



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117043352 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 10

(21) 申请号 202280020213.3

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256

(22) 申请日 2022.01.28

专利代理师 陈文平

(30) 优先权数据

63/143,680 2021.01.29 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6806 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/014329 2022.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/165188 EN 2022.08.04

(71) 申请人 伊鲁米纳公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 伊鲁米纳剑桥有限公司

(72) 发明人 吴怡萱 F·戈尔佩-亚萨尔

T·K·库拉纳 J·M·鲍特尔

权利要求书6页 说明书22页

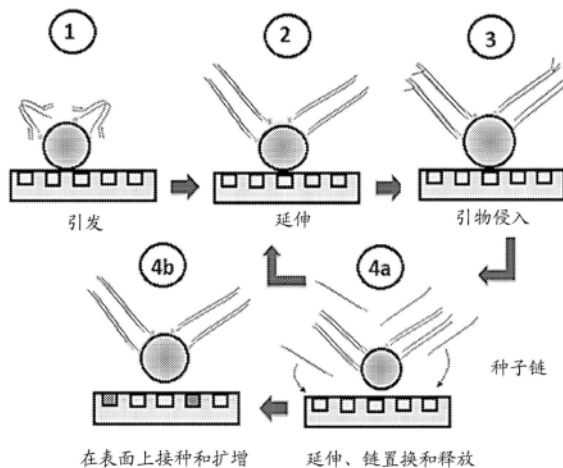
序列表3页 附图7页

(54) 发明名称

使用多核苷酸改善流通池的接种效率的方法、组合物和试剂盒

(57) 摘要

本公开涉及使用多核苷酸改善流通池的接种效率的方法、组合物和试剂盒,以及它们的应用,包括用于测序。



1. 一种用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,所述方法包括:

(i) 将第一引物退火至结合到小珠的多核苷酸链,其中所述多核苷酸链的5'端使用第一附接剂结合到所述小珠,其中所述多核苷酸链包含含有与所述第一引物的序列互补的序列的接头,并且其中所述第一引物在溶液中;

(ii) 使用聚合酶从所述第一引物延伸以形成双链多核苷酸产物;

(iii) 通过使用额外量的所述第一引物和重组酶进行所述双链多核苷酸产物的引物侵入;

(iv) 通过使用聚合酶从步骤(iii)中的所述额外的第一引物延伸,从所述小珠置换并且释放步骤(ii)的所述双链多核苷酸产物的链;

(v) 通过使用第二附接剂将步骤(iv)中释放的所述链附接到流通池的所述表面来接种流通池;并且

任选地,重复步骤(iii)至(v)多次。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述小珠的形状通常为球形或通常为卵形。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述小珠具有为约500nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、3.6 μ M、3.7 μ M、3.8 μ M、3.9 μ M、4 μ M、4.1 μ M、4.2 μ M、4.3 μ M、4.4 μ M、4.5 μ M、4.6 μ M、4.7 μ M、4.8 μ M、4.9 μ M、5.0 μ M、5.1 μ M、5.2 μ M、5.3 μ M、5.4 μ M、5.5 μ M、5.6 μ M、5.7 μ M、5.8 μ M、5.9 μ M、6 μ M、6.1 μ M、6.2 μ M、6.3 μ M、6.4 μ M、6.5 μ M、6.6 μ M、6.7 μ M、6.8 μ M、6.9 μ M、7 μ M、7.1 μ M、7.2 μ M、7.3 μ M、7.4 μ M、7.5 μ M、7.6 μ M、7.7 μ M、7.8 μ M、7.9 μ M、8 μ M、8.1 μ M、8.2 μ M、8.3 μ M、8.4 μ M、8.5 μ M、8.6 μ M、8.7 μ M、8.8 μ M、8.9 μ M、9.0 μ M、9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M、9.9 μ M、10 μ M,或包括前述任何两个距离或在前述任何两个距离之间的范围的直径。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述小珠具有为约500nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M,或包括前述任何两个距离或在前述任何两个距离之间的范围的直径。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述小珠由聚合物材料、二氧化硅材料、氧化铝材料或超顺磁性材料组成。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述小珠由超顺磁性材料组成。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述小珠用选自生物素;链霉抗生物素蛋白;胺基;羧基;环氧基;甲苯磺酰基;抗体或抗原;多组氨酸标签或包含金属离子的载体;和受体或配体的涂层或层官能化。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述小珠不固定在所述流通池的一个或多个表面上。

9. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中使用附接剂将所述小珠固定在所述流通池的一个或多个表面上。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述附接剂是两个互补序列之间的生物素/链霉抗生物素蛋白连接或碱基配对。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中结合到所述小珠的所述多核苷酸链

包含基因组DNA。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中结合到所述小珠的所述多核苷酸链包含长模板DNA。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中结合到所述小珠的所述多核苷酸链包含来自受试者样品的DNA。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述受试者的样品是尿液、血液、唾液、组织、血清、血浆、痰、胆汁、排泄物、毛发、皮肤和/或原代细胞样品。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过使用连接到所述小珠的转座体,将所述多核苷酸链片段标签化并且结合到所述小珠。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中连接到所述小珠的所述转座体包含转座酶Tn5或其突变体或变体。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸链包含通过第一附接剂结合到小珠的序列的第一部分和通过使用连接酶和连接到所述小珠的转座体进行片段标签化并且连接到序列的所述第一部分的序列的第二部分。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中连接到所述小珠的所述转座体包含转座酶Tn5或其突变体或变体。

19. 根据权利要求17或权利要求18所述的方法,其中所述序列的所述第一部分包含一个或多个条形码或索引序列、一个或多个通用引物序列和/或嵌合末端序列。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述序列的所述第一部分包含一个或多个条形码或索引序列、一个或多个通用引物序列和嵌合末端序列,并且其中所述嵌合末端序列位于所述序列的所述第一部分的3'端。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的方法,其中所述接头包含互补的并且可与所述多核苷酸链的所述序列的所述第一部分杂交的第一序列,并且其中所述接头包含不互补的并且不能与所述多核苷酸链的所述序列的所述第一部分杂交的第二序列。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述接头的所述第二序列包含与所述第一引物的所述序列互补的序列。

23. 根据权利要求17至22中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸链的序列的所述第二部分包含gDNA。

24. 根据权利要求17至23中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸链的序列的所述第二部分包含长模板DNA。

25. 根据权利要求17至24中任一项所述的方法,其中所述多核苷酸链的序列的所述第二部分包含来自受试者的样品的DNA。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中所述受试者的样品是尿液、血液、唾液、组织、血清、血浆、痰、胆汁、排泄物、毛发、皮肤和/或原代细胞样品。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一附接剂和第二附接剂选自生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述第一附接剂是生物素/链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白连接,并且其中所述第二附接剂是两个互补序列之间的碱基配对。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述多核苷酸链在5'端包含生物素残基,并且所述小珠包含链霉抗生物素蛋白残基。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一引物具有序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述第一引物具有所述序列SEQ ID NO:2。

32. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中使用DNA聚合酶从所述第一引物延伸所述序列。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法提供用于所述多核苷酸链的线性拷贝。

34. 一种用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,所述方法包括:

(i) 提供包含结合到小珠的多核苷酸链的小珠,其中所述多核苷酸链的5'端使用第一附接剂结合到所述小珠,并且其中所述多核苷酸链包含含有与第一引物的所述序列互补的序列的接头,并且其中所述小珠还包含结合的第一扩增引物,其中所述第一扩增引物通过第三附接剂结合到所述小珠,其中所述第一扩增引物具有与所述第一引物的所述序列不同并且不互补的序列,并且其中所述多核苷酸链包含与所述第一扩增引物互补的序列;

(ii) 将所述第一引物退火至结合到小珠的所述多核苷酸链,其中所述第一引物在溶液中;

(iii) 使用聚合酶从所述第一引物延伸以形成双链多核苷酸产物;

(iv) 通过使用额外量的所述第一引物和/或所述第一扩增引物和重组酶进行所述双链多核苷酸产物的引物侵入;

(v) 通过使用聚合酶从步骤(iv)中的所述额外的第一引物和/或所述第一扩增引物延伸,从所述小珠置换并且释放步骤(iii)的所述双链多核苷酸产物的链;

(vi) 通过使用第二附接剂将步骤(v)中释放的所述链附接到流通池的所述表面来接种流通池;并且

任选地,重复步骤(ii)至(vi)多次。

35. 一种用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,所述方法包括:

(i) 提供包含结合到小珠的多核苷酸链的小珠,其中所述多核苷酸链的5'端使用生物素/链霉抗生物素蛋白连接结合到所述小珠,并且其中所述小珠还包含结合的第二扩增引物,其中所述第二扩增引物通过第三附接剂结合到所述小珠,其中所述第二扩增引物具有与第二引物的序列不同并且不互补的序列,并且其中所述多核苷酸链含有与所述第二扩增引物互补的序列并且含有与所述第二引物互补的序列;

(ii) 将所述第二扩增引物退火至结合到小珠的所述多核苷酸链;

(iii) 使用聚合酶从所述第二扩增引物延伸以形成双链多核苷酸产物;

然后步骤(a),或者步骤(b)和(b'):

(a) 将所述小珠引入流通池中,并且使用加热和过量的生物素从所述小珠中释放所述双链多核苷酸产物作为单链多核苷酸产物;

或者

(b) 通过使用所述第二引物和重组酶进行所述双链多核苷酸产物的引物侵入,其中所述第二引物在溶液中;

(b') 通过用聚合酶从所述第二引物延伸,从所述小珠置换和释放所述双链多核苷酸产物的链;并且

(iv) 使用第二附接剂用步骤(a)中释放的所述单链多核苷酸产物或步骤(b')中从所述小珠释放的所述双链多核苷酸产物的所述链接种流通池的所述表面;并且

任选地,重复步骤(ii)至(iv)多次。

36. 一种用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,所述方法包括:

(i) 提供包含结合到小珠的多核苷酸链的小珠,其中所述多核苷酸链的5'端使用生物素/链霉抗生物素蛋白连接结合到所述小珠,并且其中所述小珠还包含结合的第一和第二扩增引物,其中所述第一和第二扩增引物通过附接剂结合到所述小珠,其中所述第一扩增引物具有与第一引物的序列至少99%相同的序列,其中所述第二扩增引物具有与第二引物的序列至少99%相同的序列,并且其中所述多核苷酸链含有与所述第一扩增引物互补的序列,并且含有与所述第二扩增引物互补的序列;

(ii) 将所述第一和第二扩增引物退火至结合到小珠的所述多核苷酸链;

(iii) 使用聚合酶从所述第一和第二扩增引物延伸以形成双链多核苷酸产物的簇;

然后步骤(A),或者步骤(B)和(B'):

(A) 将所述小珠引入流通池中,并且使用加热和过量的生物素从所述小珠中释放所述双链多核苷酸产物作为单链多核苷酸产物;

或者

(B) 通过使用所述第一引物和/或所述第二引物和重组酶进行所述双链多核苷酸产物的引物侵入,其中所述第一和第二引物在溶液中;并且

(B') 通过用聚合酶从所述第一和/或第二引物延伸,从所述小珠置换和释放所述双链多核苷酸产物的链;并且

(iv) 使用附接剂用步骤(A)中释放的所述单链多核苷酸产物或步骤(B')中从小珠释放的所述双多核苷酸产物的所述链接种流通池的所述表面;并且

任选地,重复步骤(ii)至(iv)多次。

37. 根据权利要求35或权利要求36所述的方法,其中使用附接剂将所述小珠固定到所述流通池的所述表面。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中所述附接剂选自生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述附接剂是两个互补序列之间的生物素/链霉抗生物素蛋白连接或碱基配对。

40. 根据权利要求35或权利要求36中任一项所述的方法,其中使用附接剂将所述小珠不固定到所述流通池的所述表面。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述流通池是图案化流通池。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中从所述小珠释放的所述链被所述流通池表面上的捕获剂结合。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述捕获剂位于图案化流通池的特征部阵列上,其中所述捕获剂不位于所述特征部之间的间隙区域上。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中图案化流通池的所述特征部阵列是孔。

45. 根据权利要求42或权利要求43所述的方法,其中所述捕获剂是结合到所述流通池的所述表面的捕获核酸,并且其中从所述小珠释放的所述链包含可以与结合到所述流通池的所述表面的所述引物杂交的序列。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述捕获核酸包括通用捕获序列。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述通用捕获序列包含P5:5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'((SEQ ID NO:1))或P7(5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3'(SEQ ID NO:2)),或它们的片段。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述通用捕获序列包含抗P5:5'-TCGGTGGTCGCCGATCATT-3'(SEQ ID NO:3)或抗P7:5'-TCGTATGCCGCTTCTGCTTG-3'(SEQ ID NO:4)),或它们的片段。

49. 根据权利要求46至48中任一项所述的方法,其中所述捕获核酸还包含测序引物结合位点(SBS)、靶特异性捕获区、限制性位点和/或连接区。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述SBS是SBS3:5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3'(SEQ ID NO:5)或SBS85'-CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT-3'(SEQ ID NO:6)。

51. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:

进行流通池上线性扩增反应,以制备接种在所述流通池表面上的所述多核苷酸的拷贝;并且

将所述拷贝的多核苷酸变性并接种在所述流通池表面上。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述流通池上线性扩增反应包括低温AMS1第一延伸反应。

53. 根据权利要求51或权利要求52所述的方法,其中通过使用包含化学变性剂的杂交缓冲液使所述拷贝的多核苷酸变性。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述化学变性剂是甲酰胺。

55. 根据权利要求53或权利要求54所述的方法,其中所述杂交缓冲液包含HT1。

56. 根据权利要求53至55中任一项所述的方法,其中所述混合物浅浅地覆盖所述图案化流通池的所述表面,使得所述图案化流通池表面上的所述阵列特征部彼此流体接触。

57. 根据权利要求51至56中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:

通过使用桥式扩增在所述图案化流通池的所述表面上形成簇,以制备每种接种的多核苷酸的多个拷贝。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述方法还包括:

通过合成生成在所述图案化流通池的所述表面上的所述簇进行测序。

59. 一种用于提高流通池表面上的多核苷酸接种效率的方法,所述方法包括:

进行流通池上线性扩增反应,以制备接种在所述流通池表面上的所述多核苷酸的拷贝;并且

将所述拷贝的多核苷酸变性并接种在所述流通池表面上。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述流通池上线性扩增反应包括低温AMS1第一延伸反应。

61. 根据权利要求59或权利要求60所述的方法,其中通过使用包含化学变性剂的杂交溶液使所述拷贝的多核苷酸变性。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述化学变性剂是甲酰胺。

63. 根据权利要求61或权利要求62所述的方法,其中所述杂交溶液包含HT1。

64. 根据权利要求59至63中任一项所述的方法,其中所述混合物浅浅地覆盖所述图案化流通池的所述表面,使得所述图案化流通池表面上的所述阵列特征部彼此流体接触。

65. 根据权利要求59至64中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:

通过使用桥式扩增在所述图案化流通池的所述表面上形成簇,以制备每种接种的多核苷酸的多个拷贝。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中所述方法还包括:

通过合成生成在所述图案化流通池的所述表面上的所述簇进行测序。

使用多核苷酸改善流通池的接种效率的方法、组合物和试剂盒

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2021年1月29日提交的美国临时申请序列号63/143,680的优先权,其公开内容以引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于使用多核苷酸改善流通池的接种效率的方法、组合物和试剂盒,以及它们的应用,包括用于测序。

背景技术

[0004] DNA测序处于快速变化的时期,其中毛细管测序不再是大多数超高通量应用的选择技术。利用流通池中引发的合成以同时获得数百万个不同DNA模板的序列的新一代仪器已经改变了该领域。

[0005] 下一代测序(NGS)平台通常采用核酸片段文库。核酸片段文库可使用基于PCR的方法或基于转座子的方法制备。在后一种情况下,游离的转座子末端和修饰的转座酶用于形成转座体复合物。然后该转座体复合物用于将核酸片段化并加标签,生成准备好用于测序仪的片段标签化文库。转座体复合物可以在溶液中形成或附着于固体载体,如小珠。为了在流通池中使用结合到固体载体(例如,转座体小珠)的转座体复合物,该转座体复合物的核酸组分必须被释放,然后接种在流通池表面上。通常,这样做的手段是通过使用加热或过量使用的竞争性结合剂(例如,生物素)。然而,加热引起流通池中的扩散增加,其将破坏所形成的簇的空间共定位。

发明内容

[0006] 本公开提供了解决流通池的低接种效率问题的组合物、方法和试剂盒。特别地,本公开的组合物、方法和试剂盒提供了通过使用排除扩增(ExAmp)以使用溶液中的引物(“溶液引物”)将转座的多核苷酸复制到小珠上,从而将扩增的核酸从该小珠释放到种子流通池。更具体地说,通过使用该溶液引物的链侵入引起拷贝的链置换到溶液中,从而有效地将它们从该小珠中释放出来,并且促进该流通池的接种。在另外的实施方案中,小珠还可以包含结合的扩增引物,以便增强自该小珠扩增的核酸的扩增和置换。在其他实施方案中,该流通池的接种效率可通过使用流通池上线性扩增和浅层液体变性/接种 workflow 来改善或进一步改善。

[0007] 在具体实施方案中,本公开提供了使用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,该方法包括:(i)将第一引物退火至结合到小珠的多核苷酸链,其中该多核苷酸链的5'端使用第一附接剂结合到小珠,其中该多核苷酸链包含含有与该第一引物的序列互补的序列的接头,并且其中该第一引物在溶液中;(ii)使用聚合酶从该第一引物延伸以形成双链多核苷酸产物;(iii)通过使用额外量的该第一引物和重组酶进行该双链多核苷酸产物的

引物侵入；(iv)通过使用聚合酶从步骤(iii)中的该额外的第一引物延伸，从该小珠置换并且释放步骤(ii)的该双链多核苷酸产物的链；(v)通过使用第二附接剂将步骤(iv)中释放的该链附接到流通池的该表面来接种流通池；并且任选地，重复步骤(iii)至(v)多次。在另外的实施方案中，该小珠的形状通常为球形或通常为卵形。在另一个实施方案中，该小珠具有为约500nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、3.6 μ M、3.7 μ M、3.8 μ M、3.9 μ M、4 μ M、4.1 μ M、4.2 μ M、4.3 μ M、4.4 μ M、4.5 μ M、4.6 μ M、4.7 μ M、4.8 μ M、4.9 μ M、5.0 μ M、5.1 μ M、5.2 μ M、5.3 μ M、5.4 μ M、5.5 μ M、5.6 μ M、5.7 μ M、5.8 μ M、5.9 μ M、6 μ M、6.1 μ M、6.2 μ M、6.3 μ M、6.4 μ M、6.5 μ M、6.6 μ M、6.7 μ M、6.8 μ M、6.9 μ M、7 μ M、7.1 μ M、7.2 μ M、7.3 μ M、7.4 μ M、7.5 μ M、7.6 μ M、7.7 μ M、7.8 μ M、7.9 μ M、8 μ M、8.1 μ M、8.2 μ M、8.3 μ M、8.4 μ M、8.5 μ M、8.6 μ M、8.7 μ M、8.8 μ M、8.9 μ M、9.0 μ M、9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M、9.9 μ M、10 μ M，或包括前述任何两个距离或在前述任何两个距离之间的范围的直径。在又一个实施方案中，该小珠具有为约500nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M，或包括前述任何两个距离或在前述任何两个距离之间的范围的直径。在某个实施方案中，该小珠由聚合物材料、二氧化硅材料、氧化锆材料或超顺磁性材料组成。在另外的实施方案中，该小珠由超顺磁性材料组成。在又另外的实施方案中，该小珠用选自生物素；链霉抗生物素蛋白；胺基；羧基；环氧基；甲苯磺酰基；抗体或抗原；多组氨酸标签或包含金属离子的载体；和受体或配体的涂层或层官能化。在具体实施方案中，该小珠不固定在该流通池的一个或多个表面上。

[0008] 在另选实施方案中，使用附接剂将该小珠固定在流通池的一个或多个表面上。在另一个实施方案中，该附接剂是两个互补序列之间的生物素/链霉抗生物素蛋白连接或碱基配对。在又一个实施方案中，结合到该小珠的该多核苷酸链包含基因组DNA。在另外的实施方案中，结合到该小珠的该多核苷酸链包含长模板DNA。在又另外的实施方案中，结合到该小珠的该多核苷酸链包含来自受试者的样品的DNA。在某个实施方案中，该受试者的样品是尿液、血液、唾液、组织、血清、血浆、痰、胆汁、排泄物、毛发、皮肤和/或原代细胞样品。在另一个实施方案中，通过使用连接到该小珠的转座体，将该多核苷酸链片段标签化并且结合到该小珠。在又一个实施方案中，连接到该小珠的该转座体包含转座酶Tn5或其突变体或变体。在另外的实施方案中，该多核苷酸链包含通过第一附接剂结合到小珠的序列的第一部分和通过使用连接酶和连接到该小珠的转座体进行片段标签化并且连接到该序列的第一部分的序列的第二部分。在又另外的实施方案中，连接到该小珠的该转座体包含转座酶Tn5或其突变体或变体。在另一个实施方案中，该序列的该第一部分包含一个或多个条形码或索引序列、一个或多个通用引物序列和/或嵌合末端序列。在又一个实施方案中，该序列的该第一部分包含一个或多个条形码或索引序列、一个或多个通用引物序列和嵌合末端序列，并且其中该嵌合末端序列位于该序列的该第一部分3'端。在某个实施方案中，该接头包含互补的并且可与该多核苷酸链的该序列的该第一部分杂交的第一序列，并且其中该接头包含不互补的并且不能与该多核苷酸链的该序列的该第一部分杂交的第二序列。在另一个实施方案中，该接头的该第二序列包含与该第一引物的该序列互补的序列。在又一个实施方案中，该多核苷酸链的序列的该第二部分包含gDNA。在某个实施方案中，该多

核苷酸链的序列的该第二部分包含长模板DNA。在另外的实施方案中,该多核苷酸链的序列的该第二部分包含来自受试者的样品的DNA。

[0009] 在又另外的实施方案中,该受试者的样品是尿液、血液、唾液、组织、血清、血浆、痰、胆汁、排泄物、毛发、皮肤和/或原代细胞样品。在某个实施方案中,该第一附接剂和第二附接剂选自生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。在另一个实施方案中,该第一附接剂是生物素/链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白连接,并且其中该第二附接剂是两个互补序列之间的碱基配对。在又另一个实施方案中,该多核苷酸链在5'端包含生物素残基,并且该小珠包含链霉抗生物素蛋白残基。在另外的实施方案中,该第一引物具有序列SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2。在又另外的实施方案中,该第一引物具有序列SEQ ID NO:2。在某个实施方案中,使用DNA聚合酶从该第一引物延伸该序列。在另外的实施方案中,该方法提供用于该多核苷酸链的线性拷贝。在某个实施方案中,该流通池是图案化流通池。在另外的实施方案中,从该小珠释放的该链被该流通池表面上的捕获剂结合。在又另外的实施方案中,该捕获剂位于图案化流通池的特征部阵列上,其中该捕获剂不位于该特征部之间的间隙区域上。在另一个实施方案中,图案化流通池的该特征部阵列是孔。在又另一个实施方案中,该捕获剂是结合到该流通池的该表面的捕获核酸,并且其中从该小珠释放的该链包含可以与结合到该流通池的该表面的该引物杂交的序列。在另外的实施方案中,该捕获核酸包含通用捕获序列。在又另外的实施方案中,该通用捕获序列包含P5 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'((SEQ ID NO:1))或P7(5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3'(SEQ ID NO:2)),或它们的片段。在另选实施方案中,该通用捕获序列包含抗P5:5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'(SEQ ID NO:3)或抗P7:5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'(SEQ ID NO:4)),或它们的片段。在另外的实施方案中,该捕获核酸还包含测序引物结合位点(SBS)、靶特异性捕获区、限制性位点和/或连接区。在又另外的实施方案中,SBS是SBS3:5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCG ATCT-3'(SEQ ID NO:5)或SBS8:5'-CGGTCTCGGCATTCCTGCTGAACCGC TCTCCGATCT-3'(SEQ ID NO:6)。在某个实施方案中,该方法还包括:进行流通池上线性扩增反应,以制备接种在该流通池表面上的该多核苷酸的拷贝;并且将该拷贝的多核苷酸变性并接种在该流通池表面上。在另外的实施方案中,该流通池上线性扩增反应包括低温AMS1第一延伸反应。在又另外的实施方案中,通过使用包含化学变性剂的杂交缓冲液使该拷贝的多核苷酸变性。在另一个实施方案中,该化学变性剂是甲酰胺。在又另一个实施方案中,该混合物包含HT1。在另外的实施方案中,包含化学变性剂的该杂交缓冲液浅浅地覆盖该图案化流通池的该表面,使得该图案化流通池表面上的该阵列特征部彼此流体接触。在又另外的实施方案中,该方法还包括:通过使用桥式扩增在该图案化流通池的该表面上形成簇,以制备每种接种的多核苷酸的多个拷贝。在又另一个实施方案中,该方法还包括:通过合成生成在该图案化流通池的该表面上的该簇进行测序。

[0010] 在具体实施方案中,一种用于用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,该方法包括:(i)提供包含结合到小珠的多核苷酸链的小珠,其中该多核苷酸链的5'端使用第一附接剂结合到该小珠,并且其中该多核苷酸链包含含有与第一引物的该序列互补的序列的接头,并且其中该小珠还包含结合的第一扩增引物,其中该第一扩增引物通过第三附接剂

结合到该小珠,其中该第一扩增引物具有与该第一引物的该序列不同并且不互补的序列,并且其中该多核苷酸链包含与该第一扩增引物互补的序列;(ii)将该第一引物退火至结合到小珠的该多核苷酸链,其中该第一引物在溶液中;(iii)使用聚合酶从该第一引物延伸以形成双链多核苷酸产物;(iv)通过使用额外量的该第一引物和/或该第一扩增引物和重组酶进行该双链多核苷酸产物的引物侵入;(v)通过使用聚合酶从步骤(iv)中的该额外的第一引物和/或该第一扩增引物延伸,从该小珠置换并且释放步骤(iii)的该双链多核苷酸产物的链;(vi)通过使用第二附接剂将步骤(v)中释放的该链附接到流通池的该表面来接种流通池;并且任选地,重复步骤(ii)至(vi)多次。在另一个实施方案中,本公开提供了用于从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法,该方法包括:(i)提供包含结合到小珠的多核苷酸链的小珠,其中该多核苷酸链的5'端使用生物素/链霉抗生物素蛋白连接结合到该小珠,并且其中该小珠还包含结合的第二扩增引物,其中该第二扩增引物通过第三附接剂结合到该小珠,其中该第二扩增引物具有与第二引物的该序列不同并且不互补的序列,并且其中该多核苷酸链含有与该第二扩增引物互补的序列并且含有与该第二引物互补的序列;(ii)将该第二扩增引物退火至结合到小珠的该多核苷酸链;(iii)使用聚合酶从该第二扩增引物延伸以形成双链多核苷酸产物;然后步骤(a),或步骤(b)和(b'):(a)将该小珠引入流通池中,并且使用加热和过量的生物素从该小珠中释放该双链多核苷酸产物作为单链多核苷酸产物;或者(b)通过使用该第二引物和重组酶进行该双链多核苷酸产物的引物侵入,其中该第二引物在溶液中;(b')通过用聚合酶从该第二引物延伸,从该小珠置换和释放该双链多核苷酸产物的链;并且(iv)使用第二附接剂用步骤(a)中释放的该单链多核苷酸产物或步骤(b')中从该小珠释放的该双链多核苷酸产物的该链接种流通池的该表面;并且任选地,重复步骤(ii)至(iv)多次。在另外的实施方案中,使用附接剂将该小珠固定到该流通池的该表面。在又另外的实施方案中,该附接剂选自生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。在又另外的实施方案中,该附接剂是两个互补序列之间的生物素/链霉抗生物素蛋白连接或碱基配对。在另选实施方案中,使用附接剂将该小珠不固定到该流通池的该表面。在某个实施方案中,该流通池是图案化流通池。在另外的实施方案中,从该小珠释放的该链被该流通池表面上的捕获剂结合。在又另外的实施方案中,该捕获剂位于图案化流通池的特征部阵列上,其中该捕获剂不位于该特征部之间的间隙区域上。在另一个实施方案中,图案化流通池的该特征部阵列是孔。在又一个实施方案中,该捕获剂是结合到该流通池的该表面的捕获核酸,并且其中从该小珠释放的该链包含可以与结合到该流通池的该表面的该引物杂交的序列。在另外的实施方案中,该捕获核酸包含通用捕获序列。在又另外的实施方案中,该通用捕获序列包含P5 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'((SEQ ID NO:1))或P7(5'-CAAGCAGAAGACGGCATA CGA-3'(SEQ ID NO:2)),或它们的片段。在另选实施方案中,该通用捕获序列包含抗P5:5'-TCGGTGGTCCCGTATCATT-3'(SEQ ID NO:3)或抗P7:5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'(SEQ ID NO:4),或它们的片段。在另外的实施方案中,该捕获核酸还包含测序引物结合位点(SBS)、靶特异性捕获区、限制性位点和/或连接区。在又另外的实施方案中,SBS是SBS3:5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG ATCT-3'(SEQ ID NO:5)或SBS8:5'-CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGC TCTTCCGATCT-3'(SEQ ID NO:6)。在某个实施方案中,该方

法还包括：进行流通池上线性扩增反应，以制备接种在该流通池表面上的该多核苷酸的拷贝；并且将该拷贝的多核苷酸变性并接种在该流通池表面上。在另外的实施方案中，该流通池上线性扩增反应包括低温AMS1第一延伸反应。在又另外的实施方案中，通过使用包含化学变性剂的杂交缓冲液使该拷贝的多核苷酸变性。在另一个实施方案中，该化学变性剂是甲酰胺。在又另一个实施方案中，该杂交缓冲液包含HT1。在另外的实施方案中，包含化学变性剂的该杂交缓冲液浅浅地覆盖该图案化流通池的该表面，使得该图案化流通池表面上的该阵列特征部彼此流体接触。在又另外的实施方案中，该方法还包括：通过使用桥式扩增在该图案化流通池的该表面上形成簇，以制备每种接种的多核苷酸的多个拷贝。在又另一个实施方案中，该方法还包括：通过合成生成在该图案化流通池的该表面上的该簇进行测序。

[0011] 在某个实施方案中，本公开还提供了用从小珠释放的多核苷酸接种流通池的方法，该方法包括：(i) 提供包含结合到小珠的多核苷酸链的小珠，其中该多核苷酸链的5'端使用生物素/链霉抗生物素蛋白连接结合到该小珠，并且其中该小珠还包含结合的第一和第二扩增引物，其中该第一和第二扩增引物通过附接剂结合到该小珠，其中该第一扩增引物具有与第一引物的该序列至少99%相同的序列，其中该第二扩增引物具有与第二引物的该序列至少99%相同的序列，并且其中该多核苷酸链含有与该第一扩增引物互补的序列，并且含有与该第二扩增引物互补的序列；(ii) 将该第一和第二扩增引物退火至结合到小珠的该多核苷酸链；(iii) 使用聚合酶从该第一和第二扩增引物延伸以形成双链多核苷酸产物的簇；然后步骤(A)，或者步骤(B)和(B')：(A) 将该小珠引入流通池中，并且使用加热和过量的生物素从该小珠中释放该双链多核苷酸产物作为单链多核苷酸产物；或者(B) 通过使用该第一引物和/或该第二引物和重组酶进行该双链多核苷酸产物的引物侵入，其中该第一和第二引物在溶液中；以及(B') 通过用聚合酶从该第一和/或第二引物延伸，从该小珠置换和释放该双链多核苷酸产物的链；并且(iv) 使用附接剂用步骤(A)中释放的该单链多核苷酸产物或步骤(B')中从小珠释放的该双链多核苷酸产物的该链接种流通池的该表面；并且任选地，重复步骤(ii)至(iv)多次。在另外的实施方案中，使用附接剂将该小珠固定到该流通池的该表面。在又另外的实施方案中，该附接剂选自生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。在又另外的实施方案中，该附接剂是两个互补序列之间的生物素/链霉抗生物素蛋白连接或碱基配对。在另选实施方案中，使用附接剂将该小珠不固定到该流通池的该表面。在某个实施方案中，该流通池是图案化流通池。在另外的实施方案中，从该小珠释放的该链被该流通池表面上的捕获剂结合。在又另外的实施方案中，该捕获剂位于图案化流通池的特征部阵列上，其中该捕获剂不位于该特征部之间的间隙区域上。在另一个实施方案中，图案化流通池的该特征部阵列是孔。在又另一个实施方案中，该捕获剂是结合到该流通池的该表面的捕获核酸，并且其中从该小珠释放的该链包含可以与结合到该流通池的该表面的该引物杂交的序列。在另外的实施方案中，该捕获核酸包含通用捕获序列。在又另外的实施方案中，该通用捕获序列包含P5 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'((SEQ ID NO:1))或P7(5'-CAAGCAGAAGACGGCATA CGA-3'(SEQ ID NO:2))，或它们的片段。在另选实施方案中，该通用捕获序列包含抗P5:5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'(SEQ ID NO:3)或抗P7:5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'(SEQ ID NO:4))，或它们的片段。在另外的实施方案中，该捕获核酸还包含测序引物结合位点(SBS)、

靶特异性捕获区、限制性位点和/或连接区。在又另外的实施方案中，SBS是SBS3:5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCG ATCT-3'(SEQ ID NO:5)或SBS8:5'-CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGC TCTCCGATCT-3'(SEQ ID NO:6)。在某个实施方案中，该方法还包括：进行流通池上线性扩增反应，以制备接种在该流通池表面上的该多核苷酸的拷贝；并且将该拷贝的多核苷酸变性并接种在该流通池表面上。在另外的实施方案中，该流通池上线性扩增反应包括低温AMS1第一延伸反应。在又另外的实施方案中，通过使用包含化学变性剂的杂交缓冲液使该拷贝的多核苷酸变性。在另一个实施方案中，该化学变性剂是甲酰胺。在又另一个实施方案中，该杂交缓冲液包含HT1。在另外的实施方案中，包含化学变性剂的该杂交缓冲液浅浅地覆盖该图案化流通池的该表面，使得该图案化流通池表面上的该阵列特征部彼此流体接触。在又另外的实施方案中，该方法还包括：通过使用桥式扩增在该图案化流通池的该表面上形成簇，以制备每种接种的多核苷酸的多个拷贝。在又另一个实施方案中，该方法还包括：通过合成生成在该图案化流通池的该表面上的该簇进行测序。

[0012] 在某个实施方案中，本公开还提供一种用于提高多核苷酸在流通池该表面上的接种效率的方法，该方法包括：进行流通池上线性扩增反应以制备接种在该流通池表面上的该多核苷酸的拷贝；并且将该拷贝的多核苷酸变性并接种在该流通池表面上。在另外的实施方案中，该流通池上线性扩增反应包括低温AMS1第一延伸反应。在又另外的实施方案中，通过使用包含化学变性剂的杂交溶液使该拷贝的多核苷酸变性。在另一个实施方案中，该化学变性剂是甲酰胺。在又另一个实施方案中，该杂交溶液包含HT1。在另外的实施方案中，该混合物浅浅地覆盖该图案化流通池的该表面，使得该图案化流通池表面上的该阵列特征部彼此流体接触。在又另外的实施方案中，该方法还包括：通过使用桥式扩增在该图案化流通池的该表面上形成簇，以制备每种接种的多核苷酸的多个拷贝。在另一个实施方案中，该方法还包括：通过合成生成在该图案化流通池的该表面上的该簇进行测序。

[0013] 本公开的一个或多个实施方案的细节在附图和下文描述中示出。根据说明书和附图以及权利要求书，其他特征、对象和优点将显而易见。

附图说明

[0014] 图1提供构成本公开的示例性方法的步骤的概述，以增强或改善用转座体小珠接种流通池的效率。如图所示，步骤1提供用于用溶液中的引物如P7或P5引发小珠上的Y型接头的3'端。步骤2提供用于通过使用排除扩增从结合的引物延伸以制备双链核酸产物。然后，在步骤3中，当使用排除扩增形成延伸产物时，产物将先前拷贝的链置换到溶液中，步骤4a。然后释放的链接种在流通池的表面，步骤4b，用于分析和应用。

[0015] 图2提供本公开的方法的实施方案，其中小珠包含扩增引物(例如，P5)，其具有与溶液中的引物(例如，P7)不同的序列。

[0016] 图3提供本公开的方法的实施方案，其中小珠包含扩增引物(例如，P7)，其具有与溶液中的引物(例如，P7)相同或几乎相同的序列。

[0017] 图4提供本公开的方法的实施方案，其中使用桥式扩增方法来扩增小珠上的文库并将扩增产物接种在流通池的表面上。

[0018] 图5证明当将两个或更多个DNA文库分子接种在图案化流通池的相同孔中时，产生一个优势簇(蓝色)或者产生两个(或更多个)等同多克隆簇(蓝色+粉红色)。

[0019] 图6A至图6D示出流通池上线性扩增的工作流程：(A) 将DNA文库的多核苷酸接种在流通池的孔中。(B) 用IlluminaTMAMS1进行第一次延伸产生双链DNA(一条拷贝的锚链与原始链)。(C) 在浅层液体变性/接种之后，链离开初始孔并接种附近的孔。(D) 在桥式扩增后，有更高的机会从DNA文库收集测序信息。

[0020] 图7A至图7B示出在流通池的孔上的线性扩增的结果。(A) 使用标准接种方案形成的簇。(B) 使用本文所述的线性扩增方案形成的簇。

[0021] 图8提供图案化流通池的底部孔的照片，以评价是否可使用本文公开的方法用最少量DNA接种流通池。顶部照片：加载有标准量(300pM)的DNA的流通池的底部的图片。中间照片：加载有10pM的DNA的流通池的底部的图片。底部照片：加载有10pM的DNA和P7寡核苷酸以及ExAmp的流通池的底部的图片。照片指示，当使用本文所述的扩增方法时，图案化流通池的孔可被起始的少量DNA(即，10pM)完全占据。

[0022] 图9提供图案化流通池的底部孔的照片，以评价在加载过程期间扩增的量是否可以被控制。如照片中所示，扩增量与使用的P7寡核苷酸量呈剂量依赖关系。

[0023] 图10提供来自图案化流通池的孔的底部和顶部的照片，其中本公开的方法用于从使用P7寡核苷酸的小珠释放DNA并且接种流通池的孔。如上面两张照片中所示，使用本公开的方法接种了孔的顶部表面和底部表面两者。在直接对比中，当仅使用小珠时，孔的顶部表面没有被接种(右下照片)，而当仅使用小珠时，孔的底部表面被最少地接种(左下照片)。

[0024] 并入本说明书中并构成本说明书的一部分的附图示出了一个或多个本公开的实施方案，其与详细描述一起用于说明本公开的原理和实施方式。

具体实施方式

[0025] 如本文和所附权利要求书中所用，单数形式“一个”、“一种”和“该”包括多个指代物，除非文中另外明确指出。因此，例如，提及“流通池”时，包括多个此类流通池，以及提及“DNA文库”时，指一个或多个DNA文库，等等。

[0026] 另外，除非另有说明，否则使用“或”表示“和/或”。类似地，“包括”、“包含”、“具有”和“含有”是可互换的，并非旨在进行限制。

[0027] 还应当理解，在各种实施方案的描述使用术语“包括”的情况下，本领域的技术人员将理解，在一些特定实例中，实施方案可替代地使用语言“基本上由.....组成”或“由.....组成”来描述。

[0028] 除非另有定义，否则本文所用的所有技术和科学术语都具有本公开文本所属技术领域普通技术人员通常理解的含义。虽然与本文所描述的方法和材料类似或等同的方法和材料也可用于本发明所公开的方法和组成的实践，但本文描述了示例性的方法、装置和材料。

[0029] 本文中的术语“扩增”旨在表示通过生成模板的拷贝来增加模板多核苷酸序列的数量的过程。扩增过程可以是线性的或者指数的。在指数扩增中，由模板多核苷酸序列形成的拷贝数量以指数级增加。例如，在30轮的理想指数扩增反应中，模板DNA的一个拷贝将产生 2^{30} 个或1,073,741,824个拷贝。然而，如本文所描述的桥式扩增通常不在理想条件下发生，并且30个循环的“指数”反应可能只会产生几百个至几千个原始模板的拷贝，主要原因在于表面结合的引物的局部浓度有限以及与模板再杂交之间存在竞争。在线性扩增中，由

模板多核苷酸序列形成的拷贝数量以线性速率增加。例如,在理想的4小时内以每分钟2,000个拷贝的拷贝速率进行的线性扩增反应中,模板DNA的每个拷贝将产生480,000个拷贝。在某个实施方案中,本公开的组合物、方法和试剂盒提供线性扩增反应以从小珠释放多核苷酸。

[0030] 术语“捕获剂”是指存在于流通池的表面上的试剂,其能够结合靶生物分子,通常是基于核酸的生物分子,使得靶生物分子变得固定在流通池的表面上。特别地,“捕获剂”对靶生物分子是特异性的,并且不结合到非靶生物分子或其他化合物。示例性捕获剂包括具有附接到靶核酸的相应结合伴侣的受体和/或配体,其示例在前文中阐述。特别有用的捕获剂是与一个或多个靶核酸的序列互补的捕获核酸。例如,存在于流通池的表面上的捕获核酸可具有与存在于靶核酸中的通用序列互补的通用捕获序列。在一些实施方案中,该捕获核酸还可用作扩增靶核酸的引物(无论其是否还含有通用序列)。通用捕获序列可包括,例如,具有通用 Illumina® 捕获引物的序列的区域或与通用 Illumina® 捕获引物特异性杂交的区域。通用 Illumina® 捕获引物包括,例如,P5 (5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' (SEQ ID NO:1)) 或 P7 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3' (SEQ ID NO:2)) 或它们的片段。与通用 Illumina® 捕获引物特异性杂交的区域可包括,例如, Illumina® 捕获引物 P5 (“抗P5”:5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3' (SEQ ID NO:3) 或 P7 (“抗P7”:5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3' (SEQ ID NO:4)) 或它们的片段的反向互补序列。其他捕获核酸可包括通用捕获序列和靶特异性捕获区。捕获核酸还可包含测序引物结合位点(SBS)、靶特异性捕获区、预定的切割位点,诸如限制性位点和连接区,例如,分隔两个或更多个限制性位点的连接区。一些捕获引物可包括例如通用捕获区和SBS。SBS可包括例如具有 Illumina® 测序引物或其片段的序列的区域,或与 Illumina® 测序引物或其片段特异性杂交的区域。Illumina® 测序引物包括例如 SBS3 (5'-ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT-3' (SEQ ID NO:5)) 或 SBS8 (5'-CGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT-3' (SEQ ID NO:6))。与 Illumina® 测序引物或其片段特异性杂交的区域可包括例如 Illumina® 测序引物 SBS3 (“抗SBS3”:5'-AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT-3' (SEQ ID NO:7)) 或 SBS8 (“抗SBS8”:5'-AGATCGGAAGAGCGGTTCAGCAGGAATG CCGAGACCG-3' (SEQ ID NO:8)) 或它们的片段的反向互补序列。捕获核酸可具有区域的任何组合,例如, Illumina® P5、P7、SBS3 或 SBS8 引物区域或它们的片段的任何组合,包括诸如 P5-SBS3 和 P7-SBS8 或它们的片段的组合。

[0031] 捕获核酸可以在3'-端被封闭(3'-封闭)或在3'-端未封闭(3'-未封闭)。具有封闭的3'-端的捕获核酸可以例如是3'-磷酸终止的。一些具有封闭的3'-端的捕获核酸可以被解封闭。解封闭可在酶促反应或化学反应中发生。酶促反应可例如由激酶或磷酸酶介导。例如,3'-磷酸终止的引物可被激酶诸如T4激酶解封闭。

[0032] 捕获核酸可包括预定的(非随机的)切割位点。可能的预定的切割位点公开于例如美国专利No.8,715,966 B2中。在预定位点的切割可以发生例如为酶促切割或非酶促切割,诸如化学切割。在预定位点诸如限制性位点处的酶促切割可例如由限制性酶诸如限制性核酸内切酶介导。在一些实施方案中,引物中的预定的切割位点可包括尿嘧啶碱基。切割可通过用尿嘧啶DNA糖基酶处理含尿嘧啶的引物以在该引物中形成碱性位点,随后用核酸内切

酶、加热或碱处理以在该碱性位点切割引物而发生。在一些实施方案中,该预定的切割位点包括二醇连接子,其可通过用高碘酸盐处理而被切割。在一些实施方案中,该预定的切割位点包括8-氧代-鸟嘌呤。

[0033] 该预定的切割位点可包括酶限制性位点。技术人员已知的任何限制性酶或任何酶限制性位点可用于本文提供的方法或组合物中。例如,限制性核酸内切酶可以是I型酶(EC 3.1.21.3)、II型酶(EC 3.1.21.4)、III型酶(EC 3.1.21.5)或IV型酶(EC 3.1.21.5)。限制性核酸内切酶可包括,例如,但不限于Alu I、Ava I、Bam HI、Bgl II、Eco P15 I、Eco RI、Eco RII、Eco RV、Hae III、Hga I、Hha I、Hind III、Hinf I、Hpa I、Kpn I、Mbo I、Not I、Pst I、Pvu II、Sac I、Sal I、SapI、Sau 3A、Sca I、Sma I、Spe I、Sph I、Sst I、Stu I、Taq I、Xba I或Xma I。该限制性核酸内切酶可以是重组限制性酶。重组限制性酶可包括但不限于融合蛋白,该融合蛋白包括天然或工程化DNA结合结构域(例如,锌指结构域、TAL效应子结构域)和核酸酶结构域(例如,IIS型限制性酶FokI的切割结构域)。

[0034] 在具体实施方案中,捕获剂(诸如捕获核酸)可附接到排列在图案化流通池表面上的特定特征部。例如,该捕获剂可附接到图案化流通池上的阵列的特征部(例如,孔)的表面。另选地,该捕获剂以随机方式结合到流通池的表面(即,非图案化流通池)。附接可经由中间结构,诸如小珠、颗粒或凝胶。WO 2008/093098(其以引用方式并入本文)中描述了通过使用凝胶将捕获核酸附接到图案化流通池阵列的特征部。可用于本文所述的方法和设备中的示例性凝胶包括但不限于具有胶体结构的那些凝胶,诸如琼脂糖;具有聚合物网状结构的那些,诸如明胶;或交联的聚合物结构,诸如聚丙烯酰胺、SFA(参见例如美国专利申请公开No.2011/0059865 A1,其以引用方式并入本文)或PAZAM(参见例如美国专利申请公开No.2014/0079923A1、美国专利No.9,815,916B2和美国专利No.10,208,142B2,这些的公开内容以引用方式并入本文)。关于PAZAM,通过使用点击化学可以将捕获剂结合到PAZAM表面上的残留叠氮化物。

[0035] 如本文所用,术语“克隆群体”是指相对于特定核苷酸序列而言是同源的核酸群体。同质序列可以为至少10个核苷酸长,或更长,例如至少50、100、250、500或1000个核苷酸长。克隆群体可来源于单个靶核酸或模板核酸。基本上克隆群体中的所有核酸具有相同的核苷酸序列。应当理解,在不脱离克隆性的情况下,少量突变(例如,由于扩增伪影(amplification artifact))可发生在克隆群体中。

[0036] 术语“变性”是广义术语,其主要指DNA碱基的物理分离,该DNA碱基与例如单链多核苷酸序列的沃森-克里克DNA双螺旋结构及其互补物进行相互作用。该术语也指上述两条链的物理分离。在其最广泛的意义上,该术语指形成一种情形的过程,在这一情形下,将另一个引物寡核苷酸或多核苷酸序列退火至双螺旋的一条或两条链变得可行。

[0037] 如本文所用,术语“流通池”旨在表示具有一种或多种流体试剂可流过的表面的槽室,并且核酸可结合到该表面并接种该流通池的表面。通常,流通池将具有流入进口和流出口,以促进流体流动。可容易地用于本公开的方法中的流通池以及相关流体系统和检测平台的示例在以下文献中有所描述,例如:Bentley等人,Nature 456:53-59(2008);WO 04/018497;美国专利申请No.7,057,026;WO 91/06678;WO 07/123744;美国专利申请No.7,329,492;美国专利申请No.7,211,414;美国专利申请No.7,315,019;美国专利申请No.7,405,281和公开号为2008/0108082的美国专利,上述每一篇均以引用方式并入本文。

[0038] 在某个实施方案中,流通池包括具有核酸可以结合到其上的表面的固体载体。在一些实施方案中,该表面包括可结合到从小珠释放的多核苷酸的捕获剂的坪。在一些示例中,该表面为图案化表面。“图案化表面”是指在固体载体的暴露表面之中或之上的不同区域(诸如扩增位点)的排列(诸如阵列)。例如,这些区域中的一个或多个区域可以是存在一种或多种捕获剂的特征部。特征部可以由其中不存在捕获剂的间隙区域分隔开。在一些实施方案中,图案可以为呈行和列形式的特征部的x-y格式。在一些实施方案中,图案可以为特征部和/或间隙区域的重复布置。在一些示例中,图案可以是随机布置的特征部和/或间隙区域。在一些实施方案中,表面是包括具有结合到从小珠释放的多核苷酸的捕获剂的孔的阵列的图案化表面,其中孔之间的间隙区域缺少捕获剂。在一些情况下,在这些参考文献中举例说明了在孔中使用小珠的应用的基底。图案化流通池可与本公开的组合物、方法和试剂盒一起使用。

[0039] 图案化流通池包括在玻璃、硅、塑料或其他合适的固体载体上的特征部诸如微孔或纳米孔的阵列。特征部的阵列可包含捕获剂,在一个实施方案中,该捕获剂与孔表面上的凝胶共价连接,诸如聚(N-(5-叠氮乙酰胺基戊基)丙烯酰胺)(PAZAM,参见例如美国公开No.2013/184796、WO 2016/066586和WO 2015/002813,这些专利中的每一篇均以引用方式全文并入本文)。通过将聚合物共价连接到流通池表面上的特征部可以延长流通池的寿命。然而,在许多示例中,凝胶不需要共价连接到流通池表面上的特征部。例如,不含硅烷的丙烯酰胺(SFA,参见例如,美国专利申请No.8,563,477,其以引用方式全文并入本文)可用作凝胶材料。SFA不与流通池表面上的特征部共价附接。可用于本文所述的方法中的具有图案化表面的流通池的示例描述于美国专利No.8,778,848、8,778,849和9,079,148以及美国专利公布No.2014/0243224中,这些专利中的每一篇均以引用方式全文并入本文。流通池的表面上的特征部的阵列可用于捕获单个核酸模板分子以进行接种,随后例如经由桥式扩增形成同质集落。此类图案化阵列尤其可用于核酸测序应用。

[0040] 流通池表面上的特征部的阵列可具有多种密度中的任一种密度,包括例如至少约10个(诸如至少约100个、至少约500个、至少约1000个、至少约5,000个、至少约10,000个、至少约50,000个、至少约100,000个、至少约1,000,000个或至少约5,000,000个或更多个)特征部/cm²。

[0041] 图案化流通池表面上的特征部的阵列(例如,孔)可表现为点或片的网格。特征部可以以重复图案或以不规则的非重复图案定位。特别有用的图案是六边形图案、直线图案、网格图案、具有反射对称性的图案、具有旋转对称性的图案等。不对称的图案也可以是有用的。不同的最近相邻特征部对之间的间距可以相同,或者不同的最近相邻特征部对之间的间距可以不同。在具体实施方案中,图案化流通池的阵列的特征部(例如,孔)可各自具有大于约100nm²、250nm²、500nm²、1μm²、2.5μm²、5μm²、10μm²、100μm²或500μm²的面积。另选地或除此之外,阵列的特征部(例如,孔)可各自具有小于约1mm²、500μm²、100μm²、25gm²、10μm²、5μm²、1μm²、500nm²或100nm²的面积。实际上,区域可具有在选自上文所例示的那些上限和下限之间的范围内的尺寸。

[0042] 图案化流通池表面上的特征部(例如,孔)的阵列可以是离散的,由间隙区域分隔开。特征部的大小和/或区域之间的间隔可以不同,使得阵列可以是高密度、中密度或较低密度。高密度阵列的特征在于具有由小于约15μm分隔开的特征部。中密度阵列具有由约15μ

m至30 μ m分隔开的特征部,而低密度阵列具有由大于30 μ m分隔开的区域。阵列可具有由小于100 μ m、50 μ m、10 μ m、5 μ m、1 μ m或0.5 μ m分隔开的区域。与阵列的特征部相比,具有基本上更低量或浓度的捕获剂的间隙区域是有利的。缺乏捕获剂的间隙区域是特别有利的。例如,在间隙区域相对少量存在或不存在捕获剂有利于靶核酸和随后产生的簇定位到期望的特征部。在具体实施方案中,特征部可以是表面中的凹形特征部(例如,孔),并且该特征部可以包含凝胶材料。含凝胶的特征部(例如,PAZAM)可通过表面上的间隙区域彼此分隔,其中该凝胶基本上不存在,或者如果存在,该凝胶基本上不能支持核酸的定位。制备和使用具有含凝胶特征部(例如孔)的基底的方法和组合物。

[0043] 如本文所用,术语“流通池表面”意指流通池的能够与试剂、小珠或分析物接触的部分。流通池表面可为基本上平坦的或平面的。另选地,流通池表面可为圆形的或轮廓状的。可包括在流通池表面上的示例性轮廓为孔、凹陷、柱、脊、通道等。流通池表面可由包括但不限于玻璃(诸如修饰或官能化的玻璃)的材料组成。塑料,诸如丙烯酸、聚苯乙烯或苯乙烯与另一种材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯或TeflonTM;多糖或交联多糖,诸如琼脂糖或琼脂糖凝胶;尼龙;硝化纤维;树脂;二氧化硅或基于二氧化硅的材料,包括硅和改性硅;碳纤维;金属;无机玻璃;光纤束,或多种其他聚合物。单一材料或几种不同材料的混合物可用于形成流通池的表面。可容易地用于本公开的方法中的流通池以及相关流体系统和检测平台的示例在以下文献中有所描述,例如:Bentley等人,Nature 456:53-59 (2008);WO 04/018497;美国专利申请No.7,057,026;WO 91/06678;WO 07/123744;美国专利申请No.7,329,492;美国专利申请No.7,211,414;美国专利申请No.7,315,019;美国专利申请No.7,405,281和公开号为2008/0108082的美国专利,上述每一篇均以引用方式并入本文。

[0044] 如本文所用的术语“等温”指系统或装置的温度保持恒定的过程,即,其中 $\Delta T=0$ 。可选地,这在系统/装置与外部热贮存器(例如,加热器、热浴、热电控制器(TEC)等)接触时发生,并且以使得系统/装置可持续通过热交换将系统/装置调整到贮存器的温度的速率在系统/装置内实现动作或变化。

[0045] 如本文所用,术语“聚合酶”旨在与其在本领域中的用途一致,并且包括例如使用核酸作为模板链产生核酸分子的互补复制的酶。通常,DNA聚合酶结合到模板链并且然后沿模板链向下移动,将核苷酸依序添加到生长核酸链的3'端处的游离羟基。DNA聚合酶通常自DNA模板合成互补DNA分子并且RNA聚合酶通常自DNA模板合成RNA分子(转录)。聚合酶可以使用短RNA或DNA链(称为引物)来开始链生长。一些聚合酶可以置换它们将碱基添加到链的位点上游的链。此类聚合酶称为链置换的,意味着它们具有从由聚合酶读取的模板链中去除互补链的活性。具有链置换活性的示例性聚合酶包括但不限于Bst(嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*))聚合酶、exo-Klenow聚合酶或测序级T7 exo-聚合酶的大片段。一些聚合酶使它们前方的链降解,从而有效地用后面生长的链置换前方链(5'核酸外切酶活性)。一些聚合酶具有使它们后面的链降解的活性(3'核酸外切酶活性)。一些有用的聚合酶已经通过突变或者以其他方式修饰以减少或消除3'和/或5'核酸外切酶活性。

[0046] 如本文所用,术语“多核苷酸”或“核酸”指脱氧核糖核酸(DNA),然而,在适当的情况下,技术人员将认识到本文的系统 and 装置也可以应用于核糖核酸(RNA)。应理解,该术语包括作为等同物的由核苷酸类似物形成的DNA或RNA的类似物。如本文所用,术语还涵盖

cDNA,即由RNA模板例如通过逆转录酶的作用产生的互补DNA或拷贝DNA。

[0047] “引物寡核苷酸”或“引物”为能够特别地退火至单链多核苷酸序列的寡核苷酸序列,从而该单链多核苷酸序列可在等温扩增反应的每个循环的引物退火步骤中遇到的条件下进行扩增。通常,扩增反应需要至少两个扩增引物,一般表示为“正向”和“反向”引物。在某些实施方案中,正向引物和反向引物可以彼此相同。引物寡核苷酸可以包括“模板特异部分”,其是在退火步骤期间能够退火至待扩增的单链多核苷酸分子(或在模板被视为单链的情况下其互补物)中的引物结合序列的核苷酸序列。引物结合序列通常将具有已知序列,并因此将与单链多核苷酸分子的已知序列I和已知序列II内的序列特别地互补。引物结合序列的长度不必与已知序列I或已知序列II的长度相同并可以更短,例如,16个至50个核苷酸、16个至40个核苷酸或20个至30个核苷酸的长度。引物寡核苷酸的最佳长度将取决于许多因素,并且通常而言,引物足够长(络合),从而使退火到除引物结合序列之外的序列的可能性非常低。

[0048] 待扩增的多核苷酸分子通常是单链形式,作为ssDNA或RNA;或双链DNA(dsDNA)形式(例如,基因组DNA片段、PCR和扩增产物,等)。因此,单链多核苷酸可以是多核苷酸双螺旋的有义链或反义链。可利用标准技术制备适用于本公开的系统/装置中的单链多核苷酸分子的方法是本领域已知的,例如加热或使用氢氧化物处理,然后稀释。初级多核苷酸分子的精确序列通常对本公开并不重要,并且可以是已知的或未知的。单链多核苷酸分子可以表示基因组DNA分子(例如,人的基因组DNA),该基因组DNA分子包括内含子和外显子序列(编码序列),还有非编码调控序列,诸如,启动子和增强子序列。在具体实施方案中,待扩增的多核苷酸分子是DNA文库。在另外的实施方案中,使用文库制备试剂盒生成该DNA文库。在又另外的实施方案中,该文库制备试剂盒来自Illumina公司(例如,AmpliSeq™试剂盒、COVIDSeq™试剂盒、Illumina DNA制备试剂盒、Illumina RNA制备试剂盒、Nextera™试剂盒、SureCell WTA™试剂盒、TruSeq™试剂盒和TruSight™试剂盒)。

[0049] 如本文所用,术语“重组酶”旨在与其在本领域中的用途一致,并且包括例如RecA蛋白、T4 uvsX蛋白、来自任何门的任何同源蛋白或蛋白复合物,或它们的官能化变体。真核RecA同系物通常在该组待鉴定的第一个成员后命名为Rad51。其他非同源重组酶可被用于代替RecA,例如RecT或ReCo。

[0050] 如本文所用,术语“单链结合蛋白”旨在指具有结合到单链核酸的功能的任何蛋白,例如,以防止过早退火、以保护单链核酸不被核酸酶消化、以从核酸中去除二级结构或以促进核酸的复制。该术语旨在包括但不必限于由国际生物化学与分子生物学联合会的命名委员会(NC-IUBMB)正式鉴定为单链结合蛋白的蛋白质。示例性单链结合蛋白包括但不限于大肠杆菌(E.coli)SSB、T4 gp32、T7基因2.5 SSB、噬菌体phi 29 SSB、来自任何门的任何同源蛋白或蛋白复合物、或它们的官能化变体。

[0051] 如本文所用,“固相扩增”指在流通池的通道表面上进行的核酸扩增反应,使得全部或一部分扩增产物在形成时固定在该固体载体上。

[0052] 文库制备是所有下一代测序(NGS)应用的重要第一步骤,并且通常采用几个共同步骤。体外转座已被用于从基因组DNA(gDNA)生成准备好用于测序仪的文库,与以前的方法相比具有显著的时间节省和减少的输入需求。基于转座体的文库构建通过消除对单独的DNA片段化步骤的需要和移除DNA片段之间连接的先决条件而改进了DNA文库制备过程。片

段化的效率高度依赖于酶与DNA的比率。因此,可变的DNA输入量将生成文库的片段大小分布的不一致性。这在文库制备过程中引入了可变性,其可对测序覆盖具有下游影响。

[0053] 小珠连接的转座体技术已经用于制备用于全基因组测序技术(例如, Illumina™DNA制备)以及靶向测序应用(例如,用于富集的Illumina™ DNA制备)的文库。该方法利用已知浓度的直接偶联到小珠的转座体来结合固定量的DNA。这因此提供了广泛的适用性,支持宽范围的DNA输入范围以及血液和唾液样品的综合提取,生成用于测序的标准化文库以促进无定量的工作流程。文库在工作流程的标准参数之外生成,突出了用于全基因组测序的新应用,包括人基因组构建和从低于1ng DNA输入调用变体、插入片段长度的定制,以及从短片段和严重降解的样品制备文库。对于大并且复杂的基因组,与其他文库制备方法相比,跨基因组(包括困难区域)的覆盖得到改善。从不同大小(从50bp至11kb)的扩增子成功地生成文库,然而,对于小于250bp的扩增子观察到效率降低。小珠上标签化学也适用于靶向测序,并且支持广泛种类的DNA输入量、各种样品类型和宽范围的应用,包括固定板、定制板和全外显子组测序。因此,小珠连接的转座体可有效地用于全基因组测序以及靶向再测序。DNA的来源可来自环境、来自受试者的样品等,DNA可以从受试者身体的几乎任何部分提取。例如,输入DNA可提取自多种样品类型,包括但不限于尿液、血液、唾液、组织、血清、血浆、痰、胆汁、排泄物、毛发、皮肤和/或原代细胞样品。

[0054] 本文提供的实施方式包括在流通池的表面上捕获从本文公开的小珠连接的转座体释放的多核苷酸。将小珠连接的转座体加载入流通池中,并且使用本公开的方法,从小珠连接的转座体释放多核苷酸,并且将其接种在流通池的表面上。

[0055] 在一些示例中,通过流通池的表面上捕获剂与释放的多核苷酸或与转座体小珠的相互作用,将小珠连接的转座体或从小珠连接的转座体释放的多核苷酸捕获到流通池的表面上。在所公开的方法中,用于将转座体小珠固定到流通池的表面上捕获剂的示例包括但不限于:与连接到小珠上的接头的核酸的至少一部分互补的捕获核酸,或与从转座体小珠释放的核酸的一部分互补的捕获核酸;或与能够连接到靶核酸(或与其附接的连接部分)的受体-配体结合对(例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、生物素、凝集素、碳水化合物、核酸结合蛋白、表位、抗体等等)的成员互补的捕获核酸;或与能够与靶核酸(或与其附接的连接部分)形成共价键的化学试剂互补的捕获核酸。

[0056] 在一些示例中,捕获剂是位于流通池上的特异性结合对的第一成员,并且结合到位于转座体小珠上的特异性结合对的第二成员,或结合到从小珠释放的多核苷酸。例如,流通池使用特异性结合对的第一成员官能化,并且从小珠释放的多核苷酸含有特异性结合对的第二成员。

[0057] 在一些示例中,捕获剂存在于流通池上的分隔位置处。例如,在流通池是包含孔的阵列的图案化流通池的示例中,捕获剂可存在于图案化流通池的孔处。

[0058] 除此之外,流通池可以包含小珠捕获结构,诸如柱/杆、堰、杯形结构,以将小珠固定/捕获在流通池内的限定位置中。这些捕获结构可通过在玻璃或硅树脂中蚀刻或通过可光图案化材料的光刻而制成。

[0059] 在具体实施方案中,本公开描述了用小珠连接的转座体增强或改善流通池的接种效率的方法,该方法包括以下步骤:将核酸转座到转座体小珠上。转座后,转座链的两个5'端经由强生物素/链霉抗生物素蛋白连接与小珠连接的转座体连接。迄今为止,这需要使用

过量的生物素和加热以从小珠释放分子。加热还引起流通池中的扩散增加,其将破坏所形成的簇的空间共定位。本公开提供了用于改善核酸释放和流通池接种的改善或增强的方法,其不需要使用加热或过量的生物素。

[0060] 在另一个实施方案中,本公开描述了用小珠连接的转座体增强或改善流通池的接种效率的方法,该方法包括以下步骤:从转座体小珠释放核酸并且将核酸接种在流通池的一个或多个表面上,使得紧密连接的核酸在空间上共同位于流通池的表面的选定位置上。核酸在流通池表面上的空间共定位充当一种索引形式,从而使得测序读段能够被连接到一起成为重叠群。

[0061] 在某个实施方案中,本公开的方法是有利地无PCR的。在另一个实施方案中,本公开的方法呈现出高效率的释放/接种,使得几乎所有的转座分子被捕获到流通池的一个或多个表面上。通常,通过使用加热/过量的生物素从小珠释放核酸分子。然而,使用所述技术的一个缺点是图案化的流通池需要2个至3个分子或更多个分子来有效地接种纳米孔,并且标准方法学的使用不是过度有效的,导致转座分子的捕获效率降低并且因此引起每个重叠群的覆盖中的更多“孔”。与标准技术相比,本公开的方法提供用于使用多核苷酸改善或增强流通池的释放和接种效率。

[0062] 图1提供了本公开的方法的示例性实施方案,其用于用小珠连接的转座体增强或改善流通池的接种效率。如图所示,该方法使用溶液引物(例如,P7)来引发小珠上的Y型接头的3'端(步骤1)。使用排除扩增来延伸引物以制备步骤2中所见的dsDNA结构。然后,通过更多的P7引物和重组酶发生进一步的链侵入(步骤3)。当这些被聚合酶延伸时,产物将置换先前拷贝的链到溶液中(步骤4a),其然后能够用于在表面上接种和扩增(步骤4b)。当P7/排除扩增混合物与小珠一起孵育时,进行另外轮的延伸、引物侵入和释放,引起链从小珠的线性拷贝。其结果是克服了对多条链接种图案化流通池的每个纳米孔的需要,其进一步不倾向于通常的2引物溶液PCR的偏差(因此维持无PCR文库的良好GC偏差)。

[0063] 本公开的另外实施方案显示在图2中,其中不同于溶液引物的扩增引物包含在小珠上。例如,小珠可包含扩增引物,如P5。因此,在图1的步骤3中,除了结合到接头的溶液引物(例如,P7)之外,扩增引物(例如,P5)将在小珠表面处存在另外的引物侵入。结果,从每条链产生甚至更多的拷贝,更像指数型扩增而不是线性扩增。尽管使用扩增引物可引入PCR型偏差,但该方法是基于表面的扩增而不是基于主体溶液的PCR,即,对试剂的较少竞争。例如,基于簇的表面扩增比纳米文库扩增偏差更少。这个概念在图2中示出。

[0064] 在图3中示出了本公开的方法的另选实施方案。在该实施方案中,小珠包含与溶液引物相同的扩增引物(例如,两者都是P7)。然后使用排除扩增(例如,ExAMP)在围绕每个转座事件的扩增引物上进行定位线性扩增。这之后,将小珠引入流通池中,并且(a)使用加热/过量生物素手段以从链霉抗生物素蛋白/生物素连接释放扩增的多核苷酸,或者(b)使用排除扩增(例如,ExAmp)和第二溶液引物手段以经由侵入/置换释放扩增的多核苷酸。后一种手段将进一步提供跨小珠的表面的扩增。

[0065] 本公开的方法的另一个另选实施方案是小珠包含两种或更多种不同类型的扩增引物(例如,P5和P7)。在该实施方案中,在转座后,可使用扩增进行文库的基于表面的成簇。这之后,将小珠引入流通池中,并且(a)使用加热/过量生物素手段以从链霉抗生物素蛋白/生物素连接释放扩增的多核苷酸,或者(b)使用排除扩增(即,ExAmp)和溶液引物手段以经

由侵入/置换释放扩增的多核苷酸。关于后一种手段,可使用与一种或另一种扩增引物相关的溶液引物,或者使用与多种类型的扩增引物相关的溶液引物。小珠上的扩增引物应该对转座是惰性的,或者通过使用单链结合蛋白等使其成为惰性。

[0066] 图4提供了本公开的方法的实施方案,其中使用桥式扩增方法来扩增小珠上的文库并且将扩增产物接种在纳米孔中。在该方法中,可溶性引物首先与文库杂交,并且使用扩增混合物(例如,AMS)延伸。然后,在40%甲酰胺/HT1混合物中流动后,通过升高温度至 $>80^{\circ}\text{C}$,使文库变性离开小珠。通过将温度降低至 20°C 接种变性的文库链。然后,通过交换试剂进行另一轮延伸和变性。

[0067] 本文公开的组合物、方法和试剂盒涉及从在流通池表面上接种和扩增的小珠有效释放多核苷酸,以便提供用于多核苷酸的最大分子覆盖的可读簇。如图5中所示出,一旦将两个或更多个DNA文库分子接种在图案化流通池的相同孔上,其以仅一个优势簇结束,或者以产生多克隆性的两个或更多个等同簇结束。在这两种情况下,未能成为丛生簇的多核苷酸失去了有价值的信息。

[0068] 为了提供图案化流通池的甚至更广泛的接种,本公开提供了流通池上线性扩增/浅层变性过程,其在簇云区域内提供更有效和广泛的接种。如图6A至图6D所示,在将多核苷酸接种在流通池的表面上之后,使用采用IlluminaTMAMS1的低温第一次延伸拷贝多核苷酸。然后使用“浅层液体”变性和接种步骤以用拷贝的多核苷酸重新接种附近的孔。用于单罐变性/接种的试剂是LDR(甲酰胺)和HT1的混合物。然后使用桥式扩增步骤。使用上述方法,可以实现从小珠释放的所有多核苷酸的测序信息。

[0069] 在具体实施方案中,通过使用具有溶液引物的排除扩增(例如,ExAmp)以将转座模板拷贝到小珠上,解决了从小珠连接的转座体到图案化流通池上的低接种效率的问题。随后通过更多溶液引物的链侵入将引起拷贝的链置换到溶液中,从而有效地将它们从小珠释放并允许它们在小珠附近接种在流通池的表面。该方法的其他实施方案可包括小珠结合的扩增引物,以增强小珠结合的模板的扩增和置换。

[0070] 本文所述的方法可用于在流通池表面上生成各种密度的簇。例如,流通池表面可以包括为约5、10、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1100、1050、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950、2000、2500、3000、4000、5000,或包括前述任何两个值或在前述任何两个值之间的密度范围的簇密度(K/mm²)。簇的密度与所用小珠的数量和小珠的大小相关。

[0071] 核酸可以通过在核酸的5'端处或附近、或在核酸的3'端处或附近与表面的单点共价附接而结合到小珠上。在核酸用作扩增引物的实施方案中,附接被配置为使引物的模板特异性部分自由退火至其同源模板并且使3'羟基自由用于引物延伸。本领域已知的任何合适的共价附接剂均可用于此目的。所选择的附接化学将取决于小珠表面的性质,以及对其应用的任何衍生化或官能化。该附接剂的示例可包括但不限于:生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。结合到小珠的扩增引物可包含可为非核苷酸化学修饰的部分,以促进附接。在某个实施方案中,该扩增引物可以在5'端包含生物素残基,其可以与小珠表面上的链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白形成连接。在另一

个实施方案中,该扩增引物可包含例如位于5'端的含硫亲核试剂,诸如硫代磷酸酯或硫代磷酸盐。在基于聚丙烯酰胺基小珠的情况下,该亲核试剂将结合到存在于小珠表面上的溴乙酰胺基。附接也可经由配体受体相互作用发生,诸如本文其他地方所述的那些。

[0072] 与本文公开的图案化流通池一起使用的小珠由聚合物材料(例如,聚苯乙烯或聚苯乙烯二乙烯基苯)、二氧化硅材料、氧化锆材料和/或超顺磁性材料等组成,其已被“官能化”,例如通过施加包含允许核酸或其他生物分子共价附接的反应性基团的材料的层或涂层。此类涂层的示例包括但不限于链霉抗生物素蛋白、胺基、羧基、环氧基、甲苯磺酰基或配体(例如,受体、受体配体等)。在此类实施方案中,多核苷酸可直接共价附接到小珠上的层或涂层中的反应性基团(例如,甲苯磺酰基),但涂层或层本身可非共价附接到小珠。在另外的实施方案中,本文公开的小珠可具有多个层,并且该层可具有不同的组合物。本文公开的小珠通常是球形的,但也可以是卵形的。小珠可包含通常亲水的表面或通常疏水的表面。小珠具有为约500nm、1 μ M、1.1 μ M、1.2 μ M、1.3 μ M、1.4 μ M、1.5 μ M、1.6 μ M、1.7 μ M、1.8 μ M、1.9 μ M、2 μ M、2.1 μ M、2.2 μ M、2.3 μ M、2.4 μ M、2.5 μ M、2.6 μ M、2.7 μ M、2.8 μ M、2.9 μ M、3 μ M、3.1 μ M、3.2 μ M、3.3 μ M、3.4 μ M、3.5 μ M、3.6 μ M、3.7 μ M、3.8 μ M、3.9 μ M、4 μ M、4.1 μ M、4.2 μ M、4.3 μ M、4.4 μ M、4.5 μ M、4.6 μ M、4.7 μ M、4.8 μ M、4.9 μ M、5.0 μ M、5.1 μ M、5.2 μ M、5.3 μ M、5.4 μ M、5.5 μ M、5.6 μ M、5.7 μ M、5.8 μ M、5.9 μ M、6 μ M、6.1 μ M、6.2 μ M、6.3 μ M、6.4 μ M、6.5 μ M、6.6 μ M、6.7 μ M、6.8 μ M、6.9 μ M、7 μ M、7.1 μ M、7.2 μ M、7.3 μ M、7.4 μ M、7.5 μ M、7.6 μ M、7.7 μ M、7.8 μ M、7.9 μ M、8 μ M、8.1 μ M、8.2 μ M、8.3 μ M、8.4 μ M、8.5 μ M、8.6 μ M、8.7 μ M、8.8 μ M、8.9 μ M、9.0 μ M、9.1 μ M、9.2 μ M、9.3 μ M、9.4 μ M、9.5 μ M、9.6 μ M、9.7 μ M、9.8 μ M、9.9 μ M、10 μ M,或包括前述任何两个距离或在前述任何两个距离之间的范围,包含它们的小数增量的直径。小珠通常包含多个结合的多核苷酸,其可以具有或不具有相同的序列。结合的多核苷酸的数量很大程度上取决于小珠的大小和小珠表面上可用的反应性基团的数量。小珠可由多种材料组成,包括可控孔玻璃珠、顺磁珠、聚苯乙烯、氧化钪溶胶、琼脂糖凝胶珠、纳米晶体和本领域已知的其他材料,如例如在来自Bangs Laboratories, Fishers Ind.的Microsphere Detection Guide中所述。小珠可由生物或非生物材料制成。由于在本文所述方法的各个步骤中使用磁体容易操纵磁珠,所以磁珠是特别有用的。

[0073] 本文公开的小珠通常包含小珠连接的转座体。小珠连接的转座体能够在提供的DNA模板(例如,基因组DNA、长模板DNA等)上进行小珠上标签化。转座体可以使用附接剂直接附接到小珠,该附接剂诸如生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。另选地,转座体可以通过使用连接子间接附接到小珠。该连接子的示例可包括核苷酸、聚合物、肽等。在具体实施方案中,该转座体经由寡核苷酸连接子间接连接到小珠。在这种情况下,寡核苷酸连接子可以包含被转座体识别和结合的末端序列(例如,嵌合末端序列)。连接到小珠的转座酶可以是转座酶Tn5、睡美人转座酶、Tn7转座子或上述每一种中的突变,以改善活性和/或稳定性。在具体实施方案中,连接到小珠的转座体包含转座酶Tn5或其突变体或变体。将转座体连接到小珠的寡核苷酸连接子可以使用附接剂附接到小珠,该附接剂诸如生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。在具体实施方案中,寡核苷酸连接子经由生物素/链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白连接与小珠结合。寡核苷酸连接子还可包含一个或多个条形码序列、引物

序列、测序引物结合位点和/或限制性酶识别位点。

[0074] 通过从固定小珠释放多核苷酸而在流通池的表面上生成的簇可以具有与自其生成簇的小珠所占据的表面面积相似或更小的尺寸,并且簇通常将具有彼此相似的大小和强度。均匀的尺寸、均匀的强度和没有重叠可以提供有利的每单位面积的簇密度,其高于从其他随机沉积方法能够获得的密度,因为这些其他方法经常产生其中簇可以重叠并且具有不同尺寸和强度的表面。具有均匀尺寸和强度的紧密填充的非重叠簇的图像通常比其中簇的子集彼此重叠的图像更容易分析。

[0075] 在具体实施方案中,结合到小珠的多核苷酸包含基因组DNA。在另外的实施方案中,结合到小珠的多核苷酸链包含长模板DNA。在又另外的实施方案中,

[0076] 结合到小珠的多核苷酸链包含来自受试者的样品的DNA。从受试者获得的样品的示例包括但不限于尿液、血液、唾液、组织、血清、血浆、痰、胆汁、排泄物、毛发、皮肤和/或原代细胞样品。多核苷酸使用附接剂可结合到小珠。附接剂的示例包括但不限于:生物素/链霉抗生物素蛋白连接、共价键、两个互补序列之间的碱基配对、结合抗原的抗体、结合另一抗体的抗体、结合包含金属离子的载体的多组氨酸标签和结合配体的受体。

[0077] 当通过使用本文公开的方法从小珠释放链时,该链结合到最靠近小珠的流通池的表面的捕获剂,层中小珠彼此的接近度决定了在流通池表面上捕获的多核苷酸的接近度。基于所用小珠的尺寸和它们在流通池的表面的填充密度,使用小珠接种非图案化流通池提供用于间接的“图案化阵列”。另选地,图案化流通池可与本文所公开的方法一起使用。在将多核苷酸的链捕获到流通池表面上(流通池接种)之后,用聚合酶和dNTP进行延伸以拷贝链、随后变性的循环提供了期望的单链形式的附接核酸阵列,其然后可以经受等温扩增循环。另选地,在等温扩增(例如,桥式扩增)之前,流通池的接种效率可以通过进行接种的多核苷酸的流通池上线性扩增,随后进行本公开的低体积变性和接种方法来进一步改善。在此类实施方案中,该流通池的多个表面或特征部包括单链引物序列的坪,从而实现“桥式扩增”。在桥式扩增中,当该表面遇到适合杂交的条件时,该待扩增的单链核酸分子形成桥接,使接头序列在其自由端与结合到该流通池表面的互补单链引物序列进行杂交。然后,将核苷酸和DNA聚合酶输送到该流通池中,以形成待扩增的核酸的互补链。然后,通过在变性试剂中流动使形成的双链序列变性,并且再次开始上述过程,从而在扩增循环期间在不改变系统温度的情况下形成扩增核酸簇。在典型实施方案中,绝大部分簇为单克隆,这是由单个原始核酸序列的扩增引起的。

[0078] 通常,用于形成DNA簇的引物寡核苷酸为单链多核苷酸。其还可以含有天然和非天然碱基的混合物以及天然和非天然主链连杆,前提条件是任何非天然修饰不排除作为引物的功能(即,在扩增反应条件下退火至模板多核苷酸链并充当用于合成与该模板链互补的新多核苷酸链的起始点的能力)。该引物中的一个引物可含有使得引物能从表面去除(裂解)以使得形成单链簇的修饰。此类线性化簇可经历与另外的引物链杂交以实现测序反应。然后可以通过在共价结合的单链多核苷酸分子上进行等温扩增循环来生成延伸产物,从而使每个集落包括原始固定单链多核苷酸分子(及其互补序列)的多个拷贝。扩增的一个循环由杂交、延伸和变性步骤构成。在试剂组分(例如,缓冲液等)方面,这些步骤在传统核酸扩增工序如PCR中通常类似。适用于扩增核酸(例如杂交、延伸等)的试剂是本领域众所周知的。下文更详细地描述了示例性的试剂。

[0079] 因此,可以将中和/杂交缓冲液应用于单链多核苷酸分子和多个引物寡核苷酸,从而使结合到表面的单链多核苷酸分子的未结合的末端与结合到表面的引物寡核苷酸进行杂交,以形成络合物(其中,引物寡核苷酸与单链多核苷酸分子的区域或模板特异部分进行杂交并与其互补)。此过程形成了“桥式”结构。请同样参阅W0/0246456、美国序列号为No.60/783,618的专利申请、W0/9844151和W0/0018957,以对桥式扩增进行进一步讨论。

[0080] 适合的中和/杂交缓冲液是本领域中众所周知的(参阅纽约冷泉港实验室出版社出版的Sambrook等人的《分子克隆实验指南》第3版、Ausubel等人在《实验室指南》(Current Protocols)杂志上编辑的文章和以下描述扩增的说明部分)。适合的缓冲液可包括添加剂(诸如,甜菜碱或有机溶剂,以规格化不同模板序列的解链温度)和洗涤剂。示例性的杂交缓冲液包括2M的甜菜碱、20mM的Tris、10mM的硫酸铵、2mM的硫酸镁、0.1%的Triton、1.3%的DMSO、8.8的pH值。

[0081] 接下来,通过将包括具有聚合酶活性的酶和dNTP的延伸溶液施加到桥接络合物来完成延伸反应。通过按顺序添加核苷酸延伸络合物的引物寡核苷酸,以生成与单链多核苷酸分子互补的延伸产物。适合的延伸缓冲液/溶液是本领域中众所周知的(例如,参阅纽约冷泉港实验室出版社出版的Sambrook等人的《分子克隆实验指南》第3版、Ausubel等人在《实验室指南》(Current Protocols)杂志上编辑的文章和以下示例)。

[0082] 可在本公开的系统/装置中使用的具有聚合酶活性的酶的示例包括DNA聚合酶(Klenow片段、T4 DNA聚合酶)和来自各种热稳定细菌的热稳定DNA聚合酶(诸如,Taq、VENT、Pfu、Bst和Tf1 DNA聚合酶)及其经基因修饰的衍生物(TaqGold、VENT exo、Pfu exo等)。应当理解,由于在流通池中进行的扩增反应是等温的,因此相比于用于热循环扩增的聚合酶,可使用另外的和/或替代性的DNA聚合酶,并且在大多数实施方案中,并非特别要求聚合酶一定要热稳定。另外,虽然具有链置换活性的酶(例如,Bst聚合酶)在促进用于测序的有效簇的生长中表现出极佳性能,但任何DNA聚合酶均可使用。

[0083] 用于形成DNA簇的核苷三磷酸腺苷分子通常为脱氧核糖核苷酸三磷酸腺苷,例如,dATP、dTTP、dCTP和dGTP。该核苷三磷酸腺苷分子可以为天然存在的或非天然存在的。

[0084] 在杂交和延伸步骤之后,将载体和附接的核酸在变性条件进行处理。适合的变性缓冲液是本领域中众所周知的(例如,参阅纽约冷泉港实验室出版社出版的Sambrook等人的《分子克隆实验指南》第3版、Ausubel等人在《实验室指南》(Current Protocols)杂志上编辑的文章)。本公开的系统/装置产生等温核酸扩增;因此,本文中的核酸链并不通过升高温度或操纵温度进行变性,而是通过其它方法(例如、化学的或物理的方法等)进行变性。举例来说,已知改变pH值和低离子强度溶液可在基本上等温的温度条件下将核酸变性。甲酰胺和脲形成新的氢键,其中,核酸的碱基破坏引起沃森-克里克碱基配对的氢键。上述会产生单链核酸分子。或者,可通过使用低盐和高pH值(>12)的溶液或使用离液盐(例如,盐酸胍)进行处理来分离链。在一个具体实施方案中,以约0.25M到约0.1M的浓度使用氢氧化钠(NaOH)溶液。在另选实施方案中,使用95%甲酰胺的水溶液或100%的甲酰胺。此类甲酰胺的实施方案示出了另外的优点,因为使用氢氧化物处理会损坏表面并在一些情况下产生较低强度的簇。与所使用的其他试剂一样,此类变性试剂会通过流动通道。

[0085] 变性之后将存在两种固定的核酸,一种是初始固定的单链多核苷酸分子,而另一种是其互补物,其从一个固定的引物寡核苷酸延伸而来。然后,形成的原始固定的单链多核

核苷酸分子和固定的延伸引物寡核苷酸(互补物)均可通过使载体经过进一步的杂交、延伸和变性的循环过程来引发新一轮扩增。此类新一轮扩增将产生核酸集落或“簇”,其包括单链多核苷酸序列的多个固定拷贝及其互补序列。单链多核苷酸分子的初始固定意味着单链多核苷酸分子只能与位于单链多核苷酸分子总长度的距离内的引物寡核苷酸进行杂交。因此,形成的核酸集落或簇的边界受限于相对局部的区域,其中初始单链多核苷酸分子是固定的。术语“簇”和“集落”在本文中可互换使用并指由多个相同的固定核酸链和多个相同的固定互补核酸链组成的固体载体上的离散位点。术语“集簇列”或“簇阵列”指由此类簇或集落形成的阵列。在该语境中,术语“阵列”不应当被理解为需要簇的有序布置。

[0086] 在典型实施方案中,将待扩增的核酸结合到小珠并且固定在流通池的表面上。小珠连接的转座体也可以固定在流通池的表面上。除非另有说明或通过上下文明确指示,否则如本文所用的术语“固定”旨在涵盖直接或间接的、共价或非共价结合。在本公开的某些实施方案中,共价结合可以作为典型,但一般来讲,一切要求在于分子(例如,核酸)在旨在使用载体的条件下(例如,在扩增应用中)保持固定或附接到载体。用于扩增的固定核酸分子可通过将经适当修饰的(单链或双链的)核酸分子直接附接到适当活性的表面或通过表面固定引物进行杂交来获得,然后,使用聚合酶和dNTP进行延伸循环以拷贝该杂交链。然后,延伸的链或化学附接的双螺旋可经过变性条件以移除小珠并且产生期望的固定的单链核酸分子,然后可通过本文所描述的仪器使该分子进行等温扩增循环。将溶液中的DNA杂交到流通池上的初始步骤可在比后续扩增反应中更高的温度下进行,然后,在基本上等温的温度条件下进行。该杂交步骤也可在扩增温度下进行,前提条件是输入的核酸链以附接到小珠的单链形式供应到流通池表面。

[0087] 制备模板核酸的一些实施方案可包括使靶标核酸片段化。在一些实施方案中,将已带条形码或已编索引的接头附接到片段化的靶标核酸(例如,DNA文库)。可使用本领域已知的任何数量的方法(诸如,(酶或化学)连接、标签化、聚合酶延伸等)附接接头。在一些实施方案中,包括非连续转座子序列的转座体的插入可使得靶标核酸片段化。在包括环状转座体的一些实施方案中,包括转座子序列的靶标核酸可在转座子序列的片段化位点处进行片段化。可与本文提供的实施方案一起使用将靶标核酸片段化的方法的另外的示例可在,例如,公开号为2012/0208705的美国专利申请、公开号为2012/0208724的美国专利申请和公开号为W02012/061832的国际专利申请中找到,上述专利申请中的每一篇通过引用的方式全文并入本文。在另外的实施方案中,使用有限循环PCR反应扩增标签化DNA序列,该有限循环PCR反应包含具有与接头序列互补的序列、SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的序列以及任选的条形码或索引序列的引物。在另外的实施方案中,使用有限循环PCR反应扩增的序列属于/来自DNA文库。在另外的实施方案中,使用有限循环PCR反应扩增的序列被变性为单链DNA,并且被识别特定序列的生物素化捕获探针和含有与生物素化捕获探针相互作用的链霉抗生物素蛋白的磁珠选择性结合。在另外的实施方案中,使用本公开的方法将包含与通过有限循环PCR扩增的序列杂交的生物素化捕获探针的磁珠固定到流通池的一个或多个表面。

[0088] 在一些实施方案中,在小珠上的线性扩增和/或接种在流通池表面上的多核苷酸的扩增可以使用动力学排除扩增(KEA),也称为排除扩增(ExAmp)来进行。动力学排除扩增反应包括促进所选扩增产物(例如,从珠释放的链)形成的组分。ExAmp组分的示例是重组

酶。重组酶可通过允许反复侵入/延伸来促进选择扩增产物形成。更具体地,重组酶可促进通过聚合酶进行靶核酸的侵入以及通过该聚合酶进行的引物的延伸(引物侵入),该聚合酶使用靶核酸作为扩增产物形成的模板。由于不需要变性循环(例如,经由加热或化学变性),因此该过程可比标准PCR更快速地发生。因此,重组酶促进的扩增可等温地进行。通常期望在重组酶促进的扩增试剂中包括ATP或其他核苷酸(或在一些情况下其非可水解的类似物)以促进扩增。重组酶和单链结合(SSB)蛋白的混合物是特别有用的,因为SSB可进一步促进扩增。用于重组酶促进的扩增的示例性制剂包括由TwistDx(Cambridge,UK)市售为TwistAmp试剂盒的那些制剂。重组酶促进的扩增试剂的可用组分和反应条件在US 5,223,414和US 7,399,590中有所描述。

[0089] 解旋酶是动力学排除扩增反应的组分的另一个示例,其促进所选扩增产物形成,并且在一些情况下,增加扩增产物形成的速率。由于不需要变性循环(例如,经由加热或化学变性),因此该过程可比标准PCR更快速地发生。因此,解旋酶促进的扩增可等温地进行。解旋酶和单链结合(SSB)蛋白的混合物是特别有用的,因为SSB可进一步促进扩增。用于解旋酶促进的扩增的示例性制剂包括来自Biohelle(Beverly,MA)的市售为IsoAmp试剂盒的那些制剂。此外,包括解旋酶蛋白的可用制剂的示例在US 7,399,590和US 7,829,284中有所描述。源结合蛋白是可被包括在ExAmp反应中以促进扩增的线性产物形成的组分的另一个示例。可以在ExAmp驱动的多核苷酸释放步骤之前或之后从流通池中取出小珠。

[0090] 各种流通池装置可用于执行本公开的方法,包括由Illumina公司制造的流通池装置(例如,HiSeq装置、NovaSeq装置、MiSeq装置和NextSeq装置);由F.Hoffmann-La Roche有限公司制造的流通池装置(例如,GS FLX装置和GS Junior装置);和由Life Sciences制造的流通池装置(例如,SOLiD/Ion Torrent装置)。在具体实施方案中,用于执行本公开的方法的流通池装置为由Illumina公司制造的流通池装置。

[0091] 在一些实施方案中,可使用排除扩增反应来扩增在流通池表面上接种的多核苷酸。排除扩增反应继续进行,直到生成足够数量的扩增子以填充相应扩增位点,例如,图案化流通池的孔的容量。以这种方式将已接种的位点填充至容量抑制了靶核酸在该位点处着位和扩增,从而在该位点处产生扩增子的克隆群体。在一些实施方案中,在第二靶核酸到达该位点之前,即使扩增位点未被填充至容量,也可实现表现的克隆性。在一些条件下,第一靶核酸的扩增可进行到制备了足够数量的拷贝的点,以有效地超出或压倒来自被转运到该点的第二靶核酸的拷贝的产生。例如,在使用小于500nm的直径的圆形特征的桥式扩增过程的实施方案中,已确定在第一靶核酸的指数扩增14个循环之后,来自相同位点处的第二靶核酸的污染将产生不足够数量的污染扩增子,而不会对Illumina测序平台上的边合成边测序分析产生不利影响。

[0092] 在一些实施方案中,当过程以足够快的速率发生以有效地排除另一事件或过程发生时,可发生动力学排除。以在流通池表面上制作核酸阵列为例,其中该流通池上的位点使用本公开的方法用来自小珠的靶核酸随机接种,并且在扩增过程中生成靶核酸的拷贝以将每个接种位点填充至容量。根据本公开的动力学排除方法,接种和扩增过程可在扩增速率超过接种速率的条件下同时进行。因此,在已由第一靶核酸接种的位点处产生拷贝的相对较快速率将有效地排除第二核酸使其不接种用于扩增的位点。动力学排除扩增方法可如美国申请公布2013/0338042的公开内容中详细描述的那样来执行。

[0093] 动力学排除可以利用相对慢的速率来启动扩增(例如,以慢速率来制作靶核酸的第一拷贝),与之相比,利用相对快的速率来制作靶核酸(或靶核酸的第一拷贝)的后续拷贝。在前一段落的示例中,由于靶核酸接种以相对慢的速率(例如相对慢的扩散或转运速率)发生,与之相比,扩增通过用核酸种子的拷贝填充位点以相对快的速率发生,因此出现了动力学排斥。在另一个示例性实施方案中,由于已在位点接种的靶核酸形成第一拷贝延迟(例如,活化延迟或缓慢),与之相比,制作后续拷贝以填充该位点的速率相对较快,因此可以出现动力学排斥。在该示例中,各个位点或孔可能已接种有几种不同的靶核酸(例如,几种靶核酸可能在扩增之前就存在于每个位点处)。然而,任何给定的靶核酸的第一拷贝形成可被随机激活,使得第一拷贝形成的平均速率与后续拷贝生成的速率相比相对较慢。在这种情况下,虽然单个位点可能已接种有若干不同的靶核酸,但动力学排除将只允许扩增这些靶核酸中的一个靶核酸。更具体地,一旦第一靶核酸已被激活用于扩增,则该位点或孔将用其拷贝快速填充至容量,从而防止在该位点处制备第二靶核酸的拷贝。

[0094] 在一些图案化流通池中,图案化流通池包括孔,该孔具有在有利于动力学排除扩增(KEA)和孔内靶特异性多核苷酸的单克隆群体形成的范围内选择的大小尺寸(例如,直径)。核酸文库的动力学排除扩增在例如美国专利公开No.2013/0338042中有描述。例如,孔大小(例如,直径)可在约30nm和约1 μ m之间、约50nm和约800nm之间、约70nm和约600nm之间或100nm和约400nm之间变化。在一些实施方案中,该孔具有约400nm的直径。在一些实施方案中,该孔具有小于约1 μ m的直径。示例性图案化流通池包括 Illumina[®] HiSeq-X10 图案化流通池。

[0095] 在另外的实施方案中,本公开提供了一种提高图案化流通池的接种效率的方法,其通过进行流通池上的线性扩增以拷贝在流通池表面上捕获的多核苷酸,然后进行“浅层液体”变性和接种以迫使多核苷酸拷贝重新接种在附近区域中。可用于此类方法的变性剂的示例包括但不限于:使用加热、氢氧化钠处理、高盐浓度、甲酰胺、胍、水杨酸钠、二甲基亚砷、丙二醇和尿素。

[0096] 对于流通池上线性扩增步骤,可以使用任何数量的扩增技术,包括本文已经讨论的ExAmp。另选地,AMS1第一次延伸可用于在流通池表面上生成双链DNA(一条拷贝的锚链与原始链)。对于“浅层液体”变性步骤,可以使用包含化学变性剂(例如,甲酰胺)的杂交缓冲液,例如,来自Illumina[™]的HT1。杂交缓冲液通常包括缓冲盐溶液,诸如5%SSPE或5xSSC,和少量非离子表面活性剂(例如,0.1%吐温或0.1%十二烷基硫酸钠)。杂交缓冲液可包含化学变性剂,诸如甲酰胺或胍,百分比为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或包括前述百分比中任何两个或在前述百分比中任何两个之间的范围。所使用的杂交量应足以流体连接图案化流通池的孔。在再接种多核苷酸之后,桥式扩增然后可用于在图案化流通池的表面上形成簇以用于进一步的过程,诸如测序。

[0097] 为了用于本文所描述的流通池应用,本文还描述了生产的试剂盒和制品。此类试剂盒可包括分隔开来以接纳一个或多个容器的载体、包装或容器,例如,小瓶、管等,每个容器包括将用于本文所描述的方法中的独立元件中的一个元件。适合的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器和试管。该容器可由多种材料形成,诸如,玻璃或塑料。

[0098] 例如,该容器可包含一种或多种小珠连接的转座体和试剂,例如可溶性引物、ExAmp、缓冲液等,用于进行本文所述的方法。可选地,该容器具有无菌入口(例如,该容器可

以为静脉输液袋或具有可被皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。可选地,此类试剂盒包括具有辨别描述或标记或关于其在本文所描述方法中使用说明的试剂。

[0099] 试剂盒通常将包括一个或多个附加容器,每个容器带有各种材料(诸如可选地呈浓缩形式的附加试剂和/或装置)中一种或多种从商业和用户的观点出发期望用于本文所描述小珠连接的转座体的材料。此类材料的非限制性示例包括但不限于:缓冲液、稀释剂、过滤器、针、注射器;载体、包装、容器、小瓶和/或列出内容物和/或使用说明的管标签,以及带有使用说明的包装说明书。也通常将包括一套说明书。

[0100] 标记可在容器上或与容器相关联。在形成标记的字母、数字或其它字符附接、模制或蚀刻到容器本身的情形下,标记可在容器上,而在其存在于同样支撑容器的容座或载体如包装说明书内时,标记可与容器相关联。标记可用于指示内容物将用于特定流通池应用。例如,在本文所描述的方法中,该标记还可指示使用内容物的方向。

[0101] 实施例

[0102] 评价流通池上线性化扩增方法的性能。为了检查流通池上线性化扩增方法的性能,在MiSeq流通池上测试工作流程以绘制出所有接种/再接种的DNA文库分子。图7A是来自标准工作流程的簇云(无浅层变性/再接种),并且图7B是来自具有浅层液体变性/再接种的同一批小珠的簇。图7B中的簇明显比图7A中的簇多,示出流通池上线性扩增工作流程的成功地再接种原始DNA文库分子以使得能够最大化测序信息。

[0103] 检查重复拷贝数以确认流通池上线性扩增的性能:还使用流通池上线性扩增工作流程评价了从簇云生成DNA片段岛。观察到最多4个拷贝的重复(通过浅层再接种使Y-接头文库的两条链获得翻倍)。当使用标准工作流程时,仅观察到最多两个拷贝的重复(Y-接头文库的两条链)。

[0104] 本公开已描述了多个实施方案。然而,应当理解,在不脱离本公开的实质和范围的前提下,可进行各种修改。因此,其他实施方案也在以下权利要求书的范围内。

序列表

<110> 伊鲁米纳公司 (Illumina, Inc.)

<120> 使用多核苷酸改善流通池的接种效率的方法、组合物和试剂盒

<130> 00140-018WO1/IP-1892

<140> 尚未指定

<141> 2022-01-28

<150> US 63/143,680

<151> 2021-01-29

<160> 8

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0001] <220>

<223> 通用捕获序列引物 P5

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 通用捕获序列引物 P7

<400> 2

caagcagaag acggcatacg a

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

	<223> 通用捕获序列引物抗 P5	
	<400> 3 tcggtggtcg ccgtatcatt	20
	<210> 4 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 通用捕获序列引物抗 P7	
	<400> 4 tcgtatgccg tcttctgctt g	21
	<210> 5 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0002]	<220> <223> SBS3 引物	
	<400> 5 acactcttc cctacacgac gctctccga tct	33
	<210> 6 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> SBS8 引物	
	<400> 6 cggctcggc attctgctg aaccgctctt ccgatct	37
	<210> 7 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
	<220> <223> 抗 SBS3 引物	

	<400> 7 agatcggaag agcgtcgtgt agggaaagag tgt	33
	<210> 8 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0003]	<220> <223> 抗 SBS8 引物	
	<400> 8 agatcggaag agcgggtcag caggaatgcc gagaccg	37

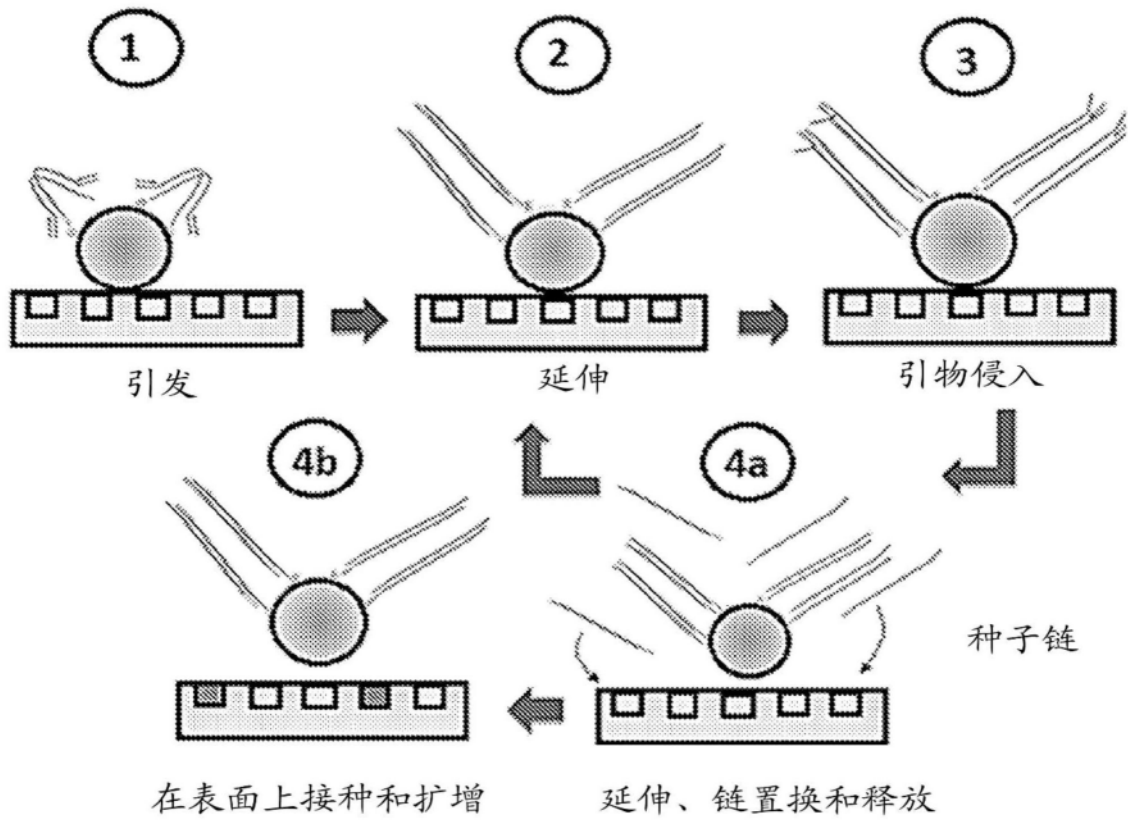


图1

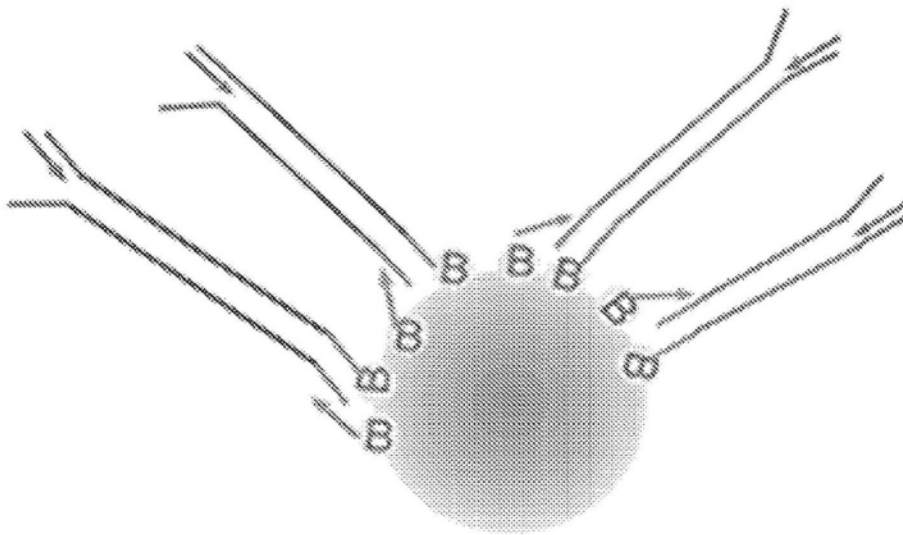


图2

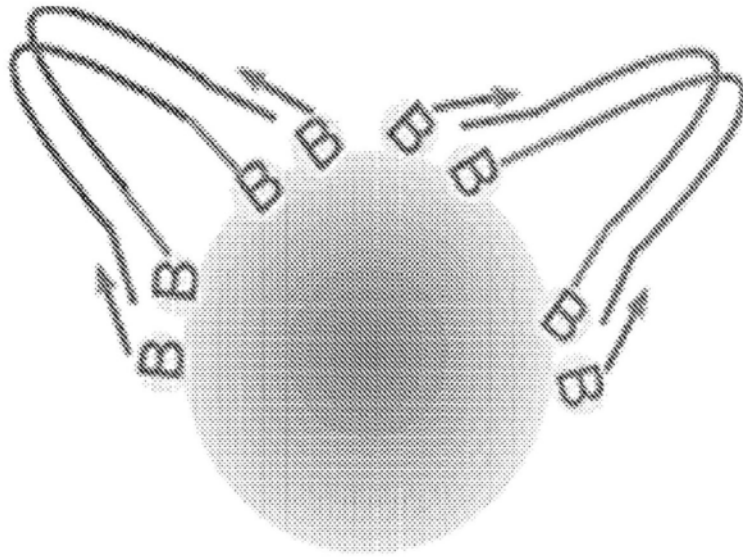


图3

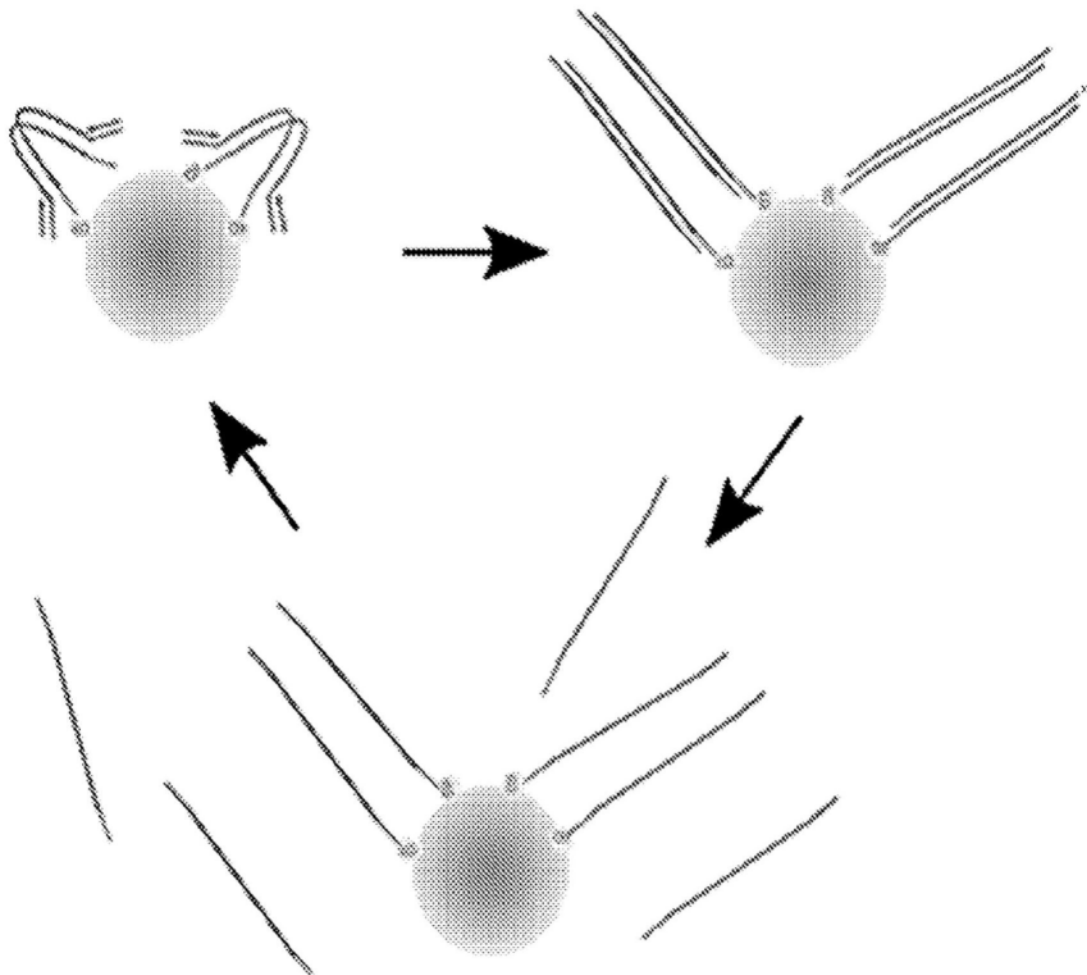


图4

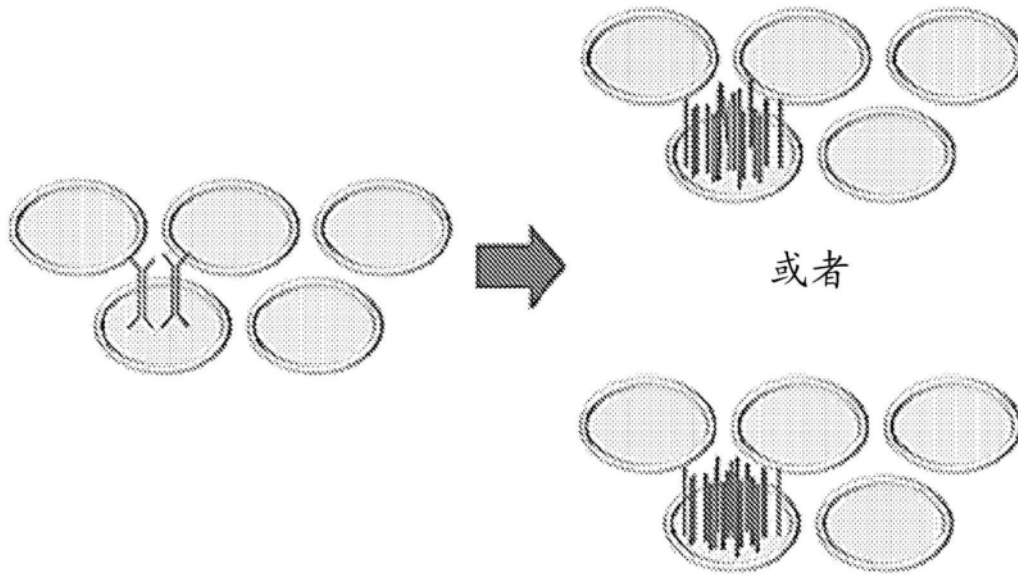


图5

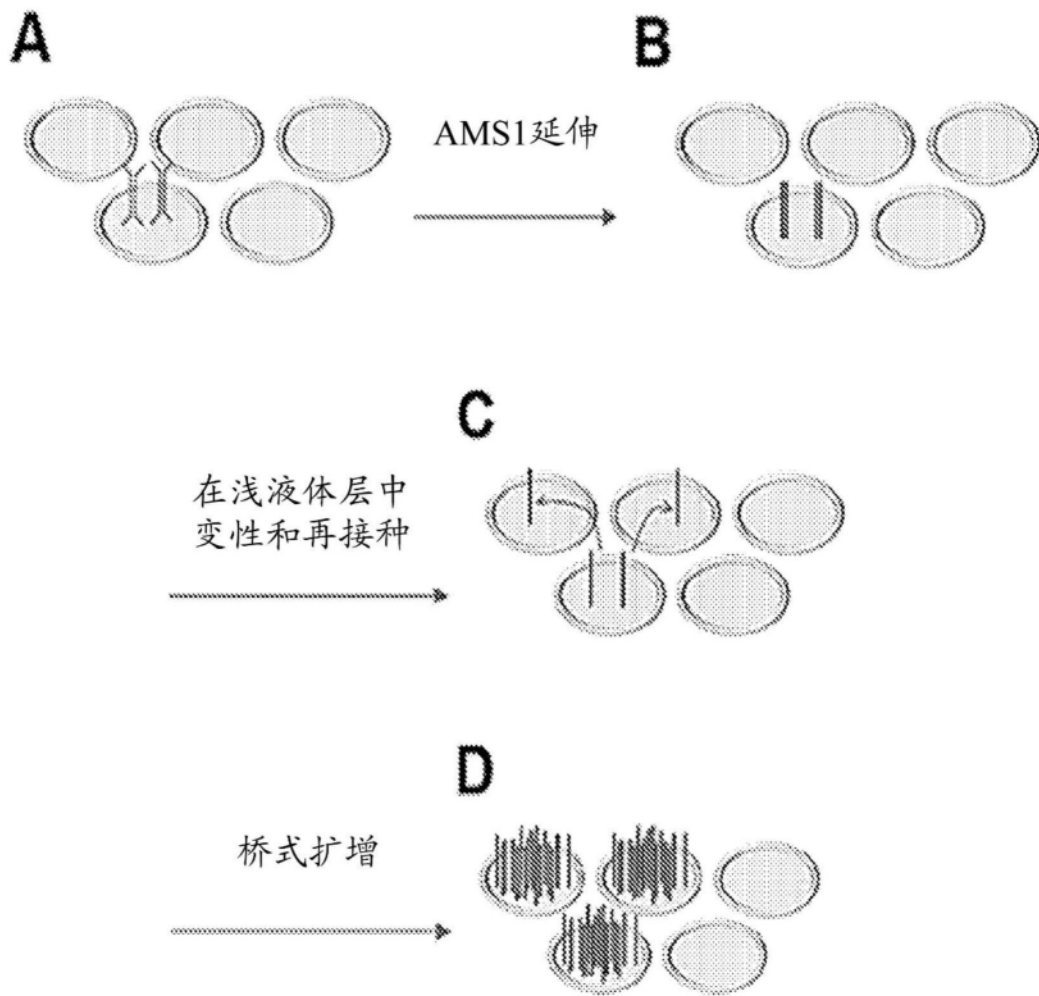


图6A-D

A

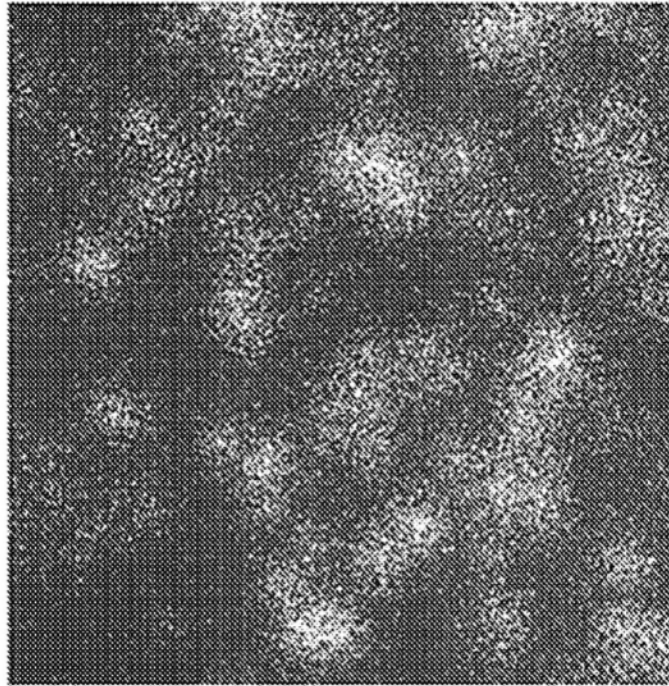


图7A

B

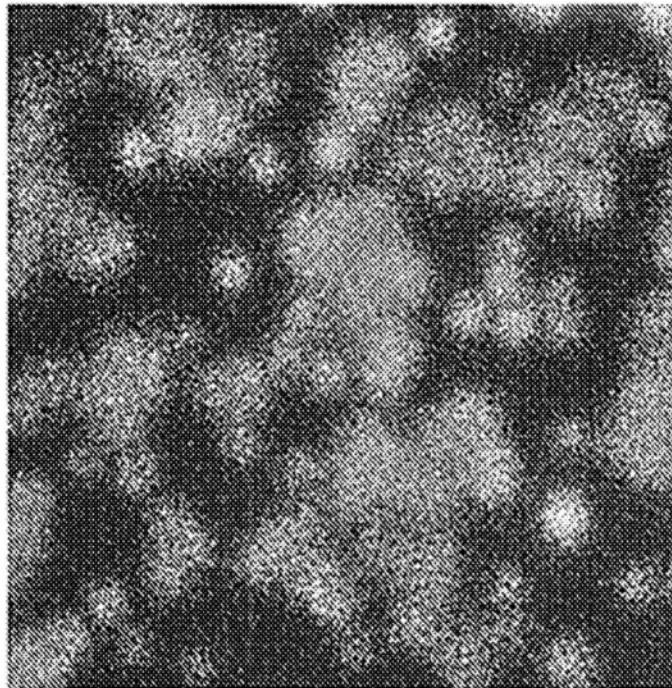


图7B

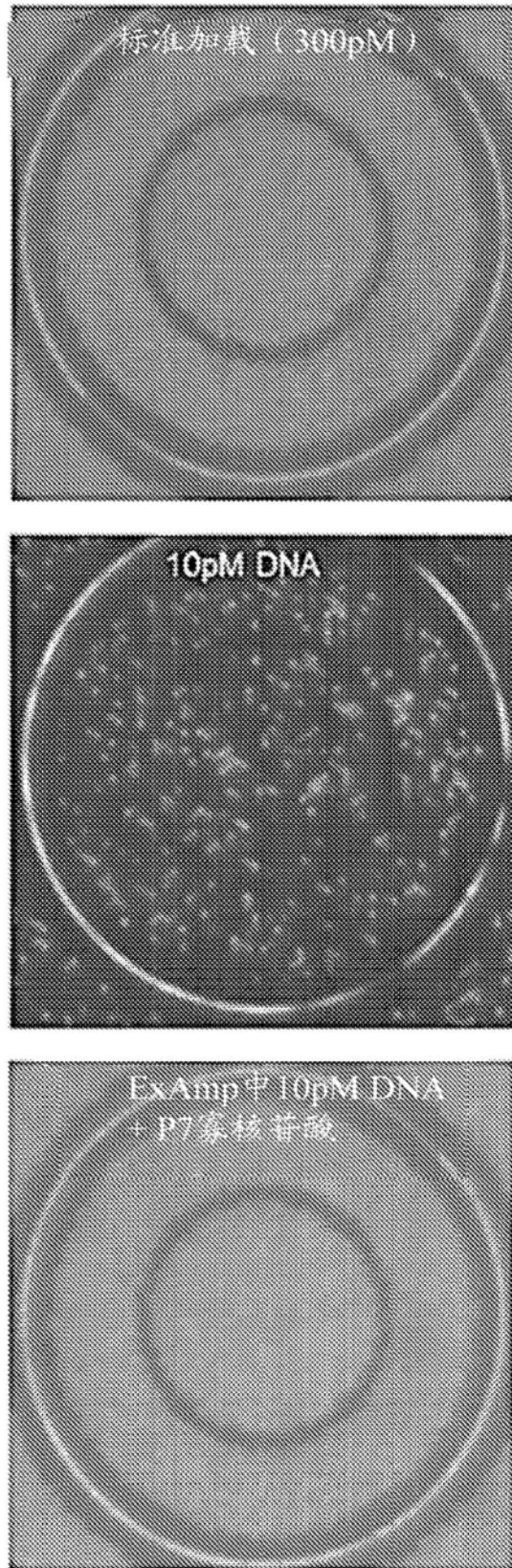


图8

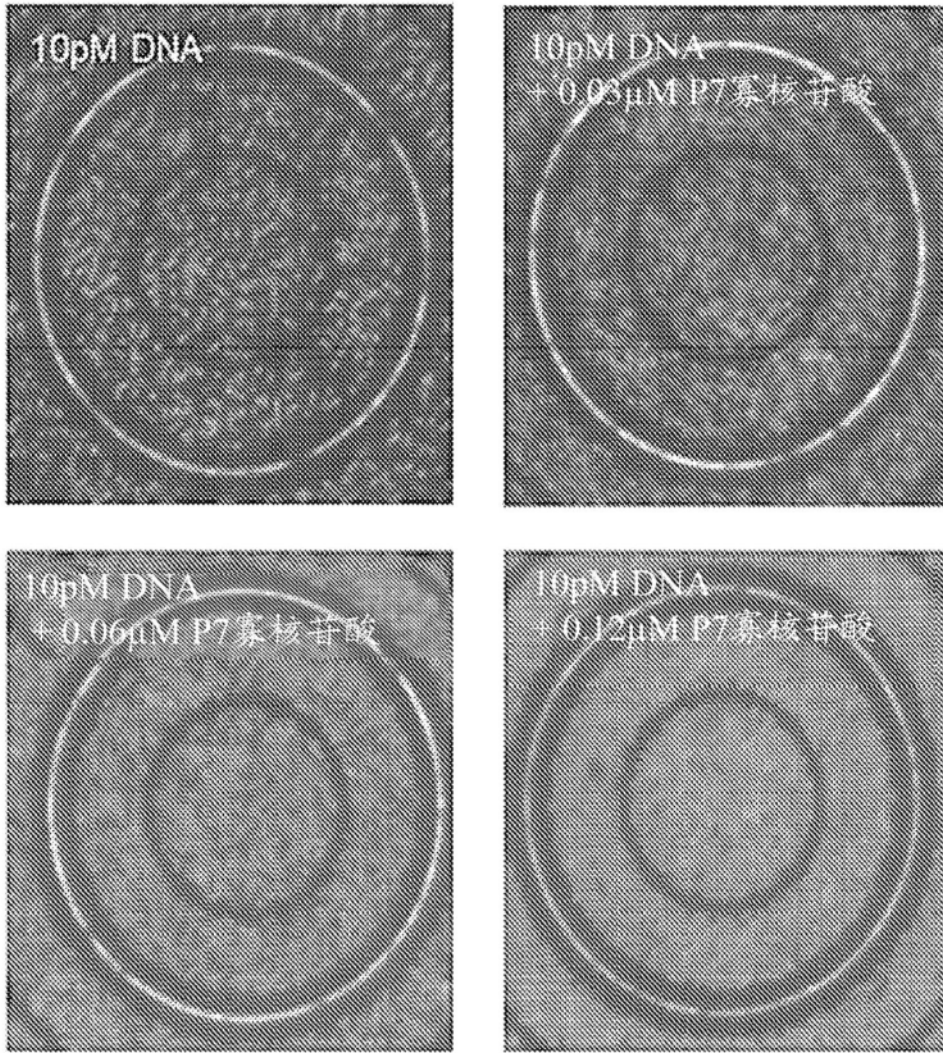


图9

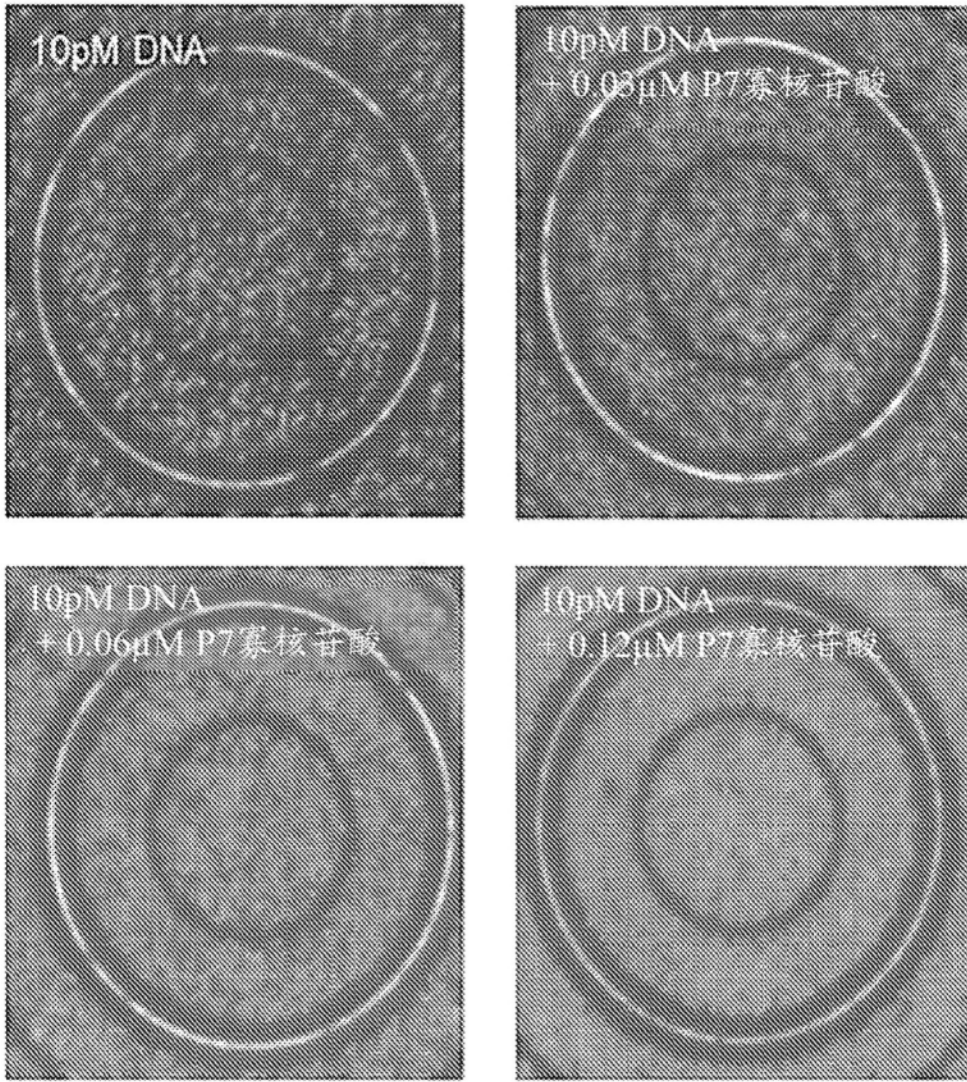


图10