



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111148850 B

(45) 授权公告日 2024.11.08

(21) 申请号 201880061906.0

杰瑞米·拉基 布莱恩·瑞德

(22) 申请日 2018.07.24

施兴华 黄海冬 大卫·达德

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

申请公布号 CN 111148850 A

72003

(43) 申请公布日 2020.05.12

专利代理人 付文川 吴小瑛

(30) 优先权数据

(51) Int.CI.

62/536,426 2017.07.24 US

C12Q 1/6869 (2018.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 21/64 (2006.01)

2020.03.24

G01N 21/76 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/US2018/043526 2018.07.24

US 2009233302 A1, 2009.09.17

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2015050659 A1, 2015.02.19

W02019/023257 EN 2019.01.31

US 5594117 A, 1997.01.14

(73) 专利权人 宽腾矽公司

US 8383791 B1, 2013.02.26

地址 美国康涅狄格州

审查员 王娟

(72) 发明人 乔纳森·M·罗思伯格

权利要求书5页 说明书45页

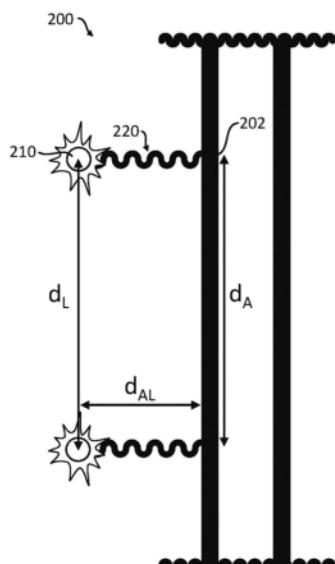
序列表6页 附图34页

(54) 发明名称

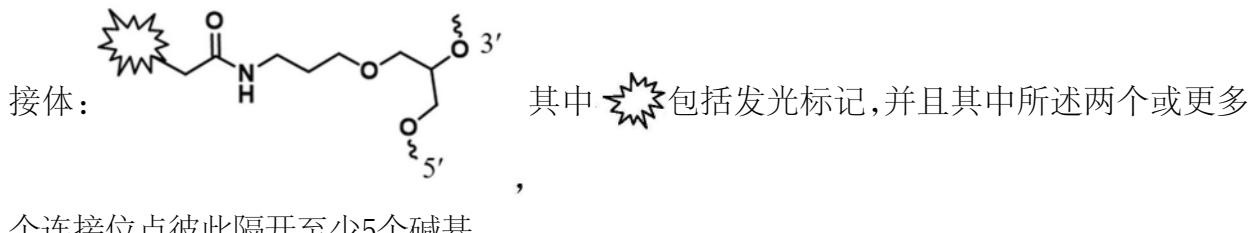
高强度经标记的反应物组合物及用于测序的方法

(57) 摘要

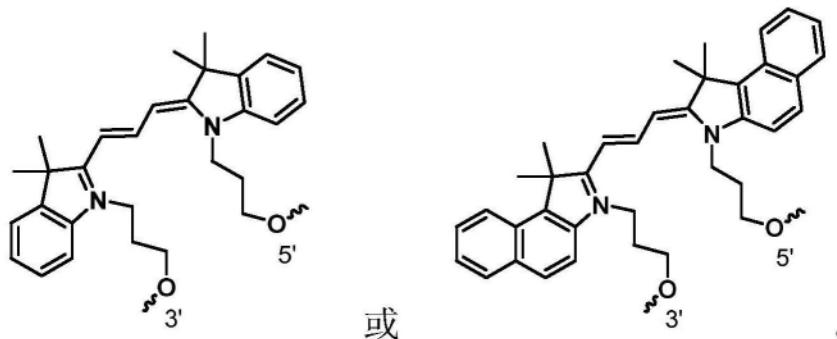
本公开提供可用于检测样品中单一分子的组合物。在一些方面中，本公开提供连接至核苷酸及两个或更多个发光标记的核酸。在一些实施方案中，本文所述的核酸包含一或多个提供增强荧光强度的结构特征。在一些方面中，提供使用本公开的经标记的核苷酸的测序方法。



1. 一种经标记的核苷酸,其包含经由核酸连接体连接至两个或更多个发光标记的核苷多磷酸,其中所述核酸连接体连接至所述核苷多磷酸的末端磷酸,其中所述两个或更多个发光标记均通过包括以下结构的间隔体分子在两个或更多个连接位点连接至所述核酸连

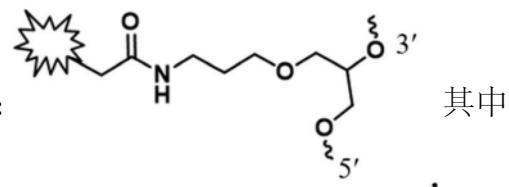


2. 如权利要求1所述的经标记的核苷酸,其中至少一个发光标记是基于花青的荧光团。
3. 如权利要求1所述的经标记的核苷酸,其中该核酸连接体是包含至少10个单体单元的寡聚物。
4. 如权利要求3所述的经标记的核苷酸,其中该寡聚物包含少于150、少于100或少于50个单体单元。
5. 如权利要求1所述的经标记的核苷酸,其中该核酸连接体包含DNA、RNA、PNA、LNA或其衍生物。
6. 如权利要求1所述的经标记的核苷酸,其中该核酸连接体包含第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链,其中所述两个或更多个连接位点位于第一寡核苷酸链。
7. 如权利要求6所述的经标记的核苷酸,其中该第一寡核苷酸链连接至该核苷多磷酸。
8. 如权利要求6所述的经标记的核苷酸,其中该第二寡核苷酸链连接至该核苷多磷酸。
9. 如权利要求6所述的经标记的核苷酸,其中该两个或更多个连接位点在该第一寡核苷酸链上彼此隔开至少5个且少于50个碱基。
10. 如权利要求6所述的经标记的核苷酸,其中至少一个连接位点发生在该第一寡核苷酸链上的无碱基位点。
11. 如权利要求6所述的经标记的核苷酸,其中该第一寡核苷酸链形成一或多个茎环。
12. 如权利要求11所述的经标记的核苷酸,其中每一茎环的环区包含该两个或更多个连接位点的连接位点。
13. 如权利要求12所述的经标记的核苷酸,其中每一茎环的环区包含至少4个未配对碱基。
14. 如权利要求11所述的经标记的核苷酸,其中每一茎环的环区包含具有少于33% G/C含量的序列。
15. 如权利要求2所述的经标记的核苷酸,其中所述基于花青的荧光团具有以下化学结构:



16. 如权利要求1所述的经标记的核苷酸,其中通过间隔体分子连接至所述核酸连接体的至少一个发光标记包括罗丹明染料、BODIPY染料或花青染料。

17. 一种经标记的核苷酸,其包含经由核酸连接体连接至两个或更多个发光标记的核苷多磷酸,其中所述核酸连接体连接至所述核苷多磷酸的末端磷酸,其中所述两个或更多个发光标记在两个或更多个连接位点连接至所述核酸连接体,其中所述两个或更多个连接位点彼此隔开至少5个碱基,其中至少一个连接位点发生在无碱基位点,并且其中(i)至少一个整合在所述核酸连接体内的发光标记是基于花青的荧光团和/或(ii)至少一个发光标记通过



包括以下结构的间隔体分子连接到所述核酸连接体:

包括发光标记。

18. 如权利要求17所述的经标记的核苷酸,其中所述核酸连接体是包含至少10个单体单元的寡聚体。

19. 如权利要求18所述的经标记的核苷酸,其中所述寡聚体包含少于150个、少于100个或少于50个单体单元。

20. 如权利要求17所述的经标记的核苷酸,其中所述核酸连接体包括DNA、RNA、PNA、LNA或其衍生物。

21. 如权利要求17所述的经标记的核苷酸,其中所述核酸连接体包括第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链,其中所述两个或更多个连接位点位于第一寡核苷酸链上。

22. 如权利要求21所述的经标记的核苷酸,其中第一寡核苷酸链连接到所述核苷多磷酸。

23. 如权利要求21所述的经标记的核苷酸,其中第二寡核苷酸链连接到所述核苷多磷酸。

24. 如权利要求17所述的经标记的核苷酸,其中所述两个或更多个连接位点在第一寡核苷酸链上彼此相隔至少5个且少于50个碱基。

25. 如权利要求21所述的经标记的核苷酸,其中第一寡核苷酸链形成一个或多个茎环。

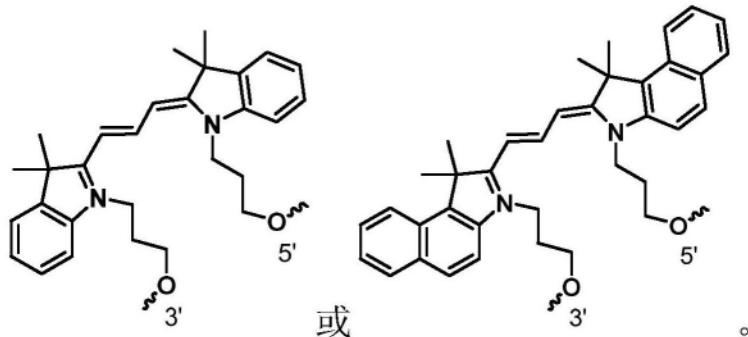
26. 如权利要求25所述的经标记的核苷酸,其中每一茎环的环区包含所述两个或更多个连接位点中的连接位点。

27. 如权利要求25所述的经标记的核苷酸,其中每一茎环的环区包含至少4个未配对碱

基。

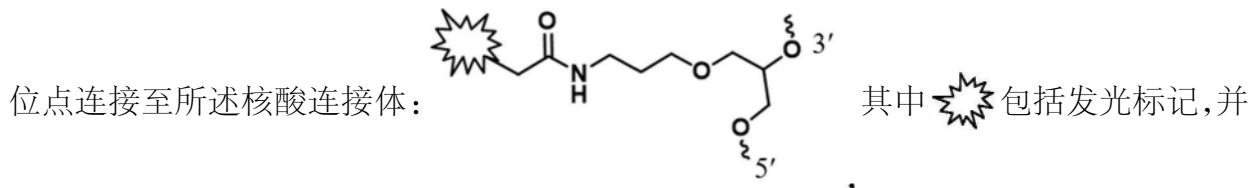
28. 如权利要求25所述的经标记的核苷酸,其中每一茎环的环区包含具有少于33%G/C含量的序列。

29. 如权利要求17所述的经标记的核苷酸,其中基于花青的荧光团具有化学结构:



30. 如权利要求17所述的经标记的核苷酸,其中通过间隔体分子连接至所述核酸连接体的至少一个发光标记包括罗丹明染料、BODIPY染料或花青染料。

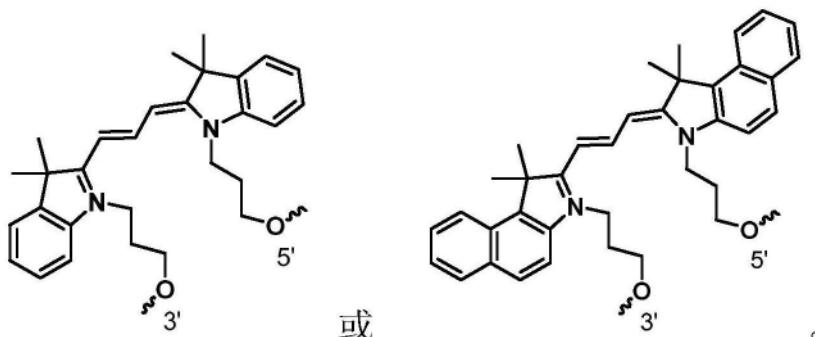
31. 一种经标记的分子,其包含经由核酸连接体连接至两个或更多个发光标记的反应物,其中所述两个或更多个发光标记通过包括以下结构的间隔体分子在两个或更多个连接



且其中所述两个或更多个连接位点彼此隔开至少5个碱基。

32. 如权利要求31所述的经标记的分子,其中至少一个发光标记是基于花青的荧光团。

33. 如权利要求32所述的经标记的分子,其中所述基于花青的荧光团具有以下化学结构:



34. 如权利要求31所述的经标记的分子,其中通过间隔体分子连接至所述核酸连接体的至少一个发光标记包括罗丹明染料、BODIPY染料或花青染料。

35. 如权利要求31所述的经标记的分子,其中所述核酸连接体是包含至少10个单体单元的寡聚体。

36. 如权利要求35所述的经标记的分子,其中所述寡聚体包含少于150个、少于100个或少于50个单体单元。

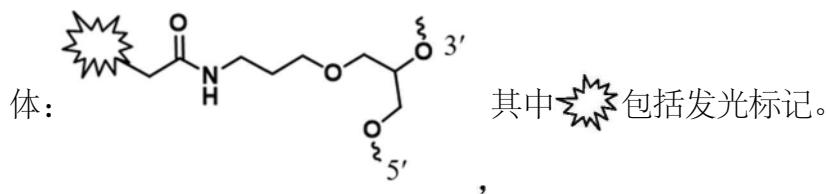
37. 如权利要求31所述的经标记的分子,其中所述核酸连接体包括DNA、RNA、PNA、LNA或

其衍生物。

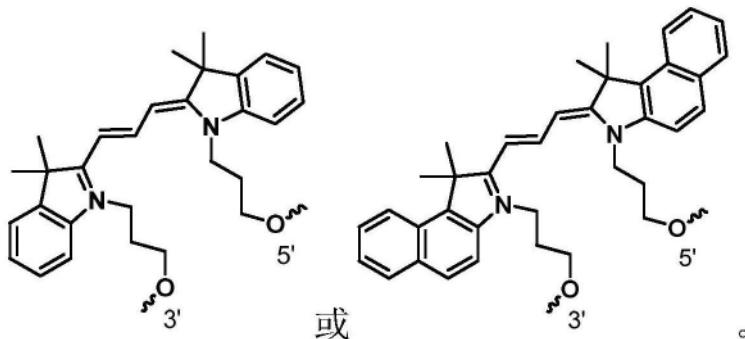
38. 如权利要求31所述的经标记的分子,其中所述核酸连接体包括第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链,其中所述两个或更多个连接位点位于第一寡核苷酸链上。

39. 如权利要求31所述的经标记的分子,其中所述两个或更多个连接位点在第一寡核苷酸链上彼此相隔至少5个且少于50个碱基。

40. 一种经标记的分子,其包含经由核酸连接体连接至两个或更多个发光标记的反应物,其中所述两个或更多个发光标记在两个或更多个连接位点连接至所述核酸连接体,并且其中所述两个或更多个连接位点彼此隔开至少5个碱基,其中至少一个连接位点发生在无碱基位点,并且其中(i)至少一个整合在所述核酸连接体内的发光标记是基于花青的荧光团和/或(ii)至少一个发光标记通过包括以下结构的间隔体分子连接到所述核酸连接



41. 如权利要求40所述的经标记的分子,其中基于花青的荧光团具有化学结构:



42. 如权利要求40所述的经标记的分子,其中通过间隔体分子连接至所述核酸连接体的至少一个发光标记包括罗丹明染料、BODIPY染料或花青染料。

43. 如权利要求40所述的经标记的分子,其中所述核酸连接体是包含至少10个单体单元的寡聚体。

44. 如权利要求43所述的经标记的分子,其中所述寡聚体包含少于150个、少于100个或少于50个单体单元。

45. 如权利要求40所述的经标记的分子,其中所述核酸连接体包括DNA、RNA、PNA、LNA或其衍生物。

46. 如权利要求40所述的经标记的分子,其中所述核酸连接体包括第一寡核苷酸链和第二寡核苷酸链,其中所述两个或更多个连接位点位于第一寡核苷酸链上。

47. 如权利要求40所述的经标记的分子,其中所述两个或更多个连接位点在第一寡核苷酸链上彼此相隔至少5个且少于50个碱基。

48. 一种测定模板核酸的序列的方法,该方法包含:

(i) 将靶体积中的复合物暴露于一或多种不同类型的经发光标记的核苷酸,该复合物包含该模板核酸、引物及聚合酶,其中每一类型的经发光标记的核苷酸包含如权利要求1至30中任一项的经标记的核苷酸;

- (ii) 引导一或多个激发能的一系列脉冲朝向该靶体积附近；
- (iii) 在依序引入包含该引物的核酸期间检测来自经发光标记的核苷酸的多个发射光子；及
- (iv) 借由测定 (a) 这些发射光子的时间或 (b) 这些发射光子的时间和发光强度，鉴别具有该引入的核苷酸的序列。

49. 一种用于测序模板核酸的试剂盒，该试剂盒包含：

两种或更多种不同类型的经发光标记的核苷酸，其中每一类型的经发光标记的核苷酸包含如权利要求1至30中任一项的经标记的核苷酸。

50. 如权利要求49所述的试剂盒，其进一步包含聚合酶。

51. 如权利要求49所述的试剂盒，其进一步包含与该模板核酸互补的引物。

52. 一种核酸测序反应组合物，其在反应混合物中包含两种或更多种不同类型的经发光标记的核苷酸，其中每一类型的经发光标记的核苷酸包含如权利要求1至30中任一项的经标记的核苷酸。

53. 如权利要求52所述的组合物，其进一步包含聚合酶。

54. 如权利要求52所述的组合物，其进一步包含模板核酸。

55. 如权利要求54所述的组合物，其进一步包含与该模板核酸互补的引物。

高强度经标记的反应物组合物及用于测序的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e)要求2017年7月24日提交的美国临时专利申请系列号62/536,426的优先权,其全文通过引用并入此处。

技术领域

[0003] 本申请概言之是关于经明亮标记的反应物组合物及使用该组合物检测单一分子的方法。

现有技术

[0004] 下一代测序技术的进步使得可执行单一分子的大规模并行分析,这根本上改变了生命科学的研究前景。这些技术中的一些涉及使用经发光标记的反应组分实时监测生物反应。标记用光源照明以引起发光,且用光检测器检测发光。可记录这些事件且基于相应发光性质进行分析,以鉴别个别反应组分。在鉴别多种类型中特定类型的经标记的分子中,每种类型均具有独特且易于鉴别的发光性质是至关重要的。此外,这些参数能决定仪器要求,例如激发源功率及整体仪器大小。

发明内容

[0005] 本文所公开的技术的方面是关于包含两个或更多个由连接体(例如受限连接体)隔开的发光标记的经标记的反应组分。在一些实施方案中,本申请是关于发光标记的分离,以防止由于标记-标记相互作用引起的可检测信号的减弱。在一些方面中,本申请提供经标记的核苷酸,其包含经由连接体连接至两个或更多个发光标记的核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些方面中,本申请提供用于测序模板核酸的组合物、方法及试剂盒。

[0006] 在一些方面中,本申请提供包含经由连接体连接至两个或更多个发光标记的核苷酸(例如核苷多磷酸)的经标记的核苷酸。在一些实施方案中,核苷酸经配置以用作聚合反应中的底物。在一些实施方案中,本申请的经标记的核苷酸包含两个或更多个彼此隔开最小距离的发光标记。在一些实施方案中,每一发光标记与任何其他发光标记隔开至少5埃。举例而言,在一些实施方案中,每一发光标记与任何其他发光标记隔开至少5、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少40或至少50埃。在一些实施方案中,每一发光标记包含与任何其他发光标记的质量中心隔开至少5埃的质量中心。

[0007] 在一些实施方案中,本申请的经标记的核苷酸包含一或多个经由间隔体分子连接至连接体的发光标记。在一些实施方案中,间隔体分子将发光标记链接至连接体上的连接位点。在一些实施方案中,发光标记经由间隔体分子连接至连接体,该间隔体分子在发光标记与连接体上的连接位点之间包含至少8个连续原子。在一些实施方案中,间隔体分子在发光标记与连接体上的连接位点之间包含少于50个、少于40个、少于30个或少于20个连续原子。在一些实施方案中,发光标记整合至连接体中。

[0008] 在一些实施方案中,连接体是寡聚物(例如寡聚连接体或聚合连接体)。在一些实

施方案中,寡聚物包含单体单元。在一些实施方案中,寡聚物包含两种或更多种不同类型的单体单元。在一些实施方案中,寡聚物包含多种相同类型的单体单元(例如寡聚物是一种类型的单体单元的聚合物)。在一些实施方案中,寡聚物包含具有多个第一类型的单体单元的第一区及具有多个第二类型的单体单元的第二区。在一些实施方案中,寡聚物包含多个不同区(例如2、3、4、5或更多个),其各自包含多种不同类型的单体单元。在一些实施方案中,寡聚物包含至少5个单体单元。在一些实施方案中,寡聚物包含至少10个单体单元。在一些实施方案中,寡聚物包含少于150、少于100或少于50个单体单元(例如至少5个单体单元且少于200、150、100、75、50或25个单体单元;至少10个单体单元且少于200、150、100、75、50或25个单体单元)。

[0009] 在一些实施方案中,若连接体是寡聚物(例如寡聚连接体、聚合连接体),则每一发光标记是由至少5个寡聚物单体单元彼此隔开的标记。在一些实施方案中,第一发光标记在与第二位置隔开至少5个单体单元的第一位置整合至连接体中,在该第二位置,第二发光标记整合至连接体中或连接至连接体。在一些实施方案中,若毗邻发光标记整合至连接体中,则标记可由少于5个单体单元隔开。在一些实施方案中,每一发光标记在与任何另一连接位点隔开至少5个单体单元(例如至少6、至少8、至少10、至少12、至少14、至少16、至少18、至少20或更多个单体单元)的连接位点连接至连接体。在一些实施方案中,每一发光标记在与任何另一连接位点隔开至少5个单体单元且少于40个单体单元(例如少于38、少于36、少于34、少于32、少于30、少于28、少于26、少于24、少于22或少于20个单体单元)的连接位点连接。在一些实施方案中,发光标记整合至寡聚物的两个连续单体单元之间的连接体中(例如共价连接寡聚物的两个毗邻单体单元)。

[0010] 在一些实施方案中,连接体足够刚性以防止两个或更多个链接至连接体的标记之间相互作用。在一些实施方案中,连接体的刚性足以相对于其在以连接至相同连接体的单一标记形式存在时的强度保存每一标记的至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、例如95-100%(例如约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、约100%)的强度。

[0011] 在一些实施方案中,连接体是肽。在一些实施方案中,肽的氨基酸组合物提供结构刚性(例如由于肽连接体中存在一或多个聚脯氨酸区段)。在一些实施方案中,90%或更多(例如全部)肽连接体由聚脯氨酸聚合物组成。在一些实施方案中,借由经由化学修饰限制肽提供肽刚性。举例而言,在一些实施方案中,肽包含一或多个环化区段。在一些实施方案中,肽是环化肽(例如U形钉(stapled)肽、对接(end-to-end)环化肽等)。在一些实施方案中,可借由引入一或多个刚性氨基酸聚合物区段及一或多个化学修饰的氨基酸聚合物区段的组合提供足够肽刚性。

[0012] 在一些实施方案中,连接体是多糖(例如肝素、硫酸肝素、聚葡萄糖、聚乳糖、氨基糖苷、N-乙酰氨基糖苷及其组合)。

[0013] 在一些实施方案中,连接体是核酸。在一些实施方案中,核酸包含脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、肽核酸(PNA)、锁核酸(LNA)或其衍生物。在一些实施方案中,借由使用一或多个双链核酸区段(例如隔开两个或更多个不同标记)提供足够刚性。在一些实施方案中,借由核酸(例如单链或双链核酸或包含一或多条单链及一或多个双链区段的核酸)的一或多种化学修饰提供足够刚性。在一些实施方案中,核酸包含一或多个双链区段及一或多个化学修饰的区段的组合。

[0014] 在一些实施方案中,核酸包含一或多条单链及一或多个双链区段的组合。在一些实施方案中,单链区段可以环(例如如本文中别处阐述的茎环二级结构中)形式存在。在一些实施方案中,单链区段是以双链区段内的未配对区形式存在。举例而言,内部环可在双链区段内形成,其中一链的一或多个碱基不与另一链的一或多个毗邻碱基形成碱基配对相互作用。未配对区的又一实例包括凸环,其可在双链区段内形成,其中一链相对于另一链包括一或多个额外碱基。在一些实施方案中,单链区及双链区赋予结构刚性。

[0015] 在一些实施方案中,单链区(例如未配对区)至少2个碱基长(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个碱基长)。在一些实施方案中,单链区是介于2个与10个之间的碱基长(例如介于2个与8个之间、介于4个与10个之间或介于4个与8个之间的碱基长)。在一些实施方案中,双链区是介于2个与40个之间的碱基长(例如介于2个与20个之间、介于2个与10个之间、介于10个与40个之间、介于10个与30个之间、介于10个与20个之间、介于20个与40个之间或介于20个与30个之间碱基长)。

[0016] 在一些实施方案中,核酸包含连接至两个或更多个发光标记的第一寡核苷酸链。在一些实施方案中,两个或更多个发光标记在第一寡核苷酸链上的两个或更多个连接位点连接。在一些实施方案中,每一发光标记包含中心点与任何另一发光标记的中心点隔开至少5埃的空间体积。举例而言,在一些实施方案中,每一发光标记包含中心点与任何另一发光标记的中心点隔开至少6埃、约5至10埃、约6至10埃、约10至15埃、约15至20埃、约20至25埃或约25至50埃的空间体积。

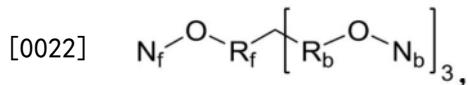
[0017] 在一些实施方案中,核酸进一步包含与第一寡核苷酸链杂交的第二寡核苷酸链。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链连接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,第二寡核苷酸链连接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。

[0018] 在一些实施方案中,两个或更多个连接位点由第一寡核苷酸链上的至少5个碱基(例如至少5个核苷酸)彼此隔开。在一些实施方案中,两个或更多个连接位点由第一寡核苷酸链上的至少5且少于40个碱基(例如介于约5个与30个之间的碱基、介于约5个与20个之间的碱基、介于约5个与10个之间的碱基、介于约10个与40个之间的碱基、介于约20个与40个之间的碱基或介于约30个与40个之间的碱基)彼此隔开。在一些实施方案中,每一连接位点与第一寡核苷酸链上的鸟嘌呤或胞嘧啶隔开至少2个碱基。在一些实施方案中,每一连接位点发生在第一寡核苷酸链上的无碱基位点。在一些实施方案中,每一连接位点发生在第一寡核苷酸链上的核苷酸的核碱基。在一些实施方案中,核碱基是选自A、T或U的核碱基。

[0019] 在一些实施方案中,第一寡核苷酸链形成一或多个(例如1、2、3、4或更多个)茎环。在一些实施方案中,每一茎环的环区包含两个或更多个连接位点的连接位点。在一些实施方案中,每一茎环的环区包含至少4个未配对碱基(例如4、5、6、7、8或更多个未配对碱基)。在一些实施方案中,环区包含具有少于33% G/C含量的序列(例如核苷酸序列)。

[0020] 在一些方面中,本公开内容的经标记的核苷酸包含核酸连接体,其包含在第一寡核苷酸链的末端连接至两个或更多个分支寡核苷酸链的第一寡核苷酸链。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链经由共价偶联化合物连接至两个或更多个分支寡核苷酸链。在一些实施方案中,每一分支寡核苷酸链包含至少一个发光标记。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链与第二寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,第二寡核苷酸链连接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,每一分支寡核苷酸链进一步与互补分支寡核苷酸链杂交。

[0021] 在一些实施方案中,共价偶联化合物具有以下结构:



[0023] 其中N_f是第一寡核苷酸链;N_b是分支寡核苷酸链;R_f及R_b各自彼此独立地是键或选自由以下组成的组的连接基团:经取代或未经取代的亚烷基;经取代或未经取代的亚烯基;经取代或未经取代的亚炔基;经取代或未经取代的亚杂烷基;经取代或未经取代的亚杂烯基;经取代或未经取代的亚杂炔基;经取代或未经取代的亚杂环基;经取代或未经取代的亚碳环基;经取代或未经取代的亚芳基;经取代或未经取代的亚杂芳基;及其组合;且各0是毗邻寡核苷酸链的5'磷酸基或3'羟基的氧原子。

[0024] 在一些方面中,本公开内容的经标记的核苷酸包含含有第一寡核苷酸组分的核酸连接体,该第一寡核苷酸组分包含三个或更多个自共价偶联化合物延伸的寡核苷酸链(例如3、4、5、6或更多个寡核苷酸链)。在一些实施方案中,三个或更多个寡核苷酸链中的至少一个连接至核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,第一寡核苷酸组分与第二寡核苷酸组分杂交。在一些实施方案中,第二寡核苷酸组分包含至少一个连接至发光标记的寡核苷酸链。

[0025] 在一些实施方案中,将本公开内容的经标记的核苷酸用荧光染料发光标记。在一些实施方案中,荧光染料是罗丹明染料、BODIPY染料或花青染料。

[0026] 在一些实施方案中,本公开内容的经标记的核苷酸包含与两个或更多个发光标记的任一发光标记隔开至少1nm的核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,核苷酸与两个或更多个发光标记的任一发光标记隔开介于大约1nm与10nm之间(例如介于大约2nm与10nm之间、介于大约4nm与10nm之间、介于大约6nm与10nm之间或介于大约8nm与10nm之间)。在一些实施方案中,核苷酸与两个或更多个发光标记的任一发光标记隔开介于大约2nm与20nm之间(例如介于大约6nm与20nm之间、介于大约10nm与20nm之间、介于大约12nm与20nm之间或介于大约16nm与20nm之间)。

[0027] 在一些方面中,本公开内容提供测定模板核酸的序列的方法。在一些实施方案中,这些方法包括包含将靶体积的复合物暴露于本申请提供的多种类型的经发光标记的核苷酸的步骤,该复合物包含模板核酸、引物及聚合酶。在一些实施方案中,多种类型的经发光标记的核苷酸中的一或多个包含经由连接体连接至两个或更多个发光标记的核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,连接体是包含至少10个单体单元的寡聚物。在一些实施方案中,每一发光标记在与任何另一连接位点隔开至少5个单体单元的连接位点连接至连接体。举例而言,在一些实施方案中,连接位点与任何另一连接位点隔开介于约5个与30个之间的单体单元、介于约5个与20个之间的单体单元、介于约5个与10个之间的单体单元、介于约10个与40个之间的单体单元、介于约20个与40个之间的单体单元或介于约30个与40个之间的单体单元。在一些实施方案中,每一发光标记与任何另一发光标记隔开至少5埃。举例而言,在一些实施方案中,每一发光标记与任何另一发光标记隔开大约5至10埃、大约6至10埃、大约10至15埃、大约15至20埃、大约20至25埃或大约25至50埃。因此,在一些方面中,本公开内容提供利用本文所述经发光标记的核苷酸中的任一个的核酸测序方法。

[0028] 在一些实施方案中,这些方法进一步包含引导一或多个激发能的一系列脉冲朝向靶体积附近的步骤。在一些实施方案中,这些方法进一步包含在连续引入包含引物的核酸

期间检测来自经发光标记的核苷酸的多个发射光子的步骤。在一些实施方案中,这些方法进一步包含借由测定发射光子的时间及视情况发光强度和/或亮度鉴别引入的核苷酸的序列的步骤。

[0029] 在一些实施方案中,反应混合物中的四种不同类型的核苷酸(例如腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶/尿嘧啶)各自可用一或多个发光分子(例如具有两个或更多个发光标记,如本文所述)标记。在一些实施方案中,每一类型的核苷酸可连接至相同发光分子中的一个以上(例如连接至核苷酸的相同荧光染料中的两者或更多个)。在一些实施方案中,每一发光分子可连接至一个以上核苷酸(例如相同核苷酸中的两者或更多个)。在一些实施方案中,一个以上核苷酸可连接(例如经由本文所述连接体)至一个以上发光分子。

[0030] 在一些实施方案中,一组四个核苷酸间的发光标记可选自包含芳香族或杂芳香族化合物的染料且可为茈、蒽、萘、吖啶、二苯乙烯、吲哚、苯并吲哚、噁唑、咔唑、噻唑、苯并噻唑、菲啶、吩噁嗪、卟啉、喹啉、乙锭(ethidium)、苯甲酰胺、花青、簇花青、水杨酸脂、邻胺苯甲酸酯、香豆素、荧光素、罗丹明或其他类似化合物。染料的实例包括夹氧杂蒽染料,例如荧光素或罗丹明染料、萘染料、香豆素染料、吖啶染料、花青染料、苯并噁唑染料、二苯乙烯染料、茈染料、酞菁染料、藻胆蛋白染料、方酸菁染料、BODIPY染料及诸如此类。

[0031] 在一些方面中,本申请提供用于测序模板核酸的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含多种类型的如本文所述的经发光标记的核苷酸。在一些实施方案中,每一类型的经标记的核苷酸包含两个或更多个经由连接体连接至一或多种核苷酸(例如一或多个核苷多磷酸)的发光标记。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含聚合酶。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含与所测序的模板核酸互补的引物。

[0032] 在一些方面中,本申请提供核酸测序反应组合物。在一些实施方案中,组合物包含反应混合物中的两种或更多种(例如2、3、4或更多种)不同类型的经发光标记的核苷酸。在一些实施方案中,每一类型的经发光标记的核苷酸包含根据本申请的经标记的核苷酸。在一些实施方案中,组合物进一步包含聚合酶。在一些实施方案中,组合物进一步包含模板核酸。在一些实施方案中,组合物进一步包含与模板核酸互补的引物。

[0033] 附图简要说明

[0034] 所属领域的技术人员将理解,下文所述的图仅用于图解说明目的。应理解,在一些情况下,本发明的各个方案可放大或扩大显示以有利于理解本发明。在附图中,相同参考特征贯穿各图通常是指相同特征、功能上类似和/或结构上类似的要素。附图未必按比例绘制,而是将重点放在说明教导的原理上。附图并非意欲以任何方式限制本发明教导的范围。

[0035] 依据下文在连同附图一起进行时所述的详细说明,本发明的特征及优点将变得更加显而易见。

[0036] 当参照附图阐述实施方案时,可使用方向参考符号(「上方」、「下方」、「顶部」、「底部」、「左」、「右」、「水平」、「垂直」等)。这些参考符号仅意欲帮助读者以正交取向观看附图。这些方向参考符号并不意欲阐述所体现装置的较佳或唯一取向。装置可以其他取向体现。

[0037] 自详细说明中显而易见,图(例如图1-10)中绘示且出于说明目的在整个本申请中进一步阐述的实例阐述非限制性实施方案,且在一些情形下出于更清楚地说明的目的可简化某些过程或省略特征或步骤。

[0038] 图1A是一般地绘示在经明亮标记的反应物上的发光标记分离的图解。

- [0039] 图1B绘示具有不同发光标记连接配置的一般连接体结构。
- [0040] 图2A是一般地绘示连接至两个发光标记的核酸连接体的图解。
- [0041] 图2B绘示具有不同链配置的一般核酸(顶部)及一般地绘示发光标记空间占据的图解(底部)。
- [0042] 图2C绘示具有不同相对标记连接位点(顶部)及不同反应物连结性(底部)的一般核酸。
- [0043] 图3A绘示经由相同(左)或相反(右)寡核苷酸链链接性将标记链接至反应物的一般核酸。
- [0044] 图3B绘示具有可用于设计经明亮标记的反应物的近似大小限制的实例的一般核酸。
- [0045] 图3C是经由相同链链接性将发光标记链接至核苷多磷酸的核酸的实例性结构。
- [0046] 图3D绘示测序反应的实例,其确认棒状核酸连接体(例如如图3C中所示)可用于检测经标记的核苷多磷酸的引入。
- [0047] 图3E是经由相反链链接性将发光标记链接至核苷多磷酸的核酸的实例性结构。
- [0048] 图3F是具有整合至寡核苷酸链中的发光标记的核酸连接体的实例性结构。
- [0049] 图3G绘示使用所示的四种不同核酸连接体构建体执行的测序反应的实例。
- [0050] 图4A绘示具有单一茎环二级结构的一般核酸连接体。
- [0051] 图4B绘示具有多个茎环二级结构的一般核酸连接体。
- [0052] 图4C是具有在单独茎环二级结构的环连接的发光标记的核酸连接体的实例性结构。
- [0053] 图4D绘示测序反应的实例,其确认具有茎环核酸连接体(例如如图4C中所示)的经标记的核苷多磷酸可用于检测核苷多磷酸的引入。
- [0054] 图5A一般地绘示具有连接至发光标记的分支寡核苷酸链的树状核酸连接体。
- [0055] 图5B是具有在单独分支寡核苷酸链的末端连接的发光标记的树状核酸连接体的实例。
- [0056] 图6A一般地绘示星状核酸连接体且提供可用于设计星状核酸连接体的近似大小限制的实例。
- [0057] 图6B是星状核酸连接体的实例性结构。
- [0058] 图6C是具有四面体核的核酸连接体的实例性结构。
- [0059] 图6D绘示可用于合成具有四面体核的核酸连接体的反应方案的实例。
- [0060] 图6E一般地绘示具有在三向接点连接的发光标记的基于四面体的核酸连接体结构。
- [0061] 图7一般地绘示产生具有在三向接点连接的发光标记的基于环糊精的核酸连接体的方法。
- [0062] 图8绘示一组实验中用于评估间隔体长度对荧光寿命测量的效应的核酸连接体结构的实例。
- [0063] 图9绘示一组实验中用于评估连接体限制对荧光寿命测量的效应的核酸连接体结构的实例。
- [0064] 图10绘示一组实验中用于评估受限连接体中间隔体长度对荧光寿命的效应的核

酸连接体结构的实例。

具体实施方式

[0065] 在其他方面中,本公开内容提供包含两个或更多个标记的经发光标记的反应物,其中标记经配置以提供高强度和/或一致发射特征(例如一致发射寿命)。在一些实施方案中,两个或更多个标记经配置以避免降低发射的强度或其他发射特征的标记-标记相互作用。在一些实施方案中,两个或更多个标记经配置以a)避免与连接体相互作用,和/或b)各自与连接体具有类似相互作用。

[0066] 在一些方面中,本公开内容提供与具有高发射强度的经发光标记的反应物相关的方法及组合物。在一些方面中,本公开内容提供与具有高发射亮度的经发光标记的反应物相关的方法及组合物。在一些方面中,本公开内容是关于具有一致发射寿命的经明亮标记的反应物。在一些实施方案中,如本文所用「亮度」(及其变化形式,例如「明亮(bright、brightly)」等)是指报告每经标记的反应物分子的平均发射强度的参数。因此,在一些实施方案中,「发射强度」可用于通常指包含经明亮标记的反应物的组合物的亮度。在一些实施方案中,经标记反应物的亮度等于其量子产率与消光系数的乘积。在一些实施方案中,本公开内容的经标记反应物经改造以最大化量子产率和/或最小化消光系数值以促进增加的亮度。

[0067] 在一些实施方案中,本公开内容的经明亮标记的反应物经改造以具有增加的发射亮度及一致发射寿命。在一些实施方案中,反应物的两个标记可彼此和/或与周围环境相互作用,使得一或多个发射特征在两个标记之间不一致。不一致发射特征可成问题,在一些实施方案中,其中单一分子检测方法依赖于这些特征以鉴别某一类型的分子。举例而言,在一些实施方案中,不一致发射寿命可产生报告与利用一致发射寿命将观察到的信息的单一群组相反的两个单独信息簇的寿命读出。

[0068] 在一些实施方案中,一致发射寿命可涉及保存发射寿命,例如相对于具有少一个标记的经标记反应物具有大约未变化的发射寿命。在一些实施方案中,经多重标记的反应物中标记的发射寿命相对于经单一标记的反应物中的相同标记未变化。如本文所述,在一些实施方案中,增加单一构建体上发光标记的数目以增加亮度可引起发射寿命减少。在一些实施方案中,本公开内容提供使用特定结构限制来改造以将毗邻标记隔开某一最小距离的组合物,该最小距离增加亮度而不影响发射寿命。在一些实施方案中,比较经多重标记的构建体的发射寿命与具有至少少一个发光标记(例如至少少一个相同类型的荧光团染料)的构建体的发射寿命。在一些实施方案中,发射寿命改变大约30%或更少(例如增加或减少少于30%、少于25%、少于20%、少于15%、少于10%、少于5%、少于4%、少于3%、少于2%、少于1%或大约0%)。

[0069] 在一些方面中,本公开内容是关于识别及了解可研发测序反应中的可检测组合物以消除对某些仪器组件的需要,借此将技术移向更紧凑的系统。举例而言,测序仪器通常需要光学过滤器以过滤激发光,从而在传感器引起不期望的检测事件。用于传输期望发光且足够阻挡激光的光学过滤器可为厚的、巨大的、昂贵的且不能耐受光的入射角变化,从而阻止小型化。然而,本发明者认识并了解到,使用具有保存寿命的经明亮标记的反应物可减少对该过滤的需要,或在一些情形下,完全不需要这些过滤器。本文所述明亮反应物允许使用

较小光学功率(例如激发能),此减少散射且因此减少对过滤的需求。

[0070] 本申请的方面提供根据图1A中所示的非限制性图解配置的经明亮标记的反应物,该图绘示两个经由连接体100连接至反应物180的发光标记。如所示,每一发光标记经由间隔体连接至连接体100。在一些实施方案中,间隔体在标记与连接体之间形成共价桥。因此,在一些实施方案中,间隔体既非发光分子的部分,亦非连接体组合物的间隔体部分(例如间隔体不含聚合或寡聚连接体的单体单元)。间隔体的第一端连接至连接体连接位点102,且间隔体的第二端连接至标记连接位点122。在一些实施方案中,连接体连接位点102可接近将间隔体的原子接合至连接体100的原子的共价键的位置。在一些实施方案中,连接体连接位点102发生在连接体100的邻接链内的原子。在一些实施方案中,标记连接位点122可接近将间隔体的原子接合至标记的原子的共价键的位置。在一些实施方案中,标记连接位点122发生在共价结合至间隔体的原子的标记的原子。在一些实施方案中,标记连接位点122发生在共价结合至标记的原子的间隔体的原子。

[0071] 如本文中别处所述,在一些实施方案中,本申请的连接体构建体包含两个或更多个发光标记,其中毗邻发光标记阐述为具有由最小距离 d_A 隔开的连接位点。在一些实施方案中,每一发光标记与下一发光标记隔开最小距离 d_L 。如图1A中所示,在一些实施方案中, d_L 是标记连接位点之间的距离。在一些实施方案中,标记-标记隔开可进一步由每一标记分子的大小指示。因此,在一些实施方案中,发光标记可借由椭圆体或球形体的近似或计算的空间体积112来阐述以测量空间半径 r_1 。在一些实施方案中,发光标记可借由椭圆形或圆形的近似或计算的空间周长来阐述以测量空间半径 r_1 。在一些实施方案中,空间半径(例如 r_1 、 r_2)可计算或近似为发光标记的最长尺寸的一半。举例而言,在一些实施方案中,使用本领域已知的软件或适宜方法将发光标记的化学结构评估为二维或三维结构(例如基于热力学上有利的分子配置),且借由计算二维或三维空间中结构的最长尺寸的一半来测定空间半径(例如 r_1 、 r_2)。在一些实施方案中,标记隔开最小距离 d_L ,条件是合计标记半径(r_1+r_2)使得标记不重叠。

[0072] 在一些实施方案中,如图1B中所图解说明,连接体配置和/或间隔体刚性使得连接位点之间的距离 d_A 可与 d_L (例如如在构建体150中)大约相同。在一些实施方案中,连接体配置和/或间隔体刚性使得连接位点之间的距离 d_A 可小于最小距离 d_L (例如如在构建体152中)。在一些实施方案中,连接体配置和/或间隔体刚性使得连接位点之间的距离 d_A 可大于最小距离 d_L (例如如在构建体154中)。

[0073] 应了解,在一些实施方案中,本文所述概念可使用任何适宜分子支架作为连接体100来执行。在一些实施方案中,连接体是有机化合物。适用作连接体100的有机化合物的实例包括(但不限于)聚苯基、聚炔烃、 α 螺旋模拟物及肽模拟物。

[0074] 在一些实施方案中,连接体100是寡聚物,例如包括单体单元的寡聚连接体。在一些实施方案中,寡聚物包含一或多种类型的单体单元。单体单元的类型可包括(举例而言但不限于)核苷酸(例如核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸及其类似物及衍生物)、氨基酸(例如天然及非天然氨基酸)、单糖及有机化合物(例如含有苯基及炔基的化合物)。在一些实施方案中,寡聚物包含相同类型的单体单元中的一或多个。在一些实施方案中,包括一种类型的单体单元的寡聚物可称作聚合物(例如聚合连接体)。在一些实施方案中,寡聚物包含两种或更多种不同类型的单体单元(例如单体单元的混合物)。

[0075] 在一些实施方案中,寡聚物(例如寡聚连接体或聚合连接体)含有至少5个单体单元。在一些实施方案中,寡聚物含有至少10个单体单元。在一些实施方案中,寡聚物含有至少10个且少于200个单体单元(例如至少10个且少于150个单体单元、至少10个且少于100个单体单元、至少10个且少于50个单体单元、至少10个且少于40个单体单元、至少10个且少于30个单体单元或至少10个且少于20个单体单元)。

[0076] 在一些实施方案中,连接体(例如聚合连接体、寡聚连接体)是多糖。适用作连接体100的多糖的实例为本领域已知(例如如Solid Support Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries, Wiley 2001中所述)。

[0077] 在一些实施方案中,连接体(例如聚合连接体、寡聚连接体)是肽。适用作连接体100的肽的非限制性实例包括(但不限于)寡肽、环状肽及小蛋白(例如基于禽类胰脏肽的微型蛋白,例如Hodges, A.M. 及 Schepartz, A. (2007) J. Am. Chem. Soc. 129: 11024-11025中所述)。将几何限制改造成肽结构的方法为本领域熟知且被设想为尤其可用于(例如)赋予刚性并促进标记分离。举例而言,肽氨基酸序列的脯氨酸含量可经修饰以控制肽形状(例如,参见Kritzer, J.A. 等人(2006) ChemBioChem 7: 29-31)。有用肽改造技术的其他非限制性实例包括肽环化(例如,参见Maltsev, O.V. 等人(2016) Angewandte Chemie 55 (4) : 1535-1539)、经由U形钉和/或H键代用品的 α -螺旋肽限制(例如,参见Douse, C.H. 等人(2014) ACS Chem. Biol. 9: 2204-2209)、经由环状 β 折叠及 β -发夹模拟物的肽限制(例如,参见Gibbs, A.C. 等人(1998) Nat. Struc. Biol. 5: 284-288)。

[0078] 在一些实施方案中,连接体(例如聚合连接体、寡聚连接体)是核酸。在一些方面中,可根据图2A中所示的图解设计经明亮标记的反应物,该图一般地绘示两个连接至核酸构建体的发光标记。如所示,在一些实施方案中,至少一个发光标记210在连接位点202经由间隔体220连接至核酸连接体200。在一些实施方案中,核酸连接体200包含至少两个杂交的寡核苷酸链。在一些实施方案中,核酸连接体200包含至少两个发光标记,其中每一发光标记与下一发光标记隔开最小距离 d_L 。在一些实施方案中,发光标记中的至少二者连接至相同寡核苷酸链,其中每一连接位点与下一连接位点隔开最小距离 d_A 。在一些实施方案中,发光标记经由间隔体连接至寡核苷酸链,其中每一间隔体将给定发光标记与其连接位点隔开最小距离 d_{AL} 。

[0079] 在一些实施方案中,最小距离 d_L 、 d_A 及 d_{AL} 可(例如)使用本领域已知的理论方法(例如计算或其他方式)获得。在一些实施方案中,理论方法可包括考虑到分子结构(例如键长度、键角度及旋转、静电、核酸螺旋性及可代表所论述分子的其他物理因子)的任何方法。在一些实施方案中,距离测量可以实验方式、例如借由结晶学或分光镜方式获得。

[0080] 本公开内容的方面至少部分是关于以下发现:具有核酸连接体的经明亮标记的反应物(例如经标记的核苷酸)可根据以下经设计:

[0081] 式1:

[0082] 式1: $2(d_{AL}) - d_A < 12 \text{ \AA}$,

[0083] 其中 $2(d_{AL}) - d_A$ 可为负值。在一些实施方案中, d_A 大于17埃(\AA)。在一些实施方案中, d_A 为至少17 \AA ,但不大于350 \AA (例如 d_A 介于约17 \AA 与350 \AA 之间,介于约17 \AA 与300 \AA 之间,介于约17 \AA 与250 \AA 之间,介于约17 \AA 与200 \AA 之间,介于约17 \AA

与150 Å之间,介于约17 Å与100 Å之间或介于约17 Å与50 Å之间)。

[0084] 在其他方案中,本公开内容的经标记的核苷酸可根据式2经设计:

[0085] 式2: $2(d_{AL})/d_A < 1$ 。

[0086] 在一些实施方案中, $2(d_{AL})/d_A$ 小于1、较佳小于0.5。在一些实施方案中, $2(d_{AL})/d_A$ 小于0.1。

[0087] 在一些实施方案中,本公开内容的经标记的核苷酸可根据式3经设计:

[0088] 式3: $[2(d_{AL})+LLD]/d_A < 1$,

[0089] 其中LLD是代表最长标记尺寸(LLD)的距离。在一些实施方案中, $[2(d_{AL})+LLD]/d_A$ 小于0.5。在一些实施方案中, $[2(d_{AL})+LLD]/d_A$ 小于0.2。在一些实施方案中, $[2(d_{AL})+LLD]/d_A$ 小于0.1。

[0090] 在一些实施方案中,自发光标记210的近似中心原子至间隔体220所连接的寡核苷酸链上的原子测量最小距离 d_{AL} 。在一些实施方案中,自发光标记210的中心(例如基于发光分子的质量的中心或本领域已知或本文中别处阐述的一些其他方法近似)至间隔体220所连接的寡核苷酸链上的原子测量最小距离 d_{AL} 。在一些实施方案中,最小距离 d_{AL} 测量为间隔体220的长度(例如自连接发光标记210的间隔体220的原子至连接至核酸200的间隔体220的原子测量)。在一些实施方案中,最小距离 d_A 测量为间隔体共价结合的寡核苷酸主链上的原子之间(例如无碱基连接位点的碳原子之间)的距离。在一些实施方案中,最小距离 d_A 测量为寡核苷酸链上经标记的碱基之间(例如碱基连接位点的核碱基上的原子之间)的距离。

[0091] 在一些实施方案中,最小距离 d_L 测量为毗邻发光标记的近似中心原子之间的距离。在一些实施方案中,毗邻发光标记隔开大约6埃的距离 d_L 。在一些实施方案中,距离 d_L 是至少6埃(例如至少6、至少7、至少8、至少9、至少10、至少11或至少12埃)。在一些实施方案中,最小距离 d_L 测量为近似值,在间隔体配置、间隔体柔性或核酸柔性中可能考虑或不考虑其。

[0092] 在其他方案中,本公开内容提供产生发光标记之间的距离 d_L 的一般策略,使得经多重标记的反应物可经改造以具有最大化亮度而不损害发射寿命。在一些实施方案中,足够靠近性的毗邻发光标记可相互作用,使得发生淬灭效应,从而产生减小和/或不一致的发射寿命值。因此,在一些实施方案中,本文提供的一般设计策略可涉及限制毗邻发光标记之间的相互作用程度的结构限制。

[0093] 在一些实施方案中,发光标记可经由放射性和/或非放射性衰变与核酸连接体的鸟嘌呤核碱基相互作用以实现减小和/或不一致的发射寿命。在一些实施方案中,借由使连接位点周围的区中的G/C含量最小化产生发光标记连接位点。因此,在一些实施方案中,连接位点位于寡核苷酸链的富含A/T的区中。在一些实施方案中,每一连接位点与寡核苷酸链上的G或C核苷酸隔开至少2个核苷酸(例如与G或C核苷酸隔开2、3、4、5、6、7、8、9个或超过10个核苷酸)。因此,在一些实施方案中,每一连接位点侧接至少2个选自A或T的连续核苷酸。

[0094] 在某些实施方案中,寡核苷酸链的连接位点之间的距离可由插入未经标记的碱基(例如插入核苷酸)的数目阐述。在一些实施方案中,寡核苷酸链上的连接位点隔开至少5个未经标记的碱基(例如至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个未经标记的碱基)。在一些实施方案中,连接位点隔开6、7、8或9个未经标记的碱基。在一些实施方案中,寡核苷酸链上的连接位点隔开介于5个与100个之间的未经标记的碱基(例如介于5个与80个之间、介

于5个与60个之间、介于5个与40个之间、介于5个与20个之间或介于5个与10个之间的未经标记的碱基)。

[0095] 在一些实施方案中,本文所述设计原理允许向经标记的反应组分中添加连续发光标记用于增加亮度和/或发光强度。在一些实施方案中,本申请的技术提供具有根据式 $L_n(x)$ 的亮度和/或发光强度的经多重标记的反应组分,其中 L_n 等于经标记的反应物上的发光标记的总数目且 x 等于相应经单一标记的反应物的测量的亮度或荧光强度。因此,在一些实施方案中,双染料标记的反应组分的亮度和/或发光强度与单染料标记的类似物相比加倍。在一些实施方案中,三或四染料标记的反应组分分别具有与单染料标记的类似物相比三倍或四倍的亮度和/或发光强度。在一些实施方案中,本文所述经明亮标记的反应物展现由 $L_n(x)$ 所指示的值的至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的亮度和/或发光强度。

[0096] 在一些实施方案中,本文提供的核酸连接体包含具有至少两个发光标记的寡核苷酸链。图2B一般地绘示连接至两个发光标记的单链核酸连接体250。如所示,单链连接体可具有相对高的柔性程度,其可促进标记之间的相互作用。在一些实施方案中,可使用单链连接体构建体借由(例如)利用不相互作用而产生淬灭效应的某些标记(例如基于花青的染料)产生具有一致和/或保存寿命的经明亮标记的反应物。然而,对于若干类别的染料,由于连接体柔性的标记-标记靠近性的促进可产生减小和/或不一致的发射寿命。因此,在一些实施方案中,使经标记的寡核苷酸链与一或多个寡核苷酸链杂交以减小总体核酸连接体柔性。

[0097] 在一些实施方案中,使用链杂交作为一般设计策略以在核酸连接体上的发光标记之间产生适当距离 d_L 。在一些实施方案中,使用链杂交以增加核酸的特定区中(例如经标记的区内和/或隔开经标记的区与反应物的区中)的刚性。图2B一般地绘示双链核酸连接体252,其包括杂交的寡核苷酸链以刚化经标记的区且借此减小原本可促进标记-标记相互作用的链柔性。

[0098] 如由核酸连接体252所说明,在一些实施方案中,在连接点附近的发光标记移动可促进标记-标记靠近性。亦如所示,在一些实施方案中,在连接位点附近的标记移动可产生更紧密靠近核酸连接体的寡核苷酸链的标记。在一些实施方案中,寡核苷酸链可与发光标记相互作用以产生不一致和/或减小的发射寿命测量。因此,在一些实施方案中,本文所述核酸连接体包含具有限制标记-标记和/或连接体-标记相互作用的程度的某些长度、刚性、连接位点和/或配置的间隔体。

[0099] 在一些实施方案中,可在空间体积的上下文中界定发光标记之间的隔开距离,其中标记相对于彼此存在。举例而言,图2B绘示图解说明可如何测量距离 d_L 的实例的图解254。在一些实施方案中,每一发光标记可由空间体积212界定。在一些实施方案中,空间体积212近似为半径 $212-r$ 的球形或其他椭圆形状。在一些实施方案中,每一发光标记包含具有与任何另一标记隔开至少5埃的中心点(例如毗邻标记的中心点隔开至少5埃)的空间体积212。发光标记的中心点可为标记的任何适宜中心,包括(例如)标记的质量中心或几何中心。在一些实施方案中,可借由如图2B中所图解说明计算或近似半径 $212-r$ 测定发光标记的中心点。在一些实施方案中,发光标记的中心点可计算或近似为发光标记的最长尺寸的一半(例如如本文中别处针对图1A的 r_1 及 r_2 所述)。

[0100] 在一些实施方案中,毗邻发光标记之间的距离(d_L)可测量为毗邻发光标记的质量的中心之间的距离。在一些实施方案中,质量中心是指根据其质量称重的发光标记中所有原子的平均位置。计算质量中心的方法为本领域已知(例如,参见Leach, A.R. Molecular Modelling: Principles and Applications (第2版), Prentice-Hall 2001; Guenza, M. (2002) Macromolecules 35 (7): 2714-2722)。

[0101] 在一些实施方案中,毗邻发光标记之间的距离(d_L)可测量为毗邻发光标记的几何中心之间的距离。在一些实施方案中,分子的几何中心是指分子的所有原子(例如发光标记中的所有原子)的平均位置,其中原子未称重。因此,在一些实施方案中,分子的几何中心是指作为分子中的所有原子的坐标的平均值的空间中的点。

[0102] 在一些实施方案中,使用本领域已知的任何适宜方法更精确地计算空间体积212。举例而言,摩尔浓度折射性将包括极性的性质列入作为因子,且可根据以下方程计算:

[0103] 摩尔浓度折射性 = $[(n^2 - 1) / (n^2 + 2)] \times (MW/d)$,

[0104] 其中n=折射率;MW=分子量;且d=密度。

[0105] 在一些实施方案中,标记的空间体积212可以计算方式计算以包括额外和/或更多复杂因子。举例而言,Verloop空间因子基于键角、范德华半径(van der Waals radii)、键长度及可能的配置提供分子的空间尺寸(例如参见Harper, K.C. 等人(2012) Nature Chemistry 4, 366-374)。

[0106] 在一些实施方案中,在隔开距离 d_L 中可考虑发光标记在连接位点附近的移动。如图2B中所示,在一些实施方案中,可基于间隔体长度及标记的空间体积界定标记在每一连接位点附近移动的位置。移动的此理论范围由虚线说明。应了解,在一些实施方案中,本文所述的各种组合物及设计策略可有利地限制移动范围接近所示重叠区的程度。举例而言,在一些实施方案中,间隔体刚性、间隔体长度及连接位点分离可各自根据本公开内容解决以限制标记可能接近重叠区的程度。亦应了解,图解254意欲用于阐释目的,例如这是因为标记不一定需要物理接触以发生放射性和/或非放射性衰变。

[0107] 在一些实施方案中,图解254中绘示的标记的移动范围可通常称作空间体积,例如具有标记可在给定时间点在空间中的点存在的改变机率的区的空间区域。在一些实施方案中,每一标记占据实质上不与任何另一发光标记重叠的空间体积。在一些实施方案中,每一标记占据实质上不含任何另一标记的空间体积。

[0108] 在一些实施方案中,可考虑双链连接体的螺旋结构设计发光标记的相对连接位点。图2C绘示具有隔开距离x的两个标记的核酸260的实例。核酸262(按比例近似绘制)在相隔为核酸260大约一半的碱基的连接位点连接至两个发光标记,但沿着螺旋的相对连接位点位置导致穿过空间的标记隔开距离为大约2x。如所示,在一些实施方案中,核酸连接体可借由用作标记之间的立体障碍进一步限制标记之间的放射性和/或非放射性衰变程度。

[0109] 在一些实施方案中,术语「立体障碍」是指连接体或一部分连接体(例如核酸连接体或其部分),位于连接至连接体的发光标记与连接体的一些其他连接之间。不期望受限于理论,据信立体障碍可吸收、偏转或以其他方式阻挡由发光标记发射的放射性和/或非放射性衰变。在一些实施方案中,立体障碍防止或限制一或多个发光标记与一或多个其他发光标记相互作用的程度。在一些实施方案中,立体障碍防止或限制一或多个发光标记与一或多种反应物相互作用的程度。在一些实施方案中,立体障碍防止或限制一或多个发光标记

与一或多个与反应物相关的分子(例如结合至反应物的聚合酶)相互作用的程度。因此,在一些实施方案中,术语立体障碍可通常指由核酸连接体的一些部分提供的保护或遮蔽效应。

[0110] 在一些实施方案中,一或多个结构基序可用作立体障碍。举例而言,在一些实施方案中,由双链核酸连接体形成的螺旋用作立体障碍。在一些实施方案中,茎环或其部分(例如茎、环)用作立体障碍。在一些实施方案中,三向接点(例如在具有两个或更多个茎环的核酸中)用作立体障碍。在一些实施方案中,无连接的杂交链(例如支撑链)用作立体障碍。在一些实施方案中,间隔体用作立体障碍。

[0111] 在一些实施方案中,本文所述经明亮标记的反应物可隔开发光标记与反应物。在一些实施方案中,核酸264包含核苷多磷酸280反应物,其在合成反应中用作聚合酶290的底物。在一些实施方案中,接近聚合酶活性位点的标记可诱导聚合酶光损害(例如经由非放射性衰变或其他方式),其可对聚合酶活性有害。如所示,核酸266连接至反应物,使得连接体的至少一部分在标记与反应物间的插入区中。因此,在一些实施方案中,核酸连接体可用作立体障碍以进一步保护聚合酶免于标记诱导的光损害。在一些实施方案中,此聚合酶保护效应可经由标记-反应物空间分离和/或在标记与反应物之间存在立体障碍而发生。聚合酶保护进一步详细阐述于同在审查中的美国专利申请第15/600,979号中,其全文内容以引用方式并入本文中。

[0112] 在一些实施方案中,核酸连接体的大小及形态(例如核酸连接体的一或多个寡核苷酸链和/或一或多个间隔体)决定发光标记与核苷多磷酸间的距离。在一些实施方案中,距离是约1nm或2nm至约20nm。举例而言,超过2nm、超过5nm、5-10nm、超过10nm、10-15nm、超过15nm、15-20nm、超过20nm。然而,发光标记与核苷多磷酸间的距离不可太长,因为某些检测技术要求发光标记是在欲激发的界定照度内(例如当核苷多磷酸保持在聚合酶的活性位点内时)。因此,在一些实施方案中,整体距离小于30nm、小于25nm、约20nm或小于20nm。

[0113] 在一些实施方案中,可执行本文所述组合物的其他特征以促进标记-反应物分离以最小化标记诱导的光损害的潜能,例如间隔体长度、间隔体刚性、连接位点位置。在一些实施方案中,与本文所述核酸连接体的反应物连结性可相对于发光标记经修饰以促进标记-反应物分离。图3A一般地绘示具有相同链或相反链标记-反应物链接性的核酸连接体。在一些实施方案中,核酸300包含连接至相同寡核苷酸链的两个或更多个发光标记及反应物。在一些实施方案中,相同链链接性在标记与反应物之间产生共价连接。

[0114] 在一些实施方案中,核酸302包含连接至不同寡核苷酸链的两个或更多个发光标记及反应物。在一些实施方案中,相反链链接性在标记与反应物之间产生非共价连接。在一些实施方案中,标记与反应物的相反链链接性经由标记连接的寡核苷酸链与反应物连接的寡核苷酸链的杂交发生。如所示,在一些实施方案中,本公开内容的核酸连接体包含标记-反应物隔开距离 d_{LR} 。在一些实施方案中, d_{LR} 是反应物与最近发光标记之间的距离。在一些实施方案中, d_{LR} 是自标记连接位点至反应物连接位点测量。在一些实施方案中, d_{LR} 是自标记的发光分子至反应物测量。在一些实施方案中, d_{LR} 是至少1nm。在一些实施方案中, d_{LR} 介于约1nm至约10nm(例如大约1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm或超过10nm)。在一些实施方案中, d_{LR} 介于约2nm至约30nm(例如介于约2nm与25nm之间、介于约2nm与20nm之间、介于约2nm与15nm之间、介于约2nm与10nm之间、介于约2nm与5nm之间、介于约5nm与

10nm之间、介于约10nm与20nm之间、介于约5nm与30nm之间、介于约15nm与30nm之间或介于约20nm与30nm之间)。

[0115] 图3B绘示经明亮标记的反应物的设计中所用的非限制性距离规格的实例。在一些实施方案中,核酸连接体304经由相同链连结性连接至两个发光标记及核苷六磷酸(例如反应物)。在一些实施方案中,如所示, d_L 是大约1nm且 d_{LR} 是大约7nm。在一些实施方案中,本公开内容的经明亮标记的反应物包含超过两个发光标记。举例而言,在一些实施方案中,核酸连接体306经由相同链连结性连接至三个发光标记及核苷六磷酸(例如反应物)。如所示,在一些实施方案中,具有在超过两个连接位点连接的超过两个发光标记的构建体将必需具有超过一个隔开距离 d_L 。在一些实施方案中,可根据本文中的说明独立地设计单一构建体上的每一隔开距离 d_L 。在一些实施方案中,每一标记隔开距离 d_L 可设计为大约相同。举例而言,在一些实施方案中,各隔开距离 d_L 是大约3.5nm且 d_{LR} 是大约7nm。

[0116] 在一些实施方案中,本申请的经明亮标记的反应物包含两个或更多个经由不同寡核苷酸链连接的发光标记。举例而言,在一些实施方案中,核酸连接体308包含四个经由单独寡核苷酸链连接的发光标记。在一些实施方案中,核酸连接体308的未经标记的寡核苷酸链包含与连接至两个发光标记及核苷多磷酸的第一寡核苷酸链互补的第一部分。未经标记的寡核苷酸链进一步包含与连接至两个发光标记的第二寡核苷酸链互补的第二部分。如所示,在一些实施方案中,每一经标记的链内的发光标记连接位点隔开9个核苷酸。在一些实施方案中,非邻接标记的链上的最近连接位点之间的隔开可相同或不同(例如如由10个核苷酸隔开所示)。

[0117] 具有相同链标记-反应物链接性的非限制性一般核酸连接体304用于产生图3C中所示的经标记的核苷多磷酸的基础。如所示,图3C的核酸连接体包含两个杂交的寡核苷酸链。根据本公开内容的某些实施方案,两个发光标记在连接体的第一寡核苷酸链内的无碱基位点连接。如本文中别处阐述为一般连接策略的点击化学技术用于将核苷多磷酸连接至相同寡核苷酸链。根据本文所述理论使第二寡核苷酸链与第一链杂交以促进连接的组分的限制空间配置。图3C的构建体成功地用于利用其他经标记的核苷多磷酸的单一分子测序运行(图3D)。产生具有相反链连结性的类似设计的构建体且示于图3E中。

[0118] 图3E绘示非共价连接核苷多磷酸(例如反应物)与发光标记的核酸连接体的实例性结构。如所示,使在无碱基连接位点连接至两个发光标记的第一寡核苷酸链与在末端连接位点连接至核苷六磷酸的第二寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,涵盖本发明中提供用以产生经明亮标记的反应物的设计策略以包括替代标记偶联策略,例如整合至连接体中(例如整合至寡聚或聚合连接体中,例如寡核苷酸链)的标记。举例而言,图3F绘示具有两个在寡核苷酸链内连接的标记的核酸连接体的实例。

[0119] 如图3F中所示,在一些实施方案中,经明亮标记的反应物包含在寡核苷酸链内(例如整合至链中)连接的两个发光标记。在一些实施方案中,这些偶联策略可利用不经由放射性和/或非放射性衰变相互作用的发光分子(例如基于花青的染料(例如如图3F的加框区域中所示))执行。在一些实施方案中,在寡核苷酸链内连接的发光分子的数目可仅受寡核苷酸链的大小限制。因此,在一些实施方案中,经明亮标记的反应物包含超过两个在寡核苷酸链内连接的发光标记(例如2个、3个、4个、5个、6个或超过6个发光标记)。图3F中所绘示的构建体成功地用于利用三个其他经明亮标记的核苷多磷酸的测序运行(图3G)。

[0120] 在一些方面中,本公开内容是关于以下发现:核酸连接体可经改造以具有结构受限的配置,其为具有一致和/或保存发射寿命的经明亮标记的反应物提供支架。如本文所述,在一些实施方案中,寡核苷酸链杂交是一种促进出于标记隔开的目的限制配置的一般策略。在一些实施方案中,寡核苷酸链杂交涉及不同寡核苷酸链的杂交。在一些实施方案中,寡核苷酸链杂交涉及自链杂交(例如单一链内的自杂交)。在一些实施方案中,自链杂交可限制核酸连接体柔性,如本文中别处关于单独链杂交所述。在一些实施方案中,自链杂交用于形成核酸连接体中的一或多个茎环结构。

[0121] 茎环或发夹环是当寡核苷酸链折叠并与同一链的另一部分形成碱基对时形成的寡核苷酸链上的核苷酸的未配对环。在一些实施方案中,茎环的未配对环包含3个至10个核苷酸。因此,茎环可由具有杂交形成茎的反向互补序列的寡核苷酸链的两个区形成,其中两个区隔开3个至10个形成未配对环的核苷酸。在一些实施方案中,茎可经设计以具有一或多个G/C核苷酸,与A/T核苷酸相比,其可利用形成的额外氢键结相互作用提供额外稳定性。在一些实施方案中,茎包含紧密毗邻未配对环序列的G/C核苷酸。在一些实施方案中,茎包含与未配对环序列毗邻之前2个、3个、4个或5个核苷酸内的G/C核苷酸。

[0122] 在一些实施方案中,茎环核酸连接体的未配对环包含一或多个发光标记。因此,在一些实施方案中,一或多个标记连接位点存在于未配对环中。在一些实施方案中,连接位点发生在未配对环中的无碱基位点。在一些实施方案中,连接位点发生在未配对环的碱基。在一些实施方案中,例如由于利用鸟嘌呤观察到的淬灭效应,环包含富含A/T/U的序列,如本文中别处所述。在一些实施方案中,连接位点发生在未配对环中的A、T或U核苷酸。在一些实施方案中,至少四个连续A、T或U核苷酸发生在连接位点的任一侧上。在一些实施方案中,未配对环包含少于33%的G/C含量(例如少于30%、少于20%、少于10%或0%的G/C含量)。

[0123] 在一些实施方案中,发光标记连接至茎环的未配对环(例如标记连接位点发生在环内)。举例而言,图4A一般地绘示具有茎环核酸连接体400的经标记的反应物的实例。如所示,在一些实施方案中,第一寡核苷酸链410自杂交以形成茎环。在一些实施方案中,寡核苷酸链的自杂交部分形成茎环的茎412。在一些实施方案中,自链杂交可形成茎环的环414(例如未配对环)。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链410进一步与连接至反应物的第二寡核苷酸链420杂交。因此,在一些实施方案中,茎环核酸连接体经由相反链连结性非共价链接发光标记至反应物。应了解,在一些实施方案中,连接至发光标记的自杂交寡核苷酸链(例如具有茎环的链)可经由相同链连结性连接至一或多种反应物。

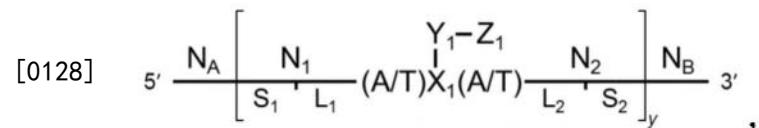
[0124] 在一些实施方案中,两个或更多个发光标记连接至茎环核酸连接体。举例而言,在一些实施方案中,茎环核酸连接体402连接至两个发光标记。如所示,在一些实施方案中,两个发光标记的连接位点发生在茎环的环内。在一些实施方案中,由自杂交茎区提供的稳定性产生具有相对低程度的柔性的环区。在一些实施方案中,未配对环内的发光标记连接位点可经设计以促进有利的标记-标记空间分离和/或有利的标记-反应物空间分离。由非限制性茎环核酸连接体402提供的实例绘示彼此隔开近似环的直径的距离的标记连接位点。在一些实施方案中,此设计可最大化经由空间的标记-标记分离。在一些实施方案中,此设计经由由环提供的立体障碍效应进一步限制标记-标记相互作用的程度,如本文中别处所述。在一些实施方案中,茎环核酸连接体包含两个或更多个茎环(图4B)。

[0125] 如图4B中所示,在一些实施方案中,茎环核酸连接体404包含两个茎环。在一些实

施方案中,两个茎环的形成产生具有Y形的核酸连接体,使得形成三向接点410。在一些实施方案中,由于自这些特征产生的相对稳定性及几何限制配置,涵盖三向接点作为一般设计策略。在一些实施方案中,茎环核酸连接体404包含一个连接至每一环的发光标记。在一些实施方案中,茎环核酸404经由相反链连结性非共价链接发光标记及反应物,例如,连接至第一寡核苷酸链的一或多个标记与连接至一或多种反应物的第二寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,茎环核酸406经由相同链链接性链接发光标记及反应物(例如一或多个标记及一或多种反应物连接至相同寡核苷酸链)。茎环核酸406绘示具有三向接点的经明亮标记的反应物的设计中所用的非限制性距离规格的实例。举例而言,这些近似距离用作产生图4C中所示的经标记的核苷多磷酸的基础。图4C的构建体成功地用于利用其他经标记的核苷多磷酸的单一分子测序运行(图4D)。

[0126] 在一些实施方案中,一或多个发光标记连接至茎环的茎。在一些实施方案中,核酸连接体的茎环不包含发光标记。在一些实施方案中,核酸连接体的茎环包含茎内的未配对区(例如「凸环」)。在一些实施方案中,在核酸连接体中包括一或多个未经标记的结构基序(例如茎环)(例如在核酸连接体上的位置中,使得其介于一或多个发光标记与一或多种核苷多磷酸之间)。在这些实施方案中,一或多个未经标记的结构基序可提供立体障碍效应,如本文中别处所述。

[0127] 在一些实施方案中,茎环核酸连接体包含连接至发光标记的第一寡核苷酸链。在一些实施方案中,发光标记在第一寡核苷酸链上的连接位点经由间隔体连接。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链形成具有茎及环(例如未配对环)的茎环二级结构。在一些实施方案中,环包含连接位点。在一些实施方案中,核酸连接体包含与第一寡核苷酸链杂交的第二寡核苷酸链。在一些实施方案中,第二寡核苷酸链连接至核苷多磷酸。在一些实施方案中,核苷多磷酸经由间隔体连接至第二寡核苷酸链。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链具有以下结构:



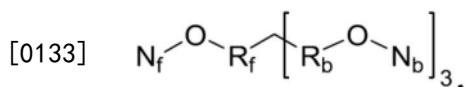
[0129] 其中 N_A 及 N_B 各自是5至40个独立地选自A、U、T、G及C的核苷酸的连续序列,其中第二寡核苷酸链与 N_A 的5'部分或 N_B 的3'部分杂交;括号表示形成y个茎环的区,每一茎环具有茎及环,其中y是1至3; N_1 及 N_2 各自是5至20个独立地选自A、U、T、G及C的核苷酸的连续序列,其中: $N_1(S_1)$ 的5'部分及 $N_2(S_2)$ 的3'部分反向互补或部分反向互补且能彼此杂交以形成茎基序;当 S_1 及 S_2 杂交形成茎基序时, $N_1(L_1)$ 的3'部分、 $N_2(L_2)$ 的5'部分及插入区形成环基序;(A/T)是选自A、T及U的核苷酸; X_1 是第二寡核苷酸链上的连接位点; Y_1 是第一连接体;且 Z_1 是发光标记。

[0130] 如本文所述,本公开内容的方面是关于用于连接一或多个发光标记至一或多种反应物(例如一或多种核苷多磷酸)的几何受限连接体配置。在一些实施方案中,几何受限配置是指具有两个或更多个发光标记的核酸连接体,其中发光标记在空间由对称配置隔开。在一些方面中,本公开内容的经明亮标记的反应物包含类似如图5A中绘示的树状配置的核酸连接体。在一些实施方案中,树状连接体500包含连接至反应物(例如核苷多磷酸)的参标记的核酸连接体。如所示,在一些实施方案中,树状连接体500包含三种主要寡核苷酸组分。

在一些实施方案中,第一寡核苷酸组分510包含经由具有支链连接体共价连接的四个寡核苷酸链。在一些实施方案中,组分510的三个寡核苷酸链各自连接至发光标记(例如经由本文所述末端连接或另一偶联策略)。因此,在一些实施方案中,组分510的三个标记的寡核苷酸链通常称作组分510的经标记部分。在一些实施方案中,组分510的四个寡核苷酸链未经标记。在一些实施方案中,四个寡核苷酸链与第二寡核苷酸组分520杂交。在一些实施方案中,核酸连接体500的第二寡核苷酸组分520连接至反应物(例如经由本文所述末端连接或另一偶联策略)。在一些实施方案中,第三寡核苷酸组分530与组分510的经标记部分的三个寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,第三寡核苷酸组分530称为支撑链,这是因为其与组分510的杂交在经标记的区中提供结构刚性以促进发光标记的空间分离。

[0131] 如应了解,本文所述连接体设计策略中的任一个可应用于由本公开内容涵盖的树状核酸连接体或任何另一核酸连接体配置(例如链连接性、间隔体性质及间隔体配置、标记-标记分离、标记-反应物分离、三向接点等)。树状核酸502绘示具有树状核酸连接体的经明亮标记的反应物的设计中所用的非限制性距离规格的实例。作为阐释性实例,这些近似距离用作产生图5B中所示的经标记的核苷多磷酸的基础。如所示,在一些实施方案中,树状核酸可包含超过一种反应物(例如两种核苷多磷酸或超过两种核苷多磷酸)。

[0132] 在一些实施方案中,在包含具有反应物的杂交部分的第一及第二寡核苷酸链方面阐述树状核酸连接体。举例而言,在一些实施方案中,树状核酸连接体包含在第一寡核苷酸的末端经由偶联化合物(例如具有支链偶联剂)连接至两个或更多个分支寡核苷酸链的第一寡核苷酸链。在一些实施方案中,每一分支寡核苷酸链连接至发光标记。在一些实施方案中,第一寡核苷酸链与连接至反应物(例如核苷多磷酸)的第二寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,第三寡核苷酸链(例如第三寡核苷酸组分)与两个或更多个分支寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,偶联化合物具有以下结构:



[0134] 其中 N_f 是第一寡核苷酸链; N_b 是分支寡核苷酸链; R_f 及 R_b 各自彼此独立地是键或选自由以下组成的组的连接基团:经取代或未经取代的亚烷基;经取代或未经取代的亚烯基;经取代或未经取代的亚炔基;经取代或未经取代的亚杂烷基;经取代或未经取代的亚杂烯基;经取代或未经取代的亚杂炔基;经取代或未经取代的亚杂环基;经取代或未经取代的亚碳环基;经取代或未经取代的亚芳基;经取代或未经取代的亚杂芳基;及其组合;且各 O 是毗邻寡核苷酸链的5'磷酸基或3'羟基的氧原子。

[0135] 在一些方面中,本公开内容提供明亮经标记的反应物,该明亮经标记反应物具有星状核酸连接体。如图6A中所示,星状核酸连接体可以提供以下:在该连接体的外部区域的对称排列的反应物及更接近配置核心区的一或多个发光标记。以此方式,在一些实施方案中,反应物可更易于与(例如)聚合酶反应。在一些实施方案中,核心区附近的发光标记连接位点周围的核苷酸含量是根据本文所述规格选择(例如低G/C含量以避免标记与连接体之间的淬灭效应)。在一些实施方案中,星状核酸连接体600包含Y形寡核苷酸组分,其具有三个经由具有支链连接体连接的寡核苷酸链。在一些实施方案中,Y形寡核苷酸组分的三个寡核苷酸链中的每一个连接(例如在末端)至反应物。在一些实施方案中,Y形寡核苷酸组分的三个寡核苷酸链中的每一个与寡核苷酸链杂交。在一些实施方案中,杂交寡核苷酸链中的

一个连接至发光标记。在一些实施方案中,然而,杂交寡核苷酸链中的二者或三者各自连接至发光标记。

[0136] 在一些实施方案中,星状核酸连接体的Y形寡核苷酸组分连接至超过三种反应物。举例而言,在一些实施方案中,具有星状核酸连接体602的经明亮标记的反应物在Y形寡核苷酸组分的两个寡核苷酸链中的每一个包含两种反应物。在一些实施方案中,该两种反应物连接至可与未经标记的链进行杂交的Y形寡核苷酸组分的链,如所示。

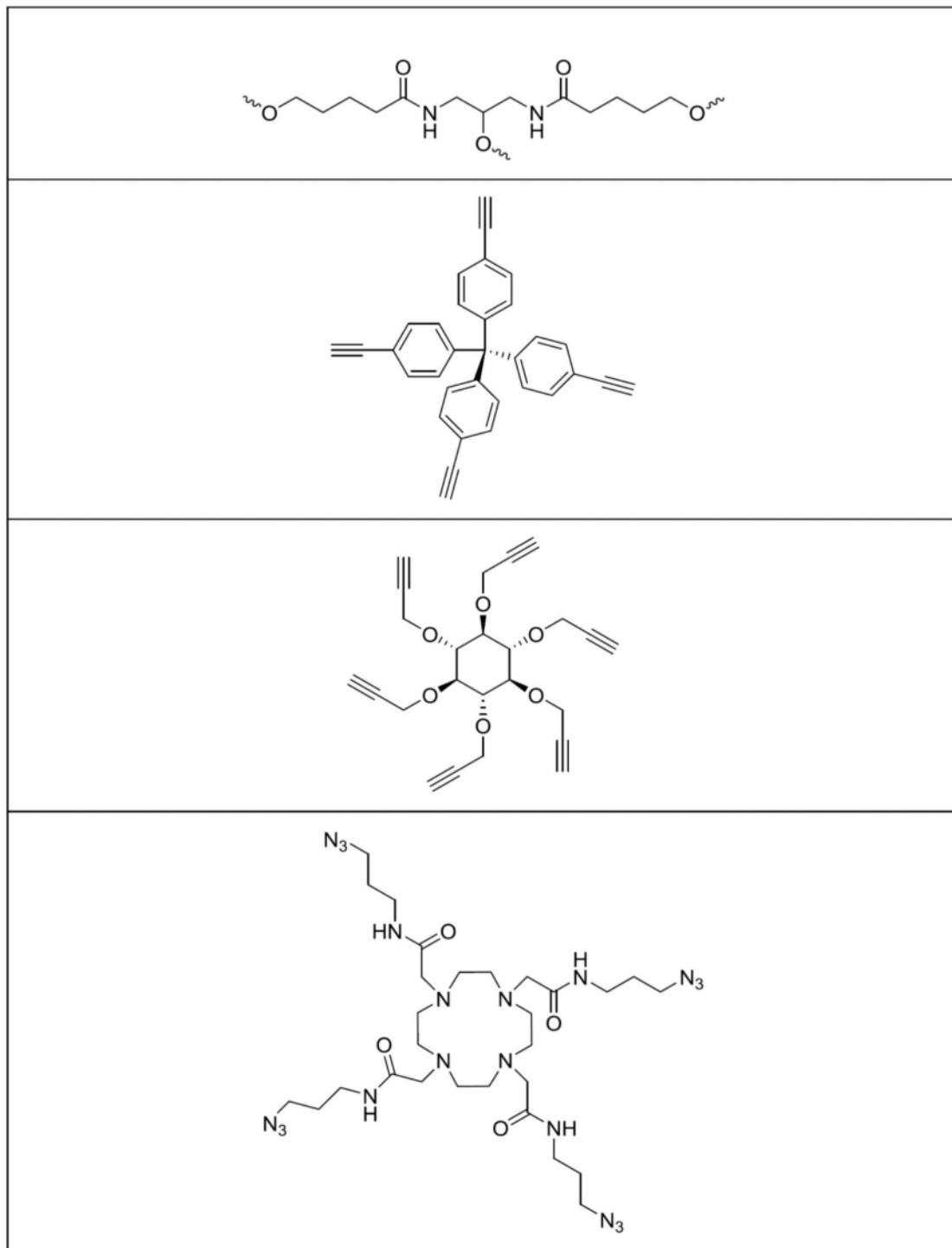
[0137] 在一些实施方案中,星状核酸连接体包含经标记的寡核苷酸组分及反应物寡核苷酸组分,其中每一寡核苷酸组分包含Y形寡核苷酸。举例而言,在一些实施方案中,星状核酸连接体604包含连接至三个发光标记的第一Y形寡核苷酸组分。在一些实施方案中,每一发光标记连接至第一Y形组分的每一寡核苷酸链。在一些实施方案中,如所示,每一发光标记在第一Y形寡核苷酸组分的核心区附近连接。在一些实施方案中,星状核酸连接体604与连接至三种反应物的第二Y形寡核苷酸组分杂交。在一些实施方案中,每一反应物连接至第二Y形组分的每一寡核苷酸链。在一些实施方案中,如所示,每一反应物是连接在第一Y形寡核苷酸组分的外部区(例如经由末端连接位点)。星状核酸606绘示具有星状核酸连接体的经明亮标记的反应物的设计中所用的非限制性距离规格的实例。具有根据本公开所产生的星状核酸连接体的经明亮标记的反应物的实例性结构示于图6B中。

[0138] 在一些实施方案中,可在连接体的Y形寡核苷酸组分中所用的共价偶联化合物方面阐述星状核酸连接体。举例而言,在一些实施方案中,具有星状核酸连接体的经明亮标记的反应物包含含有三个或更多个自共价偶联化合物延伸的寡核苷酸链的第一寡核苷酸组分。在一些实施方案中,寡核苷酸链中的至少一个连接至反应物(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,第一寡核苷酸组分的寡核苷酸链中的两者或更多个(例如2、3、4、5或更多个)各自连接至一或多种反应物。在一些实施方案中,第一寡核苷酸组分与第二寡核苷酸组分杂交。在一些实施方案中,第二寡核苷酸组分包含至少一个连接至发光标记的寡核苷酸链。在一些实施方案中,第二寡核苷酸组分包含三个或更多个自共价偶联化合物延伸的寡核苷酸链。在一些实施方案中,第二寡核苷酸组分的寡核苷酸链中的两者或更多个(例如2、3、4、5或更多个)各自连接至发光标记。

[0139] 在一些方面中,本公开内容的经明亮标记的反应物包含具有四面体核的核酸连接体。如由图6C的实例性结构所阐释,四面体核是指促进一或多个发光标记及一或多种核苷多磷酸的对称受限的空间排列的四向共价偶联化合物。图6D绘示可用于合成图6C中所示的实例性结构的反应方案的实例。在一些实施方案中,涵盖四面体核用于与本文所述经明亮标记的反应物设计策略中的一或多个中的任一个组合。作为实例,由四面体核提供的对称受限的益处是利用本文所述三向接点执行以产生图6E中所示的经明亮标记的反应物。如所示,在一些实施方案中,在三向接点处或其附近连接发光标记可有利地提供空间效应,如本文中别处所述。

[0140] 在一些实施方案中,本公开内容涵盖使用允许对称连接的核化学偶联剂的其他对称受限的配置。在一些实施方案中,例如,经明亮标记的反应物包含基于环糊精的核。产生具有三向接点的基于环糊精的核酸连接体的实例是合成方案示于图7中。环糊精偶联化合物的实例性结构提供于表1中,连同可用于根据本文所述实施方案的三个或更多个寡核苷酸链的共价键联的其他偶联化合物的实例。

[0141] 表1. 用于连接寡核苷酸链的偶联化合物的实例



[0143] 间隔体

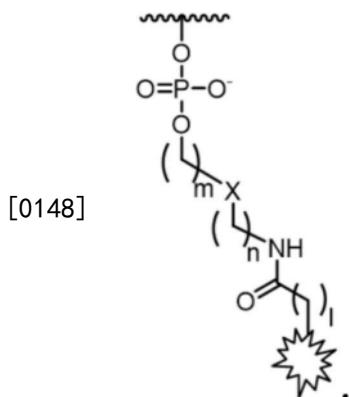
[0144] 如本文所述,在一些实施方案中,发光标记和/或反应物可经由间隔体连接至核酸连接体。在一些实施方案中,间隔体在连接位点连接至核酸连接体的寡核苷酸链。在一些实施方案中,连接位点发生在寡核苷酸链上的末端位点(例如5'或3'端)。末端连接位点的实例提供于本申请中,例如如图3C、3E、4C、6B、6C、8、9及10(核苷酸的末端连接)及图5B、9及10(发光标记的末端连接)中所示。在一些实施方案中,连接位点发生在寡核苷酸链内的无碱基位点(例如无核苷酸但毗邻核苷酸的位点)。无碱基连接位点的实例提供于本申请中,

例如如图3C、3E、6B、6C及8(发光标记的无碱基连接)中所示。在一些实施方案中,连接位点发生在寡核苷酸链上的碱基位点(例如连接至核苷酸,例如链上的核苷酸的核碱基、糖或磷酸)。碱基连接位点的实例提供于本申请中,例如如图4C及8(发光标记的碱基连接)中所示。

[0145] 在一些实施方案中,间隔体包含多个胸苷核苷酸。在一些实施方案中,间隔体包含具支链间隔体,例如具支链胸苷间隔体。在一些实施方案中,具支链间隔体包含具支链胸苷间隔体。举例而言,在一些实施方案中,每一核苷多磷酸包含式Nu-T(T)_nT-R的胸苷间隔体,其中Nu代表核苷多磷酸,T代表胸苷核苷酸,n是值介于1与30的间的整数,且R代表连接一或多种额外核苷多磷酸的汇聚点。在一些实施方案中,汇聚点进一步直接连接至核酸的寡核苷酸链。在一些实施方案中,汇聚点进一步(例如)经由其他胸苷连接体和/或其他汇聚点非直接连接至寡核苷酸链。具支链胸苷间隔体的实例示于图5B中,其绘示具有胸苷间隔体及进一步直接连接至寡核苷酸链的汇聚点的两个核苷多磷酸。

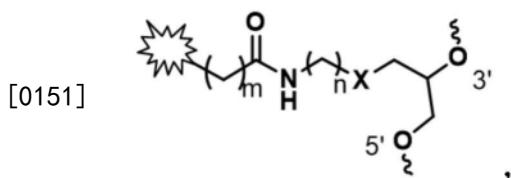
[0146] 在一些实施方案中,间隔体含有一或多个汇聚点,以使两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)核苷多磷酸链接至每一发光标记,两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)发光标记链接至每一核苷多磷酸或两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)核苷多磷酸连接至两个或更多个(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)发光标记。

[0147] 在一些实施方案中,间隔体在核酸连接体的寡核苷酸链上的末端位点连接。在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链的5'或3'端经由下文所示一般间隔体连接:



[0149] 其中 \star 是发光标记(或在替代实施方案中,反应物); $m>1$; $n>1$;且 $m+n<10$ 。

[0150] 在一些实施方案中,间隔体在核酸连接体的寡核苷酸链内的内部无碱基位点连接。在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链上的内部无碱基位点经由下文所示的一般间隔体连接:

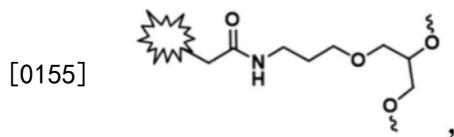


[0152] 其中 \star 是发光标记(或在替代实施方案中,反应物); $n>1$;且 $X=CH_2$ 或0。

[0153] 用于发光标记连接(例如经由末端、内部无碱基或碱基连接位点)的间隔体的实例

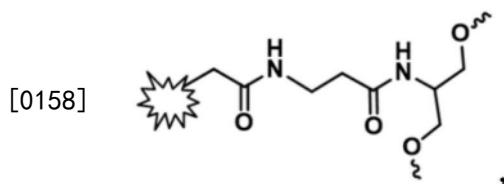
提供于表2中且示于下文中。尽管间隔体结构可显示具有发光标记,但应了解,在一些实施方案中,反应物可经取代使得本文提供的间隔体结构中的任一个可用于连接反应物(例如核苷多磷酸)至核酸连接体。

[0154] 在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链上的内部无碱基位点经由下文所示甘醇酰胺(glycolamine)间隔体连接:



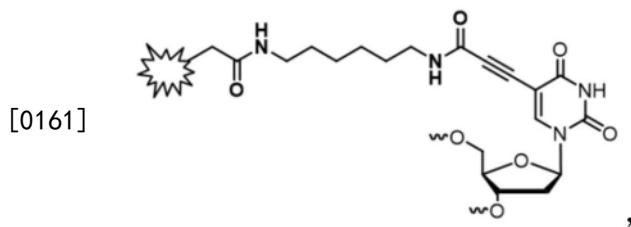
[0156] 其中[☆]是发光标记(或在替代实施方案中,反应物)。

[0157] 在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链上的内部无碱基位点经由下文所示的丝氨酸酰胺间隔体连接:



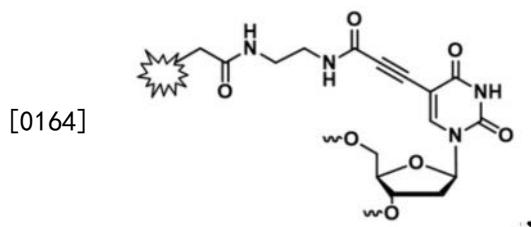
[0159] 其中[☆]是发光标记(或在替代实施方案中,反应物)。

[0160] 在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链上的内部碱基位点经由下文所示的C6-氨基-T间隔体连接:



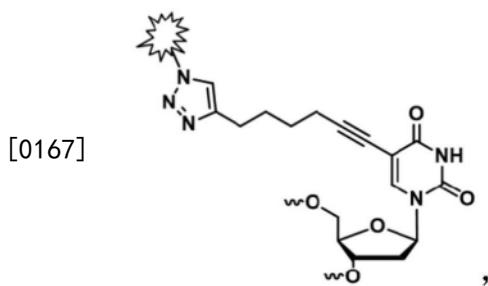
[0162] 其中[☆]是发光标记(或在替代实施方案中,反应物)。

[0163] 在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链上的内部碱基位点经由下文所示的C2-氨基-T间隔体连接:



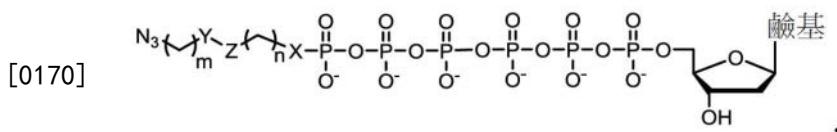
[0165] 其中[☆]是发光标记(或在替代实施方案中,反应物)。

[0166] 在一些实施方案中,发光标记和/或反应物在寡核苷酸链上的内部碱基位点经由下文所示的C8-炔烃-dT间隔体连接:



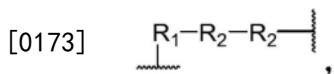
[0168] 其中[☆]是发光标记(或在替代实施方案中,反应物)。

[0169] 在一些实施方案中,一或多个发光标记和/或一或多种反应物(例如一或多种核苷多磷酸)可使用本领域已知的化学偶联技术连接至核酸连接体。举例而言,在一些实施方案中,点击化学基于(例如铜催化的、应力促进的、无铜的点击化学等)可用于连接一或多个发光标记及一或多种核苷多磷酸至核酸。在一些实施方案中,根据下文所示的一般结构经由叠氮化物偶联的dN6P(例如dN6P—N₃)使核苷多磷酸偶联至核酸连接体:



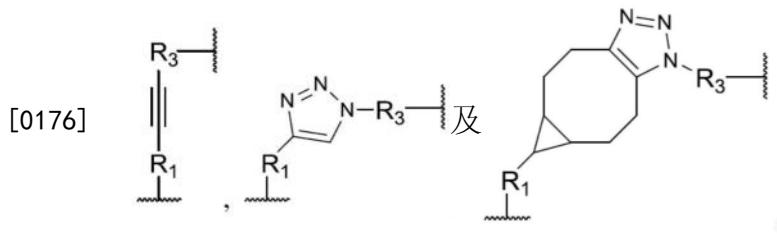
[0171] 其中碱基是选自腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶及其衍生物的核碱基;—Y—Z—=—CH₂CH₂—、—CONH—或—NHC0—;及X=NH或0。举例而言,在一些实施方案中,在铜催化的反应中借由使dN6P—N₃或染料—N₃的叠氮化物与炔烃偶联的核酸连接体的末端炔烃在适宜反应条件下接触以在核酸连接体与dN6P或染料之间形成三唑键联使叠氮化物偶联的dN6P(例如dN6P—N₃)和/或叠氮化物偶联的发光标记(例如染料—N₃)连接至核酸连接体。在一些实施方案中,在无铜的反应中借由使dN6P—N₃或染料—N₃的叠氮化物与环辛炔偶联的核酸连接体的内部炔烃在适宜反应条件下接触以在核酸连接体与dN6P或染料之间形成多环键联使叠氮化物偶联的dN6P(例如dN6P—N₃)和/或叠氮化物偶联的发光标记(例如染料—N₃)连接至核酸连接体。核酸连接体的环辛炔修饰可使用适于产生本领域已知的无铜的点击化学部分的环辛炔试剂来完成。举例而言,环辛炔修饰的核酸连接体是借由使适宜环辛炔试剂(例如(1R,8S,9s)-N-琥珀酰亚氨基碳酸二环[6.1.0]壬-4-炔-9-基甲基酯)与核酸连接体的末端胺接触来制备。

[0172] 因此,在一些实施方案中,间隔体包括偶联基团(例如BCN、四嗪、四唑及经由适于点击反应及类似偶联反应的反应性部分的偶联产生的其他产物)。在一些实施方案中,间隔体借由下式:



[0174] 其中R₁是第一连接基团且连接至第一寡核苷酸链上的连接位点;R₂是第二连接基团且包含在所实施偶联反应中形成的偶联部分以共价接合R₁及R₃;且R₃是第三连接基团且连接至发光标记。

[0175] 在一些实施方案中,间隔体具有选自以下的式:

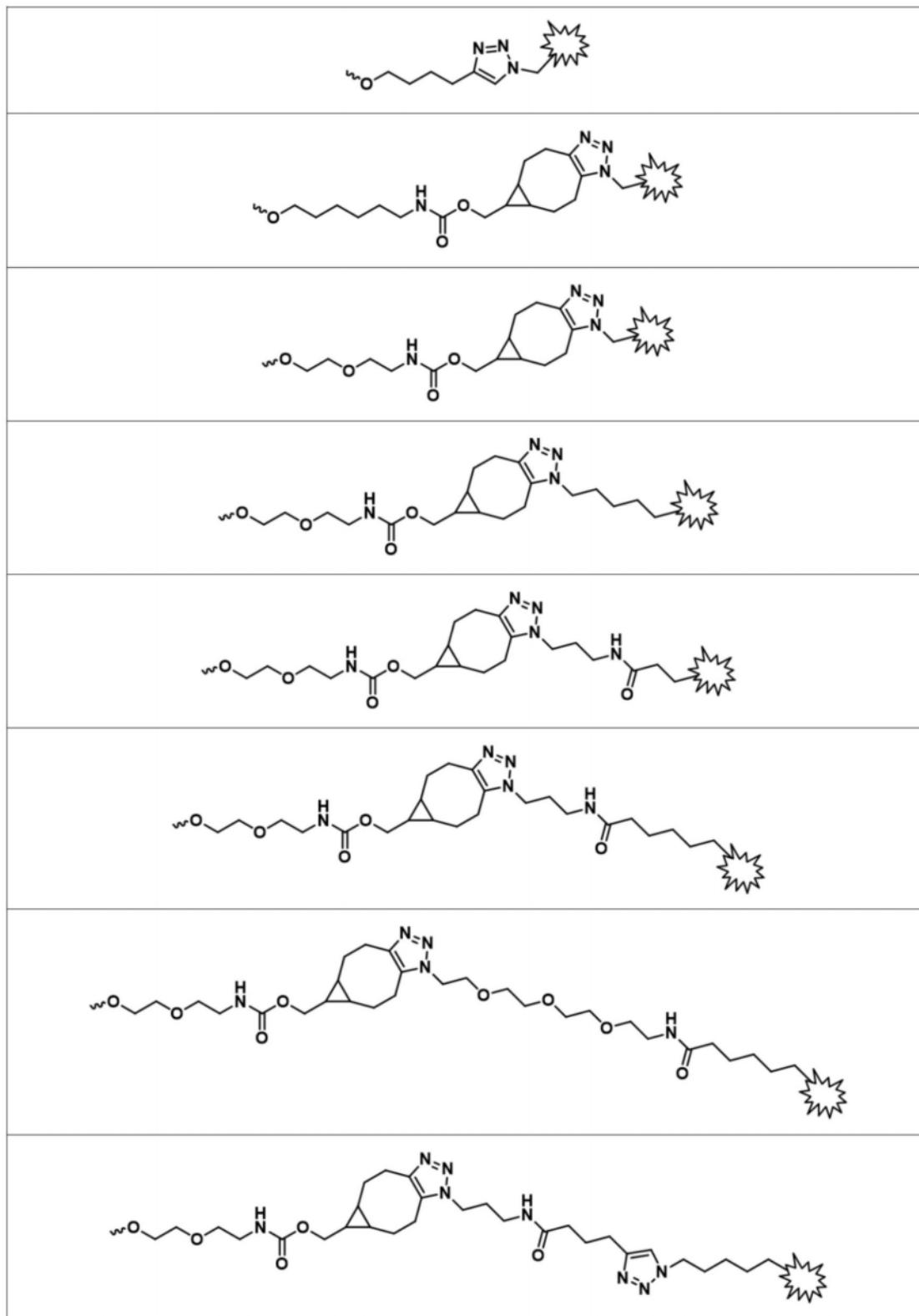


[0177] 其中R₁及R₃各自独立地是键或选自由以下组成的组的连接基团:经取代或未经取代的亚烷基;经取代或未经取代的亚烯基;经取代或未经取代的亚炔基;经取代或未经取代的亚杂烷基;经取代或未经取代的亚杂烯基;经取代或未经取代的亚杂炔基;经取代或未经取代的亚杂环基;经取代或未经取代的亚碳环基;经取代或未经取代的亚芳基;经取代或未经取代的亚杂芳基;及其组合。

[0178] 在一些实施方案中,使用点击化学产生的间隔体的实例提供于表2中,其中[△]是发光标记(或在替代实施方案中,反应物)。

[0179] 表2.点击间隔体的实例

[0180]



[0181] 如本文所用「核酸连接体」通常是指连接一或多个发光标记至一或多种核苷多磷酸的核酸。在一些实施方案中，核酸连接体可通常指具有任何数目的经由共价连接或经由碱基配对(例如杂交)连接的寡核苷酸链的构建体。在一些实施方案中，或者，连接体可称作可连接不同功能组分(例如一或多个发光标记、一或多种核苷多磷酸)的「核」或「碱基」构建体。在一些实施方案中，术语「构建体」贯穿各种上下文用于通常指连接体，且可涵盖或可不

涵盖本文所述各种其他组分(例如间隔体、标记、核苷多磷酸等)。

[0182] 在一些实施方案中,本文所述核酸连接体并不连接至材料的颗粒(例如并不连接至金属、磁性、聚合或其他材料的颗粒)。在一些实施方案中,核酸连接体是线性分子(例如「棒状」核酸)。在一些实施方案中,核酸连接体是环状分子。在一些实施方案中,核酸连接体是单链(例如具有或无茎环结构)。在一些实施方案中,核酸连接体是双链(例如具有或无茎环结构)。在一些实施方案中,双链核酸连接体的两条链杂交(由于互补序列)且不共价连接。然而,在一些实施方案中,可引入(例如使用一或多种化学连接体)一或多个共价键以共价连接双链连接体的两条链。在一些实施方案中,核酸连接体可包括如本文所述的一或多个额外部分。在一些实施方案中,核酸连接体包括i)在糖磷酸主链内或末端的一或多个额外部分,ii)一或多种修饰(例如一或多种经修饰的碱基或糖),或i)与ii)的组合。然而,在一些实施方案中,核酸连接体不包括i)、ii),或i)或ii)中的任一个。

[0183] 应了解,在核酸连接体的上下文中,与其连接的「核苷酸」或「核苷多磷酸」是指经配置以引入生长的核酸链中(例如在测序反应期间)的一或多种核苷酸(例如核苷多磷酸)。在一些实施方案中,一或多种核苷酸包含一或多种核苷单磷酸或核苷多磷酸。在一些实施方案中,核苷多磷酸的实例包括核苷二磷酸或三磷酸或具有超过三个5'磷酸的核苷,例如核苷六磷酸。因此,在一些实施方案中,「经标记的核苷酸」是指经由本申请的连接体连接至一或多个发光标记的核苷多磷酸,其中核苷多磷酸用作核酸合成反应条件下聚合酶的底物。在一些实施方案中,核苷多磷酸至少包含二磷酸基或三磷酸基,其可由适宜聚合酶在磷酸基转移反应(例如将核苷多磷酸的 α -磷酸自其 β -磷酸转移至生长核酸链的3'羟基)中起作用。

[0184] 在一些实施方案中,一或多种核苷磷酸(例如核苷多磷酸)可经由末端磷酸连接至寡核苷酸(例如经标记或未经标记的寡核苷酸链),其形成本申请的连接体的部分,其可用作保护聚合酶免于标记诱导的光损害(例如如本申请中别处所述)的保护分子。在本申请中所述的组合物或方法中的任一个的一些实施方案中,核苷磷酸(例如核苷多磷酸)的磷酸部分(例如多磷酸部分)包括一或多个磷酸(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个磷酸基)或其变体。举例而言,在一些实施方案中,核苷磷酸(例如核苷多磷酸)的磷酸部分(例如多磷酸部分)可包括磷酸酯、硫酯、氨基磷酸酯、磷酸烷基酯键联、其他适宜键联或超过一种这些修饰或其两者或更多个的组合。在一些实施方案中,核酸连接体的经标记及未经标记的链彼此实质上互补(例如相对于二聚化结构域的长度,其中二聚化结构域内的链可彼此(例如)至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%互补)。

[0185] 核苷多磷酸可具有n个磷酸基,其中n是大于或等于2、3、4、5、6、7、8、9或10的数。核苷多磷酸的实例包括核苷二磷酸及核苷三磷酸。经标记的核苷酸可为末端磷酸标记的核苷多磷酸,使得核苷多磷酸的末端磷酸连接至包含一或多个发光标记的连接体(例如核酸连接体),借此形成经标记的核苷多磷酸。该标记可为发光(例如荧光或化学发光)标记、产生荧光的标记、彩色标记、产色标记质量卷标、静电标记或电化学标记。标记(或标记物)可经由连接体(例如如本文所述的间隔体)偶联至末端磷酸。连接体(例如间隔体)可包括(例如)至少一个或多个羟基、硫氢基、氨基或卤代烷基,其可适于在天然或经修饰的核苷酸的末端磷酸形成(例如)磷酸酯、硫酯、氨基磷酸酯或磷酸烷基酯键联。连接体(例如间隔体)能解离

以便(例如)借助聚合酶分离标记与末端磷酸。核苷酸及连接体(例如间隔体)的实例提供于美国专利第7,041,812号中,该案件以引用方式整体并入本文中。

[0186] 核苷酸(例如核苷多磷酸)可包含腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其变体中的任一个。核苷酸(例如核苷多磷酸)可包含甲基化核碱基。举例而言,甲基化核苷酸可为包含一或多个连接至核碱基(例如直接连接至核碱基的环、连接至核碱基的环的取代基)的甲基的核苷酸。实例性甲基化核碱基包括1-甲基胸腺嘧啶、1-甲基尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6,N6-二甲基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、N2-甲基鸟嘌呤及N2,N2-二甲基鸟嘌呤。

[0187] 如本文所用术语「核酸」通常指包含一或多个核酸亚基的分子。核酸可包括一或多个选自腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其变体的亚基。在一些实例中,核酸是脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其衍生物。在一些实施方案中,核酸是经修饰核酸,包括但不限于锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、三唑连接的核酸、2'-F修饰的核酸及其衍生物及类似物。核酸可为单链或双链。在一些实施方案中,核酸通常指核苷酸的任何聚合物。

[0188] 在一些实施方案中,本公开内容提供用于基于单一分子的一或多种发光性质鉴别那些分子的新组合物。在一些实施方案中,分子(例如经发光标记的核苷多磷酸)是基于其亮度、发光寿命、吸收光谱、发射光谱、发光量子产率、发光强度或其两者或更多个的组合来鉴别。鉴别可意指分配分子的精确分子属性(identity)或可意指自一组可能的分子区分或区别特定分子。在一些实施方案中,多个单一分子可基于不同亮度、发光寿命、吸收光谱、发射光谱、发光量子产率、发光强度或其两者或更多个的组合彼此区分。在一些实施方案中,借由将单一分子暴露于一系列单独光脉冲并评估自分子发射的每一光子的时间或其他性质来鉴别该单一分子(例如与其他分子区分)。在一些实施方案中,集合连续地自单一分子发射的多个光子的信息并进行评估以鉴别分子。在一些实施方案中,分子的发光寿命是自多个自分子连续地发射的光子测定,且发光寿命可用于鉴别分子。在一些实施方案中,分子的发光强度是自多个自分子连续地发射的光子测定,且发光强度可用于鉴别分子。在一些实施方案中,分子的发光寿命及发光强度是自多个自分子连续地发射的光子测定,且发光寿命及发光强度可用于鉴别分子。

[0189] 因此,在本申请的一些方面中,将反应样品暴露于多个单独光脉冲且检测并分析一系列发射的光子。在一些实施方案中,发射光子的系列提供关于在反应样品中不随实验时间的流逝而变化的所存在单一分子的信息。然而,在一些实施方案中,发射光子的系列提供关于一系列在不同时间存在于反应样品中(例如随着反应或过程进行)的不同分子的信息。

[0190] **发光标记**

[0191] 如本文所用,「发光标记」是吸收一或多个光子且可随后在一或多个持续时间后发射一或多个光子的分子。在一些实施方案中,该术语用于通常指经标记反应物的非反应物部分(例如发光标记可包括荧光团及至少一部分间隔体)。在一些实施方案中,该术语特定指吸收和/或发射光子的分子(例如荧光团)。在一些实施方案中,视上下文而定,该术语可与「发光分子」互换使用。在一些实施方案中,发光标记是荧光团(例如「染料」或「荧光团染

料」,如本文互换使用)。在一些实施方案中,发光标记是基于罗丹明的分子。在一些实施方案中,发光标记是基于花青的分子。在一些实施方案中,发光标记是基于BODIPY的分子。

[0192] 通常,发光标记包含芳香族或杂芳香族化合物,且可为茈、蒽、萘、吖啶、二苯乙烯、吲哚、苯并吲哚、噁唑、咔唑、噻唑、苯并噻唑、菲啶、吩噁嗪、卟啉、喹啉、乙锭(ethidium)、苯甲酰胺、花青、簇花青、水杨酸脂、氨基苯甲酸酯、香豆素、荧光素、罗丹明或其他类似化合物。染料的实例包括氧杂蒽染料,例如荧光素或罗丹明染料,包括5-羧基荧光素(FAM)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、四氯荧光素(TET)、6-羧基罗丹明(R6G)、N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)。染料的实例亦包括在 α 或 β 位具有氨基的萘胺染料。举例而言,萘基氨基化合物包括1-二甲基氨基萘基-5-磺酸酯、1-苯胺基-8-萘磺酸酯及2-对-甲苯氨基-6-萘磺酸酯、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)。染料的其他实例包括香豆素,例如3-苯基-7-异氰酸基香豆素;吖啶,例如9-异硫氰基吖啶及吖啶橙;N-(对-(2-苯并噁唑基)苯基)马来酰亚胺;花青,例如吲哚二簇花青3(**Cy®3**)、(2Z)-2-[*(E)*-3-[3-(5-羧基戊基)-1,1-二甲基-6,8-二磺基苯并[e]吲哚-3-鎓(ium)-2-基]丙-2-亚烯基]-3-乙基-1,1-二甲基-8-(三氧烷基(trioxidanyl)硫基)苯并[e]吲哚-6-磺酸酯(**Cy®3.5**)、2-{2-[*(2,5-二侧氧基(dioxo)吡咯啶-1-基)*氧基]-2-侧氧基乙基}-16,16,18,18-四甲基-6,7,7a,8a,9,10,16,18-八氢苯并[2",3"]吲哚并[8",7":5',6']吡喃并[3',2':3,4]吡啶并[1,2-a]吲哚-5-鎓-14-磺酸酯(**Cy®3B**)、吲哚二簇花青5(**Cy®5**)、吲哚二簇花青5.5(**Cy®5.5**)、3-(-羧基-戊基)-3'-乙基-5,5'-二甲基氧杂簇花青(CyA);9-[2(或4)-[[[6-[2,5-二侧氧基-1-吡咯啶基]氧基]-6-侧氧基己基]氨基]磺酰基]-4(或2)-磺酸苯基]-2,3,6,7,12,13,16,17-八氢-1H,5H,11H,15H-氧杂蒽并[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']二喹嗪-18-鎓内盐(TR或Texas Red®);BODIPY®染料;苯并噁唑;二苯乙烯;茈;及诸如此类。

[0193] 在某些实施方案中,发光标记是选自表3的染料。表3中列示的染料是非限制性的,且本申请的发光标记可包括表3中未列示的染料。在某些实施方案中,一或多种经发光标记的核苷酸的发光标记选自表3。在某些实施方案中,经四种或更多种发光标记的核苷酸的发光标记选自表3。

[0194] 表3. 荧光团的实例

[0195]

荧光团		
5/6-羧基罗丹明6G	Chromis 678C	DyLight® 655-B1
5-羧基罗丹明6G	Chromis 678Z	DyLight® 655-B2
6-羧基罗丹明6G	Chromis 770A	DyLight® 655-B3
6-TAMRA	Chromis 770C	DyLight® 655-B4
Alexa Fluor® 350	Chromis 800A	DyLight® 662Q
Alexa Fluor® 405	Chromis 800C	DyLight® 675-B1
Alexa Fluor® 430	Chromis 830A	DyLight® 675-B2
Alexa Fluor® 480	Chromis 830C	DyLight® 675-B3
Alexa Fluor® 488	Cy®3	DyLight® 675-B4
Alexa Fluor® 514	Cy®3.5	DyLight® 679-C5
Alexa Fluor® 532	Cy®3B	DyLight® 680
Alexa Fluor® 546	Cy®5	DyLight® 683Q
Alexa Fluor® 555	Dyomics-350	DyLight® 690-B1
Alexa Fluor® 568	Dyomics-350XL	DyLight® 690-B2
Alexa Fluor® 594	Dyomics-360XL	DyLight® 696Q
Alexa Fluor® 610-X	Dyomics-370XL	DyLight® 700-B1
Alexa Fluor® 633	Dyomics-375XL	DyLight® 700-B1
Alexa Fluor® 647	Dyomics-380XL	DyLight® 730-B1
Alexa Fluor® 660	Dyomics-390XL	DyLight® 730-B2
Alexa Fluor® 680	Dyomics-405	DyLight® 730-B3

[0196]

荧光团		
Alexa Fluor® 700	Dyomics-415	DyLight® 730-B4
Alexa Fluor® 750	Dyomics-430	DyLight® 747
Alexa Fluor® 790	Dyomics-431	DyLight® 747-B1
AMCA	Dyomics-478	DyLight® 747-B2
ATTO 390	Dyomics-480XL	DyLight® 747-B3
ATTO 425	Dyomics-481XL	DyLight® 747-B4
ATTO 465	Dyomics-485XL	DyLight® 755
ATTO 488	Dyomics-490	DyLight® 766Q
ATTO 495	Dyomics-495	DyLight® 775-B2
ATTO 514	Dyomics-505	DyLight® 775-B3
ATTO 520	Dyomics-510XL	DyLight® 775-B4
ATTO 532	Dyomics-511XL	DyLight® 780-B1
ATTO 542	Dyomics-520XL	DyLight® 780-B2
ATTO 550	Dyomics-521XL	DyLight® 780-B3
ATTO 565	Dyomics-530	DyLight® 800
ATTO 590	Dyomics-547	DyLight® 830-B2
ATTO 610	Dyomics-547P1	eFluor® 450
ATTO 620	Dyomics-548	伊红
ATTO 633	Dyomics-549	FITC
ATTO 647	Dyomics-549P1	荧光素
ATTO 647N	Dyomics-550	HiLyte™ Fluor 405
ATTO 655	Dyomics-554	HiLyte™ Fluor 488
ATTO 665	Dyomics-555	HiLyte™ Fluor 532
ATTO 680	Dyomics-556	HiLyte™ Fluor 555
ATTO 700	Dyomics-560	HiLyte™ Fluor 594
ATTO 725	Dyomics-590	HiLyte™ Fluor 647
ATTO 740	Dyomics-591	HiLyte™ Fluor 680
ATTO Oxa12	Dyomics-594	HiLyte™ Fluor 750
ATTO Rho101	Dyomics-601XL	IRDye® 680LT

荧光团		
ATTO Rho11	Dyomics-605	IRDye® 750
ATTO Rho12	Dyomics-610	IRDye® 800CW
ATTO Rho13	Dyomics-615	JOE
ATTO Rho14	Dyomics-630	LightCycler® 640R
ATTO Rho3B	Dyomics-631	LightCycler® 红610
ATTO Rho6G	Dyomics-632	LightCycler® 红640
ATTO Thio12	Dyomics-633	LightCycler® 红670
BD Horizon™ V450	Dyomics-634	LightCycler® 红705
BODIPY® 493/501	Dyomics-635	丽丝胺罗丹明B
BODIPY® 530/550	Dyomics-636	萘并荧光素
BODIPY® 558/568	Dyomics-647	Oregon Green® 488
BODIPY® 564/570	Dyomics-647P1	Oregon Green® 514
BODIPY® 576/589	Dyomics-648	Pacific Blue™
BODIPY® 581/591	Dyomics-648P1	Pacific Green™
BODIPY® 630/650	Dyomics-649	Pacific Orange™
BODIPY® 650/665	Dyomics-649P1	PET
BODIPY® FL	Dyomics-650	PF350
BODIPY® FL-X	Dyomics-651	PF405
BODIPY® R6G	Dyomics-652	PF415
BODIPY® TMR	Dyomics-654	PF488
BODIPY® TR	Dyomics-675	PF505
C5.5	Dyomics-676	PF532
C7	Dyomics-677	PF546
CAL Fluor® 金 540	Dyomics-678	PF555P
CAL Fluor® 绿 510	Dyomics-679P1	PF568
CAL Fluor® 橙 560	Dyomics-680	PF594
CAL Fluor® 红590	Dyomics-681	PF610
CAL Fluor® 红610	Dyomics-682	PF633P
CAL Fluor® 红615	Dyomics-700	PF647P

[0197]

[0198]

荧光团		
CAL Fluor®红635	Dyomics-701	Quasar® 570
Cascade®蓝	Dyomics-703	Quasar® 670
CFT™350	Dyomics-704	Quasar® 705
CFT™405M	Dyomics-730	罗丹明123
CFT™405S	Dyomics-731	罗丹明6G
CFT™488A	Dyomics-732	罗丹明B
CFT™514	Dyomics-734	罗丹明绿
CFT™532	Dyomics-749	罗丹明绿-X
CFT™543	Dyomics-749P1	罗丹明红
CFT™546	Dyomics-750	ROX
CFT™555	Dyomics-751	ROX
CFT™568	Dyomics-752	Seta™ 375
CFT™594	Dyomics-754	Seta™ 470
CFT™620R	Dyomics-776	Seta™ 555
CFT™633	Dyomics-777	Seta™ 632
CFT™633-V1	Dyomics-778	Seta™ 633
CFT™640R	Dyomics-780	Seta™ 650
CFT™640R-V1	Dyomics-781	Seta™ 660
CFT™640R-V2	Dyomics-782	Seta™ 670
CFT™660C	Dyomics-800	Seta™ 680
CFT™660R	Dyomics-831	Seta™ 700
CFT™680	DyLight® 350	Seta™ 750
CFT™680R	DyLight® 405	Seta™ 780
CFT™680R-V1	DyLight® 415-Co1	Seta™ APC-780
CFT™750	DyLight® 425Q	Seta™ PerCP-680
CFT™770	DyLight® 485-LS	Seta™ R-PE-670
CFT™790	DyLight® 488	Seta™ 646
Chromo™ 642	DyLight® 504Q	Seta™u 380
Chromis 425N	DyLight® 510-LS	Seta™u 425

荧光团		
Chromis 500N	DyLight® 515-LS	Seta™u 647
Chromis 515N	DyLight® 521-LS	Seta™u 405
Chromis 530N	DyLight® 530-R2	磺酰罗丹明101
Chromis 550A	DyLight® 543Q	TAMRA
Chromis 550C	DyLight® 550	TET
Chromis 550Z	DyLight® 554-R0	Texas Red®
Chromis 560N	DyLight® 554-R1	TMR
Chromis 570N	DyLight® 590-R2	TRITC
Chromis 577N	DyLight® 594	Yakima Yellow™
[0199]	Chromis 600N	DyLight® 610-B1
	Chromis 630N	DyLight® 615-B2
	Chromis 645A	DyLight® 633
	Chromis 645C	DyLight® 633-B1
	Chromis 645Z	DyLight® 633-B2
	Chromis 678A	DyLight® 650
	Square 635	Square 650
	Square 672	Square 680
	Abberior® Star 470SXP	Abberior® Star 488
	Abberior® Star 520SXP	Abberior® Star 580
	Abberior® Star 635	Abberior® Star 635P
		Abberior® Star RED

[0200] 染料亦可基于最大吸亮度或发射发光的波长分类。表4提供根据最大吸亮度的近似波长分组成各栏的实例性荧光团。表4中列示的染料是非限制性的,且本申请的发光标记可包括表4中未列示的染料。精确最大吸亮度或发射波长可不对应于指示光谱范围。在某些实施方案中,一或多种经发光标记的核苷酸的发光标记是选自表4中列示的「红色」组。在某些实施方案中,一或多种经发光标记的核苷酸的发光标记是选自表4中列示的「绿色」组。在某些实施方案中,一或多种经发光标记的核苷酸的发光标记是选自表4中列示的「黄色/橙色」组。在某些实施方案中,四种核苷酸的发光标记经选择使得所有皆选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」或「绿色」组中的一个。在某些实施方案中,四种核苷酸的发光标记经选择使得三者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第一组,且第四者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第二组。在某些实施方案中,四种核苷酸的发光标记经选择使得两者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第一组,且第三及第四者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第二组。在某些实

施方案中,四种核苷酸的发光标记经选择使得两者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第一组,且第三者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第二组,且第四者是选自表4中列示的「红色」、「黄色/橙色」及「绿色」组的第三组。

[0201] 表4. 借由光谱范围的荧光团的实例

「绿色」 520-570 nm	「黄色/橙色」 570-620 nm	「红色」 620-670 nm
5/6-羧基罗丹明6G	Alexa Fluor® 594	Alexa Fluor® 633
6-TAMRA	Alexa Fluor® 610-X	Alexa Fluor® 647
Alexa Fluor® 532	ATTO 590	Alexa Fluor® 660
Alexa Fluor® 546	ATTO 610	ATTO 633
Alexa Fluor® 555	ATTO 620	ATTO 647
Alexa Fluor® 568	BODIPY® 576/589	ATTO 647N
ATTO 520	BODIPY® 581/591	ATTO 655
ATTO 532	CF TM 594	ATTO 665
ATTO 542	CF TM 620R	ATTO 680
ATTO 550	Chromis 570N	ATTO Rho14
ATTO 565	Chromis 577N	BODIPY® 630/650
BODIPY® 530/550	Chromis 600N	BODIPY® 650/665
BODIPY® 558/568	Dyomics-590	CAL Fluor®红635
BODIPY® 564/570	Dyomics-591	CF TM 633-V1
CF TM 514	Dyomics-594	CF TM 640R-V1
CF TM 532	Dyomics-601XL	CF TM 633
CF TM 543	Dyomics-605	CF TM 640R
CF TM 546	Dyomics-610	CF TM 640R-V2

[0202]

[0203]

「绿色」 520-570 nm	「黄色/橙色」 570-620 nm	「红色」 620-670 nm
CF TM 555	Dyomics-615	CF TM 660C
CF TM 568	DyLight [®] 590-R2	CF TM 660R
Chromis 530N	DyLight [®] 594	CF TM 680
Chromis 550A	DyLight [®] 610-B1	CF TM 680R
Chromis 550C	DyLight [®] 615-B2	CF TM 680R-V1
Chromis 550Z	HiLyte TM Fluor 594	Chromo TM 642
Chromis 560N	LightCycler ^{®®} Red 610	Chromis 630N
Cy [®] 3	PF594	Chromis 645A
Cy [®] 3.5	PF594	Chromis 645A
Cy [®] 3B	PF610	Chromis 645C
Dyomics-530	Quasar [®] 570	Chromis 645Z
Dyomics-547	Abberior [®] Star 580	Cy [®] 5
Dyomics-547P1	Abberior [®] Star 600	Cy [®] 5.5
Dyomics-548		Dyomics-630
Dyomics-549P1		Dyomics-631
Dyomics-550		Dyomics-632
Dyomics-554		Dyomics-633
Dyomics-555		Dyomics-634
Dyomics-556		Dyomics-635
Dyomics-560		Dyomics-636
DyLight [®] 521-LS		Dyomics-647
DyLight [®] 530-R2		Dyomics-647P1
DyLight [®] 543Q		Dyomics-648
DyLight [®] 550		Dyomics-648P1
DyLight [®] 554-R0		Dyomics-649
DyLight [®] 554-R1		Dyomics-649P1
HiLyte TM Fluor 532		Dyomics-650
HiLyte TM Fluor 555		Dyomics-651
PF532		Dyomics-652

[0204]

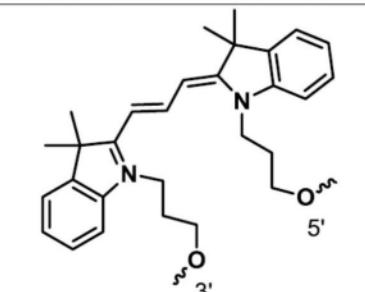
「绿色」 520-570 nm	「黄色/橙色」 570-620 nm	「红色」 620-670 nm
PF546		Dyomics-654
PF555P		DyLight® 633
PF568		DyLight® 633-B1
Seta™ 555		DyLight® 633-B2
Abberior® Star 520SXP		DyLight® 650
		DyLight® 655-B1
		DyLight® 655-B2
		DyLight® 655-B3
		DyLight® 655-B4
		DyLight® 662Q
		DyLight® 680
		DyLight® 683Q
		HiLyte™ Fluor 647
		HiLyte™ Fluor 680
		LightCycler®® 640R
		LightCycler®红640
		LightCycler®红670
		PF633P
		PF647P
		Quasar® 670
		Seta™ 632
		Seta™ 633
		Seta™ 650
		Seta™ 660
		Seta™ 670
		Seta™Tau 647
		Square 635
		Square 650
		Square 660

	「绿色」 520-570 nm	「黄色/橙色」 570-620 nm	「红色」 620-670 nm
[0205]			Abberior® Star 635
			Abberior® Star 635P
			Abberior® Star RED

[0206] 在某些实施方案中,发光标记可包含第一及第二生色团。在一些实施方案中,第一生色团的激发态能经由至第二生色团的能量转移弛豫。在一些实施方案中,能量转移是 Förster 共振能量转移 (FRET)。该 FRET 对可用于提供具有使得标记更易于自多个发光标记区别的性质的发光标记。在某些实施方案中,FRET 对可在第一光谱范围内吸收激发能量且在第二光谱范围内发光。

[0207] 在一些实施方案中,发光标记在本文所述连接体分子内连接(例如整合至寡聚或聚合连接体中)。表5提供在寡核苷酸链上下文中与该偶联策略兼容的荧光团的若干实例。如所示,表5中的基于花青的荧光团偶联至第一链部分的3'端及第二链部分的5'端,使得荧光团自身形成寡核苷酸链内的共价键联的部分(例如在未使用间隔体的情况下连接发光标记)。应了解,在一些实施方案中,这些及类似类型的荧光团可在任一类别的寡聚或聚合结构内连接。举例而言,在一些实施方案中,荧光团经由与第一肽部分的C-末端及第二肽部分的N-末端的偶联在肽内连接。在一些实施方案中,单一连接体分子包含两个或更多个在连接体内连接的荧光团(例如2种、3种、4种、5种、6种或超过6种染料在单一连接体内连接)。在一些实施方案中,连接体包含一或多个在连接体内连接的荧光团及一或多个经由间隔体连接的荧光团。举例而言,在一些实施方案中,本文所述经明亮标记的反应物包含一或多个(例如1、2、3、4、5、6或超过6个)在连接体内且在无间隔体情况下连接的荧光团及一或多个(例如1、2、3、4、5、6或超过6个)经由间隔体连接至连接体的荧光团。

[0208] 表5.在连接体内连接的荧光团的实例

[0209]	
--------	--

[0210] 对于一组经发光标记的分子(例如经发光标记的核苷酸),经发光标记的FRET对的性质可允许选择多个可区分分子(例如核苷酸)。在一些实施方案中,FRET对的第二生色团的发光寿命不同于多个其他经发光标记的分子。在一些实施方案中,FRET对的第二生色团的发光强度不同于多个其他经发光标记的分子。在一些实施方案中,FRET对的第二生色团的发光寿命及发光强度不同于多个其他经发光标记的分子。在一些实施方案中,FRET对的第二生色团在不同于多个其他经发光标记的分子的光谱范围内发射光子。在一些实施方案中,FRET对的第一生色团的发光寿命不同于多个经发光标记的分子。在某些实施方案中,FRET对可在不同于多个其他经发光标记的分子的光谱范围内吸收激发能量。在某些实施方案中,FRET对可在与多个其他经发光标记的分子中的一或多个相同的光谱范围内吸收激发能量。

[0211] 对于测序反应,经明亮标记的反应物的某些组合可较佳。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少一个包含花青染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少一个包含罗丹明染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少两者各自包含花青染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少两者各自包含罗丹明染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少三者各自包含花青染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少三者各自包含罗丹明染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少四者各自包含花青染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的至少四者各自包含罗丹明染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的三者各自包含花青染料或其类似物,且第四经明亮标记的反应物包含罗丹明染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的两者各自包含花青染料或其类似物,且第三及视情况第四经明亮标记的反应物包含罗丹明染料或其类似物。在一些实施方案中,经明亮标记的反应物中的三者各自包含罗丹明染料或其类似物,且第三及视情况第四经明亮标记的反应物包含花青染料或其类似物。

[0212] 如本文所述,「发光标记」是吸收一或多个光子且可在一或多个持续时间后随后发射一或多个光子的分子。分子的发光是由若干参数阐述,包括(但不限于)发光寿命、吸收光谱、发射光谱、发光量子产率及发光强度。术语吸收及激发贯穿本申请可互换使用。在一些实施方案中,术语发光及发射可互换使用。典型发光分子可吸收多个波长的光或经历由多个波长的光的激发。某些波长或某些光谱范围内的激发可借由发光发射事件弛豫,而某些其他波长或光谱范围的激发可不借由发光发射事件弛豫。在一些实施方案中,发光分子仅适宜地经激发以在单一波长或单一光谱范围内发光。在一些实施方案中,发光分子适宜地经激发以在两个或更多个波长或两个或更多个光谱范围内发光。在一些实施方案中,借由激发光子的波长或吸收光谱鉴别分子。

[0213] 来自发光发射事件的发射光子将在可能波长的光谱范围内的波长下发射。通常,与激发光子的波长相比,发射光子的波长较长(例如能量较低或红色移位)。在某些实施方案中,借由测量发射光子的波长鉴别分子。在某些实施方案中,借由测量多个发射光子的波长鉴别分子。在某些实施方案中,借由测量发射光谱鉴别分子。

[0214] 发光寿命是指激发事件与发射事件之间的持续时间。在一些实施方案中,发光寿命表示为指数式衰变之式中的常数。在一些实施方案中,其中存在一或多个递送激发能量

的脉冲事件,持续时间是脉冲与随后发射事件之间的时间。

[0215] 分子的发光寿命的测定可使用任何适宜方法实施(例如借由使用适宜技术测量寿命或借由测定发射的时间依赖性特征)。在一些实施方案中,测定分子的发光寿命包含测定相对于一或多个分子(例如测序反应中不同经发光标记的核苷多磷酸)的寿命。在一些实施方案中,测定分子的发光寿命包含测定相对于参照物的寿命。在一些实施方案中,测定分子的发光寿命包含测量寿命(例如荧光寿命)。在一些实施方案中,测定分子的发光寿命包含测定一或多个指示寿命的暂时特征。在一些实施方案中,分子的发光寿命可基于相对于激发脉冲在一或多个时间门控的窗中发生的多个发射事件(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个发射事件)的分布来测定。举例而言,基于相对于激发脉冲测量的光子到达时间的分布,单一分子的发光寿命可与具有不同发光寿命的多个分子区分。

[0216] 应了解,单一分子的发光寿命指示在单一分子达到激发态后发射的光子的时间且单一分子可借由指示光子的时间的信息加以区分。一些实施方案可包括借由测量与由分子发射的光子相关的时间基于分子的发光寿命区分一分子与多个分子。时间的分布可提供可自该分布测定的发光寿命的指示。在一些实施方案中,基于分布时间、例如借由比较时间的分布与对应于已知分子的参照分布,单一分子可与辐射分子区分。在一些实施方案中,发光寿命的值是自时间的分布测定。

[0217] 发光量子产率是指在导致发射事件的给定波长或在给定光谱范围内激发事件的分数,且通常小于1。在一些实施方案中,本文所述分子的发光量子产率介于0与约0.001之间、介于约0.001与约0.01之间、介于约0.01与约0.1之间、介于约0.1与约0.5之间、介于约0.5与0.9之间或介于约0.9与1之间。在一些实施方案中,借由测定或估计发光量子产率鉴别分子。

[0218] 如本文针对单一分子所用,发光强度是指每单位时间由分子发射的发射光子的数目,该分子因经脉冲激发能量的递送而被激发。在一些实施方案中,发光强度是指每单位时间由分子发射的发射光子的检测数目,该分子因经脉冲激发能量的递送而被激发,且发光强度是借由特定传感器或一组传感器来检测。

[0219] 发光寿命、发光量子产率及发光强度可在不同条件下针对给定分子各自变化。在一些实施方案中,单一分子将具有与分子的系综不同的观察发光寿命、发光量子产率或发光强度。在一些实施方案中,限制于样品孔中的分子将具有与未限制于样品孔中的分子不同的观察发光寿命、发光量子产率或发光强度。在一些实施方案中,连接至另一分子的发光标记或发光分子将具有与未连接至另一分子的发光标记或发光分子不同的发光寿命、发光量子产率或发光强度。在一些实施方案中,与高分子复合物相互作用的分子将具有与不与高分子复合物相互作用的分子不同的发光寿命、发光量子产率或发光强度。

[0220] 在某些实施方案中,本申请中所述的发光分子吸收一个光子且在一定持续时间后发射一个光子。在一些实施方案中,可借由测量持续时间测定或估计分子的发光寿命。在一些实施方案中,可借由测量多个脉冲时间及发射事件的多个持续时间测定或估计分子的发光寿命。在一些实施方案中,可借由测量持续时间区别一分子的发光寿命与多种类型的分子的发光寿命。在一些实施方案中,可借由测量多个脉冲事件及发射事件的多个持续时间区别一分子的发光寿命与多种类型的分子的发光寿命。在某些实施方案中,可借由测定或

估计分子的发光寿命鉴别或区别一分子与多种类型的分子。在某些实施方案中,可借由区别一分子的发光寿命与多种类型的分子的多个发光寿命鉴别或区别一分子与多种类型的分子。

[0221] 在某些实施方案中,发光发射事件是荧光。在某些实施方案中,发光发射事件是磷光。如本文所用术语发光涵盖包括荧光及磷光二者的所有发光事件。

[0222] 测序

[0223] 本申请的一些方面可用于测序生物聚合物,例如核酸及蛋白质。在一些方面中,本申请中所述的组合物及技术可用于鉴别引入核酸或蛋白质中的一系列核苷酸或氨基酸单体(例如借由检测一系列经标记的核苷酸或氨基酸单体的引入的时程)。在一些实施方案中,本申请中所述的组合物及技术可用于鉴别引入借由聚合酶酶合成的模板依赖性核酸测序反应产物中的一系列核苷酸。

[0224] 在靶核酸与互补核苷多磷酸(例如dNTP)之间的核碱基进行碱基配对时,聚合酶借由在新近合成的链的3'羟基端与dNTP的 α 磷酸之间形成磷酸二酯键将dNTP引入新近合成的核酸链中。在偶联至dNTP(例如经由本申请的连接体)的发光标记是荧光团的实例中,借由激发对其存在发信号,且在引入步骤期间和/或之后检测发射的脉冲。对于经由本申请的连接体偶联至dNTP的末端(γ)磷酸的检测标记(例如发光标记),将dNTP引入新近合成的链中引起释放 β 及 γ 磷酸及包含检测标记的连接体,该连接体在样品孔中自由扩散,从而引起自荧光团检测的发射减少。

[0225] 在某些实施方案中,模板依赖性核酸测序反应产物是在借由天然核酸聚合酶实施的测序反应中合成。在一些实施方案中,聚合酶是天然聚合酶的突变体或经修饰变体。在一些实施方案中,模板依赖性核酸测序产物将包含一或多个与模板核酸链互补的核苷酸区段。在一方案中,本申请提供借由测定模板(或靶)核酸链的互补核酸链的序列测定该模板(或靶)核酸链的序列的方法。

[0226] 如本文所用术语「聚合酶」通常是指任何能催化聚合反应的酶(或聚合酶)。聚合酶的实例包括(但不限于)核酸聚合酶、转录酶或连接酶。聚合酶(polymerase)可为聚合酶(polymerization enzyme)。针对单一分子核酸延伸(例如对于核酸测序)的实施方案可使用任何能合成与靶核酸分子互补的核酸的聚合酶。在一些实施方案中,聚合酶可为DNA聚合酶、RNA聚合酶、反转录酶和/或其一或多个的突变体或改变形式。

[0227] 聚合酶的实例包括(但不限于)DNA聚合酶、RNA聚合酶、热稳定聚合酶、野生型聚合酶、经修饰聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶I、T7 DNA聚合酶、噬菌体T4 DNA聚合酶、 ϕ 29(佛爱(phi)29)DNA聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、T1i聚合酶、Pfu聚合酶、Pwo聚合酶、VENT聚合酶、DEEPVENT聚合酶、EX-Taq聚合酶、LA-Taq聚合酶、Sso聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、ES4聚合酶、Tru聚合酶、Tac聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tca聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、铂Taq聚合酶、Tbr聚合酶、Tf1聚合酶、Tth聚合酶、Pfuturbo聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、KOD聚合酶、Bst聚合酶、Sac聚合酶、Klenow片段、具有3'至5'外核酸酶活性的聚合酶及其变体、经修饰产物及衍生物。在一些实施方案中,聚合酶是单一亚基聚合酶。除其他地方外,DNA聚合酶的非限制性实例及其性质详细阐述于DNA Replication,第2版,Kornberg及Baker,W.H.Freeman,New York,N.Y.(1991)。

[0228] 在一些实施方案中,聚合酶是具有高持续合成能力的聚合酶。然而,在一些实施方

案中,聚合酶是具有降低持续合成能力的聚合酶。聚合酶持续合成能力通常是指聚合酶将dNTP连续引入核酸模板而不释放核酸模板的能力。在一些实施方案中,聚合酶是具有低5'-3'外核酸酶活性的聚合酶和/或3'-5'外核酸酶。在一些实施方案中,聚合酶经修饰(例如借由氨基酸取代)以相对于相应野生型聚合酶具有降低的5'-3'外核酸酶活性和/或3'-5'活性。DNA聚合酶的其他非限制性实例包括9°Nm™ DNA聚合酶(New England Biolabs)及Klenow外聚合酶的P680G突变体(Tuske等人(2000)JBC 275(31):23759-23768)。在一些实施方案中,具有降低持续合成能力的聚合酶为含有一或多段核苷酸重复(例如两个或更多个相同类型的连续碱基)的测序模板提供增加准确度。在一些实施方案中,聚合酶是对经标记的核苷酸比对未经标记的核酸具有较高亲和力的聚合酶。

[0229] 在另一方案中,本申请提供借由测序多个核酸片段来测序靶核酸的方法,其中靶核酸包含片段。在某些实施方案中,该方法包含组合多个片段序列以提供亲本靶核酸的序列或部分序列。在一些实施方案中,组合步骤是借由计算机硬件及软件实施。本文所述方法可允许测序一组相关靶核酸,例如整个染色体或基因组。

[0230] 在测序期间,聚合酶可偶联(例如连接)至靶核酸分子的启动位置。启动位置可为与靶核酸分子的一部分互补的引物。作为替代,启动位置是在靶核酸分子的双链区段内提供的空隙或切口。空隙或切口的长度可为0至至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30或40个核苷酸。切口可在双链序列的一个链中提供断裂,其可为聚合酶(例如链置换聚合酶)提供启动位置。

[0231] 在一些情形下,测序引物可退火成可固定或可不固定至固体载体的靶核酸分子。固体载体可在用于核酸测序的芯片上包含(例如)样品孔(例如纳米孔口、反应室)。在一些实施方案中,测序引物可固定至固体载体且靶核酸分子的杂交亦将靶核酸分子固定至固体载体。在一些实施方案中,聚合酶固定至固体载体且可溶性引物及靶核酸与聚合酶接触。然而,在一些实施方案中,在溶液中形成包含聚合酶、靶核酸及引物的复合物且该复合物固定至固体载体(例如经由聚合酶、引物和/或靶核酸的固定)。在一些实施方案中,样品孔(例如纳米孔口、反应室)中无一组分固定至固体载体。举例而言,在一些实施方案中,在溶液中形成包含聚合酶、靶核酸及引物的复合物且该复合物不固定至固体载体。

[0232] 在适当条件下,与退火的引物/靶核酸接触的聚合酶可在引物上添加或引入一或多种核苷酸,且核苷酸可以5'至3'模板依赖性方式添加至引物。核苷酸至引物上的该引入(例如经由聚合酶的作用)通常可称作引物延伸反应。每一核苷酸可与可检测标记相关联,该可检测标记可在核酸延伸反应期间检测到及鉴别(例如基于其发光寿命和/或其他特征)且用于测定引入延伸引物中的每一核苷酸且因此测定新近合成的核酸分子的序列。经由新近合成的核酸分子的序列互补,亦可测定靶核酸分子的序列。在一些情形下,测序引物退火成靶核酸分子且将核苷酸引入测序引物可在类似反应条件(例如相同或类似反应温度)下或在不同反应条件(例如不同反应温度)下发生。在一些实施方案中,借由合成方法的测序可包括存在靶核酸分子的群体(例如靶核酸的拷贝)和/或靶核酸扩增以获得靶核酸的群体的步骤。然而,在一些实施方案中,借由合成的测序用于测定所评估的每一反应中单一分子的序列(且无需核酸扩增以制备靶模板用于测序)。在一些实施方案中,多个单一分子测序反应是根据本申请的方案并行(例如在单一芯片上)实施。举例而言,在一些实施方案中,多个单一分子测序反应各自在单一芯片上的单独反应室(例如纳米孔口、样品孔)中实施。

[0233] 实施方案能以高准确度及长读取长度测序单一核酸分子,例如至少约50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%或99.9999%的准确度和/或大于或等于约10个碱基对(bp)、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、1000bp、10,000bp、20,000bp、30,000bp、40,000bp、50,000bp或100,000bp的读取长度。在一些实施方案中,用于单一分子测序的靶核酸分子是单链靶核酸(例如脱氧核糖核酸(DNA)、DNA衍生物、核糖核酸(RNA)、RNA衍生物)模板,其添加或固定至含有固定或连接至固体载体(例如样品孔的底部或侧壁)的测序反应的至少一种额外组分(例如聚合酶,例如,DNA聚合酶、测序引物)的样品孔(例如纳米孔口)。靶核酸分子或聚合酶可(例如)在样品孔的底部或侧壁直接或经由连接体连接至样品壁。样品孔(例如纳米孔口)亦可含有经由引物延伸反应的核酸合成所需的任何其他试剂,例如适宜缓冲液、辅因子、酶(例如聚合酶)及脱氧核糖核苷多磷酸,例如脱氧核糖核苷三磷酸,包括脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧尿苷三磷酸(dUTP)及脱氧胸苷三磷酸(dTTP) dNTP,其包括可经由本申请的连接体链接至dNTP的发光标记,例如荧光团。在一些实施方案中,每一类别的dNTP(例如含有腺嘌呤的dNTP(例如dATP)、含有胞嘧啶的dNTP(例如dCTP)、含有鸟嘌呤的dNTP(例如dGTP)、含有尿嘧啶的dNTP(例如dUTP)及含有胸腺嘧啶的dNTP(例如dTTP))偶联(例如经由本申请的连接体)至特殊的发光标记,使得自标记发射的光的检测指示引入新近合成的核酸中的dNTP的属性。在一些实施方案中,「特殊的发光标记」可指一种dNTP包含不同于另一dNTP的发光标记(例如不同荧光团)。在一些实施方案中,特殊的发光标记是指一种dNTP包含与另一dNTP不同数目的相同或类似发光标记。在一些实施方案中,特殊的发光标记是指一种dNTP包含一或多种经检测与另一dNTP不同的发光性质。自发光标记发射的光可经由任何适宜装置和/或方法检测且归因于其适当发光标记(且因此相关的dNTP)。发光标记可在任何位置偶联(例如经由本申请的连接体)至dNTP,使得发光标记的存在不会抑制dNTP引入新近合成的核酸链中或不会抑制聚合酶的活性。在一些实施方案中,发光标记偶联(例如经由本申请的连接体)至dNTP的末端磷酸(例如 γ 磷酸)。

[0234] 在一些实施方案中,单链靶核酸模板与测序引物、dNTP、聚合酶及核酸合成所需的其他试剂接触。在一些实施方案中,所有适当dNTP皆可与单链靶核酸模板同时接触(例如所有dNTP皆同时存在),使得dNTP的引入可同时发生。在其他实施方案中,dNTP可与单链靶核酸模板依序接触,其中单链靶核酸模板与每一适当dNTP单独接触,在单链靶核酸模板与不同dNTP接触之间存在洗涤步骤。可针对欲鉴别的单链靶核酸模板的每一连续碱基位置重复单链靶核酸模板与每一dNTP单独接触、之后洗涤的该循环。

[0235] 在一些实施方案中,测序引物退火成单链靶核酸模板且聚合酶基于单链靶核酸模板将dNTP(或其他核苷多磷酸)连续引入引物。与每一引入的dNTP相关的独特发光标记可在dNTP引入引物期间或之后经适当激发光激发且随后可使用任何适宜装置和/或方法检测其发射。光的特定发射(例如具有特定发射寿命、强度、光谱/或其组合)的检测可归因于引入的特定dNTP。自检测的发光标记的收集获得的序列随后可经由序列互补用于测定单链靶核酸模板的序列。

[0236] 在一些实施方案中,本发明提供可有利地用于以下共同待决的美国专利申请中所述的技术中的方法及组合物:第14/543,865号、第14/543,867号、第14/543,888号、第14/821,656号、第14/821,686号、第14/821,688号、第15/161,067号、第15/161,088号、第15/

161,125号、第15/255,245号、第15/255,303号、第15/255,624号、第15/261,697号、第15/261,724号、第15/600,979号、第15/846,967号、第15/847,001号、第15/971,493号、第62/289,019号、第62/296,546号、第62/310,398号、第62/339,790号、第62/343,997号、第62/344,123号及第62/426,144号,其各自的内容是以引用方式并入本文中。

[0237] 试剂盒

[0238] 在其他方案中,本申请提供用于测序模板核酸的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含多种类型的如本文所述的经发光标记的核苷酸。在一些实施方案中,每一类型的经标记的核苷酸包含两个或更多个经由本申请的连接体连接至一或多种核苷多磷酸的发光标记。在一些实施方案中,多个核苷酸是选自图3A-3C、3E-3G、4A-4C、5A-5B、6A-6C及8-10中所绘示的经标记的核苷酸。举例而言,在一些实施方案中,多个核苷酸是根据图3G中所示的结构设计。在一些实施方案中,多个核苷酸是根据图3B(306)、图3B(308)及图5A(502)中所示的结构设计。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含聚合酶(例如如本文中别处所述的DNA聚合酶)。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含与测序的模板核酸互补的引物。

[0239] 在一些方面中,本申请提供包含本文所述经明亮标记的反应物中的一或多个的反应混合物。在一些实施方案中,反应混合物包含添加至测序反应的混合物。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,聚合酶经配置以固定至固体载体(例如样品孔的底部,如本文中别处所述)。在一些实施方案中,反应混合物包含欲测序的模板核酸。在一些实施方案中,反应混合物包含与模板核酸的一部分互补的引物。在一些实施方案中,反应混合物包含起始测序反应所需的一或多种组分(例如二价金属离子,例如镁或铁)。在一些实施方案中,反应混合物包含稳定测序反应所需的一或多种组分(例如一或多种缓冲剂、一或多种还原剂等)。

[0240] 实施例

[0241] 实施例1:利用核酸连接体的染料连接策略

[0242] 各种下一代测序技术执行经标记的反应组分。举例而言,染料标记的核苷酸可用于在引入事件期间基于对应于每一碱基类型的独特发光性质的检测或观察结果进行特定碱基识别(base call)。因此,对于一组中的每一碱基,这些性质(例如寿命及强度)必须容易鉴别。对增强经标记的核苷酸的荧光强度的初始努力公开,当向构建体中添加第二染料分子时,经染料标记核苷酸的亮度增加。然而,荧光寿命相对于单一标记的变体显著减少。在研发改良的经标记的核苷酸中,研究核酸作为核心结构用于连接荧光染料至核苷酸。

[0243] 经多重标记的核苷酸中改变的荧光寿命的一个潜在来源是相同构建体的染料分子之间的相互作用程度,其可产生淬灭效应。借由产生图8中所示的染料标记的核苷酸进一步探索此可能性。两个染料分子(DyLight530R2)经由核酸连接体连接至核苷多磷酸。未经标记的寡核苷酸链与经标记的寡核苷酸链杂交以在核酸连接体中赋予刚性。第一构建体800是使用C6-氨基-T间隔体将染料连接至核酸来制得,且第二构建体802是使用甘醇酰胺间隔体将染料连接来制得。

[0244] 第一构建体的分析公开大约1.4ns的荧光寿命,而第二构建体展现大约3.5ns的寿命。第二构建体的测量寿命增加归因于使用与第一构建体相比相对较短的间隔体用于染料连接。如图8中所示,第一构建体的C6-氨基-T间隔体的长度大于第二构建体的甘醇酰胺间隔体。第二构建体的增加寿命的一种可能的解释在于缩短的间隔体长度借由限制连接的染

料的移动范围重叠的程度降低染料-染料相互作用。

[0245] 实施例2:增加的连接体刚性延长荧光寿命

[0246] 遵循潜在地由于染料的空间重叠,间隔体长度可影响荧光寿命的观察结果,据信经多重标记的分子中染料的对称排列可能具有类似效应。生成Y形核酸连接体且示于图9中。初始构建体具有三个经由所示具支链连接体共价连接的寡核苷酸链。两个链各自末端连接至染料分子(Chromis530N),而第三链末端连接至核苷多磷酸。第三链进一步与未经标记的链杂交以在核苷多磷酸与经标记的区之间赋予刚性。借由与寡核苷酸组分902杂交生成此构建体的第二版本,该寡核苷酸组分902与第一及第二链杂交。

[0247] 初始构建体的分析公开大约2.3ns的荧光寿命,而具有额外寡核苷酸组分902的构建体展现大约4.2ns的寿命。后一构建体的测量的寿命增加的一种可能的解释在于寡核苷酸组分902在经标记的区中赋予刚性。增加的刚性可借由限制每一染料至更有限的移动范围可能地促进染料分离。

[0248] 实施例3:受限连接体配置中染料间隔体长度的效应

[0249] 借由生成图10中所示的三染料标记的构建体进一步研发几何受限的连接体配置。如所示,核酸连接体部分包括三种主要寡核苷酸组分。第一组分包括经由所示四向具支链连接体共价连接的四个寡核苷酸链。这些链中的三者各自末端连接至染料分子(AttoRho6G),而第四链与第二寡核苷酸组分杂交。第二寡核苷酸组分经由所示具支链连接体末端连接至两个核苷多磷酸。包括三个经由所示具支链连接体共价连接的寡核苷酸链的第三寡核苷酸组分与第一组分的三个染料标记的链杂交以在经标记的区中赋予刚性。根据图10中所示的加框区域生成具有不同间隔体长度的两个单独三染料构建体。

[0250] 具有较长间隔体的第一三染料标记的核苷酸构建体(参见图10,加框区域,顶部)显示荧光强度相对于单一染料标记的核苷酸构建体为三倍。另外,应注意,当与具有相同染料分子的二染料、一核苷酸构建体比较时,寿命稍微减少(未显示)。针对具有较短间隔体的第二三染料标记的核苷酸构建体获得的测量(参见图10,加框区域,底部)显示相对于第一三染料标记的构建体荧光寿命稍微增加。

[0251] 较早三染料标记的核苷酸在测序反应期间产生多个寿命,此被认为是相互作用的两种染料产生第一寿命而非相互作用染料产生第二寿命的结果。重要的是,在测序反应期间针对图10中所示的任一三染料标记的分子仅观察到单一寿命。

[0252] 等效内容及范围

[0253] 尽管本文中已阐述并阐释若干发明性实施方案,但本领域技术人员将易于构想用于实施功能和/或获得结果和/或本文所述的优点中的一或多个的各种其他构件和/或结构,且这些变化形式和/或修改形式中的每一个皆认为是在本文所述的发明性实施方案的范围内。更一般而言,本领域技术人员将易于了解,本文所述的所有参数、尺寸、材料及配置意欲具有实例性且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用发明性教导的一个或多个特定应用。本领域技术人员仅使用例行实验即可认识或能够断定本文所述的发明性具体实施方案的诸多等效内容。因此,应理解,前述实施方案仅是以举例方式呈现且在随附权利要求及其等效内容的范围内,可不同于所特定阐述及主张来实施发明性实施方案。本发明的发明性实施方案是针对本文所述的每一个别特征、系统、对象、材料、试剂盒和/或方法。另外,若这些特征、系统、对象、材料、试剂盒和/或方法不相互矛盾,则两个或更多个这些特

征、系统、对象、材料、试剂盒和/或方法的任何组合包括于本发明的发明范围内。

[0254] 本文所定义及使用的所有定义应理解为掌握于辞典定义、以引用方式并入的文档中的定义和/或所定义术语的普遍意义以内。

[0255] 本文所公开的所有参考文献、专利及专利申请关于其每一个所列举的目标物以引用的方式并入,其在一些情形中可涵盖整个文档。

[0256] 除非明确指示为相反,否则如本文在说明书及在权利要求中使用的不定冠词「一(a、an)」应理解为意指「至少一个」。

[0257] 如本文在说明书及权利要求中所用,词组「和/或」应理解为意指如此结合的要素中的「任一个或两者」,即,在一些情形下以结合方式存在且在其他情形下以分离方式存在的要素。以「和/或」列示的多个要素应视为呈相同方式,即,如此结合的要素中的「一或多个」。可视情况存在除由「和/或」从句特定识别的要素以外的其他要素,无论与特定识别的那些要素相关抑或不相关。因此,作为非限制性实例,当结合诸如「包含」等开放式语言使用时,对「A和/或B」的提及在一个实施方案中可是指仅A(视情况包括除B以外的要素);在另一实施方案中,是指仅B(视情况包括除A以外的要素);在再一实施方案中,是指A及B两者(视情况包括其他元素);等等。

[0258] 如本文中在说明书中及在权利要求中所用,「或」应理解为具有与如上文所定义的「和/或」相同的含义。举例而言,在分离清单中的物项时,「或」或者「和/或」应阐释为是包括性的,亦即,包括多个要素或要素清单中的至少一个(但亦包括一个以上)及视情况包括额外未列出物项。术语「仅 (only)」明确指示相反情形,诸如「……中的仅一个」或「……中的恰好一个」或在权利要求中使用时「由……组成」将是指包括若干要素或要素清单中的恰好一个。一般而言,本文所用术语「或」在前面有排他性术语(例如「或者」、「……中的一个」、「……中的仅一个」或「……中的恰好一个」)时应仅将其解释为指示排他性选择(亦即,「一个或另一个而非两者」)。当在权利要求中使用时,「基本上由……组成」应具有如其用于专利法律领域中的普通含义。

[0259] 如本文在说明书中及在权利要求中所用,关于一或多个要素的清单的词组「至少一」应理解为意指至少一个选自要素清单中的任一或多个要素的要素,但未必包括要素清单内特定列出的各自及每一要素中的至少一个,且不排除要素清单中要素的任何组合。此定义亦允许可视情况存在除词组「至少一」所指的要素清单内特定识别的要素之外的要素,无论与特定识别的那些要素相关抑或不相关。因此,作为非限制性实例,在一个实施方案中,「A及B中的至少一个」(或等效地,「A或B中的至少一个」或等效地,「A和/或B中的至少一个」)可是指至少一个(视情况包括一个以上)A,而不存在B(且视情况包括除B以外的要素);在另一实施方案中,是指至少一个(视情况包括一个以上)B,而不存在A(且视情况包括除A以外的要素);在又一实施方案中,是指至少一个(视情况包括一个以上)A及至少一个(视情况包括一个以上)B(且视情况包括其他要素);等等。

[0260] 亦应理解,除非明确指示相反情形,否则在本文所主张的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,该方法的步骤或动作的顺序不必受限于该方法所列举的步骤或动作的顺序。

[0261] 在权利要求以及在上文说明书中,所有过渡性词组(诸如「包含」、「包括」、「携载」、「具有」、「含有」、「涉及」、「固持」、「由…构成」及诸如此类)应理解为是开放式,亦即,

意指包括但不限于。仅过渡性词组「由……组成」及「基本上由……组成」应分别是封闭式或半封闭式过渡性词组,如美国专利局专利审查程序手册(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03节中所陈述。应了解,在替代实施方案中,使用开放性过渡性词组(例如「包含」)的本文件中所述的实施方案亦涵盖为「由开放性过渡性词组阐述的特征组成」及「基本上由其组成」。举例而言,若本公开内容阐述「组合物包含A及B」,则本公开内容亦涵盖「组合物由A及B组成」及「组合物基本上由A及B组成」的替代实施方案。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 宽腾矽公司(Quantum-Si Incorporated)
[0003] <120> 高强度经标记的反应物组合物及用于测序的方法
[0004] <130> R0708.70026W000
[0005] <140> 尚未指定
[0006] <141> 2018-07-24
[0007] <150> US 62/536,426
[0008] <151> 2017-07-24
[0009] <160> 19
[0010] <170> PatentIn version 3.5
[0011] <210> 1
[0012] <211> 35
[0013] <212> DNA
[0014] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0015] <220>
[0016] <223> 合成的多核苷酸
[0017] <220>
[0018] <221> misc_feature
[0019] <222> (21) .. (22)
[0020] <223> 由连接体修饰的
[0021] <220>
[0022] <221> misc_feature
[0023] <222> (30) .. (31)
[0024] <223> 由连接体修饰的
[0025] <400> 1
[0026] cacgcgtgga accctcgatt aattgcctta attgc 35
[0027] <210> 2
[0028] <211> 37
[0029] <212> DNA
[0030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0031] <220>
[0032] <223> 合成的多核苷酸
[0033] <400> 2
[0034] gcaatttaag gcaatttaat cgagggttcc acgcgtg 37
[0035] <210> 3
[0036] <211> 29
[0037] <212> DNA
[0038] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

- [0039] <220>
- [0040] <223> 合成的多核苷酸
- [0041] <220>
- [0042] <221> misc_feature
- [0043] <222> (17) .. (18)
- [0044] <223> 由iCy3修饰的
- [0045] <400> 3
- [0046] ccacgcgtgg aaccctttg ggatttcca 29
- [0047] <210> 4
- [0048] <211> 25
- [0049] <212> DNA
- [0050] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0051] <220>
- [0052] <223> 合成的多核苷酸
- [0053] <400> 4
- [0054] tggatcccaa gggttccacg cgtgg 25
- [0055] <210> 5
- [0056] <211> 63
- [0057] <212> DNA
- [0058] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0059] <220>
- [0060] <223> 合成的多核苷酸
- [0061] <220>
- [0062] <221> misc_feature
- [0063] <222> (30) .. (30)
- [0064] <223> 由连接体修饰的
- [0065] <220>
- [0066] <221> misc_feature
- [0067] <222> (50) .. (50)
- [0068] <223> 由连接体修饰的
- [0069] <400> 5
- [0070] cgctagtcgg tgagtaccca caaatgtttt ttacatttga gtatacattt tttgtataca 60
- [0071] ggg 63
- [0072] <210> 6
- [0073] <211> 16
- [0074] <212> DNA
- [0075] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0076] <220>
- [0077] <223> 合成的多核苷酸

- [0078] <400> 6
- [0079] tactcacgga ctagcg 16
- [0080] <210> 7
- [0081] <211> 9
- [0082] <212> DNA
- [0083] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0084] <220>
- [0085] <223> 合成的多核苷酸
- [0086] <400> 7
- [0087] tatgggttag 9
- [0088] <210> 8
- [0089] <211> 9
- [0090] <212> DNA
- [0091] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0092] <220>
- [0093] <223> 合成的多核苷酸
- [0094] <400> 8
- [0095] ctacccata 9
- [0096] <210> 9
- [0097] <211> 20
- [0098] <212> DNA
- [0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0100] <220>
- [0101] <223> 合成的多核苷酸
- [0102] <400> 9
- [0103] ccacgcgtgg tagggatcca 20
- [0104] <210> 10
- [0105] <211> 20
- [0106] <212> DNA
- [0107] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0108] <220>
- [0109] <223> 合成的多核苷酸
- [0110] <400> 10
- [0111] tggatcccta ccacgcgtgg 20
- [0112] <210> 11
- [0113] <211> 17
- [0114] <212> DNA
- [0115] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0116] <220>

- [0117] <223> 合成的多核苷酸
- [0118] <400> 11
- [0119] agcttggca actgtta 17
- [0120] <210> 12
- [0121] <211> 17
- [0122] <212> DNA
- [0123] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0124] <220>
- [0125] <223> 合成的多核苷酸
- [0126] <400> 12
- [0127] taacagttgc ccaagct 17
- [0128] <210> 13
- [0129] <211> 26
- [0130] <212> DNA
- [0131] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0132] <220>
- [0133] <223> 合成的多核苷酸
- [0134] <400> 13
- [0135] gcaatttaac gatgggttcca cgcgtg 26
- [0136] <210> 14
- [0137] <211> 25
- [0138] <212> DNA
- [0139] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0140] <220>
- [0141] <223> 合成的多核苷酸
- [0142] <220>
- [0143] <221> misc_feature
- [0144] <222> (20) .. (21)
- [0145] <223> 由连接体修饰的
- [0146] <400> 14
- [0147] cacgcgtgga accatcgta attgc 25
- [0148] <210> 15
- [0149] <211> 28
- [0150] <212> DNA
- [0151] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0152] <220>
- [0153] <223> 合成的多核苷酸
- [0154] <400> 15
- [0155] gtgcgctacc ttggaaatat tgcttacg 28

- [0156] <210> 16
- [0157] <211> 43
- [0158] <212> DNA
- [0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0160] <220>
- [0161] <223> 合成的多核苷酸
- [0162] <220>
- [0163] <221> misc_feature
- [0164] <222> (5) .. (6)
- [0165] <223> 由连接体修饰的
- [0166] <400> 16
- [0167] cgttaattgc ttttgcaat gcaatattcc caaggttagcg cac 43
- [0168] <210> 17
- [0169] <211> 37
- [0170] <212> DNA
- [0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0172] <220>
- [0173] <223> 合成的多核苷酸
- [0174] <220>
- [0175] <221> misc_feature
- [0176] <222> (22) .. (22)
- [0177] <223> 由连接体修饰的
- [0178] <220>
- [0179] <221> misc_feature
- [0180] <222> (32) .. (32)
- [0181] <223> 由连接体修饰的
- [0182] <400> 17
- [0183] cacgcgtgga accctcgatt atattgcctt atattgc 37
- [0184] <210> 18
- [0185] <211> 35
- [0186] <212> DNA
- [0187] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0188] <220>
- [0189] <223> 合成的多核苷酸
- [0190] <220>
- [0191] <221> misc_feature
- [0192] <222> (5) .. (6)
- [0193] <223> 由连接体修饰的
- [0194] <220>

- [0195] <221> misc_feature
- [0196] <222> (14) .. (15)
- [0197] <223> 由连接体修饰的
- [0198] <400> 18
- [0199] cgtaattcc gttaattagc tcccaagggtg cgcac 35
- [0200] <210> 19
- [0201] <211> 37
- [0202] <212> DNA
- [0203] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0204] <220>
- [0205] <223> 合成的多核苷酸
- [0206] <400> 19
- [0207] gtgcgcacct tgggagctaa tttaacggaa tttaacg 37

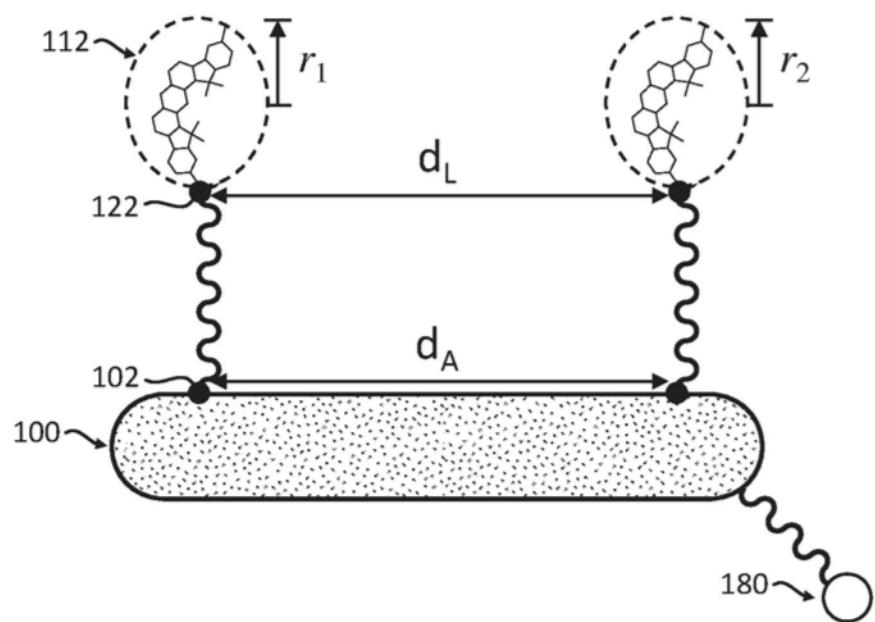


图1A

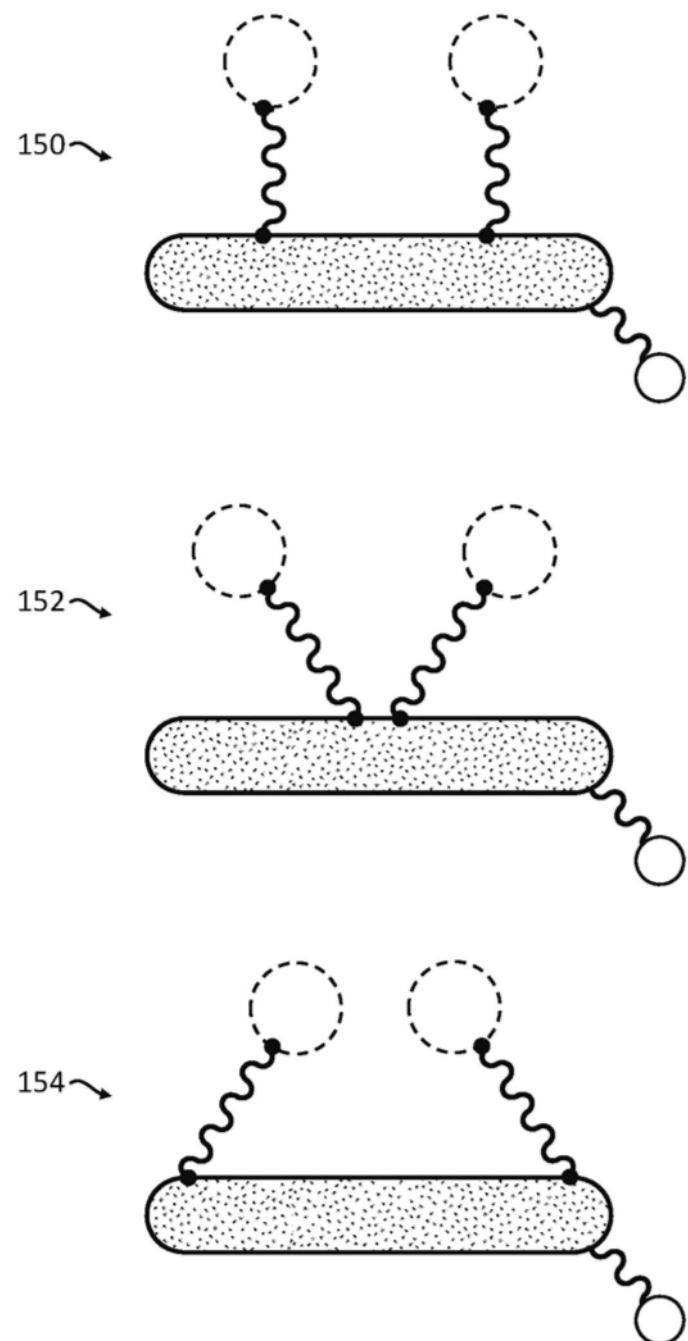


图1B

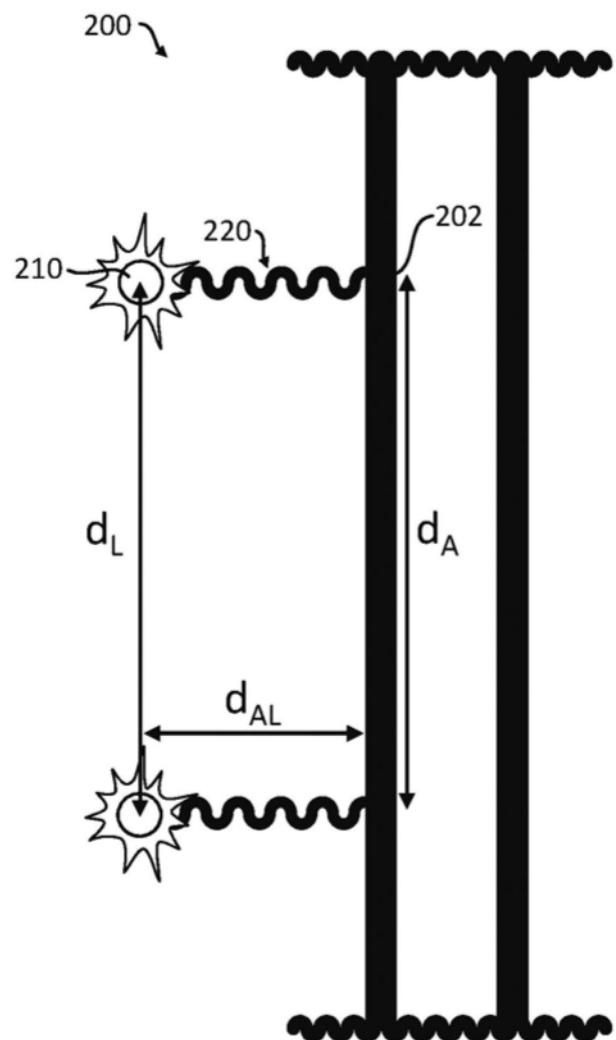


图2A

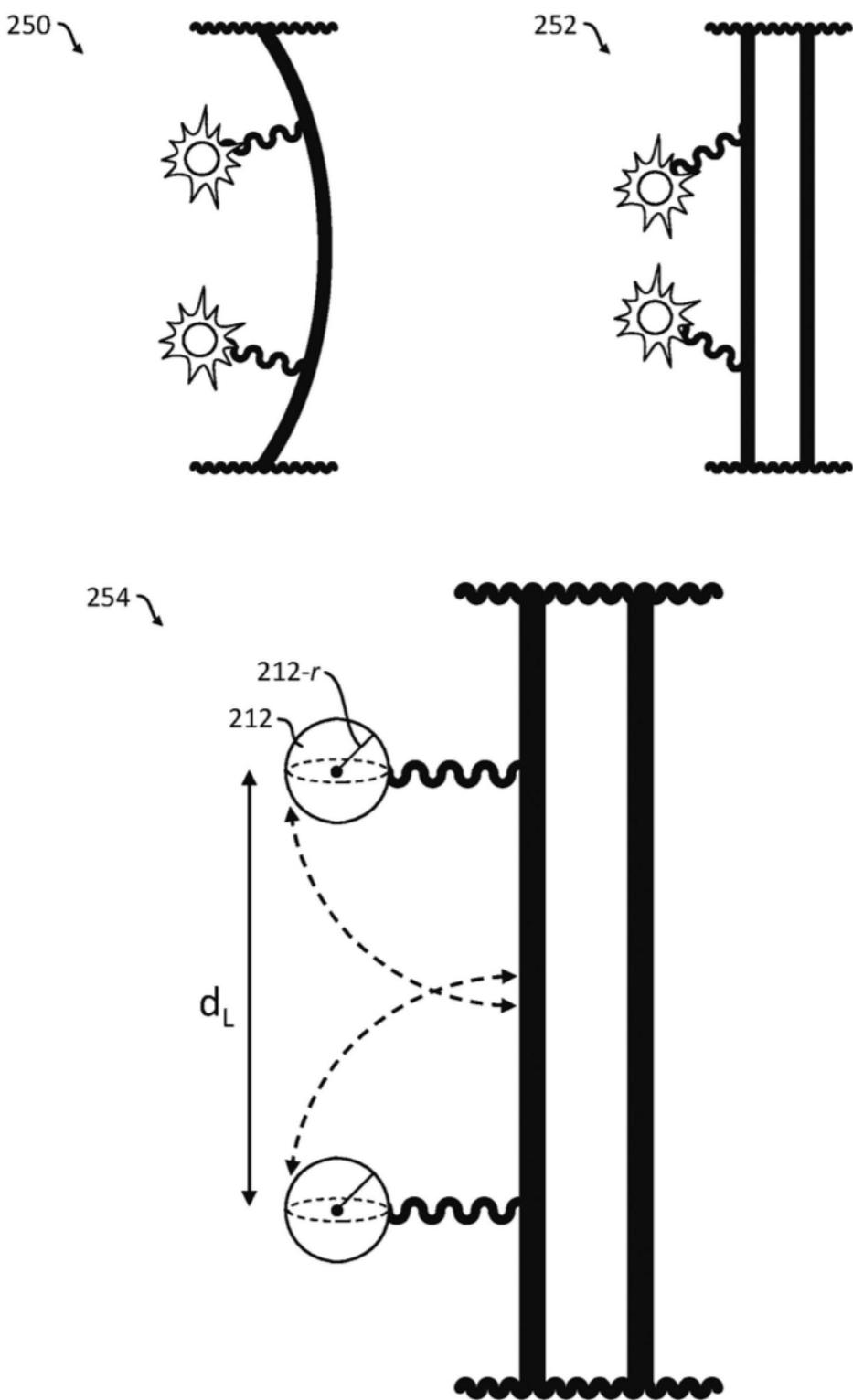


图2B

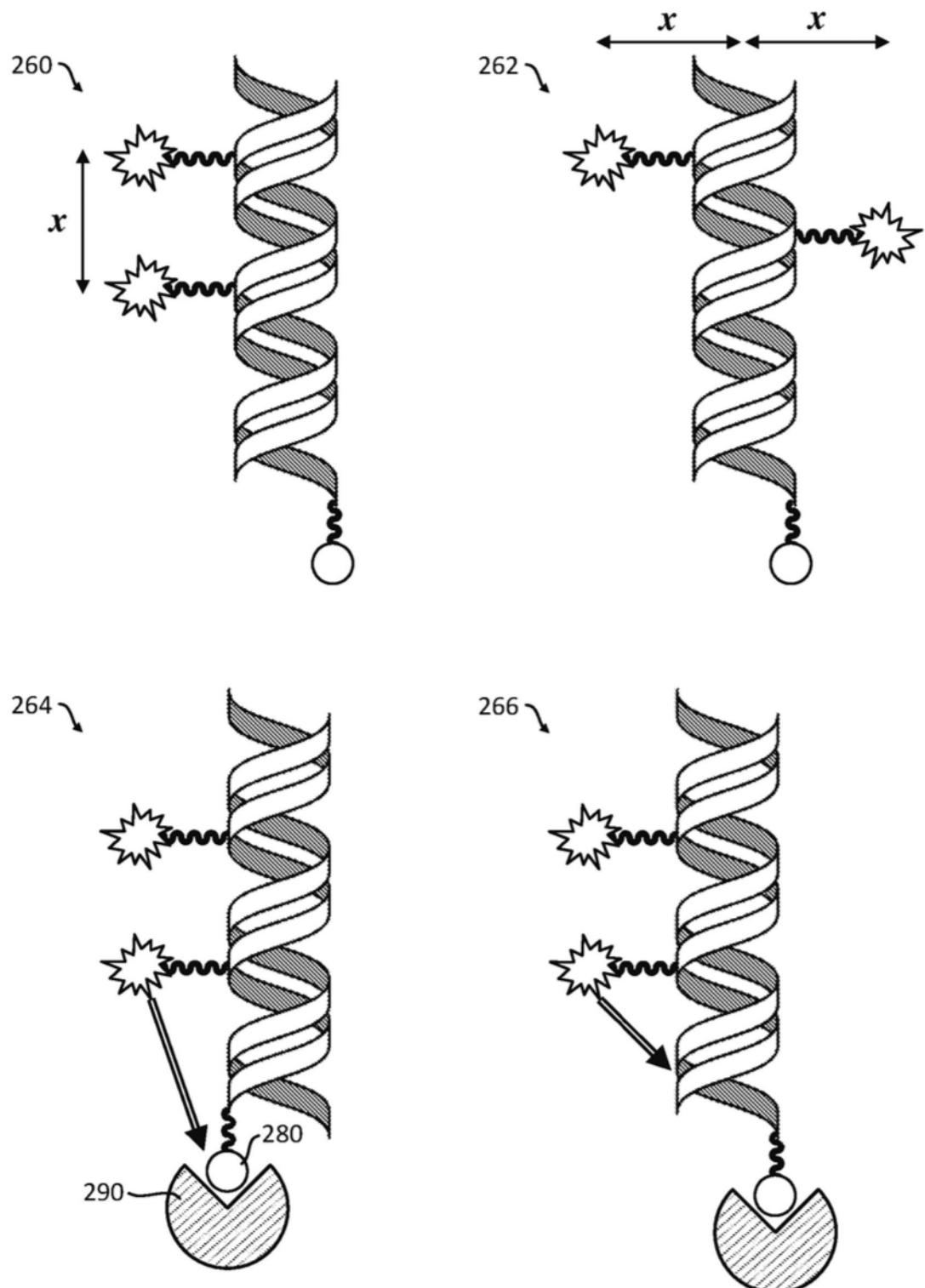


图2C

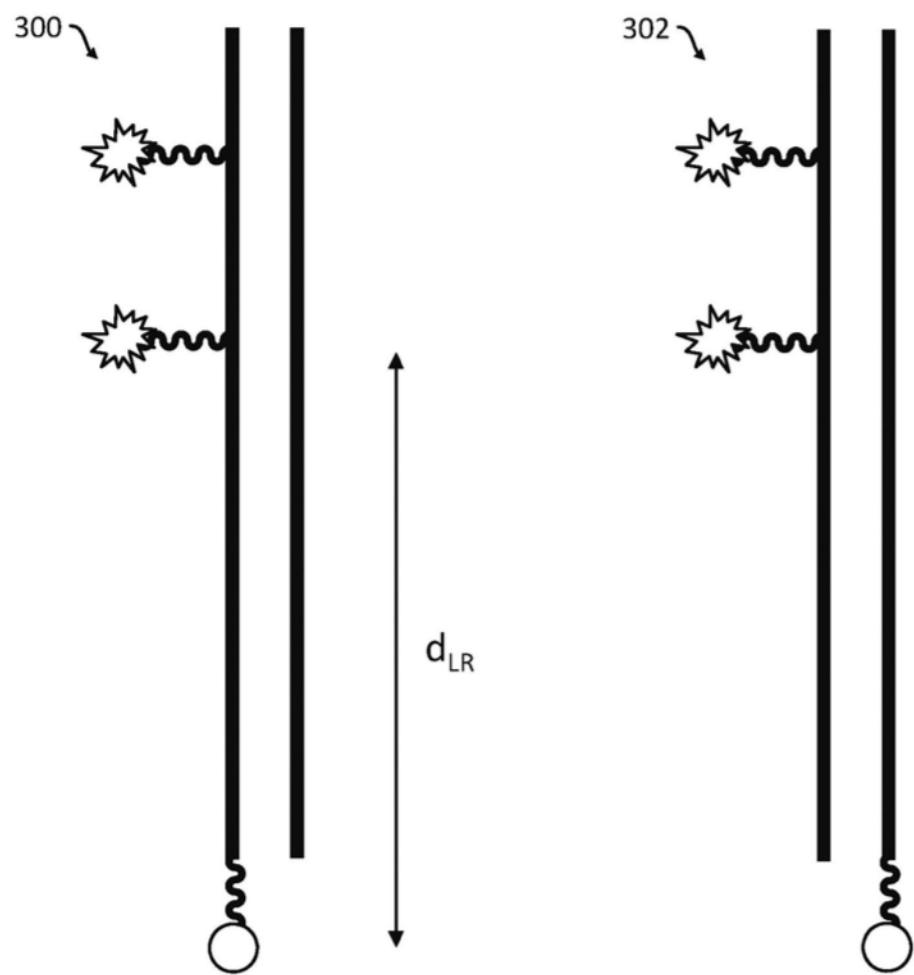


图3A

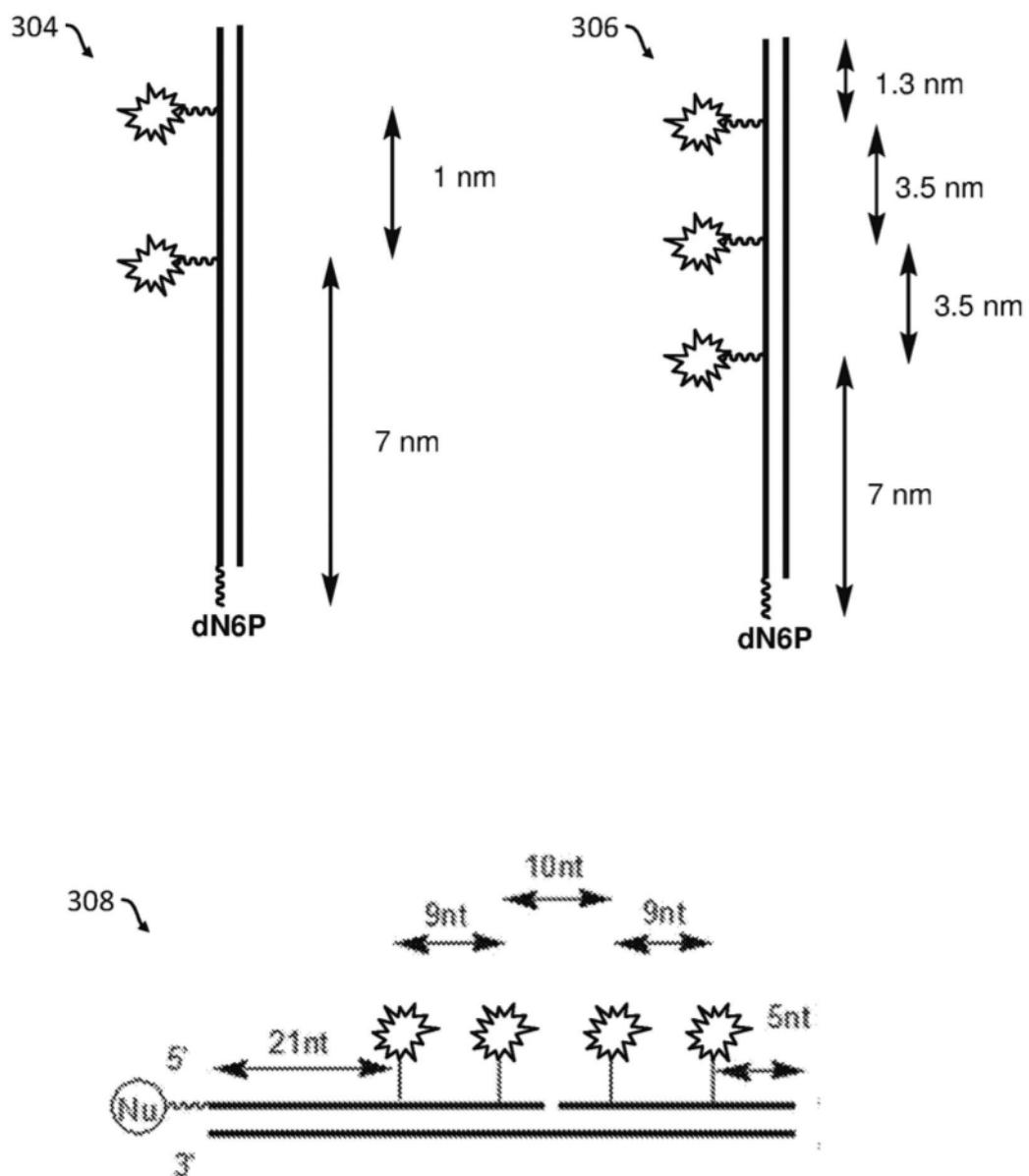


图3B

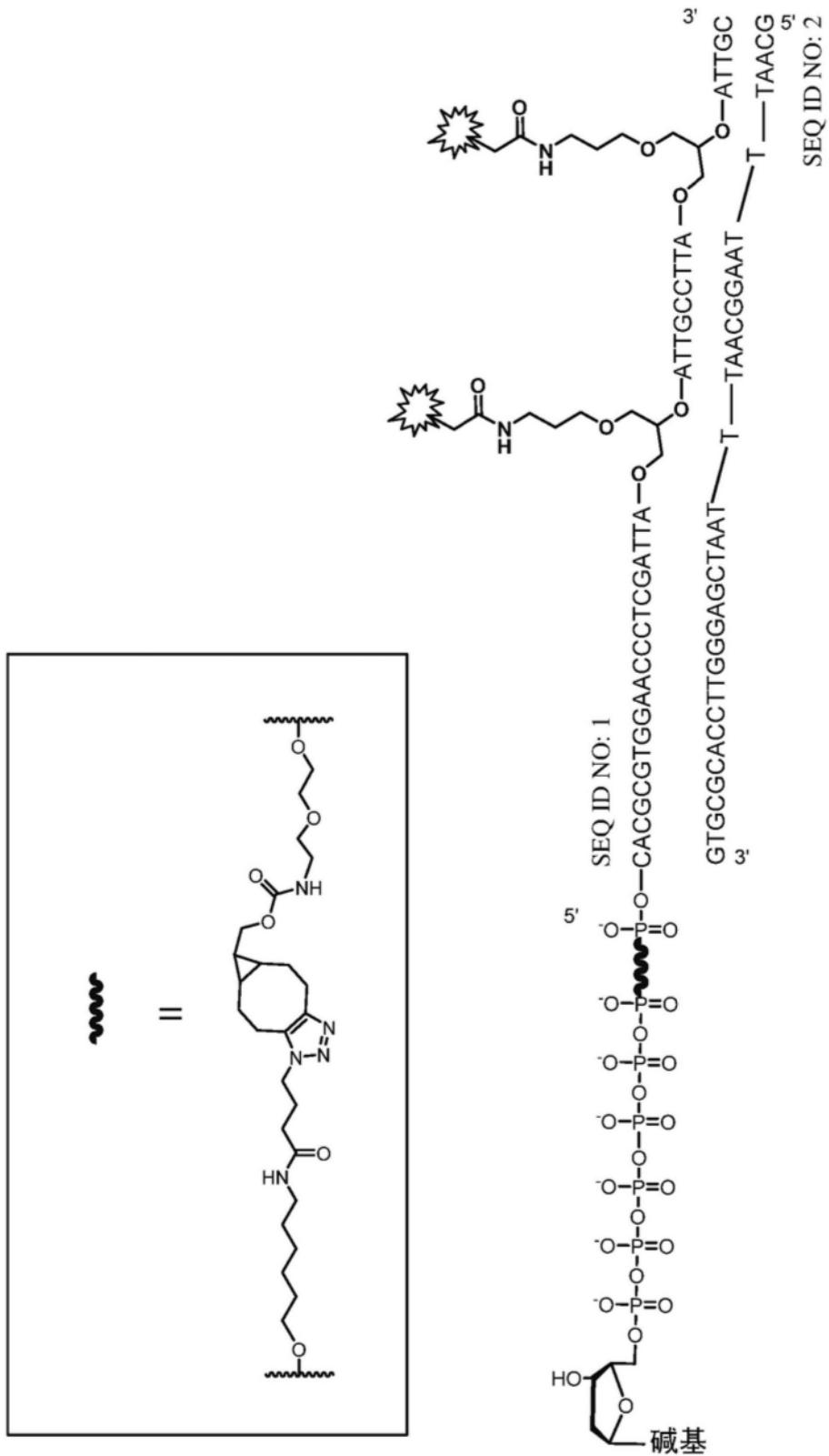


图3C

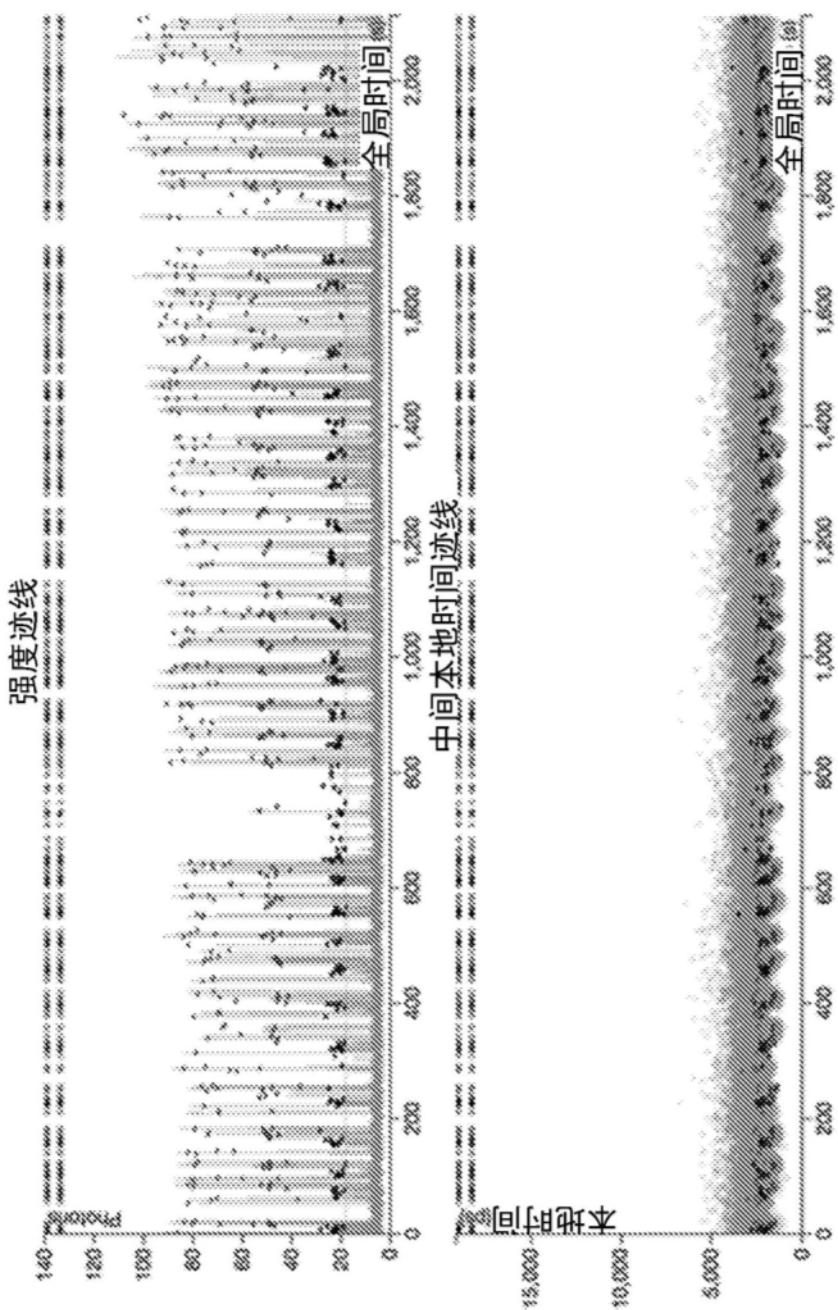


图3D

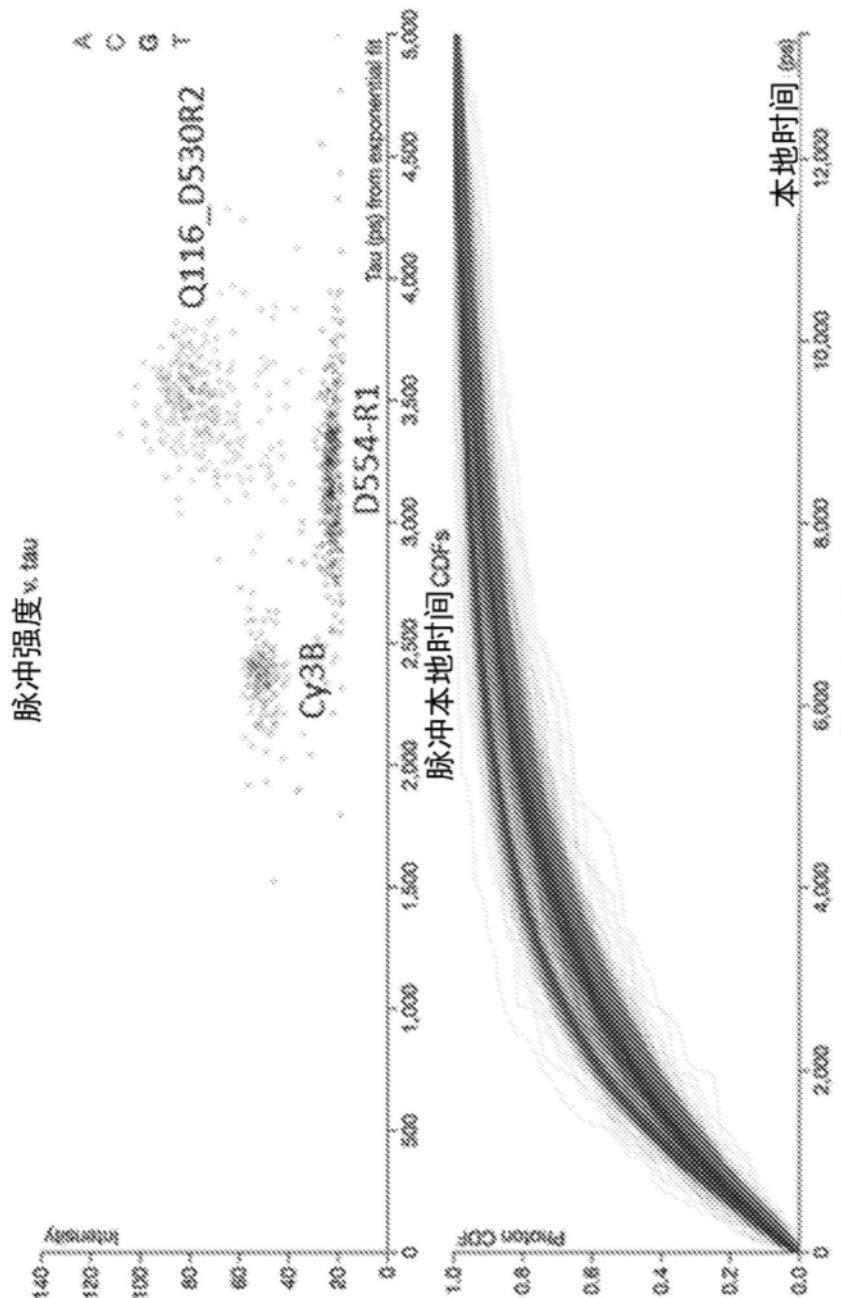


图3D(续)

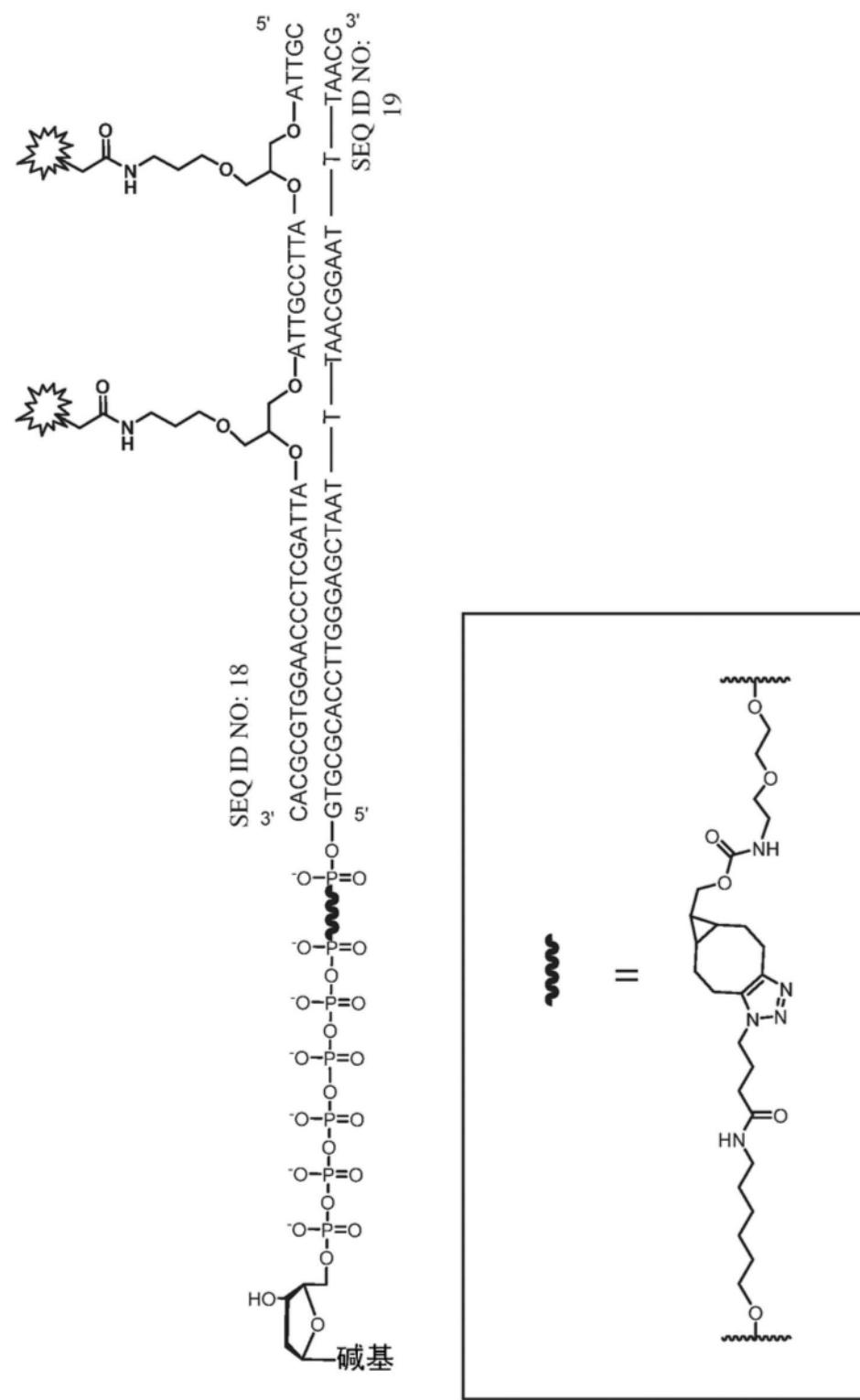


图3E

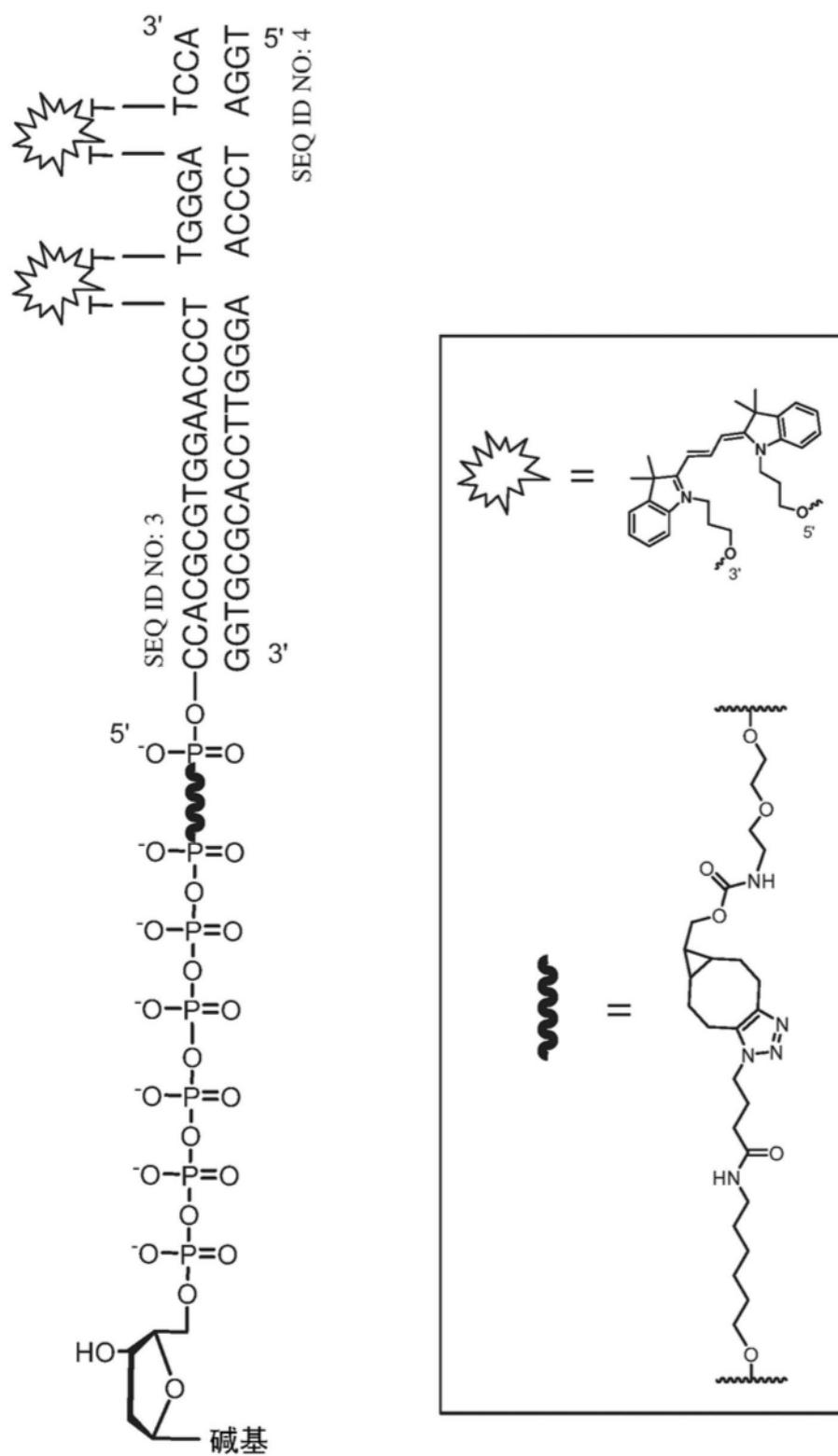


图3F

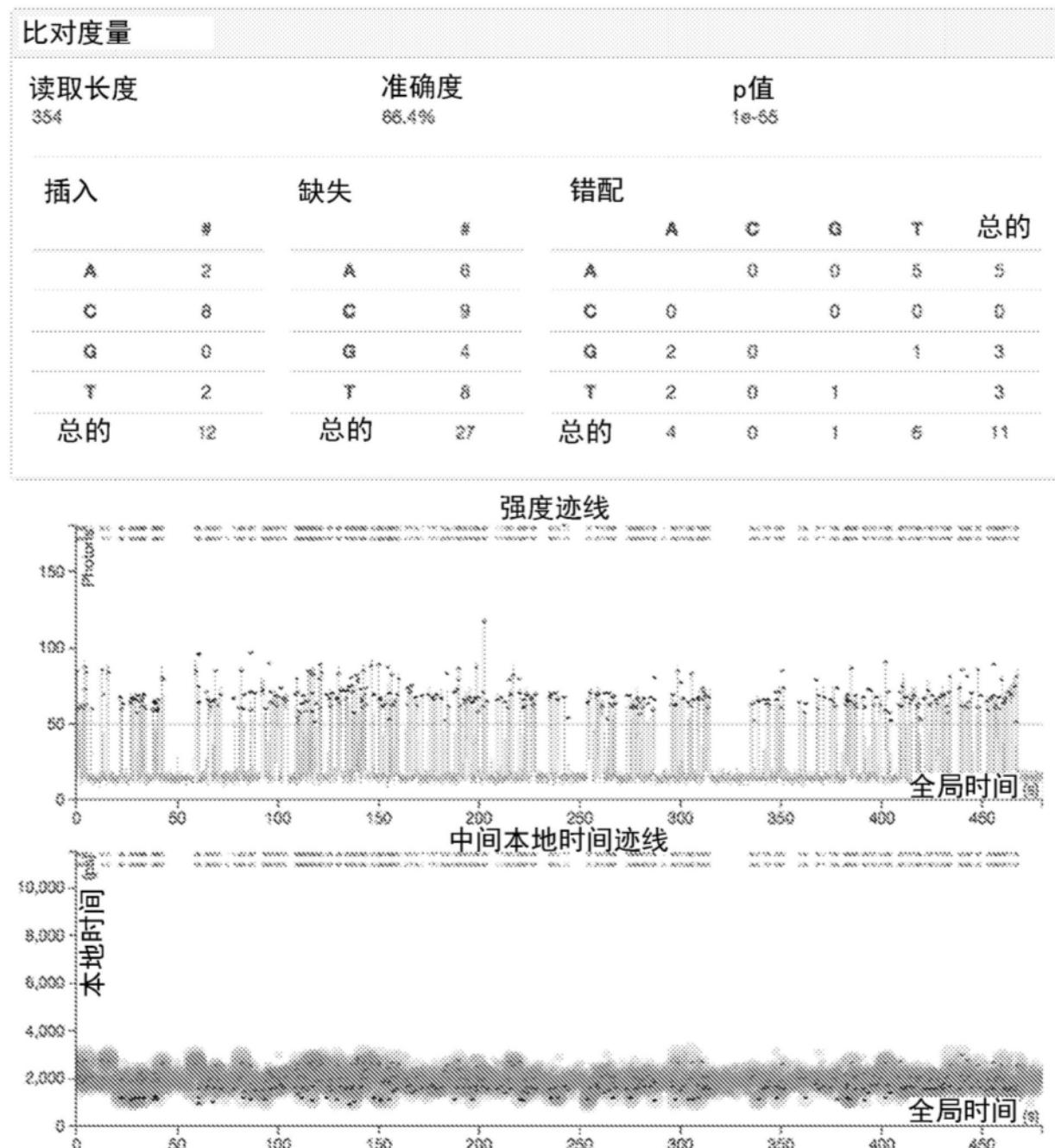


图3G

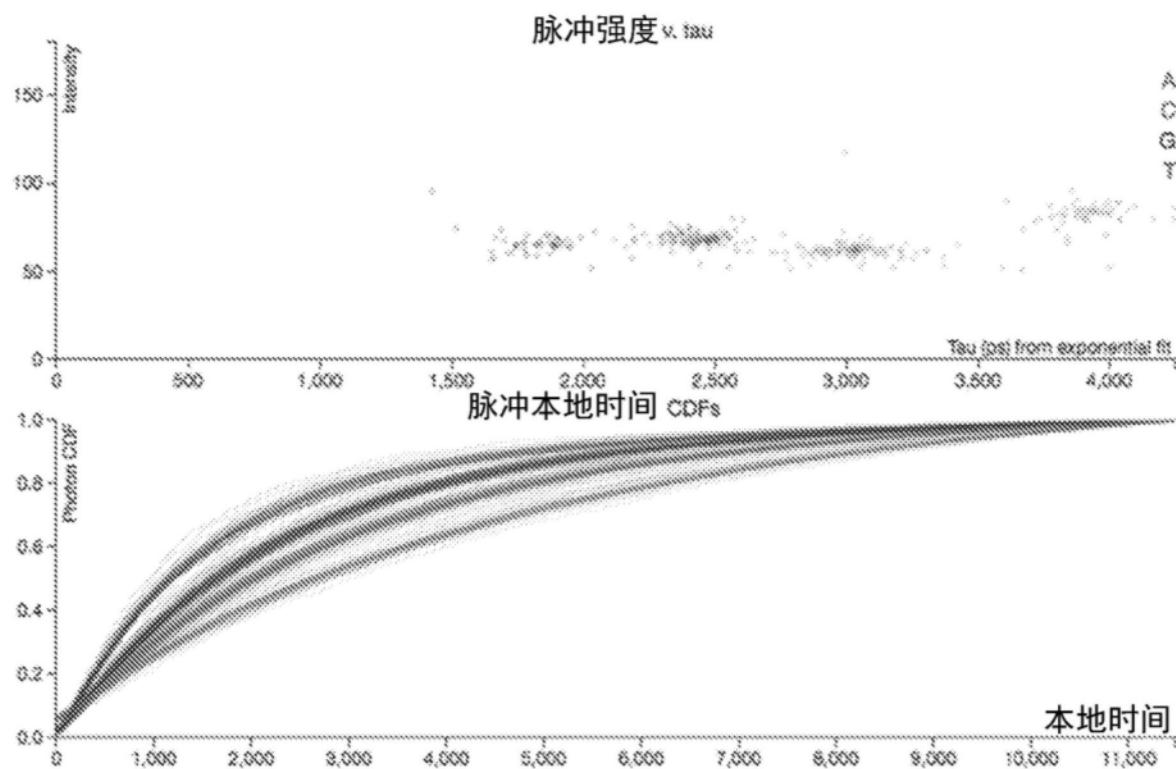


图3G (续)

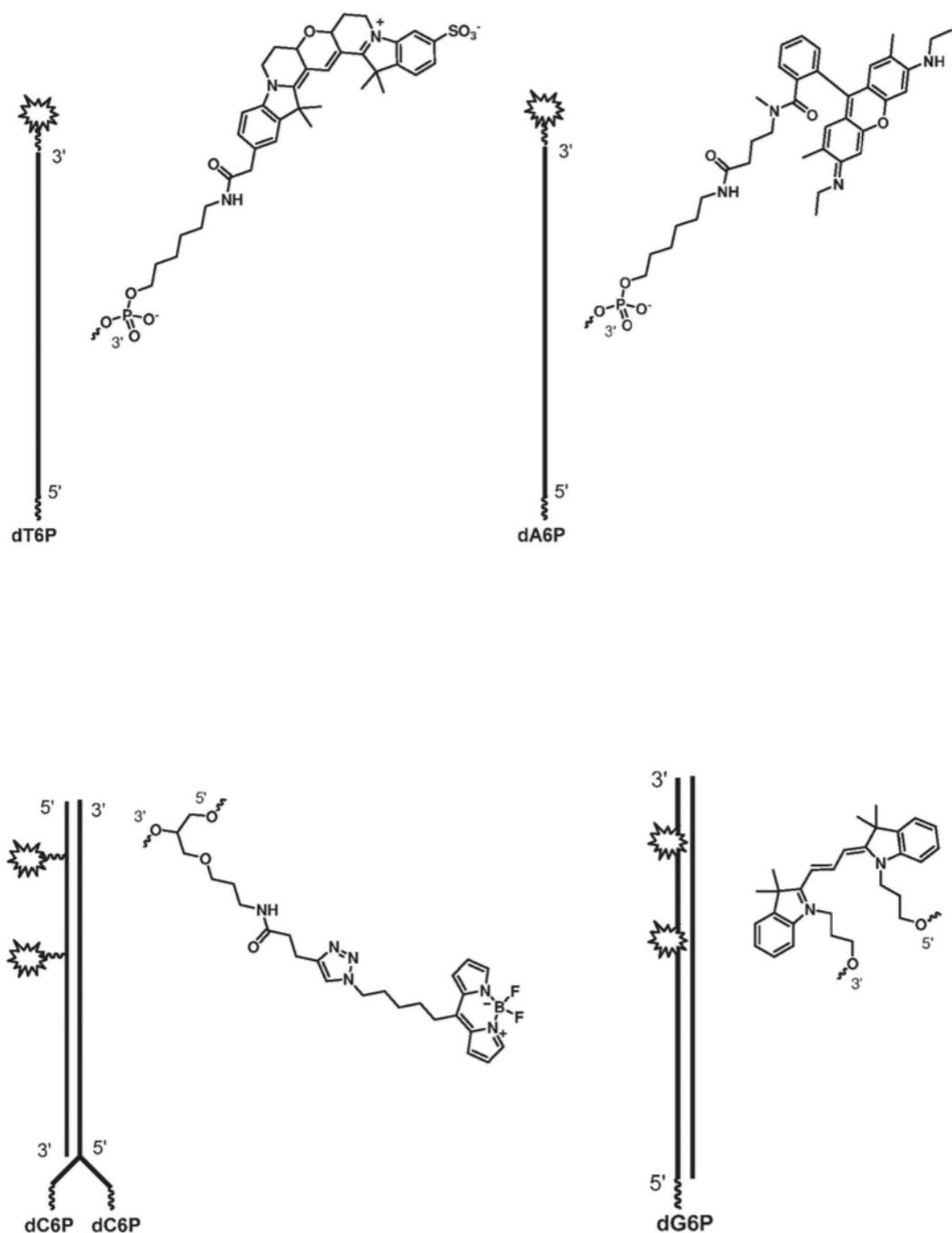


图3G(续)

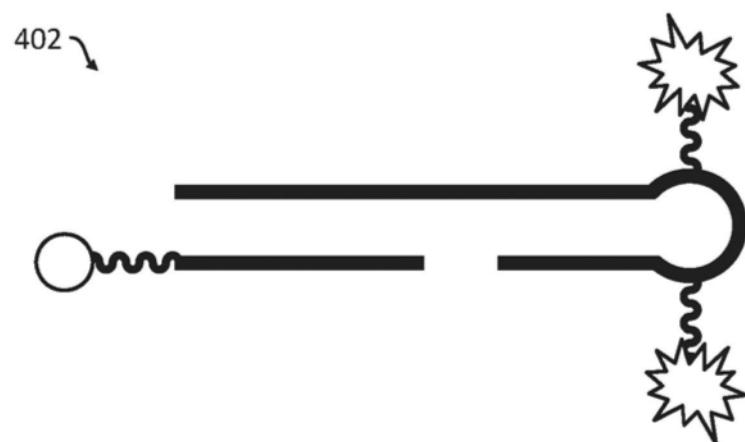
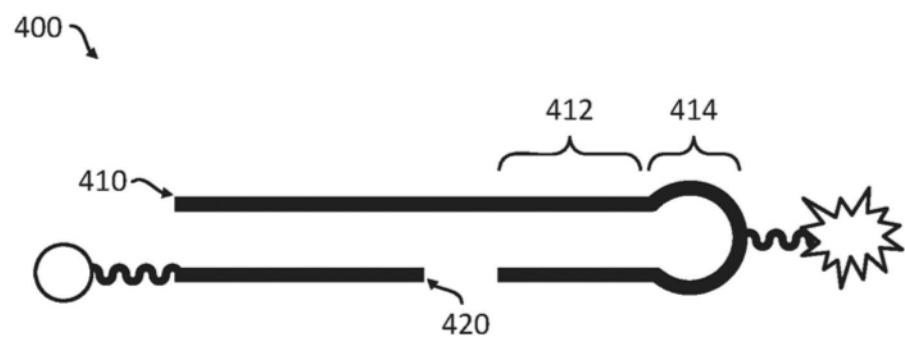


图4A

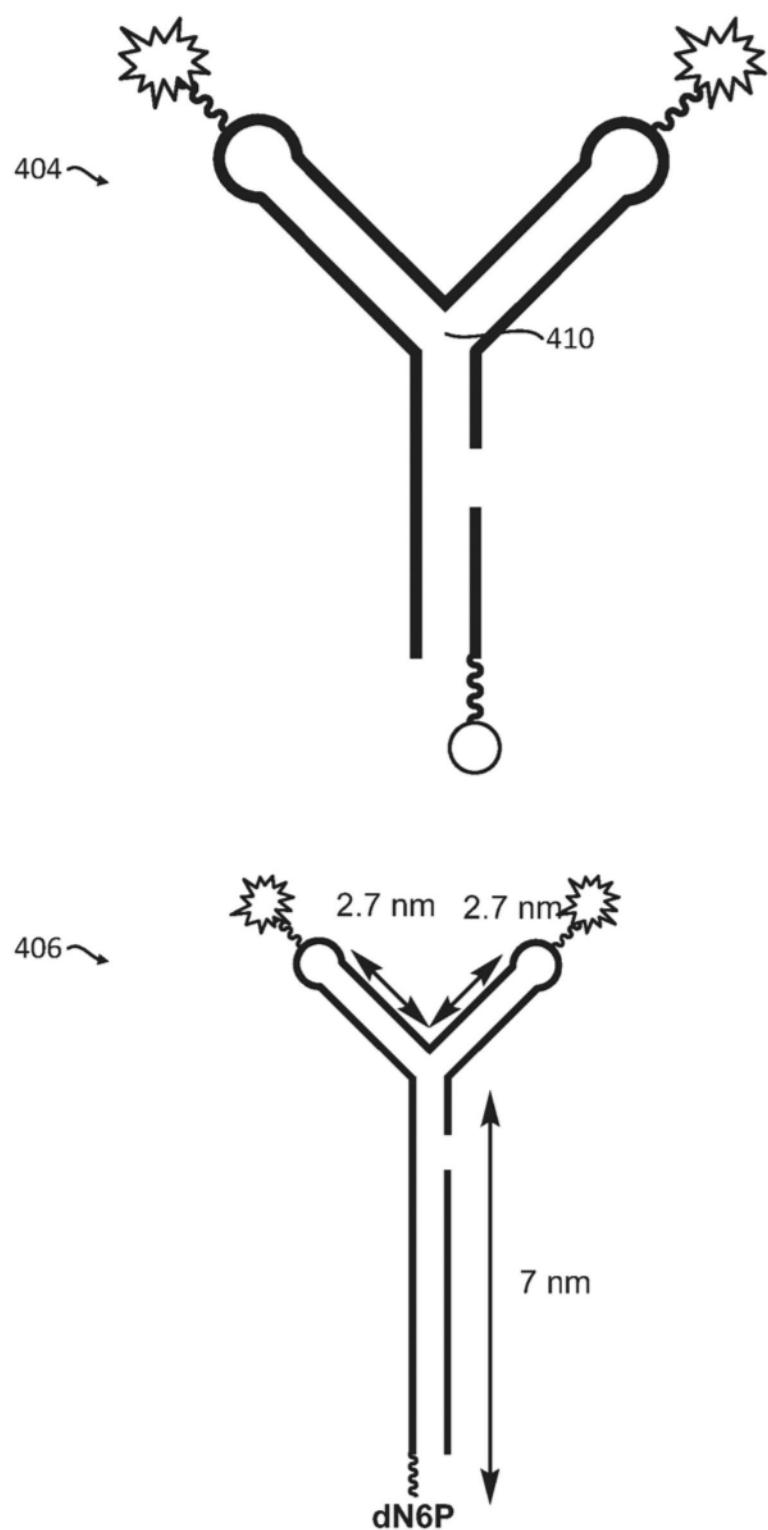


图4B

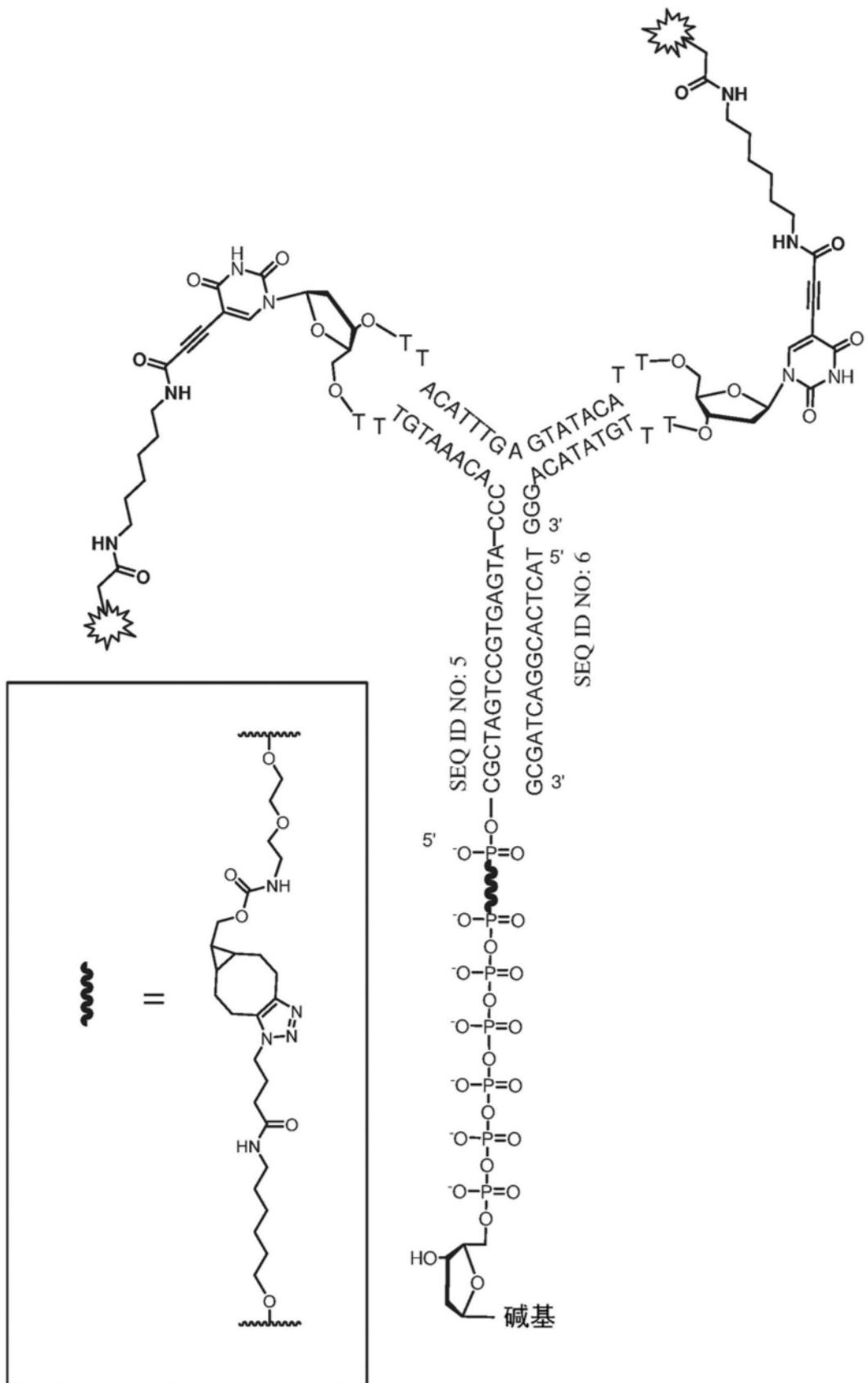


图4C

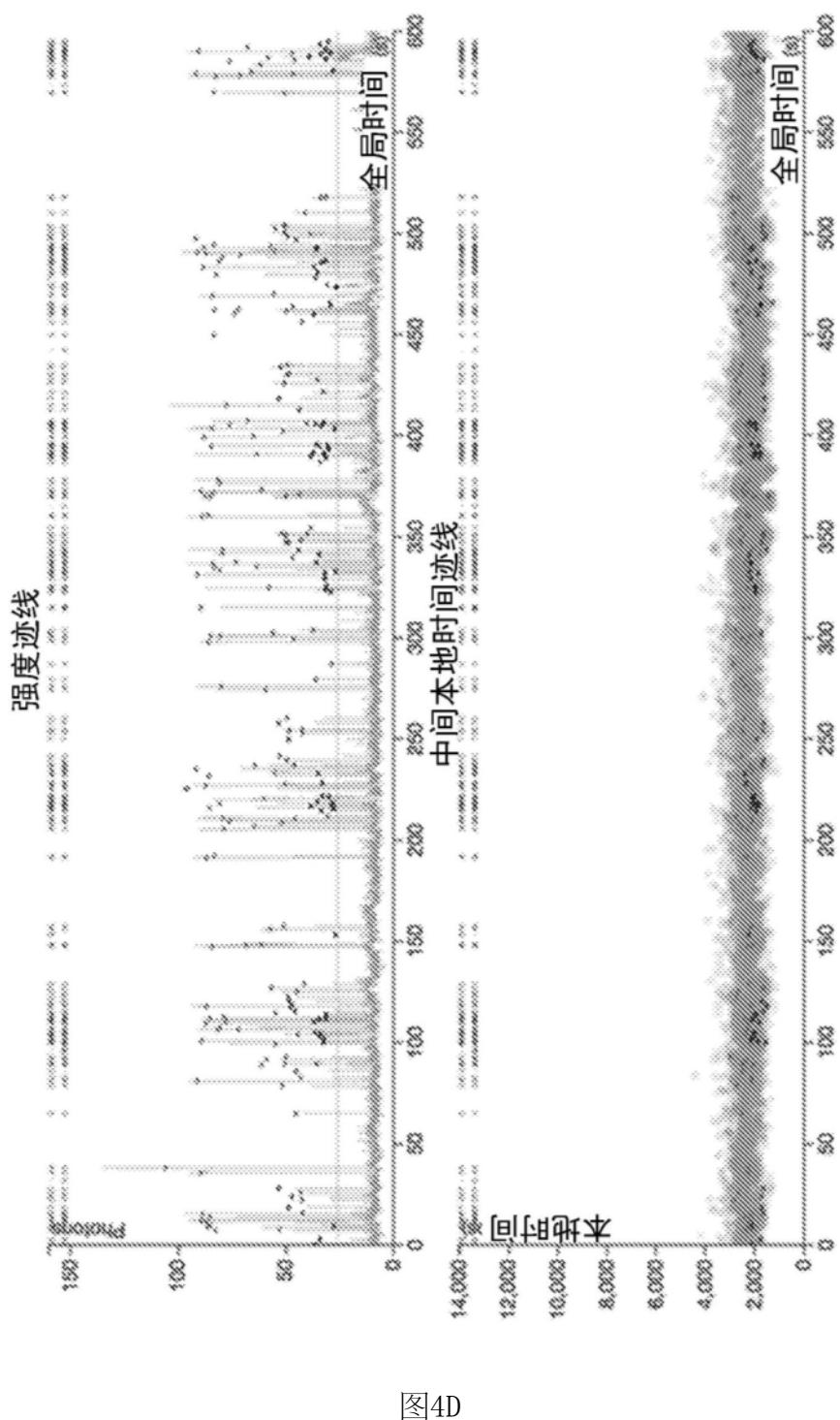
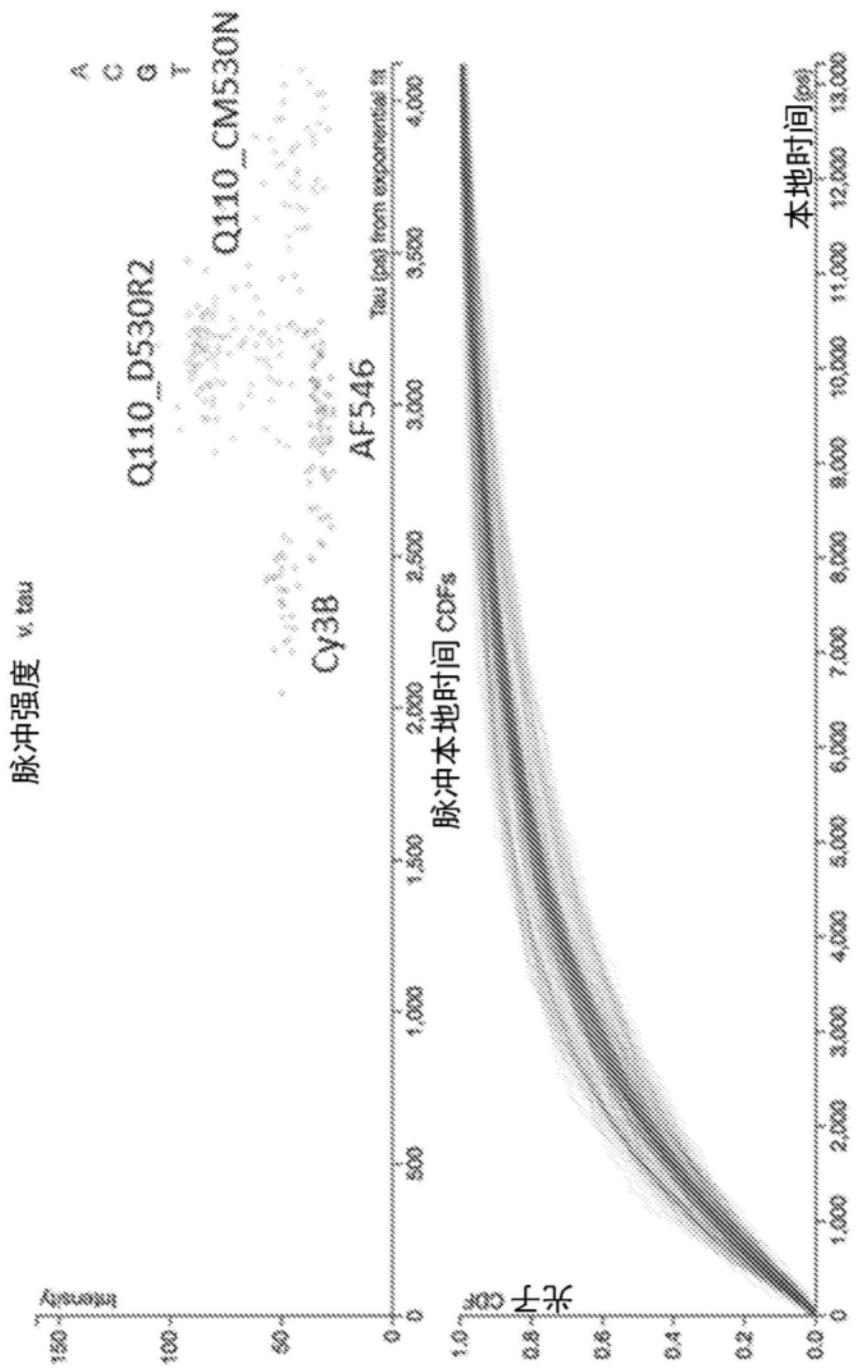


图4D



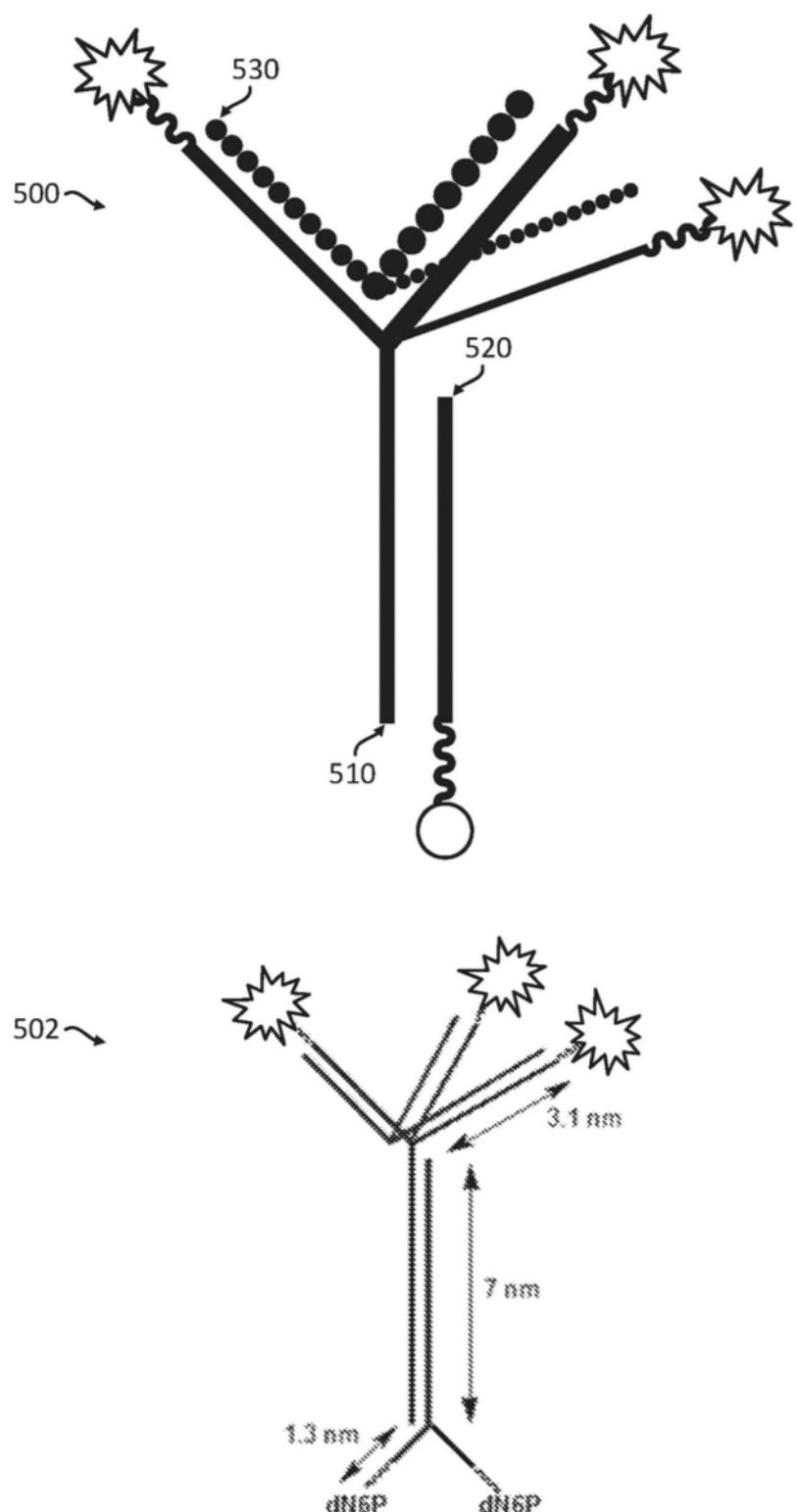


图5A

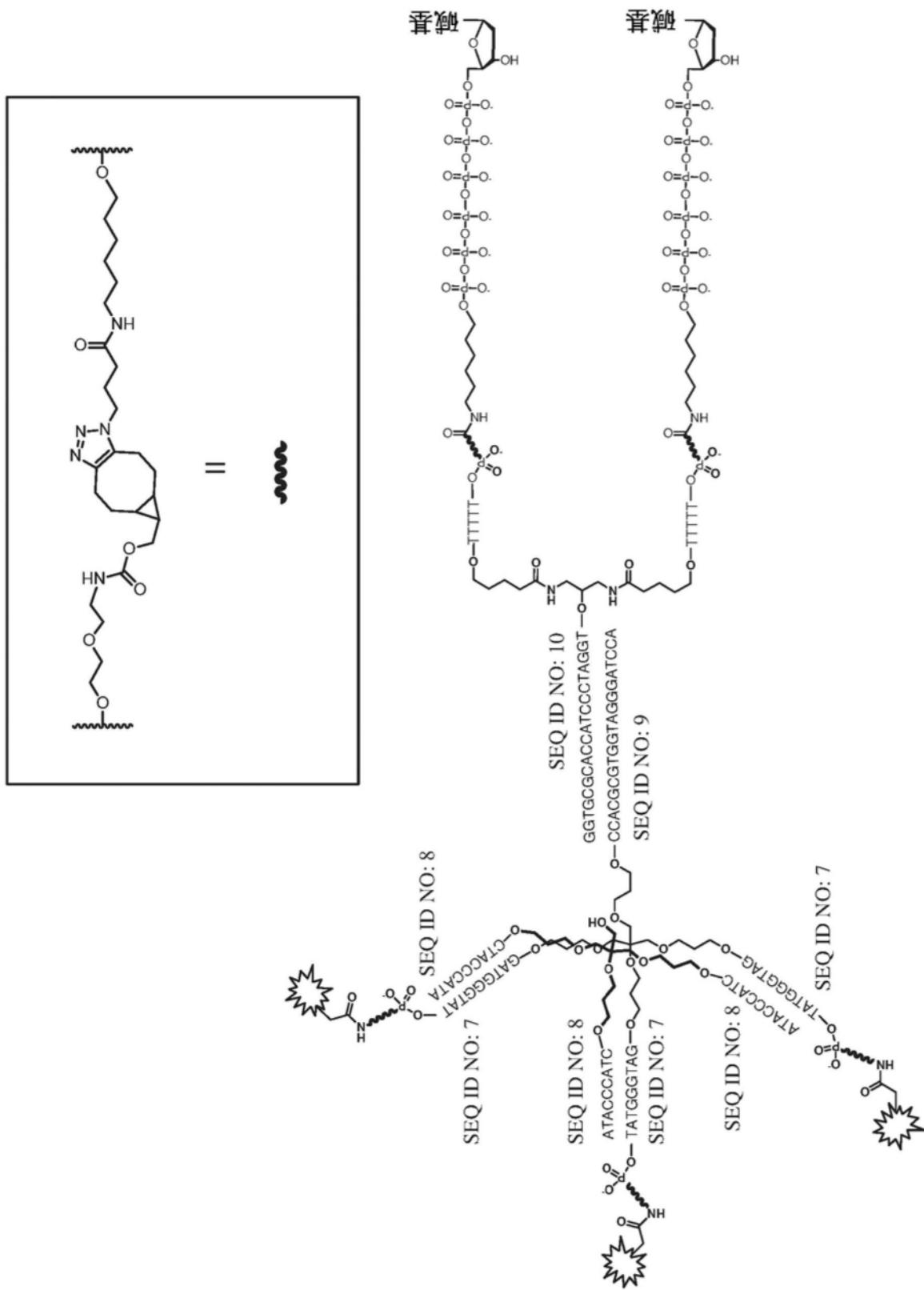


图5B

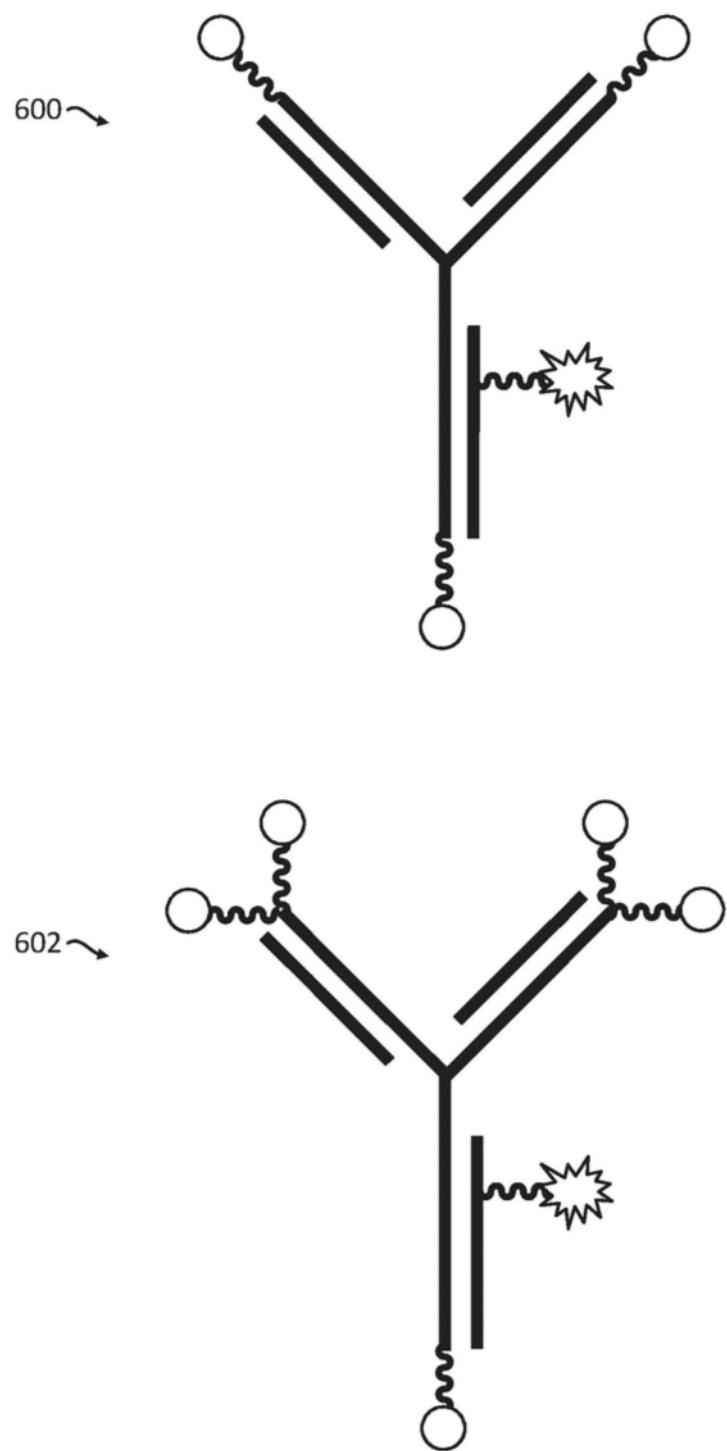


图6A

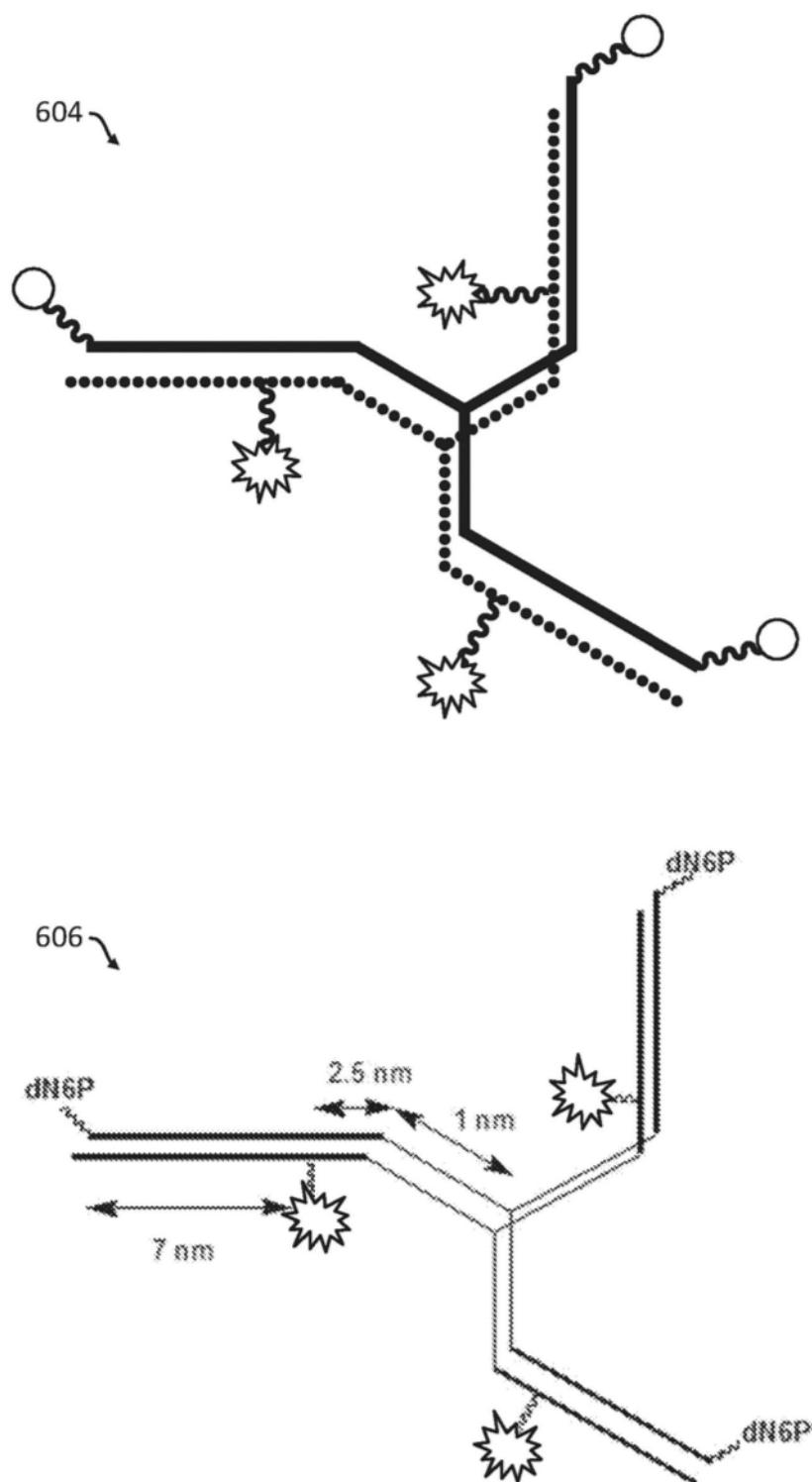


图6A(续)

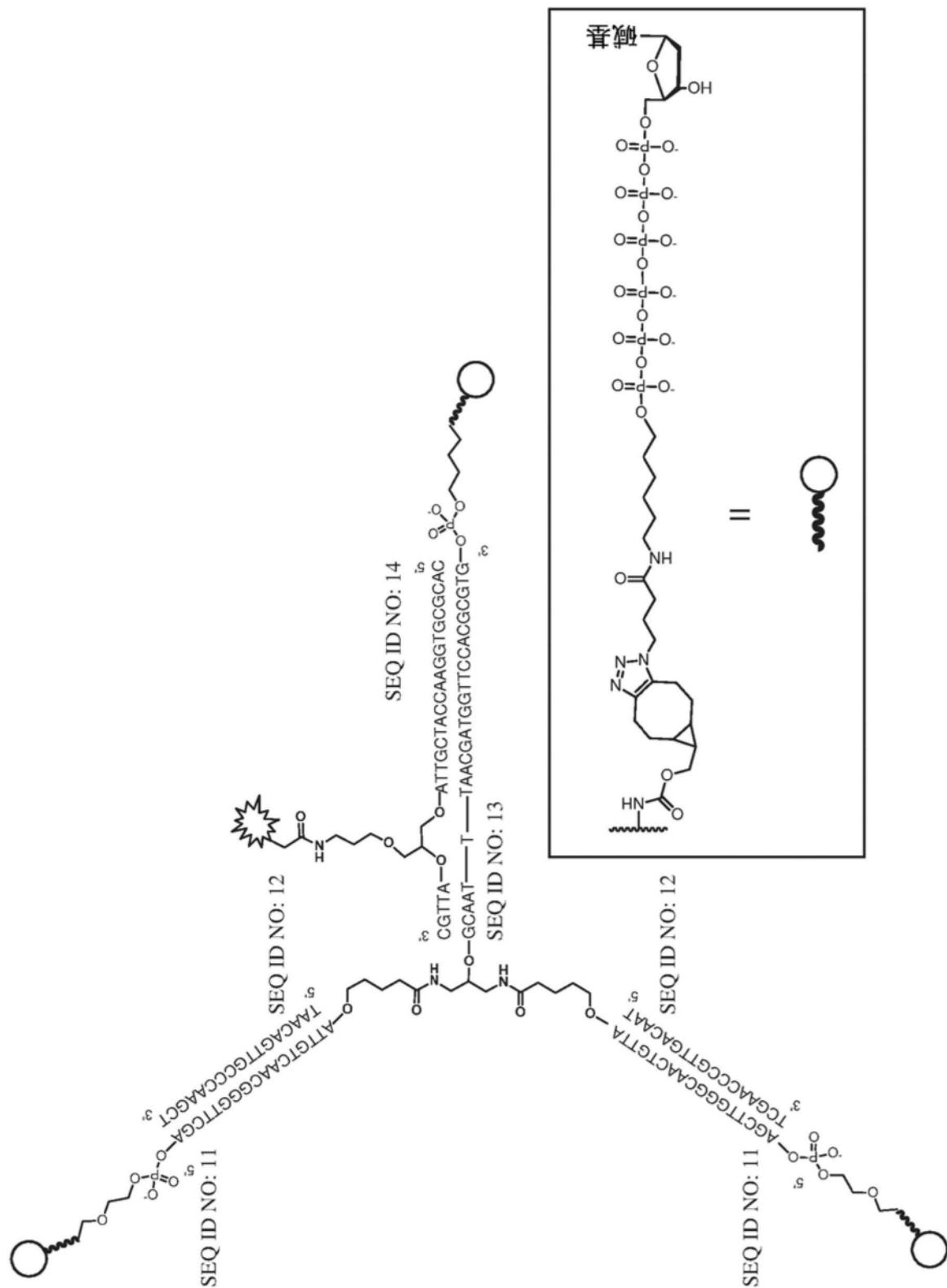


图6B

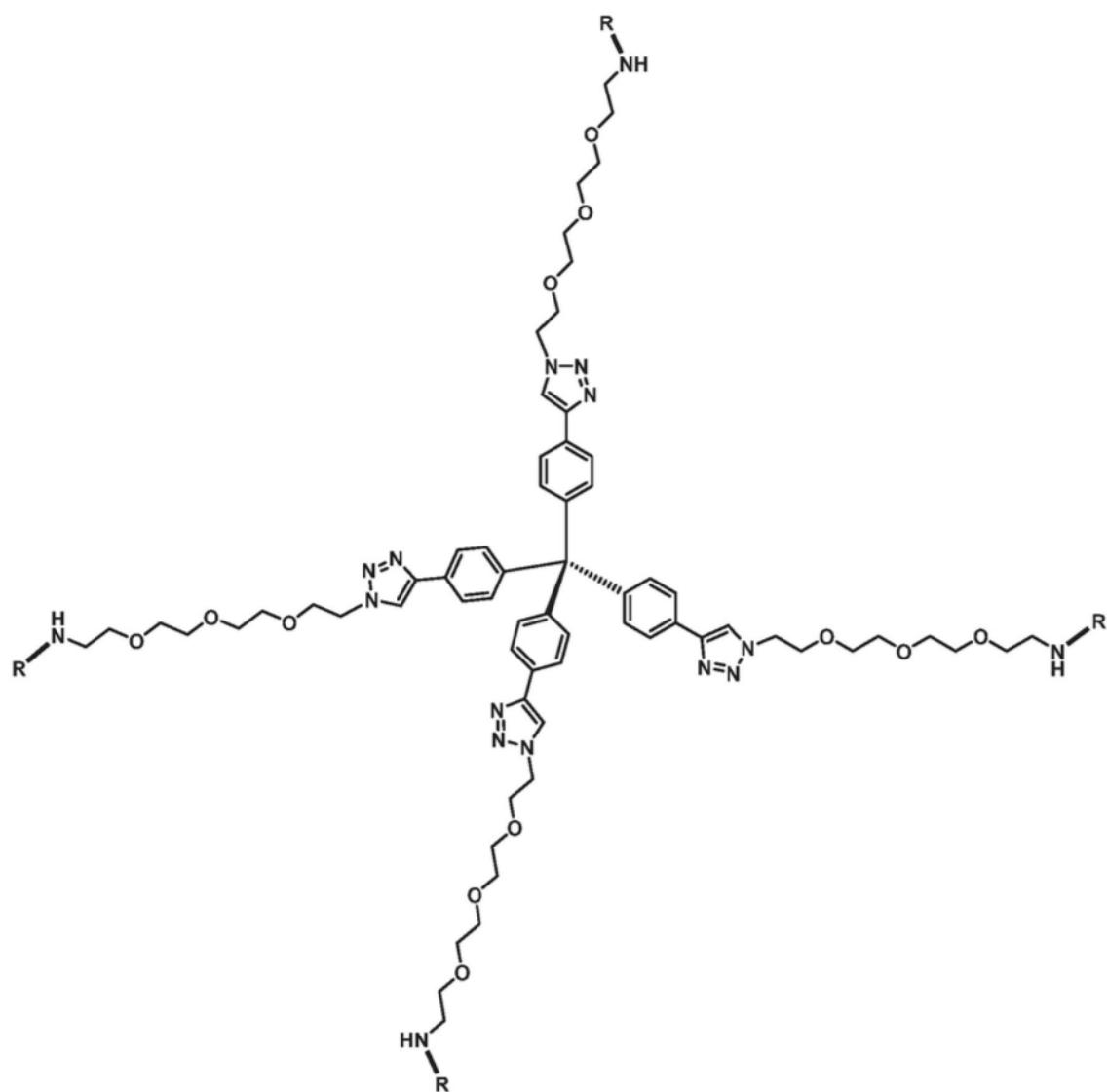


图6C

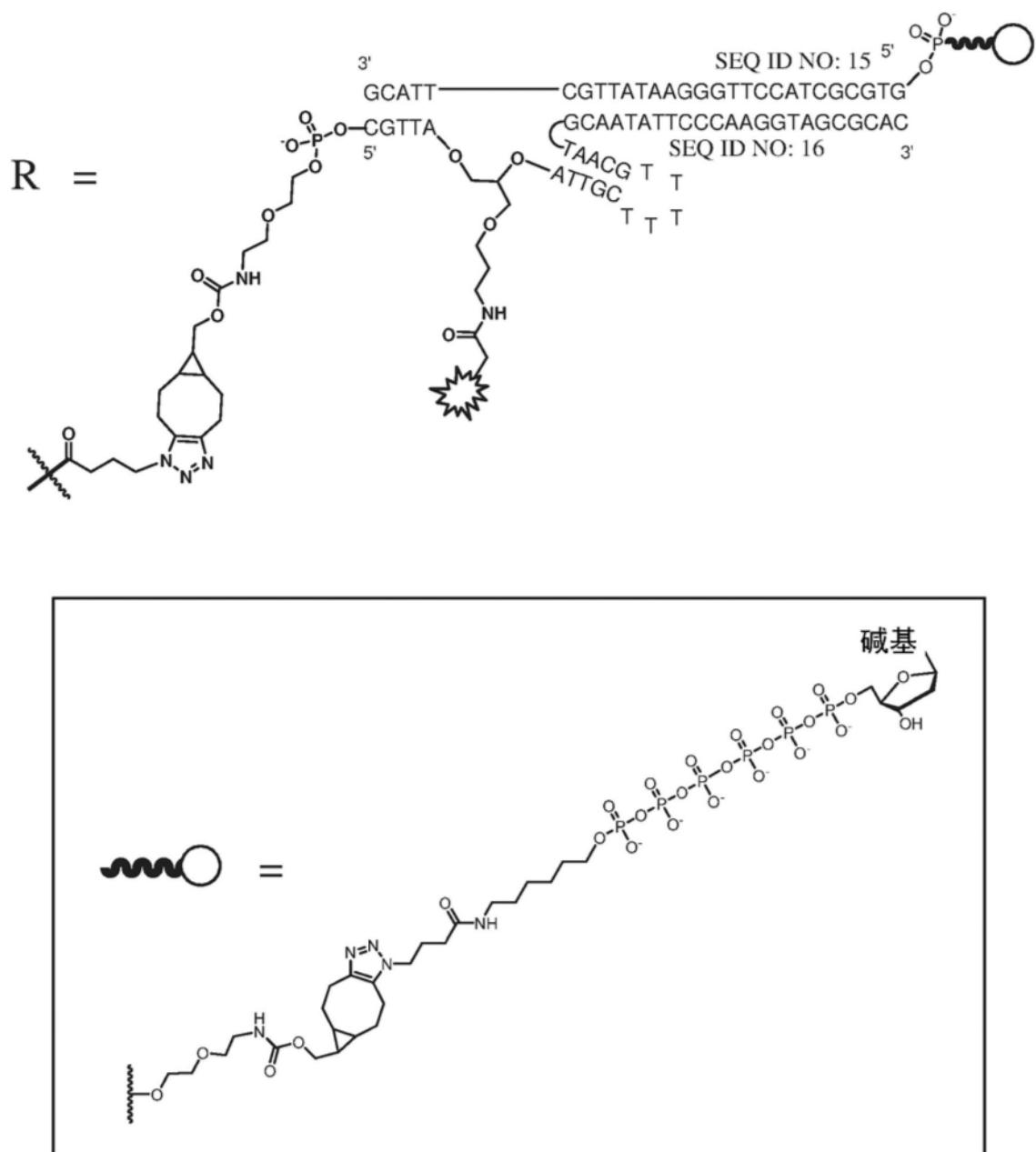


图6C(续)

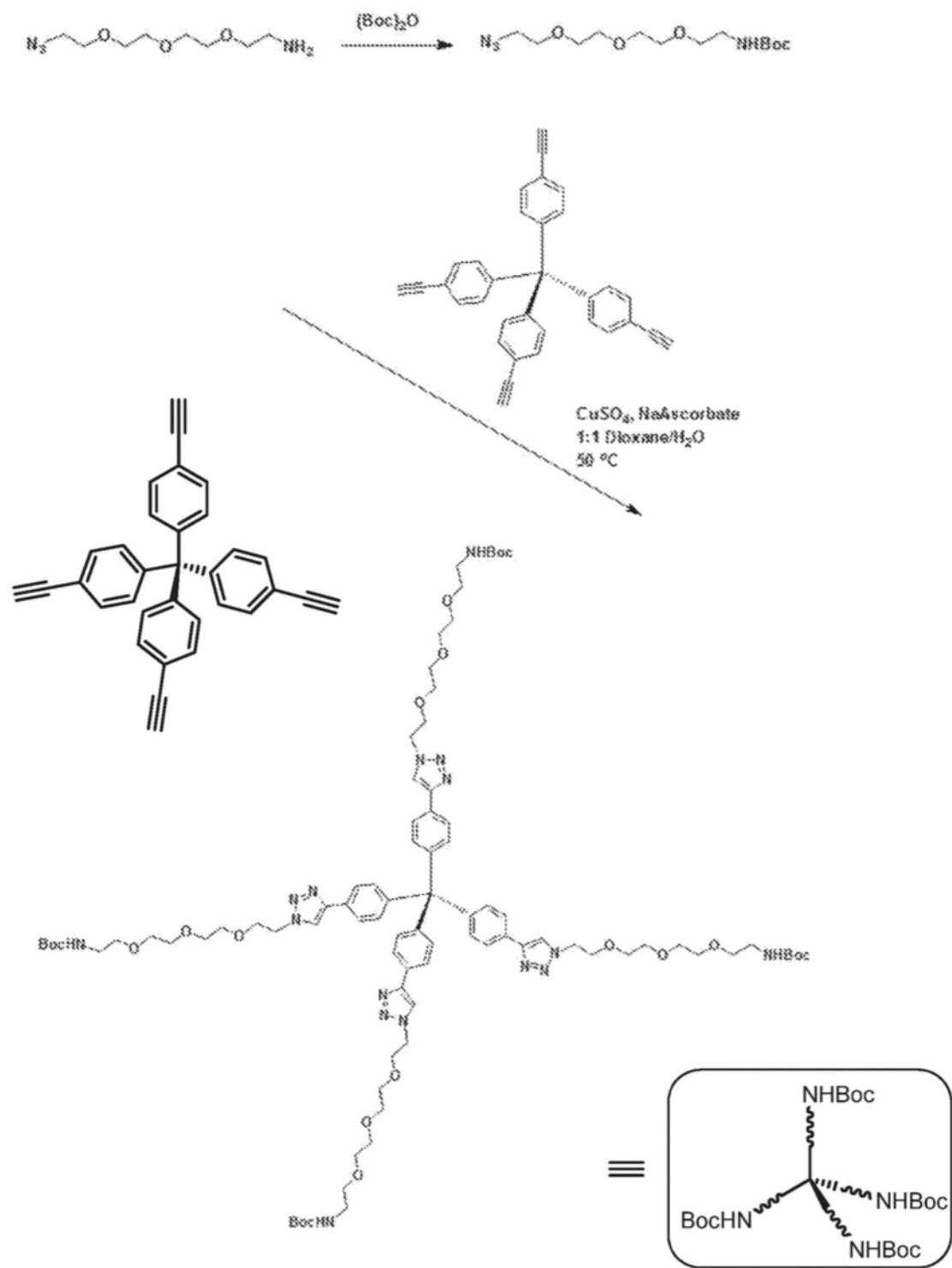


图6D

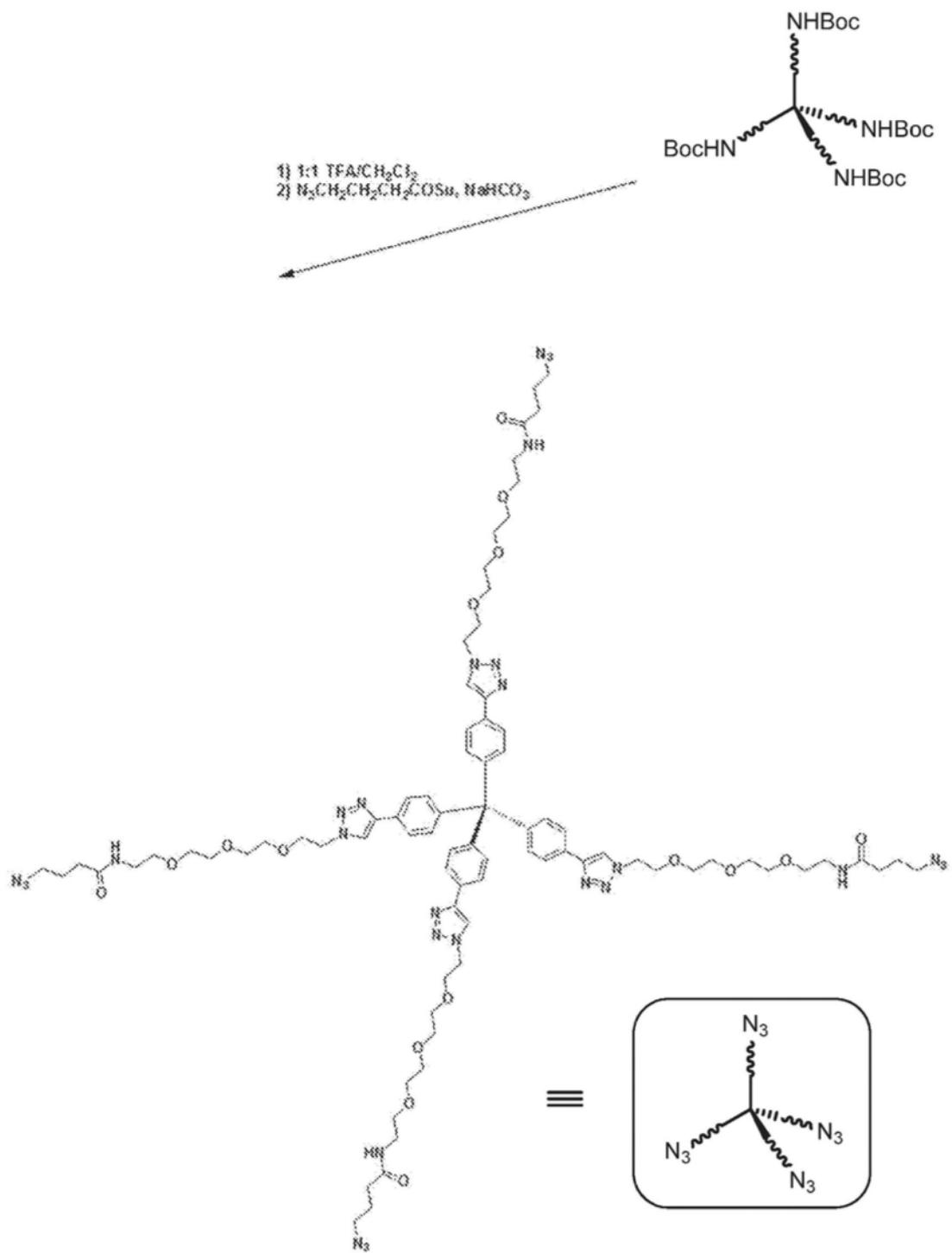


图6D(续)

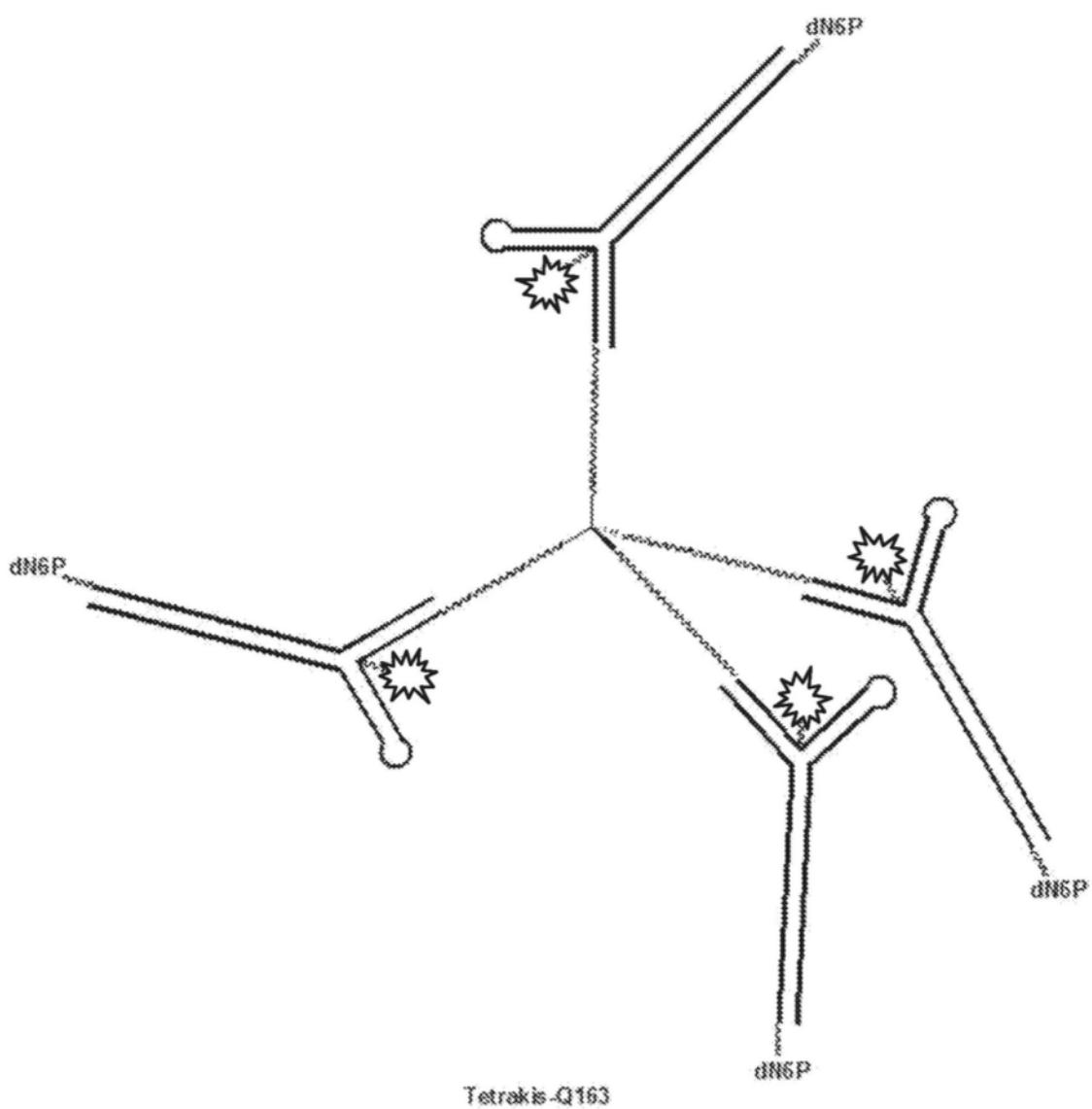


图6E

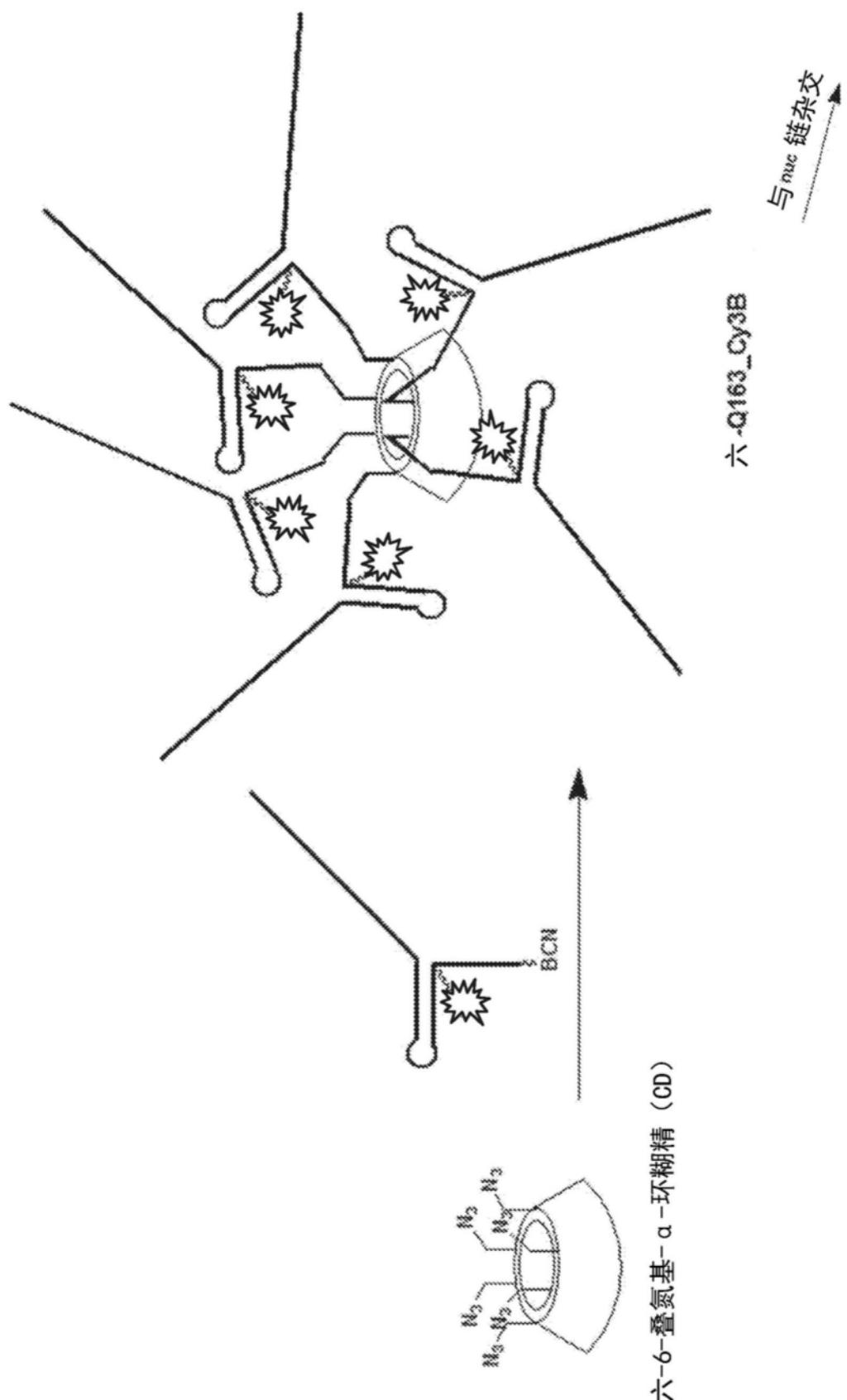


图7

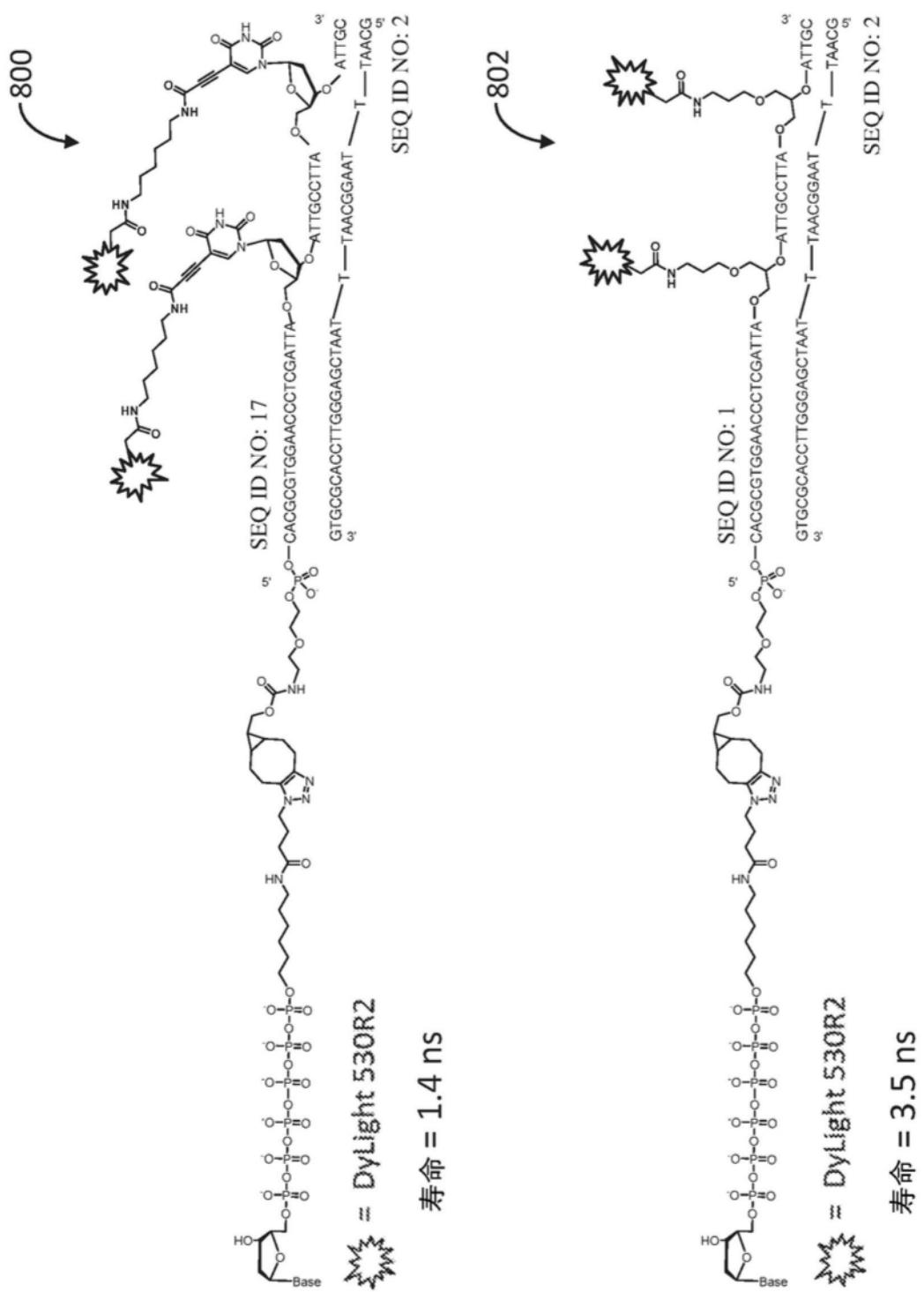


图8

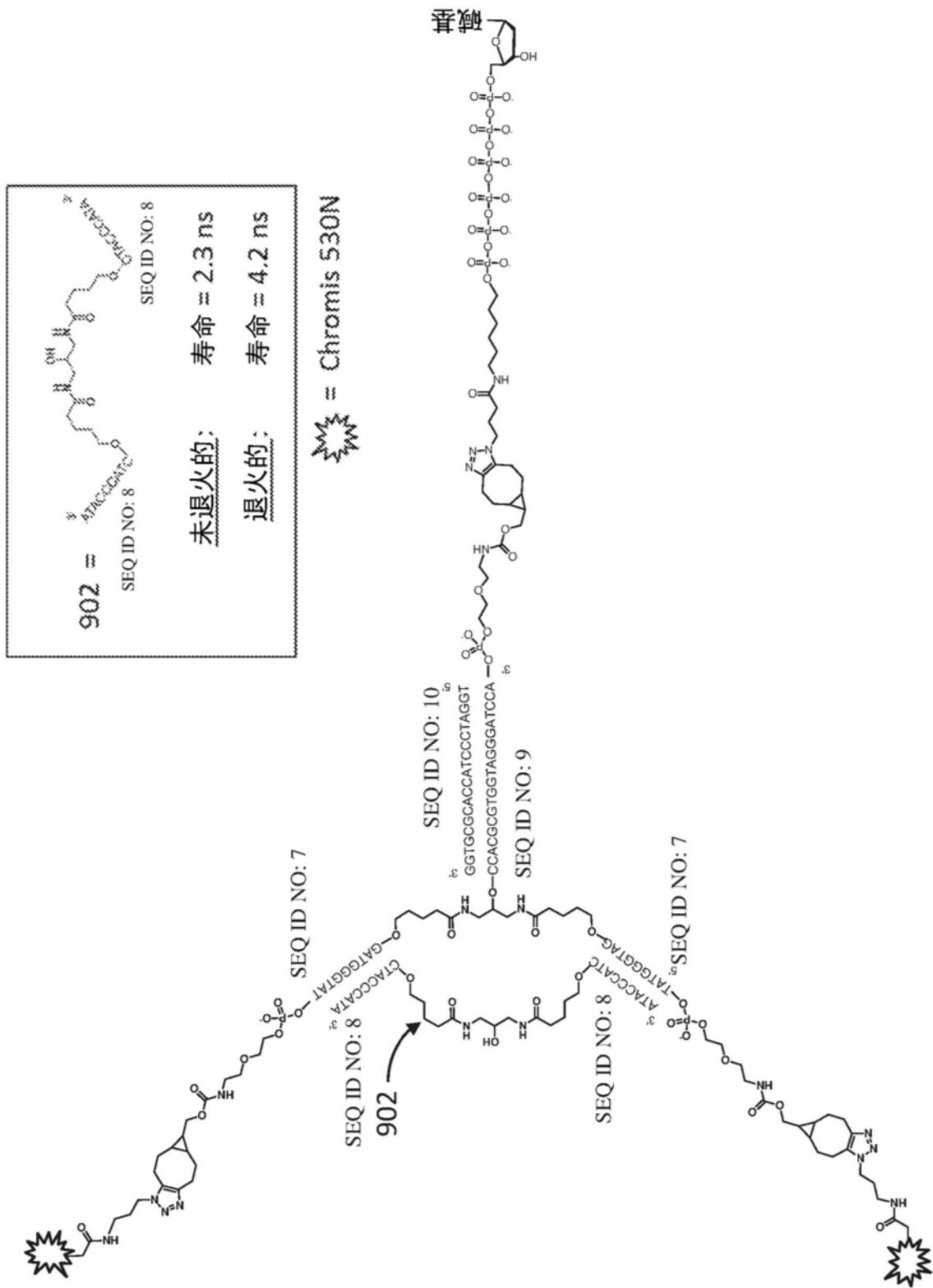


图9

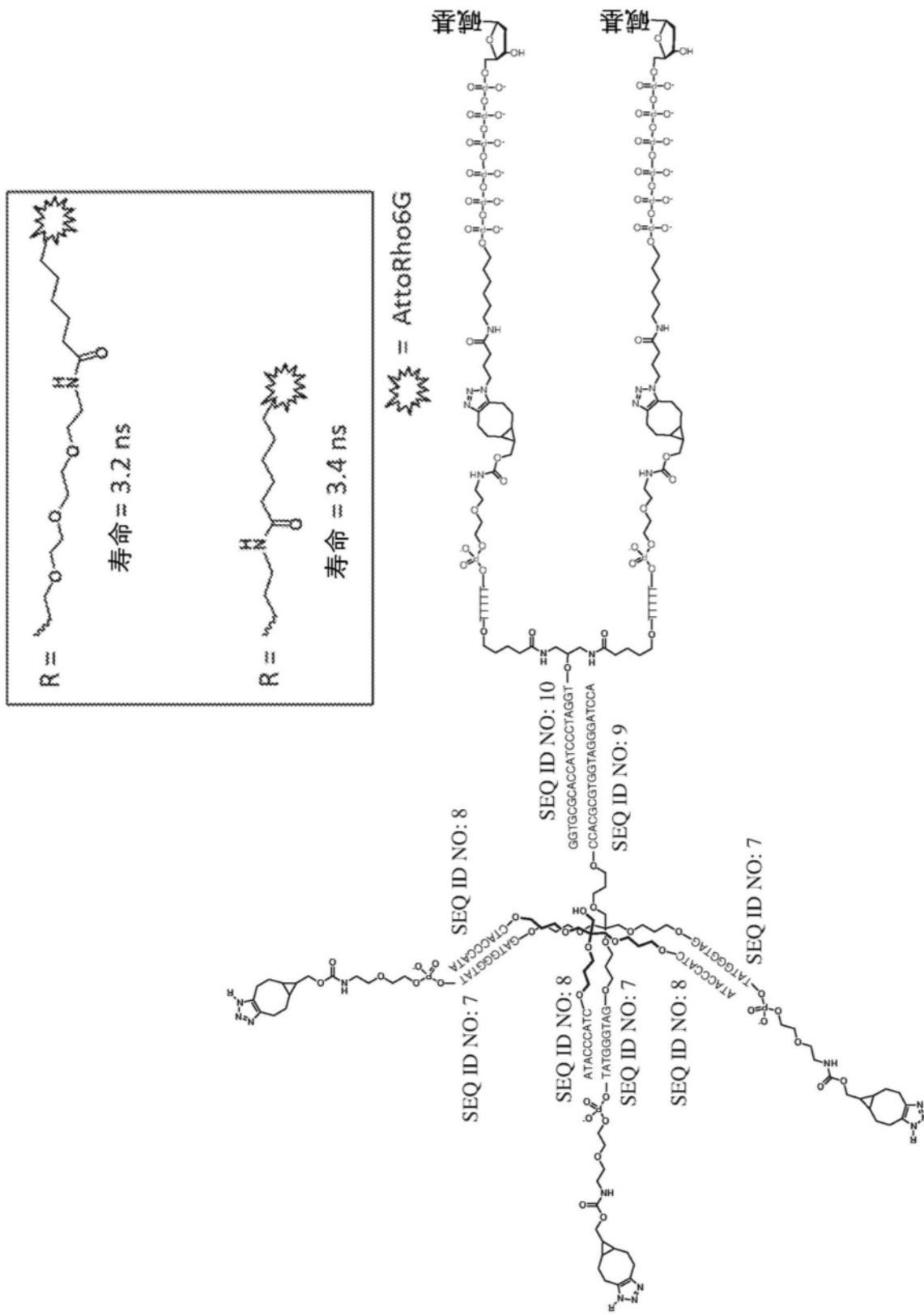


图10