(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110088293 A
(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201780078700.4

(22)申请日 2017.12.19

(30)优先权数据
62/436,407 2016.12.19 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.06.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/067421 2017.12.19

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/118992 EN 2018.06.28

(71)申请人 宽腾矽公司
地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 乔纳森·M·罗斯伯格
詹姆斯·A·鲍尔 杰瑞米·拉基
布莱恩·瑞德
亚历山大·戈里亚诺夫

(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
代理人 吴小瑛 付文川

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6806(2006.01)

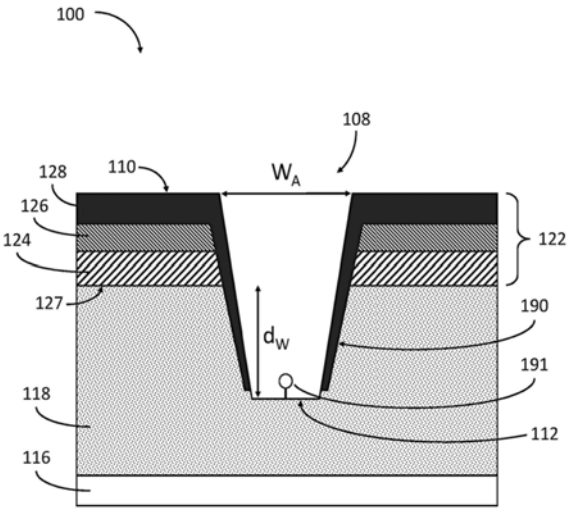
权利要求书3页 说明书27页 附图10页

(54)发明名称

分子载入样品孔以供分析

(57)摘要

本申请提供将所关注分子加载至样品孔的方法。在一些方面中,将所关注分子加载至样品孔的方法包括在拥挤试剂和/或凝聚剂存在下将所关注分子载入样品孔。在一些方面中,本申请提供将测序模板加载至样品孔的方法。



CN 110088293 A

1.一种将所关注分子加载至样品孔的方法,该方法包含:

使包含所关注分子的样品与基板的表面接触,其中所述基板的表面包含复数个样品孔;及

使所述样品与拥挤试剂接触,其中相对于所述样品中的其他组分,所述拥挤试剂排除所关注分子。

2.如权利要求1的方法,其中所关注分子包含测序模板。

3.如权利要求2的方法,其中所述测序模板包含具有至少一个杂交引物/聚合酶复合物的核酸分子。

4.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述拥挤试剂是多糖。

5.如权利要求4的方法,其中所述多糖是纤维素化合物。

6.如权利要求5的方法,其中所述纤维素化合物是甲基纤维素。

7.如权利要求5的方法,其中所述纤维素化合物是选自由以下组成的组:乙基纤维素、乙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基羟乙基纤维素及羧甲基纤维素。

8.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述拥挤试剂是聚醚化合物。

9.如权利要求8的方法,其中所述聚醚化合物是选自由以下组成的组:聚乙二醇、聚丙二醇、多聚甲醛、聚四亚甲基二醇及聚苯醚。

10.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述拥挤试剂是聚酰胺化合物。

11.如权利要求8的方法,其中所述聚酰胺化合物是选自由以下组成的组:线性聚乙烯基吡咯啶酮及环状聚乙烯基吡咯啶酮。

12.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述拥挤试剂是以膜形式提供。

13.如权利要求12的方法,其中所述膜是选自交联凝胶或去水溶液的材料。

14.如权利要求1至11中任一项的方法,其中所述拥挤试剂是以溶液形式提供。

15.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约0.6重量%。

16.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约0.9重量%。

17.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约2.0重量%。

18.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约2.3重量%。

19.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约0.1重量%至约1.0重量%之间、约1.0重量%至约2.0重量%之间、约2.0重量%至约3.0重量%之间、约3.0重量%至约4.0重量%之间或约4.0重量%至约5.0重量%之间。

20.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约5.0重量%至约6.0重量%之间、约6.0重量%至约7.0重量%之间、约7.0重量%至约8.0重量%之间、约8.0重量%至约9.0重量%之间或约9.0重量%至约10重量%之间。

21.如权利要求14的方法,其中所述拥挤试剂在所述溶液中的浓度是约10重量%至约11重量%之间、约11重量%至约12重量%之间、约12重量%至约13重量%之间、约13重量%至约14重量%之间或约14重量%至约15重量%之间。

22.如权利要求1至21中任一项的方法,其中该样品在与所述拥挤试剂接触前与所述表面接触。

23.如权利要求1至21中任一项的方法,其中所述样品在与所述表面接触前与所述拥挤

试剂接触。

24.如权利要求1至21中任一项的方法,其中在大约同时间所述样品接触至所述表面并与所述拥挤试剂接触。

25.如权利要求1至21中任一项的方法,其中所述样品在接触至所述表面时即与所述拥挤试剂接触。

26.如前述权利要求中任一项的方法,其进一步包含使所述样品与经配置以降低所关注分子弥漫性体积的凝聚剂接触。

27.如权利要求26的方法,其中所述凝聚剂包含在所述样品中为多阳离子性的多阳离子。

28.如权利要求27的方法,其中所述多阳离子选自精胺、亚精胺、聚赖氨酸、聚精氨酸、聚组氨酸、聚鸟氨酸、腐胺及鱼精蛋白。

29.如权利要求26至28中任一项的方法,其中所述样品是在与所述凝聚剂接触前接触至所述表面。

30.如权利要求1至21中任一项的方法,其中所述样品是在接触至所述表面前与所述凝聚剂接触。

31.如权利要求1至21中任一项的方法,其中在大约同时间所述样品接触至所述表面并与所述凝聚剂接触。

32.如权利要求1至21中任一项的方法,其中所述样品在接触至该表面时即与该凝聚剂接触。

33.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述复数个样品孔的每一样品孔包含在所述基板的表面的远端的底表面。

34.如权利要求33的方法,其中所述底表面包含至少一种经配置以结合所关注分子的偶合基团。

35.如权利要求34的方法,其中所述至少一种偶合基团是选自由以下组成的组:生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、凝集素蛋白或SNAP标签。

36.如权利要求34的方法,其中所述至少一种偶合基团是反应性化学基团。

37.如权利要求36的方法,其中所述反应性化学基团选自由以下组成的组:胺基团、迭氮基、羧基、羟基、烷基或硫氢基。

38.如权利要求1至37中任一项的方法,其中所述核酸分子是约1kb至约5kb之间、约5kb至约10kb之间、约10kb至约15kb之间、约15kb至约20kb之间或约20kb至约25kb之间。

39.如权利要求1至37中任一项的方法,其中所述核酸分子是约25kb至约50kb之间、约50kb至约100kb之间、约100kb至约250kb之间、约250kb至约500kb之间或约500kb至约1000kb之间。

40.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述聚合酶是DNA聚合酶。

41.如前述权利要求中任一项的方法,其中所述基板是集成装置。

42.如前述权利要求中任一项的方法,其进一步包含使所述样品与密封剂接触。

43.如权利要求42的方法,其中所述密封剂包含矿物油。

44.如权利要求42的方法,其中所述密封剂包含氧清除密封剂,所述氧清除密封剂包括可氧化试剂和催化剂。

45.如权利要求44的方法，其中所述可氧化试剂是包含至少一个烯键的有机化合物。

46.如权利要求45的方法，其中所述有机化合物包含抗坏血酸基。

47.如权利要求45的方法，其中所述有机化合物是抗坏血酸的脂肪酸酯。

48.如权利要求45的方法，其中所述有机化合物是生育酚化合物。

49.如权利要求44的方法，其中所述催化剂包含过渡金属和相对离子。

50.如权利要求49的方法，其中所述过渡金属选自由以下组成的组：钪、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜、锌、镧及铈。

51.如权利要求49的方法，其中所述过渡金属是铜。

52.如权利要求49的方法，其中所述相对离子选自由以下组成的组：卤离子、硫酸根、亚硫酸根、硫化物、硝酸根、亚硝酸根、乙酸根、乙酰丙酮酸根、过氯酸根、氢氧根、甲醇根及乙醇根。

53.如权利要求49的方法，其中所述相对离子选自由以下组成的组：月桂酸根、肉豆蔻酸根、棕榈酸根、硬脂酸根、油酸根及亚油酸根。

54.如前述权利要求中任一项的方法，其进一步包含使所述样品经受下代测序技术。

55.如前述权利要求中任一项的方法，其中所述样品孔具有约95nm至约150nm之间、约150nm至约350nm之间、约200nm至约325nm之间、约250nm至约300nm之间的深度。

56.如前述权利要求中任一项的方法，其中所述样品孔具有约270nm的深度。

57.如前述权利要求中任一项的方法，其中所述样品孔具有约95nm至约150nm之间、约150nm至约350nm之间、约200nm至约325nm之间、约250nm至约300nm之间的深度。

58.如权利要求57的方法，其中所述样品孔具有在所述底表面远端的顶部孔口。

59.如权利要求58的方法，其中所述顶部孔口具有约50nm至约150nm之间、约100nm至约150nm之间、约100nm至约200nm之间、约150nm至约250nm之间的直径。

60.如权利要求59的方法，其中所述顶部孔口具有约120nm的直径。

分子载入样品孔以供分析

[0001] 相关申请

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请案主张2016年12月19日提出的第62/436,407号美国临时专利申请的优先权,该专利申请以全文引用方式并入本文。

技术领域

[0003] 本申请案整体上涉及用于制备供分析的生物和/或化学样品的方法及组合物。

背景技术

[0004] 下世代测序技术的进步已使得可大量地平行分析单分子。该些技术从根本上改变了生命科学研究的格局,特别是在基因组学及医学诊断方面。生物样品固有的复杂性使得使用常规单分子技术通常需要费力且耗时的样品制备方案。此外,实施该等反应的异常小尺寸的样品孔会限制能够分析的分子的尺寸。

[0005] 发明概述

[0006] 本文所公开技术的方面涉及制备供分析的所关注分子的方法。在一些实施例中,本文提供可用于制备用于测序分析的样品(例如,核酸样品)的方法及组合物。在一些实施例中,本文所阐述的技术涉及将包含所关注分子的样品加载至样品孔的方法。在一些方面中,本公开提供将包含所关注分子的样品加载至样品孔的方法,所述方法包括使样品与基板的表面接触。在一些实施例中,所关注分子包含测序模板。在一些实施例中,测序模板包含具有至少一个杂交的引物/聚合酶复合物的核酸分子。在一些实施例中,基板是集成装置。在一些实施例中,基板的表面包含复数个样品孔。在一些实施例中,所述方法进一步包括使样品与拥挤试剂(crowding agent)接触。在一些实施例中,拥挤试剂排除所关注分子。在一些实施例中,相对于溶剂分子(例如,水)和/或其他反应组分(例如,盐、缓冲液、核苷酸等),拥挤试剂选择性地排除所关注分子(例如,测序模板)。在一些实施例中,拥挤试剂是体积排除剂(volume excluding agent)。

[0007] 在一些实施例中,拥挤试剂是多糖。在一些实施例中,多糖是纤维素化合物。在一些实施例中,纤维素化合物是甲基纤维素。在一些实施例中,纤维素化合物选自乙基纤维素、乙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基羟乙基纤维素及羧甲基纤维素。在一些实施例中,拥挤试剂是聚醚化合物。在一些实施例中,聚醚化合物选自聚乙二醇、聚丙二醇、多聚甲醛、聚四亚甲基二醇及聚苯醚。在一些实施例中,拥挤试剂是聚酰胺。在一些实施例中,聚酰胺选自线性聚乙烯基吡咯啶酮及环状聚乙烯基吡咯啶酮。

[0008] 在一些实施例中,拥挤试剂是以膜形式提供。在一些实施例中,膜是选自交联凝胶或去水溶液的材料。在一些实施例中,膜包含聚丙烯酰胺、聚葡萄糖、琼脂糖或其某一组合或变化形式。在一些实施例中,膜是以浆液形式提供。在一些实施例中,膜是以粒子形式提供。

[0009] 在一些实施例中,拥挤试剂(例如,甲基纤维素)是以溶液形式提供。在一些实施例

中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约2.0重量％。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约2.3重量％。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约0.1重量％至约1.0重量％之间、约1.0重量％至约2.0重量％之间、约2.0重量％至约3.0重量％之间、约3.0重量％至约4.0重量％之间或约4.0重量％至约5.0重量％之间。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约5.0重量％至约6.0重量％之间、约6.0重量％至约7.0重量％之间、约7.0重量％至约8.0重量％之间、约8.0重量％至约9.0重量％之间或约9.0重量％至约10重量％之间。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约10重量％至约11重量％之间、约11重量％至约12重量％之间、约12重量％至约13重量％之间、约13重量％至约14重量％之间或约14重量％至约15重量％之间。

[0010] 在一些实施例中，拥挤试剂的溶解性取决于温度、pH、盐和/或其他因素。在一些实施例中，拥挤试剂是以悬浮液(例如，胶体悬浮液)形式提供。在一些实施例中，悬浮液中拥挤试剂的浓度为约上文针对拥挤试剂溶液所阐述的重量％或重量范围中的任一者。

[0011] 在一些实施例中，样品是在与拥挤试剂接触之前与表面接触。在一些实施例中，样品是在与表面接触之前与拥挤试剂接触。在一些实施例中，样品大约同时与表面接触并与拥挤试剂接触。在一些实施例中，样品是当接触至表面时即与拥挤试剂接触。

[0012] 在一些实施例中，使包含所关注分子的样品与集成装置(例如，包含复数个样品孔的测序芯片)的表面接触，且将拥挤试剂(例如，包含拥挤试剂的溶液)的层施加于样品的上表面。

[0013] 在一些实施例中，使包含所关注分子的第一溶液与集成装置的表面接触以在集成装置的表面形成第一体积。在一些实施例中，使包含拥挤试剂的第二溶液与第一体积的表面接触以在第一体积的表面形成第二体积。在一些实施例中，相对于第一体积的溶剂分子，拥挤试剂优选自第二体积排除所关注分子。在一些实施例中，第一溶液包含一或多个试剂组分(例如，缓冲液、盐、经标记核苷酸)。在一些实施例中，相对于第一体积的一或多个试剂组分，拥挤试剂优选自第二体积排除所关注分子。

[0014] 在一些实施例中，复数个样品孔中的每一者包含在基板表面远端的底表面。在一些实施例中，底表面包含经配置以结合所关注分子的偶合基团。在一些实施例中，底表面包含经配置以结合测序模板的偶合基团(例如，经由偶合至聚合酶或偶合至通过聚合酶结合至测序模板上的核酸)。在一些实施例中，拥挤试剂引导所关注分子朝向底表面，其中所关注分子藉助至少一个偶合基团结合至底表面。在一些实施例中，偶合基团选自生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、凝集素蛋白或SNAP标签。在一些实施例中，偶合基团是反应性化学基团。在一些实施例中，反应性化学基团选自胺基团、迭氮基、羧基、羟基、烷基或硫氢基。

[0015] 在一些实施例中，样品包含核酸模板、聚合酶、与核酸模板互补的引物及一或多个适于测序反应的试剂组分。在一些实施例中，聚合酶及引物在核酸模板上形成至少一个杂交复合物。在一些实施例中，样品进一步包含一或多种核苷酸(例如，经标记核苷酸)、一或多种缓冲剂、一或多种盐、一或多种还原剂及一或多种表面活性剂。在一些实施例中，样品进一步包含金属阳离子(例如，镁离子)。在一些实施例中，将金属阳离子添加至样品中以开始测序反应。

[0016] 在一些实施例中，核酸分子是约1kb至约5kb之间、约5kb至约10kb之间、约10kb至

约15kb之间、约15kb至约20kb之间或约20kb至约25kb之间。在一些实施例中，核酸分子是约25kb至约50kb之间、约50kb至约100kb之间、约100kb至约250kb之间、约250kb至约500kb之间或约500kb至约1000kb之间。

[0017] 在一些实施例中，聚合酶是DNA聚合酶。在一些实施例中，DNA聚合酶是T4DNA聚合酶。在一些实施例中，DNA聚合酶是T7DNA聚合酶。在一些实施例中，DNA聚合酶是phi29DNA聚合酶。在一些实施例中，DNA聚合酶是M2Y DNA聚合酶。在一些实施例中，DNA聚合酶是铜绿蝇(Lucilia cuprina)的DNA聚合酶。在一些实施例中，聚合剂是嵌合和/或经修饰DNA聚合酶。

[0018] 在一些实施例中，使凝聚剂与所关注分子(例如，测序模板)接触。在一些实施例中，使凝聚剂在添加拥挤试剂之前与所关注分子接触。在一些实施例中，在使测序模板与集成装置的表面接触之前将凝聚剂添加至测序模板中。在一些实施例中，使凝聚剂及测序剂大约同时与集成装置的表面接触。在一些实施例中，在使测序模板与集成装置的表面接触之前，集成装置的表面包含凝聚剂。

[0019] 在一些实施例中，本文所提供的方法进一步包含使样品与密封剂接触。在一些实施例中，密封剂包含矿物油。在一些实施例中，密封剂包含包括可氧化试剂及催化剂的氧清除密封剂。在一些实施例中，可氧化试剂是包含至少一个烯键的有机化合物。在一些实施例中，有机化合物包含抗坏血酸基。在一些实施例中，有机化合物是抗坏血酸酯。在一些实施例中，有机化合物是抗坏血酸脂肪酸酯。在一些实施例中，有机化合物是生育酚化合物。在一些实施例中，催化剂包含过渡金属及相对离子。在一些实施例中，过渡金属选自钪、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜、锌、镧、铈、镨、钕、钷、钐、铕、钆、铽、镝、钬、铒、铥、镱及镥。在一些实施例中，过渡金属是铜。在一些实施例中，相对离子选自卤离子(例如，F、Cl、Br、I)、硫酸根、亚硫酸根、硫化物、硝酸根、亚硝酸根、乙酸根、乙酰丙酮酸根、过氯酸根、氢氧根、甲醇根及乙醇根。在一些实施例中，相对离子选自月桂酸根、肉豆蔻酸根、棕榈酸根、硬脂酸根、油酸根及亚油酸根。

[0020] 在一些实施例中，本文所提供的方法进一步包含使所关注分子(例如，测序模板)经受下代测序技术。

附图说明

[0021] 熟习此项技术者将理解，本文所阐述的图仅出于图解说明的目的。应理解，在一些情形中，本发明的各个方面可显示夸大或放大以便于理解本发明。在图中，在各个图中相同参考特征通常指相同特性、功能上类似和/或结构上类似的组件。附图未必按比例绘制，而是重点放在图解说明本教导内容的原理上。附图并非意欲以任何方式限制本教导内容的范围。

[0022] 根据下文详述并结合附图，将更加明了本发明的特征及优点。

[0023] 在参考附图阐述实施例时，可使用方向参考(“上方”、“下方”、“顶部”、“底部”、“左侧”、“右侧”、“水平”、“垂直”等)。该等参考仅意欲帮助读者以正常方向观看图式。这些方向参考并非意欲阐述所体现装置的优选或唯一方向。装置可以其他方向来体现。

[0024] 如自详细说明可明了，绘示于图(例如，图1-10)中且在整个申请案中出于说明目的进一步阐述的实例阐述非限制性实施例，且在一些情形下可简化某些方法或省略特征或步骤以便更清楚地说明。

[0025] 图1是图解说明样品孔的剖视图。

[0026] 图2是具有复数个样品孔的集成装置的剖视图。

[0027] 图3A是剖视图，其图解说明在不存在拥挤试剂下将样品引入具有复数个样品孔的集成装置上后，将包含所关注分子的样品加载样品孔。

[0028] 图3B是剖视图，其图解说明在存在拥挤试剂下将样品引入具有复数个样品孔的集成装置上后，将包含所关注分子的样品加载至样品孔。

[0029] 图4是绘示具有所关注分子的样品中拥挤试剂的效应的实例的图解说明。

[0030] 图5是绘示具有所关注分子的样品中凝聚剂的效应的实例的图解说明。

[0031] 图6A-6C绘示如下方法：其藉由将样品引入集成装置中(图6A)，将拥挤试剂添加至样品中(图6B)，并容许拥挤试剂将所关注分子驱至集成装置的样品孔中(图6C)，由此将包含所关注分子的样品加载至样品孔。

[0032] 图6D是图解说明在去除包含拥挤试剂的过量体积后，所关注分子加载集成装置的样品孔中的剖视图。

[0033] 图6E绘示在开始反应后的图6D的集成装置。

[0034] 图6F绘示在添加氧清除密封剂后图6E的集成装置。

[0035] 图7A及7B绘示来自使用已使用拥挤试剂加载的样品实施的实时测序反应的读数(图7A)及结果(图7B)。

[0036] 图8绘示藉由扩散载入样品孔的核酸样品(顶部)及在存在拥挤试剂下载入样品孔的核酸样品(底部)的DNA荧光染色的影像代表。

[0037] 图9绘示藉由扩散载入样品孔的核酸样品(左侧)及在存在拥挤试剂下载入样品孔的核酸样品(右侧)的DNA荧光成像。

[0038] 图10绘示证明针对固体状态拥挤试剂的概念验证的实验设置。

[0039] 发明详述

[0040] 在其他方面中，本公开提供将所关注分子加载至样品孔的方法及组合物。在一些方面中，本文所阐述的技术包括使包含所关注分子的样品与包含样品孔的固体支撑物的表面接触的步骤(例如，在包含具有在集成装置表面远端的底表面的样品孔的集成装置中)。在一些实施例中，可使样品与拥挤试剂接触，该拥挤试剂引导所关注分子朝向样品孔的底表面。在一些实施例中，样品孔的底表面包含经配置以结合所关注分子的偶合基团。以此方式，所关注分子可藉助偶合基团结合至样品孔的底表面。在一些实施例中，样品进一步包含凝聚剂，该凝聚剂可使所关注分子相对于其在不存在凝聚剂下的结构呈凝聚结构。在一些实施例中，所关注分子包含测序模板。

[0041] 在一些方面中，本文所阐述的方法及组合物可用于容许检测样品中的个体分子或粒子的技术中。个体分子可例如但不限于氨基酸、多肽、核苷酸和/或核酸。举例而言，在一些实施例中，本公开所提供的方法及组合物可结合单分子核酸测序技术使用。单分子核酸测序容许藉由实时监测与模板核酸互补的核酸分子的延伸来测定单模板核酸分子的序列。

[0042] 在某些技术中，单分子核酸测序是藉由分离复数个样品孔中的每一者内的单测序模板来实施。然而，在许多应用中，这些样品孔的总体积相对于总样品体积是相当低的。另外，最小化单样品孔中的多个模板所需要的样品中测序模板的浓度通常如此低，使得将测序模板加载至样品孔的动力学可严重限制成功载入且充分活性的复合物的量。本发明人已

认识且了解到，这些及其他限制可藉由利用特定试剂作为测序模板加载方法的一部分来克服。

[0043] 因此，已认识到需要经改良的测序模板制备及测序模板加载实践，本发明人已研发了利用拥挤试剂来有效降低样品的总体体积的技术，使得测序模板自总体体积排除并驱赶至样品孔中。本发明人已进一步认识并了解到，本文所阐述的拥挤试剂提供除上文所提及的关于测序模板大小的考虑事项以外的优点。

[0044] 在一些实施例中，本公开提供藉由使具有所关注分子的样品与集成装置的表面接触将所关注分子加载至样品孔的方法。在一些实施例中，集成装置包含样品孔。举例而言，图1是根据本申请案的一些非限制性实施例的集成装置100所包含的样品孔108的剖视图。样品孔108可在集成装置的表面110包含小体积或区域，该小体积或区域在样品孔108的底表面112的远端。样品孔108可经配置以接收包含所关注分子191的样品，该样品可保留在样品孔108的底表面112处。样品孔108的底表面112包含一或多种偶合基团，该一或多种偶合基团结合至所关注分子191至少暂时保持一定持续时间。样品孔108的底表面112可具有一或多种材料，该一或多种材料提供所关注分子191黏附至样品孔108的底表面而非侧壁190的选择性。在一些实施例中，可使用本文所阐述的技术或业内已知的方法来制备(例如，钝化、功能化等)样品孔108的底表面112及侧壁190。

[0045] 在一些实施例中，可藉助在样品孔108的底表面112远端的顶部孔口将所关注分子191安置在样品孔108内。顶部孔口可经配置以减少环境光或杂散光照射样品孔108内的所关注分子191。顶部孔口可具有宽度W_A，如在集成装置的表面110所量测，该宽度在50nm至300nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。样品孔108可在底表面112与在顶部包层118与金属层122之间的界面127之间具有深度d_W。深度d_W可在位于底表面112的所关注分子与金属层122之间提供适宜距离。深度d_W可影响与所关注分子191相连的标记物的光子发射事件的定时(timing)(例如，寿命)。因此，深度d_W可容许基于与不同标记物的个体寿命相关的定时特征来区分样品孔108中的不同标记物。在一些实施例中，样品孔108的深度d_W可影响所接收激发能量的量。深度d_W可在50nm至350nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。在一些实施例中，深度d_W在95nm与150nm之间。在一些实施例中，深度d_W在150nm与350nm之间。在一些实施例中，深度d_W在200nm与325nm之间。在一些实施例中，深度d_W在250nm与300nm之间。在一些实施例中，深度d_W为约270nm。

[0046] 在各个实施例中，样品孔108可经配置以自导波管116接收激发能量。导波管116可经配置以提供自导波管消散衰减的光学模式。在一些实施例中，该模式的消散场可至少部分地与样品孔108重叠。以此方式，样品孔108内的所关注分子191可藉助光学模式的消散场接收激发能量。

[0047] 集成装置100可在顶部包层118上方包括金属层122。金属层122可充当由样品孔中的样品发射的发射能量的反射器且可藉由朝向集成装置的传感器反射发射能量来改良发射能量的检测。金属层122可用于减少由不在样品孔内起源的光子引起的背景信号。金属层122可包含一或多个子层。用作金属层的层的适宜材料的实例可包括铝、铜、钛及氮化钛。如图1中所显示，金属层122包括第一子层124、第二子层126及第三子层128。第一子层的厚度可在30nm至165nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。第二子层的厚度可在5nm至100nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。在一些实施例中，第二子层的厚度可为

约10nm。第三子层的厚度可在5nm至100nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。在一些实施例中，第三子层的厚度可为约30nm。

[0048] 样品孔108可具有一或多个在侧壁190上至少部分地经侧壁间隔体覆盖的侧壁。侧壁间隔体的组成可使得侧壁190经配置以使得能够与所关注分子191发生某一类型的相互作用。在一些实施例中，侧壁间隔体的组成可经配置以钝化样品孔108的侧壁以降低黏附至侧壁190的所关注分子191的量。藉由用间隔体仅涂布样品壁的侧壁，可在样品孔108的不同区提供与所关注分子191的不同类型的相互作用。侧壁间隔体的厚度可在3nm至30nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。在一些实施例中，侧壁间隔体的厚度可为约10nm。用于形成侧壁间隔体的适宜材料的实例包括TiO_2、TiN、TiON、TaN、Ta_2O_5、Zr_2O_5及HfO_2。在一些实施例中，样品孔结构可具有贴近导波管116的底表面112，其在侧壁上缺乏间隔体材料。在底表面与侧壁间隔体之间的距离可在20nm至50nm的范围内或为在该范围内的任一值或值范围。以此方式，样品孔的底表面112更接近导波管116，由此改良激发能量的偶合且减少金属堆栈对激发能量的光学损失的影响。

[0049] 根据一些实施例，集成装置可包含样品孔。在一些实施例中，集成装置包含复数个样品孔或样品孔阵列(array)。举例而言，图2绘示包含复数个样品孔的集成装置200的剖视图。如所显示，集成装置200在导波管216与金属层222之间包含顶部包层218，其中顶部包层218将导波管216及金属层222间隔开最大距离h_c。顶部包层218可具有一或多个尺寸小于h_c且包括一或多个样品孔的区域。此一区域可视为具有适宜大小及形状以包括集成装置的一或多个样品孔的阵列。集成装置200包括阵列220，其中顶部包层218将导波管216与金属层222间隔开小于h_c的距离。阵列220可在垂直于图2所显示的视图的平面中具有任何适宜大小及形状以包括期望数量的样品孔的区。在一些实施例中，阵列220可具有矩形形状(例如，正方形)。阵列220可具有复数个样品孔，包括样品孔208_1、208_2、208_3、208_4、208_5及208_6。尽管图2绘示六个样品孔，但本申请案不限于此情形且可在阵列中形成任何适宜数量的样品孔。阵列可具有任何适宜大小或形状。在一些实施例中，阵列在沟槽区域中。

[0050] 本文所阐述技术的方面包括使样品与集成装置的表面接触。如图2中所显示，集成装置200在阵列220中含有复数个样品孔，该等样品孔可在集成装置的凹陷表面210_1形成。因此，在一些实施例中，可使样品与集成装置的阵列中的集成装置的凹陷表面210_1接触。在其他实施例中，可使样品与不在凹陷区域中(例如，不在沟槽区域中)的集成装置的表面接触。举例而言，如图2中所绘示，可使样品与集成装置的表面210_2接触。应了解尽管图2绘示集成装置的凹陷区域(例如，浴缸形区域)中的复数个样品孔，但集成装置可包含复数个样品孔且亦不包含凹陷区域。

[0051] 集成装置200可在顶部包层218上方包括金属层222。金属层222可充当由样品孔中的样品发射的发射能量的反射器且可藉由朝向集成装置的传感器反射发射能量来改良发射能量的检测。金属层222可用于减少由不在样品孔内起源的光子引起的背景信号。金属层222可包含一或多个子层。用作金属层的适宜材料的实例包括铝、钛及氮化钛。金属层222可具有一或多个对应于顶部包层218的经蚀刻部分的中断以形成样品孔208_1、208_2、208_3、208_4、208_5及208_6。在一些实施例中，可在集成装置中形成复数个本文所阐述类型的凹陷区域(例如，沟槽区域)，例如以减少由沿导波管216向下进行的光学模式及金属层222的相互作用引起的光学损失。在一些实施例中，集成装置可包括用于单样品孔的凹陷区域。集成装

置可在其中每一凹陷区域对应于一个样品孔的顶部包层中具有多个凹陷区域。

[0052] 在某些技术中，优选单样品孔包含所关注单分子(例如，单测序模板)。因此，在一些实施例中，当藉由将样品引入包含样品孔的阵列的集成装置上而将包含(例如)测序模板的样品加载至样品孔时，应注意避免用高浓度的测序模板使集成装置过饱和。在该等实施例中，通常适当地使用具有稀浓度的测序模板的样品加载样品孔。

[0053] 不期望受限于理论，假定稀浓度的样品中的测序模板跨样品孔阵列的分布最好藉由帕松分布(Poisson distribution)来建模。这种离散机率分布预示阵列中约37％的样品孔将含有一个测序模板，且其余孔含有零个或多个测序模板。实际上，达成跨样品孔阵列的37％单占用率(single occupancy)可藉由任一数量的化学和/或机械变量来复杂化。本发明人已认识且了解到，本文所阐述的技术(例如用拥挤试剂载入)有利地增加跨样品孔阵列的单占用率的百分比。

[0054] 在一些实施例中，本文所阐述的方法及组合物能实现样品孔阵列中所关注分子的单占用率，其与藉由帕松统计预示的量是相当、约相同或更大的。因此，不期望受限于理论，本申请案的方法及组合物可与经由非随机机制进行的加载技术一起使用，该非随机机制使随机分布歪扭以产生超过帕松分布的单加载样品孔的百分比。举例而言，在一些实施例中，本公开的方法及组合物可达成所关注分子在阵列中样品孔中的约20％、约25％、约30％、约35％、约37％、约40％、约45％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％、约99％或约100％的单占用率。然而，在一些实施例中，本发明的方法及组合物可用于增加所关注分子在一分布中占用样品孔的阵列的比率(例如，单占用率)，该比率可藉由帕松统计来预示。

[0055] 在其他方面中，本文所阐述的技术涉及使用拥挤试剂将所关注分子加载至样品孔。如本文所阐述，拥挤试剂可有效地自样品的总体溶剂排除所关注分子(例如，测序模板)。此效应的非限制性实例绘示于图3A及图3B中。如图3A中所显示，具有包含复数个样品孔的阵列320的集成装置300_1可与具有所关注分子390_1的样品340_1接触。在一些实施例中，本公开方法可用于将所关注分子加载至极小体积的样品孔中。举例而言，在一些实施例中，集成装置的阵列(例如，在沟槽区域中)及其中所有样品孔中的容量约20×10^{-6}L，其中每一样品孔具有约3×10^{-18}L的体积。在一些实施例中，集成装置中的阵列(例如，在沟槽区域中)含有512,000个样品孔。因此，在一些实施例中，阵列中所有样品孔的总体积约占样品容量的0.00000768％。如图3A中所绘示，具有在不存在拥挤试剂下加载的所关注分子390_1且具有所关注分子390_1于样品340_1的总体体积342_1中的理论上均匀的分布的样品340_1可导致一部分样品孔能接收成功加载的所关注分子391_1。

[0056] 图3B图解说明拥挤试剂对于成功载入的样品的效应。具有包含复数个样品孔的阵列的集成装置300_2可与具有所关注分子390_2的样品340_2接触。样品340_2可进一步包含拥挤试剂350。如所显示，拥挤试剂350的纳入可产生自样品340_2的总体体积342_2排除所关注分子390_2的体积排除效应，从而将所关注分子390_2驱至样品孔中。因此，远远更大百分比的样品孔能接收成功加载的所关注分子391_2。因此，在一些实施例中，拥挤试剂可产生热力学驱动力，该驱动力有效地增加集成装置的表面处所关注分子的浓度。在一些实施例中，拥挤试剂因具有加速所关注分子移动至样品孔中的动力学效应而可减少加载时间。

[0057] 本发明人已进一步认识且了解到本文所阐述的拥挤试剂可以使得所关注分子(例如测序模板)加载至具有大于单分子测序中所使用的常规样品孔(例如，大于150nm、大于

200nm、大于250nm等)的深度的样品孔中。举例而言,在一些实施例中,所关注分子在样品孔的底表面结合至样品孔。在一些实施例中,底表面是在包含样品孔的集成装置表面的远端,使得底表面与集成装置表面之间的距离接近样品孔的深度。在一些实施例中,较大深度的样品孔可有利地与利用光学组件的技术配对。

[0058] 在一些实施例中,单分子测序包含使用光学是统及传感器。举例而言,在一些实施例中,通过将光引导至集成装置上的样品孔中并检测自样品孔发射的光,实时监测测序反应。在一些实施例中,将光引导至样品孔中的光源是位于样品孔底部处或下方,且使用光检测器来检测来自样品孔的发射(例如,与一或多种组分相关的发射或与测序反应相关的事件)。在该等实施例中,光会与集成装置表面处或附近的一或多种特征发生相互作用以负面性地影响监测测序反应的能力。在一些实施例中,藉由增加样品孔深度可减少或消除该等障碍(例如,背景噪声、光学损失)。

[0059] 然而,在增加样品孔的深度时,在样品孔的底表面与集成装置的表面间的增加的距离必定产生更大距离,由于该更大距离,所关注分子必需扩散以达到底表面(例如,因此结合至底表面)。因此,增加样品孔深度所提供的优点可能会引起关于加载效率(例如,达成跨样品孔阵列的高单占用率)的某些限制。本发明人已认识且了解到,当与仅以未增强扩散进行的加载相比时,本文所阐述的技术(例如利用拥挤试剂加载)就将所关注分子(例如,测序模板)载入深样品孔中而言是优越的。

[0060] 拥挤试剂(crowding agent)

[0061] 如本文所用,“拥挤试剂”是容许、增强或促进分子拥挤的化合物或分子。不希望限于任何具体机制,认为拥挤试剂可减少可用于其他巨分子的溶剂的体积。这种排除体积效应由于与拥挤试剂的非特异性相互作用(例如空间排斥)而限制了巨分子可及的体积。因此,在一些实施例中,拥挤试剂可称作“体积排除剂(volume excluder或volume excluding agent)”。在一些实施例中,拥挤试剂相对于同一溶液中的其他组分是惰性的。举例而言,在一些实施例中,拥挤试剂自总样品体积的一部分选择性地排除所关注分子,而不自该部分排除溶液中的其他组分或将溶液中的其他组分保留在该部分中。在一些实施例中,拥挤试剂是亲水性化合物。在一些实施例中,拥挤试剂不干扰在同一溶液中发生的反应。预计拥挤试剂在本文所阐述的方法及组合物的情况下可以各种方式起作用,例如如图4中所图解说明。

[0062] 图4一般性地图解说明样品中的拥挤试剂对所关注分子的效应的实例。图400_1及图400_2各自绘示具有所关注分子491及试剂450的样品。如所显示,与图400_2中的试剂450_2相比,图400_1中的试剂450_1相对地分散在整个样品内。因此,图400_1提供其中所关注分子491可自由进入尚未被试剂450_1占用的总体体积442_1的样品的简化实例。相比之下,图400_2中的试剂450_2显示缔合使得形成间隙体积444(阴影区域)。如所显示,倘若所关注分子491的大小超过间隙体积444,则此区域不可及所关注分子491。因此,图400_2的样品中可及总体体积442_2的量小于图400_2的样品中可及总体体积442_1的量。这种效应与自样品体积排除所关注分子491相关,其可称作体积排除。然而,应了解体积排除效应可引起分子拥挤效应,且反之亦然。

[0063] 图4进一步图解说明在样品孔的情形下所排除体积效应的实例。图401_1及图401_2各自绘示具有包含经配置以结合所关注分子491的偶合基团493的底表面的样品孔。此外,图

401_1及图401_2中的一者绘示已与包含所关注分子491的样品接触的样品孔。图401_2中图解说明的样品进一步包含拥挤试剂450。如所显示，拥挤试剂450降低可及所关注分子491的总体体积442的量。由于不可及所关注分子491的拥挤试剂450的间隙体积444，所关注分子在热力学上被驱向样品孔的顶部孔口。在一些实施例中，如图401_2中所显示，拥挤试剂450可包含形成缠结结构的聚合分子，该聚合分子将一部分样品束紧以降低可及所关注分子491的总体体积442。不期望受限于理论，假定由样品中的拥挤试剂450形成的结构可限制拥挤试剂450可进入样品孔的程度。因此，间隙体积444可占用样品孔外部的区域以有效地增加于底表面远端的样品孔的顶部孔口处的所关注分子的浓度。样品孔的顶部孔口处的所关注分子491的局部浓度增加可使得所关注分子491藉助偶合基团493结合至底表面的机率提高。

[0064] 因此，在一些实施例中，相对于溶液中的溶剂分子和/或其他组分，拥挤试剂选择性地排除所关注分子。在一些实施例中，包含所关注分子的溶液已与集成装置的表面接触，使得所关注分子在集成装置的表面占用第一体积。在一些实施例中，包含拥挤试剂的溶液与第一体积的表面接触，使得拥挤试剂在第一体积的表面占用第二体积。倘若相对于溶剂分子和/或其他组分，拥挤试剂选择性地排除所关注分子，则所关注分子自第二体积排除，而第一体积的溶剂和/或其他组分不被排除。因此，选择性排除降低了第一体积且第二体积伴随的增加。应了解，在一些实施例中，第一体积中的其他组分(例如，盐、缓冲液等)可在可及由拥挤试剂占用的第二体积的程度上变化。举例而言，拥挤试剂的相对大小、电荷及其他化学及物理性质及组分可影响组分可被选择性地排除或优选由拥挤试剂保留的程度。由于所关注分子可包括反应组分(例如，测序模板)，故重要的是拥挤试剂不优选保留溶液中可能为稳定所关注分子所需的其他组分(例如，缓冲剂、还原剂等)。

[0065] 在一些实施例中，拥挤试剂吸引水且容许除水以外的分子聚集。在一些实施例中，拥挤试剂结合至溶液中的水和/或将其束紧以排除溶液中的巨分子。在一些实施例中，拥挤试剂排除所关注分子。在一些实施例中，拥挤试剂排除测序模板。在一些实施例中，拥挤试剂限制样品孔中的可用体积。在一些实施例中，拥挤试剂促进样品孔中所关注分子的单占用率。在一些实施例中，拥挤试剂压紧所关注分子(例如测序模板)，以容许较大测序模板载入样品孔。在一些实施例中，拥挤试剂促进相分离。在一些实施例中，拥挤试剂包含无规卷曲的聚合物。在一些实施例中，拥挤试剂排除污染物(例如，细胞碎片)，使得在加载所关注分子之前需要有限的样品纯化或不需样品纯化。举例而言，在一些实施例中，拥挤试剂容许不纯样品(例如，血液、尿液、裂解细胞等)的稀组分较在不存在拥挤试剂下载入的不纯样品更有效地载入。在一些实施例中，拥挤试剂施加渗透压。在一些实施例中，拥挤试剂有利于所关注分子载入深样品孔中。在一些实施例中，拥挤试剂促进样品孔较快载入。举例而言，在一些实施例中，拥挤试剂减少在包含样品孔的集成装置上培育样品所需要的时间。

[0066] 拥挤试剂为业内已知且先前已用于模拟活体外细胞内巨分子拥挤的效应(例如参见，Tokuriki,N.等人(2004)Protein Sci.13(1):125-133;Kuznetsova,I.M.等人(2014)Int.J.Mol.Sci.15:23090-23140;Phillip,Y.等人(2009)Biophys.J.97(3):875-885;Bhat,R.等人(1992)Protein Sci.1:1133-1143;Christiansen,A.等人(2013)Biophys.Rev.5(2):137-145;Aumiller,W.M.等人(2014)J.Phys.Chem.B 118(36):10624-10632;该等文献中每一者的内容以引用方式并入本文中)。

[0067] 在一些实施例中，拥挤试剂经选择使得其(例如，优选)停留在样品储器中，而不是

迁移至样品孔中。在一些实施例中，这促进热力学驱动力，从而驱动样品组分(例如，DNA-聚合酶复合物)载入样品孔。在一些实施例中，相对于较高黏度的试剂，较低黏度的拥挤试剂(例如聚蔗糖(Ficoll)或线性聚乙烯基吡咯啶酮)具有高迁移率及差局部化，且不如较高黏度的试剂有效。然而，在一些情形下可使用较低黏度的试剂。

[0068] 在一些实施例中，使用具有1mPa·s或更高黏度(例如，约或高于1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mPa·s或更高或中间范围的黏度)的拥挤试剂溶液来施加拥挤试剂。在一些实施例中，63,000Da甲基纤维素的2.7％组合物具有约6.9mPa·s的黏度。在一些实施例中，可用于移液拥挤试剂的黏度可在1,000mPa·s与15,000mPa·s之间。然而，在一些实施例中，试剂的上限黏度范围可受实际移液考虑的限制。举例而言，具有约12,000mPa·s或更高黏度的溶液可能难以移液，且在一些实施例中，拥挤试剂溶液是以具有12,000mPa·s或更低的黏度的浓度添加。

[0069] 在一些实施例中，具有较低黏度的较小(例如，较短)试剂可以比较大(例如，较长)试剂更高的浓度施加，以在加载组合物中达成类似黏度。然而，在一些实施例中，较短分子是较不有效的拥挤试剂且亦可能更易于自样品储器迁移至样品孔中。

[0070] 在一些实施例中，可基于黏度-浓度等式(例如$mPa \cdot s = (\% \times 0.747+1)^8$)来计算拥挤试剂制剂的黏度(例如，对于来自Dow的Methocel纤维素醚而言)。

[0071] 在一些实施例中，拥挤试剂的形状及大小可影响其有效性。在一些实施例中，使用类似大小的拥挤试剂(例如，在2至3倍小至2至3倍大的范围内的拥挤试剂)，排除DNA/聚合酶复合物特别有效。在一些实施例中，可使用具有促进缠结的较高黏度的溶液的形状的拥挤试剂。

[0072] 在一些实施例中，拥挤试剂是水溶性巨分子材料。在一些实施例中，适宜的巨分子材料广泛包含不与混合物中的其他试剂特异地相互作用的生物兼容性天然或合成聚合物。在一些实施例中，拥挤试剂是惰性巨分子，例如惰性多肽或惰性核酸。在一些实施例中，拥挤试剂是线性聚合物。

[0073] 在一些实施例中，拥挤试剂是多糖。在一些实施例中，拥挤试剂是纤维素分子。在一些实施例中，拥挤试剂是甲基纤维素。在一些实施例中，拥挤试剂是选自由以下组成的组的纤维素分子：乙基纤维素、乙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟乙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、乙基羟乙基纤维素、羧甲基纤维素及衍生物及其组合。在一些实施例中，拥挤试剂是聚蔗糖聚合物。

[0074] 在一些实施例中，拥挤试剂(例如纤维素拥挤试剂(例如，63,000的Methocel MC))具有50,000至500,000Da(例如，约50至100kDa、100至200kDa、200至300kDa、300至400kDa、400至500kDa或更高)的平均分子量。在一些实施例中，如本文所用“平均分子量”是指溶液中拥挤试剂的数均分子量(Mn)。在一些实施例中，纤维素拥挤试剂具有50,000至500,000Da的数均分子量。在一些实施例中，纤维素拥挤试剂的数均分子量为约63kDa。在一些实施例中，纤维素拥挤试剂的数均分子量是约20kDa与120kDa之间、约26kDa与110kDa之间、约41kDa与86kDa之间、约50kDa与75kDa之间或约60kDa与70kDa之间。

[0075] 在一些实施例中，平均分子量可根据制造商的说明书来测定。在一些实施例中，可基于特定纤维素化合物的表观黏度与分子量或链长度之间的比例关系来计算或估计纤维素拥挤试剂的平均分子量。鉴于这种比例性，平均分子量可使用已知参照值藉由在已知温

度下量测具有已知浓度纤维素的水溶液的表观黏度来测定。举例而言，在一些实施例中，可藉由以下方式获得Methocel纤维素组合物的平均分子量：在20℃下量测2％(w/v)纤维素溶液的黏度值(例如，使用ASTM专论D1347及D2363中所述的量测方法)，并将量测值与由制造商提供的已知值(例如，如METHOCEL Cellulose Ethers Technical Handbook中所阐述(DOW Chemical Company)；形式号192-01062-0902AMS，2002年9月公开)进行比较。

[0076] 在一些实施例中，拥挤试剂是聚醚化合物。在一些实施例中，拥挤试剂是选自由以下组成的组的聚醚化合物：聚乙二醇(例如，PEG 200及更大，包括PEG 20,000及更大)、聚丙二醇、多聚甲醛、聚四亚甲基二醇、聚苯醚及其衍生物及组合。在一些实施例中，拥挤试剂选自由以下组成的组：牛血浆白蛋白、肝糖、聚葡萄糖及其衍生物及组合。在一些实施例中，拥挤试剂是聚酰胺。在一些实施例中，拥挤试剂是环状聚酰胺(例如，聚乙烯基吡咯啶酮)。

[0077] 在一些实施例中，拥挤试剂是以溶液形式提供。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约0.6重量％。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约0.9重量％。在一些实施例中，溶液中所添加拥挤试剂的浓度是约1.8重量％。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约2.0重量％。在一些实施例中，拥挤试剂在溶液中的浓度是约2.3重量％。在一些实施例中，拥挤试剂是以如下量存在于溶液中：约0.1重量％至约1.0重量％之间、约1.0重量％至约2.0重量％之间、约2.0重量％至约3.0重量％之间、约3.0重量％至约4.0重量％之间、约4.0重量％至约5.0重量％之间、约5.0重量％至约6.0重量％之间、约6.0重量％至约7.0重量％之间、约7.0重量％至约8.0重量％之间、约8.0重量％至约9.0重量％之间、约9.0重量％至约10.0重量％之间、约10.0重量％至约15.0重量％之间、约10重量％至约11重量％之间、约11重量％至约12重量％之间、约12重量％至约13重量％之间、约13重量％至约14重量％之间或约14重量％至约15重量％之间、约15.0重量％至约20.0重量％之间或更大。

[0078] 在一些实施例中，拥挤试剂的溶液是以具有与样品溶液(例如，在加载缓冲液中)的体积相同的数量级(例如，1至3倍小至1至3倍大)的体积添加。在一些实施例中，将拥挤试剂(例如，Methocel MC)的2.7％溶液移液至约等体积的于载入缓冲液中的样品之上。在一些实施例中，将拥挤试剂的1.8％溶液移液至约等体积的于载入缓冲液中的样品之上。在一些实施例中，将拥挤试剂的1.2％溶液移液至约等体积的于载入缓冲液中的样品之上。在一些实施例中，将拥挤试剂的0.9％溶液移液至约等体积的于载入缓冲液中的样品之上。在一些实施例中，将拥挤试剂的0.6％溶液移液至约等体积的于载入缓冲液中的样品之上。

[0079] 在一些实施例中，将拥挤试剂溶液置于样品溶液之上而不加混合。然而，在一些实施例中亦可混合溶液。

[0080] 在一些实施例中，拥挤试剂是以凝胶(例如，亲水凝胶)形式提供，其可经放置以与样品溶液(例如，在样品储器中)直接接触。凝胶可以施加(例如，呈凝胶栓的形式)而不受移液考虑的限制，且可以凝胶形式使用较高浓度及黏度的拥挤试剂。

[0081] 在一些实施例中，拥挤试剂是以固体状态提供。举例而言，在一些实施例中，拥挤试剂是以膜形式提供。在一些实施例中，拥挤试剂可以纤维材料、膜状材料、黏合材料、复合材料、层压材料或其某一组合形式提供。在一些实施例中，膜可包含适于与本文所阐述的方法及组合物一起使用的合成和/或天然材料。在一些实施例中，膜是选自交联凝胶或去水溶液的材料。在一些实施例中，膜包含聚丙烯酰胺、聚葡萄糖、琼脂糖或其某一组合或变化形

式。在一些实施例中，固态拥挤试剂(例如，膜)有利地吸收样品总体体积中的水，同时优选排除所关注分子(例如，测序模板)。因此，应了解任何该等适宜试剂均可作为固态拥挤试剂用于本文所提供的方法中。

[0082] 凝聚剂(condensing agent)

[0083] 如本文所用的“凝聚剂”是指任何天然或合成化合物，其在与所关注分子组合时使得所关注分子相对于其在不存在凝聚剂下的结构呈凝聚结构。举例而言，在给定样品中，所关注分子在存在凝聚剂下所占用的体积小于缺乏凝聚剂的相同样品。因此，在一些实施例中，凝聚剂可降低所关注分子在样品中的占用体积。在一些实施例中，凝聚剂与所关注分子发生相互作用，使得该分子采取占用样品中总体积的较小部分的压紧结构。在一些实施例中，凝聚剂与所关注分子相互作用以降低分子的弥漫性体积。藉由引入凝聚剂，该分子的弥漫性体积可能小于不存在凝聚剂的情形，且该分子由于其弥漫性体积(pervaded volume)更小而可能更易于载入样品孔。在一些实施例中，凝聚剂相对于同一溶液中的其他组分是惰性的。在一些实施例中，凝聚剂不干扰同一溶液中发生的反应。

[0084] 图5一般性地图解说明样品中的凝聚剂对所关注分子的效应的实例。举例而言，方案500绘示其中所关注分子591与凝聚剂530接触的过程。显示所关注分子591_1占用由半径r_1的球体近似的初始体积V_1。在与凝聚剂530接触的后，显示凝聚的所关注分子591_2占用由半径r_2的球体近似的凝聚体积V_2。在一些实施例中，初始体积V_1及凝聚体积V_2分别是指所关注分子591_1及凝聚的所关注分子591_2的弥漫性体积。因此，在一些实施例中，凝聚剂530经配置以降低所关注分子591在溶液中占用的体积，该体积可视为分子的弥漫性体积。藉由引入凝聚剂，该分子的弥漫性体积可能小于不存在凝聚剂的情形，且该分子由于其弥漫性体积更小而可能更易于载入样品孔。

[0085] 图5进一步图解说明在所关注分子加载样品孔的情形下使用凝聚剂的实例。图501_1及图501_2各自绘示具有包含经配置以结合所关注分子591的偶合基团593的底表面的样品孔。此外，图501_1及501_2中的每一者绘示已与包含所关注分子591的样品接触的样品孔。绘示于图501_1中的样品包括尚未与凝聚剂接触的所关注分子591_1，而绘示于图501_2中的样品包括已与凝聚剂接触的凝聚的所关注分子591_2。如所显示，相对于显示于图501_1中的所关注分子591_1，凝聚的所关注分子591_2占用了凝聚体积。因此，由凝聚的所关注分子591_2占用的体积降低可使得所关注分子591藉助偶合基团593结合至底表面的机率提高。在一些实施例中，倘若期望将占用相对大体积的所关注分子591加载至具有相对小体积的容量的样品孔(例如，适于单一分子占用的体积，例如用于单分子测序的阵列的样品孔)中，则可有利地利用凝聚剂。在一些实施例中，凝聚剂可进一步与本文所阐述的拥挤试剂组合利用。在该等实施方案中，降低样品的可及总体体积的拥挤试剂以及降低由每一所关注分子占用的体积的拥挤试剂的净效应，使得样品孔单占用率接近或大于藉由帕松统计所预示者。

[0086] 在一些实施例中，凝聚剂是核酸凝聚剂。核酸凝聚剂可藉由各种机制(包括(但不限于)体积排除及电荷屏蔽)来压紧核酸。用于评估试剂凝聚核酸的能力的分析为业内已知，例如如WO/1996/021036中所阐述，该案的相关内容是以全文引用方式并入本文中。在一些实施例中，核酸凝聚剂经由电荷间静电相互作用与核酸发生相互作用以诱导核酸结构的压紧(collapsing)(例如，核酸凝聚)。在一些实施例中，凝聚剂由于以下各项中的一或多者而可使核酸凝聚：施加渗透压以使螺旋结构的片段结合在一起(例如，分子拥挤效应)，降低

核酸片段之间的排斥性相互作用(例如,藉由中和磷酸根电荷),及增加核酸片段之间的吸引性相互作用。在一些实施例中,可藉由多阳离子带电凝聚剂来诱导DNA片段之间的吸引性相互作用。

[0087] 在一些实施例中,凝聚剂包含多阳离子。如本文所用,多阳离子通常是指具有复数个带正电位点的化合物。在一些实施例中,多阳离子在存在于包括所关注分子的样品中时为多阳离子性。举例而言,在一些实施例中,包含所关注分子的样品中的条件(例如,pH、缓冲容量、离子强度)使得凝聚剂在样品中为多阳离子性。在一些实施例中,多阳离子在生理pH(例如,pH≈7.4)下为多阳离子性。在一些实施例中,多阳离子是带正电单体单元的聚合物,但一些非带正电单元可存在于聚合物中。在一些实施例中,多阳离子的实例包括多胺,例如精胺、亚精胺及腐胺。在一些实施例中,多阳离子包含聚氨基酸,例如聚组氨酸、聚赖氨酸、聚精氨酸及聚鸟氨酸。进一步考虑其他碱性肽及小碱性蛋白可用作多阳离子性凝聚剂(例如,组蛋白、鱼精蛋白)。对于由氨基酸组成的多阳离子,可使用L形式或D形式。碱性氨基酸包括赖氨酸、精氨酸、氨基酸类似物(例如鸟氨酸及刀豆酸)、经修饰碱性氨基酸(例如高精氨酸)及经修饰以携载正电荷的其他经修饰氨基酸(例如胍基缬氨酸及氨基乙基半胱氨酸)。多阳离子的其他实例包括聚铵(例如,聚凝胺(海地美溴铵(hexadimethrine bromide)))、脂质(例如,DOTAP、DC-Chol/DOPE、DOGS/DOPE及DOTMA/DOPE)。

[0088] 氧清除密封剂

[0089] 在再其他方面中,本公开提供可用于保护氧敏感性系统并维持样品完整性的方法及组合物。生物和/或化学反应通常可能对与外部环境的相互作用敏感,例如易于蒸发和对外部环境中的氧和/或其他分子敏感。先前曾使用密封剂来保护敏感性反应免遭与外部环境的有害相互作用。举例而言,在藉由聚合酶链式反应(PCR)的扩增期间通常使用矿物油来覆盖样品。因此,在一些实施例中,本文所阐述的加载及测序的方法进一步包含用密封剂(例如,矿物油)覆盖测序反应物。本发明人已认识且了解到,代替或除常规密封剂以外,可使用某些组合物来赋予本文所阐述的测序反应额外的保护效应。举例而言,在一些实施例中,可使氧清除密封剂与样品接触。

[0090] 本发明的方面是关于单分子测序技术。在一些实施例中,单分子测序包含使用光学系统。在该等实施例中,光学系统可包括可直接或间接降解成测序反应的一或多种组分的激发能量的使用。举例而言,在一些实施例中,激发能量可生成可损害测序反应中的聚合酶的活性的活性含氧物。本发明人已认识且了解到,氧清除密封剂使活性含氧物的存在减至最少,同时提供许多与常规密封剂(例如,矿物油)相同的益处。

[0091] 在一些实施例中,氧清除密封剂包含可氧化试剂及催化剂。如本文所用,“可氧化试剂”是任何能被氧化的试剂。在一些实施例中,可氧化试剂的氧化由催化剂介导和/或加速。因此,在一些实施例中,藉助由催化剂催化的反应或反应是列中的可氧化试剂的氧化进行氧清除。在一些实施例中,氧清除密封剂对于测序反应优选是非抑制性的(例如,惰性)。测序反应及试剂藉由相分离免除氧清除组分的影响(例如,清除剂试剂在油相中保持隔离且保持与水性测序试剂安全分离)。

[0092] 在一些实施例中,可氧化试剂是有机化合物。在一些实施例中,可氧化试剂包含至少一个烯键。如本文所用,“烯键”是碳-碳双键。在一些实施例中,烯键可经取代或未经取代。在一些实施例中,烯键可为末端键或内键。在一些实施例中,烯键是含于环结构内。举例

而言，在一些实施例中，烯键可包含在5元环或6元环(例如，戊糖环或己糖环)内。在一些实施例中，有机化合物可包含含氧部分。举例而言，含氧部分可包括(但不限于)酯、羧酸、醛、醚、酮、醇、过氧化物和/或氢过氧化物。

[0093] 在一些实施例中，本文所提供氧清除密封剂的可氧化试剂包括抗坏血酸酯及异抗坏血酸酯(呈游离酸、盐及衍生物形式)、碱金属、碱土金属或亚硫酸铵盐或其混合物。在一些实施例中，可氧化试剂是水不溶性抗坏血酸盐/酯。在一些实施例中，藉由将抗坏血酸酯或异抗坏血酸酯以离子金属盐(例如碱金属、碱土金属盐、有机酸的酯或其他衍生的抗坏血酸酯)的形式引入至密封剂中，形成可氧化试剂。在一些实施例中，可用其他已知还原剂(例如第二抗坏血酸酯或异抗坏血酸酯、单宁酸、亚硫酸酯及诸如此类)补充氧清除剂抗坏血酸酯和/或异抗坏血酸酯组分。在一些实施例中，抗坏血酸酯可呈C6-C22脂肪酸酯或二酯的形式，其可完全饱和或在具有C10-C22脂肪酸酯的烃链中含有不饱和。在一些实施例中，抗坏血酸酯可为(例如)月桂酸抗坏血酸基酯、肉豆蔻酸抗坏血酸基酯、棕榈酸抗坏血酸基酯、硬脂酸抗坏血酸基酯及诸如此类。

[0094] 在一些实施例中，清除试剂的溶解性不强。在一些实施例中，清除试剂是在油中(例如，在介于饱和与50％饱和之间的油中)提供。在一些实施例中，清除试剂(例如，在油中)是基于其溶解性来选择(和/或以适当浓度提供)，以避免分配至下方水相中至可能干扰测序或其他反应的程度。

[0095] 如本文所阐述，在一些实施例中，氧清除密封剂包含催化剂。众多种催化剂均可用于本文所阐述的技术中。适宜催化剂包括可易于在至少两个氧化态间相互转化的金属离子。在一些实施例中，催化剂是过渡金属。举例而言，在一些实施例中，过渡金属可选自周期表的第一、第二或第三过渡列。适宜金属包括(但不限于)锰II或III、铁II或III、钴II或III、镍II或III、铜I或II、铑II、III或IV及钌。应了解，金属在引入时的氧化态不一定是活性形式的氧化态。在一些实施例中，过渡金属选自钪、钛、钒、铬、锰、铁、钴、镍、铜及锌。举例而言，在一些实施例中，催化剂包含铜。在一些实施例中，过渡金属是镧系元素金属(例如、镧、铈、镨、钕、钷、钐、铕、钆、铽、镝、钬、铒、铥、镱或镥)。

[0096] 在一些实施例中，催化剂包含呈盐形式(例如金属离子及相对离子)的金属。能够与金属离子复合的任何适宜带电化合物均可用于本文所阐述的清除密封剂中。在一些实施例中，相对离子选自由以下组成的组：卤离子、硫酸根、亚硫酸根、硫化物、硝酸根、亚硝酸根、乙酸根、乙酰丙酮酸根、过氯酸根、氢氧化物、甲醇根及乙醇根。在一些实施例中，相对离子选自由以下组成的组：月桂酸根、肉豆蔻酸根、棕榈酸根、硬脂酸根、油酸根及亚油酸根。

[0097] 在一些实施例中，本文所提供氧清除密封剂的催化剂包括具有有限或没有水溶解性的氧化催化剂。在一些实施例中，催化剂是以实质上具有水不溶性的有机或无机过渡金属化合物的形式提供。在一些实施例中，催化剂可呈其中的过渡金属藉由离子键或共价键与其他元素或基团缔合的盐或化合物的形式。在一些实施例中，催化剂可呈螯合物、复合物或有机羧酸脂肪酸盐的形式。在一些实施例中，过渡金属化合物是具有呈最高氧化态的过渡金属的化合物。在一些实施例中，氧清除密封剂包含铜复合物及抗坏血酸基脂肪酸酯。

[0098] 样品载入

[0099] 在一些方面中，本公开涉及可用于将所关注分子(例如，测序模板)加载至样品孔的方法及组合物。举例而言，在一些实施例中，本公开提供可用于藉由将样品引入包含样品

孔的集成装置的表面上,以将包含所关注分子的样品加载至样品孔的方法及组合物。藉助使样品与集成装置的表面接触的样品加载可以任何适宜方法来实施。在一些实施例中,包含所关注分子的样品是由实践者将样品添加至装置中(例如经由移液管、分配器或任一适宜流体转移装置/系统)来加载。在一些实施例中,包含所关注分子的样品是经由自动化构件(例如,机器人装置/系统)将样品添加至装置中来加载。在一些实施例中,包含所关注分子的样品是藉由经由一或多个微流体通道将样品添加至装置中来加载。

[0100] 在一些实施例中,可藉由通常用于将分子递送至集成装置的方法将所关注分子递送至集成装置(例如,包含样品孔的集成装置,阵列)。举例而言,递送方法可包括将所关注分子悬浮于流体中并使所得悬浮液流动至集成装置的样品孔中。这可包括简单地将相关悬浮液移液至集成装置的一或多个区域上,或可包括更多主动流动方法,例如电引导式或基于压力的流体流动。在一些实施例中,包含所关注分子的样品是流动至集成装置的所选区域,例如其中特定的所关注分子将在集成装置的特定区域中进行分析。这可藉由遮蔽技术(施加屏蔽以引导流体流动)或藉由主动流动方法(例如电引导或基于压力的流体流动(包括喷墨式印刷方法))来实现。用于将核酸及相关试剂递送至阵列的喷墨及其他递送方法参见(例如)Kimmel及Oliver(编辑)(2006)DNA Microarrays Part A:Array Platforms&Wet-Bench Protocols,第410卷(Methods in Enzymology)ISBN-10:0121828158;Lee(2002)Microdrop Generation(Nano-and Microscience,Engineering,Technology and Medicine)CRC Press ISBN-10:084931559X;及Heller(2002)「DNA MICROARRAY TECHNOLOGY:Devices,Systems,and Applications」Annual Review of Biomedical Engineering 4:129-153。在一些实施例中,微流体流动可用于所关注分子递送。简单地藉由将相关悬浮液移液至集成装置的正确区域中,集成装置的区域亦可为选择性递送目标。

[0101] 在一些实施例中,藉由将样品引入包含样品孔的集成装置上而将包含所关注分子的样品加载样品孔的方法可包含一或多个洗涤步骤。举例而言,在一些实施例中,可在将样品引入至集成装置上之前和/或之后(例如,在将包含所关注分子的样品加载至集成装置的样品孔中之前和/或之后)将集成装置洗涤一或多次。在一些实施例中,用用于将所关注分子悬浮于待加载样品中的相同溶液或缓冲液洗涤集成装置。在一些实施例中,用非离子表面活性剂(例如,Tween 20)洗涤集成装置。在一些实施例中,洗涤步骤包含容许洗涤溶液在集成装置上培育的培育时段。在一些实施例中,本文所阐述的加载方法可在不实施洗涤步骤的情况下进行。

[0102] 在一些方面中,本公开提供将所关注分子(例如,测序模板)加载样品孔的方法,该方法包含使所关注分子与集成装置的表面接触,并使所关注分子与拥挤试剂和/或凝聚剂接触。应了解,在一些实施例中,接触步骤可以任一适宜顺序实施。举例而言,在一些实施例中,使所关注分子在与拥挤试剂和/或凝聚剂接触前与表面接触。在一些实施例中,可使所关注分子与集成装置接触(例如,加载其上),随后在与拥挤试剂和/或凝聚剂接触前培育一定时段。在一些实施例中,在此一培育时段期间样品中存在凝聚剂。在一些实施例中,在所关注分子与集成装置接触(例如,加载其上)后立即或大约不久使拥挤试剂和/或凝聚剂与集成装置接触(例如,加载其上)。在一些实施例中,样品在与集成装置接触前包含拥挤试剂和/或凝聚剂。

[0103] 图6A-6C中绘示样品与集成装置的表面接触的实施例的一个实例。如图6A中所显

示，包含所关注分子690的样品640与具有复数个样品孔的集成装置接触。图6B绘示包含已添加至样品640中的拥挤试剂650的层660。在一些实施例中，容许层660与样品640一起培育一定时间段，如本文所阐述。在一些实施例中，培育时段可容许拥挤试剂650吸收样品640中的总体体积(bulk volume)(例如，水)且排除所关注分子690。图6C图解说明在培育时段后发生的体积排除效应，在此时段期间所关注分子690被驱至样品孔中，从而样品孔接收成功加载的所关注分子691的机率更高。

[0104] 在其他实施例中，使所关注分子在与表面接触前与拥挤试剂接触。举例而言，在一些实施例中，可在与集成装置接触(例如，加载其上)前混合所关注分子和拥挤试剂。在该等实施例中，所关注分子及拥挤试剂可混合且容许平衡某一时间段。在一些实施例中，所关注分子及拥挤试剂是在即将与集成装置接触(例如，加载其上)前或在此前大约不久进行混合。在其他实施例中，所关注分子大约同时与表面接触并与拥挤试剂接触。举例而言，在一些实施例中，所关注分子及拥挤试剂大约同时与集成装置接触(例如，加载其上)，使得该两种组分在集成装置的表面上混合。在其他实施例中，所关注分子是在与表面接触时即(upon)与拥挤试剂接触。举例而言，在一些实施例中，拥挤试剂是在所关注分子前与集成装置接触(例如，加载其上)。在该等实施例中，可使拥挤试剂与集成装置接触(例如，加载其上)，随后培育一定时段，之后载入所关注分子(例如，经由将所关注分子引入集成装置上)。

[0105] 如本文所阐述，拥挤试剂通常有利于所关注分子加载至样品孔。在一些实施例中，拥挤试剂促进所关注分子结合至样品孔的底表面。因此，在一些实施例中，可期望在开始测序反应前在集成装置上培育所关注分子-拥挤试剂混合物。在一些实施例中，在开始测序反应前将所关注分子-拥挤试剂混合物在集成装置上培育约1分钟至约5分钟、约5分钟至约10分钟、约10分钟至约20分钟、约20分钟至约30分钟、约30分钟至约40分钟、约40分钟至约50分钟、约50分钟至约60分钟或约60分钟至约90分钟。

[0106] 在培育时段后，在一些实施例中，可自集成装置去除过量体积。在一些实施例中，过量体积包含拥挤试剂和/或未结合至样品孔的任何所关注分子。举例而言，在图6C中所绘示的所关注分子成功载入后，图6D绘示在去除包含拥挤试剂及未成功加载样品孔的所关注分子的过量体积后的集成装置。

[0107] 在一些实施例中，在去除过量体积后将集成装置的表面洗涤一或多次。如本文所阐述，在一些实施例中，所关注分子可参与可藉由本公开中所阐述的任何适宜技术开始的反应(例如，测序反应)。举例而言，在图6D中绘示的过量体积的去除后，图6E绘示添加包含开始反应的要素652的制备物670产生了活性所关注分子692。在一些实施例中，在开始反应前将集成装置的表面洗涤一或多次。在一些实施例中，用用于悬浮所关注分子的溶液将集成装置的表面洗涤一或多次。在一些实施例中，用用于开始反应的溶液将集成装置的表面洗涤一或多次。在一些实施例中，在任选的去除和/或洗涤步骤后，藉由本文别处阐述的任何适宜开始方式开始测序反应。举例而言，在一些实施例中，所关注分子包含参与测序反应的测序模板。在该等实施例中，测序模板可有利地被“引发”用于测序反应。在一些实施例中，包含测序模板的样品具有开始测序反应所需要的大多数或除一种以外的所有组分。因此，可在适当时间藉由将必需组分添加至样品中开始测序反应。在一些实施例中，藉由将dNTP添加至样品中开始测序反应。在一些实施例中，藉由将金属阳离子(例如，镁离子)添加至样品中开始测序反应。在一些实施例中，样品中抑制剂的存在阻止了测序反应的开始。在

该等实施例中，可藉由去除抑制剂(例如藉由稀释抑制剂(例如，经由缓冲液交换))开始反应。因此，优选可在开始测序反应前使样品与集成装置的表面接触(例如，加载其上)。

[0108] 在一些实施例中，将密封剂添加至样品中以覆盖所开始的反应物。在一些实施例中，密封剂是氧清除密封剂。举例而言，在如图6E中所显示的反应开始后，图6F绘示包含添加至样品中的氧清除密封剂654的层680。本文阐述适宜氧清除密封剂的性质、描述及实例。

[0109] 样品制备

[0110] 在一些方面中，本公开整体涉及在获得用于分析的样品与分析样品之间的步骤及过程的改良。举例而言，在一些实施例中，本公开涉及是在获得用于测序的样品与自样品获得测序信息之间的步骤及过程的改良。在一些实施例中，样品包含核酸样品。在一些方面中，制备测序用样品通常包括在使样品经受测序分析前对样品(例如，生物样品、化学样品、核酸样品、蛋白质样品)进行一或多个物理和/或化学改质。在一些实施例中，制备测序用样品包括生成测序模板。

[0111] 如本文所用，“测序模板”是作为分析(例如，测序分析)的目标的分子。在一些实施例中，测序模板包含核酸分子。在一些实施例中，核酸分子称为“靶标”或“模板”核酸。在一些实施例中，核酸分子包含至少一种杂交的引物/聚合酶复合物。举例而言，在一些实施例中，使核酸分子与与核酸分子的一部分互补的测序引物接触，使得测序引物退火至核酸分子。此引发位置生成其中聚合酶(例如，DNA或RNA聚合酶)可偶合至核酸分子以形成杂交的引物/聚合酶复合物的位点。因此，在一些实施例中，包含至少一个杂交的引物/聚合酶的测序模板可称作“测序模板复合物”。

[0112] 如本文所使用的术语“核酸”通常是指包含一或多个核酸亚单元的分子。核酸可包括一或多个选自腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其变体的亚单元。在一些实例中，核酸是脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其衍生物。核酸可为单链或双链的。核酸可为环状的。在一些实施例中，核酸通常是指核苷酸的任一聚合物。

[0113] 如本文所用术语“核苷酸”通常是指可包括A、C、G、T或U或其变体或类似物的核酸亚单元。核苷酸可包括可并入至生长核酸链中的任何亚单元。该亚单元可为A、C、G、T或U，或特异于一或多个互补A、C、G、T或U或互补于嘌呤(例如，A或G或其变体或类似物)或嘧啶(例如，C、T或U或其变体或类似物)的任何其他亚单元。亚单元可使得个体核酸碱基或碱基组(例如，AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA，或其尿嘧啶对应体)能够溶解。核苷酸可包含一或多个磷酸基团。核苷酸可包含甲基化核碱基。举例而言，甲基化核苷酸可为包含一或多个结合至核碱基(例如，直接结合至核碱基的环，结合至核碱基的环的取代基)的甲基的核苷酸。实例性甲基化核碱基包括1-甲基胸腺嘧啶、1-甲基尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6,N6-二甲基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、N2-甲基鸟嘌呤及N2,N2-二甲基鸟嘌呤。

[0114] 如本文所用术语“引物”通常是指可包括包含A、C、G、T和/或U或其变体或类似物的序列的核酸分子(例如，寡核苷酸)。引物可为包含DNA、RNA、PNA或其变体或类似物的合成寡核苷酸。引物可经设计使得其核苷酸序列与靶标或模板核酸互补，或引物可包含随机核苷酸序列。在一些实施例中，引物可包含尾(例如，聚-A尾、索引适配体(index adaptor)、分子条形码等)。在一些实施例中，引物可包含5至15个碱基、10至20个碱基、15至25个碱基、20至30个碱基、25至35个碱基、30至40个碱基、35至45个碱基、40至50个碱基、45至55个碱基、50

至60个碱基、55至65个碱基、60至70个碱基、65至75个碱基、70至80个碱基、75至85个碱基、80至90个碱基、85至95个碱基、90至100个碱基、95至105个碱基、100至150个碱基、125至175个碱基、150至200个碱基或超过200个碱基。

[0115] 在一些实施例中，可自受试者(例如，人类或其他受试者)获得的生物样品提取包含靶标核酸的样品。在一些实施例中，受试者可为患者。在一些实施例中，可对靶标核酸进行检测和/或测序用于诊断、预后和/或治疗目的。在一些实施例中，用于测序分析的信息可用于辅助疾病或病况的诊断、预后和/或治疗。在一些实施例中，受试者可怀疑患有健康病况，例如疾病(例如，癌症)。在一些实施例中，受试者可经历疾病的治疗。

[0116] 在一些实施例中，可自受试者的体液或组织(例如呼气、唾液、尿液、血液(例如，全血或血浆)、粪便或其他体液或生检样品)提取生物样品。在一些实例中，自受试者的体液或组织提取一或多种核酸分子。可自受试者(例如受试者的一部分组织)获得的一或多种细胞提取一或多种核酸或自受试者的无细胞体液(例如全血)获得。

[0117] 可处理生物样品以准备检测(例如，测序)。该处理可包括自生物样品分离和/或纯化生物分子(例如，核酸分子)并生成生物分子的更多拷贝。在一些实例中，自受试者的体液或组织分离及纯化一或多种核酸分子，并藉助核酸扩增(例如聚合酶链式反应(PCR))进行扩增。然后，可藉助(例如)测序来鉴别一或多种核酸分子或其亚单元。然而，在一些实施例中，可在不需要扩增的情况下评估(例如，测序)核酸样品。

[0118] 如此申请案中所阐述，测序可包括藉由合成与模板互补或类似的另一生物分子(例如藉由合成与模板核酸分子互补的核酸分子并鉴别随时间流逝核苷酸的纳入(例如，藉由合成测序))来测定模板生物分子(例如，核酸分子)的个体亚单元。作为替代，测序可包括直接鉴别生物分子的个体亚单元。

[0119] 在测序期间，可将指示生物分子的个体亚单元的信号收集在内存中并实时或在稍后时间点进行处理以测定生物分子的序列。该处理可包括比较该等信号与参考信号从而使得能够鉴别个别亚单元，此在一些情形下产生读段。读段可为具有足够长度(例如，至少约30、50、100个碱基对(bp)或更多)的序列，该等序列可用于鉴别较大序列或区域，例如可将该等序列与染色体或基因体区域或基因上的位置进行比对。

[0120] 序列读段可用于重构受试者的基因组的较长区域(例如，藉由比对)。读段可用于重构染色体区域、整条染色体或全基因组。序列读段或自该等读段生成的较大序列可用于分析受试者的基因组，例如鉴别变体或多型性。变体的实例包括(但不限于)单核苷酸多型性(SNP)(包括串联SNP)、小规模多碱基删除或插入(亦称为插入删除或删除插入多型性(DIP))、多核苷酸多型性(MNP)、短串联重复(STR)、删除(包括微删除)、插入(包括微插入)、结构变异(包括复制、倒位、易位、倍增、复杂多位点变体、拷贝数变异(CNV))。基因组序列可包含变体的组合。举例而言，基因组序列可涵盖一或多个SNP及一或多个CNV的组合。

[0121] 术语“基因体”通常是指生物体遗传信息的总体。基因组可以DNA或RNA来编码。基因组可包含编码蛋白质的编码区域以及非编码区域。基因组可包括生物体中所有染色体一起的序列。举例而言，人类基因组总共具有46条染色体。所有这些染色体的序列一起构成人类基因组。在一些实施例中，测定整个基因组的序列。然而，在一些实施例中，关于基因组的子集(例如，一条或几条染色体，或其区域)或一个或几个基因(或其片段)的序列信息足以用于诊断、预后和/或治疗应用。

[0122] 尽管一些实施例可藉由检测样品中的单分子来进行诊断测试,但本发明人亦已认识到,本公开的方法及组合物可用于实施多肽(例如,蛋白质)测序或(例如)基因的一或多个核酸片段的核酸(例如,DNA、RNA)测序。

[0123] 测序

[0124] 在一些实施例中,本申请案的方面可用于与生物样品的分析相关的方法中。在实例性实施例中,本文所提供的方法可用于用来测定样品中的一或多种核酸或多肽的序列和/或测定样品中的一或多个核酸或多肽变体(例如,所关注基因中的一或多个突变)的存在或不存在的技术中。在一些实施例中,可对患者样品(例如,人类患者样品)实施测试以提供核酸序列信息或测定一或多个所关注核酸的存在或不存在,用于诊断、预后和/或治疗目的。在一些实例中,诊断测试可包括对受试者的生物样品中的核酸分子进行测序,例如藉由对受试者的生物样品中的无细胞DNA分子和/或表达产物(例如,RNA)进行测序来进行。举例而言,本公开提供可有利地用于阐述于以下申请案中的技术中的方法及组合物:共同待决的美国专利申请案第14/543,865号、第14/543,867号、第14/543,888号、第14/821,656号、第14/821,686号、第14/821,688号、第15/161,067号、第15/161,088号、第15/161,125号、第15/255,245号、第15/255,303号、第15/255,624号、第15/261,697号、第15/261,724号、第62/289,019号、第62/296,546号、第62/310,398号、第62/339,790号、第62/343,997号、第62/344,123号及第62/426,144号,其各自的内容以引用方式并入本文中。

[0125] 本申请案的一些方面可用于能够对生物聚合物(例如核酸及蛋白质)进行测序的技术中。在一些实施例中,本申请案中所阐述的方法及组合物可用于鉴别纳入核酸或蛋白质中的一系列核苷酸或氨基酸单体(例如,藉由检测一系列经标记核苷酸或氨基酸单体的纳入时程)的技术中。在一些实施例中,本申请案中所阐述的方法及组合物可纳入至鉴别一系列纳入至藉由聚合酶合成的模板依赖性核酸测序反应产物中的核苷酸的技术中。

[0126] 在测序期间,聚合酶可偶合(例如,结合)至靶标核酸分子(例如,测序模板的核酸分子)的引发位置。引发位置可包含与靶标核酸分子的一部分互补的引物。作为替代,引发位置是在靶标核酸分子的双链片段内提供的间隙或切口。间隙或切口的长度可为0至至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30或40个核苷酸。切口可在双链序列的一条链中提供中断,其可为聚合酶(例如链置换聚合酶)提供引发位置。

[0127] 在一些情形下,可使测序引物退火至可固定或可未固定至固体支撑物的靶标核酸分子。固体支撑物可包含(例如)用于核酸测序的于集成装置上的样品孔。在一些实施例中,可将测序引物固定至固体支撑物,且靶标核酸分子的杂交亦将靶标核酸分子固定至固体支撑物。在一些实施例中,将聚合酶固定至固体支撑物且使可溶性引物及靶标核酸与聚合酶接触。然而,在一些实施例中,在溶液中形成包含聚合酶、靶标核酸及引物的复合物且复合物被固定至固体支撑物(例如,经由聚合酶、引物和/或靶标核酸的固定)。在一些实施例中,样品孔中的组分皆未固定至固体支撑物。举例而言,在一些实施例中,在溶液中形成包含聚合酶、靶标核酸及引物的复合物且复合物未被固定至固体支撑物。

[0128] 在适当条件下,与退火的引物/靶标核酸接触的聚合酶可将一或多种核苷酸添加或纳入至引物上,且可将核苷酸以5’至3’的模板依赖性方式添加至引物中。该核苷酸纳入至引物(例如,经由聚合酶的作用)通常可称作引物延伸反应。每一核苷酸可与可检测标签结合,该可检测标签可在核酸延伸反应期间被检测及鉴别(例如,基于其发光寿命和/或其

他特征)且可用于确定纳入延伸引物中及由此新近合成的核酸分子的序列中的每一核苷酸。经由新近合成的核酸分子的序列互补,亦可测定靶标核酸分子的序列。在一些情形下,测序引物退火至靶标核酸分子以及核苷酸纳入测序引物可在类似反应条件(例如,相同或类似的反应温度)或不同反应条件(例如,不同的反应温度)下进行。在一些实施例中,藉由合成方法的测序可包括存在靶标核酸分子的群(例如,靶标核酸的拷贝)和/或扩增靶标核酸以获得靶标核酸的群的步骤。然而,在一些实施例中,使用藉由合成的测序来测定所评估的每一反应中的单分子的序列(且制备用于测序的靶标模板不需要核酸扩增)。在一些实施例中,根据本申请案的方面平行实施复数个单分子测序反应(例如,在单集成装置上)。举例而言,在一些实施例中,复数个单分子测序反应各自是在集成装置上的单独反应室中实施。

[0129] 实施例能加载包含长度大于或等于约10个碱基对(bp)、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、1000bp、10,000bp、20,000bp、30,000bp、40,000bp、50,000bp或100,000bp的核酸分子的测序模板。在一些实施例中,将用于单分子测序中的靶标核酸分子添加或固定至含有测序反应的至少一种其他组分(例如,聚合酶,例如DNA聚合酶,及测序引物)的样品孔的单链靶标核酸模板,该至少一种其他组分被固定或结合至固体支撑物(例如样品孔的底部或侧壁)。靶标核酸分子或聚合酶可直接或藉助连接体结合至样品壁,例如在样品孔的底表面或侧壁处。样品孔亦可含有经由引物延伸反应合成核酸所需要的任何其他试剂,例如,适宜缓冲液、辅因子、酶(例如聚合酶)及脱氧核糖核苷多磷酸(例如脱氧核糖核苷三磷酸,包括脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧尿苷三磷酸(dUTP)及脱氧胸苷三磷酸(dTTP)dNTP),其可任选包含可检测部分(例如,发光标签)。

[0130] 在一些实施例中,可使单链靶标核酸模板与测序引物、dNTP、聚合酶及核酸合成所需要的其他试剂接触。在一些实施例中,所有适当的dNTP皆可与单链靶标核酸模板同时接触(例如,所有dNTP皆同时存在),使得dNTP可连续地纳入。在其他实施例中,dNTP可与单链靶标核酸模板依序接触,其中单链靶标核酸模板与每一适当dNTP单独接触,且在单链靶标核酸模板与不同的dNTP接触之间具有洗涤步骤。对于待鉴别的单链靶标核酸模板的每一接续碱基位置,可重复此一使单链靶标核酸模板与每一dNTP单独接触随后进行洗涤的循环。在一些实施例中,测序引物退火至单链靶标核酸模板且聚合酶基于单链靶标核酸模板将dNTP(或其他脱氧核糖核苷多磷酸)连续纳入引物。

[0131] 聚合酶

[0132] 如本文所用术语“聚合酶”(polymerase或者polymerizing enzyme)通常是指能催化聚合反应的任一酶。聚合酶的实例括(但不限于)核酸聚合酶、转录酶或连接酶。聚合酶可为聚合的酶(polymerization enzyme)。

[0133] 针对单分子核酸延伸(例如,用于核酸测序)的实施例可使用能合成与靶标核酸分子互补的核酸的任一聚合酶。在一些实施例中,聚合酶可为DNA聚合酶、RNA聚合酶、反转录酶和/或其一或多者的突变体或变化形式。

[0134] 聚合酶的实例包括(但不限于)DNA聚合酶、RNA聚合酶、热稳定聚合酶、野生型聚合酶、修饰的聚合酶、大肠杆菌(E.coli)DNA聚合酶I、T7 DNA聚合酶、噬菌体T4DNA聚合酶Φ29(phi29)DNA聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Tli聚合酶、Pfu聚合酶、Pwo聚合酶、Vent®聚合酶、Deep Vent™聚合酶、Ex Taq™聚合酶、LA Taq™聚合酶、Sso聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合

酶、Mth聚合酶、ES4聚合酶、Tru聚合酶、Tac聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tca聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、Platinum® Taq聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tth聚合酶、Pfuturbo®聚合酶、Pyrobest™聚合酶、Pwo聚合酶、KOD聚合酶、Bst聚合酶、Sac聚合酶、克列诺片段(Klenow fragment)、具有3'至5'核酸外切酶活性的聚合酶及其变体、修饰的产物及衍生物。在一些实施例中,聚合酶是单亚单元聚合酶。聚合酶的其他实例包括M2Y聚合酶、铜绿蝇聚合酶、屎肠球菌(Enterococcus faecium)聚合酶、芽孢杆菌属(Bacillus)噬菌体VMY22聚合酶、芽孢杆菌属噬菌体GA-1聚合酶、放线菌属(Actinomyces)噬菌体AV-1聚合酶、莫兰菌门候选种(Candidatus Moranbacteria)聚合酶、芽孢杆菌属噬菌体MG-B1聚合酶、埃格特菌属(Eggerthella sp.)聚合酶、链球菌属(Streptococcus)噬菌体CP-7聚合酶、类杆菌属(Bacteroides sp.)聚合酶及沙眼披衣菌(Chlamydia trachomatis)聚合酶。在其他地方中,DNA聚合酶的非限制性实例及其性质详细阐述于DNA Replication第2版,Kornberg及Baker,W.H.Freeman,New York,N.Y.(1991)。

[0135] 在靶标核酸的核碱基与互补dNTP间碱基配对后,藉由在新合成链的3'羟基端与dNTP的α磷酸之间形成磷酸二酯键,聚合酶将dNTP纳入至新合成的核酸链中。在一些实施例中,聚合酶是具有高持续合成能力的聚合酶。然而,在一些实施例中,聚合酶是具有降低的持续合成能力的聚合酶。聚合酶持续合成能力通常是指聚合酶将dNTP连续纳入核酸模板中而不释放核酸模板的能力。

[0136] 在一些实施例中,聚合酶是具有低5'-3'核酸外切酶活性和/或3'-5'核酸外切酶的聚合酶。在一些实施例中,聚合酶经修饰(例如,藉由氨基酸取代)以相对于相应的野生型聚合酶具有降低的5'-3'核酸外切酶活性和/或3'-5'活性。DNA聚合酶的其他非限制性实例包括9°Nm™ DNA聚合酶(New England Biolabs)及克莱诺挂式聚合酶(Klenow exo-polymerase)的P680G突变体(Tuske等人(2000)JBC 275(31):23759-23768)。在一些实施例中,具有降低的持续合成能力的聚合酶为含有一或多段核苷酸重复序列(例如,两个或更多个同一类型的连续碱基)的测序模板提供增加的准确度。

[0137] 针对单分子RNA延伸(例如,用于RNA测序)的实施例可使用能自RNA模板合成互补DNA(cDNA)的任一反转录酶。在该等实施例中,反转录酶可以类似于聚合酶的方式起作用,其中可经由将dNTP纳入退火至RNA模板的反转录引物而自RNA模板合成cDNA。cDNA然后可参与测序反应并测定其序列。然后可使用所测定的cDNA序列,经由序列互补来确定初始RNA模板的序列。反转录酶的实例包括莫罗尼鼠类白血病病毒(Moloney Murine Leukemia Virus)反转录酶(M-MLV)、禽类成髓细胞瘤病毒(AMV)反转录酶、人类免疫缺失病毒反转录酶(HIV-1)及端粒酶反转录酶。

[0138] 本领域技术人员可藉由相对于相应野生型聚合酶的突变或其他修饰来增加或降低核酸聚合酶针对不同类型核酸的持续合成能力、核酸外切酶活性、相对亲和力或其他性质。在一些实施例中,可藉由使样品与集成装置的表面接触将包含聚合酶的样品加载至样品孔,如本文所阐述。

[0139] 样品孔

[0140] 在一些方面中,本公开提供将样品加载至集成装置所包含的样品孔中的方法。如本文所用,"集成装置"是能与基础仪器接界的装置。在一些实施例中,集成装置可包含一或多个样品孔和/或传感器。在一些实施例中,集成装置可能能够与发射或检测光的基础仪器

接界。在该等实施例中，集成装置可包含一或多个样品孔，每一样品孔包括导波管(waveguide)。

[0141] 本文所阐述类型的集成装置可包含一或多个经配置以在其中接收所关注分子的样品孔。在一些实施例中，样品孔接收可安置在样品孔的表面(例如底表面)上的所关注分子。在一些实施例中，样品孔在集成装置内形成，其中样品孔的底表面在该样品孔在其中形成集成装置的表面的远端。在一些实施例中，所关注分子安置的底表面距经配置以用期望水平的激发能量激发所关注分子的导波管可能具有一定距离。在一些实施例中，样品孔可相对于导波管定位，使得沿导波管传播的光学模式的消散场与所关注分子重叠。

[0142] 样品孔可在集成装置的表面具有顶部开口，所关注分子藉助该顶部开口可置于样品孔中。顶部开口的大小可取决于不同的因素，例如所载入样品中的所关注分子(例如，测序模板)的大小。在一些实施例中，顶部开口的大小可取决于在其中利用包含样品孔的集成装置的仪器或装置。举例而言，在检测来自样品孔内的光的装置中，背景信号可能由杂散光造成。当将所关注分子安置在样品孔中并用激发能量激发时，背景信号可造成不期望的发射能量波动，由此使得量测具有噪声。为限制该等波动，顶部开口的大小可经配置以阻断至少一部分背景信号。

[0143] 在一些实施方案中，样品孔的体积是约10^{-21}升与约10^{-15}升之间。由于样品孔具有小体积，因此即使所关注分子可以类似于见于天然环境的浓度而被浓缩在所检查样品中，亦可检测到单样品事件(例如，单分子事件)。举例而言，微摩尔浓度的所关注分子可存在于经放置以与集成装置接触的样品中，但在像素水平上，在任一给定时间可仅仅约一个所关注分子(或单分子事件)位于样品孔内。

[0144] 在统计学上，一些样品孔可能不含所关注分子且一些可含有一个以上所关注分子。然而，可观数量的样品孔可含有所关注单分子(例如，在一些实施例中至少30％)，使得可对大量样品孔平行实施单分子分析。由于可在每一样品孔中分析单分子或单样品事件，因此集成装置使得可检测个体事件，否则该等个体事件可能在是总体均值中不被注意。

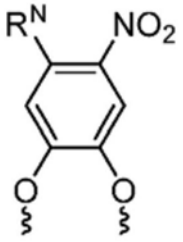
[0145] 样品孔功能化

[0146] 在某些实施例中，本文所阐述的技术涉及将分子加载至样品孔，其中该分子被限于样品孔的靶标体积(例如，反应体积)中。在一些实施例中，靶标体积是样品孔内的区域。在某些实施例中，样品孔包括包含第一材料的底表面和由复数个金属或金属氧化物层形成的侧壁。在一些实施例中，第一材料是透明材料或玻璃。在一些实施例中，底表面是平坦的。在一些实施例中，底表面是弯曲孔。在一些实施例中，底表面包括在由复数个金属或金属氧化物层形成的侧壁下方的一部分侧壁。在一些实施例中，第一材料是熔融硅石或二氧化硅。在一些实施例中，复数个层各自包含金属(例如，Al、Ti)或金属氧化物(例如，Al_2O_3、TiO_2、TiN)。

[0147] 在当一或多个分子或复合物(例如，测序模板)被固定于底表面上时的实施例中，可能期望功能化底表面以容许结合一或多个分子或复合物。在某些实施例中，底表面包含透明玻璃。在某些实施例中，底表面包含熔融硅石或二氧化硅。在一些实施例中，底表面是利用硅烷来功能化。在一些实施例中，底表面是利用带离子电荷的聚合物来功能化。在一些实施例中，带离子电荷的聚合物包含聚(赖氨酸)。在一些实施例中，底表面是利用聚(赖氨酸)-接枝-聚(乙二醇)来功能化。在一些实施例中，底表面是利用生物素化牛血清白蛋白

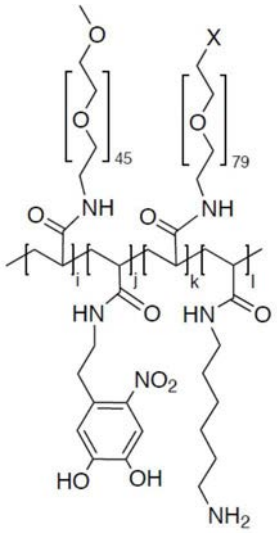
(BSA)来功能化。

[0148] 在某些实施例中,底表面是利用包含硝基多巴(nitrodopa)基团的涂层来功能化。在某些实施例中,涂层包含下式的基团:

[0149] 

,

[0150] 其中R^N是任选取代的烷基链且〰是氢或至表面的连接点。在一些实施例中,R^N包含聚合物。在一些实施例中,R^N包含聚(赖氨酸)或聚(乙二醇)。在一些实施例中,R^N包含生物素化聚(乙二醇)。在一些实施例中,涂层包括包含赖氨酸单体的聚(赖氨酸)的共聚物,其中赖氨酸单体独立地包含PEG、生物素化PEG、硝基多巴基团、膦酸酯基团或硅烷。在某些实施例中,涂层包含式(P)的聚合物:

[0151] 

(P)。

[0152] 在一些实施例中,X是-OMe、生物素基团、膦酸酯或硅烷。在一些实施例中,i、j、k及l中的每一者独立地是在0与100之间(包括末端)的整数。

[0153] 在一些实施例中,底表面是利用包含烷基链的硅烷来功能化。在一些实施例中,底表面是利用包含任选取代的烷基链的硅烷来功能化。在一些实施例中,底表面是利用包含聚(乙二醇)链的硅烷来功能化。在一些实施例中,底表面是利用包含偶合基团的硅烷来功能化。例如,偶合基团可包含化学部分,例如胺基团、羧基、羟基、硫氢基、金属、螯合剂及诸如此类。或者,其可包括特定结合要素,例如生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、中性抗生物素蛋白、凝集素、SNAP-tags™或其底物、缔合或结合性肽或蛋白质、抗体或抗体片段、核酸或核酸类似物或诸如此类。另外或可选地,可使用偶合基团来偶合用于偶合或结合所关注分子的另一基团,该偶合基团在一些情形下包括化学官能基及特定结合要素。举例而言,偶合基团(例如生物素)可沉积于基板表面上且在给定区中选择性地活化。然后可将中间结合剂(例如链霉抗生物素蛋白)偶合至第一偶合基团。然后将所关注分子(在此具体实例中其可为生物素化)偶合至链霉抗生物素蛋白。

[0154] 在一些实施例中,底表面是利用包含生物素的硅烷或其类似物来功能化。在一些

实施例中，底表面是利用包含聚(乙二醇)链的硅烷来功能化，其中聚(乙二醇)链包含生物素。在某些实施例中，底表面是利用硅烷的混合物来功能化，其中至少一种类型的硅烷包含生物素且至少一种类型的硅烷不包含生物素。在一些实施例中，混合物所包含的生物素化硅烷较不包含生物素的硅烷少约10倍、约25倍、约50倍、约100倍、约250倍、约500倍或约1000倍。

[0155] 可藉由将聚合酶复合物暴露于结合混合物中的功能化表面来将该复合物固定于底表面上。在一些实施例中，结合混合物包含一或多种盐。在一些实施例中，盐包含乙酸钾。在一些实施例中，盐包含氯化钙。在一些实施例中，盐是以约1mM与约10mM之间的浓度存在。在一些实施例中，盐是以约10mM与约50mM之间的浓度存在。在一些实施例中，盐是以约50mM与约100mM之间的浓度存在。在一些实施例中，盐是以约100mM与约250mM之间的浓度存在。在一些实施例中，乙酸钾的浓度是约75mM。在一些实施例中，氯化钙的浓度是约10mM。在一些实施例中，结合混合物包含还原剂。在一些实施例中，还原剂包含二硫苏糖醇(DTT)。在一些实施例中，还原剂是以约1mM与约20mM之间的浓度存在。在一些实施例中，二硫苏糖醇的浓度是约5mM。在一些实施例中，结合混合物包含缓冲液。在一些实施例中，缓冲液包含MOPS。在一些实施例中，缓冲液是以约10mM与约100mM之间的浓度存在。在一些实施例中，MOPS的浓度是约50mM。在一些实施例中，缓冲液是以约5.5与约6.5之间的pH存在。在一些实施例中，缓冲液是以约6.5与约7.5之间的pH存在。在一些实施例中，缓冲液是以约7.5与约8.5之间的pH存在。在一些实施例中，结合混合物包含脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)。在一些实施例中，脱氧核苷酸三磷酸是以250nM与10μM之间的浓度存在。在一些实施例中，dNTP的浓度是约2μM。在一些实施例中，结合混合物包含表面活性剂。在一些实施例中，表面活性剂是Tween表面活性剂(例如，Tween 20)。在一些实施例中，表面活性剂是以约0.01％与约0.1％之间的体积百分比存在。在一些实施例中，Tween的体积百分比是约0.03％。

[0156] 实例

[0157] 实例1:甲基纤维素样品载入

[0158] 遵循标准溶解方案在去离子水中制备2重量％METHOCEL溶液(甲基纤维素，Sigma M0387，在2％及20℃下约1,500mPa·s，约63,000Da)。为在载入测序模板复合物(聚合酶/引物/模板复合物)期间使用，将2％METHOCEL溶液与结合缓冲液的10×溶液(500mM MOPS(pH 7.5)，750mM乙酸钾，100mM DTT，20mM乙酸钙，20μM NTP(各种)，0.1％w/w tween 20)以9:1混合。所得到的于缓冲液中的1.8％聚合物溶液含有与存于1×结合缓冲液(50mM MOPS pH 7.5，75mM乙酸钾，10mM DTT，2mM乙酸钙，2μM NTP(各种)，0.01％w/w tween 20)中的测序模板复合物加载溶液相同的离子组成。

[0159] 将tween 20的溶液(0.1％)添加至具有深270nm的样品孔的测序芯片(例如，集成装置)中且容许培育10分钟。在去除tween 20后，用1×结合缓冲液将测序芯片洗涤一次，之后将30μL结合缓冲液添加至集成装置中。将含有测序模板复合物的溶液添加至集成装置中至250-1000pM的最终浓度并混合孔。用于结合缓冲液中的1.8％甲基纤维素的溶液覆盖所混合的溶液。随后将测序芯片在室温下培育30-60分钟。认为这种培育时段可使测序模板复合物的聚合酶-链霉抗生物素蛋白融合物固定于测序芯片上的样品孔中，样品孔已经生物素包被。

[0160] 在培育时段后，自测序芯片去除溶液。用结合缓冲液将测序芯片洗涤三次，之后用

反应缓冲液(65mM MOPS pH 7.7,120mM乙酸钾,20mM乙酸镁,10mM DTT,8mM原儿茶酸,6mM 4-硝基苄醇,1×原儿茶酸3,4-双加氧酶)洗涤一次。最后,将一定体积的反应缓冲液添加至测序芯片中并用等体积的矿物油覆盖。使用阐述于待决的美国申请案14/821,656、15/261,697、15/261,724及15/161,125中的方法实时监测测序反应。藉由显示于图7A中的强度及时间迹线(time trace)来绘示代表性测序反应。在此反应中,跨超过1.2kb的读长对9.1kb双链DNA模板进行测序(图7B)。

[0161] 为评价甲基纤维素对大模板加载的效应,用相同的9.1kb模板DNA各自装载两个测序芯片,一者使用2%甲基纤维素的覆盖(如上文所阐述),另一者不用覆盖。两个芯片均以660pM模板装载1小时。自载有甲基纤维素的芯片检测到多次纳入痕迹,而在无覆盖情况下在集成装置上未检测到测序活性。然后将SYBR Gold荧光DNA结合染料添加至每一测序芯片中。成像结果绘示于图8中,该图图解说明DNA染色的显著差异。载有甲基纤维素的芯片上约30%的样品孔的染色鲜亮,从而指示存在DNA模板,而在无甲基纤维素覆盖情况下在集成装置上未观察到染色。

[0162] 在类似实验中,用相同的5.4kb模板DNA各自装载两个其他测序芯片,一者使用2.7%甲基纤维素的覆盖,另一者仅藉由扩散来装载。两个芯片均利用2.5nM DNA模板装载1.5小时。然后将SYBR Gold添加至每一测序芯片中。成像结果绘示于图9中,该图图解说明DNA染色的显著差异。在甲基纤维素芯片中约25个样品孔用单模板来装载,相比之下约13个样品孔仅藉由扩散来装载。

[0163] 实例2:固态拥挤试剂

[0164] 图10绘示用于评估琼脂糖作为固态拥挤试剂的潜能的实验设置。如所显示,螺丝螺母上方约4mm部分代表可插入至集成装置的总体样品孔(例如,阵列,例如在凹陷区域中,或保持加载样品的总体体积的其他容器)中的主体。绘示三个条件来图解说明其中琼脂糖充当拥挤试剂的方法。"无琼脂糖"螺丝是无任何拥挤试剂的主体。"经干燥琼脂糖"螺丝显示经干燥琼脂糖包被的主体。如在图10中可看出,经干燥琼脂糖大约填充螺丝的螺纹。"水合琼脂糖"螺丝代表在插入至集成装置中载有样品的总体样品孔中后的经干燥琼脂糖主体。主体上的琼脂糖涂层的溶胀指示琼脂糖由总体样品孔中水再水合,此效应可使得总体溶液中测序模板的浓度增加。

[0165] 等同形式及范围

[0166] 尽管本文中已阐述并说明了若干发明性实施例,但本领域技术人员将易于构想用于实施功能和/或获得结果和/或本文所述优点中的一或多者的各种其他构件和/或结构,且该等变化形式和/或修改形式中的每一者皆认为是在本文所述的发明性实施例的范围内。更一般而言,本领域技术人员将易于了解,本文所述的所有参数、尺寸、材料及配置皆意欲具有实例性且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于使用发明性教导的一或多个特定应用。本领域技术人员仅使用常规实验即可认识或能够断定本文所述的特定发明性实施例的许多等效形式。因此,应理解前述实施例仅以举例方式呈现且在随附权利要求书及其等效形式的范围内,可不同于所特定阐述及主张来实践发明性实施例。本发明的发明性实施例是关于本文所述的每一个别特征、系统、对象、材料、套组和/或方法。另外,若该等特征、系统、对象、材料、套组和/或方法不相互矛盾,则两个或更多个该等特征、系统、对象、材料、套组和/或方法的任何组合均包括于本发明的发明范围内。

[0167] 如本文所定义及使用的所有定义皆应理解为控制在辞典定义、以引用方式并入的文件中的定义和/或所定义术语的普遍含义以内。

[0168] 本文所公开的所有参考文献、专利及专利申请案皆针对其每一者所列举的目标物以引用方式并入，其在一些情形中可涵盖整个文件。

[0169] 除非明确指示相反的情形，否则如本文在说明书中及在权利要求书中所用的不定冠词“(a及an)”应理解为意指“至少一”。

[0170] 如本文在说明书及权利要求书中所用，词组“和/或”应理解为意指如此结合的要素中的“任一者或两者”，亦即，在一些情形下以结合方式存在且在其他情形下以分离方式存在的要素。以“和/或”列示的多个要素应视为呈相同方式，亦即，如此结合的要素中的“一或多者”。除由“和/或”从句特别鉴别的要素以外，其他要素可任选存在，无论与特别指出的那些要素相关抑或不相关。因此，作为非限制性实例，当结合诸如“包含”的开放式语言使用时，对“A和/或B”的提及在一个实施例中可指仅A(任选包括除B以外的要素)；在另一实施例中，可指仅B(任选包括除A以外的要素)；在再一实施例中，可指A及B二者(任选包括其他要素)；等等。

[0171] 如本文中在说明书中及在权利要求书中所用，“或”应理解为具有与如上文所定义的“和/或”相同的含义。举例而言，在分离清单中的物项时，“或”或者“和或”应阐释为具有包括性，亦即，包括大量或一系列要素中的至少一者(但亦包括一者以上)并任选包括其他未列示物项。除非术语明确指示相反的情形，否则诸如“……中的仅一者”或“……中的恰好一者”或在用于权利要求书中时的“由……组成”将指包括大量或一系列要素中的恰好一个要素。一般而言，如本文所用术语“或”在前面有排他性术语(诸如“任何一者”、“……中的一者”、“……中的仅一者”或“……中的恰好一者”)时应仅解释为指示排他性替代(亦即，“一者或另一者而非两者”)。当在权利要求书中使用时，“基本上由……组成”应具有如其用于专利法律领域中的普通含义。

[0172] 如本文在说明书及权利要求书中所用，在提及一或多个要素的清单时，词组“至少一个”应理解为意指选自该要素清单中的该等要素中的任一或多者的至少一个要素，但未必包括该要素清单内所特别列示的每一要素中的至少一者，且不排除该要素清单中的要素的任何组合。此定义亦容许除词组“至少一个”所指的要素清单内特别指明的要素以外，任选存在要素，而无论与特别指明的那些要素相关抑或不相关。因此，作为非限制性实例，在一个实施例中，“A和B中的至少一者”(或等效地，“A或B中的至少一者”，或等效地，“A和/或B中的至少一者”)可指至少一个(任选包括一个以上)A，而不存在B(任选包括除B以外的要素)；在另一实施例中，可指至少一个(任选包括一个以上)B，而不存在A(且任选包括除A以外的要素)；在又一实施例中，可指至少一个(任选包括一个以上)A及至少一个(任选包括一个以上)B(且任选包括其他要素)；等等。

[0173] 亦应理解，除非明确指示相反的情形，否则在本文所主张的包括一个以上步骤或动作的任何方法中，该方法的步骤或动作的顺序不必受限于列举该方法的步骤或动作的顺序。

[0174] 在权利要求书中以及在以上说明书中，所有过渡词组(例如“包含”、“包括”、“携载”、“具有”、“含有”、“涉及”、“固持”、“由...构成(composed of)”及诸如此类)应理解为是开放式的，亦即，意指包括但不限于。仅过渡词组“由……组成”及“基本上由……组成”应分

别是封闭式或半封闭式过渡词组，如美国专利局专利审查程序手册(United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures)第2111.03节中所陈述。应了解，在替代实施例中，此文件中使用开放式过渡词组(例如，“包含”)阐述的实施例亦被设想为“由开放式过渡词组所阐述的特征“组成”及“基本上由其组成”。举例而言，若本发明阐述“包含A和B的组合物”，则本公开亦涵盖替代实施例“由A和B组成的组合物”及“基本上由A和B组成的组合物”。

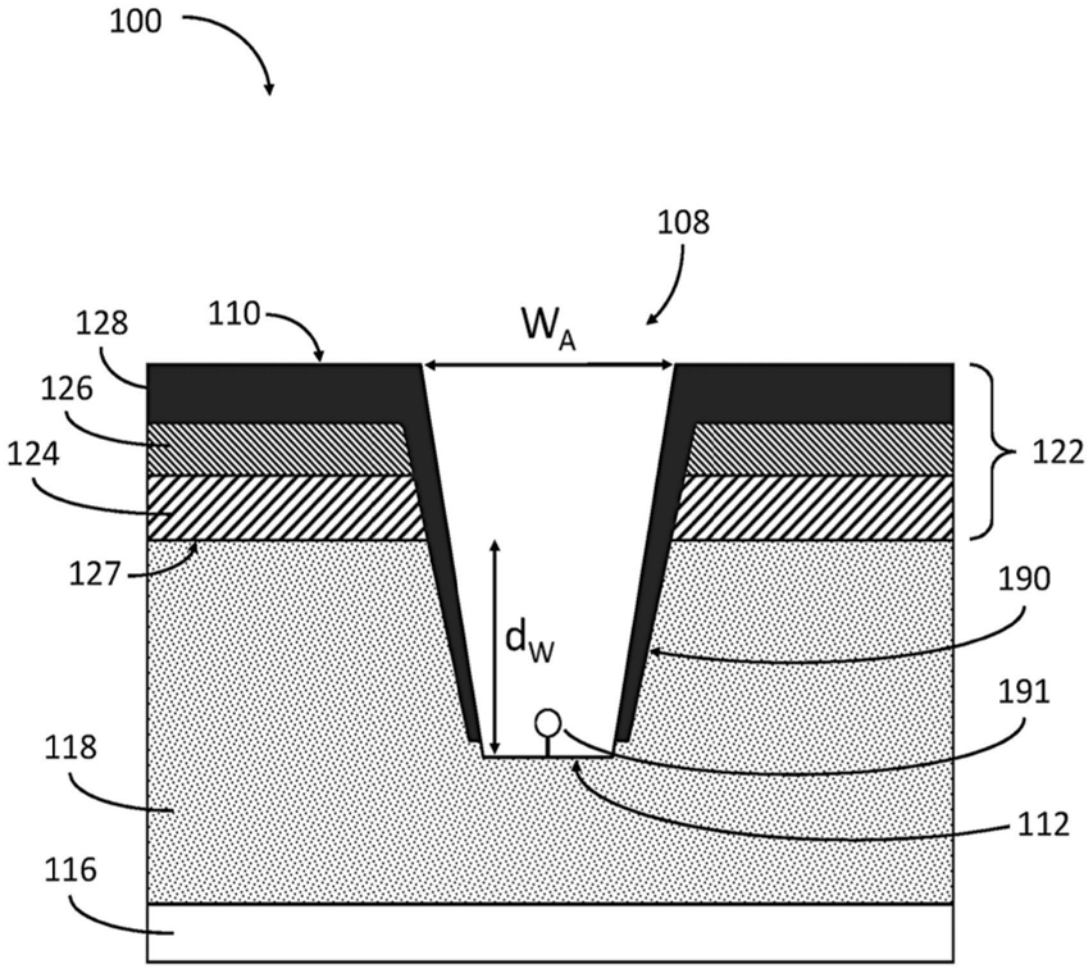


图1

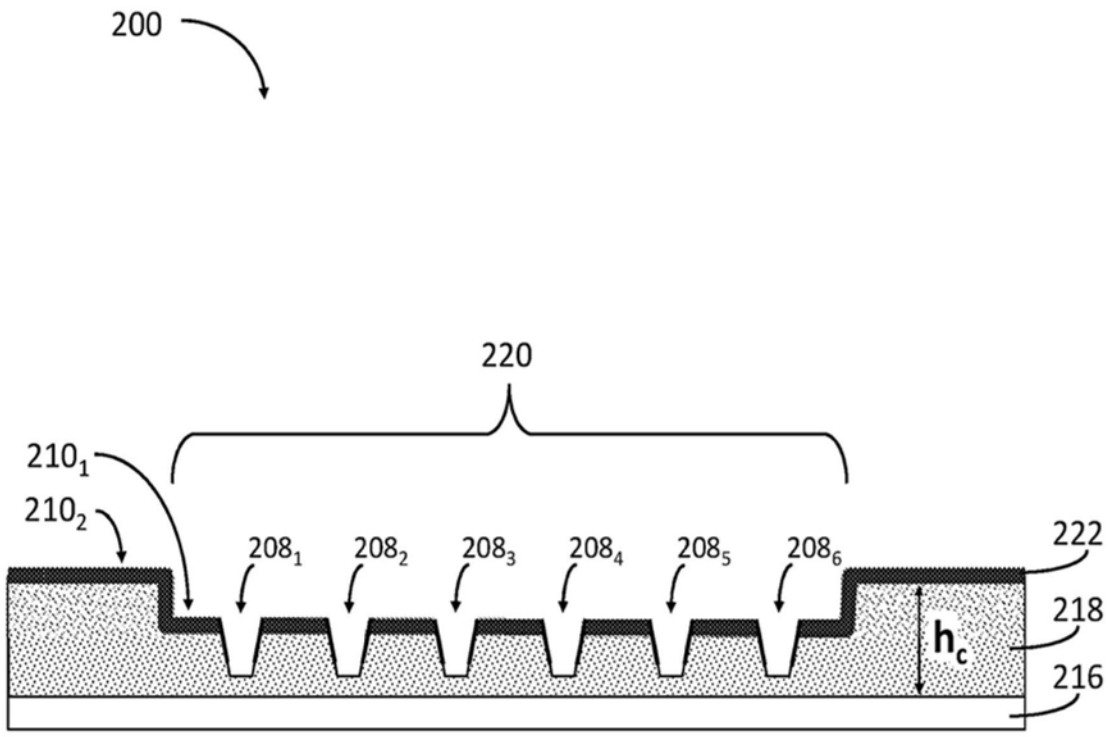

200
220
210_1
210_2
208_1
208_2
208_3
208_4
208_5
208_6
222
218
h_c
216

图2

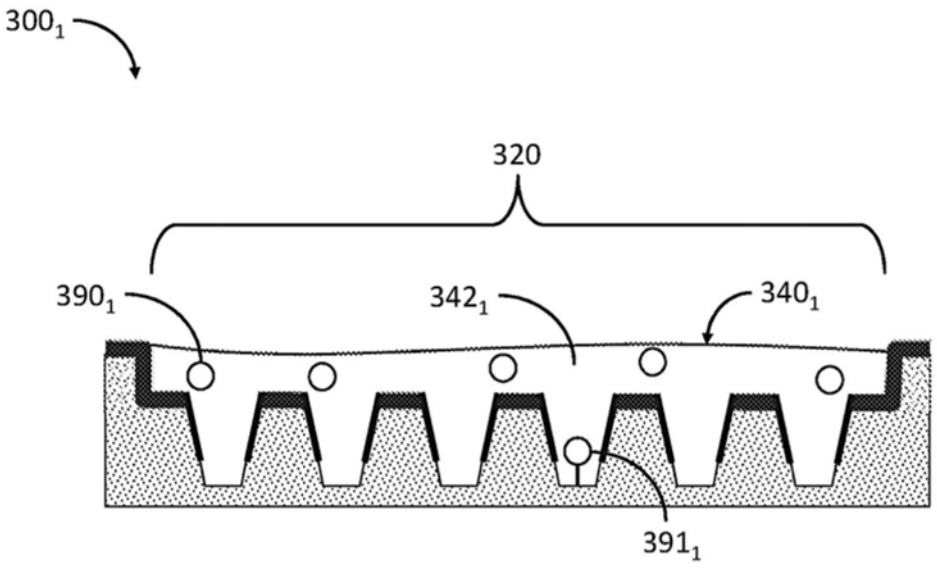

300_1
320
390_1
342_1
340_1
391_1

图3A

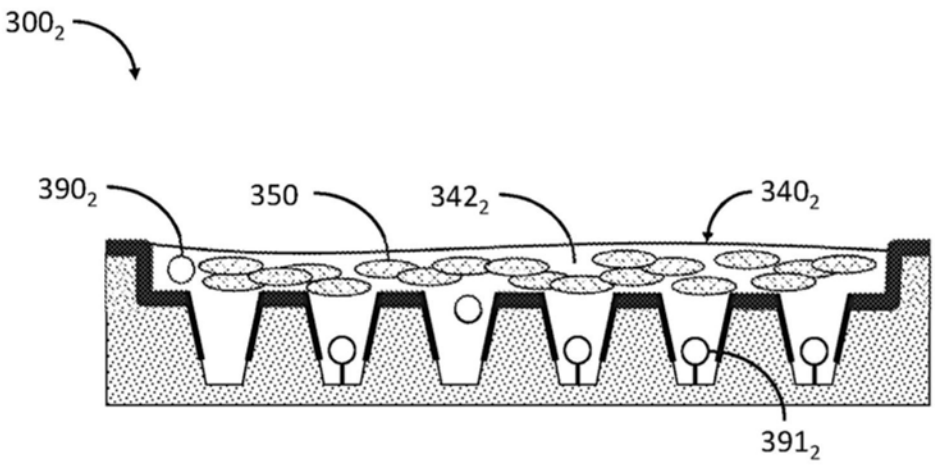


图3B

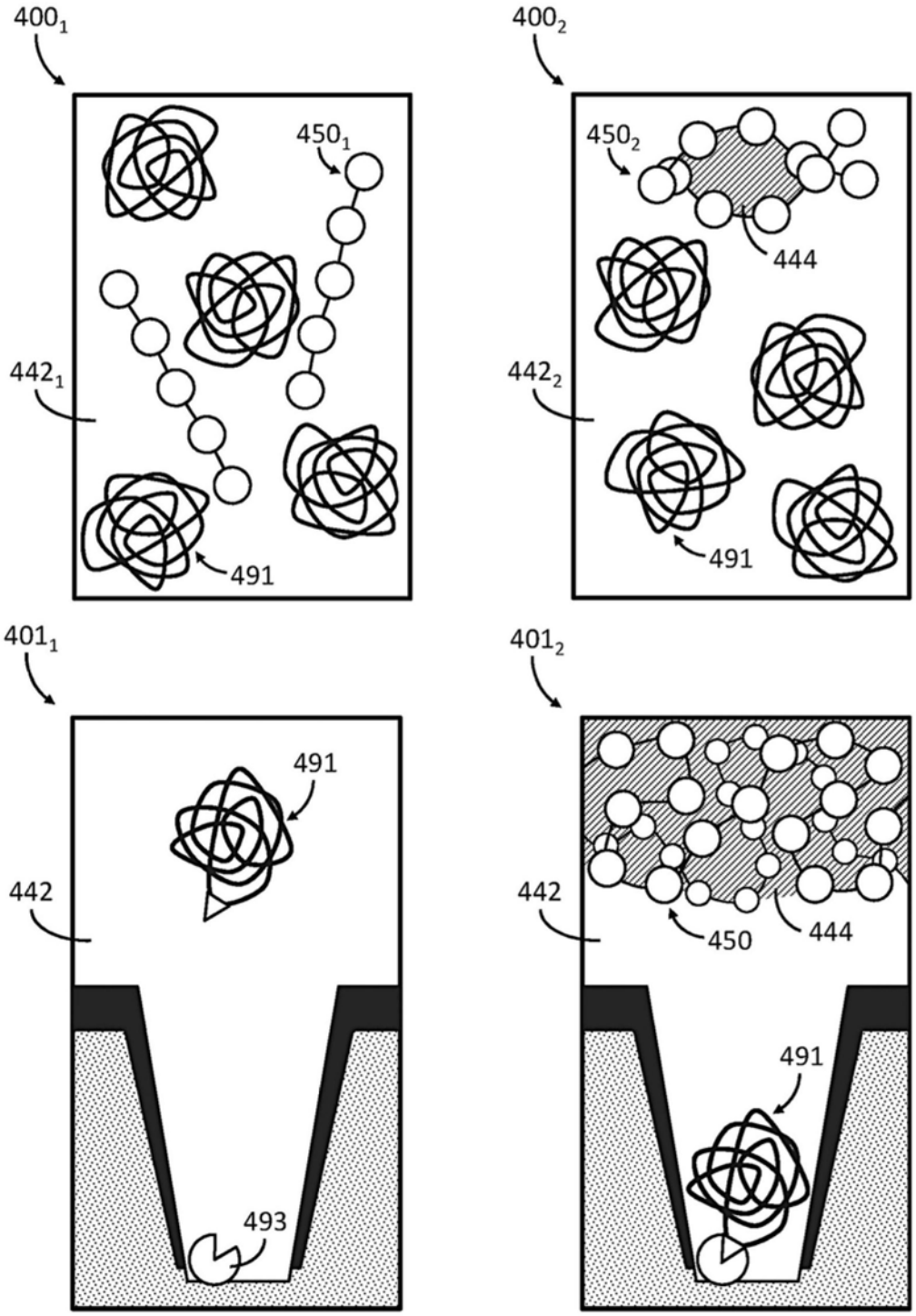

400₁
450₁
442₁
491
400₂
450₂
444
442₂
491
401₁
491
442
493
401₂
442
450
444
491

图4

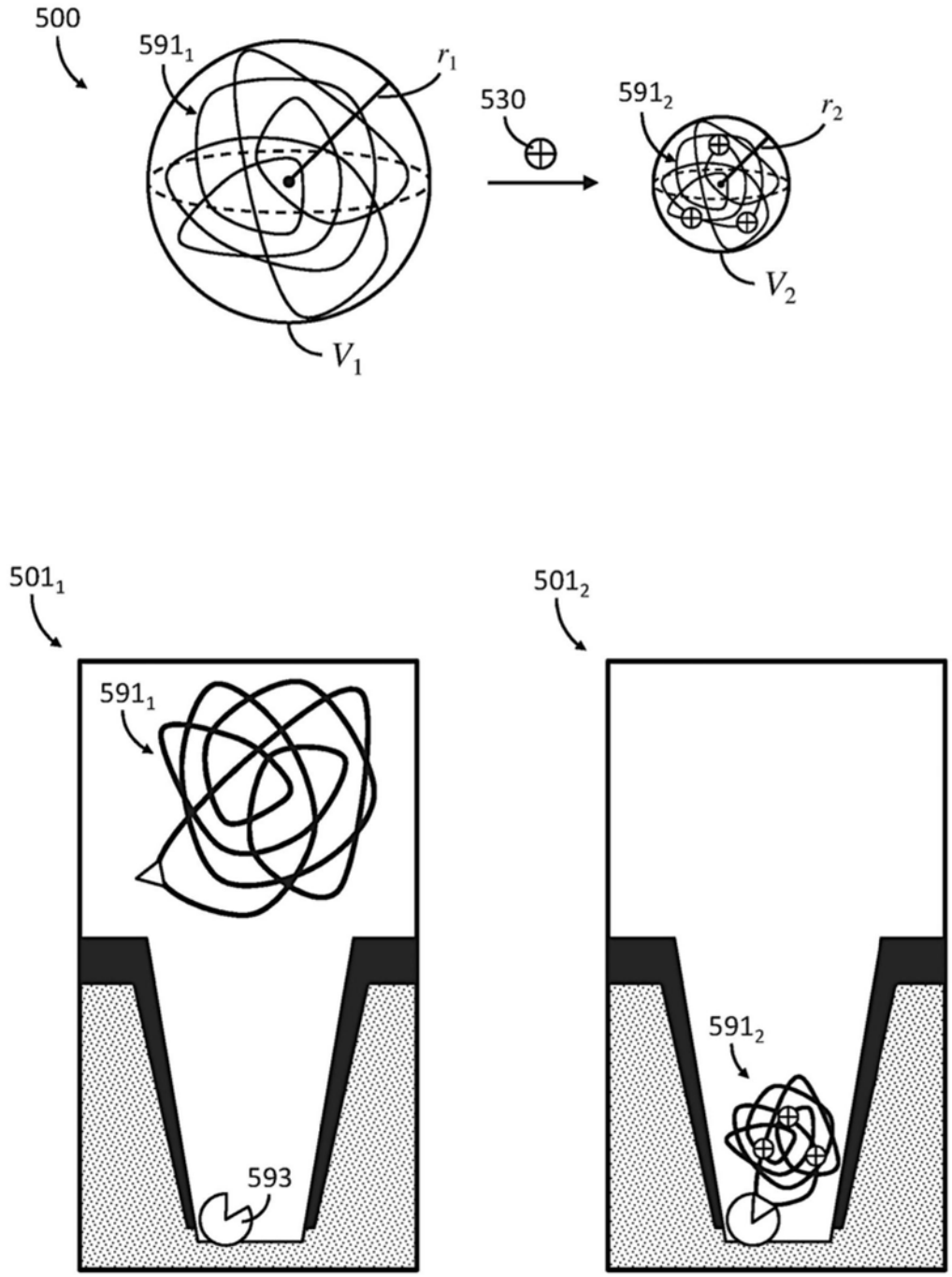


图5

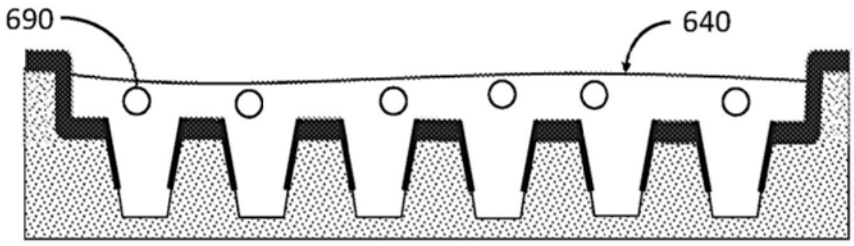


图6A

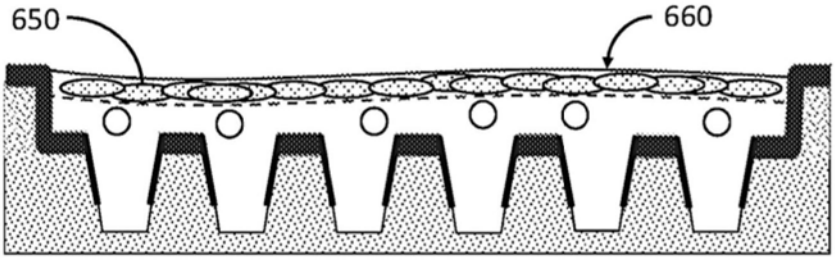


图6B

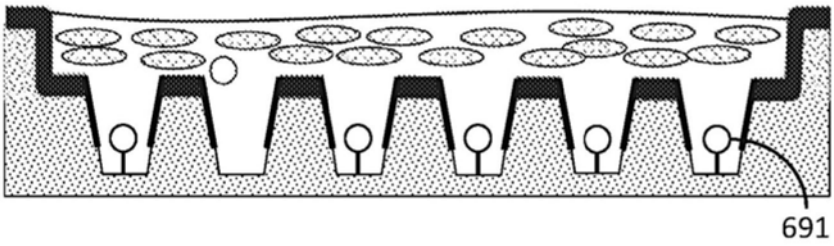


图6C

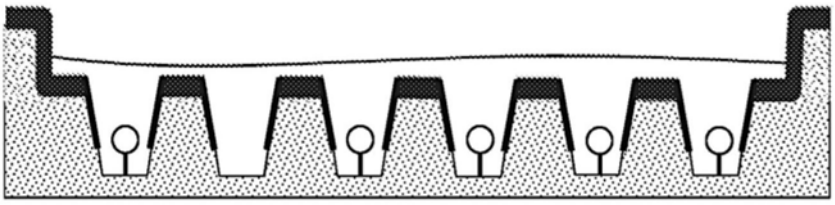


图6D

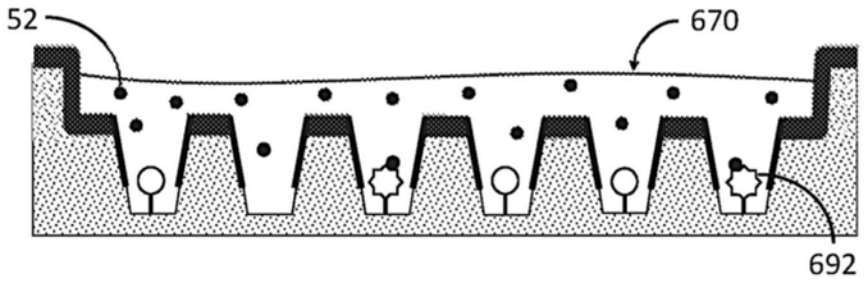

52
670
692

图6E

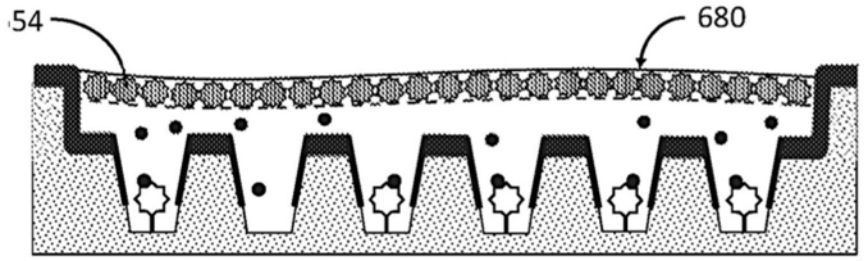

54
680

图6F

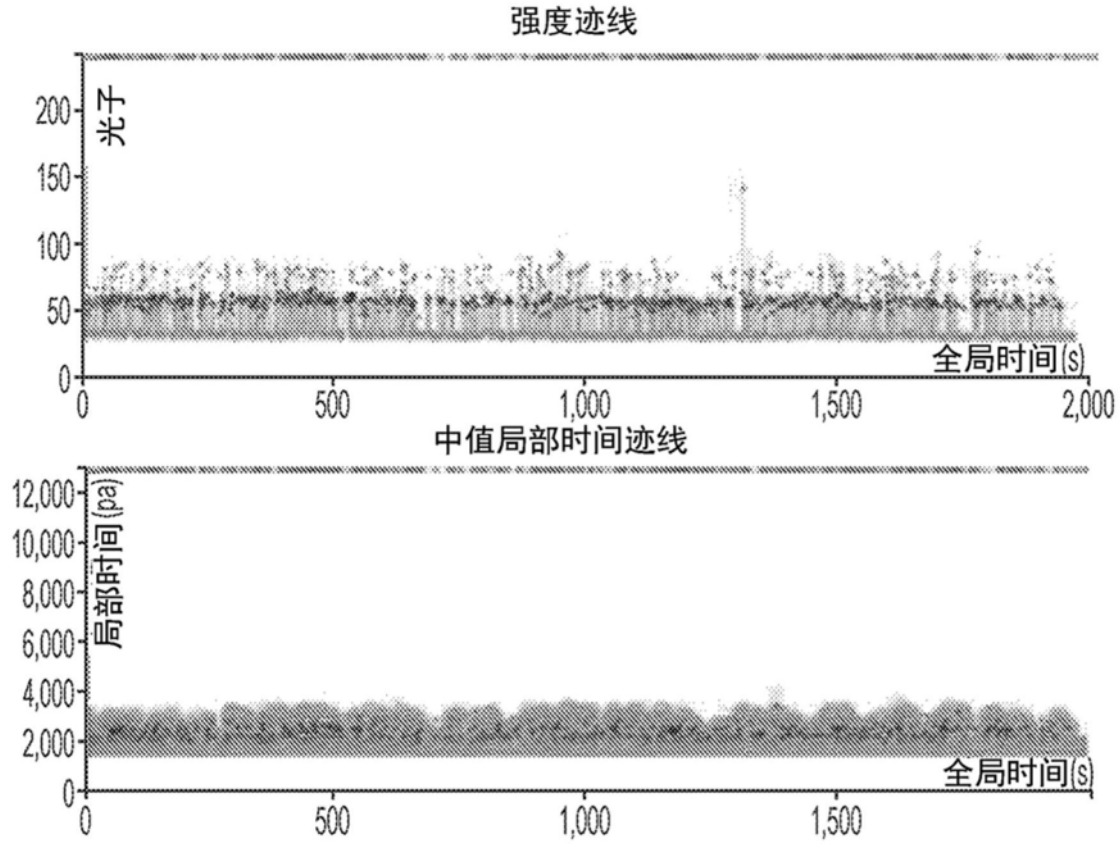

强度迹线
光子
200
150
100
50
0
全局时间(s)
0
500
1,000
1,500
2,000
中值局部时间迹线
局部时间(ps)
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
全局时间(s)
0
500
1,000
1,500

图7A

#----------

读长	插入	
1,286 碱基		#
正确性	A	15
70.5%	C	26
p-值	G	16
8e-62	T	36
	总	93

	删除	
		#
	A	57
	C	40
	G	62
	T	33
	总	192

错配					
	A	C	G	T	总
A		10	7	15	32
C	8		3	22	33
G	9	8		24	41
T	3	10	4		17
总	20	28	14	61	123

图7B

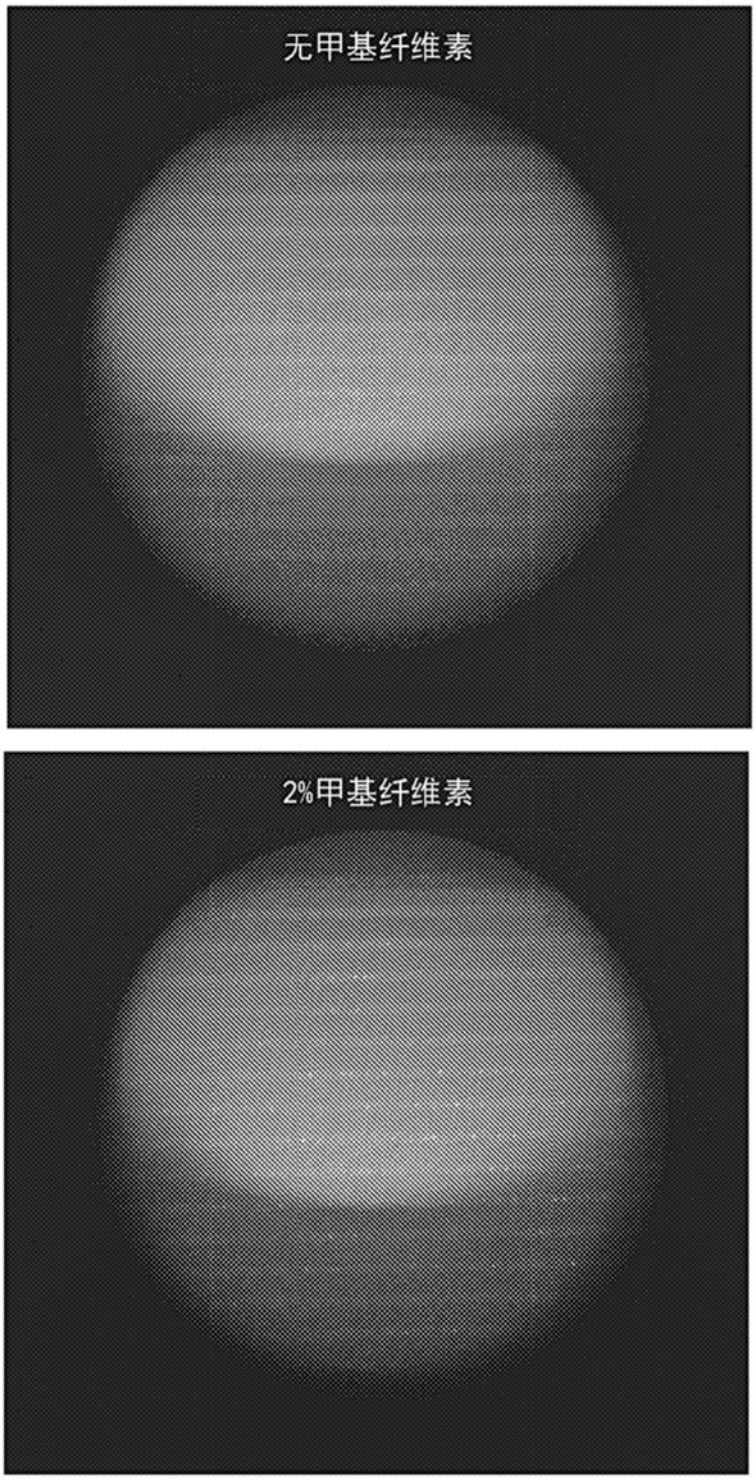


图8

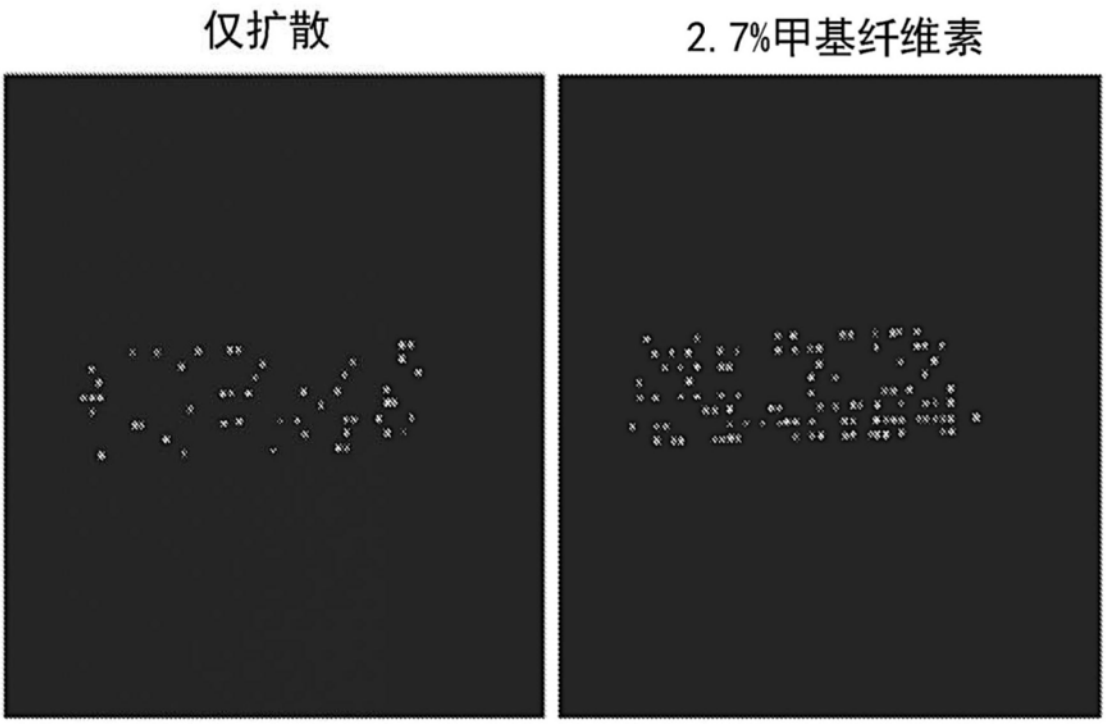


图9

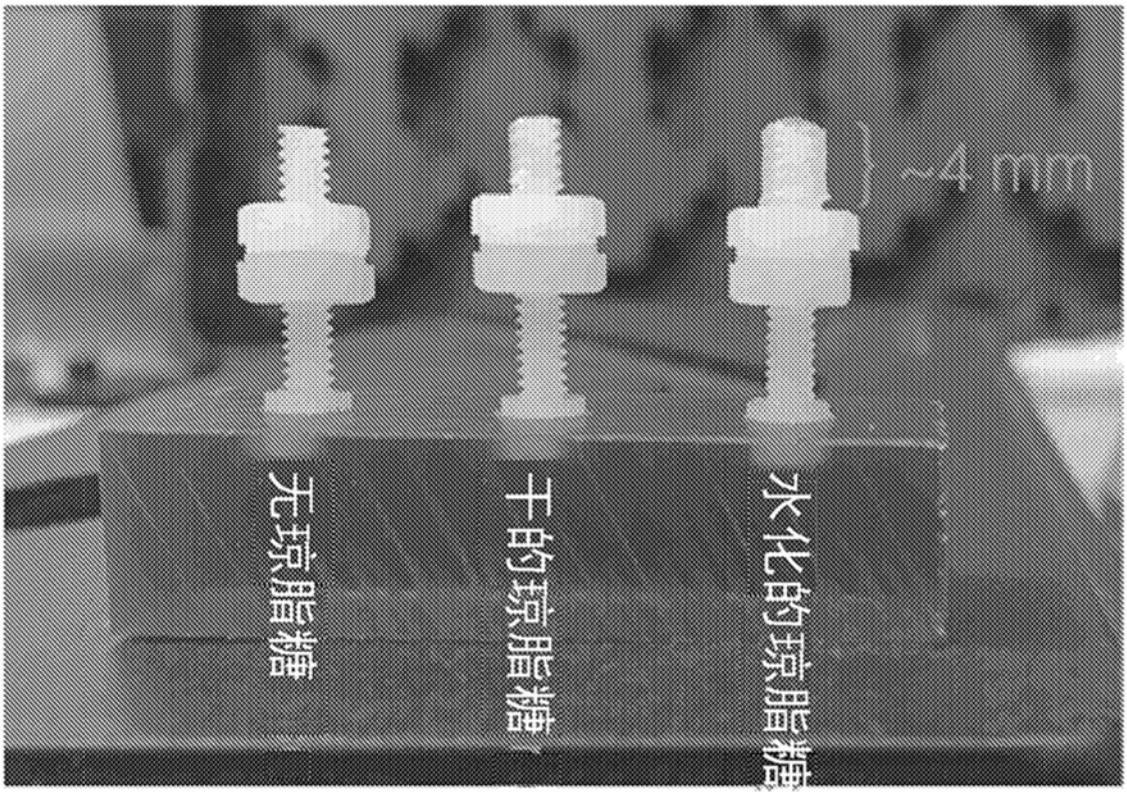


图10