



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0026668
(43) 공개일자 2018년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2013.01)
C12Q 2521/543 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7035717
(22) 출원일자(국제) 2016년05월11일
심사청구일자 2017년12월11일
(85) 번역문제출일자 2017년12월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/031891
(87) 국제공개번호 WO 2016/183218
국제공개일자 2016년11월17일
(30) 우선권주장
62/160,460 2015년05월12일 미국(US)

(71) 출원인
일루미나, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미합중국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111, 5층
(72) 발명자
건더슨 케빈 엘.
미국 캘리포니아주 92122 샌디에이고 일루미나 웨이 5200
바이 징웨이
미국 캘리포니아주 92122 샌디에이고 일루미나 웨이 5200
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

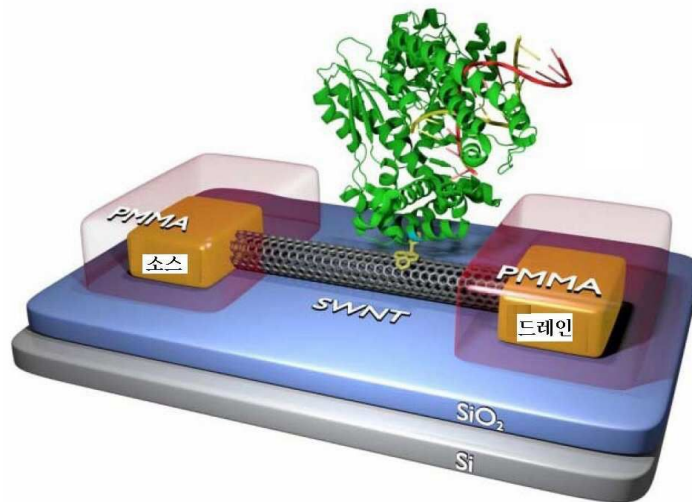
전체 청구항 수 : 총 52 항

(54) 발명의 명칭 **전계-효과 장치 및 핵산 서열결정 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 서열결정 핵산 방법을 제공한다. 방법은 핵산 주형에 대항하는 초기 핵산 가닥으로의 뉴클레오타이드의 중합효소 촉매된 혼입을 포함할 수 있고, 여기서 중합효소는 뉴클레오타이드 혼입 사건을 검출하는 전하 센서에 부착된다. 각각이 전하 센서에서 고유한 특징을 생성하는 하나 이상의 비-천연 뉴클레오타이드 유형은 주형 핵산의 상이한 뉴클레오타이드를 고유하게 확인하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2565/607 (2013.01)

(72) 발명자

첸 첵-야오

미국 캘리포니아주 92122 샌디에이고 일루미나 웨이 5200

만델 제프리 지.

미국 캘리포니아주 92122 샌디에이고 일루미나 웨이 5200

파이사조비치 세르지오

미국 캘리포니아주 92122 샌디에이고 일루미나 웨이 5200

보야노브 보얀

미국 캘리포니아주 92122 샌디에이고 일루미나 웨이 5200

콜린스 필립 지.

미국 캘리포니아주 94607-5200 오클랜드 12층 프랭클린 스트리트 1111

바이스 그레고리 에이.

미국 캘리포니아주 94607-5200 오클랜드 12층 프랭클린 스트리트 1111

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 서열결정(nucleic acid sequencing) 방법으로서,

(a) 고체 지지체 전하 센서에 부착된 중합효소를 제공하는 단계;

(b) 상기 중합효소를 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 상기 혼합물이 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형을 포함하고, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이며, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아니고, 상기 중합효소가 뉴클레오타이드를 상기 혼합물로부터 주형 핵산 가닥에 대항하는 초기 가닥으로 혼입시키는, 상기 접촉시키는 단계;

(c) 상기 전하 센서를 통한 상기 뉴클레오타이드의 혼입을 검출함으로써 제1 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 신호와 비교하여 고유한 신호를 생성하여는, 상기 제1 신호 패턴을 획득하는 단계;

(d) 상기 중합효소, 상기 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써 하는 제2 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아닌, 상기 제2 신호 패턴을 획득하는 단계; 및

(e) 상기 제1 및 제2 신호 패턴을 비교하여 상기 주형 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형에 부착되는 비-천연 모이어티를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 단계 (d)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형에 부착되는 비-천연 모이어티를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 구별 가능한 상태가 단계 (d)와 비교하여 단계 (b)에서 상이한 비-천연 모이어티를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 제1 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형의 양 또는 농도와 비교하여 더 낮은 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형의 양 또는 농도를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단계 (d)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형의 양 또는 농도와 비교하여 더 낮은 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형의 양 또는 농도를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 중합효소, 상기 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제3 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제3 신호 패턴을 획득하는 단계를 더 포함하되, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제3 유형이 상기 제3 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 및 제2 유형이 상기 제3 유형의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아닌, 핵산 서열결정 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 단계 (e)가 제1, 제2 및 제3 신호 패턴을 비교하여 상기 주형 핵산의 서열을 결정하는 것을 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 중합효소, 상기 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제4 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제4 신호 패턴을 획득하는 단계를 더 포함하되, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제4 유형이 상기 제4 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상기 제1, 제2 및 제3 유형이 상기 제4 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아닌, 핵산 서열결정 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 단계 (e)가 상기 제1, 제2, 제3 및 제4 신호 패턴을 비교하여 상기 주형 핵산의 서열을 결정하는 것을 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 주형 핵산 가닥이 환형인, 핵산 서열결정 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형이 상기 주형 핵산 가닥의 4개의 상이한 뉴클레오타이드에 상보적인, 핵산 서열결정 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형이 상기 주형 핵산 가닥의 4개의 상이한 뉴클레오타이드에 상보적인, 핵산 서열결정 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 전하 센서가 전하 센서의 어레이의 부분이고, 이로써 단계 (a)가 상기 어레이의 고체 지지체 전하 센서에 각각 부착된 복수의 중합효소를 제공하는 것을 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 단계 (b)가 상기 중합효소를 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 것을 포함하고; 단계 (c)가 상기 어레이의 전하 센서를 통해 상기 뉴클레오타이드의 혼입을 검출하는 것을 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 제조된 신호 변화에서 상기 극성과 반대인 극성을 갖는 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 다

른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 제조된 신호 변화에서 상기 극성과 반대인 극성을 갖는 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 지연을 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 지연을 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 약화된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 상기 생성된 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 약화된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 증가된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 증가된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 연장된 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 연장된 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 26

제1항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 상기 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 더 짧은 수명의 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 상기 제2 혼합물 중의 다

른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 더 짧은 수명의 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 28

제1항에 있어서, 상기 전하 센서가 SWNT FET, 나노와이어 FET, FinFET, 트라이게이트 FET, 터널링 FET, 자기 센서, 전기화학 센서, 및 나노전기기계 센서로 이루어진 군으로부터 선택되는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 29

핵산 서열결정 방법으로서,

(a) 고체 지지체 전하 센서에 부착된 중합효소를 제공하는 단계;

(b) 상기 중합효소를 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 상기 혼합물이 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형을 포함하고, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형과 비교하여 제1 구별 가능한 상태이고, 상기 중합효소가 뉴클레오타이드를 상기 혼합물로부터 주형 핵산 가닥에 대항하는 초기 가닥으로 혼입시키는, 상기 접촉시키는 단계;

(c) 상기 뉴클레오타이드의 혼입을 상기 전하 센서를 통해 검출함으로써, 제1 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 신호로부터 구별되는 신호를 생성하는, 상기 제1 신호 패턴을 획득하는 단계;

(d) 상기 중합효소, 상기 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제2 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것과 비교하여 구별 가능한 상태인, 상기 제2 신호 패턴을 획득하는 단계; 및

(e) 상기 제1 및 제2 신호 패턴을 비교하여 상기 주형 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형에 부착되는 비-천연 모이어티를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 단계 (d)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나에 부착되는 상기 비-천연 모이어티를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 구별 가능한 상태가 단계 (d)와 비교하여 단계 (b)에서 상이한 비-천연 모이어티를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, 단계 (b)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형의 양 또는 농도와 비교하여 더 낮은 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형의 양 또는 농도를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 단계 (d)에서 상기 구별 가능한 상태가 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것의 양 또는 농도와 비교하여 더 낮은 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나의 양 또는 농도를 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 35

제29항에 있어서, 상기 주형 핵산 가닥이 환형인, 핵산 서열결정 방법.

청구항 36

제29항에 있어서, 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형이 상기 주형 핵산 가닥의 4개의 상이한 뉴클레오타이드에 상보적인, 핵산 서열결정 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형이 상기 주형 핵산 가닥의 4개의 상이한 뉴클레오타이드에 상보적인, 핵산 서열결정 방법.

청구항 38

제29항에 있어서, 상기 전하 센서가 전하 센서의 어레이의 부분이고, 이로써 단계 (a)가 상기 어레이의 고체 지지체 전하 센서에 각각 부착된 복수의 증합효소를 제공하는 것을 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 단계 (b)가 상기 증합효소를 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 것을 포함하고; 단계 (c)가 상기 뉴클레오타이드의 혼입을 상기 어레이의 전하 센서를 통해 검출하는 것을 포함하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 40

제29항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 신호 변화의 상기 극성과 반대인 극성을 갖는 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제 2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것에 의해 생성된 신호 변화의 상기 극성과 반대인 극성을 갖는 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 42

제29항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 지연을 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제 2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 지연을 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 44

제29항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 약화된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제 2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것에 의해 생성된 상기 신호 변화

와 비교하여 신호 변화의 약화된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 46

제29항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 증가된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제 2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 신호 변화의 증가된 강도를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 48

제29항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 연장된 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제 2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 연장된 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 50

제29항에 있어서, 단계 (c) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 상기 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 더 짧은 수명의 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 단계 (d) 동안 상기 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 하나가 상기 제 2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것에 의해 생성된 상기 신호 변화와 비교하여 더 짧은 수명의 신호 변화를 생성하는, 핵산 서열결정 방법.

청구항 52

제29항에 있어서, 상기 전하 센서가 SWNT FET, 나노와이어 FET, FinFET, 트라이게이트 FET, 터널링 FET, 자기 센서, 전기화학 센서, 및 나노전기기계 센서로 이루어진 군으로부터 선택되는, 핵산 서열결정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 국립 일반 의학 연구소(National Institute of General Medical Sciences)에 의해 수여된 허가 번호 1R01-GM106957하에 정부 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대하여 특정 권리를 갖는다.

[0002] 본 개시내용은 일반적으로 바이오센서-기반 검출, 더욱 특히 핵산 서열결정(nucleic acid sequencing)에 사용될 수 있는 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] DNA 서열결정을 위한 최근 이용 가능한 상업적인 플랫폼은 상대적으로 비싸다. 이들 플랫폼의 대부분은 성장하는 폴리머 구조에 대한 각각의 모노머(즉, 뉴클레오타이드)의 첨가를 검출하면서 DNA 폴리머를 합성하기 때문에 그렇게 지칭되는 '합성에 의한 서열결정(sequencing-by-synthesis)' 접근법을 사용한다. 주형 DNA 가닥은 새로운 DNA 폴리머의 합성을 엄격하게 지시하기 때문에, 합성 동안 성장하는 가닥에 첨가되는 뉴클레오타이드 모노

머의 시리즈로부터 주형 DNA의 서열을 추론할 수 있다. 반응의 모니터링은 상대적으로 비싼 하드웨어, 예를 들면, 레이저, 검출 광학 및 복합 유체 전달 시스템을 사용한다. 지금까지 가장 성공적인 상업적인 플랫폼은 또한 심지어 합성에 의한 서열결정을 시작할 수 있기 전에 DNA 주형을 증폭시키는 비싼 시약 및 하드웨어를 필요로 한다. 이들 플랫폼의 복잡성 및 비용은 DNA 서열결정 기술에 대한 분명한 필요성이 존재하는 몇몇 임상 및 연구 맥락에서 이들의 사용을 방해하였다.

[0004] 따라서, 핵산 서열결정 플랫폼을 더욱 비용 효율적이고, 빠르고 편리하게 만드는 개선에 대한 요구가 존재한다. 본 개시내용은 이들 요구를 해결하고 다른 이점도 제공한다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용은 핵산 서열결정 방법을 제공한다. 방법은 (a) 고체 지지체 전하 센서에 부착된 중합효소를 제공하는 단계; (b) 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 혼합물이 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형을 포함하고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별할 수 있는 상태이고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별할 수 있는 상태가 아니고, 중합효소가 뉴클레오타이드를 혼합물로부터 주형 핵산 가닥에 대항하는 초기 가닥으로 혼입시키는, 상기 접촉시키는 단계; (c) 전하 센서를 통해 뉴클레오타이드의 혼입을 검출함으로써, 제1 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 제조된 신호와 비교하여 고유의 신호를 생성하는, 상기 제1 신호 패턴을 획득하는 단계; (d) 중합효소, 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제2 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 형태가 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 형태가 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아닌, 상기 제2 신호 패턴을 획득하는 단계; 및 (e) 제1 및 제2 신호 패턴을 비교하여 주형 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0006] (a) 고체 지지체 전하 센서에 부착된 중합효소를 제공하는 단계; (b) 중합효소를 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 혼합물이 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형을 포함하고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2의 2개의 유형이 제1 구별 가능한 상태이고, 중합효소가 뉴클레오타이드를 혼합물로부터 주형 핵산 가닥에 대항하는 초기 가닥으로 혼입시키는, 상기 접촉시키는 단계; (c) 뉴클레오타이드의 혼입을 전하 센서를 통해 검출함으로써, 제1 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 제2의 2개의 유형에 의해 생성된 신호와 구별되는 신호를 생성하는, 상기 제1 신호 패턴을 획득하는 단계; (d) 중합효소, 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제2 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형이 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1의 2개의 유형 중 다른 것과 비교하여 구별 가능한 상태인, 상기 제2 신호 패턴을 획득하는 단계; 및 (e) 제1 및 제2 신호 패턴을 비교하여 주형 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함하는 핵산 서열결정 방법이 또한 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 SWNT FET에 고정화된 단일 효소를 도시한다.
 도 2는 테더를 통해 전하 센서에 부착된 중합효소를 도시한다.
 도 3은 나노와이어 전하 센서의 부근에서 DNA 중합효소 I의 클레노브(Klenow) 절편에 대한 하전된 잔기를 도시한다.
 도 4A는 중합효소 활성의 촉매 사이클을 도시한다.
 도 4B는 프라이밍된 주형 핵산으로의 뉴클레오타이드 혼입 동안 SWNT FET에 부착된 중합효소에 의해 검출된 예시적인 신호를 도시한다.
 도 5는 천연 및 포스페이트-변형된 dATP(좌)의 혼입 및; 2-티오 dTTP(우)의 혼입 동안 SWNT FET에 부착된 중합효소에 의해 검출된 예시적인 신호를 도시한다.

도 6A는 γ -ANS 뉴클레오타이드 변형의 화학적 구조를 도시한다.

도 6B는 천연(dATP) 및 γ -ANS 변형된 뉴클레오타이드(dTTP)의 혼합물의 중합효소 처리로부터의 FRET 신호를 도시한다. γ -ANS dTTP에 의해 닫힌 상태의 기간은 천연 뉴클레오타이드보다 >10x 길고, 이는 염기의 정체성이 결정되도록 한다.

도 7A 및 도 7B는 SWNT FET에 부착된 중합효소를 사용하는 서열결정 반응 동안 핵산으로 혼입된 4개의 상이한 뉴클레오타이드 유형을 고유하게 확인하는데 사용될 수 있는 파라미터의 조합을 도시한다. 도시된 바와 같이, 극성-인버팅 및 동역학적 변형을 조합하는 변형된 뉴클레오타이드는 4개의 상이한 염기를 인코딩할 수 있다.

도 8A 및 도 8B는 언제라도 중합효소가 3개의 천연 및 하나의 변형된 dNTP의 혼합물과 접촉하는 서열결정 도식을 도시한다. 4개의 상이한 작동에 대한 전류 추적의 정렬은 DNA의 4개의 염기의 고유한 확인을 가능하게 한다.

도 9A 및 도 9B는 언제라도 중합효소가 2개의 천연 및 2개의 변형된 dNTP의 혼합물과 접촉하는 서열결정 도식을 도시한다. 2개의 상이한 작동에 대한 전류 추적의 정렬은 DNA의 4개의 염기의 고유한 확인을 가능하게 한다.

도 10은 정확도를 증가시키고, 상이한 유사체를 갖는 dNTP 혼합물과 수행된 주형 주변의 "랩(lap)"에 대하여 전류 추적을 정렬하는(예를 들면, 상이한 뉴클레오타이드 변형은 상이한 랩 동안 존재함) 수단으로서 환형 주형을 서열결정하도록 구성된 고-진행성(high-processivity) 중합효소를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0008] 본 개시내용의 실시형태는 일반적으로 핵산 서열결정 과정에서 검출된 뉴클레오타이드 혼입 발생과 같은 적용에서 단일 분자 검출에 유용한 장치, 조성물 및 방법에 관한 것이다. 고-처리량 방식으로 긴 서열결정 관독을 제공하는 개선된 검출 시스템에 대한 요구가 존재한다. 본 명세서에 기재된 본 발명의 실시형태는 이러한 요구를 만족시키고 다른 이점도 제공한다.
- [0009] 본 개시내용은 핵산 서열결정 방법을 제공한다. 방법은 핵산 주형에 대항하는 초기 핵산 가닥으로의 뉴클레오타이드의 중합효소 촉매된 혼입을 이용한다. 중합효소는 뉴클레오타이드 혼입 발생을 검출하는 전하 센서에 부착될 수 있다. 각각 전하 센서에서 고유의 특징을 생성하는 하나 이상의 비-천연 뉴클레오타이드 유형은 주형 핵산에서 상이한 뉴클레오타이드를 고유하게 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0010] 몇몇 실시형태에 있어서, 혼합물 중에 존재하는 하나 이상의 비-천연 뉴클레오타이드는 혼합물 중에 다른 뉴클레오타이드와 비교하여 전환된 극성을 갖는 신호 변화를 생성할 것이다. 대안적으로 또는 추가로, 혼합물 중에 사용되는 하나 이상의 비-천연 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 혼입의 지연 또는 혼입의 감소된 비율을 생성할 것이다. 대안적으로 또는 추가로, 핵산 서열결정 방법에서 사용되는 하나 이상의 비-천연 뉴클레오타이드는 유의미하게 변경된 신호 높이를 생성할 수 있다. 이들 신호 파라미터는 중합효소 활성 동안 비-천연 뉴클레오타이드가 상보적인 주형 핵산 중의 뉴클레오타이드를 구별하기 위하여 검출될 수 있다.
- [0011] 특정한 실시형태에 있어서, 비-천연 뉴클레오타이드(들)에 존재하는 비-천연 모이어티 또는 변형은 중합효소 형태에서 변화를 생성할 수 있고(모이어티 또는 변형이 없는 뉴클레오타이드에 의해 생성된 형태와 비교하여), 이로써 중합효소가 부착된 전하 센서에 의해 검출된 하나 이상의 신호 파라미터는 고유한 특징을 생성한다. 예시적인 신호 파라미터는 신호 기간, 신호 높이, 신호 상승 시간, 신호 하강 시간, 신호 극성, 신호 노이즈 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0012] 방법의 몇몇 실시형태는 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 유형 중 하나가 다른 3개의 유형(즉, '높은' 뉴클레오타이드)와 비교하여 실질적으로 낮은 양 또는 농도(즉, '낮은' 뉴클레오타이드)로 존재하는 4개의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형의 혼합물을 이용한다. 그 결과, 낮은 뉴클레오타이드의 혼입은 상대적인 지연 또는 감소된 혼입 속도로서 검출될 것이다. 이러한 특징은 낮은 뉴클레오타이드에 상보적인 뉴클레오타이드 유형의 주형에서의 위치를 확인하는데 이용될 수 있다. 몇몇 서열결정 작동은 동일한 주형에 있어서 완료될 수 있고, 각각의 작동은 '낮은' 상태의 상이한 뉴클레오타이드로 수행된다. 상이한 작동으로부터의 신호 패턴을 비교하여 주형의 서열을 결정할 수 있다.
- [0013] 상기 실시형태는 3 '높은'-1 '낮은' 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물에 관하여 예시된다. 예를 들면, 1 '높은'-3 '낮은' 혼합물, 또는 2 '높은'-2 '낮은' 혼합물을 포함하는 다른 혼합물도 사용하는 것이 가능하다. 상이한 농도를 갖는 뉴클레오타이드를 사용하는 혼합물의 추가의 유용한 구성은 미국 특허 제7,556,922호에 기재되고, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.

- [0014] 특정한 실시형태에 있어서 주형 핵산은 환형이다. 환형 주형의 사용은 중합효소가 대체될 필요가 없기 때문에 반복된 서열결정 작동에 대한 편리한 형식을 제공할 수 있고, 대신 주형 주변에 다중 랩을 만들 수 있고, 각각의 랩이 주형의 효과적으로 반복된 서열결정이다.
- [0015] 환형 주형을 이용하는 몇몇 실시형태에 있어서, 중합효소는 중합효소가 주형 주변에 여러번 진행되는 경우, 환형 주형으로부터 대체될 핵산 가닥을 소화하는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함할 수 있다.
- [0016] 주형이 선형이든 환형이든, 상이한 프라이머는 동일한 주형에서 수행되는 상이한 서열결정 작동을 위하여 사용될 수 있다. 상이한 프라이머는 주형 위에 상이한 위치에서 혼성화되도록 설계될 수 있다. 이와 같이, 각각의 작동은 주형의 상이한 위치에서 시작할 것이지만, 각각의 작동에서 서열화된 주형의 부분들 사이에 실질적인 겹침이 있을 수 있다. 각각의 작동으로부터 야기된 신호 패턴은 서열 콜링 및 오류 확인을 촉진하기 위하여 각각의 작동에 있어서 예상도는 출발 위치에 기반하여 정렬될 수 있다.
- [0017] 본 명세서에 기재된 방법에서 사용되는 전하 센서는 SWNT FET, 나노와이어 FET, FinFET, 트라이게이트 FET, 터널링 FET, 또는 또 다른 전계 감응 장치를 사용하여 전계 효과를 통해 중합효소에 의하여 뉴클레오타이드 혼입을 검출할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 센서는 자기, 전기화학, 또는 나노전기기계이다.
- [0018] 본 명세서에 사용된 용어는 달리 특정되지 않는 한 이들의 일반적인 의미를 갖는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에 사용된 몇몇 용어의 예 및 이들의 정의는 하기 기재된다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 "어레이"는 전하 센서 또는 분자가 이들의 상대적인 위치에 따라 서로 구별될 수 있도록 하나 이상의 고체-상 기관에 부착되는 전하 센서 또는 분자의 집단에 관한 것이다. 어레이는 고체-상 기관 위에 상이한 어드레스 가능한 위치에(예를 들면, 상이한 전하 센서에) 각각 위치한 상이한 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 어레이는 각각 상이한 분자를 갖는 별개의 고체-상 기관을 포함할 수 있고, 여기서 상이한 프로브 분자는 고체-상 기관이 부착되는 표면 위에 고체-상 기관의 위치에 따라 확인될 수 있다. 어레이의 분자는 핵산 프라이머, 핵산 프로브, 핵산 주형 또는 핵산 효소, 예를 들면, 중합효소일 수 있다.
- [0020] 본 명세서에 사용되는 용어 "부착된"은 2가지 것의 상태가 서로 결합되거나, 묶이거나, 점착되거나, 연결되거나, 결속되는 것을 의미한다. 예를 들면, 반응 성분, 예를 들면, 중합효소는 고체상 성분, 예를 들면, 전하 센서에 공유 또는 비공유 결합으로 부착될 수 있다. 공유 결합은 원자들 사이의 전자쌍의 공유를 특징으로 한다. 비공유 결합은 전자쌍의 공유를 포함하지 않는 화학적 결합이고, 예를 들면, 수소 결합, 이온 결합, 반데르발스 힘, 친수성 상호작용 및 소수성 상호작용을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 명세서에 사용되는 용어 "전하 센서"는 이의 표면 또는 이의 주변 전계에서 섭동을 전기 신호로 번역하는 검출 장치를 의미하는 것을 의도한다. 예를 들면, 전하 센서는 반응 성분의 도착 또는 출발을 전기 신호로 번역할 수 있다. 전하 센서는 또한 2개의 반응 성분 사이의 상호작용, 또는 단일 반응 성분에서의 형태적 변화를 전기 신호로 번역할 수 있다. 예시적인 전하 센서는 전계 효과 트랜지스터(FET), 예를 들면, 단일벽 탄소 나노튜브(SWNT)계 FET, 실리콘 나노와이어(SiNW) FET, 그래핀 나노리본 FET(및 MoS₂, 실리신 등과 같은 2D 물질로부터 제작된 관련된 나노리본 FET), 터널 FET(TFET), 및 가파른 역치 경사 장치(예를 들면, 문헌[Swaminathan et al., *Proceedings of the 51st Annual Design Automation Conference on Design Automation Conference*, pg 1-6, ISBN: 978-1-4503-2730-5(2014)] 및 문헌[Ionescu et al., *Nature* 479, 329-337(2011)]을 참고)이다. 본 개시내용의 방법 및 장치에서 사용될 수 있는 FET 및 SWNT 센서의 예는 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제2013/0078622 A1호에 기재된다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "형태적 신호 변화"는 분자의 부분의 구조, 형상 또는 구성에서 변화에 반응하는 분자로부터의 검출 가능한 신호의 출현, 소실, 또는 변경을 의미한다. 예를 들면, 신호 변화는 분자의 제2 부분과 상호작용하는 분자의 제1 부분이 있는 라벨의 상호작용의 변화로 인한 것일 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용하는 용어 "형태적으로 표지된"은, 분자에 관하여 사용되는 경우, 분자의 구조의 변화, 분자의 형상의 변화 또는 분자의 부분의 구성의 변화에 반응하는 적어도 하나의 라벨을 갖는 것을 의미한다. 분자는, 예를 들면, 중합효소, 역전사효소, 엑소뉴클레아제 또는 다른 핵산 효소일 수 있다. 분자의 부분은, 예를 들면, 원자들 사이의 분자 구조에서 발생하는 하나 이상의 화학적 결합 주변의 회전으로 인하여 상대적인 위치를 변화시키는 원자일 수 있다. 분자의 부분은 거대분자의 도메인, 예를 들면, 당해 분야에 흔히 알려진 것들일 수 있다. 예를 들면, 중합효소는 손가락, 손바닥 및 엄지손가락 도메인으로 지칭되는 도메인을 포함한다. 단백질의 경우, 부분은 2차, 3차 또는 4차 구조의 영역일 수 있다. 라벨(들)은 분자에, 예를 들면, 공유 연결을 통해 부착될 수 있다. 그러나, 라벨(들)은, 예를 들면, 분자에 근접하여 위치한 분자에 부착될 필요는 없다. 특

정한 실시형태에 있어서, 라벨은 뉴클레오타이드 또는 핵산과 같은 분자의 반응물 또는 생성물에 부착되지 않는다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "상이한"은, 핵산에 관하여 사용되는 경우, 서로 동일하지 않은 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 의미한다. 둘 이상의 상이한 핵산은 이들의 전체 길이에 따라 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 대안적으로, 둘 이상의 상이한 핵산은 이들 길이의 실질적인 부분에 따라 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 예를 들면, 둘 이상의 상이한 핵산은 또한 둘 이상의 분자에 대하여 동일한 일반적인 서열 부분을 가지면서 둘 이상의 분자에 대하여 상이한 표적 뉴클레오타이드 서열 부분을 가질 수 있다. 용어 "상이한"은 중합효소 및 핵산 효소와 같이 다른 분자에 유사하게 적용될 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 "구별 가능한 상태"는, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 특정한 유형에 관하여 사용되는 경우, 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트와 비교하여 검출 조건하에 고유하게 나타내는 특징 또는 성질을 갖는 특정한 유형의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트를 의미하는 것을 의도한다. 예시적인 구별 가능한 상태는 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형의 양 또는 농도보다 실질적으로 작은 양 또는 농도로 존재하는 것, 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형의 양 또는 농도보다 실질적으로 큰 양 또는 농도로 존재하는 것, 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형에 존재하지 않는 화학적 모이어티 또는 변형을 갖는 것, 또는 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형에 존재하는 화학적 모이어티 또는 변형을 갖지 않는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 구별 가능한 상태는 뉴클레오타이드 유형이 중합효소와 상호작용하는 경우 나타날 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 "각각"은, 항목의 수집에 관하여 사용되는 경우, 수집에서 개별적인 항목을 확인하지만 수집 중에 모든 항목을 지칭할 필요가 없는 것을 의도한다. 달리 분명한 기재 또는 내용이 명백하게 기재되는 경우 예외가 발생할 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "라벨"은, 반응 성분에 관하여 사용되는 경우, 반응 성분의 검출 가능한 반응 성분 또는 검출 가능한 모이어티를 의미하는 것을 의도한다. 유용한 라벨은 전하 센서에 의해 검출될 수 있는 전하 라벨이다. 라벨은 검출될 반응 성분에 대하여 내재적일 수 있거나(예를 들면, 중합효소의 하전된 아미노산), 라벨은 반응 성분에 대하여 외재적일 수 있다(예를 들면, 아미노산의 비-천연 발생 변형).

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "비-천연"은, 분자의 모이어티에 관하여, 이의 천연 환경 또는 인간, 기술적 기술적 개입에 의해 흐트러지지 않은 생물학적 시스템에서 분자에 부착된 확인되지 않은 모이어티를 지칭하는 것을 의도한다. 전형적으로, 비-천연 모이어티는 분자가 변형되지 않은 분자 또는 천연 변형을 갖는 분자와 구조적으로 또는 화학적으로 구별되도록 만드는 분자의 합성 변형이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "비-천연"은, 처리에 사용되는 유사체에 관하여 사용되는 경우, 처리가 발생하는 천연 환경에서 확인되지 않는 유사체를 의미하는 것을 의도한다. 전형적으로, 비-천연 유사체는 유사체가 속하는 분류에서 다른 유형의 분자와 구조적으로 또는 화학적으로 구별되는 합성 유사체이다. 분자가 분자의 천연 유사체에서 확인되는 모이어티의 부재로 인하여 비-천연일 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "핵산"은 당해 분야에서 이의 사용과 일치하고 천연 발생 핵산 또는 이의 기능적 유사체를 포함하는 것을 의도한다. 특히 유용한 기능적 유사체는 서열-특이적 방식으로 핵산에 혼성화될 수 있거나, 특정한 뉴클레오타이드 서열의 복제에 대한 주형으로서 사용될 수 있다. 천연 발생 핵산은 일반적으로 포스포다이에스터 결합을 함유하는 골격을 갖는다. 유사체 구조는 펩티드 핵산(PNA) 또는 잠긴 핵산(LNA)과 같이 당해 분야에 알려진 임의의 다양한 것들을 포함하는 대안적인 골격 연결을 가질 수 있다. 천연 발생 핵산은 일반적으로 데옥시리보스 당(예를 들면, 데옥시리보핵산(DNA)에서 확인됨) 또는 리보스 당(예를 들면, 리보핵산(RNA)에서 확인됨)을 갖는다.

[0030] 핵산은 당해 분야에 알려진 임의의 다양한 유사체 당 모이어티를 함유할 수 있다. 핵산은 네이티브 또는 비-네이티브 염기를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 네이티브 데옥시리보핵산은 아데닌, 티민, 시토신 또는 구아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기를 가질 수 있고, 리보핵산은 우라실, 아데닌, 시토신 또는 구아닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기를 가질 수 있다. 핵산에 포함될 수 있는 유용한 비-네이티브 염기는 당해 분야에 알려져 있다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "뉴클레오타이드"는 천연 뉴클레오타이드, 이의 유사체, 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 디데옥시리보뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드로 알려진 기타 분자를 포함하는 것을

의도한다. 용어는 예를 들면, DNA 또는 RNA 가닥에 존재하는 아단위를 확인하는, 폴리머에 존재하는 모노머 단위를 지칭하는데 사용될 수 있다. 용어는 또한 폴리머에 존재할 필요는 없는 분자, 예를 들면, 중합효소에 의한 주형 의존 방식으로 폴리뉴클레오타이드로 혼입될 수 있는 분자를 지칭하는데 사용될 수 있다. 용어는, 예를 들면, 5' 탄소 위의 0, 1, 2, 3개 또는 그 이상의 포스페이트를 갖는 뉴클레오타이드를 지칭할 수 있다. 예를 들면, 테트라포스페이트 뉴클레오타이드 및 펜타포스페이트 뉴클레오타이드가 특히 유용할 수 있다. 예시적인 천연 뉴클레오타이드는, 제한 없이, ATP, UTP, CTP, GTP, ADP, UDP, CDP, GDP, AMP, UMP, CMP, GMP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dADP, dTDP, dCDP, dGDP, dAMP, dTMP, dCMP 및 dGMP를 포함한다.

[0032] 비-천연 뉴클레오타이드는 천연 생물학적 시스템에 존재하지 않거나, 이의 천연 환경에서, 예를 들면, 중합효소를 발현하는 비-제조형 세포에서 중합효소에 의해 폴리뉴클레오타이드로 실질적으로 혼입되지 않는 것을 포함한다. 특히 유용한 비-천연 뉴클레오타이드는 또 다른 뉴클레오타이드, 예를 들면, 동일한 왓슨-크릭 상보적 염기를 갖는 염기쌍을 갖는 천연 뉴클레오타이드가 중합효소에 의해 가닥으로 혼입되는 속도보다 실질적으로 빠르거나 느린 속도로 중합효소에 의해 폴리뉴클레오타이드 가닥으로 혼입되는 것들을 포함한다. 예를 들면, 비-천연 뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드의 혼입 속도와 비교하여 적어도 2배 상이한, 5배 상이한, 10배 상이한, 25배 상이한, 50배 상이한, 100배 상이한, 1000배 상이한, 10000배 또는 그 이상 상이한 속도로 혼입될 수 있다. 비-천연 뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드로 혼입된 후, 추가로 확장될 수 있다. 예는 혼입된 뉴클레오타이드 유사체를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 추가의 확장을 허용하는 3' 하이드록실기를 갖는 뉴클레오타이드 유사체 또는 제거될 수 있는 3' 위치에서 가역적 종결자 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 사용될 수 있는 가역적 종결자 모이어티의 예는, 예를 들면, 미국 특허 제7,427,673호; 제7,414,116호; 및 제7,057,026호 및 PCT 공개 제WO 91/06678호 및 제WO 07/123744호에 기재되고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. 몇몇 실시형태에 있어서 3' 종결자 모이어티를 갖거나 3' 하이드록실이 없는 뉴클레오타이드 유사체 (예를 들면, 디데옥시뉴클레오타이드 유사체)는 뉴클레오타이드 유사체를 혼입한 폴리뉴클레오타이드가 추가로 확장되지 않는 조건하에 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 몇몇 실시형태에 있어서, 뉴클레오타이드(들)는 가역적 종결자 모이어티를 포함하지 않을 것이거나, 뉴클레오타이드(들)는 비-가역적 종결자 모이어티를 포함하지 않을 것이거나, 뉴클레오타이드(들)는 임의의 종결자 모이어티를 전혀 포함하지 않을 것이다. 5' 위치에서 변형이 있는 뉴클레오타이드 유사체가 또한 유용하다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 "고체 지지체"는 수성 액체에 불용성인 단단한 기판을 지칭한다. 기판은 비-다공성 또는 다공성일 수 있다. 기판은 임의로 액체를 흡수할 수 있지만(예를 들면, 다공성으로 인한), 전형적으로 기판이 액체에 흡입되는 경우 실질적으로 팽창하지 않고, 액체가 건조에 의해 제거되는 경우 실질적으로 접촉하지 않는 충분히 단단할 것이다. 비다공성 고체 지지체는 일반적으로 액체 또는 기체에 불투과성이다. 예시적인 고체 지지체는 유리 및 개질되거나 기능화된 유리, 플라스틱(아크릴, 폴리스티렌 및 스티렌과 다른 물질의 코폴리머, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리부틸렌, 폴리우레탄, 테플론(Teflon)TM, 환형 올레핀, 폴리이미드 등을 포함함), 나일론, 세라믹, 수지, 제오너(Zeonor), 실리카 또는 실리콘 및 변형된 실리콘을 포함하는 실리카계 물질, 탄소, 금속, 무기 유리, 광학 섬유 번들, 및 폴리머를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 몇몇 실시형태에 있어서 특히 유용한 고체 지지체는 흐름 셀 장치 내에 위치한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유형"(또는 "종")은 동일한 화학 구조를 공유하는 분자를 확인하는데 사용된다. 예를 들면, 뉴클레오타이드의 혼합물은 몇몇 dCTP 분자를 포함할 수 있다. dCTP 분자는 서로 동일한 유형 또는 종인 것으로 이해될 것이다. 유사하게, 동일한 뉴클레오타이드 서열을 갖는 개별적인 DNA 분자는 동일한 유형 또는 종이다.

[0035] 하기 기재되고 청구항에 나열된 실시형태는 상기 정의의 관점에서 이해될 수 있다.

[0036] 본 명세서에 기재된 방법 및 장치는 긴 핵산 서열결정 판독; 빠른 판독; 서열결정에 대한 고 처리량 능력; 및 서열결정에 대한 확장 가능한 플랫폼을 제공할 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서, 단일 판독 정확성에서 임의의 절충은 동시에 수행되는 판독의 수에서 처리량을 제공하는 본 명세서에 기재된 방법 및 장치의 능력으로 인하여 다중 겹침 판독을 수행함으로써 경감할 수 있다.

[0037] 본 개시내용은 핵산 서열결정 방법을 제공한다. 방법은 (a) 고체 지지체 전하 센서에 부착된 중합효소를 제공하는 단계; (b) 중합효소를 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 혼합물이 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형을 포함하고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한

상태가 아니고, 중합효소가 혼합물로부터 주형 핵산 가닥에 대항하는 초기 가닥으로 뉴클레오타이드를 혼입시키는, 상기 접촉시키는 단계; (c) 전하 센서를 통해 뉴클레오타이드의 혼입을 검출함으로써, 제1 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 제조된 신호와 비교하여 고유의 신호를 생성하는, 상기 제1 신호 패턴을 획득하는 단계; (d) 중합효소, 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제2 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 형태가 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 형태가 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아닌, 상기 제2 신호 패턴을 획득하는 단계; 및 (e) 제1 및 제2 신호 패턴을 비교하여 주형 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0038] 예시적인 센서가 도 1에 도시된다. 여기서 중합효소는 뉴클레오타이드가 프라이밍된 DNA 주형으로 혼입될 수 있는 반응 부위를 생성한다. 중합효소는 전하 센서(예를 들면, 단일벽 탄소 나노튜브(SWNT))에 부착된다. 장치는 단일 분자 감응성을 제공한다. 반응 부위에서 전하 분포의 변화(예를 들면, 중합효소 형태 변화, 뉴클레오타이드 혼입, 하전된 태그의 도착 또는 출발 등)는 게이트로 수송되고 검출될 수 있다.
- [0039] 도 1에 도시된 구성에 대한 대안은 중합효소를 테더를 통해 전하 센서에 부착하는 것이다. 예시적인 실시형태는 도 2에 도시된다. 간략하게, 중합효소(1)는 테더(3)에 의해 실리콘 나노와이어 전계-효과 트랜지스터(FET)(2)의 게이트(5)에 고정화된다. 임의로, 테더(3)는 중합효소에 근접한 테더의 말단에서 양전하(6) 및 중합효소에 원위이고 게이트(5)에 부착된 테더의 말단에 음전하(7)에 의해 지시되는 바와 같이 전도성 폴리머 가닥일 수 있다. 서열결정되는 ssDNA(4)는 뉴클레오타이드 및 다른 반응물에 따라 용액 중에 도입된 후, 중합효소(1)에 결합된다. 상보적 가닥이 합성됨에 따라, 중합효소(1)의 형태적 변화의 결과로서 또는 뉴클레오타이드의 존재로 인하여 FET(2)의 부근에 전하 분포에서의 방해가 발생한다. 전하 분포에서 이들 변형은 나노와이어-FET(2)에 의해 감지되고, FET 트랜스컨덕턴스 전류에서 변조로서 검출된다.
- [0040] 상기 예시가 SWNT 및 FET 전하 센서를 기재함에도 불구하고, 임의의 다수의 전하 센서가 사용될 수 있다. 유용한 전하 센서는 검출 가능한 신호에 대한 반응 사건의 신속하고 편리한 전환을 허용하는 방식으로 트랜스덕션 요소와 직접적인 공간 접촉을 하는 반응 성분을 혼입할 수 있는 분석 장치이다. 전계-효과 트랜지스터(FET)를 기반으로 한 장치는 반응 성분(예를 들면, 중합효소)과 트랜지스터 표면의 상호작용을 판독 가능한 전기 신호로 직접적으로 번역할 수 있다. 표준 FET에서, 전류는 2개의 전극(소스 및 드레인)에 연결된 전도 경로(채널)을 따라 흐른다. 소스와 드레인 사이의 채널 전도도는 얇은 유전층을 통해 정전적으로 커플링될 수 있는 제3(게이트) 전극에 의해 스위치가 켜지고 꺼진다.
- [0041] 특정한 실시형태에 있어서, FET는 단일 분자 검출을 달성하도록 구성된다. 더욱 특히, 이들 전하 센서는 단일 분자 반응의 동역학을 모니터링하도록 구성될 수 있다. 전계 효과 트랜지스터에서 일반적으로 발견되는 임의의 유형의 전도 채널은 본 명세서에 기재된 장치 또는 방법에서 사용될 수 있다. 예시적인 전도 채널은 금속, 산화 금속, 반도체, 또는 나노미터-규모의 전도체, 예를 들면, 나노와이어, 또는 그래핀으로부터 형성된다.
- [0042] 단일 분자 검출에 특히 유용한 전하 센서는 단일벽 탄소 나노튜브(SWNT)이다. 예를 들면, 문헌[Star et al., *Nano. Lett.* 3, 459(2003)]; 문헌[Star et al., *Org. Lett.* 6, 2089(2004)]; 문헌[Besterman et al., *Nano. Lett.* 3, 727(2003)]; 문헌[Gruner, *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 322(2005)]; 문헌[Chen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4984(2003)] 및 미국 특허 출원 공개 제2013/0078622 A1호를 참고하고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. SWNT는 전형적으로 직경이 약 1 나노미터 단위인 극도로 작은 전도체이다.
- [0043] SWNT는 화학선택적 폴리머, 금속 또는 산화금속 나노입자, 또는 단백질, 핵산 또는 항체와 같은 반응 성분으로 코팅될 수 있다. 예를 들면, 문헌[Besterman et al., *Nano. Lett.* 3, 727(2003)]; 및 문헌[Chen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4984(2003)]을 참고한다. 단일 중합효소는 본 명세서에 기재된 방법을 사용하여 이들 SWNT 및 다른 전하 센서에 부착될 수 있다.
- [0044] 몇몇 실시형태에 있어서 단일 중합효소는, 예를 들면, 본 명세서에 참고로서 포함된 문헌[Goldsmith et al. *Science* 315, 77(2007)]에 기재된 기술을 사용하여, 전하 센서 위의 단일 공유 결합을 생성함으로써 전하 센서에 부착될 수 있다. 예를 들면, SWNT는 다양한 부착 화학이 SWNT의 나머지를 추가의 중합효소로 코팅하지 않고, 선택적으로 반응 결합 부위에 단일 중합효소를 연결하는데 사용될 수 있는 단일 결합을 갖도록 제조될 수 있다. SWNT는 또한 비공유 수단에 의해, 예를 들면, 본 명세서에 참고로서 포함된 문헌[Chen et al., *J. Am. Chem. Soc.* 123, 3838(2001)]에 기재된 기술을 사용하여, 중합효소에 부착될 수 있다. 이들 방법은 본 명세서에 기재

된 바와 같이 변형되어 비공유적으로 단일 중합효소를 SWNT에 신뢰할 수 있게 결합시킬 수 있다.

- [0045] SWNT는 1 전자 볼트부터 유효 0까지 다양할 수 있는 전자 밴드갭을 가진 반도체이다. SWNT는 단일 분자 감지 장치에 게이트 전극을 갖거나 갖지 않는 다양한 유형의 SWNT로부터 유리, 플라스틱, 또는 실리콘 기판 위에 제작될 수 있기 때문에 전도 채널로서 유용하다. 단일 분자 검출을 위하여 유용한 SWNT 및 이의 구성은 본 명세서에 참고로서 포함된 미국 특허 출원 공개 제2013/0078622 A1호에 기재되어 있다.
- [0046] 본 명세서에 기재된 장치 또는 방법에서 사용을 위하여 변형될 수 있는 다른 전하 센서는, 제한 없이, 실리콘 나노와이어(SiNW) FET, III-V 물질로 만들어진 FET, 실리콘 FinFET, 그래핀 나노리본 FET 뿐만 아니라 MoS₂ 및 실리콘과 같은 다른 2D 물질로부터의 나노리본 FET, 터널 FET(TFET), 및 가파른 역치 경사 장치를 포함한다(예를 들면, 문헌[Swaminathan et al., *Proceedings of the 51st Annual Design Automation Conference on Design Automation Conference*, pg 1-6, ISBN: 978-1-4503-2730-5(2014)] 및 문헌[Ionescu et al., *Nature* 479, 329-337(2011)]을 참고).
- [0047] 특정한 실시형태에 있어서, 본 개시내용의 장치 또는 방법은 단일-분자 전하 센서로서 깊이 규모 조절된 FinFET 트랜지스터를 사용한다. FinFet 센서는 엣지 반도체 제작을 야기함으로써 이미 개발 중인 기술로부터 이득을 얻는다. 추가로, 이전에 공개된 성분을 사용할 수 있고, 이는 (1) 문헌[Choi et al, *Science*, 335, 319(2012)]에 기재된 바와 같은 실시간으로 효소 처리를 관찰하는 CNT 위의 리소자임의 고정화에 사용되는 것들, (2) 문헌[Olson et al, *J. Amer. Chem. Soc.*, 135, 7885(2013)]에 기재된 바와 같은 CNT 위에 Pol 1 클레노브 절편을 고정화시키고 실시간으로 DNA를 관찰하는데 사용되는 것들, (3) 문헌[Chi et al, *NanoLett* 13, 625(2013)]에 기재된 바와 같은 단백질 알로스테릭 운동으로 인하여 움직이는 하전된 잔기로서 트랜스덕션 메커니즘을 설명하는데 사용되는 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 방법은 또한 미국 특허 출원 공개 제2013/0078622 A1호에 기재된 장치 및 방법을 사용할 수 있다. 상기 참고의 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0048] 이론에 의해 제한되는 것을 의도하지 않지만, 전하 센서의 주변에 있는 중합효소 위의 하전된 잔기의 움직임은 전하 센서에 의해 감지되는 외부 전계를 생성할 것으로 생각된다. 예를 들면, SWNT FET에의 중합효소의 부착점의 주변의 경우 전계 효과를 유발하는 것으로 생각되는 DNA 중합효소 I의 클레노브 절편에 대한 하전된 잔기도 3에 도시된다.
- [0049] 도 4A는 중합효소 활성화에 대한 촉매 사이클의 다이어그램을 도시한다. 중합효소가 이의 촉매 사이클을 통과함에 따라, 형태의 변화(예를 들면, 도 3에 도시된 잔기 또는 다른 잔기에서)는 각각의 뉴클레오타이드가 혼입됨에 따라 시간-의존 일시적 신호를 야기할 수 있다. 프라이밍된 주형 핵산로의 뉴클레오타이드 혼입 동안 SWNT FET에 부착된 중합효소에 의해 검출된 예시적인 신호 패턴이 도 4B에 도시된다.
- [0050] 몇몇 실시형태에 있어서, 형태 변화의 전자 모니터링으로부터의 신호는, 예를 들면, 전하 센서에 의해 검출되는 전류 조절의 기간 및 강도가 각각의 중합효소 사이클에서 첨가되는 뉴클레오타이드의 유형을 기반으로 상이할 수 없는 경우에, 염기 구별이 가능할 수 없다. 이러한 실시형태에 있어서, 주형 가닥에 대항하여 중합효소에 의해 첨가된 염기의 수가 검출될 수 있다. 또한 한번에 하나의 단일 뉴클레오타이드 유형을 흐르게 하고 뉴클레오타이드 첨가의 검출과 중합효소와 접촉하는 것으로 알려진 뉴클레오타이드의 유형을 연관짓는 것이 가능하다. 그러나, 다른 실시형태에 있어서 몇몇 상이한 뉴클레오타이드 유형의 존재하에 전하 센서에 의해 검출되는 중합효소에 대한 염기 구별을 달성하는 것이 바람직하다. 단일 뉴클레오타이드 유형과 반대로, 상이한 뉴클레오타이드 유형의 혼합물을 사용하는 것의 이점은 더욱 신속하고 비용 효율적인 서열 분석(예를 들면, 유체 단계의 감소된 수로 인하여) 및 서열결정의 증가된 정확성(예를 들면, 중합효소가 뉴클레오타이드 유형의 더욱 완전한 레퍼토리에 접근한 경우 감소된 오류 발생으로 인하여)이다.
- [0051] 대안적인 실시형태는 특징적 신호 파라미터의 검출을 기반으로 한 뉴클레오타이드의 상이한 유형을 구별하도록 구성될 수 있다. 하나의 이러한 신호 파라미터는 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 특정한 유형이 초기 핵산으로 혼입되는 경우 검출되는 신호 변화의 극성이다. 예를 들면, 제1 뉴클레오타이드 유형은 중합효소에 의해 초기 핵산 가닥으로 혼입되는 경우의 신호 극성의 양성적 변화를 생성할 수 있고, 이는 중합효소가 뉴클레오타이드의 제2 유형을 초기 핵산 가닥으로 혼입시키는 경우, 제조되는 신호 극성의 음성적 변화와 구별될 수 있다.
- [0052] 뉴클레오타이드 트라이포스페이트는 이들이 전하 센서-부착된 중합효소에 의해 초기 핵산 가닥으로 혼입되는 경우에 관찰되는 신호 변화의 극성에 영향을 미치는 비-천연 모이어티를 포함할 수 있다. 특정한 실시형태에 있어서, 비-천연 모이어티는 모이어티가 결핍된 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트와 중합효소의 상호작용으로부터 구별 가능한 중합효소와의 상호작용을 생성할 수 있다. 예를 들면, 네이티브 뉴클레오타이드 데옥시아데노

신 트라이포스페이트(ATP), 데옥시티미딘 트라이포스페이트(dTTP), 데옥시시토신 트라이포스페이트(dCTP) 및 데옥시구아노신 트라이포스페이트(dGTP)는, 몇몇 공지된 뉴클레오타이드 유사체가 그러하듯, 전하 센서-부착된 중합효소와 상호작용하는 경우 동일한 극성의 신호를 생성한다. 서열결정 동안 주형 가닥에서 이의 동족 뉴클레오타이드와의 염기쌍에 유사체의 능력에 역작용을 갖지 않으면서 하나 이상의 네이티브 뉴클레오타이드 트라이포스페이트가 구별 가능한 방식으로 신호 극성을 변경하는 비-천연 모이어티를 갖는 유사체로 대체되는 혼합물이 사용될 수 있다. 동족 뉴클레오타이드 유형은 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 유사체가 혼입되는 경우에 검출되는 고유한 신호 극성을 기반으로 주형에서 다른 뉴클레오타이드 유형과 구별될 수 있다.

[0053] 반대 극성의 신호를 생성하는 2개의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 유형의 예는 도 5에 도시된다. 특히, 알파-티오-dATP는 폴리타민 주형을 사용하여 전하 센서-부착된 중합효소에 의해 초기 가닥으로 혼입될 수 있고, 결과는 신호 극성에서 음성적 변화이다. 대조적으로, 폴리아데노신 주형에 대항하는 동일한 센서-부착된 중합효소에 의해 혼입되는 2-티오-dTTP는 신호 극성에서 양성적 변화를 생성할 것이다. 예를 들면, 알파-티오-dATP 및 2-티오-dTTP는 본 명세서에 기재된 바와 같은 전하 센서-부착된 중합효소를 사용하여 주형에서 T 및 A 위치를 구별하는데 사용될 수 있다. 신호 변화의 극성에서의 차이를 기반으로 구별할 수 있는 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 유사체는 본 명세서에 기재된 방법에서 사용될 수 있다.

[0054] 센서-부착된 중합효소에 의해 초기 핵산 가닥으로 혼입되는 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 유형을 기반으로 상이할 수 있는 또 다른 신호 파라미터는 혼입 사건 동안 속도 또는 시간 기간이다. 혼입의 속도 또는 시간 기간은 반응에 사용되는 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 반응 조건 또는 화학적 구조에 의해 영향을 받을 수 있다. 조작될 수 있는 반응 조건의 예는 사용된 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상대적인 농도이다. 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 특정한 유형은 (다른 뉴클레오타이드 유형과 비교하여) 그 뉴클레오타이드 유형의 혼입의 감소된 속도 또는 이의 혼입에서 더 긴 지연을 야기할 것인 상대적으로 낮은 양 또는 농도로 존재할 수 있다. 이러한 차이는 전형적으로 평균 속도 또는 평균 지연에서의 차이로서 관찰될 것이지만, 다른 척도, 예를 들면, 역가, 최소값 또는 최대값이 또한 관찰될 수 있다.

[0055] 뉴클레오타이드 트라이포스페이트는 혼입에 대한 혼입 속도 또는 시간 기간에 영향을 미치는 비-천연 모이어티를 포함할 수 있다. 도 6A는 중합효소가 5' 변형이 없는 동일한 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 상대적인 폐쇄된 상태로 소비되는 시간 기간을 증가시키는 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 5' 위치에서 혼입될 수 있는 γ -ANS 뉴클레오타이드 변형의 화학적 구조를 도시한다. 도 6B에 도시된 바와 같이, 천연 dATP 및 γ -ANS 변형된 dTTP의 혼합물의 존재하에 중합효소에 대하여 검출된 광학 신호는 γ -ANS dTTP에 의한 폐쇄된 상태의 기간이 천연 뉴클레오타이드에 의한 것에서 관찰된 것보다 10배 이상 길다는 것을 보여준다. 미국 특허 출원 공개 제2011/0312529 A1를 참고한다(본 명세서에 참고로서 포함됨).

[0056] 뉴클레오타이드의 시간-기반 또는 속도론적 구별을 사용하는 방법은 실시간 검출과 커플링된 전하 센서에서 시약의 매우 빠른 혼합의 사용에 의해 촉진될 수 있다. 혼합은 이용 가능한 흐름-정지 장치에 따라 서브-밀리초 시간규모로 발생할 수 있다. 시약의 빠른 혼합은 빠른 유체역학, 능동 또는 수동 혼합, 및 확산에 의한 제한을 극복하는 반응의 적절한 제한(예를 들면, 혼합 블라우징)을 사용하여 달성될 수 있다. 흐름-정지 전달이 특히 유용하다. 흐름 정지 전달은 유체의 신속한 흐름 후, 흐름의 갑작스런 중단을 사용하여 검출 부위에서 유체의 전달을 제공한다. 전달되는 유체는 전형적으로 검출 부위로부터 유체의 동일한 용적을 대체한다. 유체는 고체-상 분석물, 예를 들면, 전하 센서에 부착된 중합효소와 혼합될 수 있다. 흐름-정지 유체 전달에 대한 부동 시간은, 예를 들면, 2밀리초(msec) 미만일 수 있다. 따라서, 부동 시간은 2 msec, 1.5 msec, 1 msec, 0.8 msec, 0.6 msec, 0.5 msec 또는 0.4 msec 이하일 수 있다. 유용한 흐름 정지 및 신속한 혼합 유체 시스템에 대하여, 예를 들면, 문헌[Chance, B. J. *Frank. Inst.*, 229, 613(1940)], 및 미국 특허 출원 공개 제US 2013/0165328 A1호를 참고하고, 이들 각각은 참고로서 본 명세서에 포함된다.

[0057] 전하-센서 부착된 중합효소를 위한 시간-기반 또는 속도론적 측정의 서열은 상보적 가닥을 합성하는 중합효소에 의해 사용되는 주형 핵산의 서열을 결정하는데 사용될 수 있다. 주형 가닥의 서열은 확장되는 가닥으로 혼입된 뉴클레오타이드의 서열로부터 추론될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 이와 같이, 하나의 가닥의 서열은 이의 상보적 가닥의 서열의 결정을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0058] 임의의 다양한 뉴클레오타이드 종은 본 명세서에 기재된 방법 또는 조성물에서 유용할 수 있다. 예를 들면, 천연 발생 뉴클레오타이드, 예를 들면, ATP, UTP, CTP, GTP, ADP, UDP, CDP, GDP, AMP, UMP, CMP, GMP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dADP, dTDP, dCDP, dGDP, dAMP, dTMP, dCMP, 및 dGMP가 사용될 수 있다. 전형적으로, dNTP 뉴클레오타이드는 DNA 중합효소에 의해 DNA 가닥으로 혼입되고, NTP 뉴클레오타이드는 RNA 중합효소에 의해 RNA

가닥으로 혼입된다. 특정한 실시형태에 있어서, NTP 뉴클레오타이드 또는 이의 유사체는, 예를 들면, NTP, 또는 이의 유사체가 DNA 중합효소에 의해 DNA로 혼입될 수 있는 경우 및 NTP, 또는 이의 유사체를 사용하는 DNA 중합효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간이 또 다른 뉴클레오타이드를 사용하는 DNA 중합효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간과 구별될 수 있는 경우에, DNA 중합효소에 의해 DNA로 혼입될 수 있다. 대안적으로, dNTP 뉴클레오타이드 또는 이의 유사체는, 예를 들면, dNTP, 또는 이의 유사체가 RNA 중합효소에 의해 RNA로 혼입될 수 있는 경우 및 dNTP, 또는 이의 유사체를 사용하는 RNA 중합효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간이 또 다른 뉴클레오타이드를 사용하는 RNA 중합효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간과 구별될 수 있는 경우, RNA 중합효소에 의해 RNA로 혼입될 수 있다. 추가로, dNTP 뉴클레오타이드 또는 이의 유사체는, 예를 들면, dNTP, 또는 이의 유사체가 역전사효소에 의해 RNA 주형으로부터 DNA로 혼입될 수 있는 경우 및 dNTP, 또는 이의 유사체를 사용하는 역전사효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간이 또 다른 뉴클레오타이드를 사용하는 역전사효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간과 구별될 수 있는 경우, 역전사효소에 의해 RNA 주형으로부터 DNA로 혼입될 수 있다. 속도 또는 시간 기간에서의 상대적인 차이는 속도에서의 상대적인 증가, 기간에서의 상대적인 증가, 속도에서의 상대적인 감소 또는 기간에서의 감소일 수 있다.

[0059] 비-천연 뉴클레오타이드 유사체가 또한 유용하다. 특히 유용한 비-천연 뉴클레오타이드 유사체는 또 다른 뉴클레오타이드에 의한 중합효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간과 구별될 수 있는 중합효소 전이에 대한 검출 가능하게 상이한 속도 또는 시간 기간을 생성하는 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들면, 비-천연 뉴클레오타이드 유사체는 유용하게 또 다른 뉴클레오타이드, 예를 들면, 천연 발생 뉴클레오타이드에 의해 동일한 중합효소 전이에 대한 속도 또는 시간 기간과 구별될 수 있는 중합효소 전이에 대한 검출 가능하게 상이한 속도 또는 시간 기간을 생성할 수 있다. 사용될 수 있는 예시적인 뉴클레오타이드 유사체는 dNTP αS; NTP αS; ICS, 3MN, 7AI, BEN, DM5, TM, 2Br, 3Br, 4Br, 2CN, 3CN, 4CN, 2FB, 3FB, MM1, MM2 및 MM3과 같이 문헌[Hwang et al., *Nucl. Acids Res.* 34:2037-2045(2006)](본 명세서에 참고로서 포함됨)에서 확인된 비천연 핵염기를 갖는 뉴클레오타이드; 또는 문헌[Patro et al. *Biochem.* 48:180-189(2009)](본 명세서에 참고로서 포함됨)에 기재된 것들과 같은 비-천연 핵염기를 갖는 뉴클레오타이드를 포함하지만 이에 한정되지 않고, 이는 2-아미노-1-데아자퓨린, 1-데아자퓨린, 2-피리딘, 하이폭산틴, 퓨린, 6-Cl-퓨린, 2-아미노-dA, 2-아미노 퓨린 또는 6-Cl-2-아미노-퓨린, 또는 비-천연 핵염기를 갖는 뉴클레오타이드, 예를 들면, iso-G, iso-C, 5SICS, MM02, Ds, Pa, FI, FB, dZ, DNB, 티민 등배체, 5-NI, dP, 아졸-카복사미드, xA, Im-No, Im-ON, J, A*, T*를 포함하는 문헌[Krueger et al. *Chem Biol.* 16:242-8(2009)](본 명세서에 참고로서 포함됨)에 기재된 것들을 포함한다.

[0060] 5' 변형을 갖는 비-천연 뉴클레오타이드 유사체가 특히 유용하다. 비-천연 뉴클레오타이드 유사체는 전형적으로 더 많거나 적은 포스페이트를 가질 수 있는 트라이포스페이트를 가질 것이다. 특정한 실시형태에 있어서, 비-천연 뉴클레오타이드의 알파 포스페이트, 베타 포스페이트 또는 감마 포스페이트 중 하나 이상은 산소 이외의 모이어티에 공유적으로 부착된다. 포스페이트 또는 5' 위치에 존재하는 다른 것에 부착되는 모이어티는 음전하, 양전하, 금속-킬레이팅 활성 또는 입체적 벌크를 제공할 수 있다. 예시적인 모이어티는 L-에난티오머 형태 또는 R-에난티오머 형태의 아미노산, 예를 들면, 히스티딘, 아스파르테이트, 글루타메이트, 트립토판, 페닐알라닌, 메티오닌, 티로신, 시스테인, 글리신 알라닌, 또는 프롤린; 아미노 기; 킬레이팅된 금속, 예를 들면, 마그네슘 또는 망간; 메틸 기; 할로젠, 예를 들면, 브롬, 염소 또는 요오드; 티올 기; 전자 끄는 기; 전자 주는 기; 방향족 아민; 또는 지방족 아민을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 이들 및 다른 모이어티는 효소가 모이어티가 없는 뉴클레오타이드와 갖는 상호작용과 상이한 이들이 중합효소, 또는 다른 핵산 효소와의 상호작용을 제공하는 실시형태에서 유리할 수 있다. 이와 같이, 해당 뉴클레오타이드 종 위의 모이어티의 존재 및 부재는, 예를 들면, 뉴클레오타이드 종에 작용하는 핵산 효고에서의 형태적 신호 변화에 대한 속도, 시간 기간 및/또는 강도를 기반으로, 서열결정 방법에서 뉴클레오타이드 종을 구별하는데 이용될 수 있다.

[0061] 반응 조성물 또는 방법은 하나 이상의 뉴클레오타이드 종을 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열 분석을 위한 반응 조성물 또는 방법은 핵산 주형이 합성되는 4개의 해당 뉴클레오타이드 종과 왓슨-크릭 염기쌍을 형성할 수 있는 4개의 상이한 뉴클레오타이드 종을 포함할 수 있다. 특정한 실시형태는 적어도 2개의 상이한 뉴클레오타이드 종, 적어도 3개의 상이한 뉴클레오타이드 종, 적어도 4개의 상이한 뉴클레오타이드 종, 또는 그 이상을 포함할 수 있다. 적어도 2개의 뉴클레오타이드 종은 비-천연 뉴클레오타이드 유사체일 수 있거나, 적어도 3개의 뉴클레오타이드 종은 비-천연 뉴클레오타이드 유사체일 수 있거나, 적어도 4개의 뉴클레오타이드 종은 비-천연 뉴클레오타이드 유사체일 수 있다. 따라서 반응 조성물 또는 방법은 천연 뉴클레오타이드 및 비-천연 뉴클레오타이드 유사체의 혼합물을 포함할 수 있다. 대안적으로, 반응 조성물은 천연 뉴클레오타이드를 갖지 않고 대신 오직 비-천연 뉴클레오타이드 유사체만을 가질 수 있다. 반응은 비-천연 뉴클레오타이드 유사체만이 중합효소에 의해

성장하는 핵산으로 혼입되는 조건하에 수행될 수 있다.

[0062] 몇몇 실시형태에 있어서, 반응 조성물 또는 방법은 핵산 주형에서 하나 이하의 뉴클레오타이드 종과 염기쌍인 뉴클레오타이드 종을 포함할 수 있다. 예를 들면, 핵산 서열결정 방법은 상이한 뉴클레오타이드 종이 별개의 순차적인 반응으로 중합효소 및 핵산과 접촉되는 조건하에 수행될 수 있다. 특히, A와의 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드 종은 제1 반응에 첨가될 수 있고, C와의 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드 종은 제2 반응에 첨가될 수 있고, T와의 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드 종은 제3 반응에 첨가될 수 있고, G와의 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드 종은 제4 반응에 첨가될 수 있다. 반응들은 별개라는 것을 단지 설명하기 위해서 제1, 제2, 제3 및 제4로서 기재되지만, 종이 본 명세서에 기재된 방법에 첨가될 수 있는 순서를 반드시 제한하는 것은 아니다. 그보다, A, C, T 또는 G와 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드 종은 방법의 특정한 실시형태에 바람직하거나 적절한 임의의 순서로 첨가될 수 있다. 전형적으로 서열결정 방법에서 제공된 주형 핵산 4개의 상이한 뉴클레오타이드 종과 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드 종은 순차적으로 첨가되어 서열결정 방법의 사이클을 완료한다. 그러나, 4개보다 적은 뉴클레오타이드 첨가가 몇몇 실시형태에 있어서 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 추가로, 1 이상이지만 2, 3 또는 4 이하인 뉴클레오타이드 종과 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 유사하게, 2 이상이지만 3 또는 4 이하의 뉴클레오타이드 종과 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있거나, 3 이상이지만 4 이하의 뉴클레오타이드 종과 염기쌍을 이루는 뉴클레오타이드의 혼합물이 사용될 수 있다.

[0063] 본 개시내용은 (a) 고체 지지체 전하 센서에 부착된 중합효소를 제공하는 단계; (b) 중합효소를 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 혼합물이 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 유형을 포함하고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 유형이 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아니고, 중합효소가 혼합물로부터 주형 핵산 가닥에 대항하는 초기 가닥으로 뉴클레오타이드를 혼입시키는, 상기 접촉시키는 단계; (c) 전하 센서를 통해 뉴클레오타이드의 혼입을 검출함으로써, 제1 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 유형이 혼합물 중의 다른 뉴클레오타이드 트라이포스페이트에 의해 제조된 신호와 비교하여 고유의 신호를 생성하는, 상기 제1 신호 패턴을 획득하는 단계; (d) 중합효소, 주형 핵산, 및 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 혼합물을 사용하여 단계 (b) 및 (c)를 반복함으로써, 제2 신호 패턴을 획득하는 단계로서, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제2 형태가 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태이고, 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 제1 형태가 제2 혼합물 중의 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 다른 유형과 비교하여 구별 가능한 상태가 아닌, 상기 제2 신호 패턴을 획득하는 단계; 및 (e) 제1 및 제2 신호 패턴을 비교하여 주형 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함하는 핵산 서열결정 방법을 제공한다.

[0064] 몇몇 실시형태는 서열결정되는 핵산에서 염기의 다중 유형을 구별하는 상기 기재된 신호 파라미터의 조합을 이용할 수 있다. 하나 이상의 파라미터에서의 차이는 적어도 2, 3 또는 4개의 상이한 뉴클레오타이드 유형을 구별하는데 이용될 수 있다. 사용되는 파라미터(들)에 따라, 특정한 실시형태는 최대한 2 또는 3개의 상이한 뉴클레오타이드 유형을 구별할 수 있다.

[0065] 상이한 파라미터의 조합적 사용의 예는 도 7A에 도시된 매트릭스 및 도 7B에 도시된 진리표와 관련하여 이해될 것이다. 이러한 경우에 4개의 상이한 뉴클레오타이드 유형은 동일한 주형에 대해 수행되는 몇몇 서열결정 작동을 거쳐, 신호 극성 변화에서 2개의 상이한 상태 및 뉴클레오타이드 혼입 속도론에서 2개의 상이한 상태의 조합을 기반으로 구별된다. 조합적 방법은 서열결정 작동에서 구별된 상이한 라벨의 수를 초과하는 핵산에서의 상이한 상이한 뉴클레오타이드 유형의 수를 확인하는데 사용될 수 있다. 서열결정에 사용될 수 있는 상태 및 단계의 예시적인 조합은 미국 특허 출원 공개 제2013/0079232 A1호에 기재되고, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0066] 특정한 실시형태는 동일한 핵산을 여러번 재서열결정하지만 매번 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 혼합물을 사용하는 전략을 이용한다. 예를 들면, 전하 센서-부착된 중합효소는 3개의 천연 dNTP, 및 천연 dNTP와 비교하여 전류 주석에서 고유한 특징을 생성하는 하나의 비-천연 dNTP 유사체를 함유하는 dNTP 혼합물을 사용하는 핵산 분자를 서열결정하는데 사용될 수 있다. 도 8A의 매트릭스 및 도 8B의 진리표에 도시된 바와 같이, 제1 작동은 고유한 특징을 생성하는 dCTP의 비-천연 유사체와 함께 천연 dATP, dTTP 및 dGTP를 사용할 수 있고; 제2 작동은 고유한 특징 등을 생성하는 dATP의 비-천연 유사체와 함께 천연 dCTP, dTTP 및 dGTP를 사용할 수 있다. 4개의 상이한 작동으로부터의 전류 패턴을 정렬하는 것은 패턴 인식을 통해 주형 가닥에서 뉴클레오타이드 서열

의 결정을 가능하게 하고, 이는 개별적인 염기 콜을 할 필요를 제거한다.

- [0067] 도 8의 조합적 방법이 3 천연 뉴클레오타이드 및 단일 비-천연 유사체의 사용에 관하여 예시화됨에도 불구하고, 천연 및/또는 비-천연 뉴클레오타이드 트라이포스페이트의 상이한 조합이 유사한 결과를 달성하는데 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 예를 들면, 비-천연 뉴클레오타이드 트라이포스페이트는 사용될 필요가 없다. 그보다, 4개의 상이한 비-천연 유사체가 사용될 수 있다.
- [0068] 추가로, 각각이 4개의 고유하게 검출 가능한 뉴클레오타이드 트라이포스페이트 유사체 중 하나를 사용하는 동일한 핵산 스트레치를 통한 4개의 상이한 작동이 도 8에 관하여 예시화된 바와 같이 사용될 수 있지만, 4개보다 적은 작동을 사용하는 서열에서 4개의 상이한 뉴클레오타이드 유형의 위치를 결정하는 것이 또한 가능하다. 예를 들면, 도 9A의 매트릭스 및 도 9B의 진리표에 도시된 바와 같이 대안적인 전략은 핵산의 동일한 스트레치를 통한 오직 2개의 상이한 서열결정 작동을 사용한다. 이러한 예에서, 제1 작동은 2개의 유형의 신호를 생성하고, 제1 신호 유형은 G 및 C에 관하여 발생하는 것이고, 제2 신호 유형은 T 및 A에 관하여 발생하는 것이다. 그러나, 제1 작동으로부터의 패턴과 비교하여 신호의 패턴을 수득하는데 사용될 수 있는 제2 작동은 G를 C와 구별할 것이고 T를 A와 구별할 것이다. 특히, 제1 뉴클레오타이드 유형은 두 작동 모두에서 동일한 특정한 신호를 생성하고(예를 들면, 도 9에서 C), 제2 뉴클레오타이드 유형은 제1 작동에서 특정한 신호를 생성하지만 제2 작동에서는 생성하지 않고(예를 들면, 도 9에서 G), 제3 뉴클레오타이드 유형은 제2 작동에서 특정한 신호를 생성하지만 제1 작동에서는 생성하지 않고(예를 들면, 도 9에서 T), 제4 뉴클레오타이드 유형은 어느 작동에서도 특정한 신호를 생성하지 않는다. 따라서 두 작동의 비교는 모든 4개의 뉴클레오타이드 유형을 분명하게 확인할 것이다. 이러한 예에서, 특정한 신호 유형은, 예를 들면, 비-천연 모이어티로 인하여 생성될 수 있다. 이와 같이 모이어티는 제1 작동에서 dGTP 및 dCTP에 존재할 수 있지만, dATP 및 dTTP에서 부재할 수 있고; 모이어티는 제2 작동에서 dTTP 및 dCTP에 존재할 수 있지만, dGTP 및 dATP에서 부재할 수 있다. 특징적 신호 파라미터, 예를 들면, 본 명세서에 달리 예시화된 것들을 생성하는 다른 조건 또는 화학적 변형은 작동에 대하여 상이하게 적용되어 유사한 결과를 달성할 수 있다.
- [0069] 신호 패턴에서 고유한 특징이 전류 조절의 극성; 중합효소의 검출 가능한 상태의 기간(예를 들면, 중합효소의 개방 또는 폐쇄된 상태의 기간); 전류 조절의 진폭; 또는 변형된 뉴클레오타이드의 고유한 확인을 가능하게 하는 임의의 다른 신호 특징, 예를 들면, 노이즈, 전류 펄스의 상승/하강 시간, 또는 펄스의 리딩 및/또는 트레일링 엣지의 형상을 포함하는 임의의 다양한 신호 파라미터로부터 유래될 수 있다는 것이 이해될 것이다.
- [0070] 몇몇 실시형태에 있어서, 반복된 서열결정은 고-진행성 중합효소와 환형 주형을 사용하여 달성될 수 있다. 도 10을 참고한다. 이는 합치된 서열결정을 가능하게 하고, 여기서 무작위 오류는 증가된 서열결정 깊이에 의해 제거된다. 또 다른 방법은 패턴 정렬에 대한 위치 마커로서 제공되는 서열결정 프라이머를 사용하는 것이다. 다중 작동은 주형에서 상이한 위치에서 혼성화하는 고유한 프라이머와 함께 수행될 수 있다. 혼성화의 공지된 위치는 주형의 다중 판독을 비교하는 경우에 사용될 수 있다. 이러한 방법은 계층 규모 범위를 달성하는데 이용될 수 있다.
- [0071] 몇몇 실시형태가 SWNT FET에 관하여 본 명세서에서 예시화되었음에도 불구하고, 당해 분야의 숙련자에게 임의의 전계-효과 감응성 전자 장치는 하전된 잔기의 움직임의 검출에 원칙적으로 적합하다는 것이 명백할 것이다. 예를 들면, Si 나노와이어(Yi Cui et al, *Nanolett*, p. 149, 2003), 전도 폴리머 나노튜브(A.L. Briseno et al, *Mater. Today* p.28, 2008), Fin-FET 및 트라이-게이트 FET(X. Huang et al, *IEDM*, p. 67, 1999) 및 터널링 FET(D. Sarkar, *Appl. Phys. Lett.* P.143108, 2012)는 모두 당해 적용에 적합한 센서이다. 이들 참고는 본 명세서에 참고로 포함된다. 추가로, 염기 구별을 위해 제안된 방법은 전계-효과 센서 외에도 확장 가능하고 적용 가능하며, 자기 센서, 전기화학 센서, 터널링 센서, 및 나노-전기기계(NEMS) 센서에 동일하게 적용 가능하다는 것이 인식될 것이다.
- [0072] 본 개시내용은 몇몇 상이한 핵산 분자가 평행 서열인 복합 방법을 제공한다. 복수의 전하 센서는 전하 센서의 어레이 형태로 제공될 수 있다. 어레이는 적어도 10, 100, 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^4 , 1×10^4 또는 그 이상의 전하 센서를 포함할 수 있다. 각각의 개별적인 전하 센서는 어레이에서 다른 전하 센서로부터 분리된 어레이에서 별개의 위치에 위치할 수 있다. 예를 들면, 각각의 전하 센서는 고체 지지체의 웰 또는 오목부에 남아 있을 수 있다. 위치는, 심지어 서로 분리된 경우에도, 임의로 벌크 용액과 접촉한 유체 내일 수 있다. 이러한 구성에서, 복합 반응은 벌크 유체 전달을 통해 모든 전하 센서에 공통 시약을 전달함으로써 전하 센서의 어레이에 발생할 수 있다. 핵산 서열결정 반응을 예로 보면, 뉴클레오타이드는 벌크 용액을 통해 개별적인 서열결정 반응을 호스팅하는 웰(또는 다른 특징부)의 어레이, 각각의 웰(또는 다른 특징부)에 전달될 수 있다. 뉴클레오타이드

전달은 웰(또는 다른 특징부)에서 동시에 서열결정 반응을 야기할 것이다.

- [0073] 전하 센서, 예를 들면, 나노와이어는 너비가 10 nm 미만이고 길이가 100 nm 초과인 수치를 가질 수 있다. 나노와이어 또는 다른 전하 센서는 10 nm x 10 nm, 50 nm x 100 nm 또는 그 이상인 웰 내에 위치할 수 있다. 예를 들면, 전하 센서가 있는 웰은 적어도 100 nm², 1000 nm², 5000 nm², 1 x 10⁴ nm², 또는 그 이상인 표면에 개구를 가질 수 있다. 전하 감지 요소로부터의 신호를 판독하는 회로는 1 마이크로미터 x 1 마이크로미터 또는 그 이상인 고체 지지체의 면적을 차지할 수 있다.
- [0074] 어레이의 밀도는 cm²당 2 내지 백만 또는 그 이상의 상이한 반응 부위일 수 있다. 예를 들면, 적어도 약 100,000,000 반응 부위/cm², 1,000,000,000 반응 부위/cm², 약 2,000,000,000 반응 부위/cm² 이하 또는 그 이상을 포함하는, 적어도 약 10,000,000 반응 부위/cm²를 갖는 것들을 포함하는 초고밀도 어레이가 본 발명에 유용하다. 예를 들면, 약 100,000 반응 부위/cm² 내지 약 10,000,000 반응 부위/cm² 범위의 것들을 포함하는 고밀도 어레이가 또한 사용될 수 있다. 본 발명에 유용한 중간 밀도 어레이는 약 10,000 반응 부위/cm² 내지 약 100,000 반응 부위/cm² 범위일 수 있다. 저밀도 어레이는 일반적으로 약 10,000 반응 부위/cm² 미만이다.
- [0075] 예를 들면, 전하 센서의 어레이를 이용하는 것들을 포함하는 복합 실시형태는 단일 중합효소 분자가 각각의 전하 센서에 부착되도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 복합 실시형태에서 전하 센서는 단일 중합효소에 실질적으로 모두 부착될 수 있다. 추가로, 중합효소의 동일한 종은 각각의 전하 센서에 부착될 수 있다. 이러한 구성은 각각의 전하 센서로부터의 예상된 단일한 결과를 제공하지만, 각각의 해당 전하 센서에 접촉하는 다른 반응 성분에서 차이가 있다.
- [0076] 예를 들면, 생물학적 시스템로부터 단리된 단백질계 효소 및 이의 기능적 변이체를 포함하는 임의의 다양한 중합효소가 본 명세서에 기재된 방법 또는 조성물에서 사용될 수 있다. 하기 예시화된 것들과 같은 특정한 중합효소에 대한 지칭은 달리 지시되지 않는 한, 이의 기능적 변이체를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 중합효소의 특히 유용한 기능은 주형으로서 기존의 핵산을 사용하는 핵산 가닥의 중합을 촉매하는 것이다. 유용한 다른 기능은 본 명세서에 다른 곳에 기재된다. 유용한 중합효소의 예는 DNA 중합효소 및 RNA 중합효소를 포함한다. 예시적인 DNA 중합효소는 구조적 상동성에 의해 A, B, C, D, X, Y, 및 RT로서 확인된 패밀리로 분류된 것들이다. 패밀리 A의 DNA 중합효소는, 예를 들면, T7 DNA 중합효소, 진핵 미토콘드리아 DNA 중합효소 γ , 이. 콜라이(*E. coli*) DNA Pol I, 테르무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) Pol I, 및 바실루스 스테아로테르모필루스(*Bacillus stearothermophilus*) Pol I를 포함한다. 패밀리 B의 DNA 중합효소는, 예를 들면, 진핵 DNA 중합효소 α , δ , 및 ϵ ; DNA 중합효소 ζ ; T4 DNA 중합효소, *Phi29* DNA 중합효소, 및 RB69 박테리오파지 DNA 중합효소를 포함한다. 패밀리 C는, 예를 들면, 이. 콜라이 DNA 중합효소 III 알파 서브유닛을 포함한다. 패밀리 D는, 예를 들면, 고세균의 유리고세균 서브도메인으로부터 유래된 중합효소를 포함한다. 패밀리 X의 DNA 중합효소는, 예를 들면, 진핵 중합효소 Pol b, pol s, Pol l, 및 Pol m, 및 에스. 세레비시애(*S. cerevisiae*) Pol 4를 포함한다. 패밀리 Y의 DNA 중합효소는, 예를 들면, Pol h, Pol iota, Pol 카파, 이. 콜라이 Pol IV(DINB) 및 이. 콜라이 Pol V(UmuD'2C)를 포함한다. DNA 중합효소의 RT(역전사효소) 패밀리는, 예를 들면, 레트로바이러스 역전사효소 및 진핵 텔로머라제를 포함한다. 예시적인 RNA 중합효소는 바이러스 RNA 중합효소, 예를 들면, T7 RNA 중합효소; 진핵 RNA 중합효소, 예를 들면, RNA 중합효소 I, RNA 중합효소 II, RNA 중합효소 III, RNA 중합효소 IV, 및 RNA 중합효소 V; 및 고세균 RNA 중합효소를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0077] 상기 분류는 예시적인 목적으로 제공된다. 분류 시스템에서의 변화가 가능하다는 것이 이해될 것이다. 예를 들면, 적어도 하나의 분류 시스템에서 패밀리 C 중합효소는 패밀리 X의 하위 범주로 분류되었다. 추가로, 중합효소는 상기 예시화된 구조적 특징과 겹칠 수 있거나 겹칠 수 없는, 기능이든 구조든, 다른 특징에 따라 분류될 수 있다. 몇몇 예시적인 특징들은 하기 추가로 상세하게 기재된다.
- [0078] 내인성 3'-5' 프루프리딩 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 중합효소는 몇몇 실시형태에 유용할 수 있다. 3'-5' 프루프리딩 엑소뉴클레아제 활성이 실질적으로 없는 중합효소가 또한 몇몇 실시형태, 예를 들면, 대부분의 서열결정 실시형태에서 유용하다. 엑소뉴클레아제 활성의 부재는 야생형 특징, 또는 변이 또는 가공된 중합효소 구조에 의해 부여된 특징일 수 있다. 예를 들면, 엑소 마이너스 클레노브 절편은 3'-5' 프루프리딩 엑소뉴클레아제 활성이 없는 클레노브 절편의 돌연변이된 버전이다. 클레노브 절편 및 이의 엑소 마이너스 변이는 본 명세서에 기재된 방법 또는 조성물에 유용할 수 있다.

- [0079] 중합효소는 이들의 진행성에 따라 특정될 수 있다. 중합효소는 적어도 약 50 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 100,000 뉴클레오타이드 또는 그 이상의 평균 진행성을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 명세서에 기재된 바와 같이 사용되는 중합효소의 평균 진행성은, 예를 들면, 최대한 1백만 뉴클레오타이드, 100,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 또는 50 뉴클레오타이드일 수 있다. 중합효소는 또한 이들의 진행성 또는 뉴클레오타이드 혼입의 속도에 따라 특징화될 수 있다. 예를 들면, 많은 네이티브 중합효소는 초당 적어도 1,000 뉴클레오타이드의 속도로 뉴클레오타이드를 혼입시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에 있어서 더 느린 속도가 바람직할 수 있다. 예를 들면, 초당 최대한 500 뉴클레오타이드, 초당 100 뉴클레오타이드, 초당 10 뉴클레오타이드, 초당 1 뉴클레오타이드, 10초당 1 뉴클레오타이드, 분당 1 뉴클레오타이드 또는 더 느린 평균 속도를 달성하는데 적절한 중합효소 및 반응 조건이 사용될 수 있다. 본 명세서에 다른 곳에서 추가로 상세하게 기재된 바와 같이, 천연 발생 뉴클레오타이드보다 느리거나 빠른 속도를 갖는 뉴클레오타이드 유사체가 사용될 수 있다. 임의의 다양한 공급원으로부터의 중합효소는 이들의 평균 진행성 또는 이들의 진행성의 평균 속도(예를 들면, 뉴클레오타이드 혼입의 평균 속도) 또는 둘 다를 증가시키거나 감소시키도록 변형도리 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 목적하는 반응 속도는 적절한 중합효소(들), 뉴클레오타이드 유사체(들), 핵산 주형(들) 및 다른 반응 조건을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0080] 사용되는 실시형태에 따라, 중합효소는 호열성이거나, 열 불활성화가 가능할 수 있다. 호열성 중합효소는 고온 조건 또는 열순환 조건, 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 기술에 사용되는 것들에 전형적으로 유용하다. 호열성 중합효소의 예는 9° N DNA 중합효소, Taq DNA 중합효소, 퓨손(Phusion)® DNA 중합효소, Pfu DNA 중합효소, RB69 DNA 중합효소, KOD DNA 중합효소, 및 VentR® DNA 중합효소를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 비-호열성 유기체로부터 단리된 대부분의 중합효소는 열 불활성화가 가능하다. 예는 파지로부터의 DNA 중합효소이다. 임의의 다양한 공급원으로부터의 중합효소가 고온 조건에 대한 이들의 내성을 증가시키거나 감소시키도록 변형될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 열 스파이크(즉, 증가된 온도의 짧은 시간 기간)는 호열성 중합효소를 후속적인 반응 또는 서열결정 반응의 후속적인 사이클에서 활성 상태로 남겨두면서, 어레이에서 하나 이상의 열 불활성화 가능한 중합효소를 불활성화시키는데 사용될 수 있다.
- [0081] 중합효소는 당해 분야에 공지된 임의의 다양한 화학을 사용하여 전하 센서에 부착할 수 있다. 예를 들면, 화학 링커가 사용될 수 있다. 많은 실시형태에 있어서, 전하 센서의 표면은 SiO₂, Al₂O₃, HfO₂, Ta₂O₅ 중 하나이다. 다른 산화물, 예를 들면, 란탄족으로부터의 산화물이 또한 사용될 수 있다. 니트라이드 및 옥시니트라이드가 또한 가능하다. 부착은 하이드록실의 표면을 통해 편리하게 만들어질 수 있다. 특정한 실시형태에 있어서, 중합효소(또는 중합효소에 부착되는 링커 분자)는 작용기를 포함한다. 링커는 전하 센서와 상호작용하는 제1 작용기 및 중합효소와 상호작용하는 제2 작용기를 가질 수 있다. 예시적인 제1 작용기는 피렌, 벤젠, 사이클로헥산, 및 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논을 포함한다. 예시적인 제2 작용기는 말레이미드이다. 써모 피셔(Thermo Fisher)(미국 매사추세츠주 윌섬 소재), 또는 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)(미국 미주리주 세인트루이스 소재)에 의해 판매되는 것들과 같은 단백질을 표면 또는 다른 모이어티에 공유적으로 연결하는 것으로 알려진 다른 화학이 사용될 수 있다. 테더에 부착된 중합효소 위의 화학기는 티올, 아민 또는 카복실 기일 수 있다.
- [0082] 중합효소는 수용체와 리간드 사이에 형성된 것과 같은 비공유 연결에 의해 전하 센서에 부착될 수 있다. 특히 유용한 연결은 스트렙타비딘(또는 이의 변이체 또는 유사체)과 비오틴(또는 이의 유사체) 사이의 것들, 상보적 핵산 사이의 것들, 항체와 에피토프 사이의 것들 등이다.
- [0083] 몇몇 실시형태에 있어서, 전도 테더가 중합효소를 전하 센서에 부착하는데 사용된다. 예시적인 전도 테더는 도핑된 폴리티오펜, 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜), 폴리아세틸렌, 폴리피롤, 폴리아닐린, 폴리플루오렌, 폴리페닐렌, 폴리피렌, 폴리아줄렌, 폴리아프탈렌, 폴리카바졸, 폴리인돌, 또는 폴리아제핀을 포함하는 구조를 갖는 것들을 포함한다. 이들 테더 구조의 전하 도핑은 폴리머의 산화에 의해 달성될 수 있다. 예시적인 전도 테더 및 이의 생성 방법은 문헌[Vernitskaya et al. *Russ. Chem. Rev.* 66:443ff(1997); MacDiarmid, *Angew. Chem., Int. Ed.* 40:2581-2590(2001)]; 또는 문헌[McNeill et al., *Aust. J. Chem.* 16:1056-75(1963)]에 기재되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0084] 특정한 실시형태에 있어서, 고체 지지체는 웰, 튜브, 채널, 큐벳, 페트리 플레이트, 병 등과 같은 용기 내에 있을 수 있거나 이의 부분일 수 있다. 특히 유용한 용기는 흐름-셀, 예를 들면, 제US 2010/0111768 A1호 또는 문헌[Bentley et al., *Nature* 456:53-59(2008)]에 기재된 바와 같은 것이고, 이들 각각은 참고로서 본 명세서에

포함된다. 예시적인 흐름-셀은 일루미나 인크(Illumina, Inc.)(미국 캘리포니아주 산디에고 소재)로부터 상업적으로 이용 가능한 것들이다. 흐름 셀은 전하 센서에서 수행되는 서열결정 반응 동안 전하 센서의 어레이에 별크 시약을 전달하는데 편리하다. 사이클 공정, 예를 들면, 핵산 서열결정 반응을 특히 흐름 셀 장치에 적합하다. 또 다른 특히 유용한 용기는 멀티웰 플레이트의 웰 또는 마이크로티터 플레이트이다.

[0085] 본 개시내용의 방법 또는 장치에 사용된 핵산은 DNA, RNA 또는 이의 유사체로 구성될 수 있다. 핵산의 공급원은 게놈 DNA, 메신저 RNA, 또는 네이티브 공급원으로부터의 다른 핵산일 수 있다. 몇몇 경우에 이러한 공급원으로부터 전달되는 핵산은 본 명세서에서 방법 또는 조성물에 사용하기 전에 증폭될 수 있다. 중합효소 연쇄 반응(PCR), 회전환 증폭(RCA), 다중 치환 증폭(MDA), 또는 무작위 프라임 증폭(RPA)을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 다양한 공지된 증폭 기술이 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 방법 또는 장치에서 사용 전에 핵산의 증폭은 선택사항이라는 것이 이해될 것이다. 이와 같이, 핵산은 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물의 몇몇 실시형태에서 사용 전에 증폭되지 않을 것이다. 핵산은 임의로 합성 라이브러리로부터 유래될 수 있다. 합성 핵산은 네이티브 DNA 또는 RNA 조성물을 가질 수 있거나, 이의 유사체일 수 있다.

[0086] 핵산이 유래될 수 있는 예시적인 생물학적 샘플은, 예를 들면, 포유동물, 예를 들면, 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 유제류, 말, 양, 돼지, 염소, 소, 고양이, 개, 영장류, 인간 또는 비인간 영장류; 식물, 예를 들면, 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 옥수수, 수수, 귀리, 밀, 쌀, 캐놀라, 또는 대두; 조류, 예를 들면, 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*); 선충, 예를 들면, 캐노르함디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*); 곤충, 예를 들면, 트로스필라 멜라노가스테르(*Drosophila melanogaster*), 모기, 초파리, 꿀벌 또는 거미; 어류, 예를 들면, 제브라피쉬; 파충류; 양서류, 예를 들면, 개구리 또는 제노푸스 래비스(*Xenopus laevis*); 디티오스텔리움 디스코이데움(*dictyostelium discoideum*); 균류, 예를 들면, 뉴모시스티스 카리니(*pneumocystis carinii*), 타키푸구 루브리페스(*Takifugu rubripes*), 이스트, 사카라모이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 또는 말라리아 원충으로부터의 것을 포함한다. 표적 핵산은 또한 원핵생물, 예를 들면, 박테리아, 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*), 스태필로코키(*staphylococci*) 또는 마이코플라스마 뉴모니아(*mycoplasma pneumoniae*); 고세균; 바이러스, 예를 들면, C형 간염 바이러스, 에볼라 바이러스 또는 인간 면역결핍 바이러스; 또는 비로이드로부터 유래될 수 있다. 핵산은 상기 유기체의 균질한 배양물 또는 집단으로부터 유래될 수 있거나, 대안적으로 예를 들면, 군집 또는 생태계에서 몇몇 상이한 유기체의 수집물로부터 유래될 수 있다.

[0087] 핵산은 천연 공급원으로부터 유래될 필요가 없고, 대신 공지된 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 예를 들면, 유전자 발현 프로브 또는 유전형 프로브가 합성될 수 있고, 본 명세서에 기재된 방법 및 장치에 사용될 수 있다.

[0088] 몇몇 실시형태에 있어서, 핵산은 하나 이상의 더 큰 핵산의 절편으로서 획득될 수 있다. 절편화는 예를 들면, 분무, 초음파, 화학적 절단, 효소적 절단, 또는 물리적 전달을 포함하는 당해 분야의 임의의 다양한 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 절편화는 또한 더 큰 핵산의 일부만을 복제함으로써 앰플리콘을 생성하는 특정한 증폭 기술의 사용으로부터 야기될 수 있다. 예를 들면, PCR 증폭은 측면 프라이머가 증폭 동안 혼성화되는 위치 사이에 있는 원래 주형 위의 뉴클레오타이드 서열의 길이에 의해 정의된 크기를 갖는 절편을 생성한다.

[0089] 핵산 집단, 또는 이의 앰플리콘은 본 명세서에 기재된 방법 또는 장치의 특정한 적용에 바람직하거나 적절한 평균 가닥 길이를 가질 수 있다. 예를 들면, 평균 가닥 길이는 약 100,000 뉴클레오타이드, 50,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 5,000 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 500 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드, 또는 50 뉴클레오타이드 미만일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 평균 가닥 길이는 약 10 뉴클레오타이드, 50 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드, 500 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 5,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 50,000 뉴클레오타이드, 또는 100,000 뉴클레오타이드 초과일 수 있다. 핵산 집단, 또는 이의 앰플리콘의 평균 가닥 길이는 상기 기재된 최대값과 최소값 사이의 범위일 수 있다.

[0090] 몇몇 경우에 핵산 집단은 이의 멤버에 대한 최대 길이를 갖는 조건하에 생성될 수 있거나 달리 구성될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 방법의 하나 이상의 단계에 사용되거나 특정한 조성물 중에 존재하는 멤버에 대한 최대 길이는 약 100,000 뉴클레오타이드, 50,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 5,000 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 500 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드 또는 50 뉴클레오타이드 미만일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 핵산 집단, 또는 이의 앰플리콘은 이의 멤버에 대한 최소 길이를 갖는 조건하에 생성될 수 있거나 달리 구성될 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 방법의 하나 이상의 단계에서 사용되거나 특정한 조성물 중에 존재하는 멤버의 최소 길이는 약 10 뉴클레오타이드, 50 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드, 500 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 5,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 50,000 뉴

클레오타이드, 또는 100,000 뉴클레오타이드 이상일 수 있다. 집단에서 핵산의 최대 및 최소 가닥 길이는 상기 기재된 최대값과 최소값 사이의 범위일 수 있다.

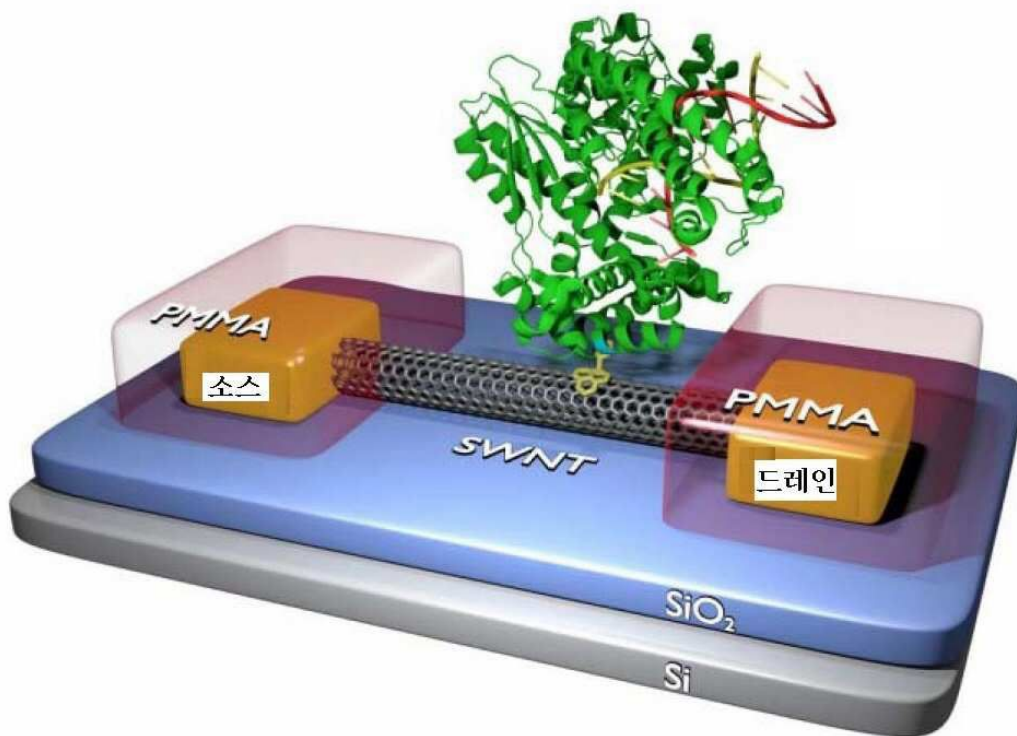
[0091] 본 출원 전체에서 다양한 문헌, 특히 또는 특허 출원이 언급되었다. 이들 문헌의 기재내용은 본 발명이 관련된 분야의 상태를 더욱 완전히 기재하기 위하여 본 출원에서 그 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0092] 용어 "포함하다"는 본 명세서에서 기재된 요소를 포함할 뿐만 아니라 임의의 추가의 요소를 더 포함하는 개방 종결을 의도한다.

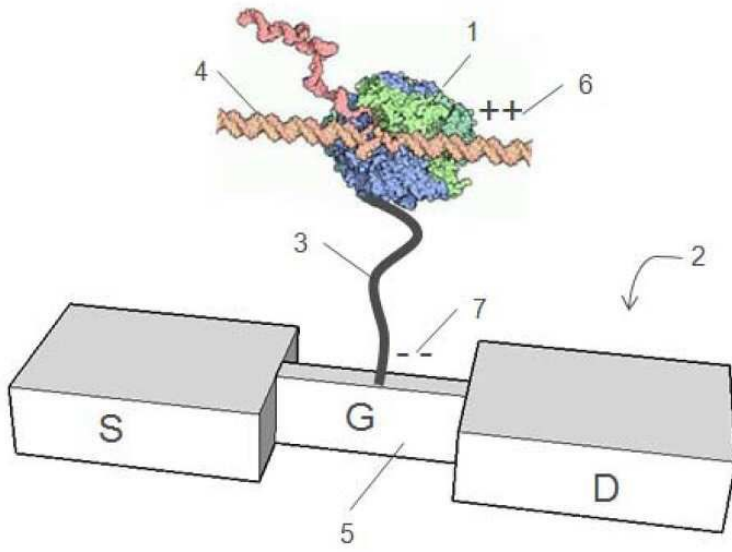
[0093] 본 발명이 상기 제공된 예시에 관하여 설명되었음에도 불구하고, 본 발명을 벗어나지 않고 다양한 변형이 만들어질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명은 오직 청구범위에 의해서만 제한된다.

도면

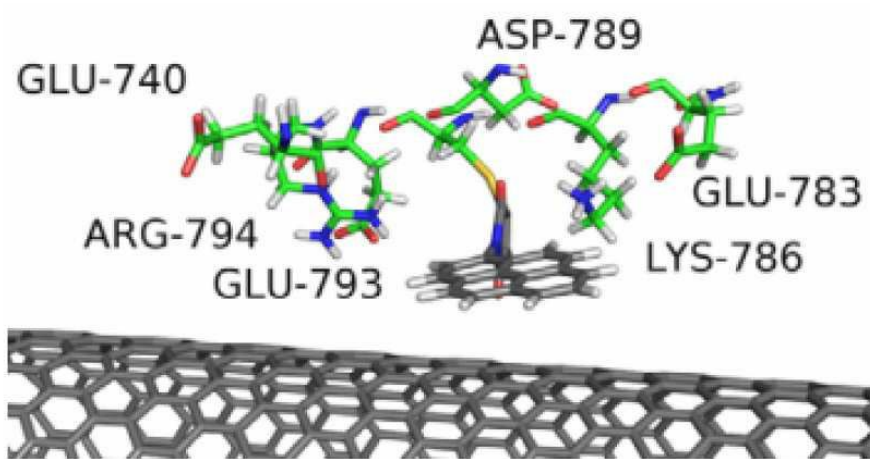
도면1



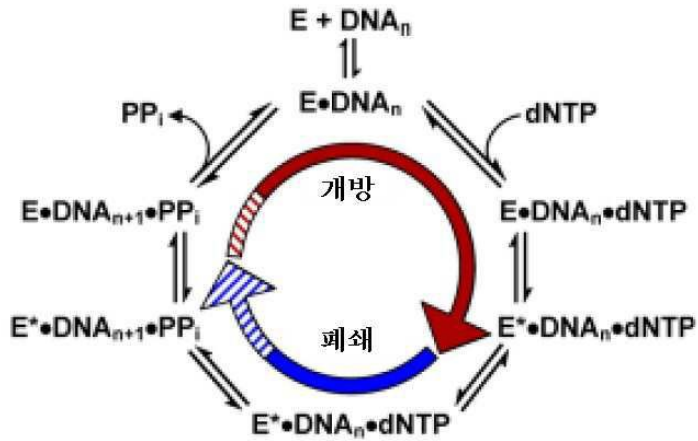
도면2



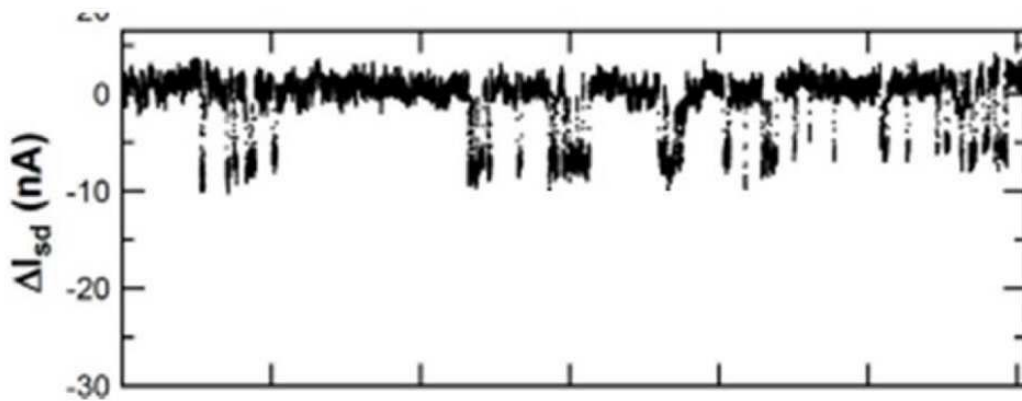
도면3



도면4

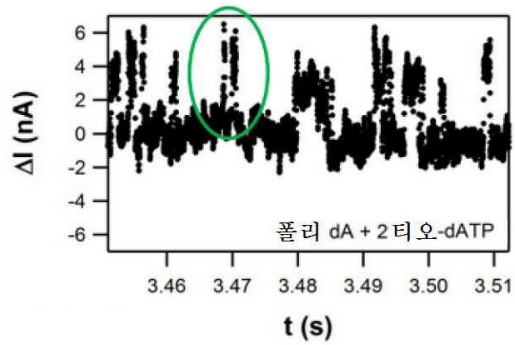
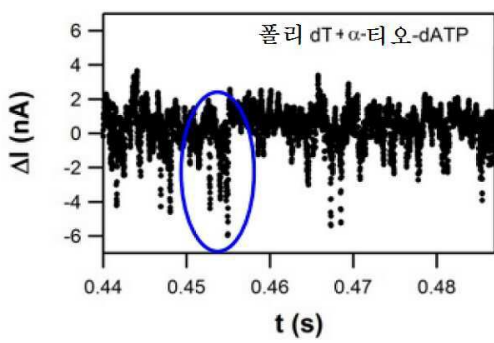


A

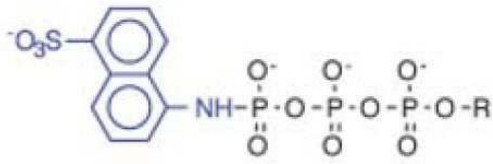


B

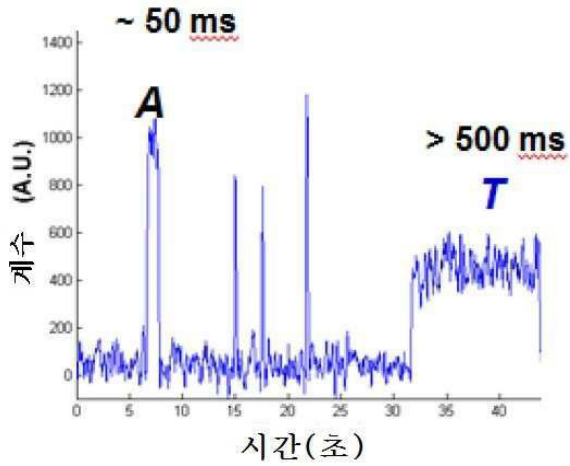
도면5



도면6



A



B

도면7

파라미터	상태 1	상태 2
극성	(+)	(-)
속도론	느림	빠름

A

염기 콜 →	A	G	C	T
극성	(+)	(+)	(-)	(-)
속도론	느림	빠름	느림	빠름

B

도면8

주형	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C
시행 1: 변형된 C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
시행 2: 변형된 A	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
시행 3: 변형된 T	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
시행 4: 변형된 G	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A

염기 콜 →	A	G	C	T
시행 1: 변형된 C	낮음	낮음	높음	낮음
시행 2: 변형된 A	높음	낮음	낮음	높음
시행 3: 변형된 T	낮음	낮음	낮음	낮음
시행 4: 변형된 G	낮음	높음	낮음	낮음

B

도면9

주형	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C	G	T	A	C
시행 1: 변형된 G, C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
시행 2: 변형된 T, C	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

A

염기 콜 →	A	G	C	T
시행 1: 변형된 G,C	낮음	높음	높음	낮음
시행 2: 변형된 T,C	낮음	낮음	높음	높음

B

도면10

