

(43) 공개일자 2024년11월15일

- (71) 출원인
엘리먼트 바이오사이언스, 인크.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 반스 캐년
로드 10055
- (72) 발명자
저우, 춘홍
미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐년 로드
10055 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내
- 크러글락, 세몬**
미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐년 로드
10055 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이삼남

(54) 발명의 명칭 차세대 시퀀싱의 1차 분석

영상 데이터 분석, 특히 DNA 시퀀싱 동안 디지털 플로우 셀 영상에서 염기 호출을 수행하기 위해 클러스터 위치를 식별하는 것이 기재된다. 지지체 상에 고정된 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 샘플 지표 서열은 k-량체 서열을 포함할 수 있다. 시퀀싱 시스템은 1회 이상의 주기의 삽입 서열 시퀀싱 반응을 수행하기 전에 k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행할 수 있고, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성한다. 픽셀 강도는 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해 결정될 수 있다. 염기 호출 주형은 결정될 수 있고, 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함할 수 있다. 염기 호출 주형은 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록할 수 있다.

600



(52) CPC특허분류

G06T 7/11 (2017.01)
G16B 25/20 (2019.02)
G16B 30/00 (2019.02)
 G06T 2207/10056 (2013.01)
 G06T 2207/30024 (2013.01)

(72) 발명자

가르시아, 프란시스코

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐년 로드
 10055 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내

구오, 밍하오

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐년 로드
 10055 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내

왕, 하오셴

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐년 로드
 10055 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내

켈리, 라이언

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐년 로드
 10055 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내

(30) 우선권주장

63/316,784	2022년03월04일	미국(US)
63/316,790	2022년03월04일	미국(US)
17/725,042	2022년04월20일	미국(US)
17/725,065	2022년04월20일	미국(US)
63/349,421	2022년06월06일	미국(US)
17/854,042	2022년06월30일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

방법으로서

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계로서, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀(flow cell) 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출(base calling) 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 2

방법으로서,

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계로서, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 k-량체 서열 하류의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 3

방법으로서,

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입

입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 4

방법으로서,

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 상기 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 k-량체 서열 하류의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 5

방법으로서

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우

우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 6

방법으로서,

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k -량체 서열의 그리고 상기 k -량체 서열 하류의 염기 위치의 $k+1$ 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 7

방법으로서,

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k -량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k -량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 8

방법으로서,

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 상기 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플

플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계;

상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 9

방법으로서,

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 단계로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 10

방법으로서,

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 단계로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 k-량체 서열 하류의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 11

방법으로서,

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계로서, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계;

상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계로서, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 12

방법으로서,

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계로서, 상기 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계;

지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계로서, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 k-량체 서열 하류의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 및 제2 복수의 라이브러리 분자를 풀링(pooling)하는 단계; 및

상기 풀링된 라이브러리 분자를 지지체 상에 분포시키고 증폭 반응을 수행하여 상기 지지체에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 생성하는 단계로서, 상기 복수의 핵산 주형 분자는 클론 증폭된, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 생성하는 단계

를 더 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자는 상기 제1 라이브러리 분자 및 상기 제2 라이브러리 분자로부터 클론 증폭된, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 상응하는 라이브러리 분자 및 상응하는 스프린트 어댑터(splint adaptor)를 포함하는 상응하는 스프린트 복합체로부터 클론 증폭된, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 하나 이상의 범용 어댑터 서열을 더 포함하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 라이브러리 분자의 각각은 하나 이상의 범용 어댑터 서열을 더 포함하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자는 상기 지지체 상의 무작위 위치에 고정된, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자는 상기 지지체 상의 사전 결정된 위치에 고정된, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해,

상기 제1 샘플 지표 서열;

상기 제1 범용 샘플 지표 서열;

상기 제2 샘플 지표 서열; 및

상기 제2 범용 샘플 지표 서열

중 임의의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 상기 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

중 하나 이상인, 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해,

상기 제1 샘플 지표 서열;

상기 제1 범용 샘플 지표 서열;

상기 제2 샘플 지표 서열;

상기 제2 범용 샘플 지표 서열;

상기 제3 샘플 지표 서열;

상기 제3 범용 샘플 지표 서열;

상기 제4 샘플 지표 서열; 및

상기 제4 범용 샘플 지표 서열

중 임의의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

중 하나 이상인, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 상기 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 것은 시퀀싱 실행의 시퀀싱 순서에 기반하는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시퀀싱 순서는 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, 상기 제1 삽입 서열의 시퀀싱을 포함하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시퀀싱 순서는 상기 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 상기 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 시퀀싱을 포함하는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시퀀싱 순서는 상기 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 상기 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, 상기 제3 및 제4 샘플 지표 서열의 시퀀싱을 포함하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상은 2, 3, 4, 5 또는 6개의 상이한 색 채널로부터 유래되는, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, k 주기 또는 k+1 주기로부터의 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상은 상기 k주기의 각각에서 상기 지지체 상에 고정된 상기 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레

오타이드 염기의 균형 다양성을 포함하는, 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지체 상에 고정된 상기 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 폴로니(polony) 또는 클론 클러스터에 상응하는, 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열은 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 무작위 서열인, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열은 A, G, C 및 T/U의 적어도 2 또는 3개의 뉴클레오타이드 염기의 무작위 서열을 포함하는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재(substrate)를 포함하는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지체는 플로우 셀 장치에 포함되는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지체는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 1개의 친수성 중합체에 의해 부통태화된, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈)(PVP), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)(PHEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함하는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분자를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함하되, 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함하는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지체 상에서 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^{12} 인, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지지체 상에서 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 인, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입 서열의 상기 제1 또는 제2 샘플 공급원은 게놈 DNA, 이중-가닥 cDNA 또는 무세포 순환 DNA인, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 둘 이상의 상이한 고정된 주형 분자는 상이한 k-량체 서열 및 동일한 한 범용 샘플 지표 서열을 갖는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 둘 이상의 상이한 고정된 주형 분자는 상이한 삽입 서열을 갖는, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 각 주기의 상기 시퀀싱 반응은 중합효소-매개된, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열의 k 주기의 상기 시퀀싱 반응을 수행하는 것은, 상이한 유형의 뉴클레오타이드 염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 뉴클레오타이드 산의 폴로니를 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 개개 뉴클레오타이드 시약은 각각 상이한 유형의 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함하는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열의 k 주기의 상기 시퀀싱 반응을 수행하는 것은, 뉴클레오타이드 산의 폴로니를 복수의 시퀀싱 프라이머, 복수의 중합효소 및 상이한 유형의 결합활성의 혼합물과 접촉시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 혼합물에서 개개 결합활성은 다중 뉴클레오타이드 아암과 부착된 코어를 포함하고, 상기 개개 결합활성의 각 아암은 동일한 유형의 뉴클레오타이드 염기를 포함하는, 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열의 k 주기의 상기 시퀀싱 반응을 수행하는 것은, 상기 k 주기의 각각에서, 광학 시스템에 의해, 상기 주형 분자에 결합된 상기 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 영상화하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열의 k 주기의 상기 시퀀싱 반응을 수행하는 것은, 상기 k 주기의 각각에서, 광학 시스템에 의해, 상기 주형 분자에 결합된 상기 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 포함하는 상기 제1 복수의 플로우 셀을 획득하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 핵산 주형 분자는 제2 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제2 샘플 지표 서열을 더 포함하되, 상기 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 상기 조합은 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 상기 제2 샘플 지표는 무작위 서열을 결여하는, 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제3 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제3 샘플 지표 서열을 더 포함하되, 상기 제1 및 제3 범용 샘플 지표 서열의 상기 조합은 상기 제1

삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 상기 제3 샘플 지표는 무작위 서열을 결여하는, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제4 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제4 샘플 지표 서열을 더 포함하되, 상기 제2 및 제4 범용 샘플 지표 서열의 상기 조합은 상기 제2 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 상기 제4 샘플 지표는 무작위 서열을 결여하는, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, k 는 0 초과이고 10 미만인 정수인, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, k 는 3인, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k -량체 서열은 하나 이상의 무작위 뉴클레오타이드 염기를 포함하는, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, k 는 3 또는 4이고, 상기 k -량체 서열은 적어도 2, 3 또는 4개의 무작위 뉴클레오타이드 염기를 포함하는, 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기 호출 위치의 각각은 상기 복수의 고정된 주형 분자의 위치에 상응하는, 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상은 상기 k 주기에 상기 지지체 상에 고정된 상기 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 신호를 포함하는, 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상은 상기 k 주기 차후의 상기 1회 이상의 주기에서 상기 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 신호를 포함하는, 방법.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 상기 불균형 다양성은 (2) 염기의 총 수에 대한 (1) 뉴클레오타이드 염기의 하나 이상의 유형의 수의 백분율을 포함하고, 이는 상기 1회 이상의 주기에서 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만인, 방법.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 상기 균형 다양성은 (2) 1회 이상의 주기에서 염기의 총 수에 대한 (1) 뉴클레오타이드 염기의 각각의 유형의 수의 백분율을 포함하고, 이는 10%, 15% 또는 20% 초과인, 방법.

청구항 60

방법으로서,

상기 시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 삽입 서열의 상기 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 61

방법으로서,

상기 시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 상기 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 62

방법으로서,

상기 프로세서에 의해, 상기 1회 이상의 차후 흐름 주기로부터의 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상을 상기 염기 호출 주형에 등록하는 단계;

상기 프로세서에 의해, 상기 등록된 제2 복수의 플로우 셀 영상으로부터의 신호를 사용하여 염기 호출 주형의 염기 호출 위치에서 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상의 염기 호출을 수행하는 단계

를 더 포함하는, 방법.

청구항 63

방법으로서,

상기 프로세서에 의해, 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상으로부터의 신호를 사용하여 상기 염기 호출 주형의 상기 염기 호출 위치에서만 염기 호출을 수행하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염기 호출 위치는 하위-픽셀 해상도에 있는, 방법.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 픽셀 강도는 상기 상응하는 픽셀의 하나 이상의 하위픽셀 강도를 포함하는, 방법.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 픽셀 강도의 상기 각각의 색 순도는 상기 상응하는 픽셀의 상기 하나 이상의 하위픽셀 강도에 상응하는 하나 이상의 색 순도를 포함하는, 방법.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 픽셀 강도의 상기 각각의 색 순도는 하나 이상의 채널에 대해 상기 각각의 색 순도를 포함하는, 방법.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 픽셀 강도의 상기 각각의 색 순도를 결정하는 단계는 (1) 특정 유형의 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 신호 대 (2) 다른 유형의 뉴클레오타이드 염기에 대한 신호의 총량의 비를 결정하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 상기 픽셀에 대해, 상기 픽셀 강도는

상기 상응하는 픽셀 또는 하위픽셀 위치에서 채널 강도의 세트 비교에 기반하여, 각각의 상이한 형광 파장에 상응하는 채널 강도 세트의 각각의 채널 강도를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1회 이상의 차후 흐름 주기로부터의 상기 제2 복수의 플로우

셀 영상을 상기 염기 호출 주형에 등록하는 단계는

상기 염기 호출 주형으로서 공통 좌표계에서 상기 제2 복수의 플로우 셀 영상의 폴로니의 좌표를 생성하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 주형을 결정하는 단계는

각각의 상기 픽셀 또는 하위픽셀에 대해, 상기 각각의 색 순도가 임계값 거리 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 큰지의 여부를 결정하는 것;

상기 각각의 색 순도가 상기 임계값 거리 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 상기 색 순도보다 크다고 결정한 것에 반응하여, 상기 상응하는 픽셀 또는 하위픽셀의 위치를 염기 호출 주형에 더하는 것; 및

상기 각각의 색 순도가 상기 임계값 거리 내의 상기 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 상기 색 순도보다 크지 않다고 결정한 것에 반응하여, 상기 염기 호출 주형에 대한 변화를 생성하지 않는 것

을 포함하는, 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열 하류의 상기 염기 위치는 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 위치인, 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열 하류의 상기 염기 위치는 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 위치인, 방법.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열 하류의 상기 염기 위치는 상기 제1 삽입 서열의 위치인, 방법.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 k-량체 서열 하류의 상기 염기 위치는 상기 제1 삽입 서열 및 상기 제2 삽입 서열의 위치인, 방법.

청구항 76

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은,

시퀀싱 시스템에 의해, 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 77

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은,

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, k -량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기의 위치의 $k+1$ 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 78

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 제1 및 제2 k -량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 제1 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체에 고정되되, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k -량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 79

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은,

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 제1 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체에 고정되고, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되되, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 80

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 81

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k -량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 $k+1$ 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체 상에서 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상에 고정되되, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 82

방법으로서,

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k -량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체 상에서 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계로서, 제1 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되되, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k -량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 단계;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 단계; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 단계

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 방법.

청구항 83

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k -량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 $k+1$ 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체 상에서 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 것은 상기 지지체 상에 고정되고, 각각의 라이브러리 분자는 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1

삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되되, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 84

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것으로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 85

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것으로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각

각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치를

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 86

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것으로서, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것;

지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 것으로서, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 것;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치를

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 87

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것으로서, 상기 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것;

지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 것으로서, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 것;

상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해서, 픽셀 강도 및 각각의 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 88

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

시퀀싱 시스템에 의해, 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에 상기 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상에 고정되고, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 89

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기의 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로, 복수의 핵산 주형 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 90

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로, 제1 복수의 라이브러리 분자는 지지체 상에 고정되고, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체에 고정되되, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 91

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 k+1 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 제1 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체에 고정되고, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되되, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 92

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 k주기의 시퀀싱 반응을 수행하여 지지체의 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상에 고정되고, 각각의 핵산 주형 분자는 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치

를 포함하되, 상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 시스템.

청구항 93

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 k+1주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체 상에서 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상에 고정되되, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 94

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치는

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 상기 지지체 상에서 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 제1 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되고, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되되, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 95

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k -량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 $k+1$ 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 지지체 상에서 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것으로서, 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 것은 상기 지지체 상에 고정되고, 각각의 라이브러리 분자는 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하고; 제2 복수의 라이브러리 분자는 상기 지지체 상에 고정되되, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k -량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 96

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것으로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k -량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것

을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 97

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것으로서, 각각의 핵산 주형 분자는 삽입 서열 및 제1

샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 수용하는 것;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 k -량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 $k+1$ 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 98

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것으로서, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 제1 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것;

지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것으로서, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k -량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 제2 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것;

시퀀싱 시스템에 의해, 상기 제1 및 제2 k -량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치.

청구항 99

명령어가 저장된, 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 장치로서, 적어도 하나의 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 때, 상기 적어도 하나의 컴퓨팅 장치가

지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것으로서, 상기 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제1 샘플 지표 서열은 제1 k -량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 상기 제1 범용 샘플 지표는 상기 제1 삽입 서열의 상기 샘플 공급원을 식별하는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것;

상기 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 단계로서, 각각의 라이브러리 분자는 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하되, 상기 제2 샘플 지표 서열은 제2 k -량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 상기 제2 범용 샘플 지표는 상기 제2 삽입 서열의 상기 샘플

플 공급원을 식별하는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 것;

상기 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 상기 제1 범용 샘플 지표 서열 및 상기 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 것;

프로세서에 의해, 상기 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대해, 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도를 결정하는 것; 및

상기 프로세서에 의해 그리고 상기 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 상기 픽셀 강도 및 상기 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함하는 작업을 수행하게 하되,

상기 염기 호출 주형은 상기 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 상기 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된, 비-일시적 컴퓨터-관독 가능 장치.

청구항 100

시스템으로서,

하나 이상의 하드웨어 프로세서;

상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서가 작업을 수행하게 하는 상기 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령을 저장하는 하나 이상의 데이터 저장 장치로서, 상기 작업은 제13항 내지 제75항 중 어느 한 항을 포함하는, 상기 데이터 저장 장치를

포함하는, 시스템.

청구항 101

시퀀싱 데이터 분석에서 작업을 수행하기 위해 하나 이상의 하드웨어 프로세서에 의해 실행 가능한 명령으로 인코딩된 하나 이상의 비-일시적 컴퓨터 저장 매체로서, 상기 작업은 제13항 내지 제75항 중 어느 한 항을 포함하는, 비-일시적 컴퓨터 저장 매체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2022년 6월 30일자로 출원된 미국 특허 출원 제17/854,042호의 일부 계속 출원이며, 이는 2021년 12월 10일자로 출원된 미국 특허 출원 제17/547,602호의 계속이며, 2021년 3월 31일자로 출원된 미국 특허 출원 제17/219,556호의 계속이고, 2020년 8월 31일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/072,649호에 대한 우선권을 주장한다. 본 출원은 2022년 4월 20일자로 출원된 미국 특허 출원 제17/725,065호의 일부 계속 출원이며, 이는 2022년 3월 4일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/316,784호에 대한 우선권을 주장한다. 본 출원은 2022년 4월 20일자로 출원된 미국 특허 출원 제17/725,042호의 일부 계속 출원이며, 이는 2022년 3월 4일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/316,790호에 대한 우선권을 주장한다. 본 출원은 2022년 6월 6일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/349,421호에 대한 우선권을 주장한다. 위에 언급된 특허 출원의 전문은 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 인용된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 개시내용은 일반적으로 영상 데이터 분석에 관한 것이며, 특히 DNA 시퀀싱 동안 플로우 셀(flow cell)의 디지털 영상에서 염기 호출(base-calling)을 수행하기 위해 클러스터 위치를 식별하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

DNA의 서열을 식별하기 위해 플로우 셀을 사용하는 합성에 의한 차세대 시퀀싱(next generation sequencing-by-synthesis)이 사용될 수 있다. 시퀀싱 라이브러리로부터의 단일 가닥 DNA 단편이 플로우 셀 전체에 넘치면, 전형적으로 플로우 셀 표면에 결합된 상보적 올리고머 또는 이에 존재하는 비드로 인해 단편은 플로우 셀 표면에 무작위로 부착될 것이다. 이어서, 주어진 단편의 복제물이 변성되고, 클로닝된 뉴클레오타이드 가닥의 클러스터

또는 폴로니(polony)를 형성하도록, DNA 단편에 대해 증폭 공정이 수행된다. 일부 양상에서, 단일 비드는 클러스터를 함유할 수 있고, 비드는 무작위 위치에서 플로우 셀에 부착될 수 있다.

[0006] 가닥의 서열을 식별하기 위해, 한 번에 1개의 뉴클레오타이드 염기로 가닥 쌍이 재구성된다. 각 염기-구성 주기 동안에, 형광 표지(또는 태그) 및 차단제에 각각 부착된 단일 뉴클레오타이드의 혼합물은 플로우 셀 전체적으로 넘친다. 뉴클레오타이드는 가닥 상의 상보적 위치에 부착된다. 단일 주기 동안 주어진 가닥에 1개의 염기만이 부착되도록 차단제가 포함된다. 플로우 셀은 여기광에 노출되어, 표지를 여기시키고, 이들에 형광을 야기한다. 클로닝 가닥은 함께 클러스터링되기 때문에, 클러스터에 대한 형광이 이미저(imager)에 의해 기록될 수 있도록 임의의 1개의 단편에 대한 형광 신호는 이의 클로닝된 상대로부터의 신호에 의해 증폭된다. 플로우 셀이 영상화된 후에, 차단제는 절단되고, 유동 뉴클레오타이드로부터 세척되며, 플로우 셀에 대해 더 많은 뉴클레오타이드가 넘치며, 주기는 반복된다. 각 흐름 주기에는, 하나 이상의 영상이 기록된다.

[0007] 염기 호출 알고리즘은 기록 영상에 적용되어 각 클러스터로부터의 연속 신호를 "관독"하며, 광학 신호를 각 단편에 더해진 뉴클레오타이드 염기 서열의 식별로 전환한다. 연속 신호가 올바른 단편으로 인한 것인지를 보장하기 위해, 정확한 염기 호출은 클러스터 중심의 정확한 식별을 필요로 한다.

발명의 내용

[0008] 컴퓨터에 의해 이미저의 해상도를 물리적 해상도 한계를 넘게 개선시키고/시키거나 영상에서 더 높은 정확도의 소스 위치를 제공하는 시스템, 장치, 제조 물품, 방법 및/또는 컴퓨터 프로그램 제품 양상 및/또는 이들의 조합 및 하위 조합이 본 명세서에서 제공된다.

[0009] 이러한 특정 적용으로서, 플로우 셀에서 염기 호출 위치의 세트를 식별하기 위한 방법 및 시스템의 양상이 기재된다. 이들은 각 흐름 주기 후에 플로우 셀 영상을 포착하는 것과 플로우 셀 영상 중 적어도 하나에서 후보 클러스터의 중심을 식별하는 것을 포함한다. 강도는 각 후보 클러스터 중심에 대해 결정된다. 순도는 강도에 기반하여 각 후보 클러스터 중심에 대해 결정된다. 일부 양상에서, 강도 및/또는 순도는 서브-픽셀 수준에서 결정된다. 거리 임계값 내에서 주변 후보 클러스터 중심의 순도보다 더 큰 순도를 갖는 각 후보 클러스터 중심이 염기 호출 위치의 세트에 추가된다. 염기 호출 위치의 세트는 본 명세서에서 주형으로 지칭될 수 있다.

[0010] 일부 양상에서, 후보 클러스터 중심을 식별하는 것은 플로우 셀 영상의 각 픽셀을 후보 클러스터 중심으로 표시하는 것을 포함한다.

[0011] 일부 양상에서, 후보 클러스터 중심을 식별하는 것은 스팟-찾기(spot-finding) 알고리즘을 사용하여 잠재적 클러스터 중심 위치의 세트를 검출하는 것, 그 다음에 각각의 잠재적 클러스터 중심 위치 주변의 추가 클러스터 위치를 식별하는 것을 포함한다.

[0012] 다른 양상은 상응하는 컴퓨터 시스템, 장치 및 컴퓨터 저장 장치(들)에 기록된 컴퓨터 프로그램 제품을 포함하며, 이는 단독으로 또는 조합하여 상기 방법의 동작 또는 작업(operation)을 수행하도록 구성된다. 작업 또는 동작을 수행하도록 구성된 또는 구성될 컴퓨터 시스템에 대해, 컴퓨터 시스템은 작업에서 컴퓨터 시스템이 작업 또는 동작을 수행하도록 소프트웨어, 펌웨어, 하드웨어 또는 이들의 조합을 설치하였다. 작업 또는 동작을 수행하도록 구성된 또는 구성될 컴퓨터 프로그램 제품에 대해, 컴퓨터 프로그램 제품은 하드웨어 프로세서에 의해, 하드웨어 프로세서가 작업 또는 동작을 수행하게 하는 명령을 포함한다.

[0013] 본 개시내용의 추가 양상, 특징 및 이점뿐만 아니라 본 개시내용의 다양한 양상의 구조 및 동작은 수반하는 도면을 참조로 하여 아래에서 더욱 상세하게 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 본 명세서에 포함되고 본 명세서의 일부를 형성하는 수반하는 도면은 본 개시내용의 양상을 예시하고, 설명과 함께 추가로 본 개시내용의 원칙을 설명하고, 기술분야(들)의 당업자가 양상을 제조 및 사용하는 것을 가능하게 하는 역할을 한다.

도 1은 일부 양상에 따라 플로우 셀 상의 클러스터 위치를 식별하기 위한 시스템의 블록 다이어그램을 도시한다.

도 2는 일부 양상에 따라 후보 클러스터 중심이 있는 예시적 플로우 셀 영상을 도시한다.

도 3은 일부 양상에 따라 염기 호출을 수행하는 위치를 식별하기 위한 방법을 도시하는 흐름도이다.

도 4는 일부 양상에 따라 본 개시내용의 다양한 양상을 수행하기 위해 사용될 수 있는 컴퓨터의 블록 다이어그램을 도시한다.

도 5A는 예시적인 선형 단일 가닥 라이브러리 분자(500)를 나타내는 개략도이며, 이는 표면 피닝 프라이머 결합 부위(520); 선택적 k-량체 서열(561)을 갖는 좌측 지표 서열(560); 정방향 시퀀싱 프라이머 결합 부위 (540); 관심 서열을 갖는 삽입 영역(510); 역방향 시퀀싱 프라이머 결합 부위 (550); 선택적 k-량체 서열(571)을 갖는 우측 지표 서열(570); 및 표면 포착 프라이머 결합 부위(530)를 포함한다. 라이브러리 분자(500)는 일부 양상에 따라, 우측 지표 서열(570)과 표면 포착 프라이머 결합 부위(530) 사이에 선택적 우측 고유 식별 서열을 가질 수 있다.

도 5B는 이중-가닥 스프린트 분자(splint molecule)와 혼성화함으로써(580) 라이브러리 분자를 원형화하여 2개의 틸을 갖는 라이브러리-스프린트 복합체(590)를 형성하는 예시적인 선형 단일 가닥 라이브러리 분자(도 5A에서 (500))를 보여주는 개략도이다. 라이브러리 분자(도 5A에서 (500))는 제1 현수 좌측 범용 어댑터 서열; 제1 좌측 범용 어댑터 서열(520); 제1 좌측 접합 어댑터(junction adaptor) 서열; 좌측 지표 서열(560); 제2 좌측 접합 어댑터 서열; 제2 좌측 범용 어댑터 서열(540); 제3 좌측 접합 어댑터 서열; 관심 서열(510); 제3 우측 접합 어댑터 서열; 제2 우측 범용 어댑터 서열(540); 제2 우측 접합 어댑터 서열; 우측 지표 서열(570); 제1 우측 접합 어댑터 서열; 제1 우측 고유 식별 서열; 제1 우측 범용 어댑터 서열(530); 및 제1 현수 우측 범용 어댑터 서열로부터 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 이중-가닥 스프린트 분자(580)는 제2 스프린트 가닥에 혼성화된 제1 스프린트 가닥을 포함한다. 제1 스프린트 분자는 선형 단일 가닥 라이브러리 분자의 하나의 말단 상의 서열과 혼성화되는 제1 영역(320), 및 선형 단일 가닥 라이브러리 분자의 다른 말단 상의 서열과 혼성화되는 제2 영역(330)을 포함한다. 제1 스프린트 분자의 내부 영역(310)은 제2 스프린트 분자에 혼성화한다. 단순함을 위해, 라이브러리-스프린트 복합체(580)는 임의의 접합 어댑터 서열 또는 현수된 범용 어댑터 서열을 나타내지 않는다. 당업자라면 선형 라이브러리 분자(500)가 현수 범용 어댑터 서열 중 하나 또는 둘 다의 유무와 상관없이 접합 어댑터 중 둘 이상 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함할 수 있다는 것을 인식할 것이다. 당업자라면 라이브러리-스프린트 복합체(590)가 일부 양상에 따라, 라이브러리 분자(500)에 존재하는 현수 범용 어댑터 서열 중 하나 또는 둘 다의 유무와 상관없이 접합 어댑터 중 둘 이상 중 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

도 6은 일부 양상에 따라 염기 호출을 수행하는 위치를 식별하기 위한 방법을 도시하는 흐름도이다.

도 7은 다가 분자의 다양한 예시적인 입체배치의 개략도이다. 좌측(부류 I): "스타버스트(starburst)" 또는 "헬터-스켈터(helter-skelter)" 입체배치를 갖는 다가 분자의 개략도. 중앙(부류 II): 덴드리머 입체배치를 갖는 다가 분자의 개략도. 우측(부류 II): 스트랩타비딘을 4-아암 또는 8-아암 PEG-NHS와 바이오틴 및 dNTP와 반응시킴으로써 형성된 다중 다가 분자의 개략도. 일부 양상에 따라, 뉴클레오타이드 단위는 'N'으로 표기되고, 바이오틴은 'B'로 표기되고, 스트랩타비딘은 'SA'로 표기된다.

도 8은 일부 양상에 따라, 복수의 뉴클레오타이드-아암에 부착된 일반적 코어를 포함하는 예시적인 다가 분자의 개략도이다.

도 9는 일부 양상에 따라, 복수의 뉴클레오타이드-아암에 부착된 덴드리머 코어를 포함하는 예시적인 다가 분자의 개략도이다.

도 10은 일부 양상에 따라, 복수의 뉴클레오타이드-아암에 부착된 코어를 포함하는 예시적인 다가 분자의 개략도를 나타내며, 여기서, 뉴클레오타이드 아암은 바이오틴, 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 단위를 포함한다.

도 11은 일부 양상에 따라, 코어 부착 모이어티, 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 단위를 포함하는 예시적인 뉴클레오타이드-아암의 개략도이다.

도 12는 일부 양상에 따라, 예시적인 스페이서의 화학 구조(상단) 및 11-원자 링커, 16-원자 링커, 23-원자 링커 및 N3 링커를 포함하는 및 다양한 예시적인 링커의 화학 구조(하단)를 나타낸다.

도 13은 일부 양상에 따라, 링커 1 내지 9를 포함하는 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 14는 일부 양상에 따라, 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 15는 일부 양상에 따라, 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 16은 일부 양상에 따라, 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 17은 일부 양상에 따라, 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 18은 예시적인 바이오틴일화된 뉴클레오타이드-아암의 화학 구조를 나타낸다. 본 예에서, 일부 양상에 따라, 뉴클레오타이드 단위는 피리미딘 염기의 5번 위치 또는 퓨린 염기의 7번 위치에서 프로파길 아민 부착을 통해 링커에 연결된다.

도 19는 일부 양상에 따라, 본 개시내용의 낮은 결합 고체 지지체의 일 양상의 개략적 도시를 제공하며, 이때 지지체는 유리에 공유 또는 비공유 접착되고, 올리고뉴클레오타이드 프라이머에 대한 부착 부위로서 작용하는 화학 반응성 작용기를 더 포함하는 친수성 코팅의 유리 기재 및 교번의 층을 포함한다.

도면에서, 동일한 참조 번호는 일반적으로 동일 또는 유사한 요소를 나타낸다. 추가로, 일반적으로, 참조 번호의 가장 좌측 숫자(들)는 참조 번호가 처음 나타나는 도면을 식별한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 컴퓨터에 의해 이미지의 해상도를 물리적 해상도 한계를 넘게 개선시키고/시키거나 영상에서 더 높은 정확도의 소스 위치를 제공하는 시스템, 장치, 제조 물품, 방법 및/또는 컴퓨터 프로그램 제품 양상 및/또는 이들의 조합 및 하위 조합이 본 명세서에서 제공된다. 본 명세서에 기재된 영상 처리 기법은 차세대 시퀀싱에서 염기 호출에 특히 유용하며, 염기 호출은 이러한 기법의 적용을 설명하기 위한 본 명세서의 1차적인 예로서 사용될 것이다. 그러나, 이러한 영상 분석 기법은 또한 스냅-검출 및/또는 CCD 영상화가 사용되는 다른 적용에서 특히 유용할 수 있다. 예를 들어, 감지된 광학 신호의 실제 중심(예를 들어, 소스 위치)을 식별하는 것은 수많은 다른 분야, 예컨대, 위치 검출 및 트래킹, 천문학적 영상화, 열 맵핑 등에서 효용을 갖는다. 추가로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 이러한 기법은 이미지의 물리적 해상도 한계에 도달되었다면 컴퓨터에 의해 해상도를 증가시키는 것으로부터 유익을 얻는 임의의 다른 적용에서 유용할 수 있다.
- [0016] DNA 시퀀싱에서, 클러스터 또는 폴로니의 중심(비드 상에서 종종 형성됨)을 식별하는 것은 때때로 1차 분석으로 지칭된다. 1차 분석은 플로우 셀에 대한 주형의 형성을 수반한다. 주형은 공통 좌표계에서 모든 검출된 클러스터의 추정 위치를 포함한다. 주형은 시퀀싱 과정의 처음 몇 개의 흐름에서 모든 영상의 클러스터 위치를 식별함으로써 생성된다. 영상은 모든 영상에 걸쳐 정렬되어 공통 좌표계를 제공할 수 있다. 다른 영상으로부터의 클러스터 위치는 좌표계에서의 근접성에 기반하여 병합될 수 있다. 일단 주형이 생성되면, 이에 대해 모든 추가 영상이 등록되고, 시퀀싱은 주형에서의 클러스터 위치에 기반하여 수행된다.
- [0017] 영상에서 클러스터 중심을 식별하기 위한 다양한 알고리즘이 존재한다. 이러한 기존의 알고리즘은 다수의 단점이 있다. 위에 논의한 바와 같이, 클러스터 중심은 서로 가까운 경우에 병합되어 나타날 수 있다. 근접성은 정밀도 문제 또는 등록 문제로 인한 것일 수 있다. 따라서 상이한 클러스터가 단일 클러스터로 처리되어, 서열 식별이 부적절하게 되거나 또는 서열이 누락될 수 있다.
- [0018] 추가로, 알고리즘은 주형에 대한 클러스터 위치를 식별하기 위해 여러 영상에 걸쳐 클러스터를 찾을 필요가 있을 수 있다. 이는 과도한 처리 시간을 필요로 할 수 있다.
- [0019] 도 1은 양상에 따라 플로우 셀 상의 클러스터 위치를 식별하기 위한 시스템(100)의 블록 다이어그램을 도시한다. 시스템(100)은 플로우 셀(112), 시퀀서(114), 이미지(116), 데이터 저장 장치(122) 및 사용자 인터페이스(124)를 포함할 수 있는 시퀀싱 시스템(110)을 갖는다. 시퀀싱 시스템(110)은 클라우드(130)에 연결될 수 있다. 시퀀싱 시스템(110)은 전용 프로세서(118), 필드-프로그램 가능 게이트 어레이(들)(Field-Programmable Gate Array: FPGA(들))(120) 및 컴퓨터 시스템(126) 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0020] 일부 양상에서, 플로우 셀(112)은 DNA 단편을 포획하고 플로우 셀 상에서의 염기 호출을 위해 DNA 서열을 형성하도록 구성된다. 시퀀서(114)는 뉴클레오타이드 혼합물이 플로우 셀(112) 상으로 흐르게 하고, 흐르는 단계에서 뉴클레오타이드로부터 차단제를 절단하고, 플로우 셀(112) 상에서의 DNA 서열의 형성을 위한 다른 단계를 수행하도록 구성될 수 있다. 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 유형을 나타내는 파장에서 광 또는 에너지를 방출하는 형광 요소가 부착되어 있을 수 있다. 형광 요소의 각 유형은 특정 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, A, G, C, T)에 상응할 수 있다. 형광 요소는 가시광선 파장에서 광을 방출할 수 있다.
- [0021] 예를 들어, 각각의 뉴클레오타이드 염기에 색이 부여될 수 있다. 예를 들어, 아데닌은 적색일 수 있고, 사이토신은 청색일 수 있고, 구아닌은 녹색일 수 있으며, 티민은 황색일 수 있다. 뉴클레오타이드가 형광 요소에 의해 방출되는 광의 파장에 기반하여 서로 구별될 수 있도록, 각 뉴클레오타이드에 대한 형광 요소의 색 또는 파장이

선택될 수 있다.

- [0022] 이미지(116)는 각 흐름 단계 후에 플로우 셀(112)의 영상을 포착하도록 구성될 수 있다. 양상에서, 이미지(116)는 CMOS 또는 CCD 카메라와 같은 디지털 영상을 포착하도록 구성된 카메라이다. 카메라는 뉴클레오타이드에 결합된 형광 요소의 파장에서 영상을 포착하도록 구성될 수 있다.
- [0023] 이미지(116)의 해상도는 픽셀 크기를 포함하는 플로우 셀 영상의 세부 수준을 제어한다. 기존의 시스템에서, 스팟-찾기 알고리즘이 클러스터 중심을 식별하는 정확도를 제어하기 때문에 이런 해상도는 매우 중요하다. 스팟-찾기의 정확도를 증가시키는 한 가지 방법은 이미지(116)의 해상도를 개선시키거나, 이미지(116)에 의해 촬영된 영상에 대해 수행된 처리를 개선시키는 것이다. 본 명세서에 기재된 방법은 스팟-찾기 알고리즘에 의해 검출되는 것 이외의 픽셀에서 클러스터 중심을 검출할 수 있다. 이러한 방법은 이미지(116)의 해상도를 증가시키지 않고 클러스터 중심 검출의 개선된 정확도를 가능하게 한다. 이미지의 해상도는 비슷한 성능을 갖는 기존의 시스템보다 훨씬 낮을 수 있으며, 이는 시퀀싱 시스템(110)의 비용을 감소시킬 수 있다.
- [0024] 양상에서, 플로우 셀의 영상은 그룹으로 포착될 수 있으며, 여기서 그룹의 각 영상은 형광 요소 중 하나만 매칭되거나 이를 포함하는 파장 또는 스펙트럼에서 촬영된다. 다른 양상에서, 영상은 형광 요소의 모든 파장을 포착하는 단일 영상으로서 포착될 수 있다.
- [0025] 시퀀싱 시스템(100)은 플로우 셀 영상에 기반하여 플로우 셀(112) 상의 클러스터 위치를 식별하도록 구성될 수 있다. 클러스터를 식별하기 위한 처리는 전용 프로세서(118), FPGA(들)(120), 컴퓨팅 시스템(126) 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다. 클러스터 위치를 식별 또는 결정하는 것은 본 명세서에 더 구체적으로 기재되는 클러스터 발견 방법과 조합하여 전통적 클러스터 발견을 수행하는 것을 수반할 수 있다.
- [0026] 범용 프로세서는 Windows™ 또는 Linux™와 같은 운영체제에서 다양한 프로그램을 실행하기 위한 인터페이스를 제공한다. 이러한 운영체제는 전형적으로 사용자에게 큰 유연성을 제공한다.
- [0027] 일부 양상에서, 전용 프로세서(118)는 본 명세서에 기재된 클러스터 발견 방법의 단계들을 수행하도록 구성될 수 있다. 이들은 범용 프로세서가 아닐 수도 있지만, 대신에 해당 단계들을 수행하기 위한 특정 하드웨어 또는 지침이 있는 맞춤형 프로세서일 수 있다. 전용 프로세서는 운영체제 없이 특정 소프트웨어를 직접 실행한다. 운영체제의 결여는, 프로세서가 수행할 수 있는 유연성의 댓가로, 오버헤드를 감소시킨다. 전용 프로세서는 범용 프로세서에서 실행되는 소프트웨어보다 더 효율적으로 작동하도록 설계될 수 있는 맞춤형 프로그래밍 언어를 사용하게 할 수 있다. 이는 단계가 수행되는 속도를 증가시키고 실시간 처리를 가능하게 할 수 있다.
- [0028] 일부 양상에서, FPGA(들)(120)는 본 명세서에 기재된 클러스터 발견 방법의 단계들을 수행하도록 구성될 수 있다. FPGA는 특정 태스크(task)만을 수행하는 하드웨어로 프로그래밍된다. 소프트웨어 단계를 하드웨어 구성부분으로 전환시키기 위해 특별한 프로그래밍 언어가 사용될 수 있다. 일단 FPGA가 프로그래밍되면, 하드웨어는 소프트웨어를 실행시키지 않고 이것에 제공되는 디지털 데이터를 직접 처리한다. 대신에 FPGA는 논리 게이트를 사용하고, 디지털 데이터를 처리하도록 등록된다. 운영체제에 필요한 오버헤드가 없기 때문에, FPGA는 일반적으로 범용 프로세서보다 더 빠르게 데이터를 처리한다. 전용 프로세서와 유사하게, 이는 유연성의 댓가이다.
- [0029] 소프트웨어 오버헤드의 결여는 또한 FPGA가 전용 프로세서보다 더 빠르게 작동하는 것을 가능하게 할 수 있지만, 이는 수행될 정확한 처리 및 특정 FPGA 및 전용 프로세서에 따를 것이다.
- [0030] FPGA(들)(120)의 그룹은 단계들을 병렬로 수행하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 다수의 FPGA(들)(120)는 영상, 영상의 세트 또는 하나 이상의 영상의 클러스터 위치에 대한 처리 단계를 수행하도록 구성될 수 있다. 각각의 FPGA(들)(120)는 처리 단계의 자체 부분을 동시에 수행하여 데이터를 처리하는 데 필요한 시간을 줄일 수 있다. 이를 통해 처리 단계가 실시간으로 완료될 수 있다. FPGA 사용의 추가 논의는 아래에 제공된다.
- [0031] 처리 단계를 실시간으로 수행하는 것은, 데이터가 수신되는 대로 처리될 수 있기 때문에 시스템이 메모리를 더 적게 사용하는 것을 가능하게 할 수 있다. 이는 데이터가 처리되기 전에 데이터를 저장해야 할 필요가 있을 수 있는 통상적인 시스템보다 개선되었고, 이는 더 많은 메모리를 필요로 하거나 클라우드(130)에 위치한 컴퓨터 시스템에 액세스될 수 있다.
- [0032] 일부 양상에서, 데이터 저장 장치(122)는 클러스터 위치의 식별에 사용되는 정보를 저장하는 데 사용된다. 이러한 정보는 영상 그 자체 또는 이미지(116)에 의해 포착되는 영상으로부터 유래된 영상을 포함할 수 있다. 염기 호출로부터 결정된 DNA 서열은 데이터 저장 장치(122)에 저장될 수 있다. 클러스터 위치를 식별하는 매개변수는 또한 데이터 저장 장치(122)에 저장될 수 있다.

- [0033] 사용자 인터페이스(124)는 시퀀싱 시스템을 작동시키거나 데이터 저장 장치(122) 또는 컴퓨터 시스템(126)에 저장된 데이터에 액세스하기 위해 사용자에게 의해 사용될 수 있다.
- [0034] 컴퓨터 시스템(126)은 시퀀싱 시스템의 일반적인 작업을 제어할 수 있고, 사용자 인터페이스(124)에 연결될 수 있다. 이는 또한 클러스터 위치의 식별 및 염기 호출에서 단계들을 수행할 수 있다. 일부 양상에서, 컴퓨터 시스템(126)은 도 4에 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이, 컴퓨터 시스템(400)이다. 컴퓨터 시스템(126)은 시퀀싱 시스템(110)의 작업에 관한 정보, 예컨대, 구성 정보, 시퀀싱 시스템(110)을 작동시키기 위한 지침 또는 사용자 정보를 저장할 수 있다. 컴퓨터 시스템(126)은 시퀀싱 시스템(110)과 클라우드(130) 사이에 정보를 전달하도록 구성될 수 있다.
- [0035] 위에 논의한 바와 같이, 시퀀싱 시스템(110)은 전용 프로세서(118), FPGA(들)(120) 또는 컴퓨터 시스템(126)을 가질 수 있다. 시퀀싱 시스템은 위에 기재된 필수 처리를 달성하기 위해 이러한 요소 중 1, 2개 또는 모두를 사용할 수 있다. 일부 양상에서, 이러한 요소가 함께 존재할 때, 처리 태스크는 둘 사이에서 분할된다. 예를 들어, FPGA(들)(120)은 본 명세서에 기재된 클러스터 중심 찾기 방법을 수행하는 데 사용될 수 있는 반면, 컴퓨터 시스템(126)은 시퀀싱 시스템(110)에 대한 다른 처리 기능을 수행할 수 있다. 당업자는 이들 요소의 다양한 조합이 처리 요소의 비용과 효율성 및 처리 속도의 균형을 맞추는 다양한 시스템 양상을 허용할 것임을 이해할 것이다.
- [0036] 클라우드(130)는 시퀀싱 시스템(110)과 별개인 네트워크, 원격 저장소 또는 일부 다른 원격 컴퓨팅 시스템일 수 있다. 클라우드(130)에 대한 연결은 시퀀싱 시스템(110)에 대해 외부에 저장된 데이터에 대한 액세스를 허용하거나, 시퀀싱 시스템(110)의 소프트웨어의 업데이트를 가능하게 할 수 있다.
- [0037] 도 3은 염기 호출을 수행하는 실제 클러스터 중심 위치를 식별하기 위한 방법(300)을 도시하는 흐름도이다. 플로우 셀 영상의 클러스터 중심은 물리적 플로우 셀 상의 클론 클러스터의 위치에 상응하는 영상 내 위치이다. 클러스터 중심에서 검출된 광학 신호의 파장은 해당 위치에서 플로우 셀 상의 단편에 더해진 뉴클레오타이드 염기와 상관관계가 있다. DNA 서열이 정확하게 결정되게 하기 위해서, 순차적으로 검출되는 광학 신호는 일관되게 올바른 DNA 단편에 기인해야 한다. 따라서 클러스터 중심의 위치를 정확히 식별하는 것은 해당 단편에 대한 염기-호출 정확도를 개선시킨다. 일부 양상에서, 일단 실제 클러스터 중심이 식별되었다면, 이러한 위치는 동일한 플로우 셀을 사용하여 후속 염기 호출 주기에서 사용하기 위한 주형에 맵핑될 수 있다. 상기 방법(300)은 전용 프로세서(118), FPGA(들)(120) 또는 컴퓨터 시스템(126)에 의해 수행될 수 있다.
- [0038] 단계(310)에서, 플로우 셀 영상이 포착된다. 플로우 셀 영상은 위에 논의한 바와 같이 이미저(116)에 의해 포착될 수 있다. 단계(310)는 다음의 단계에 의해 처리될 한 번에 하나의 영상을 포착하는 것을 포함할 수 있거나, 동시 처리를 위해 영상의 세트를 포착하는 것을 포함할 수 있다. 영상의 세트가 포착되는 예에서, 영상 세트의 각 영상은 상이한 검출 파장에 상응할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드에 연결된 색상의 위의 표기법이 주어지면, 영상의 세트는 4개의 영상을 포함할 수 있고, 각각은 적색, 청색, 녹색 및 황색 파장 중 각각의 하나에서 포착되는 신호에 상응한다. 신호 영상이 포착되는 예에서, 해당 영상은 관심의 모든 검출 파장을 포함할 수 있다. 각 영상 또는 영상의 세트는 플로우 셀 상에서 단일 흐름 단계를 위해 포착될 수 있다. 일부 양상에서, 플로우 셀 영상은 좌표계를 참조하여 포착된다.
- [0039] 도 2는 클러스터로부터의 신호가 존재하는 플로우 셀 영상(200)의 개략도를 예시한다. 플로우 셀 영상(200)은 픽셀(210), 예컨대, 픽셀(210A, 210B 및 210C)로 구성된다. 단계(310) 동안, 이미저는, 예를 들어, 플로우 셀 상의 단편에 결합된 형광 요소의 여기 후에 플로우 셀로부터 수신된 광학 신호를 기록하고, 이러한 단편은 단편의 클론 클러스터에 위치된다.
- [0040] 단계(320)에서, 플로우 셀 영상에서 잠재적 클러스터 중심의 위치가 식별된다. 예를 들어, 일부 양상에서, 스왑-찾기 알고리즘이 잠재적 클러스터 중심의 세트를 출력하도록 단계(310)에서 영상화된 광학 신호는 스왑-찾기 알고리즘에 입력될 수 있다. 일부 양상에서, 잠재적 클러스터 중심은 단일 플로우 셀 영상(예를 들어, 관심의 모든 파장을 포함하는 1개의 영상)만을 사용하여 식별될 수 있다. 일부 다른 양상에서, 잠재적 클러스터 중심은 플로우 셀 상의 단일 흐름 주기로부터의 영상의 세트(예를 들어, 관심의 각 파장에서 1개의 영상)로부터 식별될 수 있다. 단일 흐름 주기로부터의 유일한 플로우 셀 영상 또는 플로우 셀 영상 세트의 사용은 처리 시간의 양을 유리하게 감소시키는데, 스왑-찾기 알고리즘이 장래의 흐름 주기에서 추가 영상을 얻을 때까지 기다릴 필요가 없기 때문이다.
- [0041] 또한 다른 양상에서, 스왑-찾기 알고리즘은 1회 초과된 흐름 주기로부터의 영상에 적용될 수 있고, 잠재적 클러

스터 중심은 해당 영상의 일부 조합을 사용하여 발견될 수 있다. 예를 들어, 잠재적 클러스터 중심은 1회 초과
의 흐름 주기로서 영상의 동일한 위치를 차지하는 스팟의 존재에 의해 식별될 수 있다.

[0042] 스팟-찾기 알고리즘에 의해 식별되는 잠재적 클러스터 중심 위치는 도 2에서 "X", 예컨대, 잠재적 클러스터 중심 위치(220A, 220B 및 220C)로 도시된다. 플로우 셀에 대한 단편 부착의 무작위 특성으로 인해, 클론 클러스터 중 일부는 서로 가까이 있을 수 있는 반면, 다른 클러스터는 더 멀리 떨어져 있거나 심지어 단독으로 있을 수도 있다. 그 결과, 도 2의 일부 "X"는 다른 것보다 더 밀접하게 위치한다. 추가로, 일부 픽셀은 잠재적 클러스터 중심을 포함하는 것으로 식별될 수 있지만, 다른 것들은 그렇지 않다. 예를 들어, 픽셀(210A)은 잠재적 클러스터 중심 위치(220A)를 포함하는 것으로 식별될 수 있는 반면, 픽셀(210B)은 잠재적 클러스터 중심 위치(220))를 포함하는 것으로 처음에 식별되지 않는다.

[0043] 일부 양상에서, 스팟-찾기 알고리즘은 픽셀(210)에 걸쳐 보간함으로써 하위-픽셀 해상도에서 잠재적 클러스터 중심 위치(220)를 식별할 수 있다. 예를 들어, 잠재적 클러스터 중심 위치(220A)는 픽셀(210A) 중심보다 픽셀(210A)의 하부 우측에 위치된다. 다른 잠재적 클러스터 중심 위치는 이들 각각의 픽셀(210)의 상이한 영역에 위치될 수 있다. 예를 들어, 잠재적 클러스터 중심 위치(220B)는 픽셀의 상부 우측에 위치되고, 잠재적 클러스터 중심 위치(220C)는 픽셀의 상단 좌측에 위치된다. 보간 함수에 의해 보간이 수행될 수 있다.

[0044] 일부 양상에서, 보간 함수는 당업자에게 알려진 가우시안 보간 함수이다. 하위-픽셀 해상도는, 예를 들어, 1/10 픽셀 해상도로 잠재적 클러스터 위치가 결정되는 것을 허용할 수 있지만, 다른 해상도가 또한 고려된다. 양상에서, 예를 들어, 해상도는 1/4 픽셀 해상도, 1/2 픽셀 해상도 동일 수 있다. 보간 함수는 이런 해상도를 결정하도록 구성될 수 있다.

[0045] 보간 함수는 하나 이상의 픽셀(210)에서 광의 강도에 맞추기 위해 사용될 수 있다. 이런 보간은 하위-픽셀 위치가 식별될 수 있게 한다. 보간 함수는 잠재적 클러스터 중심 위치(220)를 포함하는 픽셀(210)의 세트에 걸쳐 적용될 수 있다. 양상에서, 보간 함수는 잠재적 클러스터 중심 위치(220)가 있는 픽셀(210) 및 픽셀(210)의 에지에 닿는 주변 픽셀(210)에 맞춰질 수 있다.

[0046] 일부 양상에서, 보간 함수는 영상 내 다수의 지점에서 결정될 수 있다. 해상도는 다수의 지점이 각 픽셀(210)에 어떻게 위치되는지를 결정한다. 예를 들어, 해상도가 픽셀의 1/10이라면, 픽셀 가장자리에 수직인 선을 따라서, 픽셀(210)에 걸쳐 계산된 9개의 지점 및 각 에지에 대해 1개의 지점이 있어서, 픽셀(210)을 10개의 부분으로 나눌 수 있다. 일부 양상에서, 보간 함수는 각 지점에서 계산되고, 각 지점에서 보간 함수와 픽셀 강도 사이의 차이가 결정된다. 보간 함수의 중심은 각 픽셀(210)에서 보간 함수와 강도 사이의 차이를 최소화하기 위해 이동된다. 이런 하위-픽셀 보간은 시스템이 더 낮은-해상도 이미지를 이용하여 더 높은 해상도를 달성하여, 시스템의 비용 및/또는 복잡성을 감소시키는 것을 가능하게 한다.

[0047] 일부 양상에서, 보간은 5×5 그리드 상에서 수행될 수 있다. 그리드는 잠재적 클러스터 중심 위치를 갖는 픽셀 중심(210)에 중심이 있을 수 있다.

[0048] 단계(320)의 일부 양상은 잠재적 클러스터 중심 위치를 식별하기 위해 스팟-찾기 알고리즘을 사용하지만, 단계(320)의 일부 다른 양상은 잠재적 클러스터 중심 위치로서 포착된 플로우 셀 영상의 모든 픽셀을 초기에 식별한다. 예를 들어, 도 2에서, 모든 픽셀(210)은 잠재적 클러스터 중심 위치(220)로서 식별될 수 있다. 이 접근은 스팟-찾기 알고리즘에 대한 필요를 제거하고, 방법(300)을 구현하는 데 필요한 처리 유형을 단순화할 수 있다. 이 접근은 각 잠재적 클러스터 중심 위치가 병렬로 처리될 수 있기 때문에 대규모 병렬 처리가 가능할 때 유리할 수 있다. 이는 전용 프로세서(118) 또는 FPGA(들)(120)와 같은 추가 하드웨어의 잠재적 비용이 증가하더라도, 처리 시간을 감소시킬 수 있다. 일부 양상에서, 이어서, 보간 함수는 플로우 셀 영상 전체에 걸쳐 하위-픽셀 해상도에서 강도를 식별하기 위해 위에 기재된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0049] 위에 논의한 바와 같이, 클러스터 중심은 물리적 플로우 셀 상의 클론 클러스터의 위치에 상응하는 픽셀(210)과 같은 영상 내 위치를 식별한다. 잠재적 클러스터 중심 위치(220)는 하나 이상의 파장에서 광이 이미지에 의해 검출되는 영상 내 위치이다. 일부 경우에, 클러스터의 물리적 위치는 픽셀(210)의 하나의 세트에 상응하지만, 예를 들어, 카메라 내의 상응하는 센서의 포화("블루밍"으로도 지칭됨)로 인해 해당 클러스터로부터의 광학 신호가 해당 하나의 세트에 인접한 추가 픽셀(210)에 오버플로될 수 있다. 추가로, 클러스터가 함께 근접하여 위치될 때, 클러스터 그 자체는 그렇지 않더라도, 해당 클러스터로부터의 광학 신호는 중첩될 수 있다. 진정한 클러스터 중심을 식별하는 것은 검출된 신호가 정확한 DNA 단편으로 인한 것임을 허용하며, 따라서 염기 호출 알고리즘의 정확도를 개선시킨다.

- [0050] 따라서, 단계(325)에서, 추가 클러스터 신호 위치(225)는 각 잠재적 클러스터 중심 위치(220) 주변에서 식별된다. 이들은 (225A, 225B 및 225C)와 같이 도 2에서 "+"로 도시된다. 이러한 추가 클러스터 신호 위치(225)는 잠재적 클러스터 중심 위치(220)로 이미 식별된 위치 대신에 또는 추가로 클러스터 중심을 구성할 수 있는 플로우 셀의 다른 위치에 상응한다.
- [0051] 일부 양상에서, 추가 클러스터 위치(225)는 잠재적 클러스터 중심 위치(220) 주변에 위치된다. 일부 양상에서, 이러한 추가 클러스터 위치(225)는 스팟 찾기 알고리즘에 의해 초기에 식별되지 않지만, 스팟 찾기 알고리즘에 의해 식별되는 각 잠재적 클러스터 중심 위치(220) 주변의 패턴에 위치된다. 추가 클러스터 위치(225)는 실제, 검출된 클러스터 중심을 나타내지는 않지만, 오히려 달리 검출되지 않을 수 있는 클러스터 중심을 확인하기 위한 잠재적 위치를 나타낸다. 이러한 클러스터 중심은 근접한 클러스터 중심의 신호간 혼합, 스팟 찾기 알고리즘의 오류 또는 기타 효과로 인해 검출되지 않을 수도 있다.
- [0052] 예로서, 추가 클러스터 위치(225A)는 잠재적 클러스터 중심 위치(220A)의 위치에 기반하여 픽셀(210A)에 배치될 수 있다. 이와 관련하여, 이는 추가 클러스터 위치(225A)가 잠재적 클러스터 중심 위치(220A)로부터 픽셀의 폭만큼 떨어져 배치된다는 것을 의미할 수 있다. 다른 추가적인 클러스터 위치(225)는 또한 잠재적 클러스터 중심 위치(220A) 주변에 위치된다. 잠재적 클러스터 중심 위치(220)가 플로우 셀 영상(200)의 에지 근처일 때와 같이 픽셀(210)이 존재하지 않는 경우에 추가 클러스터 위치(225)가 위치되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.
- [0053] 일부 양상에서, 추가 클러스터 신호 위치(225)는 잠재적 클러스터 중심 위치(220) 주변에 집중된 그리드에 위치된다. 추가 클러스터 위치(225)는 서로로부터 그리고 잠재적 클러스터 중심 위치(220)와 픽셀 폭만큼 이격되어 위치될 수 있다. 일부 양상에서, 추가 클러스터 위치(225) 및 잠재적 클러스터 중심 위치(220)는 정사각형 그리드를 형성한다. 그리드는 5개 픽셀×5개 픽셀, 9×9, 15×15 또는 다른 치수의 면적을 가질 수 있다.
- [0054] 일부 양상에서, 잠재적 클러스터 중심 위치(220)는 추가 클러스터 위치(225)의 상응하는 그리드가 중첩되도록 충분히 함께 근접해 있을 수 있다. 이는 하나 초과와 추가적인 클러스터 위치(225)가 동일한 픽셀(210)에 기인하도록, 동일한 픽셀(210)이 하나 초과와 잠재적 클러스터 중심 위치(220)로부터 추가 클러스터 위치(225)를 포함하게 한다. 예를 들어, 픽셀(210C)은 추가 클러스터 위치(225B)(잠재적 클러스터 중심 위치(220B)에 기반하여 식별됨)뿐만 아니라 추가 클러스터 위치(225C)(잠재적 클러스터 중심 위치(220C)에 기반하여 식별됨)를 포함한다.
- [0055] 일부 양상에서, 동일한 픽셀(210)에서 추가 클러스터 위치(225)가 함께 충분히 근접해 있다면, 추가 클러스터 위치(225) 중 하나는 버려지고, 다른 하나는 둘 모두를 나타내기 위해 사용된다. 2개의 추가 클러스터 위치(225)는, 예를 들어, 제한 없이, 픽셀의 2/10, 픽셀의 1/10 또는 일부 다른 하위-픽셀 거리 이내인 경우, 이러한 처리를 위해 함께 충분히 근접한 것으로 간주될 수 있다.
- [0056] 당업자라면, 단계(320)에서, 모든 픽셀 위치가 잠재적 클러스터 중심 위치(220)로 식별되었다면, 식별된 잠재적 클러스터 중심 위치에 추가로 고려할 다른 픽셀이 플로우 셀 영상에 남아있지 않기 때문에 단계(325)를 건너뛸 수 있다는 것을 인식할 것이다.
- [0057] 일부 양상에서, 잠재적 클러스터 중심 위치(220)(및 식별되었다면 주변의 추가 클러스터 위치(225))는 모든 후보 클러스터 중심의 세트를 함께 구성한다. 이러한 후보 클러스터 중심은 각 포착된 플로우 셀 영상에 대한 실제 클러스터 중심을 식별하도록 처리될 수 있다.
- [0058] 따라서, 일단 잠재적 클러스터 중심 위치(220) 및 추가 클러스터 위치(225)(즉, 후보 클러스터 중심)의 이들의 주변 그리드가 식별되었다면, 이들은 본래 식별된 잠재적 클러스터 중심 위치(220)와 동일할 수도 있고 동일하지 않을 수도 있는 클러스터 중심의 실제 위치를 결정하기 위한 시작 지점으로서 사용될 수 있다.
- [0059] 도 3으로 돌아가서, 단계(330)에서, 각 포착된 플로우 셀 영상에 대해 각 후보 클러스터 중심에 대한 순도값이 결정된다. 순도값은 뉴클레오타이드에 결합된 형광 요소의 파장 및 포착된 플로우 셀 영상의 픽셀 강도에 기반하여 결정될 수 있다.
- [0060] 각 후보 클러스터 중심에서, 픽셀의 강도는 이미지의 스펙트럼 밴드폭에 걸쳐 방출된 에너지 또는 광의 조합이다. 일부 양상에서, 각 뉴클레오타이드 염기의 형광 스펙트럼 밴드폭에 상응하는 에너지 또는 광의 양이 발견될 수 있다. 특정 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 각 신호의 순도는 1개의 뉴클레오타이드 염기 신호에 대한 에너지의 양 대 각각의 다른 뉴클레오타이드 염기 신호에 대한 에너지의 총량의 비로서 발견될 수 있다(예를 들어, "적색" 신호의 순도는 검출된 청색, 녹색 및 황색 파장 각각에 비해 해당 픽셀 또는 하위-픽셀에 대해 검출된

적색 파장의 상대 강도에 기반하여 결정될 수 있다). 픽셀의 전체 순도는 가장 큰 비, 가장 작은 비, 비의 평균 또는 비의 중앙값일 수 있다. 이어서, 계산된 순도는 해당 픽셀 또는 하위-픽셀에 부여될 수 있다.

[0061] 위에 언급된 바와 같이, 플로우 셀 영상의 세트는 단일 흐름 주기를 위해 포착될 수 있다. 세트의 각 영상은 상이한 파장에서 포착되고, 각 파장은 뉴클레오타이드에 결합된 형광 요소 중 하나에 상응한다. 영상 세트에 걸쳐 주어진 클러스터 중심의 순도는 영상 세트에 대해 순도 세트에서 최고, 최저, 중간 또는 평균 순도일 수 있다.

[0062] 일부 양상에서, 후보 클러스터 중심의 순도는 픽셀에 대한 파장에서 두 번째로 높은 강도 또는 에너지 대 해당 픽셀에 대한 파장에서 가장 높은 강도 또는 에너지의 비를 1에서 뺀 것으로 결정될 수 있다. 높은 순도 또는 낮은 순도를 구성하는 임계값이 설정될 수 있다. 예를 들어, 가장 높은 순도는 1일 수 있고, 낮은 순도 픽셀은 0에 가까운 순도값을 가질 수 있다. 임계값은 그 사이에서 설정될 수 있다.

[0063] 일부 양상에서, 두 강도의 비는 두 번째로 높은 강도와 가장 높은 강도 모두에 오프셋을 더함으로써 수정될 수 있다. 오프셋은 품질 점수에 개선된 정확도를 제공할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 비에서 두 강도는 최고 강도의 큰 비율이기도 한 절대 최대 강도와 약간 다를 수 있다. 구체적인, 비제한적 예로서, 가장 높은 강도는 10일 수 있고, 가장 낮은 강도는 1일 수 있으며, 최대 가능한 강도는 1000이다. 이 경우에 비는 0.1일 것이며, 0.9의 순도를 초래한다. 더 많은 정보가 없으면, 이는 잠재적으로 높은 품질의 점수로 해석된다. 이는, 예를 들어, 가장 높은 강도의 경우 500 및 두 번째로 높은 강도의 경우 490인 강도와 대조적이다. 본 실시예는 절대 차이가 거의 동일하지만, 비는 1에 가까우며, 순도는 0에 가깝다. 첫 번째 경우에, 낮은 전체 강도는 플로우 셀이 존재하지 않는다는 것을 시사하기 때문에 순도는 오해의 소지가 있다. 두 번째 경우에, 순도는 더 정확하며, 이는 픽셀이 가까이 위치되는 두 상이한 클러스터 중심으로부터의 강도 또는 에너지를 나타낸다는 것을 표시한다.

[0064] 오프셋은 이러한 문제를 해결하기 위해 비의 강도에 더해지는 값일 수 있다. 예를 들어, 오프셋이 최대 진폭의 10%인 경우에, 위의 예에서, 오프셋은 100이고, 첫 번째 비는 110에 대해 101이고, 이는 1에 훨씬 더 가까워서, 순도가 0 근처가 되게 하는데, 이는 두 파장 강도 사이의 작은 델타를 정확하게 반영한다. 두 번째 비에서, 비는 590에 대해 600이며, 이는 여전히 1에 가깝고, 또한 순도가 0 근처가 되게 한다.

[0065] 오프셋을 혼입하는 다른 예로서, 가장 높은 강도가 800이고 가장 낮은 강도가 1이라면, 비가 거의 0이기 때문에 오프셋이 없는 순도는 1에 가깝다. 오프셋이 다시 100이라면, 비는 900에 대해 101이 된다. 이는 순도를 1에서 약 0.89로 낮춘다. 이는 순도를 감소시킬 수 있지만, 계산된 순도는 여전히 높다. 이 영향을 줄이기 위해 오프셋 값이 설정될 수 있다. 예를 들어, 다른 경우에 오프셋은 10일 수 있다. 가장 높은 강도가 10이고 가장 낮은 강도가 1인 앞의 예를 사용하면, 1에서 10/11를 뺀 것, 또는 대략 0.09가 되기 때문에 순도는 강도 간의 작은 차이를 정확하게 반영한다. 가장 높은 강도가 600이고, 가장 낮은 강도가 590인 예에서, 순도는 1에서 600/610을 뺀 것, 또는 대략 0.016이며, 이는 또한 강도 간의 작은 차이를 반영한다. 가장 높은 강도가 800이고 가장 낮은 강도가 1인 예에서, 순도는 1에서 11/810, 또는 대략 0.99를 뺀 것이며, 이는 순도의 훨씬 더 작은 감소이고, 강도 간의 큰 차이를 반영한다.

[0066] 단계(340)에서, 실제 클러스터 중심은 플로우 셀의 경우 후보 클러스터 중심에 대해 계산된 순도 값에 기반하여 식별된다. 실제 클러스터 중심은 단계(320 및 325)에서 식별된 후보 클러스터 위치의 서브세트일 수 있다.

[0067] 일부 양상에서, 실제 클러스터 중심은 플로우 셀 영상에 걸쳐 각 후보 클러스터 중심에 대한 순도를 동일한 영상 내의 근처의 후보 클러스터 중심과 비교함으로써 식별된다. 일부 양상에서, 비교 중인 2개의 후보 클러스터 중심이 주어지면, 더 큰 순도를 갖는 후보 클러스터 중심이 유지된다. 일부 양상에서, 후보 클러스터 중심은 특정 거리 내에서 다른 후보 클러스터 중심과만 비교된다. 예를 들어, 이런 거리 임계값은 픽셀 크기 및 주어진 뉴클레오타이드의 클러스터 크기에 기반할 수 있다.

[0068] 예를 들어, 클러스터의 평균 크기가 4개의 픽셀 폭/높이라면, 거리 임계값은 2개 픽셀 폭/높이일 수 있는데, 서로 2개의 픽셀 폭/높이 내에 있는 임의의 후보 클러스터 중심은 동일한 클러스터에 속하거나 더 높은 강도를 가질 가능성이 있기 때문이다(후보 클러스터 중심이 사실상 2개의 별개의 클러스터의 예지에 있다는 것을 나타냄).

[0069] 일부 양상에서, 순도가 다중 플로우 셀 주기에 걸쳐 계산되는 경우, 후보 클러스터 중심이 일관되게 다중 플로우 셀 영상에 걸쳐 주변 후보 클러스터 중심보다 더 높은 순도를 갖는지를 결정하는 것은 위치가 실제 클러스터 중심이라는 가능성을 추가로 강화시킬 수 있다. 더 낮은 순도는 후보 클러스터 중심에서 검출된 신호가 실제 클러스터 중심이 아니라, 노이즈, 다른 신호의 혼합 또는 일부 다른 현상이라는 것을 나타낼 수 있다.

- [0070] 단계(350)에서, 실제 클러스터 중심은 플로우 셀 영상에서 염기 호출을 수행하는 데 사용된다. 예를 들어, 실제 클러스터 중심에서 검출된 파장은 결정될 수 있고, 이는 결국 특정 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, A, G, C, T)와 상관관계가 있다. 이어서, 해당 뉴클레오타이드 염기는 실제 클러스터 중심에 상응하는 서열에 추가된 것으로 기록된다.
- [0071] 연속 플로우 셀 영상의 실제 클러스터 중심에서 흐름 주기 및 형광 파장 식별의 연속 반복을 통해, 플로우 셀 영상의 각 실제 클러스터 중심에 상응하는 DNA 단편에 대한 서열은 구성될 수 있다.
- [0072] 일부 양상에서, 주형은 단일 흐름 주기에 대해 식별된 실제 클러스터 중심으로부터 형성된다. 이어서, 주형에서 실제 클러스터 위치는 차후 흐름 주기로부터 영상의 염기 호출을 수행하는 경우를 식별하기 위해 사용될 수 있다.
- [0073] 상이한 흐름 주기에서 포착된 플로우 셀 영상은 흐름 주기 간의 플로우 셀 또는 이미지의 위치의 이동으로 인해 등록 문제가 있을 수 있다. 따라서, 일부 양상에서, 단계(350)는 연속적인 영상을 적절히 정렬하기 위한 등록 단계를 포함할 수 있다. 이는 주형 상의 실제 클러스터 중심이 각 플로우 셀 영상 상의 동일한 위치에 맵핑되어, 염기 호출의 정확도를 개선시킨다는 것을 보장한다.
- [0074] 일부 양상에서, 후속 영상에서 실제 클러스터 중심을 식별하기 위해 주형이 사용되는 경우, 해당 후속 영상의 관련 위치에 상응하는 데이터만이 유지 및/또는 처리될 필요가 있다. 정확한 결과가 레거시(legacy) 시스템에서 보다 더 빨리 얻어질 수 있도록, 처리된 데이터 양의 이런 감소는 처리 속도 및/또는 효율을 증가시킨다. 추가로, 저장된 데이터 양의 감소는 시퀀스에 필요한 저장의 양을 감소시키고, 따라서, 필요한 자원의 양 및/또는 비용을 감소시킨다.
- [0075] 추가로, 일부 레거시 시스템은 클러스터 위치를 식별하기 위해 상이한 영상을 서로 비교하는 것을 필요로 한다. 이 비교는 다중 플로우 셀 주기로부터의 영상에 스왑-찾기 알고리즘을 적용하고, 이어서, 영상에 걸쳐 스왑-찾기 결과를 비교하는 것을 포함할 수 있다. 이는 다중 흐름 주기 각각에 대해 영상 또는 스왑-찾기 결과를 저장하는 것을 필요로 할 수 있다. 방법(300)은 영상이 직접 비교될 필요가 없기 때문에 클러스터 찾기의 처리 및 저장 효율을 개선시킬 수 있다. 대신에, 영상은 실시간으로 처리될 수 있고, 순도 정보 및/또는 최종 주형 위치는 저장될 필요가 있다.
- [0076] 시퀀싱 흐름 주기 및 영상 생성 처리는 종종 영상을 분석하는 스왑-찾기 및 염기 호출 프로그램보다 더 빨리 실행된다. 실행 시간의 이러한 차이는, 완료까지 영상 분석 프로세스의 일부 또는 모두에 대한 대기 동안에, 각 흐름 주기 후 플로우 셀 영상의 저장, 또는 시퀀싱 흐름 주기의 지연을 필요로 할 수 있다.
- [0077] FPGA의 사용은 정확도를 희생시키는 일 없이 처리 속도의 증가를 가능하게 한다. FPGA에 대해 본 명세서에 기재된 처리의 일부 또는 모두를 구현하는 것은 프로세서 오버헤드를 감소시키고, FPGA에서 병렬 처리를 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 각각의 가능한 클러스터 위치는 가능한 클러스터 위치를 동시에 병렬로 처리하도록 구성된 상이한 FPGA, 또는 단일 FPGA에 의해 처리될 수 있다. 적절히 구현되었을 때, 이는 실시간 처리를 가능하게 할 수 있다. 실시간 처리는 영상이 생성됨에 따라 영상이 처리될 수 있다는 이점을 갖는다. 시퀀싱 시스템이 플로우 셀을 준비할 때쯤에 FPGA가 다음 영상을 처리할 준비가 된다. 시퀀싱 시스템은 후처리를 기다릴 필요가 없으며, 1차 분석의 전체 프로세스는 단시간 내에 완료될 수 있다. 추가로, 전체 영상이 수신되는 대로 처리되었기 때문에, 저장될 필요가 있는 정보만이 염기 호출을 수행하기 위한 데이터이다. 모든 영상을 저장하는 대신에, 특정 픽셀의 순도 또는 강도만이 저장될 필요가 있다. 이는 시퀀싱 시스템에서 데이터 저장 장치에 대한 또는 영상의 원거리 저장에 대한 필요를 크게 감소시킨다.
- [0078] 일부 양상에서, 영상 등록, 강도 추출, 순도 계산, 염기 호출, 및 기타 단계를 포함하는 전체 과정은 FPGA에 의해 수행된다. 이는 가장 콤팩트한 구현을 제공할 수 있고, 실시간 처리에 필요한 속도 및 처리량을 제공한다.
- [0079] 일부 양상에서, 예컨대, FPGA와 관련 컴퓨터 시스템 간의 처리 책임이 공유된다. 예를 들어, 일부 양상에서, FPGA는 영상 등록, 강도 추출 및 순도 계산을 처리할 수 있다. 이어서, FPGA는 염기 호출을 위해 컴퓨터 시스템에 정보를 전달한다. 이 접근은 FPGA와 컴퓨터 시스템 간의 통신을 축소하는 것을 포함하여 FPGA와 컴퓨터 시스템 리소스 간의 로드의 균형을 유지한다. 이는 또한 빠른 알고리즘 조정 능력을 이용하여 염기 호출을 처리하도록 컴퓨터 시스템의 소프트웨어에 대한 유연성을 제공한다. 이러한 접근은 실시간 처리를 제공할 수 있다.
- [0080] 당업자라면 다양한 단계를 수행하기 위해 FPGA, 전용 프로세서 및 컴퓨터 시스템의 상이한 구성이 사용될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 주어진 구성의 선택은 플로우 셀 영상 크기, 이미지 해상도, 처리할 영상의 수 및 필

요한 속도에 기반할 수 있다. FPGA, 전용 프로세서 및 컴퓨터 시스템에 대한 구현 비용 및 하드웨어 비용은 또한 구성 선택에 영향을 미칠 수 있다.

- [0081] 기존의 방법과 본 명세서에 기재된 방법의 양상 간의 성능을 비교하는 비제한적 예로서, 시험은 두 예시적 플로우 셀(하나는 저밀도 클러스터를 갖고, 하나는 고밀도 클러스터를 가짐)에서 실행되었다. 비교를 위해, 시험은 식별된 클러스터에 대해 위양성에 대한 특정 평균 오류율을 목표로 하기 위해 각 방법을 사용하여 실행되었다.
- [0082] 저밀도 플로우 셀의 경우, 평균 오류율은 0.3%였다. 기존의 방법은 대략 78,000개의 클러스터 중심을 식별하였지만, 본 명세서에 기재된 방법은 대략 98,000개의 클러스터 중심을 식별하였다. 고밀도 플로우 셀의 경우, 평균 오류율은 1.1%였다. 기존의 방법은 대략 63,000개의 클러스터 중심을 식별하였지만, 본 명세서에 기재된 방법은 대략 170,000개의 클러스터를 식별하였다.
- [0083] 결과는 본 명세서에 기재된 방법이 기존의 방법보다 더 많은 클러스터를 효과적으로 식별한다는 것을 시사한다. 추가로, 동일한 오류율에서조차, 플로우 셀 상의 클러스터 밀도가 증가할 때, 본 명세서에 개시된 방법은 훨씬 더 양호하게 수행되어, 거의 3배 더 많은 클러스터를 식별한다. 일부 양상에서, 이는 기존 방법에서 전형적으로 경험되는 성능 손실 없이 플로우 셀이 더 높은 밀도로 흐르게 할 수 있다.
- [0084] 도 6은 NGS 데이터 분석의 1차 분석에서 염기 호출 위치를 식별하기 위한 방법(600)의 예시적인 양상의 흐름도를 나타낸다. 방법(600)은 본 명세서에 개시된 작업 중 일부 또는 모두를 포함할 수 있다. 작업은 본 명세서에 기재된 순서로 수행될 수 있지만, 이것으로 제한되지는 않는다.
- [0085] 방법(600)은 본 명세서에 개시된 하나 이상의 프로세서(예를 들어, 도 4의 (404))에 의해 수행될 수 있다. 일부 양상에서, 프로세서는 처리 장치, 집적회로 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 처리 장치는 중앙 처리 장치(CPU) 및/또는 그래픽 처리 장치(GPU)를 포함할 수 있다. 집적회로는 필드-프로그래머블 게이트 어레이(FPGA)와 같은 칩을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 프로세서는 컴퓨팅 시스템(400)을 포함할 수 있다.
- [0086] 일부 양상에서, 방법(600)에서 일부 또는 모든 작업은 FPGA(들)에 의해 수행될 수 있다. 양상에서, 일부 작업이 FPGA(들)에 의해 수행될 때, FPGA(들)에 의해 수행되는 작업 후의 데이터는 FPGA(들)에 의해 CPU(들)와 통신될 수 있고, 따라서 CPU(들)는 이러한 데이터를 사용하여 방법(500)에서 후속 작업(들)을 수행할 수 있다. 유사하게, 데이터는 또한 FPGA(들)에 의한 처리를 위해 CPU(들)에서 FPGA(들)로 통신될 수 있다. 일부 양상에서, 방법(500)에서 모든 작업은 CPU(들)에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, CPU(들)에 의해 수행되는 작업은 전용 프로세서 또는 GPU(들)와 같은 다른 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 양상에서, 방법(600)에서 모든 작업은 FPGA(들)에 의해 수행될 수 있다.
- [0087] 일부 양상에서, 방법(600)의 일부 또는 모든 작업은 시퀀싱 실행에서 시퀀싱 주기(N) 동안에 또는 전에 수행된다. 염기 호출 주형, 예를 들어, 폴로니 맵은 주기 1 내지 N의 일부 또는 모두에서 생성될 수 있다. 이러한 주기 내의 하나 이상의 채널로부터의 폴로니 또는 클러스터는 참조 좌표계에서 주형에 포함될 수 있지만, 주기 N 및/또는 이의 차후 주기(subsequent cycle)의 플로우 셀 영상은 아직 포착되지 않았거나 현재 포착 중이다. 일부 양상에서, 주기 N은 현재의 주기이다. N은 임의의 0이 아닌 정수, 예를 들어, 3, 4 또는 5일 수 있다.
- [0088] 멀티플렉스 라이브러리 분자에 대한 방법
- [0089] 일부 양상에서, 방법(600)은 지지체에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 작업(610)을 포함할 수 있다. 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열; 및 제1 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 제1 범용 샘플 지표는 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원의 고유 식별을 위해 구성될 수 있다. 일부 양상에서, 제1 복수의 라이브러리 분자는 동일한 샘플 공급원으로부터 유래된다.
- [0090] 도 5A는 본 명세서에 개시된 라이브러리 분자(500)의 예시적인 양상을 나타낸다. 라이브러리 분자(500)는 제1 샘플로부터 얻어진 제1 삽입 서열(510), 즉, 제1 관심 서열, 및 적어도 제1 범용 샘플 서열(570)이 있는 제1 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 제1 샘플 지표 서열은 또한 k-량체 서열(571)을 포함할 수 있다.
- [0091] 일부 양상에서, 각각의 라이브러리 분자(500)는 단일 삽입 서열(510)만을 포함할 수 있다. 다른 양상에서, 각각의 라이브러리 분자(500)는 서로 직접 인접해 있거나, 라이브러리 분자의 일부 다른 부분에 의해 분리되는, 다중 삽입 서열을 포함할 수 있다.
- [0092] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 상이한 라이브러리 분자(500)는 동일한 크기의 삽입 서열, 예를 들어, 120개의

뉴클레오타이드 염기의 삽입을 가질 수 있다. 다른 양상에서, 지지체에 고정된 상이한 라이브러리 분자(500)는 상이한 크기의 삽입 서열을 가질 수 있다.

- [0093] 일부 양상에서, 방법(600)은 지지체에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 작업(620)을 포함한다. 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열; 및 제2 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 제2 범용 샘플 지표는 제2 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별하기 위해 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 제2 샘플 공급원은 제1 샘플 공급원과 상이하다.
- [0094] 일부 양상에서, 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제3 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제3 샘플 지표 서열을 더 포함한다. 제1 및 제3 범용 샘플 지표 서열의 조합은 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별하기 위해 구성될 수 있다. 일부 양상에서, 제3 샘플 지표는 k-량체 서열 또는 무작위 서열을 결여한다. 일부 양상에서, 제3 샘플 지표는 k-량체 서열 또는 무작위 서열을 포함한다. 제1 샘플 지표 서열은 제1 삽입 서열의 좌측, 즉, 5' 단부, 또는 삽입 서열의 우측, 즉, 3' 단부에 있을 수 있다. 이어서, 제3 샘플 지표 서열은 삽입 서열의 반대 단부에 있을 수 있다.
- [0095] 도 5A는 제1 샘플로부터 얻어진 제1 삽입 서열(510), 즉, 제1 관심 서열, 및 적어도 제3 범용 샘플 서열(560)을 갖는 제3 샘플 지표 서열을 포함하는, 라이브러리 분자(500)의 예시적인 양상을 나타낸다. 제1 샘플 지표 서열은 또한 k-량체 서열(561)을 포함할 수 있다.
- [0096] 일부 양상에서, 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제4 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제4 샘플 지표를 더 포함한다. 제2와 제4 범용 샘플 지표 서열의 조합은 제2 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별할 수 있다. 일부 양상에서, 제4 샘플 지표는 무작위 서열 또는 무작위 서열을 결여한다. 일부 양상에서, 제4 샘플 지표는 k-량체 서열 또는 무작위 서열을 포함한다. 제2 샘플 지표 서열은 제2 삽입 서열의 좌측, 즉, 5' 단부, 또는 삽입 서열의 우측, 즉, 3' 단부에 있을 수 있다. 이어서, 제3 샘플 지표 서열은 제2 삽입 서열의 반대 단부에 있을 수 있다.
- [0097] 일부 양상에서, 라이브러리 분자의 각각은 하나 이상의 범용 어댑터 서열을 더 포함한다(예를 들어, 도 5A 내지 도 5B의 (520, 540)).
- [0098] 일부 양상에서, 방법(600)은 제3, 제4, 제5, 제6 또는 심지어 더 많은 복수의 라이브러리 분자에 대한 반복 작업(610 및/또는 620)을 포함할 수 있으며, 각각의 복수의 라이브러리 분자는 상이한 샘플로부터 유래된다. 예를 들어, 작업(610)은 작업(610 및 620)을 1회 수행한 후에 95회 반복될 수 있다. 각각의 반복은 상이한 샘플로부터의 복수의 라이브러리 분자를 가질 수 있고, 따라서, 지지체 상에서의 시퀀싱을 위해 96개의 샘플이 제조될 수 있다.
- [0099] 동일한 샘플로부터의 상이한 라이브러리 분자에 대해서, 각각의 라이브러리 분자는 상이한 삽입 서열, 상이한 k-량체 서열 및 동일한 범용 샘플 지표 서열(들)을 가질 수 있다. 상이한 샘플로부터의 상이한 라이브러리 분자에 대해서, 각각의 라이브러리 분자는 상이한 삽입 서열, 상이한 k-량체 서열 및 상이한 범용 샘플 지표 서열(들)을 가질 수 있다.
- [0100] 삽입 서열의 제1, 제2 또는 다른 샘플 공급원은 게놈 DNA, 이중-가닥 cDNA 및/또는 무세포 순환 DNA일 수 있다.
- [0101] 일부 양상에서, 방법(600)은 제1 및 제2 복수의 라이브러리 분자를 함께 풀링(pooling)하는 단계; 풀링된 라이브러리 분자를 지지체 상에 분포시키는 단계; 및 증폭 반응을 수행하여 지지체에 고정된 복수의 핵산 주형 분자를 생성하는 단계의 작업을 포함할 수 있다. 복수의 핵산 주형 분자는 본 명세서에 개시된 바와 같이 클론 증폭될 수 있다. 2개 초과 샘플, 예를 들어, 96개의 샘플에 의한 양상에서, 모든 복수의 라이브러리 분자는 함께 풀링될 수 있고, 증폭 반응을 위해 지지체 상에 분포될 수 있다.
- [0102] 일부 양상에서, 핵산 주형 분자는 상응하는 라이브러리 분자로부터 클론 증폭된다. 각각의 핵산 주형 분자는 상응하는 라이브러리 분자의 다중 클로닝 복제물을 가질 수 있다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 상응하는 라이브러리 분자를 포함하는 상응하는 스프린트 복합체(예를 들어, 도 5B에서 (590)) 및 상응하는 스프린트 분자/어댑터(예를 들어, 도 5B에서 (580))로부터 클론 증폭된다. 스프린트 분자/어댑터는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다(예를 들어, 도 5B). 스프린트 복합체를 형성하는 것의 상세한 설명 및 주형 분자를 형성하기 위한 증폭은 미국 특허 출원 제17/725,042호 및 제17/725,065호에 개시되어 있다(이들 둘 다의 내용은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 인용된다).

- [0103] 일부 양상에서, 각각의 핵산 주형 분자는 상응하는 라이브러리 분자의 단일 복제물을 가질 수 있고, 다중 주형 분자는 함께 클러스터링되어 "클러스터"를 형성할 수 있다.
- [0104] 각 주형 분자는 상응하는 라이브러리 분자의 하나 이상의 복제물을 가질 수 있기 때문에, 동일한 샘플로부터의 상이한 주형 분자에 대해서, 각 주형 분자는 상이한 삽입 서열, 상이한 k-량체 서열 및 동일한 범용 샘플 지표 서열(들)을 가질 수 있다. 주형 샘플로부터의 상이한 주형 분자에 대해서, 각각의 주형 분자는 상이한 삽입 서열, 상이한 k-량체 서열 및 상이한 범용 샘플 지표 서열(들)을 가질 수 있다.
- [0105] 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상의 사전 결정된 위치에 고정된다. 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 폴로니 또는 클론 클러스터에 상응할 수 있다. 지지체 상의 복수의 고정된 주형 분자의 위치는 염기 호출 위치에 상응할 수 있다. 고정된 핵산 주형 분자는 시퀀싱 반응의 주기가 수행될 때 시퀀싱될 수 있다.
- [0106] 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 약 10² 내지 10¹²일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 약 10⁴ 내지 10⁸일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 약 10⁴ 내지 10¹²일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 약 10⁴ 내지 10⁵일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 10² 내지 10¹²일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 10⁴ 내지 10⁸일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 10⁴ 내지 10¹²일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm²당 10⁴ 내지 10⁵일 수 있다.
- [0107] 지지체는 하나 이상의 기재를 포함할 수 있다. 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재를 포함할 수 있다. 지지체는 광학 시스템의 대물렌즈에 가장 가까운 투명한 상부 기재를 포함할 수 있다. 지지체는 하나 이상의 미세유체 채널을 포함할 수 있고, 주형 분자는 미세유체 채널 표면에 고정된다. 일부 양상에서, 지지체는 플로우 셀 장치에 포함된다.
- [0108] 일부 양상에서, 지지체 또는 이의 일부(예를 들어, 미세유체 통로 표면)는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 1개의 친수성 중합체에 의해 부동태화된다. 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈)(PVP), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)(PHEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분지를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함한다.
- [0109] 일부 양상에서, k-량체 서열(예를 들어, 도 5A의 (561 또는 571))은 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, k-량체 서열은 A, G, C 및 T/U의 적어도 2 또는 3개의 뉴클레오타이드 염기의 무작위 서열을 포함한다. 일부 양상에서, k-량체 서열은 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 무작위 서열만을 포함한다.
- [0110] 방법(600)은 제1 및 제2 k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)을 포함할 수 있다. 작업(630)은 본 개시된 시퀀싱 시스템에 의해 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성할 수 있다. 각각의 시퀀싱 주기에서, 상이한 샘플의 상이한 주형 분자로부터의 상이한 k-량체 서열은 병렬로 시퀀싱될 수 있다. 예를 들어, 제1 시퀀싱 주기에서, 96개 샘플로부터의 96,000 k-량체 서열에서 제1 뉴클레오타이드 염기는 병렬로 시퀀싱되어, 1000개의 염기 호출 위치가 있는 채널당 플로우 셀 영상을 생성한다.
- [0111] 일부 양상에서, 작업(630)은 삽입 서열, 예를 들어, 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에 수행된다.
- [0112] 일부 양상에서, 작업(630)은 시퀀싱 실행의 시퀀싱 순서(즉, 판독 순서)에 기반한다. 시퀀싱 순서는 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 삽입 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 및 제2 삽입 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, k-량체 서열의 시퀀싱; 및, 이어서, 제1 및 제2 삽입 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 k-량체 서열

의 시퀀싱; 및 이어서, 제1 및 제2 삽입 서열의 시퀀싱; 및 이어서, 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 제1 및 제2 삽입 서열의 다수의 염기(예를 들어, 처음 3 내지 8개의 염기)의 시퀀싱; k-량체 서열의 시퀀싱; 및 이어서, 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서에서, 제3 및 제4 샘플 지표 서열이 무작위 서열을 겹쳐할 때, 제3 및 제4 샘플 지표 서열의 시퀀싱은 제1 및 제2 샘플 지표 서열의 시퀀싱 후에 일어날 수 있다.

[0113] 일부 양상에서, 제1 복수의 플로우 셀 영상은 각 시퀀싱 주기에서 2, 3, 4, 5 또는 6개의 상이한 색 채널로부터 유래된다. 일부 양상에서, 제1 복수의 플로우 셀 영상은 k 주기 또는 k+1 시퀀싱 주기로부터 유래되고, k 또는 k+1 주기의 1회 이상의 주기는 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성을 포함한다.

[0114] 일부 양상에서, 시퀀싱 반응의 각 주기는 중합효소-매개된다. k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은 상이한 유형의 뉴클레오타이드 염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 뉴클레오타이드 산 또는 복수의 핵산 주형 분자의 폴리머를 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 개개 뉴클레오타이드 시약은 각각의 상이한 유형의 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함한다.

[0115] 일부 다른 양상에서, 작업(630)은 뉴클레오타이드 산 또는 복수의 핵산 주형 분자의 폴리머를 복수의 시퀀싱 프라이머, 복수의 중합효소 및 상이한 유형의 결합활성의 혼합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 혼합물에서 개개 결합활성은 다중 뉴클레오타이드 아암과 부착된 코어를 포함하고, 개개 결합활성의 각 아암은 동일한 유형의 뉴클레오타이드 염기를 포함한다.

[0116] 일부 양상에서, k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은, 본 명세서의 광학 시스템에 의해, 주형 분자에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 영상화하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은, k 주기에서, 본 명세서의 광학 시스템에 의해, 주형 분자에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 포함하는 제1 복수의 플로우 셀 영상을 획득하는 것을 포함한다.

[0117] 제1 복수의 플로우 셀 영상은 k-량체 서열에서 시퀀싱 반응의 수행에 상응하는 k 주기에서 생성될 수 있다. 제1 복수의 플로우 셀 영상은 k 주기에서 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 신호를 포함할 수 있다.

[0118] 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성은 (2) 1회 이상의 주기에서의 염기의 총 수에 대한 (1) 뉴클레오타이드 염기의 각 유형의 수의 백분율을 포함할 수 있다. 백분율은 10%, 15% 또는 20% 초과될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 주기의 주형 분자 중에서 모든 뉴클레오타이드 염기의 총 수의 각각 26%, 15%, 27% 및 32%인 다수의 뉴클레오타이드 염기 A, G, C, T를 포함한다.

[0119] 방법(600)은 픽셀 강도 및 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대한 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도를 결정하는 작업(640)을 포함할 수 있다. 작업(640)은 본 명세서에 개시된 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 각각의 픽셀 강도는 픽셀 강도 및/또는 픽셀에 상응하는 하위픽셀의 하나 이상의 하위픽셀 강도를 포함할 수 있다. 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도는 픽셀의 하나의 색 순도 및/또는 상응하는 픽셀의 하나 이상의 하위픽셀 강도에 상응하는 하나 이상의 색 순도를 포함할 수 있다. 픽셀 강도 각각의 각 색 순도는 하나 이상의 색 채널에 대한 각 색 순도를 포함할 수 있다.

[0120] 픽셀 강도를 결정하는 것은 채널 강도 세트에서 각 채널 강도를 결정하는 것을 포함하며, 각각의 채널은 각 상이한 형광 파장에 상응한다. 이러한 결정은 상응하는 픽셀 또는 하나 이상의 하위픽셀 위치에서 채널 강도 세트의 비교에 기반할 수 있다.

[0121] 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도를 결정하는 것은 (1) 특정 유형의 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 신호 대 (2) 다른 유형의 뉴클레오타이드 염기에 대한 신호의 총량의 비를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도를 결정하는 것은 본 명세서에 개시된 작업(330)을 적어도 부분적으로 포함할 수 있다.

[0122] 방법(600)은 작업(640)에서 결정된 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 작업(650)을 포함할 수 있다.

[0123] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 주형을 결정하

는 작업은 픽셀 또는 하위픽셀 각각에 대해서, 각각의 색 순도가 임계값 거리 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 큰지의 여부를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 각각의 색 순도가 임계값 거리 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 크다고 결정한 것에 반응하여, 상응하는 픽셀 또는 하위픽셀의 위치를 염기 호출 주형에 더한다. 각각의 색 순도가 거리 임계값 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 크지 않다고 결정한 것에 반응하여, 염기 호출 주형에 대한 변화를 생성하지 않으며, 다음 픽셀로 이동하여 모든 픽셀 또는 픽셀의 적어도 서브세트가 유사한 결정 작업을 통할 때까지 결정 작업을 반복한다.

[0124] 염기 호출 주형을 결정하는 작업은 (340)의 작업을 적어도 부분적으로 포함할 수 있다.

[0125] 염기 호출 주형이 결정된 후에, 서열 실행에서 플로우 셀 영상, 예를 들어, k 주기에 후속하여 1회 이상의 주기에서 플로우 셀 장치의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성될 수 있다.

[0126] 일부 양상에서, 방법(600)은 제1 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 추가로 포함할 수 있다. 적어도 2개의 상이한 샘플에 의한 양상에서, 상기 방법은 시퀀싱 시스템에 의해, 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 더 포함할 수 있다.

[0127] 제2 복수의 플로우 셀 영상은 k-량체 서열에서 시퀀싱 반응을 수행하는 것에 상응하는 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 생성될 수 있다. 제2 복수의 플로우 셀 영상은 이러한 1회 이상의 주기에서 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 신호를 포함할 수 있다. 1회 이상의 주기는 k-량체 서열을 포함하지 않는 주형 분자 부분의 시퀀싱 반응에 상응할 수 있다. 예를 들어, 1회 이상의 주기는 선택적 제2 샘플 지표 서열 또는 삽입 서열의 적어도 일부에 상응할 수 있다.

[0128] 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 (2) 염기의 총 수에 대한 (1) 뉴클레오타이드 염기의 하나 이상의 유형의 수의 백분율을 포함하고, 이는 상기 1회 이상의 주기에서 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만이다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 주기의 주형 분자 중에서 모든 뉴클레오타이드 염기의 총수의 약 5%인 뉴클레오타이드 염기 A의 수를 포함한다. 다른 예로서, 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 약 8%인 뉴클레오타이드 염기 C 및 주기의 주형 분자 중에서 모든 뉴클레오타이드 염기의 총수의 약 1%인 T의 수를 포함한다.

[0129] 단일 시퀀싱 실행 동안에, 염기 호출 위치, 즉, 폴로니 또는 클러스터는 상이한 주기 및/또는 교차 채널로부터 얻은 플로우 셀 영상에서 이동, 회전 또는 달리 공간적으로 전환될 수 있다. 그 결과, 주형은 시퀀싱 실행에서 염기 호출 위치가 공간적으로 정렬되고, 염기 호출이 상응하는 폴로니 또는 클러스터, 주형 분자 및 샘플에 정확히 부여된다는 것을 보장할 필요가 있다. 시퀀싱 실행에서 초기에 주형을 생성하고 주형이 생성된 후에 모든 시퀀싱 주기에서 염기 호출 위치의 등록을 허용하는 것이 유리할 수 있다. 주형의 초기 생성은 또한 차후 주기에서 플로우 셀 영상의 1차 분석에서의 지연을 유리하게 감소시킬 수 있고, 시퀀싱 실행이 여전히 진행 중인 동안에 실시간 분석을 허용한다. 예를 들어, 주형이 처음 3 내지 5주기로부터 생성된다면, 1차 분석은 주기 6에서 플로우 셀 영상이 획득된 후에 실시간으로 수행될 수 있고, 주기 7에서 시퀀싱 및 영상화 작업은 동시에 수행될 수 있다. 유사하게, 주기 6 후에 각 주기의 분석은 수행될 수 있지만, 이의 후속 시퀀싱 주기는 여전히 진행 중이다. 이렇게 해서, 시퀀싱 실행이 완료되지 않은 경우 1차 분석은 완전히 직후에 완료될 수 있다.

[0130] 일부 양상에서, 방법(600)은 1회 이상의 차후 흐름 주기에서 염기 호출 주형까지 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록 또는 정렬하는 작업을 추가로 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하는 작업은 공통 좌표계에서 제2 복수의 플로우 셀 영상의 폴로니 좌표를 생성하는 것을 포함할 수 있다. 염기 호출 주형은 또한 좌표계에 있다. 일부 양상에서, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하는 작업은 플로우 셀 영상의 하위타일에 상응하는 복수의 전환을 이용하여 전체 플로우 셀 영상의 영상 전환을 추정할 수 있다. 플로우 셀 영상을 등록하는 작업은 플로우 셀 영상의 영상 전환 추정을 제공하는 하위타일의 전환을 생성하는 것을 포함할 수 있다. 이웃하는 하위타일의 정보는 하위타일의 각 개개 변환을 결정할 때 사용될 수 있다.

[0131] 일부 양상에서, 폴로니의 좌표는 일차원 벡터 또는 목록에 저장될 수 있다. 벡터 또는 목록의 각 항목은 폴로니의 고유 식별, 이의 좌표 및 기타 관련 정보, 예컨대, 주기의 하나 이상의 채널에서의 픽셀 강도를 포함할 수 있다.

[0132] 일부 양상에서, 방법(600)은 등록된 제2 복수의 플로우 셀 영상으로부터의 신호를 사용하여 염기 호출 주형의 염기 호출 위치에서 제2 복수의 플로우 셀 영상의 염기 호출을 수행하는 작업을 추가로 포함할 수 있다. 본 명

세서의 1차 분석에서 염기 호출은 공통 좌표계의 등록 영상 강도에 기반할 수 있다. 일부 양상에서, 염기 호출은 주형에서 염기 호출 위치에서만 수행된다. 다시 말해서, 주형은 플로우 셀 상의 모든 정확한 폴로니 위치를 확인하고 폴로니일 가능성이 없는 다른 신호 위치를 무시하는 폴로니 맵으로서 작용한다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 염기 호출 위치는 하위 픽셀 위치에 있을 수 있다.

[0133] 제2 복수의 플로우 셀 영상의 염기 호출을 수행하는 작업은 도 3에서 작업(350)을 적어도 부분적으로 포함할 수 있다.

[0134] 일부 양상에서, 작업(610 및 620)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 작업을 포함할 수 있되, 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 범용 샘플 지표는 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별한다. 일부 양상에서, 방법(600)은 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 작업을 포함할 수 있되, 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 제2 범용 샘플 지표는 제2 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 식별한다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0135] 일부 양상에서, 작업(630)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 k-량체 서열 하류의(예를 들어, 제1 범용 샘플 지표 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열의) 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, k-량체 서열과 k-량체 서열의 시퀀싱 직후 제1 주기는 함께 구성되어 k+1 주기 중 적어도 2 또는 3주기에서 균형 또는 높은 다양성 뉴클레오타이드 염기를 생성한다. 염기 호출 주형은 함께 k+1 주기에 기반하여 생성될 수 있다. 추가 주기는 무작위 서열을 포함할 수 있지만 반드시 포함할 필요는 없다. 추가 주기는 범용 샘플 지표 서열로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 시퀀싱의 특정 순서에 기반하여, 추가 주기는 삽입 서열 또는 주형 분자의 임의의 다른 부분으로부터 유래될 수 있다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0136] 일부 양상에서, 작업(610 및 620)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 작업을 포함할 수 있되, 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 범용 샘플 지표는 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별한다. 이러한 양상에서, 방법(600)은 지지체 상에 고정된 제2 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 작업을 포함할 수 있되, 제2 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 제2 삽입 서열 및 제2 샘플 지표 서열을 포함하고, 제2 샘플 지표 서열은 제2 k-량체 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하며, 제2 범용 샘플 지표는 제2 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 식별한다. 이러한 양상에서, 작업(630)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 제1 범용 샘플 지표 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, k-량체 서열과 k-량체 서열의 시퀀싱 직후 제1 주기는 함께 구성되어 적어도 2 또는 3주기에서 균형 또는 높은 다양성 뉴클레오타이드 염기를 생성하고, 염기 호출 주형은 함께 k+1 주기에 기반하여 생성될 수 있다. 추가 1회의 주기는 무작위 서열을 포함할 수 있지만 반드시 포함할 필요는 없다. 추가 주기는 범용 샘플 지표 서열로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 시퀀싱의 특정 순서에 기반하여, 추가 1회의 주기는 삽입 서열 또는 주형 분자의 임의의 다른 부분으로부터 유래될 수 있다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0137] 일부 양상에서, 작업(650)은 프로세서에 의해 그리고 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반한 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함할 수 있되, 염기 호출 주형은 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0138] 유니플렉스 라이브러리 분자에 대한 방법

[0139] 위에 개시된 양상에서, 방법(600)은 다중플렉스 라이브러리 분자, 즉, 둘 이상의 샘플로부터의 라이브러리 분자에 대해 구성된다. 일부 양상에서, 방법(600) 및 이의 작업은 유니플렉스 라이브러리 분자, 즉, 단일 샘플로부터의 라이브러리 분자에 대해 구성된다. 이러한 양상에서, 상기 방법은 작업(620)을 포함하지 않는다. 작업

(610)은 위에 개시된 것과 유사하게 남아있을 수 있다. 작업은 제2 샘플 공급원에 상응하는 제2 복수의 라이브러리 분자, 제2 삽입 서열, 제2 k-량체 서열, 또는 이들의 조합을 제거하도록 맞춰서 조정될 수 있다.

- [0140] 일부 양상에서, 핵산 주형 분자의 각각은 제2 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제2 샘플 지표 서열(예를 들어, 도 5A 내지 도 5B에서 (540 또는 560))을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 조합은 삽입 서열(예를 들어, 도 5에서 (510))의 샘플 공급원을 고유하게 식별한다. 일부 양상에서, 제2 샘플 지표는 무작위 서열(예를 들어, 도 5에서 (561 또는 571))을 결여한다.
- [0141] 일부 양상에서, 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제3 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제3 샘플 지표 서열을 더 포함한다. 제1 및 제3 범용 샘플 지표 서열의 조합은 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별할 수 있다. 일부 양상에서, 제3 샘플 지표는 k-량체 서열 또는 무작위 서열을 결여한다. 일부 양상에서, 제3 샘플 지표는 k-량체 서열 또는 무작위 서열을 포함한다. 제1 샘플 지표 서열은 제1 삽입 서열의 좌측, 즉, 5' 단부, 또는 삽입 서열의 우측, 즉, 3' 단부에 있을 수 있다. 이어서, 제3 샘플 지표 서열은 삽입 서열의 반대 단부에 있을 수 있다.
- [0142] 일부 양상에서, 라이브러리 분자의 각각은 하나 이상의 범용 어댑터 서열을 더 포함한다(예를 들어, 도 5A 내지 도 5B의 (520, 540)).
- [0143] 동일한 샘플로부터의 상이한 라이브러리 분자에 대해서, 각각의 라이브러리 분자는 상이한 삽입 서열을 가질 수 있다. 동일한 샘플로부터의 상이한 라이브러리 분자에 대해서, 각각의 라이브러리 분자는 동일한 범용 지표 서열(들)을 가질 수 있다. 동일한 샘플로부터의 상이한 라이브러리 분자에 대해서, 각각의 라이브러리 분자는 상이한 k-량체 서열을 가질 수 있다.
- [0144] 삽입 서열의 제1 샘플 공급원은 게놈 DNA, 이중-가닥 cDNA 또는 무세포 순환 DNA일 수 있다.
- [0145] 일부 양상에서, 핵산 주형 분자는 상응하는 라이브러리 분자로부터 클론 증폭된다. 핵산 주형 분자는 상응하는 라이브러리 분자의 하나 또는 다중 클로닝 복제물을 가질 수 있다.
- [0146] 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 상응하는 라이브러리 분자를 포함하는 상응하는 스프린트 복합체(예를 들어, 도 5B에서 (590)) 및 상응하는 스프린트 분자/어댑터로부터 클론 증폭된다.
- [0147] 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 지지체 상의 사전 결정된 위치에 고정된다. 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자의 각각은 풀로니 또는 클론 클러스터에 상응할 수 있다. 지지체 상의 복수의 고정된 주형 분자의 위치는 염기 호출 위치에 상응할 수 있다.
- [0148] 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^2 내지 10^{12} 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^8 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^{12} 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^5 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^2 내지 10^{12} 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^{12} 일 수 있다. 지지체 상의 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^5 일 수 있다.
- [0149] 핵산 주형 분자는 시퀀싱 반응의 주기가 수행될 때 시퀀싱될 수 있다.
- [0150] 지지체는 하나 이상의 기재를 포함할 수 있다. 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재를 포함할 수 있다. 지지체는 광학 시스템의 대물렌즈에 가장 가까운 투명한 상부 기재를 포함할 수 있다. 지지체는 하나 이상의 미세유체 채널을 포함할 수 있고, 주형 분자는 미세유체 채널 표면에 고정된다. 일부 양상에서, 지지체는 플로우 셀 장치에 포함된다.
- [0151] 일부 양상에서, 지지체 또는 이의 일부(예를 들어, 미세유체 통로 표면)는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 1개의 친수성 중합체에 의해 부통태화된다. 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈)(PVP), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)(PHEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함할 수

있다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분지를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함한다.

- [0152] 일부 양상에서, k-량체 서열은 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 뉴클레오타이드 염기를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, k-량체 서열은 A, G, C 및 T/U의 적어도 2 또는 3개의 뉴클레오타이드 염기의 무작위 서열을 포함한다. 일부 양상에서, k-량체 서열은 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 무작위 서열이다.
- [0153] 방법(600)은 제1 및 제2 k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)을 포함할 수 있다. 작업(630)은 본 개시된 시퀀싱 시스템에 의해 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성할 수 있다.
- [0154] 일부 양상에서, 작업(630)은 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에 수행된다.
- [0155] 일부 양상에서, 작업(630)은 시퀀싱 실행의 시퀀싱 순서에 기반한다. 시퀀싱 순서는 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 삽입 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 제1 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱; 이어서, k-량체 서열의 시퀀싱; 및 이어서, 제1 삽입 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 삽입 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서는 제1 삽입 서열의 다수의 염기(예를 들어, 처음 3 내지 8개의 염기); k-량체 서열의 시퀀싱; 이어서, 제1 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 시퀀싱 순서에서, 제3 샘플 지표 서열이 무작위 서열을 결여할 때, 제3 샘플 지표 서열의 시퀀싱은 제1 샘플 지표 서열을 시퀀싱한 후에 일어날 수 있다.
- [0156] 일부 양상에서, 제1 복수의 플로우 셀 영상은 각 시퀀싱 주기에서 2, 3, 4, 5 또는 6개의 상이한 색 채널로부터 유래된다. 일부 양상에서, 제1 복수의 플로우 셀 영상은 k 주기 또는 k+1 시퀀싱 주기로부터 유래되고, 각 주기는 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성을 포함한다.
- [0157] 일부 양상에서, 시퀀싱 반응의 각 주기는 중합효소-매개된다. k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은 상이한 유형의 뉴클레오타이드 염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 뉴클레오타이드 산 또는 복수의 핵산 주형 분자의 폴로니를 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 개개 뉴클레오타이드 시약은 각각의 상이한 유형의 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함한다.
- [0158] 일부 다른 양상에서, k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은 뉴클레오타이드 산 또는 복수의 핵산 주형 분자의 폴로니를 복수의 시퀀싱 프라이머, 복수의 중합효소 및 상이한 유형의 결합활성의 혼합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 혼합물에서 개개 결합활성은 다중 뉴클레오타이드 아암과 부착된 코어를 포함하고, 개개 결합활성의 각 아암은 동일한 유형의 뉴클레오타이드 염기를 포함한다.
- [0159] 일부 양상에서, k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은, 본 명세서의 광학 시스템에 의해, 주형 분자에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 영상화하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, k-량체 서열의 k 주기의 시퀀싱 반응을 수행하는 작업(630)은, k 주기의 각각에서, 본 명세서의 광학 시스템에 의해, 주형 분자에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 포함하는 제1 복수의 플로우 셀 영상을 획득하는 것을 포함한다.
- [0160] 제1 복수의 플로우 셀 영상은 k-량체 서열에서 시퀀싱 반응의 수행에 상응하는 k 주기에서 생성된다. 제1 복수의 플로우 셀 영상은 k 주기에서 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 신호를 포함할 수 있다.
- [0161] 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 균형 다양성은 (2) 1회 이상의 주기에서의 염기의 총 수에 대한 (1) 뉴클레오타이드 염기의 각 유형의 수의 백분율을 포함할 수 있다. 백분율은 10%, 15% 또는 20% 초과일 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 주기의 주형 분자 중에서 모든 뉴클레오타이드 염기의 총 수의 각각 26%, 15%, 27% 및 32%인 다수의 뉴클레오타이드 염기 A, G, C, T를 포함한다.
- [0162] 방법(600)은 픽셀 강도 및 제1 복수의 플로우 셀 영상의 픽셀에 대한 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도를 결정하는 작업(640)을 포함할 수 있다. 작업(640)은 본 명세서에 개시된 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 각각의 픽

셀 강도는 픽셀 강도 및/또는 픽셀에 상응하는 하위픽셀의 하나 이상의 하위픽셀 강도를 포함할 수 있다. 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도는 픽셀의 하나의 색 순도 및/또는 상응하는 픽셀의 하나 이상의 하위픽셀 강도에 상응하는 하나 이상의 색 순도를 포함할 수 있다. 픽셀 강도 각각의 각 색 순도는 하나 이상의 색 채널에 대한 각 색 순도를 포함할 수 있다.

[0163] 각각의 픽셀 강도의 각 색 순도를 결정하는 것은 (1) 특정 유형의 뉴클레오타이드 염기에 상응하는 신호 대 (2) 다른 유형의 뉴클레오타이드 염기에 대한 신호의 총량의 비를 결정하는 것을 포함할 수 있다.

[0164] 픽셀 강도를 결정하는 것은 채널 강도 세트에서 각 채널 강도를 결정하는 것을 포함하며, 각각의 채널은 각 상이한 형광 파장에 상응한다. 이러한 결정은 상응하는 픽셀 또는 하나 이상의 하위픽셀 위치에서 채널 강도 세트의 비교에 기반할 수 있다.

[0165] 방법(600)은 작업(640)에서 결정된 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각 색 순도에 기반하여 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 작업(650)을 포함할 수 있다.

[0166] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반하여 염기 호출 주형을 결정하는 작업은 픽셀 또는 하위픽셀 각각에 대해서, 각각의 색 순도가 임계값 거리 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 큰지의 여부를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 상기 각각의 색 순도가 임계값 거리 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 크다고 결정한 것에 반응하여, 상응하는 픽셀 또는 하위픽셀의 위치를 염기 호출 주형에 더한다. 각각의 색 순도가 거리 임계값 내의 다른 픽셀 또는 하위픽셀의 색 순도보다 크지 않다고 결정한 것에 반응하여, 염기 호출 주형에 대한 변화를 생성하지 않으며, 다음 픽셀로 이동하여 모든 픽셀 또는 픽셀의 적어도 서브세트가 유사한 결정 작업을 통한 때까지 결정 작업을 반복한다.

[0167] 주형이 결정된 후에, 염기 호출 주형, 또는 등가물, 주형은 서열 실행에서 플로우 셀 영상, 예를 들어, k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 플로우 셀 장치의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된다.

[0168] 단일 시퀀싱 실행 동안에, 염기 호출 위치, 즉, 폴로니 또는 클러스터는 주기에서 주기로 그리고/또는 교차 채널로의 이동, 회전 또는 달리 공간적으로 전환될 수 있다. 그 결과, 주형은 시퀀싱 실행에서 염기 호출 위치가 공간적으로 정렬되고, 염기 호출이 상응하는 폴로니, 주형 분자 및 샘플에 정확히 부여된다는 것을 보장할 필요가 있다. 주형을 초기에 생성하고 후속 주기에서 염기 호출 위치의 등록을 허용하는 것이 유리할 수 있다. 주형의 초기 생성은 또한 차후 주기에서 플로우 셀 영상의 1차 분석에서의 지연을 유리하게 감소시킬 수 있고, 시퀀싱 실행이 여전히 실행 중인 동안에 실시간 1차 분석을 허용한다. 예를 들어, 주형이 처음 3 내지 5주기를 사용하여 생성된다면, 주기 6에서 1차 분석은 플로우 셀 영상이 획득된 후에 실시간으로 수행될 수 있고, 주기 7에서 시퀀싱 및 영상화 작업은 동시에 수행될 수 있다. 각 주기의 유사한 분석은 그에 맞춰서 수행될 수 있다. 이렇게 해서, 시퀀싱 실행이 완료되지 않은 경우 1차 분석은 완전히 직후에 완료될 수 있다.

[0169] 일부 양상에서, 방법(600)은 제1 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 추가로 포함할 수 있다. 적어도 2개의 상이한 샘플에 의한 양상에서, 상기 방법은 시퀀싱 시스템에 의해, 제1 및 제2 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하여, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 더 포함할 수 있다.

[0170] 제2 복수의 플로우 셀 영상은 k-량체 서열에서 시퀀싱 반응을 수행하는 것에 상응하는 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 생성된다. 제2 복수의 플로우 셀 영상은 이러한 1회 이상의 주기에서 지지체 상에 고정된 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성에 결합된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 신호를 포함할 수 있다. 1회 이상의 주기는 k-량체 서열을 포함하지 않는 주형 분자 부분의 시퀀싱 반응에 상응할 수 있다. 예를 들어, 1회 이상의 주기는 선택적 제2 샘플 지표 서열 또는 삽입 서열의 적어도 일부에 상응할 수 있다.

[0171] 복수의 핵산 주형 분자 중에서 A, G, C 및 T/U의 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 (2) 염기의 총 수에 대한 (1) 뉴클레오타이드 염기의 하나 이상의 유형의 수의 백분율을 포함할 수 있다. 백분율은 1회 이상의 주기에서 20%, 15%, 10% 또는 5% 미만일 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 주기의 주형 분자 중에서 모든 뉴클레오타이드 염기의 총수의 약 5%인 뉴클레오타이드 염기 A의 수를 포함한다. 다른 예로서, 뉴클레오타이드 염기의 불균형 다양성은 약 8%인 뉴클레오타이드 염기 C 및 주기의 주형 분자 중에서 모든 뉴클레오타이드 염기의 총수의 약 1%인 T의 수를 포함한다.

[0172] 일부 양상에서, 방법(600)은 1회 이상의 차후 흐름 주기에서 염기 호출 주형까지 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록 또는 정렬하는 작업을 추가로 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하는 작

업은 공통 좌표계에서 제2 복수의 플로우 셀 영상의 폴로니 좌표를 생성하는 것을 포함할 수 있다. 염기 호출 주형은 또한 좌표계에 있다. 일부 양상에서, 폴로니의 좌표는 일차원 벡터 또는 목록에 저장될 수 있다. 벡터 또는 목록의 각 항목은 폴로니의 고유 식별, 이의 좌표 및 기타 관련 정보, 예컨대, 주기의 하나 이상의 채널에서의 픽셀 강도를 포함할 수 있다.

[0173] 일부 양상에서, 방법(600)은 등록된 제2 복수의 플로우 셀 영상으로부터의 신호를 사용하여 염기 호출 주형의 염기 호출 위치에서 제2 복수의 플로우 셀 영상의 염기 호출을 수행하는 작업을 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서의 1차 분석에서 염기 호출은 공통 좌표계의 등록 영상 강도에 기반할 수 있다. 일부 양상에서, 염기 호출은 주형에서 염기 호출 위치에서만 수행된다. 다시 말해서, 주형은 플로우 셀 상의 모든 정확한 폴로니 위치를 확인하고 폴로니일 가능성이 없는 다른 신호 위치를 무시하는 폴로니 맵으로서 작용한다. 본 명세서에 개시된 바와 같이, 염기 호출 위치는 하위 픽셀 위치에 있을 수 있다.

[0174] 일부 양상에서, 작업(610 및 620)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 작업을 포함할 수 있되, 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 범용 샘플 지표는 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별한다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 유니플렉스 라이브러리 분자에 대해서 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0175] 일부 양상에서, 작업(630)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 k-량체 서열 하류의 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, k-량체 서열과 k-량체 서열의 시퀀싱 직후 제1 주기는 함께 구성되어 적어도 2 또는 3 주기에서 균형 또는 높은 다양성 뉴클레오타이드 염기를 생성하고, 염기 호출 주형은 함께 k+1 주기에 기반하여 생성될 수 있다. 추가 1회의 주기는 무작위 서열을 포함할 수 있지만 반드시 포함할 필요는 없다. 추가 주기 1은 범용 샘플 지표 서열로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 시퀀싱의 특정 순서에 기반하여, 추가 1회의 주기는 삽입 서열 또는 주형 분자의 임의의 다른 부분으로부터 유래될 수 있다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 유니플렉스 라이브러리 분자에 대해서 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0176] 일부 양상에서, 작업(610 및 620)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 지지체 상에 고정된 제1 복수의 라이브러리 분자를 수용하는 작업을 포함할 수 있되, 제1 복수의 라이브러리 분자의 각각은 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 제1 삽입 서열 및 제1 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 샘플 지표 서열은 제1 k-량체 서열 및 제1 범용 샘플 지표 서열을 포함하고, 제1 범용 샘플 지표는 제1 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별한다. 이러한 양상에서, 작업(630)을 포함하는 대신에, 방법(600)은 제1 및 제2 k-량체 서열의 그리고 k-량체 서열 하류의 염기 위치의 시퀀싱 반응의 k+1 주기를 수행하여, 제1 복수의 플로우 셀 영상을 생성하는 작업을 포함할 수 있다. 이러한 양상에서, k-량체 서열과 k-량체 서열의 시퀀싱 직후 제1 주기는 함께 구성되어 적어도 2 또는 3주기에서 균형 또는 높은 다양성 뉴클레오타이드 염기를 생성하고, 염기 호출 주형은 함께 k+1 주기에 기반하여 생성될 수 있다. 추가 1회의 주기는 무작위 서열을 포함할 수 있지만 반드시 포함할 필요는 없다. 추가 주기 1은 범용 샘플 지표 서열로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 시퀀싱의 특정 순서에 기반하여, 추가 1회의 주기는 삽입 서열 또는 주형 분자의 임의의 다른 부분으로부터 유래될 수 있다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0177] 일부 양상에서, 작업(650)은 프로세서에 의해 그리고 삽입 서열의 1회 이상의 주기의 시퀀싱 반응을 수행하기 전에, 픽셀 강도 및 픽셀 강도의 각각의 색 순도에 기반한 염기 호출 위치를 포함하는 염기 호출 주형을 결정하는 것을 포함할 수 있되, 염기 호출 주형은 k 주기 차후의 1회 이상의 주기에서 지지체의 제2 복수의 플로우 셀 영상을 등록하도록 구성된다. 이러한 양상에서, 방법(600)의 다른 작업은 유니플렉스 라이브러리 분자에 대해서 위에 개시된 것과 유사하게 남아있다.

[0178] 불균형 다양성을 갖는 주형 분자를 시퀀싱하는 방법

[0179] 일반적으로, 지지체(예를 들어, 코팅된 플로우 셀) 상에 분포될 수 있는 핵산 라이브러리를 제조하는 것이 바람직하며, 라이브러리 분자는 대규모 병렬 시퀀싱을 지원하기 위해 고밀도로 고정된 주형 분자로 전환된다. 예를 들어, 지지체 상의 무작위 위치에서 고밀도로 고정된 주형 분자에 대해서, 시퀀싱 실행 동안 정확한 염기 호출을 위해 고밀도 형광 영상을 해상하는 것(resolving)은 문제가 될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 상대 고밀도의 폴로니 또는 클러스터, 예를 들어, μm^2 당 10^4 내지 10^{12} 개의 주형 분자 또는 폴로니의 염기 호출을 허용한다.

- [0180] 고정된 주형 분자 집단의 뉴클레오타이드 다양성은 시퀀싱 주기에 존재하는 뉴클레오타이드 A, G, C 및 T/U의 상대 비율을 지칭할 수 있다. 높은 다양성 라이브러리는 일반적으로 시퀀싱 실행의 각 주기에 나타난 모두 4개의 뉴클레오타이드를 거의 동일한 비율로 갖는 관심 서열(삽입) 영역을 포함할 수 있다. 낮은 다양성 라이브러리는 일반적으로 높은 비율의 특정 뉴클레오타이드 및 낮은 비율의 다른 뉴클레오타이드를 갖는 관심 서열(삽입) 영역을 포함할 수 있다. 다양성이 낮은 라이브러리의 문제를 극복하기 위해, PhiX 박테리오파지로부터 제조된 소량의 높은 다양성 라이브러리는 전형적으로 관심 라이브러리(예를 들어, 라이브러리 내 PhiX 스파이크)와 혼합되고, 동일한 플로우 셀 상에서 함께 시퀀싱된다. 라이브러리 내 PhiX 라이브러리 스파이크가 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있지만, 이는 또한 플로우 셀 상의 공간을 차지하여 관심 서열을 지니는 표적 라이브러리를 대체하고 표적 라이브러리로부터 얻을 수 있는 시퀀싱 데이터의 양을 감소시킨다(예를 들어, 시퀀싱 처리량을 감소시킨다). 다양성이 낮은 라이브러리의 문제를 극복하기 위한 다른 방법은 색의 균형이 있도록 설계되고, 따라서 높은 다양성을 갖는 적어도 하나의 샘플 지표 서열을 갖는 표적 라이브러리 분자를 제조하기 위한 것일 수 있다. 그러나, 매우 다수의 샘플 지표 세트, 예를 들어, 16-플렉스, 24-플렉스, 96-플렉스 또는 더 큰 플렉스 수준에 대한 단일 지표 샘플 서열 또는 짝지어진 지표 샘플 서열의 세트를 설계하는 것이 바람직할 수 있다. 모든 샘플 지표 서열의 색의 균형있는 큰 샘플 지표 세트에 대한 단일 지표 샘플 서열 또는 짝지어진 샘플 지표로서, 샘플 지표 서열을 설계하는 것은 어려울 수 있다.
- [0181] (예를 들어, 지지체 상에서 높은 밀도로) 낮은 다양성 라이브러리 분자를 시퀀싱하는 것의 어려움을 극복하기 위한 다른 방법은 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 짧은 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함하는 적어도 1개의 샘플 지표 서열을 갖는 라이브러리를 제조하는 것이며, 여기서, k-량체 서열은 뉴클레오타이드 다양성 및 색 균형을 제공한다. 샘플-지표 라이브러리 분자의 집단에서, 샘플 지표의 k-량체 서열은 시퀀싱 실행의 각 주기에서 표시될 모두 4개의 뉴클레오타이드(예를 들어, A, G, C, T 및/또는 U)의 거의 동일한 집단을 포함하는 높은 뉴클레오타이드 다양성을 제공한다. k-량체 서열의 높은 뉴클레오타이드 다양성은 또한 시퀀싱 실행의 각 주기 동안에 색 균형을 제공한다. k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함하는 샘플 지표를 설계하는 것의 이점은 라이브러리 분자의 낮은-플렉스 집단(예를 들어, 2-플렉스 또는 4-플렉스)에서, 2 또는 4개의 상이한 샘플을 식별하는 범용 샘플 지표 서열이 뉴클레오타이드 다양성을 나타낼 필요가 없다는 것이다. 추가적으로, k-량체 서열(예를 들어, NNN)의 뉴클레오타이드 다양성은 PhiX 스파이크-인(spike-in) 라이브러리를 포함하기 위한 필요를 제거하거나, 플로우 셀 상에 분포되고 시퀀싱될 PhiX 스파이크-인 라이브러리의 감소된 양의 사용을 허용한다.
- [0182] 표적 라이브러리 분자는 k-량체 서열(예를 들어, 샘플 지표) 및 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 단일 샘플 지표 서열을 포함할 수 있다. 도 5는 k-량체 서열 및 제2 선택적 k-량체 서열(571)(561)을 포함하는 예시적인 선형 라이브러리 분자(500)를 나타낸다. 예시적인 선형 라이브러리 분자(500)는 또한 범용 샘플 지표 서열 및 선택적 제2 범용 샘플 지표 서열(570)(560)을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, k-량체 서열(예를 들어, NNN)이 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색 균형을 제공하기 때문에, 폴로니 맵핑 및 염기 호출 주형 등록을 위해 단일 샘플 지표 서열(예를 들어, 도 5에서 (570 또는 560))만으로부터의 시퀀싱 데이터가 사용된다. 범용 샘플 지표 서열로부터의 시퀀싱 데이터는 멀티플렉스 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻어진 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있다.
- [0183] 표적 라이브러리 분자는 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 제2 샘플 지표 서열(예를 들어, 이중 샘플 지표)를 추가로 포함할 수 있다. 일부 양상에서, k-량체 서열이 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색 균형을 제공하기 때문에, 그리고 또한 폴로니 맵핑 및/또는 염기 호출 주형 등록이 차후 주기에서 염기 호출 주형을 제공하기 위한 서열 실행의 더 조기의 시퀀싱 주기에서 바람직하기 때문에 단일 샘플 지표 서열만으로부터의 시퀀싱 데이터는 폴로니 맵핑 및/또는 염기 호출 주형 등록을 위해 사용된다. 제1 범용 샘플 지표 서열 및 제2 범용 샘플 지표 서열로부터의 시퀀싱 데이터는 멀티플렉스 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻어진 관심 서열을 구별하기 위해 이중 샘플 지표로서 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 제2 샘플 지표 서열은, 예를 들어, 제2 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다.
- [0184] 관심 서열 영역 및 샘플 지표 영역(들)의 시퀀싱 순서는 또한 낮은 다양성 라이브러리 분자를 시퀀싱하는 것의 어려움을 개선시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘플 지표 영역은 관심 서열 영역을 시퀀싱하기 전에 처음에 시퀀싱될 수 있고, 샘플 지표 서열은 관심 서열 영역과 관련될 수 있다. 예를 들어, 샘플 지표 영역은 처음에 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 시퀀싱하고, 선택적으로 범용 샘플 지표의 적어도 일부를 시퀀싱하고, 이어서, 관심 서열 영역을 시퀀싱하는 것을 포함하여, 시퀀싱될 수 있다. 샘플 지표 라이브러리 분자의 집단에서, k-량체 서열(예를 들어, NNN)은 라이브러리 분자의 관심 서열 영역을 제공하지 않을 수도 있는 뉴클레오타이드

다양성을 제공한다. 샘플 지표의 서열은 폴리머 맵핑 및 주형 등록을 위한 개선된 뉴클레오타이드 다양성 및 색균형을 제공한다.

[0185] 추가적으로, 처음에 샘플 지표 영역을 시퀀싱할 때, 시퀀싱된 샘플 지표 영역의 길이는 상대적으로 짧으며(예를 들어, 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이) 따라서 시퀀싱된 샘플 지표 영역 생성물의 탈혼성화는 더 완료된다. 주형 분자에 혼성화된 채로 남아있는 임의의 시퀀싱 생성물로부터 잔여 신호 수준을 감소시키는 시퀀싱된 샘플 지표 영역의 생성물 중 대부분 또는 모두를 제거하기 위해 보다 온화한 탈혼성화 조건이 사용될 수 있다. 대조적으로, 관심 서열 영역은 전형적으로 샘플 지표 영역보다 훨씬 더 길다(예를 들어, 100개 초과 뉴클레오타이드 길이). 샘플 지표 영역 전에 관심 서열 영역이 시퀀싱될 때, 시퀀싱된 관심 서열 영역의 생성물은 주형 분자를 손상시킬 수 있는 주형 분자에 혼성화된 채로 남아있는 임의의 생성물을 제거하기 위해 더 혹독한 탈혼성화 조건이 가해져야 한다.

[0186] 본 개시내용은 멀티플렉스 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻어진 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있는 적어도 1개의 샘플 지표 서열을 각각 포함하는 핵산 라이브러리 분자(500)를 제공하며, 여기서, 적어도 1개의 샘플 지표 서열은 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 범용 좌측 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함하고/하거나 우측 샘플 지표는 우측 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함한다. 적어도 1개의 샘플 지표 서열은 개선된 염기 호출을 위해 서열 다양성을 포함할 수 있다. 적어도 1개의 샘플 지표 서열은 염기 호출 정확도를 개선시키기 위해 사용될 수 있다.

[0187] 일부 양상에서, k-량체 서열(예를 들어, NNN)은 범용 샘플 지표 서열 상류에 위치되며, 따라서 시퀀싱 실행 동안 k-량체 서열 부분이 범용 샘플 지표 서열 전에 시퀀싱된다. 범용 샘플 지표 서열의 상류는 시퀀싱 또는 판독 순서에 따라서 범용 샘플 지표 서열의 좌측 또는 우측 중 하나에 있을 수 있다. 다시 말해서, 범용 샘플 지표 서열의 상류는 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱이 '5' 단부 또는 '3' 단부로부터 유래되는지의 여부에 따라서 범용 샘플 지표 서열의 좌측 또는 우측에 있을 수 있다. 일부 양상에서, k-량체 서열은 범용 샘플 지표 서열 하류에 위치되며, 따라서 시퀀싱 실행 동안 k-량체 부분이 범용 샘플 지표 서열 다음에 시퀀싱된다. 범용 샘플 지표 서열의 하류는 시퀀싱 또는 판독 순서에 따라서 범용 샘플 지표 서열의 우측 또는 좌측 중 하나에 있을 수 있다. 다시 말해서, 범용 샘플 지표 서열의 하류는 범용 샘플 지표 서열의 시퀀싱이 '5' 단부 또는 '3' 단부로부터 유래되는지의 여부에 따라서 범용 샘플 지표 서열의 우측 또는 좌측에 있을 수 있다. 도 5에 나타난 바와 같이, 예시적인 양상에서, 범용 샘플 지표 서열(570)의 판독 또는 시퀀싱이 '5' 단부에서 '3' 단부까지일 때 범용 샘플 지표 서열(570)의 상류는 지표 서열의 좌측에 있다. 동일한 양상에서, 제2 범용 샘플 지표 서열(560)의 상류는 제2 범용 샘플 지표 서열(560)의 판독 또는 시퀀싱이 '5' 단부에서 '3' 단부까지일 때 우변 상에 있다.

[0188] 일부 양상에서, k-량체 서열에서, 1개 이상의 염기는 A, G, C, T 또는 U로부터 독립적으로 그리고 무작위로 선택된다. 일부 양상에서, k-량체 서열에서, k-량체 서열이 2 또는 3개의 동일한 뉴클레오타이드 염기를 갖는 연속 반복 서열, 예를 들어 AA, TT, CC, GG, UU, AAA, TTT, CCC, GGG 또는 UUU를 갖도록, 1개 이상의 염기가 A, G, C, T 또는 U로부터 독립적으로 그리고 무작위로 선택된다. 일부 양상에서, 라이브러리 분자의 집단에서, 범용 샘플 지표 서열은 시퀀싱 실행의 각 주기에서 표시될 모두 4개의 뉴클레오타이드(예를 들어, A, G, C, T 및/또는 U)의 거의 동일한 비율을 포함하는 높은 다양성 서열을 갖는 k-량체 서열을 포함한다.

[0189] 일부 양상에서, k-량체 서열은 1 내지 20개의 뉴클레오타이드, 또는 1 내지 10개의 뉴클레오타이드, 또는 2 내지 8개의 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 6개의 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 5개의 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 4개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0190] 일부 양상에서, k-량체 서열은 AGC, AGT, GAC, GAT, CAT, CAG, TAG, TAC를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 당업자라면 k-량체 서열의 주어진 위치에서 각 염기 "N"가 A, G, C, T 또는 U로부터 독립적으로 선택되는 다수의 더 많은 무작위 서열이 제조될 수 있다(예를 들어, 64개의 가능한 조합)는 것을 인식할 것이다.

[0191] 일부 양상에서, 범용 샘플 지표 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타이드, 또는 7 내지 18개의 뉴클레오타이드, 또는 9 내지 16개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0192] 일부 양상에서, k-량체 서열은 1개 이상의 무작위 뉴클레오타이드 염기를 포함한다. 일부 양상에서, k는 0 초과이고 10 미만인 정수이다. 일부 양상에서, k는 3이고, k-량체 서열은 NNN이되, 각각의 "N"은 A, G, C, T 및 U로부터 무작위로 그리고 독립적으로 선택된 염기를 표시한다. 일부 양상에서, k는 1, 2, 3, 4 또는 5이다. 일부 양상에서, k는 3이고, k-량체 서열은 적어도 2개의 무작위 뉴클레오타이드 염기를 포함한다. 일부 양상에서, k

는 4이고, k-량체 서열은 적어도 2개 또는 3개의 무작위 뉴클레오타이드 염기를 포함한다.

- [0193] 일부 양상에서, k-량체 서열(예를 들어, 571 또는 561)은 높은 다양성 뉴클레오타이드 염기를 제공하고 본 명세서에 개시된 폴로니 맵 또는 염기 호출 주형을 생성하기 위해 k-량체 서열에 인접한 범용 샘플 지표 서열로부터의 하나 이상의 염기와 조합된다. 본 명세서에 개시된 "폴로니 맵"은 공통 좌표계에서 염기 호출 위치를 포함하는 "염기 호출 주형"과 동일할 수 있다.
- [0194] 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서 개개 우측 샘플 지표 서열은 범용 샘플 지표 서열(예를 들어, 도 5에서 (570)) 및 k-량체 서열(예를 들어, 도 5에서 (571))을 포함한다. 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서 k-량체 서열은 k-량체 서열을 시퀀싱하는 동안 각 시퀀싱 주기에서 뉴클레오타이드 다양성을 제공하기 위해 모두 4개의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, A, G, C 및 T/U)의 약 25% 또는 약 15 내지 35%의 전체 염기 조성을 갖는다.
- [0195] 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 임의의 주어진 위치에서 아데닌(A)의 비율은 약 20 내지 30% 또는 약 15 내지 35% 또는 약 10 내지 40%이다. 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 임의의 주어진 위치에서 구아닌(G)의 비율은 약 20 내지 30% 또는 약 15 내지 35% 또는 약 10 내지 40%이다. 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 임의의 주어진 위치에서 사이토신(C)의 비율은 약 20 내지 30% 또는 약 15 내지 35% 또는 약 10 내지 40%이다. 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 임의의 주어진 위치에서 티민(T) 또는 유라실(U)의 비율은 약 20 내지 30% 또는 약 15 내지 35% 또는 약 10 내지 40%이다.
- [0196] 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 임의의 주어진 위치에서의 아데닌(A) 및 티민(T)의 비율, 또는 아데닌(A) 및 유라실(U)의 비율은 약 10 내지 65%이다. 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 임의의 주어진 위치에서의 구아닌(G) 및 사이토신(C)의 비율은 약 10 내지 65%이다.
- [0197] 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 서열 다양성은 적어도 k-량체 서열의 시퀀싱 동안 4개 미만의 상이한 뉴클레오타이드 염기에 의해 시퀀싱 주기가 제공되지 않는다는 것을 보장한다. 일부 양상에서, 우측 샘플 지표 서열의 집단에서, k-량체 서열의 서열 다양성은 적어도 k-량체 서열의 시퀀싱 동안 3개 미만의 상이한 뉴클레오타이드 염기에 의해 시퀀싱 주기가 제공되지 않는다는 것을 보장한다.
- [0198] 본 명세서에 개시된 바와 같이, "불균형 다양성"은 "낮은 다양성"과 상호 호환 가능하게 사용되고, "균형 다양성"은 "높은 다양성"과 상호 호환 가능하게 사용된다.
- [0199] 범용 샘플 지표 서열과 직접 연결되는 k-량체 서열을 포함하는 예시적인 샘플 지표 서열은: NNGTAGGAGCC(서열번호 97); NNCCGCTGCTA(서열번호 98); NNNAACAACAAG(서열번호 99); NNNGGTGGTCTA(서열번호 100); NNNTTGCCAAC(서열번호 101); NNNCAGGAGTGC(서열번호 105); 및 NNNATCACA(서열번호 106)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 당업자라면 범용 샘플 지표가 임의의 길이일 수 있고, 멀티플렉스 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻어진 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있는 임의의 서열을 갖는다는 것을 인식할 것이다. 주어진 샘플 지표의 집단, 예를 들어, NNGTAGGAGCC(서열번호 97)에서, 상기 집단은 동일한 범용 샘플 지표 서열(예를 들어, GTAGGAGCC) 및 상이한 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 각각 지니는 개개 샘플 지표 분자의 혼합물을 포함하며, 최대 64개의 상이한 k-량체 서열이 주어진 샘플 지표의 집단에 존재할 수 있다.
- [0200] 일부 양상에서, k-량체 서열(예를 들어, NNN 또는 NNNN)은 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실의 균형비를 제공한다. 일부 양상에서, 샘플-지표 라이브러리 분자의 집단에서, 범용 샘플 지표 서열의 적어도 일부와 함께 k-량체 서열은 시퀀싱 실행의 각 주기에 표시된 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실의 균형비를 제공한다. 일부 양상에서, 샘플-지표 라이브러리 분자의 집단에서, 범용 샘플 지표 서열의 1, 2, 3개 이상의 염기와 함께 k-량체 서열은 시퀀싱 실행의 각 주기에 표시된 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실의 균형비를 제공한다.
- [0201] 일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 핵염기에 상응하는 상이한 형광단으로 표지된 뉴클레오타이드(예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체) 및 중합효소의 사용을 포함한다. 일부 양상에서, 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 시퀀싱하는 것은 시퀀싱 실행의 각 주기에서 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실에 상응하는 형광 색의 균형비를 제공한다. 일부 양상에서, 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열의 적어도 일부를 시퀀싱하는 것은 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실에 상응하는 형광 색의 균형 비를 제공한다. 표지된 뉴클레오타이드는 시퀀싱

반응 동안에 형광 신호를 방출한다.

[0202]

일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 본 명세서에 개시된 시퀀싱 시스템(예를 들어, 도 1에서 (110))에서 수행된다. 시퀀싱 시스템은 고정된 주형 분자 상에서 시퀀싱 반응으로부터 형광 영상을 포획하는 광학 시스템을 가질 수 있다. 시퀀싱 시스템은 광학 시스템에 의해 포착된 형광 영상화 데이터를 본 명세서에 개시된 프로세서(예를 들어, 도 4에서 (400))에 전달하도록 구성될 수 있다. 프로세서는 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자의 위치를 결정하기 위해(예를 들어, 맵핑하기 위해) 본 명세서에 개시된 하나 이상의 작업을 수행하도록 프로그래밍될 수 있다. 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자의 위치(예를 들어, 맵핑)는 본 명세서의 염기 호출 위치와 동등할 수 있다. 프로세서는 k-량체 서열(예를 들어, NNN)만의 형광 영상화 데이터에 기반하거나, k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열의 적어도 일부에 기반하여 고정된 주형 분자의 염기 호출 위치의 주형을 생성할 수 있다. 따라서, k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 선택적으로 범용 샘플 지표 서열의 일부를 시퀀싱하기 위해 사용되는 소수의 시퀀싱 주기는 플로우 셀 상의 염기 호출 위치의 주형과 동등한 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 프로세서는 k-량체 서열(예를 들어, NNN), 또는 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 적어도 범용 샘플 지표 서열의 적어도 일부만의 형광 색 및 강도를 추출하도록 구성될 수 있다. 프로세서는 삽입 영역을 시퀀싱하는 동안 염기 호출을 위해 주어진 주형 분자(k-량체 서열을 시퀀싱하는 동안 확립됨)와 관련된 형광 색 및 강도 및 주어진 고정된 주형 분자의 위치를 사용하도록 구성될 수 있다. 프로세서는 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열, 및 삽입 영역을 시퀀싱하는 동안 위상 및 사전 위상화를 검출하도록 구성될 수 있다. 일부 양상에서, 각 시퀀싱 주기에서 k-량체 서열(예를 들어, NNN)에 의해 제공된 형광 색의 균형 비는 광학 시스템에 의해 포착된 형광 영상으로부터 가공된 데이터의 품질을 개선시킬 수 있고, 결국 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자의 위치, 및 색 및 강도를 결정하기 위해 프로세서에 의한 능력을 개선시킬 수 있으며, 이들 모두는 염기 호출 정확도 및 시퀀싱된 삽입 영역의 품질 점수를 개선시킬 수 있다.

[0203]

일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 주어진 다가 분자에서 뉴클레오타이드 아암에 부착된 뉴클레오타이드 단위의 핵 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티민 또는 유라실)에 상응하는 상이한 형광단으로 표시된 다가 분자 및 중합효소의 사용을 포함한다. 일부 양상에서, 개개 다가 분자의 코어는 주어진 다가 분자에서 뉴클레오타이드 아암에 부착된 뉴클레오타이드 단위(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티민 또는 유라실)에 상응하는 형광단에 부착된다. 일부 양상에서, 다가 분자의 뉴클레오타이드 아암 중 적어도 하나는 형광단에 부착된 링커 및/또는 뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 주어진 링커 또는 뉴클레오타이드 염기에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티민 또는 유라실)에 상응한다. 일부 양상에서, 표시된 다가 분자를 사용하여 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 시퀀싱하는 것은 시퀀싱 실행의 각 주기에서 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실에 상응하는 형광 색의 균형비를 제공한다. 일부 양상에서, 표시된 다가 분자를 사용하여 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열의 적어도 일부를 시퀀싱하는 것은 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 티민 및/또는 유라실에 상응하는 형광 색의 균형 비를 제공한다. 표시된 다가 분자는 시퀀싱 반응 동안에 형광 신호를 방출한다.

[0204]

일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 고정된 주형 분자 상의 시퀀싱 반응으로부터의 형광 영상을 포획하는 광학 시스템을 갖는 시퀀싱 시스템(예를 들어, 도 1에서 (110)) 상에서 수행된다. 시퀀싱 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 영상화 데이터를 플로우 셀 상의 염기 호출 위치와 동등한 고정된 주형 분자(폴로니)의 위치를 결정하도록(예를 들어, 맵핑하도록) 프로그래밍된 프로세서(예를 들어, 도 4에서 (400))에 전달하도록 구성될 수 있다. 프로세서는 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 단독의 형광 영상화 데이터에 기반하거나, k-량체 서열(예를 들어, NNN)과 범용 샘플 지표 서열의 적어도 일부에 기반하여 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성할 수 있다. 따라서, k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 선택적으로 범용 샘플 지표 서열의 일부를 시퀀싱하기 위해 사용되는 소수의 시퀀싱 주기는 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 프로세서는 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 단독, 또는 k-량체 서열(예를 들어, NNN)과 적어도 범용 샘플 지표 서열의 형광 색 및 강도를 추출하도록 구성될 수 있다. 프로세서는 삽입 영역을 시퀀싱하는 동안 염기 호출을 위해 주어진 주형 분자(k-량체 서열을 시퀀싱하는 동안 확립됨)와 관련된 형광 색 및 강도 및 주어진 고정된 주형 분자의 위치를 사용하도록 구성될 수 있다. 프로세서는 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열, 및 삽입 영역을 시퀀싱하는 동안 위상 및 사전 위상화를 검출하도록 구성될 수 있다. 일부 양상에서, 각 시퀀싱 주기에서 k-량체 서열(예를 들어, NNN)에 의해 제공된 형광 색의 균형 비는 검출기에 의해 포착된 형광 영상으로부터 가공된 데이터의 품질을 개선시킬 수 있고, 결국 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자의 위치, 및 색 및 강도를 결정하기 위해 프로세서에 의한 능력을 개선시킬 수 있으며, 이들 모두는 염기 호출 정확도 및 시퀀싱된 삽입 영역의 품질 점수를 개선시킬 수 있다.

- [0205] 시퀀싱 순서
- [0206] 일부 양상에서, 다중 주기 시퀀싱 반응을 수행하는 순서는 하기를 포함한다: (1) 우측 지표가 제1 k-량체 서열(예를 들어, 도 5에서 (571)) 및 우측 범용 샘플 지표 서열(예를 들어, 도 5에서 (570))을 포함하는 우측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것; (2) 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것; 및 (3) 삽입 영역(510)을 시퀀싱하는 것. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 좌측 범용 샘플 지표 서열(예를 들어, 도 5에서 (560))을 포함한다. 일부 양상에서, 제1 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표 영역을 시퀀싱하는 것은 염기 호출 주형을 생성하는 목적을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있고, 따라서, 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것은 생략될 수 있다.
- [0207] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 주형 분자에 상응하는 다중 주기 동안 시퀀싱 반응을 수행하는 방법으로서, 개개 주형 분자(예를 들어, 도 5에서 (500))는 (i) 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520), (ii) 범용 좌측 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열(560), (iii) 정방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(540), (iv) 관심 서열(510), (v) 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(550), (vi) 우측 범용 샘플 지표 서열(560)에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열(571), 및 (vii) 제2 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130)을 포함하고, 상기 방법은 단계 (a): 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열에 혼성화되는 제1 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화시키고 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 것을 포함하는 우측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여, 고정된 주형 분자에 혼성화된 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계를 포함하되, 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0208] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (b)를 더 포함한다.
- [0209] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 표면 프라이머(520)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화된 제2 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정 주형 분자를 혼성화시키고 좌측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (c)를 더 포함하되, 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0210] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (d)를 더 포함한다.
- [0211] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 정방향 시퀀싱 프라이머(540)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정된 주형 분자를 혼성화하고, 삽입 영역(510)을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계 (e)를 더 포함하되, 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(510)에 상보적이다.
- [0212] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (f1)을 더 포함한다.
- [0213] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열 및 (iii) 좌측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (f2)를 더 포함한다.
- [0214] 일부 양상에서, 단계 (b) 및 (d)의 복수의 시퀀싱 연장 생성물을 제거하는 것은, 예를 들어 50 내지 90℃와 같은 핵산 변성을 촉진시키는 온도에서, 폼아마이드 유무와 상관없이, SSC(예를 들어, 식염수-시트르산나트륨) 완충제를 포함하는 변성 시약을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0215] 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 시퀀싱 증합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 시퀀싱 증합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 본 명세서에 기재된 임의의 결합에 의한 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다.

- [0216] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체에 고정된다.
- [0217] 일부 양상에서, 시퀀싱 순서는, (1) 우측 지표가 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것; (2) 삽입 영역을 시퀀싱하는 것; 및 (3) 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 제2 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 제1 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표 영역을 시퀀싱하는 것은 본 명세서의 염기 호출 주형을 생성하는 목적을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있고, 따라서, 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것은 생략될 수 있다.
- [0218] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 주형 분자를 시퀀싱하는 방법으로서, 개개 주형 분자는 (i) 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520), (ii) 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열, (iii) 정방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(540), (iv) 관심 서열(510), (v) 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(550), (vi) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열, 및 (vii) 제2 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(530)을 포함하고, 상기 방법은, 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(550)에 혼성화되는 제1 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화시키고 k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 것을 포함하는 우측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여, 고정된 주형 분자에 혼성화된 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (a)를 포함하되, 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0219] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (b)를 더 포함한다.
- [0220] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 정방향 시퀀싱 프라이머(540)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정된 주형 분자를 혼성화하고, 삽입 영역(510)을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계 (c)를 더 포함하되, 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(510)에 상보적이다.
- [0221] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (d)를 더 포함한다.
- [0222] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520)에 혼성화된 제3 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정 주형 분자를 혼성화시키고 좌측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (e)를 더 포함하되, 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0223] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (f1)을 더 포함한다.
- [0224] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열 및 (iii) 좌측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (f2)를 더 포함한다.
- [0225] 일부 양상에서, 단계 (b) 및 (d)의 복수의 시퀀싱 연장 생성물을 제거하는 것은, 예를 들어 50 내지 90°C와 같은 핵산 변성을 촉진시키는 온도에서, 폼아마이드 유무와 상관없이, SSC(예를 들어, 식염수-시트르산나트륨) 완충제를 포함하는 변성 시약을 사용하여 수행될 수 있다.

- [0226] 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 본 명세서에 기재된 임의의 결합에 의한 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다.
- [0227] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 약 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 약 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 약 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체에 고정된다.
- [0228] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 주형 분자에 상응하는 다중 주기에서 시퀀싱 반응을 수행하는 순서는 (1) 삽입 영역(510)의 시퀀싱; (2) 우측 지표가 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것; 및 (3) 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 제2 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 제1 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표 영역을 시퀀싱하는 것은 염기 호출 주형을 생성하는 목적을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있고, 따라서, 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것은 생략될 수 있다.
- [0229] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 주형 분자를 시퀀싱하는 방법으로서, 개개 주형 분자는 (i) 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520), (ii) 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열, (iii) 정방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(540), (iv) 관심 서열(510), (v) 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(550), (vi) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열, 및 (vii) 제2 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(530)을 포함하고, 상기 방법은 단계 (a): 정방향 시퀀싱 프라이머(540)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화시키고 삽입 영역(510)을 시퀀싱하여, 고정된 주형 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계 (a)를 포함하되, 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(510)에 상보적이다.
- [0230] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (b)를 더 포함한다.
- [0231] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 역방향 시퀀싱 프라이머(550)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화하고, k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 것을 포함하여 우측 샘플 지표 서열을 시퀀싱함으로써 고정된 주형 분자에 혼성화된 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (c)를 더 포함하되, 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0232] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (d)를 더 포함한다.
- [0233] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520)에 혼성화된 제3 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정 주형 분자를 혼성화시키고 좌측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (e)를 더 포함하되, 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0234] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (f1)을 더 포함한다.
- [0235] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열 및 (iii) 좌측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽

입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (f2)를 더 포함한다.

- [0236] 일부 양상에서, 단계 (b) 및 (d)의 복수의 시퀀싱 연장 생성물을 제거하는 것은, 예를 들어 50 내지 90℃와 같은 핵산 변성을 촉진시키는 온도에서, 폼아마이드 유무와 상관없이, SSC(예를 들어, 식염수-시트르산나트륨) 완충제를 포함하는 변성 시약을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0237] 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 시퀀싱은 본 명세서에 기재된 임의의 결합에 의한 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다.
- [0238] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체에 고정된다.
- [0239] 일부 양상에서, 주형 분자에 상응하는 다중 주기에서 시퀀싱 반응을 수행하는 순서는 하기를 포함한다: (1) 삽입 영역(510) 처음 3 내지 5개의 염기의 시퀀싱; (2) 우측 지표가 선택적 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것; 및 (3) 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 제2 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 삽입 영역(510)의 처음 3 내지 5개의 염기를 시퀀싱하는 것은 충분한 서열 다양성을 제공할 수 있고, 따라서 우측 샘플 지표 및 좌측 샘플 지표는 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 포함하지 않는다. 일부 양상에서, 제1 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표 영역을 시퀀싱하는 것은 충분한 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있고, 따라서, 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것은 생략될 수 있다.
- [0240] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 주형 분자를 시퀀싱하는 방법으로서, 개개 주형 분자는 (i) 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520), (ii) 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열, (iii) 정방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(540), (iv) 관심 서열(510), (v) 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(550), (vi) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열, 및 (vii) 제2 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(530)을 포함하고, 상기 방법은 단계 (a): 정방향 시퀀싱 프라이머(540)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화시키고 삽입 영역(510)의 처음 3 내지 5개의 염기를 시퀀싱하여, 고정된 주형 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계 (a)를 포함하되, 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(510)에 상보적이다. 삽입 영역(510)의 처음 3 내지 5개의 염기의 서열은 폴로니 맵핑 및 주형 등록을 위해 충분한 서열 다양성 및 색 균형을 제공할 수 있다.
- [0241] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (b)를 더 포함한다.
- [0242] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 역방향 시퀀싱 프라이머(550)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화하고, 존재한다면, k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 것을 포함하여 우측 샘플 지표 서열을 시퀀싱함으로써 고정된 주형 분자에 혼성화된 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (c)를 더 포함하되, 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 우측 샘플 지표 서열에 상보적이다.
- [0243] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (d)를 더 포함한다.
- [0244] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520)에 혼성화된 제3 복수의

가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정 주형 분자를 혼성화시키고 좌측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (e)를 더 포함하되, 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열에 상보적이다.

- [0245] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (f)를 더 포함한다.
- [0246] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 정방향 시퀀싱 프라이머(540)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제4 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정된 주형 분자를 혼성화하고, 삽입 영역(510)의 전장을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 복수의 전장 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계 (g)를 더 포함하되, 복수의 전장 삽입 연장 생성물은 관심 서열(510)에 상보적이다.
- [0247] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 전장 서열을 (ii) 우측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어진 것으로 식별하는 단계 (h1)를 더 포함한다.
- [0248] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 전장 서열을 (ii) 우측 샘플 지표 서열, 및 (iii) 좌측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어진 것으로 식별하는 단계 (h2)를 더 포함한다.
- [0249] 일부 양상에서, 단계 (b), (d) 및 (f)의 복수의 시퀀싱 연장 생성물을 제거하는 것은, 예를 들어 50 내지 90℃와 같은 핵산 변성을 촉진시키는 온도에서, 폼아마이드 유무와 상관없이, SSC(예를 들어, 식염수-시트르산나트륨) 완충제를 포함하는 변성 시약을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0250] 일부 양상에서, 단계 (a), (c), (e) 및 (g)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c), (e) 및 (g)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c), (e) 및 (g)의 시퀀싱은 본 명세서에 기재된 임의의 결합에 의한 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다.
- [0251] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^2 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 약 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^{15} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^{12} 이다. 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체에 고정된다.
- [0252] 일부 양상에서, 시퀀싱 순서는, (1) 고정된 주형 분자의 삽입 영역(510)의 처음 3 내지 5개의 염기의 시퀀싱(예를 들어, 정방향의 시퀀싱); (2) 우측 지표가 제1 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표의 시퀀싱; (3) 좌측 샘플 지표의 시퀀싱; (4) 고정된 주형 분자가 주형 분자에 상보적인 고정된 가닥으로 대체되도록 쌍별 회전 반응을 수행하는 것; 및 (5) 고정된 상보적 가닥의 삽입 영역(510)의 전장의 시퀀싱(예를 들어, 역방향의 시퀀싱)을 포함한다. 일부 양상에서, 라이브러리 분자 집단의 삽입 영역(510)의 처음 3 내지 5개의 염기의 서열은 개선된 염기 호출 정확도를 위해 충분한 서열 다양성을 제공할 수 있다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 좌측 샘플 지표는 제2 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 좌측 범용 샘플 지표 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 제1 무작위 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 우측 샘플 지표 영역을 시퀀싱하는 것은 충분한 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있고, 따라서, 좌측 샘플 지표를 시퀀싱하는 것은 생략될 수 있다.
- [0253] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 주형 분자를 시퀀싱하는 방법으로서, 개개 주형 분자는 유라실 염기를 결합하는 고정된 포착 프라이머에 공유 결합되고, 개개 주형 분자는 무작위 분포된 유라실 염기를 포함하며, 개개 주형 분자는 (i) 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520), (ii) 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열, (iii) 정방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(540), (iv) 관심 서열(510), (v) 역방향 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 서열(550), (vi) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를

들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열, 및 (vii) 제2 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(530)을 포함하되, 상기 방법은 단계 (a): 정방향 시퀀싱 프라이머(540)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화시키고 삽입 영역(510)의 처음 3 내지 5개의 염기를 시퀀싱하여, 고정된 주형 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계 (a)를 포함하되, 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(510)에 상보적이다.

[0254] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (b)를 더 포함한다.

[0255] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 역방향 시퀀싱 프라이머(550)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 주형 분자를 혼성화하고, k-량체 서열(예를 들어, NNN) 및 우측 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 것을 포함하여 우측 샘플 지표 서열을 시퀀싱함으로써 고정된 주형 분자에 혼성화된 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (c)를 더 포함하되, 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 상보적이다.

[0256] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 제거하고 고정된 주형 분자를 유지하는 단계 (d)를 더 포함한다.

[0257] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 제1 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열(520)에 혼성화된 제3 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 유지된 고정 주형 분자를 혼성화시키고 좌측 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여 고정된 주형 분자에 혼성화된 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 생성하는 단계 (e)를 더 포함하되, 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물은 좌측 범용 샘플 지표 서열을 갖는 좌측 샘플 지표 서열에 상보적이다.

[0258] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 가닥-변위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 고정된 주형 분자에 혼성화된 제2 복수의 샘플 지표 연장 생성물을 대체하여 고정된 포착 프라이머를 포함하는 고정된 주형 분자에 혼성화된 연장 생성물을 생성하는 단계 (f)를 더 포함한다.

[0259] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 유라실 부위에서 고정된 주형 분자 내 비염기성 부위를 생성하고 비염기성 부위에서 갭을 생성함으로써 고정된 주형 분자를 제거하여 갭-포함 주형 분자를 생성하면서, 개개 연장 생성물이 고정된 포착 프라이머에 혼성화되는 것에 의해 유지되는 단계 (f)에서 생성된 연장 생성물을 유지하는 단계 (g)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 쌍별 회전은 단계 (g) 및 (h)를 수행함으로써 달성된다.

[0260] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 역방향 시퀀싱 프라이머(550)를 위한 범용 결합 서열에 혼성화된 제4 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머(예를 들어, 역방향 시퀀싱 프라이머)와 유지된 연장 생성물을 혼성화하고, 삽입 영역(510)을 시퀀싱하는(예를 들어, 삽입 영역(510)의 적어도 일부 또는 전장을 시퀀싱하는) 단계 (h)를 더 포함한다.

[0261] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (i1)을 더 포함한다.

[0262] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(510)의 서열을 (ii) 우측 범용 샘플 지표 서열에 직접 연결된 k-량체 서열(예를 들어, NNN)을 갖는 우측 샘플 지표 서열 및 (iii) 좌측 샘플 지표 서열에 부여하여, 삽입 영역을 제1 공급원으로부터 얻어지는 것으로 식별하는 단계 (i2)를 더 포함한다.

[0263] 일부 양상에서, 단계 (b) 및 (d)의 복수의 시퀀싱 연장 생성물을 제거하는 것은, 예를 들어 50 내지 90℃와 같은 핵산 변성을 촉진시키는 온도에서, 폼아마이드 유무와 상관없이, SSC(예를 들어, 식염수-시트르산나트륨) 완충제를 포함하는 변성 시약을 사용하여 수행될 수 있다.

[0264] 일부 양상에서, 단계 (a), (c), (e) 및 (h)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c), (e) 및 (h)의 시퀀싱은 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (a), (c), (e) 및 (h)의 시퀀싱은 본 명세서에 기재된 임의의 결합에 의한 시퀀싱 방법을 수행하는 것을 포함한다.

[0265] 일부 양상에서, 지지체에 고정된 복수의 주형 분자의 밀도는 μm^2 당 약 102 내지 1015이다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자는 사전결정된 패턴으로

지지체에 고정된다.

- [0266] 일부 양상에서, 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는 핵산을 시퀀싱하는 방법을 제공한다: (a) 지지체 상에 고정된(예를 들어, 무작위 또는 사전 결정된 위치에 고정된) 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계로서, 개개 고정된 주형 분자는 삽입 서열 영역 및 1개의 샘플 지표표를 포함하고, 각각의 샘플 지표표는 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열을 포함하되, 상이한 고정된 주형 분자는 상이한 k-량체 서열 및 동일한 범용 샘플 지표 서열을 갖고, 고정된 주형 분자는 상이한 삽입 서열을 갖는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계; (b) 상이한 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자의 k-량체 서열의 3주기의 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하는 단계로서, 뉴클레오타이드 시약은 각각 상이한 유형의 핵염기와 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함하되, 3주기의 시퀀싱은 고정된 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 검출 및 영상화하여, 복수의 고정된 주형 분자의 개개 주형 분자에서 k-량체 서열의 서열을 결정하고, A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 다양성은 복수의 고정된 주형 분자 중에서 제1, 제2 및 제3 시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화되는, 상기 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 얻어진 영상을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계로서, 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않는, 상기 맵을 생성하는 단계.
- [0267] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 단계 (b)의 균형 다양성은 제1, 제2 및 제3 시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75%이다.
- [0268] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은 (a) 복수의 고정된 주형 분자의 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 단계 (a)에서 얻어진 동일한 주어진 주형 분자로부터의 범용 샘플 지표 서열을 부여하여, 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.
- [0269] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 복수의 핵산 주형 분자는 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 제2 샘플 지표표를 더 포함하고, 제2 샘플 지표표는 무작위 서열을 결여한다.
- [0270] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은 (a) 제1, 제2 및 제3 시퀀싱 주기의 각각에서 검출 및 영상화되는 A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 다양성을 얻기 위해 복수의 고정된 주형 분자의 k-량체 서열을 시퀀싱하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (c) 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (d) 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (e) 단계 (c)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 단계 (a) 및 (b)에서 얻어진 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 부여하여, 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.
- [0271] 일부 양상에서, 본 개시내용은 하기 단계를 포함하는 핵산을 시퀀싱하는 방법을 제공한다: (a) 지지체 상에 고정된(예를 들어, 무작위 또는 사전 결정된 위치에 고정된) 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계로서, 개개 고정된 주형 분자는 삽입 서열 영역 및 1개의 샘플 지표표를 포함하고, 각각의 샘플 지표표는 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열을 포함하되, 범용 샘플 지표 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 상이한 고정된 주형 분자는 상이한 k-량체 서열 및 동일한 범용 샘플 지표 서열을 갖고, 고정된 주형 분자는 상이한 삽입 서열을 갖는, 상기 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계; (b) 상이한 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자의 범용 샘플 지표 서열의 첫 번째 염기 위치 및 k-량체 서열의 4주기의 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하는 단계로서, 뉴클레오타이드 시약은 각각 상이한 유형의 핵염기에 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함하고, 4주기의 시퀀싱은 고정된 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 검출 및 영상화하여, 복수의 고정된 주형 분자의 개개 주형 분자에서 범용 샘플 지표 서열의 첫 번째 염기 위치 및 k-량체 서열의 서열을 결정하는 것을 포함하고, A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 다양성은 복수의 고정된 주형 분자 중에서 제1, 제2, 제3 및 제4 시퀀싱 주기의 각각에서 검출 및 영상화된, 상기 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 얻어진 4주기의 중합효소-매개 시퀀싱 반응의 영상을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계로서, 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않는, 상기 맵을 생성하는 단계.

- [0272] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 단계 (b)의 균형 다양성은 제1, 제2, 제3 및 제4시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75%이다.
- [0273] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은 (a) 복수의 고정된 주형 분자의 남아있는 염기 위치의 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (c) 단계 (b)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 단계 (a)에서 얻어진 동일한 주어진 주형 분자로부터의 범용 샘플 지표 서열을 부여하여, 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.
- [0274] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 복수의 핵산 주형 분자는 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 제2 범용 샘플 지표 서열을 포함하는 제2 샘플 지표를 더 포함하고, 제2 샘플 지표는 무작위 서열을 결여한다.
- [0275] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은 (a) 제1, 제2 및 제3 및 제4 시퀀싱 주기의 각각에서 검출 및 영상화되는 A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 다양성을 얻기 위해 복수의 고정된 주형 분자의 k-량체 서열 및 첫 번째 염기 위치의 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 남아있는 염기 위치의 제1 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (c) 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (d) 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (e) 단계 (c)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 단계 (a) 및 (b)에서 얻어진 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 부여하여, 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.
- [0276] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재를 포함한다. 일부 양상에서, 지지체는 플로우 셀 채널, 플로우 셀 또는 모세관 내강 상에서 구성된다. 일부 양상에서, 지지체는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 1개의 친수성 중합체에 의해 부동태화된다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈)(PVP), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)(HEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분자를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함한다.
- [0277] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열과 1개의 샘플 지표의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머(concatemer) 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열의 1개의 복제물 및 1개의 샘플 지표의 1개의 복제물을 갖는 복수의 상이한 클러스터링된 주형 분자를 포함하되, 클러스터링된 주형 분자는 브리지 증폭을 통해 생성된다. 일부 양상에서, 지지체 상의 무작위 또는 사전 결정된 위치에 위치한 고정된 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 삽입 서열의 샘플 공급원은 게놈 DNA, 이중-가닥 cDNA 또는 무세포 순환 DNA이다.
- [0278] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 연쇄 중결기를 갖는 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 각각 포함하는 다가 분자를 포함하되, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.
- [0279] 일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 단계 (b)에서 고정된 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 시퀀싱 프라이머에 혼성화된 개개 고정된 주형 분자를 포함하여 듀플렉스를 형성하고, 듀플렉스는 중합효소에 결합되어 복합체화된 중합효소를 형성하고, 복합체화된 중합효소는 검출 가능

하게 표시된 뉴클레오타이드 시약에 결합된다. 일부 양상에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드를 혼성화된 시퀀싱 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건하에서 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오타당 모이어티, 1 내지 10개의 포스포이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드를 혼성화된 시퀀싱 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건하에서 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 연쇄 종결기를 갖는 오타당 모이어티, 1 내지 10개의 포스포이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건하에서 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약에 결합되고, 조건은 뉴클레오타이드 혼입을 저해하는 데 적합하되, 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약은 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암, 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하는 다가 분자를 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.

[0280]

일부 양상에서, 핵산을 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 복수의 시퀀싱 프라이머에 혼성화된 고정된 콘카타머 분자를 포함하여 동일한 콘카타머 분자 상에 적어도 제1 및 제2 듀플렉스를 형성하되, 제1 및 제2 듀플렉스는 제1 중합효소에 결합되고, 제2 듀플렉스는 제2 중합효소에 결합되어 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하고, 상기 방법은 (a) 복수의 다가 분자를 동일한 콘카타머 주형 분자 상의 제1 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계로서, 개개 다가 분자는 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암, 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하며, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되며, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착되되, 접촉시키는 단계는 복수로부터의 단일 다가 분자를 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건하에서 수행되고, 단일 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 혼성화된 제1 시퀀싱 프라이머를 포함하는 제1 복합체화된 중합효소에 결합되어 제1 결합 복합체를 형성하고, 단일 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 혼성화된 제2 시퀀싱 프라이머를 포함하는 제2 복합체화된 중합효소에 결합되어 제2 결합 복합체를 형성하고, 동일한 다가 분자에 결합된 제1 및 제2 결합 복합체는 결합할성 복합체를 형성하고, 접촉시키는 단계는 제1 및 제2 결합 복합체에서 결합된 제1 및 제2 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 저해하는 데 적합한 조건하에서 수행되는, 상기 접촉시키는 단계; (b) 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 제1 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 동일한 콘카타머 주형 분자 상에 제1 및 제2 결합 복합체를 형성하는 검출 가능하게 표시된 다가 분자로부터 방출된 광학 색 신호를 영상화하는 단계; 및 (d) 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 결정하고, 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0281]

일부 양상에서, 본 개시내용은 하기 단계들을 포함하는 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법을 제공한다: (a) (i) 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제1 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열을 갖는 제1 샘플 지표, 및 (iii) 무작위 서열을 결여하는 제2 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제2 샘플 지표를 포함하는, 복수 중 각 분자의 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 조합은 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 상이한 제1 라이브러리 분자는 상이한 k-량체 서열을 갖고, 상이한 삽입 서열을 갖는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계; (b)(i) 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제3 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열을 갖는 제3 샘플 지표, 및 (iii) 무작위 서열을 결여하는 제4 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제4 샘플 지표를 포함하는, 복수 중 각 분자의 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 제3 및 제4 범용 샘플 지표 서열의 조합은 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 상이한 제2 라이브러리 분자는 상이한 k-량체 서열을 갖고, 상이한 삽입 서열을 갖는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계; (c) 제1 및 제2 복수의 라이브러리 분자를 풀링하는 단계; (d) 풀링된 라이브러리 분자를 지지체 상에 분포시키고, 증폭 반응을 수행하여 지지체에 고정된(예를 들어, 무작위 또는 사전 결정된 위치에 고정된) 복수의 클론 증폭된 주형 분자를 생성하는 단계; (e) 상이한 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 검출 가능하게 표시된 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 제1 및 제3 샘플 지표의 k-량체 서열의 3주기의 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하는 단계로서,

뉴클레오타이드 시약은 각각 상이한 유형의 핵염기와 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함하되, 3주기의 시퀀싱은 고정된 증폭 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 검출 및 영상화하여, 복수의 고정된 주형 분자의 개개 주형 분자에서 k-량체 서열의 서열을 결정하고, A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 다양성은 복수의 고정된 증폭 주형 분자 중에서 제1, 제2 및 제3 시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화되는, 상기 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하는 단계; 및 (f) 단계 (e)에서 얻어진 영상을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계로서, 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않는, 상기 맵을 생성하는 단계.

[0282] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법에서, 단계 (e)의 균형 다양성은 제1, 제2 및 제3 시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75%이다.

[0283] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은: (a) 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (c) 제1 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 부여하여 주어진 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0284] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은: (a) 복수의 고정된 주형 분자의 제3 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 제4 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (c) 제2 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제3 및 제4 범용 샘플 지표 서열을 부여하여 주어진 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0285] 일부 양상에서, 본 개시내용은 하기 단계들을 포함하는 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법을 제공한다: (a) (i) 제1 샘플 공급원으로부터 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제1 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열을 갖는 제1 샘플 지표, 및 (iii) 무작위 서열을 결여하는 제2 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제2 샘플 지표를 포함하는, 복수 중 각 분자의 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열의 조합은 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 제1 범용 샘플 지표 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 상이한 제1 라이브러리 분자는 상이한 k-량체 서열을 갖고 상이한 삽입 서열을 갖는, 상기 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계; (b) (i) 제2 샘플 공급원으로부터 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제3 범용 샘플 지표 서열에 연결된 k-량체 서열을 갖는 제3 샘플 지표, 및 (iii) 무작위 서열을 결여하는 제4 범용 샘플 지표 서열을 갖는 제4 샘플 지표를 포함하는, 복수 중 각 분자의 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계로서, 제3 및 제4 범용 샘플 지표 서열의 조합은 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 제3 범용 샘플 지표 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 상이한 제2 라이브러리 분자는 상이한 k-량체 서열을 갖고, 상이한 삽입 서열을 갖는, 상기 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계; (c) 제1 및 제2 복수의 라이브러리 분자를 풀링하는 단계; (d) 풀링된 라이브러리 분자를 지지체 상에 분포시키고, 증폭 반응을 수행하여 지지체에 고정된(예를 들어, 무작위 또는 사전 결정된 위치에 고정된) 복수의 클론 증폭된 주형 분자를 생성하는 단계; (e) 상이한 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 복수의 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 제1 및 제3 샘플 지표의 k-량체 서열의 4주기의 중합효소-매개 시퀀싱 반응을 수행하고 제1 및 제3 범용 샘플 지표 서열의 첫 번째 염기 위치를 시퀀싱하는 단계로서, 뉴클레오타이드 시약은 각각 상이한 유형의 핵염기와 상응하는 상이한 검출 가능한 색 표지를 포함하되, 3주기의 시퀀싱은 고정된 증폭 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약으로부터 방출된 광학 색 신호를 검출 및 영상화하여, 복수의 고정된 주형 분자의 개개 주형 분자에서 k-량체 서열의 서열을 결정하고, A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 다양성은 복수의 고정된 증폭 주형 분자 중에서 제1, 제2, 제3 및 제4 시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화되는, 단계; 및 (f) 단계 (e)에서 얻어진 영상을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계로서, 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않는, 상기 맵을 생성하는 단계.

[0286] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법에서, 단계 (e)의 균형 다양성은 제1, 제2, 제3 및 제4 시퀀싱 주기 각각에서 검출 및 영상화된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75%이다.

[0287] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은: (a) 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 지표 서열의 남아있는 염기 위치를 시퀀싱하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플

플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (c) 제1 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 지표 서열을 부여하여 주어진 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0288] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 방법에서, 상기 방법은: (a) 복수의 고정된 주형 분자의 제3 범용 샘플 지표 서열의 남아있는 염기 위치를 시퀀싱하는 단계; (b) 복수의 고정된 주형 분자의 제4 범용 샘플 지표 서열을 시퀀싱하는 단계; (c) 제2 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 시퀀싱하는 단계; 및 (d) 단계 (c)에서 얻어진 주어진 주형 분자의 삽입 서열에 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제3 및 제4 범용 샘플 지표 서열을 부여하여 주어진 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0289] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재를 포함한다. 일부 양상에서, 지지체는 플로우 셀 채널, 플로우 셀 또는 모세관 내강 상에서 구성된다. 일부 양상에서, 지지체는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 1개의 친수성 중합체에 의해 부통대화된다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈)(PVP), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록실에틸 메타크릴레이트)(HEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분자를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함한다.

[0290] 일부 양상에서, 핵산을 다중플렉스 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열과 1개의 샘플 지표의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열의 1개의 복제물 및 1개의 샘플 지표의 1개의 복제물을 갖는 복수의 상이한 클러스터링된 주형 분자를 포함하되, 클러스터링된 주형 분자는 브리지 증폭을 통해 생성된다. 일부 양상에서, 지지체 상의 (예를 들어, 무작위 또는 사전 결정된 위치에 고정된) 고정된 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2 당 10^4 내지 10^8 이다. 일부 양상에서, 삽입 서열의 샘플 공급원은 게놈 DNA, 이중-가닥 cDNA 또는 무세포 순환 DNA이다.

[0291] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오타당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 연쇄 중결기를 갖는 오타당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 각각 포함하는 다가 분자를 포함하되, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.

[0292] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 단계 (e)에서 고정된 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 시퀀싱 프라이머에 혼성화된 개개 고정된 주형 분자를 포함하여 듀플렉스를 형성하고, 듀플렉스는 중합효소에 결합되어 복합체화된 중합효소를 형성하고, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합된다. 일부 양상에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드를 혼성화된 시퀀싱 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건하에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오타당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드를 혼성화된 시퀀싱 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건하에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 연쇄 중결기를 갖는 오타당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건하에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시

약에 결합되고, 조건은 뉴클레오타이드 혼입을 저해하는 데 적합하되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암, 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하는 다가 분자를 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.

[0293] 일부 양상에서, 핵산을 멀티플렉스 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 복수의 시퀀싱 프라이머에 혼성화된 고정된 콘카타머 분자를 포함하여 동일한 콘카타머 분자 상에 적어도 제1 및 제2 듀플렉스를 형성하되, 제1 및 듀플렉스는 제1 중합효소에 결합되고, 제2 듀플렉스는 제2 중합효소에 결합되어 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하고, 상기 방법은 (a) 복수의 다가 분자를 동일한 콘카타머 주형 분자 상의 제1 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계로서, 개개 다가 분자는 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암, 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하며, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되며, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착되고, 접촉시키는 단계는 복수로부터의 단일 다가 분자를 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건하에서 수행되고, 단일 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 혼성화된 제1 시퀀싱 프라이머를 포함하는 제1 복합체화된 중합효소에 결합되어 제1 결합 복합체를 형성하고, 단일 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 혼성화된 제2 시퀀싱 프라이머를 포함하는 제2 복합체화된 중합효소에 결합되어 제2 결합 복합체를 형성하고, 동일한 다가 분자에 결합된 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성하고, 접촉시키는 단계는 제1 및 제2 결합 복합체에서 결합된 제1 및 제2 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 저해하는 데 적합한 조건하에서 수행되는, 상기 접촉시키는 단계; (b) 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 제1 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 동일한 콘카타머 주형 분자 상에 제1 및 제2 결합 복합체를 형성하는 검출 가능하게 표지된 다가 분자로부터 방출된 광학 색 신호를 영상화하는 단계; 및 (d) 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 결정하고, 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0294] 예시적인 컴퓨터 시스템

[0295] 예를 들어, 하나 이상의 컴퓨터 시스템, 예컨대, 도 4에 나타난 컴퓨터 시스템(400)을 사용하여 다양한 양상이 구현될 수 있다. 하나 이상의 컴퓨터 시스템(400)은, 예를 들어, 본 명세서에서 논의되는 임의의 양상뿐만 아니라 이의 조합 및 하위 조합을 구현하기 위해 사용될 수 있다.

[0296] 컴퓨터 시스템(400)은 하나 이상의 프로세서(중앙 처리 장치 또는 CPU로도 불림), 예컨대, 프로세서(404)를 포함할 수 있다. 프로세서(404)는 버스 또는 통신 인프라(communication infrastructure)(406)에 연결될 수 있다.

[0297] 컴퓨터 시스템(400)은 또한 사용자 입력/출력 인터페이스(들)(402)를 통해 통신 인프라(406)와 통신할 수 있는 사용자 입력/출력 장치(들)(403), 예컨대, 모니터, 키보드, 포인팅 장치 등을 포함할 수 있다. 사용자 입력/출력 장치(403)는 도 1에서 사용자 인터페이스(124)에 커플링될 수 있다.

[0298] 프로세서(404) 중 하나 이상은 그래픽 처리 장치(GPU)일 수 있다. 양상에서, GPU는 수학적으로 집약적인 어플리케이션을 처리하도록 설계된 특수 전자 회로인 프로세서일 수 있다. GPU는, 예를 들어, 컴퓨터 그래픽 어플리케이션, 영상, 비디오, 벡터 처리, 어레이 처리 등에 공통적인 수학적으로 집약적인 데이터와 같은 대용량 데이터 블록의 병렬 처리에 효율적인 병렬 구조뿐만 아니라 암호학(브루트 포스 크래킹(brute-force cracking) 포함), 암호화 해시 또는 해시 시퀀스 생성, 부분적 해시-반전(hash-inversion) 문제의 해결, 및/또는 일부 블록체인-기반 어플리케이션에 대한 다른 작업 증명 계산 결과의 생성을 가질 수 있다. 그래픽 처리 장치에 대한 범용 컴퓨팅(general-purpose computing on graphics processing unit: GPGPU) 능력을 이용하여, GPU는 적어도 본 명세서에 기재된 영상 인식 및 기계 학습 양상에서 특히 유용할 수 있다.

[0299] 추가적으로, 프로세서(404) 중 하나 이상은 하드웨어-가속 암호처리 코프로세서(cryptographic coprocessor)를 포함하여, 암호처리 계산 또는 기타 특수 수학적 기능을 가속화하기 위한 코프로세서 또는 기타 논리 구현을 포함할 수 있다. 이러한 가속 프로세서는 이러한 가속을 촉진시키기 위해 코프로세서 및/또는 기타 로직을 사용하여 가속을 위한 명령 세트(들)를 더 포함할 수 있다.

- [0300] 컴퓨터 시스템(400)은 또한 주기억 장치 또는 1차 기억(408), 예컨대, 랜덤 액세스 메모리(random access memory: RAM)를 포함할 수 있다. 주기억 장치(408)는 하나 이상의 캐시 레벨을 포함할 수 있다. 주기억 장치(408)는 제어 로직(즉, 컴퓨터 소프트웨어) 및/또는 데이터가 저장되어 있을 수 있다.
- [0301] 컴퓨터 시스템(400)은 또한 하나 이상의 보조 저장 장치 또는 보조 기억 장치(410)를 포함할 수 있다. 보조 기억 장치(410)는, 예를 들어, 주기억 드라이브(412) 및/또는 제거 가능한 저장 장치 또는 드라이브(414)를 포함할 수 있다. 주기억 드라이브(412)는, 예를 들어, 하드 디스크 드라이브 또는 솔리드-스테이트 드라이브일 수 있다. 이동식 저장 드라이브(414)는 플로피 디스크 드라이브, 자기 테이프 드라이브, 콤팩트 디스크 드라이브, 광학 저장 장치, 테이프 백업 장치 및/또는 임의의 다른 저장 장치/드라이브일 수 있다.
- [0302] 이동식 저장 드라이브(414)는 이동식 저장 장치(418)와 상호작용할 수 있다.
- [0303] 이동식 저장 장치(418)는 컴퓨터 소프트웨어(제어 로직) 및/또는 데이터가 저장되어 있는 컴퓨터 사용 가능 또는 판독 가능 저장 장치를 포함할 수 있다. 이동식 저장 장치(418)는 플로피 디스크, 자기 테이프, 콤팩트 디스크, DVD, 광학 기억 디스크 및/또는 임의의 다른 컴퓨터 데이터 저장 장치일 수 있다. 이동식 저장 드라이브(414)는 이동식 저장 장치(418)로부터 읽고/읽거나 쓸 수 있다.
- [0304] 보조 기억 장치(410)는 컴퓨터 프로그램 및/또는 기타 명령 및/또는 데이터가 컴퓨터 시스템(400)에 의해 액세스될 수 있도록 하기 위한 기타 수단, 장치, 컴포넌트, 도구 또는 기타 접근 방식을 포함할 수 있다. 이러한 수단, 장치, 컴포넌트, 도구 또는 기타 접근은, 예를 들어, 이동식 저장 장치(422) 및 인터페이스(420)를 포함할 수 있다. 이동식 저장 장치(422) 및 인터페이스(420)의 예는 프로그램 카트리지 및 카트리지 인터페이스(예컨대, 비디오 게임 장치에서 발견된 것), 이동식 메모리 칩(예컨대, EPROM 또는 PROM) 및 관련 소켓, 메모리 스틱 및 USB 포트, 메모리 카드 및 관련 메모리 카드 슬롯 및/또는 임의의 다른 이동식 저장 장치 및 관련 인터페이스를 포함할 수 있다.
- [0305] 컴퓨터 시스템(400)은 통신 또는 네트워크 인터페이스(424)를 추가로 포함할 수 있다. 통신 인터페이스(424)는 컴퓨터 시스템(400)이 외부 장치, 외부 네트워크, 외부 엔터티 등의 임의의 조합(개개로 그리고 총괄적으로 참조 번호(428)로 언급됨)과 통신하고 상호작용하는 것을 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 통신 인터페이스(424)는 컴퓨터 시스템(400)이 유선 및/또는 무선(또는 이들의 조합)일 수 있고, LAN, WAN, 인터넷 등의 임의의 조합을 포함할 수 있는 통신 경로(426)를 거쳐 외부 또는 원거리 장치(428)와 통신하는 것을 가능하게 할 수 있다. 제어 논리 및/또는 데이터는 통신 경로(426)를 통해 컴퓨터 시스템(400)으로 그리고 컴퓨터 시스템에서 전송될 수 있다. 일부 양상에서, 통신 경로(426)는 도 1에 도시된 바와 같이 클라우드(130)에 연결된다. 참조 번호(428)로 지칭되는 외부 장치 등은 클라우드(130)의 장치, 네트워크, 엔터티 등일 수 있다.
- [0306] 컴퓨터 시스템(400)은 또한, 몇 가지 예를 들면, 개인 휴대정보 단말기(personal digital assistant: PDA), 데스크탑 워크스테이션, 랩톱 또는 노트북 컴퓨터, 넷북, 태블릿, 스마트폰, 스마트 워치 또는 기타 웨어러블, 기기, 사물 인터넷(IoT)의 일부 및/또는 임베디드 시스템 중 어느 것 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.
- [0307] 본 명세서에 기재된 프레임워크는 방법, 프로세스, 장치, 시스템, 또는 비-일시적 컴퓨터-판독 가능 매체 또는 장치와 같은 제조 물품으로서 구현될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 예시 목적을 위해, 본 프레임워크는 분산원장(distributed ledger)이 공개적으로 이용 가능하거나, 적어도 신뢰할 수 없는 제3자에게 이용 가능하다는 맥락에서 설명될 수 있다. 최신 사용 사례의 한 가지 예는 블록체인-기반 시스템이다. 그러나, 본 프레임워크는 민감하거나 기밀정보가 신뢰할 수 없는 제3자를 통과하거나 그의 손을 거칠 필요가 있을 수 있는 다른 환경에도 적용될 수 있다는 것과, 이 기술이 분산원장 또는 블록체인 사용에만 국한되지 않는다는 것을 인식해야 한다.
- [0308] 컴퓨터 시스템(400)은 원격 또는 분산 클라우드 컴퓨팅 솔루션; 로컬 또는 온-프레미스(on-premise) 소프트웨어(예를 들어, "온-프레미스" 클라우드-기반 솔루션); "서비스형" 모델(예를 들어, 서비스형 콘텐츠(CaaS), 디지털 서비스형 콘텐츠(DCaaS), 서비스형 소프트웨어(SaaS), 서비스형 관리 소프트웨어(MSaaS), 서비스형 플랫폼(PaaS), 서비스형 데스크탑(DaaS), 서비스형 프레임워크(FaaS), 서비스형 백엔드(BaaS), 모바일 백엔드 서비스형(MBaaS), 서비스형 인프라(IaaS), 서비스형 데이터베이스(DBaaS) 등); 및/또는 앞서 언급한 예 또는 다른 서비스 또는 전달 패러다임의 임의의 조합을 포함하는 하이브리드 모델을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 임의의 전달 패러다임을 통해 임의의 애플리케이션 및/또는 데이터에 액세스하거나 호스팅하는 클라이언트 또는 서버일 수 있습니다.
- [0309] 임의의 적용 가능한 데이터 구조, 파일 형식 및 스키마는 제이슨(JavaScript Object Notation: JSON), 확장성 마크업 언어(Extensible Markup Language: XML), 또 다른 마크업 언어(Yet Another Markup Language: YAML),

확장성 하이퍼텍스트 마크업 언어(Extensible Hypertext Markup Language: XHTML), 무선 마크업 언어(Wireless Markup Language: WML), MessagePack, XML 사용자 인터페이스 언어(User Interface Language: XUL), 또는 임의의 다른 기능적으로 유사한 표현을 단독으로 또는 조합하여 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 표준으로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 독점 데이터 구조, 형식 또는 스키마는 배타적으로 또는 알려진 또는 공개된 표준과 조합하여 사용될 수 있다.

[0310] 임의의 관련있는 데이터, 파일 및/또는 데이터베이스는 가능한 형식 중에서도 다양한 유형의 마크업 언어를 포함하여 숫자, 텍스트, 그래픽 또는 멀티미디어 형식과 같은 사람이 읽을 수 있는 형식으로 저장, 검색, 액세스 및/또는 전송될 수 있다. 대안적으로 또는 위의 형식과 조합하여, 데이터, 파일 및/또는 데이터베이스는 바이너리, 인코딩, 압축 및/또는 암호화된 형식 또는 임의의 다른 기계-판독 가능 형식으로 저장, 검색, 액세스 및/또는 전송될 수 있다.

[0311] 다양한 시스템 및 레이어 간의 인터페이싱 또는 상호 연결은 유사한 기능 및 결과를 달성할 수 있는 개방형 또는 독점적인 문서 객체 모델(Document Object Model: DOM), 디스커버리 서비스(Discovery Service: DS), NSUserDefaults, 웹 서비스 기술 언어(Web Services Description Language: WSDL), 메시지 교환 패턴(Message Exchange Pattern: MEP), 웹 분산 데이터 교환(Web Distributed Data Exchange: WDDX), 웹 하이퍼텍스트 응용 기술 작업 그룹(Web Hypertext Application Technology Working Group: WHATWG) HTML5 Web Messaging, 웹 표현상태 변경(Representational State Transfer: REST 또는 RESTful 웹 서비스), 확장 가능한 사용자 인터페이스 프로토콜(Extensible User Interface Protocol: XUP), 단순 객체 접근 프로토콜(SOAP), XML 스키마 정의(XML Schema Definition: XSD), XML 원격 프로시저 호출(XML Remote Procedure Call: XML-RPC) 또는 임의의 다른 메커니즘을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 다수의 메커니즘, 예컨대, 다수의 프로토콜, 프로그래밍 프레임워크, 플로우플랜 또는 어플리케이션 프로그래밍 인터페이스(application programming interface: API)를 사용할 수 있다.

[0312] 이러한 인터페이싱 또는 상호 연결은 또한 균일 자원 지시자(uniform resource locator: URL) 또는 균일 자원 명칭(uniform resource name: URN)을 추가로 포함할 수 있는 균일 자원 식별자(uniform resource identifier: URI)를 사용하게 할 수 있다. 다른 형태의 균일 및/또는 고유 식별자, 위치 지정자(locator) 또는 명칭은 배타적으로 또는 위에 제시한 것과 같은 형태와 조합하여 사용될 수 있다.

[0313] 임의의 위의 프로토콜 또는 API는 절차적, 기능적 또는 객체 지향적인 임의의 프로그래밍 언어와 인터페이스되거나 구현될 수 있으며, 컴파일되거나 또는 해석될 수 있다. 비제한적 예는 다수의 다른 비제한적 예 중에서도 Node.js, V8, Knockout, jQuery, Dojo, Dijit, OpenUI5, AngularJS, Expressjs, Backbone.js, Ember.js, DHTMLX, Vue, React, Electron 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 프레임워크, 런타임 환경, 가상 기계, 인터프리터, 스택, 엔진 또는 유사한 메커니즘의 임의의 종류에서 임의의 다른 라이브러리 또는 스키마와 함께 C, C++, C#, Objective-C, Java, Scala, Clojure, Elixir, Swift, Go, Perl, PHP, Python, Ruby, JavaScript, WebAssembly, 또는 사실상 다른 임의의 언어를 포함한다.

[0314] 일부 양상에서, 제어 논리(소프트웨어)가 저장된 유형의(tangible), 비-일시적 컴퓨터 사용 가능 또는 판독 가능 매체를 포함하는 유형, 비-일시적 장치 또는 물품은 본 명세서에서 컴퓨터 프로그램 제품 또는 프로그램 저장 장치로도 지칭될 수 있다. 이는 컴퓨터 시스템(400), 주기억장치(408), 보조 기억 장치(410) 및 이동식 저장 장치(418 및 422)뿐만 아니라 앞서 언급한 것의 임의의 조합을 구현하는 유형의 제조 물품을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 제어 논리는, 하나 이상의 데이터 처리 장치(예컨대, 컴퓨터 시스템(400))에 의해 실행될 때, 이러한 데이터 처리 장치가 본 명세서에 기재된 바와 같이 작동하게 할 수 있다.

[0315] 본 개시내용에 포함된 교시에 기반하여, 도 4에 나타난 것 이외의 데이터 처리 장치, 컴퓨터 시스템 및/또는 컴퓨터 아키텍처를 사용하여 본 개시내용의 양상을 만들고 사용하는 방법은 관련 기술(들) 분야의 당업자에게 자명할 것이다. 특히, 양상은 본 명세서에 기재된 것 이외의 소프트웨어, 하드웨어 및/또는 운영체제 구현에 의해 작동할 수 있다.

[0316] 도 1의 이미지(116)는 하나 이상의 광학 시스템을 포함할 수 있다. 형광 영상화-기반 계층 적용을 위해 개선된 광학 해상도 및 영상 품질을 제공하는 광학 시스템 설계 가이드라인 및 고성능 형광 영상화 방법 및 시스템이 본 명세서에 추가로 개시된다. 개시된 광학 영상화 시스템 설계는 더 큰 시계, 증가된 공간 해상도, 개선된 변조 전달, 콘트라스트 대 노이즈 비, 및 영상 품질, 더 높은 공간 샘플링 주파수, (예를 들어, 상이한 시계의) 일련의 영상을 포착하기 위해 샘플 평면을 재구성할 때 영상 포착 간의 더 빠른 전환, 및 개선된 영상화 시스템 듀티 사이클을 제공하고, 따라서, 더 높은 고속대량 영상 획득 및 분석을 가능하게 한다.

- [0317] 일부 예에서, 예를 들어, 양면(플로우 셀) 영상화 적용분야를 위한, 영상화 성능의 개선은 플로우 셀의 위쪽(근처)과 아래쪽(먼곳) 내부 표면을 분리시키는 유체의 층에 의해 유발된 광학 수차를 보상하기 위해 대물렌즈와 조합된 전기 광학 위상판을 사용함으로써 달성될 수 있다. 일부 예에서, 이런 설계 접근은 또한, 예를 들어, 플로우 셀의 어느 표면이 영상인지에 따라서 광학 경로 안쪽으로 이동하는 동작-작동 보상기(motion-actuated compensator)에 의해 도입된 진동을 보상할 수 있다.
- [0318] 일부 예에서, 예를 들어, 두꺼운 플로우 셀 벽(예를 들어, 벽(또는 커버슬립) 두께 $> 700\mu\text{m}$) 및 유체 채널(예를 들어, 50 내지 $200\mu\text{m}$ 의 유체 채널 높이 또는 두께)의 사용을 포함하는 양면(플로우 셀) 영상화 적용분야를 위한 영상화 성능의 개선은 대물렌즈와 조합하여 두꺼운 플로우 셀 벽 및/또는 개재 유체층에 의해 유도되는 광학 수차를 보정하는 튜브 렌즈 설계를 이용함으로써, 상업적으로 입수 가능한, 규격 대물렌즈를 이용할 때조차도 달성될 수 있다.
- [0319] 일부 예에서, 예를 들어, 다중 채널(예를 들어, 2-색 또는 4-색) 영상화 적용분야의 경우, 영상화 성능의 개선은 각 영상화 채널에 하나씩 여러 개의 튜브 렌즈를 사용함으로써 달성될 수 있으며, 여기서, 각 튜브 렌즈 설계는 해당 영상화 채널에서 사용되는 특정 파장 범위에 대해 최적화되었다.
- [0320] 본 명세서에 개시된 예시적인 양상은 형광 영상화 시스템을 포함할 수 있으며, 상기 시스템은 a) 하나 이상의 특정 파장 범위 내에서 여기 광을 제공하도록 구성된 적어도 하나의 광원; b) 여기 광에 샘플 평면의 노출 시 샘플 평면의 특정 시계 내에서 발생하는 형광을 수집하도록 구성된 대물렌즈로서, 대물렌즈의 개구수(numerical aperture)는 적어도 0.1, 적어도 0.2, 적어도 0.3, 적어도 0.4, 적어도 0.5, 적어도 0.6, 적어도 0.7, 적어도 0.8, 또는 적어도 0.9 또는 앞서 언급한 것 중 임의의 둘로 정해지는 범위에 속하는 개구수 값이고; 대물렌즈의 작동 거리는 적어도 $400\mu\text{m}$, 적어도 $500\mu\text{m}$, 적어도 $600\mu\text{m}$, 적어도 $700\mu\text{m}$, 적어도 $800\mu\text{m}$, 적어도 $900\mu\text{m}$, 적어도 $1000\mu\text{m}$, 또는 앞서 언급한 것 중 임의의 둘로 정해지는 범위에 속하는 작동 거리이며; 시계는 적어도 0.1mm^2 , 적어도 0.2mm^2 , 적어도 0.5mm^2 , 적어도 0.7mm^2 , 적어도 1mm^2 , 적어도 2mm^2 , 적어도 3mm^2 , 적어도 5mm^2 또는 적어도 10mm^2 의 면적, 또는 앞서 언급한 것 중 임의의 둘로 정해지는 범위에 속하는 시계를 갖는, 상기 대물렌즈; 그리고 c) 적어도 1개의 영상 센서로서, 대물렌즈에 의해 수집된 형광은 영상 센서에 영상화되고, 영상 센서에 대한 픽셀 치수는 형광 영상화 시스템에 대한 공간 샘플링 주파수가 형광 영상화 시스템의 광학 해상도의 적어도 2배가 되도록 선택되는, 상기 영상 센서를 포함한다.
- [0321] 일부 양상에서, 개구수는 적어도 0.75일 수 있다. 일부 양상에서, 개구수는 적어도 1.0이다. 일부 양상에서, 작동 거리는 적어도 $850\mu\text{m}$ 이다. 일부 양상에서, 작동 거리는 적어도 $1,000\mu\text{m}$ 이다. 일부 양상에서, 시계는 적어도 2.5mm^2 의 면적을 가질 수 있다. 일부 양상에서, 시계는 적어도 3mm^2 의 면적을 가질 수 있다. 일부 양상에서, 공간적 샘플링 주파수는 형광 영상화 시스템의 광학 해상도의 적어도 2.5배일 수 있다. 일부 양상에서, 공간적 샘플링 주파수는 형광 영상화 시스템의 광학 해상도의 적어도 3배일 수 있다. 일부 양상에서, 시스템이 자동 방식으로 일련의 둘 이상의 형광 영상을 획득하기 위해 구성되도록 시스템은 X-Y-Z 병진 스테이지를 추가로 포함할 수 있되, 각 영상은 상이한 시계에 대해 획득되거나 획득될 수 있다. 일부 양상에서, 샘플 평면의 위치는 상이한 시계에 대한 영상을 획득하는 사이에 대물렌즈 초점 평면의 위치와 매칭되도록 X 방향, Y 방향, 및 Z 방향에서 동시에 조절될 수 있다. 일부 양상에서, X 방향, Y 방향 및 Z 방향에서 동시 조절을 위해 필요한 시간은 0.3초 미만, 0.4초 미만, 0.5초 미만, 0.7초 미만 또는 1초 미만, 또는 앞서 언급한 것 중 임의의 둘로 정해지는 범위 내에 속하는 시간일 수 있다. 일부 양상에서, 시스템은, 오류 신호가 Z 방향에서 초점 평면과 샘플 평면의 위치 차이가 특정 오류 임계값보다 크다는 것을 나타내는 경우 상이한 시계의 영상을 획득하기 전에 초점 평면 위치를 조절하도록 구성된 자동 초점 메커니즘을 추가로 포함한다. 일부 양상에서, 특정 오류 임계값은 100nm 이상이다. 일부 양상에서, 특정 오류 임계값은 50nm 이하이다. 일부 양상에서, 시스템은 3개 이상의 영상 센서를 포함하되, 시스템은 상이한 영상 센서 상에 3개 이상의 파장 범위 각각에서 형광을 영상화하도록 구성된다. 일부 양상에서, 3개 이상의 영상 센서 및 샘플 평면 각각에 대한 초점 평면 위치의 차이는 100nm 미만이다. 일부 양상에서, 3개 이상의 영상 센서 및 샘플 평면 각각에 대한 초점 평면 위치의 차이는 50nm 미만이다. 일부 양상에서, 샘플 평면을 다시 위치시키고, 필요한 경우 초점을 조절하고, 영상을 획득하는 데 필요한 총 시간은 시계당 0.4초 미만이다. 일부 양상에서, 샘플 평면을 다시 위치시키고, 필요한 경우 초점을 조절하고, 영상을 획득하는 데 필요한 총 시간은 시계당 0.3초 미만이다.
- [0322] 또한 a) 플로우 셀 내에서 샘플 평면의 특정 시계 내에서 발생하는 형광을 수집하도록 구성된 대물렌즈; b) 대물렌즈와 적어도 1개의 영상 센서 사이에 위치된 적어도 1개의 튜브 렌즈로서, 적어도 1개의 튜브 렌즈는 대물렌즈, 적어도 1개의 튜브 렌즈 및 플로우 셀의 내부 표면을 영상화하는 경우 적어도 1개의 영상 센서의 조합에 대한 영상화 성능 척도를 보정하도록 구성되고, 플로우 셀은 벽 두께가 적어도 $700\mu\text{m}$ 이고, 상부 내부 표면과 하

부 내부 표면 사이의 갭이 적어도 $50\mu\text{m}$ 인, 상기 튜브 렌즈를 포함하는 플로우 셀의 양면 영상화를 위한 형광 영상화 시스템이 본 명세서에 개시되며; 영상화 성능 척도는 광학 보상기를 플로우 셀과 적어도 1개의 영상 센서 사이의 광학 경로 안팎으로 이동시키지 않고, 광학 경로를 따라서 튜브 렌즈의 하나 이상의 광학 요소를 이동시키지 않고, 그리고 튜브 렌즈의 하나 이상의 광학 요소를 광학 경로 안팎으로 이동시키지 않고 플로우 셀의 상부 내부 표면 또는 하부 내부 표면을 영상화하기 위해 실질적으로 동일하다.

[0323]

일부 양상에서, 대물렌즈는 상업적으로 입수 가능한 현미경 대물렌즈일 수 있다. 일부 양상에서, 상업적으로 입수 가능한 현미경 대물렌즈는 개구수가 적어도 0.3일 수 있다. 일부 양상에서, 대물렌즈는 작동 거리가 적어도 $700\mu\text{m}$ 일 수 있다. 일부 양상에서, 대물렌즈는 0.17mm 의 커버 슬립 두께(또는 플로우 셀 벽 두께) 또는 0.17mm 보다 크거나 더 작은 두께를 보상하도록 보정될 수 있다. 일부 양상에서, 광학 시스템은 커버 슬립 두께, 플로우 셀 두께, 또는 목적하는 초점 평면 사이의 거리를 보상하도록 보정될 수 있다. 일부 양상에서, 상기 보정은 광학 시스템의 광 경로에 렌즈 또는 광학 어셈블리와 같은 보정 광학 장치를 삽입함으로써 이루어질 수 있다. 일부 양상에서, 상기 보정은 광학 시스템의 광 경로에 렌즈 또는 광학 어셈블리와 같은 보정 광학 장치를 삽입하지 않고 이루어질 수 있다. 일부 양상에서, 형광 영상화 시스템은 대물렌즈에 인접하여 그리고 대물렌즈와 튜브 렌즈 사이에 위치한 전기광학 위상판을 더 포함할 수 있되, 전기광학 위상판은 플로우 셀의 상부 내부 표면과 하부 내부 표면 사이의 갭을 유체로 채움으로써 야기되는 광학 수차에 대한 보정을 제공할 수 있다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈는 3개 이상의 광학 컴포넌트를 포함하는 복합 렌즈일 수 있다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈는 위에 열거된 바와 같은 순서로 또는 임의의 교체 순서로 존재할 수 있는 제1 비대칭 볼록-볼록 렌즈, 제2 볼록-평면 렌즈, 제3 비대칭 오목-오목 렌즈 및 제4 비대칭 볼록-오목 렌즈 중 하나 이상을 포함할 수 있는 4개의 광학 성분을 포함하는 복합 렌즈이다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈는 대물렌즈, 적어도 1개의 튜브 렌즈 및 벽 두께가 적어도 1mm 인 플로우 셀의 내부 표면을 영상화하는 경우 적어도 1개의 영상 센서의 조합을 위해 영상화 성능 척도를 보정하도록 구성된다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈는 대물렌즈, 적어도 1개의 튜브 렌즈 및 갭이 적어도 $100\mu\text{m}$ 인 플로우 셀의 내부 표면을 영상화하는 경우 적어도 1개의 영상 센서의 조합을 위해 영상화 성능 척도를 보정하도록 구성된다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈는 대물렌즈, 적어도 1개의 튜브 렌즈 및 갭이 적어도 $200\mu\text{m}$ 인 플로우 셀의 내부 표면을 영상화하는 경우 적어도 1개의 영상 센서의 조합을 위해 영상화 성능 척도를 보정하도록 구성된다. 일부 양상에서, 시스템은 단일 대물렌즈, 2개의 튜브 렌즈 및 2개의 영상 센서를 포함하고, 2개의 튜브 렌즈 각각은 상이한 형광 파장에서 광학 영상화 성능을 제공하도록 설계된다. 일부 양상에서, 시스템은 단일 대물렌즈, 3개의 튜브 렌즈 및 3개의 영상 센서를 포함하고, 3개의 튜브 렌즈 각각은 상이한 형광 파장에서 광학 영상화 성능을 제공하도록 설계된다. 일부 양상에서, 시스템은 단일 대물렌즈, 4개의 튜브 렌즈 및 4개의 영상 센서를 포함하고, 4개의 튜브 렌즈 각각은 상이한 형광 파장에서 광학 영상화 성능을 제공하도록 설계된다. 일부 양상에서, 대물렌즈 또는 적어도 1개의 튜브 렌즈의 설계는 중간 내지 높은 공간 주파수 범위에서 변조 전달 함수를 최적화하도록 구성된다. 일부 양상에서, 영상화 성능 척도는 하나 이상의 특정 공간 주파수, 디포커스, 구면수차, 색 수차, 코마(coma), 난시, 상면 만곡, 영상 왜곡, 콘트라스트 대 노이즈 비(contrast-to-noise ratio: CNR) 또는 이들의 임의의 조합에서 변조 전달 함수(modulation transfer function: MTF)의 측정을 포함한다. 일부 양상에서, 플로우 셀의 상부 내부 표면 및 하부 내부 표면을 영상화하기 위한 영상화 성능 척도의 차이는 10% 미만이다. 일부 양상에서, 플로우 셀의 상부 내부 표면 및 하부 내부 표면을 영상화하기 위한 영상화 성능 척도의 차이는 5% 미만이다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈의 사용은 대물렌즈, 동작-작동 보상기 및 영상 센서를 포함하는 통상적인 시스템에 대한 것보다 양면 영상화에 대한 영상화 성능 척도에서 적어도 동일하거나 더 양호한 개선을 제공한다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 튜브 렌즈의 사용은 대물렌즈, 동작-작동 보상기 및 영상 센서를 포함하는 통상적인 시스템에 대한 것보다 양면 영상화에 대한 영상화 성능 척도의 적어도 10% 개선을 제공한다.

[0324]

영상화-기반 교체상 지노타이핑 및 시퀀싱 적용분야에서 사용하기 위한 조명 시스템이 본 명세서에 개시되며, 발광 시스템은 a) 광원; 및 b) 광원에 의해 방출되는 광을 보정하고 이를 테더링된 생물학적 거대분자를 포함하는 지지체 상의 지정된 조명 필드에 이를 전달하도록 구성된 액체 도광체를 포함한다.

[0325]

일부 양상에서, 조명 시스템은 콘덴서 렌즈를 더 포함한다. 일부 양상에서, 지정된 조명 필드는 적어도 2mm^2 의 면적을 갖는다. 일부 양상에서, 지정된 조명 필드에 전달된 광은 지지체 표면의 영상을 획득하는 데 사용되는 영상화 시스템에 대해 지정된 시계에 걸쳐 균일한 강도를 갖는다. 일부 양상에서, 지정된 시계는 적어도 2mm^2 의 면적을 갖는다. 일부 양상에서, 지정된 조명 필드에 전달된 광은 광 강도에 대한 변동 계수(CV)가 10% 미만일 때 지정 시계에 걸쳐 균일한 강도를 갖는다. 일부 양상에서, 지정된 조명 필드에 전달된 광은 광 강도에 대한 변동 계수(CV)가 5% 미만일 때 지정 시계에 걸쳐 균일한 강도를 갖는다. 일부 양상에서, 지정된 조명 필드에 전

달된 광은 0.1 미만의 스펙클 콘트라스트(speckle contrast) 값을 갖는다. 일부 양상에서, 지정된 조명 필드에 전달된 광은 0.05 미만의 스펙클 콘트라스트 값을 갖는다.

[0326] 영상화 모듈 및 시스템: 개시된 광학 시스템, 영상화 시스템 또는 모듈이, 일부 예에서, 샘플 또는 기재 표면을 영상화하기 위해 설계된 독립형 광학 시스템일 수 있다는 것은 당업자에 의해 이해될 것이다. 일부 예에서, 이들은 하나 이상의 프로세서 또는 컴퓨터를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 이들은 기기 제어 기능 및/또는 영상 처리 기능을 제공하는 하나 이상의 소프트웨어 패키지를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 광원(예를 들어, 고체 레이저, 색소 레이저, 다이오드 레이저, 아크등, 텅스텐-할로겐 램프 등), 렌즈, 프리즘, 거울, 다이크로익 반사경, 광학 필터, 광학 대역필터, 조리개 및 영상 센서(예를 들어, 상보성 금속 산화막 반도체(CMOS) 영상 센서 및 카메라, 전하 결합 소자(CCD) 영상 센서 및 카메라 등)와 같은 광학 부품에 추가로, 이들은 또한 기계적 및/또는 광역학적 부품, 예컨대, X-Y 병진 스테이지, X-Y-Z 병진 스테이지, 압전 포커싱 메커니즘 등을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 이들은 계층적 적용분야(예를 들어, 유전자 검사 및/또는 핵산 시퀀싱 적용분야)를 위해 설계된 더 큰 시스템의 모듈, 부품, 하위 어셈블리 또는 하위 시스템으로 기능할 수 있다. 예를 들어, 일부 예에서, 이들은 차광(light-tight) 및/또는 기타 환경 제어 하우징, 온도 제어 모듈, 유체 공학 제어 모듈, 유체 분배 로봇, 픽 앤 플레이스(pick-and-place) 로봇, 하나 이상의 프로세서 또는 컴퓨터, 하나 이상의 로컬 및/또는 클라우드-기반 소프트웨어 패키지(예를 들어, 기기/시스템 제어 소프트웨어 패키지, 영상 처리 소프트웨어 패키지, 데이터 분석 소프트웨어 패키지), 데이터 저장 모듈, 데이터 통신 모듈(예를 들어, 블루투스, WiFi, 인터넷, 인터넷 통신 하드웨어 및 관련 소프트웨어), 디스플레이 모듈 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함하는 더 큰 시스템의 모듈, 부품, 하위 어셈블리 또는 하위 시스템으로서 기능할 수 있다.

[0327] 시퀀싱 방법

[0328] 본 개시내용의 일부 양상은 고정 또는 비고정 주형 분자를 시퀀싱하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 시스템(100)에서, 예를 들어, 시퀀서(114)에서 작동될 수 있다. 일부 양상에서, 고정된 주형 분자는 관심 표적 서열의 1개의 복제물을 갖는 복수의 핵산 주형 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 관심 표적 서열의 1개 복제물을 갖는 핵산 주형 분자는 선형 라이브러리 분자를 사용하여 브리지 증폭을 수행함으로써 생성될 수 있다. 일부 양상에서, 고정된 주형 분자는 각각 관심 표적 서열(예를 들어, 콘카타머)의 2개 이상의 탠덤 복제물을 갖는 복수의 핵산 주형 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 콘카타머 분자를 포함하는 핵산 주형 분자는 원형화된 선형 라이브러리 분자의 회전된 증폭을 수행함으로써 생성될 수 있다. 일부 양상에서, 비고정 주형 분자는 원형 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은 지지체에 고정된 가용성(예를 들어, 비고정) 시퀀싱 중합효소 또는 시퀀싱 중합효소를 사용한다.

[0329] 일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 검출 가능하게 표지된 다가 분자에 결합하는 것, 및 뉴클레오타이드 유사체를 혼입시키는 것을 포함하는 2단계 시퀀싱 반응을 사용한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 비표지 뉴클레오타이드 유사체를 사용한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 반응은 포스포이트 사슬 표지된 뉴클레오타이드를 사용한다.

[0330] 일부 양상에서, 고정된 콘카타머는 각각 관심 서열(예를 들어, 삽입 영역) 및 임의의 어댑터 서열의 탠덤 반복 단위를 포함한다. 예를 들어, 탠덤 반복 단위는 (i) 제1 표면 프라이머(720)(예를 들어, 표면 피닝(pinning) 프라이머)에 대한 결합 서열을 갖는 좌측 범용 어댑터 서열, (ii) 제1 시퀀싱 프라이머(740)(예를 들어, 정방향 시퀀싱 프라이머)에 대한 결합 서열을 갖는 좌측 범용 어댑터 서열, (iii) 관심 서열(710), (iv) 제2 시퀀싱 프라이머(750)(예를 들어, 역방향 시퀀싱 프라이머)에 대한 결합 서열을 갖는 우측 범용 어댑터 서열, (v) 제2 표면 프라이머(730)(예를 들어, 표면 포착 프라이머)에 대한 결합 서열을 갖는 우측 범용 어댑터 서열, 및 (vii) 좌측 샘플 지표 서열(760) 및/또는 우측 샘플 지표 서열(770)을 포함한다. (ii) 일부 양상에서, 탠덤 반복 단위는 좌측 고유 식별 서열(780) 및/또는 우측 고유 식별 서열(790)을 더 포함한다. 일부 양상에서, 탠덤 반복 단위는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 적어도 하나의 결합 서열을 더 포함한다. 일부 양상에서, 도 6 및 도 7은 선형 라이브러리 분자 또는 콘카타머 분자의 단위를 나타낸다.

[0331] 고정된 콘카타머는 콤팩트한 핵산 나노볼로 자기-붕괴될 수 있다. RCA 반응 동안 1개 이상의 압축 올리고뉴클레오타이드의 포함은 나노볼의 크기 및/또는 형상을 추가로 압축시킬 수 있다. 주어진 콘카타머에서 탠덤 반복 단위 수의 증가는 중합효소-촉매 시퀀싱 반응에 대한 다중 개시 부위로서 작용하는 다중 시퀀싱 프라이머(예를 들어, 범용 서열을 갖는 시퀀싱 프라이머)에 혼성화하기 위해 콘카타머를 따라서 부위 수를 증가시킨다. 시퀀싱 반응이 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 검출 가능하게 표지된 다가 분자(예를 들어, 뉴클레오타이드 단위를 가짐)를 사용할 때, 콘카타머를 따라서 병행 시퀀싱에 참여하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드

드 단위에 의해 방출되는 신호는 각 콘카티머에 대해 증가된 신호 강도를 수득한다. 주어진 콘카티머의 다중 부분은 동시에 시퀀싱될 수 있다. 더 나아가, 복수의 결합 복합체는 특정 콘카티머 분자를 따라서 형성할 수 있고, 각 결합 복합체는 주형/프라이머 듀플렉스에 결합되고 다가 분자에 결합된 시퀀싱 중합효소를 포함하되, 복수의 결합 복합체는 해리 없이 안정하게 유지되어, 신호 강도를 증가시키고 영상화 시간을 감소시키는 증가된 지속 시간을 초래한다.

[0332] 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 시퀀싱 방법

[0333] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 기재된 임의의 고정된 주형 분자를 시퀀싱시키는 방법을 제공하며, 상기 방법은, 시퀀싱 중합효소를 (i) 핵산 주형 분자 및 (ii) 핵산 시퀀싱 프라이머에 접촉시키는 단계 (a)를 포함하되, 접촉시키는 단계는 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 주형 분자에 시퀀싱 중합효소를 결합하는 데 적합한 조건하에 수행되고, 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 주형 분자는 핵산 듀플렉스를 형성한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소는 뉴클레오타이드 유사체에 결합하고 혼입할 수 있는 재조합 돌연변이체 시퀀싱 중합효소를 포함한다.

[0334] 일부 양상에서, 시퀀싱 주형 분자에 대한 방법에서, 시퀀싱 프라이머는 3' 연장 가능한 단부 또는 3' 비-연장 가능한 단부를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 증폭된 주형 분자(예를 들어, 클론 증폭된 주형 분자)를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 관심 표적 서열의 1개의 복제물을 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 분자는 관심 표적 서열(예를 들어, 콘카타머)의 둘 이상의 탠덤 복제물을 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 관심의 동일한 표적 서열 또는 관심의 상이한 표적 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 프라이머는 용액 중에 있거나, 지지체에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자 및/또는 복수의 핵산 프라이머가 지지체에 고정될 때, 제1 시퀀싱 중합효소와의 결합은 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소를 생성한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자 및/또는 핵산 프라이머는 지지체 상에서 102 내지 1015개의 상이한 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자 및 핵산 프라이머와 복수의 제1 시퀀싱 중합효소의 결합은 지지체 상에서 102 내지 1015개의 상이한 부위에 고정된 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 생성한다. 일부 양상에서, 지지체 상에서 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소는 지지체 상에서 사전 결정된 또는 무작위 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소는 지지체 상에 시약(예를 들어, 시퀀싱 중합효소, 다가 분자, 뉴클레오타이드 및/또는 2가 양이온을 포함하는 효소) 용액이 흐르도록 서로 유체 연통하고, 따라서, 지지체 상에서 복수의 고정된 복합체화된 중합효소는 대규모 병렬 방식으로 시약 용액과 반응된다.

[0335] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 핵산 듀플렉스에 결합되는 시퀀싱 중합효소에 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 결합하는 데 적합하고 하나의 뉴클레오타이드에 의해 시퀀싱 프라이머를 연장시키는 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입에 적합한 조건하에 시퀀싱 중합효소를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계 (b)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소는 마그네슘 및/또는 망간을 포함하는 적어도 하나의 촉매 양이온의 존재하에 복수의 뉴클레오타이드와 접촉된다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 당 2' 또는 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티를 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 연쇄 종결 모이어티를 OH 또는 H 기로 전환시키기 위해 당 2' 또는 3' 위치에서 제거될 수 있다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 연쇄 종결 모이어티를 결여하는 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 신호를 방출하는 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)로 표지된다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 형광단은 핵-염기에 부착된다. 일부 양상에서, 형광단은 염기로부터 절단 가능/제거 가능한 링커에 의해 핵-염기에 부착된다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지되지 않는다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 핵-염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다. 혼입된 연쇄 종결 뉴클레오타이드가 검출 가능하게 표지된 경우, 단계 (b)는 혼입된 연쇄 종결 뉴클레오타이드로부터 방출된 신호를 검출하는 것을 더 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (b)는 혼입된 연쇄 종결 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 것을 더 포함한다.

[0336] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 혼입된 연쇄 종결 뉴클레오타이드로부터 연쇄 종결 모이어티를 제거하여 연장 가능한 3'OH 기를 생성하는 단계 (c)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (c)는 혼입된 연쇄 종결 뉴클레오타이드로부터 검출 가능한 표지를 제거하는 것을 더 포함한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소는 하나의 핵염기에 의해 연장된 시퀀싱 프라이머에 혼성화된 주형 분자에 결합된 채로 남아있다.

- [0337] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 단계 (b) 및 (c)를 적어도 1회 반복하는 단계 (d)를 더 포함한다.
- [0338] 핵산 시퀀싱을 위한 2단계 방법
- [0339] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 기재된 임의의 고정된 주형 분자를 시퀀싱하기 위한 2단계 방법을 제공한다. 일부 양상에서, 제1 단계는 일반적으로 다가 분자를 복합체화된 중합효소에 결합시켜 다가-복합체화된 중합효소를 형성하는 것, 및 다가-복합체화된 중합효소를 검출하는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 제1 단계는, 복수의 제1 시퀀싱 중합효소를 (i) 복수의 핵산 주형 분자 및 (ii) 복수의 핵산 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계 (a)를 포함하되, 상기 접촉시키는 단계는 복수의 제1 시퀀싱 중합효소를 복수의 핵산 주형 분자 및 복수의 핵산 프라이머에 결합시키는 데 적합한 조건하에 수행되어, 핵산 듀플렉스에 결합된 제1 시퀀싱 중합효소를 각각 포함하는 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 형성하고, 핵산 듀플렉스는 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 주형 분자를 포함한다. 일부 양상에서, 제1 중합효소는 재조합 돌연변이체 시퀀싱 중합효소를 포함한다.
- [0340] 일부 양상에서, 주형 분자의 시퀀싱을 위한 방법에서, 시퀀싱 프라이머는 3' 연장 가능한 단부 또는 3' 비-연장 가능한 단부를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 증폭된 주형 분자(예를 들어, 클론 증폭된 주형 분자)를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자는 관심 표적 서열의 1개의 복제물을 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 분자는 관심 표적 서열(예를 들어, 콘카타머)의 둘 이상의 탠덤 복제물을 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자의 핵산 주형 분자는 관심의 동일한 표적 서열 또는 관심의 상이한 표적 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자 및/또는 복수의 핵산 프라이머는 용액 중이거나, 지지체에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자 및/또는 복수의 핵산 프라이머가 지지체에 고정될 때, 제1 시퀀싱 중합효소와의 결합은 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소를 생성한다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형 분자 및/또는 핵산 프라이머는 지지체 상에서 102 내지 1015개의 상이한 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 주형 분자 및 핵산 프라이머와 복수의 제1 시퀀싱 중합효소의 결합은 지지체 상에서 102 내지 1015개의 상이한 부위에 고정된 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 생성한다. 일부 양상에서, 지지체 상에서 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소는 지지체 상에서 사전 결정된 또는 무작위 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소는 지지체 상에 시약(예를 들어, 시퀀싱 중합효소, 다가 분자, 뉴클레오타이드 및/또는 2가 양이온을 포함하는 효소) 용액이 흐르도록 서로 유체 연통하고, 따라서, 지지체 상에서 복수의 고정된 복합체화된 중합효소는 대규모 병렬 방식으로 시약 용액과 반응된다.
- [0341] 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은, 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 복수의 다가 분자와 접촉시켜 복수의 다가-복합체화된 중합효소(예를 들어, 결합 복합체)를 형성하는 단계 (b)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 다가 분자에서 개개 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 각각의 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드(예를 들어, 뉴클레오타이드 단위)에 부착된다(예를 들어, 도 9 내지 도 13). 일부 양상에서, 단계 (b)의 접촉시키는 단계는 복수의 제1 복합체화된 중합효소 중 적어도 둘에 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드를 결합시켜 복수의 다가-복합체화된 중합효소를 형성하는 데 적합한 조건하에 수행된다. 일부 양상에서, 조건은 복수의 다가-복합체화된 중합효소의 프라이머에 상보적 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 저해하는 데 적합하다. 일부 실시형태에서, 복수의 다가 분자는 뉴클레오타이드 유사체(예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체 단위)에 각각 부착된 다중 뉴클레오타이드 아암(예를 들어, 도 9 내지 도 12)을 갖는 적어도 1개의 다가 분자를 포함하며, 여기서, 뉴클레오타이드 유사체는 당 2' 및/또는 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 다가 분자는 연쇄 종결 모이어티를 결여하는 뉴클레오타이드 단위와 각각 부착된 다중 뉴클레오타이드 아암을 포함하는 적어도 1개의 다가 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 다가 분자에서 다가 분자 중 적어도 1개는 신호를 방출하는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다. 일부 양상에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, (b)의 접촉시키는 단계는 스트론튬, 바륨 및/또는 칼슘을 포함하는 적어도 하나의 비촉매 양이온의 존재하에 수행된다.
- [0342] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 복수의 다가-복합체화된 중합효소를 검출하는 단계 (c)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 검출하는 단계는 복합체화된 중합효소에 결합된 다가 분자에 의해 방출되는 신호를 검출하는 것을 포함하며, 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 단위는 프라이머에 결합되지만, 상보적 뉴클레오타이드 단위의 혼입은 저해된다. 일부 양상에서, 다가 분자는 검출을 가능하게 하도록 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다. 일부 양상에서, 표지된 다가 분자는 다가 분자의 코어, 링커 및/또는 뉴클레오타이드 단위에 부착된 형광단을 포함한다.
- [0343] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 복수의 제1 복합체화된 중합효소에 결합된 상보적 뉴클레오타이드 단위

의 핵염기를 식별하여, 주형 분자의 서열을 결정하는 단계 (d)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 다가 분자는 복수의 제1 복합체화된 중합효소에 결합된 상보적 뉴클레오타이드 단위(예를 들어, 뉴클레오타이드 염기 아데닌, 구아닌, 사이토신, 티민 또는 유라실)의 식별을 가능하게 하도록 뉴클레오타이드 아암에 부착된 특정 뉴클레오타이드 단위에 상응하는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시된다.

[0344] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 복수의 다가-복합체화된 중합효소를 해리시키고 복수의 제1 시퀀싱 중합효소 및 이들의 결합된 다가 분자를 제거하고, 복수의 핵산 듀플렉스를 유지하는 단계 (e)를 더 포함한다.

[0345] 일부 양상에서, 2단계 시퀀싱 방법의 2단계는 일반적으로 뉴클레오타이드 혼입을 포함한다. 일부 양상에서, 상기 방법은 시퀀싱을 위한 방법은, 단계 (e)의 복수의 유지된 핵산 듀플렉스를 복수의 제2 시퀀싱 중합효소와 접촉시키는 단계로서, 접촉시키는 단계는 복수의 제2 시퀀싱 중합효소를 복수의 유지된 핵산 듀플렉스에 결합시켜, 유지된 핵산 듀플렉스에 결합된 제2 시퀀싱 중합효소를 각각 포함하는 복수의 제2 복합체화된 중합효소를 형성하는 데 적합한 조건하에 수행되는, 상기 접촉시키는 단계 (f)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 제2 시퀀싱 중합효소는 재조합 돌연변이체 시퀀싱 중합효소를 포함한다.

[0346] 일부 양상에서, 단계 (a)의 복수의 제1 시퀀싱 중합효소는 단계 (f)의 복수의 제2 시퀀싱 중합효소의 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 양상에서, 단계 (a)의 복수의 제1 시퀀싱 중합효소는 단계 (f)의 복수의 제2 시퀀싱 중합효소의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0347] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 복수의 제2 복합체화된 중합효소를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계 (g)를 더 포함하되, 접촉시키는 단계는 복수의 뉴클레오타이드로부터의 상보적 뉴클레오타이드를 제2 복합체화된 중합효소 중 적어도 2개에 결합시켜 복수의 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소를 형성하는 데 적합한 조건하에 수행된다. 일부 양상에서, (g)의 접촉시키는 단계는 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 프라이머에 결합된 상보적 뉴클레오타이드의 중합효소-촉매된 혼입을 촉진시키는 데 적합한 조건하에 수행되어, 하나의 핵염기에 의해 시퀀싱 프라이머를 연장시킨다. 일부 양상에서, 단계 (g)에서 시퀀싱 프라이머의 3' 단부에 뉴클레오타이드의 혼입은 프라이머 연장 반응을 포함한다. 일부 양상에서, (g)의 접촉시키는 단계는 마그네슘 및/또는 망간을 포함하는 적어도 하나의 촉매 양이온의 존재하에 수행된다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드(예를 들어, 비유사체 뉴클레오타이드) 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 제거 가능한 또는 제거 가능하지 않은 2' 및/또는 3' 연쇄 종결 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시되지 않는다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 비표지이다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 양상에서, 형광단은 염기로부터 절단 가능/제거 가능한 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착되거나, 염기로부터 제거되지 않는다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0348] 일부 양상에서, 단계 (g)에서 복수의 뉴클레오타이드가 검출 가능하게 표시될 때, 시퀀싱을 위한 방법은, 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 프라이머에 혼입된 상보적 뉴클레오타이드를 검출하는 단계 (h)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출을 가능하게 하도록 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시된다. 일부 양상에서, 단계 (g)에서 복수의 뉴클레오타이드가 비표지될 때, 단계 (h)의 검출하는 단계는 생략된다.

[0349] 일부 양상에서, 단계 (g)에서 복수의 뉴클레오타이드가 검출 가능하게 표시될 때, 시퀀싱을 위한 방법은 단계 (i) 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 프라이머에 혼입된 상보적 뉴클레오타이드의 염기를 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (i)에서 혼입된 상보적 뉴클레오타이드의 식별은 단계 (d)에서 복수의 제1 복합체화된 중합효소에 결합된 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드의 동일성을 식별하기 위해 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 단계 (i)를 식별하는 단계는 핵산 주형 분자의 서열을 결정하는 데 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 단계 (g)에서 복수의 뉴클레오타이드가 비표지될 때, 단계 (i)의 식별하는 단계는 생략된다.

[0350] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 단계 (g)가 2' 및/또는 3' 연쇄 종결 모이어티를 갖는 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드와 복수의 제2 복합체화된 중합효소를 접촉시킴으로써 수행될 때 혼입된 뉴클레오타이드로부터 연쇄 종결 모이어티를 제거하는 단계 (j)를 더 포함한다.

- [0351] 일부 양상에서, 시퀀싱을 위한 방법은, 단계 (a) 내지 (j)를 적어도 1회 반복하는 단계 (k)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 핵산 주형 분자의 서열은 시퀀싱 중합효소에 결합하지만 단계 (c) 및 (d)의 프라이머의 3' 단부에 혼입되지 않는 다가 분자를 검출하고 식별하는 것에 의해 결정될 수 있다. 일부 양상에서, 핵산 주형 분자의 서열은 단계 (h) 및 (i)에서 프라이머의 3' 단부에 혼입되는 뉴클레오타이드를 검출하고 식별함으로써 결정(또는 확인)될 수 있다.
- [0352] 일부 양상에서, 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 제1 복합체화된 중합효소와 복수의 다가 분자의 결합은 적어도 하나의 결합활성 복합체를 형성하고, 상기 방법은 (a) 제1 핵산 프라이머, 제1 시퀀싱 중합효소 및 제1 다가 분자를 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 결합시켜 제1 결합 복합체를 형성하는 단계로서, 제1 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 제1 시퀀싱 중합효소에 결합하는, 상기 결합 복합체를 형성하는 단계; 및 (b) 제2 핵산 프라이머, 제2 시퀀싱 중합효소 및 제1 다가 분자를 동일한 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 결합시켜 제2 결합 복합체를 형성하는 단계로서, 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 제2 시퀀싱 중합효소에 결합하고, 동일한 다가 분자를 포함하는 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성하는, 상기 결합 복합체를 형성하는 단계를 포함한다. 일부 양상에서, 제1 시퀀싱 중합효소는 임의의 야생형 또는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 중합효소를 포함한다. 일부 양상에서, 제2 시퀀싱 중합효소는 임의의 야생형 또는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 중합효소를 포함한다. 콘카타머 주형 분자는 관심 서열 및 적어도 1개의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위의 탠덤 반복부 서열을 포함한다. 제1 및 제2 핵산 프라이머는 콘카타머 주형 분자를 따라서 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 예시적인 다가 분자는 도 9 내지 도 12에 나타낸다.
- [0353] 일부 양상에서, 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 상기 방법은 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 복수의 다가 분자와 결합시켜 적어도 하나의 결합활성 복합체를 형성하고, 상기 방법은, (a) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 복수의 핵산 프라이머를 콘카타머 핵산 콘카타머 분자의 상이한 부분과 접촉시켜 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 적어도 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계; (b) 복수로부터의 단일 다가 분자를 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건하에 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 복수의 다가 분자를 적어도 제1 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계로서, 단일 다가 분자의 적어도 제1 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 혼성화된 제1 시퀀싱 프라이머를 포함하는 제1 복합체화된 중합효소에 결합되어 제1 결합 복합체(예를 들어, 제1 삼원 복합체)를 형성하고, 단일 다가 분자의 적어도 제2 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 혼성화된 제2 프라이머를 포함하는 제2 복합체화된 중합효소에 결합되어 제2 결합 복합체(예를 들어, 제2 삼원 복합체)를 형성하며, 접촉시키는 단계는 제1 및 제2 결합 복합체에서 결합된 제1 및 제2 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 저해하는 데 적합한 조건하에 수행되고, 동일한 다가 분자에 결합된 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성하는, 상기 접촉시키는 단계; (c) 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 제1 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계, 및 (d) 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 결정하고, 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 양상에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 임의의 야생형 또는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 시퀀싱 중합효소를 포함한다. 콘카타머 주형 분자는 관심 서열 및 적어도 1개의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위의 탠덤 반복부 서열을 포함한다. 복수의 핵산 프라이머는 콘카타머 주형 분자를 따라서 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 예시적인 다가 분자는 도 10 내지 도 13에 나타낸다.
- [0354] 결합에 의한 시퀀싱
- [0355] 본 개시내용의 일부 양상은 본 명세서에 기재된 임의의 고정된 주형 분자를 시퀀싱하기 위한 방법을 제공하되, 시퀀싱 방법은 비표지 연쇄-종결 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 시퀀싱(SBB) 절차를 포함한다. 일부 양상에서, 결합에 의한 시퀀싱(SBB) 방법은 (a) 삼원 복합체 안정화 조건하에 프라이밍된 주형 핵산을 적어도 2개의 별개의 혼합물과 순차적으로 접촉시키는 단계로서, 적어도 2개의 별개 혼합물은 각각 중합효소 및 뉴클레오타이드를 포함하고, 순차적으로 접촉시키는 것은 삼원 복합체 안정화 조건하에 주형에서 제1, 제2 및 제3 염기 유형에 대한 뉴클레오타이드 동족과 접촉 중인 프라이밍된 주형 핵산을 생성하는, 상기 접촉시키는 단계; (b) 삼원 복합체가 형성되는지의 여부를 결정하기 위해 적어도 2개의 별개의 혼합물을 시험하는 단계; 및 (c) 프라이밍된 주형 핵산 분자에 대한 다음의 정확한 뉴클레오타이드를 식별하는 단계로서, 삼원 복합체가 단계 (b)에서 검출되는 경우 다음의 정확한 뉴클레오타이드는 제1, 제2 및 제3 염기 유형의 동족으로서 식별되고, 다음의 정확한 뉴클레오타이드는 단계 (b)에서 삼원 복합체의 부재에 기반하여 제4 염기 유형의 뉴클레오타이드 동족인 것으로 여겨지는, 상기 식별하는 단계; (d) 단계 (b) 후에 프라이밍된 주형 핵산의 프라이머에 다음의 정확한 뉴클레오타이드를 더하여, 연장된 프라이머를 생성하는 단계; 및 (e) 연장된 프라이머를 포함하는 프라

이밍된 주형 핵산에 단계 (a) 내지 (d)를 적어도 1회 반복하는 단계를 더 포함한다. 예시적인 결합에 의한 시퀀싱 방법은 미국 특허 출원 제10,246,744호 및 제10,731,141호에 기재되어 있다(특허 둘 다의 내용은 이들의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 인용됨).

[0356] 포스페이트-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 시퀀싱 방법

[0357] 본 개시내용의 일부 양상은 비고정 주형 분자에 결합하는 비고정 시퀀싱 중합효소를 사용하여 시퀀싱하는 방법을 제공하며, 시퀀싱 반응은 포스페이트-사슬 표지된 뉴클레오타이드에 의해 수행된다. 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은 단계 (a): 복수의 시퀀싱 중합효소가 고정된 지지체를 제공하는 단계를 포함한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소는 진행성 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소는 야생형 또는, 예를 들어, Phi29 DNA 중합효소를 포함하는, 돌연변이체 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 양상에서, 지지체는 복수의 별개의 구획을 포함하고, 시퀀싱 중합효소는 구획 바닥에 고정된다. 일부 양상에서, 별개의 구획은 광이 투과할 수 있는 실리카 바닥을 포함한다. 일부 양상에서, 별개의 구획은 필름(예를 들어, 알루미늄 클래딩 필름)에 홀(hole)을 포함하는 나노광자 가둠 구조(nanophotonic confinement structure)로 구성된 실리카 바닥을 포함한다. 일부 양상에서, 금속 클래딩의 홀은 작은 조리개, 예를 들어, 대략 70nm를 갖는다. 일부 양상에서, 나노광자 가둠 구조의 높이는 대략 100nm이다. 일부 양상에서, 나노광자 가둠 구조는 제로 모드 도파관(zero mode waveguide: ZMW)을 포함한다. 일부 양상에서, 나노광자 가둠 구조는 액체를 함유한다.

[0358] 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은, 개개 고정된 시퀀싱 중합효소가 단일 가닥 환형 주형 분자에 결합하기에 적합하고, 개개 시퀀싱 프라이머가 개개 단일 가닥 환형 주형 분자에 혼성화하기에 적합한 조건하에 복수의 고정된 시퀀싱 중합효소를 복수의 단일 가닥 환형 핵산 주형 분자 및 복수의 올리고뉴클레오타이드 시퀀싱 프라이머와 접촉시켜, 복수의 중합효소/주형/프라이머 복합체를 생성하는 단계 (b)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 개개 시퀀싱 프라이머는 단일 가닥 원형 주형 분자 상의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 혼성화한다.

[0359] 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은, 복수의 중합효소/주형/프라이머 복합체를 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스), 및 3 내지 20개의 포스페이트기를 포함하는 포스페이트 사슬을 각각 포함하는 복수의 포스페이트 사슬 표지 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계 (c)를 더 포함하고, 말단의 포스페이트기는 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)에 연결된다. 제1, 제2 및 제3 포스페이트기는 알파, 베타 및 감마 포스페이트기로도 지칭될 수 있다. 일부 양상에서, 말단의 포스페이트기에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 핵-염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다. 일부 양상에서, 복수의 중합효소/주형/프라이머 복합체는 중합효소-축매된 뉴클레오타이드 혼입에 적합한 조건하에 복수의 포스페이트 사슬 표지된 뉴클레오타이드와 접촉된다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소는 상보적 포스페이트 사슬 표지된 뉴클레오타이드에 결합하고 주형 분자에서 뉴클레오타이드에 마주보는 상보적 뉴클레오타이드를 혼입할 수 있다. 일부 양상에서, 중합효소-축매된 뉴클레오타이드 혼입 반응은 알파와 베타 포스페이트기 사이를 절단하여, 형광단에 연결된 다중-포스페이트 사슬을 방출한다.

[0360] 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은, 시퀀싱 중합효소에 의해 결합되고, 시퀀싱 프라이머의 말단 단부에 혼입된 포스페이트기 사슬 표지된 뉴클레오타이드에 의해 방출된 형광 신호를 검출하는 단계 (d)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 단계 (d)는 시퀀싱 중합효소에 의해 결합되고, 시퀀싱 프라이머의 말단 단부에 혼입된 포스페이트기 사슬 표지된 뉴클레오타이드를 식별하는 것을 더 포함한다.

[0361] 일부 양상에서, 시퀀싱 방법은, 단계 (c) 내지 (d)를 적어도 1회 반복하는 단계 (d)를 더 포함한다. 일부 양상에서, 포스페이트기 사슬 표지된 뉴클레오타이드를 사용하는 시퀀싱 방법은 미국 특허 제7,170,050호; 제7,302,146호; 및/또는 제7,405,281호에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0362] 시퀀싱 중합효소

[0363] 본 개시내용의 일부 양상은 핵산 분자를 시퀀싱하는 방법을 제공하며, 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법은 시퀀싱 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 유형을 사용하거나, 시퀀싱 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 및 복수의 다가 분자 중 적어도 하나의 유형을 사용한다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소(들)는 주형 분자에서 뉴클레오타이드에 마주보는 상보적 뉴클레오타이드에 혼입할 수 있다. 일부 양상에서, 시퀀싱 중합효소(들)는 주형 분자에서 뉴클레오타이드에 마주보는 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 단위에 결합할 수 있다. 일부 양상에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 재조합 돌연변이체 중합효소를 포함한다.

[0364] 뉴클레오타이드 및/또는 다가 분자를 이용하는 시퀀싱에서 사용하기 위한 적합한 중합효소의 예는 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 클레나우(Klenow) DNA 중합효소; 더무스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)

DNA 중합효소 I(Taq 중합효소); KlenTaq 중합효소; 캔디다투스 알티아르케알레스(*Candidatus altiarthaeales*) 고세균; 캔디다투스 하다르카움 옐로스토넨스(*Candidatus Hadarchaeum Yellowstonense*); 하데스아르케아(*Hadesarchaea*) 고세균; 유리카르케오타(*Euryarchaeota*) 고세균; 테르모플라스마타(*Thermoplasmata*) 고세균; 써모코커스(*Thermococcus*) 중합효소, 예컨대, 써모코커스 리토랄리스(*Thermococcus litoralis*), 박테리오파지 T7 DNA 중합효소; 인간 알파, 델타 및 엡실론 DNA 중합효소; 박테리오파지 중합효소, 예컨대, T4, RB69 및 phi29 박테리오파지 DNA 중합효소; 파이로코커스 퓨리오서스(*Pyrococcus furiosus*) DNA 중합효소(Pfu 중합효소); 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) DNA 중합효소 III; 이콜라이 DNA 중합효소 III 알파 및 엡실론; 9° N 중합효소; 역전사효소, 예컨대, HIV 타입 M 또는 O 역전사효소; 조류 골수아세포종 바이러스 역전사효소; 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney Murine Leukemia Virus: MMLV) 역전사효소; 또는 텔로머라제. DNA 중합효소의 추가적인 비제한적 예는 다양한 고세균 속, 예컨대, 에로피룸(*Aeropyrum*), 아카에글로부스(*Archaeoglobus*), 데선풀로코커스(*Desulfurococcus*), 파이로바쿨룸(*Pyrobaculum*), 파이로코커스(*Pyrococcus*), 파이로로부스(*Pyrolobus*), 피로딕티움(*Pyrodictium*), 스태필로써무스(*Staphylothermus*), 스테테리아, 설펠로부스(*Sulfolobus*), 써모코커스 및 볼카니사에타 등 또는 이들의 변이체로부터의 중합효소를 포함하며, 9° N, VENT, DEEP VENT, THERMINATOR, Pfu, KOD, Pfx, Tgo 및 RB69 중합효소와 같은 당업계에서 알려진 것과 같은 중합효소를 포함한다.

[0365] 뉴클레오타이드

[0366] 본 개시내용의 일부 양상은 핵산 분자를 시퀀싱하는 방법을 제공하며, 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 사용한다. 뉴클레오타이드는 염기, 당 및 적어도 1개의 포스페이트기를 포함한다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 방향족 염기, 오타당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스), 및 1개 이상의 포스페이트기(예를 들어, 1 내지 10개의 포스페이트기)를 포함한다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1가지 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 2가지 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물에 포함될 수 있다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체가 아니다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

[0367] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 1, 2 또는 3개의 인 원자의 사슬을 포함하며, 사슬은 전형적으로 에스터 또는 포스포르아마이드 연결을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되는 인 사슬을 갖는 유사체이다. 일부 양상에서, 사슬의 인 원자는 O, S 또는 BH₃를 포함하는 치환된 측기를 포함한다. 일부 양상에서, 사슬은 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포르다이트오에이트 및 O-메틸포스포르아미다이트기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트기를 포함한다.

[0368] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 갖는 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 초기 가닥에서 후속 뉴클레오타이드 단위 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소-촉매된 혼입을 저해할 수 있다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 3' 당 위치에 부착되고, 당은 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장 가능한 3'OH 당기를 갖는 뉴클레오타이드를 생성하는 3' 당 위치로부터 제거 가능/절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 알킬기, 알켄일기, 알킨일기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아자이드기, 아민기, 아마이드기, 케토기, 아이소사이아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 다이설파이드기, 카보네이트기, 유레아기, 실릴 또는 아세탈기를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는, 예를 들어, 연쇄 종결 모이어티를 화학 제제, pH 변화, 광 또는 열과 반응시킴으로써, 뉴클레오타이드로부터 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴은 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh₃)₄)에 의해, 피페리딘에 의해, 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H₂ Pd/C에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 아민, 아마이드, 케토, 아이소사이아네이트, 포스페이트, 티오, 다이설파이드는 포스핀에 의해 또는 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오텐트리톨(DTT)을 포함하는 티올기에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중 탄산칼륨(K₂CO₃)에

의해, 피리딘 중 트라이에틸아민에 의해, 또는 아세트산(AcOH) 중 Zn에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 상기 연쇄 종결 모이어티 유레아 및 실릴은 테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF에 의해, 암모늄 플루오라이드에 의해 또는 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 아질산에 의해 절단 가능/제거 가능할 수 있다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 아질산, 예를 들어, 아질산과 아세트산, 황산 또는 질산과 같은 산의 조합물을 포함하는 용액을 사용하여 절단 가능/제거 가능할 수 있다. 일부 추가 양상에서, 상기 용액은 유기산을 포함할 수 있다.

[0369] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 갖는 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 아자이드, 아지도 또는 아지도메틸기를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 3'-O-아지도 또는 3'-O-아지도메틸기를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기는 포스핀 화합물에 의해 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트라이-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트라이-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 포스핀 화합물은 트리 스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트라이페닐 포스핀(BS-TTP) 또는 트라이(하이드록시프로필)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 양상에서, 절단제는 4-다이메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다. 일부 양상에서, 3'-O-아미노기, 3'-O-아미노메틸기, 3'-O-메틸아미노기 또는 이들의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 연쇄 종결 모이어티는 아질산을 사용하거나, 아질산을 포함하는 용액을 사용하는 메커니즘을 통해, 아질산에 의해 절단될 수 있다. 일부 양상에서, 3'-O-아미노기, 3'-O-아미노메틸기, 3'-O-메틸아미노기, 또는 이들의 유도체 중 하나 이상을 포함하는 연쇄 종결 모이어티는 아질산을 포함하는 용액을 사용하여 절단될 수 있다. 일부 양상에서, 예를 들어, 아질산은 아세트산, 황산 또는 질산과 같은 산과 조합되거나 접촉될 수 있다. 일부 추가 양상에서, 예를 들어, 아질산은, 예를 들어, 폼산, 아세트산, 프로피온산, 뷰티르산, 아이소뷰티르산 등과 같은 유기산과 조합되거나 접촉될 수 있다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 팔라듐 탈차단 시약(예를 들어, Pd(0))에 의해 절단될 수 있는 3'-아세탈 모이어티를 포함한다.

[0370] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드는 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-다이데옥시뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에틸, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-다이플루오로메틸, 3'-트라이플루오로메틸, 3'-설포닐, 3'-말론일, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-설포하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'-뷰틸, 3'-tert 뷰틸, 3'-플루오렌일메틸옥시카본일, 3'-tert-뷰틸옥시카본일, 3'-O-알킬 하이드록실아미노기, 3'-포스포로티오에이트, 3'-O-벤질 및 3'-O-벤질, 3'-아세탈 모이어티 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 연쇄 종결 모이어티를 포함한다.

[0371] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 양상에서, 형광단은 염기로부터 절단 가능/제거 가능한 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 양상에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시되지 않는다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0372] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 시퀀싱 핵산 분자에 대한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상에서 절단 가능한 링커는 알킬기, 알켄일기, 알킨일기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아자이드기, 아민기, 아마이드기, 케토기, 아이소사이아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 다이설파이드기, 카보네이트기, 유레아기 또는 실릴기를 포함하는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 염기 상에서 절단 가능한 링커는 절단 가능한 모이어티를 화학 제제, pH 변화, 광 또는 열과 반응시킴으로써 염기로부터 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 절단 가능한 모이어티 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴은 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh₃)₄)에 의해, 피페리딘에 의해, 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 절단 가능 모이어티 아릴 및 벤질은 H₂ Pd/C에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 절단 가능 모이어티 아민, 아마이드, 케토, 아이소사이아네이트, 포스페이트, 티오, 다이설파이드는 포스핀에 의해 또는 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오텐트리톨(DTT)을 포함하는 티올기에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 절단 가능 모이어티 카보네이트는 MeOH 중 탄산칼륨(K₂CO₃)에 의해, 피리딘 중 트라이에틸아민에 의해, 또는 아세트산(AcOH) 중 Zn에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 절단 가능 모이어티 유레아 및 실릴은

테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF에 의해, 암모늄 플루오라이드에 의해 또는 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드에 의해 절단 가능하다.

[0373] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능 링커는 아자이드, 아지도 또는 아지도메틸기를 포함하는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 절단 가능 모이어티 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기는 포스핀 화합물에 의해 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트라이-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트라이-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트라이페닐 포스핀(BS-TTP) 또는 트라이(하이드록시프로필)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 양상에서, 절단제는 4-다이메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0374] 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에서) 및 제거 가능 링커는 동일 또는 상이한 제거 가능 모이어티를 갖는다. 일부 양상에서, 염기에 연결된 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에서) 및 검출 가능한 리포터 모이어티는 동일한 화학 제제에 의해 화학적으로 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 염기에 연결된 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에서) 및 검출 가능한 리포터 모이어티는 상이한 화학 제제에 의해 화학적으로 절단 가능/제거 가능하다.

[0375] 다가 분자

[0376] 본 개시내용의 일부 양상은 핵산 분자를 시퀀싱하는 방법을 제공하며, 본 명세서에 기재된 임의의 시퀀싱 방법은 적어도 하나의 다가 분자를 사용한다. 일부 양상에서, 다가 분자는 코어에 부착되고 스타버스트, 헬터 스켈터 또는 보틀 브러쉬 입체구조를 포함하는 임의의 입체구조를 갖는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함한다(예를 들어, 도 9). 다가 분자는 (1) 코어; 및 (2)(i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하는, 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함하되, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되며, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드 단위는 염기, 당 및 적어도 1개의 포스페이트기를 포함하며, 링커는 염기를 통해 뉴클레오타이드 단위에 부착된다. 일부 양상에서, 링커는 지방족 사슬 또는 올리고 에틸렌 글리콜 사슬을 포함하며, 링커 사슬 둘 다 2 내지 6개의 서브유닛을 갖는다. 일부 양상에서, 링커는 또한 방향족 모이어티를 포함한다. 예시적인 뉴클레오타이드 아암은 도 13에 나타난다. 예시적인 다가 분자는 도 9 내지 도 12에 나타난다. 예시적인 스페이서는 도 14(상단)에 나타내고, 예시적인 링커는 도 15(하단) 및 도 15에 나타난다. 링커에 부착된 예시적인 뉴클레오타이드는 도 16 내지 도 19에 나타난다. 예시적인 바이오틴일화된 뉴클레오타이드 아암은 도 20에 나타난다.

[0377] 일부 양상에서, 다가 분자 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 다중 뉴클레오타이드 아암은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 유형의 뉴클레오타이드 단위를 갖는다.

[0378] 일부 양상에서, 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하며, 여기서, 각 아암은 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 뉴클레오타이드 단위는 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스), 및 1개 이상의 포스페이트기(예를 들어, 1 내지 10개의 포스페이트기)를 포함한다. 복수의 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 1가지 유형의 뉴클레오타이드 단위를 갖는 1가지 유형의 다가 분자를 포함할 수 있다. 복수의 다가 분자는 2가지 이상의 유형의 다가 분자의 임의의 조합을 혼합물을 포함할 수 있으며, 혼합물 중의 개개 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 단위를 포함한다.

[0379] 일부 양상에서, 뉴클레오타이드 단위는 1, 2 또는 3개의 인 원자의 사슬을 포함하며, 사슬은 전형적으로 에스터 또는 포스포르아마이드 연결을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 뉴클레오타이드 단위는 인 원자가 개개 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되는 인 사슬을 갖는 뉴클레오타이드 유사체이다. 일부 양상에서, 사슬의 인 원자는 O, S 또는 BH₃를 포함하는 치환된 측기를 포함한다. 일부 양상에서, 사슬은 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포르다티오에이트 및 0-메틸포스포로아미다이트기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트기를 포함한다.

[0380] 일부 양상에서, 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서 또는 당 2' 및 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 갖는 뉴클레오타이드 유사체인 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드 단위는 당 2'

위치에서, 당 3' 위치에서 또는 당 2' 및 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 초기 가닥에서 후속 뉴클레오타이드 단위 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소-촉매된 혼입을 저해할 수 있다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 3' 당 위치에 부착되고, 당은 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장 가능한 3'OH 당기를 갖는 뉴클레오타이드를 생성하는 3' 당 위치로부터 제거 가능/절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 알킬기, 알켄일기, 알킨일기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아자이드기, 아민기, 아마이드기, 케토기, 아이소시아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 다이설파이드기, 카보네이트기, 유레아기 또는 실릴기를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는, 예를 들어, 연쇄 종결 모이어티를 화학 제제, pH 변화, 광 또는 열과 반응 시킴으로써, 뉴클레오타이드 단위로부터 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴은 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh₃)₄)에 의해, 피페리딘에 의해, 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H₂ Pd/C에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 아민, 아마이드, 케토, 아이소시아네이트, 포스페이트, 티오, 다이설파이드는 포스핀에 의해 또는 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오 트리톨(DTT)을 포함하는 티올기에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중 탄산칼륨(K₂CO₃)에 의해, 피리딘 중 트라이에틸아민에 의해, 또는 아세트산(AcOH) 중 Zn에 의해 절단 가능하다. 일부 양상에서, 상기 연쇄 종결 모이어티 유레아 및 실릴은 테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF에 의해, 암모늄 플루오라이드에 의해 또는 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드에 의해 절단 가능하다.

[0381] 일부 양상에서, 뉴클레오타이드 단위는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서 또는 당 2' 및 3' 위치에서 연쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 아자이드, 아지도 또는 아지도메틸기를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티는 3'-O-아지도 또는 3'-O-아지도메틸기를 포함한다. 일부 양상에서, 연쇄 종결 모이어티 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기는 포스핀 화합물에 의해 절단 가능/제거 가능하다. 일부 양상에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트라이-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트라이-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 양상에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트라이페닐 포스핀(BS-TTP) 또는 트라이(하이드록시프로필)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 양상에서, 절단제는 4-다이메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0382] 일부 양상에서, 뉴클레오타이드 단위는 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-다이데옥시뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에틸일, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'- 플루오로 메틸, 3'-다이플루오로메틸, 3'-트라이플루오로메틸, 3'-설포닐, 3'-말론일, 3'-아미노, 3'-O 아미노, 3'-설포 하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'뷰틸, 3'-tert 뷰틸, 3'- 플루오렌일메틸옥시카본일, 3' tert-뷰틸옥시카본일, 3'-O-알킬 하이드록실아미노기, 3'- 포스포로티오에이트 및 3'-O-벤질 또는 이들의 유도체로 이루어진 군 으로부터 선택된 연쇄 종결 모이어티를 포함한다.

[0383] 일부 양상에서, 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착되는 코어를 포함하되, 뉴클레오타이드 아암은 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어, 링커 및/또는 뉴클레오타이드 단위는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표시된다. 일부 양상에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 단위의 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0384] 일부 양상에서, 다가 분자의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 아암은 검출 가능한 리포터 모이어티에 부착된 뉴클레오타이드 단위를 갖는다. 일부 양상에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 양상에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 양상에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 단위의 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0385] 일부 양상에서, 다가 분자의 코어는 아비딘-유사 또는 스트렙타비딘-유사 모이어티를 포함하고, 코어 부착 모이어티는 바이오틴을 포함한다. 일부 양상에서, 코어는 아비딘 단백질을 포함하는 스트렙타비딘-형 또는 아비딘-형 모이어티뿐만 아니라 임의의 유도체, 유사체 및 적어도 1개의 바이오틴 모이어티에 결합할 수 있는 아비딘의 다른 비천연 형태를 포함한다. 아비딘 모이어티의 다른 형태는 천연 및 재조합 아비딘 및 스트렙타비딘뿐만 아니라 유도체화된 분자뿐만 아니라 유도체화된 분자, 예를 들어, 비글리코실화된 아비딘 및 절단된 스트렙타비딘을 포함한다. 예를 들어, 아비딘 모이어티는 아비딘의 탈글리코실화된 형태, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)

(예를 들어, 스트렙토마이세스 아비디니(*Streptomyces avidinii*))에 의해 생성된 박테리아 스트렙타비딘뿐만 아니라 유도체화된 형태, 예를 들어, N-아실 아비딘, 예를 들어, N-아세틸, N-프탈일 및 N-석신일 아비딘, 및 상업적으로 입수 가능한 제품 EXTRAVIDIN, CAPTAVIDIN, NEUTRAVIDIN 및 NEUTRALITE AVIDIN을 포함한다.

[0386] 일부 양상에서, 시퀀싱 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 시퀀싱하기 위한 임의의 방법은 결합 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서, 결합 복합체는 (i) 중합효소, 프라이머와 듀플렉스화된 핵산 주형 분자 및 뉴클레오타이드를 포함하거나, 결합 복합체는 (ii) 중합효소, 프라이머와 듀플렉스화된 핵산 주형 분자 및 다가 분자의 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 일부 양상에서, 결합 복합체는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1초 초과지속 시간을 갖는다. 결합 복합체는 약 0.1 내지 0.25초, 또는 약 0.25 내지 0.5초, 또는 약 0.5 내지 0.75초, 또는 약 0.75 내지 1초, 또는 약 1 내지 2초, 또는 약 2 내지 3초, 또는 약 3 내지 4초, 또는 약 4 내지 5초 초과지속 시간을 갖고/갖거나, 상기 방법은 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 35℃ 이상, 37℃ 이상, 42℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상 또는 72℃ 이상, 또는 80℃ 이상에서 또는 임의의 앞서 언급한 것에 의해 정해진 범위 내에서 수행될 수 있다. 결합 복합체(예를 들어, 삼원 복합체)는 임의의 중합효소, 주형 분자, 프라이머 및/또는 뉴클레오타이드 단위 또는 뉴클레오타이드 사이의 해리를 야기하는 조건을 가할 때까지 안정하게 남아있다. 예를 들어, 해리 조건은 결합 복합체를 세정제, EDTA 및/또는 물 중 임의의 하나 또는 임의의 조합과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 본 개시내용은 상기 방법을 제공하되, 결합 복합체는 검출 단계에서 콘트라스트 대 노이즈비를 20 초과로 나타내는 표면에 침착되거나, 부착되거나, 혼성화된다. 일부 양상에서, 본 개시내용은 상기 방법을 제공하되, 접촉시키는 단계는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위가 주형 핵산의 다음 염기에 상보적일 때 결합 복합체를 안정화하고, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위가 주형 핵산의 다음 염기에 상보적이지 아닐 때 결합 복합체를 탈안정화시키는 조건하에 수행된다.

[0387] 압축 올리고뉴클레오타이드

[0388] 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카타머 분자 중 제1 부분에 혼성화할 수 있는 5' 영역을 갖는 단일-가닥 선형 올리고뉴클레오타이드 및 콘카타머 분자(예를 들어, 동일한 콘카타머 분자)의 제2 부분에 혼성화할 수 있는 3' 영역을 갖는 압축 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 양상에서, 개개 콘카타머 분자에 압축 올리고뉴클레오타이드의 혼성화는 콘카타머 분자가 비붕괴 DNA 분자에 비해 더 콤팩트한 형상 및 크기인 DNA 나노볼로 붕괴 또는 폴딩되게 한다. DNA 나노볼의 스팟 영상은 가우시안 스팟으로서 나타낼 수 있고, 크기는 반치전폭(FWHM)으로서 측정될 수 있다. 더 작은 FWHM으로 표시되는 바와 같은 더 작은 스팟 크기는 전형적으로 스팟의 개선된 영상과 상관관계가 있다. 일부 양상에서, DNA 나노볼 스팟의 FWHM은 약 10um 또는 더 작을 수 있다. DNA 나노볼은 DNA 나노볼로 붕괴/폴딩되지 않는 콘카타머에 비해 더 작은 반치전폭(FWHM)을 갖는 콤팩트한 핵산 구조일 수 있다.

[0389] 일부 양상에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 또는 DNA와 RNA의 조합을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 압축 올리고뉴클레오타이드는 20 내지 150개의 뉴클레오타이드, 또는 30 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 40 내지 80개의 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 임의의 길이일 수 있다.

[0390] 일부 양상에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 5' 영역 및 3' 영역, 및 선택적으로 5' 영역과 3' 영역 사이의 개재 영역을 포함한다. 개재 영역은 임의의 길이, 예를 들어, 약 2 내지 20개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 개재 영역은 연속적인 동일한 염기(예를 들어, AAA, GGG, CCC, TTT 또는 UUU)를 갖는 동형중합체를 포함한다. 개재 영역은 비-동형중합체 서열을 포함한다.

[0391] 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카타머 분자 중 제1 부분에 대해 길이를 따라 완전히 상보적이거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카타머 분자 중 제2 부분에 대해 길이를 따라 완전히 상보적이거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카타머 분자 중 제1 범용 서열 부분에 혼성화될 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카타머 분자 중 제2 범용 서열 부분에 혼성화될 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 영역은 콘카타머에 혼성화되어 콘카타머의 원위 부분을 함께 당겨서 콘카타머의 압축을 야기하고 DNA 나노볼을 형성할 수 있다.

[0392] 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 동일한 서열을 가질 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 상이한 서열을 가질 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 5' 영역의 역방향 서열인 서열을 가질 수 있다.

[0393] 일부 양상에서 서열 데이터는 막에 걸쳐, 예컨대, 기공을 통해 상기 핵산을 전위시킴으로써 핵산의 시퀀싱을 포

합하는 나노기공 시퀀싱을 통해 파생될 수 있고, 서열 판독 또는 염기 호출은 전위 사건 동안 하나 이상의 신호, 예컨대, 임피던스, 전류, 전압 또는 전기용량을 측정함으로써 생성된다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드의 동일성은 전류 차단 시간, 지속시간, 정도 또는 선운곽, 임피던스 변화, 전압 변화 또는 전기용량 변화와 같은 특유의 전기적 특징에 의해 결정될 수 있다. 막에 걸쳐 그리고/또는 기공을 통한 전위에 의한 핵산의 시퀀싱은 광학적, 화학적, 생화학적, 형광, 발광, 자기, 전자기, 음향 또는 전기음향 검출과 같은 대체 검출 방법을 배제하지 않는다.

[0394] 지지체 및 낮은 비-특이적 코팅

[0395] 일부 양상에서, 도 1에서 플로우 셀(112)은 지지체, 예를 들어, 본 명세서에 개시된 바와 같은 고체 지지체를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 고정된 복수의 올리고뉴클레오타이드 표면 프라이머를 포함하는 지지체를 사용하는 쌍별 시퀀싱 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 양상에서, 지지체는 낮은 비특이적 결합 코팅으로 부동태화된다. 본 명세서에 기재된 표면 코팅은 핵산 포획, 증폭 및 시퀀싱 작업 흐름, 예컨대, 염료, 뉴클레오타이드, 효소 및 핵산 프라이머에 대해 전형적으로 사용되는 시약에 대해 매우 낮은 비-특이적 결합을 나타낸다. 표면 코팅은 통상적인 표면 코팅에 비해서 낮은 배경 형광 신호 또는 높은 콘트라스트 대 노이즈(contrast-to-noise: CNR) 비를 나타낸다.

[0396] 낮은 비특이적 결합 코팅은 1개의 층 또는 다층층을 포함한다(도 20). 일부 양상에서, 복수 개의 표면 프라이머는 낮은 비특이적 결합 코팅에 고정된다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 표면 프라이머는 낮은 비특이적 결합 코팅 내에 함입된다. 낮은 비특이적 결합 코팅은 개선된 핵산 혼성화 및 증폭 성능을 가능하게 한다. 일반적으로, 지지체는 기재(또는 지지체 구조), 공유적 또는 비공유적으로 부착된 낮은-결합의 1개 이상의 층, 화학적 개질 층, 예를 들어, 실란층, 중합체 필름, 및 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자를 지지체에 테더링하기 위해 사용될 수 있는 1개 이상의 공유적 또는 비공유적으로 부착된 표면 프라이머를 포함한다. 일부 양상에서, 단백질, 핵산 분자 및 기타 혼성화 및 증폭 반응 성분의 코팅에 대한 비특이적 결합이 비슷한 단일층에 비해 최소화되거나 감소되도록 코팅의 제형, 예를 들어, 1개 이상의 층의 화학적 조성물, 지지체에 1개 이상의 층을 그리고/또는 서로에 대해 가교하는 데 사용되는 결합 화학 및 층의 총 수는 달라질 수 있다. 코팅 상의 비특이적 혼성화가 비슷한 단일층에 비해 최소화 또는 감소되도록 본 명세서에 기재된 코팅의 제형은 달라질 수 있다. 코팅 상의 비특이적 증폭이 비슷한 단일층에 비해 최소화 또는 감소되도록 코팅의 제형은 달라질 수 있다. 코팅 상의 특이적 증폭을 및/또는 수율이 최대화되도록 코팅의 제형은 달라질 수 있다. 검출에 적합한 증폭 수준은 본 명세서에 개시된 일부 경우에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 또는 30보다 더 많은 수의 증폭 주기 이하로 달성된다.

[0397] 1개 이상의 화학적으로 개질된 층, 예를 들어, 낮은 비특이적 결합 중합체의 층을 포함하는 지지체 구조는 독립적일 수 있거나 다른 구조 또는 조립체에 통합될 수 있다. 예를 들어, 일부 양상에서, 지지체 구조는 통합 또는 조립된 미세유체 유동셀 내에 1개 이상의 표면을 포함할 수 있다. 지지체 구조는 마이크로플레이트 형식 내의 1개 이상의 표면, 예를 들어, 마이크로플레이트에서 웰의 하부 표면을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 지지체 구조는 모세관 내면(예컨대, 내강 표면)을 포함한다. 일부 양상에서, 지지체 구조는 평면 칩으로 에칭된 모세관 내면(예컨대, 내강 표면)을 포함한다.

[0398] 지지체의 표면에 제1 화학적 개질층을 접합시키기 위해 사용되는 부착 화학은 일반적으로 표면이 제작된 물질과 층의 화학적 특성 모두에 따를 것이다. 일부 양상에서, 제1 층은 표면에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 양상에서, 제1 층은 비공유적으로 부착될 수 있으며, 예를 들어, 제1 층의 지지체와 분자 성분 사이의 정전기적 상호작용, 수소 결합 또는 반데르발스 상호작용과 같은 비공유적 상호작용을 통해 지지체에 흡착될 수 있다. 두 경우 중 하나에, 지지체는 제1 층의 부착 또는 증착 전에 처리될 수 있다. 당업자에게 알려진 임의의 다양한 표면 제조 기법은 표면을 세정 또는 처리하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 유리 또는 실리콘 표면은 피라냐 용액(Piranha solution)(황산(H₂SO₄)과 과산화수소(H₂O₂)의 혼합물), KOH 및 NaOH 중 염기 처리를 이용해서 산 세척될 수 있고/있거나 산소 플라즈마 처리 방법을 이용해서 세정될 수 있다.

[0399] 실란 화학은 유리 또는 실리콘 표면 상의 실란기를 공유적으로 개질시켜 더 반응성인 작용기(예를 들어, 아민 또는 카복실기)를 부착하고, 이어서, 표면에 대한 결합 링커 분자(예를 들어, 다양한 길이의 선형 탄화수소 분자, 예컨대, C₆, C₁₂, C₁₈ 탄화수소 또는 선형 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자) 또는 층 분자(예를 들어, 분지된 PEG 분자 또는 다른 중합체)에서 사용될 수 있는 비제한적 접근을 구성한다. 임의의 개시된 낮은 결합 코팅을 생성하는 데 사용될 수 있는 적합한 실란의 예는 (3-아미노프로필) 트라이메톡시실란(APTMS), (3-아미노프로필) 트라이에톡시실란(APTES), 임의의 다양한 PEG-실란(예를 들어, 1K, 2K, 5K, 10K, 20K 등의 분자량 포함), 아미

노-PEG 실란(즉, 유리 아미노 작용기 포함), 말레이미드-PEG 실란, 바이오틴-PEG 실란 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0400] 아미노산, 펩타이드, 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 기타 단량체 또는 중합체 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업자에게 알려진 임의의 다양한 분자는 지지체 상에 하나 이상의 화학적으로 개질된 층을 생성하는 데 사용될 수 있으며, 여기서, 사용되는 성분의 선택은 층의 하나 이상의 특성, 예를 들어, 작용기 및/또는 테더링된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 표면 밀도, 층의 친수성/소수성, 또는 층의 3차원 특성(즉, "두께")을 변경시키도록 변화될 수 있다. 임의의 개시된 코팅에서 낮은 비특이적 결합 물질의 하나 이상의 층을 생성하는 데 사용될 수 있는 중합체의 예는 다양한 분자량 및 분지 구조의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 스트렙타비딘, 폴리아크릴아마이드, 폴리에스터, 텍스트란, 폴리-라이신 및 폴리-라이신 공중합체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 표면에 물질(예를 들어, 중합체 층)의 하나 이상의 층을 접합시키고/시키거나 층을 서로에 대해 가교하는 데 사용될 수 있는 접합 화학의 예는 바이오틴-스트렙타비딘 상호작용(또는 이들의 변형), his 태그 - Ni/NTA 접합 화학, 메톡시 에터 접합 화학, 카복실레이트 접합 화학, 아민 접합 화학, NHS 에스터, 말레이미드, 티올, 에폭시, 아자이드, 하이드라자이드, 알카인, 아이소사이아네이트 및 실란을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0401] 낮은 비특이적 결합 표면 코팅은 지지체를 가로질러 균일하게 도포될 수 있다. 대안적으로, 화학적 개질층이 지지체의 하나 이상의 별도의 영역에 국한되도록 표면 코팅이 패턴화될 수 있다. 예를 들어, 코팅은 지지체 상에서 화학적 개질 영역의 규칙적 어레이 또는 무작위 패턴을 생성하도록 포토리소그래피 기법을 이용해서 패턴화될 수 있다. 대안적으로 또는 조합하여, 코팅은, 예를 들어, 밀착 인쇄 및/또는 잉크젯 인쇄 기법을 이용해서 패턴화될 수 있다. 일부 양상에서, 화학적 개질 영역의 규칙적 어레이 또는 무작위 패턴은 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 또는 10,000개 이상의 별도의 영역을 포함할 수 있다.

[0402] 일부 양상에서, 낮은 비특이적 결합 코팅은 지지체에 비특이적으로 흡착되거나 공유 결합된 친수성 중합체를 포함한다. 전형적으로, 폴리(에틸렌 글리콜)(폴리에틸렌 옥사이드(PEO) 또는 폴리옥시에틸렌으로도 알려진 PEG) 또는, 예를 들어, 실란 화학을 이용해서 지지체에 연결된 상이한 분자량 및 말단기를 갖는 다른 친수성 중합체를 이용해서 부동태화가 수행된다. 표면으로부터 원위의 말단기는 바이오틴, 메톡시 에터, 카복실레이트, 아민, NHS 에스터, 말레이미드 및 비스-실란을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 양상에서, 친수성 중합체, 예를 들어, 선형 중합체, 분지된 중합체 또는 다중-분지된 중합체의 둘 이상의 층은 표면 상에 증착될 수 있다. 일부 양상에서, 둘 이상의 층이 서로 공유결합될 수 있거나 얻어진 코팅의 코팅을 개선시키도록 내부가 교될 수 있다. 일부 양상에서, 상이한 뉴클레오타이드 서열 및/또는 염기 변형(또는 다른 생체분자, 예를 들어, 효소 또는 항체)을 갖는 표면 프라이머는 얻어진 층에 다양한 표면 밀도로 테더링될 수 있다. 일부 양상에서, 예를 들어, 표면 작용기 밀도와 표면 프라이머 농도는 둘 다 목적하는 표면 프라이머 밀도 범위를 달성하도록 변화될 수 있다. 추가적으로, 표면 프라이머 밀도는 동일한 작용기를 지니는 다른 분자로 표면 프라이머를 희석 시킴으로써 제어될 수 있다. 예를 들어, 아민-표지된 표면 프라이머는 최종 프라이머 밀도를 감소시키는 NHS-에스터 코팅 표면과의 반응에서 아민-표지된 폴리에틸렌 글리콜로 희석될 수 있다. 혼성화 영역과 표면 부착 작용기 사이에서 상이한 길이의 링커를 갖는 표면 프라이머는 표면 밀도를 제어하는 데 적용될 수 있다. 적합한 링커의 예는 프라이머(예를 들어, 0 내지 20개의 염기), PEG 링커(예를 들어, 3 내지 20개의 단량체 단위) 및 탄소 사슬(예를 들어, C6, C12, C18 등)의 5' 단부에 폴리-T 및 폴리-A 가닥을 포함한다. 프라이머 밀도를 측정하기 위해, 형광 표지된 프라이머는 표면에 테더링될 수 있고, 이어서, 형광 판독은 알려진 농도의 염료 용액에 대한 것과 비교된다.

[0403] 일부 양상에서, 낮은 비특이적 결합 코팅은 지지체 상의 화학기를 통해 지지체의 적어도 일부에 공유 결합된 작용기화된 중합체 코팅층, 작용기화된 중합체 코팅에 결합된 프라이머 및 프라이머 상의 수용성 보호 코팅 및 작용기화된 중합체 코팅을 포함한다. 일부 양상에서, 작용기화된 중합체 코팅은 폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸)아크릴아마이드-코-아크릴아마이드(PAZAM))를 포함한다.

[0404] 프라이머 표면 밀도를 조정하고 친수성 또는 양쪽성 코팅에 추가적인 치수를 더하기 위해, PEG 및 다른 친수성 중합체의 다중층 코팅을 포함하는 지지체가 개발되었다. 아래에 기재하는 중합체/공중합체 물질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 친수성 및 양쪽성 표면 층화 접근을 이용함으로써, 지지체 상의 프라이머 로딩 밀도를 유의미하게 증가시킬 수 있다. 전통적인 PEG 코팅 접근은 단일층 프라이머 증착을 사용하며, 이는 일반적으로 단일 분자 접근을 위해 보고되었지만, 핵산 증폭 적용을 위한 높은 복제수를 수득하지 않는다. 본 명세서에서 기재된 바와 같은 "층화"는 둘 이상의 고도로 가교된 층을 포함하는 표면이 순차적으로 구성될 수 있도록 임의의

적합한 중합체 또는 단량체 서브유닛에 의한 전통적인 가교 접근을 이용하여 달성될 수 있다. 적합한 중합체의 예는 스트렙타비딘, 폴리 아크릴아마이드, 폴리에스터, 텍스트란, 폴리-라이신, 및 폴리-라이신과 PEG의 공중합체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 양상에서, 상이한 층은 바이오틴-스트렙타비딘 결합, 아자이드-알카인 클릭 반응, 아민-NHS 에스터 반응, 티올-말레이미드 반응 및 양으로 하전된 중합체와 음으로 하전된 중합체 사이의 이온성 상호작용을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 다양한 접합 반응을 통해 서로 부착될 수 있다. 일부 양상에서, 높은 프라이머 밀도 물질은 용액 중에서 구성될 수 있고, 후속적으로 다단계로 표면 상에 증화될 수 있다.

[0405] 지지체 구조가 제작될 수 있는 물질의 예는 유리, 용융 실리카, 실리콘, 중합체(예를 들어, 폴리스타이렌(PS), 거대 다공성 폴리스타이렌(MPPS), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트(PC), 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌(PE), 고밀도 폴리에틸렌(HDPE), 환식 올레핀 중합체(COP), 환식 올레핀 공중합체(COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 유리와 플라스틱 지지체 구조 둘 다의 다양한 조성이 상정된다.

[0406] 지지체 구조는 당업자에게 알려진 임의의 다양한 기하학 및 치수로 제공될 수 있고, 당업자에게 알려진 임의의 다양한 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 지지체 구조는 국부적으로 평면(예를 들어, 현미경 슬라이드 또는 현미경 슬라이드의 표면 포함)일 수 있다. 전체적으로, 지지체 구조는 원통형(예를 들어, 모세관 또는 모세관의 내면 포함), 구체(예를 들어, 비다공성 비드의 외면 포함) 또는 불규칙적(예를 들어, 불규칙적 형상, 비다공성 비드 또는 입자의 외면 포함)일 수 있다. 일부 양상에서, 핵산 혼성화 및 증폭을 위해 사용되는 지지체 구조의 표면은 고체, 비다공성 표면일 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 기재된 코팅이 다공성 표면을 침투하고, 이에 대해 수행된 핵산 혼성화 및 증폭 반응이 기공 내에서 일어나도록, 핵산 혼성화 및 증폭을 위해 사용되는 지지체 구조의 표면은 다공성일 수 있다.

[0407] 1개 이상의 화학적으로 개질된 층, 예를 들어, 낮은 비특이적 결합 중합체의 층을 포함하는 지지체 구조는 독립적일 수 있거나 다른 구조 또는 조립체에 통합될 수 있다. 예를 들어, 지지체 구조는 통합 또는 조립된 미세유체 유동셀 내에 1개 이상의 표면을 포함할 수 있다. 지지체 구조는 마이크로플레이트 형식 내의 1개 이상의 표면, 예를 들어, 마이크로플레이트에서 웰의 하부 표면을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 지지체 구조는 모세관 내면(예컨대, 내강 표면)을 포함한다. 일부 양상에서, 지지체 구조는 평면 칩으로 예칭된 모세관 내면(예컨대, 내강 표면)을 포함한다.

[0408] 주목한 바와 같이, 본 개시내용의 낮은 비특이적 결합 지지체는 단백질, 핵산, 및 고체상 핵산 증폭을 위해 사용되는 혼성화 및/또는 증폭 제형의 다른 성분의 감소된 비특이적 결합을 나타낸다. 주어진 지지체 표면에 의해 나타내는 비특이적 결합 정도는 정량적 또는 정성적으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 표준화된 조건 세트 하의 형광 염료(예를 들어, 사이아닌, 예컨대, Cy3, 또는 Cy5 등, 플루오레세인, 쿠마린, 로다민 등 또는 본 명세서에 개시된 다른 염료), 형광 표지된 뉴클레오타이드, 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드 및/또는 형광 표지된 단백질(예를 들어, 중합효소)에 대한 표면의 노출, 다음에, 명시된 린스 프로토콜 및 형광 영상화는 상이한 표면 제형을 포함하는 지지체 상에서의 비특이적 결합의 비교를 위한 정량적 도구로서 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 표준화된 조건 세트 하의 형광 염료, 형광 표지된 뉴클레오타이드, 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드 및/또는 형광 표지된 단백질(예를 들어, 중합효소)에 대한 표면의 노출, 다음에, 명시된 린스 프로토콜 및 형광 영상화는 상이한 표면 제형을 포함하는 지지체 상의 비특이적 결합의 비교를 위한 정량적 도구로서 사용될 수 있다 - 단, 형광 신호가 (예를 들어, 형광단의 신호 포화 및/또는 자기-소광이 문제되지 않는 조건하에) 지지체 표면 상의 형광단 수와 선형으로 관련되고(또는 예측 가능한 방식으로 관련되고) 적합한 교정 표준이 사용되는 조건하에 형광 영상화가 수행된다는 것을 보장하는 것을 주의하였다. 일부 양상에서, 본 개시내용의 상이한 지지체 표면 제형에 의해 비특이적 결합이 나타나는 정도로 정량적 평가를 위해 당업자에게 알려진 다른 기법, 예를 들어, 방사성동위원소 표지 및 계수 방법이 사용될 수 있다.

[0409] 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단의 특이적 결합 대 비특이적 결합의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐 있는 임의의 중간값의 Cy3을 나타낸다. 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단의 특이적 결합 대 비특이적 결합의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐 있는 임의의 중간값의 Cy3을 나타낸다.

[0410] 개시된 낮은-결합 지지체로 나타내는 비특이적 결합 정도는 인큐베이션 및 린스 조건의 표준화된 세트 하에서,

표면과 표지된 단백질(예를 들어, 소 혈청 알부민(BSA), 스트렙타비딘, DNA 중합효소, 역전사효소, 헬리카제, 단일 가닥 결합 단백질(SSB) 등, 또는 이들의 임의의 조합), 표지된 뉴클레오타이드, 표지된 올리고뉴클레오타이드 등을 접촉시키기 위한 표준화된 프로토콜을 이용해서 평가될 수 있고, 이어서, 표면 상에 남아있는 표지 양의 검출 및 이들로부터 얻어진 신호와 적절한 교정 표준의 비교의 검출이 이어질 수 있다. 일부 양상에서, 표지는 형광 표지를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 표지는 방사성표지를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 표지는 당업자에게 알려진 임의의 다른 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 따라서 주어진 지지체 표면 제형에 의해 나타나는 비특이적 결합 정도는 단위 구역당 비특이적으로 결합된 단백질 분자(또는 핵산 분자 또는 다른 분자) 수에 관해 평가될 수 있다. 일부 양상에서, 본 개시내용의 낮은-결합 지지체는 μm^2 당 0.001개 미만의 분자, μm^2 당 0.01개 미만의 분자, μm^2 당 0.1개 미만의 분자, μm^2 당 0.25개 미만의 분자, μm^2 당 0.5개 미만의 분자, μm^2 당 1개 미만의 분자, μm^2 당 10개 미만의 분자, μm^2 당 100개 미만의 분자 또는 μm^2 당 1,000개 미만의 분자의 비특이적 단백질 결합(또는 다른 명시된 분자(예를 들어, 사이아닌, 예컨대, Cy3 또는 Cy5 등, 플루오레세인, 쿠마린, 로다민 등 또는 본 명세서에 개시된 다른 염료)의 비특이적 결합)을 나타낼 수 있다. 당업자라면 본 개시내용의 주어진 지지체 표면이 이 범위 내의 어디에나 속하는, 예를 들어, μm^2 당 86개 미만의 분자의 비특이적 결합을 나타낼 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 일부 개질된 표면은 15분 동안 포스페이트 완충 식염수(PBS) 완충제 중 Cy3 표지된 스트렙타비딘(GE Amersham)의 $1\mu\text{M}$ 용액과 접촉된 후, 탈이온수로 3회 린스된 후에 0.5개 미만의 분자/ μm^2 의 비특이적 단백질 결합을 나타낸다. 본 명세서에 개시된 일부 개질된 표면은 μm^2 당 0.25개 미만의 분자의 Cy3 염료 분자의 비특이적 결합을 나타낸다. 독립적인 비특이적 결합 분석에서, $1\mu\text{M}$ 표지된 Cy3 SA(ThermoFisher), $1\mu\text{M}$ Cy5 SA 염료(ThermoFisher), $10\mu\text{M}$ 아미노알릴-dUTP-ATTO-647N(Jena Biosciences), $10\mu\text{M}$ 아미노알릴-dUTP-ATTO-Rho1 1(Jena Biosciences), $10\mu\text{M}$ 아미노알릴-dUTP-ATTO-Rho1 1(Jena Biosciences), $10\mu\text{M}$ 7-프로파길아미노-7-데아자-dGTP-Cy5(Jena Biosciences) 및 $10\mu\text{M}$ 7-프로파길아미노-7-데아자-dGTP-Cy3(Jena Biosciences)은 384 웰 플레이트 형식으로 37°C 에서 15분 동안 낮은 결합 코팅된 지지체 상에서 인큐베이션된다. 각각의 웰은 $50\mu\text{l}$ 탈이온 RNase/DNase 무함유 워터로 2 내지 3X 린스되고, 25mM ACES 완충제 pH 7.4로 2 내지 3X 린스된다. 800의 PMT 획득 설정(gain setting) 및 50 내지 $100\mu\text{m}$ 의 분해능에서 제조업자에 의해 명시되는 바와 같이 Cy3, AF555, 또는 Cy5 필터 세트(수행된 염료 시험에 따름)를 이용해서 384 웰 플레이트를 GE Typhoon 기기 상에서 영상화하였다. 더 높은 해상도 영상화를 위해, 내부 전반사 형광(total internal reflectance fluorescence: TIRF) 대물렌즈($100\times$, 1.5 NA, Olympus), CCD 카메라(예를 들어, Olympus EM-CCD 흑백 카메라, Olympus XM-10 흑백 카메라 또는 Olympus DP80 칼라 및 흑백 카메라), 조명원(예를 들어, Olympus 100W Hg 램프, Olympus 75W Xe 램프 또는 Olympus U-HGLGPS 형광 광원), 및 532nm 또는 635nm의 여기 파장을 이용하는 Olympus IX83 현미경(예를 들어, 도립 형광 현미경)(Olympus Corp., 펜실베이니아주 센터 밸리 소재)에서 영상을 수집하였다. 다이크로익 미러는 Semrock(DEX Health & Science, LLC, Rochester, N.Y.), 예를 들어, 405, 488, 532 또는 633nm 다이크로익 반사경/빔 스플리터로부터 구입하였고, 대역필터는 적절한 여기 파장을 이용하여 532 LP 또는 645 LP 동향성으로서 선택되었다. 본 명세서에 개시된 일부 개질된 표면은 μm^2 당 0.25개 미만의 분자의 염료 분자의 비특이적 결합을 나타낸다. 일부 양상에서, 영상이 획득되는 동안 코팅된 지지체가 완충제(예를 들어, 25mM ACES, pH 7.4) 중에 침지되었다.

[0411] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단의 특이적 결합 대 비특이적 결합의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐 있는 임의의 중간값의 Cy3을 나타낸다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단에 대한 특이적 형광 신호 대 비특이적 형광 신호의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐 있는 임의의 중간값의 Cy3을 나타낸다.

[0412] 본 명세서의 개시내용과 일치되는 낮은-배경 표면은 비특이적으로 흡착된 분자당 적어도 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 또는 50 초과와 부착된 비특이적 염료 분자의 특이적 염료 부착(예를 들어, Cy3 부착) 대 비특이적 염료 흡착(예를 들어, Cy3 염료 흡착) 비를 나타낼 수 있다. 유사하게, 여기 에너지를 가할 때, 형광단, 예를 들어, Cy3이 부착된 본 명세서의 개시내용과 일치되는 낮은-배경 표면은 특이적 형광 신호(예를 들어, 표면에 부착된 Cy3-표지 올리고뉴클레오타이드로부터 생김) 대 적어도 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 또는 50:1 초과와 비특이적 흡착 염료 형광 신호의 비를 나타낼 수 있다.

[0413] 일부 양상에서, 개시된 지지체 표면의 친수성(또는 수용액에 의한 "습윤성") 정도는, 예를 들어, 작은 물방울이 표면에 위치되는 물 접촉각의 측정을 통해 평가될 수 있고, 표면과 이의 접촉각은, 예를 들어, 광학 텐시오미터

를 이용하여 측정된다. 일부 양상에서, 정적 접촉각이 결정될 수 있다. 일부 양상에서, 전진 또는 후진 접촉각이 결정될 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 친수성, 낮은-결합 지지체 표면에 대한 물 접촉각은 약 0도 내지 약 30도의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 친수성, 낮은-결합 지지체 표면에 대한 물 접촉각은 50도, 40도, 30도, 25도, 20도, 18도, 16도, 14도, 12도, 10도, 8도, 6도, 4도, 2도 또는 1도 이하일 수 있다. 다수의 경우에 접촉각은 40도 이하이다. 당업자라면 본 개시내용의 주어진 친수성, 낮은 결합 지지체 표면이 이 범위 내의 다른 것의 값을 갖는 물 접촉각을 나타낼 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0414] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 친수성 표면은 종종 낮은-결합 표면에 대한 생체분자의 감소된 비특이적 결합으로 인해 생물검정에 대해 감소된 세척 시간을 촉진시킨다. 일부 양상에서, 적절한 세척 단계는 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 미만, 또는 10초 미만으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 적절한 세척 단계는 30초 미만으로 수행될 수 있다.

[0415] 본 개시내용의 일부 낮은 결합 표면은 용매 및 상승된 온도, 또는 반복된 주기의 용매 노출 또는 온도 변화에 대한 장기간 노출의 안정성 또는 내구성의 유의미한 개선을 나타낸다. 예를 들어, 개시된 표면의 안정성은 표면 상의 작용기 또는 표면 상의 테더링된 생체분자(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 프라이머)를 형광 표지하고, 용매 및 상승된 온도에, 또는 반복된 주기의 용매 노출 또는 온도 변화에 장기간 노출 전, 노출 동안 및 노출 후에 형광 신호를 모니터링함으로써 시험될 수 있다. 일부 양상에서, 표면 품질을 평가하기 위해 사용되는 형광 변화 정도는 용매 및/또는 상승된 온도에 대해 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 15시간, 20시간, 25시간, 30시간, 35시간, 40시간, 45시간, 50시간 또는 100시간 노출의 시간 기간에 걸쳐 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 미만(또는 이러한 시간 기간에 걸쳐 측정된 바와 같은 이러한 백분율의 임의의 조합)일 수 있다. 일부 양상에서, 표면 품질을 평가하기 위해 사용되는 형광의 변화 정도는 용매 변화 및/또는 온도 변화에 대한 5주기, 10주기, 20주기, 30주기, 40주기, 50주기, 60주기, 70주기, 80주기, 90주기, 100주기, 200주기, 300주기, 400주기, 500주기, 600주기, 700주기, 800주기, 900주기 또는 1,000주기의 반복된 노출에 걸쳐 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 미만(또는 이러한 주기 범위에 걸쳐 측정된 바와 같은 이러한 백분율의 임의의 조합)일 수 있다.

[0416] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 표면은 특이적 신호 대 비특이적 신호 또는 다른 배경의 높은 비를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 핵산 증폭을 위해 사용될 때, 일부 표면은 표면의 인접한 비집단 영역의 신호보다 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100배, 또는 100보다 더 큰 수의 배수 초과로 증폭 신호를 나타낼 수 있다. 유사하게, 일부 표면은 표면의 인접한 증폭 핵산 집단 영역의 신호보다 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100배 또는 100보다 더 큰 수의 배수 초과로 증폭 신호를 나타낸다.

[0417] 일부 양상에서, (예를 들어, 직접적으로 또는 형광단으로 간접적으로 표지된) 혼성화된 또는 클론 증폭된 핵산 분자의 폴로니를 생성하기 위해 핵산 혼성화 또는 증폭 적용에서 사용될 때 개시된 낮은 배경 표면의 형광 이미지는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 210, 220, 230, 240, 250, 또는 250 초과 수의 콘트라스트 대 노이즈 비(CNR)를 나타낸다.

[0418] 한 가지 유형의 프라이머가 지지체 표면에 부착 또는 테더링될 수 있다. 일부 양상에서, 한 가지 이상 유형의 어댑터 또는 프라이머는 스페이서 서열, 어댑터-결합 표적 라이브러리 핵산 서열에 대한 혼성화를 위한 어댑터 서열, 정방향 증폭 프라이머, 역방향 증폭 프라이머, 시퀀싱 프라이머 및/또는 분자 바코딩 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 1개의 프라이머 또는 어댑터 서열은 표면의 적어도 1개의 층에 테더링될 수 있다. 일부 양상에서, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 초과 상이한 프라이머 또는 어댑터 서열은 표면의 적어도 1개의 층에 테더링될 수 있다.

[0419] 일부 양상에서, 테더링된 어댑터 및/또는 프라이머 서열은 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 100개의 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 테더링된 어댑터 및/또는 프라이머 서열은 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 양상에서, 테더링된 어댑터 및/또는 프라이머 서열은 최대 100, 최대 90, 최대 80, 최대 70, 최대 60, 최대 50, 최대 40, 최대 30, 최대 20, 또는 최대 10개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 이 단락에 기재된 임의의 하한값 및 상한값은 조합되어 본 개시내용 내에 포함된 범위를 형성할 수 있고, 예를 들어, 일부 양상에서, 테더링된 어댑터 및/또는 프라이머 서열의 길이는 약 20개의 뉴클레오타이드 내지 약 80개의 뉴클레오타이드의 범위일 수 있다. 당업자라면 테더링된 어댑터 및/또는 프라이머 서열의 길이는 이 범위 내의 임의의 값, 예를 들어, 약 24개의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다는 것을 인식할 것이다.

- [0420] 일부 양상에서, 본 개시내용의 낮은 결합 지지체 표면 상의 프라이머(예를 들어, 포획 프라이머)의 얻어진 표면 밀도는 μm^2 당 약 100개의 프라이머 분자에서 μm^2 당 약 100,000개의 프라이머 분자의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 본 개시내용의 낮은 결합 지지체 표면 상의 프라이머의 얻어진 표면 밀도는 μm^2 당 약 1,000개의 프라이머 분자에서 μm^2 당 약 1,000,000개의 프라이머 분자의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 프라이머의 표면 밀도는 μm^2 당 적어도 1,000, 적어도 10,000, 적어도 100,000 또는 적어도 1,000,000개의 분자일 수 있다. 일부 양상에서, 프라이머의 표면 밀도는 μm^2 당 최대 1,000,000, 최대 100,000, 최대 10,000, 또는 최대 1,000개의 분자일 수 있다. 본 단락에 기재된 임의의 하한값 및 상한값은 조합되어 본 개시내용 내에 포함된 범위를 형성할 수 있고, 예를 들어, 일부 양상에서 프라이머의 표면 밀도는 μm^2 당 약 10,000개의 분자에서 μm^2 당 약 100,000개의 분자의 범위일 수 있다. 당업자라면 프라이머 분자의 표면 밀도가 이 범위 내의 임의의 값, 예를 들어, μm^2 당 약 455,000개의 분자를 가질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 양상에서, 지지체 표면 상의 어댑터 또는 프라이머 서열에 초기에 혼성화된 표면 라이브러리 핵산 서열의 표면 밀도는 테더링된 프라이머의 표면 밀도에 대해 나타난 것보다 적거나 동일할 수 있다. 일부 양상에서, 지지체 표면 상의 어댑터 또는 프라이머 서열에 혼성화된 클론 증폭된 표면 라이브러리 핵산 서열의 표면 밀도는 테더링된 프라이머의 표면 밀도에 나타난 것과 동일한 범위에 걸쳐 있을 수 있다.
- [0421] 표면이, 예를 들어, $500,000/\mu\text{m}^2$ 의 올리고 밀도를 갖는 영역을 포함하는 한편, 또한 실질적으로 상이한 국소 밀도를 갖는 적어도 제2 영역을 포함할 수 있도록, 위에 열거한 바와 같은 국소 밀도는 표면에 걸쳐 밀도의 변동을 불가능하지 않는다.
- [0422] 일부 양상에서, 개시된 반응 제형 및 낮은-결합 지지체를 이용하는 핵산 혼성화 및/또는 증폭 반응의 수행은 형광 영상화 기법을 이용해서 평가될 수 있으며, 여기서, 영상의 콘트라스트 대 노이즈 비(CNR)는 지지체 상의 증폭 특이성 및 비특이적 결합을 평가함에 있어서 중요한 측정 기준을 제공한다. CNR은 통상적으로 다음과 같이 정의된다: $\text{CNR} = (\text{신호} - \text{배경}) / \text{노이즈}$. 배경 용어는 통상적으로, 명시된 관심 영역(region of interest: ROI)에서 특정 특징(회절 제한 스팟, DLS)을 둘러싸는 사이 영역에 대해 측정된 신호로 간주된다. 신호 대 노이즈 비(SNR)는 종종 전체 신호 품질의 기준점인 것으로 간주되지만, 개선된 CNR이 아래의 실시예에 나타내는 바와 같이 빠른 영상 포획을 필요로 하는 적용(예를 들어, 주기 시간이 최소화되는 시퀀싱 적용)에서 신호 품질에 대한 배경으로서 SNR에 대한 유의미한 이점을 제공할 수 있다는 것으로 나타날 수 있다. 높은 CNR에서, 정확한 구별(및 그에 따른 시퀀싱 적용의 경우에 정확한 염기 호출)에 도달하는 데 필요한 영상화 시간은 CNR의 보통의 개선에서조차 극적으로 감소될 수 있다. 영상화 통합 시간에 대한 영상화 데이터에서의 개선된 CNR은 지지체 표면 상의 클론 증폭된 핵산 콜로니와 같은 특징을 더 정확하게 검출하는 방법을 제공한다.
- [0423] 대부분의 양상불-기반 시퀀싱 접근에서, 배경 용어는 전형적으로 '사이(interstitial)' 영역과 관련된 신호로서 측정된다. "사이" 배경(Binter) 외에도, "내부(intrastitial)" 배경(Bintra)은 증폭된 DNA 콜로니에 의해 점유되는 영역 내에 존재한다. 이러한 두 배경 신호의 조합은 달성 가능한 CNR에 영향을 주고, 후속적으로 광학 기기 요건, 아키텍처 비용, 시약 비용, 실행 시간, 비용/개놈, 및 궁극적으로 환식 어레이 기반 시퀀싱 적용에 대한 정확도 및 데이터 품질에 직접 영향을 미친다. Binter 배경 신호는 다양한 공급원으로부터 생기고; 몇 가지 예에는 소모성 플로셀의 자동 형광, ROI로부터의 신호를 모호하게 할 수 있는 허위 형광 신호를 수득하는 검출 분자의 비특이적 흡착, 비특이적 DNA 증폭 산물의 존재(예를 들어, 프라이머 이량체로부터 생기는 것)이 포함된다. 전형적인 차세대 시퀀싱(NGS) 적용에서, 현재 시계(field-of-view: FOV)에서 이런 배경 신호를 시간에 따라 평균 내고, 차감한다. 개개 DNA 콜로니로부터 생기는 신호(즉, FOV에서 (신호)-B(사이))는 분류될 수 있는 식별될 수 있는 특징을 수득한다. 일부 양상에서, 내부 배경(B(내부))은 관심 표적에 특이적이지 않은 교락 형광 신호에 기여할 수 있지만, 동일한 ROI에 존재하고, 따라서 평균 내고 차감하는 것을 훨씬 더 어렵게 만든다.
- [0424] 본 명세서에 기재된 낮은 결합 코팅 지지체에 대한 핵산 증폭은 비특이적 결합을 감소시킴으로써 B(사이) 배경 신호를 감소시킬 수 있고, 특이적 핵산 증폭의 개선을 야기할 수 있으며, 사이 영역과 내부 영역 둘 다로부터 생긴 배경 신호에 영향을 미칠 수 있는 비특이적 증폭의 감소를 야기할 수 있다. 일부 양상에서, 개시된 혼성화 및/또는 증폭 반응 제형과 조합하여 선택적으로 사용되는 개시된 낮은-결합 코팅 지지체는 통상적인 지지체 및 혼성화, 증폭 및/또는 시퀀싱 프로토콜을 이용하여 달성된 것보다 2, 5, 10, 100, 250, 500 또는 1000-배만큼 CNR의 개선을 야기할 수 있다. 판독 또는 검출 방식으로서 형광 영상화를 사용하는 것과 관련하여 본 명세서에 기재되어 있지만, 광학 검출 방식과 비광학 검출 방식을 모두 포함하는 다른 검출 방식에 대해서도 개시된 낮은-결합 코팅 지지체 및 핵산 혼성화 및 증폭 제형의 사용에 대한 동일한 원칙이 적용된다.
- [0425] 본 명세서에 제공된 표제는 본 개시내용의 다양한 양상의 제한이 아니며, 이의 양상은 전체로서 명세서에 참조

에 의해 이해될 수 있다.

- [0426] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 달리 정의되지 않는 한 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 분자 생물학, 핵산 화학, 단백질 화학, 유전학, 미생물학, 유전자이식 세포 생산 및 혼성화의 기법에 관한 용어는 잘 공지되고 당업계에서 통상적으로 사용되는 것이다. 본 명세서에 기재된 기법 및 절차는 당업계에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전체적으로 인용되고 논의되는 다양한 일반적 및 더 구체적인 참고문헌에 기재되는 바와 같이 일반적으로 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2000)]을 참조한다. 또한 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)]을 참조한다. 본 명세서와 관련하여 이용되는 명명법 및 본 명세서에 기재된 실험 절차 및 기법은 당업계에 잘 알려지고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0427] 본 명세서의 내용에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수의 용어는 복수를 포함하며, 복수의 용어는 단수를 포함할 것이다. 단수의 형태 및 임의의 단어의 단수의 사용은 하나의 대상에 대해 달리 분명하게 그리고 모호하지 않게 제한되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.
- [0428] 대안의 용어(예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 한 또는 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하기 위해 취해진다는 것이 이해된다.
- [0429] 본 명세서에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다른 것의 유무와 상관없이 명시된 특징 또는 성분 각각의 구체적인 개시내용을 의미하기 위해 취해질 것이다. 예를 들어, 본 명세서의 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"은 "A 및 B"; "A 또는 B"; "A"(A 단독); 및 "B"(B 단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 유사한 방식으로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"은 다음의 양상 각각을 포괄하는 것으로 의도된다: "A, B 및 C"; "A, B 또는 C"; "A 또는 C"; "A 또는 B"; "B 또는 C"; "A 및 B"; "B 및 C"; "A 및 C"; "A"(A 단독); "B"(B 단독); 및 "C"(C 단독).
- [0430] 본 명세서 및 첨부하는 청구범위에서 사용되는 바와 같은 용어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "갖는" 및 "함유하는", 및 이들의 문법적 변형은 비제한적인 것으로 의도되며, 따라서, 목록에서 하나의 항목 또는 다수의 항목은 열거된 항목을 대체하거나 이에 부가되는 하나의 항목을 제외하지는 않는다. 본 명세서에서 양상이 "포함하는"이라는 언어로 기재된 경우에 "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진"에 관해 기재된 다른 유사한 양상이 또한 제공된다는 것이 이해된다.
- [0431] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약", "대략" 및 "실질적으로"는 값 또는 조성이 측정 또는 결정되는 방법, 즉, 측정 시스템의 제한에 부분적으로 따르는 당업자에 의해 결정되는 바와 같은 특정 값 또는 조성에 대한 허용 가능한 오차 범위 내인 값 또는 조성을 지칭한다. 예를 들어, "약", "대략" 또는 "실질적으로"는 당업계의 실행당 1 이상의 표준 편차를 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "대략"은 측정 시스템의 제한에 따라 최대 10% (즉, $\pm 10\%$) 이상의 범위를 의미할 수 있다. 예를 들어, 약 5mg은 4.5mg과 5.5mg 사이의 임의의 수를 포함할 수 있다. 더 나아가, 특히 생물학적 시스템 또는 과정에 대해, 상기 용어는 값의 최대 10배 또는 최대 5배를 의미할 수 있다. 특정 값 또는 조성이 본 개시내용에서 제공될 때, 달리 언급되지 않는 한, "약", "대략", "실질적으로"는 특정 값 또는 조성에 대한 허용 가능한 오차 범위 이내인 것으로 추정되어야 한다. 또한, 값의 범위 및/또는 하위범위가 제공되는 경우에, 범위 및/또는 하위범위는 범위 및/또는 하위범위의 중점을 포함할 수 있다.
- [0432] 본 명세서에서 사용된 "폴로니"는 시퀀싱을 위해 주형 분자로서 작용할 수 있는 애플리콘을 생성하기 위해 용액 중 또는 고체 지지체 상에서 클론 증폭될 수 있는 핵산 라이브러리 분자를 지칭한다. 일부 양상에서, 선형 라이브러리 분자는 원형 라이브러리 분자를 생성하도록 원형화될 수 있고, 원형화된 라이브러리 분자는 콘카타머를 생성하도록 용액 중 또는 지지체 상에서 클론 증폭될 수 있다. 일부 양상에서, 콘카타머는 시퀀싱될 수 있는 핵산 주형 분자로서 작용할 수 있다. 콘카타머는 때때로 폴로니로 지칭된다. 일부 양상에서, 폴로니는 뉴클레오타이드 가닥을 포함한다.
- [0433] 본 명세서에서 사용되는 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질" 및 다른 관련 용어는 상호 호환 가능하게 사용되고, 아미노산의 중합체를 지칭하며, 임의의 특정 길이로 제한되지 않는다. 폴리펩타이드는 천연 및 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 재조합 또는 화학적으로 합성된 형태를 포함한다. 폴리펩타이드는 또한 번역 후 변형, 예컨대, 단백질 분해 절단, 리보솜 스킵핑으로 인한 절단, 하이드록실화, 메틸화, 지질화, 아세틸화, 수모일화(SUMOylation), 유비퀴틴화, 글리코실화, 인산화 및/또는 이황화 결합 형성 아직 적용되

지 않은 전구체 분자를 포함한다. 이러한 용어는 천연 및 인공 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체(예컨대, 뮤테인, 변이체, 키메라 단백질 및 융합 단백질)뿐만 아니라 번역 후 또는 달리 공유적 또는 비공유적으로 변형된 단백질을 포괄한다.

[0434] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "중합효소" 및 이의 변이체는 뉴클레오타이드(이의 유사체 포함)가 핵산 가닥에 중합되는 것을 촉매할 수 있는 임의의 효소를 포함한다. 반드시 아니지만 전형적으로, 이러한 뉴클레오타이드 중합은 주형-의존적 방식으로 일어날 수 있다. 전형적으로, 중합효소는 뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레오타이드 중합의 촉매가 일어날 수 있는 1개 이상의 활성 부위를 포함한다. 일부 양상에서, 중합효소는 다른 효소 활성, 예컨대, 3'에서 5'로의 엑소뉴클레아제 활성 또는 5'에서 3'로의 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 일부 양상에서, 중합효소는 가닥 전위 활성을 갖는다. 중합효소는 천연 유래 중합효소 및 임의의 서브유닛 및 이들의 절단, 돌연변이체 중합효소, 변이체 중합효소, 재조합체, 융합 또는 다르게 조작된 중합효소, 화학적으로 개질된 중합효소, 합성 분자 또는 조립체, 및 뉴클레오타이드 중합을 촉매하는 능력을 보유하는 이들의 임의의 유사체, 유도체 또는 단편(예를 들어, 촉매적으로 활성인 단편)을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 양상에서, 중합효소는 세포로부터 단리될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 기술 또는 화학적 합성 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 일부 양상에서, 중합효소는 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 파지 유기체에서 발현될 수 있다. 일부 양상에서, 중합효소는 번역 후 변형된 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 중합효소는 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 파지로부터 유래될 수 있다. 중합효소는 DNA-전향적 DNA 중합효소 및 RNA-전향적 DNA 중합효소를 포함한다.

[0435] 본 명세서에서 사용되는 용어 "충실도"는 주형-의존적 DNA 중합효소에 의한 DNA 중합의 정확도를 지칭한다. DNA 중합효소의 충실도는 오류율(부정확한 뉴클레오타이드, 즉 주형 뉴클레오타이드에 상보적이지 않는 뉴클레오타이드를 혼입하는 빈도)에 의해 측정된다. DNA 중합의 정확도 또는 충실도는 중합효소 활성과 DNA 중합효소의 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성 모두에 의해 유지된다.

[0436] 본 명세서에서 사용되는 용어 "결합 복합체"는 핵산 듀플렉스, 중합효소, 및 유리 뉴클레오타이드 또는 다가 분자의 뉴클레오타이드 단위를 함께 결합시킴으로써 형성된 복합체를 지칭하며, 여기서, 핵산 듀플렉스는 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 주형 분자를 포함한다. 결합 복합체에서, 유리 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위는 핵산 주형 분자에서 상보적 뉴클레오타이드와 마주보는 위치에서 핵산 프라이머의 3' 말단에 결합될 수도 있고 결합되지 않을 수도 있다. "삼원 복합체"는 핵산 듀플렉스, 중합효소, 및 유리 뉴클레오타이드 또는 다가 분자의 뉴클레오타이드 단위를 함께 결합시킴으로써 형성되는 결합 복합체의 예이며, 여기서, 유리 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위는 핵산 주형 분자의 상보적 뉴클레오타이드에 마주보는 위치에서 (핵산 듀플렉스의 부분으로서) 핵산 프라이머의 3' 말단에 결합된다.

[0437] 용어 "지속 시간" 및 관련된 용어는 결합 복합체가 임의의 성분의 해리 없이 안정하게 남아있는 시간의 길이를 지칭하며, 여기서, 결합 복합체의 성분은 핵산 주형 및 핵산 프라이머, 중합효소, 다가 분자의 뉴클레오타이드 단위 또는 유리(예를 들어, 비접합) 뉴클레오타이드를 포함한다. 뉴클레오타이드 단위 또는 유리 뉴클레오타이드는 주형 분자에서 뉴클레오타이드 잔기에 상보적 또는 비상보적일 수 있다. 뉴클레오타이드 단위 또는 유리 뉴클레오타이드는 핵산 주형 분자에서 상보적 뉴클레오타이드 잔기와 마주보는 위치에서 핵산 프라이머의 3' 말단에 결합할 수 있다. 지속 시간은 결합 복합체의 안정성 및 결합 상호작용의 강도를 나타낸다. 지속 시간은 결합 복합체의 개시 및/또는 지속기간을 관찰함으로써, 예컨대, 결합 복합체의 표지된 성분으로부터의 신호를 관찰함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 표지된 뉴클레오타이드 또는 1개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 표지된 시약은 결합 복합체에 존재할 수 있고, 따라서 결합 복합체의 지속 시간 동안 표지가 검출되는 신호를 허용한다. 하나의 예시적인 표지는 형광 표지이다. 결합 복합체(예를 들어, 삼원 복합체)는 임의의 중합효소, 주형 분자, 프라이머 및/또는 뉴클레오타이드 단위 또는 뉴클레오타이드 사이의 해리를 야기하는 조건을 가할 때까지 안정하게 남아있다. 예를 들어, 해리 조건은 결합 복합체를 세정제, EDTA 및/또는 물 중 임의의 하나 또는 임의의 조합과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0438] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드" 및 본 명세서에서 사용되는 기타 관련된 용어는 상호 교환적으로 사용되고, 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, 임의의 특정 길이로 제한되지 않는다. 핵산은 재조합체이고, 화학적으로 합성된 형태를 포함한다. 핵산은 DNA 분자(예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자(예를 들어, mRNA), 뉴클레오타이드 유사체를 이용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체(예를 들어, 펩타이드 핵산 및 비천연 유래 뉴클레오타이드 유사체), 및 DNA 및 RNA를 함유하는 키메라 형태를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중가닥일 수 있다. 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체를 포함하며, 여기서 뉴클레오타이드는 천연 또는 비천연 염기 및/또는 당을 포함한다. 핵산은 천연 유래 뉴클레오타이드간 결합, 예를 들어 포스포다이에스터

결합을 포함한다. 핵산은 포스포로티오에이트, 포스포로티올에이트, 또는 펩타이드 핵산(PNA) 결합을 포함하는 비천연 뉴클레오사이드간 연결을 포함한다. 일부 양상에서, 핵산은 한 가지 유형의 폴리뉴클레오타이드 또는 둘 이상의 상이한 유형의 폴리뉴클레오타이드의 혼합물을 포함한다.

[0439] 용어 "프라이머" 및 본 명세서에서 사용된 관련된 용어는 DNA 및/또는 RNA 폴리뉴클레오타이드 주형과 혼성화하여 듀플렉스 분자를 형성할 수 있는 천연 또는 합성인 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 프라이머는 임의의 길이를 가질 수 있지만, 전형적으로 4 내지 50개의 뉴클레오타이드의 범위일 수 있다. 전형적인 프라이머는 5' 단부 및 3' 단부를 포함한다. 프라이머의 3' 단부는 중합효소-촉매된 프라이머 연장 반응에서 뉴클레오타이드 중합 개시 부위로서 작용하는 3' OH 모이어티를 포함할 수 있다. 대안적으로, 프라이머의 3' 말단은 3' OH 모이어티를 결여할 수 있거나, 또는 중합효소-매개된 반응에서 뉴클레오타이드 중합을 저해하는 말단의 3' 차단기를 포함할 수 있다. 프라이머의 길이를 따라서 임의의 1개의 뉴클레오타이드, 또는 1개 초과 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지될 수 있다. 프라이머는 용액 중에 있을 수 있거나(예를 들어, 가용성 프라이머) 또는 지지체(예를 들어, 포획 프라이머)에 고정될 수 있다.

[0440] 용어 "주형 핵산", "주형 폴리뉴클레오타이드", "표적 핵산", "표적 폴리뉴클레오타이드", "주형 가닥" 및 기타 변형은 상보적 핵산 가닥을 생성하기 위한 기초 핵산 분자로서 작용하는 핵산 가닥을 지칭한다. 주형 핵산은 단일 가닥 또는 이중가닥일 수 있거나, 또는 주형 핵산은 단일 가닥 또는 이중가닥 부분을 가질 수 있다. 주형 핵산의 서열은 상보적 가닥의 서열에 부분적 또는 전체적으로 상보적일 수 있다. 주형 핵산은 천연 유래 공급원, 재조합 형태로부터 얻을 수 있거나 임의의 유형의 핵산 유사체를 포함하도록 화학적으로 합성될 수 있다. 주형 핵산은 선형, 원형 또는 다른 형태일 수 있다. 주형 핵산은 관심 서열로도 알려진 삽입 서열을 갖는 삽입 영역을 포함할 수 있다. 주형 핵산은 또한 적어도 1개의 어댑터 서열을 포함할 수 있다. 주형 핵산은 관심 서열 및 적어도 1개의 어댑터 서열의 2개 또는 탠덤 복제물을 갖는 콘카티머일 수 있다. 삽입 영역은 신선 동결 파라핀 포매 조직, 바늘 생검, 무세포 순환 DNA, 또는 임의의 유형의 핵산 라이브러리로부터 얻은 염색체, 게놈, 세포 소기관 (예를 들어, 미토콘드리아, 엽록체 또는 리보솜), 재조합 분자, 클로닝, 증폭된, cDNA, RNA, 예컨대, 전구체 mRNA 또는 mRNA, 올리고뉴클레오타이드, 전체 게놈 DNA를 포함하는 임의의 형태로 단리될 수 있다. 삽입 영역은 유기체, 예컨대, 원핵생물, 진핵생물(예를 들어, 인간, 식물 및 동물), 진균, 바이러스 세포, 조직, 정상 또는 질환 세포 또는 조직, 혈액, 소변, 혈청, 림프, 종양, 타액, 항문 및 질 분비물을 포함하는 체액, 양막 샘플, 땀, 정액, 환경 샘플, 배양 샘플, 또는 재조합 분자 생물학 또는 화학적 합성 방법을 이용해서 제조된 합성된 핵산 분자로부터를 포함하는 임의의 공급원으로부터 단리될 수 있다. 삽입 영역은 두부, 경부, 뇌, 유방, 난소, 자궁경부, 결장, 직장, 자궁내막, 담낭, 장, 방광, 전립선, 고환, 간, 폐, 신장, 식도, 췌장, 갑상선, 뇌하수체, 흉선, 피부, 심장, 후두 또는 다른 기관을 포함하는 임의의 기관으로부터 단리될 수 있다. 주형 핵산은 시퀀싱 및 조성 분석을 포함하는 핵산 분석이 가해질 수 있다.

[0441] 핵산 분자에 관해 사용될 때, 용어 "혼성화하다" 또는 "혼성화하는" 또는 "혼성화" 또는 다른 관련된 용어는 듀플렉스 핵산을 형성하는 두 상이한 핵산 사이의 수소 결합을 지칭한다. 혼성화는 또한 듀플렉스 영역을 갖는 자기-혼성화 분자를 형성하는 단일 핵산 분자의 두 상이한 영역 사이에 수소 결합을 포함한다. 혼성화는 듀플렉스 이중가닥 핵산, 또는 핵산 분자 내의 이중가닥 영역을 형성하는 왓슨-크릭 또는 후그스틴(Hoogsteen) 결합을 포함할 수 있다. 이중가닥 핵산, 또는 단일 핵산의 두 상이한 영역은 전체적으로 상보적이거나, 부분적으로 상보적일 수 있다. 상보적 핵산 가닥은 이들의 전체 길이에 걸쳐 서로 혼성화될 필요는 없다. 상보적 염기 짝짓기는 표준 A-T 또는 C-G 염기 짝짓기일 수 있거나, 또는 염기-짝짓기 상호작용의 다른 형태일 수 있다. 듀플렉스 핵산은 미스매칭된 염기 짝짓기된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0442] 용어 "뉴클레오타이드" 및 관련 용어는 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스), 및 적어도 1개의 포스페이트기를 포함하는 분자를 지칭한다. 정규 또는 비정규 뉴클레오타이드는 상기 용어의 사용과 일치된다. 일부 양상에서, 포스페이트는 모노포스페이트, 다이포스페이트 또는 트라이포스페이트, 또는 상응하는 포스페이트 유사체를 포함한다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 포스페이트기를 포함한다. 용어 "뉴클레오사이드"는 방향족 염기 및 당을 포함하는 분자를 지칭한다.

[0443] 뉴클레오타이드(및 뉴클레오사이드)는 전형적으로 천연 유래, 치환, 변형 또는 조작된 변이체, 또는 이들의 유사체를 포함하는 핵산에서 통상적으로 발견되는 치환 또는 비치환된 질소-함유 모 헤테로방향족 고리를 포함하는 헤테로 환식 염기를 포함한다. 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)의 염기는 적절한 상보적 염기와 왓슨-크릭 및/또는 후그스틴 수소결합을 형성할 수 있다. 예시적인 염기는 하기와 같은 퓨린 및 피리미딘을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: 2-아미노퓨린, 2,6-다이아미노퓨린, 아데닌(A), 에데노아데닌, N6-Δ2-아이소펜텐일아데닌(6iA), N6-Δ2-아이소펜텐일-2-메틸티오아데닌(2ms6iA), N6-메틸아데닌, 구아닌(G), 아이소구아닌, N2-

다이메틸구아닌(dmG), 7-메틸구아닌(7mG), 2-티오피리미딘, 6-티오구아닌(6sG), 하이포잔틴 및 06-메틸구아닌; 7-테아자-퓨린, 예컨대, 7-테아자아데닌(7-테아자-A) 및 7-테아자구아닌(7-테아자-G); 피리미딘, 예컨대, 사이토신(C), 5-프로핀일사이토신, 아이소사이토신, 티민(T), 4-티오티민(4sT), 5,6-다이하이드로티민, 04-메틸티민, 유라실(U), 4-티오유라실(4sU) 및 5,6-다이하이드로유라실(다이하이드로유라실; D); 인돌, 예컨대, 나이트로인돌 및 4-메틸인돌; 피롤, 예컨대, 나이트로피롤; 네불라린; 이노신; 하이드록시메틸사이토신; 5-메틸사이토신; 염기(Y); 및 메틸화, 글리코실화 및 아실화된 염기 모이어티 등. 추가적인 예시적인 염기는 문헌[Fasman, 1989, in "Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla]에서 찾을 수 있다.

[0444] 뉴클레오타이드(및 뉴클레오사이드)는 전형적으로 당 모이어티, 예컨대, 탄소환식 모이어티(Ferraro and Gotor 2000 Chem. Rev. 100: 4319-48), 비환식 모이어티(Martinez, et al., 1999 Nucleic Acids Research 27: 1271-1274; Martinez, et al., 1997 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters vol. 7: 3013-3016), 및 기타 당 모이어티(Joeng, et al., 1993 J. Med. Chem. 36: 2627-2638; Kim, et al., 1993 J. Med. Chem. 36: 30-7; Eschenmosser 1999 Science 284:2118-2124; 및 미국 특허 제5,558,991호)를 포함한다. 당 모이어티는 리보실; 2'-데옥시리보실; 3'-데옥시리보실; 2',3'-다이데옥시리보실; 2',3'-다이데하이드로다이데옥시리보실; 2'-알콕시리보실; 2'-아지도리보실; 2'-아미노리보실; 2'-플루오로리보실; 2'-머캅토리보실; 2'-알킬티오리보실; 3'-알콕시리보실; 3'-아지도리보실; 3'-아미노리보실; 3'-플루오로리보실; 3'-머캅토리보실; 3'-알킬티오리보실 탄소환식; 비환식 또는 기타 변형된 당을 포함한다.

[0445] 일부 양상에서, 뉴클레오타이드는 1, 2 또는 3개의 인 원자의 사슬을 포함하며, 사슬은 전형적으로 에스터 또는 포스포르아마이드 연결을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 양상에서, 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되는 인 사슬을 갖는 유사체이다. 일부 양상에서, 사슬의 인 원자는 O, S 또는 BH₃를 포함하는 치환된 측기를 포함한다. 일부 양상에서, 사슬은 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포르다이트오에이트 및 0-메틸포스포로아미다이트기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트기를 포함한다.

[0446] 핵산에 관해 사용될 때, 용어 "연장하다", "연장시키는", "연장" 및 기타 변이체는 핵산 분자에 1개 이상의 뉴클레오타이드의 혼입을 지칭한다. 뉴클레오타이드 혼입은 핵산 가닥의 말단 3' OH에 1개 이상의 뉴클레오타이드의 중합을 포함하여, 핵산 가닥의 연장을 초래한다. 뉴클레오타이드 혼입은 천연 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체에 의해 수행될 수 있다. 반드시 아니지만 전형적으로, 뉴클레오타이드 혼입은 주형-의존적 방식으로 일어난다. DNA 중합효소 또는 RNA 중합효소에 의해 촉매되는 프라이머 연장을 비롯한, 핵산 분자를 연장시키는 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다.

[0447] 용어 "리포터 모이어티", "리포터 모이어티" 또는 관련 용어는 검출 가능한 신호를 생성하거나 생성하도록 야기하는 화합물을 지칭한다. 리포터 모이어티는 때때로 "표지"로 불린다. 발광, 광발광, 전계발광, 생물발광, 화학발광, 형광, 인광, 발색단, 방사성동위원소, 전기화학, 질량분석법, 라만, 합텐, 친화도 태그, 원자 또는 효소를 포함하는 임의의 적합한 리포터 모이어티가 사용될 수 있다. 리포터 모이어티는 화학적 또는 물리적 변화(예를 들어, 열, 광, 전기, pH, 염 농도, 효소 활성 또는 근접 사건)으로부터 초래되는 검출 가능한 신호를 생성한다. 근접 사건은 서로 접근하는 또는 서로 회합하거나 서로 결합하는 2개의 리포터 모이어티를 포함한다. 당업자가 리포터 모이어티를 선택하는 것은 잘 공지되어 있어서 각각이 여기 방사선을 흡수하고/하거나 다른 리포터 모이어티와 구별 가능한 파장에서 형광을 방출하여 동일한 반응에서 또는 상이한 반응에서 상이한 리포터 모이어티의 존재의 모니터링을 가능하게 한다. 스펙트럼으로 별개인 방출 프로파일을 갖거나, 또는 최소 중복 스펙트럼 방출 프로파일을 갖는 2개 이상의 상이한 리포터 모이어티가 선택될 수 있다. 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드, 핵산, 효소(예를 들어, 중합효소 또는 역전사효소), 또는 지지체(예를 들어, 표면)에 연결(예를 들어, 작동 가능하게 연결)될 수 있다.

[0448] 리포터 모이어티(또는 표지)는 형광 표지 또는 형광단을 포함한다. 형광 표지 또는 형광단으로 작용할 수 있는 예시적인 형광 모이어티는 플루오레세인 및 플루오레세인 유도체, 예컨대, 카복시플루오레세인, 테트라클로로플루오레세인, 헥사클로로플루오레세인, 카복시나프토플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오시아아네이트, NHS-플루오레세인, 아이오도아세트아미도플루오레세인, 플루오레세인 말레이미드, SAMSA-플루오레세인, 플루오레세인 티오세미카바자이드, 카보하이드라지노메틸티오아세틸-아미노 플루오레세인, 로다민 및 로다민 유도체, 예컨대, TRITC, TMR, 리사민 로다민, Texas Red, 로다민 B, 로다민 6G, 로다민 10, NHS-로다민, TMR-아이오도아세트아마이드, 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드, 리사민 로다민 B 설포닐 하이드라진, Texas Red 설포닐 클로

라이드, Texas Red 하이드라자이드, 쿠마린 및 쿠마린 유도체, 예컨대, AMCA, AMCA-NHS, AMCA-설폰-NHS, AMCA-HPDP, DCIA, AMCE-하이드라자이드, BODIPY 및 유도체, 예컨대, BODIPY FL C3-SE, BODIPY 530/550 C3, BODIPY 530/550 C3-SE, BODIPY 530/550 C3 하이드라자이드, BODIPY 493/503 C3 하이드라자이드, BODIPY FL C3 하이드라자이드, BODIPY FL IA, BODIPY 530/551 IA, Br-BODIPY 493/503, Cascade Blue 및 유도체, 예컨대, Cascade Blue 아세틸 아자이드, Cascade Blue 카바페린, Cascade Blue 에틸렌다이아민, Cascade Blue 하이드라자이드, Lucifer Yellow 및 유도체, 예컨대, Lucifer Yellow 아이오도아세트아마이드, Lucifer Yellow CH, 사아아닌 및 유도체, 예컨대, 인돌류계 사아아닌 염료, 벤조-인돌류계 사아아닌 염료, 피리딘계 사아아닌 염료, 티오졸류계 사아아닌 염료, 퀴놀리늄계 사아아닌 염료, 이미다졸류계 사아아닌 염료, Cy 3, Cy5, 란탄족 킬레이트 및 유도체, 예컨대, BCPDA, TBP, TMT, BHHCT, BCOT, 유로퓸 킬레이트, 터븀 킬레이트, Alexa Fluor 염료, DyLight 염료, Atto 염료, LightCycler Red 염료, CAL Flour 염료, JOE 및 이들의 유도체, Oregon Green 염료, WellRED 염료, IRD 염료, 피코에리트린 및 피콜빌린 염료, Malachite green, 스틸벤, DEG 염료, NR 염료, 근적외선 염료 및 당업계에 알려진 다른 것, 예컨대, 문헌[Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, Oreg.) 6th Edition; Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Plenum Press New York (1999), 또는 Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2nd Edition]에 기재된 것, 또는 이들의 유도체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 사이아닌 염료는 설폰화된 또는 비-설폰화된 형태로 존재할 수 있고, 2개의 질소 원자 사이의 폴리메틴 브리지에 의해 분리되는 2종의 인돌렌, 벤조-인돌류, 피리딘, 티오졸류 및/또는 퀴놀리늄계로 이루어진다. 상업적으로 입수 가능한 사아아닌 형광단은, 예를 들어, Cy3(1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-2-(3-{1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-3,3-다이메틸-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴}프로프-1-엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌 또는 1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-2-(3-{1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-3,3-다이메틸-5-설폰-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴}프로프-1-엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌-5-설폰에이트를 포함할 수 있음), Cy5(1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-3,3-다이메틸-5-인돌-2-일리덴)펜타-1,3-다이엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌-1-이움 또는 1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-3,3-다이메틸-5-설폰인돌-2-일리덴)펜타-1,3-다이엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌-1-이움-5-설폰에이트를 포함할 수 있음) 및 Cy7(1-(5-카복시펜틸)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-에틸-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴)헥사-1,3,5-트라이엔-1-일]-3H-인돌 또는 1-(5-카복시펜틸)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-에틸-5-설폰-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴)헥사-1,3,5-트라이엔-1-일]-3H-인돌-5-설폰에이트를 포함할 수 있음)을 포함하며, "Cy"는 '사아아닌'을 나타내고, 첫 번째 숫자는 2개의 인돌렌인기 사이의 탄소 원자 수를 식별한다. 인돌렌인보다는 옥사졸 유도체인 Cy2, 및 벤조-유도체화된 Cy3.5, Cy5.5 및 Cy7.5는 이런 규칙에 대한 예외이다.

[0449] 일부 양상에서, 다중 분류가 단일 여기 및 영상화 단계 하에 수행될 수 있도록 리포터 모이어티는 FRET 쌍일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, FRET는 여기 교환(Forster) 전달 또는 전자-교환(Dexter) 전달을 포함할 수 있다.

[0450] 용어 "연결된", "결합된", "부착된" 및 이들의 변형은 특정 절차에서의 사용을 견뎌내는 충분한 안정성을 갖는 화합물 또는 분자의 임의의 조합 사이의 임의의 유형의 융합, 결합, 부착 또는 회합을 포함한다. 절차는 뉴클레오타이드 일지적-결합; 뉴클레오타이드 혼입; 탈-차단(de-blocking); 세척; 제거; 흐름; 검출; 영상화 및/또는 식별을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 결합은, 예를 들어, 공유, 이온, 수소, 쌍극자-쌍극자, 친수성, 소수성, 또는 친화도 결합, 반데르발스 힘을 수반하는 결합 또는 회합, 기계적 결합 등을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 이러한 결합은 분자내에서 일어나며, 예를 들어, 단일 가닥 또는 이중가닥 선형 핵산 분자의 말단을 함께 연결하여 원형 분자를 형성한다. 일부 양상에서, 이러한 연결은 상이한 분자의 조합 사이에서, 또는 핵산 분자와 고체 표면 사이의 연결; 단백질과 검출 가능한 수용체 모이어티 사이의 연결; 뉴클레오타이드와 검출 가능한 수용체 모이어티 사이의 연결 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는, 분자와 비분자 사이에서 일어날 수 있다. 결합의 일부 예는, 예를 들어, 문헌[Hermanson, G., "Bioconjugate Techniques", Second Edition (2008); Aslam, M., Dent, A., "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", London: Macmillan (1998); Aslam, M., Dent, A., "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", London: Macmillan (1998)]에서 찾을 수 있다.

[0451] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "작동 가능하게 연결된" 및 "작동 가능하게 결합된" 또는 관련된 용어는 성분의 병치를 지칭한다. 병치된 성분은 공유적으로 함께 연결될 수 있다. 예를 들어, 2개의 핵산 성분은 함께 효소에 의해 결합될 수 있으며, 여기서, 2개의 성분과 함께 결합되는 연결이 포스포다이에스터 결합을 포함

한다. 제1 핵산 및 제2 핵산 성분은 함께 연결될 수 있으며, 여기서, 제1 핵산 성분은 제2 핵산 성분에 기능을 부여할 수 있다. 예를 들어, 프라이머 결합 서열과 관심 서열 사이의 연결은 프라이머에 결합할 수 있는 부분을 갖는 핵산 라이브러리 분자를 형성한다. 다른 예에서, 이식유전자(예를 들어, 폴리펩타이드 또는 핵산 관심 서열을 암호화하는 핵산)는 벡터에 결합될 수 있으며, 여기서, 연결은 벡터에 함유된 이식유전자 서열의 발현 또는 기능화를 가능하게 한다. 일부 양상에서, 이식유전자는 이식유전자의 발현에 영향을 미치는 숙주 세포 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 양상에서, 벡터는 프로모터 서열, 인핸서, 전사 및/또는 번역 개시 서열, 전사 및/또는 번역 종결 서열, 폴리펩타이드 분비 신호 서열 등을 포함하는 적어도 1개의 숙주 세포 조절 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 숙주 세포 조절 서열은 이식유전자의 수준, 시기 및/또는 위치의 발현을 제어한다.

[0452] 용어 "어댑터" 및 관련된 용어는 표적 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결(현수)될 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭하며, 여기서, 어댑터는 공동 결합된 어댑터-표적 분자에 기능을 부여한다. 어댑터는 DNA, RNA, 키메라 DNA/RNA, 또는 이들의 유사체를 포함한다. 어댑터는 적어도 1개의 리보뉴클레오타이드 잔기를 포함할 수 있다. 어댑터는 단일 가닥, 이중가닥일 수 있거나, 또는 단일 가닥 및/또는 이중가닥 부분을 가질 수 있다. 어댑터는 선형, 줄기-루프, 헤어핀 또는 Y-형태로 배치될 수 있다. 어댑터는 4 내지 100개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 길이일 수 있다. 어댑터는 평활 말단, 돌출부 말단, 또는 둘 다의 조합을 가질 수 있다. 돌출부 말단은 5' 돌출부 및 3' 돌출부 말단을 포함한다. 단일 가닥 어댑터의 5' 단부, 또는 이중가닥 어댑터의 1개의 가닥은 5' 포스페이트기를 갖거나 5' 포스페이트기를 결여할 수 있다. 어댑터는 표적 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 꼬리 어댑터)에 혼성화되지 않는 5' 꼬리를 포함할 수 있거나, 또는 어댑터는 꼬리가 아닐 수 있다. 어댑터는 증폭 프라이머, 시퀀싱 프라이머 또는 포획 프라이머(예를 들어, 가용성 또는 고정된 포획 프라이머)와 같은 프라이머의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 무작위 서열 또는 축퇴 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 1개의 이노신 잔기를 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 1개의 포스포로티오에이트, 포스포로티올에이트 및/또는 포스포아미데이트 연결을 포함할 수 있다. 어댑터는 다중복합 분석에서 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 삽입 서열)를 상이한 샘플 공급원과 구별하기 위해 사용될 수 있는 바코드 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 어댑터가 현수된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있는 고유 식별 서열(예를 들어, 고유 분자 지표(고유 분자 지표) UMI; 또는 고유 분자 태그)을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 고유 식별 서열은 오류 정정 및 정확도를 증가시키고/시키거나, 위양성 변이체 호출 비율을 감소시키고/시키거나 변이체 검출의 민감도를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 어댑터는 I형, II형, III형, IV형, Hs형 또는 IIB형으로 이루어진 군으로부터 선택된 임의의 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함하는 적어도 하나의 제한 효소 인식 서열을 포함할 수 있다.

[0453] 용어 "범용 서열", "범용 어댑터 서열" 및 관련된 용어는 둘 이상의 폴리뉴클레오타이드 분자 중에서 공통되는 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 예를 들어, 공동 결합된 분자의 집단이 동일한 범용 어댑터 서열을 지니도록 동일한 범용 서열을 갖는 어댑터는 복수의 폴리뉴클레오타이드에 결합될 수 있다. 범용 어댑터 서열의 예는 증폭 프라이머 서열, 시퀀싱 프라이머 서열 또는 포획 프라이머 서열(예를 들어, 가용성 또는 지지체 고정된 포획 프라이머)을 포함한다.

[0454] 일부 양상에서, 지지체는 고체, 반고체 또는 둘 다의 조합물이다. 일부 양상에서, 지지체는 다공성, 반다공성, 비다공성 또는 다공성의 임의의 조합이다. 일부 양상에서, 지지체는 실질적으로 평면, 오목, 볼록, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 일부 양상에서, 지지체는, 예를 들어, 모세관 또는 모세관의 내면을 포함하는 원통형일 수 있다.

[0455] 일부 양상에서, 지지체의 표면은 실질적으로 매끄러울 수 있다. 일부 양상에서, 범프, 에칭, 기공, 3차원 스케폴드, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 지지체는 규칙적 또는 불규칙적으로 질감처리될 수 있다.

[0456] 일부 양상에서, 지지체는 구체, 반구체, 원통형, 배럴형, 도넛형, 원판형, 막대형, 원뿔형, 삼각형, 입방체, 다각형, 관형 또는 와이어형상을 포함하는 임의의 형상을 갖는 비드를 포함한다.

[0457] 지지체는 유리, 용융 실리카, 실리콘, 중합체(예를 들어, 폴리스타이렌(PS), 거대 다공성 폴리스타이렌(MPPS), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트(PC), 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌(PE), 고밀도 폴리에틸렌(HDPE), 환식 올레핀 중합체(COP), 환식 올레핀 공중합체(COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 물질로부터 제작될 수 있다. 유리와 플라스틱 기재 둘 다의 다양한 조성이 상정된다.

[0458] 일부 양상에서, 지지체의 표면은 하나 이상의 화합물로 코팅되어 지지체 상에 부동태화된 층을 생성한다. 일부

양상에서, 지지체는 지지체 상에서 개선된 핵산 혼성화 및 증폭 성능을 가능하게 하는 낮은 비-특이적 결합 표면을 포함한다. 일반적으로, 지지체는 공유적 또는 비공유적으로 부착된 낮은-결합, 화학적 변형 층 중 1개 이상의 층, 예를 들어, 실란층, 중합체 필름, 및 지지체에 복수의 핵산 주형 분자를 고정시키기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 공유적 또는 비공유적으로 부착된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0459]

일부 양상에서, 표면 코팅의 친수성(또는 수용액에 의한 "습윤성") 정도는, 예를 들어, 작은 물방울이 표면에 위치되는 물 접촉각의 측정을 통해 평가될 수 있고, 표면과 이의 접촉각은, 예를 들어, 광학 텐시오미터를 이용하여 측정된다. 일부 양상에서, 정적 접촉각이 결정될 수 있다. 일부 양상에서, 전진 또는 후진 접촉각이 결정될 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 친수성, 낮은-결합 지지체 표면에 대한 물 접촉각은 약 0도 내지 약 30도의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 친수성, 낮은-결합 지지체 표면에 대한 물 접촉각은 50도, 40도, 30도, 25도, 20도, 18도, 16도, 14도, 12도, 10도, 8도, 6도, 4도, 2도 또는 1도 이하일 수 있다. 다수의 경우에 접촉각은 40도 이하이다. 당업자라면 본 개시내용의 주어진 친수성, 낮은 결합 지지체 표면이 이 범위 내의 다른 것의 값을 갖는 물 접촉각을 나타낼 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0460]

본 개시내용은 지지체에 고정된 복수의 (예를 들어, 둘 이상의) 핵산 주형을 제공한다. 일부 양상에서, 고정된 복수의 핵산 주형은 동일한 서열을 갖거나, 상이한 서열을 갖는다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형에서 개개 핵산 주형 분자는 지지체 상의 다른 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 복수의 핵산 주형에서 2개 이상의 개개 핵산 주형 분자는 지지체 상의 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 지지체는 어레이에 배열된 복수의 부위를 포함한다. 용어 "어레이"는 지지체 상의 사전 결정된 위치에 위치되어 부위의 어레이를 형성하는 복수의 부위를 포함하는 지지체를 지칭한다. 부위는 분리될 수 있고, 틈새 영역에 의해 분리될 수 있다. 일부 양상에서, 지지체 상의 사전 결정된 부위는 행 또는 열에 1차원으로 배열될 수 있거나, 또는 행 및 열에서 2차원으로 배열된다. 일부 양상에서, 복수의 사전 결정된 부위는 조직화된 방식으로 지지체 상에 배열된다. 일부 양상에서, 복수의 사전 결정된 부위는 직선형, 육각형 패턴, 그리도 패턴, 반사 대칭을 갖는 패턴, 회전 대칭을 갖는 패턴 등을 포함하는 임의의 유기체화된 패턴으로 배열된다. 부위의 상이한 쌍 사이의 피치(pitch)는 동일할 수도 있고 다를 수도 있다. 일부 양상에서, 지지체는 μm 당 약 102 내지 1015개 부위 이상의 표면 밀도로 복수의 부위에서 고정된 핵산 주형 분자를 가져서 핵산 주형 어레이를 형성할 수 있다. 일부 양상에서, 지지체는 적어도 102개의 부위, 적어도 103개의 부위, 적어도 104개의 부위, 적어도 105개의 부위, 적어도 106개의 부위, 적어도 107개의 부위, 적어도 108개의 부위, 적어도 109개의 부위, 적어도 1010개의 부위, 적어도 1011개의 부위, 적어도 1012개의 부위, 적어도 1013개의 부위, 적어도 1014개의 부위, 적어도 1015개 이상의 부위를 포함하며, 부위는 지지체 상의 사전 결정된 위치에 위치된다. 일부 양상에서, 지지체 상의 복수의 사전 결정된 부위(예를 들어, 102 내지 1015개 이상의 부위)는 핵산 주형과 고정되어 핵산 주형 어레이를 형성한다. 일부 양상에서, 고정된 표면 포획 프라이머 또는 핵산 주형에 대한 혼성화에 의해 복수의 사전 결정된 부위에 고정된 핵산 주형은 표면 포획 프라이머에 공유적으로 부착된다. 일부 양상에서, 핵산 주형은 복수의 사전 결정된 부위에 고정되고, 예를 들어, 102 내지 1015개 이상의 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 지지체 상의 복수의 부위에서 고정된 핵산 주형은 선형 또는 원형 핵산 주형 분자 또는 선형 분자와 원형 분자 둘 다의 혼합물을 포함한다. 일부 양상에서, 고정된 핵산 주형은 복수의 사전 결정된 부위에서 고정된 핵산 폴리머를 생성한다. 일부 양상에서, 개개의 고정된 핵산 주형 분자는 관심의 표적 서열의 하나의 복제물을 포함하거나, 관심의 표적 서열의 둘 이상의 탠덤 복제물을 갖는 콘카타머를 포함한다.

[0461]

일부 양상에서, 지지체 상의 무작위 위치에 위치한 복수의 부위를 포함하는 지지체는 본 명세서에서 그 위에 무작위로 위치한 부위를 갖는 지지체로서 지칭된다. 지지체 상의 무작위로 위치한 부위의 위치는 사전 결정되지 않는다. 복수의 무작위로 위치한 부위는 불규칙적 및/또는 예측 가능하지 않은 방식으로 지지체 상에 배열된다. 일부 양상에서, 지지체는 적어도 102개의 부위, 적어도 103개의 부위, 적어도 104개의 부위, 적어도 105개의 부위, 적어도 106개의 부위, 적어도 107개의 부위, 적어도 108개의 부위, 적어도 109개의 부위, 적어도 1010개의 부위, 적어도 1011개의 부위, 적어도 1012개의 부위, 적어도 1013개의 부위, 적어도 1014개의 부위, 적어도 1015개 이상의 부위를 포함하며, 부위는 지지체 상에 무작위로 위치된다. 일부 양상에서, 지지체 상에서 복수의 무작위로 위치한 부위(예를 들어, 102 내지 1015개 이상의 부위)는 핵산 주형과 함께 고정되어 핵산 주형이 고정된 지지체를 형성한다. 일부 양상에서, 고정된 표면 포획 프라이머 또는 핵산 주형에 대한 혼성화에 의해 복수의 무작위로 위치한 부위에 고정된 핵산 주형은 표면 포획 프라이머에 공유적으로 부착된다. 일부 양상에서, 핵산 주형은 복수의 무작위로 위치한 부위에 고정되고, 예를 들어, 102 내지 1015개 이상의 부위에 고정된다. 일부 양상에서, 지지체 상의 복수의 부위에서 고정된 핵산 주형은 선형 또는 원형 핵산 주형 분자 또는 선형 분자와 원형 분자 둘 다의 혼합물을 포함한다. 일부 양상에서, 고정된 핵산 주형은 복수의 무작위로 위치한 부위에서 고정된 핵산 폴리머를 생성한다. 일부 양상에서, 개개의 고정된 핵산 주형 분자는 관심의 표적 서열의 하

나의 복제물을 포함하거나, 관심의 표적 서열의 둘 이상의 탠덤 복제물을 갖는 콘카타머를 포함한다.

- [0462] 일부 양상에서, 지지체 상의 사전 결정된 또는 무작위 부위에 고정된 핵산 주형 분자에 대해, 지지체 상에서 복수의 고정된 핵산 주형 분자는 시약(예를 들어, 중합효소, 다가 분자, 뉴클레오타이드, 2가 양이온 및/또는 완충제 등을 포함하는 효소)의 용액이 지지체 상에 흐르는 것을 가능하게 하여 서로 유체 연통하여, 지지체 상에서 복수의 고정된 핵산 주형 분자가 대량 병렬 방식으로 시약과 반응될 수 있다. 일부 양상에서, 복수의 고정된 핵산 주형 분자의 유체 연통은 뉴클레오타이드 결합 분석을 수행하고/하거나 복수의 고정된 핵산 콘카타머 주형 분자 상에서 뉴클레오타이드 중합 반응(예를 들어, 프라이머 연장 또는 시퀀싱)을 수행하기 위해, 대량 병렬 시퀀싱을 위해 검출 및 영상화를 수행하기 위해 사용될 수 있다. 일부 양상에서, 용어 "고정된" 및 관련 용어는 사전 결정된 또는 무작위 위치에서 지지체에 부착된 핵산 분자 또는 효소(예를 들어, 중합효소)를 지칭하며, 핵산 분자 또는 효소는 공유 결합 또는 비공유 상호작용을 통해 지지체에 직접 부착되거나, 핵산 분자 또는 효소는 지지체 상의 코팅에 부착된다.
- [0463] 낮은 결합 표면 코팅에 관해 사용될 때, 다중층 표면 코팅의 하나 이상의 층은 분지된 중합체를 포함할 수 있거나 선형일 수 있다. 적합한 분지된 중합체의 예는 분지된 PEG, 분지된 폴리(비닐 알코올)(분지된 PVA), 분지된 폴리(비닐 피리딘), 분지된 폴리(비닐 피롤리돈)(분지된 PVP), 분지된, 폴리(아크릴산)(분지된 PAA), 분지된 폴리아크릴아마이드, 분지된 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(분지된 PNIPAM), 분지된 폴리(메틸 메타크릴레이트)(분지된 PMA), 분지된 폴리(2-하이드록실에틸 메타크릴레이트)(분지된 PHEMA), 분지된 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(분지된 POEGMA), 분지된 폴리글루탐산(분지된 PGA), 분지된 폴리-라이신, 분지된 폴리-글루코사이드 및 텍스트란을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0464] 일부 양상에서, 본 명세서에 개시된 임의의 다중층 표면 중 하나 이상의 층을 생성하기 위해 사용되는 분지된 중합체는 적어도 4개의 분지, 적어도 5개의 분지, 적어도 6개의 분지, 적어도 7개의 분지, 적어도 8개의 분지, 적어도 9개의 분지, 적어도 10개의 분지, 적어도 12개의 분지, 적어도 14개의 분지, 적어도 16개의 분지, 적어도 18개의 분지, 적어도 20개의 분지, 적어도 22개의 분지, 적어도 24개의 분지, 적어도 26개의 분지, 적어도 28개의 분지, 적어도 30개의 분지, 적어도 32개의 분지, 적어도 34개의 분지, 적어도 36개의 분지, 적어도 38개의 분지 또는 적어도 40개의 분지를 포함할 수 있다.
- [0465] 본 명세서에 개시된 임의의 다중층 표면 중 하나 이상의 층을 생성하기 위해 사용되는 선형, 분지 또는 다중-분지된 중합체는 적어도 500, 적어도 1,000, 적어도 2,000, 적어도 3,000, 적어도 4,000, 적어도 5,000, 적어도 10,000, 적어도 15,000, 적어도 20,000, 적어도 25,000, 적어도 30,000, 적어도 35,000, 적어도 40,000, 적어도 45,000 또는 적어도 50,000 달톤의 분자량을 가질 수 있다.
- [0466] 일부 양상에서, 예를 들어, 다중층 표면의 적어도 1개의 층은 분지된 중합체를 포함하고, 침착 중인 층의 분지된 중합체 분자와 이전 층의 분자 사이의 공유 결합의 수는 분자당 약 1개의 공유 결합 및 분자당 약 32개의 공유 결합의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 새로운 층의 분지된 중합체 분자와 이전 층의 분자 사이의 공유 결합의 수는 분자당 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20, 적어도 22, 적어도 24, 적어도 26, 적어도 28, 적어도 30 또는 적어도 32개의 공유 결합일 수 있다.
- [0467] 표면에 물질층의 결합 후에 남아있는 임의의 반응성 작용기는 고수율 결합 화학을 이용하여 작은, 비활성 분자를 결합시킴으로써 선택적으로 차단될 수 있다. 예를 들어, 이전의 물질층에 새로운 물질 층을 부착하기 위해 아민 결합 화학을 사용하는 경우에, 임의의 잔여 아민기는 후속적으로 글리신과 같은 소형 아미노산과의 결합에 의해 아세틸화 또는 탈아세틸화될 수 있다.
- [0468] 표면 상에 침착된 낮은 비특이적 결합 물질, 예를 들어, 친수성 중합체 물질 층의 수는 1 내지 약 10의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 층의 수는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10이다. 일부 양상에서, 층의 수는 최대 10, 최대 9, 최대 8, 최대 7, 최대 6, 최대 5, 최대 4, 최대 3, 최대 2, 또는 최대 1개일 수 있다. 본 단락에 기재된 임의의 하한값 및 상한값은 조합되어 본 개시내용 내에 포함된 범위를 형성할 수 있고, 예를 들어, 일부 양상에서, 층의 수는 약 2 내지 약 4의 범위일 수 있다. 일부 양상에서, 모든 층은 동일한 물질을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 각각의 층은 상이한 물질을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 복수의 층은 복수의 물질을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 적어도 1개의 층은 분지된 중합체를 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 모든 층은 분지된 중합체를 포함할 수 있다.
- [0469] 낮은 비특이적 결합 물질 중 1개 이상의 층은, 일부 경우에, 극성 양성자성 용매, 극성 또는 극성 비양성자성

용매, 비극성 용매, 또는 이들의 임의의 조합을 이용해서 기재 표면 상에 침착 및/또는 접합될 수 있다. 일부 양상에서, 층 침착 및/또는 결합을 위해 사용되는 용매는 알코올(예를 들어, 메탄올, 에탄올, 프로판올 등), 다른 유기 용매(예를 들어, 아세토나이트릴, 다이메틸 설펍사이드(DMSO), 다이메틸 폼아마이드(DMF) 등), 물, 수성 완충제 용액(예를 들어, 포스페이트 완충제, 포스페이트 완충 식염수, 3-(N-몰폴리노)프로판설펍산(MOPS) 등), 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 사용되는 용매 혼합물의 유기 성분은 전체 중 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 포함할 수 있고, 나머지는 물 또는 수성 완충 용액으로 구성된다. 일부 양상에서, 사용되는 용매 혼합물의 구성 성분은 전체의 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 포함할 수 있으며, 나머지는 유기 용매로 구성된다. 사용되는 용매 혼합물의 pH는 6 미만, 약 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 또는 pH 9 초과일 수 있다.

[0470] 용어 "분지된 중합체" 및 관련 용어는 생물학적 활성 분자, 예컨대, 뉴클레오타이드에 접합을 돕는 복수의 작용기를 갖는 중합체를 지칭하며, 작용기는 중합체의 측쇄 상에 있거나 중합체의 중심 코어 또는 중심 골격에 직접 부착될 수 있다. 분지된 중합체는 접합을 위한 골격을 벗어나는 1개 이상의 작용기를 갖는 선형 골격을 가질 수 있다. 분지된 중합체는 또한 1개 이상의 측쇄를 갖는 중합체일 수 있되, 측쇄는 접합에 적합한 부위를 갖는다. 작용기의 예는 하이드록실, 에스터, 아민, 탄산염, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알켄일, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설펍, 하이드라자이드, 티올, 알칸산, 산 할로겐화물, 아이소사이아네이트, 아이소티오사이아네이트, 말레이미드, 비닐설펍, 다이티오피리딘, 비닐피리딘, 아이오도아세트아마이드, 에폭사이드, 글리옥살, 다이온, 메실레이트, 토실레이트 및 트레실레이트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0471] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "클론 증폭된" 및 이의 변형은 용액 중 또는 지지체 상에서 하나 이상의 증폭 반응이 가해진 핵산 분자를 지칭한다. 용액 중 증폭된 주형 분자의 경우에, 얻어진 앰플리콘은 지지체에 분포된다. 증폭 전에, 주형 분자는 관심 서열 및 적어도 하나의 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 양상에서, 클론 증폭은 중합효소 연쇄 반응(PCR), 다중 변위 증폭(MDA), 전사-매개 증폭(TMA), 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), 가닥 변위 증폭(SDA), 실시간 SDA, 브리지 증폭, 등은 브리지 증폭, 회전환 증폭(RCA), 서클-투-서클 증폭, 헬리카제-의존적 증폭, 재조합효소-의존적 증폭, 단일-가닥 결합(SSB) 단백질-의존적 증폭, 또는 이들의 임의의 조합의 사용을 포함한다.

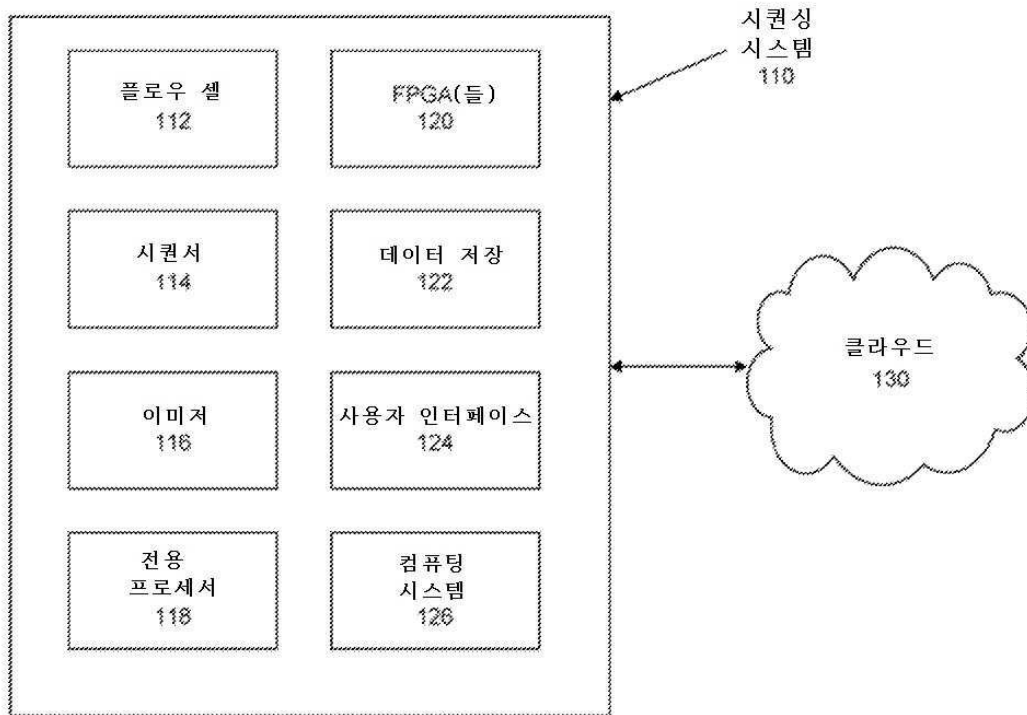
[0472] 본 명세서에서 사용되는 용어 "시퀀싱" 및 이의 변형은 전형적으로 핵산 주형 분자 내에서 적어도 일부 뉴클레오타이드(이들의 핵염기 성분 포함)의 동일성을 결정함으로써 핵산 가닥으로부터 서열 정보를 얻는 것을 포함한다. 일부 양상에서, 핵산 분자의 주어진 영역을 "시퀀싱"하는 것은 시퀀싱되는 영역 내에서 각각 및 모든 뉴클레오타이드를 식별/판독하는 것을 포함하지만, 일부 양상에서 "시퀀싱"은 영역의 뉴클레오타이드 중 일부만의 동일성이 결정되지만, 일부 뉴클레오타이드의 동일성은 결정되지 않거나 부정확하게 결정된 채로 남아있는 방법을 포함한다. 시퀀싱의 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예시적인 양상에서, 시퀀싱은 무표지 또는 이온 기반 시퀀싱 방법을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 시퀀싱은 표지 또는 색소-함유 뉴클레오타이드 또는 형광 기반 뉴클레오타이드 시퀀싱 방법을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 시퀀싱은 폴로니-기반 시퀀싱 또는 브리지 시퀀싱 방법을 포함할 수 있다. 일부 양상에서, 시퀀싱은 서열별 합성, 서열별 혼성화 또는 서열별 결합 절차를 사용하는 대량 병렬 시퀀싱 플랫폼을 포함한다. 대량 병렬 서열별 합성 절차의 예는 폴로니 시퀀싱, 파이로시퀀싱(예를 들어, 454 Life Sciences사; 미국 특허 제7,211,390호, 제7,244,559호 및 제7,264,929호), 연쇄 종결자 시퀀싱(예를 들어, Illumina사; 미국 특허 제7,566,537호; 문헌[Bentley 2006 Current Opinion Genetics and Development 16:545-552; 및 Bentley, et al., 2008 Nature 456:53-59], 이온-민감성 시퀀싱(예를 들어, Ion Torrent사), 프로브-앵커 결합 시퀀싱(예를 들어, Complete Genomics), DNA 나노볼 시퀀싱, 나노포어 DNA 시퀀싱을 포함한다. 단일 분자 시퀀싱의 예는 Pacific Biosciences사의 Heliscope 단일 분자 시퀀싱, 및 단일 분자 실시간(SMRT) 시퀀싱(문헌[Levene, et al., 2003 Science 299(5607):682-686; Eid, et al., 2009 Science 323(5910): 133-138]; 미국 특허 제7,170,050호; 제7,302,146호; 및 제7,405,281호)을 포함한다. 서열별 혼성화의 예는 SOLiD 시퀀싱(예를 들어, Life Technologies사; WO 2006/084132)을 포함한다. 서열별 결합의 예는 Omniome 시퀀싱(예를 들어, 미국 특허 출원 제10,246,744호)을 포함한다.

[0473] 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용 부분 및 임의의 다른 부분은 청구범위를 해석하기 위해 사용되도록 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 다른 부분은 발명자(들)에 의해 상정된 바와 같은 하나 이상이지만 모두는 아닌 예시적인 양상을 제시할 수 있고, 따라서, 본 개시내용 또는 첨부되는 청구범위를 임의의 방법으로 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

- [0474] 본 개시내용은 예시적인 분야 및 적용분야에 대한 예시적인 양상을 기재하지만, 본 개시내용은 이것으로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 다른 양상 및 이에 대한 변형이 가능하며, 이는 본 개시내용의 범주 및 사상 내에 있다. 예를 들어, 본 단락의 일반론을 제한하는 일 없이, 양상은 도면에 도시되고/되거나 본 명세서에 기재된 소프트웨어, 하드웨어, 펌웨어 및/또는 엔터티로 제한되지 않는다. 추가로, 양상은 (본 명세서에 명확하게 기재되든 아니든) 본 명세서에 기재된 예를 넘어서는 분야 및 적용분야에 대해 상당한 유용성을 갖는다.
- [0475] 양상은 특정 기능의 구현 및 이의 관계를 설명하는 기능적 빌딩 블록을 사용하여 본 명세서에 기재되었다. 이러한 기능적 빌딩 블록의 경계는 설명의 편리함을 위해 본 명세서에 임의로 정의되었다. 지정된 기능 및 관계(또는 이의 동등물)이 적절하게 수행되는 한 대체 경계가 정해질 수 있다. 또한, 대안의 양상은 본 명세서에 기재된 것과 상이한 순서를 사용하여 기능 블록, 단계, 작업, 방법 등을 수행할 수 있다.
- [0476] "일 양상", "양상", "예시적 양상", "일부 양상" 또는 유사한 어구에 대한 본 명세서의 언급은 기재된 양상이 특정 특징, 구조 또는 특징을 포함할 수 있지만, 모든 양상이 반드시 특정 특징, 구조 또는 특징을 포함하지 않을 수도 있다는 것을 나타낸다. 또한, 이러한 어구가 반드시 동일한 양상을 언급하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특징이 양상과 관련하여 기재될 때, 이러한 특징, 구조 또는 특징을 본 명세서에 언급되거나 기재되어 있는지의 여부와 관계없이 다른 양상에 통합하는 것은 관련 기술(들)의 당업자의 지식 내에 있을 것이다.
- [0477] 추가적으로, 일부 양상은 "커플링된" 및 "연결된"이라는 표현을 이들의 파생어와 함께 사용하여 기재될 수 있다. 이러한 용어는 반드시 서로 동의어인 것으로 의도되지는 않는다. 예를 들어, 일부 양상은 둘 이상의 요소가 서로 직접적인 물리적 또는 전기적 접촉을 이룬다는 것을 나타내기 위해 "연결된" 및/또는 "커플링된"이라는 용어를 사용하여 기재될 수 있다. 그러나, 용어 "커플링된"은 또한 둘 이상의 요소가 서로 직접 접촉되지 않지만, 아직 여전히 서로 공동 작용하거나 상호작용한다는 것을 의미한다.
- [0478] 본 개시내용의 양상을 본 명세서에 나타내고 기재하였지만, 이러한 양상이 단지 예로서 제공된다는 것은 당업자에게 분명할 것이다. 본 개시내용의 폭 및 범주는 임의의 위에 기재한 예시적인 양상에 의해 제한되어서는 안 되지만, 다음의 청구범위 및 이들의 균등물에 따라서만 정해져야 한다. 이제 본 개시내용으로부터 벗어나는 일 없이 당업자에게 수많은 변형, 변화 및 치환이 일어날 것이다. 본 명세서에 기재된 본 개시내용의 양상에 대한 다양한 대안은 본 개시내용을 실행하는 데 사용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 다음의 청구범위는 본 개시내용의 범주를 정하며 이러한 청구범위의 범주 내의 방법 및 구조 및 이들의 균등물은 이에 의해 포괄되는 것으로 의도된다.

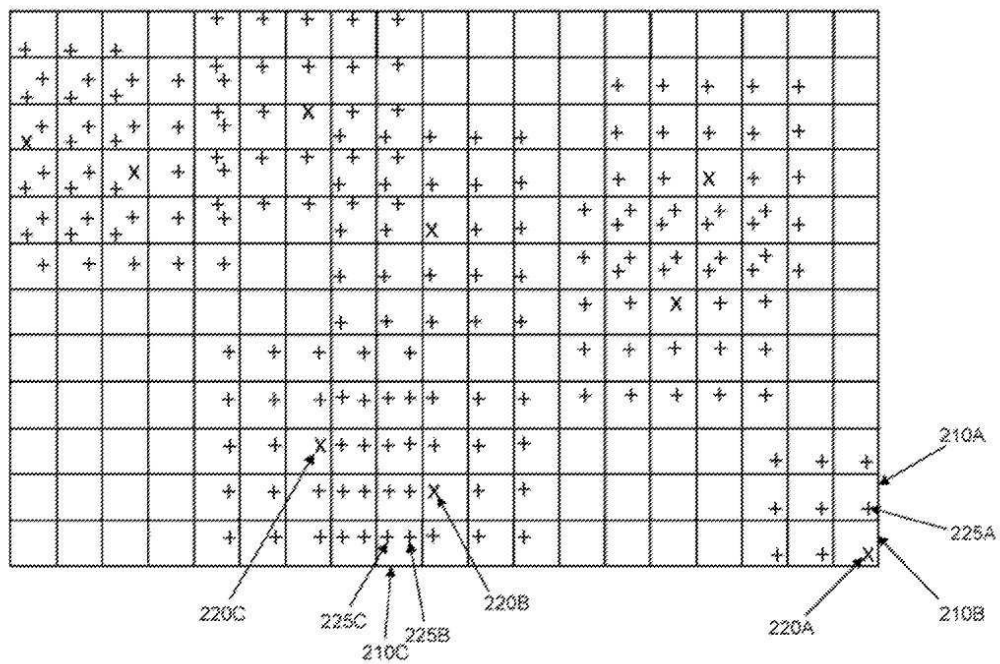
도면

도면1

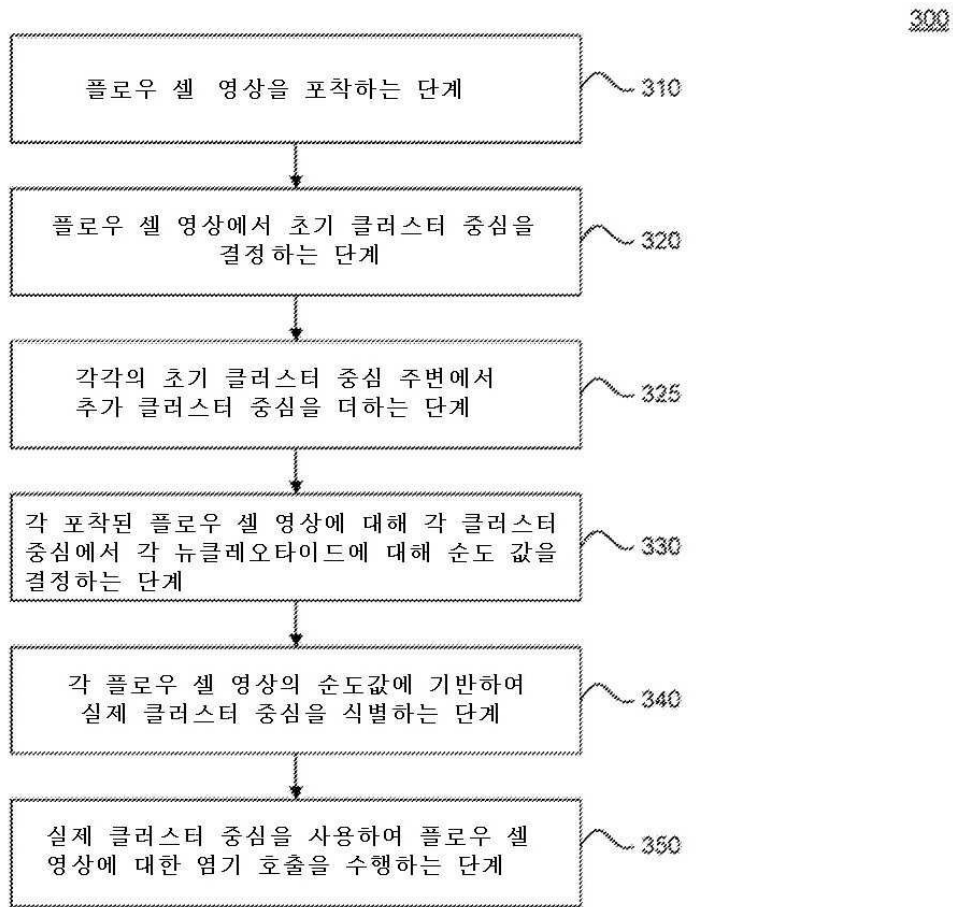


도면2

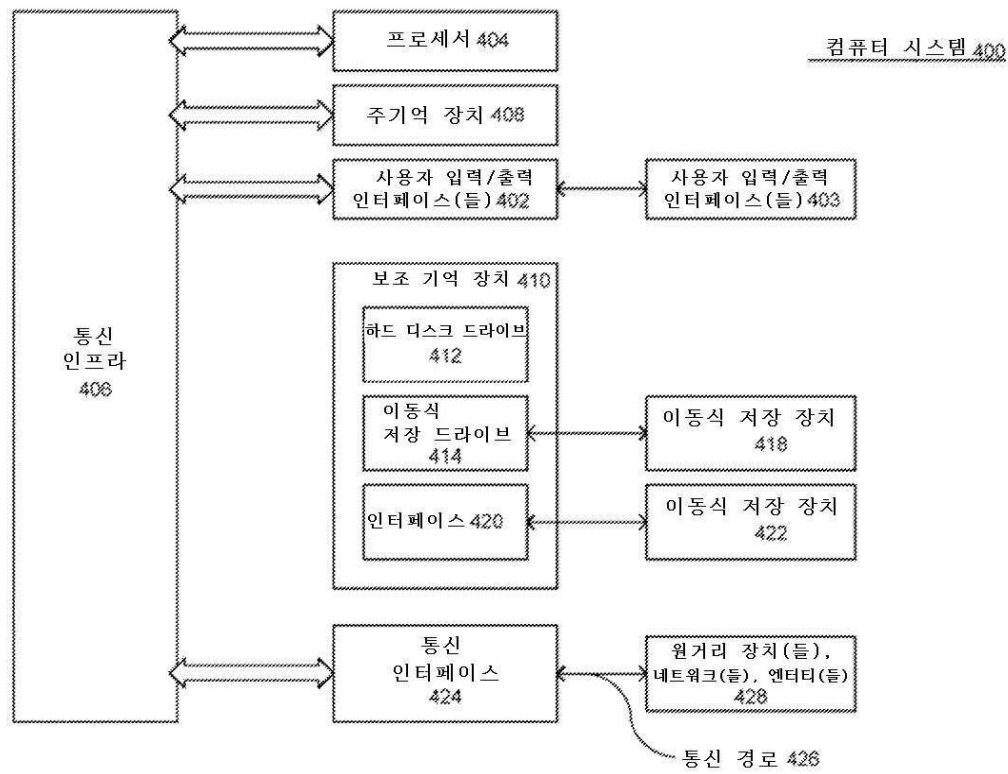
200



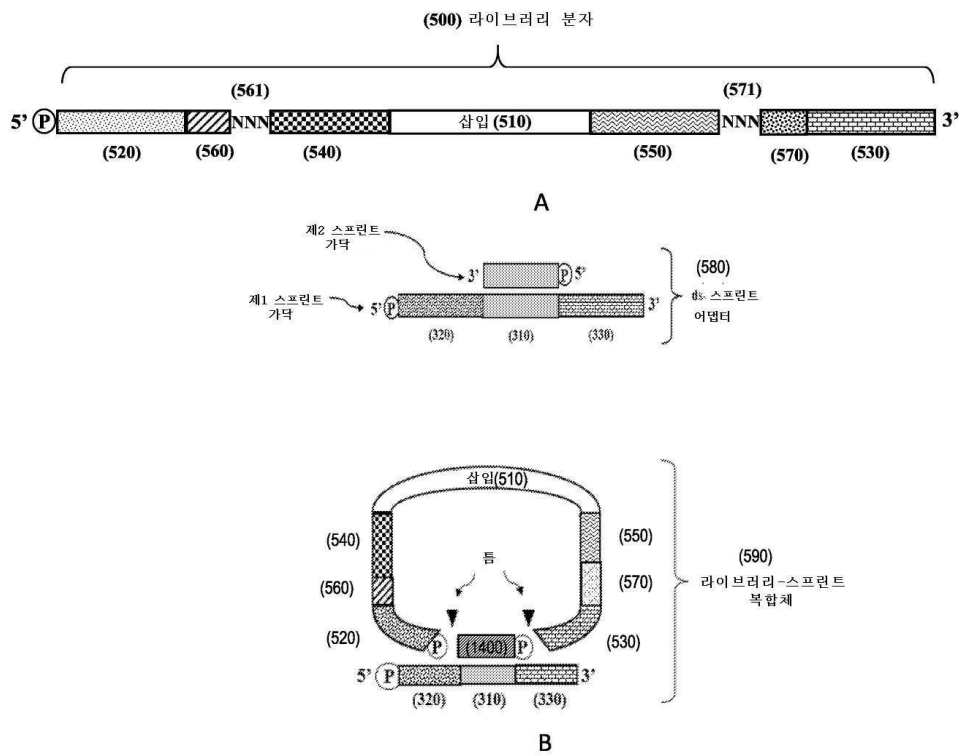
도면3



도면4

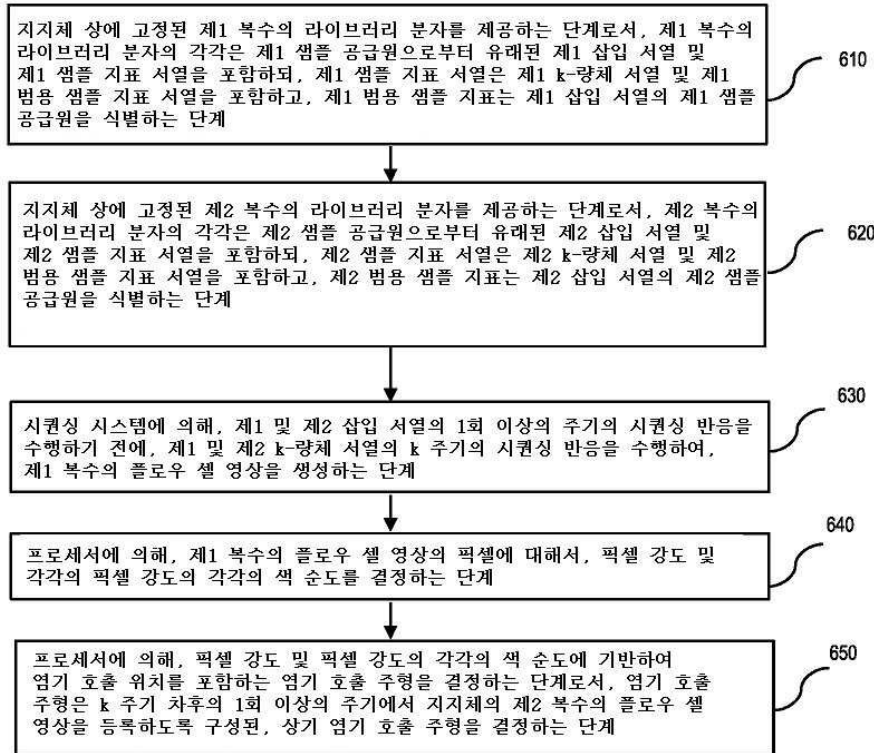


도면5

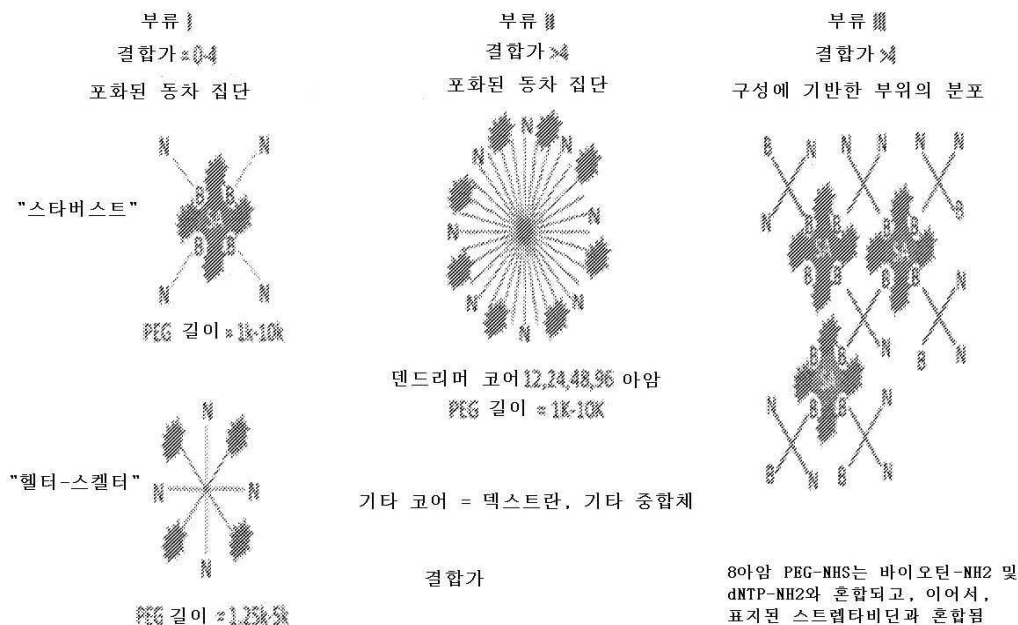


도면6

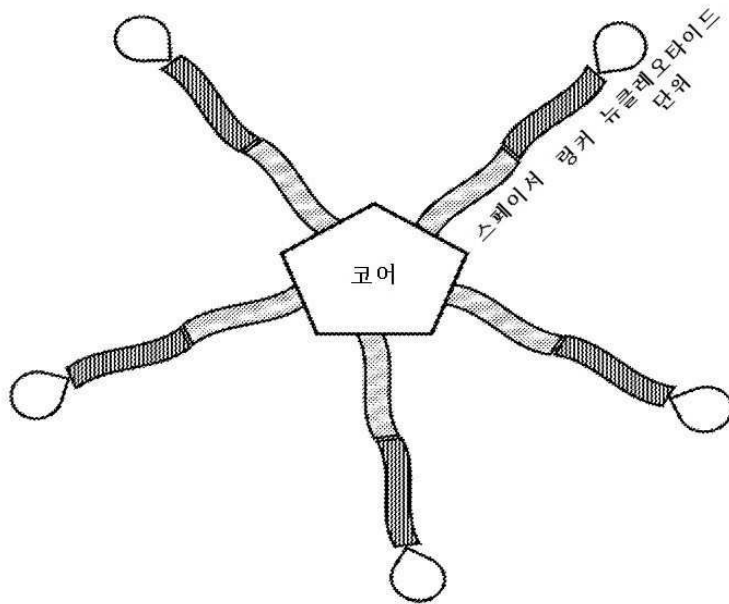
600



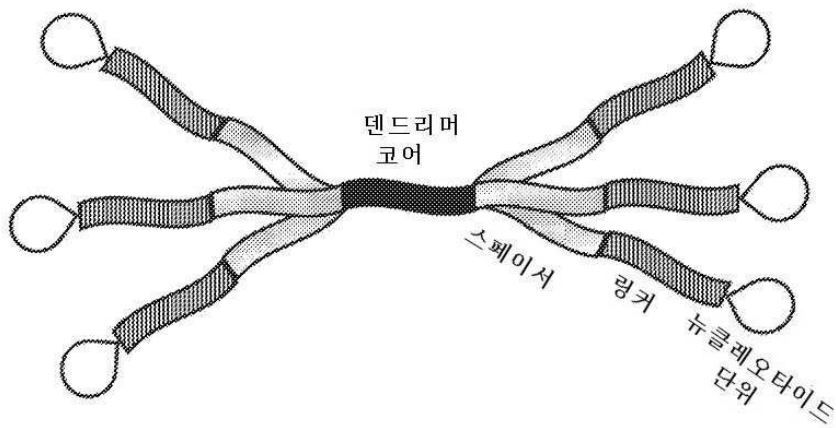
도면7



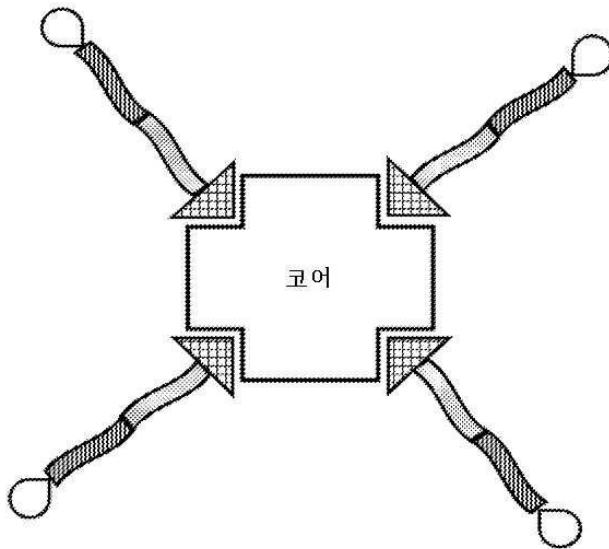
도면8



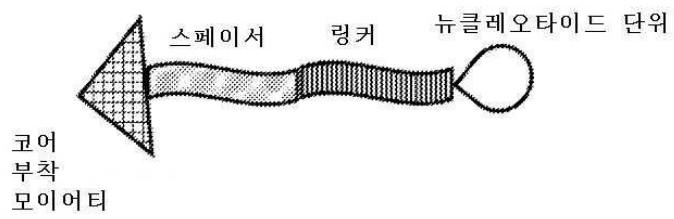
도면9



도면10



도면11

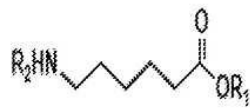


도면 12

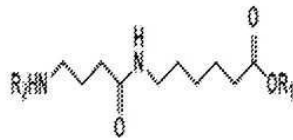
스페이서:

링커:

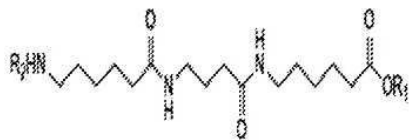
11 원자 링커:



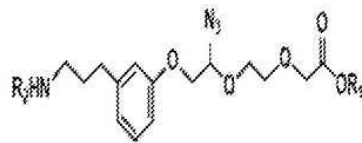
16 원자 링커:



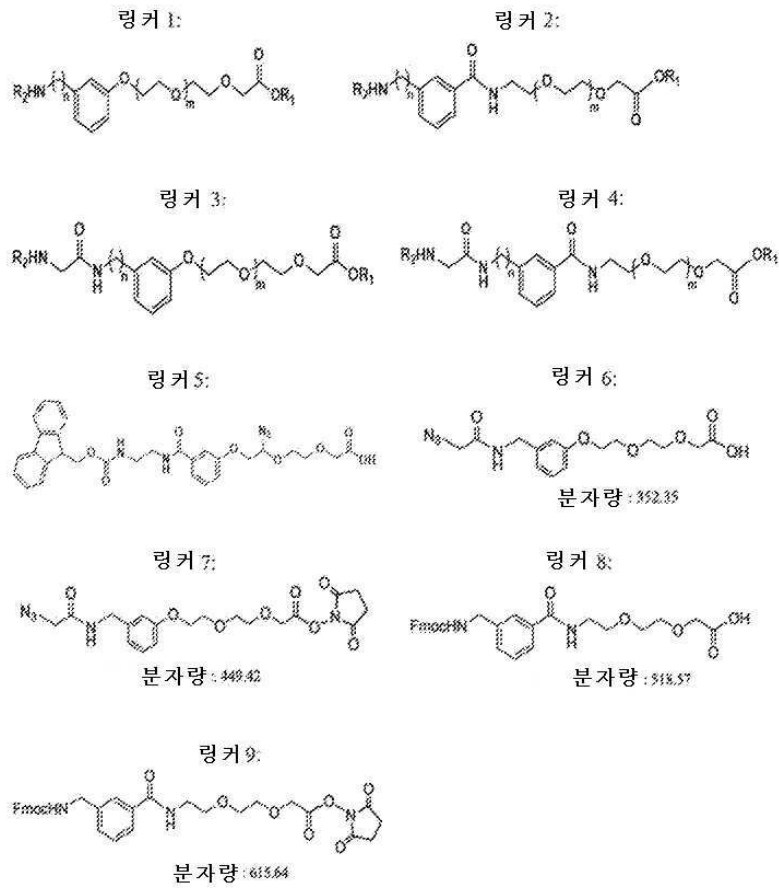
23 원자 링크:



N3 링커:

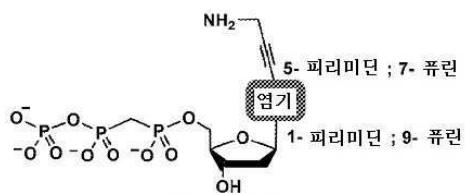


도면13

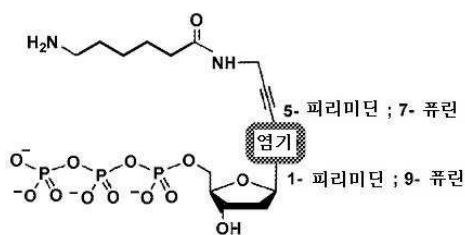


도면14

dNTP-PA-NH₂:



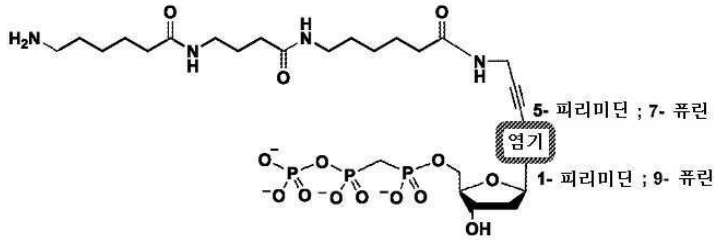
dNTP-PA-11 원자 링커-NH₂:



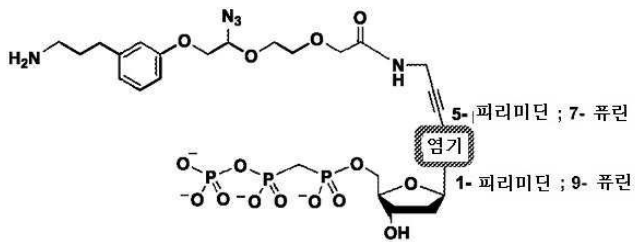
dNTP-PA-16 원자 링커-NH₂:

도면15

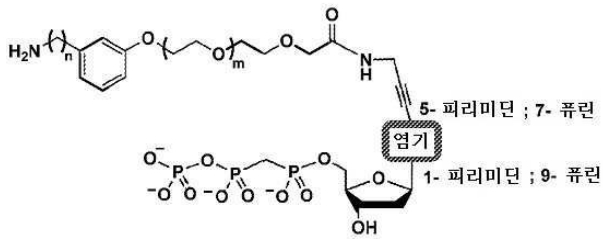
dNTP-PA-23 원자 링커-
NH₂:



dNTP-PA-N3 링커-NH₂:

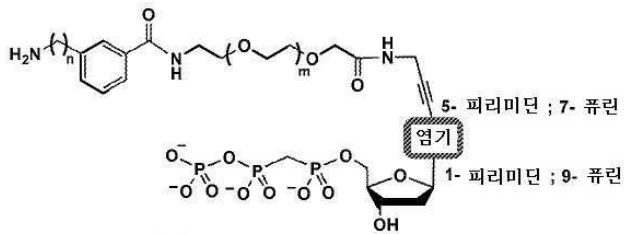


dNTP-PA- 링커1-NH₂:

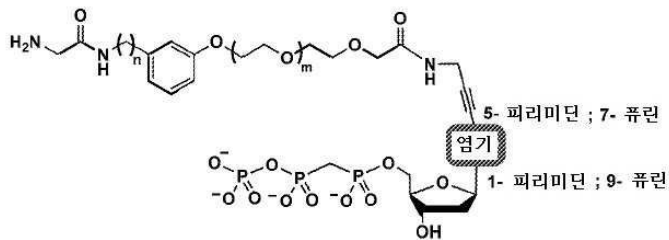


도면16

dNTP-PA-링커 2-NH₂:

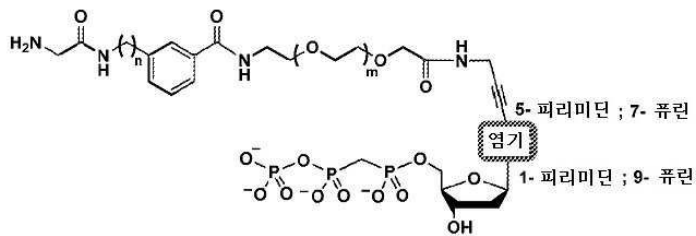


dNTP-PA-링커 3-NH₂:

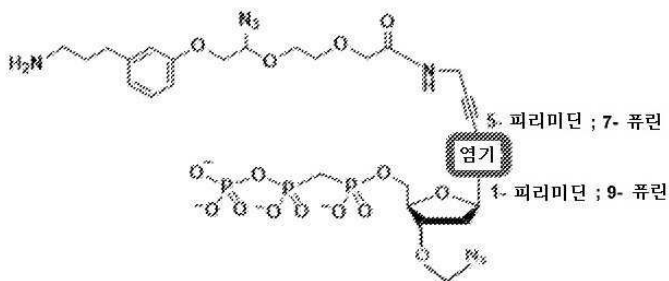


도면17

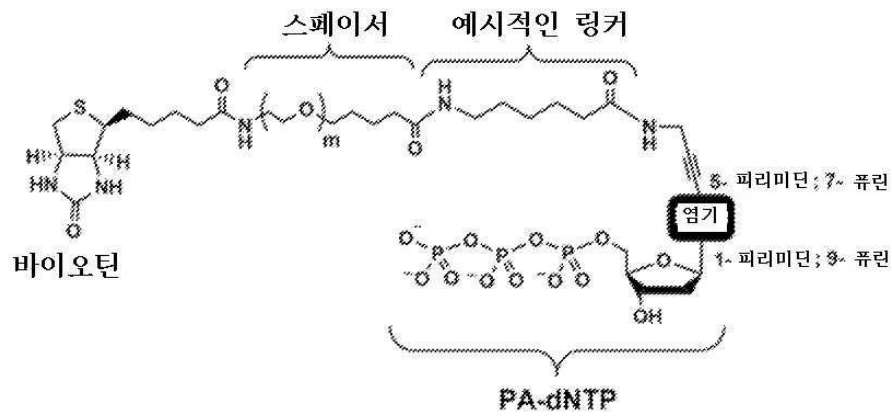
dNTP-PA-링커 4-NH₂:



dNTP-PA-N3 링커-NH₂:



도면18



도면19

