



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월20일
(11) 등록번호 10-2591300
(24) 등록일자 2023년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) B01L 3/00 (2023.01)
B01L 9/00 (2023.01) C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
B01L 3/50857 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7020659
(22) 출원일자(국제) 2017년12월19일
심사청구일자 2020년12월18일
(85) 번역문제출일자 2019년07월16일
(65) 공개번호 10-2019-0098184
(43) 공개일자 2019년08월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/067421
(87) 국제공개번호 WO 2018/118992
국제공개일자 2018년06월28일
(30) 우선권주장
62/436,407 2016년12월19일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
EP00702090 A2*
US09101928 B2*
W02016025872 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
퀀텀-에스아이 인코포레이티드
미국 06437 코네티컷주 길포드 올드 화이트필드
스트리트 530
(72) 발명자
로스버그, 조나단, 엠.
미국 06437 코네티컷주 길포드 운카스 포인트 로
드 215
블, 제임스, 에이.
미국 06339 코네티컷주 레디어드 슈빌 로드 674알
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 25 항

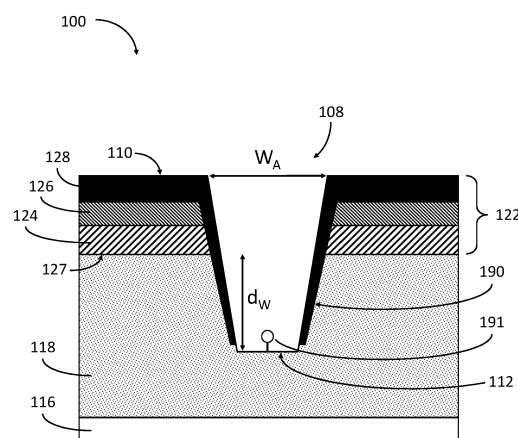
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 분석을 위한 샘플 웰 내로의 분자의 로딩

(57) 요약

관심 분자를 샘플 웰 내로 로딩하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, 관심 분자를 샘플 웰 내로 로딩하는 방법은 관심 분자를 크라우딩 작용제 및/또는 응축제의 존재 하에 샘플 웰 내로 로딩하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 서열분석 주형을 샘플 웰 내로 로딩하는 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B01L 9/523 (2013.01)

C12Q 1/6869 (2018.05)

B01L 2200/0642 (2013.01)

B01L 2300/0829 (2013.01)

B01L 2300/0893 (2013.01)

C12Q 2527/125 (2019.08)

C12Q 2563/159 (2013.01)

(72) 발명자

래키, 제레미

미국 06437 코네티컷주 길포드 노튼타운 로드 636

리드, 브라이언

미국 06443 코네티컷주 매디슨 홀 로드 94

고레이노브, 알렉산더

미국 06511 코네티컷주 뉴헤이븐 드와이트 스트리트 136 아파트먼트 35

명세서

청구범위

청구항 1

서열분석 주형을 포함하는 관심 분자를 포함하는 샘플을, 복수의 샘플 웰을 포함하는 기관의 표면에 접촉시키는 것; 및

기관의 표면 상의 샘플 위에 크라우딩 작용제를 포함하는 조성물의 층을 첨가하는 것

을 포함하며, 여기서 샘플 위에 제공되는 크라우딩 작용제는 관심 분자가 샘플의 벌크 부피로부터 배제되고 상기 복수의 샘플 웰 중 샘플 웰 내로 인도되도록 샘플의 벌크 부피를 감소시키는 것인, 관심 분자를 샘플 웰 내로 로딩하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열분석 주형이 적어도 하나의 혼성화된 프라이머/중합 효소 복합체를 갖는 핵산 분자를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 크라우딩 작용제가 폴리사카라이드인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 폴리사카라이드가 셀룰로스 화합물인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 셀룰로스 화합물이 에틸 셀룰로스, 에틸 메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 에틸 히드록시에틸 셀룰로스, 및 카르복시메틸 셀룰로스로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 크라우딩 작용제가 폴리에테르 화합물인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 폴리에테르 화합물이 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 파라포름알데히드, 폴리테트라메틸렌 글리콜, 및 폴리페닐 에테르로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 크라우딩 작용제가 폴리아미드 화합물인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 폴리아미드 화합물이 선형 폴리비닐피롤리돈 및 시클릭 폴리비닐피롤리돈으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 크라우딩 작용제가 필름으로서 제공되는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 필름이 가교된 겔 또는 탈수된 용액으로부터 선택된 물질인 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 크라우딩 작용제가 용액으로서 제공되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도가 0.6 중량%, 0.9 중량%, 2.0 중량%, 또는 2.3 중량%인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도가 0.1 중량% 내지 5.0 중량%인 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 샘플을 관심 분자의 층만 부피를 감소시키도록 구성된 응축제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 응축제가 샘플 중 다가양이온성인 다가양이온을 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 다가양이온이 스페르민, 스페르미딘, 폴리리신, 폴리아르기닌, 폴리히스티딘, 폴리오르니틴, 푸트레신, 및 프로타민으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 18

제1항 또는 제2항에 있어서, 복수의 샘플 웰의 각각의 샘플 웰이 기관의 표면에 대해 원위에 있는 저부 표면을 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 저부 표면이 관심 분자에 결합하도록 구성된 적어도 1개의 커플링 기를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 또는 제2항에 있어서, 샘플을 실란트와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 실란트가 산화성 작용제 및 촉매를 포함하는 산소 스캐빈징 실란트를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 산화성 작용제가 적어도 1개의 에틸렌 결합을 포함하는 유기 화합물이고, 촉매가 전이 금속 및 반대이온을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항 또는 제2항에 있어서, 샘플을 차세대 서열분석 기술로 처리하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 24

제1항 또는 제2항에 있어서, 샘플 웰이 저부 표면에 대해 원위에 있는 상부 개구를 갖는 것인 방법.

청구항 25

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 샘플 웰이 10^{-21} 리터 내지 10^{-15} 리터의 부피를 갖는 것인 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2016년 12월 19일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/436,407의 우선권을 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 본 출원의 분야
- [0004] 본 출원은 일반적으로 분석을 위한 생물학적 및/또는 화학적 샘플의 제조를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 차세대 서열분석 기술의 진보는 단일 분자의 대량 병렬 분석을 수행하는 것을 가능하게 하였다. 이러한 기술은 특히 유전체학 및 의학적 진단과 관련하여 생명 과학 연구의 전망을 근본적으로 변경하였다. 생물학적 샘플의 고유한 복잡성은 일반적으로 통상적인 단일 분자 기술을 사용하는 힘들고 시간 소모적인 샘플 제조 프로토콜을 필요로 한다. 또한, 이들 반응이 수행되는 샘플 웰의 특별히 작은 크기는 분석될 수 있는 분자의 크기를 제한할 수 있다.

발명의 내용

- [0006] 본원에 개시된 기술의 측면은 분석을 위한 관심 분자의 제조 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 서열분석을 위한 샘플 (예를 들어, 핵산 샘플)의 제조에 유용한 방법 및 조성물이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 기술은 관심 분자를 포함하는 샘플을 샘플 웰 내로 로딩하는 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 관심 분자를 포함하는 샘플을, 기관의 표면에 상기 샘플을 접촉시키는 것을 수반하여 샘플 웰 내로 로딩하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 관심 분자는 서열분석 주형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석 주형은 적어도 하나의 혼성화된 프라이머/중합 효소 복합체를 갖는 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 기관은 집적 디바이스이다. 일부 실시양태에서, 기관의 표면은 복수의 샘플 웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 샘플을 크라우딩 작용제와 접촉시키는 것을 추가로 수반한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자를 배제한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 용매 분자 (예를 들어, 물) 및/또는 다른 반응 성분 (예를 들어, 염, 완충제, 뉴클레오티드 등)에 비해 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)를 선택적으로 배제한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 부피 배제 작용제이다.
- [0007] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리사카라이드이다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 셀룰로스 화합물이다. 일부 실시양태에서, 셀룰로스 화합물은 메틸 셀룰로스이다. 일부 실시양태에서, 셀룰로스 화합물은 에틸 셀룰로스, 에틸 메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 에틸 히드록시에틸 셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리에테르 화합물이다. 일부 실시양태에서, 폴리에테르 화합물은 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 파라포름알데히드, 폴리테트라메틸렌 글리콜 및 폴리페닐 에테르로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리아미드이다. 일부 실시양태에서, 폴리아미드는 선형 폴리비닐피롤리돈 및 시클릭 폴리비닐피롤리돈으로부터 선택된다.
- [0008] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 필름으로서 제공된다. 일부 실시양태에서, 필름은 가교된 겔 또는 탈수된 용액으로부터 선택된 물질이다. 일부 실시양태에서, 필름은 폴리아크릴아미드, 텍스트란, 아가로스, 또는 그의 일부 조합 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 필름은 슬러리로서 제공된다. 일부 실시양태에

서, 필름은 입자로서 제공된다.

- [0009] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제 (예를 들어, 메틸 셀룰로스)가 용액으로서 제공된다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 2.0 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 2.3 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 0.1 중량% 내지 약 1.0 중량%, 약 1.0 중량% 내지 약 2.0 중량%, 약 2.0 중량% 내지 약 3.0 중량%, 약 3.0 중량% 내지 약 4.0 중량%, 또는 약 4.0 중량% 내지 약 5.0 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 5.0 중량% 내지 약 6.0 중량%, 약 6.0 중량% 내지 약 7.0 중량%, 약 7.0 중량% 내지 약 8.0 중량%, 약 8.0 중량% 내지 약 9.0 중량%, 또는 약 9.0 중량% 내지 약 10 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 10 중량% 내지 약 11 중량%, 약 11 중량% 내지 약 12 중량%, 약 12 중량% 내지 약 13 중량%, 약 13 중량% 내지 약 14 중량%, 또는 약 14 중량% 내지 약 15 중량%이다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 용해도는 온도, pH, 염 및/또는 다른 인자에 따라 달라진다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 현탁액 (예를 들어, 콜로이드 현탁액) 중에 제공된다. 일부 실시양태에서, 현탁액 중 크라우딩 작용제의 농도는 크라우딩 작용제 용액에 대해 상기 기재된 중량% 또는 중량 범위 중 대략 어느 하나이다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 샘플은 크라우딩 작용제와 접촉되기 전에 표면에 접촉된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 표면에 접촉되기 전에 크라우딩 작용제와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 표면과 접촉되고, 대략 동시에 크라우딩 작용제와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 표면에 접촉시에 크라우딩 작용제와 접촉된다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 샘플을 집적 디바이스 (예를 들어, 복수의 샘플 웰을 포함하는 서열 분석 칩)의 표면과 접촉시키고, 크라우딩 작용제 (예를 들어, 크라우딩 작용제를 포함하는 용액)의 층을 샘플의 상부 표면에 적용한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 제1 용액을 집적 디바이스의 표면과 접촉시켜 집적 디바이스의 표면에서 제1 부피를 형성한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제를 포함하는 제2 용액을 제1 부피의 표면에 접촉시켜 제1 부피의 표면에서 제2 부피를 형성한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 제1 부피의 용매 분자에 비해 우선적으로 관심 분자를 제2 부피로부터 배제한다. 일부 실시양태에서, 제1 용액은 1종 이상의 시약 성분 (예를 들어, 완충제, 염, 표지된 뉴클레오티드)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 제1 부피의 1종 이상의 시약 성분에 비해 우선적으로 관심 분자를 제2 부피로부터 배제한다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 복수의 샘플 웰 각각은 기관의 표면에 대해 원위에 있는 저부 표면을 포함한다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 관심 분자에 결합하도록 구성된 커플링 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 서열분석 주형에 (예를 들어, 중합 효소로의 또는 서열분석 주형 상의 중합 효소에 의해 결합된 핵산으로의 커플링을 통해) 결합하도록 구성된 커플링 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자를 저부 표면 쪽으로 향하게 하고, 이에 의해 관심 분자는 적어도 1개의 커플링 기를 통해 저부 표면에 결합된다. 일부 실시양태에서, 커플링 기는 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 뉴트라비딘, 렉틴 단백질 또는 SNAP-태그로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 커플링 기는 반응성 화학적 기이다. 일부 실시양태에서, 반응성 화학적 기는 아민 기, 아지도 기, 카르복실 기, 히드록실 기, 알킬 기 또는 술폰히드릴 기로부터 선택된다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 샘플은 핵산 주형, 중합 효소, 핵산 주형에 상보적인 프라이머, 및 서열분석 반응에 적합한 1종 이상의 시약 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 효소 및 프라이머는 핵산 주형 상에 적어도 하나의 혼성화 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 1종 이상의 뉴클레오티드(예를 들어, 표지된 뉴클레오티드), 1종 이상의 완충제, 1종 이상의 염, 1종 이상의 환원제, 및 1종 이상의 계면활성제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 금속 양이온 (예를 들어, 마그네슘 이온)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 금속 양이온은 서열분석 반응을 개시하기 위해 샘플에 첨가된다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 약 1 kb 내지 약 5 kb, 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 15 kb, 약 15 kb 내지 약 20 kb, 또는 약 20 kb 내지 약 25 kb이다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 약 25 kb 내지 약 50 kb, 약 50 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 250 kb, 약 250 kb 내지 약 500 kb, 또는 약 500 kb 내지 약 1000 kb이다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 중합 효소는 DNA 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, DNA 폴리머라제는 T4 DNA 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, DNA 폴리머라제는 T7 DNA 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, DNA 폴리머라제는 phi29 DNA 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, DNA 폴리머라제는 M2Y DNA 폴리머라제이다. 일부 실시양태에

서, DNA 폴리머라제는 루실리아 쿠프리나(*Lucilia cuprina*)의 DNA 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, 중합제는 키메라 및/또는 변형된 DNA 폴리머라제이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 응축제가 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 응축제는 크라우딩 작용제의 첨가 전에 관심 분자와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 응축제는 서열분석 주형이 집적 디바이스의 표면과 접촉되기 전에 서열분석 주형에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 응축제 및 서열분석제는 대략 동시에 집적 디바이스의 표면에 접촉된다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스의 표면은 서열분석 주형이 집적 디바이스의 표면에 접촉되기 전에 응축제를 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 샘플을 실란트와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 실란트는 미네랄 오일을 포함한다. 일부 실시양태에서, 실란트는 산화성 작용제 및 촉매를 포함하는 산소 스캐빈징 실란트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 산화성 작용제는 적어도 1개의 에틸렌 결합을 포함하는 유기 화합물이다. 일부 실시양태에서, 유기 화합물은 아스코르빌 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유기 화합물은 아스코르빌산 에스테르이다. 일부 실시양태에서, 유기 화합물은 아스코르베이트의 지방산 에스테르이다. 일부 실시양태에서, 유기 화합물은 토코페롤 화합물이다. 일부 실시양태에서, 촉매는 전이 금속 및 반대이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전이 금속은 스칸듐, 티타늄, 바나듐, 크로뮴, 망가니즈, 철, 코발트, 니켈, 구리, 아연, 란타넘, 세륨, 프라세오디뮴, 네오디뮴, 프로메튬, 사마륨, 유로퓸, 가돌리늄, 테르븀, 디스프로슘, 홀뮴, 에르븀, 툴륨, 이테르븀 및 루테튬으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 전이 금속은 구리이다. 일부 실시양태에서, 반대이온은 할라이드 (예를 들어, F, Cl, Br, I), 술페이트, 술파이트, 술피드, 니트레이트, 니트라이드, 아세테이트, 아세틸아세토네이트, 퍼클로레이트, 히드록시드, 메톡시드 및 에톡시드로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 반대이온은 라우레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 올레에이트 및 리놀레이트로부터 선택된다.

[0020] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)를 차세대 서열분석 기술에 적용하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 통상의 기술자는 본원에 기재된 도면이 예시 목적만을 위한 것임을 이해할 것이다. 일부 경우에, 본 발명의 다양한 측면은 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해 과장되거나 확대하여 제시될 수 있음을 이해해야 한다. 도면에서, 유사 참조 문자는 일반적으로 다양한 도면 전체에서 유사 특색, 기능적으로 유사한 및/또는 구조적으로 유사한 요소를 지칭한다. 도면은 반드시 척도화된 것은 아니고, 대신 본 교시의 원리를 예시하는데 강조를 두었다. 도면은, 본 발명의 범위를 어떤 방식으로든 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

본 발명의 특색 및 이점은 도면과 함께 볼 때, 하기에 제시된 상세한 설명으로부터 더욱 명백해질 것이다.

도면을 참조하여 실시양태를 기재하는 경우, 방향 언급 ("위", "아래", "상부", "저부", "좌측", "우측", "수평", "수직" 등)이 사용될 수 있다. 이러한 언급은 단지 통상의 배향으로 도면을 보는 독자를 돕기 위한 것으로 의도된다. 이들 방향 언급은 구현된 디바이스의 바람직한 또는 유일한 배향을 기재하는 것으로 의도되지 않는다. 디바이스는 다른 배향으로 구현될 수 있다.

상세한 설명으로부터 명백한 바와 같이, 도면 (예를 들어, 도 1 - 10)에 도시되고 출원 전반에 걸쳐 예시의 목적으로 추가로 기재된 예는 비제한적인 실시양태를 기재하고, 일부 경우에 보다 명확한 예시의 목적을 위해 특정 공정을 단순화하거나 또는 특색 또는 단계를 생략할 수 있다.

도 1은 샘플 웰을 예시하는 단면도이다.

도 2는 복수의 샘플 웰을 갖는 집적 디바이스의 단면도이다.

도 3a는 크라우딩 작용제의 부재 하에 복수의 샘플 웰을 갖는 집적 디바이스 상에 샘플을 도입한 후의 샘플 웰 내로 로딩된 관심 분자를 포함하는 샘플을 예시하는 단면도이다.

도 3b는 크라우딩 작용제의 존재 하에 복수의 샘플 웰을 갖는 집적 디바이스 상에 도입한 후의 샘플 웰 내로 로딩된 관심 분자를 포함하는 샘플을 예시하는 단면도이다.

도 4는 관심 분자를 갖는 샘플에서의 크라우딩 작용제의 효과의 예를 도시하는 예시이다.

도 5는 관심 분자를 갖는 샘플에서의 응축제의 효과의 예를 도시하는 예시이다.

도 6a-6c는 샘플을 집적 디바이스 상에 도입하고 (도 6a), 샘플에 크라우딩 작용제를 첨가하고 (도 6b), 크라우딩 작용제로 하여금 관심 분자를 집적 디바이스의 샘플 웰 내로 인도하도록 함으로써 (도 6c), 관심 분자를 포함하는 샘플을 샘플 웰 내로 로딩하는 공정을 도시한다.

도 6d는 크라우딩 작용제를 포함하는 과잉의 부피를 제거한 후의 집적 디바이스의 샘플 웰 내로 로딩된 관심 분자를 예시하는 단면도이다.

도 6e는 반응 개시 후의 도 6d의 집적 디바이스를 도시한다.

도 6f는 산소 스캐빈징 실란트를 첨가한 후의 도 6e의 집적 디바이스를 도시한다.

도 7a 및 7b는 크라우딩 작용제를 사용하여 로딩된 샘플을 사용하여 수행된 실시간 서열분석 반응으로부터의 획득값 (도 7a) 및 결과 (도 7b)를 도시한다.

도 8은 확산에 의해 샘플 웰 내로 로딩된 핵산 샘플(위) 및 크라우딩 작용제의 존재 하에 샘플 웰 내로 로딩된 핵산 샘플(아래)의 DNA 형광 염색의 이미지 표현을 도시한다.

도 9는 확산에 의해 샘플 웰 내로 로딩된 핵산 샘플(좌) 및 크라우딩 작용제의 존재 하에 샘플 웰 내로 로딩된 핵산 샘플(우)의 DNA 형광 영상을 도시한다.

도 10은 고체 상태 크라우딩 작용제에 대한 개념 증명을 나타내는 실험 설정을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 다른 측면들 중, 본 개시내용은 관심 분자를 샘플 웰 내로 로딩하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 본원에 기재된 기술은 관심 분자를 포함하는 샘플을 샘플 웰을 포함하는 고체 지지체의 표면에 접촉시키는 단계를 수반한다(예를 들어, 집적 디바이스의 표면에 대해 원위에 있는 저부 표면을 갖는 샘플 웰을 포함하는 집적 디바이스에서). 일부 실시양태에서, 샘플은 관심 분자를 샘플 웰의 저부 표면 쪽으로 향하게 하는 크라우딩 작용제와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰의 저부 표면은 관심 분자에 결합하도록 구성된 커플링 기를 포함한다. 이러한 방식으로, 관심 분자는 커플링 기를 통해 샘플 웰의 저부 표면에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은, 관심 분자가 응축제의 부재 하의 자신의 구조에 비해 응축된 구조를 취하도록 하는 응축제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 분자는 서열분석 주형을 포함한다.
- [0023] 일부 측면에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 샘플 내의 개별 분자 또는 입자의 검출을 가능하게 하는 기술에 유용할 수 있다. 개별 분자는, 예로서 및 비제한적으로, 아미노산, 폴리펩티드, 뉴클레오티드, 및/또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용에서 제공된 방법 및 조성물은 단일 분자 핵산 서열분석 기술과 함께 사용될 수 있다. 단일 분자 핵산 서열분석은 주형 핵산에 상보적인 핵산 분자의 연장을 실시간 모니터링함으로써 단일 주형 핵산 분자의 서열을 결정할 수 있게 한다.
- [0024] 특정 기술에서, 단일 분자 핵산 서열분석은 각각의 복수의 샘플 웰 내의 단일 서열분석 주형을 분리함으로써 수행된다. 그러나, 많은 적용에서, 총 샘플 부피에 비해 이들 샘플 웰의 총 부피는 상당히 작다. 추가로, 단일 샘플 웰 중 다중 주형을 최소화하는데 요구되는 샘플 중 서열분석 주형의 농도는 종종 너무 낮아서 서열분석 주형을 샘플 웰 내로 로딩하는 동역학은, 성공적으로 로딩되고 충분히 활성인 복합체의 양을 심각하게 제한할 수 있다. 본 발명자들은 이들 및 다른 제한이 서열분석 주형 로딩 과정의 일부로서 특수 시약을 이용함으로써 극복될 수 있다는 것을 인식하고 인지하였다.
- [0025] 따라서, 개선된 서열분석 주형 제조 및 서열분석 주형 로딩 관행에 대한 필요성을 인식하여, 본 발명자들은 서열분석 주형이 벌크 부피로부터 배제되고 샘플 웰 내로 인도되도록 샘플의 벌크 부피를 효과적으로 감소시키기 위해 크라우딩 작용제를 사용하는 기술을 개발하였다. 본 발명자들은 추가로 본원에 기재된 크라우딩 작용제가 서열분석 주형 크기와 관련하여 상기 언급된 고려사항을 넘어서 이점을 제공한다는 것을 인식하고 인지하였다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 관심 분자를 갖는 샘플을 집적 디바이스의 표면에 접촉시킴으로써 관심 분자를 샘플 웰 내로 로딩하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 샘플 웰을 포함한다. 예를 들어, 도 1은 본 출원의 일부 비제한적 실시양태에 따른 집적 디바이스(100)에 포함된 샘플 웰(108)의 단면도이다. 샘플 웰(108)은 샘플 웰(108)의 저부 표면(112)에 대해 원위에 있는 집적 디바이스의 표면(110)에서의 작은 부피 또는 영역을 포함할 수 있다. 샘플 웰(108)은 샘플 웰(108)의 저부 표면(112)에서 보유될 수 있는 관심 분자(191)를 포함하는 샘플을 수용하도록 구성될 수 있다. 샘플 웰(108)의 저부 표면(112)은 관심 분자(191)에 결합하는 1개 이상의 커플링 기를 적어도 일시적으로 소정 기간 동안 포함한다. 샘플 웰(108)의 저부

표면(112)은 관심 분자(191)가 샘플 웰(108)의 측벽(190)보다는 저부 표면에 부착하는 선택성을 제공하는 1종 이상의 물질을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰(108)의 저부 표면(112) 및 측벽(190)은 본원에 기재된 기술 또는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 제조 (예를 들어, 부동태화, 관능화 등)될 수 있다.

[0027] 일부 실시양태에서, 관심 분자(191)는 샘플 웰(108)의 저부 표면(112)에 대해 원위에 있는 상부 개구를 통해 샘플 웰(108) 내에 배치될 수 있다. 상부 개구는 샘플 웰(108) 내의 조명하는 관심 분자(191)로부터의 미광 또는 주위광을 감소시키도록 구성될 수 있다. 상부 개구는, 50 nm 내지 300 nm 범위의, 집적 디바이스의 표면(110)에서 측정된 폭 W_A , 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위를 가질 수 있다. 샘플 웰(108)은 저부 표면(112)과, 상부 클래딩(118)과 금속 층(122) 사이의 계면(127) 사이의 깊이 d_W 를 가질 수 있다. 깊이 d_W 는 저부 표면(112)에 위치하는 관심 분자와 금속 층(122) 사이에 적합한 거리를 제공할 수 있다. 깊이 d_W 는 관심 분자(191)와 회합된 마커의 광자 방출 사건의 타이밍 (예를 들어, 수명)에 영향을 줄 수 있다. 따라서, 깊이 d_W 는 상이한 마커의 개별 수명과 연관된 타이밍 특징에 기초하여 샘플 웰(108) 내의 상이한 마커들 간에 구별이 가능하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰(108)의 깊이 d_W 는 수용된 여기 에너지의 양에 영향을 줄 수 있다. 깊이 d_W 는 50 nm 내지 350 nm 범위, 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 깊이 d_W 는 95 nm 내지 150 nm이다. 일부 실시양태에서, 깊이 d_W 는 150 nm 내지 350 nm이다. 일부 실시양태에서, 깊이 d_W 는 200 nm 내지 325 nm이다. 일부 실시양태에서, 깊이 d_W 는 250 nm 내지 300 nm이다. 일부 실시양태에서, 깊이 d_W 는 대략 270 nm이다.

[0028] 다양한 실시양태에서, 샘플 웰(108)은 도파관(116)으로부터의 여기 에너지를 수용하도록 배열될 수 있다. 도파관(116)은 도파관으로부터 소산 붕괴하는 광학 모드를 제공하도록 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 모드의 소산장은 적어도 부분적으로 샘플 웰(108)과 중첩될 수 있다. 이러한 방식으로, 샘플 웰(108) 내의 관심 분자(191)는 광학 모드의 소산장을 통해 여기 에너지를 수용할 수 있다.

[0029] 집적 디바이스(100)는 상부 클래딩(118) 위에 금속 층(122)을 포함할 수 있다. 금속 층(122)은 샘플 웰 내의 샘플에 의해 방출되는 방출 에너지에 대한 반사기로서 작용할 수 있고, 집적 디바이스의 센서를 향한 방출 에너지를 반사함으로써 방출 에너지의 검출을 개선할 수 있다. 금속 층(122)은 샘플 웰 내에서 유래하지 않은 광자로 인한 배경 신호를 감소시키는 작용을 할 수 있다. 금속 층(122)은 하나 이상의 하위층을 포함할 수 있다. 금속 층의 층으로서 사용되는 적합한 물질의 예는 알루미늄, 구리, 티타늄 및 질화티타늄을 포함할 수 있다. 도 1에 도시된 바와 같이, 금속 층(122)은 제1 하위층(124), 제2 하위층(126), 및 제3 하위층(128)을 포함한다. 제1 하위층의 두께는 30 nm 내지 165 nm 범위, 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위일 수 있다. 제2 하위층의 두께는 5 nm 내지 100 nm 범위, 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 하위층의 두께는 대략 10 nm일 수 있다. 제3 하위층은 5 nm 내지 100 nm 범위의 두께, 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 제3 하위층은 대략 30 nm의 두께를 가질 수 있다.

[0030] 샘플 웰(108)은 측벽(190) 상에 적어도 부분적으로 측벽 스페이서가 피복된 하나 이상의 측벽을 가질 수 있다. 측벽 스페이서의 조성은 측벽(190)이 관심 분자(191)와의 특정 유형의 상호작용을 가능하게 하도록 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 측벽 스페이서는 측벽(190)에 부착되는 관심 분자(191)의 양을 감소시키기 위해 샘플 웰(108)의 측벽을 부동태화하도록 구성된 조성을 가질 수 있다. 스페이서로 샘플 벽의 측벽만을 코팅함으로써, 샘플 웰(108)의 상이한 영역들에서 관심 분자(191)와의 상이한 유형의 상호작용들이 제공될 수 있다. 측벽 스페이서는 3 nm 내지 30 nm 범위의 두께, 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 측벽 스페이서는 대략 10 nm의 두께를 가질 수 있다. 측벽 스페이서를 형성하는데 사용되는 적합한 물질의 예는 TiO_2 , TiN , $TiON$, TaN , Ta_2O_5 , Zr_2O_5 및 HfO_2 를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰 구조물은 측벽 상의 스페이서 물질이 결여된 도파관(116)에 근접한 저부 표면(112)을 가질 수 있다. 저부 표면과 측벽 스페이서 사이의 거리는 20 nm 내지 50 nm 범위, 또는 그 범위 내의 임의의 값 또는 값의 범위일 수 있다. 이러한 방식으로, 샘플 웰의 저부 표면(112)은 도파관(116)에 더 근접하고, 따라서 여기 에너지의 커플링을 개선하고 여기 에너지의 광학적 손실에 대한 금속 스택의 영향을 감소시킨다.

[0031] 일부 실시양태에 따르면, 샘플 웰은 집적 디바이스에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 복수의 또는 "어레이"의 샘플 웰을 포함한다. 예를 들어, 도 2는 복수의 샘플 웰을 포함하는 집적 디바이스(200)의 단면도를 도시한다. 도시된 바와 같이, 집적 디바이스(200)는 도파관(216)과 금속 층(222) 사이의 상부

클래딩(218)을 포함하고, 여기서 상부 클래딩(218)은 도파관(216)과 금속 층(222)을 최대 거리 h_c 만큼 분리한다. 상부 클래딩(218)은, h_c 미만의 치수를 갖고 하나 이상의 샘플 웰을 포함하는 하나 이상의 영역을 가질 수 있다. 이러한 영역은 집적 디바이스의 하나 이상의 샘플 웰을 포함하는 적합한 크기 및 형상의 어레이로 간주될 수 있다. 집적 디바이스(200)는 어레이(220)를 포함하고, 여기서 상부 클래딩(218)은 도파관(216)과 금속 층(222)을 h_c 보다 작은 거리만큼 분리한다. 어레이(220)는 원하는 수의 샘플 웰을 포함하는 임의의 적합한 크기 및 형상의, 도 2에 제시된 도면에 수직인 평면 내의 영역을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 어레이(220)는 직사각형 형상(예컨대, 정사각형)을 가질 수 있다. 어레이(220)는 측벽(208₁, 208₂, 208₃, 208₄, 208₅, 및 208₆)을 포함하는 복수의 샘플 웰을 가질 수 있다. 도 2는 6개의 샘플 웰을 도시하고 있지만, 이와 관련하여 적용은 제한되지 않고 임의의 적합한 수의 샘플 웰이 어레이 내에 형성될 수 있다. 어레이는 임의의 적합한 크기 또는 형상을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 어레이는 트랜치 영역에 있다.

[0032] 본원에 기재된 기술의 측면은 샘플을 집적 디바이스의 표면에 접촉시키는 것을 포함한다. 도 2에 도시된 바와 같이, 집적 디바이스(200)는 집적 디바이스의 오목부 표면(210₁)에서 형성될 수 있는 어레이(220) 내의 복수의 샘플 웰을 함유한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 샘플은 집적 디바이스의 어레이 내의 집적 디바이스의 오목부 표면(210₁)에 접촉될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 샘플은 오목부 영역이 아닌 (예를 들어, 트랜치 영역이 아닌) 집적 디바이스의 표면에 접촉될 수 있다. 예를 들어, 도 2에 도시된 바와 같이, 샘플은 집적 디바이스의 표면(210₂)에 접촉될 수 있다. 도 2는 집적 디바이스의 오목부 영역 (예를 들어, 배스텝) 내의 복수의 샘플 웰을 도시하지만, 집적 디바이스는 또한 오목부 영역을 포함하지 않으면서 복수의 샘플 웰을 포함할 수 있음이 인지되어야 한다.

[0033] 집적 디바이스(200)는 상부 클래딩(218) 위에 금속 층(222)을 포함할 수 있다. 금속 층(222)은 샘플 웰 내의 샘플에 의해 방출되는 방출 에너지에 대한 반사기로서 작용할 수 있고, 집적 디바이스의 센서를 향한 방출 에너지를 반사함으로써 방출 에너지의 검출을 개선할 수 있다. 금속 층(222)은 샘플 웰 내에서 유래하지 않은 광자로 인한 배경 신호를 감소시키는 작용을 할 수 있다. 금속 층(222)은 하나 이상의 하위층을 포함할 수 있다. 금속 층으로서 사용되는 적합한 물질의 예는 알루미늄, 티타늄 및 질화티타늄을 포함한다. 금속 층(222)은 샘플 웰 (208₁, 208₂, 208₃, 208₄, 208₅, 및 208₆)을 형성하도록 상부 클래딩(218)의 에칭된 부분에 상응하는 하나 이상의 불연속부를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 도파관(216) 및 금속 층(222)을 이동하는 광학 모드의 상호작용으로 인한 광학 손실을 감소시키기 위해, 본원에 기재된 유형의 복수의 오목부 영역 (예를 들어, 트랜치 영역)이 집적 디바이스에서 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 단일 샘플 웰마다의 오목부 영역을 포함할 수 있다. 집적 디바이스는 상부 클래딩에 복수의 오목부 영역을 가질 수 있고, 여기서 각각의 오목부 영역은 하나의 샘플 웰에 상응한다.

[0034] 특정 기술에서, 단일 샘플 웰은 단일 관심 분자 (예를 들어, 단일 서열분석 주형)를 포함하는 것이 바람직하다. 따라서, 일부 실시양태에서, 샘플을 샘플 웰의 어레이를 포함하는 집적 디바이스 상에 도입함으로써, 예를 들어 서열분석 주형을 포함하는 샘플을 샘플 웰 내로 로딩하는 경우, 집적 디바이스가 고농도의 서열분석 주형에 의해 과포화되는 것을 피하기 위해 주의를 기울여야 한다. 이러한 실시양태에서, 희석 농도의 서열분석 주형을 갖는 샘플을 사용하여 샘플 웰을 로딩하는 것이 종종 권장된다.

[0035] 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 샘플 웰의 어레이에 걸쳐 희석 농도의 샘플 중의 서열분석 주형의 분포는 포아송 분포에 의해 가장 잘 모델링되는 것으로 추정된다. 이러한 이산형 확률 분포는 어레이 내의 샘플 웰의 대략 37%가 하나의 서열분석 주형을 함유할 것이고, 나머지 웰은 0개 또는 다수의 서열분석 주형을 함유할 것으로 예측한다. 실제로, 샘플 웰의 어레이에 걸쳐 37% 단일 점유율을 달성하는 것은 임의의 수의 화학적 및/또는 기계적 변수에 의해 복잡할 수 있다. 본 발명자들은 본원에 기재된 기술, 예를 들어, 크라우딩 작용제를 사용한 로딩이 유리하게는 샘플 웰의 어레이에 걸쳐 단일 점유율의 백분율을 증가시킨다는 것을 인식하고 인지하였다.

[0036] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 포아송 통계에 의해 예측되는 양과 동등하게, 대략 동일하게 또는 그보다 크게 샘플 웰의 어레이에서 관심 분자의 단일 점유율을 달성할 수 있다. 따라서, 이론에 얽매하고자 하는 것은 아니지만, 본 출원의 방법 및 조성물은 무작위 분포를 왜곡하는 비-무작위 메카니즘을 통해 진행되어 포아송 분포를 초과하는 단일 로딩된 샘플 웰의 백분율을 생성하는 로딩 기술로 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법 및 조성물은 어레이 내의 샘플 웰의 대략 20%, 대략 25%, 대

략 30%, 대략 35%, 대략 37%, 대략 40%, 대략 45%, 대략 50%, 대략 60%, 대략 70%, 대략 80%, 대략 90%, 대략 95%, 대략 99%, 또는 대략 100%의 관심 분자의 단일 점유율을 달성할 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법 및 조성물은 관심 분자가 포아송 통계에 의해 예측되는 분포에서 샘플 웰의 어레이를 점유하는 비율 (예를 들어, 단일 점유율)을 증가시키는데 유용하다.

[0037] 다른 측면들 중, 본원에 기재된 기술은 관심 분자를 샘플 웰 내로 로딩하기 위한 크라우딩 작용제의 용도에 관한 것이다. 본원에 기재된 바와 같이, 크라우딩 작용제는 샘플의 벌크 용매로부터 관심 분자 (예를 들어, 서열 분석 주형)를 효과적으로 배제할 수 있다. 이러한 효과의 비제한적인 예가 도 3a 및 3b에 도시되어 있다. 도 3a에 도시된 바와 같이, 복수의 샘플 웰을 포함하는 어레이(320)를 갖는 집적 디바이스(300₁)는 관심 분자(390₁)를 갖는 샘플(340₁)과 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은 관심 분자를 극히 작은 부피의 샘플 웰 내로 로딩하는데 유용하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 집적 디바이스에서 어레이(예를 들어 트렌치 영역) 및 그 안의 모든 샘플 웰의 용량은 대략 20×10^{-6} L이고, 각각의 샘플 웰은 대략 3×10^{-18} L의 부피를 갖는다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스 내의 어레이(예를 들어 트렌치 영역)는 512,000개의 샘플 웰을 함유한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 어레이 내의 모든 샘플 웰의 총 부피는 샘플에 대한 용량의 대략 0.00000768%를 차지한다. 도 3a에 도시된 바와 같이, 크라우딩 작용제의 부재 하에 로딩된 관심 분자(390₁)를 갖고 샘플(340₁)의 벌크 부피(342₁) 중에 이론적으로 균일한 관심 분자(390₁) 분포를 갖는 샘플(340₁)은 성공적으로 로딩된 관심 분자(391₁)를 수용할 수 있는 샘플 웰의 분획을 생성할 것이다.

[0038] 도 3b는 성공적으로 로딩된 샘플과 관련하여 크라우딩 작용제의 효과를 예시한다. 복수의 샘플 웰을 포함하는 어레이를 갖는 집적 디바이스(300₂)가 관심 분자(390₂)를 갖는 샘플(340₂)과 접촉될 수 있다. 샘플(340₂)은 추가로 크라우딩 작용제(350)를 포함할 수 있다. 도시된 바와 같이, 크라우딩 작용제(350)를 포함하는 것은 샘플(340₂)의 벌크 부피(342₂)로부터 관심 분자(390₂)를 배제하여 관심 분자(390₂)를 샘플 웰 내로 인도하는 부피 배제 효과를 생성할 수 있다. 그 결과, 훨씬 더 큰 백분율의 샘플 웰이 성공적으로 로딩된 관심 분자(391₂)를 수용할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 집적 디바이스의 표면에서의 관심 분자의 농도를 효과적으로 증가시키는 열역학적 구동력을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자의 샘플 웰로의 이동을 가속화시키는 동역학적 효과를 갖는 것에 의해 로딩 시간을 감소시킬 수 있다.

[0039] 본 발명자들은 본원에 기재된 크라우딩 작용제가 관심 분자, 예를 들어 서열분석 주형을 단일 분자 서열분석에 사용된 통상적인 샘플 웰보다 더 큰 깊이 (예를 들어, 150 nm 초과, 200 nm 초과, 250 nm 초과 등)의 샘플 웰 내로 로딩되도록 하는 것을 추가로 인식하고 인지하였다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 관심 분자는 샘플 웰의 저부 표면에서 샘플 웰에 결합된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 샘플 웰을 포함하는 집적 디바이스의 표면에 대해 원위에 있고, 따라서 저부 표면과 집적 디바이스의 표면 사이의 거리는 샘플 웰의 깊이에 근접한다. 일부 실시양태에서, 보다 큰 깊이의 샘플 웰은 광학 부품을 이용하는 기술과 유리하게 쌍을 이룰 수 있다.

[0040] 일부 실시양태에서, 단일 분자 서열분석은 광학 시스템 및 센서의 사용을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 광을 집적 디바이스 상의 샘플 웰로 향하게 하고 샘플 웰로부터 방출된 광을 검출함으로써 서열분석 반응을 실시간으로 모니터링한다. 일부 실시양태에서, 광을 샘플 웰로 향하게 하는 광원을 샘플 웰의 저부에 또는 저부 아래에 위치시키고, 광검출기를 사용하여 샘플 웰로부터의 방출 (예를 들어, 서열분석 반응과 연관된 하나 이상의 성분 또는 사건과 관련된 방출)을 검출한다. 이러한 실시양태에서, 광은 집적 디바이스의 표면에서 또는 그 근처에서의 하나 이상의 특색부와 상호작용하여 서열분석 반응을 모니터링하는 능력에 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 방해 (예를 들어, 배경 잡음, 광학 손실)는 샘플 웰 깊이를 증가시킴으로써 감소 또는 제거될 수 있다.

[0041] 그러나, 샘플 웰의 깊이가 증가함에 따라, 샘플 웰의 저부 표면과 집적 디바이스의 표면 사이의 증가된 거리는 필연적으로 더 큰 거리를 생성하며, 관심 분자는 이를 통해 확산되어 저부 표면에 도달 (예를 들어, 그 결과로 저부 표면에 결합)하여야 한다. 이와 같이, 증가된 샘플 웰 깊이에 의해 제공되는 이점은 로딩 효율(예를 들어, 샘플 웰의 어레이에 걸쳐 높은 단일 점유율을 달성하는 것)과 관련하여 특정 제한을 수반할 수 있다. 본 발명자들은, 본원에 기재된 기술, 예를 들어 크라우딩 작용제를 사용한 로딩이, 증강되지 않은 확산 단독에 의한 로딩과 비교하여 깊은 샘플 웰 내로 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)를 로딩하는데 우수하다는 것을 인식하고 인지하였다.

- [0042] 크라우딩 작용제
- [0043] 본원에서 사용된 "크라우딩 작용제"는 분자 크라우딩을 가능하게 하거나, 증진시키거나 또는 용이하게 하는 화합물 또는 분자이다. 어떠한 특정 메카니즘에 의해 얻매이는 것을 원하지는 않지만, 크라우딩 작용제는 다른 거대분자에 이용가능한 용매의 부피를 감소시키는 것으로 제안된다. 이러한 배제 부피 효과는 크라우딩 작용제와의 비-특이적 상호작용, 예컨대 입체 반발의 결과로서 거대분자에의 접근가능한 부피를 제한한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 "부피 배제제" 또는 "부피 배제 작용제"로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 동일한 용액 내의 다른 성분에 대해 불활성이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 전체 샘플 부피의 부분으로부터 용액 중의 다른 성분을 배제하지 않거나 또는 그 부분 내의 용액 중의 다른 성분은 유지하면서 그 부분으로부터 관심 분자를 선택적으로 배제한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 친수성 화합물이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 동일한 용액 중에서 발생하는 반응을 방해하지 않는다. 크라우딩 작용제는 본원에 기재된 방법 및 조성물을 사용하여 다양한 방식으로, 예를 들어 도 4에 예시된 바와 같이 기능하는 것으로 고려된다.
- [0044] 도 4는 일반적으로 관심 분자를 갖는 샘플에서의 크라우딩 작용제의 효과의 예를 도시한다. 패닐(400_1 및 400_2)은 각각 관심 분자(491) 및 작용제(450)를 갖는 샘플을 도시한다. 도시된 바와 같이, 패닐(400_1) 내의 작용제(450_1)는 패닐(400_2) 내의 작용제(450_2)에 비해 상대적으로 샘플 전체에 걸쳐 분산된다. 따라서, 패닐(400_1)은 관심 분자(491)가 작용제(450_1)에 의해 미리 점유되지 않은 벌크 부피(442_1)를 자유롭게 접근할 수 있는 샘플의 단순화된 예를 제공한다. 이와 비교하여, 패닐(400_2) 내의 작용제(450_2)는 간질 부피(444)가 형성되도록 회합되는 것으로 나타난다 (음영 영역). 도시된 바와 같이, 관심 분자(491)의 크기가 간질 부피(444)를 초과하는 경우, 이러한 영역은 관심 분자(491)에 접근불가능하게 된다. 결과적으로, 패닐(400_2)의 샘플 내의 접근가능한 벌크 부피(442_2)의 양은 패닐(400_2)의 샘플 내의 접근가능한 벌크 부피(442_1)의 양보다 적다. 샘플 내의 부피로부터 관심 분자(491)의 배제에 관한 이러한 효과는 부피 배제로 지칭될 수 있다. 그러나, 부피 배제 효과가 분자 크라우딩 효과를 유도하고, 그 반대도 가능하다는 것이 인지되어야 한다.
- [0045] 도 4는 샘플 웰과 관련하여 배제된 부피 효과의 예를 추가로 도시한다. 패닐(401_1 및 401_2)는 각각 관심 분자(491)에 결합하도록 구성된 커플링 기(493)를 포함하는 저부 표면을 갖는 샘플 웰을 도시한다. 또한, 각각의 패닐(401_1 및 401_2)은 관심 분자(491)를 포함하는 샘플과 접촉된 샘플 웰을 도시한다. 패닐(401_2)에 도시된 샘플은 추가로 크라우딩 작용제(450)를 포함한다. 도시된 바와 같이, 크라우딩 작용제(450)는 관심 분자(491)에 접근가능한 벌크 부피(442)의 양을 감소시킨다. 관심 분자(491)에 접근불가능한 크라우딩 작용제(450)의 간질 부피(444)의 결과로서, 관심 분자는 샘플 웰의 상부 개구 쪽으로 열역학적으로 인도된다. 일부 실시양태에서, 패닐(401_2)에 도시된 바와 같이, 크라우딩 작용제(450)는 샘플의 일부를 차지하는 얇은 구조를 형성하여 관심 분자(491)에 접근가능한 벌크 부피(442)를 감소시키는 중합체 분자를 포함할 수 있다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 샘플 내의 크라우딩 작용제(450)에 의해 형성된 구조는, 크라우딩 작용제(450)가 샘플 웰에 들어갈 수 있는 정도를 제한하는 것으로 추정된다. 결과적으로, 간질 부피(444)는 샘플 웰 외부의 영역을 점유하여, 저부 표면에 대해 원위에 있는 샘플 웰의 상부 개구에서 관심 분자의 농도를 효과적으로 증가시킬 것이다. 샘플 웰의 상부 개구에서 관심 분자(491)의 증가된 로컬 농도에 의해 관심 분자(491)가 커플링 기(493)를 통해 저부 표면에 결합될 가능성이 더 커질 수 있다.
- [0046] 따라서, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 용액 중의 용매 분자 및/또는 다른 성분에 비해 관심 분자를 선택적으로 배제한다. 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 용액이 집적 디바이스의 표면에 접촉하여 관심 분자가 집적 디바이스의 표면에서 제1 부피를 점유하도록 한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제를 포함하는 용액은 크라우딩 작용제가 제1 부피의 표면에서 제2 부피를 점유하도록 제1 부피의 표면에 접촉된다. 크라우딩 작용제가 용매 분자 및/또는 다른 성분에 비해 관심 분자를 선택적으로 배제하는 경우, 관심 분자는 제2 부피로부터 배제되는 반면, 제1 부피의 용매 및/또는 다른 성분은 배제되지 않는다. 그 결과, 선택적 배제는 제1 부피를 감소시키고 제2 부피의 동시 증가를 동반한다. 일부 실시양태에서, 제1 부피 내의 다른 구성요소 (예를 들어, 염, 완충제 등)는 크라우딩 작용제에 의해 점유되는 제2 부피가 접근가능한 정도로 변할 수 있음을 이해하여야 한다. 예를 들어, 크라우딩 작용제 및 성분의 상대적인 크기, 전하, 및 다른 화학적 및 물리적 특성은 성분이 크라우딩 작용제에 의해 선택적으로 배제되거나 또는 우선적으로 유지될 수 있는 정도에 영향을 미칠 수 있다. 관심 분자는 반응 성분 (예를 들어, 서열분석 주형)을 포함할 수 있기 때문에, 크라우딩 작용제는

관심 분자를 안정화시키기 위해 필요할 수 있는 용액 중의 다른 성분 (예를 들어, 완충제, 환원제 등)을 우선적으로 유지하지 않는 것이 중요하다.

[0047] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 물을 유인하고 물 이외의 분자는 응집되도록 한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 용액 중 거대분자를 배제하기 위해 용액 중의 물에 결합하고/거나 이를 차지한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자를 배제한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 서열분석 주형을 배제한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 샘플 웰 내의 이용가능한 부피를 제한한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 샘플 웰 내의 관심 분자의 단일 점유율을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자, 예컨대 서열분석 주형을 압축하여 보다 큰 서열분석 주형이 샘플 웰 내로 로딩될 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 상 분리를 촉진한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 무작위로 감긴 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 분자의 로딩 전에 샘플 정제가 제한적으로 필요하거나 또는 전혀 필요하지 않도록, 크라우딩 작용제는 오염물 (예를 들어, 세포 파편)을 배제한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 불순한 샘플 (예를 들어, 혈액, 소변, 용해된 세포 등)의 회석 성분이 크라우딩 작용제의 부재 하에 로딩된 불순한 샘플보다 더 효과적으로 로딩될 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 삼투압을 발휘한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 깊은 샘플 웰 내로의 관심 분자의 로딩을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 샘플 웰의 보다 빠른 로딩을 촉진한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 샘플 웰을 포함하는 집적 디바이스 상에서 샘플을 인큐베이션 하는데 요구되는 시간을 감소시킨다.

[0048] 크라우딩 작용제는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 이전에 시험관내에서 세포내 거대분자 크라우딩의 효과를 모방하기 위해 사용된 바 있다 (예를 들어, 문헌 [Tokuriki, N., et al. (2004) Protein Sci. 13(1):125-133; Kuznetsova, I.M., et al. (2014) Int. J. Mol. Sci. 15:23090-23140; Phillip, Y., et al. (2009) Biophys. J. 97(3):875-885; Bhat, R., et al. (1992) Protein Sci. 1:1133-1143; Christiansen, A., et al. (2013) Biophys. Rev. 5(2):137-145; Aumiller, W.M., et al. (2014) J. Phys. Chem. B 118(36):10624-10632] 참조; 각각의 내용은 본원에 참조로 포함된다).

[0049] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 샘플 웰 내로 이동하는 것과 반대로 샘플 저장소 내에 (예를 들어, 우선적으로) 머무르도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 이는 샘플 웰 내로 샘플 성분 (예를 들면, DNA-폴리머라제 복합체)의 로딩을 인도하는 열역학적 구동력을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 낮은 점도 크라우딩 작용제 예컨대 피콜 또는 선형 폴리비닐피롤리돈은 보다 높은 점도 작용제와 비교하여 높은 이동성 및 불량한 국제화를 가지며, 높은 점도 작용제만큼 효과적이지 않다. 그러나, 낮은 점도 작용제는 일부 경우에 유용할 수 있다.

[0050] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 1 mPa · s 이상의 점도 (예를 들면, 약 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0 mPa · s 이상, 또는 높은 또는 중간 범위의 점도)를 갖는 크라우딩 작용제 용액을 사용하여 적용된다. 일부 실시양태에서, 63,000 Da 메틸-셀룰로스의 2.7% 조성물은 대략 6.9 mPa · s의 점도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제를 피펫팅하기 위한 유용한 점도는 1,000 내지 15,000 mPa · s일 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서 작용제의 상부 점도 범위는 실제적 피펫팅 고려사항에 의해 제한될 수 있다. 예를 들면, 약 12,000 mPa · s 이상의 점도를 갖는 용액은 피펫팅하기 어려울 수 있고, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제 용액은 12,000 mPa · s 이하의 점도를 갖는 농도로 첨가된다.

[0051] 일부 실시양태에서, 보다 낮은 점도를 갖는 보다 작은 (예를 들면, 보다 짧은) 작용제는 로딩 조성물 중에서 유사한 점도를 달성하기 위해 보다 큰 (예를 들면, 보다 긴) 작용제보다 더 높은 농도로 적용될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서 짧은 분자는 덜 효율적인 크라우딩 작용제이고, 또한 샘플 저장소로부터 샘플 웰 내로 보다 용이하게 이동할 수 있다.

[0052] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제 제조의 점도는 점도 - 농도 방정식 예컨대 $\text{mPa} \cdot \text{s} = (\% \times 0.747 + 1)^8$ (예를 들면, 다우(Dow)로부터의 메토셀, 셀룰로스 에테르의 경우)에 기초하여 계산될 수 있다.

[0053] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 형상 및 크기는 그의 유효성에 영향을 줄 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA/폴리머라제 복합체의 배제는 유사한 크기의 크라우딩 작용제 (예를 들어, 2 내지 3배 더 작은 범위 내지 2 내지 3배 더 큰 범위의 크라우딩 작용제)를 사용하면 특히 효과적이다. 일부 실시양태에서, 얇힘을 촉진하는 형상을 갖는 크라우딩 작용제, 즉 보다 높은 점도 용액이 유용하다.

[0054] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 수용성 거대분자 물질이다. 일부 실시양태에서, 적합한 거대분자 물질

은 생체적합성 천연 또는 합성 중합체를 광범위하게 포함하고, 혼합물 중 다른 시약과 특이적으로 상호작용하지 않는다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 불활성 거대분자, 예컨대 불활성 폴리펩티드 또는 불활성 핵산이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 선형 중합체이다.

[0055] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리사카라이드이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 셀룰로스 분자이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 메틸 셀룰로스이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 에틸 셀룰로스, 에틸 메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 에틸 히드록시에틸 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 및 이들의 유도체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 셀룰로스 분자이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 피콜 중합체이다.

[0056] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제, 예를 들어 셀룰로스 크라우딩 작용제(예를 들어, 메토셀 MC, 63,000)는 평균 분자량이 50,000 내지 500,000 Da (예를 들어, 약 50 내지 100 kDa, 100 내지 200 kDa, 200 내지 300 kDa, 300 내지 400 kDa, 400 내지 500 kDa 이상)이다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 "평균 분자량"은 용액 중 크라우딩 작용제의 수 평균 분자량 (Mn)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 셀룰로스 크라우딩 작용제는 50,000 내지 500,000 Da의 수 평균 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 셀룰로스 크라우딩 작용제의 수 평균 분자량은 대략 63 kDa이다. 일부 실시양태에서, 셀룰로스 크라우딩 작용제의 수 평균 분자량은 약 20 내지 120 kDa, 약 26 내지 110 kDa, 약 41 내지 86 kDa, 약 50 내지 75 kDa, 또는 약 60 내지 70 kDa이다.

[0057] 일부 실시양태에서, 평균 분자량은 제조사의 규격에 따라 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 셀룰로스 크라우딩 작용제의 평균 분자량은 겔보기 점도와 특정 셀룰로스 화합물의 분자량 또는 사슬 길이 사이의 비례 관계에 기초하여 계산하거나 근사화될 수 있다. 이러한 비례성을 고려하여, 공지된 참조 값은, 기지의 온도에서 기지의 농도의 셀룰로스를 갖는 수용액의 겔보기 점도를 측정함으로써 평균 분자량을 결정하는데 사용할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 메토셀 셀룰로스 조성물의 평균 분자량은 20℃에서의 셀룰로스의 2% (w/v) 용액에 대한 점도 값을 측정하고 (예를 들어, ASTM 모노그래프 D1347 및 D2363에 제시된 측정 방법을 사용하여), 측정된 값을 제조사에 의해 제공되는 공지된 값과 비교하여 (예를 들어, 문헌 [METHOCEL Cellulose Ethers Technical Handbook (The DOW Chemical Company); Form No. 192-01062-0902 AMS, 2002년 9월 공개됨]에 기재된 바와 같이) 수득할 수 있다.

[0058] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리에테르 화합물이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, PEG 200 이상, 예컨대 PEG 20,000 이상), 폴리프로필렌 글리콜, 파라포름알데하이드, 폴리테트라메틸렌 글리콜, 폴리페닐 에테르, 및 이들의 유도체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리에테르 화합물이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 소 혈장 알부민, 글리코젠, 텍스트란, 및 이들의 유도체 및 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 폴리아미드이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 시클릭 폴리아미드 (예를 들어, 폴리비닐피롤리돈)이다.

[0059] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 용액으로서 제공된다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 0.6 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 0.9 중량%이다. 일부 실시양태에서, 첨가되는 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 1.8 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 2.0 중량%이다. 일부 실시양태에서, 용액 중 크라우딩 작용제의 농도는 약 2.3 중량%이다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 용액 중 약 0.1 중량% 내지 약 1.0 중량%, 약 1.0 중량% 내지 약 2.0 중량%, 약 2.0 중량% 내지 약 3.0 중량%, 약 3.0 중량% 내지 약 4.0 중량%, 약 4.0 중량% 내지 약 5.0 중량%, 약 5.0 중량% 내지 약 6.0 중량%, 약 6.0 중량% 내지 약 7.0 중량%, 약 7.0 중량% 내지 약 8.0 중량%, 약 8.0 중량% 내지 약 9.0 중량%, 약 9.0 중량% 내지 약 10.0 중량%, 약 10.0 중량% 내지 약 15.0 중량%, 약 10 중량% 내지 약 11 중량%, 약 11 중량% 내지 약 12 중량%, 약 12 중량% 내지 약 13 중량%, 약 13 중량% 내지 약 14 중량%, 또는 약 14 중량% 내지 약 15 중량%, 약 15.0 중량% 내지 약 20.0 중량% 이상 존재한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 용액은 (예를 들어, 로딩 완충제 중) 샘플 용액의 부피와 동일한 크기 정도 (예를 들어 1 내지 3배 더 작은 내지 1 내지 3배 더 큰)의 부피로 첨가된다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제 (예를 들어, 메토셀 MC)의 2.7% 용액을 로딩 완충제 중 대략 동등한 부피의 샘플 위에 피펫팅한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 1.8% 용액을 로딩 완충제 중 대략 동등한 부피의 샘플 위에 피펫팅한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 1.2% 용액을 로딩 완충제 중 대략 동등한 부피의 샘플 위에 피펫팅한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 0.9% 용액을 로딩 완충제 중 대략 동등한 부피의 샘플 위에 피펫팅한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제의 0.6% 용액을 로딩 완충제 중 대략 동등한 부피의 샘플 위에 피펫팅한다.

- [0061] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제 용액을 혼합 없이 샘플 용액 위에 놓는다. 그러나, 용액은 또한 일부 실시양태에서 혼합될 수 있다.
- [0062] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 샘플 용액 (예를 들어 샘플 저장소 내)과 직접 접촉될 수 있는 겔 (예를 들어, 친수성 겔)의 형태로 제공된다. 겔은 피펫팅 고려사항에 의해 제한되지 않으면서 적용될 수 있고 (예를 들어, 겔 플러그 형태로), 보다 높은 농도 및 점도의 크라우딩 작용제는 겔의 형태로 사용될 수 있다.
- [0063] 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 고체 상태로 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 필름으로서 제공된다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 섬유 재료, 막 재료, 접착 재료, 복합 재료, 라미네이트 재료, 또는 이들의 일부 조합으로서 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 필름은 본원에 기재된 방법 및 조성물과 함께 사용하기에 적합한 합성 및/또는 천연 물질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 필름은 가교된 겔 또는 탈수된 용액으로부터 선택된 물질이다. 일부 실시양태에서, 필름은 폴리아크릴아미드, 텍스트란, 아가로스, 또는 그의 일부 조합 또는 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 상태 크라우딩 작용제 (예를 들어, 필름)는 유리하게는 샘플의 벌크 부피에서 물을 차지하면서, 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)를 우선적으로 배제한다. 따라서, 임의의 이러한 적합한 작용제는 본원에 제공된 방법에서 고체 상태 크라우딩 작용제로서 사용될 수 있음을 인지해야 한다.
- [0064] 응축제
- [0065] 본원에 사용된 "응축제"는 관심 분자와 조합되는 경우에 관심 분자가 응축제의 부재 하의 그의 구조에 비해 응축된 구조를 취하도록 하는 임의의 천연 또는 합성 화합물을 지칭한다. 예를 들어, 주어진 샘플에서, 관심 분자는 응축제가 없는 동일한 샘플보다 응축제의 존재 하에 더 작은 부피를 점유한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 응축제는 샘플 중 관심 분자의 점유 부피를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 응축제는 관심 분자와 상호작용하여 상기 분자가 샘플 내의 총 부피의 보다 작은 분율을 점유하는 압축된 구조를 취하도록 한다. 일부 실시양태에서, 응축제는 관심 분자와 상호작용하여 분자의 총만 부피(pervaded volume)를 감소시킨다. 응축제를 도입함으로써, 분자는 응축제가 존재하지 않는 경우보다 더 작은 총만 부피를 가질 수 있고, 그의 더 작은 총만 부피로 인해 분자는 샘플 웰 내에 보다 용이하게 로딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 응축제는 동일한 용액 내의 다른 성분에 대해 불활성이다. 일부 실시양태에서, 응축제는 동일한 용액에서 발생하는 반응을 방해하지 않는다.
- [0066] 도 5는 관심 분자를 갖는 샘플에서 응축제의 효과의 예를 일반적으로 예시한다. 예를 들어, 반응식(500)은 관심 분자(591)가 응축제(530)와 접촉되는 방법을 도시한다. 관심 분자(591₁)는 반경 r_1 의 구에 의해 근사된 초기 부피 V_1 를 점유하는 것으로 도시된다. 응축제(530)와 접촉한 후, 응축된 관심 분자(591₂)는 반경 r_2 의 구에 의해 근사된 응축 부피 V_2 를 점유하는 것으로 도시된다. 일부 실시양태에서, 초기 부피 V_1 및 응축 부피 V_2 는 각각 관심 분자의 총만 부피(591₁) 및 관심 분자의 응축 부피(591₂)를 지칭한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 응축제(530)는 관심 분자(591)가 용액 중에서 점유되는 부피를 감소시키도록 구성되고, 이는 분자의 총만 부피로 고려될 수 있다. 응축제를 도입함으로써, 분자는 응축제가 존재하지 않는 경우보다 더 작은 총만 부피를 가질 수 있고, 그의 더 작은 총만 부피로 인해 분자는 샘플 웰에 보다 용이하게 로딩될 수 있다.
- [0067] 도 5는 추가로 관심 분자를 샘플 웰에 로딩하는 것에 관련해 응축제 사용의 예를 예시한다. 패널(501₁ 및 501₂)은 각각 관심 분자(591)에 결합하도록 구성된 커플링 기(593)를 포함하는 저부 표면을 갖는 샘플 웰을 도시한다. 또한, 각각의 패널(501₁ 및 501₂)은 관심 분자(591)를 포함하는 샘플과 접촉된 샘플 웰을 도시한다. 패널(501₁)에 도시된 샘플은 응축제와 접촉되지 않은 관심 분자(591₁)를 포함하고, 반면에 패널(501₂)에 도시된 샘플은 응축제와 접촉된 응축된 관심 분자(591₂)를 포함한다. 도시된 바와 같이, 응축된 관심 분자(591₂)는 패널(501₁)에 나타난 관심 분자(591₁)에 비해 응축된 부피를 점유한다. 따라서, 응축된 관심 분자(591₂)가 점유하는 감소된 부피는 관심 분자(591)가 커플링 기(593)를 통해 저부 표면에 결합되는 확률을 보다 높일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상대적으로 큰 부피를 점유하는 관심 분자(591)를 상대적으로 작은 부피의 용량을 갖는 샘플 웰 (예를 들어 단일 분자 점유에 적합한 부피, 예컨대 단일 분자 서열분석에 사용되는 어레이의 샘플 웰) 내로 로딩하는 것을 목적하는 경우에 응축제가 유리하게 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 응축제는 본원에 기재된 크라우딩 작용제와 함께 추가로 사용될 수 있다. 이러한 실시에서, 샘플의 접근가능한 벌크 부피를 감소시키는 크라우딩 작용제 및 각각의 관심 분자에 의해 점유되는 부피를 감소시키는 크라우딩 작용제의 순 효과는

포아송 통계에 의해 예측되는 것에 근접하거나 그보다 더 큰 샘플 웰 단일 점유율을 유도한다.

[0068] 일부 실시양태에서, 응축제는 핵산 응축제이다. 핵산 응축제는 부피 배제 및 전하 스크리닝을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 메카니즘에 의해 핵산을 압축할 수 있다. 핵산을 응축시키는 작용제의 능력을 평가하는 검정은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 그의 관련 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 WO/1996/021036에 기재된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 핵산 응축제는 정전기 전하-전하 상호작용을 통해 핵산과 상호작용하여 핵산 구조의 붕괴 (예를 들어, 핵산 응축)를 유도한다. 일부 실시양태에서, 응축제는 하기 중 하나 이상의 결과로서 핵산을 응축시킬 수 있다: 삼투압을 가해 나선 구조의 절편을 함께 모으는 것 (예를 들어, 분자 크라우딩 효과), 핵산 세그먼트 사이의 반발 상호작용을 감소시키는 것 (예를 들어, 포스페이트 전하를 중화시키는 것에 의해), 및 핵산 세그먼트 사이의 인력 상호작용을 증가시키는 것. 일부 실시양태에서, DNA 세그먼트 사이의 인력 상호작용은 다가 양이온성 하전된 응축제에 의해 유도될 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 응축제는 다가양이온을 포함한다. 본원에 사용된 다가양이온은 일반적으로 복수의 양으로 하전된 부위를 갖는 화합물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 다가양이온은 관심 분자를 포함하는 샘플 중에 존재하는 경우 다가양이온성이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 샘플 중의 조건 (예를 들어, pH, 완충 용량, 이온 강도)은 응축제가 샘플 중 다가양이온성이도록 하는 것이다. 일부 실시양태에서, 다가양이온은 생리적 pH (예를 들어, 약 pH 7.4)에서 다가양이온성이다. 일부 실시양태에서, 다가양이온은 양으로 하전된 단량체 단위의 중합체이지만, 일부 비-양으로 하전된 단위가 중합체에 존재할 수 있다. 다가양이온의 예는, 일부 실시양태에서, 폴리아민, 예컨대 스페르민, 스페르미딘 및 푸트레신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가양이온은 폴리아미노산, 예컨대 폴리히스티딘, 폴리리신, 폴리아르기닌 및 폴리오르니틴을 포함한다. 다른 염기성 펩티드 및 작은 염기성 단백질이 다가양이온성 응축제 (예를 들어, 히스톤, 프로타민)로서 사용하기 위해 추가로 고려된다. 아미노산으로 구성된 다가양이온의 경우, L- 또는 D-형태가 사용될 수 있다. 염기성 아미노산은 리신, 아르기닌, 아미노산 유사체, 예컨대 오르니틴 및 카날린, 변형된 염기성 아미노산, 예컨대 호모아르기닌, 및 양성 전하를 보유하도록 변형된 다른 변형된 아미노산, 예컨대 구아니디노발리네이트, 및 아미노에틸시스테인을 포함한다. 다가양이온의 추가적인 예는 폴리암모늄 (예를 들어, 폴리브렌(Polybrene) (핵사디메트린 브로마이드)), 지질 (예를 들어, DOTAP, DC-Chol/DOPE, DOGS/DOPE, 및 DOTMA/DOPE)을 포함한다.

[0070] 산소 스캐빈징 실란트

[0071] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 산소-민감성 시스템을 보호하고 샘플 완전성을 유지하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 생물학적 및/또는 화학적 반응은 종종 외부 환경과의 상호작용, 예를 들어 증발에 대한 감수성, 및 외부 환경에서 산소 및/또는 다른 분자에 대한 감수성에 대해 민감할 수 있다. 실란트는 외부 환경과의 유해한 상호작용으로부터 민감한 반응을 보호하기 위해 이전에 사용되었다. 예를 들어, 미네랄 오일은 종종 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의한 증폭 동안 샘플을 오버레이하기 위해 사용된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 로딩 및 서열분석의 방법은 실란트 (예를 들어, 미네랄 오일)로 서열분석 반응을 오버레이하는 것을 추가로 포함한다. 본 발명자들은 특정 조성물이 본원에 기재된 서열분석 반응에 대한 추가의 보호 효과를 부여하기 위해 통상적인 실란트 대신에 또는 그에 추가로 사용될 수 있음을 인식하고 인지하였다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈징 실란트가 샘플에 접촉될 수 있다.

[0072] 본 개시내용의 측면은 단일 분자 서열분석 기술에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 단일 분자 서열분석은 광학 시스템의 사용을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 광학 시스템은 서열분석 반응의 하나 이상의 성분에 직접 또는 간접적으로 분해될 수 있는 여기 에너지의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 서열분석 반응에서 중합 효소의 활성화에 손상을 줄 수 있는 반응성 산소 종을 생성할 수 있다. 본 발명자들은 산소 스캐빈징 실란트가 반응성 산소 종의 존재를 최소화하면서 통상적인 실란트 (예를 들어, 미네랄 오일)와 많은 동일한 이점을 제공한다는 것을 인식하고 인지하였다.

[0073] 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈징 실란트는 산화성 작용제 및 촉매를 포함한다. 본원에 사용된 "산화성 작용제"는 산화될 수 있는 임의의 작용제이다. 일부 실시양태에서, 산화성 작용제의 산화는 촉매에 의해 매개 및/또는 가속화된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈징은 촉매에 의해 촉매되는 반응 또는 일련의 반응에서 산화성 작용제의 산화를 통해 진행된다. 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈징 실란트는 서열분석 반응에 대하여 바람직하게는 비-억제성 (예를 들어, 불활성)이다. 서열분석 반응 및 시약은 상 분리에 의해 산소 스캐빈징 성분으로부터 보호된다 (예를 들어, 스캐빈저 작용제는 오일 상에서 분리되어 유지되고, 수성 서열분석 시약으로부터 안전하게 분리되어 유지된다).

[0074] 일부 실시양태에서, 산화성 작용제는 유기 화합물이다. 일부 실시양태에서, 산화성 작용제는 적어도 1개의 예

틸렌 결합을 포함한다. 본원에 사용된 "에틸렌 결합"은 탄소-탄소 이중 결합이다. 일부 실시양태에서, 에틸렌 결합은 치환 또는 비치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 에틸렌 결합은 말단 결합 또는 내부 결합일 수 있다. 일부 실시양태에서, 에틸렌 결합은 고리 구조 내에 함유된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 에틸렌 결합은 5-원 또는 6-원 고리 (예를 들어, 펜토스 고리 또는 헥소스 고리)에 의해 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유기 화합물은 산소-함유 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 산소-함유 모이어티는 에스테르, 카르복실산, 알데히드, 에테르, 케톤, 알콜, 퍼옥시드 및/또는 히드로퍼옥시드를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0075] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 산소 스캐빈징 실란트의 산화성 작용제는 아스코르베이트 및 이소아스코르베이트 (유리 산, 염 및 유도체로서), 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 또는 암모늄 술파이트 염 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 산화성 작용제는 수불용성 아스코르베이트이다. 일부 실시양태에서, 산화성 작용제는 아스코르베이트 또는 이소아스코르베이트를 이온성 금속 염, 예컨대 알칼리 금속, 알칼리 토금속 염, 유기산의 에스테르, 또는 다른 유도체화된 아스코르베이트로서 실란트 내로 도입함으로써 형성된다. 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈저 아스코르베이트 및/또는 이소아스코르베이트 성분에는 다른 공지된 환원제, 예컨대 제2 아스코르베이트 또는 이소아스코르베이트, 탄닌, 술파이트 등이 보충될 수 있다. 일부 실시양태에서, 아스코르베이트는 C6-C22 지방산 에스테르 또는 디에스테르의 형태일 수 있으며, 이는 C10-C22 지방산 에스테르를 갖는 탄화수소 쇠 내에서 완전히 포화되거나 불포화를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 아스코르베이트 에스테르는, 예를 들어 아스코르빌 라우레이트, 아스코르빌 미리스테이트, 아스코르빌 팔미테이트, 아스코르빌 스테아레이트 등일 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 스캐빈징 작용제는 그리 가용성이 아니다. 일부 실시양태에서, 스캐빈징 작용제는 오일 (예를 들어 포화 내지 50% 포화의 오일) 중에 제공된다. 일부 실시양태에서, 스캐빈징 작용제 (예를 들어, 오일 중)는 서열분석 또는 다른 반응을 방해할 수 있는 정도로 기저 수성 상 내로 분배되는 것을 피하기 위해 그의 용해도를 기초로 하여 선택된다 (및/또는 적절한 농도로 제공됨).

[0077] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈징 실란트는 촉매를 포함한다. 광범위한 촉매가 본원에 기재된 기술에서 작동가능한 것으로 고려된다. 적합한 촉매는 적어도 2개의 산화 상태 사이에서 용이하게 상호전환될 수 있는 금속 이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 촉매는 전이 금속이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 전이 금속은 주기율표의 제1, 제2 또는 제3 전이 시리즈로부터 선택될 수 있다. 적합한 금속은 망가니즈 II 또는 III, 철 II 또는 III, 코발트 II 또는 III, 니켈 II 또는 III, 구리 I 또는 II, 로듐 II, III 또는 IV, 및 루테튬을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 도입될 때 금속의 산화 상태는 반드시 활성 형태의 상태는 아님이 인지되어야 한다. 일부 실시양태에서, 전이 금속은 스칸듐, 티타늄, 바나듐, 크로뮴, 망가니즈, 철, 코발트, 니켈, 구리 및 아연으로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 촉매는 구리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 전이 금속은 란타나이드 금속 (예를 들어 란타넘, 세륨, 프라세오디뮴, 네오디뮴, 프로메튬, 사마륨, 유로퓸, 가돌리늄, 테르븀, 디스프로슘, 홀뮴, 에르븀, 툴륨, 이테르븀 또는 루테튬)이다.

[0078] 일부 실시양태에서, 촉매는 염 형태의 금속, 예를 들어 금속 이온 및 반대이온을 포함한다. 금속 이온과 착화할 수 있는 임의의 적합한 하전된 화합물이 본원에 기재된 스캐빈징 실란트에서 사용되는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 반대이온은 할라이드, 술파이트, 술파이트, 술피드, 니트레이트, 니트라이트, 아세테이트, 아세틸아세토네이트, 퍼클로레이트, 히드록시드, 메톡시드 및 에톡시드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 반대이온은 라우레이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 올레이트 및 리놀레이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0079] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 산소 스캐빈징 실란트의 촉매는 수용해도가 제한적이거나 또는 수용해도가 없는 산화 촉매를 포함하는 것으로 고려된다. 일부 실시양태에서, 촉매는 실질적으로 수불용성인 유기 또는 무기 전이 금속 화합물의 형태로 제공된다. 일부 실시양태에서, 촉매는 전이 금속이 이온 또는 공유 결합에 의해 다른 원소 또는기와 회합되는 염 또는 화합물의 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 촉매는 킬레이트제, 착물, 또는 유기 카르복실산 지방산 염의 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 전이 금속 화합물은 최고 산화 상태에 있는 전이 금속을 갖는 화합물이다. 일부 실시양태에서, 산소 스캐빈징 실란트는 구리 착물 및 아스코르빌 지방산 에스테르를 포함한다.

[0080] 샘플 로딩

[0081] 일부 측면에서, 본 개시내용은 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)를 샘플 웰 내로 로딩하는 데 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 관심 분자를 포함하는 샘플을 샘플

웰을 포함하는 집적 디바이스의 표면 상에 도입함으로써 샘플 웰 내로 샘플을 로딩하는데 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 샘플을 집적 디바이스의 표면에 접촉시키는 것에 의한 샘플 로딩은 임의의 수의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 샘플은 실무자에 의해, 특히 피펫, 분배기, 또는 임의의 적합한 유체 전달 장치/시스템을 통해 샘플을 장치에 첨가함으로써 로딩된다. 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 샘플은 자동화 수단 (예를 들어, 로봇 장치/시스템)을 통해 샘플을 디바이스에 첨가함으로써 로딩된다. 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 샘플은 하나 이상의 마이크로유체 채널을 통해 샘플을 디바이스에 첨가함으로써 로딩된다.

[0082] 일부 실시양태에서, 분자를 집적 디바이스에 전달하기 위해 일반적으로 사용되는 방법에 의해 관심 분자를 집적 디바이스 (예를 들어, 샘플 웰, 어레이를 포함하는 집적 디바이스)로 전달할 수 있다. 예를 들어, 전달 방법은 관심 분자를 유체 중에 현탁시키고 생성된 현탁액을 집적 디바이스의 샘플 웰 내로 유동시키는 것을 포함할 수 있다. 이는 관련 현탁액을 집적 디바이스의 하나 이상의 영역에 단순히 피펫팅하는 것을 포함할 수 있거나, 또는 전기-방향 또는 압력-기반 유체 유동과 같은 보다 능동적 유동 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 분자를 포함하는 샘플은 집적 디바이스의 선택된 영역, 예를 들어 특정 관심 분자가 집적 디바이스의 특정한 영역에서 분석되는 영역으로 유동한다. 이는 마스킹 기술 (마스크를 유체 유동에 방향을 주도록 적용함)에 의해, 또는 잉크-젯 인쇄 방법에 의한 것을 비롯한 능동 유동 방법, 예컨대 전기-방향 또는 압력 기반 유체 유동에 의해 달성될 수 있다. 핵산 및 관련 시약을 어레이에 전달하기 위한 잉크 젯 및 다른 전달 방법은 예를 들어 문헌 [Kimmel and Oliver (Eds) (2006) DNA Microarrays Part A: Array Platforms & Wet-Bench Protocols, Volume 410 (Methods in Enzymology) ISBN-10: 0121828158; Lee (2002) Microdrop Generation (Nano- and Microscience, Engineering, Technology and Medicine) CRC Press ISBN-10: 084931559X; and Heller (2002) "DNA MICROARRAY TECHNOLOGY: Devices, Systems, and Applications" Annual Review of Biomedical Engineering 4: 129-153]에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로유체 유동이 관심 분자 전달을 위해 사용될 수 있다. 집적 디바이스의 영역들은 또한 관련 현탁액을 집적 디바이스의 정확한 영역으로 간단히 피펫팅함으로써 전달의 선택적 표적이 될 수 있다.

[0083] 일부 실시양태에서, 샘플 웰을 포함하는 집적 디바이스 상에 샘플을 도입함으로써 관심 분자를 포함하는 샘플을 샘플 웰 내로 로딩하는 방법은 하나 이상의 세척 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 집적 디바이스 상에 샘플을 도입하기 전 및/또는 후에 (예를 들어, 관심 분자를 포함하는 샘플을 집적 디바이스의 샘플 웰 내로 로딩하기 전 및/또는 후에) 1회 이상 세척될 수 있다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 로딩될 샘플 중 관심 분자를 현탁시키기 위해 사용되는 동일한 용액 또는 완충제로 세척된다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스를 비이온성 계면활성제 (예를 들어, 트윈 (Tween) 20)로 세척된다. 일부 실시양태에서, 세척 단계는 세척 용액이 집적 디바이스 상에서 인큐베이션되도록 하는 인큐베이션 기간을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 로딩 방법은 세척 단계를 수행하지 않고 수행될 수 있다.

[0084] 일부 측면에서, 본 개시내용은 관심 분자를 집적 디바이스의 표면에 접촉시키고, 관심 분자를 크라우딩 작용제 및/또는 응축제와 접촉시키는 것을 포함하는, 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)를 샘플 웰 내로 로딩하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 접촉 단계는 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 관심 분자는 크라우딩 작용제 및/또는 응축제와 접촉되기 전에 표면에 접촉된다. 일부 실시양태에서, 관심 분자는 집적 디바이스와 접촉 (예를 들어, 그 상에 로딩) 후, 크라우딩 작용제 및/또는 응축제와 접촉되기 전에 인큐베이션 기간이 이어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 응축제는 이러한 인큐베이션 기간 동안 샘플 중에 존재한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제 및/또는 응축제는 관심 분자가 집적 디바이스와 접촉된 (예를 들어, 그 상에 로딩된) 후 즉시 또는 대략 직후에 집적 디바이스와 접촉된다 (예를 들어, 그 상에 로딩된다). 일부 실시양태에서, 샘플은 집적 디바이스와 접촉하기 전에 크라우딩 작용제 및/또는 응축제를 포함한다.

[0085] 샘플이 집적 디바이스의 표면에 접촉하는 실시양태의 한 예는 도 6a-6c에 도시되어 있다. 도 6a에 도시된 바와 같이, 관심 분자(690)를 포함하는 샘플(640)은 복수의 샘플 웰을 갖는 집적 디바이스에 접촉된다. 도 6b는 샘플(640)에 첨가된 크라우딩 작용제(650)를 포함하는 층(660)을 도시한다. 일부 실시양태에서, 층(660)은 본원에 기재된 바와 같이 일정 기간 동안 샘플(640)과 함께 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 인큐베이션 기간은 크라우딩 작용제(650)로 하여금 샘플(640) 중 벌크 부피(예를 들어, 물)를 차지하고 관심 분자(690)를 배제하도록 할 수 있다. 도 6c는 인큐베이션 기간 후에 발생하는 이러한 부피 배제 효과를 예시하며, 그 동안 관심 분자(690)는 샘플 웰 내로 인도되고, 이로써 샘플 웰은 성공적으로 로딩된 관심 분자(691)를 수용할 확률이 더 높아진다.

- [0086] 또 다른 실시양태에서, 관심 분자는 표면에 접촉되기 전에 크라우딩 작용제와 접촉된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 관심 분자 및 크라우딩 작용제는 집적 디바이스와 접촉하기 (예를 들어, 그 상에 로딩되기) 전에 혼합될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 관심 분자 및 크라우딩 작용제는 혼합되고 일정 기간 동안 평형화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 분자 및 크라우딩 작용제는 집적 디바이스와 접촉하기 (예를 들어, 그 상에 로딩되기) 직전에 또는 대략 곧 혼합된다. 또 다른 실시양태에서, 관심 분자는 표면에 접촉되고 대략 동시에 크라우딩 작용제와 접촉된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 관심 분자 및 크라우딩 작용제는 집적 디바이스와 대략 동시에 접촉되어 (예를 들어, 그 상에 로딩되어), 2개의 성분은 집적 디바이스의 표면 상에서 혼합된다. 또 다른 실시양태에서, 관심 분자는 표면에 접촉시에 크라우딩 작용제와 접촉된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자 전에 집적 디바이스와 접촉된다 (예를 들어, 그 상에 로딩된다). 이러한 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 집적 디바이스와 접촉 (예를 들어, 그 상에 로딩) 후, (예를 들어 집적 디바이스 상에 관심 분자의 도입을 통해) 관심 분자를 로딩하기 전에 인큐베이션 기간이 이어질 수 있다.
- [0087] 본원에 기재된 바와 같이, 크라우딩 작용제는 일반적으로 관심 분자가 샘플 웰 내로 로딩되는 것을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 크라우딩 작용제는 관심 분자가 샘플 웰의 저부 표면에 부착되는 것을 촉진한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 서열분석 반응의 개시 전에 집적 디바이스 상에서 관심 분자-크라우딩 작용제 혼합물을 인큐베이션하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 분자-크라우딩 작용제 혼합물은 서열분석 반응물의 개시 전에 대략 1분 내지 대략 5분, 대략 5분 내지 대략 10분, 대략 10분 내지 대략 20분, 대략 20분 내지 대략 30분, 대략 30분 내지 대략 40분, 대략 40분 내지 대략 50분, 대략 50분 내지 대략 60분, 또는 대략 60분 내지 대략 90분 동안 집적 디바이스에서 인큐베이션된다.
- [0088] 인큐베이션 기간 후에, 일부 실시양태에서, 과잉 부피를 집적 디바이스로부터 제거할 수 있다. 일부 실시양태에서, 과잉 부피는 크라우딩 작용제 및/또는 샘플 웰에 부착되지 않은 임의의 관심 분자를 포함한다. 예를 들어, 도 6c에 도시된 관심 분자의 성공적인 로딩 후에, 도 6d는 샘플 웰 내로 성공적으로 로딩되지 않은 관심 분자 및 크라우딩 작용제를 포함하는 과잉 부피를 제거한 후의 집적 디바이스를 도시한다.
- [0089] 일부 실시양태에서, 집적 디바이스의 표면은 과잉 부피의 제거 후 1회 이상 세척된다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 관심 분자는 본 개시내용에 기재된 임의의 적합한 기술에 의해 개시될 수 있는 반응 (예를 들어, 서열분석 반응)에 참여할 수 있다. 예를 들어, 도 6d에 도시된 과잉 부피의 제거 후, 도 6e는 활성 관심 분자(692)를 생성하는 반응을 개시하는 요소(652)를 포함하는 제제(670)의 첨가를 도시한다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스의 표면은 반응 개시 이전에 1회 이상 세척된다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스의 표면은 관심 분자를 현탁시키는데 사용되는 용액으로 1회 이상 세척된다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스의 표면은 반응을 개시하는데 사용되는 용액으로 1회 이상 세척된다. 일부 실시양태에서, 서열분석 반응은 본원의 다른 곳에 기재된 임의의 적합한 개시 수단에 의해 임의의 제거 및/또는 세척 단계 후 개시된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 관심 분자는 서열분석 반응에 참여하는 서열분석 주형을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 서열분석 주형은 서열분석 반응을 위해 유리하게 "프라이밍"될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열분석 주형을 포함하는 샘플은 서열분석 반응을 개시하는데 필요한 성분을 대부분 또는 전부 중 하나를 갖는다. 따라서, 서열분석 반응은 샘플에 필요한 성분을 첨가함으로써 적절한 시간에 개시될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열분석 반응은 샘플에 dNTP를 첨가함으로써 개시된다. 일부 실시양태에서, 서열분석 반응은 샘플에 금속 양이온 (예를 들어, 마그네슘 이온)을 첨가함으로써 개시된다. 일부 실시양태에서, 샘플 중 억제제의 존재는 서열분석 반응의 개시를 방지한다. 이러한 실시양태에서, 반응은 억제제의 제거에 의해, 예를 들어 억제제를 희석함으로써 (예를 들어, 완충제 교환을 통해) 개시될 수 있다. 따라서, 서열분석 반응의 개시 전에 샘플을 집적 디바이스의 표면과 접촉 (예를 들어, 그 상에 로딩)시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0090] 일부 실시양태에서, 개시된 반응을 오버레이하기 위해 실란트가 샘플에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 실란트는 산소-스캐빈징 실란트이다. 예를 들어, 도 6e에 도시된 바와 같은 반응 개시 후, 도 6f는 샘플에 첨가된 산소 스캐빈징 실란트(654)를 포함하는 층(680)을 도시한다. 적합한 산소 스캐빈징 실란트의 특성, 설명 및 예가 본원에 기재되어 있다.
- [0091] 샘플 제조
- [0092] 일부 측면에서, 본 개시내용은 일반적으로 분석을 위한 샘플을 수득하는 단계와 샘플을 분석하는 단계 사이의 단계 및 과정에서의 개선에 관한 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열분석을 위한 샘플을 수득하는 단계와 샘플로부터의 서열분석 정보를 수득하는 단계 사이의 단계 및 과정에서의 개선에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 핵산 샘플을 포함한다. 일부 측면에서, 서열분석을 위한 샘플을 제조하는 것

은 일반적으로 샘플을 서열분석에 적용하기 전에 샘플 (예를 들어 생물학적 샘플, 화학적 샘플, 핵산 샘플, 단백질 샘플)에 하나 이상의 물리적 및/또는 화학적 변형을 수행하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 서열분석을 위한 샘플을 제조하는 것은 서열분석 주형을 생성하는 것을 포함한다.

[0093] 본원에서 사용된 "서열분석 주형"은 분석 (예를 들어, 서열분석)의 대상인 분자이다. 일부 실시양태에서, 서열분석 주형은 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 "표적" 또는 "주형" 핵산으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 적어도 하나의 혼성화된 프라이머/중합 효소 복합체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 서열분석 프라이머가 핵산 분자에 어닐링되도록 핵산 분자의 일부에 상보적인 서열분석 프라이머와 접촉된다. 이러한 프라이밍 위치는 중합 효소 (예를 들어, DNA 또는 RNA 폴리머라제)가 핵산 분자에 커플링되어 혼성화된 프라이머/중합 효소 복합체를 형성할 수 있는 부위를 생성한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 혼성화된 프라이머/중합 효소를 포함하는 서열분석 주형은 "서열분석 주형 복합체"로 지칭될 수 있다.

[0094] 본원에 사용된 용어 "핵산"은 일반적으로 1개 이상의 핵산 서브유닛을 포함하는 분자를 지칭한다. 핵산은 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 및 우라실 (U), 또는 그의 변이체로부터 선택된 1개 이상의 서브유닛을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 핵산은 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 또는 그의 유도체이다. 핵산은 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산은 원형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 일반적으로 뉴클레오타이드의 임의의 중합체를 지칭한다.

[0095] 본원에 사용된 용어 "뉴클레오타이드"는 일반적으로 A, C, G, T 또는 U, 또는 그의 변이체 또는 유사체를 포함할 수 있는 핵산 서브유닛을 지칭한다. 뉴클레오타이드는 신장 핵산 가닥에 혼입될 수 있는 임의의 서브유닛을 포함할 수 있다. 이러한 서브유닛은 A, C, G, T, 또는 U, 또는 하나 이상의 상보성 A, C, G, T 또는 U에 특이적인 임의의 다른 서브유닛, 또는 퓨린 (예를 들어, A 또는 G, 또는 그의 변이체 또는 유사체) 또는 피리미딘 (예를 들어, C, T, 또는 U, 또는 그의 변이체 또는 유사체)에 상보적인 것일 수 있다. 서브유닛은 개별 핵산 염기 또는 염기의 군 (예를 들어, AA, TA, AT, GC, CG, CT, TC, GT, TG, AC, CA, 또는 그의 우라실-대응물)이 해석될 수 있게 한다. 뉴클레오타이드는 하나 이상의 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 메틸화 핵염기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 메틸화 뉴클레오타이드는 핵염기에 부착된 (예를 들어, 핵염기의 고리에 직접 부착된, 핵염기의 고리의 치환기에 부착된) 1개 이상의 메틸 기를 포함하는 뉴클레오타이드일 수 있다. 예시적인 메틸화 핵염기는 1-메틸티민, 1-메틸우라실, 3-메틸우라실, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, 7-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, N6,N6-디메틸아데닌, 1-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, N2-메틸구아닌, 및 N2,N2-디메틸구아닌을 포함한다.

[0096] 본원에 사용된 용어 "프라이머"는 일반적으로 A, C, G, T 및/또는 U, 또는 그의 변이체 또는 유사체를 포함하는 서열을 포함할 수 있는 핵산 분자 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)를 지칭한다. 프라이머는 DNA, RNA, PNA 또는 그의 변이체 또는 유사체를 포함하는 합성 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 프라이머는 그의 뉴클레오타이드 서열이 표적 또는 주형 핵산에 상보적하도록 설계될 수 있거나, 또는 프라이머는 무작위 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 꼬리 (예를 들어, 폴리-A 꼬리, 인덱스 어댑터, 분자 바코드 등)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 5 내지 15개의 염기, 10 내지 20개의 염기, 15 내지 25개의 염기, 20 내지 30개의 염기, 25 내지 35개의 염기, 30 내지 40개의 염기, 35 내지 45개의 염기, 40 내지 50개의 염기, 45 내지 55개의 염기, 50 내지 60개의 염기, 55 내지 65개의 염기, 60 내지 70개의 염기, 65 내지 75개의 염기, 70 내지 80개의 염기, 75 내지 85개의 염기, 80 내지 90개의 염기, 85 내지 95개의 염기, 90 내지 100개의 염기, 95 내지 105개의 염기, 100 내지 150개의 염기, 125 내지 175개의 염기, 150 내지 200개의 염기, 또는 200개 초과 염기를 포함할 수 있다.

[0097] 일부 실시양태에서, 표적 핵산을 포함하는 샘플은 대상체 (예를 들어, 인간 또는 다른 대상체)로부터 수득된 생물학적 샘플로부터 추출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 환자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 진단, 예후 및/또는 치료 목적을 위해 검출 및/또는 서열분석될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열분석 검정에 대한 정보는 질환 또는 상태의 진단, 예후, 및/또는 치료를 돕는데 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 건강 상태, 예컨대 질환 (예를 들어, 암)을 갖는 것으로 의심될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환에 대한 치료를 받을 수 있다.

[0098] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체의 체액 또는 조직, 예컨대 호흡, 타액, 소변, 혈액 (예를 들어, 전혈 또는 혈장), 대변, 또는 다른 체액 또는 생검 샘플로부터 추출될 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 핵산 분자가 대상체의 체액 또는 조직으로부터 추출된다. 하나 이상의 핵산은 대상체, 예컨대 대상체의 조직의 일부

로부터 수득된 하나 이상의 세포로부터 추출되거나, 또는 대상체의 세포-무함유 체액, 예컨대 전혈로부터 수득될 수 있다.

[0099] 생물학적 샘플은 검출 (예를 들어, 서열분석)을 위한 제조에서 프로세싱될 수 있다. 이러한 프로세싱은 생물학적 샘플로부터 생체분자 (예를 들어, 핵산 분자)의 분리 및/또는 정제, 및 생체분자의 보다 많은 카피의 생성을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 대상체의 체액 또는 조직으로부터 하나 이상의 핵산 분자를 분리 및 정제하고, 핵산 증폭, 예컨대 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 통해 증폭시킨다. 이어서, 하나 이상의 핵산 분자 또는 그의 서브유닛은, 예컨대 서열분석을 통해 확인될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 핵산 샘플은 증폭을 필요로 하지 않으면서 평가 (예를 들어, 서열분석)될 수 있다.

[0100] 본원에 기재된 바와 같이, 서열분석은 주형에 상보적이거나 유사한 또 다른 생체분자를 합성하는 것에 의한, 예컨대 주형 핵산 분자에 상보적인 핵산 분자를 합성하고, 시간 경과에 따른 뉴클레오타이드의 혼입을 확인하는 것에 의한 (예를 들어, 합성에 의한 서열분석) 주형 생체분자 (예를 들어, 핵산 분자)의 개별 서브유닛의 결정을 포함할 수 있다. 대안으로서, 서열분석은 생체분자의 개별 서브유닛의 직접 확인을 포함할 수 있다.

[0101] 서열분석 동안, 생체분자의 개별 서브유닛을 지시하는 신호는 메모리에 수집될 수 있고, 생체분자의 서열을 결정하기 위해 실시간으로 또는 나중 시점에 프로세싱될 수 있다. 이러한 프로세싱은 일부 경우에 판독물을 산출하는 개별 서브유닛의 확인을 가능하게 하는 참조 신호에 대한 신호의 비교를 포함할 수 있다. 판독물은 예를 들어, 염색체 또는 게놈 영역 또는 유전자 상의 위치에 정렬될 수 있는 더 큰 서열 또는 영역을 확인하는데 사용될 수 있는 충분한 길이(예를 들어 적어도 약 30, 50, 100개 이상의 염기쌍 (bp))의 서열일 수 있다.

[0102] 서열 판독물은 대상체의 게놈의 더 긴 영역을 (예를 들어, 정렬에 의해) 재구성하는 데 사용될 수 있다. 판독물은 염색체 영역, 전체 염색체 또는 전체 게놈을 재구성하는 데 사용될 수 있다. 서열 판독물 또는 이러한 판독물로부터 생성된 보다 큰 서열은, 대상체의 게놈을 분석하기 위해 예컨대 변이체 또는 다형성을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 변이체의 예는 탠덤 SNP를 포함한 단일 뉴클레오타이드 다형성 (SNP), indel 또는 결실 삽입 다형성 (DIP)으로 또한 지칭되는 소규모 다중-염기 결실 또는 삽입, 다중-뉴클레오타이드 다형성 (MNP), 짧은 탠덤 반복물 (STR), 마이크로결실을 포함한 결실, 마이크로삽입을 포함한 삽입, 구조적 변이, 예를 들어 복제, 역위, 전위, 증식, 복합 다중-부위 변이체, 카피 수 변이체 (CNV)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 게놈 서열은 변이체의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 게놈 서열은 하나 이상의 SNP 및 하나 이상의 CNV의 조합을 포함할 수 있다.

[0103] 용어 "게놈"은 일반적으로 유기체의 유전성 정보의 전체를 지칭한다. 게놈은 DNA 또는 RNA에 코딩될 수 있다. 게놈은 단백질을 코딩하는 코딩 영역뿐만 아니라 비-코딩 영역을 포함할 수 있다. 게놈은 유기체 내의 모든 염색체의 서열을 함께 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 게놈은 총 46개의 염색체를 갖는다. 이들 모두의 서열은 인간 게놈을 구성한다. 일부 실시양태에서, 전체 게놈의 서열이 결정된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 게놈의 하위세트 (예를 들어, 하나 또는 소수의 염색체, 또는 그의 영역) 또는 하나 또는 소수의 유전자 (또는 그의 단편)에 대한 서열 정보는 진단, 예후 및/또는 치료 용도에 충분하다.

[0104] 일부 실시양태는 시료에서 단일 분자를 검출하는 것에 의한 진단 시험에 관한 것일 수 있지만, 본 발명자들은 또한 본 개시내용의 방법 및 조성물이 폴리펩티드 (예를 들어, 단백질) 서열분석 또는 예를 들어 유전자의 하나 이상의 핵산 절편의 핵산 (예를 들어, DNA, RNA) 서열분석을 수행하기 위해 사용될 수 있다는 것을 인지하였다.

[0105] 서열분석

[0106] 일부 실시양태에서, 본 출원의 측면은 생물학적 샘플의 검정과 관련된 방법에 사용될 수 있다. 예시적인 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 샘플 중 하나 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 서열을 결정하고/거나 샘플 중 하나 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 변이체 (예를 들어, 관심 유전자 내의 하나 이상의 돌연변이)의 존재 또는 부재를 결정하는데 사용되는 기술에 유용하다. 일부 실시양태에서, 시험은 진단, 예후 및/또는 치료 목적을 위해 핵산 서열 정보를 제공하거나, 또는 1개 이상의 관심 핵산의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 환자 샘플 (예를 들어, 인간 환자 샘플)에 대해 수행될 수 있다. 일부 실시예에서, 진단 시험은 대상체의 생물학적 샘플 중 예를 들어 세포 무함유 DNA 분자 및/또는 발현 산물 (예를 들어, RNA)을 서열분석함으로써 대상체의 생물학적 샘플 중 핵산 분자를 서열분석하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 동시-게류 중인 미국 특허 출원 번호: 14/543,865, 14/543,867, 14/543,888, 14/821,656, 14/821,686, 14/821,688, 15/161,067, 15/161,088, 15/161,125, 15/255,245, 15/255,303, 15/255,624, 15/261,697, 15/261,724, 62/289,019, 62/296,546, 62/310,398, 62/339,790, 62/343,997, 62/344,123, 및 62/426,144에서 기재된 기술에서 유리하게

이용될 수 있는 방법 및 조성물을 제공하며, 각각의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

- [0107] 본 출원의 일부 측면은 생물학적 중합체, 예컨대 핵산 및 단백질을 서열분석할 수 있는 기술에 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 출원에 기재된 방법 및 조성물은 핵산 또는 단백질에 혼입된 일련의 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체를 확인하는 기술에 사용될 수 있다 (예를 들어, 일련의 표지된 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체의 혼입의 시간-경과 검출에 의해). 일부 실시양태에서, 본 출원에 기재된 방법 및 조성물은 중합 효소에 의해 합성된 주형-의존성 핵산 서열분석 반응 생성물에 혼입된 일련의 뉴클레오티드를 확인하는 기술에 포함될 수 있다.
- [0108] 서열분석 동안, 중합 효소는 표적 핵산 분자 (예를 들어, 서열분석 주형의 핵산 분자)의 프라이밍 위치에 커플링 (예를 들어, 부착)될 수 있다. 프라이밍 위치는 표적 핵산 분자의 일부에 상보적인 프라이머를 포함할 수 있다. 대안적 프라이밍 위치는 표적 핵산 분자의 이중 가닥 절편 내에 제공되는 갭 또는 틈이다. 갭 또는 틈은 길이가 0 내지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개의 뉴클레오티드일 수 있다. 틈은 이중 가닥 서열 중 1개의 가닥에 절단점을 제공할 수 있고, 이는 예를 들어 가닥 치환 폴리머라제 효소와 같은, 중합 효소에 대한 프라이밍 위치를 제공할 수 있다.
- [0109] 일부 경우에, 서열분석 프라이머는, 고체 지지체에 고정되거나 또는 고정되지 않을 수 있는 표적 핵산 분자에 어닐링될 수 있다. 고체 지지체는 예를 들어 핵산 서열분석을 위해 사용되는 집적 디바이스 상의 샘플 웰을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열분석 프라이머는 고체 지지체에 고정될 수 있고, 표적 핵산 분자의 혼성화는 또한 표적 핵산 분자를 고체 지지체에 고정한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 고체 지지체에 고정되고, 가용성 프라이머 및 표적 핵산은 폴리머라제에 접촉된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 폴리머라제, 표적 핵산 및 프라이머를 포함하는 복합체는 용액 중에 형성되고, 복합체는 (예를 들어, 폴리머라제, 프라이머 및/또는 표적 핵산의 고정을 통해) 고체 지지체에 고정된다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰 내의 성분 중 어느 것도 고체 지지체에 고정되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 폴리머라제, 표적 핵산, 및 프라이머를 포함하는 복합체는 용액 중에 형성되고, 복합체는 고체 지지체에 고정되지 않는다.
- [0110] 적절한 조건 하에, 어닐링된 프라이머/표적 핵산에 접촉된 폴리머라제 효소는 프라이머에 1개 이상의 뉴클레오티드를 부가 또는 혼입시킬 수 있고, 뉴클레오티드는 프라이머에 5'에서 3' 주형-의존 방식으로 부가될 수 있다. 프라이머에의 뉴클레오티드의 이러한 혼입 (예를 들어, 폴리머라제의 작용을 통한)은 일반적으로 프라이머 연장 반응으로 지칭될 수 있다. 각각의 뉴클레오티드는 핵산 연장 반응 동안 (예를 들어, 그의 발광 수명 및/또는 다른 특징에 기초하여) 검출 및 식별될 수 있는 검출가능한 태그와 회합될 수 있고, 연장된 프라이머 내로 혼입된 각각의 뉴클레오티드, 및 그에 따라 새로이 합성된 핵산 분자의 서열을 결정하는데 사용될 수 있다. 새로이 합성된 핵산 분자의 서열 상보성을 통해 표적 핵산 분자의 서열을 또한 결정할 수 있다. 일부 경우에, 서열분석 프라이머의 표적 핵산 분자에의 어닐링 및 서열분석 프라이머에의 뉴클레오티드의 혼입은 유사한 반응 조건 (예를 들어, 동일한 또는 유사한 반응 온도)에서 또는 상이한 반응 조건 (예를 들어, 상이한 반응 온도)에서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 방법에 의한 서열분석은 표적 핵산 분자의 집단 (예를 들어, 표적 핵산의 카피)의 존재 및/또는 표적 핵산의 집단을 달성하기 위한 표적 핵산의 증폭 단계를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 합성에 의한 서열분석은 평가되는 각각의 반응에서 단일 분자의 서열을 결정하기 위해 사용된다 (핵산 증폭은 서열분석을 위해 표적 주형을 제조하는데 요구되지 않음). 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자 서열분석 반응은 본 출원의 측면에 따라 병렬로 (예를 들어, 단일 집적 디바이스 상에서) 수행된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자 서열분석 반응은 집적 디바이스 상의 별개의 반응 챔버에서 각각 수행된다.
- [0111] 실시양태는 약 10개 이상의 염기쌍 (bp), 50 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 1000 bp, 10,000 bp, 20,000 bp, 30,000 bp, 40,000 bp, 50,000 bp 또는 100,000 bp 이상의 길이를 갖는 핵산 분자를 포함하는 서열분석 주형을 로딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자 서열분석에서 사용되는 표적 핵산 분자는 샘플 웰의 저부 또는 측벽과 같은 고체 지지체에 고정되거나 부착된 서열분석 반응의 적어도 하나의 추가 성분 (예를 들어, 중합 효소, 예컨대 DNA 폴리머라제, 및 서열분석 프라이머)을 함유하는 샘플 웰에 첨가되거나 또는 고정된 단일 가닥 표적 핵산 주형이다. 표적 핵산 분자 또는 폴리머라제는 샘플 벽에, 예컨대 샘플 웰의 저부 표면 또는 측벽에서 직접 또는 링커를 통해 부착될 수 있다. 샘플 웰은 또한 프라이머 연장 반응을 통한 핵산 합성에 필요한 임의의 다른 시약, 예컨대 예를 들어 적합한 완충제, 보조인자, 효소 (예를 들어, 폴리머라제) 및 데옥시리보뉴클레오타이드 폴리포스페이트, 예컨대 예를 들어 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트, 예를 들어 데옥시아데노신 트리포스페이트 (dATP), 데옥시시티딘 트리포스페이트 (dCTP), 데옥시구아노신 트리포스페이트 (dGTP), 데옥시우리딘 트리포스페이트 (dUTP) 및 데옥시티미딘 트리포스페이트 (dTTP) dNTP를 함유할 수

있고, 이는 검출가능한 모이어티 (예를 들어, 발광 태그)를 임의로 포함할 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 단일-가닥 표적 핵산 주형은 서열분석 프라이머, dNTP, 폴리머라제, 및 핵산 합성에 필요한 다른 시약과 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, dNTP의 혼입이 연속해서 발생할 수 있도록 모든 적절한 dNTP을 단일-가닥 표적 핵산 주형과 동시에 접촉시킬 수 있다 (예를 들어, 모든 dNTP이 동시에 존재한다). 다른 실시양태에서, dNTP는 단일-가닥 표적 핵산 주형과 순차적으로 접촉될 수 있고, 이 경우 단일-가닥 표적 핵산 주형은 각각의 적절한 dNTP와 개별적으로 접촉되고, 단일-가닥 표적 핵산 주형이 dNTP를 바꿔 접촉되는 사이에 세척 단계가 존재한다. 단일-가닥 표적 핵산 주형을 각각의 dNTP와 개별적으로 접촉시키고 이어서 세척하는 이러한 사이클은, 식별하고자 하는 단일-가닥 표적 핵산 주형의 각각의 연속적인 염기 위치에 대해 반복될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열분석 프라이머는 단일-가닥 표적 핵산 주형에 어닐링되고, 폴리머라제는 단일-가닥 표적 핵산 주형에 기초하여 dNTP (또는 다른 데옥시리보뉴클레오타이드 폴리포스페이트)를 프라이머에 연속적으로 혼입시킨다.

[0113] 폴리머라제

[0114] 본원에 사용된 용어 "폴리머라제" 및 "중합 효소"는 일반적으로 중합 반응을 촉매할 수 있는 임의의 효소를 지칭한다. 폴리머라제의 예는, 비제한적으로, 핵산 폴리머라제, 트랜스크립타제 또는 리가제를 포함한다. 폴리머라제는 중합 효소일 수 있다.

[0115] 단일 분자 핵산 연장에 대한 실시양태 (예를 들어, 핵산 서열분석의 경우)는 표적 핵산 분자에 대해 상보적인 핵산을 합성할 수 있는 임의의 폴리머라제를 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 리버스 트랜스크립타제, 및/또는 이들 중 1종 이상의 돌연변이체 또는 변경된 형태일 수 있다.

[0116] 폴리머라제의 예는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 열안정성 폴리머라제, 야생형 폴리머라제, 변형 폴리머라제, E. 콜라이 DNA 폴리머라제 I, T7 DNA 폴리머라제, 박테리오파지 T4 DNA 폴리머라제 ϕ 29 (phi29) DNA 폴리머라제, Taq 폴리머라제, Tth 폴리머라제, Tli 폴리머라제, Pfu 폴리머라제, Pwo 폴리머라제, Vent® 폴리머라제, 딥 벤트(Deep Vent)™ 폴리머라제, Ex Taq™ 폴리머라제, LA Taq™ 폴리머라제, Sso 폴리머라제, Poc 폴리머라제, Pab 폴리머라제, Mth 폴리머라제, ES4 폴리머라제, Tru 폴리머라제, Tac 폴리머라제, Tne 폴리머라제, Tma 폴리머라제, Tca 폴리머라제, Tih 폴리머라제, Tfi 폴리머라제, 플라티늄(Platinum)® Taq 폴리머라제, Tbr 폴리머라제, Tfi 폴리머라제, Tth 폴리머라제, 푸투르보(Pfuturbo)® 폴리머라제, 피로베스트(Pyrobest)™ 폴리머라제, Pwo 폴리머라제, KOD 폴리머라제, Bst 폴리머라제, Sac 폴리머라제, 클레나우(Klenow) 단편, 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라제, 및 그의 변이체, 변형된 생성물 및 그의 유도체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 단일 서브유닛 폴리머라제이다. 폴리머라제의 추가의 예는 M2Y 폴리머라제, 루실리아 쿠프리나(*Lucilia cuprina*) 폴리머라제, 엔테로코쿠스 파에시움(*Enterococcus faecium*) 폴리머라제, 바실루스 파지 VMY22 폴리머라제, 바실루스 파지 GA-1 폴리머라제, 악티노미세스 파지 AV-1 폴리머라제, 칸디다투스 모란박테리아 폴리머라제, 바실루스 파지 MG-B1 폴리머라제, 에그게르텔라 sp. 폴리머라제, 스트렙토코쿠스 파지 CP-7 폴리머라제, 박테로이데스 sp. 폴리머라제, 및 클라미디아 트라코마티스 폴리머라제를 포함한다. DNA 폴리머라제의 비제한적인 예 및 그의 특성은 특히 다른 문헌 중, 문헌 [DNA Replication 2nd edition, Kornberg and Baker, W. H. Freeman, New York, N.Y. (1991)]에 상세히 기재되어 있다.

[0117] 표적 핵산의 핵염기와 상보적 dNTP 사이의 염기 쌍형성 시, 폴리머라제는 새로이 합성되는 가닥의 3' 히드록실 단부와 dNTP의 알파 포스페이트 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성함으로써 새로이 합성되는 핵산 가닥으로 dNTP를 혼입시킨다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 높은 프로세스성을 갖는 폴리머라제이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 감소된 프로세스성을 갖는 폴리머라제이다. 폴리머라제 프로세스성은 일반적으로 핵산 주형을 방출하지 않으면서 핵산 주형 내로 dNTP를 연속적으로 혼입시킬 수 있는 폴리머라제의 능력을 지칭한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 낮은 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성 및/또는 3'-5' 엑소뉴클레아제를 갖는 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 (예를 들어, 아미노산 치환에 의해) 변형되어, 상응하는 야생형 폴리머라제에 비해 감소된 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성 및/또는 3'-5' 활성을 갖는다. DNA 폴리머라제의 추가의 비제한적 예는 9° Nm™ DNA 폴리머라제 (뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)), 및 클레나우 엑소- 폴리머라제의 P680G 변이체 (Tuske et al. (2000) JBC 275(31):23759-23768)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 감소된 프로세스성을 갖는 폴리머라제는 뉴클레오타이드 반복부 (예를 들어, 동일한 유형의 2개 이상의 순차적 염

기)의 1개 이상의 스트레치를 함유하는 서열분석 주형에 대해 증가된 정확도를 제공한다.

- [0119] 단일 분자 RNA 연장에 관한 실시양태 (예를 들어, RNA 서열분석의 경우)는 RNA 주형으로부터 상보적 DNA (cDNA)를 합성할 수 있는 임의의 리버스 트랜스크립타제를 사용할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 리버스 트랜스크립타제는 RNA 주형에 어닐링된 역전사 프라이머에 dNTP의 혼입을 통해 RNA 주형으로부터 cDNA가 합성될 수 있다는 점에서 폴리머라제와 유사한 방식으로 기능할 수 있다. 이어서, cDNA를 서열분석 반응에 참여시키고, 그의 서열을 결정할 수 있다. 이어서, cDNA의 결정된 서열을 서열 상보성을 통해 사용하여 원래 RNA 주형의 서열을 결정할 수 있다. 리버스 트랜스크립타제의 예는 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 리버스 트랜스크립타제 (M-MLV), 조류 골수아세포종 바이러스 (AMV) 리버스 트랜스크립타제, 인간 면역결핍 바이러스 리버스 트랜스크립타제 (HIV-1) 및 텔로머라제 리버스 트랜스크립타제를 포함한다.
- [0120] 프로세스성, 엑소뉴클레아제 활성, 상이한 유형의 핵산에 대한 상대적 친화도, 또는 핵산 폴리머라제의 다른 특성은 상응하는 야생형 폴리머라제에 비해 통상의 기술자에 의해 돌연변이 또는 다른 변형에 의해 증가 또는 감소될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제를 포함하는 샘플은 본원에 기재된 바와 같이 샘플을 집적 디바이스의 표면과 접촉시킴으로써 샘플 웰에 로딩될 수 있다.
- [0121] 샘플 웰
- [0122] 일부 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 집적 디바이스에 포함된 샘플 웰 내로 로딩하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용된 "집적 디바이스"는 베이스 기기와 인터페이스할 수 있는 디바이스이다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 하나 이상의 샘플 웰 및/또는 센서를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 집적 디바이스는 광을 방출하거나 검출하는 베이스 기기와 인터페이스할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 집적 디바이스는 각각 도파관을 포함하는 하나 이상의 샘플 웰을 포함할 수 있다.
- [0123] 본원에 기재된 유형의 집적 디바이스는 그 안에 관심 분자를 수용하도록 구성된 하나 이상의 샘플 웰을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰은 샘플 웰의 표면, 예컨대 저부 표면 상에 배치될 수 있는 관심 분자를 수용한다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰은 집적 디바이스 내에 형성되고, 여기서 샘플 웰의 저부 표면은 저부 표면이 형성되는 집적 디바이스의 표면에 대해 원위에 존재한다. 일부 실시양태에서, 관심 분자가 배치되는 저부 표면은 목적하는 수준의 여기 에너지로 관심 분자를 여기시키도록 구성된 도파관으로부터의 거리를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰은 도파관에 대해, 도파관을 따라 전파되는 광학 모드의 소산장이 관심 분자와 중첩되도록 위치할 수 있다.
- [0124] 샘플 웰은 집적 디바이스의 표면에 상부 개구를 가질 수 있으며, 상부 개구를 통해 관심 분자가 샘플 웰에 위치할 수 있다. 상부 개구의 크기는 여러 인자, 예컨대 로딩되는 샘플 중 관심 분자 (예를 들어, 서열분석 주형)의 크기에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상부 개구의 크기는 샘플 웰을 포함하는 집적 디바이스가 이용되는 기기 또는 장치에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 샘플 웰 내로부터의 광을 검출하는 장치에서, 배경 신호는 미광으로부터 유도될 수 있다. 관심 분자가 샘플 웰에 배치되고 여기 에너지로 여기되는 경우, 배경 신호는 방출 에너지에서의 원치 않는 변동을 야기할 수 있고, 따라서 측정 노이즈를 만든다. 이러한 변동을 제한하기 위해, 상단 개구의 크기는 배경 신호의 적어도 일부를 차단하도록 구성될 수 있다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 샘플 웰의 부피는 약 10^{-21} 리터 내지 약 10^{-15} 리터일 수 있다. 샘플 웰은 작은 부피를 갖기 때문에, 관심 분자가 천연 환경에서 발견되는 것과 유사한 농도로, 조사된 표본 중에 농축될 수 있더라도 단일-샘플 사건 (예를 들어, 단일-분자 사건)의 검출이 가능할 수 있다. 예를 들어, 집적 디바이스와 접촉하여 위치하는 시편 중에 마이크로몰 농도의 관심 분자가 존재할 수 있지만, 픽셀 수준에서는 단지 약 1개의 관심 분자 (또는 단일 분자 사건)만이 임의의 주어진 시간에 샘플 웰 내에 있을 수 있다.
- [0126] 통계적으로, 일부 샘플 웰은 관심 분자를 함유하지 않을 수 있고, 일부는 1개 초과와 관심 분자를 함유할 수 있다. 그러나, 상당한 수의 샘플 웰이 단일 관심 분자를 함유할 수 있으므로 (예를 들어, 일부 실시양태에서는 적어도 30%), 다수의 샘플 웰에 대해 단일-분자 분석을 병행하여 수행할 수 있다. 각각의 샘플 웰에서 단일-분자 또는 단일-샘플 사건이 분석될 수 있기 때문에, 집적 디바이스에 의해 달리 양상별 평균을 구하지 않고 개별 사건들을 검출할 수 있게 된다.
- [0127] 샘플 웰 관능화
- [0128] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 기술은 샘플 웰 내로 분자의 로딩에 관한 것이며, 여기서 분자는 샘플 웰의 표적 부피 (예를 들어, 반응 부피) 내에 구속된다. 일부 실시양태에서, 표적 부피는 샘플 웰 내의 영역이다.

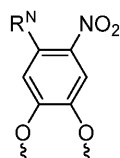
특정 실시양태에서, 샘플 웰은 제1 물질을 포함하는 저부 표면 및 복수의 금속 또는 금속 산화물 층에 의해 형성된 측벽을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 물질은 투명 물질 또는 유리이다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 편평하다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 곡면 웰이다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 복수의 금속 또는 금속 산화물 층에 의해 형성된 측벽 아래의 측벽의 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 물질은 용융 실리카 또는 이산화규소이다. 일부 실시양태에서, 복수의 층은 각각 금속 (예를 들어, Al, Ti) 또는 금속 산화물 (예를 들어, Al₂O₃, TiO₂, TiN)을 포함한다.

[0129]

하나 이상의 분자 또는 복합체 (예를 들어, 서열분석 주형)가 저부 표면 상에 고정되는 경우, 하나 이상의 분자 또는 복합체의 부착을 허용하도록 저부 표면을 관능화하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시양태에서, 저부 표면은 투명 유리를 포함한다. 특정 실시양태에서, 저부 표면은 용융 실리카 또는 이산화규소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 실란으로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 이온 하전된 중합체로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 이온 하전된 중합체는 폴리(리신)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 폴리(리신)-그래프트-폴리(에틸렌 글리콜)로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 비오틴일화 소혈청 알부민 (BSA)으로 관능화된다.

[0130]

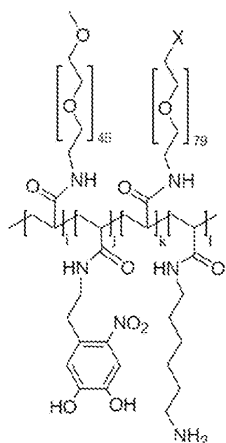
특정 실시양태에서, 저부 표면은 니트로도파 기를 포함하는 코팅으로 관능화된다. 특정 실시양태에서, 코팅은 하기 화학식의 기를 포함한다.



[0131]

[0132]

여기서, R^N은 임의로 치환된 알킬 쇠이고, 는 수소 또는 표면에 대한 부착 지점이다. 일부 실시양태에서, R^N은 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, R^N은 폴리(리신) 또는 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다. 일부 실시양태에서, R^N은 비오틴일화 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 코팅은 리신 단량체를 포함하는 폴리(리신)의 공중합체를 포함하며, 여기서 리신 단량체는 독립적으로 PEG, 비오틴일화 PEG, 니트로도파기, 포스포네이트 기 또는 실란을 포함한다. 특정 실시양태에서, 코팅은 화학식 (P)의 중합체를 포함한다.



[0133]

[0134]

일부 실시양태에서, X는 -OMe, 비오틴 기, 포스포네이트 또는 실란이다. 일부 실시양태에서, 각각의 i, j, k 및 l은 독립적으로 0 내지 100의 정수이다.

[0135]

일부 실시양태에서, 저부 표면은 알킬 쇠를 포함하는 실란으로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 임의로 치환된 알킬 쇠를 포함하는 실란으로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 폴리(에틸렌 글리콜) 쇠를 포함하는 실란으로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 커플링 기를 포함하는 실란으로 관능화된다. 예를 들어, 커플링 기는 화학적 모이어티, 예컨대 아민 기, 카르복실 기, 히드록실 기, 술폰히드릴 기, 금속, 킬레이트화제 등을 포함할 수 있다. 대안적으로, 이들은 특이적 결합 요소, 예컨대 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, 뉴트라비딘, 렉틴, SNAP-태그™ 또는 기질 따라서, 회합 또는 결합 캡티드 또는 단백질, 항

체 또는 항체 단편, 핵산 또는 핵산 유사체 등을 포함할 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, 커플링 기는 관심 분자와 커플링하거나 결합하기 위해 사용되는 추가의 기를 커플링시키기 위해 사용될 수 있으며, 일부 경우에 화학적 관능기 및 특이적 결합 요소 둘 다를 포함할 수 있다. 예를 들어, 커플링 기, 예를 들어 비오틴은 기관 표면 상에 침착될 수 있고 주어진 영역에서 선택적으로 활성화될 수 있다. 이어서, 중간 결합체, 예를 들어, 스트렙타비딘을 제1 커플링 기에 커플링시킬 수 있다. 이어서, 이러한 특정한 예에서 비오틴화될 수 있는 관심 분자는 스트렙타비딘에 커플링된다.

[0136] 일부 실시양태에서, 저부 표면은 비오틴을 포함하는 실란, 또는 그의 유사체로 관능화된다. 일부 실시양태에서, 저부 표면은 폴리(에틸렌) 글리콜쇄를 포함하는 실란으로 관능화되며, 여기서 폴리(에틸렌 글리콜)쇄는 비오틴을 포함한다. 특정 실시양태에서, 저부 표면은 실란의 혼합물로 관능화되고, 여기서 실란 중 적어도 1종의 유형은 비오틴을 포함하고, 실란 중 적어도 1종의 유형은 비오틴을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 혼합물은 비오틴을 포함하지 않는 실란보다 약 10배 적은, 약 25배 적은, 약 50배 적은, 약 100배 적은, 약 250배 적은, 약 500배 적은, 또는 약 1000배 적은 비오틴화 실란을 포함한다.

[0137] 폴리머라제 복합체는 결합 혼합물 내의 관능화된 표면에 복합체를 노출시킴으로써 저부 표면 상에 고정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 혼합물은 하나 이상의 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 아세트산칼륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 염화칼슘을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 약 1 mM 내지 약 10 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 염은 약 10 mM 내지 약 50 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 염은 약 50 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 염은 약 100 mM 내지 약 250 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 아세트산칼륨의 농도는 약 75 mM이다. 일부 실시양태에서, 염화칼슘의 농도는 약 10 mM이다. 일부 실시양태에서, 결합 혼합물은 환원제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 환원제는 디티오트레이톨(DTT)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 환원제는 약 1 mM 내지 약 20 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 디티오트레이톨의 농도는 약 5 mM이다. 일부 실시양태에서, 결합 혼합물은 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 MOPS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 약 10 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, MOPS의 농도는 약 50 mM이다. 일부 실시양태에서, 완충제는 약 5.5 내지 약 6.5의 pH로 존재한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 약 6.5 내지 약 7.5의 pH로 존재하고, 일부 실시양태에서, 완충제는 약 7.5 내지 약 8.5의 pH로 존재한다. 일부 실시양태에서, 결합 혼합물은 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTP)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트는 250 nM 내지 10 μ M의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, dNTP의 농도는 약 2 μ M이다. 일부 실시양태에서, 결합 혼합물은 계면활성제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 트윈 계면활성제(예를 들어, 트윈 20)이다. 일부 실시양태에서, 계면활성제는 약 0.01% 내지 약 0.1%의 부피 퍼센트로 존재한다. 일부 실시양태에서, 트윈의 부피 퍼센트는 약 0.03%이다.

[0138] 실시예

[0139] 실시예 1: 메틸셀룰로스 샘플 로딩

[0140] 2 중량% 메토셀(METHOCEL) 용액을 표준 용해 프로토콜(메틸 셀룰로스, 시그마 M0387, 2% 및 20°C에서 ~1,500 mPa·s, ~63,000 Da)에 따라 탈이온수 중에서 제조하였다. 서열분석 주형 복합체(폴리머라제/프라이머/주형 복합체)의 로딩 동안 사용하기 위해, 2% 메토셀 용액을 결합 완충제의 10X 용액(500 mM MOPS pH 7.5, 750 mM 아세트산칼륨, 100 mM DTT, 20 mM 아세트산칼슘, 20 μ M NTP(각각), 0.1% w/w 트윈 20)과 9:1로 혼합하였다. 완충제 중의 생성된 1.8% 중합체 용액은 1X 결합 완충제(50 mM MOPS pH 7.5, 75 mM 아세트산칼륨, 10 mM DTT, 2 mM 아세트산칼슘, 2 μ M NTP(각각), 0.01% w/w 트윈 20) 중의 서열분석 주형 복합체 로딩 용액과 동일한 이온 조성을 함유하였다.

[0141] 270 nm 깊이의 샘플 웰을 갖는 서열분석 칩(예를 들어, 집적 디바이스)에 트윈 20(0.1%)의 용액을 첨가하고, 10분 동안 인큐베이션하였다. 트윈 20의 제거 시에, 서열분석 칩을 1X 결합 완충제로 1회 세척한 후, 집적 디바이스에 30 μ L 결합 완충제를 첨가하였다. 서열분석 주형 복합체를 함유하는 용액을 250 - 1000 pM의 최종 농도로 집적 디바이스에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 혼합 용액에 결합 완충제 중 1.8% 메틸셀룰로스의 용액을 오버레이시켰다. 후속적으로, 서열분석 칩을 실온에서 30-60분 동안 인큐베이션하였다. 상기 인큐베이션 기간은 아마도 서열분석 주형 복합체의 폴리머라제-스트렙타비딘 융합체가 서열분석 칩 상의 샘플 웰에 고정되게 할 수 있고, 여기서 샘플 웰은 비오틴으로 코팅되어 있는 것이다.

[0142] 인큐베이션 기간 후, 용액을 서열분석 칩으로부터 제거하였다. 서열분석 칩을 결합 완충제로 3회 세척한 후, 반응 완충제(65 mM MOPS pH 7.7, 120 mM 아세트산칼륨, 20 mM 아세트산마그네슘, 10 mM DTT, 8 mM 프로토카테

큐에이트, 6 mM 4-니트로벤질 알콜, 1X 프로토키나제 3,4-디옥시게나제)로 1회 세척하였다. 마지막으로, 반응 완충제의 부피를 서열분석 칩에 첨가하고 동일 부피의 미네랄 오일로 덮었다. 서열분석 반응을 계류 중인 U.S. 출원 14/821,656, 15/261,697, 15/261,724 및 15/161,125에 기재된 방법을 사용하여 실시간으로 모니터링 하였다. 대표적인 서열분석 반응을 도 7a에 제시된 강도 및 시간 트레이스에 의해 도시하였다. 상기 반응에서, 9.1 kb 이중-가닥 DNA 주형을 1.2 kb 초과 판독 길이에 걸쳐 서열분석하였다 (도 7b).

[0143] 대형 주형 로딩에 대한 메틸셀룰로스의 효과를 평가하기 위해, 2개의 서열분석 칩에 각각 동일한 9.1 kb 주형 DNA를 로딩하였고, 하나는 2% 메틸셀룰로스의 오버레이 (상기 기재된 바와 같음)를 사용하고 하나는 오버레이가 없었다. 두 칩에 660 pM로 주형을 1시간 동안 로딩하였다. 다수의 혼입 트레이스가 메틸셀룰로스-로딩된 칩으로부터 검출된 한편, 오버레이가 없는 집적 디바이스 상에서는 서열분석 활성이 검출되지 않았다. 이어서, 형광 DNA-결합 염료인 SYBR 골드를 각각의 서열분석 칩에 첨가하였다. 영상화 결과는 DNA 염색에서의 극적인 차이를 예시하는 도 8에 도시되어 있다. 메틸셀룰로스-로딩된 칩 상의 샘플 웰의 대략 30%가 밝게 염색되었고, 이는 DNA 주형의 존재를 나타내는 반면, 메틸셀룰로스 오버레이가 없는 집적 디바이스에서는 어떤 염색도 관찰되지 않았다.

[0144] 유사한 실험에서, 2개의 추가의 서열분석 칩에 각각 동일한 5.4 kb 주형 DNA를 로딩하였고, 하나는 2.7% 메틸셀룰로스의 오버레이를 사용하고, 하나는 확산 단독으로 로딩하였다. 2개의 칩에 2.5 nM DNA 주형을 1.5시간 동안 로딩하였다. 이어서, SYBR 골드를 각각의 서열분석 칩에 첨가하였다. 영상화 결과는 DNA 염색에서의 극적인 차이를 예시하는 도 9에 도시되어 있다. 확산 단독으로 로딩된 대략 13개의 샘플 웰과 비교하여, 메틸셀룰로스 칩에서는 대략 25개의 샘플 웰에 단일 주형이 로딩되었다.

[0145] 실시예 2: 고체 상태 크라우딩 작용제

[0146] 도 10은 고체 상태 크라우딩 작용제로서 아가로스의 잠재력을 평가하는데 사용된 실험 설정을 도시한다. 도시된 바와 같이, 스크류의 너트 위의 ~4 mm 부분은 집적 디바이스의 벌크 샘플 웰 (예를 들어, 어레이, 예컨대 오목부 영역 내 또는 로딩된 샘플의 벌크 부피를 유지하는 다른 용기)에 삽입될 수 있는 바디를 나타낸다. 아가로스가 크라우딩 작용제로서 작용하는 본 발명의 방법을 예시하기 위해 3개의 조건이 도시되어 있다. "아가로스 없음" 스크류는 크라우딩 작용제가 없는 바디이다. "건조 아가로스" 스크류는 건조 아가로스로 코팅된 바디를 나타낸다. 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 건조 아가로는 대체로 스크류의 나사부를 충전한다. "수화 아가로스" 스크류는 샘플이 로딩된 집적 디바이스의 벌크 샘플 웰 내로 삽입된 후의 건조 아가로스 바디를 나타낸다. 바디 상의 아가로스 코팅의 팽윤은 벌크 샘플 웰 내의 물에 의한 아가로스의 재수화를 나타내고, 그 효과는 벌크 용액 중 서열분석 주형의 증가된 농도를 생성할 것이다.

[0147] 등가물 및 범위

[0148] 여러 본 발명의 실시양태가 본원에 기재 및 예시되어 있지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 기능을 수행하고/거나 결과 및/또는 하나 이상의 이점을 획득하기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 구상할 것이고, 각각의 이러한 변경 및/또는 변형은 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범주 내에 있는 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질 및 구성이 예시적인 것으로 의도되고, 실제 파라미터, 치수, 물질 및/또는 구성은 본 발명의 교시가 사용되는 구체적인 적용 또는 적용들에 따라 달라질 것임을 용이하게 인지할 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용 실험을 사용하여, 본원에 기재된 구체적인 본 발명의 실시양태에 대한 많은 등가물을 인지하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 실시양태는 단지 예로서 제시된 것이고, 첨부된 청구범위 및 그에 대한 등가물의 범주 내에서, 본 발명의 실시양태가 구체적으로 기재되고 청구된 바와 달리 실시될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본 개시내용의 본 발명의 실시양태는 본원에 기재된 각각의 개별 특색, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 이러한 특색, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법이 상호 불일치하지 않는 경우, 2종 이상의 이러한 특색, 시스템, 물품, 물질, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합이 본 개시내용의 발명의 범주 내에 포함된다.

[0149] 본원에서 정의되고 사용된 모든 정의는 사전적인 정의, 참조로 포함된 문헌의 정의, 및/또는 정의된 용어의 통상적인 의미보다 우선하는 것으로 이해되어야 한다.

[0150] 본원에 개시된 모든 참고문헌, 특허 및 특허 출원은 각각 인용된 대상과 관련하여 참조로 포함되고, 일부 경우에 이는 그 문헌의 전체를 포괄할 수 있다.

[0151] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 단수 형태는, 달리 명백하게 나타내지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하

는 것으로 이해되어야 한다.

[0152] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "및/또는"은 그렇게 결합된 요소, 즉 일부 경우에는 결합하여 존재하고 다른 경우에는 분리되어 존재하는 요소 중 "어느 하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"과 함께 열거된 복수의 요소는 동일한 방식으로, 즉 결합된 요소의 "하나 이상의"로 이해되어야 한다. 다른 요소는 구체적으로 식별되는 요소와의 관련 또는 비관련에 불문하고 "및/또는" 절에 의해 구체적으로 식별되는 요소 외에 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및/또는 B"에 대한 언급은 "포함하는"과 같은 개방형 언어와 함께 사용될 때, 한 실시양태에서 단지 A만 (임의로 B 이외의 요소를 포함함); 또 다른 실시양태에서 단지 B만 (임의로 A 이외의 요소를 포함함); 또 다른 실시양태에서 A 및 B 둘 다 (임의로 다른 요소를 포함함) 등을 지칭할 수 있다.

[0153] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 "또는"은 상기 정의된 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리하는 경우에, "또는" 또는 "및/또는"은 포함의 의미로, 즉 요소의 개수 또는 목록 중, 적어도 하나의 포함, 뿐만 아니라 하나 초과, 및 임의로, 추가의 열거되지 않은 항목을 포함하는 것으로 해석될 것이다. "중 오직 하나" 또는 "중 정확하게 하나" 또는 청구범위에서 사용될 때 "로 이루어진"과 같이 달리 명백하게 나타내어진 용어만이 다수의 요소의 개수 또는 목록 중 정확하게 한 요소를 포함하는 것으로 지칭될 것이다. 일반적으로, 본원에서 사용된 용어 "또는"은 "어느 하나", "중 하나", "중 오직 하나" 또는 "중 정확하게 하나"와 같은 배제적 용어가 이어질 때에만 배제적 대안 (즉, "둘 다가 아닌 하나 또는 다른 것")을 나타내는 것으로 해석될 것이다. "로 본질적으로 이루어진"이 청구범위에 사용된 경우에, 특허법 영역에서 사용되는 바와 같은 통상의 의미를 가질 것이다.

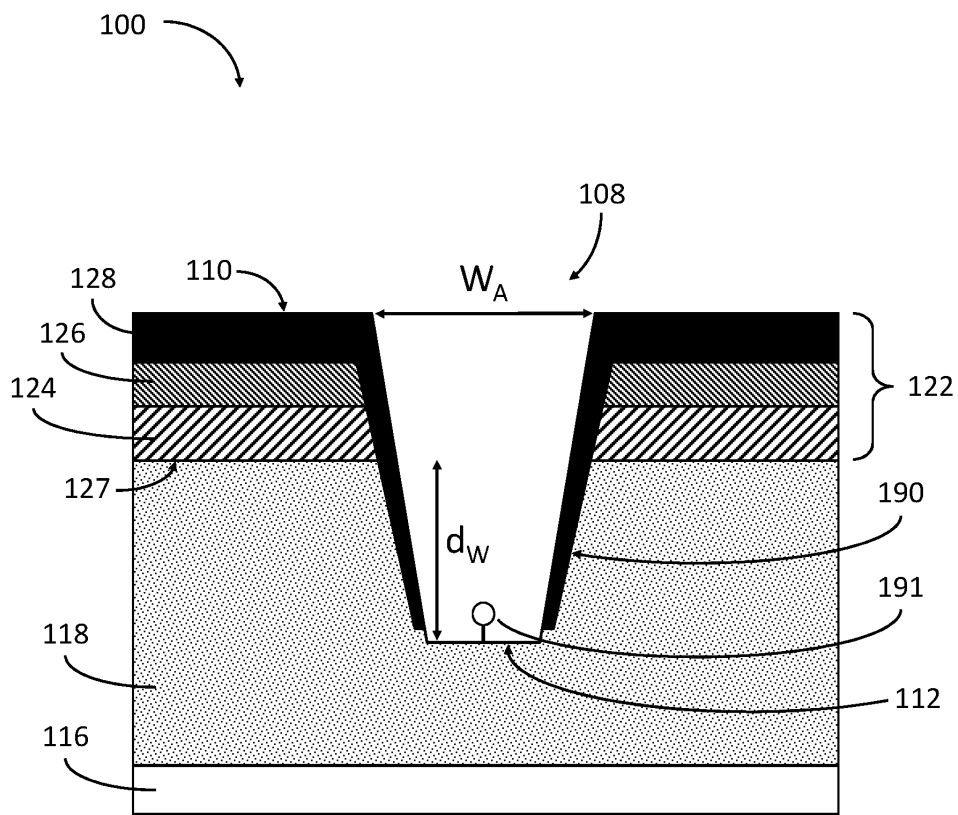
[0154] 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "적어도 하나"는 요소의 목록의 요소 중 어느 하나 이상으로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하지만, 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 및 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함하는 것은 아니며, 요소의 목록에서 요소의 임의의 조합을 배제하는 것이 아님을 이해해야 한다. 이러한 정의는 또한 어구 "적어도 하나"가 언급하는 요소의 목록 내에서 구체적으로 확인되는 요소 이외의 요소가, 그러한 구체적으로 확인되는 요소와 관련되는지 관련되지 않는지에 관계없이 임의로 존재할 수 있다는 것을 허용한다. 따라서, 비제한적 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는, 동등하게, "A 또는 B 중 적어도 하나" 또는, 동등하게 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는, 한 실시양태에서, B가 존재하지 않는, 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 A (및 임의로 B 이외의 요소를 포함함); 또 다른 실시양태에서, A가 존재하지 않는, 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 B (및 임의로 A 이외의 요소를 포함함); 또 다른 실시양태에서, 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 A, 및 임의로 하나 초과를 포함하는 적어도 하나의 B (및 임의로 다른 요소를 포함함) 등을 지칭할 수 있다.

[0155] 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 하나 초과와 단계 또는 작용을 포함하는 본원에 청구된 임의의 방법에서, 방법의 단계 또는 작용의 순서는 반드시 방법의 단계 또는 작용이 언급된 순서에 제한되지는 않는 것으로 또한 이해되어야 한다.

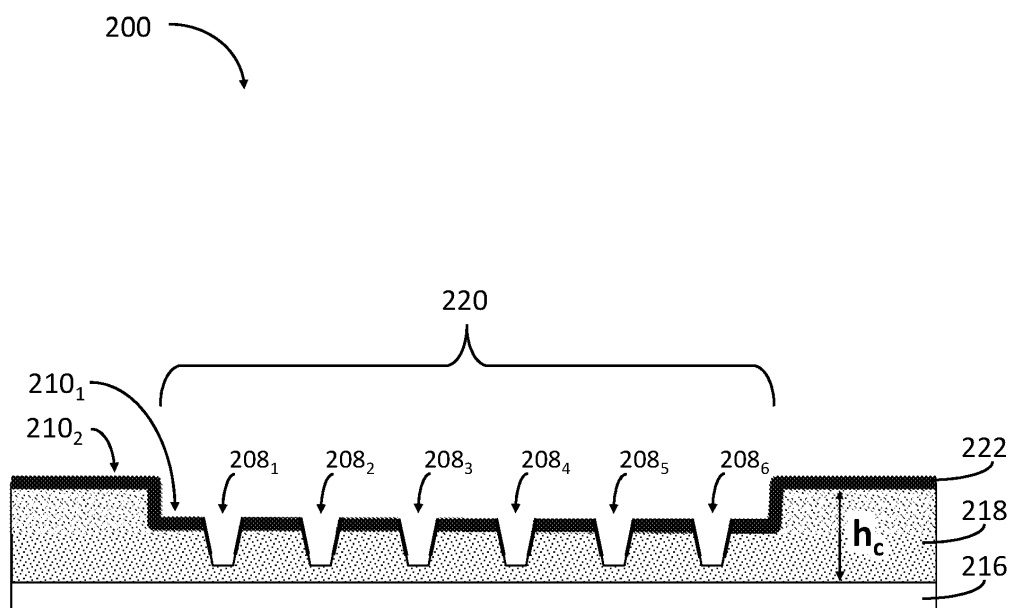
[0156] 상기 명세서뿐만 아니라 청구범위에서, 모든 연결 어구, 예컨대 "포함하는", "포함한", "보유하는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "유지하는", "로 구성된" 등은 개방형, 즉 포함하지만 이에 제한되지는 않는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 다만 연결 어구 "로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어진"은 문헌 [United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03]에 기재된 바와 같이, 각각 폐쇄형 및 반-폐쇄형 연결 어구일 것이다. 개방형 연결 어구 (예를 들어, "포함하는")를 사용하여 이러한 문헌에 기재된 실시양태가 또한 고려되며, 대안적 실시양태에서, "로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어진" 특색이 개방형 연결 어구에 의해 기재되는 것으로서 인지되어야 한다. 예를 들어, 개시내용이 "A 및 B를 포함하는 조성물"을 기재하는 경우에, 개시내용은 또한 대안적 실시양태 "A 및 B로 이루어진 조성물" 및 "A 및 B로 본질적으로 이루어진 조성물"을 고려한다.

도면

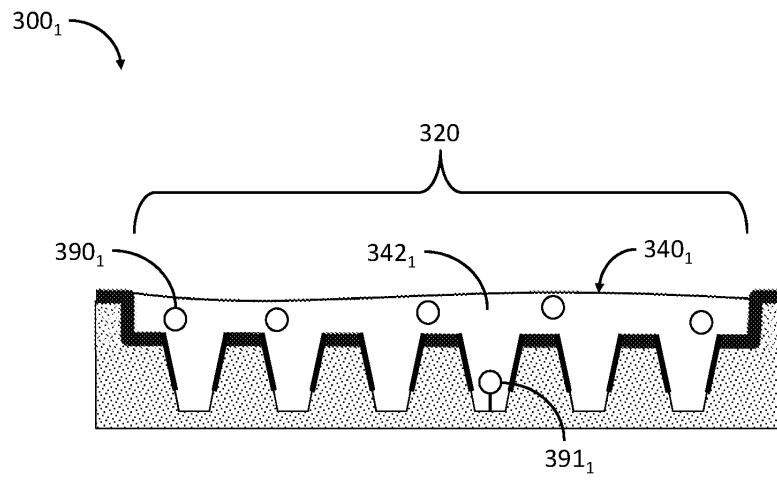
도면1



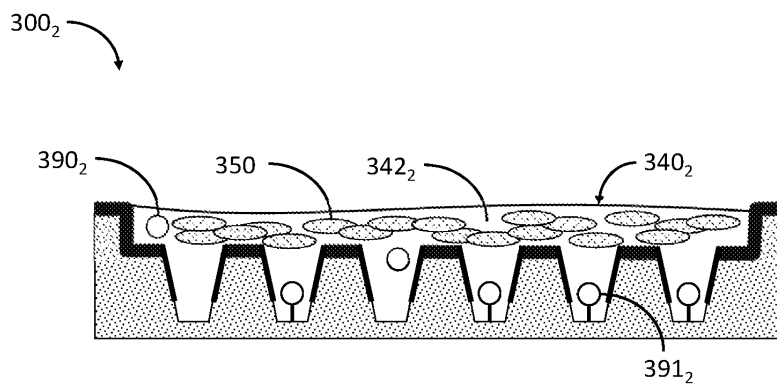
도면2



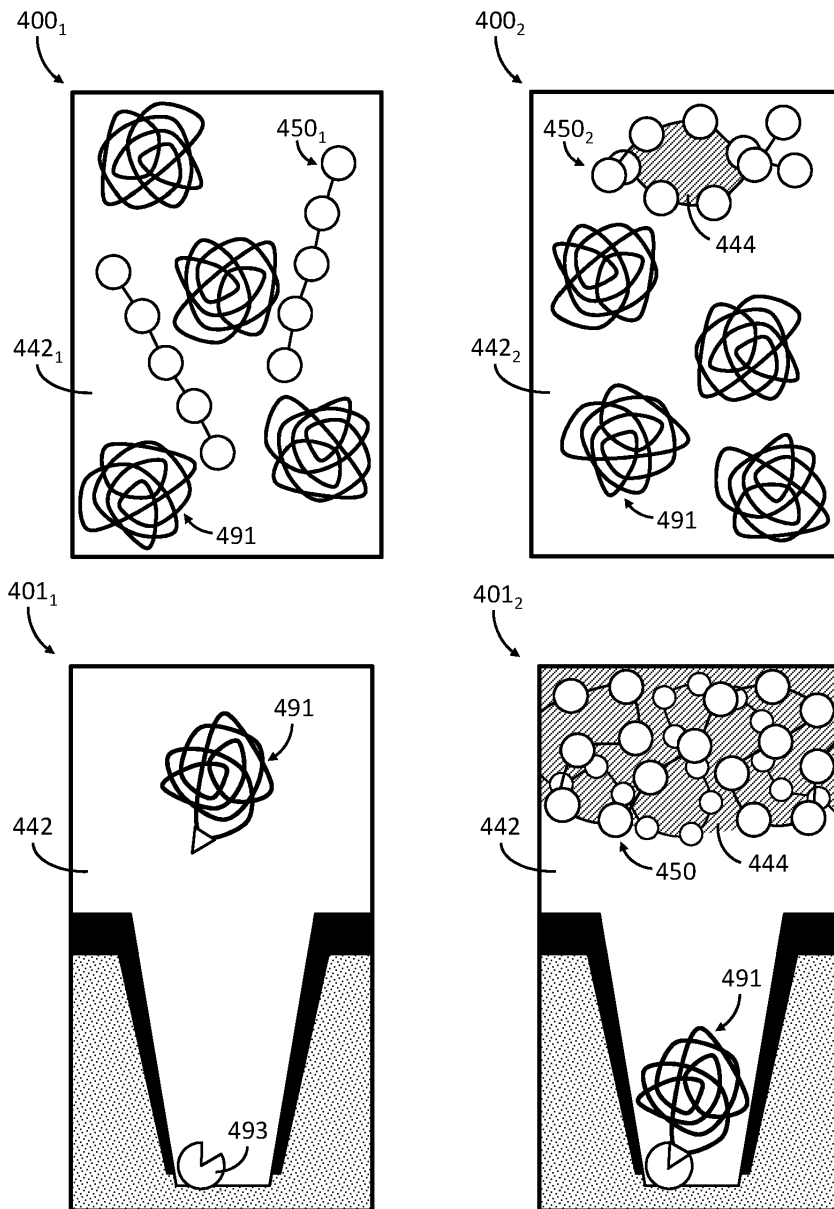
도면3a



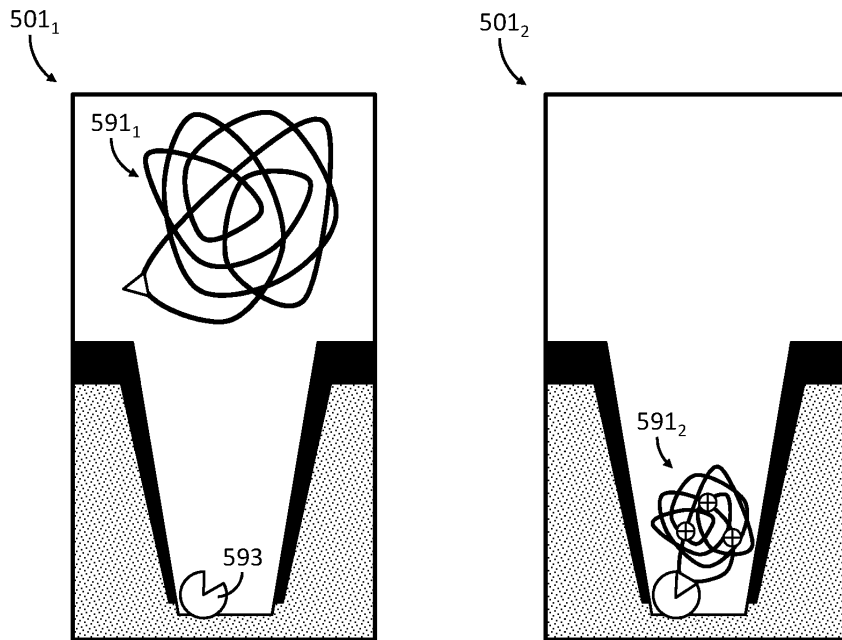
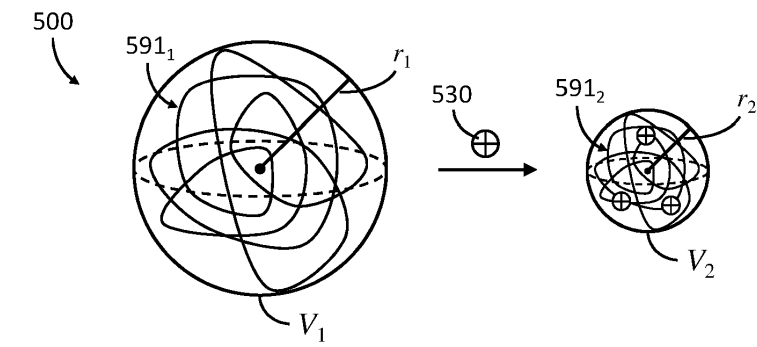
도면3b



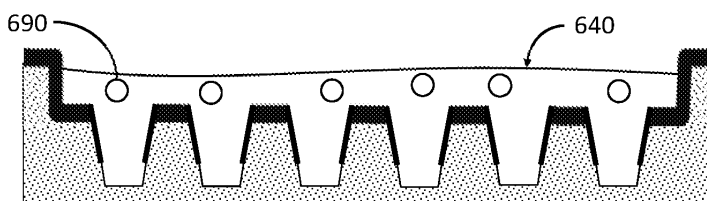
도면4



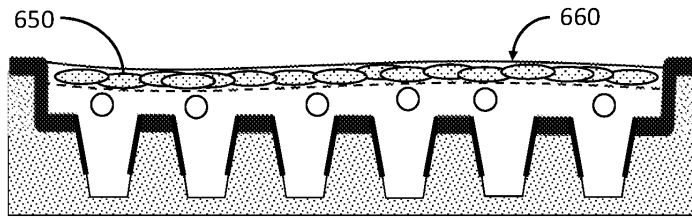
도면5



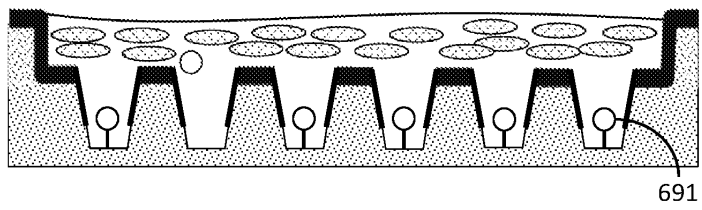
도면6a



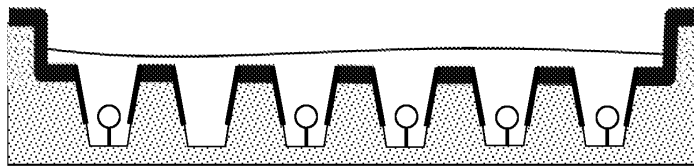
도면6b



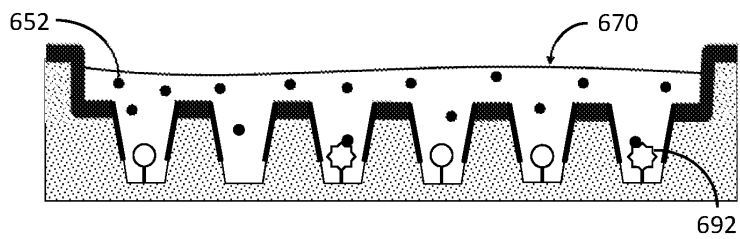
도면6c



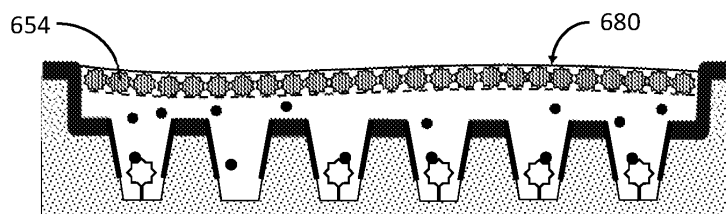
도면6d



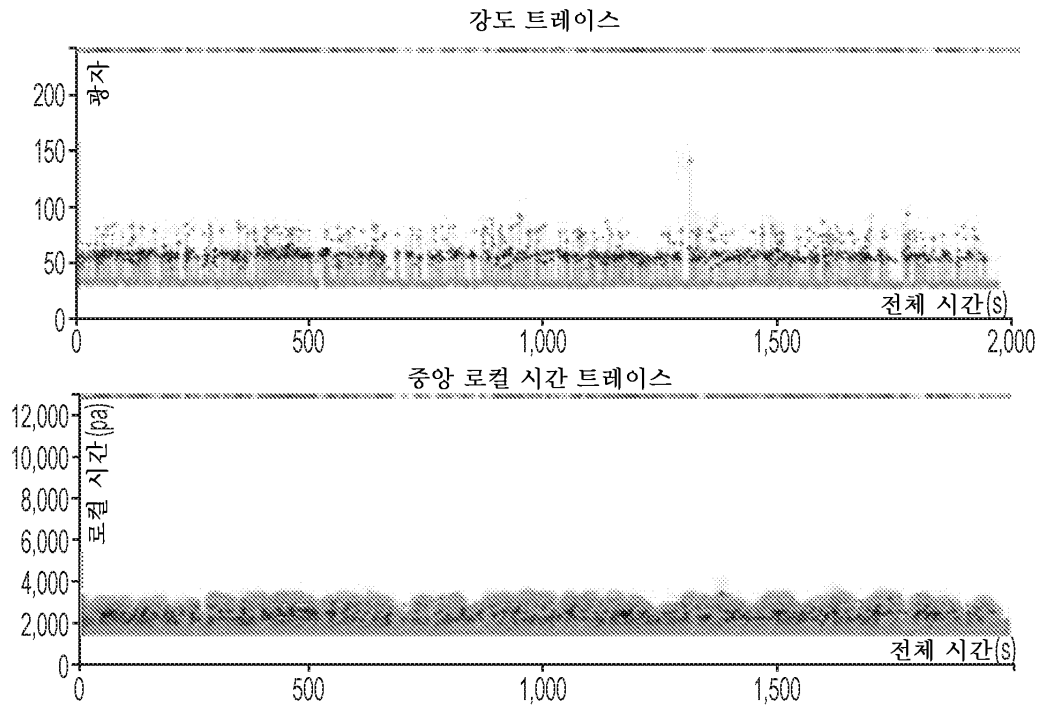
도면6e



도면6f



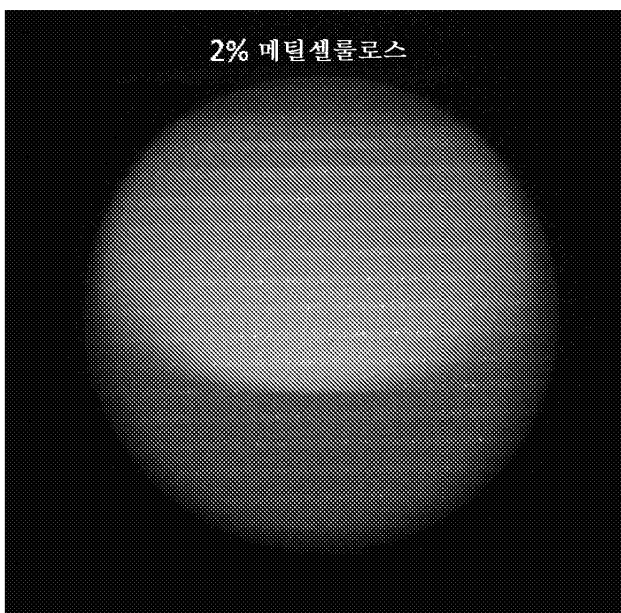
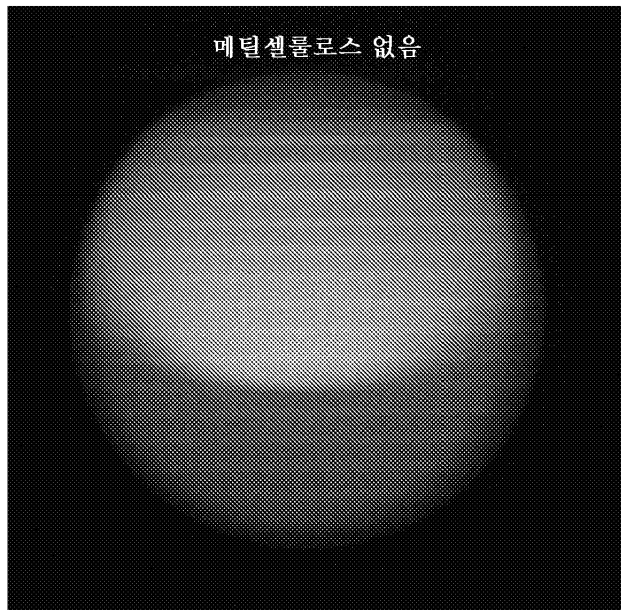
도면7a



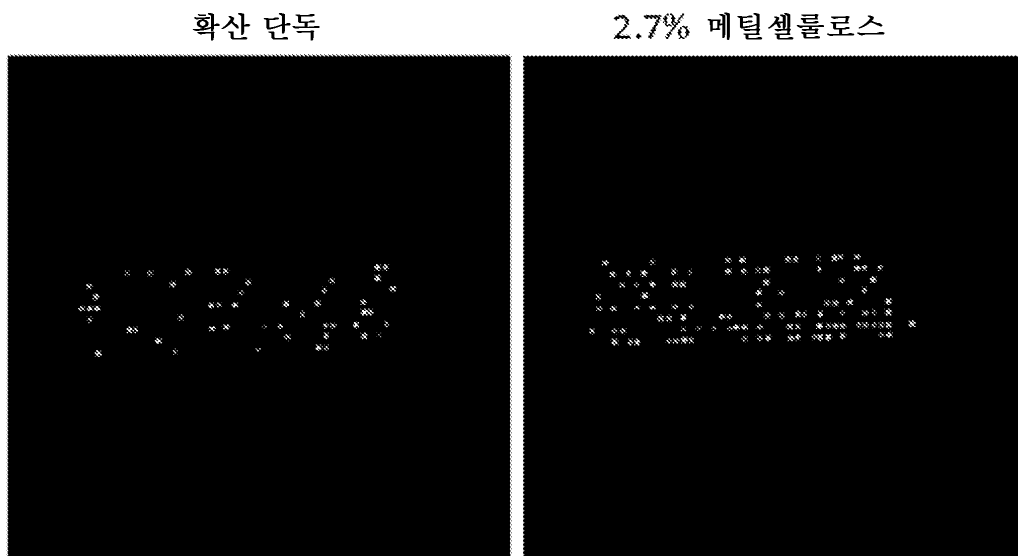
도면7b

#	삽입		결실		미스매치				
관독 길이	#		#		A	C	G	T	총
1,286 염기	A	15	A	57	A	10	7	15	32
정확도	C	26	C	40	C	8	3	22	33
70.5%	G	16	G	62	G	9	8	24	41
p-값	T	36	T	33	T	3	10	4	17
8e-62	총	93	총	192	총	20	28	14	61
									123

도면8



도면9



도면10

