



(12) **Patentschrift**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2020 002 516.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2020/034409**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2020/243017**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.05.2020**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **03.12.2020**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: **24.03.2022**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **13.03.2025**

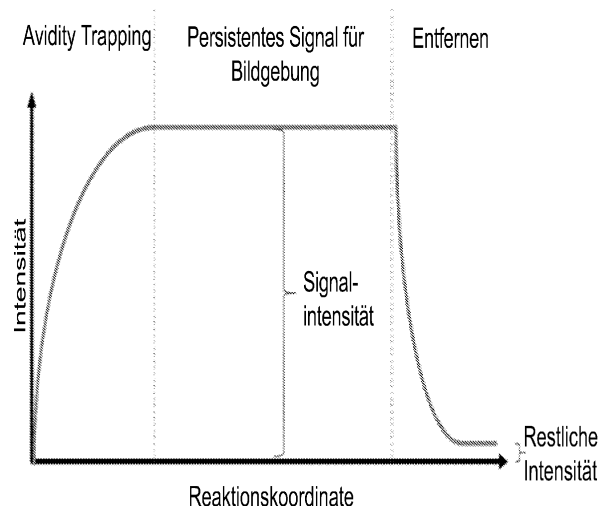
(51) Int Cl.: **C12Q 1/6869** (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
G01N 33/533 (2006.01)

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität: 62/852,87624.05.2019US 62/897,17206.09.2019US 16/579,79423.09.2019US	(72) Erfinder: Arslan, Sinan, San Diego, CA, US; He, Molly, San Diego, CA, US; Kellinger, Matthew, San Diego, CA, US; Levieux, Jake, San Diego, CA, US; Previte, Michael, San Diego, CA, US; Zhao, Junhua, San Diego, CA, US; Zhang, Su, San Diego, CA, US; Lopez, Tyler, San Diego, CA, US
(62) Teilung in: 11 2020 007 924.4	
(73) Patentinhaber: Element Biosciences, Inc., San Diego, CA, US	(56) Ermittelter Stand der Technik: US2009 / 0 186 343A1 WO2005/ 111 240A2 WO2009/ 073 201A2
(74) Vertreter: BARDEHLE PAGENBERG Partnerschaft mbB Patentanwälte, Rechtsanwälte, 81675 München, DE	

(54) Bezeichnung: **MULTIVALENTE BINDUNGSZUSAMMENSETZUNG ZUR NUKLEINSÄUREANALYSE**

(57) Zusammenfassung: Es werden multivalente Bindungszusammensetzungen beschrieben, die ein Partikel-Nukleotid-Konjugat mit einer Vielzahl von Kopien eines Nukleotids, das an das Partikel gebunden ist, einschließen. Die multivalenten Bindungszusammensetzungen ermöglichen, nachweisbare Signale für aktive Regionen biochemischer Wechselwirkung zu lokalisieren, z. B. Stellen einer Protein-Protein-Wechselwirkung, einer Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkung, einer Nukleinsäure-Hybridisierung oder einer enzymatischen Reaktion, und sie können verwendet werden, um Stellen des Baseneinbaus bei der Verlängerung von Nukleinsäureketten während Polymerasereaktionen zu identifizieren und um eine verbesserte Basendiskriminierung für Sequenzierungs- und Array-basierte Anwendungen bereitzustellen.



Beschreibung**QUERVERWEIS**

[0001] Diese Anmeldung ist eine Teilfortsetzung der am 23. September 2019 eingereichten US-Patentanmeldung Nr. 16/579.794 und beansprucht den Vorteil der am 6. September 2019 eingereichten US-Patentanmeldung Nr. 62/897.172 und der am 24. Mai 2019 eingereichten US-Patentanmeldung Nr. 62/852.876, von denen jede durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit hierin eingeschlossen ist.

GEBIET DER ERFINDUNG

[0002] Die vorliegende Offenbarung bezieht sich allgemein auf multivalente Bindungszusammensetzungen und ihre Verwendung bei der Analyse von Nukleinsäuremolekülen. Insbesondere betrifft der Erfindungsgedanke eine multivalente Bindungszusammensetzung mit mehreren Kopien eines Nukleotids, das an einen Partikel- oder Polymerkern gebunden ist, was die lokale Konzentration des Nukleotids effektiv erhöht und die Bindungssignale verstärkt. Die multivalente Bindungszusammensetzung kann beispielsweise auf dem Gebiet der Sequenzierung und Biosensor-Mikroarrays eingesetzt werden.

HINTERGRUND

[0003] Die Nukleinsäuresequenzierung kann verwendet werden, um Informationen in einer großen Vielfalt von biomedizinischen Zusammenhängen zu erhalten, einschließlich Diagnostik, Prognose, Biotechnologie und forensischer Biologie. Es wurden verschiedene Sequenzierungsverfahren entwickelt, darunter die Maxam-Gilbert-Sequenzierung und das Kettenabbruchverfahren oder die De-novo-Sequenzierungsverfahren einschließlich Schrotschuss-Sequenzierung und Bridge-PCR oder Methoden der nächsten Generation wie Polony-Sequenzierung, 454-Pyrosequenzierung, Illumina-Sequenzierung, SOLiD-Sequenzierung, Ionen-Halbleitersequenzierung, HeliScope-Einzelmolekül-Sequenzierung, SMRT®-Sequenzierung und andere. Trotz der Fortschritte bei der DNA-Sequenzierung bleiben viele Herausforderungen auf dem Weg zu einer kostengünstigen Sequenzierung mit hohem Durchsatz bestehen. Die vorliegende Offenbarung stellt neue Lösungen und Ansätze zur Behebung vieler der Mängel bestehender Technologien bereit.

ZUSAMMENFASSUNG

[0004] Hierin offenbart sind Verfahren zum Bestimmen einer Identität eines Nukleotids in einer Zielnukleinsäuresequenz, umfassend: a. Bereitstellen einer Zusammensetzung, umfassend: i. zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz; ii. zwei oder mehr Primer-Nukleinsäuremoleküle, die zu

einer oder mehreren Regionen der Zielnukleinsäuresequenz komplementär sind; und iii. zwei oder mehr Polymerasemoleküle; b. Inkontaktbringen der Zusammensetzung mit einem Polymer-Nukleotid-Konjugat unter Bedingungen, die ausreichen, um die Bildung eines multivalenten Bindungskomplexes zwischen dem Polymer-Nukleotid-Konjugat und den zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz in der Zusammensetzung von (a) zu ermöglichen, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat zwei oder mehr Kopien eines Nukleotidrests und gegebenenfalls eine oder mehrere nachweisbare Markierungen umfasst; und c. Nachweisen des multivalenten Bindungskomplexes, wodurch die Identität des Nukleotids in der Zielnukleinsäuresequenz bestimmt wird. In einigen Ausführungsformen ist die Zielnukleinsäuresequenz DNA. In einigen Ausführungsformen wird der Nachweis des multivalenten Bindungskomplexes in Abwesenheit von ungebundenen oder in Lösung befindlichen Polymer-Nukleotid-Konjugaten durchgeführt. In einigen Ausführungsformen wurde die Zielnukleinsäuresequenz repliziert oder amplifiziert oder wurde durch Replikation oder Amplifikation hergestellt. In einigen Ausführungsformen sind die eine oder die mehreren nachweisbaren Markierungen Fluoreszenzmarkierungen. In einigen Ausführungsformen umfasst das Nachweisen des multivalenten Komplexes eine Fluoreszenzmessung. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen die Verwendung einer Art von Polymer-Nukleotid-Konjugat. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen die Verwendung von zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten. In einigen Ausführungsformen umfasst jede Art der zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotidrest. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen die Verwendung von drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten, und wobei jede Art der drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotidrest umfasst. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat einen blockierten Nukleotidrest. In einigen Ausführungsformen ist das blockierte Nukleotid ein 3'-O-Azidomethyl-Nukleotid, ein 3' -O-Methyl-Nukleotid oder ein 3'-O-Alkylhydroxylamin-Nukleotid. In einigen Ausführungsformen erfolgt das Inkontaktbringen in Gegenwart eines Ions, das den multivalenten Bindungskomplex stabilisiert. In einigen Ausführungsformen erfolgt das Inkontaktbringen in Gegenwart von Strontiumionen, Magnesiumionen, Calciumionen oder einer beliebigen Kombination davon. In einigen Ausführungsformen sind die Polymerasemoleküle katalytisch inaktiv. In einigen Ausführungsformen wurden die Polymerasemoleküle durch Mutation oder chemische Modifikation katalytisch inaktiv gemacht. In einigen Ausführungsformen wurden die Polymerasemoleküle durch die Abwesenheit eines notwendigen Ions oder Cofaktors katalytisch inaktiv gemacht. In einigen Ausführungsformen sind die Polymerasemo-

leküle katalytisch aktiv. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat keinen blockierten Nukleotidrest. In einigen Ausführungsformen weist der multivalente Bindungskomplex eine Persistenzzeit von mehr als 2 Sekunden auf. In einigen Ausführungsformen kann das Verfahren bei einer Temperatur innerhalb eines Bereichs von 25 °C bis 62 °C durchgeführt werden. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat ferner eine oder mehrere Fluoreszenzmarkierungen und die zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz sind auf einer Oberfläche abgeschieden, daran befestigt oder daran hybridisiert, wobei ein Fluoreszenzbild des multivalenten Bindungskomplexes auf der Oberfläche ein Kontrast-Rausch-Verhältnis im Nachweis-schritt von mehr als 20 aufweist. In einigen Ausführungsformen wird die Zusammensetzung von (a) unter Verwendung eines Puffers, der ein polares aprotisches Lösungsmittel enthält, auf einer Oberfläche abgeschieden. In einigen Ausführungsformen wird das Inkontaktbringen unter einer Bedingung durchgeführt, die den multivalenten Bindungskomplex stabilisiert, wenn der Nukleotidrest komplementär zu einer nächsten Base der Zielnukleinsäuresequenz ist, und den multivalenten Bindungskomplex destabilisiert, wenn der Nukleotidrest nicht komplementär zu der nächsten Base der Zielnukleinsäuresequenz ist. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat ein Polymer mit einer Vielzahl von Verzweigungen, und die zwei oder mehr Nukleotidreste sind an die Verzweigungen gebunden. In einigen Ausführungsformen weist das Polymer eine Stern-, Kamm-, vernetzte, Flaschenbürsten- oder Dendrimer-Konfiguration auf. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat eine oder mehrere Bindungsgruppen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Avidin, einem Biotin, einem Affinitäts-Tag und Kombinationen davon. In einigen Ausführungsformen umfasst das Verfahren ferner einen Dissoziationsschritt, der den multivalenten Bindungskomplex destabilisiert, der zwischen der Zusammensetzung von (a) und dem Polymer-Nukleotid-Konjugat gebildet wird, wobei der Dissoziationsschritt die Entfernung des Polymer-Nukleotid-Konjugats ermöglicht. In einigen Ausführungsformen umfasst das Verfahren ferner einen Verlängerungsschritt, um ein Nukleotid, das zu einer nächsten Base der Zielnukleinsäuresequenz komplementär ist, in die zwei oder mehr Primer-Nukleinsäuremoleküle einzubauen. In einigen Ausführungsformen erfolgt der Verlängerungsschritt gleichzeitig mit oder nach dem Dissoziationsschritt.

[0005] Hierin offenbart sind Verfahren zum Bestimmen einer Identität eines Nukleotids in einer Zielnukleinsäuresequenz, umfassend: a. Bereitstellen einer Zusammensetzung, umfassend: i. zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz; ii. zwei

oder mehr Primer-Nukleinsäuremoleküle, die zu einer oder mehreren Regionen der Zielnukleinsäuresequenz komplementär sind; und iii. zwei oder mehr Polymerasemoleküle; b. Inkontaktbringen der Zusammensetzung mit einem Polymer-Nukleotid-Konjugat unter Bedingungen, die ausreichen, um die Bildung eines multivalenten Komplexes zwischen dem Polymer-Nukleotid-Konjugat und den zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz in der Zusammensetzung von (a) zu ermöglichen, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat zwei oder mehr Kopien eines reversibel terminierten Nukleotidrests und gegebenenfalls eine oder mehrere spaltbare nachweisbare Markierungen umfasst; und c. Nachweisen des multivalenten Komplexes, wodurch die Identität des Nukleotids in der Zielnukleinsäuresequenz bestimmt wird. In einigen Ausführungsformen ist die Zielnukleinsäuresequenz DNA. In einigen Ausführungsformen umfasst das Verfahren ferner das Inkontaktbringen der Zusammensetzung von (a) mit reversibel terminierten Nukleotiden oder Polymer-Nukleotid-Konjugaten, die zwei oder mehr Kopien eines reversibel terminierten Nukleotids nach dem Nachweis des multivalenten Bindungskomplexes umfassen. In einigen Ausführungsformen wurde die Zielnukleinsäuresequenz repliziert oder amplifiziert oder wurde durch Replikation oder Amplifikation hergestellt. In einigen Ausführungsformen sind die eine oder die mehreren nachweisbaren Markierungen Fluoreszenzmarkierungen. In einigen Ausführungsformen umfasst das Nachweisen des multivalenten Komplexes eine Fluoreszenzmessung. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen die Verwendung einer Art von Polymer-Nukleotid-Konjugat. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen die Verwendung von zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten. In einigen Ausführungsformen umfasst jede Art der zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotidrest. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen die Verwendung von drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten, und wobei jede Art der drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotidrest umfasst. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat einen blockierten Nukleotidrest. In einigen Ausführungsformen ist das blockierte Nukleotid ein 3'-O-Azidomethyl, 3'-O-Methyl oder 3'-O-Alkylhydroxylamin. In einigen Ausführungsformen erfolgt das Inkontaktbringen in Gegenwart eines Ions, das den multivalenten Bindungskomplex stabilisiert. In einigen Ausführungsformen sind die Polymerasemoleküle katalytisch inaktiv. In einigen Ausführungsformen wurden die Polymerasemoleküle durch Mutation oder chemische Modifikation katalytisch inaktiv gemacht. In einigen Ausführungsformen sind die Polymerasemoleküle katalytisch aktiv. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat keinen blockierten Nukleotidrest. In einigen

Ausführungsformen kann das Verfahren bei einer Temperatur innerhalb eines Bereichs von 25 °C bis 80 °C durchgeführt werden. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat ferner eine oder mehrere Fluoreszenzmarkierungen und die zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz sind auf einer Oberfläche abgeschieden, daran befestigt oder daran hybridisiert, wobei ein Fluoreszenzbild des multivalenten Bindungskomplexes auf der Oberfläche ein Kontrast-Rausch-Verhältnis im Nachweisschritt von mehr als 20 aufweist.

[0006] Ebenfalls hierin offenbart sind Systeme, umfassend: a) einen oder mehrere Computerprozessoren, die einzeln oder gemeinsam programmiert sind, um ein Verfahren zu implementieren, das Folgendes umfasst: i) Inkontaktbringen eines Substrats, das mehrere Kopien einer Zielnukleinsäuresequenz umfasst, die an eine Oberfläche des Substrats gebunden ist, mit einem Reagens, das eine Polymerase und eine oder mehrere Primer-Nukleinsäuresequenzen umfasst, die komplementär zu einer oder mehreren Regionen der Zielnukleinsäuresequenz sind, um eine geprimte Zielnukleinsäuresequenz zu bilden; ii) Inkontaktbringen der Substratoberfläche mit einem Reagens, das ein Polymer-Nukleotid-Konjugat umfasst, unter Bedingungen, die ausreichen, um zu ermöglichen, dass ein multivalenter Bindungskomplex zwischen dem Polymer-Nukleotid-Konjugat und zwei oder mehr Kopien der geprimten Zielnukleinsäuresequenz gebildet wird, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat zwei oder mehr Kopien eines bekannten Nukleotidrests und einer nachweisbaren Markierung umfasst; iii) Erfassen und Verarbeiten eines Bildes der Substratoberfläche, um den multivalenten Bindungskomplex nachzuweisen, wodurch die Identität eines Nukleotids in der Zielnukleinsäuresequenz bestimmt wird. In einigen Ausführungsformen umfasst das System ferner ein Fluidikmodul, das konfiguriert ist, um eine Reihe von Reagenzien in einer festgelegten Reihenfolge und für festgelegte Zeitintervalle an die Substratoberfläche abzugeben. In einigen Ausführungsformen umfasst das System ferner ein Bildgebungsmodul, das konfiguriert ist, um Bilder der Substratoberfläche zu erfassen. In einigen Ausführungsformen werden (ii) und (iii) zwei oder mehr Male wiederholt, wodurch die Identität einer Reihe von zwei oder mehr Nukleotiden in der Zielnukleinsäuresequenz bestimmt wird. In einigen Ausführungsformen umfasst die Reihe von Schritten ferner einen Dissoziationsschritt, der den multivalenten Bindungskomplex destabilisiert, wobei der Dissoziationsschritt die Entfernung des Polymer-Nukleotid-Konjugats ermöglicht. In einigen Ausführungsformen umfasst die Reihe von Schritten ferner einen Verlängerungsschritt, um ein Nukleotid, das zu einer nächsten Base der Zielnukleinsäuresequenz komplementär ist, in die zwei oder mehr Primer-Nukleinsäuremoleküle einzubauen. In einigen Ausführungsformen erfolgt der Verlängerungsschritt gleich-

zeitig mit oder nach dem Dissoziationsschritt. In einigen Ausführungsformen umfasst die nachweisbare Markierung ein Fluorophor und die Bilder umfassen Fluoreszenzbilder. In einigen Ausführungsformen weisen die Fluoreszenzbilder des multivalenten Bindungskomplexes auf der Substratoberfläche ein Kontrast-Rausch-Verhältnis von größer als 20 auf, wenn es sich bei dem Fluorophor um Cyaninfarbstoff 3 (Cy3) handelt und das Bild unter Verwendung eines inversen Fluoreszenzmikroskops aufgenommen wird, das mit einem 20X-Objektiv, NA = 0,75, einem dichroitischen Spiegel, der für Licht von 532 nm optimiert ist, einem Bandpassfilter, der für die Emission von Cyaninfarbstoff 3 optimiert ist, und einer Kamera unter nicht sättigenden Bedingungen ausgerüstet ist, während die Oberfläche in einen Puffer von 25 mM ACES, pH 7,4 eingetaucht ist. In einigen Ausführungsformen ist die Reihe von Schritten in weniger als 60 Minuten abgeschlossen. In einigen Ausführungsformen ist die Reihe von Schritten in weniger als 30 Minuten abgeschlossen. In einigen Ausführungsformen ist die Reihe von Schritten in weniger als 10 Minuten abgeschlossen. In einigen Ausführungsformen ist eine Genauigkeit des Basenaufrufs durch einen Q-Wert von mehr als 25 für mindestens 80 % der bestimmten Nukleotidentitäten gekennzeichnet. In einigen Ausführungsformen ist eine Genauigkeit des Basenaufrufs durch einen Q-Wert von mehr als 30 für mindestens 80 % der bestimmten Nukleotidentitäten gekennzeichnet. In einigen Ausführungsformen ist eine Genauigkeit des Basenaufrufs durch einen Q-Wert von mehr als 40 für mindestens 80 % der bestimmten Nukleotidentitäten gekennzeichnet.

[0007] Hierin offenbart sind Zusammensetzungen, umfassend: a) einen Polymerkern; und b) zwei oder mehr Nukleotid-, Nukleotidanalogen-, Nukleosid- oder Nukleosidanalogen-Einheiten, die an den Polymerkern gebunden sind; wobei die Länge des Linkers von der Nukleotid-, Nukleotidanalogen-, Nukleosid- oder Nukleosidanalogen-Einheit abhängt, die an den Polymerkern gebunden ist. Ebenfalls hierin offenbart sind Zusammensetzungen, umfassend: a) eine Mischung von Polymer-Nukleotid-Konjugaten, wobei jedes Polymer-Nukleotid-Konjugat Folgendes umfasst: i) einen Polymerkern; und ii) zwei oder mehr Nukleotid-, Nukleotidanalogen-, Nukleosid- oder Nukleosidanalogen-Einheiten, die an den Polymerkern gebunden sind, wobei die Länge des Linkers von der Nukleotid-, Nukleotidanalogen-, Nukleosid- oder Nukleosidanalogen-Einheit abhängt, die an den Polymerkern gebunden ist; und wobei das Gemisch Polymer-Nukleotid-Konjugate umfasst, die mindestens zwei verschiedene Arten von gebundenen Nukleotid-, Nukleotidanalogen-, Nukleosid- oder Nukleosidanalogen-Einheiten aufweisen. In einigen Ausführungsformen umfasst der Polymerkern ein Polymer mit einer Vielzahl von Verzweigungen und die zwei oder mehr Nukleotid-, Nukleotida-

analogon-, Nukleosid- oder Nukleosidanalogen-Einheiten sind an die Verzweigungen gebunden. In einigen Ausführungsformen weist das Polymer eine Stern-, Kamm-, vernetzte, Flaschenbürsten- oder Dendrimer-Konfiguration auf. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat eine oder mehrere Bindungsgruppen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einem Avidin, einem Biotin, einem Affinitäts-Tag und Kombinationen davon. In einigen Ausführungsformen umfasst der Polymerkern ein verzweigtes Polyethylenglycol-molekül (PEG). In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat einen blockierten Nukleotidrest. In einigen Ausführungsformen ist das blockierte Nukleotid ein 3'-O-Azidomethyl-Nukleotid, ein 3'-O-Methyl-Nukleotid oder ein 3'-O-Alkylhydroxylamin-Nukleotid. In einigen Ausführungsformen umfasst das Polymer-Nukleotid-Konjugat ferner eine oder mehrere Fluoreszenzmarkierungen.

[0008] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung Verfahren zum Bestimmen der Identität eines Nukleotids in einer Zielnukleinsäure bereit, umfassend die Schritte, ohne Rücksicht auf irgendeine bestimmte Reihenfolge von Vorgängen, 1) Bereitstellen einer Zusammensetzung, umfassend: eine Zielnukleinsäure, umfassend zwei oder mehr Wiederholungen einer identischen Sequenz; zwei oder mehr Primer-Nukleinsäuren, die zu einer oder mehreren Regionen der Zielnukleinsäure komplementär sind; und zwei oder mehr Polymerasemoleküle; 2) Inkontaktbringen der Zusammensetzung mit einer multivalenten Binde- oder Einbauszusammensetzung umfassend ein Polymer-Nukleotid-Konjugat, unter Bedingungen, die ausreichen, um die Bildung eines Bindungs- oder Einbaukomplexes zwischen dem Polymer-Nukleotid-Konjugat und der Zusammensetzung von Schritt (a) zu ermöglichen, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat zwei oder mehr Kopien eines Nukleotids und gegebenenfalls eine oder mehrere nachweisbare Markierungen umfasst; und 3) Nachweisen des Bindungs- oder Einbaukomplexes, wodurch die Identität des Nukleotids in dem Zielnukleinsäurepolymer festgestellt wird. In einigen weiteren Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die Zielnukleinsäure DNA ist, und/oder wobei die Zielnukleinsäure repliziert wurde, wie durch jedes allgemein praktizierte Verfahren der DNA-Replikation oder -Amplifikation, wie Rolling-Circle-Amplifikation, Brückenamplifikation, helikaseabhängige Amplifikation, isotherme Brückenamplifikation, Rolling-Circle-Multiple-Displacement-Amplifikation (RCA/MDA) und/oder Rekombinasebasierte Replikations- oder Amplifikationsverfahren. In einigen weiteren Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die nachweisbare Markierung eine Fluoreszenzmarkierung ist und/oder wobei das Nachweisen des Kom-

plexes eine Fluoreszenzmessung umfasst. In einigen weiteren Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die multivalente Bindungszusammensetzung eine Art von Polymer-Nukleotid-Konjugat umfasst, wobei die multivalente Bindungszusammensetzung zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten umfasst und/oder wobei jede Art der zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotid umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei der Bindungskomplex oder Einbaukomplex ferner ein blockiertes Nukleotid umfasst, insbesondere wobei das blockierte Nukleotid ein 3'-O-Azidomethyl-Nukleotid, ein 3'-O-Alkylhydroxylamin-Nukleotid oder ein 3'-O-Methyl-Nukleotid ist. In einigen weiteren Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Inkontaktbringen in Gegenwart von Strontiumionen, Barium-, Magnesiumionen und/oder Calciumionen erfolgt. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, bei dem das Polymerasemolekül katalytisch inaktiv ist, beispielsweise wenn das Polymerasemolekül durch Mutation, durch chemische Modifikation oder durch die Abwesenheit eines notwendigen Ions oder Cofaktors katalytisch inaktiv gemacht wurde. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung auch das Verfahren bereit, wobei das Polymerasemolekül katalytisch aktiv ist und/oder wobei der Bindungskomplex kein blockiertes Nukleotid umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei der Bindungskomplex eine Persistenzzeit von mehr als 2 Sekunden aufweist und/oder wobei das Verfahren bei einer Temperatur von 15 °C oder mehr, 20 °C oder mehr, 25 °C oder mehr, 35 °C oder mehr, 37 °C oder mehr, 42 °C oder mehr, 55 °C oder mehr, 60 °C oder mehr oder 72 °C oder innerhalb eines durch eine der vorstehenden Angaben definierten Bereichs durchgeführt wird oder werden kann. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei der Bindungskomplex auf einer Oberfläche abgeschieden, daran befestigt oder daran hybridisiert ist, die ein Kontrast-Rausch-Verhältnis im Nachweisschritt von mehr als 20 zeigt. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die Zusammensetzung unter Pufferbedingungen abgeschieden wird, die ein polares aprotisches Lösungsmittel einschließen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Inkontaktbringen unter einer Bedingung durchgeführt wird, die den Bindungskomplex stabilisiert, wenn das Nukleotid zu einer nächsten Base der Zielnukleinsäure komplementär ist, und den Bindungskomplex destabilisiert, wenn das Nukleotid nicht zu der nächsten Base der Zielnukleinsäure komplementär ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende

Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat ein Polymer mit einer Vielzahl von Verzweigungen umfasst und die Vielzahl von Kopien des ersten Nukleotids an die Verzweigungen gebunden sind, insbesondere wobei das erste Polymer eine Stern-, Kamm-, vernetzte, Flaschenbürsten- oder Dendrimer-Konfiguration aufweist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat eine oder mehrere Bindungsgruppen umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Avidin, Biotin, einem Affinitäts-Tag und Kombinationen davon. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, ferner umfassend einen Dissoziationsschritt, der den zwischen der Zusammensetzung von (a) und dem Polymer-Nukleotid-Konjugat gebildeten Bindungskomplex destabilisiert, um das Polymer-Nukleotid-Konjugat zu entfernen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, ferner umfassend einen Verlängerungsschritt, um ein Nukleotid, das zu der nächsten Base der Zielnukleinsäure komplementär ist, in die Primer-Nukleinsäure einzubauen, und wobei der Verlängerungsschritt wahlweise gleichzeitig mit oder nach dem Dissoziationsschritt erfolgt.

[0009] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, die ein verzweigtes Polymer mit zwei oder mehr Verzweigungen und zwei oder mehr Kopien eines Nukleotids umfasst, wobei das Nukleotid an eine erste Vielzahl der Verzweigungen oder Arme gebunden ist und wobei wahlweise eine oder mehrere Wechselwirkungseinheiten an eine zweite Vielzahl der Verzweigungen oder Arme gebunden sind. In einigen Ausführungsformen kann die Zusammensetzung ferner eine oder mehrere Markierungen auf dem Polymer umfassen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei das Nukleosid eine Oberflächendichte von mindestens 4 Nukleotiden pro Polymer aufweist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, die ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst oder einbaut, das modifiziert ist, um seinen Einbau in eine verlängerte Nukleinsäurekette während einer Polymerasereaktion zu verhindern. In einigen Ausführungsformen kann die Zusammensetzung ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen oder einbauen, das reversibel modifiziert ist, um seinen Einbau in eine verlängerte Nukleinsäurekette während einer Polymerasereaktion zu verhindern. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei eine oder mehrere Markierungen eine Fluoreszenzmarkierung, einen FRET-Donor und/oder einen FRET-Akzeptor umfassen. In einigen Ausführungsformen kann die Zusammensetzung 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 oder mehr Ver-

zweigungen oder Arme oder 2, 4, 8, 16, 32, 64 oder mehr Verzweigungen oder Arme umfassen. In einigen Ausführungsformen können die Verzweigungen oder Arme von einer zentralen Einheit ausgehen. In einigen Ausführungsformen kann die Zusammensetzung eine oder mehrere Wechselwirkungseinheiten umfassen, wobei die Wechselwirkungseinheiten Avidin oder Streptavidin; eine Biotineinheit; einen Affinitäts-Tag; ein Enzym, einen Antikörper, ein Minibody, einen Rezeptor oder ein anderes Protein; einen Nicht-Protein-Tag; ein Metallaaffinitäts-Tag oder eine beliebige Kombination davon umfassen können. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei das Polymer Polyethylenglycol, Polypropylenglycol, Polyvinylacetat, Polymilchsäure oder Polyglycol-säure umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen durch einen Linker an die Verzweigung oder den Arm gebunden ist; und insbesondere wobei der Linker PEG umfasst, und wobei die PEG-Linkereinheit ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 1 kDa, etwa 2 kDa, etwa 3 kDa, etwa 4 kDa, etwa 5 kDa, etwa 10 kDa, etwa 15 kDa, etwa 20 kDa, etwa 50 kDa, etwa 100 kDa, etwa 150 kDa oder etwa 200 kDa oder größer als etwa 200 kDa aufweist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei der Linker PEG umfasst und wobei die PEG-Linkereinheit ein durchschnittliches Molekulargewicht zwischen etwa 5 kDa und etwa 20 kDa aufweist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei mindestens ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen ein Desoxyribonukleotid, ein Ribonukleotid, ein Desoxyribonukleosid oder ein Ribonukleosid umfasst; und/oder wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen durch das 5'-Ende des Nukleotids oder Nukleotidanalogs an den Linker konjugiert ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei eines der Nukleotide oder Nukleotidanaloga Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Thymidin, Desoxyuridin, Desoxycytidin, Adenosin, Guanosin, 5-Methyluridin und/oder Cytidin umfasst; und wobei die Länge des Linkers zwischen 1 nm und 1000 nm liegt. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei mindestens ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen ein Nukleotid ist, das modifiziert wurde, um die Verlängerung während einer Polymerasereaktion oder einer Sequenzierungsreaktion zu hemmen, wie beispielsweise in einem Fall, in dem das mindestens eine Nukleotid oder Nukleotidanalogen ein Nukleotid ist, dem eine 3'-Hydroxylgruppe fehlt; ein Nukleotid ist, das modifiziert wurde, um eine Blockierungsgruppe an der 3'-Position zu enthalten; und/oder ein Nukleotid ist, das mit einer 3'-O-Azidogruppe, einer 3'-O-Azidomethylgruppe, einer 3'-O-Alkylhydroxylamin-

gruppe, einer 3'-Phosphorthioatgruppe, einer 3'-O-Malonyl-Gruppe oder einer 3'-O-Benzylgruppe modifiziert wurde. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei mindestens ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen ein Nukleotid ist, das an der 3'-Position nicht modifiziert wurde.

[0010] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Verfahren zum Bestimmen der Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls bereit, umfassend die Schritte, ohne Rücksicht auf irgendeine bestimmte Reihenfolge, von 1) Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend einen Matrizenstrang und einen komplementären Strang, der zumindest teilweise komplementär zu dem Matrizenstrang ist; 2) Inkontaktbringen des Nukleinsäuremoleküls mit der einen oder den mehreren Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen gemäß einer der hierin offenbarten Ausführungsformen; 3) Nachweisen der Bindung der Nukleinsäure-Bindungszusammensetzung an das Nukleinsäuremolekül und 4) Bestimmen einer Identität eines terminalen Nukleotids, das in den komplementären Strang des Nukleinsäuremoleküls eingebaut werden soll. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Verfahren zum Bestimmen der Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls bereit, umfassend die Schritte, ohne Rücksicht auf irgendeine bestimmte Reihenfolge, von 1) Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend einen Matrizenstrang und einen komplementären Strang, der zumindest teilweise komplementär zu dem Matrizenstrang ist; 2) Inkontaktbringen des Nukleinsäuremoleküls mit der einen oder den mehreren Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen gemäß einer der hierin offenbarten Ausführungsformen; 3) Nachweisen eines teilweisen oder vollständigen Einbaus der Nukleinsäure-Bindungszusammensetzung in das Nukleinsäuremolekül, und 4) Bestimmen einer Identität eines terminalen Nukleotids, das in den komplementären Strang des Nukleinsäuremoleküls eingebaut werden soll, aus dem teilweisen oder vollständigen Einbau der hierin beschriebenen Ausführungsformen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, das ferner das Einbauen des terminalen Nukleotids in den komplementären Strang und das Wiederholen der Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Einbaus für eine oder mehrere zusätzliche Iterationen umfasst, wodurch die Sequenz des Matrizenstrangs des Nukleinsäuremoleküls bestimmt wird. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Nukleinsäuremolekül an einen festen Träger gebunden ist; und insbesondere wobei der feste Träger ein Glas- oder Polymersubstrat, mindestens eine hydrophile Polymerbeschichtungsschicht und eine Vielzahl von Oligonukleotidmolekülen, die an mindestens eine hydrophile Polymerbeschichtungsschicht

gebunden sind, umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, das ferner Ausführungsformen umfasst, in denen mindestens eine hydrophile Polymerbeschichtungsschicht PEG umfasst; und/oder wobei mindestens eine hydrophile Polymerschicht ein verzweigtes hydrophiles Polymer mit mindestens 8 Verzweigungen umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die Vielzahl von Oligonukleotidmolekülen mit einer Oberflächendichte von mindestens 500 Molekülen/mm², mindestens 1.000 Molekülen/mm², mindestens 5.000 Molekülen/mm², mindestens 10.000 Molekülen/mm², mindestens 20.000 Molekülen/mm², mindestens 50.000 Molekülen/mm², mindestens 100.000 Molekülen/mm² oder mindestens 500.000 Molekülen/mm² vorliegt. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Nukleinsäuremolekül klonal auf einem festen Träger amplifiziert wurde. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die klonale Amplifikation die Verwendung einer Polymerasekettenreaktion (PCR), einer multiplen Verdrängungsamplifikation (MDA), einer transkriptionsvermittelten Amplifikation (TMA), einer Nukleinsäuresequenzbasierten Amplifikation (NASBA), einer Strangverdrängungsamplifikation (SDA), einer Echtzeit-SDA, einer Brückenamplifikation, einer isothermen Brückenamplifikation, einer Rolling-Circle-Amplifikation (RCA), einer Circle-to-Circle-Amplifikation, einer Helikase-abhängigen Amplifikation, einer Rekombinase-abhängigen Amplifikation, einer Einzelstrang-Bindungsprotein-abhängigen Amplifikation (SSB) oder einer Kombination davon umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die eine oder die mehreren Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen mit Fluorophoren markiert sind und der Nachweisschritt die Verwendung von Fluoreszenzbildgebung umfasst; und insbesondere wobei die Fluoreszenzbildgebung die Fluoreszenzbildgebung mit zwei Anregungswellenlängen/vier Emissionswellenlängen umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei vier verschiedene Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen, die jeweils ein anderes Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen, verwendet werden, um die Identität des terminalen Nukleotids zu bestimmen, wobei die vier verschiedenen Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen mit getrennten jeweiligen Fluorophoren markiert sind, und wobei der Nachweisschritt die gleichzeitige Anregung bei einer Wellenlänge, die ausreicht, um alle vier Fluorophore anzuregen, und die Bildgebung der Fluoreszenzemission bei Wellenlängen, die ausreichen, um jedes jeweilige Fluorophor nachzuweisen, umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei vier verschiedene Nukleinsäure-Bindungszu-

sammensetzungen, die jeweils ein anderes Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen, verwendet werden, um die Identität des terminalen Nukleotids zu bestimmen, wobei die vier verschiedenen Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen entsprechend mit Cyaninfarbstoff 3 (Cy3), Cyaninfarbstoff 3.5 (Cy3.5), Cyaninfarbstoff 5 (Cy5) und Cyaninfarbstoff 5.5 (Cy5.5) markiert sind, und wobei der Nachweisschritt die gleichzeitige Anregung bei beliebigen zwei von 532 nm, 568 nm und 633 nm und die Bildgebung der Fluoreszenzemission bei etwa 570 nm, 592 nm, 670 nm bzw. 702 nm umfasst; und/oder wobei die Fluoreszenzbildgebung die Fluoreszenzbildgebung mit zwei Anregungswellenlängen/zwei Emissionswellenlängen umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei vier verschiedene Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen, die jeweils ein anderes Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen, verwendet werden, um die Identität des terminalen Nukleotids zu bestimmen, wobei eine, zwei, drei oder vier verschiedene Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen jeweils markiert sind, jeweils mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder Satz von Fluorophoren, und wobei der Nachweisschritt die gleichzeitige Anregung bei einer Wellenlänge, die ausreicht, um ein, zwei, drei oder vier Fluorophore oder Sätze von Fluorophoren anzuregen, und die Bildgebung der Fluoreszenzemission bei Wellenlängen, die ausreichen, um jedes jeweilige Fluorophor nachzuweisen, umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei drei verschiedene Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen, die jeweils ein unterschiedliches Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen, verwendet werden, um die Identität des terminalen Nukleotids zu bestimmen, wobei eine, zwei oder drei verschiedene Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen jeweils mit einem unterschiedlichen Fluorophor oder Satz von Fluorophoren markiert sind, und wobei der Nachweisschritt die gleichzeitige Anregung bei einer Wellenlänge, die ausreicht, um ein, zwei oder drei Fluorophore oder Sätze von Fluorophoren anzuregen, und die Bildgebung der Fluoreszenzemission bei Wellenlängen, die ausreichen, um jedes jeweilige Fluorophor nachzuweisen, umfasst, und wobei der Nachweis des vierten Nukleotids in Bezug auf den Ort von „dunklen“ oder unmarkierten Spots oder Ziel-nukleotiden bestimmt oder bestimmbar ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten umfassen kann und wobei jede Art der drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotid umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei der Nachweis des Bindungs- oder Einbaukomplexes in Abwesenheit von ungebundenen oder in

Lösung befindlichen Polymer-Nukleotid-Konjugaten durchgeführt wird.

[0011] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei vier verschiedene Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen, die jeweils ein anderes Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen, verwendet werden, um die Identität des terminalen Nukleotids zu bestimmen, wobei eine der vier oder drei verschiedenen Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen mit einem ersten Fluorophor markiert ist, eines mit einem zweiten Fluorophor markiert ist, eines mit sowohl dem ersten als auch dem zweiten Fluorophor markiert ist und eines nicht markiert ist oder fehlt, und wobei der Nachweisschritt eine gleichzeitige Anregung bei einer ersten Anregungswellenlänge und einer zweiten Anregungswellenlänge umfasst und Bilder bei einer ersten Fluoreszenzemissionswellenlänge und einer zweiten Fluoreszenzemissionswellenlänge erfasst werden. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das erste Fluorophor Cy3 ist, das zweite Fluorophor Cy5 ist, die erste Anregungswellenlänge 532 nm oder 568 nm beträgt, die zweite Anregungswellenlänge 633 nm beträgt, die erste Fluoreszenzemissionswellenlänge etwa 570 nm beträgt und die zweite Fluoreszenzemissionswellenlänge etwa 670 nm beträgt. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die Nachweismarkierung einen oder mehrere Abschnitte eines Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Paares (FRET) umfassen kann, sodass mehrere Klassifizierungen unter einem einzigen Anregungs- und Bildgebungsschritt durchgeführt werden können. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei ein Sequenzierungsreaktionszyklus umfassend die Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Einbauens/Verlängerns, in weniger als 30 Minuten in weniger als 20 Minuten oder in weniger als 10 Minuten durchgeführt wird. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei ein durchschnittlicher Q-Wert für die Genauigkeit des Basisaufrufs über einen Sequenzierungslauf größer oder gleich 30 und/oder größer oder gleich 40 ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 % oder mindestens 90 % der identifizierten terminalen Nukleotide einen Q-Wert von größer als 30 und/oder größer als oder gleich 40 aufweisen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, hierin weisen mindestens 95 % der identifizierten terminalen Nukleotide einen Q-Wert von mehr als 30 auf.

[0012] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, umfassend eine oder mehrere Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen, wie hierin offenbart, und einen Puffer. Zum Beispiel stellt die vorliegende Offenbarung in einigen Ausführungsformen ein Reagens bereit, wobei das Reagens 1, 2, 3, 4 oder mehr Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen umfasst, wobei jede Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzung eine einzelne Art von Nukleotid umfasst. In einigen Ausführungsformen umfasst ein Reagens der vorliegenden Offenbarung 1, 2, 3, 4 oder mehr Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen, wobei jede Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzung eine einzelne Art von Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst, und wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen jeweils einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus Adenosintri-phosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP), Desoxyadenosintri-phosphat (dATP), Desoxyadenosindiphosphat (dADP) und Desoxyadenosinmonophosphat (dAMP) entsprechen kann; einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus Thymidintri-phosphat (TTP), Thymidindiphosphat (TDP), Thymidinmonophosphat (TMP), Desoxythymidintri-phosphat (dTTP), Desoxythymidindiphosphat (dTDP), Desoxythymidinmonophosphat (dTMP), Uridintri-phosphat (UTP), Uridindiphosphat (UDP), Uridinmonophosphat (UMP), Desoxyuridintri-phosphat (dUTP), Desoxyuridindiphosphat (dUDP) und Desoxyuridinmonophosphat (dUMP); einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus Cytidintri-phosphat (CTP), Cytidindiphosphat (CDP), Cytidinmonophosphat (CMP), Desoxycytidintri-phosphat (dCTP), Desoxycytidindiphosphat (dCDP) und Desoxycytidinmonophosphat (dCMP); und einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus Guanosintri-phosphat (GTP), Guanosindiphosphat (GDP), Guanosinmonophosphat (GMP), Desoxyguanosintri-phosphat (dGTP), Desoxyguanosindiphosphat (dGDP) und Desoxyguanosinmonophosphat (dGMP). In einigen anderen Beispielen oder einigen weiteren Beispielen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, umfassend oder ferner umfassend 1, 2, 3, 4 oder mehr Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen, wobei jede Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzung eine einzelne Art von Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst, und wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen jeweils einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus ATP, ADP, AMP, dATP, dADP, dAMP, TTP, TDP, TMP, dTTP, dTDP, dTMP, UTP, UDP, UMP, dUTP, dUDP, dUMP, CTP, CDP, CMP, dCTP, dCDP, dCMP, GTP, GDP, GMP, dGTP, dGDP und dGMP entsprechen kann.

[0013] Hierin offenbart sind Kits umfassend die Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammenset-

zung einer der hierin offenbarten Ausführungsformen und/oder ein Reagens einer der hierin offenbarten Ausführungsformen und/oder einen oder mehrere Puffer; und Anweisungen zu ihrer Verwendung.

[0014] Hierin offenbart sind Systeme zur Durchführung des Verfahrens nach einer hierin offenbarten Ausführungsform, umfassend eine Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzung nach einer der hierin offenbarten Ausführungsformen und/oder ein Reagens nach einer der hierin offenbarten Ausführungsformen. In einigen Ausführungsformen ist ein System konfiguriert, um das sequenzielle Inkontaktbringen von angebundenen, geprimten Nukleinsäuremolekülen mit den Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen und/oder den Reagenzien iterativ durchzuführen; und zum Nachweis der Bindung oder des Einbaus der offenbarten Nukleinsäure-Bindungs- oder Einbauszusammensetzungen an das eine oder die mehreren geprimten Nukleinsäuremoleküle.

[0015] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, umfassend ein Partikel (z. B. ein Nanopartikel oder einen Polymerkern), wobei das Partikel eine Vielzahl von Enzym- oder Protein-Bindungs- oder -Einbausubstraten umfasst, wobei die Enzym- oder Protein-Bindungs- oder -Einbausubstrate mit einem oder mehreren Enzymen oder Proteinen binden, um einen oder mehrere Bindungs- oder Einbaukomplexe zu bilden (z. B. einen multivalenten Bindungs- oder Einbaukomplex) zu bilden, und wobei die Bindung oder der Einbau durch Beobachtung des Ortes, des Vorhandenseins oder der Persistenz des einen oder der mehreren Bindungs- oder Einbaukomplexe überwacht oder identifiziert werden kann. In einigen Ausführungsformen kann das Partikel ein Polymer, verzweigtes Polymer, Dendrimer, Liposom, eine Mizelle, ein Nanopartikel oder einen Quantenpunkt umfassen. In einigen Ausführungsformen kann das Substrat ein Nukleotid, ein Nukleosid, ein Nukleotidanalogen oder ein Nukleosidanalogen umfassen. In einigen Ausführungsformen kann das Enzym- oder Protein-Bindungs- oder Einbausubstrat ein Mittel umfassen, das mit einer Polymerase binden kann. In einigen Ausführungsformen kann das Enzym oder Protein eine Polymerase umfassen. In einigen Ausführungsformen kann die Beobachtung des Ortes, des Vorhandenseins oder der Persistenz eines oder mehrerer Bindungs- oder Einbaukomplexe einen Fluoreszenznachweis umfassen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, umfassend mehrere verschiedene Partikel, wie hierin offenbart, wobei jedes Partikel eine einzelne Art von Nukleosid oder Nukleosidanalogen umfasst und wobei jedes Nukleosid oder Nukleosidanalogen mit einer Fluoreszenzmarkierung einer nachweisbar unterschiedlichen Emissions- oder Anregungswellenlänge assoziiert ist. In

einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, ferner umfassend eine oder mehrere Markierungen, z. B. Fluoreszenzmarkierungen, auf dem Partikel. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei die Zusammensetzung mindestens 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder mehr als 20 gebundene Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga umfasst, die an das Partikel gebunden sind. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei das Nukleosid oder Nukleosidanalogen in einer Oberflächendichte zwischen 0,001 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 0,01 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 0,1 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 1 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 10 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 100 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 1.000 und 1.000.000 pro μm^2 , zwischen 10.000 und 100.000 pro μm^2 oder zwischen 50.000 und 100.000 pro μm^2 oder innerhalb eines Bereichs liegt, der durch beliebige zwei der vorhergehenden Werte definiert ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei das Nukleosid oder Nukleosidanalogen innerhalb eines Nukleotids oder Nukleotidanalogs vorliegt. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei die Zusammensetzung ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst oder einschließt, das modifiziert ist, um seinen Einbau in eine verlängerte Nukleinsäurekette während einer Polymerasereaktion zu verhindern. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei die Zusammensetzung ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst oder einschließt, das reversibel modifiziert ist, um seinen Einbau in eine verlängerte Nukleinsäurekette während einer Polymerasereaktion zu verhindern. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei eine oder mehrere Markierungen eine Fluoreszenzmarkierung, einen FRET-Donor und/oder einen FRET-Akzeptor umfassen. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei das Substrat (z. B. Nukleotid, Nukleotidanalogen, Nukleosid oder Nukleosidanalogen) durch einen Linker an das Partikel gebunden ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung die Zusammensetzung bereit, wobei mindestens ein Nukleotid oder Nukleotidanalogen ein Nukleotid ist, das modifiziert wurde, um die Verlängerung während einer Polymerasereaktion oder einer Sequenzierungsreaktion zu hemmen, wie zum Beispiel ein Nukleotid, dem eine 3'-Hydroxylgruppe fehlt; ein Nukleotid ist, das modifiziert wurde, um eine Blockierungsgruppe an der 3'-Position zu enthalten; ein Nukleotid, das mit einer 3'-O-Azidogruppe, einer 3'-O-Azidomethylgruppe, einer 3'-O-

Alkylhydroxylaminingruppe, einer 3'-Phosphorthioatgruppe, einer 3'-O-Malonyl-Gruppe oder einer 3'-O-Benzylgruppe modifiziert wurde; und/oder ein Nukleotid, das nicht an der 3'-Position modifiziert wurde.

[0016] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Verfahren zum Bestimmen der Sequenz eines Nukleinsäuremoleküls bereit, umfassend die Schritte, ohne Rücksicht auf die Reihenfolge, von 1) Bereitstellen eines Nukleinsäuremoleküls, umfassend einen Matrizenstrang und einen komplementären Strang, der zumindest teilweise komplementär zu dem Matrizenstrang ist; 2) Inkontaktbringen des Nukleinsäuremoleküls mit der einen oder den mehreren Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen gemäß einer der hierin offenbarten Ausführungsformen; 3) Nachweisen der Bindung oder des Einbaus der Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzung in das Nukleinsäuremolekül, und 4) Bestimmen einer Identität eines terminalen Nukleotids, das in den komplementären Strang des Nukleinsäuremoleküls eingebaut werden soll. In einigen Ausführungsformen kann das Verfahren ferner das Einbauen des terminalen Nukleotids in den komplementären Strang und das Wiederholen der Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Einbaus für eine oder mehrere zusätzliche Iterationen umfassen, wodurch die Sequenz des Matrizenstrangs des Nukleinsäuremoleküls bestimmt wird. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Nukleinsäuremolekül klonal auf einem festen Träger amplifiziert wurde. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei die klonale Amplifikation die Verwendung einer Polymerasekettenreaktion (PCR), einer multiplen Verdrängungsamplifikation (MDA), einer transkriptionsvermittelten Amplifikation (TMA), einer Nukleinsäuresequenz-basierten Amplifikation (NASBA), einer Strangverdrängungsamplifikation (SDA), einer Echtzeit-SDA, einer Brückenamplifikation, einer isothermen Brückenamplifikation, einer Rolling-Circle-Amplifikation, einer Circle-to-Circle-Amplifikation, einer Helikase-abhängigen Amplifikation, einer Rekombinase-abhängigen Amplifikation, einer Einzelstrang-Bindungsprotein-abhängigen Amplifikation (SSB) oder einer Kombination davon umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei ein Sequenzierungsreaktionszyklus umfassend die Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Einbaus, in weniger als 30 Minuten in weniger als 20 Minuten oder in weniger als 10 Minuten durchgeführt wird. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei ein durchschnittlicher Q-Wert für die Genauigkeit des Basisaufrufs über einen Sequenzierungslauf größer oder gleich 30 oder größer oder gleich 40 ist. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offen-

barung das Verfahren bereit, wobei mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 % oder mindestens 90 % der identifizierten terminalen Nukleotide einen Q-Wert von größer als 30 aufweisen; oder größer als 40. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei mindestens 95 % der identifizierten terminalen Nukleotide einen Q-Wert von mehr als 30 aufweisen.

[0017] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, das eine oder mehrere Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen, wie hierin offenbart, und einen Puffer umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Reagens bereit, wobei das Reagens 1, 2, 3, 4 oder mehr Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen umfasst, wobei jede Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzung eine einzelne Art von Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst, und wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen ein Nukleotid, Nukleotidanalogen, Nukleosid oder Nukleosidanalogen umfasst. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Reagens 1, 2, 3, 4 oder mehr Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen umfasst, wobei jede Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzung eine einzelne Art von Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst, und wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen jeweils Folgendem entsprechen kann: einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus ATP, ADP, AMP, dATP, dADP und dAMP; einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus TTP, TDP, TMP, dTTP, dTDP, dTMP, UTP, UDP, UMP, dUTP, dUDP und dUMP; einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus CTP, CDP, CMP, dCTP, dCDP und dCMP; und einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus GTP, GDP, GMP, dGTP, dGDP und dGMP. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei das Reagens 1, 2, 3, 4 oder mehr Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen umfasst, wobei jede Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzung eine einzelne Art von Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfasst, und wobei das Nukleotid oder Nukleotidanalogen jeweils einem oder mehreren aus der Gruppe bestehend aus ATP, ADP, AMP, dATP, dADP, dAMP, TTP, TDP, TMP, dTTP, dTDP, dTMP, UTP, UDP, UMP, dUTP, dUDP, dUMP, CTP, CDP, CMP, dCTP, dCDP, dCMP, GTP, GDP, GMP, dGTP, dGDP und dGMP entspricht.

[0018] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Kit bereit, umfassend eine der hierin offenbarten Zusammensetzungen; und/oder ein beliebiges der hierin offenbarten Reagenzien; einen oder mehrere Puffer; und Anweisungen zu ihrer Verwendung.

[0019] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein System zum Durchführen eines der hierin offenbarten Verfahren bereit; wobei die Verfahren Folgendes umfassen können: die Verwendung einer der Zusammensetzungen, wie hierin offenbart; und/oder eines der Reagenzien, wie hierin offenbart; eines oder mehrerer Puffer und eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle, die optional an einen festen Träger gebunden oder angeheftet sind, wobei das System so konfiguriert ist, dass Folgendes iterativ durchgeführt wird: das sequenzielle Inkontaktingen der Nukleinsäuremoleküle mit der Zusammensetzung und/oder dem Reagens; und der Nachweis der Bindung oder des Einbaus der Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen an das eine oder die mehreren Nukleinsäuremoleküle.

[0020] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Erhöhung des Kontrast-Rausch-Verhältnisses (Contrast to Noise Ratio, CNR) eines markierten Nukleinsäurekomplexes, der an eine Oberfläche gebunden oder damit assoziiert ist.

[0021] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Herstellung oder Aufrechterhaltung der Kontrolle über die Persistenzzeit eines Signals von einem markierten Nukleinsäurekomplex, der an eine Oberfläche gebunden oder damit assoziiert ist.

[0022] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Herstellung oder Aufrechterhaltung der Kontrolle über die Persistenzzeit eines Fluoreszenz-, Lumineszenz-, elektrischen, elektrochemischen, kolorimetrischen, radioaktiven, magnetischen oder elektromagnetischen Signals von einem markierten Nukleinsäurekomplex, der an eine Oberfläche gebunden oder damit assoziiert ist.

[0023] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Erhöhung der Spezifität, Genauigkeit oder Lese-länge einer Anwendung zur Nukleinsäuresequenzierung und/oder Genotypisierung.

[0024] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung eine Zusammensetzung bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Erhöhung der Spezifität, Genauigkeit oder Lese-länge bei einem Verfahren zur Sequenzierung durch Bindung oder Einbau, zur Sequenzierung durch Synthese, zur Einzelmolekülsequenzierung oder zur Ensemble-Sequenzierung.

[0025] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Erhöhung des Kontrast-Rausch-Verhältnisses (CNR) eines markierten Nukleinsäurekomplexes, der an eine Oberfläche gebunden oder damit assoziiert ist.

[0026] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Herstellung oder Aufrechterhaltung der Kontrolle über die Persistenzzeit eines Signals von einem markierten Nukleinsäurekomplex, der an eine Oberfläche gebunden oder damit assoziiert ist.

[0027] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Herstellung oder Aufrechterhaltung der Kontrolle über die Persistenzzeit eines Fluoreszenz-, Lumineszenz-, elektrischen, elektrochemischen, kolorimetrischen, radioaktiven, magnetischen oder elektromagnetischen Signals von einem markierten Nukleinsäurekomplex, der an eine Oberfläche gebunden oder damit assoziiert ist.

[0028] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Erhöhung der Spezifität, Genauigkeit oder Leselänge einer Anwendung zur Nukleinsäuresequenzierung und/oder Genotypisierung.

[0029] In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung ein Reagens bereit, wie hierin offenbart, zur Verwendung bei der Erhöhung der Spezifität, Genauigkeit oder Leselänge bei einem Verfahren zur Sequenzierung durch Bindung oder Einbau, zur Sequenzierung durch Synthese, zur Einzelmolekülsequenzierung oder zur Ensemble-Sequenzierung.

EINBEZIEHUNG DURCH BEZUGNAHME

[0030] Alle in dieser Beschreibung erwähnten Veröffentlichungen, Patente und Patentanmeldungen sind in ihrer Gesamtheit in demselben Umfang durch Bezugnahme hierin eingeschlossen, als ob jede einzelne Veröffentlichung, jedes einzelne Patent oder jede einzelne Patentanmeldung spezifisch und einzeln als durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit eingeschlossen angegeben wären. Im Falle eines Konflikts zwischen einem Begriff hierin und einem Begriff in einer eingeschlossenen Referenz ist der Begriff hierin maßgeblich.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0031] Die Patent- oder Anmeldungsdatei enthält mindestens eine farbig ausgeführte Zeichnung. Kopien von Veröffentlichungen dieses Patents oder

dieser Patentanmeldung mit Farbzeichnung(en) werden vom Büro auf Anforderung und Bezahlung der erforderlichen Gebühr bereitgestellt.

[0032] Die neuartigen Merkmale der hierin offenbarten erfinderischen Konzepte sind in den beigefügten Ansprüchen genau beschrieben. Ein besseres Verständnis der Merkmale und Vorteile der offenbarten Zusammensetzungen, Verfahren und Systeme wird durch Bezugnahme auf die folgende ausführliche Beschreibung, die veranschaulichende Ausführungsformen darlegt, in denen die Prinzipien der erfinderischen Konzepte verwendet werden, und auf die beigefügten Zeichnungen ermöglicht, die Folgendes beinhalten:

Fig. 1A-1H veranschaulichen die Schritte unter Verwendung eines nicht einschränkenden Beispiels für eine multivalente Bindungszusammensetzung zum Sequenzieren einer Zielnukleinsäure: **Fig. 1A** veranschaulicht ein nicht einschränkendes Beispiel 4 des Anheftens von Zielnukleinsäure an eine Oberfläche; **Fig. 1B** veranschaulicht klonal die Zielnukleinsäure, um Cluster amplifizierter Zielnukleinsäuremoleküle zu bilden; **Fig. 1C** veranschaulicht ein nicht einschränkendes Beispiel für das Primen der Zielnukleinsäure, um eine gepimte Zielnukleinsäure herzustellen; **Fig. 1D** veranschaulicht ein nicht einschränkendes Beispiel des Inkontaktbringens der gepimten Zielnukleinsäure mit der multivalenten Bindungszusammensetzung und Polymerase, um einen Bindungskomplex zu bilden; **Fig. 1E** veranschaulicht ein nicht einschränkendes Beispiel der Bilder des Bindungskomplexes, die auf der Oberfläche erfasst wurden; **Fig. 1F** veranschaulicht ein nicht einschränkendes Beispiel der Verlängerung des Primerstrangs um ein Nukleotid;

Fig. 1G veranschaulicht ein nicht einschränkendes Beispiel eines anderen Zyklus des Inkontaktbringens der gepimten Zielnukleinsäure mit der multivalenten Bindungszusammensetzung und Polymerase, um einen Bindungskomplex zu bilden; und

Fig. 1H veranschaulicht nicht einschränkende Beispiele der Bilder des Bindungskomplexes, die auf der Oberfläche in nachfolgenden Sequenzierungszyklen erfasst wurden.

Fig. 2 zeigt ein Flussdiagramm, das die Schritte zur Sequenzierung einer Zielnukleinsäure und Verlängerung des Primerstrangs durch eine einzige Basenzugabe skizziert.

Fig. 3 zeigt ein Flussdiagramm, das die Schritte zur Sequenzierung einer Zielnukleinsäure und Verlängerung des Primerstrangs durch Einbau des Nukleotids in das Partikel-Nukleotid-Konjugat skizziert.

Fig. 4A-4B veranschaulichen ein nicht einschränkendes Beispiel für den Nachweis von Zielnukleinsäure unter Verwendung der Polymer-Nukleotid-Konjugate. **Fig. 4A** zeigt den Schritt des Inkontaktbringens der Polymerase und der Polymer-Nukleotid-Konjugate mit einigen Nukleinsäuremolekülen; **Fig. 4B** zeigt den Bindungskomplex, der zwischen der Polymerase, den Polymer-Nukleotid-Konjugaten und den Zielnukleinsäuremolekülen gebildet wird.

Fig. 5A-5C zeigen schematische Darstellungen von nicht einschränkenden Beispielen variierender Konfigurationen der Polymer-Nukleotid-Konjugate: **Fig. 5A** zeigt Polymer-Nukleotid-Konjugate mit verschiedenen mehrarmigen Konfigurationen; **Fig. 5B** zeigt ein Polymer-Nukleotid-Konjugat, bei dem der Polymerzweig von der Mitte ausgeht; und **Fig. 5C** zeigt Polymer-Nukleotid-Konjugate mit dem Bindungsrest Biotin.

Fig. 6 zeigt eine verallgemeinerte grafische Darstellung der Zunahme der Signalintensität, die während des Bindens, der Persistenz und des Waschens und Entfernens multivalenter Substrate beobachtet wurde.

Fig. 7A-7J zeigen Fluoreszenzbilder der Schritte in einer Sequenzierungsreaktion unter Verwendung multivalenter PEG-Substratzusammensetzungen. **Fig. 7A**. Rote und grüne Fluoreszenzbilder nach Exposition von DNA-RCA-Matrizen (G und A erste Base) gegenüber 500 nM basenmarkierten Nukleotiden (A-Cy3 und G-Cy5) in Belichtungspuffer, der 20 nM Klenow-Polymerase und 2,5 mM Sr^{+2} enthält. Die Bilder wurden aufgenommen nach Waschen mit Bildgebungspuffer mit der gleichen Zusammensetzung wie der Belichtungspuffer, jedoch ohne Nukleotide oder Polymerase. Der Kontrast wurde skaliert, um die Visualisierung der schwächsten Signale zu maximieren, jedoch blieben nach Waschen mit Bildgebungspuffer keine Signale bestehen (**Fig. 7A**, Einsatz). **Fig. 7B-7E**: Fluoreszenzbilder, welche die multivalenten (basenmarkierten) PEG-Nukleotid-Liganden PB1 (**Fig. 7B**), PB2 (**Fig. 7C**), PB3 (**Fig. 7D**) und PB5 (**Fig. 7E**) mit einer effektiven Nukleotidkonzentration von 500 nM nach dem Mischen im Belichtungspuffer und der Bildgebung im Bildgebungspuffer wie oben beschrieben zeigen. **Fig. 7F**: Fluoreszenzbild, das den multivalenten (basenmarkierten) PEG-Nukleotid-Liganden PB5 bei 2,5 μM nach Mischen im Belichtungspuffer und Bildgebung im Bildgebungspuffer wie oben zeigt.

Fig. 7G-7I: Fluoreszenzbilder, die eine weitere Basendiskriminierung zeigen, indem die multivalente Bindungszusammensetzung inaktiven Mutanten von Klenow-Polymerase ausgesetzt

wird (**Fig. 7G**. D882H; **Fig. 7H**. D882E; **Fig. 7I**. D882A) vs. das Wildtyp-Klenow-Enzym (Kontrolle) (**Fig. 7J**).

Fig. 8A-8B zeigen die Wirksamkeit der multivalenten Reporterzusammensetzungen bei der Bestimmung der Basensequenz einer DNA-Sequenz über 5 Sequenzierungszyklen:

Fig. 8A zeigt Bilder und erwartete Sequenzen für Matrizen, die nach jedem Sequenzierungszyklus aufgenommen wurden; und **Fig. 8B** zeigt ausgerichtete Sequenzierungsergebnisse unter Verwendung der in **Fig. 8A** aufgenommenen Bilder.

Fig. 9A-9J zeigen Fluoreszenzbilder von multivalenten Polyethylenglycol-Polymer-Nukleotid-Konjugaten (PEG) (basenmarkiert) mit einer effektiven Nukleotidkonzentration von 500 nM und variierender PEG-Verzweigungslänge nach Inkontaktbringen mit einer Trägeroberfläche, die DNA-Matrizen (umfassend G oder A als die erste Base; hergestellt unter Verwendung von Rolling-Circle-Amplifikation (RCA)) in einem Belichtungspuffer, der 20 nM Klenow Polymerase und 2,5 mM Sr^{+2} umfasst. Die Bilder wurden nach Waschen mit einem Bildgebungspuffer, der die gleiche Zusammensetzung wie der Belichtungspuffer, jedoch keine Nukleotide und Polymere aufwies, aufgenommen. Panels zeigen Bilder, die unter Verwendung multivalenter PEG-Nukleotidliganden mit Armlängen wie folgt erhalten wurden. **Fig. 9A**: 1 K PEG. **Fig. 9B**: 2 K PEG. **Fig. 9C**: 3 K PEG. **Fig. 9D**: 5 K PEG.

Fig. 9E: 10 K PEG. **Fig. 9F**: 20 K PEG. **Fig. 9G** zeigt Bilder, die unter Verwendung von 10 K PEG und einer inaktiven Klenow-Polymerase umfassend die Mutation D882H erhalten wurden. **Fig. 7H** zeigt Bilder, die unter Verwendung von 10 K PEG und einer inaktiven Klenow-Polymerase umfassend die Mutation D882E erhalten wurden. **Fig. 7I** zeigt Bilder, die unter Verwendung von 10 K PEG und einer inaktiven Klenow-Polymerase umfassend die Mutation D882A erhalten wurden. **Fig. 7J** zeigt Bilder, die unter Verwendung von 10 K PEG und einer aktiven Wildtyp-Klenow-Polymerase erhalten wurden.

Fig. 10 zeigt eine quantitative Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in den in **Fig. 9A-9F** gezeigten Bildern, getrennt durch Farbwert, mit orangefarbener Spur, die der roten Markierung (Cy3-Markierung; A Basen) und blauer Spur, die der grünen Markierung (Cy5-Markierung; G Basen), entspricht.

Fig. 11 zeigt normalisierte Fluoreszenz von multivalenten Substraten, die an DNA-Cluster gebunden sind, wie für **Fig. 7A-7J** beschrieben,

wobei die Substratkomplexe in Gegenwart (Bedingung B) und Abwesenheit (Bedingung A) von Triton-X100 (0,016 %) gebildet werden.

Fig. 12 A-12B zeigen Diagramme normalisierter Fluoreszenzintensität, die für multivalente Polymer-Nukleotid-Konjugate und freie Nukleotide gemessen wurden. **Fig. 12A:** Zwei Replikate eines multivalenten Polymer-Nukleotid-Konjugats, die an DNA-Cluster (Bedingungen A und B) gebunden sind, vs. Bindungskomplexe, die unter Verwendung markierter freier Nukleotide (Bedingung C) nach 1 Minute gebildet wurden; **Fig. 12B:** Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz multivalenter Substratkomplexe im Verlauf von 60 min.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

I. Definitionen

[0033] Wie hier verwendet, ist „Nukleinsäure“ (auch als „Polynukleotid“, „Oligonukleotid“, Ribonukleinsäure (RNA) oder Desoxyribonukleinsäure (DNA) bezeichnet) ein lineares Polymer von zwei oder mehr Nukleotiden, die durch kovalente internukleosidische Bindungen verbunden sind, oder Varianten oder funktionelle Fragmente davon. In natürlich vorkommenden Beispielen für Nukleinsäuren ist die Internukleosidverknüpfung eine Phosphodiesterbindung. Andere Beispiele umfassen jedoch wahlweise andere Internukleosidverknüpfungen, wie Phosphor-thiolatbindungen, und können eine Phosphatgruppe umfassen oder nicht. Nukleinsäuren schließen doppel- und einzelsträngige DNA sowie doppel- und einzelsträngige RNA, DNA/RNA-Hybride, Peptid-Nukleinsäuren (PNAs), Hybride zwischen PNAs und DNA oder RNA ein und können auch andere Arten von Nukleinsäuremodifikationen einschließen.

[0034] Wie hier verwendet, nimmt ein „Nukleotid“ auf ein Nukleotid, Nukleosid oder Analogon davon Bezug. Das Nukleotid nimmt sowohl auf natürlich vorkommende als auch chemisch modifizierte Nukleotide Bezug und kann ein Nukleosid, ein Ribonukleotid, ein Desoxyribonukleotid, einen Protein-Nukleinsäurerest oder Derivate einschließen, ist jedoch nicht darauf beschränkt. Beispiele des Nukleotids schließen Folgendes ein: ein Adenin, ein Thymin, ein Uracil, ein Cytosin, ein Guanin oder einen Rest davon; ein Desoxyadenin, ein Desoxythymin, ein Desoxyuracil, ein Desoxycytosin, ein Desoxyguanin oder einen Rest davon; eine Adenin-PNA, eine Thymin-PNA, eine Uracil-PNA, eine Cytosin-PNA, eine Guanin-PNA oder einen Rest oder Äquivalent davon, ein N- oder C-Glycosid einer Purin- oder Pyrimidinbase (z. B. ein Desoxyribonucleosid, das 2-Desoxy-D-Ribose enthält, oder ein Ribonucleosid, das D-Ribose enthält).

[0035] „Komplementär“, wie hier verwendet, bezieht sich auf die topologische Kompatibilität oder Übereinstimmung interagierender Oberflächen eines Ligandenmoleküls und seines Rezeptors. Somit können der Rezeptor und sein Ligand als komplementär bezeichnet werden, und außerdem sind die Kontaktoberflächeneigenschaften komplementär zueinander.

[0036] „Verzweigtes Polymer“, wie hier verwendet, bezieht sich auf ein Polymer mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen, die dazu beitragen, ein biologisch aktives Molekül, wie ein Nukleotid, zu konjugieren, und die funktionelle Gruppe kann sich entweder an der Seitenkette des Polymers befinden oder direkt an einen zentralen Kern oder eine zentrale Hauptkette des Polymers gebunden sein. Das verzweigte Polymer kann ein lineares Rückgrat mit einer oder mehreren funktionellen Gruppen aufweisen, die zur Konjugation vom Rückgrat abgelöst werden. Das verzweigte Polymer kann auch ein Polymer mit einer oder mehreren Seitenketten sein, wobei die Seitenkette eine zur Konjugation geeignete Stelle aufweist. Beispiele der funktionellen Gruppe schließen, ohne darauf beschränkt zu sein, Hydroxyl, Ester, Amin, Carbonat, Acetal, Aldehyd, Aldehydhydrat, Alkenyl, Acrylat, Methacrylat, Acrylamid, aktives Sulfon, Hydrazid, Thiol, Alkansäure, Säurehalogenid, Isocyanat, Isothiocyanat, Maleimid, Vinylsulfon, Dithiopyridin, Vinylpyridin, Iodacetamid, Epoxid, Glyoxal, Dion, Mesylat, Tosylat und Tresylat ein.

[0037] „Polymerase“, wie hier verwendet, bezieht sich auf ein Enzym, das eine Nukleotidbindungseinheit enthält und die Bildung eines Bindungskomplexes zwischen einer Ziel-nukleinsäure und einem komplementären Nukleotid unterstützt. Die Polymerase kann eine oder mehrere Aktivitäten aufweisen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Aktivitäten zum Nachweis von Basenanaloga, DNA-Polymerisationsaktivität, Reverse-Transkriptase-Aktivität, DNA-Bindung oder -Einbau, Strangverdrängungsaktivität und Nukleotidbindung oder -einbau und -erkennung. Die Polymerase kann katalytisch inaktive Polymerase, katalytisch aktive Polymerase, Reverse-Transkriptase und andere Enzyme, die eine Nukleotid-Bindungs- oder -Einbaueinheit enthalten, einschließen.

[0038] „Persistenzzeit“, wie hier verwendet, bezieht sich auf die Zeitdauer, in der ein Bindungskomplex, der zwischen der Ziel-nukleinsäure, einer Polymerase, einem konjugierten oder unkonjugierten Nukleotid gebildet wird, stabil bleibt, ohne dass irgendeine Bindungskomponente von dem Bindungskomplex dissoziiert. Die Persistenzzeit ist ein Indikator für die Stabilität des Bindungskomplexes und die Stärke der Bindungswechselwirkungen. Die Persistenzzeit kann durch Beobachten des Beginns und/oder der Dauer eines Bindungskomplexes gemessen werden, wie durch Beobachten eines

Signals von einer markierten Komponente des Bindungskomplexes. Zum Beispiel kann ein markiertes Nukleotid oder ein markiertes Reagens, das ein oder mehrere Nukleotide umfasst, in einem Bindungskomplex vorhanden sein, wodurch ermöglicht wird, dass das Signal von der Markierung während der Persistenzzeit des Bindungskomplexes nachgewiesen wird. Ein nicht einschränkendes Beispiel für die Markierung ist eine Fluoreszenzmarkierung.

II. Verfahren zur Analyse von Zielnukleinsäure

[0039] Hierin offenbart sind multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzungen und ihre Verwendung bei der Analyse von Nukleinsäuremolekülen, einschließlich bei Sequenzierungs- oder anderen Bioassay-Anwendungen. Eine Erhöhung der Bindung oder des Einbaus eines Nukleotids an ein Enzym (z. B. Polymerase) oder einen Enzymkomplex kann durch Erhöhen der wirksamen Konzentration des Nukleotids beeinflusst werden. Die Erhöhung kann durch Erhöhung der Konzentration des Nukleotids in freier Lösung oder durch Erhöhung der Menge des Nukleotids in der Nähe der betreffenden Bindungs- oder Einbaustelle erreicht werden. Die Erhöhung kann auch durch physisches Einschränken einer Anzahl von Nukleotiden in ein begrenztes Volumen erreicht werden, was zu einer lokalen Erhöhung der Konzentration führt, und eine solche Struktur kann somit mit einer höheren scheinbaren Avidität an die Bindungs- oder Einbaustelle binden oder eingebaut werden, als dies bei unkonjugiertem, ungebundenem oder anderweitig uneingeschränktem individuellem Nukleotid beobachtet würde. Ein nicht einschränkendes Mittel zum Bewirken einer solchen Einschränkung ist das Bereitstellen einer multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung, in der mehrere Nukleotide an ein Partikel, wie ein Polymer, ein verzweigtes Polymer, ein Dendrimer, eine Mizelle, ein Liposom, ein Mikropartikel, ein Nanopartikel, einen Quantenpunkt oder ein anderes geeignetes Partikel, das dem Stand der Technik entspricht, gebunden sind.

[0040] Die hierin offenbarte multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung kann mindestens ein Partikel-Nukleotid-Konjugat einschließen, und das Partikel-Nukleotid-Konjugat weist eine Vielzahl von Kopien desselben Nukleotids auf, das an das Partikel gebunden ist. Wenn das Nukleotid komplementär zu der Zielnukleinsäure ist, bildet das Partikel-Nukleotid-Konjugat einen Bindungs- oder Einbaukomplex mit der Polymerase und der Zielnukleinsäure und der Bindungs- oder Einbaukomplex weist eine erhöhte Stabilität und längere Persistenzzeit auf als der Bindungs- oder Einbaukomplex, der unter Verwendung eines einzelnen unkonjugierten oder ungebundenen Nukleotids gebildet wird. Jeder der Nukleotidreste der multivalenten Bindungszusammensetzung kann an ein komple-

mentäres N+1-Nukleotid eines geprimten Zielnukleinsäuremoleküls binden, wodurch ein multivalenter Bindungskomplex gebildet wird, der zwei oder mehr Zielnukleinsäuremoleküle, zwei oder mehr Polymerasemoleküle (oder andere Enzymmoleküle) und die multivalente Bindungszusammensetzung (z. B. das Polymer-Nukleotid-Konjugat) umfasst. Jeder der Nukleotidreste der multivalenten Bindungszusammensetzung kann an ein komplementäres N-Nukleotid eines geprimten Zielnukleinsäuremoleküls binden, wodurch ein multivalenter Bindungskomplex gebildet wird, der zwei oder mehr Zielnukleinsäuremoleküle, zwei oder mehr Polymerasemoleküle (oder andere Enzymmoleküle) und die multivalente Bindungszusammensetzung (z. B. das Polymer-Nukleotid-Konjugat) umfasst. Von diesem gebundenen Komplex kann das Nukleotid die komplementäre Base vor dem Einbau eines modifizierten reversibel blockierten Nukleotids abfragen, das den Replikationsstrang um 1 Base verlängert. Darüber hinaus kann man sich vorstellen, das N-Nukleotid mit einem gebundenen Komplex abzufragen, mit einem reversibel terminierten Nukleotid voranzuschreiten und anschließend die N+1-Base vor und nach der Entblockung zu untersuchen. Auf diese Weise könnte eine Fehlerprüfung durchgeführt und die Gesamtgenauigkeit des Basisaufrufs durch zweimaliges Lesen der abgefragten Daten verbessert werden. Der wichtige Unterscheidungsfaktor gegenüber herkömmlichen Verfahren besteht darin, dass die Bindung zur Abfrage der passenden Base verwendet wird, während der Vorwärts- oder Einbauschritt nur zur Weiterbewegung auf dem Verlängerungsstrang verwendet wird.

[0041] Die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung kann verwendet werden, um nachweisbare Signale in aktiven Regionen biochemischer Wechselwirkungen, wie Stellen von Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen, Nukleinsäure-Hybridisierungsreaktionen oder enzymatischen Reaktionen, wie Polymerasereaktionen, zu lokalisieren. Zum Beispiel kann die hierin beschriebene multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung verwendet werden, um Stellen des Baseneinbaus bei der Verlängerung von Nukleinsäureketten während Polymerasereaktionen zu identifizieren und eine Basendiskriminierung für Sequenzierungs- und Array-basierte Anwendungen bereitzustellen. Die erhöhte Bindung oder der erhöhte Einbau zwischen der Zielnukleinsäure und dem Nukleotid in der multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung, wenn das Nukleotid komplementär zu der Zielnukleinsäure ist, stellt ein verstärktes Signal bereit, das die Genauigkeit des Basenaufbaus stark verbessert und die Bildungszeit verkürzt.

[0042] Außerdem ermöglicht die Verwendung der multivalenten Bindungszusammensetzung, dass Sequenzierungssignale von einer gegebenen

Sequenz aus Clusterregionen stammen, die mehrere Kopien der Zielsequenz enthalten. Sequenzierungsverfahren mit mehreren Kopien einer Zielsequenz haben den Vorteil, dass die Signale durch das Vorhandensein mehrerer gleichzeitiger Sequenzierungsreaktionen innerhalb der definierten Region amplifiziert werden können, wobei jede ihr eigenes Signal liefert. Das Vorhandensein mehrerer Signale innerhalb eines definierten Bereichs verringert auch die Auswirkung eines einzelnen übersprungenen Zyklus, da das Signal von einer großen Anzahl korrekter Basisaufrufe das Signal von einer kleineren Anzahl übersprungener oder falscher Basisaufrufe überwältigen kann, wodurch Verfahren zur Verringerung von Phasenfehlern und/oder zur Verbesserung der Leselänge bei Sequenzierungsreaktionen bereitgestellt werden.

[0043] Die hierin offenbarten multivalenten Bindungszusammensetzungen und ihre Verwendung haben eine oder mehrere der folgenden Auswirkungen: (i) ein stärkeres Signal für eine bessere Genauigkeit des Basenaufbaus im Vergleich zu herkömmlichen Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren und Sequenzierungsverfahren; ii) es wird eine größere Unterscheidung des sequenzspezifischen Signals von Hintergrundsignalen ermöglicht; (iii) reduzierte Anforderungen an die Menge an erforderlichem Ausgangsmaterial, (iv) erhöhte Sequenzierungsrate und verkürzte Sequenzierungszeit; (v) Reduzieren von Phasenfehlern und (vi) Verbessern der Leselänge in Sequenzierungsreaktionen.

[0044] In einigen Ausführungsformen kann die Zielnukleinsäure auf eine Zielnukleinsäureprobe mit einem oder mehreren Nukleinsäuremolekülen Bezug nehmen. In einigen Ausführungsformen kann die Zielnukleinsäure eine Vielzahl von Nukleinsäuremolekülen einschließen. In einigen Ausführungsformen kann die Zielnukleinsäure zwei oder mehr Nukleinsäuremoleküle einschließen. In einigen Ausführungsformen kann die Zielnukleinsäure zwei oder mehr Nukleinsäuremoleküle mit den gleichen Sequenzen einschließen.

A. Sequenzierung von Zielnukleinsäure

[0045] Fig. 1A-1H veranschaulichen ein beispielhaftes Verfahren, bei dem die multivalente Bindungszusammensetzung zum Sequenzieren einer Zielnukleinsäure verwendet wird. Wie in Fig. 1A gezeigt, kann die Zielnukleinsäure 102 an eine feste Trägeroberfläche 101 gebunden werden. Die Zielnukleinsäure kann direkt oder indirekt an die Oberfläche gebunden werden. Obwohl in Fig. 1A nicht gezeigt, kann die Zielnukleinsäure 102 an einen Adapter hybridisiert werden, der über eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung an die Oberfläche gebunden ist. Wenn ein oder mehrere Adapter verwendet werden,

um die Zielnukleinsäure an die Oberfläche zu binden, kann die Zieloberfläche ein Fragment umfassen, das komplementär zu dem Adapter ist und somit an den Adapter hybridisiert. In einigen Fällen kann eine Adaptersequenz an die Oberfläche gebunden werden. In einigen Fällen kann eine Vielzahl von Adaptersequenzen an die Oberfläche gebunden werden. In einigen Fällen kann die Zielnukleinsäure 102 auch direkt ohne die Verwendung eines Adapters an die Oberfläche des festen Trägers gebunden werden. Der feste Träger kann eine Oberfläche mit schwacher unspezifischer Bindung sein.

[0046] In Fig. 1B wird nach dem anfänglichen Schritt des Anheftens der Zielnukleinsäure an die Oberfläche einer festen Trägeroberfläche (z. B. durch Hybridisierung an Adapter) die Zielnukleinsäure dann klonal amplifiziert, um Cluster amplifizierter Nukleinsäuren zu bilden. Wenn die Zielnukleinsäure über einen Adapter an die Oberfläche gebunden ist, kann die Oberflächendichte klonal amplifizierter Nukleinsäuresequenzen, die an den Adapter auf der Trägeroberfläche hybridisiert sind, den gleichen Bereich überspannen wie die Oberflächendichte angebundener Adapter (oder Primer). Die klonale Amplifikation kann durch die Verwendung einer Polymerasekettenreaktion (PCR), einer multiplen Verdrängungsamplifikation (MDA), einer transkriptionsvermittelten Amplifikation (TMA), einer Nukleinsäuresequenzbasierten Amplifikation (NASBA), einer Strangverdrängungsamplifikation (SDA), einer Echtzeit-SDA, einer Brückenamplifikation, einer isothermen Brückenamplifikation, einer Rolling-Circle-Amplifikation, einer Circle-to-Circle-Amplifikation, einer Helikase-abhängigen Amplifikation, einer Rekombinase-abhängigen Amplifikation, einer Einzelstrang-Bindungsprotein-abhängigen Amplifikation (SSB) oder einer Kombination davon durchgeführt werden.

[0047] Fig. 1C veranschaulicht einen nicht einschränkenden Schritt des Annealens eines Primers 103 an die Zielnukleinsäure 102, um eine geprimte Zielnukleinsäure 104 zu bilden. Fig. 1B zeigt nur einen Primer, der im Annealing-Schritt verwendet wird, jedoch können je nach Art der Zielnukleinsäure mehr als ein Primer verwendet werden. In einigen Fällen hat der Adapter, der verwendet wird, um die Zielnukleinsäure an die Oberfläche zu binden, die gleiche Sequenz wie der Primer, der verwendet wird, um die geprimte Zielnukleinsäure herzustellen. Der Primer kann Vorwärts-Amplifikationsprimer, Rückwärts-Amplifikationsprimer, Sequenzierungsprimer und/oder molekulare Barcodierungssequenzen oder eine beliebige Kombination davon umfassen. In einigen Fällen kann eine Primersequenz in dem Hybridisierungsschritt verwendet werden. In einigen Fällen kann eine Vielzahl von verschiedenen Primersequenzen in dem Hybridisierungsschritt verwendet werden.

[0048] Wie in **Fig. 1D** gezeigt, wird die geprimte Zielnukleinsäure 104 mit einer multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung und einer Polymerase 106 kombiniert, um einen Bindungs- oder Einbaukomplex zu bilden. Das nicht einschränkende Beispiel für eine multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung in **Fig. 1D** umfasst vier Partikel-Nukleotid-Konjugate 105a, 105b, 105c und 105d. Jedes Partikel-Nukleotid-Konjugat weist mehrere Kopien eines Nukleotids auf, das an das Partikel gebunden ist, und die vier Partikel-Nukleotid-Konjugate decken jeweils vier Arten von Nukleotiden ab. Das Partikel-Nukleotid-Konjugat, das ein zu der nächsten Base auf der geprimten Zielnukleinsäure komplementäres Nukleotid aufweist, bildet einen Bindungs- oder Einbaukomplex mit der Polymerase und der Zielnukleinsäure. In einigen Fällen kann die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung ein, zwei oder drei Partikel-Nukleotid-Konjugate einschließen. In einigen Ausführungsformen kann jede unterschiedliche Art von Partikel-Nukleotid-Konjugat mit einer separaten Markierung markiert sein. In einigen Ausführungsformen können drei von vier Arten von Nukleotid-Konjugaten markiert sein, wobei eine vierte entweder unmarkiert oder an eine nicht nachweisbare Markierung konjugiert ist. In einigen Ausführungsformen können 1, 2, 3 oder 4 Partikel-Nukleotid-Konjugate markiert sein, entweder mit der gleichen Markierung oder jeweils mit einer Markierung, die der Identität ihres konjugierten Nukleotids entspricht, mit jeweils 3, 2, 1 oder keinen Partikel-Nukleotid-Konjugaten, die entweder unmarkiert belassen oder mit einer nicht nachweisbaren Markierung konjugiert sein können. In einigen Ausführungsformen kann der Nachweis eines Polymerasekomplexes, der ein Partikel-Nukleotid-Konjugat enthält, unter Verwendung von Vierfarbendetektion durchgeführt werden, sodass Konjugate, die allen vier Nukleotiden entsprechen, in einer Probe vorhanden sind, wobei jedes Konjugat eine separate Markierung aufweist, die dem daran konjugierten Nukleotid entspricht. In einigen Ausführungsformen können die vier Partikel-Nukleotid-Konjugate gleichzeitig der Zielnukleinsäure ausgesetzt oder damit in Kontakt gebracht werden; in einigen anderen Ausführungsformen können die vier Partikel-Nukleotid-Konjugate der Zielnukleinsäure sequenziell ausgesetzt oder damit in Kontakt gebracht werden, entweder einzeln oder in Gruppen von zwei oder drei. In einigen Ausführungsformen kann der Nachweis eines Polymerasekomplexes, der ein Partikel-Nukleotid-Konjugat enthält, unter Verwendung von Dreifarbendetektion durchgeführt werden, sodass Konjugate, die drei der vier Nukleotide entsprechen, in einer Probe vorhanden sind, wobei drei Konjugate eine separate Markierung aufweisen, die dem Nukleotid entspricht, das daran konjugiert ist, und ein Konjugat keine Markierung aufweist oder an eine nicht nachweisbare Markierung konjugiert ist. In einigen Ausführungsformen werden nur drei Arten von Konjugaten bereitge-

stellt, sodass Konjugate, die drei der vier Nukleotide entsprechen, in einer Probe vorhanden sind, wobei drei Konjugate eine separate Markierung aufweisen, die dem daran konjugierten Nukleotid entspricht, und ein Konjugat fehlt. In einigen Ausführungsformen kann die Identität von Nukleotiden, die einem unmarkierten oder fehlenden Nukleotid-Konjugat entsprechen, in Bezug auf die Position und/oder Identität von „dunklen“ Punkten oder Positionen bekannter Zielnukleinsäuren, die kein Fluoreszenzsignal zeigen, bestimmt werden. In einigen Ausführungsformen stellt die vorliegende Offenbarung das Verfahren bereit, wobei der Nachweis des Bindungs- oder Einbaukomplexes in Abwesenheit von ungebundenen oder in Lösung befindlichen Polymer-Nukleotid-Konjugaten durchgeführt wird.

[0049] In einigen Ausführungsformen, in denen drei der vier Partikel-Nukleotid-Konjugate markiert sind oder in denen nur drei der vier Partikel-Nukleotid-Konjugate vorhanden sind, kann die Identität des Nukleotids, das dem unmarkierten oder abwesenden Konjugat entspricht, durch das Fehlen eines Signals oder durch Überwachen des Vorhandenseins von unmarkierten Komplexen, wie durch die Identifizierung von „dunklen“ Stellen oder unmarkierten Regionen in einer Sequenzierungsreaktion, festgestellt werden. In einigen Ausführungsformen kann der Nachweis eines Polymerasekomplexes, der ein Partikel-Nukleotid-Konjugat enthält, unter Verwendung von Zweifarbendetektion durchgeführt werden, sodass Konjugate, die zwei der vier Nukleotide entsprechen, in einer Probe vorhanden sind, wobei zwei Konjugate eine separate Markierung aufweisen, die dem Nukleotid entspricht, das daran konjugiert ist, und zwei Konjugate keine Markierung aufweisen oder an eine nicht nachweisbare Markierung konjugiert sind. In einigen Ausführungsformen sind nur zwei der vier Partikel-Nukleotid-Konjugate markiert. In einigen Ausführungsformen, in denen zwei der vier Partikel-Nukleotid-Konjugate markiert sind, kann die Identität des Nukleotids, das dem unmarkierten Konjugat oder den unmarkierten Konjugaten entspricht, durch das Fehlen eines Signals oder durch Überwachen des Vorhandenseins von unmarkierten Komplexen, wie durch die Identifizierung von „dunklen“ Stellen oder unmarkierten Regionen in einer Sequenzierungsreaktion, festgestellt werden. In einigen Ausführungsformen, in denen zwei der vier Partikel-Nukleotid-Konjugate markiert sind, können die vier Partikel-Nukleotid-Konjugate der Zielnukleinsäure sequenziell ausgesetzt oder damit in Kontakt gebracht werden, entweder einzeln oder in Gruppen von zwei oder drei. In einigen Ausführungsformen können zwei der vier Partikel-Nukleotid-Konjugate eine gemeinsame Markierung teilen, und die vier Partikel-Nukleotid-Konjugate können der Zielnukleinsäure sequenziell ausgesetzt oder damit in Kontakt gebracht werden, entweder einzeln, oder in Gruppen von zwei oder drei, wobei jeder Kontaktie-

rungsschritt die Unterscheidung zwischen zwei oder mehr verschiedenen Basen zeigt, sodass nach zwei, drei, vier oder mehr solcher Kontaktierungsschritte die Identitäten aller unbekannten Basen bestimmt wurden.

[0050] Fig. 1E veranschaulicht die Bilder, die auf der Oberfläche aufgenommen wurden, nachdem der Bindungs- oder Einbaukomplex zwischen der Polymerase, der Zielnukleinsäure und dem Partikel-Nukleotid-Konjugat mit einem Nukleotid, das zu der nächsten Base der geprimten Zielnukleinsäure komplementär ist, gebildet wurde. Das aufgenommene Bild schließt vier Bindungs- oder Einbaukomplexe 107a, 107b, 107c und 107d ein, die auf der Oberfläche gebildet werden, und jeder Bindungs- oder Einbaukomplex weist ein unterschiedliches Nukleotid auf, das basierend auf der Markierung (z. B. Fluoreszenzemissionsfarbe) auf dem Partikel-Nukleotid-Konjugat unterschieden werden kann. Da die Verwendung des Partikel-Nukleotid-Konjugats ermöglicht, dass Bindungs- oder Einbausignale von einer gegebenen Sequenz innerhalb von Clusterregionen entstehen, die mehrere Kopien der Zielsequenz enthalten, werden die Sequenzierungssignale stark verstärkt. Obwohl Fig. 1E vier Partikel-Nukleotid-Konjugate beinhaltet, die jeweils eine unterschiedliche Art Nukleotid aufweisen, können einige Verfahren ein, zwei oder drei Partikel-Nukleotid-Konjugate verwenden, die jeweils eine unterschiedliche Art Nukleotid und Markierung aufweisen. In einigen Ausführungsformen kann jede unterschiedliche Art von Partikel-Nukleotid-Konjugat entweder mit der gleichen Markierung oder jeweils mit einer Markierung, die der Identität ihres konjugierten Nukleotids entspricht, markiert sein. In einigen Ausführungsformen können drei von vier Arten von Nukleotid-Konjugaten markiert sein, wobei eine vierte entweder unmarkiert oder an eine nicht nachweisbare Markierung konjugiert ist. In einigen Ausführungsformen können 1, 2, 3 oder 4 Partikel-Nukleotid-Konjugate mit einer separaten Markierung markiert sein, wobei 3, 2, 1 bzw. keine Partikel-Nukleotid-Konjugate entweder unmarkiert oder mit einer nicht nachweisbaren Markierung konjugiert sind. In einigen Ausführungsformen kann ein Nachweisschritt eine gleichzeitige und/oder serielle Anregung von bis zu 4 verschiedenen Anregungswellenlängen umfassen, beispielsweise wobei die Fluoreszenzbildgebung durch Nachweisen einzelner und/oder mehrerer Fluoreszenzemissionsbanden durchgeführt wird, die jede der möglichen Basenpaarungen (A, G, C oder T) eindeutig klassifizieren. In einigen Ausführungsformen können vier verschiedene Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen, die jeweils ein anderes Nukleotid oder Nukleotidanalogen umfassen, verwendet werden, um die Identität des terminalen Nukleotids zu bestimmen, wobei eine der vier verschiedenen Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauzusammensetzungen mit einem ersten Fluorophor markiert ist,

eines mit einem zweiten Fluorophor markiert ist, eines mit sowohl dem ersten als auch dem zweiten Fluorophor markiert ist und eines nicht markiert ist, und wobei der Nachweisschritt eine gleichzeitige Anregung bei einer ersten Anregungswellenlänge und einer zweiten Anregungswellenlänge umfasst und Bilder bei einer ersten Fluoreszenzemissionswellenlänge und einer zweiten Fluoreszenzemissionswellenlänge erfasst werden.

[0051] Wenn die multivalente Bindungs- oder Einbauzusammensetzung als Ersatz einzelner unkongjugierter oder ungebundener Nukleotide verwendet wird, um einen Bindungs- oder Einbaukomplex mit der Polymerase und der geprimten Zielnukleinsäure zu bilden, wird die lokale Konzentration des Nukleotids um ein Vielfaches erhöht, was wiederum die Signalintensität erhöht. Der gebildete Bindungs- oder Einbaukomplex weist auch eine längere Persistenzzeit auf, was wiederum zur Verkürzung des Bildgebungsschritts beiträgt. Die hohe Signalintensität resultiert aus der hohen Bindungs- oder Einbauavidität des Polymer-Nukleotid-Konjugats (das auch mehrere Fluorophore oder andere Markierungen umfassen kann), das somit einen Komplex bildet, der für den gesamten Bindungs- oder Einbau- und Bildgebungsschritt stabil bleibt. Die starke Bindung oder der starke Einbau zwischen der Polymerase, dem geprimten Zielstrang und dem Polymer-Nukleotid- oder -Nukleotidanalogen-Konjugat bedeutet auch, dass der so gebildete multivalente Bindungs- oder Einbaukomplex während der Waschschrte stabil bleibt und die Signalintensität hoch bleibt, wenn andere Reaktionsgemischkomponenten und nicht übereinstimmende Nukleotidanaloga weggewaschen werden. Nach dem Bildgebungsschritt kann der Bindungs- oder Einbaukomplex destabilisiert werden (z. B. durch Ändern der Pufferzusammensetzung) und die geprimte Zielnukleinsäure kann dann um eine Base verlängert werden.

[0052] Das Sequenzierungsverfahren kann ferner das Einbauen des N+1- oder terminalen Nukleotids in den geprimten Strang umfassen, wie in Fig. 1F gezeigt. In Fig. 1F kann der Primerstrang der geprimten Zielnukleinsäure 108 um eine Base verlängert werden, um eine verlängerte Nukleinsäure 109 zu bilden. Der Verlängerungsschritt kann nach oder gleichzeitig mit der Destabilisierung des multivalenten Bindungs- oder Einbaukomplexes erfolgen. Die geprimte Zielnukleinsäure 108 kann unter Verwendung eines komplementären Nukleotids, das an das Partikel in dem Partikel-Nukleotid-Konjugat gebunden ist, oder unter Verwendung eines unkongjugierten oder ungebundenen freien Nukleotids, das bereitgestellt wird, nachdem die multivalente Bindungs- oder Einbauzusammensetzung entfernt wurde, verlängert werden.

[0053] Nach dem Verlängerungsschritt kann der Kontaktierungsschritt, wie in **Fig. 1G** gezeigt, erneut durchgeführt werden, um Bindungs- oder Einbaukomplexe zu bilden und den nächsten Sequenzierungszyklus zu imitieren. Die Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Verlängerns können für einen oder mehrere Zyklen wiederholt werden, wodurch die Sequenz des Zielnukleinsäuremoleküls bestimmt wird. Zum Beispiel veranschaulicht **Fig. 1H** die Oberflächenbilder, die nach dem Durchführen mehrerer Sequenzierungszyklen erhalten werden, und die Bilder können dann verarbeitet werden, um die Sequenzen der Zielnukleinsäuremoleküle zu bestimmen.

[0054] Die Verlängerung der geprimten Zielnukleinsäure kann aufgrund eines blockierten Nukleotids auf dem Strang oder der Verwendung von Polymerase, die katalytisch inaktiv ist, verhindert oder gehemmt werden. Wenn das Nukleotid in dem Polymer-Nukleotid-Konjugat eine blockierende Gruppe aufweist, welche die Verlängerung der Nukleinsäure verhindert, kann der Einbau eines Nukleotids durch die Entfernung einer blockierenden Gruppe von dem Nukleotid erreicht werden (wie beispielsweise durch Abspaltung des Nukleotids von seinem Polymer, verzweigten Polymer, Dendrimer, Partikel oder dergleichen). Wenn die Verlängerung der geprimten Zielnukleinsäure aufgrund der Verwendung von Polymerase, die katalytisch inaktiv ist, inhibiert wird, kann der Einbau eines Nukleotids durch die Bereitstellung eines Cofaktors oder Aktivators, wie eines Metallions, erreicht werden.

[0055] Ebenfalls hierin offenbart sind Systeme, die zum Durchführen eines der offenbarten Nukleinsäuresequenzierungs- oder Nukleinsäureanalyseverfahren konfiguriert sind. Das System kann eine Fluidflusssteuerung und/oder ein Fluidabgabesystem umfassen, die konfiguriert sind, um die geprimten Zielnukleinsäuremoleküle, die an einen festen Träger gebunden sind, sequenziell und iterativ mit der offenbarten Polymerase und den multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzungen und/oder Reagenzien in Kontakt zu bringen. Das Inkontaktbringen kann innerhalb einer oder mehrerer Durchflussszellen durchgeführt werden. In einigen Fällen können diese Durchflussszellen feste Komponenten des Systems sein. In einigen Fällen können die Durchflussszellen entfernbare und/oder Einweg-Komponenten des Systems sein.

[0056] Das Sequenzierungssystem kann ein Bildgebungsmodul einschließen, d. h. eine oder mehrere Lichtquellen, eine oder mehrere optische Komponenten und einen oder mehrere Bildsensoren zur Bildgebung und zum Nachweis der Bindung oder des Einbaus der offenbarten Nukleinsäure-Bindungs- oder -Einbauszusammensetzungen an Zielnukleinsäuremoleküle, die an einen festen Träger oder

das Innere einer Durchflussszelle gebunden sind. Die offenbarten Zusammensetzungen, Reagenzien und Verfahren können für jede von einer Vielfalt von Nukleinsäure-Sequenzierungsanwendungen und Analyseanwendungen verwendet werden. Beispiele schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, DNA-Sequenzierung, RNA-Sequenzierung, Sequenzierung des gesamten Genoms, gezielte Sequenzierung, Exom-Sequenzierung, Genotypisierung und dergleichen ein.

[0057] Das Sequenzierungssystem kann auch Computersteuersysteme einschließen, die programmiert sind, um Verfahren der Offenbarung zu implementieren. Das Computersystem ist programmiert oder anderweitig konfiguriert, um Verfahren der Offenbarung zu implementieren, einschließlich Nukleinsäure-Sequenzierungsverfahren, Interpretation von Nukleinsäure-Sequenzierungsdaten und Analyse von zellulären Nukleinsäuren, wie RNA (z. B. mRNA), und Charakterisierung von Zellen aus Sequenzierungsdaten. Das Computersystem kann eine elektronische Vorrichtung eines Benutzers oder ein Computersystem sein, das in Bezug auf die elektronische Vorrichtung entfernt angeordnet ist. Die elektronische Vorrichtung kann eine mobile elektronische Vorrichtung sein.

[0058] **Fig. 2** ist ein Flussdiagramm, das die Schritte bei der Sequenzierung einer Zielnukleinsäure skizziert. 201 beschreibt einen Schritt des Anheftens von Zielbibliothekssequenzen an eine feste Trägoberfläche durch Hybridisieren der Zielnukleinsäuremoleküle an komplementäre Adapter auf der Substratoberfläche. Die Zielnukleinsäuremoleküle können einzelsträngig oder teilweise doppelsträngig sein. Vor 201 können die Nukleinsäuremoleküle in der Zielbibliothek durch Ligation oder andere Verfahren so vorbereitet worden sein, dass sie Fragmente enthalten, die zu den Adaptersequenzen komplementär sind. 202 beschreibt den Schritt der klonalen Amplifikation, um Cluster von Zielnukleinsäuremolekülen auf der Oberfläche zu erzeugen. 203 beschreibt die Hybridisierung von Sequenzierungsprimern an komplementäre Primerbindungs- oder Einbausequenzen auf der Zielnukleinsäure zur Bildung der geprimten Zielnukleinsäure. 204 beschreibt das Kombinieren der Polymerase, der multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung, die markierte (z. B. fluoreszenzmarkierte) Partikel-Nukleotid-Konjugate enthält, und der geprimten Zielnukleinsäure. 204 kann auch einen Schritt des Waschens oder Entfernens der ungebundenen Reagenzien einschließlich Polymerase und Partikel-Nukleotid-Konjugat einschließen.

[0059] Wiederum bezugnehmend auf **Fig. 2**, wenn das Nukleotid auf dem Partikel-Nukleotid-Konjugat komplementär zu der nächsten Base der geprimten Zielnukleinsäure (205) ist, bilden das Partikel-Nuk-

leotid-Konjugat, die Polymerase, und die geprimte Zielnukleinsäure einen ternären Bindungs- oder Einbaukomplex, der durch Nachweisverfahren (z. B. Fluoreszenzbildgebung) nachgewiesen werden kann, die mit der Markierung auf dem Partikel-Nukleotid-Konjugat kompatibel sind. 205 kann auch das Messen der Persistenzzeit des ternären Bindungs- oder Einbaukomplexes einschließen. In 206 wird der Bindungs- oder Einbaukomplex destabilisiert, um die Bindung oder den Einbau des Partikel-Nukleotid-Konjugats und der Polymerase zu entfernen. Die Dissoziation kann erreicht werden, indem der Bindungs- oder Einbaukomplex in einen Zustand versetzt wird (z. B. Zugabe von Strontiumionen), der die Konformation der Polymerase ändert und die Bindung oder den Einbau destabilisiert. 206 kann auch einen Schritt des Waschens oder Entfernens des dissoziierten Partikel-Nukleotid-Konjugats und/oder der Polymerase einschließen. 207 beschreibt den Schritt des Verlängerns des geprimten Strangs der geprimten Zielnukleinsäure durch eine Einzelbasen-Additionsreaktion. Nach der Einzelbasenverlängerung können die Schritte 204, 205, 206 und 207 in mehreren Zyklen wiederholt werden, um die Sequenzen der Zielnukleinsäure zu bestimmen. **Fig. 3** ist ein weiteres Flussdiagramm, das die Schritte beim Sequenzieren einer Zielnukleinsäure skizziert, was das Abspalten eines Nukleotids von dem Partikel-Nukleotid-Konjugat und das Einbauen des abgespaltenen Nukleotids einschließt. 301 beschreibt einen Schritt des Anheftens von Zielbibliothekssequenzen an eine feste Trägeroberfläche durch Hybridisieren der Zielnukleinsäuremoleküle an komplementäre Adapter auf der Substratoberfläche. Die Zielnukleinsäuremoleküle können einzelsträngig oder teilweise doppelsträngig sein. Vor 301 können die Nukleinsäuremoleküle in der Zielbibliothek durch Ligation oder andere Verfahren so vorbereitet worden sein, dass sie Fragmente enthalten, die zu den Adaptersequenzen komplementär sind. 302 beschreibt den Schritt der klonalen Amplifikation, um Cluster von Zielnukleinsäuremolekülen auf der Oberfläche zu erzeugen. 303 beschreibt die Hybridisierung von Sequenzierungsprimern an komplementäre Primerbindungs- oder Einbausequenzen auf der Zielnukleinsäure zur Bildung der geprimten Zielnukleinsäure. 304 beschreibt das Kombinieren der Polymerase, der multivalenten Bindungs- oder Einbauzusammensetzung, die markierte (z. B. fluoreszenzmarkierte) Partikel-Nukleotid-Konjugate enthält, und der geprimten Zielnukleinsäure. In den Partikel-Nukleotid-Konjugaten sind die Nukleotide über chemische Bindungen oder später trennbare Wechselwirkungen an das Partikel gebunden. 404 kann auch einen Schritt des Waschens oder Entfernens der ungebundenen Reagenzien einschließlich Polymerase und Partikel-Nukleotid-Konjugat einschließen.

[0060] Wiederum beziehend auf **Fig. 3**, wenn das Nukleotid auf dem Partikel-Nukleotid-Konjugat komplementär zu der nächsten Base der geprimten Zielnukleinsäure (305) ist, bilden das Partikel-Nukleotid-Konjugat, die Polymerase, und die geprimte Zielnukleinsäure einen ternären Bindungs- oder Einbaukomplex, der durch Nachweisverfahren (z. B. Fluoreszenzbildgebung) nachgewiesen werden kann, die mit der Markierung auf dem Partikel-Nukleotid-Konjugat kompatibel sind. 305 kann auch das Messen der Persistenzzeit des ternären Bindungs- oder Einbaukomplexes einschließen. In 306 wird die Polymerase in einen Zustand gebracht, der sie katalytisch aktiv macht, um ein Nukleotid einzubauen. Der Zustand kann die Exposition der Polymerase gegenüber Mg- oder Mn-Ionen in der Reaktionslösung einschließen. Das Nukleotid, das an die Polymerase und die geprimte Zielnukleinsäure gebunden ist, wird dann von dem Partikel abgespalten und dann in den geprimten Strang der geprimten Zielnukleinsäure eingebaut. Der Bindungs- oder Einbaukomplex wird destabilisiert. 306 kann auch einen Schritt des Waschens oder Entfernens des dissoziierten Partikel-Nukleotid-Konjugats und/oder der Polymerase einschließen. Nach der Verlängerung können die Schritte 304, 305 und 306 in mehreren Zyklen wiederholt werden, um die Sequenzen der Zielnukleinsäure zu bestimmen.

B. Nachweisen von Zielnukleinsäuremolekülen

[0061] **Fig. 4A-4B** veranschaulichen ein beispielhaftes Verfahren, bei dem die multivalente Bindungs- oder Einbauzusammensetzung zum Nachweisen einer Zielnukleinsäure verwendet wird. Wie in **Fig. 4A** gezeigt, wird das Polymer-Nukleotid-Konjugat 401 mit Polymerase 406, einem ersten Nukleinsäuremolekül 404 und einem zweiten Nukleinsäuremolekül 405 in Kontakt gebracht. Das Polymer-Nukleotid-Konjugat 401 weist mehrere Polymerzweige auf, die strahlenförmig vom Kern ausgehen, und einige Zweige sind an Nukleotid oder Oligonukleotid 402 gebunden, und einige Zweige sind an eine Markierung 403 gebunden. Wenn das Nukleotid oder Oligonukleotid 402 auf dem Polymer-Nukleotid-Konjugat 401 zu mindestens einem Teil der ersten Nukleinsäure 404 komplementär ist, wird ein multivalenter Bindungs- oder Einbaukomplex gebildet, wie in **FIG. B** gezeigt, und das starke Bindungs- oder Einbausignal kann dabei helfen, Zielnukleinsäure mit Sequenzen nachzuweisen, die komplementär oder teilweise komplementär zu dem Nukleotid oder Oligonukleotid auf dem Polymer-Nukleotid-Konjugat sind. In einigen Fällen ist mindestens eines von der Polymerase, den Nukleinsäuremolekülen und den Polymer-Nukleotid-Konjugaten an einen festen Träger gebunden.

[0062] Die hierin beschriebene multivalente Bindungs- oder Einbauzusammensetzung kann in

einem Verfahren zum Nachweisen einer Zielnukleinsäure in einer Probe verwendet werden. Ebenfalls hierin offenbart sind Systeme, die zum Durchführen eines der offenbarten Nukleinsäureanalyseverfahren konfiguriert sind. Das System kann eine Fluidflusssteuerung und/oder ein Fluidabgabesystem umfassen, die konfiguriert sind, um die Nukleinsäuremoleküle sequenziell und iterativ mit der offenbarten Polymerase und den multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzungen und/oder Reagenzien in Kontakt zu bringen. Das Inkontaktbringen kann innerhalb einer oder mehrerer Durchflussszellen durchgeführt werden. In einigen Fällen können diese Durchflussszellen feste Komponenten des Systems sein. In einigen Fällen können die Durchflussszellen entfernbare und/oder Einweg-Komponenten des Systems sein. Das System kann auch eine Kartusche einschließen, die eine Probensammeleinheit und eine Assay-Anordnung umfasst, wobei die Probensammeleinheit konfiguriert ist, um eine Probe zu sammeln, und wobei die Assay-Anordnung mindestens eine Reaktionsstelle umfasst, die eine multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung enthält, die angepasst ist, um mit dem Analyten zu interagieren, wodurch ermöglicht wird, dass der vorbestimmte Teil der Probe mit Assay-Reagenzien, die in der Assay-Anordnung enthalten sind, reagiert, um ein Signal zu ergeben, welches das Vorhandensein des Analyten in der Probe anzeigt, und dass das von dem Analyten erzeugte Signal nachgewiesen wird.

III. Multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung

[0063] Die vorliegende Offenbarung betrifft multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzungen mit einer Vielzahl von Nukleotiden, die an ein Partikel konjugiert sind (z. B. ein Polymer, verzweigtes Polymer, Dendrimer oder eine äquivalente Struktur). Das Inkontaktbringen der multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung mit einer Polymerase und mehreren Kopien einer geprimten Zielnukleinsäure kann zur Bildung eines ternären Komplexes führen, der nachgewiesen werden kann, und wodurch wiederum eine genauere Bestimmung der Basen der Zielnukleinsäure erreicht werden kann.

[0064] Wenn die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung als Ersatz für ein einzelnes unkonjugiertes oder ungebundenes Nukleotid verwendet wird, um einen Komplex mit der Polymerase und einer oder mehreren Kopien der Zielnukleinsäure zu bilden, wird die lokale Konzentration des Nukleotids sowie die Bindungsavidität des Komplexes (für den Fall, dass ein Komplex aus zwei oder mehr Zielnukleinsäuremolekülen gebildet wird) um ein Vielfaches erhöht, was wiederum die Signalintensität erhöht, insbesondere das korrekte Signal im Vergleich zur Nichtübereinstimmung. Die hierin beschriebene multivalente Bindungs- oder Einbau-

zusammensetzung kann mindestens ein Partikel-Nukleotid-Konjugat (wobei jedes Partikel-Nukleotid-Konjugat mehrere Kopien eines einzelnen Nukleotidrests umfasst) für die Interaktion mit der Zielnukleinsäure einschließen. Die multivalente Zusammensetzung kann auch zwei, drei oder vier unterschiedliche Partikel-Nukleotid-Konjugate einschließen, die jeweils ein unterschiedliches Nukleotid aufweisen, das an das Partikel konjugiert ist.

[0065] Die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung kann 1, 2, 3, 4 oder mehr Arten von Partikel-Nukleotid-Konjugaten umfassen, wobei jedes Partikel-Nukleotid-Konjugat eine andere Art von Nukleotid umfasst. Eine erste Art des Partikel-Nukleotid-Konjugats kann ein Nukleotid umfassen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus ATP, ADP, AMP, dATP, dADP und dAMP. Eine zweite Art des Partikel-Nukleotid-Konjugats kann ein Nukleotid umfassen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus TTP, TDP, TMP, dTTP, dTDP, dTMP, UTP, UDP, UMP, dUTP, dUDP und dUMP. Eine dritte Art des Partikel-Nukleotid-Konjugats kann ein Nukleotid umfassen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CTP, CDP, CMP, dCTP, dCDP und dCMP. Eine vierte Art des Partikel-Nukleotid-Konjugats kann ein Nukleotid umfassen, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus GTP, GDP, GMP, dGTP, dGDP und dGMP. In einigen Ausführungsformen umfasst jedes Partikel-Nukleotid-Konjugat eine einzelne Art von Nukleotid, der jeweils einem oder mehreren Nukleotiden entspricht, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus ATP, ADP, AMP, dATP, dADP, dAMP, TTP, TDP, TMP, dTTP, dTDP, dTMP, UTP, UDP, UMP, dUTP, dUDP, dUMP, CTP, CDP, CMP, dCTP, dCDP, dCMP, GTP, GDP, GMP, dGTP, dGDP und dGMP. Jede multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung kann ferner eine oder mehrere Markierungen umfassen, die dem bestimmten Nukleotid entsprechen, das an jedes jeweilige Konjugat konjugiert ist. Nicht einschränkende Beispiele für Markierungen schließen Fluoreszenzmarkierungen, kolorimetrische Markierungen, elektrochemische Markierungen (wie zum Beispiel Glucose oder andere reduzierende Zucker oder Thiole oder andere redoxaktive Einheiten), Lumineszenzmarkierungen, Chemilumineszenzmarkierungen, Spin-Markierungen, radioaktive Markierungen, sterische Markierungen, Affinitäts-Tags oder dergleichen ein.

A. Partikel-Nukleotid-Konjugat

[0066] In einem Partikel-Nukleotid-Konjugat können mehrere Kopien desselben Nukleotids kovalent oder nicht-kovalent an das Partikel gebunden sein. Beispiele für das Partikel können Folgendes einschließen: ein verzweigtes Polymer; ein Dendrimer; ein vernetztes Polymerpartikel, wie ein Agarose-, Polyacrylamid-, Acrylat-, Methacrylat-, Cyanoacrylat-,

Methylmethacrylatpartikel; ein Glaspartikel; ein Keramikpartikel; ein Metallpartikel; einen Quantenpunkt; ein Liposom; ein Emulsionspartikel oder ein beliebiges anderes Partikel (z. B. Nanopartikel, Mikropartikel oder dergleichen), das in der Technik bekannt ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Partikel ein verzweigtes Polymer.

[0067] In einigen Fällen kann das Partikel-Nukleotid-Konjugat (z. B. ein Polymer-Nukleotid-Konjugat) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder mehr als 10 Kopien eines Nukleotids, eines Nukleotidanalogs, eines Nukleosids oder eines Nukleosidanalogs umfassen, das an das Partikel gebunden ist.

[0068] Das Nukleotid kann über einen Linker mit dem Partikel verbunden sein, und das Nukleotid kann an ein Ende oder eine Stelle eines Polymers gebunden sein. Das Nukleotid kann über das 5'-Ende des Nukleotids an das Partikel konjugiert sein. In einigen Partikel-Nukleotid-Konjugaten ist ein Nukleotid an ein Ende oder eine Stelle eines Polymers gebunden. In einigen Partikel-Nukleotid-Konjugaten sind mehrere Nukleotide an ein Ende oder eine Stelle eines Polymers gebunden. Das konjugierte Nukleotid ist für ein oder mehrere Proteine, ein oder mehrere Enzyme und Nukleotidbindungseinheiten oder Nukleotideinbaueinheiten sterisch zugänglich. In einigen Ausführungsformen kann ein Nukleotid separat von einer Nukleotidbindungseinheit oder Nukleotideinbaueinheit, wie einer Polymerase, bereitgestellt werden. In einigen Ausführungsformen umfasst der Linker keine photoemittierende oder photoabsorbierende Gruppe.

[0069] Das Partikel kann auch eine Bindungs- oder Einbaueinheit aufweisen. In einigen Ausführungsformen können sich Partikel ohne die Verwendung einer separaten Wechselwirkungskomponente selbst assoziieren. In einigen Ausführungsformen können sich Partikel aufgrund von Pufferbedingungen oder Salzbedingungen selbst assoziieren, z. B. wie im Fall von durch Calcium vermittelten Wechselwirkungen von Hydroxyapatit-Partikeln, durch Lipide oder Polymer vermittelten Wechselwirkungen von Mizellen oder Liposomen oder durch Salz vermittelte Aggregation von metallischen (wie Eisen- oder Gold-) Nanopartikeln.

[0070] Das Partikel-Nukleotid-Konjugat kann eine oder mehrere Markierungen aufweisen. Zu Beispielen der Markierungen gehören, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Fluorophore, Spin-Markierungen, Metalle oder Metallionen, kolorimetrische Markierungen, Nanopartikel, PET-Markierungen, radioaktive Markierungen oder andere solche Markierungen, die Zusammensetzung durch solche Verfahren nachweisbar machen können, die in der Technik des Nachweisens von Makromolekülen oder molekularen Wechselwirkungen bekannt sind. Die Markierung

kann an das Nukleotid (z. B. durch Bindung an die 5'-Phosphateinheit eines Nukleotids), an das Partikel selbst (z. B. an die PEG-Untereinheiten), an ein Ende des Polymers, an eine zentrale Einheit, oder an irgendeine andere Stelle innerhalb des Polymer-Nukleotid-Konjugats angeheftet werden, die von einem Fachmann als ausreichend erkannt würde, um die Zusammensetzung, wie beispielsweise ein Partikel, durch solche Verfahren nachweisbar zu machen, die in der Technik bekannt sind oder an anderer Stelle hierin beschrieben sind. In einigen Ausführungsformen werden eine oder mehrere Markierungen bereitgestellt, um einem bestimmten Partikel-Nukleotid-Konjugat zu entsprechen oder ein solches zu unterscheiden.

[0071] In einigen Ausführungsformen ist die Markierung ein Fluorophor. Nicht einschränkende Beispiele für fluoreszierende Einheiten schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die Folgenden ein: Fluoreszein und Fluoreszeinderivate wie Carboxyfluoreszein, Tetrachlorfluoreszein, Hexachlorfluoreszein, Carboxynaphthofluoreszein, Fluoreszeinisothiocyanat, NHS-Fluoreszein, Iodacetamidofluoreszein, Fluoreszeinmaleimid, SAMS-Fluoreszein, Fluoreszein-Thiosemicarbazid, Carbohydrazinomethylthioacetyl-Amino-Fluoreszein, Rhodamin und Rhodaminderivate wie TRITC, TMR, Lissaminrhodamin, Texas Red, Rhodamin B, Rhodamin 6G, Rhodamin 10, NHS-Rhodamin, TMR-Iodacetamid, Lissamin-Rhodamin-B-Sulfonylchlorid, Lissamin-Rhodamin-B-Sulfonylhydrazin, Texas Red Sulfonylchlorid, Texas Red Hydrazid, Cumarin und Cumarinderivate wie AMCA, AMCA-NHS, AMCA-sulfo-NHS, AMCA-HPDP, DCIA, AMCE-Hydrazid, BODIPY und Derivate wie BODIPY FL C3-SE, BODIPY 530/550 C3, BODIPY 530/550 C3-SE, BODIPY 530/550 C3 Hydrazid, BODIPY 493/503 C3 Hydrazid, BODIPY FL C3 Hydrazid, BODIPY FL IA, BODIPY 530/551 IA, Br-BODIPY 493/503, Cascade Blue und Derivate wie Cascade Blue Acetylazid, Cascade Blue Cadaverin, Cascade Blue Ethylendiamin, Cascade Blue Hydrazid, Luzifergelb und Derivate wie Luzifergelb-Iodacetamid, Luzifergelb CH, Cyanin und Derivaten wie beispielsweise indoliumbasierte Cyaninfarbstoffe, benzoindoliumbasierte Cyaninfarbstoffe, pyridiumbasierte Cyaninfarbstoffe, thiozoliumbasierte Cyaninfarbstoffe, chinoliniumbasierte Cyaninfarbstoffe, imidazoliumbasierte Cyaninfarbstoffe, Cy3, Cy5, Lanthanidchelate und Derivate wie BCPDA, TBP, TMT, BHHCT, BCOT, Europiumchelate, Terbiumchelate, Alexa-Fluorfarbstoffe, DyLight -Farbstoffe, Atto-Farbstoffe, LightCycler-Rotfarbstoffe, CAL-Mehlfarbstoffe, JOE und Derivate davon, Oregongrün-Farbstoffe, WellRED-Farbstoffe, IRD-Farbstoffe, Phycocerythrin- und Phycobilin-Farbstoffe, Malachitgrün, Stilben, DEG-Farbstoffe, NR-Farbstoffe, Nahinfrarot-Farbstoffe und andere in der Technik bekannte Farbstoffe, wie diejenigen, die beschrieben sind in Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene,

Oreg.), 6. Auflage; Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2. Auflage, Plenum Press New York (1999), oder Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2. Auflage, oder Derivate davon oder beliebige Kombinationen davon. Cyaninfarbstoffe können in sulfonierter oder nichtsulfonierter Form vorliegen und bestehen aus zwei Indolenin-, Benzo-Indolium-, Pyridium-, Thiozolium- und/oder Chinoliniumgruppen, die durch eine Polymethinbrücke zwischen zwei Stickstoffatomen getrennt sind. Zu im Handel erhältlichen Cyaninfluorophoren gehören zum Beispiel, Cy3, (welches 1-[6-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yloxy)-6-oxohexyl]-2-(3-{ 1-[6-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy)-6-oxohexyl]-3,3-dimethyl-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden}prop-1-en-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indolium oder 1-[6-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yloxy)-6-oxohexyl]-2-(3-{ 1-[6-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yloxy)-6-oxohexyl]-3,3-dimethyl-5-sulfo-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden}prop-1-en-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indolium-5-sulfonat umfassen kann), Cy5 (welches 1-(6-((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-5-indolin-2-yliden)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium oder 1-(6-((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)-6-oxohexyl)-3,3-dimethyl-5-sulfoindolin-2-yliden)penta-1,3-dien-1-yl)-3,3-dimethyl-3H-indol-1-ium-5-sulfonat umfassen kann), und Cy7 (welches 1-(5-Carboxypentyl)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-ethyl-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden)hepta-1,3,5-trien-1-yl]-3H-indolium oder 1-(5-carboxypentyl)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-ethyl-5-sulfo-1,3-dihydro-2H-indol-2-yliden)hepta-1,3,5-trien-1-yl]-3H-indolium-5-sulfonat umfassen kann), wobei „Cy“ für „Cyanin“ steht und die erste Ziffer die Anzahl der Kohlenstoffatome zwischen zwei Indolenin-Gruppen angibt. Cy2, bei dem es sich nicht um Indolenin, sondern um ein Oxazolderivat handelt, und die benzoderivatisierten Cy3.5, Cy5.5 und Cy7.5 sind Ausnahmen von dieser Regel.

[0072] In einigen Ausführungsformen kann die Nachweismarkierung ein FRET-Paar sein, sodass mehrere Klassifizierungen in einem einzigen Anregungs- und Bildgebungsschritt durchgeführt werden können. Wie hier verwendet, kann FRET Übertragungen durch Anregungsaustausch (Forster) oder Elektronenaustausch (Dexter) umfassen.

B. Polymer-Nukleotid-Konjugat

[0073] Ein Beispiel für das Partikel-Nukleotid-Konjugat ist ein Polymer-Nukleotid-Konjugat. Einige nicht einschränkende Beispiele der Polymer-Nukleotid-Konjugate sind in **Fig. 5A-5C** gezeigt. Zum Beispiel zeigt **Fig. 5A** Polymer-Nukleotid-Konjugate mit verschiedenen Konfigurationen, z. B. einer „Starburst“-Konfiguration, umfassend einen fluoreszenzmarkierten Streptavidinkern und vier Nukleotide, die über

biotinylierte, lineare PEG-Linker mit einem Molekulargewicht im Bereich von 1 K Dalton bis 10 K Dalton an den Kern gebunden sind; **Fig. 5B** zeigt ein Polymer-Nukleotid-Konjugat mit einem Dendrimer-Kern aus zum Beispiel 12, 24, 48 oder 96 Armen und linearen PEG-Linkern mit einem Molekulargewicht im Bereich von 1 K Dalton bis 10 K Dalton, die vom Zentrum ausgehen; und **Fig. 5C** zeigt ein Beispiel für Polymer-Nukleotid-Konjugate, die ein Netzwerk von z. B. Streptavidin-Kernen umfassen, die durch verzweigte PEG-Linker miteinander verbunden sind, die eine Bindungs- oder Einbaueinheit, wie ein Biotin, umfassen.

[0074] Beispiele geeigneter linearer oder verzweigter Polymere schließen lineares oder verzweigtes Polyethylenglycol (PEG), lineares oder verzweigtes Polypropylenglycol, linearen oder verzweigten Polyvinylalkohol, lineare oder verzweigte Polymilchsäure, lineare oder verzweigte Polyglycolsäure, lineares oder verzweigtes Polyglycin, lineares oder verzweigtes Polyvinylacetat, ein Dextran oder andere solche Polymere oder Copolymere ein, die beliebige zwei oder mehr der Vorstehenden enthalten oder andere Polymere enthalten, wie sie in der Technik bekannt sind. In einer Ausführungsform ist das Polymer ein PEG. In einer anderen Ausführungsform kann das Polymer PEG-Verzweigungen aufweisen.

[0075] Geeignete Polymere können durch eine Wiederholungseinheit gekennzeichnet sein, die eine funktionelle Gruppe einschließt, die zur Derivatisierung geeignet ist, wie eine Amin-, eine Hydroxyl-, eine Carbonyl- oder eine Allylgruppe. Das Polymer kann auch einen oder mehrere vorderivatisierte Substituenten aufweisen, sodass eine oder mehrere bestimmte Untereinheiten eine Derivatisierungsstelle oder eine Verzweigungsstelle einschließen, unabhängig davon, ob andere Untereinheiten die gleiche Stelle, den gleichen Substituenten oder die gleiche Einheit einschließen oder nicht. Ein vorderivatisierter Substituent kann zum Beispiel ein Nukleotid, ein Nukleosid, ein Nukleotidanalogen, eine Markierung, wie eine Fluoreszenzmarkierung, eine radioaktive Markierung oder eine Spin-Markierung, eine Wechselwirkungseinheit, eine zusätzliche Polymereinheit oder dergleichen oder eine beliebige Kombination der Vorstehenden umfassen.

[0076] Im Polymer-Nukleotid-Konjugat kann das Polymer eine Vielzahl von Verzweigungen aufweisen. Das verzweigte Polymer kann verschiedene Konfigurationen aufweisen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf sternförmige Formen („Starburst“), aggregierte sternförmige Formen („Helterskeller“), Flaschenbürste oder Dendrimer. Das verzweigte Polymer kann von einem zentralen Befestigungspunkt oder einer zentralen Einheit ausgehen oder mehrere Verzweigungspunkte einschließen, wie zum Beispiel 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder

mehr Verzweigungspunkte. In einigen Ausführungsformen kann jede Untereinheit eines Polymers wahlweise einen separaten Verzweigungspunkt bilden.

[0077] Länge und Größe der Verzweigung können je nach Art des Polymers unterschiedlich sein. In einigen verzweigten Polymeren kann die Verzweigung eine Länge zwischen 1 und 1.000 nm, zwischen 1 und 100 nm, zwischen 1 und 200 nm, zwischen 1 und 300 nm, zwischen 1 und 400 nm, zwischen 1 und 500 nm, zwischen 1 und 600 nm, zwischen 1 und 700 nm, zwischen 1 und 800 nm oder zwischen 1 und 900 nm oder mehr aufweisen oder eine Länge aufweisen, die in oder zwischen einen der hierin offenbarten Werte fällt.

[0078] In einigen Polymer-Nukleotid-Konjugaten kann der Polymerkern eine Größe aufweisen, die einem scheinbaren Molekulargewicht von 1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 4 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa, 100 kDa oder einem beliebigen Wert innerhalb eines Bereichs entspricht, der durch beliebige zwei der Vorstehenden definiert ist. Das scheinbare Molekulargewicht eines Polymers kann aus dem bekannten Molekulargewicht einer repräsentativen Anzahl von Untereinheiten berechnet werden, wie durch Größenausschlusschromatographie bestimmt, wie durch Massenspektrometrie bestimmt oder wie durch ein beliebiges anderes Verfahren bestimmt, das dem Stand der Technik entspricht.

[0079] In einigen verzweigten Polymeren kann die Verzweigung eine Größe aufweisen, die einem scheinbaren Molekulargewicht von 1 kDa, 2 kDa, 3 kDa, 4 kDa, 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 50 kDa, 80 kDa, 100 kDa oder einem beliebigen Wert innerhalb eines Bereichs entspricht, der durch beliebige zwei der Vorstehenden definiert ist. Das scheinbare Molekulargewicht eines Polymers kann aus dem bekannten Molekulargewicht einer repräsentativen Anzahl von Untereinheiten berechnet werden, wie durch Größenausschlusschromatographie bestimmt, wie durch Massenspektrometrie bestimmt oder wie durch ein beliebiges anderes Verfahren bestimmt, das dem Stand der Technik entspricht. Das Polymer kann mehrfach verzweigt sein. Die Anzahl der Verzweigungen im Polymer kann 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 24, 32, 64, 128 oder mehr betragen, oder eine Zahl, die in einen Bereich fällt, der durch beliebige zwei dieser Werte definiert ist.

[0080] Für Polymer-Nukleotid-Konjugate, die ein verzweigtes Polymer von beispielsweise einem verzweigten PEG umfassen, das 4, 8, 16, 32 oder 64 Verzweigungen umfasst, kann das Polymer-Nukleotid-Konjugat Nukleotide aufweisen, die an die Enden der PEG-Verzweigungen gebunden sind, sodass an jedes Ende 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder mehr Nukleotide gebunden sind. In einem nicht einschränkenden Bei-

spiel kann an ein verzweigtes PEG-Polymer mit zwischen 3 und 128 PEG-Armen ein oder mehrere Nukleotide gebunden sein, sodass an jedem Ende 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder mehr Nukleotide oder Nukleotidanaloga gebunden sind. In einigen Ausführungsformen weist ein verzweigtes Polymer oder Dendrimer eine gerade Anzahl von Armen auf. In einigen Ausführungsformen weist ein verzweigtes Polymer oder Dendrimer eine ungerade Anzahl von Armen auf.

[0081] In einigen Fällen kann die Länge des Linkers (z. B. eines PEG-Linkers) im Bereich von etwa 1 nm bis etwa 1.000 nm liegen. In einigen Fällen kann die Länge des Linkers mindestens 1 nm, mindestens 10 nm, mindestens 25 nm, mindestens 50 nm, mindestens 75 nm, mindestens 100 nm, mindestens 200 nm, mindestens 300 nm, mindestens 400 nm, mindestens 500 nm, mindestens 600 nm, mindestens 700 nm, mindestens 800 nm, mindestens 900 nm oder mindestens 1.000 nm betragen. In einigen Fällen kann die Länge des Linkers zwischen beliebigen zwei der Werte in diesem Absatz liegen. Zum Beispiel kann in einigen Fällen die Länge des Linkers im Bereich von etwa 75 nm bis etwa 400 nm liegen. Fachleute werden erkennen, dass in einigen Fällen die Länge des Linkers einen beliebigen Wert innerhalb des Wertebereichs in diesem Absatz z. B. 834 nm aufweisen kann.

[0082] In einigen Fällen ist die Länge des Linkers für verschiedene Nukleotide (einschließlich Desoxyribonukleotide und Ribonukleotide), Nukleotidanaloga (einschließlich Desoxyribonukleotidanaloga und Ribonukleotidanaloga), Nukleoside (einschließlich Desoxyribonukleoside oder Ribonukleoside) oder Nukleosidanaloga (einschließlich Desoxyribonukleosidanaloga oder Ribonukleosidanaloga) unterschiedlich. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Desoxyadenosin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Desoxyguanosin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Thymidin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Desoxyuridin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Desoxycytidin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Adenosin, und die Länge des Linkers beträgt zwi-

schen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Guanosin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel 5-Methyluridin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Uridin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm. In einigen Fällen umfasst eines der Nukleotide, Nukleotidanaloga, Nukleoside oder Nukleosidanaloga zum Beispiel Cytidin, und die Länge des Linkers beträgt zwischen 1 nm und 1.000 nm.

[0083] In dem Polymer-Nukleotid-Konjugat kann an jede Verzweigung oder eine Teilmenge von Verzweigungen des Polymers eine Einheit umfassend ein Nukleotid (z. B. ein Adenin, ein Thymin, ein Uracil, ein Cytosin, oder ein Guaninrest oder ein Derivat oder Mimetikum davon ist) gebunden sein, und die Einheit ist in der Lage, an eine Polymerase, reverse Transkriptase oder eine andere Nukleotid-Bindungs- oder -Einbaudomäne zu binden oder eingebaut zu werden. Optional kann die Einheit in der Lage sein, während einer Polymerasereaktion in eine verlängernde Nukleinsäurekette eingebaut zu werden. In einigen Fällen kann die Einheit so blockiert sein, dass sie während einer Polymerasereaktion nicht in eine verlängernde Nukleinsäurekette eingebaut werden kann. In einigen anderen Fällen kann die Einheit reversibel blockiert sein, sodass sie nicht in der Lage ist, während einer Polymerasereaktion in eine verlängernde Nukleinsäurekette eingebaut zu werden, bis diese Blockierung entfernt ist, wonach die Einheit dann in der Lage ist, während einer Polymerasereaktion in eine verlängernde Nukleinsäurekette eingebaut zu werden.

[0084] Das Nukleotid kann über das 5'-Ende des Nukleotids an den Polymerzweig konjugiert sein. In einigen Fällen kann das Nukleotid modifiziert werden, um den Einbau des Nukleotids in eine verlängernde Nukleinsäurekette während einer Polymerasereaktion zu hemmen oder zu verhindern. Beispielsweise kann das Nukleotid ein 3'-Desoxyribonukleotid, ein 3'-Azidonukleotid, ein 3'-Methylazido-Nukleotid oder ein anderes solches Nukleotid einschließen, wie es im Stand der Technik bekannt ist oder sein kann, um nicht in der Lage zu sein, während einer Polymerasereaktion in eine verlängernde Nukleinsäurekette eingebaut zu werden. In einigen Ausführungsformen kann das Nukleotid eine 3'-O-Azidogruppe, eine 3'-O-Azidomethylgruppe, eine 3'-Phosphorthioatgruppe, eine 3'-O-Malonylgruppe, eine 3'-O-Alkylhydroxylaminygruppe oder eine 3'-O-Benzylgruppe einschließen. In einigen Ausführungsformen fehlt dem Nukleotid eine 3'-Hydroxylgruppe.

[0085] Das Polymer kann ferner eine Bindungs- oder Einbaueinheit in jeder Verzweigung oder einer Teilmenge von Verzweigungen aufweisen. Einige Beispiele der Bindungs- oder Einbaueinheit schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Biotin, Avidin, Streptavidin oder dergleichen, Polyhistidindomänen, komplementäre gepaarte Nukleinsäuredomänen, G-Quartett bildende Nukleinsäuredomänen, Calmodulin, Maltose-bindendes Protein, Cellulase, Maltose, Saccharose, Glutathion-S-Transferase, Glutathion, O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, Benzylguanin und Derivate davon, Benzylcytein und Derivate davon, einen Antikörper, ein Epitop, ein Protein A, ein Protein G ein. Die Bindungs- oder Einbaueinheit kann jedes interaktive Molekül oder Fragment davon sein, von dem bekannt ist, dass es an Interaktionen zwischen Proteinen, zwischen Proteinen und Liganden, zwischen Proteinen und Nukleinsäuren, zwischen Nukleinsäuren oder zwischen niedermolekularen Wechselwirkungsdomänen oder -einheiten bindet oder diese erleichtert.

[0086] In einigen Ausführungsformen kann eine Zusammensetzung, wie hierin bereitgestellt, ein oder mehrere Elemente einer komplementären Wechselwirkungseinheit umfassen. Nicht einschränkende Beispiele komplementärer Wechselwirkungseinheiten schließen zum Beispiel die Folgenden ein: Biotin und Avidin; SNAP-Benzylguanin; Antikörper oder FAB und Epitop; IgG FC und Protein A, Protein G, Protein A/G oder Protein L; Maltosebindungsprotein und Maltose; Lektin und verwandtes Polysaccharid; Ionen-Chelatbildungseinheiten, komplementäre Nukleinsäuren, Nukleinsäuren, die in der Lage sind, Dreifach- oder Dreifachhelix-Wechselwirkungen zu bilden; zur Bildung von G-Quartetten fähige Nukleinsäuren und dergleichen. Ein Fachmann wird leicht erkennen, dass viele Paare von Einheiten existieren und dass sie üblicherweise für ihre Eigenschaft, stark und spezifisch miteinander zu interagieren, verwendet werden; und daher wird jedes derartige komplementäre Paar oder Set als für diesen Zweck geeignet angesehen, um die Zusammensetzungen der vorliegenden Offenbarung zu konstruieren oder zu konzipieren. In einigen Ausführungsformen kann eine Zusammensetzung, wie hierin offenbart, Zusammensetzungen umfassen, in denen ein Element einer komplementären Wechselwirkungseinheit an ein Molekül oder einen multivalenten Liganden gebunden ist und das andere Element der komplementären Wechselwirkungseinheit an ein separates Molekül oder einen multivalenten Liganden gebunden ist. In einigen Ausführungsformen kann eine Zusammensetzung, wie hierin offenbart, Zusammensetzungen umfassen, in denen beide oder alle Elemente einer komplementären Wechselwirkungseinheit an ein einzelnes Molekül oder einen multivalenten Liganden gebunden sind. In einigen Ausführungsformen kann eine Zusammensetzung, wie hierin offenbart, Zusammensetzungen umfassen, in denen beide

oder alle Elemente einer komplementären Wechselwirkungseinheit an separate Arme oder Stellen auf einem einzelnen Molekül oder multivalenten Liganden gebunden sind. In einigen Ausführungsformen kann eine Zusammensetzung, wie hierin offenbart, Zusammensetzungen umfassen, in denen beide oder alle Elemente einer komplementären Wechselwirkungseinheit an denselben Arm oder an dieselben Stellen eines einzelnen Moleküls oder multivalenten Liganden gebunden sind. In einigen Ausführungsformen können Zusammensetzungen, die ein Element einer komplementären Wechselwirkungseinheit umfassen, und Zusammensetzungen, die ein anderes Element einer komplementären Wechselwirkungseinheit umfassen, gleichzeitig oder nacheinander gemischt werden. In einigen Ausführungsformen ermöglichen Wechselwirkungen zwischen Molekülen oder Partikeln, wie hierin offenbart, die Assoziation oder Aggregation mehrerer Moleküle oder Partikel, sodass zum Beispiel nachweisbare Signale verstärkt werden. In einigen Ausführungsformen werden fluoreszierende, kolorimetrische oder radioaktive Signale verstärkt. In anderen Ausführungsformen werden andere Wechselwirkungseinheiten, wie hierin offenbart oder wie in der Technik bekannt, in Betracht gezogen. In einigen Ausführungsformen kann eine Zusammensetzung, wie hierin bereitgestellt, so bereitgestellt werden, dass ein oder mehrere Moleküle, die eine erste Wechselwirkungseinheit umfassen, wie zum Beispiel eine oder mehrere Imidazol- oder Pyridineinheiten, und ein oder mehrere zusätzliche Moleküle, die eine zweite Wechselwirkungseinheit umfassen, wie zum Beispiel Histidinreste, gleichzeitig oder nacheinander gemischt werden. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder mehr Imidazol- oder Pyridineinheiten. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder mehr Histidinreste. In solchen Ausführungsformen kann die Wechselwirkung zwischen den bereitgestellten Molekülen oder Partikeln durch das Vorhandensein eines zweiwertigen Kations, wie Nickel, Mangan, Magnesium, Calcium, Strontium oder dergleichen, erleichtert werden. In einigen Ausführungsformen kann zum Beispiel eine (His)₃-Gruppe mit einer (His)₃-Gruppe an einem anderen Molekül oder Partikel über Koordination eines Nickel- oder Mangans interagieren.

[0087] Die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung kann einen oder mehrere Puffer, Salze, Ionen oder Zusatzstoffe umfassen. In einigen Ausführungsformen können repräsentative Additive Folgende einschließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein: Betain, Spermidin, Detergenzien wie Triton X-100, Tween 20, SDS oder NP-40, Ethylenglykol, Polyethylenglykol, Dextran, Polyvinylalkohol, Vinylalkohol, Methylcellulose, Heparin, Heparansulfat, Glycerin, Saccharose, 1,2-Propandiol, DMSO, N,N,N-Trimethylglycin, Ethanol, Ethoxyethanol, Pro-

pylenglykol, Polypropylenglykol, Block-Copolymere wie die Polymere der Pluronic(r)-Reihe, Arginin, Histidin, Imidazol oder eine beliebige Kombination davon, oder eine beliebige Substanz, die in der Technik als ein DNA-„Relaxer“ bekannt ist (eine Verbindung, mit der Wirkung des Änderns der Persistenzlänge von DNA, des Änderns der Anzahl von Inter-Polymer-Verknüpfungen oder -Kreuzungen oder Änderns der Konformationsdynamik eines DNA-Moleküls, sodass die Zugänglichkeit von Stellen innerhalb des Strangs zu DNA-Bindungs- oder -Einbaueinheiten erhöht wird).

[0088] Die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung kann zwitterionische Verbindungen als Additive einschließen. Weitere repräsentative Additive finden sich in Lorenz, T.C. J. Vis. Exp. (63), e3998, doi: 10.3791/3998 (2012), die hiermit bezüglich ihrer Offenbarung von Additiven zur Erleichterung der Nukleinsäurebindung oder -dynamik oder zur Erleichterung von Prozessen mit Manipulation, Verwendung oder Lagerung von Nukleinsäuren einbezogen wird. In einigen Ausführungsformen können repräsentative Kationen Folgende einschließen, ohne darauf beschränkt zu sein: Natrium, Magnesium, Strontium, Kalium, Mangan, Calcium, Lithium, Nickel, Cobalt, oder andere solche Kationen, die in der Technik bekannt sind, um Nukleinsäurewechselwirkungen wie Selbstassoziation, Sekundär- oder Tertiärstrukturbildung, Basenpaarung, Oberflächenassoziation, Peptidassoziation, Proteinbindung oder dergleichen zu erleichtern.

IV. Bindung zwischen Zielnukleinsäure und der multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung

[0089] Wenn die multivalente Bindungs- oder Einbauszusammensetzung als Ersatz für ein einzelnes unkonjugiertes oder ungebundenes Nukleotid verwendet wird, um einen Komplex mit der Polymerase und einer oder mehreren Kopien der Zielnukleinsäure zu bilden, wird die lokale Konzentration des Nukleotids sowie die Bindungsavidität des Komplexes (für den Fall, dass ein Komplex aus zwei oder mehr Zielnukleinsäuremolekülen gebildet wird) um ein Vielfaches erhöht, was wiederum die Signalintensität erhöht, insbesondere das korrekte Signal im Vergleich zur Nichtübereinstimmung. Die vorliegende Offenbarung sieht das Inkontaktbringen der multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzung mit einer Polymerase und einer geprierten Zielnukleinsäure vor, um die Bildung eines ternären Bindungs- oder Einbaukomplexes zu bestimmen.

[0090] Fig. 6 veranschaulicht die Verwendung der offenbarten Polymer-Nukleotid-Konjugate zum Erreichen einer erhöhten Signalintensität während Bindungs-, Persistenz- und Wasch-/Entfernungsschrit-

ten. Aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration des Nukleotids auf dem Polymer-Nukleotid-Konjugat und/oder der Ausbildung nichtkovalenter Bindungen mit zwei oder mehr geprimten Zielnukleinsäuremolekülen, wird die Bindung zwischen der Polymerase, dem geprimten Zielstrang und dem polymerkonjugierten Nukleotid, wenn das Nukleotid komplementär zur nächsten Base der Zielnukleinsäure ist, begünstigt. Der gebildete Bindungskomplex hat eine längere Persistenzzeit, was wiederum hilft, das Signal zu erhöhen und den Bildgebungsschritt zu verkürzen. Die hohe Signalintensität, die aus der Verwendung der offenbaren Polymer-Nukleotid-Konjugate resultiert, bleibt für die gesamten Bindungs- und Bildgebungsschritte stabil. Die starke Bindung zwischen der Polymerase, dem geprimten Zielstrang und dem polymerkonjugierten Nukleotid oder Nukleotidanaloga führt auch dazu, dass der so gebildete Bindungskomplex während der Waschschrte stabil bleibt, während andere Reaktionsgemischkomponenten und unpassende Nukleotidanaloga gewaschen werden. Nach dem Bildgebungsschritt kann der Bindungskomplex destabilisiert werden (z. B. durch Ändern der Pufferzusammensetzung) und die geprimte Zielnukleinsäure kann dann um eine Base verlängert werden. Nach der Verlängerung können die Bindungs- und Bildgebungsschritte unter Verwendung der offenbaren Polymer-Nukleotid-Konjugate wiederholt werden, um die Identität der nächsten Base zu bestimmen.

[0091] Als Beispiel wird eine grafische Darstellung der Zunahme der Signalintensität während des Bindens, der Persistenz und des Waschens/Entfernens eines multivalenten Substrats, wie hierin beschrieben, in **Fig. 6** bereitgestellt, die repräsentativ für die Änderungen der Signalintensität ist, die experimentell beobachtet wurde. Daher bieten die Zusammensetzungen und Verfahren der vorliegenden Offenbarung ein robustes und steuerbares Mittel zum Herstellen und Aufrechterhalten eines ternären Enzymkomplexes sowie ein stark verbessertes Mittel, durch welches das Vorhandensein des Komplexes identifiziert und/oder gemessen werden kann, und ein Mittel, durch das die Persistenz des Komplexes gesteuert werden kann. Dies stellt wichtige Lösungen für Probleme bereit, wie die Bestimmung der Identität der N+1-Base in Nukleinsäuresequenzierungsanwendungen.

[0092] Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, wurde beobachtet, dass hierin offenbarte multivalente Bindungszusammensetzungen mit Polymerase-Nukleotid-Komplexen assoziieren, um ternäre Bindungskomplexe mit einer Rate zu bilden, die zeitabhängig ist, wenn auch wesentlich langsamer als die Assoziationsgeschwindigkeit, die bekanntermaßen von Nukleotiden in freier Lösung erreicht werden kann. Somit ist die On-Rate (K_{on}) wesentlich und überraschend langsamer als die On-

Rate für einzelne Nukleotide oder Nukleotide, die nicht an multivalente Ligandenkomplexe gebunden sind. Wichtig ist jedoch, dass die Off-Rate (K_{off}) des multivalenten Ligandenkomplexes wesentlich langsamer ist als die, die für Nukleotide in freier Lösung beobachtet wird. Daher bieten die multivalenten Ligandenkomplexe der vorliegenden Offenbarung eine überraschende und vorteilhafte Verbesserung der Persistenz von ternären Polymerase-Polynukleotid-Nukleotid-Komplexen (insbesondere gegenüber solchen Komplexen, die mit freien Nukleotiden gebildet werden), und ermöglichen zum Beispiel signifikante Verbesserungen der Bildgebungsqualität für Nukleinsäuresequenzierungsanwendungen gegenüber derzeit verfügbaren Verfahren und Reagenzien. Wichtig ist, dass diese Eigenschaft der hierin offenbarten multivalenten Bindungszusammensetzungen die Bildung sichtbarer ternärer Komplexe steuerbar macht, sodass nachfolgende Visualisierungs-, Modifizierungs- oder Verarbeitungsschritte im Wesentlichen ohne Rücksicht auf die Dissoziation des Komplexes vorgenommen werden können, der Komplex kann nach Bedarf gebildet, abgebildet, modifiziert oder auf andere Weise verwendet werden und bleibt stabil, bis ein Benutzer einen bestätigenden Dissoziationsschritt durchführt, wie beispielsweise das Aussetzen der Komplexe einem Dissoziationspuffer.

[0093] In einigen Fällen können die Persistenzzeiten für die multivalenten Bindungskomplexe, die unter Verwendung der offenbaren Partikel-Nukleotid- oder Polymer-Nukleotid-Konjugate gebildet werden, unter nicht-destabilisierenden Bedingungen im Bereich von etwa 0,1 Sekunden bis etwa 600 Sekunden liegen. In einigen Fällen kann die Persistenzzeit mindestens 0,1 Sekunden, mindestens 1 Sekunde, mindestens 2 Sekunden, mindestens 3 Sekunden, mindestens 4 Sekunden, mindestens 5 Sekunden, mindestens 6 Sekunden, mindestens 7 Sekunden, mindestens 8 Sekunden, mindestens 9 Sekunden, mindestens 10 Sekunden, mindestens 20 Sekunden, mindestens 30 Sekunden, mindestens 40 Sekunden, mindestens 50 Sekunden, mindestens 60 Sekunden, mindestens 120 Sekunden, mindestens 180 Sekunden, mindestens 240 Sekunden, mindestens 300 Sekunden, mindestens 360 Sekunden, mindestens 420 Sekunden, mindestens 480 Sekunden, mindestens 540 Sekunden oder mindestens 600 Sekunden betragen. In einigen Fällen kann die Persistenzzeit zwischen beliebigen zwei der in diesem Absatz angegebenen Werte liegen. Zum Beispiel kann in einigen Fällen die Persistenzzeit im Bereich von etwa 10 Sekunden bis etwa 360 Sekunden liegen. Fachleute werden erkennen, dass in einigen Fällen die Persistenzzeit einen beliebigen Wert innerhalb des in diesem Absatz spezifizierten Wertebereichs aufweisen kann, z. B. 78 Sekunden.

[0094] In verschiedenen Ausführungsformen können Polymerasen, die für die hierin beschriebene

Bindungs- oder Einbauwechselwirkung geeignet sind, jede Polymerase einschließen, wie sie im Stand der Technik bekannt ist oder sein kann. Es ist beispielsweise bekannt, dass jeder Organismus innerhalb seines Genoms eine oder mehrere DNA-Polymerasen kodiert. Beispiele geeigneter Polymerasen können einschließen, sind aber nicht beschränkt auf: Klenow DNA-Polymerase, *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase I (Taq Polymerase), KlenTaq Polymerase und Bakteriophage T7 DNA-Polymerase; humane Alpha-, Delta- und Epsilon-DNA-Polymerasen; Bakteriophagen-Polymerasen, wie T4, RB69 und phi29 Bakteriophagen-DNA-Polymerasen, *Pyrococcus furiosus* DNA-Polymerase (Pfu-Polymerase); *Bacillus subtilis* DNA-Polymerase III und *E. coli* DNA-Polymerase III Alpha und Epsilon; 9 Grad N-Polymerase, reverse Transkriptasen, wie reverse Transkriptasen des HIV-Typs M oder O, reverse Transkriptase des aviären Myeloblastose-Virus oder reverse Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) oder Telomerase. Weitere nicht einschränkende Beispiele für DNA-Polymerasen können diejenigen aus verschiedenen Archaea-Gattungen, wie *Aeropyrum*, *Archaeoglobus*, *Desulfurococcus*, *Pyrobaculum*, *Pyrococcus*, *Pyrolobus*, *Pyrodicticum*, *Staphylothermus*, *Stetteria*, *Sulfolobus*, *Thermococcus* und *Vulcanisaeta* und dergleichen oder Varianten davon, einschließlich solcher Polymerasen, wie sie in der Technik bekannt sind, wie Vent™, Deep Vent™, Pfu, KOD, Pfx, Terminator™ und Tgo-Polymerasen. In einigen Ausführungsformen ist die Polymerase eine Klenow-Polymerase.

[0095] Der ternäre Komplex weist eine längere Persistenzzeit auf, wenn das Nukleotid auf dem Polymer-Nukleotid-Konjugat komplementär zu der Zielnukleinsäure ist, als wenn es sich um ein nicht-komplementäres Nukleotid handelt. Der ternäre Komplex weist auch eine längere Persistenzzeit auf, wenn das Nukleotid auf dem Polymer-Nukleotid-Konjugat komplementär zu der Zielnukleinsäure ist, als ein komplementäres Nukleotid, das nicht konjugiert oder gebunden ist. Zum Beispiel können in einigen Ausführungsformen die ternären Komplexe eine Persistenzzeit von weniger als 1 s, mehr als 1 s, mehr als 2 s, mehr als 3 s, mehr als 5 s, mehr als 10 s, mehr als 15 s, mehr als 20 s, mehr als 30 s, mehr als 60 s, mehr als 120 s, mehr als 360 s, mehr als 3600 s oder mehr aufweisen, oder eine Zeit, die innerhalb eines Bereichs liegt, der durch beliebige zwei oder mehr dieser Werte definiert ist.

[0096] Die Persistenzzeit kann zum Beispiel durch Beobachten des Beginns und/oder der Dauer eines Bindungskomplexes gemessen werden, wie durch Beobachten eines Signals von einer markierten Komponente des Bindungskomplexes. Zum Beispiel kann ein markiertes Nukleotid oder ein markiertes Reagens, das ein oder mehrere Nukleotide umfasst, in einem Bindungskomplex vorhanden sein, wodurch

ermöglicht wird, dass das Signal von der Markierung während der Persistenzzeit des Bindungskomplexes nachgewiesen wird.

[0097] Es wurde beobachtet, dass mit unterschiedlichen Salzen oder Ionen unterschiedliche Bereiche von Persistenzzeiten erreichbar sind. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass sich in Gegenwart von beispielsweise Magnesiumionen (Mg^{2+}) gebildete Komplexe schneller bilden als mit anderen Ionen gebildete Komplexe. Es wurde auch beobachtet, dass Komplexe, die in Gegenwart von zum Beispiel Strontiumionen (Sr^{2+}) gebildet werden, sich leicht bilden und vollständig oder mit wesentlicher Vollständigkeit dissoziieren, nachdem das Ion entzogen wird oder nach dem Waschen mit Puffer, dem eine oder mehrere Komponenten der vorliegenden Zusammensetzungen fehlen, wie z. B. ein Polymer und/oder ein oder mehrere Nukleotide und/oder eine oder mehrere Wechselwirkungseinheiten, oder ein Puffer, der zum Beispiel einen Chelatbildner enthält, der die Entfernung eines zweiwertigen Kations aus dem Komplex, der ein multivalentes Reagens enthält, bewirken oder beschleunigen kann. Somit umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung in einigen Ausführungsformen Mg^{2+} . In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung Ca^{2+} . In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung Sr^{2+} . In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung Cobaltionen (Co^{2+}). In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung $MgCl_2$. In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung $CaCl_2$. In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung $SrCl_2$. In einigen Ausführungsformen umfasst eine Zusammensetzung der vorliegenden Offenbarung $CoCl_2$. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung kein oder im Wesentlichen kein Magnesium. In einigen Ausführungsformen umfasst die Zusammensetzung kein oder im Wesentlichen kein Calcium. In einigen Ausführungsformen sorgen die Verfahren der vorliegenden Offenbarung für das Inkontaktbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren mit einer oder mehreren der hierin offenbarten Zusammensetzungen, wobei der Zusammensetzung entweder Calcium oder Magnesium fehlt oder sowohl Calcium als auch Magnesium fehlt.

[0098] Die Dissoziation ternärer Komplexe kann durch Änderung der Pufferbedingungen gesteuert werden. Nach dem Bildgebungsschritt wird ein Puffer mit erhöhtem Salzgehalt verwendet, um eine Dissoziation der ternären Komplexe zu bewirken, sodass markierte Polymer-Nukleotid-Konjugate ausgewaschen werden können, wodurch ein Mittel bereitge-

stellt wird, durch das Signale abgeschwächt oder beendet werden können, wie beispielsweise beim Übergang zwischen einem Sequenzierungszyklus und dem nächsten. Diese Dissoziation kann in einigen Ausführungsformen durch Waschen der Komplexe mit einem Puffer, dem ein notwendiges Metall oder ein notwendiger Cofaktor fehlt, beeinflusst werden. In einigen Ausführungsformen kann ein Waschpuffer eine oder mehrere Zusammensetzungen zum Zwecke der Aufrechterhaltung der pH-Steuerung umfassen. In einigen Ausführungsformen kann ein Waschpuffer ein oder mehrere einwertige Kationen, wie Natrium, umfassen. In einigen Ausführungsformen fehlt einem Waschpuffer im Wesentlichen oder gänzlich ein zweiwertiges Kation, das beispielsweise kein oder im Wesentlichen kein Strontium, Calcium, Magnesium oder Mangan aufweist. In einigen Ausführungsformen umfasst ein Waschpuffer ferner einen Chelatbildner, wie zum Beispiel EDTA, EGTA, Nitrilotriessigsäure, Polyhistidin, Imidazol oder dergleichen. In einigen Ausführungsformen kann ein Waschpuffer den pH-Wert der Umgebung auf demselben Niveau wie für den gebundenen Komplex halten. In einigen Ausführungsformen kann ein Waschpuffer den pH-Wert der Umgebung relativ zu dem für den gebundenen Komplex gesehenen Niveau erhöhen oder senken. In einigen Ausführungsformen kann der pH-Wert innerhalb eines Bereichs von 2-4, 2-7, 5-8, 7-9, 7-10 oder niedriger als 2 oder höher als 10 oder eines Bereichs liegen, der durch beliebige zwei der hierin bereitgestellten Werte definiert ist.

[0099] Die Zugabe eines bestimmten Ions kann die Bindung der Polymerase an eine geprimte Zielnukleinsäure, die Bildung eines ternären Komplexes, die Dissoziation eines ternären Komplexes oder den Einbau eines oder mehrerer Nukleotide in eine verlängerte Nukleinsäure, wie während einer Polymerasereaktion, beeinflussen. In einigen Ausführungsformen können relevante Anionen Chlorid, Acetat, Gluconat, Sulfat, Phosphat oder dergleichen umfassen. In einigen Ausführungsformen kann ein Ion durch die Zugabe einer oder mehrerer Säuren, Basen oder Salze, wie NiCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 , SrCl_2 , CaCl_2 , CaSO_4 , SrCO_3 , BaCl_2 oder dergleichen, in die Zusammensetzungen der vorliegenden Offenbarung aufgenommen werden. Repräsentative Salze, Ionen, Lösungen und Bedingungen finden sich in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. Ausgabe, Gennaro, A.R.: Hrsg. (2000), die hiermit durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit und insbesondere in Bezug auf Kapitel 17 und verwandte Offenbarung von Salzen, Ionen, Salzlösungen und ionischen Lösungen eingeschlossen ist.

[0100] Die vorliegende Offenbarung zieht das Inkontaktbringen der multivalenten Bindungs- oder Einbauzusammensetzung, die mindestens ein Partikel-Nukleotid-Konjugat umfasst, mit einer oder meh-

rerer Polymerasen in Betracht. Das Inkontaktbringen kann gegebenenfalls in Gegenwart einer oder mehrerer Zielnukleinsäuren erfolgen. In einigen Ausführungsformen sind die Zielnukleinsäuren einzelsträngige Nukleinsäuren. In einigen Ausführungsformen sind die Zielnukleinsäuren geprimte einzelsträngige Nukleinsäuren. In einigen Ausführungsformen sind die Zielnukleinsäuren doppelsträngige Nukleinsäuren. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen das Inkontaktbringen der multivalenten Bindungs- oder Einbauzusammensetzung mit einer Polymerase. In einigen Ausführungsformen umfasst das Inkontaktbringen das Inkontaktbringen der Zusammensetzung, die ein oder mehrere Nukleotide umfasst, mit mehreren Polymerasen. Die Polymerase kann an ein einziges Nukleinsäuremolekül gebunden sein.

[0101] Die Bindung zwischen Zielnukleinsäure und multivalenter Bindungszusammensetzung kann in Gegenwart einer Polymerase bereitgestellt werden, die katalytisch inaktiv gemacht wurde. In einer Ausführungsform kann die Polymerase durch Mutation katalytisch inaktiv gemacht worden sein. In einer Ausführungsform kann die Polymerase durch chemische Modifikation katalytisch inaktiv gemacht worden sein. In einigen Ausführungsformen kann die Polymerase durch die Abwesenheit eines notwendigen Substrats, Ions oder Cofaktors katalytisch inaktiv gemacht worden sein. In einigen Ausführungsformen kann das Polymeraseenzym durch die Abwesenheit von Magnesiumionen katalytisch inaktiv gemacht worden sein.

[0102] Die Bindung zwischen Zielnukleinsäure und multivalenter Bindungszusammensetzung erfolgt in Gegenwart einer Polymerase, wobei der Bindungslösung, Reaktionslösung oder Puffer Magnesium oder Mangan fehlt. Alternativ erfolgt die Bindung zwischen Zielnukleinsäure und multivalenter Bindungszusammensetzung in Gegenwart einer Polymerase, wobei die Bindungslösung, Reaktionslösung oder der Puffer Calcium oder Strontium umfasst.

[0103] Wenn die katalytisch inaktiven Polymerasen verwendet werden, um eine Wechselwirkung einer Nukleinsäure mit einer multivalenten Bindungszusammensetzung zu unterstützen, stabilisiert die Wechselwirkung zwischen der Zusammensetzung und der Polymerase einen ternären Komplex, um den Komplex durch Fluoreszenz oder durch andere Verfahren, wie hierin offenbart oder anderweitig in der Technik bekannt, nachweisbar zu machen. Ungebundene Polymer-Nukleotid-Konjugate können gegebenenfalls vor dem Nachweis des ternären Bindungskomplexes gewaschen werden.

[0104] Inkontaktbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren mit den hierin offenbarten Polymer-Nukleotid-Konjugaten in einer Lösung, die entweder Cal-

cium oder Magnesium enthält oder sowohl Calcium als auch Magnesium enthält. Alternativ dazu wird das Inkontaktbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren mit den hierin offenbarten Polymer-Nukleotid-Konjugaten in einer Lösung, der entweder Calcium oder Magnesium fehlt oder der sowohl Calcium als auch Magnesium fehlt durchgeführt, und in einem separaten Schritt, ohne Rücksicht auf die Reihenfolge der Schritte, erfolgt die Zugabe von Calcium oder Magnesium oder sowohl Calcium als auch Magnesium zu der Lösung. In einigen Ausführungsformen erfolgt das Inkontaktbringen einer oder mehrerer Nukleinsäuren mit den hierin offenbarten Polymer-Nukleotid-Konjugaten in einer Lösung, der Strontium fehlt, und umfasst das Zugeben von Strontium zu der Lösung in einem separaten Schritt, ohne Rücksicht auf die Reihenfolge der Schritte.

V. Verwendung von multivalenten Bindungs- oder Einbauszusammensetzungen in Kombination mit einer Oberfläche mit schwacher unspezifischer Bindung

[0105] Hierin offenbart sind feste Träger, umfassend Oberflächenzusammensetzungen mit schwacher unspezifischer Bindung, die eine verbesserte Leistung bei der Nukleinsäurehybridisierung und Amplifikation ermöglichen. Im Allgemeinen können die offenbarten Träger ein Substrat (oder eine Trägerstruktur), eine oder mehrere Schichten kovalent oder nicht-kovalent gebundener schwach bindender chemischer Modifikationsschichten, z. B. Silanschichten, Polymerfilme und eine oder mehrere kovalent oder nicht-kovalent gebundene Primersequenzen umfassen, die zum Anbinden einzelsträngiger Zielnukleinsäure(n) an die Trägeroberfläche verwendet werden können. In einigen Fällen kann die Formulierung der Oberfläche, z. B. die chemische Zusammensetzung einer oder mehrerer Schichten, die Kopplungschemie, die verwendet wird, um die eine oder mehreren Schichten mit der Trägeroberfläche und/oder miteinander zu vernetzen, und die Gesamtzahl der Schichten, variiert werden, sodass eine unspezifische Bindung von Proteinen, Nukleinsäuremolekülen und anderen Komponenten von Hybridisierungs- und Amplifikationsreaktionen an die Trägeroberfläche im Vergleich zu einer vergleichbaren Monoschicht minimiert oder reduziert ist. Oft kann die Formulierung der Oberfläche so variiert werden, dass eine unspezifische Hybridisierung auf der Trägeroberfläche gegenüber einer vergleichbaren Monoschicht minimiert oder reduziert wird. Die Formulierung der Oberfläche kann so variiert werden, dass eine unspezifische Amplifikation auf der Trägeroberfläche gegenüber einer vergleichbaren Monoschicht minimiert oder reduziert wird. Die Formulierung der Oberfläche kann so variiert werden, dass bestimmte Amplifikationsraten und/oder Ausbeuten auf der Trägeroberfläche maximiert werden. Amplifikationsniveaus, die zum Nachweis geeignet

sind, werden in einigen hierin offenbarten Fällen in nicht mehr als 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 oder mehr als 30 Amplifikationszyklen erreicht.

[0106] Beispiele für Materialien, aus denen das Substrat oder die Trägerstruktur hergestellt werden kann, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Folgende ein: Glas, Quarzglas, Silicium, ein Polymer (z. B. Polystyrol (PS), makroporöses Polystyrol (MPPS), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polycarbonat (PC), Polypropylen (PP), Polyethylen (PE), Polyethylen hoher Dichte (HDPE), zyklische Olefinpolymere (COP), zyklische Olefincopolymere (COC), Polyethylenterephthalat (PET)) oder eine beliebige Kombination davon. Es kommen verschiedene Zusammensetzungen sowohl von Glas als auch von Kunststoffsubstraten in Betracht.

[0107] Das Substrat oder die Trägerstruktur kann in einer Vielfalt von Geometrien und Abmessungen bereitgestellt werden, die dem Fachmann bekannt sind, und kann ein beliebiges einer Vielfalt von Materialien umfassen, die dem Fachmann bekannt sind. Zum Beispiel kann das Substrat oder die Trägerstruktur in einigen Fällen lokal planar sein (z. B. umfassend einen Objektträger oder die Oberfläche eines Objektträgers). Insgesamt kann das Substrat oder die Trägerstruktur zylindrisch (z. B. umfassend eine Kapillare oder die innere Oberfläche einer Kapillare), sphärisch (z. B. umfassend die äußere Oberfläche eines nicht-porösen Kügelchens) oder unregelmäßig (z. B. umfassend die äußere Oberfläche eines unregelmäßig geformten, nicht-porösen Kügelchens oder Partikels) sein. In einigen Fällen kann die Oberfläche des Substrats oder der Trägerstruktur, die zur Nukleinsäurehybridisierung und -amplifikation verwendet wird, eine feste, nicht poröse Oberfläche sein. In einigen Fällen kann die Oberfläche des Substrats oder der Trägerstruktur, die zur Nukleinsäurehybridisierung und -amplifikation verwendet wird, porös sein, sodass die hierin beschriebenen Beschichtungen die poröse Oberfläche durchdringen und Nukleinsäurehybridisierungs- und -amplifikationsreaktionen, die darauf durchgeführt werden, innerhalb der Poren stattfinden können.

[0108] Das Substrat oder die Trägerstruktur, das bzw. die eine oder die mehreren chemisch modifizierten Schichten, z. B. Schichten eines Polymers mit schwacher unspezifischer Bindung, umfasst, kann unabhängig oder in eine andere Struktur oder Anordnung integriert sein. Zum Beispiel kann in einigen Fällen das Substrat oder die Trägerstruktur eine oder mehrere Oberflächen innerhalb einer integrierten oder zusammengebauten mikrofluidischen Durchflusszelle umfassen. Das Substrat oder die Trägerstruktur kann eine oder mehrere Oberflächen innerhalb eines Mikroplattenformats, z. B. die untere Oberfläche der Vertiefungen in einer Mikroplatte, umfassen. Wie oben erwähnt, umfasst in einigen

bevorzugten Ausführungsformen das Substrat oder die Trägerstruktur die Innenoberfläche (wie beispielsweise die Lumenoberfläche) einer Kapillare. In alternativen bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Substrat oder die Trägerstruktur die Innenoberfläche (wie beispielsweise die Lumenoberfläche) einer Kapillare, die in einen planaren Chip geätzt ist.

[0109] Wie erwähnt, zeigen die Träger mit schwacher unspezifischer Bindung der vorliegenden Offenbarung eine verringerte unspezifische Bindung von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Komponenten der Hybridisierungs- und/oder Amplifikationsformulierung, die für die Festphasen-Nukleinsäureamplifikation verwendet wird. Der Grad der unspezifischen Bindung, den eine gegebene Trägeroberfläche aufweist, kann entweder qualitativ oder quantitativ beurteilt werden. Zum Beispiel kann in einigen Fällen eine Exposition der Oberfläche gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. Cyaninen wie Cy3 oder Cy5 usw., Fluoresceinen, Cumarinen, Rhodaminen, usw. oder anderen hierin offenbarten Farbstoffen), fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden, und/oder fluoreszenzmarkierten Proteinen (z. B. Polymerasen) unter einem standardisierten Satz von Bedingungen, gefolgt von einem spezifizierten Spülprotokoll, und Fluoreszenzbildgebung als qualitatives Werkzeug für den Vergleich von unspezifischer Bindung auf Trägern verwendet werden, die unterschiedliche Oberflächenformulierungen umfassen. In einigen Fällen kann die Exposition der Oberfläche gegenüber Fluoreszenzfarbstoffen, fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden und/oder fluoreszenzmarkierten Proteinen (z. B. Polymerasen) unter einem standardisierten Satz von Bedingungen, gefolgt von einem spezifizierten Spülprotokoll und Fluoreszenzbildgebung als quantitatives Werkzeug zum Vergleich von unspezifischer Bindung auf Trägern verwendet werden, die unterschiedliche Oberflächenformulierungen umfassen - vorausgesetzt, dass Sorgfalt aufgewendet wurde, um sicherzustellen, dass die Fluoreszenzbildgebung unter Bedingungen durchgeführt wird, bei denen das Fluoreszenzsignal linear (oder in vorhersehbarer Weise) mit der Anzahl der Fluorophore auf der Trägeroberfläche zusammenhängt (z. B. unter Bedingungen, bei denen Signalsättigung und/oder Selbstabschwächung des Fluorophors keine Rolle spielt) und dass geeignete Kalibrierstandards verwendet werden. In einigen Fällen können andere Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, zum Beispiel Radioisotopenmarkierungs- und -zählverfahren, zur quantitativen Beurteilung des Grads verwendet werden, in dem die verschiedenen Trägeroberflächenformulierungen der vorliegenden Offenbarung unspezifische Bindung zeigen.

[0110] Einige hierin offenbarte Oberflächen weisen ein Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung eines Fluorophors wie Cy3 von mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 oder mehr als 100 oder einen beliebigen Zwischenwert auf, der durch den hierin beschriebenen Bereich aufgespannt wird. Einige hierin offenbarte Oberflächen weisen ein Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Fluoreszenz eines Fluorophors wie Cy3 von mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 oder mehr als 100 oder einen beliebigen Zwischenwert auf, der durch den hierin beschriebenen Bereich aufgespannt wird.

[0111] Wie erwähnt, kann in einigen Fällen der Grad der unspezifischen Bindung, den die offenbarten Träger mit niedriger Bindung zeigen, unter Verwendung eines standardisierten Protokolls zum Inkontaktbringen der Oberfläche mit einem markierten Protein (z. B. Rinderserumalbumin (BSA), Streptavidin, einer DNA-Polymerase, einer reversen Transkriptase, einer Helikase, einem einzelsträngigen Bindungsprotein (SSB) usw. oder einer beliebigen Kombination davon), einem markierten Nukleotid, einem markierten Oligonukleotid usw. unter einem standardisierten Satz von Inkubations- und Spülbedingungen, gefolgt von dem Nachweis der Menge an Markierung, die auf der Oberfläche verbleibt, und dem Vergleich des daraus resultierenden Signals mit einem geeigneten Kalibrierungsstandard, beurteilt werden. In einigen Fällen kann die Markierung eine Fluoreszenzmarkierung umfassen. In einigen Fällen kann die Markierung ein Radioisotop umfassen. In einigen Fällen kann die Markierung jede andere nachweisbare Markierung umfassen, die dem Fachmann bekannt ist. In einigen Fällen kann der Grad der unspezifischen Bindung, den eine gegebene Trägeroberflächenformulierung aufweist, somit in Bezug auf die Anzahl unspezifisch gebundener Proteinmoleküle (oder anderer Moleküle) pro Flächeneinheit beurteilt werden. In einigen Fällen können die schwach bindenden Träger der vorliegenden Offenbarung eine unspezifische Proteinbindung (oder eine unspezifische Bindung anderer spezifizierter Moleküle (z. B. Cyaninfarbstoffe wie Cy3 oder Cy5 usw., Fluoresceine, Cumarine, Rhodamine usw. oder andere hierin offenbarte Farbstoffe) von weniger als 0,001 Molekül pro μm^2 , weniger als 0,01 Moleküle pro μm^2 , weniger als 0,1 Moleküle pro μm^2 , weniger als 0,25 Moleküle pro μm^2 , weniger als 0,5 Moleküle pro μm^2 , weniger als 1 Molekül pro μm^2 , weniger als 10 Moleküle pro μm^2 , weniger als 100 Moleküle pro μm^2 oder weniger als 1000 Moleküle pro μm^2 , aufweisen. Fachleute werden erkennen, dass eine gegebene Trägeroberfläche der vorliegenden Offenbarung eine unspezifische Bindung aufweisen kann, die irgendwo in diesen Bereich fällt, zum Beispiel von weniger als 86 Molekülen pro μm^2 . Zum Beispiel zeigen einige hierin offenbarte modifizierte

Oberflächen eine unspezifische Proteinbindung von weniger als 0,5 Molekülen/ μm^2 nach Kontakt mit einer 1 μM Lösung von Cy3-markiertem Streptavidin (GE Amersham) in einem PBS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung) für 15 Minuten, gefolgt von 3 Spülungen mit entionisiertem Wasser. Einige hierin offenbarte modifizierte Oberflächen weisen eine unspezifische Bindung von Cy3-Farbstoffmolekülen von weniger als 0,25 Molekülen pro μm^2 auf. In unabhängigen unspezifischen Bindungstests wurden 1 μM markierter Cy3 SA (ThermoFisher), 1 μM Cy5 SA-Farbstoff (ThermoFisher), 10 μM Aminoallyl-dUTP - ATTO-647N (Jena Biosciences), 10 μM Aminoallyl-dUTP - ATTO-Rho11 (Jena Biosciences), 10 μM Aminoallyl-dUTP - ATTO-Rho11 (Jena Biosciences), 10 μM 7-Propargylamino-7-deaza-dGTP - Cy5 (Jena Biosciences) und 10 μM 7-Propargylamino-7-deaza-dGTP - Cy3 (Jena Biosciences) auf den schwach bindenden Substraten bei 37 °C für 15 Minuten in einem Plattenformat mit 384 Vertiefungen inkubiert. Jede Vertiefung wurde 2-3 x mit 50 μl entionisiertem RNase/DNase-freiem Wasser und 2-3 x mit 25 mM ACES-Puffer mit pH 7,4 gespült. Die Platten mit 384 Vertiefungen wurden auf einem GE-Typhoon-Instrument unter Verwendung der Cy3-, AF555- oder Cy5-Filtersätze (je nach durchgeführten Farbstofftest) gemäß den Angaben des Herstellers bei einer PMT-Verstärkungseinstellung von 800 und einer Auflösung von 50-100 μm abgebildet. Für eine Bildgebung mit höherer Auflösung wurden Bilder auf einem Olympus IX83 Mikroskop (Olympus Corp., Center Valley, PA) aufgenommen, und zwar mit einem TIRF-Objektiv (Total Internal Reflectance Fluorescence) (100X, 1.5 NA, Olympus), einer CCD-KAMERA (z. B. einer Olympus EM-CCD-Monochromkamera, Olympus XM-10-Monochromkamera oder einer Olympus DP80-Farb- und Monochromkamera), einer Beleuchtungsquelle (z. B. einer Olympus 100-W-Hg-Lampe, einer Olympus 75-W-Xe-Lampe oder einer Olympus U-HGLGPS-Fluoreszenzlichtquelle) und Anregungswellenlängen von 532 nm oder 635 nm. Dichroitische Spiegel wurden von Semrock (IDEX Health & Science, LLC, Rochester, New York) erworben, z. B. 405, 488, 532 oder 633 nm dichroitische Reflektoren/Strahlenteiler, und Bandpassfilter wurden als 532 LP oder 645 LP entsprechend der entsprechenden Anregungswellenlänge ausgewählt. Einige hierin offenbarte modifizierte Oberflächen zeigen eine unspezifische Bindung von Farbstoffmolekülen von weniger als 0,25 Molekülen pro μm^2 .

[0112] In einigen Fällen weisen die hierin offenbarten Oberflächen ein Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer Bindung eines Fluorophors wie Cy3 von mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 oder größer als 100 oder einen beliebigen Zwischenwert auf, der durch den hierin beschriebenen Bereich aufgespannt wird. In einigen Fällen weisen die hierin

offenbarten Oberflächen ein Verhältnis von spezifischen zu unspezifischen Fluoreszenzsignalen für ein Fluorophor wie Cy3 von mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 oder größer als 100 oder einen beliebigen Zwischenwert auf, der durch den hierin beschriebenen Bereich aufgespannt wird.

[0113] Die Oberflächen mit niedrigem Hintergrund, die mit der Offenbarung hierin konsistent sind, können spezifische Verhältnisse von Farbstoffbindung (z. B. Cy3-Bindung) zu unspezifischer Farbstoffadsorption (z. B. Cy3-Farbstoffadsorption) von mindestens 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 oder mehr als 50 spezifische Farbstoffmoleküle aufweisen, die pro Molekül unspezifisch adsorbiert gebunden sind. Ähnlich können der Offenbarung hierin entsprechende Oberflächen mit niedrigem Hintergrund, an die Fluorophore, z. B. Cy3, angelagert wurden, wenn sie einer Anregungsenergie ausgesetzt werden, Verhältnisse eines spezifischen Fluoreszenzsignals (z. B. das von Cy3-markierten Oligonukleotiden, die an die Oberfläche gebunden sind, herrührt) zu unspezifischen adsorbierten Farbstofffluoreszenzsignalen von mindestens 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 oder mehr als 50:1 aufweisen.

[0114] In einigen Fällen kann der Grad der Hydrophilie (oder „Benetzbarkeit“ mit wässrigen Lösungen) der offenbarten Trägeroberflächen zum Beispiel durch die Messung von Wasserkontaktwinkeln beurteilt werden, wobei ein kleines Wassertropfen auf die Oberfläche gegeben wird, und dessen Kontaktwinkel mit der Oberfläche unter Verwendung z. B. eines optischen Tensiometers gemessen wird. In einigen Fällen kann ein statischer Kontaktwinkel bestimmt werden. In einigen Fällen kann ein fortschreitender oder zurückgehender Kontaktwinkel bestimmt werden. In einigen Fällen kann der Wasserkontaktwinkel für die hierin offenbarte hydrophile, schwach bindende Trägeroberfläche im Bereich von etwa 0 Grad bis etwa 30 Grad liegen. In einigen Fällen kann der Wasserkontaktwinkel für die hierin offenbarte hydrophile, schwach bindende Trägeroberfläche nicht mehr als 50 Grad, 40 Grad, 30 Grad, 25 Grad, 20 Grad, 18 Grad, 16 Grad, 14 Grad, 12 Grad, 10 Grad, 8 Grad, 6 Grad, 4 Grad, 2 Grad oder 1 Grad betragen. In vielen Fällen beträgt der Kontaktwinkel nicht mehr als 40 Grad. Fachleute werden erkennen, dass eine gegebene hydrophile, schwach bindende Trägeroberfläche der vorliegenden Offenbarung einen Wasserkontaktwinkel mit einem Wert von irgendwo innerhalb dieses Bereichs aufweisen kann.

[0115] In einigen Fällen erleichtern die hierin offenbarten hydrophilen Oberflächen reduzierte Waschzeiten für Bioassays, oft aufgrund reduzierter unspezifischer Bindung von Biomolekülen an die schwach

bindenden Oberflächen. In einigen Fällen können angemessene Waschschrte in weniger als 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 oder weniger als 10 Sekunden durchgeführt werden. Zum Beispiel können in einigen Fällen adäquate Waschschrte in weniger als 30 Sekunden durchgeführt werden.

[0116] Einige schwach bindende Oberflächen der vorliegenden Offenbarung zeigen eine signifikante Verbesserung der Stabilität oder Beständigkeit gegenüber längerer Exposition gegenüber Lösungsmitteln und erhöhten Temperaturen oder wiederholten Zyklen von Lösungsmittelexposition oder Temperaturänderungen. Zum Beispiel kann in einigen Fällen die Stabilität der offenbaren Oberflächen getestet werden, indem eine funktionelle Gruppe auf der Oberfläche oder ein gebundenes Biomolekül (z. B. ein Oligonukleotid-Primer) auf der Oberfläche fluoreszierend markiert wird, und das Fluoreszenzsignal vor, während und nach längerer Exposition gegenüber Lösungsmitteln und erhöhten Temperaturen oder wiederholten Zyklen von Lösungsmittelexposition oder Temperaturänderungen überwacht wird. In einigen Fällen kann der Grad der Änderung der Fluoreszenz, die verwendet wird, um die Qualität der Oberfläche zu beurteilen, weniger als 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % oder 25 % über einen Zeitraum von 1 Minute, 2 Minuten, 3 Minuten, 4 Minuten, 5 Minuten, 10 Minuten, 20 Minuten, 30 Minuten, 40 Minuten, 50 Minuten, 60 Minuten, 2 Stunden, 3 Stunden, 4 Stunden, 5 Stunden, 6 Stunden, 7 Stunden, 8 Stunden, 9 Stunden, 10 Stunden, 15 Stunden, 20 Stunden, 25 Stunden, 30 Stunden, 35 Stunden, 40 Stunden, 45 Stunden, 50 Stunden oder 100 Stunden Exposition gegenüber Lösungsmitteln und/oder erhöhten Temperaturen (oder einer beliebigen Kombination dieser Prozentsätze, wie über diese Zeiträume gemessen). In einigen Fällen kann der Grad der Änderung der Fluoreszenz, die verwendet wird, um die Qualität der Oberfläche zu beurteilen, weniger als 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % oder 25 % über 5 Zyklen, 10 Zyklen, 20 Zyklen, 30 Zyklen, 40 Zyklen, 50 Zyklen, 60 Zyklen, 70 Zyklen, 80 Zyklen, 90 Zyklen, 100 Zyklen, 200 Zyklen, 300 Zyklen, 400 Zyklen, 500 Zyklen, 600 Zyklen, 700 Zyklen, 800 Zyklen, 900 Zyklen oder 1000 Zyklen wiederholter Exposition gegenüber Lösungsmitteln und/oder Temperaturänderungen betragen (oder einer beliebigen Kombination dieser Prozentsätze, wie über diesen Bereich von Zyklen gemessen).

[0117] In einigen Fällen können die hierin offenbaren Oberflächen ein hohes Verhältnis von spezifischem Signal zu unspezifischem Signal oder anderem Hintergrund aufweisen. Zum Beispiel können einige Oberflächen, wenn sie zur Nukleinsäureamplifikation verwendet werden, ein Amplifikationssignal aufweisen, das mindestens 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100 oder mehr als 100-mal größer

ist als ein Signal einer benachbarten unbesiedelten Region der Oberfläche. Ebenso weisen einige Oberflächen ein Amplifikationssignal auf, das mindestens 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10-, 15-, 20-, 30-, 40-, 50-, 75-, 100- oder mehr als 100-fach größer ist als ein Signal einer benachbarten amplifizierten Nukleinsäurepopulationsregion der Oberfläche.

[0118] In einigen Fällen weisen Fluoreszenzbilder der offenbaren Oberflächen mit niedrigem Hintergrund, wenn diese in Nukleinsäurehybridisierungs- oder -amplifikationsanwendungen verwendet werden, um Cluster von hybridisierten oder klonal amplifizierten Nukleinsäuremolekülen (die z. B. direkt oder indirekt mit einem Fluorophor markiert wurden) Kontrast-Rausch-Verhältnisse (CNRs) von mindestens 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 210, 220, 230, 240, 250 oder größer als 250 auf.

[0119] Ein oder mehrere Primertypen können an der Trägeroberfläche befestigt oder angebunden sein. In einigen Fällen können der eine oder die mehreren Typen von Adaptern oder Primern Spacer-Sequenzen, Adapter-Sequenzen zur Hybridisierung an Adapter-ligierte Zielbibliothek-Nukleinsäuresequenzen, Vorwärts-Amplifikationsprimer, Rückwärts-Amplifikationsprimer, Sequenzierungsprimer und/oder molekulare Barcodierungssequenzen oder eine beliebige Kombination davon umfassen. In einigen Fällen kann 1 Primer- oder Adaptersequenz an mindestens eine Schicht der Oberfläche gebunden sein. In einigen Fällen können mindestens 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder mehr als 10 verschiedene Primer- oder Adaptersequenzen an mindestens eine Schicht der Oberfläche gebunden sein.

[0120] In einigen Fällen können die angebundenen Adapter- und/oder Primersequenzen einen Längenbereich von etwa 10 Nukleotiden bis etwa 100 Nukleotiden umfassen. In einigen Fällen können die gebundenen Adapter- und/oder Primersequenzen mindestens 10, mindestens 20, mindestens 30, mindestens 40, mindestens 50, mindestens 60, mindestens 70, mindestens 80, mindestens 90 oder mindestens 100 Nukleotide lang sein. In einigen Fällen können die gebundenen Adapter- und/oder Primersequenzen höchstens 100, höchstens 90, höchstens 80, höchstens 70, höchstens 60, höchstens 50, höchstens 40, höchstens 30, höchstens 20 oder höchstens 10 Nukleotide lang sein. Jeder der in diesem Absatz beschriebenen unteren und oberen Werte kann kombiniert werden, um einen Bereich zu bilden, der in der vorliegenden Offenbarung eingeschlossen ist, zum Beispiel kann in einigen Fällen die Länge der angebundenen Adapter- und/oder Primersequenzen im Bereich von etwa 20 Nukleotiden bis etwa 80 Nukleotiden liegen. Fachleute werden erkennen, dass die Länge der angebundenen Adapter- und/oder Primersequenzen einen beliebigen

Wert innerhalb dieses Bereichs, z. B. etwa 24 Nukleotide, aufweisen kann.

[0121] In einigen Fällen kann die resultierende Oberflächendichte von Primern auf den schwach bindenden Trägeroberflächen der vorliegenden Offenbarung im Bereich von etwa 100 Primermolekülen pro μm^2 bis etwa 100.000 Primermolekülen pro μm^2 liegen. In einigen Fällen kann die resultierende Oberflächendichte von Primern auf den schwach bindenden Trägeroberflächen der vorliegenden Offenbarung im Bereich von etwa 1.000 Primermolekülen pro μm^2 bis etwa 1.000.000 Primermolekülen pro μm^2 liegen. In einigen Fällen kann die Oberflächendichte der Primer mindestens 1.000, mindestens 10.000, mindestens 100.000 oder mindestens 1.000.000 Moleküle pro μm^2 betragen. In einigen Fällen kann die Oberflächendichte von Primern höchstens 1.000.000, höchstens 100.000, höchstens 10.000 oder höchstens 1.000 Moleküle pro μm^2 betragen. Jeder der in diesem Absatz beschriebenen unteren und oberen Werte kann kombiniert werden, um einen Bereich zu bilden, der in der vorliegenden Offenbarung eingeschlossen ist, zum Beispiel kann in einigen Fällen die Oberflächendichte von Primern im Bereich von etwa 10.000 Molekülen pro μm^2 bis etwa 100.000 Molekülen pro μm^2 liegen. Fachleute werden erkennen, dass die Oberflächendichte von Primermolekülen einen beliebigen Wert innerhalb dieses Bereichs, z. B. von etwa 455.000 Molekülen pro μm^2 aufweisen kann. In einigen Fällen kann die Oberflächendichte von Zielbibliothek-Nukleinsäuresequenzen, die anfänglich an Adapter- oder Primersequenzen auf der Trägeroberfläche hybridisiert sind, kleiner oder gleich der sein, die für die Oberflächendichte von angebundenen Primern angegeben ist. In einigen Fällen kann sich die Oberflächendichte klonal amplifizierter Zielbibliothek-Nukleinsäuresequenzen, die an Adapter- oder Primersequenzen auf der Trägeroberfläche hybridisiert sind, über den gleichen Bereich erstrecken, der für die Oberflächendichte angegebener Primer angegeben ist.

[0122] Lokale Dichten, wie oben aufgeführt, schließen eine Variation der Dichte über eine Oberfläche nicht aus, sodass eine Oberfläche einen Bereich mit einer Oligodichte von beispielsweise 500.000/ μm^2 umfassen kann, während sie auch mindestens einen zweiten Bereich mit einer wesentlich anderen lokalen Dichte umfasst.

VI. Veranschaulichende alternative Ausführungsformen

[0123] Die offenbarten Verfahren zum Bestimmen der Sequenz einer Zielnukleinsäure umfassen: a) Inkontaktbringen eines doppelsträngigen oder teilweise doppelsträngigen Zielnukleinsäuremoleküls, das den zu sequenzierenden Matrizenstrang und einen zu verlängernden Primerstrang umfasst, mit

einer oder mehreren der offenbarten Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen; und b) Nachweisen der Bindung einer Nukleinsäure-Bindungszusammensetzung an das Nukleinsäuremolekül, wodurch das Vorhandensein einer von der einen oder den mehreren Nukleinsäure-Bindungszusammensetzungen auf dem Nukleinsäuremolekül und die Identität des nächsten Nukleotids (d. h. des N+1- oder terminalen Nukleotids), das in den komplementären Strang eingebaut werden soll, bestimmt wird.

[0124] Das Sequenzierungsverfahren kann ferner das Einbauen des N+1- oder terminalen Nukleotids in den Primerstrang und dann das Wiederholen der Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Einbauens für eine oder mehrere zusätzliche Iterationen umfassen, wodurch die Sequenz des Matrizenstrangs des Nukleinsäuremoleküls bestimmt wird. Nach dem Schritt des Nachweisens des ternären Bindungskomplexes wird der geprimte Strang der geprimten Zielnukleinsäure um eine Base verlängert, bevor eine weitere Analyserunde durchgeführt wird. Die geprimte Zielnukleinsäure kann unter Verwendung des konjugierten Nukleotids, das an das Polymer in der multivalenten Bindungszusammensetzung gebunden ist, oder unter Verwendung eines unkonjugierten oder ungebundenen freien Nukleotids, das bereitgestellt wird, nachdem die multivalente Bindungszusammensetzung entfernt wurde, verlängert werden.

[0125] Die Verlängerung der geprimten Zielnukleinsäure kann aufgrund eines blockierten Nukleotids auf dem Strang oder der Verwendung von Polymerase, die katalytisch inaktiv ist, verhindert oder gehemmt werden. Wenn das Nukleotid in dem Polymer-Nukleotid-Konjugat eine blockierende Gruppe aufweist, welche die Verlängerung der Nukleinsäure verhindert, kann der Einbau eines Nukleotids durch die Entfernung einer blockierenden Gruppe von dem Nukleotid erreicht werden (wie beispielsweise durch Abspaltung des Nukleotids von seinem Polymer, verzweigten Polymer, Dendrimer, Partikel oder dergleichen). Wenn die Verlängerung der geprimten Zielnukleinsäure aufgrund der Verwendung von Polymerase, die katalytisch inaktiv ist, inhibiert wird, kann der Einbau eines Nukleotids durch die Bereitstellung eines Cofaktors oder Aktivators, wie eines Metallions, erreicht werden.

[0126] Der Nachweis des ternären Komplexes wird vor, gleichzeitig mit oder nach dem Einbau des Nukleotidrests erreicht. In einigen Ausführungsformen kann eine geprimte Zielnukleinsäure eine Zielnukleinsäure mit mehreren geprimten Stellen für die Anbindung von Polymerasen und/oder Nukleinsäure-Bindungseinheiten umfassen. In einigen Ausführungsformen können mehrere Polymerasen an ein einzelnes Zielnukleinsäuremolekül gebunden sein, wie beispielsweise an mehreren Stellen inner-

halb eines Zielnukleinsäuremoleküls. In einigen Ausführungsformen können mehrere Polymerasen an eine hierin offenbarte multivalente Bindungszusammensetzung gebunden sein, die mehrere Nukleotide umfasst. In einigen Ausführungsformen kann ein Zielnukleinsäuremolekül ein Produkt einer Strangverdrängungssynthese, einer Rolling-Circle-Amplifikation, einer Verkettung oder Fusion mehrerer Kopien einer Abfragesequenz oder anderer solcher Verfahren sein, die in der Technik bekannt sind oder an anderer Stelle hierin offenbart sind, um Nukleinsäuremoleküle herzustellen, die mehrere Kopien einer identischen Sequenz umfassen. Daher können in einigen Ausführungsformen mehrere Polymerasen an mehreren identischen oder im Wesentlichen identischen Stellen innerhalb einer Zielnukleinsäure angebracht werden, die mehrere identische oder im Wesentlichen identische Kopien einer Abfragesequenz umfasst. In einigen Ausführungsformen können die mehreren Polymerasen dann an Wechselwirkungen mit einem oder mehreren multivalenten Bindungskomplexen beteiligt sein; in bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Anzahl der Bindungsstellen innerhalb einer Zielnukleinsäure jedoch mindestens zwei, und die Anzahl der Nukleotide oder Substrateinheiten, die auf einem Partikel-Nukleotid-Konjugat, wie einem Polymer-Nukleotid-Konjugat, vorhanden sind, ist ebenfalls größer als oder gleich zwei.

[0127] Es kann vorteilhaft sein, die multivalenten Bindungszusammensetzungen in Kombination mit anderen Elementen bereitzustellen, um optimierte Signale bereitzustellen, zum Beispiel um eine Identifizierung eines Nukleotids an einer bestimmten Position in einer Nukleinsäuresequenz bereitzustellen. In einigen Ausführungsformen werden die hierin offenbarten Zusammensetzungen in Kombination mit einer Oberfläche bereitgestellt, die eine schwache Hintergrundbindung oder niedrige Proteinbindungsgrade bereitstellt, insbesondere einer hydrophilen oder mit einem Polymer beschichteten Oberfläche. Repräsentative Oberflächen finden sich beispielsweise in der US-Patentanmeldung Nr. 16/363.842, deren Inhalt hiermit durch Bezugnahme in vollem Umfang aufgenommen wird.

[0128] In einigen Fällen wird das Nukleinsäuremolekül an die Oberfläche eines festen Trägers gebunden, z. B. durch Hybridisierung des Matrizenstrangs an eine Adapter-Nukleinsäuresequenz oder Primer-Nukleinsäuresequenz, die an den festen Träger gebunden ist. In einigen Fällen umfasst der feste Träger ein Glas-, Quarzglas-, Silicium- oder Polymer-substrat. In einigen Fällen umfasst der feste Träger eine Beschichtung mit schwacher unspezifischer Bindung, die eine oder mehrere hydrophile Polymerschichten (z. B. PEG-Schichten) umfasst, wobei mindestens eine der hydrophilen Polymerschichten ein verzweigtes Polymermolekül (z. B. ein verzweigtes

PEG-Molekül, das 4, 8, 16 oder 32 Verzweigungen umfasst) umfasst.

[0129] Der feste Träger umfasst Oligonukleotid-Adapter oder Primer, die an mindestens eine hydrophile Polymerschicht mit einer Oberflächendichte im Bereich von etwa 1.000 Primermolekülen pro μm^2 bis etwa 1.000.000 Primermolekülen pro μm^2 gebunden sind. In einigen Fällen kann die Oberflächendichte von Oligonukleotid-Primern mindestens 1.000, mindestens 10.000, mindestens 100.000 oder mindestens 1.000.000 Moleküle pro μm^2 betragen. In einigen Fällen kann die Oberflächendichte von Oligonukleotid-Primern höchstens 1.000.000, höchstens 100.000, höchstens 10.000 oder höchstens 1.000 Moleküle pro μm^2 betragen. Jeder der in diesem Absatz beschriebenen unteren und oberen Werte kann kombiniert werden, um einen Bereich zu bilden, der in der vorliegenden Offenbarung eingeschlossen ist, zum Beispiel kann in einigen Fällen die Oberflächendichte von Primern im Bereich von etwa 10.000 Molekülen pro μm^2 bis etwa 100.000 Molekülen pro μm^2 liegen. Fachleute werden erkennen, dass die Oberflächendichte von Primermolekülen einen beliebigen Wert innerhalb dieses Bereichs, z. B. von etwa 455.000 Molekülen pro μm^2 aufweisen kann.

[0130] Ein Fachmann würde erkennen, dass in einer Reihe iterativer Sequenzierungsreaktionen gelegentlich eine oder mehrere Stellen während eines gegebenen Zyklus kein Nukleotid einbauen, was dazu führt, dass eine oder mehrere Stellen nicht mit der Masse der verlängernden Nukleinsäureketten synchronisiert sind. Unter Bedingungen, bei denen Sequenzierungssignale von Reaktionen abgeleitet werden, die an einzelnen Kopien einer Zielnukleinsäure auftreten, ergeben diese Einbaufehler diskrete Fehler in der Ausgabesequenz. Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, Verfahren zur Verringerung derartiger Fehler bei Sequenzierungsreaktionen anzugeben. Zum Beispiel kann die Verwendung multivalenter Substrate, die in der Lage sind, in den verlängernden Strang eingebaut zu werden, weil damit erhöhte Wahrscheinlichkeiten der Neubindung bei vorzeitiger Dissoziation eines ternären Polymerase-komplexes bereitgestellt werden, die Häufigkeit von „übersprungenen“ Zyklen, bei denen keine Base eingebaut wird, verringern. Somit zieht die vorliegende Offenbarung in einigen Ausführungsformen die Verwendung hierin offenbarter multivalenter Substrate in Betracht, in denen die Nukleosideinheit in einem Nukleotid mit einer freien oder reversibel modifizierten 5'-Phosphat-, Diphosphat- oder Triphosphateinheit enthalten ist, und wobei das Nukleotid mit dem Partikel oder Polymer, wie hierin offenbart, durch eine labile oder spaltbare Bindung verbunden ist. In einigen Ausführungsformen zieht die vorliegende Offenbarung eine Verringerung der intrinsischen Fehlerrate aufgrund übersprungener Einbauvor-

gänge als Ergebnis der Verwendung der hierin offenbarten multivalenten Substrate in Betracht.

[0131] Die vorliegende Offenbarung zieht auch Sequenzierungsreaktionen in Betracht, bei denen Sequenzierungssignale, die von einer gegebenen Sequenz stammen oder sich auf sie beziehen, von definierbaren Regionen, die mehrere Kopien der Zielsequenz enthalten, abgeleitet sind oder von diesen stammen. Sequenzierungsverfahren mit mehreren Kopien einer Zielsequenz haben den Vorteil, dass die Signale durch das Vorhandensein mehrerer gleichzeitiger Sequenzierungsreaktionen innerhalb der definierten Region amplifiziert werden können, wobei jede ihr eigenes Signal liefert. Das Vorhandensein mehrerer Signale innerhalb eines definierten Bereichs verringert auch die Auswirkung eines einzelnen übersprungenen Zyklus, da das Signal von einer großen Anzahl korrekter Basisaufrufe das Signal von einer kleineren Anzahl übersprungenen oder falscher Basisaufrufe überwältigen kann. Die vorliegende Offenbarung zieht ferner den Einschluss freier, unmarkierter Nukleotide während Verlängerungsreaktionen oder während eines separaten Teils des Verlängerungszyklus in Betracht, um den Einbau an Stellen bereitzustellen, die in vorherigen Zyklen übersprungen wurden. Zum Beispiel können während oder nach einem Einbauzyklus unmarkierte blockierte Nukleotide hinzugefügt werden, sodass sie an übersprungenen Stellen eingebaut werden können. Die unmarkierten blockierten Nukleotide können von derselben Art oder denselben Arten sein wie das Nukleotid, das an das multivalente Bindungssubstrat oder die multivalenten Bindungssubstrate gebunden ist, die während eines bestimmten Zyklus vorhanden sind oder vorhanden waren, oder es kann eine Mischung von 1, 2, 3, 4 oder mehr Arten von unmarkierten blockierten Nukleotiden eingeschlossen sein.

[0132] Wenn jeder Sequenzierungszyklus perfekt abläuft, liefert jede Reaktion innerhalb des definierten Bereichs ein identisches Signal. Wie jedoch an anderer Stelle herein erwähnt, werden in einer Reihe iterativer Sequenzierungsreaktionen gelegentlich eine oder mehrere Stellen während eines gegebenen Zyklus kein Nukleotid einbauen, was dazu führt, dass eine oder mehrere Stellen nicht mit der Masse der verlängernden Nukleinsäureketten synchronisiert sind. Dieses Problem, das als „Phasing“ bezeichnet wird, führt zu einer Verschlechterung des Sequenzierungssignals, da das Signal mit Störsignalen von Stellen verunreinigt ist, die einen oder mehrere Zyklen übersprungen haben. Dies wiederum erzeugt das Fehlerpotential bei der Basisidentifikation. Die fortschreitende Akkumulation von übersprungenen Zyklen über mehrere Zyklen verringert auch die effektive Leselänge aufgrund fortschreitender Verschlechterung des Sequenzierungssignals mit jedem Zyklus. Es ist eine weitere Aufgabe dieser

Offenbarung, Verfahren zur Verringerung von Phasenfehlern bereitzustellen und/oder die Leselänge bei Sequenzierungsreaktionen zu verbessern.

[0133] Das Sequenzierungsverfahren kann das Inkontaktbringen einer Zielnukleinsäure oder mehrerer Zielnukleinsäuren, die mehrere verknüpfte oder nicht verknüpfte Kopien einer Zielsequenz umfassen, mit den hierin beschriebenen multivalenten Bindungszusammensetzungen einschließen. Das Inkontaktbringen der Zielnukleinsäure oder mehrerer Zielnukleinsäuren, die mehrere verknüpfte oder nicht verknüpfte Kopien einer Zielsequenz umfassen, mit einem oder mehreren Partikel-Nukleotid-Konjugaten kann eine wesentlich erhöhte lokale Konzentration des korrekten Nukleotids bereitstellen, das in einem gegebenen Sequenzierungszyklus abgefragt wird, wodurch Signale von falschen Einbauvorgängen oder phasengesteuerten Nukleinsäureketten unterdrückt werden (d. h. diejenigen verlängernden Nukleinsäureketten, die einen oder mehrere übersprungenen Zyklen aufwiesen).

[0134] Verfahren zum Erhalten von Nukleinsäuresequenzinformationen können das Inkontaktbringen einer Zielnukleinsäure oder mehrerer Zielnukleinsäuren mit einem oder mehreren Partikel-Nukleotid-Konjugaten einschließen, wobei die Zielnukleinsäure oder die mehreren Zielnukleinsäuren mehrere verknüpfte oder nicht verknüpfte Kopien einer Zielsequenz umfassen. Dieses Verfahren führt zu einer Verringerung der Fehlerrate der Sequenzierung, was sich dadurch bemerkbar macht, dass weniger Basen falsch identifiziert werden, weniger nicht vorhandene Basen gemeldet werden oder es seltener dazu kommt, dass korrekte Basen nicht gemeldet werden. In einigen Ausführungsformen kann die Verringerung der Fehlerrate bei der Sequenzierung eine Verringerung von 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 % oder mehr im Vergleich zu der Fehlerrate umfassen, die unter Verwendung monovalenter Liganden beobachtet wird, einschließlich freier Nukleotide, markierter freier Nukleotide, Protein- oder Peptidgebundener Nukleotide oder markierter protein- oder peptidgebundener Nukleotide.

[0135] Das Verfahren zum Erhalten von Nukleinsäuresequenzinformationen kann das Inkontaktbringen einer Zielnukleinsäure oder mehrerer Zielnukleinsäuren mit einem oder mehreren Partikel-Nukleotid-Konjugaten einschließen, wobei die Matrizen-nukleinsäure oder die mehreren Zielnukleinsäuren mehrere verknüpfte oder nicht verknüpfte Kopien einer Zielsequenz umfassen. Dieses Verfahren führt zu einer Zunahme der durchschnittlichen Leselänge von 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 % oder mehr im Vergleich zu der durchschnittlichen Leselänge, die unter Verwendung monovalenter Liganden beobachtet wird, ein-

schließlich freier Nukleotide, markierter freier Nukleotide, Protein- oder Peptidgebundener Nukleotide oder markierter Protein- oder Peptid-gebundener Nukleotide.

[0136] Hierin offenbart sind Verfahren zum Erhalten von Nukleinsäuresequenzinformationen, wobei die Verfahren das Inkontaktbringen einer Zielnukleinsäure oder mehrerer Zielnukleinsäuren mit einem oder mehreren Partikel-Nukleotid-Konjugaten umfassen, wobei die Zielnukleinsäure oder die mehreren Zielnukleinsäuren mehrere verknüpfte oder nicht verknüpfte Kopien einer Zielsequenz umfassen. Dieses Verfahren führt zu einer Erhöhung der durchschnittlichen Leselänge von 10 Nukleotiden (NT), 20 NT, 25 NT, 30 NT, 50 NT, 75 NT, 100 NT, 125 NT, 150 NT, 200 NT, 250 NT, 300 NT, 350 NT, 400 NT, 500 NT oder mehr verglichen mit der durchschnittlichen Leselänge, die unter Verwendung monovalenter Liganden beobachtet wird, einschließlich freier Nukleotide, markierter freier Nukleotide, Protein- oder Peptid-gebundener Nukleotide oder markierter Protein- oder Peptid-gebundener Nukleotide.

[0137] In einigen Fällen können die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zu durchschnittlichen Leselängen für Sequenzierungsanwendungen führen, die im Bereich von 100 Nukleotiden bis 1.000 Nukleotiden liegen. In einigen Fällen kann die durchschnittliche Leselänge mindestens 100 Nukleotide, mindestens 200 Nukleotide, mindestens 225 Nukleotide, mindestens 250 Nukleotide, mindestens 275 Nukleotide, mindestens 300 Nukleotide, mindestens 325 Nukleotide, mindestens 350 Nukleotide, mindestens 375 Nukleotide, mindestens 400 Nukleotide, mindestens 425 Nukleotide, mindestens 450 Nukleotide, mindestens 475 Nukleotide, mindestens 500 Nukleotide, mindestens 525 Nukleotide, mindestens 550 Nukleotide, mindestens 575 Nukleotide, mindestens 600 Nukleotide, mindestens 625 Nukleotide, mindestens 650 Nukleotide, mindestens 675 Nukleotide, mindestens 700 Nukleotide, mindestens 725 Nukleotide, mindestens 750 Nukleotide, mindestens 775 Nukleotide, mindestens 800 Nukleotide, mindestens 825 Nukleotide, mindestens 850 Nukleotide, mindestens 875 Nukleotide, mindestens 900 Nukleotide, mindestens 925 Nukleotide, mindestens 950 Nukleotide, mindestens 975 Nukleotide oder mindestens 1000 Nukleotide betragen. In einigen Fällen kann die durchschnittliche Leselänge ein Bereich sein, der durch beliebige zwei der Werte innerhalb dieses Bereichs begrenzt ist, z. B. eine durchschnittliche Leselänge im Bereich von 375 Nukleotiden bis 825 Nukleotiden. Fachleute werden erkennen, dass in einigen Fällen die durchschnittliche Leselänge einen beliebigen Wert innerhalb des in diesem Absatz angegebenen Bereichs aufweisen kann, z. B. 523 Nukleotide.

[0138] Die Verwendung einer multivalenten Bindungszusammensetzung zur Sequenzierung verkürzt wirksam die Sequenzierungszeit. Der Sequenzierungsreaktionszyklus umfassend die Schritte des Inkontaktbringens, Nachweisens und Einbaus, wird in einer Gesamtzeit im Bereich von etwa 5 Minuten bis etwa 60 Minuten durchgeführt. In einigen Fällen wird der Sequenzierungsreaktionszyklus in mindestens 5 Minuten, mindestens 10 Minuten, mindestens 20 Minuten, mindestens 30 Minuten, mindestens 40 Minuten, mindestens 50 Minuten oder mindestens 60 Minuten durchgeführt. In einigen Fällen wird der Sequenzierungsreaktionszyklus in höchstens 60 Minuten, höchstens 50 Minuten, höchstens 40 Minuten, höchstens 30 Minuten, höchstens 20 Minuten, höchstens 10 Minuten oder höchstens 5 Minuten durchgeführt. Jeder der in diesem Absatz beschriebenen unteren und oberen Werte kann kombiniert werden, um einen Bereich zu bilden, der in der vorliegenden Offenbarung eingeschlossen ist, zum Beispiel kann in einigen Fällen der Sequenzierungsreaktionszyklus in einer Gesamtzeit im Bereich von etwa 10 Minuten bis etwa 30 Minuten durchgeführt werden. Fachleute werden erkennen, dass die Sequenzierungszykluszeit einen beliebigen Wert innerhalb dieses Bereichs, z. B. etwa 16 Minuten, aufweisen kann.

[0139] In einigen Fällen stellen die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung eine durchschnittliche Genauigkeit des Basenaufrufs von mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 92 %, mindestens 94 %, mindestens 96 %, mindestens 98 %, mindestens 99 %, mindestens 99,5 %, mindestens 99,8 % oder mindestens 99,9 % korrekter Werte im Verlauf eines Sequenzierungslaufs bereit. In einigen Fällen stellen die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung eine durchschnittliche Genauigkeit des Basenaufrufs von mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 92 %, mindestens 94 %, mindestens 96 %, mindestens 98 %, mindestens 99 %, mindestens 99,5 %, mindestens 99,8 % oder mindestens 99,9 % korrekt aufgerufener Basen pro alle 1.000 Basen, 10.000 Basen, 25.000 Basen, 50.000 Basen, 75.000 Basen oder 100.000 Basen bereit.

[0140] Die Verwendung einer multivalenten Bindungszusammensetzung zur Sequenzierung stellt eine genauere Basenablesung bereit. Die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung liefern einen durchschnittlichen Q-Wert für die Genauigkeit des Basenaufrufs über einen Sequenzierungslauf, der im Bereich von etwa 20 bis etwa 50 liegt. In einigen Fällen beträgt der durchschnittliche Q-Wert mindestens 20, mindestens 25, mindestens 30, mindestens 35, mindestens 40, mindestens 45 oder mindestens 50. Fachleute werden erkennen, dass der durchschnittliche Q-Wert

einen beliebigen Wert innerhalb dieses Bereichs aufweisen kann, z. B. etwa 32.

[0141] In einigen Fällen liefern die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung einen Q-Wert von mehr als 30 für mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 98 % oder mindestens 99 % der identifizierten terminalen (oder N+1) Nukleotide. In einigen Fällen liefern die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung einen Q-Wert von mehr als 35 für mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 98 % oder mindestens 99 % der identifizierten terminalen (oder N+1) Nukleotide. In einigen Fällen liefern die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung einen Q-Wert von mehr als 40 für mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 98 % oder mindestens 99 % der identifizierten terminalen (oder N+1) Nukleotide. In einigen Fällen liefern die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung einen Q-Wert von mehr als 45 für mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 98 % oder mindestens 99 % der identifizierten terminalen (oder N+1) Nukleotide. In einigen Fällen liefern die offenbarten Zusammensetzungen und Verfahren zur Nukleinsäuresequenzierung einen Q-Wert von mehr als 50 für mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 85 %, mindestens 90 %, mindestens 95 %, mindestens 98 % oder mindestens 99 % der identifizierten terminalen (oder N+1) Nukleotide.

[0142] Die offenbarten Träger mit schwacher unspezifischer Bindung und die assoziierten Nukleinsäurehybridisierungs- und Amplifikationsverfahren können für die Analyse von Nukleinsäuremolekülen verwendet werden, die von einer Vielfalt von verschiedenen Zell-, Gewebe- oder Probenarten abgeleitet sind, die dem Fachmann bekannt sind. Zum Beispiel können Nukleinsäuren aus Zellen oder Gewebeproben extrahiert werden, die eine oder mehrere Arten von Zellen umfassen, die von Eukaryonten (wie Tieren, Pflanzen, Pilzen, Protista), Archaeobakterien oder Eubakterien stammen. In einigen Fällen können Nukleinsäuren aus prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, wie adhären oder nicht-adhären eukaryontischen Zellen, extrahiert werden. Nukleinsäuren werden beispielsweise aus primären oder immortalisierten Nagetier-, Schweine-, Katzen-, Hunde-, Rinder-, Pferde-, Primaten- oder humanen Zelllinien unterschiedlich extrahiert. Nukleinsäuren können aus einer Vielfalt verschiedener Zell-,

Organ- oder Gewebetypen extrahiert werden (z. B. weiße Blutkörperchen, rote Blutkörperchen, Blutplättchen, Epithelzellen, Endothelzellen, Neuronen, Gliazellen, Astrozyten, Fibroblasten, Skelettmuskelzellen, glatte Muskelzellen, Gameten oder Zellen aus dem Herzen, der Lunge, dem Gehirn, der Leber, der Niere, der Milz, der Bauchspeicheldrüse, dem Thymus, der Blase, dem Magen, dem Dickdarm oder dem Dünndarm). Nukleinsäuren können aus normalen oder gesunden Zellen extrahiert werden. Alternativ oder in Kombination werden Nukleinsäuren aus erkrankten Zellen, wie Krebszellen, oder aus pathogenen Zellen, die einen Wirt infizieren, extrahiert. Einige Nukleinsäuren können aus einer unterschiedlichen Untergruppe von Zelltypen extrahiert werden, z. B. Immunzellen (wie T-Zellen, zytotoxische T-Zellen (Killer-T-Zellen), Helfer-T-Zellen, Alpha-Beta-T-Zellen, Gamma-Delta-T-Zellen, T-Zell-Vorläufer, B-Zellen, B-Zell-Vorläufer, lymphoide Stammzellen, myeloide Vorläuferzellen, Lymphozyten, Granulozyten, natürliche Killerzellen, Plasmazellen, Gedächtniszellen, Neutrophile, Eosinophile, Basophile, Mastzellen, Monozyten, dendritische Zellen und/oder Makrophagen oder eine beliebigen Kombination davon), undifferenzierten humanen Stammzellen, humanen Stammzellen, die zur Differenzierung induziert wurden, seltenen Zellen (z. B. zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), zirkulierenden Epithelzellen, zirkulierenden Endothelzellen, zirkulierenden Endometriumzellen, Knochenmarkzellen, Vorläuferzellen, Schaumzellen, Mesenchymzellen oder Trophoblasten). Nukleinsäuren können ferner Nukleinsäuren umfassen, die von viralen Proben und von subviralen Pathogenen, wie Viroiden und infektiösen RNAs, abgeleitet sind. Nukleinsäuren können aus klinischen oder anderen Proben, wie Sputum, Speichel, Augenflüssigkeit, Synovialflüssigkeit, Blut, Fäkalien, Urin, Gewebeexsudat, Schweiß, Eiter, Drainageflüssigkeit oder dergleichen, stammen. Nukleinsäuren können ferner von Pflanzen- oder Pilzproben, wie Blatt, Kambium, Wurzel, Meristem, Pollen, Eizelle, Samen, Sporen, Infloreszenz, Mycel oder dergleichen, stammen. Nukleinsäuren können auch aus Umweltpuben oder industriellen Proben, wie Wasser, Luft, Staub, Nahrungsmitteln oder dergleichen, stammen. Andere Zellen, Gewebe und Proben werden in Betracht gezogen und stimmen mit der Offenbarung hierin überein.

[0143] Nukleinsäureextraktion aus Zellen oder anderen biologischen Proben kann unter Verwendung einer Reihe von Techniken durchgeführt werden, die dem Fachmann bekannt sind. Beispielsweise kann ein DNA-Extraktionsverfahren Folgendes umfassen: (i) Sammeln der Zellprobe oder Gewebeprobe, aus der DNA extrahiert werden soll, (ii) Aufbrechen von Zellmembranen (d. h. Zelllyse), um DNA und andere zytoplasmatische Komponenten freizusetzen, (iii) Behandeln der lysierten Probe mit einer konzentrierten Salzlösung, um Pro-

teine, Lipide und RNA auszufällen, gefolgt von Zentrifugation, um die ausgefällten Proteine, Lipide und RNA zu trennen, und (iv) Reinigen von DNA aus dem Überstand, um Detergenzien, Proteine, Salze oder andere Reagenzien, die während des Zellmembran-Lyseschritts verwendet werden, zu entfernen.

[0144] Eine Vielfalt von geeigneten kommerziellen Nukleinsäureextraktions- und Reinigungskits stimmen mit der Offenbarung hierin überein. Zu Beispielen gehören, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, die QIAamp-Kits (zur Isolierung genomischer DNA aus menschlichen Proben) und DNAeasy-Kits (zur Isolierung genomischer DNA aus tierischen oder pflanzlichen Proben) von Qiagen (Germantown, MD) oder die Maxwell®- und ReliaPrep™-Serien von Kits von Promega (Madison, WI).

VII. Systeme

[0145] Systemmodule: Wie oben erwähnt, werden hierin auch Systeme offenbart, die zum Durchführen eines der offenbarten Nukleinsäuresequenzierungs- oder Nukleinsäurenachweis- und Analyseverfahren konfiguriert sind. In einigen Fällen können die offenbarten Systeme eine oder mehrere der hierin beschriebenen multivalenten Bindungszusammensetzungen, einen oder mehrere Puffer und/oder ein oder mehrere Nukleinsäuremoleküle, die an einen festen Träger gebunden sind, umfassen.

[0146] In einigen Fällen kann das System ferner eine Fluidflusssteuerung und/oder ein Fluidabgabesystem umfassen, die bzw. das so konfiguriert ist, dass es sequentiell und iterativ Matrizen-Nukleinsäuremoleküle, die an Nukleinsäuremoleküle (z. B. Adapter oder Primer) hybridisiert sind, die an einen festen Träger gebunden sind, mit den offenbarten multivalenten Bindungszusammensetzungen und/oder Reagenzien in Kontakt bringt. In einigen Fällen kann das Inkontaktbringen innerhalb einer oder mehrerer Durchflusszellen durchgeführt werden. In einigen Fällen können diese Durchflusszellen feste Komponenten des Systems sein. In einigen Fällen können die Durchflusszellen entfernbare und/oder Einweg-Komponenten des Systems sein.

[0147] In einigen Fällen kann das System ferner ein Bildgebungsmodul umfassen, wobei das Bildgebungsmodul z. B. eine oder mehrere Lichtquellen, eine oder mehrere optische Komponenten (z. B. Linsen, Spiegel, Prismen, optische Filter, Farbglassfilter, schmalbandige Interferenzfilter, breitbandige Interferenzfilter, dichroitische Reflektoren, Beugungsgitter, Aperturen, optische Fasern oder optische Wellenleiter und dergleichen) und einen oder mehrere Bildsensoren (z. B. CCD-Sensoren oder -Kameras (Charge-Coupled Device), CMOS-Bildsensoren oder -Kameras (Complementary Metal-Oxide-Semi-

conductor) oder NMOS-Bildsensoren oder -Kameras (Negative-Channel Metal-Oxide Semiconductor)) zur Bildgebung und zum Nachweis der Bindung der offenbarten multivalenten Bindungszusammensetzungen an Zielnukleinsäuremoleküle (oder Matrizen-Nukleinsäuremoleküle), die an einen festen Träger oder das Innere einer Durchflusszelle gebunden sind.

[0148] Prozessoren und Computersysteme: Ein oder mehrere Prozessoren können verwendet werden, um die Systeme zur Nukleinsäuresequenzierung oder andere hierin offenbarte Nukleinsäurenachweis- und Analyseverfahren zu implementieren. Der eine oder die mehreren Prozessoren können einen Hardwareprozessor, wie beispielsweise eine Zentraleinheit (CPU), eine Grafikverarbeitungseinheit (GPU), eine Allzweckverarbeitungseinheit oder eine Rechenplattform, umfassen. Der eine oder die mehreren Prozessoren können aus einer Vielfalt von geeigneten integrierten Schaltungen (z. B. Application Specific Integrated Circuits (ASICs), die speziell zum Implementieren von Deep-Learning-Netzwerkarchitekturen ausgelegt sind, oder feldprogrammierbare Gate-Arrays (FPGAs) zur Beschleunigung der Rechenzeit usw. und/oder zur Erleichterung des Einsatzes), Mikroprozessoren, aufkommenden Mikroprozessorentwürfen der nächsten Generation (z. B. Memristor-basierte Prozessoren), Logikbausteinen und dergleichen bestehen. Obwohl die Offenbarung unter Bezugnahme auf einen Prozessor beschrieben wird, können auch andere Arten von integrierten Schaltungen und Logikbausteinen anwendbar sein. Der Prozessor kann jede geeignete Datenverarbeitungsfähigkeit aufweisen. Beispielsweise kann der Prozessor 512-Bit-, 256-Bit-, 128-Bit-, 64-Bit-, 32-Bit- oder 16-Bit-Datenoperationen durchführen. Bei dem einen oder den mehreren Prozessoren kann es sich um Einkern- oder Mehrkernprozessoren oder um eine Vielzahl von Prozessoren handeln, die für eine parallele Verarbeitung konfiguriert sind.

[0149] Der eine oder die mehreren Prozessoren oder Computer, die zum Implementieren der offenbarten Verfahren verwendet werden, können Teil eines größeren Computersystems sein und/oder können mit Hilfe einer Kommunikationsschnittstelle operativ mit einem Computernetzwerk (einem „Netzwerk“) gekoppelt sein, um die Übertragung und gemeinsame Nutzung von Daten zu erleichtern. Das Netzwerk kann ein lokales Netzwerk, ein Intranet und/oder Extranet, ein Intranet und/oder Extranet, das mit dem Internet kommuniziert, oder das Internet sein. Das Netzwerk ist teilweise ein Telekommunikations- und/oder Datennetzwerk. Das Netzwerk kann einen oder mehrere Computerserver einschließen, was in einigen Fällen eine verteilte Datenverarbeitung, wie z. B. Cloud Computing, ermöglicht. Das Netzwerk kann in manchen Fällen

mit Hilfe des Computersystems ein Peer-to-Peer-Netzwerk implementieren, das es Geräten, die mit dem Computersystem gekoppelt sind, ermöglichen kann, sich wie ein Client oder ein Server zu verhalten.

[0150] Das Computersystem kann auch Speicher oder Speicherorte (z. B. Direktzugriffsspeicher, Nur-Lese-Speicher, Flash-Speicher, Intel® Optane™-Technologie), elektronische Speichereinheiten (z. B. Festplatten), Kommunikationsschnittstellen (z. B. Netzwerkadapter) zur Kommunikation mit einem oder mehreren anderen Systemen und Peripherievorrichtungen, wie Cache, andere Speicher, Datenspeicher und/oder elektronische Anzeigeadapter, einschließen. Der Speicher, die Speichereinheiten, die Schnittstellen und die Peripherievorrichtungen können mit dem einen oder den mehreren Prozessoren, z. B. einer CPU, über einen Kommunikationsbus, z. B. wie er auf einer Hauptplatine zu finden ist, kommunizieren. Bei der/den Speichereinheit(en) kann es sich um Datenspeichereinheiten (oder Datenlager) zur Speicherung von Daten handeln.

[0151] Der eine oder die mehreren Prozessoren z. B. eine CPU, führen eine Sequenz von maschinenlesbaren Anweisungen aus, die in einem Programm (oder Software) verkörpert sind. Die Anweisungen werden in einem Speicherplatz gespeichert. Die Anweisungen werden an die CPU geleitet, wodurch die CPU anschließend programmiert oder anderweitig konfiguriert wird, um die Verfahren der vorliegenden Offenbarung zu implementieren. Beispiele für Vorgänge, die von der CPU durchgeführt werden, schließen Abrufen, Decodieren, Ausführen und Zurückschreiben ein. Die CPU kann Teil einer Schaltung, wie beispielsweise einer integrierten Schaltung, sein. Eine oder mehrere andere Komponenten des Systems können in der Schaltung enthalten sein. In einigen Fällen ist die Schaltung eine anwendungsspezifische integrierte Schaltung (ASIC).

[0152] In der Speichereinheit sind Dateien, wie Treiber, Bibliotheken und gespeicherte Programme gespeichert. Die Speichereinheit speichert Benutzerdaten, z. B. vom Benutzer spezifizierte Präferenzen und vom Benutzer spezifizierte Programme. Das Computersystem kann in einigen Fällen eine oder mehrere zusätzliche Datenspeichereinheiten einschließen, die sich außerhalb des Computersystems befinden, wie beispielsweise auf einem entfernten Server, der über ein Intranet oder das Internet mit dem Computersystem kommuniziert.

[0153] Einige Aspekte der hierin bereitgestellten Verfahren und Systeme können mit maschinenausführbarem Code (z. B. Prozessor) implementiert werden, der an einem elektronischen Speicherort des Computersystems gespeichert ist, wie zum Beispiel im Speicher oder in der elektronischen Speicherein-

heit. Der maschinenausführbare oder maschinenlesbare Code kann in Form von Software bereitgestellt werden. Während der Verwendung wird der Code durch den einen oder die mehreren Prozessoren ausgeführt. In einigen Fällen wird der Code aus der Speichereinheit abgerufen und in dem Speicher für einen einfachen Zugriff durch den einen oder die mehreren Prozessoren gespeichert. In einigen Fällen wird auf die elektronische Speichereinheit verzichtet, und die maschinenausführbaren Anweisungen werden im Speicher abgelegt. Der Code kann vorkompiliert und zur Verwendung mit einer Maschine konfiguriert sein, die einen oder mehrere Prozessoren aufweist, die angepasst sind, um den Code auszuführen, oder er kann während der Laufzeit kompiliert werden. Der Code kann in einer Programmiersprache bereitgestellt werden, die so ausgewählt ist, dass der Code vorkompiliert oder wie kompiliert ausgeführt werden kann.

[0154] Verschiedene Aspekte der Technologie können als „Produkte“ oder „Herstellungsartikel“, z. B. „Computerprogramm- oder Softwareprodukte“ angesehen werden, oft in Form von maschinenausführbarem (oder prozessorausführbarem) Code und/oder zugehörigen Daten, die in einer Art von maschinenlesbarem Medium gespeichert sind, wobei der ausführbare Code eine Vielzahl von Anweisungen zum Steuern eines Computers oder Computersystems beim Durchführen eines oder mehrerer der hierin offenbarten Verfahren umfasst. Maschinenausführbarer Code kann in einer optischen Speichereinheit gespeichert sein, die ein optisch lesbares Medium wie eine optische Platte, CD-ROM, DVD oder Blue-Ray-Platte umfasst. Maschinenausführbarer Code kann in einer elektronischen Speichereinheit, wie einem Speicher (z. B. Nur-Lese-Speicher, Direktzugriffsspeicher, Flash-Speicher) oder auf einer Festplatte gespeichert sein. „Speichermedien“ schließen einen beliebigen oder den gesamten greifbaren Speicher der Computer, Prozessoren oder dergleichen oder zugehörige Module davon ein, wie beispielsweise verschiedene Halbleiterspeicherchips, optische Laufwerke, Bandlaufwerke, Plattenlaufwerke und dergleichen, die jederzeit einen nicht-flüchtigen Speicher für die Software bereitstellen können, die die hierin offenbarten Verfahren und Algorithmen codiert.

[0155] Der Softwarecode kann ganz oder teilweise zu manchen Zeiten über das Internet oder verschiedene andere Telekommunikationsnetze übermittelt werden. Solche Kommunikationen ermöglichen beispielsweise das Laden der Software von einem Rechner oder Prozessor in einen anderen, beispielsweise von einem Managementserver oder Hostrechner in die Rechnerplattform eines Anwendungsservers. Somit schließen andere Arten von Medien, die verwendet werden, um die softwarecodierten Anweisungen zu übertragen, optische, elektrische und

elektromagnetische Wellen ein, wie diejenigen, die über physische Schnittstellen zwischen lokalen Vorrichtungen, über drahtgebundene und optische Festnetze und über verschiedene atmosphärische Verbindungen verwendet werden. Die physischen Elemente, die solche Wellen tragen, wie drahtgebundene oder drahtlose Verbindungen, optische Verbindungen oder dergleichen, werden auch als Medien betrachtet, welche die softwarecodierten Anweisungen zum Durchführen der hierin offenbarten Verfahren übertragen. Wie hier verwendet, beziehen sich, sofern nicht auf nichtflüchtige, greifbare „Speicher“-Medien beschränkt, Begriffe wie Computer oder „maschinenlesbares Medium“ auf jedes Medium, das an der Bereitstellung von Anweisungen an einen Prozessor zur Ausführung teilnimmt.

[0156] Das Computersystem schließt oft eine elektronische Anzeige zum Bereitstellen von zum Beispiel Bildern, die von einem maschinellen Sichtsystem erfasst werden, ein oder kann damit in Kommunikation stehen. Die Anzeige ist oft auch in der Lage, eine Benutzeroberfläche (UI) bereitzustellen. Beispiele für Benutzeroberflächen schließen grafische Benutzerschnittstellen (GUIs), webbasierte Benutzerschnittstellen und dergleichen ein, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0157] Systemsteuerungssoftware: In einigen Fällen können die offenbarten Systeme einen Computer (oder Prozessor) und computerlesbare Medien umfassen, die Code zum Bereitstellen einer Benutzerschnittstelle sowie manuelle, halbautomatische, oder vollautomatische Steuerung aller Systemfunktionen umfassen, z. B. Steuerung einer Fluidströmungssteuerung und/oder eines Fluidabgabesystems (oder Subsystems), eines Temperatursteuersystems (oder Subsystems), eines Bildgebungssystems (oder Subsystems) usw. In einigen Fällen kann der Systemcomputer oder -prozessor eine integrierte Komponente des Instrumentensystems sein (z. B. ein Mikroprozessor oder eine Hauptplatine, die in das Instrument eingebettet ist). In einigen Fällen kann der Systemcomputer oder -prozessor ein eigenständiges Modul sein, zum Beispiel ein Personalcomputer oder ein Laptop-Computer. Beispiele für Funktionen der Fluidströmungssteuerung, die von der Instrumentensteuerungssoftware bereitgestellt werden können, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, volumetrische Fluidströmungsraten, Fluidströmungsgeschwindigkeiten, den Zeitpunkt und die Dauer für Proben- und Reagenzzugaben, Spülschritte und dergleichen ein. Beispiele für Temperatursteuerfunktionen, die von der Instrumentensteuerungssoftware bereitgestellt werden können, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, das Spezifizieren des Temperatursollwerts bzw. der Temperatursollwerte und das Steuern des Zeitpunkts, der Dauer und der Rampenraten für Temperaturänderungen ein. Beispiele für

Bildgebungssystem-Steuerfunktionen, die von der Instrumentensteuerungssoftware bereitgestellt werden können, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Autofokusfähigkeit, Steuerung der Belichtungszeiten und -intensitäten von Beleuchtungs- oder Anregungslicht, Steuerung der Bilderfassungsrates, Belichtungszeit, Datenspeicheroptionen und dergleichen ein.

[0158] Bildverarbeitungssoftware: In einigen Fällen der offenbarten Systeme kann das System ferner computerlesbare Medien umfassen, die Code zum Bereitstellen von Bildverarbeitungs- und Analysefähigkeit einschließen. Beispiele für Bildverarbeitungs- und Analysefähigkeit, die von der Software bereitgestellt werden können, schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, manuelle, halbautomatische oder vollautomatische Bildbelichtungsanpassung (z. B. Weißabgleich, Kontrastanpassung, Signalmitteilung und andere Rauschreduzierungsfähigkeit usw.), manuelle, halbautomatische oder vollautomatische Kantenerkennung und Objektidentifikation (z. B. zum Identifizieren von Clustern amplifizierter Matrizen-Nukleinsäuremoleküle auf einer Substratoberfläche), manuelle, halbautomatische oder vollautomatische Signalintensitätsmessungen und/oder Schwellenwertbildung in einem oder mehreren Nachweis Kanälen (z. B. einem oder mehreren Fluoreszenzemissionskanälen), manuelle, halbautomatische oder vollautomatische statistische Analyse (z. B. zum Vergleich von Signalintensitäten mit einem Referenzwert für Basisaufrufzwecke) ein.

[0159] In einigen Fällen kann die Systemsoftware eine integrierte Echtzeitbildanalyse und Instrumentensteuerung bereitstellen, sodass Schritte des Probenladens, der Reagenzzugabe, Spülschritte und/oder Bildgebungsschritte/Basenaufrufschritte nach Bedarf verlängert, modifiziert oder wiederholt werden können, bis z. B. optimale Basenaufrufergebnisse erreicht sind. Zur Implementierung von Echtzeit- oder Nachbearbeitungs-Bildanalysefunktionen kann eine Vielzahl von Bildverarbeitungs- und Analysealgorithmen verwendet werden, die dem Fachmann bekannt sind. Beispiele schließen, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein, Folgende ein: die Canny-Kantenerkennungsmethode, die Canny-Derivative-Kantenerkennungsmethode, Gradienten-Kantenerkennungsmethoden erster Ordnung (z. B. der Sobel-Operator), differentielle Kantenerkennungsmethoden zweiter Ordnung, Phasenkongruenz-Kantenerkennungsmethoden (Phasenkohärenz-Kantenerkennungsmethoden), andere Bildsegmentierungsalgorithmen (z. B. Intensitätsschwellenwertbildung, Intensitätsclusterverfahren, Intensitätshistogramm-basierte Verfahren usw.), Merkmal- und Mustererkennungsalgorithmen (z. B. die verallgemeinerte Hough-Transformation zum Erkennen beliebiger Formen, die zirkuläre Hough-Transformation usw.) und mathematische Analyseal-

gorithmen (z. B. Fourier-Transformation, schnelle Fourier-Transformation, Wavelet-Analyse, Autokorrelation usw.) oder Kombinationen davon.

[0160] In einigen Fällen können die Systemsteuerungssoftware und die Bildverarbeitungssoftware/Bildanalysesoftware als separate Softwaremodule geschrieben sein. In einigen Fällen können die Systemsteuerungssoftware und die Bildverarbeitungssoftware/Bildanalysesoftware in ein integriertes Softwarepaket eingebaut sein.

VIII. Beispiele

1. Herstellung einer multivalenten Bindungszusammensetzung

[0161] Eine Art von mehrarmigem Substrat, wie in **Fig. 5A** gezeigt, wurde durch Umsetzen von Propargylamin-dNTPs mit Biotin-PEG-NHS hergestellt. Diese wässrige Reaktion wurde zu Ende geführt und gereinigt; woraus eine reine Biotin-PEG-dNTP-Spezies resultierte. In separaten Reaktionen wurden mehrere unterschiedliche PEG-Längen verwendet, was durchschnittlichen Molekulargewichten entspricht, die von 1 kDa bis 20 kDa variieren. Die Biotin-PEG-dNTP-Spezies wurden entweder mit frisch hergestelltem oder handelsüblichem farbstoffmarkiertem Streptavidin (SA) unter Verwendung eines Farbstoff:SA-Verhältnisses von 3-5:1 gemischt. Das Mischen von Biotin-PEG-dNTP mit farbstoffmarkiertem Streptavidin erfolgte in Gegenwart von überschüssigem Biotin-PEG-dNTP, um die Sättigung der Biotin-Bindungsstellen an jedem Streptavidin-Tetramer sicherzustellen. Vollständige Komplexe wurden durch Größenausschlusschromatographie von überschüssigem Biotin-PEG-dNTP gereinigt. Jeder Nukleotidtyp wurde separat konjugiert und gereinigt, dann zusammengemischt, um eine Vier-Basen-Mischung zur Sequenzierung zu erzeugen.

[0162] Eine andere Art von mehrarmigem Substrat, wie in **Fig. 5A** gezeigt, wurde in einem einzigen Topf durch Umsetzen von mehrarmigem PEG-NHS mit überschüssigem Farbstoff-NH₂ und Propargylamin-dNTP hergestellt. Es wurden verschiedene mehrarmige PEG-NHS-Varianten mit 4-16 Armen und einem Molekulargewicht von 5 kDa bis 40 kDa verwendet. Nach der Umsetzung wurden überschüssiger kleinmolekularer Farbstoff und dNTP durch Größenausschlusschromatographie entfernt.

[0163] Jeder Nukleotidtyp wurde unabhängig konjugiert und gereinigt und dann zusammengemischt, um eine Vier-Basen-Mischung zur Sequenzierung zu erzeugen. Klasse II-Substrate, wie in **Fig. 5B** gezeigt, wurden unter Verwendung von Eintopfreaktionen hergestellt, um gleichzeitig Farbstoff und dNTP zu konjugieren. Alkin-PEG-NHS wurde mit überschüssigem Propargylamin dNTP umgesetzt.

Dieses Produkt (Alkin-PEG-dNTP) wurde anschließend chromatographisch bis zur Homogenität gereinigt. Es wurden mehrere PEG-Längen verwendet, wobei die durchschnittlichen Molekulargewichte zwischen 1 kDa und 20 kDa schwanken. Verwendet wurden Dendrimer-Kerne, die eine variable, diskrete Anzahl (12, 24, 48, 96) von Azid-Konjugationsstellen enthielten. Die Konjugation von Alkin-Farbstoff und Alkin-PEG-dNTP an den Dendrimer-Kern erfolgte in einer Eintopfreaktion mit überschüssigen Farbstoff- und dNTP-Spezies über kupfervermittelte Klick-Chemie. Nach der Umsetzung wurden überschüssiger kleinmolekularer Farbstoff und dNTP durch Größenausschlusschromatographie entfernt. Jeder Nukleotidtyp wurde unabhängig konjugiert und gereinigt und dann zusammengemischt, um eine Vier-Basen-Mischung zur Sequenzierung zu erzeugen. Wir beachten, dass dieses Schema die leichte Substitution alternativer Kerne, wie Dextrane, andere Polymere, Proteine usw. ermöglicht.

[0164] Klasse III-Polymer-Nukleotid-Konjugate wie in **Fig. 5C** gezeigt, wurden konstruiert, indem 4- oder 8-armiges PEG NHS mit einem sättigenden Gemisch aus Biotin und Propargylamin dNTP umgesetzt wurde. Diese Reaktion wurde dann durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Das Ergebnis dieser Reaktion war ein mehrarmiges PEG, das eine diskrete Verteilung von Biotin und Nukleotid enthielt. Diese heterogene Population wurde dann mit farbstoffmarkiertem Streptavidin umgesetzt und durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Jeder Nukleotidtyp wurde unabhängig konjugiert und gereinigt und dann zusammengemischt, um eine Vier-Basen-Mischung zur Sequenzierung zu erzeugen. Wir beachten, dass die Verteilung von Biotin und Nukleotid durch das Eingangsverhältnis von Biotin-NH₂ zu Propargylamin dNTP abstimmbare ist.

2. Nachweis eines ternären Komplexes

[0165] Bindungsreaktionen unter Verwendung der multivalenten Bindungszusammensetzung mit PEG-Polymer-Nukleotid-Konjugaten wurden analysiert, um eine mögliche Bildung eines ternären Bindungskomplexes nachzuweisen, und die Fluoreszenzbilder der verschiedenen Schritte sind in **Fig. 7A-7J** veranschaulicht. In **Fig. 7A**, rote und grüne Fluoreszenzbilder nach Exposition von DNA-RCA-Matrizen (Rolling Circle Application) (G und A erste Base) gegenüber 500 nM basenmarkierten Nukleotiden (A-Cy3 und G-Cy5) in Belichtungspuffer, der 20 nM Klenow-Polymerase und 2,5 mM Sr²⁺ enthält. Multivalente PEG-Substratzusammensetzungen wurden unter Verwendung variierender Verhältnisse von 4-armigem PEG-Amin (4ArmPEG-NH), Biotin-PEG-Amin (Biotin-PEG-NH) und Nukleotid (Nuc) wie folgt hergestellt: Proben PB1 und PB5, 4ArmPEG-NH: Biotin-PEG-NH: Nuc = 0,25: 1: 0,5; Probe PB2, 4ArmPEG-NH:

Biotin-PEG-NH: Nuc = 0,125: 0,5: 0,25; Probe PB3, 4ArmPEG-NH: Biotin-PEG-NH: Nuc = 0,25: 1: 0,5. Die Bilder wurden aufgenommen nach Waschen mit Bildgebungspuffer mit der gleichen Zusammensetzung wie der Belichtungspuffer, jedoch ohne Nukleotide oder Polymerase.

[0166] Der Kontrast wurde skaliert, um die Visualisierung der schwächsten Signale zu maximieren, jedoch blieben nach Waschen mit Bildgebungspuffer keine Signale bestehen (**Fig. 7A**, Einsatz). In **Fig. 7B-7E** zeigen die Fluoreszenzbilder multivalente PEG-Nukleotid-Liganden (basenmarkiert) bei 500 nM nach Mischen in dem Belichtungspuffer und Bildgebung in dem Bildgebungspuffer wie oben (**Fig. 7B**: PB1; **Fig. 7C**: PB2; **Fig. 7D**: PB3; **Fig. 7E**: PB5; **Fig. 7F**: Fluoreszenzbild, das den multivalenten (basenmarkierten) PEG-Nukleotid-Liganden PB5 bei 2,5 μ M nach Mischen im Belichtungspuffer und Bildgebung im Bildgebungspuffer wie oben zeigt. In **Fig. 7G-7I** zeigen die Fluoreszenzbilder eine weitere Basendiskriminierung durch Exposition von multivalenten Liganden gegenüber inaktiven Mutanten der Klenow-Polymerase (**Fig. 7G**: D882H; **Fig. 7H**: D882E; **Fig. 7I**: D882A, und das Wildtyp-Klenow-Enzym (Kontrollenzym) ist in **Fig. 7J**) gezeigt.

[0167] Unter Verwendung multivalenter Ligandenformulierungen kann die Basendiskriminierung ermöglicht werden, indem Polymerase-Ligand-Wechselwirkungen mit erhöhter Avidität bereitgestellt werden. Darüber hinaus wird gezeigt, dass eine erhöhte Konzentration multivalenter Liganden höhere Signale erzeugen kann und dass verschiedene Klenow-Mutationen, die die katalytische Aktivität ausschalten, für die aviditätsbasierte Sequenzierung verwendet werden können.

3. Sequenzierung von Zielnukleinsäuremolekülen unter Verwendung von ternären Komplexen

[0168] Um die Sequenzierung auf der Basis multivalenter Ligandenreporter zu demonstrieren, wurden 4 bekannte Matrizen unter Verwendung von RCA-Verfahren auf einem schwach bindenden Substrat amplifiziert. Aufeinanderfolgende Zyklen wurden Belichtungspuffer ausgesetzt, der 20 nM Klenow-Polymerase und 2,5 mM Sr^{+2} enthielt, und mit Bildgebungspuffer gewaschen und abgebildet. Nach der Bildgebung wurden die Substrate mit Waschpuffer (EDTA und hohem Salz) gewaschen und blockierte Nukleotide wurden zugegeben, um zur nächsten Base voranzuschreiten. Der Zyklus wurde für 5 Zyklen wiederholt. Spots wurden unter Verwendung von Standardbildverarbeitung und Spot-Detektion detektiert, und die Sequenzen wurden unter Verwendung eines zweifarbigen grünen und roten Schemas (G-Cy3 und A-Cy5) aufgerufen, um die Matrizen, die zyklisch durchlaufen wurden, zu identifizieren. Wie in **Fig. 8A** und **Fig. 8B** gezeigt, sind multivalente

Liganden in der Lage, Basendiskriminierung durch alle 5 Sequenzierungszyklen bereitzustellen.

4. Steuerung der Nukleotiddissoziation aus dem ternären Komplex

[0169] Ternäre Komplexe werden wie in Beispiel 2 hergestellt und abgebildet. Die Komplexe werden über verschiedene Zeiträume abgebildet, um die Persistenz des ternären Komplexes, z. B. bis zu 60 Sekunden, zu demonstrieren. Nach einer gewissen Zeit werden die Komplexe mit einem Puffer gewaschen, der identisch ist mit dem Puffer, der für die Bildung der Komplexe verwendet wird, dem nur ein zweiwertiges Kation fehlt, z. B. 10 mM Tris pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,016 % Triton X100 (ohne SrOAc), oder die Komplexe werden alternativ mit einem Puffer gewaschen, der identisch ist mit dem Puffer, der für die Bildung der Komplexe verwendet wird, der einen Chelatbildner enthält, aber ansonsten kein zweiwertiges Kation aufweist, z. B. 10 mM Tris pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,016 % Triton X100 (ohne SrOAc), mit 100 nM - 100 mM EDTA. Die Fluoreszenz der Komplexe wird im Laufe der Zeit beobachtet, wodurch die Dissoziation der ternären Komplexe beobachtet und quantifiziert werden kann. Ein repräsentativer zeitlicher Verlauf dieser Auflösung ist in **Fig. 6** dargestellt.

5. Verlängerung der komplementären Zielnukleinsäuresequenz

[0170] Nach Herstellung, Bildgebung und Dissoziation ternärer Komplexe wie in Beispiel 4 wird eine Deblockierungslösung in die Kammer, die die gebundenen DNA-Moleküle enthält, eingeleitet, die ausreicht, um die Blockierungseinheit, wie eine O-Azidomethylgruppe, eine O-Alkylhydroxylamino-Gruppe oder eine O-Amino-Gruppe, vom 3'-Ende des verlängernden DNA-Strangs zu entfernen. Anschließend oder gleichzeitig wird eine Verlängerungslösung in die Kammer mit den gebundenen DNA-Molekülen eingeleitet. Die Verlängerungslösung enthält einen Puffer, ein zweiwertiges Kation, das ausreicht, um die Polymeraseaktivität zu unterstützen, eine aktive Polymerase und eine geeignete Menge aller vier Nukleotide, wobei die Nukleotide so blockiert sind, dass sie nicht in der Lage sind, eine weitere Verlängerung nach der Zugabe eines einzelnen Nukleotids zu dem sich verlängernden DNA-Strang zu unterstützen, wie z. B. durch Einbau einer 3'-O-Azidomethylgruppe, einer 3'-O-Alkylhydroxylamino-Gruppe oder einer 3'-O-Amino-Gruppe. Der Verlängerungsstrang wird somit um eine und nur eine Base verlängert, und die Bindung von katalytisch inaktiver Polymerase und multivalentem Bindungssubstrat kann dazu verwendet werden, die nächste Base im Zyklus aufzurufen.

[0171] Alternativ können die Nukleotide, die an das multivalente Substrat gebunden sind, durch eine labile Bindung gebunden sein, sodass ein Puffer in die Kammer eingeleitet werden kann, der die gebundenen DNA-Moleküle enthält, die ein divalentes Kation oder einen anderen Cofaktor enthalten, der ausreicht, um die Polymerase katalytisch aktiv zu machen. Vor, nach oder gleichzeitig damit können Bedingungen bereitgestellt werden, die ausreichen, um die Base von dem multivalenten Substrat abzuspalten, sodass sie in den verlängernden Strang aufgenommen werden kann. Diese Spaltung und dieser Einbau führt zur Dissoziation der Markierung und des Polymerrückgrats des multivalenten Substrats unter Verlängerung des verlängernden DNA-Strangs um genau eine Base. Ein Waschvorgang wird durchgeführt, um verbrauchtes Polymerrückgrat zu entfernen, und neues multivalentes Substrat wird in die Kammer geleitet, welche die gebundenen DNA-Moleküle enthält, wodurch die neue Base wie in Beispiel 1 aufgerufen werden kann.

6. Verwendung von Polymer-Nukleotid-Konjugaten mit unterschiedlichen Längen des PEG-Verzweigung

[0172] Die in Beispiel 3 beschriebenen Polymer-Nukleotid-Konjugate mit variierenden PEG-Armlängen wurden einem einzigen Sequenzierungszyklus unterzogen und wie in Beispiel 1 beschrieben abgebildet. Wie in **Fig. 9A-9J** gezeigt, führte eine Vergrößerung der Länge der PEG-Verzweigungen zu einem erhöhten Signal bis zu einer Länge, die einem scheinbaren Mittelwert PEG MW von 5 kDa entspricht (**Fig. 9A-9D**). Die Verwendung längerer PEG-Arme als diese führte sowohl bei Cy3-A als auch Cy5-G zu Abnahmen des Fluoreszenzsignals (**Fig. 9E-9G**). Quantitative Messungen der Signalintensität sind in **Fig. 10** graphisch dargestellt.

7. Verstärkung der Bindung multivalenter Substrate durch Zugabe von Detergenzien

[0173] Multivalente Substrate wurden hergestellt und in Gegenwart und Abwesenheit von Detergenzien zu Bindungskomplexen zusammengefügt: ein Satz unter Verwendung von 10 mM Tris pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM SroAc, 0 % Triton X100 (Bedingung A) und ein Satz unter Verwendung von 10 mM Tris pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM SroAc, 0,016 % Triton X100. **Fig. 11** zeigt normalisierte Fluoreszenz von diesen multivalenten Substraten, die an DNA-Cluster gebunden sind, wobei die gebildeten Substratkomplexe in Gegenwart (Bedingung B) von Triton-X100 (0,016 %) eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität zeigen.

8. Bewertung der Zeitverläufe bei der Bindung multivalenter Substrate

[0174] Multivalente Substrate wurden wie in Beispiel 2 hergestellt und zu Bindungskomplexen zusammengefügt. Unter identischen Pufferbedingungen wurden auch Komplexe mit freien markierten Nukleotiden gebildet. Zur Charakterisierung der Persistenzzeit der Komplexe wurden Komplexe im Verlauf von 60 min. abgebildet. **Fig. 12A-12B** zeigen repräsentative Ergebnisse. Multivalente Bindungskomplexe sind über Zeitskalen von > 60 Minuten stabil (**Fig. 12B**), während markierte freie Nukleotide in weniger als einer Minute dissoziieren (**Fig. 12A**).

VIII. Schlussfolgerung

[0175] Die vorliegende Offenbarung stellt stark verbesserte Verfahren und Zusammensetzungen für DNA-Sequenzierungs- und Biosensoranwendungen bereit. Es versteht sich, dass die vorstehende Beschreibung veranschaulichend und nicht einschränkend sein soll. Viele Ausführungsformen werden Fachleuten beim Überprüfen der vorstehenden Beschreibung offensichtlich sein. Beispielfhaft wurden die erfindungsgemäßen Konzepte in erster Linie unter Bezugnahme auf die Verwendung von Polymer-Nukleotid-Konjugaten beschrieben, jedoch ist es für Fachleute ohne weiteres ersichtlich, dass auch andere Arten von Partikel-Nukleotid-Konjugaten verwendet werden könnten. Zum Beispiel kann es in einigen Ausführungsformen wünschenswert sein, Partikel-Nukleotid-Konjugate zu verwenden, die einen Quantenpunkt; ein Liposom; oder ein Emulsionspartikel einschließen. Alternativ könnte die Konjugation durch nichtkovalente Bindung wie Wasserstoffbindung oder andere Wechselwirkungen erreicht werden. Der Schutzzumfang der offenbarten Erfindungsgedanken sollte daher nicht unter Bezugnahme auf die vorstehende Beschreibung bestimmt werden, sondern unter Bezugnahme auf die beigelegten Ansprüche zusammen mit dem vollen Schutzzumfang von Äquivalenten, zu denen solche Ansprüche berechtigt sind.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bestimmen einer Identität eines Nukleotids in einer Zielnukleinsäuresequenz, umfassend:
 - (a) Bereitstellen einer Zusammensetzung, umfassend:
 - (i) zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz;
 - (ii) zwei oder mehr Primer-Nukleinsäuremoleküle, die zu einer oder mehreren Regionen der Zielnukleinsäuresequenz komplementär sind; und
 - (iii) zwei oder mehr Polymerasemoleküle;
 - (b) Inkontaktbringen der Zusammensetzung mit einem Polymer-Nukleotid-Konjugat unter Bedingun-

gen, die ausreichen, um zu ermöglichen, dass ein multivalenter Bindungskomplex zwischen dem Polymer-Nukleotid-Konjugat und den zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz in der Zusammensetzung von (a) gebildet wird, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat zwei oder mehr Nukleotidreste umfasst; und

(c) Nachweisen des multivalenten Bindungskomplexes, wodurch die Identität des Nukleotids in der Zielnukleinsäuresequenz bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zielnukleinsäuresequenz DNA ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Nachweis des Bindungskomplexes in Abwesenheit von ungebundenen oder in Lösung befindlichen Polymer-Nukleotid-Konjugaten durchgeführt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zielnukleinsäuresequenz repliziert oder amplifiziert wurde oder durch Replikation oder Amplifikation hergestellt wurde.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Nachweisen des multivalenten Bindungskomplexes eine Fluoreszenzmessung umfasst.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Inkontaktbringen die Verwendung einer Art von Polymer-Nukleotid-Konjugat umfasst.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Inkontaktbringen die Verwendung von zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei jede Art der zwei oder mehr Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine unterschiedliche Art von Nukleotidrest umfasst.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei das Inkontaktbringen die Verwendung von drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten umfasst und wobei jede Art der drei Arten von Polymer-Nukleotid-Konjugaten eine andere Art von Nukleotidrest umfasst.

10. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat einen blockierten Nukleotidrest umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das blockierte Nukleotid ein 3'-O-Azidomethyl-, 3'-O-Methyl- oder 3'-O-Alkylhydroxylamin-Nukleotid ist.

12. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Inkontaktbringen in Gegenwart eines Ions erfolgt, das den multivalenten Bindungskomplex stabilisiert.

13. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Inkontaktbringen in Gegenwart von Strontiumionen, Magnesiumionen, Calciumionen oder einer beliebigen Kombination davon erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Polymerasemoleküle katalytisch inaktiv sind.

15. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Polymerasemoleküle durch Mutation oder chemische Modifikation katalytisch inaktiv gemacht wurden.

16. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Polymerasemoleküle durch die Abwesenheit eines notwendigen Ions oder Cofaktors katalytisch inaktiv gemacht wurden.

17. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Polymerasemoleküle katalytisch aktiv sind.

18. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat keinen blockierten Nukleotidrest umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der multivalente Bindungskomplex eine Persistenzzeit von mehr als 2 Sekunden aufweist.

20. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Verfahren bei einer Temperatur innerhalb eines Bereichs von 25 °C bis 42 °C durchgeführt wird.

21. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat ferner eine oder mehrere Fluoreszenzmarkierungen umfasst und die zwei oder mehr Kopien der Zielnukleinsäuresequenz auf einer Oberfläche abgeschieden, daran befestigt oder daran hybridisiert sind, wobei ein Fluoreszenzbild des multivalenten Bindungskomplexes auf der Oberfläche ein Kontrast-Rausch-Verhältnis im Nachweisschritt von mehr als 20 aufweist.

22. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zusammensetzung von (a) unter Verwendung eines Puffers, der ein polares aprotisches Lösungsmittel enthält, auf einer Oberfläche abgeschieden wird.

23. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Inkontaktbringen unter einer Bedingung durchgeführt wird, die den multivalenten Bindungskomplex stabilisiert, wenn der Nukleotidrest komplementär zu einer nächsten Base der Zielnukleinsäuresequenz ist, und den multivalenten Bindungskomplex destabilisiert, wenn der Nukleotidrest nicht komplementär zu der nächsten Base der Zielnukleinsäuresequenz ist.

24. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat ein Polymer mit einer Viel-

zahl von Verzweigungen umfasst und die zwei oder mehr Nukleotidreste an die Verzweigungen gebunden sind.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei das erste Polymer eine Stern-, Kamm-, vernetzte, Flaschenbürsten- oder Dendrimer-Konfiguration aufweist.

26. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat eine oder mehrere Bindungsgruppen umfasst, die ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus einem Avidin, einem Biotin, einem Affinitäts-Tag und Kombinationen davon.

27. Verfahren nach Anspruch 1, ferner umfassend einen Dissoziationsschritt, der den multivalenten Bindungskomplex destabilisiert, der zwischen der Zusammensetzung von (a) und dem Polymer-Nukleotid-Konjugat gebildet wird, wobei der Dissoziationsschritt die Entfernung des Polymer-Nukleotid-Konjugats ermöglicht.

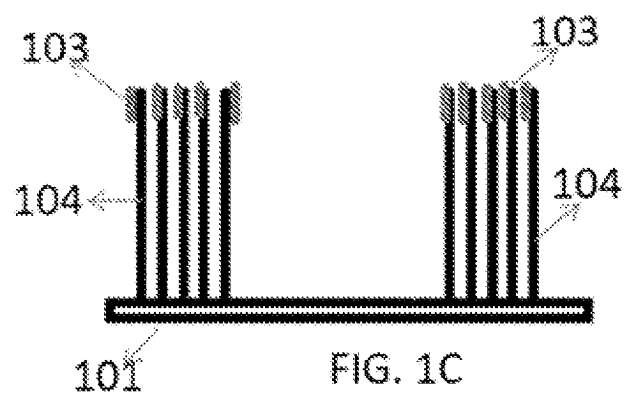
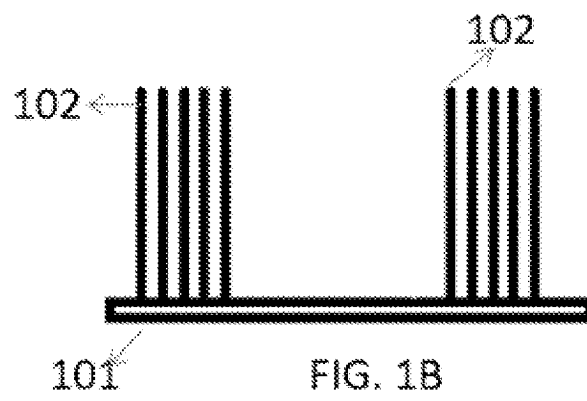
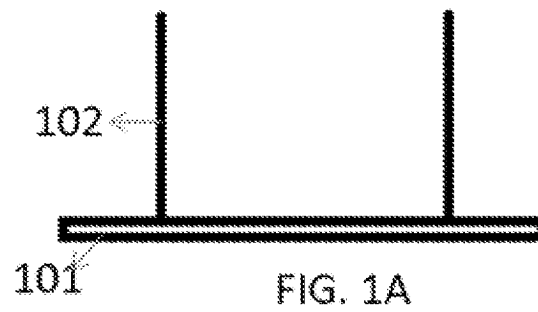
28. Verfahren nach Anspruch 27, ferner umfassend einen Verlängerungsschritt, um ein Nukleotid, das komplementär zu einer nächsten Base der Ziel-nukleinsäuresequenz ist, in die zwei oder mehr Primer-Nukleinsäuremoleküle einzubauen.

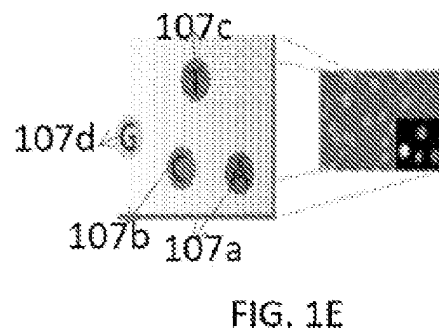
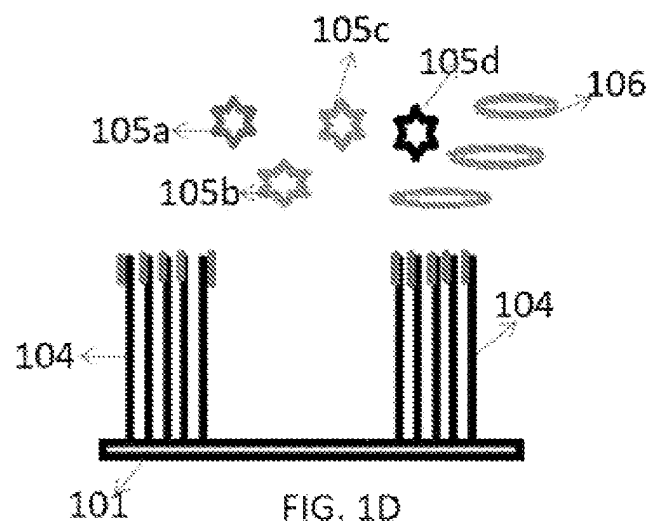
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei der Verlängerungsschritt gleichzeitig mit oder nach dem Dissoziationsschritt erfolgt.

30. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer-Nukleotid-Konjugat eine oder mehrere nachweisbare Markierungen umfasst.

Es folgen 16 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen





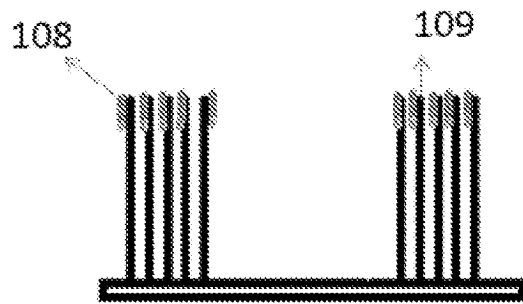


FIG. 1F

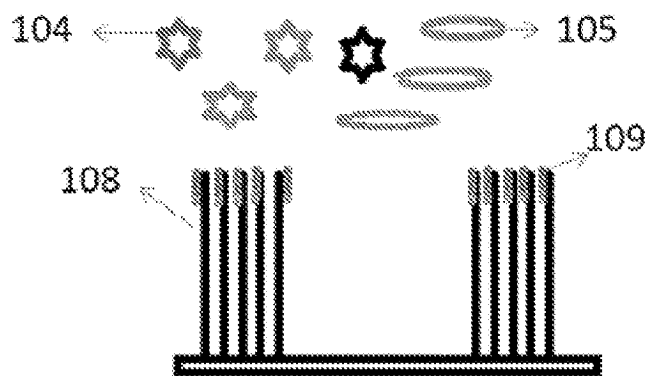


FIG. 1G

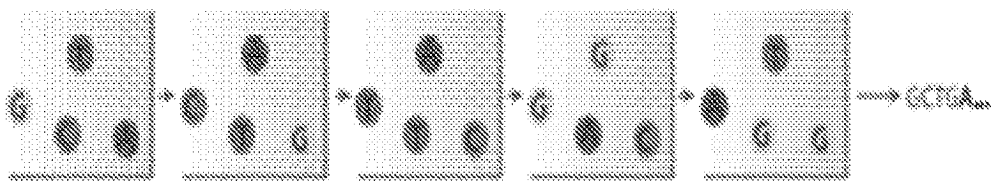


FIG. 1H

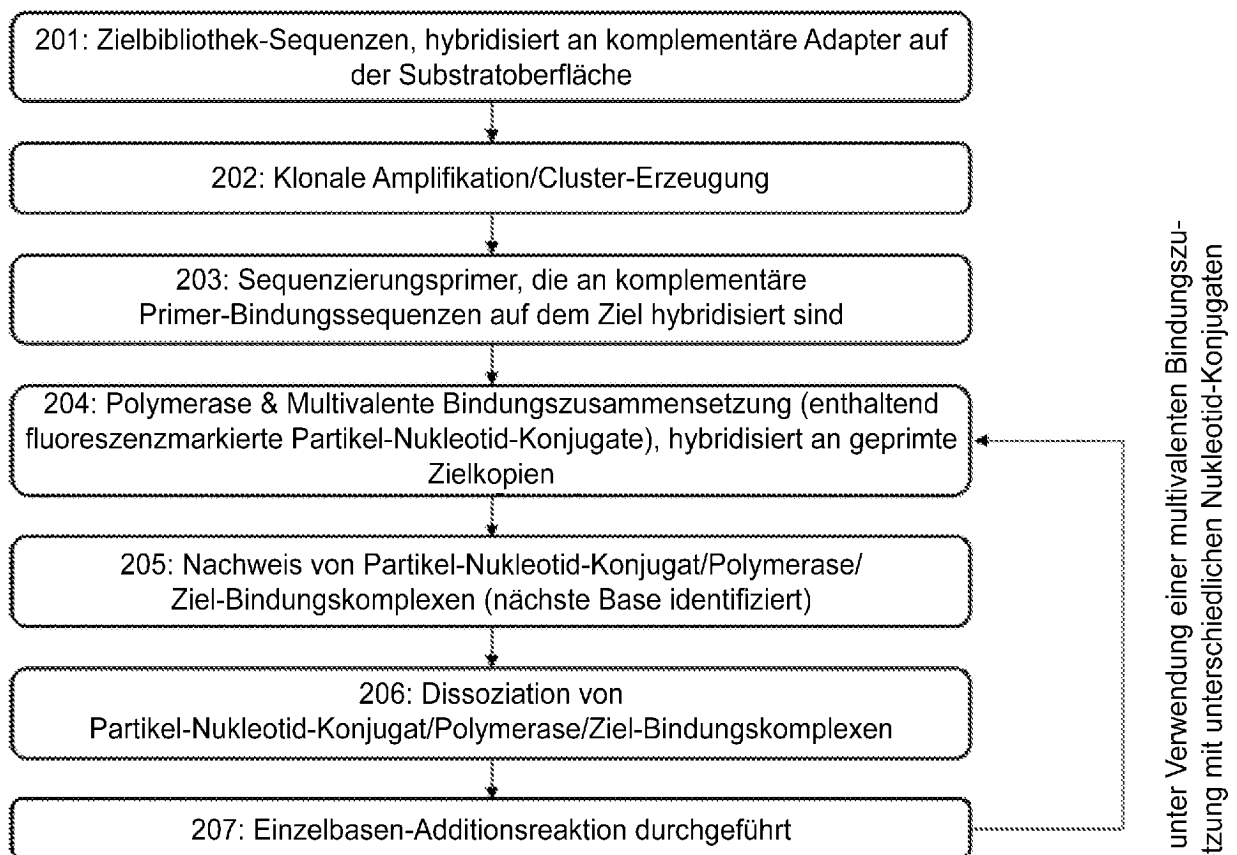


FIG. 2

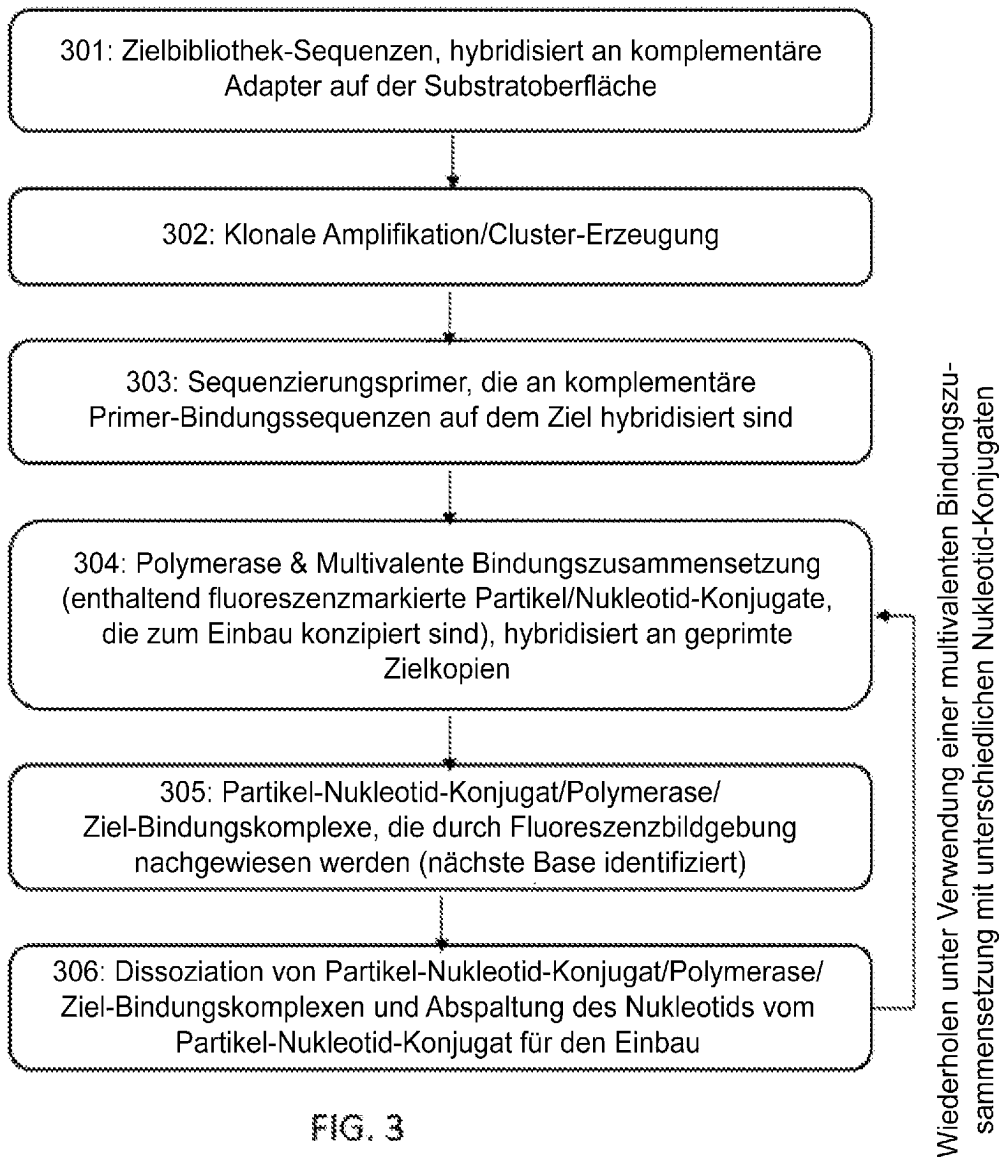


FIG. 3

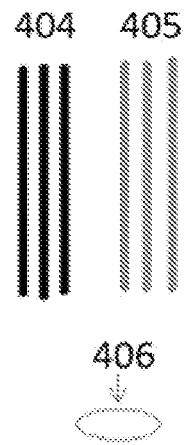
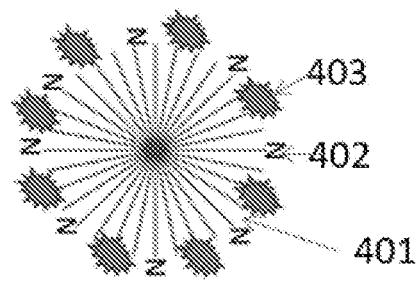


FIG. 4A

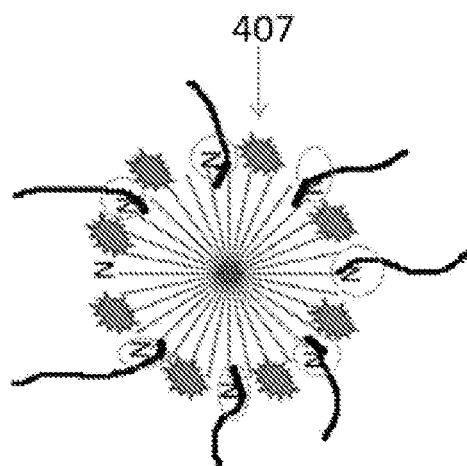


FIG. 4B

Klasse I

Valenz = 0-4

Homogene Population mit Sättigung

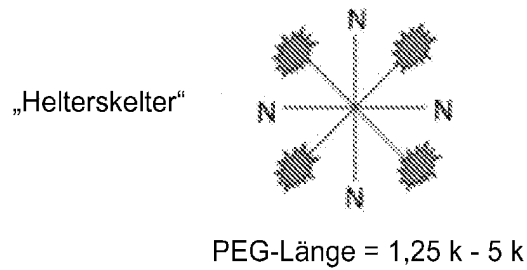
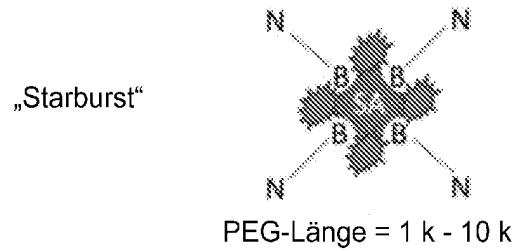
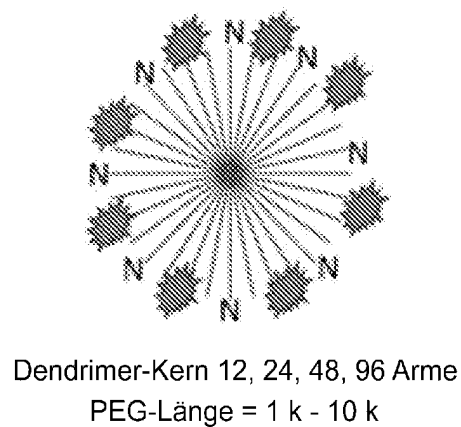


FIG. 5A

Klasse II

Valenz > 4

Homogene Population mit Sättigung



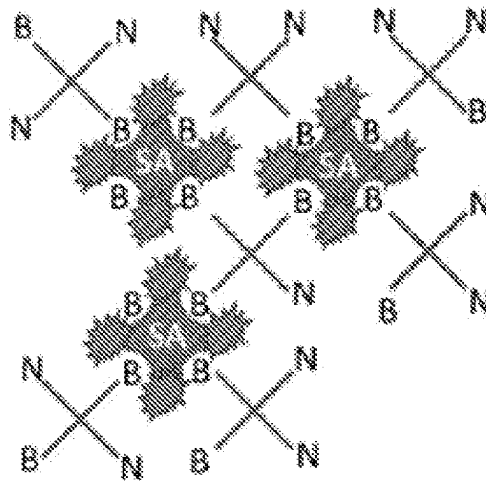
Andere Kerne = Dextrane, andere Polymere

FIG. 5B

Klasse III

Valenz > 4

Größenverteilung auf der Grundlage der Konstruktion



8-armiges PEG-NHS gemischt mit Biotin-NH₂
und dNTP-NH₂, dann gemischt mit markiertem
Streptavidin

FIG. 5C

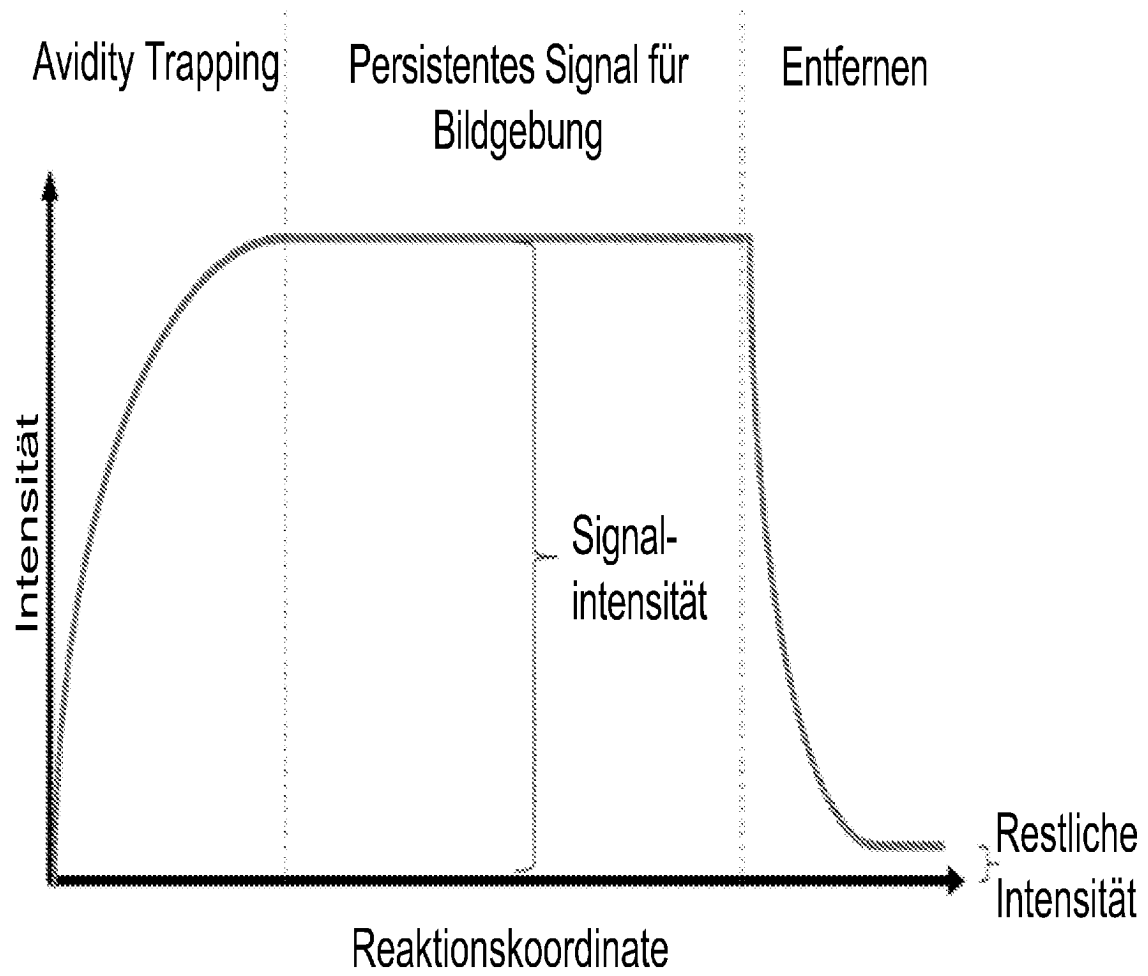


FIG. 6

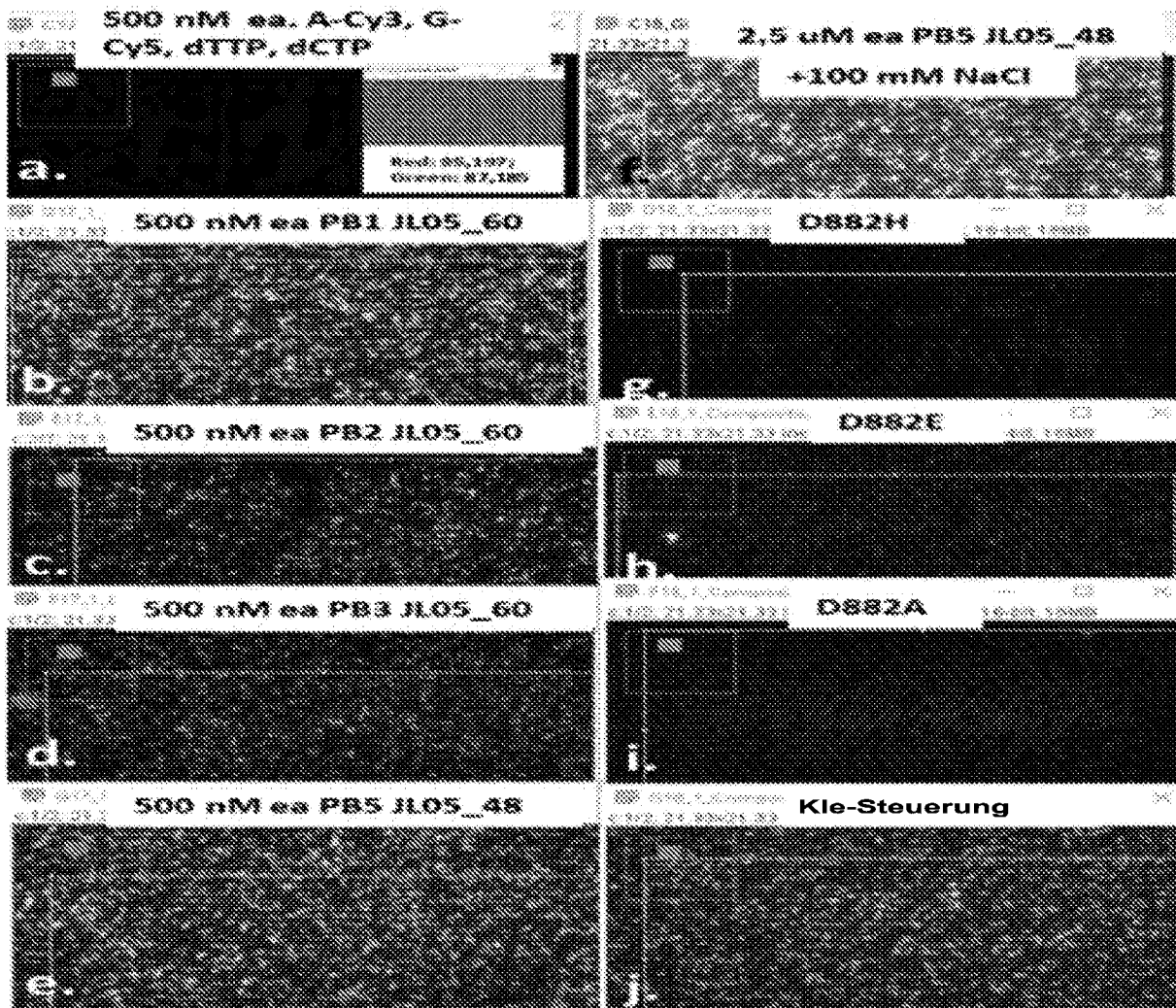


FIG. 7A-7J

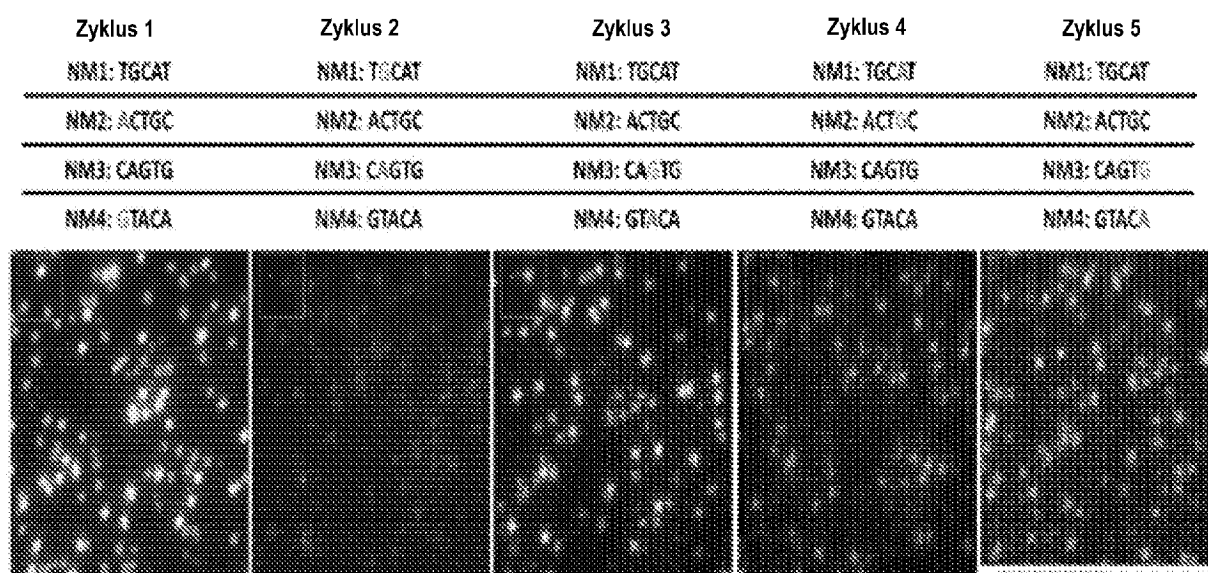
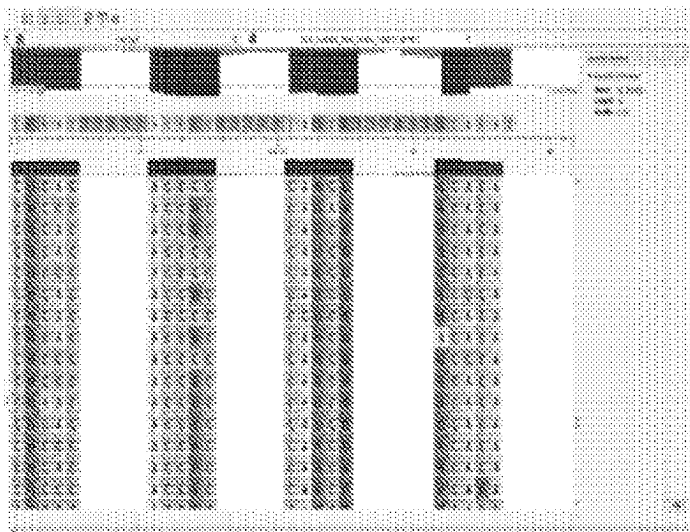


FIG. 8A

- * 5 Zyklen:
- * G: Cy3 (Grün)
- * A: Cy5 (Rot)
- * C: dunkle Basen (beide C&T)



Erwartete Seq.	#
CGCAC	1484
ACCGC	1466
CAGCG	1515
GCACA	1320
# korrekt	5785
Ablesungen gesamt	10508
# gelesen in FOV	9238
% korrekt	0.626218
1 Fehler zulassen	8727
% abgebildet	0.83051

FIG.8B

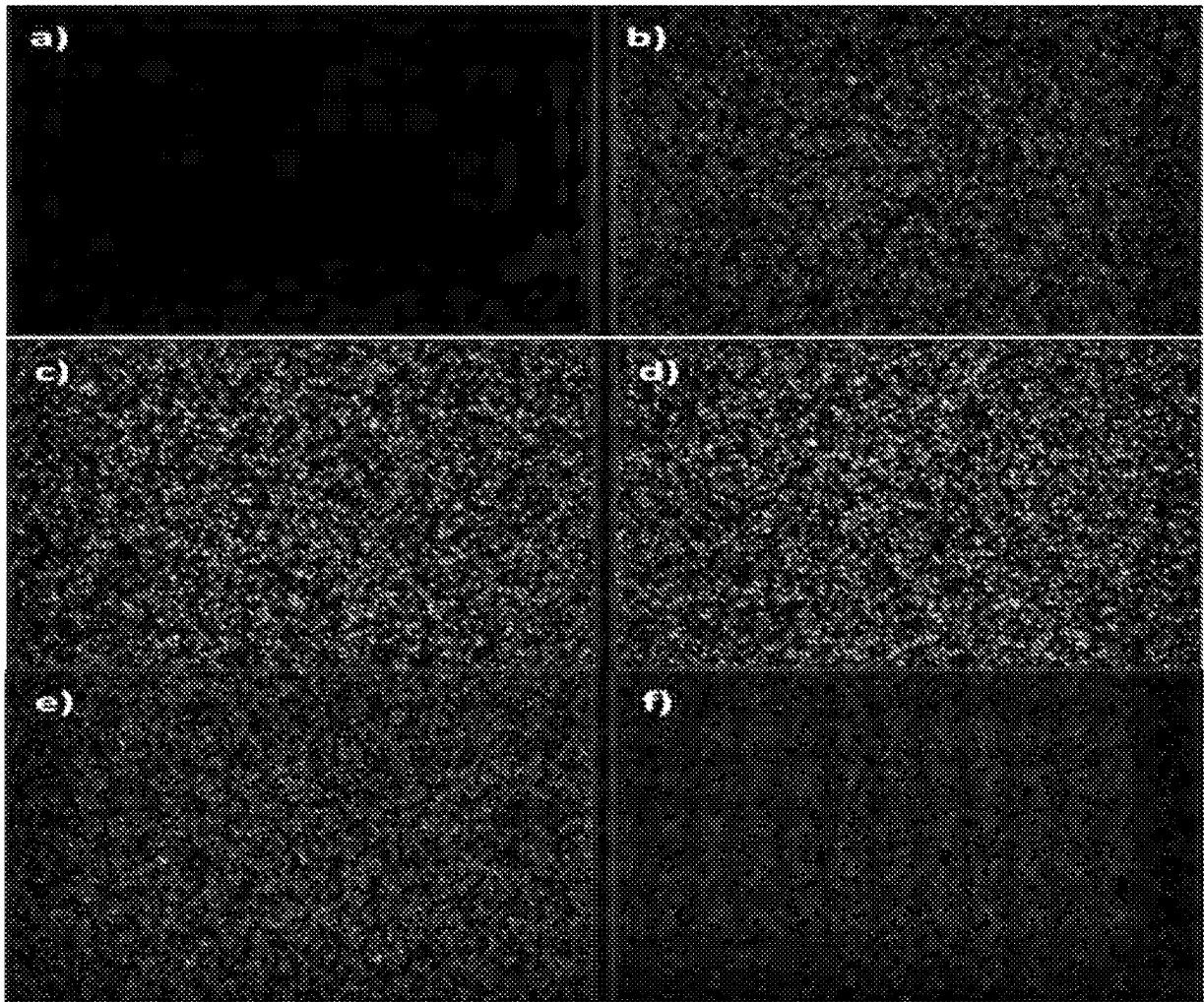


FIG. 9A-9F

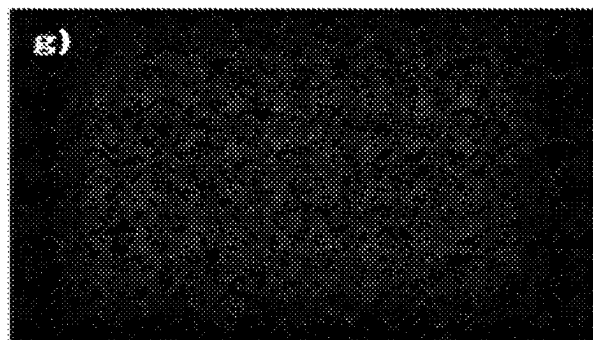


FIG. 9G

Intensität vs. PEG-Länge

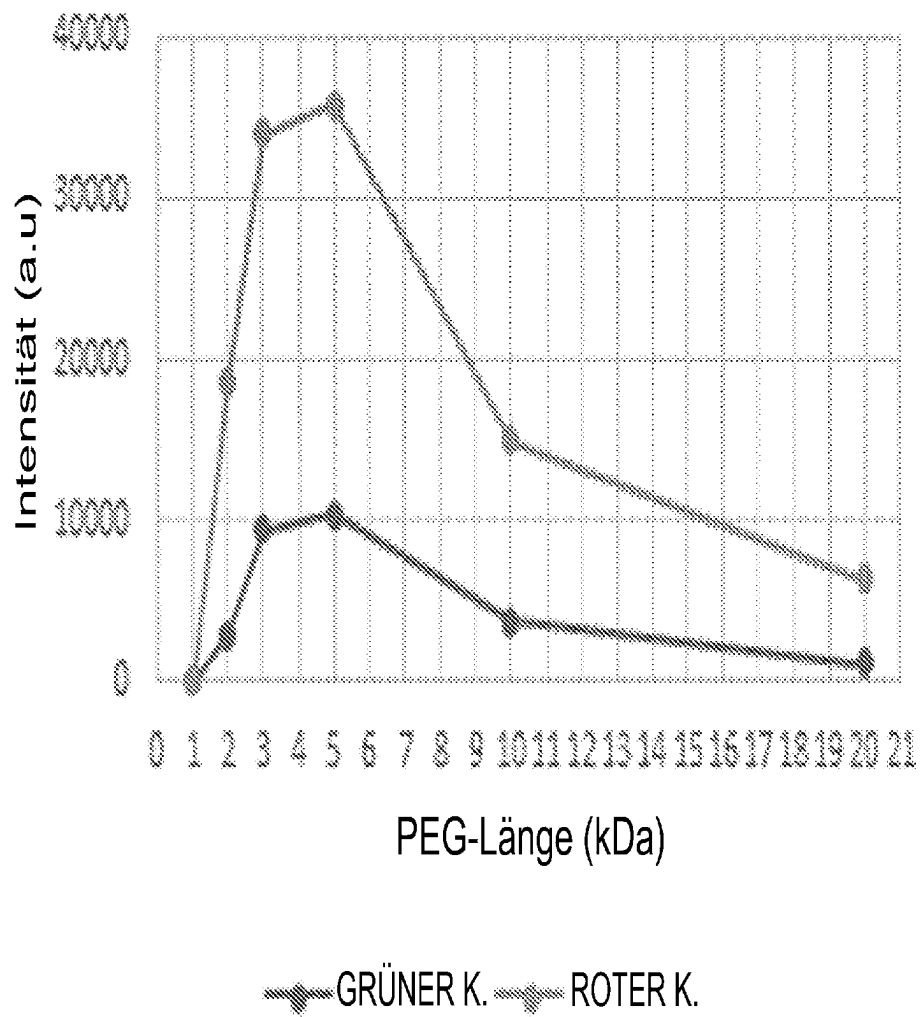


FIG. 10

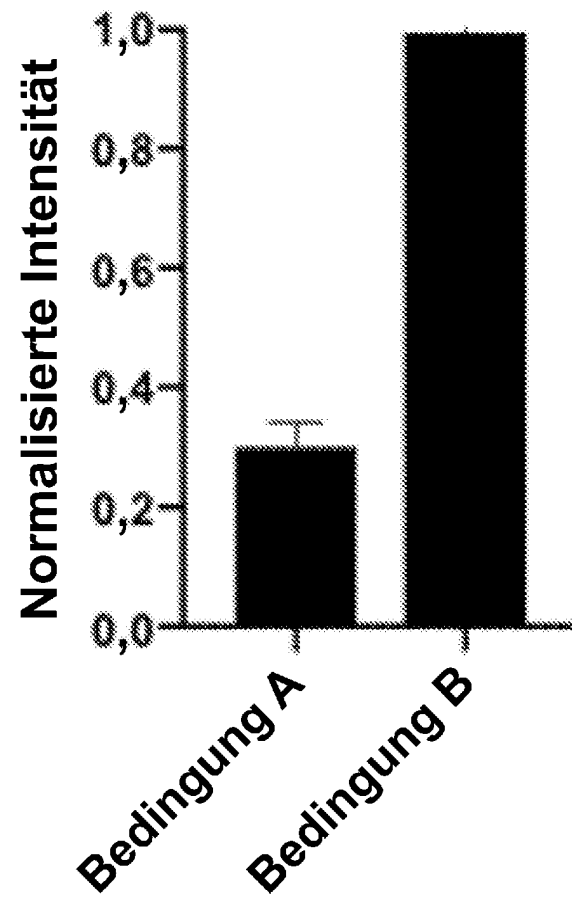


FIG.11

FIG.12A

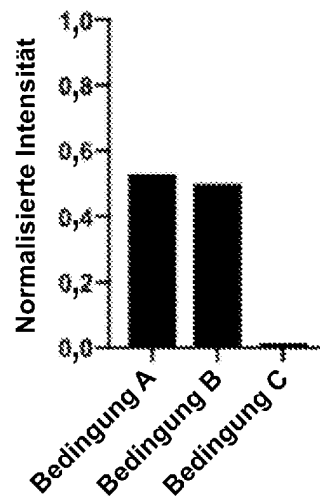


FIG.12B

