



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201837184 A

(43) 公開日：中華民國 107 (2018) 年 10 月 16 日

(21) 申請案號：106144669

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 19 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/6806 (2018.01)

(30) 優先權：2016/12/19 美國 62/436,407

(71) 申請人：美商寬騰矽公司 (美國) QUANTUM-SI INCORPORATED (US)  
美國

(72) 發明人：羅斯伯格 強納森 M ROTHBERG, JONATHAN M. (US)；波爾 詹姆士 BALL, JAMES (US)；雷克伊 傑瑞米 LACKEY, JEREMY (CA)；瑞德 布萊恩 REED, BRIAN (US)；高里亞諾夫 亞立山德 GORYAYNOV, ALEXANDER (RU)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：59 項 圖式數：10 共 78 頁

(54) 名稱

分子載入樣品孔以供分析

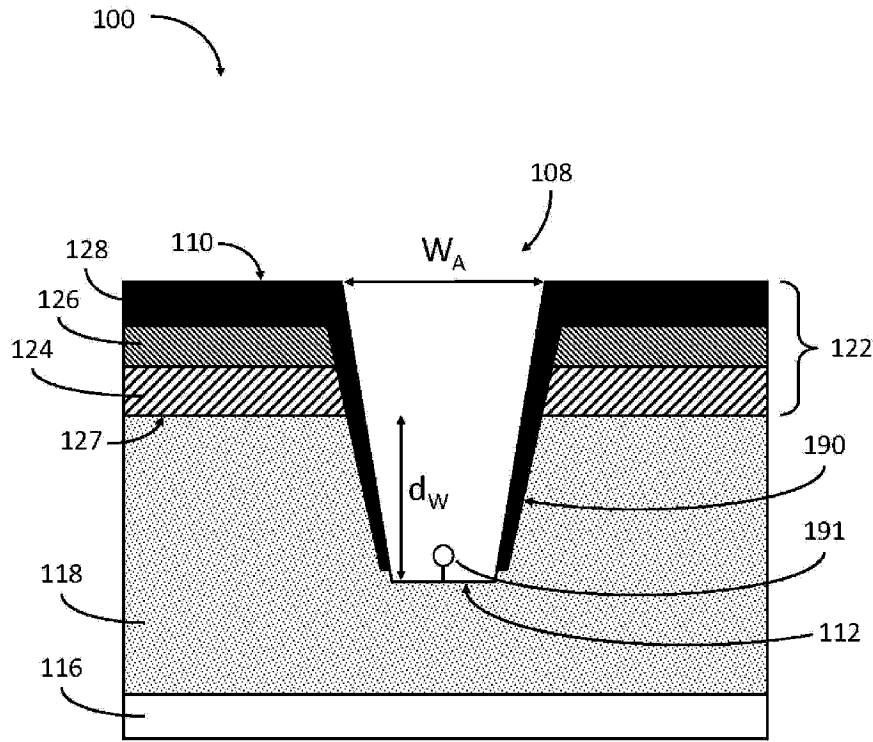
LOADING MOLECULES INTO SAMPLE WELLS FOR ANALYSIS

(57) 摘要

本發明提供將所關注分子載入樣品孔之方法。在一些態樣中，將所關注分子載入樣品孔之方法涉及在擁擠試劑及/或凝聚劑之存在下將所關注分子載入樣品孔。在一些態樣中，本發明提供將測序模板載入樣品孔之方法。

Methods of loading a molecule of interest into a sample well are provided. In some aspects, methods of loading a molecule of interest into a sample well involve loading a molecule of interest into a sample well in the presence of a crowding agent and/or a condensing agent. In some aspects, methods of loading a sequencing template into a sample well are provided.

指定代表圖：



【圖1】

符號簡單說明：

- 100 . . . 積體裝置
- 108 . . . 樣品孔
- 110 . . . 積體裝置之表面
- 112 . . . 底部表面
- 116 . . . 導波管
- 118 . . . 頂部包層
- 122 . . . 金屬層
- 124 . . . 第一子層
- 126 . . . 第二子層
- 127 . . . 界面
- 128 . . . 第三子層
- 190 . . . 側壁
- 191 . . . 所關注分子
- $W_A$  . . . 寬度
- $d_w$  . . . 深度

## 【發明說明書】

### 【中文發明名稱】

分子載入樣品孔以供分析

### 【英文發明名稱】

LOADING MOLECULES INTO SAMPLE WELLS FOR ANALYSIS

### 【技術領域】

本申請案概言之係關於用於製備供分析之生物及/或化學樣品之方法及組合物。

### 【先前技術】

次世代測序技術之進步已使得其可大量地同一時間分析單一分子。該等技術從根本上改變了生命科學研究的格局，特別是在基因體及醫學診斷方面。生物樣品的固有複雜性使用習用單分子技術通常需要費力且耗時的樣品製備方案。此外，實施該等反應之異常小尺寸之樣品孔會限制能夠分析之分子之尺寸。

### 【發明內容】

本文所揭示技術之態樣係關於製備供分析之所關注分子之方法。在一些實施例中，本文提供可用於製備用於測序分析之樣品(例如，核酸樣品)之方法及組合物。在一些實施例中，本文所闡述之技術係關於將包含所關注分子之樣品載入樣品孔之方法。在一些態樣中，本發明提供將包含所關注分子之樣品載入樣品孔之方法，該等方法涉及使樣品與基板之表面接觸。在一些實施例中，所關注分子包含測序模板。在一些實施例中，測序模板包含具有至少一種雜交之引子/聚合酵素錯合物之核酸分子。在一

些實施例中，基板係積體裝置。在一些實施例中，基板之表面包含複數個樣品孔。在一些實施例中，該等方法進一步涉及使樣品與擁擠試劑接觸。在一些實施例中，擁擠試劑排除所關注分子。在一些實施例中，相對於溶劑分子(例如，水)及/或其他反應組分(例如，鹽、緩衝液、核苷酸等)，擁擠試劑選擇性地排除所關注分子(例如，測序模板)。在一些實施例中，擁擠試劑係體積排除劑。

在一些實施例中，擁擠試劑係多醣。在一些實施例中，多醣係纖維素化合物。在一些實施例中，纖維素化合物係甲基纖維素。在一些實施例中，纖維素化合物選自乙基纖維素、乙基甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥乙基甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、乙基羥乙基纖維素及羧甲基纖維素。在一些實施例中，擁擠試劑係聚醚化合物。在一些實施例中，聚醚化合物選自聚乙二醇、聚丙二醇、多聚甲醛、聚四亞甲基二醇及聚苯醚。在一些實施例中，擁擠試劑係聚醯胺。在一些實施例中，聚醯胺選自線性聚乙炔基吡咯啉酮及環狀聚乙炔基吡咯啉酮。

在一些實施例中，擁擠試劑係以薄膜形式提供。在一些實施例中，薄膜係選自交聯凝膠或去水溶液之材料。在一些實施例中，薄膜包含聚丙烯醯胺、聚葡萄糖、瓊脂糖或其某一組合或變化形式。在一些實施例中，薄膜係以漿液形式提供。在一些實施例中，薄膜係以粒子形式提供。

在一些實施例中，擁擠試劑(例如，甲基纖維素)係以溶液形式提供。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約2.0重量%。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約2.3重量%。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約0.1重量%至約1.0重量%之間、約1.0重量%至約2.0重量%之間、約2.0重量%至約3.0重量%之間、約3.0重量%至約4.0重

量%之間或約4.0重量%至約5.0重量%之間。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約5.0重量%至約6.0重量%之間、約6.0重量%至約7.0重量%之間、約7.0重量%至約8.0重量%之間、約8.0重量%至約9.0重量%之間或約9.0重量%至約10重量%之間。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約10重量%至約11重量%之間、約11重量%至約12重量%之間、約12重量%至約13重量%之間、約13重量%至約14重量%之間或約14重量%至約15重量%之間。

在一些實施例中，擁擠試劑之溶解性取決於溫度、pH、鹽及/或其他因素。在一些實施例中，擁擠試劑係以懸浮液(例如，膠體懸浮液)形式提供。在一些實施例中，懸浮液中擁擠試劑之濃度為約上文針對擁擠試劑溶液所闡述之重量%或重量範圍中之任一者。

在一些實施例中，樣品係在與擁擠試劑接觸之前與表面接觸。在一些實施例中，樣品係在與表面接觸之前與擁擠試劑接觸。在一些實施例中，樣品大約同時與表面接觸並與擁擠試劑接觸。在一些實施例中，樣品係當接觸至表面時與擁擠試劑接觸。

在一些實施例中，使包含所關注分子之樣品與積體裝置(例如，包含複數個樣品孔之測序晶片)之表面接觸，且將擁擠試劑(例如，包含擁擠試劑之溶液)之層施加於樣品之上表面。

在一些實施例中，使包含所關注分子之第一溶液與積體裝置之表面接觸以在積體裝置之表面形成第一體積。在一些實施例中，使包含擁擠試劑之第二溶液與第一體積之表面接觸以在第一體積之表面形成第二體積。在一些實施例中，相對於第一體積之溶劑分子，擁擠試劑優先自第二體積排除所關注分子。在一些實施例中，第一溶液包含一或多種試劑組分(例

如，緩衝液、鹽、經標記核苷酸)。在一些實施例中，相對於第一體積之一或多種試劑組分，擁擠試劑優先自第二體積排除所關注分子。

在一些實施例中，複數個樣品孔中之每一者包含在基板表面遠端之底部表面。在一些實施例中，底部表面包含經構形以結合所關注分子之偶合基團。在一些實施例中，底部表面包含經構形以結合測序模板之偶合基團(例如，經由偶合至聚合酵素或偶合至測序模板上結合有聚合酵素之核酸)。在一些實施例中，擁擠試劑引導所關注分子朝向底部表面，其中所關注分子藉助至少一種偶合基團結合至底部表面。在一些實施例中，偶合基團選自生物素、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、凝集素蛋白或SNAP標籤。在一些實施例中，偶合基團係反應性化學基團。在一些實施例中，反應性化學基團選自胺基團、疊氮基、羧基、羥基、烷基或硫氫基。

在一些實施例中，樣品包含核酸模板、聚合酵素、與核酸模板互補之引子及一或多種適於測序反應之試劑組分。在一些實施例中，聚合酵素及引子在核酸模板上形成至少一種雜交錯合物。在一些實施例中，樣品進一步包含一或多種核苷酸(例如，經標記核苷酸)、一或多種緩衝劑、一或多種鹽、一或多種還原劑及一或多種表面活性劑。在一些實施例中，樣品進一步包含金屬陽離子(例如，鎂離子)。在一些實施例中，將金屬陽離子添加至樣品中以開始測序反應。

在一些實施例中，核酸分子係約1 kb至約5 kb之間、約5 kb至約10 kb之間、約10 kb至約15 kb之間、約15 kb至約20 kb之間或約20 kb至約25 kb之間。在一些實施例中，核酸分子係約25 kb至約50 kb之間、約50 kb至約100 kb之間、約100 kb至約250 kb之間、約250 kb至約500 kb之間

或約500 kb至約1000 kb之間。

在一些實施例中，聚合酵素係DNA聚合酶。在一些實施例中，DNA聚合酶係T4 DNA聚合酶。在一些實施例中，DNA聚合酶係T7 DNA聚合酶。在一些實施例中，DNA聚合酶係phi29 DNA聚合酶。在一些實施例中，DNA聚合酶係M2Y DNA聚合酶。在一些實施例中，DNA聚合酶係銅綠蠅(*Lucilia cuprina*)之DNA聚合酶。在一些實施例中，聚合劑係嵌合及/或經修飾DNA聚合酶。

在一些實施例中，使凝聚劑與所關注分子(例如，測序模板)接觸。在一些實施例中，使凝聚劑在添加擁擠試劑之前與所關注分子接觸。在一些實施例中，在使測序模板與積體裝置之表面接觸之前將凝聚劑添加至測序模板中。在一些實施例中，使凝聚劑及測序劑大約同時與積體裝置之表面接觸。在一些實施例中，在使測序模板與積體裝置之表面接觸之前，積體裝置之表面包含凝聚劑。

在一些實施例中，本文所提供之方法進一步包含使樣品與密封劑接觸。在一些實施例中，密封劑包含礦物油。在一些實施例中，密封劑包含包括可氧化試劑及觸媒之氧清除密封劑。在一些實施例中，可氧化試劑係包含至少一個烯鍵之有機化合物。在一些實施例中，有機化合物包含抗壞血酸基。在一些實施例中，有機化合物係抗壞血酸酯。在一些實施例中，有機化合物係抗壞血酸脂肪酸酯。在一些實施例中，有機化合物係生育酚化合物。在一些實施例中，觸媒包含過渡金屬及相對離子。在一些實施例中，過渡金屬選自鈮、鈦、鈮、鉻、錳、鐵、鈷、鎳、銅、鋅、鐳、銻、鏷、釷、鈾、鉍、鎢、鈳及鎳。在一些實施例中，過渡金屬係銅。在一些實施例中，相對離子選自鹵離子(例如，F、

Cl、Br、I)、硫酸根、亞硫酸根、硫化物、硝酸根、亞硝酸根、乙酸根、乙醯丙酮酸根、過氯酸根、氫氧根、甲醇根及乙醇根。在一些實施例中，相對離子選自月桂酸根、肉豆蔻酸根、棕櫚酸根、硬脂酸根、油酸根及亞油酸根。

在一些實施例中，本文所提供之方法進一步包含使所關注分子(例如，測序模板)經受次世代測序技術。

### 【圖式簡單說明】

熟習此項技術者將理解，本文所闡述之圖僅出於圖解說明之目的。應理解，在一些情形中，本發明之各個態樣可顯示誇大或放大以便於理解本發明。在圖式中，在各個圖中相同參考特徵通常指相同特性、功能上類似及/或結構上類似之元件。該等圖式未必按比例繪製，而是重點放在圖解說明本教示之原理上。該等圖式並非意欲以任何方式限制本教示之範圍。

依據下文在結合圖式進行時所陳述的詳細說明，將更加明瞭本發明之特性及優點。

在參考圖式闡述實施例時，可使用方向參考(「上方」、「下方」、「頂部」、「底部」、「左側」、「右側」、「水平」、「垂直」等)。該等參考僅意欲幫助讀者以正常定向觀看圖式。該等方向參考並非意欲闡述所體現裝置之較佳或唯一定向。裝置可以其他定向來體現。

如自詳細說明可明瞭，繪示於圖(例如，圖1-10)中且在整個申請案中出於說明目的進一步闡述之實例闡述非限制性實施例，且在一些情形下可簡化某些製程或省略特性或步驟以便更清楚地說明。

圖1係圖解說明樣品孔之剖視圖。

圖2係具有複數個樣品孔之積體裝置之剖視圖。

圖3A係剖視圖，其圖解說明在不存在擁擠試劑下將樣品引入具有複數個樣品孔之積體裝置上之後，將包含所關注分子之樣品載入樣品孔。

圖3B係剖視圖，其圖解說明在存在擁擠試劑下將樣品引入具有複數個樣品孔之積體裝置上之後，將包含所關注分子之樣品載入樣品孔。

圖4係繪示樣品中之擁擠試劑對所關注分子之效應之實例之圖解說明。

圖5係繪示樣品中之凝聚劑與所關注分子之效應之實例之圖解說明。

圖6A-6C繪示如下製程：其中藉由將樣品引入積體裝置中將包含所關注分子之樣品載入樣品孔(圖6A)，將擁擠試劑添加至樣品中(圖6B)，且容許擁擠試劑將所關注分子驅至積體裝置之樣品孔中(圖6C)。

圖6D係圖解說明在去除包含擁擠試劑之過量體積後，所關注分子載入積體裝置之樣品孔中之剖視圖。

圖6E繪示在開始反應後之圖6D之積體裝置。

圖6F繪示在添加氧清除密封劑之後圖6E之積體裝置。

圖7A及7B繪示來自使用已使用擁擠試劑載入之樣品實施之即時測序反應之讀數(圖7A)及結果(圖7B)。

圖8繪示藉由擴散載入樣品孔之核酸樣品(頂部)及在存在擁擠試劑下載入樣品孔之核酸樣品(底部)之DNA螢光染色之影像代表。

圖9繪示藉由擴散載入樣品孔之核酸樣品(左側)及在存在擁擠試劑下載入樣品孔之核酸樣品(右側)之DNA螢光成像。

圖10繪示證明針對固體狀態擁擠試劑之概念驗證之實驗設置。

## 【實施方式】

## 相關申請案

本申請案主張2016年12月19日提出申請的第62/436,407號美國臨時專利申請案在35 U.S.C. § 119(e)下之優先權，該專利申請案以全文引用方式併入本文。

在其他態樣中，本發明提供將所關注分子載入樣品孔之方法及組合物。在一些態樣中，本文所闡述之技術涉及使包含所關注分子之樣品與包含樣品孔之固體載體之表面接觸之步驟(例如，在包含具有在積體裝置表面遠端之底部表面之樣品孔之積體裝置中)。在一些實施例中，可使樣品與擁擠試劑接觸，該擁擠試劑引導所關注分子朝向樣品孔之底部表面。在一些實施例中，樣品孔之底部表面包含經構形以結合所關注分子之偶合基團。以此方式，所關注分子可藉助偶合基團結合至樣品孔之底部表面。在一些實施例中，樣品進一步包含凝聚劑，該凝聚劑可使所關注分子相對於其在不存在凝聚劑下之結構呈凝聚結構。在一些實施例中，所關注分子包含測序模板。

在一些態樣中，本文所闡述之方法及組合物可用於容許檢測樣品中之個別分子或粒子之技術中。個別分子可例如但不限於胺基酸、多肽、核苷酸及/或核酸。舉例而言，在一些實施例中，本發明所提供之方法及組合物可結合單一分子核酸測序技術使用。單一分子核酸測序容許藉由即時監測與模板核酸互補之核酸分子之延伸來測定單一模板核酸分子之序列。

在某些技術中，單一分子核酸測序係藉由分離複數個樣品孔中之每一者內之單一測序模板來實施。然而，在許多應用中，該等樣品孔之總體積相對於總樣品體積係相當低的。另外，最小化單一樣品孔中之多個模板所需要之樣品中測序模板之濃度通常如此低，使得將測序模板載入樣品孔

之動力學可嚴重限制成功載入且充分活性的錯合物的量。本發明者已認識且瞭解到，該等及其他限制可藉由利用特定試劑作為測序模板載入製程之一部分來克服。

因此，已認識到需要經改良之測序模板製備及測序模板載入實踐，本發明者已研發了利用擁擠試劑來有效降低樣品之總體體積之技術，使得測序模板自總體體積排除並驅趕至樣品孔中。本發明者已進一步認識並瞭解到，本文所闡述之擁擠試劑提供除上文所提及之關於測序模板大小之考慮事項以外之優點。

在一些實施例中，本發明提供藉由使具有所關注分子之樣品與積體裝置之表面接觸將所關注分子載入樣品孔之方法。在一些實施例中，積體裝置包含樣品孔。舉例而言，圖1係根據本申請案之一些非限制性實施例之積體裝置100所包含之樣品孔108之剖視圖。樣品孔108可在積體裝置之表面110包含小體積或區域，該小體積或區域在樣品孔108之底部表面112之遠端。樣品孔108可經構形以接收包含所關注分子191之樣品，該樣品可保留在樣品孔108之底部表面112處。樣品孔108之底部表面112包含一或多種偶合基團，該一或多種偶合基團結合至所關注分子191至少暫時保持一定持續時間。樣品孔108之底部表面112可具有一或多種材料，該一或多種材料提供所關注分子191黏附至樣品孔108之底部表面而非側壁190之選擇性。在一些實施例中，可使用本文所闡述之技術或業內已知之方法來製備(例如，鈍化、功能化等)樣品孔108之底部表面112及側壁190。

在一些實施例中，可藉助在樣品孔108之底部表面112遠端之頂部孔口將所關注分子191安置在樣品孔108內。頂部孔口可經構形以減少環境光或雜散光照射樣品孔108內之所關注分子191。頂部孔口可具有寬度

$W_A$ ，如在積體裝置之表面110所量測，該寬度在50 nm至300 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或值範圍。樣品孔108可在底部表面112與在頂部包層118與金屬層122之間之界面127之間具有深度 $d_w$ 。深度 $d_w$ 可在位於底部表面112之所關注分子與金屬層122之間提供適宜距離。深度 $d_w$ 可影響與所關注分子191相關之標記物之光子發射事件之定時(例如，壽命)。因此，深度 $d_w$ 可容許基於與不同標記物之個別壽命相關之定時特徵來區分樣品孔108中之不同標記物。在一些實施例中，樣品孔108之深度 $d_w$ 可影響所接收激發能量之量。深度 $d_w$ 可在50 nm至350 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或值範圍。在一些實施例中，深度 $d_w$ 在95 nm與150 nm之間。在一些實施例中，深度 $d_w$ 在150 nm與350 nm之間。在一些實施例中，深度 $d_w$ 在200 nm與325 nm之間。在一些實施例中，深度 $d_w$ 在250 nm與300 nm之間。在一些實施例中，深度 $d_w$ 為約270 nm。

在各個實施例中，樣品孔108可經構形以自導波管116接收激發能量。導波管116可經構形以提供自導波管消散衰減之光學模式。在一些實施例中，該模式之消散場可至少部分地與樣品孔108重疊。以此方式，樣品孔108內之所關注分子191可藉助光學模式之消散場接收激發能量。

積體裝置100可在頂部包層118上方包括金屬層122。金屬層122可充當由樣品孔中之樣品發射之發射能量之反射器且可藉由朝向積體裝置之感測器反射發射能量來改良發射能量之檢測。金屬層122可用於減少由不在樣品孔內起源之光子引起之背景信號。金屬層122可包含一或多個子層。欲用作金屬層之層之適宜材料之實例可包括鋁、銅、鈦及氮化鈦。如圖1中所顯示，金屬層122包括第一子層124、第二子層126及第三子層128。第一子層之厚度可在30 nm至165 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或

值範圍。第二子層之厚度可在5 nm至100 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或值範圍。在一些實施例中，第二子層之厚度可為約10 nm。第三子層之厚度可在5 nm至100 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或值範圍。在一些實施例中，第三子層之厚度可為約30 nm。

樣品孔108可具有一或多個在側壁190上至少部分地經側壁間隔體覆蓋之側壁。側壁間隔體之組成可使得側壁190經構形以使得能夠與所關注分子191發生某一類型之相互作用。在一些實施例中，側壁間隔體之組成可經構形以鈍化樣品孔108之側壁以降低黏附至側壁190之所關注分子191之量。藉由用間隔體僅塗佈樣品壁之側壁，可在樣品孔108之不同區提供與所關注分子191之不同類型之相互作用。側壁間隔體之厚度可在3 nm至30 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或值範圍。在一些實施例中，側壁間隔體之厚度可為約10 nm。用於形成側壁間隔體之適宜材料之實例包括TiO<sub>2</sub>、TiN、TiON、Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>、Zr<sub>2</sub>O<sub>5</sub>及HfO<sub>2</sub>。在一些實施例中，樣品孔結構可具有貼近導波管116之底部表面112，其在側壁上缺乏間隔體材料。在底部表面與側壁間隔體之間之距離可在20 nm至50 nm之範圍內或為在該範圍內之任一值或值範圍。以此方式，樣品孔之底部表面112更接近導波管116，由此改良激發能量之偶合且減少金屬堆疊對激發能量之光學損失之影響。

根據一些實施例，積體裝置可包含樣品孔。在一些實施例中，積體裝置包含複數個或一「系列」樣品孔。舉例而言，圖2繪示包含複數個樣品孔之積體裝置200之剖視圖。如所顯示，積體裝置200在導波管216與金屬層222之間包含頂部包層218，其中頂部包層218將導波管216及金屬層222間隔開最大距離 $h_c$ 。頂部包層218可具有一或多個具有小於 $h_c$ 之尺寸且

包括一或多個樣品孔之區域。此一區域可視為具有適宜大小及形狀以包括積體裝置之一或多個樣品孔之陣列。積體裝置200包括陣列220，其中頂部包層218將導波管216與金屬層222間隔開小於 $h_c$ 之距離。陣列220可在垂直於圖2所顯示之視圖之平面中具有任何適宜大小及形狀以包括期望數量之樣品孔之區。在一些實施例中，陣列220可具有矩形形狀(例如，正方形)。陣列220可具有複數個樣品孔，包括樣品孔208<sub>1</sub>、208<sub>2</sub>、208<sub>3</sub>、208<sub>4</sub>、208<sub>5</sub>及208<sub>6</sub>。儘管圖2繪示六個樣品孔，但本申請案不限於此情形且可在陣列中形成任何適宜數量之樣品孔。陣列可具有任何適宜大小或形狀。在一些實施例中，陣列在溝槽區域中。

本文所闡述技術之態樣涉及使樣品與積體裝置之表面接觸。如圖2中所顯示，積體裝置200在陣列220中含有複數個樣品孔，該等樣品孔可在積體裝置之凹陷表面210<sub>1</sub>形成。因此，在一些實施例中，可使樣品與積體裝置之陣列中之積體裝置之凹陷表面210<sub>1</sub>接觸。在其他實施例中，可使樣品與不在凹陷區域中(例如，不在溝槽區域中)中之積體裝置之表面接觸。舉例而言，如圖2中所繪示，可使樣品與積體裝置之表面210<sub>2</sub>接觸。應瞭解儘管圖2繪示積體裝置之凹陷區域(例如，浴缸形區域)中之複數個樣品孔，但積體裝置可包含複數個樣品孔且亦不包含凹陷區域。

積體裝置200可在頂部包層218上方包括金屬層222。金屬層222可充當由樣品孔中之樣品發射之發射能量之反射器且可藉由朝向積體裝置之感測器反射發射能量來改良發射能量之檢測。金屬層222可用於減少由不在樣品孔內起源之光子引起之背景信號。金屬層222可包含一或多個子層。欲用作金屬層之適宜材料之實例包括鋁、鈦及氮化鈦。金屬層222可具有一或多個對應於頂部包層218之經蝕刻部分之中斷以形成樣品孔208<sub>1</sub>、

208<sub>2</sub>、208<sub>3</sub>、208<sub>4</sub>、208<sub>5</sub>及208<sub>6</sub>。在一些實施例中，可在積體裝置中形成複數個本文所闡述類型之凹陷區域(例如，溝槽區域)，例如以減少由沿導波管216向下進行之光學模式及金屬層222之相互作用引起之光學損失。在一些實施例中，積體裝置可包括用於單一樣品孔之凹陷區域。積體裝置可在其中每一凹陷區域對應於一個樣品孔之頂部包層中具有多個凹陷區域。

在某些技術中，單一樣品孔較佳包含單一所關注分子(例如，單一測序模板)。因此，在一些實施例中，當藉由將樣品引入包含樣品孔之陣列之積體裝置上而將包含(例如)測序模板之樣品載入樣品孔時，應注意避免用高濃度之測序模板使積體裝置過飽和。在該等實施例中，通常適當地使用具有稀濃度之測序模板之樣品載入樣品孔。

不期望受限於理論，假定稀濃度之樣品中之測序模板跨樣品孔陣列之分佈最好藉由帕松分佈(Poisson distribution)來建模。此離散機率分佈預示陣列中約37%之樣品孔將含有一個測序模板，且其餘孔含有零個或多個測序模板。實際上，達成跨樣品孔陣列之37%單佔用率可藉由任一數量之化學及/或機械變量來實現。本發明者已認識且瞭解到，本文所闡述之技術(例如用擁擠試劑載入)有利地增加跨樣品孔陣列之單佔用率之百分比。

在一些實施例中，與藉由帕松統計預示之量相比，本文所闡述之方法及組合物能達成之所關注分子於樣品孔陣列中之單佔用率係相當、約相同或更大的。因此，不期望受限於理論，本申請案之方法及組合物可與經由非隨機機制進行之載入技術一起使用，該非隨機機制使隨機分佈歪扭以產生超過帕松分佈之單載入樣品孔之百分比。舉例而言，在一些實施例

中，本發明之方法及組合物可達成所關注分子於陣列中樣品孔中之約20%、約25%、約30%、約35%、約37%、約40%、約45%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%或約100%之單佔用率。然而，在一些實施例中，本發明之方法及組合物可用於增加所關注分子在一分佈中佔用樣品孔之陣列之比率(例如，單一佔用率)，該比率可藉由帕松統計來預示。

在其他態樣中，本文所闡述之技術涉及使用擁擠試劑將所關注分子載入樣品孔。如本文所闡述，擁擠試劑可有效地自樣品之總體溶劑排除所關注分子(例如，測序模板)。此效應之非限制性實例繪示於圖3A及圖3B中。如圖3A中所顯示，具有包含複數個樣品孔之陣列320之積體裝置300<sub>1</sub>可與具有所關注分子390<sub>1</sub>之樣品340<sub>1</sub>接觸。在一些實施例中，本發明方法可用於將所關注分子載入極小體積之樣品孔中。舉例而言，在一些實施例中，積體裝置及其中所有樣品孔中之陣列(例如，在溝槽區域中)之容量約 $20 \times 10^{-6}$  L，其中每一樣品孔具有約 $3 \times 10^{-18}$  L之體積。在一些實施例中，積體裝置中之陣列(例如，在溝槽區域中)含有512,000個樣品孔。因此，在一些實施例中，陣列中所有樣品孔之總體積約佔樣品容量之0.00000768%。如圖3A中所繪示，在不存在擁擠試劑下載入所關注分子390<sub>1</sub>且具有所關注分子390<sub>1</sub>於樣品340<sub>1</sub>之總體體積342<sub>1</sub>中之理論上均勻的分佈之樣品340<sub>1</sub>可導致一部分樣品孔能接收成功載入之所關注分子391<sub>1</sub>。

圖3B圖解說明擁擠試劑關於成功載入樣品之效應。具有包含複數個樣品孔之陣列之積體裝置300<sub>2</sub>可與具有所關注分子390<sub>2</sub>之樣品340<sub>2</sub>接觸。樣品340<sub>2</sub>可進一步包含擁擠試劑350。如所顯示，擁擠試劑350之納入可產生自樣品340<sub>2</sub>之總體體積342<sub>2</sub>排除所關注分子390<sub>2</sub>之體積排除效應，從

將所關注分子 $390_2$ 驅至樣品孔中。因此，遠遠更大百分比之樣品孔能接收成功載入之所關注分子 $391_2$ 。因此，在一些實施例中，擁擠試劑可產生熱力學驅動力，該驅動力有效地增加積體裝置之表面處所關注分子之濃度。在一些實施例中，擁擠試劑因具有加速所關注分子移動至樣品孔中之動力學效應而可減少載入時間。

本發明者已進一步認識且瞭解到本文所闡述之擁擠試劑可以使得所關注分子(例如測序模板)載入具有大於單一分子測序中所使用之習用樣品孔(例如，大於150 nm、大於200 nm、大於250 nm等)之深度之樣品孔中。舉例而言，在一些實施例中，所關注分子在樣品孔之底部表面結合至樣品孔。在一些實施例中，底部表面係在包含樣品孔之積體裝置表面之遠端，使得底部表面與積體裝置表面之間之距離接近樣品孔之深度。在一些實施例中，較大深度之樣品孔可有利地與利用光學組件之技術配對。

在一些實施例中，單一分子測序包含使用光學系統及感測器。舉例而言，在一些實施例中，藉由以下來即時監測測序反應：將光引導至積體裝置上之樣品孔中並檢測自樣品孔發射之光。在一些實施例中，將光引導至樣品孔中之光源係位於樣品孔底部處或下方，且使用光檢測器來檢測來自樣品孔之發射(例如，與一或多種組分相關之發射或與測序反應相關之事件)。在該等實施例中，光會與積體裝置表面處或附近的一或多種特徵發生相互作用以負面性地影響監測測序反應之能力。在一些實施例中，藉由增加樣品孔深度可減少或消除該等障礙(例如，背景雜訊、光學損失)。

然而，在增加樣品孔之深度時，在樣品孔之底部表面與積體裝置之表面間之增加的距離必定產生更大距離，由於該更大距離，所關注分子必需擴散以達到底部表面(例如，因此結合至底部表面)。因此，增加樣品孔

深度所提供之優點可能會引起關於載入效率(例如，達成跨樣品孔陣列之高單佔用率)之某些限制。本發明者已認識且瞭解到，當與僅以未增強擴散進行之載入相比時，本文所闡述之技術(例如利用擁擠試劑載入)就將所關注分子(例如，測序模板)載入深樣品孔中而言係優越的。

### *擁擠試劑*

如本文所用，「擁擠試劑」係容許、增強或有利於分子擁擠之化合物或分子。不希望限於任何具體機制，咸推測擁擠試劑可減少可用於其他巨分子之溶劑的體積。此排除之體積效應係由於與擁擠試劑之非特異性相互作用(例如空間排斥)而限制了巨分子可及之體積。因此，在一些實施例中，擁擠試劑可稱作「體積排除劑(volume excluder或volume excluding agent)。在一些實施例中，擁擠試劑相對於同一溶液中之其他組分係惰性的。舉例而言，在一些實施例中，擁擠試劑自總樣品體積之一部分選擇性地排除所關注分子，而不自該部分排除溶液中之其他組分或將溶液中之其他組分保留在該部分中。在一些實施例中，擁擠試劑係親水性化合物。在一些實施例中，擁擠試劑不干擾在同一溶液中發生之反應。預計擁擠試劑在本文所闡述之方法及組合物之情況下可以各種方式起作用，例如如圖4中所圖解說明。

圖4一般性地圖解說明樣品中之擁擠試劑對所關注分子之效應之實例。圖400<sub>1</sub>及圖400<sub>2</sub>各自繪示具有所關注分子491及試劑450之樣品。如所顯示，與圖400<sub>2</sub>中之試劑450<sub>2</sub>相比，圖400<sub>1</sub>中之試劑450<sub>1</sub>相對地分散在整個樣品內。因此，圖400<sub>1</sub>提供其中所關注分子491可自由進入尚未被試劑450<sub>1</sub>佔用之總體體積442<sub>1</sub>之樣品之簡化實例。相比之下，圖400<sub>2</sub>中之試劑450<sub>2</sub>顯示締合使得形成間隙體積444(陰影區域)。如所顯示，倘若所關

注分子491之大小超過間隙體積444，則此區域不可及所關注分子491。因此，圖400<sub>2</sub>之樣品中可及總體體積442<sub>2</sub>之量小於圖400<sub>2</sub>之樣品中可及總體體積442<sub>1</sub>之量。此效應與自樣品體積排除所關注分子491相關，其可稱作體積排除。然而，應瞭解體積排除效應可引起分子擁擠效應，且反之亦然。

圖4進一步圖解說明在樣品孔之情形下所排除體積效應之實例。圖401<sub>1</sub>及圖401<sub>2</sub>各自繪示具有包含經構形以結合所關注分子491之偶合基團493之底部表面之樣品孔。此外，圖401<sub>1</sub>及圖401<sub>2</sub>中之一者繪示已與包含所關注分子491之樣品接觸之樣品孔。圖401<sub>2</sub>中圖解說明之樣品進一步包含擁擠試劑450。如所顯示，擁擠試劑450降低可及所關注分子491之總體體積442之量。由於不可及所關注分子491之擁擠試劑450之間隙體積444，所關注分子在熱力學上被驅向樣品孔之頂部孔口。在一些實施例中，如圖401<sub>2</sub>中所顯示，擁擠試劑450可包含形成纏結結構之聚合分子，該聚合分子將一部分樣品束緊以降低可及所關注分子491之總體體積442。不期望受限於理論，假定由樣品中之擁擠試劑450形成之結構可限制擁擠試劑450可進入樣品孔之程度。因此，間隙體積444可佔用樣品孔外部之區域以有效地增加於底部表面遠端之樣品孔之頂部孔口處之所關注分子的濃度。樣品孔之頂部孔口處之所關注分子491之局部濃度增加可使得所關注分子491藉助偶合基團493結合至底部表面之機率提高。

因此，在一些實施例中，相對於溶液中之溶劑分子及/或其他組分，擁擠試劑選擇性地排除所關注分子。在一些實施例中，包含所關注分子之溶液已與積體裝置之表面接觸，使得所關注分子在積體裝置之表面佔用第一體積。在一些實施例中，包含擁擠試劑之溶液與第一體積之表面接觸，

使得擁擠試劑在第一體積之表面佔用第二體積。倘若相對於溶劑分子及/或其他組分，擁擠試劑選擇性地排除所關注分子，則所關注分子自第二體積排除，而第一體積之溶劑及/或其他組分不被排除。因此，選擇性排除降低第一體積且第二體積伴隨的增加。應瞭解，在一些實施例中，第一體積中之其他組分(例如，鹽、緩衝液等)可在可及由擁擠試劑佔用之第二體積之程度上變化。舉例而言，擁擠試劑之相對大小、電荷及其他化學及物理性質及組分可影響組分可被選擇性地排除或優先由擁擠試劑保留之程度。由於所關注分子可包括反應組分(例如，測序模板)，故重要的是擁擠試劑不優先保留溶液中可能為穩定所關注分子所需的其他組分(例如，緩衝劑、還原劑等)。

在一些實施例中，擁擠試劑吸引水且容許除水以外之分子聚集。在一些實施例中，擁擠試劑結合至溶液中之水及/或將其束緊以排除溶液中之巨分子。在一些實施例中，擁擠試劑排除所關注分子。在一些實施例中，擁擠試劑排除測序模板。在一些實施例中，擁擠試劑限制樣品孔中之可用體積。在一些實施例中，擁擠試劑促進樣品孔中所關注分子之單佔用率。在一些實施例中，擁擠試劑壓緊所關注分子(例如測序模板)，以容許較大測序模板載入樣品孔。在一些實施例中，擁擠試劑促進相分離。在一些實施例中，擁擠試劑包含無規捲曲的聚合物。在一些實施例中，擁擠試劑排除污染物(例如，細胞碎片)，使得在載入所關注分子之前需要有限的樣品純化或不需樣品純化。舉例而言，在一些實施例中，擁擠試劑容許不純樣品(例如，血液、尿液、溶解細胞等)之稀組分較在不存在擁擠試劑下載入之不純樣品更有效地載入。在一些實施例中，擁擠試劑施加滲透壓。在一些實施例中，擁擠試劑有利於所關注分子載入深樣品孔中。在一些實

施例中，擁擠試劑促進樣品孔較快載入。舉例而言，在一些實施例中，擁擠試劑減少在包含樣品孔之積體裝置上培育樣品所需要的時間。

擁擠試劑為業內已知且先前已用於模擬活體外細胞內巨分子擁擠之效應(例如參見，Tokuriki, N.等人(2004) *Protein Sci.* 13(1):125-133；Kuznetsova, I.M.等人(2014) *Int. J. Mol. Sci.* 15:23090-23140；Phillip, Y.等人(2009) *Biophys. J.* 97(3):875-885；Bhat, R.等人(1992) *Protein Sci.* 1:1133-1143；Christiansen, A.等人(2013) *Biophys. Rev.* 5(2):137-145；Aumiller, W.M.等人(2014) *J. Phys. Chem. B* 118(36):10624-10632；該等文獻中每一者之內容以引用方式併入本文中)。

在一些實施例中，擁擠試劑經選擇使得其(例如，優先)停留在樣品儲器中，而不是遷移至樣品孔中。在一些實施例中，此促進熱力學驅動力，從而驅動樣品組分(例如，DNA-聚合酶錯合物)載入樣品孔。在一些實施例中，相對於較高黏度之試劑，較低黏度之擁擠試劑(例如聚蔗糖(Ficoll)或線性聚乙烷基吡咯啉酮)具有較高遷移率及較差局部化且不如較高黏度之試劑有效。然而，在一些情形下可使用較低黏度之試劑。

在一些實施例中，使用具有1 mPa·s或更高黏度(例如，約或高於1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 mPa·s或更高或中間範圍之黏度)之擁擠試劑溶液來施加擁擠試劑。在一些實施例中，63,000 Da甲基纖維素之2.7%組合物具有約6.9 mPa·s之黏度。在一些實施例中，可用於移液擁擠試劑之黏度可在1,000mPa·s與15,000 mPa·s之間。然而，在一些實施例中，試劑之上限黏度範圍可受實際移液考慮的限制。舉例而言，具有約12,000 mPa·s或更高之黏度之溶液可能難以移液，且在一些實施例中，擁擠試

劑溶液係以具有12,000 mPa · s或更低之黏度之濃度添加。

在一些實施例中，具有較低黏度之較小(例如，較短)試劑可以比較大(例如，較長)試劑更高之濃度施加以在載入組合物中達成類似黏度。然而，在一些實施例中，較短分子係較不有效的擁擠試劑且亦可能更易於自樣品儲器遷移至樣品孔中。

在一些實施例中，可基於黏度 - 濃度等式(例如 $\text{mPa} \cdot \text{s} = (\% \times 0.747 + 1)^8$ )來計算擁擠試劑製劑之黏度(例如，對於來自Dow之Methocel纖維素醚而言)。

在一些實施例中，擁擠試劑之形狀及大小可影響其有效性。在一些實施例中，使用類似大小之擁擠試劑(例如，在2至3倍小至2至3倍大之範圍內之擁擠試劑)排除DNA/聚合酶錯合物特別有效。在一些實施例中，可使用具有促進纏結、較高黏度之溶液之形狀之擁擠試劑。

在一些實施例中，擁擠試劑係水溶性巨分子材料。在一些實施例中，適宜巨分子材料廣泛包含不與混合物中之其他試劑特異地相互作用之生物相容性天然或合成聚合物。在一些實施例中，擁擠試劑係惰性巨分子，例如惰性多肽或惰性核酸。在一些實施例中，擁擠試劑係線性聚合物。

在一些實施例中，擁擠試劑係多醣。在一些實施例中，擁擠試劑係纖維素分子。在一些實施例中，擁擠試劑係甲基纖維素。在一些實施例中，擁擠試劑係選自由以下組成之群之纖維素分子：乙基纖維素、乙基甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥乙基甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、乙基羥乙基纖維素、羧甲基纖維素及衍生物及其組合。在一些實施例中，擁擠試劑係聚蔗糖聚合物。

在一些實施例中，攙擠試劑(例如纖維素攙擠試劑(例如，63,000之Methocel MC))具有50,000至500,000 Da (例如，約50至100 kDa、100至200 kDa、200至300 kDa、300至400 kDa、400至500 kDa或更高)之平均分子量。在一些實施例中，如本文所用「平均分子量」係指溶液中攙擠試劑之數目平均分子量(Mn)。在一些實施例中，纖維素攙擠試劑具有50,000至500,000 Da之數目平均分子量。在一些實施例中，纖維素攙擠試劑之數目平均分子量為約63 kDa。在一些實施例中，纖維素攙擠試劑之數目平均分子量係約20 kDa與120 kDa之間、約26 kDa與110 kDa之間、約41 kDa與86 kDa之間、約50 kDa與75 kDa之間或約60 kDa與70 kDa之間。

在一些實施例中，平均分子量可根據製造商之說明書來測定。在一些實施例中，可基於特定纖維素化合物之表觀黏度與分子量或鏈長度之間之比例關係來計算或估計纖維素攙擠試劑之平均分子量。鑒於此比例性，平均分子量可使用已知參照值藉由在已知溫度下量測具有已知濃度纖維素之水溶液之表觀黏度來測定。舉例而言，在一些實施例中，可藉由以下方式獲得Methocel纖維素組合物之平均分子量：在20°C下量測2% (w/v)纖維素溶液之黏度值(例如，使用ASTM專論D1347及D2363中所述之量測方法)，並將量測值與由製造商提供之已知值(例如，如METHOCEL Cellulose Ethers Technical Handbook中所闡述(DOW Chemical Company)；形式號192-01062-0902 AMS，2002年9月公開)進行比較。

在一些實施例中，攙擠試劑係聚醚化合物。在一些實施例中，攙擠試劑係選自由以下組成之群之聚醚化合物：聚乙二醇(例如，PEG 200及更大，包括PEG 20,000及更大)、聚丙二醇、多聚甲醛、聚四亞甲基二醇、聚苯醚及其衍生物及組合。在一些實施例中，攙擠試劑選自由以下組

成之群：牛血漿白蛋白、肝醣、聚葡萄糖及其衍生物及組合。在一些實施例中，擁擠試劑係聚醯胺。在一些實施例中，擁擠試劑係環狀聚醯胺(例如，聚乙烯基吡咯啉酮)。

在一些實施例中，擁擠試劑係以溶液形式提供。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約0.6重量%。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約0.9重量%。在一些實施例中，溶液中所添加擁擠試劑之濃度係約1.8重量%。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約2.0重量%。在一些實施例中，擁擠試劑在溶液中之濃度係約2.3重量%。在一些實施例中，擁擠試劑係以如下量存在於溶液中：約0.1重量%至約1.0重量%之間、約1.0重量%至約2.0重量%之間、約2.0重量%至約3.0重量%之間、約3.0重量%至約4.0重量%之間、約4.0重量%至約5.0重量%之間、約5.0重量%至約6.0重量%之間、約6.0重量%至約7.0重量%之間、約7.0重量%至約8.0重量%之間、約8.0重量%至約9.0重量%之間、約9.0重量%至約10.0重量%之間、約10.0重量%至約15.0重量%之間、約10重量%至約11重量%之間、約11重量%至約12重量%之間、約12重量%至約13重量%之間、約13重量%至約14重量%之間或約14重量%至約15重量%之間、約15.0重量%至約20.0重量%之間或更大。

在一些實施例中，擁擠試劑之溶液係以具有與樣品溶液(例如，在載入緩衝液中)之體積相同之數量級(例如，1至3倍小至1至3倍大)之體積添加。在一些實施例中，將擁擠試劑(例如，Methocel MC)之2.7%溶液移液至約等體積之於載入緩衝液中之樣品中。在一些實施例中，將擁擠試劑之1.8%溶液移液至約等體積之於載入緩衝液中之樣品中。在一些實施例中，將擁擠試劑之1.2%溶液移液至約等體積之於載入緩衝液中之樣品

中。在一些實施例中，將擁擠試劑之0.9%溶液移液至約等體積之於載入緩衝液中之樣品中。在一些實施例中，將擁擠試劑之0.6%溶液移液至約等體積之於載入緩衝液中之樣品中。

在一些實施例中，將擁擠試劑溶液置於樣品溶液上而不加混合。然而，在一些實施例中亦可混合溶液。

在一些實施例中，擁擠試劑係以凝膠(例如，親水凝膠)形式提供，其可經放置以與樣品溶液(例如，在樣品儲器中)直接接觸。凝膠可以施加(例如，呈凝膠堵漏劑之形式)而不受移液考慮的限制，且可以凝膠形式使用較高濃度及黏度之擁擠試劑。

在一些實施例中，擁擠試劑係以固體狀態提供。舉例而言，在一些實施例中，擁擠試劑係以薄膜形式提供。在一些實施例中，擁擠試劑可以纖維材料、膜狀材料、黏合材料、複合材料、層壓材料或其某一組合形式提供。在一些實施例中，薄膜可包含適於與本文所闡述之方法及組合物一起使用之合成及/或天然材料。在一些實施例中，薄膜係選自交聯凝膠或去水溶液之材料。在一些實施例中，薄膜包含聚丙烯醯胺、聚葡萄糖、瓊脂糖或其某一組合或變化形式。在一些實施例中，固體狀態擁擠試劑(例如，薄膜)有利地吸收樣品總體體積中之水，同時優先排除所關注分子(例如，測序模板)。因此，應瞭解任何該等適宜試劑均可作為固體狀態擁擠試劑用於本文所提供之方法中。

### *凝聚劑*

如本文所用之「凝聚劑」係指任何天然或合成化合物，其在與所關注分子組合時使得所關注分子相對於其在不存在凝聚劑下之結構呈凝聚結構。舉例而言，在給定樣品中，所關注分子在存在凝聚劑下所佔用之體積

小於缺乏凝聚劑之相同樣品。因此，在一些實施例中，凝聚劑可降低所關注分子在樣品中之佔用體積。在一些實施例中，凝聚劑與所關注分子發生相互作用，使得該分子採取佔用樣品中總體積之較小部分之壓緊結構。在一些實施例中，凝聚劑與所關注分子相互作用以降低分子之瀰漫性體積。藉由引入凝聚劑，該分子之瀰漫性體積可能小於不存在凝聚劑之情形，且該分子由於其瀰漫性體積更小而可能更易於載入樣品孔。在一些實施例中，凝聚劑相對於同一溶液中之其他組分係惰性的。在一些實施例中，凝聚劑不干擾同一溶液中發生之反應。

圖5一般性地圖解說明樣品中之凝聚劑對所關注分子之效應之實例。舉例而言，方案500繪示其中所關注分子591與凝聚劑530接觸之過程。顯示所關注分子591<sub>1</sub>佔用由半徑 $r_1$ 之球體近似之初始體積 $V_1$ 。在與凝聚劑530接觸之後，顯示凝聚的所關注分子591<sub>2</sub>佔用由半徑 $r_2$ 之球體近似之凝聚體積 $V_2$ 。在一些實施例中，初始體積 $V_1$ 及凝聚體積 $V_2$ 分別係指所關注分子591<sub>1</sub>及凝聚的所關注分子591<sub>2</sub>之瀰漫性體積。因此，在一些實施例中，凝聚劑530經構形以降低所關注分子591在溶液中佔用之體積，該體積可視為分子之瀰漫性體積。藉由引入凝聚劑，該分子之瀰漫性體積可能小於不存在凝聚劑之情形，且該分子由於其瀰漫性體積更小而可能更易於載入樣品孔。

圖5進一步圖解說明在所關注分子載入樣品孔之情形下使用凝聚劑之實例。圖501<sub>1</sub>及圖501<sub>2</sub>各自繪示具有包含經構形以結合所關注分子591之偶合基團593之底部表面之樣品孔。此外，圖501<sub>1</sub>及501<sub>2</sub>中之每一者繪示已與包含所關注分子591之樣品接觸之樣品孔。繪示於圖501<sub>1</sub>中之樣品包括尚未與凝聚劑接觸之所關注分子591<sub>1</sub>，而繪示於圖501<sub>2</sub>中之樣品包括已

與凝聚劑接觸之凝聚的所關注分子591<sub>2</sub>。如所顯示，相對於顯示於圖501<sub>1</sub>中之所關注分子591<sub>1</sub>，凝聚的所關注分子591<sub>2</sub>佔用凝聚體積。因此，由凝聚的所關注分子591<sub>2</sub>佔用之體積降低可使得所關注分子591藉助偶合基團593結合至底部表面之機率提高。在一些實施例中，倘若期望將佔用相對大體積之所關注分子591載入具有相對小體積之容量之樣品孔(例如，適於單一分子佔用之體積，例如用於單一分子測序之陣列之樣品孔)中，則可有利地利用凝聚劑。在一些實施例中，凝聚劑可進一步與本文所闡述之擁擠試劑組合利用。在該等實施方案中，降低樣品之可及總體體積之擁擠試劑及降低由每一所關注分子佔用之體積之擁擠試劑的淨效應，使得樣品孔單佔用率接近或大於藉由帕松統計所預示者。

在一些實施例中，凝聚劑係核酸凝聚劑。核酸凝聚劑可藉由各種機制(包括(但不限於)體積排除及電荷屏蔽)來壓緊核酸。用於評估試劑凝聚核酸之能力之分析為業內已知，例如如WO/1996/021036中所闡述，該案之相關內容係以全文引用方式併入本文中。在一些實施例中，核酸凝聚劑經由電荷間靜電相互作用與核酸發生相互作用以誘導核酸結構之摺疊(例如，核酸凝聚)。在一些實施例中，凝聚劑由於以下各項中之一或多者而可使核酸凝聚：施加滲透壓以使螺旋結構之片段結合在一起(例如，分子擁擠效應)，降低核酸片段之間之排斥性相互作用(例如，藉由中和磷酸根電荷)，及增加核酸片段之間之吸引力相互作用。在一些實施例中，可藉由多陽離子帶電凝聚劑來誘導DNA片段之間之吸引力相互作用。

在一些實施例中，凝聚劑包含多陽離子。如本文所用，多陽離子通常係指具有複數個帶正電位點之化合物。在一些實施例中，多陽離子在存在於包括所關注分子之樣品中時為多陽離子性。舉例而言，在一些實施例

中，包含所關注分子之樣品中之條件(例如，pH、緩衝容量、離子強度)使得凝聚劑在樣品中為多陽離子性。在一些實施例中，多陽離子在生理pH(例如，pH  $\approx$  7.4)下為多陽離子性。在一些實施例中，多陽離子係帶正電單體單元之聚合物，但一些非帶正電單元可存在於聚合物中。在一些實施例中，多陽離子之實例包括多胺，例如精胺、亞精胺及腐胺。在一些實施例中，多陽離子包含聚胺基酸，例如聚組胺酸、聚離胺酸、聚精胺酸及聚鳥胺酸。進一步預計其他鹼性肽及小鹼性蛋白可用作多陽離子性凝聚劑(例如，組織蛋白、魚精蛋白)。對於由胺基酸組成之多陽離子，可使用L形式或D形式。鹼性胺基酸包括離胺酸、精胺酸、胺基酸類似物(例如鳥胺酸及刀豆酸)、經修飾鹼性胺基酸(例如高精胺酸)及經修飾以攜載正電荷之其他經修飾胺基酸(例如胍基纈胺酸及胺基乙基半胱胺酸)。多陽離子之其他實例包括聚銨(例如，聚凝胺(海地美溴銨(hexadimethrine bromide)))、脂質(例如，DOTAP、DC-Chol/DOPE、DOGS/DOPE及DOTMA/DOPE)。

### *氧清除密封劑*

在再其他態樣中，本發明提供可用於保護氧敏感性系統並維持樣品完整性之方法及組合物。生物及/或化學反應通常可能對與外部環境之相互作用敏感，例如易於蒸發及對外部環境中之氧及/或其他分子敏感。先前曾使用密封劑來保護敏感性反應免遭與外部環境之有害相互作用。舉例而言，在藉由聚合酶鏈式反應(PCR)之擴增期間通常使用礦物油來覆蓋樣品。因此，在一些實施例中，本文所闡述之載入及測序之方法進一步包含用密封劑(例如，礦物油)覆蓋測序反應。本發明者已認識且瞭解到，代替或除習用密封劑以外，可使用某些組合物來賦予本文所闡述之測序反應其

他保護效應。舉例而言，在一些實施例中，可使氧清除密封劑與樣品接觸。

本發明之態樣係關於單一分子測序技術。在一些實施例中，單一分子測序包含使用光學系統。在該等實施例中，光學系統可涉及可直接或間接降解成測序反應之一或多種組分之激發能量之使用。舉例而言，在一些實施例中，激發能量可生成可損害測序反應中之聚合酵素之活性之活性含氧物。本發明者已認識且瞭解到，氧清除密封劑使活性含氧物之存在減至最少，同時提供許多與習用密封劑(例如，礦物油)相同之益處。

在一些實施例中，氧清除密封劑包含可氧化試劑及觸媒。如本文所用，「可氧化試劑」係任何能氧化之試劑。在一些實施例中，可氧化試劑之氧化由觸媒介導及/或加速。因此，在一些實施例中，藉助由觸媒催化之反應或反應系列中之可氧化試劑之氧化進行氧清除。在一些實施例中，氧清除密封劑關於測序反應較佳係非抑制性的(例如，惰性)。測序反應及試劑藉由相分離免除氧清除組分之影響(例如，清除劑試劑在油相中保持隔離且保持與水性測序試劑安全分離)。

在一些實施例中，可氧化試劑係有機化合物。在一些實施例中，可氧化試劑包含至少一個烯鍵。如本文所用，「烯鍵」係碳-碳雙鍵。在一些實施例中，烯鍵可經取代或未經取代。在一些實施例中，烯鍵可為末端鍵或內鍵。在一些實施例中，烯鍵係含於環結構內。舉例而言，在一些實施例中，烯鍵可包含在5員或6員環(例如，戊醯環或己糖環)內。在一些實施例中，有機化合物可包含含氧部分。舉例而言，含氧部分可包括(但不限於)酯、羧酸、醛、醚、酮、醇、過氧化物及/或氫過氧化物。

在一些實施例中，預計本文所提供氧清除密封劑之可氧化試劑包括

抗壞血酸酯及異抗壞血酸酯(呈游離酸、鹽及衍生物形式)、鹼金屬、鹼土金屬或亞硫酸銨鹽或其混合物。在一些實施例中，可氧化試劑係水不溶性抗壞血酸酯。在一些實施例中，藉由將抗壞血酸酯或異抗壞血酸酯以離子金屬鹽(例如鹼金屬、鹼土金屬鹽、有機酸之酯或其他衍生之抗壞血酸酯)之形式引入密封劑中形成可氧化試劑。在一些實施例中，可用其他已知還原劑(例如第二抗壞血酸酯或異抗壞血酸酯、單寧酸、亞硫酸酯及諸如此類)補充氧清除劑抗壞血酸酯及/或異抗壞血酸酯組分。在一些實施例中，抗壞血酸酯可呈C6-C22脂肪酸酯或二酯之形式，其可完全飽和或在具有C10-C22脂肪酸酯之烴鏈中含有不飽和。在一些實施例中，抗壞血酸酯可為(例如)月桂酸抗壞血酸基酯、肉豆蔻酸抗壞血酸基酯、棕櫚酸抗壞血酸基酯、硬脂酸抗壞血酸基酯及諸如此類。

在一些實施例中，清除試劑之溶解性不強。在一些實施例中，清除試劑係在油中(例如，在介於飽和與50%飽和之間之油中)提供。在一些實施例中，清除試劑(例如，在油中)係基於其溶解性來選擇(及/或以適當濃度提供)，以避免分配至下伏水相中至可能干擾測序或其他反應之程度。

如本文所闡述，在一些實施例中，氧清除密封劑包含觸媒。預計眾多觸媒均可用於本文所闡述之技術中。適宜觸媒包括可易於在至少兩個氧化態之間相互轉化之金屬離子。在一些實施例中，觸媒係過渡金屬。舉例而言，在一些實施例中，過渡金屬可選自週期表之第一、第二或第三過渡系列。適宜金屬包括(但不限於)錳II或III、鐵II或III、鈷II或III、鎳II或III、銅I或II、銻II、III或IV及鈦。應瞭解，金屬在引入時之氧化態不一定是活性形式之氧化態。在一些實施例中，過渡金屬選自鈦、鈦、鈮、鉻、錳、鐵、鈷、鎳、銅及鋅。舉例而言，在一些實施例中，觸媒包含

銅。在一些實施例中，過渡金屬係鏷系元素金屬(例如、鏷、銻、鏷、鏷、鈳、鉅、鈰、鎢、鈳、鈳、鈳、鈳、鈳、鈳、鈳、鈳、鈳或鈳)。

在一些實施例中，觸媒包含呈鹽形式(例如金屬離子及相對離子)之金屬。預計能夠與金屬離子錯合之任何適宜帶電化合物均可用於本文所闡述之清除密封劑中。在一些實施例中，相對離子選自由以下組成之群：鹵離子、硫酸根、亞硫酸根、硫化物、硝酸根、亞硝酸根、乙酸根、乙醯丙酮酸根、過氯酸根、氫氧化物、甲醇根及乙醇根。在一些實施例中，相對離子選自由以下組成之群：月桂酸根、肉豆蔻酸根、棕櫚酸根、硬脂酸根、油酸根及亞油酸根。

在一些實施例中，預計本文所提供氧清除密封劑之觸媒包括具有有限或沒有水溶解性之氧化觸媒。在一些實施例中，觸媒係以實質上具有水不溶性之有機或無機過渡金屬化合物之形式提供。在一些實施例中，觸媒可呈其中過渡金屬藉由離子鍵或共價鍵與其他元素或基團締合之鹽或化合物之形式。在一些實施例中，觸媒可呈螯合物、錯合物或有機羧酸脂肪酸鹽之形式。在一些實施例中，過渡金屬化合物係具有呈最高氧化態之過渡金屬之化合物。在一些實施例中，氧清除密封劑包含銅錯合物及脂肪酸抗壞血酸基酯。

### 樣品載入

在一些態樣中，本發明係關於可用於將所關注分子(例如，測序模板)載入樣品孔之方法及組合物。舉例而言，在一些實施例中，本發明提供可用於藉由將樣品引入包含樣品孔之積體裝置之表面上，以將包含所關注分子之樣品載入樣品孔之方法及組合物。藉助使樣品與積體裝置之表面接觸之樣品載入可以任何適宜方法來實施。在一些實施例中，包含所關注分子

之樣品係由實踐者將樣品添加至裝置中(例如經由移液管、分配器或任一適宜流體轉移裝置/系統)來載入。在一些實施例中，包含所關注分子之樣品係經由自動化構件(例如，機器人裝置/系統)將樣品添加至裝置中來載入。在一些實施例中，包含所關注分子之樣品係藉由經由一或多個微流體通道將添加至樣品裝置中來載入。

在一些實施例中，可藉由通常用於將分子遞送至積體裝置之方法將所關注分子遞送至積體裝置(例如，包含樣品孔之積體裝置，陣列)。舉例而言，遞送方法可包括將所關注分子懸浮於流體中及使所得懸浮液流動至積體裝置之樣品孔中。此可包括簡單地將相關懸浮液移液至積體裝置之一或多個區域上，或可包括更多主動流動方法，例如電引導式或基於壓力之流體流動。在一些實施例中，包含所關注分子之樣品係流動至積體裝置之所選區域，例如其中特定的所關注分子欲在積體裝置之特定區域中進行分析。此可藉由遮蔽技術(施加遮罩以引導流體流動)或藉由主動流動方法(例如電引導或基於壓力之流體流動(包括噴墨式印刷方法))來實現。用於將核酸及相關試劑遞送至陣列之噴墨及其他遞送方法參見(例如) Kimmel 及 Oliver (編輯) (2006) DNA Microarrays Part A: Array Platforms & Wet-Bench Protocols, 第 410 卷 (Methods in Enzymology) ISBN-10: 0121828158 ; Lee (2002) Microdrop Generation (Nano-and Microscience, Engineering, Technology and Medicine) CRC Press ISBN-10: 084931559X ; 及 Heller (2002) 「DNA MICROARRAY TECHNOLOGY: Devices, Systems, and Applications」 Annual Review of Biomedical Engineering 4: 129-153。在一些實施例中，微流體流動可用於所關注分子遞送。簡單地藉由將相關懸浮液移液至積體裝置之正確區域

中，積體裝置之區域亦可為選擇性遞送目標。

在一些實施例中，藉由將樣品引入包含樣品孔之積體裝置上而將包含所關注分子之樣品載入樣品孔之方法可包含一或多個洗滌步驟。舉例而言，在一些實施例中，可在將樣品引入積體裝置上之前及/或之後(例如，在將包含所關注分子之樣品載入積體裝置之樣品孔中之前及/或之後)將積體裝置洗滌一或多次。在一些實施例中，用用於將所關注分子懸浮於欲載入樣品中之相同溶液或緩衝液洗滌積體裝置。在一些實施例中，用非離子表面活性劑(例如，Tween 20)洗滌積體裝置。在一些實施例中，洗滌步驟包含容許洗滌溶液在積體裝置上培育之培育時段。在一些實施例中，本文所闡述之載入方法可在不實施洗滌步驟之情況下進行。

在一些態樣中，本發明提供將所關注分子(例如，測序模板)載入樣品孔之方法，該方法包含使所關注分子與積體裝置之表面接觸，及使所關注分子與擁擠試劑及/或凝聚劑接觸。應瞭解，在一些實施例中，接觸步驟可以任一適宜順序實施。舉例而言，在一些實施例中，使所關注分子在與擁擠試劑及/或凝聚劑接觸之前與表面接觸。在一些實施例中，可使所關注分子與積體裝置接觸(例如，載入其上)，隨後在與擁擠試劑及/或凝聚劑接觸之前培育一定時段。在一些實施例中，在此一培育時段期間樣品中存在凝聚劑。在一些實施例中，在所關注分子與積體裝置接觸(例如，載入其上)之後立即或大約不久使擁擠試劑及/或凝聚劑與積體裝置接觸(例如，載入其上)。在一些實施例中，樣品在與積體裝置接觸之前包含擁擠試劑及/或凝聚劑。

圖6A-6C中繪示樣品與積體裝置之表面接觸之實施例之一個實例。如圖6A中所顯示，包含所關注分子690之樣品640係與具有複數個樣品孔

之積體裝置接觸。圖6B繪示包含已添加至樣品640中之擁擠試劑650之層660。在一些實施例中，容許層660與樣品640一起培育一定時間段，如本文所闡述。在一些實施例中，培育時段可容許擁擠試劑650吸收樣品640中之總體體積(例如，水)且排除所關注分子690。圖6C圖解說明在培育時段後發生之此體積排除效應，在該培育時段期間所關注分子690被驅至樣品孔中，其中樣品孔接收成功載入之所關注分子691之機率提高。

在其他實施例中，使所關注分子在與表面接觸之前與擁擠試劑接觸。舉例而言，在一些實施例中，可在與積體裝置接觸(例如，載入其上)之前混合所關注分子及擁擠試劑。在該等實施例中，所關注分子及擁擠試劑可混合且容許平衡某一時間段。在一些實施例中，所關注分子及擁擠試劑係在即將與積體裝置接觸(例如，載入其上)之前或在此之前大約不久進行混合。在其他實施例中，所關注分子大約同時與表面接觸並與擁擠試劑接觸。舉例而言，在一些實施例中，所關注分子及擁擠試劑大約同時與積體裝置接觸(例如，載入其上)，使得該兩種組分在積體裝置之表面上經混合。在其他實施例中，所關注分子係在與表面接觸之後與擁擠試劑接觸。舉例而言，在一些實施例中，擁擠試劑係在所關注分子之前與積體裝置接觸(例如，載入其上)。在該等實施例中，可使擁擠試劑與積體裝置接觸(例如，載入其上)，隨後培育一定時段，之後載入所關注分子(例如，經由將所關注分子引入積體裝置上)。

如本文所闡述，擁擠試劑通常有利於所關注分子載入樣品孔。在一些實施例中，擁擠試劑促進所關注分子附接至樣品孔之底部表面。因此，在一些實施例中，可期望在開始測序反應之前在積體裝置上培育所關注分子-擁擠試劑混合物。在一些實施例中，在開始測序反應之前將所關注分

子-擁擠試劑混合物在積體裝置上培育約1分鐘至約5分鐘、約5分鐘至約10分鐘、約10分鐘至約20分鐘、約20分鐘至約30分鐘、約30分鐘至約40分鐘、約40分鐘至約50分鐘、約50分鐘至約60分鐘或約60分鐘至約90分鐘。

在培育時段之後，在一些實施例中，可自積體裝置去除過量體積。在一些實施例中，過量體積包含擁擠試劑及/或未附接至樣品孔之任何所關注分子。舉例而言，在圖6C中所繪示之所關注分子之成功載入之後，圖6D繪示在去除包含擁擠試劑及未成功載入樣品孔之所關注分子之過量體積之後的積體裝置。

在一些實施例中，在去除過量體積之後將積體裝置之表面洗滌一或多次。如本文所闡述，在一些實施例中，所關注分子可參與可藉由本發明中所闡述之任何適宜技術開始之反應(例如，測序反應)。舉例而言，在圖6D中繪示之過量體積之去除之後，圖6E繪示添加包含開始反應之要素652之製備物670產生活性所關注分子692。在一些實施例中，在開始反應之前將積體裝置之表面洗滌一或多次。在一些實施例中，用用於懸浮所關注分子之溶液將積體裝置之表面洗滌一或多次。在一些實施例中，用用於開始反應之溶液將積體裝置之表面洗滌一或多次。在一些實施例中，在可選去除及/或洗滌步驟之後，藉由本文別處闡述之任何適宜開始方式開始測序反應。舉例而言，在一些實施例中，所關注分子包含參與測序反應之測序模板。在該等實施例中，測序模板可有利地「引發」用於測序反應。在一些實施例中，包含測序模板之樣品具有開始測序反應所需要之大多數或除一種以外之所有組分。因此，可在適當時間藉由將必需組分添加至樣品中開始測序反應。在一些實施例中，藉由將dNTP添加至樣品中開始測序

反應。在一些實施例中，藉由將金屬陽離子(例如，鎂離子)添加至樣品中開始測序反應。在一些實施例中，樣品中抑制劑之存在阻止測序反應之開始。在該等實施例中，可藉由去除抑制劑(例如藉由稀釋抑制劑(例如，經由緩衝液交換))開始反應。因此，較佳地可在開始測序反應之前使樣品與積體裝置之表面接觸(例如，載入其上)。

在一些實施例中，將密封劑添加至樣品中以覆蓋所開始反應。在一些實施例中，密封劑係氧清除密封劑。舉例而言，在如圖6E中所顯示之反應開始之後，圖6F繪示包含添加至樣品中之氧清除密封劑654之層680。本文闡述適宜氧清除密封劑之性質、闡述及實例。

### 樣品製備

在一些態樣中，本發明概言之係關於在獲得用於分析之樣品與分析樣品之間之步驟及製程之改良。舉例而言，在一些實施例中，本發明係關於在獲得用於測序之樣品與自樣品獲得測序資訊之間之步驟及製程之改良。在一些實施例中，試樣包含核酸試樣。在一些態樣中，製備測序用樣品通常涉及在使樣品經受測序分析之前對樣品(例如，生物樣品、化學樣品、核酸樣品、蛋白質樣品)進行一或多種物理及/或化學改質。在一些實施例中，製備測序用樣品涉及生成測序模板。

如本文所用，「測序模板」係作為分析(例如，測序分析)之目標之分子。在一些實施例中，測序模板包含核酸分子。在一些實施例中，核酸分子稱為「靶標」或「模板」核酸。在一些實施例中，核酸分子包含至少一種雜交之引子/聚合酵素錯合物。舉例而言，在一些實施例中，使核酸分子與與核酸分子之一部分互補之測序引子接觸，使得測序引子退火至核酸分子。此引發位置生成其中聚合酵素(例如，DNA或RNA聚合酶)可偶合

至核酸分子以形成雜交之引子/聚合酵素錯合物之位點。因此，在一些實施例中，包含至少一種雜交之引子/聚合酵素之測序模板可稱作「測序模板錯合物」。

如本文所使用之術語「核酸」通常係指包含一或多個核酸亞單元之分子。核酸可包括一或多個選自腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其變體之亞單元。在一些實施例中，核酸係去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其衍生物。核酸可為單鏈或雙鏈的。核酸可為環狀的。在一些實施例中，核酸通常係指核苷酸之任一聚合物。

如本文所用術語「核苷酸」通常係指可包括A、C、G、T或U或其變體或類似物之核酸亞單元。核苷酸可包括可併入至生長核酸鏈中之任何亞單元。該亞單元可為A、C、G、T或U，或特異於一或多個互補A、C、G、T或U或互補於嘌呤(例如，A或G或其變體或類似物)或嘧啶(例如，C、T或U或其變體或類似物)之任何其他亞單元。亞單元可使得個別核酸鹼基或鹼基組(例如，AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA，或其尿嘧啶對應體)能夠溶解。核苷酸可包含一或多個磷酸酯基團。核苷酸可包含甲基化核鹼基。舉例而言，甲基化核苷酸可為包含一或多個附接至核鹼基(例如，直接附接至核鹼基之環，附接至核鹼基環之取代基)之甲基之核苷酸。實例性甲基化核鹼基包括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-甲基鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、N2-甲基鳥嘌呤及N2,N2-二甲基鳥嘌呤。

如本文所用術語「引子」通常係指可包括包含A、C、G、T及/或U

或其變體或類似物之序列之核酸分子(例如，寡核苷酸)。引子可為包含DNA、RNA、PNA或其變體或類似物之合成寡核苷酸。引子可經設計使得其核苷酸序列與靶標或模板核酸互補，或引子可包含隨機核苷酸序列。在一些實施例中，引子可包含尾(例如，聚-A尾、索引適配體(index adaptor)、分子條碼等)。在一些實施例中，引子可包含5至15個鹼基、10至20個鹼基、15至25個鹼基、20至30個鹼基、25至35個鹼基、30至40個鹼基、35至45個鹼基、40至50個鹼基、45至55個鹼基、50至60個鹼基、55至65個鹼基、60至70個鹼基、65至75個鹼基、70至80個鹼基、75至85個鹼基、80至90個鹼基、85至95個鹼基、90至100個鹼基、95至105個鹼基、100至150個鹼基、125至175個鹼基、150至200個鹼基或超過200個鹼基。

在一些實施例中，可自受試者(例如，人類或其他受試者)獲得之生物樣品提取包含靶標核酸之樣品。在一些實施例中，受試者可為患者。在一些實施例中，可對靶標核酸進行檢測及/或測序用於診斷、預後及/或治療目的。在一些實施例中，用於測序分析之資訊可用於輔助疾病或病況之診斷、預後及/或治療。在一些實施例中，受試者可懷疑患有健康病況，例如疾病(例如，癌症)。在一些實施例中，受試者可經歷疾病之治療。

在一些實施例中，可自受試者之體液或組織(例如呼氣、唾液、尿液、血液(例如，全血或血漿)、糞便或其他體液或生檢樣品)提取生物樣品。在一些實例中，自受試者之體液或組織提取一或多種核酸分子。該一或多種核酸可自受試者(例如受試者之一部分組織)獲得之一或多種細胞提取或自受試者之無細胞體液(例如全血)獲得。

可處理生物樣品以準備檢測(例如，測序)。該處理可包括自生物樣品

分離及/或純化生物分子(例如，核酸分子)及生成生物分子之更多拷貝。在一些實例中，自受試者之體液或組織分離及純化一或多種核酸分子，並藉助核酸擴增(例如聚合酶鏈式反應(PCR))進行擴增。然後，可藉助(例如)測序來鑑別一或多種核酸分子或其亞單元。然而，在一些實施例中，可在不需要擴增之情況下評估(例如，測序)核酸樣品。

如此申請案中所闡述，測序可包括藉由合成與模板互補或類似之另一生物分子(例如藉由合成與模板核酸分子互補之核酸分子並鑑別隨時間流逝核苷酸之納入(例如，藉由合成測序))來測定模板生物分子(例如，核酸分子)之個別亞單元。作為替代，測序可包括直接鑑別生物分子之個別亞單元。

在測序期間，可將指示生物分子之個別亞單元之信號收集在記憶體中並即時或在稍後時間點進行處理以測定生物分子之序列。該處理可包括比較該等信號與參考信號從而使得能夠鑑別個別亞單元，此在一些情形下產生讀段。讀段可為具有足夠長度(例如，至少約30、50、100個鹼基對(bp)或更多)之序列，該等序列可用於鑑別較大序列或區域，例如可將該等序列與染色體或基因體區域或基因上之位置進行比對。

序列讀段可用於重構受試者之基因體之較長區域(例如，藉由比對)。讀段可用於重構染色體區域、整條染色體或全基因體。序列讀段或自該等讀段生成之較大序列可用於分析受試者之基因體，例如鑑別變體或多型性。變體之實例包括(但不限於)單核苷酸多型性(SNP) (包括串聯SNP)、小規模多鹼基缺失或插入(亦稱為插入缺失或缺失插入多型性(DIP))、多核苷酸多型性(MNP)、短串聯重複(STR)、缺失(包括微缺失)、插入(包括微插入)、結構變異(包括複製、倒位、易位、倍增、複雜多位點變體、拷

貝數變異(CNV))。基因體序列可包含變體之組合。舉例而言，基因體序列可涵蓋一或多種SNP及一或多種CNV之組合。

術語「基因體」通常係指生物體遺傳資訊之總體。基因體可以DNA或RNA來編碼。基因體可包含編碼蛋白質之編碼區域以及非編碼區域。基因體可包括生物體中所有染色體一起之序列。舉例而言，人類基因體總共具有46條染色體。所有該等染色體之序列一起構成人類基因體。在一些實施例中，測定整個基因體之序列。然而，在一些實施例中，關於基因體之子集(例如，一條或幾條染色體，或其區域)或一個或幾個基因(或其片段)之序列資訊足以用於診斷、預後及/或治療應用。

儘管一些實施例可藉由檢測樣品中之單一分子來進行診斷測試，但本發明者亦已認識到，本發明之方法及組合物可用於實施多肽(例如，蛋白質)測序或(例如)基因之一或多個核酸片段之核酸(例如，DNA、RNA)測序。

### 測序

在一些實施例中，本申請案之態樣可用於與生物樣品之分析相關之方法中。在實例性實施例中，本文所提供之方法可用於用來測定樣品中之一或多種核酸或多肽之序列及/或測定樣品中之一或多種核酸或多肽變體(例如，所關注基因中之一或多種突變)之存在或不存在的技術中。在一些實施例中，可對患者樣品(例如，人類患者樣品)實施測試以提供核酸序列資訊或測定一或多種所關注核酸之存在或不存在，用於診斷、預後及/或治療目的。在一些實例中，診斷測試可包括對受試者之生物樣品中之核酸分子進行測序，例如藉由對受試者之生物樣品中之無細胞DNA分子及/或表現產物(例如，RNA)進行測序來進行。舉例而言，本發明提供可有利地

用於闡述於以下申請案中之技術中之方法及組合物：共同待決之美國專利申請案第 14/543,865 號、第 14/543,867 號、第 14/543,888 號、第 14/821,656 號、第 14/821,686 號、第 14/821,688 號、第 15/161,067 號、第 15/161,088 號、第 15/161,125 號、第 15/255,245 號、第 15/255,303 號、第 15/255,624 號、第 15/261,697 號、第 15/261,724 號、第 62/289,019 號、第 62/296,546 號、第 62/310,398 號、第 62/339,790 號、第 62/343,997 號、第 62/344,123 號及第 62/426,144 號，其各自之內容係以引用方式併入本文中。

本申請案之一些態樣可用於能夠對生物聚合物(例如核酸及蛋白質)進行測序之技術中。在一些實施例中，本申請案中所闡述之方法及組合物可用於鑑別納入核酸或蛋白質中之一系列核苷酸或胺基酸單體(例如，藉由檢測一系列經標記核苷酸或胺基酸單體之納入時程)之技術中。在一些實施例中，本申請案中所闡述之方法及組合物可納入鑑別一系列納入藉由聚合酵素合成之模板依賴性核酸測序反應產物之核苷酸之技術中。

在測序期間，聚合酵素可偶合(例如，附接)至靶標核酸分子(例如，測序模板之核酸分子)之引發位置。引發位置可包含與靶標核酸分子之一部分互補之引子。作為替代，引發位置係在靶標核酸分子之雙鏈片段內提供之間隙或切口。間隙或切口之長度可為 0 至至少 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30 或 40 個核苷酸。切口可在雙鏈序列之一條鏈中提供中斷，其可為聚合酵素(例如鏈置換聚合酶)提供引發位置。

在一些情形下，可使測序引子退火至可或未固定至固體載體之靶標核酸分子。固體載體可包含(例如)用於核酸測序之於積體裝置上之樣品孔。在一些實施例中，可將測序引子固定至固體載體，且靶標核酸分子之

雜交亦將靶標核酸分子固定至固體載體。在一些實施例中，將聚合酶固定至固體載體且使可溶性引子及靶標核酸與聚合酶接觸。然而，在一些實施例中，在溶液中形成包含聚合酶、靶標核酸及引子之錯合物且錯合物固定至固體載體(例如，經由聚合酶、引子及/或靶標核酸之固定)。在一些實施例中，樣品孔中之組分皆未固定至固體載體。舉例而言，在一些實施例中，在溶液中形成包含聚合酶、靶標核酸及引子之錯合物且錯合物未固定至固體載體。

在適當條件下，與退火引子/靶標核酸接觸之聚合酶可將一或多種核苷酸添加或納入至引子上，且可將核苷酸以5'至3'模板依賴性方式添加至引子中。該核苷酸納入引子(例如，經由聚合酶之作用)通常可稱作引子延伸反應。每一核苷酸可與可檢測標籤締合，該可檢測標籤可在核酸延伸反應期間檢測及鑑別(例如，基於其發光壽命及/或其他特徵)且可用於測定納入延伸引子中之每一核苷酸及由此新近合成之核酸分子之序列。經由新近合成之核酸分子之序列互補，亦可測定靶標核酸分子之序列。在一些情形下，測序引子退火至靶標核酸分子及核苷酸納入測序引子可在類似反應條件(例如，相同或類似的反應溫度)或不同反應條件(例如，不同的反應溫度)下進行。在一些實施例中，藉由合成方法之測序可包括提供靶標核酸分子之群體(例如，靶標核酸之拷貝)及/或擴增靶標核酸以達成靶標核酸之群體之步驟。然而，在一些實施例中，使用藉由合成之測序來測定所評估之每一反應中之單一分子之序列(且製備用於測序之靶標模板不需要核酸擴增)。在一些實施例中，根據本申請案之態樣平行實施複數個單一分子測序反應(例如，在單一積體裝置上)。舉例而言，在一些實施例中，複數個單一分子測序反應各自係在積體裝置上之單獨反應室中實施。

實施例能載入包含長度大於或等於約10個鹼基對(bp)、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、1000 bp、10,000 bp、20,000 bp、30,000 bp、40,000 bp、50,000 bp或100,000 bp之核酸分子之測序模板。在一些實施例中，將用於單一分子測序中之靶標核酸分子添加或固定至含有測序反應之至少一種其他組分(例如，聚合酵素，例如DNA聚合酶，及測序引子)之樣品孔之單鏈靶標核酸模板，該至少一種其他組分係固定或附接至固體載體(例如樣品孔之底部或側壁)。靶標核酸分子或聚合酶可直接或藉助連接體附接至樣品壁，例如在樣品孔之底部表面或側壁處。樣品孔亦可含有經由引子延伸反應合成核酸所需要之任何其他試劑，例如，適宜緩衝液、輔因子、酶(例如聚合酶)及去氧核糖核苷多磷酸(例如去氧核糖核苷三磷酸，包括去氧腺苷三磷酸(dATP)、去氧胞苷三磷酸(dCTP)、去氧鳥苷三磷酸(dGTP)、去氧尿苷三磷酸(dUTP)及去氧胸苷三磷酸(dTTP) dNTP)，其可視情況包含可檢測部分(例如，發光標籤)。

在一些實施例中，可使單鏈靶標核酸模板與測序引子、dNTP、聚合酶及核酸合成所需要之其他試劑接觸。在一些實施例中，所有適當的dNTP皆可與單鏈靶標核酸模板同時接觸(例如，所有dNTP皆同時存在)，使得dNTP可連續地納入。在其他實施例中，dNTP可與單鏈靶標核酸模板依序接觸，其中單鏈靶標核酸模板與每一適當dNTP分開接觸，且在單鏈靶標核酸模板與不同的dNTP接觸之間具有洗滌步驟。對於欲鑑別之單鏈靶標核酸模板之每一接續鹼基位置，可重複此一使單鏈靶標核酸模板與每一dNTP分開接觸隨後進行洗滌之循環。在一些實施例中，測序引子退火至單鏈靶標核酸模板且聚合酶基於單鏈靶標核酸模板將dNTP (或其他去氧核糖核苷多磷酸)連續納入引子。

## 聚合酶

如本文所用術語「聚合酶」及「聚合酵素」通常係指能催化聚合反應之任一酶。聚合酶之實例括(但不限於)核酸聚合酶、轉錄酶或連接酶。聚合酶可為聚合酶。

針對單一分子核酸延伸(例如,用於核酸測序)之實施例可使用能合成與靶標核酸分子互補之核酸之任一聚合酶。在一些實施例中,聚合酶可為DNA聚合酶、RNA聚合酶、反轉錄酶及/或其一或多者之突變體或變化形式。

聚合酶之實例包括(但不限於)DNA聚合酶、RNA聚合酶、熱穩定聚合酶、野生型聚合酶、經改質聚合酶、大腸桿菌(*E. coli*) DNA聚合酶I、T7 DNA聚合酶、噬菌體T4 DNA聚合酶 $\phi$ 29 (phi29) DNA聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Tli聚合酶、Pfu聚合酶、Pwo聚合酶、Vent®聚合酶、Deep Vent™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、鉑® Taq聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tth聚合酶、Pfurbo®聚合酶、Pyrobest™聚合酶、Pwo聚合酶、KOD聚合酶、Bst聚合酶、Sac聚合酶、克列諾片段(Klenow fragment)、具有3'至5'外核酸酶活性之聚合酶及其變體、經改質產物及衍生物。在一些實施例中,聚合酶係單一亞單元聚合酶。聚合酶之其他實例包括M2Y聚合酶、銅綠蠅聚合酶、屎腸球菌(*Enterococcus faecium*)聚合酶、芽孢桿菌屬(*Bacillus*)噬菌體VMY22聚合酶、芽孢桿菌屬噬菌體GA-1聚合酶、放線菌屬(*Actinomyces*)噬菌體AV-1聚合酶、莫蘭菌門候選種(*Candidatus Moranbacteria*)聚合酶、芽孢

桿菌屬噬菌體MG-B1聚合酶、埃格特菌屬(*Eggerthella* sp.)聚合酶、鏈球菌屬(*Streptococcus*)噬菌體CP-7聚合酶、類桿菌屬(*Bacteroides* sp.)聚合酶及沙眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)聚合酶。在其他地方中，DNA聚合酶之非限制性實例及其性質詳細闡述於DNA Replication第2版，Kornberg及Baker, W. H. Freeman, New York, N.Y. (1991)。

在靶標核酸之核鹼基與互補dNTP之間鹼基配對之後，藉由在新近合成鏈之3'羥基端與dNTP之 $\alpha$ 磷酸之間形成磷酸二酯鍵，聚合酶將dNTP納入新近合成之核酸鏈中。在一些實施例中，聚合酶係具有高持續力之聚合酶。然而，在一些實施例中，聚合酶係具有降低之持續力之聚合酶。聚合酶持續力通常係指聚合酶將dNTP連續納入核酸模板中而不釋放核酸模板之能力。

在一些實施例中，聚合酶係具有低5'-3'外核酸酶活性及/或3'-5'外核酸酶之聚合酶。在一些實施例中，聚合酶經改質(例如，藉由胺基酸取代)以相對於相應的野生型聚合酶具有降低之5'-3'外核酸酶活性及/或3'-5'活性。DNA聚合酶之其他非限制性實例包括9°Nm™ DNA聚合酶(New England Biolabs)及克萊諾掛式聚合酶(Klenow exo- polymerase)之P680G突變體(Tuske等人(2000) JBC 275(31):23759-23768)。在一些實施例中，具有降低之持續力之聚合酶為含有一或多段核苷酸重複序列(例如，兩個或更多個同一類型之連續鹼基)之測序模板提供增加之準確度。

針對單一分子RNA延伸(例如，用於RNA測序)之實施例可使用能自RNA模板合成互補DNA (cDNA)之任一反轉錄酶。在該等實施例中，反轉錄酶可以類似於聚合酶之方式起作用，因為可經由將dNTP納入退火至RNA模板之反轉錄引子自RNA模板合成cDNA。cDNA然後可參與測序反

應並測定其序列。然後可使用所測定之cDNA序列，經由序列互補來測定初始RNA模板之序列。反轉錄酶之實例包括莫洛尼鼠類白血病毒(Moloney Murine Leukemia Virus)反轉錄酶(M-MLV)、禽類成髓細胞瘤病毒(AMV)反轉錄酶、人類免疫缺失病毒反轉錄酶(HIV-1)及端粒酶反轉錄酶。

熟習此項技術者可藉由相對於相應野生型聚合酶之突變或其他修飾來增加或降低不同類型核酸之持續力、外核酸酶活性、相對親和力或核酸聚合酶之其他性質。在一些實施例中，可藉由使樣品與積體裝置之表面接觸將包含聚合酶之樣品載入樣品孔，如本文所闡述。

### 樣品孔

在一些態樣中，本發明提供將樣品載入積體裝置所包含之樣品孔中之方法。如本文所用，「積體裝置」係能與基礎儀器接口之裝置。在一些實施例中，積體裝置可包含一或多個樣品孔及/或感測器。在一些實施例中，積體裝置可能能夠與發射或檢測光之基礎儀器接口。在該等實施例中，積體裝置可包含一或多個樣品孔，每一樣品孔包括導波管。

本文所闡述類型之積體裝置可包含一或多個經構形以在其中接收所關注分子之樣品孔。在一些實施例中，樣品孔接收可安置在樣品孔之表面(例如底部表面)上之所關注分子。在一些實施例中，樣品孔係在積體裝置內形成，其中樣品孔之底部表面係在該樣品孔形成至其中之積體裝置之表面之遠端。在一些實施例中，所關注分子欲安置之底部表面距經構形以用期望量之激發能量激發所關注分子之導波管可能具有一定距離。在一些實施例中，樣品孔可相對於導波管定位，使得沿導波管傳播之光學模式之消散場與所關注分子重疊。

樣品孔可在積體裝置之表面具有頂部開口，所關注分子藉助該頂部開口可置於樣品孔中。頂部開口之大小可取決於不同的因素，例如所載入樣品中之所關注分子(例如，測序模板)之大小。在一些實施例中，頂部開口之大小可取決於其中利用包含樣品孔之積體裝置之儀器或裝置。舉例而言，在檢測來自樣品孔內之光之裝置中，背景信號可能由雜散光造成。當將所關注分子安置在樣品孔中並用激發能量激發時，背景信號可造成不期望之發射能量波動，由此使得量測具有雜訊。為限制該等波動，頂部開口之大小可經構形以阻斷至少一部分背景信號。

在一些實施方案中，樣品孔之體積係約 $10^{-21}$ 公升與約 $10^{-15}$ 公升之間。由於樣品孔具有小體積，因此即使所關注分子可以類似於見於天然環境之彼等濃度之濃度濃縮在所檢查樣品中，亦可檢測到單樣品事件(例如，單分子事件)。舉例而言，微莫耳濃度之所關注分子可存在於經放置以與積體裝置接觸之樣品中，但在像素水準上，在任一給定時間可僅僅約一個所關注分子(或單分子事件)位於樣品孔內。

在統計學上，一些樣品孔可能不含所關注分子且一些可含有一個以上所關注分子。然而，可觀數量之樣品孔可含有單一所關注分子(例如，在一些實施例中至少30%)，使得可對大量樣品孔平行實施單分子分析。由於可在每一樣品孔中分析單分子或單樣品事件，因此積體裝置使得可檢測個別事件，否則該等個別事件可能在系綜平均值中不被注意。

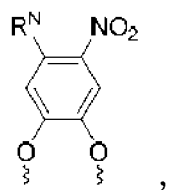
### *樣品孔功能化*

在某些實施例中，本文所闡述之技術係關於將分子載入樣品孔，其中該分子係限於樣品孔之靶標體積(例如，反應體積)中。在一些實施例中，靶標體積係樣品孔內之區域。在某些實施例中，樣品孔包括包含第一

材料及由複數個金屬或金屬氧化物層形成之側壁之底部表面。在一些實施例中，第一材料係透明材料或玻璃。在一些實施例中，底部表面係平坦的。在一些實施例中，底部表面係彎曲孔。在一些實施例中，底部表面包括在由複數個金屬或金屬氧化物層形成之側壁下方之一部分側壁。在一些實施例中，第一材料係熔融矽石或二氧化矽。在一些實施例中，複數個層各自包含金屬(例如，Al、Ti)或金屬氧化物(例如，Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、TiO<sub>2</sub>、TiN)。

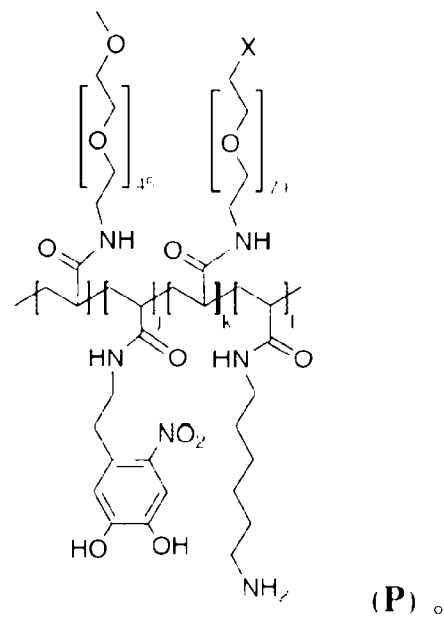
在當一或多種分子或錯合物(例如，測序模板)固定於底部表面上時之實施例中，可能期望功能化底部表面以容許附接一或多種分子或錯合物。在某些實施例中，底部表面包含透明玻璃。在某些實施例中，底部表面包含熔融矽石或二氧化矽。在一些實施例中，底部表面係利用矽烷來功能化。在一些實施例中，底部表面係利用帶離子電荷之聚合物來功能化。在一些實施例中，帶離子電荷之聚合物包含聚(離胺酸)。在一些實施例中，底部表面係利用聚(離胺酸)-接枝-聚(乙二醇)來功能化。在一些實施例中，底部表面係利用生物素化牛血清白蛋白(BSA)來功能化。

在某些實施例中，底部表面係利用包含硝基多巴(nitrodopa)基團之塗層來功能化。在某些實施例中，塗層包含下式之基團：



其中R<sup>N</sup>係視情況經取代之烷基鏈且 ~ 係氫或至表面之附接點。在一些實施例中，R<sup>N</sup>包含聚合物。在一些實施例中，R<sup>N</sup>包含聚(離胺酸)或聚(乙二醇)。在一些實施例中，R<sup>N</sup>包含生物素化聚(乙二醇)。在一些實施例中，塗層包括包含離胺酸單體之聚(離胺酸)之共聚物，其中離胺酸單體獨立地包含PEG、生物素化PEG、硝基多巴基團、磷酸酯基團或矽烷。在某

些實施例中，塗層包含式(P)之聚合物：



在一些實施例中，X係-OMe、生物素基團、磷酸酯或矽烷。在一些實施例中，i、j、k及l中之每一者獨立地係在0與100之間(包括末端)之整數。

在一些實施例中，底部表面係利用包含烷基鏈之矽烷來功能化。在一些實施例中，底部表面係利用包含視情況經取代之烷基鏈之矽烷來功能化。在一些實施例中，底部表面係利用包含聚(乙二醇)鏈之矽烷來功能化。在一些實施例中，底部表面係利用包含偶合基團之矽烷來功能化。例如，偶合基團可包含化學部分，例如胺基團、羧基、羥基、硫氫基、金屬、螯合劑及諸如此類。或者，其可包括特定結合要素，例如生物素、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、凝集素、SNAP-tags™或其受質、縮合或結合性肽或蛋白質、抗體或抗體片段、核酸或核酸類似物或諸如此類。另外或另一選擇為，可使用偶合基團來偶合用於偶合或結合所關注分子之另一基團，該偶合基團在一些情形下包括化學官能基及特定結合要素。舉例而言，偶合基團(例如生物素)可沈積於基板表面

上且在給定區中選擇性地活化。然後可將中間結合劑(例如鏈黴抗生物素蛋白)偶合至第一偶合基團。然後將所關注分子(在此具體實例中其可為生物素化)偶合至鏈黴抗生物素蛋白。

在一些實施例中，底部表面係利用包含生物素之矽烷或其類似物來功能化。在一些實施例中，底部表面係利用包含聚(乙二醇)鏈之矽烷來功能化，其中聚(乙二醇)鏈包含生物素。在某些實施例中，底部表面係利用矽烷之混合物來功能化，其中至少一種類型之矽烷包含生物素且至少一種類型之矽烷不包含生物素。在一些實施例中，混合物所包含之生物素化矽烷較不包含生物素之矽烷少約10倍、約25倍、約50倍、約100倍、約250倍、約500倍或約1000倍。

可藉由將聚合酶錯合物暴露於結合混合物中之功能化表面來將該錯合物固定於底部表面上。在一些實施例中，結合混合物包含一或多種鹽。在一些實施例中，鹽包含乙酸鉀。在一些實施例中，鹽包含氯化鈣。在一些實施例中，鹽係以約1 mM與約10 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，鹽係以約10 mM與約50 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，鹽係以約50 mM與約100 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，鹽係以約100 mM與約250 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，乙酸鉀之濃度係約75 mM。在一些實施例中，氯化鈣之濃度係約10 mM。在一些實施例中，結合混合物包含還原劑。在一些實施例中，還原劑包含二硫蘇糖醇(DTT)。在一些實施例中，還原劑係以約1 mM與約20 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，二硫蘇糖醇之濃度係約5 mM。在一些實施例中，結合混合物包含緩衝液。在一些實施例中，緩衝液包含MOPS。在一些實施例中，緩衝液係以約10 mM與約100 mM之間之濃度存在。在一些實施

例中，MOPS之濃度係約50 mM。在一些實施例中，緩衝液係以約5.5與約6.5之間之pH存在。在一些實施例中，緩衝液係以約6.5與約7.5之間之pH存在。在一些實施例中，緩衝液係以約7.5與約8.5之間之pH存在。在一些實施例中，結合混合物包含去氧核苷酸三磷酸(dNTP)。在一些實施例中，去氧核苷酸三磷酸係以250 nM與10  $\mu$ M之間之濃度存在。在一些實施例中，dNTP之濃度係約2  $\mu$ M。在一些實施例中，結合混合物包含表面活性劑。在一些實施例中，表面活性劑係Tween表面活性劑(例如，Tween 20)。在一些實施例中，表面活性劑係以約0.01%與約0.1%之間之體積百分比存在。在一些實施例中，Tween之體積百分比係約0.03%。

## 實例

### 實例1：甲基纖維素樣品載入

遵循標準溶解方案在去離子水中製備2重量% METHOCEL溶液(甲基纖維素，Sigma M0387，在2%及20 $^{\circ}$ C下約1,500 mPa·s，約63,000 Da)。為在載入測序模板錯合物(聚合酶/引子/模板錯合物)期間使用，將2% METHOCEL溶液與結合緩衝液之10 $\times$ 溶液(500 mM MOPS (pH 7.5)，750 mM乙酸鉀，100 mM DTT，20 mM乙酸鈣，20  $\mu$ M NTP (各自)，0.1% w/w tween 20)以9:1混合。所得到的於緩衝液中之1.8%聚合物溶液含有與存於1 $\times$ 結合緩衝液(50 mM MOPS pH 7.5，75 mM乙酸鉀，10 mM DTT，2 mM乙酸鈣，2  $\mu$ M NTP (各自)，0.01% w/w tween 20)中之測序模板錯合物載入溶液相同的離子組成。

將tween 20之溶液(0.1%)添加至具有深270 nm之樣品孔之測序晶片(例如，積體裝置)中且容許培育10分鐘。在去除tween 20之後，用1 $\times$ 結合緩衝液將測序晶片洗滌一次，之後將30  $\mu$ L結合緩衝液添加至積體裝置

中。將含有測序模板錯合物之溶液添加至積體裝置中至250-1000 pM之最終濃度並混合孔。用1.8%甲基纖維素於結合緩衝液中之溶液覆蓋混合溶液。隨後將測序晶片在室溫下培育30-60分鐘。此培育時段大概容許測序模板錯合物之聚合酶-鏈黴抗生物素蛋白融合物固定於測序晶片上之樣品孔中，樣品孔已經生物素塗佈。

在培育時段後，自測序晶片去除溶液。用結合緩衝液將測序晶片洗滌三次，之後用反應緩衝液(65 mM MOPS pH 7.7，120 mM乙酸鉀，20 mM乙酸鎂，10 mM DTT，8 mM原兒茶酸，6 mM 4-硝基苄醇，1×原兒茶酸3,4-雙加氧酶)洗滌一次。最後，將一定體積之反應緩衝液添加至測序晶片中並用等體積之礦物油覆蓋。使用闡述於懸而待決之美國申請案14/821,656、15/261,697、15/261,724及15/161,125中之方法即時監測測序反應。藉由顯示於圖7A中之強度及時間跡線來繪示代表性測序反應。在此反應中，跨超過1.2 kb之讀長對9.1 kb雙鏈DNA模板進行測序(圖7B)。

為評價甲基纖維素對大模板載入之效應，用相同的9.1 kb模板DNA各自裝載兩個測序晶片，一者使用2%甲基纖維素之覆蓋(如上文所闡述)且一者不用覆蓋。兩個晶片均以660 pM模板裝載1小時。自載有甲基纖維素之晶片檢測道多次納入痕跡，而在無覆蓋情況下在積體裝置上未檢測到測序活性。然後將SYBR Gold螢光DNA結合染料添加至每一測序晶片中。成像結果繪示於圖8中，該圖圖解說明DNA染色之顯著差異。載有甲基纖維素之晶片上約30%之樣品孔之染色鮮亮，從而指示存在DNA模板，而在無甲基纖維素覆蓋情況下在積體裝置上未觀察到染色。

在類似實驗中，用相同的5.4 kb模板DNA各自裝載兩個其他測序晶

片，一者使用2.7%甲基纖維素之覆蓋且一者僅藉由擴散來裝載。兩個晶片均利用2.5 nM DNA模板裝載1.5小時。然後將SYBR Gold添加至每一測序晶片中。成像結果繪示於圖9中，該圖圖解說明DNA染色之顯著差異。約25個樣品孔在甲基纖維素晶片中用單一模板來裝載，相比之下約13個樣品孔僅藉由擴散來裝載。

### 實例2：固體狀態擁擠試劑

圖10繪示用於評估瓊脂糖作為固體狀態擁擠試劑之潛能之實驗設置。如所顯示，螺絲螺母上方之約4 mm部分代表可插入積體裝置之總體樣品孔(例如，陣列，例如在凹陷區域中，或保持載入樣品之總體體積之其他容器)中之主體。繪示三個條件來圖解說明其中瓊脂糖充當擁擠試劑之方法。「無瓊脂糖」螺絲係無任何擁擠試劑之主體。「經乾燥瓊脂糖」螺絲顯示經乾燥瓊脂糖塗佈之主體。如在圖10中可看出，經乾燥瓊脂糖大約填充螺絲之螺紋。「水合瓊脂糖」螺絲代表在插入積體裝置中載有樣品之總體樣品孔中後之經乾燥瓊脂糖主體。主體上瓊脂糖塗層之溶脹指示總體樣品孔中瓊脂糖由水再水合，此效應可使得總體溶液中測序模板之濃度增加。

### 等效形式及範圍

儘管本文中已闡述並說明了若干發明性實施例，但熟習此項技術者將易於構想用於實施功能及/或獲得結果及/或本文所述優點中之一或多者之各種其他構件及/或結構，且該等變化形式及/或修改形式中之每一者皆認為係在本文所述之發明性實施例之範圍內。更一般而言，熟習此項技術者將易於瞭解，本文所述之所有參數、尺寸、材料及構形皆意欲具有實例性且實際參數、尺寸、材料及/或構形將取決於使用發明性教示之一或多

個特定應用。熟習此項技術者僅使用常規實驗即可認識或能夠斷定本文所述之特定發明性實施例之許多等效形式。因此，應理解前述實施例僅以舉例方式呈現且在隨附申請專利範圍及其等效形式之範圍內，可不同於所特定闡述及主張來實踐發明性實施例。本發明之發明性實施例係關於本文所述之每一個別特徵、系統、物件、材料、套組及/或方法。另外，若該等特徵、系統、物件、材料、套組及/或方法不相互矛盾，則兩個或更多個該等特徵、系統、物件、材料、套組及/或方法之任何組合均包括於本發明之發明範圍內。

如本文所定義及使用之所有定義皆應理解為控制在辭典定義、以引用方式併入之文件中之定義及/或所定義術語之普遍含義以內。

本文所揭示之所有參考文獻、專利及專利申請案皆關於其每一者所列舉之標的物以引用方式併入，其在一些情形中可涵蓋整個文件。

除非明確指示相反之情形，否則如本文在說明書中及在申請專利範圍中所用之不定冠詞「一(a及an)」應理解為意指「至少一」。

如本文在說明書及申請專利範圍中所用，片語「及/或」應理解為意指如此結合之要素中之「任一者或兩者」，亦即，在一些情形下以結合方式存在且在其他情形下以分離方式存在之要素。以「及/或」列示之多個要素應視為呈相同方式，亦即，如此結合之要素中之「一或多者」。除由「及/或」從句特別鑑別之要素以外，其他要素可視情況存在，無論與特別鑑別之彼等要素相關抑或不相關。因此，作為非限制性實例，當結合諸如「包含」之開放式語言使用時，對「A及/或B」之提及在一個實施例中可指僅A（視情況包括除B以外之要素）；在另一實施例中，可指僅B（視情況包括除A以外之要素）；在再一實施例中，可指A及B二者（視情況包括其

他要素)；等等。

如本文中在說明書中及在申請專利範圍中所用，「或」應理解為具有與如上文所定義之「及/或」相同之含義。舉例而言，在分離清單中之物項時，「或」或者「及/或」應闡釋為具有包括性，亦即，包括大量或一系列要素中之至少一者(但亦包括一者以上)及視情況包括其他未列示物項。除非術語明確指示相反之情形，否則諸如「……中之僅一者」或「……中之恰好一者」或在用於申請專利範圍中時之「由……組成」將係指包括大量或一系列要素中之恰好一個要素。一般而言，如本文所用術語「或」在前面有排他性術語(諸如「任何一者」、「……中之一者」、「……中之僅一者」或「……中之恰好一者」)時應僅解釋為指示排他性替代(亦即，「一者或另一者而非兩者」)。當在申請專利範圍中使用時，「基本上由……組成」應具有如其用於專利法律領域中之普通含義。

如本文在說明書及申請專利範圍中所用，在提及一或多個要素之清單時之片語「至少一個」應理解為意指選自該要素清單中之該等要素中之任一或多者之至少一個要素，但未必包括該要素清單內所特別列示之每一要素中之至少一者，且不排除該要素清單中之要素之任何組合。此定義亦容許除片語「至少一個」所指之要素清單內特別鑑別之要素以外，可視情況存在要素，無論與特別鑑別之彼等要素相關抑或不相關。因此，作為非限制性實例，在一個實施例中，「A及B中之至少一者」(或等效地，「A或B中之至少一者」，或等效地，「A及/或B中之至少一者」)可指至少一個(視情況包括一個以上) A，而不存在B(且視情況包括除B以外之要素)；在另一實施例中，可指至少一個(視情況包括一個以上) B，而不存在A(且視情況包括除A以外之要素)；在又一實施例中，可指至少一個(視情況

包括一個以上) **A**及至少一個(視情況包括一個以上) **B** (且視情況包括其他要素); 等等。

亦應理解，除非明確指示相反之情形，否則在本文所主張之包括一個以上步驟或動作之任何方法中，該方法之步驟或動作之順序不必受限於列舉該方法之步驟或動作之順序。

在申請專利範圍中以及在上文說明書中，所有過渡片語(例如「包含」、「包括」、「攜載」、「具有」、「含有」、「涉及」、「固持」、「由...構成」及諸如此類)應理解為係開放式的，亦即，意指包括但不限於。僅過渡片語「由……組成」及「基本上由……組成」應分別係封閉式或半封閉式過渡片語，如美國專利局專利審查程序手冊(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03節中所陳述。應瞭解，在替代實施例中，此文件中使用開放式過渡片語(例如，「包含」)闡述之實施例亦被設想為「由開放式過渡片語所闡述之特徵組成」及「基本上由其組成」。舉例而言，若本發明闡述「包含**A**及**B**之組合物」，則本發明亦涵蓋替代實施例「由**A**及**B**組成之組合物」及「基本上由**A**及**B**組成之組合物」。

#### 【符號說明】

|     |         |
|-----|---------|
| 100 | 積體裝置    |
| 108 | 樣品孔     |
| 110 | 積體裝置之表面 |
| 112 | 底部表面    |
| 116 | 導波管     |
| 118 | 頂部包層    |

|                  |         |
|------------------|---------|
| 122              | 金屬層     |
| 124              | 第一子層    |
| 126              | 第二子層    |
| 127              | 界面      |
| 128              | 第三子層    |
| 190              | 側壁      |
| 191              | 所關注分子   |
| 200              | 積體裝置    |
| 208 <sub>1</sub> | 樣品孔     |
| 208 <sub>2</sub> | 樣品孔     |
| 208 <sub>3</sub> | 樣品孔     |
| 208 <sub>4</sub> | 樣品孔     |
| 208 <sub>5</sub> | 樣品孔     |
| 208 <sub>6</sub> | 樣品孔     |
| 210 <sub>1</sub> | 凹陷表面    |
| 210 <sub>2</sub> | 積體裝置之表面 |
| 216              | 導波管     |
| 218              | 頂部包層    |
| 220              | 陣列      |
| 222              | 金屬層     |
| 300 <sub>1</sub> | 積體裝置    |
| 300 <sub>2</sub> | 積體裝置    |
| 320              | 陣列      |

|                  |       |
|------------------|-------|
| 340 <sub>1</sub> | 樣品    |
| 340 <sub>2</sub> | 樣品    |
| 342 <sub>1</sub> | 總體體積  |
| 342 <sub>2</sub> | 總體體積  |
| 350              | 擁擠試劑  |
| 390 <sub>1</sub> | 所關注分子 |
| 390 <sub>2</sub> | 所關注分子 |
| 391 <sub>1</sub> | 所關注分子 |
| 391 <sub>2</sub> | 所關注分子 |
| 400 <sub>1</sub> | 圖     |
| 400 <sub>2</sub> | 圖     |
| 401 <sub>1</sub> | 圖     |
| 401 <sub>2</sub> | 圖     |
| 442              | 總體體積  |
| 442 <sub>1</sub> | 總體體積  |
| 442 <sub>2</sub> | 總體體積  |
| 444              | 間隙體積  |
| 450              | 擁擠試劑  |
| 450 <sub>1</sub> | 試劑    |
| 450 <sub>2</sub> | 試劑    |
| 491              | 所關注分子 |
| 493              | 偶合基團  |
| 500              | 方案    |

|                  |        |
|------------------|--------|
| 501 <sub>1</sub> | 圖      |
| 501 <sub>2</sub> | 圖      |
| 530              | 凝聚劑    |
| 591 <sub>1</sub> | 所關注分子  |
| 591 <sub>2</sub> | 所關注分子  |
| 593              | 偶合基團   |
| 640              | 樣品     |
| 650              | 擁擠試劑   |
| 652              | 要素     |
| 654              | 氧清除密封劑 |
| 660              | 層      |
| 670              | 製備物    |
| 680              | 層      |
| 690              | 所關注分子  |
| 691              | 所關注分子  |
| 692              | 所關注分子  |
| $d_w$            | 深度     |
| $h_c$            | 最大距離   |
| $r_1$            | 半徑     |
| $r_2$            | 半徑     |
| $V_1$            | 初始體積   |
| $V_2$            | 凝聚體積   |
| $W_A$            | 寬度     |



201837184

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

分子載入樣品孔以供分析

### 【英文發明名稱】

LOADING MOLECULES INTO SAMPLE WELLS FOR ANALYSIS

### 【中文】

本發明提供將所關注分子載入樣品孔之方法。在一些態樣中，將所關注分子載入樣品孔之方法涉及在擁擠試劑及/或凝聚劑之存在下將所關注分子載入樣品孔。在一些態樣中，本發明提供將測序模板載入樣品孔之方法。

### 【英文】

Methods of loading a molecule of interest into a sample well are provided. In some aspects, methods of loading a molecule of interest into a sample well involve loading a molecule of interest into a sample well in the presence of a crowding agent and/or a condensing agent. In some aspects, methods of loading a sequencing template into a sample well are provided.

### 【指定代表圖】

圖1

### 【代表圖之符號簡單說明】

- |     |      |
|-----|------|
| 100 | 積體裝置 |
| 108 | 樣品孔  |

|       |         |
|-------|---------|
| 110   | 積體裝置之表面 |
| 112   | 底部表面    |
| 116   | 導波管     |
| 118   | 頂部包層    |
| 122   | 金屬層     |
| 124   | 第一子層    |
| 126   | 第二子層    |
| 127   | 界面      |
| 128   | 第三子層    |
| 190   | 側壁      |
| 191   | 所關注分子   |
| $W_A$ | 寬度      |
| $d_w$ | 深度      |

## 【發明申請專利範圍】

### 【第1項】

一種將所關注分子載入樣品孔之方法，該方法包含：

使包含所關注分子之樣品與基板之表面接觸，其中該基板之該表面包含複數個樣品孔；及

使該樣品與擁擠試劑(crowding agent)接觸，其中相對於該樣品中之其他組分，該擁擠試劑排除該所關注分子。

### 【第2項】

如請求項1之方法，其中該所關注分子包含測序模板。

### 【第3項】

如請求項2之方法，其中該測序模板包含具有至少一種雜交引子/聚合酶錯合物之核酸分子。

### 【第4項】

如前述請求項中任一項之方法，其中該擁擠試劑係多醣。

### 【第5項】

如請求項4之方法，其中該多醣係纖維素化合物。

### 【第6項】

如請求項5之方法，其中該纖維素化合物係甲基纖維素。

### 【第7項】

如請求項5之方法，其中該纖維素化合物係選自由以下組成之群：乙基纖維素、乙基甲基纖維素、羥乙基纖維素、羥丙基纖維素、羥乙基甲基纖維素、羥丙基甲基纖維素、乙基羥乙基纖維素及羧甲基纖維素。

### 【第8項】

如前述請求項中任一項之方法，其中該擁擠試劑係聚醚化合物。

**【第9項】**

如請求項8之方法，其中該聚醚化合物係選自由以下組成之群：聚乙二醇、聚丙二醇、多聚甲醛、聚四亞甲基二醇及聚苯醚。

**【第10項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該擁擠試劑係聚醯胺化合物。

**【第11項】**

如請求項8之方法，其中該聚醯胺化合物係選自由以下組成之群：線性聚乙烯基吡咯啉酮及環狀聚乙烯基吡咯啉酮。

**【第12項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該擁擠試劑係以薄膜形式提供。

**【第13項】**

如請求項12之方法，其中該薄膜係選自交聯凝膠或去水溶液之材料。

**【第14項】**

如請求項1至11中任一項之方法，其中該擁擠試劑係以溶液形式提供。

**【第15項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約0.6重量%。

**【第16項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約0.9重量

%。

**【第17項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約2.0重量%。

**【第18項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約2.3重量%。

**【第19項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約0.1重量%至約1.0重量%之間、約1.0重量%至約2.0重量%之間、約2.0重量%至約3.0重量%之間、約3.0重量%至約4.0重量%之間或約4.0重量%至約5.0重量%之間。

**【第20項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約5.0重量%至約6.0重量%之間、約6.0重量%至約7.0重量%之間、約7.0重量%至約8.0重量%之間、約8.0重量%至約9.0重量%之間或約9.0重量%至約10重量%之間。

**【第21項】**

如請求項14之方法，其中該擁擠試劑在該溶液中之濃度係約10重量%至約11重量%之間、約11重量%至約12重量%之間、約12重量%至約13重量%之間、約13重量%至約14重量%之間或約14重量%至約15重量%之間。

**【第22項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中該樣品係待與該擁擠試劑接觸之前與該表面接觸。

**【第23項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中該樣品係待與該表面接觸之前與該擁擠試劑接觸。

**【第24項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中在大約同時間該樣品接觸至該表面並與該擁擠試劑接觸。

**【第25項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中該樣品係在當接觸至該表面時與該擁擠試劑接觸。

**【第26項】**

如前述請求項中任一項之方法，其進一步包含使該樣品與經構形以降低該所關注分子瀰漫性體積之凝聚劑接觸。

**【第27項】**

如請求項26之方法，其中該凝聚劑包含在該樣品中為多陽離子性之多陽離子。

**【第28項】**

如請求項27之方法，其中該多陽離子係選自精胺(spermine)、亞精胺(spermidine)、聚離胺酸、聚精胺酸、聚組胺酸、聚鳥胺酸、腐胺(putrescine)及魚精蛋白(protamine)。

**【第29項】**

如請求項26至28中任一項之方法，其中該樣品係在與該凝聚劑接觸

之前接觸至該表面。

**【第30項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中該樣品係在接觸至該表面之前與該凝聚劑接觸。

**【第31項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中在大約同時間該樣品接觸至該表面並與該凝聚劑接觸。

**【第32項】**

如請求項1至21中任一項之方法，其中該樣品當接觸至該表面時與該凝聚劑接觸。

**【第33項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該複數個樣品孔之每一樣品孔包含一底部表面，該底部表面是該基板之該表面遠端。

**【第34項】**

如請求項33之方法，其中該底部表面包含至少一種經構形以結合該所關注分子之偶合基團。

**【第35項】**

如請求項34之方法，其中該至少一種偶合基團係選自由以下組成之群：生物素、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、凝集素蛋白或SNAP標籤。

**【第36項】**

如請求項34之方法，其中該至少一種偶合基團係反應性化學基團。

**【第37項】**

如請求項36之方法，其中該反應性化學基團係選自由以下組成之群：胺基團、疊氮基、羧基、羥基、烷基或硫氫基。

**【第38項】**

如請求項1至37中任一項之方法，其中該核酸分子係約1 kb至約5 kb之間、約5 kb至約10 kb之間、約10 kb至約15 kb之間、約15 kb至約20 kb之間或約20 kb至約25 kb之間。

**【第39項】**

如請求項1至37中任一項之方法，其中該核酸分子係約25 kb至約50 kb之間、約50 kb至約100 kb之間、約100 kb至約250 kb之間、約250 kb至約500 kb之間或約500 kb至約1000 kb之間。

**【第40項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該聚合酵素係DNA聚合酶。

**【第41項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該基板係積體裝置(integrated device)。

**【第42項】**

如前述請求項中任一項之方法，其進一步包含使該樣品與密封劑接觸。

**【第43項】**

如請求項42之方法，其中該密封劑包含礦物油。

**【第44項】**

如請求項42之方法，其中該密封劑包含氧清除密封劑，該氧清除密封劑包括可氧化試劑及觸媒。

**【第45項】**

如請求項44之方法，其中該可氧化試劑係包含至少一個烯鍵之有機化合物。

**【第46項】**

如請求項45之方法，其中該有機化合物包含抗壞血酸基。

**【第47項】**

如請求項45之方法，其中該有機化合物係抗壞血酸脂肪酸酯。

**【第48項】**

如請求項45之方法，其中該有機化合物係生育酚化合物。

**【第49項】**

如請求項44之方法，其中該觸媒包含過渡金屬及相對離子。

**【第50項】**

如請求項49之方法，其中該過渡金屬係選自由以下組成之群：鈦、鈦、鈮、鉻、錳、鐵、鈷、鎳、銅、鋅、鏷及鈾。

**【第51項】**

如請求項49之方法，其中該過渡金屬係銅。

**【第52項】**

如請求項49之方法，其中該相對離子係選自由以下組成之群：鹵離子、硫酸根、亞硫酸根、硫化物、硝酸根、亞硝酸根、乙酸根、乙醯丙酮酸根、過氯酸根、氫氧根、甲醇根及乙醇根。

**【第53項】**

如請求項49之方法，其中該相對離子係選自由以下組成之群：月桂酸根、肉豆蔻酸根、棕櫚酸根、硬脂酸根、油酸根及亞油酸根。

**【第54項】**

如前述請求項中任一項之方法，其進一步包含使該樣品經受次世代測序技術(next generation sequencing technique)。

**【第55項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該樣品孔具有約95 nm至約150 nm之間、約150 nm至約350 nm之間、約200 nm至約325 nm之間、約250 nm至約300 nm之間之深度。

**【第56項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該樣品孔具有約270 nm之深度。

**【第57項】**

如前述請求項中任一項之方法，其中該樣品孔具有一頂部孔口，該頂部孔口是在該底部表面之遠端。

**【第58項】**

如請求項57之方法，其中該頂部孔口具有約50 nm至約150 nm之間、約100 nm至約150 nm之間、約100 nm至約200 nm之間、約150 nm至約250 nm之間之直徑。

**【第59項】**

如請求項58之方法，其中該頂部孔口具有約120 nm之直徑。





















