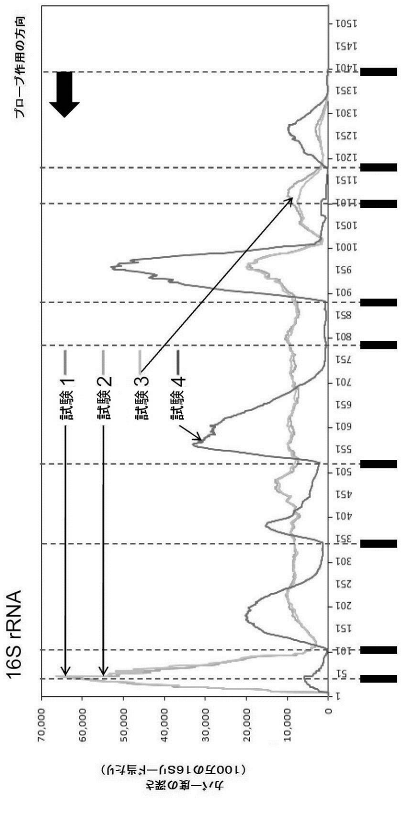
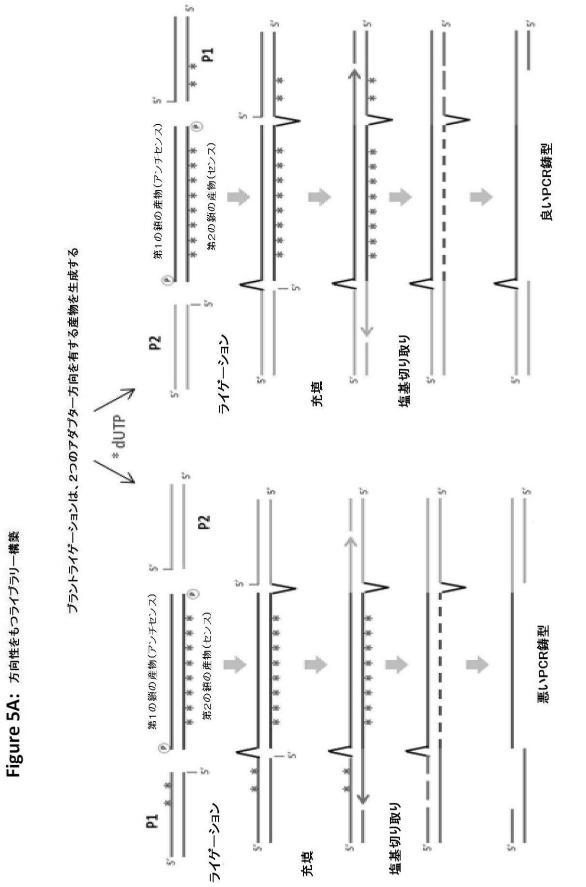
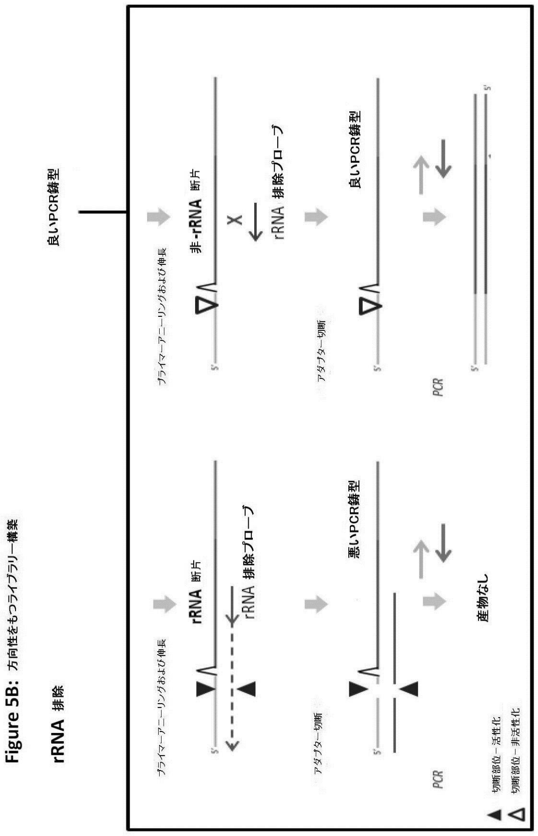


Figure 4

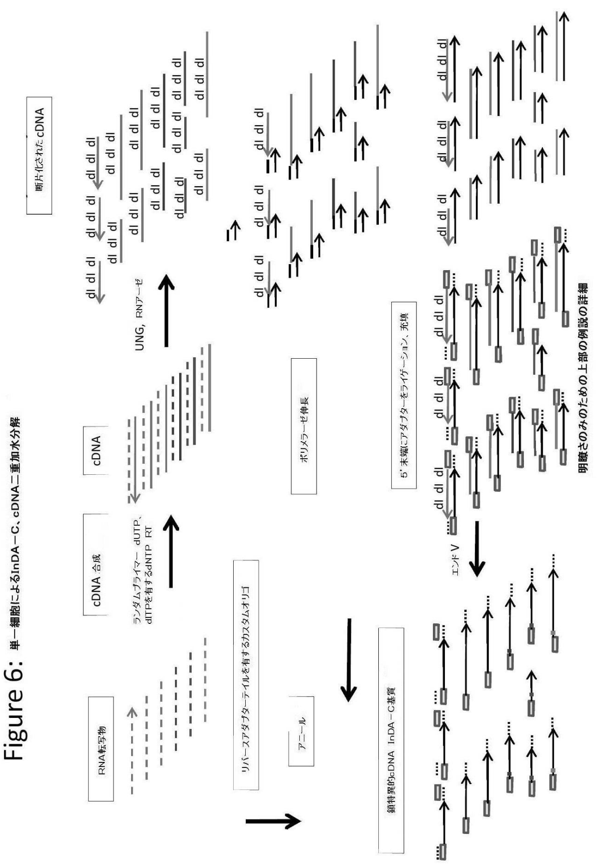
【図５Ａ】



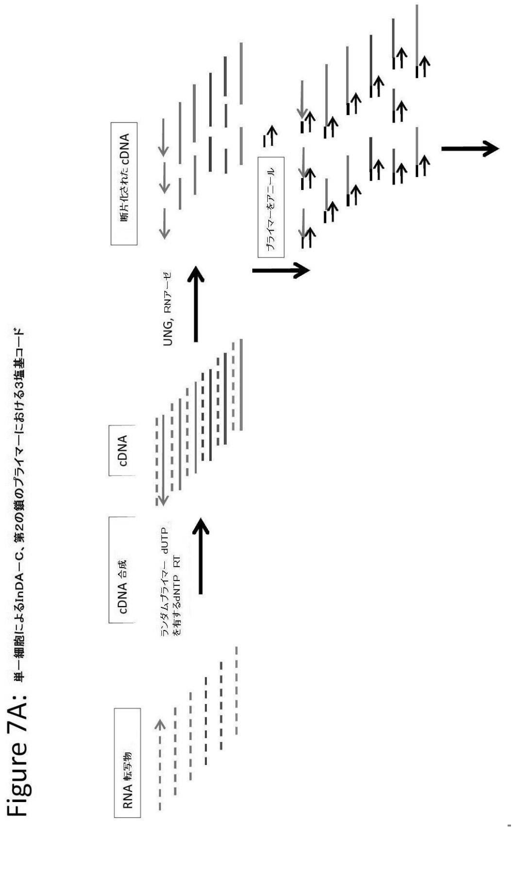
【図５Ｂ】



【図６】



【図７Ａ】



【図７Ｂ】

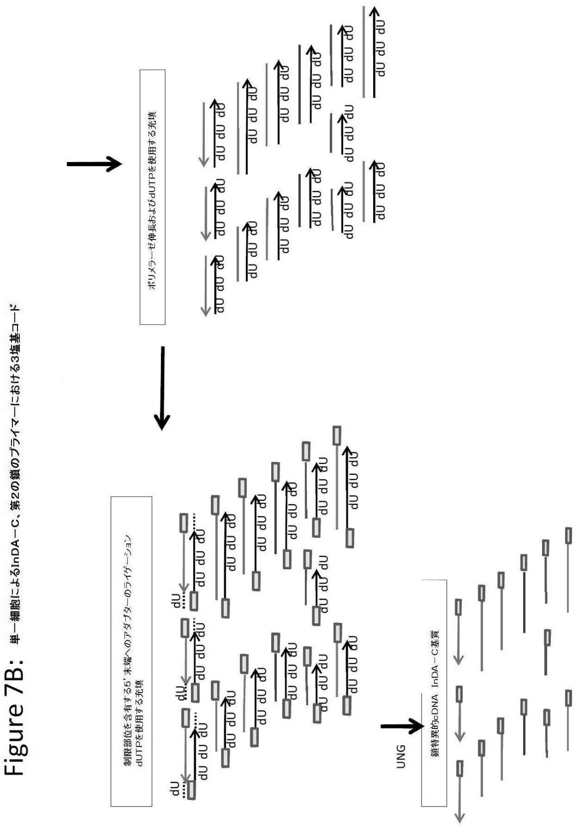


Figure 7B: 単一細胞によるInDA−C、第2の鎖のプライマーにおける3塩基コード
ポリメラーゼ伸長およびdUTPを使用する充填
制限部位を含有する5'末端へのアダプターのライゲーション
dUTPを使用する充填
UNG
鎖特異的cDNA InDA−C基質

【図８】

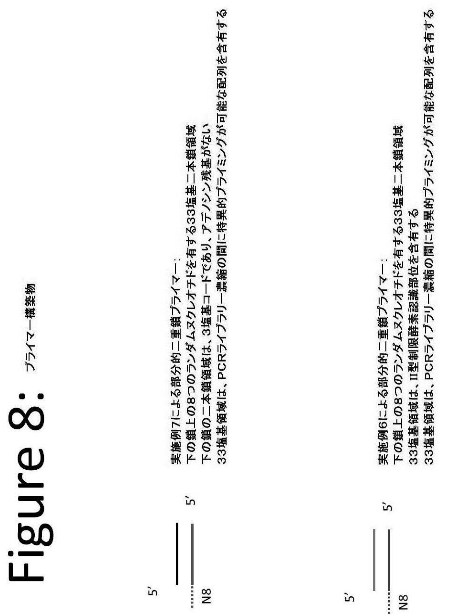


Figure 8: プライマー構築物
実施例7による部分的二重鎖プライマー：
下の鎖上の8つのランダムヌクレオチドを有する33塩基二本鎖領域
下の鎖の二本鎖領域は、3塩基コードであり、アデノシン残基がない
33塩基領域は、PCRライブラリー濃縮の間に特異的プライミングが可能な配列を含有する
実施例6による部分的二重鎖プライマー：
下の鎖上の8つのランダムヌクレオチドを有する33塩基二本鎖領域
33塩基領域は、II型制限酵素認識部位を含有する
33塩基領域は、PCRライブラリー濃縮の間に特異的プライミングが可能な配列を含有する
5'
N8

【図９】

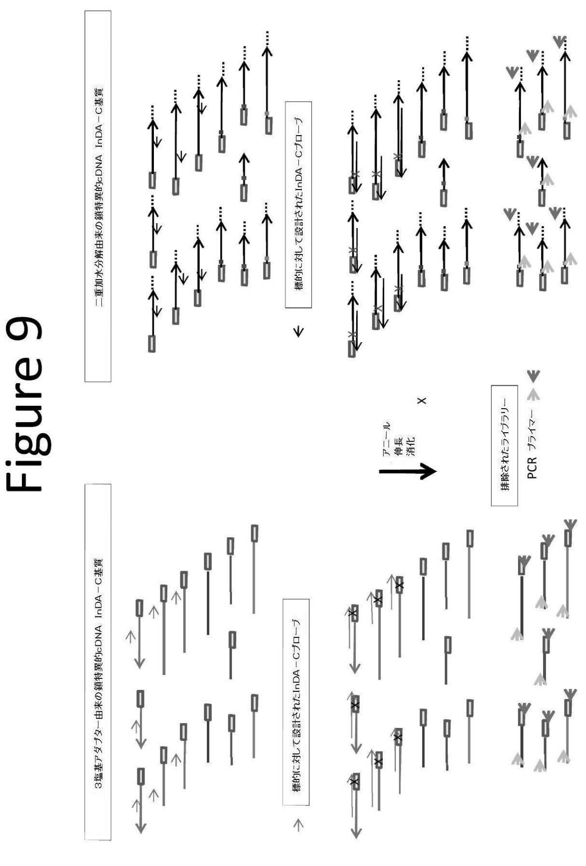


Figure 9
3塩基アダプター由来の鎖特異的cDNA InDA−C基質
二重加水分解由来の鎖特異的cDNA InDA−C基質
標的に対して設計されたInDA−Cプローブ
アニール
伸長
消化
排除されたライブラリー
PCR プライマー

【配列表】
0006181751000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　アモーレス，　ダグ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２２，　ロス　アルトス，　サウス　エル　モンテ　アベニュー　３５７
(72)発明者　リー，　ビン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０３，　パロ　アルト，　ヘーロン　ウェイ　３７２３
(72)発明者　カーン，　ヌリス
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４３０６，　パロ　アルト，　ラモナ　ストリート　２８７６

審査官　中村　勇介

(56)参考文献　特表２０１２－５３３３１４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１２／０２９５７７（ＷＯ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１２／００７４９２５（ＵＳ，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１１／０３１９２９０（ＵＳ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ１／００－３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）