(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월18일
(11) 등록번호 10-2626317
(24) 등록일자 2024년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/6876* (2018.01) *C07H 19/073* (2006.01)
*C07H 19/173* (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
*C12Q 1/6869* (2018.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/6876* (2018.05)
*C07H 19/073* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7005177
(22) 출원일자(국제) 2018년07월24일
심사청구일자 2021년07월26일
(85) 번역문제출일자 2020년02월21일
(65) 공개번호 10-2020-0029581
(43) 공개일자 2020년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/043526
(87) 국제공개번호 WO 2019/023257
국제공개일자 2019년01월31일
(30) 우선권주장
62/536,426 2017년07월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2015073523 A
*(뒷면에 계속)*

(73) 특허권자
**퀀텀-에스아이 인코포레이티드**
미국 06437 코네티컷주 길포드 올드 화이트필드 스트리트 530
(72) 발명자
**로스버그, 조나단 엠.**
미국 06437 코네티컷주 길포드 언카스 포인트 로드 215
**래키, 제레미**
미국 06437 코네티컷주 길포드 노튼타운 로드 636
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**양영준, 김연송, 백만기**

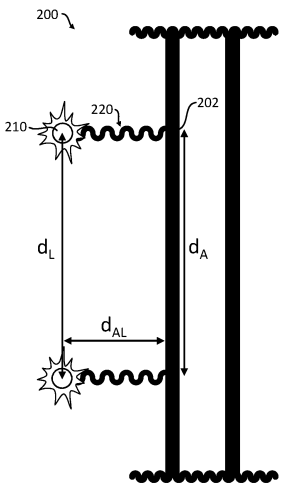
전체 청구항 수 : 총 23 항 심사관 : 최지다

(54) 발명의 명칭 **고강도 표지된 반응물 조성물 및 서열분석 방법**

## (57) 요 약

샘플에서 단일 분자를 검출하는데 유용한 조성물이 제공된다. 일부 측면에서, 개시내용은 뉴클레오티드 및 2개 이상의 발광 표지에 연결된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산은 증진된 형광 강도를 제공하는 하나 이상의 구조적 특색을 포함한다. 일부 측면에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드를 사용하여 서열분석하는 방법이 제공된다.

*대 표 도* - 도2a



(52) CPC특허분류
***C07H 19/173*** (2013.01)
***C07H 21/04*** (2013.01)
***C12Q 1/6869*** (2018.05)
*C12Q 2563/103* (2013.01)
(72) 발명자
**리드, 브라이언**
미국 06443 코네티컷주 매디슨 헐 로드 94
**시, 싱화**
미국 06443 코네티컷주 매디슨 라일 드라이브 9
**황, 하이둥**
미국 06443 코네티컷주 매디슨 시닉 로드 71
**도드, 데이비드**
미국 06437 코네티컷주 길포드 하이 스트리트 43

(56) 선행기술조사문헌
WO2004096997 A2*
WO2003102239 A2
WO1993009128 A1*
WO2016187580 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

핵산 링커를 통해 2개 이상의 발광 표지에 연결된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 포함하는 표지된 뉴클레오티드이며, 여기서 핵산 링커는 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 말단 포스페이트에 연결되고, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리되어 있고, (i) 적어도 1개의 발광 표지는 핵산 링커 내에 통합되고, 핵산 링커 내에 통합된 적어도 1개의 발광 표지는 시아닌-기반 형광단이거나; (ii) 적어도 1개의 발광 표지는 글리콜아민 스페이서 분자를 통해 핵산 링커에 부착되거나; 또는 (iii) (i) 및 (ii)의 조합인 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 각각의 발광 표지가 임의의 다른 발광 표지의 질량 중심으로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된 질량 중심을 포함하는 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 핵산 링커가 적어도 10개의 단량체 단위를 포함하는 올리고머인 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 올리고머가 150개 미만, 100개 미만, 또는 50개 미만의 단량체 단위를 포함하는 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 5

제3항에 있어서, 1개 이상의 발광 표지가 임의의 다른 부착 부위로부터 적어도 5개의 단량체 단위만큼 분리된 부착 부위에서 핵산 링커에 부착된 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 핵산 링커는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 2개 이상의 부착 부위에서 2개 이상의 발광 표지에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하고, 여기서 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지의 것으로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된 중심점을 갖는 입체 부피를 포함하는 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함하며, 여기서

(i) 제1 올리고뉴클레오티드 가닥이 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착되거나, 또는

(ii) 제2 올리고뉴클레오티드 가닥이 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착된 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 8

제6항에 있어서, 2개 이상의 부착 부위가 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 적어도 5개 및 50개 미만의 염기만큼 서로 분리된 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 9

제6항에 있어서, 각각의 부착 부위가 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 구아닌 또는 시토신으로부터 적어도 2개의 염기만큼 분리된 것인 표지된 뉴클레오티드.

### 청구항 10

제6항에 있어서, 적어도 1개의 부착 부위가 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 무염기성 부위에서 발생한 것인 표지된 뉴클레오티드.

**청구항 11**

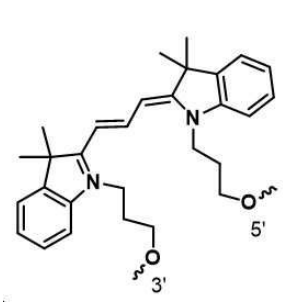
제6항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥이 1개 이상의 스템-루프를 형성하는 것인 표지된 뉴클레오티드.

**청구항 12**

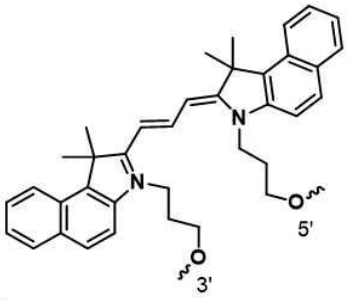
제11항에 있어서, 각각의 스템-루프의 루프 영역이 2개 이상의 부착 부위의 부착 부위를 포함하는 것인 표지된 뉴클레오티드.

**청구항 13**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 시아닌-기반 형광단이 하기 화학 구조를 갖는 것인 표지된 뉴클레오티드:




또는



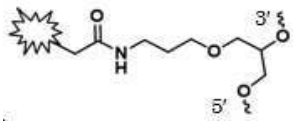

.

**청구항 14**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 글리콜아민 스페이서 분자를 통해 핵산 링커에 부착된 적어도 1개의 발광 표지가 로다민 염료, 바디피 염료 또는 시아닌 염료를 포함하는 것인 표지된 뉴클레오티드.

**청구항 15**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 구조를 포함하며:



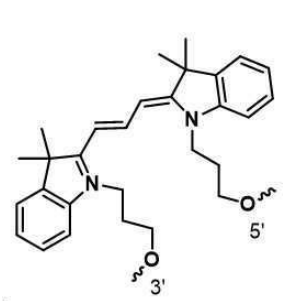

, 여기서 는 글리콜아민 스페이서 분자를 통해 핵산 링커에 부착된 적어도 1개의 발광 표지인 것인 표지된 뉴클레오티드.

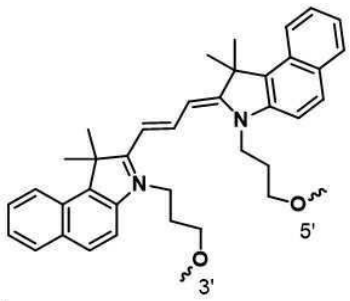
**청구항 16**

핵산 링커를 통해 2개 이상의 발광 표지에 연결된 반응물을 포함하는 표지된 분자이며, 여기서 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리되어 있고, (i) 적어도 1개의 발광 표지는 핵산 링커 내에 통합되고, 핵산 링커 내에 통합된 적어도 1개의 발광 표지는 시아닌-기반 형광단이거나; (ii) 적어도 1개의 발광 표지는 글리콜아민 스페이서 분자를 통해 핵산 링커에 부착되거나; 또는 (i) 및 (ii)의 조합인 것인 표지된 분자.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 시아닌-기반 형광단이 하기 화학 구조를 갖는 것인 표지된 분자:



또는 

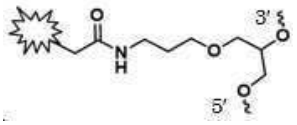
.

**청구항 18**

제16항 또는 제17항에 있어서, 글리콜아민 스페이서 분자를 통해 핵산 링커에 부착된 적어도 1개의 발광 표지가 로다민 염료, 바디피 염료 또는 시아닌 염료를 포함하는 것인 표지된 분자.

**청구항 19**

제16항 또는 제17항에 있어서, 하기 구조를 포함하며:



, 여기서 는 글리콜아민 스페이서 분자를 통해 핵산 링커에 부착된 적어도 1개의 발광 표지인 것인 표지된 분자.

**청구항 20**

(i) 주형 핵산, 프라이머, 및 중합 효소를 포함하는 표적 부피 내의 복합체를 1종 이상의 상이한 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드에 노출시키는 단계이며, 여기서 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 단계;

(ii) 1개 이상의 여기 에너지의 일련의 펄스를 표적 부피 부근으로 향하게 하는 단계;

(iii) 프라이머를 포함하는 핵산에의 순차적 혼입 동안 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 복수의 방출된 광자를 검출하는 단계; 및

(iv) 방출된 광자의 타이밍을 결정함으로써 혼입된 뉴클레오티드의 서열을 식별하는 단계를 포함하는, 주형 핵산의 서열을 결정하는 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 단계 (iv)에서의 방법이 방출된 광자의 타이밍 및 발광 강도를 결정함으로써 혼입된 뉴클레오티드의 서열을 식별하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 22**

2종 이상의 상이한 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함하는, 주형 핵산을 서열분석하기 위한 키트이며, 여기서 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 키트.

**청구항 23**

반응 혼합물 중에 2개 이상의 상이한 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열분석 반응 조성물이며, 여기서 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 핵산 서열분석 반응 조성물.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**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

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2017년 7월 24일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/536,426을 우선권 주장하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 출원의 분야

[0004] 본 출원은 일반적으로, 밝게 표지된 반응물 조성물 및 단일 분자의 검출을 위한 그의 사용 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0005] 차세대 서열분석 기술의 진보는 단일 분자의 대량 병렬 분석을 수행하는 것을 가능하게 하였고, 이는 생명 과학 연구의 지평을 근본적으로 변경시켰다. 이들 기술 중 일부는 발광 표지된 반응 성분을 사용하여 실시간으로 생물학적 반응을 모니터링하는 것을 수반한다. 표지는 광원으로 조명되어 발광을 생성하고, 발광 광은 광검출기에 의해 검출된다. 이들 이벤트는 상응하는 발광 특성에 기초하여 개별 반응 성분을 식별하기 위해 기록되고 분석될 수 있다. 복수의 유형 중에서 특정 유형의 표지된 분자를 식별함에 있어서, 각각의 유형은 고유하고 용이하게 식별가능한 발광 특성을 갖는 것이 중요하다. 또한, 이들 파라미터는 기기 요건, 예컨대 여기원 전력 및 전체 기기 크기를 결정할 수 있다.

### 발명의 내용

[0006] 본원에 개시된 기술의 측면은 링커 (예를 들어, 구속성 링커)에 의해 분리된 2개 이상의 발광 표지를 포함하는 표지된 반응 성분에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 출원은 표지-표지 상호작용으로 인한 검출가능한 신호의 감쇠를 방지하기 위한 발광 표지의 분리에 관한 것이다. 일부 측면에서, 본 출원은 링커를 통해 2개 이상의 발광 표지에 연결된 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 포함하는 표지된 뉴클레오티드를 제공한다. 일부 측면에서, 본 출원은 주형 핵산을 서열분석하기 위한 조성물, 방법, 및 키트를 제공한다.

[0007] 일부 측면에서, 본 출원은 링커를 통해 2개 이상의 발광 표지에 연결된 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 포함하는 표지된 뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드는 중합 반응에서 기질로서의 사용을 위해 구성된다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 표지된 뉴클레오티드는 최소 거리만큼 서로 분리된 2개 이상의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지로부터 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 40, 또는 적어도 50 옹스트롬만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지의 질량 중심으로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된 질량 중심을 포함한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 본 출원의 표지된 뉴클레오티드는 스페이서 분자를 통해 링커에 부착된 1개 이상의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 분자는 발광 표지를 링커 상의 부착 부위에 연결한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 발광 표지와 링커 상의 부착 부위 사이에 적어도 8개의 인접 원자를 포함하는 스페이서 분자를 통해 링커에 부착된다. 일부 실시양태에서, 스페이서 분자는 발광 표지와 링커 상의 부착 부위 사이에 50개 미만, 40개 미만, 30개 미만, 또는 20개 미만의 인접 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 링커 내로 통합된다.

[0009] 일부 실시양태에서, 링커는 올리고머 (예를 들어, 올리고머 링커, 또는 중합체 링커)이다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 2개 이상의 상이한 유형의 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 복수의 동일한 유형의 단량체 단위를 포함한다 (예를 들어, 올리고머는 하나의 유형의 단량체 단위의 중합체임). 일부 실시양태에서, 올리고머는 복수의 제1 유형의 단량체 단위를 갖는 제1 영역 및 복수의 제2 유형의 단량체 단위를 갖는 제2 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는, 각각이 복수의 상이한 유형의 단량체 단위를 포함하는, 복수의 상이한 영역 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 적어도 5개의 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 적어도 10개의 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 150개 미만, 100개 미만, 또는 50개 미만의 단량체 단위 (예를 들어, 적어도 5개의 단량체 단위 및 200, 150, 100, 75, 50, 또는 25개 미만의 단량체 단위; 적어도 10개의 단량체 단위 및 200, 150, 100, 75, 50, 또는 25개 미만의 단량체 단위)를 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 링커가 올리고머 (예를 들어, 올리고머 링커, 중합체 링커)인 경우, 각각의 발광 표지는 올리고머의 적어도 5개의 단량체 단위만큼 서로 분리된다. 일부 실시양태에서, 제1 발광 표지는 제2 발광 표지가 링커 내로 통합되거나 부착된 제2 위치로부터 적어도 5개의 단량체 단위만큼 분리된 제1 위치에서 링커 내로 통합된다. 일부 실시양태에서, 인접한 발광 표지가 링커 내로 통합되는 경우, 표지는 5개 미만의 단량체 단위만큼 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 부착 부위로부터 적어도 5개의 단량체 단위 (예를 들어, 적어도 6, 적어도 8, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20개, 또는 그 초과의 단량체 단위)만큼 분리된 부착 부위에서 링커에 부착된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 부착 부위로부터 적어도 5 단량체 단위 및 40개 미만의 단량체 단위 (예를 들어, 38개 미만, 36개 미만, 34개 미만, 32개 미만, 30개 미만, 28개 미만, 26개 미만, 24개 미만, 22개 미만, 또는 20개 미만의 단량체 단위)만큼 분리된 부착 부위에 부착된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 올리고머의 2개의 순차적 단량체 단위 사이에서 링커 내로 통합된다 (예를 들어, 올리고머의 2개의 인접한 단량체 단위를 공유 연결함).

[0011] 일부 실시양태에서, 링커는 링커에 연결된 2개 이상의 표지 사이의 상호작용을 방지하기에 충분히 강성이다. 일부 실시양태에서, 링커의 강성은, 동일한 링커에 부착된 단일 표지로서 존재하는 경우의 그의 강도에 비해, 각각의 표지의 강도의 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 예를 들어 95-100% (예를 들어, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 100%)를 보존하기에 충분하다.

[0012] 일부 실시양태에서, 링커는 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 펩티드의 아미노산 조성은 (예를 들어, 펩티드 링커 내의 1개 이상의 폴리프롤린 절편의 존재로 인해) 구조적 강성을 제공한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커의 90% 이상 (예를 들어, 모두)은 폴리프롤린 중합체로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 펩티드 강성은 화학적 변형을 통해 펩티드를 구속함으로써 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 펩티드는 1개 이상의 고리화 절편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 고리화 펩티드 (예를 들어, 스테이플 펩티드, 단부-단부 고리화 펩티드 등)이다. 일부 실시양태에서, 충분한 펩티드 강성은 1개 이상의 강성 아미노산 중합체 절편 및 1개 이상의 화학적으로 변형된 아미노산 중합체 절편의 조합을 혼입함으로써 제공될 수 있다.

[0013] 일부 실시양태에서, 링커는 폴리사카라이드 (예를 들어, 헤파린, 헤파린 술페이트, 폴리글루코스, 폴리락토스, 아미노글리코시드, N-아세틸아미노글리코시드, 및 그의 조합)이다.

[0014] 일부 실시양태에서, 링커는 핵산이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 데옥시리보핵산 (DNA), 리보핵산 (RNA), 펩티드 핵산 (PNA), 잠금 핵산 (LNA), 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 충분한 강성은 1개 이상의 이중 가닥 핵산 절편을 사용함으로써 (예를 들어, 2개 이상의 상이한 표지를 분리함으로써) 제공된다. 일부 실시양태에서, 충분한 강성은 핵산의 (예를 들어, 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산의, 또는 1개 이상의 단일-가닥 및 1개 이상의 이중-가닥 절편을 포함하는 핵산의) 1개 이상의 화학적 변형에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 1개 이상의 이중-가닥 절편 및 1개 이상의 화학적으로 변형된 절편의 조합을 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 핵산은 1개 이상의 단일-가닥 및 1개 이상의 이중-가닥 절편의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일-가닥 절편은 루프의 형태로 존재할 수 있다 (예를 들어, 본원의 다른 곳에 기재된 스템-루프 2차 구조에서와 같음). 일부 실시양태에서, 단일-가닥 절편은 이중-가닥 절편 내의 쌍형성되지 않은 영역의 형태로 존재한다. 예를 들어, 내부 루프가 이중-가닥 절편 내에 형성될 수 있고, 여기서 하나의 가닥의 1개 이상의 염기는 다른 가닥의 1개 이상의 인접한 염기와 염기 쌍형성 상호작용을 형성하지 않는다. 쌍형성되지 않은 영역의 추가의 예는 돌출 루프를 포함하며, 이는 하나의 가닥이 다른 가닥에 비해 1개 이상의 추가의 염기를 포

함하는 이중-가닥 절편 내에서 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일-가닥 영역 및 이중-가닥 영역은 구조적 강성을 부여한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 단일-가닥 영역 (예를 들어, 쌍형성되지 않은 영역)은 적어도 2개의 염기 길이 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 염기 길이)이다. 일부 실시양태에서, 단일-가닥 영역은 2 내지 10개의 염기 길이 (예를 들어, 2 내지 8, 4 내지 10, 또는 4 내지 8개의 염기 길이)이다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 영역은 2 내지 40개의 염기 길이 (예를 들어, 2 내지 20, 2 내지 10, 10 내지 40, 10 내지 30, 10 내지 20, 20 내지 40, 또는 20 내지 30개의 염기 길이)이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 핵산은 2개 이상의 발광 표지에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 발광 표지는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 2개 이상의 부착 부위에 부착된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지의 것으로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된 중심점을 갖는 입체 부피를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지의 것으로부터 적어도 6 옹스트롬, 약 5 내지 10 옹스트롬, 약 6 내지 10 옹스트롬, 약 10 내지 15 옹스트롬, 약 15 내지 20 옹스트롬, 약 20 내지 25 옹스트롬, 또는 약 25 내지 50 옹스트롬만큼 분리된 중심점을 갖는 입체 부피를 포함한다.

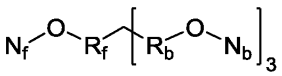
[0018] 일부 실시양태에서, 핵산은 제1 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 2개 이상의 부착 부위는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 적어도 5개의 염기 (예를 들어, 적어도 5개의 뉴클레오티드)만큼 서로 분리된다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 부착 부위는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 적어도 5 및 40개 미만의 염기 (예를 들어, 약 5 내지 30개의 염기, 약 5 내지 20개의 염기, 약 5 내지 10개의 염기, 약 10 내지 40개의 염기, 약 20 내지 40개의 염기, 또는 약 30 내지 40개의 염기)만큼 서로 분리된다. 일부 실시양태에서, 각각의 부착 부위는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 구아닌 또는 시토신으로부터 적어도 2개의 염기만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 각각의 부착 부위는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 무염기성 부위에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 각각의 부착 부위는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 뉴클레오티드의 핵염기에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 핵염기는 A, T, 또는 U 핵염기로부터 선택된다.

[0020] 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 1개 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4개, 또는 그 초과의) 스템-루프를 형성한다. 일부 실시양태에서, 각각의 스템-루프의 루프 영역은 2개 이상의 부착 부위의 부착 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 스템-루프의 루프 영역은 적어도 4개의 쌍형성되지 않은 염기 (예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8개, 또는 그 초과의 쌍형성되지 않은 염기)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 루프 영역은 33% 미만의 G/C 함량을 갖는 서열 (예를 들어, 뉴클레오티드 서열)을 포함한다.

[0021] 일부 측면에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥의 말단 단부에서 2개 이상의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하는 핵산 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 공유 커플링 화합물을 통해 2개 이상의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된다. 일부 실시양태에서, 각각의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥은 적어도 1개의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 제2 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 각각의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥은 상보성 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥과 추가로 혼성화된다.

[0022] 일부 실시양태에서, 공유 커플링 화합물은 하기 구조를 갖고:

[0023] 

[0024] 여기서 $N_f$는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥이고; $N_b$는 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥이고; $R_f$ 및 $R_b$는 각각, 서로 독립적으로, 결합, 또는 치환 또는 비치환된 알킬렌; 치환 또는 비치환된 알케닐렌; 치환 또는 비치환된 알키닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알킬렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알케닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알

키닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴렌; 치환 또는 비치환된 카르보시클릴렌; 치환 또는 비치환된 아릴렌; 치환 또는 비치환된 헤테로아릴렌; 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 연결기이고; 각각의 경우의 O는 인접한 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 포스페이트 기 또는 3' 히드록실 기의 산소 원자이다.

[0025] 일부 측면에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드는 공유 커플링 화합물로부터 연장된 3개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥 (예를 들어, 3, 4, 5, 6개, 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드 가닥)을 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 성분을 포함하는 핵산 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 3개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개는 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 성분은 제2 올리고뉴클레오티드 성분과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 성분은 발광 표지에 부착된 적어도 1개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드는 형광 염료로 발광 표지된다. 일부 실시양태에서, 형광 염료는 로다민 염료, 바디피 염료, 또는 시아닌 염료이다.

[0027] 일부 실시양태에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드는 2개 이상의 발광 표지 중 임의의 발광 표지로부터 적어도 1 nm만큼 분리된 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드는 2개 이상의 발광 표지 중 임의의 발광 표지로부터 대략 1 내지 10 nm (예를 들어, 대략 2 내지 10 nm, 대략 4 내지 10 nm, 대략 6 내지 10 nm, 또는 대략 8 내지 10 nm)만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드는 2개 이상의 발광 표지 중 임의의 발광 표지로부터 대략 2 내지 20 nm (예를 들어, 대략 6 내지 20 nm, 대략 10 내지 20 nm, 대략 12 내지 20 nm, 또는 대략 16 내지 20 nm)만큼 분리된다.

[0028] 일부 측면에서, 개시내용은 주형 핵산의 서열을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 주형 핵산, 프라이머, 및 중합 효소를 포함하는 표적 부피 내의 복합체를 본 출원에 제공된 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드에 노출시키는 것을 포함하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드 중 1개 이상은 링커를 통해 2개 이상의 발광 표지에 연결된 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 10개의 단량체 단위를 포함하는 올리고머이다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 부착 부위로부터 적어도 5개의 단량체 단위만큼 분리된 부착 부위에서 링커에 부착된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 부착 부위는 임의의 다른 부착 부위로부터 약 5 내지 30개의 단량체 단위, 약 5 내지 20개의 단량체 단위, 약 5 내지 10개의 단량체 단위, 약 10 내지 40개의 단량체 단위, 약 20 내지 40개의 단량체 단위, 또는 약 30 내지 40개의 단량체 단위만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 임의의 다른 발광 표지로부터 대략 5 내지 10 옹스트롬, 대략 6 내지 10 옹스트롬, 대략 10 내지 15 옹스트롬, 대략 15 내지 20 옹스트롬, 대략 20 내지 25 옹스트롬, 또는 대략 25 내지 50 옹스트롬만큼 분리된다. 따라서, 일부 측면에서, 개시내용은 본원에 기재된 발광 표지된 뉴클레오티드 중 임의의 것을 사용한 핵산 서열분석 방법을 제공한다.

[0029] 일부 실시양태에서, 방법은 1개 이상의 여기 에너지의 일련의 펄스를 표적 부피 부근으로 향하게 하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 프라이머를 포함하는 핵산에의 순차적 혼입 동안 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 복수의 방출된 광자를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 방출된 광자의 타이밍 및 임의로 발광 강도 및/또는 밝기를 결정함으로써 혼입된 뉴클레오티드의 서열을 식별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, 반응 혼합물 중 4종의 상이한 유형의 뉴클레오티드 (예를 들어, 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민/우라실)는 각각 1개 이상의 발광 분자 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은, 2개 이상의 발광 표지를 갖는 것)로 표지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 유형의 뉴클레오티드는 1개 초과의 동일한 발광 분자에 연결될 수 있다 (예를 들어, 2개 이상의 동일한 형광 염료가 뉴클레오티드에 연결됨). 일부 실시양태에서, 각각의 발광 분자는 1개 초과의 뉴클레오티드 (예를 들어, 2개 이상의 동일한 뉴클레오티드)에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 초과의 뉴클레오티드는 1개 초과의 발광 분자에 (예를 들어, 본원에 기재된 링커를 통해) 연결될 수 있다.

[0031] 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 방향족 또는 헤테로방향족 화합물을 포함하는 염료로부터 선택될 수 있고, 피렌, 안트라센, 나프탈렌, 아크리딘, 스틸벤, 인돌, 벤즈인돌, 옥사졸, 카르바졸, 티아졸, 벤조티아졸, 페난트리딘, 페녹사진, 포르피린, 퀴놀린, 에티듐, 벤즈아미드, 시아닌, 카르보시아닌, 살리실레이트, 안트라닐레이트, 쿠마린, 플루오로세인, 로다민, 또는 다른 유사 화합물일 수 있다. 염료의 예는 크산텐 염료, 예컨대 플루오레세인 또는 로다민 염료, 나프탈렌 염료, 쿠마린 염료, 아크리딘 염료, 시아닌 염

료, 벤족사졸 염료, 스틸벤 염료, 피렌 염료, 프탈로시아닌 염료, 피코빌리단백질 염료, 스쿠아레인 염료, 바디피(BODIPY) 염료 등을 포함한다.

[0032] 일부 측면에서, 본 출원은 주형 핵산을 서열분석하기 위한 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 유형의 표지된 뉴클레오티드는 링커를 통해 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된 2개 이상의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 중합 효소를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 서열분석되는 주형 핵산에 상보적인 프라이머를 추가로 포함한다.

[0033] 일부 측면에서, 본 출원은 핵산 서열분석 반응 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 반응 혼합물 중에 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4개, 또는 그 초과)의 상이한 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 본 출원에 따른 표지된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 중합 효소를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 주형 핵산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 주형 핵산에 상보적인 프라이머를 추가로 포함한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0034] 통상의 기술자는 본원에 기재된 도면이 예시 목적만을 위한 것임을 이해할 것이다. 일부 경우에 본 발명의 다양한 측면이 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해 과장되어 또는 확대되어 제시될 수 있다는 것이 이해된다. 도면에서, 유사 참조 문자가 다양한 도면 전체에서 유사 특색, 기능적으로 유사한 및/또는 구조적으로 유사한 요소를 일반적으로 지칭한다. 도면은 반드시 척도화된 것은 아니고, 대신 본 교시의 원리를 예시하는데 강조를 두었다. 도면은 어떠한 방식으로도 본 발명의 교시의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

본 발명의 특색 및 이점은 도면과 함께 이해할 때, 하기에 제시된 상세한 설명으로부터 더욱 명백해 질 것이다.

도면을 참조하여 실시양태를 기재할 때, 방향 언급 ("위", "아래", "상부", "하부", "좌측", "우측", "수평", "수직" 등)이 사용될 수 있다. 이러한 언급은 단지 통상의 배향으로 도면을 보는 독자를 돕기 위한 것이다. 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 본 출원 전반에 걸쳐 예시의 목적으로 추가로 기재된 예는 비제한적 실시양태를 기재하고, 일부 경우에 보다 분명한 예시의 목적으로 특정 공정을 단순화하거나 특색 또는 단계를 생략할 수 있다.

도 1a는 밝게 표지된 반응물 상에서의 발광 표지 분리를 일반적으로 도시한 다이어그램이다.

도 1b는 상이한 발광 표지 부착 구성을 갖는 일반적 링커 구조를 도시한다.

도 2a는 2개의 발광 표지에 부착된 핵산 링커를 일반적으로 도시한 다이어그램이다.

도 2b는 상이한 가닥 구성을 갖는 일반적 핵산 (상부) 및 발광 표지 공간상 점유를 일반적으로 도시한 다이어그램 (하부)을 도시한다.

도 2c는 상이한 상대적인 표지 부착 부위 (상부) 및 상이한 반응물 연결성 (하부)을 갖는 일반적 핵산을 도시한다.

도 3a는 동일한 (좌측) 또는 대향하는 (우측) 올리고뉴클레오티드 가닥 연결성을 통해 표지를 반응물에 연결한 일반적 핵산을 도시한다.

도 3b는 일반적 핵산을, 밝게 표지된 반응물의 설계에 사용될 수 있는 대략적인 크기 구속의 예와 함께 도시한다.

도 3c는 동일한-가닥 연결성을 통해 2개의 발광 표지를 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결한 핵산의 예시적인 구조이다.

도 3d는 막대-형상의 핵산 링커 (예를 들어, 도 3c에 제시된 바와 같음)가 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 혼입을 검출하는데 사용될 수 있음을 확인시켜 주는 서열분석 반응의 예를 도시한다.

도 3e는 대향하는-가닥 연결성을 통해 2개의 발광 표지를 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결한 핵산의 예시적인 구조이다.

도 3f는 올리고뉴클레오티드 가닥 내로 통합된 발광 표지를 갖는 핵산 링커의 예시적인 구조이다.

도 3g는 제시된 4개의 상이한 핵산 링커 구축물을 사용하여 수행된 서열분석 반응의 예를 도시한다.

도 4a는 단일 스템-루프 2차 구조를 갖는 일반적 핵산 링커를 도시한다.

도 4b는 다수의 스템-루프 2차 구조를 갖는 일반적 핵산 링커를 도시한다.

도 4c는 개별 스템-루프 2차 구조의 루프에 부착된 발광 표지를 갖는 핵산 링커의 예시적인 구조이다.

도 4d는 스템-루프 핵산 링커를 갖는 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트 (예를 들어, 도 4c에 제시된 바와 같음)가 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 혼입을 검출하는데 사용될 수 있음을 확인시켜 주는 서열분석 반응의 예를 도시한다.

도 5a는 발광 표지에 부착된 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥을 갖는 나무-형상의 핵산 링커를 일반적으로 도시한다.

도 5b는 개별 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥의 말단 단부에 부착된 발광 표지를 갖는 나무-형상의 핵산 링커의 예이다.

도 6a는 별-형상의 핵산 링커를 일반적으로 도시하고, 별-형상의 핵산 링커의 설계에 사용될 수 있는 대략적인 크기 구속의 예를 제공한다.

도 6b는 별-형상의 핵산 링커의 예시적인 구조이다.

도 6c는 사면체 코어를 갖는 핵산 링커의 예시적인 구조이다.

도 6d는 사면체 코어를 갖는 핵산 링커를 합성하는데 사용될 수 있는 반응식의 예를 도시한다.

도 6e는 3-원 접합부에 부착된 발광 표지를 갖는 사면체-기반 핵산 링커 구조를 일반적으로 도시한다.

도 7은 3-원 접합부에 부착된 발광 표지를 갖는 시클로덱스트린-기반 핵산 링커를 생성하는 과정을 일반적으로 도시한다.

도 8은 형광 수명 측정치에 대한 스페이서 길이의 효과를 평가하기 위해 일련의 실험에 사용된 핵산 링커 구조의 예를 도시한다.

도 9는 형광 수명 측정치에 대한 링커 구속의 효과를 평가하기 위해 일련의 실험에 사용된 핵산 링커 구조의 예를 도시한다.

도 10은 구속성 링커에서 형광 수명에 대한 스페이서 길이의 효과를 평가하기 위해 일련의 실험에 사용된 핵산 링커 구조의 예를 도시한다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0035] 다른 측면 중에서, 개시내용은 2개 이상의 표지를 포함하는 발광 표지된 반응물을 제공하며, 여기서 표지는 높은 강도 및/또는 지속적인 방출 특징 (예를 들어, 지속적인 방출 수명)을 제공하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 표지는 방출의 강도 또는 다른 방출 특징을 감소시킬 수 있는 표지-표지 상호작용을 피하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 표지는 a) 링커와의 상호작용을 피하고/거나 b) 각각이 링커와 유사한 상호작용을 갖도록 구성된다.

[0036] 일부 측면에서, 개시내용은 높은 방출 강도를 갖는 발광 표지된 반응물과 관련된 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 개시내용은 높은 방출 밝기를 갖는 발광 표지된 반응물과 관련된 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 개시내용은 지속적인 방출 수명을 갖는 밝게 표지된 반응물에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, 일부 실시양태에서, "밝기" (및 그의 변형, 예를 들어 "밝은", "밝게" 등)는 표지된 반응물 분자당 평균 방출 강도를 보고하는 파라미터를 지칭한다. 따라서, 일부 실시양태에서, "방출 강도"는 밝게 표지된 반응물을 포함하는 조성물의 밝기를 일반적으로 지칭하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지된 반응물의 밝기는 그의 양자 수율 및 흡광 계수의 곱과 동등하다. 일부 실시양태에서, 개시내용의 표지된 반응물은 증가된 밝기를 촉진하기 위해 양자 수율을 최대화하고/거나 흡광 계수 값을 최소화하도록 조작된다.

[0037] 일부 실시양태에서, 개시내용의 밝게 표지된 반응물은 증가된 방출 밝기 및 지속적인 방출 수명을 갖도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 반응물의 2개의 표지는 서로 및/또는 주변 환경과 상호작용하여 하나 이상의 방출

특징이 2개의 표지 사이에서 비지속적이게 될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비지속적인 방출 특징은 단일 분자 검출 방법이 특정 유형의 분자를 식별하기 위해 이들 특징에 의존하는 경우에 문제가 될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 비지속적인 방출 수명은 지속적인 방출 수명을 갖는 것으로 관찰될 단일 정보 군과 반대되는 2개의 별개의 정보 클러스터를 보고하는 수명 판독을 초래할 수 있다.

[0038] 일부 실시양태에서, 지속적인 방출 수명은 1개 더 적은 표지를 갖는 표지된 반응물에 비해 방출 수명이 보존되는 것, 예를 들어 대략 변하지 않은 방출 수명을 갖는 것을 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다중-표지된 반응물 내의 표지의 방출 수명은 단일-표지된 반응물 내의 동일한 표지에 비해 변하지 않는다. 본원에 기재된 바와 같이, 밝기를 증가시키기 위해 단일 구축물 상에 발광 표지의 수를 증가시키는 것은, 일부 실시양태에서, 감소된 방출 수명을 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 개시내용은 방출 수명에 영향을 미치지 않으면서 밝기를 증가시키는 특정 최소 거리만큼 인접한 표지를 분리하기 위해 특정 구조적 구속을 사용하여 조작된 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 다중-표지된 구축물의 방출 수명은 적어도 1개 더 적은 발광 표지 (예를 들어, 적어도 1개 더 적은 동일한 유형의 형광단 염료)를 갖는 구축물의 방출 수명과 비교된다. 일부 실시양태에서, 방출 수명은 대략 30% 이하만큼 변경된다 (예를 들어, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 1% 미만, 또는 대략 0%만큼 증가 또는 감소됨).

[0039] 일부 측면에서, 개시내용은 서열분석 반응에서 검출가능한 조성물을 개발하여 특정 기기 성분에 대한 필요를 없앰으로써, 기술을 보다 소형의 시스템으로 진보시킬 수 있다는 인식 및 인지에 관한 것이다. 예를 들어, 서열분석 기기는 일반적으로, 센서에서 바람직하지 않은 검출 이벤트를 유발하는 여기 광을 여과하기 위해 광학 필터를 필요로 한다. 목적하는 발광은 투과시키고 여기 광을 충분히 차단하기 위해 사용되는 광학 필터는 두껍고, 부피가 크고, 고가이며, 광의 입사각의 변경을 수용하지 못하여 소형화를 막을 수 있다. 그러나, 본 발명자들은 보존된 수명을 갖는 밝게 표지된 반응물을 사용하는 것이 이러한 여과에 대한 필요를 감소시킬 수 있거나, 일부 경우에, 이러한 필터에 대한 필요를 완전히 제거할 수 있다는 것을 인식하고 인지하였다. 본원에 기재된 밝은 반응물은 보다 낮은 광학 출력 (예를 들어, 여기 에너지)을 사용하는 것을 가능하게 하며, 이는 산란을 감소시키고 그 결과 필터링 요건을 감소시킨다.

[0040] 본 출원의 측면은, 링커(100)를 통해 반응물(180)에 연결된 2개의 발광 표지를 도시한 도 1a에 제시된 비제한적 다이어그램에 따라 구성된, 밝게 표지된 반응물을 제공한다. 제시된 바와 같이, 각각의 발광 표지는 스페이서를 통해 링커(100)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 표지와 링커 사이에 공유 가교를 형성한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 스페이서는 발광 분자의 일부도 아니고 링커 조성물의 스페이서 부분도 아니다 (예를 들어, 스페이서는 중합체 또는 올리고머 링커의 단량체 단위를 함유하지 않음). 스페이서의 제1 단부는 링커 부착 부위(102)에 부착되고, 스페이서의 제2 단부는 표지 부착 부위(122)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커 부착 부위(102)는 스페이서의 원자를 링커(100)의 원자에 연결하는 공유 결합의 위치에 의해 근사화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 부착 부위(102)는 링커(100)의 인접 쇄 내에 있는 원자에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 표지 부착 부위(122)는 스페이서의 원자를 표지의 원자에 연결하는 공유 결합의 위치에 의해 근사화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지 부착 부위(122)는 스페이서의 원자에 공유 결합된 표지의 원자에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 표지 부착 부위(122)는 표지의 원자에 공유 결합된 스페이서의 원자에서 발생한다.

[0041] 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 본 출원의 링커 구축물은 2개 이상의 발광 표지를 포함하고, 여기서 인접한 발광 표지는 최소 거리 $d_A$만큼 분리된 부착 부위를 갖는 것으로 기재된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 다음의 것과 최소 거리 $d_L$만큼 분리된다. 도 1a에 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, $d_L$은 표지 부착 부위 사이의 거리이다. 일부 실시양태에서, 표지-표지 분리는 각각의 표지 분자의 크기에 의해 추가로 좌우될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 발광 표지는 입체 반경, $r_1$에 대한 측정치를 수득하기 위해 타원형 또는 타원체의 근사화된 또는 계산된 입체 부피(112)에 의해 기재될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 입체 반경, $r_1$에 대한 측정치를 수득하기 위해 타원형 또는 원형의 근사화된 또는 계산된 입체 원주에 의해 기재될 수 있다. 일부 실시양태에서, 입체 반경 (예를 들어, $r_1$, $r_2$)은 발광 표지의 최장 치수의 절반으로 계산되거나 근사화될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 발광 표지의 화학 구조는 소프트웨어 또는 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법을 사용하여 2차원 또는 3차원 구조로서 평가되고 (예를 들어, 열역학적으로 유리한 분자 입체형태에 기초함), 입체 반경 (예를 들어, $r_1$, $r_2$)은 2차원 또는 3차원 공간에서 구조의 최장 치수의 절반을 계산함으로써 결정된다. 일부 실시양태에서, 표지는 최소 거리 $d_L$만큼 분리되며, 단

응집물 표지 반경 ($r_1 + r_2$)은 표지가 중첩되지 않도록 한다.

[0042] 일부 실시양태에서, 도 1b에 예시된 바와 같이, 링커 구성 및/또는 스페이서 강성은 부착 부위 사이의 거리 $d_A$가 (예를 들어, 구축물(150)에서와 같이) $d_L$과 거의 동일할 수 있도록 한다. 일부 실시양태에서, 링커 구성 및/또는 스페이서 강성은 부착 부위 사이의 거리 $d_A$가 (예를 들어, 구축물(152)에서와 같이) 최소 거리 $d_L$ 미만일 수 있도록 한다. 일부 실시양태에서, 링커 구성 및/또는 스페이서 강성은 부착 부위 사이의 거리 $d_A$가 (예를 들어, 구축물(154)에서와 같이) 최소 거리 $d_L$ 초과일 수 있도록 한다.

[0043] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 개념은 링커(100)로서 임의의 적합한 분자 스캐폴드를 사용하여 구현될 수 있음이 인지될 것이다. 일부 실시양태에서, 링커는 유기 화합물이다. 링커(100)로서 사용하기에 적합한 유기 화합물의 예는, 비제한적으로, 폴리페닐, 폴리알킨, 알파 나선 모방체, 및 펩티드모방체를 포함한다.

[0044] 일부 실시양태에서, 링커(100)는 올리고머, 예를 들어 단량체 단위로 구성된 올리고머 링커이다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 1개 이상의 유형의 단량체 단위를 포함한다. 단량체 단위의 유형은, 예로서 및 비제한적으로, 뉴클레오티드 (예를 들어, 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 및 그의 유사체 및 유도체), 아미노산 (예를 들어, 천연 및 비천연 아미노산), 모노사카라이드, 및 유기 화합물, 예컨대 페닐- 및 알키닐-함유 화합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 1개 이상의 동일한 유형의 단량체 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개의 유형의 단량체 단위로 구성된 올리고머는 중합체 (예를 들어, 중합체 링커)로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 2개 이상의 상이한 유형의 단량체 단위 (예를 들어, 단량체 단위의 혼합물)를 포함한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 올리고머 (예를 들어, 올리고머 링커 또는 중합체 링커)는 적어도 5개의 단량체 단위를 함유한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 적어도 10개의 단량체 단위를 함유한다. 일부 실시양태에서, 올리고머는 적어도 10개 및 200개 미만의 단량체 단위 (예를 들어, 적어도 10개 및 150개 미만의 단량체 단위, 적어도 10개 및 100개 미만의 단량체 단위, 적어도 10개 및 50개 미만의 단량체 단위, 적어도 10개 및 40개 미만의 단량체 단위, 적어도 10개 및 30개 미만의 단량체 단위, 또는 적어도 10개 및 20개 미만의 단량체 단위)를 함유한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 링커 (예를 들어, 중합체 링커, 올리고머 링커)는 폴리사카라이드이다. 링커(100)로서 사용하기에 적합한 폴리사카라이드의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries, Wiley 2001]에 기재된 바와 같음).

[0047] 일부 실시양태에서, 링커 (예를 들어, 중합체 링커, 올리고머 링커)는 펩티드이다. 링커(100)로서 사용하기에 적합한 펩티드의 비제한적 예는, 비제한적으로, 올리고펩티드, 시클릭 펩티드, 및 소형 단백질 (예를 들어, 예컨대 문헌 [Hodges, A.M. and Schepartz, A. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129:11024-11025]에 기재된 바와 같은 조류 췌장 펩티드-기반 소형 단백질)을 포함한다. 펩티드 구조 내로 기하학적 구속을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 이는 예를 들어 강성을 부여하고 표지 분리를 촉진하는데 특히 유용한 것으로 고려된다. 예를 들어, 펩티드 형상을 제어하기 위해 펩티드 아미노산 서열의 프롤린 함량을 변형시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kritzer, J.A., et al. (2006) ChemBioChem 7:29-31] 참조). 유용한 펩티드 조작 기술의 추가의 비제한적 예는 펩티드 고리화 (예를 들어, 문헌 [Maltsev, O.V., et al. (2016) Angewandte Chemie 55(4):1535-1539] 참조), 스테이플링 및/또는 H-결합 대용물을 통한 α-나선 펩티드 구속 (예를 들어, 문헌 [Douse, C.H., et al. (2014) ACS Chem. Biol. 9:2204-2209] 참조), 시클릭 β-시트 및 β-헤어핀 모방체를 통한 펩티드 구속 (예를 들어, 문헌 [Gibbs, A.C., et al. (1998) Nat. Struc. Biol. 5:284-288] 참조)을 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, 링커 (예를 들어, 중합체 링커, 올리고머 링커)는 핵산이다. 일부 측면에서, 밝게 표지된 반응물은, 코어 핵산 구축물에 부착된 2개의 발광 표지를 일반적으로 도시한 도 2a에 제시된 다이어그램에 따라 설계될 수 있다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 적어도 1개의 발광 표지(210)는 스페이서(220)를 통해 핵산 링커(200)에 부착 부위(202)에서 부착된다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커(200)는 적어도 2개의 혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커(200)는 적어도 2개의 발광 표지를 포함하고, 여기서 각각의 발광 표지는 다음의 것과 최소 거리 $d_L$만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 중 적어도 2개는 동일한 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착되며, 여기서 각각의 부착 부위는 다음의 것과 최소 거리 $d_A$만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착되며, 여기

서 각각의 스페이서는 주어진 발광 표지를 그의 부착 부위로부터 최소 거리 $d_{AL}$만큼 분리한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_L$, $d_A$, 및 $d_{AL}$은, 예를 들어 관련 기술분야에 공지된 이론적 방법을 사용하여 (예를 들어, 컴퓨터로 또는 다른 방식으로) 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이론적 방법은 분자 구조, 예컨대 결합 길이, 결합각 및 회전, 정전기, 핵산 나선성, 및 용액 중의 분자를 나타낼 수 있는 다른 물리적 인자를 설명하는 임의의 접근법을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 거리 측정치는 실험적으로, 예를 들어 결정학적 또는 분광학적 수단에 의해 수득할 수 있다.

[0050] 개시내용의 측면은, 적어도 부분적으로, 핵산 링커를 갖는 밝게 표지된 반응물 (예를 들어, 표지된 뉴클레오티드)이 방정식 1에 따라 설계될 수 있다는 발견에 관한 것이다:

[0051] 방정식 1: $2(d_{AL}) - d_A < 12$ Å,

[0052] 여기서, $2(d_{AL}) - d_A$는 음수일 수 있다. 일부 실시양태에서, $d_A$는 17 옹스트롬 (Å) 초과이다. 일부 실시양태에서, $d_A$는 적어도 17 Å이지만, 350 Å은 초과하지 않는다 (예를 들어, $d_A$는 약 17 내지 350 Å, 약 17 내지 300 Å, 약 17 내지 250 Å, 약 17 내지 200 Å, 약 17 내지 150 Å, 약 17 내지 100 Å, 또는 약 17 내지 50 Å임).

[0053] 또 다른 측면에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드는 방정식 2에 따라 설계될 수 있다:

[0054] 방정식 2: $2(d_{AL})/d_A < 1$.

[0055] 일부 실시양태에서, $2(d_{AL})/d_A$는 1 미만, 바람직하게는 0.5 미만이다. 일부 실시양태에서, $2(d_{AL})/d_A$는 0.1 미만이다.

[0056] 일부 실시양태에서, 개시내용의 표지된 뉴클레오티드는 방정식 3에 따라 설계될 수 있다:

[0057] 방정식 3: $[2(d_{AL}) + LLD]/d_A < 1$,

[0058] 여기서 LLD는 최장 표지 치수 (LLD)를 나타내는 거리이다. 일부 실시양태에서, $[2(d_{AL}) + LLD]/d_A$는 0.5 미만이다. 일부 실시양태에서, $[2(d_{AL}) + LLD]/d_A$는 0.2 미만이다. 일부 실시양태에서, $[2(d_{AL}) + LLD]/d_A$는 0.1 미만이다.

[0059] 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_{AL}$은 발광 표지(210)의 대략 중심 원자로부터 스페이서(220)가 부착된 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 원자까지 측정된다. 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_{AL}$은 발광 표지(210)의 중심으로부터 (예를 들어, 발광 분자의 질량 중심에 기초하여, 또는 관련 기술분야에 공지되거나 본원의 다른 곳에 기재된 일부 다른 방법에 기초하여 근사화됨) 스페이서(220)가 부착된 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 원자까지 측정된다. 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_{AL}$은 스페이서(220)의 길이로서 측정된다 (예를 들어, 발광 표지(210)에 부착된 스페이서(220)의 원자로부터 핵산(200)에 부착된 스페이서(220)의 원자까지 측정됨). 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_A$는 스페이서가 공유 결합된 올리고뉴클레오티드 백본 상의 원자 사이 (예를 들어, 무염기성 부착 부위의 탄소 원자 사이)의 거리로서 측정된다. 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_A$는 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 표지된 염기 사이 (예를 들어, 염기성 부착 부위의 핵염기 상의 원자 사이)의 거리로서 측정된다.

[0060] 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_L$은 인접한 발광 표지의 대략 중심 원자 사이의 거리로서 측정된다. 일부 실시양태에서, 인접한 발광 표지는 대략 6 옹스트롬의 거리 $d_L$만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 거리 $d_L$은 적어도 6 옹스트롬 (예를 들어, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 11, 또는 적어도 12 옹스트롬)이다. 일부 실시양태에서, 최소 거리 $d_L$은 근사값으로서 측정되며, 이는 스페이서 구성, 스페이서 가요성, 또는 핵산 가요성에서의 인자일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.

[0061] 다른 측면 중에서, 개시내용은 다중-표지된 반응물이 방출 수명을 손상시키지 않으면서 최대화된 밝기를 갖게 조작될 수 있도록 발광 표지 사이의 거리 $d_L$을 개발하기 위한 일반적 전략을 제공한다. 일부 실시양태에서, 충분한 근접성의 인접한 발광 표지는 켄칭 효과가 발생하도록 상호작용하여, 방출 수명에 대해 감소된 및/또는 비지속적인 값을 야기할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 일반적 설계 전략은, 일부 실시양태에서, 인접한 발광

표지 사이의 상호작용의 정도를 제한하는 구조적 구속을 수반할 수 있다.

[0062] 일부 실시양태에서, 발광 표지는 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 통해 핵산 링커의 구아닌 핵염기와 상호작용하여, 감소된 및/또는 비지속적인 방출 수명을 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 부착 부위는 부착 부위의 주위 영역 내의 G/C 함량을 최소화함으로써 개발된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 부착 부위는 올리고뉴클레오티드 가닥의 A/T-풍부 영역에 위치한다. 일부 실시양태에서, 각각의 부착 부위는 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 G 또는 C 뉴클레오티드로부터 적어도 2개의 뉴클레오티드만큼 분리된다 (예를 들어, G 또는 C 뉴클레오티드로부터 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개, 또는 10개 초과의 뉴클레오티드만큼 분리됨). 따라서, 일부 실시양태에서, 각각의 부착 부위는 A 또는 T로부터 선택된 적어도 2개의 연속 뉴클레오티드와 플랭킹된다.

[0063] 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥의 부착 부위 사이의 거리는 개재된 비표지된 염기 (예를 들어, 개재된 뉴클레오티드)의 수에 의해 기재될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 부착 부위는 적어도 5개의 비표지된 염기 (예를 들어, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 또는 적어도 10개의 비표지된 염기)만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 6, 7, 8, 또는 9개의 비표지된 염기만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 올리고뉴클레오티드 가닥 상에서 5 내지 100개의 비표지된 염기 (예를 들어, 5 내지 80, 5 내지 60, 5 내지 40, 5 내지 20, 또는 5 내지 10개의 비표지된 염기)만큼 분리된다.

[0064] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 설계 원리는 밝기 및/또는 발광 강도를 증가시키기 위해 표지된 반응 성분에 연속적인 발광 표지를 첨가하는 것을 허용한다. 일부 실시양태에서, 본 출원의 기술은 식 $L_n(x)$에 따른 밝기 및/또는 발광 강도를 갖는 다중-표지된 반응 성분을 제공하며, 여기서 $L_n$은 표지된 반응물 상의 발광 표지의 총 수와 동등하고, x는 상응하는 단일-표지된 반응물의 측정된 밝기 또는 형광 강도와 동등하다. 따라서, 일부 실시양태에서, 2-염료 표지된 반응 성분은 1-염료 표지된 유사체와 비교하여 2배의 밝기 및/또는 발광 강도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 3- 또는 4-염료 표지된 반응 성분은 1-염료 표지된 유사체와 비교하여, 각각 3배 또는 4배의 밝기 및/또는 발광 강도를 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 밝게 표지된 반응물은 $L_n(x)$에 의해 예측된 값의 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 밝기 및/또는 발광 강도를 나타낸다.

[0065] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산 링커는 적어도 2개의 발광 표지를 갖는 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 도 2b는 2개의 발광 표지에 부착된 단일-가닥 핵산 링커(250)를 일반적으로 도시한다. 제시된 바와 같이, 단일-가닥 링커는 표지 사이의 상호작용을 촉진할 수 있는 비교적 높은 정도의 가요성을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 지속적이고/거나 보존된 수명을 갖는 밝게 표지된 반응물은, 예를 들어 상호작용하여 켄칭 효과를 생성하지 않는 특정 표지, 예컨대 시아닌-기반 염료를 사용함으로써, 단일-가닥 링커 구축물을 사용하여 생성할 수 있다. 그러나, 여러 부류의 염료의 경우, 링커 가요성으로 인한 표지-표지 근접성의 촉진은 감소된 및/또는 비지속적인 방출 수명을 일으킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 표지된 올리고뉴클레오티드 가닥은 전반적인 핵산 링커 가요성을 감소시키기 위해 1개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다.

[0066] 일부 실시양태에서, 가닥 혼성화는 핵산 링커 상의 발광 표지 사이의 적절한 거리 $d_L$을 발생시키기 위한 일반적 설계 전략으로서 사용되었다. 일부 실시양태에서, 가닥 혼성화는 핵산의 특정 영역에서 (예를 들어, 표지된 영역 내에서 및/또는 표지된 영역을 반응물로부터 분리시키는 영역에서) 강성을 증가시키는데 사용되었다. 도 2b는 표지된 영역을 강성화하여 표지-표지 상호작용을 달리 촉진할 수 있는 가닥 가요성을 감소시키기 위해 혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하는 이중-가닥 핵산 링커(252)를 일반적으로 도시한다.

[0067] 핵산 링커(252)에 의해 예시되는 바와 같이, 일부 실시양태에서, 부착 지점에 대한 발광 표지 이동은 표지-표지 근접성을 촉진할 수 있다. 또한, 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 부착 부위에 대한 표지 이동은 표지가 핵산 링커의 올리고뉴클레오티드 가닥과 보다 근접해 질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥은 발광 표지와 상호작용하여 비지속적이고/거나 감소된 방출 수명 측정치를 생성할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 링커는 표지-표지 및/또는 링커-표지 상호작용의 정도를 제한하는 특정 길이, 강성, 부착 부위, 및/또는 구성을 갖는 스페이서를 포함한다.

[0068] 일부 실시양태에서, 발광 표지 사이의 분리 거리는 표지가 서로에 대해 존재하는 공간의 부피의 맥락에서 정의될 수 있다. 예를 들어, 도 2b는 거리 $d_L$을 측정하는 방법의 예를 예시하는 다이어그램(254)을 도시한다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 입체 부피(212)에 의해 정의될 수 있다. 일부 실시양태에서, 입체 부피(212)는 반경 212-r의 구로서 또는 달리 타원형 형상으로서 근사화된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지

는 임의의 다른 표지의 중심점으로부터 적어도 5 옹스트롬만큼 분리된 중심점을 갖는 입체 부피(212)를 포함한다 (예를 들어, 인접한 표지의 중심점은 적어도 5 옹스트롬만큼 분리됨). 발광 표지의 중심점은, 예를 들어 질량의 중심 또는 표지의 기하학적 중심을 포함한, 표지의 임의의 적합한 중심일 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지의 중심점은 도 2b에 예시된 바와 같이 반경 212-r을 계산하거나 근사화함으로써 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지의 중심점은 발광 표지의 최장 치수의 절반으로서 계산되거나 근사화될 수 있다 (예를 들어, 도 1a의 $r_1$ 및 $r_2$에 대해 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같음).

[0069] 일부 실시양태에서, 인접한 발광 표지 사이의 거리 ($d_L$)는 인접한 발광 표지의 질량 중심 사이의 거리로서 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 질량 중심은 그의 질량에 따라 칭량된 발광 표지 내의 모든 원자의 평균 위치를 지칭한다. 질량 중심을 계산하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Leach, A.R. Molecular Modelling: Principles and Applications ($2^{nd}$ edition), Prentice-Hall 2001; Guenza, M. (2002) Macromolecules 35(7):2714-2722] 참조).

[0070] 일부 실시양태에서, 인접한 발광 표지 사이의 거리 ($d_L$)는 인접한 발광 표지의 기하학적 중심 사이의 거리로서 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 기하학적 중심은 분자의 칭량되지 않은 모든 원자 (예를 들어, 발광 표지 내의 모든 원자)의 평균 위치를 지칭한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 분자의 기하학적 중심은 분자 내의 모든 원자의 좌표의 평균인 공간 내 지점을 지칭한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 입체 부피(212)는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 보다 정확하게 계산된다. 예를 들어, 분극률을 포함한 특성에서 몰 굴절지수 인자는 하기 식에 따라 계산될 수 있다:

[0072] 몰 굴절지수 = $[(n^2 - 1)/(n^2 + 2)]$ x (MW/d),

[0073] 여기서, n = 굴절률; MW = 분자량; 및 d = 밀도.

[0074] 일부 실시양태에서, 표지의 입체 부피(212)는 추가의 및/또는 보다 복잡한 인자를 포함하도록 컴퓨터로 계산될 수 있다. 예를 들어, 베르루프(Verloop) 입체 인자는 결합 각도, 반 데르 발스 반경, 결합 길이, 및 가능한 입체형태에 기초하여 분자의 공간상 차원을 제공한다 (예를 들어, 문헌 [Harper, K.C., et al. (2012) Nature Chemistry 4, 366-374] 참조).

[0075] 일부 실시양태에서, 부착 부위에 대한 발광 표지 이동은 분리 거리 $d_L$에 인자화될 수 있다. 도 2b에 제시된 바와 같이, 각각의 부착 부위에 대한 표지 이동의 범위는, 일부 실시양태에서, 스페이서 길이 및 표지의 입체 부피에 기초하여 정의될 수 있다. 이러한 이론적 이동 범위는 파선으로 예시된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 다양한 조성물 및 설계 전략은 이동 범위가 제시된 중첩 영역에 접근하는 정도를 유리하게 제한할 수 있음이 인지될 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 스페이서 강성, 스페이서 길이, 및 부착 부위 분리는 각각 본 개시내용에 따라 표지가 중첩 영역에 접근할 가능성의 정도를 제한하도록 다룰 수 있다. 또한, 다이어그램(254)은, 예를 들어 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴가 발생하기 위해 표지가 반드시 물리적으로 접촉할 필요는 없기 때문에, 예시적 목적으로 의도된다는 것이 인지될 것이다.

[0076] 일부 실시양태에서, 다이어그램(254)에 도시된 표지의 운동 범위는 일반적으로 공간상 부피, 예를 들어 주어진 시점에 공간의 지점에 표지가 존재할 수 있는 가변적 확률 영역을 갖는 공간의 구역으로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 표지는 임의의 다른 발광 표지의 공간상 부피와 실질적으로 중첩되지 않는 공간상 부피를 점유한다. 일부 실시양태에서, 각각의 표지는 임의의 다른 표지가 실질적으로 없는 공간상 부피를 점유한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 발광 표지에 대한 상대적 부착 부위는 이중-가닥 링커의 나선 구조를 고려하여 설계될 수 있다. 도 2c는 거리, x만큼 분리된 2개의 표지를 갖는 핵산(260)의 예를 도시한다. 핵산(262) (대략 척도화되어 도시됨)은 핵산(260)만큼 많은 염기의 대략 절반만큼 분리된 부착 부위에서 2개의 발광 표지에 부착되지만, 나선을 따라서 상대적인 부착 부위 위치는 대략 2x의 공간을 통한 표지 분리 거리를 발생시킨다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 표지 사이의 입체 장벽으로 작용함으로써 표지 사이의 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴의 정도를 추가로 제한할 수 있다.

[0078] 일부 실시양태에서, 용어 "입체 장벽"은 링커에 부착된 발광 표지와 링커의 일부 다른 부착 사이에 위치한 링커 또는 링커의 부분 (예를 들어, 핵산 링커 또는 그의 부분)을 지칭한다. 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 입체 장벽은 발광 표지에 의해 방출된 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 흡수하거나, 편향시키거나, 또는 달리 차단할 수 있는 것으로 생각된다. 일부 실시양태에서, 입체 장벽은 1개 이상의 발광 표지가 1개 이상

의 다른 발광 표지와 상호작용하는 정도를 막거나 제한한다. 일부 실시양태에서, 입체 장벽은 1개 이상의 발광 표지가 1개 이상의 반응물과 상호작용하는 정도를 막거나 제한한다. 일부 실시양태에서, 입체 장벽은 1개 이상의 발광 표지가 반응물과 회합된 1개 이상의 분자 (예를 들어, 반응물에 결합된 폴리머라제)와 상호작용하는 정도를 막거나 제한한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 용어 입체 장벽은 일반적으로, 핵산 링커의 일부 부분에 의해 제공되는 보호 또는 차폐 효과를 지칭할 수 있다.

[0079] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 구조적 모티프가 입체 장벽으로서 기능할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 이중-가닥 핵산 링커에 의해 형성된 나선이 입체 장벽으로서 기능한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프 또는 그의 부분 (예를 들어, 스템, 루프)이 입체 장벽으로서 기능한다. 일부 실시양태에서, 3-원 접합부 (예를 들어, 2개 이상의 스템-루프를 갖는 핵산에서와 같음)가 입체 장벽으로서 기능한다. 일부 실시양태에서, 부착물 (예를 들어, 지지 가닥)을 갖지 않는 혼성화된 가닥이 입체 장벽으로서 기능한다. 일부 실시양태에서, 스페이서가 입체 장벽으로서 기능한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 밝게 표지된 반응물은 발광 표지와 반응물 사이의 분리를 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산(264)은 합성 반응에서 폴리머라제(290)에 대한 기질로서 작용하는 뉴클레오시드 폴리포스페이트(280) 반응물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제 활성 부위에 근접한 표지는 폴리머라제 활성에 유해할 수 있는 폴리머라제 광손상 (예를 들어, 비-방사성 붕괴 등을 통해)을 유도할 수 있다. 제시된 바와 같이, 핵산(266)은 링커의 적어도 일부가 표지와 반응물 사이의 개재 영역에 있도록 반응물에 부착된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 폴리머라제를 표지-유도된 광손상으로부터 추가로 보호하기 위한 입체 장벽으로서 기능할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제 보호의 이러한 효과는 표지-반응물 공간상 분리 및/또는 표지와 반응물 사이의 입체 장벽의 존재를 통해 일어날 수 있다. 폴리머라제 보호는 동시-계류중인 미국 특허 출원 번호 15/600,979에 추가로 상세하게 기재되어 있고, 그의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0081] 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 크기 및 구성 (예를 들어, 핵산 링커의 1개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥 및/또는 1개 이상의 스페이서)은 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이의 거리를 결정한다. 일부 실시양태에서, 거리는 약 1 nm 또는 2 nm 내지 약 20 nm이다. 예를 들어, 2 nm 초과, 5 nm 초과, 5-10 nm, 10 nm 초과, 10-15 nm, 15 nm 초과, 15-20 nm, 20 nm 초과. 그러나, 특정 검출 기술은 발광 표지가 여기될 규정된 조명 부피 내에 있을 것을 요구하기 때문에 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 폴리머라제의 활성 부위 내에 유지되어 있는 경우), 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이의 거리는 너무 길 수 없다. 따라서, 일부 실시양태에서, 전반적 거리는 30 nm 미만, 25 nm 미만, 약 20 nm, 또는 20 nm 미만이다.

[0082] 일부 실시양태에서, 표지-유도된 광손상 잠재력을 최소화하기 위해 표지-반응물 분리를 촉진하기 위해 본원에 기재된 조성물의 다른 특색, 예를 들어 스페이서 길이, 스페이서 강성, 부착 부위 위치가 구현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 링커에 대한 반응물 연결성은 표지-반응물 분리를 촉진하기 위해 발광 표지와 관련하여 변형될 수 있다. 도 3a는 동일한-가닥 또는 대향하는 가닥 표지-반응물 연결성을 갖는 핵산 링커를 일반적으로 도시한다. 일부 실시양태에서, 핵산(300)은 동일한 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 2개 이상의 발광 표지 및 반응물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동일한 가닥 연결성은 표지와 반응물 사이에 공유 연결을 발생시킨다.

[0083] 일부 실시양태에서, 핵산(302)은 상이한 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 2개 이상의 발광 표지 및 반응물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대향하는 가닥 연결성은 표지와 반응물 사이에 비-공유 연결을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 표지와 반응물의 대향하는 가닥 연결성은 표지-부착된 올리고뉴클레오티드 가닥 및 반응물-부착된 올리고뉴클레오티드 가닥의 혼성화를 통해 일어난다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 개시내용의 핵산 링커는 표지-반응물 분리 거리 $d_{LR}$을 포함한다. 일부 실시양태에서, $d_{LR}$은 반응물 및 가장 가까운 발광 표지 사이의 거리이다. 일부 실시양태에서, $d_{LR}$은 표지 부착 부위로부터 반응물 부착 부위까지 측정된다. 일부 실시양태에서, $d_{LR}$은 표지의 발광 분자로부터 반응물까지 측정된다. 일부 실시양태에서, $d_{LR}$은 적어도 1 nm이다. 일부 실시양태에서, $d_{LR}$은 약 1 nm 내지 약 10 nm (예를 들어, 대략 1 nm, 2 nm, 3 nm, 4 nm, 5 nm, 6 nm, 7 nm, 8 nm, 9 nm, 10 nm, 또는 10 nm 초과)이다. 일부 실시양태에서, $d_{LR}$은 약 2 nm 내지 약 30 nm (예를 들어, 약 2 내지 25 nm, 약 2 내지 20 nm, 약 2 내지 15 nm, 약 2 내지 10 nm, 약 2 내지 5 nm, 약 5 내지 10 nm, 약 10 내지 20 nm, 약 5 내지 30 nm, 약 15 내지 30 nm, 또는 약 20 내지 30 nm)이다.

[0084] 도 3b는 밝게 표지된 반응물의 설계에 사용된 비제한적 거리 세부사항의 예를 도시한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커(304)는 동일한 가닥 연결성을 통해 2개의 발광 표지 및 뉴클레오시드 헥사포스페이트 (예를 들어, 반

응물)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제시된 바와 같이, $d_L$은 대략 1 nm이고, $d_{LR}$은 대략 7 nm이다. 일부 실시양태에서, 개시내용의 밝게 표지된 반응물은 2개 초과의 발광 표지를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 링커(306)는 동일한 가닥 연결성을 통해 3개의 발광 표지 및 뉴클레오시드 헥사포스페이트 (예를 들어, 반응물)에 부착된다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 2개 초과의 부착 부위에 부착된 2개 초과의 발광 표지를 갖는 구축물은 반드시 1개 초과의 분리 거리 $d_L$을 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 단일 구축물 상에서 각각의 분리 거리 $d_L$은 독립적으로 본원의 기재에 따라 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 표지 분리 거리 $d_L$은 거의 동일하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 각 경우의 분리 거리 $d_L$은 대략 3.5 nm이고, $d_{LR}$은 대략 7 nm이다.

[0085] 일부 실시양태에서, 본 출원의 밝게 표지된 반응물은 상이한 올리고뉴클레오티드 가닥을 통해 부착된 2개 이상의 발광 표지를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 링커(308)는 별개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 통해 부착된 4개의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커(308)의 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥은 2개의 발광 표지 및 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 상보적인 제1 부분을 포함한다. 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥은 2개의 발광 표지에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥에 상보적인 제2 부분을 추가로 포함한다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 각각의 표지된 가닥 내의 발광 표지 부착 부위는 9개의 뉴클레오티드만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 비-인접 표지된 가닥 상의 가장 가까운 부착 부위 사이의 분리는 동일하거나 상이할 수 있다 (예를 들어, 10-뉴클레오티드 분리에 의해 제시된 바와 같음).

[0086] 동일한-가닥 표지-반응물 연결성을 갖는 비-제한적인 일반적 핵산 링커(304)가 도 3c에 제시된 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 생성하기 위한 기초로서 사용되었다. 제시된 바와 같이, 도 3c의 핵산 링커는 2개의 혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 개시내용의 특정 실시양태에 따라, 2개의 발광 표지를 링커의 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 내의 무염기성 부위에 부착시켰다. 일반적 부착 전략으로서 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 클릭 화학 기술을 사용하여 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 동일한 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착시켰다. 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 제1 가닥에 혼성화하여 본원에 기재된 이론에 따라 부착된 성분의 구속된 공간상 입체형태를 촉진시켰다. 도 3c의 구축물은 다른 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 사용한 단일 분자 서열분석 실행에서 성공적으로 사용되었다 (도 3d). 대향하는-가닥 연결성을 갖는 유사하게 설계된 구축물을 생성하였고, 이를 도 3e에 제시한다.

[0087] 도 3e는 뉴클레오시드 폴리포스페이트 (예를 들어, 반응물)를 발광 표지와 비공유적으로 연결하는 핵산 링커의 예시적인 구조를 도시한다. 제시된 바와 같이, 무염기성 부착 부위에서 2개의 발광 표지에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 말단 부착 부위에서 뉴클레오시드 헥사포스페이트에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화되었다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물을 생성하기 위해 본 개시내용에 제공된 설계 전략은 대안적 표지 접합 전략, 예컨대 링커 내로 통합된 (예를 들어, 올리고머 또는 중합체 링커, 예컨대 올리고뉴클레오티드 가닥 내로 통합된) 표지를 포함하는 것으로 고려된다. 예를 들어, 도 3f는 올리고뉴클레오티드 가닥 내에 부착된 2개의 표지를 갖는 핵산 링커의 예를 도시한다.

[0088] 도 3f에 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물은 올리고뉴클레오티드 가닥 내에 부착된 (예를 들어, 가닥 내로 통합된) 2개의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 접합 전략은 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 통해 상호작용하지 않는 발광 분자, 예컨대 시아닌-기반 염료를 사용하여 구현될 수 있다 (예를 들어, 도 3f의 박스표시된 구역에 제시된 바와 같음). 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥 내에 부착된 발광 분자의 수는 오직 올리고뉴클레오티드 가닥의 크기에 의해서만 제한될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물은 올리고뉴클레오티드 가닥 내에 부착된 2개 초과의 발광 표지 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 6개 초과의 발광 표지)를 포함한다. 도 3f에 도시된 구축물은 3개의 다른 밝게 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 사용한 서열분석 실행에서 성공적으로 사용되었다 (도 3g).

[0089] 개시내용은, 일부 측면에서, 핵산 링커가 지속적이고/거나 보존된 방출 수명을 갖는 밝게 표지된 반응물을 위한 스캐폴드를 제공하는 구조적으로 구속된 입체형태를 갖도록 조작될 수 있다는 발견에 관한 것이다. 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥 혼성화는 표지 분리 목적을 위해 구속성 입체형태를 촉진하는 하나의 일반적 전략이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥 혼성화는 상이한 올리고뉴클레오티드 가닥의 혼성화를 수반한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥 혼성화는 자기-가닥 혼성화 (예를 들어, 단일 가닥 내에서의 자기-혼성화)를 수반한다. 일부 실시양태에서, 자기-가닥 혼성화는, 개

별 가닥 혼성화에 관하여 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 핵산 링커 가요성을 제한할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자기-가닥 혼성화는 핵산 링커에서 1개 이상의 스템-루프 구조를 형성하는데 사용된다.

[0090] 스템-루프 또는 헤어핀 루프는 올리고뉴클레오티드 가닥이 폴딩되어 동일한 가닥의 또 다른 섹션과 염기 쌍을 형성할 때 형성되는, 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 뉴클레오티드의 쌍형성되지 않은 루프이다. 일부 실시양태에서, 스템-루프의 쌍형성되지 않은 루프는 3 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 따라서, 스템-루프는 혼성화하여 스템을 형성하는 역전된 상보적 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 가닥의 2개의 영역에 의해 형성될 수 있고, 여기서 2개의 영역은 쌍형성되지 않은 루프를 형성하는 3 내지 10개의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, 스템은 1개 이상의 G/C 뉴클레오티드를 갖도록 설계될 수 있고, 이는 A/T 뉴클레오티드와 비교하여 형성되는 추가의 수소 결합 상호작용에 의해 추가적 안정성을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스템은 쌍형성되지 않은 루프 서열에 바로 인접한 G/C 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템은 쌍형성되지 않은 루프 서열에 인접한 처음 2, 3, 4 또는 5개의 뉴클레오티드 내에 G/C 뉴클레오티드를 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커의 쌍형성되지 않은 루프는 1개 이상의 발광 표지를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 1개 이상의 표지 부착 부위는 쌍형성되지 않은 루프 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 쌍형성되지 않은 루프 내의 무염기성 부위에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 쌍형성되지 않은 루프의 염기에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 루프는 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들어 구아닌에 의해 관찰되는 켄칭 효과로 인해, A/T/U-풍부 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 쌍형성되지 않은 루프 내의 A, T, 또는 U 뉴클레오티드에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 적어도 4개의 연속 A, T, 또는 U 뉴클레오티드가 부착 부위의 어느 하나의 측면에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 쌍형성되지 않은 루프는 33% 미만의 G/C 함량 (예를 들어, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 또는 0% G/C 함량)을 포함한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 발광 표지는 스템-루프의 쌍형성되지 않은 루프에 부착된다 (예를 들어, 표지 부착 부위는 루프 내에서 발생함). 예를 들어, 도 4a는 스템-루프 핵산 링커(400)를 갖는 표지된 반응물의 예를 일반적으로 도시한다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥(410)은 자기-혼성화하여 스템-루프를 형성한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥의 자기-혼성화 부분은 스템-루프의 스템(412)을 형성한다. 일부 실시양태에서, 자기-가닥 혼성화는 스템-루프의 루프(414) (예를 들어, 쌍형성되지 않은 루프)의 형성을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥(410)은 반응물에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥(420)과 추가로 혼성화된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커는 대향하는 가닥 연결성을 통해 발광 표지를 반응물에 비-공유 연결한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지에 부착된 자기-혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥 (예를 들어, 스템-루프를 갖는 가닥)은 동일한 가닥 연결성을 통해 1개 이상의 반응물에 부착될 수 있음이 인지될 것이다.

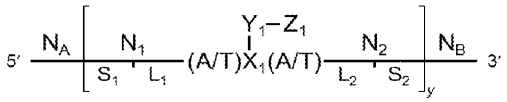
[0093] 일부 실시양태에서, 2개 이상의 발광 표지가 스템-루프 핵산 링커에 부착된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커(402)는 2개의 발광 표지에 부착된다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 2개의 발광 표지를 위한 부착 부위는 스템-루프의 루프 내에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 자기-혼성화된 스템 영역에 의해 제공되는 안정성은 비교적 낮은 수준의 가요성을 갖는 루프 영역을 생성한다. 일부 실시양태에서, 쌍형성되지 않은 루프 내의 발광 표지 부착 부위는 유리한 표지-표지 공간상 분리 및/또는 유리한 표지-반응물 공간상 분리를 촉진하도록 설계될 수 있다. 비제한적 스템-루프 핵산 링커(402)에 의해 제공되는 예는 루프의 직경에 근사화된 거리만큼 서로 분리된 표지 부착 부위를 도시한다. 일부 실시양태에서, 이러한 설계는 공간을 통한 표지-표지 분리를 최대화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 설계는, 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 루프에 의해 제공되는 입체 장벽 효과를 통해 표지-표지 상호작용의 정도를 추가로 제한한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커는 2개 이상의 스템-루프를 포함한다 (도 4b).

[0094] 도 4b에 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커(404)는 2개의 스템-루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개의 스템-루프의 형성은 Y-형상을 갖는 핵산 링커를 생성하여 3-원 접합부(410)가 형성되도록 한다. 일부 실시양태에서, 3-원 접합부는 이들 특색으로부터 생성된 상대적 안정성 및 기하학적으로 구속된 입체형태로 인한 일반적 설계 전략으로서 고려된다. 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커(404)는 각각의 루프에 부착된 1개의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산(404)은 대향하는 가닥 연결성을 통해 발광 표지 및 반응물을 비-공유 연결하며, 예를 들어 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 1개 이상의 표지는 1개 이상의 반응물에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산(406)은 동일한 가닥 연결성 (예를 들어, 동일한 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 1개 이상의 표지

및 1개 이상의 반응물)을 통해 발광 표지 및 반응물을 연결한다. 스템-루프 핵산(406)은 3-원 접합부를 갖는 밝게 표지된 반응물의 설계에 사용된 비-제한적인 거리 구격의 예를 도시한다. 예를 들어, 이들 대략적인 거리는 도 4c에 제시된 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 생성하기 위한 기초로서 사용되었다. 도 4c의 구축물은 다른 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 사용한 단일 분자 서열분석 실행에서 성공적으로 사용되었다(도 4d).

[0095] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지는 스템-루프의 스템에 부착된다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 스템-루프는 발광 표지를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 스템-루프는 스템 내에 쌍형성되지 않은 영역 (예를 들어, "돌출 루프")을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비표지된 구조적 모티프, 예컨대 스템-루프가 핵산 링커에 (예를 들어, 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 사이에 있는 핵산 링커의 위치에) 포함된다. 이러한 실시양태에서, 1개 이상의 비표지된 구조적 모티프는, 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 입체 장벽 효과를 제공할 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, 스템-루프 핵산 링커는 발광 표지에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 스페이서를 통해 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 부착 부위에서 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 스템 및 루프 (예를 들어, 쌍형성되지 않은 루프)를 갖는 스템-루프 2차 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 루프는 부착 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 스페이서를 통해 제2 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 하기 구조를 갖는다.

[0097] 

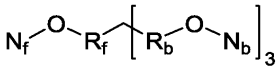

[0098] 여기서 $N_A$ 및 $N_B$는 각각 A, U, T, G, 및 C로부터 독립적으로 선택된 5 내지 40개 뉴클레오티드의 연속 서열이며, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 $N_A$의 5' 부분 또는 $N_B$의 3' 부분에 혼성화되고; 괄호는 y 스템-루프를 형성하는 영역을 나타내며, 각각의 스템-루프는 스템 및 루프를 갖고, 여기서 y는 1 내지 3이고; $N_1$ 및 $N_2$는 각각 A, U, T, G, 및 C로부터 독립적으로 선택된 5 내지 20개 뉴클레오티드의 연속 서열이고, 여기서 $N_1$ ($S_1$)의 5' 부분 및 $N_2$ ($S_2$)의 3' 부분은 역 상보적이거나 부분적으로 역 상보적이고, 서로 혼성화하여 스템 모티프를 형성할 수 있고; $N_1$ ($L_1$)의 3' 부분, $N_2$ ($L_2$)의 5' 부분, 및 개재 영역은 $S_1$ 및 $S_2$가 혼성화되어 스템 모티프를 형성하는 경우 루프 모티프를 형성하고; (A/T)는 A, T, 및 U로부터 선택된 뉴클레오티드이고; $X_1$은 제2 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 부착 부위이고; $Y_1$은 제1 링커이고; $Z_1$은 발광 표지이다.

[0099] 본원에 기재된 바와 같이, 개시내용의 측면은 1개 이상의 발광 표지를 1개 이상의 반응물 (예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 연결시키기 위한 기하학적 구속성 링커 구성에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 기하학적 구속성 구성은 발광 표지가 대칭적 구성에 의해 공간상 분리된 2개 이상의 발광 표지를 갖는 핵산 링커를 지칭한다. 일부 측면에서, 개시내용의 밝게 표지된 반응물은 도 5a에 도시된 바와 같은 나무-형상의 구성과 유사한 핵산 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 나무-형상의 링커(500)는 반응물 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 연결된 트리스-표지된 핵산 링커를 포함한다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 나무-형상의 링커(500)는 3개의 주요 올리고뉴클레오티드 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 성분(510)은 분지형 링커를 통해 공유 부착된 4개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 성분(510)의 올리고뉴클레오티드 가닥 중 3개는 각각 (예를 들어, 말단 부착 또는 본원에 기재된 다른 접합 전략을 통해) 발광 표지에 부착된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 성분(510)의 3개의 표지된 올리고뉴클레오티드 가닥은 일반적으로 성분(510)의 표지된 부분으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 성분(510)의 제4 올리고뉴클레오티드 가닥은 비표지된다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오티드 가닥은 제2 올리고뉴클레오티드 성분(520)과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커(500)의 제2 올리고뉴클레오티드 성분(520)은 (예를 들어, 말단 부착 또는 본원에 기재된 다른 접합 전략을 통해) 반응물에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 성분(530)은 성분(510)의 표지된 부분의 3개의 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 성분(530)은, 그의 성분(510)과의 혼성화가 표지된

영역에서 구조적 강성을 제공하여 발광 표지의 공간상 분리를 촉진하므로, 지지 가닥으로 지칭된다.

[0100] 인지될 바와 같이, 본원에 기재된 링커 설계 전략 중 임의의 것은 개시내용에 의해 고려되는 나무-형상의 핵산 링커 또는 임의의 다른 핵산 링커 구성에 적용될 수 있다 (예를 들어, 가닥 연결성, 스페이서 특성 및 스페이서 구성, 표지-표지 분리, 표지-반응물 분리, 3-원 접합부 등). 나무-형상의 핵산(502)은 나무-형상의 핵산 링커를 갖는 밝게 표지된 반응물의 설계에 사용된 비제한적 거리 세부사항의 예를 도시한다. 예시적인 예로서, 이들 대략적인 거리는 도 5b에 제시된 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 생성하기 위한 기초로서 사용되었다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 나무-형상의 핵산은 1개 초과의 반응물 (예를 들어, 2개의 뉴클레오시드 폴리포스페이트, 또는 2개 초과의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)을 포함할 수 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 나무-형상의 핵산 링커는 반응물을 갖는 혼성화된 부분을 포함하는 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥과 관련하여 기재된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 나무-형상의 핵산 링커는 커플링 화합물 (예를 들어, 분지형 커플러)을 통해 제1 올리고뉴클레오티드의 말단 단부에서 2개 이상의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥은 발광 표지에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥은 반응물 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 가닥 (예를 들어, 제3 올리고뉴클레오티드 성분)은 2개 이상의 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 커플링 화합물은 하기 구조를 갖는다:

[0102] 

[0103] 여기서 $N_f$는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥이고; $N_b$는 분지화 올리고뉴클레오티드 가닥이고; $R_f$ 및 $R_b$는 각각, 서로 독립적으로, 결합, 또는 치환 또는 비치환된 알킬렌; 치환 또는 비치환된 알케닐렌; 치환 또는 비치환된 알키닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알킬렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알케닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알키닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴렌; 치환 또는 비치환된 카르보시클릴렌; 치환 또는 비치환된 아릴렌; 치환 또는 비치환된 헤테로아릴렌; 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 연결기이고; 각각의 경우의 O는 인접한 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 포스페이트 기 또는 3' 히드록실 기의 산소 원자이다.

[0104] 일부 측면에서, 개시내용은 별-형상의 핵산 링커를 갖는 밝게 표지된 반응물을 제공한다. 도 6a에 제시된 바와 같이, 별-형상의 핵산 링커는 링커의 외부 영역에서 대칭적으로 배열된 반응물 및 구성의 코어 영역에 보다 가까운 1개 이상의 발광 표지를 제공할 수 있다. 이러한 방식으로, 일부 실시양태에서, 반응물은 예를 들어 폴리머라제와의 반응에 보다 감수성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어 영역에 가까운 발광 표지 부착 부위 주변의 뉴클레오티드 함량은 본원에 기재된 세부사항에 따라 선택된다 (예를 들어, 표지와 링커 사이의 켄칭 효과를 피하기 위해 낮은 G/C 함량). 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커(600)는 분지형 링커를 통해 부착된 3개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 갖는 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분의 3개의 올리고뉴클레오티드 가닥 각각은 반응물에 (예를 들어, 말단) 부착된다. 일부 실시양태에서, Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분의 3개의 올리고뉴클레오티드 가닥 각각은 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥 중 1개는 발광 표지에 부착된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥 중 2 또는 3개는 각각 발광 표지에 부착된다.

[0105] 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커의 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분은 3개 초과의 반응물에 부착된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커(602)를 갖는 밝게 표지된 반응물은 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분의 2개의 올리고뉴클레오티드 가닥 각각에서 2개의 반응물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개의 반응물은 제시된 바와 같이 비표지된 가닥과 혼성화된 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분의 가닥에 부착된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커는 표지된 올리고뉴클레오티드 성분 및 반응물 올리고뉴클레오티드 성분을 포함하고, 여기서 각각의 올리고뉴클레오티드 성분은 Y-형상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커(604)는 3개의 발광 표지에 부착된 제1 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지는 제1 Y-형상의 성분의 각각의 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제시된 바와 같이, 각각의 발광 표지는 제1 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분의 코어 영역 근처에 부착된다. 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커(604)는 3개의 반응물에 부착

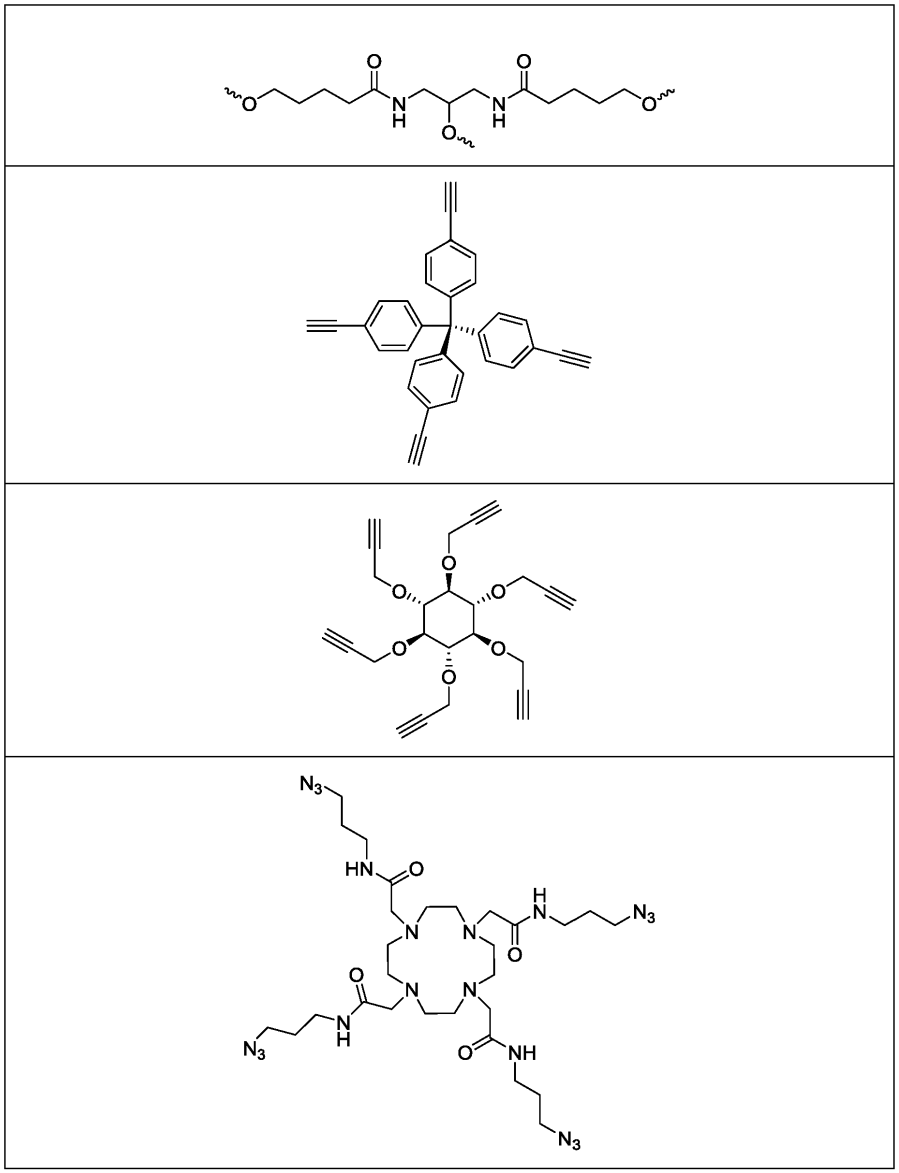
된 제2 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 각각의 반응물은 제2 Y-형상의 성분의 각각의 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제시된 바와 같이, 각각의 반응물은 제1 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분의 외부 영역에 (예를 들어, 말단 부착 부위를 통해) 부착된다. 별-형상의 핵산(606)은 별-형상의 핵산 링커를 갖는 밝게 표지된 반응물의 설계에 사용된 비제한적 거리 세부사항의 예를 도시한다. 개시내용에 따라 생성된 별-형상의 핵산 링커를 갖는 밝게 표지된 반응물의 예시적 구조가 도 6b에 제시된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커는 링커의 Y-형상의 올리고뉴클레오티드 성분에 사용된 공유 커플링 화합물과 관련하여 기재될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 별-형상의 핵산 링커를 갖는 밝게 표지된 반응물은 공유 커플링 화합물로부터 연장된 3개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개는 반응물 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 성분의 올리고뉴클레오티드 가닥 중 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)은 각각 1개 이상의 반응물에 부착된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 성분은 제2 올리고뉴클레오티드 성분과 혼성화된다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 성분은 발광 표지에 부착된 적어도 1개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 성분은 공유 커플링 화합물로부터 연장된 3개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 성분의 올리고뉴클레오티드 가닥 중 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)은 각각 발광 표지에 부착된다.

[0108] 일부 측면에서, 개시내용의 밝게 표지된 반응물은 사면체 코어를 갖는 핵산 링커를 포함한다. 도 6c의 예시적 구조에 의해 예시된 바와 같이, 사면체 코어는 1개 이상의 발광 표지 및 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 대칭적으로 구속된 공간상 배열을 촉진하는 4-원 공유 커플링 화합물을 지칭한다. 도 6d는 도 6c에 제시된 예시적 구조를 합성하는데 사용될 수 있는 반응식의 예를 도시한다. 일부 실시양태에서, 사면체 코어는 본원에 기재된 1종 이상의 밝게 표지된 반응물 설계 전략 중 임의의 것과 조합하여 사용하는 것이 고려된다. 예로서, 도 6e에 제시된 밝게 표지된 반응물을 생성하기 위해 사면체 코어에 의해 제공되는 대칭적 구속 이점이 본원에 기재된 3-원 접합부에 의해 구현되었다. 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 3-원 접합부에의 또는 그 근처에의 발광 표지의 부착은 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이 입체 효과를 유리하게 제공할 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 개시내용은 대칭적 부착을 허용하는 코어 화학적 커플러를 사용한 추가의 대칭적으로 구속된 구성을 고려한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 밝게 표지된 반응물은 시클로덱스트린-기반 코어를 포함한다. 3-원 접합부를 갖는 시클로덱스트린-기반 핵산 링커를 생성하기 위한 예시적인 합성 반응식이 도 7에 제시된다. 시클로덱스트린 커플링 화합물의 예시적인 구조는, 본원에 기재된 실시양태에 따라 3개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥의 공유 연결에 사용될 수 있는 다른 커플링 화합물의 예와 함께, 표 1에 제공된다.

[0110] 표 1. 올리고뉴클레오티드 가닥을 연결하기 위한 커플링 화합물의 예



[0111]

[0112] 스페이서

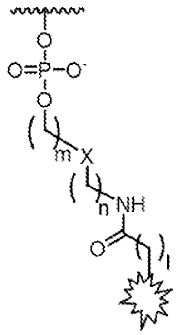
[0113] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 스페이서를 통해 핵산 링커에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 핵산 링커의 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착 부위에서 부착된다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 말단 부위에서 (예를 들어, 5' 또는 3' 단부에서) 발생한다. 말단 부착 부위의 예는 본 출원에 제공되며, 예를 들어 도 3c, 3e, 4c, 6b, 6c, 8, 9, 및 10 (뉴클레오티드의 말단 부착), 및 도 5b, 9 및 10 (발광 표지의 말단 부착)에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 올리고뉴클레오티드 가닥 내의 무염기성 부위에서 (예를 들어, 뉴클레오티드가 결여되었지만 그에 인접한 부위에서) 발생한다. 무염기성 부착 부위의 예는 본 출원에서 제공되며, 예를 들어 도 3c, 3e, 6b, 6c, 및 8 (발광 표지의 무염기성 부착)에 제시된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 부착 부위는 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 염기성 부위에서 발생한다 (예를 들어, 가닥 상의 뉴클레오티드, 예컨대 뉴클레오티드의 핵염기, 당, 또는 포스페이트에 부착됨). 염기성 부착 부위의 예는 본 출원에서 제공되며, 예를 들어 도 4c 및 8에 제시된 바와 같다 (발광 표지의 염기성 부착).

[0114] 일부 실시양태에서, 스페이서는 복수의 티미딘 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 분지형 스페이서, 예를 들어, 분지형 티미딘 스페이서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분지형 스페이서는 분지형 티미딘 스페이서를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 각각의 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 화학식 $Nu\text{-}T(T)_nT\text{-}R$의 티미딘 스페이서를 포함하며, 여기서 Nu는 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 나타내고, T는 티미딘

뉴클레오티드를 나타내고, n은 1 내지 30의 값을 갖는 정수이고, R은 1개 이상의 추가의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 연결하는 수렴 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 수렴 지점은 핵산의 올리고뉴클레오티드 가닥에 추가로 직접적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 수렴 지점은 올리고뉴클레오티드 가닥에, 예를 들어, 추가의 티미딘 링커 및/또는 추가의 수렴 지점을 통해 추가로 간접적으로 부착된다. 분지형 티미딘 스페이서의 예는 도 5b에 제시되며, 이는 티미딘 스페이서 및 올리고뉴클레오티드 가닥에 추가로 직접 부착되는 수렴 지점을 갖는 2개의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 도시한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 스페이서는 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 각각의 발광 표지에 연결되거나, 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 발광 표지가 각각의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결되거나, 또는 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 발광 표지에 연결되도록 1개 이상의 분기 지점을 함유한다.

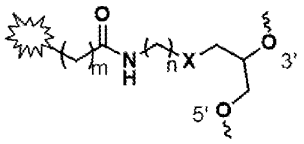
[0116] 일부 실시양태에서, 스페이서는 핵산 링커의 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 말단 부위에서 부착된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 일반적 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 또는 3' 단부에 부착된다:



[0117]

[0118] 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이고; m > 1; n > 1; 및 m+n < 10이다.

[0119] 일부 실시양태에서, 스페이서는 핵산 링커의 올리고뉴클레오티드 가닥 내의 내부 무염기성 부위에서 부착된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 일반적 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 내부 무염기성 부위에서 부착된다:

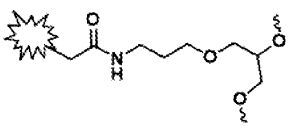


[0120]

[0121] 여기서 는 발광 표지 (또는 대안적 실시양태에서, 반응물)이고; n >1; 및 X = $CH_2$ 또는 O이다.

[0122] (예를 들어, 말단, 내부 무염기성, 또는 염기성 부착 부위를 통한) 발광 표지 부착을 위한 스페이서의 예가 표 2에 제공되고, 하기에 제시된다. 스페이서 구조가 발광 표지를 갖는 것으로 제시될 수 있지만, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 스페이서 구조 중 임의의 것이 반응물 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)을 핵산 링커에 부착시키는데 사용될 수 있도록 반응물이 치환될 수 있음이 인지될 것이다.

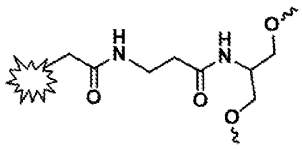
[0123] 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 글리콜아민 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 내부 무염기성 부위에 부착된다:



[0124]

[0125] 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이다.

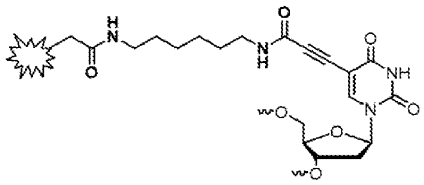
[0126] 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 세리놀아민 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 내부 무염기성 부위에 부착된다:



[0127]

[0128] 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이다.

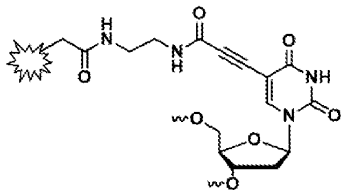
[0129] 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 C6-아미노-T 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 내부 염기성 부위에 부착된다:



[0130]

[0131] 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이다.

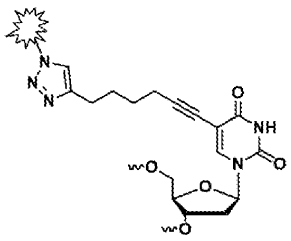
[0132] 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 C2-아미노-T 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 내부 염기성 부위에 부착된다:



[0133]

[0134] 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이다.

[0135] 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 반응물은 하기 제시된 C8-알킨-dT 스페이서를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 내부 염기성 부위에 부착된다:

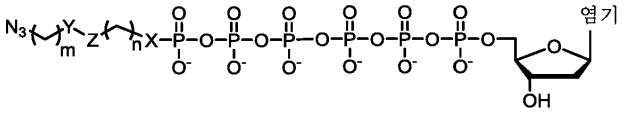


[0136]

[0137] 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이다.

[0138] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지 및/또는 1개 이상의 반응물 (예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)은 관련 기술분야에 공지된 화학적 커플링 기술을 사용하여 핵산 링커에 부착될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 클릭 화학 기술 (예를 들어, 구리-촉매화된, 변형-촉진된, 구리-무함유 클릭 화학

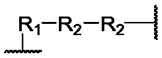
등)이 핵산에 1개 이상의 발광 표지 및 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 부착시키는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 하기 제시된 일반적 구조에 따라 아지드-접합된 dN6P (예를 들어, dN6P-$N_3$)를 통해 핵산 링커에 커플링된다:




[0139]

[0140] 여기서 염기는 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민, 우라실, 및 그의 유도체로부터 선택된 핵염기이고; -Y-Z- = $-CH_2CH_2-$, -CONH-, 또는 -NHCO-이고; X = NH 또는 O이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 아지드-접합된 dN6P (예를 들어, dN6P-$N_3$) 및/또는 아지드-접합된 발광 표지 (예를 들어, 염료-$N_3$)는 구리-촉매화된 반응에서 dN6P-$N_3$ 또는 염료-$N_3$의 아지드를 알킨-접합된 핵산 링커의 말단 알킨과 적합한 반응 조건 하에 접촉시켜 핵산 링커 및 dN6P 또는 염료 사이에 트리아졸 연결을 형성시키는 것에 의해 핵산 링커에 부착된다. 일부 실시양태에서, 아지드-접합된 dN6P (예를 들어, dN6P-$N_3$) 및/또는 아지드-접합된 발광 표지 (예를 들어, 염료-$N_3$)는 구리-무함유 반응에서 dN6P-$N_3$ 또는 염료-$N_3$의 아지드를 시클로옥틴-접합된 핵산 링커의 내부 알킨과 적합한 반응 조건 하에 접촉시켜 핵산 링커 및 dN6P 또는 염료 사이에 멀티시클릭 연결을 형성시키는 것에 의해 핵산 링커에 부착된다. 핵산 링커의 시클로옥틴 변형은 관련 기술분야에 공지된 구리-무함유 클릭 화학 모이어티를 생성하는데 적합한 시클로옥틴 시약을 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 시클로옥틴-변형된 핵산 링커는 적합한 시클로옥틴 시약 (예를 들어, (1R,8S,9s)-비시클로[6.1.0]논-4-인-9-일메틸 N-숙신이미딜 카르보네이트)을 핵산 링커의 말단 아민과 접촉시킴으로써 제조된다.

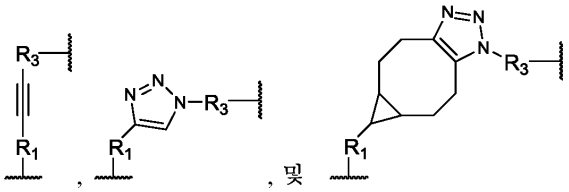
[0141] 따라서, 일부 실시양태에서, 스페이서는 커플링된 기 (예를 들어, BCN, 테트라진, 테트라졸, 및 클릭 반응 및 유사한 커플링 기술에 적합한 반응성 모이어티의 커플링을 통해 생성된 다른 생성물)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 하기 화학식을 갖는다:



[0142]

[0143] 여기서 $R_1$은 제1 연결기이고, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 부착 부위에 부착되고; $R_2$는 제2 연결기이고, $R_1$ 및 $R_3$을 공유 연결시키기 위해 수행된 커플링 반응에서 형성된 커플링된 모이어티를 포함하고; $R_3$은 제3 연결기이고, 발광 표지에 부착된다.

[0144] 일부 실시양태에서, 스페이서는 하기로부터 선택된 화학식을 갖는다:

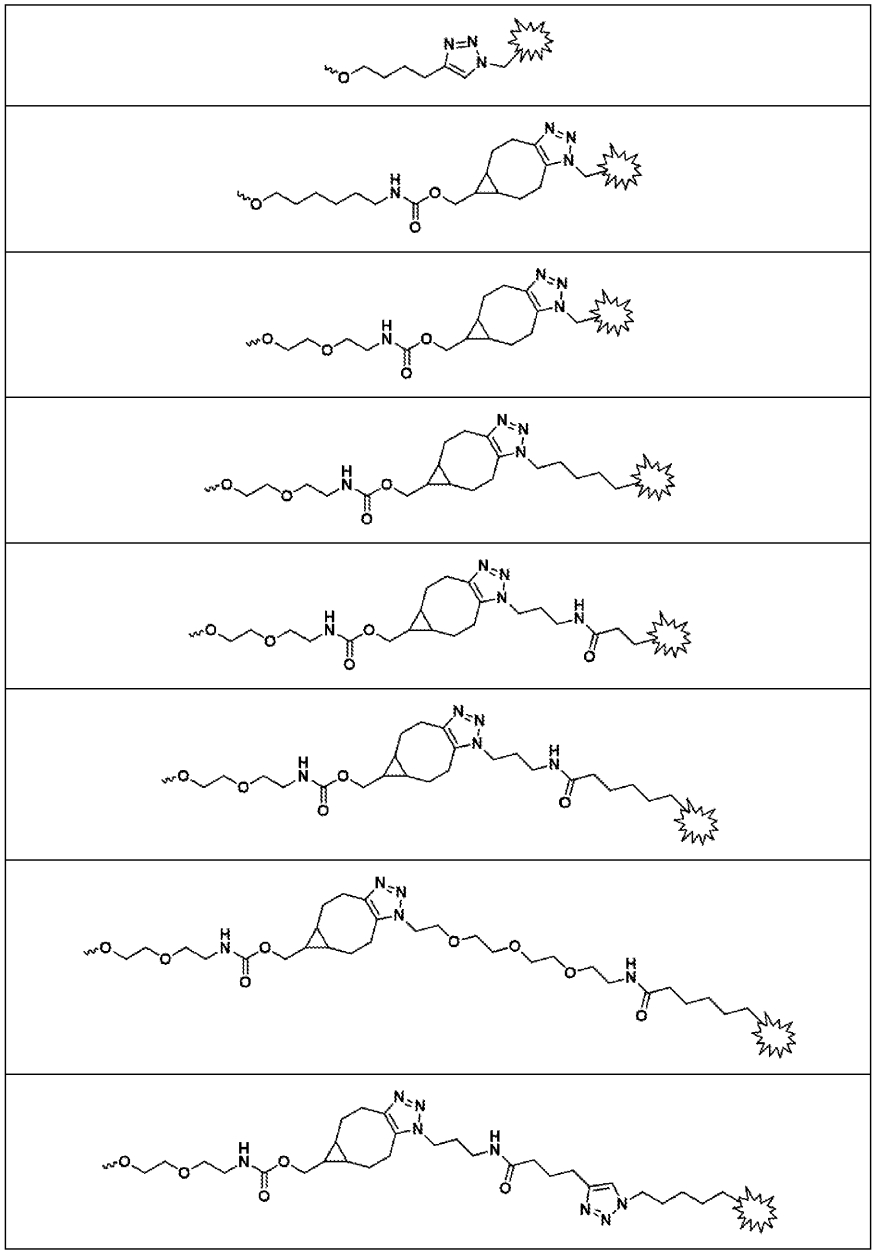


[0145]

[0146] 여기서 $R_1$ 및 $R_3$은 각각 독립적으로 결합, 또는 치환 또는 비치환된 알킬렌; 치환 또는 비치환된 알케닐렌; 치환 또는 비치환된 알키닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알킬렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알케닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로알키닐렌; 치환 또는 비치환된 헤테로시클릴렌; 치환 또는 비치환된 카르보시클릴렌; 치환 또는 비치환된 아릴렌; 치환 또는 비치환된 헤테로아릴렌; 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 연결기이다.

[0147] 일부 실시양태에서, 클릭 화학을 사용하여 생성된 스페이서의 예가 표 2에 제공되고, 여기서 는 발광 표지 (또는, 대안적 실시양태에서, 반응물)이다.

[0148] 표 2. 클릭된 스페이서의 예



[0149]

[0150] 본원에 사용된 "핵산 링커"는 1개 이상의 발광 표지를 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결시키는 핵산을 일반적으로 지칭한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 공유 부착을 통해 또는 염기-쌍형성 (예를 들어, 혼성화)을 통해 연결된 임의의 수의 올리고뉴클레오티드 가닥을 갖는 구축물을 일반적으로 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 상이한 기능적 성분 (예를 들어, 1개 이상의 발광 표지, 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)이 부착될 수 있는 "코어" 또는 "염기" 구축물로서 대안적으로 지칭될 수 있다. 용어 "구축물"은, 일부 실시양태에서, 링커를 일반적으로 지칭하기 위해 다양한 문맥에서 전반적으로 사용되고, 본원에 기재된 다양한 다른 성분 (예를 들어, 스페이서, 표지, 뉴클레오시드 폴리포스페이트 등)을 포괄할 수 있거나, 포괄하지 않을 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 링커는 물질의 입자에 부착되지 않는다 (예를 들어, 금속성, 자기성, 중합체, 또는 다른 물질의 입자에 부착되지 않음). 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 선형 분자 (예를 들어, "막대-형상의" 핵산)이다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 원형 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 (예를 들어, 스템-루프 구조의 존재 또는 부재 하에) 단일-가닥이다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 (예를 들어, 스템 루프 구조의 존재 또는 부재 하에) 이중 가닥이다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥 핵산 링커의 2개의 가닥은 (상보적 서열로 인해) 혼성화되고, 공유 부착되지 않는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 이중 가닥 링커의 2개의 가닥을 공유 부착시키기 위해 (예를 들어, 1개 이상의 화학적 링커를 사용하여) 1개 이상의 공유

결합을 도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 본원에 기재된 바와 같은 1개 이상의 추가의 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 i) 당 포스페이트 백본 내에 또는 단부(들)에 1개 이상의 추가의 모이어티, ii) 1개 이상의 변형 (예를 들어, 1개 이상의 변형된 염기 또는 당), 또는 i) 및 ii)의 조합을 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서 핵산 링커는 i), ii) 또는 i) 또는 ii) 중 어느 것도 포함하지 않는다.

[0152] 핵산 링커와 관련하여, 그에 부착되는 "뉴클레오티드" 또는 "뉴클레오시드 폴리포스페이트"는 (예를 들어, 서열분석 반응 동안) 신장 핵산 가닥 내로 혼입되도록 구성된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 1개 이상의 뉴클레오시드 모노포스페이트 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 포함한다. 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 예는, 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 디- 또는 트리포스페이트, 또는 3개 초과의 5' 포스페이트를 갖는 뉴클레오시드, 예컨대 뉴클레오시드 헥사포스페이트를 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, "표지된 뉴클레오티드"는 본 출원의 링커를 통해 1개 이상의 발광 표지에 연결된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 지칭하며, 여기서 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 핵산 합성 반응 조건 하에 폴리머라제 효소에 대한 기질로서 작용한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 포스포릴 전달 반응 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 α-포스페이트의, 그의 β-포스페이트로부터 성장하는 핵산 가닥의 3' 히드록실 기로의 전달)에서 적합한 폴리머라제 효소에 의해 작용될 수 있는 적어도 디포스페이트 기 또는 트리포스페이트 기를 포함한다.

[0153] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오시드 포스페이트 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 말단 포스페이트를 통해, (예를 들어, 본 출원의 다른 곳에 기재된 바와 같이) 폴리머라제를 표지-유도된 광손상으로부터 보호하는 보호 분자로서 기능할 수 있는 본 출원의 링커 부분을 형성하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 표지된 또는 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥)에 부착될 수 있다. 본 출원에 기재된 조성물 또는 방법 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 포스페이트의 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의) 포스페이트 부분 (예를 들어, 폴리포스페이트 부분)은 1개 이상의 포스페이트 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과의 포스페이트 기) 또는 그의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 포스페이트의 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의) 포스페이트 부분 (예를 들어, 폴리포스페이트 부분)은 포스페이트 에스테르, 티오에스테르, 포스포르아미데이트, 알킬 포스포네이트 연결, 다른 적합한 연결, 또는 1개 초과의 이러한 변형, 또는 그의 2종 이상의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 표지된 가닥 및 비표지된 가닥은 서로 실질적으로 상보적이다 (예를 들어, 이량체화 도메인의 길이에 걸쳐, 여기서 이량체화 도메인 내의 가닥은 서로, 예를 들어, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 상보성을 가질 수 있음).

[0154] 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 n개의 포스페이트 기를 가질 수 있고, 여기서 n은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10을 초과하거나 그와 동등한 수이다. 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 예는 뉴클레오시드 디포스페이트 및 뉴클레오시드 트리포스페이트를 포함한다. 표지된 뉴클레오티드는 말단 포스페이트 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트일 수 있고, 이에 따라 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 말단 포스페이트는 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 링커 (예를 들어, 핵산 링커)에 부착됨으로써, 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 형성한다. 이러한 표지는 발광 (예를 들어, 형광 또는 화학발광) 표지, 형광원성 표지, 착색 표지, 발색 표지, 질량 태그, 정전기적 표지 또는 전기화학적 표지일 수 있다. 표지 (또는 마커)는 링커, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 스페이서를 통해 말단 포스페이트에 커플링될 수 있다. 링커 (예를 들어, 스페이서)는, 예를 들어 천연 또는 변형된 뉴클레오티드의 말단 포스페이트에서 예를 들어 포스페이트 에스테르, 티오에스테르, 포스포르아미데이트 또는 알킬 포스포네이트 연결을 형성하는데 적합할 수 있는 적어도 1개 또는 복수의 히드록실 기, 술프히드릴 기, 아미노 기 또는 할로알킬 기를 포함할 수 있다. 링커 (예를 들어, 스페이서)는 예컨대 중합 효소의 도움 하에 표지를 말단 포스페이트와 분리시키도록 절단가능할 수 있다. 뉴클레오티드 및 링커 (예를 들어, 스페이서)의 예는 미국 특허 번호 7,041,812에 제공되고, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0155] 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 및 우라실 (U), 또는 그의 변이체 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 메틸화 핵염기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 메틸화 뉴클레오티드는 핵염기에 부착된 (예를 들어, 핵염기의 고리에 직접적으로 부착된, 핵염기의 고리의 치환기에 부착된) 1개 이상의 메틸 기를 포함하는 뉴클레오티드일 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.

[0156] 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. 일부 실시양태에서, 핵산은, 비제한적으로, 잠금 핵산 (LNA), 펩티드 핵산 (PNA), 트리아졸-연결된 핵산, 2'-F-변형된 핵산, 및 그의 유도체 및 유사체를 포함한 변형된 핵산이다. 핵산은 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 일반적으로 뉴클레오티드의 임의의 중합체를 지칭한다.

[0157] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 분자의 1종 이상의 발광 특성에 기초하여 단일 분자를 식별하기 위한 신규 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 분자 (예를 들어, 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 그의 밝기, 발광 수명, 흡수 스펙트럼, 방출 스펙트럼, 발광 양자 수율, 발광 강도, 또는 그의 2 이상의 조합에 기초하여 식별된다. 식별하는 것은 분자의 정확한 분자 아이덴티티를 할당하는 것을 의미할 수 있거나, 또는 가능한 분자의 세트로부터 특정한 분자를 구별 또는 차별화하는 것을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자는 상이한 밝기, 발광 수명, 흡수 스펙트럼, 방출 스펙트럼, 발광 양자 수율, 발광 강도, 또는 그의 2 이상의 조합에 기초하여 서로 구별될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자는 분자를 일련의 분리된 광 펄스에 노출시키고 분자로부터 방출된 각각의 광자의 타이밍 또는 다른 특성을 평가함으로써 식별된다 (예를 들어, 다른 분자와 구별됨). 일부 실시양태에서, 단일 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자에 대한 정보는 분자를 식별하기 위해 모아서 평가된다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자로부터 결정되고, 발광 수명은 분자를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 강도는 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자로부터 결정되고, 발광 강도는 분자를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명 및 발광 강도는 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자로부터 결정되고, 발광 수명 및 발광 강도는 분자를 식별하는데 사용될 수 있다.

[0158] 따라서, 본 출원의 일부 측면에서, 반응 샘플은 복수의 분리된 광 펄스에 노출되고, 일련의 방출된 광자는 검출되고 분석된다. 일부 실시양태에서, 일련의 방출된 광자는 실험 시간에 걸쳐 반응 샘플에 존재하고 변화되지 않은 단일 분자에 대한 정보를 제공한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 일련의 방출된 광자는 반응 샘플에서 (예를 들어, 반응 또는 공정 진행으로서) 상이한 시간에 존재하는 일련의 상이한 분자에 대한 정보를 제공한다.

[0159] 발광 표지

[0160] 본원에 기재된 "발광 표지"는 1개 이상의 광자를 흡수하고, 후속해서 하나 이상의 시간 기간 후에 1개 이상의 광자를 방출할 수 있는 분자이다. 일부 실시양태에서, 용어는 표지된 반응물의 비-반응물 부분을 일반적으로 지칭하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 발광 표지는 형광단, 및 스페이서의 적어도 일부를 포함할 수 있음). 일부 실시양태에서, 용어는 구체적으로 광자 (예를 들어, 형광단)를 흡수 및/또는 방출하는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 용어는 문맥에 따라 "발광 분자"와 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 형광단 (예를 들어, 본원에서 상호교환가능하게 사용되는 바와 같은 "염료" 또는 "형광단 염료")이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 로다민-기반 분자이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 시아닌-기반 분자이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 바디피-기반 분자이다.

[0161] 전형적으로, 발광 표지는 방향족 또는 헤테로방향족 화합물을 포함하고, 피렌, 안트라센, 나프탈렌, 아크리딘, 스틸벤, 인돌, 벤즈인돌, 옥사졸, 카르바졸, 티아졸, 벤조티아졸, 페난트리딘, 페녹사진, 포르피린, 퀴놀린, 에티듐, 벤즈아미드, 시아닌, 카르보시아닌, 살리실레이트, 안트라닐레이트, 쿠마린, 플루오로세인, 로다민 또는 다른 유사 화합물일 수 있다. 염료의 예는 5-카르복시플루오레세인 (FAM), 2'7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인 (JOE), 테트라클로로플루오레세인 (TET), 6-카르복시로다민 (R6G), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민 (TAMRA), 6-카르복시-X-로다민 (ROX)을 포함한 크산텐 염료, 예컨대 플루오레세인 또는 로다민 염료를 포함한다. 염료의 예는 또한 알파 또는 베타 위치에서 아미노 기를 갖는 나프틸아민 염료를 포함한다. 예를 들어, 나프틸아미노 화합물은 1-디메틸아미노나프틸-5-술포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 술포네이트 및 2-p-톨루이디닐-6-나프탈렌 술포네이트, 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-술폰산 (EDANS)을 포함한다. 염료의 다른 예는 쿠마린, 예컨대 3-페닐-7-이소시아네이토쿠마린; 아크리딘, 예컨대 9-이소티오시아네이토아크리딘 및 아크리딘 오렌지; N-(p-(2-벤족사졸릴)페닐)말레이미드; 시아닌, 예컨대 인도디카르보시아닌 3 (Cy® 3), (2Z)-2-[(E)-3-[3-(5-카르복시펜틸)-1,1-디메틸-6,8-디술포벤조[e]인돌-3-윰-2-일]프로프-2-에닐리덴]-3-에틸-1,1-디메틸-8-(트리옥시다닐술파닐)벤조[e]인돌-6-술포네이트 (Cy®3.5), 2-{2-[(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시]-2-옥소에틸}-16,16,18,18-테트라메틸-6,7,7a,8a,9,10,16,18-옥타히드로벤조[2",3"]인돌리지노[8",7":5',6']피라노[3',2':3,4]피리도[1,2-a]인돌-5-윰-14-술포네이트 (Cy®3B), 인도디카르보시아닌 5 (Cy®5), 인도디카르보시아닌 5.5 (Cy®5.5), 3-(-카르복시-펜틸)-3'-에틸-5,5'-디메틸옥사카르보시아닌 (CyA);

1H,5H,11H,15H-크산테노[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']디퀴놀리진-18-윰, 9-[2(또는 4)-[[[6-[2,5-디옥소-1-피롤리디닐)옥시]-6-옥소헥실]아미노]술포닐]-4(또는 2)-술포페닐]-2,3,6,7,12,13,16,17-옥타히드로-내부 염 (TR 또는 텍사스 레드(Texas Red)®); 바디피(BODIPY)® 염료; 벤족사졸; 스틸벤; 피렌; 등을 포함한다.

[0162] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 표 3으로부터 선택된 염료이다. 표 3에 열거된 염료는 비-제한적이고, 본 출원의 발광 표지는 표 3에 열거되지 않은 염료를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 3으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 3으로부터 선택된다.

[0163] 표 3. 형광단의 예

| 형광단 | | |
|---|---|---|
| 5/6-카르복시로다민 6G | 크로미스 678C | 딜라이트® 655-B1 |
| 5-카르복시로다민 6G | 크로미스 678Z | 딜라이트® 655-B2 |
| 6-카르복시로다민 6G | 크로미스 770A | 딜라이트® 655-B3 |
| 6-TAMRA | 크로미스 770C | 딜라이트® 655-B4 |
| 알렉사 플루오르® 350 | 크로미스 800A | 딜라이트® 662Q |
| 알렉사 플루오르® 405 | 크로미스 800C | 딜라이트® 675-B1 |
| 알렉사 플루오르® 430 | 크로미스 830A | 딜라이트® 675-B2 |
| 알렉사 플루오르® 480 | 크로미스 830C | 딜라이트® 675-B3 |
| 알렉사 플루오르® 488 | Cy®3 | 딜라이트® 675-B4 |
| 알렉사 플루오르® 514 | Cy®3.5 | 딜라이트® 679-C5 |
| 알렉사 플루오르® 532 | Cy®3B | 딜라이트® 680 |
| 알렉사 플루오르® 546 | Cy®5 | 딜라이트® 683Q |
| 알렉사 플루오르® 555 | 디오믹스-350 | 딜라이트® 690-B1 |
| 알렉사 플루오르® 568 | 디오믹스-350XL | 딜라이트® 690-B2 |
| 알렉사 플루오르® 594 | 디오믹스-360XL | 딜라이트® 696Q |
| 알렉사 플루오르® 610-X | 디오믹스-370XL | 딜라이트® 700-B1 |
| 알렉사 플루오르® 633 | 디오믹스-375XL | 딜라이트® 700-B1 |
| 알렉사 플루오르® 647 | 디오믹스-380XL | 딜라이트® 730-B1 |
| 알렉사 플루오르® 660 | 디오믹스-390XL | 딜라이트® 730-B2 |
| 알렉사 플루오르® 680 | 디오믹스-405 | 딜라이트® 730-B3 |
| 알렉사 플루오르® 700 | 디오믹스-415 | 딜라이트® 730-B4 |
| 알렉사 플루오르® 750 | 디오믹스-430 | 딜라이트® 747 |
| 알렉사 플루오르® 790 | 디오믹스-431 | 딜라이트® 747-B1 |
| AMCA | 디오믹스-478 | 딜라이트® 747-B2 |
| ATTO 390 | 디오믹스-480XL | 딜라이트® 747-B3 |
| ATTO 425 | 디오믹스-481XL | 딜라이트® 747-B4 |
| ATTO 465 | 디오믹스-485XL | 딜라이트® 755 |
| ATTO 488 | 디오믹스-490 | 딜라이트® 766Q |
| ATTO 495 | 디오믹스-495 | 딜라이트® 775-B2 |
| ATTO 514 | 디오믹스-505 | 딜라이트® 775-B3 |
| ATTO 520 | 디오믹스-510XL | 딜라이트® 775-B4 |
| ATTO 532 | 디오믹스-511XL | 딜라이트® 780-B1 |
| ATTO 542 | 디오믹스-520XL | 딜라이트® 780-B2 |
| ATTO 550 | 디오믹스-521XL | 딜라이트® 780-B3 |
| ATTO 565 | 디오믹스-530 | 딜라이트® 800 |
| ATTO 590 | 디오믹스-547 | 딜라이트® 830-B2 |
| ATTO 610 | 디오믹스-547P1 | 이플루오르® 450 |
| ATTO 620 | 디오믹스-548 | 에오신 |
| ATTO 633 | 디오믹스-549 | FITC |
| ATTO 647 | 디오믹스-549P1 | 플루오레세인 |

[0164]

[0165]

| 형광단 | | |
|---|---|---|
| ATTO 647N | 디오믹스-550 | 하이라이트™ 플루오르 405 |
| ATTO 655 | 디오믹스-554 | 하이라이트™ 플루오르 488 |
| ATTO 665 | 디오믹스-555 | 하이라이트™ 플루오르 532 |
| ATTO 680 | 디오믹스-556 | 하이라이트™ 플루오르 555 |
| ATTO 700 | 디오믹스-560 | 하이라이트™ 플루오르 594 |
| ATTO 725 | 디오믹스-590 | 하이라이트™ 플루오르 647 |
| ATTO 740 | 디오믹스-591 | 하이라이트™ 플루오르 680 |
| ATTO Oxa12 | 디오믹스-594 | 하이라이트™ 플루오르 750 |
| ATTO Rho101 | 디오믹스-601XL | IRDye® 680LT |
| ATTO Rho11 | 디오믹스-605 | IRDye® 750 |
| ATTO Rho12 | 디오믹스-610 | IRDye® 800CW |
| ATTO Rho13 | 디오믹스-615 | JOE |
| ATTO Rho14 | 디오믹스-630 | 라이트사이클러® 640R |
| ATTO Rho3B | 디오믹스-631 | 라이트사이클러®레드610 |
| ATTO Rho6G | 디오믹스-632 | 라이트사이클러®레드640 |
| ATTO Thio12 | 디오믹스-633 | 라이트사이클러®레드670 |
| BD 호리즌™ V450 | 디오믹스-634 | 라이트사이클러®레드705 |
| 바디피® 493/501 | 디오믹스-635 | 리사민 로다민 B |
| 바디피® 530/550 | 디오믹스-636 | 나프토플루오레세인 |
| 바디피® 558/568 | 디오믹스-647 | 오레곤 그린® 488 |
| 바디피® 564/570 | 디오믹스-647P1 | 오레곤 그린® 514 |
| 바디피® 576/589 | 디오믹스-648 | 퍼시픽 블루™ |
| 바디피® 581/591 | 디오믹스-648P1 | 퍼시픽 그린™ |
| 바디피® 630/650 | 디오믹스-649 | 퍼시픽 오렌지™ |
| 바디피® 650/665 | 디오믹스-649P1 | PET |
| 바디피® FL | 디오믹스-650 | PF350 |
| 바디피® FL-X | 디오믹스-651 | PF405 |
| 바디피® R6G | 디오믹스-652 | PF415 |
| 바디피® TMR | 디오믹스-654 | PF488 |
| 바디피® TR | 디오믹스-675 | PF505 |
| C5.5 | 디오믹스-676 | PF532 |
| C7 | 디오믹스-677 | PF546 |
| CAL 플루오르® 골드 540 | 디오믹스-678 | PF555P |
| CAL 플루오르® 그린 510 | 디오믹스-679P1 | PF568 |
| CAL 플루오르® 오렌지 560 | 디오믹스-680 | PF594 |
| CAL 플루오르® 레드 590 | 디오믹스-681 | PF610 |
| CAL 플루오르® 레드 610 | 디오믹스-682 | PF633P |
| CAL 플루오르® 레드 615 | 디오믹스-700 | PF647P |
| CAL 플루오르® 레드 635 | 디오믹스-701 | 퀴사르® 570 |
| 캐스케이드® 블루 | 디오믹스-703 | 퀴사르® 670 |
| CF™350 | 디오믹스-704 | 퀴사르® 705 |
| CF™405M | 디오믹스-730 | 로다민 123 |

[0166]

| 형광단 | | |
|---|---|---|
| CF™405S | 디오믹스-731 | 로다민 6G |
| CF™488A | 디오믹스-732 | 로다민 B |
| CF™514 | 디오믹스-734 | 로다민 그린 |
| CF™532 | 디오믹스-749 | 로다민 그린-X |
| CF™543 | 디오믹스-749P1 | 로다민 레드 |
| CF™546 | 디오믹스-750 | ROX |
| CF™555 | 디오믹스-751 | ROX |
| CF™568 | 디오믹스-752 | 세타™ 375 |
| CF™594 | 디오믹스-754 | 세타™ 470 |
| CF™620R | 디오믹스-776 | 세타™ 555 |
| CF™633 | 디오믹스-777 | 세타™ 632 |
| CF™633-V1 | 디오믹스-778 | 세타™ 633 |
| CF™640R | 디오믹스-780 | 세타™ 650 |
| CF™640R-V1 | 디오믹스-781 | 세타™ 660 |
| CF™640R-V2 | 디오믹스-782 | 세타™ 670 |
| CF™660C | 디오믹스-800 | 세타™ 680 |
| CF™660R | 디오믹스-831 | 세타™ 700 |
| CF™680 | 딜라이트® 350 | 세타™ 750 |
| CF™680R | 딜라이트® 405 | 세타™ 780 |
| CF™680R-V1 | 딜라이트® 415-Co1 | 세타™ APC-780 |
| CF™750 | 딜라이트® 425Q | 세타™ PerCP-680 |
| CF™770 | 딜라이트® 485-LS | 세타™ R-PE-670 |
| CF™790 | 딜라이트® 488 | 세타™646 |
| 크로메오™ 642 | 딜라이트® 504Q | 세타™u 380 |
| 크로미스 425N | 딜라이트® 510-LS | 세타™u 425 |
| 크로미스 500N | 딜라이트® 515-LS | 세타™u 647 |
| 크로미스 515N | 딜라이트® 521-LS | 세타™u 405 |
| 크로미스 530N | 딜라이트® 530-R2 | 술포로다민 101 |
| 크로미스 550A | 딜라이트® 543Q | TAMRA |
| 크로미스 550C | 딜라이트® 550 | TET |
| 크로미스 550Z | 딜라이트® 554-R0 | 텍사스 레드® |
| 크로미스 560N | 딜라이트® 554-R1 | TMR |
| 크로미스 570N | 딜라이트® 590-R2 | TRITC |
| 크로미스 577N | 딜라이트® 594 | 야키마 옐로우™ |
| 크로미스 600N | 딜라이트® 610-B1 | 제논® |
| 크로미스 630N | 딜라이트® 615-B2 | Zy3 |
| 크로미스 645A | 딜라이트® 633 | Zy5 |
| 크로미스 645C | 딜라이트® 633-B1 | Zy5.5 |
| 크로미스 645Z | 딜라이트® 633-B2 | Zy7 |
| 크로미스 678A | 딜라이트® 650 | 아베리어®® 스타 635 |
| 스퀘어 635 | 스퀘어 650 | 스퀘어 660 |
| 스퀘어 672 | 스퀘어 680 | 아베리어® 스타 440SXP |
| 아베리어® 스타 470SXP | 아베리어® 스타 488 | 아베리어® 스타 512 |

[0167]

| 형광단 | | |
|---|---|---|
| 아베리어® 스타 520SXP | 아베리어® 스타 580 | 아베리어® 스타 600 |
| 아베리어® 스타 635 | 아베리어® 스타 635P | 아베리어® 스타 레드 |

[0168] 염료는 또한 최대 흡광도의 파장 또는 방출된 발광에 기초하여 분류될 수 있다. 표 4는 최대 흡광도의 대략적인 파장에 따라 열로 그룹화한 예시적인 형광단을 제공한다. 표 4에 열거된 염료는 비-제한적이고, 본 출원의 발광 표지는 표 4에 열거되지 않은 염료를 포함할 수 있다. 정확한 최대 흡광도 또는 방출 파장은 표시된 스펙트럼 범위에 상응하지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 4에 열거된 "적색" 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 4에 열거된 "녹색" 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 4에 열거된 "황색/오렌지색" 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 모두 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 또는 "녹색" 그룹 중 하나로부터 선택되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 3종이 표 4에 열거된 "적색", "황색/오

렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제1 그룹으로부터 선택되고, 제4가 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제2 그룹으로부터 선택되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 2종이 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제1로부터 선택되고, 제3 및 제4가 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제2 그룹으로부터 선택되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 2종이 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제1로부터 선택되고, 제3이 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제2 그룹으로부터 선택되고, 제4가 표 4에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제3 그룹으로부터 선택되도록 선택된다.

[0169] 표 4. 스펙트럼 범위에 의한 형광단의 예

| "녹색" 520-570 nm | "황색/오렌지색" 570-620 nm | "적색" 620-670 nm |
|---|---|---|
| 5/6-카르복시로다민 6G | 알렉사 플루오르® 594 | 알렉사 플루오르® 633 |
| 6-TAMRA | 알렉사 플루오르® 610-X | 알렉사 플루오르® 647 |
| 알렉사 플루오르® 532 | ATTO 590 | 알렉사 플루오르® 660 |
| 알렉사 플루오르® 546 | ATTO 610 | ATTO 633 |
| 알렉사 플루오르® 555 | ATTO 620 | ATTO 647 |
| 알렉사 플루오르® 568 | 바디피® 576/589 | ATTO 647N |
| ATTO 520 | 바디피® 581/591 | ATTO 655 |
| ATTO 532 | CF™594 | ATTO 665 |
| ATTO 542 | CF™620R | ATTO 680 |
| ATTO 550 | 크로미스 570N | ATTO Rho14 |
| ATTO 565 | 크로미스 577N | 바디피® 630/650 |
| 바디피® 530/550 | 크로미스 600N | 바디피® 650/665 |
| 바디피® 558/568 | 디오믹스-590 | CAL 플루오르® 레드 635 |
| 바디피® 564/570 | 디오믹스-591 | CF™ 633-V1 |
| CF™514 | 디오믹스-594 | CF™ 640R-V1 |
| CF™532 | 디오믹스-601XL | CF™633 |
| CF™543 | 디오믹스-605 | CF™640R |
| CF™546 | 디오믹스-610 | CF™640R-V2 |
| CF™555 | 디오믹스-615 | CF™660C |
| CF™568 | 딜라이트® 590-R2 | CF™660R |
| 크로미스 530N | 딜라이트® 594 | CF™680 |
| 크로미스 550A | 딜라이트® 610-B1 | CF™680R |
| 크로미스 550C | 딜라이트® 615-B2 | CF™680R-V1 |
| 크로미스 550Z | 하이라이트™ 플루오르 594 | 크로메오™ 642 |
| 크로미스 560N | 라이트사이클러®® 레드 610 | 크로미스 630N |
| Cy®3 | PF594 | 크로미스 645A |
| Cy®3.5 | PF594 | 크로미스 645A |
| Cy®3B | PF610 | 크로미스 645C |
| 디오믹스-530 | 퀘사르® 570 | 크로미스 645Z |
| 디오믹스-547 | 아베리어® 스타 580 | Cy®5 |
| 디오믹스-547P1 | 아베리어® 스타 600 | Cy®5.5 |
| 디오믹스-548 | | 디오믹스-630 |
| 디오믹스-549P1 | | 디오믹스-631 |
| 디오믹스-550 | | 디오믹스-632 |
| 디오믹스-554 | | 디오믹스-633 |
| 디오믹스-555 | | 디오믹스-634 |
| 디오믹스-556 | | 디오믹스-635 |
| 디오믹스-560 | | 디오믹스-636 |

[0170]

| “녹색” 520-570 nm | “황색/오렌지색” 570-620 nm | “적색” 620-670 nm |
|---|---|---|
| 딜라이트® 521-LS | | 디오믹스-647 |
| 딜라이트® 530-R2 | | 디오믹스-647P1 |
| 딜라이트® 543Q | | 디오믹스-648 |
| 딜라이트® 550 | | 디오믹스-648P1 |
| 딜라이트® 554-R0 | | 디오믹스-649 |
| 딜라이트® 554-R1 | | 디오믹스-649P1 |
| 하이라이트™ 플루오르 532 | | 디오믹스-650 |
| 하이라이트™ 플루오르 555 | | 디오믹스-651 |
| PF532 | | 디오믹스-652 |
| PF546 | | 디오믹스-654 |
| PF555P | | 딜라이트® 633 |
| PF568 | | 딜라이트® 633-B1 |
| 세타™ 555 | | 딜라이트® 633-B2 |
| 아베리어® 스타 520SXP | | 딜라이트® 650 |
| | | 딜라이트® 655-B1 |
| | | 딜라이트® 655-B2 |
| | | 딜라이트® 655-B3 |
| | | 딜라이트® 655-B4 |
| | | 딜라이트® 662Q |
| | | 딜라이트® 680 |
| | | 딜라이트® 683Q |
| | | 하이라이트™ 플루오르 647 |
| | | 하이라이트™ 플루오르 680 |
| | | 라이트사이클러®® 640R |
| | | 라이트사이클러®레드640 |
| | | 라이트사이클러®레드670 |
| | | PF633P |
| | | PF647P |
| | | 퀘사르® 670 |
| | | 세타™ 632 |
| | | 세타™ 633 |
| | | 세타™ 650 |
| | | 세타™ 660 |
| | | 세타™ 670 |
| | | 세타™타우 647 |
| | | 스퀘어 635 |
| | | 스퀘어 650 |
| | | 스퀘어 660 |
| | | 아베리어® 스타 635 |
| | | 아베리어® 스타 635P |
| | | 아베리어® 스타 레드 |

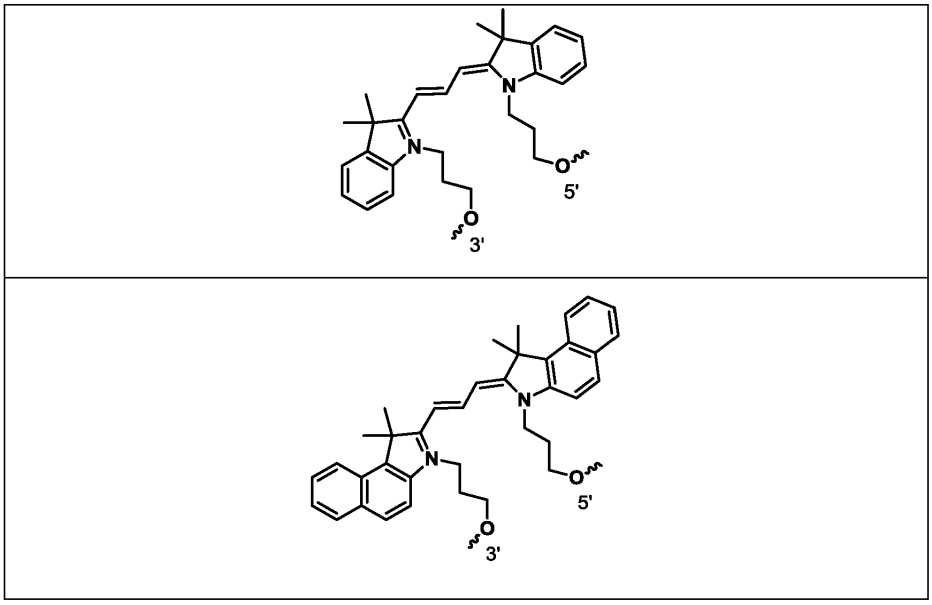
[0171]

[0172] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 제1 및 제2 발색단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 발색단의 여기 상태는 에너지 전달을 통해 제2 발색단으로 완화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 에너지 전달은 포스터 공명 에너지 전달 (FRET)이다. 이러한 FRET 쌍은 표지가 복수의 발광 표지로부터 보다 용이하게 차별화되게 하는 특성을 갖는 발광 표지를 제공하는데 유용할 수 있다. 특정 실시양태에서, FRET 쌍은 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수할 수 있고, 제2 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출할 수 있다.

[0173] 일부 실시양태에서, 발광 표지는 본원에 기재된 링커 분자 내에 부착된다 (예를 들어, 올리고머 또는 중합체 링커 내로 통합됨). 표 5는 올리고뉴클레오티드 가닥과 관련하여 이러한 접합 전략과 상용가능한 형광단의 여러 예를 제공한다. 제시된 바와 같이, 표 5의 시아닌-기반 형광단은 형광단 그 자체가 올리고뉴클레오티드 가닥 내에서 공유 연결의 일부를 형성하도록 제1 가닥 부분의 3' 단부 및 제2 가닥 부분의 5' 단부에 접합된다 (예를 들어, 발광 표지는 스페이서를 사용하지 않고 부착됨). 일부 실시양태에서, 이들 및 유사한 유형의 형광단이 임의의 부류의 올리고머 또는 중합체 구조 내에 부착될 수 있음이 인지될 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 형광단은 제1 펩티드 부분의 C-말단 단부 및 제2 펩티드 부분의 N-말단 단부에의 접합을 통해 펩티드 내에 부착된다. 일부 실시양태에서, 단일 링커 분자는 링커 내에 부착된 2개 이상의 형광단 (예를 들어, 단일 링커

내에 부착된 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 6개 초과의 염료)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 링커 내에 부착된 1개 이상의 형광단 및 스페이서를 통해 부착된 1개 이상의 형광단을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 밝게 표지된 반응물은 링커 내에 스페이서 없이 부착된 1개 이상 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 6개 초과)의 형광단, 및 스페이서를 통해 링커에 부착된 1개 이상 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 6개 초과)의 형광단을 포함한다.

[0174] 표 5. 링커 내에의 부착을 위한 형광단의 예

| |
|---|
|  |



[0175]

[0176] 발광 표지된 분자 (예를 들어, 발광 표지된 뉴클레오티드)의 세트의 경우에, 발광 표지된 FRET 쌍의 특성은 복수의 구별가능한 분자 (예를 들어, 뉴클레오티드)의 선택을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 발광 수명을 갖는다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 발광 강도를 갖는다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 발광 수명 및 발광 강도를 갖는다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제1 발색단은 복수의 발광 표지된 분자와 별개의 발광 수명을 갖는다. 특정 실시양태에서, FRET 쌍은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수할 수 있다. 특정 실시양태에서, FRET 쌍은 복수의 다른 발광 표지된 분자 중 1종 이상과 동일한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수할 수 있다.

[0177] 서열분석 반응을 위해, 밝게 표지된 반응물의 특정 조합이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 1개는 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 1개는 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 2개는 각각 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 2개는 각각 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 3개는 각각 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 3개는 각각 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 4개는 각각 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 적어도 4개는 각각 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 3개는 각각 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 제4의 밝게 표지된 반응물은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 2개는 각각 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 제3, 및 임의로 제4의 밝게 표지된 반응물은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 밝게 표지된 반응물 중 3개는 각각 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 제3, 및 임의로 제4의 밝게 표지된 반응물은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다.

[0178] 본원에 기재된 바와 같이, 발광 표지는 하나 이상의 광자를 흡수하고, 후속해서 하나 이상의 시간 기간 후에 하나 이상의 광자를 방출할 수 있는 분자이다. 분자의 발광은 발광 수명, 흡수 스펙트럼, 방출 스펙트럼, 발광

양자 수율 및 발광 강도를 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 파라미터에 의해 기재된다. 용어 흡수 및 여기는 본 출원 전반에서 상호교환가능하게 사용된다. 일부 실시양태에서, 용어 발광 및 방출은 상호교환가능하게 사용된다. 전형적 발광 분자는 다수의 파장의 광을 흡수할 수 있거나, 또는 그에 의해 여기를 겪을 수 있다. 특정 파장에서의 또는 특정 스펙트럼 범위 내에서의 여기가 발광 방출 이벤트에 의해 이완될 수 있는 한편, 특정의 다른 파장 또는 스펙트럼 범위에서의 여기는 발광 방출 이벤트에 의해 이완되지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 분자는 단일 파장에서의 또는 단일 스펙트럼 범위 내에서의 발광의 경우에만 적합하게 여기된다. 일부 실시양태에서, 발광 분자는 2 이상의 파장에서의 또는 2 이상의 스펙트럼 범위 내에서의 발광의 경우에 적합하게 여기된다. 일부 실시양태에서, 분자는 여기 광자 또는 흡수 스펙트럼의 파장을 측정함으로써 식별된다.

[0179] 발광 방출 이벤트로부터 방출되는 광자는 가능한 파장의 스펙트럼 범위 내에서의 파장에서 방출될 것이다. 전형적으로, 방출된 광자는 여기 광자의 파장과 비교하여 더 긴 파장을 갖는다 (예를 들어, 더 낮은 에너지를 갖거나 적색-시프트됨). 특정 실시양태에서, 분자는 방출된 광자의 파장을 측정함으로써 식별된다. 특정 실시양태에서, 분자는 복수의 방출된 광자의 파장을 측정함으로써 식별된다. 특정 실시양태에서, 분자는 방출 스펙트럼을 측정함으로써 식별된다.

[0180] 발광 수명은 여기 이벤트와 방출 이벤트 사이의 시간 기간을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발광 수명은 지수 붕괴 방정식의 상수로서 표현된다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지를 전달하는 하나 이상의 펄스 이벤트가 존재하는 경우에, 시간 기간은 펄스와 후속 방출 이벤트 사이의 시간이다.

[0181] 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 임의의 적합한 방법을 사용하여 (예를 들어, 적합한 기술을 사용하여 수명을 측정하는 것에 의해 또는 방출의 시간-의존성 특징을 결정하는 것에 의해) 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 하나 이상의 분자 (예를 들어, 서열분석 반응에서 상이하게 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트)와 관련하여 수명을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 참조물과 관련하여 수명을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 수명 (예를 들어, 형광 수명)을 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 수명을 나타내는 하나 이상의 시간적 특징을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 여기 펄스와 관련하여 하나 이상의 시간-게이팅 윈도우를 가로질러 발생한 복수의 방출 이벤트 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 그 초과의 방출 이벤트)의 분포에 기초하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 단일 분자의 발광 수명은 여기 펄스와 관련하여 측정된 광자 도달 시간의 분포에 기초하여 상이한 발광 수명을 갖는 복수의 분자와 구별될 수 있다.

[0182] 단일 분자의 발광 수명은 단일 분자가 여기 상태에 도달한 후에 방출된 광자의 타이밍을 나타내고, 단일 분자는 광자의 타이밍을 나타내는 정보에 의해 구별될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 일부 실시양태는 분자에 의해 방출된 광자와 연관된 시간을 측정함으로써 분자의 발광 수명에 기초하여 복수의 분자로부터 분자를 구별하는 것을 포함할 수 있다. 시간의 분포는 분포로부터 결정될 수 있는 발광 수명의 지표를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자는 시간의 분포에 기초하여, 예컨대 시간의 분포를 공지된 분자에 상응하는 참조 분포와 비교함으로써 복수의 분자로부터 구별가능하다. 일부 실시양태에서, 발광 수명에 대한 값은 시간의 분포로부터 결정된다.

[0183] 발광 양자 수율은 방출 이벤트로 이어지는 주어진 파장에서의 또는 주어진 스펙트럼 범위 내에서의 여기 이벤트의 분율을 지칭하며, 전형적으로 1 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자의 발광 양자 수율은 0 내지 약 0.001, 약 0.001 내지 약 0.01, 약 0.01 내지 약 0.1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.5 내지 0.9, 또는 약 0.9 내지 1이다. 일부 실시양태에서, 발광 양자 수율을 결정 또는 추정함으로써 분자가 식별된다.

[0184] 단일 분자에 대해 본원에 사용된 바와 같이, 발광 강도는 펄스 여기 에너지의 전달에 의해 여기되는 분자에 의해 방출된, 단위 시간당 방출된 광자의 수를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발광 강도는 펄스 여기 에너지의 전달에 의해 여기되는 분자에 의해 방출되고 특정한 센서 또는 센서의 세트에 의해 검출된, 단위 시간당 방출된 광자의 검출된 수를 지칭한다.

[0185] 발광 수명, 발광 양자 수율, 및 발광 강도는 상이한 조건 하에서 주어진 분자에 대해 각각 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자는 분자 집단과 상이한 관측 발광 수명, 발광 양자 수율, 또는 발광 강도를 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰 내에 국한된 분자는 샘플 웰에 국한되지 않은 분자와 상이한 관측 발광 수명, 발광 양자 수율 또는 발광 강도를 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 또 다른 분자에 부착된 발광 표지 또

는 발광 분자는 또 다른 분자에 부착되지 않은 발광 표지 또는 발광 분자와 상이한 발광 수명, 발광 양자 수율, 또는 발광 강도를 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 거대분자 복합체와 상호작용하는 분자는 거대분자 복합체와 상호작용하지 않는 분자와 상이한 발광 수명, 발광 양자 수율, 또는 발광 강도를 가질 것이다.

[0186] 특정 실시양태에서, 본 출원에 기재된 발광 분자는 하나의 광자를 흡수하고, 시간 기간 후에 하나의 광자를 방출한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 시간 기간을 측정함으로써 결정 또는 추정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 다수의 펄스 이벤트 및 방출 이벤트에 대해 복수의 시간 기간을 측정함으로써 결정 또는 추정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 시간 기간을 측정함으로써 복수의 유형의 분자의 발광 수명과 차별화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 다수의 펄스 이벤트 및 방출 이벤트에 대해 복수의 시간 기간을 측정함으로써 복수의 유형의 분자의 발광 수명과 차별화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 분자는 분자의 발광 수명을 결정 또는 추정함으로써 복수의 유형의 분자에서 식별 또는 차별화된다. 특정 실시양태에서, 분자는 분자의 발광 수명을 복수의 유형의 분자의 복수의 발광 수명과 차별화함으로써 복수의 유형의 분자에서 식별 또는 차별화된다.

[0187] 특정 실시양태에서, 발광 방출 이벤트는 형광이다. 특정 실시양태에서, 발광 방출 이벤트는 인광이다. 본원에 사용된 용어 발광은 형광 및 인광 둘 다를 포함한 모든 발광 이벤트를 포괄한다.

[0188] 서열분석

[0189] 본 출원의 일부 측면은 생물학적 중합체, 예컨대 핵산 및 단백질을 서열분석하는데 유용하다. 일부 측면에서, 본 출원에 기재된 조성물 및 기술은 (예를 들어, 일련의 표지된 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체의 혼입의 시간-경과를 검출하는 것에 의해) 핵산 또는 단백질에 혼입된 일련의 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물 및 기술을 사용하여, 폴리머라제 효소에 의해 합성된 주형-의존 핵산 서열분석 반응 생성물에 혼입된 일련의 뉴클레오티드를 식별할 수 있다.

[0190] 표적 핵산의 핵염기와 상보적 뉴클레오시드 폴리포스페이트 (예를 들어, dNTP) 사이의 염기 쌍형성 시, 폴리머라제는 새로이 합성되는 가닥의 3' 히드록실 말단과 dNTP의 알파 포스페이트 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성함으로써 새로이 합성되는 가닥으로 dNTP를 혼입시킨다. (예를 들어, 본 출원의 링커를 통해) dNTP에 접합된 발광 표지가 형광단인 예에서, 그의 존재는 여기에 의해 신호전달되고 방출의 펄스는 혼입 단계 동안 및/또는 그 후에 검출된다. 본 출원의 링커를 통해 dNTP의 말단 (감마) 포스페이트에 접합된 검출 표지 (예를 들어, 발광 표지)의 경우에, 새로이 합성되는 가닥에의 dNTP의 혼입은 베타 및 감마 포스페이트 및 샘플 웰에서 자유롭게 확산되는 검출 표지를 포함하는 링커의 방출을 발생시켜, 형광단으로부터 검출되는 방출의 감소를 발생시킨다.

[0191] 특정 실시양태에서, 주형-의존 핵산 서열분석 반응 생성물은 자연 발생 핵산 폴리머라제에 의해 이루어지는 서열분석 반응에서 합성된다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 자연 발생 폴리머라제의 돌연변이체 또는 변형된 변이체이다. 일부 실시양태에서, 주형-의존 핵산 서열분석 생성물은 주형 핵산 가닥에 상보적인 하나 이상의 뉴클레오티드 절편을 포함할 것이다. 한 측면에서, 본 출원은 주형 (또는 표적) 핵산 가닥의 상보적 핵산 가닥의 서열을 결정함으로써 그의 서열을 결정하는 방법을 제공한다.

[0192] 본원에 사용된 용어 "폴리머라제"는 일반적으로 중합 반응을 촉매할 수 있는 임의의 효소 (또는 중합 효소)를 지칭한다. 폴리머라제의 예는, 비제한적으로, 핵산 폴리머라제, 트랜스크립타제 또는 리가제를 포함한다. 폴리머라제는 중합 효소일 수 있다. 단일 분자 핵산 연장 (예를 들어, 핵산 서열분석의 경우)에 대한 실시양태는 표적 핵산 분자에 상보적인 핵산을 합성할 수 있는 임의의 폴리머라제를 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 리버스 트랜스크립타제, 및/또는 이들 중 하나 이상의 돌연변이체 또는 변경된 형태일 수 있다.

[0193] 폴리머라제의 예는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 열안정성 폴리머라제, 야생형 폴리머라제, 변형된 폴리머라제, 이. 콜라이(E. coli) DNA 폴리머라제 I, T7 DNA 폴리머라제, 박테리오파지 T4 DNA 폴리머라제 ϕ29 (phi29) DNA 폴리머라제, Taq 폴리머라제, Tth 폴리머라제, Tli 폴리머라제, Pfu 폴리머라제, Pwo 폴리머라제, 벤트(VENT) 폴리머라제, 딥벤트(DEEPVENT) 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, 플래티늄(Platinum) Taq 폴리머라제, Tbr 폴리머라제, Tfl 폴리머라제, Tth 폴리머라제, 푸투르보(Pfuturbo) 폴리머라제, 피로베스트(Pyrobest) 폴리머라제, Pwo 폴리머라제, KOD 폴리머라제, Bst 폴리머라제, Sac 폴리머라제, 클레나우 단편,

3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라제, 및 그의 변이체, 변형된 생성물 및 유도체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 단일 서브유닛 폴리머라제이다. DNA 폴리머라제의 비제한적 예 및 그의 특성은 특히 문헌 [DNA Replication 2nd edition, Kornberg and Baker, W. H. Freeman, New York, N.Y. (1991)]에 상세하게 기재되어 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 높은 진행성을 갖는 폴리머라제이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 감소된 진행성을 갖는 폴리머라제이다. 폴리머라제 진행성은 일반적으로 핵산 주형을 방출하지 않으면서 핵산 내로 dNTP를 연속적으로 혼입시킬 수 있는 폴리머라제의 능력을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 낮은 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성 및/또는 3'-5' 엑소뉴클레아제를 갖는 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 상응하는 야생형 폴리머라제에 비해 감소된 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성 및/또는 3'-5' 활성을 갖도록 (예를 들어, 아미노산 치환에 의해) 변형된다. 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 진행성을 갖는 폴리머라제는 뉴클레오티드 반복부 (예를 들어, 동일한 유형의 2개 이상의 순차적 염기)의 하나 이상의 스트레치를 함유하는 서열분석 주형에 대해 증가된 정확도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 비-표지된 핵산보다 표지된 뉴클레오티드에 대해 더 높은 친화도를 갖는 폴리머라제이다.

[0195] 또 다른 측면에서, 본 출원은 복수의 핵산 단편을 서열분석함으로써 표적 핵산을 서열분석하는 방법을 제공하며, 여기서 표적 핵산은 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 방법은 모 표적 핵산에 대한 서열 또는 부분 서열을 제공하기 위해 복수의 단편 서열을 조합하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조합하는 단계는 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어에 의해 수행된다. 본원에 기재된 방법은 전체 염색체 또는 게놈과 같은 관련된 표적 핵산의 세트가 서열분석되게 할 수 있다.

[0196] 서열분석 동안, 중합 효소는 표적 핵산 분자의 프라이밍 위치에 커플링 (예를 들어, 부착)할 수 있다. 프라이밍 위치는 표적 핵산 분자의 일부와 상보적인 프라이머일 수 있다. 대안으로서 프라이밍 위치는 표적 핵산 분자의 이중 가닥 절편 내에 제공되는 갭 또는 닉이다. 갭 또는 닉은 길이가 0 내지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개 뉴클레오티드일 수 있다. 닉은 이중 가닥 서열 중 하나의 가닥에 절단점을 제공할 수 있고, 이는 예를 들어 가닥 치환 폴리머라제 효소와 같은, 중합 효소에 대한 프라이밍 위치를 제공할 수 있다.

[0197] 일부 경우에, 서열분석 프라이머는 표적 핵산 분자에 어닐링될 수 있고, 이는 고체 지지체에 고정될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 고체 지지체는, 예를 들어, 핵산 서열분석에 사용되는 칩 상의 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구, 반응 챔버)을 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 (예를 들어, 나노개구, 반응 챔버) 내의 어떠한 성분도 고체 지지체에 고정되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 폴리머라제, 표적 핵산, 및 프라이머를 포함하는 복합체는 용액 중에 형성되고, 복합체는 고체 지지체에 고정되지 않는다.

[0198] 적절한 조건 하에서, 어닐링된 프라이머/표적 핵산에 접촉된 폴리머라제 효소는 프라이머에 하나 이상의 뉴클레오티드를 부가 또는 혼입시킬 수 있고, 뉴클레오티드는 프라이머에 5'에서 3' 주형-의존 방식으로 부가될 수 있다. (예를 들어, 폴리머라제의 작용을 통한) 프라이머에의 뉴클레오티드의 이러한 혼입은 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 표지와 회합될 수 있고, 연장되는 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 결정하는데 사용된다 (및 핵산 증폭은 서열분석을 위한 표적 주형을 제조하는데 필요하지 않음). 일부 실시양태에서, 복수

의 단일 분자 서열분석 반응은 본 출원의 측면에 따라 (예를 들어, 단일 칩 상에서) 병렬로 수행된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자 서열분석 반응은 단일 칩 상의 분리된 반응 챔버 (예를 들어, 나노개구, 샘플 웰)에서 각각 수행된다.

[0199] 실시양태는 높은 정확도 및 긴 판독 길이, 예컨대 적어도 약 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99%, 99.999%, 또는 99.9999%의 정확도, 및/또는 약 10 염기 쌍 (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 판독 길이로 단일 핵산 분자를 서열분석할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자 서열분석에 사용되는 표적 핵산 분자는, 샘플 웰의 하부 또는 측벽과 같은 고체 지지체에 고정되거나 부착된 서열분석 반응의 적어도 1종의 추가의 성분 (예를 들어, 폴리머라제, 예컨대 DNA 폴리머라제, 서열분석 프라이머)을 함유하는 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구)에 부가되거나 고정된 단일 가닥 표적 핵산 (예를 들어, 데옥시리보핵산 (DNA), DNA 유도체, 리보핵산 (RNA), RNA 유도체) 주형이다. 표적 핵산 분자 또는 폴리머라제는 샘플 벽, 예컨대 샘플 웰의 하부 또는 측벽에 직접 또는 링커를 통해 부착될 수 있다. 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구)은 또한 프라이머 연장 반응을 통한 핵산 합성에 필요한 임의의 다른 시약, 예컨대 예를 들어 적합한 완충제, 보조-인자, 효소 (예를 들어, 폴리머라제), 및 본 출원의 링커를 통해 dNTP에 연결될 수 있는 발광 표지, 예컨대 형광단을 포함하는 데옥시리보뉴클레오시드 폴리포스페이트, 예컨대, 예를 들어, 데옥시아데노신 트리포스페이트 (dATP), 데옥시시티딘 트리포스페이트 (dCTP), 데옥시구아노신 트리포스페이트 (dGTP), 데옥시우리딘 트리포스페이트 (dUTP) 및 데옥시티미딘 트리포스페이트 (dTTP) dNTP를 포함한 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 부류의 dNTP (예를 들어, 아데닌-함유 dNTP (예를 들어, dATP), 시토신-함유 dNTP (예를 들어, dCTP), 구아닌-함유 dNTP (예를 들어, dGTP), 우라실-함유 dNTP (예를 들어, dUTP) 및 티민-함유 dNTP (예를 들어, dTTP))는 표지로부터 방출된 광의 검출이 새로이 합성된 핵산에 혼입된 dNTP의 아이덴티티를 나타내도록 (예를 들어, 본 출원의 링커를 통해) 별개의 발광 표지에 접합된다. "별개의 발광 표지"는, 일부 경우에, 또 다른 dNTP와 상이한 발광 표지 (예를 들어, 상이한 형광단)를 포함하는 하나의 dNTP를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 별개의 발광 표지는 또 다른 dNTP와 동일하거나 유사한 발광 표지를 상이한 수로 포함하는 하나의 dNTP를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 별개의 발광 표지는 또 다른 dNTP와 검출가능하게 상이한 1개 이상의 발광 특성을 포함하는 하나의 dNTP를 지칭한다. 발광 표지로부터 방출된 광은 임의의 적합한 디바이스 및/또는 방법을 통해 검출될 수 있고, 그의 적절한 발광 표지 (및, 이에 따라 회합된 dNTP)에 기인할 수 있다. 발광 표지는 발광 표지의 존재가 새로이 합성되는 핵산 가닥으로의 dNTP의 혼입 또는 폴리머라제의 활성을 억제하지 않도록 하는 임의의 위치에서 (예를 들어, 본 출원의 링커를 통해) dNTP에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 dNTP의 말단 포스페이트 (예를 들어, 감마 포스페이트)에 (예를 들어, 본 출원의 링커를 통해) 접합된다.

[0200] 일부 실시양태에서, 단일-가닥 표적 핵산 주형을 서열분석 프라이머, dNTP, 폴리머라제 및 핵산 합성에 필요한 다른 시약과 접촉시킬 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 존재함). 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 주형과 상이한 dNTP와의 접촉 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.

[0201] 일부 실시양태에서, 서열분석 프라이머는 단일-가닥 표적 핵산 주형에 어닐링되고, 폴리머라제는 단일-가닥 표적 핵산 주형에 기초하여 dNTP (또는 다른 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 프라이머에 연속적으로 혼입시킨다. 각각의 혼입된 dNTP와 회합된 고유의 발광 표지는 dNTP의 프라이머에의 혼입 동안 또는 그 후에 적절한 여기 광에 의해 여기될 수 있고, 후속해서 그의 방출은 임의의 적합한 디바이스(들) 및/또는 방법(들)을 사용하여 검출될 수 있다. (예를 들어, 특정한 방출 수명, 강도, 스펙트럼 및/또는 그의 조합을 갖는) 광의 특정한 방출의 검출은 혼입된 특정한 dNTP에 기인할 수 있다. 이어서, 검출된 발광 표지의 수집으로부터 수득된 서열은 서열 상보성을 통해 단일-가닥 표적 핵산 주형의 서열을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0202] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 동시-계류 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, 15/600,979, 15/846,967, 15/847,001, 15/971,493, 62/289,019, 62/296,546, 62/310,398, 62/339,790, 62/343,997, 62/344,123, 및 62/426,144에 기재된 기술에 유리하게 사용

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

[0203] 키트

[0204] 또 다른 측면에서, 본 출원은 주형 핵산을 서열분석하기 위한 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 유형의 표지된 뉴클레오티드는 본 출원에 따른 링커를 통해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착된 2개 이상의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오티드는 도 3a-3c, 3e-3g, 4a-4c, 5a-5b, 6a-6c, 및 8-10에 도시된 표지된 뉴클레오티드로부터 선택된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오티드는 도 3g에 제시된 구조에 따라 설계된다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오티드는 도 3b (306), 도 3b (308) 및 도 5a (502)에 제시된 구조에 따라 설계된다. 일부 실시양태에서, 키트는 중합 효소 (예를 들어, 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 DNA 폴리머라제)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 서열분석되는 주형 핵산에 상보적인 프라이머를 추가로 포함한다.

[0205] 일부 측면에서, 본 출원은 본원에 기재된 밝게 표지된 반응물 중 1개 이상을 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열분석 반응에 첨가되는 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 중합 효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 효소는 고체 지지체 (예를 들어, 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 샘플 웰의 하부)에 고정되도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열분석될 주형 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 주형 핵산의 부분에 상보적인 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열분석 반응을 개시하는데 필요한 1종 이상의 성분 (예를 들어, 2가 금속 이온, 예컨대 마그네슘 또는 철)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열분석 반응을 안정화시키는데 필요한 1종 이상의 성분 (예를 들어, 1종 이상의 완충제, 1종 이상의 환원제 등)을 포함한다.

[0206] 실시예

[0207] 실시예 1: 핵산 링커를 사용한 염료 부착 전략

[0208] 다양한 차세대 서열분석 기술은 표지된 반응 성분을 구현한다. 예를 들어, 염료-표지된 뉴클레오티드는 각각의 염기 유형에 상응하는 고유한 발광 특성의 검출 또는 관찰에 기초하여 혼입 이벤트 동안 특정 염기 호출을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 이들 특성, 예컨대 수명 및 강도는 세트 중의 각각의 염기를 용이하게 식별가능하여야 한다. 표지된 뉴클레오티드의 형광 강도를 증진시키기 위한 초기 노력은 제2 염료 분자가 구축물에 부가될 때 염료-표지된 뉴클레오티드의 밝기가 증가되었음을 보여주었다. 그러나, 형광 수명은 단일-표지된 변이체에 비해 현저하게 감소되었다. 개선된 표지된 뉴클레오티드를 개발함에 있어서, 형광 염료를 뉴클레오티드에 연결시키기 위한 코어 구조로서 핵산을 조사하였다.

[0209] 다중-표지된 뉴클레오티드에서 변경된 형광 수명의 하나의 가능한 원인은 동일한 구축물의 염료 분자 사이의 상호작용의 정도이고, 이는 켄칭 효과를 초래할 수 있다. 이러한 가능성을 도 8에 제시된 염료-표지된 뉴클레오티드를 생성함으로써 추가로 연구하였다. 2개의 염료 분자 (딜라이트 530R2)를 핵산 링커를 통해 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결하였다. 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥을 표지된 올리고뉴클레오티드 가닥과 혼성화시켜 핵산 링커에 강성을 부여하였다. 핵산에 대한 염료 부착을 위해 C6-아미노-T 스페이서를 사용하여 제1 구축물(800)을 제조하고, 염료 부착을 위해 글리콜아민 스페이서를 사용하여 제2 구축물(802)을 제조하였다.

[0210] 제1 구축물의 분석은 대략 1.4 ns의 형광 수명을 나타낸 한편, 제2 구축물은 대략 3.5 ns의 수명을 나타내었다. 제2 구축물에 의한 수명에서의 측정된 증가는 제1 구축물과 비교하여 염료 부착을 위해 비교적 더 짧은 스페이서를 사용한 것에 기인하였다. 도 8에 제시된 바와 같이, 제1 구축물의 C6-아미노-T 스페이서는 제2 구축물의 글리콜아민 스페이서보다 더 긴 길이를 갖는다. 제2 구축물의 개선된 수명에 대한 하나의 가능한 설명은 단축된 스페이서 길이가 부착된 염료의 이동 범위가 중첩되는 정도를 제한함으로써 염료-염료 상호작용을 감소시킨다는 것이다.

[0211] 실시예 2: 증가된 링커 강성은 형광 수명을 연장시킨다

[0212] 스페이서 길이가 잠재적으로 염료의 공간상 중첩으로 인해 형광 수명에 영향을 미칠 수 있다는 관찰에 따라, 다중-표지된 분자 내의 염료의 대칭 배열이 유사한 효과를 가질 수 있을 것으로 생각되었다. Y-형상의 핵산 링커를 생성하였고, 도 9에 제시하였다. 초기 구축물은 제시된 분지형 링커를 통해 공유 부착된 3개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 가졌다. 2개의 가닥을 각각 염료 분자 (크로미스 530N)에 말단 부착시킨 반면, 제3 가닥은 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 말단 부착시켰다. 제3 가닥을 비표지된 가닥과 추가로 혼성화시켜 뉴클레오시드 폴리포스페이트와 표지된 영역 사이에 강성을 부여하였다. 제1 및 제2 가닥에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드

성분(902)과의 혼성화에 의해 이러한 구축물의 제2 버전을 생성하였다.

[0213] 초기 구축물의 분석은 대략 2.3 ns의 형광 수명을 나타낸 한편, 추가의 올리고뉴클레오티드 성분(902)을 갖는 구축물은 대략 4.2 ns의 수명을 나타내었다. 후자의 구축물에 의한 수명에서의 측정된 증가에 대한 하나의 가능한 설명은 올리고뉴클레오티드 성분(902)이 표지된 영역에서 강성을 부여한다는 것이다. 증가된 강성은 아마도 각각의 염료를 보다 제한된 이동 범위로 구속함으로써 염료 분리를 촉진할 수 있었을 것이다.

[0214] 실시예 3: 구속된 링커 구성에서 염료 스페이서 길이의 효과

[0215] 도 10에 제시된 트리스-염료 표지된 구축물을 생성함으로써 기하학적으로 구속된 링커 구성을 추가로 개발하였다. 제시된 바와 같이, 핵산 링커 부분은 3개의 주요 올리고뉴클레오티드 성분을 포함하였다. 제1 성분은 제시된 4-원 분지형 링커를 통해 공유 부착된 4개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하였다. 이들 가닥 중 3개를 각각 염료 분자 (AttoRho6G)에 말단 부착시킨 반면, 제4 가닥은 제2 올리고뉴클레오티드 성분과 혼성화시켰다. 제2 올리고뉴클레오티드 성분은 제시된 분지형 링커를 통해 2개의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 말단 부착시켰다. 제시된 분지형 링커를 통해 공유 부착된 3개의 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 성분을 제1 성분의 3개의 염료-표지된 가닥과 혼성화시켜 표지된 영역에 강성을 부여하였다. 도 10에 제시된 박스표시된 구역에 따라 상이한 스페이서 길이를 갖는 2개의 개별 트리스-염료 구축물을 생성하였다.

[0216] 보다 긴 스페이서를 갖는 제1 트리스-염료 표지된 뉴클레오티드 구축물 (도 10 참조, 박스표시된 구역, 상부)은 1-염료 표지된 뉴클레오티드 구축물에 비해 형광 강도에서 3배수를 나타내었다. 추가적으로, 동일한 염료 분자를 갖는 2-염료, 1개 뉴클레오티드 구축물과 비교할 경우 수명이 약간 감소되었음이 주목되었다 (제시되지 않음). 보다 짧은 스페이서를 갖는 제2 트리스-염료 표지된 뉴클레오티드 구축물 (도 10 참조, 박스표시된 구역, 하부)에 대해 수득된 측정치는 제1 트리스-염료 표지된 구축물에 비해 형광 수명에서 약간의 증가를 나타내었다.

[0217] 이전의 트리스-염료 표지된 뉴클레오티드는 서열분석 반응 동안 다수의 수명을 생성하였는데, 이는 2개의 염료가 상호작용하여 제1 수명을 생성한 한편 비-상호작용 염료는 제2 수명을 생성한 결과인 것으로 생각되었다. 중요한 것으로, 서열분석 반응 동안 도 10에 제시된 어느 하나의 트리스-염료 표지된 분자에 대해 단지 단일 수명만이 관찰되었다.

[0218] 등가물 및 범주

[0219] 여러 본 발명의 실시양태가 본원에 기재 및 예시되어 있지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 기능을 수행하고/거나 결과 및/또는 하나 이상의 이점을 수득하기 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 좌우될 것임을 용이하게 인지할 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용 실험을 사용하여, 본원에 기재된 구체적인 본 발명의 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 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.

[0220] 본원에서 정의되고 사용된 모든 정의는 사전적인 정의, 참조로 포함된 문헌의 정의, 및/또는 정의된 용어의 통상적인 의미보다 우선하는 것으로 이해되어야 한다.

[0221] 본원에 개시된 모든 참고문헌, 특허, 및 특허 출원은 각각 인용된 대상과 관련하여 참조로 포함되고, 일부 경우에 이는 그 문헌의 전체를 포괄할 수 있다.

[0222] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 단수 용어는 달리 명백하게 나타내지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0223] 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "및/또는"은 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 해석되어야 한다. 다른 요소는 구체적으로 식별되는 요소와의 관련 또는 비관련과 관계없이, "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.

[0224] 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 수 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 요소의 수 또는 목록 중 정확하게 한 요소를 포함하는 것으로 지칭될 것이다. 일반적으로, 본원에 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.

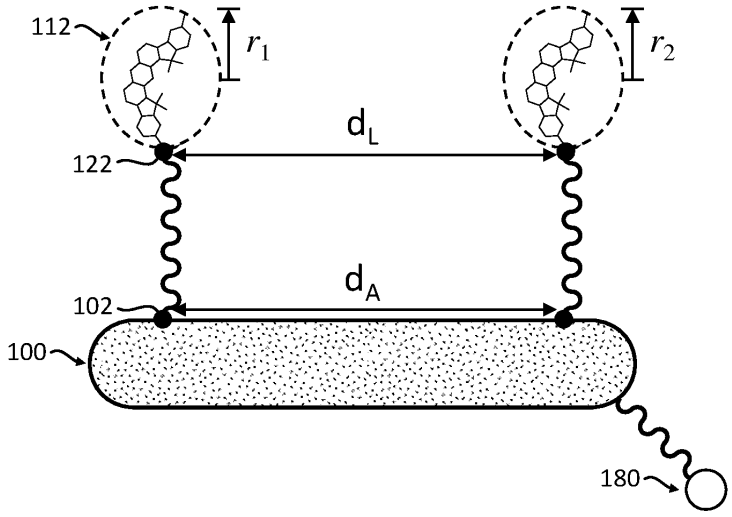
[0225] 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 명세서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "적어도 하나"는 요소의 목록에 있는 요소 중 어느 하나 이상으로부터 선택되는 적어도 하나의 요소를 의미하나, 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 및 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함하는 것은 아니며, 요소의 목록에서 요소의 임의의 조합을 배제하는 것이 아님이 이해되어야 한다. 이러한 정의는 또한 어구 "적어도 하나"가 언급하는 요소의 목록 내에서 구체적으로 식별된 요소 이외의 요소가 구체적으로 식별되는 그러한 요소와 관련되든 관련되지 않든 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.

[0226] 달리 명백하게 나타내지 않는 한, 하나 초과의 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.

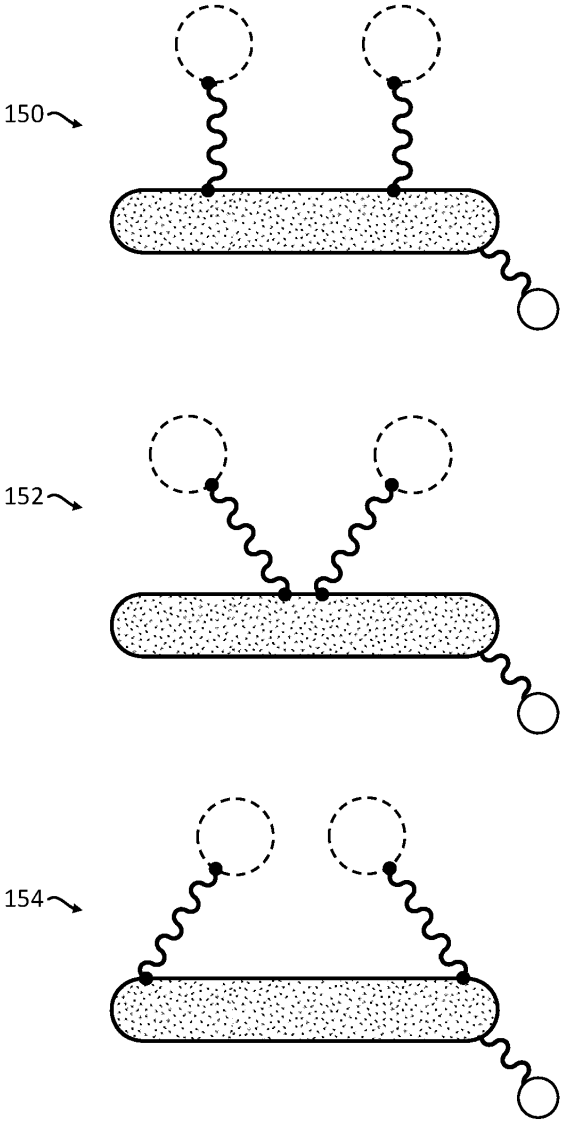
[0227] 상기 명세서뿐만 아니라 청구범위에서, 모든 연결 어구, 예컨대 "포함하는", "포함한", "보유하는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "유지하는", "로 구성된" 등은 개방형, 즉 포함하지만 이에 제한되지는 않는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 다만 연결 어구 "로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어진"은 문헌 [United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03]에 제시된 바와 같이, 각각 폐쇄형 또는 반-폐쇄형 연결 어구일 것이다. 개방형 연결 어구 (예를 들어, "포함하는")를 사용하여 이러한 문헌에 기재된 실시양태는 또한, 대안적 실시양태에서, 개방형 연결 어구에 의해 기재된 특색으"로 이루어진" 및 "로 본질적으로 이루어진" 것으로서 고려된다는 것이 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

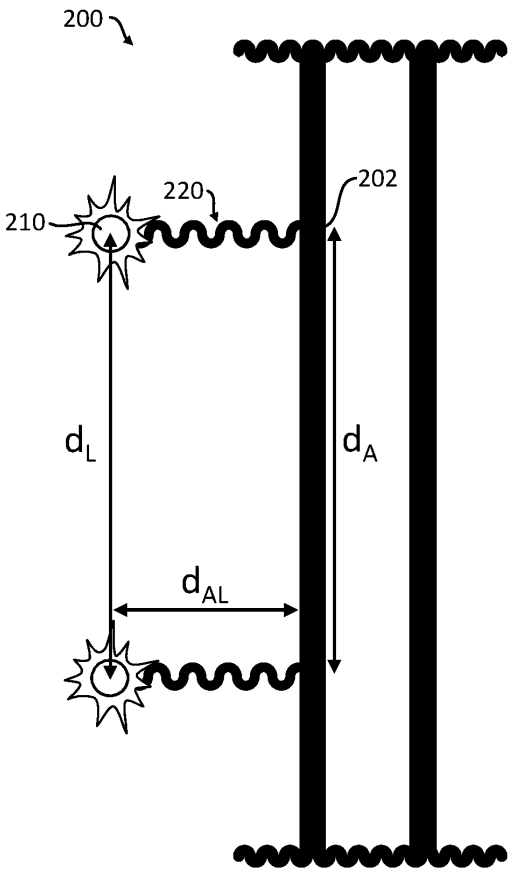
도면1a



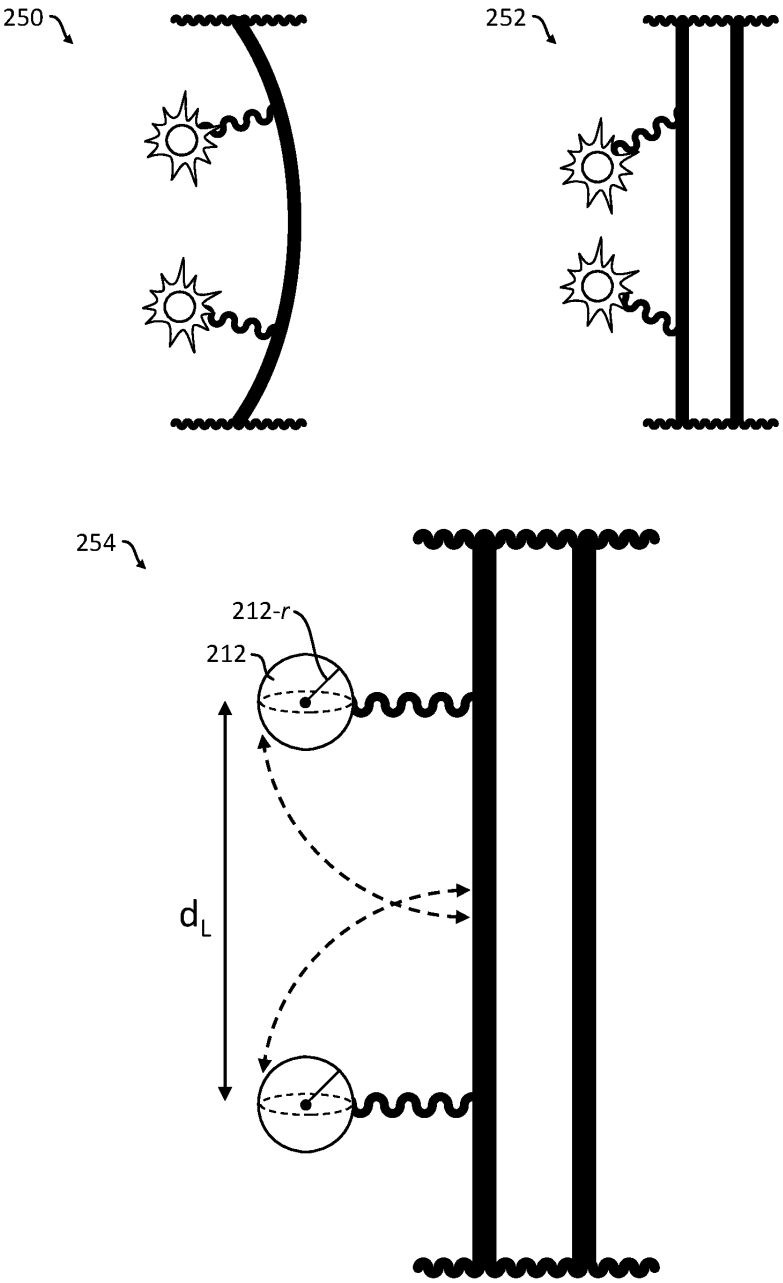
도면1b



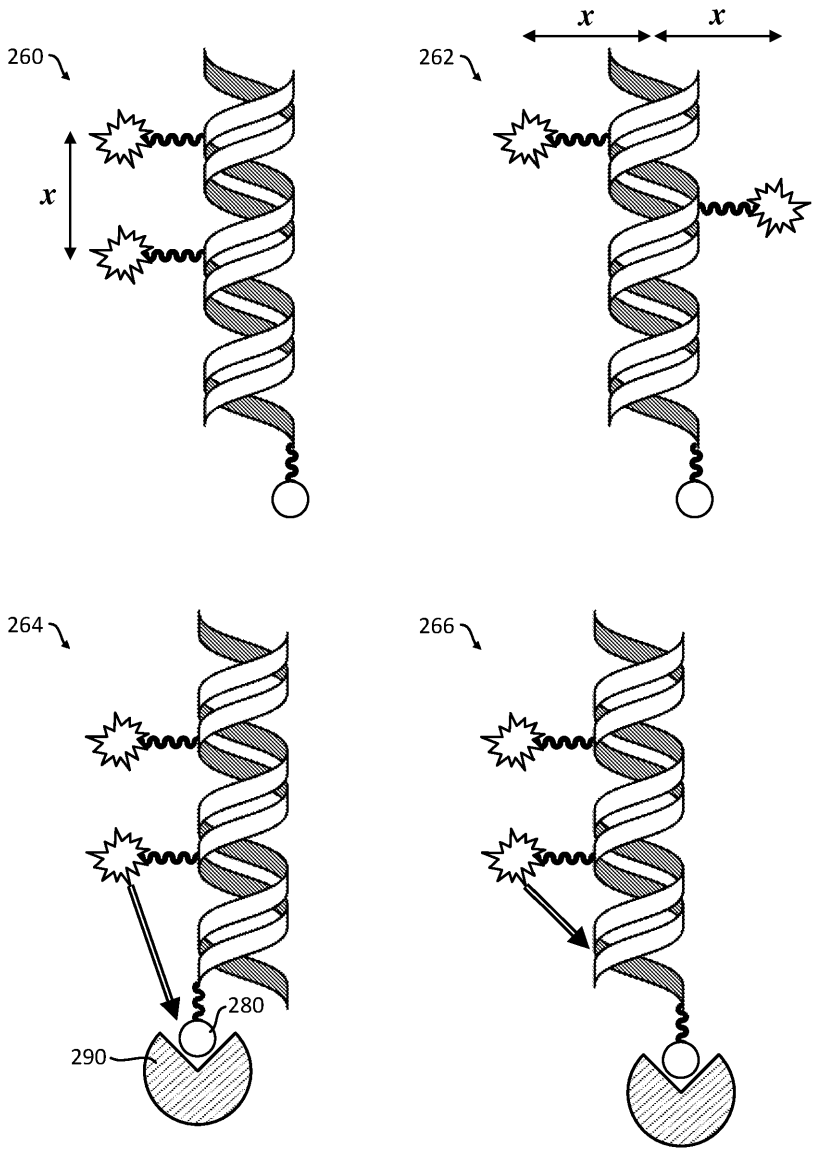
도면2a



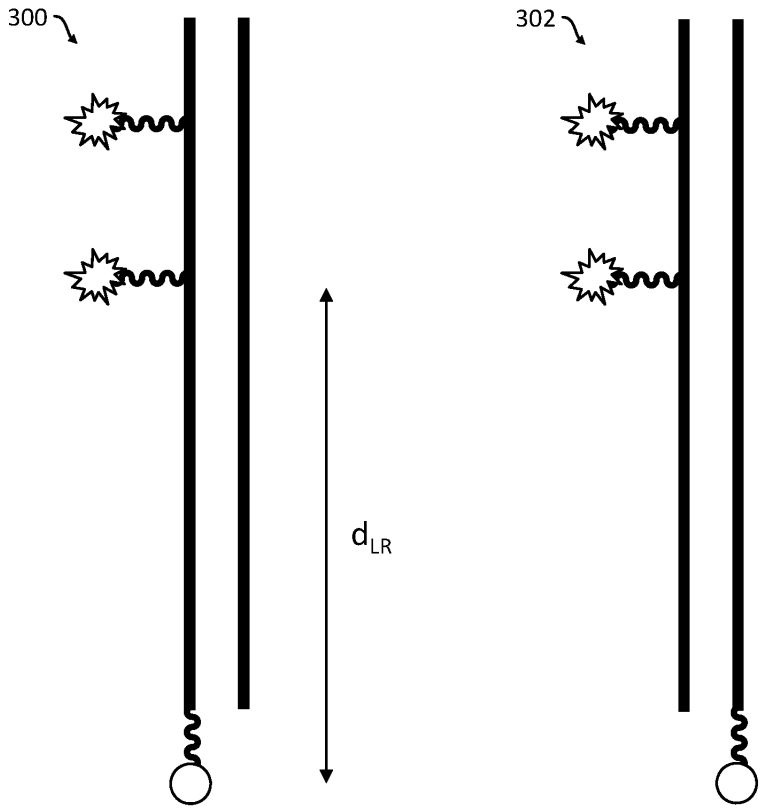
도면2b



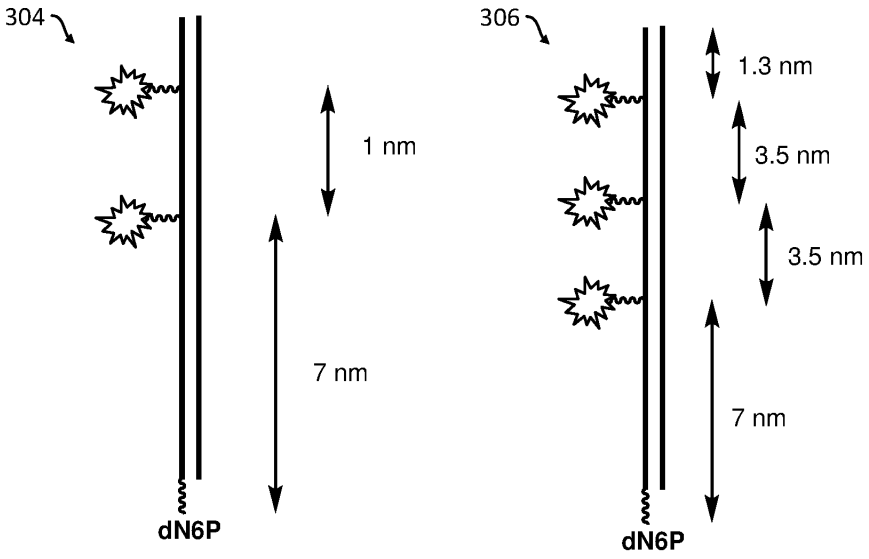
도면2c

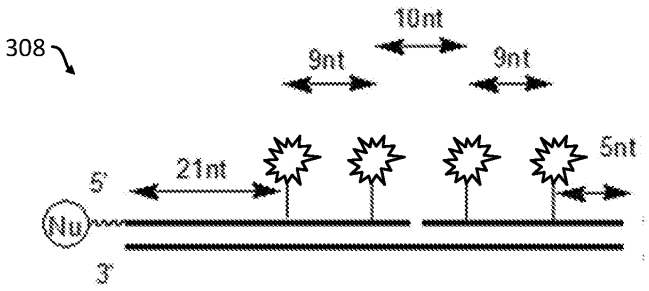


도면3a

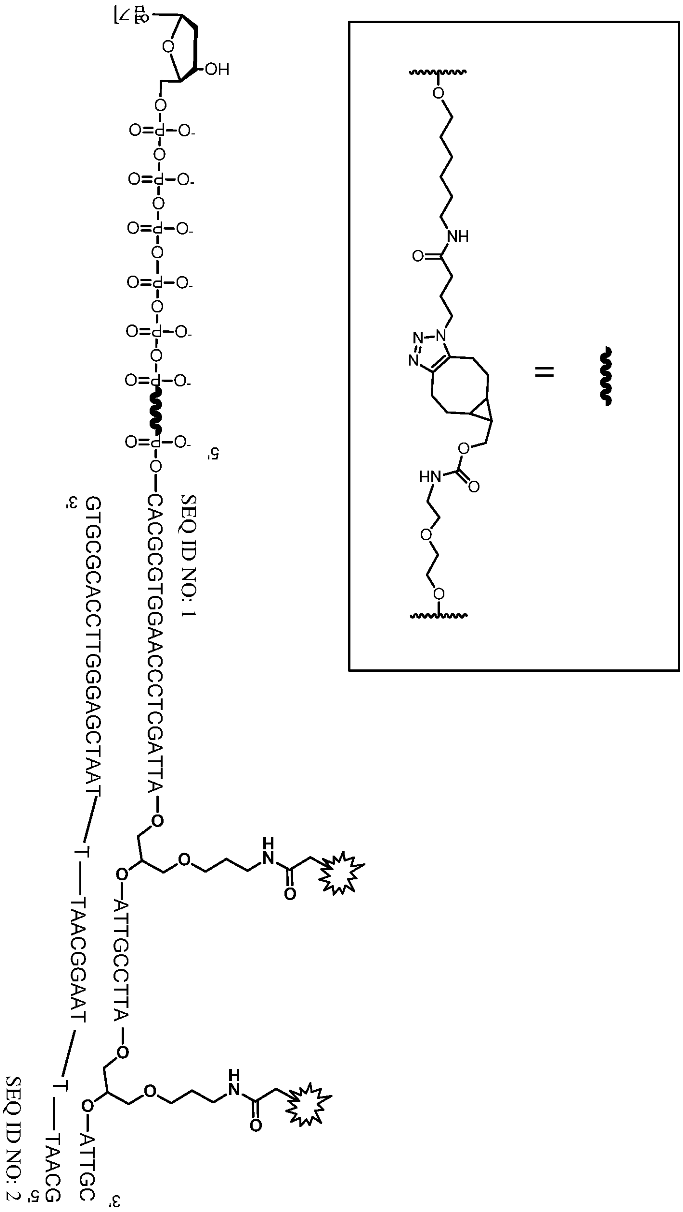


도면3b

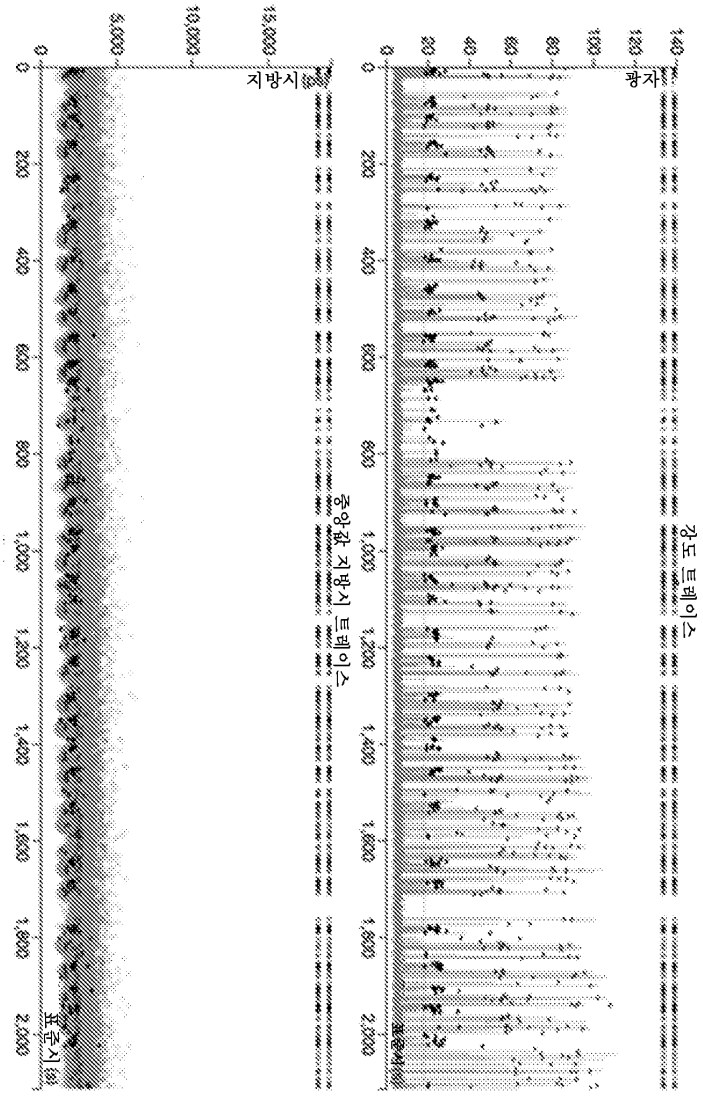

304
1 nm
7 nm
dN6P
306
1.3 nm
3.5 nm
3.5 nm
7 nm
dN6P


308
10nt
9nt
9nt
21nt
5nt
5'
Nu
3'

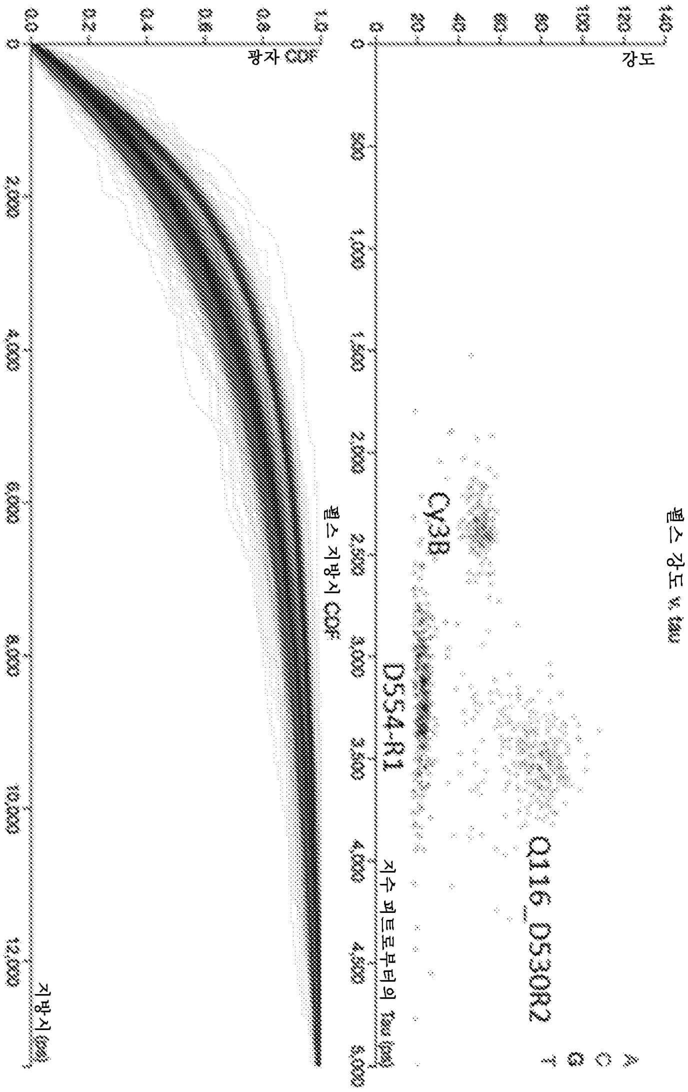
도면3c


SEQ ID NO: 1
CACGCGTGGAACCCTCGATTA
GTGCGCACCTTGGGAGCTAAT
ATTGCCTTA
TAACGGAAT
ATTGC
TAACG
SEQ ID NO: 2

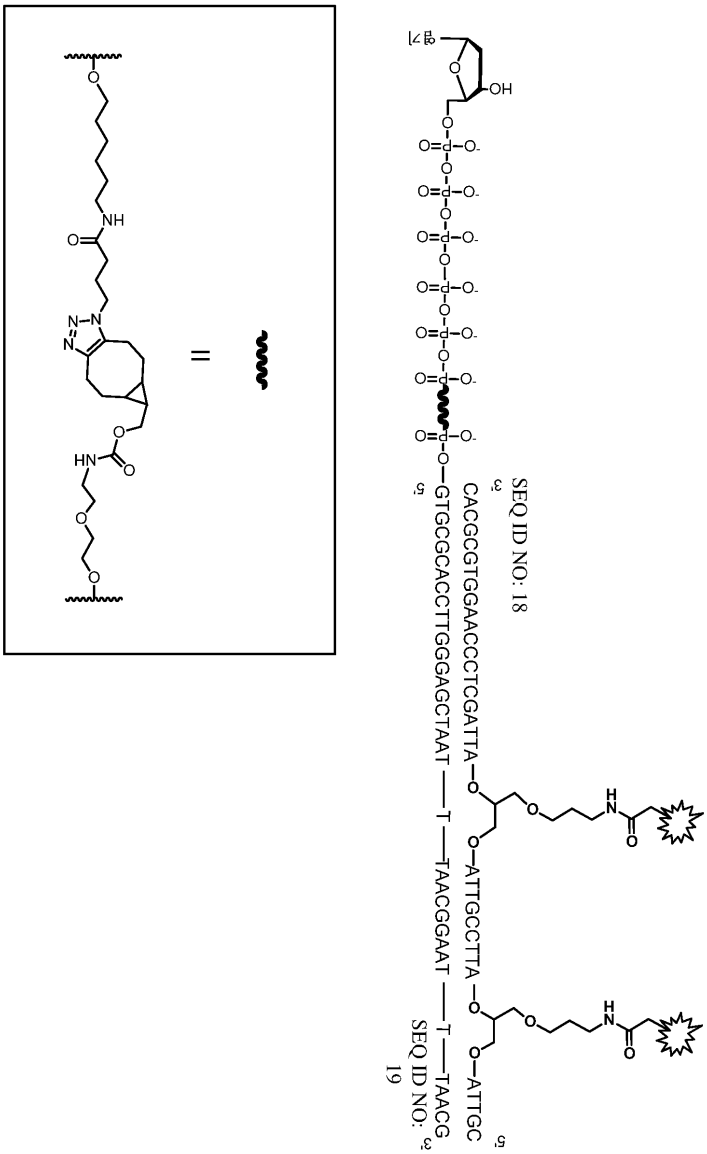
도면3da



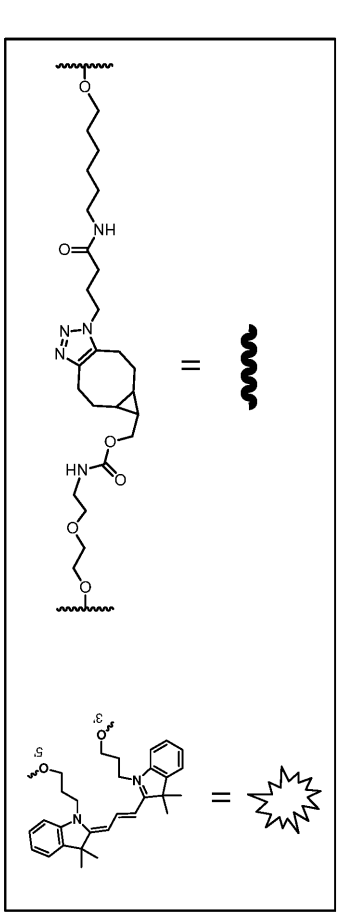
도면3db

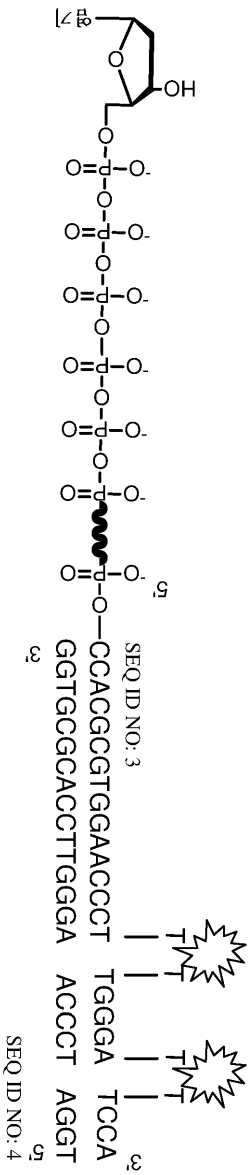

펄스 강도 v. tau
강도
지수 피트로부터의 Tau (ps)
Cy3B
D554-R1
Q116_D530R2
A
C
G
T
광자 CDF
펄스 지방시 CDF
지방시 (ps)

도면3e


SEQ ID NO: 18
3' CACGCGTGGAACCCTCGATTA
ATTGCCTTA
ATTGC 5'
5' GTGCGCACCTTGGGAGCTAAT
TAACGGAAT
TAACG 3'
SEQ ID NO: 19

도면3f




염기
OH
SEQ ID NO: 3
5'
CCACGCGTGGAACCCT
3'
GGTGCGCACCTTGGGA
SEQ ID NO: 4
5'
TGGGA TCCA
ACCCT AGGT
3'

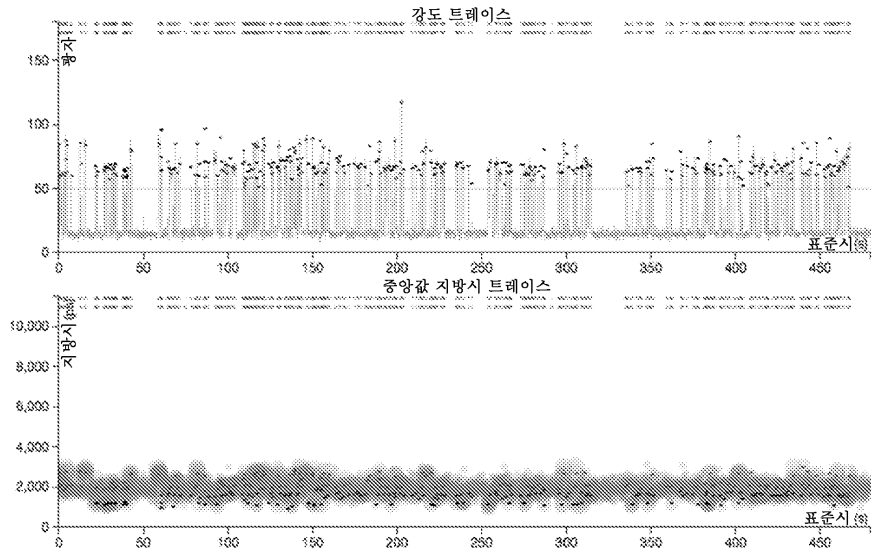
도면3ga

정렬 기준

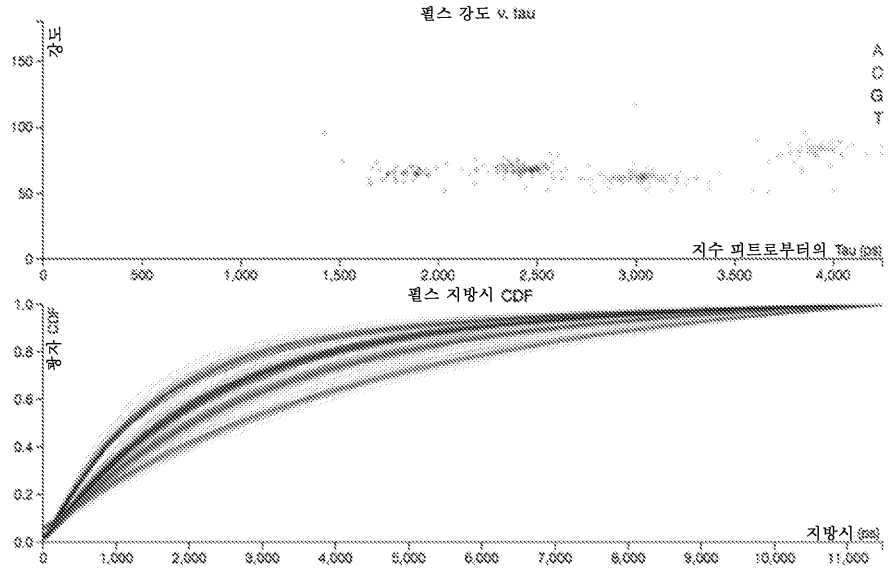
| 판독 길이 | 정확도 | p-값 |
|---|---|---|
| 354 | 86.4% | 1e-55 |

| 삽입 | # | 결실 | # |
|---|---|---|---|
| A | 2 | A | 6 |
| C | 8 | C | 9 |
| G | 0 | G | 4 |
| T | 2 | T | 8 |
| 총 | 12 | 총 | 27 |

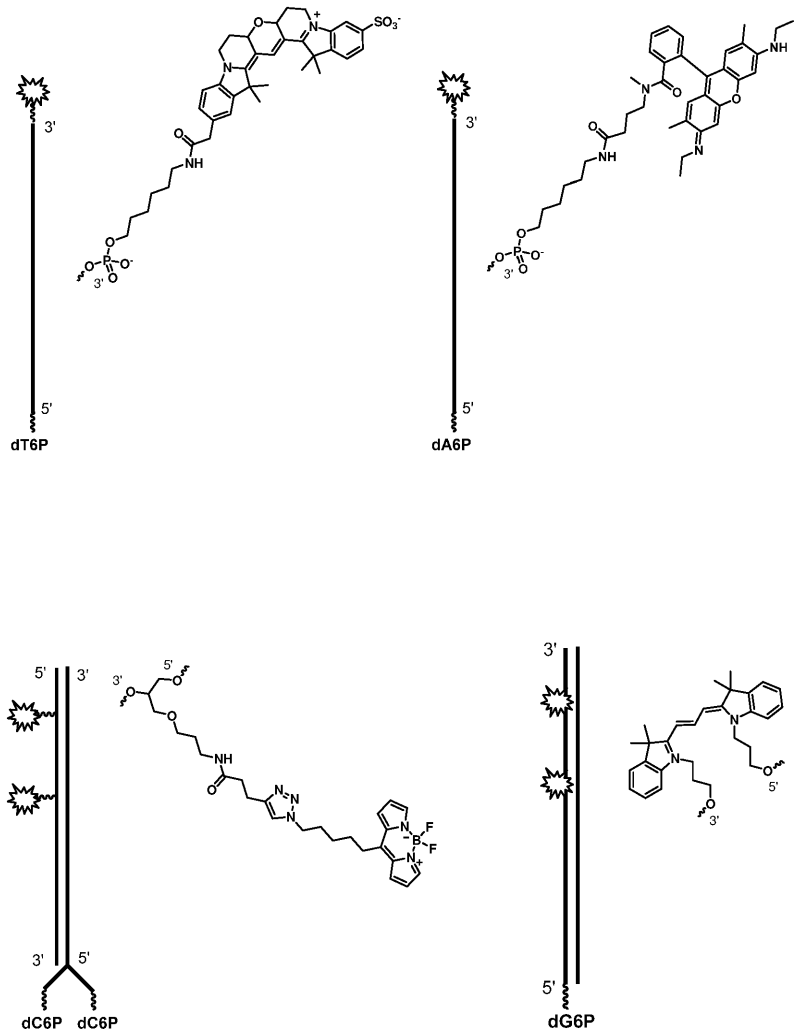
| 미스매치 | A | C | G | T | 총 |
|---|---|---|---|---|---|
| A | | 0 | 0 | 5 | 5 |
| C | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| G | 2 | 0 | | 1 | 3 |
| T | 2 | 0 | 1 | | 3 |
| 총 | 4 | 0 | 1 | 6 | 11 |



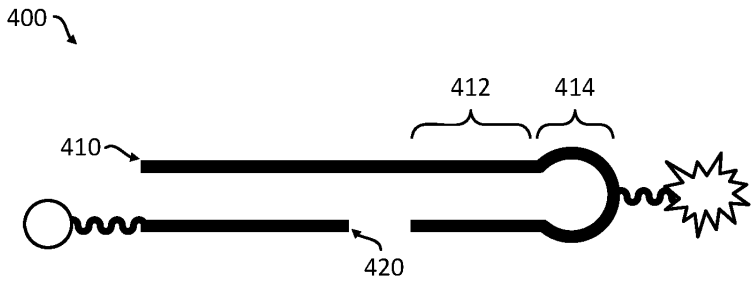

도면3gb

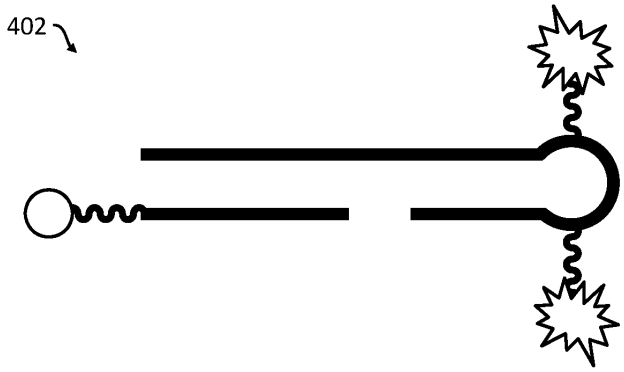


도면3gc

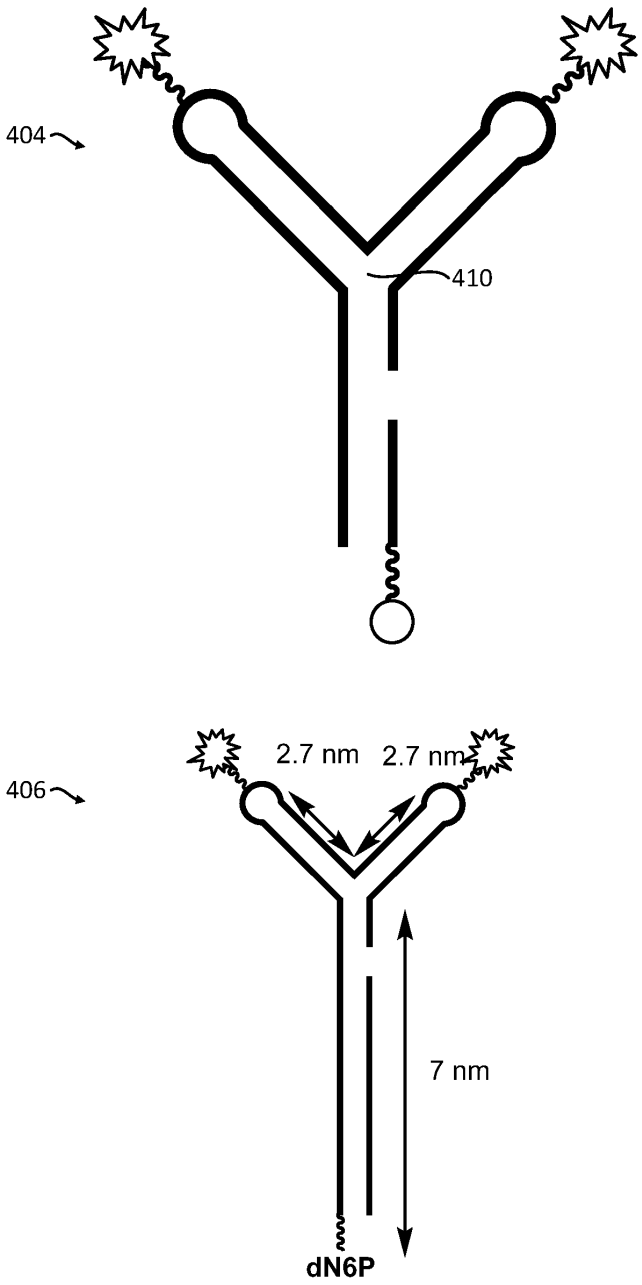


도면4a

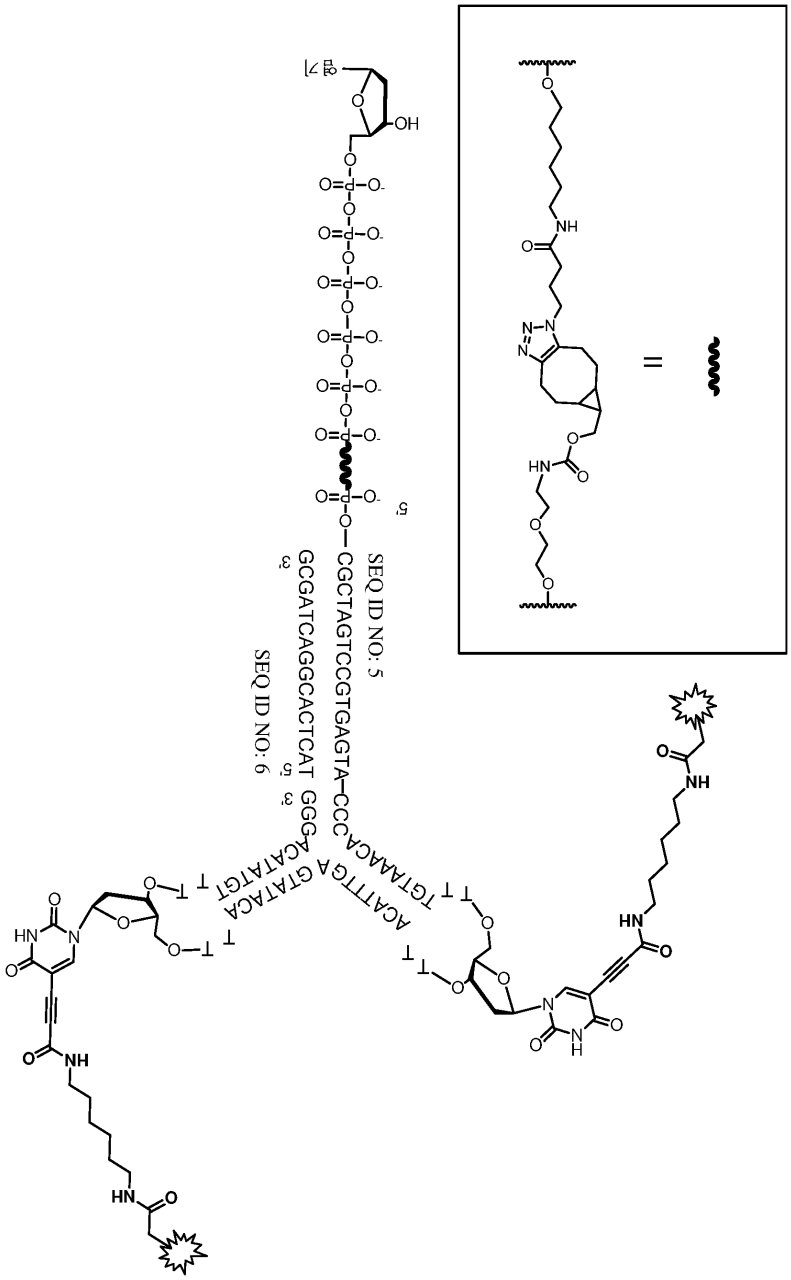


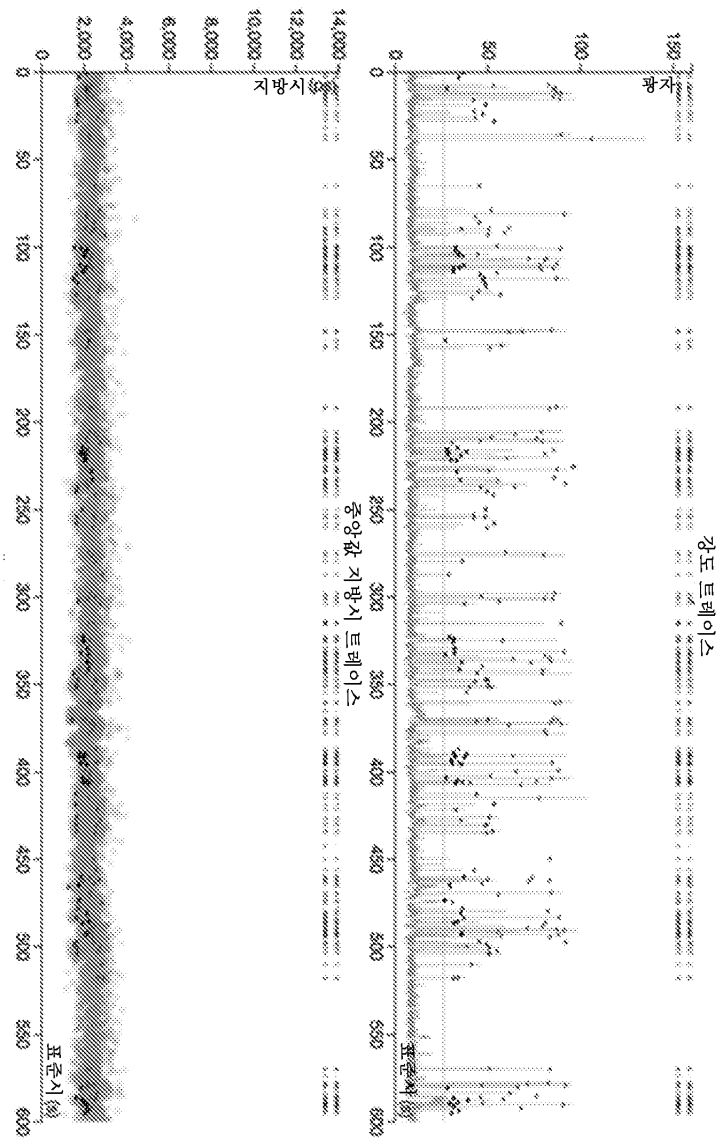
도면4b



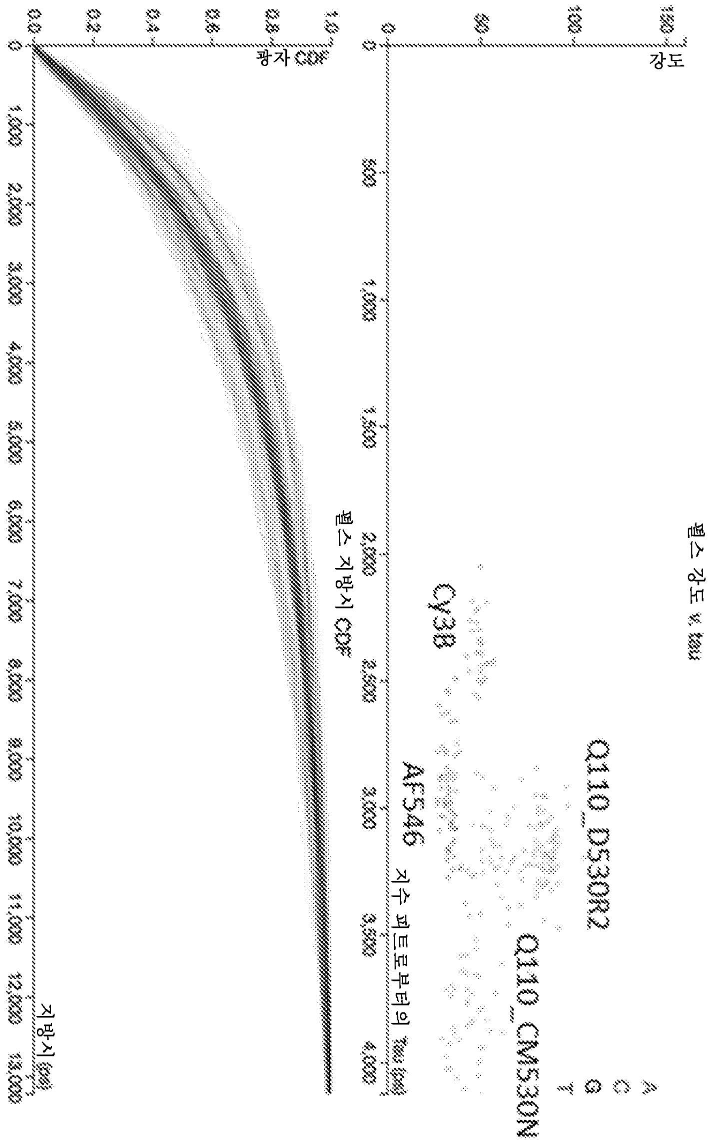
도면4c


염기
OH
5'
SEQ ID NO: 5
CGCTAGTCCGTGAGTA-CCC-ACATTGA GTATACA
3'
GCGATCAGGCACTCAT GGG-TGTAAACA
5'
SEQ ID NO: 6
3'
=
NH
HN
O
N
H

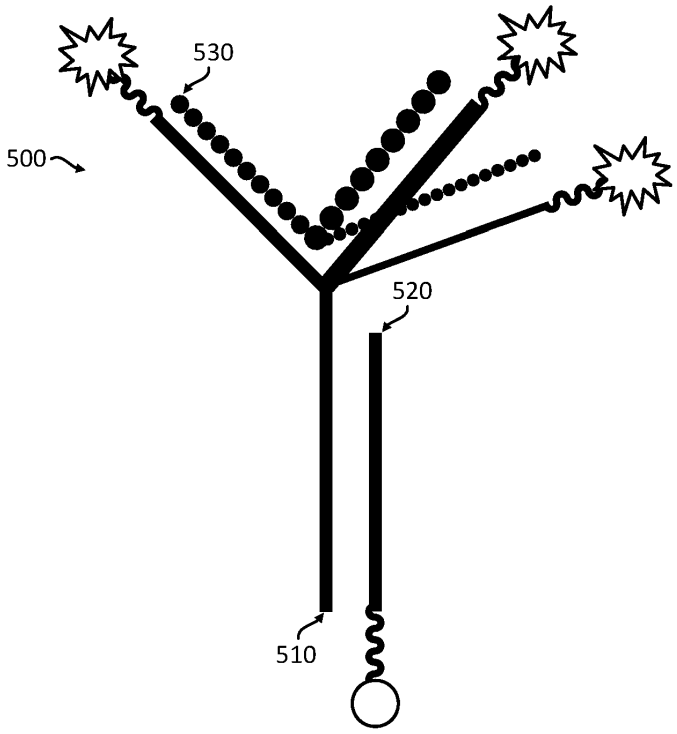
도면4da

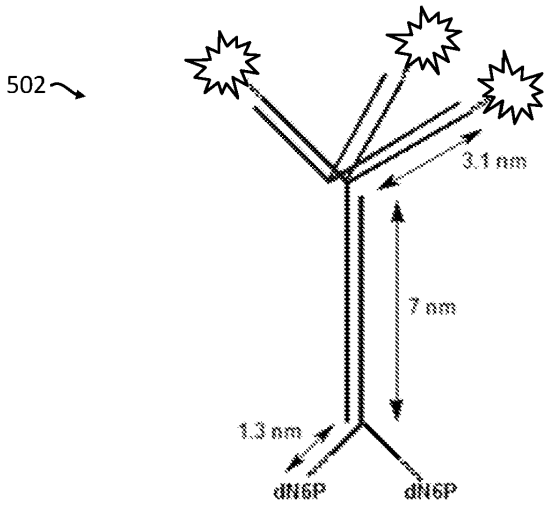


도면4db

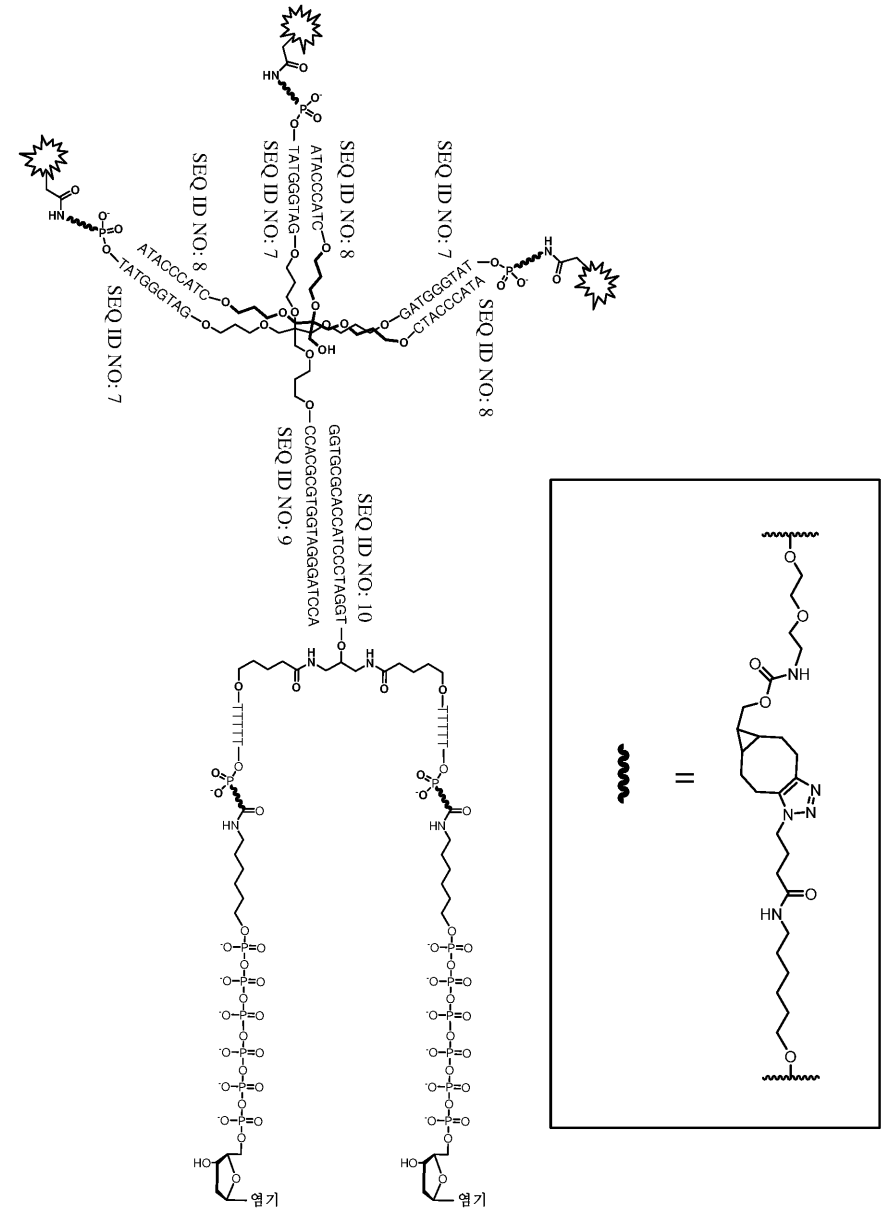

펄스 강도 v. tau
강도
Q110_D530R2
Q110_CM530N
Cy3B
AF546
A
C
G
T
지수 피트로부터의 Tau (ps)
펄스 지방시 CDF
광자 CDF
지방시 (ps)

도면5a

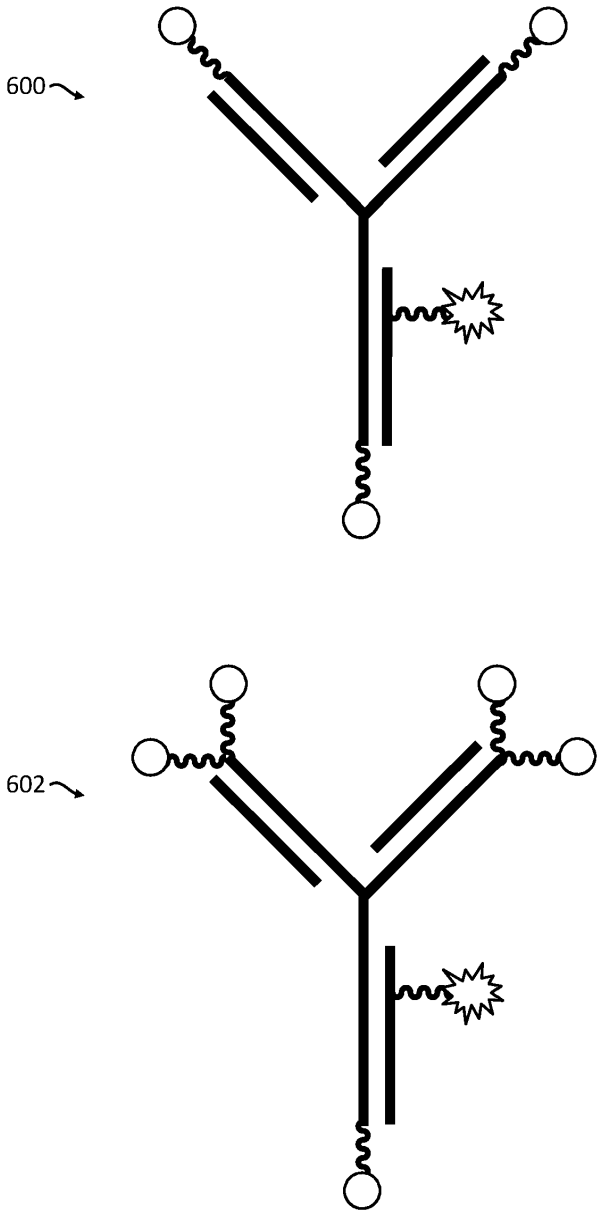


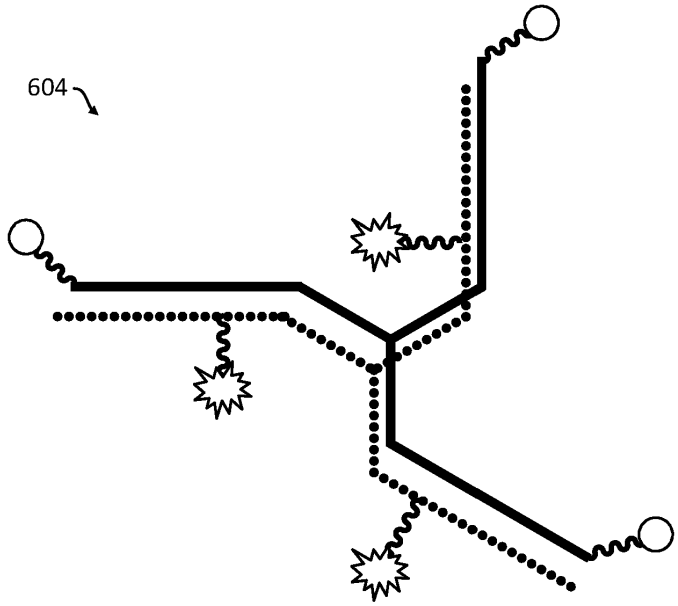
도면5b

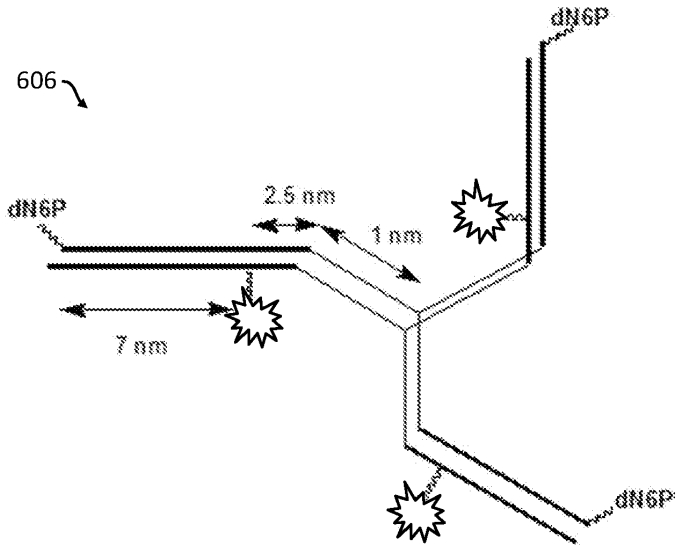

SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
염기
염기
=

도면6aa

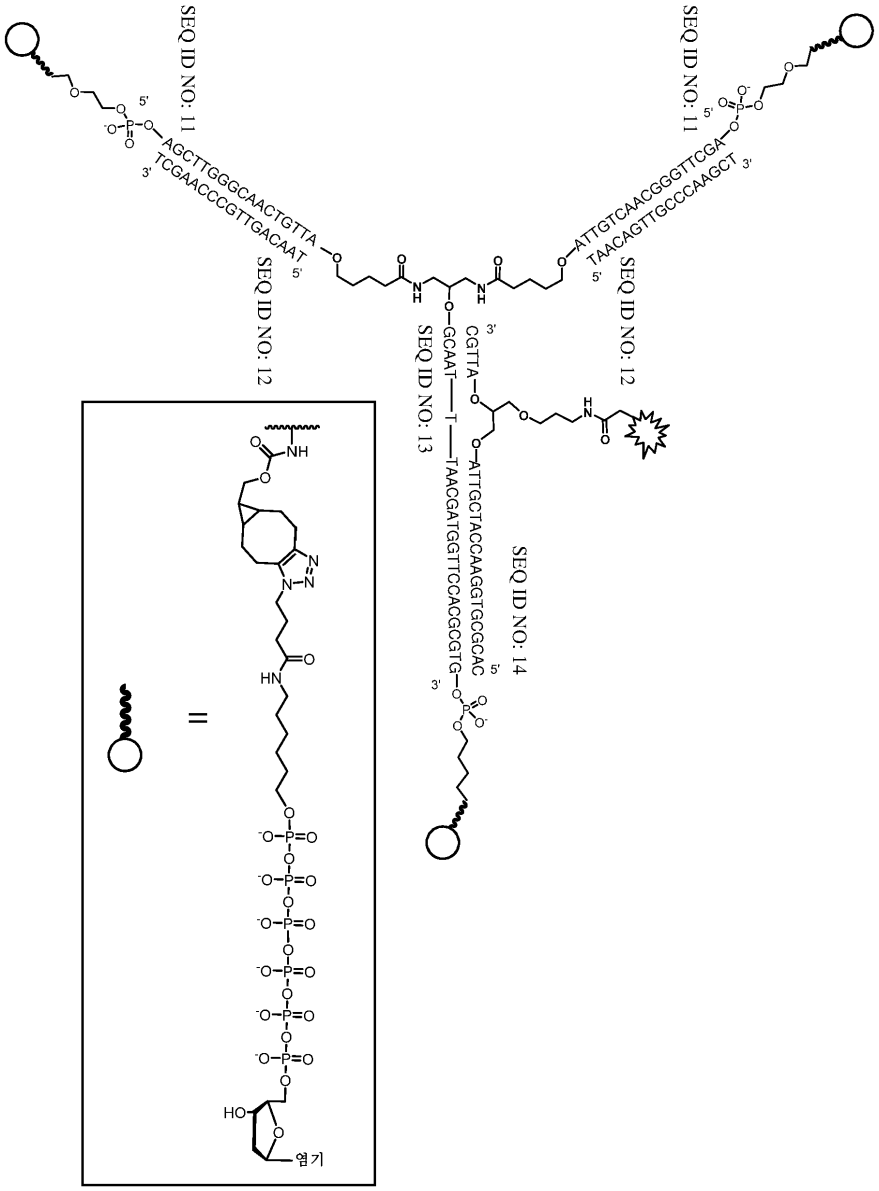


도면6ab

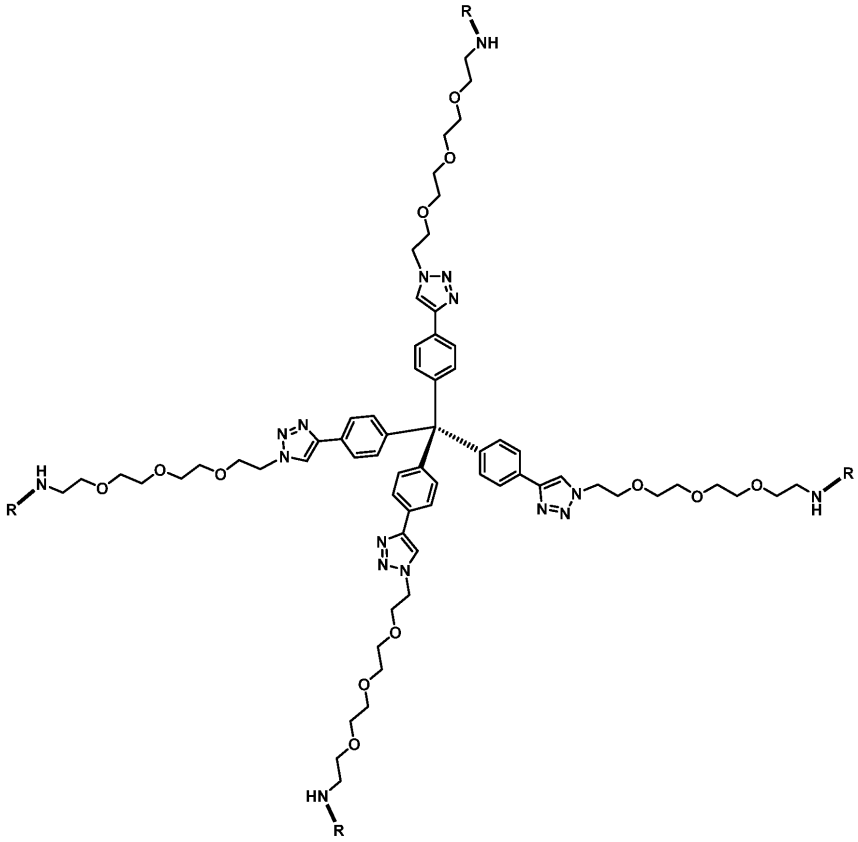


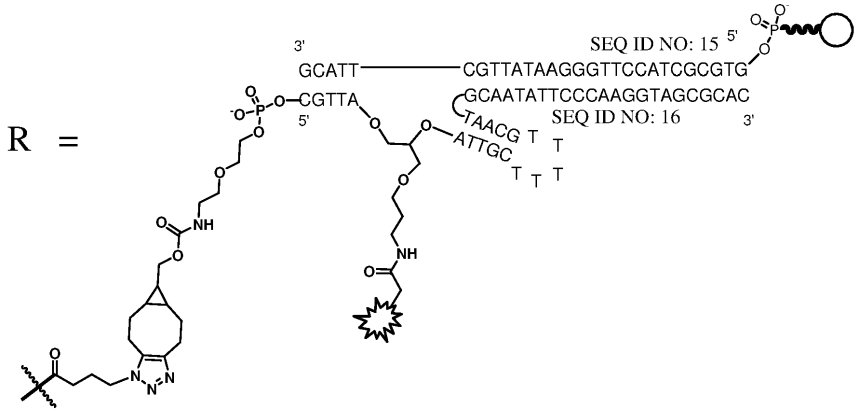
도면6b

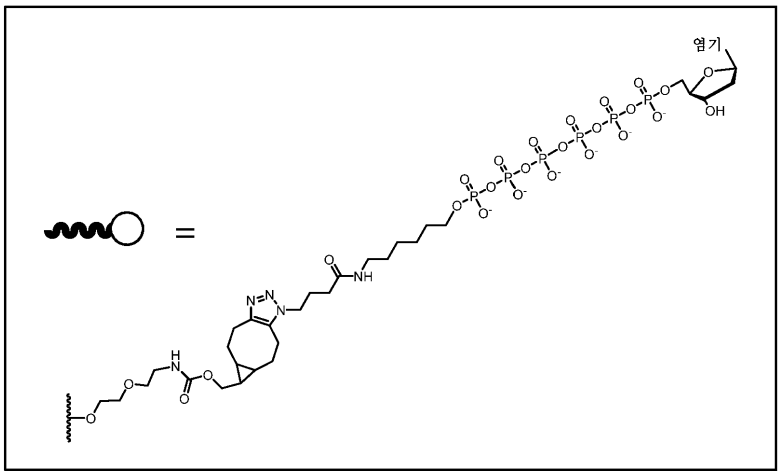


도면6ca

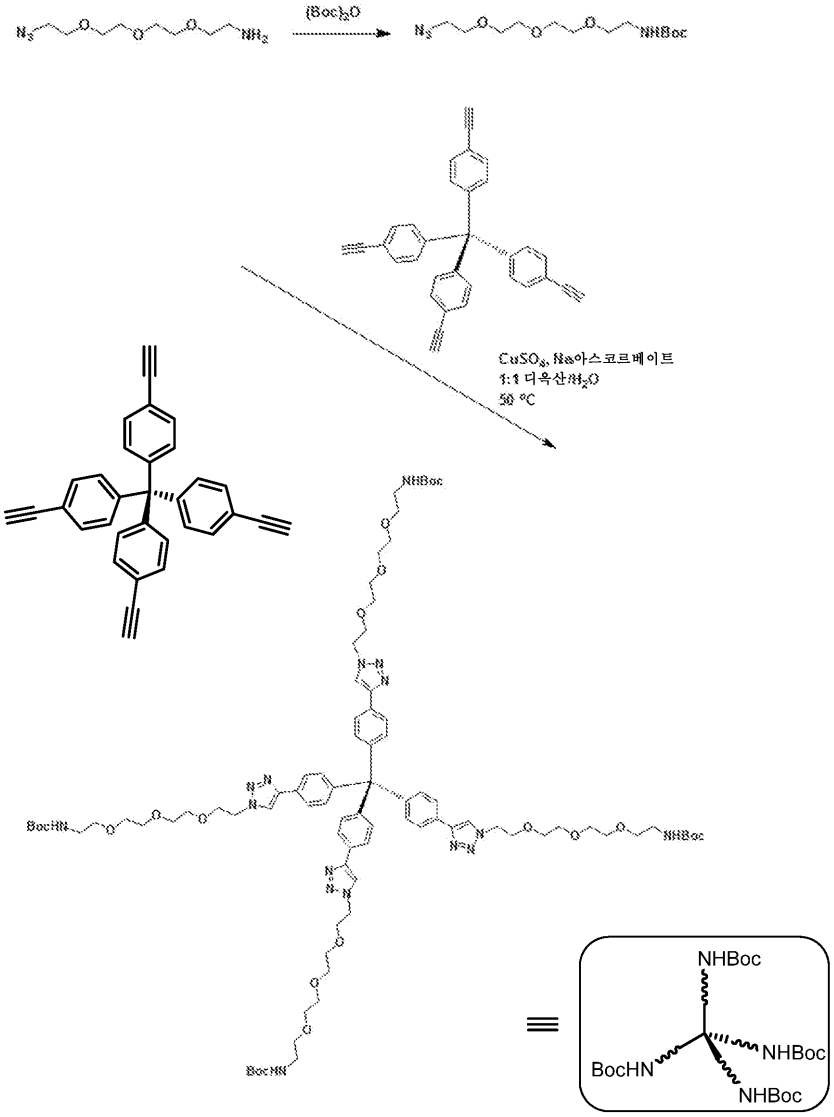


도면6cb

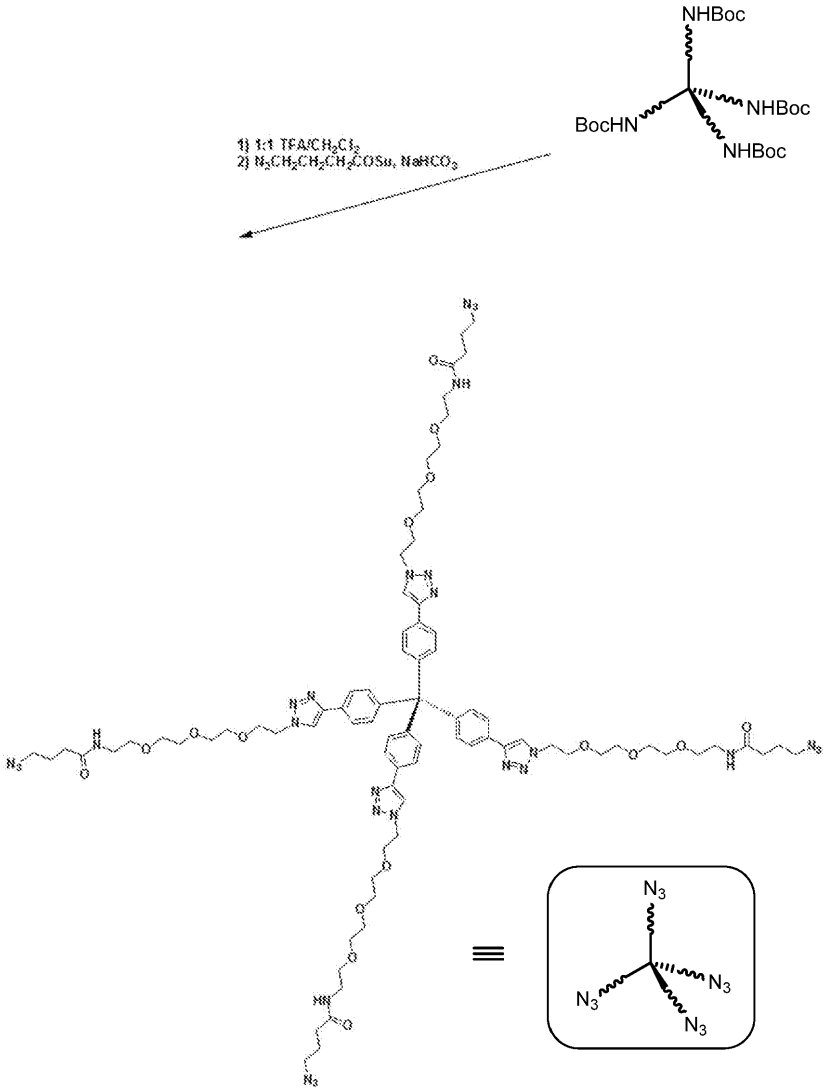

R =
3'
GCATT
CGTTATAAGGGTTCCATCGCGTG
SEQ ID NO: 15
5'
GCAATATTCCCAAGGTAGCGCAC
SEQ ID NO: 16
3'
CGTTA
TAACG
ATTGC
NH
NH


=
염기
OH
NH

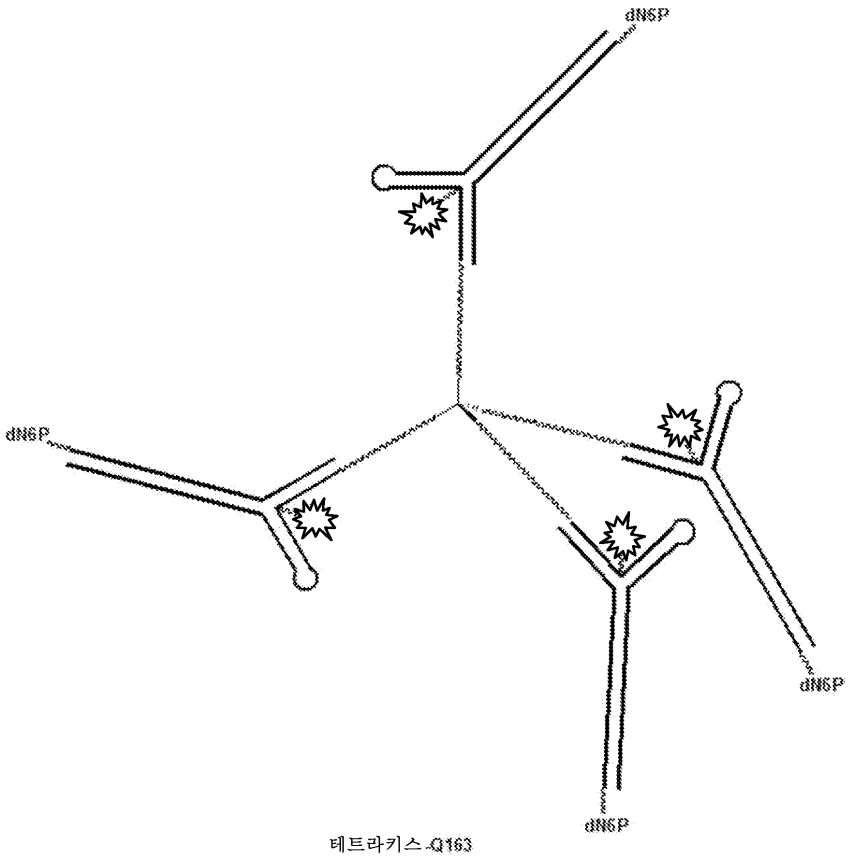
도면6da


(Boc)2O
CuSO4, Na아스코르베이트
1:1 디옥산/H2O
50 °C
NHBoc
BocHN
NHBoc
NHBoc
NHBoc
BocHN
NHBoc
NHBoc
NHBoc

도면6db

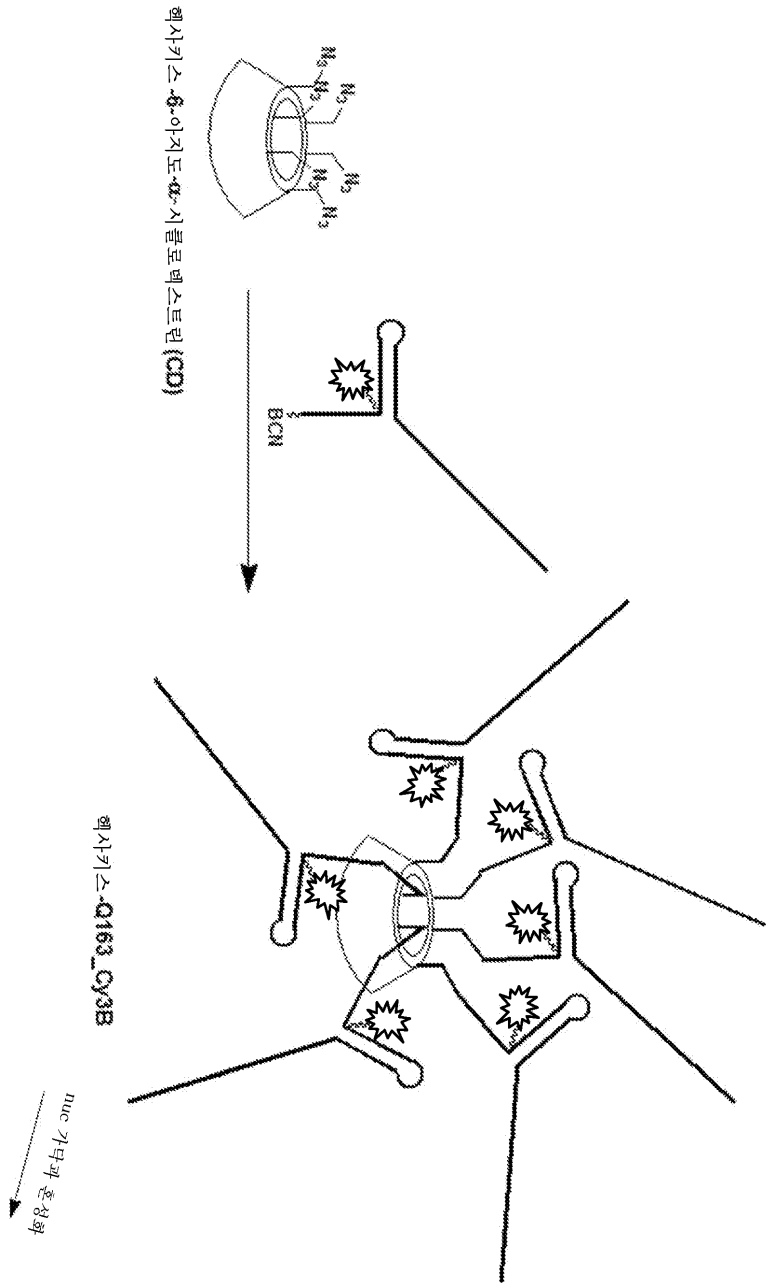

NHBoc
BocHN
NHBoc
NHBoc
1) 1:1 TFA/CH2Cl2
2) N3CH2CH2CH2COSu, NaHCO3
N3
N3
N3
N3

도면6e

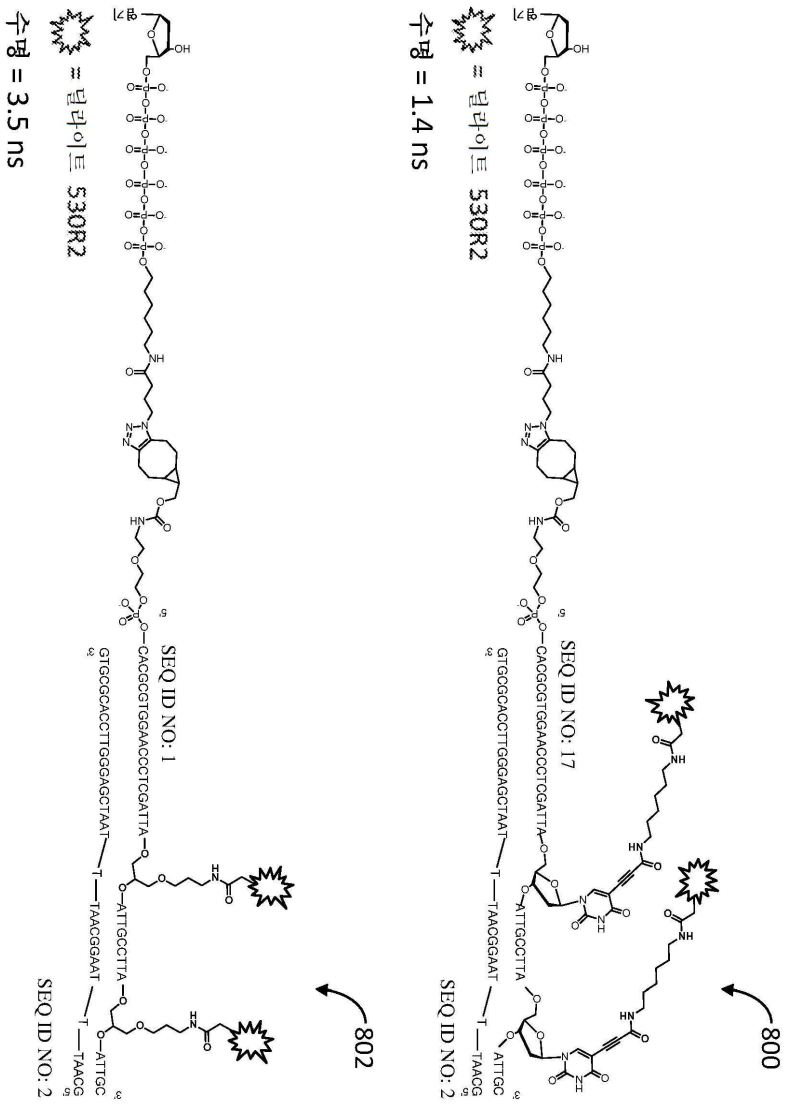



테트라키스-Q163

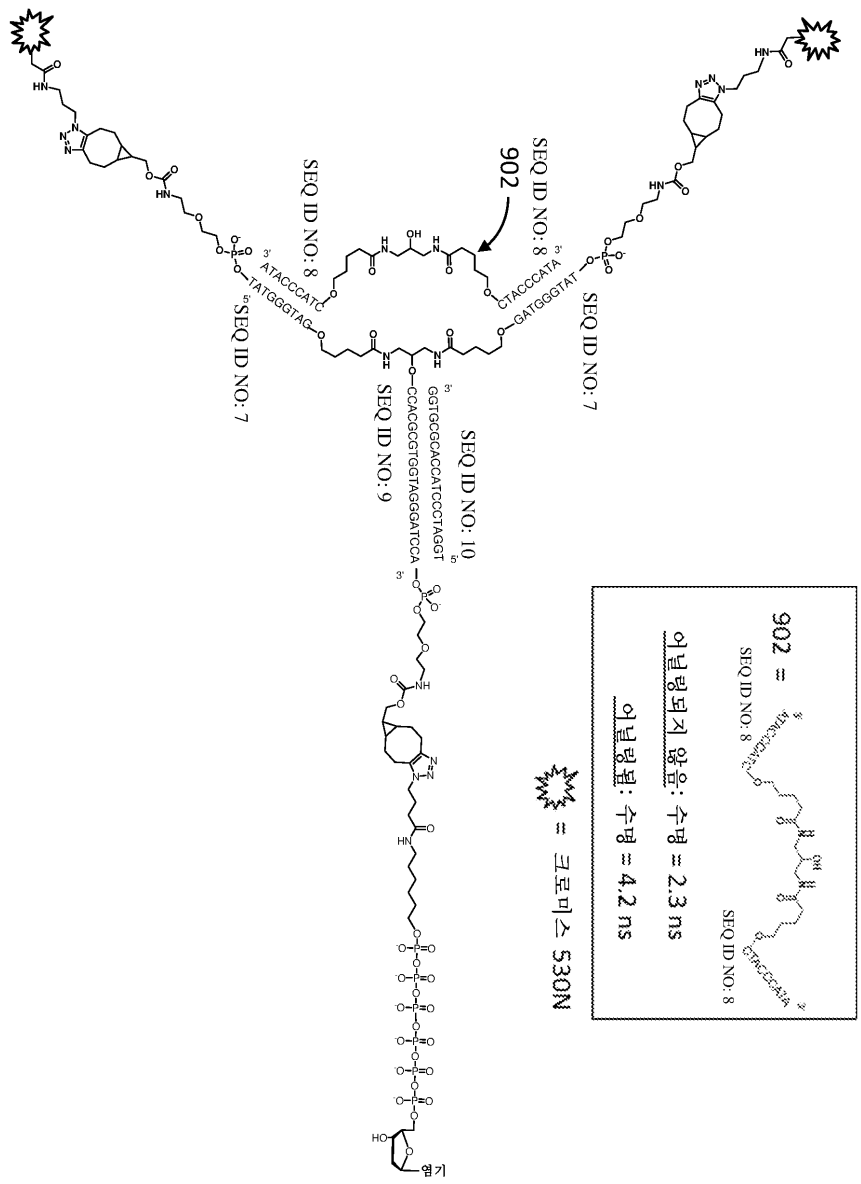
도면7



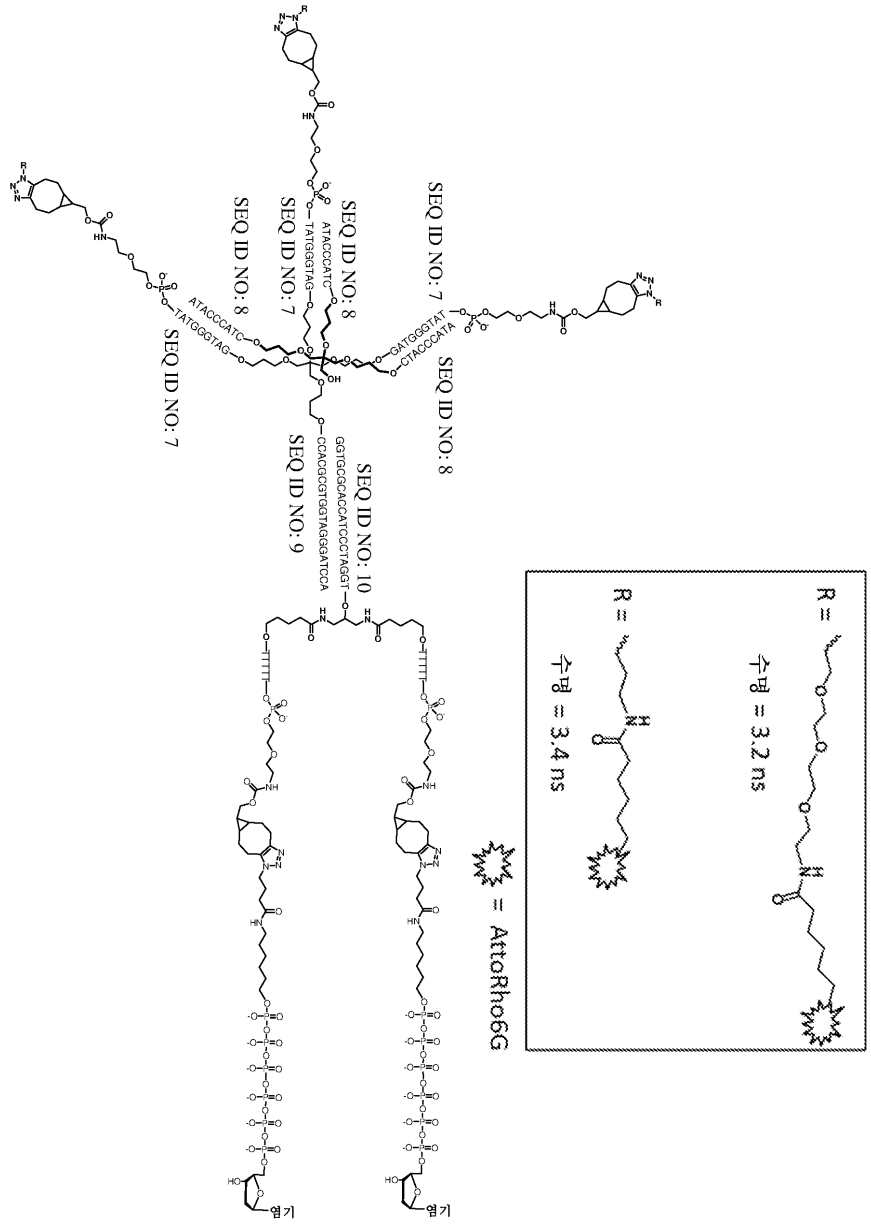
도면8


800
SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 2
= 텔라이트 530R2
수명 = 1.4 ns
802
SEQ ID NO: 1
SEQ ID NO: 2
= 텔라이트 530R2
수명 = 3.5 ns

도면9


SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
902
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
염기
902 =
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 8
어닐링되지 않음: 수명 = 2.3 ns
어닐링됨: 수명 = 4.2 ns
= 크로미스 530N

도면10


SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
염기
염기
R =
수명 = 3.2 ns
R =
수명 = 3.4 ns
= AttoRho6G