



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109486902 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201810576963.4

(22)申请日 2013.03.15

(30)优先权数据

61/635,584 2012.04.19 US

61/699,810 2012.09.11 US

61/767,766 2013.02.21 US

61/781,016 2013.03.14 US

(62)分案原申请数据

201380031868.1 2013.03.15

(71)申请人 生命技术公司

地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 C-Y·李 D·拉夫 S-M·陈

J·奥尼尔 R·卡辛斯卡斯

J·罗恩伯格

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6806(2018.01)

权利要求书1页 说明书102页

序列表1页 附图19页

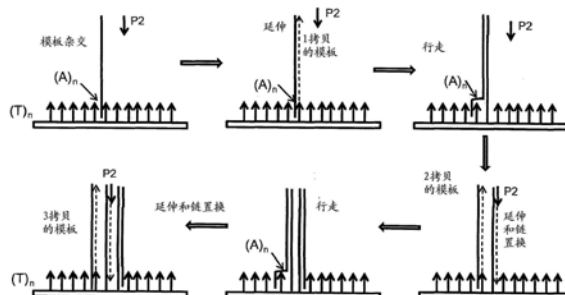
(54)发明名称

核酸扩增

(57)摘要

在一些实施方案中,本教导内容提供了用于核酸扩增的方法,包括形成反应混合物,和使反应混合物经历适合于核酸扩增的条件。在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括使待被扩增的核酸经历部分变性条件。在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括在不完全变性被扩增的核酸的情况下进行扩增。在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法使用催化同源重组的酶和聚合酶。在一些实施方案中,可在单个反应容器中进行用于核酸扩增的方法。在一些实施方案中,可在反应混合物的单一连续液相中进行用于核酸扩增的方法,而无需反应混合物的区室化或反应组分的固定。在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括任选地在存在聚合物的情况下,在等温扩增条件下在表面上扩增至少一个多核苷酸。聚合物可包括筛分剂和/或扩散减少剂。

在表面上利用Poly(T)引物的模板行走



1. 用于核酸扩增的方法, 包括:

(a) 将至少两个多核苷酸分配至反应室的阵列中, 这是通过将单个所述多核苷酸引入至少两个所述反应室来进行的; 和

(b) 通过扩增所述至少两个反应室内的多核苷酸来形成至少两个基本上单克隆的核酸群, 其中所述至少两个反应室在扩增期间彼此流体连通。

2. 权利要求1的方法, 其中所述至少两个多核苷酸具有不同的序列。

3. 权利要求1的方法, 其中在扩增期间在不完全变性所述至少两个多核苷酸的情况下进行所述扩增。

4. 权利要求1的方法, 其中所述扩增包括: 将所述至少两个多核苷酸与包含用于核酸合成的试剂的单个反应混合物接触。

5. 权利要求1的方法, 其中所述扩增包括: 将所述至少两个多核苷酸与反应室中的重组酶接触。

6. 权利要求1的方法, 其中所述至少两个反应室可操作地偶联至传感器。

7. 权利要求6的方法, 其中所述传感器能检测反应室内核苷酸并入副产物的存在。

8. 权利要求6的方法, 其中所述反应室包含共形地置于反应室内的亲水聚合物基质。

9. 权利要求8的方法, 其中所述亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

10. 权利要求8的方法, 其中所述亲水聚合物基质是原位固化的聚合物基质。

## 核酸扩增

[0001] 发明背景

[0002] 本申请是申请号为201380031868.1的分案申请。

[0003] 核酸扩增在分子生物学中非常有用并且实际上在生物学、治疗学、诊断学、法医学和研究的每个方面都具有广泛的适用性。通常地,使用一种或多种引物从起始模板产生扩增子,其中扩增子相应于或互补于从其产生所述扩增子的模板。多重扩增还可使过程简化并减少费用。该应用涉及用于核酸扩增和/或分析的方法和试剂。

[0004] 发明概述

[0005] 本文中提供了核酸扩增和/或分析的方法、试剂和产物。扩增可利用固定的和/或溶解的引物。可将单组引物与不同的模板混合,或者可将单个模板与多种不同的引物接触,或者可将多种不同的模板与多种不同的引物接触。从本文中提供的方法产生的扩增子是适合用于进一步分析例如序列测定的底物。

[0006] 在一些实施方案中,本教导内容提供了用于核酸扩增的组合物、系统、方法、装置和试剂盒。

[0007] 附图详述

[0008] 图1提供了显示模板行走(template walking)的实施方案的示意图。在可选择的实施方案中,固定的引物包含被命名为(A)<sub>n</sub>的富含腺苷的序列,例如(A)<sub>30</sub>,并且模板上针对固定引物的引物结合部位包含互补的富含T的序列,例如(T)<sub>30</sub>。

[0009] 图2描述了在小珠上通过模板行走的扩增和小珠在的平面阵列上的堆积以用于测序的概图。

[0010] 图3描述了使用合成测序的基于半导体的检测的一些可选择的实施方案。模板行走可用于在小珠上或在反应室的基底或底部上产生克隆扩增子群。在可选择的实施方案中,固定的引物包含被命名为(A)<sub>n</sub>的富含腺苷的序列,例如(A)<sub>30</sub>,并且模板上针对固定引物的引物结合部位包含互补的富含T的序列,例如(T)<sub>30</sub>。

[0011] 图4描述了以引物草坪(primer lawn)形式在平面衬底上的固定位点的一些可选择的实施方案。可使用不连续的固定位点的阵列或者引物的单个连续草坪可被认为是固定位点的随机阵列。任选地,一个或多个固定位点在引物的连续草坪中的位置可以是还未确定的,其中位置在行走之前起始模板的附着之时被确定,或由扩增的簇所占据的空间来确定。在可选择的实施方案中,固定的引物包含被命名为(A)<sub>n</sub>的富含腺苷的序列,例如(A)<sub>30</sub>,并且模板上针对固定引物的引物结合部位包含互补的富含T的序列,例如(T)<sub>30</sub>。

[0012] 图5显示了温度对模板行走反应的影响。针对反应温度计算和绘制了模板行走扩增之前和之后的 $\Delta C_t$ 的图表。

[0013] 图6提供了96个双重TaqMan qPCR反应的C<sub>t</sub>值的表。

[0014] 图7描述了显示了在小珠上通过模板行走进行的约100,000倍扩增的数据。针对反应时间计算和绘制了模板行走反应之前和之后的 $\Delta C_t$ 和模板行走反应之前和之后的扩增倍数。

[0015] 图8提供了示例性链翻转和行走策略的示意图描述。(A) 模板行走, (B) 链翻转以产

生翻转的链，(C) 在最终的翻转链上添加新的引物结合序列Pg'。

[0016] 图9描述了来自使用重组酶介导的扩增反应扩增的多核苷酸模板的Ion Torrent™ PGM测序运行的示例性阅读长度直方图。

[0017] 图10描述了来自使用重组酶介导的扩增反应扩增的多核苷酸模板的Ion Torrent™ Proton测序运行的示例性阅读长度直方图。

[0018] 图11描述了来自使用重组酶介导的扩增反应扩增的多核苷酸模板的Ion Torrent™ Proton测序运行的示例性阅读长度直方图。

[0019] 图12描述了来自使用重组酶介导的扩增反应扩增的多核苷酸模板的Ion Torrent™ Proton测序运行的示例性阅读长度直方图。

[0020] 图13包括示例性测量系统的图解。

[0021] 图14包括示例性测量组件的图解。

[0022] 图15包括示例性测量组件的阵列的图解。

[0023] 图16包括示例性孔结构的图解。

[0024] 图17包括示例性孔和传感器结构的图解。

[0025] 图18、图19、图20和图21包括在通过示例性方法进行处理期间工作件的图解。

[0026] 图22、图23和图24包括在通过示例性方法进行处理期间工作件的图解。

[0027] 图25、图26和图27包括在通过示例性方法进行处理期间工作件的图解。

[0028] 图28显示了根据示例性实施方案的用于核酸测序的系统的组件的示例性方块图。

[0029] 图29显示了根据示例性实施方案的集成电路装置和流动池的部分的示例性剖面图。

[0030] 图30显示了根据示例性实施方案的代表性化学传感器和相应的反应区的示例性剖面图。

[0031] 发明详述

[0032] 核酸模板的常规扩增通常包括使用适当的合成系统的模板(和/或其子代)的重复复制。在这样的常规方法中,复制的每个实例通常通过使用极端的变性条件变性待被扩增的模板来开始,从而使得模板为基本上单链的。用于常规扩增的极端变性条件的一些通常和广泛使用的实例包括使用远高于待被扩增的核酸模板的解链温度的温度的热变性(例如,常规PCR包括使用远高于90℃,通常约94-95℃的变性温度的热循环),或模板至强力的变性剂例如NaOH、胍盐试剂等的暴露。这样的方法通常需要专门的设备(例如热循环仪),并且在扩增过程期间需要额外的操作(例如用于常规PCR的退火步骤;用于去除化学变性剂的洗涤步骤等等),从而增加了与这样的扩增相关的成本、工作量和时间,以及限制了使用这样的方法可最终获得的产率。此外,这样的极端变性条件通常使得待被扩增的模板为基本上单链的,从而为涉及多重克隆扩增(即多种不同模板在相同的反应混合物内的克隆扩增)的大量应用提出了挑战。对于这样的多重应用,这些极端变性条件的使用可以是适得其反的,因为这通常导致模板的一条链从其缔合位置的释放,从而使得释放的链自由地在溶液内迁移和污染其它发展得紧密靠近的扩增子。这样的交叉污染通常导致减少的单克隆扩增群的产率并增加多克隆污染物(通常不可用于许多的下游应用)的产率。需要改进的核酸扩增方法(以及相关的组合物、系统和试剂盒)以消除与常规扩增方法相关的缺陷。

[0033] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法以及相关的组合

物、系统和装置,所述方法包括扩增核酸模板以产生基本上单克隆的多核苷酸群的扩增子。通常认为单克隆性在核酸测定中是期望的,因为多克隆群内不同多核苷酸的不同特性可使得测定数据的解释复杂化。一个实例涉及核酸测序应用,其中多克隆群的存在可使得测序数据的解释复杂化;然而,许多测序系统不足以敏感到从单个多核苷酸模板检测核苷酸序列数据,因此在测序前需要模板的克隆扩增。

[0034] 在一些实施方案中,本公开内容的扩增方法可用于任选地使用相同的反应混合物和在相同的反应混合物内克隆地扩增两个或更多个不同的核酸模板,以产生至少两个基本上单克隆的核酸群。任选地,至少一个基本上单克隆的群通过单个多核苷酸模板的扩增形成。

[0035] 任选地,两个或更多个不同的核酸模板同时地和/或平行地扩增。

[0036] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸合成的方法(以及相关的组合物、系统和试剂盒),所述方法包括:在反应混合物中提供至少两个双链核酸模板;和根据本文中公开的任何方法克隆地扩增所述至少两个双链核酸模板,以形成至少两个基本上单克隆的核酸群。

[0037] 在一些实施方案中,克隆地扩增任选地包括形成反应混合物。反应混合物可包含连续的液相。在一些实施方案中,连续的液相包含单一连续水相。液相可包含两个或更多个多核苷酸模板,所述多核苷酸模板可任选地具有相同的核苷酸序列或可具有彼此不同的核苷酸序列。在一些实施方案中,所述两个或更多个多核苷酸模板的至少一个可包含至少一个与反应混合物内的至少一个其它的多核苷酸模板基本上不相同或基本上不互补的核酸序列。

[0038] 在一些实施方案中,两个或更多个不同的核酸模板在扩增前局限于、置于或位于不同的位点。

[0039] 在一些实施方案中,在溶液中,任选地在单个反应混合物内克隆地扩增两个或更多个不同的核酸模板,并且在这样的克隆扩增之后,所得的两个或更多个基本上单克隆的核酸群随后局限于、置于或位于不同的位点。

[0040] 不同的位点任选地是位点阵列的成员。阵列可包含在表面(例如流动池、电子装置、晶体管芯片、反应室、槽等的表面)上的位点二维阵列或基质或其它媒介物(例如固体、半固体、液体、流体等)内的位点三维阵列。

[0041] 任选地,两个或更多个不同的核酸模板在相同反应混合物的连续液相,通常地连续水相内被扩增,从而产生两个或更多个不同的和基本上单克隆的多核苷酸群,其中每一个多核苷酸群通过存在于反应混合物中单个多核苷酸模板的扩增来产生。

[0042] 任选地,连续液相包含在反应混合物的单个相或相同相之内。

[0043] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸合成的方法(以及相关的组合物、系统和试剂盒),所述方法包括:提供双链核酸模板;和通过扩增所述双链核酸模板来形成基本上单克隆的核酸群。任选地,扩增包括克隆地扩增双链核酸模板。

[0044] 任选地,扩增包括在基本上等温条件下进行至少一个扩增回合。

[0045] 任选地,扩增包括在基本上等温条件下进行至少两个连续的核酸合成循环。

[0046] 在一些实施方案中,扩增包括重组酶聚合酶扩增(RPA)。例如,扩增可包括进行至少一个RPA回合。

[0047] 在一些实施方案中,扩增包括模板行走。例如,扩增可包括进行至少一个模板行走回合。

[0048] 在一些实施方案中,扩增任选地包括在位点或反应室内进行两种不同的扩增回合。例如,扩增可包括以回合的任何顺序或组合在位点或反应室内进行至少一个RPA回合并在位点或反应室内进行至少一个模板行走回合。在一些实施方案中,任一个或多个扩增回合中的至少两个连续循环在基本上等温条件下进行。在一些实施方案中,扩增回合的至少一个在基本上等温条件下进行。

[0049] 任选地,待被扩增的核酸模板是双链的,或在扩增前利用适当的程序使得所述模板为至少部分双链的。(在本文中待被扩增的模板与核酸模板或多核苷酸模板可互换使用)。在一些实施方案中,模板是线性的。或者,模板可以是环状的,或包含线性和环状区域的组合。

[0050] 任选地,双链核酸模板包含正向链。双链核酸模板还可包含反向链。正向链任选地包含第一引物结合部位。反向链任选地包含第二引物结合部位。

[0051] 在一些实施方案中,模板已包含第一和/或第二引物结合部位。或者,模板任选地最初不包含引物结合部位,公开的方法任选地包括在扩增前将引物结合部位连接至或引入模板。例如,方法可任选地包括将包含引物结合部位的接头连接至或以其它方式引入模板。可将接头连接至或以其它方式引入线性模板的末端或线性或环状模板的主体内。任选地,在连接上或引入接头后可环化模板。在一些实施方案中,可将第一接头连接至或引入线性模板的第一末端,并且可将第二接头连接至或引入模板的第二末端。

[0052] 在一些实施方案中,扩增包括将部分变性的模板与第一引物、与第二引物或与第一引物和第二引物以任意顺序或组合进行接触。

[0053] 在一些实施方案中,第一引物包含第一引物序列。第一引物任选地包含可延伸的末端(例如3' 含OH的末端)。可任选地将第一引物连接至化合物(例如“阻力标签(drag tag)”)或连接至支持物(例如小珠或位点或反应室的表面)。

[0054] 在一些实施方案中,第二引物包含第二引物序列。第二引物任选地包含可延伸的末端(例如3' 含OH的末端)。可任选地将第二引物连接至化合物(例如“阻力标签”)或连接至支持物(例如小珠或位点或反应室的表面)。

[0055] 任选地,第一引物结合至第一引物结合部位以形成第一引物-模板双链。第二引物可结合至第二引物结合部位以形成第二引物-模板双链。

[0056] 在一些实施方案中,扩增包括延伸第一引物以形成延伸的第一引物。例如,扩增可包括延伸第一引物-模板双链的第一引物以形成延伸的第一引物。

[0057] 在一些实施方案中,扩增包括延伸第一引物以形成延伸的第一引物。例如,扩增可包括延伸第一引物-模板双链的第一引物以形成延伸的第一引物。

[0058] 任选地,通过聚合酶进行延伸。聚合酶可以是链置换聚合酶。

[0059] 在一些实施方案中,扩增包括将待被扩增的模板与重组酶接触。

[0060] 在一些实施方案中,扩增包括形成部分变性的模板。例如,扩增可包括部分变性双链核酸模板。

[0061] 任选地,部分变性包括使双链核酸模板经历部分变性条件。

[0062] 在一些实施方案中,部分变性条件包括小于核酸模板的 $T_m$ 的温度,包括例如低于

核酸模板的 $T_m$  5℃、10℃、15℃、20℃、25℃或50℃的温度。在一些实施方案中,部分变性条件包括高于(例如至少5℃、10℃、15℃、20℃、25℃或50℃更高)第一引物、第二引物或第一和第二引物的 $T_m$ 的温度。在一些实施方案中,部分变性条件包括高于(例如至少5℃、10℃、15℃、20℃、25℃或50℃更高)第一引物结合部位、第二引物结合部位或第一引物结合部位和第二引物结合部位的 $T_m$ 的温度。在一些实施方案中,核酸模板可在一个或两个末端包含接头序列,并且部分变性条件可包括高于接头序列的 $T_m$ 的温度。在一些实施方案中,部分变性条件(特别地部分变性温度)用于在“模板行走”过程中选择性扩增核酸模板,如在本文中进一步描述的。

[0063] 在其它实施方案中,部分变性条件包括用一种或多种能够任选地以序列特异性或序列定向方式部分变性核酸模板的酶处理待被扩增的核酸模板或使其接触。在一些实施方案中,至少一种酶任选地以序列特异性方式催化链侵入和/或解旋。任选地,一种或多种酶包括一种或多种选自重组酶、拓扑异构酶和解旋酶的酶。在一些实施方案中,部分变性模板可包括将模板与重组酶接触并形成包含重组酶的核蛋白复合物。任选地,在存在第一引物、第二引物或第一和第二引物的情况下将模板与重组酶接触。部分变性可包括使用重组酶催化链交换和将第一引物与第一引物结合部位杂交(或将第二引物与第二引物结合部位杂交)。在一些实施方案中,部分变性包括使用重组酶进行链交换和将第一引物与第一引物结合部位和将第二引物与第二引物结合部位进行杂交。

[0064] 在一些实施方案中,部分变性的模板包含单链部分和双链部分。在一些实施方案中,单链部分包含第一引物结合部位。在一些实施方案中,单链部分包含第二引物结合部位。在一些实施方案中,单链部分包含第一引物结合部位和第二引物结合部位。

[0065] 在一些实施方案中,部分变性模板包括将模板与一种或多种核蛋白复合物接触。核蛋白复合物的至少一种可包含重组酶。核蛋白复合物的至少一种可包含引物(例如,第一引物或第二引物,或包含与模板中对应的引物结合序列互补的序列的引物)。在一些实施方案中,部分变性模板可包括将模板与包含引物的核蛋白复合物接触。部分变性可包括将核蛋白复合物的引物与模板中对应的引物结合部位杂交,从而形成引物-模板双链。

[0066] 在一些实施方案中,部分变性模板可包括将模板与包含第一引物的第一核蛋白复合物接触。部分变性可包括将第一核蛋白复合物的第一引物与正向链的第一引物结合部位杂交,从而形成第一引物-模板双链。

[0067] 在一些实施方案中,部分变性模板可包括将模板与包含第二引物的第二核蛋白复合物接触。部分变性可包括将第二核蛋白复合物的第二引物与反向链的第二引物结合部位杂交,从而形成第二引物-模板双链。

[0068] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括一个或多个引物延伸步骤。例如,方法可包括通过使用聚合酶并入核苷酸来延伸引物。

[0069] 在一些实施方案中,聚合酶是链置换聚合酶。

[0070] 任选地,延伸引物包括将引物与聚合酶和一种或多种类型的核苷酸在核苷酸并入条件下进行接触。在一些实施方案中,一种或多种类型的核苷酸不包含外源标记,特别地光学上可检测的标记,例如荧光部分或染料。任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。通常地,延伸引物以模板依赖性方式发生。

[0071] 任选地,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括通过使用聚合酶将一个或多个核苷酸并入第一引物-模板双链的第一引物来延伸第一引物,从而形成延伸的第一引物。

[0072] 任选地,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括通过任何适当的方法(例如连接或杂交)将第二引物结合至第一延伸的引物的第二引物结合部位。

[0073] 任选地,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括通过使用聚合酶将一个或多个核苷酸并入第二引物-模板双链的第二引物来延伸第二引物,从而形成延伸的第二引物。

[0074] 在一些实施方案中,延伸第一引物导致第一延伸的引物的形成。第一延伸的引物可包含模板的反向链序列的一些或全部。任选地,第一延伸的引物包含第二引物结合部位。

[0075] 在一些实施方案中,延伸第二引物导致第二延伸的引物的形成。第二延伸的引物可包含模板的正向链序列的一些或全部。任选地,第二延伸的引物包含第一引物结合部位。

[0076] 在一些实施方案中,在不使双链核酸模板在扩增期间经历极端变性条件的情况下进行方法。例如,可在不使核酸模板在扩增期间经历大于或等于模板的 $T_m$ 的温度的情况下进行方法。在一些实施方案中,可在不使模板在扩增期间与化学变性剂例如NaOH、尿素、胍盐等接触的情况下进行方法。在一些实施方案中,扩增包括等温扩增。

[0077] 在一些实施方案中,在不使核酸模板在至少两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环期间经历极端变性条件的情况下进行方法。例如,方法可包括两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环而不使核酸模板与化学变性剂接触。在一些实施方案中,方法可包括进行两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环而不使核酸模板经历高于模板或模板群的实际或经计算的 $T_m$ (或模板或模板群的实际或经计算的平均 $T_m$ )之下25、20、15、10、5、2或1℃的温度。两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环可包括介入其间的部分变性和/或引物延伸步骤。

[0078] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括将一个或多个延伸的引物链连接至支持物。可任选地在扩增期间或可选择地在扩增完成后进行连接。在一些实施方案中,支持物包含多个第二引物,并且方法可包括将至少一个延伸的第一引物链与支持物的第二引物杂交。

[0079] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括将一个或多个延伸的第二引物链连接至支持物。在一些实施方案中,支持物连接至第一引物。例如,支持物可包含多个第一引物,并且方法可包括将至少一个延伸的第二引物与支持物的第一引物杂交,从而将延伸的第二引物连接至支持物。例如,第一引物可杂交至延伸的第二引物中的第一引物结合部位。

[0080] 在一些实施方案中,支持物连接至第二引物。例如,支持物可包含多个第二引物,并且方法可包括将至少一个延伸的第一引物与支持物的第二引物杂交,从而将延伸的第一引物连接至支持物。例如,第一引物可杂交至延伸的第一引物中的第二引物结合部位。

[0081] 在一些实施方案中,支持物包含至少一个第一引物和至少一个第二引物,并且公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括将延伸的第一引物和延伸的第二引物连接至支持物。

[0082] 任选地,支持物连接至靶特异性引物。靶特异性引物任选地杂交(或能够杂交)至

反应混合物内模板的第一亚组,但不能结合至反应混合物内模板的第二亚组。

[0083] 任选地,支持物连接至通用引物。通用引物任选地杂交(或能够杂交)至反应混合物内的所有或基本上所有的模板。

[0084] 任选地,反应混合物包含共价地连接至第一靶特异性引物的第一支持物和共价地连接至第二靶特异性引物的第二支持物,并且其中第一和第二靶特异性引物彼此不同。

[0085] 任选地,第一靶特异性引物基本上互补于第一靶核酸序列并且第二靶特异性引物基本上互补于第二靶核酸序列,并且其中第一和第二靶核酸序列是不同的。

[0086] 在一些实施方案中,公开的方法包括任选地在反应混合物的相同连续相内,在第一支持物上通过扩增第一模板形成第一扩增子,和在第二支持物上通过扩增第二模板形成第二扩增子。第一扩增子任选地连接或附着至第一支持物,并且第二扩增子任选地连接或附着至第二支持物。

[0087] 公开的方法任选地包括通过克隆地扩增两个或更多个多核苷酸模板来产生两个或更多个单克隆或基本上单克隆的扩增子。任选地在扩增反应混合物的连续液相内克隆地扩增两个或更多个多核苷酸模板。扩增反应混合物的连续液相可包含连续水相。在一些实施方案中,扩增包括产生至少两个基本上单克隆的扩增的多核苷酸群,所述多核苷酸群的每一个通过单个多核苷酸模板的扩增来形成。任选地,克隆地扩增包括至少一个RPA回合。任选地,克隆地扩增包括至少一个模板行走回合。

[0088] 在一些实施方案中,扩增任选地包括形成包含连续液相的扩增反应混合物。在一些实施方案中,连续液相是单连续水相。液相可包含两个或更多个多核苷酸模板,所述多核苷酸模板可任选地彼此不同。例如,两个或更多个多核苷酸模板可包含至少一个与扩增反应混合物内的至少一个其它的多核苷酸模板基本上不相同或基本上不互补的核酸序列。

[0089] 在一些实施方案中,扩增任选地包括形成包含具有两个或更多个多核苷酸模板的单连续水相的扩增反应混合物。扩增任选地包括通过克隆地扩增单一水相内的两个或更多个多核苷酸模板来形成两个或更多个基本上单克隆的核酸群。任选地,克隆地扩增包括至少一个RPA回合。任选地,克隆地扩增包括至少一个模板行走回合。

[0090] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于使用部分变性条件任选地平行扩增一个或多个核酸模板的方法(及相关地组合物、系统和试剂盒)。在一些实施方案中,任选地以阵列形式使用这样的方法来扩增两个或更多个模板。任选地,在分配至阵列中之前在溶液中大批扩增模板。或者,首先将模板分配至阵列中的位点,随后在阵列的位点处(或之内)原位扩增模板。

[0091] 任选地,模板是单链的或双链的。模板任选地包含一个或多个引物结合部位。

[0092] 在一些实施方案中,方法可包括使在至少一条链上包含引物结合部位的双链核酸模板经历至少一个使用聚合酶的基于模板的复制循环。

[0093] 任选地,至少一个基于模板的复制循环包括部分变性步骤、退火步骤和延伸步骤。

[0094] 在一些实施方案中,方法包括通过使模板经历至少两个连续的基于模板的复制循环来扩增双链核酸模板。

[0095] 在一些实施方案中,方法包括部分变性模板。任选地,方法包括形成包含单链区的部分变性模板。部分变性模板还可包含双链区。单链区可包含引物结合部位。

[0096] 任选地,部分变性包括使模板经历比引物结合部位的 $T_m$ 低至少20、15、10、5、2或1℃的温度。

[0097] 任选地,部分变性包括使模板经历与引物结合部位的 $T_m$ 相同的或高于所述 $T_m$ 的温度。

[0098] 任选地,部分变性包括将双链模板与重组酶和引物接触。重组酶和引物可形成核蛋白复合物的部分,并且部分变性包括将模板与复合物接触。

[0099] 在一些实施方案中,方法包括通过使引物与单链区的引物结合部位杂交来形成引物-模板双链。在一些实施方案中,待发的模板包含双链区。任选地,双链区不包含引物结合部位。

[0100] 在一些实施方案中,方法包括延伸引物-模板双链的引物。任选地,方法包括形成延伸的引物。

[0101] 在一些实施方案中,可在不同的不连续的支持物(流入小珠或颗粒)上克隆地扩增不同的模板而无需在扩增前进行划分。在其它实施方案中,在扩增前将模板分区或分配至乳剂内。任选地,将模板分配至微滴内,形成具有非连续亲水相和连续疏水相的乳剂的亲水相的部分。在一些实施方案中,亲水相的乳剂微滴还包含一个或多个进行PRA所必需的组分。例如,乳剂微滴可包含重组酶。任选地,微滴包含链置换聚合酶。在一些实施方案中,微滴包含支持物固定的引物和/或溶液相引物。任选地,引物可结合至模板或结合至其扩增产物。

[0102] 在一些实施方案中,本文公开的用于使用基于乳剂的扩增的包括在模板的部分变性后进行核酸合成的核酸扩增的组合物、系统、方法、装置和试剂盒提供了相较于常规扩展方法(包括牵涉传统热循环的基于乳剂的PCR或emPCR)的有利方面。例如,包括基于乳剂的RPA(“emRPA”)或基于乳剂的模板行走的核酸扩增反应可产生更长扩增的多核苷酸模板、具有更少的扩增步骤、减少的制备扩增的多核苷酸模板的时间和/或增加的测序数据质量。用于与本文中公开的扩增方法一起使用的一些适当的乳剂组合物可见于例如美国专利号7622280、7601499和7323305中,上述专利通过引用整体并入本文。

[0103] 在一些实施方案中,方法包括提供包含含有第一引物结合部位的正向链、含有第二引物结合部位的反向链的双链模板;部分变性模板和形成包含含有第一引物结合部位的单链区和至少一个双链区的部分变性模板;通过使第一引物与单链区的第一引物结合部位杂交形成第一引物-模板双链;使用聚合酶延伸第一引物-模板双链的第一引物以形成包含第二引物结合部位的延伸的第一引物,其中延伸的第一引物至少部分杂交于模板的正向链;部分变性来自模板的延伸的第一链以形成包含第二引物结合部位的单链区;使第二引物与单链区的第二引物结合部位杂交并形成第二引物-模板双链,和延伸第二引物-模板双链的第二引物,从而形成延伸的第二引物。

[0104] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于从核酸模板合成核酸的方法的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒),包括:提供包含正向链和反向链的第一核酸双链,其中正向链包含正向引物结合部位并且反向链包含反向引物结合部位,以及其中第一双链具有第一解链温度(“模板 $T_m$ ”),正向引物结合部位具有第二解链温度(“正向引物 $T_m$ ”),反向引物结合部位具有第三解链温度(“反向引物 $T_m$ ”);部分变性第一双链,其中部分变性的第一双链包含含有正向引物结合部位的单链区和至少一个双链区;通过使正向引物与部分变性

的第一双链的正向引物结合部位杂交来形成待发的第一双链;通过将待发的第一双链与链置换聚合酶和核苷酸在引物延伸条件下接触来延伸正向引物,从而形成具有第四解链温度(“第四 $T_m$ ”)的第二双链,所述第二双链包括含有正向引物结合部位的一条链和含有反向引物结合部位的一条链;部分变性第二双链,其中部分变性的第二双链包含含有反向引物结合部位的单链区和至少一个双链区;通过使反向引物与部分变性的第二双链的反向引物结合部位杂交来形成反向待发的第二双链;通过将反向待发的第二双链与链置换聚合酶和核苷酸在引物延伸条件下接触来延伸反向待发的第二双链的反向引物。

[0105] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括测序扩增的模板或测序延伸的引物(例如延伸的第一引物或延伸的第二引物)。测序可包括本领域中已知的任何适当的测序方法。在一些实施方案中,测序包括通过合成的测序或通过电子检测的测序(例如纳米孔测序)。在一些实施方案中,测序包括通过聚合酶介导的核苷酸并入来延伸模板或扩增的模板或延伸与模板或扩增的模板杂交的测序引物。在一些实施方案中,测序包括通过将模板或延伸的引物与测序引物、聚合酶和至少一种类型的核苷酸接触来对连接至支持物的模板或扩增的模板进行测序。在一些实施方案中,测序包括将模板或扩增的模板或延伸的引物与测序引物、聚合酶以及与仅一种类型的不包含外源标记或链终止基团的核苷酸进行接触。

[0106] 任选地,模板(或扩增的产物)可置于、局限于或位于位点。在一些实施方案中,多种模板/扩增的模板/延伸的第一引物置于或位于位点阵列中不同的位点。在一些实施方案中,在模板扩增之前进行放置、定位或局部化。在一些实施方案中,在扩增之后进行放置、定位或局部化。例如,扩增的模板或延伸的第一引物可置于、位于或局限于阵列的不同位点。

[0107] 本文公开的方法导致多个扩增子的产生,至少一些所述扩增子包括克隆地扩增的核酸群。通过本公开内容的方法产生的克隆地扩增的群可用于多种目的。在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)任选地还包括克隆地扩增的群(扩增子)的分析和/或处理。例如,在一些实施方案中,可检测和任选地定量显示出某些期望特性的扩增子的数量。

[0108] 在一些实施方案中,方法可包括测定哪些不连续的支持物(例如小珠)包含扩增子。类似地,方法可包括测定阵列的哪些位点包含扩增子。可任选地使用基于DNA的检测程序例如紫外吸收、用DNA特异性染料染色、**TAQMAN®**测定、qPCR、与荧光探针的杂交等来检测测定支持物或位点上的扩增子的存在。在一些实施方案中,方法可包括测定哪些小珠支持物(或阵列的位点)已得到基本上单克隆的扩增子。例如,可分析小珠支持物(或阵列位点)以确定哪些支持物或位点可产生可检测的和相干的(coherent)(即可分析的)序列依赖性信号。

[0109] 在一些实施方案中,扩增之后进行扩增的产物的测序。被测序的扩增的产物可包括包含基本上单克隆的核酸群的扩增子。在一些实施方案中,公开的方法包括将多个扩增子的单个成员形成或定位于不同的位点。不同的位点任选地形成位点阵列的部分。在一些实施方案中,位点阵列中的位点包括在isFET阵列的表明上的孔(反应室)。

[0110] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括测序扩增的模板或测序延伸的引物(例如延伸的第一引物或延伸的第二引物)。测序可包括本领域中已知的任何适当的测序方法。在一些实施方案中,测序包括通过合成的测序或通过电子检测

的测序(例如纳米孔测序)。在一些实施方案中,测序包括通过聚合酶介导的核苷酸并入来延伸模板或扩增的模板或延伸与模板或扩增的模板杂交的测序引物。在一些实施方案中,测序包括通过将模板或延伸的引物与测序引物、聚合酶和至少一种类型的核苷酸接触来对连接至支持物的模板或扩增的模板进行测序。在一些实施方案中,测序包括将模板或扩增的模板或延伸的引物与测序引物、聚合酶以及与仅一种类型的不包含外源标记或链终止基团的核苷酸进行接触。

[0111] 在一些实施方案中,下游分析的方法包括平行地测序多个扩增子的至少一些。任选地,平行地测序位于不同的阵列位点的多个模板/扩增的模板/延伸的第一引物。

[0112] 在一些实施方案中,测序可包括将测序引物结合至至少两个不同的扩增子或至少两个不同的基本上单克隆的群的核酸。

[0113] 在一些实施方案中,测序可包括使用聚合酶将核苷酸并入测序引物。任选地,并入包括形成至少一种核苷酸并入副产物。

[0114] 任选地,待被测序的核酸位于位点。位点可包括反应室或孔。位点可以是相似或相同位点的阵列的部分。阵列可包含在表面(例如流动池、电子装置、晶体管芯片、反应室、槽等的表面)上的位点二维阵列或基质或其它媒介物(例如固体、半固体、液体、流体等)内的位点三维阵列。

[0115] 在一些实施方案中,位点可操作地偶联至传感器。方法可包括使用传感器检测核苷酸并入。任选地,位点和传感器位于偶联至传感器的位点的阵列中。

[0116] 在一些实施方案中,位点包含共形地置于可操作地偶联至传感器的孔之内的亲水聚合物基质。

[0117] 任选地,亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

[0118] 任选地,亲水聚合物基质是原位固化聚合物基质。

[0119] 任选地,亲水聚合物基质包括聚丙烯酰胺、其共聚物、其衍生物或其组合。

[0120] 任选地,聚丙烯酰胺缀合于寡核苷酸引物。

[0121] 任选地,孔具有0.1微米至2微米的特征直径。

[0122] 任选地,孔具有0.01微米至10微米的深度。

[0123] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。FET可包括离子敏感性FET(ISFET)。

[0124] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)可包括任选地使用FET检测一种或多种核苷酸并入副产物在阵列位点处的存在。

[0125] 在一些实施方案中,方法可包括任选地使用FET检测在至少一个反应室内发生的pH变化。

[0126] 在一些实施方案中,公开的方法包括将核苷酸引入位点;和检测因核苷酸至测序引物的并入而引起的来自传感器的输出信号。输出信号任选地基于FET的临阈电压。在一些实施方案中,FET包括偶联至位点的浮动栅导体。

[0127] 在一些实施方案中,FET包括包含彼此电偶联并被电介质层分离的多个导体的浮动栅结构,并且浮动栅导体是多个导体中最上面的导体。

[0128] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含定义位点的底面的上表面。

[0129] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含导电材料,并且浮动栅导体的上表面包含导

电材料的氧化物。

[0130] 在一些实施方案中,浮动栅导体通过传感材料偶联至至少一个反应室。

[0131] 在一些实施方案中,传感材料包含金属-氧化物。

[0132] 在一些实施方案中,传感材料对氢离子敏感。

[0133] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含重组酶。重组酶可包括任何适当的可促进多核苷酸分子之间的重组的试剂。重组酶可以是催化同源重组的酶。例如,扩增反应混合物可包含重组酶,所述重组酶包含或衍生自细菌、真核生物或病毒(例如噬菌体)的重组酶。

[0134] 在一些实施方案中,扩增反应混合物包含可结合引物和多核苷酸模板以形成复合物或可催化多核苷酸模板的链侵入以形成D-环结构的酶。在一些实施方案中,扩增反应混合物包含一个或多个选自UvsX、RecA和Rad51的蛋白。

[0135] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含重组酶辅助蛋白例如UvsY。

[0136] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含单链结合蛋白(SSBP)。

[0137] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含聚合酶。聚合酶任选地具有或缺乏外切核酸酶活性。在一些实施方案中,聚合酶具有5'至3'外切核酸酶活性、3'至5'外切核酸酶活性或具有上述两种活性。任选地,聚合酶缺乏这样的外切核酸酶活性的任一种或多种。

[0138] 在一些实施方案中,聚合酶具有链置换活性。

[0139] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含一个或多个固体或半固体支持物。支持物的至少一个可包含一个或多个包含第一引物序列的第一引物。在一些实施方案中,反应混合物中的至少一个多核苷酸包含第一引物结合序列。第一引物结合序列可与第一引物序列是基本上相同的或基本上互补的。在一些实施方案中,支持物的至少一个、一些或所有支持物包括彼此基本上相同的多个第一引物。在一些实施方案中,支持物上的所有引物彼此是基本上相同的,或所有引物包含基本上相同的第一引物序列。

[0140] 在一些实施方案中,至少一个支持物包含两个或更多个不同的连接至其的引物。例如,至少一个支持物可包含至少一个第一引物和至少一个第二引物。

[0141] 在一些实施方案中,反应混合物的水相包含多个支持物,其中多个支持物的至少两个支持物连接至包含第一引物序列的引物。在一些实施方案中,反应混合物包含两个或更多个不同的具有第一引物结合序列的多核苷酸模板。

[0142] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含扩散限制剂。扩散限制剂可以有效地阻止或减缓多核苷酸模板的一个或多个和/或扩增反应产物的一个或多个通过扩增反应混合物扩散的任何试剂。

[0143] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含筛分剂。筛分剂可以有效地筛分存在于扩增反应混合物中的一种或多种多核苷酸(例如扩增反应产物和/或多核苷酸模板)的任何试剂。在一些实施方案中,筛分剂限制或减缓多核苷酸扩增产物通过反应混合物迁移。

[0144] 在一些实施方案中,扩增反应混合物可包含拥挤试剂。

[0145] 在一些实施方案中,扩增反应混合物包含拥挤试剂和筛分剂。

[0146] 在一些实施方案中,公开的方法包括通过如下方法克隆地扩增两个或更多个多核苷酸模板的至少两个:(a)形成包含单一连续液相的扩增反应混合物,所述液相包含两个或更多个多核苷酸模板、一个或多个表面或支持物和扩增组分;和(b)在一个或多个支持物上

克隆地扩增至少两个所述多核苷酸模板。任选地,克隆地扩增包括形成至少两个不同的基本上单克隆的扩增子。在一些实施方案中,克隆地扩增包括使扩增反应混合物经历扩增条件。在一些实施方案中,两个或更多个所述扩增子各自连接至表面或支持物。例如,扩增反应混合物可包含单个支持物或表面,以便每一个多核苷酸模板连接至支持物或表面的给定区域。

[0147] 在一些实施方案中,可在单个反应容器中进行用于核酸扩增的方法。

[0148] 在一些实施方案中,可在单一连续液相中进行用于核酸扩增的方法,所述单一连续液相不提供在单个反应容器中发生的多个核酸扩增反应的划分。在一些实施方案中,可在提供划分的油包水型乳剂(微反应容器)中进行用于核酸扩增的方法。

[0149] 在一些实施方案中,可进行用于核酸扩增的方法以将多个多核苷酸连接至支持物或表面。例如,方法可包括形成包含至少一个表面的反应混合物,和使反应混合物经历扩增条件。在一些实施方案中,表面包括小珠的表面、槽或管的平面表面或内壁。

[0150] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括:(a)形成包含单一连续液相的扩增反应混合物,所述液相包含多个小珠、多个不同的多核苷酸以及重组酶;(b)使扩增反应混合物经历等温扩增条件,从而产生多个连接至附着至其的基本上单克隆的核酸群的小珠。

[0151] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于直接在阵列的表面上进行核酸模板的基于阵列的扩增,从而导致任何其个体特征包括扩增子(包含基本上单克隆的扩增产物群)的阵列的形成的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)。这些实施方案与本文中描述的其它实施方案形成了对比,在所述其它实施方案中,核酸模板任选地在溶液中于不连续的支持物(例如小珠)上被扩增,随后被分配至阵列中。

[0152] 在一些实施方案中,提供了用于基于阵列的扩增的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)。在一些实施方案中,将不同的多核苷酸模板分配至位点阵列中并随后进行原位扩增。随后使用适当的下游程序分析所产生的扩增子阵列。

[0153] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括:a)通过将单个多核苷酸引入彼此流体连通的至少两个位点来将至少两个不同的多核苷酸分配至位点;和(b)通过扩增所述至少两个位点内的多核苷酸来形成至少两个基本上单克隆的核酸群。位点可任选地包括表面、孔、沟、流动池、反应室或槽。在一些实施方案中,在不使位点彼此封闭的情况下进行扩增。例如,至少两个位点可在扩增期间彼此保持流体连通。

[0154] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括:a)通过将单个多核苷酸引入至少两个位点来将至少两个不同的多核苷酸分配至位点;和(b)通过扩增所述至少两个位点内的多核苷酸来形成至少两个基本上单克隆的核酸群。位点可任选地包括表面、孔、沟、流动池、反应室或槽。在一些实施方案中,在不使位点彼此封闭的情况下进行扩增。例如,至少两个位点可在扩增期间彼此保持流体连通。

[0155] 在一些实施方案中,位点包括反应室,并且用于核酸扩增的方法包括:a)通过将单个多核苷酸引入彼此流体连通的至少两个反应室来将至少两个多核苷酸模板分配至反应室;和(b)通过扩增所述至少两个反应室内的多核苷酸模板来形成至少两个基本上单克隆的核酸群。在一些实施方案中,在不使反应室彼此封闭的情况下进行扩增。例如,至少两个反应室可在扩增期间彼此保持流体连通。

[0156] 在一些实施方案中,位点包括反应室,并且用于核酸扩增的方法包括:a)通过将单

个多核苷酸引入彼此流体连通的至少两个反应室来将至少两个不同的多核苷酸分配至反应室；和 (b) 通过扩增所述至少两个反应室内的多核苷酸来形成至少两个基本上单克隆的核酸群。在一些实施方案中，在不使反应室彼此封闭的情况下进行扩增。例如，至少两个反应室可在扩增期间彼此保持流体连通。

[0157] 在一些实施方案中，本公开内容的任意和所有方法的扩增步骤可在扩增期间不完全变性多核苷酸的情况下进行。例如，公开的方法可包括通过等温扩增来扩增至少两个不同的多核苷酸。扩增可包括在基本上等温的条件下扩增至少两个不同的多核苷酸。任选地，在扩增期间不将多核苷酸与化学变性剂接触的情况下进行扩增。

[0158] 任选地，扩增包括在基本上等温条件下进行至少一个扩增回合。

[0159] 任选地，扩增包括在基本上等温条件下进行至少两个连续的核酸合成循环。

[0160] 在一些实施方案中，扩增包括重组酶聚合酶扩增 (RPA)。例如，扩增可包括进行至少一个 RPA 回合。

[0161] 在一些实施方案中，扩增包括模板行走。例如，扩增可包括进行至少一个模板行走回合。

[0162] 在一些实施方案中，扩增任选地包括在位点或反应室内进行两个不同的扩增回合。例如，扩增可包括以回合的任何顺序或组合在位点或反应室内进行至少一个 RPA 回合并在位点或反应室内进行至少一个模板行走回合。在一些实施方案中，任一个或多个扩增回合中的至少两个连续循环在基本上等温条件下进行。在一些实施方案中，扩增回合的至少一个在基本上等温条件下进行。

[0163] 在一些实施方案中，扩增包括将待被扩增的多核苷酸与反应混合物接触。接触可任选地在分配之前或之后进行；将理解本公开内容包括其中将多核苷酸与反应混合物的各个组分 (或组分的组合) 在不同的时间连续地进行接触的实施方案，以及其中将反应混合物的任一个或一些组分与至少两个不同的多核苷酸在分配前接触而将反应混合物的其余组分与至少两个不同的多核苷酸在分配后接触的实施方案。

[0164] 被分配的至少两个多核苷酸可任选地在其各自的反应室内作用于核酸合成的模板。在一些实施方案中，至少两个多核苷酸包含不同的序列。在一些实施方案中，多核苷酸在分配之前是双链或作为单链的。在一些实施方案中，多核苷酸是线性的、环状的或两者的组合。在典型的实施方案中，多核苷酸是至少部分双链的 (或以单链形式分配并随后在分配之后在位点或反应室内使其为至少部分双链的)。可在扩增之前使多核苷酸为双链 (特别地在其中扩增包括 RPA 或模板行走的实施方案中)。

[0165] 在一些实施方案中，待被扩增的至少两个不同的多核苷酸模板各自包含引物结合部位，并且扩增包括将引物结合至引物结合部位以形成引物-模板双链。

[0166] 任选地，扩增包括延伸引物-模板双链的引物。延伸任选地发生在阵列的位点或反应室处或之内。任选地，延伸引物包括将引物与聚合酶和一种或多种类型的核苷酸在核苷酸并入条件下进行接触。在一些实施方案中，一种或多种类型的核苷酸不包含外源标记，特别地光学上可检测的标记，例如荧光部分或染料。任选地，反应混合物包含核苷酸，其是天然存在的核苷酸。任选地，核苷酸不包含终止核酸合成的基团 (例如双脱氧基团、可逆终止子等)。通常地，延伸引物以模板依赖性方式发生。

[0167] 任选地，至少两个不同的多核苷酸 (即待被扩增的模板) 各自包含与第一引物的至

少某一部分基本上相同或基本上互补的第一序列(被称作“第一引物结合部位”)。

[0168] 在一些实施方案中,反应混合物包括包含第一引物序列的第一引物。第一引物任选地包含可延伸的末端(例如3' 含OH的末端)。可任选地将第一引物连接至化合物(例如“阻力标签”)或连接至支持物(例如小珠或位点或反应室的表面)。

[0169] 任选地,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括通过使用聚合酶将一个或多个核苷酸并入第一引物-模板双链的第一引物来延伸第一引物,从而形成延伸的第一引物。

[0170] 在一些实施方案中,至少两个不同的多核苷酸包含与第二引物的至少某一部分基本上相同或基本上互补的第二序列(被称作“第二引物结合部位”)。

[0171] 在一些实施方案中,延伸第一引物导致第一延伸的引物的形成。第一延伸的引物可包含模板的反向链序列的一些或全部。任选地,第一延伸的引物包含第二引物结合部位。

[0172] 任选地,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括通过任何适当的方法(例如连接或杂交)将第二引物结合至第一延伸的引物的第二引物结合部位。

[0173] 在一些实施方案中,第二引物包含第二引物序列。第二引物任选地包含可延伸的末端(例如3' 含OH的末端)。可任选地将第二引物连接至化合物(例如“阻力标签”)或连接至支持物(例如小珠或位点或反应室的表面)。

[0174] 在一些实施方案中,方法包括通过使用聚合酶将一个或多个核苷酸并入第二引物-模板双链的第二引物来延伸第二引物,从而形成延伸的第二引物。

[0175] 在一些实施方案中,延伸第二引物导致第二延伸的引物的形成。第二延伸的引物可包含模板的正向链序列的一些或全部。任选地,第二延伸的引物包含第一引物结合部位。

[0176] 在一些实施方案中,在不使双链核酸模板在扩增期间经历极端变性条件的情况下进行方法。例如,可在不使核酸模板在扩增期间经历大于或等于模板的 $T_m$ 的温度的情况下进行方法。在一些实施方案中,可在不使模板在扩增期间与化学变性剂例如NaOH、尿素、胍盐等接触的情况下进行方法。在一些实施方案中,扩增包括等温扩增。

[0177] 在一些实施方案中,在不使核酸模板在至少两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环期间经历极端变性条件的情况下进行方法。例如,方法可包括两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成步骤而不使核酸模板与化学变性剂接触。在一些实施方案中,方法可包括进行两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环而不使核酸模板经历高于模板或模板群的实际或经计算的 $T_m$ (或模板或模板群的实际或经计算的平均 $T_m$ )之下25、20、15、10、5、2或1℃的温度。两个、三个、四个或多于四个的连续的核酸合成循环可包括介入其间的部分变性和/或引物延伸步骤。

[0178] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括将一个或多个延伸的引物链连接至支持物。可任选地在扩增期间或可选择地在扩增完成后进行连接。在一些实施方案中,支持物包含多个第二引物,并且方法可包括将至少一个延伸的第一引物链与支持物的第二引物杂交。

[0179] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括将一个或多个延伸的第二引物链连接至支持物。在一些实施方案中,支持物连接至第一引物。例如,支持物可包含多个第一引物,并且方法可包括将至少一个延伸的第二引物与支持物的第一引物杂交,从而将延伸的第二引物连接至支持物。例如,第一引物可杂交至延伸的第二

引物中的第一引物结合部位。支持物可包括例如任何阵列的表面。

[0180] 在一些实施方案中,支持物连接至第二引物。例如,支持物可包含多个第二引物,并且方法可包括将至少一个延伸的第一引物与支持物的第二引物杂交,从而将延伸的第一引物连接至支持物。例如,第一引物可杂交至延伸的第一引物中的第二引物结合部位。

[0181] 在一些实施方案中,支持物包含至少一个第一引物和至少一个第二引物,并且公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括将延伸的第一引物和延伸的第二引物连接至支持物。

[0182] 任选地,支持物连接至靶特异性引物。靶特异性引物任选地杂交(或能够杂交)至反应混合物内模板的第一亚组,但不能结合至反应混合物内模板的第二亚组。

[0183] 任选地,支持物连接至通用引物。通用引物任选地杂交(或能够杂交)至反应混合物内的所有或基本上所有的模板。

[0184] 任选地,第一靶特异性引物基本上互补于第一靶核酸序列并且第二靶特异性引物基本上互补于第二靶核酸序列,并且其中第一和第二靶核酸序列是不同的。

[0185] 在一些实施方案中,公开的方法包括任选地在反应混合物的相同连续相内和在表面(例如阵列内)的不同位点处,在第一支持物上通过扩增第一模板形成第一扩增子,和在第二支持物上通过扩增第二模板形成第二扩增子。第一扩增子任选地连接或附着至第一支持物,并且第二扩增子任选地连接或附着至第二支持物。

[0186] 公开的方法任选地包括在位点阵列的两个或更多个不同的位点通过克隆地扩增两个或更多个多核苷酸模板来产生两个或更多个单克隆或基本上单克隆的扩增子,以便将至少两个位点形成为各自包含基本上单克隆的核酸群。两个或更多个多核苷酸模板任选地置于或位于不同的位点并随后在与阵列接触的扩增反应混合物的连续液相内被克隆地扩增。扩增反应混合物的连续液相可包括连续水相。

[0187] 在一些实施方案中,扩增包括产生至少两个基本上单克隆的扩增的多核苷酸群,所述多核苷酸群的每一个通过单个多核苷酸模板的扩增来形成。

[0188] 任选地,克隆地扩增包括至少一个RPA回合。

[0189] 任选地,克隆地扩增包括至少一个模板行走回合。

[0190] 在一些实施方案中,扩增任选地包括形成包含连续液相的扩增反应混合物。在一些实施方案中,连续液相是单连续水相。液相可包含两个或更多个多核苷酸模板,所述多核苷酸模板可任选地彼此不同。例如,两个或更多个多核苷酸模板可包含至少一个与扩增反应混合物内的至少一个其它的多核苷酸模板基本上不相同或基本上不互补的核酸序列。

[0191] 在一些实施方案中,扩增任选地包括形成包含具有两个或更多个多核苷酸模板的单连续水相的扩增反应混合物。扩增任选地包括通过克隆地扩增单一水相内的两个或更多个多核苷酸模板来形成两个或更多个基本上单克隆的核酸群。任选地,克隆地扩增包括至少一个RPA回合。任选地,克隆地扩增包括至少一个模板行走回合。

[0192] 在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸模板在扩增前置于或位于不同的位点。例如,扩增的模板或延伸的第一引物可置于、位于或局限于阵列的不同位点。

[0193] 在一些实施方案中,扩增导致在表面的至少两个不同的位点中形成至少两个基本上单克隆的核酸群(例如扩增子),随后可使用适当的程序原位分析所述核酸群。

[0194] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于制备表面的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)。任选地,表面包括包含第一位点和第二位点的多个位点。

[0195] 在一些实施方案中,方法包括在表面上形成核酸阵列,其中所述形成包括将第一核酸连接至第一位点和将第二核酸连接至第二位点。所述连接可任选地通过使用本文中公开的任何方法,包括例如通过将核酸连接至共价地附着至表面的引物来进行。

[0196] 在一些实施方案中,方法包括将至少第一和第二核酸与包含用于核酸合成的试剂的单个反应混合物接触。反应混合物可任选地包含任一种或多种本文中描述的组分。在一些实施方案中,反应混合物包含进行RPA所需的所有组分。在一些实施方案中,反应混合物包含进行模板行走的所有组分。

[0197] 在一些实施方案中,方法包括通过使用反应混合物中的用于核酸合成的试剂复制第一或第二核酸来在第一位点形成第一扩增子和在第二位点形成第二扩增子。复制可包括引物延伸。复制可包括一个或更多个RPA循环。复制可包括一个或更多个模板行走循环。

[0198] 在一些实施方案中,复制包括至少一个RPA循环。

[0199] 在一些实施方案中,复制包括至少一个模板行走循环。

[0200] 在一些实施方案中,复制包括至少一个RPA循环和至少一个模板行走循环。

[0201] 在一些实施方案中,复制包括至少一个RPA回合。

[0202] 在一些实施方案中,复制包括至少一个模板行走回合。

[0203] 在一些实施方案中,复制包括至少一个RPA回合和至少一个模板行走回合。

[0204] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于制备表面的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒),所述方法包括:(a)提供具有包含第一位点和第二位点的多个位点的表面;(b)在表面上形成核酸阵列,其中所述形成包括将第一核酸连接至第一位点和将第二核酸连接至第二位点;(c);和(d)通过使用反应混合物中的用于核酸合成的试剂复制第一或第二核酸来在第一位点形成第一扩增子和在第二位点形成第二扩增子。

[0205] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于制备表面的方法,所述方法包括:提供具有包含第一位点和第二位点的多个位点的表面;在表面上形成核酸阵列,其中所述形成包括将第一核酸连接至第一位点和将第二核酸连接至第二位点;将至少第一和第二核酸与包含用于核酸合成的试剂的单个反应混合物接触;和通过使用反应混合物中的用于核酸合成的试剂扩增第一或第二核酸来在第一位点形成第一基本上单克隆的扩增子和在第二位点形成第二基本上单克隆的扩增子。任选地,第一和第二位点在扩增期间保持流体连通。任选地,在扩增期间不完全变性多核苷酸的情况下进行扩增。例如,公开的方法可包括通过等温扩增来扩增至少两个不同的多核苷酸。扩增可包括在基本上等温的条件下扩增至少两个不同的多核苷酸。任选地,在扩增期间不将多核苷酸与化学变性剂接触的情况下进行扩增。

[0206] 在一些实施方案中,多个位点的至少一个位点包括反应孔、槽、沟或室。

[0207] 在一些实施方案中,多个位点的至少一个位点连接至传感器。

[0208] 在一些实施方案中,传感器能够检测在至少一个位点处或附近发生的核苷酸并入。

[0209] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。

[0210] 在一些实施方案中,至少第一位点或第二位点或第一和第二位点包含连接至表面

的引物。

[0211] 在一些实施方案中,多个位点的至少一个位点包含共形地置于可操作地偶联至传感器的孔之内的亲水聚合物基质。

[0212] 任选地,亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

[0213] 任选地,亲水聚合物基质是原位固化聚合物基质。

[0214] 任选地,亲水聚合物基质包括聚丙烯酰胺、其共聚物、其衍生物或其组合。

[0215] 任选地,聚丙烯酰胺缀合于寡核苷酸引物。

[0216] 任选地,孔具有0.1微米至2微米的特征直径。

[0217] 任选地,孔具有0.01微米至10微米的深度。

[0218] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。FET可包括离子敏感性FET(ISFET)、chemFET、bioFET等。

[0219] 在一些实施方案中,FET能够检测核苷酸并入副产物在至少一个位点的存在。

[0220] 在一些实施方案中,FET能够检测选自氢离子、焦磷酸盐、羟离子等的化学部分。

[0221] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)可包括任选地使用FET检测一种或多种核苷酸并入副产物在阵列位点处的存在。

[0222] 在一些实施方案中,方法可包括任选地使用FET检测在位点处或在至少一个反应室内发生的pH变化。

[0223] 在一些实施方案中,公开的方法包括将核苷酸引入多个位点的至少一个位点;和检测因核苷酸至测序引物的并入而引起的来自传感器的输出信号。输出信号任选地基于FET的临阈电压。在一些实施方案中,FET包括偶联至位点的浮动栅导体。

[0224] 在一些实施方案中,FET包括包含彼此电偶联并被电介质层分离的多个导体的浮动栅结构,并且浮动栅导体是多个导体中最上面的导体。

[0225] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含定义位点的底面的上表面。

[0226] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含导电材料,并且浮动栅导体的上表面包含导电材料的氧化物。

[0227] 在一些实施方案中,浮动栅导体通过传感材料偶联至至少一个反应室。

[0228] 在一些实施方案中,传感材料包含金属-氧化物。

[0229] 在一些实施方案中,传感材料对氢离子敏感。

[0230] 在一些实施方案中,反应混合物包含进行RPA所需的所有组分。

[0231] 在一些实施方案中,反应混合物包含进行模板行走所需的所有组分。

[0232] 在一些实施方案中,反应混合物可包含一个或多个固体或半固体支持物。支持物的至少一个可包括一个或多个包含第一引物序列的第一引物。在一些实施方案中,支持物的至少一个包含两个或更多个不同的连接至其的引物。例如,至少一个支持物可包含至少一个第一引物和至少一个第二引物。

[0233] 或者,在一些实施方案中,反应混合物不包含任何支持物。在一些实施方案中,直接在阵列的位点或反应室的表面上扩增至少两个不同的多核苷酸模板。

[0234] 在一些实施方案中,反应混合物可包含重组酶。重组酶可包括任何适当的可促进多核苷酸分子之间的重组的试剂。重组酶可以是催化同源重组的酶。例如,反应混合物可包含重组酶,所述重组酶包括或衍生自细菌、真核生物或病毒(例如噬菌体)的重组酶。

[0235] 任选地,反应混合物包含未进行外源标记的核苷酸。例如,核苷酸可以是天然存在的核苷酸,或不包含荧光部分、染料或其它外源的光学上可检测的标记的合成类似物。任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。

[0236] 任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。

[0237] 在一些实施方案中,反应混合物包含可结合引物和多核苷酸模板以形成复合物或可催化多核苷酸模板的链侵入以形成D-环结构的酶。在一些实施方案中,反应混合物包含一个或多个选自UvsX、RecA和Rad51的蛋白。

[0238] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于制备表面的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒),所述方法包括:(a)提供具有多个位点的表面,其中各个位点连接至核酸引物;(c)将表面与多个多核苷酸模板接触并将至少一个模板连接至表面;和在表面上扩增至少一个模板,从而形成至少一个位于表面上的位点处的基本上单克隆的扩增的靶多核苷酸序列的群。

[0239] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法,包括:(1)提供具有第一位点和第二位点的表面,第一位点可操作地偶联至第一传感器并包含第一模板;第二位点可操作地偶联至第二传感器并包含第二模板;(2)将反应混合物分配至第一和第二位点;和(3)通过在第一位点扩增第一模板形成第一扩增子;和通过在第二位点扩增第二模板形成第二扩增子。

[0240] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个RPA循环。

[0241] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个模板行走循环。

[0242] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个RPA循环和至少一个模板行走循环。

[0243] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个RPA回合。

[0244] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个模板行走回合。

[0245] 在一些实施方案中,扩增包括至少一个RPA回合和至少一个模板行走回合。

[0246] 在一些实施方案中,本文中公开的任一些或所有方法可导致多个扩增子的产生,所述扩增子的至少一些包含克隆地扩增的核酸群。通过本公开内容的方法产生的克隆地扩增的群可用于多种目的。在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)任选地还包括克隆地扩增的群(扩增子)的分析和/或处理。

[0247] 在一些实施方案中,可使根据本公开内容产生的扩增子经历下游分析方法例如测序。

[0248] 在一些实施方案中,可在分配的位点处进一步分析(例如测序)扩增的核酸而无需将扩增的产物回收并移至不同的位点或表面以用于分析(例如测序)。

[0249] 在一些实施方案中,下游分析的方法包括平行地测序多个扩增子的至少一部分。任选地,平行地测序位于不同的阵列位点的多个模板/扩增的模板/延伸的第一引物。

[0250] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还可包括测序扩增的模板或测序延伸的引物(例如延伸的第一引物或延伸的第二引物)。测序可包括本领域中已知的任何适当的测序方法。在一些实施方案中,测序包括通过合成的测序或通过电子检测的测序(例如纳米孔测序)。在一些实施方案中,测序包括通过聚合酶介导的核苷酸并入来

延伸模板或扩增的模板或延伸与模板或扩增的模板杂交的测序引物。在一些实施方案中，测序包括通过将模板或延伸的引物与测序引物、聚合酶和至少一种类型的核苷酸接触来对连接至支持物的模板或扩增的模板进行测序。在一些实施方案中，测序包括将模板或扩增的模板或延伸的引物与测序引物、聚合酶以及仅一种类型的不包含外源标记或链终止基团的核苷酸进行接触。

[0251] 例如，在一些实施方案中，扩增之后原位测序扩增的产物。被测序的扩增的产物可包括包含基本上单克隆的核酸群的扩增子。任选地，平行地测序位于阵列的不同位点的单克隆的核酸群(扩增子)。

[0252] 在一些实施方案中，测序可包括将测序引物结合至至少两个不同的扩增子或至少两个不同的基本上单克隆的群的核酸。

[0253] 在一些实施方案中，测序可包括使用聚合酶将核苷酸并入测序引物。任选地，并入包括形成至少一种核苷酸并入副产物。

[0254] 任选地，待被测序的核酸位于位点。位点可包括反应室或孔。位点可以是相似或相同位点的阵列的部分。阵列可包含在表面(例如流动池、电子装置、晶体管芯片、反应室、槽等的表面)上的位点二维阵列或基质或其它媒介物(例如固体、半固体、液体、流体等)内的位点三维阵列。

[0255] 在一些实施方案中，位点可操作地偶联至传感器。方法可包括使用传感器检测核苷酸并入。任选地，位点和传感器位于偶联至传感器的位点的阵列中。

[0256] 在一些实施方案中，位点包含共形地置于可操作地偶联至传感器的孔之内的亲水聚合物基质。

[0257] 任选地，亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

[0258] 任选地，亲水聚合物基质是原位固化聚合物基质。

[0259] 任选地，亲水聚合物基质包括聚丙烯酰胺、其共聚物、其衍生物或其组合。

[0260] 任选地，聚丙烯酰胺缀合于寡核苷酸引物。

[0261] 任选地，孔具有0.1微米至2微米的特征直径。

[0262] 任选地，孔具有0.01微米至10微米的深度。

[0263] 在一些实施方案中，传感器包括场效应晶体管(FET)。FET可包括离子敏感性FET(ISFET)。

[0264] 在一些实施方案中，方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)可包括任选地使用FET检测一种或多种核苷酸并入副产物在阵列位点处的存在。

[0265] 在一些实施方案中，方法可包括任选地使用FET检测在至少一个反应室内发生的pH变化。

[0266] 在一些实施方案中，公开的方法包括将核苷酸引入位点；和检测因核苷酸至测序引物的并入而引起的来自传感器的输出信号。输出信号任选地基于FET的临阈电压。在一些实施方案中，FET包括偶联至位点的浮动栅导体。

[0267] 在一些实施方案中，FET包括包含彼此电偶联并被电介质层分离的多个导体的浮动栅结构，并且浮动栅导体是多个导体中最上面的导体。

[0268] 在一些实施方案中，浮动栅导体包含定义位点的底面的上表面。

[0269] 在一些实施方案中，浮动栅导体包含导电材料，并且浮动栅导体的上表面包含导

电材料的氧化物。

[0270] 在一些实施方案中,浮动栅导体通过传感材料偶联至至少一个反应室。

[0271] 在一些实施方案中,传感材料包含金属-氧化物。

[0272] 在一些实施方案中,传感材料对氢离子敏感。

[0273] 在一些实施方案中,反应混合物包含进行RPA所需的所有组分。

[0274] 在一些实施方案中,反应混合物包含进行模板行走所需的所有组分。

[0275] 在一些实施方案中,反应混合物可包含一个或多个固体或半固体支持物。支持物的至少一个可包括一个或多个包含第一引物序列的第一引物。在一些实施方案中,支持物的至少一个包含两个或更多个不同的连接至其的引物。例如,至少一个支持物可包含至少一个第一引物和至少一个第二引物。

[0276] 或者,在一些实施方案中,反应混合物不包含任何支持物。在一些实施方案中,直接在阵列的位点或反应室的表面上扩增至少两个不同的多核苷酸模板。

[0277] 在一些实施方案中,反应混合物可包含重组酶。重组酶可包括任何适当的可促进多核苷酸分子之间的重组的试剂。重组酶可以是催化同源重组的酶。例如,反应混合物可包含重组酶,所述重组酶包括或衍生自细菌、真核生物或病毒(例如噬菌体)的重组酶。

[0278] 任选地,反应混合物包含未进行外源标记的核苷酸。例如,核苷酸可以是天然存在的核苷酸,或不包含荧光部分、染料或其它外源的光学上可检测的标记的合成类似物。任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。

[0279] 任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。

[0280] 在一些实施方案中,反应混合物包含可结合引物和多核苷酸模板以形成复合物或可催化多核苷酸模板的链侵入以形成D-环结构的酶。在一些实施方案中,反应混合物包含一个或多个选自UvsX、RecA和Rad51的蛋白。

[0281] 在一些实施方案中,反应混合物可包含重组酶辅助蛋白例如UvsY。

[0282] 在一些实施方案中,反应混合物可包含单链结合蛋白(SSBP)。

[0283] 在一些实施方案中,反应混合物可包含聚合酶。聚合酶任选地具有或缺乏外切核酸酶活性。在一些实施方案中,聚合酶具有5'至3'外切核酸酶活性、3'至5'外切核酸酶活性或具有上述两种活性。任选地,聚合酶缺乏这样的外切核酸酶活性的任一种或多种。

[0284] 在一些实施方案中,聚合酶具有链置换活性。

[0285] 在一些实施方案中,反应混合物可包含扩散限制剂。扩散限制剂可以有效地阻止或减缓多核苷酸模板的一个或多个和/或扩增反应产物的一个或多个通过反应混合物扩散的任何试剂。

[0286] 在一些实施方案中,反应混合物可包含筛分剂。筛分剂可以有效地筛分存在于反应混合物中的一种或多种多核苷酸(例如扩增反应产物和/或多核苷酸模板)的任何试剂。在一些实施方案中,筛分剂限制或减缓多核苷酸扩增产物通过反应混合物迁移。

[0287] 在一些实施方案中,反应混合物可包含拥挤试剂。

[0288] 在一些实施方案中,反应混合物包含拥挤试剂和筛分剂。

[0289] 在一些实施方案中,公开的方法包括将至少两个多核苷酸的每一个与重组酶、连

接有多个第一寡核苷酸引物的支持物(第一寡核苷酸引物至少部分互补于多核苷酸的至少某一部分)、聚合酶和多个核苷酸以任何顺序和以任何组合进行接触。

[0290] 在一些实施方案中,至少两个不同的多核苷酸包括包含第一引物结合部位的正向链,并且在至少两个位点内(或在至少两个反应室内)的扩增任选地包括在位点或反应室内将第一引物与第一引物结合部位结合以形成第一引物-模板双链。任选地,第一引物至少两个不同的多核苷酸模板的结合由重组酶介导。例如,扩增可包括形成包含重组酶和第一引物的核蛋白复合物。任选地,第一引物连接至位点或反应室的表面。在一些实施方案中,在位点或反应室内的扩增包括:形成第一核蛋白复合物(或“第一核蛋白丝”)。扩增任选地还包括将位点或反应室中的多核苷酸的至少一个与第一核蛋白丝、聚合酶和多个核苷酸以任何顺序或组合进行接触。

[0291] 任选地,在扩增之前将各自包含多个第一引物的分散的支持物(例如小珠)各自分配至反应室或位点中,并且扩增包括在位点或反应室内的支持物上扩增至少两个不同的多核苷酸的一个。在一些实施方案中,可在扩增之前重复分配和/或接触步骤的任一个,任选地以增加产生单克隆产物的位点或反应室的数量和/或产率。

[0292] 任选地,扩增包括在反应室内使用聚合酶延伸第一引物-模板双链的第一引物,从而形成延伸的第一引物。任选地,延伸第一引物从正向链取代反向链。延伸的第一引物任选地包含第二引物结合部位。

[0293] 任选地,扩增包括反向合成步骤,所述步骤包括将第二引物结合至延伸的第一引物的第二引物结合部位,并延伸第二引物以形成第二引物-模板双链。任选地,第二引物至多核苷酸模板的结合由重组酶介导。例如,扩增可包括形成包含重组酶和第二引物的核蛋白复合物。任选地,第二引物连接至位点或反应室的表面。在一些实施方案中,在位点或反应室内的扩增包括:形成第二核蛋白复合物(或“第二核蛋白丝”)。扩增任选地还包括将位点或反应室中的多核苷酸模板的至少一个或延伸的第一引物的至少一个与第二核蛋白丝、聚合酶和多个核苷酸以任何顺序或组合进行接触。

[0294] 任选地,扩增包括使用聚合酶延伸第一引物-模板双链、第二引物-模板双链或延伸上述两者。聚合酶可具有链置换活性。

[0295] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)可包括将至少一个基本上单克隆的群置于、定位于或局限于位点。位点可形成位点阵列的部分。

[0296] 任选地,位点的至少一个包括反应室、支持物、颗粒、微粒、球体、小珠、滤器、流动池、孔、沟、槽容器(channel reservoir)、凝胶或管的内壁。

[0297] 在一些实施方案中,至少一个位点包含共形地置于可操作地偶联至传感器的孔之内的亲水聚合物基质。

[0298] 任选地,亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

[0299] 任选地,亲水聚合物基质是原位固化聚合物基质。

[0300] 任选地,亲水聚合物基质包括聚丙烯酰胺、其共聚物、其衍生物或其组合。

[0301] 任选地,聚丙烯酰胺缀合于寡核苷酸引物。

[0302] 任选地,孔具有0.1微米至2微米的特征直径。

[0303] 任选地,孔具有0.01微米至10微米的深度。

[0304] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。FET可包括离子敏感性FET

(ISFET)。

[0305] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)可包括任选地使用FET检测一种或多种核苷酸并入副产物在阵列位点处的存在。

[0306] 在一些实施方案中,方法可包括任选地使用FET检测在至少一个反应室内发生的pH变化。

[0307] 在一些实施方案中,公开的方法包括将核苷酸引入位点;和检测因核苷酸至测序引物的并入而引起的来自传感器的输出信号。输出信号任选地基于FET的临阈电压。在一些实施方案中,FET包括偶联至位点的浮动栅导体。

[0308] 在一些实施方案中,FET包括包含彼此电偶联并被电介质层分离的多个导体的浮动栅结构,并且浮动栅导体是多个导体中最上面的导体。

[0309] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含定义位点的底面的上表面。

[0310] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含导电材料,并且浮动栅导体的上表面包含导电材料的氧化物。

[0311] 在一些实施方案中,浮动栅导体通过传感材料偶联至至少一个反应室。

[0312] 在一些实施方案中,传感材料包含金属-氧化物。

[0313] 在一些实施方案中,传感材料对氢离子敏感。

[0314] 任选地,多个不同的多核苷酸模板(或扩增的多核苷酸)包含至少一个含有可选择性切割的部分的核酸。

[0315] 任选地,可选择性切割的部分包括尿嘧啶。

[0316] 任选地,用于核酸扩增的方法还包括用切割剂切割可切割的部分。

[0317] 任选地,切割可在扩增之前例如在形成反应混合物之前进行。

[0318] 任选地,切割可在扩增之后例如在核酸模板被扩增之后进行。

[0319] 任选地,反应混合物包含至少一个含有可切割部分的引物。

[0320] 任选地,用于核酸扩增的方法还包括用切割剂切割可切割的部分。

[0321] 任选地,多个不同的多核苷酸包括多个扩增子。

[0322] 任选地,多个不同的多核苷酸包括多个不同的扩增子。

[0323] 在一些实施方案中,可使用2013年3月15日提交的美国临时专利申请号61/792247(通过引用整体并入本文)中公开的任何方法、组合物、系统和试剂盒来进行扩增。

[0324] 在一些实施方案中,可使根据本公开内容产生的扩增子经历下游分析方法例如定量。例如,在一些实施方案中,可检测和任选地定量显示出某些期望特性的扩增子的数量。

[0325] 在一些实施方案中,在公开的方法中可任选地使扩增的核酸经历另外的下游分析步骤。

[0326] 在一些包括在不连续的和分离的支持物上扩增不同的多核苷酸模板的实施方案中,方法可包括测定哪些不连续的支持物(例如小珠)包含扩增子。类似地,在其中模板在扩增之前被分配至阵列的实施方案中,方法可包括测定阵列的哪些位点包含扩增子,并可任选地还包括计数包含扩增子的位点的数量。可任选地使用基于DNA的检测程序例如紫外吸收、用DNA特异性染料染色、**TAQMAN®**测定、qPCR、与荧光探针的杂交等来检测测定支持物或位点上的扩增子的存在。在一些实施方案中,方法可包括测定哪些小珠支持物(或阵列的位点)已得到基本上单克隆的扩增子。例如,可分析小珠支持物(或阵列位点)以确定哪

些支持物或位点可产生可检测的和相干的(即可分析的)序列依赖性信号。

[0327] 在一些实施方案中,公开的方法包括另外的下游分析步骤,所述下游分析步骤提供先前通过常规技术例如数字PCR或数字RPA(如例如在Shen 2011Analytical Chemistry 83:3533-3540;公开的美国专利申请US2012/0264132和2012/0329038(所有文献通过引用整体并入本文)中所描述的)获得的相同类型的信息。数字PCR(dPCR)是常规聚合酶链式反应(PCR)的改进,其可用于直接定量和克隆地扩增核酸(包括DNA、cDNA、甲基化DNA或RNA)。dPCR和传统PCR之间的一个区别在于测量核酸量的方法。PCR和dPCR每个样本都进行一个反应,dPCR还在样本内进行单个反应,然而样本被分开至大量的分区中并且在每个分区中各自地进行反应。所述分开允许核酸量的敏感测量。已证明dPCR可用于研究基因序列中的变化,例如拷贝数变化或点突变。

[0328] 与本方法相比,dPCR通常需要样本在扩增前的分区;相反,本文中公开的几个实施方案提供了不同的模板在反应混合物的单一连续相内的平行扩增而无需分区。在dPCR中,样本通常被分区以便样本内的个体核酸分子定位和局限于许多分离的区域内。通过简单的稀释法划分样本以便每一个部分包含约1个拷贝的DNA模板或更少。通过分离个体DNA模板,该方法有效地富集在原始样本中以非常低的水平存在的DNA分子。样本的分区有利于使用Poisson统计学的分子计数。作为结果,每一个分区将分别地包含“0”或“1”分子,或阴性或阳性反应。虽然在常规PCR中分子的起始拷贝数量与扩增循环的数量成比例,但是dPCR通常不依赖于扩增循环的数量来确定起始的样本量。

[0329] dPCR分析的常规方法通常利用荧光探索和基于光的检测方法来鉴定扩增的产物。这样的方法需要靶分子的充分扩增以产生足够的可被检测的信号,但可导致额外的错误或偏差。

[0330] 在本公开内容的那些包括核酸模板至isFET阵列的孔中的分配和随后的模板在阵列的孔中的扩增的实施方案中,可在扩增之后进行任意的下游分析步骤,其定量包含扩增产物的位点或孔的数量。在一些实施方案中,可检测核酸扩增反应的产物以计数包含扩增的模板的位点或孔的数量。

[0331] 例如,在一些实施方案中,本公开内容通常涉及核酸合成的方法,包括:提供包含第一数量的多核苷酸的样本;和将样本的单个多核苷酸分配至位点阵列的不同位点中。

[0332] 任选地,方法还可包括通过扩增单个多核苷酸在它们各自的位点内形成基本上单克隆的核酸群。

[0333] 任选地,位点在扩增期间保持流体连通。

[0334] 任选地,扩增包括部分变性模板。

[0335] 任选地,扩增包括使模板经历部分变性温度。在一些实施方案中,模板包括包含引物结合部位的低熔点序列,当模板经历部分变性温度时所述序列被赋予单链。

[0336] 任选地,扩增包括部分变性模板。

[0337] 任选地,扩增包括将在两个不同的阵列位点处的至少两个不同的模板与用于核酸扩增的单个反应混合物接触。

[0338] 任选地,反应混合物包含重组酶。

[0339] 任选地,反应混合物包含至少一个包含“阻力标签”的引物。

[0340] 任选地,扩增包括进行至少一个扩增循环,所述扩增循环包括:部分变性模板,使

引物与模板杂交,和以模板依赖性方式延伸引物。任选地,扩增包括等温扩增。在一些实施方案中,在基本上等温的条件下进行扩增。

[0341] 在一些实施方案中,含有一个或多个模板分子的位点的百分率是大于50%且小于100%。

[0342] 在一些实施方案中,公开的方法还可包括检测至少一个位点中因至少一个扩增循环而引起的离子浓度的变化。

[0343] 在一些实施方案中,公开的方法还可包括定量靶核酸的起始量。

[0344] 使用基于离子的传感技术的基于阵列的数字PCR的一些实例可见于例如2012年4月19日提交的美国临时申请号61/635584(通过引用整体并入本文)中。

[0345] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于检测靶核酸的方法,包括:将样本划分至多个样本容量中,其中多于50%的部分包含每样本容量不多于1个的靶核酸分子;使多个样本容量经历用于扩增的条件,其中所述条件包括部分变性条件;检测其中存在靶核酸的样本容量中的离子浓度的变化;计数具有扩增的靶核酸的部分的数量;和确定样本中靶核酸的量。离子浓度的变化可以是离子浓度的升高或可以是离子浓度的降低。在一些实施方案中,方法还可包括将样本与小珠组合。在一些实施方案中,方法可包括将样本载至衬底上,其中所述衬底包括至少一个孔。

[0346] 在一些实施方案中,使靶核酸经历部分变性条件包括将靶核酸分子在它们各自的样本容量中与重组酶和聚合酶在RPA条件下接触。

[0347] 在一些实施方案中,使靶核酸经历部分变性条件包括使靶核酸分子经历部分变性温度。

[0348] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于进行核酸的绝对定量的方法,包括:稀释包含起始量的核酸模板的样本和将样本的核酸模板分配至阵列的多个位点中,其中包含一个或多个核酸模板的位点的百分比大于50%并小于100%;使多个位点经历至少一个扩增循环,其中根据本文中公开的任何扩增方法来进行所述扩增循环;检测多个样本容量的至少一个中因至少一个扩增循环而引起的离子浓度的变化;和定量核酸模板的起始数量。离子浓度的变化可以是离子浓度的升高、离子浓度的降低、pH的变化,可涉及阳离子例如氢离子、阴离子例如焦磷酸盐分子或阳离子和阴离子的检测。

[0349] 在一些实施方案中,本公开内容还通常涉及用于通过使用重组酶介导的链交换将核酸模板群的个体成员连接至多个支持物中的不同支持物或连接至多个位点中的不同位点的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)。这些方法、组合物、系统和试剂盒可在需要个别地获得或者区分不同的扩增子的应用中用于产生适于操作的固定的扩增子群。在一些实施方案中,多个不连续的支持物或阵列中的多个位点各自包含捕获引物。各个模板至各个支持物(或至阵列的各个位点)的固定可通过将模板与支持物或位点在引物(“融合引物”)存在的情况下进行接触来实现。在一些实施方案中,融合引物包含互补于模板的部分的靶特异性部分,和互补于支持物或位点的捕获引物至少某一部分的通用引物结合部位。任选地,在RPA组分存在的情况下进行接触。RPA组分可包含重组酶。RPA组分可包含链置换聚合酶。在一些实施方案中,通过重组酶介导的链交换将融合引物重组至模板中,从而形成包含通用引物结合部位的模板:引物加合物。在一些实施方案中,随后将捕获引物重组至通用引物结合部位中,形成连接至支持物或位点的固定的模板。

[0350] 在基于小珠的扩增的一些实施方案中,将各自包含不同的靶特异性部分和共同的通用引物结合部位的融合引物文库与多个模板和多个支持物在包含聚合酶和链置换聚合酶的反应混合物中进行接触。随后通过使混合物经历RPA条件将模板文库连接至多个支持物,从而产生各自连接有不同的模板的多个支持物。

[0351] 在基于阵列的扩增的一些实施方案中,将各自包含不同的靶特异性部分和共同的通用引物结合部位的融合引物文库与多个模板和包含多个位点的表面在包含聚合酶和链置换聚合酶的反应混合物中进行接触。多个位点的至少一些包含通用捕获引物。随后通过使混合物经历RPA条件将模板文库连接至表面的多个位点,从而产生各自连接有不同的模板的多个支持物。

[0352] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含用于使用部分变性条件平行地扩增一个或多个核酸模板的试剂的组合物(及相关的用于制备和使用所述组合物的方法)。

[0353] 在一些实施方案中,组合物可包含本文中描述的用于进行RPA的组分的任何组分。

[0354] 在一些实施方案中,组合物可包含本文中描述的用于进行模板行走的组分的任何组分。

[0355] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的组合物和系统,包括:包含第一位点和第二位点的表面;和核酸扩增反应混合物,其中所述混合物与第一和第二位点接触。

[0356] 在一些实施方案中,反应混合物包含重组酶。

[0357] 在一些实施方案中,第一位点可操作地偶联至第一传感器,并且第二位点可操作地连接至第二传感器。

[0358] 在一些实施方案中,第一和第二位点可操作地连接至相同的传感器。

[0359] 任选地,第一位点包含第一基本上单克隆的核酸群。第二位点任选地包含第二基本上单克隆的核酸群。

[0360] 在一些实施方案中,公开的组合物包含:包含第一位点和第二位点的表面,其中第一位点包含第一基本上单克隆的核酸群并且第二位点包含第二基本上单克隆的核酸群;和核酸扩增反应混合物,其中所述混合物与第一和第二位点接触。

[0361] 在一些实施方案中,组合物包含位点的阵列,所述位点的阵列包括包含(例如连接至)第一捕获引物的第一位点和包含(例如连接至)第二捕获引物的第二位点。

[0362] 在一些实施方案中,多个位点的至少一个位点包括反应孔、槽、沟或室。

[0363] 在一些实施方案中,多个位点的至少一个位点连接至传感器。

[0364] 在一些实施方案中,传感器能够检测在至少一个位点处或附近发生的核苷酸并入。

[0365] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。

[0366] 在一些实施方案中,至少第一位点或第二位点或第一和第二位点包含连接至表面的捕获引物。

[0367] 在一些实施方案中,多个位点的至少一个位点包含共形地置于可操作地偶联至传感器的孔之内的亲水聚合物基质。

[0368] 任选地,亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

[0369] 任选地,亲水聚合物基质是原位固化聚合物基质。

- [0370] 任选地,亲水聚合物基质包括聚丙烯酰胺、其共聚物、其衍生物或其组合。
- [0371] 任选地,聚丙烯酰胺缀合于寡核苷酸引物。
- [0372] 任选地,孔具有0.1微米至2微米的特征直径。
- [0373] 任选地,孔具有0.01微米至10微米的深度。
- [0374] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。FET可包括离子敏感性FET(ISFET)、chemFET、bioFET等。
- [0375] 在一些实施方案中,FET能够检测核苷酸并入副产物在至少一个位点的存在。
- [0376] 在一些实施方案中,FET能够检测选自氢离子、焦磷酸盐、羟离子等的化学部分。
- [0377] 在一些实施方案中,方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)可包括任选地使用FET检测一种或多种核苷酸并入副产物在阵列位点处的存在。
- [0378] 在一些实施方案中,方法可包括任选地使用FET检测在位点处或在至少一个反应室内发生的pH变化。
- [0379] 在一些实施方案中,公开的方法包括将核苷酸引入多个位点的至少一个位点;和检测因核苷酸至测序引物的并入而引起的来自传感器的输出信号。输出信号任选地基于FET的临阈电压。在一些实施方案中,FET包括偶联至位点的浮动栅导体。
- [0380] 在一些实施方案中,FET包括包含彼此电偶联并被电介质层分离的多个导体的浮动栅结构,并且浮动栅导体是多个导体中最上面的导体。
- [0381] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含定义位点的底面的上表面。
- [0382] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含导电材料,并且浮动栅导体的上表面包含导电材料的氧化物。
- [0383] 在一些实施方案中,浮动栅导体通过传感材料偶联至至少一个反应室。
- [0384] 在一些实施方案中,传感材料包含金属-氧化物。
- [0385] 在一些实施方案中,传感材料对氢离子敏感。
- [0386] 在一些实施方案中,反应混合物包含进行RPA所需的所有组分。
- [0387] 在一些实施方案中,反应混合物包含进行模板行走所需的所有组分。
- [0388] 在一些实施方案中,反应混合物可包含一个或多个固体或半固体支持物。支持物的至少一个可包括一个或多个包含第一引物序列的第一引物。在一些实施方案中,支持物的至少一个包含两个或更多个不同的连接至其的引物。例如,至少一个支持物可包含至少一个第一引物和至少一个第二引物。
- [0389] 或者,在一些实施方案中,反应混合物不包含任何支持物。在一些实施方案中,直接在阵列的位点或反应室的表面上扩增至至少两个不同的多核苷酸模板。
- [0390] 在一些实施方案中,反应混合物可包含重组酶。重组酶可包括任何适当的可促进多核苷酸分子之间的重组的试剂。重组酶可以是催化同源重组的酶。例如,反应混合物可包含重组酶,所述重组酶包括或衍生自细菌、真核生物或病毒(例如噬菌体)的重组酶。
- [0391] 任选地,反应混合物包含未进行外源标记的核苷酸。例如,核苷酸可以是天然存在的核苷酸,或不包含荧光部分、染料或其它外源的光学上可检测的标记的合成类似物。任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。
- [0392] 任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含

终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。

[0393] 在一些实施方案中,反应混合物包含可结合引物和多核苷酸模板以形成复合物或可催化多核苷酸模板的链侵入以形成D-环结构的酶。在一些实施方案中,反应混合物包含一个或多个选自UvsX、RecA和Rad51的蛋白。

[0394] 在一些实施方案中,扩增的方法可包括进行如2012年6月21日公开的美国专利公开号2012/0156728(其通过引用整体并入本文)中所描述的“模板行走”。例如,在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于克隆地扩增一个或多个核酸模板以形成克隆地扩增的核酸模板群的方法、组合物、系统、装置和试剂盒。本文中描述的任何扩增方法任选地包括重复的核酸扩增循环。扩增循环任选地包括:(a) 引物至模板链的杂交,(b) 引物延伸以形成第一延伸的链,(c) 延伸的链从模板链的部分或不完全变性。杂交至模板链的引物(为方便起见,命名为“正向”引物)任选地固定在支持物上或固定至支持物。支持物例如是固体或半固体。任选地,来自步骤(c)的模板链的变性部分在下一个扩增循环中可自由地与不同的正向引物杂交。在实施方案中,在随后的扩增循环中引物延伸包括第一延伸的链从模板链的置换。可包括例如第二“反向”引物,其杂交至第一延伸的链的3'末端。反向引物任选地是非固定的。

[0395] 在实施方案中,使用固定在一个或多个固体或半固体支持物上或固定至其的引物扩增模板。任选地支持物包含固定的互补于模板链的第一部分的引物。任选地,支持物不显著地包含固定的与相同的模板链的第二非重叠部分同源的引物。如果两个部分不包含任何彼此杂交或与其互补物杂交的子部分,则它们是非重叠的。在另一个实例中,支持物任选地不显著地包含固定的可与模板链的互补物杂交的引物。

[0396] 任选地,在单一连续液相中在一个或多个支持物存在的情况下,其中每一个支持物包含一个或多个固定位点,同时地扩增多个核酸模板。在实施方案中,扩增每一个模板以产生克隆的扩增子群,其中各个克隆群固定在与其它扩增的群不同的支持物或固定位点之内或之上。任选地,扩增的群在扩增之后保持基本上单克隆。

[0397] 模板例如被扩增以产生克隆群,其包含模板同源链(在本文中被称作“模板链”或“反向链”)和/或模板互补链(在本文中被称作“引物链”或“正向链”)。在实施方案中,在所产生的扩增的核酸群中通过维持模板链与其引物链之间的缔合来保持克隆性,从而有效地将相关的克隆子代联合或“束缚”在一起并减少不同的克隆群之间交叉污染的可能性。任选地,克隆群中的一个或多个扩增的核酸连接至支持物。基本上相同的核酸的克隆群可任选地具有空间上局限的或不连续的宏观表现。在实施方案中,克隆群可类似于分离的点或集落(例如,当被分配至支持物中时,任选地在支持物的外表面上)。

[0398] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及产生克隆扩增子的局限的克隆群的新型方法,所述克隆群任选地固定至一个或多个支持物或固定于其中或其上。支持物可以例如是固体或半固体(例如凝胶或水凝胶)。扩增的克隆群任选地连接至支持物的外表面或也可以在支持物的内表面内(例如当支持物具有多孔或基质结构时)。

[0399] 在一些实施方案中,通过多个循环的沿目的模板链(也称为“反向”链)的引物延伸来实现扩增。为方便起见,将杂交至目的模板链的引物称作“正向”引物,并任选地以模板依赖性方式延伸其,以形成互补于目的模板链的“正向”链。在一些方法中,正向链本身与被称作“反向”引物的第二引物杂交,延伸所述第二引物以形成新的模板链(也称作反向链)。任

选地,新模板链的至少部分与原始的目的模板(“反向”)链是同源的。

[0400] 如所提及的,一个或多个引物可固定至一个或多个支持物或固定于其中或其上。任选地,通过连接至支持物来固定一个引物。第二引物可以是存在的并且任选地不固定或连接至支持物。可以例如在单一连续液相中在不同的支持物或固定位点上同时地扩增不同的模板以形成单克隆的核酸群。如果液相的任何部分与液体的任何其它部分是流体接触或连通的,则可认为液相是连续的。在另一个实例中,如果没有部分与液体的其余部分被完全地细分或划分或以其它方式被完全地物理分开,则可认为液相是连续的。任选地,液相是可流动的。任选地,连续液相不在凝胶或基质内。在其它实施方案中,连续液相在凝胶或基质内。例如连续液相占据固体或半固体支持物的孔、间隙或其它空隙。

[0401] 当液相在凝胶或基质内时,一个或多个引物任选地固定在支持物上。任选地支持物是凝胶或基质本身。或者,支持物不是凝胶或基质本身。在实例中,一个引物固定在包含在凝胶内的固体支持物上并且不固定至凝胶分子。支持物例如是平面表面的形式或一个或多个微粒。任选地平面表面或多个微粒包含具有基本上相同的序列的正向引物。在实施方案中,支持物不包含显著量的第二不同的引物。任选地,第二非固定引物在凝胶内的溶液中。第二非固定引物例如结合至模板链(即反向链),而固定的引物结合至正向链。

[0402] 模板行走的实施方案包括引物延伸的方法,包括:(a)引物-杂交步骤,(b)延伸步骤,和(c)行走步骤。任选地,引物-杂交步骤包括将第一引物分子(“第一正向引物”)杂交至核酸链(“反向链”)上的互补的正向引物结合序列(“正向PBS”)。任选地,延伸步骤包括产生延伸的第一正向链,该链是反向链的全长互补物并杂交至其。例如通过使用反向链作为模板以模板依赖性方式延伸第一正向引物分子来产生延伸的第一正向链。任选地,行走步骤包括将第二引物(“第二正向引物”)杂交至正向PBS,其中反向链也杂交至第一正向链。例如,行走步骤包括从正向链变性正向PBS的至少部分(“游离部分”),而反向链的另一部分仍然杂交至正向链。

[0403] 在实施方案中,引物延伸方法是包括模板行走的扩增方法,其中引物-杂交、延伸和/或行走的任一个或多个步骤被重复至少一次。例如,方法可包括通过一个或多个扩增循环扩增正向链。扩增循环任选地包括延伸和行走。示例性扩增循环包括或基本上由延伸和随后的行走组成。任选地,第一扩增循环的第二正向引物用作随后的扩增循环的第一正向引物。例如,第一扩增循环中行走步骤的第二正向引物用作随后的扩增循环的延伸步骤的第一正向引物。

[0404] 任选地,引物延伸或扩增的方法还包括通过如下步骤延伸或扩增反向链:(a)将第一反向引物分子与延伸的正向链上的互补的反向引物结合序列(“反向PBS”)杂交;(b)通过使用正向链作为模板以模板依赖性方式延伸第一反向引物分子来产生延伸的第一反向链,该链是正向链的全长互补物并杂交至其;和(c)将第二引物(“第二反向引物”)杂交至反向PBS,其中正向链也杂交至第一反向链。任选地进行步骤(b)-(c)的一次或多次重复,其中步骤(c)的第二反向引物是重复的步骤(b)的第一反向引物;和其中在所述一次或多次重复期间或之间的所有时间正向链的大部分杂交至反向链。在实施方案中,大部分任选地为至少30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。

[0405] 任选地,在扩增期间反向链和/或正向链不暴露于完全变性条件,所述完全变性条件会导致显著部分(例如多于10%、20%、30%、40%或50%)的多个链与其延伸的和/或全

长的互补物的完全分离。

[0406] 在实施方案中,在一个或多个扩增循环(例如进行的1、5、10、20个或所有的扩增循环)期间或之间的所有时间正向和/或反向链的大部分任选地杂交至延伸的和/或全长的互补物。在实施方案中,链的大部分任选地为链的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%。在实施方案中,这通过将扩增反应维持在高于未延伸的引物的 $T_m$ 而低于引物-互补链的 $T_m$ 的温度来实现。例如,扩增条件被保持在这样的温度内,其高于未延伸的正向引物的 $T_m$ 而低于延伸的或全长的反向链的 $T_m$ 。同样地,例如,扩增条件被保持在这样的温度内,其高于未延伸的反向引物的 $T_m$ 而低于延伸的或全长的正向链的 $T_m$ 。

[0407] 任选地,一个或多个正向引物和/或一个或多个反向引物是可呼吸的(breathable),例如具有低 $T_m$ 。在实例中,可呼吸引物的核苷酸碱基的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%是腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶或互补于腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶。

[0408] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于在扩增反应溶液中在支持物上克隆地扩增核酸模板的方法、组合物、系统、装置和试剂盒。任选地,核酸模板与支持物在包含连续液相的溶液中接触。支持物可包括包含至少第一引物和第二引物的引物群。可以例如通过至支持物的共价连接将引物群固定在支持物上。在一些实施方案中,核酸模板包含靠近靶序列的引物结合序列。引物结合序列可互补于第一引物的序列和任选地第二引物的序列。靶序列可以不互补于引物群中的引物。在一些实施方案中,核酸模板的引物结合序列杂交至第一引物。可使用聚合酶沿模板延伸第一引物,从而形成延伸的第一引物。模板的引物结合序列的至少部分可与延伸的第一引物分离(例如变性或解链)。任选地进行分离同时维持模板的部分与延伸的第一引物之间的杂交。分离的引物结合序列的部分可随后杂交至第二引物。任选地,进行这样的杂交同时维持模板的其它部分与延伸的第一引物之间的杂交。可使用聚合酶沿模板延伸第二引物,从而形成包含延伸的第一引物和延伸的第二引物的支持物。延伸的第一引物和/或延伸的第二引物的延伸的部分可包含互补于靶序列的序列。

[0409] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于在扩增反应溶液中在支持物上克隆地扩增核酸模板的方法,包括:将核酸模板与支持物在液体溶液中接触,其中支持物包括包含至少第一引物和第二引物的固定的引物群,并且其中核酸模板包含靠近靶序列的引物结合序列,其中引物结合序列互补于第一引物的序列和第二引物的序列,并且靶序列不互补于引物群中的引物;将核酸模板的引物结合序列杂交至第一引物;使用聚合酶沿模板延伸第一引物,从而形成延伸的第一引物;将模板的引物结合序列的至少部分与延伸的第一引物变性,同时维持模板的另一部分与延伸的第一引物之间的杂交;将变性的引物结合序列的部分杂交至第二引物,同时维持模板的其它部分与延伸的第一引物之间的杂交;和使用聚合酶沿模板延伸第二引物,从而形成包含延伸的第一引物和延伸的第二引物的支持物,其中延伸的第一引物和延伸的第二引物的延伸各自包含互补于靶序列的序列。引物群可包含基本上相同的引物,所述基本上相同的引物在序列上有不多于1、2、3、4或5个核苷酸的不同。在一些实施方案中,引物群包含不同的引物,所述引物的至少一些包含互补于模板的引物结合序列的序列。在一些实施方案中,引物群的引物不互补于模板的5'端半边序列。在一些实施方案中,引物群的引物不互补于支持物的任何延伸的引物的3'端半边序列。在一些实施方案中,引物群的引物不互补于模板的除引物结合序列外的任何序列。

[0410] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于在扩增反应溶液中在支持物群上克隆地扩增核酸模板群的方法,包括:根据本文中公开的任何方法在第一支持物上在第一核酸模板上克隆地扩增第一模板,和根据相同的方法在第二支持物上克隆地扩增第二核酸模板,其中所有支持物在扩增期间包含在单一连续液相内。

[0411] 除其它以外,提供了产生单链模板序列的固定的克隆扩增子的局限的克隆群的方法,包括:(a)将单链模板序列(“模板1”)连接至固定位点(“IS1”),其中IS1包含多个拷贝的可基本上杂交至模板1的固定的引物(“IS1引物”),并且模板1通过与IS1引物杂交而结合至IS1,和(b)使用IS1引物和非固定的引物(“SP1引物”)在溶液中扩增模板1,其中互补于单链模板1的扩增的链当为单链时不能与IS1上的引物基本上杂交,其中扩增在模板1至IS1的起始杂交点周围产生固定的克隆扩增子的局限的克隆群。

[0412] 还提供了产生第一模板序列(“模板1”)和第二模板序列(“模板2”)的分离和固定的克隆群的方法,所述方法包括扩增第一和第二模板序列以产生基本上连接至第一固定位点(“IS1”)而非第二固定位点(“IS2”)的模板1的克隆扩增子群,或基本上连接至IS2而非IS1的模板2的克隆扩增子群,其中:(a)两个模板和所有扩增子均包含在相同的连续液相内,其中连续液相与第一和第二固定位点(分别地,“IS1”和“IS2”)接触,并且其中IS1和IS2是空间上分离的,(b)模板1当为单链形式时在一个末端包含第一子序列(“T1-FOR”)并在其相对末端包含第二子序列(“T1-REV”),(c)模板2当为单链形式时在一个末端包含第一子序列(“T2-FOR”)并在其相对末端包含第二子序列(“T2-REV”),(d)IS1包含多个拷贝的固定的核酸引物(“IS1引物”),所述引物在T1和T2为单链时可基本上杂交至T1-FOR和T2-FOR,(e)IS2包含多个拷贝的固定的引物(“IS2引物”),所述引物在T1和T2为单链时可基本上杂交至T1-FOR和T2-FOR,(f)T1-REV的反向互补物当为单链时不能基本上杂交至IS1上的引物,但可基本上杂交至连续液相中非固定的引物(“SP1”);和(g)T2-REV的反向互补物当为单链时不能基本上杂交至IS2上的引物,但可基本上杂交至连续液相中非固定的引物(“SP2”)

[0413] 任选地,在本文中描述的任何方法中,任何已从一个固定位点解离的核酸能够基本上杂交至所述两个固定位点并且在连续液相中所述解离的核酸至另一个固定位点的任何移动(例如通过扩散、对流的移动)基本上不受阻碍。

[0414] 任选地,在本文中描述的任何方法中,连续液相同时与IS1和IS2接触。

[0415] 任选地,在本文中描述的任何方法中,被固定的引物结合的模板的第一部分不与模板的第二部分重叠,所述第二部分的互补物被非固定的引物结合。

[0416] 任选地,在本文中描述的任何方法中,至少一个待被扩增的模板从输入核酸在将核酸与至少一个固定位点接触后产生。

[0417] 任选地,本文中描述的任何方法包括如下步骤:(a)将包含固定的引物的支持物与单链核酸模板接触,其中:将第一固定的引物杂交至模板上的引物结合序列(PBS);(b)以模板依赖性延伸来延伸杂交的第一引物以形成延伸的链,所述延伸的链互补于模板并且至少部分杂交于模板;(c)从延伸的互补链部分变性模板以便PBS的至少部分为单链的形式(“游离部分”);(d)将游离部分杂交至未延伸的、固定的第二引物;(e)以模板依赖性延伸来延伸第二引物以形成互补于模板的延伸的链;(f)任选地,将退火的延伸的固定的核酸链彼此分离。

[0418] 任选地,在本文中描述的任何方法中,(a)在扩增期间,形成核酸双链从而包含起

始模板和/或扩增的链;所述双链在扩增期间不经历会导致实质性数量的双链的完全变性的条件。

[0419] 任选地,在本文中描述的任何方法中,通过获取多个待被扩增的输入双链或单链核酸序列(所述序列可以是已知的或未知的)和在至少一个输入核酸的末端上添加或产生第一通用接头序列和第二通用接头序列来产生单链模板;其中所述第一通用接头序列杂交至IS1引物和/或IS2引物,并且所述第二通用接头序列的反向互补物杂交至至少一个非固定的引物。接头可以是双链或单链的。

[0420] 任选地,在本文中描述的任何方法中,在所述单链模板序列的第一和第二末端处提供第一和第二核酸接头序列。

[0421] 任选地,在本文中描述的任何方法中,还将标签添加至一个或多个核酸序列(例如模板或引物或扩增子),所述标签使得能够鉴定包含标签的核酸。

[0422] 任选地,在本文中描述的任何方法中,在至少一个固定位点或支持物上的所有引物具有相同的序列。任选地,固定位点或支持物包含具有至少两个不同的序列的多个引物。在一些实施方案中,固定位点或支持物包含至少一个靶特异性引物。

[0423] 任选地,在本文中描述的任何方法中,连续介质是可流动的。任选地,非固定的核酸分子的混合在连续液相中在至少部分的扩增过程期间,例如在任一个或多个本文中描述的步骤或循环期间,是基本上不受阻碍的。

[0424] 任选地,在本文中描述的任何方法中,在扩增期间的时期内混合是基本上不受阻碍的。例如,在扩增的整个持续时间期间混合是基本上不受阻碍的。

[0425] 在实施方案中,使用RPA即重组酶-聚合酶扩增(参见例如W02003072805,其通过引用并入本文)来实现扩增。任选地在没有温度或试剂条件的实质性变化的情况下进行RPA。在本文的实施方案中,可使用重组酶和/或单链结合蛋白来实现部分变性和/或扩增,包括本文中描述的任一个或多个步骤或方法。任选地与单链结合蛋白(SSB)组合,适当的重组酶包括RecA及其原核或真核类似物或其功能性片段或变体。在实施方案中,重组酶剂任选地涂覆单链DNA(ssDNA)例如扩增引物以形成核蛋白丝链,所述核蛋白丝链侵入模板上具有同源性的双链区。这任选地产生短杂交体和替代链泡(displaced strand bubble)(被称作D-环)。在实施方案中,D-环中丝链的游离的3'-末端通过DNA聚合酶来延伸以合成新的互补链。互补链在延伸时置换模板的原始配对的配对链。在实施方案中,一个或多个扩增引物对在任选为双链的模板接触之前与一个或多个重组酶剂接触。

[0426] 在本文中描述的任何方法中,模板(靶序列)的扩增包括将重组酶剂与至少一个扩增引物对的一个或多个接触,从而形成一个或多个“正向”和/或“反向”RPA引物。任选地去除任何未与一个或多个引物缔合的重组酶剂。任选地,随后将一个或多个正向RPA引物与模板链接触,所述模板链任选地具有与至少一个RPA引物互补的区域。可将模板链杂交至RPA引物与互补模板的接触处,所述接触任选地导致所述引物与模板之间的杂交。任选地,利用一种或多种聚合酶(例如在dNTP存在的情况下)沿模板延伸引物的3'末端以产生双链核酸和置换模板链。扩增反应可包括这样的接触和延伸的重复循环直到可获得期望的扩增程度。任选地,通过并行的RPA反应扩增核酸的置换链。任选地,核酸的置换链通过将其依次与一个或多个互补引物接触来扩增;和(b)通过本文中描述的任何策略延伸互补引物。

[0427] 在实施方案中,一个或多个引物包含“正向”引物和“反向”引物。将两种引物与模

板接触任选地在所述第一链的第一部分导致第一双链结构并在所述第二链的第二部分导致双链结构。任选地,用一种或多种聚合酶延伸正向和/或反向引物的3'末端以产生第一和第二双链核酸和核酸的第一和第二置换链。任选地,第二置换链彼此间至少部分互补并且可杂交以形成子双链核酸,其可在随后的扩增循环中用作双链模板核酸。

[0428] 任选地所述第一和所述第二置换链至少部分互补于所述第一或所述第二引物并且可杂交至所述第一或所述第二引物。

[0429] 在本文中描述的任何方法或步骤或组合物或阵列的备选实施方案中,支持物任选地包含具有多于一种序列的固定的引物。在模板核酸链杂交至第一互补固定引物之后,则可延伸第一引物并且可将模板和引物彼此间部分地或完全地分离。随后可将延伸的引物退火至具有与第一引物不同的序列的第二固定引物,并可延伸第二引物。随后可分离(例如彼此完全地或部分地变性)两种延伸的引物并可将其进而用作用于延伸另外的固定引物的模板。可重复过程以提供扩增的、固定的核酸分子。在实施方案中,该扩增导致具有两种不同的彼此互补的序列的固定的引物延伸产物,其中所有引物延伸产物在5'末端固定至支持物。

[0430] 在一些实施方案中,公开的方法包括扩增,其中扩增包括链翻转。在下文描述的“翻转”实施方案中,延伸两个或更多个引物以形成两个或更多个对应的延伸的链。任选地,被延伸的两个或更多个引物包含基本上相同的序列或基本上由其组成,并且对应的延伸的链的延伸的部分是至少部分不相同的和/或彼此互补。

[0431] 翻转的一个示例性实施方案如下所述。例如通过模板行走扩增起始模板,以产生多个引物-延伸的链(为方便起,见其将被称作“正向”链)。任选地,正向链互补于起始模板。任选地,正向链固定在支持物上。任选地,正向链包含基本上相同的序列,例如正向链基本上彼此相同。在实施方案中,通过延伸一个或多个固定在支持物上的引物(“正向”引物)来形成正向链。正向引物和/或正向链任选地在其5'末端或附近连接至支持物。任选地,引物-延伸的正向链的一个或多个包含被称作自杂交序列的3'序列,所述3'序列不存在于未延伸的引物中并可在选择的条件下杂交至5'序列(这个过程将被称为“自杂交”)。5'序列任选地是未延伸的正向引物的部分。在实例中,正向延伸产物在这样的杂交后形成“茎-环”结构。任选地,未延伸的正向引物在其3'末端或附近包含对切割易感的“可切割的”核苷酸。在实施方案中,通过“易切断的”核苷间连接将可切割的核苷酸连接至至少一个其它核苷酸,所述核苷间连接可在基本上不会切割磷酸二酯键的条件下被切割。

[0432] 延伸后,任选地允许正向-引物延伸产物(即正向链)自杂交。在其它实施方案中,在允许自杂交之后,在可切割的核苷酸(例如与相邻的核苷酸形成易切断的连接的核苷酸)的易切断的连接处切割正向链。切割导致引物-延伸产物(即延伸的正向链)的两个片段。在实施方案中,第一片段包含原始的未延伸的正向引物的至少部分。任选地,第一片段不包含任何延伸的序列。任选地,第一片段是固定的(例如,因为未延伸的正向引物已经是固定的)。在实施方案中,第二片段包含延伸的序列。任选地,第二片段包含未延伸的引物在可切割的核苷酸之外的任何3'部分或不包含未延伸的引物的任何部分。任选地,第二片段通过其自杂交序列杂交至第一部分。

[0433] 在实例中,可切割的核苷酸是被一种或多种酶去除的核苷酸。酶可以例如是糖基化酶。糖基化酶任选地据哟N-糖基化酶活性,其从双链DNA释放可切割的核苷酸。任选地,可

切割的核苷酸的去除产生无碱基、无嘌呤或无嘧啶位点。可任选地例如通过另一种酶活性来进一步修饰无碱基位点。任选地,通过裂合酶修饰无碱基位点以产生碱基缺口。裂合酶例如切割无碱基位点的3'和/或5'。通过裂合酶的切割任选地发生在5'和3'末端,导致去除无碱基位点和留下碱基缺口。示例性可切割的核苷酸例如5-羟基-尿嘧啶、7,8-二氢-8-羟鸟嘌呤(8-羟鸟嘌呤)、8-羟腺嘌呤、fapy-鸟嘌呤、甲基-fapy-鸟嘌呤、fapy-腺嘌呤、黄曲霉毒素B1-fapy-鸟嘌呤、5-羟基-胞嘧啶,可被多种糖基化酶识别和去除以形成无嘌呤位点。一种合适的酶是甲酰氨基嘧啶[fapy]-DNA糖基化酶,也称为8-羟鸟嘌呤DNA糖基化酶或FPG。FPG可用作N-糖基化酶和AP-裂合酶。N-糖基化酶活性任选地从双链DNA释放被损坏的嘌呤,从而产生无嘌呤(AP位点),其中磷酸二酯主链任选地是完整的。AP-裂合酶活性切割AP位点的3'和5'从而去除AP位点和留下单碱基缺口。在实例中,可切割的核苷酸是8-羟腺嘌呤,其被具有糖基化酶和裂合酶活性的FPG转化成单碱基缺口。

[0434] 在另一个实施方案中,可切割的核苷酸是尿苷。任选地,尿苷由“USER”试剂切割,所述试剂包括尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂合酶内切核酸酶VIII,其中UDG催化尿嘧啶碱基的切除,形成无碱基(无嘧啶)位点同时保持磷酸二酯主链的完整,并且其中内切核酸酶VIII的裂合酶活性在无碱基位点的3'和5'侧破坏磷酸二酯主链以便释放无碱基的脱氧核糖,随后任选地使用激酶将切割产物的3'末端上的磷酸基团转化至-OH基。

[0435] 任选地将至少一个切割的片段与聚合酶接触。任选地第一固定的片段可由聚合酶延伸。如果这样期望,则第二杂交的片段可用作第一片段的延伸的模板。在实施方案中,形成“翻转的”双链延伸产物。该翻转的产物可任选地以本文中描述的任何方式经历模板行走。当翻转的和未翻转的均经历模板行走时,形成两个不同的延伸产物群,其中两种延伸产物具有相同的部分(对应于未延伸的引物)和彼此互补的部分(对应于延伸产物的延伸的部分)。

[0436] 在实施方案中,可任选地通过将延伸的正向链与单链“剪接”接头序列在延伸试剂(例如聚合酶和dNTP)存在的情况下进行接触来将目的序列例如自杂交序列或新的引物结合部位添加在延伸的正向链的3'末端。该剪接序列任选地包含基本上互补于延伸的正向链的3'末端部分的3'部分和基本上互补于待被添加的目的序列的5'部分。在将剪接接头杂交至延伸的正向链的3'末端之后,使用剪接接头作为模板使正向链经历模板依赖性聚合酶延伸。这样的延伸导致目的序列至延伸的正向链的3'末端的添加。

[0437] 因此,本文中描述的引物延伸和/或扩增的任何方法可包括如下步骤的任一个或多个:(a)通过模板行走延伸固定的正向引物以产生多个延伸的正向链,所述正向链任选地是相同的;(b)任选地将剪接接头杂交至延伸的正向链的3'末端并使用剪接接头作为模板使正向链经历模板依赖性聚合酶延伸,从而将其它3'序列添加至进一步延伸的正向链,其中添加的3'序列的部分是互补于未延伸的正向引物的部分的并且杂交至其以形成茎环结构;(c)在位于未延伸的正向引物序列与延伸的正向链序列的连接点处或附近的可切割的核苷酸的易切断连接处切割正向链;和任选地去除可切割的核苷酸,从而产生两个切割的片段,其中第一片段包含杂交至第二片段上的3'引物-互补序列的未延伸的正向引物的部分;(d)任选地使用第二片段作为模板使第一片段经历聚合酶延伸以产生翻转的正向链;(e)任选地将第二剪接接头杂交至翻转的正向链的3'末端,并使用剪接接头作为模板使正向链经历模板依赖性延伸,从而将其它3'序列添加至翻转的正向链,其中添加的3'序列

的部分是不存在于翻转的链中的新的引物结合序列；(f) 选择性地通过与新引物接触和以任何方法（例如如本文中所描述的）延伸或扩增来延伸或扩增包含新的引物结合序列的翻转的链。新引物将不结合于未翻转的链或未在步骤(e)中被进一步延伸的翻转的链。

[0438] 图8显示了示例性链翻转和行走策略的示意图描述。(A) 模板行走，(B) 链翻转以产生翻转的链，(C) 在最终的翻转链上添加新的引物结合序列Pg'。

[0439] 任选地，将单个支持物用于本文中的任何扩增方法，其中单个支持物具有可杂交于模板的多个引物。在这样的实施方案中，在模板收集物与固体支持物接触之前调节模板收集物的浓度以便收集物中的个体模板分子以至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 或 $10^7$ 个分子/ $\text{mm}^2$ 的密度被连接或缔合（例如通过杂交至固定在固体支持物上的引物）。

[0440] 任选地，在支持物上原位扩增个体模板分子，产生在空间上局限于起始模板的杂交点周围的克隆群。任选地，扩增从单个扩增的模板产生不多于约 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 、 $10^{11}$ 、 $10^{12}$ 、 $10^{15}$ 或 $10^{20}$ 的扩增子。任选地，克隆扩增子的集落以至少 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 或 $10^7$ 个分子/ $\text{mm}^2$ 的密度位于固体支持物上。

[0441] 在一些实施方案中，可将核酸收集物与一个或多个支持物在其中多个核酸结合至相同的支持物的条件下进行接触。这样的接触可特别地用于涉及核酸在相同支持物的不同区域中的平行克隆扩增的方法。可调节核酸数量对支持物表面积的比率，以通过例如确保在支持物中适当地间隔核酸以促进扩增的核酸的单克隆群在基本上于不同的克隆群之间无交叉污染的情况下形成来促进单克隆形成。例如当使用单个支持物时，将待被扩增的核酸的收集物调节至这样的稀释度以便从个体核酸产生的所得的扩增的克隆群普遍是不连续的或分离的，例如无重叠。例如，50%、70%、80%或90%或更多的扩增的克隆群内的个体核酸中没有散布基本上不相同的核酸。任选地，不同的扩增群不与其它的扩增群接触或完全重叠，或可使用选择的检测方法彼此区分。

[0442] 在一些实施方案中，核酸连接至支持物的表面。在一些实施方案中，核酸可以附着在支持物内。例如，对于包含水凝胶或其它多孔基质的支持物，核酸可以附着在支持物的整个体积包括表面上和支持物内。

[0443] 在一些实施方案中，可将支持物（或支持物群中的至少一个支持物）连接至至少一个引物，任选地连接至引物群。例如，支持物（或至少一个支持物）可包含引物群。引物群的引物可以是基本上彼此相同的或可包含基本上相同的序列。引物的一个、一些或全部可包含互补于一种或多种核酸模板内的序列的序列。在一些实施方案中，引物群可包含至少两个非互补的引物。

[0444] 引物可通过其5'末端连接至支持物，并具有游离的3'末端。支持物可以是载玻片的表面或小珠的表面。引物具有低解链温度，例如寡(dT)<sub>20</sub>，并且可杂交至收集物接头的低T<sub>m</sub>区域。引物间的距离需要比接头长度短以允许模板行走，或可选择地，具有5'末端长接头的长引物将增加行走的机会。

[0445] 在一些实施方案中，将支持物与引物和模板（或反向链）在其中引物和模板彼此杂交以形成核酸双链的条件下进行连接和/或接触。双链可包括包含模板和引物的互补序列的双链部分，其中互补序列的至少一个核苷酸残基是彼此碱基配对的。在一些实施方案中，

双链还可包含单链部分。双链还可包含单链部分。单链部分可包含模板(或引物)内的任何不互补于引物(或模板)中的任何其它序列的序列。

[0446] 在支持物上克隆的核酸扩增的非限制性示例性方法如下所述。在支持物上克隆地扩增核酸(为方便起见,其将被称为反向链),所述支持物上连接有多个拷贝的互补正向引物。示例性核酸是多个DNA收集物分子的一个,例如多个核酸成员在其5'和/或3'末端具有一种或多种共同(“接头”)的序列并在其间具有可变的序列,例如gDNA或cDNA。在实施方案中,3'共同部分例如接头,具有可呼吸的(例如低 $T_m$ )区域,并且5'共同序列(例如接头)任选地具有较不可呼吸的(例如较高的 $T_m$ )区域,或反之亦然。在另一个实施方案中,5'和3'共同序列都是可呼吸的。可呼吸的(例如低 $T_m$ )区域例如是富含A、T和/或U的区域,例如富含AT(或U)的序列,例如polyT、polyA、polyU和A、T和U碱基或互补于这样的碱基的碱基的任何组合。示例性方法描述于本文中。

[0447] 在支持物上通过“模板行走”进行的克隆的核酸扩增的一个非限制性示例性方法显示于图1中。模板行走的示例性方法的非限制性描述如下所述。

[0448] 将双链DNA文库分子变性并将单链DNA通过杂交至支持物上的引物来连接至支持物。DNA分子数量对支持物面积或小珠数量的比率被设置来促进单克隆形成。

[0449] 引物通过其5'连接在引物上并具有游离的3'。支持物可以是载玻片的表面或小珠的表面。引物具有低解链温度,例如寡(dT)<sub>20</sub>或寡(dA)<sub>30</sub>,并且可杂交至文库接头的低 $T_m$ 区域。引物间的距离可以比接头长度短以允许模板行走,或可选择地,具有5'末端长接头的长引物将增加行走的机会。

[0450] 在支持物上克隆地扩增核酸,所述支持物上连接有多个拷贝的引物。示例性核酸是多个DNA文库分子的一个,所述多个DNA文库分子例如在其5'和/或3'末端具有一种或多种共同(例如“接头”)的序列并在其间具有可变的序列,例如gDNA或cDNA。在实施方案中,3'接头具有低 $T_m$ 区域,并且5'接头任选地具有较高的 $T_m$ 区域,或反之亦然。低 $T_m$ 区域例如是富含嘧啶的区域,例如富含AT(或U)的序列,例如polyT、polyA、polyU和A、T和U碱基或互补于这样的碱基的碱基的任何组合。示例性方法描述于本文中。

[0451] 利用DNA聚合或延伸反应混合物,其任选地包含任一种或多种试剂例如酶、dNTP和缓冲液,温育一个或多个引物,无论其是溶解形式的或是连接至支持物。延伸引物(例如正向引物)。任选地,延伸是引物沿模板的模板依赖性延伸,包括各自互补于模板上的连续核苷酸的核苷酸的连续并入,以便延伸的或未延伸的正向引物互补于反向链(也称作反向平行或互补)。任选地,通过具有聚合酶活性或其它延伸活性的酶例如聚合酶来实现延伸。酶可任选地具有其它活性包括3'-5'外切核酸酶活性(校正活性)和/或5'-3'外切核酸酶活性。或者,在一些实施方案中,酶可缺乏这些活性的一种或多种。在实施方案中,聚合酶具有链置换活性。有用的链置换聚合酶的实例包括细菌噬菌体 $\Phi$ 29DNA聚合酶和Bst DNA聚合酶。任选地,酶在升高的温度,例如在45℃或之上、在50℃、60℃、65℃、70℃、75℃或85℃之上具有活性。

[0452] 示例性聚合酶是Bst DNA聚合酶(外切核酸酶阴性),其为67kDa嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)DNA聚合酶蛋白(大片段)(示例于登录号2BDP\_A),其具有5'-3'聚合酶活性和链置换活性单缺乏3'-5'外切核酸酶活性。其它的聚合酶包括来自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)的Taq DNA聚合酶I(示例于登录号1TAQ)、来自大肠杆菌

(*Escherichia coli*)的Eco DNA聚合酶I(登录号P00582)、来自超嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)的Aea DNA聚合酶I(登录号067779),或其功能性片段或变体,例如在核苷酸水平上具有至少80%、85%、90%、95%或99%的序列同一性的功能性片段或变体。

[0453] 通常地,延伸步骤产生核酸,其包含其中两条互补链彼此杂交的双链双螺旋部分。在一个实施方案中,行走包括使核酸经历部分变性条件,所述部分变性条件变性核酸链的部分但不足以在其整个长度上完全地变性核酸。在实施方案中,在行走程序的部分或整个持续时间期间不使核酸经历完全变性条件。

[0454] 在实施方案中,这样设计负链和/或正链的序列以便引物结合序列或其部分是可呼吸的,即在选择的条件(例如扩增条件)下对变性易感。可呼吸的部分任选地比大部分相似长度的具有随机序列的核酸更易感,或比包含可呼吸序列的链的至少另一个部分更易感。任选地,可呼吸序列在选择的扩增条件下显示显著量的变性(例如至少10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%或95%的分子在可呼吸序列上是完全变性的)。例如将可呼吸序列设计为在选择的条件(例如扩增条件)下在30、35、40、42、45、50、55、60、65或70℃在50%的链分子中是完全变性的。

[0455] 当通过加热或升高的温度来实现部分变性时,示例性的可呼吸PBS可以是富含嘧啶的(例如具有高含量的A和/或T和/或U)。PBS包含例如poly-A、poly-T或poly-U序列或多聚嘧啶束。任选地将一个或多个扩增或其它引物(例如固定的引物)设计为对应地互补于这些引物结合序列。核酸链的示例性PBS包含poly-T序列,例如至少10、15、20、25或30个胸苷核苷酸的区段,而对应的引物具有PBS的互补序列,例如至少10、15、20、25或30个腺苷核苷酸的区段。示例性低熔点引物任选地具有这样的高比例(例如至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)核碱基:其在引物与互补模板杂交时通常(例如在选择的扩增条件下)与互补碱基形成不多于两个氢键。这样的核碱基的实例包括A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)和U(尿嘧啶)。示例性低熔点引物任选地具有高比例的A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)和/或U(尿嘧啶)的任一种或多种或其衍生物。在实施方案中,衍生物包含互补于A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)和/或U(尿嘧啶)的核碱基。杂交至PBS的引物的部分任选地具有至少50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的A(腺嘌呤)、T(胸腺嘧啶)或U(尿嘧啶)核苷酸或其任意组合。在另一个实例中,杂交至PBS的引物的部分包含polyA序列(例如至少5、10、15、20、25或30个核苷酸长)。其它的示例性引物包含 $(NA_x)_n$ 重复序列。任选地,n(小写字母的)为2-30,例如3-10,例如4-8。“N”(大写字母的)为任意核苷酸一并且任选地,N为C或G。“A”为腺嘌呤的简略记法,“x”表示在重复序列中腺嘌呤残基的数量,例如2、3、4、5、6、10或更多个。示例性引物包含 $(CAA)_n$ 、 $(CA)_n$ 、 $(CAAA)_n$ 或甚至 $(GAA)_n$ 的多个重复序列。

[0456] 任选地仅一条链(例如正向或反向链)具有可呼吸的PBS。在另一个实施方案中,正向和反向链都具有可呼吸的PBS。可呼吸的PBS任选地互补于固定至支持物或非固定的(例如溶解形式的)引物。任选地,包含可呼吸的PBS的链固定至支持物或是非固定的(例如溶解形式的)。任选地两种引物均是固定的,或两条链均是固定的。任选地引物均不是固定的,或链均不是固定的。

[0457] 扩增循环任选地包括呼吸(breathing)、退火和延伸。任选地使待被扩增的核酸经历对于至少一个这些步骤为适合的或最佳的条件。在实施方案中,使核酸经历适合用于多于一个这些步骤(例如,退火和延伸,或呼吸和延伸)的条件。在一些实例中,所有三个这些

步骤可在相同的条件下同时发生。

[0458] 在示例性方法中,可使核酸经历允许或促进呼吸的条件。在实施方案中,当双链双螺旋体的两条链为基本上彼此杂交但在目的局部部分中是变性的时,则认为“呼吸”发生。核酸的一个或多个可呼吸的序列(例如具有低 $T_m$ 部分的正向和/或反向PBS)从其杂交至的第一互补链(例如正向或反向链)局部变性(“呼吸”),从而可用于杂交至另一第二链。示例性第一链是来自第一引物的引物延伸产物。示例性第二链例如是第二未延伸的引物(例如,包含例如dT或dA序列的PBS互补寡核苷酸)。任选地,第一和第二链固定在支持物上,并且可以是紧密放置的(例如,足够地紧密相邻以允许行走)。用于呼吸的条件是任选地部分变性条件,在所述条件下PBS被基本上变性但核酸的另一部分保持杂交或双链状态。任选地,DNA解旋酶可包含在反应混合物中以促进部分变性。

[0459] 任选地,随后使核酸经历促进退火的条件,例如降低温度,以使得可呼吸的PBS与第二链之间能够杂交。在实施方案中,使用相同的条件以促进呼吸和延伸。在另一个实施方案中,退火条件与呼吸条件不同—例如,退火条件是非变性条件或促进小于呼吸条件的变性的条件。在实例中,退火条件包括比呼吸条件更低的温度(例如37℃),在所述呼吸条件中使用了更高的温度(例如60–65℃)。任选地,在一个或多个扩增循环(例如大部分扩增循环或基本上所有的扩增循环)期间避免完全变性条件。

[0460] 任选地,将一个或多个PBS-呼吸和引物延伸步骤重复多次以扩增起始核酸。当一种或多种核酸试剂(例如引物)被固定至支持物时,引物-延伸产物例如由于在扩增前未延伸的延伸的引物至支持物的连接或通过这样的引物的杂交而基本上保持至支持物的连接。

[0461] 任选地,制备一个或多个待被扩增的核酸群的样本。核酸群可以是单链或双链形式;任选地一个或多个核酸各自包含具有已知3'末端序列和已知5'末端序列的核酸链,所述末端序列与用于扩增的一个或多个引物是基本上相同的或互补的。核酸链的3'部分可例如与固定的引物互补,而5'部分可与溶解的引物相同。在群体内的个体核酸之间5'和/或3'部分可以是共同的(“通用的”)或不变的。任选地,群体内的核酸在共同部分之间各自包含不同的(例如未知的)序列,例如基因组DNA、cDNA、mRNA、配对(mate-pair)片段、外显子组等。收集物可例如具有足够的成员以确保覆盖高于50%、70%或90%的相应的遗传源。

[0462] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的包含用于核酸扩增的反应混合物的组合物以及相关的系统、装置、试剂盒和方法。

[0463] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的包含反应混合物的组合物以及相关的系统、装置、试剂盒和方法,所述反应混合物包含连续液相,所述连续液相包含(i)聚合酶和(ii)多个支持物,支持物的至少一个连接至基本上单克隆的核酸群。

[0464] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的包含反应混合物的组合物以及相关的系统、装置、试剂盒和方法,所述反应混合物包含连续液相,所述连续液相包含(i)聚合酶和(ii)包括第一支持物和第二支持物的多个支持物。

[0465] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的组合物(及相关的系统、装置、试剂盒和方法),其包含:包含连续液相的反应混合物,所述连续液相包含(i)包括第一支持物和第二支持物的多个支持物,(ii)包含第一多核苷酸和第二多核苷酸的多个不同的多核苷酸和(iii)用于等温核酸扩增的试剂。在一些实施方案中,用于核酸扩增的试剂包

含聚合酶和一种或多种类型的核苷酸(例如多个核苷酸)。任选地,用于等温核酸扩增的试剂包含重组酶。

[0466] 任选地,第一和第二多核苷酸具有不同的序列。

[0467] 任选地,多个不同的多核苷酸的至少一个的至少一个末端连接至至少一个寡核苷酸接头。

[0468] 任选地,多个不同的多核苷酸的至少一些至少一个末端包含共同的序列。

[0469] 任选地,反应混合物中不同的多核苷酸的至少两个包含共同的序列。

[0470] 任选地,第一和第二多核苷酸是不同的。

[0471] 在一些实施方案中,液相包括包含引物的多个中的一个或多个支持物。

[0472] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的包含用于核酸扩增的反应混合物的组合物以及相关的系统、装置、试剂盒和方法。

[0473] 任选地,反应混合物包含连续液相。

[0474] 任选地,可将反应混合物用于进行等温或热循环核酸扩增。

[0475] 任选地,连续液相包含(i)一种或多种聚合酶和/或(ii)至少一个支持物的任一个或任何组合。

[0476] 任选地,连续液相包含多个支持物。

[0477] 任选地,连续液相包含第一支持物。

[0478] 任选地,连续液相包含第二支持物。

[0479] 任选地,可将多个中的至少一个支持物连接至基本上单克隆的核酸群。

[0480] 任选地,可将第一支持物连接至第一基本上单克隆的核酸群。

[0481] 任选地,可将第二支持物连接至第二基本上单克隆的核酸群。

[0482] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群包含不同的序列或基本上相同的序列。

[0483] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群在严格杂交条件下彼此杂交或不杂交。

[0484] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群是不相同的。

[0485] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群是非互补的。

[0486] 任选地,反应混合物包含未进行外源标记的核苷酸。例如,核苷酸可以是天然存在的核苷酸,或不包含荧光部分、染料或其它外源的光学上可检测的标记的合成类似物。

[0487] 任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。

[0488] 任选地,反应混合物包含在单个反应容器中。

[0489] 任选地,反应混合物包含等温或热循环反应混合物。

[0490] 任选地,多个支持物包括小珠、颗粒、微粒、球体、凝胶、滤器、或管的内壁。

[0491] 任选地,可将多个中的至少一个支持物连接至多个核酸。

[0492] 任选地,可将多个中的至少一个支持物连接至一个或多个引物。引物可以是相同的(或包含共同的序列)或不同的。

[0493] 任选地,可将至少一个支持物连接至多个第一引物。

[0494] 任选地,可将至少一个支持物连接至多个第一引物和多个第二引物。

- [0495] 任选地,多个第一引物包含基本上相同的序列。
- [0496] 任选地,多个第一引物包含至少一个包含与多个不同的多核苷酸的多核苷酸的至少部分相同或互补的序列的第一引物。
- [0497] 任选地,多个第二引物包含至少一个包含与多个不同的多核苷酸的多核苷酸的至少部分相同或互补的序列的第二引物。
- [0498] 在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸的至少一个多核苷酸包含与第一引物内的序列基本上相同或基本上互补的第一序列。在一些实施方案中,至少一个多核苷酸还包含与第二引物内的序列基本上相同或基本上互补的第二序列。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸中的基本上所有多核苷酸包含第一序列和第二序列。
- [0499] 任选地,多个中的至少一个支持物连接至2-10个不同的多个引物。
- [0500] 任选地,2-10个不同的多个引物包含不同的序列。
- [0501] 任选地,2-10个不同的多个引物包含至少一个与不同的多核苷酸的至少部分进行杂交的序列。
- [0502] 任选地,2-10个不同的多个引物包含至少一个与不同的多核苷酸中的共同序列的至少部分进行杂交的序列。
- [0503] 任选地,支持物的至少一个连接至至少一个唯一识别条码序列。
- [0504] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群具有基本上相同的或不同的序列。
- [0505] 任选地,反应混合物包含至少一种重组酶。
- [0506] 任选地,重组酶可催化同源重组、链侵入和/或D-环形成。
- [0507] 任选地,重组酶是核蛋白丝的部分,所述核蛋白丝包含连接至反应混合物中附着于支持物的引物的重组酶。由重组酶连接的引物可连接至支持物或在溶液中。
- [0508] 任选地,反应混合物包含核蛋白复合物或多个核蛋白复合物。
- [0509] 任选地,反应混合物包含第一核蛋白复合物。
- [0510] 任选地,反应混合物包含第二核蛋白复合物。
- [0511] 任选地,多个中的至少一个核蛋白复合物包含至少一个连接至引物的重组酶。
- [0512] 任选地,反应混合物包含含有至少一个连接至第一引物的重组酶的第一核蛋白复合物。
- [0513] 任选地,反应混合物包含含有至少一个连接至第二引物的重组酶的第二核蛋白复合物。
- [0514] 任选地,重组酶包含来自T4、T2、T6、Rb69、Aeh1、KVP40、不动杆菌属(*Acinetobacter*)噬菌体133、气单胞菌属(*Aeromonas*)噬菌体65、蓝绿藻噬菌体P-SSM2、蓝绿藻噬菌体PSSM4、蓝绿藻噬菌体S-PM2、Rb14、Rb32、气单胞菌属噬菌体25、弧菌属(*Vibrio*)噬菌体nt-1、phi-1、Rb16、Rb43、噬菌体31、噬菌体44RR2.8t、Rb49、噬菌体Rb3或噬菌体LZ2的噬菌体重组酶。
- [0515] 任选地,重组酶包含来自T4细菌噬菌体的uvsX重组酶或来自大肠杆菌的recA重组酶。
- [0516] 任选地,反应混合物还包含聚合酶。
- [0517] 任选地,聚合酶缺乏5'至3'外切核酸酶活性。
- [0518] 任选地,聚合酶包含链置换活性。

- [0519] 任选地,聚合酶包含热稳定性或热敏感性聚合酶。
- [0520] 任选地,聚合酶包含DNA聚合酶或RNA聚合酶。
- [0521] 任选地,反应混合物还包含至少一种类型的核苷酸。
- [0522] 任选地,反应混合物包含未进行外源标记的核苷酸。例如,核苷酸可以是天然存在的核苷酸,或不包含荧光部分、染料或其它外源的光学上可检测的标记的合成类似物。
- [0523] 任选地,反应混合物包含核苷酸,其是天然存在的核苷酸。任选地,核苷酸不包含终止核酸合成的基团(例如双脱氧基团、可逆终止子等)。
- [0524] 任选地,多个中的至少一个支持物包含至少一个引物。
- [0525] 任选地,第一支持物连接至第一基本上单克隆的核酸群并且第二支持物连接至第二基本上单克隆的核酸群。
- [0526] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群具有不同的核酸序列。
- [0527] 任选地,第一和第二基本上单克隆的核酸群在严格杂交条件下彼此不杂交。
- [0528] 任选地,第一和第二核酸基本上单克隆的核酸群是不相同和非互补的。
- [0529] 任选地,反应混合物包含(i)至少两个待被扩增的多核苷酸模板和/或(ii)至少一个核蛋白丝复合物。
- [0530] 任选地,反应混合物包含至少一个连接至阻力化合物的多核苷酸、引物、模板或扩增产物。如本文中所用,术语“阻力化合物”及其变体描述这样的任何化学组合物:所述组合物可连接至核酸并阻碍其通过反应混合物的扩散,但仍允许在核酸合成反应中使用这样的多核苷酸、引物、模板或扩增产物进行核酸合成。在合成反应内这样的阻力化合物至核酸的连接通常减小这样的核酸在反应混合物中的流动性并可用于防止在使用相同的反应混合物发生的不同的合成反应之间扩增产物或模板的交叉污染。在一些实施方案中,阻力成分至一个或多个核酸成分的连接可增加单克隆产物的数量或比例。
- [0531] 在一些实施方案中,本教导提供用于核酸扩增的方法,所述核酸扩增包含至少一个流动性改变的核酸(例如引物)。在一些实施方案中,流动性改变的核酸显示增加的或减小的通过水介质的流动性。在一些实施方案中,修饰的核酸包含在沿核酸长度的任何位置上连接至一种或多种改变核酸通过水介质的流动性的化合物(例如阻力化合物)的核酸(例如引物)。在一些实施方案中,可将改变核酸的流动性的阻力化合物连接至核酸扩增反应中任何引物,包括第一、第二、第三、第四或任何其它引物。例如,可在5'末端、3'末端和/或内部位置的任一个或任何组合上将一个或多个阻力化合物连接至核酸。在一些实施方案中,可将修饰的核酸共价地或非共价地连接至改变核酸通过水介质的流动性的阻力化合物。例如,阻力化合物当连接至核酸时,可通过改变修饰的核酸相较于缺乏连接的化合物的核酸的外形尺寸、长度、半径、形状或电荷来提供水流体动力阻力。在一些实施方案中,连接至核酸的阻力化合物可改变核酸与水介质之间的相互作用(相较于水介质与缺乏连接的化合物的核酸之间的相互作用)。在一些实施方案中,阻力化合物可以是合成的、重组的或天然存在的。在一些实施方案中,阻力化合物可以是带点的、不带电的、极性的或疏水性的。在一些实施方案中,阻力化合物可以是线性的、分支的或具有树枝状聚合结构(dendrimeric structure)。在一些实施方案中,阻力化合物可包括核苷、糖、脂或氨基酸的单个部分或聚合物。
- [0532] 任选地,阻力化合物包括糖部分、多糖、蛋白、糖蛋白或多肽。任选地,阻力化合物

包括BSA、溶菌酶、 $\beta$ -肌动蛋白、肌球蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶或免疫球蛋白(例如IgG)。

[0533] 任选地,改变核酸通过水介质的流动性的阻力化合物包含一个或多个聚氧化乙烯(PEO)或聚氧化丙烯(PP0)部分,包括聚氧化乙烯(PEO)或聚氧化丙烯(PP0)的聚合物。这样的聚合物的非限制性实例包括三嵌段共聚物(例如PEO-PP0-PEO)、Pluronic<sup>TM</sup>-型聚合物和疏水性修饰的PEO聚合物。任选地阻力化合物包含一个或多个氨基酸部分、多肽和聚类肽。任选地,阻力化合物包括糖部分、多糖、疏水性修饰的多糖、纤维素衍生物、羧甲基纤维素钠、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素或羟丙甲基纤维素。任选地,阻力化合物包括疏水性修饰碱可溶联合的(HASE)聚合物、疏水性修饰的聚丙烯酰胺、热敏感聚合物或N-异丙基丙烯酰胺(NTPAAm),任选地,阻力化合物包括聚(乙二醇)甲基醚丙烯酸酯(PEGMEA)、四甘醇二丙烯酸酯(TEGDA)、聚(乙二醇)二甲基丙烯酸(EGDMA)或N,N'-亚甲基-二-丙烯酰胺(NMBA)。

[0534] 任选地,阻力化合物包括蛋白或多肽,包括BSA、溶菌酶、 $\beta$ -肌动蛋白、肌球蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乳酸脱氢酶。在一些实施方案中,可通过胺基或巯基连接将阻力化合物连接至核酸。

[0535] 在一些实施方案中,流动性改变的核酸包括连接至结合伴侣(例如用于与受体部分相互作用的亲和力部分)的核酸。在一些实施方案中,受体部分可用作阻力化合物。在一些实施方案中,可将亲和力部分连接至核酸,并且亲和力部分(其用作阻力化合物)与受体部分相互作用。例如,可将核酸连接至可结合抗生物素蛋白样部分的生物素部分。抗生物素蛋白样部分可用作阻力化合物。抗生物素蛋白样部分包括抗生物素蛋白以及抗生物素蛋白的可与生物素部分结合的任何衍生物、类似物和其它非天然形式。结合伴侣的其它实例包括表位(例如蛋白A)及其各自的抗体(例如抗-FLAG抗体),以及荧光素和抗荧光素抗体。本领域技术人员将容易地识别用于将阻力化合物连接至核酸的其它结合伴侣组合。

[0536] 任选地,可通过将阻力化合物和引物连接至结合伴侣对的两个成员的每一个来将阻力化合物连接至引物。

[0537] 任选地,反应混合物中的至少一个引物包含生物素。

[0538] 任选地,阻力化合物包括抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素。

[0539] 任选地,阻力化合物包括糖部分、多糖、蛋白、糖蛋白或多肽。

[0540] 任选地,阻力化合物包括BSA、溶菌酶、 $\beta$ -肌动蛋白、肌球蛋白、乳清蛋白、卵清蛋白、 $\beta$ -半乳糖苷酶、乳酸脱氢酶或免疫球蛋白(例如IgG)。

[0541] 任选地,反应混合物还包含辅助蛋白。

[0542] 任选地,辅助蛋白包括解旋酶、单链结合蛋白或重组酶载入因子。

[0543] 任选地,解旋酶包括来自T4噬菌体的uvsW。

[0544] 任选地,单链结合蛋白包括来自硫磺硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)的Sso SSB、来自詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)的MjA SSB或大肠杆菌SSB蛋白。

[0545] 任选地,单链结合蛋白包括来自T4噬菌体的gp32蛋白或来自T4噬菌体的经修饰的gp32蛋白。

[0546] 任选地,重组酶载入蛋白包括来自T4噬菌体的uvsY。

[0547] 任选地,反应混合物还包含ATP。

- [0548] 任选地,反应混合物还包含ATP再生系统。
- [0549] 任选地,ATP再生系统包含磷酸肌酸。
- [0550] 任选地,ATP再生系统包含肌酸激酶。
- [0551] 任选地,反应混合物还包含用于增加核酸扩增反应的效率或产率的加合物。
- [0552] 任选地,加合物包括甜菜碱、DMSO、脯氨酸、海藻糖、MMNO (4-甲基吗啉N-氧化物) 或PEG样化合物。
- [0553] 任选地,反应混合物中的至少一个多核苷酸模板包含与第一引物的至少某一部分互补或相同的第一序列,和与第二引物的至少某一部分互补或相同的第二序列。任选地,反应混合物包含多个双链多核苷酸,所述多核苷酸包含与第一引物的至少某一部分互补或相同的第一序列,和与第二引物的至少某一部分互补或相同的第二序列。任选地,第一序列位于多个中至少一个双链多核苷酸的末端处或附近,并且第二序列位于多个中至少一个双链多核苷酸的另一个末端处或附近。
- [0554] 任选地,反应混合物还包含扩散限制剂。
- [0555] 任选地,扩散限制剂减小多核苷酸离开支持物的扩散速率。
- [0556] 任选地,扩散限制剂减小连接至支持物的多克隆核酸群的水平。
- [0557] 任选地,扩散限制剂包含聚合物化合物。
- [0558] 任选地,扩散限制剂包括糖聚合物。
- [0559] 任选地,扩散限制剂包括基于纤维素的化合物。
- [0560] 任选地,扩散限制剂包括葡萄糖或半乳糖聚合物。
- [0561] 任选地,糖聚合物包括纤维素、葡聚糖、淀粉、糖原、琼脂或琼脂糖。
- [0562] 任选地,扩散限制剂包括嵌段共聚物化合物。
- [0563] 任选地,扩散限制剂包括由两条聚(环氧乙烷)亲水链侧接的聚(丙基环氧乙烷)中心链。
- [0564] 任选地,扩散限制剂形成胶束。
- [0565] 任选地,扩散限制剂形成胶束液晶。
- [0566] 任选地,扩散限制剂包括Pluronic<sup>TM</sup>化合物。
- [0567] 任选地,反应混合物还包括浓度为约0.025-0.8%w/v、或约0.05-0.7%w/v、或约0.075-0.6%w/v、或约0.1-0.5%w/v、或约0.2-0.4%w/v的扩散减少剂。
- [0568] 任选地,用于核酸扩增的组合物以及相关的系统、装置、试剂盒和方法还包括包含多个位点的表面、基质或介质,其中至少一个位点可操作地偶联至一个或多个传感器。
- [0569] 任选地,多个位点包括反应室、支持物、颗粒、微粒、球体、小珠、滤器、流动池、孔、沟、槽容器、凝胶或管的内壁。
- [0570] 任选地,多个位点可排列在随机阵列或已编阵列中。
- [0571] 任选地,多个位点可彼此流体连通。
- [0572] 任选地,多个位点的至少一个包括三维化学基质。
- [0573] 任选地,多个位点的至少一个可共价地连接至三维化学基质。
- [0574] 任选地,多个位点的至少一个包括丙烯酰胺层。任选地,多个位点的至少一个包括共价地连接至丙烯酰胺层的核酸。
- [0575] 在一些实施方案中,位点包含共形地置于可操作地偶联至传感器的孔之内的亲水

聚合物基质。

[0576] 任选地,亲水聚合物基质包括水凝胶聚合物基质。

[0577] 任选地,亲水聚合物基质是原位固化聚合物基质。

[0578] 任选地,亲水聚合物基质包括聚丙烯酰胺、其共聚物、其衍生物或其组合。

[0579] 任选地,聚丙烯酰胺缀合于寡核苷酸引物。

[0580] 任选地,孔具有0.1微米至2微米的特征直径。

[0581] 任选地,孔具有0.01微米至10微米的深度。

[0582] 在一些实施方案中,传感器包括场效应晶体管(FET)。FET可包括离子敏感性FET(ISFET)、化学敏感性场效应晶体管(chemFET)或生物活性场效应晶体管(bioFET)。

[0583] 任选地,配置一个或多个传感器来检测核苷酸并入的副产物。

[0584] 任选地,可配置一个或多个传感器来检测化学部分在一个或多个所述多个位点的存在。

[0585] 任选地,一个或多个传感器包括场效应晶体管(FET)、离子敏感性场效应晶体管(ISFET)、化学敏感性场效应晶体管(chemFET)或生物活性场效应晶体管(bioFET)。

[0586] 在一些实施方案中,FET包括包含彼此电偶联并被电介质层分离的多个导体的浮动栅结构,并且浮动栅导体是多个导体中最上面的导体。

[0587] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含定义位点的底面的上表面。

[0588] 在一些实施方案中,浮动栅导体包含导电材料,并且浮动栅导体的上表面包含导电材料的氧化物。

[0589] 在一些实施方案中,浮动栅导体通过传感材料偶联至至少一个反应室。

[0590] 在一些实施方案中,传感材料包含金属-氧化物。

[0591] 在一些实施方案中,传感材料对氢离子敏感。

[0592] 任选地,来自核苷酸并入反应的副产物包括焦磷酸盐、氢离子或质子。

[0593] 还提供了包含下述的任一个、任何亚组或所有的组合物:至少一个反向核酸链、固定在至少一个支持物上的多个正向引物、溶液中的多个反向引物和聚合酶。正向和/或反向引物任选地是低熔点的或如本文中所述地富含腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶。示例性组合物包括包含多个空间上分离的克隆群的固体支持物,所述克隆群各自在3'末端包含低熔点引物结合序列并在5'末端包含低熔点引物序列。任选地,组合物还包含重组酶。或者,组合物任选地不包含另一种不是聚合酶的酶,例如重组酶或逆转录酶或解旋酶或切口酶。另一种示例性组合物包含下列组分的任一种或多种:(1)反向核酸链,(2)固定在支持物上的多个低熔点正向引物,(3)溶液中的多个低熔点反向引物,和(4)聚合酶。任选地,正向引物与反向链的3'部分或末端是可杂交的(例如互补)。任选地,反向引物与反向链的5'部分或末端是基本上相同的。组合物可包含本文中描述的任一种或多种试剂,和/或可经历本文中描述的任一种或多种程序或条件。

[0594] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含由本公开内容的任何方法产生的扩增的核酸的组合物。在一些实施方案中,在支持物上的不连续位点周围形成克隆扩增子的局限的克隆群。示例性不连续位点是起始核酸链至支持物的连接点,并且从该位点利用起始核酸或其拷贝作为模板通过引物延伸直接或间接地产生克隆群内的其它核酸。

[0595] 任选地,组合物包括可由本文中描述的任一种或多种方法产生的核酸的收集物。

例如,收集物可包括在表面上占据一个或多个分离的区域的固定的核酸。在一些实施方案中,每个区域包含多个相同的核酸链和任选地多个相同的杂交至其的互补链,其中互补链不与固体支持物附着或连接或缔合,除因与固定的核酸杂交而引起的以外。任选地,如此定位这样的区域内的个体核酸链以便另一个核酸链在表面上位于该链的长度的距离之内。任选地在其上固定了核酸的表面的每 $\text{mm}^2$ 上存在至少一个分离的区域。例如,分离的区域的数量/ $\text{mm}^2$ 在其上固定了核酸的表面大于 $10^2$ 、大于 $10^3$ 、大于 $10^4$ 、大于 $10^5$ 、大于 $10^6$ 、大于 $10^7$ 或大于 $10^8$ 。

[0596] 扩增的克隆群的收集物可形成阵列,其可以是一维的(例如一系列普遍单克隆的微珠)或二维的(例如扩增的克隆群位于平面支持物上)或三维的。任选地但非必须地定位或排列阵列的个体克隆群以便其被寻址或是可寻址的。任选地,不同的克隆群以适当的距离彼此间隔,所述距离通常足以允许不同的克隆群彼此区分。在实施方案中,以有序的或无序的(例如随机的)方式在平面衬底上散布局限的克隆群。

[0597] 示例性阵列的特征是个体可区分的核酸克隆群,其中任选地在一个或多个支持物上分布该特征。在示例性微珠实施方案中,阵列包含多个微珠,其中个体微珠通常包含核酸的单克隆群,不同的微珠通常包含不同的克隆群(例如,其在序列上不同)。任选地,将微珠分布或填充在平面衬底上的单层中。在其它实施方案中,阵列包括单个(例如平面)支持物,单个支持物包含多个空间上不连续的核酸克隆群,其中不同的克隆群任选地在序列上不同。

[0598] 任选地,个体克隆群内的一个或多个核酸可直接地连接至平面衬底。在另一个实例中,个体克隆群的核酸连接至微珠,例如如本文中所讨论的。任选地在平面衬底上以随机或有序的方式将克隆微珠紧密地填充在一起。任选地,多于20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或99%的微珠与至少一个、两个、四个或六个其它的微珠接触。任选地,少于10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或99%的微珠与一个、两个、四个或六个其它的微珠接触。

[0599] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法以及相关的组合物、系统、试剂盒和装置,包括使用本文中公开的任何扩增方法、组合物或系统进行多重核酸扩增。

[0600] 在一些实施方案中,方法包括使用聚合酶进行多重扩增(例如聚合酶介导的多重核酸扩增反应)。

[0601] 在一些实施方案中,方法还可包括使用核酸扩增反应再扩增来自多重核酸扩增的扩增子。

[0602] 任选地,多重核酸扩增可在单个反应混合物中进行。

[0603] 任选地,可对包含多个不同的核酸靶序列的样本进行多重核酸扩增。

[0604] 任选地,可在单个反应混合物中扩增多个不同的核酸靶序列。

[0605] 任选地,可在单个反应混合物中扩增至少数十打或至少数百或至少数千(或更多)的核酸靶序列。

[0606] 任选地,可在单个反应混合物中扩增至少五十或至少一百个核酸靶序列。

[0607] 任选地,多重扩增可包括将至少部分样本与重组酶、聚合酶和/或至少一个引物的任一种或任意组合进行接触。

[0608] 任选地,可在等温或热循环条件下进行多重扩增。

[0609] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法以及相关的组合物、系统、试剂盒和装置,包括多重核酸扩增,所述多重核酸扩增包括在单个反应混合物内从包含多个不同的核酸靶序列的样本扩增至少五十个不同的核酸靶序列(或更多),所述扩增包括将至少部分样本与重组酶和多个引物在等温扩增条件下进行接触。

[0610] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法以及相关的组合物、系统、试剂盒和装置,包括多重核酸扩增,所述多重核酸扩增包括在单个反应混合物内从包含多个不同的核酸靶序列的样本扩增不同的核酸靶序列,所述扩增包括通过将至少部分样本与重组酶和多个引物在等温扩增条件下进行接触来产生至少五十个的多个不同的扩增的靶序列(或更多)。

[0611] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法以及相关的组合物、系统、试剂盒和装置,包括通过使用核酸扩增反应(例如重组酶)再扩增来自多重核酸扩增的扩增子来产生基本上单克隆的核酸群。

[0612] 任选地,用于多重核酸扩增的方法还可包括重组酶介导的核酸扩增方法,其包括通过如下步骤再扩增至少五十个不同的扩增的靶序列的至少一些:(a)形成包括单一连续液相的反应混合物,其包含(i)多个支持物,(ii)五十个不同的扩增的靶序列的至少一个和(iii)重组酶;和(b)使反应混合物经历扩增条件,从而产生多个支持物,所述多个支持物连接至基本上单克隆的连接至其的核酸群。

[0613] 任选地,在用于多重核酸扩增的方法中,可在基本上非耗尽的条件下扩增来自样本的不同的核酸靶序列。

[0614] 任选地,在用于多重核酸扩增的方法中,可在基本上耗尽的条件下扩增来自样本的不同的核酸靶序列。

[0615] 任选地,在用于多重核酸扩增的方法中,单个反应混合物包括等温或热循环反应混合物。

[0616] 在一些实施方案中,可在阵列的分离的室、孔、腔或位点内扩增两个或更多个模板或靶,所述阵列的分离的室、孔、腔或位点彼此流体连通或被扩增反应混合物的相同的单一连续液相占据。这样的实施方案包括用于基于阵列的核酸扩增的实施方案。

[0617] 例如,在一些实施方案中,本公开内容涉及用于核酸扩增的方法,包括:将靶多核苷酸分配至反应室或位点的阵列中的反应室或位点,和在反应室或位点内扩增单个靶多核苷酸。任选地,将两个或更多个靶多核苷酸分配至阵列的两个或更多个反应室或位点中,并且两个或更多个经分配的靶多核苷酸在其各自的反应室或位点内平行地被扩增。任选地,反应室或位点的至少两个在分配期间各自接收单个靶多核苷酸(反应室或位点的一个或多个可任选地在分配期间接收零个或多于一个靶多核苷酸)。至少两个靶多核苷酸可在其各自的反应室内被克隆地扩增。包含靶多核苷酸的至少一个反应室可与包含靶多核苷酸的至少一个其它的反应室在扩增期间流体连通。

[0618] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法(以及相关的组合物、系统、装置和试剂盒),包括:(a)通过将单个多核苷酸引入至少两个彼此流体连通的反应室来将至少两个不同的多核苷酸分配至反应室的阵列中;和(b)通过在所述至少两个反应室内扩增多核苷酸形成至少两个基本上单克隆的核酸群。通常地,至少两个反应室在扩

增期间彼此保持流体连通。

[0619] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法(以及相关的组合物、系统、装置和试剂盒),包括:(a)在包括第一和第二反应室的反应室的阵列中,将第一模板多核苷酸分配至第一反应室中并将第二模板多核苷酸分配至第二反应室中,和(b)通过在其各自的反应室内克隆地扩增第一和第二模板多核苷酸来形成至少两个基本上单克隆的核酸群,其中从具有多个不同的多核苷酸的核酸样本分配单个多核苷酸。任选地,第一和第二反应室在扩增期间包含单一连续液相的不同部分。例如,阵列的第一和第二反应室可在扩增期间流体连通。

[0620] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法,包括(a)将不同的单个多核苷酸分配至多个反应室的每一个中,和(b)通过在多个反应室内扩增不同的单个多核苷酸来在反应室的每一个中形成单克隆核酸群,其中从具有多个不同的多核苷酸的核酸样本分配单个不同的多核苷酸。

[0621] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法,包括(a)通过将单个多核苷酸引入至少两个彼此流体连通的反应室来将至少两个不同的多核苷酸分配至反应室的阵列中;和(b)通过在所述至少两个反应室内扩增多核苷酸形成至少两个基本上单克隆的核酸群。

[0622] 在一些实施方案中,方法还可包括将一个或多个支持物(例如小珠或颗粒等)引入阵列的至少一个反应室或位点。可在将多核苷酸分配至阵列中之前、期间或之后将一个或多个支持物引入至少一个反应室或位点。在一些实施方案中,阵列的至少一个反应室或位点接收单个支持物。在一些实施方案中,大部分反应室或位点接收单个支持物。在一些实施方案中,可在分配之前将支持物与多核苷酸混合并将其与多核苷酸一起分配至阵列中。至少一个支持物可任选地连接至核酸分子,所述核酸分子包含与在扩增期间存在于反应室或位点中的多核苷酸的部分基本上互补或基本上相同的引物序列。在一些实施方案中,至少一个支持物包含核酸分子,所述核酸分子包含与反应室或孔中的靶多核苷酸或模板的部分基本上互补或基本上相同的引物序列。在一些实施方案中,至少一个支持物包含核酸分子,所述核酸分子包含与在扩增期间存在于反应室或位点中的另一种引物的至少部分基本上互补或基本上相同的引物序列。

[0623] 在一些实施方案中,扩增可包括将反应混合物引入阵列的至少一个反应室或位点中。任选地,在多核苷酸至阵列的分配或支持物至阵列的引入之前、期间或之后将反应混合物引入反应室或位点中。可以以任何顺序或任何组合将反应混合物、支持物和多核苷酸引入或分配至阵列中。在一些实施方案中,阵列的至少一个反应室或位点接收单个支持物、单个多核苷酸和足够用以支持多核苷酸在反应室或位点内的扩增的反应混合物。

[0624] 在一些实施方案中,方法可包括通过将支持物与多核苷酸在杂交条件下接触来将多核苷酸的至少部分杂交至支持物。杂交可在支持物和/或多核苷酸至阵列的反应室或位点的引入之前、期间或之后发生。在一些实施方案中,将连接至第一引物序列的至少一个支持物引入阵列的至少一个反应室或位点,随后将多核苷酸引入反应室或位点,在反应室或位点内多核苷酸杂交至支持物。或者,支持物可杂交至通过在反应室或位点内多核苷酸的扩增产生的扩增产物。

[0625] 反应混合物可包括本文中描述的任何反应混合物和组分。在一些实施方案中,反

应混合物可包括下列组分的任一种或多种：等温扩增试剂（例如，一种或多种重组酶、解旋酶即相关的辅助因子、聚合酶等）、筛分剂、核苷酸等。

[0626] 在一些实施方案中，本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法（及相关的组合物、试剂盒、系统和装置），包括：(a) 以任何顺序或组合将第一多核苷酸模板和第一支持物引入反应室或位点的阵列的第一反应室或位点，并将第二多核苷酸模板和第二支持物引入阵列的第二反应室或位点；和 (b) 在第一反应室或位点内在第一支持物上克隆地扩增第一多核苷酸模板，并在第二反应室或位点内在第二支持物上克隆地扩增第二多核苷酸模板，同时在扩增期间第一反应室或位点与第二反应室或位点流体连通。克隆地扩增可包括产生连接至来自第一多核苷酸模板的第一扩增子的第一支持物，和连接至来自第二多核苷酸模板的第二扩增子的第二支持物。任选地，第一和第二位点（或反应室）在扩增期间包含相同反应混合物的相同连续液相。例如反应混合物可包括包含第一和第二多核苷酸模板和第一和第二支持物的单一连续液相。可在多核苷酸模板和/或支持物的引入之前、期间或之后将反应混合物引入阵列的反应室或位点。在一些实施方案中，公开的方法还包括在引入第一和第二多核苷酸模板和第一和第二支持物之后将反应混合物引入第一和第二反应室或位点。在一些实施方案中，反应混合物包括重组酶或解旋酶或重组酶和解旋酶。重组酶可来源于肌尾病毒（例如 uvsX）、细菌、酵母或人的重组酶或其来自其它物种的类似物。在一些实施方案中，反应混合物包含聚合酶。在一些实施方案中，反应混合物包含筛分剂，例如聚丙烯酰胺、琼脂糖或纤维素聚合物（例如，HEC、CMC 或 MC 或其衍生物）。在一些实施方案中，反应混合物包含扩散限制剂。

[0627] 在一些实施方案中，扩增包括将多核苷酸模板的第一引物结合序列杂交至支持物的第一引物的第一引物序列来将所述多核苷酸模板连接至具有包含第一引物序列的第一引物的支持物或表面（例如颗粒或小珠）。

[0628] 在一些实施方案中，可在单一连续液相中进行用于核酸扩增的方法，所述单一连续液相不提供在单个反应容器中发生的多个核酸扩增反应的划分。在一些实施方案中，可在提供划分的油包水型乳剂（微反应容器）中进行用于核酸扩增的方法。

[0629] 在其中在阵列的反应室或位点内进行扩增的实施方案以及其中在单个反应容器内进行扩增的实施方案中，表面或支持物任选地包括至少第一引物，其包含第一引物序列。在一些实施方案中，一个或多个多核苷酸模板包括第一引物结合序列。第一引物结合序列可与第一引物序列是相同的或基本上相同的。或者，第一引物结合序列可与第一引物序列是互补的或基本上互补的。在一些实施方案中，第一引物序列和第一引物结合序列不显示显著的同源性或互补性，而是与反应混合物中存在的另一种核苷酸序列基本上相同或基本上互补。在这样的实施方案中，扩增可包括扩增反应中间产物的形成，所述中间产物包括与第一引物序列、第一引物结合序列或两者具有显著的同源性或互补性的核苷酸序列。

[0630] 在一些实施方案中，在反应混合物中存在至少两个不同的多核苷酸模板，并且扩增导致至少两个不同的基本上单克隆群的形成，所述单克隆群各自来源于单个所述多核苷酸模板的扩增。在一些实施方案中，至少两个基本上单克隆群的两个或更多个连接至相同的支持物或表面。两个或更多个基本上单克隆群的每一个可连接至相同的支持物或表面上的不同的独特位置。或者，两个或更多个基本上单克隆群的每一个可各自连接至不同的支持物或表面。不同的单克隆群至不同的支持物或表面的分离在需要在分析之前分离群体的

应用中可以是有利的。在一些实施方案中,支持物或表面是小珠或颗粒的部分,其在形状上可以是球形或球体的。在一些实施方案中,支持物或表面形成二维或三维阵列的部分。

[0631] 在一些实施方案中,可在反应混合物中包含筛分剂或扩散减少剂的时候进行公开的用于核酸扩增的方法。这些试剂可增加在扩增期间形成的单克隆群的总数量和/或比例(例如百分比)。在一些实施方案中,方法包括使用相对于常规反应混合物提供增加的单克隆或基本上单克隆的扩增子的产率的反应混合物。

[0632] 在一些实施方案中,方法包括通过部分变性模板进行扩增。例如,扩增包括模板行走。例如,待被扩增的模板可包括包含引物结合部位的接头序列,其相较于模板整体具有相对低的 $T_m$ 。在一些实施方案中,如本文中更详细地描述的,在基本上高于接头序列的 $T_m$ 而基本上低于模板的 $T_m$ 的温度下进行扩增。在一些实施方案中,在低于核酸模板的 $T_m$ 至少5℃、10℃、15℃、20℃、25℃或50℃的温度下进行扩增。在一些实施方案中,在高于(例如至少5℃、10℃、15℃、20℃、25℃或50℃更高)第一引物、第二引物或第一和第二引物的 $T_m$ 的温度下进行扩增。

[0633] 在一些实施方案中,反应混合物可任选地包括下列组分的任一种或多种:(a) 任选地包含至少第一引物序列的一个或多个支持物;(2) 重组酶;(3) 聚合酶;(4) 扩散限制剂;(5) 筛分剂;(6) 拥挤试剂;(7) ATP再生系统;(8) 单链结合蛋白(SSBP);和(8) 重组酶辅助因子,例如重组酶载体蛋白。在一些实施方案中,通过在扩散限制剂和/或筛分剂存在的条件下在表面上扩增(例如,通过将一个扩增引物连接至表面上)多核苷酸模板来增加单克隆或基本上单克隆的群的产率。扩散限制剂或筛分剂可通过减少在扩增期间扩增的产物多核苷酸离开表面的扩散或迁移来提供增加的单克隆群的产率。

[0634] 在一些实施方案中,反应混合物包括一种或多种等温扩增试剂。这样的试剂可包括例如重组酶或解旋酶。

[0635] 在一些实施方案中,可利用催化同源重组的酶,例如可结合第一引物以形成复合物或可催化链侵入或可形成D-环结构的酶,来进行用于核酸扩增的方法。在一些实施方案中,催化同源重组的酶包括重组酶。

[0636] 在一些实施方案中,扩增条件包括等温条件或热循环条件。

[0637] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括:(a) 形成包括单一连续液相的反应混合物,所述单一连续液相包括(i) 催化同源重组的酶,(ii) 一个或多个表面,和(iii) 多个不同的多核苷酸;和(b) 使反应混合物经历适合用于核酸扩增的条件。

[0638] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括:(a) 形成包括单一连续液相的反应混合物,所述单一连续液相包括(i) 催化同源重组的酶,(ii) 一个或多个各自连接至多个第一引物的小珠,和(iii) 多个不同的多核苷酸;(b) 通过使反应混合物经历扩增条件形成两个或更多个基本上单克隆的扩增的核酸群。扩增条件可包括等温或热循环条件。在一些实施方案中,第一引物可杂交至多核苷酸的至少部分。

[0639] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法,包括:(a) 形成包括单一连续液相的反应混合物,所述单一连续液相包括一个或多个支持物(或表面)、多个多核苷酸和重组酶;(b) 通过使反应混合物经历扩增条件在至少一个支持物(或表面)上克隆地扩增所述多个不同的多核苷酸的至少两个。在一些实施方案中,扩增条件可包括等温或热循环扩增条件。反应混合物可任选地包括重组酶。在一些实施方案中,反应混合物包括

聚合酶。在一些实施方案中,反应混合物包括引物,所述引物可以在溶液中。任选地,支持物或表面的至少一个可包括引物。

[0640] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸扩增的方法,包括:(a)形成包括单一连续液相的反应混合物,所述单一连续液相包括(i)重组酶,(ii)连接至一个或多个包含第一引物序列的第一引物的多个小珠,和(iii)多个不同的多核苷酸模板;(b)将所述第一引物的至少一个杂交至多个不同的多核苷酸模板的至少一个;(c)使反应混合物经历核酸扩增条件和通过扩增至少一个多核苷酸模板以形成至少第一扩增群来产生至少一个基本上单克隆的多核苷酸群。在一些实施方案中,至少一个基本上单克隆的群中的至少30%、90%的多核苷酸与原始存在于反应混合物中的至少一个多核苷酸模板是基本上相同的(或基本上互补)。在一些实施方案中,第一扩增群的至少部分连接至多个小珠的一个小珠。

[0641] 在一些实施方案中,步骤(a)中的形成反应混合物包括:通过将重组酶与连接至多个小珠的多个第一引物的至少一个进行接触来形成核蛋白复合物。

[0642] 在一些实施方案中,步骤(b)中的使反应混合物经历核酸扩增条件包括进行核苷酸聚合反应。例如,核苷酸聚合反应可包括任选地当第一引物序列杂交至反应混合物中的一个多核苷酸模板时将核苷酸并入第一引物序列。

[0643] 在一些实施方案中,使反应混合物经历核酸扩增条件包括将第一引物与多核苷酸模板、重组酶、聚合酶和核苷酸以任何顺序或以任何组合进行接触。

[0644] 在一些实施方案中,核酸扩增条件包括重复这样的循环:形成包含重组酶、第一引物的至少部分和第一多核苷酸模板的至少部分的核蛋白复合物,和将核蛋白复合物与催化一种或多种核苷酸至第一引物的并入的聚合酶进行接触。

[0645] 在一些实施方案中,可进行循环的核酸扩增反应以产生各自连接了基本上单克隆的多核苷酸群的多个小珠。

[0646] 在一些实施方案中,可在等温条件或热循环条件下进行用于核酸扩增的方法。

[0647] 在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸可以是单链或双链多核苷酸。在一些实施方案中,双链多核苷酸的热变性或化学变性是非必需的,因为重组酶可通过催化链侵入产生局部的链变性。

[0648] 在一些实施方案中,可在单个反应容器中进行用于核酸扩增的方法。在一些实施方案中,可在包含单一连续液相的单个反应容器中进行核酸扩增反应。例如,单一连续液相可包括扩增混合物,所述扩增混合物包括多个各自连接了多个第一引物的小珠、多个不同的多核苷酸和多个重组酶。在一些实施方案中,扩增混合物还可包括聚合酶和多个核苷酸。在一些实施方案中,扩增混合物还可包括ATP、核苷酸和辅助因子。单个反应容器的非限制性实例包括管、孔或类似的结构。

[0649] 在一些实施方案中,可以以任何顺序包括连续地或基本上同时地或两者的组合将多核苷酸和试剂放置入反应容器中。在一些实施方案中,试剂包括连接了多个第一引物的小珠、重组酶、聚合酶、核苷酸、ATP、二价阳离子和辅助因子。

[0650] 在一些实施方案中,可在单一连续液相中进行用于核酸扩增的方法。单一连续液相可包括其中单一连续液相的任何给定部分或区域与相同的单一连续液相的任何其它部分或区域流体连通的任何液相。通常地,溶解或悬浮在单一连续液相中的组分可自由地扩

散或迁移至液相中的任何其它点。在一些实施方案中,然而,单一连续液相可包括扩散限制剂,其减缓单一连续液相中的扩散速率。单一连续液相的一个示例性实施方案是油包水型乳剂中的单个含水微滴;在这样的乳剂中,每一个微滴将形成分离的相;两个微滴可合并形成单个相。

[0651] 在一些实施方案中,单一连续液相基本上由单一水相组成。在一些实施方案中,单一连续液相缺乏非水相;例如,连续液相不包括油或有机溶剂。在一些实施方案中,多个核酸扩增反应在单个反应容器的水相中发生。在一些实施方案中,单一连续液相不划分在单个反应容器中发生多个核酸扩增反应。

[0652] 在一些实施方案中,可在提供划分的油包水型乳剂中进行用于核酸扩增的方法。

[0653] 当使用多个多核苷酸模板进行核酸扩增时,使用传统扩增方法的克隆扩增通常依赖于技术例如将反应混合物划分至彼此非流体连通的分离的部分或组分,以保持克隆性和防止不同的扩增群的交叉污染以及保持足够的单克隆扩增产物的产率。使用这样的常规扩增方法,在相同的反应混合物内克隆地扩增多核苷酸模板而不进行反应混合物至分离的区室或容器的划分或分配通常是不可行的,因为在这样的扩增期间反应混合物内的任何多核苷酸(包括模板和/或扩增产物)将因扩散和/或布朗运动而倾向于通过混合物随机地迁移。这样的扩散或迁移通常增加多克隆扩增的发生,从而将产生极少的(如果有的话)单克隆群。

[0654] 在常规扩增方法中用以减少多克隆群的产生的一个适当的技术使用物理屏障来将个体扩增反应分离至不连续的区室中。例如,乳剂PCR使用油包水型微反应容器,其中油相包括许多分离的即不连续的含水反应区室。每一个区室用作独立的扩增反应容器,从而整个乳剂能够支持在单个反应容器(例如Eppendorf管或孔)的分离(不连续的)液相中的许多分离的扩增反应。类似地,可制备扩增“主要混合物”并将其分配至分离的反应室(例如孔的阵列)中,产生一组不连续的和分离的相,其每一个限定分离的扩增反应。可在扩增前将这样的分离相进一步彼此封闭。这样的封闭可用于防止平行的和分离的反应之间的交叉污染。封闭的示例性形式可包括使用盖子或相屏障(例如在含水反应之上的矿物油层)以将PCR反应划分至个体的和不连续的区室,在所述区室之间反应组分的转移不会发生。

[0655] 用以防止交叉污染和减少多克隆性的其它技术依赖于在扩增期间一个或多个反应组分(例如一个或多个模板和/或引物)的固定以防止扩增反应产物的交叉污染和其导致的单克隆性的减少。一个这样的实例包括桥式PCR,其中扩增所需要的所有引物(例如正向和反向引物)均连接至基质支持物的表面。除了这样的固定,在反应混合物中可包括另外的固定组分。例如,在扩增期间可将多核苷酸模板和/或扩增引物悬浮在凝胶或其它基质中以防止扩增反应产物从合成位点迁移。这样的凝胶和基质通常需要在之后被去除,这需要使用适当的“解链”或其它的回收步骤,从而损失产率。

[0656] 在一些实施方案中,本公开内容提供用于在反应混合物的单一连续液相中平行地进行多个多核苷酸模板的基本上单克隆的扩增,而不需要多个反应组分(例如两种引物)在扩增期间的划分或固定的方法。替代地,可直接地将溶液中的多核苷酸模板的混合物与扩增反应组分和具有连接至其的第一引物的适当的表面或支持物进行接触,可在相同的连续液相中提供扩增所需的其它组分,包括聚合酶、一种或多种类型的核苷酸和任选地第二引物。在一些实施方案中,反应混合物还包括重组酶。任选地,反应混合物还包括至少一种选

自扩散限制剂、筛分剂和拥挤试剂的试剂。包含在单一连续液相中的适合用于实现模板的单克隆扩增的扩增混合物的实例进一步地描述于本文中。任选地,可在单个表面或支持物上的不同的位置上扩增不同的模板,或可在相同的反应混合物内的不同的表面或不同的支持物上扩增不同的模板。

[0657] 在一些实施方案中,反应混合物可包括一种或多种筛分剂。筛分剂任选地包括可对多核苷酸模板或其相应的扩增产物的迁移提供物理屏障的任何化合物。(迁移可包括模板或扩增产物在反应混合物内的任何移动;扩散包括牵涉沿浓度梯度移动的迁移形式)。在一些实施方案中,筛分剂包括可提供具有多个小孔的基质的任何化合物,所述多个小孔足够小以减少核酸合成反应混合物或核酸反应混合物的任一种或多种特定组分的移动。

[0658] 在一些实施方案中,筛分剂提供分子筛。例如,筛分剂可减少多核苷酸(或与表面或小珠缔合的多核苷酸)通过包含筛分剂的反应混合物的移动。筛分剂可任选地具有小孔。

[0659] 当在反应混合物的单一连续液相内克隆地扩增两个或更多个模板多核苷酸的时候,筛分剂的包含可以是有利的。例如,筛分剂可阻止或减缓模板或通过模板的至少某一部分的复制产生的扩增的多核苷酸在反应混合物内的扩散,从而防止多克隆污染物的形成而无需在扩增期间通过物理方法或封装方法(例如乳剂)划分反应混合物。这样的在单个反应混合物的单一连续液相内克隆地扩增模板而无需进行划分的方法极大地减少了与产生适合用于高通量方法例如数字PCR、下一代测序等的文库相关的成本、时间和工作量。

[0660] 在一些实施方案中,筛分剂的平均孔径为使得靶组分(例如多核苷酸)在反应混合物内的移动被选择性阻碍或阻止。在一个实例中,筛分剂包括可提供具有多个小孔的基质的任何化合物,所述多个小孔足够小以减缓或阻碍多核苷酸通过包含筛分剂的反应混合物的移动。因此,筛分剂可减少多核苷酸的布朗运动。

[0661] 在一些实施方案中,筛分剂选择性作用以阻碍具有高于特定阈值或范围的平均分子大小或重量的分子的迁移,而不阻碍其它的具有低于阈值或范围的平均分子大小或重量的分子的迁移。

[0662] 在一些实施方案中,筛分剂选择性作用以阻碍具有低于特定阈值或范围的平均分子大小或重量的分子的迁移,而不阻碍其它的具有高于阈值或范围的平均分子大小或重量的分子的迁移。

[0663] 在一些实施方案中,可选择筛分剂来选择性阻碍、减缓、减少或阻止多核苷酸通过反应混合物的移动,但足够大以允许较小的组分(例如,阳离子、核苷酸、ATP和辅助因子)通过反应混合物的移动。在一些实施方案中,筛分剂具有可通过增加或减小筛分剂的浓度来调整的平均孔径或平均孔径范围。例如,可选择筛分剂(或筛分剂的组合)的分子量、固有粘度和浓度来在特定溶剂(例如水)中制备核酸反应混合物以产生这样的基质:其具有期望的阻止具有特定大小或长度的靶多核苷酸的迁移的能力,或期望的平均孔径或粘度。在一些实施方案中,筛分剂可通过增加核酸反应混合物的粘度来减少总体流量。在一些实施方案中,筛分剂可以是水溶性的。在一些实施方案中,可通过将筛分剂与溶剂(例如含水溶剂,例如水)混合来制备具有多个小孔的基质。在一些实施方案中,筛分剂不干扰重组酶核蛋白复合物的形成或核苷酸聚合。

[0664] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于进行核酸扩增反应的方法,包括通过在存在一种或多种筛分剂,任选地在存在重组酶、聚合酶或任何其他适当的能够催化或

促进核酸扩增的试剂的情况下在表面或支持物上扩增靶多核苷酸来产生两个或更多个基本上单克隆的群。

[0665] 在一些实施方案中,在反应混合物中包括筛分剂可减少多核苷酸离开给定支持物或表面的移动(例如减少脱落)并可增加多核苷酸将杂交至支持物或表面和提供核苷酸聚合的起始部位的可能性,从而增加在扩增反应期间产生的基本上单克隆的扩增子的比例。

[0666] 在一些实施方案中,扩增包括在存在筛分剂的情况下在多个不同的小珠支持物上扩增多个不同的多核苷酸模板,和回收一定百分比的基本上单克隆的小珠支持物,每一个这样的基本上单克隆的小珠支持物包括连接至基本上单克隆的多核苷酸群的小珠支持物。在一些实施方案中,回收的基本上单克隆的小珠支持物的百分比基本上高于从反应混合物回收的总的扩增的小珠支持物(即包括多克隆或单克隆群的总的小珠支持物)的5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、89%、90%或95%。在一些实施方案中,回收的基本上单克隆的小珠支持物的百分比基本上高于在不存在筛分剂的情况下但在其它方面基本上相似或相同的扩增条件下进行扩增之后回收的基本上单克隆的小珠支持物的百分比。

[0667] 在一些实施方案中,筛分剂包括聚合物化合物。在一些实施方案中,筛分剂包括交联的或非交联的聚合物化合物。以非限制性实例的方式,筛分剂可包括多糖、多肽、有机聚合物等。

[0668] 在一些实施方案中,筛分剂包括线性或分支的聚合物。在一些实施方案中,筛分剂包括带点的或中性的聚合物。

[0669] 在一些实施方案中,筛分剂可包括一种或多种各自具有平均分子量和粘度的聚合物的混合物。

[0670] 在一些实施方案中,筛分剂包括具有约10,000-2,000,000或约12,000-95,000或约13,000-95,000的平均分子量的聚合物。

[0671] 在一些实施方案中,筛分剂可显示在以2个重量百分比溶解于水中时在约25℃下测量的约5厘泊至约15,000厘泊,或以2%水溶液在约25℃下测量的约10厘泊至约10,000厘泊,或以2%水溶液在约25℃下测量的约15厘泊至约5,000厘泊的平均粘度范围。

[0672] 在一些实施方案中,筛分剂包括约25至约1,5000k<sub>Mv</sub>或约75-1,000k<sub>Mv</sub>或约85-800k<sub>Mv</sub>的粘度平均分子量(M<sub>v</sub>)。在一些实施方案中,反应混合物包括约0.1至约20%重量/体积或约1-10%w/v或约2-5%w/v的筛分剂。

[0673] 在一些实施方案中,筛分剂包括丙烯酰胺聚合物例如聚丙烯酰胺。

[0674] 在一些实施方案中,筛分剂包括一种或多种氨基酸的聚合物。例如,筛分剂可包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、肌动蛋白、肌球蛋白、角蛋白、原肌球蛋白(tropomyosin)等。在一些实施方案中,筛分剂可包括这些多肽的任何多肽的衍生物。

[0675] 在一些实施方案中,筛分剂包括多糖聚合物。在一些实施方案中,筛分剂包括葡萄糖或半乳糖的聚合物。在一些实施方案中,筛分剂包括一种或多种选自纤维素、葡聚糖、淀粉、糖原、琼脂、壳多糖、果胶或琼脂糖的聚合物。在一些实施方案中,筛分剂包括吡喃葡萄糖聚合物。

[0676] 在一些实施方案中,筛分剂包括具有一个或多个在扩增反应条件下为极性或带电的基团的聚合物。例如,聚合物可包含一个或多个阳离子基团、一个或多个阴离子基团或两

者。在一些实施方案中,筛分剂是包含一个或多个带电基团的多糖。在一些实施方案中,筛分剂是包含一个或多个羧基的多糖,所述羧基在扩增反应条件下是或倾向于是带负电的。例如筛分剂可包括羧甲基纤维素(CMC)聚合物。在一些实施方案中,筛分剂可包括精胺和/或精脒。在一些实施方案中,筛分剂包括聚赖氨酸和/或聚精氨酸。例如,筛分剂可包括聚-L-赖氨酸、聚-D-赖氨酸、聚-D-谷氨酸等。在一些实施方案中,筛分剂包括一个或多个组蛋白或组蛋白-核酸复合物或其衍生物。组蛋白是高度碱性蛋白,其能够结合核酸并包括蛋白H1、H2A、H2B、H3和H4。在一些实施方案中,例如通过甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、SUMO化、瓜氨酸化、核糖基化(包括ADP-核糖基化)等来修饰组蛋白。

[0677] 在一些实施方案中,筛分剂包括聚合物,包括化学取代的聚合物。聚合物可包括反应基团(例如,反应基团可以与适当的取代物反应以产生取代的聚合物)。在一些实施方案中,聚合物包括荧光-、羧基-、氨基-或烷氧基-取代的聚合物。在一些实施方案中,通过甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、羧基化等来修饰聚合物。取代物可包括带电基团,例如阴离子或阳离子基团,该基团至聚合物链中的取代可导致带电聚合物的产生。取代的程度可在约0.2至约1.0衍生物/单体单元之间,通常在约0.4至约1.0之间,更通常地在约0.6至约0.95之间变化。

[0678] 在一些实施方案中,筛分剂包括纤维素衍生物,例如羧甲基纤维素钠、羧甲基2-羟乙基纤维素钠、甲基纤维素、羟乙基纤维素、2-羟丙基纤维素、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、(羟丙基)甲基纤维素或羟乙基乙基纤维素或包含这样的聚合物的任一种或多种的混合物。

[0679] 在一些实施方案中,核酸反应混合物包括不同的筛分剂的混合物,例如不同的纤维素衍生物、淀粉、聚丙烯酰胺等的混合物。

[0680] 在一些实施方案中,筛分剂包括一种或多种复合性聚合物,所述复合性聚合物包含任何两种不同的聚合物(包括本文中描述的任何聚合物)的子部分。例如,复合性聚合物可包括连接至多核苷酸聚合物的多糖聚合物,例如连接至DNA或RNA的多糖。在一些实施方案中,筛分剂可包括包含纤维素部分和核酸部分的聚合物,例如DNA-纤维素。在其它实施方案中,复合性聚合物可包括连接至多核苷酸和/或多肽的聚丙烯酰胺。在反应混合物中包括这样的复合性聚合物可用于进一步阻碍靶多核苷酸通过反应混合物的移动。

[0681] 在一些实施方案中,筛分剂可包括已首先与适当的交联剂接触或反应的聚合物。例如,筛分剂可包括已与双丙烯酰胺和/或二(丙烯酰)脲反应的丙烯酰胺。

[0682] 在一些实施方案中,反应混合物包括至少一种扩散减少剂。在一些实施方案中,扩散减少剂包括减少多核苷酸从较高浓度区域至具有较低浓度的区域的迁移的任何化合物。在一些实施方案中,扩散减少剂包括减少核酸扩增反应的任何组分(不论大小)的迁移的任何化合物。在一些实施方案中,核酸扩增反应的组分包括小珠/引物、多核苷酸、重组酶、聚合酶、核苷酸、ATP和/或辅助因子。

[0683] 应当注意到,筛分剂和扩散减少剂的概念不是一定互相排斥的;筛分剂常常可有效地减少靶化合物通过反应混合物的扩散,而扩散减少剂常常可具有对反应组分的筛分效应。在一些实施方案中,相同的化合物或反应混合物添加物可用作筛分剂和/或扩散减少剂。本文中公开的任何筛分剂可在一些实施方案中能挂钩用作扩散减少剂,反之亦然。

[0684] 在一些实施方案中,扩散减少剂和/或筛分剂包括聚丙烯酰胺、琼脂、琼脂糖或纤

纤维素聚合物例如羟乙基纤维素 (HEC)、甲基纤维素 (MC) 或羧甲基纤维素 (CMC)。

[0685] 在一些实施方案中,筛分剂和/或扩散减少剂以至少1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、74%、90%或95%w/v (试剂的重量/反应混合物的单位体积) 的浓度包括在反应混合物中。

[0686] 在一些实施方案中,反应混合物包括至少一种拥挤试剂。例如,拥挤试剂可通过产生拥挤的反应环境增加核酸扩增反应中一种或多种组分的浓度。在一些实施方案中,反应混合物包括筛分剂和拥挤试剂。

[0687] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括一个或多个表面。在一些实施方案中,表面可连接有多个第一引物,多个中的第一引物具有共同的第一引物序列。

[0688] 在一些实施方案中,表面可以是物体的外部的或最上面的层或边界。在一些实施方案中,表面可以是物体的边界的内侧。

[0689] 在一些实施方案中,反应混合物包括多个不同的表面,例如反应混合物可包括多个小珠(例如颗粒、纳米颗粒、微粒等)并且至少两个不同的多核苷酸模板可在不同的表面上被克隆地扩增,从而形成至少两个不同的表面,所述表面的每一个连接至扩增子。在一些实施方案中,反应混合物包括单个表面(例如,载玻片的表面或反应室的阵列)并且至少两个不同的多核苷酸模板在表面上两个不同的区域或位置被扩增,从而形成连接至两个或更多个扩增子的单个表面。

[0690] 在一些实施方案中,表面可以是多孔的、半多孔的或非多孔的。在一些实施方案中,表面可以是平面表面以及凹面、凸面或其任意组合。在一些实施方案中,表面可以是小珠、颗粒、微粒、球体、滤器、流动池、孔、沟、槽容器、凝胶或毛细管的内壁。在一些实施方案中,表面包括毛细管、槽、孔、沟、槽、容器的内壁。在一些实施方案中,表面可包括纹理(例如,蚀刻的、成腔的、小孔、三维支架或隆起物)。

[0691] 在一些实施方案中,颗粒可具有球体的、半球体的、圆柱体的、桶形的、环形的、杆状的、盘状的、圆锥形的、三角形的、立方体形的、多边形的。管状的、线状的或不规则的形状。

[0692] 在一些实施方案中,表面可从任何材料制备,所述材料包括玻璃、硼硅玻璃、硅石、石英、熔融石英、云母、聚丙烯酰胺、塑料聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸酯(PMA)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)、硅、锗、石墨、陶瓷制品、硅、半导体、高折射率电介质、晶体、凝胶、聚合物或薄膜(例如,金、银、铝或金刚石的薄膜)。

[0693] 在一些实施方案中,薄膜可以是磁性或顺磁性小珠(例如,磁性或顺磁性纳米颗粒或微粒)。在一些实施方案中,顺磁性微粒可以是连接了抗生蛋白链菌素的顺磁性小珠(例如来自Invitrogen, Carlsbad, CA的Dynabeads™ M-270)。颗粒可具有铁核心或包含水凝胶或琼脂糖(例如Sepharose™)。

[0694] 在一些实施方案中,表面可连接有多个第一引物。表面可涂覆有丙烯酰胺、羧基或胺类化合物以连接核酸(例如第一引物)。在一些实施方案中,可将氨基修饰的核酸(例如引物)连接至涂覆有羧酸的表面。在一些实施方案中,氨基修饰的核酸可与EDC(或EDAC)反应以连接至羧酸涂覆的表面(具有或不具有NHS)。可将第一引物固定至表面上的丙烯酰胺化合物涂层。颗粒可涂覆有抗生物素蛋白样化合物(例如抗生蛋白链菌素)以结合生物素化的核酸。

[0695] 在一些实施方案中,表面包括小珠的表面。在一些实施方案中,小珠包括聚合物材料。例如,小珠包括凝胶、水凝胶或丙烯酸胺聚合物。小珠可以是多孔的。颗粒可具有腔或小孔,或可包括三维支架。在一些实施方案中,颗粒可以是Ion Sphere™颗粒。

[0696] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)包括将一个或多个核酸模板固定在一个或多个支持物上。可通过任何方法包括但不限于物理吸附、通过离子或共价键形成或其组合,将核酸固定在固体支持物上。固体支持物可包括聚合、玻璃或金属材料。固体支持物的实例包括膜、平面表面、微孔板、小珠、滤器、测试条、载玻片、盖玻片和试管。意指在其上合成、附着、连接或以其它方式固定寡聚物的任何固相材料。支持物可任选地包含“树脂”、“相”、“表面”和“支持物”。支持物可由有机聚合物例如聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、聚氟乙烯、聚乙烯氧基(polyethyleneoxy)和聚丙烯酰胺及其共聚物和移植物组成。支持物还可以是无机的,例如玻璃、硅石、可控孔度玻璃(CPG)或反相硅石。支持物的结构可以是小珠、球体、颗粒、细粒、凝胶或表面的形式。表面可以是平面的、基本上平面的或非平面的。支持物可以是多孔的或非多孔的,并可具有膨胀或非膨胀特性。可将支持物定形为包含一个或多个孔、凹陷或其它储存器、容器、特征或位置。可将多个支持物配置在阵列中的不同位置。支持物任选地是可寻址的(例如,用于试剂的机器人递送),或通过检测手段包括通过激光照射的扫描和共聚焦或偏转光收集。可将扩增支持物(例如小珠)置于另一个支持物之内或之上(例如在第二支持物的孔内)。

[0697] 在实施方案中,固体支持物是“微粒”、“小珠”、“微珠”等(任选地但非必须地在形状上为球形),其具有50微米或更小,优选10微米或更小,3微米或更小,约1微米或更小,约0.5微米或更小,例如约0.1、0.2、0.3或0.4微米,或更小(例如,低于1纳米,约1-10纳米,约10-100纳米,或约100-500纳米)的最小横截面长度(例如直径)。微粒(例如来自Dyna1, Oslo, Norway的Dynabead)可由多种无机或有机材料制成,所述材料包括但不限于玻璃(例如可控孔度玻璃)、硅石、铅、交联的聚苯乙烯、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、二氧化钛、胶乳、聚苯乙烯等。磁化作用可帮助在扩增之后微粒连接的试剂(例如多核苷酸或连接酶)的收集和浓缩,并还可帮助另外的步骤(例如洗涤、试剂去除等)。在本发明的某些实施方案中,可使用具有不同的形状大小和/或颜色的微粒群。可任选地例如用量子点编码微粒以便可个别地或独特地鉴定这样的微粒。

[0698] 在一些实施方案中,可将小珠表面官能化以连接多个第一引物。在一些实施方案中,小珠可以是可装配至反应室中的任何尺寸。例如,一个小珠可装配至反应室中。在一些实施方案中,多于一个小珠可装配至反应室中。在一些实施方案中,小珠的最小横截面长度(例如直径)可以是约50微米或更小,或约10微米或更小,或约3微米或更小,约1微米或更小,约0.5微米或更小,例如约0.1、0.2、0.3或0.4微米,或更小(例如,低于1纳米,约1-10纳米,约10-100纳米,或约100-500纳米)。

[0699] 在一些实施方案中,小珠可连接有多个一种或多种不同的引物序列。在一些实施方案中,小珠可连接有多个一种引物序列,或可连接有多个两种或更多种不同的引物序列。在一些实施方案中,小珠可连接有至少1,000个引物,或约1,000-10,000个引物,或约10,000-50,000个引物,或约50,000-75,000个引物,或约75,000-100,000个引物或更多的多个引物。

[0700] 在一些实施方案中,反应混合物包括重组酶。重组酶可包括能够诱导重组事件或

增加重组事件的发生频率的任何试剂。重组事件包括其中两条不同的多核苷酸链彼此重组的任何事件。重组可包括同源重组。重组酶可以是酶或其遗传工程化的衍生物。重组酶可任选地与单链寡核苷酸(例如第一引物)缔合(例如结合)。在一些实施方案中,催化同源重组的酶可通过结合单链寡核苷酸形成核蛋白复合物。在一些实施方案中,同源重组酶作为核蛋白复合物发部分可结合双链多核苷酸的同源部分。在一些实施方案中,多核苷酸的同源部分可杂交至第一引物的至少部分。在某一实施方案中,多核苷酸的同源部分可部分地或完全地互补于第一引物的至少部分。

[0701] 在一些实施方案中,同源重组酶可通过形成核蛋白复合物和结合至双链多核苷酸的同源部分以形成具有三链结构的重组中间体(D-环形成)来催化链侵入(Zarling的美国专利号5,223,414,Sena的美国专利号5,273,881和5,670,316,以及美国专利号7,270,981、7,399,590、7,435,561、7,666,598、7,763,427、8,017,339、8,030,000、8,062,850和8071308)。在一些实施方案中,同源重组酶包括野生型、突变体、重组体、融合体或其片段。在一些实施方案中,同源重组酶包括来自任何生物包括肌病毒科(myoviridae)(例如来自细菌噬菌体T4的uvsX、RB69等)、大肠杆菌(例如recA)或人(例如RAD51)的酶。

[0702] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括一种或多种辅助蛋白。例如,辅助蛋白可改善重组酶的活性(授予Piepenburg的美国专利8,071,308等)。在一些实施方案中,辅助蛋白可结合核酸的单链或可将重组酶装载在核酸上。在一些实施方案中,辅助蛋白包括野生型、突变体、重组体、融合体或其片段。在一些实施方案中,辅助蛋白可来源于与用来进行核酸扩增反应的重组酶相同或不同的物种的任何组合。辅助蛋白可来源于任何细菌噬菌体包括肌尾病毒噬菌体。肌尾病毒噬菌体的实例包括T4、T2、T6、Rb69、Aeh1、KVP40、不动杆菌属噬菌体133、气单胞菌属噬菌体65、蓝绿藻噬菌体P-SSM2、蓝绿藻噬菌体PSSM4、蓝绿藻噬菌体S-PM2、Rb14、Rb32、气单胞菌属噬菌体25、弧菌属噬菌体nt-1、phi-1、Rb16、Rb43、噬菌体31、噬菌体44RR2.8t、Rb49、噬菌体Rb3和噬菌体LZ2。辅助蛋白可来源于任何细菌种类包括大肠杆菌、硫化叶菌属(例如硫矿硫化叶菌)或甲烷球菌属(例如詹氏甲烷球菌)。

[0703] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括单链结合蛋白。单链结合蛋白包括肌尾病毒gp32(例如T4或RB69)、来自硫矿硫化叶菌的Sso SSB、来自詹氏甲烷球菌的MjA SSB或大肠杆菌SSB蛋白。

[0704] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括可增加在核酸上的重组酶载入的蛋白。例如,重组酶载入蛋白包括UsvY蛋白(授予Piepenburg的美国专利8,071,308)。

[0705] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括至少一种结合核酸的蛋白,包括解开双链核酸的蛋白(例如解旋酶)。

[0706] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括至少一种用于重组酶或聚合酶活性的辅助因子。在一些实施方案中,辅助因子包括一种或多种二价阳离子。二价阳离子的实例包括镁、锰和钙。

[0707] 在一些实施方案中,可在抑制过早的反应起始的条件下预温育核酸扩增反应。例如,可从反应容器扣留核酸扩增反应的一种或多种组分以防止过早的反应起始。为了开始反应,可加入二价阳离子(例如镁或锰)。在另一个实例中,可在抑制酶活性的温度下预温育核酸扩增反应。可在约0-15℃或约15-25℃下预温育反应以抑制过早的反应起始。随后可在更高的温度下温育反应以引发酶活性。

[0708] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括至少一种用于在核酸上的重组酶装配或用于同源核酸配对的辅助因子。在一些实施方案中,辅助因子包括任何形式的ATP包括ATP和ATP  $\gamma$  S。

[0709] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括至少一种产生ATP的辅助因子。例如辅助因子包括将ADP转化至ATP的酶系统。在一些实施方案中,辅助因子包括磷酸肌酸和肌酸激酶。

[0710] 在一些实施方案中,本文中公开的任何核酸扩增方法可在等温或基本上等温的扩增条件下进行或可包括在所述条件下进行的步骤。在一些实施方案中,等温扩增条件包括经历这样的温度变化的核酸扩增反应:所述温度变化在扩增的至少某一部分(或整个扩增过程)期间局限于有限的范围内,包括例如温度变化等于或小于约20°C,或约10°C,或约5°C,或约1-5°C,或约0.1-1°C,或小于约0.1°C。

[0711] 在一些实施方案中,可进行等温核酸扩增反应约2、5、10、15、20、30、40、50、60或120分钟。

[0712] 在一些实施方案中,可在约15-25°C,或约25-35°C,或约35-40°C,或约40-45°C,或约45-50°C,或约50-55°C,或约55-60°C下进行等温核酸扩增反应。

[0713] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括多个不同的多核苷酸。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括单链或双链多核苷酸或两者的混合物。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括具有相同的或不同的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括具有相同的或不同的长度的多核苷酸。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括约2-10,或约10-50,或约50-100,或约100-500,或约500-1,000,或约1,000-5,000,或约 $10^3$ - $10^6$ ,或约 $10^6$ - $10^{10}$ 个或更多个不同的多核苷酸。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括脱氧核苷酸、核糖核苷酸和/或其类似物的聚合物。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括天然存在的、合成的、重组的、克隆的、扩增的、未扩增的或归档的(例如保存的)形式。在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸包括DNA、cDNA、RNA或嵌合RNA/DNA和核酸类似物。

[0714] 在一些实施方案中,多个不同的多核苷酸模板可包括具有连接有核酸接头序列的一个或两个末端的双链多核苷酸文库构建体。例如,多核苷酸文库构建体可包括第一和第二末端,其中第一末端连接至第一核酸接头。多核苷酸文库构建体还可包括连接至第二核酸接头的第二末端。第一和第二接头可具有相同的或不同的序列。在一些实施方案中,第一或第二核酸接头的至少部分(即作为多核苷酸文库构建体的部分)可杂交至第一引物。在一些实施方案中,同源重组酶作为核蛋白复合物的部分可与具有第一或第二核酸接头序列的多核苷酸文库构建体结合。

[0715] 在一些实施方案中,多核苷酸文库构建体可适合用于任何类型的测序平台包括化学降解、链终止、合成测序、焦磷酸盐、大规模并行、离子敏感和单分子平台。

[0716] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括稀释与小珠(例如,连接有多个第一引物的小珠)反应的多核苷酸的量以减少与多于一个多核苷酸反应的小珠的百分比。在一些实施方案中,可利用这样的多核苷酸对小珠比率来进行核酸扩增反应,所述多核苷酸对小珠比率经选择以优化具有连接至其的单克隆多核苷酸群的小珠的百分比。例如,可以以约1:2至1:500范围内的任一个多核苷酸对小珠比率来进行核酸扩增反应。在一些实施方案

中,多核苷酸对小珠比率包括约1:2,或约1:5,或约1:10,或约1:25,或约1:50,或约1:75,或约1:100,或约1:125,或约1:150,或约1:175,或约1:200,或约1:225,或约1:250。在一些实施方案中,核酸扩增反应可产生不具有连接至其的多核苷酸的小珠,具有连接至其的一种类型的多核苷酸的其它小珠,和具有连接至其的多于一种类型的多核苷酸的其它小珠。

[0717] 在一些实施方案中,反应混合物包含一个或多个引物。例如,反应混合物可包含至少第一寡核苷酸引物。在一些实施方案中,第一引物可包括杂交至多核苷酸的一条链的至少部分的正向扩增引物。在一些实施方案中,第一引物包含用于核苷酸聚合的可延伸的3'末端。

[0718] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法包括杂交至模板的另外的引物。例如,第二引物可以是杂交至多核苷酸的一条链的至少部分的反向扩增引物。在一些实施方案中,第二引物包含可延伸的3'末端。在一些实施方案中,第二引物不连接至表面。

[0719] 在一些实施方案中,第三引物可以是杂交至多核苷酸的一条链的至少部分的正向扩增引物。在一些实施方案中,第三引物包含可延伸的3'末端。在一些实施方案中,第三引物不连接至表面。在一些实施方案中,第三引物包含用于富集扩增的核酸的结合伴侣或亲和部分(例如生物素)。

[0720] 在一些实施方案中,引物(例如第一、第二和第三引物)包括单链寡核苷酸。

[0721] 在一些实施方案中,引物的至少部分可与反应混合物中多核苷酸的至少一条链的部分杂交。例如,引物的至少部分可与连接至多核苷酸的一个或两个末端的核酸接头杂交。在一些实施方案中,引物的至少部分可部分地或完全地互补于多核苷酸的部分或核酸接头。在一些实施方案中,引物可适合用于任何类型的测序平台包括化学降解、链终止、合成测序、焦磷酸盐、大规模并行、离子敏感和单分子平台。

[0722] 在一些实施方案中,引物(例如第一、第二或第三引物)可具有不与反应混合物中多核苷酸的至少一条链的部分杂交的5'或3'突出尾部(带尾引物)。在一些实施方案中,带尾引物可具有任何长度,包括1-50或更多个核苷酸的长度。

[0723] 在一些实施方案中,引物包括脱氧核苷酸、核糖核苷酸和/或其类似物的聚合物。在一些实施方案中,引物包括天然存在的、合成的、重组的、克隆的、扩增的或未扩增的形式。在一些实施方案中,引物包括DNA、cDNA、RNA或嵌合RNA/DNA和核酸类似物。

[0724] 在一些实施方案中,引物可以为任何长度,包括约5-10个核苷酸,或约10-25个核苷酸,或约25-40个核苷酸,或约40-55个核苷酸,或更长。

[0725] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括一种或多种不同的聚合酶。在一些实施方案中,聚合酶包括可催化核苷酸和/或核苷酸类似物的聚合的任何酶或其片段或亚基。在一些实施方案中,聚合酶需要可延伸的3'末端。例如,聚合酶需要核酸引物的末端3' OH以起始核苷酸聚合。

[0726] 聚合酶包括可催化核苷酸(包括其类似物)至核酸链中的聚合的任何酶。通常地但非必须地这样的核苷酸聚合可以以模板依赖性方式发生。在一些实施方案中,聚合酶可以是高保真度聚合酶。这样的聚合酶可包括但不限于天然存在的聚合酶及其任何亚基和截短体、突变体聚合酶、变体聚合酶、重组、融合或以其它方式工程化的聚合酶、化学修饰的聚合酶、合成的分子或组装体以及其保留了催化这样的聚合的能力的任何类似物、衍生物或片

段。任选地,聚合酶可以是包含一种或多种突变的突变体聚合酶,所述突变包括一个或多个氨基酸被其它氨基酸置换、一个或多个氨基酸从聚合酶的插入或缺失或两种或更多种聚合酶的部分的连接。如本文中所用,属于“聚合酶”及其变体还指包含至少两个彼此连接的部分的融合蛋白,其中第一部分包含可催化核苷酸至核酸链中的聚合的肽并连接至第二部分,所述第二部分包含第二多肽,例如报告酶或持续合成能力促进酶。通常地,聚合酶包含一个或多个活性位点,在其上可发生核苷酸结合和/或核苷酸结合的催化。在一些实施方案中,聚合酶包含或缺乏其它的酶活性例如3'至5'外切核酸酶活性或5'至3'外切核酸酶活性。在一些实施方案中,可从细胞分离或使用重组DNA技术或化学合成方法产生聚合酶。在一些实施方案中,可在原核、真核、病毒或噬菌体生物中表达聚合酶。在一些实施方案中,聚合酶可以是翻译后修饰的蛋白或其片段。

[0727] 在一些实施方案中,聚合酶可包括任一种或多种聚合酶或聚合酶的生物活性片段,其描述于Davidson等人的于2011年10月27日公开的美国专利公开号2011/0262903和/或Vander Horn等人的于2013年2月14日公开的国际PCT公开号WO 2013/023176中。

[0728] 在一些实施方案中,聚合酶可以是DNA聚合酶并包括但不限于细菌DNA聚合酶、真核生物DNA聚合酶、古细菌DNA聚合酶。病毒DNA聚合酶和噬菌体DNA聚合酶。

[0729] 在一些实施方案中,聚合酶可以是复制酶、DNA依赖性聚合酶、引物酶、RNA依赖性聚合酶(包括RNA依赖性的DNA聚合酶例如逆转录酶)、热不稳定性聚合酶或热稳定性聚合酶。在一些实施方案中,聚合酶可以是任何的家族A或B型聚合酶。家族A(例如大肠杆菌Pol I)、B(例如大肠杆菌Pol II)、C(例如大肠杆菌Pol III)、D(例如阔古细菌Pol II)、X(例如人Pol $\beta$ )和Y(例如大肠杆菌UmuC/DinB和真核生物RAD30/着色性干皮病变体)聚合酶的许多类型描述于Rothwell and Watsman 2005Advances in Protein Chemistry 71:401-440中。在一些实施方案中,聚合酶可以是T3、T5、T7或SP6RNA聚合酶。

[0730] 在一些实施方案中,可利用聚合酶、重组酶和/或连接酶的一种类型或混合物来进行核酸扩增反应。在一些实施方案中,可利用低保真度或高保真度聚合酶来进行核酸扩增反应。

[0731] 在一些实施方案中,可通过热稳定或热不稳定性聚合酶来催化核酸扩增反应。

[0732] 在一些实施方案中,聚合酶可缺乏5'-3'外切核酸酶活性。在一些实施方案中,聚合酶可具有链置换活性。

[0733] 在一些实施方案中,古生物DNA聚合酶可以是但不限于热稳定性或嗜热性DNA聚合酶例如:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) (Bsu) DNA聚合酶I大片段;水生栖热菌(*Taq*) DNA聚合酶;丝状栖热菌(*Thermus filiformis*) (Tfi) DNA聚合酶;Phi29DNA聚合酶;嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bst*) DNA聚合酶;超嗜热古菌(*Thermococcus* sp.) 9°N-7DNA聚合酶;史氏芽孢杆菌(*Bacillus smithii*) (Bsm) DNA聚合酶大片段;海滨嗜热球菌(*Thermococcus litoralis*) (Tli) DNA聚合酶或Vent<sup>TM</sup>(exo-) DNA聚合酶(来自New England Biolabs);或“Deep Vent”(exo-) DNA聚合酶(New England Biolabs)。

[0734] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可包括一种或多种类型的核苷酸。核苷酸包括可选择性结合聚合酶或可被聚合酶聚合的任何化合物。通常地但非必须的,核苷酸与聚合酶的选择性结合之后为通过聚合酶的核苷酸至核酸链中的聚合;然而偶尔地核苷酸可从聚合酶解离而不并入核酸链中,该事件在本文中被称作“非生产性”事件。这样的核苷

酸不仅包括天然存在的核苷酸还包括可选择性结合聚合酶或可被聚合酶聚合的任何类似物(不论其结构)。尽管天然存在的核苷酸通常包含碱基、糖和磷酸盐部分,但本公开内容的核苷酸可包括缺乏这样的部分的任一个、一些或全部的化合物。在一些实施方案中,核苷酸可任选地包含磷原子链,其包含3、4、5、6、7、8、9、10或更多个磷原子。在一些实施方案中,磷链可连接至糖环的任何碳例如5' 碳。可利用插入的O或S将磷链连接至糖。在一个实施方案中,链中的一个或多个磷原子可以是具有P和O的磷酸基团的部分。在另一个实施方案中,可利用插入的O、NH、S、亚甲基、取代的亚甲基、乙烯、取代的乙烯、 $\text{CNH}_2$ 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 $\text{C}(\text{CH}_2)$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}_2$ 或 $\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2\text{R}$ (其中R可以是4-吡啶或1-咪唑)将链中的磷原子连接在一起。在一个实施方案中,链中的磷原子可具有包含O、 $\text{BH}_3$ 或S的侧基。在磷链中,具有除O外的侧基的磷原子可以是取代的磷酸基团。在磷链中,具有除O外的插入的原子的磷原子可以是取代的磷酸基团。核苷酸类似物的一些实例描述于Xu的美国专利号7,405,281中。

[0735] 可用于公开的方法和组合物的核苷酸的一些实例包括但不限于核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、修饰的核糖核苷酸、修饰的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸多磷酸盐、脱氧核糖核苷酸多磷酸盐、修饰的核糖核苷酸多磷酸盐、修饰的脱氧核糖核苷酸多磷酸盐、肽核苷酸、修饰的肽核苷酸、金属核苷、磷酸酯核苷以及修饰的磷酸盐-糖主链核苷酸、前述化合物的类似物、衍生物或变体等。在一些实施方案中,核苷酸可包含取代桥接核苷酸的 $\alpha$ 磷酸盐和糖、或核苷酸的 $\alpha$ 和 $\beta$ 磷酸盐、或核苷酸的 $\beta$ 和 $\gamma$ 磷酸盐、或核苷酸的任何其它两个磷酸盐之间、或其任何组合的氧部分的非氧部分例如硫-或硼烷-部分。

[0736] 在一些实施方案中,核苷酸是未标记的。在一些实施方案中,核苷酸包含标记并在本文中被称作“标记的核苷酸”。在一些实施方案中,标记可以是连接至核苷酸的任何部分(包括碱基、糖或任何介入其间的磷酸基团或末端磷酸基团即离糖最远的磷酸基团)的荧光染料的形式。

[0737] 在一些实施方案中,核苷酸(或其类似物)可连接至标记。在一些实施方案中,标记包括光学上可检测的部分。在一些实施方案中,标记包括通常不存在于天然存在的核苷酸中的部分。例如,标记可包括荧光、发光或放射性的部分。

[0738] 在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法还可包括富集步骤。在一些实施方案中,用于核酸扩增的方法可产生至少一个连接有多个具有与模板多核苷酸互补的序列的多核苷酸(例如扩增的核酸)的小珠。连接至小珠的多核苷酸的至少一个可杂交至具有生物素化部分的多核苷酸(例如具有第三引物的反向扩增产物)。在一些实施方案中,富集步骤包括通过将具有生物素化部分的多核苷酸与连接至抗生蛋白链菌素部分的纯化小珠(例如顺磁小珠)(例如来自Dynabeads的MyOne™ Bead)结合来形成纯化复合物。在一些实施方案中,可通过利用磁体的吸引力将纯化复合物从反应混合物分离/去除。

[0739] 在一些实施方案中,将包含基本上单克隆的核酸群的扩增子各自放置、分配或定位于位点阵列中的不同位点。

[0740] 在一些实施方案中,公开的方法包括将单个模板分子(例如样本的单个靶多核苷酸)分配、放置或以其它方式定位与反应室或位点(例如阵列中的)中。可通过使具有多核苷酸样本的流体流经反应室将单个多核苷酸从样本分配至反应室中。分配至反应室中的单个多核苷酸可以是单链的或双链的。在一些实施方案中,在分配之后在反应室或位点中扩增核酸。

[0741] 在一些实施方案中,可将不同的单个靶多核苷酸从样本分配至排列在阵列中的不同的反应室的每一个中。可通过使具有多核苷酸样本的流体流经反应室将不同的单个多核苷酸从样本分配至不同的反应室的每一个中。分配至不同的反应室的每一个中的不同的单个多核苷酸可以是单链的或双链的。

[0742] 在一些实施方案中,方法包括将单个多核苷酸分配至反应室中,和在反应室内扩增单个多核苷酸,从而在反应室中产生单克隆核酸群。

[0743] 在一些实施方案中,用于将单个靶多核苷酸分配至反应室中和扩增单个靶多核苷酸的方法包括核酸样本。在一些实施方案中,可从具有多个多核苷酸的核酸样本分配单个多核苷酸或不同的单个多核苷酸。例如,核酸样本可包括约2-10,或约10-50,或约50-100,或约100-500,或约500-1,000,或约1,000-5,000,或约 $10^3$ - $10^6$ ,或更多个不同的多核苷酸。不同的多核苷酸可具有相同的或不同的序列。不同的多核苷酸可具有相同的或不同的长度。样本可包括单链的或双链的多核苷酸或两者的混合物。

[0744] 在一些实施方案中,用于将单个靶多核苷酸分配至反应室中和扩增单个靶多核苷酸的方法包括分配单个多核苷酸。在一些实施方案中,单个多核苷酸可包括单链的和双链的核酸分子。在一些实施方案中,核酸可包括脱氧核苷酸、核糖核苷酸和/或其类似物的聚合物。在一些实施方案中,核酸可包括天然存在的、合成的、重组的、克隆的、扩增的、未扩增的或归档的(例如保存的)形式。在一些实施方案中,核酸可包括DNA、cDNA、RNA或嵌合RNA/DNA和核酸类似物。在一些实施方案中,单个多核苷酸可包括包含在一个或两个末端连接至寡核苷酸接头的核酸的核酸文库构建体。在一些实施方案中,核酸文库构建体可适合用于任何类型的测序平台包括化学降解、链终止、合成测序、焦磷酸盐、大规模并行、离子敏感和单分子平台。

[0745] 在一些实施方案中,阵列的位点可包括一个或多个反应室(可以是固体表面上的孔)。反应室可具有限定宽度和深度的孔。反应室的尺度可以是足够的以允许试剂的沉积或用于进行反应。反应室可具有任何形状包括圆柱形、多边形或不同形状的组合。反应室的任何壁可具有平滑的或不规则的表面。反应室可包括具有平面的、凹的或凸的表面的底。反应室的底和侧壁可包含相同的或不同的材料和/或可用化学基团涂覆,所述化学基团可与生物分子例如核酸、蛋白或酶反应。

[0746] 在一些实施方案中,反应室可以是排列在栅格或阵列中的多个反应室的一个。阵列可包括两个或更多个反应室。多个反应室可以随机地排列或排列在有序的阵列中。有序的阵列可包括以排或以具有排和列的二维栅格排列的反应室。

[0747] 阵列可包括任何数量的用于沉积试剂和进行多个个体反应的反应室。例如,阵列可包括至少256个反应室,或至少256,000,或至少1-3百万,或至少3-5百万,或至少5-7百万,或至少7-9百万,至少9-11百万,至少11-13百万个反应室,或甚至更高的密度包括13-700百万个反应室或更多。排列在栅格中的反应室可具有小于约10微米、或小于约5微米、或小于约1微米、或小于约0.5微米的相邻反应室之间的中心距离(例如节距(pitch))。

[0748] 阵列可包括具有任何宽度和深度尺度的反应室。例如,反应室可具有适应单个微粒(例如微珠)或多个微粒的尺度。反应室可容纳0.001-100皮升的水体积。

[0749] 在一些实施方案中,至少一个反应室可偶联至一个或多个传感器或可被焊接在一个或多个传感器之上。偶联至传感器的反应室可提供沉积在其中的试剂的封闭以便来自反

应的产物可由传感器检测。传感器可检测来自任何类型的反应的产物的变化,所述反应包括任何核酸反应例如引物延伸、或者或核苷酸并入反应。传感器可检测离子(例如氢离子)、质子、磷酸基团例如焦磷酸盐基团的变化。在一些实施方案中,至少一个反应室可偶联至一个或多个离子敏感性场效应晶体管(ISFET)。偶联至ISFET传感器的反应室的阵列的实例可见于美国专利号7,948,015和美国系列号12/002,781。

[0750] 在一些实施方案中,可在反应室的阵列中进行本文中描述的扩增方法(及相关的组合物、系统和装置),其中阵列的反应室形成单一流体性系统的部分。在一些实施方案中,多个反应室的阵列可包括流体性界面,所述流体性界面使流体(例如液体或气体)以受控的层流流经反应室。在一些实施方案中,反应室的阵列可在反应室之上包括用于层流的流体压头空间。在一些实施方案中,反应室的阵列可以是流动池或流动室的部分,其中反应室彼此间流体连通。例如,流体可在阵列上流动以至少部分地或全部地填充阵列的一个或多个反应室。在一些实施方案中,流体可完全地填充多个反应室,过量的流体可淹没反应室的顶部以在反应室的上方形成流体层。反应室上方的流体层可为阵列中的多个反应室提供流体连通。在一些实施方案中,阵列中多个反应室之间的流体连通可用于在多个反应室中进行分离的平行反应。例如,流体连通可用于将多核苷酸和/或试剂递送至多个反应室以进行平行的核酸扩增反应。

[0751] 在一些实施方案中,可将具有多个不同的多核苷酸的样本应用于流动室以将单个多核苷酸分配至阵列中的各个反应室。在一些实施方案中,可将另外的试剂应用于流动室以分配至阵列中的各个反应室中。例如,另外的反应试剂可包括微粒、一种或多种酶、酶辅助因子、引物和/或三磷酸核苷。在一些实施方案中,可以以任何顺序,包括连续地或基本上同时地或两者的组合,将多核苷酸和试剂递送至反应室的阵列。例如,在一些实施方案中,可首先将多核苷酸分配至反应室的阵列随后分配试剂,或可使用相反的顺序,或可基本上同时地分配多核苷酸和试剂。

[0752] 在一些实施方案中,可使用任何方法(包括流动室)将多核苷酸和/或试剂递送至阵列中一定百分比的反应室。例如,阵列中被装载的反应室的百分比包括约1-25%,或约25%,或约30%,或约40%,或约50%,或约60%,或约70%,或更高的百分比。在一些实施方案中,可通过进行两个或更多个回合的载入步骤来增加装载了多核苷酸和/或试剂的反应室的百分比。例如,(a)在第一回合,可将多核苷酸和/或试剂分配至阵列中的多个反应室,和(b)在第二回合,可将多核苷酸和/或试剂分配至相同的阵列。可进行额外的载入回合(例如第三、第四或更多个回合)。在一些实施方案中,可在任何载入回合之间进行任何类型的反应和/或可在多个载入回合完成后进行任何类型的反应。例如,可在任何载入回合之间进行核酸扩增反应或可在多个载入回合完成后进行核酸扩增反应。在一些实施方案中,在每个载入回合之后,可将化合物铺层在阵列上以阻止多核苷酸和小珠迁移出反应室。例如,在每个载入回合之后,可将包含至少一种筛分剂的溶液铺层在阵列上。在一些实施方案中,筛分剂包括纤维素衍生物。或者,可将油层铺层在阵列的孔或室内的反应混合物的上方。

[0753] 在一些实施方案中,公开的方法(及相关的组合物、系统和试剂盒)还包括在扩增模板之前将核酸模板连接至阵列的位点。任选地,位点包含引物,并且所述连接包括将引物杂交至模板的引物结合部位。例如,阵列内的位点可包含至少一个固定的引物,所述引物包含与被分配或置于位点处的模板的引物结合部位的至少部分互补的序列。引物促进模板至

阵列的连接。在一些实施方案中,阵列中的大部分位点包含至少一个引物。不同位点的引物可以是彼此相同的。或者,不同位点的引物可以是彼此不同的。在一个示例性实施方案中,至少两个位点各自包括不同的靶特异性引物。

[0754] 可使用任何适当的方法将引物连接至阵列的位点。微粒将引物连接至反应室的纳米阵列(例如,用于基于离子的测序的ISFET阵列类型)的表面,首先在阵列的至少一些反应室内合成或制备三维基质可以是有用的。在实施方案中,可将聚合物基质前体应用于与一个或多个传感器联合的孔的阵列。可将聚合物基质前体聚合以形成聚合物基质的阵列。这些聚合物基质可缀合于寡核苷酸并可用于多种分析技术包括遗传测序技术。

[0755] 在一些实施方案中,将亲水聚合物基质分配在与传感器(例如传感器阵列的传感器)联合的孔中。在实例中,亲水基质是如水凝胶基质的。亲水基质可以以一对一的结构对应于传感器阵列的传感器。在其它实例中,传感器阵列的传感器可包括场效应晶体管(FET)传感器,例如离子敏感性场效应晶体管(ISFET)。特别地,基质材料是原位固化的并适应于传感装置的个体孔的结构。孔之间的空隙区域可以是基本上没有聚合物基质的。在实例中,基质材料可键合例如共价键合于孔的表面。在实例中,孔具有100纳米至10微米范围内的深度或厚度。在另一个实例中,孔可具有0.1微米至2微米范围内的特征直径。

[0756] 在示例性方法中,可通过将包含聚合物前体的水溶液施用于孔阵列的孔中来形成聚合物基质。可使用置于孔阵列之上的不互溶流体隔离由孔阵列限定的含水材料的容量。可起始溶液的经隔离的容量以促进基质前体的聚合,从而导致分配在孔内的基质阵列。在实例中,通过使含水前体流经孔来将包含基质前体的水溶液分配至传感装置的孔。在另一个实例中,将水溶液作为分散相包含在乳剂中。分散相可沉降或被激发在孔阵列的孔中。可使用置于水相内或不互溶流体内的起始因子来起始基质前体的聚合。在另一个实例中,可热起始聚合。

[0757] 在另一个示例性方法中,可通过将起始分子锚定在孔阵列的孔内的表面来在传感装置的孔内形成基质阵列。可在孔阵列的孔上提供包含基质前体的溶液。起始因子可起始基质前体的聚合,导致在孔阵列的孔内形成聚合物基质。在其它实例中,组合上述方法的方面以进一步增强基质阵列的形成。

[0758] 在特别的实施方案中,测序系统包括其中置入传感器阵列的流动池,包括与传感器阵列电子通信的通信电路,以及包括与流动池流体连通的容器和流体控制。在实例中,图13显示了流动池100的展开图和剖面图并显示了流动室106的部分。试剂流108流经孔阵列102的表面,其中试剂流108在孔阵列102的孔的开口末端上方流动。孔阵列102和传感器阵列105一起可形成构成流动池100的下壁(或底面)的集成单元。参比电极104可流体地偶联至流动室106。此外,流动池盖130包封流动室106以将试剂流108包含在受限的区域内。

[0759] 图14显示了孔201和传感器214(如在图13的110处显示的)的展开图。可基于发生的反应的性质以及使用的标记技术(如果有的话)或试剂、副产物来选择孔的体积、形状、长宽比(例如底宽对孔深比)和其它的尺寸特征。传感器214可以是化学场效应晶体管(chemFET),更特别地是离子敏感性FET(ISFET),其具有浮动栅218,浮动栅218具有任选地通过材料层216与孔内部分离的传感器板220。另外,在传感器板220上可放置导电层(未示出)。在实例中,材料层216包括离子敏感性材料层。材料层216可以是陶瓷层,例如除其它以外锆、钪、钽、铝或钛的氧化物或钛的氮化物。在实例中,材料层216可具有5nm至100nm,例如

10nm至70nm, 15nm至65nm, 或20nm至50nm的厚度。

[0760] 尽管材料层216被显示为延伸在显示的FET组件的边界之外, 但材料层216可沿孔201的底和任选地沿孔201的壁延伸。传感器214可感应(和产生相关的输出信号)存在于传感器板220相对的材料层216上的电荷224的量。电荷224的变化可引起chemFET的源极221和漏极222之间的电流变化。进而, chemFET可直接地用于提供基于电流的输出信号或利用另外的电路间接地提供基于电压的输出信号。反应物、洗涤溶液和其它试剂可通过扩散机制240移入和移出孔。

[0761] 在实施方案中, 在孔201中进行的反应可以用以鉴定或测定目的分析物的特性或性质的分析反应。这样的反应可直接地或间接地产生影响传感器板220附近的电荷量的副产物。如果这样的副产物小量地产生或迅速衰减或与其它组分反应, 则可同时在孔201中分析相同分析物的多个拷贝, 以增加产生的输出信号。在实施方案中, 可将分析物的多个拷贝在置入孔201之前或之后连接至固相支持物212。固相支持物212可以是聚合物基质, 例如亲水聚合物基质, 例如水凝胶基质或类似的。为了简便和易于说明, 固相支持物212在本文中也称作为聚合物基质。

[0762] 孔201可由壁结构定义, 所述壁结构可由一层或多层材料形成。在实例中, 壁结构可具有从孔的下表面延伸至上表面的0.01微米至10微米, 例如0.05微米至10微米, 0.1微米至10微米, 0.3微米至10微米, 或0.5微米至6微米的厚度。特别地, 厚度可以在0.01微米至1微米的范围内, 例如在0.05微米至0.5微米, 或0.05微米至0.3微米的范围内。孔201可具有不超过5微米, 例如不超过3.5微米, 不超过2.0微米, 不超过1.6微米, 不超过1.0微米, 不超过0.8微米或不超过0.6微米的特征直径, 所述直径由4乘以横截面积(A)除以Pi的平方根(例如,  $\sqrt{4A/\pi}$ )来定义。在实例中, 孔201可具有至少0.01微米的特征直径。

[0763] 虽然图14显示了单层壁结构和单层材料层216, 但系统可包括一个或多个壁结构层、一个或多个传导层或一个或多个材料层。例如, 壁结构可由一个或多个层形成, 所述层包含TEOS或硅的氧化物或包含硅的氮化物。

[0764] 在图15中显示的具体实例中, 系统300包含定义孔304的阵列的孔壁结构302, 所述孔置于传感器阵列的感应垫上或可操作地偶联至其。孔壁结构302定义了上表面306。与孔联合的下表面308置于传感器阵列的感应垫上。孔壁结构302定义了上表面306和下表面308之间的侧壁310。如上所述, 与传感器阵列的感应垫接触的材料层可沿孔304的阵列的孔的下表面308或沿由孔壁结构302定义的壁310的至少部分延伸。上表面306可没有材料层。特别地, 聚合物基质可置于孔304的阵列的孔中。上表面306可以是基本上没有聚合物基质的。例如, 上表面306可包括没有聚合物基质的面积, 例如总面积的至少70%, 总面积的至少80%, 总面积的至少90%或总面积的约100%。

[0765] 虽然图14的壁表面被显示为基本上垂直地和向外地延伸, 但壁表面可以在不同的方向上延伸并可具有不同的形状。术语“基本上垂直地”意指在与由感应垫定义的表面正交的分量方向上延伸。例如, 如图16中显示的, 孔壁402可垂直地延伸, 其与由感应垫定义的法向分量412平行。在另一个实例中, 壁表面404在离开感应垫的向外方向上基本上垂直地延伸, 从而提供比孔的下表面积更大的孔开口。如图16中显示的, 壁表面404在与表面414的法向分量412平行的垂直分量方向上延伸。在备选的实例中, 壁表面406在向内的方向上基本上垂直地延伸, 从而提供比孔的下表面积更小的开口面积。壁表面406在与表面414

的法向分量412平行的分量方向上延伸。

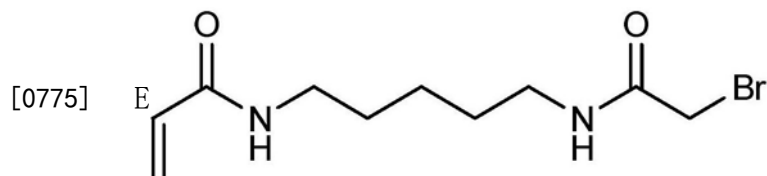
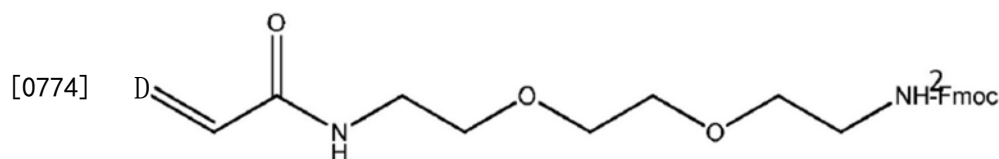
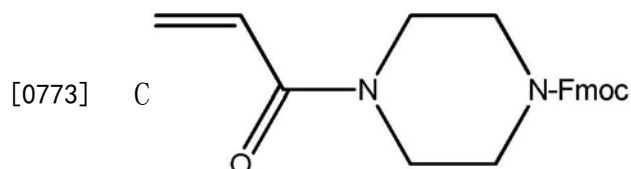
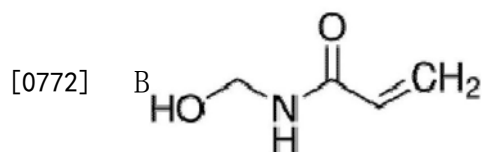
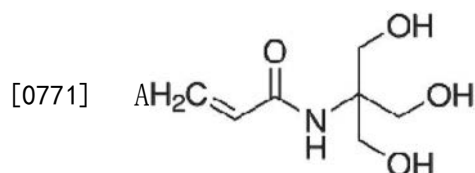
[0766] 虽然通过直线显示表面402、404或406,但一些半导体或CMOS制造工艺可导致具有非线性形状的结构。特别地,壁表面例如壁表面408和上表面例如上表面410在形状上可以是弧形的或可具有各种非线性形式。虽然随同显示的结构和设备被描述为具有线性层、表面或形状,但由半导体工艺产生的实际的层、表面或形状可在一些程度上不同,可能包括显示的实施方案的非线性和弧形的变化。

[0767] 图17显示了示例性的包含离子敏感性材料层的孔。例如,孔结构502可定义孔的阵列,例如示例性孔504、506或508。孔(504、506或508)可以可操作地偶联至下方的传感器(未显示)或连接至这样的下方的传感器。示例性孔504包含定义孔504的底部并延伸至结构502中的离子敏感性材料层510。虽然图17中未显示,但传导层,例如栅极,例如离子敏感性场效应晶体管的浮动栅,可位于离子敏感性材料层510的下方。

[0768] 在另一个实例中,如通过孔506显示的,离子敏感性材料层512可定义孔506的底部而不延伸至结构502中。在其它实例中,孔508可包含沿由结构502定义的孔508的侧壁516的至少部分延伸的离子敏感层514。同上地,离子敏感性材料层512或514可位于下方的电子装置的传导层或栅极之上。

[0769] 在图14中,基质材料212与孔结构是共形的。特别地,基质材料可原位固化以与孔的壁和底面共形。定义孔的上表面可包含基本上没有基质材料的面积,例如总面积的至少70%,总面积的至少80%,总面积的至少90%或总面积的约100%。取决于孔结构的性质,聚合物基质可物理地固定至孔壁结构。在另一个实例中,聚合物基质可化学地结合至孔壁结构。特别地,聚合物基质可共价地结合至孔壁结构。在另一个实例中,可通过氢键或离子键将聚合物基质结合至孔壁结构。

[0770] 可从基质前体,例如可完全聚合的单体,例如基于乙烯基的单体,形成聚合物基质。具体地,单体可包括亲水单体,例如丙烯酰胺、乙酸乙烯酯、羟烷基甲基丙烯酸酯(hydroxyalkylmethacrylate)、其变体或衍生物、其共聚物或其任意组合。在具体的实例中,亲水单体是丙烯酰胺,例如经官能化以包含羟基、氨基、羧基、卤基或其组合的丙烯酰胺。在实例中,亲水单体是氨烷基丙烯酰胺、用胺封端的聚丙烯醇官能化的丙烯酰胺(D,显示于下文中)、丙烯哌嗪(C,显示于下文中)或其组合。在另一个实例中,丙烯酰胺可以是羟烷基丙烯酰胺,例如羟乙基丙烯酰胺。具体地,羟烷基丙烯酰胺可包括N-三(羟甲基)甲基丙烯酰胺(A,显示于下文中)、N-(羟甲基)丙烯酰胺(B,显示于下文中)或其组合。在另一个实例中,共聚单体可包括卤素修饰的丙烯酸酯或丙烯酰胺,例如N-(5-溴乙酰胺基戊基)丙烯酰胺(BRAPA,E,显示于下文中)。在另一个实例中,共聚单体可包括寡核苷酸修饰的丙烯酸酯或丙烯酰胺单体。在其它实例中,可使用单体的混合物,例如羟烷基丙烯酰胺和胺官能化丙烯酰胺的混合物或丙烯酰胺和胺官能化的丙烯酰胺的混合物。在实例中,可以以这样的羟烷基丙烯酰胺:胺官能化的丙烯酰胺或丙烯酰胺:胺官能化的丙烯酰胺的比率包含胺官能化丙烯酰胺,所述比率在100:1至1:1的范围内,例如在100:1至2:1、50:1至3:1、50:1至5:1或50:1至10:1的范围内。在另一个实例中,可以以这样的羟烷基丙烯酰胺:溴官能化的丙烯酰胺或丙烯酰胺:溴官能化的丙烯酰胺的比率包含胺官能化丙烯酰胺,所述比率在100:1至1:1的范围内,例如在100:1至2:1、50:1至3:1、50:1至5:1或50:1至10:1的范围内。



[0776] 在其它的实例中,可包括寡核苷酸官能化的丙烯酰胺或丙烯酸酯单体,例如 Acrydite™ 单体,以将寡核苷酸并入聚合物基质中。

[0777] 另一个示例性基质前体包括交联剂。在实例中,以单体对交联剂的15:1至1:2,例如10:1至1:1、6:1至1:1或4:1至1:1的质量比包含交联剂。特别地,交联剂可以是二乙烯交联剂。例如,二乙烯交联剂可包括双丙烯酰胺,例如N,N'-(乙烷-1,2-二基)二(2-羟乙基)丙烯酰胺、N,N'-(2-羟丙烷-1,3-二基)双丙烯酰胺或其组合。在另一个实例中,二乙烯交联剂包括乙二醇二甲基丙烯酸、二乙烯苯、环己烷双丙烯酰胺、三羟甲基丙烷三甲基丙烯酸酯、其受保护的衍生物或其组合。

[0778] 在一个方面,聚合物网络包含具有3-20%的范围内,更优选地5-10%的范围内的总单体百分比的聚丙烯酰胺凝胶。在一个实施方案中,单体的交联剂百分比在5-10%的范围内。在具体的实施方案中,聚合物网络包含10%的总丙烯酰胺,其中10%是双丙烯酰胺交联剂。

[0779] 可通过溶液内的起始因子来起始聚合。例如,起始因子可以是基于水的。在另一个实例中,起始因子可以是疏水起始因子,优选位于疏水相中。示例性起始因子包括过硫酸铵或TEMED(四甲基乙二胺)。TEMED可加速来自过硫酸盐的自由基的形成速率,进而催化聚合。过硫酸盐自由基例如将丙烯酰胺单体转化为自由基,其与未活化的单体反应以起始聚合链式反应。延伸的聚合物链可随机地交联,从而导致具有特征性多孔性的凝胶,所述多孔性取决于聚合条件和单体浓度。核黄素(或核黄素-5'-磷酸盐)也可用作自由基的来源,其通常与TEMED和过硫酸铵组合使用。在光和氧存在的情况下,核黄素被转化为其具有起始聚合的活性的无色形式,这通常被称作光化聚合。

[0780] 在另一个实例中,可将含氮起始因子用于起始聚合。示例性的水溶性含氮起始因子显示于表1中,示例性的油溶性含氮起始因子显示于表2中。特别的,含氮起始因子可以是偶氮二异丁腈(AIBN)。

[0781] 表I

[0782] 水溶性含氮起始因子化合物

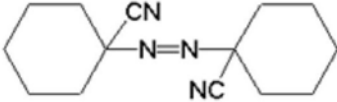
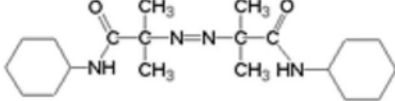
[0783]

| 结构                                                   | 10 小时半衰期<br>分解温度 |
|------------------------------------------------------|------------------|
| 2HCl                                                 | 44°C             |
| 2H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>2H <sub>2</sub> O | 47°C             |
| 2HCl                                                 | 56°C             |
| 4H <sub>2</sub> O                                    | 57°C             |
| 2HCl                                                 | 60°C             |
|                                                      | 61°C             |
| · 2HCl                                               | 67°C             |
|                                                      | 80°C             |
|                                                      | 87°C             |

[0784] 表II

[0785] 油溶性含氮起始因子化合物

[0786]

| 结构                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 10 小时半衰期<br>分解温度 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| $  \begin{array}{c}  \text{H}_3\text{CO} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{OCH}_3 \\    \quad   \quad   \quad   \\  \text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_3 \\    \quad   \quad   \quad   \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CN} \quad \text{CN} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $                              | 30°C             |
| $  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\    \quad   \\  \text{H}_3\text{CH}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3 \\    \quad   \quad   \quad   \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CN} \quad \text{CN} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $                                                                                         | 51°C             |
| $  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{O} \\     \quad   \quad   \quad    \\  \text{H}_3\text{CO}-\text{C}-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OCH}_3 \\    \quad   \quad   \quad   \\  \text{H}_3\text{CO} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{OCH}_3  \end{array}  $                                                  | 66°C             |
| $  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\    \quad   \\  \text{H}_3\text{CH}_2-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\    \quad   \\  \text{CN} \quad \text{CN}  \end{array}  $                                                                                                                                                                         | 67°C             |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 88°C             |
| $  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{O} \\     \quad   \quad   \quad    \\  \text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2 \\    \quad   \quad   \quad   \\  \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3  \end{array}  $               | 96°C             |
| $  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{CONH}_2 \\    \\  \text{CN}  \end{array}  $                                                                                                                                                                                                                                                | 104°C            |
| $  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{O} \\     \quad   \quad   \quad    \\  \text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \\    \quad   \quad   \quad   \\  \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3  \end{array}  $ | 110°C            |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 111°C            |

[0787] 在其它实例中, 聚合物基质的前体可包含表面活性添加剂以增强与表面的结合。示例性添加剂包括官能化丙烯酸单体或官能化的丙烯酰胺单体。例如, 丙烯酸单体可经官能化以结合表面材料, 例如形成孔的底或侧壁的陶瓷材料。在实例中, 添加剂可包括丙烯

基-膦酸酯,例如甲基丙烯膦酸酯。在另一个实例中,添加剂可包括二甲基丙烯酰胺或聚二甲基丙烯酰胺。在其它的实例中,添加剂可包括被可聚合的基团(例如丙烯酸基团)修饰的聚赖氨酸。

[0788] 在另一个实例中,可使用原子转移自由基聚合(ATRP)来促进聚合。ATRP系统可包括起始因子、过渡金属离子和配体。示例性过渡金属离子络合物包括基于铜的络合物。示例性配体包括2,2'-二吡啶、4,4'-二-5-壬烷基-2,2'-二吡啶、4,4',4''-三(5-壬烷基)-2,2':6',2''-三联吡啶、N,N,N',N',N''-五甲基二乙烯三胺、1,1,4,7,10,10-六甲基三乙四胺、三(2-二甲基氨基乙基)胺、N,N-二(2-吡啶甲基)十八胺、N,N,N',N'-四[(2-吡啶)甲基]乙二胺、三[2-吡啶)甲基]胺、三(2-氨基乙基)胺、三(2-二(3-丁氧基-3-氧丙基)氨基乙基)胺、三(2-二(3-(2-乙基己氧)-3-氧丙基)氨基乙基)胺、三(2-二(3-十二氧-3-氧丙基)氨基乙基)胺、其变体和衍生物或其组合。示例性起始因子包括2-溴丙腈、乙基2-溴异丁酸酯、乙基2-溴丙酸酯、甲基2-溴丙酸酯、1-苯基溴乙烷、对甲苯磺酰氯、1-氰-1-甲基乙基二乙基二硫代氨基甲酸酯、2-(N,N-二乙基二硫代氨基甲酰)-异丁酸乙酯、二甲基2,6-二溴庚二酸酯、其变体或衍生物和其任意组合。任选地,在存在ATRP系统时BRAPA单体可用作支化剂。

[0789] 在实例中,在表面起始ATRP以直接地将聚合物键合至表面。例如,可在过渡金属离子/配体络合物存在的情况下,将丙烯酸单体、丙烯酰胺单体、Acrydite™单体、琥珀酰亚胺丙烯酸酯、双丙烯酸或双丙烯酰胺单体、其衍生物或其组合在溶液中应用于起始的表面。

[0790] 在另一个中,可将ATRP系统用于使用经修饰的膦酸盐、磺酸盐、硅酸盐或锆酸盐化合物将聚合物连接至孔的表面。具体地,可将胺或羟基封端的烷基膦酸酯或其烷氧基衍生物应用于表面并使用起始因子来起始。可施用催化剂络合物和单体,以延伸表面化合物。

[0791] 在示例性方法中,可将包含聚合物基质的前体的水溶液施用至定义孔的阵列的结构孔中。可通过在孔之上提供不互溶流体和起始孔内的溶液内的聚合物前体的聚合来隔离孔中的水溶液。

[0792] 例如,图18显示了定义孔604的示例性孔结构602。一个或多个传感器(未显示)可以可操作地偶联或连接至孔604。例如,一个或多个传感器可包含与孔604的至少底表面电通信的栅极结构。在孔之上提供包含除其它组分以外聚合物前体的水溶液606并将包含聚合物前体的溶液分配至孔604中。示例性聚合物前体包括除其它以外单体、交联剂、起始因子或表面活性剂,例如如上文描述的。任选地,可在沉积之前使用亲水溶液,例如包含水、醇或其混合物的溶液,或包含水和表面活性剂的溶液,来润湿孔604。示例性醇包括异丙醇。在另一个实例中,醇包括乙醇。虽然未显示,但孔的底表面和任选地孔的侧壁可包括离子敏感性材料。这样的离子敏感性材料可覆在下方的电子装置例如场效应晶体管的传导结构之上。可在施用包含聚合物前体的溶液之前使用表面活性添加剂处理孔的一个或多个表面。

[0793] 包含聚合物前体的水溶液至孔604中的分配可通过振摇结构(例如通过旋转或涡旋)来进一步加强。在另一个实例中,可使用振动例如声波或超声波振动来增加水溶液在孔604内的分配。在其它实例中,可使用真空泵对孔除气并在负压下施用溶液。在实例中,在室温下将水溶液分配至孔。在另一个实例中,在低于室温的温度下分配水溶液,特别地当使用基于水的起始因子时如此分配。或者,在升高的温度下分配水溶液。

[0794] 如图19中显示的,将不互溶流体708施用在孔604之上,其将水溶液606推离孔的顶部并隔离孔604内的水溶液606,如图20中显示的。示例性不互溶流体包括矿物油、硅油(例

如聚(二甲基硅氧烷))、庚烷、碳酸酯油(例如二乙基己基碳酸酯(Tegosoft **DEC®**))或其组合。

[0795] 可在水溶液606内施用起始因子。或者,可在不互溶流体708内提供起始因子。可通过改变衬底的温度来起始聚合。或者,聚合可在室温下发生。具体地,可将聚合物前体溶液在20℃至100℃,例如25℃至90℃、25℃至50℃或25℃至45℃的温度下保持10分钟至5小时,例如10分钟至2小时或10分钟至1小时。

[0796] 由于聚合作用,聚合物基质912的阵列在由孔结构602定义的孔604内形成,如图21所显示的。任选地,可用NaOH(例如1N NaOH)洗涤阵列以从孔之间的空隙区域除去聚合物。

[0797] 在备选实例中,将包含在不互溶流体内作为分散相的聚合物前体的水溶液的乳剂用于将水溶液的微滴沉积在孔内。例如,如图22中显示的,孔结构1002定义孔1004。孔可以可操作地偶联或电连接至一个或多个传感器(未显示)。如上文所述的,孔1004的壁的底表面和任选地侧表面可由离子敏感性材料层定义,所述材料层可覆在下方的电子装置的传导部件之上。

[0798] 乳剂1006可包含在连续的不互溶流体1010内分散的包含聚合物前体的含水微滴1008。微滴1008可沉降在孔1004中。特别地,含水微滴1008具有比不互溶流体1010更大的密度。示例性不互溶流体包括矿物油、硅油(例如聚(二甲基硅氧烷))庚烷、碳酸酯油(例如二乙基己基碳酸酯(Tegosoft **DEC®**))或其组合。在其它实例中,可通过旋转、涡旋或超声处理流体或结构来促进含水微滴至孔1004中的分配。任选地,可在沉积之前使用亲水溶液,例如包含水、醇或其混合物的溶液,或包含水和表面活性剂的溶液,来润湿孔604。微滴至孔中的分配期间的温度可在室温下进行。或者,可在升高的温度下进行分配。

[0799] 如图23中显示的,微滴在孔1004内合并以提供包含聚合物前体1112的隔离的溶液。任选地,可使用不互溶流体例如不含微滴1008的不互溶流体1010或不同的不互溶流体1116来替换乳剂1006。示例性不互溶流体包括矿物油、硅油(例如聚(二甲基硅氧烷))庚烷、碳酸酯油(例如二乙基己基碳酸酯(Tegosoft **DEC®**))或其组合。或者,乳剂1006可在聚合期间保持在原位。照这样,孔1004内的溶液1112与其它孔1004中的溶液隔离开来。可起始聚合,导致孔1004内的聚合物基质1214,如图24中显示的。如上所述,可热起始聚合。在另一个实例中,可使用油相起始因子来起始聚合。或者,可使用水相起始因子来起始聚合。特别地,可在孔1004上施用第二乳剂。第二乳剂可包括包含水相起始因子的分散的水相。

[0800] 可通过改变衬底的温度来起始聚合。或者,聚合可在室温下发生。具体地,可将聚合物前体溶液在20℃至100℃,例如25℃至90℃、25℃至50℃或25℃至45℃的温度下保持10分钟至5小时,例如10分钟至2小时或10分钟至1小时。任选地,可用NaOH(例如1N NaOH)洗涤阵列以从孔之间的空隙区域除去聚合物。

[0801] 在另一个实例中,可使用固定在孔阵列的表面的起始因子在孔阵列的孔内形成基质材料的阵列。例如,如图25中显示的,结构1302可定义孔1304。材料层1306可定义孔1304的下表面。可将锚定化合物1308,例如用于原子转移自由基聚合(ATRP)的锚定化合物,固定至定义孔1304的底表面的材料层1306。或者,限定在结构1302的孔或层内暴露在孔1304内的侧壁材料可锚定化合物例如如上所述的用于ATRP的化合物。

[0802] 在这样的实例中,可在结构1302之上和孔1304内施用包含聚合物前体例如单体、交联剂和任选地表面活性添加剂的溶液1310。可引发锚定化合物1308以促进从锚定化合物

延伸的聚合,将聚合隔离在孔1304内和将聚合物固定至孔1304。在实例中,锚定化合物具有表面活性基团和远端自由基形成基团。表面活性基团可包括膦酸盐、硅酸盐磺酸盐、锆酸盐、钛酸盐或其组合。远端自由基形成基团可包括胺或羟基,所述胺或羟基可经历例如与卤代(例如溴代)化合物的转移并随后形成用于聚合聚合物前体和将所产生的聚合物锚定至孔表面的自由基。通常地,可选择ATRP系统以在统计上平均长度或数量的单体添加后终止聚合。以这样的方式,可控制孔1304内的聚合总数。在其它实例中,可将影响链延伸或终止的其它实际施用和添加至水溶液1310。

[0803] 在图26中显示的另一个实例中,结构1402可定义孔1404。孔1404可包括沿结构1402和孔1404的侧壁1410延伸的材料层1406。起始因子1408可沿孔1404的底和沿侧壁1410固定至材料层1406。可在结构1402和孔1404之上施用包含聚合物前体、交联剂和其它试剂的溶液1412。

[0804] 如图27中显示的,聚合物基质1512因起始的从孔1304内的表面(例如由材料层1306定义的表面)延伸的聚合而形成。

[0805] 可通过改变衬底的温度来起始聚合。或者,聚合可在室温下发生。具体地,可将聚合物前体溶液在20℃至100℃,例如25℃至90℃、25℃至50℃或25℃至45℃的温度下保持10分钟至5小时,例如10分钟至2小时或10分钟至1小时。

[0806] 形成后,可活化聚合物基质以促进与靶分析物例如多核苷酸的缀合。例如,可增强聚合物基质上的官能团以允许与靶分析物或分析物受体(例如寡核苷酸引物)的结合。在具体的实例中,可利用能够将亲水聚合物官能团转化为可经历亲核或亲电取代的活性部分的试剂来修饰亲水聚合物基质的官能团。例如,可通过用磺酸基团或氯取代羟基的至少部分来活化聚合物基质上的羟基。示例性磺酸基团可来源于三氟代乙烷磺酰(tresyl)、甲磺酰、对甲苯磺酰或对氟苯磺酰(fosyl)氯或其任意组合。磺酸酯用于允许亲核基团取代磺酸酯。磺酸酯还可与被释放的氯反应以提供可用于缀合基质的过程的氯化官能团。在另一个实例中,可活化聚合物基质上的胺基。

[0807] 例如,靶分析物或分析物受体可通过与磺酸基团的亲核取代结合至亲水聚合物。在具体的实例中,以亲核基团例如胺或巯基封端的靶分析物受体可经历亲核取代以替换聚合物基质中的磺酸基团。由于活化,可形成缀合的聚合物基质。

[0808] 在另一个实例中,磺化的聚合物基质可进一步与单或多官能性单或多亲核试剂(例如马来酰亚胺)反应,所述试剂可形成与基质的连接同时保留用于包含亲电基团的寡核苷酸的亲核活性。此外,可通过连接至包含多亲电基团的试剂将剩余的亲核活性转化为亲电活性,其随后将连接至包含亲核基团的寡核苷酸。

[0809] 在另一个实例中,可在聚合期间添加包含官能团的单体。单体包括例如包含羧酸、酯、卤素或其它胺反应基团的丙烯酰胺。酯基可在与寡胺(amine oligo)反应之前被水解。

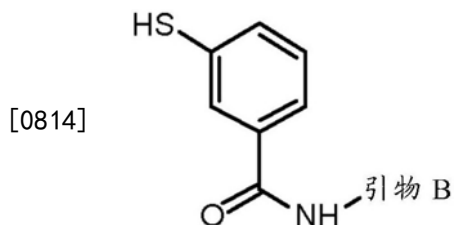
[0810] 其它的缀合技术包括使用包含胺的单体。胺基是可被胺反应性双官能性双亲电试剂进一步修饰的亲核基团,所述试剂在连接至聚合物基质之后产生单官能性亲电基团。这样的亲电基团可与具有亲核基团(例如胺或巯基)的寡核苷酸反应,导致寡核苷酸的连接(通过与空出的亲电体反应)。

[0811] 如果从氨基-和羟基-丙烯酰胺的组合制备聚合物基质,则聚合物基质包含亲核氨基和和中性羟基的组合。可利用双官能性双亲电部分例如二异氰酸酯或二-NHS酯来修饰氨

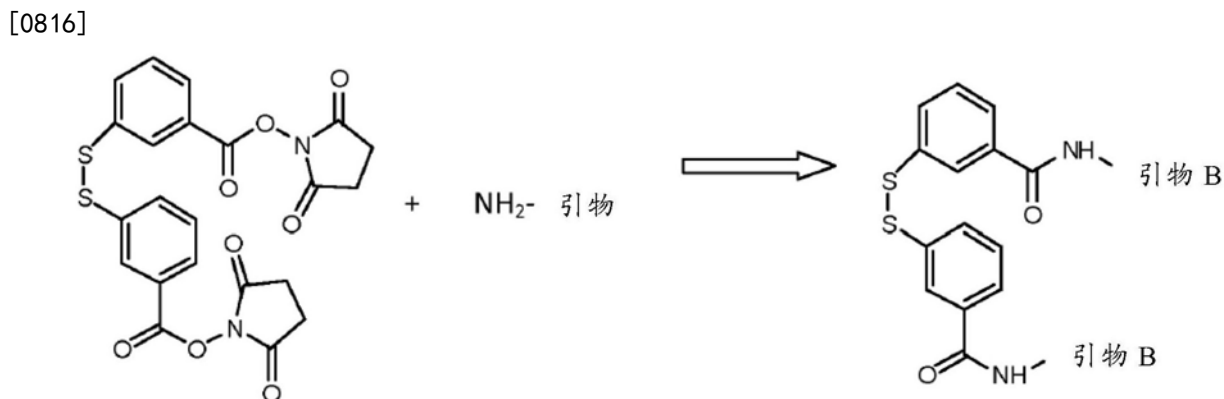
基,从而产生对亲核基团具有反应性的亲水聚合物基质。示例性二-NHS酯包括二-琥珀酰亚胺酯C2-C12烷酯,例如二-琥珀酰亚胺酯辛二酸酯或二-琥珀酰亚胺酯戊二酸酯。

[0812] 其它的活化化学包括掺入多个步骤以将特定的官能团转化为适应特定的期望的连接。例如,可通过几种方法将磺酸酯修饰的羟基转化入亲核基团中。在实例中,磺酸酯与叠氮化物阴离子的反应产生叠氮化物取代的亲水聚合物。叠氮化物可直接地用于通过可在具有或不具有铜催化的情况下进行的“CLICK”化学作用缀合至乙炔取代的生物分子。任选地,可通过例如使用氢的催化还原或使用有机磷的还原将叠氮化物转化至胺。随后可使用多种试剂例如二异氰酸酯、二-NHS酯、氰尿酸氯或其组合将所得的胺转化至亲电基团。在实例中,使用二异氰酸酯在聚合物和接头之间产生脲键(urea linkage),这导致剩余的异氰酸酯基团,其能够与氨基取代的生物分子反应以在接头和生物分子之间产生脲键。在另一个实例中,使用二-NHS酯产生了聚合物和接头之间的酰胺键和剩余的NHS酯基,所述NHS酯基能够与氨基取代的生物分子反应以在接头和生物分子之间产生酰胺连接。在其它实例中,使用氰尿酸氯产生了聚合物和接头之间的氨基-三嗪键和两个剩余的氯三嗪基团,所述氯三嗪基团的一个能够与氨基取代的生物分子反应以在接头和生物分子之间产生氨基-三嗪键。可通过磺酸酯活化将其它亲核基团并入基质中。例如,磺酸酯基质与硫代苯甲酸阴离子的反应和产生的硫代苯甲酸酯的水解将巯基并入基质中,所述巯基随后可与马来酰亚胺取代的生物分子反应以产生与生物分子的硫-琥珀酰亚胺连接。

[0813] 巯基还可与溴-乙酰基或溴-酰胺基(bromo-amidyl group)反应。在具体的实例中,当包含n-(5-溴乙酰胺基戊基)丙烯酰胺(BRAPA)为共聚单体时,可通过形成用于与聚合物上的溴-乙酰基反应的硫代苯甲酰胺-寡核苷酸化合物来并入寡核苷酸,例如如下显示的。



[0815] 可通过使下述二硫代苯甲酸-NHS化合物与胺封端的寡核苷酸反应和活化二硫代苯甲酰胺-寡核苷酸化合物以形成上文显示的硫代苯甲酰胺-寡核苷酸化合物来形成硫代苯甲酰胺-寡核苷酸化合物。



[0817] 或者,在聚合期间可将acrydite寡核苷酸用于并入寡核苷酸。示例性acrydite寡

核苷酸可包括离子交换的寡核苷酸。

[0818] 可通过使用衬底上与生物分子上的亲核部分偶联的亲电部分或衬底上与生物分子上的亲电连接偶联的亲核连接来产生生物分子在耐火材料(refractory)或聚合材料衬底上的共价连接。由于大多数通常的目的生物分子的亲水性质,选择的用于这些偶联的溶剂是水或包含某一水溶性有机溶剂的水以将生物分子分散在衬底上。特别地,通常在水系统中将多核苷酸偶联至衬底,因为它们具有多聚阴离子性质。由于水通过将亲电体水解成对于缀合无活性的部分来与亲核基团竞争亲电体,因而含水系统可导致低产率的偶联产物,其中产率是基于偶联体亲电部分的。当期望反应偶联体的亲电部分的高产率时,高浓度的亲核基团驱动反应和减缓水解作用,导致亲核基团的无效使用。在多聚核酸的情况下,磷酸盐的金属平衡离子可被亲脂平衡离子取代,以帮助将生物分子溶解于极性、无反应性的非水溶剂中。这些溶剂可包括酰胺或尿素例如甲酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、乙酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、六甲基磷酸酰胺、吡咯烷酮、N-甲基吡咯烷酮、N,N,N',N'-四甲基脲、N,N'-二甲基-N,N'-三亚甲脲或其组合;碳酸盐例如碳酸二甲酯、碳酸丙烯酯或其组合;酯例如四氢呋喃;亚砷和砷例如二甲基亚砷、二甲基砷或其组合;阻醇(hindered alcohol)例如叔丁基乙醇;或其组合。亲脂阳离子可包括四烷基铵或四芳基铵阳离子例如四甲基铵、四乙基铵、四丙基铵、四丁基铵、四戊基铵、四己基铵、四庚基铵、四辛基铵及其烷基和芳基混合物,四芳基磷阳离子例如四苯磷,四烷基肿或四芳基肿例如四苯肿,以及三烷基铊阳离子例如三甲基铊,或其组合。可通过多种标准阳离子交换技术进行多聚核酸至有机溶剂可溶的材料转化(通过将金属阳离子与亲脂阳离子交换)。

[0819] 在具体的实施方案中,将聚合物基质暴露于靶多核苷酸,所述靶多核苷酸具有与缀合于聚合物基质的寡核苷酸互补的区段。使多核苷酸经历扩增,例如通过聚合酶链式反应(PCR)或重组酶聚合酶扩增(RPA)。例如,以低浓度提供靶多核苷酸,以便单个多核苷酸有可能位于聚合物基质的阵列的单个聚合物基质内。聚合物基质可暴露于酶、核苷酸、盐或其它足以促进靶多核苷酸的复制的组分。

[0820] 在具体的实施方案中,酶例如聚合酶存在于、连接于或紧密接近于聚合物基质。多种核酸聚合酶可用于本文中描述的方法。在示例性实施方案中,聚合酶可包括可催化多核苷酸的复制的酶、其片段或亚基。在另一个实施方案中,聚合酶可以是天然存在的聚合酶、重组聚合酶、突变体聚合酶、变体聚合酶、融合或以其它方式工程化的聚合酶、化学修饰的聚合酶、合成分子、或其类似物、衍生物或片段。

[0821] 在一些实施方案中,用于将单个靶多核苷酸分配至反应室和扩增单个靶多核苷酸的方法包括核酸扩增反应。在一些实施方案中,可进行任何类型的核酸扩增反应包括聚合酶链式反应(PCR)(授予Mullis的美国专利4,683,195和4,683,202)、连接酶链式反应(LCR)(Barany 1991 Proceedings National Academy of Science USA 88:189-193;Barnes 1994 Proceedings National Academy of Science USA91:2216-2220)、解旋酶依赖性扩增(HDA)或等温自主维持序列反应(Kwoh 1989 Proceedings National Academy of Science USA 86:1173-1177;WO 1988/10315;和美国专利5,409,818,5,399,491和5,194,370)。

[0822] 在一些实施方案中,扩增反应包括重组酶聚合酶扩增(RPA)。(参见例如,Zarling的美国专利号5,223,414,Sena的美国专利号5,273,881和5,670,316,以及美国专利号7,

270,981、7,399,590、7,435,561、7,666,598、7,763,427、8,017,339、8,030,000、8,062,850和8071308)。

[0823] 在一些实施方案中,用于将单个靶多核苷酸分配至反应室和扩增单个靶多核苷酸的方法包括等温扩增条件。在一些实施方案中,可在等温条件下进行核酸扩增反应。在一些实施方案中,等温扩增条件包括经历这样的温度变化的核酸扩增反应:所述温度变化在扩增的至少某一部分期间局限于有限的范围内,包括例如温度变化在约20℃,或约10℃,或约5℃,或约1-5℃,或约0.1-1℃之内,或小于约0.1℃。在一些实施方案中,可在等温或热循环条件下进行核酸扩增反应。

[0824] 在一些实施方案中,可进行等温核酸扩增反应约2、5、10、15、20、30、40、50、60或120分钟。

[0825] 在一些实施方案中,可在约15-25℃,或约25-35℃,或约35-40℃,或约40-45℃,或约45-50℃,或约50-55℃,或约55-60℃下进行等温核酸扩增反应。

[0826] 在一些实施方案中,已根据本教导内容扩增的核酸可用于任何核酸测序 workflow,包括通过寡核苷酸探针连接和检测的测序(例如来自Life Technologies的SOLiD™,WO 2006/084131)、探针-锚定连接测序(例如Complete Genomics™或Polonator™)、合成测序(例如来自Illumina的Genetic Analyzer和HiSeq™)、焦磷酸盐测序(例如来自454Life Sciences的Genome Sequencer FLX)、离子敏感性测序(例如来自Ion Torrent Systems, Inc.的Personal Genome Machine (PGM™)和Ion Proton™ Sequencer)以及单分子测序平台(例如来自Helicos™的HeliScope™)。

[0827] 在一些实施方案中,可通过任何测序方法测序已根据本教导内容扩增的核酸,所述测序方法包括合成测序、包括使用场效应晶体管(例如FET和ISFET)检测测序副产物的基于离子的测序、化学降解测序、基于连接的测序、杂交测序、焦磷酸盐检测测序、毛细管电泳、凝胶电泳、下一代、大规模并行测序平台、检测氢离子或其它测序副产物的测序平台和单分子测序平台。在一些实施方案中,可使用至少一个可杂交至多核苷酸构建体的任何部分(包括核酸接头或靶多核苷酸)的测序引物来进行测序反应。

[0828] 在一些实施方案中,可使用检测核苷酸并入的一种或多种副产物的方法来测序根据本教导内容扩增的核酸。通过检测延伸反应的物理化学副产物的聚合酶延伸检测可包括焦磷酸盐、氢离子、电荷转移、热等,如例如公开于Rothberg等人的美国专利号7,948,015和Rothberg等人的美国专利公开号2009/0026082(通过引用整体并入本文)中的。检测基于聚合酶的延伸的方法的其它实例可见于例如Pourmand等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,103:6466-6470(2006);Purushothaman等人,IEEE ISCAS,IV-169-172;Anderson等人,Sensors and Actuators B Chem.,129:79-86(2008);Sakata等人,Angew.Chem.118:2283-2286(2006);Esfandyapour等人,美国专利公开号2008/01666727;和Sakurai等人,Anal.Chem.64:1996-1997(1992)中。

[0829] 广泛地进行了牵涉离子的产生和检测的反应。使用直接的离子检测方法监测这样的反应的进程可简化许多现行的生物测定。例如,通过检测被产生为由聚合酶催化的核苷酸并入的天然副产物的氢离子可监测由聚合酶介导的模板依赖性核酸合成。离子敏感性测序(也称为“基于pH的”或“基于离子的”核酸测序)利用了离子副产物例如氢离子(被产生为核苷酸并入的副产物)的直接检测。在一个用于基于离子的测序的示例性系统中,可将待

被测序的核酸捕获在微孔中,并在核苷酸并入条件下使核苷酸一次一个地流经孔。聚合酶将适当的核苷酸并入生长的链,被释放的氢离子可改变溶液的pH,其可通过与孔偶联的离子传感器来检测。该技术不需要核苷酸的标记或昂贵的光学组件,并且允许测序运行的远远更快的完成。这样的基于离子的核酸测序方法和平台的实例包括Ion Torrent PGM™或Proton™测序仪(Ion Torrent™ Systems,Life Technologies Corporation)。

[0830] 在一些实施方案中,使用本教导内容的方法、系统和试剂盒产生的靶多核苷酸可用作用于生物或化学反应的底物,所述反应通过传感器包括场效应晶体管(FET)来检测和/或监测。在不同的实施方案中FET是chemFET或ISFET。“chemFET”或化学场效应晶体管是用作化学传感器的场效应晶体管类型。它是MOSFET晶体管的结构类似物,其中通过化学过程来应用栅电极上的电荷。“ISFET”或离子敏感性场效应晶体管用于测量溶液中的离子浓度;当离子浓度(例如H<sup>+</sup>)改变时,通过晶体管的电流将相应地变化。操作ISFET的详细理论见于“Thirty years of ISFETOLOGY:what happened in the past 30years and what may happen in the next 30years,”P.Bergveld,Sens.Actuators,88(2003),pp.1-20中。

[0831] 在一些实施方案中,FET可以是FET阵列。如本文中所用,“阵列”是元件例如传感器或孔的平面排列。阵列可以是一维或二维的。一维阵列可以是在第一维具有一列(或排)的元件并在第二维具有多个列(或排)的阵列。第一和第二维中列(或排)的数目可以或不可以是相同的。FET或阵列可包含102、103、104、105、106、107或更多个FET。

[0832] 在一些实施方案中,可将一个或多个微流体结构焊接在FET传感器阵列之上以提供生物或化学反应的容纳和/或封闭。例如,在一个仪器中,可将微流体结构配置为置于阵列的一个或多个传感器之上的一个或多个孔(或微孔或反应室或反应孔,在本文中可互换地使用这些术语),以便给定孔置于其上的一个或多个传感器检测和测量给定孔中分析物的存在、水平和/或浓度。在一些实施方案中,FET传感器和反应孔的对应关系可以是1:1。

[0833] 微孔或反应室通常是具有明确定义的形状和体积的洞或孔,其可被加工至衬底中并可使用常规微焊接技术来焊接,例如如下述参考资料中所公开的:Doering and Nishi, Editors, Handbook of Semiconductor Manufacturing Technology, Second Edition (CRC Press, 2007); Saliterman, Fundamentals of BioMEMS and Medical Microdevices (SPIE Publications, 2006); Elwenspoek et al, Silicon Micromachining (Cambridge University Press, 2004); 以及类似的。微孔或反应室的结构(例如间距、形状和体积)的实例公开于Rothberg等人的美国专利公开2009/0127589; Rothberg等人的英国专利申请GB24611127中。

[0834] 在一些实施方案中,可在与FET例如chemFET或ISFET接触、可操作地偶联或电容性偶联的溶液或反应室中进行生物或化学反应。FET(或chemFET或ISFET)和/或反应室可分别是FET或反应室的阵列。

[0835] 在一些实施方案中,可在反应室的二维阵列中进行生物或化学反应,其中每个反应室可偶联至FET,并且每个反应室在容量上不超过10 $\mu$ m<sup>3</sup>(即1pL)。在一些实施方案中,每个反应室在容量上不超过0.34pL、0.096pL或0.012pL。反应室可任选地在顶部的横截面积上不超过2、5、10、15、22、32、42、52、62、72、82、92或102平方微米。优选地,阵列具有至少10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup>或更多个反应室。在一些实施方案中,反应室的至少一个可操作地偶联至FET的至少一个。

[0836] 可根据常规CMOS焊接技术以及改良的CMOS焊接技术和在CMOS焊接中常规使用的技术以外的其它半导体焊接技术,来焊接用于根据本公开内容的各种实施方案的FET阵列。此外,各种石版印刷技术可用作阵列焊接工艺的部分。

[0837] 适合用于公开的方法的示例性FET阵列和微孔和流体以及制备其的方法公开于例如美国专利公开号20100301398;美国专利公开号20100300895;美国专利公开号20100300559;美国专利公开号20100197507,美国专利公开号20100137143;美国专利公开号20090127589;和美国专利公开号20090026082中,上述参考资料通过引用整体并入本文。

[0838] 在一个方面,公开的方法、组合物、系统、装置和试剂盒可用于进行无标记核酸测序,特别是基于离子的核酸测序。核苷酸并入的无标记检测的概念已描述于文献中,包括如下的文献(其通过引用并入本文):Rothberg等人的美国专利公开2009/0026082;Anderson等人,Sensors and Actuators B Chem.,129:79-86(2008);和Pourmand等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,103:6466-6470(2006)。简要地,在核酸测序应用中,通过测量聚合酶催化的延伸反应的天然副产物包括氢离子、多磷酸盐、PPi和Pi(例如在存在焦磷酸酶时)来测定核苷酸并入。这样的基于离子的核酸测序方法和平台的实例包括Ion Torrent PGM™或Proton™测序仪(Ion Torrent™ Systems,Life Technologies Corporation)。

[0839] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于测序已通过本文中提供的教导内容进行扩增的核酸的方法。在一个示例性实施方案中,本公开内容通常涉及用于从多核苷酸获得序列信息的方法,包括:(a)扩增核酸;和(b)将在步骤(a)期间产生的扩增的核酸的至少一个用作模板来进行模板依赖性核酸合成。可任选地根据本文中描述的任何扩增方法进行扩增。

[0840] 在一些实施方案中,模板依赖性合成包括将一个或多个核苷酸以模板依赖性方式并入新合成的核酸链。

[0841] 任选地,方法还可包括产生这样的核苷酸并入的一种或多种离子副产物。

[0842] 在一些实施方案中,方法还可包括检测一个或多个核苷酸至测序引物中的并入。任选地,检测可包括检测氢离子的释放。

[0843] 在另一个实施方案中,本公开内容通常涉及用于测序核酸的方法,包括:(a)根据本文中公开的方法扩增核酸;(b)将扩增的核酸置于多个反应室中,其中反应室的一个或多个与场效应晶体管(FET)接触。任选地,方法还包括将置于反应室的一个中的扩增的核酸与聚合酶接触,从而通过将一个或多个核苷酸连续地并入核酸分子来合成新的核酸链。任选地,方法还包括产生一个或多个氢离子作为这样的核苷酸并入的副产物。任选地,方法还包括通过使用FET检测一个或多个氢离子的产生来检测一个或多个核苷酸的并入。

[0844] 在一些实施方案中,检测包括检测阵列内至少一个FET处的电压和/或电流响应一个或多个氢离子的产生的变化。

[0845] 在一些实施方案中,FET可选自:离子敏感性FET(isFET)和化学敏感性FET(chemFET)。

[0846] 包括通过检测核苷酸并入的离子副产物的测序的一个示例性系统是Ion Torrent PGM™或Proton™测序仪(Life Technologies),其是通过检测产生为核苷酸并入的副产物的氢离子来测序核酸模板的基于离子的测序系统。通常地,氢离子被释放为在由聚合酶介导的模板依赖性核酸合成期间存在的核苷酸并入副产物。Ion Torrent PGM™或Proton™测

序仪通过检测核苷酸并入的氢离子副产物来检测核苷酸并入。Ion Torrent PGM™或Proton™测序仪可包含多个待被测序的核酸模板,其中每个模板置于阵列中各自的测序反应孔内。阵列的孔可各自偶联至至少一个离子传感器,所述传感器可检测作为核苷酸并入的副产物产生的H<sup>+</sup>离子的释放或溶液pH的变化。离子传感器包括偶联至可感应H<sup>+</sup>离子的存在或溶液pH的变化的离子敏感性检测层的场效应晶体管(FET)。离子传感器可提供指示核苷酸并入的输出信号,其可表示为电压变化,所述电压变化的量值与各自孔或反应室中的H<sup>+</sup>离子浓度相关。不同的核苷酸类型可连续地流入反应室中,并可通过聚合酶以由模板的序列决定的顺序并入延伸引物(或聚合位点)。每一个核苷酸并入可伴随着反应孔中H<sup>+</sup>离子的释放以及局部pH的并行变化。H<sup>+</sup>离子的释放可由传感器的FET记录,其产生指示发生核苷酸并入的信号。在特定的核苷酸流中未被并入的核苷酸可不产生信号。来自FET的信号波幅还可与并入延伸核酸分子的特定类型的核苷酸的数量相关,从而允许解析同聚物区域。因此,在测序仪的运行期间,进入反应室的多个核苷酸流以及在大量孔或反应室间的并入监测可允许设备同时地解析许多核酸模板的序列。关于Ion Torrent PGM™或Proton™测序仪的组成、设计和操作的其它细节可见于例如美国专利申请系列号12/002781,现公开为美国专利公开号2009/0026082;美国专利申请系列号12/474897,现公开为美国专利公开号2010/0137143;和美国专利申请系列号12/492844,现公开为美国专利公开号2010/0282617中,上述参考资料通过引用整体并入本文。

[0847] 图28显示了用于根据示例性实施方案的核酸测序的系统的组件的方块图。组件包括在集成电路装置100上的流动池101、参比电极108、用于测序的多个试剂114、阀体116、洗涤溶液110、阀112、流体控制器118、线路120/122/126、通道104/109/111、废料容器106、阵列控制器124、和用户界面128。集成电路装置100包括覆在传感器阵列上的微孔阵列107,所述传感器阵列包含如本文中描述的化学传感器。流动池101包括入口102、出口103和定义在微孔阵列107上的试剂流动路径的流动室105。

[0848] 参比电极108可具有任何适当的类型或形状,包括具有流动通道或插入通道111的腔中的导线的同轴圆柱体。可通过泵、气压或其它适当的方法驱动试剂114通过流动路径、阀和流动池101,并可在离开流动池101的出口103后将其排出至废料容器106中。流体控制器118可使用适当的软件控制用于试剂114的驱动力、阀112和阀体116的操作。

[0849] 微孔阵列107包括如本文中描述的反应区的阵列,在本文中也称作微孔,其可操作地与传感器阵列中对应的化学传感器联合。例如,每个反应区可偶联至适合用于检测反应区内的目的分析物或反应性质的化学传感器。可将微孔阵列107整合至集成电路装置100中,以便微孔阵列107和传感器阵列是单个装置或芯片的部分。

[0850] 流动池101可具有多种用于控制试剂114在微孔阵列107上的路径和流动速率的结构。阵列控制器124为集成电路装置100提供偏置电压以及定时和控制信号以用于读取传感器阵列的化学传感器。阵列控制器124还为参比电极108提供参照偏置电压以对流经微孔阵列107的试剂114加偏压。

[0851] 在实验期间,阵列控制器124收集和加工来自传感器阵列的化学传感器的通过集成电路装置100上的输出端口经过总线127的输出信号。阵列控制器124可以是计算机或其它的计算工具。阵列控制器124可包括用于存储数据的存储器和应用软件、用于存取数据和执行应用的处理器以及促进与图28中的系统的各种组件的通信的组件。

[0852] 化学传感器的输出信号的值指示在微孔阵列107中的对应反应区中发生的一个或多个反应的物理和/或化学参数。例如,在示例性实施方案中,可使用下列参考资料中公开的技术处理输出信号的值:Rearick等人于2011年12月29日提交的美国专利申请号13/339,846,基于2010年12月30日提交的美国临时专利申请号61/428,743和2011年1月3日提交的美国临时专利申请号61/429,328,以及Hubbell于2011年12月29日提交的美国专利申请号13/339,753,基于2010年12月29日提交的美国临时专利申请号61/428,097。

[0853] 用户界面128可显示关于流动池101和接收自集成电路装置100上的传感器阵列中的化学传感器的输出信号的信息。用户界面128还可显示设备设置和控制并允许用户输入或设置设备设置和控制。

[0854] 在示例性实施方案中,在实验期间流体控制器118可将个体试剂114至流动池101和集成电路装置100的递送控制在预先确定的顺序、预先确定的持续时间、预先确定的流速。阵列控制器124可随后收集和分析指示响应试剂114的递送而发生的化学反应的化学传感器的输出信号。

[0855] 在实验期间,系统还可监测和控制集成电路装置100的温度,以便在已知的预先确定的温度下发生反应和进行测量。

[0856] 可配置系统以使得在操作期间在整个多步反应中单个流体或试剂接触参比电极108。可关闭阀112以防止任何洗涤溶液110在试剂114流动时流入通道109中。尽管洗涤溶液的流动可被阻止,但在参比电极108、通道109和微孔阵列107之间可仍然存在连续的流体和电通信。可选择参比电极108与通道109和111间的连接点之间的距离,以便没有或极少量的在通道109中流动和可能地扩散至通道111中的试剂到达参比电极108。在示例性实施方案中,可将洗涤溶液110选择为与参比电极108连续接触,这可特别地用于使用频繁的洗涤步骤的多步反应。

[0857] 图29显示集成电路装置100和流动池101的部分的剖面图和展开图。在操作期间,流动池101的流动室105封闭流经微孔阵列107中的反应区的开口末端的经递送的试剂的试剂流208。可基于发生的反应的性质以及使用的标记技术(如果有的话)或试剂、副产物来选择反应区的体积、形状、长宽比(例如底宽对孔深比)和其它的尺寸特征。

[0858] 传感器阵列205的化学传感器感应(和产生输出信号)微孔阵列107中相关的反应区内的化学反应以检测目的分析或反应性质。传感器阵列205的化学传感器可例如是化学敏感性场效应晶体管(chemFET),例如离子敏感性场效应晶体管(ISFET)。可用于实施方案的化学传感器和阵列结构的实例描述于美国专利申请公开号2010/0300559、2010/0197507、2010/0301398、2010/0300895、2010/0137143和2009/0026082以及美国专利号7,575,865中,上述每一个参考资料通过引用并入本文。

[0859] 图30显示了根据示例性实施方案的两个代表性化学传感器及其对应的反应区的剖面图。在图30中,显示了两个化学传感器350、351,其代表可包括数百万化学传感器的传感器阵列的一小部分。在一些实施方案中,传感器阵列可包括至少1百万个化学传感器和任选地至少1百万个对应的反应区,至少1千万个化学传感器和任选地至少1千万个对应的反应区,至少1亿个化学传感器和任选地至少1亿个对应的反应区,至少5亿个化学传感器和任选地至少5亿个对应的反应区或至少10亿个化学传感器和任选地至少10亿个对应的反应区。

[0860] 化学传感器350偶联至对应的反应区301,化学传感器351偶联至对应的反应区302。化学传感器350代表传感器阵列中的化学传感器。在显示的实例中,化学传感器350是离子敏感性场效应晶体管。化学传感器350包括浮动栅结构318,所述浮动栅结构318具有通过传感材料316与反应区301分离的浮动栅导体(在本文中被称作传感器板320)。如图30中显示的,传感器板320在反应区301下方的浮动栅结构318中的传导材料的最上面的图案层。

[0861] 在显示的实例中,浮动栅结构318包括在电介质材料319的层中的传导材料的多个图案层。如下文更详细地描述的,传感材料316的上表面用作化学传感器350的传感表面317。

[0862] 在显示的实施方案中,传感材料316是离子敏感性材料,从而离子或其它电荷种类在反应区301中的溶液中的存在改变传感表面317的表面电势。表面电势的变化是因溶液中存在的离子导致的传感表面处的表面电荷基团的质子化或去质子化而引起的。传感材料316可通过使用多种技术来置入,或在用来形成化学传感器350的一个或多个制造工艺期间天然地形成。在一些实施方案中,传感材料316是金属氧化物,例如硅、钽、铝、镧、钛、锆、钪、钨、钼、铌等的氧化物。

[0863] 在一些实施方案中,传感材料316是传感器板320的传导材料的上层的氧化物。例如,传感器板320的上层可以是氮化钛,传感材料316可包括氧化钛或氮氧化钛。更一般地,传感材料316可包括多种不同材料的一个或多个以促进对特定离子的敏感性。例如,氮化硅或氮氧化硅以及金属氧化物例如氧化硅、氧化铝或氧化钽通常提供对氢离子的敏感性,然而包含具有缬氨霉素的聚氯乙烯的传感材料提供对钾离子的敏感性。取决于仪器,还可使用对其它离子(例如钠、银、铁、溴、碘、钙和硝酸盐)敏感的材料。

[0864] 化学传感器350还包括半导体衬底354内的源极区321和漏极区322。源极区321和漏极区322包含掺杂的半导体材料,其具有与衬底354的传导率类型不同的传导率类型。例如,源极区321和漏极区322可包含掺杂的P-类型半导体材料,衬底可包含掺杂的N-类型半导体材料。

[0865] 槽区323将源极区321和漏极区322分离。浮动栅结构318覆在槽区323之上,并通过栅极电介质352与衬底354分离。栅极电介质352可例如是二氧化硅。或者,其它的电介质可用于栅极电介质352。

[0866] 如图30中显示的,反应区301延伸穿过电介质材料319上的填充材料310。填充材料310可例如包含一层或多层电介质材料例如二氧化硅或氮化硅。

[0867] 反应区301、302的尺度(例如宽度和深度)以及其节距(相邻反应区之间的中心距离)可在仪器和仪器之间不同。在一些实施方案中,反应区可具有不超过5微米,例如不超过3.5微米,不超过2.0微米,不超过1.6微米,不超过1.0微米,不超过0.8微米,不超过0.6微米,不超过0.4微米,不超过0.2微米或不超过0.1微米的特征直径,所述直径由4乘以平面图横截面积(A)除以Pi的平方根(例如, $\sqrt{4 \cdot A / \pi}$ )来定义。

[0868] 在一些实施方案中,相邻反应区之间的节距不超过10微米,不超过5微米,不超过2微米,不超过1微米或不超过0.5微米。

[0869] 在显示的实施方案中,反应区301、302以等于其宽度的距离被分离。或者,相邻反应区之间的分离距离可小于其宽度。例如,分离距离可以是用于用来形成反应区301、302的工艺(例如石版印刷工艺)的最小特征尺寸。在这样的情况下,分离直接可显著地小于个体

反应区的宽度。

[0870] 传感器板320、传感材料316和反应区301可例如具有圆形横截面。或者,这些可以是非圆形的。例如,横截面可以是正方形的、矩形的、六边形的或是不规则形状的。

[0871] 取决于其中实现本文中描述的化学传感器的装置和阵列结构,图30中的装置还可包括另外的元件例如用于访问化学传感器的阵列线路(例如字线、位线等)、衬底354中另外的掺杂区和用于操作化学传感器的其它电路(例如接入电路、偏置电路等)。在一些实施方案中,可例如使用美国专利申请公开号2010/0300559、2010/0197507、2010/0301398、2010/0300895、2010/0137143和2009/0026082以及美国专利号7,575,865(其每一个通过引用并入本文)中描述的技术生产装置。

[0872] 在操作中,反应物、洗涤溶液和其它试剂可通过扩散机制340移进和移出反应区301。化学传感器350感应(和产生相关的输出信号)存在于与传感器板320相对的传感材料316上的电荷324的量。电荷324的变化引起浮动栅结构318上的电压变化,其进而引起晶体管的临阈电压的变化。可通过测量源极区321和漏极区322之间的槽区323中的电流来测量该临阈电压的变化。因此,化学传感器350可直接地用于提供连接至源极区321或漏极区322的阵列线路上的基于电流的输出信号,或间接地利用另外的电路来提供基于电压的输出信号。

[0873] 在实施方案中,在反应区301中进行的反应可以用以鉴定或测定目的分析物的特性或性质的分析反应。这样的反应可直接地或间接地产生影响传感器板320附近的电荷量的副产物。如果这样的副产物小量地产生或迅速衰减或其它组分反应,则可同时在反应区301中分析相同分析物的多个拷贝,以增加产生的输出信号。在实施方案中,可将分析物的多个拷贝在置入反应区301中之前或之后连接至固相支持物312。固相支持物312可以是微粒、纳米颗粒、小珠、固体的或多孔的包括凝胶等。为了简便和易于说明,固相支持物312在本文中也称作颗粒。对于核酸分析物,多个连接的拷贝可通过滚环扩增(RCA)、指数RCA、重组酶聚合酶扩增(RPA)、聚合酶链式反应扩增(PCR)、乳剂PCR扩增或类似的技术来制备,以产生扩增子而无需固体支持物。

[0874] 在多个示例性实施方案中,本文中描述的方法、系统和计算机可读的介质可有利地用于处理和/或分析获自基于电子或电荷的核酸测序的数据和信号。在基于电子或电荷的测序(例如,基于pH的测序)中,可通过检测被产生为聚合酶催化的核苷酸延伸反应的天然副产物的离子(例如氢离子)来测定核苷酸并入事件。这可用于测序样本或模板核酸,其可以是例如目的核酸序列的片段,并且其可直接地或间接地作为克隆群连接至固体支持物例如颗粒、微粒、小珠等。样本或模板核酸可以可操作地缔合至引物和聚合物并可经历重复的核苷酸添加和洗涤的循环或“流”(在本文中其可被称作“核苷酸流”,该“核苷酸流”可导致核苷酸并入)。引物可退火至样本或模板以便每当添加与模板中的下一个碱基互补的核苷酸时引物的3'末端可被聚合酶延伸。随后,基于已知的核苷酸流的序列和基于测量的化学传感器的指示每个核苷酸流期间的离子浓度的输出信号,可测定与存在于偶联至化学传感器的反应区中的样本核酸缔合的核苷酸的类型、序列和数量的信息。

[0875] 在典型的基于离子的核酸测序的实施方案中,可通过检测由聚合酶催化的延伸反应产生的氢离子的存在和/或浓度来检测核苷酸并入。在一个实施方案中,可将任选地与测序引物和/或聚合酶预结合的模板装载至反应室(例如本文中引用的Rothberg等人中公开

的微孔)中,随后可进行重复的核苷酸添加和洗涤的循环。在一些实施方案中,这样的模板可作为克隆群连接至固体支持物例如颗粒、小珠或类似的,并将所述克隆群载入反应室中。

[0876] 在另一个实施方案中,将任选地结合至聚合酶的模板分配于、置入或定位于阵列的不同位点。阵列的位点包含引物并且方法可包括将不同的模板杂交至不同的位点中的引物。

[0877] 在循环的每一个添加步骤中,仅当模板中的下一个碱基是添加的核苷酸的互补物时,聚合酶可通过并入添加的核苷酸来延伸引物。如果存在一个互补碱基,则存在一个并入,如果有两个,则存在两个并入,如果有三个,则存在三个并入,等等。对于每一个这样的并入,存在释放的氢离子,并且共同地释放氢离子的模板群改变反应室的局部pH。氢离子的产生与模板中连续的互补碱基的数量(以及与引物和聚合物参与延伸反应的模板分子的总数量)单调相关。因此,当模板中存在许多连续相同的互补碱基(即同聚物区域)时,产生的氢离子的数量和由此导致的局部pH变化的量值,可与连续相同的互补碱基的数量成比例。如果模板中的下一个碱基与添加的核苷酸不互补,那么并入不发生并且不释放氢离子。在一些实施方案中,在每一个添加核苷酸的步骤之后,可进行额外的步骤,其中将在预先确定的pH下的无缓冲洗涤溶液用来除去先前步骤的核苷酸以防止在之后循环中的错误掺入。在一些实施方案中,在每一个添加核苷酸的步骤之后,可进行额外的步骤,其中用核苷酸破坏试剂例如腺苷三磷酸双磷酸酶处理反应室以除去保留在室内的任何残留的核苷酸,这些核苷酸可在随后的循环中导致假延伸。

[0878] 在一个示例性实施方案中,将不同种类的核苷酸连续地添加至反应室,以便每个反应可一次一个地暴露于不同的核苷酸。例如,可按下面的顺序添加核苷酸:dATP,dCTP,dGTP,dTTP,dATP,dCTP,dGTP,dTTP,等等;每一次暴露后进行洗涤步骤。取决于期望的序列信息的长度,可重复循环50次、100次、200次、300次、400次、500次、750次或更多次。

[0879] 在一些实施方案中,可根据PGM™或Proton™测序仪提供的用户手册来进行测序。实施例3提供了用于使用Ion Torrent PGM™测序仪(Ion Torrent™ Systems,Life Technologies,CA)的基于离子的测序的一个示例性方案。

[0880] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于测序模板多核苷酸群的方法,包括:(a)通过在多个表面上克隆地扩增多个模板多核苷酸来产生多个扩增子,其中在反应混合物的单一连续相内进行所述扩增和其中所产生的扩增子的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%在本质上是基本上单克隆的。在一些实施方案中,在单个扩增反应中产生足够数量的基本上单克隆的扩增子以在Ion Torrent PGM™ 314、316或318测序仪上产生至少100MB、200MB、300MB、400MB、500MB、750MB、1GB或2GB的AQ20测序读数。如本文中所用,术语“AQ20”及其变体是指在Ion Torrent PGM™测序仪中测量测序准确度的特定方法。可以以Phred-样Q分数的方式测量准确度,所述Phred-样Q分数在对数标度上测量准确度:Q10=90%,Q20=99%,Q30=99.9%,Q40=99.99%和Q50=99.999%。例如,在特定的测序反应中,可通过预测算法或通过与已知参照基因组的实际比对来计算准确度度量。预测的质量分数(“Q分数”)可来源于这样的算法:其考虑输入信号的固有性质并对于包含在测序“读数”中的给定单个碱基是否将对齐进行相当准确的评价。在一些实施方案中,这样的预测的质量分数可用于在下游比对之前过滤和去除低质量读数。在一些实施方案中,可以以Phred-样Q分数的方式报告准确度,所述Phred-样Q分数在对数标度上测量

准确度:Q10=90%,Q17=98%,Q20=99%,Q30=99.9%,Q40=99.99%和Q50=99.999%。在一些实施方案中,可将获自给定聚合酶反应的数据过滤以仅量度测量“N”个核苷酸或更长并具有超过一定阈值例如Q10、Q17、Q100(在本文中被称作“NQ17”分数)的Q分数的聚合酶读数。例如,100Q20分数可指示获自给定反应的在长度上为至少100个核苷酸并且具有Q20(99%)或更高的Q分数的读数的数量。类似地,200Q20分数可指示在长度上为至少200个核苷酸并且具有Q20(99%)或更高的Q分数的读数的数量。

[0881] 在一些实施方案中,还可基于使用参照基因组序列的适当比对来计算准确度,其在本文中被称作“原始”准确度。这是单通准确度(single pass accuracy),其包括与单个读数相关的每碱基错误的“真”的测量,这与共有准确度相反,共有准确度测量来自共有序列的错误率,其是多个读数的结果。可以以“AQ”(“比对的质量”的简写)分数的方式报告原始准确度测量。在一些实施方案中,可将获自给定聚合酶反应的数据过滤以仅量度测量“N”个核苷酸或更长并具有超过一定阈值例如AQ10、AQ17、AQ100(在本文中被称作“NAQ17”分数)的AQ分数的聚合酶读数。例如,100AQ20分数可指示获自给定聚合酶反应的在长度上为至少100个核苷酸并且具有AQ20(99%)或更高的AQ分数的读数的数量。类似地,200AQ20分数可指示在长度上为至少200个核苷酸并且具有AQ20(99%)或更高的AQ分数的读数的数量。

[0882] 在一些实施方案中,本教导内容提供了用于核酸扩增的系统,所述系统包含下列的任何组合:连接有多个第一引物的小珠、第二引物、第三引物、多核苷酸、重组酶、重组酶载入蛋白、单链结合蛋白(SSB)、聚合酶、核苷酸、ATP、磷酸肌酸、肌酸激酶、杂交液和/或洗涤溶液。系统可包含这些组分的全部或一些。在一些实施方案中,用于核酸扩增的系统还可包含缓冲液和/或阳离子(例如二价阳离子)的任何组合。

[0883] 在一些实施方案中,本教导内容提供了用于核酸扩增的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含可用于核酸扩增的任何试剂。在一些实施方案中,试剂盒可包含下列的任何组合:连接有多个第一引物的小珠、第二引物、第三引物、多核苷酸、重组酶、重组酶载入蛋白、单链结合蛋白(SSB)、聚合酶、核苷酸、ATP、磷酸肌酸、肌酸激酶、杂交液、洗涤溶液、缓冲液和/或阳离子(例如二价阳离子)。试剂盒可包含这些组分的全部或一些。

[0884] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于在多个经划分的反应容量中平行地扩增不同的核酸模板(如与在单一连续液相内的扩增相反的)的方法、组合物、系统。例如,可将核酸模板分配至或置于反应室的阵列或反应容量的阵列中,以便阵列中的至少两个这样的室或容量各自接收单个核酸模板。在一些实施方案中,形成了多个分离的反应容量。可任选地在扩增之前封闭反应室(或反应容量)。在另一个实施方案中,可将反应混合物划分或分离至分散在乳剂的连续相内的多个微反应器中。经划分或分离的反应容量任选地不彼此混合或连通,或不能够彼此混合或连通。在一些实施方案中,至少一些反应室(或反应容量)包含重组酶和任选地聚合酶。聚合酶可以是链置换聚合酶。

[0885] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸合成和/或扩增的包含乳剂的组合物、系统、方法、装置和试剂盒。如本文中所用,术语“乳剂”包括包含第一液体和第二液体的混合物的任何组合物,其中第一和第二液体是基本上彼此不互溶的。通常地,液体的一种是亲水性的而其它的液体是疏水性的。通常地,乳剂包含分散相和连续相。例如,第一液体可形成分散在第二液体中的分散相,所述第二液体形成连续相。分散相任选地主要由第

一液体组成。连续相任选地主要由第二液体组成。在各种实施方案中,相同的两种液体可形成不同类型的乳剂。例如,包含油和水的混合物可首先形成水包油型乳剂,其中油是分散相,水是分散介质。其次,它们可形成油包水型乳剂,其中水是分散相,油是外相。多重乳剂也是可能的,包括“水包油包水”乳剂和“油包水包油”乳剂。在一些实施方案中,分散相包含一个或多个其中核酸模板可各个地被扩增的微反应器。一个或多个微反应器可形成其中可发生分离的扩增反应的经划分的反应容量。用于核酸扩增的适当的媒介物的一个实例包括油包水型乳剂,其中基于水的相包含几个分散在乳剂的油相内的含水微反应器。在一些实施方案中,乳剂还可包含乳化剂或表面活性剂。乳化剂或表面活性剂可用于在核酸合成条件下稳定乳剂。

[0886] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含乳剂的组合物,所述乳剂包含反应混合物。乳剂可包含水相。水相可分散在乳剂的连续相中。水相可包含一个或多个微反应器。在一些实施方案中,反应混合物包含在乳剂的相内的多个液相微反应器中。任选地,反应混合物包含重组酶。任选地,反应混合物包含多个不同的多核苷酸。任选地,反应混合物包含多个支持物。任选地,反应混合物包含重组酶、多个不同的多核苷酸和/或多个支持物的任何组合。任选地,至少一个支持物可连接至基本上单克隆的核酸群。

[0887] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含反应混合物的组合物,所述反应混合物包含 (i) 多个支持物, (ii) 多个不同的多核苷酸和 (iii) 重组酶,反应混合物包含在乳剂中的多个液相微反应器中。

[0888] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含反应混合物的组合物,所述反应混合物包含 (i) 重组酶和 (ii) 多个支持物,至少一个支持物可连接至基本上单克隆的核酸群,其中反应混合物包含在乳剂中的多个液相微反应器中。

[0889] 任选地,乳剂包含亲水相。

[0890] 任选地,乳剂包含分散在疏水相中的亲水相。例如,乳剂可包含油包水型乳剂。

[0891] 在一些实施方案中,亲水相包含多个微反应器。

[0892] 任选地,反应混合物包含在单个反应容器中。

[0893] 任选地,多个不同的多核苷酸的序列可以是相同或不同的。

[0894] 任选地,多个支持物的至少一个连接至多个第一引物(例如正向扩增引物)。

[0895] 任选地,反应混合物还包含多个第二引物(例如反向扩增引物)。

[0896] 在一些实施方案中,多个支持物的至少一个还包含多个第二引物。

[0897] 在一些实施方案中,多个支持物的至少一个包含多个第一和第二引物。

[0898] 在一些实施方案中,第一和第二引物包含相同的序列。在一些实施方案中,第一和第二引物包含不同的序列。

[0899] 在一些实施方案中,支持物包括小珠、颗粒、平面表面或槽或管的内壁。

[0900] 在一些实施方案中,反应混合物还包含聚合酶和多个核苷酸。

[0901] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含乳剂的组合物。任选地,乳剂包含亲水相和疏水相。任选地,乳剂包含分散在疏水相中的亲水相。任选地,亲水相可包含多个多核苷酸模板、多个支持物和/或重组酶的任何组合。任选地,亲水相可包含多个多核苷酸模板。任选地,亲水相可包含多个支持物。选地,亲水相可包含重组酶。

[0902] 在一些实施方案中,组合物包含乳剂,所述乳剂包含亲水相和疏水相,其中亲水相

包含多个多核苷酸模板、多个支持物和重组酶。

[0903] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及包含乳剂的组合物,所述乳剂包含分散在疏水相中的亲水相。任选地,亲水相包含多个微反应器。任选地,多个中的至少两个微反应器包含不同的多核苷酸模板。任选地,不同的多核苷酸模板的序列是相同或不同的。任选地,第一微反应器包含第一多核苷酸模板并且第二微反应器包含第二多核苷酸模板。任选地,第一和第二多核苷酸模板包含相同或不同的序列。任选地,多个中的至少两个微反应器包含重组酶。

[0904] 在一些实施方案中,组合物包含乳剂,所述乳剂包含分散在疏水相中的亲水相,其中亲水相包含多个微反应器,多个中的至少两个微反应器包含不同的多核苷酸模板和重组酶。

[0905] 在一些实施方案中,亲水相包含多个含水微反应器,微反应器的至少两个各自包含不同的多核苷酸模板、支持物和重组酶。

[0906] 任选地,第一微反应器包含第一多核苷酸模板并且第二微反应器包含第二多核苷酸模板。任选地,第一和第二多核苷酸模板包含相同或不同的序列。

[0907] 任选地,多个支持物的至少一个连接至多个第一引物(例如正向扩增引物)。

[0908] 任选地,反应混合物还包含多个第二引物(例如反向扩增引物)。

[0909] 在一些实施方案中,多个支持物的至少一个还包含多个第二引物。

[0910] 在一些实施方案中,多个支持物的至少一个包含多个第一和第二引物。

[0911] 在一些实施方案中,第一和第二引物包含相同的序列。

[0912] 在一些实施方案中,第一和第二引物包含不同的序列。在一些实施方案中,亲水相还包含聚合酶。

[0913] 在一些实施方案中,聚合酶包括链置换聚合酶。在一些实施方案中,亲水相包含核苷酸。

[0914] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸合成的方法(及相关的组合物和系统),包括:(a)形成反应混合物;和(b)使反应混合物经历扩增条件。任选地,反应混合物包含在乳剂的亲水相内。任选地,乳剂包含亲水相和疏水相。任选地,乳剂包含分散在疏水相中的亲水相。任选地,反应混合物包含多个支持物、多个不同的多核苷酸和/或重组酶的任何组合。任选地,反应混合物包含多个支持物。任选地,反应混合物包含多个不同的多核苷酸。任选地,不同的多核苷酸模板的序列是相同或不同的。任选地,第一微反应器包含第一多核苷酸模板并且第二微反应器包含第二多核苷酸模板。任选地,第一和第二多核苷酸模板包含相同或不同的序列。任选地,反应混合物包含重组酶。任选地,扩增条件包括等温或热循环温度条件。任选地,方法还包括形成至少两个支持物使乳剂经历扩增条件导致形成多个支持物,其中支持物的至少两个各自独立地连接至基本上单克隆的核酸群。

[0915] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸合成的方法(及相关的组合物和系统),包括:(a)形成包含多个支持物、多个不同的多核苷酸和重组酶的反应混合物,反应混合物包含在乳剂的亲水相内;和(b)使包含反应混合物的乳剂经历等温扩增条件,从而产生多个支持物和连接至其的基本上单克隆的核酸群。

[0916] 在一些实施方案中,乳剂包括油包水型乳剂。在一些实施方案中,液相微反应器包含亲水相。在一些实施方案中,乳剂包含分散在疏水相中的亲水相。在一些实施方案中,在

单个反应容器中形成反应混合物。任选地,多个不同的多核苷酸模板的序列是相同或不同的。任选地,第一多核苷酸模板包含第一序列并且第二多核苷酸模板包含第二序列。任选地,第一和第二多核苷酸模板序列是相同或不同的。任选地,多个支持物的至少一个连接至多个第一引物(例如正向扩增引物)。任选地,反应混合物还包含多个第二引物(例如反向扩增引物)。在一些实施方案中,多个支持物的至少一个还包含多个第二引物。在一些实施方案中,多个支持物的至少一个包含多个第一和第二引物。在一些实施方案中,第一和第二引物包含相同的序列。在一些实施方案中,第一和第二引物包含不同的序列。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括从反应混合物回收至少一些连接至基本上核酸单克隆群的支持物。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括将至少一些连接至基本上单克隆的核酸群的支持物放置在表面上。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括通过将至少一些连接至基本上单克隆的核酸群的支持物放置在表面上来形成阵列。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括测序至少一个连接至支持物的基本上单克隆的核酸群。在一些实施方案中,支持物包括小珠、颗粒、平面表面或槽或管的内壁。在一些实施方案中,反应混合物还包含聚合酶和多个核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶包括链置换聚合酶。

[0917] 在一些实施方案中,用于核酸合成的方法包括形成乳剂。任选地,乳剂包含亲水相和疏水相。任选地,乳剂包含分散在疏水相中的亲水相。任选地,亲水相包含多个微反应器。任选地,多个中的至少两个微反应器包含个体多核苷酸模板。任选地,多个中的至少两个微反应器包含不同的多核苷酸模板。任选地,第一微反应器包含第一多核苷酸模板,并且第二微反应器包含第二多核苷酸模板。任选地,第一和第二多核苷酸模板具有相同或不同的序列。任选地,多个中的至少两个微反应器包含重组酶。

[0918] 在一些实施方案中,本公开内容通常涉及用于核酸合成的方法(及相关的组合物和系统),包括:形成包含分散在疏水相中的亲水相的乳剂,所述亲水相包含多个微反应器,多个中的至少两个微反应器包含不同的多核苷酸模板和重组酶。

[0919] 在一些实施方案中,乳剂包括油包水型乳剂。在一些实施方案中,亲水相还包含聚合酶。在一些实施方案中,聚合酶是链置换聚合酶。在一些实施方案中,亲水相包含核苷酸。在一些实施方案中,在单个反应容器中形成乳剂。任选地,不同的多核苷酸模板的序列是相同或不同的。任选地,第一微反应器包含第一多核苷酸模板并且第二微反应器包含第二多核苷酸模板。任选地,第一和第二多核苷酸模板包含相同或不同的序列。在一些实施方案中,多个中的至少两个微反应器包含多个支持物。任选地,多个支持物的至少一个连接至多个第一引物(例如正向扩增引物)。任选地,反应混合物还包含多个第二引物(例如反向扩增引物)。在一些实施方案中,多个支持物的至少一个还包含多个第二引物。在一些实施方案中,多个支持物的至少一个包含多个第一和第二引物。在一些实施方案中,第一和第二引物包含相同的序列。在一些实施方案中,第一和第二引物包含不同的序列。在一些实施方案中,亲水相包含反应混合物。在一些实施方案中,反应混合物包含多个多核苷酸模板、多个支持物和重组酶。在一些实施方案中,用于核酸合成的方法还包括使乳剂(例如包含反应混合物)经历等温扩增条件,从而产生多个基本上单克隆的核酸群。在一些实施方案中,多个基本上单克隆的核酸群连接至多个支持物。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括从反应混合物回收至少一些连接至基本上核酸单克隆群的支持物。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括将至少一些连接至基本上单克隆的核酸群的支持物放置在表面上。在一些实

施方案中,核酸合成方法还包括通过将至少一些连接至基本上单克隆的核酸群的支持物放置在表面上来形成阵列。在一些实施方案中,核酸合成方法还包括测序至少一个连接至支持物的基本上单克隆的核酸群。在一些实施方案中,支持物包括小珠、颗粒、平面表面或槽或管的内壁。在一些实施方案中,反应混合物还包含聚合酶和多个核苷酸。在一些实施方案中,聚合酶包括链置换聚合酶。

[0920] 本文中使用的段落标题仅用于组织目的并不应被解释为以任何方式限制描述的主题。

[0921] 本申请中引用的所有文献和类似的材料,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、论文和互联网页,均明确地通过引用整体并入本文以用于任何目的。当并入的参考资料中的术语的定义看起来与本教导内容中提供的定义不同时,应当以本教导内容中提供的定义为准。

[0922] 将理解在本教导内容中讨论的温度、浓度、次数等之前存在隐含的“约”,因此轻微的和非实质性的差异在本教导内容的范围内。

[0923] 除非上下文另有要求,单数的术语将包含复数并且复数的术语将包含单数。

[0924] 术语“包含”、“包括”、“含有”、“具有”、“带有”和“有”不意欲是限制性的。

[0925] 将理解上文的一般性描述和下文的详细描述仅是示例性和解释性的并且不限制本发明。

[0926] 除非另有定义,与本文中描述的本教导内容相关地使用的科学和技术术语将具有由本领域技术人员通常理解的意义。通常地,与细胞和组织培养、分子生物学以及蛋白和寡-或多-核苷酸化学和杂交相关地使用的命名法及其技术是本领域中公知和通常使用的。标准技术例如用于核酸纯化和制备、化学分析、重组核酸和寡核苷酸合成。根据制造商的说明书或如本领域中通常实现地或如本文中描述地进行酶促反应和纯化技术。通常根据本领域中公知的常规方法和如整个本说明书中引用和讨论的各种一般性和更具体的参考资料中所描述地进行本文中描述的技术和方法。参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2000)。相关使用的命名法以及本文中描述的实验室方法和技术是本领域中公知和通常使用的。

[0927] 如根据本文中提供的示例性实施方案所使用的,下列术语,除另有指明,应当被理解为具有如下意义:

[0928] 如本文中所用,术语“扩增”及其变体包括用于产生多核苷酸的至少某一部分的多个拷贝或互补物的任何过程,所述多核苷酸通常被称作“模板”。模板多核苷酸可以是单链或双链的。给定模板的扩增可导致多核苷酸扩增产物群的产生,所述多核苷酸扩增产物群共同地被称作“扩增子”。扩增子的多核苷酸可以是单链或双链或两种的混合物。通常地,模板将包含靶序列,并且所产生的扩增子将包含具有与靶序列基本上相同或基本上互补的序列的多核苷酸。在一些实施方案中,特定扩增子的多核苷酸彼此是基本上相同或基本上互补的;或者,在一些实施方案中,给定扩增子内的多核苷酸可具有彼此不同的核苷酸序列。扩增可以以线性或指数性的方式进行,并且可包括给定模板的重复和连续的复制以形成两个或更多个扩增产物。一些典型的扩增反应包括基于模板的核酸合成的连续和重复循环,导致多个子多核苷酸的形成,所述子多核苷酸包含模板的核苷酸序列的至少某一部分并且

与模板享有至少某一程度的核苷酸序列同一性(或互补性)。在一些实施方案中,每一个核酸合成(其可被称作扩增的“循环”)包括引物退火和引物延伸步骤;任选地,还可包括其中模板被部分或完全变性的另外的变性步骤。在一些实施方案中,一个扩增回合包括单个扩增循环的给定的重复次数。例如,扩增回合可包括特定循环的5、10、15、20、25、30、35、40、50、75、100或更多次重复。在一个示例性实施方案中,扩增包括其中特定多核苷酸模板经历两个连续的核酸合成循环的任何反应。合成可包括模板依赖性核酸合成。核酸合成的每一个循环任选地包括单个引物退火步骤和单个延伸步骤。在一些实施方案中,扩增包括等温扩增。

[0929] 如本文中所用,术语“接触”及其变体,当对于组分的任何组使用时,包括其中将待被接触的组分混合至相同的混合物中(例如,被添加至相同的区室或溶液中)的任何过程,并且不一定需要所述组分之间的实际物理接触。可以以任何顺序或任何组合(或子组合)接触所述组分,并且可包括这样的情形:其中随后将所述组分的一个或一些从混合物去除,任选地在添加其它的所述组分之前。例如,“将A与B和C接触”包括任意的和全部的下列情形:(i) 将A与C混合,随后将B添加至混合物;(ii) 将A和B混合至混合物中;将B从混合物去除,和随后将C添加至混合物;和(iii) 将A添加至B和C的混合物。“将模板与反应混合物接触”包括任意的或全部的下列情形:(i) 将模板与反应混合物的第一组分接触以产生混合物;随后将反应混合物的其它组分以任何顺序或组合添加至混合物;和(ii) 在与模板混合之前,反应混合物已完全形成。

[0930] 如本文中所用,术语“支持物”及其变体包括在其上可固定试剂例如核酸的任何固体或半固体的物品。

[0931] 如本文中所用,术语“等温”及其变体,当关于指任何反应条件、过程或方法使用时,包括在基本上等温的条件下进行的条件、过程和方法。基本上等温的条件包括其中温度局限在有限的范围内的任何条件。在示例性实施方案中,温度的变化不超过20℃,通常不超过10℃、5℃或2℃。等温扩增包括其中在基本上等温的条件下进行至少两个连续的核酸合成循环的任何扩增反应,并且包括其中在至少两个连续的核酸合成循环的持续时间期间温度的变化不超过20℃、10℃、5℃或2℃的扩增反应,尽管其中在扩增过程的其它部分期间,包括在其它的核酸合成循环期间,温度的变化可超过20℃。任选地,在等温反应(包括等温扩增)中,将温度在或约50℃、55℃、60℃、65℃或70℃保持至少约10、15、20、30、45、60或120分钟。任选地,在一个或多个扩增循环(例如,进行的1、5、10、20个或所有的扩增循环)期间,任何温度变化不超过20℃,任选地在10℃之内,例如在5℃或2℃之内。在一些实施方案中,等温扩增可包括热循环,其中温度变化在等温范围之内。在实例中,变性步骤与另一个步骤例如退火和/或延伸之间的温度变化受到限制。在实例中,对于一个或多个扩增循环,变性温度与退火或延伸温度之间的差异不超过20℃,任选地在10℃之内,例如在5℃或2℃之内。任选地,在扩增的至少5、10、15、20、30、35或基本上全部循环内温度变化被限制。

[0932] 如本文中所用,术语“测序”及其变体包括通常地通过测定核酸分子内的至少一些核苷酸(包括其核碱基组分)的信息来从核酸链获得序列信息。而在一些实施方案中,“测序”核酸分子的给定区域包括鉴定被测序的区域内的每一个核苷酸,“测序”还可包括其中一个或多个核苷酸的信息被确定而一些核苷酸的信息仍然是未确定的或不正确地确定的方法。

[0933] 如本文中所用,术语“同一性”和“相同的”及其变体,当对于两个或更多个核酸序列使用时,是指两个或更多个序列(例如核苷酸或多肽序列)的序列相似性。在两个或更多个同源序列的背景下,序列或其子序列的百分比同一性或同源性表示所有相同的单体单元(例如核苷酸或氨基酸)的比率(即约70%的同一性,优选75%、80%、85%、90%、95%或99%的同一性)。当比较和比对比较窗口或指定区域上的如通过使用具有下文所述的缺省参数的BLAST或BLAST2.0序列比较算法或通过人工比对和目测检测来测量的最大对应性时,百分比同一性可以是特定区域上的百分比同一性。当在氨基酸水平或在核苷酸水平上存在至少85%的同一性时,则认为序列是“基本上相同的”。优选地,在长度上为至少约25、50或100个残基的区域上,或在至少一个被比较的序列的整个长度上存在同一性。用于测定百分比序列同一性和序列相似性的典型算法是BLAST和BLAST2.0算法,其描述于Altschul等人,Nuc.Acids Res.25:3389-3402(1977)中。其它的方法包括Smith&Waterman, Adv.Appl.Math.2:482(1981)和Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)等的算法。两个核酸序列是基本上相同的另一个指示是两个分子或其互补物在严格杂交条件下彼此杂交。

[0934] 如本文中关于两个或更多个多核苷酸所使用的,术语“互补的”及其变体是指包含可在两个或更多个个体对应位点上在反向平行的方向上经历累积碱基配对(如在杂交的双链体中的)的任何核酸序列的多核苷酸。任选地,在第一和第二核酸序列之间可存在“完全的”或“整个的”互补性,其中第一核酸序列中的每个核苷酸可与第二核酸序列上的对应的反向平行位置中多核苷酸经历稳定的碱基配对相互作用(然而,术语“互补的”本身可包括在整个长度上非完全互补的核酸序列);“部分的”互补性描述其中核酸序列的至少20%但少于100%的残基与其它核酸序列中的残基互补的核酸序列。在一些实施方案中,核酸序列的至少50%但少于100%的残基与其它核酸序列中的残基互补。在一些实施方案中,核酸序列的至少70%、80%、90%或95%但少于100%的残基与其它核酸序列中的残基互补。当一个核酸序列的残基的至少85%与其它核酸序列中的残基互补时,则认为序列是“基本上互补的”。“非互补的”描述其中核酸序列的少于20%的残基与其它核酸序列中的残基互补的核酸序列。“错配”存在于其中两个相对的核苷酸不是互补的任何位置处。互补的核苷酸包括在生理条件下在DNA复制期间通过DNA聚合酶被有效地彼此相对地并入的核苷酸。在典型的实施方案中,互补的核苷酸可彼此形成碱基对,例如通过在彼此反向平行的位置上的核苷酸和/或多核苷酸的核碱基之间的特定Watson-Crick类型的氢键合形成的A-T/U和G-C碱基对。其它的人工碱基对的互补性可基于其它类型的氢键合和/或碱基的疏水相和/或碱基之间的形状互补性。

[0935] 如本文中关于任何多核苷酸或核酸分子所使用的,术语“双链的”及其变体是指具有一条或多条链并包括包含与核苷酸残基碱基配对的核苷酸残基的区域(例如如核酸双链体中的)的任何多核苷酸或核酸分子。任选地,双链的多核苷酸(或核酸分子)可以是“完全地”或“整个地”双链的,如此,多核苷酸(或核酸分子)中的每个核苷酸残基与另一个对应的核苷酸残基碱基配对。在一些实施方案中,双链多核苷酸包含一个或多个包含未与任何其它核苷酸残基碱基配对的核苷酸残基的单链区。在一些实施方案中,双链多核苷酸(或核酸分子)中的至少51%、75%、85%、95%、97%或99%的核苷酸残基与其它核苷酸残基碱基配对。在一些实施方案中,双链多核苷酸(或核酸分子)包含两条彼此未共价连接的链;或者,

双链多核苷酸(或核酸分子)包含在其长度的至少某一部分上与自身碱基配对(例如如发夹寡核苷酸中的)的单链。当多核苷酸的核苷酸残基的至少85%与对应的核苷酸残基碱基配对时,则认为多核苷酸是“基本上双链的”。当一个核酸序列的残基与另一个核酸序列中对应的残基碱基配对时,则认为这两个核酸序列是“双链的”。在一些实施方案中,碱基配对可根据某一常规的配对范型来发生,例如通过在彼此反向平行的核苷酸和/或多核苷酸位置的核碱基之间的特定Watson-Crick类型的氢键合形成的A-T/U和G-C碱基对;在其它实施方案中,碱基配对可通过任何其它范型来发生,其中碱基配对根据已建立的和可预测的规则来进行。

[0936] 如本文中所用,术语“单链的”及其变体,当对于任何多核苷酸或核酸分子使用时,是指包括包含未与任何核苷酸残基碱基配对的核苷酸残基的区域的任何多核苷酸或核酸分子。任选地,单链的多核苷酸(或核酸分子)可以是“完全地”或“整个地”单链的,如此,多核苷酸(或核酸分子)中的每个核苷酸残基未与任何其它的核苷酸残基碱基配对。在一些实施方案中,单链多核苷酸包含一个或多个包含与核苷酸残基碱基配对的核苷酸残基的双链区。在一些实施方案中,单链多核苷酸(或核酸分子)中的至少51%、75%、85%、95%、97%或99%的核苷酸残基未与其它核苷酸残基碱基配对。当多核苷酸的核苷酸残基的至少85%未与核苷酸残基碱基配对时,则认为多核苷酸是“基本上单链的”。

[0937] 如本文中所用,术语“变性”及其变体,当对于任何双链多核苷酸分子或双链多核苷酸序列使用时,包括其中双链分子或双链序列的相对链内的核苷酸之间的碱基配对被破坏的任何过程。通常地,变性包括使得双链多核苷酸分子或序列的两条链的至少某一部分或区域成为单链的。在一些实施方案中,变性包括将双链多核苷酸分子或序列的两条链的至少某一部分或区域彼此分离。通常地,变性的区域或部分随后能够杂交至另一个多核苷酸分子或序列。任选地,可存在双链多核苷酸分子或序列的“完全的”或“整个的”变性。完全变性条件是例如会导致大量链的显著部分(例如多于10%、20%、30%、40%或50%)与其延伸的和/或全长的互补物完全分离的条件。通常地,完全或整个的变性破坏两条链的核苷酸彼此间的所有碱基配对。类似地,任选地当样本的个体分子的多于80%或90%缺乏任何双链性(或缺乏任何至互补链的杂交)时,则认为核酸样本是完全变性的。

[0938] 或者,双链多核苷酸分子或序列可以是部分或非完全变性的。当核酸的至少一条链的部分保持与互补链的杂交,而另一部分处于未杂交的状态(即使在互补链存在的情况下)时,可认为给定的核酸分子是部分变性的。未杂交的部分任选地具有至少5、7、8、10、12、15、17、20或50个核苷酸的长度。杂交的部分任选地具有至少5、7、8、10、12、15、17、20或50个核苷酸的长度。部分变性包括其中一条链或序列的核苷酸的一些但非全部与双链多核苷酸内的其它链或序列的一些核苷酸碱基配对的情形。在一些实施方案中,部分变性的多核苷酸(或序列)的一条链的核苷酸残基的至少20%但少于100%未与相对链内的核苷酸残基碱基配对。在示例性条件下,双链多核苷酸分子(或双链多核苷酸序列)内的核苷酸残基的至少50%是单链的(或未杂交的)形式,但少于20%或10%的残基是双链的。

[0939] 任选地,当样本的个体核酸分子的实质性部分(例如,多于20%、30%、50%或70%)处于部分杂交状态时,可认为核酸样本是部分变性的。任选地,样本中少于实质性量的个体核酸分子是完全变性的,例如样本中不超过5%、10%、20%、30%或50%的核酸分子。在示例性条件下,样本的核苷酸分子的至少50%是部分变性的,但少于20%或10%是完

全变性的。在其它情形中,样本的核苷酸分子的至少30%是部分变性的,但少于10%或5%是完全变性的。类似地,当样本中少数的个体核酸分子是部分或完全变性的时,可认为核酸样本是非变性的。

[0940] 在实施方案中,通过将双链体保持在适当的温度范围来实现部分变性条件。例如,将核酸保持在充分升高以实现一些热变性(例如高于45℃、50℃、55℃、60℃、65℃或70℃)但不足够高以实现完全热变性(例如,低于95℃或90℃或85℃或80℃或75℃)

[0941] 的温度。在实施方案中,使用基本上等温的条件部分变性核酸。

[0942] 还可通过其它方法,例如使用浓度适当调整的化学变性剂例如尿素或甲酰胺或使用高或低pH(例如4-6或8-9之间的pH)的化学方法,来实现部分变性。在实施方案中,使用重组酶-聚合酶扩增(RPA)

[0943] 来实现部分变性和扩增。示例性RPA方法描述于本文中。

[0944] 在一些实施方案中,通过使用适当的变性剂处理待被变性的双链多核苷酸序列来实现完全或部分变性。例如,可通过将温度升高至其中实现期望水平的变性的点来使双链多核苷酸经历热变性(也可互换地称作加热变性)。在一些实施方案中,双链多核苷酸的完全热变性,可调节温度以实现多核苷酸的两条链的完全分离,如此,链的至少90%在其整个长度上是单链形式的。在一些实施方案中,通过将多核苷酸分子(或序列)暴露于高于多核苷酸分子或序列的经计算的或预测的解链温度( $T_m$ )至少5℃、10℃、15℃、20℃、25、30℃、50℃或100℃的温度来实现多核苷酸分子(或多核苷酸序列)的完全热变性。

[0945] 或者,可通过将待被变性的双链多核苷酸与适当的化学变性剂接触来实现化学变性,所述化学变性剂例如是强碱、强酸、促溶剂等并且可包括例如NaOH、尿素或含胍的化合物。在一些实施方案中,通过暴露于浓度适当调整的化学变性剂例如尿素或甲酰胺或使用高或低pH(例如4-6或8-9之间的pH)来实现部分或完全变性。在实施方案中,使用重组酶-聚合酶扩增(RPA)来实现部分变性和扩增。示例性RPA方法描述于本文中。

[0946] 当关于给定多核苷酸(或多核苷酸内的给定靶序列)使用时,术语“解链温度”、“ $T_m$ ”或“ $T_m$ ”及其变体通常是指这样的温度,在该温度下在确定的条件组下给定的多核苷酸(或给定的靶序列)的50%以双链形式存在并且50%是单链的。在一些实施方案中,确定的条件组可包括指示含水反应条件中离子强度和/或pH的确定的参数。确定的条件可通过改变盐(例如钠)的浓度、温度、pH、缓冲液和/或甲酰胺来调整。通常地,经计算的热解链温度可以是 $T_m$ 之下约5-30℃或 $T_m$ 之下约5-25℃或 $T_m$ 之下约5-20℃或 $T_m$ 之下约5-15℃或 $T_m$ 之下约5-10℃。用于计算 $T_m$ 的方法是公知的并可见于Sambrook(1989in“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,2<sup>nd</sup> edition,volumes 1-3;Wetmur 1966,J.Mol.Biol.,31:349-370;Wetmur 1991Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology,26:227-259)中。用于计算用于杂交或变性核酸的 $T_m$ 的其它来源包括OligoAnalyze(来自Integrated DNA Technologies)和Primer3(由the Whitehead Institute for Biomedical Research发布)。在一些实施方案中,术语“解链温度”、

[0947] “ $T_m$ ”和“ $T_m$ ”及其变体包括给定的多核苷酸(或靶序列)的实际 $T_m$ (如使用确定的条件以经验为主地测量的)或预测的或经计算的 $T_m$ 。在一些实施方案中,可通过假定模板包含4种常见核苷酸(A、C、G和T)的一定比例并具有一定长度(或在模板群的情况下,平均长度)来在不使用模板的序列的情况下预测或计算模板的 $T_m$ 。例如,可假定在凝胶上拖尾地迁移

的模板群包含每一种25%的A、C、G或T,并且具有200、300、400个碱基对的平均长度。

[0948] 如本文中关于化学部分所使用的,术语“标记”及其变体包括包含光学上或非光学上可检测的部分的任何组合物,其中可检测的部分已通过化学处理人工地添加、连接或附着至未被标记的第二部分。通常地,使用者(或上游供应者)为了增强第二部分的可检测性的目的进行标记的添加。已存在于组合物的天然存在的形式中的组合物的光学上或非光学上可检测的组分(例如,存在于天然细胞内的典型的DNA分子、RNA分子或核苷酸中的氢离子和氨基酸)不是用于本公开内容的目的的标记。一些典型的标记包括荧光部分和染料。

[0949] 如果核酸以至少在选择的条件期间(例如扩增反应期间)为基本上稳定的方式连接至支持物,则可认为核酸是固定的。可通过任何机制,包括但不限于非共价键合、离子相互作用、共价连接,来进行连接。如果第一核酸杂交至固定在支持物上的第二核酸,如果扩增条件是如此的以至于实质性量的第一和第二核酸在扩增期间的任何或所有时间是彼此缔合或连接的,则也可认为第一核酸在扩增期间是固定至支持物的。例如第一和第二核酸可通过包括Watson-Crick碱基配对或氢键合的杂交缔合在一起。在实例中,选择的扩增条件允许第一核酸的至少50%、80%、90%、95%或99%保持与第二核酸的杂交,或反之亦然。如果核酸未直接地或间接地与支持物连接或缔合,则可认为核酸是未固定的或非固定的。

[0950] 如果媒介物在选择的条件下至少暂时地是流体媒介物,所述流体媒介物不实质性地或完全地抑制或阻碍未固定的分子的转移或移动,则可认为媒介物在选择的条件下是可流动的。未固定的分子其本身未固定至固体支持物或表面或未与另一个固定的分子缔合。在实施方案中,未固定的分子是通过可流动的媒介物的溶质(例如核酸)。示例性的媒介物中的转移或移动可以是藉由扩散、对流、湍流、搅拌、布朗运动、平流、电流或液体内的其它分子运动从连续相中的任何第一点至流体连通的或相同的连续相中的任何其它点的转移或移动。例如,在可流动的媒介物中,显著量的未固定的核酸从一个固定位点转移至可流动的媒介物的相同连续相内的或与第一固定位点流体连通的另一个固定位点。任选地,媒介物中核酸的转移或移动的速率与水中核酸的转移或移动的速率是可比的。在一些实例中,选择的条件是媒介物在扩增期间所经历的条件。选择的条件可或可不允许可流动的媒介物保持基本上静止的。条件可或可不使可流动的媒介物经历有效的混合、搅拌或摇动。媒介物任选地在扩增期间至少暂时地是可流动的。例如媒介物在选择的至少一个预扩增和/或扩增条件下是可流动的。任选地,可流动的媒介物不实质性地阻止不同的未固定的核酸的混合或未固定的核酸在可流动的媒介物的连续相的不同区域之间的转移。核酸的移动或转移例如可由扩散或对流引起。如果未固定的核酸在扩增后在不同的固定位点之间或在整个连续相上不能传播或移动,则任选地认为媒介物是不可流动的。一般地,在扩增时期期间可流动的媒介物基本上不将未固定的核酸(例如模板或扩增子)限制在反应容量的有效区域内或将其限制在固定的位置。任选地,可通过多种方法或通过改变可流动的媒介物的条件来使其成为不可流动的。任选地,如果媒介物是液体的或不是半固体的,则其是可流动的。如果媒介物的流动性与纯水是可比的,则可认为其是可流动的。在其它实施方案中,如果媒介物是基本上没有聚合物的流体,或如果其粘度系数与纯水的粘度系数是相似的,则可认为该媒介物是可流动的。

[0951] 如本领域技术人员将理解的,模板、起始寡核苷酸、延伸探针、引物等的提及可指在相关的部分内是基本上相同的核酸分子的群或库而非单个分子。例如,“模板”可指多个

基本上相同的模板分子;“探针”可指多个基本上相同的探针分子等。在于一个或多个位置上是简并的探针的情况下,将理解包含特定探针的探针分子的序列将在简并位置上不同,即构成特定探针的探针分子的序列可仅在非简并位置上是基本上相同的。本申请内的这些术语意欲对群或分子提供支持。当意欲指单个核酸分子(即一个分子)时,可使用术语“模板分子”、“探针分子”、“引物分子”等来替换。在某些实例中,将明确地指出基本上相同的核酸分子群的复数性质。

[0952] “模板”、“寡核苷酸”、“探针”、“引物”、“模板”、“核酸”等在本文中意欲是可互换的术语。这些术语是指多核苷酸,其不一定被限定至任何长度或功能。相同的核酸可根据背景被当作“模板”、“探针”或“引物”,并且可随时间在这些角色间转换。“多核苷酸”也被称作“核酸”,其是通过共价的核苷间键连接的两个或多个核苷酸的线性聚合物或其变体或功能性片段。在天然存在的实例中,核苷间键通常是磷酸二酯键。然而,其它的实例任选地包含其它的核苷间键例如硫醇磷酸酯(phosphorothiolate)键,并且可或可不包含磷酸基团。多核苷酸包括双链的和单链的DNA以及双链的和单链的RNA、DNA:RNA杂合体、肽核酸(PNA)和PNA与DNA或RNA之间的杂合体,并且还可包括已知类型的修饰。多核苷酸可任选地通过5'或3'末端连接至一个或多个非核苷酸部分例如标记和其它的小分子、大分子例如蛋白、脂、糖和固体或半固体支持物。标记包括可使用选择的检测方法检测的任何部分,并因此使得连接的核苷酸或多核苷酸类似地可通过使用选择的检测方法检测。任选地,标记发射光学上可检测的或可见的电磁辐射。在一些情况下,核苷酸或多核苷酸未连接至标记,而直接地检测核苷酸或多核苷酸的存在。“核苷酸”是指核苷酸、核苷或其类似物。任选地,核苷酸是嘌呤或嘧啶碱基的N-或C-糖苷。(例如包含2-脱氧-D-核糖的脱氧核糖核苷或包含D-核糖的核糖核苷)。其它类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2-O-甲基核糖核苷酸。通过这些术语的任何一个提及核酸应当不被解释为意指核酸具有任何特定的活性、功能或性质。例如,单词“模板”不表示“模板”正通过聚合酶复制或模板不能够用作“引物”或“探针”。

[0953] 将理解在某些实例中,参与扩增的核酸试剂例如模板、探针、引物等可以是较大核酸分子的部分,所述较大核酸分子还包含不具有相同功能的另一个部分。任选地,该其它部分不具有任何模板、探针或引物功能。在一些实例中,基本上杂交至任选地固定的引物(例如固定位点上的)的核酸被认为是“模板”。可在扩增之前或期间从其它核酸产生参与模板行走的任一种或多种核酸试剂(模板、固定的链、固定的或非固定的引物等)。任选地通过对最初被引入模板行走媒介物中的核酸进行一个或多个修饰来从输入核酸产生(并且不需要与其相同)核酸试剂。可例如使输入核酸经历限制性消化、连接、一个或多个扩增循环、变性、突变等以产生在扩增或进一步扩增期间用作模板、引物等的核酸。例如,可将双链的输入核酸变性以产生第一单链核酸,所述第一单链核酸任选地用于产生第二互补链。如果期望如此,则可认为第一单链核酸是用于本文中我方目的的“模板”。或者,从第一单链核酸产生的第二互补链可被认为是用于本文中我方目的的“模板”。在另一个实例中,模板来源于输入核酸并且不一定与输入核酸相同。例如,模板可包含不存在于输入核酸中的另外的序列。在实施方案中,模板可以是使用一种或多种具有与输入核酸不互补的5'突出端的引物从输入核酸产生的扩增子。

[0954] 如本文中关于两个或更多个多核苷酸所使用的,术语“杂交”及其变体是指其中所

述多核苷酸内的任一个或多个核酸序列(每个序列包含连续核苷酸残基的区段)在两个或更多个体对应位置经历碱基配对(例如如杂交的核酸双链体中的)的任何过程。任选地,在第一和第二核酸序列之间可存在“完全的”或“整个的”杂交,其中第一核酸序列中的每个核苷酸残基可与第二核酸序列上的反向平行位置中对应的核苷酸经历碱基配对相互作用。在一些实施方案中,杂交可包括两个或更多个在其整个长度上不完全互补或未碱基配对的核酸序列之间的碱基配对。例如,当两个核酸序列经历碱基配对,其中一个核酸序列的至少20%但少于100%的残基与其它核酸序列中的残基碱基配对时,“部分的”杂交发生。在一些实施方案中,杂交包括两个核酸序列之间的碱基配对,其中一个核酸序列的至少50%但少于100%的残基与其它核酸序列中对应的残基碱基配对。在一些实施方案中,一个核酸序列的至少70%、80%、90%或95%但少于100%的残基与其它核酸序列中对应的残基碱基配对。当一个核酸序列的残基的至少85%与其它核酸序列中对应的残基碱基配对时,则认为两个核酸序列是“基本上杂交的”。在其中一个核酸分子比另一个基本上更长(或其中两个核酸分子包含基本上互补和基本上不互补的区域)的情形中,即使当一个或两个核酸分子的部分可保持未杂交时,仍可将两个核酸分子描述为“杂交的”。“未杂交的”描述其中一个核酸序列的少于20%的残基与其它核酸序列中的残基碱基配对的核酸序列。在一些实施方案中,碱基配对可根据某一常规的配对范型来发生,例如通过在彼此反向平行的核苷酸和/或多核苷酸位置的核碱基之间的特定Watson-Crick类型的氢键合形成的A-T/U和G-C碱基对;在其它实施方案中,碱基配对可通过任何其它范型来发生,其中碱基配对根据已建立的和可预测的规则来进行。

[0955] 两个或更多个多核苷酸的杂交可在每当所述两个或更多个多核苷酸在适当的杂交条件下进行接触时发生。杂交条件包括适合用于核酸杂交的任何条件;进行杂交的方法和用于杂交的适当条件在本领域中是公知的。杂交的严格性可被多个参数影响,包括待杂交的多核苷酸(或多核苷酸内的任何靶序列)之间的同一性和/或互补性的程度;待杂交的多核苷酸和/或靶序列的解链温度,其被称作为“ $T_m$ ”;参数例如盐、缓冲液、pH、温度、多核苷酸和引物的GC%含量和/或时间。通常地,杂交在较低的温度和/或升高的盐浓度以及减少的有机溶剂浓度下是有利的。高严格杂交条件通常将需要两个靶序列之间的较高度度的互补性以发生杂交,而低严格杂交条件即使在待杂交的两个多核苷酸显示低水平的互补性时也将促使杂交。可在杂交步骤或任选和相继的洗涤步骤或杂交和任选的洗涤步骤期间应用杂交条件。

[0956] 高严格杂交条件的实例包括下列的任一个或多个:约0.0165至约0.0330的盐(例如NaCl)浓度;待杂交的靶序列(或多核苷酸)的解链温度( $T_m$ )之下约5℃至约10℃的温度;和/或约50%或更高的甲酰胺浓度。通常地,高严格杂交条件允许具有高同源性例如 $\geq 95\%$ 的同一性或互补性的序列之间的结合。在高严格杂交条件的一个示例性实施方案中,在约42℃在包含25mM  $KPO_4$  (pH 7.4)、 $5\times SSC$ 、 $5\times Denhardt$ 溶液、50 $\mu g/mL$ 变性的超声处理的鲑精DNA、50%甲酰胺、10%硫酸葡聚糖和1-15ng/mL双链多核苷酸(或双链靶序列)的杂交溶液中进行杂交,而在约65℃利用包含 $0.2\times SSC$ 和0.1%十二烷基硫酸钠的洗涤溶液进行洗涤。

[0957] 中等严格杂交条件的实例包括下列的任一个或多个:约0.165至约0.330的盐(例如NaCl)浓度;待杂交的靶序列的解链温度( $T_m$ )之下约20℃至约29℃的温度;和/或约35%或更低的甲酰胺浓度。通常地,这样的中等严格杂交条件允许具有高的或中等的同源性例

如 $\geq 80\%$ 的同一性或互补性的序列之间的结合。在中等严格杂交条件的一个示例性实施方案中,在约 $42^{\circ}\text{C}$ 在包含 $25\text{mM KPO}_4$  (pH 7.4)、 $5\times\text{SSC}$ 、 $5\times\text{Denhart}$ 溶液、 $50\mu\text{g/mL}$ 变性的超声处理的鲑精DNA、 $50\%$ 甲酰胺、 $10\%$ 硫酸葡聚糖和 $1\text{--}15\text{ng/mL}$ 双链多核苷酸(或双链靶序列)的杂交溶液中进行杂交,而在约 $50^{\circ}\text{C}$ 利用包含 $2\times\text{SSC}$ 和 $0.1\%$ 十二烷基硫酸钠的洗涤溶液进行洗涤。

[0958] 低严格杂交条件的实例包括下列的任一个或多个:约 $0.330$ 至约 $0.825$ 的盐(例如NaCl)浓度;待杂交的靶序列的解链温度( $T_m$ )之下约 $40^{\circ}\text{C}$ 至约 $48^{\circ}\text{C}$ 的温度;和/或约 $25\%$ 或更低的甲酰胺浓度。通常地,这样的低严格条件允许具有低同源性例如 $\geq 50\%$ 的同一性或互补性的序列之间的结合。

[0959] 适用于杂交的一些示例性条件包括在具有钠盐例如NaCl、柠檬酸钠和/或磷酸钠的溶液中温育待杂交的多核苷酸。在一些实施方案中,杂交或洗涤溶液可包含约 $10\text{--}75\%$ 的甲酰胺和/或约 $0.01\text{--}0.7\%$ 的十二烷基硫酸钠(SDS)。在一些实施方案中,杂交溶液可以是严格杂交溶液,其可包括 $50\%$ 甲酰胺、 $5\times\text{SSC}$  ( $0.75\text{M NaCl}$ 、 $0.075\text{M}$ 柠檬酸钠)、 $50\text{mM}$ 磷酸钠(pH 6.8)、 $0.1\%$ 焦磷酸钠、 $5\times\text{Denhardt}$ 溶液、 $0.1\%$ SDS和/或 $10\%$ 硫酸葡聚糖的任何组合。在一些实施方案中,杂交或洗涤溶液可包含BSA(可在牛血清白蛋白)。在一些实施方案中,可在约 $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ 、或约 $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ 、或约 $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ 、或约 $35\text{--}40^{\circ}\text{C}$ 、或约 $40\text{--}45^{\circ}\text{C}$ 、或约 $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$ 、或约 $50\text{--}55^{\circ}\text{C}$ 或更高的温度范围下进行杂交或洗涤。

[0960] 在一些实施方案中,可将杂交或洗涤进行约 $1\text{--}10$ 分钟,或约 $10\text{--}20$ 分钟,或约 $20\text{--}30$ 分钟,或约 $30\text{--}40$ 分钟,或约 $40\text{--}50$ 分钟,或约 $50\text{--}60$ 分钟或更长的时间范围。

[0961] 在一些实施方案中,可在约 $5\text{--}10$ 的pH范围,或约pH $6\text{--}9$ ,或约pH $6.5\text{--}8$ ,或约pH $6.5\text{--}7$ 下进行杂交或洗涤。

[0962] 在一些实施方案中,术语“单克隆的”及其变体用于描述其中群体成员的实质性部分(例如至少约 $50\%$ ,通常至少 $75\%$ 、 $80\%$ 、 $85\%$ 、 $90\%$ 、 $95\%$ 或 $99\%$ ) 在核苷酸序列水平上共有至少 $80\%$ 的同一性的多核苷酸群。通常地,群体的至少约 $90\%$ ,通常地至少约 $95\%$ ,更通常地至少约 $99\%$ 、 $99.5\%$ 或 $99.9\%$ ) 通过特定多核苷酸序列的扩增或模板依赖性复制来产生,所述特定多核苷酸序列存在于单克隆多核苷酸群的成员的实质性部分之中。单克隆群的所有成员不需要是彼此完全相同或互补的。例如,多核苷酸模板的不同部分可被扩增或复制以产生所得的单克隆群的成员;类似地,一定数量的“错误”和/或不完全延伸可在原始模板的扩增期间发生,从而产生其个体成员可在其本身之间显示序列差异性的单克隆群。在一些实施方案中,单克隆群的成员的至少 $50\%$ 与参照核酸序列(即作为基础用于序列比较的具有确定的序列的核酸)是至少 $80\%$ 同一的。在一些实施方案中,群体的至少 $60\%$ 、至少 $70\%$ 、至少 $80\%$ 、至少 $90\%$ 、至少 $95\%$ 、至少 $99\%$ 或更多的成员包含与参照核酸序列具有至少 $80\%$ 、 $85\%$ 、 $90\%$ 、 $95\%$ 、 $97\%$ 或 $99\%$ 的同一性(或互补性)的序列。在一些实施方案中,非同源的多核苷酸的或非实质性水平的混合可在本文中描述的核酸扩增反应期间发生,因此基本上单克隆群可包含少数的不同的多核苷酸(例如少于 $30\%$ 、少于 $20\%$ 、少于 $10\%$ 、少于 $5\%$ 、少于 $1\%$ 、少于 $0.5\%$ 、少于 $0.1\%$ 或少于 $0.001\%$ 的不同的多核苷酸)。如本文中所用,词组“基本上单克隆的”及其变体,当对于一个或多个多核苷酸群使用时,是指一个或多个包含与原始的单个模板具有至少 $80\%$ 同一性的多核苷酸的多核苷酸群,所述原始的单个模板用作基础用于克隆扩增以产生基本上单克隆的群。

[0963] 在一些实施方案中,扩增子的成员的至少80%,通常地扩增子的成员的至少90%,更通常地至少95%,更通常地至少99%将与多核苷酸模板共有大于90%的同一性,通常地大于95%的同一性,更通常地大于97%和更通常地大于99%的同一性。或者,扩增子的成员可与原始模板具有大于90%的互补性,通常地大于95%的互补性,更通常地大于97%的互补性,更通常地大于99%的互补性。在一些实施方案中,基本上单克隆的核酸群的成员可在严格杂交条件下彼此杂交。

[0964] 在一些实施方案中,如果扩增子包含足够少的多克隆污染物以在受到模板序列影响的核酸分析的任何方法中产生可检测的信号,则将扩增子称作为“单克隆的”或“基本上单克隆的”。例如,多核苷酸的“单克隆”群可包括产生可使用特定测序系统来检测的信号(例如测序信号、核苷酸并入信号等)的任何群体。任选的,可随后分析信号以正确地测定存在于群体的任何多核苷酸内的任一个或多个核苷酸的序列和/或碱基信息。用于检测和/或分析这样的信号的适当的测序系统的实例包括Ion Torrent测序系统,例如Ion Torrent PGM™测序系统,包括314、316和318系统,以及Ion Torrent Proton™测序系统,包括Proton I、Proton II和Proton III (Life Technologies, Carlsbad, CA)。在一些实施方案中,单克隆扩增子允许至少5个连续核苷酸残基在Ion Torrent测序系统上的准确测序。

[0965] 如本文中所用,术语“克隆扩增”及其变体是指其中通过多核苷酸模板的扩增产生基本上单克隆的多核苷酸群的任何过程。在克隆扩增的一些实施方案中,扩增两个或更多个多核苷酸模板以产生至少两个基本上单克隆的多核苷酸群。

[0966] 如本文中所用,术语“接头”包括包含DNA、RNA、嵌合RNA/DNA分子、其类似物的多核苷酸或寡核苷酸并且通常地意指在操作过程期间连接或结合至目的靶多核苷酸(例如模板)的添加的或外来的序列。接头至模板的连接可任选地在模板扩增之前或之后发生。在一些实施方案中,接头可包含与对应引物内的序列基本上相同或基本上互补的引物结合序列。在一些实施方案中,包含第一引物结合部位的第一接头连接至线性双链模板的一个末端,而包含第二引物结合部位的第二接头连接至另一个末端。

[0967] 如本文中所用,术语“结合伴侣”包括两个分子或其部分,其具有针对彼此的特定结合亲和性,并且通常地将优先于与其它分子的结合而彼此结合。通常地但不一定地,特定结合对的一个成员的一些或全部结构与另一个成员所具有的一些或全部结构是互补的,其中两个成员能够特别地通过互补结构间的键合(任选的通过多个非共价吸引力)的方式结合在一起。

[0968] 在一些实施方案中,用作结合伴侣的分子包括:生物素(及其衍生物)与其结合伴侣抗生物素蛋白部分、抗生蛋白链菌素部分(及其衍生物);结合镍、钴或铜的His-标签;结合Ni-NTA的半胱氨酸、组氨酸或组氨酸段(histidine patch);结合麦芽糖结合蛋白(MBP)的麦芽糖;凝集素-碳水化合物结合伴侣;钙-钙结合蛋白(CBP);乙酰胆碱与受体-乙酰胆碱;蛋白A与结合伴侣抗-FLAG抗体;GST与结合伴侣谷胱甘肽;尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)与ugi(尿嘧啶-DNA糖基化酶抑制剂)蛋白;结合抗体或抗体片段的抗原或附加表位,特别地是抗原例如地高辛配基、荧光素、二硝基酚或溴脱氧尿苷与其各自的抗体;小鼠免疫球蛋白与山羊抗-小鼠免疫球蛋白;结合的IgG与蛋白A;受体-受体激动剂或受体拮抗剂;酶-酶辅助因子;酶-酶抑制因子;和甲状腺素-皮质醇。生物素的另一个结合伴侣可以是来自鸡的生物素结合蛋白(Hytonen等人,BMC Structural Biology 7:8)。

[0969] 抗生物素蛋白部分可包括抗生物素蛋白以及抗生物素蛋白的可结合生物素部分的任何衍生物、类似物和其它的非天然形式。抗生物素蛋白部分的其它形式包括天然的和重组的抗生物素蛋白和抗生蛋白链菌素以及衍生的分子,例如非糖基化的抗生物素蛋白、N-酰基抗生物素蛋白和截短的抗生蛋白链菌素。例如,抗生物素蛋白部分包括抗生物素蛋白的去糖基化形式,链霉菌属(*Streptomyces*) (例如阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*))产生的细菌抗生蛋白链菌素,截短的抗生蛋白链菌素,重组的抗生物素蛋白和抗生蛋白链菌素以及天然的、去糖基化的和重组的抗生物素蛋白和天然的、重组的和截短的抗生蛋白链菌素的衍生物,例如N-酰基抗生物素蛋白,例如N-乙酰基、N-邻苯二甲酰和N-琥珀酰抗生物素蛋白,以及商业产品ExtrAvidin™、Captavidin™、Neutravidin™和Neutralite Avidin™。

### 实施例

[0970] 根据下列实施例将进一步地理解本教导内容的实施方案,这些实施例不应当被解释为以任何方式限定本教导内容的范围。

#### [0971] 实施例1

[0972] 在单个反应容器中在~220μL的总反应体积的单一连续液相中进行核酸扩增反应。

[0973] 在1.5mL管(管1)中用水将约 $420 \times 10^6$ 的小珠洗涤1次(涡旋/旋转),随后在缓冲液中洗涤1次(涡旋/旋转)。

[0974] 重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx, Cambridge, Great Britain)。试剂盒中的经脱水的沉淀物包含usvX重组酶、usvY重组酶载入蛋白、gp32蛋白、Bsu DNA聚合酶、dNTP、ATP、磷酸肌酸和肌酸激酶。在120μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的四个沉淀物(管2)。将重组酶溶液涡旋和旋转,随后冰冷。制备两个加热块,一个设置在约68-70℃,一个设置在40℃。

[0975] 将上清液从小珠沉淀物(管1)去除,在底部留下约~20μL的液体。

[0976] 将反向引物(2μL的100μM原液)添加至小珠管(管1),随后涡旋和旋转。反向引物序列:5'-ATCCCTGCGTGTCTCCGAC-3'。

[0977] 将生物素化的反向引物(2μL的10μM原液)添加至小珠管(管1),随后涡旋和旋转。生物素化的反向引物序列:5' Bio-ATCCCTGCGTGTCTCCGAC-3'。

[0978] 将1μL的多核苷酸文库(不同浓度的)添加至小珠管(管1),涡旋/旋转,并置于冰上。文库浓度根据期望的1:50、1:75、1:200的DNA对小珠比率而变化。

[0979] 将再水化的重组酶混合物(管2,在120μL再水化缓冲液中重建)添加至小珠管(管1),涡旋、旋转;并置于冰上。

[0980] 将65μL的本公开内容的示例性筛分剂添加至小珠管,涡旋和旋转,并置于冰上。

[0981] 将11μL的冰冷的280mM Mg-醋酸盐添加至小珠管(在中间),随后在最大设置下涡旋3秒并放回在冰上10秒,并在加热块上于40℃温育20分钟。

[0982] 在加热块中于68℃-70℃将反应加热灭活10分钟。

[0983] 用TE缓冲液加满反应管,在最大设置(~20KG)下涡旋和旋转3分钟,从小珠除去溶液,留下~100μL。重复洗涤步骤两次。

[0984] 用回收溶液洗涤小珠一次。

[0985] 用洗涤缓冲液加满反应管,在最大设置(~20KG)下涡旋和旋转3分钟,从小珠除去溶液,留下~100μL。重复洗涤步骤两次。

[0986] 在最后的旋转之后,将溶液减少至100μL(洗涤溶液)。

[0987] 通过将生物素化的多核苷酸与缀合了抗生蛋白链菌素的顺磁小珠(来自Dynabeads的MyOne™ Bead)结合来富集小珠。

[0988] 将富集的小珠装载入Ion Torrent离子敏感性芯片并进行标准测序反应。富集的小珠的显著部分被测定为包含扩增的多核苷酸的基本上单克隆的群,如通过Ion Torrent PGM™测序仪上来自这样的小珠的可检测的测序信号的观察所证实的。分析测序信号以测定存在于每个这样的小珠的扩增子内的序列。

[0989] 实施例2

[0990] 将约 $240 \times 10^6$ 小珠(结合了正向引物)在2mL管中在退火缓冲液(来自Ion Sequencing试剂盒,例如PN 4482006)中洗涤一次。去除(除~50μL外)并丢弃上清液。在100μL退火缓冲液中重悬小珠。

[0991] 将具有300bp或400bp插入片段(约 $120-240 \times 10^6$ 拷贝)的条码DNA文库与经洗涤的小珠预杂交。文库包含在一个末端连接至杂交至正向引物的接头和在另一个末端连接至杂交至反向引物的接头的插入序列。被检测的模板/小珠比率包括1:1、0.75:1和0.5:1。用退火缓冲液将终体积调整至200μL。通过涡旋和旋转混合管。在95-100℃温育管3分钟,并在37℃温育5分钟。添加1mL退火缓冲液,在高于16,000xG涡旋和旋转管3.5分钟,丢弃上清液。添加1mL的10mM乙酸钾,在高于16,000xG涡旋和旋转管3.5分钟,丢弃上清液。重复乙酸钾洗涤一次。在480μL乙酸钾中重悬小珠(管1)。

[0992] 重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx, Cambridge, Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。在15mL管(管2)中,在2.88mL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的96个沉淀物。

[0993] 将48μL的100μM反向引物(非固定的引物)添加至经洗涤/预杂交的小珠(管1)。将48μL的10μM生物素化的反向引物(非固定的引物)添加至经洗涤/预杂交的小珠,并涡旋管(管1)。将管1的内含物(包含文库、小珠和反向引物)添加至管2(包含再水化的沉淀物),将管2涡旋5秒并置于冰上。添加144μL T4gp32蛋白(15μg/μL),涡旋并放回至冰上。添加1.56mL的本公开内容的示例性筛分剂,涡旋管并放回至冰上。在反应在冰上保持超过5分钟之后,添加264μL醋酸镁,涡旋管3次,每次3秒。将50μL样本等分至冰预冷的96孔板中。在热循环仪(温度维持在40℃)上将96孔板在40℃温育25分钟。

[0994] 为了终止反应,将150μL的100mM EDTA添加至每个孔。将所有的反应集合起并在高于16,000xG离心3.5分钟。丢弃上清液。添加1mL的Tris/1%SDS,涡旋管。在1mL OneTouch洗涤溶液中洗涤小珠两次。将小珠重悬于100μL中。

[0995] 通过与顺磁抗生蛋白链菌素小珠(来自Dynabeads的MyOne™小珠)结合来富集接上文库的拷贝的小珠。将富集的小珠装载入Ion Torrent PGM离子敏感性芯片。

[0996] 根据Ion PGM™ Sequencing 400Kit (User Guide PN4474246B)中制造商的说明书进行标准测序反应。被载入至芯片上的富集的小珠的显著部分被测定为包含扩增的多核苷

酸的基本上单克隆的群,如通过Ion Torrent PGM™测序仪上来自这些小珠的可检测的测序信号的观察所证实的。通过Torrent Suite Software分析测序信号以测定存在于这些小珠的扩增子内的序列。

[0997] 测序数据产生305bp的平均阅读长度(图9),比对的质量测量是1.16G(AQ17)和1.07G(AQ20)。

#### [0998] 实施例3

[0999] 将约 $250 \times 10^6$ 小珠(结合了正向引物)在1.5mL退火缓冲液(来自Ion Sequencing kit,例如PN 4482006)中洗涤一次,在15,000xG涡旋并旋转6分钟。丢弃上清液,在管中留下约50μL。

[1000] 将具有140bp插入片段(约 $50 \times 10^6$ 拷贝)的文库与经洗涤的小珠预杂交。文库包含在一个末端连接至杂交至正向引物的接头和在另一个末端连接至杂交至反向引物的接头的插入序列。将文库(0.81μL的62M原液)和0.1mL退火缓冲液添加至经洗涤的小珠并通过上下吸液混合。小珠/模板比率为约5:1。在92-95℃温育管7分钟,并在37℃温育10分钟。添加1mL退火缓冲液,在高于15,000xG涡旋和旋转管6分钟,丢弃上清液。添加1mL的10mM乙酸钾,在高于15,000xG涡旋和旋转管6分钟,丢弃上清液。重复乙酸钾洗涤一次并将管置于冰上。约60μL的液体保留在管中(管1)。

[1001] 重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx, Cambridge, Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。在约240μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的8个沉淀物。将沉淀物和再水化缓冲液涡旋、旋转和冰冷。

[1002] 将4μL的100μM反向引物(非固定的引物)和1μL的10μM生物素化的反向引物(非固定的引物)添加至经洗涤/预杂交的小珠(管1),并涡旋和旋转管(管1)。将管1的内含物(包含文库、小珠和反向引物)添加至管2(包含再水化的沉淀物),将管2涡旋并置于冰上。添加130μL的本公开内容的示例性筛分剂,涡旋管并放回至冰上。添加24μL冰冷的280mM醋酸镁,涡旋和旋转管。总反应体积是约332μL。将管在40℃温育60分钟。

[1003] 添加1mL的100mM EDTA以终止反应。将管在15,000xG涡旋和旋转6分钟。丢弃上清液并在管中留下约20μL。重复EDTA终止反应步骤、涡旋和旋转步骤。添加1mL的Tris/1% SDS,将管在15,000xG涡旋和旋转6分钟。丢弃上清液并在管中留下约50μL。在1mL OneTouch 洗涤溶液中通过涡旋和旋转洗涤小珠,在管中留下约100μL。将所有反应集合起来并在15,000xG旋转6分钟,丢弃上清液,在管中留下约100μL。

[1004] 通过与顺磁抗生蛋白链菌素小珠(来自Dynabeads的MyOne™小珠)结合来富集接上文库的拷贝的小珠。将富集的小珠装载入Ion Torrent Proton I™离子敏感性芯片。

[1005] 根据Ion PI™ Sequencing 200Kit (User Guide PN MAN0007491)中制造商的说明书进行标准测序反应。被载入至芯片上的富集的小珠的显著部分被测定为包含扩增的多核苷酸的基本上单克隆的群,如通过Ion Torrent Proton™测序仪上来自这些小珠的可检测的测序信号的观察所证实的。通过Torrent Suite Software分析测序信号以测定存在于这些小珠的扩增子内的序列。

[1006] 进行两次测序运行。测序数据在第一次运行产生96bp的平均阅读长度(图10),在第二次运行产生94bp的阅读长度(图11)。比对的质量测量在第一次运行是1.76G(AQ17)和

1.43G (AQ20), 在第二次运行是1.48G (AQ17) 和1.17G (AQ20)。

[1007] 实施例4:

[1008] 将20 $\mu$ L的小珠(结合了正向引物)(103 $\times 10^6/\mu$ L)与440 $\mu$ L的10mM乙酸钾和3 $\mu$ L的1M Tris (pH 8)混合。通过涡旋和旋转来混合小珠。

[1009] 通过与2 $\mu$ L的NaOH混合来变性16 $\mu$ L的具有200bp插入片段(约199 $\times 10^6$ 拷贝)的文库, 涡旋和旋转, 并允许静置1分钟。通过添加440 $\mu$ L的10mM乙酸钾和3 $\mu$ L的1M Tris pH 8来中和反应。文库包含在一个末端连接至杂交至正向引物的接头和在另一个末端连接至杂交至反向引物的接头的插入序列。

[1010] 将小珠添加至变性的文库。小珠/模板比率为约10:1 (2000亿小珠:2亿文库)。涡旋管, 并允许在室温静置5分钟(管1)。

[1011] 重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx, Cambridge, Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。在15mL管(管2)中, 在3mL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的96个沉淀物(管2)。

[1012] 将24 $\mu$ L的100 $\mu$ M反向引物(非固定的引物)和2 $\mu$ L的100 $\mu$ M生物素化的反向引物(非固定的引物)添加至经洗涤/预杂交的小珠, 涡旋管(管1)并冰冷管。将1.6mL的本公开内容的示例性筛分剂添加至管2, 将管涡旋5秒, 手工地翻转/旋转10秒, 涡旋5秒, 并置于冰上。将260 $\mu$ L 280mM醋酸镁添加至管2, 将管涡旋5秒, 手工地翻转/旋转10秒(涡旋和翻转/旋转3次), 并置于冰上。将50 $\mu$ L样本等分至冰预冷的96孔板中。将96孔板在40℃温育60分钟。

[1013] 添加100 $\mu$ L的200mM EDTA至每个孔以终止反应。将所有反应集合起来并在最高速离心7分钟。丢弃上清液。在具有1%SDS的1mL回收缓冲液中重悬沉淀物, 涡旋30秒, 并在最高速旋转6分钟。在每次旋转后, 通过合并两个管的内含物将管减少一半。在具有1%SDS的1mL回收缓冲液中重悬沉淀物, 涡旋30秒, 并在1550rpm旋转7分钟。

[1014] 通过与顺磁抗生蛋白链菌素小珠(来自Dynabeads的MyOne™小珠)结合来富集接上文库的拷贝的小珠。在富集步骤期间, 用具有0.1%SDS的回收缓冲液替换ES-洗涤缓冲液。最后将小珠重悬在1mL水中并减少至100 $\mu$ L。将富集的小珠装载入Ion Torrent Proton I™离子敏感性芯片。

[1015] 根据Ion PI™ Sequencing 200Kit (User Guide PN MAN0007491)中制造商的说明书进行标准测序反应。被载入至芯片上的富集的小珠的显著部分被测定为包含扩增的多核苷酸的基本上单克隆的群, 如通过Ion Torrent Proton™测序仪上来自这些小珠的可检测的测序信号的观察所证实的。通过Torrent Suite Software分析测序信号以测定存在于这些小珠的扩增子内的序列。

[1016] 测序数据产生144bp的平均阅读长度(图12), 比对的质量测量是4G (AQ17)。

[1017] 实施例5

[1018] 在dH<sub>2</sub>O中通过涡旋和旋转洗涤375 $\times 10^6$ 的小珠(结合了正向引物)。去除上清液(除~50 $\mu$ L外)。将DNA文库(约75 $\times 10^6$ 个分子)添加至经洗涤的小珠。将约4 $\mu$ L的反向引物(非生物素化的)和0.4 $\mu$ L的生物素化的反向引物添加至小珠。将约0.8 $\mu$ L的融合正向引物添加至小珠。将40 $\mu$ L的醋酸镁添加至小珠(终浓度14mM)。将dH<sub>2</sub>O添加至小珠至320 $\mu$ L的最终总体积。

[1019] 重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx, Cambridge, Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。在单独的管中,在488μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的16个沉淀物。对于400bp文库,添加0.25mg/ml的T4gp32蛋白(0.2mg的终浓度),对于600bp文库,添加0.5mg/ml的T4gp32蛋白(0.4mg的终浓度)。涡旋管以混合并旋转。

[1020] 将小珠混合物的内含物添加至重组酶管,涡旋和旋转。将小珠/重组酶混合物与预冷的油转移至管,并在Ion Torrent OneTouch™装置上的10微米Sterlitech滤器上收集。根据制造商的说明书产生和打破乳剂。

[1021] 通过与顺磁抗生蛋白链菌素小珠(来自Dynabeads的MyOne™小珠)结合来富集接上文库的拷贝的小珠(或者省略富集步骤)。将富集的小珠装载入Ion Torrent离子敏感性芯片并进行标准测序反应。富集的小珠的显著部分被测定为包含扩增的多核苷酸的基本上单克隆的群,如通过Ion Torrent PGM™测序仪上来自这些小珠的可检测的测序信号的观察所证实的。分析测序信号以测定存在于这样的小珠的扩增子内的序列。

#### [1022] 实施例6

[1023] 用退火缓冲液将约 $120 \times 10^6$ 小珠(结合了正向引物)洗涤一次。去除上清液(除~50 μL外)。在100μL退火缓冲液中重悬经洗涤的小珠。将DNA文库的约 $60 \times 10^6$ 分子添加至小珠。用退火缓冲液将终体积调节至200μL。通过涡旋和旋转混合小珠和文库。将小珠/文库混合物加热至95-100℃并保持3分钟,随后在37℃温育5分钟。

[1024] 将1mL的10mM乙酸钾添加至小珠/文库混合物,随后涡旋和旋转。丢弃上清液。重复乙酸钾洗涤一次。在120μL乙酸钾中重悬小珠/DNA。

[1025] 重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx, Cambridge, Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。在单独的管中,在720μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的24个沉淀物。将另外的54μL的dNTP混合物(包含10mM的每种dNTP)添加至TwistAmp™混合物。

[1026] 在第三个管中,将3μL的抗生蛋白链菌素(500μM)与12μL生物素化的反向引物(100 μM)混合,随后转移至小珠/文库管。将重组酶混合物添加至小珠/文库管,随后涡旋以混合并冰冷。将27μL T4gp32蛋白(15/μg/μL)添加至小珠/文库管,涡旋以混合。将390μL的示例性筛分剂添加至小珠/文库管,倒转管并涡旋以混合,冰冷至少5分钟。将80μL醋酸镁添加至小珠/文库管,并将管涡旋、旋转和冰冷至少10秒。在40℃温育小珠/文库管40分钟。通过添加500μL的EDTA(250mM)终止反应。将管在高于18,000xG下旋转3分钟。丢弃上清液,在1mL的具有1%SDS的TE中重悬沉淀物。在1mL OneTouch洗涤溶液中洗涤小珠两次。将小珠重悬于100μL中。通过上下吸液重悬沉淀物,并通过添加2mL Ion Torrent OneTouch™洗涤溶液来洗涤。重复洗涤步骤一次。在300μL熔脱溶液(melt-off solution)中重悬沉淀物,并在摇动下温育5分钟。

[1027] 通过与顺磁抗生蛋白链菌素小珠(来自Dynabeads的MyOne™小珠)结合来富集接上文库的拷贝的小珠(或者省略富集步骤)。将富集的小珠装载入Ion Torrent离子敏感性芯片并进行标准测序反应。富集的小珠的显著部分被测定为包含扩增的多核苷酸的基本上单克隆的群,如通过Ion Torrent PGM™测序仪上来自这些小珠的可检测的测序信号的观察所

证实的。分析测序信号以测定存在于这样的小珠的扩增子内的序列。

#### [1028] 实施例7

[1029] 在Ion测序芯片上进行核酸扩增。首先在芯片上进行模板行走扩增反应,随后进行重组酶介导的扩增反应。

[1030] 制备Ion Torrent PGM™测序芯片以包含低T<sub>m</sub>的单链引物,所述引物在其5'末端连接至孔的底部。固定的引物包含polyA (30) 序列。

[1031] 双链DNA模板包含具有polyT (30) 序列的单链末端突出序列。

[1032] 用聚合物处理Ion Torrent PGM™测序芯片以在孔的底部产生基质。捕获引物连接至基质。

[1033] 用含TE的缓冲液预洗涤Ion Torrent PGM™测序芯片一次,并真空干燥。

[1034] 将40微升的溶液混合并载入至芯片上。溶液的终浓度包含:来自New England Biolabs的1X等温缓冲液、1.6mM MgSO<sub>4</sub>、3mM dNTP、1U/uL Bst聚合酶(来自New England Biolabs)、0.1nM模板和无核酸酶的水至40uL体积。将芯片离心5分钟并在37℃温育30分钟。真空干燥芯片。

[1035] 模板行走扩增:将40微升的模板行走溶液载入至芯片上。模板行走溶液的终浓度包含:来自New England Biolabs的1X等温缓冲液、3.6mM MgSO<sub>4</sub>、5mM dNTP、2uM可溶的单链引物、6U/uL Bst聚合酶(来自New England Biolabs)和无核酸酶的水至40uL体积。将芯片离心并在60℃温育30分钟。用1X含TE的缓冲液洗涤芯片一次并真空干燥。

[1036] 重组酶介导的扩增:本实施例的重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx,Cambridge,Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。将50微升的扩增反应混合物(包含重组酶)载入至芯片上。扩增反应混合物包含:来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx,Cambridge,Great Britain)的一个沉淀物、来自TwistAmp™ Basic试剂盒的30uL再水化缓冲液、与DNA模板的一个接头杂交的2uM的可溶性引物和无核酸酶的水至50uL总体积。将芯片离心2分钟。将2微升的醋酸镁(280mM原液)添加至芯片。将芯片离心2分钟,随后在40℃温育1小时。

[1037] 连续地用0.5M EDTA (pH 8)、含TE的缓冲液、1% SDS洗涤芯片,并用洗涤溶液洗涤2X。

[1038] 使用芯片的颜色编码的比对图谱测定出大部分的孔包含扩增的多核苷酸的基本上单克隆的群。

[1039] 根据Ion PI™ Sequencing 200Kit (User Guide PN MAN0007491) 中制造商的说明书进行标准测序反应。通过Torrent Suite Software分析测序信号以测定存在于这些小珠的扩增子内的序列。测序数据产生151bp的平均阅读长度。

#### [1040] 实施例8

[1041] 在重组酶存在的情况下直接地在Ion Torrent PGM™测序芯片上在等温条件下进行核酸扩增。将聚合的水凝胶置于PGM™芯片的孔中。

[1042] 本实施例的重组酶来源来自TwistAmp™ Basic试剂盒(来自TwistDx,Cambridge,Great Britain)。来自Basic试剂盒的经脱水的沉淀物中的组分列表可参见上文的实施例1。

[1043] 使用热变性方法或重组酶方法(如上所述)变性多核苷酸模板,随后进行核酸扩增

步骤。

[1044] (A) 热变性方法：将多核苷酸模板文库在退火缓冲液中稀释至60μL的终体积。稀释旨在将约5个拷贝的模板置入Ion Torrent Proton™测序芯片(约600–650x10<sup>6</sup>个孔)的每个孔中。用退火缓冲液洗涤芯片一次，并置于设置在40℃的热循环仪上。将1:1退火缓冲液对水的比率的100μL的等份混合并在95℃预加热。将模板文库通过置于芯片上并在95℃温育2分钟来变性。将缓冲液/水混合物(预加热至95℃)吸至流动池中。将芯片转移至40℃热循环仪并温育5分钟。将芯片转移至实验台(约25℃)。用100μL的退火缓冲液洗涤芯片。将芯片置于4℃热循环仪上。下面的步骤是任选的：在20μL的水和30μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™Basic试剂盒的1个沉淀物。剧烈的涡旋沉淀混合物以溶解沉淀物。将50μL的沉淀混合物载入至芯片上。在室温温育芯片至少1分钟以允许重组酶结合预载入芯片的孔中的引物。

[1045] (B) 重组酶变性方法：用150μL的退火/水混合物(退火缓冲液和水的1:1的比率)洗涤Ion Torrent Proton™测序芯片(约600–650x10<sup>6</sup>个孔)。将芯片置于40℃热循环仪上。在60μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的2个沉淀物。将多核苷酸模板文库在退火缓冲液中稀释至50μL的终体积。稀释旨在将约5个拷贝的模板置入Ion Torrent Proton™测序芯片的每个孔中。将总体积的稀释的模板添加至再水化的沉淀混合物。用水将体积调节至100μL。涡旋沉淀/模板以混合并旋转。将沉淀/模板混合物载入至Ion Torrent Proton™测序芯片(置于40℃热循环仪上)并温育20分钟。将芯片从热循环仪移去并在室温下静置。

[1046] 如下进行核酸扩增：所有的试剂保持在冰上。在30μL的由试剂盒提供的再水化缓冲液、16μL的无核酸酶水和1μL的100μM反向扩增引物中再水化来自TwistAmp™ Basic试剂盒的1个沉淀物。通过涡旋和旋转溶解沉淀物。在载入至芯片之前立即地，将3μL的280μM醋酸镁添加至沉淀混合物。将整个沉淀混合物载入至芯片上并在40℃温育1小时。

[1047] 通过用0.1M EDTA (pH 8) 洗涤芯片来终止扩增反应。用芯片洗涤溶液洗涤芯片。用1% SDS洗涤芯片。用TEX洗涤溶液洗涤芯片两次。

[1048] 制备芯片以用于测序：使用熔脱溶液洗涤芯片。用退火缓冲液洗涤芯片3次并置于40℃热循环仪上。在单独的管中制备测序引物：将80μL的50%退火缓冲液与50%测序引物混合，随后预加热至95℃。制备退火缓冲液和水的1:1的混合物并预加热至95℃。用预加热的退火/水缓冲液洗涤芯片。将80μL的预加热的引物混合物载入芯片。在40℃温育芯片5分钟。用退火/水缓冲液洗涤芯片一次。在单独的管中，将6μL的测序聚合酶与57μL的退火/水混合物混合，并载入至芯片上。

[1049] 根据制造商的说明书进行标准测序反应。

## 序列表

&lt;110&gt; LI, Chieh-Yuan

RUFF, David W.

CHEN, Shiaw-Min

O'NEIL, Jennifer

KASINSKAS, Rachel

ROTHBERG, Jonathan M.

&lt;120&gt; 核酸扩增

&lt;130&gt; LT00718 PCT

&lt;140&gt; PCT/US2013/032598

&lt;141&gt; 2013-03-15

&lt;150&gt; 61/635,584

&lt;151&gt; 2012-04-19

&lt;150&gt; 61/699,810

&lt;151&gt; 2012-09-11

&lt;150&gt; 61/767,766

&lt;151&gt; 2013-03-14

&lt;150&gt; 61/792,247

&lt;151&gt; 2013-03-15

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的引物

&lt;400&gt; 1

atccctgcgt gtctccgac 19

在表面上利用Poly(T)引物的模板行走

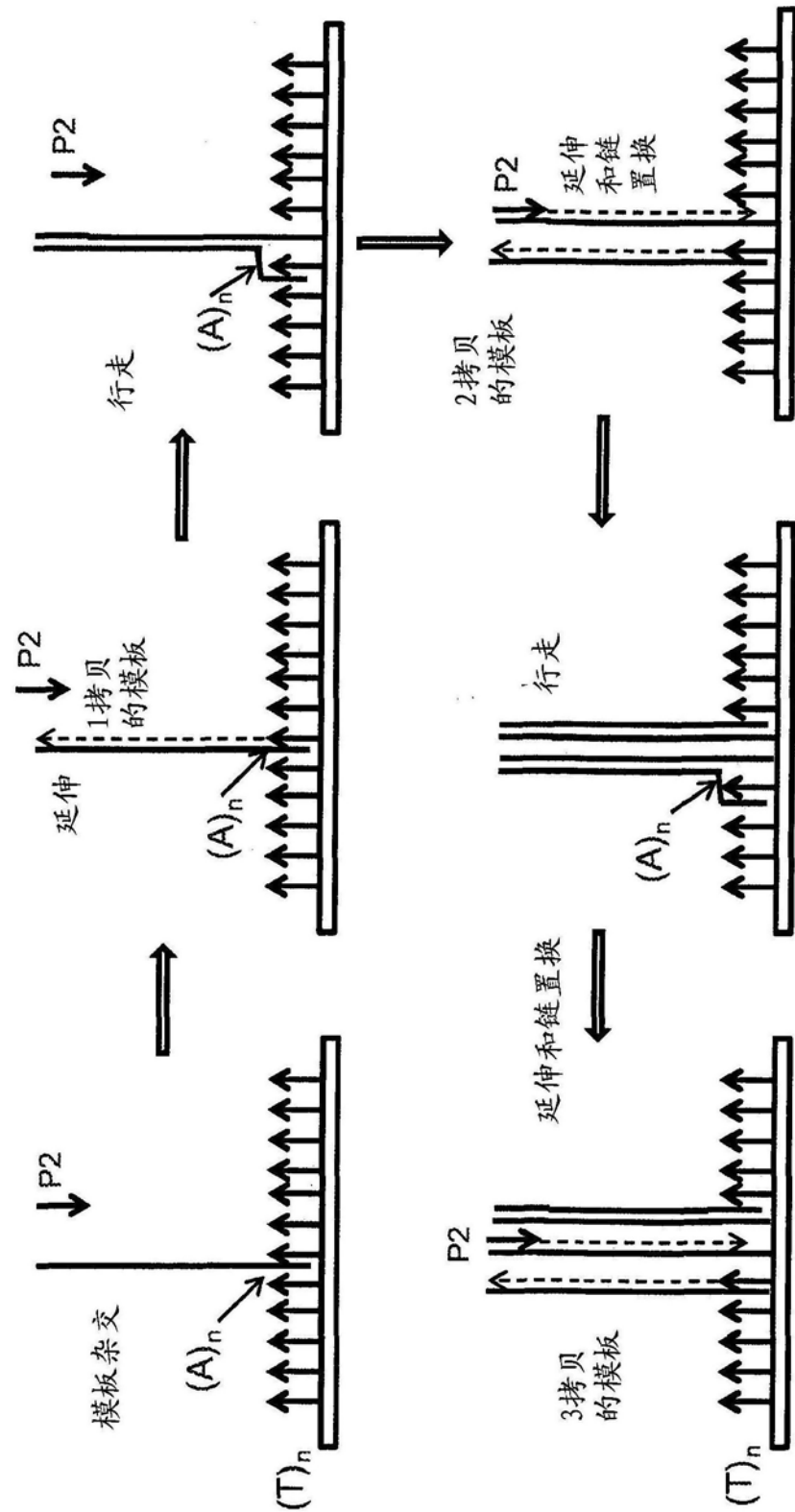


图1

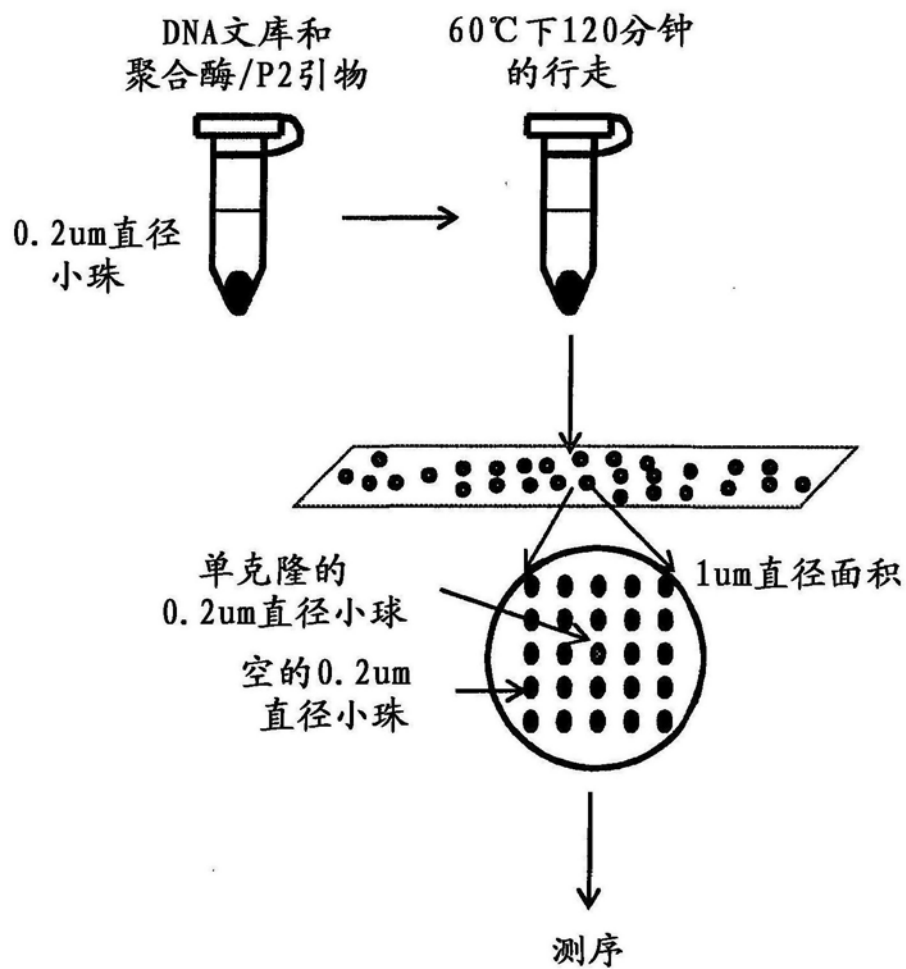


图2

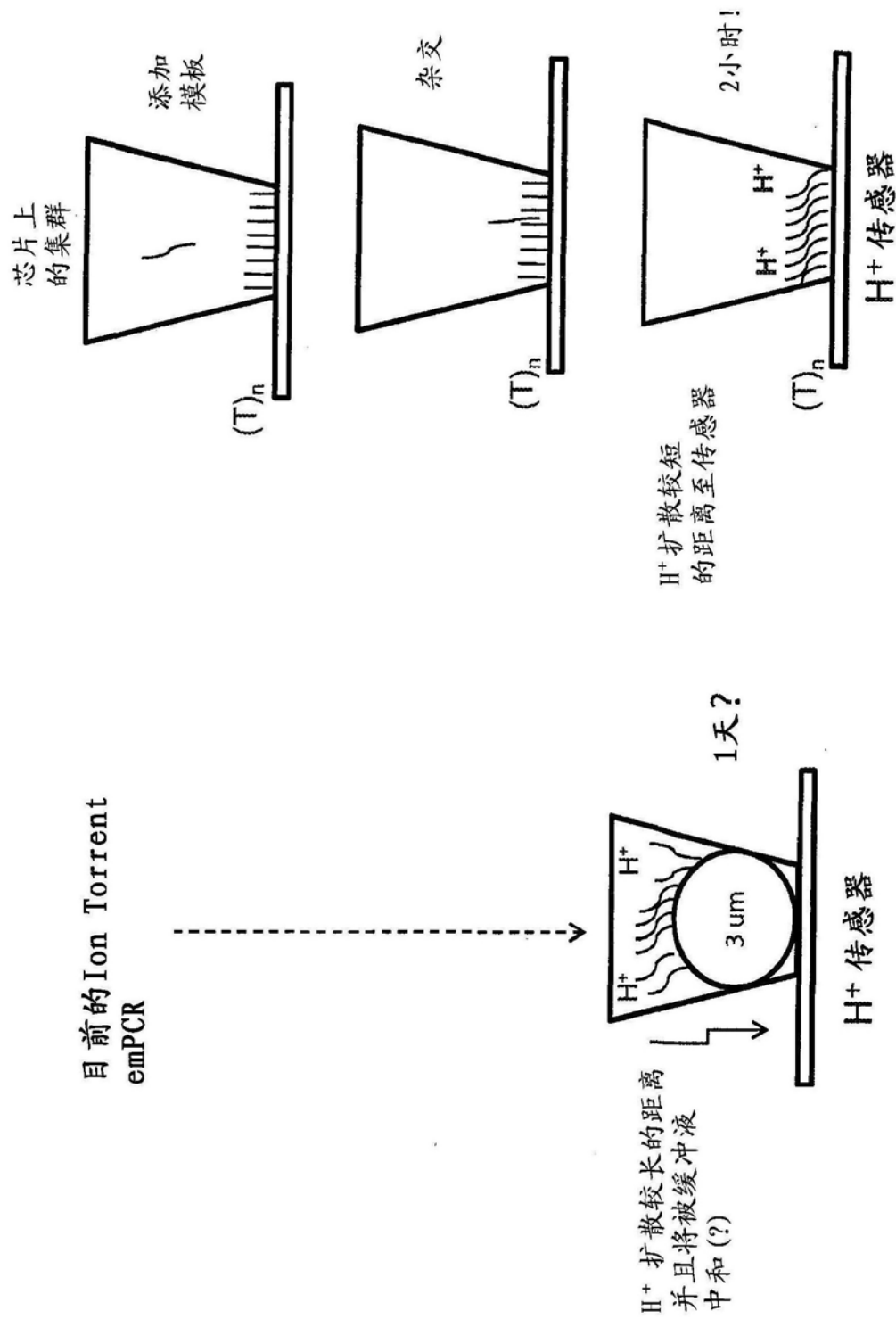


图3

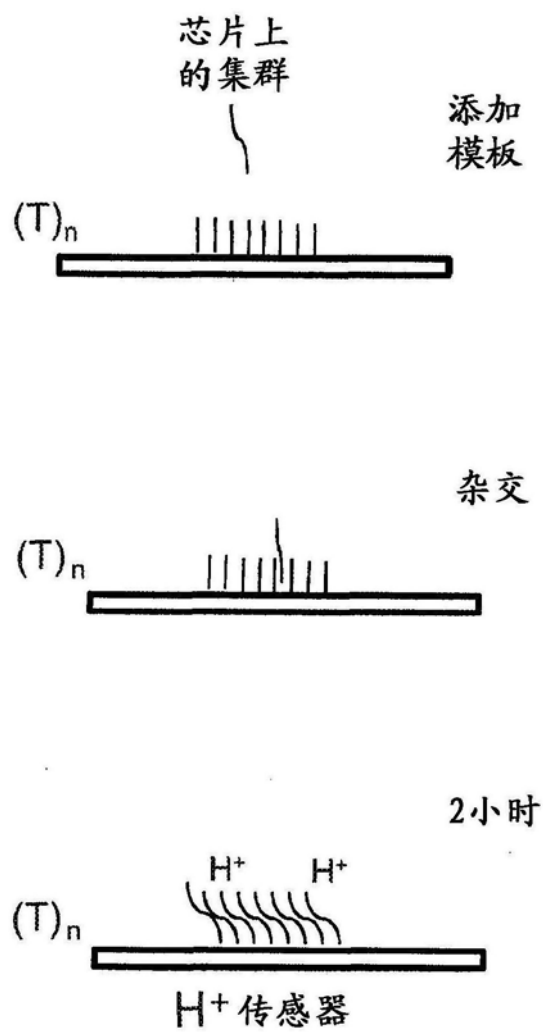


图4

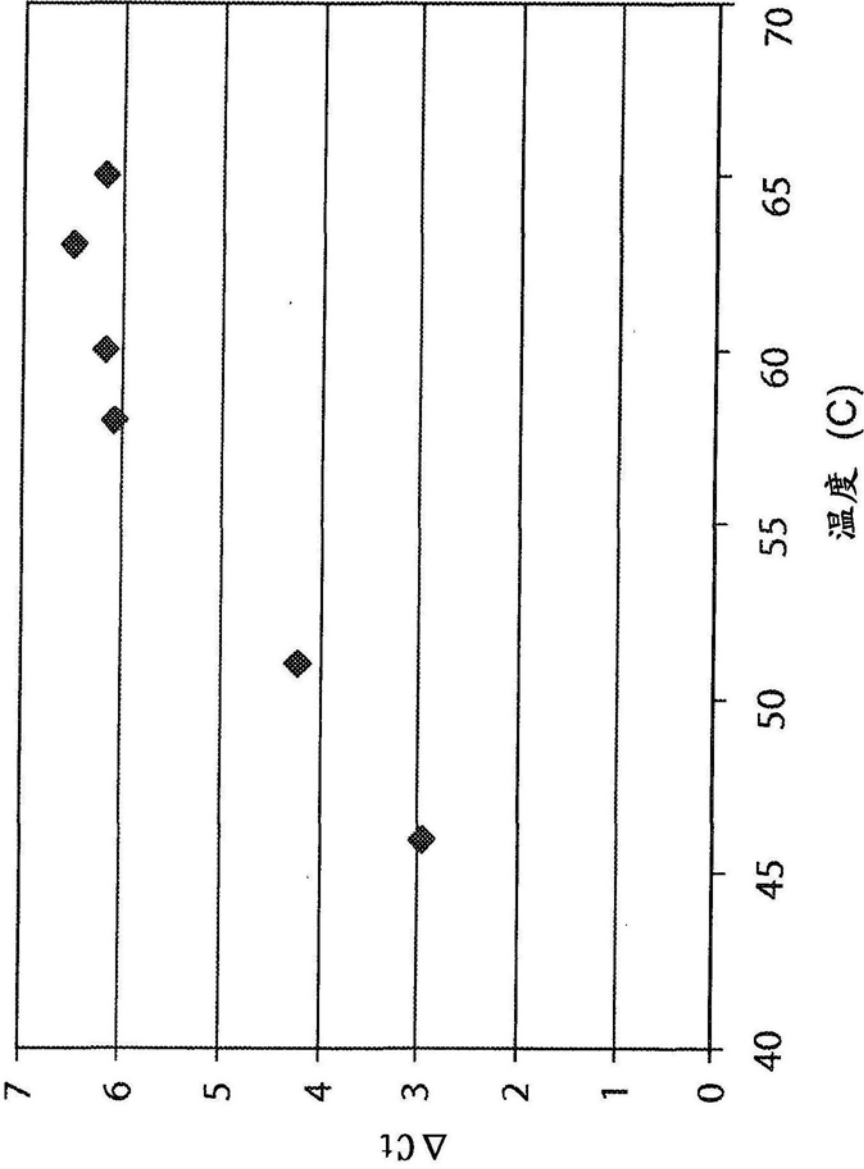


图5

|     | FAM      | VIC      |     | FAM      | VIC      |    | FAM | VIC      |     | FAM      | VIC      |
|-----|----------|----------|-----|----------|----------|----|-----|----------|-----|----------|----------|
| A1  | 50       | 31.96548 | C1  | 50       | 50       | 50 | E1  | 50       | G1  | 50       | 50       |
| A2  | 50       | 39.86279 | C2  | 50       | 50       | 50 | E2  | 50       | G2  | 30.95665 | 38.49394 |
| A3  | 44.3971  | 50       | C3  | 50       | 50       | 50 | E3  | 50       | G3  | 42.10394 | 36.18042 |
| A4  | 50       | 50       | C4  | 50       | 50       | 50 | E4  | 45.15652 | G4  | 50       | 50       |
| A5  | 50       | 50       | C5  | 50       | 50       | 50 | E5  | 50       | G5  | 39.25991 | 50       |
| A6  | 50       | 50       | C6  | 50       | 50       | 50 | E6  | 50       | G6  | 40.46702 | 50       |
| A7  | 50       | 50       | C7  | 50       | 50       | 50 | E7  | 50       | G7  | 50       | 50       |
| A8  | 50       | 50       | C8  | 50       | 50       | 50 | E8  | 50       | G8  | 50       | 31.60849 |
| A9  | 50       | 50       | C9  | 38.08558 | 50       | 50 | E9  | 50       | G9  | 50       | 50       |
| A10 | 50       | 50       | C10 | 44.47919 | 50       | 50 | E10 | 50       | G10 | 50       | 50       |
| A11 | 50       | 50       | C11 | 50       | 50       | 50 | E11 | 50       | G11 | 50       | 50       |
| A12 | 50       | 50       | C12 | 50       | 50       | 50 | E12 | 50       | G12 | 50       | 31.61124 |
| B1  | 50       | 39.01974 | D1  | 32.6227  | 38.27389 | 50 | F1  | 41.63503 | H1  | 39.91924 | 50       |
| B2  | 50       | 50       | D2  | 32.34154 | 37.80156 | 50 | F2  | 50       | H2  | 50       | 50       |
| B3  | 50       | 50       | D3  | 50       | 50       | 50 | F3  | 50       | H3  | 50       | 38.31835 |
| B4  | 50       | 50       | D4  | 50       | 50       | 50 | F4  | 50       | H4  | 50       | 37.56089 |
| B5  | 50       | 35.26348 | D5  | 42.20201 | 50       | 50 | F5  | 50       | H5  | 50       | 50       |
| B6  | 42.93367 | 40.18534 | D6  | 50       | 39.90506 | 50 | F6  | 50       | H6  | 50       | 50       |
| B7  | 50       | 50       | D7  | 50       | 39.65005 | 50 | F7  | 36.69026 | H7  | 30.11287 | 50       |
| B8  | 50       | 30.90235 | D8  | 46.95021 | 50       | 50 | F8  | 36.95259 | H8  | 50       | 50       |
| B9  | 50       | 50       | D9  | 50       | 30.54854 | 50 | F9  | 50       | H9  | 50       | 50       |
| B10 | 50       | 50       | D10 | 50       | 50       | 50 | F10 | 50       | H10 | 29.22241 | 50       |
| B11 | 50       | 50       | D11 | 34.98179 | 50       | 50 | F11 | 50       | H11 | 50       | 50       |
| B12 | 50       | 50       | D12 | 50       | 50       | 50 | F12 | 50       | H12 | 50       | 50       |

图6

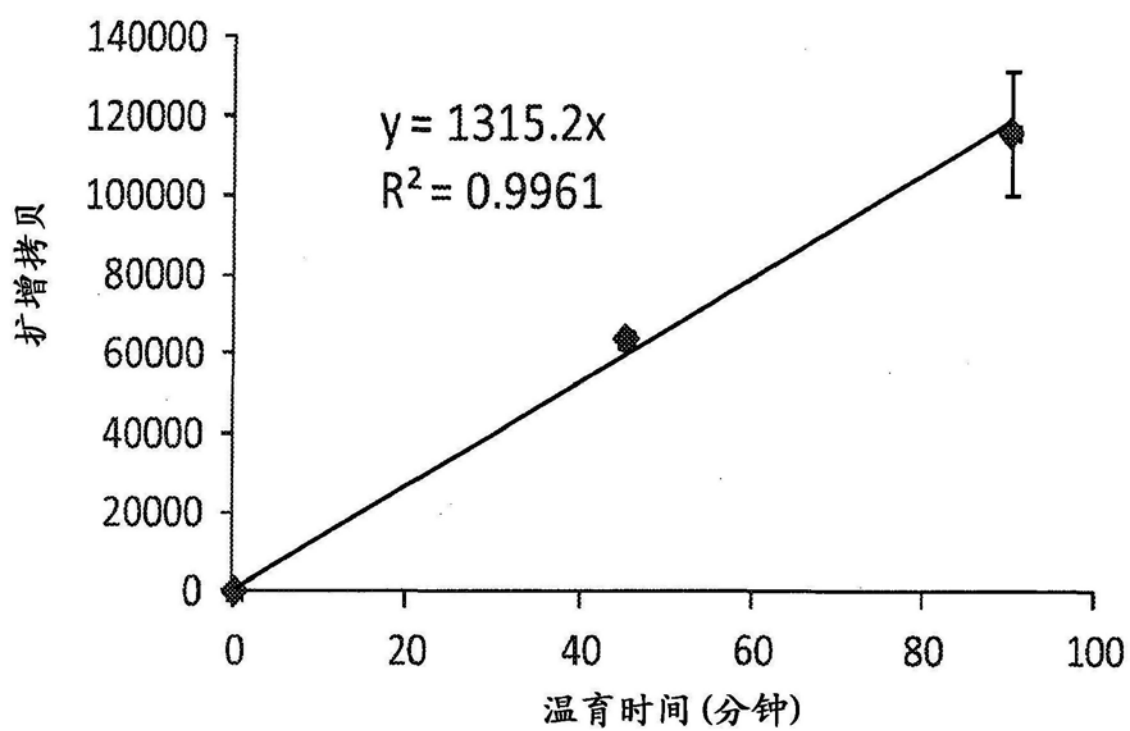


图7

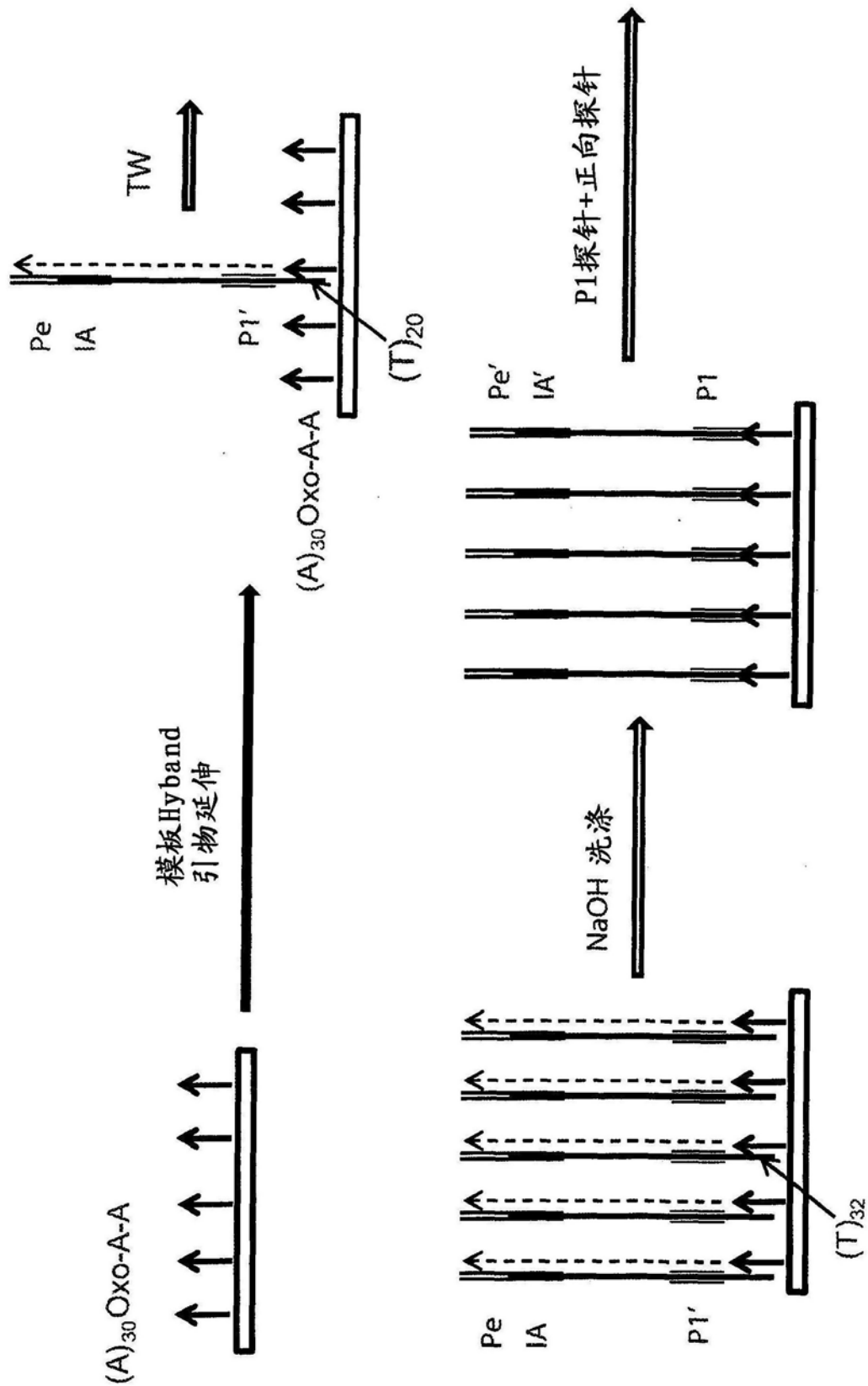


图8A

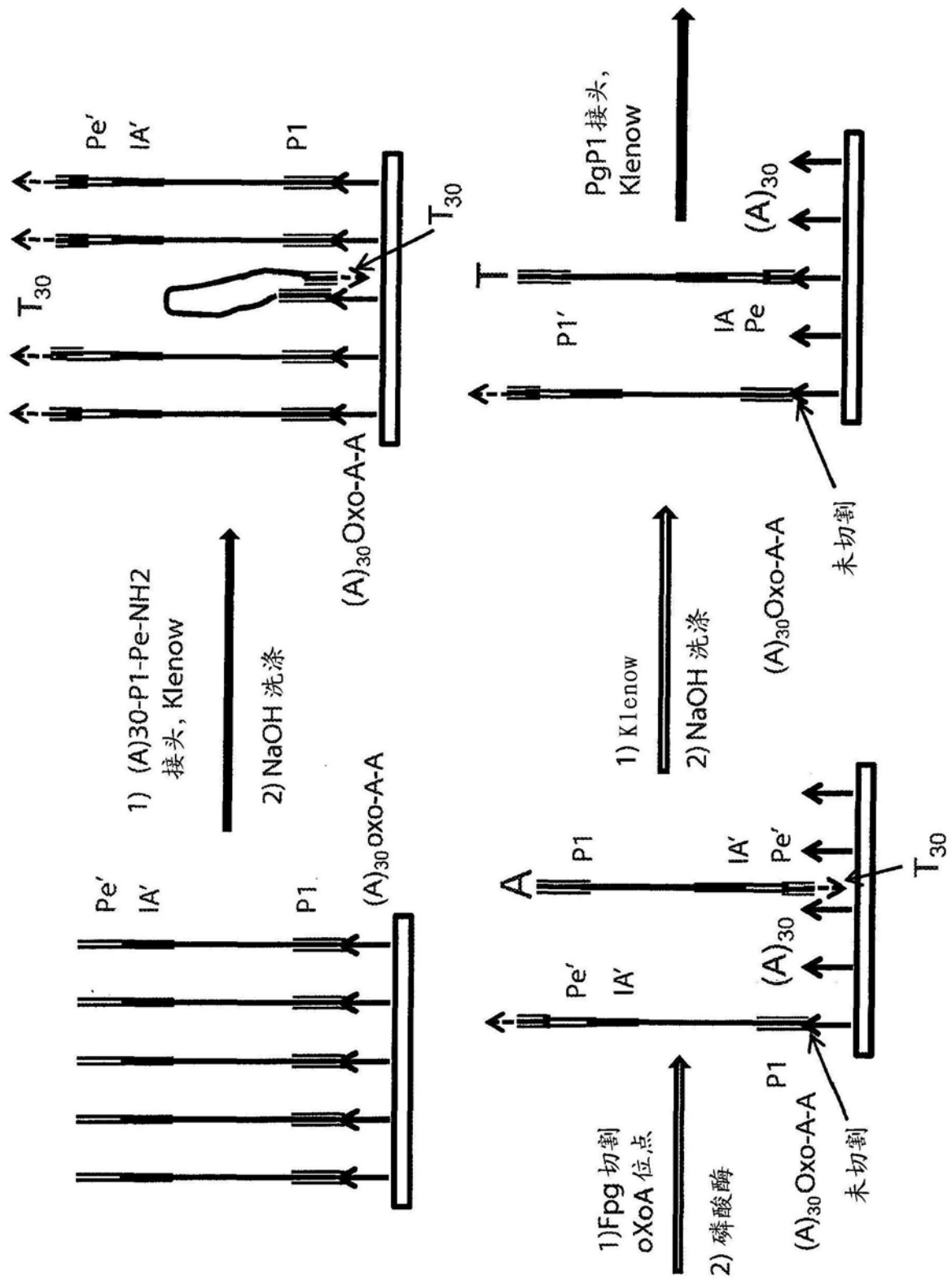


图8B

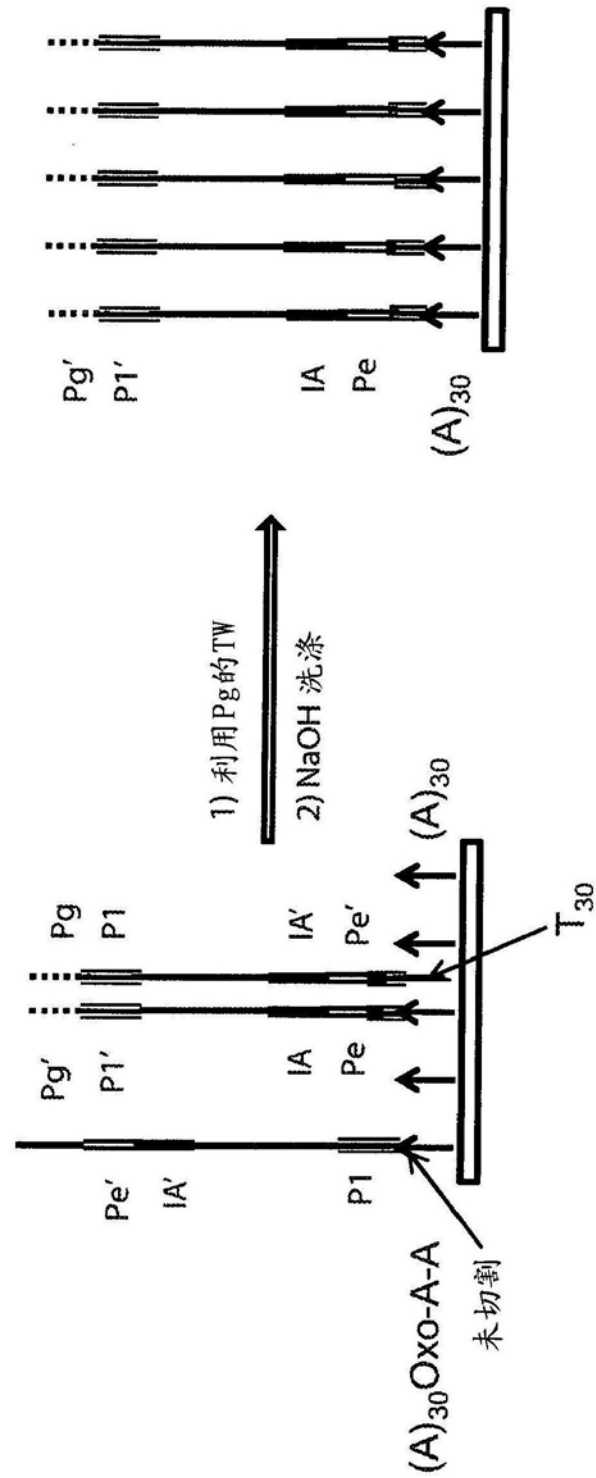


图8C

未切割的链在利用Pg引物的第二轮TW中不被扩增

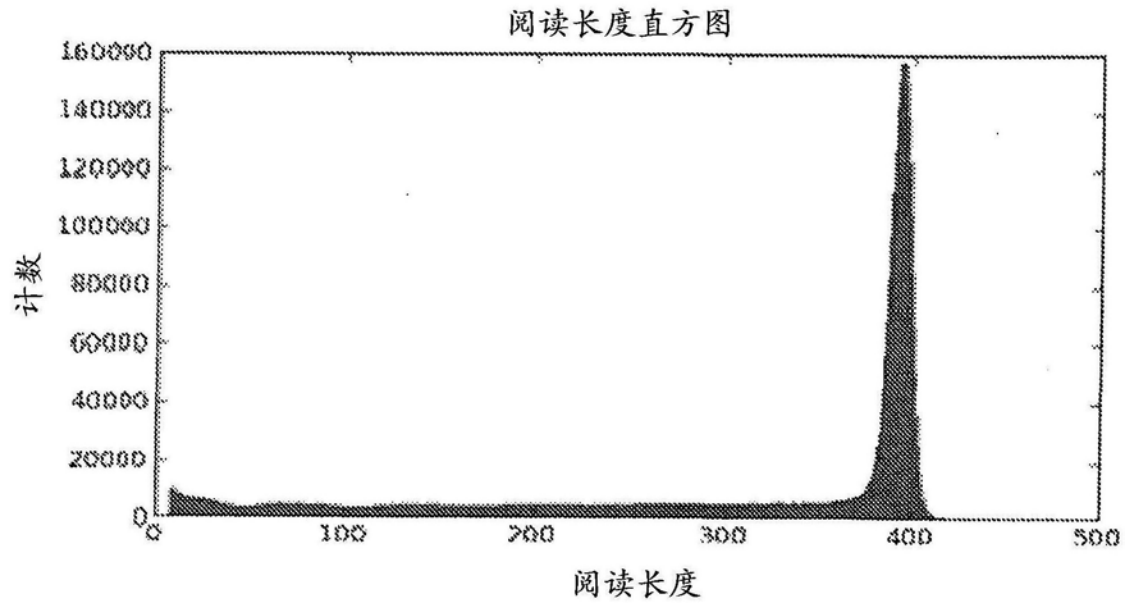


图9

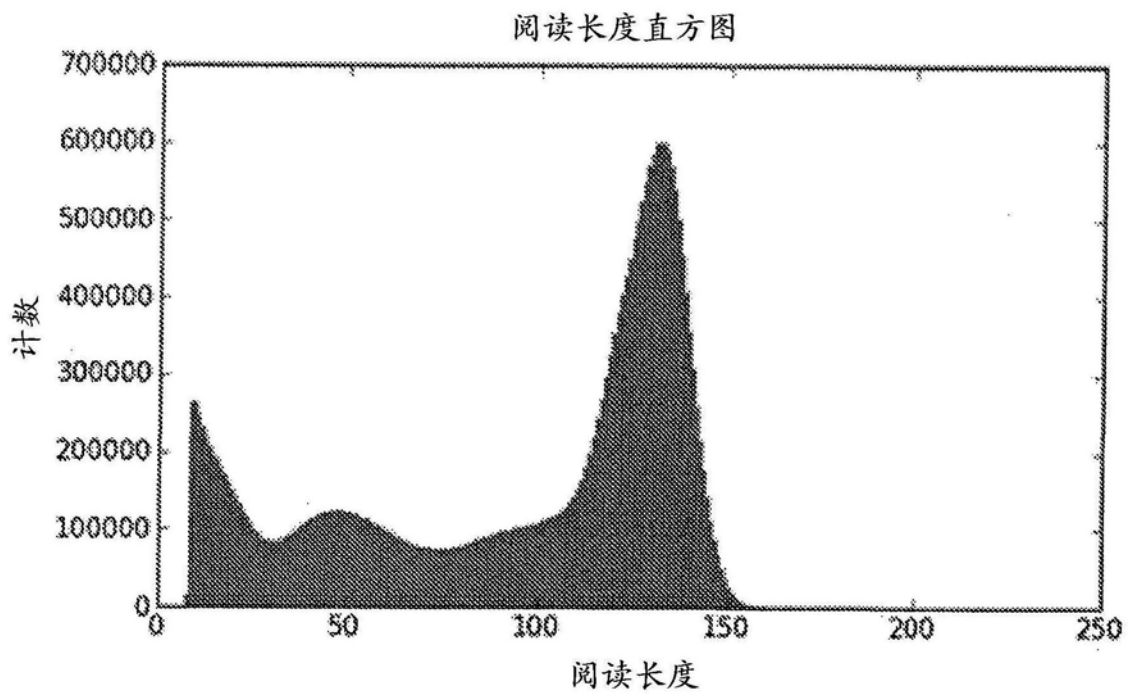


图10

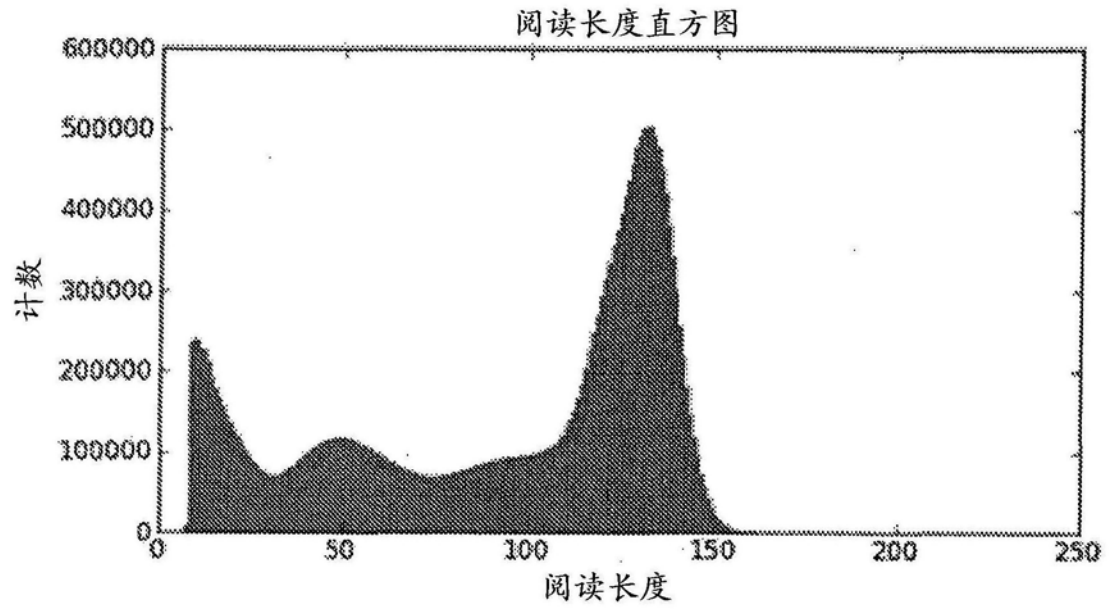


图11

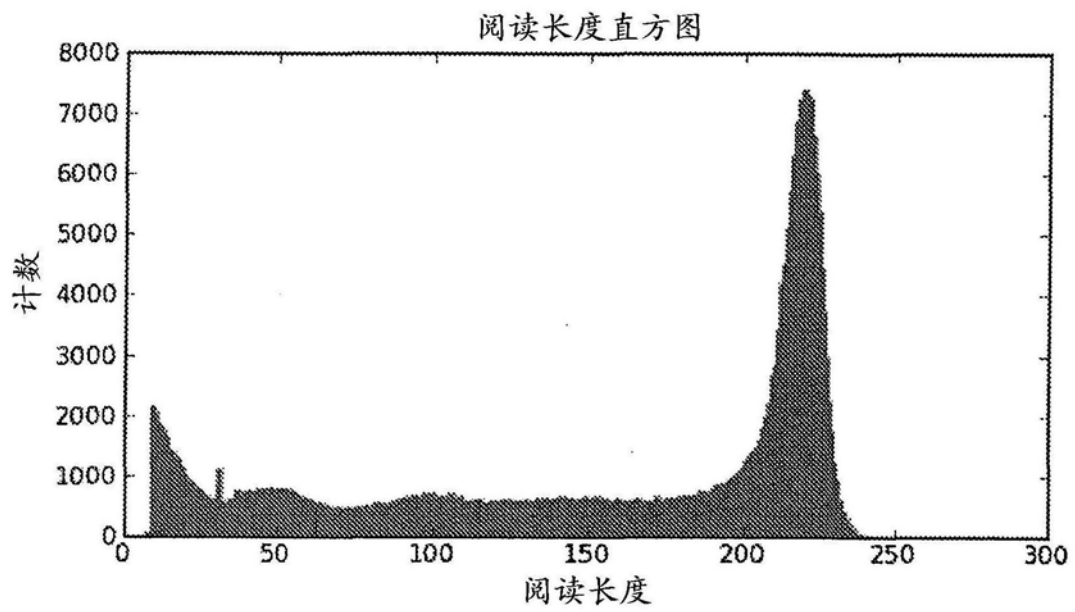


图12

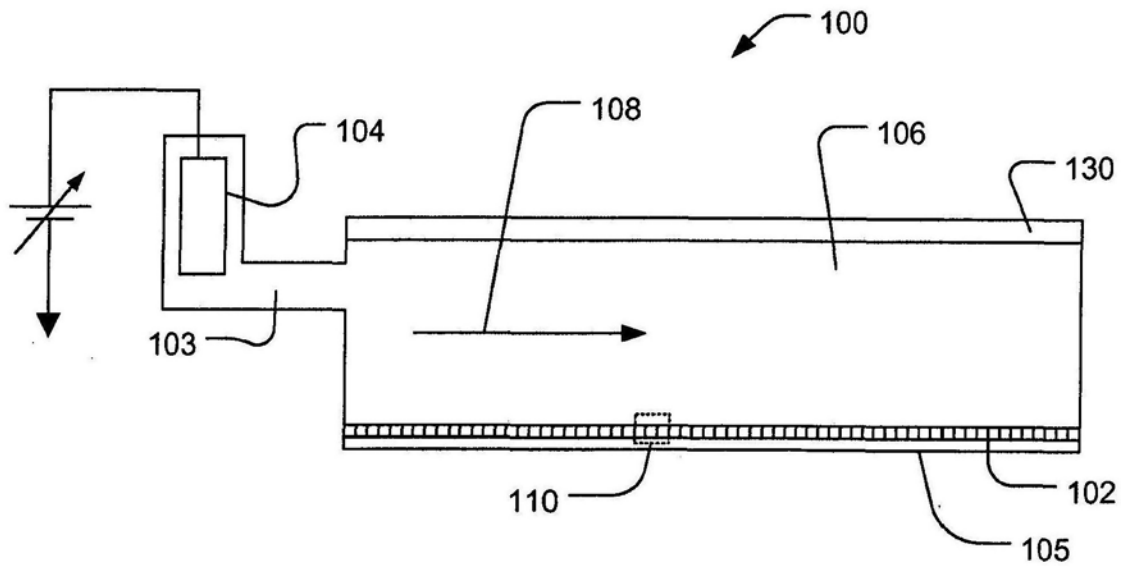


图13

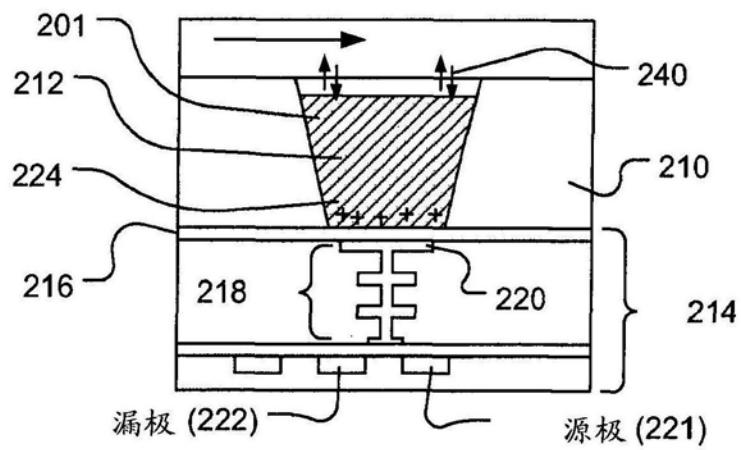


图14

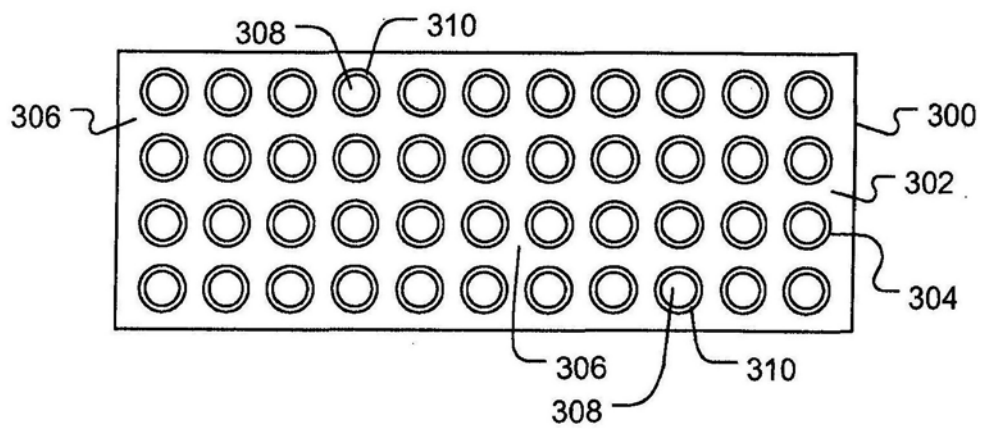


图15

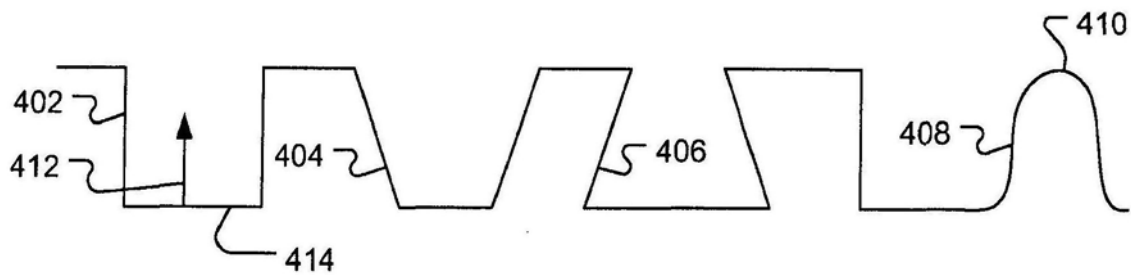


图16

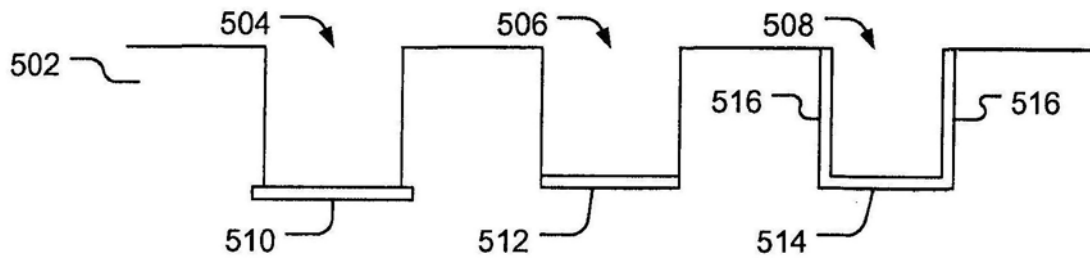


图17

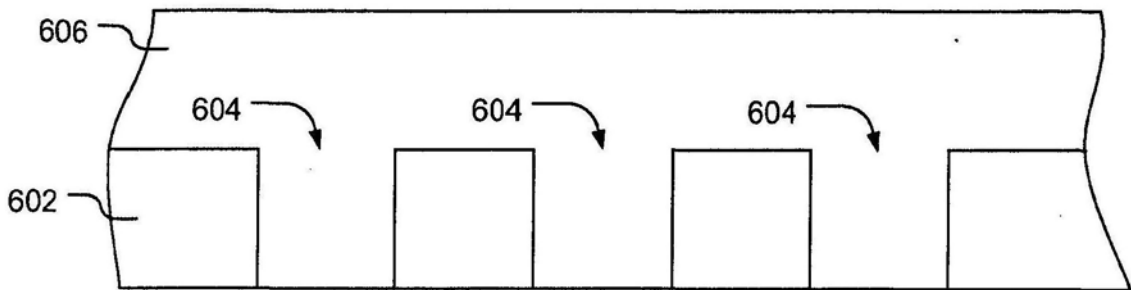


图18

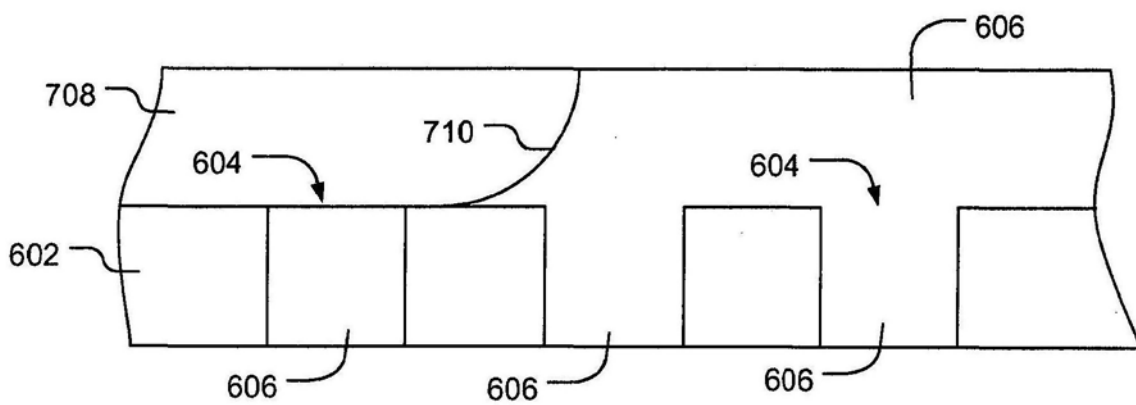


图19

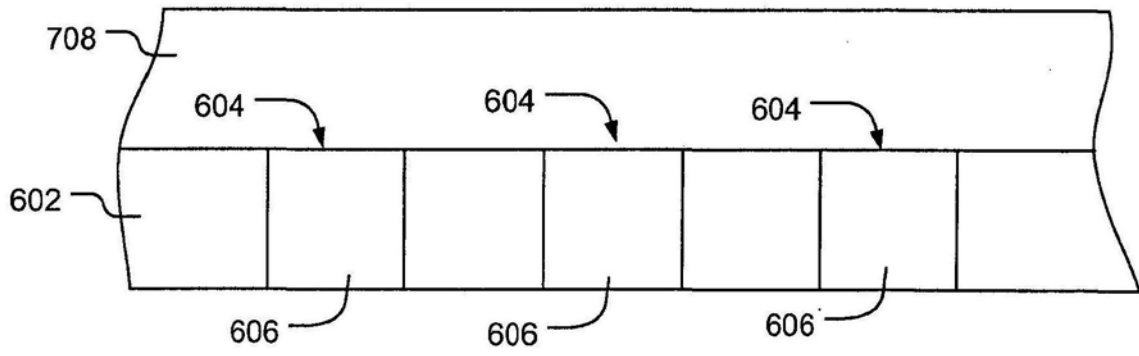


图20

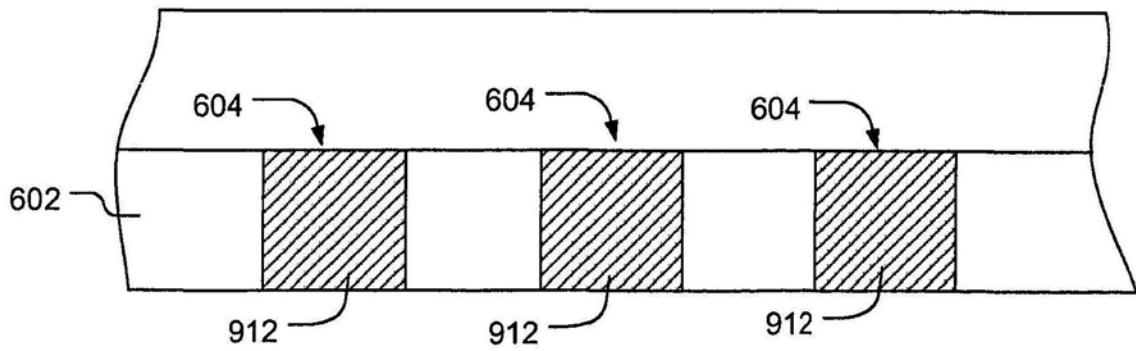


图21

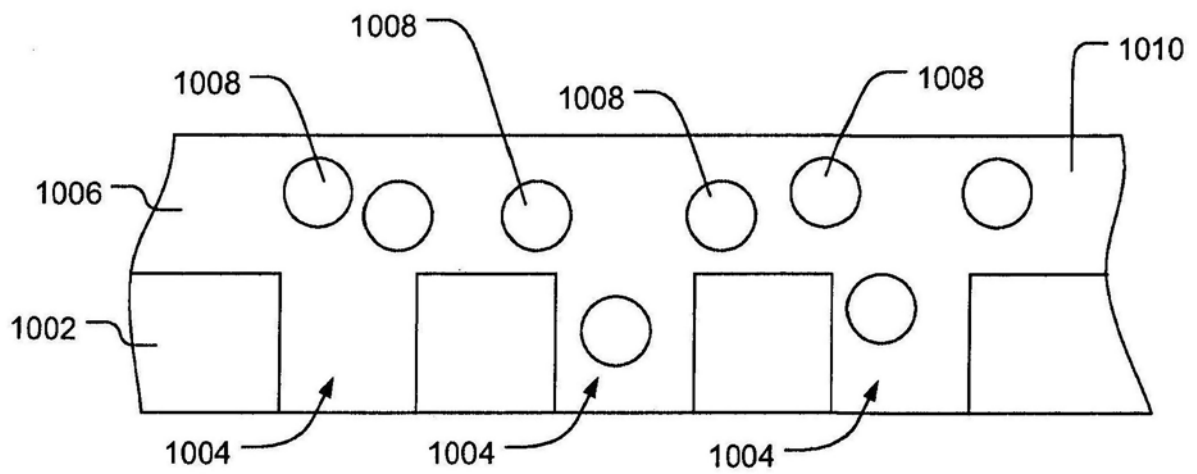


图22

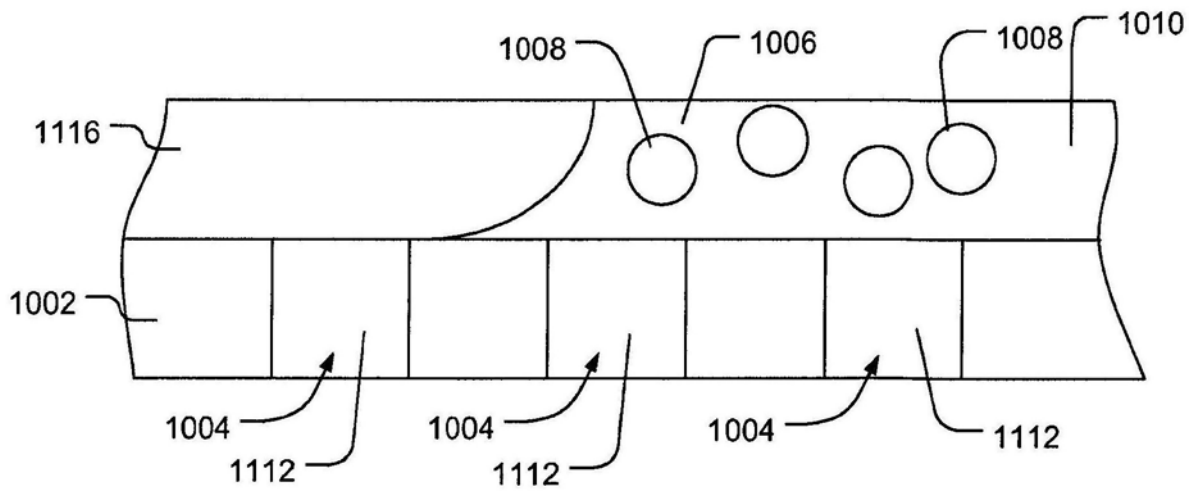


图23

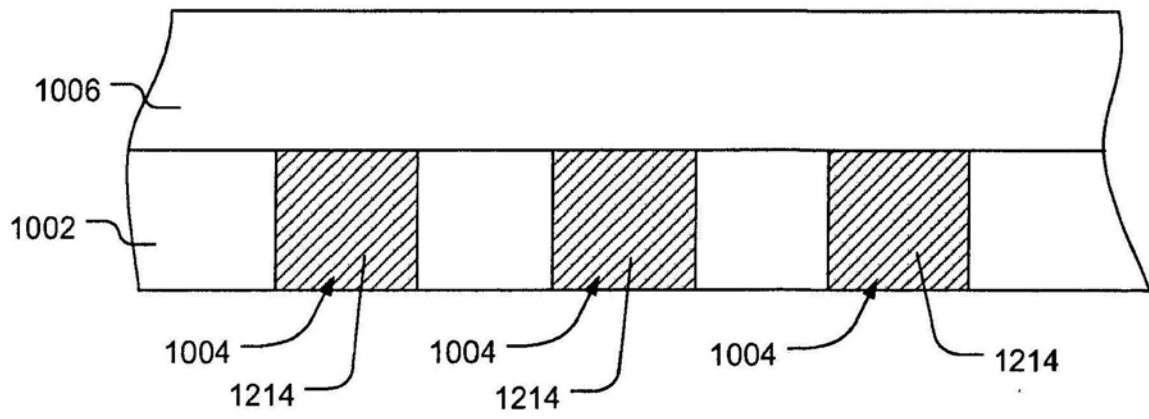


图24

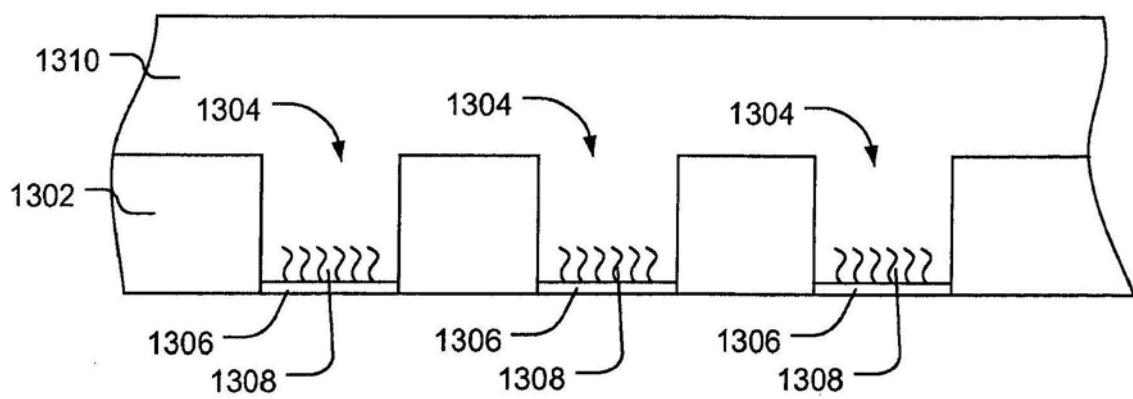


图25

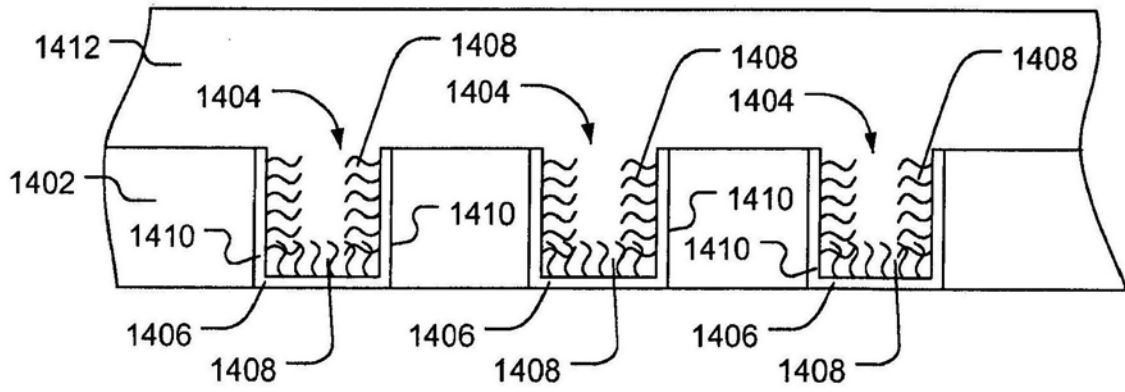


图26

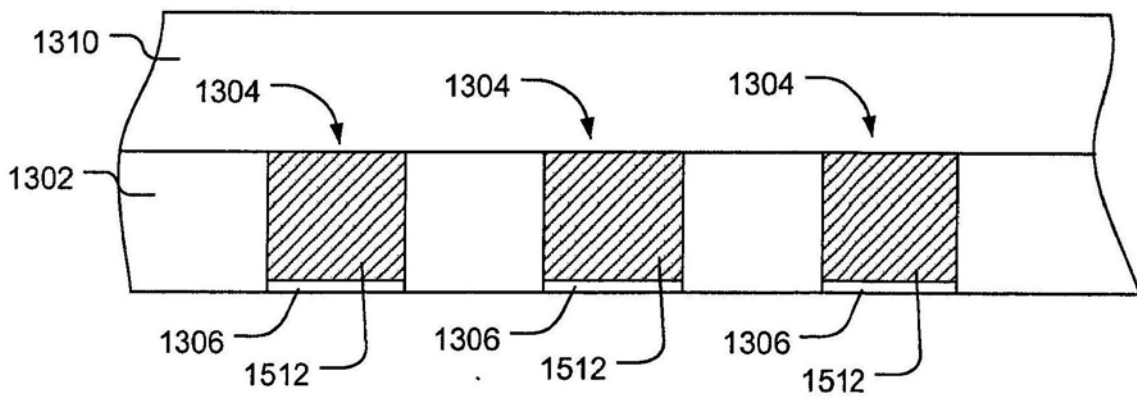


图27

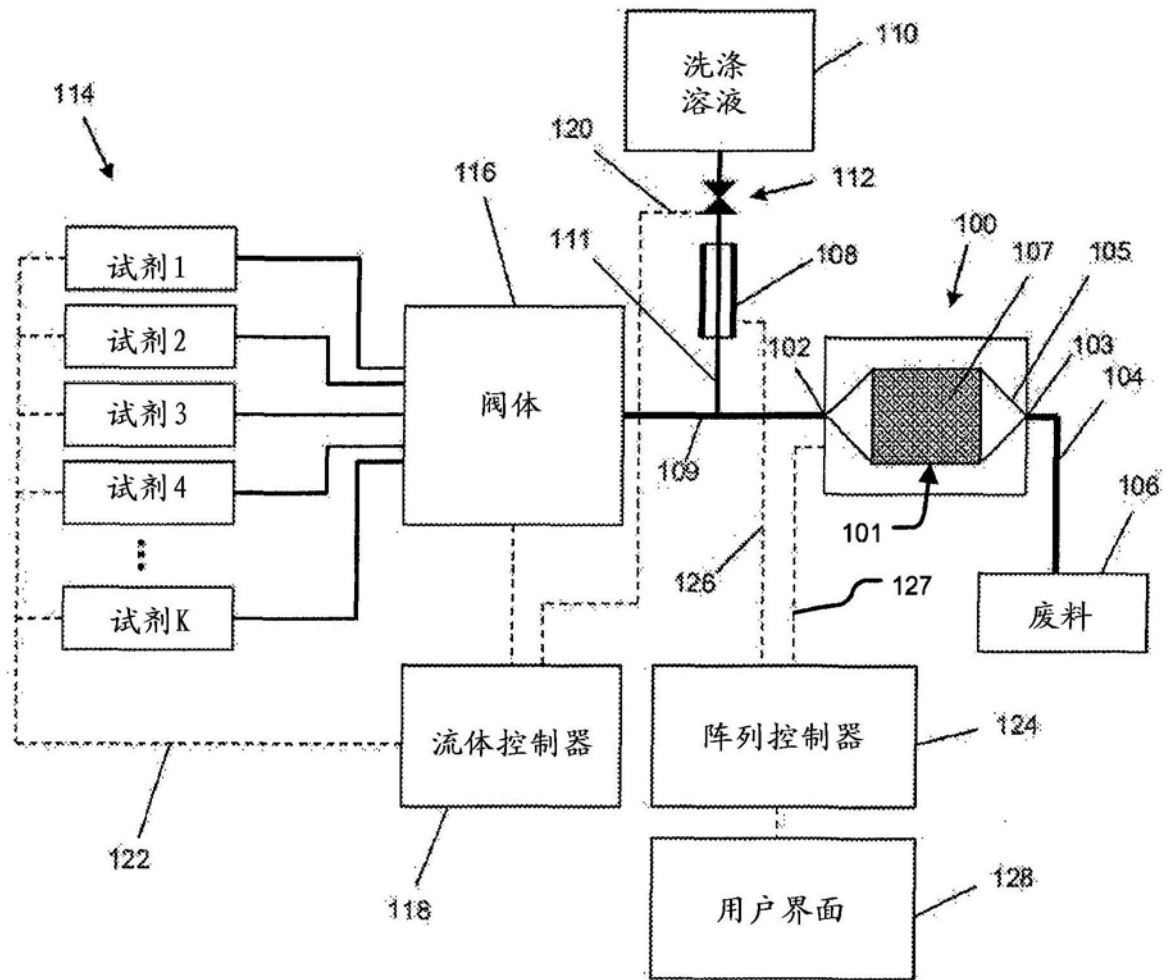


图28

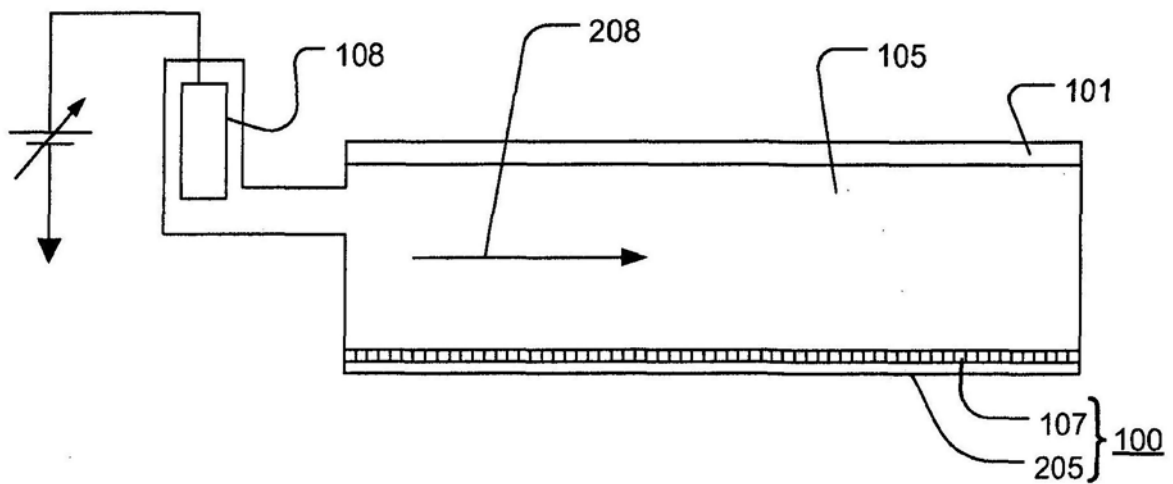


图29

