



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I829642 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 01 月 21 日

(21)申請案號：107125536

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 07 月 24 日

(51)Int. Cl. : C12N15/12 (2006.01)

C12Q1/6869 (2018.01)

A61K47/65 (2017.01)

(30)優先權：2017/07/24 美國

62/536,426

(71)申請人：美商寬騰矽公司 (美國) QUANTUM-SI INCORPORATED (US)

美國

(72)發明人：羅斯伯格 強納森 M ROTHBERG, JONATHAN M. (US)；雷克伊 傑瑞米

LACKEY, JEREMY (CA)；瑞德 布萊恩 REED, BRIAN (US)；施興華 SHI,

XINGHUA (CN)；黃海冬 HUANG, HAIDONG (CN)；達德 大衛 DODD, DAVID

(CA)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

JP 2015-73523A

WO 93/09128A1

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：22 項 圖式數：10 共 127 頁

(54)名稱

高強度經標記之反應物組合物及用於定序之方法

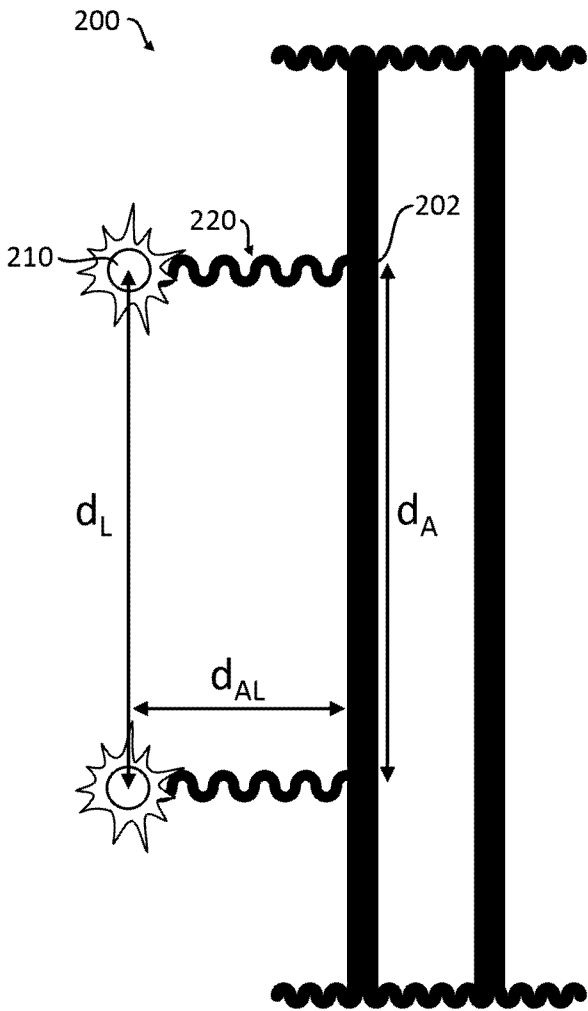
(57)摘要

本揭示提供可用於檢測樣品中單一分子的組合物。在一些態樣中，本揭示提供連結至核苷酸及兩個或更多個發光標記之核酸。在一些實施例中，本文所述之核酸包含一或多個提供增強螢光強度之結構特徵。在一些態樣中，提供使用本揭示之經標記核苷酸的定序方法。

Compositions useful for the detection of single molecules in a sample are provided. In some aspects, the disclosure provides a nucleic acid connected to a nucleotide and two or more luminescent labels. In some embodiments, the nucleic acids described herein comprise one or more structural features that provide enhanced fluorescence intensity. In some aspects, methods of sequencing using the labeled nucleotides of the disclosure are provided.

指定代表圖：

- 符號簡單說明：
- 200 . . . 核酸連接體
 - 202 . . . 連接位點
 - 210 . . . 發光標記
 - 220 . . . 間隔體
 - d_L . . . 最小距離
 - d_A . . . 最小距離
 - d_{AL} . . . 最小距離



【圖2A】



I829642

【發明摘要】

【中文發明名稱】

高強度經標記之反應物組合物及用於定序之方法

【英文發明名稱】

HIGH INTENSITY LABELED REACTANT COMPOSITIONS AND
METHODS FOR SEQUENCING

【中文】

本揭示提供可用於檢測樣品中單一分子的組合物。在一些態樣中，本揭示提供連結至核苷酸及兩個或更多個發光標記之核酸。在一些實施例中，本文所述之核酸包含一或多個提供增強螢光強度之結構特徵。在一些態樣中，提供使用本揭示之經標記核苷酸的定序方法。

【英文】

Compositions useful for the detection of single molecules in a sample are provided. In some aspects, the disclosure provides a nucleic acid connected to a nucleotide and two or more luminescent labels. In some embodiments, the nucleic acids described herein comprise one or more structural features that provide enhanced fluorescence intensity. In some aspects, methods of sequencing using the labeled nucleotides of the disclosure are provided.

【指定代表圖】

圖2A

【代表圖之符號簡單說明】

200 核酸連接體

202	連接位點
210	發光標記
220	間隔體
d _L	最小距離
d _A	最小距離
d _{AL}	最小距離

【發明說明書】

【中文發明名稱】

高強度經標記之反應物組合物及用於定序之方法

【英文發明名稱】

HIGH INTENSITY LABELED REACTANT COMPOSITIONS AND
METHODS FOR SEQUENCING

【技術領域】

【0001】 本申請案概言之係關於經明亮標記之反應物組合物及使用該組合物檢測單一分子之方法。

【先前技術】

【0002】 下一代定序技術之進步使得可執行單一分子之大規模並行分析，此根本上改變了生命科學研究之前景。該等技術中之一些涉及使用經發光標記之反應組分即時監測生物反應。標記用光源照明以引起發光，且用光檢測器檢測發光。可記錄該等事件且基於相應發光性質進行分析，以鑑別個別反應組分。在鑑別多種類型中特定類型之經標記分子中，每種類型具有獨特且易於鑑別之發光性質係至關重要的。此外，該等參數能決定儀器要求，例如激發源功率及整體儀器大小。

【發明內容】

【0003】 本文所揭示之技術之態樣係關於包含兩個或更多個由連接體(例如受限連接體)隔開之發光標記之經標記之反應組分。在一些實施例中，本申請案係關於發光標記之分離，以防止由於標記-標記相互作用引起之可檢測信號之減弱。在一些態樣中，本申請案提供經標記核苷酸，其包含經由連接體連結至兩個或更多個發光標記之核苷酸(例如核苷多磷

酸)。在一些態樣中，本申請案提供用於定序模板核酸之組合物、方法及套組。

【0004】 在一些態樣中，本申請案提供包含經由連接體連結至兩個或更多個發光標記之核苷酸(例如核苷多磷酸)的經標記核苷酸。在一些實施例中，核苷酸經構形以用作聚合反應中之受質。在一些實施例中，本申請案之經標記核苷酸包含兩個或更多個彼此隔開最小距離之發光標記。在一些實施例中，每一發光標記與任何其他發光標記隔開至少5埃。舉例而言，在一些實施例中，每一發光標記與任何其他發光標記隔開至少5、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少40或至少50埃。在一些實施例中，每一發光標記包含與任何其他發光標記之質量中心隔開至少5埃的質量中心。

【0005】 在一些實施例中，本申請案之經標記核苷酸包含一或多個經由間隔體分子連接至連接體之發光標記。在一些實施例中，間隔體分子將發光標記連結至連接體上之連接位點。在一些實施例中，發光標記經由間隔體分子連接至連接體，該間隔體分子在發光標記與連接體上之連接位點之間包含至少8個相連原子。在一些實施例中，間隔體分子在發光標記與連接體上之連接位點之間包含少於50個、少於40個、少於30個或少於20個相連原子。在一些實施例中，發光標記整合至連接體中。

【0006】 在一些實施例中，連接體係寡聚物(例如寡聚連接體或聚合連接體)。在一些實施例中，寡聚物包含單體單元。在一些實施例中，寡聚物包含兩種或更多種不同類型之單體單元。在一些實施例中，寡聚物包含複數種相同類型之單體單元(例如寡聚物係一種類型之單體單元之聚合物)。在一些實施例中，寡聚物包含具有複數個第一類型之單體單元之第

一區及具有複數個第二類型之單體單元之第二區。在一些實施例中，寡聚物包含複數個不同區(例如2、3、4、5或更多個)，其各自包含複數種不同類型之單體單元。在一些實施例中，寡聚物包含至少5個單體單元。在一些實施例中，寡聚物包含至少10個單體單元。在一些實施例中，寡聚物包含少於150、少於100或少於50個單體單元(例如至少5個單體單元且少於200、150、100、75、50或25個單體單元；至少10個單體單元且少於200、150、100、75、50或25個單體單元)。

【0007】 在一些實施例中，若連接體係寡聚物(例如寡聚連接體、聚合連接體)，則每一發光標記係由至少5個寡聚物單體單元彼此隔開之標記。在一些實施例中，第一發光標記在與第二位置隔開至少5個單體單元之第一位置整合至連接體中，在該第二位置，第二發光標記整合至連接體中或連接至連接體。在一些實施例中，若毗鄰發光標記整合至連接體中，則標記可由少於5個單體單元隔開。在一些實施例中，每一發光標記在與任何另一連接位點隔開至少5個單體單元(例如至少6、至少8、至少10、至少12、至少14、至少16、至少18、至少20或更多個單體單元)之連接位點連接至連接體。在一些實施例中，每一發光標記在與任何另一連接位點隔開至少5個單體單元且少於40個單體單元(例如少於38、少於36、少於34、少於32、少於30、少於28、少於26、少於24、少於22或少於20個單體單元)的連接位點連接。在一些實施例中，發光標記整合至寡聚物之兩個依序單體單元之間的連接體中(例如共價連結寡聚物之兩個毗鄰單體單元)。

【0008】 在一些實施例中，連接體足夠剛性以防止兩個或更多個連結至連接體之標記之間相互作用。在一些實施例中，連接體之剛性足以相

對於其在以連接至相同連接體之單一標記形式存在時之強度保存每一標記之至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、例如95-100% (例如約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、約100%)之強度。

【0009】 在一些實施例中，連接體係肽。在一些實施例中，肽之胺基酸組合物提供結構剛性(例如由於肽連接體中存在一或多個聚脯胺酸區段)。在一些實施例中，90%或更多(例如全部)肽連接體由聚脯胺酸聚合物組成。在一些實施例中，藉由經由化學修飾限制肽提供肽剛性。舉例而言，在一些實施例中，肽包含一或多個環化區段。在一些實施例中，肽係環化肽(例如U形釘肽、對接環化肽等)。在一些實施例中，可藉由納入一或多個剛性胺基酸聚合物區段及一或多個化學修飾之胺基酸聚合物區段的組合提供足夠肽剛性。

【0010】 在一些實施例中，連接體係多醣(例如肝素、硫酸肝素、聚葡萄糖、聚乳糖、胺基醣苷、N-乙醯基胺基醣苷及其組合)。

【0011】 在一些實施例中，連接體係核酸。在一些實施例中，核酸包含去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、肽核酸(PNA)、鎖核酸(LNA)或其衍生物。在一些實施例中，藉由使用一或多個雙股核酸區段(例如隔開兩個或更多個不同標記)提供足夠剛性。在一些實施例中，藉由核酸(例如單股或雙股核酸或包含一或多條單股及一或多個雙股區段之核酸)之一或多種化學修飾提供足夠剛性。在一些實施例中，核酸包含一或多個雙股區段及一或多個化學修飾之區段的組合。

【0012】 在一些實施例中，核酸包含一或多條單股及一或多個雙股區段之組合。在一些實施例中，單股區段可以環(例如如本文中別處闡述之莖環二級結構中)形式存在。在一些實施例中，單股區段係以雙股區段

內之未配對區形式存在。舉例而言，內部環可在雙股區段內形成，其中一股之一或多個鹼基不與另一股之一或多個毗鄰鹼基形成鹼基配對相互作用。未配對區之又一實例包括膨出部環，其可在雙股區段內形成，其中一股相對於另一股包括一或多個額外鹼基。在一些實施例中，單股區及雙股區賦予結構剛性。

【0013】 在一些實施例中，單股區(例如未配對區)係至少2個鹼基長(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個鹼基長)。在一些實施例中，單股區係介於2個與10個之間之鹼基長(例如介於2個與8個之間、介於4個與10個之間或介於4個與8個之間之鹼基長)。在一些實施例中，雙股區係介於2個與40個之間之鹼基長(例如介於2個與20個之間、介於2個與10個之間、介於10個與40個之間、介於10個與30個之間、介於10個與20個之間、介於20個與40個之間或介於20個與30個之間鹼基長)。

【0014】 在一些實施例中，核酸包含連接至兩個或更多個發光標記之第一寡核苷酸股。在一些實施例中，兩個或更多個發光標記在第一寡核苷酸股上之兩個或更多個連接位點連接。在一些實施例中，每一發光標記包含中心點與任何另一發光標記之中心點隔開至少5埃之的空間體積。舉例而言，在一些實施例中，每一發光標記包含中心點與任何另一發光標記之中心點隔開至少6埃、約5至10埃、約6至10埃、約10至15埃、約15至20埃、約20至25埃或約25至50埃的空間體積。

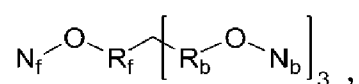
【0015】 在一些實施例中，核酸進一步包含與第一寡核苷酸股雜交之第二寡核苷酸股。在一些實施例中，第一寡核苷酸股連接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，第二寡核苷酸股連接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。

【0016】 在一些實施例中，兩個或更多個連接位點由第一寡核苷酸股上之至少5個鹼基(例如至少5個核苷酸)彼此隔開。在一些實施例中，兩個或更多個連接位點由第一寡核苷酸股上之至少5且少於40個鹼基(例如介於約5個與30個之間之鹼基、介於約5個與20個之間之鹼基、介於約5個與10個之間之鹼基、介於約10個與40個之間之鹼基、介於約20個與40個之間之鹼基或介於約30個與40個之間之鹼基)彼此隔開。在一些實施例中，每一連接位點與第一寡核苷酸股上之鳥嘌呤或胞嘧啶隔開至少2個鹼基。在一些實施例中，每一連接位點發生在第一寡核苷酸股上之無鹼基位點。在一些實施例中，每一連接位點發生在第一寡核苷酸股上之核苷酸之核鹼基。在一些實施例中，核鹼基係選自A、T或U核鹼基。

【0017】 在一些實施例中，第一寡核苷酸股形成一或多個(例如1、2、3、4或更多個)莖環。在一些實施例中，每一莖環之環區包含兩個或更多個連接位點之連接位點。在一些實施例中，每一莖環之環區包含至少4個未配對鹼基(例如4、5、6、7、8或更多個未配對鹼基)。在一些實施例中，環區包含具有少於33% G/C含量之序列(例如核苷酸序列)。

【0018】 在一些態樣中，本揭示內容之經標記核苷酸包含核酸連接體，其包含在第一寡核苷酸股之末端連接至兩個或更多個分支寡核苷酸股的第一寡核苷酸股。在一些實施例中，第一寡核苷酸股經由共價偶合化合物連接至兩個或更多個分支寡核苷酸股。在一些實施例中，每一分支寡核苷酸股包含至少一個發光標記。在一些實施例中，第一寡核苷酸股與第二寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，第二寡核苷酸股連接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，每一分支寡核苷酸股進一步與互補分支寡核苷酸股雜交。

【0019】 在一些實施例中，共價偶合化合物具有以下結構：



其中 N_f 係第一寡核苷酸股； N_b 係分支寡核苷酸股； R_f 及 R_b 各自彼此獨立地係鍵或選自由以下組成之群之連接基團：經取代或未經取代之伸烷基；經取代或未經取代之伸烯基；經取代或未經取代之伸炔基；經取代或未經取代之伸雜烷基；經取代或未經取代之伸雜烯基；經取代或未經取代之伸雜炔基；經取代或未經取代之伸雜環基；經取代或未經取代之伸碳環基；經取代或未經取代之伸芳基；經取代或未經取代之伸雜芳基；及其組合；且各O係毗鄰寡核苷酸股之5'磷酸基或3'羥基之氧原子。

【0020】 在一些態樣中，本揭示內容之經標記核苷酸包含含有第一寡核苷酸組分之核酸連接體，該第一寡核苷酸組分包含三個或更多個自共價偶合化合物延伸之寡核苷酸股(例如3、4、5、6或更多個寡核苷酸股)。在一些實施例中，三個或更多個寡核苷酸股中之至少一者連接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，第一寡核苷酸組分與第二寡核苷酸組分雜交。在一些實施例中，第二寡核苷酸組分包含至少一個連接至發光標記之寡核苷酸股。

【0021】 在一些實施例中，將本揭示內容之經標記核苷酸用螢光染料發光標記。在一些實施例中，螢光染料係玫瑰紅染料、BODIPY染料或花青染料。

【0022】 在一些實施例中，本揭示內容之經標記核苷酸包含與兩個或更多個發光標記之任一發光標記隔開至少1 nm的核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，核苷酸與兩個或更多個發光標記之任一發光標記隔開介於大約1 nm與10 nm之間(例如介於大約2 nm與10 nm之間、介於大

約4 nm與10 nm之間、介於大約6 nm與10 nm之間或介於大約8 nm與10 nm之間)。在一些實施例中，核苷酸與兩個或更多個發光標記之任一發光標記隔開介於大約2 nm與20 nm之間(例如介於大約6 nm與20 nm之間、介於大約10 nm與20 nm之間、介於大約12 nm與20 nm之間或介於大約16 nm與20 nm之間)。

【0023】 在一些態樣中，本揭示內容提供測定模板核酸之序列之方法。在一些實施例中，該等方法包括包含將靶體積之複合物暴露於本申請案提供之複數種類型之經發光標記之核苷酸的步驟，該複合物包含模板核酸、引子及聚合酶。在一些實施例中，複數種類型之經發光標記之核苷酸中之一或多者包含經由連接體連結至兩個或更多個發光標記之核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，連接體係包含至少10個單體單元之寡聚物。在一些實施例中，每一發光標記在與任何另一連接位點隔開至少5個單體單元之連接位點連接至連接體。舉例而言，在一些實施例中，連接位點與任何另一連接位點隔開介於約5個與30個之間之單體單元、介於約5個與20個之間之單體單元、介於約5個與10個之間之單體單元、介於約10個與40個之間之單體單元、介於約20個與40個之間之單體單元或介於約30個與40個之間之單體單元。在一些實施例中，每一發光標記與任何另一發光標記隔開至少5埃。舉例而言，在一些實施例中，每一發光標記與任何另一發光標記隔開大約5至10埃、大約6至10埃、大約10至15埃、大約15至20埃、大約20至25埃或大約25至50埃。因此，在一些態樣中，本揭示內容提供利用本文所述經發光標記之核苷酸中之任一者之核酸定序方法。

【0024】 在一些實施例中，該等方法進一步包含引導一或多個激發

能之一系列脈衝朝向靶體積附近的步驟。在一些實施例中，該等方法進一步包含在依序納入包含引子之核酸期間檢測來自經發光標記之核苷酸的複數個發射光子的步驟。在一些實施例中，該等方法進一步包含藉由測定發射光子之時間及視情況發光強度及/或亮度鑑別納入之核苷酸之序列的步驟。

【0025】 在一些實施例中，反應混合物中之四種不同類型之核苷酸(例如腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶/尿嘧啶)各自可用一或多個發光分子(例如具有兩個或更多個發光標記，如本文所述)標記。在一些實施例中，每一類型之核苷酸可連結至相同發光分子中之一者以上(例如連結至核苷酸之相同螢光染料中之兩者或更多者)。在一些實施例中，每一發光分子可連結至一個以上核苷酸(例如相同核苷酸中之兩者或更多者)。在一些實施例中，一個以上核苷酸可連結(例如經由本文所述連接體)至一個以上發光分子。

【0026】 在一些實施例中，一組四個核苷酸間之發光標記可選自包含芳香族或雜芳香族化合物之染料且可為芘、蔥、蔡、吡啶、二苯乙烯、吲哚、苯并吲哚、噁唑、呋唑、噻唑、苯并噻唑、啡啶、啡噁嗪、卟啉、喹啉、乙錠(ethidium)、苯甲醯胺、花青、羰花青、柳酸酯、鄰胺苯甲酸酯、香豆素、螢光素、玫瑰紅或其他類似化合物。染料之實例包括吡啶染料，例如螢光黃或玫瑰紅染料、蔡染料、香豆素染料、吡啶染料、花青染料、苯并噁唑染料、二苯乙烯染料、芘染料、酞青素染料、藻膽蛋白染料、方酸菁染料、BODIPY染料及諸如此類。

【0027】 在一些態樣中，本申請案提供用於定序模板核酸之套組。在一些實施例中，套組包含複數種類型之如本文所述之經發光標記之核苷

酸。在一些實施例中，每一類型之經標記核苷酸包含兩個或更多個經由連接體連接至一或多種核苷酸(例如一或多個核苷多磷酸)之發光標記。在一些實施例中，套組進一步包含聚合酶。在一些實施例中，套組進一步包含與所定序之模板核酸互補之引子。

【0028】 在一些態樣中，本申請案提供核酸定序反應組合物。在一些實施例中，組合物包含反應混合物中之兩種或更多種(例如2、3、4或更多種)不同類型之經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，每一類型之經發光標記之核苷酸包含根據本申請案之經標記核苷酸。在一些實施例中，組合物進一步包含聚合酶。在一些實施例中，組合物進一步包含模板核酸。在一些實施例中，組合物進一步包含與模板核酸互補之引子。

【圖式簡單說明】

【0029】 所屬領域之技術人員將理解，下文所述之圖僅用於圖解說明目的。應理解，在一些情況下，本發明之各個態樣可放大或擴大顯示以有利於理解本發明。在圖式中，相同參考特徵貫穿各圖通常係指相同特徵、功能上類似及/或結構上類似之要素。圖式未必按比例繪製，而是將重點放在說明教示之原理上。圖式並非意欲以任何方式限制本發明教示之範圍。

【0030】 依據下文在連同圖式一起進行時所述的詳細說明，本發明之特徵及優點將變得更加顯而易見。

【0031】 當參照圖式闡述實施例時，可使用方向參考符號(「上方」、「下方」、「頂部」、「底部」、「左」、「右」、「水平」、「垂直」等)。該等參考符號僅意欲幫助讀者以正交取向觀看圖式。該等方向參考符號並不意欲闡述所體現裝置之較佳或唯一取向。裝置可以其他取向體現。

【0032】 自詳細說明中顯而易見，圖(例如圖1-10)中繪示且出於說明目的在整個本申請案中進一步闡述之實例闡述非限制性實施例，且在一些情形下出於更清楚地說明之目的可簡化某些過程或省略特徵或步驟。

【0033】 圖1A係一般地繪示在經明亮標記之反應物上之發光標記分離的圖解。

【0034】 圖1B繪示具有不同發光標記連接構形之一般連接體結構。

【0035】 圖2A係一般地繪示連接至兩個發光標記之核酸連接體的圖解。

【0036】 圖2B繪示具有不同股構形之一般核酸(頂部)及一般地繪示發光標記空間佔據的圖解(底部)。

【0037】 圖2C繪示具有不同相對標記連接位點(頂部)及不同反應物連結性(底部)之一般核酸。

【0038】 圖3A繪示經由相同(左)或相反(右)寡核苷酸股連結性將標記連結至反應物之一般核酸。

【0039】 圖3B繪示具有可用於設計經明亮標記之反應物之近似大小限制的實例之一般核酸。

【0040】 圖3C係經由相同股連結性將發光標記連結至核苷多磷酸之核酸的實例性結構。

【0041】 圖3D繪示定序反應之實例，其確認棒狀核酸連接體(例如如圖3C中所示)可用於檢測經標記之核苷多磷酸的納入。

【0042】 圖3E係經由相反股連結性將發光標記連結至核苷多磷酸之核酸的實例性結構。

【0043】 圖3F係具有整合至寡核苷酸股中之發光標記之核酸連接體

的實例性結構。

【0044】 圖3G繪示使用所示之四種不同核酸連接體構築體執行之定序反應的實例。

【0045】 圖4A繪示具有單一莖環二級結構之一般核酸連接體。

【0046】 圖4B繪示具有多個莖環二級結構之一般核酸連接體。

【0047】 圖4C係具有在單獨莖環二級結構之環連接之發光標記之核酸連接體的實例性結構。

【0048】 圖4D繪示定序反應之實例，其確認具有莖環核酸連接體(例如如圖4C中所示)之經標記之核苷多磷酸可用於檢測核苷多磷酸之納入。

【0049】 圖5A一般地繪示具有連接至發光標記之分支寡核苷酸股之樹狀核酸連接體。

【0050】 圖5B係具有在單獨分支寡核苷酸股之末端連接之發光標記之樹狀核酸連接體的實例。

【0051】 圖6A一般地繪示星狀核酸連接體且提供可用於設計星狀核酸連接體之近似大小限制的實例。

【0052】 圖6B係星狀核酸連接體之實例性結構。

【0053】 圖6C係具有四面體核之核酸連接體的實例性結構。

【0054】 圖6D繪示可用於合成具有四面體核之核酸連接體之反應方案的實例。

【0055】 圖6E一般地繪示具有在三向接點連接之發光標記的基於四面體之核酸連接體結構。

【0056】 圖7一般地繪示產生具有在三向接點連接之發光標記的基

於環糊精之核酸連接體的方法。

【0057】 圖8繪示一組實驗中用於評估間隔體長度對螢光壽命量測之效應的核酸連接體結構之實例。

【0058】 圖9繪示一組實驗中用於評估連接體限制對螢光壽命量測之效應的核酸連接體結構之實例。

【0059】 圖10繪示一組實驗中用於評估受限連接體中間隔體長度對螢光壽命之效應的核酸連接體結構之實例。

【實施方式】

相關申請案

【0060】 本申請案根據35 U.S.C. §119(e)主張於2017年7月24日提出申請之美國臨時專利申請案第62/536,426號之優先權，其全文以引用方式併入本文中。

【0061】 在其他態樣中，本揭示內容提供包含兩個或更多個標記之經發光標記之反應物，其中標記經構形以提供高強度及/或一致發射特徵(例如一致發射壽命)。在一些實施例中，兩個或更多個標記經構形以避免降低發射之強度或其他發射特徵的標記-標記相互作用。在一些實施例中，兩個或更多個標記經構形以a) 避免與連接體相互作用，及/或b) 各自與連接體具有類似相互作用。

【0062】 在一些態樣中，本揭示內容提供與具有高發射強度之經發光標記之反應物相關的方法及組合物。在一些態樣中，本揭示內容提供與具有高發射亮度之經發光標記之反應物相關的方法及組合物。在一些態樣中，本揭示內容係關於具有一致發射壽命之經明亮標記之反應物。在一些實施例中，如本文所用「亮度」(及其變化形式，例如「明亮(bright、

brightly)」等)係指報告每經標記之反應物分子之平均發射強度的參數。因此，在一些實施例中，「發射強度」可用於通常指包含經明亮標記之反應物之組合物的亮度。在一些實施例中，經標記反應物之亮度等於其量子產率與消光係數之乘積。在一些實施例中，本揭示內容之經標記反應物經改造以最大化量子產率及/或最小化消光係數值以促進增加之亮度。

【0063】 在一些實施例中，本揭示內容之經明亮標記之反應物經改造以具有增加之發射亮度及一致發射壽命。在一些實施例中，反應物之兩個標記可彼此及/或與周圍環境相互作用，使得一或多個發射特徵在兩個標記之間不一致。不一致發射特徵可成問題，在一些實施例中，其中單一分子檢測方法依賴於該等特徵以鑑別某一類型之分子。舉例而言，在一些實施例中，不一致發射壽命可產生報告與利用一致發射壽命將觀察到之資訊之單一群組相反的兩個單獨資訊簇之壽命讀出。

【0064】 在一些實施例中，一致發射壽命可涉及保存發射壽命，例如相對於具有少一個標記之經標記反應物具有大約未變化之發射壽命。在一些實施例中，經多重標記之反應物中標記之發射壽命相對於經單一標記之反應物中之相同標記未變化。如本文所述，在一些實施例中，增加單一構築體上發光標記之數目以增加亮度可引起發射壽命減少。在一些實施例中，本揭示內容提供使用特定結構限制來改造以將毗鄰標記隔開某一最小距離的組合物，該最小距離增加亮度而不影響發射壽命。在一些實施例中，比較經多重標記之構築體之發射壽命與具有至少少一個發光標記(例如至少少一個相同類型之螢光團染料)之構築體的發射壽命。在一些實施例中，發射壽命改變大約30%或更少(例如增加或減少少於30%、少於25%、少於20%、少於15%、少於10%、少於5%、少於4%、少於3%、少

於2%、少於1%或大約0%)。

【0065】 在一些態樣中，本揭示內容係關於識別及瞭解可研發定序反應中之可檢測組合物以消除對某些儀器組件之需要，藉此將技術移向更緊湊之系統。舉例而言，定序儀器通常需要光學過濾器以過濾激發光，從而在感測器引起不期望之檢測事件。用於傳輸期望發光且足夠阻擋激光之光學過濾器可為厚的、巨大的、昂貴的且不能耐受光之入射角變化，從而阻止小型化。然而，本發明者認識並瞭解到，使用具有保存壽命之經明亮標記之反應物可減少對該過濾之需要，或在一些情形下，完全不需要該等過濾器。本文所述明亮反應物允許使用較小光學功率(例如激發能)，此減少散射且因此減少對過濾之需求。

【0066】 本申請案之態樣提供根據圖1A中所示之非限制性圖解構形之經明亮標記之反應物，該圖繪示兩個經由連接體100連結至反應物180之發光標記。如所示，每一發光標記經由間隔體連接至連接體100。在一些實施例中，間隔體在標記與連接體之間形成共價橋。因此，在一些實施例中，間隔體既非發光分子之部分，亦非連接體組合物之間隔體部分(例如間隔體不含聚合或寡聚連接體之單體單元)。間隔體之第一端連接至連接體連接位點102，且間隔體之第二端連接至標記連接位點122。在一些實施例中，連接體連接位點102可接近將間隔體之原子接合至連接體100之原子之共價鍵的位置。在一些實施例中，連接體連接位點102發生在連接體100之鄰接段內的原子。在一些實施例中，標記連接位點122可接近將間隔體之原子接合至標記之原子之共價鍵的位置。在一些實施例中，標記連接位點122發生在共價結合至間隔體之原子之標記的原子。在一些實施例中，標記連接位點122發生在共價結合至標記之原子之間隔體的原

子。

【0067】如本文中別處所述，在一些實施例中，本申請案之連接體構築體包含兩個或更多個發光標記，其中毗鄰發光標記闡述為具有由最小距離 d_A 隔開之連接位點。在一些實施例中，每一發光標記與下一發光標記隔開最小距離 d_L 。如圖1A中所示，在一些實施例中， d_L 係標記連接位點之間之距離。在一些實施例中，標記-標記隔開可進一步由每一標記分子之大小指示。因此，在一些實施例中，發光標記可藉由橢圓體或球形體之近似或計算之空間體積112來闡述以量測空間半徑 r_1 。在一些實施例中，發光標記可藉由橢圓形或圓形之近似或計算之空間周長來闡述以量測空間半徑 r_1 。在一些實施例中，空間半徑(例如 r_1 、 r_2)可計算或近似為發光標記之最長尺寸之一半。舉例而言，在一些實施例中，使用業內已知之軟體或適宜方法將發光標記之化學結構評估為二維或三維結構(例如基於熱力學上有利之分子構形)，且藉由計算二維或三維空間中結構之最長尺寸的一半來測定空間半徑(例如 r_1 、 r_2)。在一些實施例中，標記隔開最小距離 d_L ，條件係合計標記半徑($r_1 + r_2$)使得標記不重疊。

【0068】在一些實施例中，如圖1B中所圖解說明，連接體構形及/或間隔體剛性使得連接位點之間之距離 d_A 可與 d_L (例如如在構築體150中)大約相同。在一些實施例中，連接體構形及/或間隔體剛性使得連接位點之間之距離 d_A 可小於最小距離 d_L (例如如在構築體152中)。在一些實施例中，連接體構形及/或間隔體剛性使得連接位點之間之距離 d_A 可大於最小距離 d_L (例如如在構築體154中)。

【0069】應瞭解，在一些實施例中，本文所述概念可使用任何適宜分子支架作為連接體100來執行。在一些實施例中，連接體係有機化合

物。適用作連接體100之有機化合物之實例包括(但不限於)聚苯基、聚炔烴、 α 螺旋模擬物及肽模擬物。

【0070】 在一些實施例中，連接體100係寡聚物，例如包括單體單元之寡聚連接體。在一些實施例中，寡聚物包含一或多種類型之單體單元。單體單元之類型可包括(舉例而言但不限於)核苷酸(例如核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸及其類似物及衍生物)、胺基酸(例如天然及非天然胺基酸)、單醣及有機化合物(例如含有苯基及炔基之化合物)。在一些實施例中，寡聚物包含相同類型之單體單元中之一或多者。在一些實施例中，包括一種類型之單體單元之寡聚物可稱作聚合物(例如聚合連接體)。在一些實施例中，寡聚物包含兩種或更多種不同類型之單體單元(例如單體單元之混合物)。

【0071】 在一些實施例中，寡聚物(例如寡聚連接體或聚合連接體)含有至少5個單體單元。在一些實施例中，寡聚物含有至少10個單體單元。在一些實施例中，寡聚物含有至少10個且少於200個單體單元(例如至少10個且少於150個單體單元、至少10個且少於100個單體單元、至少10個且少於50個單體單元、至少10個且少於40個單體單元、至少10個且少於30個單體單元或至少10個且少於20個單體單元)。

【0072】 在一些實施例中，連接體(例如聚合連接體、寡聚連接體)係多醣。適用作連接體100之多醣之實例為業內已知(例如如Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries, Wiley 2001中所述)。

【0073】 在一些實施例中，連接體(例如聚合連接體、寡聚連接體)係肽。適用作連接體100之肽之非限制性實例包括(但不限於)寡肽、環狀

肽及小蛋白(例如基於禽類胰臟肽之微型蛋白，例如Hodges, A.M.及Schepartz, A. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129:11024-11025中所述)。將幾何限制改造成肽結構之方法為業內熟知且被設想為尤其可用於(例如)賦予剛性並促進標記分離。舉例而言，肽胺基酸序列之脯胺酸含量可經修飾以控制肽形狀(例如，參見Kritzer, J.A.等人 (2006) ChemBioChem 7:29-31)。有用肽改造技術之其他非限制性實例包括肽環化(例如，參見Maltsev, O.V.等人 (2016) Angewandte Chemie 55(4):1535-1539)、經由U形釘及/或H鍵代用品之 α -螺旋肽限制(例如，參見Douse, C.H.等人 (2014) ACS Chem. Biol. 9:2204-2209)、經由環狀 β 褶疊及 β -髮夾模擬物之肽限制(例如，參見Gibbs, A.C.等人 (1998) Nat. Struc. Biol. 5:284-288)。

【0074】 在一些實施例中，連接體(例如聚合連接體、寡聚連接體)係核酸。在一些態樣中，可根據圖2A中所示之圖解設計經明亮標記之反應物，該圖一般地繪示兩個連接至核核酸構築體之發光標記。如所示，在一些實施例中，至少一個發光標記210在連接位點202經由間隔體220連接至核酸連接體200。在一些實施例中，核酸連接體200包含至少兩個雜交之寡核苷酸股。在一些實施例中，核酸連接體200包含至少兩個發光標記，其中每一發光標記與下一發光標記隔開最小距離 d_L 。在一些實施例中，發光標記中之至少二者連接至相同寡核苷酸股，其中每一連接位點與下一連接位點隔開最小距離 d_A 。在一些實施例中，發光標記經由間隔體連接至寡核苷酸股，其中每一間隔體將給定發光標記與其連接位點隔開最小距離 d_{AL} 。

【0075】 在一些實施例中，最小距離 d_L 、 d_A 及 d_{AL} 可(例如)使用業內

已知之理論方法(例如計算或其他方式)獲得。在一些實施例中，理論方法可包括慮及分子結構(例如鍵長度、鍵角度及旋轉、靜電、核酸螺旋性及可代表所論述分子之其他物理因子)之任何方法。在一些實施例中，距離量測可以實驗方式、例如藉由結晶學或分光鏡方式獲得。

【0076】 本揭示內容之態樣至少部分係關於以下發現：具有核酸連接體之經明亮標記之反應物(例如經標記核苷酸)可根據以下經設計：

方程式1：

$$\text{方程式1: } 2(d_{AL}) - d_A < 12 \text{ \AA},$$

其中 $2(d_{AL}) - d_A$ 可為負值。在一些實施例中， d_A 大於17埃(Å)。在一些實施例中， d_A 為至少17 Å，但不大於350 Å (例如 d_A 介於約17 Å與350 Å之間，介於約17 Å與300 Å之間，介於約17 Å與250 Å之間，介於約17 Å與200 Å之間，介於約17 Å與150 Å之間，介於約17 Å與100 Å之間或介於約17 Å與50 Å之間)。

【0077】 在其他態樣中，本揭示內容之經標記核苷酸可根據方程式2經設計：

$$\text{方程式2: } 2(d_{AL})/d_A < 1。$$

【0078】 在一些實施例中， $2(d_{AL})/d_A$ 小於1、較佳小於0.5。在一些實施例中， $2(d_{AL})/d_A$ 小於0.1。

【0079】 在一些實施例中，本揭示內容之經標記核苷酸可根據方程式3經設計：

$$\text{方程式3: } [2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A < 1，$$

其中LLD係代表最長標記尺寸(LLD)之距離。在一些實施例中， $[2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A$ 小於0.5。在一些實施例中， $[2(d_{AL}) + \text{LLD}]/d_A$ 小於

0.2。在一些實施例中， $[2(d_{AL}) + LLD]/d_A$ 小於0.1。

【0080】 在一些實施例中，自發光標記210之近似中心原子至間隔體220所連接之寡核苷酸股上之原子量測最小距離 d_{AL} 。在一些實施例中，自發光標記210之中心(例如基於發光分子之質量之中心或業內已知或本文中別處闡述之一些其他方法近似)至間隔體220所連接之寡核苷酸股上之原子量測最小距離 d_{AL} 。在一些實施例中，最小距離 d_{AL} 量測為間隔體220之長度(例如自連接發光標記210之間隔體220之原子至連接至核酸200之間隔體220之原子量測)。在一些實施例中，最小距離 d_A 量測為間隔體共價結合之寡核苷酸主股上之原子之間(例如無鹼基連接位點之碳原子之間)的距離。在一些實施例中，最小距離 d_A 量測為寡核苷酸股上經標記之鹼基之間(例如鹼基連接位點之核鹼基上之原子之間)的距離。

【0081】 在一些實施例中，最小距離 d_L 量測為毗鄰發光標記之近似中心原子之間的距離。在一些實施例中，毗鄰發光標記隔開大約6埃之距離 d_L 。在一些實施例中，距離 d_L 係至少6埃(例如至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或至少12埃)。在一些實施例中，最小距離 d_L 量測為近似值，在間隔體構形、間隔體撓性或核酸撓性中可能考慮或不考慮其。

【0082】 在其他態樣中，本揭示內容提供產生發光標記之間之距離 d_L 之一般策略，使得經多重標記之反應物可經改造以具有最大化亮度而不損害發射壽命。在一些實施例中，足夠靠近性之毗鄰發光標記可相互作用，使得發生淬滅效應，從而產生減小及/或不一致之發射壽命值。因此，在一些實施例中，本文提供之一般設計策略可涉及限制毗鄰發光標記之間之相互作用程度的結構限制。

【0083】 在一些實施例中，發光標記可經由放射性及/或非放射性衰變與核酸連接體之鳥嘌呤核鹼基相互作用以實現減小及/或不一致之發射壽命。在一些實施例中，藉由使連接位點周圍之區中的G/C含量最小化產生發光標記連接位點。因此，在一些實施例中，連接位點位於寡核苷酸股之富含A/T之區中。在一些實施例中，每一連接位點與寡核苷酸股上之G或C核苷酸隔開至少2個核苷酸(例如與G或C核苷酸隔開2、3、4、5、6、7、8、9個或超過10個核苷酸)。因此，在一些實施例中，每一連接位點側接至少2個選自A或T之連續核苷酸。

【0084】 在某些實施例中，寡核苷酸股之連接位點之間之距離可由插入未經標記之鹼基(例如插入核苷酸)之數目闡述。在一些實施例中，寡核苷酸股上之連接位點隔開至少5個未經標記之鹼基(例如至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10個未經標記之鹼基)。在一些實施例中，連接位點隔開6、7、8或9個未經標記之鹼基。在一些實施例中，寡核苷酸股上之連接位點隔開介於5個與100個之間之未經標記之鹼基(例如介於5個與80個之間、介於5個與60個之間、介於5個與40個之間、介於5個與20個之間或介於5個與10個之間之未經標記之鹼基)。

【0085】 在一些實施例中，本文所述設計原理容許向經標記之反應組分中添加連續發光標記用於增加亮度及/或發光強度。在一些實施例中，本申請案之技術提供具有根據式 $L_n(x)$ 之亮度及/或發光強度的經多重標記之反應組分，其中 L_n 等於經標記之反應物上之發光標記的總數目且 x 等於相應經單一標記之反應物之量測之亮度或螢光強度。因此，在一些實施例中，雙染料標記之反應組分的亮度及/或發光強度與單染料標記之類似物相比加倍。在一些實施例中，三或四染料標記之反應組分分別具有與

單染料標記之類似物相比三倍或四倍之亮度及/或發光強度。在一些實施例中，本文所述經明亮標記之反應物展現由 $L_n(x)$ 所指示之值之至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的亮度及/或發光強度。

【0086】 在一些實施例中，本文提供之核酸連接體包含具有至少兩個發光標記之寡核苷酸股。圖2B一般地繪示連接至兩個發光標記之單股核酸連接體250。如所示，單股連接體可具有相對高之撓性程度，其可促進標記之間之相互作用。在一些實施例中，可使用單股連接體構築體藉由(例如)利用不相互作用而產生淬滅效應之某些標記(例如基於花青之染料)產生具有一致及/或保存壽命之經明亮標記之反應物。然而，對於若干類別之染料，由於連接體撓性之標記-標記靠近性之促進可產生減小及/或不一致之發射壽命。因此，在一些實施例中，使經標記之寡核苷酸股與一或多個寡核苷酸股雜交以減小總體核酸連接體撓性。

【0087】 在一些實施例中，使用股雜交作為一般設計策略以在核酸連接體上之發光標記之間產生適當距離 d_L 。在一些實施例中，使用股雜交以增加核酸之特定區中(例如經標記之區內及/或隔開經標記之區與反應物之區中)的剛性。圖2B一般地繪示雙股核酸連接體252，其包括雜交之寡核苷酸股以剛化經標記之區且藉此減小原本可促進標記-標記相互作用之股撓性。

【0088】 如由核酸連接體252所說明，在一些實施例中，在連接點附近之發光標記移動可促進標記-標記靠近性。亦如所示，在一些實施例中，在連接位點附近之標記移動可產生更緊密靠近核酸連接體之寡核苷酸股的標記。在一些實施例中，寡核苷酸股可與發光標記相互作用以產生不

一致及/或減小之發射壽命量測。因此，在一些實施例中，本文所述核酸連接體包含具有限制標記-標記及/或連接體-標記相互作用之程度之某些長度、剛性、連接位點及/或構形的間隔體。

【0089】 在一些實施例中，可在空間體積之上下文中界定發光標記之間之隔開距離，其中標記相對於彼此存在。舉例而言，圖2B繪示圖解說明可如何量測距離 d_L 之實例的圖解254。在一些實施例中，每一發光標記可由空間體積212界定。在一些實施例中，空間體積212近似為半徑 $212-r$ 之球形或其他橢圓形狀。在一些實施例中，每一發光標記包含具有與任何另一標記隔開至少5埃之中心點(例如毗鄰標記之中心點隔開至少5埃)的空間體積212。發光標記之中心點可為標記之任何適宜中心，包括(例如)標記之質量中心或幾何中心。在一些實施例中，可藉由如圖2B中所圖解說明計算或近似半徑 $212-r$ 測定發光標記之中心點。在一些實施例中，發光標記之中心點可計算或近似為發光標記之最長尺寸之一半(例如如本文中別處針對圖1A之 r_1 及 r_2 所述)。

【0090】 在一些實施例中，毗鄰發光標記之間之距離(d_L)可量測為毗鄰發光標記之質量之中心之間的距離。在一些實施例中，質量中心係指根據其質量稱重之發光標記中所有原子之平均位置。計算質量中心之方法為業內已知(例如，參見Leach, A.R. *Molecular Modelling: Principles and Applications* (第2版), Prentice-Hall 2001；Guenza, M. (2002) *Macromolecules* 35(7):2714-2722)。

【0091】 在一些實施例中，毗鄰發光標記之間之距離(d_L)可量測為毗鄰發光標記之幾何中心之間之距離。在一些實施例中，分子之幾何中心係指分子之所有原子(例如發光標記中之所有原子)之平均位置，其中原子

未稱重。因此，在一些實施例中，分子之幾何中心係指作為分子中之所有原子之坐標之平均值的空間中之點。

【0092】 在一些實施例中，使用業內已知之任何適宜方法更精確地計算空間體積²¹²。舉例而言，莫耳濃度折射性將包括極性之性質列入作為因子，且可根據以下方程式計算：

$$\text{莫耳濃度折射性} = [(n^2 - 1)/(n^2 + 2)] \times (MW/d),$$

其中 n = 折射率； MW = 分子量；且 d = 密度。

【0093】 在一些實施例中，標記之空間體積²¹²可以計算方式計算以包括額外及/或更多複雜因子。舉例而言，Verloop空間因子基於鍵角、凡得瓦半徑(van der Waals radii)、鍵長度及可能之構形提供分子之空間尺寸(例如參見Harper, K.C.等人 (2012) Nature Chemistry 4, 366-374)。

【0094】 在一些實施例中，在隔開距離 d_L 中可考慮發光標記在連接位點附近之移動。如圖2B中所示，在一些實施例中，可基於間隔體長度及標記之空間體積界定標記在每一連接位點附近移動之位置。移動之此理論範圍由虛線說明。應瞭解，在一些實施例中，本文所述之各種組合物及設計策略可有利地限制移動範圍接近所示重疊區之程度。舉例而言，在一些實施例中，間隔體剛性、間隔體長度及連接位點分離可各自根據本揭示內容解決以限制標記可能接近重疊區之程度。亦應瞭解，圖解254意欲用於闡釋目的，例如此乃因標記不一定需要物理接觸以發生放射性及/或非放射性衰變。

【0095】 在一些實施例中，圖解254中繪示之標記之移動範圍可通常稱作空間體積，例如具有標記可在給定時間點在空間中之點存在的改變機率的區之空間區域。在一些實施例中，每一標記佔據實質上不與任何另

一發光標記重疊之空間體積。在一些實施例中，每一標記佔據實質上不含任何另一標記之空間體積。

【0096】 在一些實施例中，可考慮雙股連接體之螺旋結構設計發光標記之相對連接位點。圖2C繪示具有隔開距離 x 之兩個標記之核酸260的實例。核酸262 (按比例近似繪製)在相隔為核酸260大約一半之鹼基的連接位點連接至兩個發光標記，但沿著螺旋之相對連接位點位置導致穿過空間之標記隔開距離為大約 $2x$ 。如所示，在一些實施例中，核酸連接體可藉由用作標記之間之立體障壁進一步限制標記之間之放射性及/或非放射性衰變程度。

【0097】 在一些實施例中，術語「立體障壁」係指連接體或一部分連接體(例如核酸連接體或其部分)，位於連接至連接體之發光標記與連接體之一些其他連接之間。不期望受限於理論，據信立體障壁可吸收、偏轉或以其他方式阻擋由發光標記發射之放射性及/或非放射性衰變。在一些實施例中，立體障壁防止或限制一或多個發光標記與一或多個其他發光標記相互作用之程度。在一些實施例中，立體障壁防止或限制一或多個發光標記與一或多種反應物相互作用之程度。在一些實施例中，立體障壁防止或限制一或多個發光標記與一或多個與反應物相關之分子(例如結合至反應物之聚合酶)相互作用的程度。因此，在一些實施例中，術語立體障壁可通常指由核酸連接體之一些部分提供之保護或遮蔽效應。

【0098】 在一些實施例中，一或多個結構基序可用作立體障壁。舉例而言，在一些實施例中，由雙股核酸連接體形成之螺旋用作立體障壁。在一些實施例中，莖環或其部分(例如莖、環)用作立體障壁。在一些實施例中，三向接點(例如在具有兩個或更多個莖環之核酸中)用作立體障壁。

在一些實施例中，無連接之雜交股(例如支撐股)用作立體障壁。在一些實施例中，間隔體用作立體障壁。

【0099】 在一些實施例中，本文所述經明亮標記之反應物可隔開發光標記與反應物。在一些實施例中，核酸264包含核苷多磷酸280反應物，其在合成反應中用作聚合酶290之受質。在一些實施例中，接近聚合酶活性位點之標記可誘導聚合酶光損害(例如經由非放射性衰變或其他方式)，其可對聚合酶活性有害。如所示，核酸266連接至反應物，使得連接體之至少一部分在標記與反應物間之插入區中。因此，在一些實施例中，核酸連接體可用作立體障壁以進一步保護聚合酶免於標記誘導之光損害。在一些實施例中，此聚合酶保護效應可經由標記-反應物空間分離及/或在標記與反應物之間存在立體障壁而發生。聚合酶保護進一步詳細闡述於同在審查中之美國專利申請案第15/600,979號中，其全文內容以引用方式併入本文中。

【0100】 在一些實施例中，核酸連接體之大小及組態(例如核酸連接體之一或多個寡核苷酸股及/或一或多個間隔體)決定發光標記與核苷多磷酸間之距離。在一些實施例中，距離係約1 nm或2 nm至約20 nm。舉例而言，超過2 nm、超過5 nm、5-10 nm、超過10 nm、10-15 nm、超過15 nm、15-20 nm、超過20 nm。然而，發光標記與核苷多磷酸間之距離不可太長，因為某些檢測技術要求發光標記係在欲激發之界定照度內(例如當核苷多磷酸保持在聚合酶之活性位點內時)。因此，在一些實施例中，整體距離小於30 nm、小於25 nm、約20 nm或小於20 nm。

【0101】 在一些實施例中，可執行本文所述組合物之其他特徵以促進標記-反應物分離以最小化標記誘導之光損害之潛能，例如間隔體長

度、間隔體剛性、連接位點位置。在一些實施例中，與本文所述核酸連接體之反應物連結性可相對於發光標記經修飾以促進標記-反應物分離。圖3A一般地繪示具有相同股或相反股標記-反應物連結性之核酸連接體。在一些實施例中，核酸300包含連接至相同寡核苷酸股之兩個或更多個發光標記及反應物。在一些實施例中，相同股連結性在標記與反應物之間產生共價連結。

【0102】 在一些實施例中，核酸302包含連接至不同寡核苷酸股之兩個或更多個發光標記及反應物。在一些實施例中，相反股連結性在標記與反應物之間產生非共價連結。在一些實施例中，標記與反應物之相反股連結性經由標記連接之寡核苷酸股與反應物連接之寡核苷酸股的雜交發生。如所示，在一些實施例中，本揭示內容之核酸連接體包含標記-反應物隔開距離 d_{LR} 。在一些實施例中， d_{LR} 係反應物與最近發光標記之間之距離。在一些實施例中， d_{LR} 係自標記連接位點至反應物連接位點量測。在一些實施例中， d_{LR} 係自標記之發光分子至反應物量測。在一些實施例中， d_{LR} 係至少1 nm。在一些實施例中， d_{LR} 介於約1 nm至約10 nm (例如大約1 nm、2 nm、3 nm、4 nm、5 nm、6 nm、7 nm、8 nm、9 nm、10 nm或超過10 nm)。在一些實施例中， d_{LR} 介於約2 nm至約30 nm (例如介於約2 nm與25 nm之間、介於約2 nm與20 nm之間、介於約2 nm與15 nm之間、介於約2 nm與10 nm之間、介於約2 nm與5 nm之間、介於約5 nm與10 nm之間、介於約10 nm與20 nm之間、介於約5 nm與30 nm之間、介於約15 nm與30 nm之間或介於約20 nm與30 nm之間)。

【0103】 圖3B繪示經明亮標記之反應物之設計中所用之非限制性距離規格的實例。在一些實施例中，核酸連接體304經由相同股連結性連接

至兩個發光標記及核苷六磷酸(例如反應物)。在一些實施例中，如所示， d_L 係大約1 nm且 d_{LR} 係大約7 nm。在一些實施例中，本揭示內容之經明亮標記之反應物包含超過兩個發光標記。舉例而言，在一些實施例中，核酸連接體306經由相同股連結性連接至三個發光標記及核苷六磷酸(例如反應物)。如所示，在一些實施例中，具有在超過兩個連接位點連接之超過兩個發光標記的構築體將必需具有超過一個隔開距離 d_L 。在一些實施例中，可根據本文中之說明獨立地設計單一構築體上之每一隔開距離 d_L 。在一些實施例中，每一標記隔開距離 d_L 可設計為大約相同。舉例而言，在一些實施例中，各隔開距離 d_L 係大約3.5 nm且 d_{LR} 係大約7 nm。

【0104】 在一些實施例中，本申請案之經明亮標記之反應物包含兩個或更多個經由不同寡核苷酸股連接之發光標記。舉例而言，在一些實施例中，核酸連接體308包含四個經由單獨寡核苷酸股連接之發光標記。在一些實施例中，核酸連接體308之未經標記之寡核苷酸股包含與連接至兩個發光標記及核苷多磷酸之第一寡核苷酸股互補的第一部分。未經標記之寡核苷酸股進一步包含與連接至兩個發光標記之第二寡核苷酸股互補的第二部分。如所示，在一些實施例中，每一經標記之股內之發光標記連接位點隔開9個核苷酸。在一些實施例中，非鄰接標記之股上之最近連接位點之間之隔開可相同或不同(例如如由10個核苷酸隔開所示)。

【0105】 具有相同股標記-反應物連結性之非限制性一般核酸連接體304用於產生圖3C中所示之經標記之核苷多磷酸的基礎。如所示，圖3C之核酸連接體包含兩個雜交之寡核苷酸股。根據本揭示內容之某些實施例，兩個發光標記在連接體之第一寡核苷酸股內之無鹼基位點連接。如本文中別處闡述為一般連接策略之點擊化學技術用於將核苷多磷酸連接至相同寡

核苷酸股。根據本文所述理論使第二寡核苷酸股與第一股雜交以促進連接之組分的限制空間構形。圖3C之構築體成功地用於利用其他經標記之核苷多磷酸之單一分子定序運行(圖3D)。產生具有相反股連結性之類似設計之構築體且示於圖3E中。

【0106】 圖3E繪示非共價連結核苷多磷酸(例如反應物)與發光標記之核酸連接體的實例性結構。如所示，使在無鹼基連接位點連接至兩個發光標記之第一寡核苷酸股與在末端連接位點連接至核苷六磷酸之第二寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，涵蓋本發明中提供用以產生經明亮標記之反應物的設計策略以包括替代標記偶聯策略，例如整合至連接體中(例如整合至寡聚或聚合連接體中，例如寡核苷酸股)之標記。舉例而言，圖3F繪示具有兩個在寡核苷酸股內連接之標記之核酸連接體的實例。

【0107】 如圖3F中所示，在一些實施例中，經明亮標記之反應物包含在寡核苷酸股內(例如整合至股中)連接之兩個發光標記。在一些實施例中，該等偶聯策略可利用不經由放射性及/或非放射性衰變相互作用之發光分子(例如基於花青之染料(例如如圖3F之加框區域中所示))執行。在一些實施例中，在寡核苷酸股內連接之發光分子的數目可僅受寡核苷酸股之大小限制。因此，在一些實施例中，經明亮標記之反應物包含超過兩個在寡核苷酸股內連接之發光標記(例如2個、3個、4個、5個、6個或超過6個發光標記)。圖3F中所繪示之構築體成功地用於利用三個其他經明亮標記之核苷多磷酸的定序運行(圖3G)。

【0108】 在一些態樣中，本揭示內容係關於以下發現：核酸連接體可經改造以具有結構受限之構形，其為具有一致及/或保存發射壽命之經明亮標記之反應物提供支架。如本文所述，在一些實施例中，寡核苷酸股

雜交係一種促進出於標記隔開之目的限制構形之一般策略。在一些實施例中，寡核苷酸股雜交涉及不同寡核苷酸股之雜交。在一些實施例中，寡核苷酸股雜交涉及自股雜交(例如單一股內之自雜交)。在一些實施例中，自股雜交可限制核酸連接體撓性，如本文中別處關於單獨股雜交所述。在一些實施例中，自股雜交用於形成核酸連接體中之一或多個莖環結構。

【0109】 莖環或髮夾環係當寡核苷酸股摺疊並與同一股之另一部分形成鹼基對時形成的寡核苷酸股上之核苷酸的未配對環。在一些實施例中，莖環之未配對環包含3個至10個核苷酸。因此，莖環可由具有雜交形成莖之倒轉互補序列之寡核苷酸股的兩個區形成，其中兩個區隔開3個至10個形成未配對環之核苷酸。在一些實施例中，莖可經設計以具有一或多個G/C核苷酸，與A/T核苷酸相比，其可利用形成之額外氫鍵結相互作用提供額外穩定性。在一些實施例中，莖包含緊密毗鄰未配對環序列之G/C核苷酸。在一些實施例中，莖包含與未配對環序列毗鄰之前2個、3個、4個或5個核苷酸內的G/C核苷酸。

【0110】 在一些實施例中，莖環核酸連接體之未配對環包含一或多個發光標記。因此，在一些實施例中，一或多個標記連接位點存在於未配對環中。在一些實施例中，連接位點發生在未配對環中之無鹼基位點。在一些實施例中，連接位點發生在未配對環之鹼基。在一些實施例中，例如由於利用鳥嘌呤觀察到之淬滅效應，環包含富含A/T/U之序列，如本文中別處所述。在一些實施例中，連接位點發生在未配對環中之A、T或U核苷酸。在一些實施例中，至少四個連續A、T或U核苷酸發生在連接位點之任一側上。在一些實施例中，未配對環包含少於33%之G/C含量(例如少於30%、少於20%、少於10%或0%之G/C含量)。

【0111】 在一些實施例中，發光標記連接至莖環之未配對環(例如標記連接位點發生在環內)。舉例而言，圖4A一般地繪示具有莖環核酸連接體400之經標記之反應物的實例。如所示，在一些實施例中，第一寡核苷酸股410自雜交以形成莖環。在一些實施例中，寡核苷酸股之自雜交部分形成莖環之莖412。在一些實施例中，自股雜交可形成莖環之環414 (例如未配對環)。在一些實施例中，第一寡核苷酸股410進一步與連接至反應物之第二寡核苷酸股420雜交。因此，在一些實施例中，莖環核酸連接體經由相反股連結性非共價連結發光標記至反應物。應瞭解，在一些實施例中，連接至發光標記之自雜交寡核苷酸股(例如具有莖環之股)可經由相同股連結性連接至一或多種反應物。

【0112】 在一些實施例中，兩個或更多個發光標記連接至莖環核酸連接體。舉例而言，在一些實施例中，莖環核酸連接體402連接至兩個發光標記。如所示，在一些實施例中，兩個發光標記之連接位點發生在莖環之環內。在一些實施例中，由自雜交莖區提供之穩定性產生具有相對低程度之撓性之環區。在一些實施例中，未配對環內之發光標記連接位點可經設計以促進有利之標記-標記空間分離及/或有利之標記-反應物空間分離。由非限制性莖環核酸連接體402提供之實例繪示彼此隔開近似環之直徑之距離的標記連接位點。在一些實施例中，此設計可最大化經由空間之標記-標記分離。在一些實施例中，此設計經由由環提供之立體障壁效應進一步限制標記-標記相互作用之程度，如本文中別處所述。在一些實施例中，莖環核酸連接體包含兩個或更多個莖環(圖4B)。

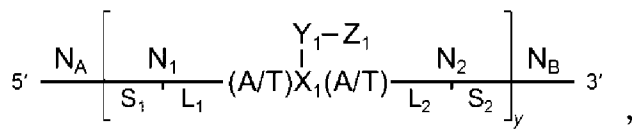
【0113】 如圖4B中所示，在一些實施例中，莖環核酸連接體404包含兩個莖環。在一些實施例中，兩個莖環之形成產生具有Y形之核酸連接

體，使得形成三向接點410。在一些實施例中，由於自該等特徵產生之相對穩定性及幾何限制構形，涵蓋三向接點作為一般設計策略。在一些實施例中，莖環核酸連接體404包含一個連接至每一環之發光標記。在一些實施例中，莖環核酸404經由相反股連結性非共價連結發光標記及反應物，例如，連接至第一寡核苷酸股之一或多個標記與連接至一或多種反應物之第二寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，莖環核酸406經由相同股連結性連結發光標記及反應物(例如一或多個標記及一或多種反應物連接至相同寡核苷酸股)。莖環核酸406繪示具有三向接點之經明亮標記之反應物之設計中所用之非限制性距離規格的實例。舉例而言，該等近似距離用作產生圖4C中所示之經標記之核苷多磷酸的基礎。圖4C之構築體成功地用於利用其他經標記之核苷多磷酸之單一分子定序運行(圖4D)。

【0114】 在一些實施例中，一或多個發光標記連接至莖環之莖。在一些實施例中，核酸連接體之莖環不包含發光標記。在一些實施例中，核酸連接體之莖環包含莖內之未配對區(例如「膨出部環」)。在一些實施例中，在核酸連接體中包括一或多個未經標記之結構基序(例如莖環)(例如在核酸連接體上之位置中，使得其介於一或多個發光標記與一或多種核苷多磷酸之間)。在該等實施例中，一或多個未經標記之結構基序可提供立體障壁效應，如本文中別處所述。

【0115】 在一些實施例中，莖環核酸連接體包含連接至發光標記之第一寡核苷酸股。在一些實施例中，發光標記在第一寡核苷酸股上之連接位點經由間隔體連接。在一些實施例中，第一寡核苷酸股形成具有莖及環(例如未配對環)之莖環二級結構。在一些實施例中，環包含連接位點。在一些實施例中，核酸連接體包含與第一寡核苷酸股雜交之第二寡核苷酸

股。在一些實施例中，第二寡核苷酸股連接至核苷多磷酸。在一些實施例中，核苷多磷酸經由間隔體連接至第二寡核苷酸股。在一些實施例中，第一寡核苷酸股具有以下結構：



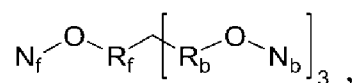
其中N_A及N_B各自係5至40個獨立地選自A、U、T、G及C之核苷酸的連續序列，其中第二寡核苷酸股與N_A之5'部分或N_B之3'部分雜交；括號表示形成y個莖環之區，每一莖環具有莖及環，其中y係1至3；N₁及N₂各自係5至20個獨立地選自A、U、T、G及C之核苷酸的連續序列，其中：N₁ (S₁)之5'部分及N₂ (S₂)之3'部分反向互補或部分反向互補且能彼此雜交以形成莖基序；當S₁及S₂雜交形成莖基序時，N₁ (L₁)之3'部分、N₂ (L₂)之5'部分及插入區形成環基序；(A/T)係選自A、T及U之核苷酸；X₁係第二寡核苷酸股上之連接位點；Y₁係第一連接體；且Z₁係發光標記。

【0116】 如本文所述，本揭示內容之態樣係關於用於連結一或多個發光標記至一或多種反應物(例如一或多種核苷多磷酸)之幾何受限連接體構形。在一些實施例中，幾何受限構形係指具有兩個或更多個發光標記之核酸連接體，其中發光標記在空間由對稱構形隔開。在一些態樣中，本揭示內容之經明亮標記之反應物包含類似如圖5A中繪示之樹狀構形的核酸連接體。在一些實施例中，樹狀連接體500包含連結至反應物(例如核苷多磷酸)之參標記之核酸連接體。如所示，在一些實施例中，樹狀連接體500包含三種主要寡核苷酸組分。在一些實施例中，第一寡核苷酸組分510包含經由具支股連接體共價連接之四個寡核苷酸股。在一些實施例中，組分510之三個寡核苷酸股各自連接至發光標記(例如經由本文所述末端連接或另一偶聯策略)。因此，在一些實施例中，組分510之三個標記之寡核苷酸

股通常稱作組分510之經標記部分。在一些實施例中，組分510之四個寡核苷酸股未經標記。在一些實施例中，四個寡核苷酸股與第二寡核苷酸組分520雜交。在一些實施例中，核酸連接體500之第二寡核苷酸組分520連接至反應物(例如經由本文所述末端連接或另一偶聯策略)。在一些實施例中，第三寡核苷酸組分530與組分510之經標記部分之三寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，第三寡核苷酸組分530稱為支撐股，此乃因其與組分510之雜交在經標記之區中提供結構剛性以促進發光標記之空間分離。

【0117】 如應瞭解，本文所述連接體設計策略中之任一者可應用於由本揭示內容涵蓋之樹狀核酸連接體或任何另一核酸連接體構形(例如股連結性、間隔體性質及間隔體構形、標記-標記分離、標記-反應物分離、三向接點等)。樹狀核酸502繪示具有樹狀核酸連接體之經明亮標記之反應物之設計中所用之非限制性距離規格的實例。作為闡釋性實例，該等近似距離用作產生圖5B中所示之經標記之核苷多磷酸的基礎。如所示，在一些實施例中，樹狀核酸可包含超過一種反應物(例如兩種核苷多磷酸或超過兩種核苷多磷酸)。

【0118】 在一些實施例中，在包含具有反應物之雜交部分之第一及第二寡核苷酸股方面闡述樹狀核酸連接體。舉例而言，在一些實施例中，樹狀核酸連接體包含在第一寡核苷酸之末端經由偶合化合物(例如具支股偶合劑)連接至兩個或更多個分支寡核苷酸股的第一寡核苷酸股。在一些實施例中，每一分支寡核苷酸股連接至發光標記。在一些實施例中，第一寡核苷酸股與連接至反應物(例如核苷多磷酸)之第二寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，第三寡核苷酸股(例如第三寡核苷酸組分)與兩個或更多個分支寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，偶合化合物具有以下結構：



其中 N_f 係第一寡核苷酸股； N_b 係分支寡核苷酸股； R_f 及 R_b 各自彼此獨立地係鍵或選自由以下組成之群之連接基團：經取代或未經取代之伸烷基；經取代或未經取代之伸烯基；經取代或未經取代之伸炔基；經取代或未經取代之伸雜烷基；經取代或未經取代之伸雜烯基；經取代或未經取代之伸雜炔基；經取代或未經取代之伸雜環基；經取代或未經取代之伸碳環基；經取代或未經取代之伸芳基；經取代或未經取代之伸雜芳基；及其組合；且各O係毗鄰寡核苷酸股之5'磷酸基或3'羥基之氧原子。

【0119】 在一些態樣中，本揭示內容提供明亮經標記之反應物，該明亮經標記反應物具有星狀核酸連接體。如圖6A中所示，星狀核酸連接體可以提供以下：在該連接體的外部區域之對稱排列的反應物及更接近構形核心區之一或多個發光標記。以此方式，在一些實施例中，反應物可更易於與(例如)聚合酶反應。在一些實施例中，核心區附近之發光標記連接位點周圍之核苷酸含量係根據本文所述規格選擇(例如低G/C含量以避免標記與連接體之間之淬滅效應)。在一些實施例中，星狀核酸連接體600包含Y形寡核苷酸組分，其具有三個經由具支股連接體連接之寡核苷酸股。在一些實施例中，Y形寡核苷酸組分之三個寡核苷酸股中之每一者連接(例如在末端)至反應物。在一些實施例中，Y形寡核苷酸組分之三個寡核苷酸股中之每一者與寡核苷酸股雜交。在一些實施例中，雜交寡核苷酸股中之一者連接至發光標記。在一些實施例中，然而，雜交寡核苷酸股中之二者或三者各自連接至發光標記。

【0120】 在一些實施例中，星狀核酸連接體之Y形寡核苷酸組分連接至超過三種反應物。舉例而言，在一些實施例中，具有星狀核酸連接體

602之經明亮標記之反應物在Y形寡核苷酸組分之兩個寡核苷酸股中之每一者包含兩種反應物。在一些實施例中，該兩種反應物連接至可與未經標記之股進行雜交的Y形寡核苷酸組分之股，如所示。

【0121】 在一些實施例中，星狀核酸連接體包含經標記之寡核苷酸組分及反應物寡核苷酸組分，其中每一寡核苷酸組分包含Y形寡核苷酸。舉例而言，在一些實施例中，星狀核酸連接體604包含連接至三個發光標記之第一Y形寡核苷酸組分。在一些實施例中，每一發光標記連接至第一Y形組分之每一寡核苷酸股。在一些實施例中，如所示，每一發光標記在第一Y形寡核苷酸組分之核心區附近連接。在一些實施例中，星狀核酸連接體604與連接至三種反應物之第二Y形寡核苷酸組分雜交。在一些實施例中，每一反應物連接至第二Y形組分之每一寡核苷酸股。在一些實施例中，如所示，每一反應物係連接在第一Y形寡核苷酸組分之外部區(例如經由末端連接位點)。星狀核酸606繪示具有星狀核酸連接體之經明亮標記之反應物之設計中所用之非限制性距離規格的實例。具有根據本揭示所產生之星狀核酸連接體之經明亮標記之反應物的實例性結構示於圖6B中。

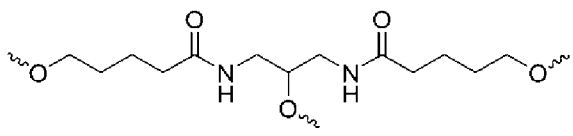
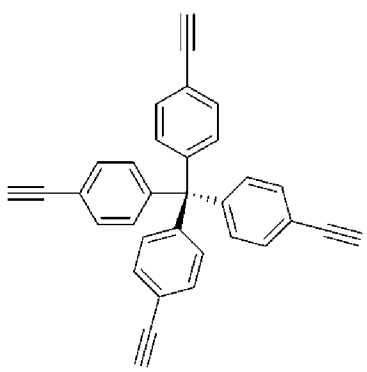
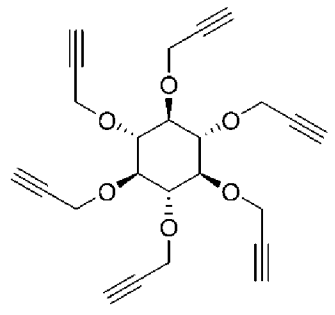
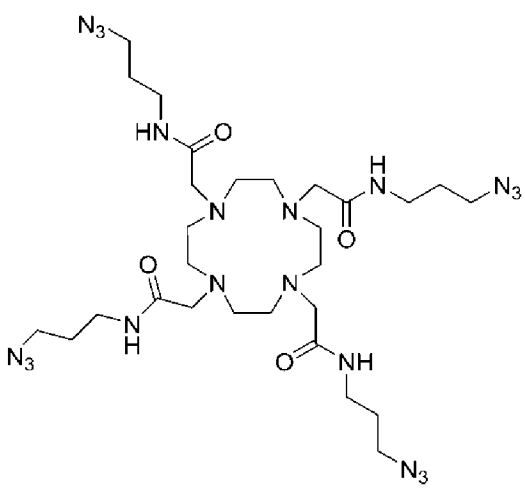
【0122】 在一些實施例中，可在連接體之Y形寡核苷酸組分中所用之共價偶合化合物方面闡述星狀核酸連接體。舉例而言，在一些實施例中，具有星狀核酸連接體之經明亮標記之反應物包含含有三個或更多個自共價偶合化合物延伸之寡核苷酸股的第一寡核苷酸組分。在一些實施例中，寡核苷酸股中之至少一者連接至反應物(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，第一寡核苷酸組分之寡核苷酸股中之兩者或更多者(例如2、3、4、5或更多者)各自連接至一或多種反應物。在一些實施例中，第一寡核苷酸組分與第二寡核苷酸組分雜交。在一些實施例中，第二寡核苷酸組分

包含至少一個連接至發光標記之寡核苷酸股。在一些實施例中，第二寡核苷酸組分包含三個或更多個自共價偶合化合物延伸之寡核苷酸股。在一些實施例中，第二寡核苷酸組分之寡核苷酸股中之兩者或更多者(例如2、3、4、5或更多者)各自連接至發光標記。

【0123】 在一些態樣中，本揭示內容之經明亮標記之反應物包含具有四面體核之核酸連接體。如由圖6C之實例性結構所闡釋，四面體核係指促進一或多個發光標記及一或多種核苷多磷酸之對稱受限之空間排列的四向共價偶合化合物。圖6D繪示可用於合成圖6C中所示之實例性結構之反應方案的實例。在一些實施例中，涵蓋四面體核用於與本文所述經明亮標記之反應物設計策略中之一或多者中之任一者組合。作為實例，由四面體核提供之對稱受限之益處係利用本文所述三向接點執行以產生圖6E中所示之經明亮標記之反應物。如所示，在一些實施例中，在三向接點處或其附近連接發光標記可有利地提供空間效應，如本文中別處所述。

【0124】 在一些實施例中，本揭示內容涵蓋使用允許對稱連接之核化學偶合劑的其他對稱受限之構形。在一些實施例中，例如，經明亮標記之反應物包含基於環糊精之核。產生具有三向接點之基於環糊精之核酸連接體的實例係合成方案示於圖7中。環糊精偶合化合物之實例性結構提供於表1中，連同可用於根據本文所述實施例之三個或更多個寡核苷酸股之共價鍵聯之其他偶合化合物的實例。

表1. 用於連接寡核苷酸股之偶合化合物的實例

間隔體

【0125】 如本文所述，在一些實施例中，發光標記及/或反應物可經由間隔體連接至核酸連接體。在一些實施例中，間隔體在連接位點連接至核酸連接體之寡核苷酸股。在一些實施例中，連接位點發生在寡核苷酸股上之末端位點(例如5'或3'端)。末端連接位點之實例提供於本申請案中，

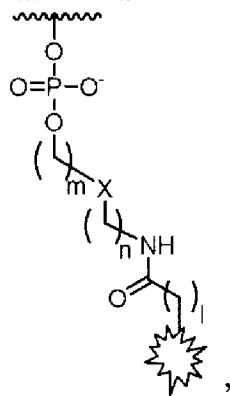
例如如圖 3C、3E、4C、6B、6C、8、9及10 (核苷酸之末端連接)及圖 5B、9及10 (發光標記之末端連接)中所示。在一些實施例中，連接位點發生在寡核苷酸股內之無鹼基位點(例如無核苷酸但毗鄰核苷酸之位點)。無鹼基連接位點之實例提供於本申請案中，例如如圖 3C、3E、6B、6C及8 (發光標記之無鹼基連接)中所示。在一些實施例中，連接位點發生在寡核苷酸股上之鹼基位點(例如連接至核苷酸，例如股上之核苷酸之核鹼基、糖或磷酸)。鹼基連接位點之實例提供於本申請案中，例如如圖 4C及8 (發光標記之鹼基連接)中所示。

【0126】 在一些實施例中，間隔體包含複數個胸苷核苷酸。在一些實施例中，間隔體包含具支股間隔體，例如具支股胸苷間隔體。在一些實施例中，具支股間隔體包含具支股胸苷間隔體。舉例而言，在一些實施例中，每一核苷多磷酸包含式Nu-T(T)_nT-R之胸苷間隔體，其中Nu代表核苷多磷酸，T代表胸苷核苷酸，n係值介於1與30之間之整數，且R代表連結一或多種額外核苷多磷酸之彙聚點。在一些實施例中，彙聚點進一步直接連接至核酸之寡核苷酸股。在一些實施例中，彙聚點進一步(例如)經由其他胸苷連接體及/或其他彙聚點非直接連接至寡核苷酸股。具支股胸苷間隔體之實例示於圖5B中，其繪示具有胸苷間隔體及進一步直接連接至寡核苷酸股之彙聚點的兩個核苷多磷酸。

【0127】 在一些實施例中，間隔體含有一或多個彙聚點，以使兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)核苷多磷酸連結至每一發光標記，兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)發光標記連結至每一核苷多磷酸或兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)核苷多磷酸連結至兩個或更多個(例如2、3、

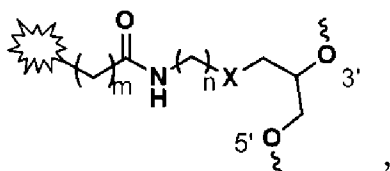
4、5、6、7、8、9、10或更多個)發光標記。

【0128】 在一些實施例中，間隔體在核酸連接體之寡核苷酸股上之末端位點連接。在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股之5'或3'端經由下文所示一般間隔體連接：



其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)； $m > 1$ ； $n > 1$ ；且 $m+n < 10$ 。

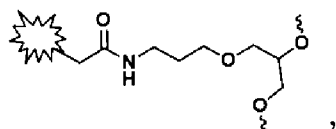
【0129】 在一些實施例中，間隔體在核酸連接體之寡核苷酸股內之內部無鹼基位點連接。在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股上之內部無鹼基位點經由下文所示之一般間隔體連接：



其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)； $n > 1$ ；且 $X = CH_2$ 或 O 。

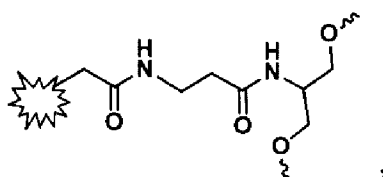
【0130】 用於發光標記連接(例如經由末端、內部無鹼基或鹼基連接位點)之間隔體的實例提供於表2中且示於下文中。儘管間隔體結構可顯示具有發光標記，但應瞭解，在一些實施例中，反應物可經取代使得本文提供之間隔體結構中之任一者可用於連接反應物(例如核苷多磷酸)至核酸連接體。

【0131】 在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股上之內部無鹼基位點經由下文所示甘胺酸間隔體連接：



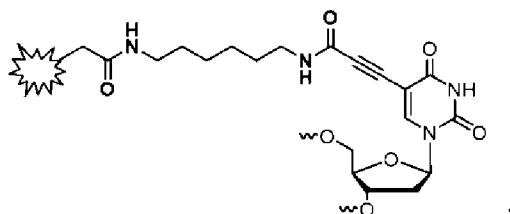
其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)。

【0132】 在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股上之內部無鹼基位點經由下文所示之絲胺醇胺間隔體連接：



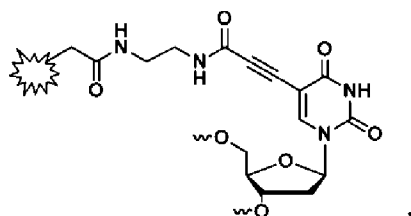
其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)。

【0133】 在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股上之內部鹼基位點經由下文所示之C6-胺基-T間隔體連接：



其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)。

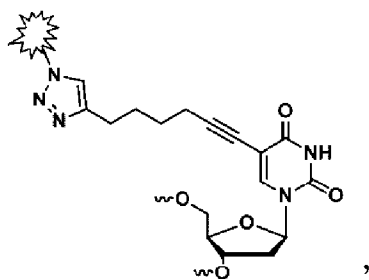
【0134】 在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股上之內部鹼基位點經由下文所示之C2-胺基-T間隔體連接：



其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)。

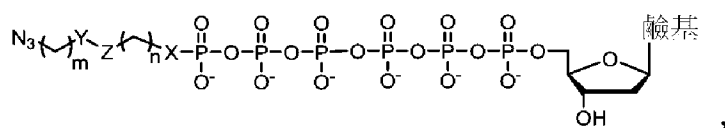
【0135】 在一些實施例中，發光標記及/或反應物在寡核苷酸股上之

內部鹼基位點經由下文所示之C8-炔烴-dT間隔體連接：



其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)。

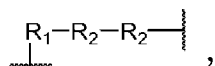
【0136】 在一些實施例中，一或多個發光標記及/或一或多種反應物(例如一或多種核苷多磷酸)可使用業內已知之化學偶合技術連接至核酸連接體。舉例而言，在一些實施例中，點擊化學基於(例如銅催化之、應力促進之、無銅之點擊化學等)可用於連接一或多個發光標記及一或多種核苷多磷酸至核酸。在一些實施例中，根據下文所示之一般結構經由疊氮化物偶聯之dN6P (例如dN6P—N₃)使核苷多磷酸偶合至核酸連接體：



其中鹼基係選自腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶及其衍生物之核鹼基；—Y—Z— = —CH₂CH₂—、—CONH—或—NHCO—；及X = NH或O。舉例而言，在一些實施例中，在銅催化之反應中藉由使dN6P—N₃或染料—N₃之疊氮化物與炔烴偶聯之核酸連接體之末端炔烴在適宜反應條件下接觸以在核酸連接體與dN6P或染料之間形成三唑鍵聯使疊氮化物偶聯之dN6P (例如dN6P—N₃)及/或疊氮化物偶聯之發光標記(例如染料—N₃)連接至核酸連接體。在一些實施例中，在無銅之反應中藉由使dN6P—N₃或染料—N₃之疊氮化物與環辛炔偶聯之核酸連接體之內部炔烴在適宜反應條件下接觸以在核酸連接體與dN6P或染料之間形成多環鍵聯使疊氮化物偶聯之dN6P (例如dN6P—N₃)及/或疊氮化物偶聯之發光標

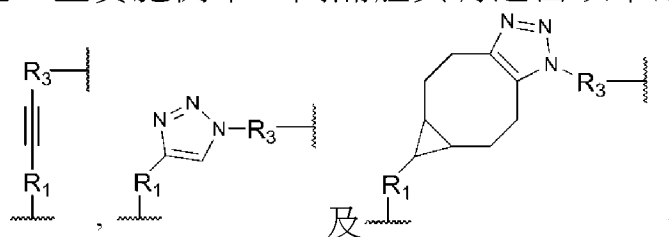
記(例如染料—N₃)連接至核酸連接體。核酸連接體之環辛炔修飾可使用適於產生業內已知之無銅之點擊化學部分的環辛炔試劑來完成。舉例而言，環辛炔修飾之核酸連接體係藉由使適宜環辛炔試劑(例如(1*R*,8*S*,9*S*)-*N*-琥珀醯亞胺基碳酸二環[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基酯)與核酸連接體之末端胺接觸來製備。

【0137】 因此，在一些實施例中，間隔體包括偶合基團(例如BCN、四嗪、四唑及經由適於點擊反應及類似偶合反應之反應性部分之偶合產生的其他產物)。在一些實施例中，間隔體藉由下式：



其中R₁係第一連接基團且連接至第一寡核苷酸股上之連接位點；R₂係第二連接基團且包含在所實施偶合反應中形成之偶合部分以共價接合R₁及R₃；且R₃係第三連接基團且連接至發光標記。

【0138】 在一些實施例中，間隔體具有選自以下之式：

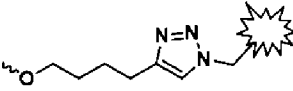
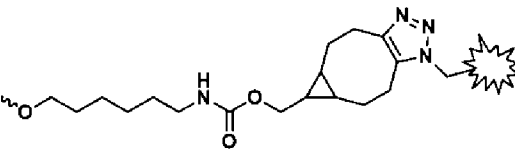
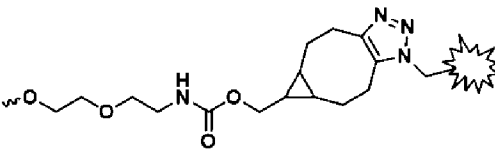
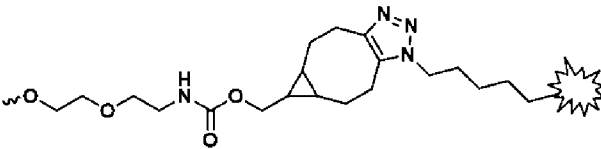
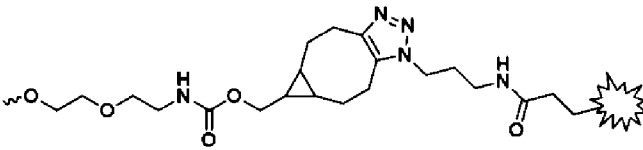
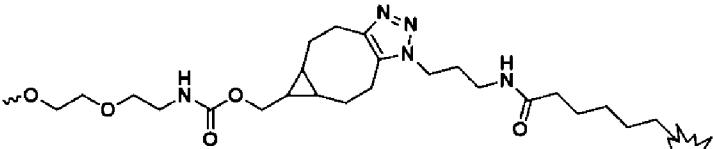
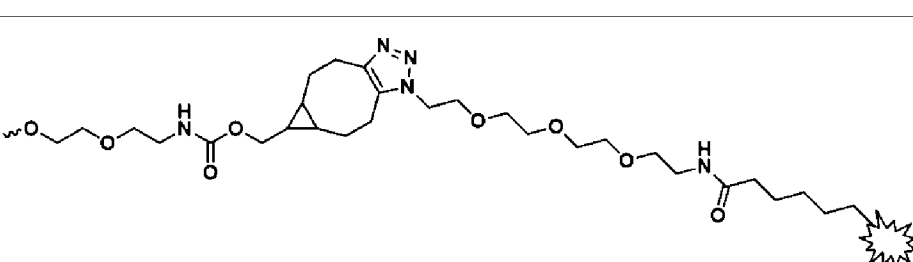
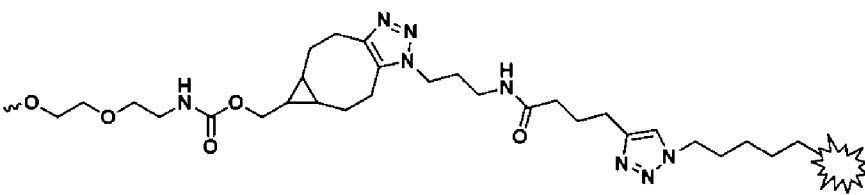


其中R₁及R₃各自獨立地係鍵或選自由以下組成之群之連接基團：經取代或未經取代之伸烷基；經取代或未經取代之伸烯基；經取代或未經取代之伸炔基；經取代或未經取代之伸雜烷基；經取代或未經取代之伸雜烯基；經取代或未經取代之伸雜炔基；經取代或未經取代之伸雜環基；經取代或未經取代之伸碳環基；經取代或未經取代之伸芳基；經取代或未經取代之伸雜芳基；及其組合。

【0139】 在一些實施例中，使用點擊化學產生之間隔體之實例提供

於表2中，其中  係發光標記(或在替代實施例中，反應物)。

表2. 點擊間隔體之實例

【0140】 如本文所用「核酸連接體」通常係指連結一或多個發光標

記至一或多種核苷多磷酸之核酸。在一些實施例中，核酸連接體可通常指具有任何數目之經由共價連接或經由鹼基配對(例如雜交)連結之寡核苷酸的構築體。在一些實施例中，或者，連接體可稱作可連接不同功能組分(例如一或多個發光標記、一或多種核苷多磷酸)之「核」或「鹼基」構築體。在一些實施例中，術語「構築體」貫穿各種上下文用於通常指連接體，且可涵蓋或可不涵蓋本文所述各種其他組分(例如間隔體、標記、核苷多磷酸等)。

【0141】 在一些實施例中，本文所述核酸連接體並不連接至材料之粒子(例如並不連接至金屬、磁性、聚合或其他材料之粒子)。在一些實施例中，核酸連接體係線性分子(例如「棒狀」核酸)。在一些實施例中，核酸連接體係環狀分子。在一些實施例中，核酸連接體係單股(例如具有或無莖環結構)。在一些實施例中，核酸連接體係雙股(例如具有或無莖環結構)。在一些實施例中，雙股核酸連接體之兩條股雜交(由於互補序列)且不共價連接。然而，在一些實施例中，可引入(例如使用一或多種化學連接體)一或多個共價鍵以共價連接雙股連接體之兩條股。在一些實施例中，核酸連接體可包括如本文所述之一或多個額外部分。在一些實施例中，核酸連接體包括i) 在糖磷酸主股內或末端之一或多個額外部分，ii) 一或多種修飾(例如一或多種經修飾之鹼基或糖)，或i)與ii)之組合。然而，在一些實施例中，核酸連接體不包括i)、ii)，或i)或ii)中之任一者。

【0142】 應瞭解，在核酸連接體之上下文中，與其連接之「核苷酸」或「核苷多磷酸」係指經構形以納入生長之核酸股中(例如在定序反應期間)的一或多種核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些實施例中，一或多種核苷酸包含一或多種核苷單磷酸或核苷多磷酸。在一些實施例中，核苷

多磷酸之實例包括核苷二磷酸或三磷酸或具有超過三個5'磷酸之核苷，例如核苷六磷酸。因此，在一些實施例中，「經標記核苷酸」係指經由本申請案之連接體連結至一或多個發光標記的核苷多磷酸，其中核苷多磷酸用作核酸合成反應條件下聚合酶之受質。在一些實施例中，核苷多磷酸至少包含二磷酸基或三磷酸基，其可由適宜聚合酶在磷醯基轉移反應(例如將核苷多磷酸之 α -磷酸自其 β -磷酸轉移至生長核酸股之3'羥基)中起作用。

【0143】 在一些實施例中，一或多種核苷磷酸(例如核苷多磷酸)可經由末端磷酸連接至寡核苷酸(例如經標記或未經標記之寡核苷酸股)，其形成本申請案之連接體之部分，其可用作保護聚合酶免於標記誘導之光損害(例如如本申請案中別處所述)的保護分子。在本申請案中所述之組合物或方法中之任一者之一些實施例中，核苷磷酸(例如核苷多磷酸)之磷酸部分(例如多磷酸部分)包括一或多個磷酸(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個磷酸基)或其變體。舉例而言，在一些實施例中，核苷磷酸(例如核苷多磷酸)之磷酸部分(例如多磷酸部分)可包括磷酸酯、硫酯、胺基磷酸酯、磷酸烷基酯鍵聯、其他適宜鍵聯或超過一種該等修飾或其兩者或更多者之組合。在一些實施例中，核酸連接體之經標記及未經標記之股彼此實質上互補(例如相對於二聚化結構域之長度，其中二聚化結構域內之股可彼此(例如)至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互補)。

【0144】 核苷多磷酸可具有 n 個磷酸基，其中 n 係大於或等於2、3、4、5、6、7、8、9或10之數。核苷多磷酸之實例包括核苷二磷酸及核苷三磷酸。經標記核苷酸可為末端磷酸標記之核苷多磷酸，使得核苷多磷酸之末端磷酸連接至包含一或多個發光標記之連接體(例如核酸連接體)，藉

此形成經標記之核苷多磷酸。該標記可為發光(例如螢光或化學發光)標記、產生螢光之標記、彩色標記、產色標記質量標籤、靜電標記或電化學標記。標記(或標記物)可經由連接體(例如如本文所述之間隔體)偶合至末端磷酸。連接體(例如間隔體)可包括(例如)至少一個或複數個羥基、硫氫基、胺基或鹵代烷基，其可適於在天然或經修飾之核苷酸之末端磷酸形成(例如)磷酸酯、硫酯、胺基磷酸酯或磷酸烷基酯鍵聯。連接體(例如間隔體)能解離以便(例如)借助聚合酶分離標記與末端磷酸。核苷酸及連接體(例如間隔體)之實例提供於美國專利第7,041,812號中，該案件以引用方式整體併入本文中。

【0145】 核苷酸(例如核苷多磷酸)可包含腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其變體中之任一者。核苷酸(例如核苷多磷酸)可包含甲基化核鹼基。舉例而言，甲基化核苷酸可為包含一或多個連接至核鹼基(例如直接連接至核鹼基之環、連接至核鹼基之環之取代基)之甲基的核苷酸。實例性甲基化核鹼基包括1-甲基胸腺嘧啶、1-甲基尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6,N6-二甲基腺嘌呤、1-甲基鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、N2-甲基鳥嘌呤及N2,N2-二甲基鳥嘌呤。

【0146】 如本文所用術語「核酸」通常指包含一或多個核酸亞單元之分子。核酸可包括一或多個選自腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其變體之亞單元。在一些實例中，核酸係去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其衍生物。在一些實施例中，核酸係經修飾核酸，包括但不限於鎖核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、三唑連接之核

酸、2'-F修飾之核酸及其衍生物及類似物。核酸可為單股或雙股。在一些實施例中，核酸通常指核苷酸之任何聚合物。

【0147】 在一些實施例中，本揭示內容提供用於基於單一分子之一或多種發光性質鑑別彼等分子的新組合物。在一些實施例中，分子(例如經發光標記之核苷多磷酸)係基於其亮度、發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率、發光強度或其兩者或更多者之組合來鑑別。鑑別可意指分配分子之精確分子屬性(identity)或可意指自一組可能之分子區分或區別特定分子、 在一些實施例中，複數個單一分子可基於不同亮度、發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率、發光強度或其兩者或更多者之組合彼此區分。在一些實施例中，藉由將單一分子暴露於一系列單獨光脈衝並評估自分子發射之每一光子之時間或其他性質來鑑別該單一分子(例如與其他分子區分)。在一些實施例中，集合依序自單一分子發射之複數個光子之資訊並進行評估以鑑別分子。在一些實施例中，分子之發光壽命係自複數個自分子依序發射之光子測定，且發光壽命可用於鑑別分子。在一些實施例中，分子之發光強度係自複數個自分子依序發射之光子測定，且發光強度可用於鑑別分子。在一些實施例中，分子之發光壽命及發光強度係自複數個自分子依序發射之光子測定，且發光壽命及發光強度可用於鑑別分子。

【0148】 因此，在本申請案之一些態樣中，將反應樣品暴露於複數個單獨光脈衝且檢測並分析一系列發射之光子。在一些實施例中，發射光子之系列提供關於在反應樣品中不隨實驗時間之流逝而變化的所存在單一分子之資訊。然而，在一些實施例中，發射光子之系列提供關於一系列在不同時間存在於反應樣品中(例如隨著反應或過程進行)之不同分子的資

訊。

發光標記

【0149】如本文所用，「發光標記」係吸收一或多個光子且可隨後在一或多個持續時間後發射一或多個光子的分子。在一些實施例中，該術語用於通常指經標記反應物之非反應物部分(例如發光標記可包括螢光團及至少一部分間隔體)。在一些實施例中，該術語特定指吸收及/或發射光子之分子(例如螢光團)。在一些實施例中，視上下文而定，該術語可與「發光分子」互換使用。在一些實施例中，發光標記係螢光團(例如「染料」或「螢光團染料」，如本文互換使用)。在一些實施例中，發光標記係基於玫瑰紅之分子。在一些實施例中，發光標記係基於花青之分子。在一些實施例中，發光標記係基於BODIPY之分子。

【0150】通常，發光標記包含芳香族或雜芳香族化合物，且可為芘、蔥、萘、吡啶、二苯乙烯、吡啶、苯并吡啶、噁唑、呋喃、噻吩、苯并噻吩、吡啶、吡噁嗪、吡啶、喹啉、乙錠(ethidium)、苯甲醯胺、花青、羧花青、柳酸酯、鄰胺苯甲酸酯、香豆素、螢光黃、玫瑰紅或其他類似化合物。染料之實例包括吡啶染料，例如螢光黃或玫瑰紅染料，包括5-羧基螢光黃(FAM)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基螢光黃(JOE)、四氯螢光黃(TET)、6-羧基玫瑰紅(R6G)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基玫瑰紅(TAMRA)、6-羧基-X-玫瑰紅(ROX)。染料之實例亦包括在 α 或 β 位具有胺基之萘胺染料。舉例而言，萘基胺基化合物包括1-二甲基胺基萘基-5-磺酸酯、1-苯胺基-8-萘磺酸酯及2-對-甲苯胺基-6-萘磺酸酯、5-(2'-胺基乙基)胺基萘-1-磺酸(EDANS)。染料之其他實例包括香豆素，例如3-苯基-7-異氰酸基香豆素；吡啶，例如9-異硫氰基吡啶及吡啶橙；N-(對-(2-苯并噁

唑基)苯基)馬來醯亞胺；花青，例如吡啶二羧花青3 (Cy®3)、(2Z)-2-[(E)-3-[3-(5-羧基戊基)-1,1-二甲基-6,8-二磺基苯并[e]吡啶-3-鎢(ium)-2-基]丙-2-亞烯基]-3-乙基-1,1-二甲基-8-(三氧烷基(trioxidanyl)硫基)苯并[e]吡啶-6-磺酸酯(Cy®3.5)、2-{2-[(2,5-二側氧基(dioxo)吡咯啉-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-16,16,18,18-四甲基-6,7,7a,8a,9,10,16,18-八氫苯并[2'',3'']吡啶并[8'',7'':5',6']吡喃并[3',2':3,4]吡啶并[1,2-a]吡啶-5-鎢-14-磺酸酯(Cy®3B)、吡啶二羧花青5 (Cy®5)、吡啶二羧花青5.5 (Cy®5.5)、3-(-羧基-戊基)-3'-乙基-5,5'-二甲基氧雜羧花青(CyA)；9-[2(或4)-[[[6-[2,5-二側氧基-1-吡咯啉基)氧基]-6-側氧基己基]胺基]磺醯基]-4(或2)-磺酸苯基]-2,3,6,7,12,13,16,17-八氫-1H,5H,11H,15H-吡啶并[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']二嗪啉-18-鎢內鹽(TR或Texas Red®)；BODIPY®染料；苯并噁唑；二苯乙炔；苊；及諸如此類。

【0151】 在某些實施例中，發光標記係選自表3之染料。表3中列示之染料係非限制性的，且本申請案之發光標記可包括表3中未列示之染料。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表3。在某些實施例中，經四種或更多種發光標記之核苷酸之發光標記係選自表3。

表3. 螢光團之實例

螢光團		
5/6-羧基玫瑰紅6G	Chromis 678C	DyLight® 655-B1
5-羧基玫瑰紅6G	Chromis 678Z	DyLight® 655-B2
6-羧基玫瑰紅6G	Chromis 770A	DyLight® 655-B3
6-TAMRA	Chromis 770C	DyLight® 655-B4
Alexa Fluor® 350	Chromis 800A	DyLight® 662Q
Alexa Fluor® 405	Chromis 800C	DyLight® 675-B1

螢光團		
Alexa Fluor® 430	Chromis 830A	DyLight® 675-B2
Alexa Fluor® 480	Chromis 830C	DyLight® 675-B3
Alexa Fluor® 488	Cy®3	DyLight® 675-B4
Alexa Fluor® 514	Cy®3.5	DyLight® 679-C5
Alexa Fluor® 532	Cy®3B	DyLight® 680
Alexa Fluor® 546	Cy®5	DyLight® 683Q
Alexa Fluor® 555	Dyomics-350	DyLight® 690-B1
Alexa Fluor® 568	Dyomics-350XL	DyLight® 690-B2
Alexa Fluor® 594	Dyomics-360XL	DyLight® 696Q
Alexa Fluor® 610-X	Dyomics-370XL	DyLight® 700-B1
Alexa Fluor® 633	Dyomics-375XL	DyLight® 700-B1
Alexa Fluor® 647	Dyomics-380XL	DyLight® 730-B1
Alexa Fluor® 660	Dyomics-390XL	DyLight® 730-B2
Alexa Fluor® 680	Dyomics-405	DyLight® 730-B3
Alexa Fluor® 700	Dyomics-415	DyLight® 730-B4
Alexa Fluor® 750	Dyomics-430	DyLight® 747
Alexa Fluor® 790	Dyomics-431	DyLight® 747-B1
AMCA	Dyomics-478	DyLight® 747-B2
ATTO 390	Dyomics-480XL	DyLight® 747-B3
ATTO 425	Dyomics-481XL	DyLight® 747-B4
ATTO 465	Dyomics-485XL	DyLight® 755
ATTO 488	Dyomics-490	DyLight® 766Q
ATTO 495	Dyomics-495	DyLight® 775-B2
ATTO 514	Dyomics-505	DyLight® 775-B3
ATTO 520	Dyomics-510XL	DyLight® 775-B4
ATTO 532	Dyomics-511XL	DyLight® 780-B1
ATTO 542	Dyomics-520XL	DyLight® 780-B2
ATTO 550	Dyomics-521XL	DyLight® 780-B3
ATTO 565	Dyomics-530	DyLight® 800

螢光團		
ATTO 590	Dyomics-547	DyLight® 830-B2
ATTO 610	Dyomics-547P1	eFluor® 450
ATTO 620	Dyomics-548	伊紅
ATTO 633	Dyomics-549	FITC
ATTO 647	Dyomics-549P1	螢光黃
ATTO 647N	Dyomics-550	HiLyte™ Fluor 405
ATTO 655	Dyomics-554	HiLyte™ Fluor 488
ATTO 665	Dyomics-555	HiLyte™ Fluor 532
ATTO 680	Dyomics-556	HiLyte™ Fluor 555
ATTO 700	Dyomics-560	HiLyte™ Fluor 594
ATTO 725	Dyomics-590	HiLyte™ Fluor 647
ATTO 740	Dyomics-591	HiLyte™ Fluor 680
ATTO Oxa12	Dyomics-594	HiLyte™ Fluor 750
ATTO Rho101	Dyomics-601XL	IRDye® 680LT
ATTO Rho11	Dyomics-605	IRDye® 750
ATTO Rho12	Dyomics-610	IRDye® 800CW
ATTO Rho13	Dyomics-615	JOE
ATTO Rho14	Dyomics-630	LightCycler® 640R
ATTO Rho3B	Dyomics-631	LightCycler®紅610
ATTO Rho6G	Dyomics-632	LightCycler®紅640
ATTO Thio12	Dyomics-633	LightCycler®紅670
BD Horizon™ V450	Dyomics-634	LightCycler®紅705
BODIPY® 493/501	Dyomics-635	麗絲胺玫瑰紅B
BODIPY® 530/550	Dyomics-636	蔡并螢光黃
BODIPY® 558/568	Dyomics-647	Oregon Green® 488
BODIPY® 564/570	Dyomics-647P1	Oregon Green® 514
BODIPY® 576/589	Dyomics-648	Pacific Blue™
BODIPY® 581/591	Dyomics-648P1	Pacific Green™
BODIPY® 630/650	Dyomics-649	Pacific Orange™

螢光團		
BODIPY® 650/665	Dyomics-649P1	PET
BODIPY® FL	Dyomics-650	PF350
BODIPY® FL-X	Dyomics-651	PF405
BODIPY® R6G	Dyomics-652	PF415
BODIPY® TMR	Dyomics-654	PF488
BODIPY® TR	Dyomics-675	PF505
C5.5	Dyomics-676	PF532
C7	Dyomics-677	PF546
CAL Fluor® Gold 540	Dyomics-678	PF555P
CAL Fluor® Green 510	Dyomics-679P1	PF568
CAL Fluor® Orange 560	Dyomics-680	PF594
CAL Fluor®紅590	Dyomics-681	PF610
CAL Fluor®紅610	Dyomics-682	PF633P
CAL Fluor®紅615	Dyomics-700	PF647P
CAL Fluor®紅635	Dyomics-701	Quasar® 570
Cascade®藍	Dyomics-703	Quasar® 670
CFT TM 350	Dyomics-704	Quasar® 705
CFT TM 405M	Dyomics-730	玫瑰紅123
CFT TM 405S	Dyomics-731	玫瑰紅6G
CFT TM 488A	Dyomics-732	玫瑰紅B
CFT TM 514	Dyomics-734	玫瑰紅綠
CFT TM 532	Dyomics-749	玫瑰紅綠-X
CFT TM 543	Dyomics-749P1	玫瑰紅紅
CFT TM 546	Dyomics-750	ROX
CFT TM 555	Dyomics-751	ROX
CFT TM 568	Dyomics-752	Seta TM 375
CFT TM 594	Dyomics-754	Seta TM 470
CFT TM 620R	Dyomics-776	Seta TM 555

螢光團		
CF TM 633	Dyomics-777	Seta TM 632
CF TM 633-V1	Dyomics-778	Seta TM 633
CF TM 640R	Dyomics-780	Seta TM 650
CF TM 640R-V1	Dyomics-781	Seta TM 660
CF TM 640R-V2	Dyomics-782	Seta TM 670
CF TM 660C	Dyomics-800	Seta TM 680
CF TM 660R	Dyomics-831	Seta TM 700
CF TM 680	DyLight® 350	Seta TM 750
CF TM 680R	DyLight® 405	Seta TM 780
CF TM 680R-V1	DyLight® 415-Co1	Seta TM APC-780
CF TM 750	DyLight® 425Q	Seta TM PerCP-680
CF TM 770	DyLight® 485-LS	Seta TM R-PE-670
CF TM 790	DyLight® 488	Seta TM 646
Chromeo TM 642	DyLight® 504Q	Seta TM u 380
Chromis 425N	DyLight® 510-LS	Seta TM u 425
Chromis 500N	DyLight® 515-LS	Seta TM u 647
Chromis 515N	DyLight® 521-LS	Seta TM u 405
Chromis 530N	DyLight® 530-R2	磺醯玫瑰紅101
Chromis 550A	DyLight® 543Q	TAMRA
Chromis 550C	DyLight® 550	TET
Chromis 550Z	DyLight® 554-R0	Texas Red®
Chromis 560N	DyLight® 554-R1	TMR
Chromis 570N	DyLight® 590-R2	TRITC
Chromis 577N	DyLight® 594	Yakima Yellow TM
Chromis 600N	DyLight® 610-B1	Zenon®
Chromis 630N	DyLight® 615-B2	Zy3
Chromis 645A	DyLight® 633	Zy5
Chromis 645C	DyLight® 633-B1	Zy5.5
Chromis 645Z	DyLight® 633-B2	Zy7

螢光團		
Chromis 678A	DyLight® 650	Abberior®® Star 635
Square 635	Square 650	Square 660
Square 672	Square 680	Abberior® Star 440SXP
Abberior® Star 470SXP	Abberior® Star 488	Abberior® Star 512
Abberior® Star 520SXP	Abberior® Star 580	Abberior® Star 600
Abberior® Star 635	Abberior® Star 635P	Abberior® Star RED

【0152】 染料亦可基於最大吸光度或發射發光之波長分類。表4提供根據最大吸光度之近似波長分組成各欄之實例性螢光團。表4中列示之染料係非限制性的，且本申請案之發光標記可包括表4中未列示之染料。精確最大吸光度或發射波長可不對應於指示光譜範圍。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表4中列示之「紅色」組。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表4中列示之「綠色」組。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表4中列示之「黃色/橙色」組。在某些實施例中，四種核苷酸之發光標記經選擇使得所有皆選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」或「綠色」組中之一者。在某些實施例中，四種核苷酸之發光標記經選擇使得三者係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第一組，且第四者係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第二組。在某些實施例中，四種核苷酸之發光標記經選擇使得兩者係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第一組，且第三及第四者係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第二組。在某些實施例中，四種核苷酸之發光標記經選擇使得兩者係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第一組，且第三者係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第二組，且第四者

係選自表4中列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第三組。

表4. 藉由光譜範圍之螢光團之實例

「綠色」 520-570 nm	「黃色/橙色」 570-620 nm	「紅色」 620-670 nm
5/6-羧基玫瑰紅6G	Alexa Fluor® 594	Alexa Fluor® 633
6-TAMRA	Alexa Fluor® 610-X	Alexa Fluor® 647
Alexa Fluor® 532	ATTO 590	Alexa Fluor® 660
Alexa Fluor® 546	ATTO 610	ATTO 633
Alexa Fluor® 555	ATTO 620	ATTO 647
Alexa Fluor® 568	BODIPY® 576/589	ATTO 647N
ATTO 520	BODIPY® 581/591	ATTO 655
ATTO 532	CFTM594	ATTO 665
ATTO 542	CFTM620R	ATTO 680
ATTO 550	Chromis 570N	ATTO Rho14
ATTO 565	Chromis 577N	BODIPY® 630/650
BODIPY® 530/550	Chromis 600N	BODIPY® 650/665
BODIPY® 558/568	Dyomics-590	CAL Fluor®紅635
BODIPY® 564/570	Dyomics-591	CFTM 633-V1
CFTM514	Dyomics-594	CFTM 640R-V1
CFTM532	Dyomics-601XL	CFTM633
CFTM543	Dyomics-605	CFTM640R
CFTM546	Dyomics-610	CFTM640R-V2
CFTM555	Dyomics-615	CFTM660C
CFTM568	DyLight® 590-R2	CFTM660R
Chromis 530N	DyLight® 594	CFTM680
Chromis 550A	DyLight® 610-B1	CFTM680R
Chromis 550C	DyLight® 615-B2	CFTM680R-V1
Chromis 550Z	HiLyte™ Fluor 594	Chromeo™ 642
Chromis 560N	LightCycler® Red 610	Chromis 630N
Cy®3	PF594	Chromis 645A

「綠色」 520-570 nm	「黃色/橙色」 570-620 nm	「紅色」 620-670 nm
Cy®3.5	PF594	Chromis 645A
Cy®3B	PF610	Chromis 645C
Dyomics-530	Quasar® 570	Chromis 645Z
Dyomics-547	Abberior® Star 580	Cy®5
Dyomics-547P1	Abberior® Star 600	Cy®5.5
Dyomics-548		Dyomics-630
Dyomics-549P1		Dyomics-631
Dyomics-550		Dyomics-632
Dyomics-554		Dyomics-633
Dyomics-555		Dyomics-634
Dyomics-556		Dyomics-635
Dyomics-560		Dyomics-636
DyLight® 521-LS		Dyomics-647
DyLight® 530-R2		Dyomics-647P1
DyLight® 543Q		Dyomics-648
DyLight® 550		Dyomics-648P1
DyLight® 554-R0		Dyomics-649
DyLight® 554-R1		Dyomics-649P1
HiLyte™ Fluor 532		Dyomics-650
HiLyte™ Fluor 555		Dyomics-651
PF532		Dyomics-652
PF546		Dyomics-654
PF555P		DyLight® 633
PF568		DyLight® 633-B1
Seta™ 555		DyLight® 633-B2
Abberior® Star 520SXP		DyLight® 650
		DyLight® 655-B1
		DyLight® 655-B2
		DyLight® 655-B3

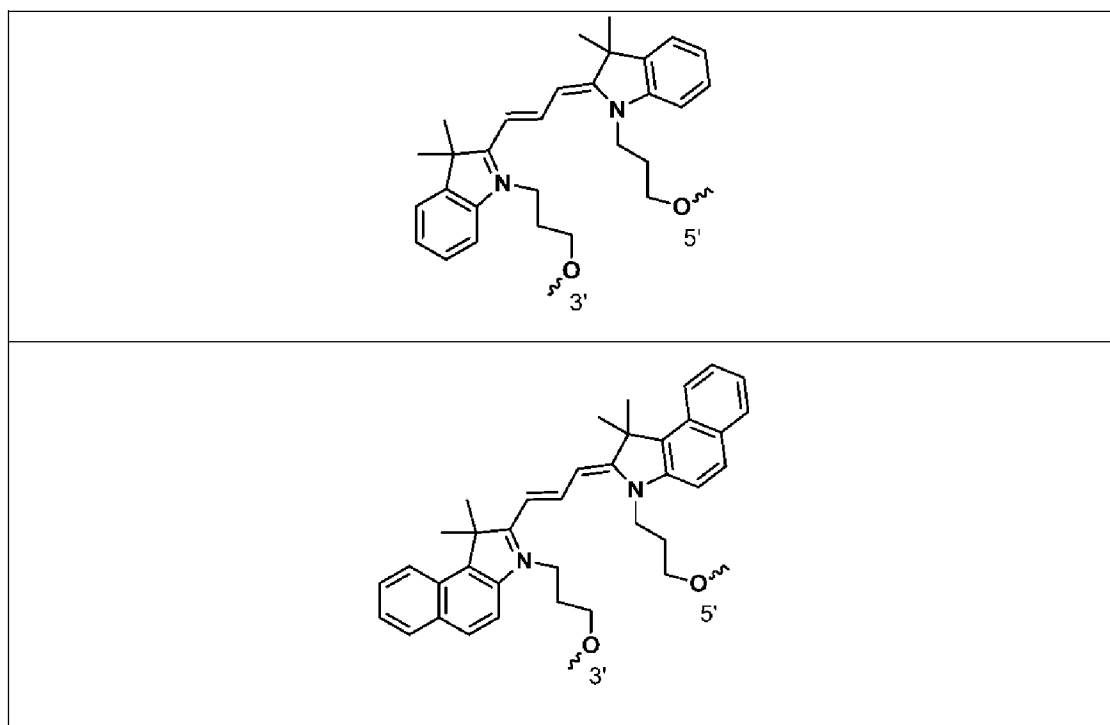
「綠色」 520-570 nm	「黃色/橙色」 570-620 nm	「紅色」 620-670 nm
		DyLight® 655-B4
		DyLight® 662Q
		DyLight® 680
		DyLight® 683Q
		HiLyte™ Fluor 647
		HiLyte™ Fluor 680
		LightCycler®® 640R
		LightCycler®紅640
		LightCycler®紅670
		PF633P
		PF647P
		Quasar® 670
		Seta™ 632
		Seta™ 633
		Seta™ 650
		Seta™ 660
		Seta™ 670
		Seta™Tau 647
		Square 635
		Square 650
		Square 660
		Abberior® Star 635
		Abberior® Star 635P
		Abberior® Star RED

【0153】 在某些實施例中，發光標記可包含第一及第二發色團。在一些實施例中，第一發色團之激發態能經由至第二發色團之能量轉移弛豫。在一些實施例中，能量轉移係Förster共振能量轉移(FRET)。該FRET對可用於提供具有使得標記更易於自複數個發光標記區別之性質的發光標

記。在某些實施例中，FRET對可在第一光譜範圍中吸收激發能量且在第二光譜範圍中發光。

【0154】 在一些實施例中，發光標記在本文所述連接體分子內連接(例如整合至寡聚或聚合連接體中)。表5提供在寡核苷酸股上下文中與該偶聯策略相容之螢光團的若干實例。如所示，表5中之基於花青之螢光團偶聯至第一股部分之3'端及第二股部分之5'端，使得螢光團自身形成寡核苷酸股內之共價鍵聯之部分(例如在未使用間隔體之情況下連接發光標記)。應瞭解，在一些實施例中，該等及類似類型之螢光團可在任一類別之寡聚或聚合結構內連接。舉例而言，在一些實施例中，螢光團經由與第一肽部分之C-末端及第二肽部分之N-末端之偶聯在肽內連接。在一些實施例中，單一連接體分子包含兩個或更多個在連接體內連接之螢光團(例如2種、3種、4種、5種、6種或超過6種染料在單一連接體內連接)。在一些實施例中，連接體包含一或多個在連接體內連接之螢光團及一或多個經由間隔體連接之螢光團。舉例而言，在一些實施例中，本文所述經明亮標記之反應物包含一或多個(例如1、2、3、4、5、6或超過6個)在連接體內且在無間隔體情況下連接之螢光團及一或多個(例如1、2、3、4、5、6或超過6個)經由間隔體連接至連接體之螢光團。

表5. 在連接體內連接之螢光團之實例



【0155】對於一組經發光標記之分子(例如經發光標記之核苷酸)，經發光標記之FRET對之性質可允許選擇複數個可區分分子(例如核苷酸)。在一些實施例中，FRET對之第二發色團的發光壽命不同於複數個其他經發光標記之分子。在一些實施例中，FRET對之第二發色團的發光強度不同於複數個其他經發光標記之分子。在一些實施例中，FRET對之第二發色團的發光壽命及發光強度不同於複數個其他經發光標記之分子。在一些實施例中，FRET對之第二發色團在不同於複數個其他經發光標記之分子的光譜範圍內發射光子。在一些實施例中，FRET對之第一發色團的發光壽命不同於複數個經發光標記之分子。在某些實施例中，FRET對可在不同於複數個其他經發光標記之分子之光譜範圍內吸收激發能量。在某些實施例中，FRET對可在與複數個其他經發光標記之分子中之一或多者相同之光譜範圍內吸收激發能量。

【0156】對於定序反應，經明亮標記之反應物之某些組合可較佳。

在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少一者包含花青染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少一者包含玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少兩者各自包含花青染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少兩者各自包含玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少三者各自包含花青染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少三者各自包含玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少四者各自包含花青染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之至少四者各自包含玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之三者各自包含花青染料或其類似物，且第四經明亮標記之反應物包含玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之兩者各自包含花青染料或其類似物，且第三及視情況第四經明亮標記之反應物包含玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，經明亮標記之反應物中之三者各自包含玫瑰紅染料或其類似物，且第三及視情況第四經明亮標記之反應物包含花青染料或其類似物。

【0157】 如本文所述，「發光標記」係吸收一或多個光子且可在一或多個持續時間後隨後發射一或多個光子的分子。分子之發光係由若干參數闡述，包括(但不限於)發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率及發光強度。術語吸收及激發貫穿本申請案可互換使用。在一些實施例中，術語發光及發射可互換使用。典型發光分子可吸收多個波長之光或經歷由多個波長之光的激發。某些波長或某些光譜範圍內之激發可藉由發光發射事件弛豫，而某些其他波長或光譜範圍之激發可不藉由發光發射事件

弛豫。在一些實施例中，發光分子僅適宜地經激發以在單一波長或單一光譜範圍內發光。在一些實施例中，發光分子適宜地經激發以在兩個或更多個波長或兩個或更多個光譜範圍內發光。在一些實施例中，藉由激發光子之波長或吸收光譜鑑別分子。

【0158】 來自發光發射事件之發射光子將在可能波長之光譜範圍內之波長下發射。通常，與激發光子之波長相比，發射光子之波長較長(例如能量較低或紅色移位)。在某些實施例中，藉由量測發射光子之波長鑑別分子。在某些實施例中，藉由量測複數個發射光子之波長鑑別分子。在某些實施例中，藉由量測發射光譜鑑別分子。

【0159】 發光壽命係指激發事件與發射事件之間之持續時間。在一些實施例中，發光壽命表示為指數式衰變之方程式中之常數。在一些實施例中，其中存在一或多個遞送激發能量之脈衝事件，持續時間係脈衝與隨後發射事件之間之時間。

【0160】 分子之發光壽命之測定可使用任何適宜方法實施(例如藉由使用適宜技術量測壽命或藉由測定發射之時間依賴性特徵)。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包含測定相對於一或多個分子(例如定序反應中不同經發光標記之核苷多磷酸)之壽命。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包含測定相對於參照物之壽命。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包含量測壽命(例如螢光壽命)。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包含測定一或多個指示壽命之暫時特徵。在一些實施例中，分子之發光壽命可基於相對於激發脈衝在一或多個時間門控之窗中發生之複數個發射事件(例如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或更多個發

射事件)的分佈來測定。舉例而言，基於相對於激發脈衝量測之光子到達時間之分佈，單一分子之發光壽命可與具有不同發光壽命之複數個分子區分。

【0161】 應瞭解，單一分子之發光壽命指示在單一分子達到激發態後發射之光子之時間且單一分子可藉由指示光子之時間之資訊加以區分。一些實施例可包括藉由量測與由分子發射之光子相關之時間基於分子之發光壽命區分一分子與複數個分子。時間之分佈可提供可自該分佈測定之發光壽命的指示。在一些實施例中，基於分佈時間、例如藉由比較時間之分佈與對應於已知分子之參照分佈，單一分子可與輻射分子區分。在一些實施例中，發光壽命之值係自時間之分佈測定。

【0162】 發光量子產率係指在導致發射事件之給定波長或在給定光譜範圍內激發事件的分數，且通常小於1。在一些實施例中，本文所述分子之發光量子產率介於0與約0.001之間、介於約0.001與約0.01之間、介於約0.01與約0.1之間、介於約0.1與約0.5之間、介於約0.5與0.9之間或介於約0.9與1之間。在一些實施例中，藉由測定或估計發光量子產率鑑別分子。

【0163】 如本文針對單一分子所用，發光強度係指每單位時間由分子發射之發射光子之數目，該分子因經脈衝激發能量之遞送而被激發。在一些實施例中，發光強度係指每單位時間由分子發射之發射光子之檢測數目，該分子因經脈衝激發能量之遞送而被激發，且發光強度係藉由特定感測器或一組感測器來檢測。

【0164】 發光壽命、發光量子產率及發光強度可在不同條件下針對給定分子各自變化。在一些實施例中，單一分子將具有與分子之系綜不同

之觀察發光壽命、發光量子產率或發光強度。在一些實施例中，限制於樣品孔中之分子將具有與未限制於樣品孔中之分子不同之觀察發光壽命、發光量子產率或發光強度。在一些實施例中，連接至另一分子之發光標記或發光分子將具有與未連接至另一分子之發光標記或發光分子不同的發光壽命、發光量子產率或發光強度。在一些實施例中，與巨分子複合物相互作用之分子將具有與不與巨分子複合物相互作用之分子不同的發光壽命。發光量子產率或發光強度。

【0165】 在某些實施例中，本申請案中所述之發光分子吸收一個光子且在一定持續時間後發射一個光子。在一些實施例中，可藉由量測持續時間測定或估計分子之發光壽命。在一些實施例中，可藉由量測多個脈衝時間及發射事件之複數個持續時間測定或估計分子之發光壽命。在一些實施例中，可藉由量測持續時間區別一分子之發光壽命與複數種類型之分子之發光壽命。在一些實施例中，可藉由量測多個脈衝事件及發射事件之複數個持續時間區別一分子之發光壽命與複數種類型之分子之發光壽命。在某些實施例中，可藉由測定或估計分子之發光壽命鑑別或區別一分子與複數種類型之分子。在某些實施例中，可藉由區別一分子之發光壽命與複數種類型之分子之複數個發光壽命鑑別或區別一分子與複數種類型之分子。

【0166】 在某些實施例中，發光發射事件係螢光。在某些實施例中，發光發射事件係磷光。如本文所用術語發光涵蓋包括螢光及磷光二者之所有發光事件。

定序

【0167】 本申請案之一些態樣可用於定序生物聚合物，例如核酸及蛋白質。在一些態樣中，本申請案中所述之組合物及技術可用於鑑別納入

核酸或蛋白質中之一系列核苷酸或胺基酸單體(例如藉由檢測一系列經標記核苷酸或胺基酸單體之納入之時程)。在一些實施例中，本申請案中所述之組合物及技術可用於鑑別納入藉由聚合酶合成之模板依賴性核酸定序反應產物中的一系列核苷酸。

【0168】 在靶核酸與互補核苷多磷酸(例如dNTP)之間之核鹼基進行鹼基配對時，聚合酶藉由在新近合成之股之3'羥基端與dNTP之 α 磷酸之間形成磷酸二酯鍵將dNTP納入新近合成之核酸股中。在偶聯至dNTP (例如經由本申請案之連接體)之發光標記係螢光團的實例中，藉由激發對其存在發信號，且在納入步驟期間及/或之後檢測發射之脈衝。對於經由本申請案之連接體偶聯至dNTP之末端(γ)磷酸之檢測標記(例如發光標記)，將dNTP納入新近合成之股中引起釋放 β 及 γ 磷酸及包含檢測標記之連接體，該連接體在樣品孔中自由擴散，從而引起自螢光團檢測之發射減少。

【0169】 在某些實施例中，模板依賴性核酸定序反應產物係在藉由天然核酸聚合酶實施之定序反應中合成。在一些實施例中，聚合酶係天然聚合酶之突變體或經修飾變體。在一些實施例中，模板依賴性核酸定序產物將包含一或多個與模板核酸股互補之核苷酸區段。在一態樣中，本申請案提供藉由測定模板(或靶)核酸股之互補核酸股之序列測定該模板(或靶)核酸股之序列的方法。

【0170】 如本文所用術語「聚合酶」通常係指任何能催化聚合反應之酶(或聚合酶)。聚合酶之實例包括(但不限於)核酸聚合酶、轉錄酶或連接酶。聚合酶(polymerase)可為聚合酶(polymerization enzyme)。針對單一分子核酸延伸(例如對於核酸定序)之實施例可使用任何能合成與靶核酸分子互補之核酸的聚合酶。在一些實施例中，聚合酶可為DNA聚合酶、

RNA聚合酶、反轉錄酶及/或其一或多者之突變體或改變形式。

【0171】聚合酶之實例包括(但不限於) DNA聚合酶、RNA聚合酶、熱穩定聚合酶、野生型聚合酶、經修飾聚合酶、大腸桿菌DNA聚合酶I、T7 DNA聚合酶、噬菌體T4 DNA聚合酶、 ϕ 29 (佛愛(phi) 29) DNA聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Tli聚合酶、Pfu聚合酶、Pwo聚合酶、VENT聚合酶、DEEPVENT聚合酶、EX-Taq聚合酶、LA-Taq聚合酶、Sso聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、ES4聚合酶、Tru聚合酶、Tac聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tca聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、鉑Taq聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tth聚合酶、Pfuturbo聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、KOD聚合酶、Bst聚合酶、Sac聚合酶、Klenow片段、具有3'至5'外核酸酶活性之聚合酶及其變體、經修飾產物及衍生物。在一些實施例中，聚合酶係單一亞單元聚合酶。除其他地方外，DNA聚合酶之非限制性實例及其性質詳細闡述於DNA Replication，第2版，Kornberg及Baker, W. H. Freeman, New York, N.Y. (1991)。

【0172】在一些實施例中，聚合酶係具有高持續力之聚合酶。然而，在一些實施例中，聚合酶係具有降低持續力之聚合酶。聚合酶持續力通常係指聚合酶將dNTP連續納入核酸模板而不釋放核酸模板的能力。在一些實施例中，聚合酶係具有低5'-3'外核酸酶活性之聚合酶及/或3'-5'外核酸酶。在一些實施例中，聚合酶經修飾(例如藉由胺基酸取代)以相對於相應野生型聚合酶具有降低之5'-3'外核酸酶活性及/或3'-5'活性。DNA聚合酶之其他非限制性實例包括9°Nm™ DNA聚合酶(New England Biolabs)及Klenow外聚合酶之P680G突變體(Tuske等人 (2000) JBC

275(31):23759-23768)。在一些實施例中，具有降低持續力之聚合酶為含有一或多段核苷酸重複(例如兩個或更多個相同類型之依序鹼基)之定序模板提供增加準確度。在一些實施例中，聚合酶係對經標記之核苷酸比對未經標記之核酸具有較高親和力的聚合酶。

【0173】 在另一態樣中，本申請案提供藉由定序複數個核酸片段來定序靶核酸之方法，其中靶核酸包含片段。在某些實施例中，該方法包含組合複數個片段序列以提供親本靶核酸之序列或部分序列。在一些實施例中，組合步驟係藉由電腦硬體及軟體實施。本文所述方法可允許定序一組相關靶核酸，例如整個染色體或基因體。

【0174】 在定序期間，聚合酶可偶合(例如連接)至靶核酸分子之啟動位置。啟動位置可為與靶核酸分子之一部分互補之引子。作為替代，啟動位置係在靶核酸分子之雙股區段內提供之空隙或切口。空隙或切口之長度可為0至至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30或40個核苷酸。切口可在雙股序列之一個股中提供斷裂，其可為聚合酶(例如設置換聚合酶)提供啟動位置。

【0175】 在一些情形下，定序引子可退火成可固定或可不固定至固體載體之靶核酸分子。固體載體可在用於核酸定序之晶片上包含(例如)樣品孔(例如奈米孔口、反應室)。在一些實施例中，定序引子可固定至固體載體且靶核酸分子之雜交亦將靶核酸分子固定至固體載體。在一些實施例中，聚合酶固定至固體載體且可溶性引子及靶核酸與聚合酶接觸。然而，在一些實施例中，在溶液中形成包含聚合酶、靶核酸及引子之複合物且該複合物固定至固體載體(例如經由聚合酶、引子及/或靶核酸之固定)。在一些實施例中，樣品孔(例如奈米孔口、反應室)中無一組分固定至固體載

體。舉例而言，在一些實施例中，在溶液中形成包含聚合酶、靶核酸及引子之複合物且該複合物不固定至固體載體。

【0176】 在適當條件下，與退火之引子/靶核酸接觸之聚合酶可在引子上添加或納入一或多種核苷酸，且核苷酸可以5'至3'模板依賴性方式添加至引子。核苷酸至引子上之該納入(例如經由聚合酶之作用)通常可稱作引子延伸反應。每一核苷酸可與可檢測標記相關聯，該可檢測標記可在核酸延伸反應期間檢測到及鑑別(例如基於其發光壽命及/或其他特徵)且用於測定納入延伸引子中之每一核苷酸且因此測定新近合成之核酸分子之序列。經由新近合成之核酸分子之序列互補，亦可測定靶核酸分子之序列。在一些情形下，定序引子退火成靶核酸分子且將核苷酸納入定序引子可在類似反應條件(例如相同或類似反應溫度)下或在不同反應條件(例如不同反應溫度)下發生。在一些實施例中，藉由合成方法之定序可包括存在靶核酸分子之群體(例如靶核酸之拷貝)及/或靶核酸擴增以獲得靶核酸之群體的步驟。然而，在一些實施例中，藉由合成之定序用於測定所評估之每一反應中單一分子之序列(且無需核酸擴增以製備靶模板用於定序)。在一些實施例中，複數個單一分子定序反應係根據本申請案之態樣並行(例如在單一晶片上)實施。舉例而言，在一些實施例中，複數個單一分子定序反應各自在單一晶片上之單獨反應室(例如奈米孔口、樣品孔)中實施。

【0177】 實施例能定序具有高準確度及長讀取長度之單一核酸分子，例如至少約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%或99.9999%之準確度及/或大於或等於約10個鹼基對(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或100,000 bp之讀取長度。在一些實施例中，用於單一分子定序之靶核酸分子係單股靶核酸(例如去氧核糖核酸(DNA)、DNA衍生物、核糖核酸(RNA)、RNA衍生物)模板，其添加或固定至含有固定或連接至固體載體(例如樣品孔之底部或側壁)之定序反應之至少一種額外組分(例如聚合酶，例如，DNA聚合酶、定序引子)的樣品孔(例如奈米孔口)。靶核酸分子或聚合酶可(例如)在樣品孔之底部或側壁直接或經由連接體連接至樣品壁。樣品孔(例如奈米孔口)亦可含有經由引子延伸反應之核酸合成所需之任何其他試劑，例如適宜緩衝液、輔因子、酶(例如聚合酶)及去氧核糖核苷多磷酸，例如去氧核糖核苷三磷酸，包括去氧腺苷三磷酸(dATP)、去氧胞苷三磷酸(dCTP)、去氧鳥苷三磷酸(dGTP)、去氧尿苷三磷酸(dUTP)及去氧胸苷三磷酸(dTTP) dNTP，其包括可經由本申請案之連接體連結至dNTP的發光標記，例如螢光團。在一些實施例中，每一類別之dNTP (例如含有腺嘌呤之dNTP (例如dATP)、含有胞嘧啶之dNTP (例如dCTP)、含有鳥嘌呤之dNTP (例如dGTP)、含有尿嘧啶之dNTP (例如dUTP)及含有胸腺嘧啶之dNTP (例如dTTP))偶聯(例如經由本申請案之連接體)至特殊的發光標記，使得自標記發射之光之檢測指示納入新近合成之核酸中之dNTP的屬性。在一些實施例中，「特殊的發光標記」可係指一種dNTP包含不同於另一dNTP之發光標記(例如不同螢光團)。在一些實施例中，特殊的發光標記係指一種dNTP包含與另一dNTP不同數目之相同或類似發光標記。在一些實施例中，特殊的發光標記係指一種dNTP包含一或多種經檢測與另一dNTP不同之發光性質。自發光標記發射之光可經由任何適宜裝置及/或方法檢測且歸因於其適當發光標記(且因此相關之dNTP)。發光標記可在任何位置偶聯(例如經由本申請案之連

接體)至dNTP，使得發光標記之存在不會抑制dNTP納入新近合成之核酸股中或不會抑制聚合酶之活性。在一些實施例中，發光標記偶聯(例如經由本申請案之連接體)至dNTP之末端磷酸(例如 γ 磷酸)。

【0178】 在一些實施例中，單股靶核酸模板與定序引子、dNTP、聚合酶及核酸合成所需之其他試劑接觸。在一些實施例中，所有適當dNTP皆可與單股靶核酸模板同時接觸(例如所有dNTP皆同時存在)，使得dNTP之納入可同時發生。在其他實施例中，dNTP可與單股靶核酸模板依序接觸，其中單股靶核酸模板與每一適當dNTP單獨接觸，在單股靶核酸模板與不同dNTP接觸之間存在洗滌步驟。可針對欲鑑別之單股靶核酸模板之每一連續鹼基位置重複單股靶核酸模板與每一dNTP單獨接觸、之後洗滌之該循環。

【0179】 在一些實施例中，定序引子退火成單股靶核酸模板且聚合酶基於單股靶核酸模板將dNTP (或其他核苷多磷酸)連續納入引子。與每一納入之dNTP相關之獨特發光標記可在dNTP納入引子期間或之後經適當激發光激發且隨後可使用任何適宜裝置及/或方法檢測其發射。光之特定發射(例如具有特定發射壽命、強度、光譜/或其組合)的檢測可歸因於納入之特定dNTP。自檢測之發光標記之收集獲得之序列隨後可經由序列互補用於測定單股靶核酸模板之序列。

【0180】 在一些實施例中，本發明提供可有利地用於以下共同待決之美國專利申請案中所述之技術中的方法及組合物： 第14/543,865號、第14/543,867號、第14/543,888號、第14/821,656號、第14/821,686號、第14/821,688號、第15/161,067號、第15/161,088號、第15/161,125號、第15/255,245號、第15/255,303號、第15/255,624號、第15/261,697號、

第15/261,724號、第15/600,979號、第15/846,967號、第15/847,001號、第15/971,493號、第62/289,019號、第62/296,546號、第62/310,398號、第62/339,790號、第62/343,997號、第62/344,123號及第62/426,144號，其各自之內容係以引用方式併入本文中。

套組

【0181】 在其他態樣中，本申請案提供用於定序模板核酸之套組。在一些實施例中，套組包含複數種類型之如本文所述之經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，每一類型之經標記核苷酸包含兩個或更多個經由本申請案之連接體連接至一或多種核苷多磷酸之發光標記。在一些實施例中，複數個核苷酸係選自圖3A-3C、3E-3G、4A-4C、5A-5B、6A-6C及8-10中所繪示之經標記核苷酸。舉例而言，在一些實施例中，複數個核苷酸係根據圖3G中所示之結構設計。在一些實施例中，複數個核苷酸係根據圖3B (306)、圖3B (308)及圖5A (502)中所示之結構設計。在一些實施例中，套組進一步包含聚合酶(例如如本文中別處所述之DNA聚合酶)。在一些實施例中，套組進一步包含與測序之模板核酸互補之引子。

【0182】 在一些態樣中，本申請案提供包含本文所述經明亮標記之反應物中之一或多者之反應混合物。在一些實施例中，反應混合物包含添加至定序反應之混合物。在一些實施例中，反應混合物包括聚合酶。在一些實施例中，聚合酶經構形以固定至固體載體(例如樣品孔之底部，如本文中別處所述)。在一些實施例中，反應混合物包含欲測序之模板核酸。在一些實施例中，反應混合物包含與模板核酸之一部分互補之引子。在一些實施例中，反應混合物包含起始定序反應所需之一或多種組分(例如二價金屬離子，例如鎂或鐵)。在一些實施例中，反應混合物包含穩定定序

反應所需之一或多種組分(例如一或多種緩衝劑、一或多種還原劑等)。

實例

實例1：利用核酸連接體之染料連接策略

【0183】 各種下一代定序技術執行經標記之反應組分。舉例而言，染料標記之核苷酸可用於在納入事件期間基於對應於每一鹼基類型之獨特發光性質之檢測或觀察結果進行特定鹼基識別(base call)。因此，對於一組中之每一鹼基，該等性質(例如壽命及強度)必須容易鑑別。對增強經標記核苷酸之螢光強度的初始努力揭示，當向構築體中添加第二染料分子時，經染料標記核苷酸之亮度增加。然而，螢光壽命相對於單一標記之變體顯著減少。在研發改良之經標記核苷酸中，研究核酸作為核結構用於連接螢光染料至核苷酸。

【0184】 經多重標記之核苷酸中改變之螢光壽命的一個潛在來源係相同構築體之染料分子之間之相互作用程度，其可產生淬滅效應。藉由產生圖8中所示之染料標記之核苷酸進一步探索此可能性。兩個染料分子(DyLight 530R2)經由核酸連接體連結至核苷多磷酸。未經標記之寡核苷酸股與經標記之寡核苷酸股雜交以在核酸連接體中賦予剛性。第一構築體800係使用C6-胺基-T間隔體將染料連接至核酸來製得，且第二構築體802係使用甘胺酸間隔體將染料連接來製得。

【0185】 第一構築體之分析揭示大約1.4 ns之螢光壽命，而第二構築體展現大約3.5 ns之壽命。第二構築體之量測壽命增加歸因於使用與第一構築體相比相對較短之間隔體用於染料連接。如圖8中所示，第一構築體之C6-胺基-T間隔體的長度大於第二構築體之甘胺酸間隔體。第二構築體之增加壽命之一種可能的解釋在於縮短之間隔體長度藉由限制連接之染

料之移動範圍重疊之程度降低染料-染料相互作用。

實例2：增加之連接體剛性延長螢光壽命

【0186】 遵循潛在地由於染料之空間重疊，間隔體長度可影響螢光壽命之觀察結果，據信經多重標記之分子中染料之對稱排列可能具有類似效應。生成Y形核酸連接體且示於圖9中。初始構築體具有三個經由所示具支股連接體共價連接之寡核苷酸股。兩個股各自末端連接至染料分子(Chromis 530N)，而第三股末端連接至核苷多磷酸。第三股進一步與未經標記之股雜交以在核苷多磷酸與經標記之區之間賦予剛性。藉由與寡核苷酸組分902雜交生成此構築體之第二型式，該寡核苷酸組分902與第一及第二股雜交。

【0187】 初始構築體之分析揭示大約2.3 ns之螢光壽命，而具有額外寡核苷酸組分902之構築體展現大約4.2 ns之壽命。後一構築體之量測之壽命增加之一種可能的解釋在於寡核苷酸組分902在經標記之區中賦予剛性。增加之剛性可藉由限制每一染料至更有限之移動範圍可能地促進染料分離。

實例3：受限連接體構形中染料間隔體長度之效應

【0188】 藉由生成圖10中所示之參染料標記之構築體進一步研發幾何受限之連接體構形。如所示，核酸連接體部分包括三種主要寡核苷酸組分。第一組分包括經由所示四向具支股連接體共價連接之四個寡核苷酸股。該等股中之三者各自末端連接至染料分子(AttoRho6G)，而第四股與第二寡核苷酸組分雜交。第二寡核苷酸組分經由所示具支股連接體末端連接至兩個核苷多磷酸。包括三個經由所示具支股連接體共價連接之寡核苷酸股的第三寡核苷酸組分與第一組分之三個染料標記之股雜交以在經標記

之區中賦予剛性。根據圖10中所示之加框區域生成具有不同間隔體長度之兩個單獨參染料構築體。

【0189】 具有較長間隔體之第一參染料標記之核苷酸構築體(參見圖10，加框區域，頂部)顯示螢光強度相對於單一染料標記之核苷酸構築體為三倍。另外，應注意，當與具有相同染料分子之二染料、一核苷酸構築體比較時，壽命稍微減少(未顯示)。針對具有較短間隔體之第二參染料標記之核苷酸構築體獲得之量測(參見圖10，加框區域，底部)顯示相對於第一參染料標記之構築體螢光壽命稍微增加。

【0190】 較早參染料標記之核苷酸在定序反應期間產生多個壽命，此被認為係相互作用之兩種染料產生第一壽命而非相互作用染料產生第二壽命的結果。重要的是，在定序反應期間針對圖10中所示之任一參染料標記之分子僅觀察到單一壽命。

等效內容及範圍

【0191】 儘管本文中已闡述並闡釋若干發明性實施例，但熟習此項技術者將易於構想用於實施功能及/或獲得結果及/或本文所述之優點中之一或多者之各種其他構件及/或結構，且該等變化形式及/或修改形式中之每一者皆認為係在本文所述之發明性實施例之範圍內。更一般而言，熟習此項技術者將易於瞭解，本文所述之所有參數、尺寸、材料及構形意欲具有實例性且實際參數、尺寸、材料及/或構形將取決於使用發明性教示之一個或多個特定應用。熟習此項技術者僅使用例行實驗即可認識或能夠斷定本文所述之發明性具體實施例之諸多等效內容。因此，應理解，前述實施例僅係以舉例方式呈現且在隨附申請專利範圍及其等效內容之範圍內，可不同於所特定闡述及主張來實施發明性實施例。本發明之發明性實施例

係針對本文所述之每一個別特徵、系統、物件、材料、套組及/或方法。另外，若此等特徵、系統、物件、材料、套組及/或方法不相互矛盾，則兩個或更多個此等特徵、系統、物件、材料、套組及/或方法之任何組合包括於本發明之發明範圍內。

【0192】 本文所定義及使用之所有定義應理解為掌握於辭典定義、以引用方式併入之文檔中之定義及/或所定義術語之普遍意義以內。

【0193】 本文所揭示之所有參考文獻、專利及專利申請案關於其每一者所列舉之標的物以引用的方式併入，其在一些情形中可涵蓋整個文檔。

【0194】 除非明確指示為相反，否則如本文在說明書及在申請專利範圍中使用之不定冠詞「一(a、an)」應理解為意指「至少一個」。

【0195】 如本文在說明書及申請專利範圍中所用，片語「及/或」應理解為意指如此結合之要素中之「任一者或兩者」，即，在一些情形下以結合方式存在且在其他情形下以分離方式存在之要素。以「及/或」列示之多個要素應視為呈相同方式，即，如此結合之要素中之「一或多者」。可視情況存在除由「及/或」從句特定識別之要素以外的其他要素，無論與特定識別之彼等要素相關抑或不相關。因此，作為非限制性實例，當結合諸如「包含」等開放式語言使用時，對「A及/或B」之提及在一個實施例中可係指僅A (視情況包括除B以外之要素)；在另一實施例中，係指僅B (視情況包括除A以外之要素)；在再一實施例中，係指A及B兩者(視情況包括其他元素)；等等。

【0196】 如本文中在說明書中及在申請專利範圍中所用，「或」應理解為具有與如上文所定義之「及/或」相同之含義。舉例而言，在分離

清單中之物項時，「或」或者「及/或」應闡釋為係包括性的，亦即，包括多個要素或要素清單中之至少一者(但亦包括一個以上)及視情況包括額外未列出物項。術語「僅(only)」明確指示相反情形，諸如「.....中之僅一者」或「.....中之恰好一者」或在申請專利範圍中使用時「由.....組成」將係指包括若干要素或要素清單中之恰好一者。一般而言，本文所用術語「或」在前面有排他性術語(例如「或者」、「.....中之一者」、「.....中之僅一者」或「.....中之恰好一者」)時應僅將其解釋為指示排他性選擇(亦即，「一者或另一者而非兩者」)。當在申請專利範圍中使用時，「基本上由.....組成」應具有如其用於專利法律領域中之普通含義。

【0197】 如本文在說明書中及在申請專利範圍中所用，關於一或多個要素之清單之片語「至少一」應理解為意指至少一個選自要素清單中之任一或多個要素之要素，但未必包括要素清單內特定列出之各自及每一要素中之至少一者，且不排除要素清單中要素之任何組合。此定義亦容許可視情況存在除片語「至少一」所指之要素清單內特定識別之要素之外之要素，無論與特定識別之彼等要素相關抑或不相關。因此，作為非限制性實例，在一個實施例中，「A及B中之至少一者」(或等效地，「A或B中之至少一者」或等效地，「A及/或B中之至少一者」)可係指至少一個(視情況包括一個以上) A，而不存在B (且視情況包括除B以外之要素)；在另一實施例中，係指至少一個(視情況包括一個以上) B，而不存在A (且視情況包括除A以外之要素)；在又一實施例中，係指至少一個(視情況包括一個以上) A及至少一個(視情況包括一個以上) B (且視情況包括其他要素)；等等。

【0198】 亦應理解，除非明確指示相反情形，否則在本文所主張之包括多於一個步驟或動作之任何方法中，該方法之步驟或動作之順序不必

受限於該方法所列舉之步驟或動作之順序。

【0199】 在申請專利範圍以及在上文說明書中，所有過渡性片語(諸如「包含」、「包括」、「攜載」、「具有」、「含有」、「涉及」、「固持」、「由...構成」及諸如此類)應理解為係開放式，亦即，意指包括但不限於。僅過渡性片語「由.....組成」及「基本上由.....組成」應分別係封閉式或半封閉式過渡性片語，如美國專利局專利審查程序手冊(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03節中所陳述。應瞭解，在替代實施例中，使用開放性過渡性片語(例如「包含」)之本文件所述之實施例亦涵蓋為「由開放性過渡性片語闡述之特徵組成」及「基本上由其組成」。舉例而言，若本揭示內容闡述「組合物包含A及B」，則本揭示內容亦涵蓋「組合物由A及B組成」及「組合物基本上由A及B組成」之替代實施例。

【符號說明】

【0200】

- 100 連接體
- 102 連接位點
- 112 空間體積
- 122 標記連接位點
- 150 構築體
- 152 構築體
- 154 構築體
- 180 反應物
- 200 核酸連接體

202	連接位點
210	發光標記
212	空間體積
212- <i>r</i>	半徑
220	間隔體
250	單股核酸連接體
252	雙股核酸連接體
254	圖解
260	核酸
262	核酸
264	核酸
266	核酸
280	核苷多磷酸
290	聚合酶
300	核酸
302	核酸
304	核酸連接體
306	核酸連接體
308	核酸連接體
400	莖環核酸連接體
402	莖環核酸連接體
404	莖環核酸連接體
406	莖環核酸

410	第一寡核苷酸股/三向接點
412	莖環之莖
414	莖環之環
420	第二寡核苷酸股
500	樹狀連接體
502	樹狀核酸
510	第一寡核苷酸組分
520	第二寡核苷酸組分
530	第三寡核苷酸組分
600	星狀核酸連接體
602	星狀核酸連接體
604	星狀核酸連接體
606	星狀核酸
800	第一構築體
802	第二構築體
902	寡核苷酸組分
r_1	空間半徑
r_2	空間半徑
d_L	最小距離
d_A	最小距離
d_{AL}	最小距離
d_{LR}	標記-反應物隔開距離
x	隔開距離

【序列表】

<110> 美商寬騰矽公司(QUANTUM-SI INCORPORATED)

<120> 高強度經標記之反應物組合物及用於定序之方法

<130> R0708.70026W000

<140> TW 107125536

<141> 2018-07-24

<150> US 62/536,426

<151> 2017-07-24

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(22)

<223> 由連接體修飾

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(31)

<223> 由連接體修飾

<400> 1

cacgcgtgga accctcgatt aattgcctta attgc 35

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多核苷酸

<400> 2
gcaattttaag gcaatttaat cgagggttcc acgcgtg

37

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(18)
<223> 由iCy3修飾

<400> 3
ccacgcgtgg aacccttttg ggatttcca

29

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 4
tggatcccaa gggttccacg cgtgg

25

<210> 5
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)..(30)
<223> 由連接體修飾

<220>
<221> misc_feature

<222>	(50)..(50)	
<223>	由連接體修飾	
<400>	5	
cgctagtc	cg tgagtaccca caaatgtttt ttacatttga gtatacattt tttgtataca	60
ggg		63
<210>	6	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	6	
tactcacgga	ctagcg	16
<210>	7	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	7	
tatgggtag		9
<210>	8	
<211>	9	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成多核苷酸	
<400>	8	
ctacccata		9
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>	
<223>	合成多核苷酸
<400>	9
ccacgcgtgg tagggatcca	20
<210>	10
<211>	20
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多核苷酸
<400>	10
tggatcccta ccacgcgtgg	20
<210>	11
<211>	17
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多核苷酸
<400>	11
agcttgggca actgtta	17
<210>	12
<211>	17
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多核苷酸
<400>	12
taacagttgc ccaagct	17
<210>	13
<211>	26
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	合成多核苷酸

<400> 13
gcaatttaac gatggttcca cgcgtg

26

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> 由連接體修飾

<400> 14
cacgcgtgga accatcgtta attgc

25

<210> 15
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 15
gtgcgctacc ttgggaatat tgcttacg

28

<210> 16
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 由連接體修飾

<400> 16

cgttaattgc tttttgcaat gcaatatgcc caaggtagcg cac

43

<210> 17
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> 由連接體修飾

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> 由連接體修飾

<400> 17
cacgcgtgga accctcgatt atattgcctt atattgc

37

<210> 18
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(6)
<223> 由連接體修飾

<220>
<221> misc_feature
<222> (14)..(15)
<223> 由連接體修飾

<400> 18
cgttaattcc gttaattagc tccaaggtg cgcac

35

<210> 19

<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多核苷酸

<400> 19
gtgcgcacct tgggagctaa tttaacggaa tttaacg

37

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種經標記核苷酸，其包含經由核酸連接體連結至兩個或更多個發光標記之核苷多磷酸，其中該核酸連接體連結至該核苷多磷酸之末端磷酸，其中每一發光標記與任何其他發光標記隔開至少5埃，其中(i)至少一個發光標記整合至該核酸連接體中，且其中該至少一個整合至該核酸連接體中之發光標記為基於花青之螢光團；及/或(ii)其中至少一個發光標記經由甘胺酸(glycolamine)間隔體分子連接至該核酸連接體。

【請求項2】

如請求項1之經標記核苷酸，其中每一發光標記包含一質量中心，該質量中心與任何其他發光標記之質量中心隔開至少5埃。

【請求項3】

如請求項1之經標記核苷酸，其中該核酸連接體係包含至少10個單體單元之寡聚物。

【請求項4】

如請求項3之經標記核苷酸，其中該寡聚物包含少於150、少於100或少於50個單體單元。

【請求項5】

如請求項3之經標記核苷酸，其中一或多個發光標記在與任何其他連接位點隔開至少5個單體單元之連接位點連接至該核酸連接體。

【請求項6】

如請求項1之經標記核苷酸，其中該核酸連接體包含第一寡核苷酸股，其上之兩個或更多個連接位點連接至該兩個或更多個發光標記，且其

中每一發光標記包含具有中心點之空間體積，該中心點與任何其他發光標記之中心點隔開至少5埃。

【請求項7】

如請求項6之經標記核苷酸，其進一步包含與該第一寡核苷酸股雜交之第二寡核苷酸股，其中

- (i) 該第一寡核苷酸股連接至該核苷多磷酸，或
- (ii) 該第二寡核苷酸股連接至該核苷多磷酸。

【請求項8】

如請求項6或7之經標記核苷酸，其中該兩個或更多個連接位點在該第一寡核苷酸股上彼此隔開至少5個且少於50個鹼基。

【請求項9】

如請求項6或7之經標記核苷酸，其中每一連接位點在該第一寡核苷酸股上與鳥嘌呤或胞嘧啶隔開至少2個鹼基。

【請求項10】

如請求項6或7之經標記核苷酸，其中至少一個連接位點發生在該第一寡核苷酸股上之無鹼基位點。

【請求項11】

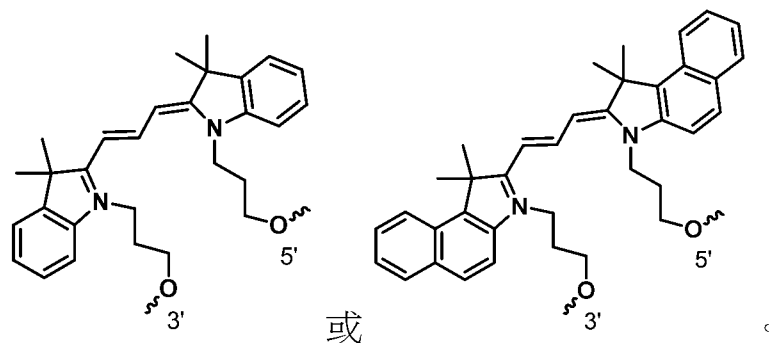
如請求項6或7之經標記核苷酸，其中該第一寡核苷酸股形成一或多個莖環。

【請求項12】

如請求項11之經標記核苷酸，其中每一莖環之環區包含該兩個或更多個連接位點之一個連接位點。

【請求項13】

如請求項1之經標記核苷酸，其中該基於花青之螢光團具有以下化學結構：

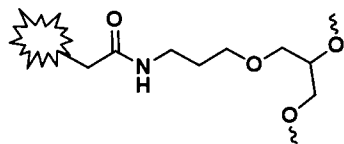


【請求項14】

如請求項1之經標記核苷酸，其中該至少一個經由甘胺酸間隔體分子連接至該核酸連接體之發光標記包含玫瑰紅染料、BODIPY染料或花青染料。

【請求項15】

如請求項1之經標記核苷酸，其包含結構：



，其中 為該至少一個經由甘胺酸間隔體分子連接至該核酸連接體之發光標記。

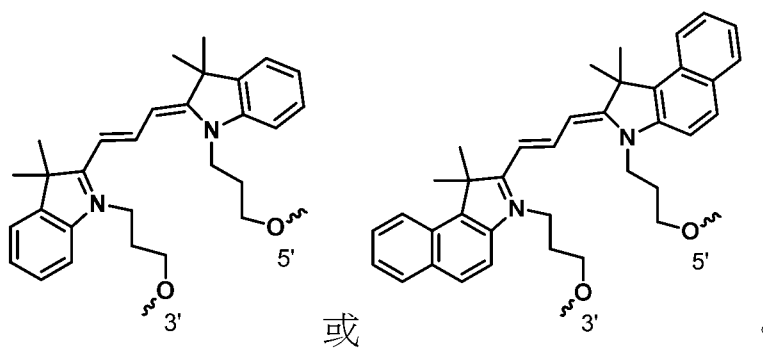
【請求項16】

一種經標記分子，其包含經由核酸連接體連結至兩個或更多個發光標記之反應物，其中每一發光標記與任何其他發光標記隔開至少5埃，其中(i)至少一個發光標記整合至該核酸連接體中，且其中該至少一個整合至該核酸連接體中之發光標記為基於花青之螢光團；及/或(ii)其中至少一個發光標記經由甘胺酸間隔體分子連接至該核酸連接體。

【請求項17】

如請求項16之經標記分子，其中該基於花青之螢光團具有以下化學

結構：

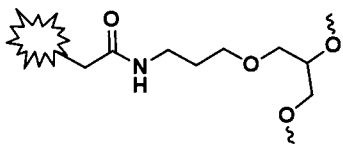


【請求項18】

如請求項16之經標記分子，其中該至少一個經由甘胺酸間隔體分子連接至該核酸連接體之發光標記包含玫瑰紅染料、BODIPY染料或花青染料。

【請求項19】

如請求項16之經標記分子，其包含結構：



，其中為該至少一個經由甘胺酸間隔體分子連接至該核酸連接體之發光標記。

【請求項20】

一種測定模板核酸之序列之方法，該方法包含：

- (i) 將靶體積中之複合物暴露於一或多種不同類型之經發光標記之核苷酸，該複合物包含該模板核酸、引子及聚合酶，其中每一類型之經發光標記之核苷酸包含如請求項1至15中任一項之經標記核苷酸；
- (ii) 引導一或多個激發能之一系列脈衝朝向該靶體積附近；
- (iii) 在依序納入包含該引子之核酸期間檢測來自經發光標記之核苷酸的複數個發射光子；及
- (iv) 藉由測定(a)該等發射光子之時間或(b)該等發射光子之時間及發

光強度鑑別該納入核苷酸之序列。

【請求項21】

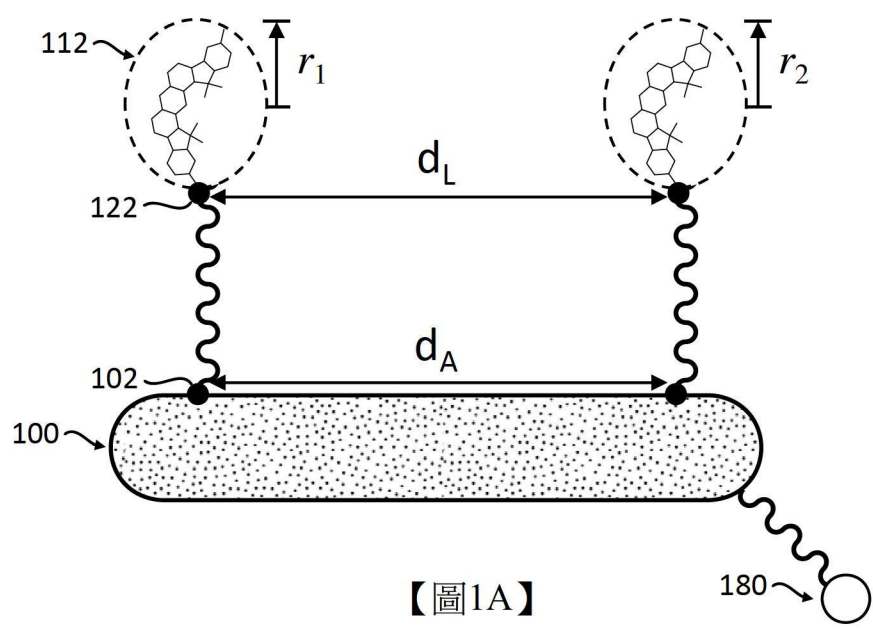
一種用於定序模板核酸之套組，該套組包含：

兩種或更多種不同類型之經發光標記之核苷酸，其中每一類型之經發光標記之核苷酸包含如請求項1至15中任一項之經標記核苷酸。

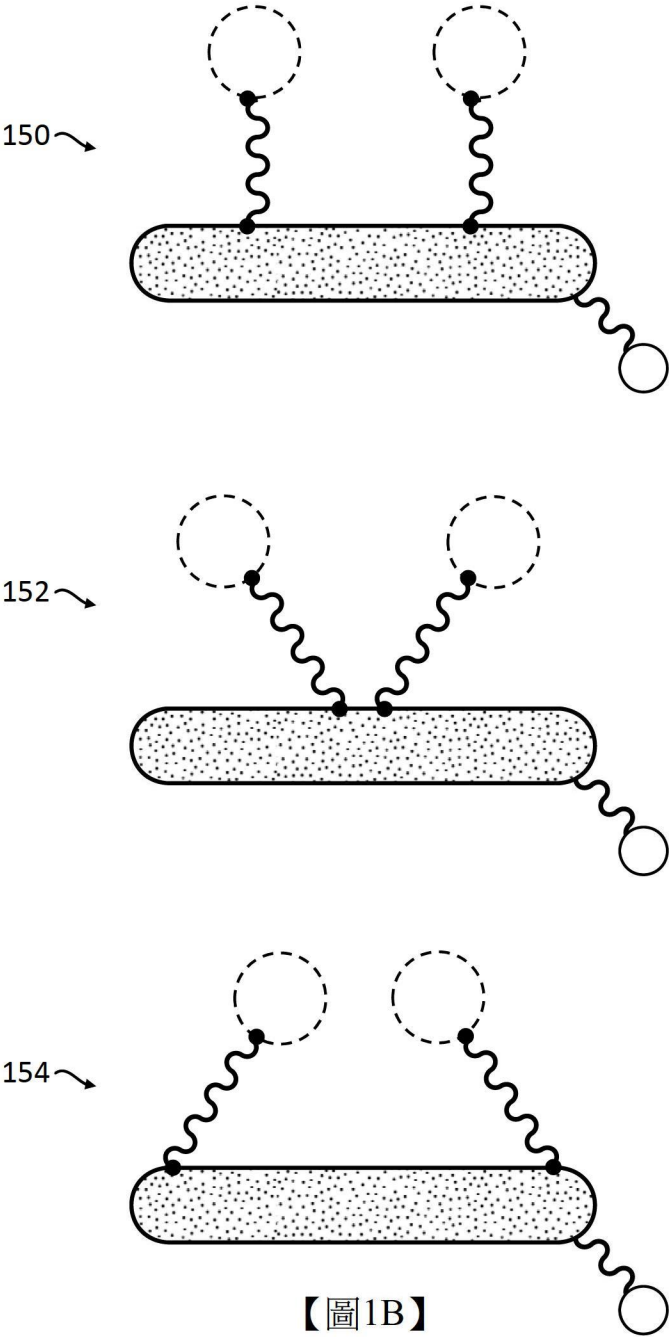
【請求項22】

一種核酸定序反應組合物，其在反應混合物中包含兩種或更多種不同類型之經發光標記之核苷酸，其中每一類型之經發光標記之核苷酸包含如請求項1至15中任一項之經標記核苷酸。

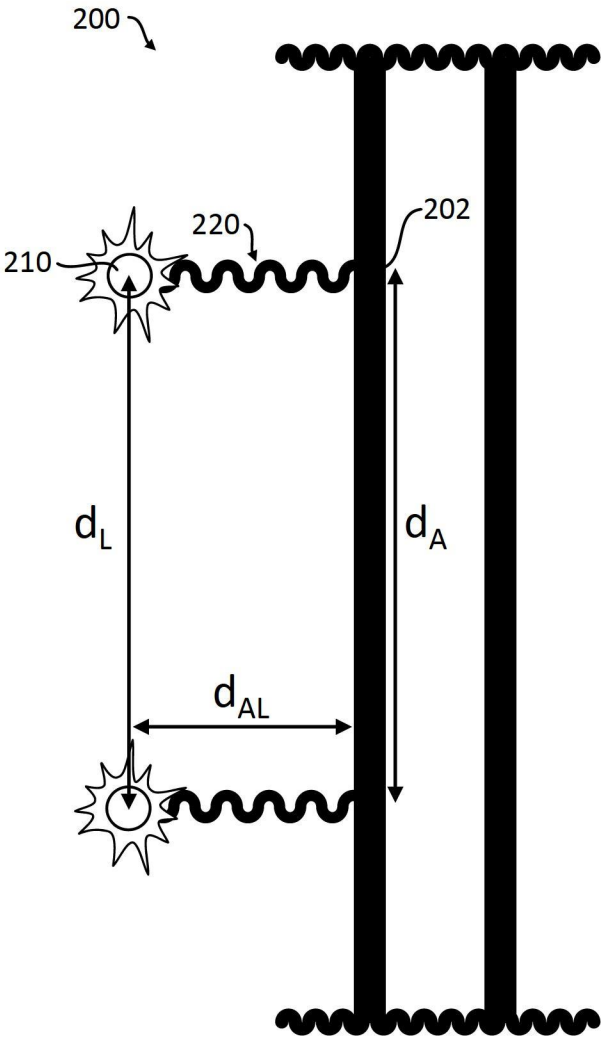
【發明圖式】



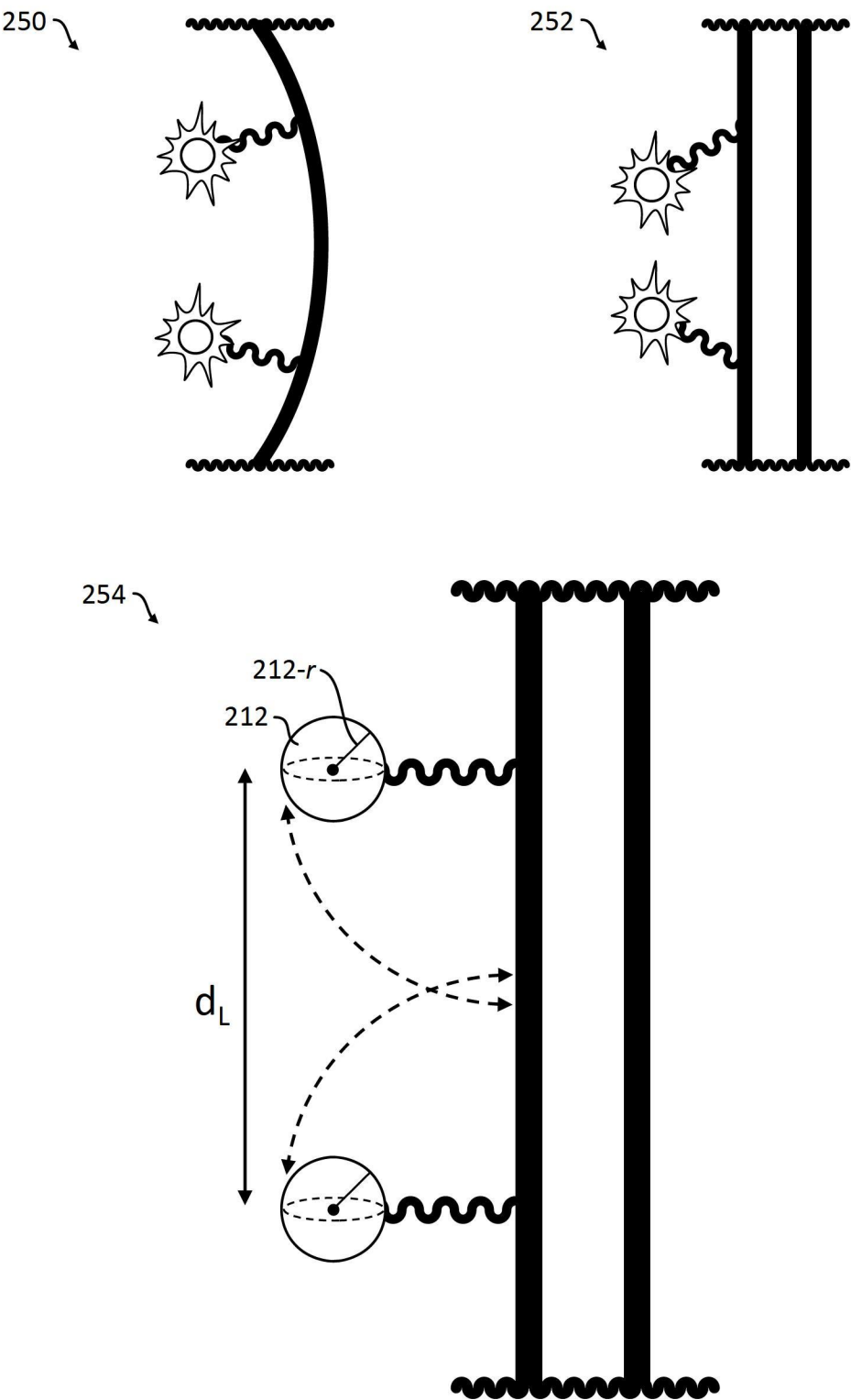
【圖1A】



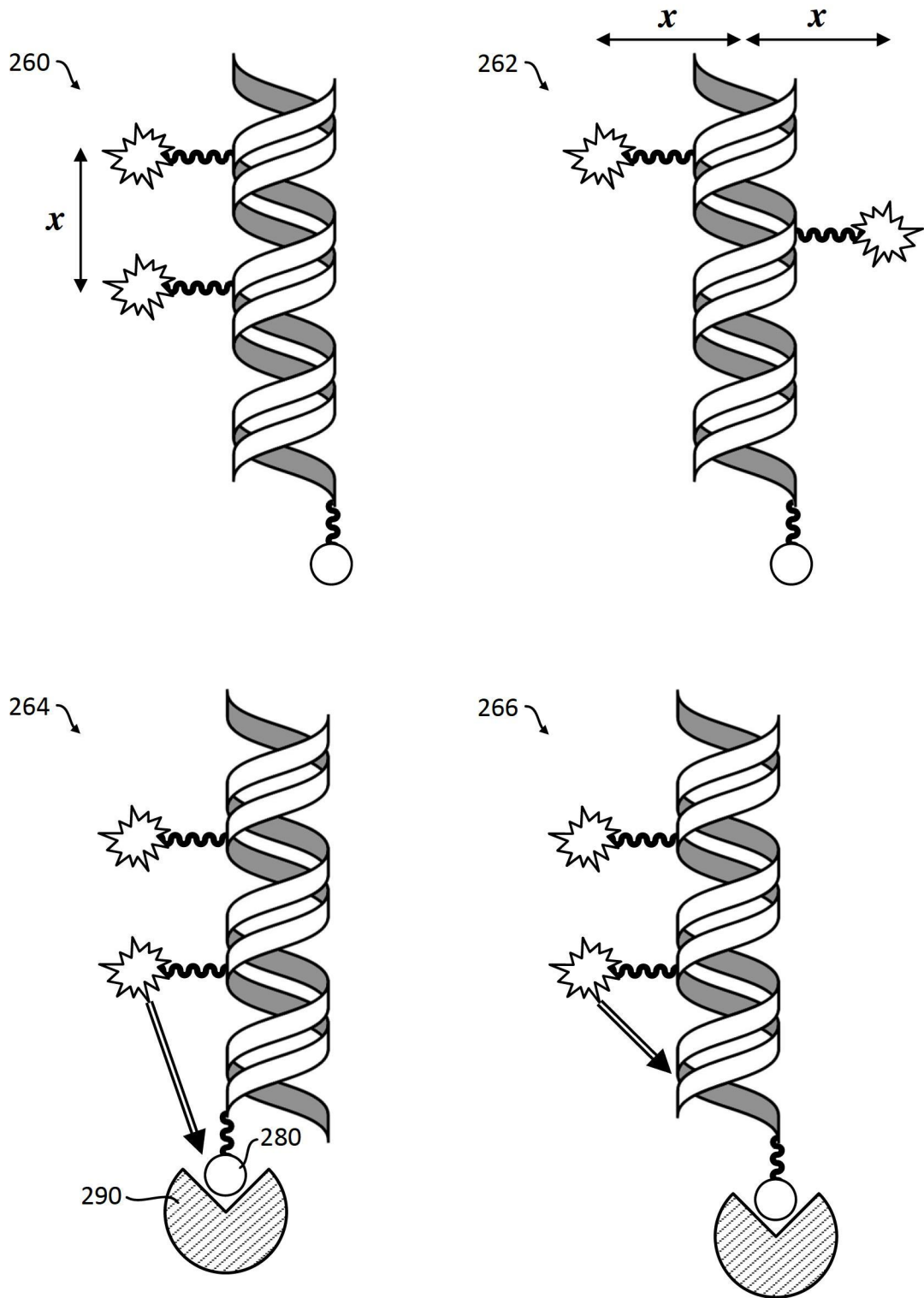
【圖1B】



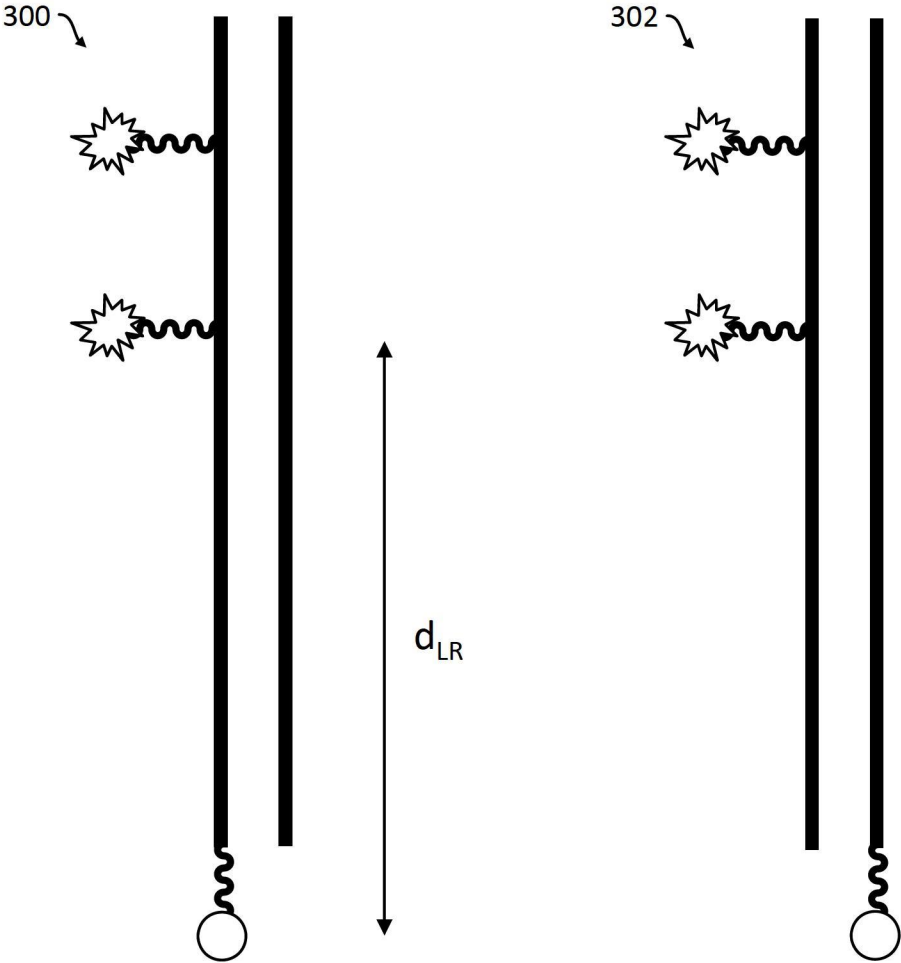
【圖2A】



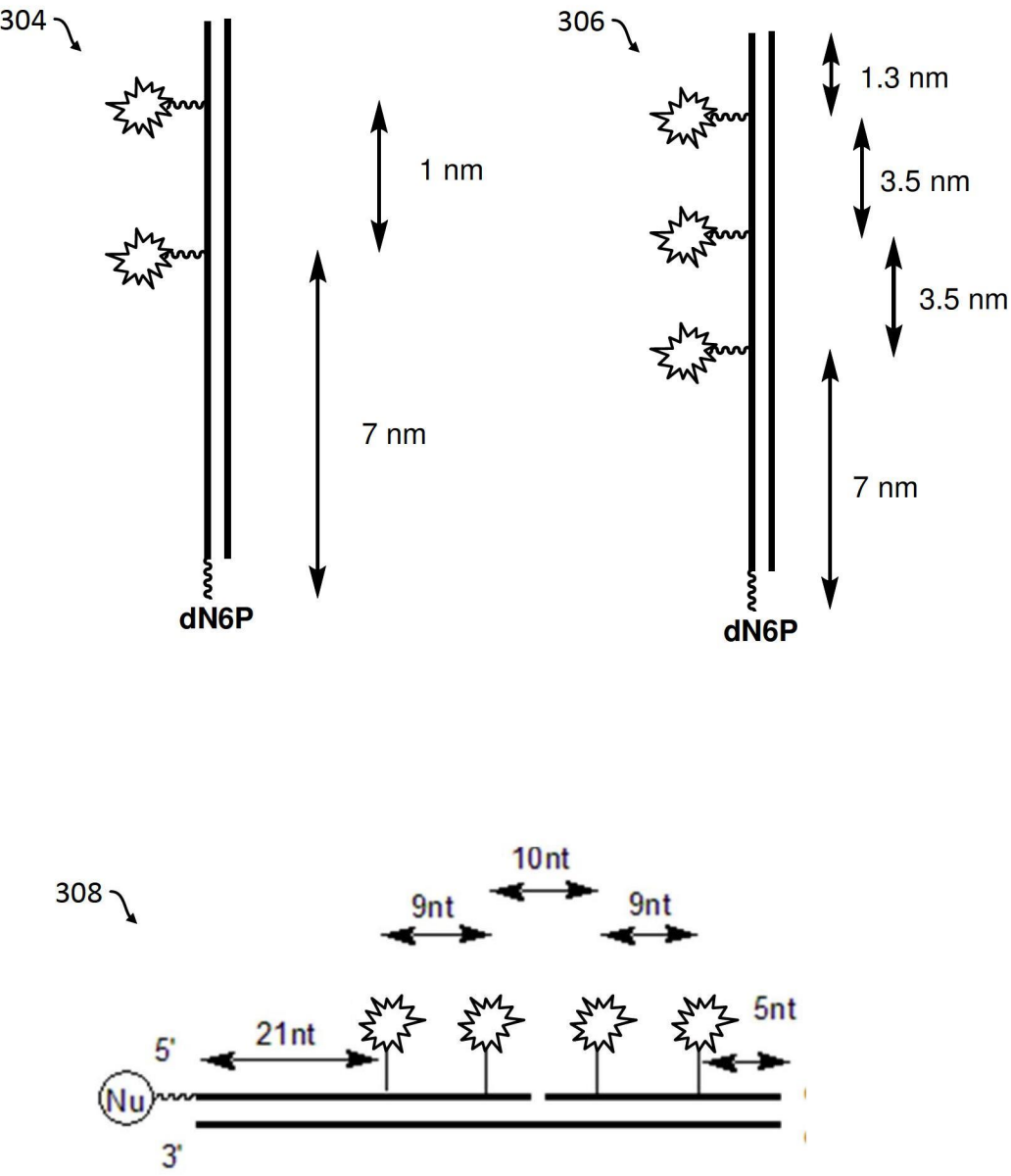
【圖2B】



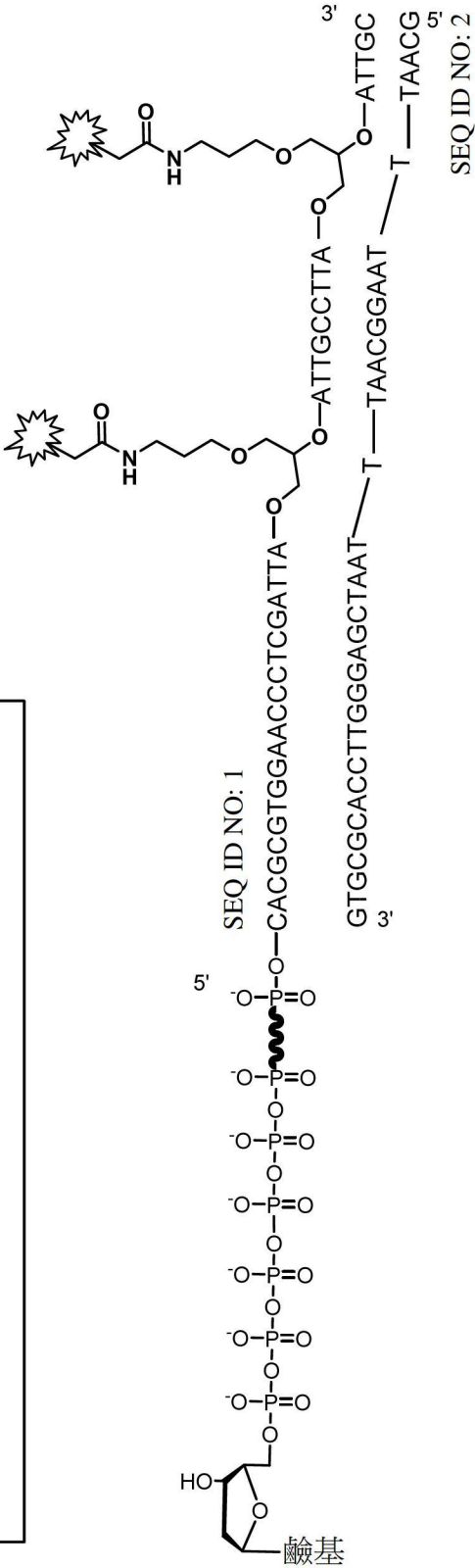
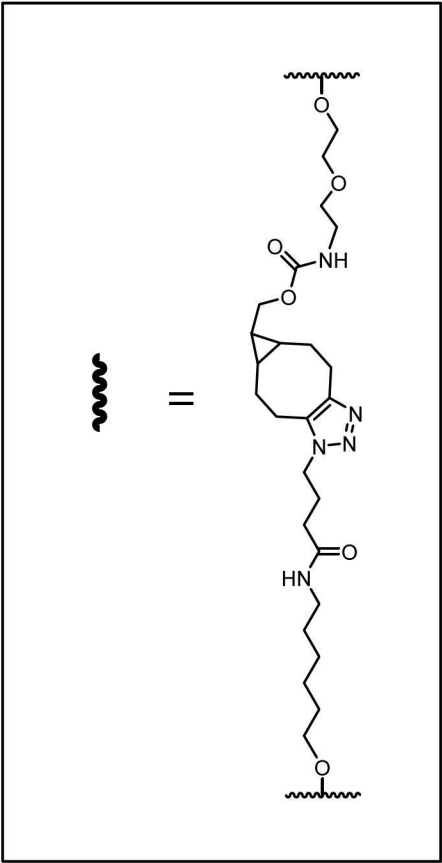
【圖2C】



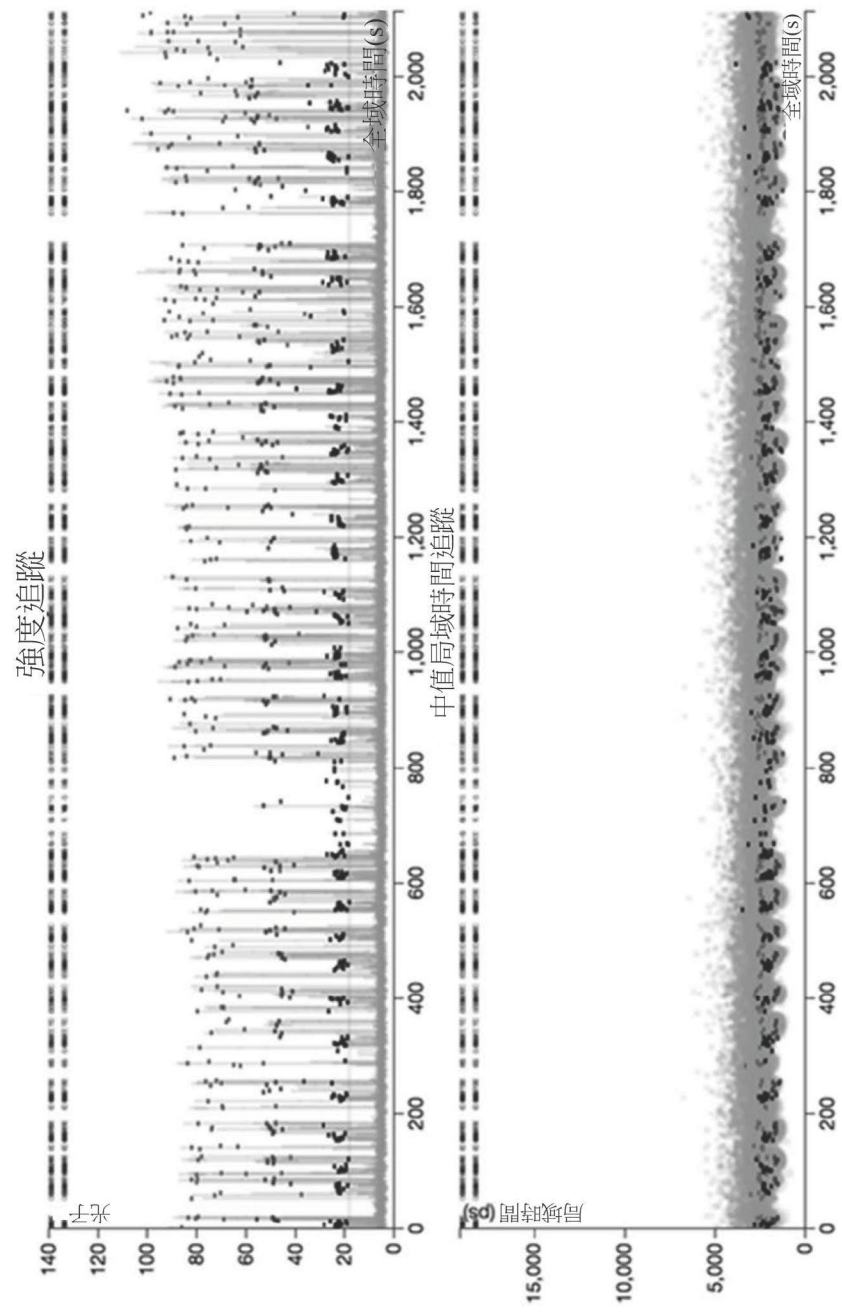
【圖3A】



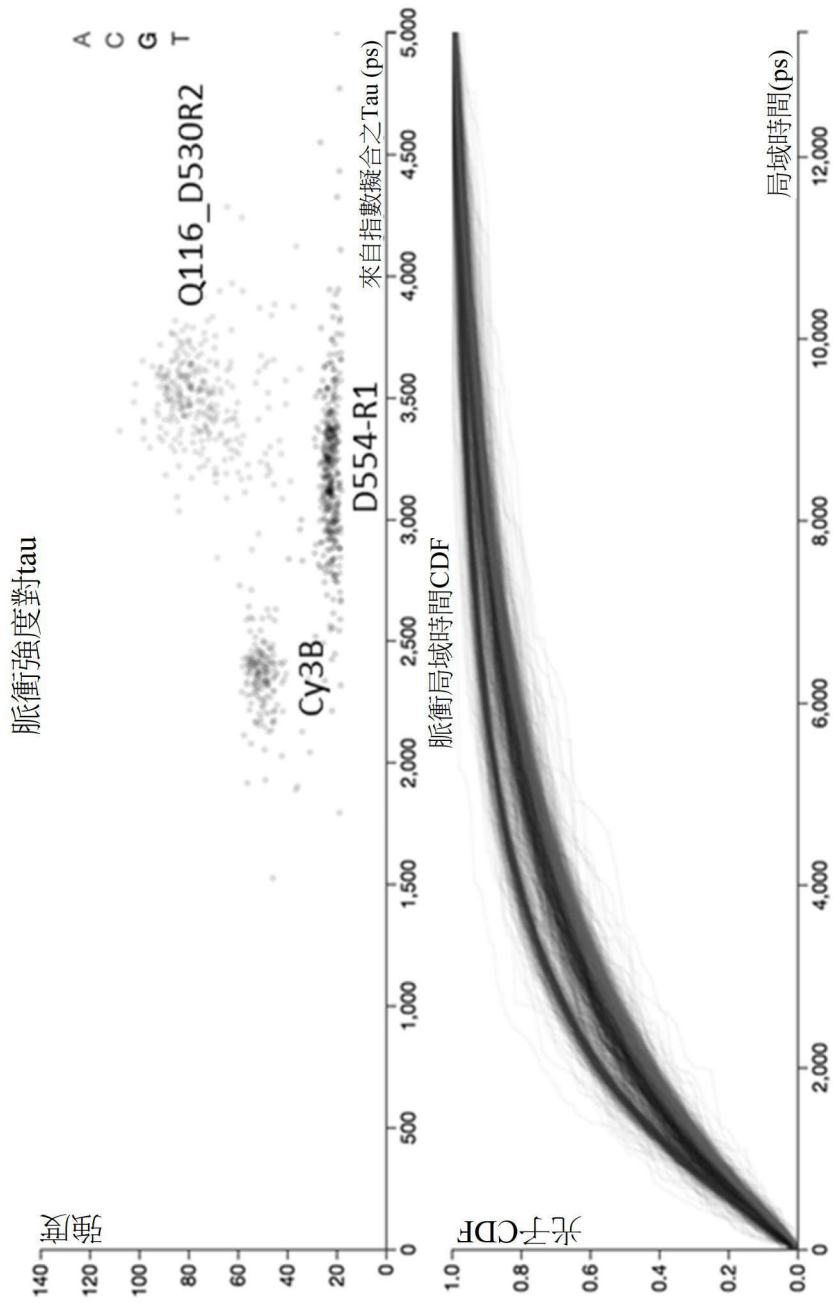
【圖3B】



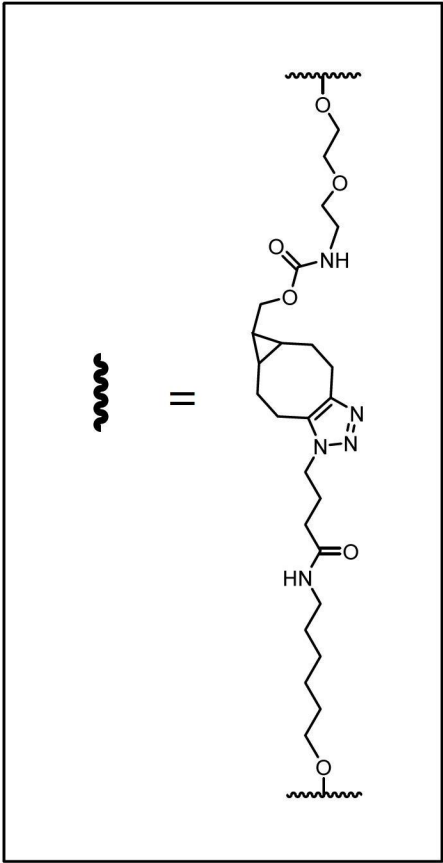
【圖3C】



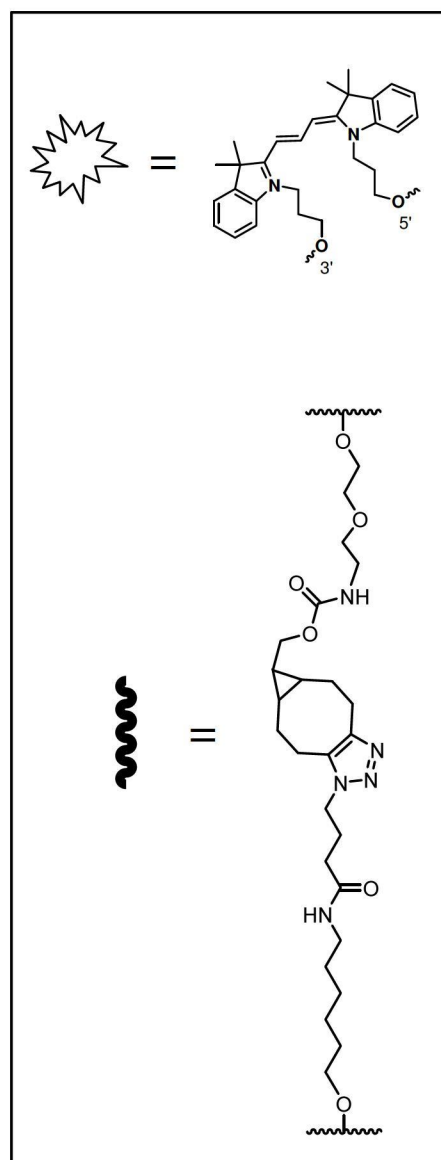
【圖3D】



【圖3D】(續)



【圖3E】



【圖3F】

對齊度

讀取長度
354

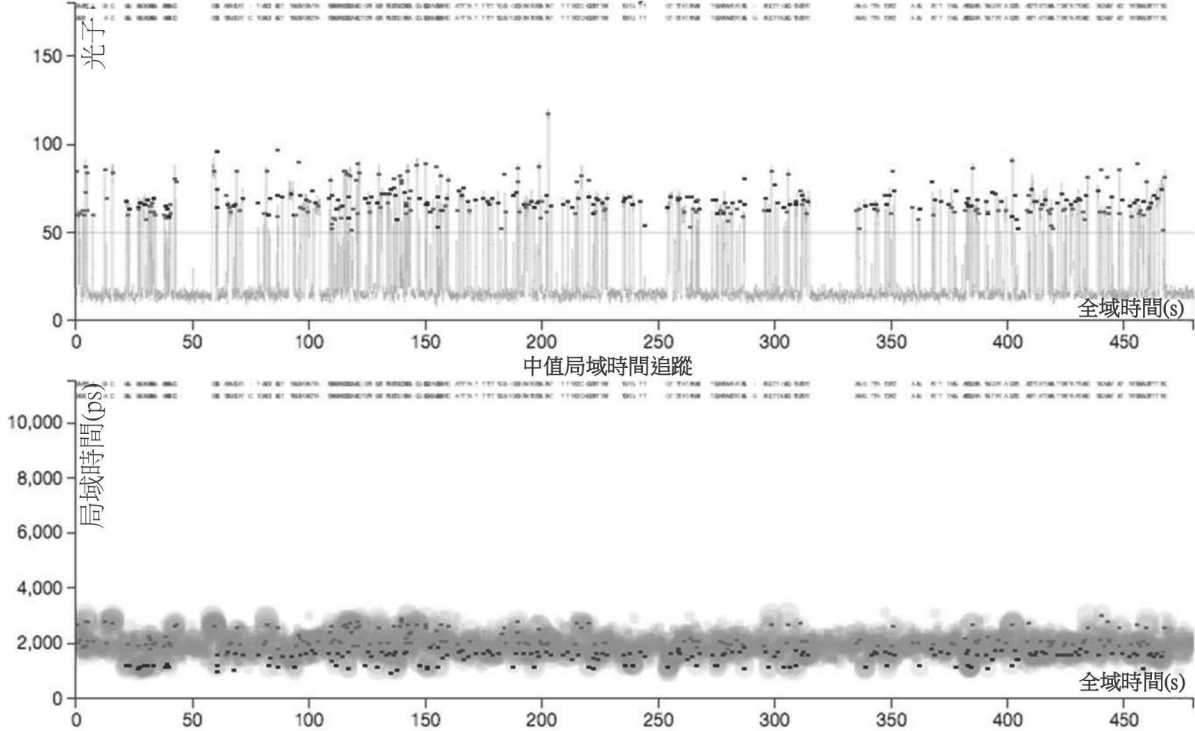
準確度
86.4%

p值
1e-55

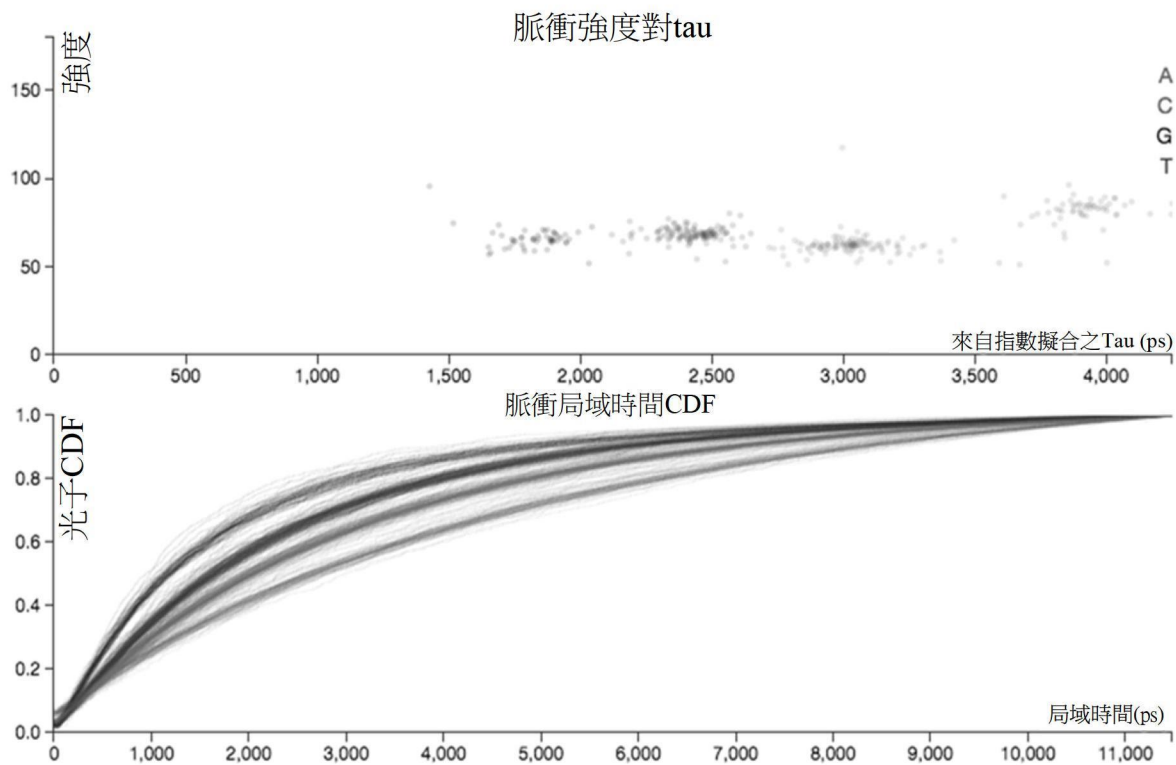
插入		缺失		失配				
	數量		數量		A	C	G	T
A	2	A	6	A		0	0	5
C	8	C	9	C	0		0	0
G	0	G	4	G	2	0		1
T	2	T	8	T	2	0	1	
總計	12	總計	27	總計	4	0	1	6

		總計	
A	5		
C	0		
G	3		
T	3		
總計	11		

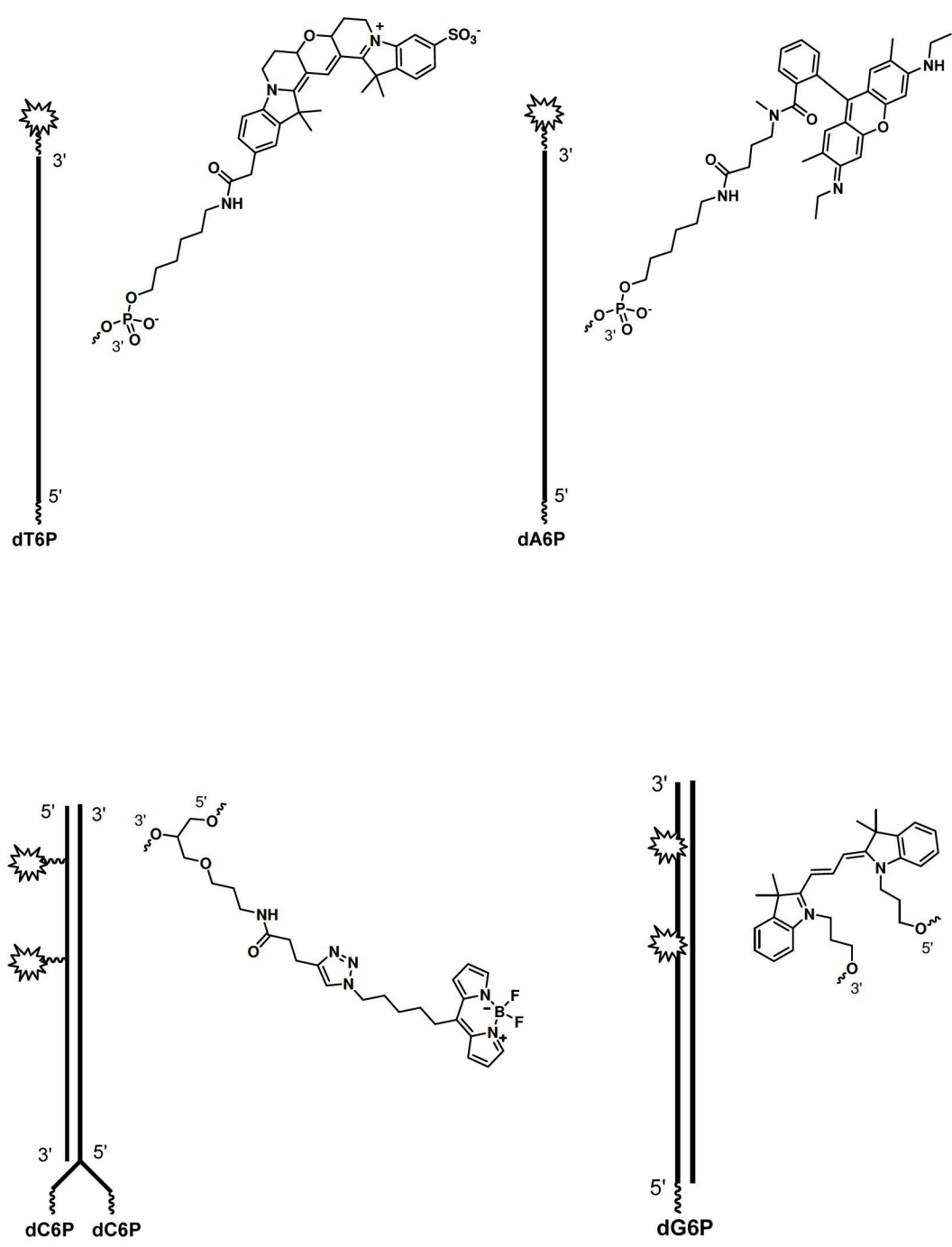
強度追蹤



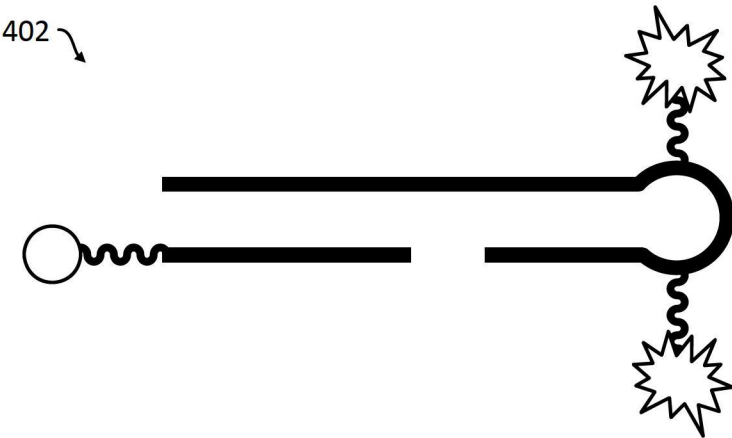
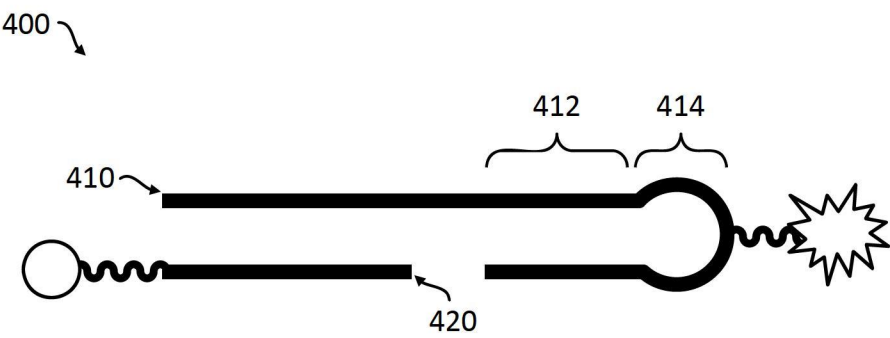
【圖3G】



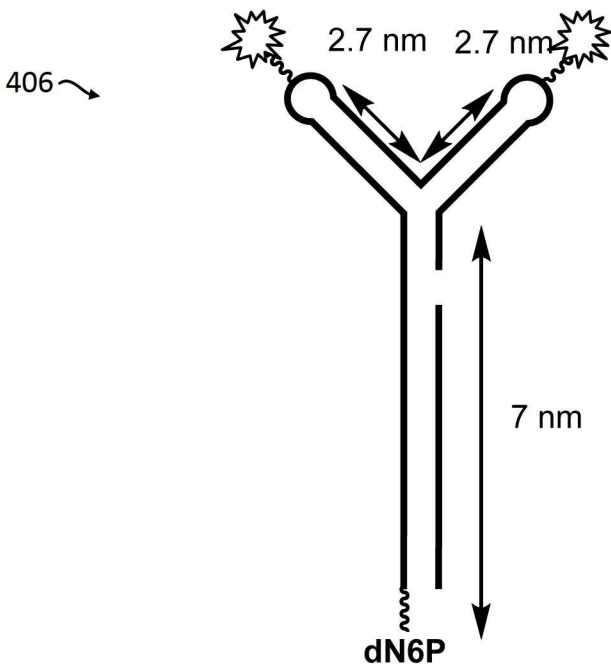
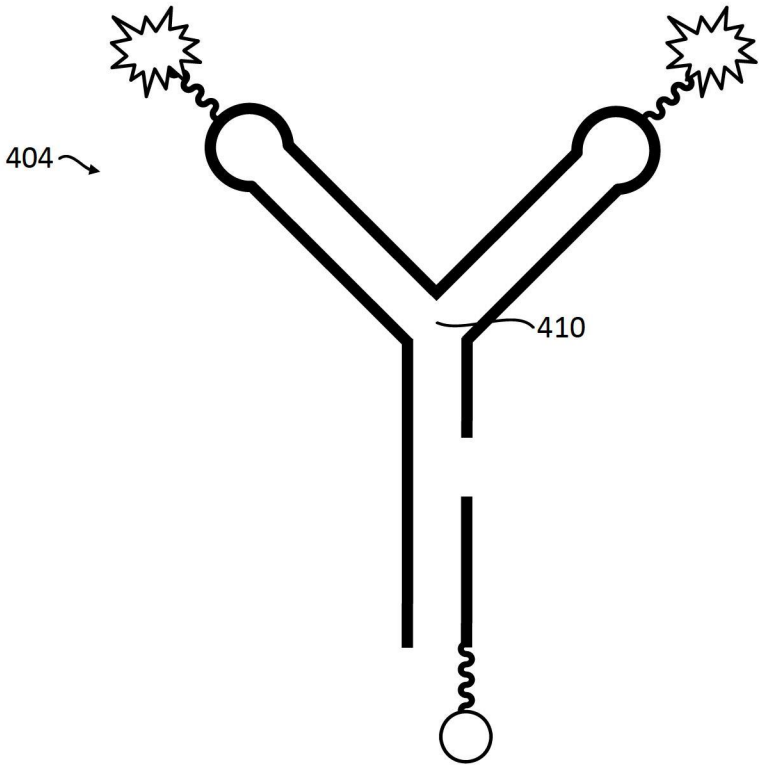
【圖3G】 (續)



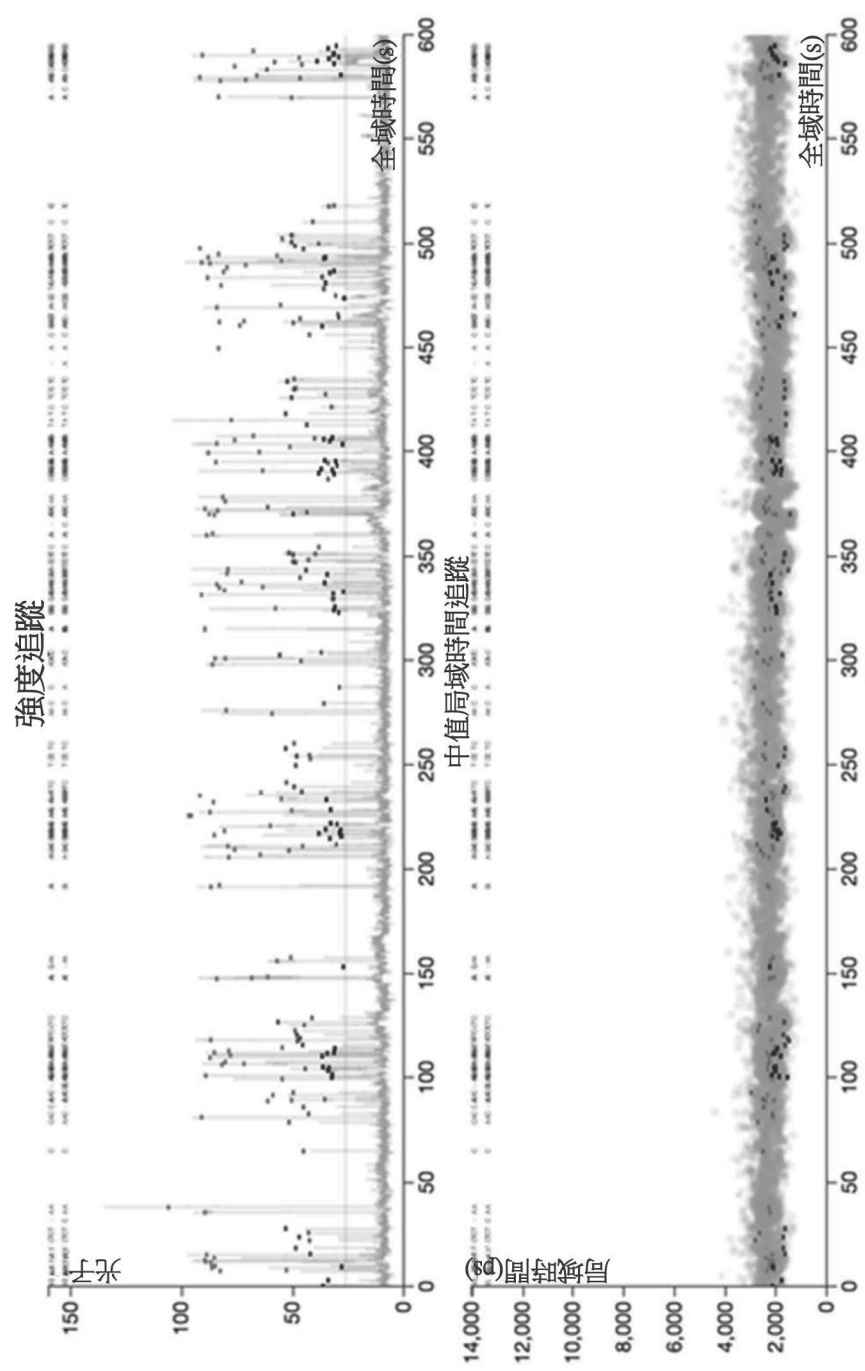
【圖3G】(續)



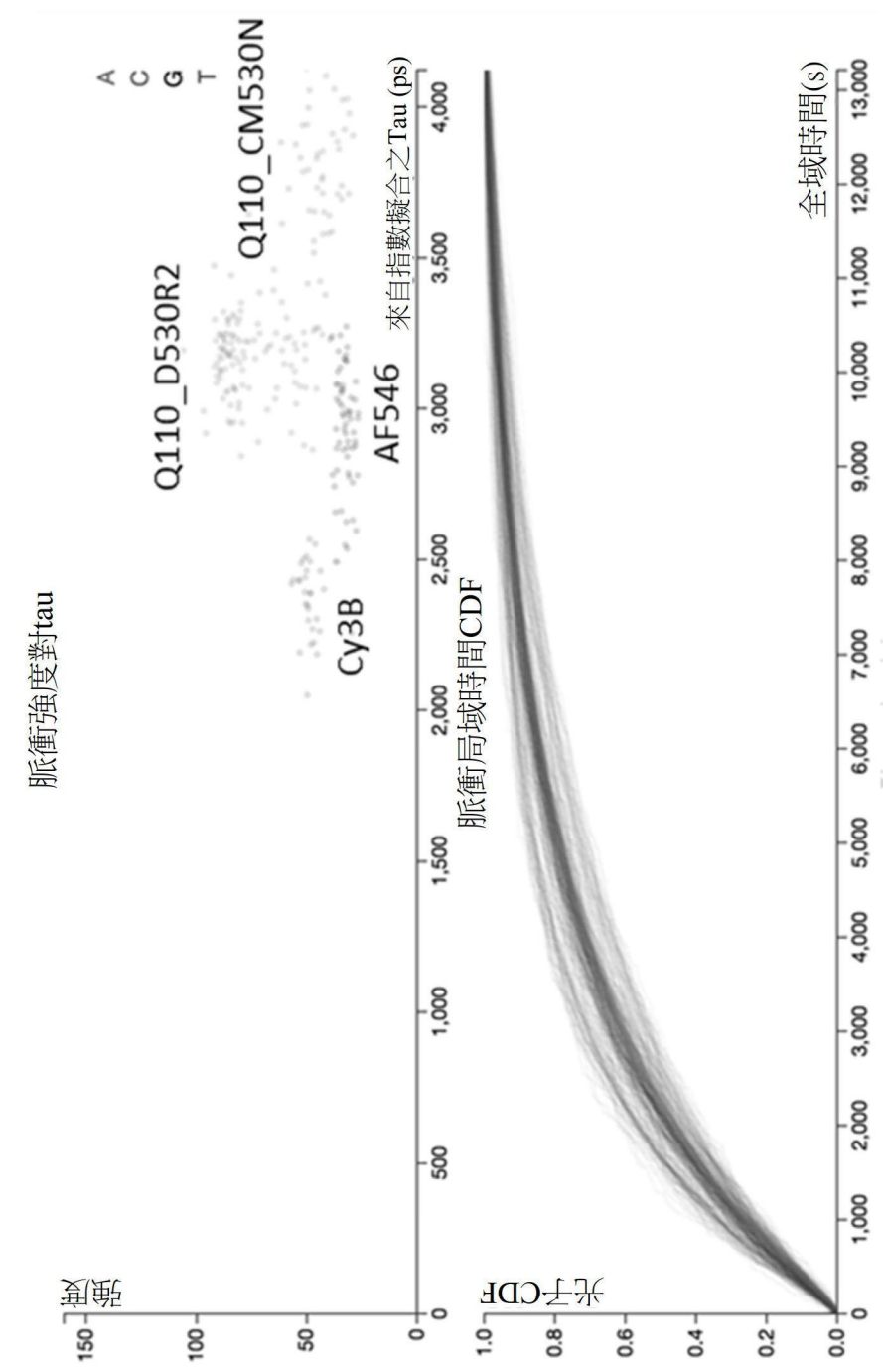
【圖4A】



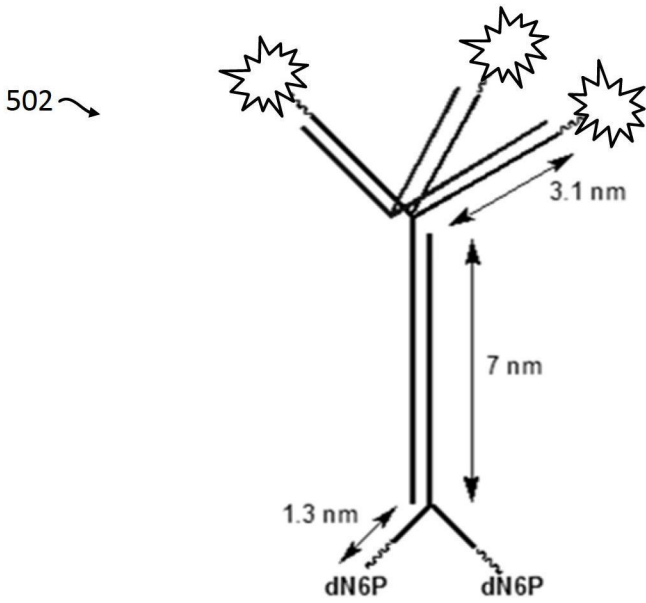
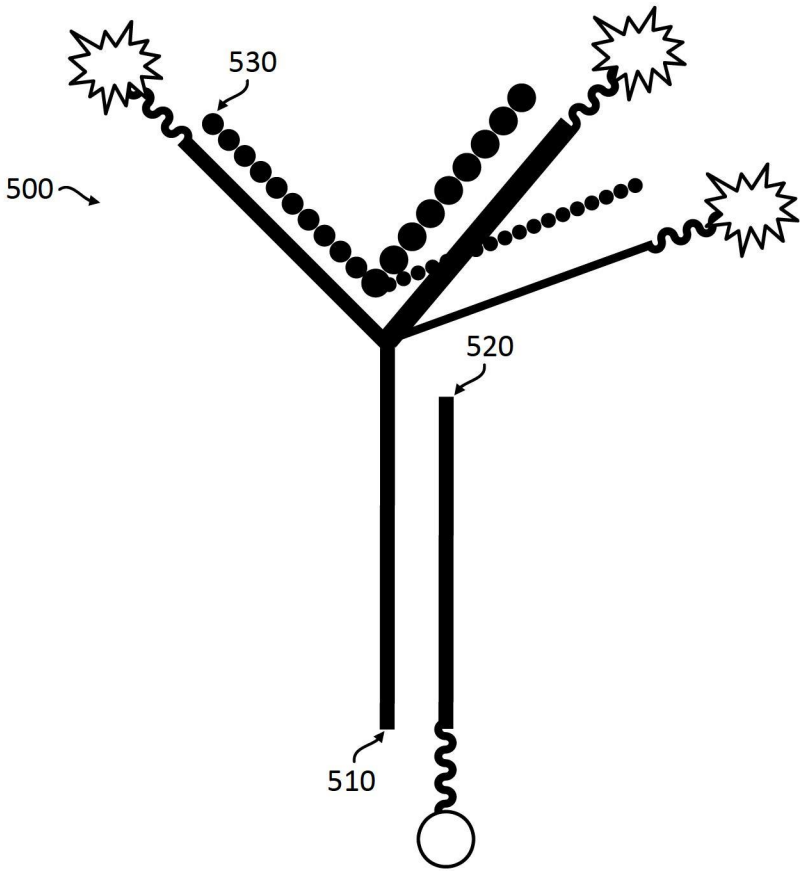
【圖4B】



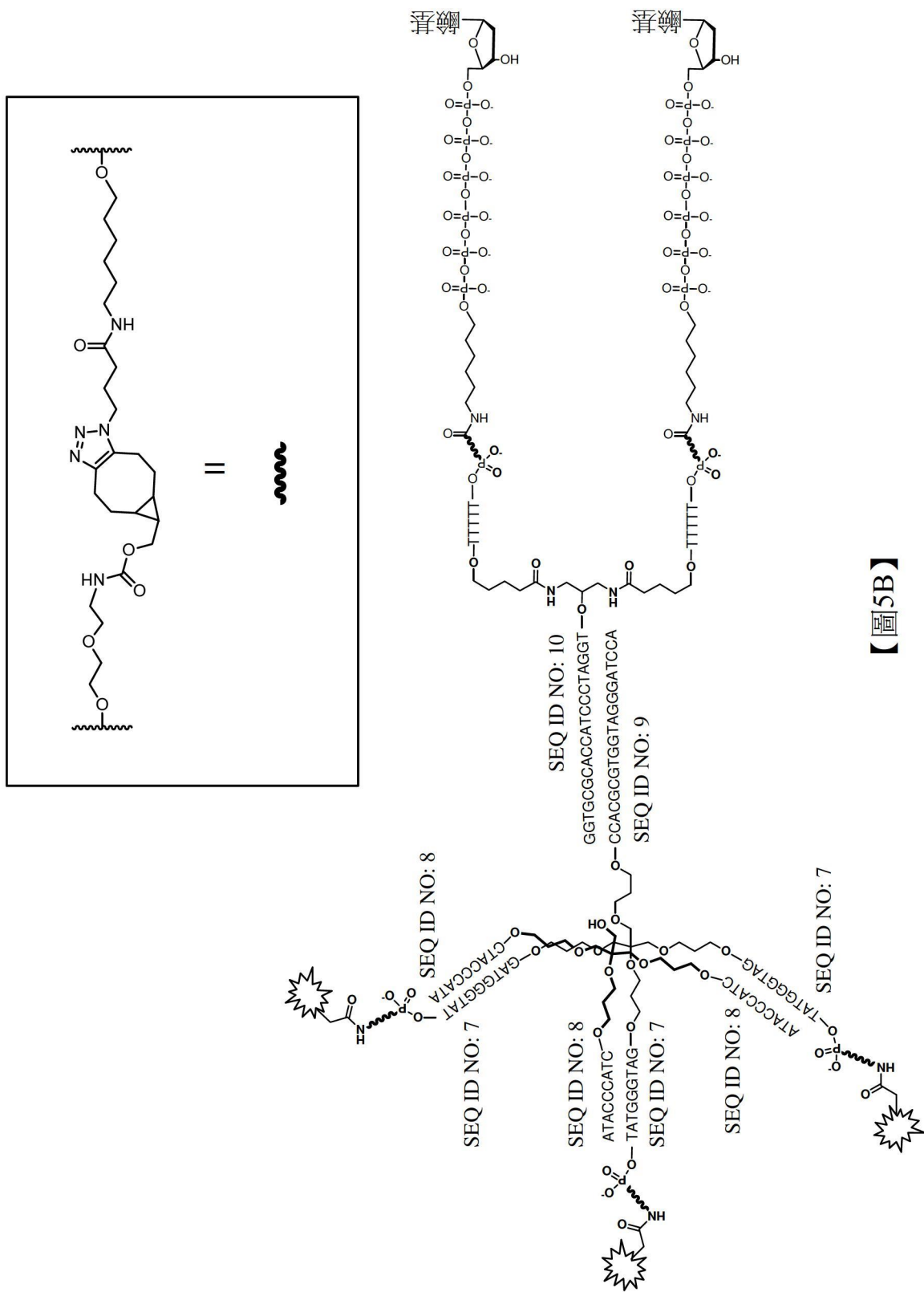
【圖4D】

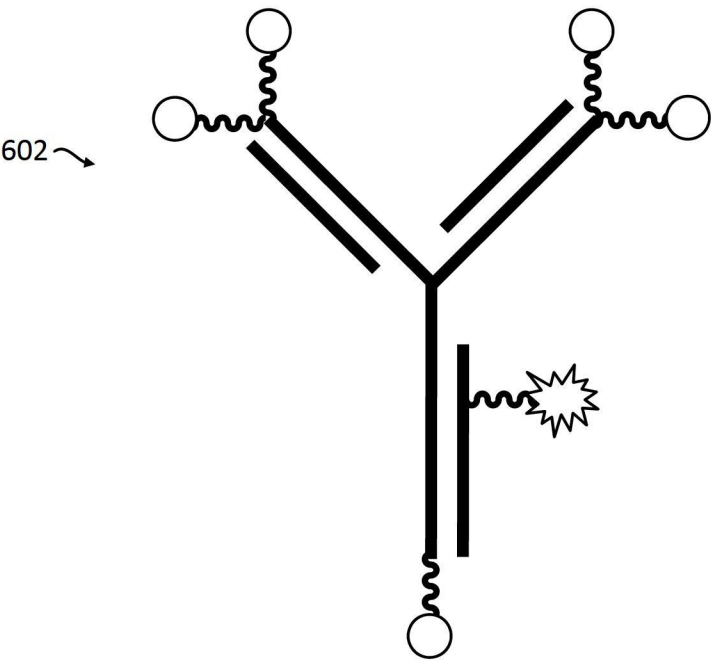
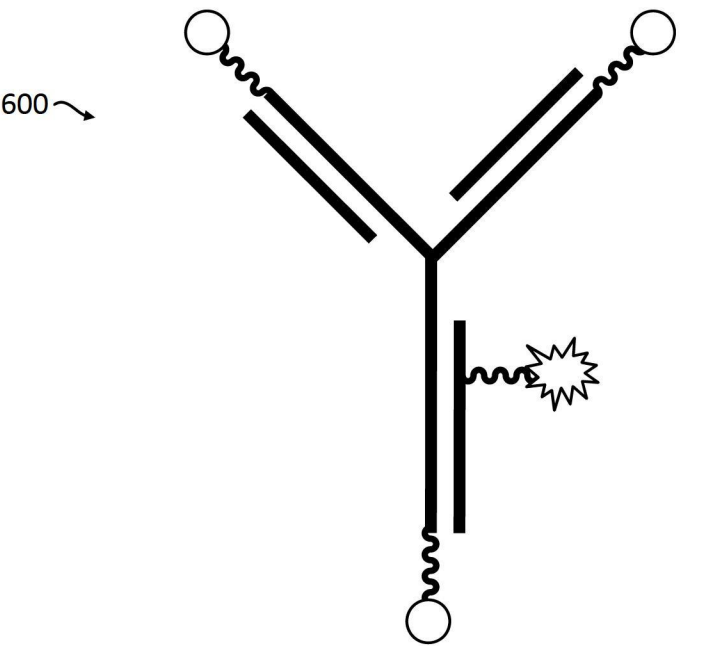


【圖4D】(續)

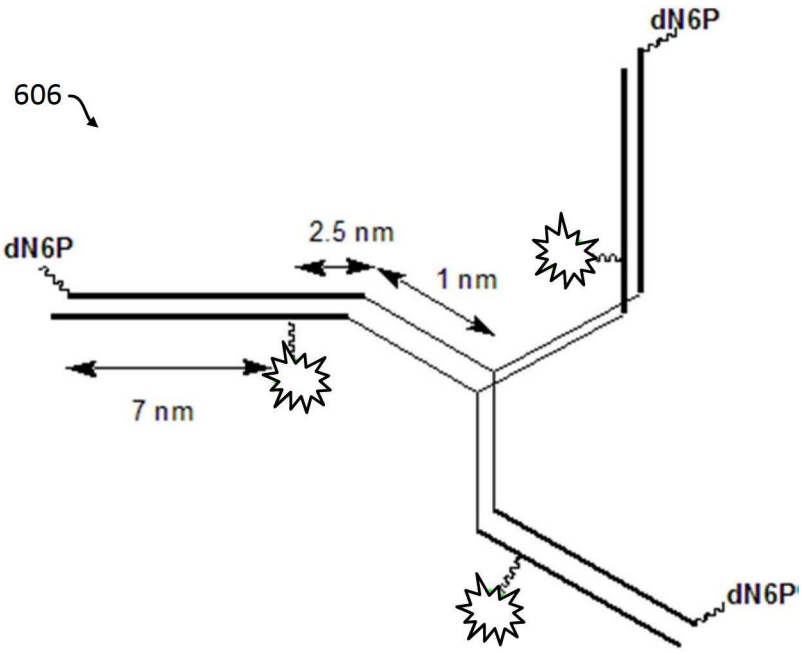
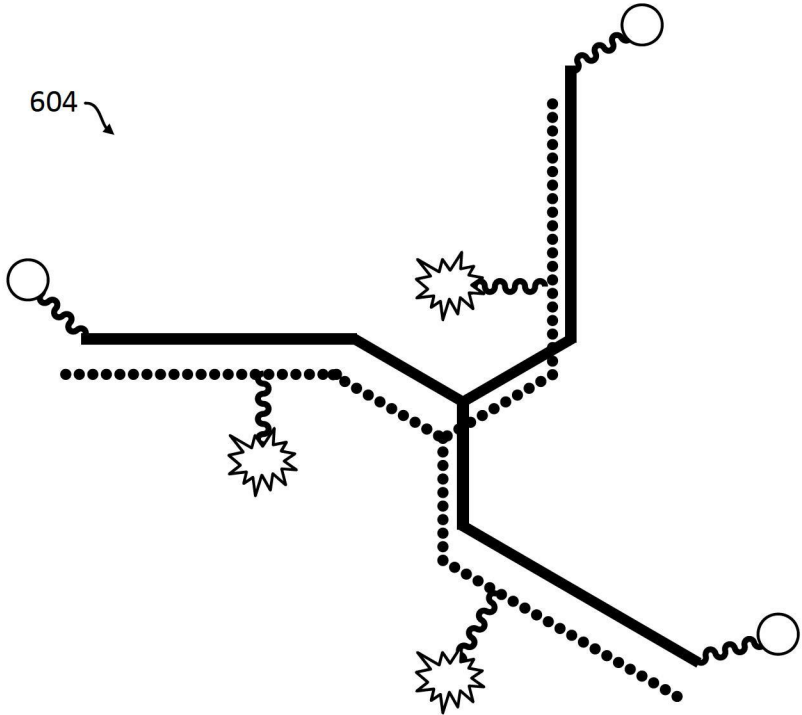


【圖5A】

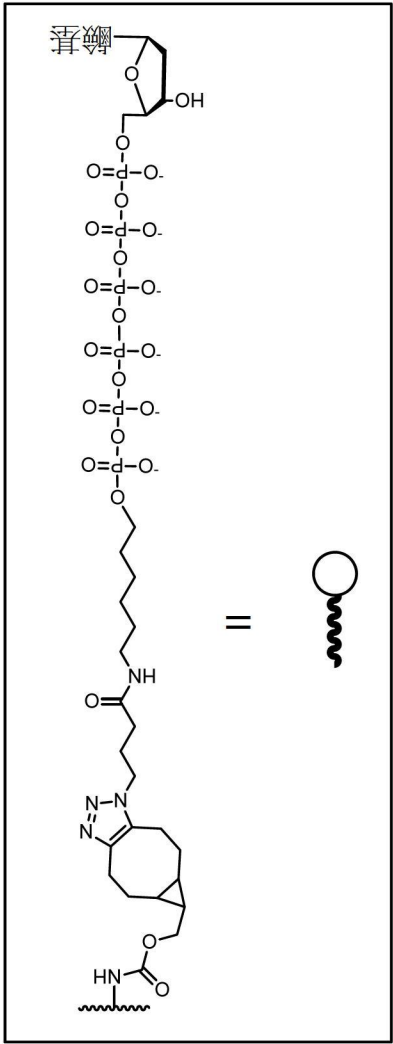
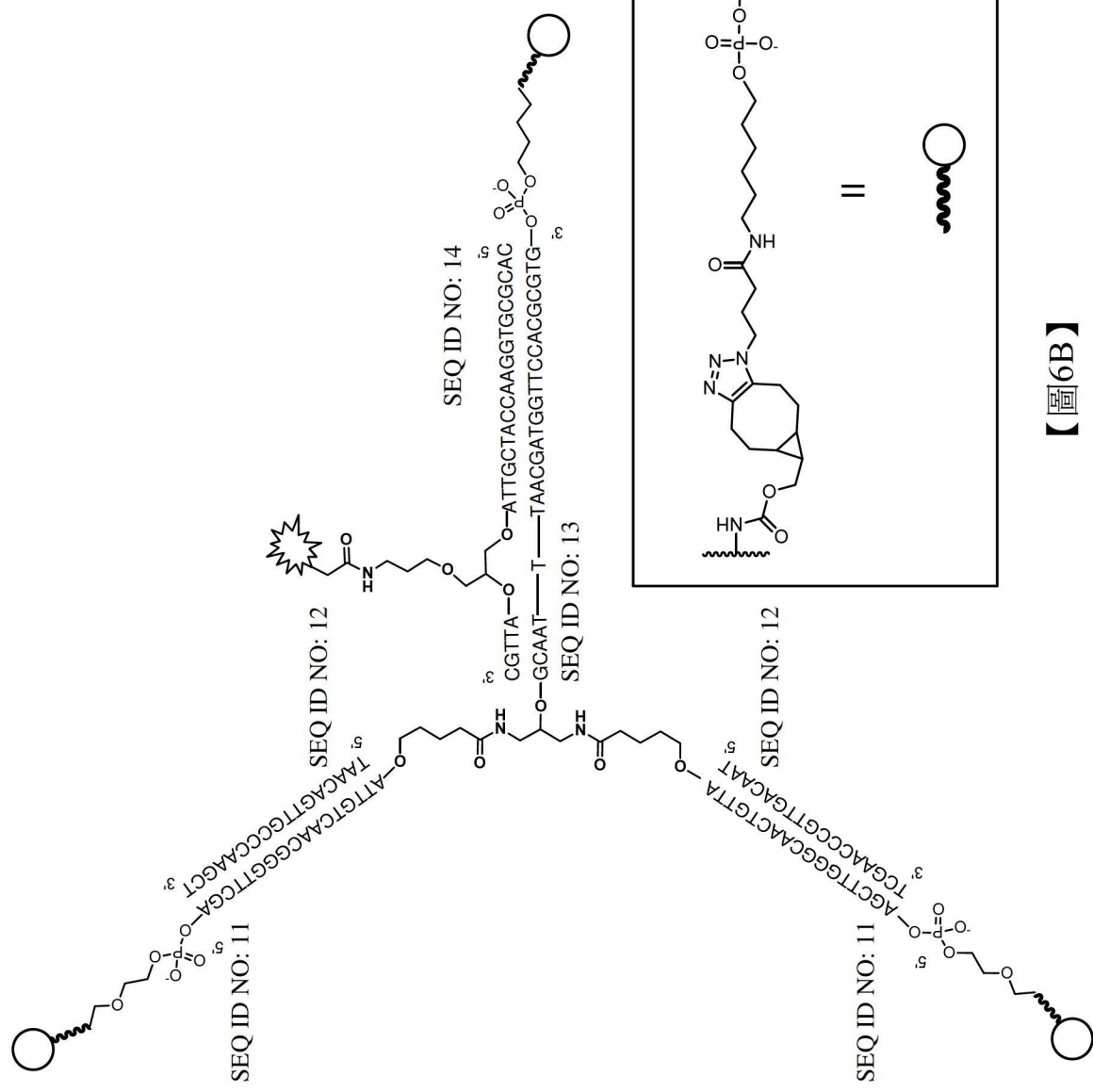




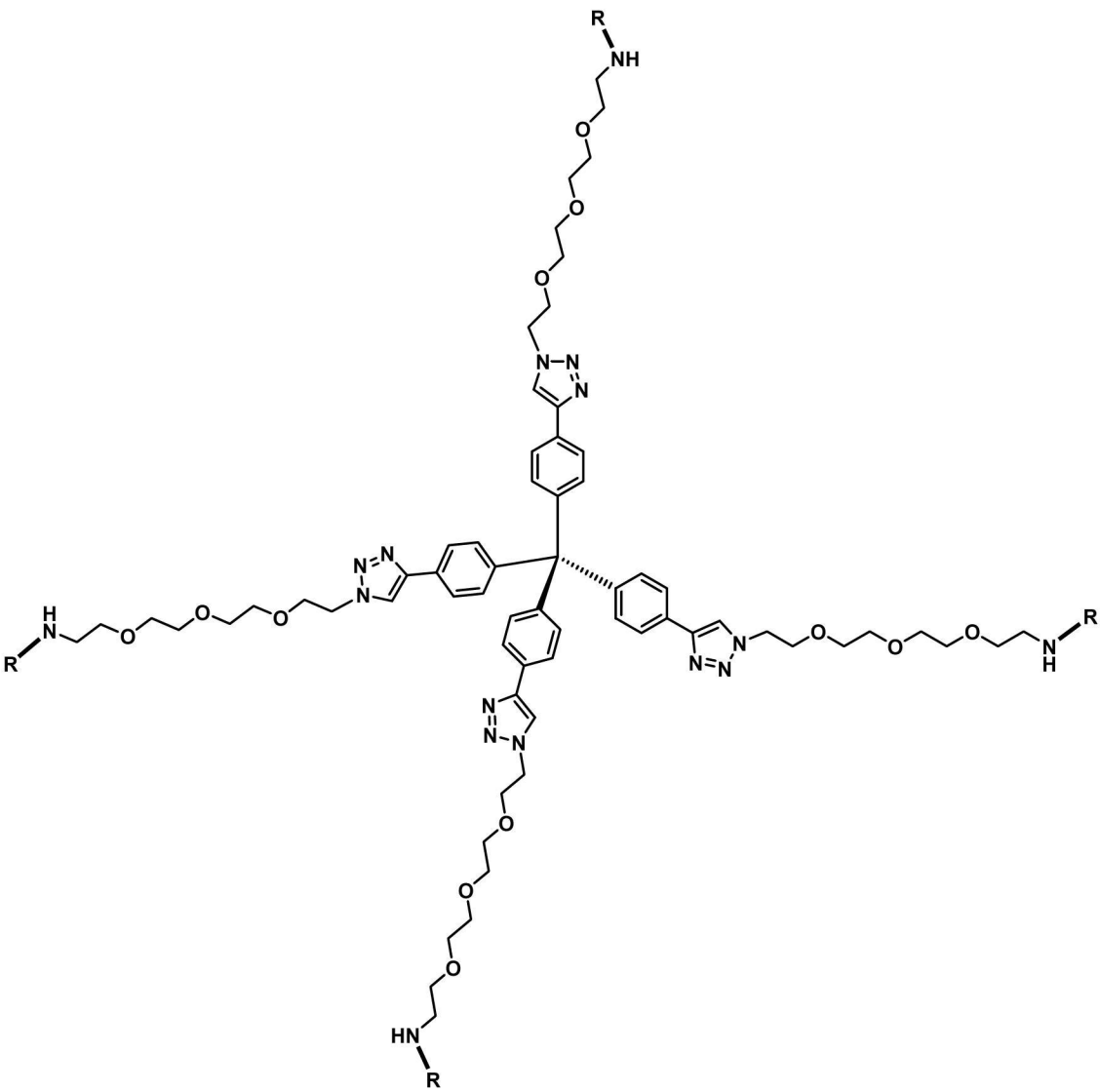
【圖6A】



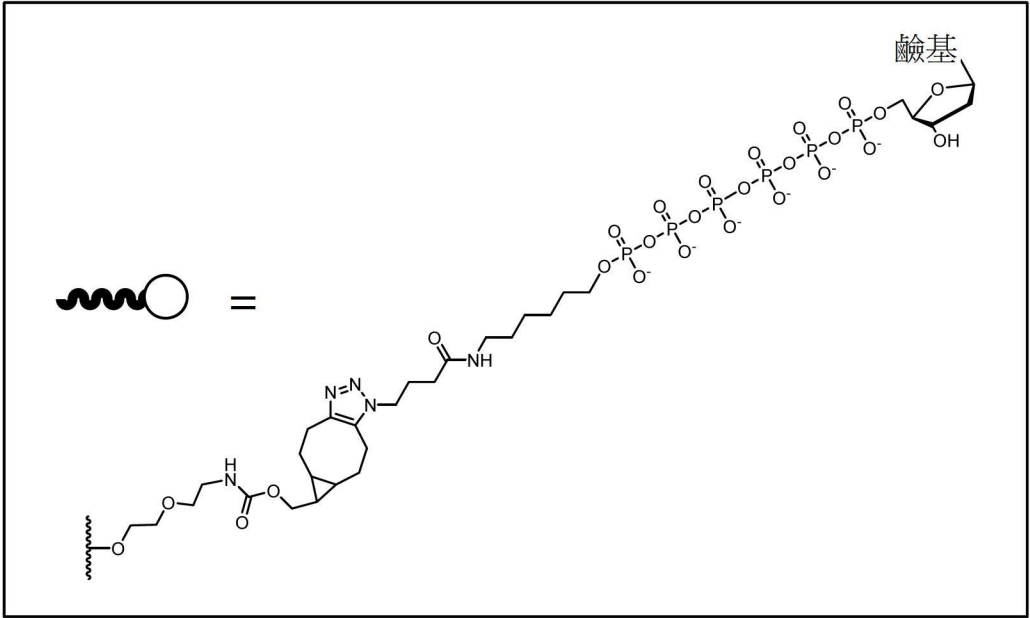
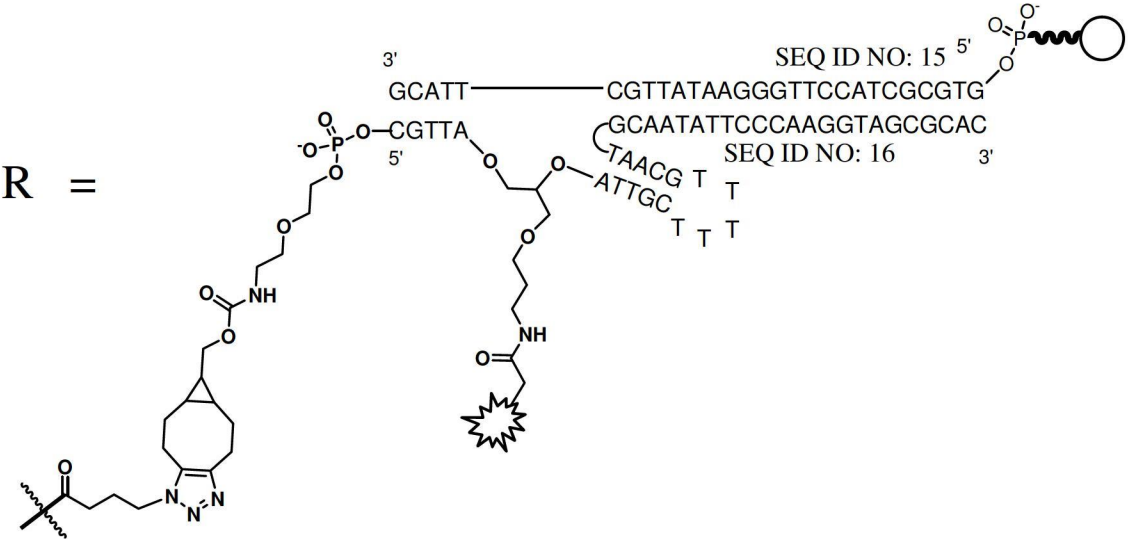
【圖6A】(續)



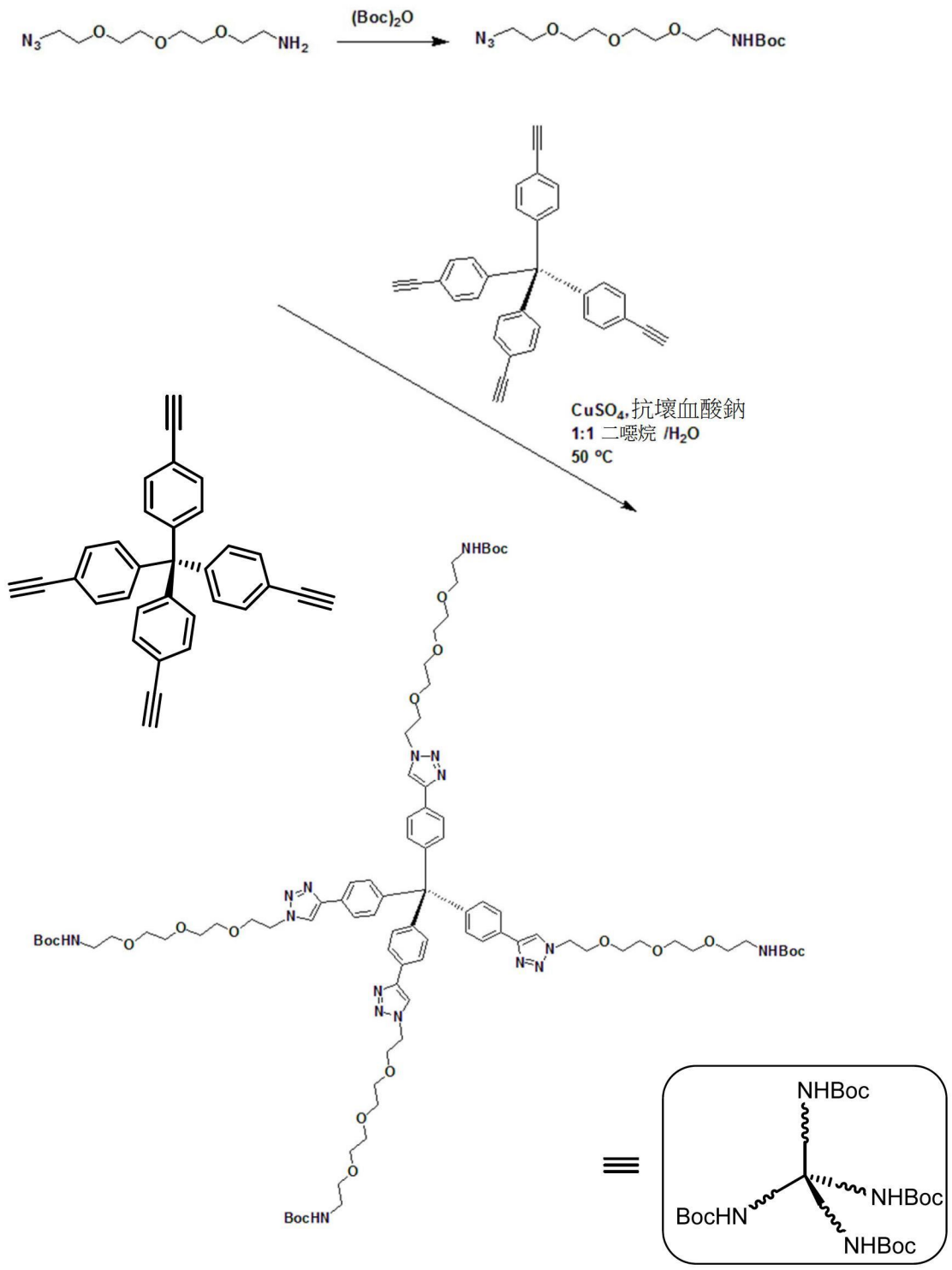
【圖6B】



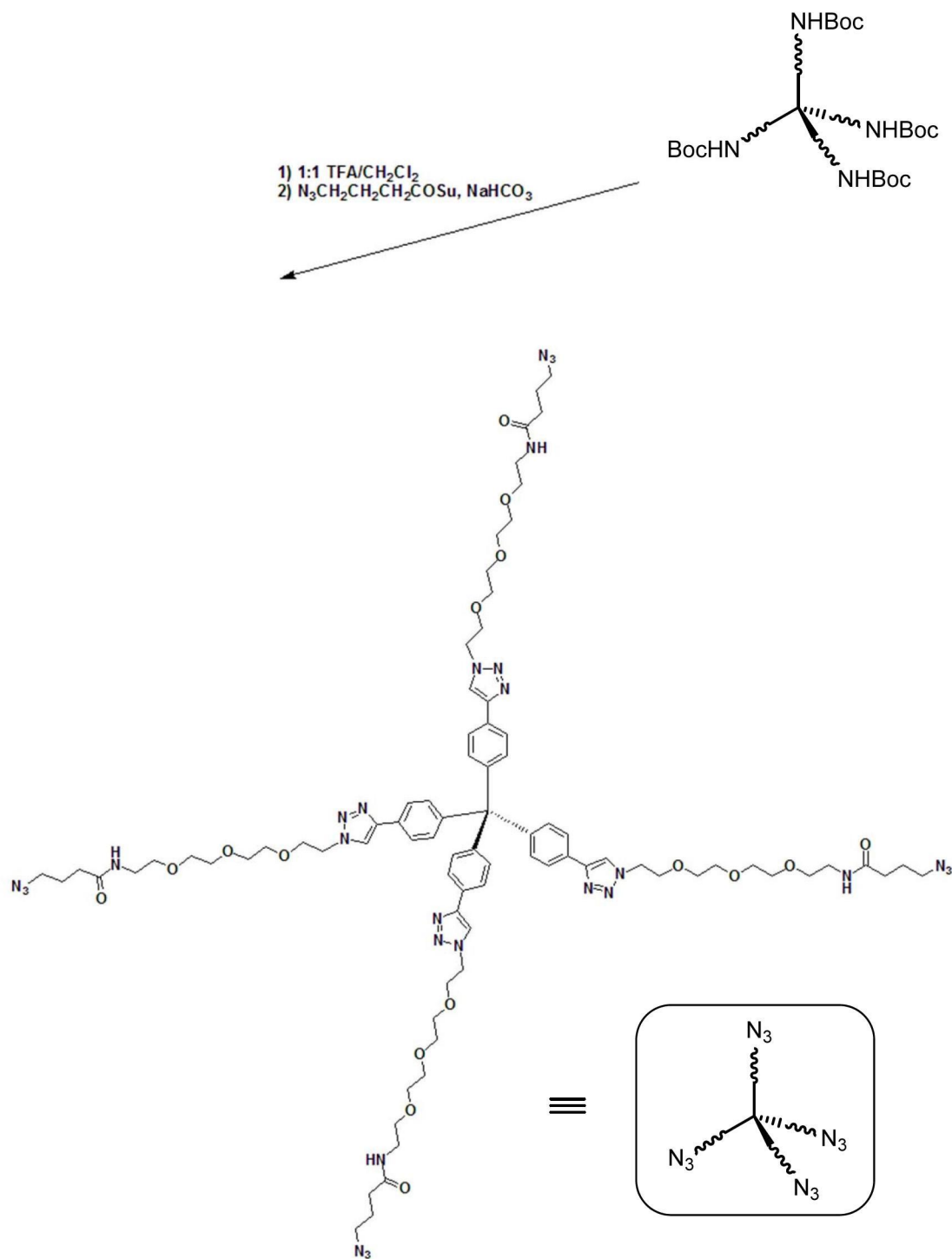
【圖6C】



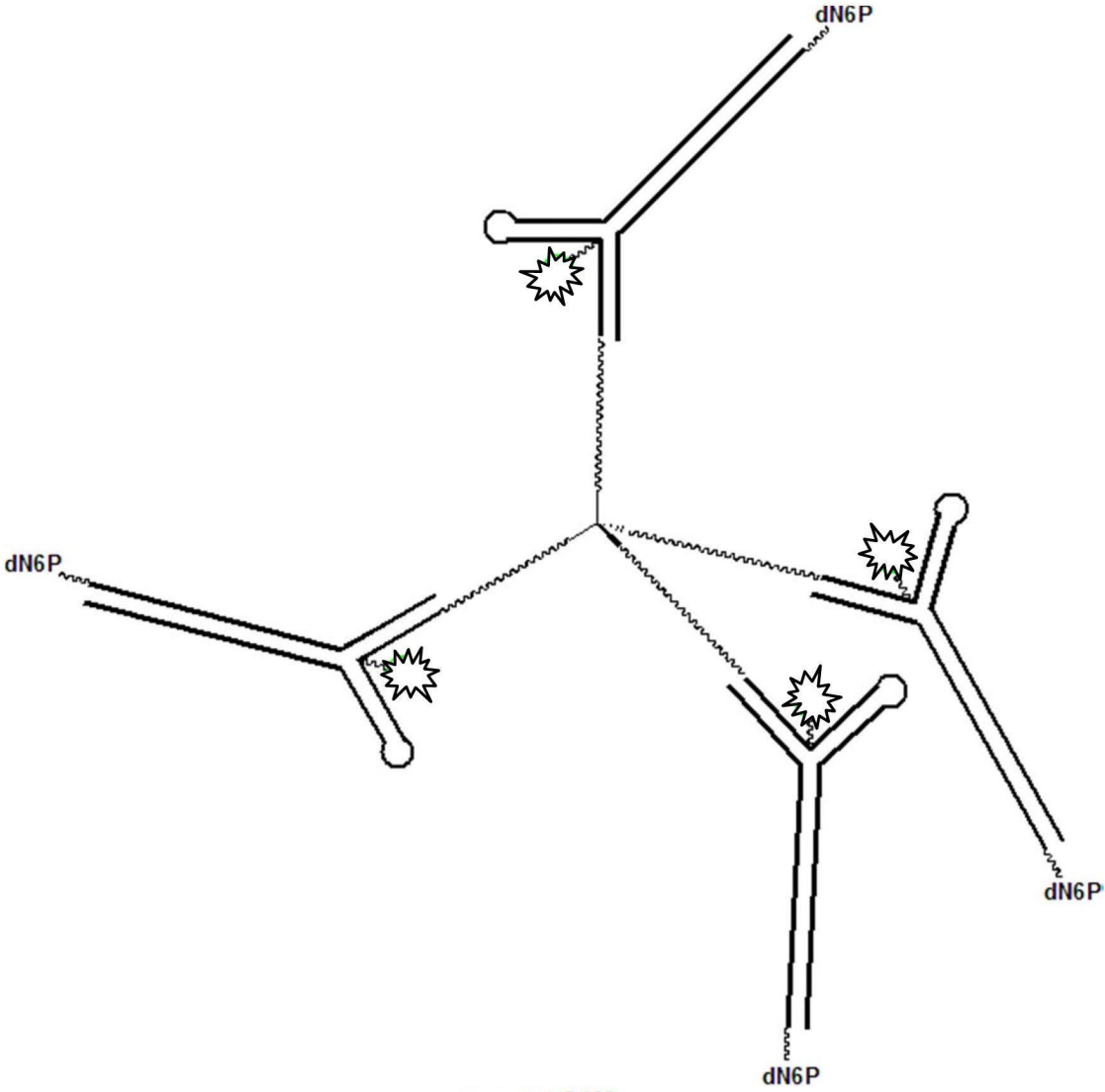
【圖6C】 (續)



【圖6D】

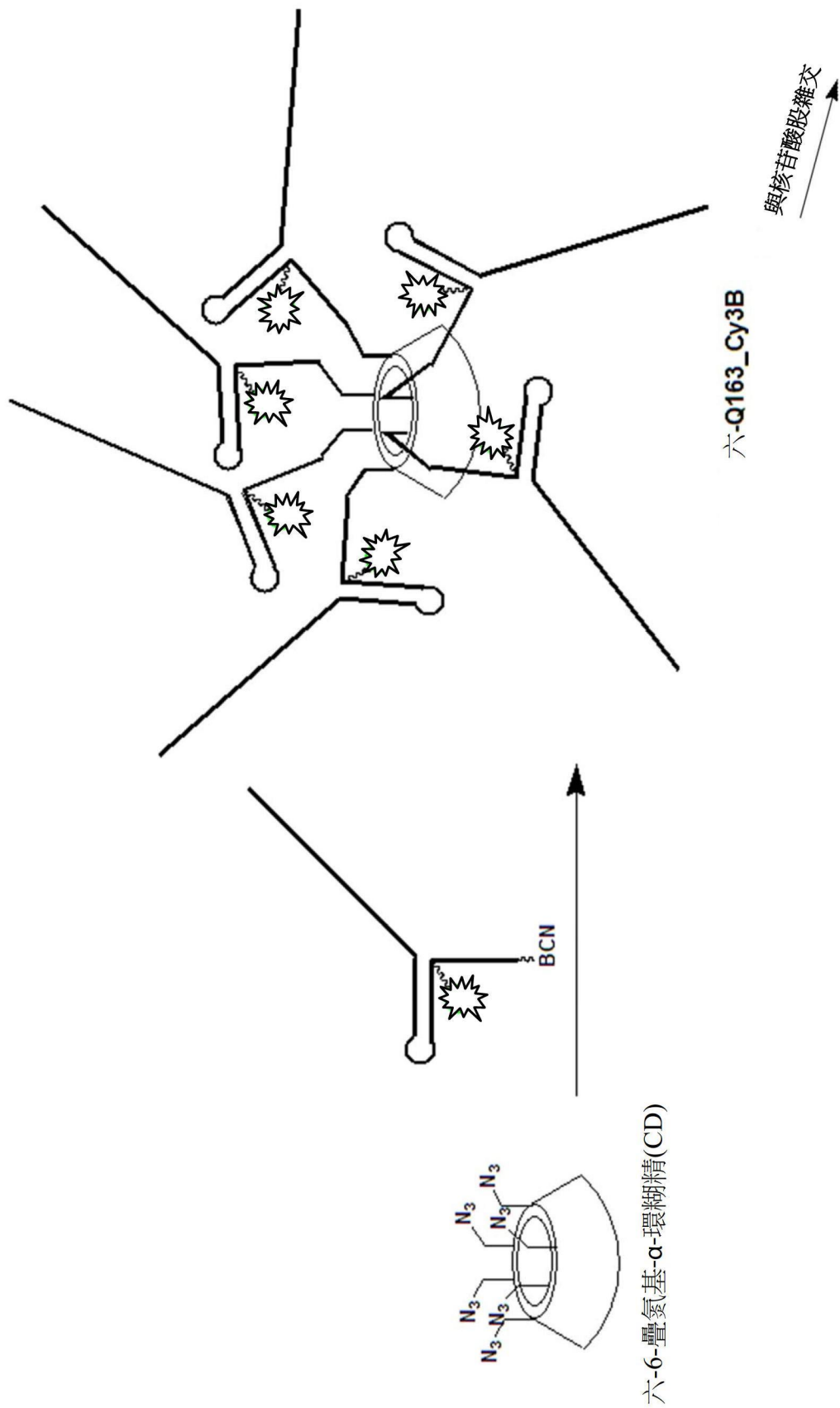


【圖6D】 (續)

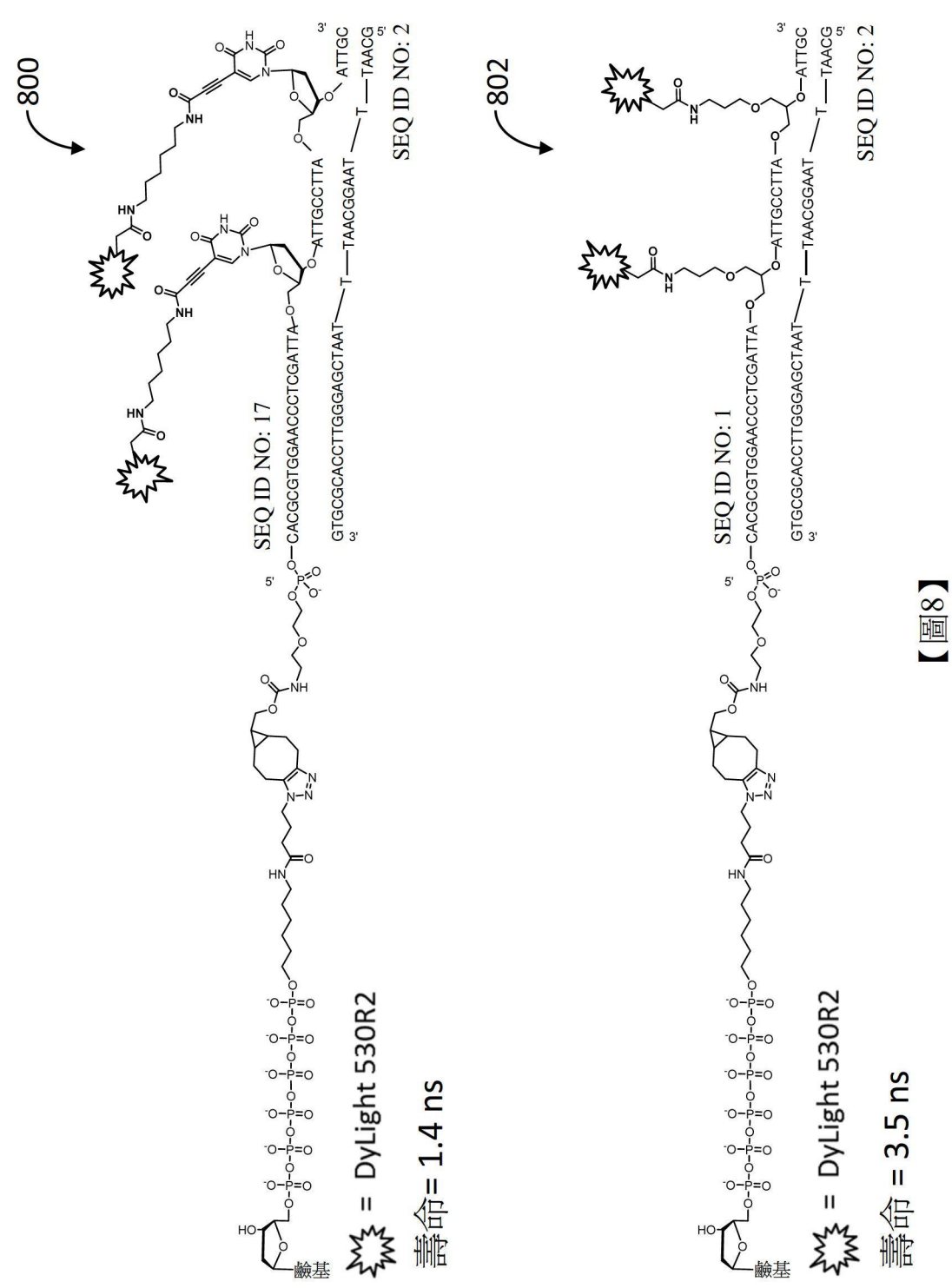


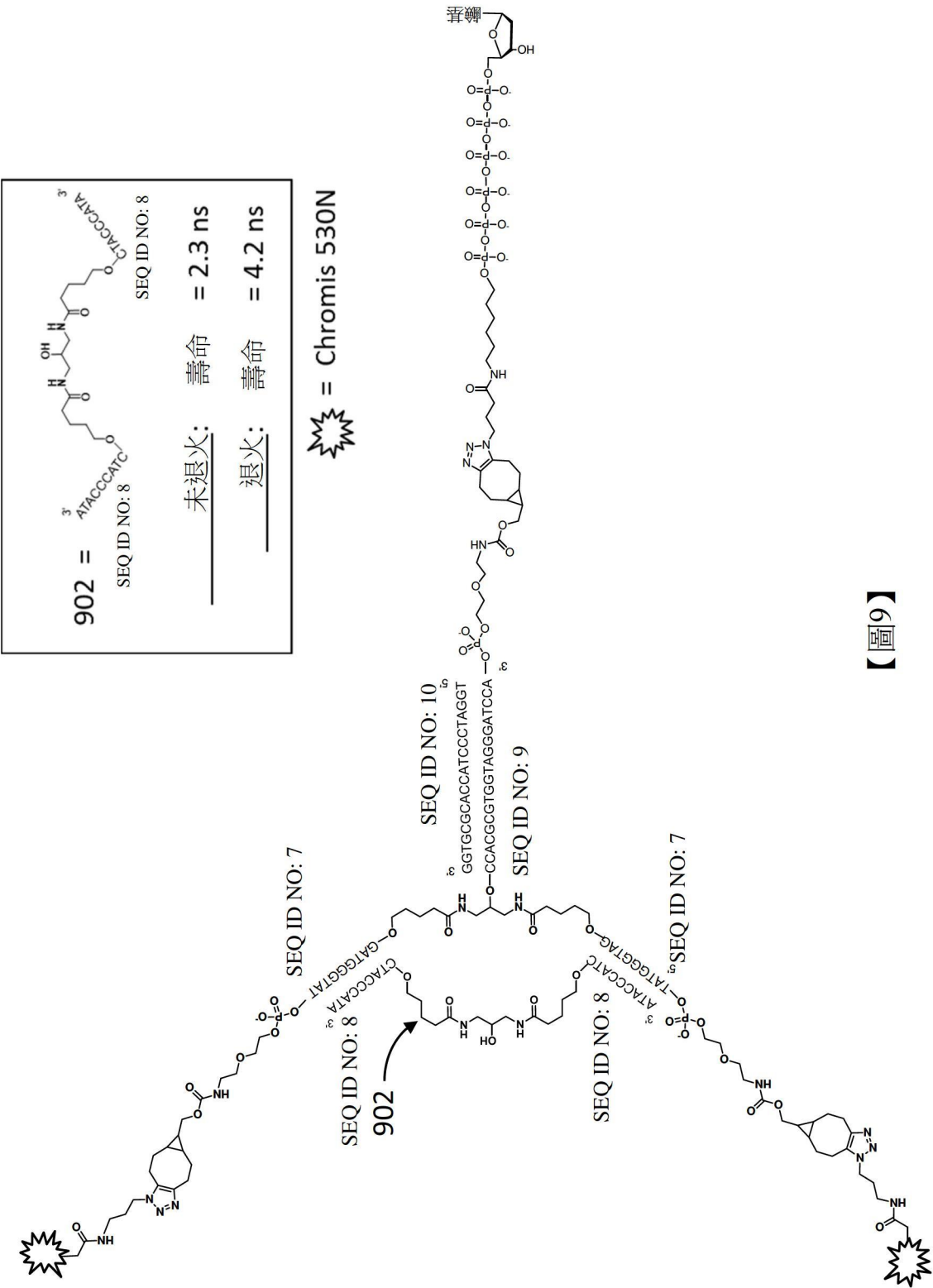
四-Q163

【圖6E】

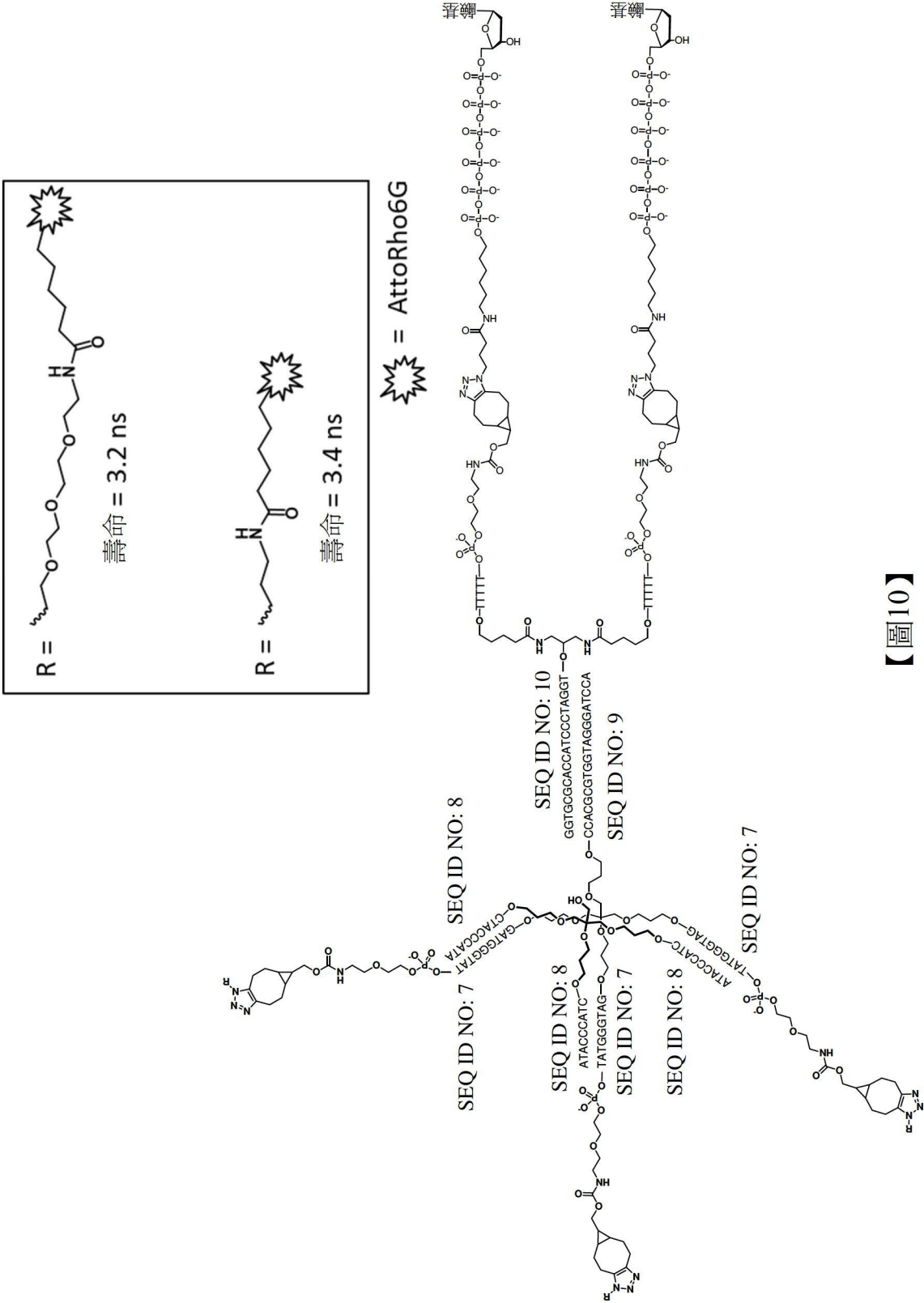


【圖7】





【9回】



【圖10】