



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115777024 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 10

(21) 申请号 202180046824.0

(22) 申请日 2021.08.27

(30) 优先权数据

63/077,857 2020.09.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/048064 2021.08.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/055729 EN 2022.03.17

(71) 申请人 伊鲁米纳公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 伊鲁米纳剑桥有限公司

(72) 发明人 J·费希尔 J·贝特利

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 赵磊

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6869 (2006.01)

权利要求书7页 说明书26页

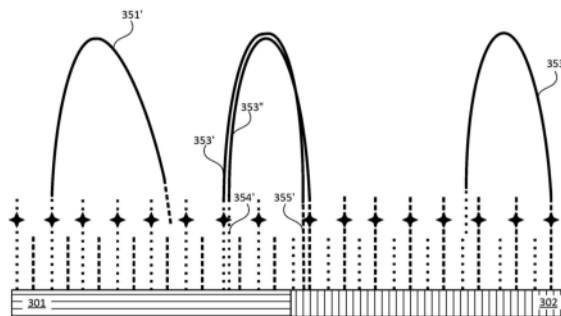
序列表3页 附图20页

(54) 发明名称

用于扩增多核苷酸的组合物和方法

(57) 摘要

提供了一种用于扩增多核苷酸的组合物,该组合物包含包括第一区域和第二区域的底物。第一多个捕获引物偶联到该底物的该第一区域。第二多个捕获引物偶联到该底物的该第二区域。该第二多个捕获引物中的这些捕获引物比该第一多个捕获引物中的这些捕获引物长。第一多个正交捕获引物偶联到该底物的该第一区域。第二多个正交捕获引物偶联到该底物的该第二区域。该第二多个正交捕获引物中的这些正交捕获引物比该第一多个正交捕获引物中的这些正交捕获引物短。



1. 一种用于扩增多核苷酸的组合物,所述组合物包含:
底物,所述底物包括第一区域和第二区域;
第一多个捕获引物,所述第一多个捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;
第二多个捕获引物,所述第二多个捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域,所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物比所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物长;
第一多个正交捕获引物,所述第一多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;和
第二多个正交捕获引物,所述第二多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域,所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物比所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物短。
2. 根据权利要求1所述的组合物,还包含流体,所述流体包含靶多核苷酸,所述靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包含与所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物互补的第一接头,和与所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物互补的第二接头。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述靶多核苷酸的所述第一接头比所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物短,并且其中所述靶多核苷酸的所述第二接头比所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物短。
4. 根据权利要求2或权利要求3所述的组合物,其中使所述靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的第一个正交捕获引物杂交,或者其中使所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第二接头与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的第一个捕获引物杂交。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中由所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述正交捕获引物中的所述第一个正交捕获引物之间的所述杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约40°C。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,还包含共价偶联到所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物的第一扩增子,所述第一扩增子具有与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,还包含共价偶联到所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物的第二扩增子,所述第二扩增子具有与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,还包含共价偶联到所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物的第三扩增子,所述第三扩增子具有不能与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交的第二接头。
9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述第二接头不能与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交抑制了所述第三扩增子的扩增。
10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述第三扩增子的所述第二接头与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的任一个捕获引物之间的任何部分双链体的熔解温度(T_m)小于约20°C。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,还包含共价偶联到所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物的第四扩增子,所述第四扩增子具有不能与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述第一接头不能与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交抑制了所述第四扩增子的扩增。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的组合物,其中所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物是P5捕获引物,并且其中所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物是P7捕获引物。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物是缩短的P5捕获引物,并且其中所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物是缩短的P7捕获引物。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的组合物,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物比所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物短至少5个碱基,并且其中所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物比所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物短至少5个碱基。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的组合物,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第二多个捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的组合物,其中所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第一多个捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的组合物,其中所述底物的所述第一区域与所述底物的所述第二区域相邻。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的组合物,其中所述底物的所述第一区域围绕所述底物的所述第二区域。

20. 根据权利要求1至18中任一项所述的组合物,其中所述底物的所述第二区域围绕所述底物的所述第一区域。

21. 一种用于扩增多核苷酸的组合物,所述组合物包含:

底物,所述底物包括第一区域和第二区域;

第一多个捕获引物,所述第一多个捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;

第一多个正交捕获引物,所述第一多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;

第二多个捕获引物,所述第二多个捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域;

第二多个正交捕获引物,所述第二多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域;

第一多个可去除封闭基团,所述第一多个可去除封闭基团偶联到所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物;和

第二多个可去除封闭基团,所述第二多个可去除封闭基团偶联到所述第二多个捕获引物中的所述正交捕获引物。

22. 根据权利要求21所述的组合物,还包含流体,所述流体包含靶多核苷酸,所述靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包含与所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物互补的第一接头,和与所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物互补的第二接头。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述靶多核苷酸的所述第一接头的长度与所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度大致相同,并且其中所述靶多核苷酸的所述第二接头的长度与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

24. 根据权利要求22或权利要求23所述的组合物,其中使所述靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者其中使所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第二接头与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物杂交。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其中由所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第二接头与所述捕获引物中的所述一个捕获引物之间的所述杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约 40°C ,或者其中由所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述正交捕获引物中的所述一个正交捕获引物之间的所述杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约 40°C 。

26. 根据权利要求22至25中任一项所述的组合物,其中使所述靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的所述第一接头与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者其中使所述靶多核苷酸中的所述第二个靶多核苷酸的所述第二接头与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物杂交。

27. 根据权利要求26所述的组合物,其中偶联到所述捕获引物中的所述一个捕获引物的所述可去除封闭基团抑制所述靶多核苷酸中的所述第二个靶多核苷酸的扩增,或者其中偶联到所述正交捕获引物中的所述一个正交捕获引物的所述可去除封闭基团抑制所述靶多核苷酸中的所述第二个靶多核苷酸的扩增。

28. 根据权利要求21至27中任一项所述的组合物,还包含共价偶联到所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物的扩增子,所述扩增子具有与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。

29. 根据权利要求21至28中任一项所述的组合物,还包含共价偶联到所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物的扩增子,所述扩增子具有与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。

30. 根据权利要求21至29中任一项所述的组合物,其中所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物是P5捕获引物,并且其中所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物是P7捕获引物。

31. 根据权利要求21至30中任一项所述的组合物,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度大致相同。

32. 根据权利要求21至31中任一项所述的组合物,其中所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

33. 根据权利要求21至32中任一项所述的组合物,其中所述底物的所述第一区域与所

述底物的所述第二区域相邻。

34. 根据权利要求21至33中任一项所述的组合物,其中所述底物的所述第一区域围绕所述底物的所述第二区域。

35. 根据权利要求21至34中任一项所述的组合物,其中所述底物的所述第二区域围绕所述底物的所述第一区域。

36. 一种用于扩增多核苷酸的方法,所述方法包括:

使组合物与流体接触,其中所述组合物包含:

底物,所述底物包括第一区域和第二区域;

第一多个捕获引物,所述第一多个捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;

第二多个捕获引物,所述第二多个捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域,所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物比所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物长;

第一多个正交捕获引物,所述第一多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;和

第二多个正交捕获引物,所述第二多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域,所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物比所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物短,并且

其中所述流体包含:

靶多核苷酸,所述靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包含与所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物互补的第一接头,和与所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物互补的第二接头;

使所述靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述第一多个正交捕获引物或所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交或者使所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第二接头与所述第一多个捕获引物或所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物杂交;以及然后

扩增所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸,所述扩增包括生成所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的扩增子。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述靶多核苷酸的所述第一接头比所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物短,并且其中所述靶多核苷酸的所述第二接头比所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物短。

38. 根据权利要求37或权利要求38所述的方法,其中由所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述正交捕获引物中的所述第一个正交捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约40°C。

39. 根据权利要求36至38中任一项所述的方法,其中所述扩增子与所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸杂交。

40. 根据权利要求39所述的方法,还包括使所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸去杂交,并且然后扩增所述扩增子。

41. 根据权利要求36至40中任一项所述的方法,还包括使第一扩增子共价偶联到所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物,并且使所述第一扩增子的第二接头与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物完全杂交。

42. 根据权利要求36至41中任一项所述的方法,还包括使第二扩增子共价偶联到所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物,并且使所述第二扩增子的第一接头与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交。

43. 根据权利要求36至42中任一项所述的方法,还包括使第三扩增子共价偶联到所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物,并且使所述第三扩增子的第二接头不能与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述第二接头不能与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交抑制了所述第三扩增子的扩增。

45. 根据权利要求36至44所述的方法,其中所述第三扩增子的所述第二接头与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的任一个捕获引物之间的任何部分双链体的熔解温度(T_m)小于约20°C。

46. 根据权利要求36至45中任一项所述的方法,还包括使第四扩增子共价偶联到所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物,并且使所述第四扩增子的第一接头不能与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述第一接头不能与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交抑制了所述第四扩增子的扩增。

48. 根据权利要求36至47中任一项所述的方法,其中所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物是P5捕获引物,并且其中所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物是P7捕获引物。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物是缩短的P5捕获引物,并且其中所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物是缩短的P7捕获引物。

50. 根据权利要求36至49中任一项所述的方法,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物比所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物短至少5个碱基,并且其中所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物比所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物短至少5个碱基。

51. 根据权利要求36至50中任一项所述的方法,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第二多个捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

52. 根据权利要求36至51中任一项所述的方法,其中所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第一多个捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

53. 根据权利要求36至52中任一项所述的方法,其中所述底物的所述第一区域与所述底物的所述第二区域相邻。

54. 根据权利要求36至53中任一项所述的方法,其中所述底物的所述第一区域围绕所述底物的所述第二区域。

55. 根据权利要求36至53中任一项所述的方法,其中所述底物的所述第二区域围绕所述底物的所述第一区域。

56. 一种用于扩增多核苷酸的方法,所述方法包括:
- 使组合物与流体接触,其中所述组合物包含:
 - 底物,所述底物包括第一区域和第二区域;
 - 第一多个捕获引物,所述第一多个捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;
 - 第一多个正交捕获引物,所述第一多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第一区域;
 - 第二多个捕获引物,所述第二多个捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域;
 - 第二多个正交捕获引物,所述第二多个正交捕获引物偶联到所述底物的所述第二区域;
 - 第一多个可去除封闭基团,所述第一多个可去除封闭基团偶联到所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物;和
 - 第二多个可去除封闭基团,所述第二多个可去除封闭基团偶联到所述第二多个捕获引物中的所述正交捕获引物,并且其中所述流体包含靶多核苷酸,所述靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包含与所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物互补的第一接头,和与所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物互补的第二接头;
 - 使所述靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的第一个正交捕获引物杂交,或者
 - 使所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第二接头与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的第一个捕获引物杂交;
 - 扩增所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸,所述扩增包括在所述底物的所述第一区域中生成所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的第一扩增子;
 - 去除所述第一多个可去除封闭基团和所述第二多个可去除封闭基团;以及然后
 - 进一步扩增所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸,所述扩增包括在所述底物的所述第二区域中生成所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的额外扩增子。
57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述靶多核苷酸的所述第一接头的长度与所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同,并且其中所述靶多核苷酸的所述第二接头的长度与所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度大致相同。
58. 根据权利要求56或权利要求57所述的方法,其中由所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第二接头与所述捕获引物中的一个捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约 40°C ,或者其中由所述靶多核苷酸中的所述第一个靶多核苷酸的所述第一接头与所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约 40°C 。
59. 根据权利要求56至58中任一项所述的方法,其中使所述靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的所述第一接头与所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者其中使所述靶多核苷酸中的所述第二个靶多核苷酸的所述第二接头与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物杂交。
60. 根据权利要求59所述的方法,其中偶联到所述捕获引物中的所述一个捕获引物的

所述可去除封闭基团抑制所述靶多核苷酸中的所述第二个靶多核苷酸的扩增,或者其中偶联到所述正交捕获引物中的所述一个正交捕获引物的所述可去除封闭基团抑制所述靶多核苷酸中的所述第二个靶多核苷酸的扩增。

61. 根据权利要求56至60中任一项所述的方法,还包括使扩增子共价偶联到所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物,所述扩增子具有与所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。

62. 根据权利要求56至61中任一项所述的方法,还包括使扩增子共价偶联到所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物中的一个捕获引物,所述扩增子具有与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。

63. 根据权利要求56至62中任一项所述的方法,其中所述第一多个捕获引物和所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物是P5捕获引物,并且其中所述第一多个正交捕获引物和所述第二多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物是P7捕获引物。

64. 根据权利要求56至63中任一项所述的方法,其中所述第一多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度大致相同。

65. 根据权利要求56至64中任一项所述的方法,其中所述第二多个捕获引物中的所述捕获引物的长度与所述第一多个正交捕获引物中的所述正交捕获引物的长度大致相同。

66. 根据权利要求56至65中任一项所述的方法,其中所述底物的所述第一区域与所述底物的所述第二区域相邻。

67. 根据权利要求56至66中任一项所述的方法,其中所述底物的所述第一区域围绕所述底物的所述第二区域。

68. 根据权利要求56至66中任一项所述的方法,其中所述底物的所述第二区域围绕所述底物的所述第一区域。

用于扩增多核苷酸的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年9月14日提交的名称为“Compositions and Methods for Amplifying Polynucleotides”的美国临时专利申请第63/077,857号的权益,该专利申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本专利申请包含已以ASCII格式电子提交的序列表,该序列表据此全文以引用方式并入。所述ASCII副本创建于2021年8月26日,命名为IP-1997-PCT_SL.txt,大小为2,300字节。

背景技术

[0005] 簇扩增是扩增多核苷酸的方法,例如用于基因测序。靶多核苷酸由流通池中与底物表面偶联的引物(例如,P5和P7引物)捕获,并且在该表面上的随机位置处形成“种子”。执行扩增循环以在每个种子周围的表面上形成簇。这些簇包括种子多核苷酸的拷贝和互补拷贝。在一些情况下,将底物图案化以便限定结合不同簇的区域,诸如可填充有相应簇的孔。

发明内容

[0006] 本文提供的示例涉及扩增多核苷酸。公开了用于执行此类扩增的组合物和方法。

[0007] 在一些示例中,提供了用于扩增多核苷酸的组合物。该组合物可包括底物,该底物包括第一区域和第二区域;第一多个捕获引物,该第一多个捕获引物偶联到该底物的第一区域;和第二多个捕获引物,该第二多个捕获引物偶联到该底物的第二区域。该第二多个捕获引物中的捕获引物可比该第一多个捕获引物中的捕获引物长。该组合物还可包括第一多个正交捕获引物,该第一多个正交捕获引物偶联到该底物的第一区域;和第二多个正交捕获引物,该第二多个正交捕获引物偶联到该底物的第二区域。该第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物可比该第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物短。

[0008] 在一些示例中,使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的第一个正交捕获引物杂交,或者使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物中的第一个捕获引物杂交。在一些示例中,由靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与正交捕获引物中的第一个正交捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约40°C。

[0009] 在一些示例中,组合物还包含共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物的第一扩增子,该第一扩增子具有与第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。

[0010] 在一些示例中,组合物还包含共价偶联到第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物的第二扩增子,该第二扩增子具有与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。

[0011] 在一些示例中,组合物还包含共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引

物中的一个正交捕获引物的第三扩增子,该第三扩增子具有不能与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交的第二接头。在一些示例中,该第二接头不能与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交可抑制该第三扩增子的扩增。在一些示例中,该第三扩增子的第二接头与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物之间的任何部分双链体的熔解温度(T_m)小于约20°C。

[0012] 在一些示例中,组合物还包含共价偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物的第四扩增子,该第四扩增子具有不能与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。在一些示例中,该第一接头不能与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交抑制了该第四扩增子的扩增。

[0013] 在一些示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物是P5捕获引物,并且第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物是P7捕获引物。在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物是缩短的P5捕获引物,并且第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物是缩短的P7捕获引物。

[0014] 在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物比第二多个捕获引物中的捕获引物短至少5个碱基,并且第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物比第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物短至少5个碱基。

[0015] 在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物的长度与第二多个捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。在一些示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物的长度与第一多个捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。

[0016] 在一些示例中,底物的第一区域与底物的第二区域相邻。在一些示例中,底物的第一区域围绕底物的第二区域。在一些示例中,底物的第二区域围绕底物的第一区域。

[0017] 在一些示例中,提供了用于扩增多核苷酸的另一种组合物。该组合物可包括底物,该底物包括第一区域和第二区域;第一多个捕获引物,该第一多个捕获引物偶联到该底物的第一区域;和第一多个正交捕获引物,该第一多个正交捕获引物偶联到该底物的第一区域。组合物还可包括第二多个捕获引物,该第二多个捕获引物偶联到该底物的第二区域;第二多个正交捕获引物,该第二多个正交捕获引物偶联到该底物的第二区域;第一多个可去除封闭基团,该第一多个可去除封闭基团偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物;和第二多个可去除封闭基团,该第二多个可去除封闭基团偶联到第二多个捕获引物中的正交捕获引物。

[0018] 在一些示例中,组合物还包括流体,该流体包括靶多核苷酸,这些靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物互补的第一接头,和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物互补的第二接头。在一些示例中,靶多核苷酸的第一接头的长度与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物的长度大致相同,并且靶多核苷酸的第二接头的长度与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。

[0019] 在一些示例中,使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第二接头与第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物杂交。在一些示

例中,由靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第二接头与捕获引物中的一个捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约40°C,或由靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与正交捕获引物中的一个正交捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约40°C。

[0020] 在一些示例中,使靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的第一接头与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者使靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物杂交。在一些示例中,偶联到捕获引物中的一个捕获引物的可去除封闭基团抑制靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的扩增,或者偶联到正交捕获引物中的一个正交捕获引物的可去除封闭基团抑制靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的扩增。

[0021] 在一些示例中,组合物还包含共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物的扩增子,该扩增子具有与第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。

[0022] 在一些示例中,组合物还包含共价偶联到第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物的扩增子,该扩增子具有与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。

[0023] 在一些示例中,第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物是P5捕获引物,并且第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物是P7捕获引物。

[0024] 在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物的长度与第二多个捕获引物中的捕获引物的长度大致相同。在一些示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物的长度与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。

[0025] 在一些示例中,底物的第一区域与底物的第二区域相邻。在一些示例中,底物的第一区域围绕底物的第二区域。在一些示例中,底物的第二区域围绕底物的第一区域。

[0026] 在一些示例中,提供了一种用于扩增多核苷酸的方法。该方法包括使组合物与流体接触。该组合物可包括底物,该底物包括第一区域和第二区域;第一多个捕获引物,该第一多个捕获引物偶联到该底物的第一区域;和第二多个捕获引物,该第二多个捕获引物偶联到该底物的第二区域。该第二多个捕获引物中的捕获引物可比该第一多个捕获引物中的捕获引物长。该组合物还可包括第一多个正交捕获引物,该第一多个正交捕获引物偶联到该底物的第一区域;和第二多个正交捕获引物,该第二多个正交捕获引物偶联到该底物的第二区域。该第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物可比该第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物短。流体可包括靶多核苷酸,这些靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物互补的第一接头,和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物互补的第二接头。方法可包括使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与第一多个正交捕获引物或第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物杂交,或者使该靶多核苷酸的第二接头与第一多个捕获引物或第二多个捕获引物中的捕获引物杂交;并且然后扩增靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸,该扩增包括生成靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的扩增子。

[0027] 在一些示例中,靶多核苷酸的第一接头比第一多个正交捕获引物中的正交捕获引

物短,并且靶多核苷酸的第二接头比第二多个捕获引物中的捕获引物短。

[0028] 在一些示例中,由靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与正交捕获引物中的第一个正交捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度(T_m)大于约 40°C 。在一些示例中,使扩增子与靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸杂交。在一些示例中,方法包括使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸去杂交,并且然后扩增该扩增子。

[0029] 在一些示例中,方法包括使第一扩增子共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物,并且使该第一扩增子的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物完全杂交。

[0030] 在一些示例中,方法包括使第二扩增子共价偶联到第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物,并且使该第二扩增子的第一接头与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交。

[0031] 在一些示例中,方法包括使第三扩增子共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物,并且使该第三扩增子的第二接头不能与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交。在一些示例中,该第二接头不能与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物完全杂交抑制了该第三扩增子的扩增。在一些示例中,该第三扩增子的第二接头与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物之间的任何部分双链体的熔解温度(T_m)小于约 20°C 。

[0032] 在一些示例中,方法包括使第四扩增子共价偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物,并且使该第四扩增子的第一接头不能与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交。在一些示例中,该第一接头不能与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交抑制了该第四扩增子的扩增。

[0033] 在一些示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物是P5捕获引物,并且第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物是P7捕获引物。在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物是缩短的P5捕获引物,并且第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物是缩短的P7捕获引物。在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物比第二多个捕获引物中的捕获引物短至少5个碱基,并且第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物比第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物短至少5个碱基。在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物的长度与第二多个捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。在一些示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物的长度与第一多个捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。

[0034] 在一些示例中,底物的第一区域与底物的第二区域相邻。在一些示例中,底物的第一区域围绕底物的第二区域。在一些示例中,底物的第二区域围绕底物的第一区域。

[0035] 在一些示例中,提供了用于扩增多核苷酸的另一种方法。该方法可包括使组合物与流体接触。该组合物可包括底物,该底物包括第一区域和第二区域;第一多个捕获引物,该第一多个捕获引物偶联到该底物的第一区域;和第一多个正交捕获引物,该第一多个正交捕获引物偶联到该底物的第一区域。组合物还可包括第二多个捕获引物,该第二多个捕获引物偶联到该底物的第二区域;第二多个正交捕获引物,该第二多个正交捕获引物偶联到该底物的第二区域;第一多个可去除封闭基团,该第一多个可去除封闭基团偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物;和第二多个可去除封闭基团,该第二多个可去除封闭基团偶

联到第二多个捕获引物中的正交捕获引物。流体可包括靶多核苷酸，这些靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物互补的第一接头，和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物互补的第二接头。方法可包括使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的第一个正交捕获引物杂交，或者使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第二接头与第一多个捕获引物中的捕获引物中的第一个捕获引物杂交。方法可包括扩增靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸，该扩增包括在底物的第一区域中生成靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一扩增子。方法可包括去除第一多个可去除封闭基团和第二多个可去除封闭基团；并且然后进一步扩增靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸，该扩增包括在底物的第二区域中生成靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的额外扩增子。

[0036] 在一些示例中，靶多核苷酸的第一接头的长度与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同，并且靶多核苷酸的第二接头的长度与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物的长度大致相同。

[0037] 在一些示例中，由靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第二接头与捕获引物中的一个捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度 (T_m) 大于约 40°C ，或者其中由靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与正交捕获引物中的一个正交捕获引物之间的杂交形成的双链体的熔解温度 (T_m) 大于约 40°C 。

[0038] 在一些示例中，使靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的第一接头与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交，或者其中使靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物杂交。在一些示例中，偶联到捕获引物中的一个捕获引物的可去除封闭基团抑制靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的扩增，或者其中偶联到正交捕获引物中的一个正交捕获引物的可去除封闭基团抑制靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的扩增。

[0039] 在一些示例中，方法还包括使扩增子共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物，该扩增子具有与第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。

[0040] 在一些示例中，方法还包括使扩增子共价偶联到第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物，该扩增子具有与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。

[0041] 在一些示例中，第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物是P5捕获引物，并且第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物是P7捕获引物。在一些示例中，第一多个捕获引物中的捕获引物的长度与第二多个捕获引物中的捕获引物的长度大致相同。在一些示例中，第二多个捕获引物中的捕获引物的长度与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物的长度大致相同。

[0042] 在一些示例中，底物的第一区域与底物的第二区域相邻。在一些示例中，底物的第一区域围绕底物的第二区域。在一些示例中，底物的第二区域围绕底物的第一区域。

[0043] 应当理解，如本文所述的本公开的每个方面的任何相应特征/示例可以任何合适组合一起实施，并且来自这些方面中的任何一个或多个方面的任何特征/示例可与如本文所述的其他方面的任何特征一起以任何合适组合一起实施以实现如本文所述的有益效果。

附图说明

- [0044] 图1A至图1C示意性地示出了在底物上扩增多核苷酸的示例。
- [0045] 图2A至图2D示意性地示出了在底物上扩增多核苷酸的其他示例。
- [0046] 图3A至图3J示意性地示出了用于使用第一底物区域和第二底物区域中不同长度的引物来扩增多核苷酸的工艺流程中的示例性组合物和操作。
- [0047] 图4A至图4L示意性地示出了用于使用第一底物区域中的未封闭引物和第二底物区域中的可去除的封闭引物来扩增多核苷酸的工艺流程中的示例性组合物和操作。
- [0048] 图5A至图5D示意性地示出了用于使用第一底物区域和第二底物区域中不同长度的引物来扩增多核苷酸的其他示例性组合物。
- [0049] 图6A至图6D示意性地示出了用于使用第一底物区域中的未封闭引物和第二底物区域中的可去除的封闭引物来扩增多核苷酸的其他示例性组合物。
- [0050] 图7示出了用于使用第一底物区域和第二底物区域中不同长度的引物来扩增多核苷酸的方法中的示例性操作流程。
- [0051] 图8示出了用于使用第一底物区域中的未封闭引物和第二底物区域中的可去除的封闭引物来扩增多核苷酸的方法中的示例性操作流程。
- [0052] 图9示意性地示出了用于表征捕获引物长度对扩增效率的影响的基于溶液的模型组合物。
- [0053] 图10是示出由利用不同捕获引物长度的扩增产生的荧光强度的图。

具体实施方式

- [0054] 本文提供的示例涉及扩增多核苷酸。公开了用于执行此类扩增的组合物和方法。
- [0055] 由靶多核苷酸的扩增产生的簇的单克隆性可能影响随后可对该簇中的靶多核苷酸进行测序(例如使用边合成边测序(SBS))的容易度。彼此具有相同序列的多核苷酸被认为是“单克隆的”,而具有不同序列的多核苷酸被认为是“多克隆的”。簇的单克隆性越大——即,该簇中彼此具有相同序列的多核苷酸的数量越大——来自该簇内的全体多核苷酸的信号将足以使用SBS对具有最大扩增子数量的多核苷酸进行正确测序的可能性就越大。具有足以对该多核苷酸进行正确测序的许多相同多核苷酸的扩增子的簇被认为是“功能上单克隆的”,即使该簇可能是多克隆的。说明性地,来自其中源自特定多核苷酸的扩增子的约60%或更多的SBS信号的簇,以及来自其中源自一个或多个其他多核苷酸的扩增子的约40%或更少的SBS信号的簇可以是功能上单克隆的,并且因此可使用SBS进行准确测序。在一些示例中,SBS信号的量与多核苷酸的量呈大致线性比例,并且因此具有约60%或更多的特定多核苷酸的扩增子和约40%或更少的一种或多种其他多核苷酸扩增子的簇可能是功能上单克隆的。
- [0056] 给定簇单克隆的程度可能涉及许多因素。例如,图1A至图1C示意性地示出了在底物上扩增多核苷酸的示例。如图1A中所示,底物区域101上的单个种子111的捕获和扩增可产生单克隆簇121,该单克隆簇可填充该底物区域,并且可容易地用于SBS(虚线圆圈和点状线圆圈旨在表示该簇随时间推移的扩大)。相比之下,如图1B中所示,底物区域101上的两个种子112、113的捕获和扩增可产生多克隆簇,该多克隆簇具有由种子112的扩增产生的第一区域122和由种子113的扩增产生的第二区域123。在该示例中,簇多克隆的程度可能足够低

以致簇可用于SBS。例如,来自底物区域101的约60%或更多的信号可来自第一区域122中的种子112的扩增子,并且来自底物区域101的约40%或更少的信号可来自第二区域123中的种子113的扩增子。例如,约60%或更多的底物区域101可被第一区域122中的种子112的扩增子覆盖,并且约40%或更少的底物区域101可被第二区域123中的种子113的扩增子覆盖。因此多克隆簇122、123可能是功能上单克隆的。

[0057] 然而,底物上的不同种子的相对位置可能影响簇多克隆的程度,以及簇可用于SBS的程度。例如,如图1C中所示,底物区域101上的两个种子114、115的捕获和扩增产生多克隆簇,该多克隆簇具有由种子112的扩增产生的第一区域124和由种子115的扩增产生的第二区域125,但是第二区域125大于图1B中的第二区域123,因为种子115比种子113更居中地定位。例如,来自底物区域101的小于约60%的信号可来自第一区域124中的种子114的扩增子,并且来自底物区域101的大于约40%的信号可来自第二区域125中的种子115的扩增子,并且因此多克隆簇124、125可能不是功能上单克隆的。例如,小于约60%的底物区域101可被第一区域124中的种子114的扩增子覆盖,并且大于约40%的底物区域101可被第二区域125中的种子115的扩增子覆盖。因此多克隆簇124、125可能不是功能上单克隆的。在该示例中,簇多克隆的程度可能太高以致簇不能用于SBS。

[0058] 可预期位于给定底物区域上的种子的数量可随底物的大小而增加。底物图案化可进一步影响簇多克隆的程度,以及此类簇可用于SBS的程度。例如,图2A至图2D示意性地示出了在底物上扩增多核苷酸的其他示例。该底物可包括第一区域201和第二区域202,该第一区域和第二区域可以诸如参考图3A所描述的方式使彼此具有不同的表面处理。可能期望在区域201、202两者中对相同靶多核苷酸的拷贝执行同时双端读段以便提高读段的可靠性,例如通过沿区域201中的第一方向和沿区域202中的相反方向对拷贝执行SBS读段,并且然后使用软件对齐结果,这些结果应该彼此互补并且因此指示彼此相同的序列。如图2A中所示,底物区域202(或等效地,底物区域201)上的单个种子211的捕获和扩增产生第一区域221和第二区域222中的单克隆簇,这些单克隆簇可填充底物区域,并且可容易地用于同时双端读段。

[0059] 相比之下,如图2B中所示,桥接底物区域201、202的第一种子212和底物区域201上的第二种子213的捕获和扩增产生底物区域201内的多克隆簇和底物区域202内的单克隆簇224,该多克隆簇具有由底物区域201内的种子212的扩增产生的第一区域223和由底物区域201内的种子213的扩增产生的第二区域225;该单克隆簇由底物区域202内的种子212的扩增产生。在该示例中,簇多克隆的程度足够低以致底物区域201可能是功能上单克隆的。因此,区域201和202一起可能是功能上单克隆的,并且簇223、224可用于同时双端读段。例如,对于同时双端读段,可能有用的是,两个底物区域均独立地是至少功能上单克隆的,并且两个底物区域合在一起也是至少功能上单克隆的。

[0060] 类似于参考图1B至图1C所描述的示例,底物上的不同种子的相对位置可能影响簇多克隆的程度,以及簇可用于SBS的程度,并且特别是对于同时双端读段。例如,如图2C中所示,桥接底物区域201、202的第一种子214和底物区域201上的第二种子215产生底物区域201内的多克隆簇和底物区域202内的单克隆簇227,该多克隆簇具有由底物区域201内的种子214的扩增产生的第一区域226和由底物区域201内的种子215的扩增产生的第二区域228;该单克隆簇由底物区域202内的种子214的扩增产生。在图2C的示例中,第二区域228大

于图2B中的第二区域225,因为种子215比种子213更居中地定位。在该示例中,底物区域201是多克隆的而不是功能上单克隆的,而底物区域202是单克隆的。因此,区域201和202一起可能不是功能上单克隆的,并且簇多克隆的程度可能太高,以致簇226、228不能用于同时双端读段。另外,由于区域201不是功能上单克隆的,因此区域201可能不用于测序,而区域202可独立地用于测序。

[0061] 在另一示例中,如图2D中所示,底物区域202上的第一种子216和底物区域201上的第二种子217产生由底物区域201内的种子217的扩增产生的底物区域201内的单克隆簇229,以及由底物区域202内的种子216的扩增产生的底物区域202内的第二单克隆簇。尽管簇229、230各自是单克隆的,但是它们可能不用于同时双端读段,因为它们具有彼此不同的靶多核苷酸的拷贝,并且因此无法使用软件彼此对齐。尽管如此,由于簇229、230中的每一个簇是单克隆或至少功能上单克隆的,因此这些簇可独立地用于测序,尽管两个簇中的序列彼此不互补。

[0062] 与可使用标准P5和P7引物实现的单克隆性相比,本文提供的示例可通过使用经修饰的引物来提高簇单克隆的程度(包括但不限于在具有复杂表面的底物上)。此类经修饰的引物可包括修饰序列、修饰长度、使用非核苷酸部分和与其他经修饰的引物一起使用中的一者或多者的任何合适组合。经修饰的引物可用于减少有效扩增面积,或以其他方式使扩增偏倚,以便提高簇单克隆性。例如,在诸如参考图1A至图1C以及图2A至图2D所描述的示例中,可预期在底物的给定区域上扩增的种子数量可能预期遵循泊松分布。相比之下,诸如使用本文所提供的经修饰的引物可提供超过泊松分布所预测的单克隆性。

[0063] 首先,将简要解释本文使用的一些术语。然后,将描述一些用于扩增多核苷酸的示例性组合物和示例性方法。

[0064] 术语

[0065] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。术语“包括”以及其他形式(诸如“包括(include/includes/included)”)的使用不是限制性的。术语“具有”以及其他形式(诸如“具有(have/has/had)”)的使用不是限制性的。如本说明书中所用,无论是在过渡短语中还是在权利要求的正文中,术语“包含(comprise(s))”和“包含(comprising)”都将被解释为具有开放式含义。即,上述术语应与短语“至少具有”或“至少包括”同义地解释。例如,当在过程的上下文中使用时,术语“包含”是指该过程至少包括所列举的步骤,但是也可包括额外步骤。当在化合物、组合物或设备的上下文中使用时,术语“包含”是指该化合物、组合物或设备至少包含所列举的特征或组分,但是也可包含额外特征或组分。

[0066] 在本说明书通篇中使用的术语“基本上”、“大致”和“约”用于描述和说明小的波动,诸如由于处理中的变化所引起的小的波动。例如,它们可指小于或等于 $\pm 10\%$,诸如小于或等于 $\pm 5\%$,诸如小于或等于 $\pm 2\%$,诸如小于或等于 $\pm 1\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.5\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.2\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.1\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.05\%$ 。

[0067] 如本文所用,“杂交”旨在表示沿那些聚合物的长度使第一多核苷酸非共价缔合到第二多核苷酸以形成双链的“双链体”。例如,两条DNA多核苷酸链可通过互补碱基配对缔合。第一多核苷酸与第二多核苷酸之间的缔合强度随着这些多核苷酸内的核苷酸序列之间的互补性而增加。多核苷酸之间的杂交强度可通过熔解温度(T_m)来表征,在该熔解温度下,

50%的双链体具有彼此解离的多核苷酸链。彼此“部分”杂交的多核苷酸是指它们具有彼此互补的序列,但是此类序列仅沿它们的长度的一部分彼此杂交以形成部分双链体。“不能”杂交的多核苷酸包括彼此物理分离的那些多核苷酸,使得它们的碱基的数量不够以彼此杂交的方式彼此接触。

[0068] 如本文所用,术语“核苷酸”旨在表示包含糖和至少一个磷酸基团并且在一些示例中还包含核碱基的分子。缺乏核碱基的核苷酸可称为“无碱基的”。核苷酸包括脱氧核糖核苷酸、经修饰的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸、肽核苷酸、经修饰的肽核苷酸、经修饰的磷酸糖主链核苷酸以及它们的混合物。核苷酸的示例包括腺苷单磷酸(AMP)、腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)、胸苷单磷酸(TMP)、胸苷二磷酸(TDP)、胸苷三磷酸(TTP)、胞苷单磷酸(CMP)、胞苷二磷酸(CDP)、胞苷三磷酸(CTP)、鸟苷单磷酸(GMP)、鸟苷二磷酸(GDP)、鸟苷三磷酸(GTP)、尿苷单磷酸(UMP)、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷三磷酸(UTP)、脱氧腺苷单磷酸(dAMP)、脱氧腺苷二磷酸(dADP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胸苷单磷酸(dTMP)、脱氧胸苷二磷酸(dTDP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧胞苷二磷酸(dCDP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)、脱氧鸟苷二磷酸(dGDP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧尿苷单磷酸(dUMP)、脱氧尿苷二磷酸(dUDP)和脱氧尿苷三磷酸(dUTP)。

[0069] 如本文所用,术语“核苷酸”还旨在涵盖任何核苷酸类似物,该核苷酸类似物是与天然存在的核苷酸相比包括经修饰的核碱基、糖和/或磷酸部分的核苷酸类型。示例性经修饰的核碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫脲嘧啶、2-硫代胸腺嘧啶、2-硫代胞嘧啶、15-卤代尿嘧啶、15-卤代胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-氮杂尿嘧啶、6-氮杂胞嘧啶、6-氮杂胸腺嘧啶、5-尿嘧啶、4-硫脲嘧啶、8-卤代腺嘌呤或8-卤代鸟嘌呤、8-氨基腺嘌呤或8-氨基鸟嘌呤、8-硫代腺嘌呤或8-硫代鸟嘌呤、8-硫代烷基腺嘌呤或8-硫代烷基鸟嘌呤、8-羟基腺嘌呤或8-羟基鸟嘌呤、5-经卤代取代的尿嘧啶或5-经卤代取代的胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-去氮杂鸟嘌呤、7-去氮杂腺嘌呤、3-去氮杂鸟嘌呤、3-去氮杂腺嘌呤等。如本领域已知的,某些核苷酸类似物无法掺入多核苷酸中,例如核苷酸类似物诸如腺苷5'-磷酸。核苷酸可包括任何合适数量的磷酸,例如三个、四个、五个、六个或多于六个磷酸。

[0070] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指包括彼此结合的核苷酸序列的分子。多核苷酸是聚合物的一个非限制性示例。多核苷酸的示例包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)以及它们的类似物。多核苷酸可以是核苷酸的单链序列(诸如RNA或单链DNA)、核苷酸的双链序列(诸如双链DNA),或者可包括核苷酸的单链序列和双链序列的混合物。双链DNA(dsDNA)包括基因组DNA和PCR以及扩增产物。可将单链DNA(ssDNA)转化为dsDNA,反之亦然。多核苷酸可包括非天然存在的DNA,诸如对映异构的DNA。多核苷酸中的核苷酸的精确序列可以是已知的或未知的。以下是多核苷酸的示例:基因或基因片段(例如,探针、引物、经表达的序列标签(EST)或基因表达系列分析(SAGE)标签)、基因组DNA、基因组DNA片段、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、合成多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针、核酸引物或任一前述多核苷酸的扩增拷贝。

[0071] 如本文所用,“聚合酶”旨在表示具有通过将核苷酸聚合成多核苷酸来组装多核苷

酸的活性位点的酶。聚合酶可结合经引发的单链靶多核苷酸,并且可顺序地将核苷酸添加到生长的引物,以形成具有与该靶多核苷酸的序列互补的序列的“互补拷贝”多核苷酸。然后,另一种聚合酶或相同的聚合酶可通过形成该互补拷贝多核苷酸的互补拷贝来形成该靶核苷酸的拷贝。此类拷贝中的任一个拷贝在本文中可称为“扩增子”。DNA聚合酶可结合到靶多核苷酸,并且然后向下移动靶多核苷酸,从而顺序地将核苷酸添加到生长的多核苷酸链(生长扩增子)的3'端处的游离羟基。DNA聚合酶可从DNA模板合成互补DNA分子,并且RNA聚合酶可从DNA模板合成RNA分子(转录)。聚合酶可使用短RNA或DNA链(引物)来开始链生长。一些聚合酶可置换位点上游的链,在那里它们将碱基添加到链中。此类聚合酶可称为链置换,是指它们具有从聚合酶读取的模板链去除互补链的活性。具有链置换活性的示例性聚合酶包括但不限于Bst(嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*))聚合酶、exo-Klenow聚合酶或测序级T7 exo-聚合酶的大片段。一些聚合酶降解它们前面的链,有效地用后面生长的链置换该前面的链(5'核酸外切酶活性)。一些聚合酶具有降解它们后面的链的活性(3'核酸外切酶活性)。一些有用的聚合酶已经通过突变或以其他方式进行修饰以减少或消除3'和/或5'核酸外切酶活性。

[0072] 如本文所用,术语“引物”定义为可通过游离3'OH基团向其添加核苷酸的多核苷酸。引物可包括3'封闭基团,该封闭基团能够防止聚合直到去除该封闭基团为止。引物可包括在5'末端处的修饰以允许偶联反应或使该引物偶联到另一部分。引物可包括一个或多个部分,该一个或多个部分可在合适的条件(诸如UV光、化学、酶等)下裂解。引物长度可以是任何合适数量的碱基长度并且可包括天然核苷酸和非天然核苷酸的任何合适组合。靶多核苷酸可包括与引物杂交的“接头”(具有与引物互补的序列),并且可通过向引物的游离3'OH基团添加核苷酸来扩增以便生成互补拷贝多核苷酸。“捕获引物”旨在表示偶联到底物并且可与靶多核苷酸的第二接头杂交的引物,而“正交捕获引物”旨在表示偶联到底物并且可与该靶多核苷酸的第一接头杂交的引物。第一接头可具有与正交捕获引物的序列互补的序列,并且第二接头可具有与捕获引物的序列互补的序列。捕获引物和正交捕获引物可具有彼此不同且独立的序列。另外,捕获引物和正交捕获引物可在至少一种其他特性中彼此不同。例如,捕获引物和正交捕获引物可具有彼此不同的长度;捕获引物或正交捕获引物可包括该捕获引物或该正交捕获引物中的另一者缺乏的非核酸部分(诸如封闭基团或切除部分);或此类特性的任何合适组合。

[0073] 如本文所用,术语“底物”是指用作本文所述组合物的载体的材料。示例性底物材料可包括玻璃、二氧化硅、塑料、石英、金属、金属氧化物、有机硅酸盐(例如,多面体有机倍半硅氧烷(POSS))、聚丙烯酸酯、氧化钽、互补金属氧化物半导体(CMOS)或它们的组合。POSS的示例可以是Kehagias等人, *Microelectronic Engineering*, 第86卷(2009年)第776-778页中描述的POSS,该文献全文以引用方式并入。在一些示例中,本申请中使用的底物包括基于二氧化硅的底物,诸如玻璃、熔融二氧化硅或其他含二氧化硅的材料。在一些示例中,底物可包括硅、氮化硅或四氢化硅。在一些示例中,本申请中使用的底物包括塑料材料或组分,诸如聚乙烯、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、聚丙烯、尼龙、聚酯、聚碳酸酯和聚(甲基丙烯酸甲酯)。示例性塑料材料包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚苯乙烯和环状烯烃聚合物底物。在一些示例中,底物是基于二氧化硅的材料或塑料材料或它们的组合,或者包括基于二氧化硅的材料或塑料材料或它们的组合。在特定示例中,底物具有包括基于玻璃或硅的聚合物的至

少一个表面。在一些示例中,底物可包括金属。在一些此类示例中,金属是金。在一些示例中,底物具有包括金属氧化物的至少一个表面。在一个示例中,该表面包括氧化钽或氧化锡。丙酰胺、烯酮或丙烯酸酯也可用作底物材料或组分。其他底物材料可包括但不限于砷化镓、磷化铟、铝、陶瓷、聚酰亚胺、石英、树脂、聚合物和共聚物。在一些示例中,底物和/或底物表面可以是石英或包括石英。在一些其他示例中,底物和/或底物表面可以是半导体或包括半导体,诸如GaAs或ITO。前述列表旨在说明但不限于本申请。底物可包括单一材料或多种不同材料。底物可以是复合物或层合物。在一些示例中,底物包括有机硅酸盐材料。底物可以是平坦的、圆形的、球形的、棒状的或任何其他合适形状。底物可以是刚性的或柔性的。在一些示例中,底物是小珠或流通池。

[0074] 在一些示例中,底物包括图案化表面。“图案化表面”是指在底物的暴露层中或该暴露层上的不同区域的布置。例如,这些区域中的一个或多个区域可以是存在一种或多种捕获引物的特征部。特征部可由不存在捕获引物的间隙区域隔开。在一些示例中,图案可以是呈行和列形式的特征部的x-y格式。在一些示例中,图案可以是特征部和/或间隙区域的重复布置。在一些示例中,图案可以是特征部和/或间隙区域的随机布置。在一些示例中,底物在表面中包括孔(凹陷)的阵列。孔可由基本上竖直的侧壁提供。孔可如本领域通常已知的那样使用多种技术来制造,这些技术包括但不限于光刻法、压印技术、模制技术和微蚀刻技术。本领域的技术人员将会知道,所使用的技术将取决于阵列底物的组成和形状。

[0075] 底物的图案化表面上的特征部可包括在具有图案化的共价连接的凝胶的玻璃、硅、塑料或其他合适材料上的孔阵列(例如,微孔或纳米孔)中的孔,该凝胶诸如聚(N-(5-叠氮基乙酰氨基戊基)丙酰胺-共-丙酰胺)(PAZAM)。该方法产生用于测序的凝胶垫,该凝胶垫在具有大量循环的测序运行中可以是稳定的。聚合物与孔的共价连接可有助于在多种用途期间在结构化底物的整个寿命期间将凝胶保持在结构化特征部中。然而,在许多示例中,凝胶无需共价连接到孔。例如,在一些条件下,未共价附接到结构化底物的任何部分的不含硅烷的丙酰胺(SFA)可用作凝胶材料。

[0076] 在特定示例中,结构化底物可通过以下方法来制备:将合适材料图案化为具有孔(例如,微孔或纳米孔),用凝胶材料(例如,PAZAM、SFA或其化学改性的变体,诸如SFA的叠氮化版本(叠氮-SFA))涂覆图案化材料,并且例如通过化学或机械抛光来抛光已涂覆凝胶的材料的表面,从而将凝胶保持在孔中,而从孔之间的结构化底物的表面上的间隙区域去除基本上所有凝胶或使基本上所有凝胶失活。引物可附接到凝胶材料。然后可使包括多个靶多核苷酸(例如,片段化的人基因组或其部分)的溶液与已抛光的底物接触,使得单个靶多核苷酸将通过与附接到凝胶材料的引物的相互作用而接种到单个孔中;然而,由于不存在凝胶材料或该凝胶材料失活,靶多核苷酸将不占用间隙区域。靶多核苷酸的扩增将被限制在孔中,因为间隙区域中不存在凝胶或凝胶失活可抑制生长的簇向外迁移。该过程是可制造方便地的且具有可扩展性的,并且利用常规的微米或纳米制造方法。

[0077] 图案化底物可包括例如蚀刻到载玻片或芯片中的孔。孔的蚀刻图案和几何形状可采取各种不同的形状和大小,并且此类特征部可彼此物理上或功能上分离。具有此类结构化特征部的特别有用的底物包括可选择固体颗粒(诸如微球)的大小的图案化底物。具有这些特征的示例性图案化底物是与小珠阵列技术(Illumina有限公司, San Diego, Calif.)结合使用的蚀刻底物。

[0078] 在一些示例中,本文所述的底物形成流通池的至少一部分,或位于流通池中,或偶联到流通池。流通池可包括分成多个泳道或多个部分的流动室。可用于本文所阐述的方法和组合物中的示例性流通池和用于制造这些流通池的底物包括但不限于可从Illumina有限公司(San Diego,CA)商购获得的那些流通池和底物。

[0079] 如本文所用,当参考覆盖底物的表面的层使用时,术语“直接”旨在表示该层覆盖底物的表面而没有明显的中间层,例如粘合层或聚合物层。直接覆盖表面的层可通过任何化学或物理相互作用(包括共价键或非共价粘附)附接到该表面。

[0080] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“固定”旨在表示通过共价键或非共价键直接或间接附到底物。在某些示例中,可使用共价附接或任何其他合适附接,其中多核苷酸旨在使用底物的条件下(例如在多核苷酸扩增或测序中)保持固定或附到底物。待用作捕获引物或用作靶多核苷酸的多核苷酸可被固定,使得3'-端可用于酶促延伸,并且序列的至少一部分能够与互补序列杂交。固定可通过与表面附接的寡核苷酸杂交而发生,在这种情况下,所固定的寡核苷酸或多核苷酸可处于3'-5'取向。替代地,固定可通过除碱基配对杂交之外的方式(诸如共价附接)发生。

[0081] 如本文所用,术语“阵列”是指可根据相对位置彼此区分的一组底物区域。位于阵列的不同区域处的不同分子(诸如多核苷酸)可根据这些区域在该阵列中的位置而彼此区分。阵列的单个区域可包括一种或多种特定类型的分子。例如,底物区域可包括具有特定序列的单个靶多核苷酸,或底物区域可包括具有相同序列(或其互补序列)的若干多核苷酸。阵列的区域可分别包括相同底物上的彼此不同的特征部。示例性特征部包括但不限于底物中的孔、底物中或底物上的小珠(或其他颗粒)、底物的突出部、底物上的脊或底物中的通道。阵列的区域可分别包括彼此不同的底物上的不同区域。可根据底物在与底物相关联的表面上位置,或者根据底物在液体或凝胶中的位置,来识别附接到单独底物的不同分子。其中单独的底物位于表面上的示例性阵列包括但不限于在孔中具有小珠的那些阵列。

[0082] 如本文所用,术语“多个”旨在表示两个或更多个不同成员的组。多个的大小范围可从小、中、大到非常大。小多个的大小范围可例如从几个成员到几十个成员。中多个的大小范围可例如从几十个成员到约100个成员或几百个成员。大多数的范围可例如从约几百个成员到约1000个成员、到几千个成员和高达几万个成员。非常大多数的范围可例如从几万个成员到约几十万、一百万、几百万、几千万和高达或超过几亿个成员。因此,多个的以成员数量来测量的大小范围可从两个到远远超过一亿个成员,以及在上述示例性范围之间和超过上述示例性范围的所有大小。示例性多核苷酸的多个包括例如约 1×10^5 或更多、 5×10^5 或更多或者 1×10^6 或更多个不同的多核苷酸。因此,术语的定义旨在包括大于两个的所有整数。可例如通过样品中多核苷酸序列的理论多样性来设置多个的上限。

[0083] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“双链”旨在表示多核苷酸中的所有核苷酸或基本上所有核苷酸都与互补多核苷酸中的相应核苷酸氢键合。“部分”双链多核苷酸可具有其与互补多核苷酸中的核苷酸氢键合的至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的核苷酸,但少于其与互补多核苷酸中的核苷酸氢键合的所有核苷酸。

[0084] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“单链”是指多核苷酸中的核苷酸基本上都没有与互补多核苷酸中的相应核苷酸氢键合。“不能”与另一多核苷酸杂交的多核苷酸

可以是单链的。

[0085] 如本文所用,术语“靶多核苷酸”旨在表示作为分析或作用的对象的多核苷酸。分析或作用包括使多核苷酸进行扩增、测序和/或其他程序。靶多核苷酸可包括除待分析的靶序列之外的核苷酸序列。例如,靶多核苷酸可包括一个或多个接头,包括充当位于待分析的靶多核苷酸序列侧翼的引物结合位点的接头。与捕获引物杂交的靶多核苷酸可包括以并非所有靶多核苷酸都易于延伸的方式来延伸超过捕获寡核苷酸的5'端或3'端的核苷酸。在特定示例中,靶多核苷酸可具有彼此不同的序列,但是可具有彼此相同的第一接头和第二接头。可位于特定靶多核苷酸序列侧翼的两个接头可具有彼此相同的序列,或彼此互补的序列,或者这两个接头可具有不同的序列。因此,多个靶多核苷酸中的种类可包括已知序列的区域,该区域位于将通过例如测序(例如,SBS)来评估的未知序列区域的侧翼。在一些示例中,靶多核苷酸在单个末端携带接头,并且此类接头可位于靶多核苷酸的3'端或5'端。可在没有任何接头的情况下使用靶多核苷酸,在这种情况下,引物结合序列可直接源自靶多核苷酸中发现的序列。

[0086] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”在本文中可互换使用。除非以其他方式具体指示,否则不同的术语不旨在表示大小、序列或其他特性中的任何特定差异。为了描述的清楚起见,术语可用于在描述包括若干多核苷酸种类的特定方法或组合物时区分一种多核苷酸种类与另一种多核苷酸种类。

[0087] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“扩增子”旨在表示拷贝该多核苷酸的产物,其中该产物具有与该多核苷酸的核苷酸序列的至少一部分基本上相同或基本上互补的核苷酸序列。“扩增”(Amplification/amplifying)是指制备多核苷酸的扩增子的过程。靶多核苷酸的第一扩增子可以是互补拷贝。额外扩增子是在生成第一扩增子后,由靶多核苷酸或由第一扩增子形成的拷贝。后续的扩增子可具有与靶多核苷酸基本上互补或与靶多核苷酸基本上相同的序列。应当理解,多核苷酸的少量突变(例如,由于扩增假象)可在生成该多核苷酸的扩增子时发生。

[0088] 基本上仅包括给定多核苷酸的扩增子的底物区域可称为“单克隆的”,而包括具有彼此不同序列的多核苷酸的扩增子的底物区域可称为“多克隆的”。包括待用于测序的给定多核苷酸的足够数量的扩增子的底物区域可称为“功能上单克隆的”。说明性地,其中具有给定多核苷酸的约60%或更多的扩增子的底物区域可被认为是“功能上单克隆的”。另外地或替代地,来自约60%或更多的信号的底物区域可被认为是“功能上单克隆的”,该信号来自给定多核苷酸的扩增子。底物的多克隆区域可包括其中分别是单克隆的不同子区域。每个此类单克隆区域,无论在较大的多克隆区域内还是单独存在,都可相当于从“种子”生成的“簇”。“种子”可指单个靶多核苷酸,而“簇”可指该靶多核苷酸的扩增子的集合。

[0089] 用于扩增多核苷酸的组合物和方法

[0090] 本文提供的示例涉及通过提供在其中生成簇的底物区域中具有所选特征的捕获引物来生成基本上单克隆的簇。本文的示例特别适合生成用于同时双端读段的簇,其中彼此平行地使用SBS在第一底物区域中读取经扩增的多核苷酸序列,并使用SBS在第二底物中读取多核苷酸互补序列,但是应当理解,这些示例通常适用于任何类型的簇。

[0091] 在一些示例中,尽管利用各种多核苷酸的接种可根据泊松分布发生在第一底物区域和第二底物区域上的任何地方,但是可选择偶联到第一区域和第二区域中的底物的捕获

引物,使得与远离那些区域之间的边界捕获的多核苷酸相比,优先扩增足够靠近该边界捕获的靶多核苷酸。在一些示例中,可通过:与第一区域中的其他捕获引物(例如,全长P7引物)相比,缩短第一区域中的捕获引物(例如,P5*引物)的子集;与其他捕获引物(例如,全长P5引物)相比,缩短第二区域中的其他捕获引物(例如,P7*引物)的子集;以及提供具有短接头(例如,缩短版本的cP5和cP7)的靶多核苷酸,来实现此类优先扩增。如下文更详细地解释的,这些各种缩短的捕获引物和缩短的接头可使扩增偏倚到可能偶联到底物的某些靶多核苷酸。例如,在第一区域与第二区域之间的边界处形成种子的靶多核苷酸可比在离该边界足够远的地方形成种子的多核苷酸更容易扩增。与靶多核苷酸相比,所得扩增子可延伸以便包括全长接头(例如,全长cP5和cP7接头),从而促进该扩增子在整个底物的第一区域和第二区域两者中进行后续扩增。

[0092] 例如,图3A至图3J示意性地示出了用于使用第一底物区域和第二底物区域中不同长度的引物来扩增多核苷酸的工艺流程中的示例性组合和操作。首先参考图3A,组合物3000包括底物300和与其偶联的多个引物。在该示例中,底物300包括可彼此相邻的第一区域301和第二区域302。任选地,第一区域301和第二区域302可具有彼此不同的表面处理,例如,彼此不同的聚合物,或彼此相同但附接到不同部分的聚合物,不同捕获引物可选择性地偶联到这些聚合物。如下文所解释的,分别偶联到第一区域301和第二区域302的引物可包括在至少一个特征上彼此不同的捕获引物和至少在两个特征上彼此不同的正交捕获引物,以便抑制靶多核苷酸的扩增,这些靶多核苷酸在足够远离第一区域与第二区域之间的边界310的区域处与此类捕获引物或正交捕获引物杂交。

[0093] 例如,第一多个捕获引物331可偶联到底物300的第一区域301,并且第二多个捕获引物341可偶联到底物300的第二区域302。第二多个捕获引物中的捕获引物341可比第一多个捕获引物中的捕获引物331长。第一多个正交捕获引物332可偶联到底物300的第一区域301,并且第二多个正交捕获引物342可偶联到底物的第二区域302。第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物342可比第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332短。

[0094] 说明性地,在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物331可比第二多个捕获引物中的捕获引物341短至少2个碱基,例如,可比第二多个捕获引物中的捕获引物341短至少3个碱基、短至少4个碱基、短至少5个碱基、短至少6个碱基、短至少7个碱基、短至少8个碱基、短至少9个碱基或短至少10个碱基。在一些示例中,第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物342可比第二多个捕获引物中的捕获引物341短至少2个碱基,例如,可比第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332短至少3个碱基、短至少4个碱基、短至少5个碱基、短至少6个碱基、短至少7个碱基、短至少8个碱基、短至少9个碱基或短至少10个碱基。

[0095] 并非所有偶联到底物300的引物都需要彼此不同的长度。例如,在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物331的长度可与第二多个捕获引物中的正交捕获引物342的长度大致相同。在一些示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物341的长度可与第一多个捕获引物中的正交捕获引物332的长度大致相同。然而,应当理解,可在底物300的合适区域中使用捕获引物和正交捕获引物的任何合适的相应长度。如下文更详细地描述的,捕获引物331、341彼此在第一区域和第二区域中的长度不同,并且捕获引物332、342彼此在第一区域和第二区域中的长度不同,可导致与位于足够远离第一区域与第二区域之间的边界310的靶多核苷酸相比,优先扩增位于足够靠近边界310的靶多核苷酸。然后,如下文更详细地描

述的,与位于足够远离边界310的靶多核苷酸相比,扩增子可在整个第一区域和第二区域中进一步优先扩增。

[0096] 如图3A中所示,组合物3000还可包括流体,该流体包括靶多核苷酸351、352、353,例如,待扩增并最终测序的多核苷酸。靶多核苷酸351、352、353中的每一个靶多核苷酸可包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物332、342互补的第一接头354,和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物331、341互补的第二接头355。靶多核苷酸351、352、353的第一接头354可比第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332短,在一些示例中,比正交捕获引物332短至少2个碱基,例如,可比正交捕获引物332短至少3个碱基、短至少4个碱基、短至少5个碱基、短至少6个碱基、短至少7个碱基、短至少8个碱基、短至少9个碱基或短至少10个碱基。靶多核苷酸351、352、353的第二接头355可比第二多个捕获引物中的捕获引物341短,在一些示例中,比捕获引物341短至少2个碱基,例如,可比捕获引物341短至少3个碱基、短至少4个碱基、短至少5个碱基、短至少6个碱基、短至少7个碱基、短至少8个碱基、短至少9个碱基或短至少10个碱基。第一接头354和第二接头355可以是但不一定是彼此相同的长度。

[0097] 在一个非限制性示例中,第二多个捕获引物中的捕获引物341是P5捕获引物,并且第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332是P7捕获引物。可从Illumina有限公司(San Diego, CA)商购获得的P5捕获引物具有序列5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'(SEQ ID NO:1)。也可从Illumina有限公司商购获得的P7捕获引物具有序列5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3'(SEQ ID NO:2)。在一些示例中,第一多个捕获引物中的捕获引物331是缩短的P5捕获引物(在本文其可被指定为P5*),并且第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物是本文中的缩短的P7捕获引物(其可被指定为P7*)。例如,可将P5和P7的上述给定序列从3'-端缩短约2至10个碱基,以分别形成缩短的P5捕获引物(P5*)和缩短的P7捕获引物(P7*)。在一些示例中,缩短的P7捕获引物(P7*)可具有序列5'-TTTTTCAAGCAGAAGACGGC-3'(SEQ ID NO:3)。在一些示例中,缩短的P5捕获引物(P5*)可具有序列5'-TTTTTAATGATACGGCGACCA-3'(SEQ ID NO:4)。

[0098] 第二接头355可以是缩短的互补P5接头(在本文其可被指定为cP5*),例如可以是全长互补P5接头(在本文其可被指定为cP5)的缩短版本。全长互补P5接头(cP5)可具有序列5'-TCGGTGGTCGCCGATCATT-3'(SEQ ID NO:5),并且可从Illumina有限公司商购获得。缩短的互补P5接头(cP5*)可具有序列3'-GCGACCACCGAGATCTACAC-5'(SEQ ID NO:6)。第一接头354可以是缩短的互补P7接头(在本文其可被指定为cP7*),例如可以是全长互补P7接头(在本文其可以被指定为cP7)的缩短版本。全长互补P7接头(cP7)可具有序列5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'(SEQ ID NO:7),并且可从Illumina有限公司商购获得。缩短的互补P7接头(cP7*)可具有序列3'-GACGGCATAACGAGAT-5'(SEQ ID NO:8),其中以粗体指示的G在一些示例中可以是8-氧代-G,其可以是可裂解部分,诸如本文其他地方所描述的。说明性地,cP5和cP7的上述序列可从3'-端缩短或从5'-端缩短或从3'-端和5'-端两者缩短2至10个碱基,以形成缩短的cP7接头(cP7*)和缩短的cP5接头(cP5*)。

[0099] 如图3B中所示,第一靶多核苷酸351、第二靶多核苷酸352和第三靶多核苷酸353的接头354、355可例如根据泊松分布与底物300的不同位置中的不同捕获引物随机地杂交。在特别示出的示例中,靶多核苷酸351的第一接头354与底物300的第一区域301中的第一多个

正交捕获引物中的正交捕获引物332杂交以形成双链体361。靶多核苷酸352的第二接头355与底物300的第二区域302中的第二多个捕获引物中的捕获引物341杂交以形成双链体362。靶多核苷酸353的第一接头354与底物300的第一区域301中的第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332杂交以形成双链体363。由接头与捕获引物或正交捕获引物之间的此类初始杂交产生的双链体的熔解温度(T_m)可大于约40°C,例如大于约45°C,或大于约50°C,或大于约55°C,或大于约60°C,或大于约65°C,或大于约70°C,这些双链体例如可在保持组合物3000的反应温度或其他温度下相对稳定。然而,如本文所述,底物上靶多核苷酸的接头与捕获引物或正交捕获引物初始杂交的特定位置影响此类多核苷酸被扩增的程度。例如,与初始杂交足够远离第一底物区域301与第二底物区域302之间的边界310的多核苷酸相比,可容易地扩增初始杂交足够靠近该边界的靶多核苷酸。

[0100] 例如,如图3C中所示,在参考图3B中描述的初始杂交之后,可扩增第一靶多核苷酸351、第二靶多核苷酸352和第三靶多核苷酸353中的每一个靶多核苷酸,例如,从而分别形成第一扩增子351'、第二扩增子352'和第三扩增子353'。在此类扩增之后,第一靶多核苷酸351、第二靶多核苷酸352和第三靶多核苷酸353可以诸如图3D中所示的方式去杂交,而第一扩增子351'、第二扩增子352'和第三扩增子353'保持共价结合到底物300。注意,不一定执行此类去杂交。例如,代替使第一靶多核苷酸351、第二靶多核苷酸352和第三靶多核苷酸353去杂交,此类多核苷酸可保持与底物杂交,并且可使用诸如本领域已知的链侵入过程来进一步扩增并且可称为ExAmp。

[0101] 如图3E中所示,在参考图3C至图3D所描述的初始扩增之后,所得扩增子可弯曲以便与底物300上的其他捕获引物或正交捕获引物潜在地杂交。例如,第二扩增子352'的第一接头354可与正交捕获引物342中的第二个正交捕获引物不充分杂交,以便在反应温度下呈稳定状态。例如,因为正交捕获引物342中的每一个正交捕获引物是相对短的,并且第二扩增子352'的第一接头354是相对短的,所以第二扩增子352'可能无法足够远地弯曲以使正交捕获引物342中的任一个正交捕获引物的序列与接头354的序列充分对齐。因此,在第二扩增子的第一接头354与任一正交捕获引物342之间形成的任何双链体的熔解温度(T_m)可低于反应温度,并且因此任何此类双链体都可迅速充分熔解,以抑制第二扩增子352'的扩增。例如,由第二扩增子352'的第一接头354与正交捕获引物342中的任一个正交捕获引物之间的最多部分杂交产生的任何双链体365的熔解温度(T_m)可小于约20°C,例如小于约15°C,小于约10°C,或小于约5°C。说明性地,使用上文提供的示例性序列,缩短的P7捕获引物(P7*)可与缩短的互补P7接头(cP7*)仅重叠约5个碱基或更少,并且缩短的P5捕获引物(P5*)可与缩短的互补P5接头仅重叠约10个碱基或更少、或约9个碱基或更少、或约8个碱基或更少、或约7个碱基或更少、或约6个碱基或更少、或约5个碱基或更少、或约4个碱基或更少、或约3个碱基或更少、或约2个碱基或更少、或约1个碱基或没有碱基重叠。因此,在反应温度下,任何此类双链体不可能在足够的时间量内形成以用于聚合酶(未具体示出)使用任一正交捕获引物342作为此类扩增的引物开始形成第二扩增子352'的扩增子。类似地,第一扩增子351'的第二接头355可能无法与第一多个捕获引物中的捕获引物331中的任一个捕获引物充分杂交。例如,因为捕获引物331中的每一个捕获引物相对短,并且接头355相对短,所以第一扩增子351'可能无法充分弯曲以使接头355的序列与捕获引物331中的任一个捕获引物的序列充分接触。此类不能充分杂交可抑制第一扩增子351'的扩增,例如可抑制

聚合酶(未具体示出)能够使用任一捕获引物331作为此类扩增的引物来形成第一扩增子351'的扩增子。

[0102] 相比之下,第三扩增子353'充分接近底物300的第一区域301与第二区域302之间的边界310,以致该扩增子的第二接头355可跨越该边界,以便与底物300的第二区域302中的第二多个捕获引物中的捕获引物341完全杂交以形成双链体366。例如,因为捕获引物341是全长的,即使接头355相对短,第三扩增子353'也可能充分弯曲以使接头355的序列与捕获引物341的序列对齐。第三扩增子353'的第二接头355与捕获引物341的杂交可促进第三扩增子353'的扩增,并且因此促进靶多核苷酸353的进一步扩增。

[0103] 例如,由第三扩增子353'的接头355与捕获引物341之间的杂交产生的双链体366的熔解温度(T_m)可大于约40°C,例如大于约45°C,或大于约50°C,或大于约55°C,或大于约60°C,或大于约65°C,或大于约70°C。因此,在反应温度下,双链体366(以及参考图3B所描述的双链体363)可能在足够的时间量内形成以用于聚合酶(未具体示出)使用捕获引物341作为此类扩增的引物开始形成第三扩增子353'的扩增子。

[0104] 因此,可被认为是“足够靠近边界”的靶多核苷酸(或其扩增子)可与边界310的一侧上的捕获引物杂交,并且可与边界310的另一侧上的正交捕获引物杂交。应当理解,靶多核苷酸(或扩增子)越长,距边界越远,其越能与边界310的一侧上的捕获引物杂交以及与边界310的另一侧上的正交捕获引物杂交。说明性地,长度为500个碱基的靶多核苷酸(或扩增子)可大致长150nm。因此,根据靶多核苷酸(或扩增子)初始杂交的位置,在边界310的任一侧上至多约150nm对于该多核苷酸而言可以是“足够靠近边界”。相反,长度为250个碱基的靶多核苷酸(或扩增子)可大致长75nm,而长度为1000个碱基的靶多核苷酸(或扩增子)可大致长300nm。在任何此类示例中,距靶多核苷酸(或扩增子)可到达并且因此优先扩增的边界310的距离与该靶多核苷酸(或扩增子)的物理长度有关。

[0105] 图3F示出了在另一扩增操作之后的图3E的组合物。可看出,该组合物包括扩增子353'的额外扩增子353”。此类额外扩增子可与扩增子353'杂交。如图3F中所示,扩增操作可延伸额外扩增子353”的第一接头354和第二接头355,以分别使用第一正交捕获引物332和第二捕获引物341的序列来形成延伸的(例如,全长)接头354'、355'。相比之下,组合物可不包括扩增子351'、352'的任何其他扩增子,例如,因为那些扩增子的接头与捕获引物或正交捕获引物的不充分杂交可抑制那些扩增子的任何扩增。扩增操作可重复任何合适的次数以便生成扩增子353'、353”的其他扩增子,这些扩增子中的每一个扩增子的全长接头354'、355'可根据需要容易地与相应的缩短的捕获引物331、342或与全长捕获引物332、341杂交。例如,如图3G中所示,扩增子353'的全长第一接头354'可与第一区域301中的第一多个捕获引物中的正交捕获引物332杂交,并且扩增子353”的全长第二接头355'可与第二区域302中的第二多个捕获引物中的捕获引物341杂交。如图3H中所示,在另一扩增操作之后,可形成靶多核苷酸353的额外扩增子356'、356”。如果重复扩增操作直到第一底物区域401和第二底物区域402填满,则所得扩增子的两个接头可能不一定与对应的捕获引物或正交捕获引物杂交,并且因此扩增子可远离底物线性地延伸,如图3I中所示。

[0106] 扩增操作可形成任何合适的次数,以便基本上填充第一底物区域301和第二底物区域302两者,这些底物区域具有至少功能上单克隆的簇,并且在一些示例中是基本上单克隆的簇,例如,具有靶多核苷酸353的扩增子。例如,第一底物区域301和第二底物区域302中

的每一个底物区域内的扩增子各自可包括一个所选择的靶多核苷酸的至少约60%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约70%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约80%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约90%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约95%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约98%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约99%扩增子或一个所选择的靶多核苷酸的至少约100%扩增子。如上所述,在一些示例中,某些捕获引物和正交捕获引物可包括非核苷酸部分。此类非核苷酸部分可包括但不限于切除部分或封闭基团,通过该切除部分可选择性地去除捕获引物的一部分,诸如下文参考图4A至图4L进一步描述的。例如,如图3A至图3I中所示,第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332可包括切除部分333,并且第二多个捕获引物中的捕获引物341可包括切除部分343。切除部分333、343可位于沿任何合适的引物长度的任何合适位置处,并且可以是但不一定是彼此相同类型的切除部分。在诸如参考图3E至图3I所描述的所需数量的额外扩增操作之后,可通过使合适的酶或试剂与切除部分333反应来去除第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物332中的部分正交捕获引物,并且可通过使合适的酶或试剂与切除部分343反应来去除第二多个捕获引物中的捕获引物341中的部分捕获引物。和切除部分333一起使用的酶或试剂可与和切除部分343一起使用的酶或试剂相同或不同。如图3J中所示,切除部分333的反应去除第一底物区域301中的一个取向的多核苷酸,并且切除部分334的反应去除第二底物区域302中的另一取向的多核苷酸,使得可在两个底物区域中执行同时双端读段。第一底物区域301和第二底物区域302中的所得线性化扩增子可以是至少功能上单克隆的,并且可以是基本上单克隆的。

[0107] 本文提供了生成底物的基本单克隆区域的其他方法。说明性地,在本文提供的其他示例中,用靶多核苷酸进行接种并且在底物的第一区域中执行扩增,而底物的第二区域中的引物可被封闭,使得此类扩增最初可不在该区域中执行。然后,不封闭第二区域中的引物。可预期在第一区域中扩增了最多的靶多核苷酸可在第二区域中进一步扩增,从而提高单克隆性。

[0108] 例如,图4A至图4L示意性地示出了用于使用第一底物区域中的未封闭引物和第二底物区域中的可去除的封闭引物来扩增多核苷酸的工艺流程中的示例性组合物和操作。图4A中示出的组合物4000包括底物400,该底物包括可类似于参考图3A所描述的那些的第一区域401和第二区域402。第一多个捕获引物431可偶联到底物400的第一区域401,并且第一多个正交捕获引物432可偶联到底物400的第一区域401。第二多个捕获引物441可偶联到底物400的第二区域402,并且第二多个正交捕获引物442可偶联到底物的第二区域402。在图4A中示出的示例中,这些引物中的所有引物可以是彼此相同的长度。例如,第一多个捕获引物中的捕获引物431的长度可与第二多个捕获引物中的捕获引物441的长度大致相同。第二多个捕获引物中的捕获引物441的长度可与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物432的长度大致相同。替代地,捕获引物和正交捕获引物的长度在底物的不同区域中可以是彼此不同的,例如以诸如参考图3A至图3J所描述的方式彼此不同。

[0109] 第一多个可去除封闭基团444可偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物441,并且第二多个可去除封闭基团445可偶联到第二多个捕获引物中的正交捕获引物442。如下所述,可使用封闭基团444、445以便抑制第二区域402内的任何靶多核苷酸的扩增,直到第一区域401内的扩增基本上完成;然后可去除此类封闭基团以便允许已在第一区域401中生成

的仅某些扩增子的扩增,从而改善第二区域402内的单克隆性。在一个非限制性示例中,封闭基团444、445包括3'-磷酸基团,这些3'-磷酸基团可使用合适的酶(诸如磷酸酶或激酶)来去除(反向活性)。在另一个非限制性示例中,封闭基团444、445包括由双脱氧核苷酸(ddNTP)封端的烯丙基-T基团,并且可使用合适的试剂(诸如钯)来去除。在另一个非限制性示例中,封闭基团444、445包括3'-O-叠氮化物部分,这些3'-O-叠氮化物部分可使用合适的试剂(诸如还原剂)来去除。在另一个非限制性示例中,封闭基团444、445包括3'-O-NH₂部分,这些3'-O-NH₂部分可使用合适的试剂(诸如缓冲的(pH 5.2)硝酸钠)来去除。在另一个非限制性示例中,封闭基团444、445包括3'-O-烯丙基部分,这些3'-O-烯丙基部分可使用合适的试剂(诸如钯)来去除。在另一个非限制性示例中,封闭基团444、445包括3'-酯部分,这些3'-酯部分可使用合适的酶(诸如酯酶)来去除。

[0110] 类似地,如参考图3A至图3J所描述的,组合物4000还可包括流体,该流体包括靶多核苷酸451、452、453。靶多核苷酸451、452、453中的每一个靶多核苷酸可包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物432、442互补的第一接头454,和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物431、441互补的第二接头455。在图4A中示出的非限制性示例中,靶多核苷酸451、452、453的第一接头454的长度与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物432、442的长度大致相同,并且靶多核苷酸451、452、453的第二接头455的长度与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的捕获引物431、441的长度大致相同。

[0111] 在一个纯说明性示例中,第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物431、441是P5捕获引物,并且第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物432、443是诸如上文所描述的P7捕获引物。第一接头454可以是cP7接头,并且第二接头455可以是诸如上文所描述的cP5接头。捕获引物、正交捕获引物和接头全部可以是全长序列,或其中某些可以诸如参考图3A至图3J所描述的方式缩短。

[0112] 以类似于参考图3B所描述的方式,靶多核苷酸的接头454、455可例如根据泊松分布与捕获引物431、441或正交捕获引物432、442中的随机、相应的引物杂交。例如,靶多核苷酸451的第一接头454可与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物432杂交以形成双链体461;靶多核苷酸453的第一接头454可与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物432杂交以形成双链体463;并且靶多核苷酸452的第二接头455可与第二多个捕获引物中的捕获引物442杂交以形成双链体462。由接头与捕获引物或正交捕获引物之间的此类初始杂交产生的双链体的熔解温度(T_m)可大于约40°C,例如大于约45°C,或大于约50°C,或大于约55°C,或大于约60°C,或大于约65°C,或大于约70°C,这些双链体例如可在保持组合物4000的反应温度或其他温度下相对稳定。如下所述,可在第一底物区域401内容易地扩增靶多核苷酸451、453,而第二底物区域402中的封闭基团444、445可抑制靶多核苷酸402的扩增。

[0113] 例如,如图4C中所示,在参考图4B描述的初始杂交之后,可扩增第一靶多核苷酸451和第三靶多核苷酸453,例如从而分别形成第一扩增子451'和第三扩增子453',而封闭基团444可抑制第二靶多核苷酸452的扩增。在此类扩增之后,第一靶多核苷酸451、第二靶多核苷酸452和第三靶多核苷酸453可以诸如图4D所示的方式去杂交,而第一扩增子451'和第三扩增子453'保持共价结合到底物400。

[0114] 如图4E中所示,第一扩增子451'的第二接头455可与第一多个正交捕获引物中的

捕获引物431杂交以形成双链体464。第三扩增子453'的第二接头455可与第一多个捕获引物中的捕获引物431杂交以形成双链体465。以类似于参考图3E所描述的方式,扩增子451'、453'的第二接头455与捕获引物431的杂交可促进扩增子451'、453'的扩增。例如,由扩增子451'、453'的相应接头455和捕获引物431之间的杂交产生的双链体的熔解温度(T_m)可大于约40°C,例如大于约45°C,或大于约50°C,或大于约55°C,或大于约60°C,或大于约65°C,或大于约70°C。因此,在用于扩增的反应温度下,双链体464、465(以及参考图4B所描述的双链体461、463)可能在足够的时间量内形成以用于聚合酶(未具体示出)使用捕获引物或正交捕获引物作为此类扩增的引物开始形成扩增子451'、453'的相应扩增子。

[0115] 如图4F中所示,扩增操作生成扩增子451'的额外扩增子451"和扩增子453'的额外扩增子453",而第二底物区域402可不包括可进一步扩增的任何扩增子。例如,即使靶多核苷酸(或扩增子)中的一个靶多核苷酸的第一接头455与正交捕获引物442中的一个正交捕获引物杂交,偶联到该正交捕获引物的可去除封闭基团445也可抑制该靶多核苷酸(或扩增子)的扩增。作为另一个示例,即使靶多核苷酸(或扩增子)中的一个靶多核苷酸的第二接头与捕获引物441中的一个捕获引物杂交,偶联到该捕获引物的可去除封闭基团444也可以抑制该靶多核苷酸(或扩增子)的扩增。例如,封闭基团444、445可抑制聚合酶,使其无法使用捕获引物441或正交捕获引物442作为此类扩增的引物开始形成靶多核苷酸(例如,靶多核苷酸452)的扩增子。注意,替代地,可使用可去除封闭基团444和可去除封闭基团445中的仅一者或使用可去除封闭基团444和可去除封闭基团445中的两者来实现此类扩增抑制。

[0116] 其他扩增操作可用于生成第一底物区域401中的靶多核苷酸的其他扩增子,而封闭基团444、445继续抑制第二底物区域402中的扩增。例如,如图4G中所示,扩增子451'、451"、453'、453"的接头可变为与不同的捕获引物或正交捕获引物杂交,并且随后扩增以产生另外的扩增子,诸如图4H中所示。如果重复扩增操作直到第一底物区域401填满,则靶多核苷酸和扩增子的两种接头可能不一定与对应的捕获引物或正交捕获引物杂交,并且因此靶多核苷酸和扩增子可远离底物线性地延伸。

[0117] 在此类扩增之后,可去除第一多个可去除封闭基团444,并且可去除第二多个可去除封闭基团445,诸如图4I中所示。例如,如果封闭基团444、445包括彼此相同类型的部分,则去除封闭基团444可与去除封闭基团445同时进行。替代地,例如,如果封闭基团444、445包括彼此不同类型的部分,则可在与封闭基团445相比不同的步骤中去除封闭基团444。如图4J中所示,在去除第一多个可去除封闭基团444和第二多个可去除封闭基团445之后,靶多核苷酸451、453中的一个靶多核苷酸的扩增子的第一接头454与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物442(例如,先前被封闭的正交捕获引物)杂交。另外,如图4J中所示,在去除第一多个可去除封闭基团444和第二多个可去除封闭基团445之后,靶多核苷酸451、453中的一个靶多核苷酸的扩增子的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物441(例如,先前被封闭的捕获引物)杂交。因此,可以理解,从捕获引物441和正交捕获引物442中去除封闭基团使第二底物区域402可用于使用第一底物区域401生成的扩增子的进一步扩增。可进一步扩增各种扩增子,从而产生如图4K中所示的组合物。

[0118] 另外,以类似于参考图3A至图3J所描述的方式,第一多个捕获引物中的捕获引物431可包括切除部分433,并且第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物442可包括切除部分433。切除部分433、443可以是但不一定是彼此相同类型的切除部分。在诸如参考图4F至

图4K所描述的所需数量的扩增操作之后,可通过使合适的酶或试剂与切除部分433反应来去除第一多个捕获引物中的捕获引物431中的部分捕获引物,并且可通过使合适的酶或试剂与切除部分443反应来去除第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物442中的部分正交捕获引物。和切除部分433一起使用的酶或试剂可与和切除部分443一起使用的酶或试剂相同或不同。如图4L中所示,切除部分433的反应去除第一底物区域401中的一个取向的多核苷酸,并且切除部分434的反应去除第二底物区域402中的另一取向的多核苷酸,使得可在两个底物区域中执行同时双端读段。底物区域401、402中的每一个底物区域可以是足够单克隆的,以允许同时双端读段。例如,第一底物区域401和第二底物区域402中的每一个底物区域内的扩增子各自可包括一个所选择的靶多核苷酸的至少约60%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约70%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约80%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约90%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约95%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约98%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约99%扩增子或一个所选择的靶多核苷酸的至少约100%扩增子。

[0119] 尽管示出了参考图3A至图3J和图4A至图4L所描述的示例以便建议使用具有彼此相邻的第一区域和第二区域的平坦底物,但是显而易见的是可使用更复杂的底物。例如,图5A至图5D示意性地示出了用于使用第一底物区域和第二底物区域中不同长度的引物来扩增多核苷酸的其他示例性组合物。诸如参考图5A至图5D所描述的组合物可以类似于参考图3A至图3J所描述的那些的方式使用,例如以便使扩增偏倚在选择区域中更有效。在以图5A中的横截面和图5C中的平面图示出的示例中,底物500可包括一个或多个竖直侧壁503,该一个或多个竖直侧壁提供了其中底物的第一区域501围绕底物的第二区域502的孔(例如,竖直侧壁503可以是基本上圆柱形的并且围绕第一区域501和第二区域502两者,第一区域501可以是基本上环形的,并且第二区域502可以是基本上圆形的)。替代地,底物的第二区域502可围绕底物的第一区域501(例如,竖直侧壁503可以是基本上圆柱形的并且围绕第一区域501和第二区域502两者,第二区域502可以是基本上环形的,并且第一区域501可以是基本上圆形的)。作为又一替代方案,可省略竖直侧壁503,并且底物500可在所示区域中是基本上平坦的。应当理解,第一区域501和第二区域502可具有相对于彼此的任何合适的形状和位置。例如,第二区域502不一定是基本上是圆形的,并且不一定设置在第一区域501的中间。类似地,第一区域501不一定是基本上环形的,并且不一定对称地围绕第二区域。在任何此类示例中,以类似于参考图3A所描述的方式,相对短的捕获引物和正交捕获引物可偶联到第一区域501中的底物500,而较长的(例如,全长)捕获引物和正交捕获引物可偶联到第二区域502中的底物500。因此,可使扩增偏倚在第二区域502中更有效,该第二区域可居中定位并且其中较长的引物附接到底物500。

[0120] 在以图5B中的横截面和图5D中的平面图示出的示例中,底物500'可包括一个或多个竖直侧壁503',该一个或多个竖直侧壁提供了包围底物的第二区域502'并且被底物的第一区域501'围绕的孔(例如,竖直侧壁503'可以是基本上圆柱形的并且围绕基本上圆形的第二区域502',而第一区域501'可以是基本上环形的并且围绕竖直侧壁503'和第二区域502')。替代地,底物的第一区域501'可围绕底物的第二区域502'(例如,竖直侧壁503'可以是基本上圆柱形的并且围绕基本上圆形的第一区域501',而第二区域502'可以是基本上环形的并且围绕竖直侧壁503'和第一区域501')。作为又一替代方案,可省略竖直侧壁503',

并且底物500可在所示区域中是基本上平坦的。应当理解,第一区域501'和第二区域502'可具有相对于彼此的任何合适的形状和位置。例如,第二区域502'不一定是基本上是圆形的,并且不一定设置在第一区域501'的中间。类似地,第一区域501'不一定是基本上环形的,并且不一定对称地围绕第二区域。在任何此类示例中,以类似于参考图3A所描述的方式,相对短的捕获引物和正交捕获引物可偶联到第一区域501'中的底物500,而较长的(例如,全长)捕获引物和正交捕获引物可偶联到第二区域502'中的底物500'。因此,可使扩增偏倚在第二区域502'中更有效,该第二区域可居中定位并且其中较长的引物附接到底物500'。

[0121] 图6A至图6D示意性地示出了用于使用第一底物区域中的未封闭引物和第二底物区域中的可去除的封闭引物来扩增多核苷酸的其他示例性组合物。诸如参考图6A至图6D所描述的组合物可以类似于参考图4A至图4L所描述的那些的方式使用,例如以便使扩增偏倚在选择区域中更有效。在以图6A中的横截面和图6C中的平面图示出的示例中,底物600可包括一个或多个竖直侧壁603,该一个或多个竖直侧壁提供了其中底物的第一区域601围绕底物的第二区域602的孔(例如,竖直侧壁603可以是基本上圆柱形的并且围绕第一区域601和第二区域602两者,第一区域601可以是基本上环形的,并且第二区域602可以是基本上圆形的)。替代地,底物的第二区域602可围绕底物的第一区域601(例如,竖直侧壁603可以是基本上圆柱形的并且围绕第一区域601和第二区域602两者,第二区域602可以是基本上环形的,并且第一区域601可以是基本上圆形的)。作为又一替代方案,可省略竖直侧壁603,并且底物600可在所示区域中是基本上平坦的。应当理解,第一区域601和第二区域602可具有相对于彼此的任何合适的形状和位置。例如,第二区域602不一定是基本上是圆形的,并且不一定设置在第一区域601的中间。类似地,第一区域601不一定是基本上环形的,并且不一定对称地围绕第二区域。在任何此类示例中,以类似于参考图4A所描述的方式,具有与其偶联的封闭基团的捕获引物和正交捕获引物可偶联到第一区域601'中的底物600,而未封闭的捕获引物和正交捕获引物可偶联到第二区域602'中的底物600。因此,可使扩增偏倚在第二区域602'中更有效,该第二区域可居中定位并且其中省略封闭基团601。

[0122] 在以图6B中的横截面和图6D中的平面图所示的示例中,底物600'可包括一个或多个竖直侧壁603',该一个或多个竖直侧壁提供了包围底物的第二区域602'并且被底物的第一区域601'围绕的孔(例如,竖直侧壁603'可以是基本上圆柱形的并且围绕基本上圆形的第二区域602',而第一区域601'可以是基本上环形的并且围绕竖直侧壁603'和第二区域602')。替代地,底物的第一区域601'可围绕底物的第二区域602'(例如,竖直侧壁603'可以是基本上圆柱形的并且围绕基本上圆形的第一区域601',而第二区域602'可以是基本上环形的并且围绕竖直侧壁603'和第一区域601')。作为又一替代方案,可省略竖直侧壁603,并且底物600可在所示区域中是基本上平坦的。应当理解,第一区域601'和第二区域602'可具有相对于彼此的任何合适的形状和位置。例如,第二区域602'不一定是基本上是圆形的,并且不一定设置在第一区域601'的中间。类似地,第一区域601'不一定是基本上环形的,并且不一定对称地围绕第二区域。在任何此类示例中,以类似于参考图4A所描述的方式,封闭的捕获引物和封闭的正交捕获引物可偶联到第一区域601'中的底物600',而未封闭的捕获引物和未封闭的正交捕获引物可偶联到第二区域602'中的底物600'。因此,可使扩增偏倚在第二区域602'中更有效,该第二区域可居中定位并且其中省略封闭基团601'。

[0123] 应当理解,诸如本文所述的示例性组合物可在用于扩增多核苷酸的任何合适的方

法中使用。例如,图7示出了用于使用第一底物区域和第二底物区域中不同长度的引物来扩增多核苷酸的方法700中的示例性操作流程。尽管方法700可使用参考图3A至图3J所描述的组合物3000或参考图5A至图5D所描述的组合物来实施,但是方法700可使用任何其他合适的组合物来实施。

[0124] 现在参考图7,方法700包括使组合物与流体接触(操作710)。在一些示例中,组合物可诸如参考图3A、图5A或图5B所描述的。说明性地,组合物可包括底物,该底物包括第一区域和第二区域,例如第一区域301、501或501',和第二区域302、502或502'。第一多个捕获引物(例如,捕获引物331,或第一区域501或501'内的捕获引物)可偶联到底物的第一区域。第二多个捕获引物(例如,捕获引物341,或第二区域502或502'内的捕获引物)可偶联到底物的第二区域。该第二多个捕获引物中的捕获引物可比该第一多个捕获引物中的捕获引物长。第一多个正交捕获引物(例如,正交捕获引物332,或第一区域501或501'内的正交捕获引物)可偶联到底物的第一区域。第二多个正交捕获引物(例如,正交捕获引物342,或第二区域502或502'内的正交捕获引物)可偶联到底物的第二区域。该第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物可比该第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物短。

[0125] 流体可包括靶多核苷酸。这些靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸可包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物互补的第一接头,和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物互补的第二接头,例如,参考图3A所描述的第一接头354和第二接头355。

[0126] 方法700还包括使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与第一多个正交捕获引物或第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物杂交,或者使该靶多核苷酸的第二接头与第一多个捕获引物或第二多个捕获引物中的捕获引物杂交(操作720)。例如,如上文参考图3B所描述的,靶多核苷酸可例如根据泊松分布而被分布在整个底物表面上。然而,如上文参考图3E至图3I所描述的,对于足够远离第一底物区域与第二底物区域之间的边界杂交的靶多核苷酸,在底物的该区域中的缩短的捕获引物或缩短的正交捕获引物可完全或部分抑制此类多核苷酸的其他接头的杂交。相比之下,对于足够接近第一底物区域与第二底物区域之间的边界杂交的靶多核苷酸,可生成多个扩增子。

[0127] 方法700还可包括扩增靶多核苷酸,该扩增包括生成该靶多核苷酸的扩增子(操作730)。例如,如上文参考图3E至图3I所描述的,可进一步容易地扩增足够接近底物的第一区域与第二区域之间的边界的靶多核苷酸的扩增子,而可能不会进一步扩增足够远离该边界的靶多核苷酸的扩增子。说明性地,方法700可包括使第一扩增子共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物,并且使第一扩增子的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物完全杂交,例如,使得扩增子桥接底物的第一区域与第二区域之间的边界并且因此可被进一步扩增。替代地,方法700可包括使第二扩增子共价偶联到第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物,并且使第二扩增子的第一接头与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交,例如,使得扩增子桥接底物的第一区域与第二区域之间的边界并且因此可被进一步扩增。

[0128] 方法700还可包括使第三扩增子共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物,并且使第三扩增子的第二接头不能与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物的完全杂交。第二接头不能与第一多个捕获引物中的捕获引

物中的任一个捕获引物完全杂交可抑制第三扩增子的扩增,例如该扩增子可不桥接底物的第一区域与第二区域之间的边界。在一些示例中,该第三扩增子的第二接头与第一多个捕获引物中的捕获引物中的任一个捕获引物之间的任何部分双链体的熔解温度(T_m)小于约 20°C 。方法700还可包括或替代地可包括使第四扩增子共价偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物,并且使第四扩增子的第一接头不能与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交。第一接头不能与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的任一个正交捕获引物完全杂交可抑制第四扩增子的扩增。因此,第一扩增子或第二扩增子可被进一步扩增,而第三扩增子和第四扩增子可不被进一步扩增。

[0129] 图8示出了用于使用第一底物区域中的未封闭引物和第二底物区域中的可去除的封闭引物来扩增多核苷酸的方法800中的示例性操作流程。尽管方法800可使用参考图4A至图4L所描述的组合物4000或参考图6A至图6D所描述的组合物来实施,但是方法800可使用任何其他合适的组合物来实施。

[0130] 现在参考图8,方法800可包括使组合物与流体接触(操作810)。在一些示例中,以诸如本文其他地方所描述的方式,组合物可包括底物,该底物包括第一区域和第二区域,例如第一区域401、601或601',和第二区域402、602或602'。第一多个捕获引物(例如,捕获引物431,或第一区域601或601'内的捕获引物)可偶联到底物的第一区域。第一多个正交捕获引物(例如,正交捕获引物432,或第一区域601或601'内的正交捕获引物)可偶联到底物的第一区域。第二多个捕获引物(例如,捕获引物441,或第二区域602或602'内的捕获引物)可偶联到底物的第二区域。第二多个正交捕获引物(例如,正交捕获引物442,或第二区域602或602'内的正交捕获引物)可偶联到底物的第二区域。第一多个可去除封闭基团(例如,封闭基团444)可偶联到第二多个捕获引物中的捕获引物。第二多个可去除封闭基团(例如,封闭基团445)可偶联到第二多个捕获引物中的正交捕获引物。流体可包括靶多核苷酸。这些靶多核苷酸中的每一个靶多核苷酸可包括与第一多个正交捕获引物和第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物互补的第一接头,和与第一多个捕获引物和第二多个捕获引物中的捕获引物互补的第二接头,例如,参考图4A所描述的第一接头454和第二接头455。

[0131] 方法800还可包括分别使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第一接头与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者使靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的第二接头与第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物杂交(操作820)。例如,如上文参考图4B所描述的,靶多核苷酸可例如根据泊松分布而被分布在整个底物表面上,并且可与偶联到此类区域的引物杂交。此类靶多核苷酸中的一个或多个靶多核苷酸可处于其中引物包括封闭基团的区域,并且此类靶多核苷酸中的一个或多个靶多核苷酸(例如,靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸)可处于其中引物不包括封闭基团的区域。

[0132] 方法800还可包括扩增靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸,该扩增包括在底物的第一区域中生成靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的扩增子(操作830)。例如,因为底物的第一区域中的引物缺乏封闭基团,所以可以诸如参考图4F至图4H所描述的方式在第一区域中容易地执行扩增。例如,方法800可包括使扩增子共价偶联到第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物,该扩增子具有与第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物完全杂交的第二接头。该扩增子可在底物的第一区域中被容易地进一步扩

增。替代地,方法800可包括使扩增子共价偶联到第一多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物,该扩增子具有与第一多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物完全杂交的第一接头。该扩增子可在底物的第一区域中被容易地进一步扩增。

[0133] 相比之下,因为底物的第二区域中的引物包括封闭基团,所以可在第二区域中抑制扩增。封闭基团可抑制在底物的第二区域中杂交的任何靶多核苷酸的扩增。例如,可使靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的第一接头与第二多个正交捕获引物中的正交捕获引物中的一个正交捕获引物杂交,或者其中使靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的第二接头与第二多个捕获引物中的捕获引物中的一个捕获引物杂交。偶联到捕获引物中的一个捕获引物的可去除封闭基团可抑制靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的扩增,或者偶联到正交捕获引物中的一个正交捕获引物的可去除封闭基团可抑制靶多核苷酸中的第二个靶多核苷酸的扩增。

[0134] 方法800可包括例如以诸如参考图4I所描述的方式去除第一多个可去除封闭基团和第二多个可去除封闭基团(操作840)。方法800可包括然后进一步扩增靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸,该扩增包括例如以诸如参考图4J至图4K所描述的方式,在底物的第二区域中生成靶多核苷酸中的第一个靶多核苷酸的额外扩增子(操作850)。应当理解,本发明的组合物和方法不限于与上文所描述的特定操作一起使用。例如,尽管图3A至3J和图4A至4L可被认为是与“桥式扩增”或“表面结合的聚合酶链式反应”一致的操作,但是应当理解,本发明的组合物和方法可容易地适于与其他扩增模式一起使用。一种此类扩增模式是“排除扩增”或ExAmp。排除扩增方法可允许每个底物区域扩增单个靶多核苷酸和在底物区域中产生基本上单克隆的扩增子群体。例如,相对于在底物区域处的靶多核苷酸的更慢的转运和捕获速率,在底物区域内的第一捕获的靶多核苷酸的扩增速率可更快。因此,在底物区域中捕获的第一靶多核苷酸可快速扩增并填充整个底物区域,因此抑制相同底物区域中的额外靶多核苷酸的捕获。替代地,如果在第一多核苷酸之后第二靶多核苷酸附接到相同底物区域,则第一多核苷酸的相对快速扩增可填充足够的底物区域以产生足够强以执行边合成边测序的信号(例如,底物区域可以是至少功能上单克隆的)。排除扩增的使用也可能导致单克隆底物区域的超泊松分布;即,在功能上单克隆的阵列中的底物区域的分数的分数可超过由泊松分布预测的分数。

[0135] 增加有用簇的超泊松分布是有用的,因为更多功能上单克隆的底物区域可能产生更高质量的信号,并且因此改进的SBS;然而,将靶多核苷酸接种到底物区域可遵循空间泊松分布,其中用于增加占用的底物区域的数量数的折衷方案是增加多克隆底物区域的数量。获得较高超泊松分布的一种方法是使接种快速发生,然后在接种的靶多核苷酸之中延迟。由于延迟(术语称为“动力学延迟”)被认为是通过生物化学反应动力学而产生的,所以其给出了一种接种的靶多核苷酸(与其他接种的靶标相比更早开始)。当重组酶介导序列匹配时,排除扩增通过使用重组酶促进引物(例如,附接到底物区域的引物)侵入到双链DNA(例如,靶多核苷酸)中来工作。本发明的组合物和方法可适于与重组酶一起使用以在重组酶介导序列匹配时促进本发明的捕获引物和正交捕获引物侵入到本发明的靶多核苷酸中。实际上,本发明的组合物和方法可适于与任何基于表面的多核苷酸扩增方法一起使用,诸如热PCR、化学变性PCR和酶促介导的方法(其也可称为重组酶聚合酶扩增(RPA)或ExAmp)。

[0136] 工作实施例

[0137] 以下实施例旨在仅仅是说明性的,并且不以任何方式限制。

[0138] 图9示意性地示出了用于表征捕获引物长度对扩增效率的影响的基于溶液的模型组合物。更具体地,模型组合物包括双链体,该双链体包括偶联到荧光团(荧光,FAM)的第一寡核苷酸,该荧光团与包括偶联到淬灭剂(黑洞淬灭剂,BHQ)的P5引物的第二寡核苷酸杂交,使得淬灭剂抑制荧光团的荧光。P5接头、重组酶、聚合酶和多个核苷酸用于在重组酶聚合酶扩增(RPA或ExAmp)过程中侵入第一寡核苷酸与第二寡核苷酸之间的双链体,从而引起侵入的P5引物的延伸并使第二寡核苷酸与第一寡核苷酸解离,从而允许荧光团发荧光。

[0139] 图10是示出由利用不同捕获引物长度的扩增产生的荧光强度的图。更具体地,迹线1001是来自使用29个碱基长的全长P5引物的参考图9所描述的模型组合物的测量荧光强度;迹线1002是来自使用15个碱基长的经修饰的P5引物的系统的测量强度;迹线1003是来自使用10个碱基长的经修饰的P5引物的系统的测量强度;迹线1004是来自使用13个碱基长的经修饰的P5引物的系统的测量强度;并且迹线1005是来自不使用侵入的P5引物(阴性对照)的系统的测量强度。从图10可看出,来自使用全长P5引物的模型组合物的初始荧光强度最高,表明该引物被最有效地扩增,这导致淬灭剂与荧光团的解离最多。来自使用15个碱基长的经修饰的P5引物的模型组合物的荧光强度开始于比使用全长P5引物的荧光强度显著更低的值,但逐渐增加到与使用全长P5引物的荧光强度相似的值。来自分别使用13和10个碱基长的经修饰的P5引物的模型组合物的荧光强度彼此类似。来自不使用侵入的P5引物(阴性对照)的模型组合物的荧光强度是最低的。从图10可理解,可预期较短的引物具有较低的扩增效率。因此,对于诸如参考图3A至图3J所描述的组合物,可以预期的是,可预期扩增在其中靶多核苷酸基本上仅可获取缩短的引物的区域中不如在其中靶多核苷酸可获取较长的引物的边界区域中有效。

[0140] 附加注释

[0141] 虽然上文描述了各种说明性示例,但是对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的情况下可在其中进行各种改变和修改。例如,组合物可包括来自组合物3000和组合物4000的组分的任何合适组合,并且方法可包括来自方法700和方法800的操作的任何合适组合。所附权利要求旨在涵盖落入本发明的真实精神和范围内的所有此类改变和修改。

[0142] 应当理解,如本文所述的本公开的每个方面的任何相应特征/示例可以任何合适组合一起实施,并且来自这些方面中的任何一个或多个方面的任何特征/示例可与如本文所述的其他方面的任何特征一起以任何合适组合一起实施以实现如本文所述的有益效果。

序列表

	<110> ILLUMINA, INC. ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED	
	<120> 用于扩增多核苷酸的组合物和方法	
	<130> IP-1997-PCT	
	<140>	
	<141>	
	<150> 63/077,857	
	<151> 2020-09-14	
	<160> 8	
	<170> PatentIn 3.5 版	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0001]	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 1	
	aatgatacgg cgaccaccga	20
	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 2	
	caagcagaag acggcatacg a	21
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 3	
	tttttcaag cagaagacgg c	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 4	
	ttttaatga tacggcgacc a	21
	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0002]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 5	
	tcggtggtcg ccgatcatt	20
	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"	
	<400> 6	
	cacatctaga gccaccagcg	20
	<210> 7	

<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"

<400> 7
tcgtatgccg tcttctgctt g 21

[0003]

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成寡核苷酸"

<400> 8
tagagcatac ggcag 15

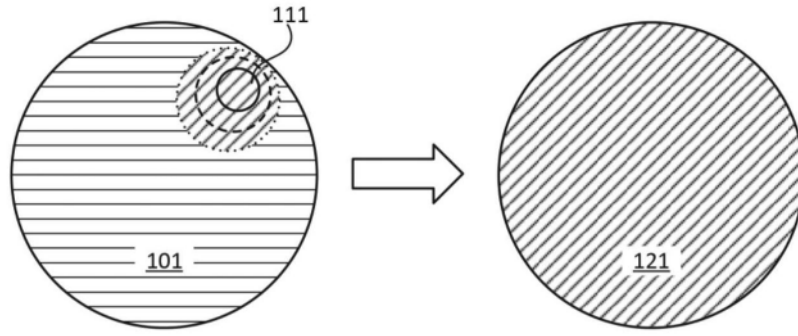


图1A

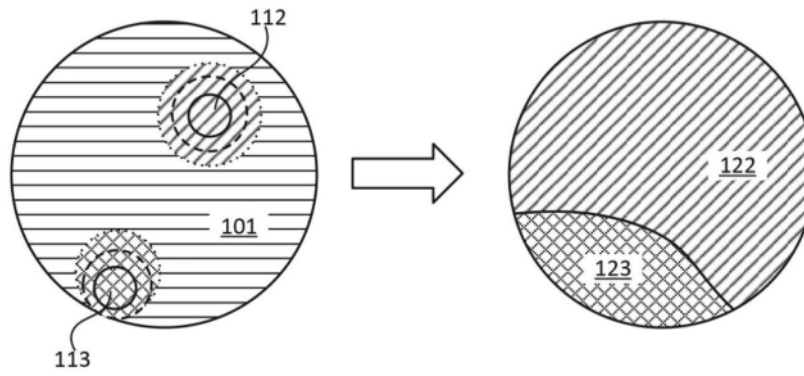


图1B

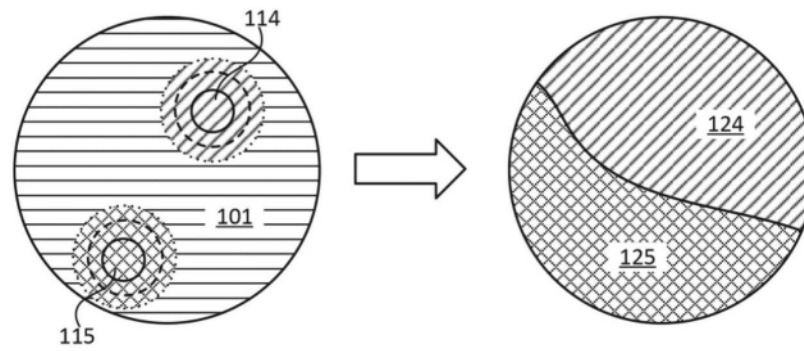


图1C

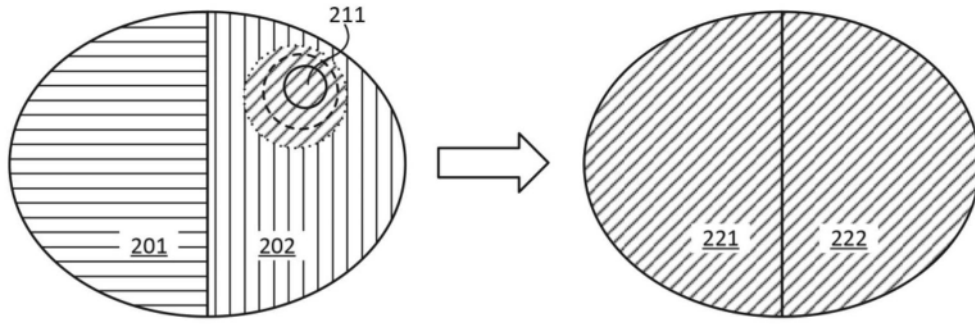


图2A

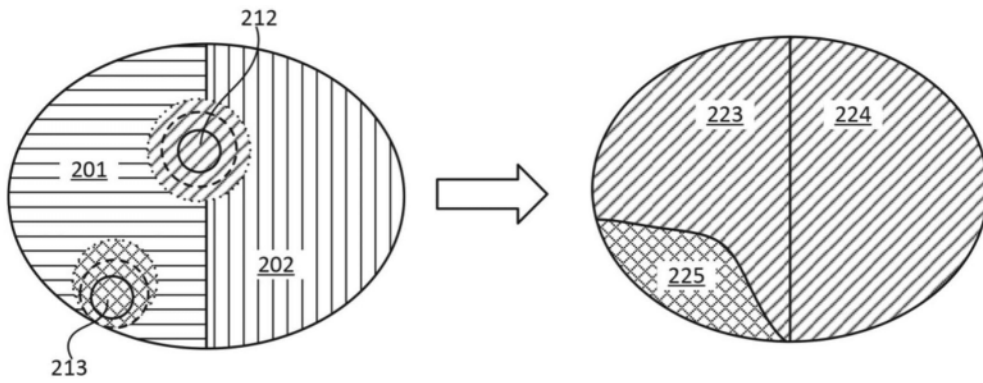


图2B

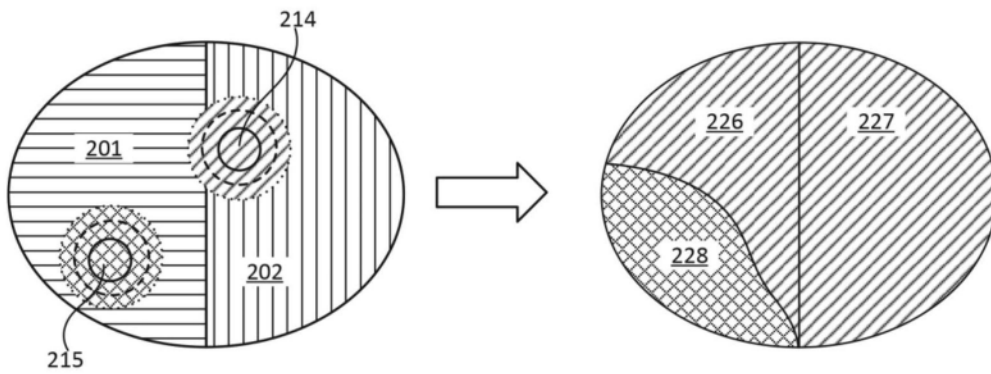


图2C

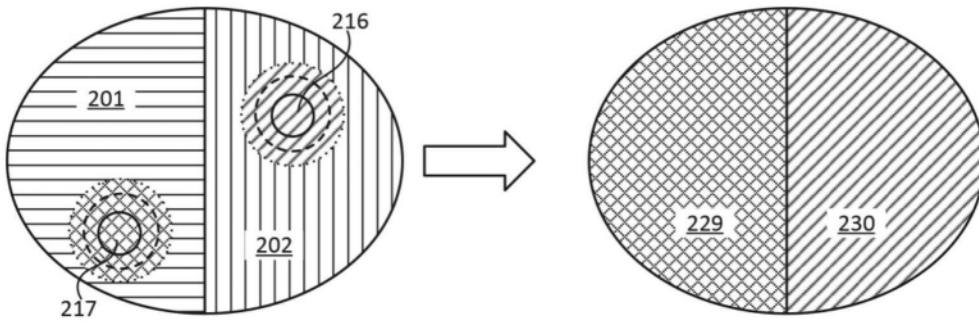


图2D

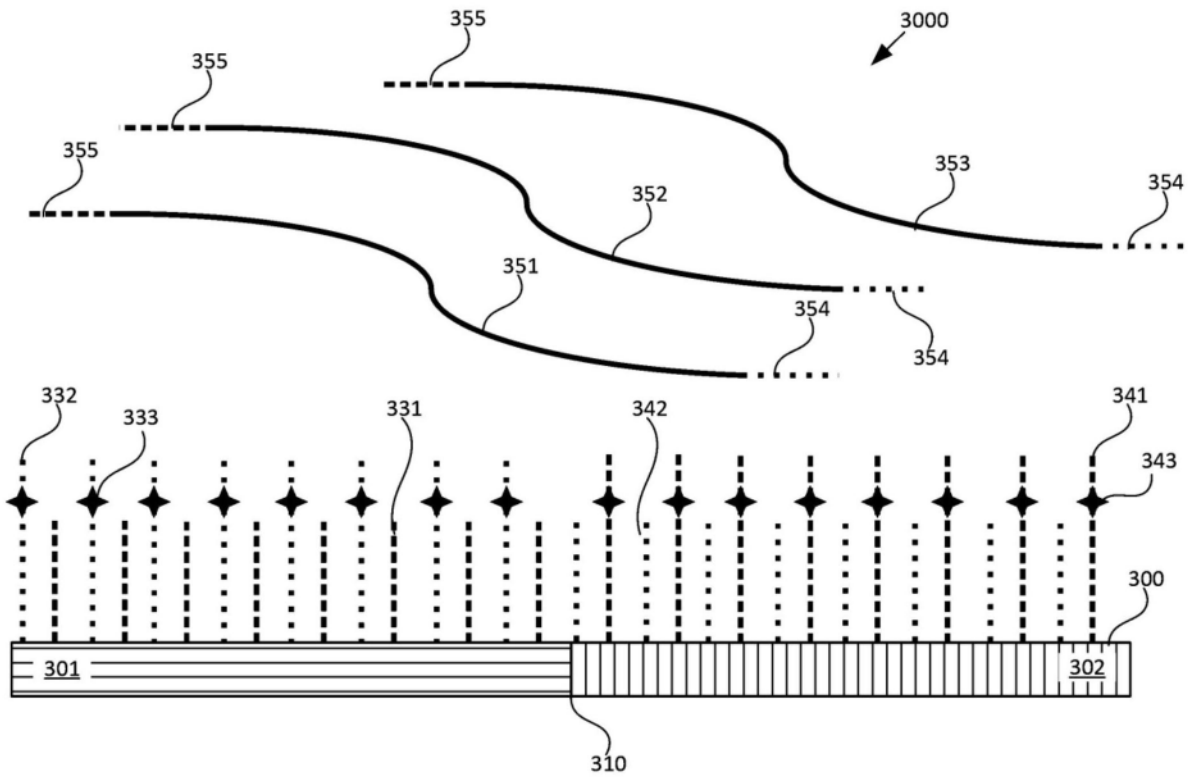


图3A

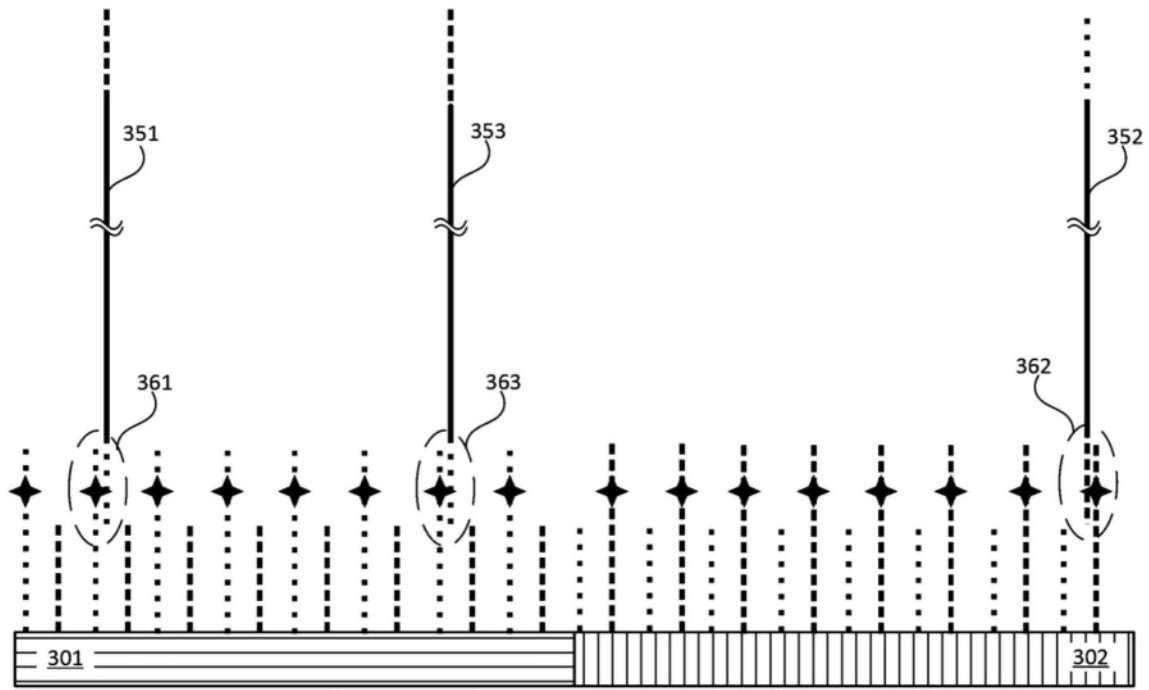


图3B

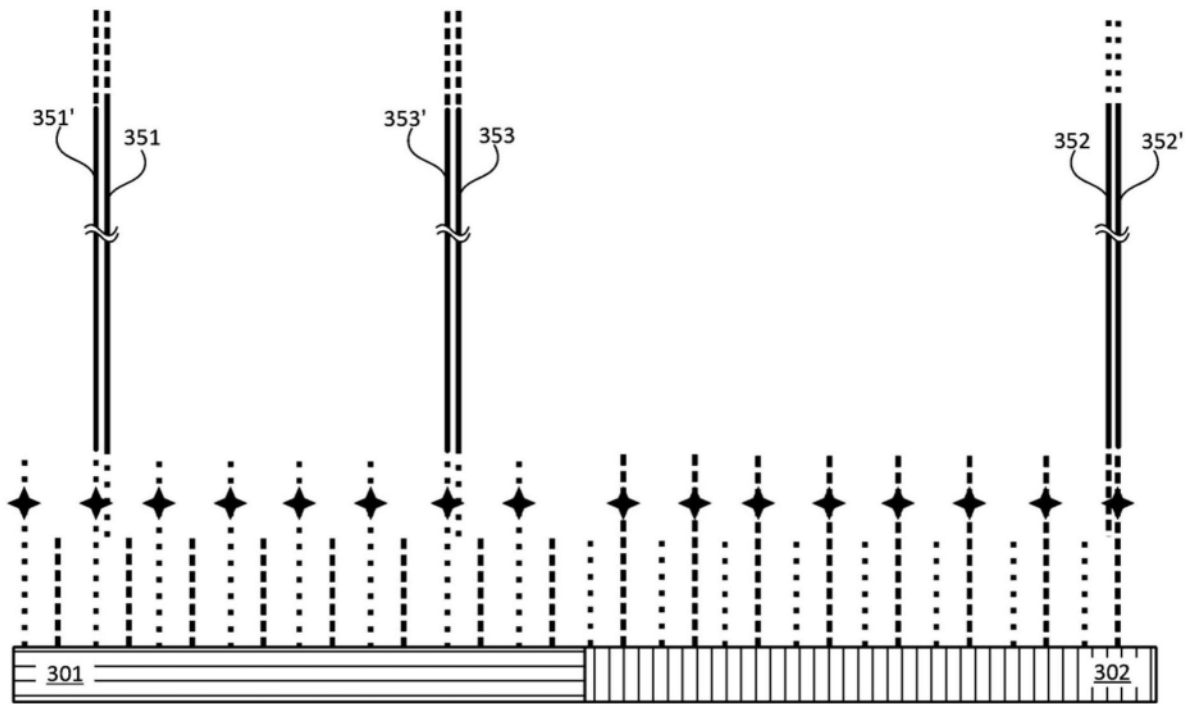


图3C

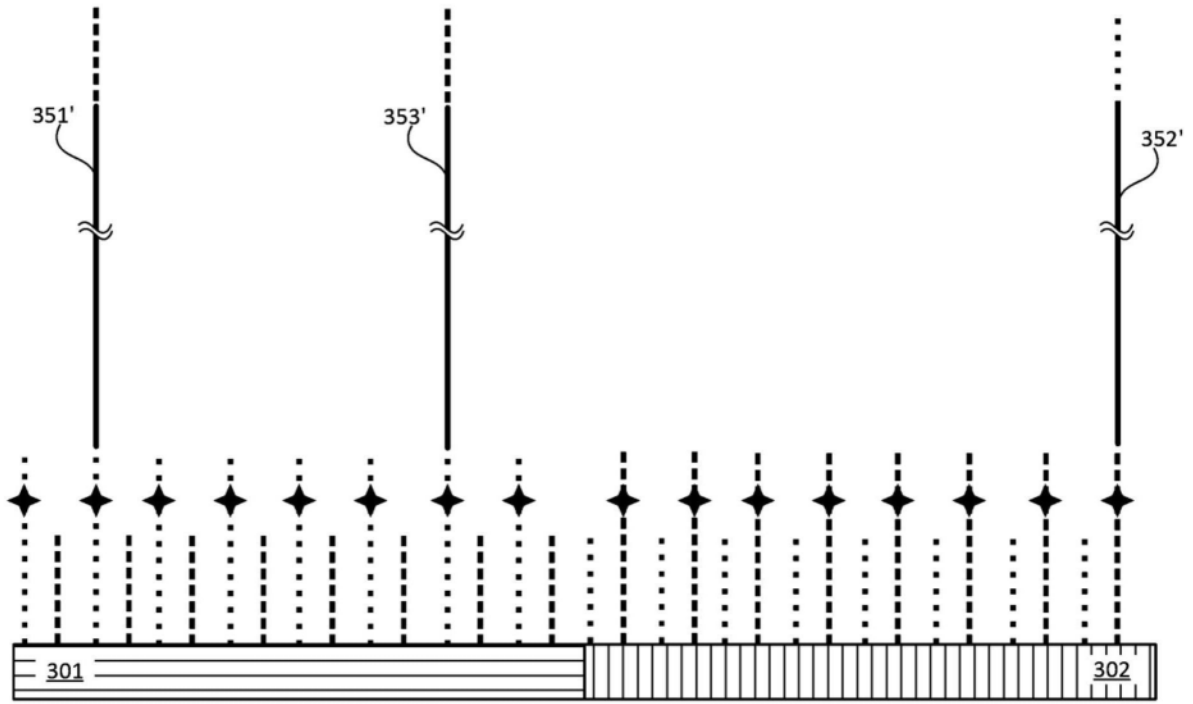


图3D

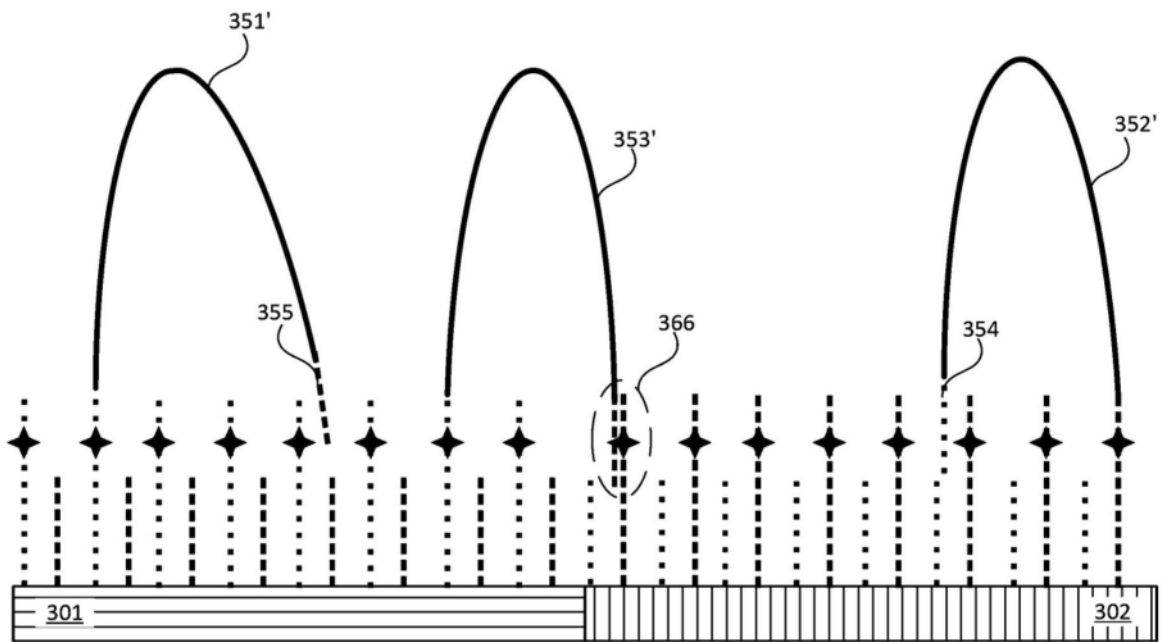


图3E

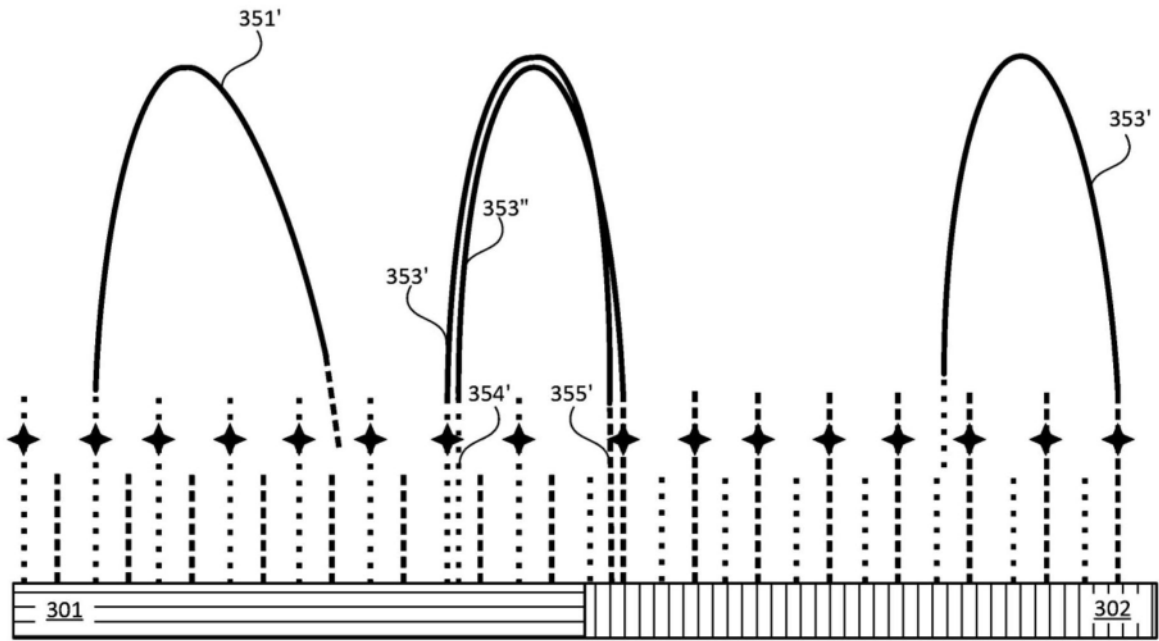


图3F

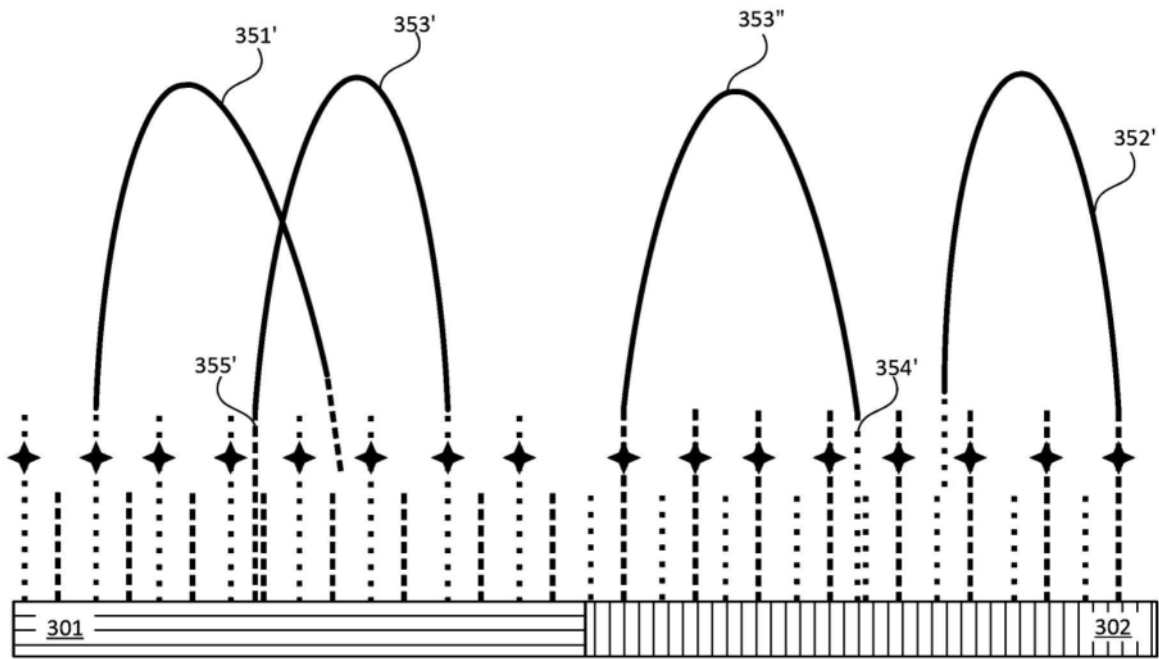


图3G

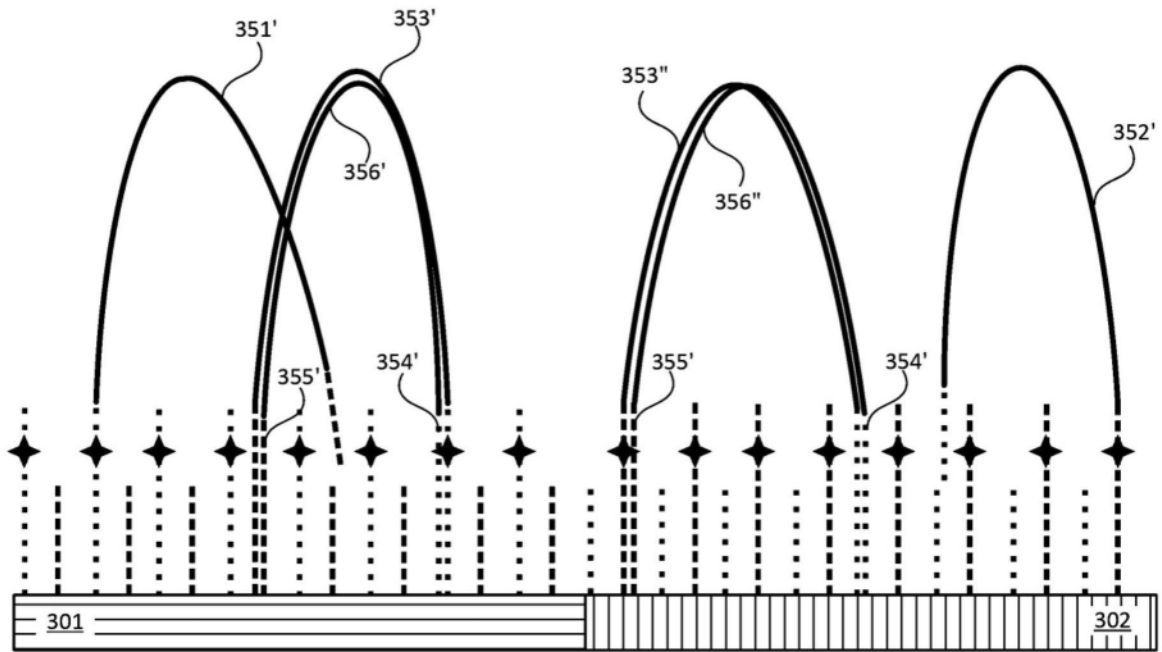


图3H

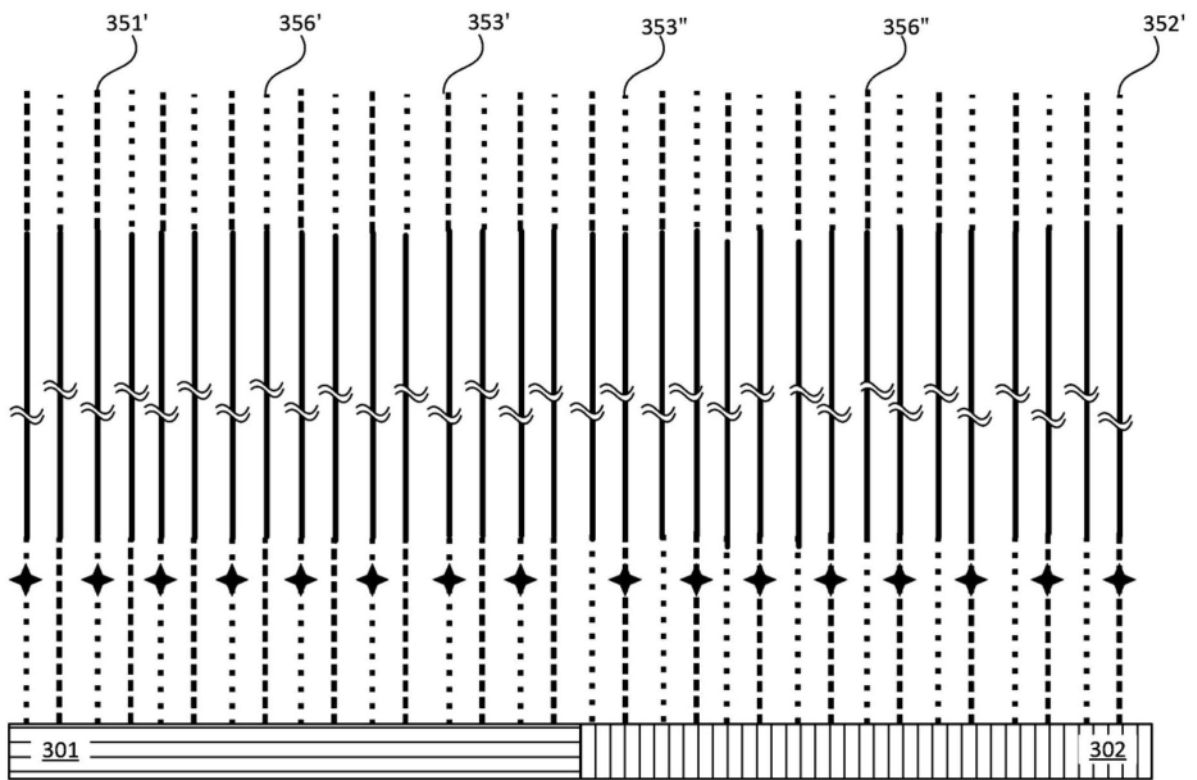


图3I

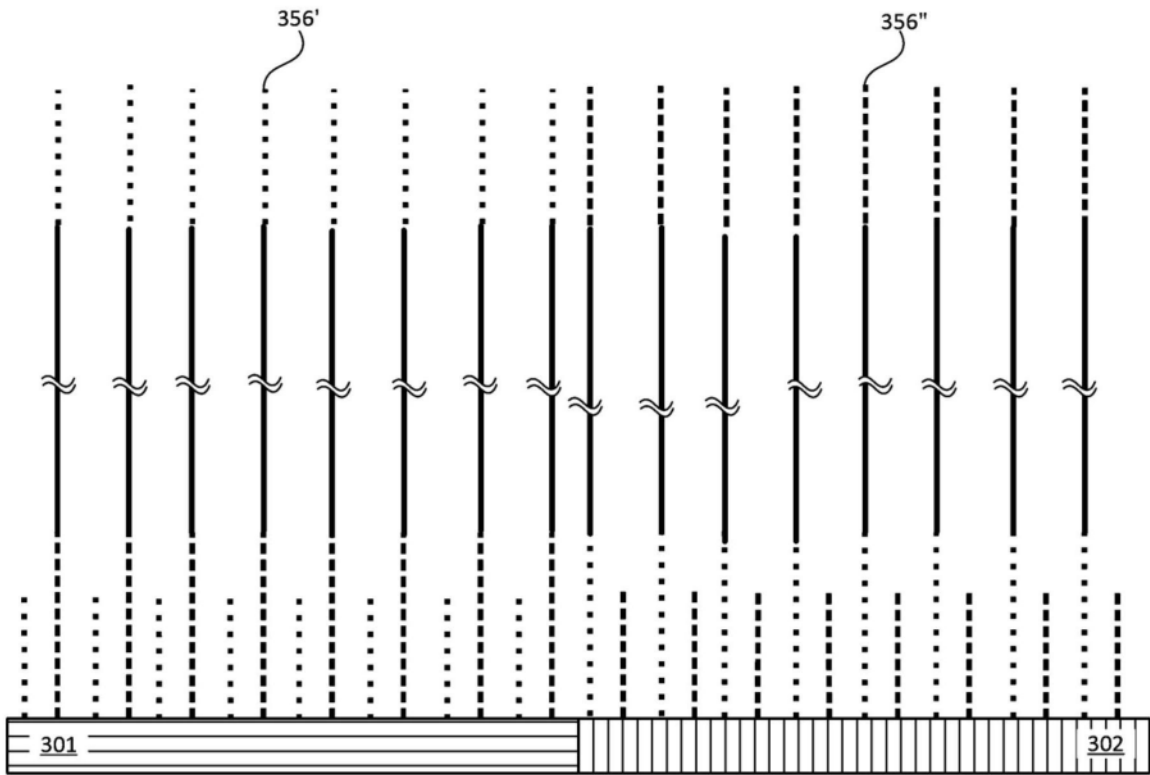


图3J

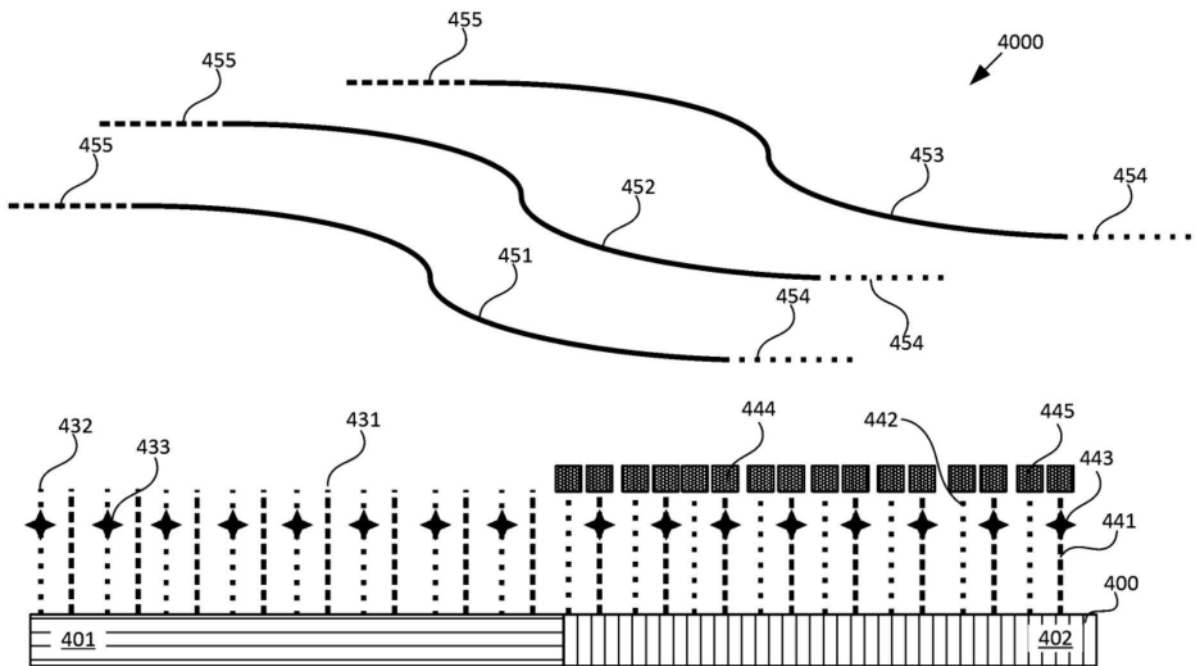


图4A

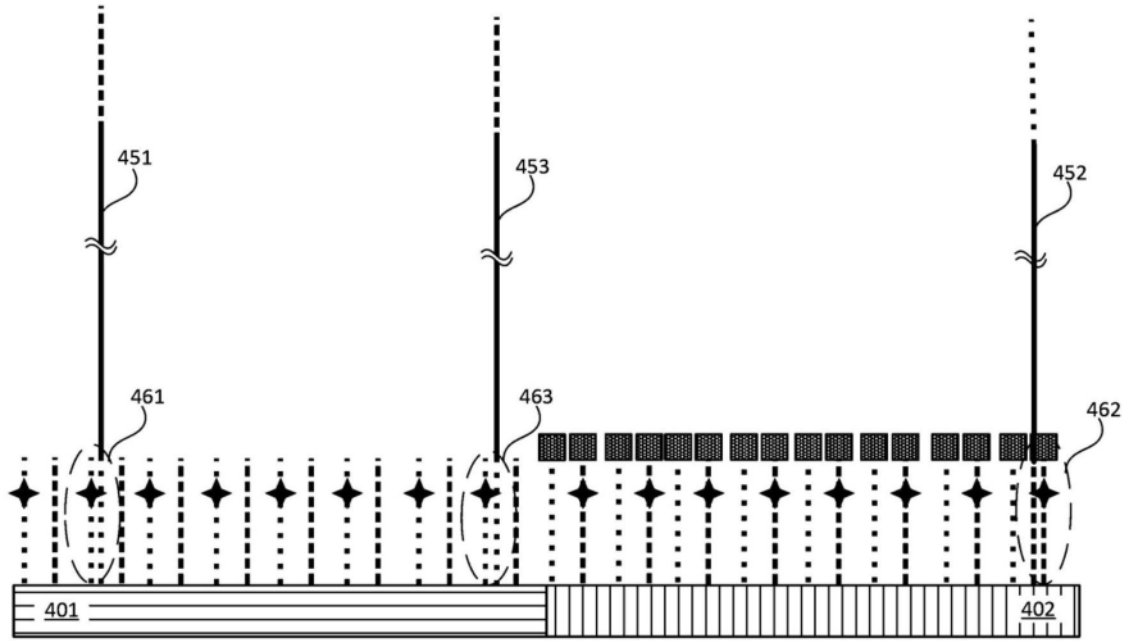


图4B

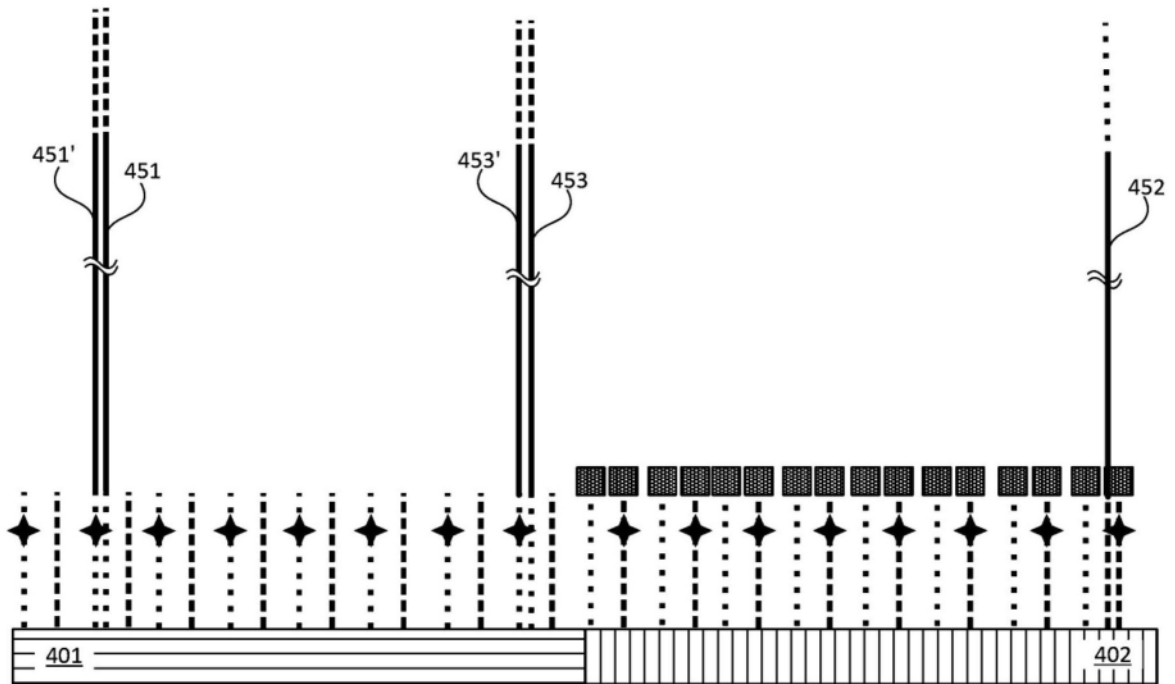


图4C

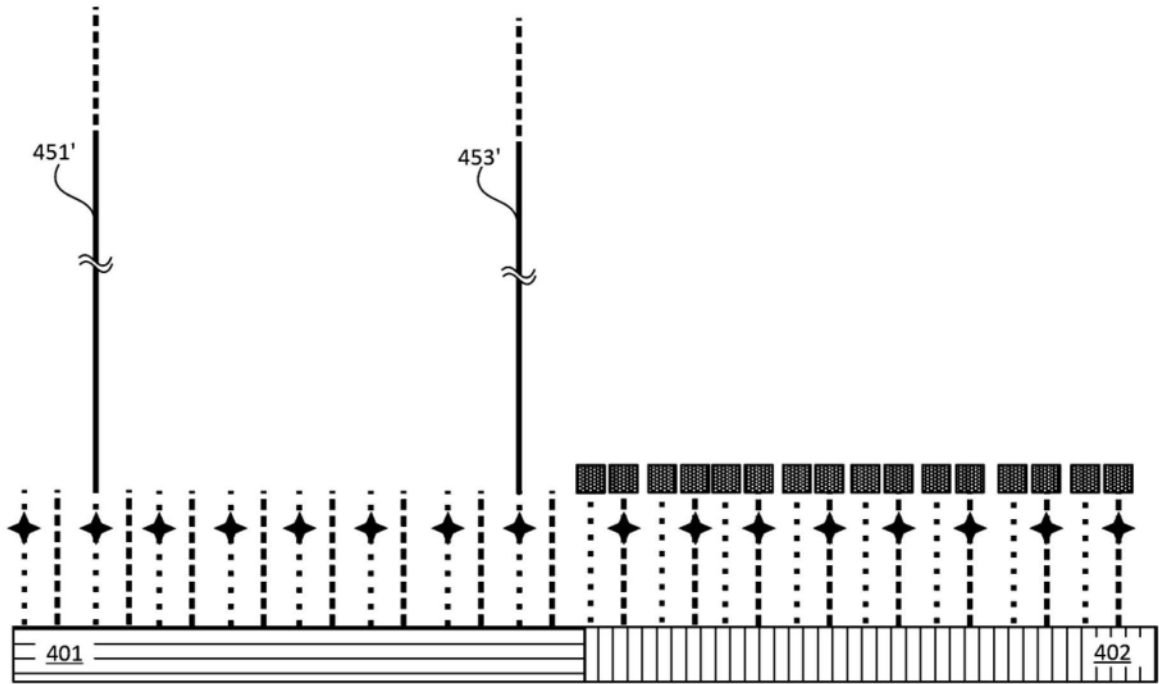


图4D

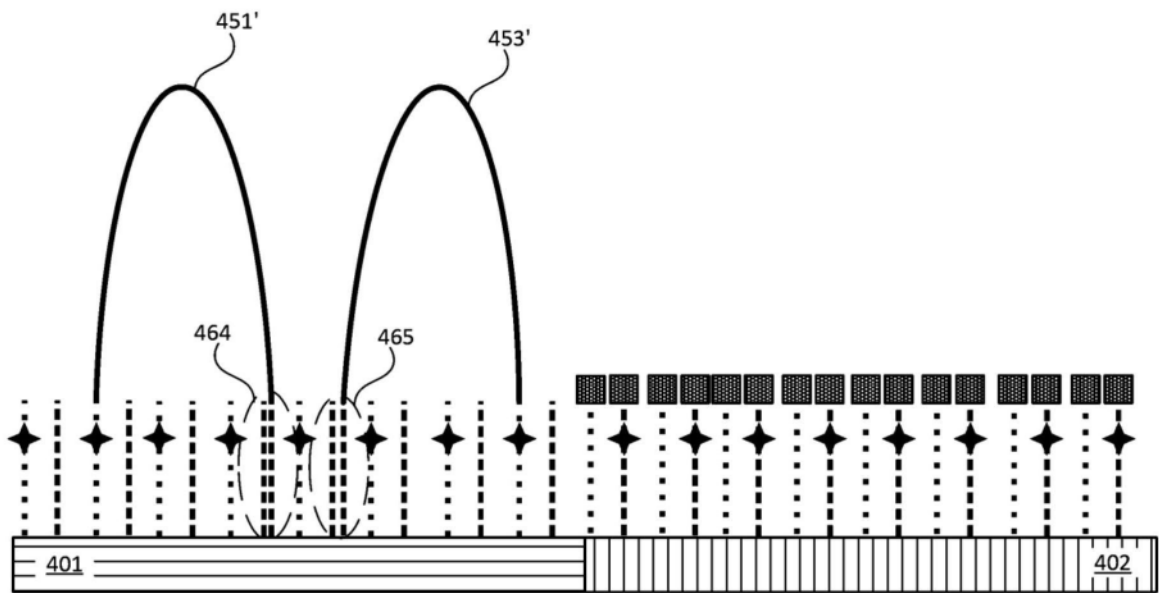


图4E

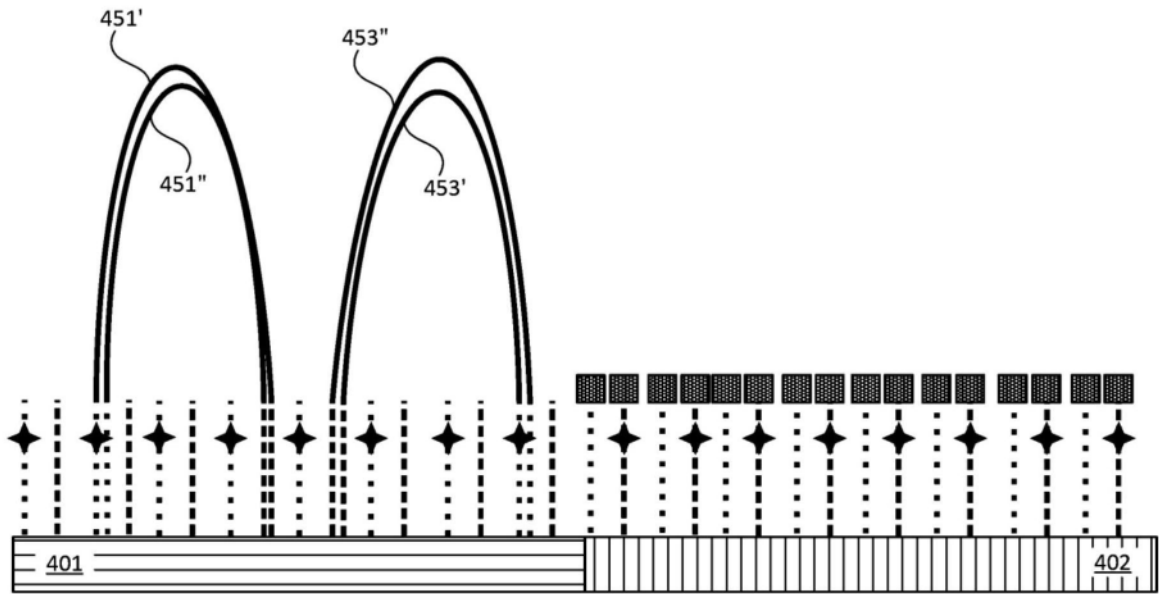


图4F

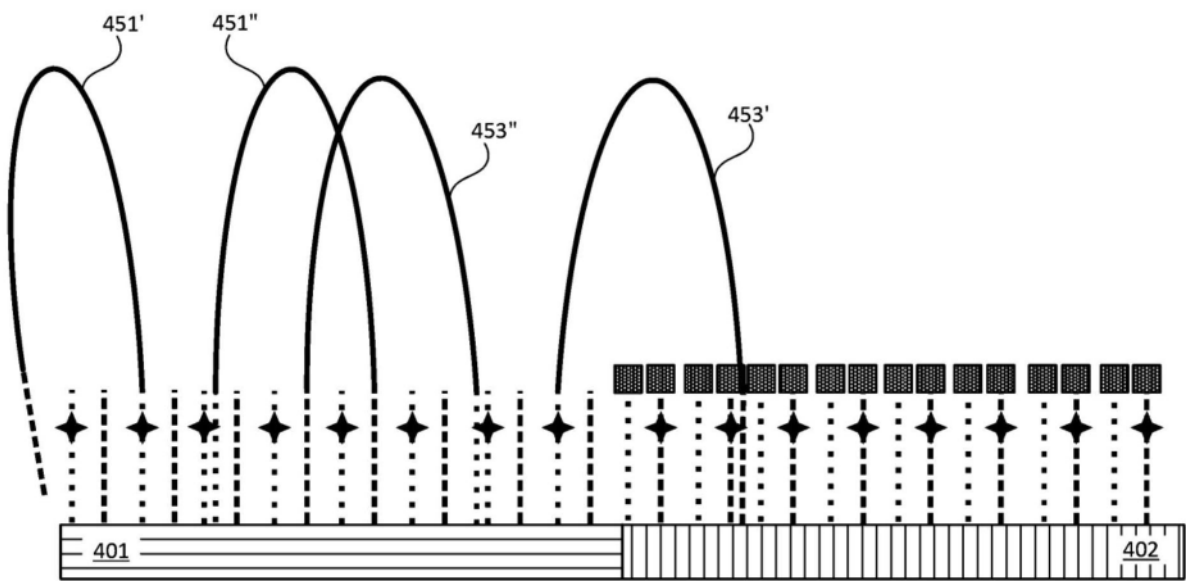


图4G

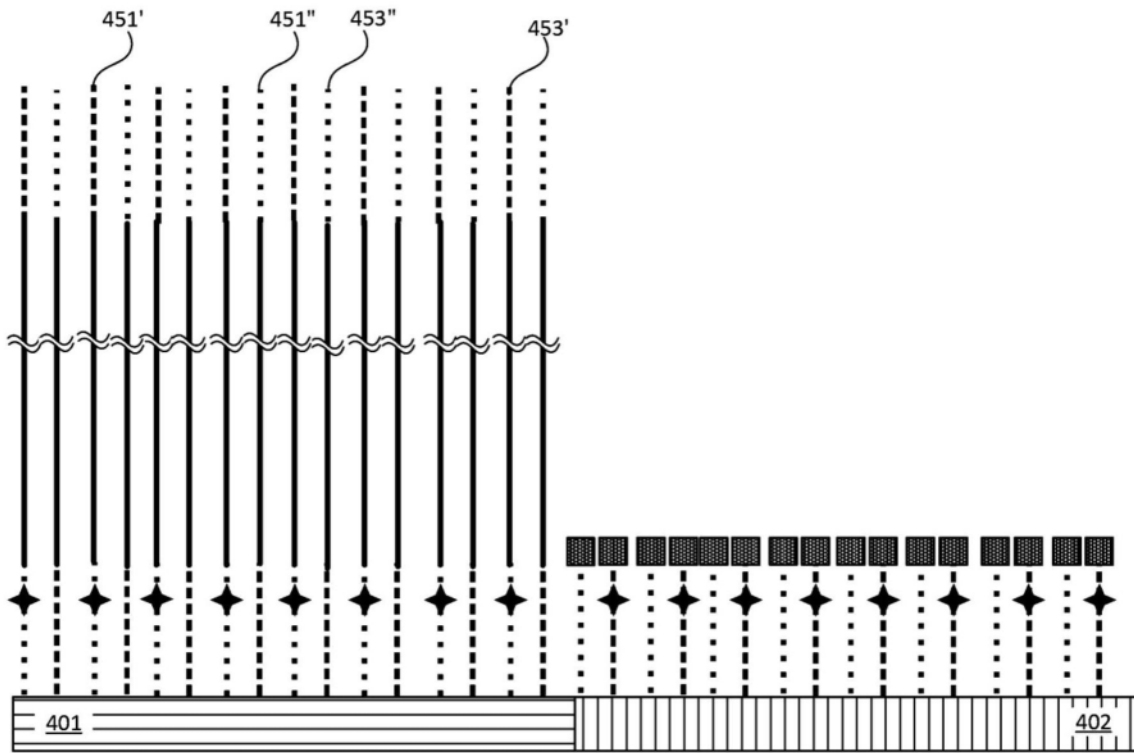


图4H

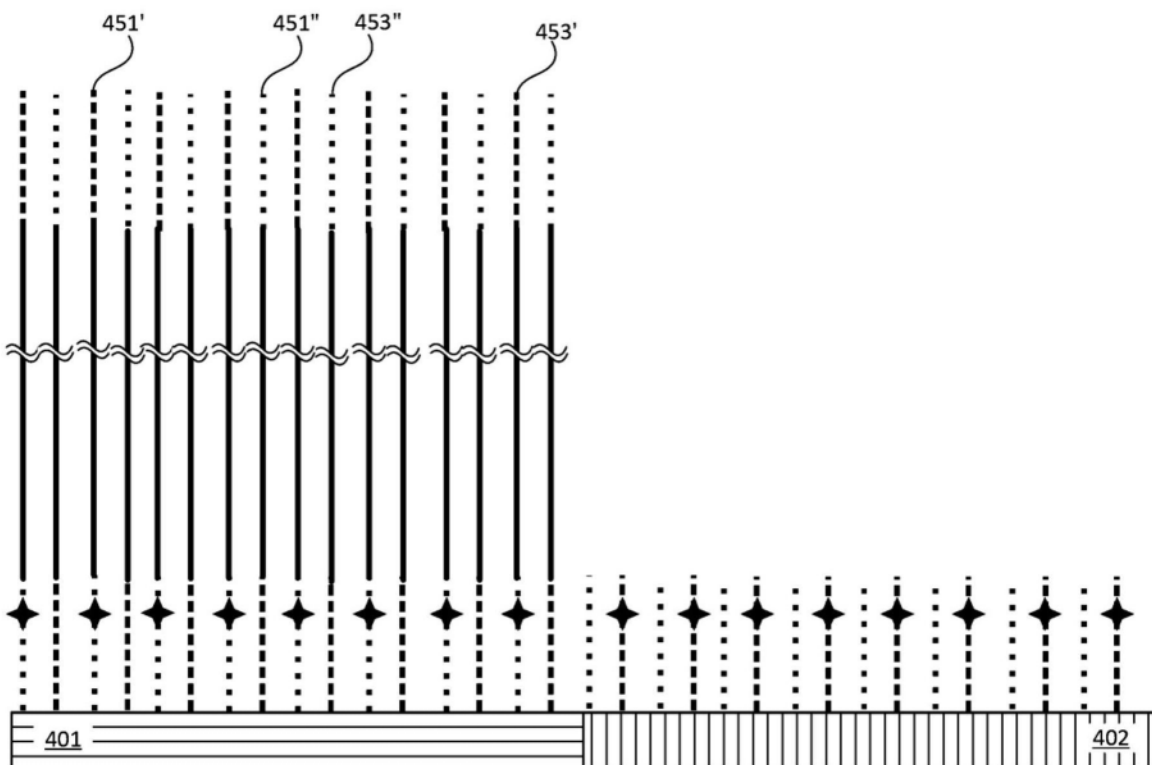


图4I

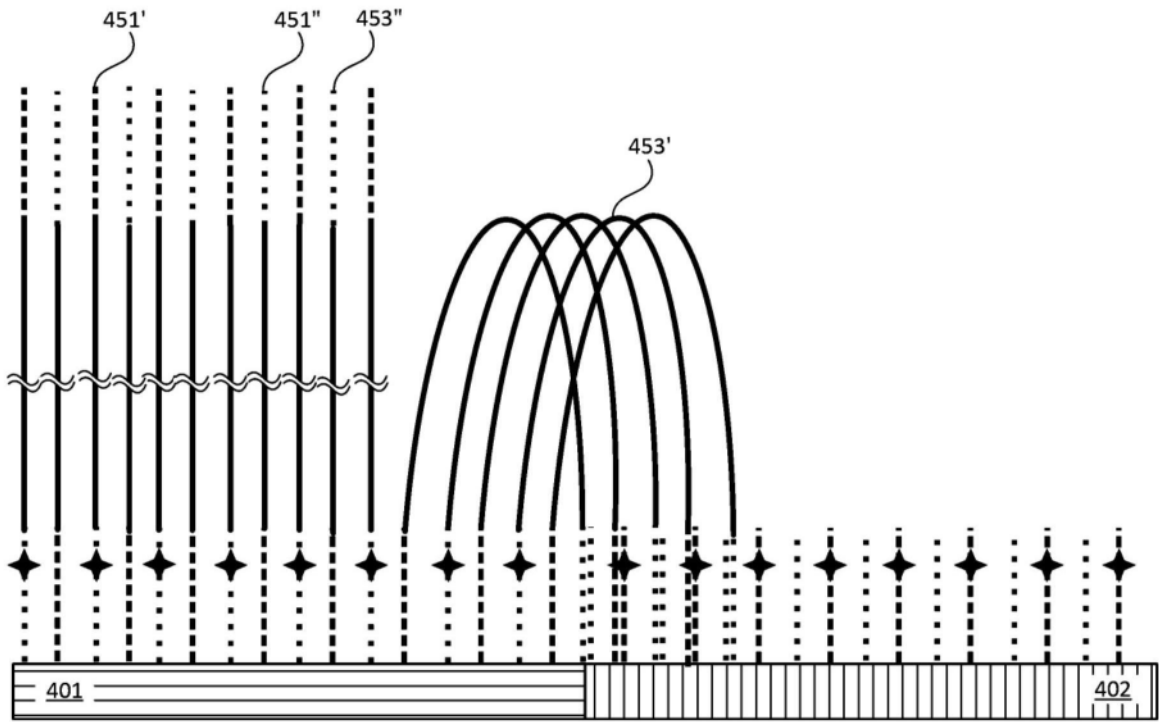


图4J

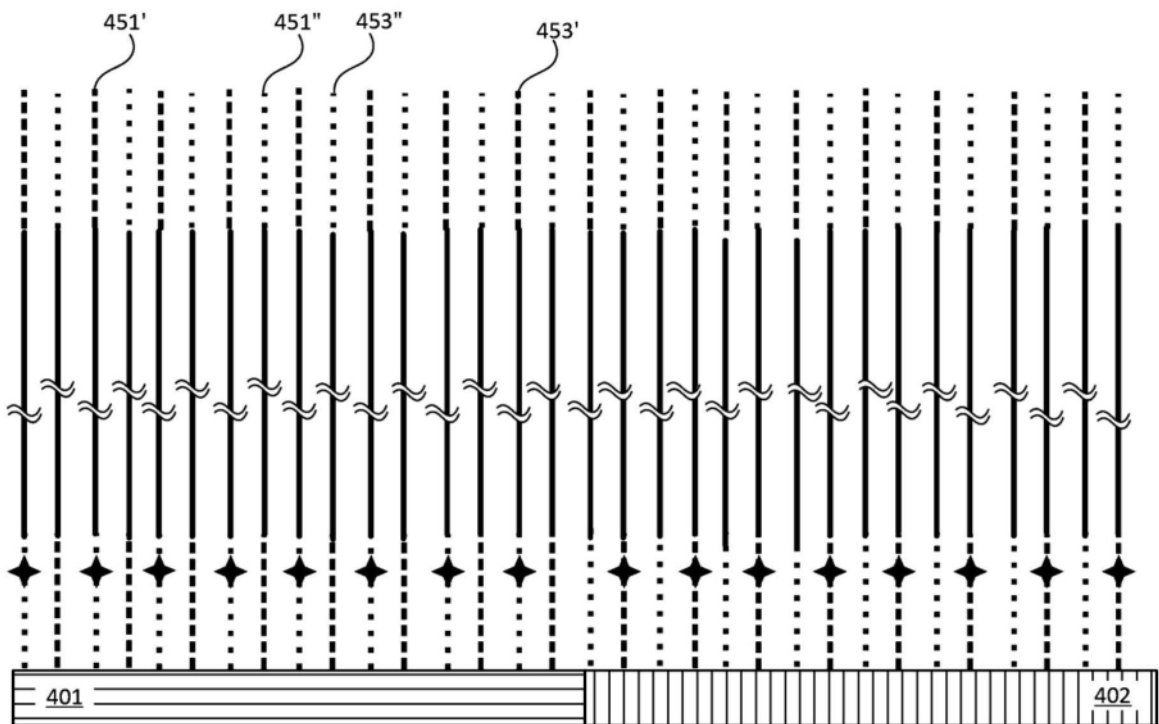


图4K

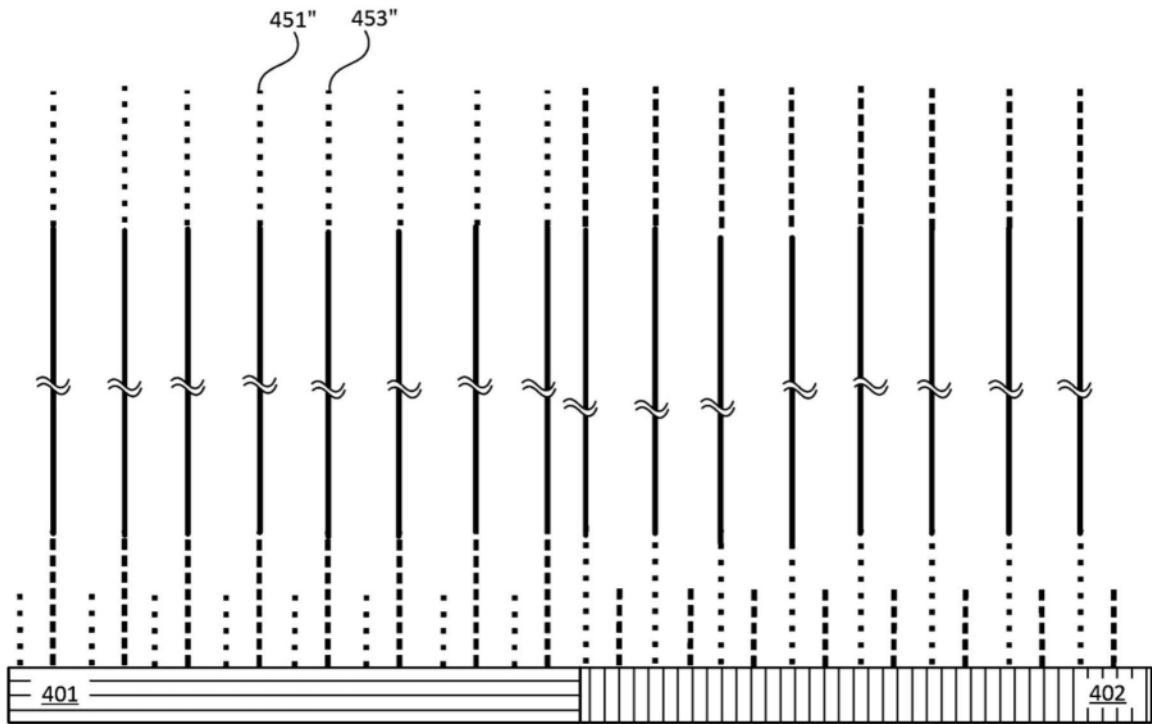


图4L

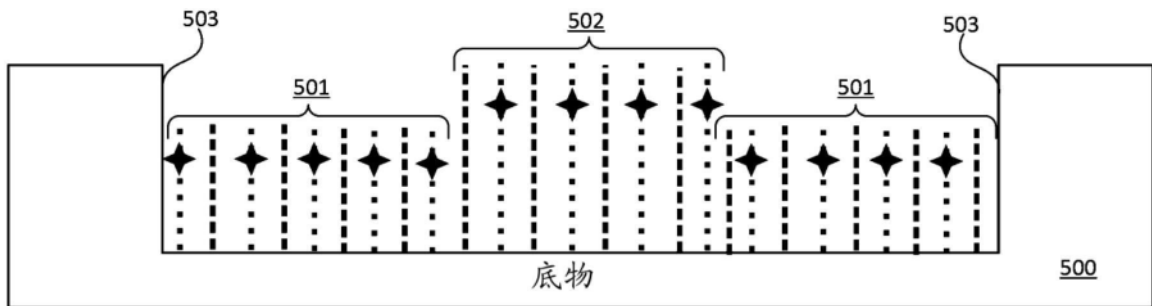


图5A

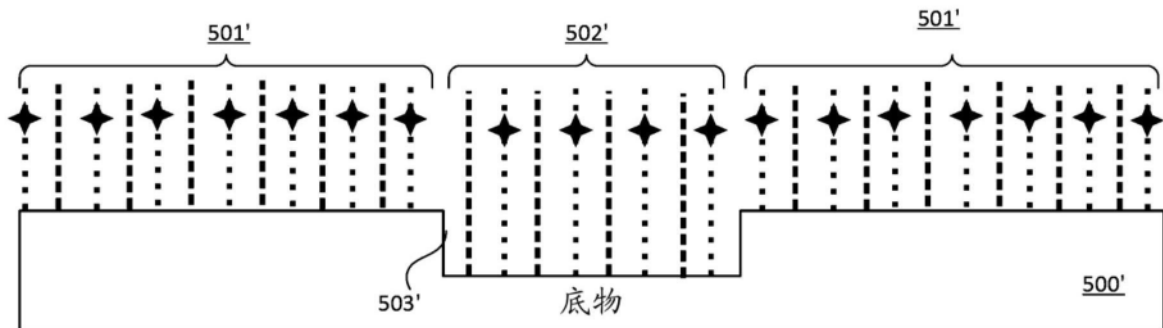


图5B

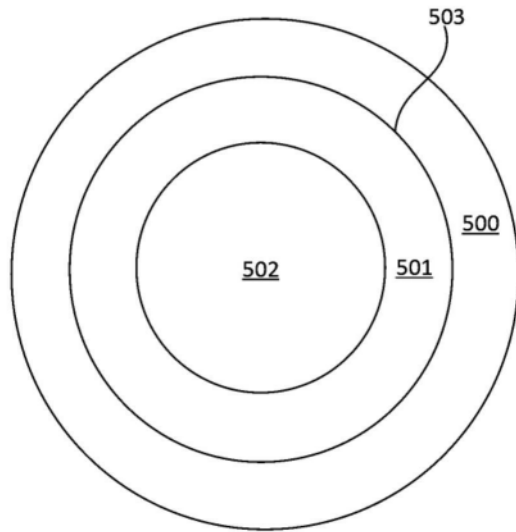


图5C

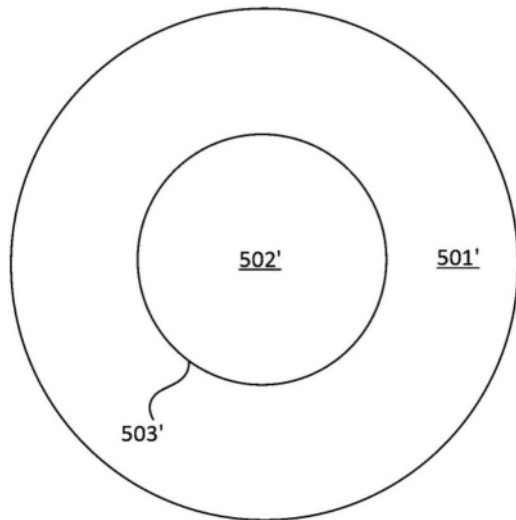


图5D

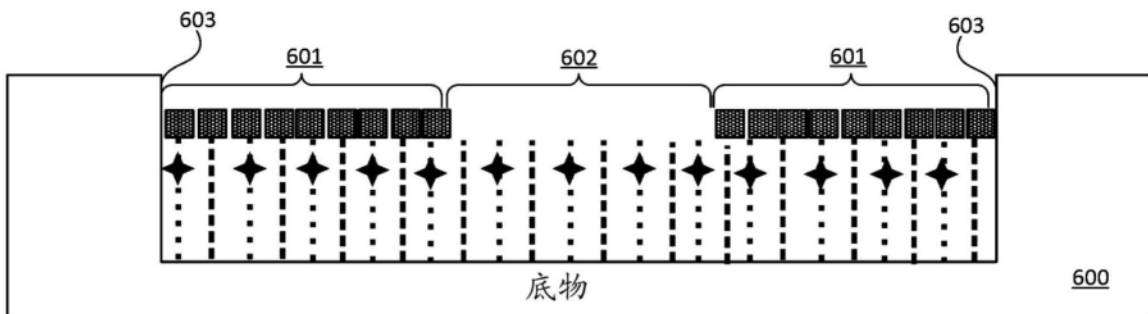


图6A

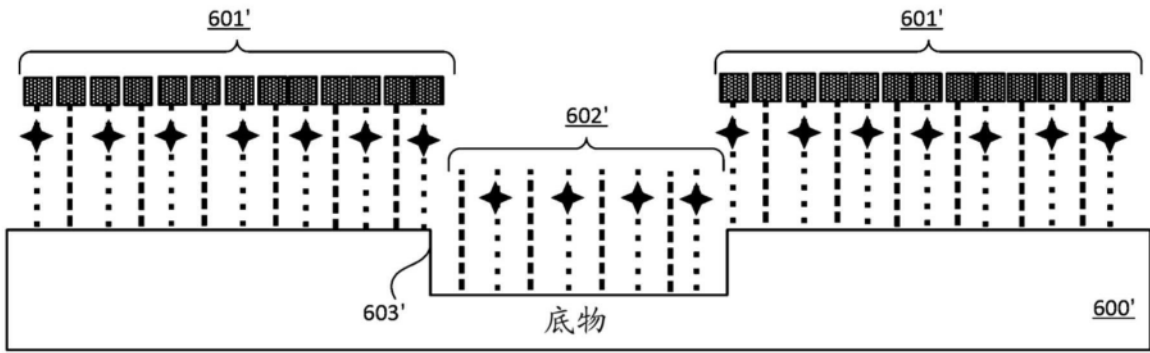


图6B

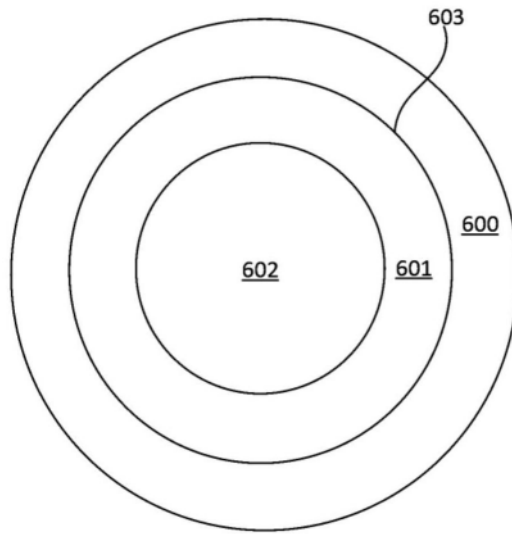


图6C

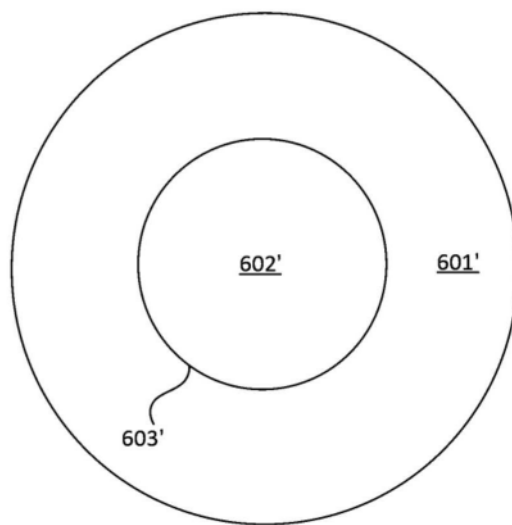


图6D

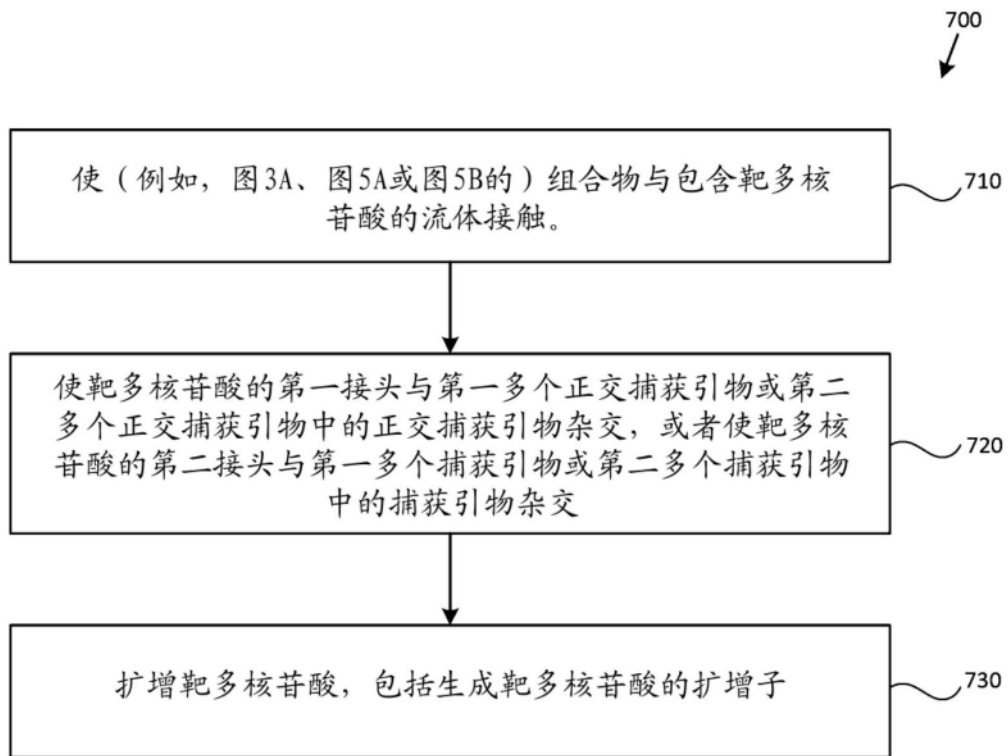


图7

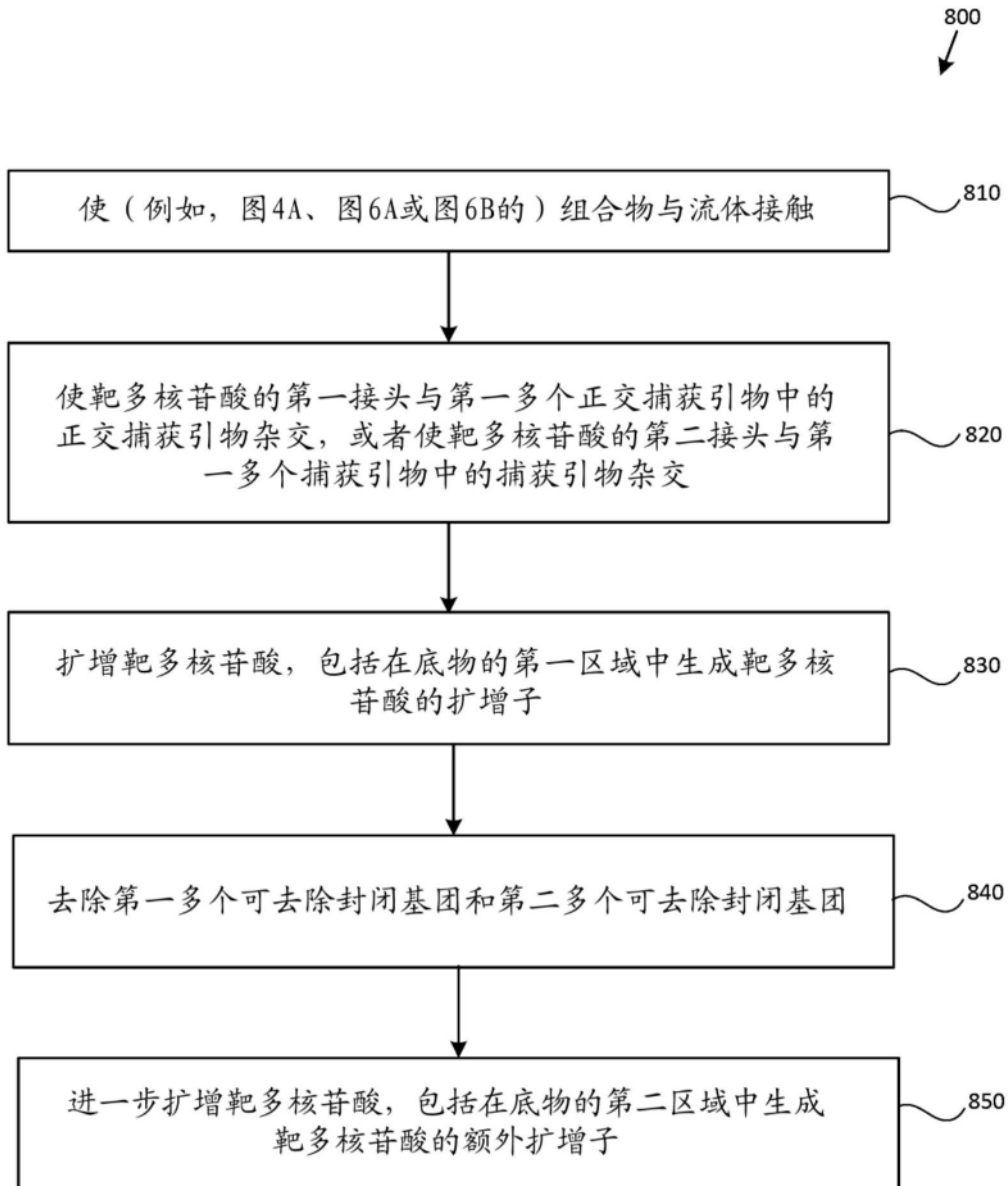


图8

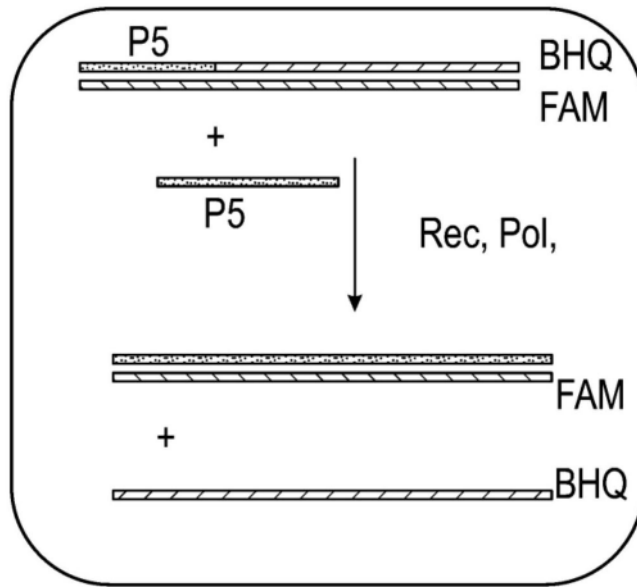


图9

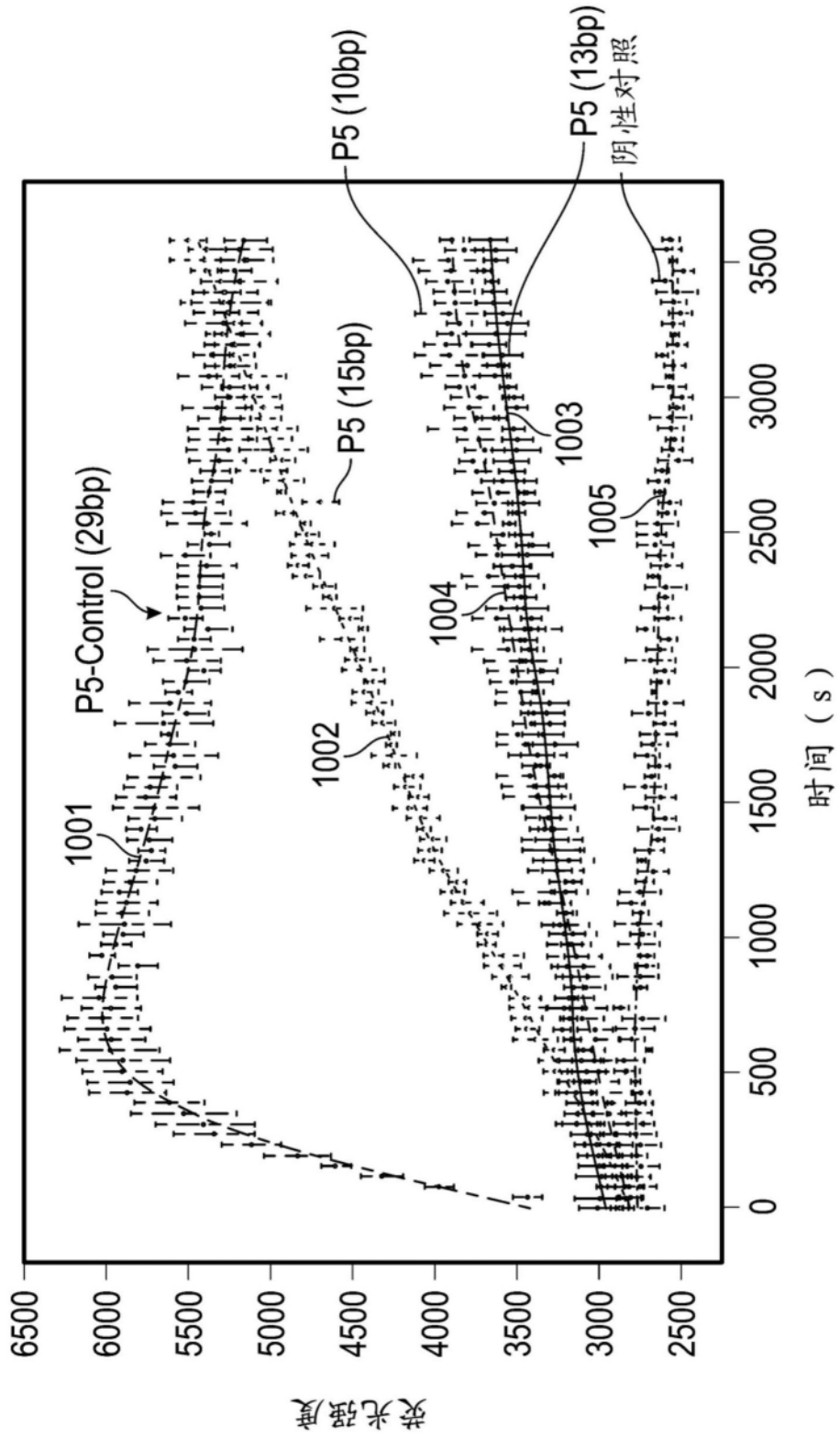


图10