



(21) 申請案號：110133695

(22) 申請日：中華民國 110 (2021) 年 09 月 10 日

(51) Int. Cl. : C12Q1/6869 (2018.01)

(30) 優先權：2020/09/14 美國 63/077,857

(71) 申請人：美商宜曼達股份有限公司 (美國) ILLUMINA, INC. (US)

美國

英商伊路米納劍橋有限公司 (英國) ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED (GB)

英國

(72) 發明人：貝特里 傑森 BETLEY, JASON (GB)；費雪 傑佛瑞 FISHER, JEFFREY (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：68 項 圖式數：10 共 97 頁

(54) 名稱

用於擴增聚核苷酸之組合物及方法

(57) 摘要

本發明提供一種用於擴增聚核苷酸之組合物，其包括基材，該基材包含第一區及第二區。第一複數個捕獲引子耦合至該基材之該第一區。第二複數個捕獲引子耦合至該基材之該第二區。該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子比該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子長。第一複數個正交捕獲引子耦合至該基材之該第一區。第二複數個正交捕獲引子耦合至該基材之該第二區。該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短。

A composition for amplifying a polynucleotide is provided that includes a substrate comprising a first region and a second region. A first plurality of capture primers is coupled to the first region of the substrate. A second plurality of capture primers is coupled to the second region of the substrate. The capture primers of the second plurality of capture primers are longer than the capture primers of the first plurality of capture primers. A first plurality of orthogonal capture primers are coupled to the first region of the substrate. A second plurality of orthogonal capture primers are coupled to the second region of the substrate. The orthogonal capture primers of the second plurality of orthogonal capture primers are shorter than the orthogonal capture primers of the first plurality of orthogonal capture primers.

指定代表圖：

符號簡單說明：

101:基材區

111:種子

112:種子

113:種子

114:種子

115:種子

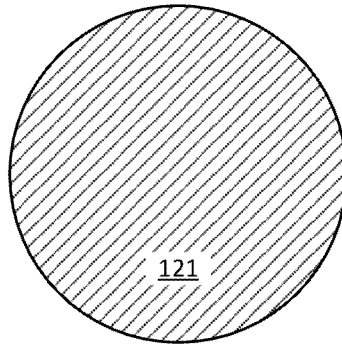
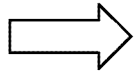
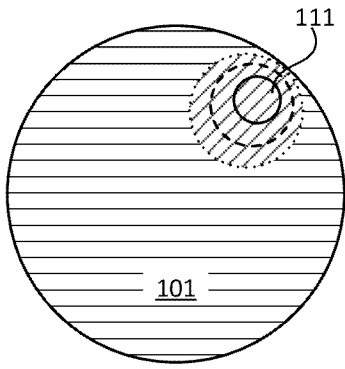
121:單株簇

122:第一區/多株簇

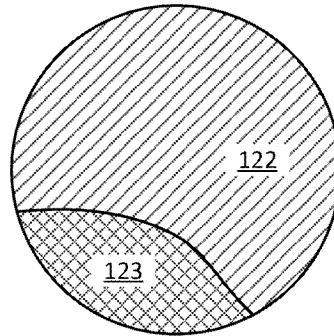
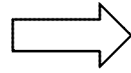
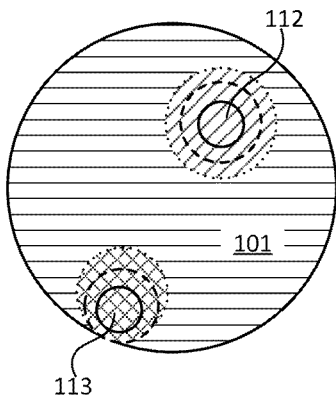
123:第二區/多株簇

124:第一區/多株簇

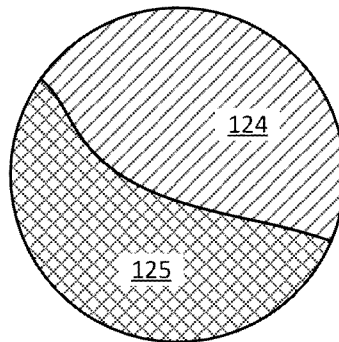
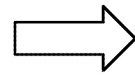
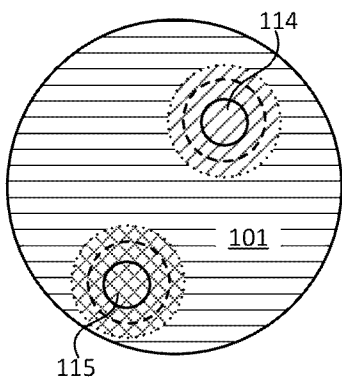
125:第二區/多株簇



【圖1A】



【圖1B】



【圖1C】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於擴增聚核苷酸之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR AMPLIFYING
POLYNUCLEOTIDES

【中文】

本發明提供一種用於擴增聚核苷酸之組合物，其包括基材，該基材包含第一區及第二區。第一複數個捕獲引子偶合至該基材之該第一區。第二複數個捕獲引子偶合至該基材之該第二區。該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子比該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子長。第一複數個正交捕獲引子偶合至該基材之該第一區。第二複數個正交捕獲引子偶合至該基材之該第二區。該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短。

【英文】

A composition for amplifying a polynucleotide is provided that includes a substrate comprising a first region and a second region. A first plurality of capture primers is coupled to the first region of the substrate. A second plurality of capture primers is coupled to the second region of the substrate. The capture primers of the second plurality of capture primers are longer than the capture primers of the first plurality of capture primers. A first plurality of orthogonal capture primers are coupled to the first region of the substrate. A second plurality of orthogonal capture

primers are coupled to the second region of the substrate. The orthogonal capture primers of the second plurality of orthogonal capture primers are shorter than the orthogonal capture primers of the first plurality of orthogonal capture primers.

【指定代表圖】

圖1A-1C

【代表圖之符號簡單說明】

101: 基材區

111: 種子

112: 種子

113: 種子

114 種子

115: 種子

121: 單株簇

122: 第一區/多株簇

123: 第二區/多株簇

124: 第一區/多株簇

125: 第二區/多株簇

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於擴增聚核苷酸之組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR AMPLIFYING
POLYNUCLEOTIDES

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 簇擴增為一種擴增聚核苷酸，例如用於基因定序之途徑。目標聚核苷酸係由偶合至流動槽中之基材表面之引子(例如，P5及P7引子)捕獲，且在表面上之隨機位置處形成「種子」。執行擴增循環以在各種子周圍之表面上形成簇。該等簇包括種子聚核苷酸之複本及互補複本。在一些情況下，基材經圖案化以限定結合不同簇之區域，諸如可填充有各別簇之孔。

【發明內容】

【0002】 本文所提供之實例係關於擴增聚核苷酸。揭示用於執行此類擴增之組合物及方法。

【0003】 在一些實例中，提供一種用於擴增聚核苷酸之組合物。該組合物可包括：基材，其包括第一區及第二區；第一複數個捕獲引子，其偶合至基材之第一區；及第二複數個捕獲引子，其偶合至基材之第二區。第二複數個捕獲引子中之捕獲引子可比第一複數個捕獲引子中之捕獲引子長。該組合物亦可包括：第一複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第一區；及第二複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第二區。第二複數個正

交捕獲引子中之正交捕獲引子可比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子短。

【0004】 在一些實例中，目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的第一者雜交，或目標聚核苷酸中之第一者的第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的第一者雜交。在一些實例中，由目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與正交捕獲引子中之第一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(Tm)。

【0005】 在一些實例中，組合物進一步包括共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者之第一擴增子，該第一擴增子具有與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。

【0006】 在一些實例中，組合物進一步包括共價偶合至第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者之第二擴增子，該第二擴增子具有與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。

【0007】 在一些實例中，組合物進一步包括共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者之第三擴增子，該第三擴增子具有不能與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者完全雜交之第二轉接子。在一些實例中，第二轉接子不能與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者完全雜交可抑制第三擴增子之擴增。在一些實例中，第三擴增子之第二轉接子與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者之間的任一部分雙螺旋體具有小於約20°C之解鏈溫度(Tm)。

【0008】 在一些實例中，組合物進一步包括共價偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者之第四擴增子，該第四擴增子具有不能與

第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的任一者完全雜交之第一轉接子。在一些實例中，第一轉接子不能與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了第四擴增子之擴增。

【0009】 在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子為P5捕獲引子，且第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為P7捕獲引子。在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子為縮短的P5捕獲引子，且第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為縮短的P7捕獲引子。

【0010】 在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子短至少5個鹼基，且第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子短至少5個鹼基。

【0011】 在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大致一樣長。在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大致一樣長。

【0012】 在一些實例中，基材之第一區鄰接基材之第二區。在一些實例中，基材之第一區圍繞基材之第二區。在一些實例中，基材之第二區圍繞基材之第一區。

【0013】 在一些實例中，提供用於擴增聚核苷酸之另一組合物。該組合物可包括：基材，其包括第一區及第二區；第一複數個捕獲引子，其偶合至基材之第一區；及第一複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第一區。該組合物亦可包括：第二複數個捕獲引子，其偶合至基材之第二區；第二複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第二區；第一複數個可移除封

端基團，其偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子；及第二複數個可移除封端基團，其偶合至第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子。

【0014】 在一些實例中，組合物進一步包括流體，該流體包括目標聚核苷酸，該等目標聚核苷酸中之每一者包括與第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子互補的第二轉接子。在一些實例中，目標聚核苷酸之第一轉接子與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子大約一樣長，且目標聚核苷酸之第二轉接子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大約一樣長。

【0015】 在一些實例中，目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者雜交，或目標聚核苷酸中之第一者的第二轉接子與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者雜交。在一些實例中，由目標聚核苷酸中之第一者的第二轉接子與捕獲引子中之一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)，或由目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與正交捕獲引子中之一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。

【0016】 在一些實例中，目標聚核苷酸中之第二者的第一轉接子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者雜交，或目標聚核苷酸中之第二者的第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者雜交。在一些實例中，偶合至捕獲引子中之一者的可移除封端基團抑制目標聚核苷酸中之第二者的擴增，或偶合至正交捕獲引子中之一者的可移除封端基團抑制目標聚核苷酸中之第二者的擴增。

【0017】 在一些實例中，組合物進一步包括共價偶合至第一複數個

正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者之擴增子，該擴增子具有與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。

【0018】 在一些實例中，組合物進一步包括共價偶合至第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者之擴增子，該擴增子具有與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。

【0019】 在一些實例中，第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子為P5捕獲引子，且第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為P7捕獲引子。

【0020】 在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子大致一樣長。在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大致一樣長。

【0021】 在一些實例中，基材之第一區鄰接基材之第二區。在一些實例中，基材之第一區圍繞基材之第二區。在一些實例中，基材之第二區圍繞基材之第一區。

【0022】 在一些實例中，提供一種用於擴增聚核苷酸之方法。該方法包括使組合物與流體接觸。組合物可包括：基材，其包括第一區及第二區；第一複數個捕獲引子，其偶合至基材之第一區；及第二複數個捕獲引子，其偶合至基材之第二區。第二複數個捕獲引子中之捕獲引子可比第一複數個捕獲引子中之捕獲引子長。組合物亦可包括：第一複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第一區；及第二複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第二區。第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子可比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子短。流體可包括目標聚核苷酸，目標聚核

苷酸中之每一者包括與第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子互補的第二轉接子。該方法可包括使目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子或第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子雜交，或使該目標聚核苷酸之第二轉接子與第一複數個捕獲引子或第二複數個捕獲引子中之捕獲引子雜交；且接著擴增目標聚核苷酸中之第一者，該擴增包含產生目標聚核苷酸中之第一者的擴增子。

【0023】 在一些實例中，目標聚核苷酸之第一轉接子比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子短，且目標聚核苷酸之第二轉接子比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子短。

【0024】 在一些實例中，由目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與正交捕獲引子中之第一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。在一些實例中，擴增子與目標聚核苷酸中之第一者雜交。在一些實例中，方法包括使目標聚核苷酸中之第一者去雜交，且接著擴增該擴增子。

【0025】 在一些實例中，方法包括將第一擴增子共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者，且使第一擴增子之第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者完全雜交。

【0026】 在一些實例中，方法包括將第二擴增子共價偶合至第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者，且使第二擴增子之第一轉接子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者完全雜交。

【0027】 在一些實例中，方法包括將第三擴增子共價偶合至第一複

數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者，且使第三擴增子之第二轉接子不能與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者完全雜交。在一些實例中，第二轉接子不能與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了第三擴增子之擴增。在一些實例中，第三擴增子之第二轉接子與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者之間的任一部分雙螺旋體具有小於約20°C之解鏈溫度(Tm)。

【0028】 在一些實例中，方法包括將第四擴增子共價偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者，且使第四擴增子之第一轉接子不能與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的任一者完全雜交。在一些實例中，第一轉接子不能與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了第四擴增子之擴增。

【0029】 在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子為P5捕獲引子，且第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為P7捕獲引子。在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子為縮短的P5捕獲引子，且第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為縮短的P7捕獲引子。在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子短至少5個鹼基，且第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子短至少5個鹼基。在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大致一樣長。在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大致一樣長。

【0030】 在一些實例中，基材之第一區鄰接基材之第二區。在一些實例中，基材之第一區圍繞基材之第二區。在一些實例中，基材之第二區

圍繞基材之第一區。

【0031】 在一些實例中，提供用於擴增聚核苷酸之另一方法。該方法可包括使組合物與流體接觸。組合物可包括：基材，其包括第一區及第二區；第一複數個捕獲引子，其偶合至基材之第一區；及第一複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第一區。組合物進一步可包括：第二複數個捕獲引子，其偶合至基材之第二區；第二複數個正交捕獲引子，其偶合至基材之第二區；第一複數個可移除封端基團，其偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子；及第二複數個可移除封端基團，其偶合至第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子。流體可包括目標聚核苷酸，目標聚核苷酸中之每一者包括與第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子互補的第二轉接子。該方法可包括使目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的第一者雜交，或使目標聚核苷酸中之第一者的第二轉接子與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的第一者雜交。該方法可包括擴增目標聚核苷酸中之第一者，該擴增包括在基材之第一區中產生目標聚核苷酸中之第一者的第一擴增子。該方法可包括移除第一複數個可移除封端基團及第二複數個可移除封端基團；且接著進一步擴增目標聚核苷酸中之第一者，該擴增包括在基材之第二區中產生目標聚核苷酸中之第一者的額外擴增子。

【0032】 在一些實例中，目標聚核苷酸之第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大約一樣長，且目標聚核苷酸之第二轉接子與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子大約一樣長。

【0033】 在一些實例中，由目標聚核苷酸中之第一者的第二轉接子與捕獲引子中之一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)，或其中由目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與正交捕獲引子中之一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。

【0034】 在一些實例中，目標聚核苷酸中之第二者的第一轉接子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者雜交，或其中目標聚核苷酸中之第二者的第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者雜交。在一些實例中，偶合至捕獲引子中之一者的可移除封端基團抑制目標聚核苷酸中之第二者的擴增，或其中偶合至正交捕獲引子中之一者的可移除封端基團抑制目標聚核苷酸中之第二者的擴增。

【0035】 在一些實例中，該方法進一步包括將擴增子共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者，該擴增子具有與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。

【0036】 在一些實例中，該方法進一步包括將擴增子共價偶合至第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者，該擴增子具有與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。

【0037】 在一些實例中，第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子為P5捕獲引子，且第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為P7捕獲引子。在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子大致一樣長。在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子大致一樣長。

【0038】 在一些實例中，基材之第一區鄰接基材之第二區。在一些實例中，基材之第一區圍繞基材之第二區。在一些實例中，基材之第二區圍繞基材之第一區。

【0039】 應理解，如本文中所描述之本發明態樣中的每一者之任何各別特徵/實例可以任何適當組合形式一起實施，且此等態樣中之任一者或多者之任何特徵/實例可與如本文中所描述之一或多個其他態樣的特徵中之任一者一起以任何適當組合形式實施以達成如本文中所描述的益處。

【圖式簡單說明】

【0040】 圖1A至1C示意性地說明在基材上擴增聚核苷酸之實例。

【0041】 圖2A至2D示意性地說明在基材上擴增聚核苷酸之額外實例。

【0042】 圖3A至3J示意性地說明用於在第一及第二基材區中使用不同長度的引子擴增聚核苷酸的製程流程中之實例組合物機及操作。

【0043】 圖4A至4L示意性地說明用於在第一基材區中使用未封端引子且在第二基材區中使用可移除封端引子來擴增聚核苷酸的製程流程中之實例組合物及操作。

【0044】 圖5A至5D示意性地說明用於在第一及第二基材區中使用不同長度之引子擴增聚核苷酸的額外實例組合物。

【0045】 圖6A至6D示意性地說明用於在第一基材區中使用未封端引子且在第二基材區中使用可移除封端引子來擴增聚核苷酸的額外實例組合物。

【0046】 圖7說明用於在第一及第二基材區中使用不同長度之引子擴增聚核苷酸之方法中的實例操作流程。

【0047】 圖8說明用於在第一基材區中使用未封端引子且在第二基材區中使用可移除封端引子來擴增聚核苷酸之方法中的實例操作流程。

【0048】 圖9示意性說明用於表徵捕獲引子長度對擴增效率之影響的基於溶液之模型組合物。

【0049】 圖10為說明由不同捕獲引子長度之擴增產生的螢光強度之曲線圖。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0050】 本申請案主張於2020年9月14日申請且名稱為「Compositions and Methods for Amplifying Polynucleotides」的美國臨時專利申請案第63/077,857號之權益，其全部內容以引用的方式併入本文中。

【0051】 本文所提供之實例係關於擴增聚核苷酸。揭示用於執行此類擴增之組合物及方法。

【0052】 由擴增目標聚核苷酸產生之簇之單純系性可影響可例如使用合成定序(SBS)來定序該簇中之目標聚核苷酸的簡易性。具有彼此相同序列之聚核苷酸被視為「單株」，而具有不同序列之聚核苷酸被視為「多株」。簇之單純系性愈大，亦即，該簇中具有彼此相同之序列的聚核苷酸的數目愈大，則來自該簇內之聚核苷酸集合的信號將足以使用SBS來正確地定序具有最大數目個擴增子之聚核苷酸的可能性愈大。具有足以正確地定序彼聚核苷酸之同一聚核苷酸的多個擴增子的簇被視為「官能性單株」，即使該簇可為多株的。說明性地，約60%或更多之SBS信號來自特定聚核苷酸之擴增子及約40%或更少之SBS信號來自一或多種其他聚核苷

酸之擴增子的簇可為官能性單株，且因此可使用SBS精確定序。在一些實施例中，SBS信號之量隨著聚核苷酸之量大致線性地調整，且因此具有特定聚核苷酸之約60%或更多擴增子及一或多種其他聚核苷酸之約40%或更少擴增子的簇可為官能性單株。

【0053】 給定簇為單株之程度可與多個因素相關。舉例而言，圖1A至1C示意性地說明在基材上擴增聚核苷酸之實例。如圖1A中所展示，在基材區101上捕獲且擴增單一種子111可產生單株簇121，其可填充基材區且可容易用於SBS（虛線及點線環意欲表示簇隨時間之擴增）。相比之下，如圖1B中所展示，在基材區101上捕獲且擴增兩個種子112、113可產生多株簇，其具有由種子112之擴增產生的第一區122及由種子113之擴增產生的第二區123。在此實例中，簇為多株之程度可足夠低以使得簇可適用於SBS。舉例而言，來自基材區101之約60%或更多的信號可來自第一區122中之種子112的擴增子，且來自基材區101之約40%或更少的信號可來自第二區123中之種子113的擴增子。舉例而言，約60%或更大的基材區101可由第一區122中之種子112的擴增子覆蓋且約40%或更小的基材區101可由第二區123中之種子113的擴增子覆蓋。因此，多株簇122、123可為官能性單株。

【0054】 然而，不同種子在基材上之相對位置可影響簇為多株之程度及簇可用於SBS之程度。舉例而言，如圖1C中所展示，基材區101上之兩個種子114、115之捕獲及擴增產生多株簇，其具有由種子112之擴增產生的第一區124及由種子115之擴增產生的第二區125，但第二區125大於圖1B中之第二區123，此係由於種子115比種子113的定位更居中。舉例而言，來自基材區101之小於約60%信號可來自第一區124中之種子114的擴

增子且來自基材區101之大於約40%信號可來自第二區125中之種子115的擴增子，且因此多株簇124、125可不為官能性單株。舉例而言，小於約60%的基材區101可由第一區124中之種子114的擴增子覆蓋且大於約40%的基材區101可由第二區125中之種子115的擴增子覆蓋。因此，多株簇124、125可不為官能性單株。在此實例中，簇為多株之程度可過高以使得簇不適用於SBS。

【0055】 可預期落在給定基材區上之種子的數目可隨基材之大小而增加。基材圖案化可進一步影響簇為多株之程度及此類簇適用於SBS之程度。舉例而言，圖2A至2D示意性地說明在基材上擴增聚核苷酸之額外實例。基材可包括第一區201及第二區202，其可以諸如參考圖3A所描述之方式具有彼此不同的表面處理。可能需要對區域201、202兩者中之同一目標聚核苷酸的複本執行同步成對末端讀段，從而提高讀段之可靠性，例如藉由在區域201中之第一方向上及在區域202中之相對方向上的複本執行SBS讀段，且接著使用軟體比對結果，其應彼此互補且因此指示彼此相同的序列。如圖2A中所展示，基材區202（或等效地，基材區201）上之單一種子211的捕獲及擴增在第一區221及第二區222中產生單株簇，其可填充兩個基材區且其可容易用於同步成對末端讀段。

【0056】 相比之下，如圖2B中所展示，橋接基材區201、202之第一種子212及基材區201上之第二種子213的捕獲及擴增在基材區201內產生多株簇，該多株簇基材具有由基材區201內之種子212之擴增產生的第一區223及由基材區201內之種子213之擴增產生的第二區225；且在基材區202內產生基材區202內之種子212之擴增產生的單株簇224。在此實例中，簇為多株之程度足夠低以使得基材區201可為官能性單株。因此，區

域201及202一起可為官能性單株，且簇223、224可適用於同步成對末端讀段。舉例而言，對於同步成對末端讀段，其可適用於基材獨立地為至少官能性單株的兩個基材區，及基材一起亦為至少官能性單株的兩個基材區。

【0057】 類似地，對於參考圖1B至1C所描述之實例，不同種子在基材上之相對位置可影響簇為多株之程度及簇可用於SBS之程度，且尤其用於同步成對末端讀段之程度。舉例而言，如圖2C中所展示，橋接基材區201、202之第一種子214及基材區201上之第二種子215在基材區201內產生多株簇，該多株簇基材具有由基材區201內之種子214之擴增產生的第一區226及由基材區201內之種子215之擴增產生的第二區228；且在基材區202內產生由基材區202內之種子214之擴增產生的基材單株簇227。在圖2C之實例中，第二區228大於圖2B中之第二區225，此係由於種子215比種子213的定位更居中。在此實例中，基材區201在不為官能性單株的情況下為多株，而基材區202為單株。因此，區域201及202一起可不為官能性地單株，且簇為多株之程度可能過高而使得簇226、228不適用於同步成對末端讀段。另外，由於區域201不為官能性單株，因此區域201可能不適用於定序，而區域202可單獨用於定序。

【0058】 在另一實例中，如圖2D中所展示，基材區202上之第一種子216及基材區201上之第二種子217在基材區201內產生由基材區201內種子217之擴增產生的單株簇229，及在基材區202內產生由基材區202內之種子216之擴增產生的第二單株簇。儘管簇229、230各自為單株，但其可能不適用於同步成對末端讀段，此係由於其具有彼此不同的目標聚核苷酸之複本且因此可能不使用軟體彼此比對。儘管如此，由於簇229、230中

之每一者為單株或至少官能性單株，因此彼等簇可獨立地用於定序，但兩個簇中之序列彼此並不互補。

【0059】 與可藉由使用標準P5及P7引子達成之單純系性相比，本文所提供之實例可經由使用經修飾之引子提高簇為單株(包括但不限於在具有複雜表面之基材上)的程度。此類經修飾之引子可包括經修飾之序列、經修飾之長度、使用非核苷酸部分及與其他經修飾之引子一起使用中之一或多者的任何適合組合。經修飾之引子可用於減小有效擴增面積或另外偏置擴增，以提高簇單純系性。舉例而言，在諸如參考圖1A至1C及圖2A至2D所描述之實例中，可預期經預期可在基材之給定區上擴增的種子之數目遵循帕松分佈(Poisson distribution)。相比之下，使用諸如本文所提供之經修飾引子可提供超出將由帕松分佈預測之單純系性的單純系性。

【0060】 首先，將簡要地解釋本文中所使用的一些術語。接著，將描述用於擴增聚核苷酸之一些實例組合物及實例方法。

術語

【0061】 除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語均具有如一般技術者通常理解之相同含義。術語「包括(including)」以及諸如「包括(include/includes/included)」之其他形式的使用不為限制性的。術語「具有(having)」以及諸如「具有(have/has/had)」之其他形式的使用不為限制性的。如在本說明書中所使用，無論在申請專利範圍之過渡片語抑或主體中，術語「包含(comprise(s)/comprising)」將解譯為具有開放式含義。亦即，上述術語將與片語「至少具有」或「至少包括」同義地解譯。舉例而言，當在方法之情形下使用時，術語「包含」意謂該方法至少包括所敘述步驟，但可包括額外步驟。當在化合物、組合物或裝置之情形下使

用時，術語「包含」意謂該化合物、組合物或裝置至少包括所敘述之特徵或組分，但亦可包括額外特徵或組分。

【0062】 本說明書通篇所使用之術語「大體上」、「大致」及「約」用以描述及解釋諸如歸因於處理變化之較小波動。舉例而言，該等較小波動可指小於或等於 $\pm 10\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 5\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 2\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 1\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.5\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.2\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.1\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.05\%$ 。

【0063】 如本文中所使用，「雜交」欲意謂沿彼等聚合物之長度將第一聚核苷酸非共價締合至第二聚核苷酸以形成雙股「雙螺旋體」。舉例而言，兩個DNA聚核苷酸股可經由互補鹼基配對締合。第一聚核苷酸與第二聚核苷酸之間的締合強度隨彼等聚核苷酸內之核苷酸序列之間的互補性而增加。聚核苷酸之間的雜交強度可由解鏈溫度(T_m)表徵，在該解鏈溫度下，50%雙螺旋體具有彼此解離之聚核苷酸股。彼此「部分」雜交之聚核苷酸意謂其具有彼此互補之序列，但此類序列沿其長度之僅一部分彼此雜交以形成部分雙螺旋體。「不能」雜交之聚核苷酸包括彼此實體上分離，使得其不足數目之鹼基可以使得彼此雜交之方式彼此接觸之聚核苷酸。

【0064】 如本文所使用之術語「核苷酸」欲意謂包括糖及至少一個磷酸酯基且在一些實例中亦包括核鹼基之分子。缺乏核鹼基之核苷酸可稱為「無鹼基」。核苷酸包括去氧核糖核苷酸、經修飾去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核糖核苷酸、肽核苷酸、經修飾肽核苷酸、經修飾磷酸酯糖主鏈核苷酸及其混合物。核苷酸之實例包括單磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、單磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷

(TDP)、三磷酸胸苷(TTP)、單磷酸胞苷(CMP)、二磷酸胞苷(CDP)、三磷酸胞苷(CTP)、單磷酸鳥苷(GMP)、二磷酸鳥苷(GDP)、三磷酸鳥苷(GTP)、單磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)、三磷酸尿苷(UTP)、單磷酸去氧腺苷(dAMP)、二磷酸去氧腺苷(dADP)、三磷酸去氧腺苷(dATP)、單磷酸去氧胸苷(dTMP)、二磷酸去氧胸苷(dTDP)、三磷酸去氧胸苷(dTTP)、二磷酸去氧胞苷(dCDP)、三磷酸去氧胞苷(dCTP)、單磷酸去氧鳥苷(dGMP)、二磷酸去氧鳥苷(dGDP)、三磷酸去氧鳥苷(dGTP)、單磷酸去氧尿苷(dUMP)、二磷酸去氧尿苷(dUDP)及三磷酸去氧尿苷(dUTP)。

【0065】如本文所使用之術語「核苷酸」亦欲涵蓋相較於天然存在之核苷酸，為包括經修飾核鹼基、糖及/或磷酸酯部分之核苷酸類型之任何核苷酸類似物。實例經修飾核鹼基包括肌苷、黃嘌呤(xanthine)、次黃嘌呤(hypoxanthine)、異胞嘧啶、異鳥嘌呤、2-胺基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-羥甲基胞嘧啶、2-胺基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鳥嘌呤、2-丙基鳥嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、15-鹵基尿嘧啶、15-鹵基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、8-鹵基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-胺基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-硫醇腺嘌呤或鳥嘌呤、8-硫烷基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-羥基腺嘌呤或鳥嘌呤、5-經鹵基取代之尿嘧啶或胞嘧啶、7-甲基鳥嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤、8-氮雜腺嘌呤、7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、3-去氮雜鳥嘌呤、3-去氮雜腺嘌呤或其類似物。如此項技術中已知，某些核苷酸類似物無法併入聚核苷酸，例如核苷酸類似物，諸如5'-磷醯硫酸腺苷中。核苷酸可包括任何

適合數目之磷酸酯，例如三個、四個、五個、六個或超過六個磷酸酯。

【0066】 如本文所使用之術語「聚核苷酸」係指包括彼此結合之核苷酸序列之分子。聚核苷酸為聚合物之一個非限制性實例。聚核苷酸之實例包括去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)及其類似物。聚核苷酸可為諸如RNA或單股DNA之單股核苷酸序列、諸如雙股DNA之雙股核苷酸序列，或可包括單股核苷酸序列及雙股核苷酸序列之混合物。雙股DNA(dsDNA)包括基因體DNA以及PCR及擴增產物。單股DNA(ssDNA)可轉化為dsDNA，且反之亦然。聚核苷酸可包括非天然存在之DNA，諸如對映異構DNA。聚核苷酸中之精確核苷酸序列可為已知或未知的。以下為聚核苷酸之實例：基因或基因片段(例如，探針、引子、經表現序列標籤(EST)或基因表現系列分析(SAGE)標籤)、基因體DNA、基因體DNA片段、外顯子、內含子、信使RNA(mRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、核糖核酸酶、cDNA、重組聚核苷酸、合成聚核苷酸、分支鏈聚核苷酸、質體、載體、具有任何序列之經分離DNA、具有任何序列之經分離RNA、核酸探針、引子或前述任一者之經擴增複本。

【0067】 如本文中所未使用，「聚合酶」欲意謂具有藉由將核苷酸聚合為聚核苷酸來組裝聚核苷酸之活性位點的酶。聚合酶可結合經引發單股目標聚核苷酸，且可將核苷酸依序添加至生長引子以形成具有與目標聚核苷酸之序列互補之序列的「互補複本」聚核苷酸。另一聚合酶或相同聚合酶接著可藉由形成該互補複本聚核苷酸之互補複本來形成目標核苷酸之複本。此類複本中之任一者在本文中可被稱作「擴增子」。DNA聚合酶可結合於目標聚核苷酸，且接著移動目標聚核苷酸，將核苷酸依序添加至生長聚核苷酸股(生長擴增子)之3'端處之游離羥基。DNA聚合酶可自DNA模板

合成互補DNA分子，且RNA聚合酶可自DNA模板合成RNA分子(轉錄)。聚合酶可使用短RNA或DNA股(引子)來開始股生長。一些聚合酶可使位點上游之股移位，其中其將鹼基添加至鏈中。此類聚合酶可被稱為股移位，意謂其具有自模板股移除由聚合酶讀段之互補股的活性。具有股移位活性之例示性聚合酶包括但不限於脂肪嗜熱芽孢桿菌(*Bacillus stearothermophilus*, Bst)聚合酶、外克列諾聚合酶(exo-Klenow polymerase)或定序級T7外聚合酶之大片段。一些聚合酶將其前面的股降解，有效地用後面的生長鏈替換該股(5'核酸外切酶活性)。一些聚合酶具有降解其後面之股的活性(3'核酸外切酶活性)。一些適用的聚合酶已藉由突變或其他方式進行修飾，以減小或消除3'及/或5'核酸外切酶活性。

【0068】 如本文所用，術語「引子」定義為可經由游離3'OH基團添加核苷酸之聚核苷酸。引子可包括阻止聚合直至嵌段經移除之3'嵌段。引子可包括5'端處之修飾以允許偶合反應或將引子偶合至另一部分。引子可包括可在適合的條件下，諸如UV光、化學物質、酶或類似物下裂解之一或多個部分。引子長度可為任何適合數目之鹼基長度且可包括天然或非天然核苷酸之任何適合組合。目標聚核苷酸可包括與引子雜交(具有與其互補之序列)之「轉接子」，且可擴增以藉由將核苷酸添加至引子之游離3'OH基團來產生互補複本聚核苷酸。「捕獲引子」欲意謂偶合至基材且可與目標聚核苷酸之第二轉接子雜交的引子，而「正交捕獲引子」欲意謂偶合至基材且可與該目標聚核苷酸之第一轉接子雜交的引子。第一轉接子可具有與正交捕獲引子之序列互補之序列，且第二轉接子可具有與捕獲引子之序列互補之序列。捕獲引子與正交捕獲引子可具有彼此不同且獨立的序列。另外，捕獲引子與正交捕獲引子可在至少一種其他特性方面彼此不

同。舉例而言，捕獲引子與正交捕獲引子可具有彼此不同的長度；捕獲引子或正交捕獲引子可包括捕獲引子或正交捕獲引子中的另一者不具有的非核酸部分(諸如封端基團或切除部分)；或此類特性之任何適合組合。

【0069】 如本文所用，術語「基材」係指用作本文所描述之組合物之支撐物的材料。實例基材材料可包括玻璃、二氧化矽、塑膠、石英、金屬、金屬氧化物、有機矽酸鹽(例如多面體有機倍半矽氧烷(POSS))、聚丙烯酸酯、氧化鋁、互補金屬氧化物半導體(CMOS)或其組合。POSS之一實例可為Kehagias等人, *Microelectronic Engineering* 86 (2009),第776-778頁中所描述之POSS，該參考文獻以全文引用的方式併入本文中。在一些實例中，本申請案中所使用之基材包括基於二氧化矽之基材，諸如玻璃、熔融二氧化矽或其他含二氧化矽材料。在一些實例中，基材可包括矽、氮化矽或氫化矽酮。在一些實例中，本申請案中所使用之基材包括塑膠材料或組分，諸如聚乙烯、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、聚丙烯、耐綸、聚酯、聚碳酸酯及聚(甲基丙烯酸甲酯)。實例塑膠材料包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚苯乙烯及環烯烴聚合物基材。在一些實例中，基材為或包括基於二氧化矽之材料或塑膠材料或其組合。在特定實例中，基材具有包含玻璃或基於矽之聚合物之至少一個表面。在一些實例中，基材可包括金屬。在一些此類實例中，金屬為金。在一些實例中，基材具有包含金屬氧化物之至少一個表面。在一個實例中，表面包含氧化鋁或氧化錫。丙烯醯胺、烯酮或丙烯酸酯亦可用作基材材料或組分。其他基材材料可包括但不限於砷化鎵、磷化銮、鋁、陶瓷、聚醯亞胺、石英、樹脂、聚合物及共聚物。在一些實例中，基材及/或基材表面可為或包括石英。在一些其他實例中，基材及/或基材表面可為或包括諸如GaAs或ITO之半導體。前述清單

意欲說明但不限制本申請案。基材可包含單種材料或複數種不同材料。基材可為複合物或層壓物。在一些實例中，基材包含有機矽酸鹽材料。基材可為平坦、圓的、球面、棒狀或任何其他適合之形狀。基材可為剛性或柔性的。在一些實例中，基材為珠粒或流動槽。

【0070】 在一些實施例中，基材包括圖案化表面。「圖案化表面」係指基材之暴露層中或上之不同區域的配置。舉例而言，區域中之一或多者可為存在一或多個捕獲引子之特徵。該等特徵可由其中不存在捕獲引子的間隙區域隔開。在一些實例中，圖案可為x-y格式之呈列及行形式之特徵。在一些實例中，圖案可為特徵及/或間隙區域之重複配置。在一些實例中，圖案可為特徵及/或間隙區域之無規配置。在一些實施例中，基材在表面上包括孔(凹陷)陣列。該等孔可藉由大體上垂直之側壁提供。孔可使用多種技術如此項技術中通常所知來製造，該等技術包括但不限於光微影、衝壓技術、模製技術及微蝕刻技術。如熟習此項技術者所瞭解，所用技術將視陣列基材之組成及形狀而定。

【0071】 基材之圖案化表面中之特徵可包括玻璃、矽、塑膠或其他適合材料上具有諸如聚(N-(5-疊氮基乙醯胺基戊基)丙烯醯胺-共-丙烯醯胺) (PAZAM)之圖案化共價鍵聯凝膠之孔陣列(例如微孔或奈米孔)中的孔。該過程產生用於定序之凝膠墊，該等凝膠墊在具有多個循環之定序操作中可為穩定的。聚合物與孔之共價鍵聯可有助於在多次使用期間在結構化基材之整個使用壽命維持結構化特徵中之凝膠。然而，在許多實例中，凝膠不必共價鍵聯至孔。舉例而言，在一些條件下，不共價連接於結構化基材之任何部分的不含矽烷之丙烯醯胺(SFA)可用作凝膠材料。

【0072】 在特定實例中，結構化基材可藉由以下方式製造：使適合

之材料圖案化而具有孔(例如微孔或奈米孔)；用凝膠材料(例如PAZAM、SFA或其化學修飾之變異體，諸如SFA之疊氮化版本(疊氮基-SFA))塗佈圖案化材料；及例如經由化學或機械拋光來拋光經凝膠塗佈之材料的表面，由此將凝膠保留於孔中，但自各孔之間的結構化基材之表面上的間隙區域移除大體上所有凝膠或使其失活。引子可連接至凝膠材料。接著可使包括複數種目標聚核苷酸(例如片段化人類基因體或其部分)之溶液與經拋光之基材接觸，使得個別目標聚核苷酸將經由與連接至凝膠材料之引子相互作用而接種個別孔；然而，由於凝膠材料之不存在或失活，目標聚核苷酸將不佔據間隙區域。目標聚核苷酸之擴增可受限於孔，此係由於間隙區域中凝膠之不存在或失活可能抑制生長簇向外遷移。該過程宜為可製造的，可擴展的且利用習知微米或奈米製造方法。

【0073】 圖案化基材可包括例如經蝕刻至載片或晶片中之孔。該等孔之蝕刻及幾何圖案可呈多種不同形狀及尺寸，且此類特徵可在實體上或功能上彼此分離。尤其適用之具有此類結構特徵的基材包括可選擇固體粒子，諸如微球體之尺寸的圖案化基材。具有此等特徵之例示性圖案化基材為與BEAD ARRAY技術結合使用之經蝕刻基材(Illumina, Inc., San Diego, Calif.)。

【0074】 在一些實例中，本文所描述之基材形成流動槽之至少一部分或位於流動槽中或偶合至流動槽。流動槽可包括分成複數個通道或複數個扇形區之流動腔室。可用於本文所闡述之方法及組合物中之實例流動槽及用於製造流動槽之基材包括但不限於可商購自Illumina, Inc. (San Diego, CA)之流動槽及基材。

【0075】 如本文所用，術語「直接地」參考覆蓋基材表面之層使用

時欲意謂層覆蓋基材之表面而無明顯中間層，諸如黏著層或聚合物層。直接覆蓋表面之層可經由任何化學或物理相互作用，包括共價鍵或非共價黏附而連接至此表面。

【0076】 如本文所用，術語「固定的」參考聚核苷酸使用時欲意謂經由共價或非共價鍵直接或間接連接至基材。在某些實例中，可使用共價連接或任一其他適合之連接，其中在例如聚核苷酸擴增或定序中在意欲使用基材的條件下聚核苷酸保持固定或連接至基材。待用作捕獲引子或目標聚核苷酸之聚核苷酸可固定，使得3'端可用於酶促延伸且序列之至少一部分能夠與互補序列雜交。固定可經由與表面連接之寡核苷酸雜交而發生，在此情況下，固定之寡核苷酸或聚核苷酸可呈3'-5'定向。替代地，固定可藉由除鹼基配對雜交以外之手段，諸如共價連接發生。

【0077】 如本文所用，術語「陣列」係指可根據相對位置彼此區分的基材區群。位於陣列之不同區域處之不同分子(諸如聚核苷酸)可根據區域在陣列中之位置而彼此區分。陣列之個別區域可包括一或多個特定類型的分子。舉例而言，基材區可包括具有特定序列之單一目標聚核苷酸，或基材區可包括具有相同序列(或其互補序列)之若干聚核苷酸。陣列之區域可分別包括同一基材上之彼此不同的特徵。例示性特徵包括但不限於基材中之孔、基材中或基材上之珠粒(或其他粒子)、基材之突出部、基材上之脊或基材中之通道。陣列之區域可分別包括不同基材上彼此不同的區域。連接至各別基材之不同分子可根據基材在與基材相關的表面上之位置或根據基材在液體或凝膠中之位置來鑑別。各別基材位於表面上之例示性陣列包括但不限於在孔中具有珠粒的陣列。

【0078】 如本文所用，術語「複數個」欲意謂兩個或更多個不同成

員之群體。複數之大小可介於小、中等、大至極大的範圍內。小複數之大小可介於例如若干成員至數十個成員的範圍內。中等大小的複數可介於例如數十個成員至約100個成員或數百個成員的範圍內。較大複數可介於例如約數百個成員至約1000個成員、至數千成員且至多數萬成員的範圍內。極大複數可介於數萬成員至約數十萬、百萬、數百萬、數千萬且至多或大於數億成員的範圍內。因此，複數之大小可介於兩百萬至一億成員的範圍內以及如藉由成員數目所量測，介於以上例示性範圍之間且大於以上例示性範圍的所有大小。例示性聚核苷酸複數包括例如約 1×10^5 或更多個、 5×10^5 或更多個、或 1×10^6 或更多個不同聚核苷酸之群體。因此，術語之定義意欲包括大於二的所有整數值。複數之上限可例如藉由樣本中之聚核苷酸序列之理論多樣性設定。

【0079】 如本文所用，術語「雙股」參考聚核苷酸使用時欲意謂聚核苷酸中之全部或大體上全部核苷酸經氫鍵結合至互補聚核苷酸中之各別核苷酸。「部分」雙股聚核苷酸可具有其經氫鍵結合至互補聚核苷酸中之核苷酸的核苷酸之至少約10%、至少約25%、至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%、或至少約95%，但少於其所有該等核苷酸。

【0080】 如本文所用，術語「單股」參考聚核苷酸使用時欲意謂聚核苷酸中基本上無一個核苷酸經氫鍵結合至互補聚核苷酸中之各別核苷酸。「不能」與另一聚核苷酸雜交之聚核苷酸可為單股。

【0081】 如本文所用，術語「目標聚核苷酸」欲意謂為分析或作用之目標的聚核苷酸。分析或作用包括使聚核苷酸經歷擴增、定序及/或其他程序。目標聚核苷酸可包括除待分析之目標序列以外的核苷酸序列。舉

例而言，目標聚核苷酸可包括一或多個轉接子，包括充當引子結合位點之轉接子、側接待分析之目標聚核苷酸序列之轉接子。與捕獲引子雜交之目標聚核苷酸可包括以使得並非所有目標聚核苷酸能夠延伸之方式延伸超出捕獲寡核苷酸的5'或3'端之核苷酸。在特定實例中，目標聚核苷酸可具有彼此不同的序列，但可具有彼此相同的第一及第二轉接子。可側接特定目標聚核苷酸序列之兩個轉接子可具有彼此相同的序列或彼此互補的序列，或兩個轉接子可具有不同序列。因此，複數個目標聚核苷酸中之物質可包括側接待藉由例如定序(例如SBS)評估之未知序列區域的已知序列區域。在一些實例中，目標聚核苷酸在單個末端處攜載轉接子，且此類轉接子可位於目標聚核苷酸之3'端或5'端處。目標聚核苷酸可在無任何轉接子的情況下使用，在此情況下，引子結合序列可直接來自目標聚核苷酸中發現的序列。

【0082】 術語「聚核苷酸」與「寡核苷酸」在本文中可互換使用。除非另外特定指示，否則不同術語並不意欲表示大小、序列或其他特性之任何特定差異。為了描述清楚起見，當描述包括若干聚核苷酸物質之特定方法或組合物時，該等術語可用於區分一種聚核苷酸物質與另一種聚核苷酸物質。

【0083】 如本文所用，術語「擴增子」參考聚核苷酸使用時欲意謂複製聚核苷酸之產物，其中該產物具有與聚核苷酸之至少一部分核苷酸序列大體上相同或大體上互補的核苷酸序列。「擴增(Amplification/amplifying)」係指製得聚核苷酸之擴增子的過程。目標聚核苷酸之第一擴增子可為互補複本。額外擴增子為在第一擴增子產生之後由目標聚核苷酸或由第一擴增子產生的複本。後續擴增子可具有與目標聚

核苷酸大體上互補或與目標聚核苷酸大體上一致的序列。應理解，當產生彼聚核苷酸之擴增子時，可能發生聚核苷酸之少數突變(例如由於擴增假像)。

【0084】 大體上僅包括給定聚核苷酸之擴增子的基材區可稱為「單株」，而包括彼此具有不同序列之聚核苷酸之擴增子的基材區可稱為「多株」。包括給定聚核苷酸之待用於定序該聚核苷酸的足夠數目個擴增子之基材區可被稱為「官能性單株」。說明性地，其中約60%或更多的擴增子屬於給定聚核苷酸之基材區可視為「官能性單株」。另外或可替代地，其中約60%或更多信號來自給定聚核苷酸之擴增子的基材區可視為「官能性單株」。基材之多株區域可包括其中分別為單株之不同子區域。各此類單株區域，無論在較大多株區域內或其自身均可對應於由「種子」產生之「簇」。「種子」可指單一目標聚核苷酸，而「簇」可指該目標聚核苷酸之擴增子集合。

用於擴增聚核苷酸之組合物及方法

【0085】 本文所提供之實例係關於藉由在將產生簇之基材區中提供具有選定特徵之捕獲引子來產生大體上為單株的簇。本文中之實例尤其極適合於產生簇以用於同步成對末端讀段，其中彼此平行地在第一基材區中使用SBS讀段擴增之聚核苷酸序列，且在第二基材中使用SBS讀段該聚核苷酸之互補序列，但應理解，該等實例通常適用於任何類型的簇。

【0086】 在一些實例中，儘管根據帕松分佈，接種各種聚核苷酸可發生在第一及第二基材區上之任何位置，但可選擇偶合至第一及第二區中之基材的捕獲引子，使得與距彼等區域之間的邊界更遠捕獲之聚核苷酸相比，優先擴增足夠靠近該邊界捕獲之目標聚核苷酸。在一些實施例中，此

類優先擴增可藉由與第一區中之其他捕獲引子(例如全長P7引子)相比縮短第一區中之捕獲引子(例如P5*引子)之子集，與其他捕獲引子(例如全長P5引子)相比縮短第二區中之其他捕獲引子(例如P7*引子)之子集，且提供具有短轉接子(例如cP5及cP7之縮短版本)之目標聚核苷酸來達成。如下文更詳細地解釋，此等各種縮短捕獲引子及縮短轉接子可偏置針對可偶合至基材之某些目標聚核苷酸之擴增。舉例而言，在第一區與第二區之間的邊界處形成種子之目標聚核苷酸可比形成充分遠離邊界之種子之聚核苷酸更容易擴增。與目標聚核苷酸相比，所得擴增子可延長以包括全長轉接子(例如全長cP5及cP7轉接子)，因此有助於在整個基材之第一及第二區兩者中之彼擴增子的後續擴增。

【0087】 舉例而言，圖3A至3J示意性地說明在第一及第二基材區中使用不同長度的引子擴增聚核苷酸的製程流程中之實例組合物及操作。首先參考圖3A，組合物3000包括基材300及與其偶合之複數個引子。在此實例中，基材300包括可彼此鄰接的第一區301及第二區302。視情況，第一區301與第二區302可具有彼此不同的表面處理，例如彼此不同的聚合物，或彼此相同但連接有可選擇性地偶合不同捕獲引子之不同部分之聚合物。如下文所解釋，分別偶合至第一區301及第二區302之引子可包括在至少一個特徵方面彼此不同之捕獲引子，及在至少一個特徵方面彼此不同之正交捕獲引子，以便抑制在充分遠離第一區與第二區之間的邊界310之區域處與此類捕獲引子或正交捕獲引子雜交的目標聚核苷酸之擴增。

【0088】 舉例而言，第一複數個捕獲引子331可偶合至基材300之第一區301，且第二複數個捕獲引子341可偶合至基材300之第二區302。第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341可比第一複數個捕獲引子中之捕獲引

子331長。第一複數個正交捕獲引子332可偶合至基材300之第一區301，且第二複數個正交捕獲引子342可偶合至基材之第二區302。第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子342可比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332短。

【0089】 例示性地，在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子331可比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341短至少2個鹼基，例如可比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341短至少3個鹼基、短至少4個鹼基、短至少5個鹼基、短至少6個鹼基、短至少7個鹼基、短至少8個鹼基、短至少9個鹼基或短至少10個鹼基。在一些實例中，第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子342可比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341短至少2個鹼基，例如可比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332短至少3個鹼基、短至少4個鹼基、短至少5個鹼基、短至少6個鹼基、短至少7個鹼基、短至少8個鹼基、短至少9個鹼基或短至少10個鹼基。

【0090】 並非偶合至基材300之所有引子需要具有彼此不同的長度。舉例而言，在一些實例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子331與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子342大致一樣長。在一些實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332大致一樣長。然而，應瞭解任何適合之各別長度的捕獲引子及正交捕獲引子可用於基材300的適合區域中。如下文更詳細地描述，第一及第二區中彼此不同長度之捕獲引子331、341及第一及第二區中彼此不同長度之正交捕獲引子332、342可使得與充分遠離邊界310著陸之目標聚核苷酸相比，優先擴增充分靠近第一區與第二區之間的邊界310

著陸之目標聚核苷酸。接著，如在下文更詳細地描述，與充分遠離邊界310著陸之目標聚核苷酸相比，彼擴增子可進一步在整個第一區及第二區中優先擴增。

【0091】 如圖3A中所展示，組合物3000進一步可包括流體，該流體包括目標聚核苷酸351、352、353，例如待擴增及最終定序之聚核苷酸。目標聚核苷酸351、352、353中之每一者可包括與第一及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332、342互補的第一轉接子354，及與第一及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子331、341互補的第二轉接子355。在一些實例中，目標聚核苷酸351、352、353之第一轉接子354可比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332短，比正交捕獲引子332短至少2個鹼基，例如可比正交捕獲引子332短至少3個鹼基、短至少4個鹼基、短至少5個鹼基、短至少6個鹼基、短至少7個鹼基、短至少8個鹼基、短至少9個鹼基或短至少10個鹼基。在一些實例中，目標聚核苷酸351、352、353之第二轉接子355可比第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341短，比捕獲引子341短至少2個鹼基，例如可比捕獲引子341短至少3個鹼基、短至少4個鹼基、短至少5個鹼基、短至少6個鹼基、短至少7個鹼基、短至少8個鹼基、短至少9個鹼基或短至少10個鹼基。第一轉接子354及第二轉接子355可(但不必一定)彼此一樣長。

【0092】 在一個非限制性實例中，第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341為P5捕獲引子，且第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332為P7捕獲引子。可購自Illumina, Inc. (San Diego, CA)之P5捕獲引子具有序列5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' ((SEQ ID NO: 1))。亦可購自Illumina, Inc. 之 P7 捕獲引子具有序列 5'-

CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3' (SEQ ID NO: 2)。在一些實施例中，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子331為縮短的P5捕獲引子(其在本文中可命名為P5*)，且第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子為縮短的P7捕獲引子(其可命名為P7*)。舉例而言，P5及P7之前述序列可自3'端縮短約2至10個鹼基，以分別形成縮短的P5捕獲引子(P5*)及縮短的P7捕獲引子(P7*)。在一些實例中，縮短的P7捕獲引子(P7*)可具有序列5'-TTTTTCAAGCAGAAGACGGC-3' (SEQ ID NO: 3)。在一些實例中，縮短的P5捕獲引子(P5*)可具有序列5'-TTTTTAATGATACGGCGACCA-3' (SEQ ID NO: 4)。

【0093】 第二轉接子355可為縮短的互補P5轉接子(在本文中其可命名為cP5*)，例如可為全長互補P5轉接子(在本文中其可命名為cP5)之縮短版本。全長互補P5轉接子(cP5)可具有序列5'-TCGGTGGTCGCCGTATCATT-3' (SEQ ID NO: 5)，且可購自Illumina, Inc。縮短的互補P5轉接子(cP5*)可具有序列3'-GCGACCACCGAGATCTACAC-5' (SEQ ID NO: 6)。第一轉接子354可為縮短的互補P7轉接子(在本文中其可命名為cP7*)，例如可為全長互補P7轉接子(在本文中其可命名為cP7)之縮短版本。全長互補P7轉接子(cP7)可具有序列5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3' (SEQ ID NO: 7)且可購自Illumina, Inc。縮短的互補P7轉接子(cP7*)可具有序列3'-GACGGCATAACGAGAT-5' (SEQ ID NO: 8)，其中在一些實例中，以粗體指示之G可為8-側氧基-G，其可為諸如本文中他處描述之可裂解部分。說明性地，cP5及cP7之上述序列可自3'端或5'端或自3'端及5'端兩者縮短約2至10個鹼基，以形成縮短的cP7轉接子(cP7*)及縮短的cP5轉接子(cP5*)。

【0094】如圖3B中所說明，第一目標聚核苷酸351、第二目標聚核苷酸352及第三目標聚核苷酸353之轉接子354、355可例如根據帕松分佈，與基材300之不同位置中之不同捕獲引子隨機雜交。在特定說明之實例中，目標聚核苷酸351之第一轉接子354與基材300之第一區301中的第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332雜交以形成雙螺旋體361。目標聚核苷酸352之第二轉接子355與基材300之第二區302中的第二複數個捕獲引子之捕獲引子341雜交以形成雙螺旋體362。目標聚核苷酸353之第一轉接子354與基材300之第一區301中的第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332雜交以形成雙螺旋體363。由轉接子與捕獲引子或正交捕獲引子之間的此類初始雜交產生的雙螺旋體之解鏈溫度(T_m)可大於約40°C，例如大於約45°C、或大於約50°C、或大於約55°C、或大於約60°C、或大於約65°C、或大於約70°C，例如在反應溫度或保存組合物3000之其他溫度下可為相對穩定的。然而，如本文中所描述，基材上目標聚核苷酸之轉接子與捕獲引子或正交捕獲引子最初雜交之特定位置影響此類聚核苷酸經擴增之程度。舉例而言，與最初充分遠離第一基材區301與第二基材區302之間的邊界310雜交之聚核苷酸相比，最初充分靠近該邊界雜交之目標聚核苷酸可容易擴增。

【0095】舉例而言，如圖3C中所說明，在參考圖3B描述之最初雜交之後，第一目標聚核苷酸351、第二目標聚核苷酸352及第三目標聚核苷酸353中之每一者可經擴增，例如分別形成第一擴增子351'、第二擴增子352'及第三擴增子353'。在此類擴增之後，第一目標聚核苷酸351、第二目標聚核苷酸352及第三目標聚核苷酸353可以諸如圖3D中所說明之方式去雜交，同時第一擴增子351'、第二擴增子352'及第三擴增子353'保持

共價鍵結至基材300。應注意，不必一定執行此類去雜交。舉例而言，代替使第一目標聚核苷酸351、第二目標聚核苷酸352及第三目標聚核苷酸353去雜交，此類聚核苷酸可保持與基材雜交且可使用諸如此項技術中已知之股侵入方法進一步擴增且可稱為ExAmp。

【0096】 如圖3E中所說明，在參考圖3C至3D所描述之初始擴增之後，所得擴增子可彎曲以便潛在地與基材300上之其他捕獲引子或正交捕獲引子雜交。舉例而言，第二擴增子352'之第一轉接子354可不與正交捕獲引子342中之第二者充分雜交，以便在反應溫度下保持穩定。舉例而言，由於正交捕獲引子342中之每一者相對較短且第二擴增子352'之第一轉接子354相對較短，因此第二擴增子352'可能無法彎曲足夠遠以將正交捕獲引子342中之任一者之序列與轉接子354之序列進行充分比對。因而，形成於第二擴增子之第一轉接子354與任一正交捕獲引子342之間的任何雙螺旋體可具有低於反應溫度之解鏈溫度(T_m)，且因此任何此類雙螺旋體可足夠快速地解鏈以抑制第二擴增子352'之擴增。舉例而言，由第二擴增子352'之第一轉接子354與正交捕獲引子342中之任一者之間的至多部分雜交產生的任一雙螺旋體365之解鏈溫度(T_m)可小於約 20°C ，例如小於約 15°C 、小於約 10°C 或小於約 5°C 。說明性地，使用上文提供之實例序列，縮短之P7捕獲引子(P7*)可與縮短之互補P7轉接子(cP7*)重疊僅約5個鹼基或更少，且縮短之P5捕獲引子(P5*)可與縮短之互補P5引子重疊僅約10個鹼基或更少、或約9個鹼基或更少、或約8個鹼基或更少、或約7個鹼基或更少、或約6個鹼基或更少、或約5個鹼基或更少、或約4個鹼基或更少、或約3個鹼基或更少、或約2個鹼基或更少、或約1個鹼基或無鹼基。因而，在反應溫度下，不大可能形成任一此類雙螺旋體持續足以使聚合酶

(未特定說明)開始使用任一正交捕獲引子342作為用於此類擴增之引子來形成第二擴增子352'中之擴增子的時間量。類似地，第一擴增子351'之第二轉接子355可能無法與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子331中之任一者充分雜交。舉例而言，由於捕獲引子331中之每一者相對較短且轉接子355相對較短，因此第一擴增子351'可能無法充分彎曲直至使轉接子355之序列與捕獲引子331中之任一者的序列充分接觸。此類不能充分雜交可抑制第一擴增子351'之擴增，例如可抑制聚合酶(未特定說明)能夠使用任一捕獲引子331作為用於此類擴增之引子來形成第一擴增子351'中之擴增子。

【0097】 相比之下，第三擴增子353'足夠靠近基材300之第一區301與第二區302之間的邊界310，使得該擴增子之第二轉接子355可與邊界交叉，從而在基材300之第二區302中與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341完全雜交，以形成雙螺旋體366。舉例而言，由於捕獲引子341為全長的，因此即使轉接子355相對較短，第三擴增子353'仍能夠彎曲足夠遠以將轉接子355之序列與捕獲引子341之序列進行比對。第三擴增子353'之第二轉接子355與捕獲引子341之雜交可促進第三擴增子353'之擴增，且因此促進目標聚核苷酸353之進一步擴增。

【0098】 舉例而言，由第三擴增子353'之轉接子355與捕獲引子341之間的雜交產生之雙螺旋體366之解鏈溫度(T_m)可大於約 40°C ，例如大於約 45°C 、或大於約 50°C 、或大於約 55°C 、或大於約 60°C 、或大於約 65°C 或大於約 70°C 。因而，在反應溫度下，有可能形成雙螺旋體366 (以及參考圖3B描述之雙螺旋體363)持續足以使聚合酶(未特定說明)開始使用捕獲引子341作為用於此類擴增之引子來形成第三擴增子353'中之擴增子的時

間量。

【0099】 因此，可視為「充分靠近邊界」之目標聚核苷酸(或其擴增子)可與邊界310之一側上的捕獲引子雜交，且可與邊界310之另一側上的正交捕獲引子雜交。應瞭解，目標聚核苷酸(或擴增子)愈長，則距該邊界愈遠，其能夠與邊界310之一側上的捕獲引子雜交且與邊界310之另一側上的正交捕獲引子雜交。說明性地，長度為500個鹼基之目標聚核苷酸(或擴增子)可為大致150 nm長。由此，視其中目標聚核苷酸(或擴增子)最初雜交之處而定，邊界310之任一側上的至多約150 nm對於該聚核苷酸而言可為「充分靠近邊界」。相反地，長度為250個鹼基之目標聚核苷酸(或擴增子)可為大致75 nm長，而長度為1000個鹼基之目標聚核苷酸(或擴增子)可為大致300 nm長。在任何此類實施例中，目標聚核苷酸(或擴增子)可到達且因此優先擴增之邊界310兩端的距離與該目標聚核苷酸(或擴增子)之物理長度有關。

【0100】 圖3F說明另一擴增操作之後的圖3E之組合物。可看出，組合物包括擴增子353'之額外擴增子353"。此類額外擴增子可與擴增子353'雜交。如圖3F中所展示，擴增操作可分別使用第一正交捕獲引子332及第二捕獲引子341之序列來延伸額外擴增子353"之第一轉接子354及第二轉接子355以形成延長(例如全長)轉接子354'、355'。相比之下，組合物可不包括擴增子351'、352'之任何其他擴增子，例如此係由於彼等擴增子之轉接子與捕獲引子或正交捕獲引子之不充分雜交可抑制彼等擴增子之任何擴增。擴增操作可重複任何適合的次數以便產生擴增子353'、353"中之其他擴增子，該等擴增子中之每一者之全長轉接子354'、355'可視需要容易地與各別縮短捕獲引子331、342或全長捕獲引子332、341雜交。舉例而

言，如圖3G中所展示，擴增子353'之全長第一轉接子354'可與第一區301中之第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332雜交，且擴增子353"之全長第二轉接子355'可與第二區302中之第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341雜交。如圖3H中所展示，在另一擴增操作之後，接著可形成目標聚核苷酸353之額外擴增子356'、356"。在重複擴增操作直至第一基材區401及第二基材區402經填滿的情況下，所得擴增子之兩個轉接子可能未必與對應捕獲引子或正交捕獲引子雜交，且因此擴增子可遠離基材線性地延伸，如圖3I中所說明。

【0101】 擴增操作可形成任何適合次數以使用至少官能性單株簇且在一些實例中大體上單株簇，例如用目標聚核苷酸353之擴增子大體上填充第一基材區301及第二基材區302兩者。舉例而言，第一基材區301及第二基材區302中之每一者內的擴增子各自可包括一個選定目標聚核苷酸之至少約60%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約70%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約80%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約90%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約95%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約98%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約99%擴增子或一個選定目標聚核苷酸之約100%擴增子。如上文所提及，在一些實例中，某些捕獲引子及正交捕獲引子可包括非核苷酸部分。此類非核苷酸部分可包括但不限於經其可選擇性地移除一部分捕獲引子之切除部分，或諸如下文參考圖4A至4L進一步描述之封端基團。舉例而言，如圖3A至3I中所展示，第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332可包括切除部分333，且第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341可包括切除部分343。切除部分333、343可沿任何適合引子之長度位於任何適合

位置處且可(但不必一定)為彼此相同類型之切除部分。在諸如參考圖3E至3I所描述之所要數目個額外擴增操作之後，可藉由使適合之酶或試劑與切除部分333反應來移除第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子332的部分，且可藉由使適合之酶或試劑與切除部分343反應來移除第二複數個捕獲引子中之捕獲引子341的部分。同切除部分333一起使用之酶或試劑可與同切除部分343一起使用之酶或試劑相同或不同。如圖3J中所說明，切除部分333之反應移除第一基材區301中之一個方向的聚核苷酸，且切除部分334之反應移除第二基材區302中之另一方向的聚核苷酸，使得可在兩個基材區中執行同步成對末端讀段。第一基材區301及第二基材區302中之所得線性化擴增子可為至少官能性單株，且可為大體上單株。

【0102】 本文提供產生基材之大體上單株區域之其他方法。說明性地，在本文提供之其他實施例中，在基材之第一區中執行接種目標聚核苷酸及擴增，同時基材之第二區中之引子可經封端，使得此類擴增最初可不在此區域中執行。接著，第二區中之引子未封端。可預期已在第一區中最高程度擴增的目標聚核苷酸在第二區中進一步擴增，因此提高單純系性。

【0103】 舉例而言，圖4A至4L示意性地說明在第一基材區中使用未封端引子且在第二基材區中使用可移除封端引子來擴增聚核苷酸的製程流程中之實例組合物及操作。圖4A中所說明之組合物4000包括基材400，其包括可與參考圖3A描述之彼等區域類似的第一區401及第二區402。第一複數個捕獲引子431可偶合至基材400之第一區401，且第一複數個正交捕獲引子432可偶合至基材400之第一區401。第二複數個捕獲引子441可偶合至基材400之第二區402，且第二複數個正交捕獲引子442可偶合至基材之第二區402。在圖4A中所說明之實例中，所有引子之長度可彼此相

同。舉例而言，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子431與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子441大致一樣長。第二複數個捕獲引子中之捕獲引子441與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子432大致一樣長。替代地，捕獲引子及正交捕獲引子在基材中之不同區域中可為彼此不同的長度，例如以諸如參考圖3A至3J所描述之方式。

【0104】 第一複數個可移除封端基團444可偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子441，且第二複數個可移除封端基團445可偶合至第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子442。如下文所描述，可使用封端基團444、445以便抑制第二區402內之任何目標聚核苷酸之擴增，直至第一區401內之擴增大體上完成；接著可移除此類封端基團以便允許第一區401中產生之僅某些擴增子擴增，因此提高第二區402內之單純系性。在一個非限制性實例中，封端基團444、445包括可使用適合之酶，諸如磷酸酶或激酶(呈反向活性)移除之3'-磷酸酯基。在另一非限制性實例中，封端基團444、445包括藉由雙去氧核苷酸(ddNTP)封端之烯丙基-T基團，且可使用適合之試劑，諸如鈀移除。在另一非限制性實例中，封端基團444、445包括可使用適合之試劑，諸如還原劑移除之3'-O-疊氮基部分。在另一非限制性實例中，封端基團444、445包括可使用適合之試劑，諸如，緩衝(pH 5.2)硝酸鈉移除之3'-O-NH₂部分。在另一非限制性實例中，封端基團444、445包括可使用適合之試劑，諸如鈀移除之3'-O-烯丙基部分。在另一非限制性實例中，封端基團444、445包括可使用適合之酶，諸如酯酶移除之3'-酯部分。

【0105】 類似地，如參考圖3A至3J所描述，組合物4000進一步可包括流體，該流體包括目標聚核苷酸451、452、453。目標聚核苷酸451、

452、453中之每一者可包括與第一及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子432、442互補的第一轉接子454，及與第一及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子431、441互補的第二轉接子455。在圖4A所說明之非限制性實例中，目標聚核苷酸451、452、453之第一轉接子454與第一及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子432、442大約一樣長，且目標聚核苷酸451、452、453之第二轉接子455與第一及第二複數個正交捕獲引子中之捕獲引子431、441大約一樣長。

【0106】 在一個純說明性實例中，第一及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子431、441為P5捕獲引子，且第一及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子432、443為諸如上文所描述之P7捕獲引子。第一轉接子454可為cP7轉接子，且第二轉接子455可為諸如上文所描述之cP5轉接子。捕獲引子、正交捕獲引子及轉接子皆可為全長序列，或其中某些可以諸如參考圖3A至3J所描述之方式縮短。

【0107】 以與參考圖3B所描述類似的方式，目標聚核苷酸之轉接子454、455可例如根據帕松分佈與捕獲引子431、441或正交捕獲引子432、442中之隨機各別者雜交。舉例而言，目標聚核苷酸451之第一轉接子454可與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子432雜交以形成雙螺旋體461；目標聚核苷酸453之第一轉接子454可與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子432雜交以形成雙螺旋體463；且目標聚核苷酸452之第二轉接子455可與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子442雜交以形成雙螺旋體462。由轉接子與捕獲引子或正交捕獲引子之間的此類初始雜交產生的雙螺旋體之解鏈溫度(T_m)可大於約40°C，例如大於約45°C、或大於約50°C、或大於約55°C、或大於約60°C、或大於約65°C、或大於約70°C，

例如在反應溫度或保存組合物4000之其他溫度下可為相對穩定的。如下文所描述，目標聚核苷酸451、453可容易在第一基材區401內擴增，而第二基材區402中之封端基團444、445可抑制目標聚核苷酸402之擴增。

【0108】 舉例而言，如圖4C中所說明，在參考圖4B所描述之最初雜交之後，第一目標聚核苷酸451及第三目標聚核苷酸453可經擴增，例如分別形成第一擴增子451'及第三擴增子453'，同時封端基團444可抑制第二目標聚核苷酸452之擴增。在此類擴增之後，第一目標聚核苷酸451、第二目標聚核苷酸452及第三目標聚核苷酸453可以諸如圖4D中所說明之方式去雜交，同時第一擴增子451'及第三擴增子453'保持共價鍵結至基材400。

【0109】 如圖4E中所說明，第一擴增子451'之第二轉接子455可與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子431雜交以形成雙螺旋體464。第三擴增子453'之第二轉接子455可與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子431雜交以形成雙螺旋體465。以與參考圖3E所描述類似之方式，擴增子451'、453'之第二轉接子455與捕獲引子431之雜交可促進擴增子451'、453'之擴增。舉例而言，由擴增子451'、453'之各別轉接子455與捕獲引子431之間的雜交產生之雙螺旋體之解鏈溫度(T_m)可大於約 40°C ，例如大於約 45°C 、或大於約 50°C 、或大於約 55°C 、或大於約 60°C 、或大於約 65°C 或大於約 70°C 。因此，在用於擴增之反應溫度下，有可能形成雙螺旋體464、465 (以及參考圖4B所描述之雙螺旋體461、463)持續足以使聚合酶(未特定說明)開始使用捕獲引子或正交捕獲引子作為用於此類擴增之引子來形成擴增子451'、453'中之各別擴增子的時間量。

【0110】 如圖4F中所展示，擴增操作產生擴增子451'之額外擴增子

451"及擴增子453'之額外擴增子453"，而第二基材區402可不包括可經進一步擴增之任何擴增子。舉例而言，即使目標聚核苷酸(或擴增子)中之一者的第一轉接子455與正交捕獲引子442中之一者雜交，偶合至正交捕獲引子之可移除封端基團445仍可抑制該目標聚核苷酸(或擴增子)之擴增。作為另一實例，即使目標聚核苷酸(或擴增子)中之一者的第二轉接子與捕獲引子441中之一者雜交，偶合至捕獲引子之可移除封端基團444仍可抑制該目標聚核苷酸(或擴增子)之擴增。舉例而言，封端基團444、445可抑制聚合酶能夠開始使用捕獲引子441或正交捕獲引子442作為用於此類擴增之引子來形成目標聚核苷酸(例如，目標聚核苷酸452)之擴增子。應注意，此類擴增抑制替代地可使用可移除封端基團444及可移除封端基團445中之僅一者或使用可移除封端基團444及可移除封端基團445兩者來達成。

【0111】 其他擴增操作可用於在第一基材區401中產生目標聚核苷酸之其他擴增子，而封端基團444、445繼續抑制第二基材區402中之擴增。舉例而言，如圖4G中所展示，擴增子451'、451"、453'、453"之轉接子可變成與不同捕獲引子或正交捕獲引子雜交，且隨後擴增以產生諸如圖4H中所說明之另外的擴增子。在重複擴增操作直至第一基材區401經填滿的情況下，目標聚核苷酸及擴增子之兩個轉接子可能未必與對應捕獲引子或正交捕獲引子雜交，且因此目標聚核苷酸及擴增子可遠離基材線性地延伸。

【0112】 在此類擴增之後，可移除第一複數個可移除封端基團444，且可移除第二複數個可移除封端基團445，諸如圖4I中所展示。例如，在封端基團444、445包括彼此相同類型之部分的情況下，可同時移

除封端基團444及封端基團445。替代地，例如，在封端基團444、445包括彼此不同類型之部分的情況下，可以單獨步驟移除封端基團444及封端基團445。如圖4J中所說明，在移除第一複數個可移除封端基團444及第二複數個可移除封端基團445之後，目標聚核苷酸451、453中之一者的擴增子之第一轉接子454與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子442，例如先前封端之正交捕獲引子雜交。另外，如圖4J中所說明，在移除第一複數個可移除封端基團444及第二複數個可移除封端基團445之後，目標聚核苷酸451、453中之一者的擴增子之第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子441，例如先前封端之捕獲引子雜交。因此，可理解，自捕獲引子441及正交捕獲引子442移除封端基團使得第二基材區402可用於進一步擴增使用第一基材區401產生之擴增子。各種擴增子可進一步擴增，產生諸如圖4K中所說明之組合物。

【0113】 舉例而言，以與參考圖3A至圖3J所描述類似之方式，第一複數個捕獲引子中之捕獲引子431可包括切除部分433，且第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子442可包括切除部分433。切除部分433、443可為(但不必一定為)彼此相同類型之切除部分。在諸如參考圖4F至4K所描述之所要數目個擴增操作之後，可藉由使適合之酶或試劑與切除部分433反應來移除第一複數個捕獲引子中之捕獲引子431的部分，且可藉由使適合之酶或試劑與切除部分443反應來移除第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子442的部分。同切除部分433一起使用之酶或試劑可與同切除部分443一起使用之酶或試劑相同或不同。如圖4L中所說明，切除部分433之反應移除第一基材區401中之一個方向的聚核苷酸，且切除部分443之反應移除第二基材區402中之另一方向的聚核苷酸，使得可在兩個

基材區中執行同步成對末端讀段。基材區401、402中之每一者可為充分單株的以便允許同步成對末端讀段。舉例而言，第一基材區401及第二基材區402中之每一者內的擴增子各自可包括一個選定目標聚核苷酸之至少約60%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約70%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約80%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約90%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約95%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約98%擴增子、或一個選定目標聚核苷酸之至少約99%擴增子或一個選定目標聚核苷酸之約100%擴增子。

【0114】 儘管說明參考圖3A至3J及圖4A至4L所描述之實例以建議使用具有彼此鄰接之第一及第二區之平坦基材，但應明白，可使用更複雜的基材。舉例而言，圖5A至5D示意性地說明用於在第一及第二基材區中使用不同長度之引子擴增聚核苷酸的額外實例組合物。可以與參考圖3A至3J所描述的方式類似的方式使用諸如參考圖5A至5D所描述之組合物，例如以便偏置擴增以在選定區域中更高效。在圖5A中之橫截面及圖5C中之平面視圖中所展示之實例中，基材500可包括提供孔之一或多個豎直側壁503，其中基材之第一區501圍繞基材之第二區502（例如，豎直側壁503可為大體上圓柱形且圍繞第一區501及第二區502兩者，第一區501可為大體上環狀的，且第二區502可為大體上圓形的）。替代地，基材之第二區502可圍繞基材之第一區501（例如，豎直側壁503可為大體上圓柱形的且圍繞第一區501及第二區502兩者，第二區502可為大體上環狀的，且第一區501可為大體上圓形的）。作為又一替代例，可省略豎直側壁503，且基材500在所說明區域中可為大體上平面的。應瞭解，第一區501及第二區502可相對於彼此具有任何適合之形狀及位置。舉例而言，第二區502不

必一定為大體上圓形的且不必一定安置於第一區501之中間。類似地，第一區501不必一定為大體上環狀的且不必一定對稱地圍繞第二區。在任何此類實例中，以與參考圖3A所描述類似之方式，相對較短捕獲引子及正交捕獲引子可偶合至第一區501中之基材500，而較長(例如全長)捕獲引子及正交捕獲引子可偶合至第二區502中之基材500。因此，可偏置擴增以在第二區502中更高效，該第二區可居中定位且其中較長引子連接至基材500。

【0115】 在圖5B中之橫截面及圖5D中之平面視圖所展示之實例中，基材500'可包括一或多個豎直側壁503'，該豎直側壁提供圍繞基材之第二區502'且由基材之第一區501'圍繞的孔(例如豎直側壁503'可為大體上圓柱形的且圍繞大體上圓形的第二區502'，而第一區501'可為大體上環狀的且圍繞豎直側壁503'及第二區502')。替代地，基材之第一區501'可圍繞基材之第二區502' (例如，豎直側壁503'可為大體上圓柱形的且圍繞大體上圓形的第一區501'，而第二區502'可為大體上環狀的且圍繞豎直側壁503'及第一區501')。作為又一替代例，可省略豎直側壁503'，且基材500在所說明區域中可為大體上平面的。應瞭解，第一區501'及第二區502'可相對於彼此具有任何適合之形狀及位置。舉例而言，第二區502'不必一定為大體上圓形的且不必一定位於第一區501'之中間。類似地，第一區501'不必一定為大體上環狀的且不必一定對稱地圍繞第二區。在任何此類實例中，以與參考圖3A所描述類似之方式，相對較短捕獲引子及正交捕獲引子可偶合至第一區501'中之基材500'，而較長(例如全長)捕獲引子及正交捕獲引子可偶合至第二區502'中之基材500'。因此，可偏置擴增以在第二區502'中更高效，該第二區可居中定位且其中較長引子連接至基材500'。

【0116】圖6A至6D示意性地說明用於在第一基材區中使用未封端引子且在第二基材區中使用可移除封端引子來擴增聚核苷酸的額外實例組合物。諸如參考圖6A至6D所描述之組合物可以與參考圖4A至4L所描述的方式類似的方式使用，例如以便偏置擴增以在選定區域中更高效。在圖6A中之橫截面及圖6C中之平面視圖中所展示之實例中，基材600可包括提供孔之一或多個豎直側壁603，其中基材之第一區601圍繞基材之第二區602 (例如，豎直側壁603可為大體上圓柱形且圍繞第一區601及第二區602兩者，第一區601可為大體上環狀的，且第二區602可為大體上圓形的)。替代地，基材之第二區602可圍繞基材之第一區601 (例如，豎直側壁603可為大體上圓柱形的且圍繞第一區601及第二區602兩者，第二區602可為大體上環狀的，且第一區601可為大體上圓形的)。作為又一替代例，可省略豎直側壁603，且基材600在所說明區域中可為大體上平面的。應瞭解，第一區601及第二區602可相對於彼此具有任何適合之形狀及位置。舉例而言，第二區602不必一定為大體上圓形的且不必一定位於第一區601之中間。類似地，第一區601不必一定為大體上環狀的且不必一定對稱地圍繞第二區。在任何此類實例中，以與參考圖4A所描述類似之方式，偶合至封端基團之捕獲引子及正交捕獲引子可偶合至第一區601中之基材600，而未封端捕獲引子及正交捕獲引子可偶合至第二區602中之基材600。因此，可偏置擴增以在第二區602中更高效，該第二區可居中定位且其中省略封端基團601。

【0117】在圖6B中之橫截面及圖6D中之平面視圖所展示之實例中，基材600'可包括一或多個豎直側壁603'，該豎直側壁提供圍繞基材之第二區602'且由基材之第一區601'圍繞的孔(例如豎直側壁603'可為大體上

圓柱形的且圍繞大體上圓形的第二區602'，而第一區601'可為大體上環狀的且圍繞豎直側壁603'及第二區602')。替代地，基材之第一區601'可圍繞基材之第二區602' (例如，豎直側壁603'可為大體上圓柱形的且圍繞大體上圓形的第一區601'，而第二區602'可為大體上為環狀的且圍繞垂直側壁603'及第一區601')。作為又一替代例，可省略豎直側壁603，且基材600在所說明區域中可為大體上平面的。應瞭解，第一區601及第二區602可相對於彼此具有任何適合之形狀及位置。舉例而言，第二區602不必一定為大體上圓形的且不必一定位於第一區601之中間。類似地，第一區601不必一定為大體上環狀的且不必一定對稱地圍繞第二區。在任何此類實例中，以與參考圖4A所描述類似之方式，經封端捕獲引子及經封端正交捕獲引子可偶合至第一區601'中之基材600'，而未封端捕獲引子及未封端正交捕獲引子可偶合至第二區602'中之基材600'。因此，可偏置擴增以在第二區602'中更高效，該第二區可居中定位且其中省略封端基團601'。

【0118】 應瞭解，諸如本文所描述之實例組合物可用於擴增聚核苷酸之任何適合之方法中。舉例而言，圖7說明在第一及第二基材區中使用不同長度之引子擴增聚核苷酸之方法700中之實施操作流程。儘管方法700可使用參考圖3A至3J所描述之組合物3000或參考圖5A至5D所描述之組合物來實施，但方法700可使用任一其他適合之組合物來實施。

【0119】 現參看圖7，方法700包括使組合物與流體接觸(操作710)。在一些實例中，組合物可為諸如參考圖3A、圖5A或圖5B所描述。說明性地，組合物可包括基材，該基材包括第一區及第二區，例如第一區301、501或501'、及第二區302、502或502'。第一複數個捕獲引子可偶合至基材之第一區，例如捕獲引子331，或第一區501或501'內之捕獲引子。

第二複數個捕獲引子可偶合至基材之第二區，例如捕獲引子341或第二區502或502'內之捕獲引子。第二複數個捕獲引子中之捕獲引子可比第一複數個捕獲引子中之捕獲引子長。第一複數個正交捕獲引子可偶合至基材之第一區，例如正交捕獲引子332，或第一區501或501'內之正交捕獲引子。第二複數個正交捕獲引子可偶合至基材之第二區，例如正交捕獲引子342或第二區502或502'內之正交捕獲引子。第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子可比第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子短。

【0120】 流體可包括目標聚核苷酸。目標聚核苷酸中之每一者可包括與第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子互補的第二轉接子，例如參考圖3A描述之第一轉接子354及第二轉接子355。

【0121】 方法700進一步可包括使目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子或第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子雜交，或使該目標聚核苷酸之第二轉接子與第一複數個捕獲引子或第二複數個捕獲引子中之捕獲引子雜交(操作720)。舉例而言，如上文參考圖3B所描述，目標聚核苷酸可例如根據帕松分佈而分佈於整個基材表面上。然而，如上文參考圖3E至3I所描述，對於充分遠離第一基材區與第二基材區之間的邊界雜交之目標聚核苷酸，基材之彼區域中之縮短捕獲引子或縮短正交捕獲引子可完全或部分地抑制此類聚核苷酸之另一轉接子的雜交。相比之下，對於充分靠近第一基材區與第二基材區之間的邊界雜交之目標聚核苷酸，可產生多個擴增子。

【0122】 方法700進一步可包括擴增目標聚核苷酸，該擴增包括產

生該目標聚核苷酸之擴增子(操作730)。舉例而言，如上文參考圖3E至3I所描述，充分靠近基材之第一區與第二區之間的邊界的目標聚核苷酸之擴增子可容易進一步擴增，而充分遠離邊界之目標聚核苷酸之擴增子不能進一步擴增。說明性地，方法700可包括將第一擴增子共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者，且使第一擴增子之第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者完全雜交，例如使得擴增子橋接基材之第一區與第二區之間的邊界且因此可進一步擴增。替代地，方法700可包括將第二擴增子共價偶合至第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者，且使第二擴增子之第一轉接子與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者完全雜交，例如使得擴增子橋接基材之第一區與第二區之間的邊界且因此可進一步擴增。

【0123】 方法700亦可包括將第三擴增子共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者，且使第三擴增子之第二轉接子不能與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者完全雜交。第二轉接子不能與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者完全雜交可擴增第三擴增子，例如，彼擴增子可不橋接基材之第一區與第二區之間的邊界。在一些實例中，第三擴增子之第二轉接子與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的任一者之間的任一部分雙螺旋體具有小於約20°C之解鏈溫度(T_m)。方法700亦或替代地可包括將第四擴增子共價偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者，且使第四擴增子之第一轉接子不能與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的任一者完全雜交。第一轉接子不能與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的任一者完全雜交可擴增第四擴增子。因而，第一或第二擴增子可進一步擴增，而第三及第四

擴增子不能進一步擴增。

【0124】 圖8說明在第一基材區中使用未封端引子且在第二基材區中使用可移除封端引子來擴增聚核苷酸之方法800中之實例操作流程。儘管方法800可使用參考圖4A至4L所描述之組合物4000或參考圖6A至6D所描述之組合物來實施，但方法800可使用任一其他適合之組合物來實施。

【0125】 現參看圖8，方法800包括使組合物與流體接觸(操作810)。在一些實例中，以諸如本文中其他處所描述之方式，組合物可包括基材，該基材包括第一區及第二區，例如第一區401、601或601'及第二區402、602或602'。第一複數個捕獲引子可偶合至基材之第一區，例如捕獲引子431，或第一區601或601'內之捕獲引子。第一複數個正交捕獲引子可偶合至基材之第一區，例如正交捕獲引子432，或第一區601或601'內之正交捕獲引子。第二複數個捕獲引子可偶合至基材之第二區，例如捕獲引子441或第二區602或602'內之捕獲引子。第二複數個正交捕獲引子可偶合至基材之第二區，例如正交捕獲引子442或第二區602或602'內之正交捕獲引子。第一複數個可移除封端基團(例如封端基團444)可偶合至第二複數個捕獲引子中之捕獲引子。第二複數個可移除封端基團(例如封端基團445)可偶合至第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子。流體可包括目標聚核苷酸。目標聚核苷酸中之每一者可包括與第一複數個正交捕獲引子及第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與第一複數個捕獲引子及第二複數個捕獲引子中之捕獲引子互補的第二轉接子，例如參考圖4A描述之第一轉接子454及第二轉接子455。

【0126】 方法800進一步可包括分別使目標聚核苷酸中之第一者的第一轉接子與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者雜交，

或使目標聚核苷酸中之第一者的第二轉接子與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者雜交(操作820)。舉例而言，如上文參考圖4B所描述，目標聚核苷酸可例如根據帕松分佈而分佈於整個基材表面上，且可與偶合至此類區域之引子雜交。此類目標聚核苷酸中之一或多者可位於其中引子包括封端基團之區域中，且此類目標聚核苷酸中之一或多者(例如目標聚核苷酸中之第一者)可位於其中引子不包括封端基團之區域中。

【0127】 方法800進一步可包括擴增目標聚核苷酸中之第一者，該擴增包含在基材之第一區中產生目標聚核苷酸中之第一者的擴增子(操作830)。舉例而言，由於基材之第一區中之引子缺乏封端基團，因此容易在第一區中以諸如參考圖4F至4H所描述之方式執行擴增。舉例而言，方法800可包括將擴增子共價偶合至第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者，該擴增子具有與第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。彼擴增子可易於在基材之第一區中進一步擴增。替代地，方法800可包括將擴增子共價偶合至第一複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者，該擴增子具有與第一複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。彼擴增子可易於在基材之第一區中進一步擴增。

【0128】 相比之下，由於基材之第二區中之引子包括封端基團，因此可在第二區中抑制擴增。封端基團可抑制在基材之第二區中雜交之任何目標聚核苷酸的擴增。舉例而言，目標聚核苷酸中之第二者的第一轉接子可與第二複數個正交捕獲引子中之正交捕獲引子中的一者雜交，或其中目標聚核苷酸中之第二者的第二轉接子與第二複數個捕獲引子中之捕獲引子中的一者雜交。偶合至捕獲引子中之一者的可移除封端基團可抑制目標聚

核苷酸中之第二者的擴增，或偶合至正交捕獲引子中之一者的可移除封端基團可抑制目標聚核苷酸中之第二者的擴增。

【0129】 方法800可包括例如以諸如參考圖4I所描述之方式移除第一複數個可移除封端基團及第二複數個可移除封端基團(操作840)。方法800可包括接著進一步擴增目標聚核苷酸中之第一者，該擴增包含例如以諸如參考圖4J至4K所描述之方式在基材之第二區中產生目標聚核苷酸中之第一者的額外擴增子(操作850)。應瞭解，本發明組合物及方法不限於與上文所描述之特定操作一起使用。舉例而言，儘管圖3A至3J及圖4A至4L可考慮符合「橋接擴增」或「表面結合聚合酶鏈反應」之操作，但應瞭解，本發明組合物及方法可容易適合於與其他擴增模態一起使用。一種此類擴增模態為「排除擴增」或ExAmp。排除擴增方法可允許擴增每個基材區之單一目標聚核苷酸及在基材區中產生大體上單株之擴增子群體。舉例而言，第一捕獲目標聚核苷酸在基材區內之擴增速率可相對於目標聚核苷酸在基材區處之慢得多的轉運及捕獲速率更快速。因而，基材區中捕獲之第一目標聚核苷酸可經快速擴增且填充整個基材區，因此抑制捕獲同一基材區中之額外目標聚核苷酸。替代地，在第二目標聚核苷酸連接至第一聚核苷酸之後的同一基材區的情況下，第一聚核苷酸之相對快速擴增可充分填充基材區以產生足夠強以藉由合成來執行定序之信號(例如基材區可為至少官能性單株)。使用排除擴增亦可產生單株基材區之超帕松分佈；亦即，官能性單株的呈陣列形式之基材區的分率可超出由帕松分佈預測之分率。

【0130】 增加適用簇之超帕松分佈係有用的，此係由於更多官能性單株基材區可產生較高品質信號，且因此改良SBS；然而，將目標聚核苷

酸接種至基材區中可遵循空間帕松分佈，其中用於增加所佔據基材區之數目的取捨增加了多株基材區的數目。一種獲得較高超帕松分佈之方法為快速進行接種，隨後在所接種目標聚核苷酸當中延遲。由於被認為係經由生物化學反應動力學而出現之延遲，稱為「動力學延遲」產生比另一接種目標開始更早之一種經接種目標聚核苷酸。排除擴增藉由使用重組酶促進引子(例如連接至基材區之引子)在重組酶介導序列匹配時侵入雙股DNA (例如目標聚核苷酸)來起作用。本發明組合物及方法可適合與重組酶一起使用，以促進本發明捕獲引子及正交捕獲引子在重組酶介導序列匹配時侵入本發明目標聚核苷酸中。實際上，本發明組合物及方法可適合與任何基於表面之聚核苷酸擴增方法一起使用，諸如熱PCR、化學變性PCR及酶介導之方法(其亦可稱為重組酶聚合酶擴增(RPA)或ExAmp)。

工作實例

【0131】 以下實例意欲為純說明性的且不得以任何方式限制。

【0132】 圖9示意性說明用於表徵捕獲引子長度對擴增效率之影響的基於溶液之模型組合物。更具體言之，模型組合物包括雙螺旋體，該雙螺旋體包括偶合至螢光團(螢光，FAM)之第一寡核苷酸；與包括P5引子之第二寡核苷酸雜交，該P5引子偶合至驟冷劑(黑色孔驟冷劑，BHQ)，使得驟冷劑抑制螢光團之螢光。P5轉接子、重組酶、聚合酶及複數個核苷酸用於在重組酶聚合酶擴增(RPA或ExAmp)過程中侵入第一寡核苷酸與第二寡核苷酸之間的雙螺旋體中，從而引起侵入P5引子之延伸及第二寡核苷酸自第一寡核苷酸之解離，進而使得螢光團發螢光。

【0133】 圖10為說明由不同捕獲引子長度之擴增產生的螢光強度之曲線圖。更具體言之，跡線1001為使用29個鹼基長之全長P5引子的參考

圖9描述之模型組合物的所量測螢光強度；跡線1002為使用15個鹼基長之經修飾P5引子的彼系統之經量測強度；跡線1003為使用10個鹼基長之經修飾P5引子的彼系統之經量測強度；跡線1004為使用13個鹼基長之經修飾P5引子的彼系統之經量測強度；且跡線1005為不使用侵入P5引子之彼系統的經量測強度(陰性對照)。自圖10可見，使用全長P5引子之模型組合物之初始螢光強度為最高的，其指示此引子經最有效地擴增，其引起驟冷劑與螢光團之最高程度解離。使用15個鹼基長之經修飾P5引子的模型組合物之螢光強度開始於顯著低於使用全長P5引子之值，但逐漸增加至與使用全長P5引子之值類似的值。使用分別為13個鹼基及10個鹼基長之經修飾P5引子的模型組合物之螢光強度彼此類似。使用侵入P5引子之模型組合物的螢光強度(陰性對照)為最低的。自圖10可理解，可預期較短引子具有較低擴增效率。因此，對於諸如參考圖3A至3J所描述之組合物，可預期相比於在目標聚核苷酸可接近較長引子之邊界區域中，可預期擴增在目標聚核苷酸大體上僅可接近縮短引子之區域中的效率較低。

額外註解

【0134】 儘管上文描述各種說明性實例，但熟習此項技術者應顯而易知，可在不背離本發明之情況下於其中作出各種改變及修改。舉例而言，組合物可包括來自組合物3000及組合物4000之組分的任何適合組合，且方法可包括來自方法700及方法800之操作的任何適合組合。所附申請專利範圍欲覆蓋落入本發明之真實精神及範疇內之全部此類改變及修改。

【0135】 應理解，如本文中所描述之本發明態樣中的每一者之任何各別特徵/實例可以任何適當組合形式一起實施，且此等態樣中之任一者

或多者之任何特徵/實例可與如本文中所描述之一或多個其他態樣的特徵中之任一者一起以任何適當組合形式實施以達成如本文中所描述的益處。

【符號說明】

【0136】

101: 基材區

111: 種子

112: 種子

113: 種子

114 種子

115: 種子

121: 單株簇

122: 第一區/多株簇

123: 第二區/多株簇

124: 第一區/多株簇

125: 第二區/多株簇

201: 第一區

202: 第二區

211: 種子

212: 第一種子

213: 第二種子

214: 第一種子

215: 第二種子

216: 第一種子

- 217: 第二種子
- 221: 第一區
- 222: 第二區
- 223: 第一區
- 224: 單株簇
- 225: 第二區
- 226: 第一區
- 227: 單株簇
- 228: 第二區
- 229: 簇
- 230: 簇
- 300: 基材
- 301: 第一區
- 302: 第二區
- 310: 邊界
- 331: 捕獲引子
- 332: 正交捕獲引子
- 333: 切除部分
- 341: 捕獲引子
- 342: 正交捕獲引子
- 343: 切除部分
- 351: 目標聚核苷酸
- 351': 第一擴增子

- 352: 目標聚核苷酸
- 352': 第二擴增子
- 353: 目標聚核苷酸
- 353': 第三擴增子
- 353": 額外擴增子
- 354: 第一轉接子
- 354': 延長(例如全長)轉接子
- 355: 第二轉接子
- 355': 延長(例如全長)轉接子
- 356': 額外擴增子
- 356": 額外擴增子
- 361: 雙螺旋體
- 362: 雙螺旋體
- 363: 雙螺旋體
- 365: 雙螺旋體
- 366: 雙螺旋體
- 400: 基材
- 401: 第一區
- 402: 第二區
- 431: 捕獲引子
- 432: 正交捕獲引子
- 433: 切除部分
- 441: 捕獲引子

- 442: 正交捕獲引子
- 443: 切除部分
- 444: 可移除封端基團
- 445: 可移除封端基團
- 451: 目標聚核苷酸
- 451': 第一擴增子
- 451": 額外擴增子
- 452: 目標聚核苷酸
- 453: 目標聚核苷酸
- 453': 第三擴增子
- 453": 額外擴增子
- 454: 第一轉接子
- 455: 第二轉接子
- 461: 雙螺旋體
- 462: 雙螺旋體
- 463: 雙螺旋體
- 464: 雙螺旋體
- 465: 雙螺旋體
- 500: 基材
- 500': 基材
- 501: 第一區
- 501': 第一區
- 502: 第二區

502': 第二區
503: 豎直側壁
503': 豎直側壁
600: 基材
600': 基材
601: 第一區
601': 第一區
602: 第二區
602': 第二區
603: 豎直側壁
603': 豎直側壁
700: 方法
710: 操作
720: 操作
730: 操作
800: 方法
810: 操作
820: 操作
830: 操作
840: 操作
850: 操作
1001: 跡線
1002: 跡線

1003: 跡線

1004: 跡線

1005: 跡線

3000: 組合物

4000: 組合物

【序列表】

<110> 美商宜曼達股份有限公司(ILLUMINA, INC.)
英商伊路米納劍橋有限公司(ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED)

<120> 用於擴增聚核苷酸之組合物及方法

<130> IP-1997-PCT

<140> TW 110133695

<141> 2021-09-10

<150> US 63/077,857

<151> 2020-09-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註解=「人工序列之描述：合成引子」

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> source

<223> /註解=「人工序列之描述：合成引子」

<400> 2

caagcagaag acggcatacg a

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註解=「人工序列之描述：合成引子」

<400> 3
tttttcaag cagaagacgg c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註解=「人工序列之描述：合成引子」

<400> 4
tttttaatga tacggcgacc a 21

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註解=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 5
tcggtggtcg ccgtatcatt 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註解=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 6
cacatctaga gccaccagcg 20

<210> 7
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註解=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 7
tcgtatgccg tcttctgctt g 21

<210> 8
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> source
<223> /註解=「人工序列之描述：合成寡核苷酸」

<400> 8
tagagcatag ggcag 15

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於擴增聚核苷酸之組合物，該組合物包含：

基材，其包含第一區及第二區；

第一複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；

第二複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區，該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子比該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子長；

第一複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；及

第二複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區，該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短。

【請求項2】

如請求項1之組合物，其進一步包含流體，該流體包含目標聚核苷酸，該等目標聚核苷酸中之每一者包含與該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子互補的第二轉接子。

【請求項3】

如請求項2之組合物，其中該等目標聚核苷酸之該等第一轉接子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短，且其中該等目標聚核苷酸之該等第二轉接子比該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子短。

【請求項4】

如請求項2或請求項3之組合物，其中該等目標聚核苷酸中之第一者的該第一轉接子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的第一者雜交，或其中該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第二轉接子與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的第一者雜交。

【請求項5】

如請求項4之組合物，其中由該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第一轉接子與該等正交捕獲引子中之該第一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之組合物，其進一步包含共價偶合至該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者之第一擴增子，該第一擴增子具有與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之組合物，其進一步包含共價偶合至該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者之第二擴增子，該第二擴增子具有與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之組合物，其進一步包含共價偶合至該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者之第三擴增子，該第三擴增子具有不能與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的任一者完全雜交之第二轉接子。

【請求項9】

如請求項8之組合物，其中該第二轉接子不能與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了該第三擴增子之擴增。

【請求項10】

如請求項9之組合物，其中該第三擴增子之該第二轉接子與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的任一者之間的任一部分雙螺旋體具有小於約20°C之解鏈溫度(T_m)。

【請求項11】

如請求項1至10中任一項之組合物，其進一步包含共價偶合至該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者之第四擴增子，該第四擴增子具有不能與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的任一者完全雜交之第一轉接子。

【請求項12】

如請求項11之組合物，其中該第一轉接子不能與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了該第四擴增子之擴增。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之組合物，其中該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子為P5捕獲引子，且其中該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子為P7捕獲引子。

【請求項14】

如請求項13之組合物，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子為縮短的P5捕獲引子，且其中該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交

捕獲引子為縮短的P7捕獲引子。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之組合物，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子比該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子短至少5個鹼基，且其中該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短至少5個鹼基。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之組合物，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大致一樣長。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之組合物，其中該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大致一樣長。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之組合物，其中該基材之該第一區鄰接該基材之該第二區。

【請求項19】

如請求項1至18中任一項之組合物，其中該基材之該第一區圍繞該基材之該第二區。

【請求項20】

如請求項1至18中任一項之組合物，其中該基材之該第二區圍繞該基材之該第一區。

【請求項21】

一種用於擴增聚核苷酸之組合物，該組合物包含：

基材，其包含第一區及第二區；

第一複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；

第一複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；

第二複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區；

第二複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區；

第一複數個可移除封端基團，其偶合至該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子；及

第二複數個可移除封端基團，其偶合至該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子。

【請求項22】

如請求項21之組合物，其進一步包含流體，該流體包含目標聚核苷酸，該等目標聚核苷酸中之每一者包含與該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子互補的第二轉接子。

【請求項23】

如請求項22之組合物，其中該等目標聚核苷酸之該等第一轉接子與該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子大約一樣長，且其中該等目標聚核苷酸之該等第二轉接子與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大約一樣長。

【請求項24】

如請求項22或請求項23之組合物，其中該等目標聚核苷酸中之第一者的該第一轉接子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中之一者雜交，或其中該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第二轉接子與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中之一者雜交。

【請求項25】

如請求項24之組合物，其中由該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第二轉接子與該等捕獲引子中之該一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)，或其中由該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第一轉接子與該等正交捕獲引子中之該一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。

【請求項26】

如請求項22至25中任一項之組合物，其中該等目標聚核苷酸中之第二者的該第一轉接子與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者雜交，或其中該等目標聚核苷酸中之該第二者的該第二轉接子與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者雜交。

【請求項27】

如請求項26之組合物，其中偶合至該等捕獲引子中之該一者的該可移除封端基團抑制該等目標聚核苷酸中之該第二者的擴增，或其中偶合至該等正交捕獲引子中之該一者的該可移除封端基團抑制該等目標聚核苷酸中之該第二者的擴增。

【請求項28】

如請求項21至27中任一項之組合物，其進一步包含共價偶合至該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者的擴增子，該擴增

子具有與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。

【請求項29】

如請求項21至28中任一項之組合物，其進一步包含共價偶合至該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者的擴增子，該擴增子具有與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。

【請求項30】

如請求項21至29中任一項之組合物，其中該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子為P5捕獲引子，且其中該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子為P7捕獲引子。

【請求項31】

如請求項21至30中任一項之組合物，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子大致一樣長。

【請求項32】

如請求項21至31中任一項之組合物，其中該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大致一樣長。

【請求項33】

如請求項21至32中任一項之組合物，其中該基材之該第一區鄰接該基材之該第二區。

【請求項34】

如請求項21至33中任一項之組合物，其中該基材之該第一區圍繞該基材之該第二區。

【請求項35】

如請求項21至34中任一項之組合物，其中該基材之該第二區圍繞該基材之該第一區。

【請求項36】

一種用於擴增聚核苷酸之方法，該方法包含：

使組合物與流體接觸，其中該組合物包含：

基材，其包含第一區及第二區；

第一複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；

第二複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區，該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子比該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子長；

第一複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；及

第二複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區，該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短，且

其中該流體包含：

目標聚核苷酸，該等目標聚核苷酸中之每一者包含與該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子互補的第二轉接子；

使該等目標聚核苷酸中之第一者的該第一轉接子與該第一複數個正

交捕獲引子或該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者雜交，或使該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第二轉接子與該第一複數個捕獲引子或該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者雜交；且接著

擴增該等目標聚核苷酸中之該第一者，該擴增包含產生該等目標聚核苷酸中之該第一者的擴增子。

【請求項37】

如請求項36之方法，其中該等目標聚核苷酸之該等第一轉接子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短，且其中該等目標聚核苷酸之該等第二轉接子比該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子短。

【請求項38】

如請求項37或請求項38之方法，其中由該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第一轉接子與該等正交捕獲引子中之該第一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。

【請求項39】

如請求項36至38中任一項之方法，其中該擴增子與該等目標聚核苷酸中之該第一者雜交。

【請求項40】

如請求項39之方法，其進一步包含使該等目標聚核苷酸中之該第一者去雜交，且接著擴增該擴增子。

【請求項41】

如請求項36至40中任一項之方法，其進一步包含將第一擴增子共價偶合至該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者，且使

該第一擴增子之第二轉接子與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者完全雜交。

【請求項42】

如請求項36至41中任一項之方法，其進一步包含將第二擴增子共價偶合至該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者，且使該第二擴增子之第一轉接子與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者完全雜交。

【請求項43】

如請求項36至42中任一項之方法，其進一步包含將第三擴增子共價偶合至該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者，且使該第三擴增子之第二轉接子不能與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的任一者完全雜交。

【請求項44】

如請求項43之方法，其中該第二轉接子不能與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了該第三擴增子之擴增。

【請求項45】

如請求項36至44中任一項之方法，其中該第三擴增子之該第二轉接子與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的任一者之間的任一部分雙螺旋體具有小於約20°C之解鏈溫度(T_m)。

【請求項46】

如請求項36至45中任一項之方法，其進一步包含將第四擴增子共價偶合至該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者，且使該第四擴增子之第一轉接子不能與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引

子中的任一者完全雜交。

【請求項47】

如請求項46之方法，其中該第一轉接子不能與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的任一者完全雜交抑制了該第四擴增子之擴增。

【請求項48】

如請求項36至47中任一項之方法，其中該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子為P5捕獲引子，且其中該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子為P7捕獲引子。

【請求項49】

如請求項48之方法，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子為縮短的P5捕獲引子，且其中該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子為縮短的P7捕獲引子。

【請求項50】

如請求項36至49中任一項之方法，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子比該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子短至少5個鹼基，且其中該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子比該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子短至少5個鹼基。

【請求項51】

如請求項36至50中任一項之方法，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大致一樣長。

【請求項52】

如請求項36至51中任一項之方法，其中該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大致一樣長。

【請求項53】

如請求項36至52中任一項之方法，其中該基材之該第一區鄰接該基材之該第二區。

【請求項54】

如請求項36至53中任一項之方法，其中該基材之該第一區圍繞該基材之該第二區。

【請求項55】

如請求項36至53中任一項之方法，其中該基材之該第二區圍繞該基材之該第一區。

【請求項56】

一種用於擴增聚核苷酸之方法，該方法包含：

使組合物與流體接觸，其中該組合物包含：

基材，其包含第一區及第二區；

第一複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；

第一複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第一區；

第二複數個捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區；

第二複數個正交捕獲引子，其偶合至該基材之該第二區；

第一複數個可移除封端基團，其偶合至該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子；及

第二複數個可移除封端基團，其偶合至該第二複數個正交捕獲引

子中之該等正交捕獲引子，且

其中該流體包含目標聚核苷酸，該等目標聚核苷酸中之每一者包含與該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子互補的第一轉接子，及與該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子互補的第二轉接子；

使該等目標聚核苷酸中之第一者的該第一轉接子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的第一者雜交，或

使該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第二轉接子與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的第一者雜交；

擴增該等目標聚核苷酸中之該第一者，該擴增包含在該基材之該第一區中產生該等目標聚核苷酸中之該第一者的第一擴增子；

移除該第一複數個可移除封端基團及該第二複數個可移除封端基團；且接著

進一步擴增該等目標聚核苷酸中之該第一者，該擴增包含在該基材之該第二區中產生該等目標聚核苷酸中之該第一者的額外擴增子。

【請求項57】

如請求項56之方法，其中該等目標聚核苷酸之該等第一轉接子與該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大約一樣長，且其中該等目標聚核苷酸之該等第二轉接子與該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子大約一樣長。

【請求項58】

如請求項56或請求項57之方法，其中由該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第二轉接子與該等捕獲引子中之該一者之間的雜交形成的雙螺旋

體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)，或其中由該等目標聚核苷酸中之該第一者的該第一轉接子與該等正交捕獲引子中之該一者之間的雜交形成的雙螺旋體具有大於約40°C之解鏈溫度(T_m)。

【請求項59】

如請求項56至58中任一項之方法，其中該等目標聚核苷酸中之第二者的該第一轉接子與該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者雜交，或其中該等目標聚核苷酸中之該第二者的該第二轉接子與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者雜交。

【請求項60】

如請求項59之方法，其中偶合至該等捕獲引子中之該一者的該可移除封端基團抑制該等目標聚核苷酸中之該第二者的擴增，或其中偶合至該等正交捕獲引子中之該一者的該可移除封端基團抑制該等目標聚核苷酸中之該第二者的擴增。

【請求項61】

如請求項56至60中任一項之方法，其進一步包含將擴增子共價偶合至該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者，該擴增子具有與該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者完全雜交之第二轉接子。

【請求項62】

如請求項56至61中任一項之方法，其進一步包含將擴增子共價偶合至該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子中的一者，該擴增子具有與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子中的一者完全雜交之第一轉接子。

【請求項63】

如請求項56至62中任一項之方法，其中該第一複數個捕獲引子及該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子為P5捕獲引子，且其中該第一複數個正交捕獲引子及該第二複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子為P7捕獲引子。

【請求項64】

如請求項56至63中任一項之方法，其中該第一複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子大致一樣長。

【請求項65】

如請求項56至64中任一項之方法，其中該第二複數個捕獲引子中之該等捕獲引子與該第一複數個正交捕獲引子中之該等正交捕獲引子大致一樣長。

【請求項66】

如請求項56至65中任一項之方法，其中該基材之該第一區鄰接該基材之該第二區。

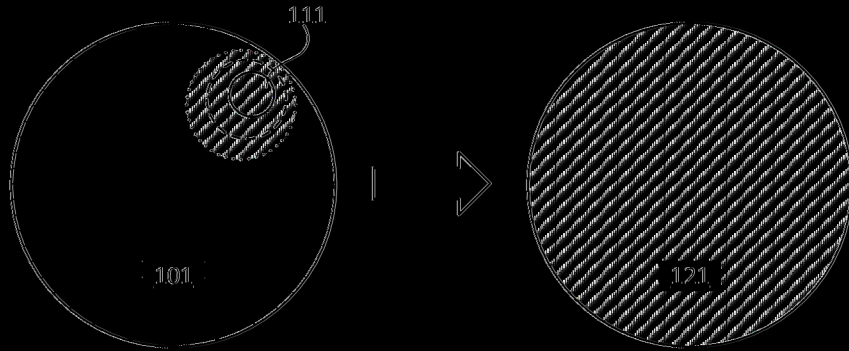
【請求項67】

如請求項56至66中任一項之方法，其中該基材之該第一區圍繞該基材之該第二區。

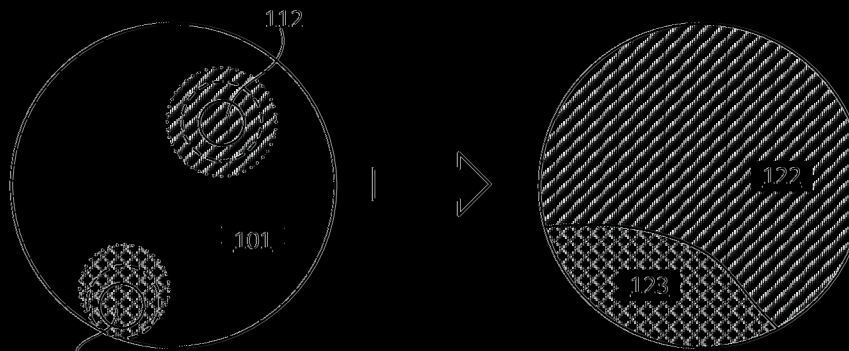
【請求項68】

如請求項56至66中任一項之方法，其中該基材之該第二區圍繞該基材之該第一區。

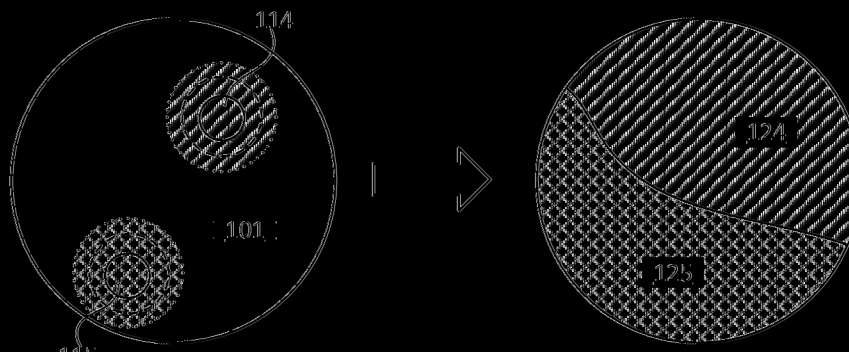
(發明圖式)



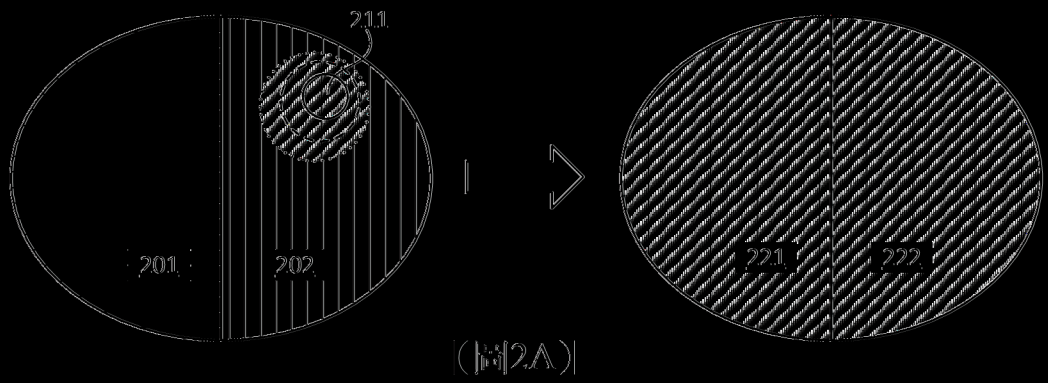
(圖1A)



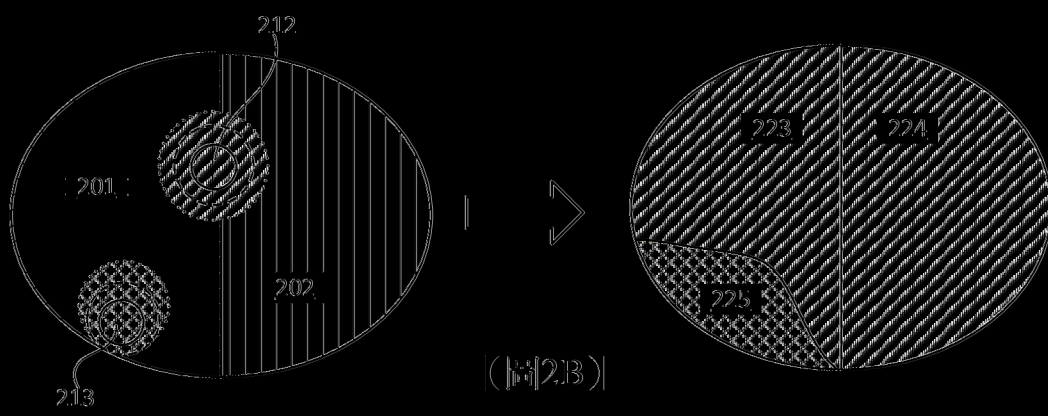
(圖1B)



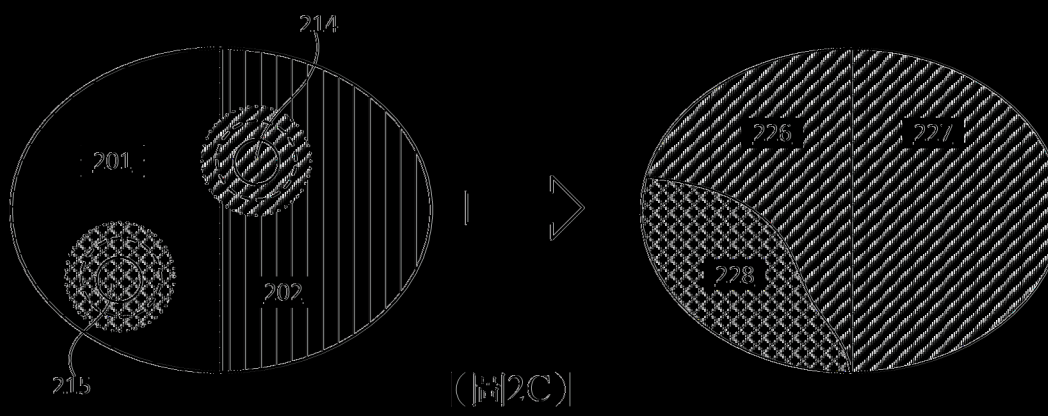
(圖1C)



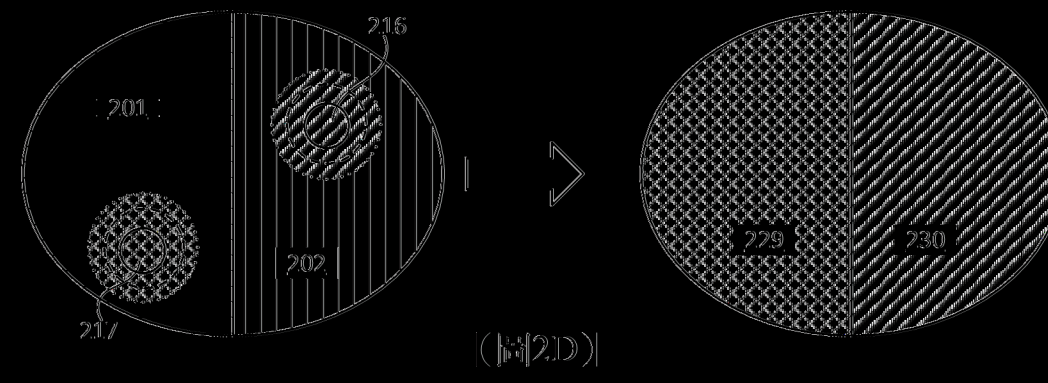
(圖2A)



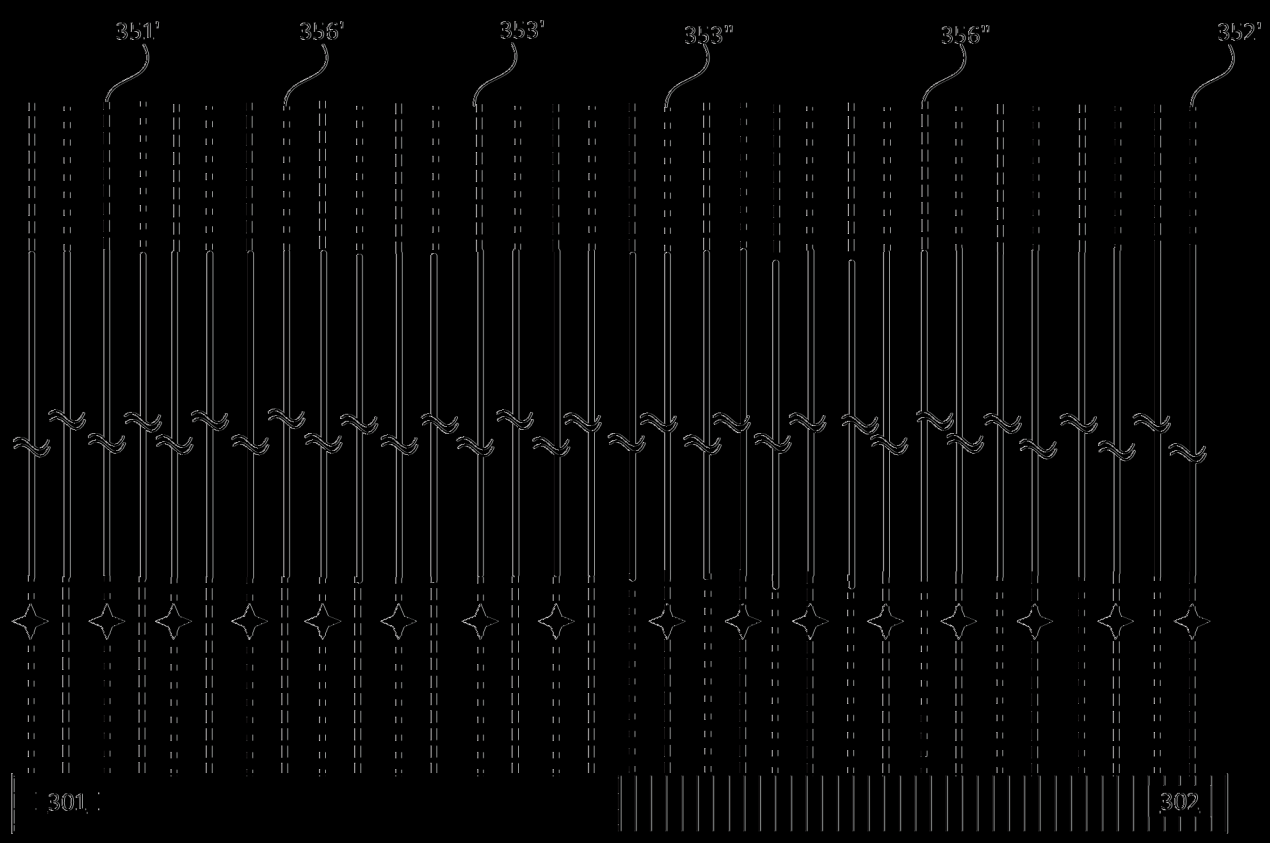
(圖2B)



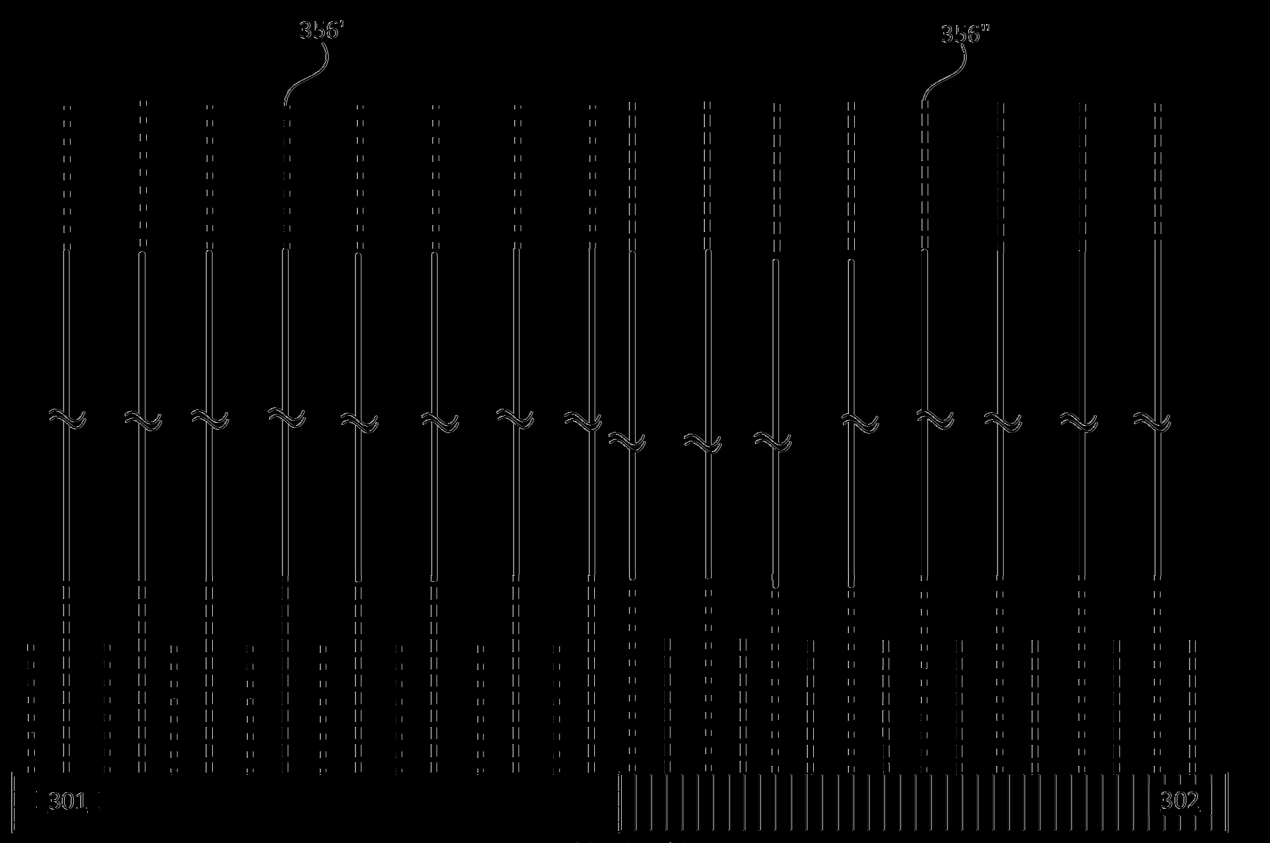
(圖2C)



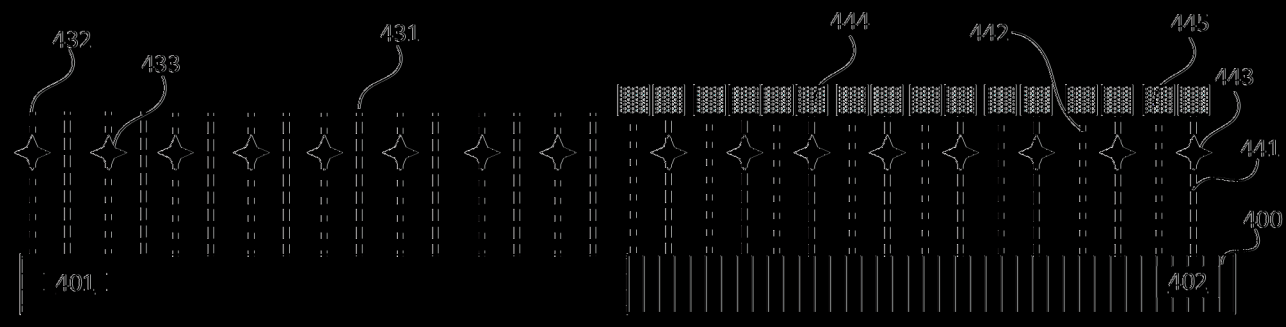
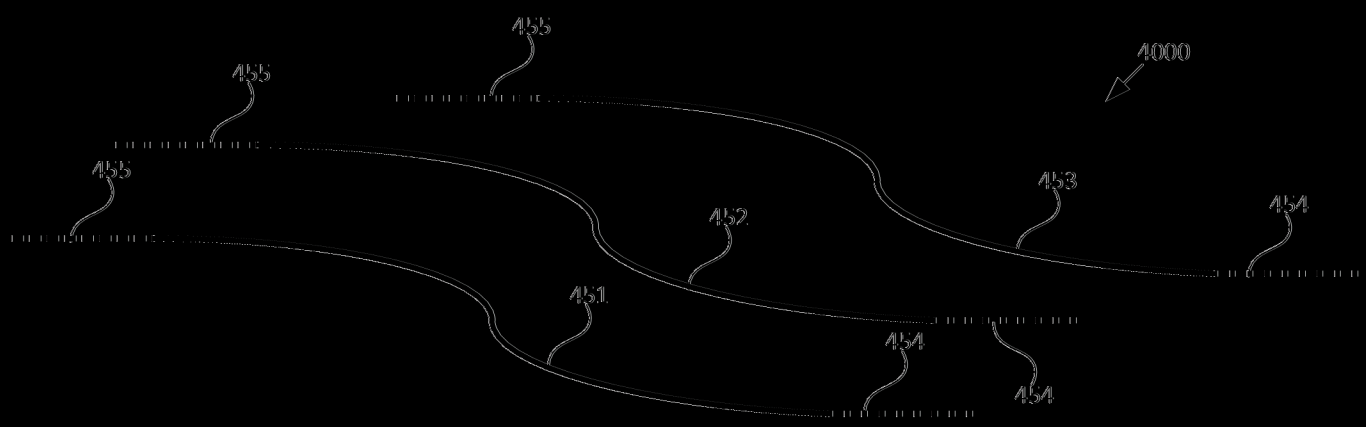
(圖2D)



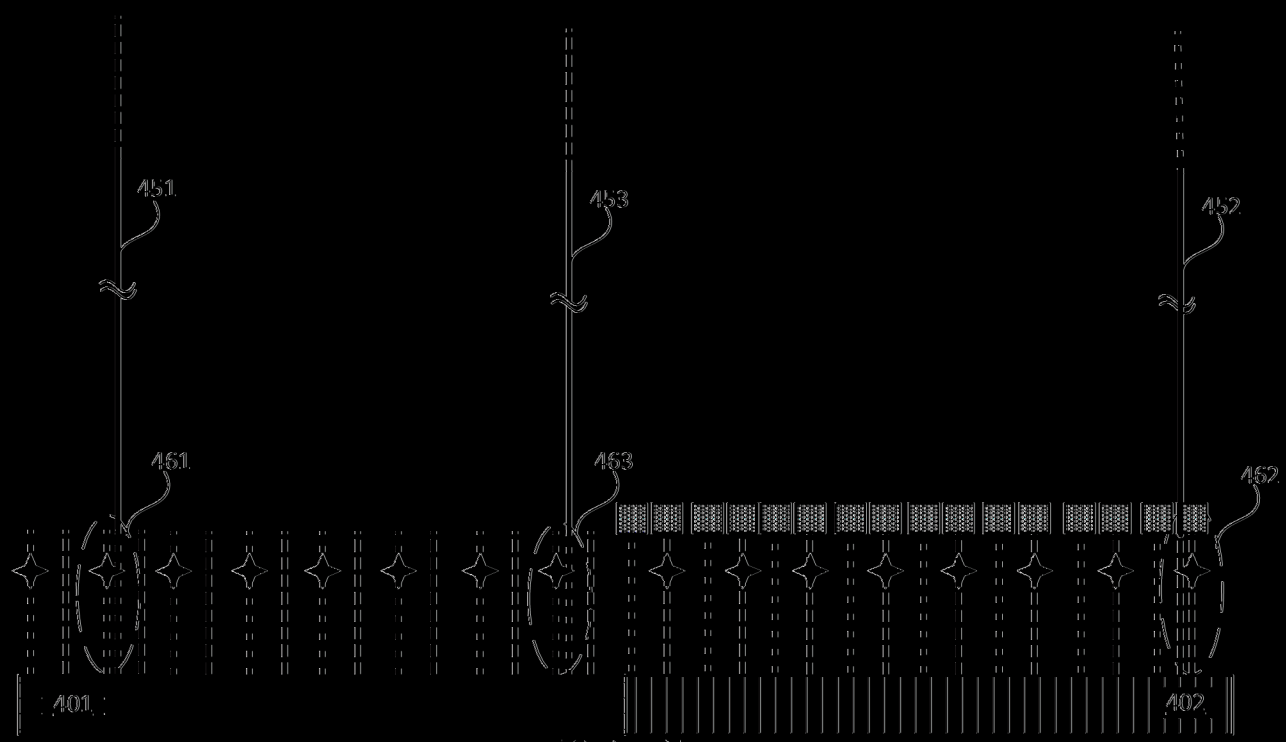
(Fig. 3I)



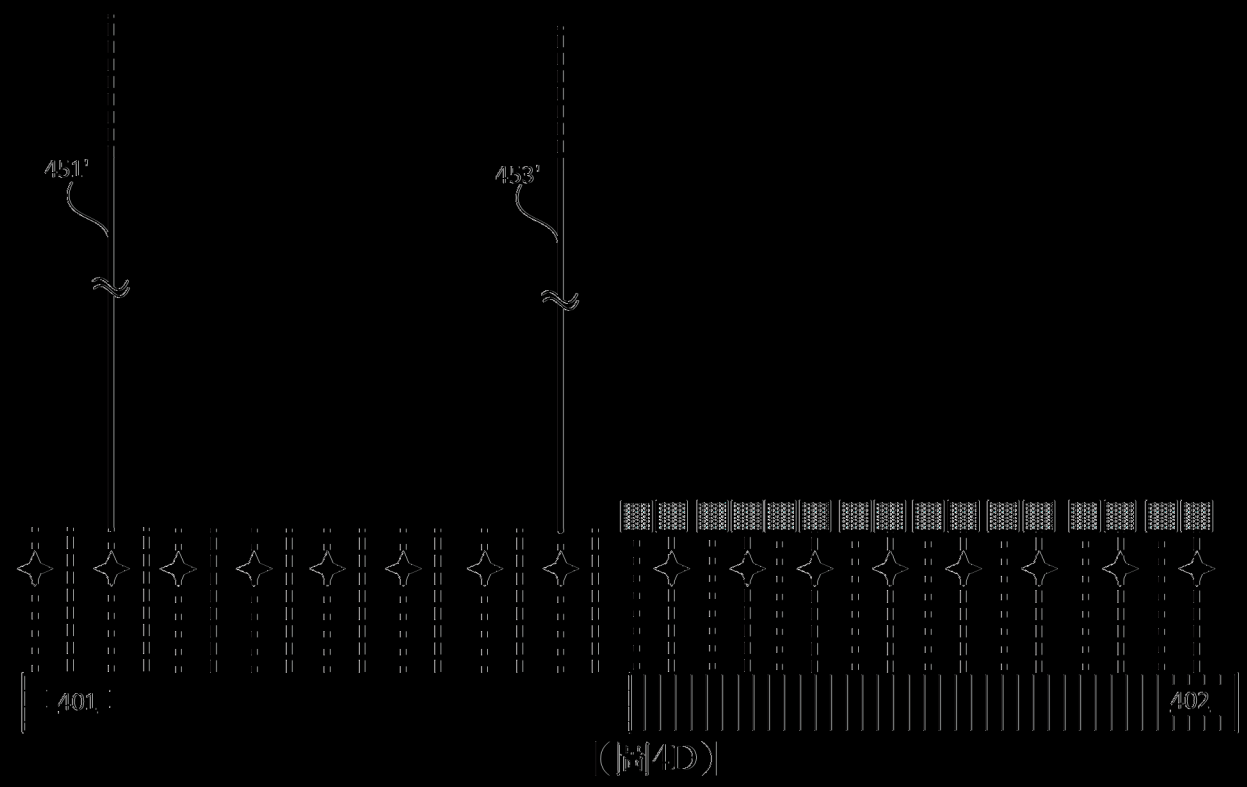
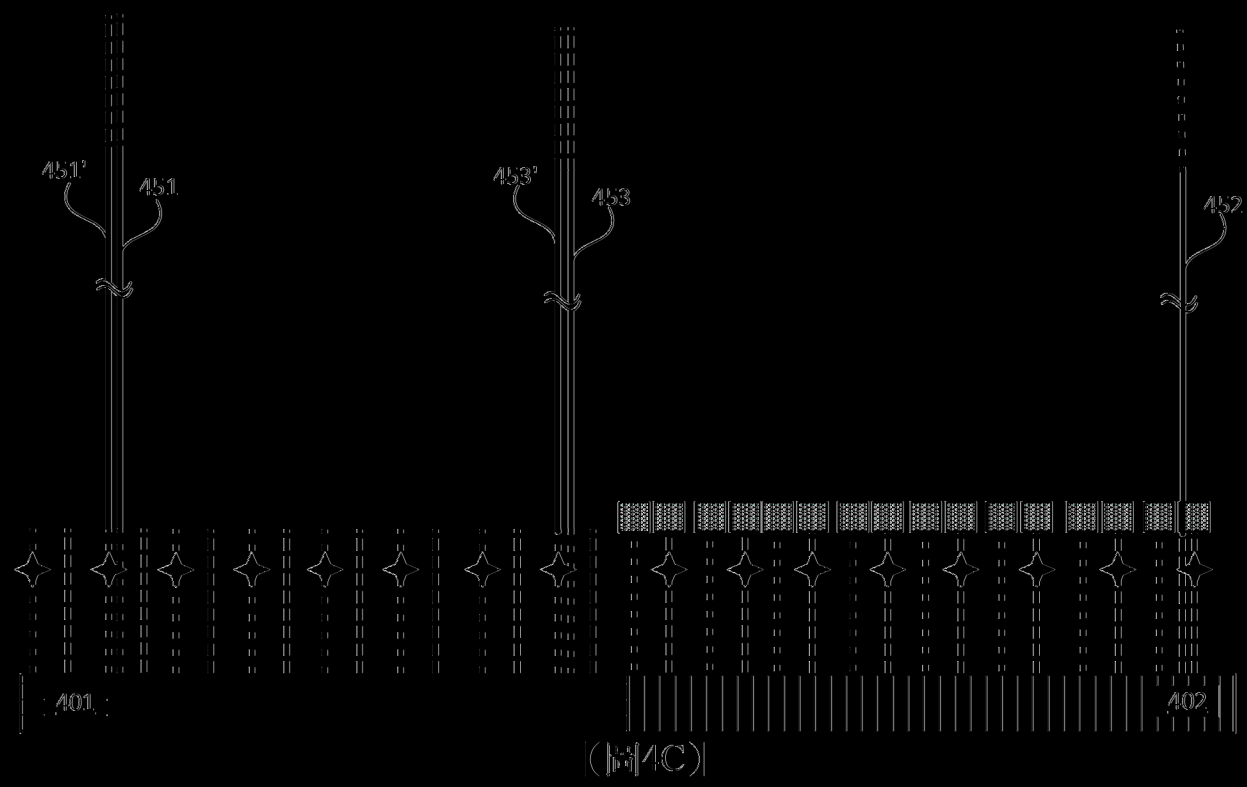
(Fig. 3J)

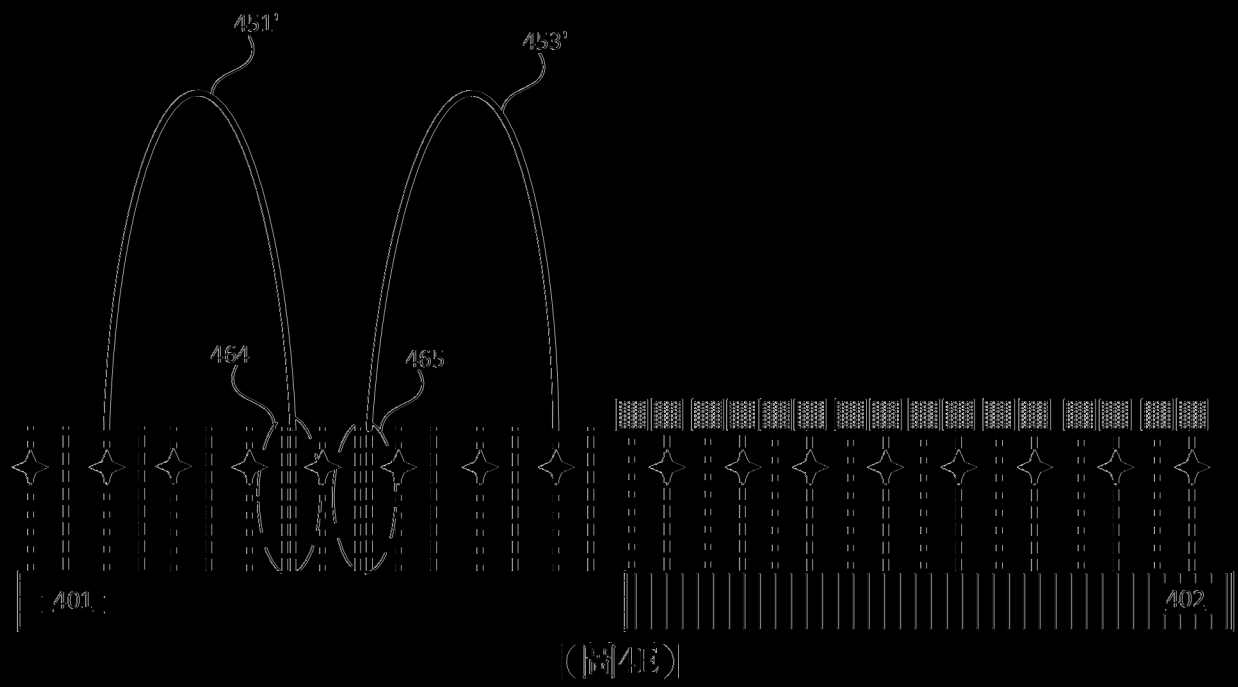


(圖4A)

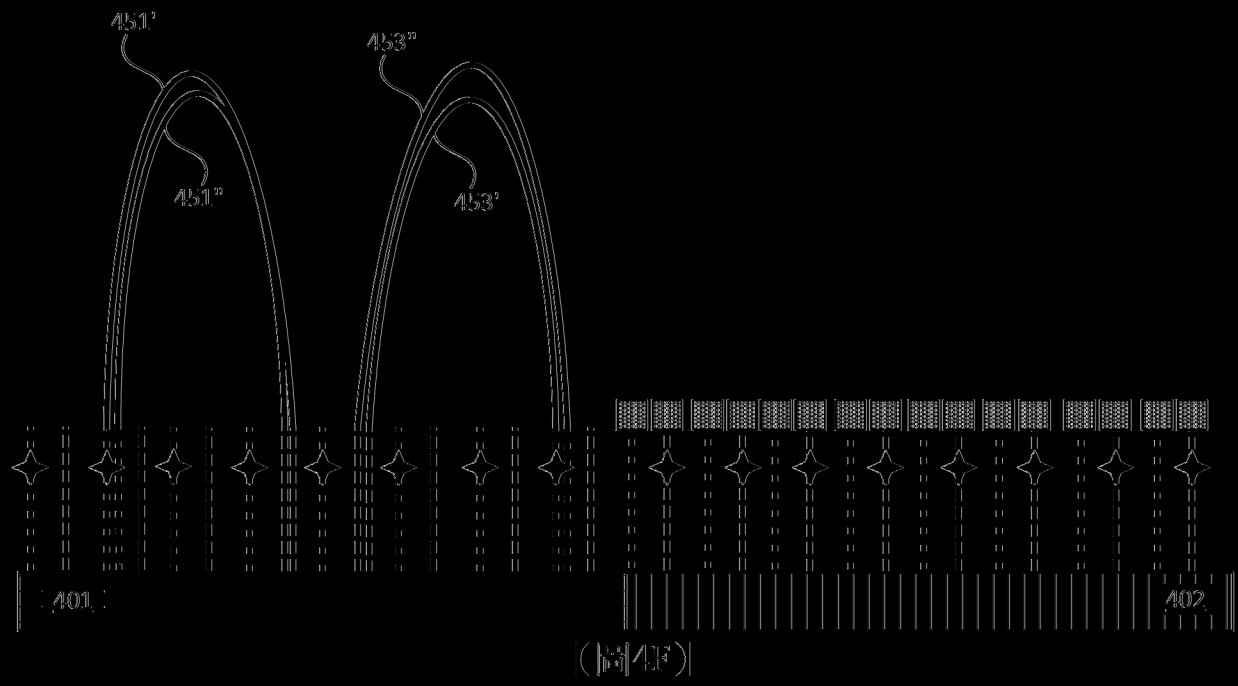


(圖4B)

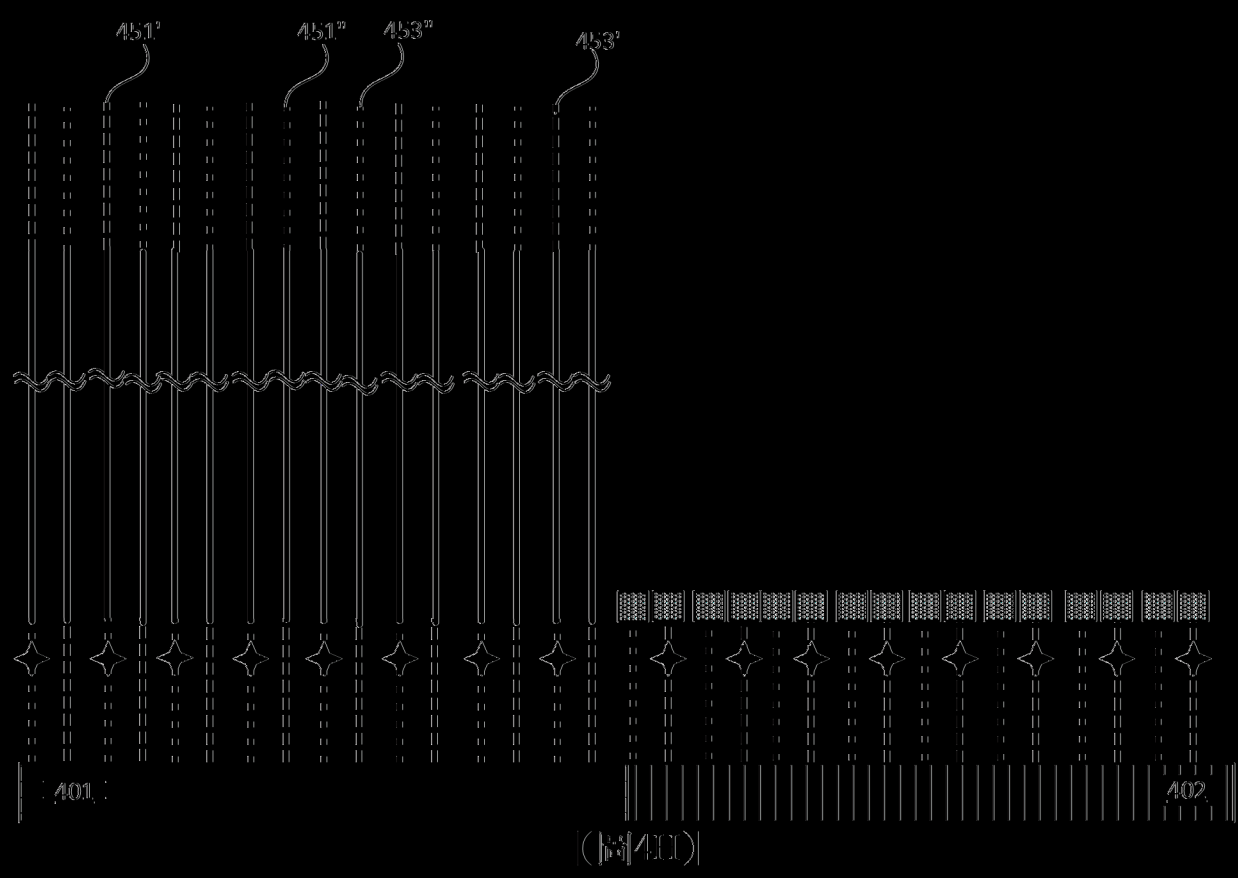
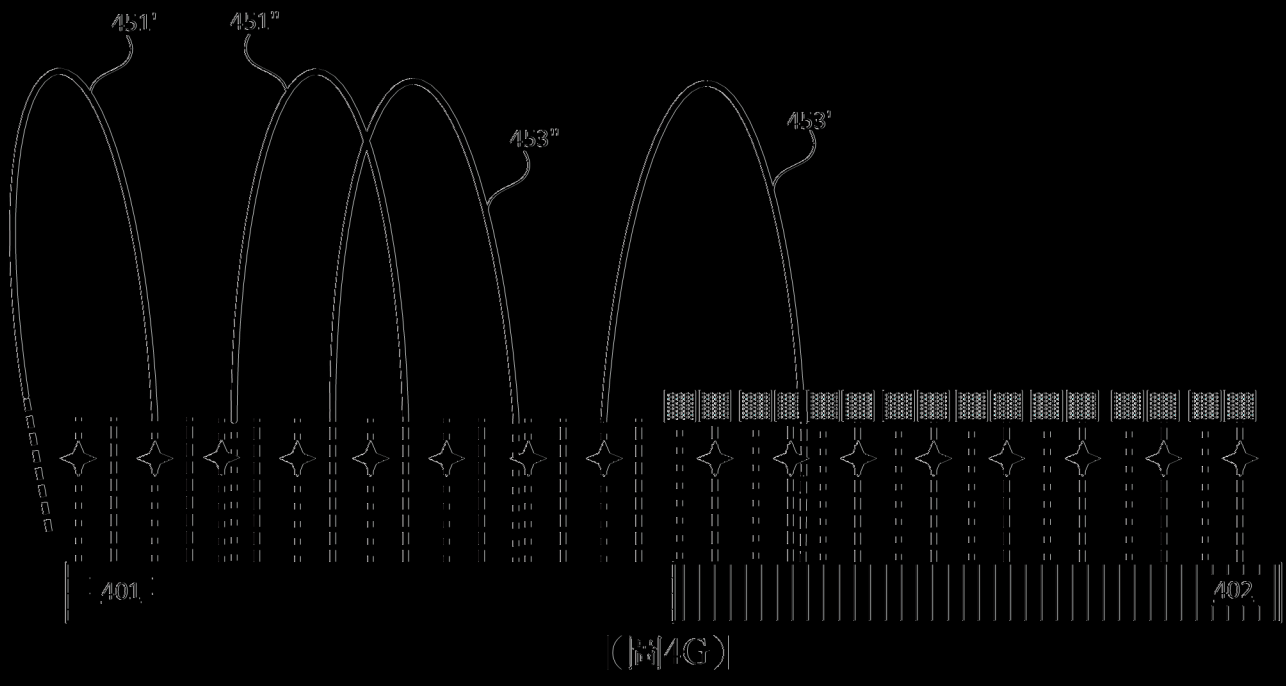


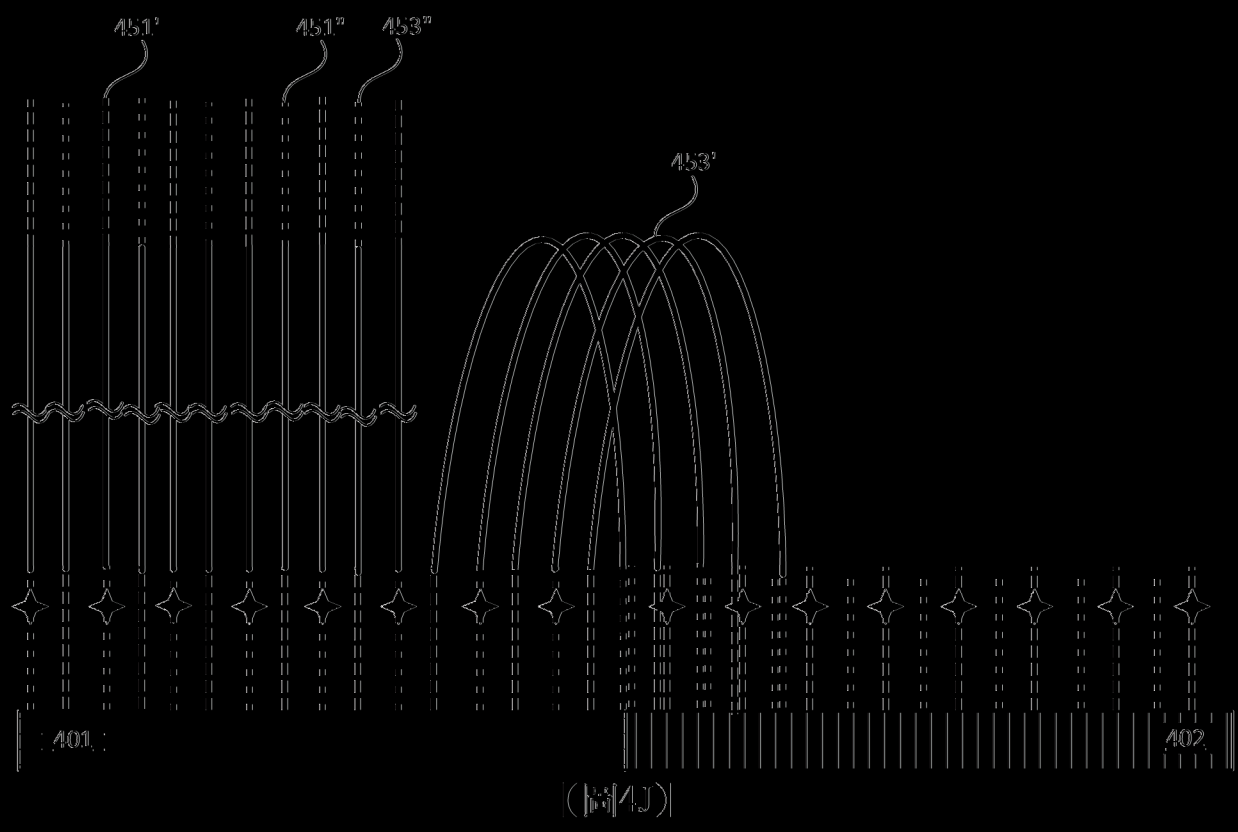
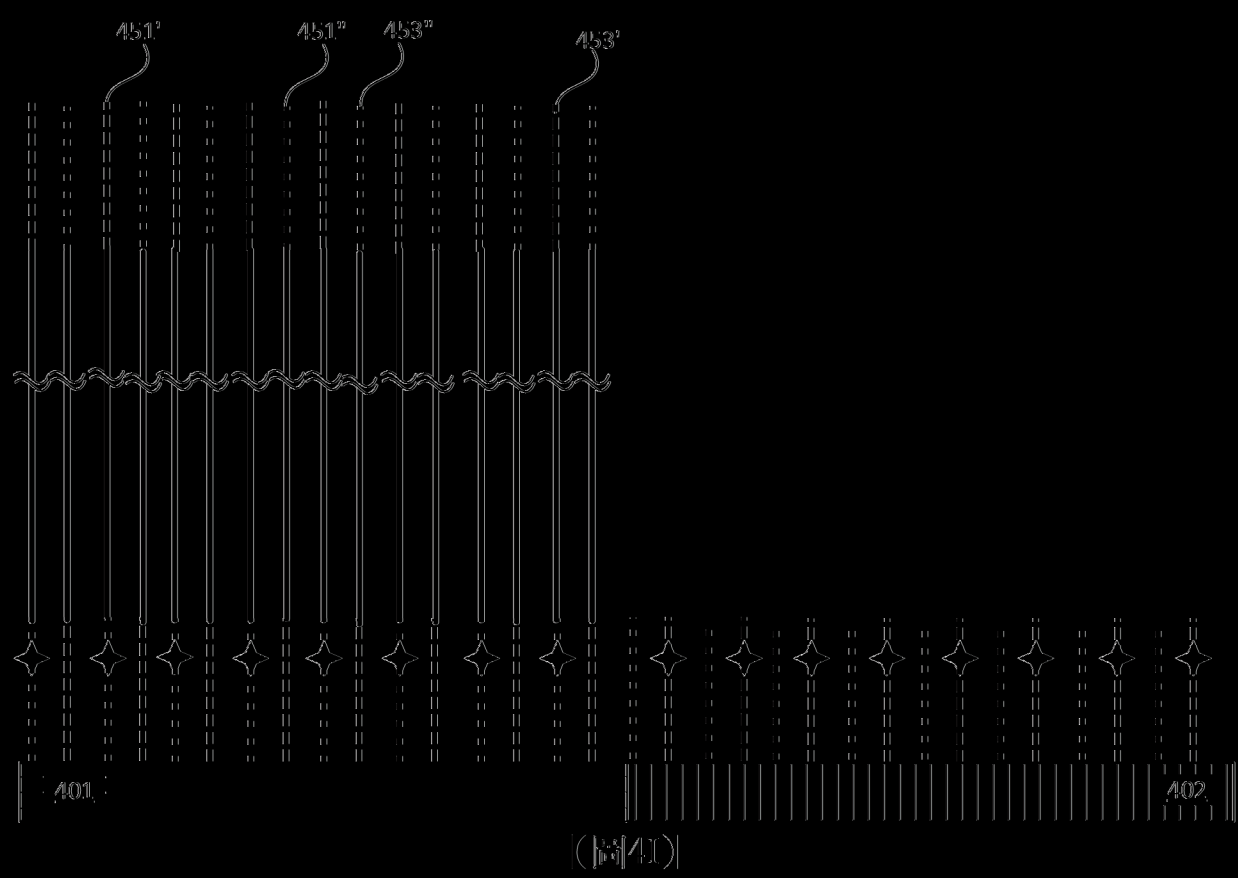


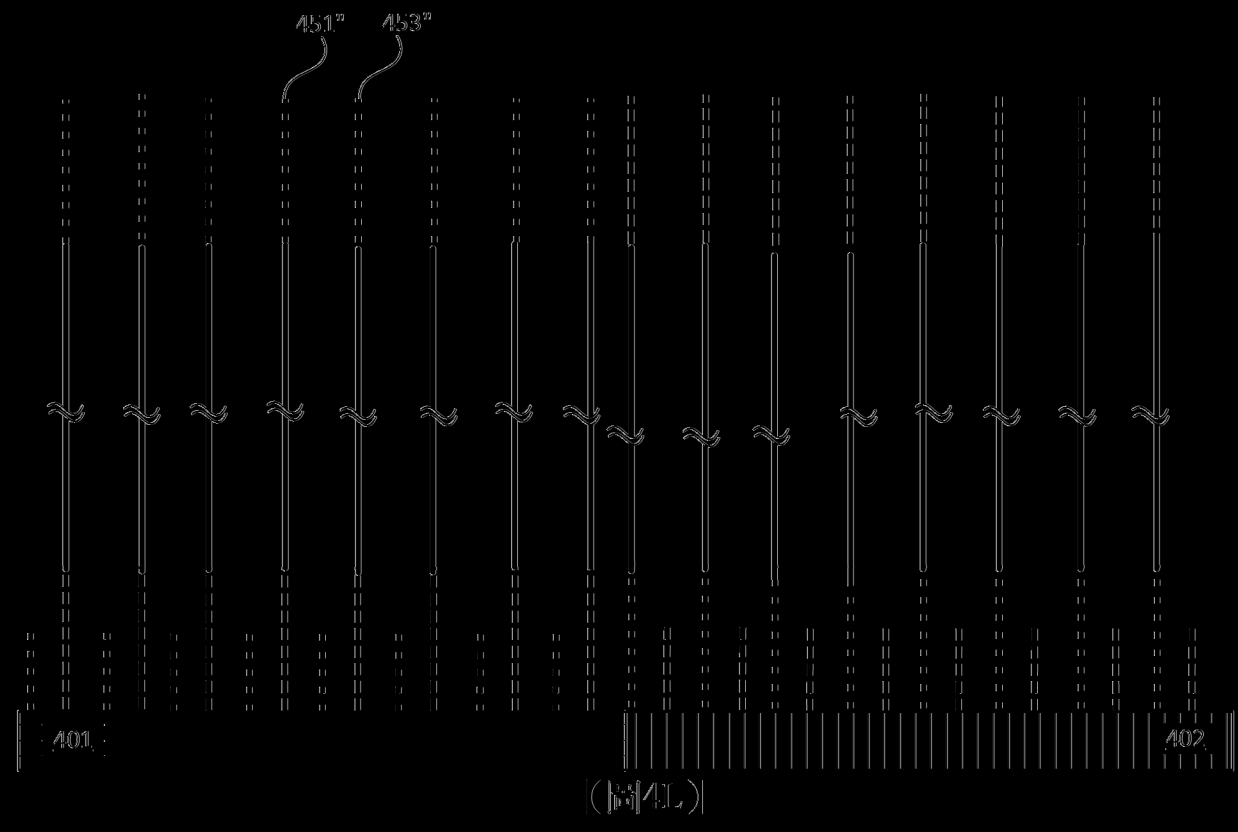
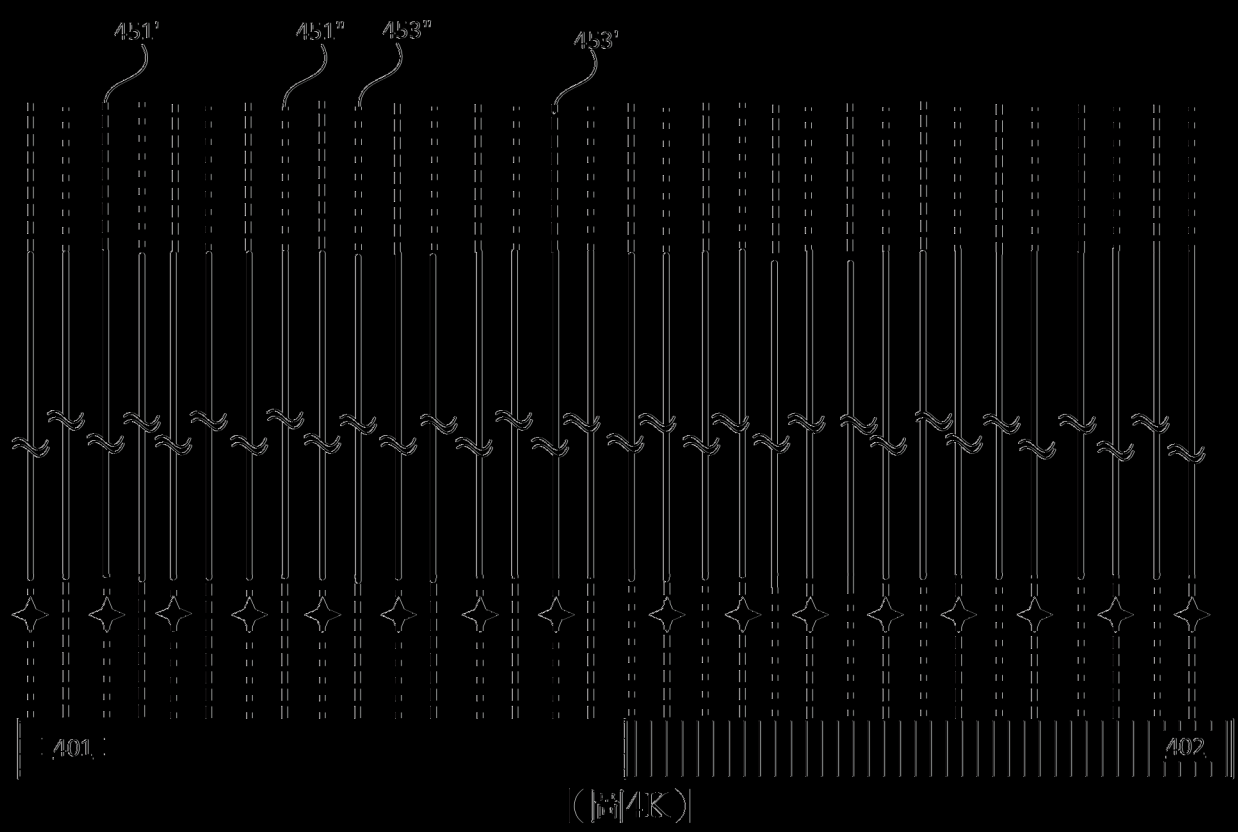
(圖4B)

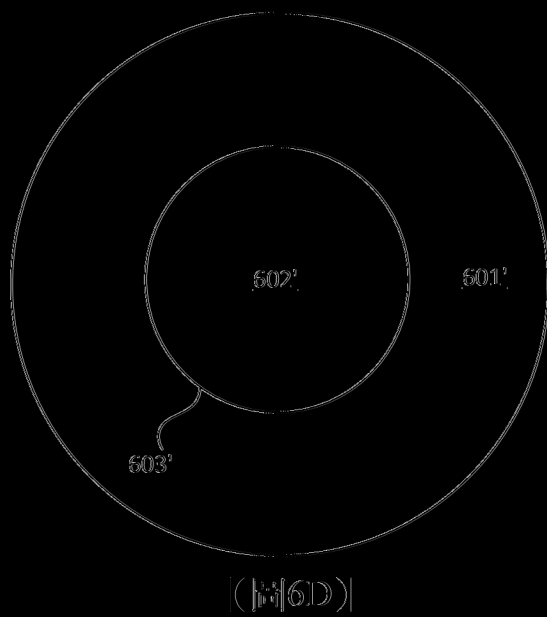
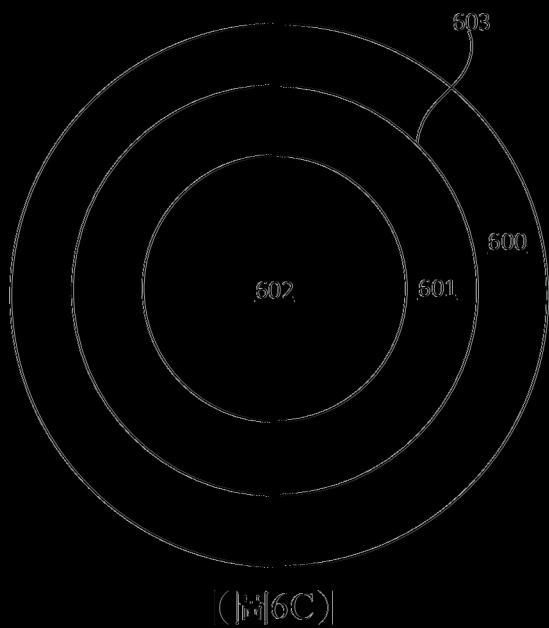
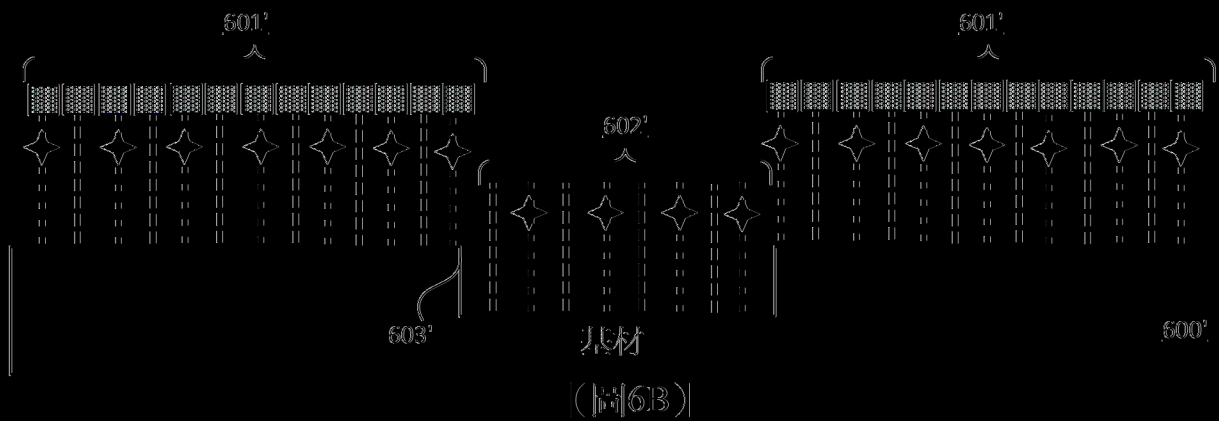
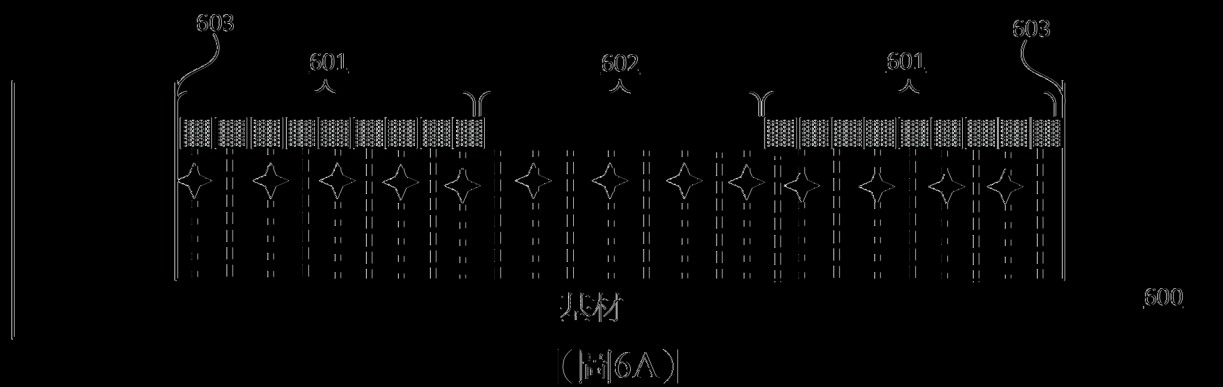


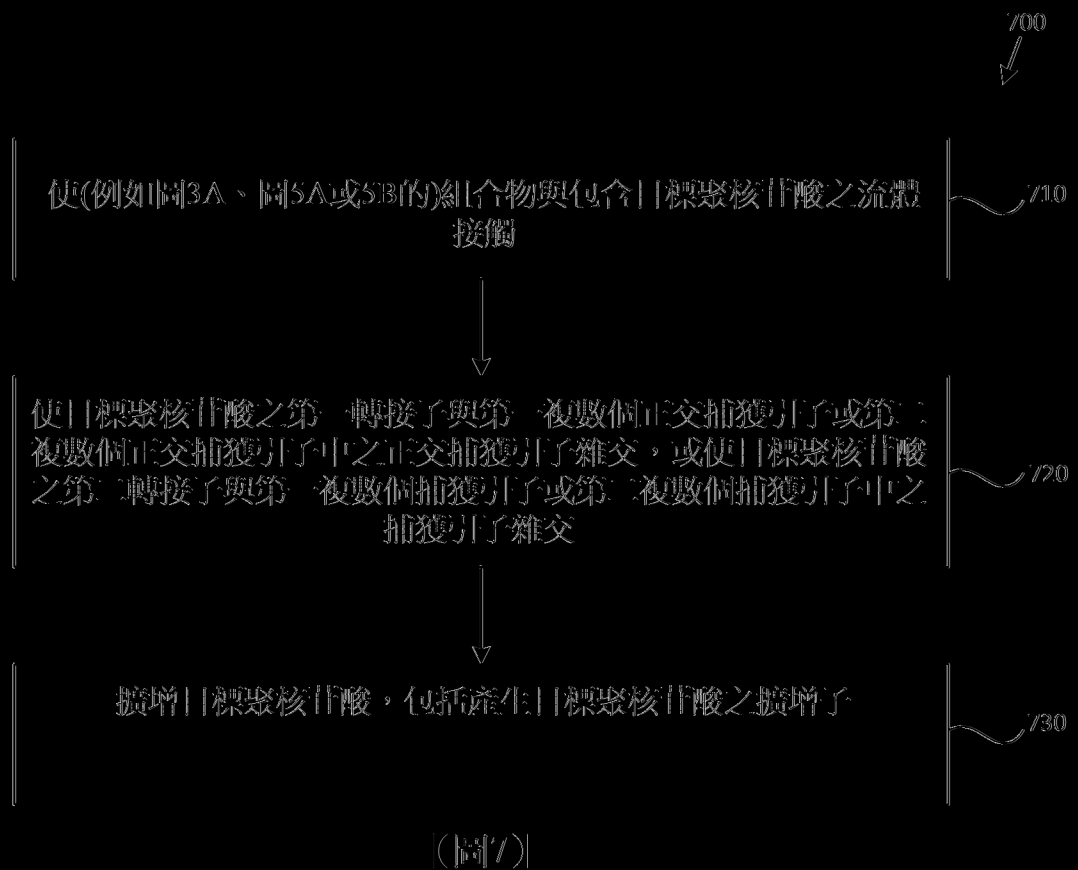
(圖4C)













〔圖8〕

