(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115803458 A
(43)申请公布日 2023.03.14

(21)申请号 202180046203.2
(22)申请日 2021.12.21
(30)优先权数据
63/129,137 2020.12.22 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/087044 2021.12.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/136402 EN 2022.06.30
(71)申请人 伊鲁米纳剑桥有限公司
地址 英国剑桥
(72)发明人 吴晓琳 C·阿纳斯塔西 G·埃文斯 刘小海
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 陈文平 袁泉
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6869(2006.01)

权利要求书6页 说明书45页 附图2页

(54)发明名称

用于核酸测序的方法和组合物

(57)摘要

本公开的实施方案涉及用于使用蓝光激发和紫光激发(例如,分别为450-460nm和400-405nm的激光)进行两通道核酸测序的方法、试剂盒和组合物。具体地,核苷酸可以用蓝色染料、紫色染料或蓝色染料和紫色染料两者直接标记。替代性地,用于掺入的一个或多个核苷酸可以是未标记的并且含有蓝色染料、紫色染料或蓝色染料和紫色染料两者的亲和试剂可用于特异性结合到掺入的每种类型的核苷酸。

CN 115803458 A

1.一种用于确定靶多核苷酸的序列的方法,所述方法包括:

(a)使引物多核苷酸与包含第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸、第三类型的核苷酸和第四类型的核苷酸中的一种或多种的混合物接触,其中所述引物多核苷酸与所述靶多核苷酸的至少一部分互补;

(b)将来自所述混合物的一种类型的核苷酸掺入到所述引物多核苷酸中以产生延伸的引物多核苷酸;

(c)使用第一激发光源执行第一成像事件并且使用第一发射滤光器收集来自所述延伸的引物多核苷酸的第一发射信号;以及

(d)使用第二激发光源执行第二成像事件并且使用第二发射滤光器收集来自所述延伸的引物多核苷酸的第二发射信号;

其中所述第一激发光源和所述第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长,并且所述第一激发光源和所述第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长;并且

其中所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长,并且所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记,所述第一可检测标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记,所述第二可检测标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测,并且其中所述第二类型的可检测标记与所述第一类型的可检测标记为光谱上可区分的。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述第三类型的核苷酸用第一可检测标记和第二可检测标记两者标记,并且所述第三类型的核苷酸可由所述第一激发光源和所述第二激发光源两者激发。

5.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述第三类型的核苷酸包括用第三标记标记的第三类型的核苷酸和用第四标记标记的第三类型的核苷酸的混合物,其中所述第三标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测,并且其中所述第四标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测。

6.根据权利要求1所述的方法,其中所述第一类型的核苷酸、所述第二类型的核苷酸和所述第三类型的核苷酸中的每一者是未标记的,并且所述方法还包括:在所述第一成像事件之前使所述延伸的引物多核苷酸与亲和试剂集合接触,其中所述集合中的至少一种亲和试剂特异性结合到所述掺入的第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸或第三类型的核苷酸。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述亲和试剂集合包含:特异性结合到所述第一类型的核苷酸的第一亲和试剂、特异性结合到所述第二类型的核苷酸的第二亲和试剂。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记,所述第一可检测标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测,所述第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记,所述第二可检测标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测,并且其中所述第一可检测标记与所述第二

可检测标记为光谱上可区分的。

9.根据权利要求7或8所述的方法，其中所述第一亲和试剂和所述第二亲和试剂两者特异性结合到所述第三类型的核苷酸。

10.根据权利要求7或8所述的方法，其中所述亲和试剂集合还包含特异性结合到所述第三类型的核苷酸的第三亲和试剂，并且其中所述第三亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记和一个或多个第四可检测标记，所述第三可检测标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测，所述第四可检测标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测。

11.根据权利要求7至10中任一项所述的方法，其中所述第一类型的核苷酸包含第一半抗原，并且所述第一亲和试剂包含特异性结合到所述第一半抗原的第一半抗原结合配偶体。

12.根据权利要求11所述的方法，其中所述第一半抗原包含生物素部分，并且所述第一半抗原结合配偶体包含链霉亲和素。

13.根据权利要求7至12中任一项所述的方法，其中所述第二类型的核苷酸包含第二半抗原，并且所述第二亲和试剂包含特异性结合到所述第二半抗原的第二半抗原结合配偶体。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述第二半抗原包含氯烷基基团，并且所述第二半抗原结合配偶体包含HaloTag®。

15.根据权利要求1所述的方法，其中所述第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记，所述第二类型的核苷酸是未标记的，所述第三类型的核苷酸是未标记的和用所述第一可检测标记标记的，并且所述第一可检测标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测，并且所述方法还包括：在所述第一成像事件之前使所述延伸的引物多核苷酸与亲和试剂接触，其中所述亲和试剂特异性结合到所述第二类型的未标记核苷酸或所述第三类型的未标记核苷酸。

16.根据权利要求15所述的方法，其中所述亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，所述第二可检测标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测。

17.根据权利要求16所述的方法，其中所述亲和试剂包含链霉亲和素，并且所述第二类型的核苷酸和所述第三类型的未标记核苷酸均包含生物素部分。

18.根据权利要求1所述的方法，其中所述第一类型的核苷酸是未标记的，所述第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记，所述第三类型的核苷酸是未标记的和用所述第二可检测标记标记的，并且所述第二可检测标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测，并且所述方法还包括：在所述第一成像事件之前使所述延伸的引物多核苷酸与亲和试剂接触，其中所述亲和试剂特异性结合到所述第一类型的未标记核苷酸或所述第三类型的未标记核苷酸。

19.根据权利要求18所述的方法，其中所述亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，所述第一可检测标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测。

20.根据权利要求19所述的方法，其中所述亲和试剂包含链霉亲和素，并且所述第一类型的核苷酸和所述第三类型的未标记核苷酸均包含生物素部分。

21.根据权利要求1至20中任一项所述的方法，其中所述第四类型的核苷酸是未标记的

(暗色),或用不具有来自所述第一成像事件或所述第二成像事件的发射的荧光部分标记。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述四种类型的核苷酸包括dATP、dCTP、dGTP和dTTP或dUTP或它们的非天然核苷酸类似物。

23.根据权利要求22所述的方法,其中所述混合物中所述四种类型的核苷酸中的每一种均具有3'羟基封端基团。

24.根据权利要求1至23中任一项所述的方法,所述方法还包括:(e)在所述第二成像事件之后并且在下一次测序循环之前从所述掺入的核苷酸去除所述3'羟基封端基团。

25.根据权利要求24所述的方法,所述方法还包括:

重复步骤(a)-(e)多个循环;以及

基于所述依序掺入的核苷酸来确定所述靶多核苷酸的序列。

26.根据权利要求25所述的方法,其中步骤(a)-(e)重复至少50个循环。

27.根据权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述第一激发光源和所述第二激发光源中的每一者包括激光、发光二极管(LED)或它们的组合。

28.根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述第一激发光源具有约350nm至约410nm的波长,并且所述第一发射滤光器具有约415nm至约450nm的检测波长。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述第二激发光源具有约450nm至约460nm的波长,并且所述第二发射滤光器具有约480nm至约525nm的检测波长。

30.根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中所述第一激发光源具有约450nm至约460nm的波长,并且所述第一发射滤光器具有约480nm至约525nm的检测波长。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述第二激发光源具有约350nm到约410nm的波长,并且所述第二发射滤光器具有约415nm至约450nm的检测波长。

32.根据权利要求1至31中任一项所述的方法,其中所述延伸的引物多核苷酸在所述第一成像事件和所述第二成像事件期间是在包含一种或多种抗氧化剂的缓冲溶液中。

33.根据权利要求1至32中任一项所述的方法,其中所述靶多核苷酸固定到固体载体。

34.根据权利要求33所述的方法,其中所述固体载体包含多个固定的靶多核苷酸。

35.根据权利要求33或34所述的方法,其中所述固体载体包括流通池。

36.根据权利要求35所述的方法,其中所述流通池是包括多个纳米孔的图案化流通池,并且每个纳米孔包括一个固定的靶多核苷酸。

37.根据权利要求33至36中任一项所述的方法,其中所述固定的靶多核苷酸在所述固体载体上的密度为约100k/mm^2至约300k/mm^2。

38.一种用于测序应用的试剂盒,所述试剂盒包括:

用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸;

用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸;

用所述第一可检测标记标记的第三类型的核苷酸;以及

用所述第二可检测标记标记的第三类型的核苷酸;

其中所述第一可检测标记和所述第二可检测标记彼此为光谱上可区分的,所述第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测,并且所述第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测;

其中所述第一激发光源和所述第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长,

并且所述第一激发光源和所述第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长;并且

其中所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长,并且所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

39.一种用于测序应用的试剂盒,所述试剂盒包括:

用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸;

用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸;

用第三可检测标记标记的第三类型的核苷酸;以及

用第四可检测标记标记的第三类型的核苷酸;

其中所述第一可检测标记和所述第二可检测标记彼此为光谱上可区分的,所述第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测,并且所述第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测;

其中所述第三可检测标记和所述第四可检测标记彼此为光谱上可区分的,所述第三可检测标记可由所述第一光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测,并且所述第四可检测标记可由所述第二光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测;

其中所述第一激发光源和所述第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长,并且所述第一激发光源和所述第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长;并且

其中所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长,并且所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

40.一种用于测序应用的试剂盒,所述试剂盒包括:

第一类型的未标记核苷酸;

第二类型的未标记核苷酸;

第三类型的未标记核苷酸;以及

亲和试剂集合,其包含:

特异性结合到所述第一类型的未标记核苷酸的第一亲和试剂;以及

特异性结合到所述第二类型的未标记核苷酸的第二亲和试剂;

其中所述第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记,所述第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测,所述第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记,所述第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测,并且其中所述第一可检测标记与所述第二可检测标记为光谱上可区分的;

其中所述第一激发光源和所述第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长,并且所述第一激发光源和所述第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长;并且

其中所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长,并且所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

41.根据权利要求40所述的试剂盒，其中所述第一类型的核苷酸包含第一半抗原，并且所述第一亲和试剂包含特异性结合到所述第一半抗原的第一半抗原结合配偶体。

42.根据权利要求41所述的试剂盒，其中所述第一半抗原包含生物素部分，并且所述第一半抗原结合配偶体包含链霉亲和素。

43.根据权利要求40至42中任一项所述的试剂盒，其中所述第二类型的核苷酸包含第二半抗原，并且所述第二亲和试剂包含特异性结合到所述第二半抗原的第二半抗原结合配偶体。

44.根据权利要求43所述的试剂盒，其中所述第二半抗原包含氯烷基基团，并且所述第二半抗原结合配偶体包含HaloTag®。

45.根据权利要求39至44中任一项所述的试剂盒，其中所述第三类型的核苷酸包含第一半抗原和第二半抗原两者，并且其中所述第一亲和试剂和所述第二亲和试剂两者特异性结合到所述第三类型的未标记核苷酸。

46.根据权利要求40至44中任一项所述的试剂盒，其中所述亲和试剂集合还包含特异性结合到所述第三类型的核苷酸的第三亲和试剂，并且其中所述第三亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记和一个或多个第四可检测标记，所述第三可检测标记可由所述第一激发光源激发并且可由所述第一发射滤光器检测，所述第四可检测标记可由所述第二激发光源激发并且可由所述第二发射滤光器检测。

47.一种用于测序应用的试剂盒，所述试剂盒包括：

未标记或用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸；

未标记或用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸，其中所述第一类型的核苷酸和所述第二类型的核苷酸中的一者是未标记的；

第三类型的未标记核苷酸，以及用与所述第一类型的核苷酸或所述第二类型的核苷酸相同的可检测标记标记的第三类型的核苷酸，其中所述第一可检测标记和所述第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，所述第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且所述第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；以及

亲和试剂，其包含第一亲和试剂或第二亲和试剂，所述第一亲和试剂特异性结合到所述第三类型的未标记核苷酸和在所述第一类型的核苷酸是未标记的情况下的所述第一类型的核苷酸，所述第二亲和试剂特异性结合到所述第三类型的未标记核苷酸和在所述第二类型的核苷酸是未标记的情况下的所述第二类型的核苷酸，其中所述第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，并且所述第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记；

其中所述第一激发光源和所述第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且所述第一激发光源和所述第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

其中所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长，并且所述第一发射滤光器和所述第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

48.根据权利要求47所述的试剂盒，其中所述第一类型的核苷酸是未标记的，所述第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记，所述第三类型的核苷酸是未标记的和用第二可检测

标记标记的，并且所述亲和试剂是特异性结合到所述第一类型的核苷酸和所述第三类型的未标记核苷酸的所述第一亲和试剂，并且其中所述第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记。

49.根据权利要求47所述的试剂盒，其中所述第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记，所述第二类型的核苷酸是未标记的，所述第三类型的核苷酸是未标记的和用第二可检测标记标记的，并且所述亲和试剂是特异性结合到所述第二类型的核苷酸和所述第三类型的未标记核苷酸的所述第二亲和试剂，并且其中所述第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记。

50.根据权利要求47至49中任一项所述的试剂盒，其中当所述第一类型的核苷酸或所述第二类型的核苷酸是未标记的时，此类未标记核苷酸独立地包含半抗原。

51.根据权利要求50所述的试剂盒，其中所述亲和试剂包含特异性结合到所述未标记核苷酸中的所述半抗原的半抗原结合配偶体。

52.根据权利要求50或51所述的试剂盒，其中所述半抗原包含生物素部分或氯烷基基团。

53.根据权利要求51或52所述的试剂盒，其中所述半抗原结合配偶体包含链霉亲和素或HaloTag®。

54.根据权利要求38至53中任一项所述的试剂盒，其中所述第一激发光源具有约350nm至约410nm的波长，所述第一发射滤光器具有约415nm至约450nm的检测波长；所述第二激发光源具有约450nm至约460nm的波长，并且所述第二发射滤光器具有约480nm至约525nm的检测波长。

55.根据权利要求38至53中任一项所述的试剂盒，其中所述第一激发光源具有约450nm至约460nm的波长，所述第一发射滤光器具有约480nm至约525nm的检测波长；所述第二激发光源具有约350nm至约410nm的波长，并且所述第二发射滤光器具有约415nm至约450nm的检测波长。

56.根据权利要求38至55中任一项所述的试剂盒，所述试剂盒还包括第四类型的核苷酸，并且其中所述第四类型的核苷酸是未标记的(暗色)。

57.根据权利要求38至56中任一项所述的试剂盒，所述试剂盒还包括DNA聚合酶和一种或多种缓冲液组合物。

58.根据权利要求57所述的试剂盒，其中至少一种缓冲液组合物包含一种或多种抗氧化剂，所述抗氧化剂用于减少由所述第一激发光源和/或所述第二激发光源引起的DNA光损伤。

59.根据权利要求38至58中任一项所述的试剂盒，所述试剂盒还包括一种或多种固体载体，所述固体载体包括多个固定的寡核苷酸，其中所述固定的寡核苷酸在所述固体载体上的密度为约100k/mm^2至约300k/mm^2。

用于核酸测序的方法和组合物

技术领域

[0001] 本公开大体上涉及用于核酸测序应用的方法、系统、试剂盒和组合物。

背景技术

[0002] 对于DNA测序而言，希望采用多个光谱上可区分的荧光标记，以实现对多个空间重叠分析物的独立检测。在此类多重方法中，可以减少反应容器的数量，从而简化实验方案并且促进专用试剂盒的生产。例如，在多色自动化DNA测序系统中，多重荧光检测允许在单个电泳通道中分析多个核苷酸碱基，从而通过单色方法提高吞吐量，并且降低与通道间电泳迁移率变化相关的不确定性。

[0003] 然而，多重荧光检测可能存在问题，并且存在的许多重要因素会限制适当荧光标记的选择。首先，在给定的应用中可能难以找到具有基本上分辨的吸收和发射光谱的染料化合物。另外，当若干荧光染料一起使用时，通过同时激发在可区分光谱区域中产生荧光信号可能是复杂的，因为这些染料的吸收带通常很分开，所以即使是两种染料也难以达到相当的荧光激发效率。许多激发方法使用高功率光源，如激光器，因此染料必须具有足够的光稳定性以承受此类激发。对分子生物学方法特别重要的最后一个考虑因素是荧光染料必须与试剂化学性质相容的程度，诸如DNA合成溶剂和试剂、缓冲液、聚合酶和连接酶。

[0004] 具有改进的荧光特性(诸如合适的荧光强度、形状和荧光带的波长最大值)的荧光染料分子可以提高核酸测序的速度和准确性。当在水基生物缓冲液中并且在较高温度下进行测量时，强荧光信号尤其重要，因为大多数有机染料的荧光强度在此类条件下显著较低。此外，染料所附接的碱基的性质也影响荧光最大值、荧光强度和染料的其他光谱特性。核碱基与荧光染料之间的序列特异性相互作用可以通过荧光染料的特异性设计来定制。荧光染料结构的优化可以提高核苷酸掺入的效率、降低测序误差的水平，并且减少核酸测序中试剂的使用，从而降低核酸测序的成本。

[0005] 一些光学和技术的开发已引起图像质量的极大改善，但是最终受到光学分辨率差的限制。光学分辨率由Abbe定律决定。一般来讲，光学显微镜法的光学分辨率限于以所使用的光的波长的大约一半间隔开的对象。实际上，只有相距相当远(至少200nm至350nm)的对象才可以通过光学显微镜法分辨。提高图像分辨率并且增加每单位表面积的可分辨对象数量的一种方法是使用较短波长的激发光。例如，如果用相同的光学器件将光波长缩短Δλ约100nm，则分辨率将更好(约Δ50nm/(约15％))，将记录较少失真的图像，并且可识别区域上的对象的密度将增加约35％。

[0006] 然而，强烈的激光辐照(尤其是蓝色或紫色区域的较短波长)可能会漂白荧光染料和损坏溶液中/流通池表面上的核苷酸样品或与荧光染料缀合的那些核苷酸样品。此类暴露于光中也可能引起DNA样品损伤。光漂白和光损伤的类型和程度可以根据例如化合物的化学结构和它们的一些物理化学特性(如氧化还原电位、特定生物标记的激发光谱、特定光源辐照的强度和在特定测量中暴露的时间)而变化。由于较低波长的光源输送更高的能量光子，因此具有较短波长的紫色LED/激光器更容易引起染料的光漂白和DNA损伤。在荧光检

测中存在许多化学途径,通过这些化学途径可能会在辐照期间引起核酸损伤。例如,已经表明暴露于紫外线(UV)辐射可以经由胸腺嘧啶或胞嘧啶的直接光化学[2+2]光环加成反应提供含有融合嘧啶二聚体(诸如TT、TC和CC)的环丁烷,从而引起DNA损伤。此类直接光环加成反应可以发生在从约100nm起延伸至约315nm的UV B区域和UV C区域中。在穿过可见光区域的一部分(从约315nm起跨至约500nm)的UV A区域中,间接机制的复杂混合物也可以通过其他组分的光敏作用引起DNA损伤。此类间接机制可以经由与不同的光诱导活性物质(例如,活性氧物质(ROS)(诸如单态氧、超氧阴离子和羟基自由基))相互作用导致氧化DNA修饰。

[0007] 为了增加测序效率并降低每个基因组的成本,必需增加节距密度,使得可以在相同的所需表面积中填充更多的簇,同时维持良好的光学分辨率,这需要使用具有较短波长(诸如紫色和蓝色激光器)的光。在用于核酸测序应用的非常拥挤的波长区域(蓝色至紫色区域)中选择适当的染料集合并减轻由较短波长激发引起的DNA损伤仍存在挑战。

发明内容

[0008] 本公开涉及用于使用蓝光激发和紫光激发(例如,在450-460nm和400-405nm处的激光)进行两通道核酸测序应用的方法、试剂盒和组合物。

[0009] 本公开的一些方面涉及一种用于确定靶多核苷酸的序列的方法,其包括:

[0010] (a)使引物多核苷酸与包含第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸、第三类型的核苷酸和第四类型的核苷酸中的一种或多种的混合物接触,其中引物多核苷酸与靶多核苷酸的至少一部分互补;

[0011] (b)将来自混合物的一种类型的核苷酸掺入到引物多核苷酸中以产生延伸的引物多核苷酸;

[0012] (c)使用第一激发光源执行第一成像事件并且使用第一发射滤光器收集来自延伸的引物多核苷酸的第一发射信号;以及

[0013] (d)使用第二激发光源执行第二成像事件并且使用第二发射滤光器收集来自延伸的引物多核苷酸的第二发射信号;

[0014] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长,并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长;并且

[0015] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长,并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。在一些实施方案中,第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸和第三类型的核苷酸中的每一者用可检测标记标记。在其他实施方案中,第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸和第三类型的核苷酸中的一种或多种是未标记的,并且方法利用第二标记步骤,该第二标记步骤涉及使用特异性结合到掺入到引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物中的未标记核苷酸的一种或多种亲和试剂。在另外的实施方案中,第四类型的核苷酸是未标记的并且在第一成像事件和第二成像事件期间不发射任何信号。

[0016] 本公开的一些方面涉及一种用于测序应用的试剂盒,其包括:

[0017] 用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸;

[0018] 用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸;

[0019] 用第一可检测标记标记的第三类型的核苷酸;以及

[0020] 用第二可检测标记标记的第三类型的核苷酸；

[0021] 其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；

[0022] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

[0023] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长，并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

[0024] 本公开的一些方面涉及一种用于测序应用的试剂盒，其包括：

[0025] 用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸；

[0026] 用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸；

[0027] 用第三可检测标记标记的第三类型的核苷酸；以及

[0028] 用第四可检测标记标记的第三类型的核苷酸；

[0029] 其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；

[0030] 其中第三可检测标记和第四可检测标记彼此为光谱上可区分的，第三可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第四可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；

[0031] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

[0032] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长，并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

[0033] 本公开的一些其他方面涉及一种用于测序应用的试剂盒，其包括：

[0034] 第一类型的未标记核苷酸；

[0035] 第二类型的未标记核苷酸；

[0036] 第三类型的未标记核苷酸；以及

[0037] 亲和试剂集合，其包含：

[0038] 特异性结合到第一类型的未标记核苷酸的第一亲和试剂；以及

[0039] 特异性结合到第二类型的未标记核苷酸的第二亲和试剂；

[0040] 其中第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，该第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测，第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，该第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测，并且其中第一可检测标记与第二可检测标记为光谱上可区分的；

[0041] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

[0042] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测

波长,并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。在一些实施方案中,第一亲和试剂和第二亲和试剂两者特异性结合到第三类型的未标记核苷酸。在其他实施方案中,该亲和试剂集合还包含特异性结合到第三类型的核苷酸的第三亲和试剂,并且其中第三亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记和一个或多个第四可检测标记,该第三可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测,该第四可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。

[0043] 本公开的一些其他方面涉及一种用于测序应用的试剂盒,其包括:

[0044] 未标记或用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸;

[0045] 未标记或用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸,其中第一类型的核苷酸和第二类型的核苷酸中的一者是未标记的;

[0046] 第三类型的未标记核苷酸,以及用与第一类型的核苷酸或第二类型的核苷酸相同的可检测标记标记的第三类型的核苷酸,其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的,第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测,并且第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测;以及

[0047] 亲和试剂,其包含第一亲和试剂或第二亲和试剂,该第一亲和试剂特异性结合到第三类型的未标记核苷酸和在第一类型的核苷酸是未标记的情况下的第一类型的核苷酸,该第二亲和试剂特异性结合到第三类型的未标记核苷酸和在第二类型的核苷酸是未标记的情况下的第二类型的核苷酸,其中第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记,并且第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记;

[0048] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长,并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长;并且

[0049] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长,并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

附图说明

[0050] 图1是示出作为时间函数的由紫外光暴露引起的DNA光损伤的线图。

[0051] 图2是通过实施例2中描述的合成方法使用二级标记测序获得的散点图。

具体实施方式

[0052] 本公开涉及用于核酸测序应用的方法、系统、试剂盒和组合物,该核酸测序应用特别是通过合成测序,使用蓝光激发和紫光激发(例如,在450-460nm和400-405nm处的激光)和使用约415-450nm和约480-525nm的滤光器带的双通道检测。本文所述的方法、试剂盒和组合物利用包含蓝色染料和紫色染料(即,在蓝光区域和紫光区域具有最大吸收的染料)的染料集合。方法进一步利用亲和试剂来减少由蓝色和紫色激发引起的DNA损伤和光漂白。与在使用红色/绿色光源激发或绿色/蓝色光源激发的Illumina's MiniSeq®、NextSeq®和NovaSeq®系统上使用的当前双通道测序相比,本文所述的使用较短波长光源的测序方法可以增加图案化阵列或流通池上的节距或成簇密度。如本文所用,术语"节距"是指图案化固体载体上两个纳米图案之间的距离(例如,图案化流通池上两个纳米孔之间的距离)。

使用红色/绿色光源激发的Illumina双通道测序的详细描述公开于美国专利公布第2013/0079232号中，该专利全文以引用方式整体并入本文。例如，在使用绿色/红色或蓝色/绿色激发的系统中，光学分辨率分别受到红色荧光染料或绿色荧光染料发射(例如，对于绿色/红色系统为约715nm，并且对于蓝色/绿色系统为约590nm)的限制。通过使用紫光激发/蓝光激发，光学分辨率受到蓝色染料发射(即，480-525nm)的限制。因此，本公开的方法和系统可以提供高达50％的节距密度增加。

[0053] 定义

[0054] 除非另有定义，否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。术语“包括”以及其他形式(诸如“包括(include/includes/included)”)的使用不是限制性的。术语“具有”以及其他形式(诸如“具有(have/has/had)”)的使用不是限制性的。如本说明书中所用，无论是在过渡短语中还是在权利要求的正文中，术语“包含(comprise(s))”和“包含(comprising)”都将被解释为具有开放式含义。即，上述术语应与短语“至少具有”或“至少包括”同义地解释。例如，当在过程的上下文中使用时，术语“包含”表示该过程至少包括所列举的步骤，但是也可包括额外步骤。当在化合物、组合物或设备的上下文中使用时，术语“包含”是指该化合物、组合物或设备至少包含所列举的特征或组分，但是也可包含额外特征或组分。

[0055] 如本文所用，常见的有机缩写定义如下：

[0056]	℃	以摄氏度计的温度
[0057]	dATP	三磷酸脱氧腺苷
[0058]	dCTP	三磷酸脱氧胞苷
[0059]	dGTP	三磷酸脱氧鸟苷
[0060]	dTTP	三磷酸脱氧胸苷
[0061]	ddNTP	三磷酸双脱氧核苷酸
[0062]	ffA	完全官能化A核苷酸
[0063]	ffC	完全官能化C核苷酸
[0064]	ffG	完全官能化G核苷酸
[0065]	ffN	完全官能化核苷酸
[0066]	ffT	完全官能化T核苷酸
[0067]	LED	发光二极管
[0068]	SBS	通过合成测序

[0069] 如本文所用，术语“阵列”是指连接到一个或多个底物的一组不同探针分子，使得这些不同探针分子可根据相对位置彼此区分。阵列可包括各自位于底物上的不同可寻址位置处的不同探针分子。替代性地或另外地，阵列可包括各自带有不同探针分子的单独底物，其中可根据底物在底物所连接到的表面上的位置或根据底物在液体中的位置来识别不同的探针分子。其中单独底物位于表面上的示例性阵列包括但不限于在孔中包含珠粒的那些，如例如美国专利第6,355,431 B1号、US 2002/0102578和PCT公布第WO 00/63437号中所述的。例如，在美国专利第6,524,793号中描述了在本发明中可用于例如使用微流体装置，诸如荧光活化细胞分选器(FACS)区分液体阵列中的珠粒的示例性形式。可用于本发明的阵列的其他示例包括但不限于美国专利第5,429,807号；第5,436,327号；第5,561,071号；第

5,583,211号;第5,658,734号;第5,837,858号;第5,874,219号;第5,919,523号;第6,136,269号;第6,287,768号;第6,287,776号;第6,288,220号;第6,297,006号;第6,291,193号;第6,346,413号;第6,416,949号;第6,482,591号;第6,514,751号和第6,610,482号;以及WO 93/17126;WO 95/11995;WO 95/35505;EP 0 742 287;和EP 0 799 897中所述的那些阵列。

[0070] 如本文所用,术语“共价连接的”或“共价键合的”是指形成特征在于原子之间共用电子对的化学键合。例如,共价连接的聚合物涂层是指与底物的官能化表面形成化学键的聚合物涂层,这与经由其他方式(例如,粘附或静电相互作用)粘附到该表面形成比较。应当理解,共价连接到表面的聚合物也可以经由除共价连接之外的方式键合。

[0071] 在示出本文所述化合物的单一内消旋形式的每种情况下,同样设想了替代性的内消旋形式。

[0072] 如本文所用,“核苷酸”包括含氮杂环碱基、糖以及一个或多个磷酸基团。它们是核酸序列的单体单元。在RNA中,糖为核糖,并且在DNA中为脱氧核糖,即,缺乏存在于核糖中的羟基基团的糖。含氮杂环碱基可为嘌呤、脱氮嘌呤或嘧啶碱基。嘌呤碱基包括腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G)以及它们的修饰衍生物或类似物,诸如7-脱氮腺嘌呤或7-脱氮鸟嘌呤。嘧啶碱基包括胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)以及它们的修饰衍生物或类似物。脱氧核糖的C-1原子与嘧啶的N-1或嘌呤的N-9键合。在一些情况下,术语“核苷酸”还可涵盖核苷酸缀合物,其是用荧光部分,任选地通过如本文所述的裂解连接基标记的核苷酸。

[0073] 如本文所用,“未标记核苷酸”是指不包含荧光部分的核苷酸。在一些情况下,未标记核苷酸可包含可裂解的连接基和/或允许其与本文所述的亲和试剂结合的功能性部分(例如,半抗原)。在其他情况下,未标记核苷酸不具有可裂解的连接基或允许其与本文所述的亲和试剂结合的官能部分。

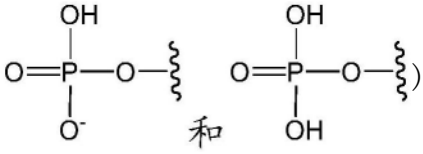
[0074] 如本文所用,“核苷”在结构上类似于核苷酸,但缺少磷酸部分。核苷类似物的一个示例是其中标记与碱基连接并且没有磷酸基团连接到糖分子的核苷类似物。术语“核苷”在本文中以本领域技术人员所理解的常规含义使用。示例包括但不限于包含核糖部分的核糖核苷和包含脱氧核糖部分的脱氧核糖核苷。经修饰的戊糖部分是其中氧原子已被碳取代和/或碳已被硫或氧原子取代的戊糖部分。“核苷”是可以具有取代的碱基和/或糖部分的单体。另外,核苷可以掺入较大的DNA和/或RNA聚合物和低聚物中。

[0075] 术语“嘌呤碱基”在本文中以本领域技术人员所理解的普通含义使用,并且包括其互变异构体。类似地,术语“嘧啶碱基”在本文中以本领域技术人员所理解的普通含义使用,并且包括其互变异构体。任选地取代的嘌呤碱基的非限制性列表包括嘌呤、腺嘌呤、鸟嘌呤、脱氮嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、别黄嘌呤、7-烷基鸟嘌呤(例如7-甲基鸟嘌呤)、可可碱、咖啡因、尿酸和异鸟嘌呤。嘧啶碱基的示例包括但不限于胞嘧啶、胸腺嘧啶、尿嘧啶、5,6-二氢尿嘧啶和5-烷基胞嘧啶(例如5-甲基胞嘧啶)。

[0076] 如本文所用,当寡核苷酸或多核苷酸被描述为“包含”本文所述的核苷或核苷酸时,这意味着本文所述的核苷或核苷酸与寡核苷酸或多核苷酸形成共价键。类似地,当核苷或核苷酸被描述为寡核苷酸或多核苷酸的一部分,诸如“掺入到”寡核苷酸或多核苷酸中时,这意味着本文所述的核苷或核苷酸与寡核苷酸或多核苷酸形成共价键。在一些此类实施方案中,共价键在寡核苷酸或多核苷酸的3’羟基与在本文中描述为寡核苷酸或多核苷酸的3’碳原子与核苷酸的5’碳原子之间的磷酸二酯键的核苷酸的5’磷酸基团之间形成。

[0077] 如本文所用，术语“可裂解的连接基”并不意在暗示需要除去整个连接基。裂解位点可以位于连接基上确保该连接基的一部分在裂解后保持连接到可检测标记和/或核苷或核苷酸部分的某个位置处。

[0078] 如本文所用，“衍生物”或“类似物”意指具有修饰的碱基部分和/或修饰的糖部分的合成核苷酸或核苷衍生物。此类衍生物和类似物在例如Scheit,Nucleotide Analogs(John Wiley&Son,1980)和Uhlman等人,Chemical Reviews 90:543-584,1990中进行了讨论。核苷酸类似物还可以包括经修饰的磷酸二酯键，包括硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键、烷基膦酸酯键、苯胺磷酸酯键和氨基磷酸酯键。如本文所用，“衍生物”、“类似物”和“修饰的”可以互换使用，并且由本文定义的术语“核苷酸”和“核苷”涵盖。

[0079] 如本文所用，术语“磷酸酯”以本领域技术人员所理解的普通含义使用，并且包括其质子化形式(例如，)。如本文所用，术语“单磷酸”、“二磷酸”和“三磷酸”以本领域技术人员所理解的其普通含义使用，并且包括质子化形式。

[0080] 如本领域的普通技术人员所理解的，本文所述的化合物诸如核苷酸可以以离子化形式存在，例如含有$-CO_2^-$、$-SO_3^-$或$-O^-$。如果化合物包含带正电荷或带负电荷的取代基基团，则其还可以包含带负电荷或带正电荷的抗衡离子，使得该化合物整体为中性的。在其他方面，该化合物可以以盐形式存在，其中抗衡离子由共轭酸或碱提供。

[0081] 如本文所用，术语“定相”是指SBS中的现象，该现象是由3’终止子和荧光团的不完全去除和/或未能通过在给定测序循环下通过聚合酶完成簇内DNA链的一部分掺入所引起的。预定相是由掺入不具有有效3’终止子的核苷酸引起的，其中掺入事件由于终止失败而提前1个周期。定相和预定相导致特定循环的测量信号强度由来自当前循环的信号以及来自前一个和后一个循环的噪声组成。随着循环的数量增加，受到定相和预定相影响的每个簇的序列分数增加，妨碍对正确碱基的识别。预定相可以由在通过合成测序(SBS)期间存在痕量的不受保护或未封端的3’-OH核苷酸引起。不受保护的3’-OH核苷酸可以在制造过程期间或可能在储存和试剂处理过程期间产生。

[0082] 如本文所用，术语“光谱上可区分的荧光染料”是指当一个样品中存在两种或更多种此类染料时，以能够通过荧光检测设备区分的波长发射荧光能量的荧光染料。

[0083] 蓝色/紫色双通道测序方法

[0084] 本公开的一些方面涉及一种用于确定靶多核苷酸(例如，单链靶多核苷酸)的序列的方法，其包括：

[0085] (a)使引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物与包含第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸、第三类型的核苷酸和第四类型的核苷酸中的一种或多种的混合物接触，其中引物多核苷酸与单链靶多核苷酸的至少一部分互补；

[0086] (b)将来自混合物的一种类型的核苷酸掺入到引物多核苷酸中以产生延伸的引物多核苷酸(即，延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物)；

[0087] (c)使用第一激发光源执行第一成像事件并且使用第一发射滤光器收集来自延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物的第一发射信号；以及

[0088] (d)使用第二激发光源执行第二成像事件并且使用第二发射滤光器收集来自延伸

的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物的第二发射信号；

[0089] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

[0090] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长，并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。

[0091] 在本文所述的方法的一些实施方案中，第一激发光源具有约350nm到约410nm(例如，约405nm)的波长，并且第一发射滤光器具有约415nm到约450nm的检测波长。第二激发光源具有约450nm到约460nm(例如，约460nm)的波长，并且第二发射滤光器具有约480nm到约525nm的检测波长。在一些其他实施方案中，第一激发光源具有约450nm到约460nm(例如，约460nm)的波长，并且第一发射滤光器具有约480nm到约525nm的检测波长。第二激发光源具有约350nm到约410nm(例如，约405nm)的波长，并且第二发射滤光器具有约415nm到约450nm的检测波长。

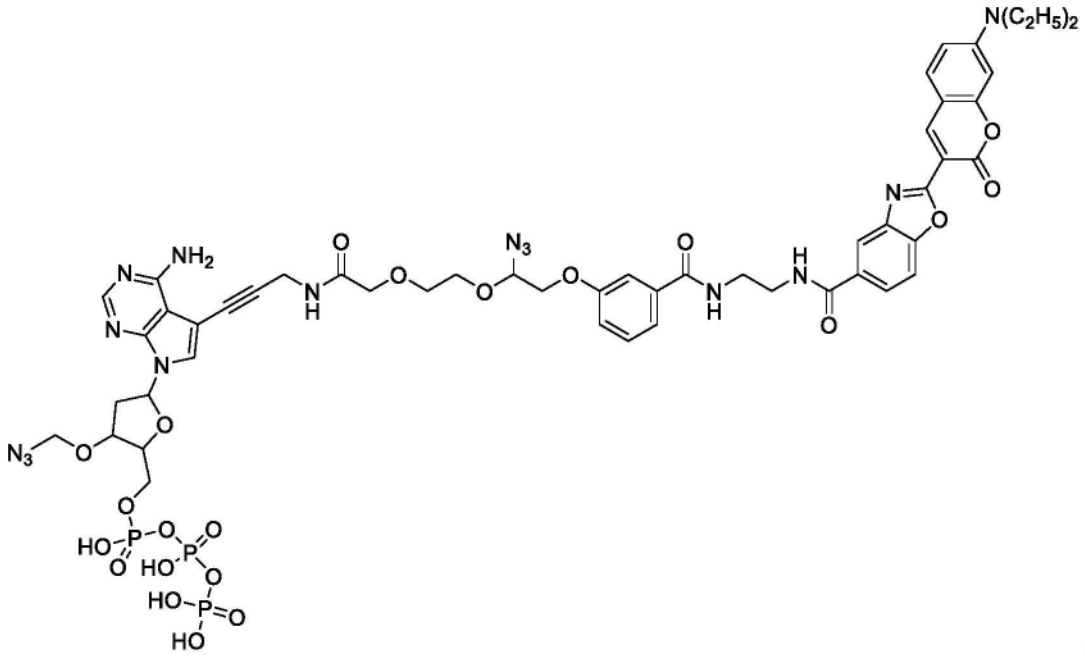
[0092] 在掺入混合物中的标记核苷酸

[0093] 在本文所述的方法的一些实施方案中，将掺入混合物中的每种类型的核苷酸标记。在一些此类实施方案中，第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记，该第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测。在一些另外的实施方案中，第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记，该第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测，并且其中第二类型的可检测标记与第一类型的可检测标记为光谱上可区分的。在一些另外的实施方案中，第三类型的核苷酸用第一可检测标记和第二可检测标记两者标记，并且第三类型的核苷酸可由第一激发光源和第二激发光源两者激发。在一些其他实施方案中，第三类型的核苷酸包括用第三标记标记的第三类型的核苷酸和用第四标记标记的第三类型的核苷酸的混合物，其中第三标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且其中第四标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。在另外的实施方案中，第四类型的核苷酸并不是未标记的，或用在第一成像事件或第二成像事件下不具有任何发射的荧光部分标记。在一些情况下，第四类型的核苷酸含有G碱基(例如，dGTP)。

[0094] 当将一种核苷酸描述为用两个不同标记标记时，它包括以下两种情形。在第一种情形下，核苷酸是用第一标记标记的核苷酸和用第二标记标记的相同类型的核苷酸的混合物。在第二种情形下，核苷酸具有与其共价连接的第一标记和第二标记(即，同一分子上的两个标记)。另外，被描述为用第一标记和第二标记标记的核苷酸的类型还可包括与第一标记和第二标记不同的一个或多个另外的可检测标记。

[0095] 作为第一示例，第一类型的核苷酸可用第一染料标记，该第一染料可由在约450-460nm处的蓝色光源(即，第一染料是蓝色染料)激发并且发射波长在480-525nm范围内。第二类型的核苷酸可用第二染料标记，该第二染料可由在约400-405nm处的紫色光源(即，第二染料是紫色染料)激发并且具有在415-450nm范围内的发射波长。第三类型的核苷酸可以是用第一染料标记的第三核苷酸和用第二染料标记的第三核苷酸的混合物。第四种类型的核苷酸是未标记的。第一成像事件使用波长为约450-460nm的蓝色光源，并且第一类型的核苷酸和第三类型的核苷酸将发射可以由具有涵盖480-525nm的滤光器带的发射滤光器检测

或收集的信号。第二成像事件使用波长为约400-405nm的紫色光源，并且第二类型和第三类型的核苷酸将发射可以由具有涵盖415-450nm的滤光器带的发射滤光器检测或收集的信号。由于第四类型的核苷酸是未标记的，因此在第一成像事件或第二成像事件下未检测到信号。基于本文所述的信号检测模式，可以确定延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物中掺入的核苷酸的身份。在另一实施方案中，掺入混合物包含以下：用蓝色染料A标记的dATP、用紫色染料B标记的dTTP、用蓝色染料A标记的dCTP、用紫色染料B标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。在一个实施方案中，用蓝色染料标记的dATP可具有以下结构：

[0096] 

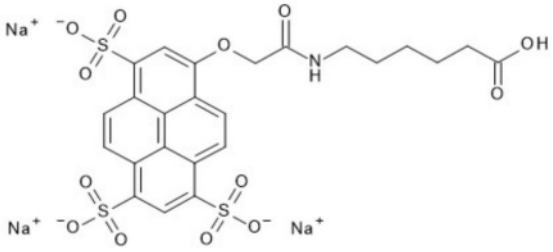
。

[0097] 此种A核苷酸染料缀合物也称为完全官能化的A核苷酸(ffA)。

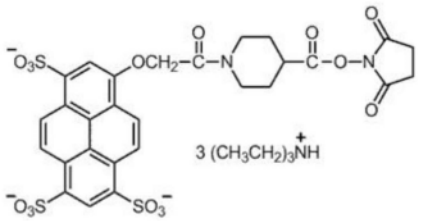
[0098] 作为第二示例，第一类型的标记核苷酸、第二类型的标记核苷酸和第四类型的未标记核苷酸与第一示例中所述的那些相同。第三类型的核苷酸可用第三染料和第四染料标记(例如，用第三染料标记的第三类型的核苷酸和用第四染料标记的第三类型的核苷酸的混合物。第三染料具有与第一染料相似的荧光特征(即，吸收光谱和发射光谱)，但在发射强度方面可能不同。第四染料具有与第二染料相似的荧光特征(即，吸收光谱和发射光谱)，但在发射强度方面可能不同。在另一实施方案中，掺入混合物包含以下：用蓝色染料A标记的dATP、用紫色染料B标记的dTTP、用蓝色染料C标记的dCTP、用紫色染料D标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。

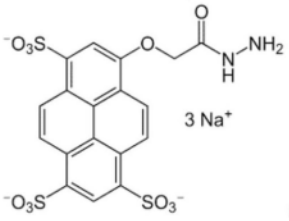
[0099] 紫色染料

[0100] 可由波长为约350-405nm的紫色光源激发的荧光染料可用作本文所述的第一可检测标记或第二可检测标记。在另外的实施方案中，特别有用的紫色染料可以具有在410-460nm或415-450nm范围内的发射光谱。紫色染料的非限制性示例包括：

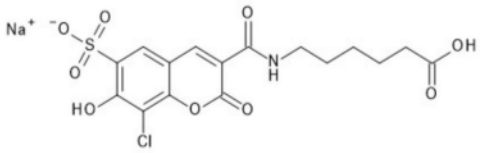


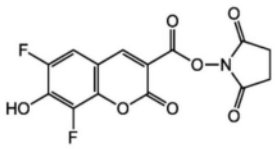
(DY405) 、

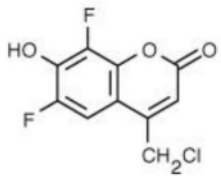
[0101] 

(Alexa 405)、

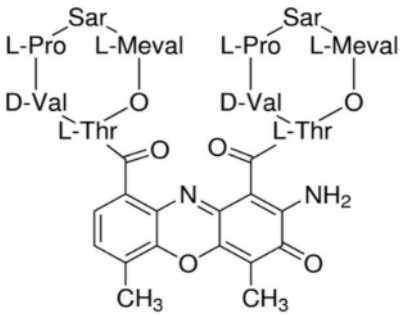
(Cascade B)、



(DY410) 、



(PacificBlue) 、 (CellTrackerBlue) 、

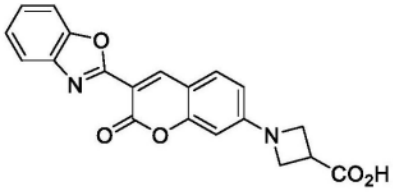
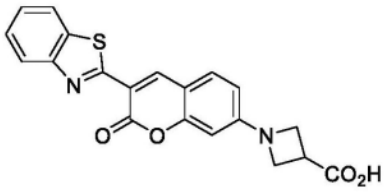
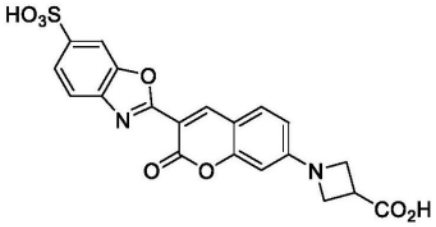
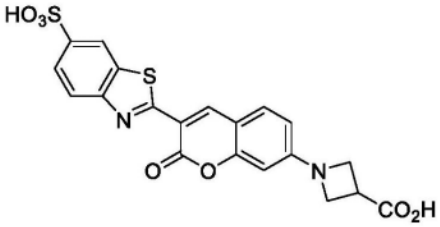
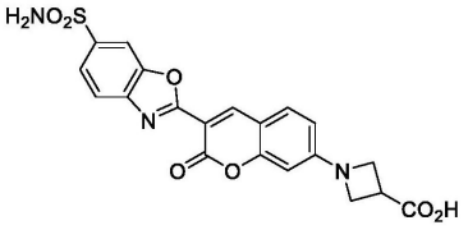
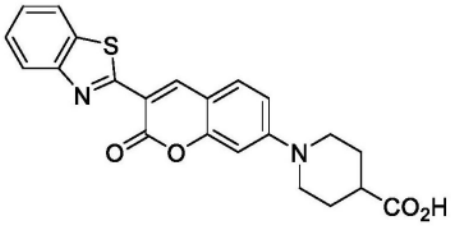
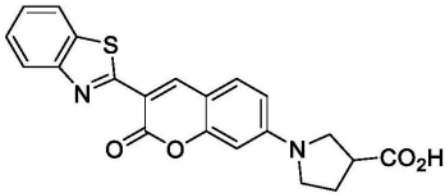
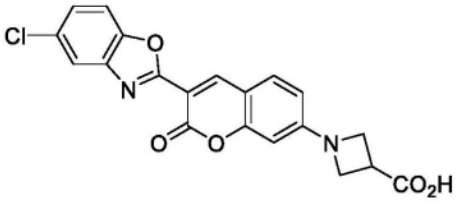
[0102] 

(Actinomycin D)、BD Horizon™V450和BD Horizon™V500。

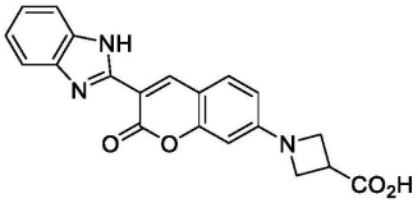
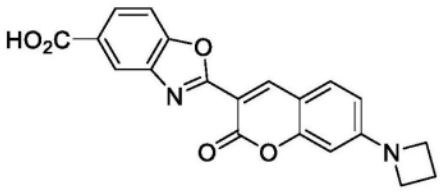
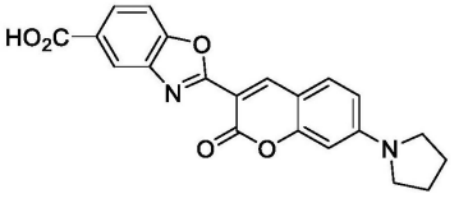
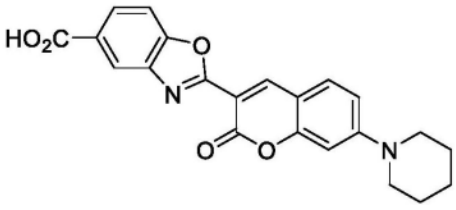
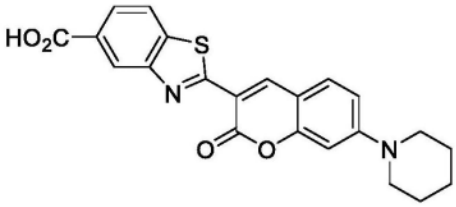
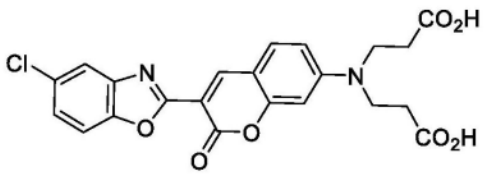
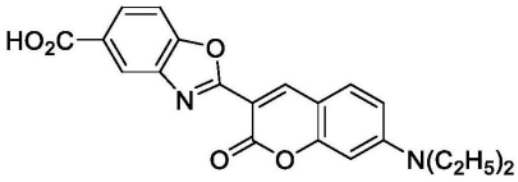
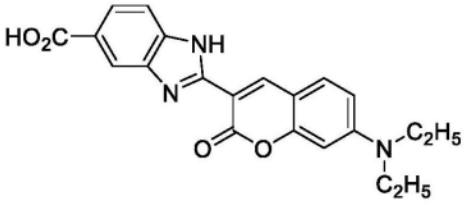
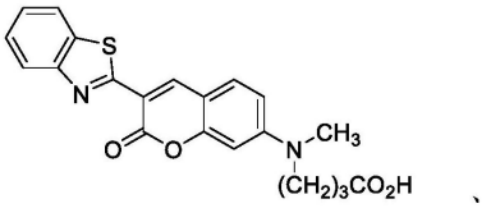
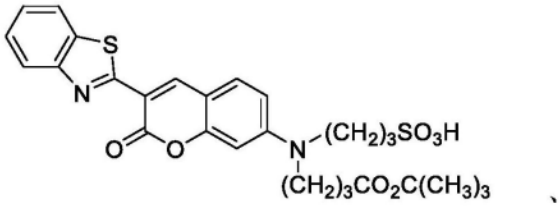
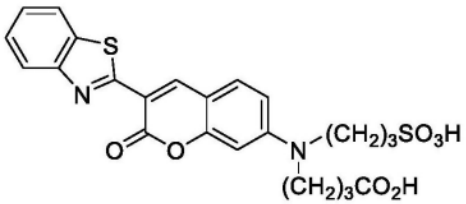
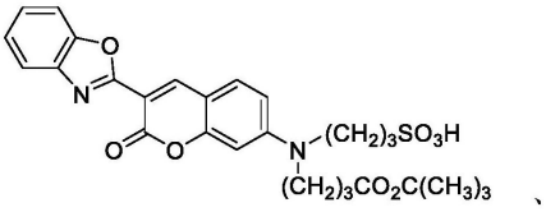
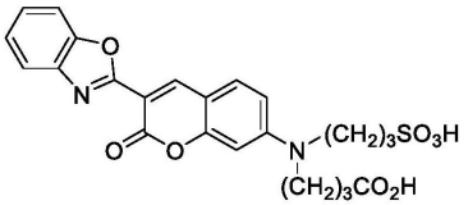
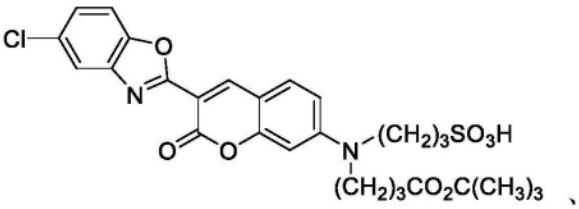
[0103] 蓝色染料

[0104] 可由波长为约450-460nm的蓝色光源激发的荧光染料可用作本文所述的第一可检测标记或第二可检测标记。在另外的实施方案中,特别有用的蓝色染料可以具有475-530nm或480-525nm范围内的发射光谱。蓝色染料的非限制性示例包括美国公布第2018/0094140A1号、第2018/0201981A1号、第2020/0277529A1号和第2020/0277670A1号中公开的香豆素染料,这些公布以引用方式并入本文。

[0105] 在一些实施方案中,非限制性示例性蓝色染料包括以下:

[0106]  、  、  、  、  、  、  、  、

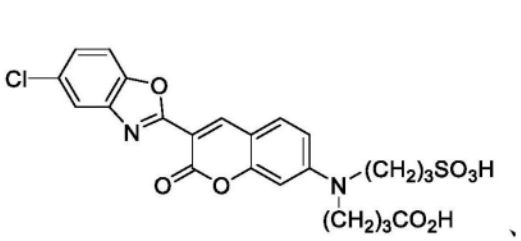
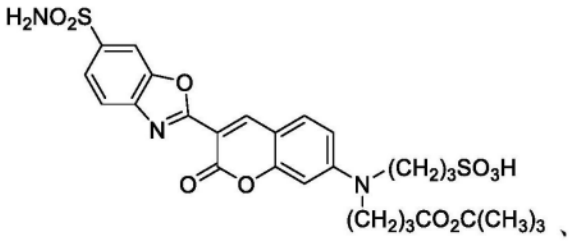
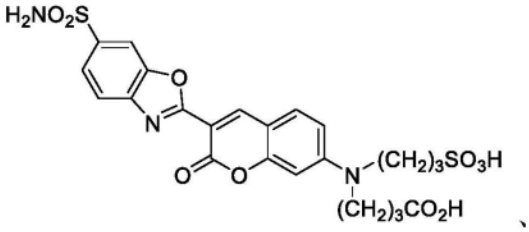
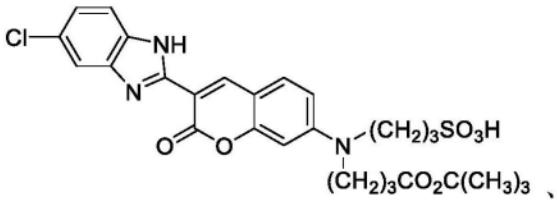
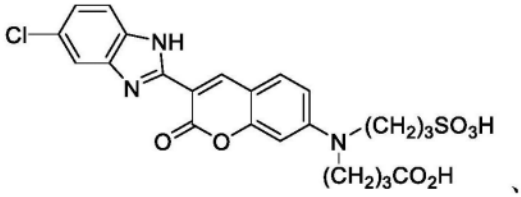
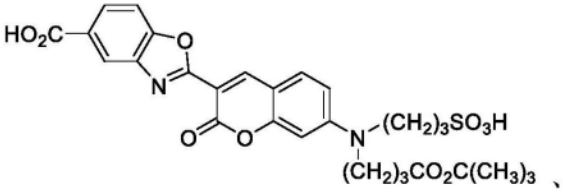
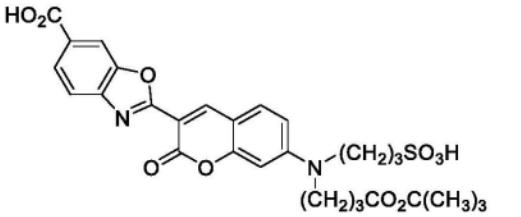
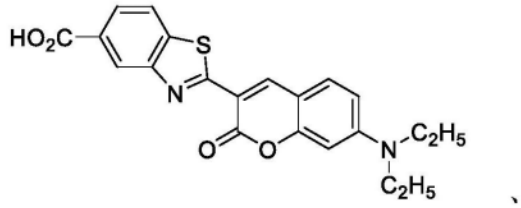
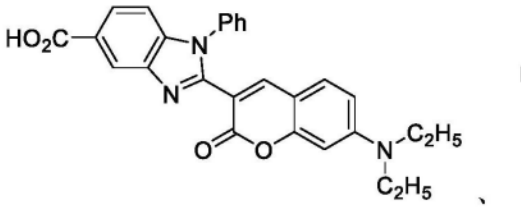
[0107]


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

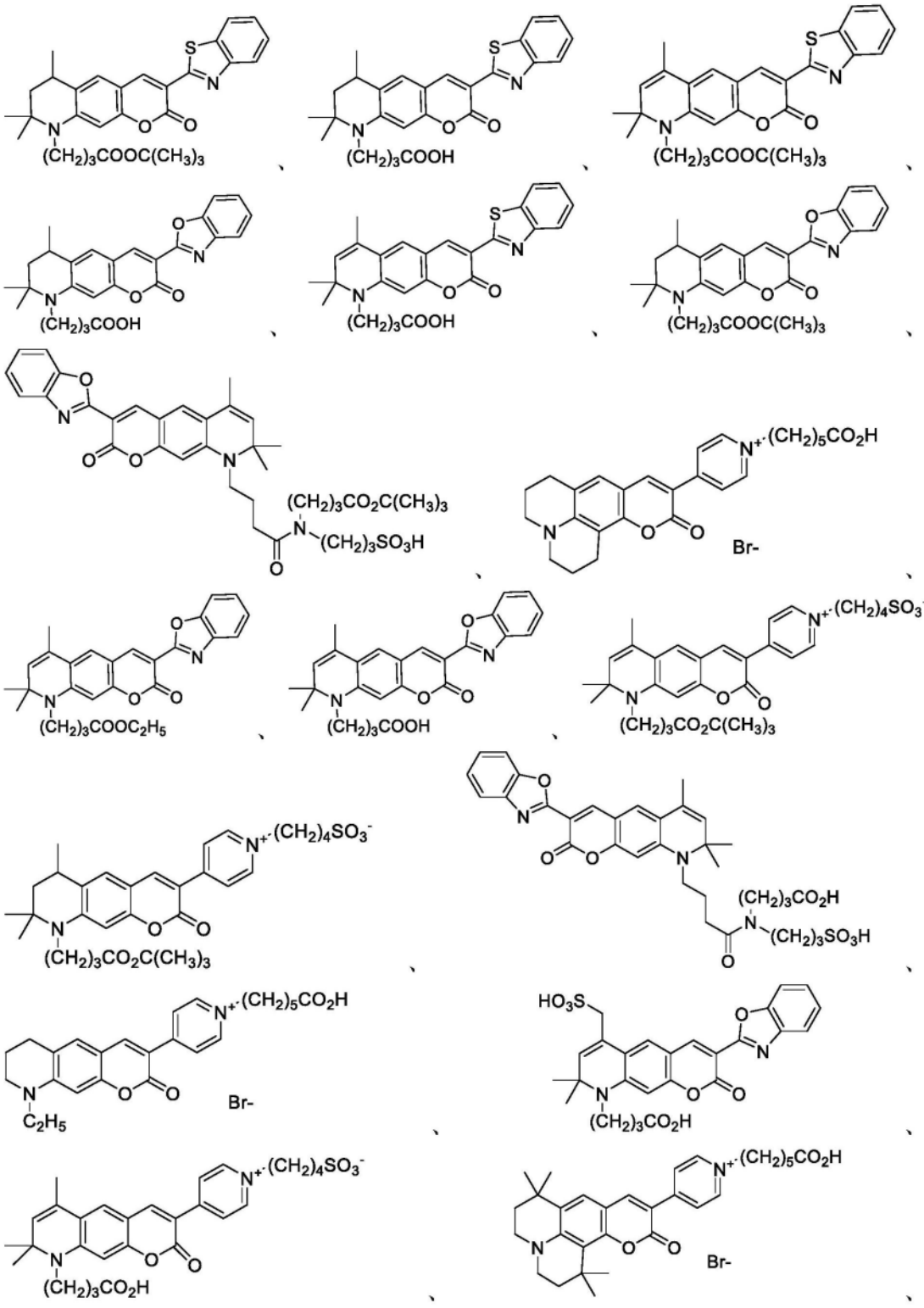
、

、

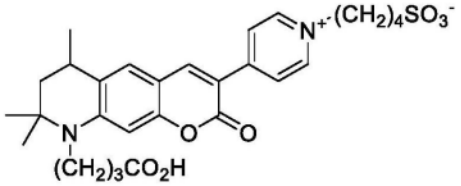
[0108]

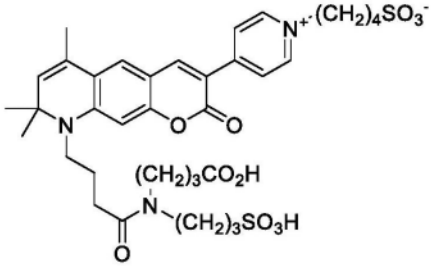










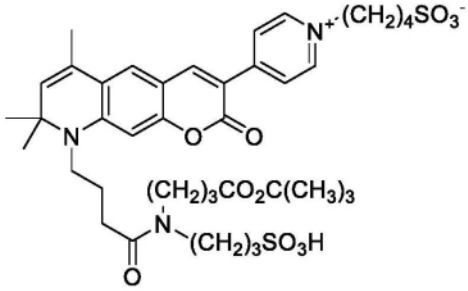
[0109]

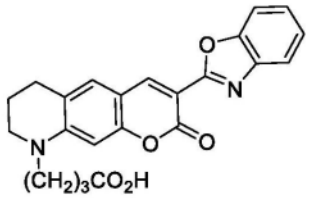

(CH2)3COOC(CH3)3
(CH2)3COOH
(CH2)3COOC(CH3)3
(CH2)3COOH
(CH2)3COOH
(CH2)3COOC(CH3)3
(CH2)3CO2C(CH3)3
(CH2)3SO3H
(CH2)5CO2H
Br-
(CH2)3COOC2H5
(CH2)3COOH
(CH2)4SO3-
(CH2)3CO2C(CH3)3
(CH2)4SO3-
(CH2)3CO2C(CH3)3
(CH2)3CO2H
(CH2)3SO3H
(CH2)5CO2H
Br-
C2H5
HO3S
(CH2)3CO2H
(CH2)4SO3-
(CH2)3CO2H
(CH2)5CO2H
Br-

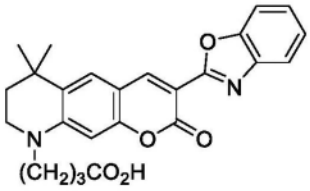
[0110]

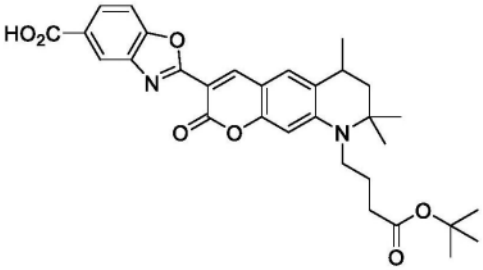


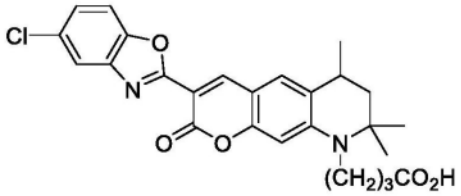


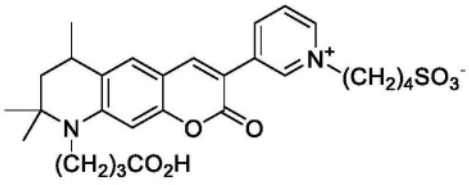


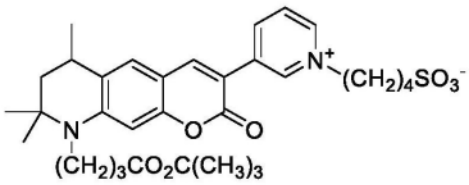


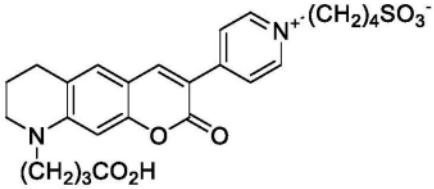


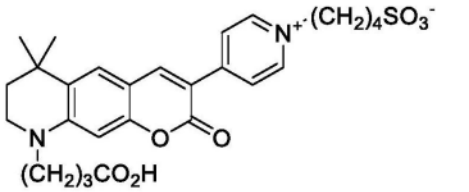


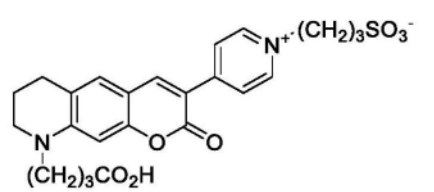


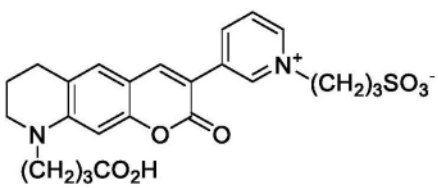


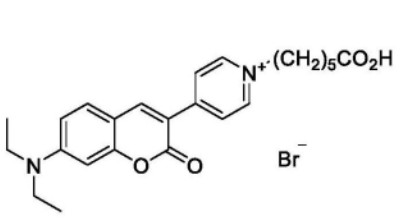
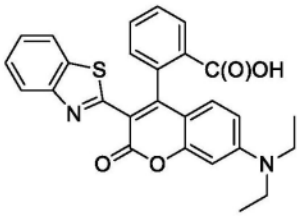
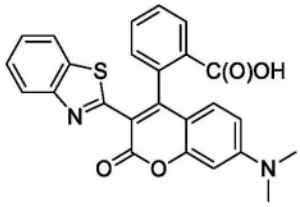
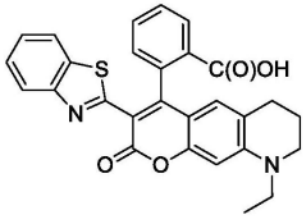
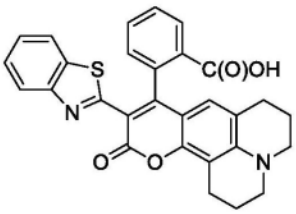
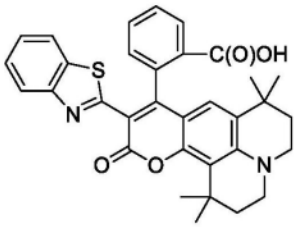
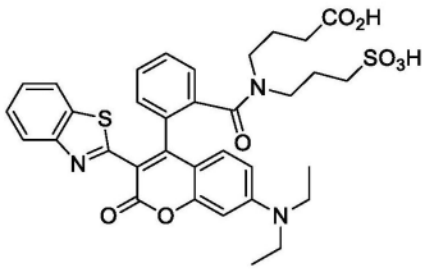
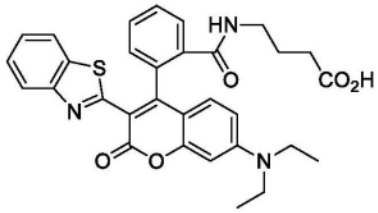
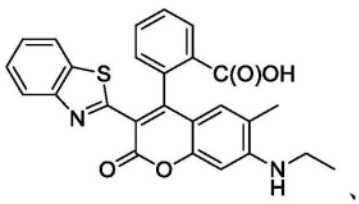
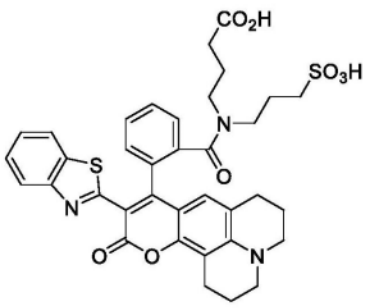
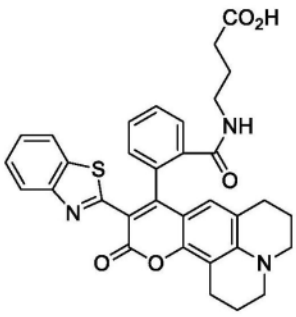
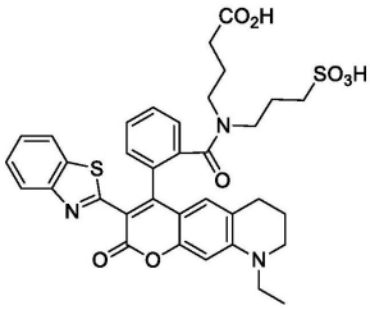
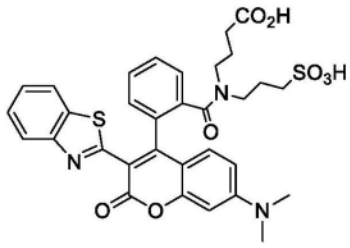
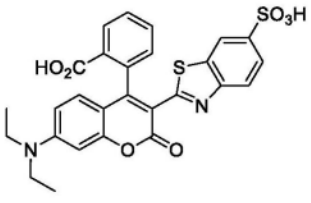
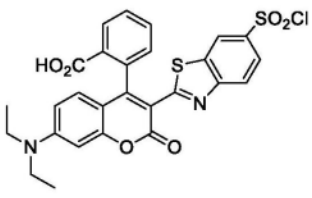
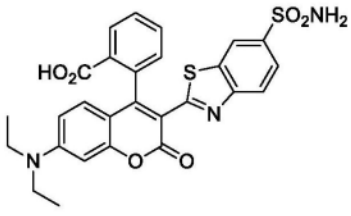
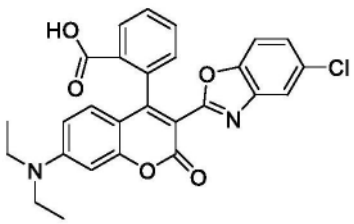




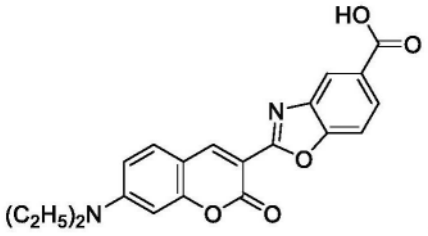






[0111] 















和

。

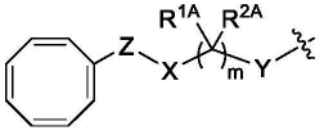
在一个示例中，测序方法中使用的蓝色染料是



另外的示例性染料化合物公开于美国申请第17/385232号中，该申请以引用方式并入本文。

[0112] 抗氧化剂/自由基清除剂

[0113] 在一些实施方案中，本文所述的方法利用包含一种或多种抗氧化剂/自由基清除剂的扫描混合物来减少由蓝色激发和紫色激发引起的光损伤。具体地，延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物在第一成像事件和第二成像事件期间是在包含一种或多种抗氧化剂的缓冲溶液中。有用的抗氧化剂包括但不限于环辛四烯(COT)、黄杉素、槲皮苷、烯丙基硫脲、二甲基硫脲、水飞蓟宾、抗坏血酸或其盐(例如，抗坏血酸钠)、多酚类化合物(诸如6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(Trolox)、没食子酸和它的低级烷基酯、它的单甲基醚以及它的低级烷基酯和单甲基醚的组合、连苯三酚和氢醌诸如叔丁基氢醌(TBHQ)、2,4,5-三羟基丁酰苯(THBP))以及它们的任选地取代的衍生物和组合。在一些另外的实施方案中，该组合物包含环辛四烯和槲皮素，以及它们的任选地取代的衍生物和组合。

[0114] 替代性地，本文所述的蓝色/紫色染料还可以与环辛四烯光保护部分共价键合。在一些实施方案中，可以与本文所述的蓝色染料或紫色染料共价键合的COT部分包含以下结构：，其中R^{1A}和R^{2A}中的每一者独立地为H、羟基、卤素、叠氮基、硫醇、硝基、氰基、任选地取代的氨基、羧基、-C(O)OR^{5A}、-C(O)$NR^{6A}R^{7A}$、任选地取代的C_{1-6}烷基、任选地取代的C_{1-6}烷氧基、任选地取代的C_{1-6}卤代烷基、任选地取代的C_{1-6}卤代烷氧基、任选地取代的C_{2-6}烯基、任选地取代的C_{2-6}炔基、任选地取代的C_{6-10}芳基、任选地取代的C_{7-14}芳烷基、任选地取代的C_{3-7}碳环基、任选地取代的5至10元杂芳基或任选地取代的3至10元杂环基；

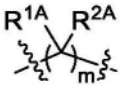
[0115] X^1和Y^1各自独立地为键、-O-、-S-、-NR^{3A}-、-C(=O)-、-C(=O)-O-、-C(=O)-NR^{4A}-、-$S(O)_2$-、-NR^{3A}-C(=O)-NR^{4A}、-NR^{3A}-C(=S)-NR^{4A}-、任选地取代的C_{1-6}亚烷基或任选地取代的亚杂烷基，其中至少一个碳原子被O、S或N取代；

[0116] Z不存在，为任选地取代的C_{2-6}亚烯基或任选地取代的C_{2-6}亚炔基；

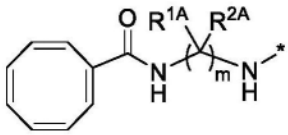
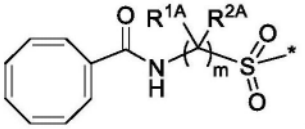
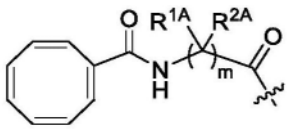
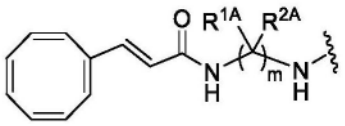
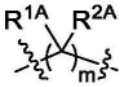
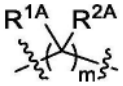
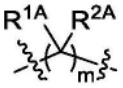
[0117] R^{3A}和R^{4A}中的每一者独立地为H、任选地取代的C_{1-6}烷基或任选地取代的C_{6-10}芳基；

[0118] R^{5A}为任选地取代的C_{1-6}烷基、任选地取代的C_{6-10}芳基、任选地取代的C_{7-14}芳烷基、任选地取代的C_{3-7}碳环基、任选地取代的5至10元杂芳基或任选地取代的3至10元杂环基；

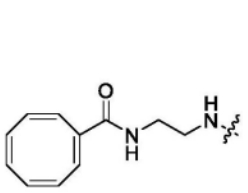
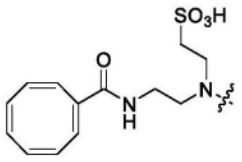
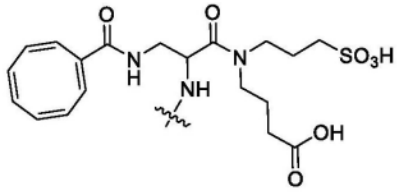
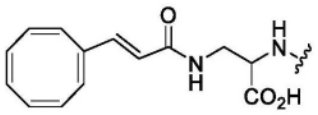
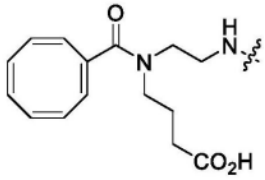
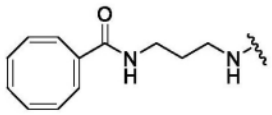
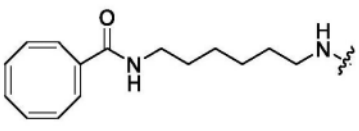
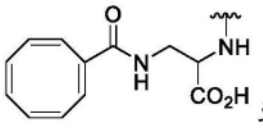
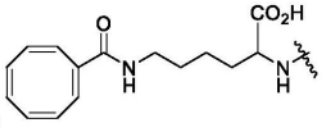
[0119] R^{6A}和R^{7A}中的每一者独立地为H、任选地取代的C_{1-6}烷基、任选地取代的C_{6-10}芳基、任选地取代的C_{7-14}芳烷基、任选地取代的C_{3-7}碳环基、任选地取代的5至10元杂芳基或任选地取代的3至10元杂环基；

[0120] 在中R_{1A}和R_{2A}所连接的碳原子任选地被O、S或N取代，前提条件是当所述碳原子被O或S取代时，则R^{1A}和R^{2A}均不存在；当所述碳原子被N取代时，则R^{2A}不存在；并且m为介

于0和10之间的整数。在一些实施方案中，X和Y均不是键。

[0121] 在一些实施方案中，环辛四烯部分包含结构、、或。在一些此类实施方案中，R^{1A}和R^{2A}中的至少一者是氢。在一些另外的实施方案中，R^{1A}和R^{2A}均为氢。在一些其他实施方案中，R^{1A}为H并且R^{2A}为任选地取代的氨基、羧基或-C(O)$NR^{6A}R^{7A}$。在一些实施方案中，m为1、2、3、4、5或6，并且R^{1A}和R^{2A}中的每一者独立地为氢、任选地取代的氨基、羧基、-C(O)$NR^{6A}R^{7A}$或它们的组合。在一些另外的实施方案中，当m是2、3、4、5或6时，一个R^{1A}是氨基、羧基或-C(O)$NR^{6A}R^{7A}$，并且其余R^{1A}和R^{2A}是氢。在一些实施方案中，中连接R^{1A}和R^{2A}的至少一个碳原子被O、S或N取代。在一些此类实施方案中，中的一个碳原子被氧原子取代，并且连接到所述取代的碳原子的两个R^{1A}和R^{2A}不存在。在一些其他实施方案中，当中的一个碳原子被氮原子取代，连接到所述取代的碳原子的R^{2A}不存在，并且连接到所述取代的碳原子的R^{1A}为氢或C_{1-6}烷基。在R^{1A}和R^{2A}的任何实施方案中，当R^{1A}或R^{2A}为-C(O)$NR^{6A}R^{7A}$时，R^{6A}和R^{7A}可以独立地为H、C_{1-6}烷基或取代的C_{1-6}烷基(例如，被-CO_2H、-NH_2、-SO_3H或-SO_3^-取代的C_{1-6}烷基)。

[0122] 在一些另外的实施方案中，本文所述的荧光染料包含以下结构的环辛四烯部分：

[0123] 、、、、、、、或。本文所述的COT部分可以由本文所述的荧光染料的官能团(例如，羧基基团)与COT衍生物的氨基基团之间的反应产生，以形成酰胺键(其中未示出酰胺键的羰基基团)。关于在SBS化学中使用的COT相关抗氧化剂的另外的公开内容可见于美国公布第2021/0155983A1号中，该公布全文以引用方式整体并入本文。

[0124] 与亲和试剂组合的掺入混合物中的未标记核苷酸

[0125] 作为上文所述的实施方案的替代方案，本文所述的序列方法的第二方面包括二级标记步骤，该二级标记步骤可用于减少由蓝色/紫色激发引起的DNA损伤和染料的光漂白。在一些实施方案中，二级标记是指对标准测序方法的修改，其中首先将未标记核苷酸掺入到引物多核苷酸中，然后掺入的未标记核苷酸结合到对掺入的核苷酸的类型具有特异性的亲和试剂，并且亲和试剂含有可由蓝色或紫色灯激发并且发射可由发射检测通道检测的信号的一个或多个可检测标记。不受特定理论束缚，亲和试剂的大小可以屏蔽来自ROS的DNA，并且因此减少或减轻由蓝光/紫光引起的光损伤。在本文所述的方法的一些实施方案中，第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸和第三类型的核苷酸中的一种或多种可以是未标记的。在一个实施方案中，掺入混合物中第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸和第三类型的核苷酸中的每一者都是未标记的，并且方法还包括：在第一成像事件之前使延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物与亲和试剂集合接触，其中集合中的至少一种亲和试剂特异性结合到掺入的第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸或第三类型的核苷酸。在一些此类实施方案中，亲和试剂集合包括：特异性结合到第一类型的核苷酸的第一亲和试剂、特异性结合到第二类型的核苷酸的第二亲和试剂。在一些另外的实施方案中，第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，该第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测，第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，该第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测，并且其中第一可检测标记与第二可检测标记为光谱上可区分的。在一些此类实施方案中，第一亲和试剂和第二亲和试剂两者特异性结合到第三类型的核苷酸。在其他实施方案中，该亲和试剂集合还包含特异性结合到第三类型的核苷酸的第三亲和试剂，并且其中第三亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记和一个或多个第四可检测标记，该第三可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测，该第四可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。第三染料具有与第一染料相似的荧光特征(即，吸收光谱和发射光谱)，但在发射强度方面可能不同。第四染料具有与第二染料相似的荧光特征(即，吸收光谱和发射光谱)，但在发射强度方面可能不同。

[0126] 当含有可检测标记的亲和试剂结合到掺入的核苷酸时，延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物变成可以在第一成像事件和/或第二成像事件中检测到的标记的延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物。本文所述的紫色染料和蓝色染料可以用于本文所述的修改的方法的任何实施方案中。另外，标记的延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物可以存在于包含本文所述的抗氧化剂和ROS清除剂中的一种或多种的扫描混合物中。亲和试剂中的可检测标记也可以含有本文所述的共价键合的光保护部分。

[0127] 亲和试剂

[0128] 如本文所用，术语“亲和试剂”是指与延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物中掺入的核苷酸特异性结合的大分子，诸如蛋白质或抗体。在一些实施方案中，亲和试剂包含蛋白质标签、抗体(包括但不限于抗体的结合片段、单链抗体、双特异性抗体等)、适体、打结素、亲和体(affimer)或任何其他已知以合适特异性和亲和力结合掺入的核苷酸的剂。本文所述的每个亲和试剂对于特定类型的核苷酸的亲和力可以基本上高于它对于其他类型的核苷酸的亲和力。此外，亲和试剂应结合到在生长的DNA链(即，延伸的引物多核苷酸)的3’

端处的掺入核苷酸，但不结合到DNA链上其他地方的核苷酸。本文所述的亲和试剂可以用一个或多个可检测标记，诸如本文所述的蓝色染料和紫色染料直接或间接标记。在一些实施方案中，一个或多个可检测标记经由可裂解的连接基共价连接到亲和试剂。

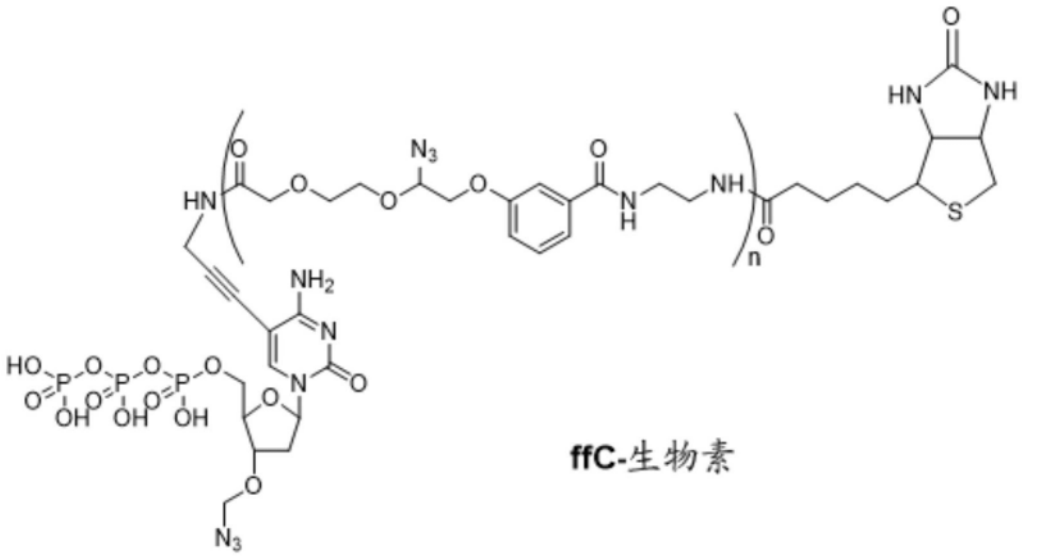
[0129] 在本文所述的方法的一些实施方案中，第一类型的核苷酸包含第一半抗原，并且第一亲和试剂包含特异性结合到第一半抗原的第一半抗原结合配偶体。在一些此类实施方案中，第二类型的核苷酸包含第二半抗原，并且第二亲和试剂包含特异性结合到第二半抗原的第二半抗原结合配偶体。第一半抗原和第二半抗原中的每一者可以包含以下或选自由以下组成的组：生物素、地高辛、二硝基苯酚或氯烷基基团。每个亲和试剂包含特异性半抗原结合配偶体，其可以是与一个或多个荧光部分缀合的抗半抗原抗体。在一些另外的实施方案中，第一半抗原包含生物素部分，并且第一半抗原结合配偶体包含链霉亲和素，其中链霉亲和素包含一个或多个第一可检测标记。在一些另外的实施方案中，第二半抗原包含氯烷基基团，并且第二半抗原结合配偶体包含HaloTag®，其中HaloTag®包含一个或多个第二可检测标记。第一可检测标记或第二可检测标记可以经由本文所述的一个或多个可裂解的连接基缀合至亲和试剂(例如，半抗原结合配偶体)。在一些此类实施方案中，第三类型的核苷酸包含第一半抗原和第二半抗原两者(例如，包含第一半抗原的第三类型的核苷酸和包含第二半抗原的第三类型的核苷酸的混合物)，使得第一亲和试剂和第二亲和试剂两者可以特异性结合到第三类型的核苷酸。

[0130] 在其他实施方案中，当集合亲和试剂还包含特异性结合到第三类型的核苷酸的第三亲和试剂时，第三类型的核苷酸可以包含第三半抗原，并且第三亲和试剂包含第三半抗原结合配偶体。第三亲和试剂可以是包含第三半抗原结合配偶体和一个或多个第三可检测标记的第三亲和试剂以及包含第三半抗原结合配偶体和一个或多个第四可检测标记的第三亲和试剂的混合物。

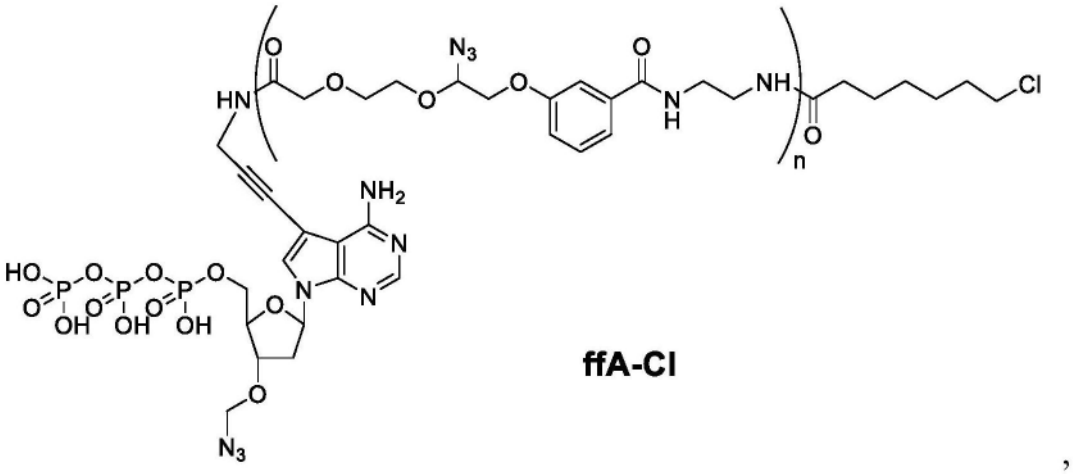
[0131] 例如，第一类型的未标记核苷酸可以含有包含生物素部分的第一半抗原，而第一亲和试剂可包含与一个或多个第一可检测标记缀合的链霉亲和素，该第一可检测标记是由在约450-460nm处的蓝色光源可激发(即，第一染料是蓝色染料)并且具有在480-525nm范围内的发射波长的蓝色染料。第二类型的未标记核苷酸可以含有包含氯烷基基团(例如-$(CH_2)_6Cl$)的第二半抗原，而第二亲和试剂可包含与一个或多个第二可检测标记缀合的HaloTag®，该第二可检测标记是可由约400-405nm处的紫色光源激发并且具有在415-450nm范围内的发射波长的紫色染料。第三类型的未标记核苷酸可以含有与第一亲和试剂和第二亲和试剂两者结合的第一半抗原和第二半抗原两者。在一些实施方案中，第四类型的核苷酸是未标记的并且不与任何亲和试剂结合。在使延伸的引物多核苷酸/靶核苷酸复合物与亲和试剂集合接触之后，洗掉未结合的亲和试剂。第一成像事件使用波长为约450-460nm的蓝色光源，并且第一类型的核苷酸和第三类型的核苷酸将发射可以由具有涵盖480-525nm的滤光器带的发射滤光器检测或收集的信号。第二成像事件使用波长为约400-405nm的紫色光源，并且第二类型的核苷酸和第三类型的核苷酸两者(通过与亲和试剂缀合的可检测标记)将发射可以由具有涵盖415-450nm的滤光器带的发射滤光器检测或收集的信号。在第四类型的核苷酸的第一成像事件或第二成像事件下不会检测到信号。基于本文所述的信号检测模式，可以确定延伸的引物多核苷酸中掺入的核苷酸的身份。在另一个实施方案中，掺入混合物包含以下：包含氯烷基基团的dATP、包含生物素部分的dTTP、包含生

物素部分的dCTP、包含氯烷基基团的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。包含生物素部分的示例性ffC和包含氯烷基基团的ffA包括：

[0132]



[0133]



，

其中n是1、2或3。

[0134] 本文所述的测序方法的第三方面还涉及使用用亲和试剂进行的二级标记，但第一类型的核苷酸、第二类型的核苷酸或第三类型的核苷酸中的仅一种是未标记的。在一些实施方案中，第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记，第二类型的核苷酸是未标记的，第三类型的核苷酸是未标记的和用第一可检测标记标记的，并且第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测。方法还包括在第一成像事件之前使延伸的引物多核苷酸与亲和试剂接触，其中亲和试剂特异性结合到第二类型的未标记核苷酸和/或第三类型的未标记核苷酸。在一些此类实施方案中，亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，该第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。在一些另外的实施方案中，亲和试剂包含与一个或多个第二可检测标记缀合的链霉亲和素，并且第二类型的核苷酸和第三类型的未标记核苷酸均包含生物素部分。在一些其他实施方案中，第一类型的核苷酸是未标记的，第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记，第三类型的核苷酸是未标记的和用第二可检测标记标记的，并且第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。方法还包括在第一成像事件之前使延伸的引物多核苷酸与亲和试剂接触，其中亲和试剂特异性结合到第一类型的未标记核苷酸和/或第三类型的未标记核

苷酸。在一些此类实施方案中，亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，该第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测。在一些另外的实施方案中，亲和试剂包含与一个或多个第一可检测标记缀合的链霉亲和素，并且第一类型的核苷酸和第三类型的未标记核苷酸均包含生物素部分。在任何此类实施方案中，第四类型的核苷酸是未标记的并且不与亲和试剂结合或在第一成像事件和第二成像事件期间不发射任何信号。

[0135] 作为另一示例，第一类型的核苷酸用蓝色染料标记，该蓝色染料可由在约450-460nm处的蓝色光源激发并且具有在480-525nm范围内的发射波长。第二类型的核苷酸是未标记的并且包含生物素部分。亲和试剂包含与一个或多个紫色染料缀合的链霉亲和素，该一个或多个紫色染料可由在约400-405nm处的紫色光源激发并且具有在415-450nm范围内的发射波长。第三类型的核苷酸是未标记的第三类型的包含生物素部分的核苷酸和用与第一类型的核苷酸相同的蓝色染料标记的第三类型的核苷酸的混合物。第四类型的核苷酸是未标记的并且不与任何亲和试剂结合或在第一成像事件/第二成像事件下不发射任何信号。在使延伸的引物多核苷酸/靶核苷酸复合物与亲和试剂接触之后，洗掉未结合的亲和试剂。第一成像事件使用波长为约450-460nm的蓝色光源，并且第一类型的核苷酸和第三类型的核苷酸将发射可以由具有涵盖480-525nm的滤光器带的发射滤光器检测或收集的信号。第二成像事件使用波长为约400-405nm的紫色光源，并且第二类型的核苷酸和第三类型的核苷酸(通过连接到链霉亲和素的紫色染料)将发射可以由具有包围415-450nm的滤光器的发射滤光器检测或收集的信号。在第四类型的核苷酸的第一成像事件或第二成像事件下不会检测到信号。基于本文所述的信号检测模式，可以确定延伸的引物多核苷酸中掺入的核苷酸的身份。在另一个实施方案中，掺入混合物包含以下：用蓝色染料标记的dATP、包含生物素部分的dTTP、包含生物素部分的dCTP、用蓝色染料标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。

[0136] 在本文所述的测序方法的第三方面的替代性实施方案中，第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记，第二类型的核苷酸是未标记的，第三类型的核苷酸是未标记的和用第三可检测标记标记的，并且第一可检测标记和第三可检测标记均可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测(例如，第三标记具有与第一标记相似的荧光特征，但在发射强度方面可能不同)。方法还包括在第一成像事件之前使延伸的引物多核苷酸与亲和试剂集合接触，其中至少一种亲和试剂特异性结合到第二类型的未标记核苷酸，并且至少一种亲和试剂特异性结合到第三类型的未标记核苷酸。在一些此类实施方案中，特异性结合到第二类型的核苷酸的亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，该第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。特异性结合到第三类型的核苷酸的亲和试剂包含一个或多个第四可检测标记，该第四可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测(例如，第四标记具有与第二标记相似的荧光特征，但在发射强度方面可能不同)。在一些另外的实施方案中，亲和试剂集合可包含与一个或多个第二可检测标记缀合的链霉亲和素和与一个或多个第四可检测标记缀合的第二抗体/蛋白质。第二类型的未标记核苷酸包含生物素部分，并且第三类型的未标记核苷酸包含对与第四标记缀合的第二抗体/蛋白质具有特异性的半抗原。

[0137] 本文所述的测序方法的第三方面的另一个替代性实施方案涉及使用掺入混合物：第一类型的核苷酸是未标记的，第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记，第三类型的核

苷酸是未标记的和用第四可检测标记标记的，并且第二可检测标记和第四可检测标记均可由第二发射光源激发并且可由第二发射滤光器检测(例如，第三标记具有与第一标记相似的荧光特征，但在发射强度方面可能不同)。方法还包括在第一成像事件之前使延伸的引物多核苷酸与亲和试剂集合接触，其中至少一种亲和试剂特异性结合到第一类型的未标记核苷酸，并且至少一种亲和试剂特异性结合到第三类型的未标记核苷酸。在一些此类实施方案中，特异性结合到第一类型的核苷酸的亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记。特异性结合到第三类型的核苷酸的亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记。第一可检测标记和第三可检测标记均可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测(例如，第三标记具有与第一标记相似的荧光特征，但在发射强度方面可能不同)。

[0138] 在本文所述的方法的任何实施方案中，步骤(a)的混合物中的核苷酸包含四种不同类型的核苷酸(A、C、G和T或U)或它们的非天然核苷酸类似物。在另外的实施方案中，四种不同类型的核苷酸是dATP、dCTP、dGTP和dTTP或dUTP或它们的非天然核苷酸类似物。在一些另外的实施方案中，四种类型的核苷酸中的三种各自用可检测标记标记，并且核苷酸中的一种未用荧光团标记，或用荧光团标记，但无法排出并且在第一成像事件或第二成像事件中发射信号。在其他实施方案中，使用本文所述的二级标记步骤添加四种类型的核苷酸中的一种、两种或三种的可检测标记，其中首先将未标记核苷酸掺入引物多核苷酸中，然后将对核苷酸的类型具有特异性的亲和试剂引入到引物多核苷酸中，其中亲和试剂含有可在第一成像事件和/或第二成像事件期间发射信号的一个或多个可检测标记。在另外的实施方案中，掺入混合物中四种类型的核苷酸中的每一种都含有3'羟基封端基团。此类3'羟基封端基团确保仅单个碱可以通过聚合酶添加到引物多核苷酸的3'端。在步骤(b)中掺入核苷酸后，洗掉剩余未掺入的核苷酸。

[0139] 在本文所述的方法的一些实施方案中，该方法还包括步骤(e)：在第二成像事件之后并且在下一次测序循环之前从掺入的核苷酸去除3'羟基封端基团。在另外的实施方案中，连接到掺入的核苷酸(经由可裂解的连接基直接连接到掺入的核苷酸；或经由亲和试剂间接连接)的任何可检测标记在下一次测序循环之前也被去除。在一些此类实施方案中，可检测标记和3'羟基封端基团在单个步骤中(例如，在相同化学反应条件下)被去除。在其他实施方案中，标记和3'羟基封端基团在两个单独的步骤中被去除(例如，标记和3'封端基团在两个单独的化学反应条件下去除)。在一些另外的实施方案中，在标记之后使用裂解后洗涤步骤，并且去除3'封端基团。在另外的实施方案中，步骤(a)到(e)在重复循环中进行(例如，至少30、50、100、150、200、250、300、400或500次)，并且方法还包括基于每个依序掺入的核苷酸的身份来依序确定单链靶多核苷酸的至少一部分的序列。在一些此类实施方案中，步骤(a)到(e)重复至少50个循环。在一些另外的实施方案中，从掺入混合物中掺入核苷酸由聚合酶(例如，DNA聚合酶)进行。示例性聚合酶包括但不限于Pol 812、Pol 1901、Pol 1558或Pol 963。Pol 812、Pol 1901、Pol 1558或Pol 963DNA聚合酶的氨基酸序列描述于例如美国专利公布第2020/0131484A1号和第2020/0181587A1号中，这些公布均以引用方式并入本文。

[0140] 在本文所述的方法的一些实施方案中，在第一成像事件中使用的第一激发光源和在第二成像事件中使用的第二激发光源中的每一者包括激光器、发光二极管(LED)或它们的组合。

[0141] 在一些实施方案中，通过图像分析软件处理来自第一成像事件和第二成像事件的发射检测的组合，以确定在每个固定的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物位置处掺入碱基的身份。在一些此类实施方案中，在重复掺入循环之后(在至少50、100、150、200、250或300次运行之后)处理图像分析。

[0142] 在本文所述的方法的任何实施方案中，单链靶多核苷酸可以固定到固体载体。在一些此类实施方案中，固体载体包含多个固定的单链靶多核苷酸。引物多核苷酸与靶多核苷酸的至少一部分杂交。在一些此类实施方案中，引物多核苷酸与靶多核苷酸的至少一部分杂交，以形成引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物。固体载体可包括成簇的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物。在一些实施方案中，固体载体包括流通池，例如包括多个纳米孔的图案化流通池，每个纳米孔彼此分开。在一些另外的实施方案中，每个纳米孔在其中包括一个固定簇。在一些实施方案中，图案化流通池上的纳米孔的密度为约100K/mm^2至约500K/mm^2、约200K/mm^2至约400K/mm^2或约250K/mm^2至约350K/mm^2。在一些实施方案中，固定的单链靶多核苷酸(或由与引物多核苷酸杂交形成的簇)在固体载体上的密度为约80K/mm^2至约400K/mm^2、约100K/mm^2至约300K/mm^2或约150K/mm^2至约250K/mm^2。在一些实施方案中，与使用具有相似或相当的光学分辨率的红色/绿色或绿色/蓝色激发的双通道测序方法相比，本文所述的测序方法允许成簇密度增加多达10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或50％。

[0143] 下文描述方法的其他说明性实施方案。

[0144] 在一个特定实施方案中，进行了合成步骤并且该合成步骤可以任选地包括将模板多核苷酸链或靶多核苷酸链与包含本公开的荧光标记的核苷酸的反应混合物一起温育。还可以在允许在退火到模板多核苷酸链或靶多核苷酸链的多核苷酸链上的游离3′OH基团和标记核苷酸上的5’磷酸基团之间形成磷酸二酯键的条件下提供聚合酶。因此，合成步骤可以包括通过核苷酸与模板链/靶链的互补碱基配对来指导多核苷酸链的形成。

[0145] 在这些方法的所有实施方案中，检测步骤可以在向其中掺入了标记的核苷酸的多核苷酸链退火到靶链上时进行，或者在其中将两条链分离的变性步骤之后进行。在合成步骤和检测步骤之间可以包括另外的步骤，例如化学反应步骤或酶促反应步骤，或者纯化步骤。具体地讲，可以分离或纯化掺入了标记的核苷酸的多核苷酸链，然后进一步加工或用于后续的分析。以举例的方式，在合成步骤中掺入如本文所述的标记核苷酸的多核苷酸链随后可以用作标记的探针或引物。在其他实施方案中，本文示出的合成步骤的产物可以经受进一步的反应步骤，并且如果需要，这些后续步骤的产物被纯化或分离。

[0146] 用于合成步骤的合适条件将为熟悉标准分子生物学技术的人员所熟知。在一个实施方式中，合成步骤可以类似于标准引物延伸反应，该标准引物延伸反应在合适的聚合酶的存在下使用核苷酸前体(包括如本文所述的标记的核苷酸)形成与靶链互补的延伸的多核苷酸链(引物多核苷酸链)。在其他实施方案中，合成步骤本身可以形成产生标记的双链扩增产物的扩增反应的一部分，该标记的双链扩增产物由来源于引物靶多核苷酸链的复制的退火互补链组成。其他示例性合成步骤包括切口平移、链置换聚合、随机引发的DNA标记等。用于合成步骤的特别有用的聚合酶是能够催化如本文示出的标记的核苷酸的掺入的聚合酶。可以使用多种天然存在的或突变的/经修饰的聚合酶。以举例的方式，热稳定聚合酶可以用于使用热循环条件进行的合成反应，而热稳定聚合酶可能不是等温引物延伸反应所期望的。能够掺入根据本公开的标记的核苷酸的合适的热稳定聚合酶包括WO 2005/024010

或WO 06/120433中描述的那些，这些专利各自以引用方式并入本文中。在较低温度诸如37℃处进行的合成反应中，聚合酶不必是热稳定聚合酶，因此对聚合酶的选择将取决于许多因素，诸如反应温度、pH、链置换活性等。

[0147] 在具体的非限制性实施方案中，本公开涵盖以下的方法：核酸测序、重新测序、全基因组测序、单核苷酸多态性评分、涉及当用本文示出的染料标记的经修饰的核苷酸或核苷掺入到多核苷酸中时对其进行检测的任何其他应用。

[0148] 在一个特定实施方案中，本公开提供了包含根据本公开的染料部分的标记的核苷酸在多核苷酸合成测序反应中的用途。合成测序通常涉及使用聚合酶或连接酶在5'至3'方向上将一个或多个核苷酸或寡核苷酸顺序添加至生长的多核苷酸链，以便形成与待测序的模板核酸/靶核酸互补的延伸多核苷酸链。存在于一个或多个添加的核苷酸中的碱基的身份可以在检测或"成像"步骤中测定。添加的碱基的身份可以在每个核苷酸掺入步骤之后测定。然后可以使用常规的Watson-Crick碱基配对规则来推断模板的序列。使用用本文示出的染料标记的核苷酸来测定单个碱基的身份可能是有用的，例如，在单核苷酸多态性的评分中，并且此类单碱基延伸反应在本公开的范围内。

[0149] 在本公开的一个实施方案中，靶多核苷酸的序列通过检测连接到掺入的核苷酸的荧光标记，检测一个或多个核苷酸掺入到与待测序的靶多核苷酸互补的新生链中来确定。靶多核苷酸的测序可以用合适的引物(或制备成发夹构建体，其将包含引物作为发夹的一部分)引发，并且新生链通过在聚合酶催化的反应中向引物的3'端添加核苷酸而以逐个方式延伸。

[0150] 在特定实施方案中，不同的核苷酸三磷酸(A、T、G和C)中的每一者可以用独特的荧光团进行标记，并且还在3′位置处包含封端基团以防止不受控制的聚合。替代性地，四种核苷酸中的一种可以是未标记的(暗色)。聚合酶将核苷酸掺入到与模板多核苷酸/靶多核苷酸互补的新生链中，并且封端基团防止核苷酸的进一步掺入。任何未掺入的核苷酸都可以被洗掉，并且来自每个掺入的核苷酸的荧光信号图案可以通过合适的装置(诸如使用光激发和合适的发射滤光器的电荷耦合器件)以光学方式"读取"。然后可以(同时或顺序地)除去(裂解)3′-封端基团和荧光染料化合物，以暴露新生链用于进一步掺入核苷酸。通常，将在每个掺入步骤之后确定所掺入的核苷酸的身份，但这不是严格必需的。类似地，美国专利号5,302,509(以引用方式并入本文)公开了对固定在固体载体上的多核苷酸进行测序的方法。

[0151] 如上文所例示，该方法利用了在DNA聚合酶的存在下将3′-封闭的核苷酸A、G、C和T掺入到与固定的多核苷酸互补的生长链中。聚合酶掺入与靶多核苷酸互补的碱基，但是被3′-羟基封端基团防止进一步添加。然后可以确定掺入的核苷酸的标记，并且通过化学裂解除去封闭基团以允许发生进一步的聚合。在合成测序反应中待测序的核酸模板可以是期望测序的任何多核苷酸。用于测序反应的核酸模板将通常包含具有游离3′OH基团的双链区域，该双链区域充当用于在测序反应中添加另外的核苷酸的引物或起始点。待测序模板的该区域将在互补链上悬垂该游离3′OH基团。待测序模板的悬垂区域可以是单链的，但也可以是双链的，前提条件是在与待测序的靶链互补的链上存在"切口"，以提供用于引发测序反应的游离3′OH基团。在此类实施方案中，测序可以通过链置换进行。在某些实施方案中，可以添加带有游离3′OH基团的引物，作为与待测序模板的单链区域杂交的单独组分(例如，

短寡核苷酸)。替代性地,待测序的引物和模板链可以各自形成能够形成分子内双链体(诸如发夹环结构)的部分自身互补核酸链的一部分。发夹多核苷酸及其可以连接到固体载体的方法在PCT公布第WO 01/57248号和第WO 2005/047301号中公开,这些公布各自以引用方式并入本文。核苷酸可以被连续地添加到生长引物,导致在5'至3'方向上合成多核苷酸链。可以确定已添加的碱基的性质,特别是但不必在每次添加核苷酸之后,从而提供核酸模板的序列信息。因此,通过经由与核苷酸的5'磷酸基团形成磷酸二酯键而将核苷酸接合到核酸链的游离3'OH基团,从而将该核苷酸掺入到核酸链(或多核苷酸)中。

[0152] 待测序的核酸模板可以是DNA或RNA,或者甚至是由脱氧核苷酸和核糖核苷酸组成的杂合分子。核酸模板可以包含天然存在的和/或非天然存在的核苷酸以及天然或非天然的骨架键,前提条件是这些不阻止测序反应中模板的复制。

[0153] 在某些实施方案中,待测序的靶多核苷酸可以经由本领域已知的任何合适的连接方法(例如经由共价连接)连接到固体载体。在某些实施方案中,靶多核苷酸可以直接连接到固体载体(例如,基于二氧化硅的载体)。然而,在本公开的其他实施方案中,固体载体的表面可以以某种方式修饰,以便允许靶多核苷酸的直接共价连接,或者通过水凝胶或聚电解质多层来固定靶多核苷酸,该多层本身可以非共价地连接到固体载体。

[0154] 其中多核苷酸已直接连接到载体(例如,基于二氧化硅的载体,诸如WO 00/06770(以引用方式并入本文)中公开的那些)的阵列,其中通过玻璃上的环氧侧基与多核苷酸上的内部氨基基团之间的反应将多核苷酸固定在玻璃载体上。此外,可以通过硫基亲核物质与固体载体的反应将多核苷酸连接到固体载体,例如,如WO 2005/047301(以引用方式并入本文)中所述。固体支撑的靶多核苷酸的又一个示例是,其中模板多核苷酸连接到支撑在基于二氧化硅的固体载体或其他固体载体上的水凝胶,例如,如WO 00/31148、WO 01/01143、WO 02/12566、WO 03/014392、美国专利第6,465,178号和WO 00/53812中所述,这些专利各自以引用方式并入本文。

[0155] 模板多核苷酸可以固定于其上的特定表面是聚丙烯酰胺水凝胶。聚丙烯酰胺水凝胶描述于上文引用的参考文献和WO 2005/065814中,该专利以引用方式并入本文。可以使用的特定水凝胶包括WO 2005/065814和美国公开2014/0079923中所述的那些。在一个实施方案中,水凝胶为PAZAM(聚(N-(5-叠氮基乙酰氨基戊基)丙烯酰胺-共-丙烯酰胺))。

[0156] DNA模板分子可以连接到珠粒或微粒,例如,如美国专利第6,172,218号(以引用方式并入本文)中所述。与珠粒或微粒的附接可以用于测序应用。可以制备珠粒文库,其中每个珠粒包含不同的DNA序列。示例性文库及其产生方法描述于Nature,437,376-380(2005);Science,309,5741,1728-1732(2005),这些文献各自以引用方式并入本文。使用本文示出的核苷酸对此类珠粒的阵列进行测序在本公开的范围内。

[0157] 待测序的模板可以形成固体载体上的"阵列"的一部分,在这种情况下,阵列可以采取任何方便的形式。因此,本公开的方法适用于所有类型的高密度阵列,包括单分子阵列、成簇阵列和珠粒阵列。用本公开的染料化合物标记的核苷酸可以用于对基本上任何类型的阵列上的模板(包括但不限于通过将核酸分子固定在固体载体上而形成的那些)进行测序。

[0158] 然而,用本公开的染料化合物标记的核苷酸在对成簇阵列进行测序的背景中是特别有利的。在成簇阵列中,阵列上的不同区域(通常称为位点或特征)包含多个多核苷酸模

板分子。一般来讲，所述多个多核苷酸分子不能通过光学手段单独地分辨，而是作为整体被检测到。取决于阵列的形成方式，阵列上的每个位点可以包含一个单独多核苷酸分子的多个拷贝(例如，该位点对于特定的单链核酸种类或双链核酸种类是同质的)或甚至少量不同多核苷酸分子的多个拷贝(例如，两个不同核酸种类的多个拷贝)。核酸分子的成簇阵列可以使用本领域中公知的技术产生。以举例的方式，WO 98/44151和WO 00/18957(这些专利各自以引用方式并入本文)均描述了扩增核酸的方法，其中模板和扩增产物均保持固定在固体载体上，以便形成由固定的核酸分子的簇或“集落”组成的阵列。根据这些方法制备的成簇阵列上存在的核酸分子是使用用本公开的染料化合物标记的核苷酸进行测序的合适模板。

[0159] 用本公开的染料化合物标记的核苷酸也可用于对单分子阵列上的模板进行测序。如本文所用的术语“单分子阵列”或“SMA”，是指分布(或排列)在固体载体上的多核苷酸分子群，其中任何单独的多核苷酸与该分子群的所有其他多核苷酸的间距使得有可能单独地分辨单独的多核苷酸分子。因此，在一些实施方案中，固定到固体载体的表面上的靶核酸分子能够通过光学手段分辨。这意味着一个或多个不同的信号(每个信号代表一种多核苷酸)将出现在所用的特定成像装置的可分辨区域内。

[0160] 可以实现单分子检测，其中阵列上的相邻多核苷酸分子之间的间距为至少100nm，更具体地讲至少250nm，还更具体地讲至少300nm，甚至更具体地讲至少350nm。因此，每个分子能够作为单分子荧光点来单独地分辨和检测，并且来自所述单分子荧光点的荧光也表现出单步光漂白。

[0161] 术语“单独分辨的”和“单独分辨”在本文中用于规定，当可视化时，有可能将阵列上的一个分子与其相邻分子区分开。阵列上各个分子之间的间隔将部分地通过用于分辨各个分子的特定技术来确定。通过参考公布的申请WO 00/06770和WO 01/57248将理解单分子阵列的一般特征，这些公布各自以引用方式并入本文。虽然本公开的标记的核苷酸的一种用途是用于合成测序反应，但此类核苷酸的效用却不限于此类方法。事实上，本文所述的标记的核苷酸可以有利地用于需要检测连接于掺入到多核苷酸中的核苷酸的荧光标记的任何测序方法。

[0162] 试剂盒

[0163] 本公开的一些方面涉及用于本文所述的蓝色/紫色双通道测序方法的试剂盒。在一些实施方案中，一种用于测序应用的试剂盒，其包括：

[0164] 用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸；

[0165] 用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸；以及

[0166] 用第一可检测标记和第二可检测标记标记的第三类型的核苷酸；

[0167] 其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；

[0168] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

[0169] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长，并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波

长。在一些实施方案中，第三类型的核苷酸是用第一可检测标记标记的第三类型的核苷酸和用第二可检测标记标记的第三类型的核苷酸的混合物。作为具体示例，试剂盒可包括用蓝色染料标记的dATP、包含生物素部分的dTTP、包含生物素部分的dCTP、用蓝色染料标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。

[0170] 在用于测序应用的试剂盒的第二方面，试剂盒包括：

[0171] 用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸；

[0172] 用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸；以及

[0173] 用第三可检测标记和第四可检测标记标记的第三类型的核苷酸；

[0174] 其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；

[0175] 其中第三可检测标记和第四可检测标记彼此为光谱上可区分的，第三可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第四可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；

[0176] 其中第一激发光源和第二激发光源中的一者具有约350nm至约410nm的波长，并且第一激发光源和第二激发光源中的另一者具有约450nm至约460nm的波长；并且

[0177] 其中第一发射滤光器和第二发射滤光器中的一者具有约415nm至约450nm的检测波长，并且第一发射滤光器和第二发射滤光器中的另一者具有约480nm至约525nm的检测波长。在一些实施方案中，第三类型的核苷酸是用第三可检测标记标记的第三类型的核苷酸和用第四可检测标记标记的第三类型的核苷酸的混合物。

[0178] 在本文所述的试剂盒的第三方面，一种或多种类型的核苷酸可以是未标记的。在一些情况下，一种用于测序应用的试剂盒，其包括：

[0179] 第一类型的未标记核苷酸；

[0180] 第二类型的未标记核苷酸；

[0181] 第三类型的未标记核苷酸；以及

[0182] 亲和试剂集合，其包含：特异性结合到第一类型的未标记核苷酸的第一亲和试剂；和特异性结合到第二类型的未标记核苷酸的第二亲和试剂；其中第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，该第一可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测，第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，该第二可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测，并且其中第一可检测标记与第二可检测标记为光谱上可区分的。在一些此类实施方案中，第一类型的核苷酸包含第一半抗原，并且第一亲和试剂包含特异性结合到第一半抗原的第一半抗原结合配偶体。在另外的实施方案中，第一半抗原包含生物素部分或由生物素部分组成，并且第一半抗原结合配偶体包含链霉亲和素或由链霉亲和素组成，其中链霉亲和素任选地通过可裂解的连接基与一个或多个第一可检测标记缀合。在一些另外的实施方案中，第二类型的核苷酸包含第二半抗原，并且第二亲和试剂包含特异性结合到第二半抗原的第二半抗原结合配偶体。在另外的实施方案中，第二半抗原包含氯烷基基团(例如，$-(CH_2)_6Cl$)并且第二半抗原结合配偶体包含HaloTag®或由HaloTag®组成，其中HaloTag®任选地通过可裂解的连接基与一种或多种第二可检测标

记缀合。在一些另外的实施方案中，第三类型的核苷酸包含第一半抗原和第二半抗原的混合物。另外的半抗原也可用于本文所述的未标记核苷酸中，包括但不限于地高辛和二硝基苯酚。对应的亲和试剂将含有抗地高辛结合配偶体或抗二硝基苯酚结合配偶体。在一些实施方案中，第一亲和试剂和第二亲和试剂两者特异性结合到第三类型的未标记核苷酸。在其他实施方案中，该亲和试剂集合还包含特异性结合到第三类型的核苷酸的第三亲和试剂，并且其中第三亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记和一个或多个第四可检测标记，该第三可检测标记可由第一激发光源激发并且可由第一发射滤光器检测，该第四可检测标记可由第二激发光源激发并且可由第二发射滤光器检测。在一些此类实施方案中，第三类型的核苷酸包含第一半抗原，并且第三亲和试剂包含第三半抗原结合配偶体。在另外的实施方案中，第三亲和试剂包含包含第三半抗原结合配偶体和一个或多个第三可检测标记的第三亲和试剂以及包含第三半抗原结合配偶体和一个或多个第四可检测标记的第三亲和试剂的混合物。

[0183] 在用于测序应用的试剂盒的第四方面，试剂盒包括：

[0184] 未标记或用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸；

[0185] 未标记或用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸，其中第一类型的核苷酸和第二类型的核苷酸中的一者是未标记的；

[0186] 第三类型的未标记核苷酸，以及用与第一类型的核苷酸或第二类型的核苷酸相同的可检测标记标记的第三类型的核苷酸，其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，第一可检测标记可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第二可检测标记可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；以及

[0187] 亲和试剂，其包含第一亲和试剂或第二亲和试剂，该第一亲和试剂特异性结合到第三类型的未标记核苷酸和在第一类型的核苷酸是未标记的情况下的第一类型的核苷酸，该第二亲和试剂特异性结合到第三类型的未标记核苷酸和在第二类型的核苷酸是未标记的情况下的第二类型的核苷酸，其中第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，并且第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记。在一些实施方案中，第一类型的核苷酸是未标记的，第二类型的核苷酸用第二可检测标记标记，第三类型的核苷酸是未标记的和用第二可检测标记标记的，并且亲和试剂是特异性结合到第一类型的核苷酸和第三类型的未标记核苷酸的第一亲和试剂，并且其中第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记。在其他实施方案中，第一类型的核苷酸用第一可检测标记标记，第二类型的核苷酸是未标记的，第三类型的核苷酸是未标记的和用第二可检测标记标记的，并且亲和试剂是特异性结合到第二类型的核苷酸和第三类型的未标记核苷酸的第二亲和试剂，并且其中第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记。在另外的实施方案中，当第一类型的核苷酸或第二类型的核苷酸是未标记的时，此类未标记核苷酸独立地包含半抗原。在另外的实施方案中，亲和试剂包含特异性结合到未标记核苷酸中的半抗原的半抗原结合配偶体。在一个示例中，半抗原包含生物素部分，并且半抗原结合配偶体包含链霉亲和素。此类链霉亲和素任选地通过可裂解的连接基与一个或多个第一可检测标记缀合。在另一个示例中，半抗原包含氯烷基基团，并且半抗原结合配偶体包含HaloTag®。HaloTag®任选地通过可裂解的连接基与一个或多个第二可检测标记缀合。

[0188] 作为本文所述的试剂盒的第四方面的替代方案，试剂盒可包括：

[0189] 未标记或用第一可检测标记标记的第一类型的核苷酸；

[0190] 未标记或用第二可检测标记标记的第二类型的核苷酸，其中第一类型的核苷酸和第二类型的核苷酸中的一者是未标记的；

[0191] 第三类型的核苷酸，其可包括：(i)当第二类型的核苷酸是未标记的时，未标记的第三类型的核苷酸和用第三可检测标记标记的第三类型的核苷酸的混合物；或(ii)当第一类型核苷酸是未标记的时，未标记的第三类型的核苷酸和用第四可检测标记标记的第三类型的核苷酸的混合物；

[0192] 其中第一可检测标记和第二可检测标记彼此为光谱上可区分的，第一可检测标记和第三可检测标记均可由第一光源激发并且可由第一发射滤光器检测，并且第二可检测标记和第四可检测标记两者均可由第二光源激发并且可由第二发射滤光器检测；以及

[0193] 亲和试剂集合，其可包括：(iii)当第一类型的核苷酸是未标记的时，特异性结合到第一类型的核苷酸的第一亲和试剂以及特异性结合到第三类型的未标记核苷酸的第三亲和试剂的混合物；或(iv)当第二类型的核苷酸是未标记的时，特异性结合到第二类型的核苷酸的第二亲和试剂以及特异性结合到第三类型的未标记核苷酸的第三亲和试剂的混合物；

[0194] 其中在(iii)中所述的混合物中，第一亲和试剂包含一个或多个第一可检测标记，并且第三亲和试剂包含一个或多个第三可检测标记；并且

[0195] 其中在(iv)中所述的混合物中，第二亲和试剂包含一个或多个第二可检测标记，并且第三亲和试剂包含一个或多个第四可检测标记。

[0196] 在本文所述的试剂盒的任何实施方案中，试剂盒可还包括第四类型的核苷酸，并且其中第四类型的核苷酸是未标记的(暗色)。另外，本文公开的蓝色和紫色染料中的任一种可以用作本部分中描述的核苷酸或亲和试剂的第一标记或第二标记。

[0197] 作为一个具体示例，试剂盒可包括以下核苷酸集合：用蓝色染料A标记的dATP、用紫色染料B标记的dTTP、用蓝色染料A标记的dCTP、用紫色染料B标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。

[0198] 作为另一具体示例，试剂盒可包括以下核苷酸集合：用蓝色染料A标记的dATP、用紫色染料B标记的dTTP、用蓝色染料C标记的dCTP、用紫色染料D标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。

[0199] 作为另一具体示例，试剂盒可包括以下核苷酸集合：用蓝色染料A标记的dATP、包含生物素部分的dTTP、包含生物素部分的dCTP、用蓝色染料A标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。另外，试剂盒可还包括亲和试剂，该亲和试剂包含用一个或多个紫色染料B任选地通过可裂解的连接基标记的链霉亲和素。

[0200] 作为另一具体示例，试剂盒可包括以下核苷酸集合：用蓝色染料A标记的dATP、包含为生物素部分的第一半抗原的dTTP、包含第二半抗原部分的dCTP、用蓝色染料B标记的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。另外，试剂盒可还包括亲和试剂集合，其包含与一个或多个紫色染料C缀合的链霉亲和素和与一个或多个紫色染料D缀合的第二半抗原结合配偶体，各自任选地通过可裂解的连接基缀合。

[0201] 在又另一个示例中，试剂盒可包括以下核苷酸集合：包含氯烷基基团(例如-$(CH_2)_6Cl$)的dATP、包含生物素部分的dTTP、包含生物素部分的dCTP、包含氯烷基基团的dCTP和未

标记的dGTP(暗色G)。试剂盒可还包括第一亲和试剂,该第一亲和试剂包含用一个或多个紫色染料任选地通过可裂解的连接基标记的链霉亲和素。试剂盒可还包括第二亲和试剂,该第二亲和试剂包含用一个或多个蓝色染料任选地通过可裂解的连接基标记的HaloTag®。

[0202] 在又另一个示例中,试剂盒可包括以下核苷酸集合:包含有包含氯烷基基团(例如,-$(CH_2)_6Cl$)的第一半抗原的dATP、包含有包含生物素部分的第二半抗原的dTTP、包含第三半抗原的dCTP和未标记的dGTP(暗色G)。试剂盒可还包括第一亲和试剂,该第一亲和试剂包含用一个或多个紫色染料B任选地通过可裂解的连接基标记的链霉亲和素。试剂盒可还包括第二亲和试剂,该第二亲和试剂包含用一个或多个蓝色染料A任选地通过可裂解的连接基标记的HaloTag®。试剂盒可还包括第三亲和试剂,该第三亲和试剂包含第三半抗原结合配偶体和一个或多个蓝色染料C。试剂盒可还包括第三亲和试剂,该第三亲和试剂包含第三半抗原结合配偶体和一个或多个紫色染料D。

[0203] 在本文所述的试剂盒的一些实施方案中,第一激发光源具有约350nm到约410nm(例如,约405nm)的波长,并且第一发射滤光器具有约415nm到约450nm的检测波长。第二激发光源具有约450nm到约460nm(例如,约460nm)的波长,并且第二发射滤光器具有约480nm到约525nm的检测波长。在一些其他实施方案中,第一激发光源具有约450nm到约460nm(例如,约460nm)的波长,并且第一发射滤光器具有约480nm到约525nm的检测波长。第二激发光源具有约350nm到约410nm(例如,约405nm)的波长,并且第二发射滤光器具有约415nm到约450nm的检测波长。

[0204] 除了上文所述的示例之外,试剂盒还可包括至少一种另外的组分。所述另外的组分可以是在本文示出的方法中或在下文的实施例部分中识别的组分中的一种或多种组分。可以结合到本公开的试剂盒中的组分的一些非限制性示例在下文示出。在一些实施方案中,试剂盒还包括DNA聚合酶(诸如突变DNA聚合酶)和一种或多种缓冲液组合物。试剂盒还可包括一种或多种本文所述的抗氧化剂和/或ROS清除剂。抗氧化剂和/或ROS清除剂可以是在缓冲溶液或缓冲液组合物中,该缓冲溶液或缓冲液组合物可以用于保护DNA(靶多核苷酸和/或引物多核苷酸)和染料免于在检测期间的光损伤。另外的缓冲液组合物可包含可用于裂解3'羟基封端基团和/或可裂解的连接基的试剂。例如,水溶性膦或由过渡金属和至少部分水溶性配体形成的水溶性过渡金属催化剂,诸如钯络合物。试剂盒的各种组分可以浓缩形式提供以在使用前稀释。在此类实施方案中,还可以包括合适的稀释缓冲液。在另外的实施方案中,试剂盒可包括一种或多种固体载体。在一些此类实施方案中,固体载体可包含固定在其上的多个寡核苷酸。在一些实施方案中,固体载体包括流通池,例如包括多个纳米孔的图案化流通池。

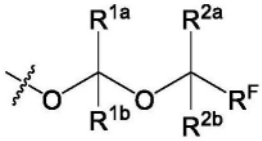
[0205] 在本文所述的试剂盒的一些实施方案中,可检测标记(例如蓝色染料和紫色染料)可经由核苷酸碱基共价连接到核苷酸。在一些此类实施方案中,标记的核苷酸可以具有任选地通过连接基部分连接到嘧啶碱基的C5位置或7-脱氮嘌呤碱基的C7位置的染料。例如,核碱基可以是7-脱氮腺嘌呤,并且染料任选地通过连接基连接到7-脱氮腺嘌呤的C7位置处。核碱基可以是7-脱氮鸟嘌呤,并且染料任选地通过连接基连接到7-脱氮鸟嘌呤的C7位置处。核碱基可以是胞嘧啶,并且染料任选地通过连接基连接到胞嘧啶的C5位置处。作为另一示例,核碱基可以是胸腺嘧啶或尿嘧啶,并且染料任选地通过连接基连接到胸腺嘧啶或

尿嘧啶的C5位置处。在本文所述的核苷酸或核苷酸缀合物的任何实施方案中，核苷酸或核苷酸缀合物可以含有3'羟基封端基团。在其他实施方案中，当核苷酸是未标记的并且使用二级标记方法时，一个或多个蓝色染料或紫色染料可以任选地通过可裂解的连接基与本文所述的亲和试剂缀合。例如，一种链霉亲和素可以用相同紫色染料的两个、三个、四个、五个或六个分子来标记，以增加待检测的掺入核苷酸的荧光强度。

[0206] 在本文所述的方法和试剂盒的任何实施方案中，当标记被描述为可由光源激发并且可由发射滤光器检测时，其还是指与可由此类光源激发并且可由此类发射滤光器检测的此类标记缀合(直接标记或通过亲和试剂二级标记)的核苷酸。

[0207] 3'羟基封端基团

[0208] 在本文所述的方法和试剂盒的任何实施方案中，在掺入混合物中使用的核苷酸可以具有与核苷酸的核糖或脱氧核糖共价连接的封端基团。在特定实施方案中，该封端基团位于核苷酸的脱氧核糖的3′-OH位置处。在WO 2004/018497和WO 2014/139596中公开了各种3'OH封端基团，这些专利以引用方式并入本文。例如，封端基团可以为叠氮甲基(-CH_2N_3)或取代的叠氮甲基(例如，-$CH(CHF_2)N_3$或$CH(CH_2F)N_3$)、或连接至核糖或脱氧核糖部分的3′氧原子的烯丙基。在一些实施方案中，3'封端基团为叠氮甲基，与核糖或脱氧核糖的3'碳形成3′-OCH_2N_3。

[0209] 在一些其他实施方案中，3'封端基团和3'氧原子形成共价连接到核糖或脱氧核糖的3'碳的结构的缩醛基团，其中：

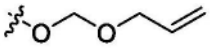
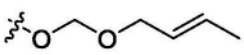
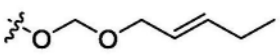
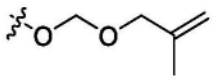
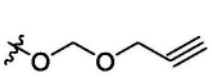
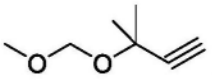
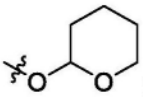
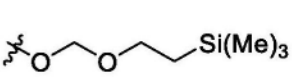
[0210] R^{1a}和R^{1b}各种独立地为H、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、C_1-C_6烷氧基、C_1-C_6卤代烷氧基、氰基、卤素、任选地取代的苯基或任选地取代的芳烷基；

[0211] R^{2a}和R^{2b}各种独立地为H、C_1-C_6烷基、C_1-C_6卤代烷基、氰基或卤素；

[0212] 替代地，R^{1a}和R^{2a}与其所连接的原子一起形成任选地取代的五至八元杂环基基团；

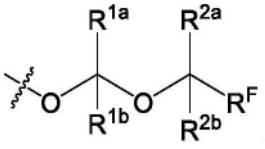
[0213] R^F为H、任选地取代的C_2-C_6烯基、任选地取代的C_3-C_7环烯基、任选地取代的C_2-C_6炔基或任选地取代的(C_1-C_6亚烷基)$Si(R^{3a})_3$；并且

[0214] 每个R^{3a}独立地为H、C_1-C_6烷基或任选地取代的C_6-C_{10}芳基。

[0215] 附加的3'OH封端基团公开于美国公布第2020/0216891A1号中，该公布全文以引用方式并入本文。缩醛封端基团的非限制性示例为(AOM)、、、、、、和，各自共价连接到核糖或脱氧核糖的3'碳。

[0216] 3'羟基封端基团的脱保护

[0217] 在一些实施方案中，可以通过使用水溶性膦试剂去除或脱保护叠氮甲基3'羟基保护基团。非限制性示例包括三(羟甲基)膦(THMP)、三(羟乙基)膦(THEP)或三(羟丙基)膦(THP或THPP)。本文所述的3'-缩醛封端基团可以在各种化学条件下去除或裂解。对于含有

乙烯基或烯基部分的缩醛封端基团非限制性裂解条件包括在膦配体，例如三(羟甲基)膦(THMP)或三(羟丙基)膦(THP或THPP)的存在下的Pd(II)络合物，诸如Pd(OAc)$_2$或烯丙基氯化Pd(II)二聚体。对于含有炔基基团(例如，乙炔基)的那些封端基团，其也可以通过在膦配体(例如，THP或THMP)的存在下的Pd(II)络合物(例如，Pd(OAc)$_2$或烯丙基氯化Pd(II)二聚体)去除。

[0218] 钯裂解试剂

[0219] 在一些实施方案中，本文所述的3′羟基封端基团可以被钯催化剂裂解。在一些此类实施方案中，Pd催化剂是水溶性的。在一些此类实施方案中，为Pd(0)络合物(例如，三(3,3',3"-次膦基三(苯磺酸基)钯(0)九钠盐九水合物)。在一些情况下，Pd(0)络合物可以通过试剂诸如烯烃、醇、胺、膦或金属氢化物还原Pd(II)络合物而原位生成。合适的钯源包括Na_2PdCl_4、$Pd(CH_3CN)_2Cl_2$、$(PdCl(C_3H_5))_2$、$[Pd(C_3H_5)(THP)]Cl$、$[Pd(C_3H_5)(THP)_2]Cl$、$Pd(OAc)_2$、$Pd(Ph_3)_4$、$Pd(dba)_2$、$Pd(Acac)_2$、$PdCl_2(COD)$和$Pd(TFA)_2$。在一个此类实施方案中，Pd(0)络合物由Na_2PdCl_4原位产生。在另一个实施方案中，钯源是烯丙基氯化钯(II)二聚体$[(PdCl(C_3H_5))_2]$。在一些实施方案中，Pd(0)络合物通过将Pd(II)络合物与膦混合而在水溶液中产生。合适的膦包括水溶性膦，诸如三(羟丙基)膦(THP)、三(羟甲基)膦(THMP)、1,3,5-三氮杂-7-磷杂金刚烷(PTA)、双(对磺酸基苯基)苯基膦二水合物钾盐、三(羧乙基)膦(TCEP)和三苯基膦-3,3',3'-三磺酸三钠盐。

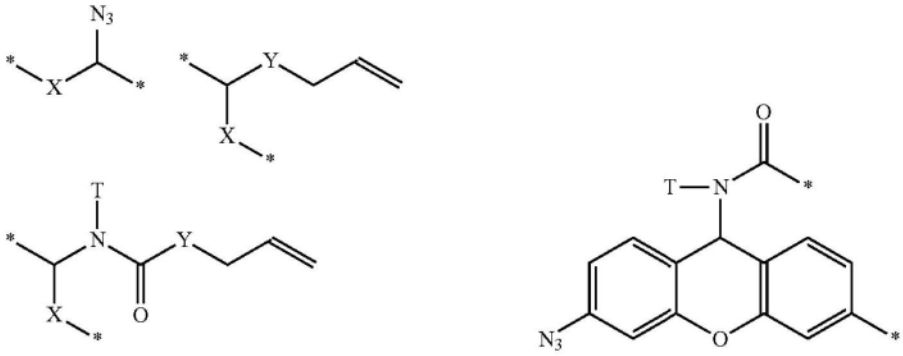
[0220] 在一些实施方案中，Pd(0)通过将Pd(II)络合物$[(PdCl(C_3H_5))_2]$与THP原位混合来制备。Pd(II)络合物和THP的摩尔比可以为约1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9或1:10。在一些另外的实施方案中，可以添加一种或多种还原剂，诸如抗坏血酸或其盐(例如，抗坏血酸钠)。在一些实施方案中，裂解混合物可以含有另外的缓冲液试剂，诸如伯胺、仲胺、叔胺、碳酸盐、磷酸盐或硼酸盐，或它们的组合。在一些另外的实施方案中，缓冲液试剂包括乙醇胺(EA)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、甘氨酸、碳酸钠、磷酸钠、硼酸钠、2-二甲基乙醇胺(DMEA)、2-二乙基乙醇胺(DEEA)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)或N,N,N',N'-四乙基乙二胺(TEEDA)或它们的组合。在一个实施方案中，缓冲剂是DEEA。在另一个实施方案中，缓冲剂含有一种或多种无机盐，诸如碳酸盐、磷酸盐或硼酸盐，或它们的组合。在一个实施方案中，无机盐为钠盐。

[0221] 连接基

[0222] 荧光标记可以经由可裂解的连接基共价连接到核苷酸。使用术语"可裂解的连接基"并不意在暗示需要除去整个连接基。裂解位点可以位于连接基上确保该连接基的一部分在裂解后保持连接到染料和/或底物部分的某个位置处。以非限制性示例的方式，可裂解的连接基可以是亲电可裂解的连接基、亲核可裂解的连接基、可光裂解的连接基、在还原条件下可裂解的(例如含有二硫化物或叠氮化物的连接基)、在氧化条件下可裂解的、通过使用安全捕获连接基可裂解的，以及通过消除机制可裂解的。使用可裂解的连接基将染料化合物连接到底物部分确保了如果需要的话，可以在检测后移除标记，从而避免下游步骤中的任何干扰信号。

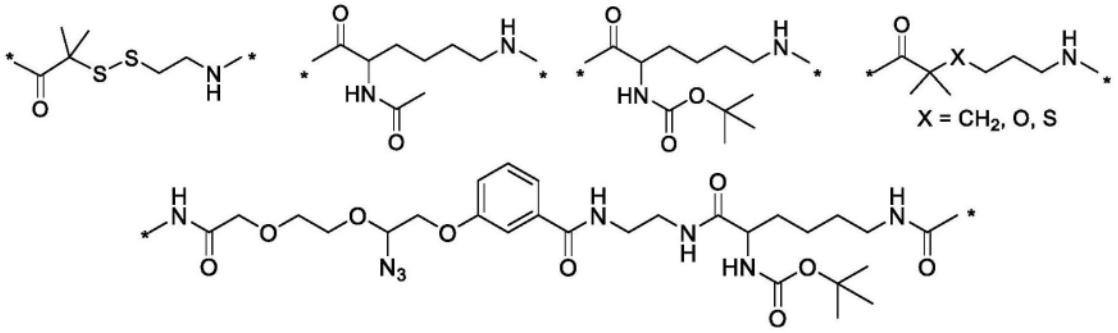
[0223] 可用的连接基基团可以见于PCT公布第WO 2004/018493号(以引用方式并入本文)中,其示例包括可以使用水溶性膦或由过渡金属和至少部分水溶性的配体形成的水溶性过渡金属催化剂裂解的连接基。在水性溶液中,后者形成至少部分水溶性的过渡金属络合物。此类可裂解的连接基可以用于将核苷酸的碱基连接到标记,诸如本文所示的染料。

[0224] 特定的连接基包括PCT公布第WO 2004/018493号(以引用方式并入本文)中所公开的那些,诸如包括下式的部分的那些:

[0225] 

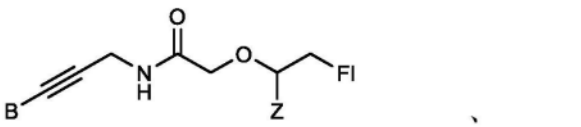
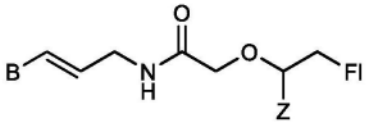
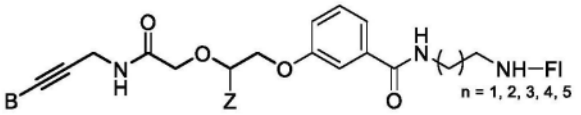
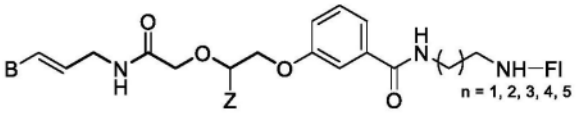
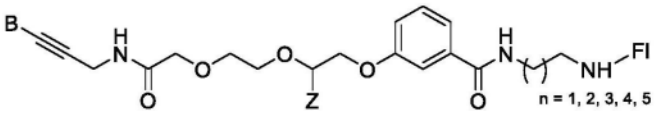
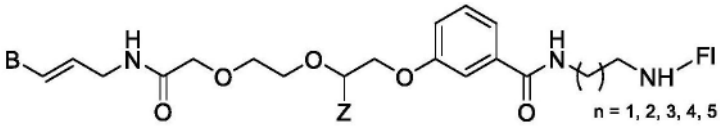
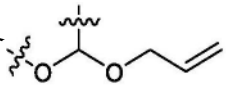
[0226] (其中X选自包括O、S、NH和NQ的组,其中Q为C1-10取代或未取代的烷基基团,Y选自包括O、S、NH和N(烯丙基)的组,T为氢或C_1-C_{10}取代或未取代的烷基基团,并且*指示该部分与核苷酸的其余部分连接的位置)。在一些方面,连接基将核苷酸的碱基连接至标记。

[0227] 连接基的附加示例包括美国公开2016/0040225(以引用方式并入本文)中所公开的那些,诸如包括下式的部分的那些:

[0228] 

[0229] (其中*指示该部分与核苷酸的其余部分连接的位置)。本文所展示的连接基部分可以包括核苷酸与标记之间的全部或部分连接基结构。本文所展示的连接基部分可以包括核苷酸与标记之间的全部或部分连接基结构。

[0230] 连接基的附加示例包括下式的部分:

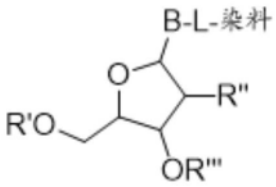
[0231] 、、、、、或其中B是核碱基;Z是-N_3(叠氮基)、-O-C_1-C_6烷基、-O-C_2-C_6烯基或-O-C_2-C_6炔基;并且F1包括染料部分,所述染料部分可以含有另外的连接基结构。本领域普通技术人员理解,本文所述的染料化合物通过使染料化合物的官能团(例如,羧基)与连接基的官能团(例如,氨基)反应而共价键合到连接基。在一个实施方案中,可裂解连接基包含("AOL"连接基部分),其中Z为-O-烯丙基。

[0232] 染料可以例如通过连接基附接到核苷酸碱基上的任何位置。在特定实施方案中,仍然可以对所得的类似物进行Watson-Crick碱基配对。特定的核碱基标记位点包括嘧啶碱基的C5位置或7-脱氮嘌呤碱基的C7位置。

[0233] 在一些实施方案中,当核苷酸在掺入时是未标记的并且依赖于将可检测标记添加到延伸的引物多核苷酸中的亲和试剂时,未标记的核苷酸仍可包含用于连接半抗原的可裂解的连接基。当使用二级标记方法来使用亲和试剂将标记添加到延伸的引物多核苷酸/靶多核苷酸复合物时,本文所述的可裂解的连接基还可用于将染料连接到亲和试剂。

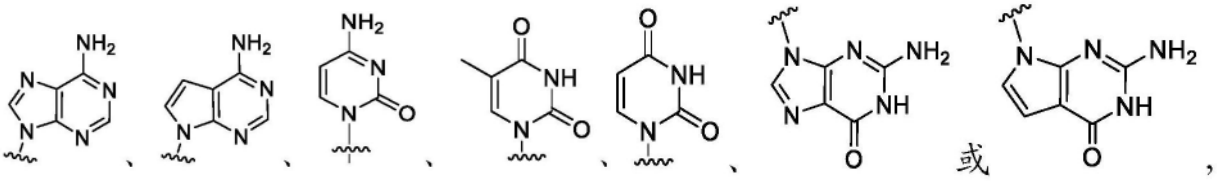
[0234] 标记的核苷酸

[0235] 用本文所述的染料标记的核苷酸可以具有下式:

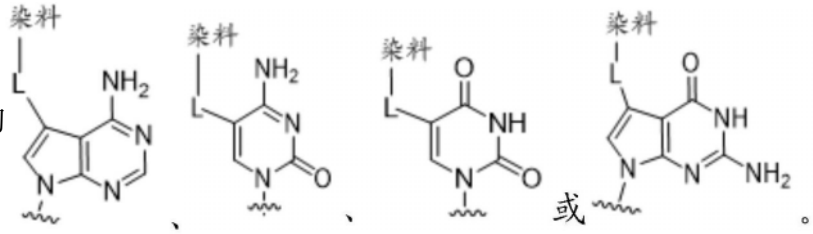
[0236] 

[0237] 其中染料是本文所述的染料化合物(标记)部分(在染料的官能团与连接基"L"的官能团之间共价键合之后);B为核碱基,诸如尿嘧啶、胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤等;L为可以存在或可以不存在的任选的连接基;R'可以为H,或-OR'为单磷酸根、二磷酸根、三磷酸根、硫代磷酸根、磷酸酯类似物、连接至反应性含磷基团的-O-,或者被封端基团保护的-O-;R"是H或OH;并且R"'是H、本文所述的3'OH封端基团,或-OR"'形成亚磷酰胺。其中-OR"'为亚磷酰胺,R'为酸可裂解的羟基保护基团,其允许随后

在自动化合成条件下进行单体偶联。在一些另外的实施方案中,B包括



或它们的任选地取代的衍生物和类似物。在一些另外的实施方案中,标记的核碱基包括结构



[0238] 在一个特定实施方案中,封端基团是与染料化合物分开的并且独立于染料化合物,即,不与后者连接。替代性地,染料可以包含3'OH封端基团的全部或部分。因此,R"'可以为可以构成或可以不构成染料化合物的3'OH封端基团。

[0239] 在又一个替代性的实施方案中,戊糖的3'碳上不存在封端基团,并且连接到碱基的染料(或染料和连接基构造)例如可以具有足以充当掺入另外的核苷酸的障碍的尺寸或结构。因此,该障碍可以归因于空间位阻或可以归因于尺寸、电荷和结构的组合,无论染料是否连接到糖的3′位置。

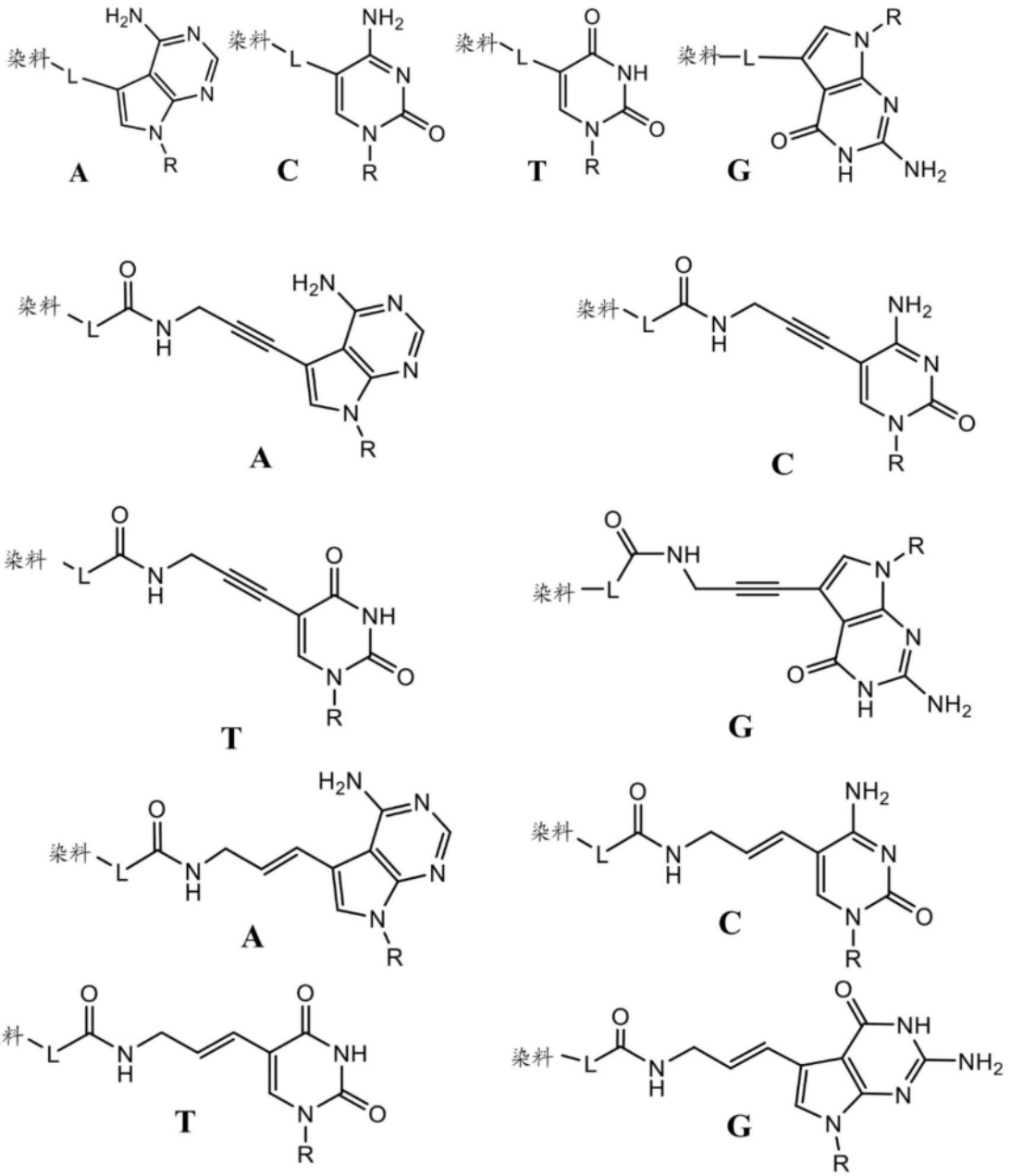
[0240] 在又另一个替代性实施方案中,该封端基团存在于戊糖的2'或4'碳上,并且可以具有足以充当掺入另外的核苷酸的障碍的尺寸或结构。

[0241] 在一些实施方案中,连接基(在染料和核苷酸之间)和封端基团均存在并且为单独的部分。在特定实施方案中,连接基和封端基团在相同或基本上类似的条件下都是可裂解的。因此,脱保护和脱封闭过程可能更有效,因为只需要单一处理就可以除去染料化合物和封闭基团这两者。然而,在一些实施方案中,连接基和封端基团不需要可在类似条件下裂解,而是可在不同条件下单独裂解。

[0242] 本公开还涵盖掺入了染料化合物的多核苷酸。此类多核苷酸可以为分别由以磷酸二酯键接合的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸组成的DNA或RNA。多核苷酸可以包含与如本文示出的至少一种经修饰的核苷酸(例如,用染料化合物标记)组合的天然存在的核苷酸、除本文所述的标记的核苷酸之外的非天然存在的(或经修饰的)核苷酸或它们的任何组合。根据本公开的多核苷酸还可以包括非天然的骨架键和/或非核苷酸化学修饰。还设想了由包含至少一种标记的核苷酸的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的混合物组成的嵌合结构。

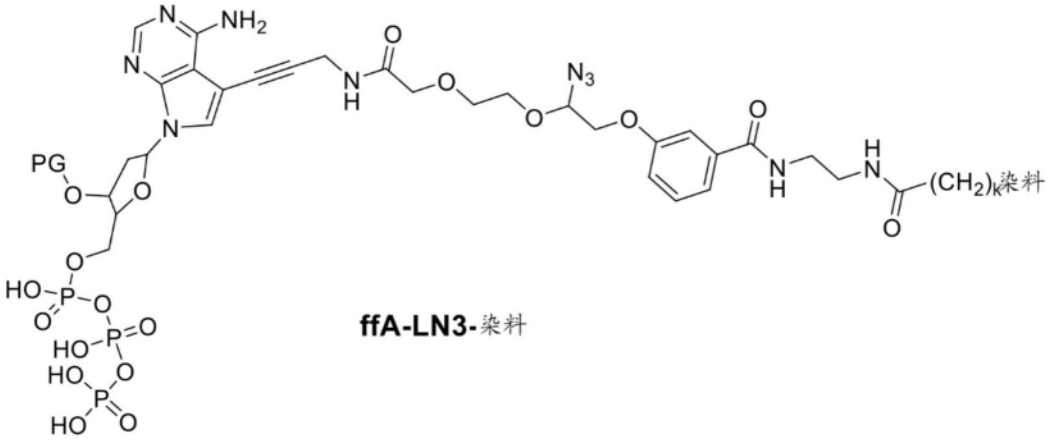
[0243] 如本文所述的非限制性示例性标记核苷酸缀合物包括:

[0244]



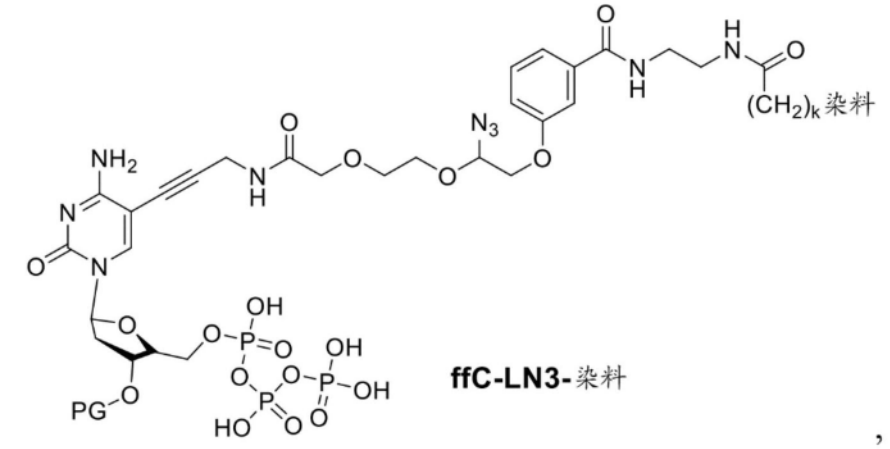
[0245] 其中L表示连接基，并且R表示如上所述的核糖或脱氧核糖部分，或具有被单磷酸、二磷酸或三磷酸取代的5'位置的核糖或脱氧核糖部分。

[0246] 在一些实施方案中，包含可裂解的连接基和荧光部分的非限制性示例性完全官能化核苷酸缀合物如下所示：

[0247] 

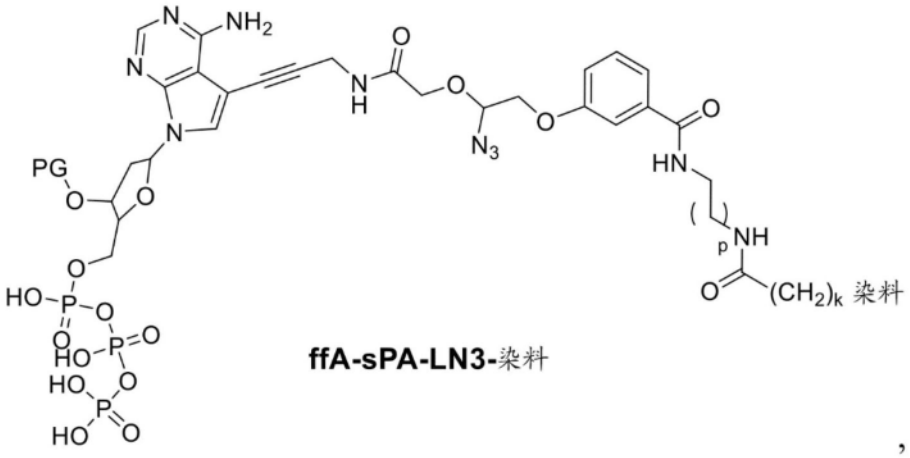
ffA-LN3-染料

,



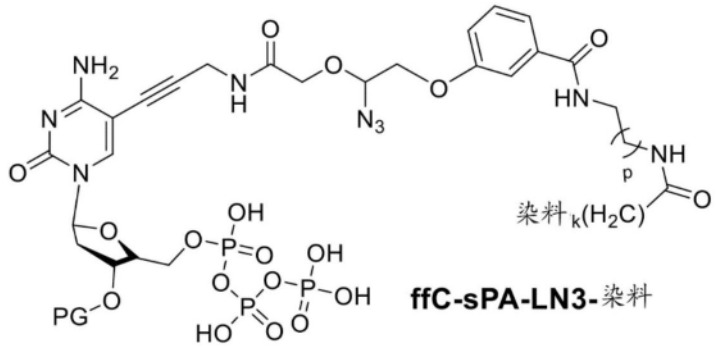
ffC-LN3-染料

，



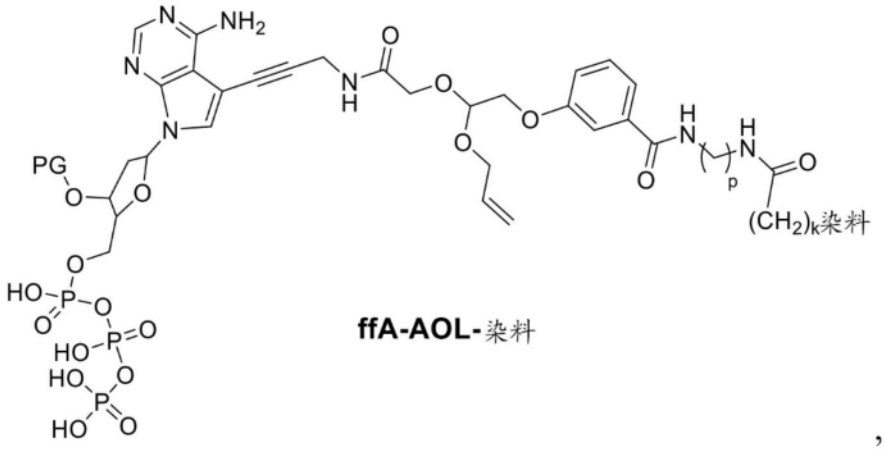
ffA-sPA-LN3-染料

[0248] ，



ffC-sPA-LN3-染料

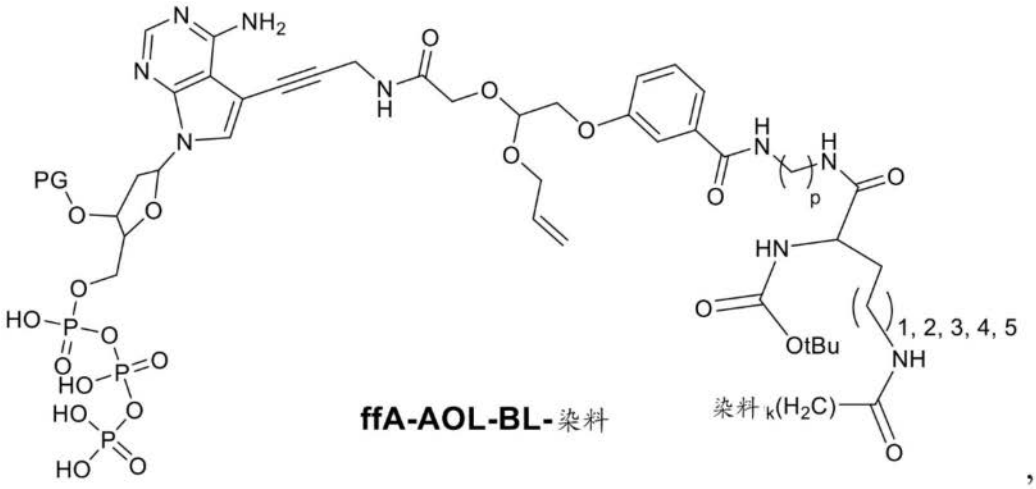
，



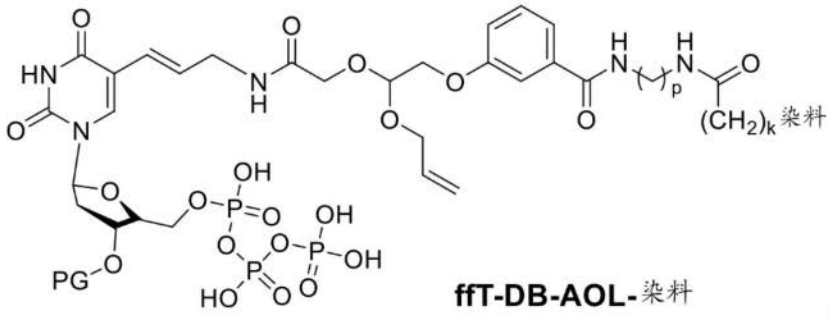
ffA-AOL-染料

，

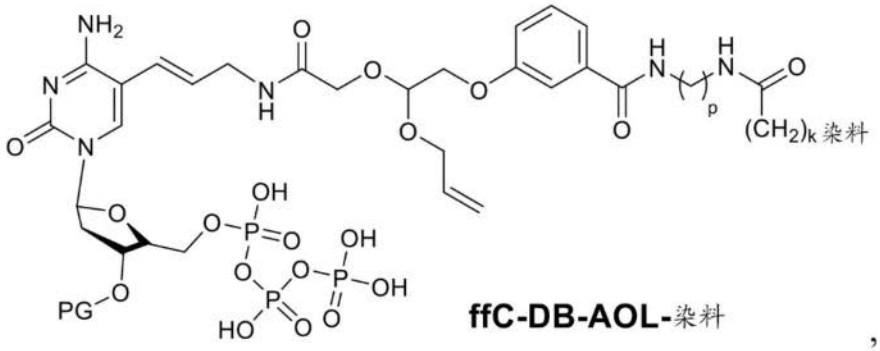
[0249]



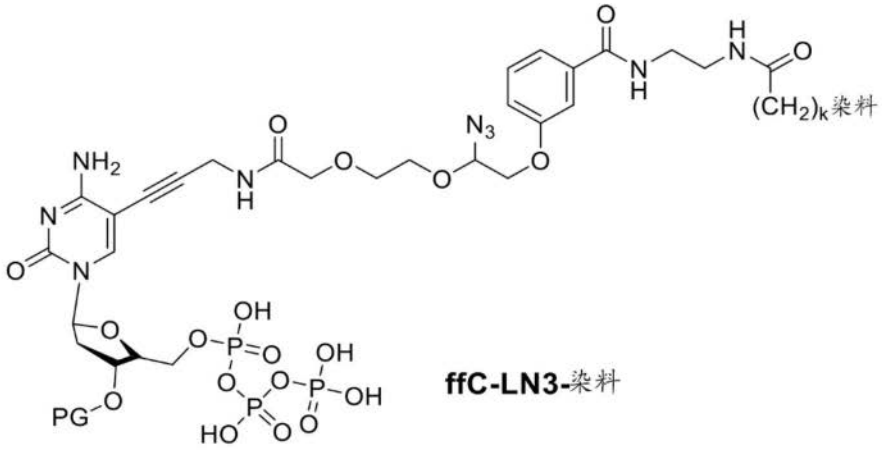
,



,

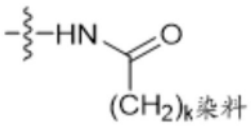


,



,

[0250] 其中PG代表本文所述的3'OH封端基团;p为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数;并且k为0、1、2、3、4或5。在一个实施方案中,-O-PG是AOM。在另一个实施方案中,-O-PG为-O-叠氮甲基。在一个实施方案中,k为5。在一些另外的实施方案中,p为1、2或3;并且k为5。



是指作为连接基部分的氨基基团与染料(即,本文所述的蓝色染料或紫色染料)的羧基基团之间的反应结果的染料与可裂解的连接基的连接点。在本文所述的标记的核苷酸的任何实施方案中,核苷酸为核苷酸三磷酸。替代性地,当ffN是未标记的时,染料部分可以用功能性部分(例如,半抗原)取代,该官能部分可以使得未标记核苷酸与本文所述的亲和试剂结合。

[0251] 实施例

[0252] 在以下实施例中更详细地公开了附加的实施方案,这些实施例并非旨在以任何方式限制权利要求书的范围。

[0253] 实施例1.评估使用在405nm处的紫光辐照的DNA光损伤

[0254] 在此实施例中,评估由405nm处的紫光引起的DNA受损。在紫色LED下将Tris缓冲液(pH=8,100mM)中的单链DNA辐照2小时,其共价连接到紫色染料DY405或在缓冲液中存在DY405。观察到当DY405共价连接到DNA的5'末端时,与当将DNA与DY405在缓冲溶液中混合时相比,由辐照引起的对DNA的光损伤基本上增加。结果示出于图1中。

[0255] 实施例2.使用蓝色/紫色双通道MiSeq®系统通过合成测序

[0256] 在此实施例中,在配置为2通道蓝色/紫色的MiSeq®仪器上进行合成测序。使用标准测序试剂。表1中汇总了用于标准SBS的掺入混合物。这些数据中呈现的测序文库是PhiX。

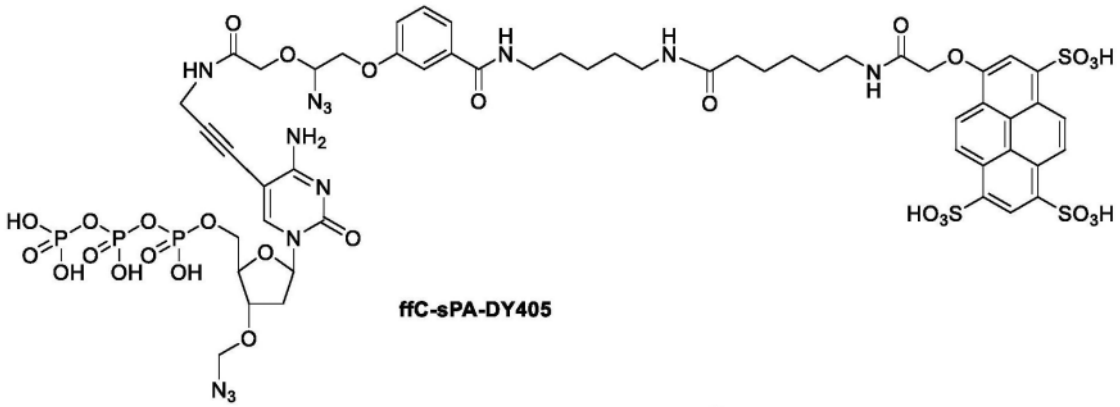
[0257] 对于标准SBS掺入混合物,所用的紫色染料是DY405。ffT和ffC二者均用DY405标记。蓝色染料A用于标记ffA和ffC。还引入绿色ffN,以减少紫色通道和蓝色通道中的信号强度,以便获得具有用于事后分析的优选形状的方形散点图。ffG是未标记的("暗色G")。掺入混合物中的核苷酸结构如下所示。通过使用标准ffN偶合反应通过使pppC-sPA-NH_2或pppT-LN3-NH_2与Dy405-NHS(5mg)反应来制备ffC-sPA-DY405和ffT-LN3-DY405。

[0258] 表1.标准SBS掺入混合物组合物

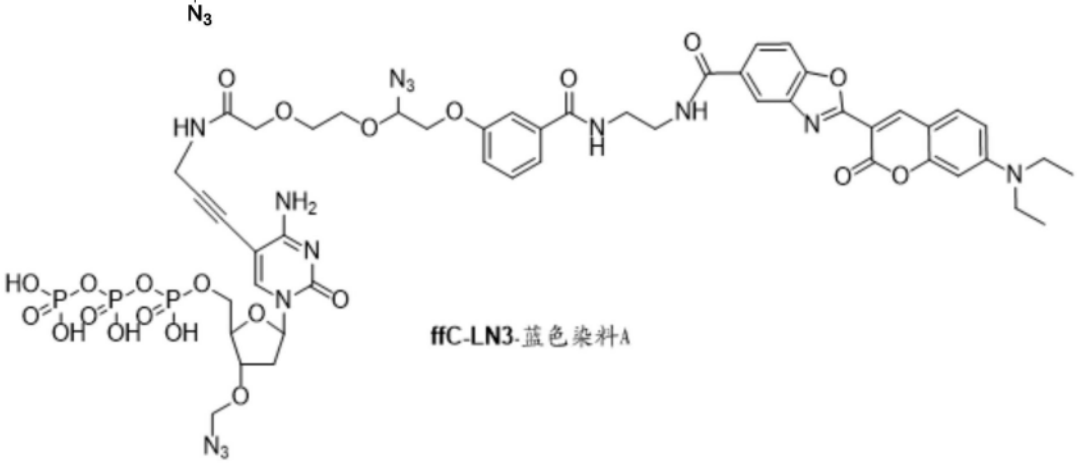
[0259]

ffN	核苷酸标记
ffG	暗色(未标记)
ffC	蓝色染料A(香豆素染料)
ffC	DY405
ffT	DY405
ffT	NR550S0(绿色染料)
ffA	蓝色染料A(香豆素染料)
ffA	NR550S0(绿色染料)

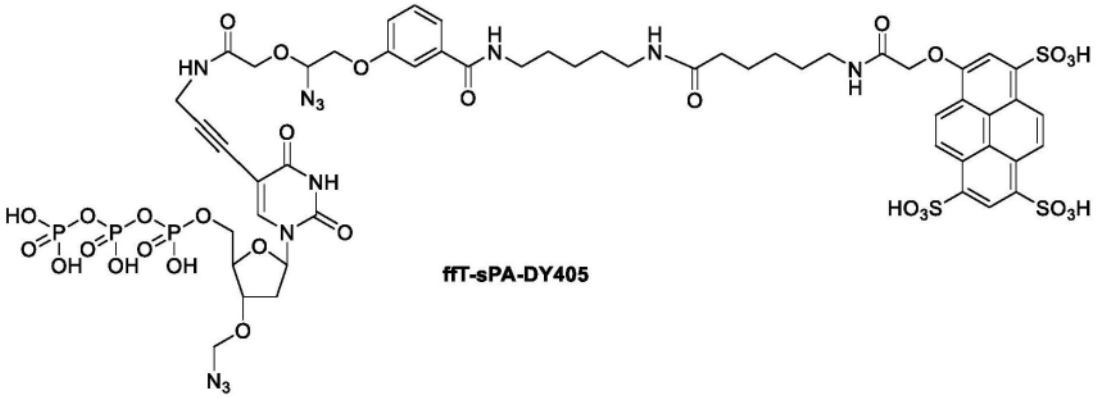
[0260]



ffC-sPA-DY405

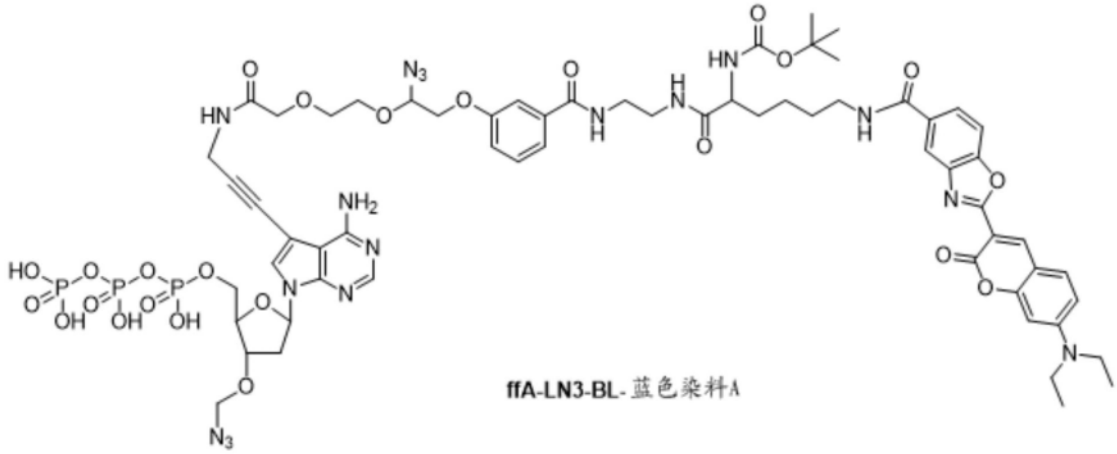


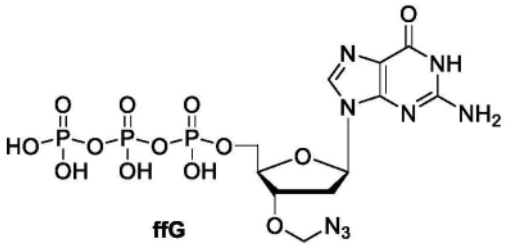
ffC-LN3-蓝色染料A



ffT-sPA-DY405

[0261]





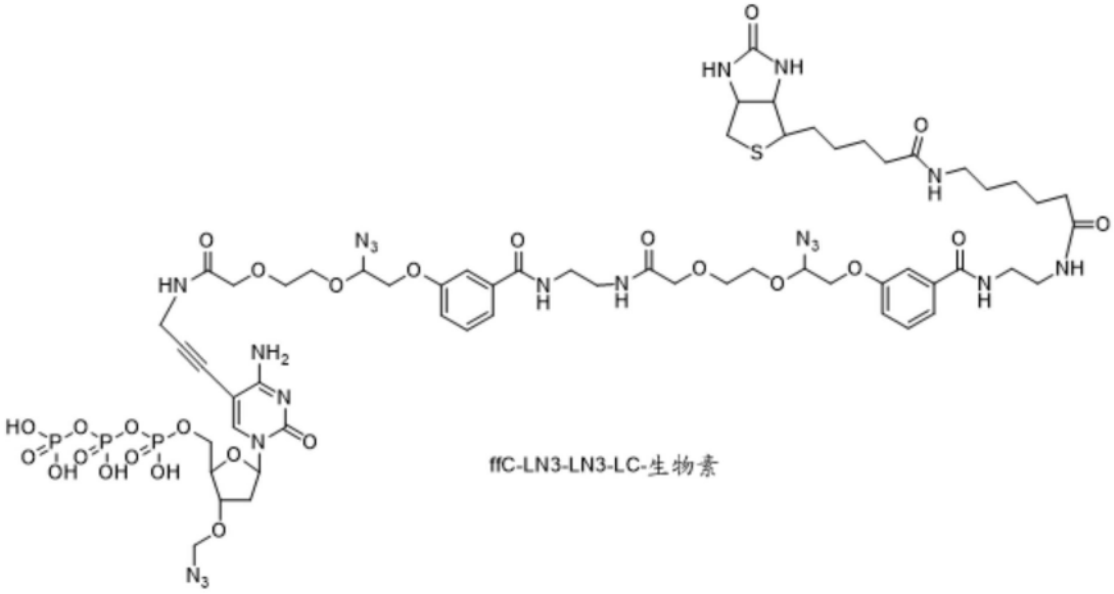
[0262] DY405标记的链霉亲和素的制备。首先，通过使DY405与N,N,N',N'-四甲基-O-(N-琥珀酰亚胺基)脲鎓四氟硼酸盐(1.5当量)在Hunig碱和TSTU存在下在无水DMA中反应30分钟，将DY405转化为DY405-NHS。其次，将链霉亲和素粉末溶解于水和$NaHCO_3$缓冲液中。将由第一步骤制备的DY405-NHS转移到链霉亲和素溶液中并在室温下温育1小时，偶尔混合。然后将5M NaCl溶液添加到反应混合物中。通过使用Thermo Fisher Dye去除柱去除过量染料来纯化反应产物。反应产物的量化显示最终染料/蛋白质比率为约3.1至3.4。

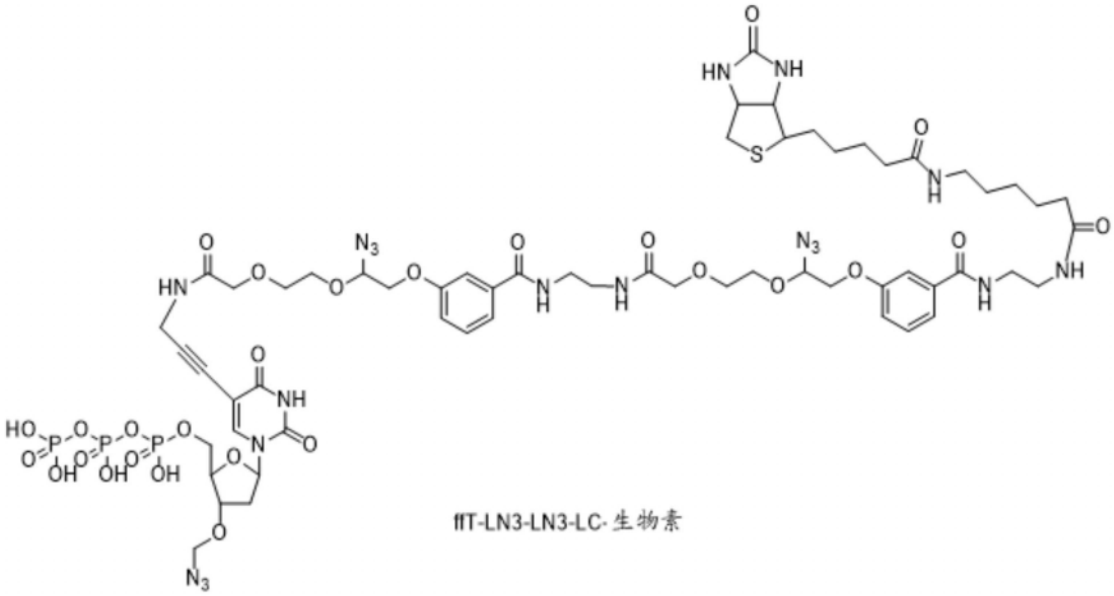
[0263] 对于二级标记SBS，将二级标记用于dTTP和dCTP。在二级标记SBS掺入混合物中，ffT是未标记的并且包含生物素部分。ffC是未标记的和用蓝色染料A标记的，并且ffA用蓝色染料A标记。掺入混合物汇总于表2中。在二级标记SBS中，在标准掺入之后测序配方中需要额外步骤。在掺入一个核苷酸之后，在流通池上冲洗DY405标记的链霉亲和素溶液，并在60℃下温育25s，随后进行缓冲液洗涤，之后进行第一成像事件和第二成像事件。链霉亲和素-DY405溶液含有：5mM Tris pH 7.5中的5ug/ml链霉亲和素-DY405、NaCl、EDTA、Tween® 20(聚山梨醇酯20)。在该实验中使用商业MiSeq®流通池。图2示出了使用二级标记SBS获得的散点图，表明此测序方法的可用性。

[0264] 表2.二级标记SBS掺入混合物组合物

[0265]

ffN	核苷酸标记/半抗原
ffG	暗色
ffC	蓝色染料A(香豆素染料)
ffC	生物素
ffT	生物素
ffT	NR550S0(绿色染料)
ffA	蓝色染料A(香豆素染料)
ffA	NR550S0(绿色染料)

[0266] 

[0267] 

[0268] 表3.两个SBS条件的一级测序度量(每个读取50个循环)。

[0269]

	%定相	%预定相	对齐(%)	错误率(%)
R1	0.497	0.237	95.27	0.67±0.02
R2	0.498	0.212	44.24	15.40±0.13

[0270] 表3示出了二级标记SBS和标准SBS两者的主要测序度量(R1=二级标记SBS,并且R2=标准SBS)。结果表明,蓝色/紫色双通道测序与涉及紫色染料的二级标记的修改方法兼容。

[0271] 然而,对于使用蓝色/紫色(B/V)通道的50次循环运行所观察到的%定相和%信号衰减远远高于标准蓝色/绿色(B/G)测序(表4)。

[0272] 表4.B/V测序和B/G测序的主要度量(50个循环)。

[0273]

SBS	%定相	%预定相	对齐（%）	错误率（%）	%信号衰减（%留下的强度）
B/V	0.497	0.237	95.27	0.67	71
B/G	0.098	0.125	/	0.13	87

[0274] 进行进一步实验，以与核苷酸掺入时间和紫色光照时间结合来理解信号衰减的原因。发现紫色光剂量增加和紫光暴露时间增加都加剧了信号衰减。然而，通过增加核苷酸掺入时间，基本上减少了%定相，并且因此也改善了信号衰减。此外，通过在减少紫光损失且缩短紫色暴露时间(例如，将紫色暴露时间从250ms减少到170ms)的情况下使用较亮流通池，也改善了信号衰减。

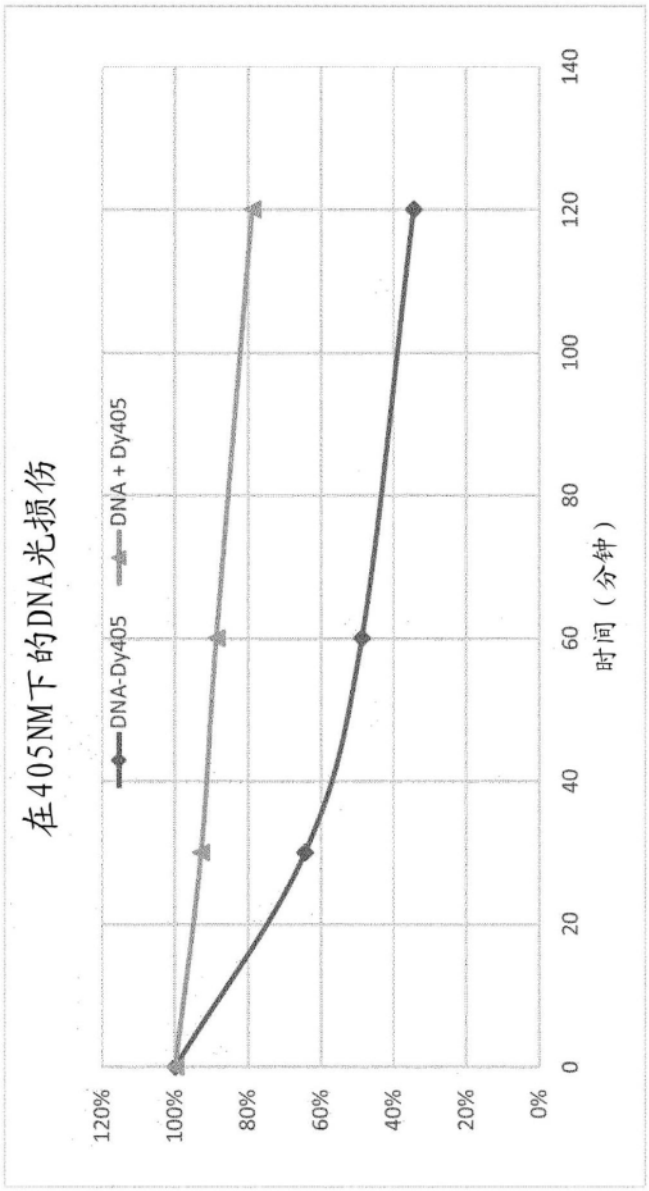

在405NM下的DNA光损伤
DNA-Dy405
DNA + Dy405
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
20
40
60
80
100
120
140
时间（分钟）

图1

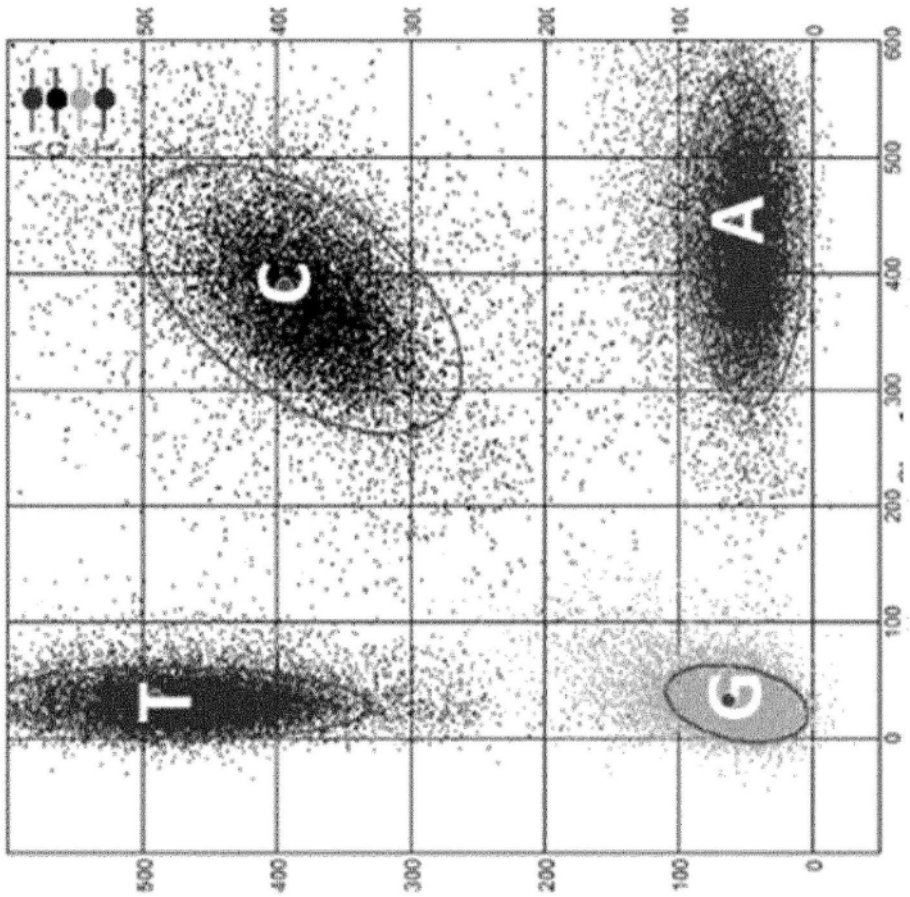


图2