



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0040758
(43) 공개일자 2025년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1093 (2013.01)
C12N 15/1031 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7008617(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년06월12일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2024-7002263
원출원일자(국제) 2018년06월12일
심사청구일자 2024년01월24일
(85) 번역문제출일자 2025년03월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/037161
(87) 국제공개번호 WO 2018/231872
국제공개일자 2018년12월20일
(30) 우선권주장
62/518,496 2017년06월12일 미국(US)
62/663,089 2018년04월26일 미국(US)

(71) 출원인
트위스트 바이오사이언스 코포레이션
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
게이트웨이 불러바드 681
(72) 발명자
뉴전트 레베카
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 미션 베이
불러바드 사우스 455 스위트 545
천 쓰위엔
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 미션 베이
불러바드 사우스 455 스위트 545
(74) 대리인
김진희, 김태홍

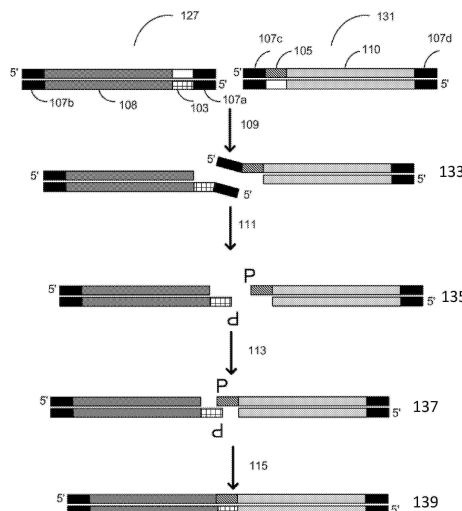
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 심리스 핵산 어셈블리를 위한 방법

(57) 요약

본 출원에서 심리스 핵산 어셈블리(seamless nucleic acid assembly)를 위한 방법, 시스템, 및 조성물이 제공된다. 본 출원에서 제공된 바와 같은 방법, 시스템, 및 조성물은 프라이머 제거 없는 핵산의 효율적인 어셈블리를 제공한다. 심리스 핵산 어셈블리를 위한 방법, 시스템, 및 조성물은 경우에 따라 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 어셈블링하기 위한 추가의 효소와 함께 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제를 사용하는 것을 포함한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 9/1252 (2013.01)

C12N 9/93 (2013.01)

C12P 19/34 (2013.01)

C12Q 1/6811 (2018.05)

C12Y 207/07007 (2013.01)

C12Y 301/11002 (2013.01)

(72) 발명자

리 엘리안

미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 미션 베이
불러바드 사우스 455 스위트 545

레이나드 나단

미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 미션 베이
불러바드 사우스 455 스위트 545

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계;
 (b) 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및
 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산을 핵산 브릿지, 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제 및 폴리머라제를 포함하는 반응 혼합물과 혼합하는 단계를 포함하는 핵산 어셈블리를 위한 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 핵산 브릿지는 제1 상동 서열 및 제2 상동 서열을 포함하고, 제1 상동 서열은 제1 이중 가닥 핵산의 일부분과 상동성이고, 제2 상동 서열은 제2 이중 가닥 핵산의 일부분과 상동성인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 제1 상동 서열은 길이가 50개 이하의 염기쌍인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 제2 상동 서열은 길이가 약 40개 내지 약 50개의 염기쌍인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 핵산 브릿지는 제1 유니버설 프라이머 결합 서열 및 제2 유니버설 프라이머 결합 서열을 더 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 제1 상동 서열, 제2 상동 서열, 또는 둘 다는 제1 유니버설 프라이머 결합 서열 및 제2 유니버설 프라이머 결합 서열 사이에 위치하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 핵산 브릿지가 이중 가닥인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 플랩 엔도뉴클레아제인 방법.

청구항 9

- (a) 5'→순서로, 제1 5' 측면 어댑터 서열, 제1 상동 서열, 및 제1 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계;
 (b) 5'→순서로, 제2 5' 측면 어댑터 서열, 제2 상동 서열, 및 제2 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및
 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산을 3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소 및 폴리머라제를 포함하는 반응 혼합물과 혼합하는 단계

를 포함하는 핵산 어셈블리를 위한 방법으로서,

3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소는 제1 5' 측면 어댑터 서열, 제2 5' 측면 어댑터 서열, 제1 3' 측면 어댑터 서열, 제2 3' 측면 어댑터 서열 또는 이들의 조합을 제거하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 폴리머라아제가 5'→폴리머라아제 활성을 포함하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 반응 혼합물은 3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소를 약 0.1 U 내지 약 10 U의 농도로 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 반응 혼합물은 리가아제를 8.0 U 이하의 농도로 더 포함하는 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 제1 이중 가닥 핵산은 제1 상동 서열 및 제1 3' 측면 어댑터 서열 사이에 삽입 서열을 포함하는 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소는 엑소뉴클레아제 III인 방법.

청구항 15

하기를 포함하는 핵산 어셈블리를 위한 방법:

- (a) 프로세서에서, 핵산 서열 데이터를 수신하는 단계;
- (b) 프로세서에서, 핵산 서열 데이터에 기초하여, 핵산의 합성을 위한 지침을 생성하는 단계;
- (c) 프로세서로부터 합성 표면 및 수집 챔버를 포함하는 물질 침적 장치로 지침을 전송하는 단계; 및
- (d) 물질 침적 장치가 핵산을 합성하도록 유도하는 단계로서, 핵산의 합성은 하기를 포함하는 단계:

합성 표면 상에 복수의 폴리뉴클레오티드를 생성하는 단계;

합성 표면으로부터 복수의 폴리뉴클레오티드를 수집 챔버로 전달하는 단계; 및

복수의 폴리뉴클레오티드를 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제 및 폴리머라아제를 포함하는 반응 혼합물과 혼합하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 핵산을 합성하는 단계는 인접한 폴리뉴클레오티드 간의 상보적인 서열을 기반으로 순서대로 복수의 폴리뉴클레오티드를 어닐링하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 합성 표면은 합성을 위한 복수의 개별의 좌위(loci)를 포함하는 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 수집 챔버는 상부 표면 및 하부 표면을 포함할 수 있고, 복수의 폴리뉴클레오티드는 어셈블리 반응 동안 상부 표면 및 하부 표면 사이에 끼워지는 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 수집 챔버는 웰 또는 채널을 포함하고, 복수의 폴리뉴클레오티드는 핵산이 합성되는 동안 웰 또는 채널에 존재하는 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 엔도뉴클레아제가 플랩 엔도뉴클레아제인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 4월 26일에 출원된 미국 가출원 번호 62/663,089; 및 2017년 6월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 62/518,496을 우선권 주장의 기초로 하며, 이들 각각은 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된 것이다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 본 출원에 그 전체 내용이 참고로 인용된다. 2018년 6월 6일에 생성된 ASCII 사본은 그 명칭이 44854-746_601_SL.txt이며, 크기는 1,585 바이트이다.

배경 기술

[0005] 드 노보 핵산 합성은 기초 생물학 연구 및 생물공학 분야를 위한 강력한 도구이다. 소규모로 상대적으로 짧은 핵산 단편의 합성을 위한 다양한 방법이 공지되어 있지만, 이들 기법들은 확장성, 자동화, 속도, 정확도, 및 비용 문제를 안고 있다. 따라서, 심리스 핵산 어셈블리(seamless nucleic acid assembly)의 효율적인 방법에 대한 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0006] 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 복수의 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계; 및 (b) 복수의 폴리뉴클레오티드와 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 혼합하는 단계로서, 이때 복수의 폴리뉴클레오티드는 인접한 폴리뉴클레오티드 사이의 상보적인 서열에 기초한 전진적인 미리 결정된 순서(processive predetermined order)로 어닐링되는 단계를 포함한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 1.0 U 내지 약 2.0 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.2 U이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 4.0 U 내지 약 8.0 U 범위 내이다.

[0007] 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (c) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 제1 이중 가닥 핵산에 대한 제1 상동 서열, 제2 이중 가닥 핵산에 대한 제2 상동 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제3 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계로서, 제1 이중 가닥 핵산, 제2 이중 가닥 핵산, 및 제3 이중 가닥 핵산은 말단 영역에 비상동 서열을 포함하는 단계; 및 (d) 제1 이중 가닥 핵산, 제2 이중 가닥 핵산, 및 제3 이중 가닥 핵산과 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계

를 포함한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 양은 약 0.32 U 내지 약 4.8 U이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 양은 약 5.0 U 미만이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 상동 서열 또는 제2 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 상동 서열 및 제2 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 상동 서열 또는 제2 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 상동 서열 및 제2 상동 서열은 각각 독립적으로 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 상동 서열 또는 제2 상동 서열은 약 40개의 염기쌍이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 상동 서열 및 제2 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 1.0 U 내지 약 2.0 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 2 U의 양으로 존재한다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 0.2 U이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 4.0 U 내지 약 8.0 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산, 제2 이중 가닥 핵산, 또는 제3 이중 가닥 핵산 또는 이의 임의의 조합은 선형 단편이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 단계 (d) 후의 생성물은 선형 단편이다. 추가로, 본 출원에서 핵산 합성 및 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (d) 후의 생성물은 환형 단편이다.

[0008]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 양은 약 0.32 U 내지 약 4.8 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 양은 약 5.0 U 미만이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각

각 독립적으로 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 1.0 U 내지 약 2.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 2 U의 양으로 존재한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 0.2 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 4.0 U 내지 약 8.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산 또는 제2 이중 가닥 핵산은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 환형 단편이다.

[0009]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 약 30℃ 내지 약 60℃의 온도에서 혼합하는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 1.0 U 내지 약 2.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.2 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 4.0 U 내지 약 8.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산 또는 제2 이중 가닥 핵산은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵

산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 환형 단편이다.

- [0010] 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 플랩 엔도뉴클레아제로서, 5' 오버행을 생성하는 플랩 엔도뉴클레아제; 폴리머라아제; 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0011] 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 약 0.5 U 내지 약 1.0 U의 엑소뉴클레아제, 약 0.32 U 내지 약 4.8 U의 플랩 엔도뉴클레아제, 약 0.01 U 내지 약 2 U의 폴리머라아제, 및 최대 약 2.0 U의 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0012] 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 약 0.32 U 내지 약 4.8 U의 플랩 엔도뉴클레아제, 약 0.01 U 내지 약 2 U의 폴리머라아제, 및 최대 약 2.0 U의 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.
- [0013] 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 복수의 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계로서, 각각의 폴리뉴클레오티드는 복수의 폴리뉴클레오티드 중 다른 폴리뉴클레오티드에 서열 상동성을 갖는 말단 영역을 포함하지 않는 것인 단계; 및 (b) 복수의 폴리뉴클레오티드와 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 혼합하는 단계로서, 이때 복수의 폴리뉴클레오티드는 인접한 폴리뉴클레오티드 사이의 상보적 서열에 기초한 전진적인 미리 결정된 순서로 어닐링되는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다.
- [0014] 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (c) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 제1 이중 가닥 핵산에 대한 제1 상동 서열, 제2 이중 가닥 핵산에 대한 제2 상동 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제3 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계로서, 이때 제1 이중 가닥 핵산, 제2 이중 가닥 핵산, 및 제3 이중 가닥 핵산은 말단 영역에 비상동 서열을 포함하는 단계; 및 (d) 제1 이중 가닥 핵산, 제2 이중 가닥 핵산, 및 제3 이중 가닥 핵산과 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1은 약 5.0 U 미만의 농도로

제공된다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산, 제2 이중 가닥 핵산, 또는 제3 이중 가닥 핵산, 또는 이의 임의의 조합은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (d) 후의 생성물은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (d) 후의 생성물은 환형 단편이다.

[0015]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법에 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제공된 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 5.0 U 미만이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U 내지 약 0.2 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산 또는 제2 이중 가닥 핵

산 또는 이의 임의의 조합은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 환형 단편이다.

[0016]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 약 30℃ 내지 약 60℃의 온도에서 혼합하는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제 1의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결을 촉매 작용한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산 또는 제2 이중 가닥 핵산 또는 이의 임의의 조합은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 선형 단편이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 단계 (c) 후의 생성물은 환형 단편이다.

[0017]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 엔도뉴클레아제로서, 5' 오버행을 생성하는 엔도뉴클레아제; 폴리머라아제; 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.

[0018]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 약 0.5 U 내지 약 1.0 U의 엑소뉴클레아제, 약 0.32 U 내지 약 4.8 U의 엔도뉴클레아제, 약 0.01 U 내지 약 2 U의 폴리머라아제, 및 최대 약 2.0 U의 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.

[0019]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하

는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 약 0.32 U 내지 약 4.8 U의 엔도뉴클레아제, 약 0.01 U 내지 약 2 U의 폴리머라아제, 및 최대 약 2.0 U의 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계를 포함한다.

[0020]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; (b) 5'→3' 순서로 5' 측면 어댑터 서열, 상동 서열, 인서트 서열, 및 3' 측면 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 핵산을 제공하는 단계; 및 (c) 제1 이중 가닥 핵산 및 제2 이중 가닥 핵산과 3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물을 혼합하는 단계로서, 이때 3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소는 5' 측면 어댑터 서열 또는 3' 측면 어댑터 서열을 제거하는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 3' 또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 적어도 하나의 효소는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 40개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 10 내지 약 100개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 또는 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 제1 이중 가닥 핵산의 상동 서열 및 제2 이중 가닥 핵산의 상동 서열은 각각 독립적으로 약 20 내지 약 80개의 염기쌍이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U 범위 내이다.

[0021]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 (a) 적어도 10개의 상이한 단편을 제공하는 단계로서, 적어도 10개의 상이한 단편 각각은 적어도 10개의 상이한 단편 중 다른 단편에 서열 상동성을 갖는 말단 영역을 포함하지 않는 것인 단계; 및 (b) 적어도 10개의 상이한 단편과 복수의 효소를 혼합하는 단계로서, 복수의 효소는 엔도뉴클레아제, 엑소뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 핵산을 형성하기 위한 리가아제로부터 선택되는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 핵산은 벡터 서열에 부착된다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 핵산은 길이가 50 염기 내지 200 염기이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 핵산은 길이가 100 염기 내지 2000 염기이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다.

[0022]

본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 복수의 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계로서, 각각의 폴리뉴클레오티드는 복수의 폴리뉴클레오티드 중 다른 폴리뉴클레오티드에 서열 상동성을 갖는 말단 영역을 포함하지 않는 것인 단계; 및 (b) 복수의 폴리뉴클레오티드와 3'→5' 엑소뉴클레아제, 열안정성 엔도뉴클레아제, 고정확도(high fidelity) 폴리머라아제, 및 열안정성 리가아제를 혼합하는 단계로서, 복수의 폴리뉴클레오티드는 인접한 폴리뉴클레오티드 사이의 상보적 서열에 기초한 전진적인 미리 결정된 순서로 어닐링되는 단계를 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, XPG, Dna2, 또는 GEN1이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1은 약 0.32 U 내지 약 4.8 U 범위의 농도

로 제공된다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제는 적어도 2개의 핵산의 연결에 촉매작용을 한다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제 III의 농도는 약 0.1 U 내지 약 10 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U 내지 약 2 U이다. 또한, 본 출원에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 리가아제의 농도는 약 2.0 U 이하이다.

[0023] **참고 인용**

[0024] 본 명세서에 언급된 모든 문헌, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별적인 문헌, 특허, 또는 특허 출원이 참고 인용되는 것으로 구체적이고 개별적으로 언급되는 바와 같이 동일한 정도로 참고 인용된 것이다.

도면의 간단한 설명

[0025] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 보유하는 이러한 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 신청 및 필요한 비용의 납부에 의해 제공될 것이다.

도 1a는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 위한 모식도이다.

도 1b는 브릿지 어셈블리를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 위한 모식도이다.

도 2는 폴리뉴클레오티드 합성 및 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 위한 모식도이다.

도 3은 컴퓨터 시스템을 나타낸다.

도 4는 컴퓨터 시스템의 구조를 나타내는 블록 다이어그램이다.

도 5는 공유 가상 주소 메모리 공간을 이용하는 멀티프로세서 컴퓨터 시스템의 블록 다이어그램이다.

도 6은 복수의 컴퓨터 시스템, 복수의 휴대폰 및 개인 데이터 보조기기를 통합하도록 구성된 네트워크 및 네트워크 결합 스토리지(NAS)를 나타내는 다이어그램이다.

도 7은 x축 상의 뉴클레오티드 염기 및 y축 상의 형광 단위(FU)를 이용하는 바이오어널라이저 판독으로부터의 플롯이다.

도 8은 x축 상의 뉴클레오티드 염기 및 y축 상의 형광 단위를 이용하는 바이오어널라이저 판독으로부터의 플롯이다.

도 9는 ExoIII 및 FenI의 농도가 다양한 콜로니 형성 유닛(CFU)의 플롯이다.

도 10은 효소 농도가 다양한 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응의 정확한 어셈블리의 퍼센트 및 콜로니 형성 유닛(CFU)의 플롯이다.

도 11은 1.8 kb 어셈블리의 콜로니 형성 유닛(CFU)의 플롯이다.

도 12는 DNA의 2개의 단편을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 플롯이다.

도 13은 DNA의 다수의 단편을 이용하는 DNA 벡터 내로의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 수 개의 유전자(x축)에 대한 콜로니 형성 유닛(y축)의 플롯이다.

도 14a는 증가된 농도의 ExoIII 및 DNA의 다수의 단편을 이용하는 DNA 벡터 내로의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 수 개의 유전자(x축)에 대한 콜로니 형성 유닛(y축)의 플롯이다.

도 14b는 어셈블링된 유전자의 차세대 서열 분석의 플롯이다.

도 14c는 어셈블리 비율의 샘플의 플롯이다.

도 15a는 핵산 브릿지를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 평균 콜로니 형성 유닛(CFU)(y축)의 플롯이다.

도 15b는 핵산 브릿지를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 로그 스케일의 평균 콜로니 형성 유닛(CFU)(y축)의 플롯이다.

도 16a는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 단편을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 콜로니 형성 유닛(CFU, y축)의 플롯이다.

도 16b는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 단편을 이용하는 어셈블링된 유전자(x축) 및 시퀀싱된 집단 퍼센트(y축)의 차세대 서열 분석의 플롯이다.

도 16c는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 단편을 이용하는 유전자(x축)에 대한 통과 비율(pass rate)의 플롯이다.

도 17은 10분 및 30분 인큐베이션 시간을 이용하는 2개의 유전자에 대한 방법 2 및 방법 3을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 콜로니 형성 유닛(CFU, y축)의 플롯이다.

도 18a는 x축 상의 뉴클레오타이드 염기 및 y축 상의 형광 단위를 이용하는 바이오어널라이저 판독으로부터의 플롯이다.

도 18b는 x축 상의 인큐베이션 시간 및 y축 상의 형광 단위를 이용하는 바이오어널라이저 판독으로부터의 플롯이다.

도 19a-19b는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리, 비교기 1, 및 비교기 2 방법을 이용하는 상이한 수의 단편(x축)에 대한 콜로니 형성 유닛(y축)의 플롯이다.

도 20a-20b는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리, 비교기 1 어셈블리, 및 비교기 2 어셈블리에 대한 어셈블리 에러의 플롯이다.

도 20c는 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리, 비교기 1 어셈블리, 및 비교기 2 어셈블리(x축)를 비교하는 어셈블리의 총 카운트의 퍼센트의 플롯이다.

도 21a는 다양한 수의 인서트에 대한 어셈블링된 구조체 PCR 증폭 전 및 증폭 후의 플롯이다.

도 21b는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리, 비교기 1, 및 비교기 2 방법을 이용하는 상이한 수의 단편(x축)에 대한 어셈블리의 총 카운트(y축)의 퍼센트의 그래프이다.

도 21c는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 이용하는 집단의 CFU 퍼센트 및 NGS 결과의 플롯이다.

도 21d는 정확하게 어셈블링된 구조체 및 미어셈블링된 또는 부정확한 구조체의 분포 퍼센트의 플롯이다.

도 22a는 어셈블리 이전에 증폭된 올리고뉴클레오타이드 집단의 다양한 GC 카테고리(x축)와 비교된 5,400(y축)당 관찰된 빈도의 그래프이다.

도 22b는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리에 의해 어셈블링된 올리고뉴클레오타이드 집단의 다양한 GC 카테고리(x축)와 비교된 5,400(y축)당 관찰된 빈도의 그래프이다.

도 23은 다중화 유전자 어셈블리 반응의 결과인 유전자 레벨의 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본 명세서 전체적으로 수치적 특징은 범위의 형태로 나타낸다. 범위 형태의 기재는 단지 편의와 간략성을 위한 것이며, 임의의 예의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 따라서, 명백하게 달리 언급하지 않는다면, 범위 기재는 모든 가능한 부분범위뿐만 아니라, 하한의 소수점 이하 첫 번째 단위까지 그 범위 내의 개개의 수치 값을 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위 기재는 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 3 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 부분 범위뿐만 아니라, 그 범위 내의 개개의 값, 예를 들어 1.1, 2, 2.3, 5, 및 5.9를 구체적으로 개시하고 있는 것으로 간주되어야 한다. 이는 범위의 폭과는 관계없이 적용된다. 이들 사이에 오는 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 더 작은 범위 내에 포함될 수 있고, 또한 기재된 범위 내에서 구체적으로 배제된 한계치라는 것을 조건으로 본 발명 내에 포함된다. 기재된 범위가 상기 한계치 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 이들 중 하나 또는 둘 다를 배제하는 범위도 명백하게 달리 언급하지 않는다면, 본 발명 내에 포함된다.

본 출원에 사용된 용어는 단지 구체적인 실시양태를 기재하기 위한 목적으로 사용된 것이고, 임의의 실시양태를 제한하는 것은 아니다. 본 출원에 사용된 바와 같은 단수형 "a", "an" 및 "the"는 명백하게 달리 언급하지 않는

다면, 복수형도 포함하는 의도이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "포함하다" 및/또는 "포함하는"은 기재된 피처(features), 정수, 단계, 동작, 요소 및/또는 성분의 존재를 명시하지만, 하나 이상의 다른 피처, 정수, 단계, 동작, 요소, 성분, 및/또는 이의 군의 존재 또는 첨가를 배제하는 것은 아니다. 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"은 관련된 목록화된 항목의 하나 이상의 임의의 조합 및 모든 조합을 포함한다.

[0029] 구체적으로 명시하지 않거나, 또는 맥락으로부터 명백하지 않으면, 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "핵산"은 이중 또는 삼중 가닥 핵산뿐만 아니라 단일 가닥 분자를 포함한다. 이중 또는 삼중 가닥 핵산에서, 핵산 가닥은 동연(coextensive)일 필요는 없다(즉, 이중 가닥 핵산은 가닥 둘 다의 전체 길이를 따라 이중 가닥일 필요는 없다는 것이다). 제공되는 경우, 핵산 서열은 달리 언급하지 않으면 5'→3' 방향으로 기재된다. 본 출원에 기재된 방법은 단리된 핵산의 생성을 제공한다. 본 출원에 제공된 방법은 추가적으로 단리된 및 정제된 핵산의 생성을 제공한다. 본 출원에 언급된 바와 같이 "핵산"은 그 길이가 적어도 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000개 또는 그 초과의 염기를 포함할 수 있다. 더구나, 본 출원에서 임의의 수의 폴리펩티드-세그먼트 코딩 뉴클레오타이드 서열의 합성을 위한 방법이 제공되는데, 상기 서열은 비-리보솜 펩티드(NRP)를 코딩하는 서열, 비-리보솜 펩티드-신테타아제(NRPS) 모듈 및 합성 변이체, 다른 모듈 단백질의 폴리펩티드 세그먼트, 예를 들어 항체, 다른 단백질 패밀리에 유래의 폴리펩티드 세그먼트를 코딩하는 서열을 포함하고, 조절 서열, 예를 들어 프로모터, 전사 인자, 인핸서, siRNA, shRNA, RNAi, miRNA, 마이크로RNA로부터 유래한 소핵소체 RNA, 또는 관심 있는 임의의 기능적 또는 구조적 DNA 또는 RNA와 같은 비코딩 DNA 또는 RNA를 포함한다. 하기는 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 코딩 또는 비코딩 영역, 유전자간 DNA, 연결 분석으로부터 규정한 유전자좌(들), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 소핵소체 RNA, 리보자임, 통상적으로 메신저 RNA(mRNA)의 역전사에 의해 또는 증폭에 의해 얻어지는 mRNA의 DNA 표현형 상보적 DNA(cDNA); 합성적으로 또는 증폭에 의해 제조된 DNA 분자, 게놈 DNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머. 본 출원에 언급된 유전자 또는 유전자 단편을 코딩하는 cDNA는 게놈의 균등 서열 내에 개재성 인트론 서열이 없는 엑손 서열을 코딩하는 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다.

[0030] 본 명세서에 구체적으로 기재하거나 명시적으로 언급하지 않는다면, 본 출원에서 사용된 바와 같이 수치 또는 수치 범위에서의 용어 "약"은 언급된 수치 및 수치들 \pm 이의 10%, 또는 범위로 기재된 값에서 기재된 하한치의 10% 미만 및 기재된 상한치의 10% 초과를 의미하는 것으로 이해된다.

[0031] "유니버설 프라이머"로서 본 출원에서 언급된 예시적인 워크플로우에서 기재된 프라이머는 다수의 DNA 단편에 공통되는 프라이머 결합 위치를 인식하는 짧은 폴리뉴클레오타이드이다. 그러나, 이들 워크플로우는 유니버설 프라이머의 사용만으로 제한되는 것은 아니고, 단편 특이적인 프라이머가 추가로 또는 대안적으로 혼입될 수 있다. 또한, 본 출원에 기재된 예시적인 워크플로우가 유전자 단편의 어셈블리를 의미하는 반면, 이들은 그렇게 제한되지 않으며, 일반적으로 더 긴 핵산의 어셈블리에 적용될 수 있다.

[0032] 심리스 핵산 어셈블리

[0033] 본 출원에서 증가된 효율과 정확성을 보유하는 핵산의 어셈블리를 위한 방법이 제공된다. 또한, 본 출원에서 긴 유전자로의 핵산의 어셈블리의 방법이 제공된다. 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오타이드는 경우에 따라 추가의 효소와 함께 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제를 포함하는 어셈블리 방법에 의해 더 긴 핵산으로 어셈블링된다.

[0034] 플랩 엔도뉴클레아제를 이용하는 핵산의 어셈블리를 위한 예시적인 프로세스는 도 1a에 도시되어 있다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 제1 유전자 단편(127) 및 제2 유전자 단편(131)을 이용하여 수행된다. 제1 유전자 단편(127)의 하부 가닥은 5'으로부터 3'으로 제1 유니버설 프라이머 결합 서열(107a), 상동 서열(103), 인서트 서열(108), 및 제2 유니버설 프라이머 서열(107b)을 포함하도록 디자인된다. 제2 유전자 단편(131)의 상부 가닥은 5'으로부터 3'으로 제1 유니버설 프라이머 결합 서열(107c), 상동 서열(105), 인서트 서열(110), 및 제2 유니버설 프라이머 서열(107d)을 포함하도록 디자인된다. 제1 유전자 단편(127) 및 제2 유전자 단편(131)은 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물과 접촉된다. 엑소뉴클레아제는 상동 부위를 노출시키기 위해 3' 말단을 분해하여 단편(133)을 생성한다(109). 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 플랩 엔도뉴클레아제는 5' 플랩을 절단하여 단편(135)을 생성한다(111). 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN-1)이다. 폴리머라아제는 갭을 충전하고

(113), 닉을 남겨 단편(137)을 생성한다. 이어서, 리가아제는 닉을 봉인하여 단편(139)을 생성한다(115).

[0035]

플랩 엔도뉴클레아제 및 브릿지 어셈블리 방법을 이용하는 핵산의 어셈블리를 위한 예시적인 프로세스는 도 1b에 도시되어 있다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 이중 가닥 핵산 브릿지(151), 제1 유전자 단편(155), 및 제2 유전자 단편(157)을 이용하여 수행된다. 이중 가닥 핵산 브릿지(151)는 제1 유니버설 프라이머 결합 서열(153a), 제1 유전자 단편(155)에 상동성인 제1 상동 서열(155a), 제2 유전자 단편(157)에 상동성인 제2 상동 서열(157a), 및 제2 유니버설 프라이머 서열(153b)을 포함한다. 이중 가닥 핵산 브릿지(151), 제1 유전자 단편(155), 및 제2 유전자 단편(157)은 엑소뉴클레아제, 플랩 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함하는 반응 혼합물과 접촉된다. 엑소뉴클레아제는 상동 부위를 노출시키기 위해 3' 말단을 분해하여 단편(169)을 생성한다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III이다. 폴리머라아제는 갭을 충전하고 닉을 남겨 단편(171)을 생성한다(161). 플랩 엔도뉴클레아제는 5' 플랩을 절단하여 단편(173)을 생성한다(165). 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN-1)이다. 이어서, 리가아제는 닉을 봉인하여 단편(175)을 생성한다(167). 몇몇 경우에서, 리가아제는 앰플리가아제이다.

[0036]

본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공된다. 몇몇 경우에서, 효소 매개 핵산 어셈블리는 유전자 단편에 대한 상동 서열의 추가를 포함한다. 몇몇 경우에서, 드 노보 합성된 유전자 단편은 이미 상동 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 매개 핵산 어셈블리는 효소 혼합물의 사용을 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 엔도뉴클레아제를 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 경우에 따라 엑소뉴클레아제, 폴리머라아제, 또는 리가아제를 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 엔도뉴클레아제, 폴리머라아제, 및 리가아제를 포함한다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 몇몇 경우에서, 효소 매개 핵산 어셈블리는 개선된 효율을 나타낸다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 제한 효소가 아닌 효소를 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 구조 특이적인 효소인 효소를 포함한다. 몇몇 경우에서, 효소 혼합물은 구조 특이적인 효소이지만, 서열 특이적인 효소는 아닌 효소를 포함한다.

[0037]

본 출원에서 방법이 제공되는데, 이때 하나 이상의 효소를 포함하는 위치 특이적 염기 제거 시약이 절단 위치에서 이중 가닥 DNA의 단일 가닥만을 절단하는 절단제로서 사용된다. 다수의 수복 효소는 단독으로 적합하거나, 또는 그러한 닉을 생성하는 다른 제제와 함께 사용된다. 수복 효소의 예시적인 목록은 표 1에 제공되어 있다. 또한, 표 1에 기재된 것들을 포함하는, 수복 효소의 동족체 또는 비천연 변이체도 다양한 실시양태에 따라 사용될 수 있다. 본 출원에 기재된 방법 및 조성물에 따라 사용하기 위한 임의의 수복 효소는 자연 발생하거나, 재조합이거나, 또는 합성일 수 있다. 몇몇 경우에서, DNA 수복 효소는 천연이거나, 또는 하나 이상의 활성을 가진 시험관 내에서 생성된 키메라 단백질이다. 다양한 실시양태에서, 절단제는 염기 제거 수복에 관련된 리아제, 니킹 엔도뉴클레아제, AP 엔도뉴클레아제, 및 글리코실라아제 중 하나 이상을 포함하는 효소 혼합물을 포함하는 효소 활성을 포함한다.

[0038]

수복 효소는 원핵세포 및 진핵세포에서 발견된다. 본 출원에서의 이용 가능성을 보유하는 몇몇 효소는 한 분자 내에 글리코실라아제 및 AP 엔도뉴클레아제 활성을 갖는다. AP 엔도뉴클레아제는 그들의 절개 부위에 따라 분류된다. 클래스 I AP 엔도뉴클레아제 및 클래스 II AP 엔도뉴클레아제는 3' 및 5'에서 염기가 존재하지 않는 위치로 포스페이트 기에서 DNA를 절단하여 3'-OH 및 5'-포스페이트 말단을 남긴다. 또한, 클래스 III 및 클래스 IV AP 엔도뉴클레아제도 3' 및 5'에서 염기가 존재하지 않는 위치로 포스페이트 기에서 DNA를 절단하지만, 3'-포스페이트 및 5'-OH를 생성한다. 사용된 폴리뉴클레오티드 절단 효소의 예는 표 1에 기재되어 있다.

표 1

DNA 수복 효소

유전자 명칭	활성	등록 번호
UNG	우라실-DNA 글리코실라아제	NM_080911
SMUG1	우라실-DNA 글리코실라아제	NM_014311
MBD4	CpG 서열에서 G에 대항하는 U 또는 T 제거	NM_003925
TDG	G에 대항하는 U, T 또는 에테노 C 제거	NM_003211
OGG1	C에 대항하는 8-옥소 G 제거	NM_016821
MUTYH (MYH)	8-옥소 G에 대항하는 A 제거	NM_012222
NTHL1 (NTH1)	고리 포화 또는 단편화된 피리미딘 제거	NM_002528
MPG	3-meA, 에타노 A, 하이포잔틴 제거	NM_002434
NEIL1	티민 글리콜 제거	NM_024608
NEIL2	피리미딘의 산화적 생성물 제거	NM_145043
XPC	RAD23B, CETN2와의 복합체로서 손상된 DNA 결합	NM_004628
RAD23B (HR23B)	XPC, CETN2와의 복합체로서 손상된 DNA 결합	NM_002874
CETN2	XPC, RAD23B와의 복합체로서 손상된 DNA 결합	NM_004344
RAD23A (HR23A)	HR23B 치환	NM_005053
XPA	예비절개 복합체로 손상된 DNA 결합	NM_000380
RPA1	예비절개 복합체로 DNA 결합	NM_002945
RPA2	예비절개 복합체로 DNA 결합	NM_002946
RPA3	예비절개 복합체로 DNA 결합	NM_002947
ERCC5 (XPG)	3' 절개	NM_000123
ERCC1	5' 절개 서브유닛	NM_001983
ERCC4 (XPF)	5' 절개 서브유닛	NM_005236
LIG1	DNA 연결	NM_000234
CKN1(CSA)	코카인 증후군, 전사 커플링된 NER을 위해 필요함	NM_000082

[0039]

ERCC6 (CSB)	코카인 증후군; 전사 커플링된 NER 을 위해 필요함	NM_000124
XAB2 (HCNP)	코카인 증후군; 전사 커플링된 NER 을 위해 필요함	NM_020196
DDB1	XP 그룹 E 에 결함이 있는 복합체	NM_001923
DDB2	DDB1, DDB2	NM_000107
MMS19L (MMS19)	전사 및 NER	NM_022362
FEN1 (DNase IV)	플랩 엔도뉴클레아제	NM_004111
SPO11	엔도뉴클레아제	NM_012444
FLJ35220 (ENDOV)	하이포잔틴 및 우라실의 3' 절개	NM_173627
FANCA	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_000135
FANCB	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_152633
FANCC	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_000136
FANCD2	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_033084
FANCE	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_021922
FANCF	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_022725
FANCG (XRCC9)	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_004629
FANCL	DNA 가교의 용인 또는 수복에 관련됨	NM_018062
DCLRE1A (SNM1)	DNA 가교 수복	NM_014881
DCLRE1B (SNM1B)	SNM1 에 관련됨	NM_022836
NEIL3	NEIL1 및 NEIL2 모사	NM_018248
ATRIP (TREX1)	TREX1/ATRIP 유전자의 ATR 상호작용 단백질 5' 대안적인 ORF	NM_130384
NTH	손상된 피리미딘 제거	NP_416150.1
NEI	손상된 피리미딘 제거	NP_415242.1
NFI	데옥시이노신 3' 엔도뉴클레아제	NP_418426.1
MUTM	포름아미도피리미딘 DNA 글리코실라아제	NP_418092.1
UNG	우라실-DNA 글리코실라아제	NP_417075.1
UVRA	DNA 절제 수복 효소 복합체	NP_418482.1
UVRB	DNA 절제 수복 효소 복합체	NP_415300.1
UVC	DNA 절제 수복 효소 복합체	NP_416423.3
DENV	피리미딘 이량체 글리코실라아제	NP_049733.1

[0040]

[0041]

본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 어셈블리를 위한 유전자 단편 또는 유전자는 상동 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 상동 서열은 적어도 또는 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개, 또는 100개 초과 염기쌍을 포함한다. 몇몇 경우에서, 염기쌍의 수는 40개의 염기쌍이다. 몇몇 경우에서, 염기쌍의 수는 약 5 내지 100, 10 내지 90, 20 내지 80, 30 내지 70, 또는 40 내지 60개의 염기쌍의 범위를 갖는다.

[0042]

본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 어셈블리를 위한 유전자 단편 또는 유전자는 상동 서열을 포함하지 않는다. 몇몇 경우에서, 상동 서열을 보유하지 않는 드 노보 합성된 유전자 단편의 효소 매개 핵산 어셈블리는 핵산 브릿지를 이용하는 어셈블리를 포함한다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 DNA 또는 RNA를 포함한다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 DNA를 포함한다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 이중 가닥이다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 단일 가닥이다.

[0043]

본 출원에서 핵산 브릿지를 이용하는 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 핵산 브릿지는 하나 이상의 유니버설 프라이머 결합 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 적어도 또는 약 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8개, 또는 8개 초과인 유니버설 프라이머 결합 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 상동 서열을 추가로 포함한다. 몇몇 경우에서, 상동 서열은 드 노보 합성된 유전자 단편에 대해 상동성적이다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 하나 이상의 상동 서열을 추가로 포함한다. 예를 들어, 핵산 브릿지는 상이한 드 노보 합성된 유전자 단편에 상동성인 하나 이상의 상동 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 핵산 브릿지는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 10개 초과인 상동 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 상동 서열은 적어도 또는 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개, 또는 100개 초과인 염기쌍을 포함한다. 몇몇 경우에서, 염기쌍의 수는 40개의 염기쌍이다. 몇몇 경우에서, 염기쌍의 수는 50개의 염기쌍이다. 몇몇 경우에서, 염기쌍의 수는 약 5 내지 100, 10 내지 90, 20 내지 80, 30 내지 70, 또는 40 내지 60개의 염기쌍의 범위를 갖는다.

[0044] 본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 이중 가닥 핵산은 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 효소와 접촉된다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 3' 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 3' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 예시적인 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 I, 엑소뉴클레아제 III, 엑소뉴클레아제 V, 엑소뉴클레아제 VII, 및 엑소뉴클레아제 T를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 예시적인 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 II, 엑소뉴클레아제 IV, 엑소뉴클레아제 V, 엑소뉴클레아제 VI, 엑소뉴클레아제 VII, 엑소뉴클레아제 VIII, T5 엑소뉴클레아제, 및 T7 엑소뉴클레아제를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 III(ExoIII)이다. 엑소뉴클레아제는 야생형 엑소뉴클레아제 및 이의 유도체, 키메라, 및/또는 돌연변이체를 포함한다. 돌연변이 엑소뉴클레아제는 하나 이상의 돌연변이, 삽입, 결실 또는 이의 임의의 조합을 엑소뉴클레아제의 아미노산 또는 핵산 서열 내에 포함하는 효소를 포함한다.

[0045] 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 효소 활성을 위한 최적 온도, 예를 들어 약 25-80°C, 25-70°C, 25-60°C, 25-50°C, 또는 25-40°C 범위의 온도에서 사용된다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 37°C이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 50°C이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 55°C이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 65°C이다. 몇몇 경우에서, 온도는 적어도 또는 약 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 또는 80°C 초과이다.

[0046] 몇몇 경우에서, 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 엑소뉴클레아제를 사용하는 것을 포함하지 않는다. 몇몇 경우에서, 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 엑소뉴클레아제를 사용하는 것을 포함한다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 엑소뉴클레아제가 사용된다. 예를 들어, 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 6개 초과인 엑소뉴클레아제가 사용된다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제 5'→3' 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, 방법은 이중 가닥 DNA와 엔도뉴클레아제를 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 몇몇 경우에서, 방법은 이중 가닥 DNA와 플랩 엔도뉴클레아제, 리가아제, 또는 폴리머라아제를 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1이다.

[0047] 본 출원에서 방법이 제공되는데, 이때 이중 가닥 핵산은 엔도뉴클레아제 활성을 포함하는 효소로 처리된다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 5' 뉴클레아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 3' 뉴클레아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 5' 뉴클레아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 5'-뉴클레아제 효소 패밀리의 구성원이다. 예시적인 5'-뉴클레아제 효소는 플랩 엔도뉴클레아제 1, 엑소뉴클레아제 1, 색소성 건피증 상보성 그룹 G(XPG), Dna2, 및 겐 엔도뉴클레아제 1(GEN1)을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제 1이다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 3' 뉴클레아제 활성을 포함한다. 3' 뉴클레아제 활성을 보유하는 예시적인 플랩 엔도뉴클레아제는 RAG1, RAG2, 및 MUS81을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 고세균, 박테리아, 효모, 식물, 또는 포유류 플랩 엔도뉴클레아제이다. 예시적인 5'-뉴클레아제 및 3' 뉴클레아제 효소는 표 2에 나타난다.

표 2

예시적인 뉴클레아제 효소

명칭	종	단백질 등록 번호
플랩 엔도뉴클레아제 1	호모 사피엔스(<i>Homo sapiens</i>)	NP_004102.1
플랩 엔도뉴클레아제 1	머스 머스컬러스(<i>Mus musculus</i>)	NP_001258544.1
플랩 엔도뉴클레아제 1	파이로코커스 푸리오시스(<i>Pyrococcus furiosus</i>)	O93634
엑소뉴클레아제 1	호모 사피엔스	AAH07491.1
XPG	호모 사피엔스	EAX09071.1
Dna2	호모 사피엔스	NP_001073918.2
GEN1	호모 사피엔스	NP_001123481.2
RAG1	호모 사피엔스	AAH37344.1 GI
RAG2	호모 사피엔스	NP_001230715.
MUS81	호모 사피엔스	Q96NY9.3

[0048]

[0049]

몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 효소 활성을 위한 최적 온도, 예를 들어 25-80℃, 25-70℃, 25-60℃, 25-50℃, 또는 25-40℃의 온도에서 사용된다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 50℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 55℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 65℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 적어도 또는 약 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 또는 80℃ 초과이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 열안정성 엔도뉴클레아제이다. 열안정성 엔도뉴클레아제는 적어도 또는 약 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 또는 80℃ 초과 온도에서 기능성인 엔도뉴클레아제를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 몇몇 경우에서, 플랩 엔도뉴클레아제는 열안정성 플랩 엔도뉴클레아제이다.

[0050]

본 발명에서 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엔도뉴클레아제 대 엑소뉴클레아제의 비율은 약 0.1:1 내지 약 1:5이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제 대 엑소뉴클레아제의 비율은 적어도 또는 약 0.2:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 또는 1:5 초과이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제 대 엑소뉴클레아제의 비율은 적어도 또는 약 1:1, 1:0.9, 1:0.85, 1:0.8, 1:0.75, 1:0.7, 1:0.65, 1:0.6, 1:0.55, 1:0.5, 1:0.45, 1:0.4, 1:0.35, 1:0.3, 1:0.25, 1:0.2, 1:0.15, 1:0.1, 또는 1:0.1 미만이다.

[0051]

본 출원에서 엑소뉴클레아제를 포함하는 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 엑소뉴클레아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 20 U 이상이다. 예를 들어, 엑소뉴클레아제의 농도는 적어도 또는 약 0.1 U, 0.25 U, 0.5 U, 0.75 U, 1 U, 1.6 U, 2 U, 3 U, 4 U, 5 U, 6 U, 7 U, 8 U, 9 U, 10 U, 12 U, 14 U, 16 U, 18 U, 20 U, 또는 20 U 초과이다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제의 농도는 약 0.5 U 내지 약 1.0 U 범위 내이다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제의 농도는 약 1.0 U 내지 약 2.0 U이다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제의 농도는 약 1.6 U이다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제의 농도는 약 5.0 U이다. 몇몇 경우에서, 엑소뉴클레아제의 농도는 약 0.1 U 내지 20 U, 0.25 U 내지 18 U, 0.5 U 내지 16 U, 0.75 U 내지 14 U, 1 U 내지 12 U, 2 U 내지 10 U, 3 U 내지 9 U, 또는 4 U 내지 8 U 범위이다.

[0052]

본 출원에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 엔도뉴클레아제를 포함할 수 있는데, 이때 엔도뉴클레아제의 농도는 약 0.25 U 내지 약 12 U 이상이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제는 플랩 엔도뉴클레아제이다. 예시적인 엔도뉴클레아제의 농도는 적어도 또는 약 0.25 U, 0.5 U, 0.75 U, 1 U, 2 U, 3 U, 4 U, 5 U, 6 U, 7 U, 8 U, 9 U, 10 U, 11 U, 12 U, 또는 12 U를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제의 농도는 0.32 U이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제의 농도는 1.6 U이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제의 농도는 약 0.32 U 내지 약 4.8 U 범위 내이다. 몇몇 경우에서, 엔도뉴클레아제의 농도는 약 0.25 U 내지 12 U, 0.5 U 내지 11 U, 0.75 U 내지 10 U, 1 U 내지 9 U, 2 U 내지 8 U, 3 U 내지

7 U, 또는 4 U 내지 6 U 범위 내이다.

[0053] 본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 이중 가닥 핵산은 폴리머라아제와 혼합된다. 몇몇 경우에서, 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제이다. 몇몇 경우에서, 폴리머라아제는 고정확도 폴리머라아제이다. 고정확도 폴리머라아제는 주형 핵산의 정확한 복제 또는 증폭으로 귀결되는 폴리머라아제를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제는 열안정성 DNA 폴리머라아제이다. DNA 폴리머라아제는 패밀리 폴리머라아제, 패밀리 B 폴리머라아제, 패밀리 C 폴리머라아제, 패밀리 D 폴리머라아제, 패밀리 X 폴리머라아제, 및 패밀리 Y 폴리머라아제를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 임의의 패밀리의 DNA 폴리머라아제로부터 유래할 수 있다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제는 썬머스(*thermus*), 바실러스(*Bacillus*), 썬코코커스(*thermococcus*), 파이로코커스(*Pyrococcus*), 에어로피럼(*Aeropyrum*), 아퀴팩스(*Aquifex*), 설향로버스(*Sulfolobus*), 파이로로버스(*Pyrolobus*), 또는 메타노파이러스(*Methanopyrus*)를 포함하는 속으로부터 선택되나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0054] 증폭 반응에 사용하기 위해 본 출원에 기재된 폴리머라아제는 다양한 효소 활성을 포함할 수 있다. 폴리머라아제는 예를 들어 프라이머를 연장하여 연장 생성물(extension product)을 생성하기 위해 본 발명의 방법에 사용된다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제는 5'→3' 폴리머라아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제는 3'→5' 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제는 교정 활성을 포함한다. 예시적인 폴리머라아제는 DNA 폴리머라아제(I, II, 또는 III), T4 DNA 폴리머라아제, T7 DNA 폴리머라아제, Bst DNA 폴리머라아제, Bc폴리머라아제, 벤트 DNA 폴리머라아제, Pfu DNA 폴리머라아제, 및 Taq DNA 폴리머라아제를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 열안정성 DNA 폴리머라아제의 비제한적인 예는 Taq, Phusion® DNA 폴리머라아제, Q5® 하이 피델리티 DNA 폴리머라아제, LongAmp® DNA 폴리머라아제, 익스팬드 하이 피델리티 폴리머라아제, Hot Tub 폴리머라아제, Pwo 폴리머라아제, Tfi 폴리머라아제, Tli 폴리머라아제, Uti 폴리머라아제, Pfu 폴리머라아제, KOD DNA 폴리머라아제, JDF-3 DNA 폴리머라아제, PGB-D DNA 폴리머라아제, Tgo DNA 폴리머라아제, 파이로버스 푸마리우스(*Pyrolobus furmaris*) DNA 폴리머라아제, 벤트 폴리머라아제, 및 팁 벤트 폴리머라아제를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 출원에서 DNA 폴리머라아제를 포함하는 방법에 기재되는데, 이때 DNA 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U 내지 약 2 U, 또는 2 U 초과이다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제의 농도는 약 0.1 U이다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제의 농도는 약 0.2 U이다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제의 농도는 약 0.01 U이다. 몇몇 경우에서, DNA 폴리머라아제의 농도는 적어도 또는 약 0.005 U 내지 2 U, 0.005 U 내지 1 U, 0.005 U 내지 .5 U, 0.01 U 내지 1 U, 0.1 U 내지 0.5 U, 0.1 U 내지 0.5 U, 0.1 U 내지 1 U, 0.1 U 내지 1.5 U, 0.1 U 내지 2 U, 0.5 U 내지 1.0 U, 0.5 U 내지 1.5 U, 0.5 U 내지 2 U, 1 U 내지 1.5 U, 1.0 U 내지 2.0 U, 또는 1.5 U 내지 2 U의 범위 내이다.

[0056] 본 출원에 기재된 방법에 사용하기 위한 DNA 폴리머라아제는 효소 활성을 위한 최적 온도, 예를 들어 25-80℃, 25-70℃, 25-60℃, 25-50℃, 또는 25-40℃의 온도에서 사용된다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 50℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 55℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 65℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 적어도 또는 약 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 또는 80℃ 초과이다.

[0057] 본 출원에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 증폭 반응을 포함할 수 있는데, 이때 증폭 반응은 유니버설 프라이머 결합 서열을 포함한다. 몇몇 경우에서, 유니버설 프라이머 결합 서열은 동일한 5' 또는 3' 프라이머를 결합할 수 있다. 몇몇 경우에서, 유니버설 프라이머 결합 서열은 증폭 반응에서 복수의 타겟 핵산 중에서 공유된다.

[0058] 본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 이중 가닥 핵산은 리가아제로 처리된다. 본 출원에 기재된 바와 같이 리가아제는 핵산 단편을 연결하는 기능을 보유할 수 있다. 예를 들어, 리가아제는 인접하는 DNA의 3'-히드록실화된 및 5'-인산화된 말단을 연결하는 기능을 한다. 리가아제는 이. 콜라이(*E. coli*) 리가아제, T4 리가아제, 포유류 리가아제(예를 들어, DNA 리가아제 I, DNA 리가아제 II, DNA 리가아제 III, DNA 리가아제 IV), 열안정성 리가아제, 및 패스트 리가아제를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 리가아제는 열안정성 리가아제이다. 몇몇 경우에서, 리가아제는 앰플리가아제이다.

[0059] 리가아제의 농도는 가변적일 수 있다. 몇몇 경우에서, 리가아제의 농도는 약 0 U 내지 약 2 U 범위 내이다. 예시적인 리가아제의 농도는 약 0.5 U이다. 몇몇 경우에서, 리가아제의 농도는 약 1.0 U이다. 몇몇 경우에서, 리가아제의 농도는 약 5.0 U이다. 몇몇 경우에서, 리가아제의 농도는 적어도 또는 약 0 U 내지 0.25 U, 0 U 내지 0.5 U, 0 U 내지 1 U, 0 U 내지 1.5 U, 0 U 내지 2 U, 0.25 U 내지 0.5 U, 0.25 U 내지 1.0 U, 0.25 U 내지

1.5 U, 0.25 U 내지 2.0 U, 0.5 U 내지 1.0 U, 0.5 U 내지 1.5 U, 0.5 U 내지 2.0 U, 1.0 U 내지 1.5 U, 1.0 U 내지 2.0 U, 1.5 U 내지 2.0 U, 2.0 U 내지 4.0 U, 4.0 U 내지 6.0 U, 4.0 U 내지 8.0 U, 6.0 U 내지 10.0 U 범위 내이다.

[0060] 몇몇 경우에서, 리가아제는 효소 활성을 위한 최적 온도, 예를 들어, 25-80℃, 25-70℃, 25-60℃, 25-50℃, 또는 25-40℃의 온도에서 사용된다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 50℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 55℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 약 65℃이다. 몇몇 경우에서, 온도는 적어도 또는 약 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃ 80℃, 또는 80℃ 초과이다.

[0061] 본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 다수의 유전자 단편이 어셈블링된다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편은 전진적으로 또는 순차적으로 어셈블링된다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편은 벡터 내로 어셈블링된다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편은 긴 선형 유전자 어셈블리를 위해 어셈블링된다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편의 수는 적어도 또는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 10개 초과 유전자 단편이다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편의 수는 적어도 또는 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 또는 20개 초과 유전자 단편이다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편의 수는 약 1 내지 2, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 1 내지 6, 1 내지 7, 1 내지 8, 1 내지 9, 1 내지 10, 2 내지 3, 2 내지 4, 2 내지 5, 2 내지 6, 2 내지 7, 2 내지 8, 2 내지 9, 2 내지 10, 3 내지 4, 3 내지 5, 3 내지 6, 3 내지 7, 3 내지 8, 3 내지 9, 3 내지 10, 4 내지 5, 4 내지 6, 4 내지 7, 4 내지 8, 4 내지 9, 4 내지 10, 5 내지 6, 5 내지 7, 5 내지 8, 5 내지 9, 5 내지 10, 6 내지 7, 6 내지 8, 6 내지 9, 6 내지 10, 7 내지 8, 7 내지 9, 7 내지 10, 8 내지 9, 8 내지 10, 또는 9 내지 10개 범위 내이다. 몇몇 경우에서, 유전자 단편의 수는 약 1 내지 약 20, 약 2 내지 약 18, 약 3 내지 약 17, 약 4 내지 약 16, 약 6 내지 약 14, 또는 약 8 내지 약 12이다.

[0062] 본 출원에서 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법이 제공되는데, 이때 어셈블링된 유전자 단편의 비율은 약 0.2:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 또는 1:5 초과이다. 예를 들어, 2개의 유전자 단편이 어셈블링되는 경우, 제1 유전자 단편 대 제2 유전자 단편의 비율은 1:1이다. 몇몇 경우에서, 제1 유전자 단편 대 제2 유전자 단편의 비율은 적어도 또는 약 1:1, 1:0.9, 1:0.85, 1:0.8, 1:0.75, 1:0.7, 1:0.65, 1:0.6, 1:0.55, 1:0.5, 1:0.45, 1:0.4, 1:0.35, 1:0.3, 1:0.25, 1:0.2, 1:0.15, 1:0.1, 또는 1:0.1 미만이다.

[0063] 본 출원에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 벡터 내로 하나 이상의 유전자 단편의 어셈블리를 포함할 수 있는데, 이때 하나 이상의 유전자 단편 대 벡터의 비율은 가변적이다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 유전자 단편 대 벡터의 비율은 적어도 또는 약 0.2:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 또는 1:5 초과이다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 유전자 단편 대 벡터의 비율은 적어도 또는 약 1:1, 1:0.9, 1:0.85, 1:0.8, 1:0.75, 1:0.7, 1:0.65, 1:0.6, 1:0.55, 1:0.5, 1:0.45, 1:0.4, 1:0.35, 1:0.3, 1:0.25, 1:0.2, 1:0.15, 1:0.1, 또는 1:0.1 미만이다.

[0064] 본 발명에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 벡터 내로의 어셈블리를 위한 올리고뉴클레오타이드 집단의 어셈블리를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 오버랩 연장 PCR은 올리고뉴클레오타이드 집단의 어셈블리를 위해 수행된다. 몇몇 경우에서, 올리고뉴클레오타이드 집단은 적어도 또는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200개, 또는 200개 초과 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 몇몇 경우에서, 올리고뉴클레오타이드 집단은 어셈블링되어 적어도 또는 약 50, 100, 200, 250 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 2000, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000개, 또는 10000개 초과 염기를 포함하는 긴 핵산을 생성한다.

[0065] 본 출원에서 기재된 바와 같은 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 멀티플렉스 유전자(multiplexed gene) 어셈블리를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 다수의 서열은 단일 반응에서 어셈블링된다. 몇몇 경우에서, 적어도 또는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200개, 또는 200개 초과 서열이 단일 반응에서 어셈블링된다. 몇몇 경우에서, 멀티플렉스 유전자 어셈블리에 의해 어셈블링된 서열은 벡터 내로 삽입된다.

[0066] 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 방법은 핵산 브릿지를 이용하는 하나 이상의 유전자 단편의 어셈블리를 포함할 수 있는데, 이때 하나 이상의 유전자 단편 대 핵산 브릿지의 비율은 가변적이다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 유전자 단편 대 핵산 브릿지의 비율은 적어도 또는 약 0.2:1, 0.25:1, 0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 또는 1:5 초과이다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 유전자 단편 대 핵산 브릿지의 비율은 적어도 또는 약 1:1, 1:0.9, 1:0.85, 1:0.8, 1:0.75, 1:0.7, 1:0.65, 1:0.6, 1:0.55, 1:0.5, 1:0.45, 1:0.4, 1:0.35,

1:0.3, 1:0.25, 1:0.2, 1:0.15, 1:0.1, 또는 1:0.1 미만이다.

[0067] 본 출원에서 유전자 단편의 효소 매개 핵산 어셈블리를 위한 단편이 제공되는데, 이때 어셈블링되는 유전자 단편의 수의 총 크기는 적어도 또는 약 50, 100, 200, 250 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 2000, 2400, 2600, 2800, 3000, 3200, 3400, 3600, 3800, 4000, 4200, 4400, 4600, 4800, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000개, 또는 10000개 초과인 범위이다. 몇몇 경우에서, 어셈블링되는 유전자 단편의 수의 총 크기는 약 300 내지 1,000, 300 내지 2,000, 300 내지 3,000, 300 내지 4,000, 300 내지 5,000, 300 내지 6,000, 300 내지 7,000, 300 내지 8,000, 300 내지 9,000, 300 내지 10,000, 1,000 내지 2,000, 1,000 내지 3,000, 1,000 내지 4,000, 1,000 내지 5,000, 1,000 내지 6,000, 1,000 내지 7,000, 1,000 내지 8,000, 1,000 내지 9,000, 1,000 내지 10,000, 2,000 내지 3,000, 2,000 내지 4,000, 2,000 내지 5,000, 2,000 내지 6,000, 2,000 내지 7,000, 2,000 내지 8,000, 2,000 내지 9,000, 2,000 내지 10,000, 3,000 내지 4,000, 3,000 내지 5,000, 3,000 내지 6,000, 3,000 내지 7,000, 3,000 내지 8,000, 3,000 내지 9,000, 3,000 내지 10,000, 4,000 내지 5,000, 4,000 내지 6,000, 4,000 내지 7,000, 4,000 내지 8,000, 4,000 내지 9,000, 4,000 내지 10,000, 5,000 내지 6,000, 5,000 내지 7,000, 5,000 내지 8,000, 5,000 내지 9,000, 5,000 내지 10,000, 6,000 내지 7,000, 6,000 내지 8,000, 6,000 내지 9,000, 6,000 내지 10,000, 7,000 내지 8,000, 7,000 내지 9,000, 7,000 내지 10,000, 8,000 내지 9,000, 8,000 내지 10,000, 또는 9,000 내지 10,000개 범위의 범위 내이다.

[0068] 본 출원에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리를 포함하는 방법은 높은 퍼센트의 정확한 어셈블리를 생성한다. 몇몇 경우에서, 정확한 어셈블리의 퍼센트는 적어도 또는 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 99% 초과이다. 몇몇 경우에서, 정확한 어셈블리의 평균 퍼센트는 적어도 또는 약 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 99% 초과이다. 몇몇 경우에서, 정확한 어셈블리의 퍼센트는 100%이다.

[0069] 본 출원에 기재된 바와 같은 효소 매개 핵산 어셈블리를 포함하는 방법은 낮은 퍼센트의 미스어셈블리를 생성한다. 몇몇 경우에서, 미스어셈블리 퍼센트는 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 몇몇 경우에서, 미스어셈블리 퍼센트는 약 1% 내지 약 25%, 약 5% 내지 약 20%, 또는 약 10% 내지 약 15%이다. 몇몇 경우에서, 평균 미스어셈블리 비율은 최대 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 또는 60%이다. 몇몇 경우에서, 평균 미스어셈블리 비율은 약 1% 내지 약 25%, 약 5% 내지 약 20%, 또는 약 10% 내지 약 15%이다.

[0070] 본 출원에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리를 포함하는 방법은 증가된 효율로 귀결된다. 몇몇 경우에서, 효율은 콜로니 형성 유닛의 수에 의해 측정된다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 기재된 방법은 적어도 또는 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000, 14000, 16000, 18000, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 또는 100000 초과인 콜로니 형성 유닛을 생성한다.

[0071] **핵산의 합성 및 심리스 어셈블리를 위한 시스템**

[0072] *폴리뉴클레오타이드 합성*

[0073] 본 출원에서 본 출원에 기재된 방법에 의해 드 노보 합성에 의한 폴리뉴클레오타이드의 생성 후 심리스 핵산의 어셈블리를 위한 방법이 제공된다. 예시적인 워크플로우는 도 2에 나타난다. 핵산 서열을 포함하는 컴퓨터 판독 가능한 입력 파일이 수용된다. 컴퓨터는 핵산 서열을 집합적으로 코딩하는 복수의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열의 합성을 위한 명령을 생성하기 위해 핵산 서열을 처리한다. 명령은 복수의 핵산 서열에 기초하여 복수의 폴리뉴클레오타이드의 합성을 위한 물질 침적 장치(203)에 전송된다. 물질 침적 장치(203), 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 산 합성기는 단계적인 방식으로 시약을 방출하도록 디자인되어 복수의 폴리뉴클레오타이드를 병렬로 한 번에 하나의 잔기를 연장하여 미리 결정된 핵산 서열을 이용하여 올리고머를 생성한다. 물질 침적 장치(203)는 폴리뉴클레오타이드 산 합성 및 연장을 위한 유전자좌의 다수의 클러스터(207)를 포함하는 어레이(205) 상에서 올리고머를 생성한다. 그러나, 어레이는 클러스터 내에 조직화된 유전자좌를 보유할 필요는 없다. 예를 들어, 유전자좌는 어레이 전체에 균일하게 스프레딩될 수 있다. 드 노보 폴리뉴클레오타이드는 합성되고, 플레이트로부터 제거되고, 어셈블리 반응은 수집 챔버(209)에서 개시되고, 이어서 더 긴 폴리뉴클레오타이드(211)의 집단이 형성된다. 수집 챔버는 합성 표면으로부터 이전된 물질을 함유하는 다수의 표면의 샌드위치(예를 들어, 상부 및 저부 표면) 또는 웰 또는 채널을 포함할 수 있다. 또한, 드 노보 폴리뉴클레오타이드는 합성되고 플레이트로부터 제거되어 더 긴 폴리뉴클레오타이드(211)의 집단을 형성할 수 있다. 이어서, 더 긴 폴리뉴클레오타이드의

집단은 액적으로 분할되거나, 또는 PCR을 수행할 수 있다. 더 긴 폴리뉴클레오티드(211)의 집단은 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리(213)에 의해 핵산 어셈블리가 수행된다.

[0074] 본 출원에서 본 출원에 기재된 방법에 의해 드 노보 합성에 의한 폴리뉴클레오티드의 생성 후 심리스 핵산의 어셈블리를 위한 시스템이 제공된다. 몇몇 경우에서, 시스템은 컴퓨터, 물질 침적 장치, 표면, 및 핵산 어셈블리 표면을 포함한다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터는 핵산 서열을 이용하여 판독 가능한 입력 파일을 포함한다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터는 핵산 서열을 집합적으로 코딩하는 복수의 폴리뉴클레오티드 서열 또는 뉴클레오티드 서열의 합성을 위한 명령을 생성하기 위해 핵산 서열을 처리한다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터는 복수의 폴리뉴클레오티드 산 서열의 합성을 위한 물질 침적 장치에 명령을 제공한다. 몇몇 경우에서, 물질 침적 장치는 연장 반응을 위해 표면 상에 뉴클레오티드를 침적시킨다. 몇몇 경우에서, 표면은 연장 반응을 위한 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 유전자좌는 스팟, 웰, 마이크로웰, 채널, 또는 포스트이다. 몇몇 경우에서, 복수의 폴리뉴클레오티드 산 서열은 연장 반응 후 합성된다. 몇몇 경우에서, 복수의 폴리뉴클레오티드 산 서열은 표면으로부터 제거되고, 핵산 어셈블리를 위해 제조된다. 몇몇 경우에서, 핵산 어셈블리는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 포함한다.

[0075] 본 출원에서 포스포르아미다이트 화학을 포함하는 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 방법이 제공된다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 염기와 포스포르아미다이트의 커플링을 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 커플링 조건 하에서 포스포르아미다이트의 침적에 의해 염기를 커플링하는 것을 포함하는데, 이때 동일한 염기는 경우에 따라 1회 초과로 포스포르아미다이트를 이용하여 침적된다. 즉, 이중 커플링된다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 미반응 부위의 캡핑을 포함한다. 몇몇 경우에서, 캡핑은 임의적이다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 산화를 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 디블록킹 또는 탈트리틸화를 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 황화를 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성은 산화 또는 황화를 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성 반응 중 하나 또는 각각의 단계 사이에, 기관은, 예를 들어 테트라졸 또는 아세토니트릴을 이용하여 세척된다. 포스포르아미다이트 합성 방법에서 임의의 한 단계의 시간 프레임은 약 2분, 1분, 50초, 40초, 30초, 20초, 또는 10초 미만을 포함한다.

[0076] 포스포르아미다이트법을 이용하는 폴리뉴클레오티드 합성은 포스파이트 트리에스테르 연결의 형성을 위해 성장하는 폴리뉴클레오티드 사슬에 포스포르아미다이트 빌딩 블록(예를 들어, 뉴클레오티드 포스포르아미다이트)의 후속 첨가를 포함할 수 있다. 포스포르아미다이트 폴리뉴클레오티드 합성은 3'→5' 방향으로 진행된다. 포스포르아미다이트 폴리뉴클레오티드 합성은 합성 사이클당 성장하는 핵산 사슬에 하나의 뉴클레오티드의 제어된 첨가를 가능하게 한다. 몇몇 경우에서, 각각의 합성 사이클은 커플링 단계를 포함한다. 포스포르아미다이트 커플링은 활성화된 뉴클레오티드 포스포르아미다이트와 기관에 예를 들어 링커에 의해 결합된 뉴클레오티드 사이의 포스파이트 트리에스테르 연결의 형성을 포함한다. 몇몇 경우에서, 뉴클레오티드 포스포르아미다이트는 활성화된 기관에 제공된다. 몇몇 경우에서, 뉴클레오티드 포스포르아미다이트는 활성화제를 이용하여 장치에 제공된다. 몇몇 경우에서, 뉴클레오티드 포스포르아미다이트는 기관 결합된 뉴클레오티드에 비해 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100배 과량 또는 그 초과로 양으로 장치에 제공된다. 몇몇 경우에서, 뉴클레오티드 포스포르아미다이트의 첨가는 무수 환경, 예를 들어 무수 아세토니트릴 내에서 수행된다. 뉴클레오티드 포스포르아미다이트의 첨가 후, 상기 장치는 경우에 따라 세척된다. 몇몇 경우에서, 커플링 단계는 1회 또는 추가의 회수로 반복되고, 경우에 따라 기관에 대한 뉴클레오티드 포스포르아미다이트 첨가 사이에 세척 단계가 수반된다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 사용된 폴리뉴클레오티드 합성 방법은 1, 2, 3회 또는 그 초과로 연속적인 커플링 단계를 포함한다. 많은 경우 커플링 이전에, 장치에 결합된 뉴클레오티드는 보호기의 제거에 의해 탈보호되는데, 이때 탈보호는 중합을 예방하기 위해 가능하다. 통상의 보호기는 4,4'-디메톡시트리틸(DMT)이다.

[0077] 커플링 후, 포스포르아미다이트 폴리뉴클레오티드 합성 방법은 경우에 따라 캡핑 단계를 포함한다. 캡핑 단계에서, 성장하는 폴리뉴클레오티드는 캡핑제로 처리된다. 캡핑 단계는 커플링 후 미반응된 기관-결합된 5'-OH기가 추가로 사슬 연장되지 않도록 차단하고, 내부 염기 결실을 보유하는 폴리뉴클레오티드의 형성을 방지한다. 또한, 1H-테트라졸로 활성화된 포스포르아미다이트는 소량으로 구아노신의 O6 위치와 반응할 수 있다. 이론에 의해 구속되지 않지만, I₂/물을 이용하는 산화 시, 가능하게는 O6-N7 이동에 의한 이러한 부산물은 탈퓨린화를 수행할 수 있다. 비퓨린 부위는 폴리뉴클레오티드의 최종 탈보호 과정 중에 절단될 수 있고, 따라서 전장 생성물의 수율을 감소시킨다. O6 변형은 I₂/물을 이용하는 산화 이전에 캡핑 시약을 이용하는 처리에 의해 제거될 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드 합성 중에 캡핑 단계를 포함시키는 것은 캡핑을 하지 않는 합성과 비교하여 에러율을 감소시킨다. 한 예로서, 캡핑 단계는 기관-결합된 폴리뉴클레오티드를 아세트산 무수물과 1-메틸이미

다졸의 혼합물로 처리하는 단계를 포함한다. 캡핑 단계 후, 장치는 경우에 따라 세척된다.

[0078] 몇몇 경우에서, 뉴클레오시드 포스포르아미다이트의 첨가 후 및 경우에 따라 캡핑 및 하나 이상의 세척 단계 후, 장치 결합된 성장하는 핵산은 산화된다. 산화 단계는, 포스파이트 트리에스테르가 4배위된 포스페이트 트리에스테르, 자연 발생하는 포스페이트 다이에스테르 뉴클레오시드간 연결의 보호된 전구체로 산화되는 것을 포함한다. 몇몇 경우에서, 성장하는 폴리뉴클레오티드의 산화는 경우에 따라 약 염기(예를 들어, 피리딘, 루티딘, 콜리딘)의 존재 하에서, 요오드 및 물을 이용하는 처리에 의해 달성된다. 산화는 예를 들어, tert-부틸 히드로 퍼옥사이드 또는 (1S)-(+)-(10-캄포르실포닐)-옥사지리딘(CS0)을 이용하는 무수 조건 하에서 수행될 수 있다. 몇몇 방법에서, 캡핑 단계는 산화 후에 수행된다. 제2 캡핑 단계는 장기 건조를 가능하게 하는데, 그 이유는 지속될 수 있는 산화 유래의 잔류수가 후속 커플링을 억제할 수 있기 때문이다. 산화 후, 장치 및 성장하는 폴리뉴클레오티드는 경우에 따라 세척된다. 몇몇 경우에서, 산화 단계는 폴리뉴클레오티드 포스포로티오에이트를 얻기 위한 황화 단계로 대체되는데, 이때 임의의 캡핑 단계는 황화 후에 수행될 수 있다. 다수의 시약이 효과적인 황 전달을 가능하게 하는데, 이들의 예로는 3-(디메틸아미노메틸리딘)아미노-3H-1,2,4-디티아졸-3-티온, DDTT, 보카주 시약으로도 공지된 3H-1,2-벤조디티올-3-온 1,1-디옥사이드, 및 N,N,N'-테트라에틸티우람 디설파이드(TETD)를 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0079] 뉴클레오티드 도입의 후속 사이클이 커플링을 통해 일어나도록 하기 위해, 장기 결합된 성장하는 폴리뉴클레오티드의 보호된 5' 말단은 제거되어 일차 히드록실기가 다음 뉴클레오시드 포스포르아미다이트와 반응성이도록 한다. 몇몇 경우에서, 보호기는 DMT이고, 및 탈보호는 트리클로로메탄 중의 트리클로로아세트산으로 일어난다. 연장된 시간 동안 또는 권고된 산 용액보다 더 강하게 트리틸의 제거를 수행하는 것은 고품질 지지체 결합된 폴리뉴클레오티드의 증가된 탈퓨린화를 유도할 수 있고, 따라서 원하는 전장 생성물의 수율을 감소시킬 수 있다. 본 출원에 기재된 개시의 방법 및 조성물은 원하지 않는 탈퓨린화를 제한하는 제어된 디블로킹 조건을 제공한다. 몇몇 경우에서, 장치 결합된 폴리뉴클레오티드는 디블로킹 후에 세척된다. 몇몇 경우에서, 디블로킹 후의 효율적인 세척은 낮은 에러율을 보유하는 합성된 폴리뉴클레오티드에 기여한다.

[0080] 폴리뉴클레오티드의 합성을 위한 방법은 전형적으로 하기 단계의 반복 시퀀스를 포함한다: 활성화된 표면, 링커, 또는 이전된 탈보호된 단량체와 연결하기 위해 능동적으로 작용화된 표면(예를 들어, 유전자좌)에 대한 보호된 단량체의 적용; 후속적으로 적용된 보호된 단량체와 반응성이도록 하기 위해 적용된 단량체의 탈보호; 및 연결의 위한 다른 보호된 단량체의 적용. 하나 이상의 중간 단계는 산화 또는 황화를 포함한다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 세척 단계는 상기 단계들의 하나 또는 모두의 이전 또는 이후에 수행된다.

[0081] 포스포르아미다이트계 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 방법은 일련의 화학적인 단계를 포함한다. 몇몇 경우에서, 합성 방법의 하나 이상의 단계는 시약 회전을 포함하는데, 이때 상기 방법의 하나 이상의 단계는 상기 단계를 위해 유용한 시약을 장치에 적용하는 것을 포함한다. 예를 들어, 시약은 일련의 액체 침착 및 진공 건조 단계에 의해 회전된다. 웰, 마이크로웰, 채널 등과 같은 3차원 피처를 포함하는 기관의 경우, 시약은 경우에 따라 웰 및/또는 채널에 의해 장치의 하나 이상의 영역을 통해 통과된다.

[0082] 본 출원에 기재된 방법 및/또는 기관을 이용하여 합성된 폴리뉴클레오티드는 길이가 적어도 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 500개 이상의 염기이다. 몇몇 경우에서, 적어도 약 1 pmol, 10 pmol, 20 pmol, 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol, 60 pmol, 70 pmol, 80 pmol, 90 pmol, 100 pmol, 150 pmol, 200 pmol, 300 pmol, 400 pmol, 500 pmol, 600 pmol, 700 pmol, 800 pmol, 900 pmol, 1 nmol, 5 nmol, 10 nmol, 100 nmol 이상의 폴리뉴클레오티드가 하나의 유전자좌(a locus) 내에서 합성된다. 본 출원에 제공된 표면 상에서 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 방법은 빠른 속도의 합성을 가능하게 한다. 예로서, 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200개의 뉴클레오티드/시간, 또는 그 초과가 합성된다. 뉴클레오티드는 아데닌, 구아닌, 티민, 시토신, 우리딘 빌딩 블록 또는 이의 유사체/변형된 버전을 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드의 라이브러리는 기관 상에서 병렬적으로 합성된다. 예를 들어, 약 또는 적어도 약 100; 1,000; 10,000; 100,000; 1,000,000; 2,000,000; 3,000,000; 4,000,000; 5,000,000개의 분해된 유전자좌(resolved loci)를 포함하는 기관은 적어도 동일한 수의 구별되는 폴리뉴클레오티드의 합성을 지원할 수 있는데, 이때 구별되는 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 분해된 유전자좌 상에서 합성된다.

[0083] 여러 가지 적합한 방법은 고밀도 폴리뉴클레오티드 어레이를 생성하기 위해 공지되어 있다. 예시적인 워크플로우에서, 기관 표면 층이 제공된다. 상기 예에서, 표면의 화학은 폴리뉴클레오티드 합성 공정을 개선하기 위해 변경된다. 저 표면 에너지 부분은 액체를 방출하기 위해 생성되는 한편, 고 표면 에너지 부분은 액체를 끌어당

기기 위해 생성된다. 표면 자체는 평평한 표면의 형태일 수 있거나, 또는 형상의 변이, 예를 들어 표면적을 증가시키는 돌출부 또는 마이크로웰을 포함할 수 있다. 상기 워크플로우 예에서, 선택된 고 표면 에너지 분자는 본 출원에 그 전체 내용이 참고로 인용된 국제특허출원 공보 WO/2015/021080에 개시된 바와 같이, DNA 화학을 지지하는 이중 기능으로 작용한다.

[0084] 폴리뉴클레오티드 어레이의 계내(in situ) 제조는 고정 지지체 상에서 생성되고, 단일 뉴클레오티드 연장 공정을 이용하여 다수의 올리고머를 병렬적으로 연장시킨다. 폴리뉴클레오티드 합성기와 같은 물질 침적 장치는 단계적인 방식으로 시약을 방출하도록 디자인되어 다수의 폴리뉴클레오티드는 미리 결정된 핵산 서열을 이용하여 올리고머를 생성하기 위해 한 번에 한 잔기씩 병렬적으로 연장되도록 한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드는 이 단계에서 표면으로부터 절단된다. 절단은 가스 절단, 예를 들어 암모니아 또는 메틸아민을 이용하는 것을 포함한다.

[0085] 기관

[0086] 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 표면으로서 사용된 장치는 기관의 형태일 수 있는데, 이는 제한 없이 균질한 어레이 표면, 패터닝된 어레이 표면, 채널, 비드, 겔 등을 포함한다. 본 출원에서 복수의 클러스터를 포함하는 기관이 제공되는데, 이때 각각의 클러스터는 폴리뉴클레오티드의 부착 및 합성을 지원하는 복수의 유전자좌를 포함한다. 본 출원에 사용된 바와 같이 용어 "유전자좌(locus)"는 기관으로부터 연장되는 단일 소정의 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 위한 지지를 제공하는 지지체 상의 구별되는 영역을 의미한다. 몇몇 경우에서, 유전자좌는 2차원 표면, 예를 들어 실질적으로 평평한 표면 상에 존재한다. 몇몇 경우에서, 유전자좌는 3차원 표면, 예를 들어 웰, 마이크로 웰, 채널, 또는 포스트 상에 존재한다. 몇몇 경우에서, 유전자좌의 표면은 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 적어도 하나의 뉴클레오티드, 또는 바람직하게는 폴리뉴클레오티드의 집단의 합성을 위한 동일한 뉴클레오티드의 집단에 부착되도록 능동적으로(actively) 작용화된 물질을 포함한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드는 동일한 핵산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 집단을 의미한다. 몇몇 경우에서, 기관의 표면은 기관의 한 표면 또는 복수의 표면을 포함한다. 제공된 시스템 및 방법을 이용하여 본 출원에 기재된 라이브러리 내에 합성된 폴리뉴클레오티드에 대한 평균 에러율은 에러 보정 없이 종종 1000 중 1 미만, 2000 중 약 1 미만, 3000 중 약 1 미만 이하이다.

[0087] 본 출원에서 통상의 지지체 상의 주소 지정 가능한(addressable) 위치에서 상이한 미리 결정된 서열을 보유하는 복수의 폴리뉴클레오티드의 병렬 합성을 지원하는 표면이 제공된다. 몇몇 경우에서, 기관은 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2,000; 5,000; 10,000; 20,000; 50,000; 100,000; 200,000; 300,000; 400,000; 500,000; 600,000; 700,000; 800,000; 900,000; 1,000,000; 1,200,000; 1,400,000; 1,600,000; 1,800,000; 2,000,000; 2,500,000; 3,000,000; 3,500,000; 4,000,000; 4,500,000; 5,000,000; 10,000,000개 이상의 동일하지 않은 폴리뉴클레오티드의 합성을 위한 지지체를 제공한다. 몇몇 경우에서, 표면은 구별되는 서열을 코딩하는 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2,000; 5,000; 10,000; 20,000; 50,000; 100,000; 200,000; 300,000; 400,000; 500,000; 600,000; 700,000; 800,000; 900,000; 1,000,000; 1,200,000; 1,400,000; 1,600,000; 1,800,000; 2,000,000; 2,500,000; 3,000,000; 3,500,000; 4,000,000; 4,500,000; 5,000,000; 10,000,000개 이상의 폴리뉴클레오티드의 합성을 위한 지지체를 제공한다. 몇몇 경우에서, 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부는 동일한 서열을 보유하거나, 또는 동일한 서열을 이용하여 합성되도록 구성된다. 몇몇 경우에서, 기관은 적어도 80, 90, 100, 120, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500개 이상의 염기를 보유하는 폴리뉴클레오티드의 성장을 위한 표면 환경을 제공한다.

[0088] 본 출원에서 기관의 구별되는 유전자좌 상에서 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 방법이 제공되는데, 이때 각각의 유전자좌는 폴리뉴클레오티드 집단의 합성을 지원한다. 몇몇 경우에서, 각각의 유전자좌는 다른 유전자좌 상에서 성장된 폴리뉴클레오티드의 집단과는 상이한 서열을 보유하는 폴리뉴클레오티드 집단의 합성을 지원한다. 몇몇 경우에서, 각각의 폴리뉴클레오티드 서열은 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 표면 상에서 유전자좌의 동일한 클러스터 내의 상이한 유전자좌를 가로질러 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 그 초과 리던던시(redundancy)로 합성된다. 몇몇 경우에서, 기관의 유전자좌는 복수의 클러스터 내에 위치된다. 몇몇 경우에서, 기관은 적어도 10, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 20000, 30000, 40000, 50000개 또는 그 초과 클러스터를 포함한다. 몇몇 경우에서, 기관은 2,000; 5,000; 10,000; 100,000; 200,000; 300,000; 400,000; 500,000; 600,000; 700,000; 800,000; 900,000; 1,000,000; 1,100,000; 1,200,000; 1,300,000; 1,400,000; 1,500,000; 1,600,000; 1,700,000; 1,800,000; 1,900,000; 2,000,000; 300,000; 400,000; 500,000; 600,000; 700,000; 800,000; 900,000; 1,000,000;

1,200,000; 1,400,000; 1,600,000; 1,800,000; 2,000,000; 2,500,000; 3,000,000; 3,500,000; 4,000,000; 4,500,000; 5,000,000; 또는 10,000,000개 또는 그 초과와 구별되는 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 기관은 약 10,000개의 구별되는 유전자좌를 포함한다. 단일 클러스터 내의 유전자좌의 양은 상이한 경우에 가변적이다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 150, 200, 300, 400, 500 또는 그 초과와 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 약 50-500개의 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 약 100-200개의 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 약 100-150개의 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 약 109, 121, 130 또는 137개의 유전자좌를 포함한다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 약 19, 20, 61, 64개 또는 그 초과와 유전자좌를 포함한다.

[0089] 몇몇 경우에서, 기관 상에서 합성된 구별되는 폴리뉴클레오티드의 수는 기관 상에서 이용할 수 있는 구별되는 유전자좌의 수에 의존한다. 몇몇 경우에서, 기관의 클러스터 내의 유전자좌의 밀도는 적어도 또는 약 1, 10, 25, 50, 65, 75, 100, 130, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 1,000개 또는 그 초과와 유전자좌/mm²이다. 몇몇 경우에서, 기관은 10-500, 25-400, 50-500, 100-500, 150-500, 10-250, 50-250, 10-200, 또는 50-200 mm²를 포함한다. 몇몇 경우에서, 클러스터 내에서 2개의 인접하는 유전자좌의 중심 사이의 거리는 약 10-500, 약 10-200, 또는 약 10-100 μ m이다. 몇몇 경우에서, 인접하는 유전자좌의 2개의 중심 사이의 거리는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 μ m보다 크다. 몇몇 경우에서, 각각의 유전자좌는 독립적으로 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 μ m의 폭을 갖는다. 몇몇 경우에서, 각각의 유전자좌는 독립적으로 약 0.5-100, 0.5-50, 10-75, 또는 0.5-50 μ m의 폭을 갖는다.

[0090] 몇몇 경우에서, 기관 내의 클러스터의 밀도는 적어도 또는 약 1 클러스터/100 mm², 1 클러스터/10 mm², 1 클러스터/5 mm², 1 클러스터/4 mm², 1 클러스터/3 mm², 1 클러스터/2 mm², 1 클러스터/1 mm², 2 클러스터/1 mm², 3 클러스터/1 mm², 4 클러스터/1 mm², 5 클러스터/1 mm², 10 클러스터/1 mm², 50 클러스터/1 mm² 또는 그 초과이다. 몇몇 경우에서, 기관은 약 1 클러스터/10 mm² 내지 약 10 클러스터/1 mm²를 포함한다. 몇몇 경우에서, 2개의 인접하는 클러스터의 중심으로부터의 거리는 약 50-100, 50-200, 50-300, 50-500, 또는 100-2000 μ m이다. 몇몇 경우에서, 2개의 인접하는 클러스터의 중심으로부터의 거리는 약 0.05-50, 0.05-10, 0.05-5, 0.05-4, 0.05-3, 0.05-2, 0.1-10, 0.2-10, 0.3-10, 0.4-10, 0.5-10, 0.5-5, 또는 0.5-2 mm이다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 독립적으로 약 0.5 내지 2, 약 0.5 내지 1, 또는 약 1 내지 2 mm의 단면을 갖는다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2 mm의 단면을 갖는다. 몇몇 경우에서, 각각의 클러스터는 독립적으로 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.15, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 또는 2 mm의 내부 단면을 갖는다.

[0091] 몇몇 경우에서, 기관은 대략 표준 96웰 플레이트, 예를 들어 약 100 내지 200 mm x 약 50 내지 150 mm의 크기일 수 있다. 몇몇 경우에서, 기관은 약 1000, 500, 450, 400, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 mm 미만이거나 또는 동일한 직경을 갖는다. 몇몇 경우에서, 기관의 직경은 약 25-1000, 25-800, 25-600, 25-500, 25-400, 25-300, 또는 25-200 mm이다. 몇몇 경우에서, 기관은 적어도 약 100; 200; 500; 1,000; 2,000; 5,000; 10,000; 12,000; 15,000; 20,000; 30,000; 40,000; 50,000 mm² 또는 그 초과와 평면 표면적을 갖는다. 몇몇 경우에서, 기관의 두께는 약 50-2000, 50-1000, 100-1000, 200-1000, 또는 250-1000 mm 사이이다.

[0092] 표면 물질

[0093] 본 출원에 제공된 기관, 장치, 및 반응기는 본 출원에 기재된 방법, 조성물, 및 시스템을 위해 적합한 임의의 다양한 물질로부터 조립된다. 특정 경우에서, 기관 물질은 낮은 레벨의 뉴클레오티드 결합을 나타내기 위해 조립된다. 몇몇 경우에서, 기관 물질은 높은 레벨의 뉴클레오티드 결합을 나타내는 구별되는 표면을 생성하기 위해 개질된다. 몇몇 경우에서, 기관 물질은 가시광 및/또는 UV 광에 대해 투명하다. 몇몇 경우에서, 기관 물질은 충분히 전도성인데, 예를 들어 기관의 전부 또는 일부를 가로질러 균일한 전기장을 형성할 수 있다. 몇몇 경우에서, 전도성 물질은 접지 연결된다. 몇몇 경우에서, 기관은 열전도성 또는 절연성이다. 몇몇 경우에서, 물질은 화학적 또는 생화학적 반응, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 합성 반응 공정을 지원하기 위해 내화학적 및 내열성이다. 몇몇 경우에서, 기관은 가용성 물질을 포함한다. 가요성 물질의 경우, 가요성 물질은 개질된 나일론, 개질되지 않은 나일론, 니트로셀룰로오스, 폴리프로필렌 등을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 기관은 강성 물질을 포함한다. 강성 물질의 경우, 강성 물질은 유리, 융합 실리카, 실리콘, 플라스틱(예

를 들어, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리카르보네이트, 및 이의 블렌드 등); 및 금속(예를 들어, 금, 백금 등)을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 기관, 고체 지지체 또는 반응기는 실리콘, 폴리스티렌, 아가로오스, 텍스트란, 셀룰로오스 중합체, 폴리아크릴아마이드, 폴리디메틸실록산(PDMS), 및 유리를 포함하는데, 이들로 제한되는 것은 아니다. 기관/고체 지지체 또는 마이크로구조체, 반응기 수지는 본 출원에 목록화된 물질 또는 당해 기술분야에 공지된 임의의 다른 적합한 물질의 조합을 이용하여 제조될 수 있다.

[0094] 표면 아키텍처

[0095] 본 출원에서 본 출원에 기재된 방법, 조성물 및 시스템을 위한 기관이 제공되는데, 이때 기관은 본 출원에 기재된 방법, 조성물, 및 시스템에 적합한 표면 아키텍처를 갖는다. 몇몇 경우에서, 기관은 융기된 및/또는 침강된 피처를 포함한다. 그러한 피처를 보유하는 한 가지 이점은 폴리뉴클레오티드 합성을 지원하는 표면적의 증가이다. 몇몇 경우에서, 융기된 및/또는 침강된 피처를 보유하는 기관은 3차원 기관으로서 언급된다. 몇몇 경우에서, 3차원 기관은 하나 이상의 채널을 포함한다. 몇몇 경우에서, 하나 이상의 유전자좌는 채널을 포함한다. 몇몇 경우에서, 채널은 침적 장치, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 합성기에 의해 시약 침적에 접근할 수 있다. 몇몇 경우에서, 시약 및/또는 유체는 하나 이상의 채널과 유체 연통하는 더 큰 웰 내에 수집된다. 예를 들어, 기관은 클러스터 내에서 복수의 유전자좌에 상응하는 복수의 채널을 포함하고, 복수의 채널은 클러스터의 하나의 웰과 유체 연통한다. 몇몇 방법에서, 폴리뉴클레오티드의 라이브러리는 클러스터의 복수의 유전자좌에서 합성된다.

[0096] 본 출원에서 본 출원에 기재된 방법, 조성물, 및 시스템을 위한 기관이 제공되는데, 이때 기관은 폴리뉴클레오티드 합성을 위해 구성된다. 몇몇 경우에서, 구조는 표면 상에서 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 제어된 유동 및 물질 전달 경로가 가능하도록 구성된다. 몇몇 경우에서, 기관의 구조는 폴리뉴클레오티드 합성 중 물질 전달 경로, 화학적 노출 시간, 및/또는 세척 효율의 제어되고 균일한 분포를 가능하게 한다. 몇몇 경우에서, 기관의 구조는 예를 들어 폴리뉴클레오티드를 성장시키기 위해 충분한 부피를 제공함으로써 증가된 스위프 효율(sweep efficiency)을 가능하게 하여 폴리뉴클레오티드를 성장시킴으로써 배제된 부피는 폴리뉴클레오티드의 성장을 위해 이용할 수 있거나, 또는 적합한 초기 이용 가능한 부피의 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% 초과, 또는 미만을 취하지 않는다. 몇몇 경우에서, 3차원 기관은 유체의 관리된 유동을 가능하게 하여 화학적 노출의 신속한 교환을 가능하게 한다.

[0097] 본 출원에서 본 출원에 기재된 효소 매개 핵산 어셈블리 및 폴리뉴클레오티드 합성과 관련되는 방법, 조성물, 및 시스템을 위한 기관이 제공되는, 이때 기관은 본 출원에 기재된 효소 반응을 하우징하기 위해 구성된 구조체를 포함한다. 몇몇 경우에서, 분리(segregation)는 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 능동 및 수동 영역을 생성하는 표면의 차등 작용화에 의해 달성된다. 몇몇 경우에서, 차등 작용화는 장치 표면 전체에 소수성을 번갈아 나오게 함으로써 침착된 시약의 비딩(beading) 또는 습윤을 유도하는 수 접촉각 효과를 생성함으로써 달성된다. 더 대형의 구조체를 사용하는 것은 인접하는 스팟의 시약에 의한 별개의 폴리뉴클레오티드 합성 위치의 스플래싱(splashing) 및 교차-오염을 감소시킬 수 있다. 몇몇 경우에서, 장치, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 합성기는 구별되는 폴리뉴클레오티드 합성 위치에 시약을 침적시키기 위해 사용된다. 3차원 피처를 보유하는 기관은 더 낮은 에러율(예를 들어, 약 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2,000; 1:3,000; 1:5,000; 또는 1:10,000 미만)로 더 큰 수의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 약 10,000개 초과)의 합성을 가능하게 하는 방식으로 구성된다. 몇몇 경우에서, 기관은 약 또는 약 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 300, 400 또는 500개 초과 μm^2 의 밀도로 피처를 포함한다.

[0098] 기관의 웰은 기관의 다른 웰과 동일하거나 상이한 너비, 높이, 및/또는 부피를 보유할 수 있다. 기관의 채널은 기관의 다른 채널과 동일하거나 상이한 너비, 높이, 및/또는 부피를 보유할 수 있다. 몇몇 경우에서, 클러스터의 직경 또는 클러스터를 포함하는 웰의 직경, 또는 둘 다는 약 0.05-50, 0.05-10, 0.05-5, 0.05-4, 0.05-3, 0.05-2, 0.05-1, 0.05-0.5, 0.05-0.1, 0.1-10, 0.2-10, 0.3-10, 0.4-10, 0.5-10, 0.5-5, 또는 0.5-2 mm이다. 몇몇 경우에서, 클러스터 또는 웰 또는 둘 다의 직경은 약 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 또는 0.05 mm 또는 그 미만이다. 몇몇 경우에서, 클러스터 또는 웰 또는 둘 다의 직경은 약 1.0 내지 약 1.3 mm이다. 몇몇 경우에서, 클러스터 또는 웰 또는 둘 다의 직경은 약 1.150 mm이다. 몇몇 경우에서, 클러스터 또는 웰 또는 둘 다의 직경은 약 0.08 mm이다. 클러스터의 직경은 2차원 또는 3차원 기관 내의 클러스터를 의미한다.

[0099] 몇몇 경우에서, 웰의 높이는 약 20-1000, 50-1000, 100-1000, 200-1000, 300-1000, 400-1000, 또는 500-1000 μm 미만이다. 몇몇 경우에서, 웰의 높이는 약 1000, 900, 800, 700, 또는 600 μm 미만이다.

- [0100] 몇몇 경우에서, 기관은 클러스터 내의 복수의 유전자좌에 상응하는 복수의 채널을 포함하는데, 이때 채널의 높이 또는 깊이는 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 10-50 μm 이다. 몇몇 경우에서, 채널의 높이는 100, 80, 60, 40, 또는 20 μm 미만이다.
- [0101] 몇몇 경우에서, 채널, 유전자좌(예를 들어, 실질적으로 평평한 기관에서) 또는 채널 및 유전자좌 둘 다(예를 들어, 3차원 기관으로서, 이때 유전자좌가 채널에 상응하는 기관에서)의 직경은 약 1-1000, 1-500, 1-200, 1-100, 5-100, 또는 10-100 μm , 예를 들어, 약 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10 μm 이다. 몇몇 경우에서, 채널, 유전자좌, 또는 채널 및 유전자좌 둘 다의 직경은 약 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10 μm 미만이다. 몇몇 경우에서, 2개의 인접한 채널, 유전자좌, 또는 채널 및 유전자좌의 중심 사이의 거리는 약 1-500, 1-200, 1-100, 5-200, 5-100, 5-50, 또는 5-30, 예를 들어, 약 20 μm 이다.
- [0102] *표면 개질*
- [0103] 본 출원에서 표면 상에서 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 방법이 제공되는데, 이때 표면은 표면 개질을 포함한다. 몇몇 경우에서, 표면 개질은 기관 표면 또는 기관 표면의 선택된 위치 또는 영역의 하나 이상의 화학적 및/또는 물리적 특성을 변화시키기 위해 가색법 또는 감색법에 의한 표면의 화학적 및/또는 물리적 변경을 위해 이용된다. 예를 들어, 표면 개질은 (1) 표면의 습윤 특성을 변화시키는 것, (2) 표면을 작용화, 즉 표면 작용기를 제공하거나, 변경하거나 또는 치환하는 것, (3) 표면을 탈작용화, 즉 표면 작용기를 제거하는 것, (4) 달리 언급하지 않으면, 예들여 에칭을 통해 표면의 화학 조성을 변경시키는 것, (5) 표면 조도를 증가 또는 감소시키는 것, (6) 표면 상에 코팅, 예를 들어 표면의 습윤 특성과는 상이한 습윤 특성을 나타내는 코팅을 제공하는 것, 및/또는 (7) 표면 상에 미립자를 침착시키는 것을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0104] 몇몇 경우에서, 표면의 상부에 화학물질 층(접착 촉진제로 언급됨)의 첨가는 기관의 표면 상에서 유전자좌의 구조화된 패턴을 용이하게 한다. 접착 촉진의 적용을 위한 예시적인 표면은 유리, 규소, 이산화규소 및 질화규소를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 접착 촉진제는 고 표면 에너지를 가진 화학물질이다. 몇몇 경우에서, 제2 화학물질 층은 기관의 표면 상에 침착된다. 몇몇 경우에서, 제2 화학물질 층은 저 표면 에너지를 갖는다. 몇몇 경우에서, 표면 상에 코팅된 화학물질 층의 표면 에너지는 상기 표면 상에서 액적의 국부화를 지원한다. 선택된 패턴 배열에 따라, 유전자좌에서 유체 접촉의 면적 및/또는 유전자좌의 인접성은 변경될 수 있다.
- [0105] 몇몇 경우에서, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 합성을 위해 핵산 또는 다른 모이어티가 침착된 장치 표면, 또는 분해된 유전자좌는 매끄럽거나 실질적으로 평평하거나(예를 들어, 2차원), 또는 용기된 또는 침강된 피처(예를 들어, 3차원 피처)와 같은 불규칙을 갖는다. 몇몇 경우에서, 기관 표면은 화합물의 하나 이상의 상이한 층을 이용하여 개질된다. 그러한 관심 있는 개질 층은 무기 및 유기 층, 예를 들어 금속, 금속 산화물, 폴리머, 유기 저분자 등을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0106] 몇몇 경우에서, 장치의 분해된 유전자좌는 표면 에너지를 증가 및/또는 감소시키는 하나 이상의 모이어티로 작용화된다. 몇몇 경우에서, 모이어티는 화학적으로 불활성이다. 몇몇 경우에서, 모이어티는 원하는 화학 반응, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 합성 반응에서의 하나 이상의 과정을 지원하기 위해 구성된다. 표면의 표면 에너지, 또는 소수성은 표면 상에 부착하는 뉴클레오티드의 친화성을 결정하기 위한 요인이다. 몇몇 경우에서, 장치 작용화를 위한 방법은 (a) 이산화규소를 포함하는 표면을 보유하는 장치를 제공하는 단계; 및 (b) 본 출원에 기재되거나 또는 당해 기술분야에 공지된 적합한 실란화제, 예를 들어 유기작용성 알콕시실란 분자를 이용하여 표면을 실란화하는 단계를 포함한다. 방법 및 작용화제는 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된 미국 특허 5474796에 기재되어 있다.
- [0107] 몇몇 경우에서, 장치 표면은 전형적으로 장치 표면 상에 존재하는 반응성의 친수성 모이어티에 의해 장치 표면에 실란을 커플링하기에 효과적인 반응 조건 하에서 실란의 혼합물을 함유하는 유도체화 조성물과 접촉에 의해 작용화된다. 실란화는 일반적으로 유기작용성 알콕시실란 분자와 자가-어셈블리를 통해 표면을 커버한다. 또한, 현재 당해 기술분야에 공지된 다양한 실록산 작용화제는 예를 들어 표면 에너지를 감소 또는 증가시키기 위해 추가로 사용될 수 있다. 유기작용성 알콕시실란은 그들의 유기 작용에 따라 분류된다.
- [0108] *컴퓨터 시스템*
- [0109] 본 출원에 기재된 임의의 시스템은 컴퓨터에 작동 가능하게 연결될 수 있고, 로컬 또는 원격으로 컴퓨터를 통해 자동화될 수 있다. 다양한 예에서, 본 개시의 방법 및 시스템은 추가로 컴퓨터 시스템 상의 소프트웨어 프로그램 및 이의 용도를 포함할 수 있다. 따라서, 분배/진공/충전 기능의 동기화, 예를 들어 물질 침착 장치 이동,

분배 작용 및 진공 작동을 조화 및 동기화를 위한 컴퓨터화된 제어는 본 개시의 범위 내에 있다. 컴퓨터 시스템은 사용자가 특정한 염기 서열과 기관의 특정된 영역으로 정확한 시약을 전달하는 물질 침착 장치의 위치 사이의 인터페이스로 프로그래밍될 수 있다.

[0110] 도 3에 예시된 컴퓨터 시스템(300)은, 경우에 따라 고정된 매체(312)를 보유하는 서버(309)에 연결될 수 있는, 매체(311) 및/또는 네트워크 포트(305)로부터의 명령을 관독할 수 있는 논리적인 장치로서 이해될 수 있다. 도 3에 도시한 바와 같은 시스템은 CPU(301), 디스크 드라이브(303), 키보드(315) 및/또는 마우스(316)와 같은 임의의 입력 장치 및 임의의 모니터(307)를 포함할 수 있다. 데이터 통신은 로컬 또는 원격 위치에서 서버에 대한 지시된 통신 매체를 통해 달성될 수 있다. 상기 통신 매체는 데이터를 전송 및/또는 수신하기 위한 임의의 수단을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 통신 매체는 네트워크 결합, 무선 연결 또는 인터넷 연결일 수 있다. 이러한 연결은 월드 와이드 웹 상에서의 통신을 제공할 수 있다. 본 개시에 관한 데이터는 도 3에 예시한 바와 같이 당사자(322)에 의한 접수 및/또는 검토를 위해 그러한 네트워크 또는 연결로 전송될 수 있는 것으로 고려된다.

[0111] 도 4는 본 개시의 예시적인 예와 함께 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템(400)의 아키텍처를 예시하는 블록 다이어그램이다. 도 4에 도시된 바와 같이, 예시적인 컴퓨터 시스템은, 명령을 처리하기 위한 프로세서(402)를 포함할 수 있다. 프로세서의 비제한적인 예는 인텔(등록상표) Xeon(등록상표) 프로세서, AMD Opteron™ 프로세서, 삼성 32-bit RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0 프로세서, ARM Cortex-A8 삼성 S5PC100TM 프로세서, ARM Cortex-A8 애플 A4TM 프로세서, 마벨 PXA 930 프로세서, 또는 기능적으로 균등한 프로세서를 포함한다. 병렬 처리에는 복수의 스레드의 실행을 이용할 수 있다. 몇몇 경우에서, 다수의 컴퓨터, 휴대 전화, 및/또는 개인 정보 단말기 장치를 포함하는, 네트워크를 통해 단일 컴퓨터 시스템에서든, 클러스터에서든, 또는 시스템에 분산되어 있든, 다수의 프로세서 또는 다수의 코어를 갖는 프로세서가 또한 사용될 수 있다.

[0112] 도 4에 예시된 바와 같이, 고속 캐시(404)는 최근에 프로세서(402)에 의해 사용되었거나 자주 사용되는 명령 또는 데이터를 위한 고속 메모리를 제공하기 위해 프로세서(402)에 연결되거나 내장될 수 있다. 프로세서(402)는 프로세서 버스(408)에 의해 노스 브릿지(406)에 접속된다. 노스 브릿지(406)는 메모리 버스(412)에 의해 랜덤 액세스 메모리(RAM)(410)에 접속되고, 프로세서(402)에 의해 RAM(410)에 대한 액세스를 관리한다. 노스 브릿지(406)는 또한 칩셋 버스(416)에 의해 사우스 브릿지(414)에 접속된다. 사우스 브릿지(414)는 차례로 주변 장치 버스(418)에 접속된다. 주변 장치 버스는, 예를 들어 PCI, PCI-X, PCI Express, 또는 다른 주변 장치 버스일 수 있다. 노스 브릿지 및 사우스 브릿지는 종종 프로세서 칩셋으로 지칭되고, 프로세서, RAM 및 주변 장치 버스(418) 상의 주변 장치 구성 요소 사이의 데이터 전송을 관리한다. 일부 대체 아키텍처에서는, 별도의 노스 브릿지 칩 대신에, 노스 브릿지의 기능을 프로세서에 통합시킬 수 있다. 몇몇 경우에서, 시스템(400)은 주변 장치 버스(418)에 부착된 가속기 카드(422)를 포함할 수 있다. 가속기는 필드 프로그램 가능한 게이트 어레이(FPGA) 또는 특정 프로세싱을 가속화하기 위한 다른 하드웨어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 가속기는 적응 데이터 재구성, 또는 확장된 세트 처리에 사용되는 대수 표현식을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0113] 소프트웨어 및 데이터는 외부 스토리지(424)에 저장되고, 프로세서에 의한 사용을 위해 RAM(410) 및/또는 캐시(404)에 로딩될 수 있다. 시스템(400)은 시스템 자원을 관리하기 위한 운영 시스템을 포함하고, 운영 체계의 비제한적인 예는, Linux, Windows™, MACOSTM, BlackBerry OSTM, iOSTM 및 다른 기능적으로 동등한 운영 체계뿐만 아니라, 본 발명의 예시적인 예에 따라 데이터 저장 및 최적화를 관리하기 위한 운영 체계의 정상부에서 실행되는 응용 소프트웨어도 포함한다. 이 예에서, 시스템(400)은 또한 네트워크 결합 스토리지(NAS)와 같은 외부 스토리지에 네트워크 인터페이스를 제공하기 위해 주변 장치 버스에 연결된 네트워크 인터페이스 카드(NIC)(420 및 421) 및 분산 병렬 처리에 사용될 수 있는 다른 컴퓨터 시스템을 포함한다.

[0114] 도 5는 예시적인 실시양태에 따른 공유된 가상 주소 메모리 공간을 이용하는 멀티프로세서 컴퓨터 시스템의 블록 다이어그램이다. 시스템은 공유된 메모리 서브시스템(504)에 접근할 수 있는 다수의 프로세서(502a-f)를 포함한다. 시스템은 메모리 서브시스템(504)에 다수의 프로그램 가능한 하드웨어 메모리 알고리즘 프로세서(MAP)(506a-f)를 포함한다. 각각의 MAP(506a-f)는 메모리(508a-f) 및 하나 이상의 필드 프로그램 가능한 게이트 어레이(FPGA)(510a-f)를 포함할 수 있다. MAP는 구성 가능한 기능 유닛을 제공하며, 각각의 프로세서와 긴밀히 협조하여 처리하기 위해, 특정 알고리즘 또는 알고리즘의 일부가 FPGA(510a-f)에 제공될 수 있다. 예를 들어, MAP는 데이터 모델에 관한 대수 표현을 평가하고 예시적인 예에서 적응 데이터 재구성을 수행하는데 사용될 수 있다. 이 예에서, 각각의 MAP는 이러한 목적으로 모든 프로세서에 의해 전역으로 접근할 수 있다. 한 구성에서, 각각의 MAP는 직접 메모리 액세스(DMA)를 사용하여 관련 메모리(508a-f)에 접근할 수 있으며, 이는 각각의 마이크로프로세서(502a-f)와 독립적으로 그리고 비동기적으로 태스크를 실행할 수 있게 한다. 이 구성에서, MAP는

파이프라이닝 및 알고리즘의 병렬 실행을 위해 다른 MAP에 결과를 직접 제공할 수 있다.

[0115] 도 6은 다수의 컴퓨터 시스템(602a 및 602b), 다수의 휴대전화 및 개인 정보 단말기(602c), 그리고 네트워크 결합 스토리지(NAS)(604a 및 604b)를 갖는 네트워크를 도시하는 다이어그램이다. 예시적인 실시양태에서, 시스템(602a, 602b 및 602c)은 네트워크 결합 스토리지(NAS)(604a 및 604b)에 저장된 데이터에 대한 데이터 저장을 관리하고 데이터 액세스를 최적화할 수 있다. 컴퓨터 시스템(602a 및 602b), 휴대전화 및 개인 정보 단말기 시스템(602c)을 거쳐, 분산된 병렬 처리를 사용하여 수학적 모델이 데이터에 사용 및 평가될 수 있다. 컴퓨터 시스템(602a 및 602b), 휴대전화 및 개인 데이터 보조 시스템(602c)은 또한 네트워크 결합 스토리지(NAS)(604a 및 604b)에 저장된 데이터의 적응 데이터 재구성을 위한 병렬 처리를 제공할 수 있다. 도 6은 단지 예시를 도시하는 것이며, 다양한 다른 컴퓨터 아키텍처 및 시스템이 본 발명의 다양한 예와 연관되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 블레이드 서버를 사용하여 병렬 처리를 제공할 수 있다. 프로세서 블레이드는 백플레인을 통해 연결되어 병렬 처리를 제공할 수 있다. 저장은 별도의 네트워크 인터페이스를 통해 백플레인 또는 네트워크 결합 스토리지(NAS)로 연결될 수도 있다. 일부 예시적인 예에서, 프로세서는 다른 프로세서에 의한 병렬 처리를 위해서 별도의 메모리 공간을 유지하고, 네트워크 인터페이스, 백플레인 또는 다른 커넥터를 통해 데이터를 전송할 수 있다. 다른 예에서, 프로세서의 일부 또는 전부는 공유된 가상 주소 메모리 공간을 사용할 수 있다.

[0116] 본 출원에 기재된 임의의 시스템은 비밀시적인 컴퓨터 관독 가능한 저장 매체에 저장된 서열 정보를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 기재된 임의의 시스템은 컴퓨터 입력 파일을 포함한다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터 입력 파일은 서열 정보를 포함한다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터 입력 파일은 복수의 폴리뉴클레오티드 서열의 합성을 위한 명령을 포함한다. 몇몇 경우에서, 명령은 컴퓨터에 의해 수용된다. 몇몇 경우에서, 명령은 컴퓨터에 의해 처리된다. 몇몇 경우에서, 명령은 물질 침착 장치로 전송된다. 몇몇 경우에서, 비밀시적인 컴퓨터 관독 가능한 저장 매체는 경우에 따라 네트워킹된 디지털 처리 장치의 운영 체제에 의해 실행될 수 있는 명령을 포함하는 프로그램으로 암호화된다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터 관독 가능한 저장 매체는 디지털 처리 장치의 유형 성분이다. 몇몇 경우에서, 컴퓨터 관독 가능한 저장 매체는 CD-ROM, DVD, 플래시 메모리 장치, 고체 상태 메모리, 자기 디스크 드라이브, 자기 테이프 드라이브, 광 디스크 드라이브, 클라우드 컴퓨터 시스템 및 서비스 등을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 프로그램 및 명령은 매체에 영구적으로, 실질적으로 영구적으로, 반영구적으로, 또는 비밀시적으로 암호화된다.

[0117] 실시예

[0118] 후술하는 실시예는 본 발명의 다양한 예를 예시하기 위한 목적으로 제공되고, 어떤 방식으로든 본 발명을 제한하려는 의도는 없다. 본 출원에 기재된 방법과 함께 본 실시예는 현재 대표적인 바람직한 예이고, 예시적인 것이며, 본 발명의 범위에 대한 제한으로서 의도되지 않는다. 특허청구범위의 범위에 의해 규정되는 바와 같은 본 발명의 정신 내에 포함되는 변화 및 다른 용도는 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 발생할 것이다.

[0119] 실시예 1: 기관 표면의 작용화

[0120] 기관은 폴리뉴클레오티드의 라이브러리의 부착 및 합성을 지지하기 위해 작용화되었다. 기관 표면은 먼저 90% H₂SO₄ 및 10% H₂O₂를 포함하는 피라냐 용액(piranha solution)을 이용하여 20분 동안 습윤 세정되었다. 상기 기관은 DI수를 이용하여 몇 개의 비이커 내에서 세정되고, DI수 거위목형 수도꼭지 아래에 5분 동안 위치되고, N₂로 건조되었다. 상기 기관은 후속적으로 NH₄OH(1:100; 3 mL:300 mL) 중에 5분 동안 침지되고, 핸드건을 이용하여 DI수로 세정되고, DI수를 이용하여 3개의 연속적인 비이커 중에 1분 동안 각각 침지되고, 이어서 핸드건을 이용하여 DI수로 다시 세정되었다. 이어서, 상기 기관은 상기 기관 표면을 O₂에 노출시킴으로써 플라즈마 세정되었다. 이어서, 상기 기관은 SAMCO PC-300 장비를 사용하여 250 와트에서 1분 동안 다운스트림 모드로 O₂ 플라즈마 세정되었다.

[0121] 세정된 기관 표면은 하기 파라미터를 이용하는 YES-1224P 증착 오븐 시스템을 이용하여 N-(3-트리에톡시실릴프로필)-4-히드록시부티르아미드를 포함하는 용액으로 활성적으로 작용화되었다: 05 내지 1 torr, 60분, 70℃, 135℃ 증발기. 상기 기관 표면은 Brewer Science 200X 스핀 코터를 이용하여 레지스트 코팅되었다. SPRTM 3612 포토레지스트는 2500 rpm으로 40초 동안 상기 장치 상에 스핀 코팅되었다. 상기 기관은 Brewer 열판 상에서 90℃에서 30분 동안 예비 베이킹되었다. 상기 기관에 대해 Karl Suss MA6 마스크 얼라이너 장비를 이용하여 포토 리소그래피가 수행되었다. 상기 기관은 22초 동안 노광되고, 1분 동안 MSF 26A에서 현상되었다. 잔류 현상액은 핸드건으로 세정되고, 상기 기관은 5분 동안 물에 침지되었다. 상기 기관은 100℃ 오븐에서 30분 동안 베이킹되

고, 이어서 Nikon L200을 이용하여 리소그래피 결함에 대해 육안 검사되었다. SAMCO PC-300 장비를 사용하여 250 와트에서 1분 동안 O₂ 플라즈마 에칭하는 스컴 제거 과정을 이용하여 잔류 레지스트가 제거되었다.

[0122] 상기 기관 표면은 10 μ L의 부드러운 광유와 혼합된 퍼플루오로옥틸트리클로로실란 용액 100 μ L로 수동적으로 작용화되었다. 상기 기관은 챔버 내에 위치되고, 10분 동안 펌핑하고, 이어서 밸브를 닫고, 10분 동안 정지시켰다. 상기 챔버는 공기를 통하게 하였다. 상기 기관은 최대 출력(크레스트 시스템에서 9)에서 초음파 처리하면서 70°C에서 500 mL NMP 중에서 5분 동안 2회 침지를 수행함으로써 레지스트 스트립핑되었다. 이어서 상기 기관은 최대 출력으로 초음파 처리되면서 실온에서 500 mL 이소프로판올 중에서 5분 동안 침지되었다. 상기 기관은 200 프루프 에탄올 300 mL 중에 담기고, N₂를 불어 건조되었다. 작용화된 표면은 폴리뉴클레오티드 합성을 위한 지지체로서 작용하기 위해 활성화되었다.

[0123] **실시예 2: 올리고뉴클레오티드 합성 장치에서의 50-mer 서열의 합성**

[0124] 2차원 폴리뉴클레오티드 합성 장치는 플로우 셀(Applied Biosystems("ABI394 DNA 합성기")에 연결된 플로우 셀로 조립되었다. 상기 폴리뉴클레오티드 합성 장치는 N-(3-트리에톡시실틸프로필)-4-히드록시부티르아미드(Gelast)로 균일하게 작용화되었고, 본 출원에 기재된 폴리뉴클레오티드 합성 방법을 이용하여 50 bp("50-mer 폴리뉴클레오티드")의 예시적인 폴리뉴클레오티드를 합성하기 위해 사용되었다.

[0125] 50-mer의 서열은 서열번호 1에 나타난 바와 같았다.

[0126] 5' AGACAATCAACCATTGGGGTGGACAGCCTTGACCTCTAGACTTCGGCAT##TTTTTTTTT3' (서열번호: 1), 이때 #는 티미딘-숙시닐헥사미드 CED 포스포르아미다이트(ChemGenes의 CLP-2244)를 나타내며, 이는 탈보호 중 표면으로부터 폴리뉴클레오티드의 방출을 가능하게 하는 절단 가능한 링커이다.

[0127] 합성은 표 3의 프로토콜 및 ABI394 DNA 합성기의 표준 DNA 합성 화학(커플링, 캡핑, 산화 및 디블로킹)을 이용하여 수행하였다.

표 3

합성 프로토콜

일반적인 DNA 합성 공정 명칭	표 3	
	공정 단계	시간(초)
세척 (아세트오니트릴 세척 플로우)	아세트오니트릴 시스템 플러시	4
	플로우 셀로의 아세트오니트릴	23
	N2 시스템 플러시	4
	아세트오니트릴 시스템 플러시	4
DNA 염기 첨가 (포스포르아미다이트 + 활성화제 플로우)	활성제 매니폴드 플러시	2
	플로우 셀로의 활성화제	6
	활성제 + 플로우 셀로의 포스포르아미다이트	6
	플로우 셀에 활성화제	0.5
	활성제 + 플로우 셀로의 포스포르아미다이트	5
	플로우 셀로의 활성화제	0.5
	활성제 + 플로우 셀로의 포스포르아미다이트	5
	플로우 셀로의 활성화제	0.5
	활성제 + 플로우 셀로의 포스포르아미다이트	5
	25 초 동안 인큐베이션	25
세척 (아세트오니트릴 세척 플로우)	아세트오니트릴 시스템 플러시	4
	플로우 셀로의 아세트오니트릴	15
	N2 시스템 플러시	4
	아세트오니트릴 시스템 플러시	4
DNA 염기 첨가 (포스포르아미다이트 + 활성화제 플로우)	활성제 매니폴드 플러시	2
	플로우 셀에 활성화제	5
	활성제 + 플로우 셀로의 포스포르아미다이트	18
	25 초 동안 인큐베이션	25
세척 (아세트오니트릴 세척 플로우)	아세트오니트릴 시스템 플러시	4
	플로우 셀로의 아세트오니트릴	15
	N2 시스템 플러시	4
	아세트오니트릴 시스템 플러시	4

[0128]

		표 3	
일반적인 DNA 합성 공정 명칭		공정 단계	시간(초)
캡핑(CapA+B, 1:1, 플로우)		플로우 셀로의 CapA+B	15
세척 (아세트오니트릴 세척 플로우)		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		플로우 셀로의 아세트오니트릴	15
		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
산화(산화제 플로우)		플로우 셀로의 산화제	18
세척 (아세트오니트릴 세척 플로우)		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		N2 시스템 플러시	4
		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		플로우 셀로의 아세트오니트릴	15
		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		플로우 셀로의 아세트오니트릴	15
		N2 시스템 플러시	4
		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		플로우 셀로의 아세트오니트릴	23
		N2 시스템 플러시	4
디블록킹(디블록 플로우)		플로우 셀로의 대한 차단 해제	36
세척 (아세트오니트릴 세척 플로우)		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		N2 시스템 플러시	4
		아세트오니트릴 시스템 플러시	4
		플로우 셀로의 아세트오니트릴	18
		N2 시스템 플러시	4.13
		아세트오니트릴 시스템 플러시	4.13
		플로우 셀로의 아세트오니트릴	15

[0129]

[0130]

[0131]

포스포르아미다이트/활성제 조합은 플로우 셀을 통한 벌크 시약의 전달과 유사하게 전달되었다. 환경은 전체적인 시간 동안 시약으로 인해 "습윤" 상태를 유지하기 때문에, 건조 단계는 수행되지 않았다.

유량 제한기는 ABI 394 DNA 합성기로부터 제거되어 더 빠른 플로우를 가능하게 하였다. 유량 제한기 없이, 아미다이트(ACN 중의 0.1M), 활성화제, (ACN 중의 0.25M 벤조일티오테트라졸("BTT"; GlenResearch의 30-3070-xx)), 및 Ox(20% 피리딘 중의 0.02M I2, 10% 물, 및 70% THF)의 유량은 대략 $\sim 100 \mu\text{l}/\text{초}$ 였고, 아세트오니트릴("ACN") 및 캡핑 시약(CapA 및 CapB의 1:1 혼합, 이때 CapA는 THF/피리딘 중의 아세트산 무수물이고, CapB는 THF 중의 16% 1-메틸이미다졸이다)의 경우, 대략 $\sim 200 \mu\text{l}/\text{초}$ 였고, 및 디블로킹(톨루엔 중의 3% 디클로로아세트산)의 경우, 대략 $\sim 300 \mu\text{l}/\text{초}$ 였다(유량 제한기가 존재하는 모든 시약의 경우 $\sim 50 \mu\text{l}/\text{초}$ 와 비교) 산화제를 완전히 밀어내기 위한 시간이 관찰되고, 그에 따라 화학물질 흐름 시간을 위한 타이밍이 조정되고, 추가의 CAN 세척이 상이한 화학물질 사이에 도입되었다. 폴리뉴클레오타이드 합성 후, 칩은 75 psi에서 하루밤 기체상 암모니아에서 탈보호되었다. 5개의 물방울이 표면에 적용되어 폴리뉴클레오타이드를 어셈블링하였다. 이어서, 어셈블링된 폴리뉴클레오타이드는 바이오어널라이저 소 RNA 칩 상에서 분석되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0132]

[0133]

실시예 3: 올리고뉴클레오티드 합성 장치에서의 100-mer 서열의 합성

100-mer 폴리뉴클레오티드 ("100-mer 폴리뉴클레오티드";
5' CGGGATCCTTATCGTCATGTCGTACAGATCCCGACCATTTTGCTGTCCACCAGTCATGCTAGCCATACCATGATGATGATGATGAGAACCCCGCAT
##TTTTTTTTTT3', 이때 #는 티미딘-숙시닐 헥사미드 CED 포스포라미다이트(ChemGenes의 CLP-2244)를
나타낸다; 서열번호: 2)를 2개의 상이한 실리콘 칩 상에서 제조하기 위해, 50-mer 서열의 합성을 위한 실시예 2
에 기재된 바와 동일한 공정이 사용되었는데, 제1 실리콘 칩은 N-(3-트리에톡시실릴프로필)-4-히드록시부티르아
미드로 균일하게 작용화되었고, 제2 실리콘 칩은 11-아세톡시운데실트리에톡시실란과 n-데실트리에톡시실란의
5/95 혼합물로 작용화되었으며, 및 상기 표면으로부터 추출된 폴리뉴클레오티드는 바이오어널라이저 장비 상에
서 분석되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0134] 2개의 칩 유래의 모두 10개의 샘플은 하기 열 사이클링 프로그램을 이용하고, 50 μl 의 PCR 믹스(25 μl 의 NEB Q5 마스터믹스, 25 μl 의 10 μM 정방향 프라이머, 25 μl 의 10 μM 역방향 프라이머, 1 μl 의 상기 표면으로부터 추출된 폴리뉴클레오티드, 및 50 μl 까지 물) 중의 정방향 프라이머(5'ATGCGGGTTCATCATC3'; 서열번호: 3) 및 역방향 프라이머(5'CGGGATCCTTATCGTCATCG3'; 서열번호: 4)를 이용하여 추가로 PCR 증폭되었다:

[0135] 98℃, 30초

[0136] 98℃, 10초; 63℃, 10초; 72℃, 10초; 12 사이클 반복

[0137] 72℃, 2분.

[0138] 또한, PCR 생성물을 바이오어널라이저 상에서 분석하였는데(데이터는 나타나지 않음), 100-mer 위치에서 날카로운 피크를 확인하였다. 이어서, PCR 증폭된 샘플은 클로닝되고, 생거 시퀀싱되었다. 표 4는 칩 1 유래의 스팟 1-5로부터 얻은 샘플 및 칩 2 유래의 스팟 6-10으로부터 얻은 샘플에 대한 생거 시퀀싱 결과를 요약한 것이다.

표 4

시퀀싱 결과

스팟	에러율	사이클 효율
1	1/763 bp	99.87%
2	1/824 bp	99.88%
3	1/780 bp	99.87%
4	1/429 bp	99.77%
5	1/1525 bp	99.93%
6	1/1615 bp	99.94%
7	1/531 bp	99.81%
8	1/1769 bp	99.94%
9	1/854 bp	99.88%
10	1/1451 bp	99.93%

[0139]

[0140] 따라서, 합성된 폴리뉴클레오티드의 높은 품질 및 균일성은 상이한 표면 화학을 가진 2개의 칩에서 반복되었다. 전체적으로, 시퀀싱된 100-mer의 262중 233에 상응하는 89%가 에러 없는 완벽한 서열이었다. 표 5는 스팟 1-10 유래의 폴리뉴클레오티드 샘플로부터 얻은 서열에 대한 에러 특성을 요약한 것이다.

표 5

에러 특성

샘플 ID/ 스팟 번호	OSA_00 46/1	OSA_00 47/2	OSA_00 48/3	OSA_00 49/4	OSA_00 50/5	OSA_00 51/6	OSA_00 52/7	OSA_00 53/8	OSA_00 54/9	OSA_00 55/10
총 서열	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
서열결정 품질	28 중 25	27 중 27	30 중 26	23 중 21	26 중 25	30 중 29	31 중 27	31 중 29	29 중 28	28 중 25
올리고 품질	25 중 23	27 중 25	26 중 22	21 중 18	25 중 24	29 중 25	27 중 22	29 중 28	28 중 26	25 중 20
ROI 매칭 카운트	2500	2698	2561	2122	2499	2666	2625	2899	2798	2348
ROI 돌연변이	2	2	1	3	1	0	2	1	2	1
ROI 다중 염기 결실	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 소 삽입	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ROI 단일 염기 결실	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
대 결실 카운트	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
돌연변이: G>A	2	2	1	2	1	0	2	1	2	1
돌연변이: T>C	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ROI 에러 카운트	3	2	2	3	1	1	3	1	2	1
ROI 에러율	Err: 834 중 ~1	Err: 1350 중 ~1	Err: 1282 중 ~1	Err: 708 중 ~1	Err: 2500 중 ~1	Err: 2667 중 ~1	Err: 876 중 ~1	Err: 2900 중 ~1	Err: 1400 중 ~1	Err: 2349 중 ~1
ROI 마이너스 프라이머 에러율	MP Err: 763 중 ~1	MP Err: 824 중 ~1	MP Err: 780 중 ~1	MP Err: 429 중 ~1	MP Err: 1525 중 ~1	MP Err: 1615 중 ~1	MP Err: 531 중 ~1	MP Err: 1769 중 ~1	MP Err: 854 중 ~1	MP Err: 1451 중 ~1

[0141]

[0142]

실시예 4: 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0143]

플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응

[0144]

플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응이 제조되었다. 표 6의 농도에 따라 물, dNTP(New England Biolabs), 앰플리가아제 완충제(Epicentre), ExoIII(New England Biolabs), Phusion(New England Biolabs), 앰플리가아제(Epicentre), 및 FenI(New England Biolabs)을 혼합하고, 96웰 플레이트 내에 분할하여 담았다. DNA 및 벡터는 표 6에 나타낸 바와 같은 농도로 첨가되었다. 플레이트는 밀봉되었고, 1000 rpm에서 30초 동안 혼합되었고, 잠시 동안 원심분리되었다. 플레이트는 105℃의 가열된 리드를 이용하여 50℃에서 30분 동안 인큐베이션되었고, 이어서 4℃로 냉각되었다. 반응은 40 μL의 차가운 완충제에서 1:5로 희석되었다.

표 6

반응 농도

시약	최종 농도
벡터	4 nM
유전자 단편 1	4 nM
dNTP	.2 mM
10X 앰플리가아제 완충제	1X
ExoIII	10U
Phusion	0.2U
앰플리가아제	1U
FenI	3.2U
물	나머지 물 10 µL 까지

[0145]

[0146] 시험관내 PCR 어셈블리

[0147] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응의 제조 후, PCR 증폭이 수행되었다. 25 µL의 PCR 반응은 하기 표 7의 반응 조건에 따라 수행되었고, 표 8에 따른 열사이클러 조건을 이용하여 증폭되었다. PCR 생성물은 바이오어널라이저(Agilent)에서 분석되었다(도 7). 특정되지 않은 백그라운드 밴드(701), 환형 벡터(703) 및 벡터 내로 삽입된 어셈블링된 DNA(705)가 검출되었다.

표 7

PCR 반응 조건

시약	반응 부피 (µL)
물	16.5
10X 서모폴 완충제	2.5
10 mM dNTP	0.5
PCR 프라이머 1 100 uM	0.125
PCR 프라이머 2 100 uM	0.125
희석된 반응 생성물	5
Taq 폴리머라아제	0.25
총 부피	25

[0148]

표 8

써모사이클러 조건

온도	시간	사이클 수
95°C	30 초	1
95°C	20 초	25
55°C	20 초	
68°C	3 분	
68°C	5 분	1
4°C	무한	

[0149]

[0150] 형질전환

[0151] PCR 반응 후, 2 μ L의 희석된 반응은 20 μ L의 일렉트로컴피턴스 세포 10G(Lucigen) 내로 전기천공법에 의해 형질전환되었다. 세포는 600 μ L의 예비 가온된 루시젠 리커버리 배지를 이용하여 리커버리되었다. 샘플은 루시젠 리커버리 배지 내로 1:2로 순차 희석되었고, 7 μ L는 레녹스+카브 플레이트 상에 스팟팅되었다. 플레이트는 37 °C에서 하룻밤 동안(약 16시간) 성장되었다. 반응 효율은 CFU 식: (콜로니의 수*총 반응 부피)/(플레이팅 부피*희석률)을 이용하여 콜로니 형성 유닛(CFU)을 결정하기 위해 콜로니를 카운트함으로써 결정되었다.

[0152] 이. 콜라이 형질전환체의 콜로니 카운트는 표 9에 나타난다. 배수 변화는 인서트를 보유하지 않는 콜로니의 수와 비교한 인서트(1X 희석)를 갖는 콜로니의 수에 의해 결정되었다.

표 9

콜로니 카운트

반응	인서트를 갖지 않는 콜로니의 수	인서트를 갖는 콜로니의 수 (1X 희석)	인서트를 갖는 콜로니의 수 (10X 희석)	배수 변화
50 C - Exo	19	23		1.2
50°C 10U ExoIII	58	929	100	16
65°C 10U ExoIII	25	33		1.3

[0153]

[0154] 어셈블링된 구조체의 판독치(표 10)로서 이. 콜라이 형질전환체의 수에 대한 시험관내 PCR 분석의 상관관계(도 7)가 관찰되었다. 구체적으로, 선형화된 벡터는 서로 40개 염기쌍 상동성을 함유하는 1개의 DNA 인서트와 어셈블링되었다. 이. 콜라이에서의 콜로니 형성은 인서트와 어셈블링된 후 벡터의 재형화와 상관관계가 있다. 시험관내 PCR 분석으로부터의 피크 크기는 형질전환 후 이. 콜라이 콜로니 카운트의 수와 상관관계가 있었다. 음성 대조군 반응은 DNA 인서트가 결여되었고, 낮은 수준의 백그라운드 콜로니를 나타냈다.

[0155] 실시예 5: 3개의 유전자 단편을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0156] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4와 유사하게 수행되었다. 3개의 DNA 단편이 벡터 내로 삽입되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응의 제조 후, PCR 증폭은 실시예 4와 유사하게 수행되

었다. PCR 생성물은 바이오어널라이저(Agilent)에서 분석되었다(도 8). 재환형화된 분해된 벡터(801) 및 벡터 내에 삽입된 어셈블링된 DNA(803)가 검출되었다.

[0157] 실시예 6: 다양한 농도의 Fen1 및 ExoIII를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0158] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4와 유사하게 제조되었다. 다양한 조건은 표 10에 나타난 바와 같이 테스트되었다.

표 10

반응 조건

샘플	반응 조건
1	베이스라인
2	앰플리가아제 없음
3	Phusion 없음
4	Fen1 없음
5	2X Fen1 (6.4U Fen1)
6	0.5X Fen1(1.7U Fen1)
7	2X Fen1 (6.4U Fen1) 2X ExoIII (20U ExoIII)
8	0.5X Fen1(1.7U Fen1) 0.5X ExoIII (5U ExoIII)
9	0.25X Fen1 (0.8U Fen1) 0.25X ExoIII (2.5U ExoIII)
10	시험관내 재조합 클로닝으로부터의 반응 조건

[0159]

[0160] 콜로니의 수는 도 9에 나타난 바와 같이 각각의 샘플에 대해 카운트되었다. 데이터는 적정된 Fen1 및 ExoIII를 이용하여 카운트된 콜로니가 베이스라인보다 현저히 더 많았고, 시험관내 PCR 분석에서 더 높은 증폭 생성물과 상관관계가 있음을 나타냈다.

[0161] 콜로니는 단리되었고, 어셈블리는 콜로니 PCR에 의해 분석되었다. 반응은 단편 분석기(모세관 겔 전기영동)에서 수행되었다. 적합한 어셈블리는 PCR 생성물의 크기에 의해 결정되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0162] 단리된 콜로니는 하룻밤 성장되었고, 어셈블링된 벡터 DNA를 단리하기 위해 미니프랩되었다. 샘플은 차세대 시퀀싱에 의해 분석되었다. Fen1 및 ExoIII 농도를 변화시키는 것은 표 11에 나타난 바와 같이 정확하게 어셈블링된 구조체의 양을 변화시켰다. 모든 유니버설 프라이머 측면 서열은 통과된 샘플에서 제거되었다. 콜로니 PCR에서 적절한 크기를 보유한 7/10 샘플에서, 모두 7개가 상동 부위에서 NGS를 통과하였다.

표 11

콜로니 데이터

반응	픽킹된 콜로니	콜로니 PCR에 의한 정확한 크기 %	통과된 NGS 분석 %
베이스라인 - 인서트	1	0	0
베이스라인+인서트	7	0	0
2X Fen1 (6.4U Fen1)	10	70	70
2X Fen1 (6.4U Fen1) 2X ExoIII (20U ExoIII)	10	0	0
0.5X Fen1(1.7U Fen1) 0.5X ExoIII (5U ExoIII)	10	50	30-50
0.25X Fen1 (0.8U Fen1) 0.25X ExoIII (2.5U ExoIII)	10	20	20

[0163]

[0164] 실시예 7: 다양한 농도의 효소를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0165] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4와 유사하게 제조되었다. 3개의 유전자 단편은 벡터 내로 삽입되었다. 실험은 베이스라인 및 Phusion, 앰플리가아제, ExoIII, 및 Fen1에 대한 변형으로서 하기 표 12에 따른 반응 조건을 이용하여 수행되었다. Phusion, 앰플리가아제, ExoIII, 및 Fen1의 농도는 표 13에 나타난다.

표 12

반응 조건

시약	최종 농도
벡터	4 nM
유전자 단편	4 nM
dNTP	0.2 mM
10X 앰플리가아제 완충제	1X
ExoIII	1U
Phusion	0.2U 또는 0.1U
앰플리가아제	1U
Fen1	0.32U
물	나머지 물 10 μ L 까지

[0166]

표 13

효소 농도

	반응 조건
1	0.32U Fen1 1U ExoIII 0.2U Phusion 1U 앰플리가아제
2	0.32U Fen1 1U ExoIII 0.1U Phusion 0.5U 앰플리가아제
3	0.32U Fen1 1U ExoIII 0.1U Phusion 1.0U 앰플리가아제
4	0.32U Fen1 1U ExoIII 0.05U Phusion 1.0U 앰플리가아제
5	0.32U Fen1 1.5U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
6	4.8U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
7	0.32U Fen1 0.5U ExoIII 0.05U Phusion 1.0U 앰플리가아제
8	0.32U Fen1 1.0U ExoIII 0.1U Phusion

[0167]

	0.1U 앰플리가아제
9	0.32U Fen1 1.0U ExoIII 0.1U Phusion 0.25U 앰플리가아제
10	0.32U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 0.5U 앰플리가아제
11	0.32U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 0.25U 앰플리가아제
12	0.32U Fen1 0.5U ExoIII 0.1U Phusion 1.0U 앰플리가아제
13	3.2U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
14	0.32U Fen1 0.5U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
15	0.32U Fen1 1.5U ExoIII 0.1U Phusion 1.0U 앰플리가아제
16	0.32U Fen1 1.5U ExoIII 0.05U Phusion 1.0U 앰플리가아제

[0168]

17	3.2U Fen1 0.5U ExoIII 0.2U Phusion 0.5U 앰플리가아제
18	3.2U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 0.5U 앰플리가아제
19	3.2U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 0U 앰플리가아제
20	4.8U Fen1 0.5U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
21	0.32U Fen1 1.5U ExoIII 0.5U Phusion 1.0U 앰플리가아제
22	3.2U Fen1 0.5U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
23	0.32U Fen1 1.0U ExoIII 0.2U Phusion 0.1U 앰플리가아제
24	0.32U Fen1 0.5U ExoIII 0.5U Phusion 1.0U 앰플리가아제
25	0.32U Fen1 1.0U ExoIII

[0169]

	0.5U Phusion 1.0U 앰플리가아제
26	3.2U Fen1 10.0U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제
27	3.2U Fen1 5.0U ExoIII 0.2U Phusion 1.0U 앰플리가아제

[0170]

[0171]

도 10과 관련하여, 평균 콜로니 형성 유닛(CFU)(회색 막대)은 각각의 상이한 효소 비율에 대해 측정되었다. 또한, 정확한 어셈블리의 퍼센트는 콜로니 PCR(cPCR)에 의해 결정된 바와 같이 측정되었다(흑색 원). 제시된 데이

터는 결과의 평균이다.

[0172] 상이한 효소 비율을 이용하여, 증가된 수의 CFU 및 개선된 퍼센트의 정확한 어셈블리가 존재하였다(도 10). 0.32 U의 Fen1, 1 U의 ExoIII, 0.2 U의 Phusion, 및 1 U의 앰플리가아제를 포함하는 반응 조건은 다른 반응 조건과 비교하여 CFU의 수에서 가장 높은 증가 및 85% 초과와 정확한 어셈블리 퍼센트를 나타냈다.

[0173] 실시예 8: 1.8 kb 단편의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0174] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4와 유사하게 제조되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 1 U의 ExoIII, 0.2 U의 Phusion, 1 U의 앰플리가아제, 및 0.32 U의 Fen1의 효소 농도를 이용하고, 인서트와 함께(흑색 막대) 및 인서트 없이(빛금 막대, 좌측부터 세 번째 막대) 수행되었다. 또한, 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 1 U의 ExoIII, 0.1 U의 Phusion, 1 U의 앰플리가아제, 및 0.32 U의 Fen1의 효소 농도를 이용하고, 인서트와 함께(흑색 막대) 및 인서트 없이(빛금 막대, 좌측부터 네 번째 막대) 수행되었다. 이어서, 스폿 플레이트로부터의 콜로니 형성 유닛이 측정되었다(Y축). 도 11과 관련하여, 인서트가 없는 반응과 비교하여 인서트를 포함하는 반응에서 증가된 수의 CFU가 존재하였다.

[0175] 실시예 9: 2개의 DNA 단편의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0176] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4와 유사하게 제조되었다. 콜로니 형성 유닛(CFU)에 대해 상이한 양의 투입 DNA 또는 선형화된 벡터가 분석되었다. 테스트된 투입된 DNA의 양은 2 nM 또는 4 nM의 선형화된 벡터였다. 도 12와 관련하여, 2개의 DNA 단편은 어셈블링되었고, 콜로니 형성 유닛의 양에 대한 출발 물질의 양에는 긍정적인 상관관계가 존재하였다.

[0177] 실시예 10: DNA 벡터 내로의 멀티피스 DNA 어셈블리

[0178] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4와 유사하게 제조하였다. 실험은 표 14에 나타난 바와 같은 시약의 반응 농도를 이용하여 수행되었다. 반응은 얼음 위에서 제조되었고, 여러 가지 시약의 첨가 후, 반응은 50℃에서 30분 동안 수행되었다. 이어서, 반응물은 1:5로 희석되었고, 이. 콜라이 내로 형질전환되었다.

표 14

방법 1 반응 조건

시약	5 μ L 반응	최종 농도
dNTP (10 mM)	0.1	.2 mM
10x 앰플리가아제 완충제	0.5	1X
ExoIII (100 U/ μ L)	0.005	0.1 U/ μ L
Phusion (2 U/ μ L)	0.05	0.02 U/ μ L
앰플리가아제 (5 U/ μ L)	0.1	0.1 U/ μ L
Fen1 (32 U/ μ L)	0.005	0.032 U/ μ L
벡터 DNA		20 fmol
인서트 DNA		40 fmol/인서트
물 *	5 μ L 까지	

[0179]

[0180] 이어서, 콜로니 형성 유닛(CFU)이 측정되었다. 도 13에 나타난 바와 같이, 콜로니 형성 유닛(y축)은 테스트된 상이한 유전자(x축)에 대해 측정되었다. 데이터로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 기재된 반응 조건에 따른 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 높은 CFU 및 어셈블리 정확도 비율을 생성하였다.

[0181] 실시예 11: 많은 양의 ExoIII를 이용하는 DNA 벡터 내로의 멀티피스 DNA 어셈블리

[0182] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4 및 실시예 10과 유사하게 제조되었다. ExoIII의 농도는 실시예 10과 비교하여 16배 증가되었다. 반응 농도는 표 15에 나타난다. 반응은 얼음 위에서 제조되었고, 여

러 가지 시약의 첨가 후, 반응은 65℃에서 30분 동안 수행되었다. 이어서, 반응물은 1:5로 희석되었고, 이. 콜라이 내로 형질전환되었다.

표 15

방법 2 반응 조건

시약	5 μ L 반응	최종 농도
dNTP (10mM)	0.1	.2 mM
10x 앰플리가아제 완충제	0.5	1x
ExoIII 100U/ μ L	0.08	1.6 U/ μ L
Phusion 2 U/ μ L	0.05	0.02 U/ μ L
앰플리가아제 5 U/ μ L	0.1	0.1 U/ μ L
Fen1 32 U/ μ L	0.005	0.032 U/ μ L
벡터 DNA		20 fmol
인서트 DNA		40 fmol/인서트
물 *	5 μ L 까지	

[0183]

[0184]

이어서, 콜로니 형성 유닛이 측정되었다. 도 14a에 나타낸 바와 같이, 콜로니 형성 유닛(y축)은 방법 1에 따른 반응 농도(표 14) 및 방법 2(표 15)에 따른 반응 농도를 이용하는 테스트된 상이한 유전자(x축)에 대해 측정되었다. 표 14a의 결과는 방법 2를 이용하는 더 높은 CFU 및 더 큰 어셈블리 정확도를 나타낸다.

[0185]

또한, 차세대 시퀀싱(NGS)이 수행되었다. 도 14b에 나타낸 바와 같이, 비어 있는 또는 낮은 커버리지(백색 막대), 미스어셈블리(점이 있는 막대), 통과 클론(수평 막대), 및 SNP(흑색 막대)는 방법 1(표 14)에 따른 반응 농도 및 방법 2(표 15)에 따른 반응 농도를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 후 측정되었다. NGS 결과는 더 높은 CFU 및 개선된 어셈블리 정확도가 방법 2를 이용하여 관찰되었다는 관점에서 도 14a와 유사한 결과를 나타냈다. 도 14c와 관련하여, 어셈블리 비율(y축)은 방법 1 및 방법 2(x축)을 이용하여 비교되었다. 어셈블리 정확도 비율은 방법 1과 비교하여 방법 2를 이용하여 개선되었다.

[0186]

본 실시예는 기재된 반응 조건을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 더 높은 콜로니 형성 유닛 및 개선된 어셈블리 정확도를 생성함을 나타낸다.

[0187]

실시예 12: 브릿지 어셈블리 방법을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0188]

플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4 및 실시예 10과 유사하게 제조되었다. 반응 조건은 표 14에 나타낸다. 또한, 40 fmol의 DNA 브릿지가 사용되었다.

[0189]

다양한 샘플은 브릿지를 보유하지 않는 어셈블리(음성 대조군), 40개의 염기쌍 상동 서열을 포함하는 단편(양성 대조군), 각각의 단편에 대해 40개의 염기쌍 상동 서열을 포함하는 이중 가닥 DNA 브릿지, 및 각각의 단편에 대해 50개의 염기쌍 상동 서열을 포함하는 이중 가닥 DNA 브릿지를 포함하였다. 반응은 제조되었고, 이. 콜라이 내로 형질전환되었다. 이어서, 정확한 어셈블리의 수 및 정확한 어셈블리의 퍼센트가 결정되었고, 표 16에 나타낸다.

표 16

브릿지 어셈블리 방법

샘플 설명	테스트된 클론	정확한 어셈블리	% 정확한 어셈블리
음성 대조군 (브릿지 없음)	12	0	0
양성 대조군 (단편은 40 bp 상동성을 가짐)	12	12	100
각각의 인서트에 대해 40 bp 상동성을 갖는 dsDNA 브릿지	12	12	100
각각의 인서트에 대해 50 bp 상동성을 갖는 dsDNA 브릿지	12	12	100

[0190]

[0191]

표 16에 나타난 바와 같이, 40개의 염기쌍 및 50개의 염기쌍의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 브릿지의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 90% 초과로 정확한 어셈블리를 생성하였다. 또한, 도 15a에 나타난 바와 같이, 40개의 염기쌍 및 50개의 염기쌍의 dsDNA 브릿지를 이용하는 어셈블리는 음성 대조군과 비교하여 더 높은 레벨의 어셈블리를 생성하였다.

[0192]

브릿지 어셈블리 방법을 이용하는 CFU가 측정되었다. 도 15b에 나타난 바와 같이, 다양한 양의 인서트(40 fmol, 225 fmol, 또는 500 fmol)로 단일 가닥 DNA(ssDNA)를 이용하는 어셈블리 유래의 콜로니 형성 유닛은 음성 대조군(대조군)보다 더 높았다. 양성 대조군으로서, ssDNA는 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 생성하기 위해 PCR 증폭되었고, 어셈블링되었다.

[0193]

데이터는 브릿지 핵산을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리에 의한 ssDNA의 어셈블리는 정확한 어셈블리의 더 높은 퍼센트 및 더 높은 수의 콜로니 형성 유닛을 생성하였다.

[0194]

실시예 13: 12개의 단편의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0195]

플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4 및 실시예 10과 유사하게 제조되었다. 다수의 단편은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12개의 단편을 포함하는 벡터 내로 어셈블링되었다. 각각의 DNA 단편은 500개의 염기쌍이었다. 어셈블리 반응 후, 반응물은 이. 콜라이 내로 형질전환되었고, 콜로니 형성 유닛이 측정되었다. 도 16a는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 및 12개 단편의 어셈블리에 대한 콜로니 형성 유닛의 그래프를 나타낸다.

[0196]

또한, 차세대 시퀀싱(NGS)이 수행되었다. 도 16b에 나타난 바와 같이, 비어 있는 또는 낮은 커버리지(백색 막대), 미어셈블리(점이 있는 막대), 통과 클론(수평 막대), 및 SNP(흑색 막대)는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 후 측정되었다. 또한, 통과 비율은 도 16c에 나타난 바와 같이 측정되었다. 데이터는 12개의 단편의 어셈블리가 성공적인 클로닝 및 높은 통과 비율을 나타낸다.

[0197]

실시예 14: 적은 양의 폴리머라아제를 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0198]

플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응은 실시예 4 및 실시예 10과 유사하게 제조되었다. Phusion 폴리머라아제의 농도는 실시예 10과 비교하여 10배였다. 반응 농도는 표 17에 나타낸다. 반응은 얼음 위에서 제조되었고, 다양한 시약의 첨가 후, 반응은 65°C에서 10-30분 동안 수행되었다. 3개의 단편을 포함하는 반응은 플라스미드 내로 클로닝되었고, 이. 콜라이 내로 형질전환되었다. 콜로니 형성 유닛은 도 17에 나타난 바와 같이 10분 인큐베이션 및 30분 인큐베이션 후에 측정되었다. 실시예 11에 기재된 반응 농도(방법 2)와 비교하여 표 17의 반응 농도에 따라 감소된 Phusion 폴리머라아제를 이용하는 감소된 수의 CFU가 존재하였다. 유사한 CFU는 10

분 인큐베이션 또는 30분 인큐베이션 후에 측정되었다. 데이터는 클로닝 효율이 감소된 양의 폴리머라아제를 이용하여 개선되었음을 나타낸다.

표 17

방법 3 반응 조건

마스터 믹스	5 μ L 반응	최종 농도
dNTP	0.1	.4 mM
10x 앰플리가아제 완충제(Epicenter)	0.5	2x
ExoIII 100 U/ μ L (NEB)	0.08	1.6 U/ μ L
Phusion 2 U/ μ L (NEB)	0.005	0.002 U/ μ L
앰플리가아제 5 U/ μ L (Epicenter)	0.1	0.1 U/ μ L
Fen1 32 U/ μ L (NEB)	0.005	0.032 U/ μ L
물 *	1.695	

[0199]

[0200] 실시예 15: 비클론 단편의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리

[0201] 비클론 단편의 어셈블리의 반응 효율이 결정되었다. 반응은 표 15에 나타낸 바와 같은 방법 2 및 표 17에 나타낸 바와 같은 방법 3을 이용하여 2개의 DNA 단편을 어셈블링하기 위해 제조되었다. 이어서, 반응은 65°C에서 10-30분 동안 인큐베이션되었다. 어셈블리 PCR 생성물은 3000개의 염기쌍인 정확하게 어셈블링된 단편을 이용하여 바이오어널라이저(도 18a)에서 분석되었다. 도 18a와 관련하여 (1801)은 어셈블링되지 않은 유전자 단편이고, (1803)은 방법 2(적색 선, 1805) 및 방법 3(청색 선, 1807)을 이용하여 어셈블링된 유전자 단편이다.

[0202] 또한, 비클론 어셈블리가 결정되었다. 도 18b와 관련하여, 형광 단위(y축)는 유전자 1 및 유전자 2를 위한 방법 2 또는 방법 3 반응 조건을 이용하는 10분, 20분, 또는 30분 동안의 인큐베이션에 대해 측정되었다. 방법 2와 비교하여 방법 3을 이용하는 10분, 20분, 또는 30분의 인큐베이션에서 형광 단위의 증가가 존재하였다.

[0203] 실시예 16: 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 이용하는 개선된 어셈블리

[0204] 실시예 14에 기재된 것과 유사한 반응 조건을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 상이한 비교기에 의한 어셈블리와 비교되었다. 12개의 500 bp 서열이 생성되었고, 벡터 내로 1개 내지 10개의 DNA 단편의 어셈블리를 위한 일련의 구조체가 디자인되었다. DNA는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법, 비교기 1 방법, 및 비교기 2 방법을 이용하여 상동성 단부로 어셈블링되었다. 비교기 1 어셈블리는 PCR에 의해 또는 DNA 합성에 의해 신속하게 도입된 구조체의 단부에서의 상동성에 의존한다. 비교기 1 어셈블리 내의 각각의 단편은 상이한 쌍의 PCR 프라이머를 필요로 한다. 비교기 2 방법은 변경된 오버랩 영역을 가진 핵산 단편을 위한 어셈블리 방법이다. 다수의 상동성 길이 및 인큐베이션 시간의 효과가 결정되었다.

[0205] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 65°C에서 수행되었다. 65°C에서 대부분의 2차 구조는 제거되었고, 어셈블리 신뢰성은 크게 개선되었다(데이터는 도시하지 않음).

[0206] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법, 비교기 1 방법, 및 비교기 2 방법을 이용하는 어셈블리의 효율 및 정확성이 결정되었다. 효율은 콜로니 형성 유닛(CFU)을 이용하여 결정되었고, 정확성은 차세대 시퀀싱 (NGS)에 의해 결정되었다.

[0207] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법, 비교기 1 방법, 및 비교기 2 방법을 이용하는 효율은 어댑터 서열을 포함하는 이중 가닥 DNA(dsDNA) 비클론 단편에 대해 결정되었다. 어댑터 서열은 유니버설 프라이머 쌍으로

서 작용하였다. 상동성 단부를 포함하는 dsDNA("어댑터-오프")는 각각의 구조체에 특이적인 프라이머를 이용하여 dsDNA 단편을 증폭함으로써 생성되었다. 각각의 단편은 그들의 의도된 목적(destination)에 대한 오버랩핑 상동성의 40 또는 20 bp를 함유하였다. 1개 내지 10개의 dsDNA 단편은 선형화된 플라스미드 내로 어셈블링되었고, 이, 콜라이 내로 형질전환되었다. 1개의 단편 어셈블리에 대해, 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법, 비교기 1 방법, 및 비교기 2 방법은 강건한 콜로니 형성 유닛을 생성하였다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법은 반응 시간, 상동성 길이, 및 어셈블링된 조각의 수에 무관하게 더 높은 콜로니 형성 유닛을 생성하였다(도 19a). 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법은 6개 이상의 단편에 대한 단편 어셈블리에 대해 백그라운드보다 더 높은 콜로니 형성 유닛을 생성하였다(도 19a). 단편의 수가 증가한 경우, 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법은 10분 반응과 비교하여 30분 반응으로 더 효율적이었다(도 19a). 또한, 25 bp 상동성 길이는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법, 비교기 1 방법, 및 비교기 2 방법을 이용하여 테스트되었는데, 3가지 방법 모두 2개 이상의 단편의 어셈블리에 대해 성공적이지 않았다.

[0208] 매립된 상동 서열을 보유하는 DNA("어댑터-온")의 효율은 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법, 비교기 1 방법, 및 비교기 2 방법을 이용하여 결정되었다. DNA 단편의 단부로부터 ~23 bp 매립된 40개의 염기쌍 상동성이 디자인되었다. 모든 방법은 그들의 각각의 백그라운드보다 현저히 더 높은 CFU를 제공하였다(도 19b). 도 19b와 관련하여, 10분 인큐베이션을 이용하는 1개의 단편 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 비교기 1 방법을 사용하는 어셈블리보다 9배 더 많은 콜로니를 생성하였고, 비교기 2를 이용하는 어셈블리보다 568배 더 많은 콜로니를 생성하였다. 인서트의 수가 증가한 경우, 비교기 1 방법 및 비교기 2 방법은 4개의 단편에서 백그라운드 레벨을 초과하는 콜로니를 생성하지 못했다(도 19b). 벡터 내로의 10개의 단편의 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 백그라운드에 비해 642배 증가를 나타냈다(도 19b). 상동 서열 및 매립된 상동 서열을 보유하는 DNA의 어셈블리는 비교기 1 방법 또는 비교기 2 방법을 이용하는 어셈블리와 비교하여 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 이용하는 더 효율적인 어셈블리를 생성하였다.

[0209] 차세대 시퀀싱은 8개의 콜로니/반응으로부터 단리된 플라스미드를 이용하여 수행되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 및 비교기 2 방법은 각각 84% 및 86% 정확한 어셈블리 비율을 나타냈다. 각각의 방법은 8%의 미스어셈블링된 샘플을 나타냈다. 비교기 1 방법을 이용하는 어셈블리는 10% 미스어셈블리 및 25% SNP 비율을 나타냈고, 결과적으로 전체적인 정확한 어셈블리 비율은 65%였다. 통과 및 실패 비율은 어셈블링된 인서트의 수에 따라 달라지므로, 비교기 1 방법은 10개의 인서트에서 정확도의 상실을 초래하였다. 대부분의 에러는 비교기 1 어셈블리 및 비교기 2 어셈블리에 대해 단편 집합의 25 bp 내에 클러스터링되었다(도 20a-20c).

[0210] 차세대 시퀀싱은 23 bp 어댑터의 존재를 결정하기 위해 사용되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 비교기 1 및 비교기 2 방법과 비교하여 더 정확한 어셈블리를 생성하였다. 모든 어셈블리 반응에 걸쳐 평균적인 정확한 어셈블리 비율은 비교기 1 어셈블리에 대한 4.5% 및 비교기 2 어셈블리에 대한 31%와 비교하여 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 반응에 대해 72%였다. 어댑터 서열은 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 샘플 내에 결코 존재하지 않았다. 대조적으로, 전장 구조체의 경우, 비교기 1 어셈블리의 59% 및 비교기 2 어셈블리의 23%는 부분적인 또는 전장 어댑터 서열을 함유한다. 비교기 1 어셈블리에 의해 어셈블링된 구조체는 더 미스어셈블리였던 것으로 생각되는데, 전체적인 미스어셈블리 비율은 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리에 대해 7% 및 비교기 2에 대해 6%와 비교하여 63%였다. 미스어셈블리 비율은 비교기 2 어셈블리 내의 단편의 수에 따라 증가되었다. 또한, 비교기 1 어셈블리는 음성 대조군 반응에서 높은 CFU를 보유하였다. 24개의 비교기 1 음성 대조군 샘플(인서트를 보유하지 않는 벡터)의 시퀀싱은, 각각의 구조체가 백본의 다양한 영역에서 스스로 재조합된 벡터였음을 나타냈다. 참조 도 20c 및 도 21b. 도 20c는 낮은 커버리지(백색 막대), 미스어셈블리(흑색 막대), 유전자 내 SNP(수평 빗금 막대), 완전 어셈블리(수직 빗금 막대), 및 유니버설(uni) 테일(체크무늬 막대)의 그래프를 나타낸다. 도 18은 도 20c의 데이터를 나타낸다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 다른 어셈블리 방법과 비교하여 더 효율적이고 정확한 어셈블리를 생성하였다. 도 21b는 낮은 커버리지(백색 막대), 미스어셈블리(흑색 막대), 유전자 내 SNP(수평 빗금 막대), 완전 어셈블리(수직 빗금 막대), 및 유니버설(uni) 테일(체크무늬 막대)의 그래프를 나타낸다.

표 18

시퀀싱 데이터

	비교기 1		플랩 어셈블리		비교기 2	
	어댑터 오프	어댑터 온	어댑터 오프	어댑터 온	어댑터 오프	어댑터 온
낮은 커버리지	NA	9.09%	3.57%	11.25%	4.17%	34.38%
미스어셈블리	45.45%	63.64%	23.21%	7.5%	6.25%	6.25%
유전자 내 SNP	13.64%	NA	5.36%	8.75%	4.17%	6.25%
퍼펙트	40.91%	4.55%	67.86%	75.20%	85.42%	31.25%
유니 테일	NA	21.59%	NA	NA	NA	21.88%

[0211]

[0212] 실시예 17: 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 이용하는 개선된 유연성

[0213] 시험관내 심리스 어셈블리

[0214] DNA 단편의 어셈블리는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리를 이용하여 결정되었다. 실시예 14에 기재된 것과 유사한 반응 조건을 이용하는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 2, 3, 및 4개의 선형 dsDNA 단편을 함께 어셈블링하기 위해 사용되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 효소 카테일을 포함하는 반응에서, 혼입되지 않은 출발 물질, 부분적인 및 전장 구조체가 검출되었다(도 21a, 레인 1-3, 7-9). 65°C에서 30분 동안 인큐베이션 후 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 효소의 부재 하에서, 출발 물질은 존재하였으나 완전히 어셈블링된 구조체는 존재하지 않았다. 전장 구조체를 농후화하기 위해, 반응은 전장 구조체에 특이적인 말단 프라이머 위치를 이용하여 PCR 증폭되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 효소 카테일의 부재 하에서, PCR 증폭 후 전장 구조체는 관찰되지 않았다(도 21a, 레인 4-6). 전장 구조체에 대한 적합한 크기의 생성물이 관찰되었다(도 21a, 레인 10-12). 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 시험관 내에서 적합하게 어셈블링된 단편을 생성하였다.

[0215] 원 포트 조합 어셈블리

[0216] 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리의 특이성이 결정되었다. 동일한 유니버설 프라이머 테일을 포함하는 9개의 선형 DNA 단편이 사용되었다. 동일한 벡터 내로 3개의 상이한 3 피스 구조체를 방향적으로 어셈블링하도록 유도된 40 bp 상동 위치가 디자인되었다. 독성에 대해 스크리닝하고 어셈블리 베이스라인을 확립하기 위해 각각의 구조체에 대한 개별적인 클로닝 효율이 결정되었다. 이어서, 모두 9개의 DNA 단편 및 목적 벡터는 단일 시험관내 어셈블리 반응에서 사용되었다. 반응 혼합물을 이. 콜라이 내로 클로닝한 후, 192개의 콜로니는 미니-프랩, 이어서 NGS 분석을 위해 픽킹되었다. 도 21a, 21c 및 21d와 관련하여, 개별적인 구조체를 클로닝하는 것에 기초하여 예측된 중앙 분포는 각각의 구조체에 대해 31%±3%였다.

[0217] 도 21c와 관련하여, 평균 CFU는 단편 1-3(사각형), 단편 7-9(삼각형), 단편 10-12(원), 및 부정확한 어셈블리(X)를 포함하는 어셈블리에 대해 결정되었다. 조합 어셈블리 후, 스프레드는 ±5%(도 21c)로 증가되었다. 테스트된 구조체 중에서, 96.5%는 적절히 어셈블링된 구조체를 함유하였다(도 21d). 실패한 어셈블리는 단편 7-8, 단편 7-12, 단편 9-12의 전장 유전자로 구성되었다. 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리는 특이적이고, 방향적인 어셈블리를 생성하였다.

[0218] 실시예 18: 증폭된 올리고뉴클레오타이드 집단의 클로닝

[0219] 다수의 단편은 유전자 내로 어셈블링되었다. 증폭된 올리고뉴클레오타이드 집단의 클로닝은 실시예 17과 유사하게 수행되었다. 오버랩 연장 PCR은 200개 초과 의 염기쌍의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 단편을 생성하기 위해 수행되었고, 벡터 내로 어셈블링되었다. 반응은 55°C에서 30분 동안 수행되었고, 표 19에 나타난 바와 같은 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법(방법 4)에 따라 제조되었다.

표 19

반응 조건 (방법 4)

마스터 믹스	50 μ L 반응	최종 농도 (2x MM 에 대해)
ExoIII 100U/ μ L	0.05	0.2 U/ μ L
Phusion 2U/ μ L	0.05	0.004 U/ μ L
Fen1 32U/ μ L	0.05	0.064 U/ μ L
dNTP	1	.4 mM
앰플리가아제 5U/ μ L	1	0.2 U/ μ L
10x 앰플리가아제 완충제	5	2x
물 *		

[0220]

[0221]

차세대 시퀀싱(NGS)은 어셈블리(도 22a) 및 후속 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리(도 22b) 이전에 증폭된 올리고뉴클레오타이드 집단에 대해 수행되었다. 도 22a-22b는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 이후, 서열의 누락이 없었음을 나타냈고, 및 샘플들은 어셈블리 이전에 증폭된 올리고뉴클레오타이드 집단과 비교하여 유의적인 샘플 바이어스의 도입 없이 어셈블링되었음을 나타냈다.

[0222]

실시예 19: 멀티플렉스 유전자 어셈블리

[0223]

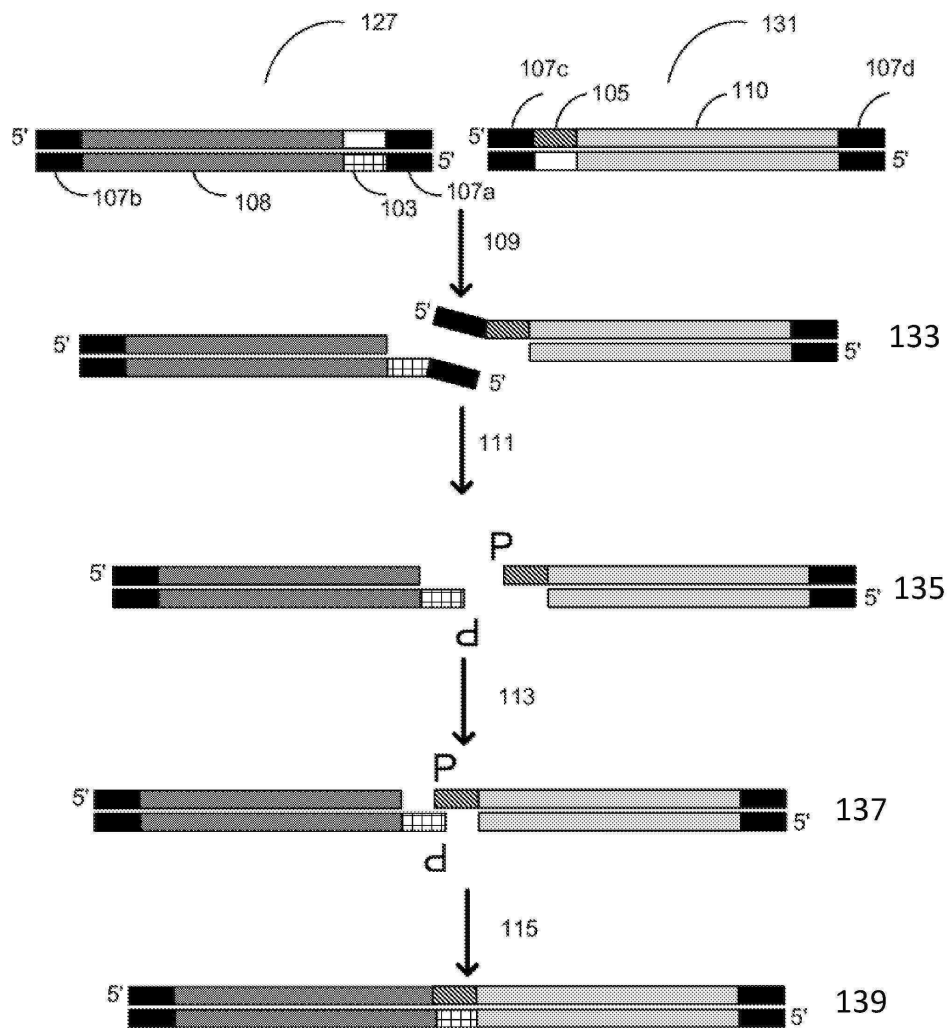
멀티플렉스 유전자 어셈블리는 플랩 엔도뉴클레아제 매개 핵산 어셈블리 방법을 이용하여 수행되었다. 다수의 서열은 1 웰 내로 어셈블링되었다. 서열은 오버랩 연장 PCR로부터 생성된 2개의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 부분을 포함하였다. 반응은 표 19에 기재된 바와 같은 방법 4에 따라 제조되었고, 55°C에서 30분 동안 수행되었다. 샘플은 어셈블링되었고, 이어서 벡터 내로 클로닝되었다. 3개의 집단이 어셈블링되었다: 집단 11, 집단 927, 및 집단 942. 각각의 집단은 유전자가 존재하는지 결정하기 위해 생겨 시퀀싱된 96개의 개별적인 클론을 포함하였다. 출발 DNA 물질의 품질은 완전 서열, SNP 보유 서열, 절두된 물질, 또는 블록 결실된 서열을 측정함으로써 결정되었다. 도 23에 나타난 바와 같이, 어셈블리의 정확도는 완전하였고(키메라 유전자 없음), 균일성/분포도 좋았다.

[0224]

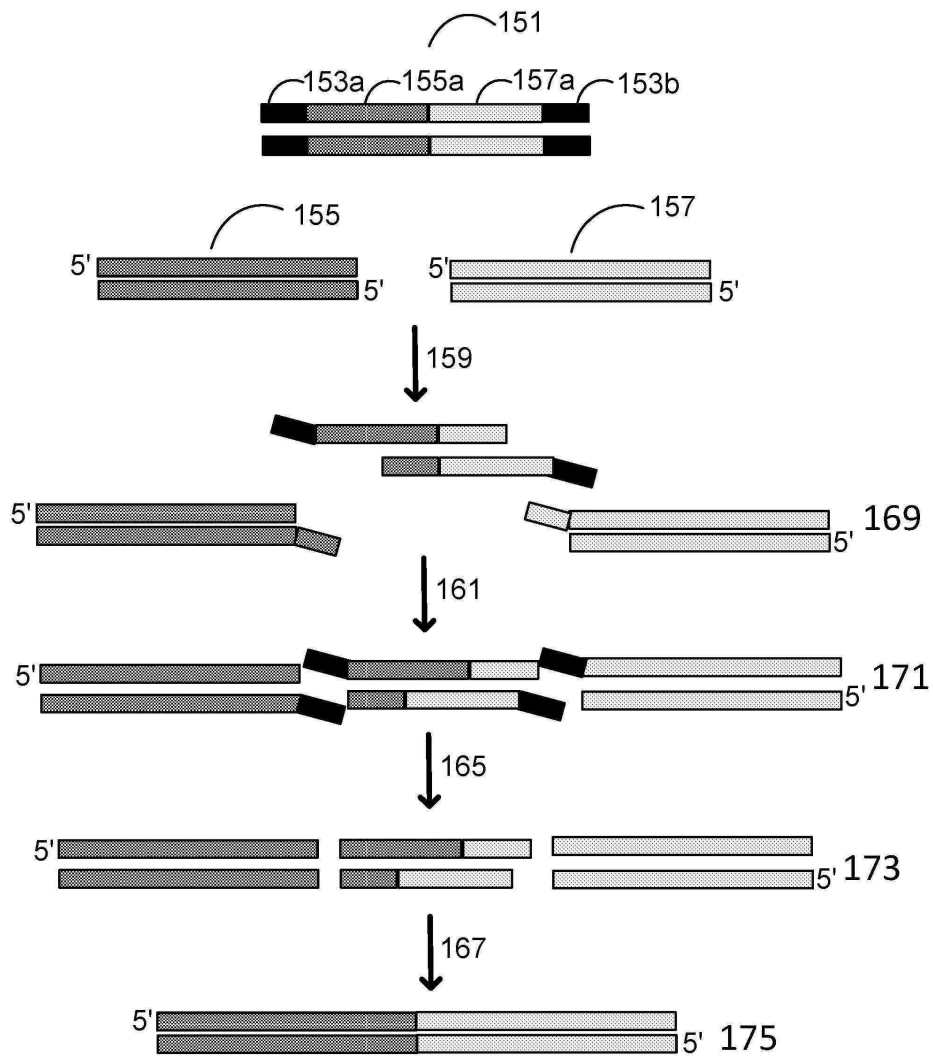
본 발명의 바람직한 실시양태는 본 출원에 나타내고 기재하였지만, 그러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 점을 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 현재 다수의 변화, 변경 및 치환이 본 발명을 벗어나지 않고 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 발생할 것이다. 본 출원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 후술하는 특허청구범위는 본 발명의 범위를 한정하고, 이들 특허청구범위 내의 방법 및 구조체 및 이들의 등가물은 이들에 의해 커버되는 것으로 의도된다.

도면

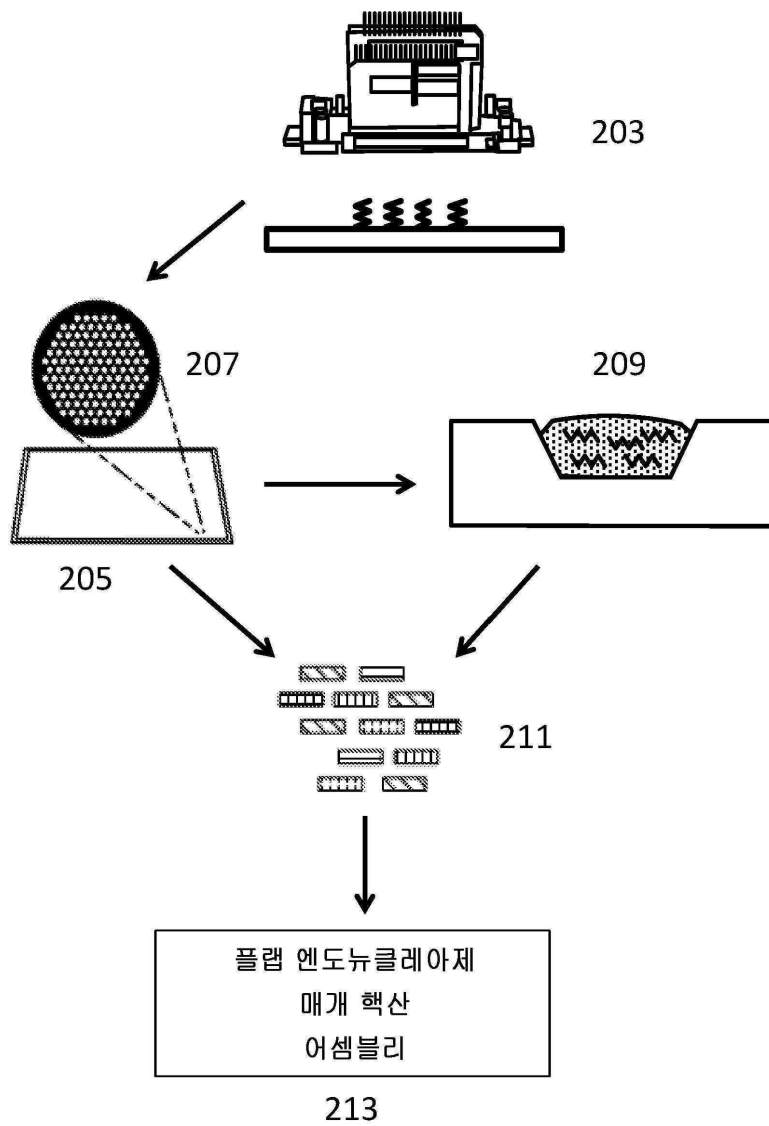
도면1a



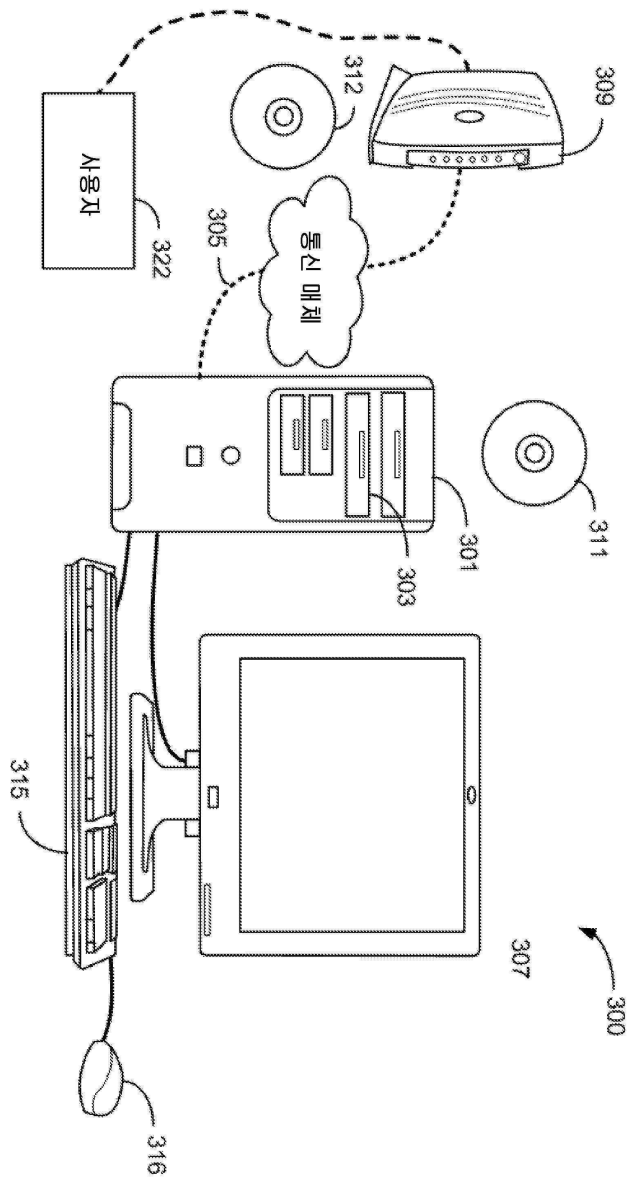
도면1b



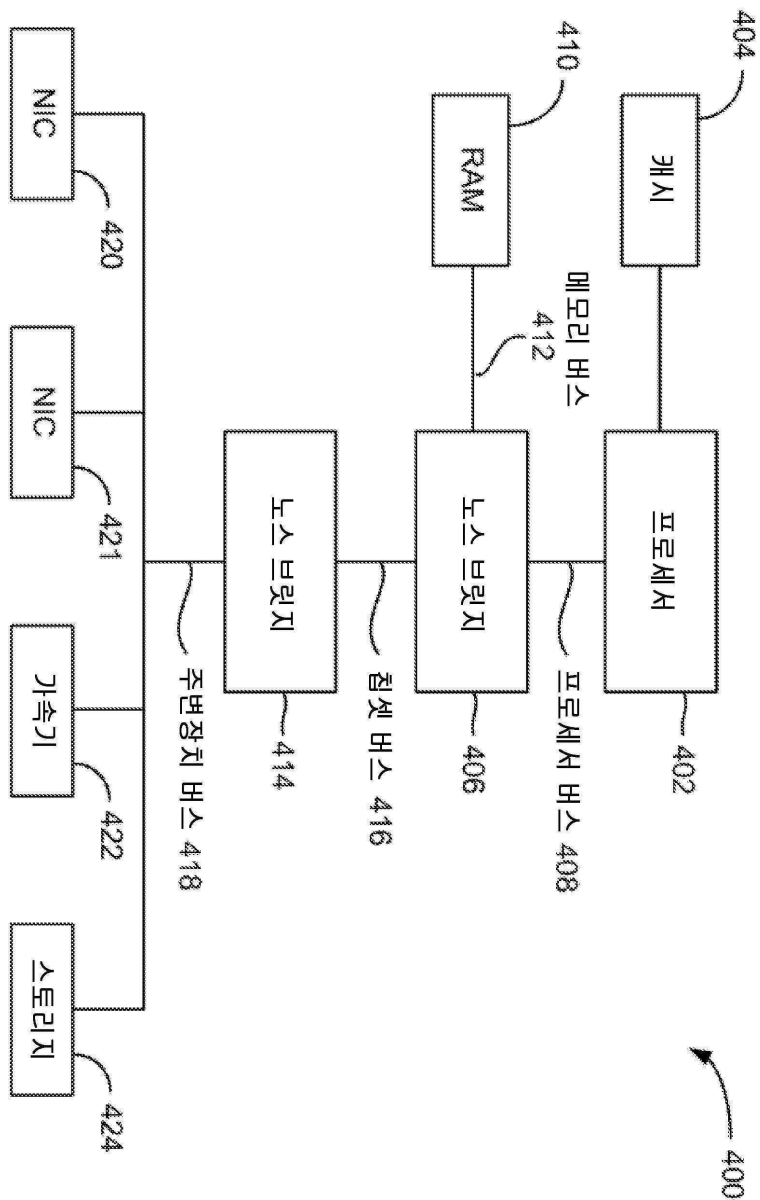
도면2



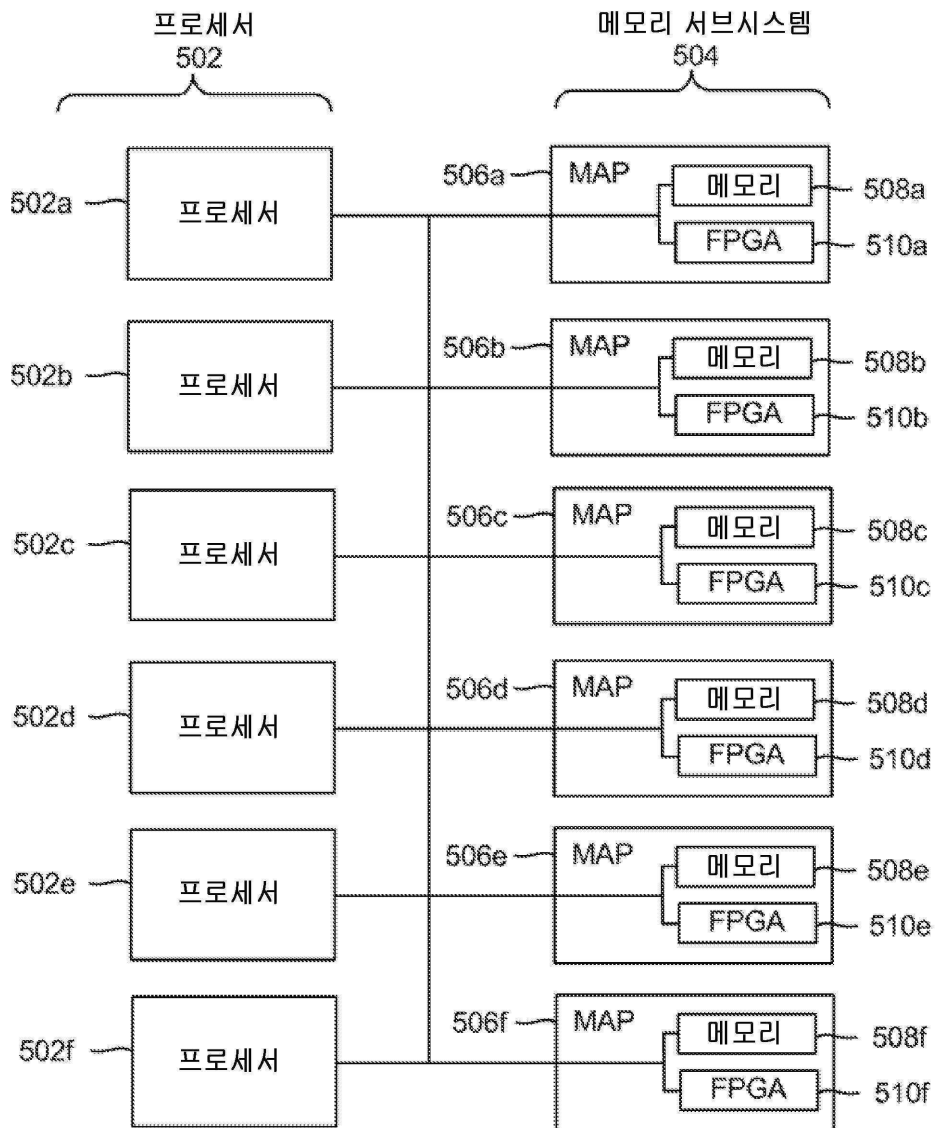
도면3



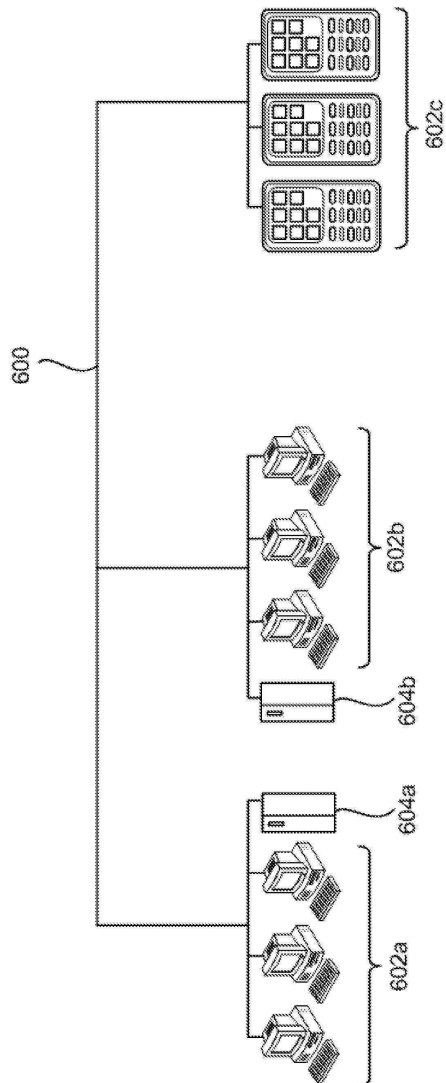
도면4



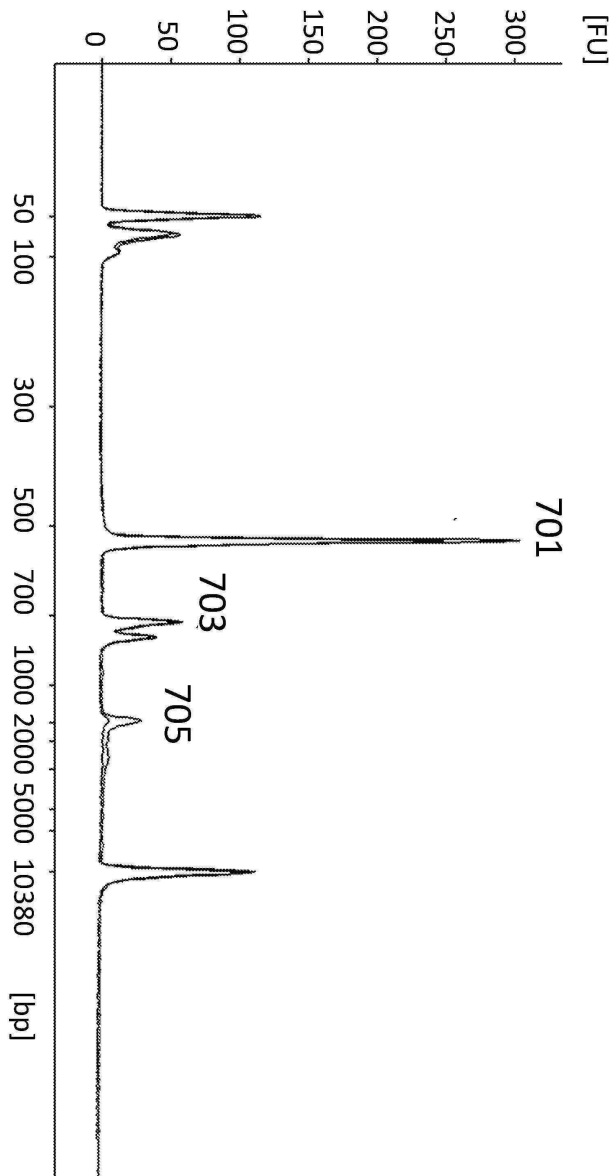
도면5



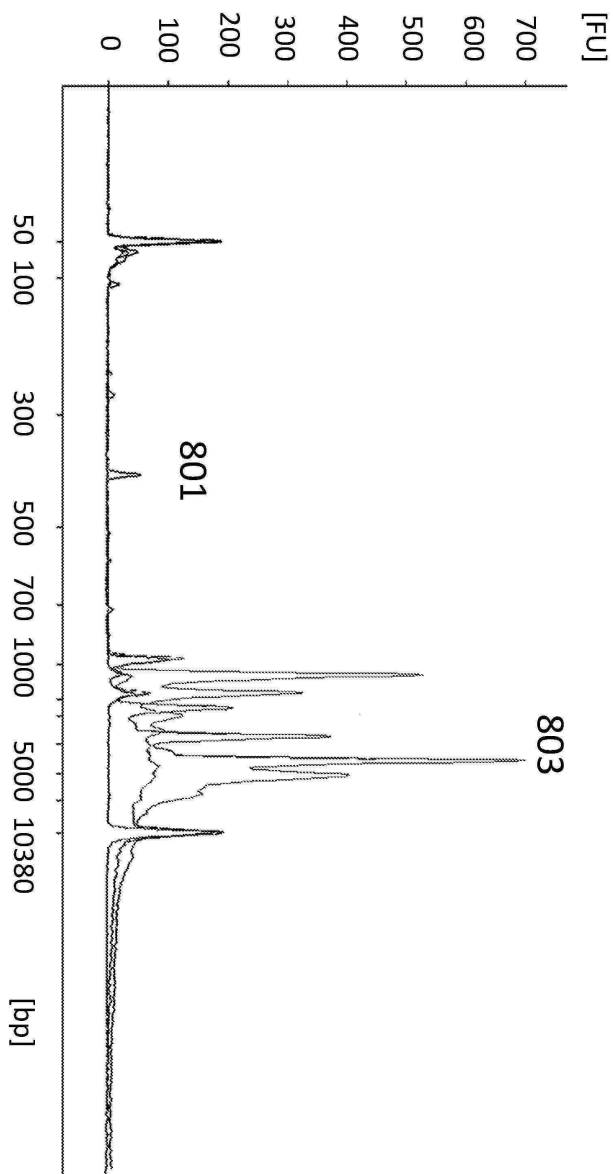
도면6



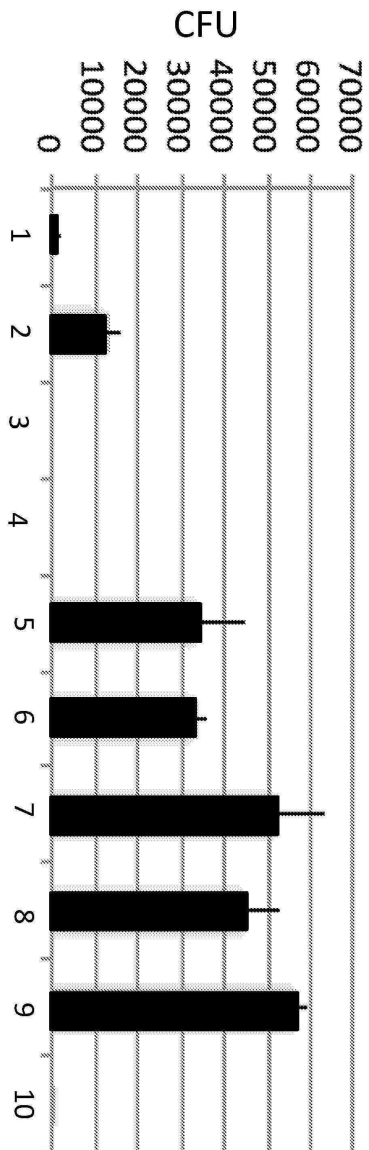
도면7



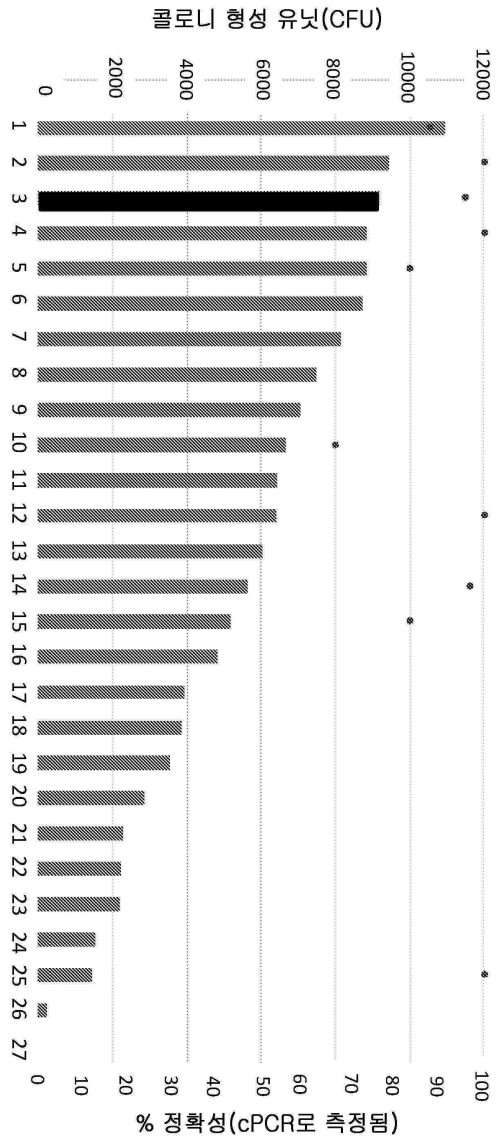
도면8



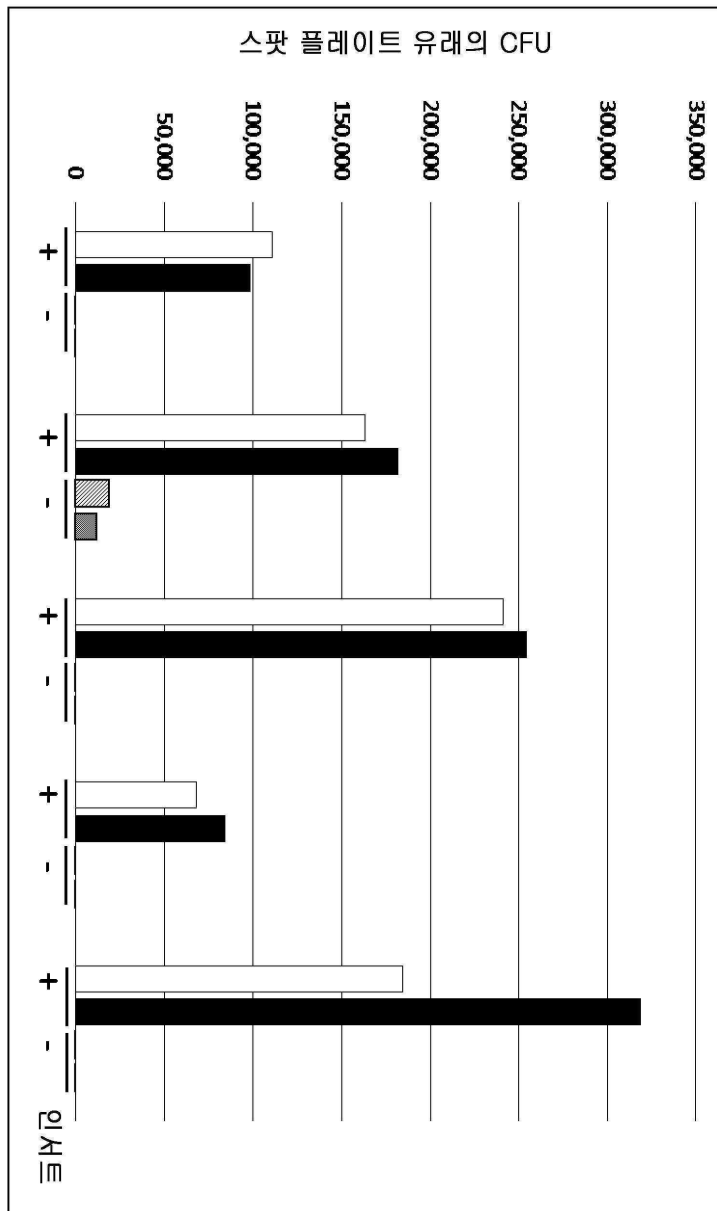
도면9



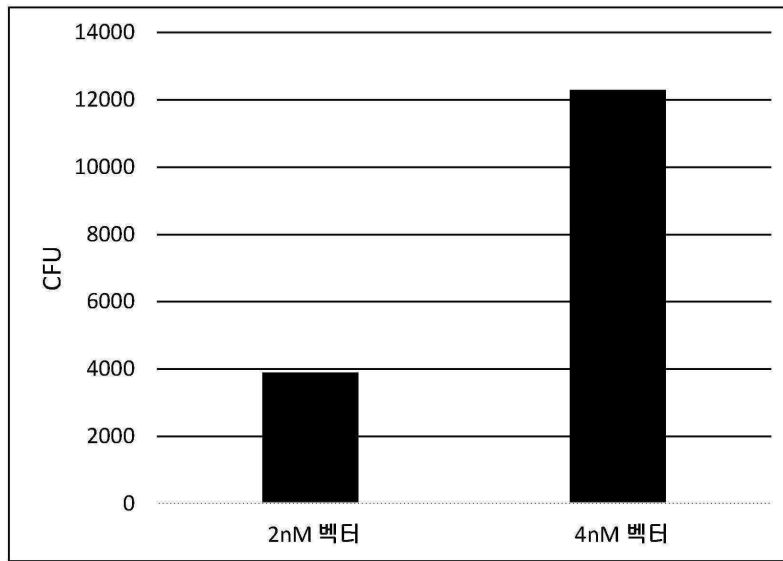
도면10



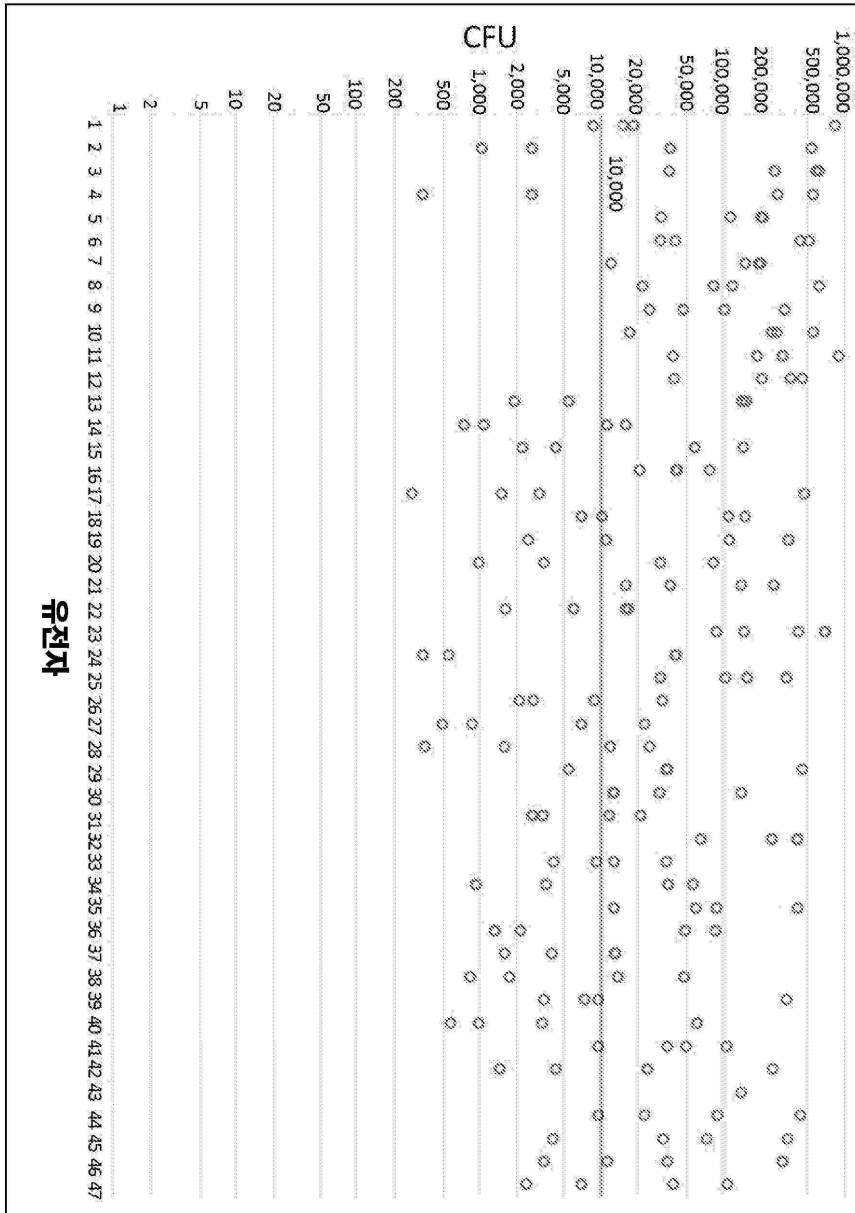
도면11



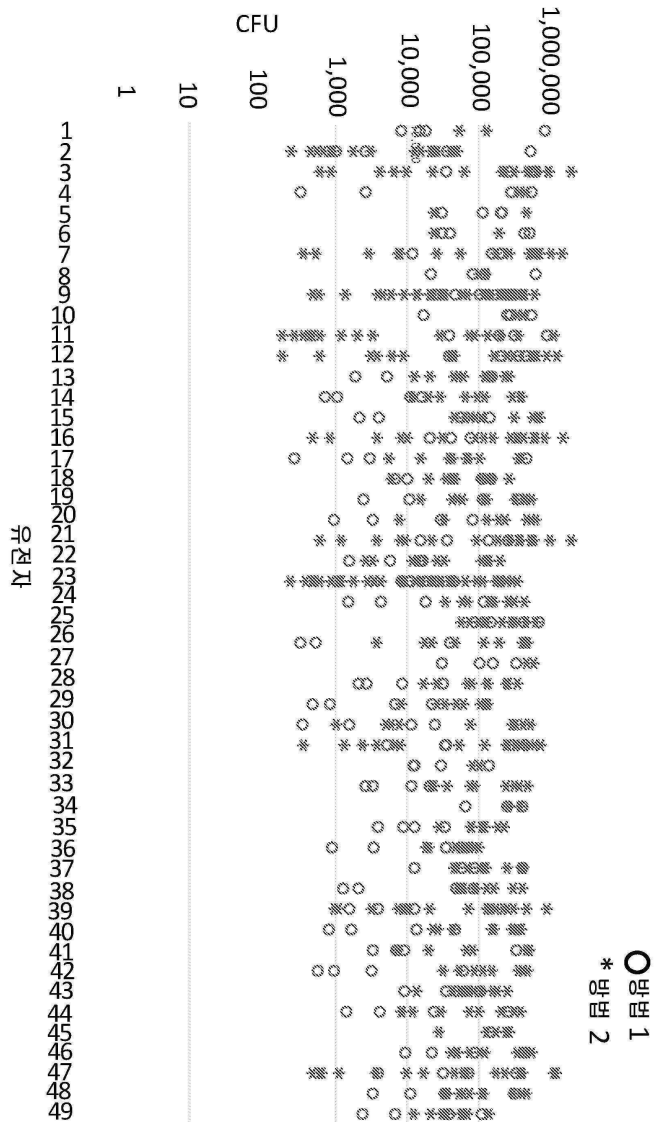
도면12



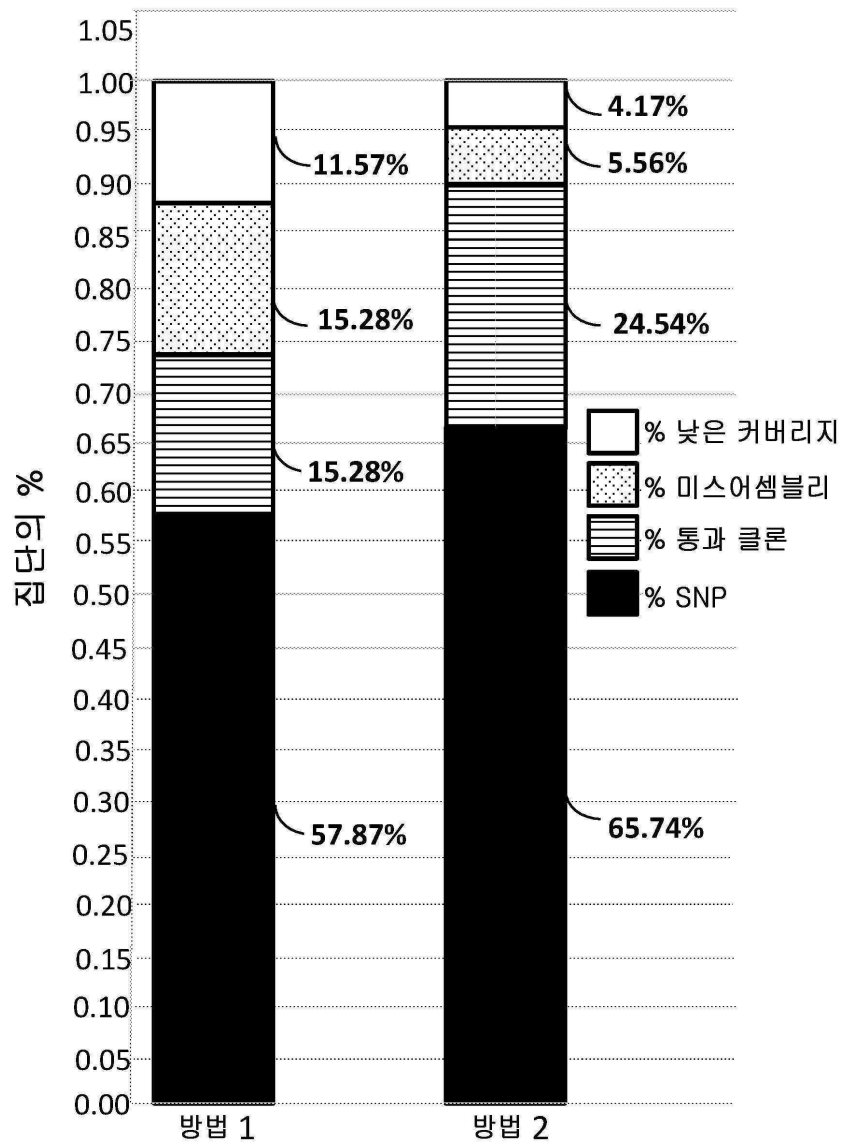
도면13



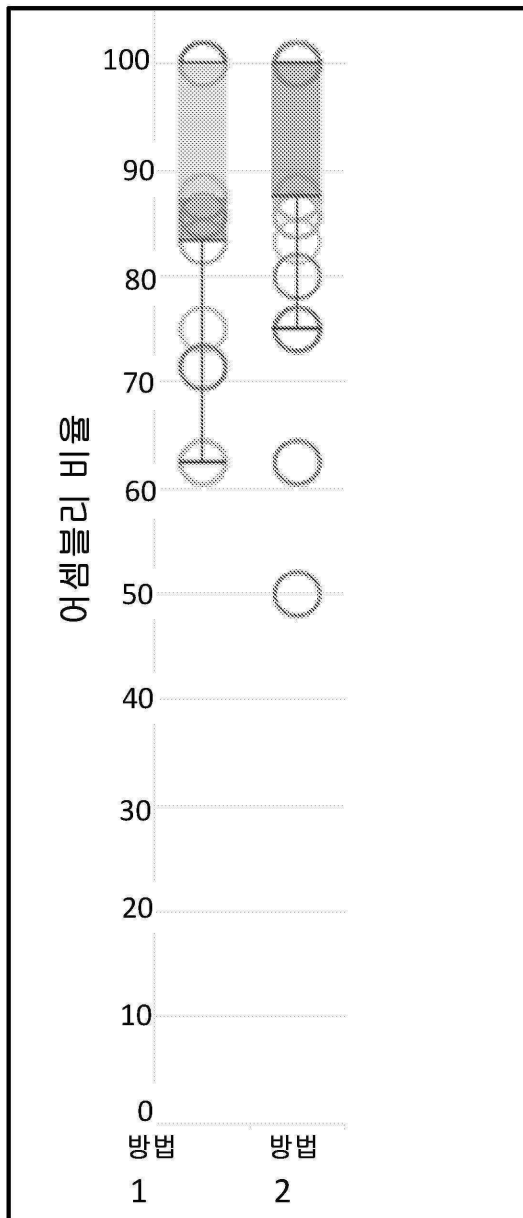
도면14a



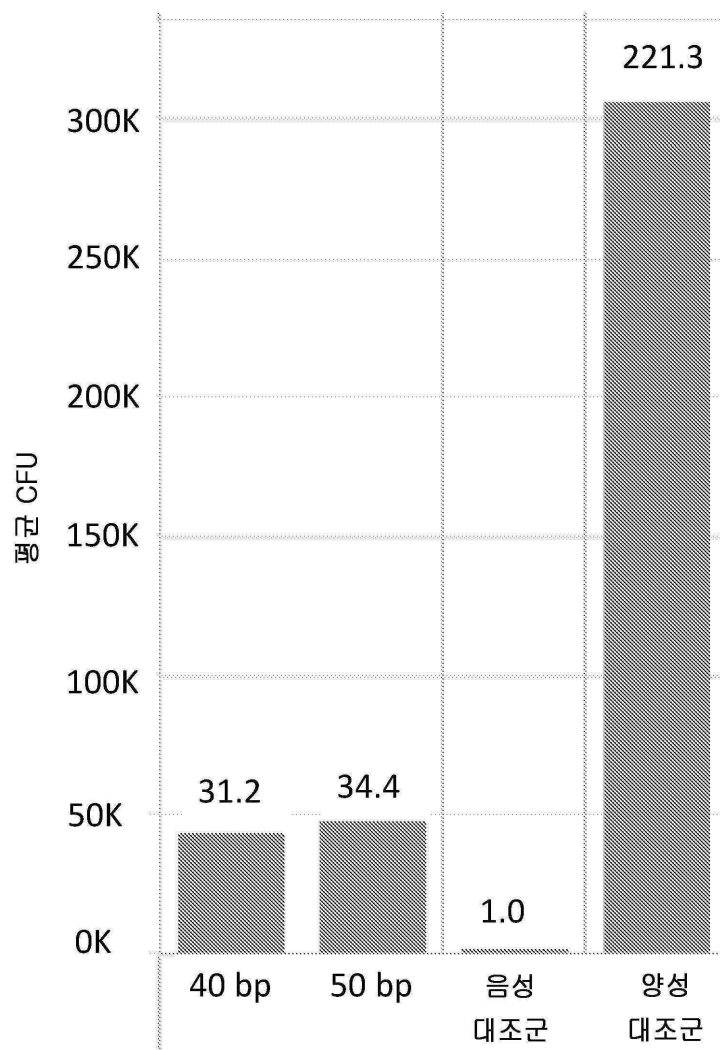
도면14b



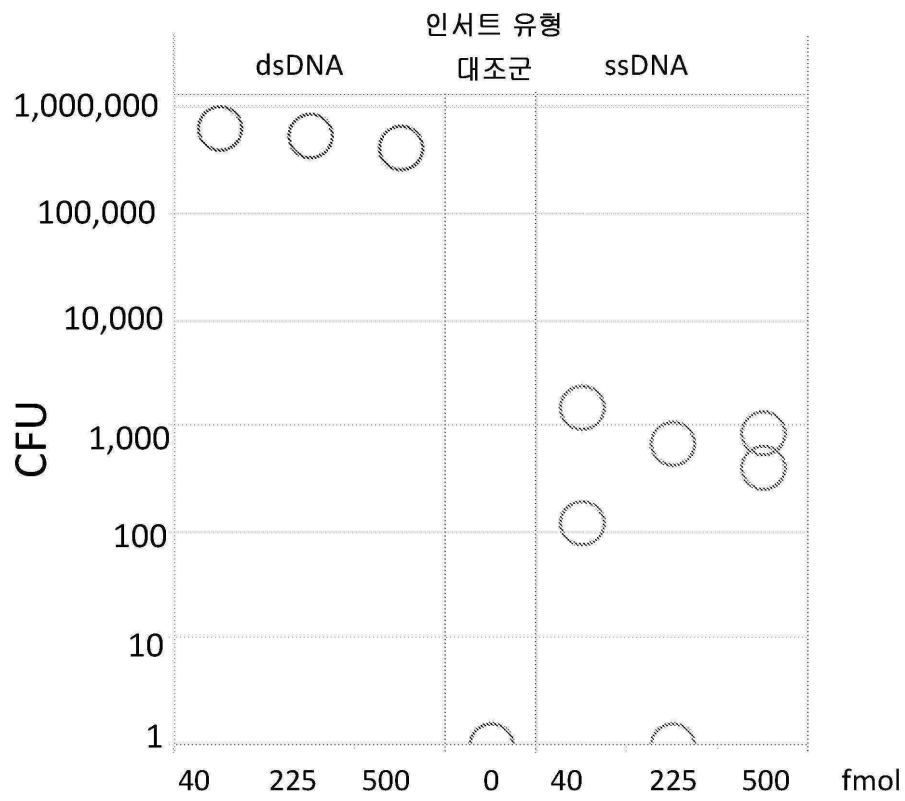
도면14c



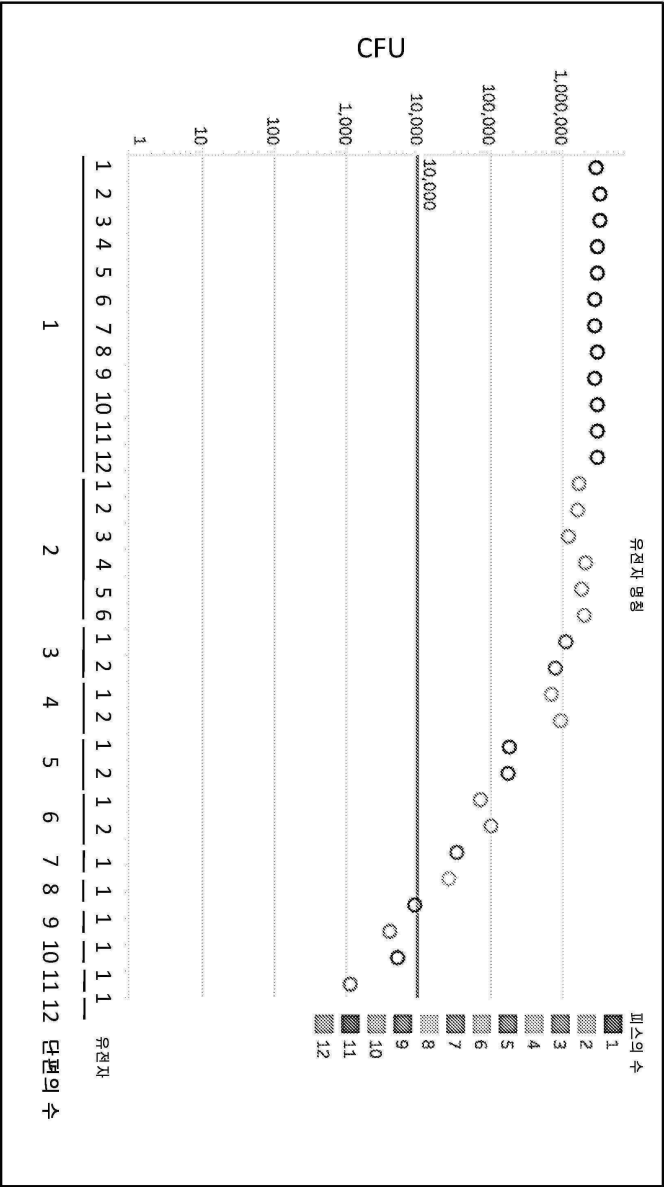
도면15a



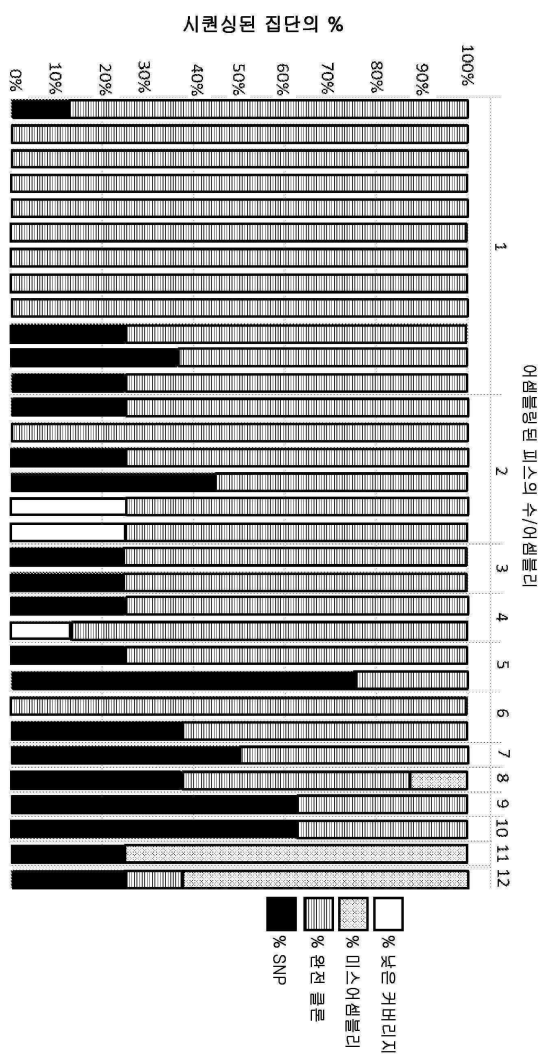
도면 15b



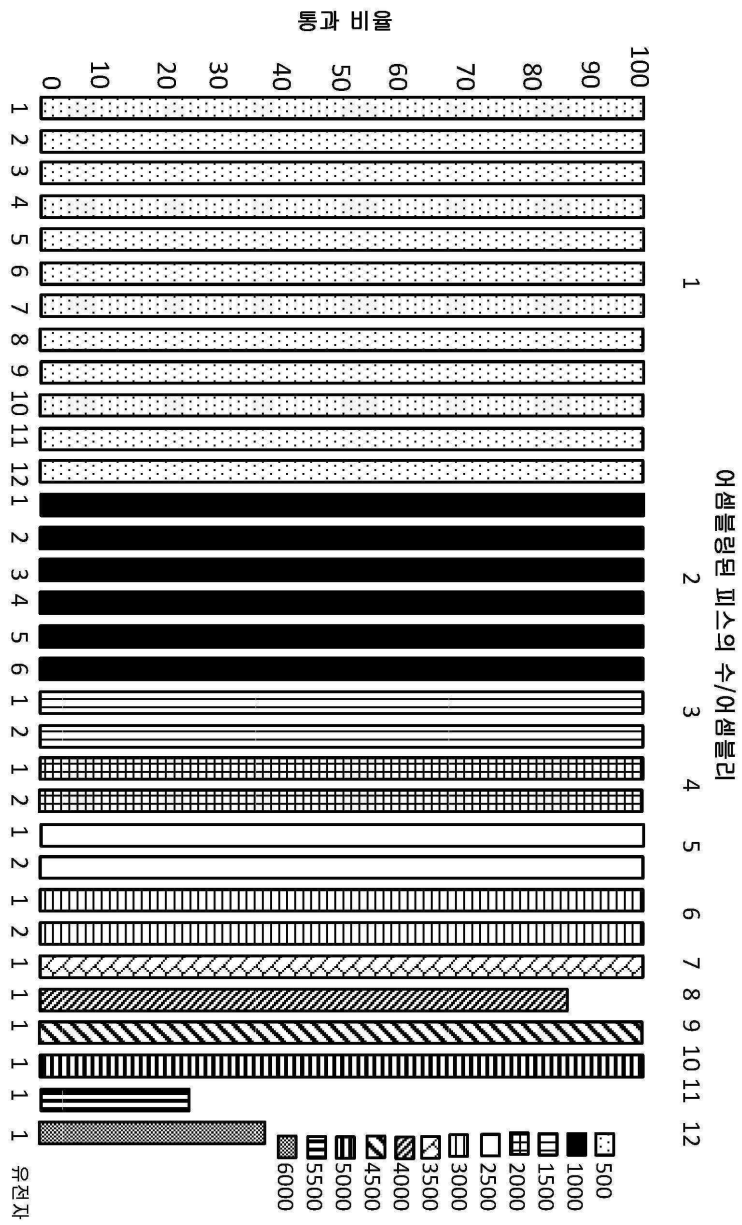
도면16a



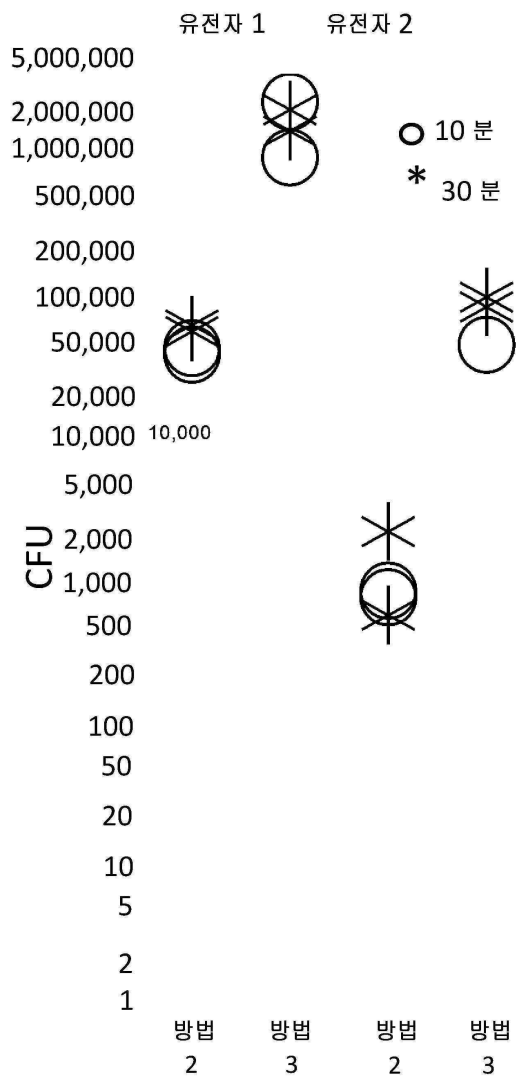
도면16b



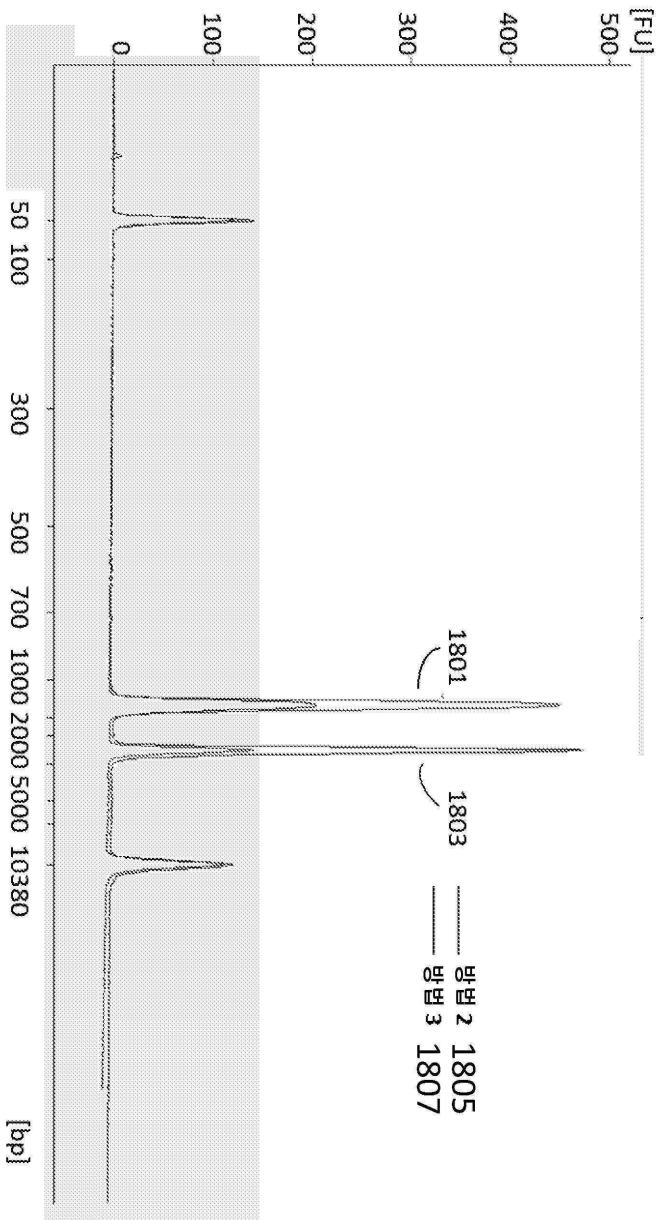
도면16c



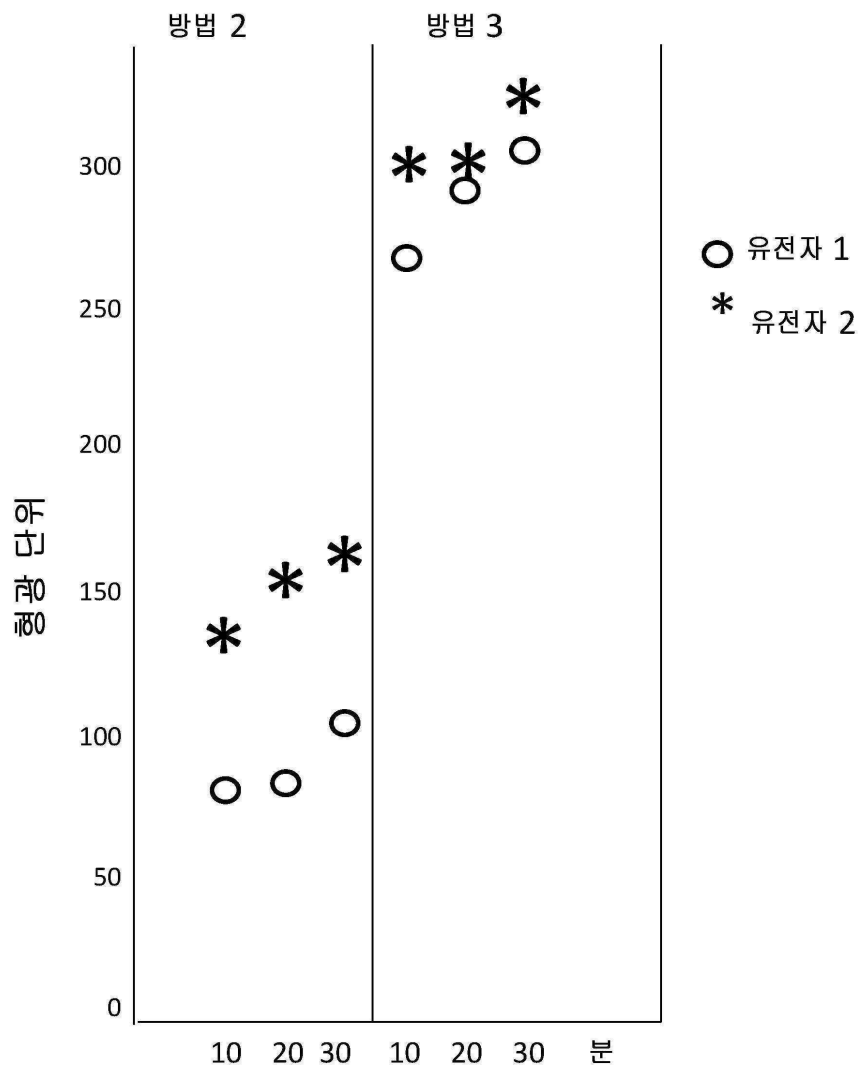
도면17



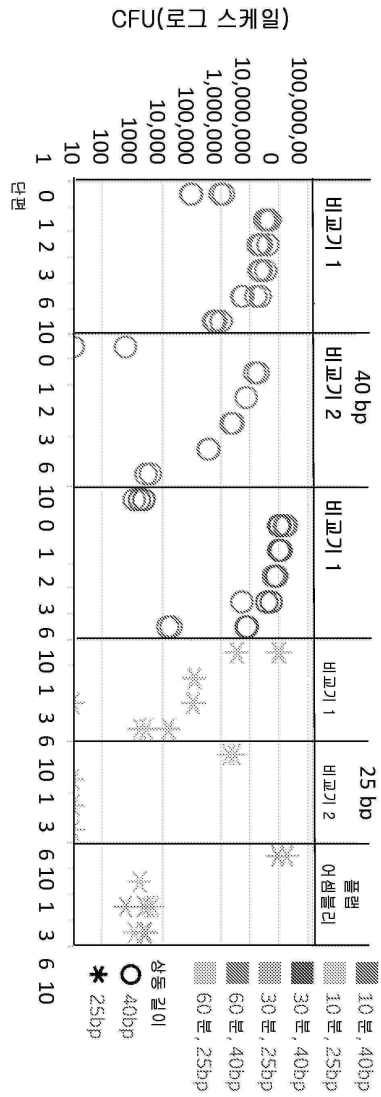
도면18a



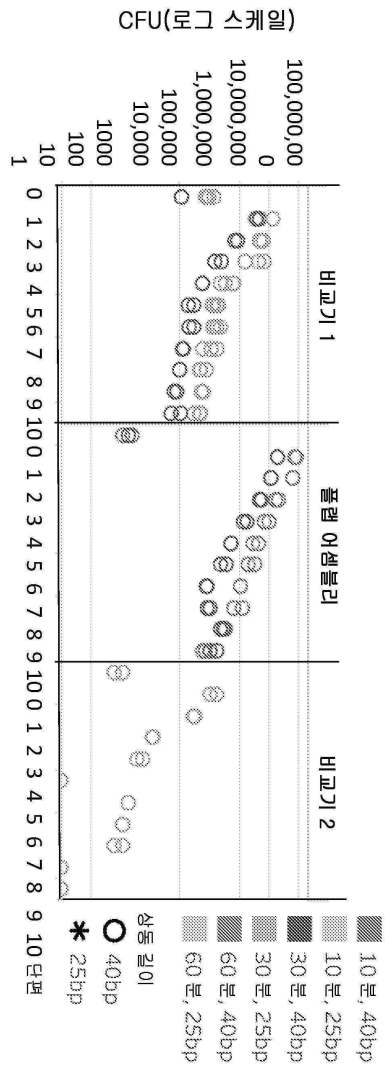
도면 18b



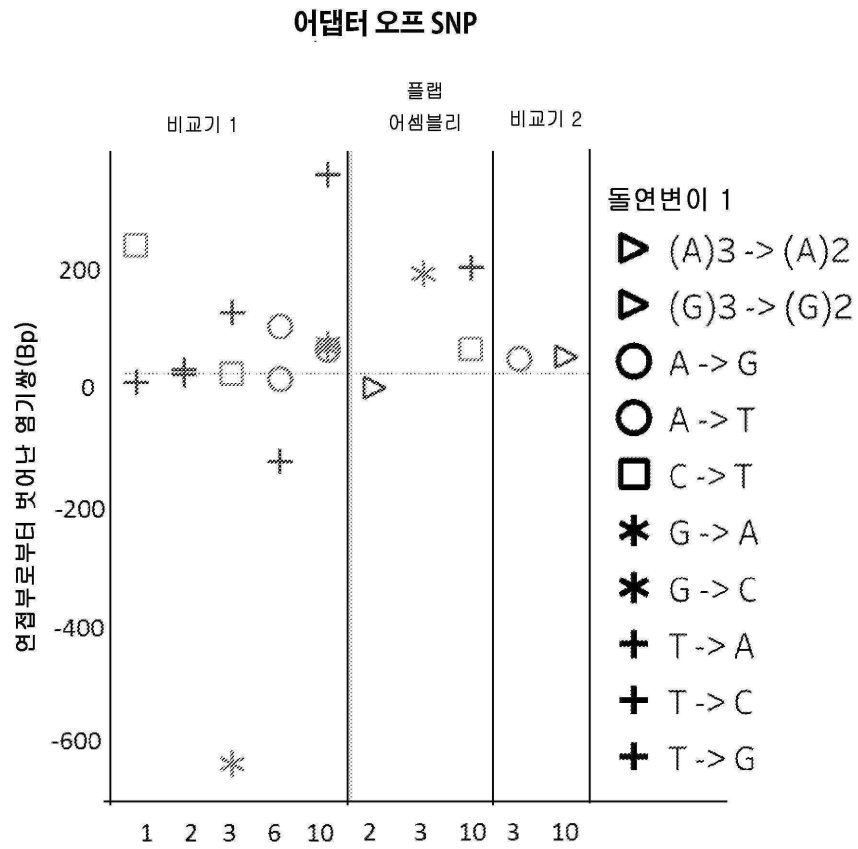
도면19a



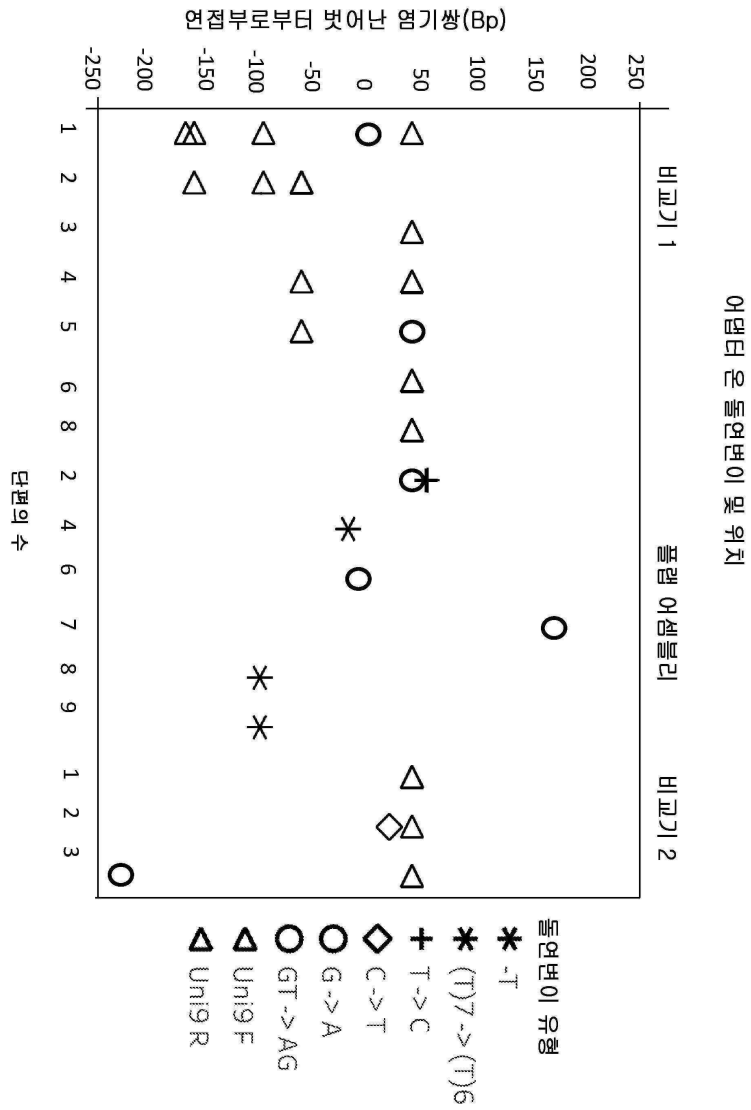
도면19b



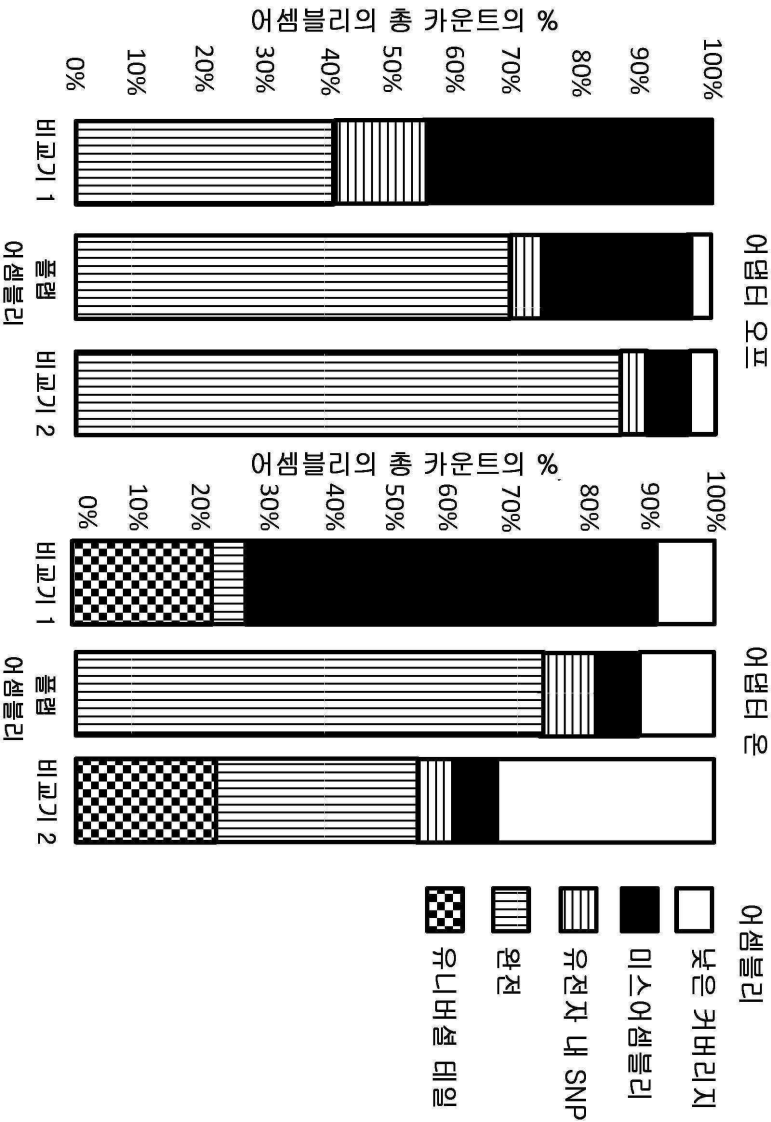
도면 20a



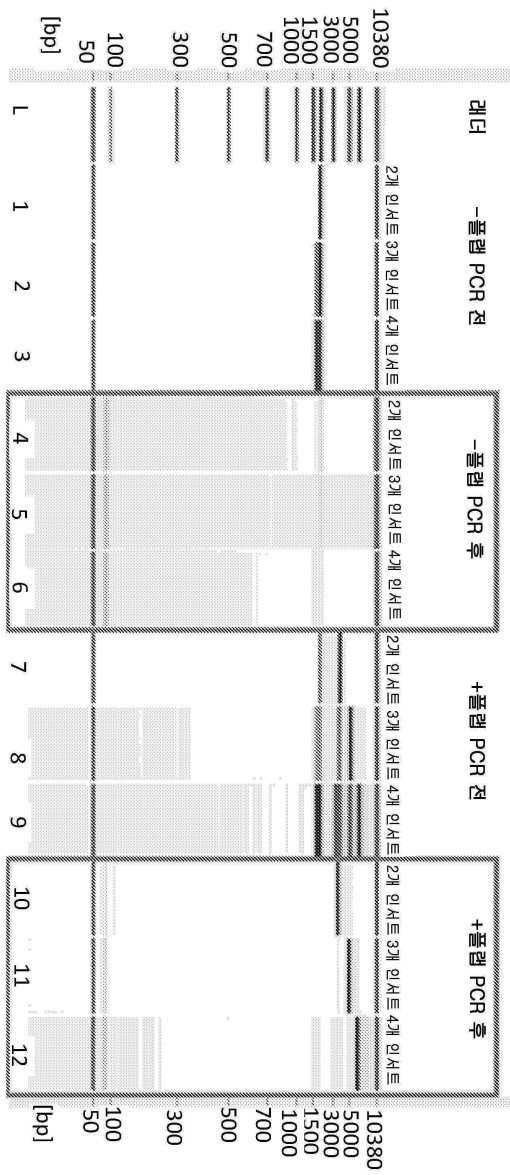
도면20b



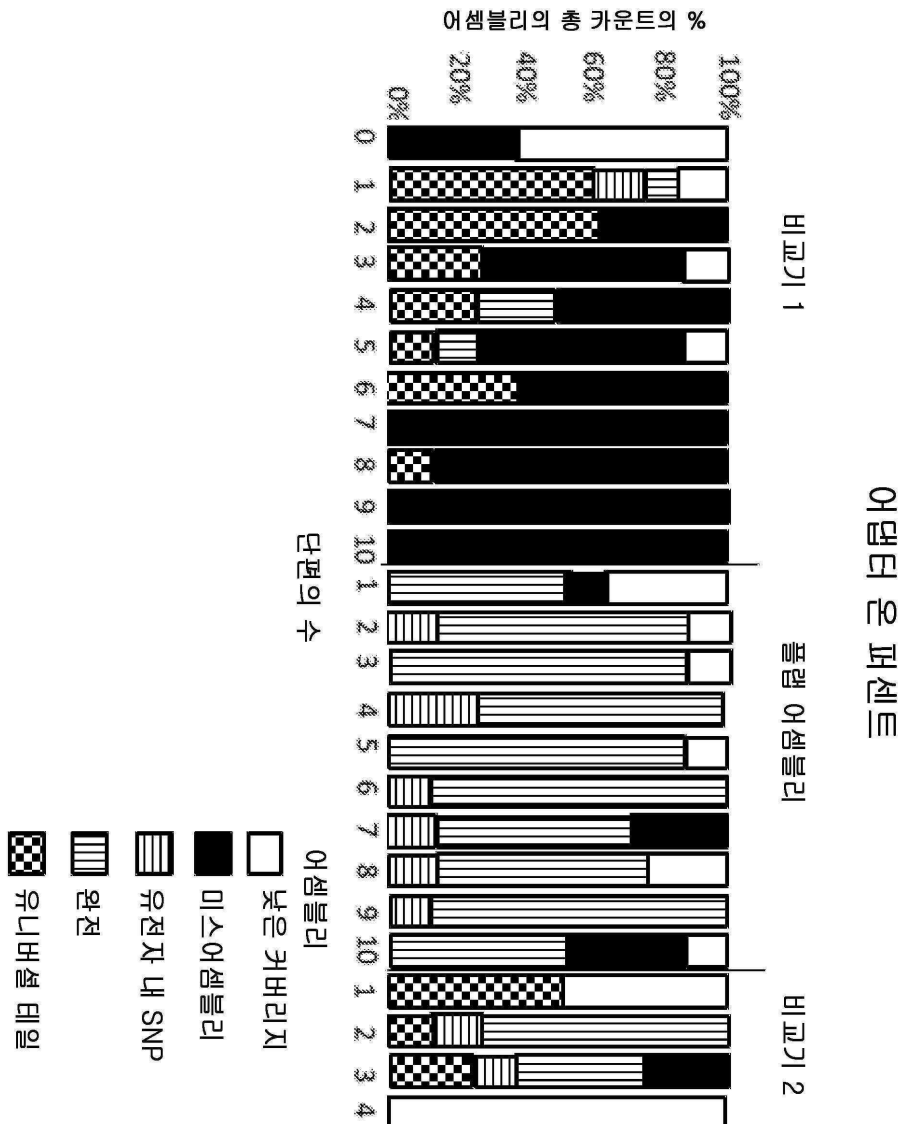
도면20c



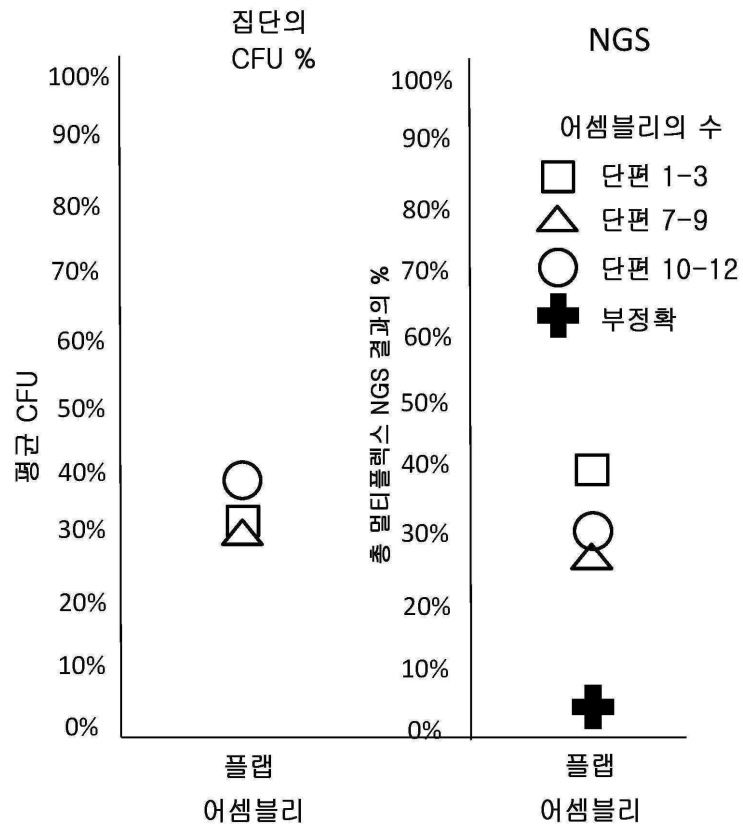
도면21a



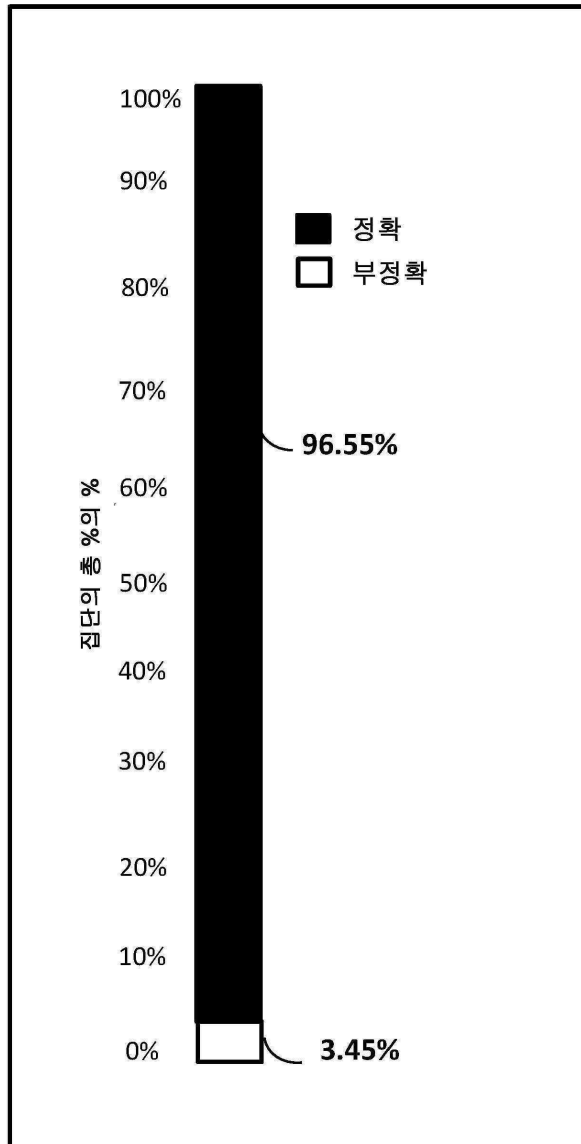
도면21b



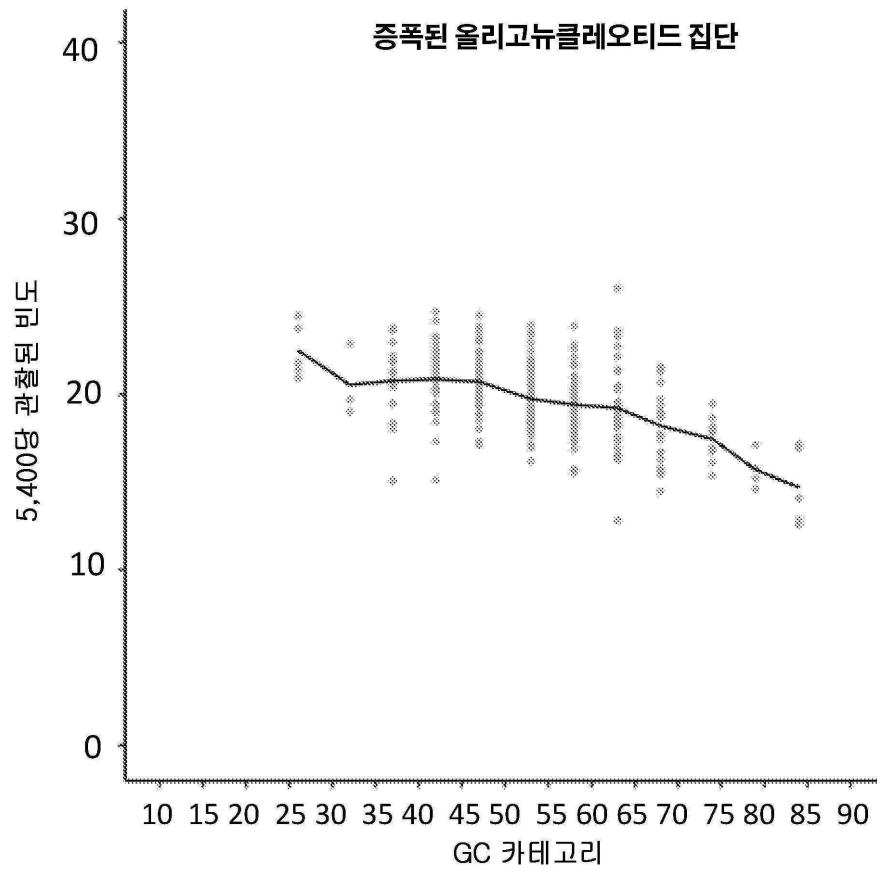
도면21c



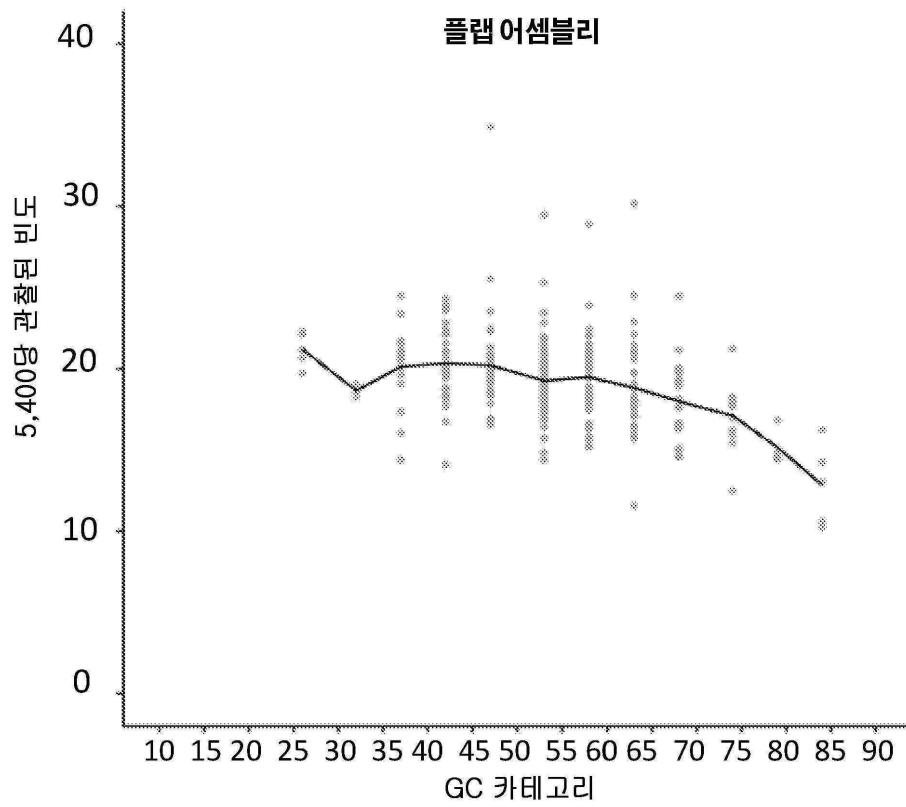
도면21d



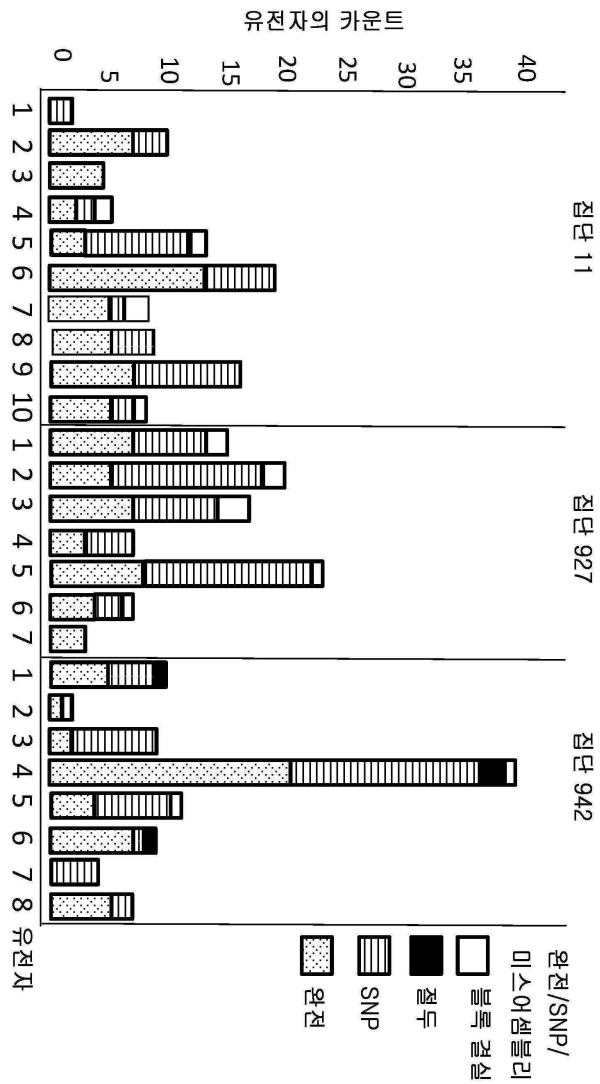
도면22a



도면22b



도면23



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> TWIST BIOSCIENCE CORPORATION

<120> METHODS FOR SEAMLESS NUCLEIC ACID ASSEMBLY

<130> 44854-746.601

<140><141><150> 62/663,089

<151> 2018-04-26

<150> 62/518,496

<151> 2017-06-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (51)..(52)

<223> Thymidine-succinyl hexamide CED phosphoramidite

<400>

> 1

agacaatcaa ccatttgggg tggacagcct tgacctctag acttcggcat tttttttttt 60

tt 62

<210> 2

<211> 112

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (101)..(102)

<223> Thymidine-succinyl hexamide CED phosphoramidite

<400> 2

cgggacctt atcgatcgcg tegtacagat cccgacccat ttgctgtcca ccagtcatgc 60

tagccatacc atgatgatga tgatgatgag aaccccgcat tttttttttt tt 112

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 3

atgcgggggtt ctcatcatc 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 4

cgggatacctt atcgatcgcg

20