(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0120985
(43) 공개일자 2023년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2563/103 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7045511
(22) 출원일자(국제) 2021년12월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년12월23일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/086349
(87) 국제공개번호 WO 2022/129439
국제공개일자 2022년06월23일
(30) 우선권주장
63/127,043 2020년12월17일 미국(US)

(71) 출원인
일루미나 케임브리지 리미티드
영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크
(72) 발명자
리우, 샤오하이
영국 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 케임브리지 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내
우, 샤오린
영국 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 케임브리지 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

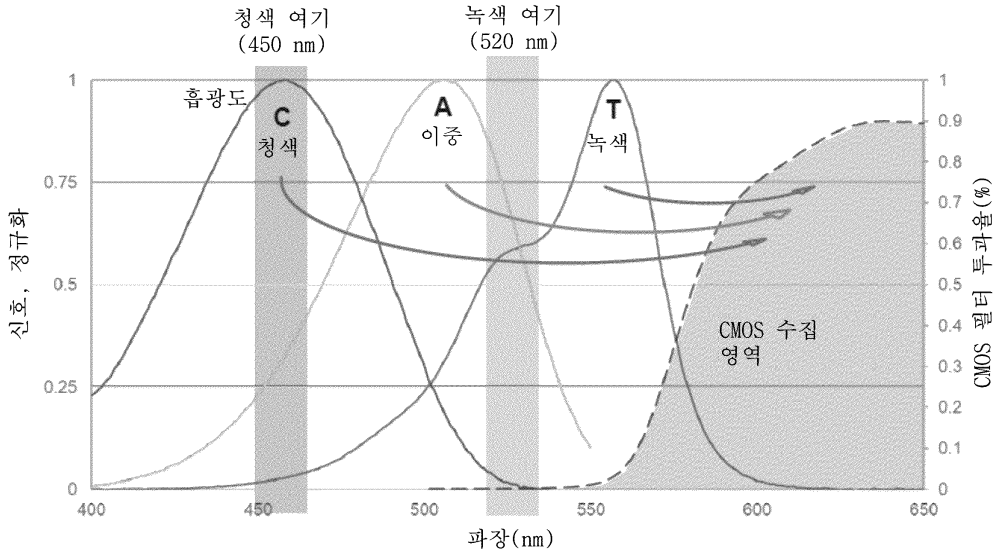
전체 청구항 수 : 총 35 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 서열분석을 위한 방법, 시스템 및 조성물**

(57) 요 약

본 개시는 핵산 서열분석 적용을 위한 방법, 시스템, 키트 및 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 방법은 상이한 여기 파장을 갖는 2개의 이미징 이벤트 및 단일 방출 채널을 사용하여 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체의 형광 신호 패턴을 수집하여, 혼입된 뉴클레오티드 접합체의 식별을 결정한다. 본원에 기재된 방법은 2개의 이미징 이벤트 사이에 혼입 혼합물 내 뉴클레오티드 접합체의 화학적 처리를 필요로 하지 않는다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

맥컬리, 패트릭

영국 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 케임브리지 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내

로마노브, 니콜라이 니콜라예비치

영국 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 케임브리지 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내

크레시나, 엘레나

영국 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 케임브리지 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내

프랑수와, 앙투안느

영국 케임브리지샤이어 씨비21 6디에프 케임브리지 유나이티드 킹덤 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크 일루미나 케임브리지 리미티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 방법으로서,

(a) 프라이머 폴리뉴클레오티드를 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 하나 이상을 포함하는 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제1 표지를 포함하고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제2 표지를 포함하고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제3 표지를 포함하되, 상기 제1 표지, 제2 표지 및 제3 표지 각각은 서로 스펙트럼적으로 구분되고, 상기 프라이머 폴리뉴클레오티드는 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적인 것인, 단계;

(b) 상기 혼합물로부터의 뉴클레오티드 접합체를 상기 프라이머 폴리뉴클레오티드에 혼입하여 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

(c) 제1 여기 광원을 사용하여 제1 이미징 이벤트를 수행하고 상기 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제1 방출 신호를 수집하는 단계;

(d) 제2 여기 광원을 사용하여 제2 이미징 이벤트를 수행하고 상기 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제2 방출 신호를 수집하는 단계로서;

상기 제1 여기 광원 및 상기 제2 여기 광원은 상이한 파장을 갖고; 제1 방출 신호 및 제2 방출 신호는 단일 방출 검출 채널에서 수집되는 것인 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체는 표지되지 않거나, 또는 상기 제1 이미징 이벤트 또는 상기 제2 이미징 이벤트로부터 검출 가능한 신호를 방출하지 않는 형광 모이어티로 표지되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 상기 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태 및 상기 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 상기 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 상기 제2 이미징 이벤트의 신호 상태에 의해 결정되는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 상기 제1 이미징 이벤트 및 상기 제2 이미징 이벤트 모두에서의 신호 상태에 의해 결정되는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 상기 제1 이미징 이벤트 및 상기 제2 이미징 이벤트 모두에서의 어두운 상태에 의해 결정되는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 4가지 유형의 뉴클레오티드 접합체는 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP, 또는 이의 비천연 뉴클레오티드 유사체를 포함하는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 혼합물 내 상기 4가지 유형의 뉴클레오티드 접합체 각각은 3' 하이드록실 차단기를 갖는,

방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, (e) 상기 제2 이미징 이벤트 후 그리고 다음 서열분석 사이클 이전에 상기 혼입된 뉴클레오티드 접합체로부터 상기 3' 하이드록실 차단기 및 상기 표지를 제거하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

다수의 사이클 동안 단계 (a) 내지 단계 (e)를 반복하는 단계; 및

상기 순차적으로 혼입된 뉴클레오티드 접합체에 기초하여 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 단계 (a) 내지 단계 (e)가 적어도 50 사이클 동안 반복되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 여기 광원 및 상기 제2 여기 광원 각각은 레이저, 발광 다이오드(LED), 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 여기 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제1 여기 광원은 약 450 nm 내지 약 460 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 여기 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 제2 여기 광원은 약 510 nm 내지 약 530 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 여기 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제1 여기 광원은 약 510 nm 내지 약 530 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제12항, 제17항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 여기 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제2 여기 광원은 약 450 nm 내지 약 460 nm의 파장을 갖는, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 방출 검출 채널은 560 nm 초과의 검출 스펙트럼 범위를 갖는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 상기 제1 이미징 이벤트와 상기 제2 이미징 이벤트 사이에 상기 혼합물 내 임의의 뉴클레오티드 접합체의 화학적 변형을 포함하지 않는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드는 고체 지지체에 고정되는, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 고체 지지체는 복수의 고정된 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 상기 고체 지지체는 패턴화된 플로우 셀을 포함하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 패턴화된 플로우 셀은 복수의 나노웰을 포함하고, 각각의 나노웰은 고정된 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 27

제23항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고체 지지체는 상보적 금속-산화물 반도체(CMOS) 칩을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 28

서열분석 적용을 위한 키트로서,

제1 표지를 포함하는 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체;

제2 표지를 포함하는 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체; 및

제3 표지를 포함하는 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체를 포함하되;

상기 제1 표지, 상기 제2 표지, 및 상기 제3 표지 각각은 서로 스펙트럼적으로 구별되고, 상기 제1 표지 및 상기 제3 표지는 제1 광원 파장을 사용하여 여기가능하고, 상기 제2 표지 및 상기 제3 표지는 상기 제1 광원 파장과 상이한 제2 광원 파장을 사용하여 여기가능하고;

상기 제1 표지, 상기 제2 표지 및 상기 제3 표지 각각은 단일 검출 채널에서 검출가능한 방출 스펙트럼을 갖는, 키트.

청구항 29

제28항에 있어서, 제4 유형의 뉴클레오티드를 추가로 포함하되, 상기 제4 유형의 뉴클레오티드는 표지되지 않은(어두운), 키트.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 제1 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm의 파장을 갖는, 키트.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 제1 광원은 약 450 nm 내지 약 460 nm의 파장을 갖는, 키트.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm의 파장을 갖는, 키트.

청구항 33

제32항에 있어서, 상기 제2 광원은 약 510 nm 내지 약 530 nm의 파장을 갖는, 키트.

청구항 34

제28항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단일 방출 검출 채널은 약 560 nm 초과의 검출 스펙트럼 범위를 갖는, 키트.

청구항 35

제28항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 중합효소 및 하나 이상의 완충제 조성물을 추가로 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 일반적으로 핵산 서열분석 적용을 위한 방법, 시스템, 키트 및 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 핵산 서열분석 방법은 Maxam 및 Gilbert에 의해 사용된 화학적 분해 방법 및 Sanger에 의해 사용된 가닥 신장 방법(strand elongation method)으로부터 상당히 진화되어 왔다. 현재는 수천 개의 핵산을 모두 단일 서열분석 실행에서 병렬 처리할 수 있게 하는 몇몇 서열분석 방법이 사용되고 있다. 현재의 방법은 전형적으로 다량의 고가의 시약 및 다수의 광학 필터 세트에 의존하여 서열분석 반응으로의 핵산 혼입을 기록하기 때문에, 이러한 방법을 수행하는 기기는 전형적으로 크고 비싸다.

[0003] 높은 처리량, 더 작고, 덜 비싼 DNA 서열분석 기술에 대한 필요성이 게놈 서열분석의 보상을 재개하는 데 유익할 것이라는 것이 명백해졌다. 개인화된 헬스케어가 선두를 향해 나아가고 있으며 이러한 기술로부터 이익을 얻을 것이다. 잠재적인 돌연변이 및 이상을 식별하기 위해 개체의 게놈을 서열분석하는 것은, 그 개체에 맞춰진 후속 요법이 뒤따르는, 사람이 특정 질환을 갖는지를 식별하는데 중요할 것이다. 이러한 노력을 수용하기 위해, 서열분석 기술은 높은 처리량을 가질 뿐만 아니라 확장성을 가질 수 있다. 이와 같이, 개선된 속도, 오류 판독을 가지며 또한 비용 효율적인 새로운 서열분석 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0004] 본 개시는 차세대 서열분석 방법, 시스템 및 조성물을 제공한다. 본 개시의 일부 구현예는,

[0005] (a) 프라이머 폴리뉴클레오티드를 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 하나 이상을 포함하는 혼합물(즉, 혼입 혼합물)과 접촉시키는 단계로서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제1 표지를 포함하고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제2 표지를 포함하고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제3 표지를 포함하되, 제1 표지, 제2 표지 및 제3 표지 각각은 서로 스펙트럼적으로 구별되고, 프라이머 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적인 것인, 단계;

[0006] (b) 혼합물로부터의 뉴클레오티드 접합체를 프라이머 폴리뉴클레오티드에 혼입하여 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0007] (c) 제1 여기 광원을 사용하여 제1 이미징 이벤트를 수행하고 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제1 방출 신호를 수집하는 단계; 및

[0008] (d) 제2 여기 광원을 사용하여 제2 이미징 이벤트를 수행하고 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제2 방출 신호를 수집하는 단계로서;

[0009] 제1 여기 광원 및 상기 제2 여기 광원은 상이한 파장을 갖고; 제1 방출 신호 및 상기 제2 방출 신호는 단일 방출 검출 채널/필터에서 검출되거나 수집되는 것인 단계를 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 방법은 제1 이미징 이벤트 후 그리고 제2 이미징 이벤트 전에 혼합물

내 임의의 뉴클레오티드 접합체의 화학적 변형을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 혼합물은 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체를 추가로 포함하되, 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체는 표지되지 않거나, 제1 또는 제2 이미징 이벤트로부터 신호를 방출하지 않는 형광 모이어티로 표지된다. 일부 추가의 구현예에서, 혼입 혼합물 내 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 하나 이상은 각각 3' 하이드록실 차단기를 함유한다.

[0010] 본원에 기재된 서열분석 방법에서, 각각의 혼입된 뉴클레오티드 접합체의 식별은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트의 검출 패턴에 기초하여 결정된다. 예를 들어, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정된다. 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정된다. 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트 둘 다에서의 신호 상태에 의해 결정된다. 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트 둘 다에서의 어두운 상태에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)에서의 혼합물은 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체(A, C, G, 및 T 또는 U)를 포함한다. 일부 추가 구현예에서, 4가지 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 3개는 각각 서로 스펙트럼적으로 구별되는 형광단으로 표지되고, 뉴클레오티드 중 하나는 형광단으로 표지되지 않는다. 추가 구현예에서, 단계 (a) 내지 (d)는 반복 사이클(예를 들어, 적어도 30, 50, 100, 150, 200, 250 또는 300회)로 수행되고, 방법은 각각의 혼입된 뉴클레오티드 접합체의 식별을 순차적으로 결정하여 단일 가닥 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부의 서열을 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0011] 본 개시의 추가적인 구현예는 서열분석 적용을 위한 키트에 관한 것으로, 키트는:

[0012] 제1 표지를 포함하는 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체;

[0013] 제2 표지를 포함하는 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체;

[0014] 제3 표지를 포함하는 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체를 포함하되;

[0015] 제1 표지, 제2 표지, 및 제3 표지 각각은 서로 스펙트럼적으로 구별되고, 제1 표지 및 제3 표지는 제1 광원 파장을 사용하여 여기가능하고, 제2 표지 및 제3 표지는 상기 제1 광원 파장과 상이한 제2 광원 파장을 사용하여 여기가능하고; 제1 표지, 제2 표지 및 제3 표지 각각은 단일 검출 채널에서 검출가능한 방출 스펙트럼을 갖는다. 일부 구현예에서, 키트는 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체(A, C, G 및 T 또는 U)를 포함한다. 일부 추가 구현예에서, 4가지 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 3개는 각각 서로 스펙트럼적으로 구별되는 형광단으로 표지되고, 뉴클레오티드 중 하나는 형광단으로 표지되지 않는다.

도면의 간단한 설명

[0016] **도 1a**는 표준 일루미나 1-채널 합성에 의한 서열분석(SBS) 화학의 흐름도를 도시한다.

도 1b는 표준 1-채널 SBS로부터의 이미지 1 및 이미지 2가 어떤 염기가 혼입되는지를 식별하기 위해 이미지 분석 소프트웨어에 의해 어떻게 가공되는지를 도시한다.

도 2는 본원에 기재된 서열분석 방법의 일 구현예를 도시한다.

도 3a는 본원에 기재된 서열분석 방법을 위한 검출 시스템의 일 구현예를 도시한다.

도 3b는 본원에 기재된 단일 방출 검출 채널의 일 구현예를 도시한다.

도 4는 본원에 기재된 서열분석 방법의 일 구현예에 따라 iSeq™ 100 시스템 상에서 얻은 산포도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 일루미나 사의 차세대 서열분석 시스템인 iSeq™ 100은 단순화된 접근 가능한 벤치탑 서열분석 해법을 전달하기 위해 상보적 금속-산화물-반도체(CMOS) 기반 기술을 사용한다. 또한 1-채널 서열분석으로도 지칭되는 표준 서열분석 흐름도는 **도 1a 및 도 1b** 에 도시된다. 각각의 서열분석 사이클은 2개의 화학 단계 및 2개의 이미징 단계를 포함한다. **도 1a**에서, 제1 화학 단계는 플로우셀을 형광 표지된 아데닌 및 티민을 갖는 뉴클레오티드의 혼합물에 노출시킨다. 제1 이미징 단계 중, 각각의 클러스터로부터의 광 방출은 CMOS 센서에 의해 기록된다. 제 2 화학 단계는 아데닌으로부터 형광 표지를 제거하고 형광 표지를 시토신에 추가한다. 두 화학 단계 모두에서, 구아닌은 어둡다(미표지). 제2 이미지가 기록된다. **도 1b**에서, 이미지 1 및 이미지 2의 조합은 이미지 분석 소프트웨어에 의해 가공되어 어떤 염기가 각각의 클러스터 위치에 혼입되는지를 식별한다. 이러한 서열분석 사이클은 "n"개의 염기의 판독 길이를 생성하기 위해 "n"회 반복된다. 서열분석기가 각각의 뉴클레오티드에 대

해 상이한 염료를 사용하는 4-채널 SBS 화학과 달리, iSeq™ 100 시스템은 서열분석 사이클 당 하나의 염료만 사용한다. 1-채널 화학에서, 아데닌은 제거 가능한 표지를 갖고 제1 이미지에서만 표지된다. 시토신은 표지에 결합할 수 있고 제2 이미지에서만 표지되는 링커기를 갖는다. 티민은 영구적인 형광 표지를 갖고, 따라서 두 이미지 모두에서 표지되며, 구아닌은 영구적으로 어둡다. 뉴클레오티드는 2개의 이미지에 걸쳐 각각의 염기에 대한 상이한 방출 패턴의 분석에 의해 식별된다.

[0018] 본 개시는 일루미나사의 iSeq™ 100 플랫폼에 기재된 1-채널 서열분석에 대한 대안적이고 개선된 해법을 제공한다. 특히, 본 개시는 2개의 이미징 단계 및 하나의 방출 검출 필터/채널을 사용하여 뉴클레오티드의 혼입의 식별을 결정하는 방법을 제공한다. 더 적은 필터의 사용은 서열분석이 더 작은 공간에서 수행될 수 있게 한다. 또한, 본 개시의 방법은 전술된 제2 화학 단계를 제거한다. 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 시스템은 기기 하드웨어 요구를 감소시키고, 데이터 출력 속도 및 정확도를 증가시키면서 기기의 크기, 시약 사용 및 비용을 감소시킨다. 예를 들어, 본원에 기재된 방법은 일루미나사의 iSeq™ 서열분석 시스템 상에서 사용되어, 빠른 턴어라운드 시간 및 효율적인 서열분석을 제공할 수 있다.

[0019] 정의

[0020] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 용어 "포함하는"뿐만 아니라 "포함하다", "포함한다", 및 "포함된"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 용어 "갖는"뿐만 아니라 "갖다", "갖는다", 및 "가진"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 청구항의 전제부에서든 또는 본문에서든, 용어 "포함한다" 및 "포함하는"은 개방형(open-ended) 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 어구 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"과 동의어로 해석되어야 한다. 예를 들어, 공정과 관련하여 사용되는 경우, 용어 "포함하는"은 공정이 적어도 언급된 단계들을 포함하지만, 추가의 단계들을 포함할 수 있음을 의미한다. 화합물, 조성물 또는 장치와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "포함하는"은 화합물, 조성물 또는 장치가 적어도 언급된 특징부들 또는 구성요소들을 포함하지만, 또한 추가의 특징부들 또는 구성요소들을 포함할 수 있음을 의미한다.

[0021] 본원에 사용된 바와 같이, 일반적인 유기 약어는 하기와 같이 정의된다:

[0022] ℃ 섭씨 온도

[0023] dATP 데옥시아데노신 트리포스페이트

[0024] dCTP 데옥시시티딘 트리포스페이트

[0025] dGTP 데옥시구아노신 트리포스페이트

[0026] dTTP 데옥시티미딘 트리포스페이트

[0027] ddNTP 디데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트

[0028] ffA 완전히 관능화된 A 뉴클레오티드

[0029] ffC 완전히 관능화된 C 뉴클레오티드

[0030] ffG 완전히 관능화된 G 뉴클레오티드

[0031] ffN 완전히 관능화된 뉴클레오티드

[0032] ffT 완전히 관능화된 T 뉴클레오티드

[0033] LED 발광 다이오드

[0034] SBS 합성에 의한 서열분석

[0035] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "어레이"는 상이한 프로브 분자들이 상대적 위치에 따라 서로 구별될 수 있도록 하나 이상의 기판에 부착된 상이한 프로브 분자의 집단을 지칭한다. 어레이는 기판 상의 상이한 주소지정 가능한 위치에 각각 위치한 상이한 프로브 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 어레이는 각각 상이한 프로브 분자를 갖는 별개의 기판을 포함할 수 있으며, 여기서 상이한 프로브 분자들은 기판이 부착된 표면 상의 기판의 위치에 따라 또는 액체 중 기판의 위치에 따라 식별될 수 있다. 별도의 기판이 표면 상에 위치하는 예시적인 어레이는, 제한 없이, 예를 들어, 미국 특허 제6,355,431 B1호, US 제2002/0102578호 및 국제

공개 WO 00/63437호에 기재된 바와 같이 웰에 비즈를 포함하는 것들을 포함한다. 예를 들어, 형광 활성화 세포 분류기(FACS)와 같은 미세유체 장치를 사용하여 액체 어레이에서 비즈를 구별하기 위해 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 형식은, 예를 들어, 미국 특허 제6,524,793호에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 어레이의 추가 예는, 제한 없이, 미국 특허 제5,429,807호; 제5,436,327호; 제5,561,071호; 제5,583,211호; 제5,658,734호; 제5,837,858호; 제5,874,219호; 제5,919,523호; 제6,136,269호; 제6,287,768호; 제6,287,776호; 제6,288,220호; 제6,297,006호; 제6,291,193호; 제6,346,413호; 제6,416,949호; 제6,482,591호; 제6,514,751호 및 제6,610,482호; 및 WO 93/17126호; 국제 특허 공개 WO 95/11995호; 국제 특허 공개 WO 95/35505호; EP 742 287; 및 EP 799 897에 기재된 것들을 포함한다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "공유결합으로 부착된" 또는 "공유 결합된"은 원자들 사이에 전자쌍을 공유하는 것을 특징으로 하는 화학 결합의 형성을 지칭한다. 예를 들어, 공유적으로 부착된 중합체 코팅은, 다른 수단, 예를 들어 접착 또는 정전기 상호작용을 통한 표면에 대한 부착과 비교하여, 기판의 작용화된 표면과 화학 결합을 형성하는 중합체 코팅을 지칭한다. 표면에 공유결합으로 부착된 중합체는 또한 공유 부착 이외의 수단을 통해 결합될 수 있음이 이해될 것이다.

[0037] 본 명세서에 기재된 화합물의 단일 메소머 형태가 나타나 있는 각각의 경우에, 대안적인 메소머 형태가 동일하게 고려된다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "뉴클레오티드"는 질소 함유 헤테로사이클릭 염기, 당, 및 하나 이상의 포스페이트 기를 포함한다. 이들은 핵산 서열의 단량체 단위이다. RNA에서, 당은 리보스이고, DNA에서는 데옥시리보스, 즉 리보스에 존재하는 하이드록실 기가 결여되어 있는 당이다. 질소 함유 헤테로환 염기는 퓨린, 데아자퓨린 또는 피리미딘 염기일 수 있다. 퓨린 염기는 아데닌(A) 및 구아닌(G), 및 이들의 변형된 유도체 또는 유사체, 예컨대 7-데아자 아데닌 또는 7-데아자 구아닌을 포함한다. 피리미딘 염기는 시토신(C), 티민(T), 및 우라실(U), 및 이들의 변형된 유도체 또는 유사체를 포함한다. 데옥시리보스의 C-1 원자는 피리미딘의 N-1 또는 퓨린의 N-9에 결합된다.

[0039] 본원에 사용된 바와 같이, "뉴클레오티드 접합체"는 일반적으로, 선택적으로 본원에 기재된 바와 같은 절단 링커를 통해 형광 모이어티로 표지된 뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 구현예에서, 뉴클레오티드 접합체가 미표지된 뉴클레오티드 접합체로서 기재될 때, 이러한 뉴클레오티드는 형광 모이어티를 포함하지 않는다. 일부 추가 구현예에서, 미표지된 뉴클레오티드 접합체는 또한 절단 가능한 링커를 갖지 않는다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "뉴클레오시드"는 뉴클레오티드와 구조적으로 유사하지만 포스페이트 모이어티가 누락되어 있다. 뉴클레오시드 유사체의 한 예는 표지가 염기에 연결되어 있고 당 분자에 부착된 포스페이트 기가 없는 것일 것이다. 용어 "뉴클레오시드"는 당업자에게 명백한 이의 통상적인 의미로 본 명세서에 사용된다. 예에는 리보스 모이어티를 포함하는 리보뉴클레오시드 및 데옥시리보스 모이어티를 포함하는 데옥시리보뉴클레오시드가 포함되지만 이로 한정되지 않는다. 변형된 펜토스 모이어티는 산소 원자가 탄소로 치환되고/되거나 탄소가 황 또는 산소 원자로 치환된 펜토스 모이어티이다. "뉴클레오시드"는 치환된 염기 및/또는 당 모이어티를 가질 수 있는 단량체이다. 추가적으로, 뉴클레오시드는 더 큰 DNA 및/또는 RNA 중합체 및 올리고머 내로 혼입될 수 있다.

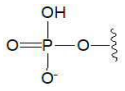
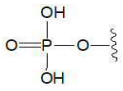
[0041] 용어 "퓨린 염기"는 당업자에게 이해되는 바와 같이 이의 통상적인 의미로 본원에서 사용되며, 이의 호변이성질체를 포함한다. 유사하게, 용어 "피리미딘 염기"는 당업자에게 이해되는 바와 같이 이의 통상적인 의미로 본원에서 사용되며, 이의 호변이성질체를 포함한다. 선택적으로 치환된 퓨린-염기의 비제한적인 목록은 퓨린, 아데닌, 구아닌, 데아자퓨린, 7-데아자 아데닌, 7-데아자 구아닌, 하이포잔틴, 잔틴, 알록산틴, 7-알킬구아닌(예를 들어, 7-메틸구아닌), 테오브로민, 카페인, 요산 및 이소구아닌을 포함한다. 피리미딘 염기의 예에는 시토신, 티민, 우라실, 5,6-디하이드로우라실 및 5-알킬시토신(예를 들어, 5-메틸시토신)이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0042] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드가 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 "포함하는" 것으로 기재될 때, 그것은 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 공유 결합을 형성한다는 것을 의미한다. 유사하게, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 일부로서 기재될 때, 예컨대 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 "내로 혼입된" 것으로 기재될 때, 그것은 본 명세서에 기재된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 공유 결합을 형성한다는 것을 의미한다. 일부 그러한 구현예에서, 공유 결합은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 3' 탄소 원자와

뉴클레오티드의 5' 탄소 원자 사이의 포스포디에스테르 결합으로서, 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 3' 하이드록시 기와 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드의 5' 포스페이트 기 사이에 형성된다.

[0043] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "절단가능한 링커"는 전체 링커가 제거될 것이 요구되는 것을 내포하는 것을 의미하지 않는다. 절단 부위는 링커의 일부가 절단 후 검출가능한 표지 및/또는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 모이어티에 부착된 채로 남아 있는 것을 보장하는 링커 상의 위치에 위치할 수 있다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, "유도체" 또는 "유사체"는 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티를 갖는 합성 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드 유도체를 의미한다. 그러한 유도체 및 유사체는, 예를 들어 문헌[Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley & Son, 1980)] 및 문헌[Uhlman *et al.*, *Chemical Reviews* 90:543'584, 1990]에 논의되어 있다. 뉴클레오티드 유사체는 또한, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬-포스포네이트, 포스포르아닐리데이트 및 포스포르아미데이트 결합을 포함한 변형된 포스포디에스테르 결합을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유도체", "유사체" 및 "변형된"은 상호교환 가능하게 사용될 수 있으며, 본 명세서에 정의된 용어 "뉴클레오티드" 및 "뉴클레오시드"에 의해 포함된다.

[0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "포스페이트"는 당업자에 의해 이해되는 바와 같은 이의 통상적인 의미로 사용되고, 이의 양성자화 형태(예를 들어,  및 )를 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "모노포스페이트", "디포스페이트", 및 "트리포스페이트"는 당업자에 의해 이해되는 바와 같은 이들의 통상적인 의미로 사용되고, 양성자화 형태를 포함한다.

[0046] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 기재된 뉴클레오티드 접합체와 같은 화합물은, 예를 들어 $-CO_2^-$, $-SO_3^-$ 또는 $-O^-$를 함유하는 이온화된 형태로 존재할 수 있다. 화합물이 양으로 또는 음으로 하전된 치환기를 함유하는 경우, 화합물은, 또한, 화합물이 전체적으로 중성이 되게 하는 음으로 또는 양으로 하전된 반대이온을 함유할 수 있다. 다른 양태에서, 화합물은 염 형태로 존재할 수 있으며, 여기서는 반대이온이 짝산 또는 짝염기에 의해 제공된다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "위상화"는 SBS에서의 현상을 지칭하는 것으로, 이 현상은 3' 종결자 및 형광단의 불완전한 제거에 의해 야기되고/되거나, 주어진 서열분석 사이클에서 중합효소에 의한 클러스터 내로의 DNA 가닥의 일부분의 혼입을 완료하지 못한다. 전위상화(prephasing)는 효과적인 3' 종결자를 갖지 않는 뉴클레오티드의 혼입에 의해 야기되는데, 여기서 이러한 혼입 이벤트는 종결 실패로 인해 1 사이클 먼저 앞서 간다. 위상화 및 전위상화는 특정 사이클에 대해 측정된 신호 강도가 현재 사이클로부터의 신호뿐만 아니라 선행 사이클 및 후속 사이클로부터의 잡음으로 이루어지게 한다. 사이클 횟수가 증가함에 따라, 위상화 및 전위상화에 의해 영향을 받는 클러스터 당 서열의 분율이 증가하여, 올바른 염기의 식별을 방해한다. 전위상화는 합성에 의한 서열분석(SBS) 동안 미량의 미보호 또는 미차단 3'-OH 뉴클레오티드의 존재에 의해 야기될 수 있다. 미보호 3'-OH 뉴클레오티드는 제조 공정 동안 또는 가능하게는 저장 및 시약 취급 과정 동안 생성될 수 있다.

[0048] 서열분석 방법들

[0049] 본 개시의 일부 양태는 표적 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 단일 가닥 표적 폴리뉴클레오티드의 서열을 결정하는 방법에 관한 것으로, 이러한 방법은:

[0050] (a) 프라이머 폴리뉴클레오티드를 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 하나 이상을 포함하는 혼합물과 접촉시키는 단계로서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제1 표지를 포함하고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제2 표지를 포함하고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 제3 표지를 포함하되, 여기서 제1 표지, 제2 표지 및 제3 표지 각각은 서로 스펙트럼적으로 구별되고, 프라이머 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적인 것인, 단계;

[0051] (b) 혼합물로부터의 뉴클레오티드 접합체를 프라이머 폴리뉴클레오티드에 혼입하여 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0052] (c) 제1 여기 광원을 사용하여 제1 이미징 이벤트를 수행하고, 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제1 방출 신호를 검출/수집하는 단계;

[0053] (d) 제2 여기 광원을 사용하여 제2 이미징 이벤트를 수행하고, 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제2 방출 신호를 검출/수집하는 단계로서;

[0054] 여기서, 제1 여기 광원 및 상기 제2 여기 광원은 상이한 파장을 갖고; 제1 방출 신호 및 제2 방출 신호는 단일 방출 검출 채널에서 검출되거나 수집되는 것인, 단계를 포함한다.

[0055] 본원에 기재된 서열분석 방법의 일부 구현예에서, 혼입 혼합물은 제4 유형의 뉴클레오티드를 추가로 포함하되, 여기서 제4 유형의 뉴클레오티드는 표지되지 않거나 제1 또는 제2 이미징 이벤트로부터 검출가능한 신호를 방출하지 않는 형광 모이어티로 표지된다. 본 방법의 일부 구현예에서, 제1 방출 신호는 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체의 제1 표지 또는 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체의 제3 표지로부터의 신호를 포함한다. 본 방법의 일부 구현예에서, 제2 방출 신호는 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체의 제2 표지 또는 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체의 제3 표지로부터의 신호를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트 둘 다에서의 신호 상태에 의해 결정된다. 일부 구현예에서, 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트 둘 다에서의 어두운 상태에 의해 결정된다. 일 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정되고; 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정되고; 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트에서 신호 상태에 의해 결정되고; 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 제1 이미징 이벤트 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정된다.

[0056] 이미징 이벤트와 관련하여 사용될 때, 용어 "신호 상태"는, 특정 방출 신호가 이러한 이미징 이벤트에 의해 생성되고, 방출 신호가 본원에 기재된 단일 검출 채널/필터(즉, 1 채널 검출)에서 검출되거나 수집되는 표지된 뉴클레오티드 접합체의 상태를 지칭한다. 예를 들어, 뉴클레오티드 접합체의 형광 모이어티는 특정 파장에서 광원(예를 들어, 레이저) 에 의해 여기될 수 있고, 단일 방출 검출 채널/필터에서 수집되거나 검출되는 형광 신호를 방출하여, 이러한 이미징 이벤트에서 "신호 상태"를 나타낸다.

[0057] 이미징 이벤트와 관련하여 사용될 때, 용어 "어두운 상태"는 이러한 이미징 이벤트에 의해 특정 방출 신호가 생성되지 않거나, 단일 방출 검출 채널/필터에서 방출 신호가 수집되거나 검출되지 않는 표지된 뉴클레오티드 접합체의 상태를 지칭한다. 뉴클레오티드 접합체의 "어두운 상태"는 다양한 상황으로부터 생성될 수 있다. 하나의 시나리오에서, 이러한 뉴클레오티드 접합체는 형광 모이어티가 결여되어 있으며, 그 결과, 이것은 어떠한 형광 신호도 방출하지 않는다. 또 다른 시나리오에서, 뉴클레오티드 접합체는 특정 파장에서 광원에 의해 여기될 수 없는 형광 모이어티로 표지되고, 따라서 임의의 신호를 방출하거나 최소 형광을 방출할 수 없다(예를 들어, 적색 방출 염료는 청색 또는 보라 영역의 파장에서 여기가능하지 않을 수 있음). 제3 시나리오에서, 뉴클레오티드 접합체는 형광 모이어티로 표지되고, 이미징 이벤트의 결과로서 신호를 방출한다. 그러나, 이러한 방출 신호의 파장은 단일 검출 채널 외부에 있으므로 검출될 수 없다(예를 들어, 염료는 청색 신호를 방출하지만, 검출 채널은 녹색 내지 적색 영역에 있음). 어두운 상태 검출은 또한 형광 표지가 없이 존재할 수 있는 임의의 백그라운드 형광을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 반응 성분은 특정 파장에서 여기될 때 최소 형광을 나타낼 수 있다. 이와 같이, 형광 모이어티가 존재하지 않더라도, 이러한 성분으로부터 백그라운드 형광이 존재할 수 있다. 또한, 백그라운드 형광은 예를 들어, 검출기에 의해 검출될 수 있는 인접한 서열분석 반응으로부터의 광 산란 때문일 수 있다. 또한, 백그라운드 형광은 불순한 클러스터에 의해 (예를 들어, 클러스터 증폭, 위상화 또는 전위상화 이벤트 동안 다수의 주형 시딩으로 인해) 야기될 수 있다. 이와 같이, "어두운 상태"는 형광 모이어티가 구체적으로 포함되지 않은 경우, 예를 들어, 형광 표지가 결여된 뉴클레오티드가 본원에 기재된 방법에 사용된 경우 백그라운드 형광을 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 백그라운드 형광은 신호 상태와 구별가능하고, 따라서 미표지된 뉴클레오티드(또는 "어두운"뉴클레오티드)의 뉴클레오티드 혼입이 여전히 식별될 수 있는 것으로 고려된다.

[0058] 본원에 기재된 방법의 일 예시에서, "T" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정되고; "C" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정되고; "A" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태와 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정되고; "G" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정된다. 다른 예에서, "C" 뉴클

레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정되고; "T" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정되고; "A" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 신호 상태와 제2 이미징 이벤트에서의 신호 상태에 의해 결정되고; "G" 뉴클레오티드 접합체는 제1 이미징 이벤트에서의 어두운 상태 및 제2 이미징 이벤트에서의 어두운 상태에 의해 결정된다. 비제한적인 예는 하기 표 A에 예시되어 있다. 각각의 예에서, "T"는 또한 "U"로 대체될 수 있다.

[0059] [표 A]

제 1 및 제 2 이미징 이벤트에 기초한 뉴클레오티드 접합체의 식별

실시예	제 1 이미징 이벤트	제 2 이미징 이벤트	결과
1	신호 상태	어두운 상태	C
	어두운 상태	신호 상태	T
	신호 상태	신호 상태	A
	어두운 상태	어두운 상태	G
2	신호 상태	어두운 상태	T
	어두운 상태	신호 상태	C
	신호 상태	신호 상태	A
	어두운 상태	어두운 상태	G
3	신호 상태	어두운 상태	A
	어두운 상태	신호 상태	C
	신호 상태	신호 상태	T
	어두운 상태	어두운 상태	G
4	신호 상태	어두운 상태	C
	어두운 상태	신호 상태	A
	신호 상태	신호 상태	T
	어두운 상태	어두운 상태	G
5	신호 상태	어두운 상태	A
	어두운 상태	신호 상태	T
	신호 상태	신호 상태	C
	어두운 상태	어두운 상태	G
6	신호 상태	어두운 상태	T
	어두운 상태	신호 상태	A
	신호 상태	신호 상태	C
	어두운 상태	어두운 상태	G
7	신호 상태	어두운 상태	G
	어두운 상태	신호 상태	T
	신호 상태	신호 상태	A
	어두운 상태	어두운 상태	C
8	신호 상태	어두운 상태	T
	어두운 상태	신호 상태	G
	신호 상태	신호 상태	A
	어두운 상태	어두운 상태	C
9	신호 상태	어두운 상태	A
	어두운 상태	신호 상태	T
	신호 상태	신호 상태	G
	어두운 상태	어두운 상태	C
10	신호 상태	어두운 상태	T
	어두운 상태	신호 상태	A
	신호 상태	신호 상태	G
	어두운 상태	어두운 상태	C
11	신호 상태	어두운 상태	G
	어두운 상태	신호 상태	A
	신호 상태	신호 상태	T
	어두운 상태	어두운 상태	C
12	신호 상태	어두운 상태	A
	어두운 상태	신호 상태	G
	신호 상태	신호 상태	T
	어두운 상태	어두운 상태	C

[0060]

[0061] 본원에 기재된 방법의 일부 구현예에서, 단계 (a)에서 혼합물 내 뉴클레오티드 접합체는 A, C, G, T 및 U, 및 이의 비천연 뉴클레오티드 유사체로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 유형을 포함한다. 추가의 구현예에서, 단계 (a)에서 혼합물은 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체(A, C, G, 및 T 또는 U), 또는 이의 비천연 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 추가 구현예에서, 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체는 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP, 또는 이의 비천연 뉴클레오티드 유사체이다. 일부 추가 구현예에서, 4가지 유형의 뉴클레오티드 접합체 중 3가지는 각각 서로 스펙트럼적으로 구별되는 형광단으로 표지되고, 뉴클레오티드 접합체 중 하나는 형광단으로 표지되지 않거나, 형광단으로 표지되지만, 제1 이미징 또는 제2 이미징 이벤트에서 여기하고 신호를 방출할 수 없다. 추가의 구현예에서, 혼입 혼합물 내 4가지 유형의 뉴클레오티드 접합체 각각은 3' 하이드록실 차단기를 함유한다.

[0062] 본원에 기재된 방법의 일부 구현예에서, 방법은 다음 서열분석 사이클 이전에 (예를 들어, 제2 이미징 이벤트 후 그리고 다음 서열분석 사이클의 시작 이전에) 혼입된 뉴클레오티드 접합체로부터 형광 표지를 절단하거나 제거하는 단계 (e)를 추가로 포함한다. 추가 구현예에서, 혼입된 뉴클레오티드 접합체는 3' 하이드록시 차단기를 갖고, 3' 하이드록시 차단기는 또한 다음 서열분석 사이클 전에 제거된다. 일부 이러한 구현예에서, 표지 및

3' 하이드록시 차단기는 단일 단계(예를 들어, 동일한 화학적 반응 조건 하)로 제거된다. 다른 구현예에서, 표지 및 3' 하이드록시 차단기는 2개의 별개의 단계에서 제거된다(예를 들어, 표지 및 3' 차단기는 2개의 별개의 화학 반응 조건 하에서 제거됨). 일부 추가 구현예에서, 절단 후 세척 단계가 표지 후 사용되고, 3' 차단기는 제거된다. 추가 구현예에서, 단계 (a) 내지 (e)는 반복 사이클(예를 들어, 적어도 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 또는 500회)로 수행되고, 방법은 각각의 순차적으로 혼입된 뉴클레오티드 접합체의 식별에 기초하여 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부의 서열을 순차적으로 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, 단계 (a) 내지 (e)는 적어도 50회 사이클로 반복된다. 일부 이러한 구현예에서, 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체는 동시에 존재하고 각각의 사이클 중 혼입을 위해 경쟁한다. 일부 추가의 구현예에서, 뉴클레오티드 접합체의 혼입은 중합효소(예를 들어, DNA 중합효소)에 의해 수행된다. 예시적인 중합효소는, 이에 제한되지는 않으나, Pol 812, Pol 1901, Pol 1558 또는 Pol 963을 포함한다. Pol 812, Pol 1901, Pol 1558 또는 Pol 963 DNA 중합효소의 아미노산 서열은, 예를 들어, 미국 특허 공개 2020/0131484 A1 및 2020/0181587 A1에 기재되어 있으며, 이들 둘 모두는 본원에 참조로 포함된다.

[0063] 본원에 기재된 방법의 일부 구현예에서, 제1 이미징 이벤트에 사용되는 제1 여기 광원 및 제2 이미징 이벤트에 사용되는 제2 여기 광원은 각각 레이저, 발광 다이오드(LED), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 여기 광원은 제2 여기 광원보다 짧은 파장을 갖는다. 일부 이러한 구현예에서, 제1 여기 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm, 약 420 nm 내지 약 470 nm, 또는 약 450 nm 내지 약 460 nm(즉, "청색 광")의 파장을 갖는다. 일 구현예에서, 제1 여기 광원은 약 450 nm의 파장을 갖는다. 제2 여기 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm, 약 500 nm 내지 약 540 nm, 또는 약 510 nm 내지 약 530 nm(즉, "녹색 광")의 파장을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 여기 광원은 약 520 nm의 파장을 갖는다. 다른 구현예에서, 제1 여기 광원은 제2 여기 광원보다 긴 파장을 갖는다. 일부 이러한 구현예에서, 제1 여기 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm, 약 500 nm 내지 약 540 nm, 또는 약 510 nm 내지 약 530 nm(즉, "녹색 광")의 파장을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 여기 광원은 약 520 nm의 파장을 갖는다. 제2 여기 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm, 약 420 nm 내지 약 470 nm, 또는 약 450 nm 내지 약 460 nm(즉, "청색 광")의 파장을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 여기 광원은 약 450 nm의 파장을 갖는다.

[0064] 본원에 기재된 방법의 일부 구현예에서, 단일 방출 검출 채널은 약 560 nm 초과, 약 570 nm 초과, 약 580 nm 초과, 약 590 nm 초과, 또는 약 600 nm 초과의 검출 스펙트럼 범위를 갖는다. 추가 구현예에서, 단일 방출 검출은 약 700 nm 미만, 약 690 nm 미만, 약 680 nm 미만, 약 670 nm 미만, 약 660 nm 미만, 또는 약 650 nm 미만인 검출 스펙트럼 범위를 갖는다. 일부 추가 구현예에서, 단일 방출 검출 채널은 약 560 nm 내지 약 690 nm, 약 570 nm 내지 약 680 nm, 또는 약 580 nm 내지 약 650 nm의 검출 스펙트럼 범위를 갖는다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단일 방출 검출 채널"은 스펙트럼의 특정 영역 또는 검출될 특정 파장 범위 내의 광만을 허용하는 검출 채널 또는 필터를 지칭하는 반면, 이러한 스펙트럼 영역 외부의 임의의 방출은 검출되지 않을 것이다. 특히, 제1 표지, 제2 표지, 및 제3 표지 각각은 제1 표지, 제2 표지 및 제3 표지 중 어느 하나로부터의 방출이 동일한 검출 채널 또는 필터에 의해 검출될 수 있도록 특정 파장 범위에서 중첩하는 방출 스펙트럼을 갖는다. 일부 이러한 구현예에서, 단일 방출 검출 채널에 의해 검출될 수 있는 방출 스펙트럼은 약 560 nm 내지 약 690 nm, 약 570 nm 내지 약 680 nm, 또는 약 580 nm 내지 약 650 nm이다.

[0065] **도 2**는 서열분석 방법에 기재된 이미징 이벤트의 일 구현예를 도시한다. 혼입 혼합물은 다음의 4가지 뉴클레오티드를 함유한다: 약 450 nm 파장을 갖는 청색 광원에 의해 여기가능한 제1 염료(ffC)로 표지된 dCTP; 약 520 nm 파장을 갖는 녹색 광원에 의해 여기가능한 제2 염료(ffT)로 표지된 dTTP; 450 nm 청색 광원 및 540 nm 녹색 광원 둘 모두에 의해 여기가능한 제3 염료(ffA)("이중 염료")로 표지된 dATP; 및 표지되지 않은 dGTP(ffG). ffC, ffT 및 ffA의 방출 스펙트럼은 560 nm 초과(예를 들어, 약 570 nm 내지 약 650 nm)인 CMOS 수집 영역에서 검출된다. 제1 이미징 이벤트가 청색 광원을 사용하고 제2 이미징 이벤트가 녹색 광원을 사용할 때, 혼입된 뉴클레오티드 접합체의 식별은 다음과 같이 결정될 수 있다:

뉴클레오티드의 식별	제 1 이미징 이벤트	제 2 이미징 이벤트
C	신호 상태	어두운 상태
T	어두운 상태	신호 상태
A	신호 상태	신호 상태
G	어두운 상태	어두운 상태

[0066]

[0067] 유사하게, 제1 이미징 이벤트가 녹색 광원을 사용하고 제2 이미징 이벤트가 청색 광원을 사용할 때, 혼입된 뉴

클레오티드 접합체의 식별은 다음과 같이 결정될 수 있다:

뉴클레오티드의 식별	제 1 이미징 이벤트	제 2 이미징 이벤트
T	신호 상태	어두운 상태
C	어두운 상태	신호 상태
A	신호 상태	신호 상태
G	어두운 상태	어두운 상태

[0068]

[0069] 본원에 기재된 2-여기, 단일 채널 검출 서열분석 방법은 형광 염료가 강한 형광 및 화학적 안정성뿐 아니라 맞춤 흡수 및 긴 스토크스 이동을 갖는 것을 필요로 한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 광원(예를 들어, 450 nm 및 520 nm, 또는 520 nm 및 450 nm) 둘 다에서 여기가능한 이중 염료를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 약 480 nm 내지 510 nm, 또는 약 490 nm 내지 500 nm의 최대 흡광도(A_{max})를 갖는다. 더 짧은 파장(제1 광원 또는 제2 광원 중 어느 하나)에서만 여기가능한 염료를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 약 450 내지 460 nm의 A_{max}를 갖는다. 더 긴 파장(제1 광원 또는 제2 광원 중 어느 하나)에서만 여기가능한 염료를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 520 nm 초과의 A_{max}를 갖는다. 추가 구현예에서, 이중 염료를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 최대 방출(E_{max})은 550 nm 초과 또는 560 nm 초과이다. 이러한 표지된 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 60 nm를 초과한다. 일부 추가 구현예에서, 더 짧은 파장(더 짧은 파장 광원에 의해 신호 상태 및 더 긴 파장 광원에 의해 어두운 상태를 나타냄)에서만 여기가능한 염료를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 560 nm를 초과한다. 이러한 표지된 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 100 nm를 초과한다. 일부 추가 구현예에서, 더 긴 파장에서만 여기가능한 염료를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 560 nm 를 초과한다. 이러한 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 약 30 nm 초과 또는 약 40 nm를 초과한다. 본원에 기재된 서열분석 방법에 사용될 수 있는 450 내지 460 nm, 480 내지 510 nm 또는 490 내지 500 nm 사이의 A_{max}를 갖는 쿠마린 염료의 비제한적인 예는 참조로 포함된, 미국 공개 2018/0094140 A1, 2018/0201981 A1, 2020/0277529 A1 및 2020/0277670 A1호 및 미국 특허 제 63/057,758호에 개시된 것들을 포함한다. 본원에 기재된 서열분석 방법에 사용될 수 있는 520 nm 초과의 A_{max}를 갖는 폴리메틴 염료의 비제한적인 예는 국제 특허 공개 WO 2013/041117, WO 2014/135221, WO 2015/170102, WO 2016/189287 및 WO 2017/051201에 개시된 것들을 포함한다.

[0070] 일부 구현예에서, 제1 이미징 이벤트와 제2 이미징 이벤트로부터의 방출 검출의 조합은 고정된 프라이머 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체 위치 각각에 혼입된 염기의 식별을 결정하기 위해 이미지 분석 소프트웨어에 의해 가공된다. 일부 이러한 구현예에서, 이미지 분석은 반복된 혼입 사이클 후(적어도 50, 100, 150, 200, 250 또는 300 실행 후) 가공된다. 추가 구현예에서, 다수의 고정된 프라이머 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체(클러스터)가 검출되고 병렬로 서열분석된다.

[0071] **도 3a**는 단일 채널 검출에 사용되는 시스템의 사시도를 도시한다. 고체 지지체(예를 들어, 플로우 셀)는 표면에 고정된 클러스터링된 표적 폴리뉴클레오티드 주형, 및 주형의 적어도 일부에 혼성화된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 함유하고, 클러스터링된 프라이머 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체를 형성한다. 플로우 채널은 각각 고정된 프라이머 폴리뉴클레오티드/표적 폴리뉴클레오티드 복합체를 함유하는 별개의 나노웰을 포함하며, 여기서 혼입된 뉴클레오티드 접합체는 녹색 광원 및 청색 광원 여기에 각각 노출된다. 혼입된 뉴클레오티드 접합체에 부착된 형광 모이어티에 따라, 청색/녹색 광 중 하나, 청색/녹색 광 둘 다 흡수하거나 (예를 들어, 혼입된 뉴클레오티드 접합체가 형광 모이어티를 함유하지 않을 때) 청색/녹색 광 중 어느 것도 흡수하지 않을 수 있다. 형광 모이어티(예를 들어, 적색 광)의 방출은 단일 검출 채널)에서 검출된다. 흐름도는 단지 이미징 이벤트 및 검출 기전을 예시하기 위해서 단순화된다. 이 흐름도는 본원에 기재된 서열분석 방법의 추가 단계, 예를 들어 제2 이미징 이벤트 후 형광 모이어티의 절단 및 선택적인 절단 후 세척 단계를 포함하지 않는다.

[0072] **도 3b**는 본원에 기재된 서열분석 방법에 사용된 예시적인 서열분석 및 검출 기전(**300**)의 사시도이다. **300**은 본원에 기재된 고체 지지체에 통합될 수 있다. 먼저, 패턴화된 플로우셀(**310**)은 간극 영역에 의해 분리된 복수의 별개의 나노웰(**315**)을 포함한다. 서열분석 반응(예를 들어, 뉴클레오티드 혼입, 혼입된 뉴클레오티드 접합체의 3' 차단의 탈보호, 검출 후 표지의 절단)은 나노웰 각각 내에서 수행된다. 플로우셀은 또한 투명한 보호 표면을 포함하여, 청색광 및 녹색 광 조명이 통과할 수 있게 한다. **320**은 차광 소자(**325**)에 내장되는 복수의 광학

필터로, 특정 파장 범위에 있는 혼입된 뉴클레오티드 접합체로부터 생성된 방출 신호만이 통과하여 CMOS 이미지 센서에 의해 검출될 수 있다.

[0073] 본원에 기재된 방법의 임의의 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 단일 가닥 표적 폴리뉴클레오티드는 고체 지지체에 고정될 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 고체 지지체는 복수의 고정된 표적 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 단일 가닥 표적 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 추가 구현예에서, 각각의 표적 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적이고 따라서 프라이머 뉴클레오티드/표적 뉴클레오티드 복합체를 형성하는 프라이머 폴리뉴클레오티드에 혼성화된다. 고체 지지체는 클러스터링된 프라이머 뉴클레오티드/표적 뉴클레오티드 복합체를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 고체 지지체는 플로우셀, 예를 들어, 서로 각각 분리된 복수의 나노웰을 포함하는 패턴화된 플로우셀을 포함한다. 일부 추가 구현예에서, 각각의 나노웰은 그 안에 하나의 고정된 클러스터를 포함한다. 일부 구현예에서, 고체 지지체는 CMOS 칩을 추가로 포함한다. 예를 들어, 패턴화된 플로우 셀은, 이미징 이벤트로부터 생성된 방출 신호가 광학 필터를 통해 필터링되고 COMS 이미지 센서에 의해 검출되도록, 복수의 광학 필터 및 차광 소자에 의해 분리되는 CMOS 칩의 상부에 제조된다. 또 다른 구현예에서, 복수의 나노웰 각각은 각각의 CMOS 포토다이오드(픽셀)에 걸쳐 직접 정렬된다.

[0074] 본원에 기재된 방법의 임의의 구현예에서, 방법은 제1 이미징 이벤트 후 그리고 제2 이미징 이벤트 전에 혼합물 내 임의의 뉴클레오티드 접합체의 임의의 화학적 변형을 포함하지 않는다. 화학적 변형은 화학 시약, 예컨대 절단 시약, 결합 파트너-형광 모이어티 접합체, 또는 제1 이미징 이벤트에서부터 제2 이미징 이벤트까지 형광의 식별 가능한 및 측정 가능한 변화를 직접적으로 또는 간접적으로 유발할 수 있는 다른 시약을 이용할 수 있다. 예를 들어, 화학적 변형은 하나 이상의 유형의 뉴클레오티드 접합체로부터 표지를 절단하는 것 및/또는 하나 이상의 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체에 표지를 첨가하는 것을 포함할 수 있다. 특히, 본원에 기재된 방법은 하나의 뉴클레오티드 접합체로부터 형광 표지를 제거하고 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체에 형광 표지를 추가하는, iSeq™ 100 시퀀서에서 요구되는 제2 화학 단계를 제거한다. 그 결과, 본원에 기재된 서열분석 방법은 사이클 시간의 실질적인 감소를 제공하고 필요한 시약(예를 들어, THP 시약 및 세척 용액)의 부피를 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 서열분석 방법은 **도 1a**에 기재된 하나의 염료를 사용하는 1 검출 방법인 일루미나사의 iSeq™ 100에서의 표준 사이클 시간에 비해 사이클 시간에서 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25% 또는 30% 감소를 제공한다.

[0075] 추가의 예시적인 구현예가 아래에 설명된다.

[0076] 일부 구현예에서, 핵산을 서열분석하는 방법은 형광 신호의 존재에 의해 검출되지 않지만 대신 형광 신호의 결여 또는 부재에 의해 검출되는 한 가지 유형의 뉴클레오티드 및 3가지 상이한 유형의 뉴클레오티드의 직접 또는 간접적인 검출을 위한 하나의 형광 표지의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산을 서열분석하는 방법은 형광 신호의 존재에 의해 검출되지 않지만 대신 형광 신호의 결여 또는 부재에 의해 검출되는 한 가지 유형의 뉴클레오티드 및 3가지 상이한 유형의 뉴클레오티드의 직접 또는 간접적인 검출을 위해 동일하거나 유사한 여기/방출 스펙트럼을 포함하는 2가지 이상의 상이한 형광 표지의 사용을 포함한다. 동일하거나 유사한 여기 및 방출 스펙트럼은 광원이 2개 이상의 상이한 형광 표지를 여기시키고, 하나의 광학 필터가 그들의 방출된 형광 신호를 포획하도록 하는 것이다. 핵산 샘플의 서열을 결정하기 위한 형광의 검출은 시간 공간에서, 예를 들어, 서열분석 반응 동안 상이한 시간(즉, 효소적 절단과 같은 반응 조건 내 사전 및 사후 변화, 환경적 pH의 변화, 추가 시약의 첨가)에서 수행되어 형광 전이 패턴과 같은 형광의 패턴을 제공하고, 이들의 누적 패턴은 핵산 표적의 서열을 결정한다. 이와 같이, 본원에 기재된 방법은 시간 및 비용 효율적이며, 연관된 서열분석기기의 단순화를 허용한다.

[0077] 표적 핵산 서열을 결정하기 위한 시간 공간 형광 패턴 차이를 이용하는 예시적인 적용은 합성에 의한 서열분석(SBS) 방법론 및 기술이다. 이와 같이, 본원에 기재된 바와 같은 구현예는 합성에 의한 서열 형광 적용에서 특히 유용성을 찾는다. 본원에 기재된 바와 같은 구현예는 예시적인 형광 서열분석의 혁신적인 방법이지만, 개시된 구현예는 또한 샘플 내 하나를 초과하는 분석물(즉, 이의 뉴클레오티드, 단백질 또는 단편)의 검출이 요구되는 다양한 다른 응용에서도 유용성을 발견한다.

[0078] 일부 구현예에서, 서열분석은 기판, 예컨대 유리, 플라스틱, 반도체 칩 또는 복합체 유래 기판에서 수행된다. 일부 구현예에서, 하나의 핵산 종은 예를 들어 단일 표적 서열분석을 위해 기판 상에 제공된다. 다른 구현예에서, 서열분석은 또한 다중 형식으로 존재할 수 있으며, 여기서 다수의 핵산 표적은, 예를 들어 플로우셀 또는 어레이 유형의 포맷에서 병렬로 검출되고 서열분석된다. 본원에 기재된 구현예는 병렬 서열분석 또는 대규모 병렬 서열분석을 실시할 때 특히 유리하다. 형광 병렬 서열분석을 실시하는 플랫폼은, 이에 제한되지는

않으나, 일루미나사(예를 들어, HiSeq®, Genome Analyzer, MiSeq™, MiniSeq™, NextSeq™, iSeq™, 및 NovaSeq™ 플랫폼), 라이프 테크놀로지즈(예를 들어, SOLiD), 헬리코스 바이오사이언스(예를 들어, Heliscope) 및 454/로쉐 라이프사이언스(Branford, Conn.) 및 퍼시픽 바이오사이언스(예를 들어, SMART)로부터 제공되는 것들을 포함한다. 플로우셀, 칩, 및 다수의 핵산 종을 수용할 수 있는 다른 유형의 표면은 병렬 서열분석에 이용되는 기판의 예시이다. 다수의 핵산 종이 병렬로 서열분석되는 멀티플렉스 형식에서, (예를 들어, 에멀젼 PCR(emPCR) 또는 브릿지 증폭을 통해) 클론 증폭된 표적 서열은 전형적으로 기판 상에 공유결합으로 고정된다. 예를 들어, 에멀젼 PCR을 실시할 때, 관심 표적은 비드 상에 고정되는 반면, 클론 증폭된 표적은 플로우셀의 채널 또는 어레이 또는 칩 상의 특정 위치에 고정된다.

[0079] 본원에 기재된 바와 같은 조성물 및 방법과 함께 사용하기 위한 플로우셀은 다수의 방식으로 서열분석에 사용될 수 있다. 예를 들어, DNA 라이브러리와 같은 DNA 샘플은 하나 이상의 에칭된 유동 채널을 포함하는 플로우셀 또는 유체 장치에 적용될 수 있으며, 여기서 플로우셀은 그 표면에 공유결합으로 부착된 프로브 분자 집단을 더 포함할 수 있다. 플로우셀 채널에 부착된 프로브는 유리하게는 채널 내의 상이한 주소지정 가능한 위치에 위치하고, DNA 라이브러리 분자가 플로우셀 채널에 첨가될 수 있으며, 여기서 상보적 서열이 (본원에 기재된 바와 같이, 추가로 그 전체 내용이 본원에 참조로서 포함된, WO 2012/096703에 기재된 바와 같이) 결합할 수 있다. 본 출원에서 사용하기 위한 플로우셀의 또 다른 예는 미국 특허 제8,906,320호 및 제9,990,381호에 기재된 바와 같은 CMOS 플로우셀을 포함하며, 이는 그 전체 내용이 본원에 참조로서 포함된다. 가교 증폭은 본원에 기재된 바와 같이 수행되고, 이어서 본원에 기재된 바와 같은 합성 방법 및 조성물에 의해 서열분석될 수 있다. 서열분석을 위한 플로우셀을 생성하고 이용하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며; 이에 대한 참조가 본원에 제공되고 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다. 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 조성물은 플로우셀 지향 서열분석 방법론의 임의의 특정 제조 또는 방법으로 제한되지 않는다는 것이 고려된다.

[0080] 본원에 기재된 방법 및 조성물을 이용하는 서열분석은 또한 미량적정 플레이트, 예를 들어 고밀도 반응 플레이트 또는 슬라이드에서 수행될 수 있다(그 전체가 참조로서 본원에 포함된 Margulies 등의 문헌[2005, Nature 437(7057): 376-380] 참조). 예를 들어, 게놈 표적은 emPCR 기술에 의해 제조될 수 있다. 반응 플레이트 또는 슬라이드는 반응, 예를 들어 형광 또는 발광 반응으로부터 생성되는 광을 포획 및 기록할 수 있는 광섬유 재료로부터 생성될 수 있다. 코어 재료는 적어도 하나의 emPCR 반응 비드를 보유할 수 있는 별개의 반응 웰을 제공하도록 에칭될 수 있다. 이러한 슬라이드/플레이트는 160만 개가 넘는 웰을 포함할 수 있다. 생성된 슬라이드/플레이트에는 표적 서열분석 반응 emPCR 비드가 로딩될 수 있고 서열분석 시약이 제공되고 서열분석이 발생하는 기기에 장착될 수 있다.

[0081] 본원에 개시된 바와 같은 조성물 및 방법을 이용하여 표적을 서열분석하기 위한 예시적인 어레이된 기판은 컴플리트 제노믹스(Mountain View, Calif.)에 의해 수행된 바와 같이 칩 또는 슬라이드 상에 DNA 나노볼을 포함하는 패턴화된 기판을 실행할 때 제공된다. Drmanac 등의 문헌[2010, Science 327(5961): 78-81]에 기재된 바와 같이, 실리콘 웨이퍼는 이산화규소 및 티타늄과 적층될 수 있고, 이어서 포토리소그래피 및 건식 에칭 기술을 사용하여 패턴화될 수 있다. 웨이퍼는 HMDS로 처리되고, 포토레지스트 층으로 코팅되어, 실란화를 위한 별개의 영역을 정의하고, 이어서 서열분석을 위한 DNA 나노볼을 공유결합으로 부착시킬 수 있다. 당업자는 서열분석 방법론에 사용하기 위한 핵산의 고정을 위한 별개의 위치를 갖는 슬라이드/칩을 생성하기 위한 많은 방법이 존재하며, 본 방법은 기판이 서열분석을 위해 제조되는 방법에 의해 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다.

[0082] 본원에 기재된 바와 같은 구현예를 제한하고자 하는 것이 아니라 예시를 위해, 일반적인 전략 서열분석 사이클은 일련의 단계에 의해 설명될 수 있다. 하기 실시예는 합성에 의한 서열분석의 서열분석 반응을 기반으로 하지만, 본원에 기재된 바와 같은 방법은 임의의 특정 서열분석 반응 방법론에 제한되지 않는다.

[0083] 대안적으로, 본원에 기재된 서열분석 방법은 또한 전술된 동일한 2개의 이미징 이벤트 및 단일 채널 방출 검출을 사용하면서 미표지된 뉴클레오티드를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 단계 (a) 의 혼입 혼합물에서 4가지의 상이한 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP) 중 1개, 2개, 3개 또는 각각은 표지되지 않을 수 있다. 4가지 유형의 뉴클레오티드(예를 들어, dNTP) 각각은 3' 하이드록실 차단기를 가지며, 이는 단일 염기만이 중합효소에 의해 프라이머 폴리뉴클레오티드의 3' 말단에 첨가될 수 있음을 보장한다. 단계 (b)에서 미표지된 뉴클레오티드의 혼입 후, 나머지 비혼입된 뉴클레오티드가 세척된다. 이어서, 혼입된 dNTP를 특이적으로 인식하고 결합하여 혼입된 dNTP를 포함하는 표지된 연장 생성물을 제공하는 친화성 시약이 도입된다. 합성에 의한 서열분석에서 미표지된 뉴클레오티드 및 친화성 시약의 용도는 WO 2018/129214 및 WO 2020/097607에 개시되어 있다. 미표지 뉴클레오티드를 사용한 본 개시의 변형된 서열분석 방법은 하기 단계

를 포함할 수 있다:

[0084] (a') 4가지 상이한 유형의 표지되지 않은 뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함하는 혼합물과 프라이머 폴리뉴클레오티드를 접촉시키는 단계로서, 프라이머 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부에 상보적인 것인, 단계;

[0085] (b') 혼합물로부터의 하나의 미표지 뉴클레오티드를 프라이머 폴리뉴클레오티드에 혼입하여 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

[0086] (c') 하나의 친화성 시약이 혼입된 미표지된 뉴클레오티드에 특이적으로 결합하여 표지된 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 제공하는 조건 하에서 상이한 친화성 시약들의 세트와 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드를 접촉시키는 단계;

[0087] (d') 제1 여기 광원을 사용하여 제1 이미징 이벤트를 수행하고, 표지된 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제1 방출 신호를 검출하는 단계;

[0088] (e') 제2 여기 광원을 사용하여 제2 이미징 이벤트를 수행하고, 표지된 연장된 프라이머 폴리뉴클레오티드로부터 제2 방출 신호를 검출하는 단계로서;

[0089] 제1 여기 광원 및 제2 여기 광원은 상이한 파장을 갖고; 제1 방출 신호 및 상기 제2 방출 신호는 단일 방출 필터 또는 채널에서 검출되거나 수집되는 것인, 단계. 본원에 기재된 변형된 서열분석 방법의 일부 구현예에서, 혼입 혼합물 내 각각의 미표지 뉴클레오티드는 3' 하이드록실 차단기를 함유한다. 추가의 구현예에서, 혼입된 뉴클레오티드의 3' 하이드록실 차단기는 다음 서열분석 사이클 전에 제거된다. 추가의 구현예에서, 방법은 혼입된 뉴클레오티드로부터 친화성 시약을 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 추가의 구현예에서, 3' 하이드록실 차단기 및 친화성 시약은 동일한 반응에서 제거된다. 일부 구현예에서, 친화성 시약의 세트는 제1 유형의 뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 제1 친화성 시약, 제2 유형의 뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 제2 친화성 시약, 및 제3 유형의 뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 제3 친화성 시약을 포함할 수 있다. 일부 추가의 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 친화성 시약 각각은 검출가능한 표지화를 포함한다. 일부 구현예에서, 친화성 시약은 단백질 태그, 항체(이에 제한되지는 않으나, 항체의 결합 단편, 단일 사슬 항체, 이중특이적 항체 등을 포함함), 압타머, 노틴, 애피머, 또는 적절한 특이성 및 친화도로 혼입된 뉴클레오티드에 결합하는 임의의 다른 공지된 제제를 포함한다. 일 구현예에서, 친화성 시약은 단백질 태그 또는 항체이다. 또 다른 구현예에서, 친화성 시약은 단백질 태그 또는 형광 표지인 하나 이상의 검출 가능한 표지를 포함하는 항체이다.

[0090] 서열분석 반응을 위해 설계된 통상적으로 변형된 뉴클레오티드인 3' 하이드록실 차단기를 갖는 4가지 뉴클레오티드 유형인 A, C, T 및 G(여기서, 4가지 유형 중 3가지는 형광 표지됨)는 다른 반응 성분과 함께 관심 주형 서열(관심 표적 폴리뉴클레오티드 서열로도 상호교환적으로 사용됨)이 위치하고, 서열분석 반응이 일어나는 위치(예를 들어, 플로우셀, 칩, 슬라이드 등)에 동시에 첨가된다. 표적 서열에 기초하여 성장하는 핵산 서열 사슬에 뉴클레오티드를 혼입한 후, 반응이 빛에 노출되고 임의의 방출 신호가 포획 및 기록된다; 이는 제1 이미징 이벤트 및 제1 형광 검출 패턴을 구성한다. 제1 이미징 이벤트 후, 샘플은 제1 광원과 상이한 파장을 갖는 제2 광으로 조사되고, 반응 위치가 다시 한번 조명되고, 형광의 임의의 변화는 포획 및 기록된다; 제2 이미징 이벤트(즉, 제2 형광 검출 패턴)가 구성된다. 다음 서열분석 사이클을 위한 준비로 제2 이미징 이벤트 후 혼입된 뉴클레오티드 상 3' 차단기를 제거하고, 존재하는 다른 시약과 함께 세척한다. 일부 구현예에서, 본 개시의 방법은 제1 이미징 이벤트에서부터 제2 이미징 이벤트까지 식별 가능하고 측정 가능한 형광의 변화를 직접 유발할 수 있는 임의의 화학 시약의 사용을 포함하지 않는다. 두 개의 이미징 이벤트로부터의 형광 패턴이 비교되고, 뉴클레오티드 혼입, 및 따라서, 그 특정 사이클에 대한 표적 핵산의 서열이 결정된다.

[0091] 일 구현예에서, 적어도 하나의 뉴클레오티드는 중합효소 효소의 작용에 의해 합성 단계에서 폴리뉴클레오티드(예컨대, 본원에 기재된 단일 가닥 프라이머 폴리뉴클레오티드)에 혼입된다. 그러나, 예를 들어 화학적 올리고뉴클레오티드 합성 또는 표지된 올리고뉴클레오티드의 미표지 올리고뉴클레오티드에 대한 라이게이션과 같은 뉴클레오티드를 폴리뉴클레오티드에 연결하는 다른 방법이 사용될 수 있다. 따라서, 뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때, 용어 "혼입시키는"은 화학적 방법뿐만 아니라 효소적 방법에 의한 폴리뉴클레오티드 합성을 포함할 수 있다.

[0092] 특정 구현예에서, 합성 단계가 수행되며, 선택적으로 주형 또는 표적 폴리뉴클레오티드 가닥을 본 개시의 형광 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 반응 혼합물과 함께 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다. 중합효소는 또한, 주형 또는 표적 폴리뉴클레오티드 가닥에 어닐링된 폴리뉴클레오티드 가닥 상의 유리 3' OH기와 표지된

뉴클레오티드 상의 5' 포스페이트기 사이의 포스포디에스테르 결합의 형성을 가능하게 하는 조건 하에서 제공될 수 있다. 따라서, 합성 단계는 주형/표적 가닥에 대한 뉴클레오티드의 상보적 염기쌍 형성에 의해 유도된 바와 같은 폴리뉴클레오티드 가닥의 형성을 포함할 수 있다.

[0093] 이러한 방법의 모든 구현예에서, 검출 단계는 표지된 뉴클레오티드가 혼입된 폴리뉴클레오티드 가닥이 표적 가닥에 어닐링되는 동안에, 또는 2개의 가닥이 분리되는 변성 단계 후에 수행될 수 있다. 추가의 단계, 예를 들어 화학적 또는 효소적 반응 단계 또는 정제 단계가 합성 단계와 검출 단계 사이에 포함될 수 있다. 특히, 표지된 뉴클레오티드(들)를 혼입시킨 폴리뉴클레오티드 가닥은 단리되거나 정제되고, 이어서 추가로 가공되거나 후속 분석에 사용될 수 있다. 예시로서, 합성 단계에서의 본원에 기재된 바와 같은 표지된 뉴클레오티드(들)가 혼입된 폴리뉴클레오티드 가닥은 이어서 표지된 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 합성 단계의 산물은 추가의 반응 단계를 거칠 수 있으며, 필요하다면, 이들 후속 단계의 산물은 정제되거나 단리될 수 있다.

[0094] 합성 단계에 적합한 조건은 표준 분자 생물학 기법에 익숙한 자들에게 잘 알려져 있을 것이다. 일 구현예에서, 합성 단계는 적합한 중합효소 효소의 존재 하에서 본원에 기재된 바와 같은 표지된 뉴클레오티드를 포함한 뉴클레오티드 전구체를 사용하여 표적 가닥에 상보적인 신장된 폴리뉴클레오티드 가닥(프라이머 폴리뉴클레오티드 가닥)을 형성하는 표준 프라이머 신장 반응과 유사할 수 있다. 다른 구현예에서, 합성 단계는 그 자체로서, 프라이머 표적 폴리뉴클레오티드 가닥의 카피로부터 유래되는 어닐링된 상보적 가닥으로 구성된 표지된 이중 가닥 증폭 산물을 생성하는 증폭 반응의 일부를 형성할 수 있다. 다른 예시적인 합성 단계는 닉 번역, 가닥 변위 중합, 랜덤 프라이밍된 DNA 표지 등을 포함한다. 합성 단계에 특히 유용한 중합효소 효소는 본원에 기재된 바와 같은 표지된 뉴클레오티드의 혼입을 촉매할 수 있는 것이다. 다양한 천연 발생 또는 돌연변이/변형된 중합효소가 사용될 수 있다. 예로서, 열안정성 중합효소가 열사이클링 조건을 사용하여 수행되는 합성 반응에는 사용될 수 있는 반면, 열안정성 중합효소는 등온 프라이머 신장 반응에 있어서는 요구되지 않을 수 있다. 본 개시에 따른 표지된 뉴클레오티드를 혼입시킬 수 있는 적합한 열안정성 중합효소는 각각이 참조로서 본원에 포함된 WO 2005/024010 또는 WO06120433에 기재된 것들을 포함한다. 37℃와 같은 낮은 온도에서 수행되는 합성 반응에서, 중합효소 효소는 반드시 열안정성 중합효소일 필요는 없으며, 이에 따라 중합효소의 선택은 반응 온도, pH, 가닥-치환 활성 등과 같은 다수의 인자에 좌우될 것이다.

[0095] 구체적인 비제한적인 구현예에서, 본 개시는 핵산 서열분석 방법, 재서열분석 방법, 전체 게놈 서열분석 방법, 단일 뉴클레오티드 다형성 점수화 방법, 폴리뉴클레오티드 내로 혼입될 때 본원에 기재된 염료로 표지된 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 검출을 수반하는 임의의 다른 응용을 포함한다.

[0096] 특정 구현예에서, 본 개시는 합성에 의한 폴리뉴클레오티드 서열분석 반응에 있어서의 본 개시에 따른 염료 모이어티를 포함하는 표지된 뉴클레오티드의 용도를 제공한다. 합성에 의한 서열분석은 일반적으로, 서열분석하고자 하는 주형/표적 핵산에 상보적인 신장된 폴리뉴클레오티드 사슬을 형성하기 위하여 중합효소 또는 리가제를 사용하여 5'에서 3' 방향으로 성장하는 폴리뉴클레오티드 사슬에 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드를 순차적으로 첨가하는 것을 수반한다. 첨가된 뉴클레오티드(들) 중 하나 이상에 존재하는 염기의 식별은 검출 또는 "이미징" 단계에서 결정될 수 있다. 첨가된 염기의 식별은 각각의 뉴클레오티드 혼입 단계 후에 결정될 수 있다. 이어서, 주형의 서열은 통상적인 왓슨-크릭 염기쌍 형성 규칙을 사용하여 추론될 수 있다. 단일 염기의 식별의 결정을 위해 본원에 기재된 염료로 표지된 뉴클레오티드의 사용은, 예를 들어 단일 뉴클레오티드 다형성의 점수화에 유용할 수 있으며, 그러한 단일 염기 신장 반응은 본 발명의 범주 내에 있다.

[0097] 본 개시의 일 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드의 서열은 혼입된 뉴클레오티드(들)에 부착된 형광 표지(들)의 검출을 통해 서열분석하고자 하는 표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 신생(nascent) 가닥 내로의 하나 이상의 뉴클레오티드의 혼입을 검출함으로써 결정된다. 표적 폴리뉴클레오티드의 서열분석은 적합한 프라이머를 사용하여 프라이밍될 수 있고(또는 헤어핀의 일부로서 프라이머를 함유할 헤어핀 구조체로서 제조될 수 있고), 신생 사슬은 중합효소-촉매 반응에서 프라이머의 3' 말단에 대한 뉴클레오티드의 첨가에 의해 단계적으로 신장된다.

[0098] 특정 구현예에서, 상이한 뉴클레오티드 트리포스페이트(A, T, G 및 C) 각각은 고유의 형광단으로 표지될 수 있으며, 또한 제어되지 않은 중합을 방지하기 위해 3' 위치에 차단기를 포함한다. 대안적으로, 4개의 뉴클레오티드 중 하나는 비표지될 수 있다(암색). 중합효소 효소는 주형/표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 신생 사슬 내로 뉴클레오티드를 혼입시키며, 차단은 뉴클레오티드의 추가 혼입을 방지한다. 임의의 미혼입 뉴클레오티드는 세척될 수 있고, 각각의 혼입된 뉴클레오티드로부터의 형광 신호 패턴은 적합한 방출 필터 및 여기를 사용하는 전하 결합 장치와 같은 적합한 수단에 의해 광학적으로 "판독" 될 수 있다. 이어서, 3' 차단기 및 형광 염료

화합물을 (동시에 또는 순차적으로) 제거하여(절단하여) 추가의 뉴클레오티드 혼입을 위해 신생 사슬을 노출시킬 수 있다. 전형적으로, 혼입된 뉴클레오티드의 식별은 각각의 혼입 단계 후에 결정될 것이지만, 이는 엄격히 필수적인 것은 아니다. 유사하게, 미국 특허 제5,302,509호(본원에 참조로 포함됨)는 고체 지지체 상에 고정된 폴리뉴클레오티드를 서열분석하는 방법을 개시한다.

[0099] 위에 예시된 바와 같이, 이 방법은 DNA 중합효소의 존재 하에, 고정된 폴리뉴클레오티드에 상보적인 성장하는 가닥 내로의 형광 표지된 3' 차단된 뉴클레오티드 A, G, C, 및 T의 혼입을 이용한다. 중합효소는 표적 폴리뉴클레오티드에 상보적인 염기를 혼입시키지만, 3' 하이드록실 차단기에 의해 추가적인 첨가를 방지한다. 이어서, 혼입된 뉴클레오티드의 표지를 결정할 수 있으며, 차단기를 화학적 절단에 의해 제거하여 추가의 중합이 일어날 수 있다. 합성에 의한 서열분석 반응에서 서열분석하고자 하는 핵산 주형은 서열분석이 요구되는 임의의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 서열분석 반응을 위한 핵산 주형은 전형적으로 서열분석 반응에서 추가의 뉴클레오티드의 첨가를 위한 프라이머 또는 개시점으로서의 역할을 하는 유리 3' OH기를 갖는 이중 가닥 영역을 포함할 것이다. 서열분석하고자 하는 주형의 영역은 상보적 가닥 상의 이러한 유리 3' OH기를 오버행(overhang)할 것이다. 서열분석하고자 하는 주형의 오버행 영역은 단일 가닥일 수 있지만, 서열분석하고자 하는 표적 가닥에 상보적인 가닥 상에 "닉이 존재하여" 서열분석 반응의 개시를 위한 유리 3' OH기를 제공한다면 이중-가닥일 수 있다. 그러한 구현예에서, 서열분석은 가닥 치환에 의해 진행될 수 있다. 소정 구현예에서, 유리 3' OH기를 갖는 프라이머가 서열분석하고자 하는 주형의 단일 가닥 영역에 혼성화되는 별개의 성분(예를 들어, 짧은 올리고뉴클레오티드)으로서 첨가될 수 있다. 대안적으로, 프라이머 및 서열분석하고자 하는 주형 가닥은 각각, 예를 들어 헤어핀 루프 구조와 같은 분자내 이중체를 형성할 수 있는 부분적으로 자가-상보적인 핵산 가닥의 일부를 형성할 수 있다. 헤어핀 폴리뉴클레오티드 및 이들이 고체 지지체에 부착될 수 있는 방법이 국제 특허 출원 공개 WO 01/57248 및 WO 2005/047301에 개시되어 있고, 각각은 참조로서 본원에 포함된다. 뉴클레오티드를 성장하는 프라이머에 연속적으로 첨가할 수 있으며, 그 결과 5'에서 3' 방향으로 폴리뉴클레오티드 사슬이 합성될 수 있다. 첨가된 염기의 성질은 각각의 뉴클레오티드 첨가 후에 - 특히 그러나 반드시 그러한 것은 아님 - 결정되며, 이로써 핵산 주형에 대한 서열 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 뉴클레오티드는 뉴클레오티드의 5' 포스페이트 기와의 포스포디에스테르 결합의 형성을 통해 핵산 가닥의 유리 3' OH기에 뉴클레오티드를 연결함으로써 핵산 가닥(또는 폴리뉴클레오티드) 내로 혼입된다.

[0100] 서열분석하고자 하는 핵산 주형은 DNA 또는 RNA, 또는 심지어 데옥시뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드로 구성된 하이브리드 분자일 수 있다. 핵산 주형은, 서열분석 반응에서 주형의 카피를 방해하지 않는 한, 천연 발생 및/또는 천연 비발생 뉴클레오티드 및 천연 또는 비천연 골격 결합을 포함할 수 있다.

[0101] 소정의 구현예에서, 서열분석하고자 하는 표적 폴리뉴클레오티드는 당업계에 알려진 임의의 적합한 결합 방법을 통해, 예를 들어 공유결합 부착을 통해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 소정의 구현예에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 고체 지지체(예를 들어, 실리카-기반 지지체)에 직접 부착될 수 있다. 그러나, 본 개시의 다른 구현예에서, 고체 지지체의 표면은 표적 폴리뉴클레오티드의 직접적인 공유결합 부착을 가능하게 하거나, 그 자체가 고체 지지체에 비공유결합적으로 부착될 수 있는 하이드로겔 또는 다가전해질 다중층을 통해 표적 폴리뉴클레오티드를 고정화하도록 하는 어떠한 방식으로 변형될 수 있다.

[0102] 폴리뉴클레오티드가 지지체(예를 들어, WO 2000/006770(참조로서 본원에 포함됨)에 개시된 것과 같은 실리카-기반 지지체)에 직접 부착된 어레이에서는 폴리뉴클레오티드가 유리 상의 펜던트 에폭사이드기와 폴리뉴클레오티드 상의 내부 아미노기 사이의 반응에 의해 유리 지지체 상에 고정된다. 게다가, 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 WO 2005/047301호(참조로서 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같이, 황 기반 친핵체와 고체 지지체의 반응에 의해 고체 지지체에 부착될 수 있다. 고체 지지된 표적 폴리뉴클레오티드의 또 다른 추가의 예는 주형 폴리뉴클레오티드가 실리카-기반 또는 다른 고체 지지체 상에 지지된 하이드로겔에 부착되어 있는 경우로서, 예를 들어 WO 00/31148호, WO 01/01143호, WO 02/12566호, WO 03/014392호, 미국 특허 제6,465,178호 및 WO 00/53812호에 기재되어 있으며, 각각은 참조로서 본원에 포함된다.

[0103] 주형 폴리뉴클레오티드가 고정화될 수 있는 특정 표면은 폴리아크릴아미드 하이드로겔이다. 폴리아크릴아미드 하이드로겔은 위에 인용된 참고문헌 및 WO 2005/065814호에 기재되어 있으며, 이는 참조로서 본원에 포함된다. 사용될 수 있는 구체적인 하이드로겔은 WO 2005/065814호 및 미국 특허 출원 공개 제2014/0079923호에 기재되어 있는 것들을 포함한다. 일 구현예에서, 하이드로겔은 PAZAM(폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸) 아크릴아미드-코-아크릴아미드))이다.

[0104] DNA 주형 분자는, 예를 들어, 미국 특허 제6,172,218호(참조로서 본원에 포함됨)에 기재된 바와 같이 비드 또는

마이크로입자에 부착될 수 있다. 비드 또는 마이크로입자에 대한 부착은 서열분석 응용에 유용할 수 있다. 비드 라이브러리가 제조될 수 있으며, 여기서는 각각의 비드가 상이한 DNA 서열을 함유한다. 이들의 생성을 위한 예시적인 라이브러리 및 방법은 문헌[Nature, 437, 376-380(2005)]; 문헌[Science, 309, 5741, 1728-1732(2005)]에 기재되어 있으며, 그 각각은 참조로서 본원에 포함된다. 본 명세서에 기재된 뉴클레오티드를 사용하는 그러한 비드들의 어레이의 서열분석은 본 발명의 범주 내에 있다.

[0105] 서열분석하고자 하는 주형(들)은 고체 지지체 상의 "어레이"의 일부를 형성할 수 있으며, 이 경우에 어레이는 임의의 편리한 형태를 취할 수 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 단일-분자 어레이, 클러스터링된 어레이, 및 비드 어레이를 포함한 모든 유형의 고밀도 어레이에 적용가능하다. 본 개시의 염료 화합물로 표지된 뉴클레오티드는 고체 지지체 상에 핵산 분자의 고정화에 의해 형성된 것들을 포함하지만 이로 한정되지 않는 본질적으로 임의의 유형의 어레이 상의 주형을 서열분석하는 데 사용될 수 있다.

[0106] 그러나, 본 개시의 염료 화합물로 표지된 뉴클레오티드는 클러스터링된 어레이의 서열분석과 관련하여 특히 유리하다. 클러스터링된 어레이에서, 어레이 상의 별개의 영역(종종 부위 또는 특징부로 지칭됨)들은 다수의 폴리뉴클레오티드 주형 분자를 포함한다. 일반적으로, 이러한 다수의 폴리뉴클레오티드 분자는 광학적 수단에 의해 개별적으로 해상가능하지 않고 대신에 앙상블(ensemble)로서 검출된다. 어레이가 어떻게 형성되는지에 따라, 어레이 상의 각각의 부위는 하나의 개별 폴리뉴클레오티드 분자의 다수의 카피(예를 들어, 그 부위는 특정 단일- 또는 이중-가닥 핵산 종에 대해 균질함) 또는 심지어 소수의 상이한 폴리뉴클레오티드 분자들의 다수의 카피(예를 들어, 2개의 상이한 핵산 종의 다수의 카피)를 포함할 수 있다. 핵산 분자들의 클러스터링된 어레이는 당업계에서 일반적으로 알려진 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 예시로서, 그 각각이 본원에 포함된 WO 98/44151호 및 WO 00/18957호는 핵산의 증폭 방법을 기재하고 있는데, 여기서 고정화된 핵산 분자의 클러스터 또는 "콜로니"로 구성된 어레이를 형성하기 위하여, 주형 및 증폭 산물 둘 다 고체 지지체 상에 고정화된 채로 남아 있다. 이들 방법에 따라 제조된 클러스터링된 어레이 상에 존재하는 핵산 분자들은 본 개시의 염료 화합물로 표지된 뉴클레오티드를 사용하여 서열분석하기에 적합한 주형이다.

[0107] 본 개시의 염료 화합물로 표지된 뉴클레오티드는 또한 단일 분자 어레이 상의 주형의 서열분석에 유용하다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "단일 분자 어레이" 또는 "SMA"는 고체 지지체 위에 분포된(또는 배열된) 폴리뉴클레오티드 분자들의 집단을 지칭하며, 여기서 집단의 모든 다른 것들로부터 임의의 개별 폴리뉴클레오티드의 간격은 개별 폴리뉴클레오티드 분자들을 개별적으로 해상하는 것이 가능하도록 하는 것이다. 따라서, 고체 지지체의 표면 상에 고정화된 표적 핵산 분자는 일부 구현예에서 광학적 수단에 의해 해상될 수 있다. 이는, 각각의 신호가 하나의 폴리뉴클레오티드를 나타내는 하나 이상의 별개의 신호가, 사용되는 특정 이미징 장치의 해상가능한 영역 내에서 발생할 것임을 의미한다.

[0108] 어레이 상의 인접한 폴리뉴클레오티드 분자들 사이의 간격이 적어도 100 nm, 더 특히 적어도 250 nm, 훨씬 더 특히 적어도 300 nm, 더욱 더 특히 적어도 350 nm인 단일 분자 검출이 달성될 수 있다. 따라서, 각각의 분자는 개별적으로 해상가능하고 단일 분자 형광점으로서 검출가능하고, 상기 단일 분자 형광점으로부터의 형광은 또한 단일 단계 광표백을 나타낸다.

[0109] 용어 "개별적으로 해상된" 및 "개별 해상도"는, 시각화될 때, 어레이 상의 하나의 분자를 그의 이웃하는 분자와 구별하는 것이 가능함을 명시하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 어레이 상의 개별 분자들 사이의 분리는 개별 분자들을 해상하는 데 사용되는 특정 기법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 단일 분자 어레이의 일반적인 특징은 각각이 참조로서 본원에 포함된 공개된 출원인 WO 00/06770호 및 WO 01/57248호를 참조함으로써 이해될 것이다. 본 개시의 표지된 뉴클레오티드의 한 가지 용도가 합성 반응에 의한 서열분석에 대한 것이지만, 그러한 뉴클레오티드의 유용성은 그러한 방법으로 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기재된 표지된 뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 내로 혼입된 뉴클레오티드에 부착된 형광 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 서열분석 방법론에서 유리하게 사용될 수 있다.

[0110] 특히, 본 개시의 염료 화합물로 표지된 뉴클레오티드 접합체는 자동화 형광 서열분석 프로토콜, 특히 Sanger 및 그 동료들의 사슬 종결 서열분석 방법에 기초한 형광 염료-종결자 사이클 서열분석에 사용될 수 있다. 그러한 방법은 일반적으로 효소, 및 프라이머 신장 서열분석 반응에서 형광 표지된 디데옥시뉴클레오티드를 도입시키는 사이클 서열분석을 사용한다. 이른바 Sanger 서열분석 방법, 및 관련 프로토콜(Sanger-유형)은 표지된 디데옥시뉴클레오티드를 이용한 랜덤화된 사슬 종결을 이용한다.

[0111] 키트

[0112] 본 개시의 일부 양태는 본원에 기재된 서열분석 방법을 위한 키트에 관한 것이다. 특히, 키트는 다음을 포함할 수 있다: 제1 형광 모이어티(즉, 제1 표지)를 포함하는 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체; 제2 형광 모이어티(즉, 제2 표지)를 포함하는 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체; 및 제3 형광 모이어티(즉, 제3 표지)를 포함하는 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체로서; 제1 표지, 제2 표지, 및 제3 표지 각각은 서로 스펙트럼적으로 구별되고, 제1 표지 및 제3 표지는 제1 광원에 의해 여기가능하고, 제2 표지 및 제3 표지는 제2 광원에 의해 여기가능하되; 제1 광원 및 제2 광원은 상이한 여기 파장을 갖고; 제1 표지, 제2 표지 및 제3 표지 각각은 단일 검출 채널에서 검출가능한 방출 스펙트럼을 갖는다. 추가의 구현예에서, 키트는 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 이러한 구현예에서, 제4 유형의 뉴클레오티드 접합체는 표지되지 않는다. 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A, C, G, 및 T 또는 U, 또는 이의 비천연 뉴클레오티드 유사체이다. 추가 구현예에서, 4가지 상이한 유형의 뉴클레오티드 접합체는 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP 또는 dUTP, 또는 이의 비천연 뉴클레오티드 유사체이다. 일부 구현예에서, 제1 여기 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm, 약 510 내지 약 540 nm, 또는 약 520 내지 약 530 nm(예를 들어, 520 nm)의 파장을 갖는다. 제2 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm, 약 420nm 내지 약 470 nm, 또는 450 nm 내지 약 460 nm(예를 들어, 450 nm)의 여기 파장을 갖는다. 대안적인 구현예에서, 제1 광원은 약 400 nm 내지 약 480 nm, 약 420nm 내지 약 470 nm, 또는 450 nm 내지 약 460 nm(예를 들어, 450 nm)의 여기 파장을 갖는다. 제2 여기 광원은 약 490 nm 내지 약 550 nm, 약 500 내지 약 540 nm, 또는 약 510 내지 약 530 nm(예를 들어, 520 nm)의 파장을 갖는다. 추가 구현예에서, 제1 표지, 제2 표지, 및 제3 표지 각각은 단일 방출 필터 또는 채널에서 수집될 수 있는 550 nm 또는 560 nm을 초과하는 방출 스펙트럼을 갖는다. 추가 구현예에서, 단일 방출 검출 채널은 560 nm 초과 및/또는 700 nm 미만(예를 들어, 약 565 nm 내지 약 690 nm, 약 570 nm 내지 약 670 nm, 또는 약 580 nm 내지 약 650 nm)의 검출 범위를 갖는다.

[0113] 본원에 기재된 화합물, 뉴클레오티드 접합체, 또는 키트는 생물학적 시스템(예를 들어, 공정 또는 이의 성분을 포함함)을 검출, 측정, 또는 식별하는 데 사용될 수 있다. 이들 화합물, 뉴클레오티드 또는 키트를 사용할 수 있는 예시적인 기법에는 서열분석, 발현 분석, 혼성화 분석, 유전자 분석, RNA 분석, 세포 검정(예를 들어, 세포 결합 또는 세포 기능 분석), 또는 단백질 검정(예를 들어, 단백질 결합 검정 또는 단백질 활성 검정)이 포함된다. 이러한 사용은 자동화 서열분석 기기와 같은 특정 기법을 수행하기 위한 자동화 기기 상에서 행해질 수 있다. 서열분석 기기는 상이한 파장에서 작동하는 2개의 광원(즉, 제1 여기 광원 및 제2 여기 광원)을 포함할 수 있다.

[0114] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 표지된 뉴클레오티드 접합체는 미표지 또는 천연 뉴클레오티드, 또는 이들의 임의의 조합과 조합하여 공급될 수 있다. 뉴클레오티드들의 조합은 별개의 개별 성분들(예를 들어, 베셀(vessel) 또는 튜브당 하나의 뉴클레오티드 유형)로서 또는 뉴클레오티드 혼합물(예를 들어, 동일한 베셀 또는 튜브 내에서 혼합된 2개 이상의 뉴클레오티드)로서 제공될 수 있다. 추가의 구현예에서, 뉴클레오티드 혼합물은 4가지 유형의 뉴클레오티드를 모두 함유할 수 있다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "스펙트럼적으로 구별된" 형광 염료 또는 표지는 상이한 파장에서 광 에너지를 흡수하고/하거나 2개 이상의 이러한 염료가 하나의 샘플에 존재할 때 형광 검출 장비에 의해 구별될 수 있는 상이한 스토크스 이동을 가지는 형광 염료를 지칭한다. 2개의 표지된 뉴클레오티드 접합체가 키트 형태로 공급되는 경우, 일부 구현예의 특징은 스펙트럼적으로 구별되는 형광 염료가, 예를 들어, 2개의 상이한 광원과 같은 상이한 파장에서 여기가능하다는 것이다. 형광 염료 화합물로 표지된 4개의 뉴클레오티드가 키트 형태로 공급될 때, 일부 구현예의 특징은 스펙트럼적으로 구별되는 형광 염료들 중 2개가 모두 하나의 파장에서 여기될 수 있고, 2개의 스펙트럼적으로 구별되는 염료가 모두 다른 파장에서 여기될 수 있다는 것이다. 염료에 대한 특정 여기 파장은 450 내지 460 nm, 490 내지 500 nm, 또는 520 nm 이상(예를 들어, 532 nm)이다.

[0116] 본원에 기재된 키트의 일부 구현예에서, 제1 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 약 450 내지 460 nm의 최대 흡광도(A_{max})를 갖는 제1 광원에 의해서만 여기가능하다. 제2 광원에 의해서만 여기가능한 제2 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 520 nm를 초과하는 A_{max}를 갖는다. 제1 및 제2 광원(예를 들어, 450 nm 및 520 nm, 또는 520 nm 및 450 nm) 둘 다에서 여기가능한 제3 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 약 480 nm 내지 510 nm, 또는 약 490 nm 내지 500 nm의 A_{max}를 갖는다. 대안적으로, 제1 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 제1 광원에 의해서만 여기가능하고 520 nm를 초과하는 A_{max}를 갖는다. 제2 광원에 의해서만 여기가능한 제2 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 약 450 내지 460 nm의 A_{max}를 갖는다. 제1 및 제2 광원(예를 들어, 450 nm 및 520 nm, 또는 520 nm 및 450 nm) 둘 다에서 여기가능한 제3 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체는 약 480 nm 내지 510 nm, 또는 약

490 nm 내지 500 nm의 A_{max}를 갖는다. 추가 구현예에서, 제3 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 최대 방출(E_{max})은 550 nm를 초과하거나 560 nm를 초과하고, 이러한 표지된 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 60 nm를 초과한다. 제1 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 560 nm를 초과하고, 이러한 표지된 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 100 nm를 초과한다. 제2 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 560 nm를 초과하고, 이러한 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 약 30 nm를 초과하거나 약 40 nm를 초과한다. 대안적으로, 제3 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 550 nm를 초과하거나 560 nm를 초과하고, 이러한 표지된 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 60 nm를 초과한다. 제1 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 560 nm를 초과하고, 이러한 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 약 30 nm를 초과하거나 약 40 nm를 초과한다. 제2 표지를 갖는 뉴클레오티드 접합체의 E_{max}는 560 nm를 초과하고, 이러한 표지된 뉴클레오티드 접합체의 스토크스 이동은 100 nm를 초과한다.

[0117] 일 예시에서, 제1 광원은 450 내지 460 nm의 여기 파장을 갖고, 제2 광원은 520 nm의 여기 파장을 갖는다. 다른 예시에서, 제1 광원은 520 nm의 여기 파장을 갖고, 제2 광원은 450 내지 460 nm의 여기 파장을 갖는다. 일부 이러한 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 C 뉴클레오티드(dCTP)이고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 T 뉴클레오티드(dTTP)이고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A 뉴클레오티드(dATP)이고, 제4 유형의 뉴클레오티드는 미표지된 G 뉴클레오티드(dGTP)이다. 일부 다른 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 T 뉴클레오티드(dTTP)이고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 C 뉴클레오티드(dCTP)이고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A 뉴클레오티드(dATP)이고, 제4 유형의 뉴클레오티드는 미표지된 G 뉴클레오티드(dGTP)이다. 일부 다른 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 C 뉴클레오티드(dCTP)이고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A 뉴클레오티드(dATP)이고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 T 뉴클레오티드(dTTP)이고, 제4 유형의 뉴클레오티드는 미표지된 G 뉴클레오티드(dGTP)이다. 또 다른 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A 뉴클레오티드(dATP)이고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 C 뉴클레오티드(dCTP)이고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 T 뉴클레오티드(dTTP)이고, 제4 유형의 뉴클레오티드는 미표지된 G 뉴클레오티드(dGTP)이다. 또 다른 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A 뉴클레오티드(dATP)이고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 T 뉴클레오티드(dTTP)이고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 C 뉴클레오티드(dCTP)이고, 제4 유형의 뉴클레오티드는 미표지된 G 뉴클레오티드(dGTP)이다. 또 다른 구현예에서, 제1 유형의 뉴클레오티드 접합체는 T 뉴클레오티드(dTTP)이고, 제2 유형의 뉴클레오티드 접합체는 A 뉴클레오티드(dATP)이고, 제3 유형의 뉴클레오티드 접합체는 C 뉴클레오티드(dCTP)이고, 제4 유형의 뉴클레오티드는 미표지된 G 뉴클레오티드(dGTP)이다. 대안적으로, G 또는 dGTP 뉴클레오티드는 본원에 기재된 스펙트럼적으로 구별되는 표지로 표지될 수 있고, 다른 3개의 뉴클레오티드 접합체 중 하나는 미표지될 수 있다.

[0118] 키트가 상이한 염료 화합물들로 표지된 상이한 뉴클레오티드들을 갖는 구성들에 관하여 본 명세서에서 예시되어 있지만, 키트는 동일한 염료 화합물을 갖는 2개, 3개, 4개 또는 그 이상의 상이한 뉴클레오티드들을 포함할 수 있음이 이해될 것이다.

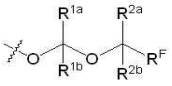
[0119] 표지된 뉴클레오티드 외에도, 키트는 적어도 하나의 추가 성분을 함께 포함할 수 있다. 추가의 성분(들)은 본 명세서에 기재된 방법에서 또는 하기 실시예 섹션에서 확인된 성분들 중 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 키트 내로 조합될 수 있는 성분들의 일부 비제한적인 예가 하기에 기재된다. 일부 구현예에서, 키트는 DNA 중합효소(예컨대, 돌연변이체 DNA 중합효소) 및 하나 이상의 완충제 조성물을 추가로 포함한다. 하나의 완충제 조성물은 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아스코르브산 나트륨을 포함할 수 있으며, 이는 검출 중 광손상으로부터 염료 화합물을 보호하는데 사용될 수 있다. 추가의 완충제 조성물은 3' 차단기 및/또는 절단가능한 링커를 절단하기 위해 사용될 수 있는 시약을 포함할 수 있다. 예를 들어, 전이 금속 및 적어도 부분적으로 수용성 리간드, 예컨대 팔라듐 착물로부터 형성된 수용성 포스핀 또는 수용성 전이 금속 촉매를 포함한다. 키트의 다양한 성분은 사용 전에 희석될 농축 형태로 제공될 수 있다. 그러한 구현예에서, 적합한 희석 완충액이 또한 포함될 수 있다. 역시, 본 명세서에 기재된 방법에서 확인된 성분들 중 하나 이상이 본 발명의 키트에 포함될 수 있다.

[0120] 본원에 기재된 키트의 일부 구현예에서, 형광 염료 화합물은 뉴클레오티드 염기를 통해 뉴클레오티드에 공유결합으로 부착될 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 표지된 뉴클레오티드는 선택적으로 링커 모이어티를 통해 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-데아자 퓨린 염기의 C7 위치에 부착된 염료를 가질 수 있다. 예를 들어, 핵염기는 7-데아자 아데닌일 수 있고, 염료는 C7 위치에서 7-데아자 아데닌에 선택적으로 링커를 통해 부착된다. 핵

염기는 7-데아자 구아닌일 수 있고, 염료는 C7 위치에서 7-데아자 구아닌에 선택적으로 링커를 통해 부착된다. 핵염기는 시토신일 수 있고, 염료는 C5 위치에서 시토신에, 선택적으로 링커를 통해 부착된다. 다른 예로서, 핵염기는 티민 또는 우라실일 수 있고, 염료는 선택적으로 링커를 통해 C5 위치에서 티민 또는 우라실에 부착된다. 본원에 기재된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 접합체의 임의의 구현예에서, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 접합체는 3' 하이드록실 차단기를 함유할 수 있다.

[0121] *3' 하이드록실 차단기*

[0122] 혼입 혼합물 내에서 사용되는 표지된 뉴클레오티드 접합체는 또한 뉴클레오티드의 리보스 또는 데옥시리보스 당에 공유결합으로 부착된 차단기를 가질 수 있다. 차단기는 리보스 또는 데옥시리보스 당 상의 임의의 위치에 부착될 수 있다. 특정 구현예에서, 차단기는 뉴클레오티드의 리보스 또는 데옥시리보스 당의 3' OH 위치에 있다. 다양한 3' OH 차단기가 WO 2004/018497 및 WO 2014/139596에 개시되어 있으며, 이는 참조로서 본원에 포함된다. 예를 들어, 차단기는 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티의 3' 산소 원자에 연결되는 아지도메틸(-CH_2N_3) 또는 치환된 아지도메틸(예를 들어, -$CH(CHF_2)N_3$ 또는 $CH(CH_2F)N_3$), 또는 알릴일 수 있다. 일부 구현예에서, 3' 차단기는 아지도메틸로서, 리보스 또는 데옥시리보스의 3' 탄소와 함께 3'-OCH_2N_3를 형성한다.

[0123] 일부 다른 구현예에서, 3' 차단기와 3' 산소 원자는 리보스 또는 데옥시리보스의 3' 탄소에 공유결합으로 부착된 구조  의 아세탈기를 형성하며, 여기서

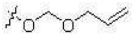
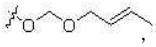
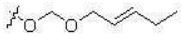
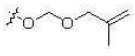
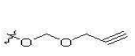
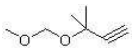
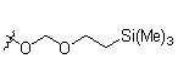
[0124] 각각의 R^{1a} 및 R^{1b}는 독립적으로 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, C_1-C_6 알콕시, C_1-C_6 할로알콕시, 시아노, 할로겐, 선택적으로 치환된 페닐, 또는 선택적으로 치환된 아르알킬이고;

[0125] 각각의 R^{2a} 및 R^{2b}는 독립적으로 H, C_1-C_6 알킬, C_1-C_6 할로알킬, 시아노, 또는 할로겐이고;

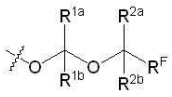
[0126] 대안적으로, R^{1a}와 R^{2a}는 그들이 부착되어 있는 원자와 함께, 선택적으로 치환된 5원 내지 8원 헤테로사이클릴 기를 형성하고;

[0127] R^F는 H, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알케닐, 선택적으로 치환된 C_3'C_7 사이클로알케닐, 선택적으로 치환된 C_2-C_6 알키닐, 또는 선택적으로 치환된 (C_1-C_6 알킬렌)Si(R^{3a})$_3$이고;

[0128] 각각의 R^{3a}는 독립적으로 H, C_1-C_6 알킬, 또는 선택적으로 치환된 C_6-C_{10} 아릴이다.

[0129] 추가의 3' OH 차단기는 미국 특허 출원 공개 2020/0216891 A1에 개시되어 있으며, 이는 그 전체가 참조로서 포함된다. 아세탈 차단기의 비제한적인 예에는  (AOM), , , , , , , 및  가 포함되며, 각각은 리보스 또는 데옥시리보스의 3' 탄소에 공유결합으로 부착되어 있다.

[0130] *3'-OH 차단기의 탈보호*

[0131] 일부 구현예에서, 아지도메틸 3' 하이드록실 보호기는 수용성 포스핀 시약을 사용함으로써 제거되거나 탈보호될 수 있다. 비제한적인 예에는 트리스(하이드록시메틸)포스핀(THMP), 트리스(하이드록시에틸)포스핀(THEP) 또는 트리스(하이드록실프로필)포스핀(THP 또는 THPP)이 포함된다. 본 명세서에 기재된 3'-아세탈 차단기는 다양한 화학적 조건 하에서 제거되거나 절단될 수 있다. 비닐 또는 알케닐 모이어티를 함유하는 아세탈 차단기  의 경우, 비제한적인 절단 조건은 포스핀 리간드, 예를 들어 트리스(하이드록시메틸)포스핀(THMP), 또는 트리스(하이드록실프로필)포스핀(THP 또는 THPP)의 존재 하에서 Pd(II) 착물, 예컨대 $Pd(OAc)_2$ 또는 알릴Pd(II) 클로라이드 이량체를 포함한다. 알키닐 기(예를 들어, 에티닐)를 함유하는 블록킹 기의 경우, 이들은 또한 포스핀 리간드(예를 들어, THP 또는 THMP)의 존재 하에서 Pd(II) 착물(예를 들어, $Pd(OAc)_2$ 또는

알릴 Pd(II) 클로라이드 이량체)에 의해 제거될 수 있다.

[0132] *팔라듐 절단 시약*

[0133] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 3' 하이드록실 차단기는 팔라듐 촉매에 의해 절단될 수 있다. 일부 그러한 구현예에서, Pd 촉매는 수용성이다. 일부 그러한 구현예에서, Pd(0) 착물(예를 들어, 트리스(3,3′,3″-포스피니딘트리스(벤젠설포네이토)팔라듐(0) 노나소디움 염 노나하이드레이트)이다. 일부 경우에, Pd(0) 착물은 알켄, 알코올, 아민, 포스핀, 또는 금속 수소화물과 같은 시약에 의해 Pd(II) 착물의 환원으로부터 원 위치(*in situ*)에서 생성될 수 있다. 적합한 팔라듐 공급원은 Na_2PdCl_4, $Pd(CH_3CN)_2Cl_2$, $(PdCl(C_3H_5))_2$, $[Pd(C_3H_5)(THP)]Cl$, $[Pd(C_3H_5)(THP)_2]Cl$, $Pd(OAc)_2$, $Pd(Ph_3)_4$, $Pd(dba)_2$, $Pd(Acac)_2$, $PdCl_2(COD)$, 및 $Pd(TFA)_2$를 포함한다. 그러한 일 구현예에서, Pd(0) 착물은 Na_2PdCl_4로부터 원 위치에서 생성된다. 다른 구현예에서, 팔라듐 공급원은 알릴 팔라듐(II) 클로라이드 이량체[$(PdCl(C_3H_5))_2$]이다. 일부 구현예에서, Pd(0) 착물은 수용액 중에서 Pd(II) 착물을 포스핀과 혼합함으로써 생성된다. 적합한 포스핀은 수용성 포스핀, 예컨대 트리스(하이드록시프로필)포스핀(THP), 트리스(하이드록시메틸)포스핀(THMP), 1,3,5-트라이아자-7-포스파아다만탄(PTA), 비스(p-설포네이토페닐)페닐포스핀 2수화물 칼륨 염, 트리스(카르복시에틸)포스핀(TCEP), 및 트라이페닐포스핀-3,3',3"-트라이설폰산 삼나트륨 염을 포함한다.

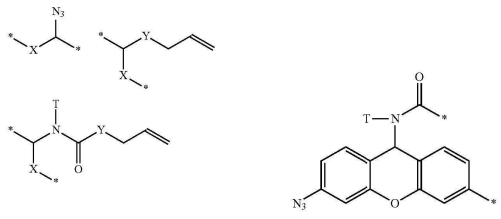
[0134] 일부 구현예에서, Pd(0)는 원 위치에서 Pd(II) 착물[$(PdCl(C_3H_5))_2$]을 THP와 혼합함으로써 제조된다. Pd(II) 착물과 THP의 몰비는 약 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 또는 1:10일 수 있다. 일부 추가의 실시 형태에서, 하나 이상의 환원제가 첨가될 수 있으며, 이에는, 예를 들어 아스코르브산 또는 이의 염(예를 들어, 소듐 아스코르베이트)이 있다. 일부 실시 형태에서, 절단 혼합물은 추가의 완충 시약, 예컨대 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민, 카르보네이트 염, 포스페이트 염, 또는 보레이트 염, 또는 이들의 조합을 함유할 수 있다. 일부 추가의 실시 형태에서, 완충 시약은 에탄올아민(EA), 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris), 글리신, 탄산나트륨, 인산나트륨, 붕산나트륨, 2-디메틸에탄올아민(DMEA), 2-디에틸에탄올아민(DEEA), N,N,N′,N′-테트라메틸에틸렌디아민(TEMED), 또는 N,N,N′,N′-테트라에틸에틸렌디아민(TEEDA), 또는 이들의 조합을 포함한다. 일 구현예에서, 완충 시약은 DEEA이다. 다른 구현예에서, 완충 시약은 하나 이상의 무기 염, 예컨대 카르보네이트 염, 포스페이트 염, 또는 보레이트 염, 또는 이들의 조합을 함유한다. 일 구현예에서, 무기 염은 나트륨 염이다.

[0135] 링커

[0136] 형광 표지는 절단 가능한 링커를 통해 뉴클레오티드에 공유결합으로 부착될 수 있다. 용어 "절단가능한 링커"의 사용은 전체 링커가 제거될 것이 요구되는 것을 내포하는 것으로 의미되지 않는다. 절단 부위는 링커의 일부가 절단 후 염료 및/또는 기질 모이어티에 부착된 채로 남아 있는 것을 보장하는 링커 상의 위치에 위치될 수 있다. 절단가능한 링커는, 비제한적인 예로서, 친전자적으로 절단가능한 링커, 친핵적으로 절단가능한 링커, 광절단성 링커일 수 있으며, 이들은 환원성 조건(예를 들어, 디설파이드 또는 아지드 함유 링커), 산화성 조건 하에서 절단가능하고, 안전성-캐치 링커(safety-catch linker)의 사용을 통해 절단가능하고, 제거 기전에 의해 절단가능하다. 염료 화합물을 기질 모이어티에 부착하기 위한 절단가능한 링커의 사용은 표지를, 필요하다면, 검출 후에 제거하여, 하류 단계들에서 어떠한 간섭 신호도 피할 수 있음을 보장한다.

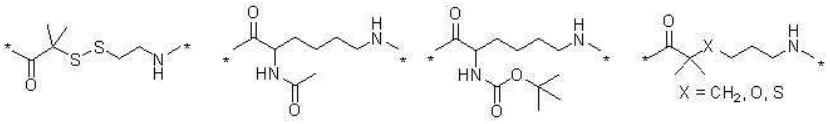
[0137] 유용한 링커 기는 국제 특허 출원 공개 WO 2004/018493(참조로서 본원에 포함됨)에서 찾을 수 있으며, 이러한 예에는 전이 금속 및 적어도 부분적으로 수용성인 리간드로부터 형성된 수용성 전이 금속 촉매 또는 수용성 포스핀을 사용하여 절단될 수 있는 링커를 포함한다. 수용액 중에서, 후자는 적어도 부분적으로 수용성인 전이 금속 착물을 형성한다. 그러한 절단가능한 링커는 본 명세서에 기재된 염료와 같은 표지에 뉴클레오티드의 염기를 연결하는 데 사용될 수 있다.

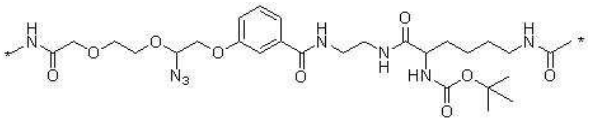
[0138] 특정 링커는 국제 특허 출원 공개 WO 2004/018493(참조로서 본원에 포함됨)에 개시된 것들, 예컨대 하기 화학식의 모이어티를 포함하는 것들을 포함한다:

[0139] 

[0140] 식에서, X는 O, S, NH 및 NQ를 포함하는 군으로부터 선택되며, 여기서 Q는 C_{1-10} 치환 또는 비치환된 알킬 기이고, Y는 O, S, NH 및 N(알릴)을 포함하는 군으로부터 선택되고, T는 수소 또는 C_1-C_{10} 치환 또는 비치환된 알킬 기이고, *는 모이어티가 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 나머지 부분에 연결되는 곳을 나타낸다. 일부 양태에서, 링커는, 예를 들어 본원에 기재된 염료 화합물과 같은 표지에 뉴클레오티드의 염기를 연결한다.

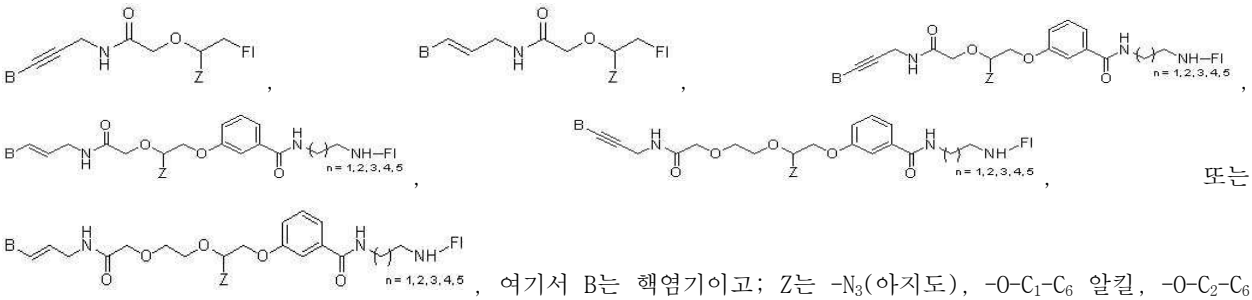
[0141] 링커의 추가의 예에는 미국 특허 출원 공개 제2016/0040225호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 개시된 것들, 예컨대 하기 화학식의 모이어티를 포함하는 것들이 포함된다:

[0142] 

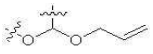
[0143] 

[0144] (상기 식에서, *는 모이어티가 뉴클레오티드 또는 뉴클레오시드의 나머지 부분에 연결되는 경우를 나타냄). 본 명세서에 예시된 링커 모이어티는 뉴클레오티드/뉴클레오시드와 표지 사이의 전체 또는 부분 링커 구조를 포함할 수 있다. 본 명세서에 예시된 링커 모이어티는 뉴클레오티드/뉴클레오시드와 표지 사이의 전체 또는 부분 링커 구조를 포함할 수 있다.

[0145] 링커의 추가적인 예는 하기 화학식의 모이어티를 포함한다:

[0146] 

또는

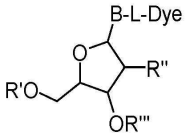
, 여기서 B는 핵염기이고; Z는 $-N_3$(아지도), $-O-C_1-C_6$ 알킬, $-O-C_2-C_6$ 알케닐, 또는 $-O-C_2-C_6$ 알키닐이고; Fl은 염료 모이어티를 포함하며, 이는 추가의 링커 구조를 함유할 수 있다. 당업자는 본 명세서에 기재된 염료 화합물은 염료 화합물의 작용기(예를 들어, 카르복실)를 링커의 작용기(예를 들어, 아미노)와 반응시킴으로써 링커에 공유 결합됨을 이해한다. 일 구현예에서, 절단성 링커는  ("AOL" 링커 모이어티) (여기서, Z는 -O-알릴임)를 포함한다. 절단 가능한 링커의 추가 구현예는 미국 특허 출원 제17/353512호에 개시되어 있으며, 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다.

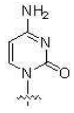
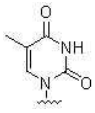
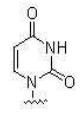
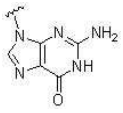
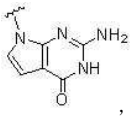
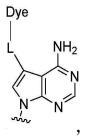
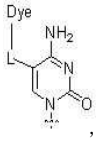
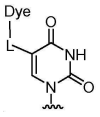
[0147] 특정 구현예에서, 형광 염료(형광단)와 구아닌 염기 사이의 링커의 길이는, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 스페이서기를 도입함으로써 변경될 수 있으며, 그럼으로써 당업계에 알려진 다른 결합을 통해 구아닌 염기에 부착된 동일한 형광단과 비교하여 형광 강도를 증가시킬 수 있다. 예시적인 링커 및 그의 특성은 국제 특허 출원 공개 WO 2007/020457(참조로서 본원에 포함됨)에 기재되어 있다. 링커의 설계, 특히 그의 증가된 길이는, DNA와 같은 폴리뉴클레오티드 내로 도입될 때, 구아노신 뉴클레오티드의 구아닌 염기에 부착된 형광단의 밝기의 개선을 가능하게 할 수 있다. 따라서, 이러한 염료가 구아닌-함유 뉴클레오티드에 부착된 형광 염료 표지의 검출을 필요로 하는 임의의 분석 방법에 사용하기 위한 것일 때, 링커는 화학식 $-((CH_2)_2O)_n-$(여기서, n은 2와 50 사이의

정수임)의 스페이서기를 포함하는 경우에 유리하며, 이는 WO 2007/020457호에 기재된 바와 같다.

[0148] 염료는, 예를 들어 링커를 통해 뉴클레오티드 염기 상의 임의의 위치에 부착될 수 있다. 특정 구현예에서, 왓슨-크릭 염기쌍 형성은 생성된 유사체에 대해 여전히 수행될 수 있다. 특정 핵염기 표지화 부위는 피리미딘 염기의 C5 위치 또는 7-데아자퓨린 염기의 C7 위치를 포함한다. 전술된 바와 같이, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드에 염료를 공유적으로 부착하는 데 링커 기가 사용될 수 있다.

[0149] 본원에 기재된 염료로 표지된 뉴클레오티드는 하기 화학식을 가질 수 있다:

[0150] 

[0151] 여기서 염료는(염료의 작용기와 링커 "L"의 작용기 사이의 공유 결합 후) 본원에 기재된 염료 화합물(표지) 모이어티이고; B는 핵염기, 예컨대 우라실, 티민, 시토신, 아데닌, 7-데아자 아데닌, 구아닌, 7-데아자 구아닌 등이고; L은 존재할 수 있거나 존재하지 않을 수 있는 선택적인 링커이고; R'은 H일 수 있거나, -OR'이 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 티오포스페이트, 포스페이트 에스테르 유사체, 반응성 인 함유 기에 부착된 -O-, 또는 차단기에 의해 보호된 -O-이고; R"는 H 또는 OH이고; R'''는 H, 본원에 기재된 3 "OH 차단기이거나, -OR"'는 포스포르아미다이트를 형성한다. -OR"'이 포스포르아미다이트인 경우, R'은 산-절단가능한 하이드록실 보호기이며, 이는 자동화 합성 조건 하에서 후속 단량체 커플링을 가능하게 한다. 일부 추가의 구현예에서, B는 , , , , ,  또는 , 또는 이들의 선택적으로 치환된 유도체 및 유사체를 포함한다. 일부 추가의 구현예에서, 표지된 핵염기는 구조 , , , 또는 를 포함한다.

[0152] 특정 구현예에서, 이러한 차단기는 염료 화합물과 분리되어 있고 독립적인데, 즉 염료 화합물에 부착되어 있지 않다. 대안적으로, 염료는 3' OH 차단기의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 따라서, R"'은 염료 화합물을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있는 3' OH 차단기일 수 있다.

[0153] 또 다른 대안적인 구현예에서, 펜토스 당의 3' 탄소 상에는 차단기가 없으며, 염기에 부착된 염료(또는 염료 및 링커 구조체)는, 예를 들어, 추가의 뉴클레오티드의 혼입에 대한 차단으로 작용하기에 충분한 크기 또는 구조를 가질 수 있다. 따라서, 이러한 차단은, 염료가 당의 3' 위치에 부착되어 있든 그렇지 않든 간에, 입체 장애로 인한 것일 수 있거나 크기, 전하 및 구조의 조합으로 인한 것일 수 있다.

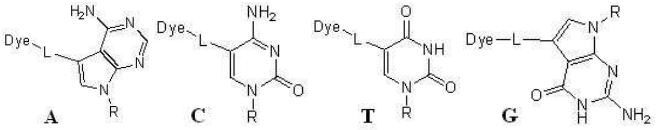
[0154] 또 다른 대안적인 구현예에서, 차단기는 펜토스 당의 2' 또는 4' 탄소 상에 존재하며, 추가의 뉴클레오티드의 혼입에 대한 차단으로 작용하기에 충분한 크기 또는 구조를 가질 수 있다.

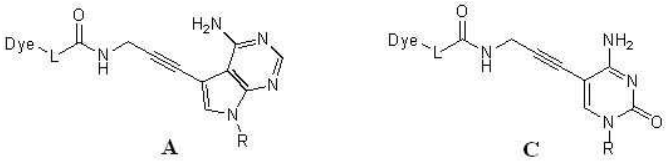
[0155] 차단기의 사용은 중합이 제어될 수 있게 하는데, 이는, 예를 들어 표지된 뉴클레오티드가 혼입될 때 신장을 정지시킴으로써 이루어진다. 차단 효과가, 예를 들어, 비제한적인 예로서, 화학적 조건을 변화시킴으로써 또는 화학적 블록의 제거에 의해 가역적인 경우, 신장이 소정의 지점에서는 정지되고, 그 후 계속되게 할 수 있다.

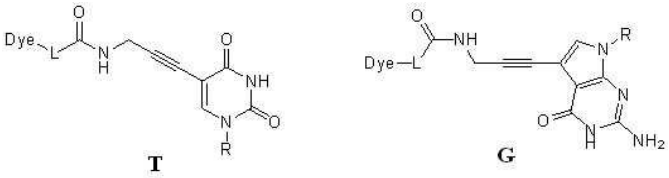
[0156] 특정 구현예에서, (염료와 뉴클레오티드 사이) 링커 및 차단기 둘 모두가 존재하며, 별개의 모이어티이다. 특정 구현예에서, 링커 및 차단기는 둘 모두 동일하거나 실질적으로 유사한 조건 하에서 절단가능하다. 따라서, 염료 화합물 및 차단기 둘 모두를 제거하는 데 단지 단일 처리만이 요구될 것이기 때문에 탈보호 및 탈차단 공정이 더 효율적일 수 있다. 그러나, 일부 구현예에서 링커 및 차단기는 유사한 조건 하에서 절단가능할 필요가 없으며, 대신에 별개의 조건 하에서 개별적으로 절단가능하다.

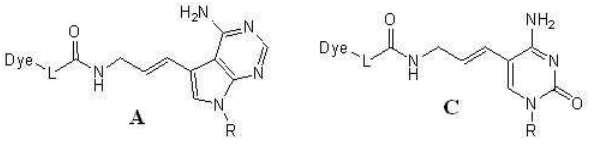
[0157] 본 발명은 또한 염료 화합물을 혼입시킨 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 그러한 폴리뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합으로 연결된 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드로 각각 구성된 DNA 또는 RNA일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 변형된(예를 들어, 염료 화합물로 표지된) 뉴클레오티드와 조합된, 본 명세서에 기재된 표지된 뉴클레오티드 이외의 천연 발생 뉴클레오티드, 천연 비발생(또는 변형된) 뉴클레오티드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 폴리뉴클레오티드는 또한 비천연 골격 결합 및/또는 비-뉴클레오티드 화학적 변형을 포함할 수 있다. 적어도 하나의 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드의 혼합물로 구성된 키메라 구조가 또한 고려된다.

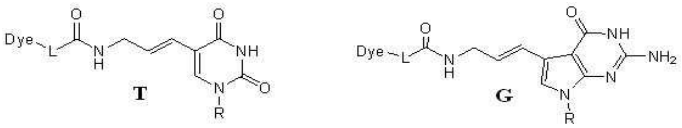
[0158] 본원에 기재된 바와 같은 비제한적인 예시적인 표지된 뉴클레오티드는 하기를 포함한다:

[0159] 

[0160] 

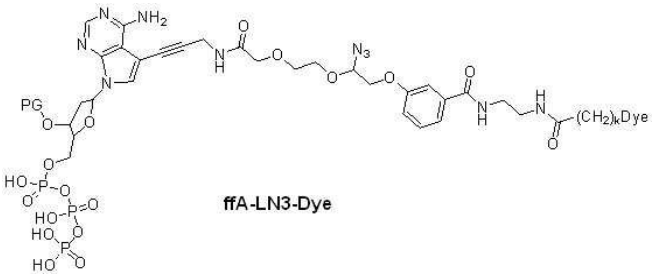
[0161] 

[0162] 

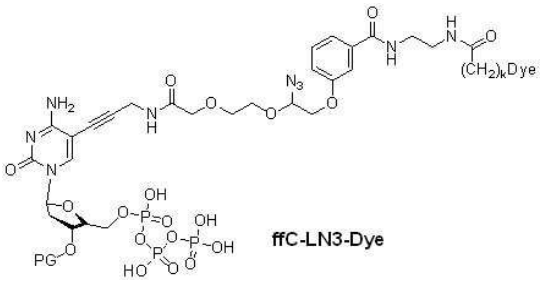
[0163] 

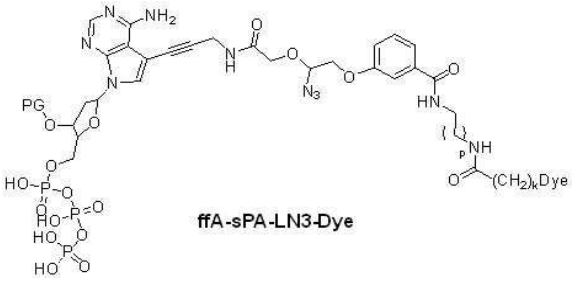
[0164] 식에서, L은 링커를 나타내고, R은 전술된 바와 같은 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티, 또는 5' 위치가 모노-, 디- 또는 트리-포스페이트로 치환된 리보스 또는 데옥시리보스 모이어티를 나타낸다.

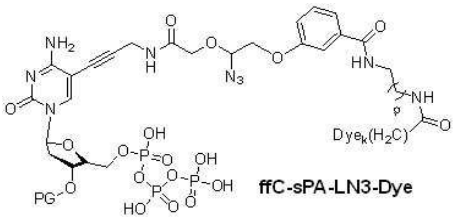
[0165] 일부 구현예에서, 절단 가능한 링커 및 형광 모이어티를 포함하는 비제한적인 예시적인 완전히 작용화된 뉴클레오티드 접합체가 하기에 제시된다:

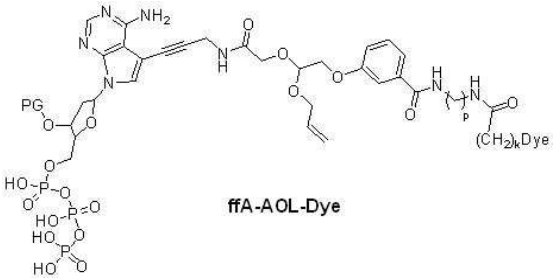
[0166] 

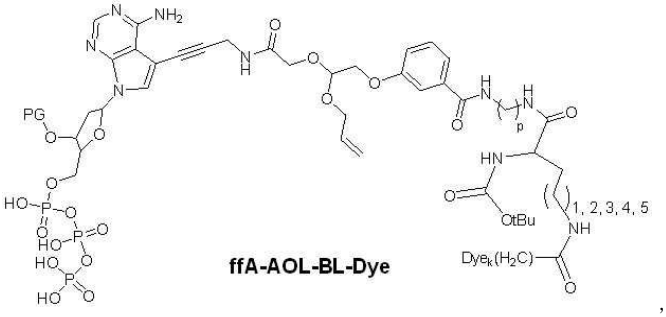
,

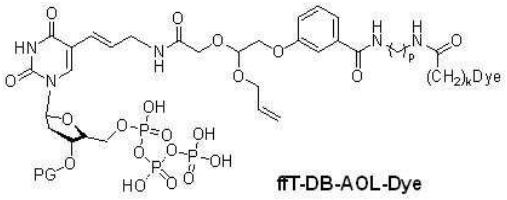
[0167] 

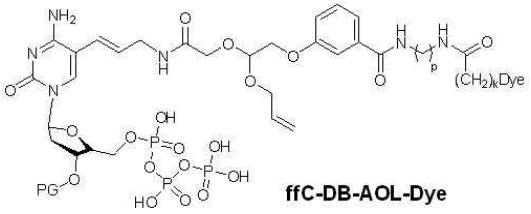
[0168] 

[0169] 

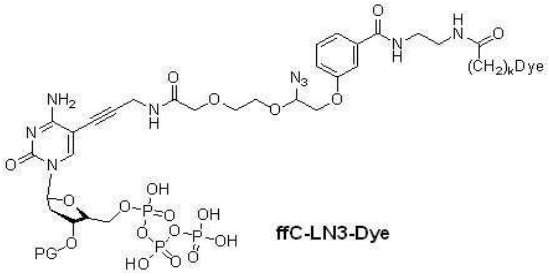
[0170] 

[0171] 

[0172] 

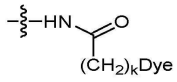
[0173] 

,

[0174] 

,

[0175] 식에서, PG 가닥은 본원에 기재된 3' OH 차단기를 나타내고; p는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10의 정수이고; k는 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5이다. 일 구현예에서, -O-PG는 AOM이다. 다른 구현예에서, -O-PG는 -O-아지도메틸이다. 다른 구현예에서, k는 5이다. 일부 추가 구현예에서, p는 1, 2 또는 3이고; k는 5이다.

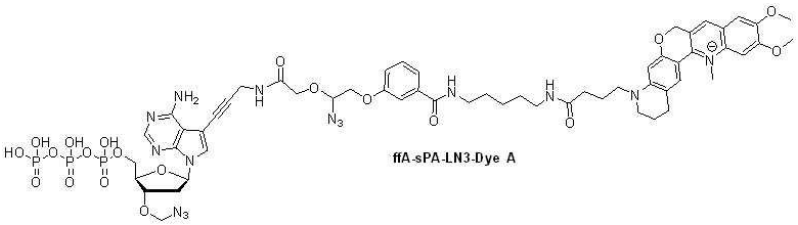

는 링커 모이어티의 아미노 기와 Dye의 카르복실 기 사이의 반응의 결과로서 Dye와 절단성 링커의 연결점을 지칭한다. 본 명세서에 기재된 표지된 뉴클레오티드의 임의의 구현예에서, 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 트리포스페이트이다.

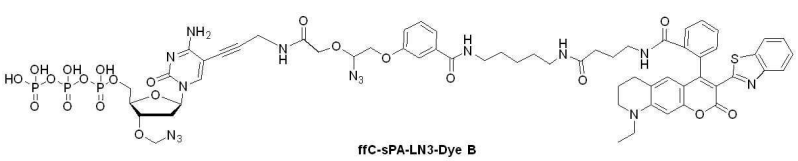
[0176] 실시예

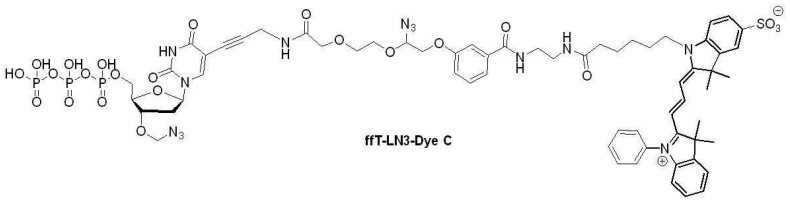
[0177] 추가의 실시 형태가 하기의 실시예에서 더 상세히 개시되며, 이러한 실시예는 결코 본 발명의 범주를 제한하고자 의도되지 않는다.

[0178] <u>실시예 1. 일루미나 iSeq™ 100 기기에 대한 서열분석 실험</u>

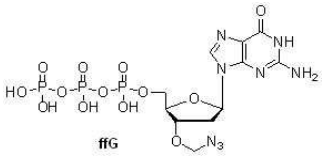
[0179] 본 실시예에서, 본원에 기재된 2-채널 여기 및 1-채널 검출 서열분석 방법은, 녹색 여기 광(~520 nm)을 이용한 제1 이미지 및 청색 여기 광(~450 nm)을 이용한 제2 이미지를 취하도록 설정된 일루미나 iSeq™ 100 기기에 사용되었다. 서열분석 레시피는 1 x 300 사이클 동안 표준 SBS 사이클(혼입, 이어서 이미징, 뒤이어 절단)을 수행하기 위해 변형되었다. 혼입 혼합물은 다음의 4개의 ffN을 포함한다: 520 nm의 녹색 광 및 450 nm의 청색 광으로 여기가능한 크로멘퀴놀린 염료 A로 표지된 ffA, 450 nm의 청색 광으로 여기가능한 쿠마린 염료 B로 표지된 ffC, 녹색 광으로 여기가능한 폴리메틴 염료 C로 표지된 ffT, 50 mM 에탄올아민 완충액(pH 9.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% CHAPS, 4 mM $MgSO_4$, 및 DNA 중합효소) 중 미표지 ffG(어두운 dGTP). ffC, ffA, ffT 및 ffG의 구조는 하기에 예시된다:

[0180] 

[0181] 



[0182]



[0183]

[0184] **도 4**는 사이클 26에서의 혼입 혼합에 대해 얻어진 산포도를 나타낸다. 산포도는 클라우드의 양호한 분리 및 ffN 세트의 유용성을 나타내었다.

[0185] 다음으로, 일루미나 iSeq™ 100 기기 상에서 실행된 2 x 300 사이클에서 동일한 ffN 세트를 사용하였다. 기기를 녹색 여기 광을 이용한 제1 이미지와 청색 여기 광을 이용한 제2 이미지를 취하도록 설정하고, 레시피를 2 x 300 사이클 동안 표준 SBS 사이클(혼입, 이어서 이미징, 뒤이어 절단)을 수행하기 위해 변형시켰다. 서열분석 메트릭은 하기 표 1에 요약되어 있다. 표준 iSeq™ 100 시약을 사용하여 수득된 것과 비교하여 위상화 및 전위상화 값이 개선되는 것으로 관찰되었다. 또한, 이러한 ffN 세트의 경우, 서열분석 레시피는 표준 iSeq™ 100 레시피와 비교하여 세척 완충액 및 스캐닝 완충액을 절반 부피만 사용한다. 이러한 특징은 낮은 오류율 및 높은 %Q30 값과 대략 28시간의 총 실행 시간을 갖는 2 x 300 사이클의 연장된 판독 길이를 달성할 수 있다.

[0186] [표 1]

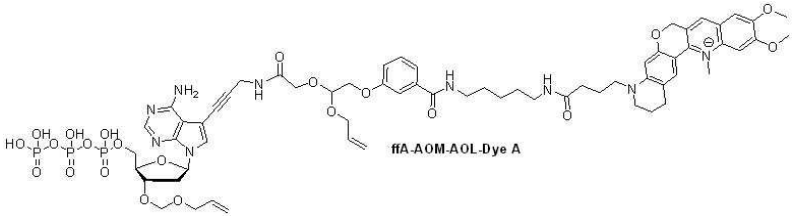
iSeq™ 100 서열분석 메트릭(2 x 300 사이클)

	위상화	전위상화	오류율 (%)	**%Q30**	%Q30 (지난 10 사이클)
판독 1	0.111	0.129	0.81	91.49	72.75
판독 2	0.11	0.141	1.01	85.57	55.56

[0187]

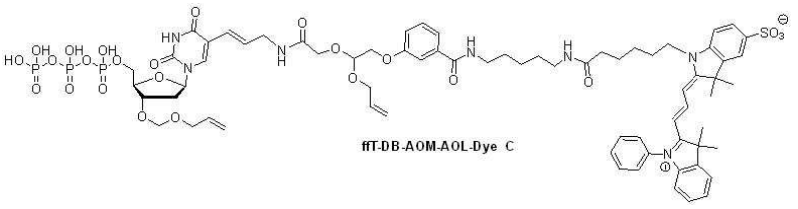
[0188] 실시예 2. 일루미나 iSeq™ 100 기기에 대한 서열분석 실험

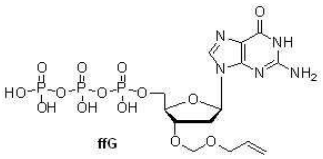
[0189] 본 실시예에서, 본원에 기재된 2-채널 여기 및 1-채널 검출 서열분석 방법은 녹색 여기 광(~520 nm)을 이용한 제1 이미지 및 청색 여기 광(~450 nm)을 이용한 제2 이미지를 취하도록 설정된 일루미나 iSeq™ 100 기기 상에서 사용되었다. 표준 서열분석 레시피를 사용하여 SBS 사이클(혼입, 이어서 이미징, 뒤이어 절단)을 2 x 300 사이클 동안 수행하였다. 혼입 혼합물은 다음의 4개의 ffN을 포함한다: 520 nm의 녹색 광 및 450 nm의 청색 광 둘 다를 이용하여 여기가능한 크로멘퀴놀린 염료 A로 표지된 ffA, 450 nm의 청색 광으로 여기가능한 쿠마린 염료 B로 표지된 ffC, 녹색 광으로 여기가능한 폴리메틴 염료 C로 표지된 ffT, 50 mM 글리신 완충액(pH 9.8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2% CHAPS, 4 mM $MgSO_4$, 및 DNA 중합효소) 중 미표지 ffG(어두운 dGTP). 이들 실험에 사용된 절단 용액은 100 mM 디에틸에탄올아민 완충액(pH 9.5, 100 mM 트리스(하이드록시프로필)포스핀, 10 mM $[알릴PdCl]_2$, 10 mM 아스코르브산 나트륨, 1 M NaCl, 0.1% Tween20)을 함유하였다. ffC, ffA, ffT 및 ffG의 구조는 하기에 예시된다:



[0190]

[0191] 

[0192] 

[0193] 

[0194] 표 2는 본 실시예에 기재된 ffN 세트를 사용하여 일루미나 iSeq™ 100 기기 상 2 x 150 사이클 실행 및 2 x 300 사이클 실행의 사이클 시간, 위상화, 전위상화, PhiX 오류율 및 %Q30 메트릭을 보여준다. 이러한 ffN 세트를 사용하여, 양호한 서열분석 매트릭스를 유지하면서 표준 iSeq™ 카트리지 및 레시피(대략 141초)와 비교하여 2×150 실행의 사이클 시간을 대략 2배 감소인 60초로 감소시키는 것이 가능하였다는 것이 관찰되었다. 또한, 이러한 ffN 세트를 갖는 서열분석 레시피는 표준 iSeq™ 100 레시피(1-Ex 화학)와 비교하여 세척 완충액 및 스캐닝 완충액을 절반의 부피만 사용한다. 이러한 특징은 표준 iSeq™ 카트리지를 사용하여 표준 iSeq™ 100 레시피에서 사용된 것과 필적하는 사이클 시간을 사용하여 낮은 오류율 및 높은 %Q30 값으로 2 x 300 사이클의 연장된 판독 길이를 달성하는 것을 가능하게 하였다. iSeq™ 100 상에서 이러한 ffN 세트를 사용한 전체 2 x 300 사이클 실행의 총 시간은 약 28시간이었고, 이는 표준 시약 및 레시피를 사용하여 일루미나 MiSeq® 상에서 수행된 2 x 300 사이클(대략 56시간)에 비교하여 2배 감소이다.

[0195] [표 2]

iSeq™ 100 서열분석 메트릭(2 x 150 및 2 x 300 사이클)

	사이클의 수	사이클 시간 (s)	위상화	전위상화	오류율 (%)	%Q30
판독 1	150	60	0.156	0.059	0.53	92.84
판독 2	150	60	0.197	0.07	0.53	91.16
판독 1	300	138	0.128	0.064	0.74	93.05
판독 2	300	138	0.142	0.053	0.65	90.9

[0196]

[0197] 표 3은 본 실시예에 기재된 ffN 세트를 사용하여 일루미나 iSeq™ 100 기기 상에서 실행되는 2 x 150 사이클의 사이클 시간, 위상화, 전위상화, PhiX 오류율, 및 %Q30 메트릭을 보여주며, 여기서 플로우셀 픽셀 크기는 1.75 μm에서 1 μm까지 감소되었다. 플로우셀 픽셀 크기의 변화는 더 양호한 신호를 위해 더 작은 피치 및 더 짧은 광 파이프를 초래하지만, 낮은 신호, 높은 배경 잡음 및 높은 크로스토크의 잠재적인 우려를 또한 갖는다. 서열분석 메트릭은 1 μm 플로우셀에 대해 전체적으로 매우 양호한 품질을 가졌고, 1.75 μm 플로우셀로부터 얻은 것들과 비슷한 것으로 관찰되었다.

[0198] [표 3]

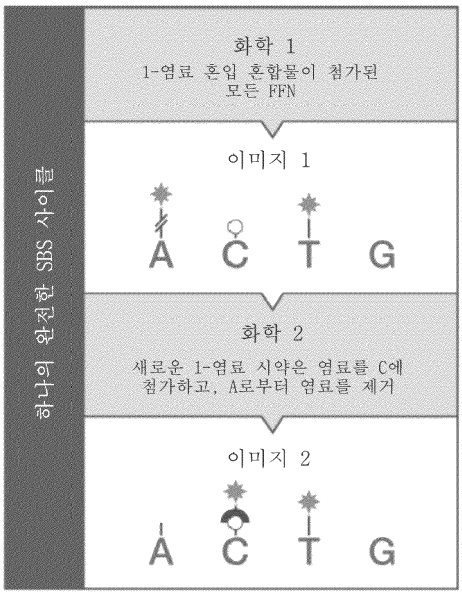
1 μm 플로우셀 상의 iSeq™ 100 서열분석 메트릭(2 x 150 사이클)

판독	사이클 시간	위상화	전위상화	% Q30	오류율 (%)
판독 1	31s	0.178	0.082	96.61	0.33 ± 0.52
판독 2		0.273	0.041	93.73	0.67 ± 0.92

[0199]

도면

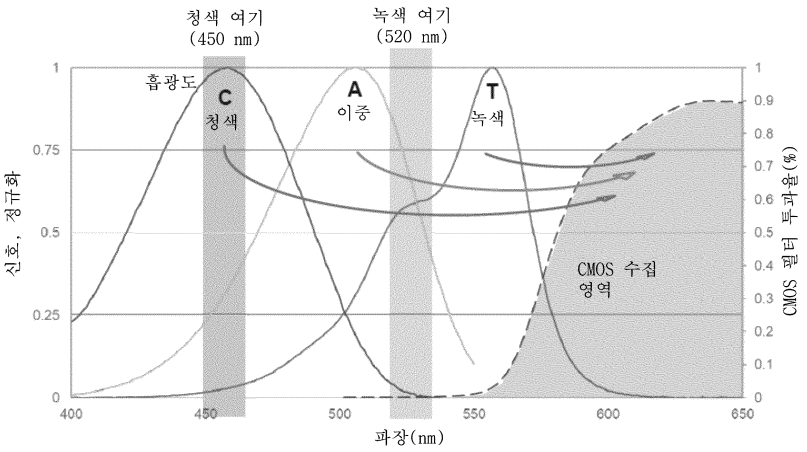
도면1a



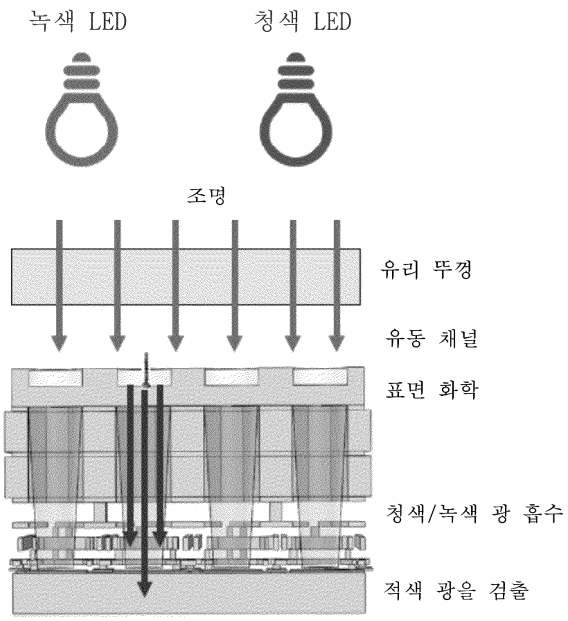
도면1b

이미지 1	이미지 2	결과
온	오프	A
오프	온	C
온	온	T
오프	오프	G

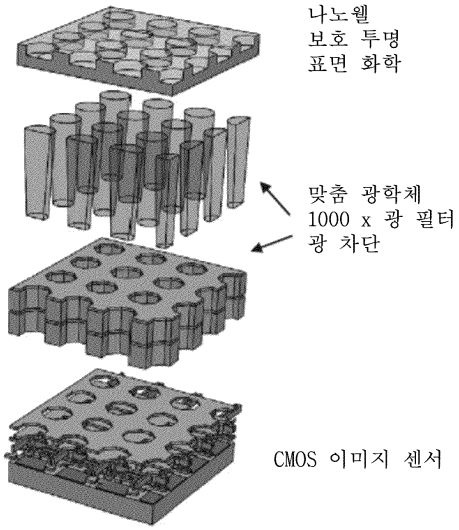
도면2



도면3a


녹색 LED
청색 LED
조명
유리 뚜껑
유동 채널
표면 화학
청색/녹색 광 흡수
적색 광을 검출

도면3b


나노웰
보호 투명
표면 화학
맞춤 광학체
1000 x 광 필터
광 차단
CMOS 이미지 센서

도면4

