202507012

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202507012 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：113123319 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 11 月 14 日

(51)Int. Cl.： *C12Q1/6834 (2018.01)* *C12Q1/6832 (2018.01)*
C12Q1/6874 (2018.01)

(30)優先權：2018/11/14 美國 62/767,343
2018/12/07 美國 62/776,898
2019/03/25 美國 16/363,842

(71)申請人：美商元素生物科學股份有限公司 (美國) ELEMENT BIOSCIENCES, INC. (US)
美國

(72)發明人：亞斯藍 錫南 ARSLAN, SINAN (TR) ；周春鴻 ZHOU, CHUNHONG (CN) ；何敏 HE, MOLLY MIN (US) ；凱林格 馬修 KELLINGER, MATTHEW (US) ；馬慧珍 MAH, ADELINE HUIZHEN (MY) ；普雷維特 麥可 PREVITE, MICHAEL (US) ；孫 雷 SUN, LEI (US)

(74)代理人：陳長文；簡秀如；姚金梅

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：137 項 圖式數：33 共 153 頁

(54)名稱

改善固相 DNA 雜交及擴增之低結合基材

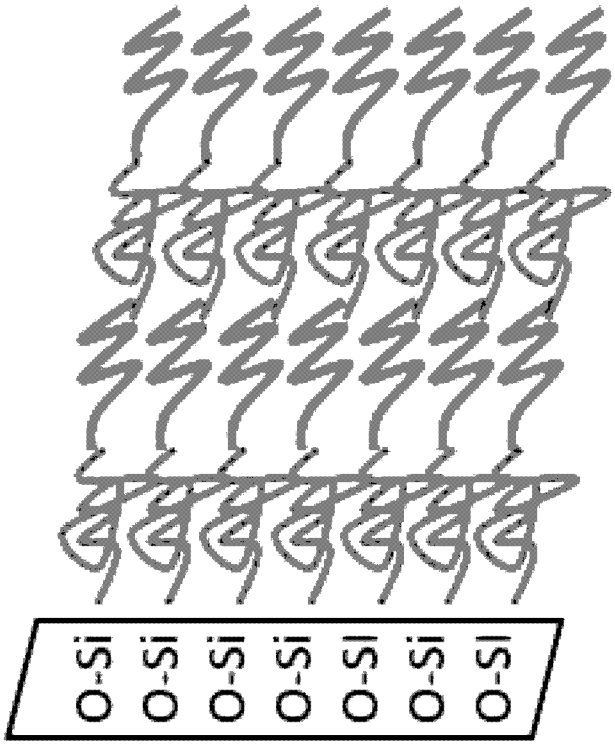
(57)摘要

本發明描述一種進行固相核酸雜交及擴增之非特異性低結合基材及調配物，其對於核酸偵測、擴增及定序應用提供改善效能。此等基材呈現高的對比雜訊比(CNR)，有助於更準確的資料收集及更準確的序列讀段。

Low non-specific binding supports and formulations for performing solid-phase nucleic acid hybridization and amplification are described that provide improved performance for nucleic acid detection, amplification, and sequencing applications. These supports exhibit a high Contrast-to Noise Ratio (CNR), facilitating more accurate data collection and more accurate sequence reads.

指定代表圖：

TW 202507012 A



【圖1】

20250[illegible]
202[illegible]
專利案號：113123319
原申請案號：108141470

【發明摘要】

【中文發明名稱】

改善固相DNA雜交及擴增之低結合基材

【英文發明名稱】

LOW BINDING SUPPORTS FOR IMPROVED SOLID-PHASE DNA HYBRIDIZATION AND AMPLIFICATION

【中文】

本發明描述一種進行固相核酸雜交及擴增之非特異性低結合基材及調配物，其對於核酸偵測、擴增及定序應用提供改善效能。此等基材呈現高的對比雜訊比(CNR)，有助於更準確的資料收集及更準確的序列讀段。

【英文】

Low non-specific binding supports and formulations for performing solid-phase nucleic acid hybridization and amplification are described that provide improved performance for nucleic acid detection, amplification, and sequencing applications. These supports exhibit a high Contrast-to Noise Ratio (CNR), facilitating more accurate data collection and more accurate sequence reads.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

改善固相DNA雜交及擴增之低結合基材

【英文發明名稱】

LOW BINDING SUPPORTS FOR IMPROVED SOLID-PHASE DNA HYBRIDIZATION AND AMPLIFICATION

【技術領域】

【先前技術】

【0001】在過去的二十年裏，已開發出且商業化各種DNA定序方法(參見例如E. Mardis (2008), 「Next-Generation DNA Sequencing Methods」, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 9:387-402；及J. Heather及B. Chain, (2016), 「The Sequence of Sequencers: The History of Sequencing DNA」, Genomics 107:1-8近期綜述)。許多「第二代」及「第三代」定序技術利用大量合成定序(SBS)之平行循環陣列途徑，其中準確解碼繫栓至固體基材之單股模板寡核苷酸序列依賴於成功分類信號，該等信號由藉由聚合酶將A、G、C及T核苷酸逐步添加至互補寡核苷酸股而產生。此等方法通常需要寡核苷酸模板經固定長度之已知銜接子序列修飾，藉由雜交至與銜接子序列之表面繫栓探針互補的已知序列之表面繫栓探針以無規或圖案化陣列黏附至固體基材，且隨後使用例如單分子(未經擴增)同步合成定序(smSBS)途徑(例如，Helicos技術)或單分子異步合成定序(smASBS)途徑(例如Pacific Biosciences技術)進行探測。在smSBS途徑中，使用用螢光標籤編碼之終止核苷酸，以使得複製酶每次循環僅可合併單個鹼基。舉例而言，Helicos技術使用單個螢光標籤，且進行依序引

入A、G、C、T-每次循環一個鹼基。在各循環期間，進行成像步驟以對陣列上之各單分子模板之正確『鹼基』進行分類。在成像步驟之後，移除可逆連接之標籤，以使得重複酶(聚合酶)可併入下一模板鹼基。此等循環反覆多次，最終對無規陣列上之模板寡核苷酸股進行解碼，且測定其各個序列。

【0002】 儘管成功，但循環陣列途徑通常存在兩個基本不足之處：(i)將各連續核苷酸添加至互補鏈之循環時間長，及(ii)由逐步添加單核苷酸產生之信號弱(通常藉由使用螢光標記及螢光成像技術偵測)，且如下文將更詳細地論述，呈現低的對比雜訊比(CNR)，且因此使用包含高精度光學裝置之昂貴儀器，需要長的成像時間以達成準確的鹼基識別(base-calling)。

【0003】 已進行解決循環陣列定序途徑之循環時間問題的嘗試，例如，藉由出現單分子異步合成定序(smASBS)途徑，例如Pacific Biosciences技術，在該技術中四個光譜不同的螢光標籤連接至各個A、G、C及T核苷酸，該等核苷酸之添加可隨後進行「實時」分類。在此途徑中，同時引入所有四種經標記之核苷酸，且在整個股複製方法期間獲得影像。基於所偵測光之光譜，序列中之各位置分類為『A』、『G』、『C』及『T』。本文中，循環時間理論上可與聚合酶催化之複製速率一樣快，但平衡點為降低之CNR，由此引入最終導致準確度降低且對高精度光學裝置及昂貴儀器具有較大依賴之分類錯誤。

【0004】 已藉由在方法中併入擴增步驟來嘗試解決一些循環陣列定序途徑(亦即，非單分子途徑)中之信號限制。以無規或圖案化陣列繫栓至固體基材之模板DNA分子之固相擴增增加待定序之目標之複本數目，以

使得當將可偵測鹼基逐步添加至其各別互補股時，由複製模板分子之「群落」產生之信號可以分類為『A』、『G』、『C』或『T』。在通常為限制性的各偵測事件期間，成功分類之機率(且因此鹼基識別之準確度)視各別CNR而定。

【0005】 因此，需要用於核酸定序之改善固體基材及固相擴增方法，其將增加鹼基添加信號之量值、減少非特異性背景信號且因此改善CNR，由此改善鹼基識別之準確度、可能縮短循環時間及降低定序過程對高精度光學裝置及昂貴儀器之依賴性。

【發明內容】

【0006】 一些實施例係關於一種進行核酸序列測定之方法，該方法包含：a)提供表面；其中該表面包含：i)基板；ii)至少一個親水性聚合物塗層；iii)複數個連接至至少一個親水性聚合物塗層之寡核苷酸分子；及iv)至少一個該表面之離散區，其包含黏接至該複數個經連接之寡核苷酸分子的複數個經選殖擴增之樣品核酸分子，其中該複數個經黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少5000個分子/mm^2之表面密度存在，b)在將樣品核酸分子黏接至該複數個寡核苷酸分子之前或之後在樣品核酸分子上進行核酸擴增反應；及c)進行單核苷酸結合或合併反應之循環系列，其中該等核苷酸用可偵測標籤標記。

【0007】 本文揭示包含基板、至少一個親水性的低的非特異性結合(亦即，低背景)塗層及複數個連接至至少一個親水性的低結合、低背景塗層之寡核苷酸分子的表面。

【0008】 所揭示之低的非特異性結合固體基材可用於各種生物分析，包括但不限於DNA定序及基因型分析。此等基材包含溫度及化學穩

定官能化基材，其耐受暴露於多個溶劑交換及溫度變化，且其在整個分析之持續時間中賦予低的非特異性結合特性。所揭示之基材可具有以下特性中之一些或全部：

【0009】 1.使用極性質子、極性非質子及/或非極性溶劑之任何組合進行之表面官能化，其相比於傳統途徑使得生物分析效能之功效增加＞5倍(例如，分別為反應速率及/或所需產物形成之改善)。

【0010】 2.官能化後極小接觸角量測值(例如，<35度)，其藉由連續溶劑及溫度變化維持。

【0011】 3.生物分子相對於特異性結合分子之低的非特異性結合(例如，超過1個特異性結合分子對比< 0.25個非特異性結合分子/相關區域)。在使用各種偵測方法中之任一者時，此可以直接轉化成改善對比雜訊(CNR)。

【0012】 本文揭示包含以下之表面：a)基板；b)至少一個親水性聚合物塗層；c)複數個連接至至少一個親水性聚合物塗層之寡核苷酸分子；及d)表面之至少一個離散區，其包含已黏接至該複數個經連接之寡核苷酸分子的複數個經選殖擴增之樣品核酸分子，其中表面之螢光影像呈現的對比雜訊比(CNR)為至少20。

【0013】 在一些實施例中，當該等樣品核酸分子或其互補序列經花青染料-3 (Cy3)螢光團標記時，且在該表面浸入緩衝液(例如，25 mM ACES，pH 7.4緩衝液)中，使用，配備有全內反射螢光(TIRF) 20×、0.75 NA物鏡、100W Hg燈、針對532 nm激發及Cy3螢光發射最佳化之帶通及雙色鏡濾光片組以及CCD相機(例如，Olympus EM-CCD相機)之Olympus IX83倒置螢光顯微鏡在非信號飽和條件下獲得該表面之螢光影像時，該

表面之螢光影像呈現對比雜訊比(CNR)為至少20。

【0014】在一些實施例中，表面之螢光影像呈現的對比雜訊比(CNR)為至少40。在一些實施例中，表面之螢光影像呈現的對比雜訊比(CNR)為至少60。在一些實施例中，基板包含玻璃。在一些實施例中，基板包含塑膠。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物塗層包含PEG。在一些實施例中，表面進一步包含第二親水性聚合物塗層。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物層包含分支鏈親水性聚合物，例如PEG，其具有至少4個支鏈。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物層包含分支鏈親水性聚合物，例如PEG，其具有至少8個支鏈。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物層包含分支鏈親水性聚合物，例如PEG，其具有至少16個支鏈。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物層包含分支鏈親水性聚合物，例如PEG，且具有至少32個支鏈。在一些實施例中，該複數個寡核苷酸分子以至少50,000個分子/μm^2之表面密度存在。在一些實施例中，該複數個寡核苷酸分子以至少100,000個分子/μm^2之表面密度存在。在一些實施例中，該複數個寡核苷酸分子以至少500,000個分子/μm^2之表面密度存在。在一些實施例中，在黏接及選殖擴增之前，該等樣品核酸分子以不超過500 nM之濃度投與。在一些實施例中，在黏接及選殖擴增之前，該等樣品核酸分子以不超過20 pM之濃度投與。在一些實施例中，該等樣品核酸分子包含單股多聚核酸分子，其包含重複之規律出現單體單元。在一些實施例中，該等單股多聚核酸分子之長度為至少10 kb。在一些實施例中，該表面進一步包含規律出現之單體單元之雙股單體複本。在一些實施例中，該表面位於流動通道內部上。在一些實施例中，該複數個寡核苷酸分子以跨越該表面之均勻表面密度存在。在一些實施例中，該複數個寡核

苷酸分子在該表面上之第一位置處以至少100,000個分子/μm^2之局部表面密度存在，且在該表面上之第二位置處以第二局部表面密度存在。在一些實施例中，在該選殖擴增之前，在該表面自該至少一個離散區橫向移位之區域量測之背景螢光強度不超過在該至少一個離散區量測之強度的2倍。在一些實施例中，該表面包含第一層、第二層及第三層，該第一層包含繫栓至該基板之表面之單層聚合物分子；該第二層包含繫栓至該第一層之該等聚合物分子的聚合物分子；該第三層包含繫栓至該第二層之該等聚合物分子的聚合物分子，其中至少一個層包含分支鏈聚合物分子。在一些實施例中，第三層進一步包含繫栓至第三層之聚合物分子之寡核苷酸。在一些實施例中，繫栓至第三層之聚合物分子之寡核苷酸可以複數種深度分佈在第三層中。在一些實施例中，該表面進一步包含第四層及第五層，該第四層包含繫栓至該第三層之該等聚合物分子的分支鏈聚合物分子，該第五層包含繫栓至該第四層之該等分支鏈聚合物分子的聚合物分子。在一些實施例中，第五層之聚合物分子進一步包含繫栓至第五層之聚合物分子之寡核苷酸。在一些實施例中，繫栓至第五層之聚合物分子之寡核苷酸可以複數種深度分佈在第五層中。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物塗層包含選自由以下組成之群之分子：聚乙二醇(PEG)、聚(乙烯醇) (PVA)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基吡咯啶酮) (PVP)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚丙烯醯胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMA)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)、聚麩胺酸(PGA)、聚離胺酸、聚葡糖苷、抗生物素蛋白鏈菌素及聚葡萄糖。在一些實施例中，表面之影像呈現經特異性擴增之Cy3標記之樣品核酸分子或其互補序列與非特異性Cy3染料吸附背景(B_{inter})之螢

光強度比為至少3:1。在一些實施例中，表面之該影像呈現經特異性擴增之Cy3標記之樣品核酸分子或其互補序列及非特異性Cy3染料吸附背景與非特異性擴增背景(B_{inter} + B_{intra})之組合之螢光強度比為至少3:1。在一些實施例中，表面之該影像呈現經特異性擴增之Cy3標記之樣品核酸分子或其互補序列與非特異性染料吸附背景(B_{inter})之螢光強度比為至少5:1。在一些實施例中，表面之該影像呈現經特異性擴增之Cy3標記之樣品核酸分子或其互補序列及非特異性Cy3染料吸附背景與非特異性擴增背景(B_{inter} + B_{intra})之組合之螢光強度比為至少5:1。

【0015】 本文亦揭示包含以下之表面：a)基板；b)至少一個親水性聚合物塗層；及c)複數個連接至至少一個親水性聚合物塗層之寡核苷酸分子，其中該表面呈現非特異性Cy3染料吸附程度低於約0.25個分子/μm^2。

【0016】 在一些實施例中，該表面呈現非特異性Cy3染料吸附程度低於約0.1個分子/μm^2。在一些實施例中，該表面呈現特異性Cy3寡核苷酸標記與非特異性Cy3染料吸附之比大於約4:1。在一些實施例中，該表面呈現特異性Cy3寡核苷酸標記與非特異性Cy3染料吸附之比大於約10:1。在一些實施例中，該複數個寡核苷酸分子以至少10,000個分子/μm^2之表面密度連接。在一些實施例中，該複數個寡核苷酸分子以至少100,000個分子/μm^2之表面密度連接。在一些實施例中，該表面進一步包含已黏接至該複數個寡核苷酸分子的模板分子之複數個經選殖擴增之團簇，且其中表面之螢光影像呈現的對比雜訊比(CNR)為至少20。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少50。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少100。在一些實施例中，至少兩個親水性聚合物層中之至少一個包含分支鏈聚乙二醇(PEG)分子。在一些實施例中，該表面包含毛細

管腔之表面或流動槽之至少一個內表面。在一些實施例中，毛細管腔或流動槽經結構設計以用於進行核酸雜交、擴增或定序反應或其任何組合。在一些實施例中，該表面進一步包含分支鏈聚合物阻擋層。在一些實施例中，分支鏈聚合物阻擋層為分支鏈PEG阻擋層。在一些實施例中，分支鏈聚合物阻擋層共價繫栓至最高親水性聚合物層。在一些實施例中，第一層之聚合物包含一級胺官能基，且第二層之聚合物包含N-羥基丁二醯亞胺(NHS)酯官能基，且在第二層沈積之後，使用共價醯胺鍵將第二層繫栓至第一層。在一些實施例中，第一層之聚合物包含N-羥基丁二醯亞胺(NHS)酯官能基，且第二層之聚合物包含一級胺官能基，且在第二層沈積之後，使用共價醯胺鍵將第二層繫栓至第一層。在一些實施例中，以約1:5之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約2:5之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約3:5之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約4:5之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約1:1之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約4:1之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約8:1之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約16:1之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例中，以約32:1之寡核苷酸與聚合物之莫耳比將寡核苷酸繫栓至第二層或第三層之聚合物分子。在一些實施例

中，寡核苷酸以每平方微米至少10,000個分子之表面密度存在。在一些實施例中，寡核苷酸以每平方微米至少100,000個分子之表面密度存在。在一些實施例中，寡核苷酸均勻地分佈於第三層內。

【0017】 本文揭示將寡核苷酸沈積在基板表面上之方法，該方法包含：a)使第一親水性聚合物與第一層中之基板表面結合；b)使第二親水性聚合物與第一層結合以形成第二層，其中第二層之親水性聚合物分子藉由每分子至少兩個共價鍵接合至第一層；及c)使最外層親水性聚合物與第二層結合，其中最外層親水性聚合物分子包含在與第二層結合之前與其共價連接之寡核苷酸分子。

【0018】 在一些實施例中，第二層之親水性聚合物分子藉由每分子至少四個共價鍵接合至第一層。在一些實施例中，第二層之親水性聚合物分子藉由每分子至少八個共價鍵接合至第一層。在一些實施例中，該方法進一步包含使最外層親水性聚合物與第二層直接結合。在一些實施例中，該方法進一步包含使第三親水性聚合物與第二層結合以形成第三層，且經由第三層使最外層親水性聚合物與第二層結合。在一些實施例中，該方法進一步包含使第三親水性聚合物與第二層結合以形成第三層，使第四親水性聚合物與第三層結合以形成第四層，且經由第四層及第三層使最外層親水性聚合物與第二層結合。在一些實施例中，第一親水性聚合物包含PEG。在一些實施例中，第一親水性聚合物包含PGA。在一些實施例中，親水性聚合物層中之至少一者包含分支鏈聚合物。在一些實施例中，分支鏈聚合物包含至少4個支鏈。在一些實施例中，分支鏈聚合物包含至少8個支鏈。在一些實施例中，分支鏈聚合物包含16至32個支鏈。在一些實施例中，第四層之親水性聚合物分子藉由每分子至少兩個共價鍵接合至第三

層。在一些實施例中，第四層之親水性聚合物分子藉由每分子至少四個共價鍵接合至第三層。在一些實施例中，第四層之親水性聚合物分子藉由每分子至少八個共價鍵接合至第三層。在一些實施例中，在包含乙醇之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含甲醇之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含二甲亞碸(DMSO)之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含乙腈之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含緩衝磷酸鹽之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含緩衝3-(N-嗎啉基)丙磺酸(MOPS)之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含75%乙腈、25%磷酸鹽緩衝液之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。在一些實施例中，在包含90%甲醇、10% MOPS緩衝液之溶劑中將親水性聚合物遞送至基板表面。

【0019】 本文揭示包含密度為每平方微米至少10,000個分子之寡核苷酸之表面，其中經由多層親水性聚合物層將寡核苷酸繫栓至表面，且其中寡核苷酸均勻分佈在多層親水性聚合物層之最外層中。

【0020】 在一些實施例中，寡核苷酸以每平方微米至少50,000個分子之表面密度分佈。在一些實施例中，寡核苷酸以每平方微米至少100,000個分子之表面密度分佈。在一些實施例中，寡核苷酸以每平方微米至少500,000個分子之表面密度分佈。在一些實施例中，至少10%之所繫栓之寡核苷酸黏接至目標(或樣品)寡核苷酸。在一些實施例中，藉由親水性溶劑使多層親水性聚合物層飽和。在一些實施例中，表面包含玻璃、熔融二氧化矽、矽或聚合物(例如，塑膠)基板之表面。在一些實施例中，多層親水性聚合物層包含三個或更多個聚合物層。在一些實施例中，多層

親水性聚合物層包含五個或更多個聚合物層。在一些實施例中，親水性聚合物層中之一或多個層包含分支鏈PEG、分支鏈PVA、分支鏈聚(乙烯基吡啶)、分支鏈PVP、分支鏈PAA、分支鏈PNIPAM、分支鏈PMA、分支鏈PHEMA、分支鏈PEGMA、分支鏈PGA、分支鏈聚離胺酸、分支鏈聚葡糖苷或聚葡萄糖。在一些實施例中，親水性聚合物層中之一或多個層包含分支鏈PEG分子。在一些實施例中，分支鏈PEG分子包含至少4個支鏈。在一些實施例中，分支鏈PEG分子包含至少8個支鏈。在一些實施例中，分支鏈PEG分子包含16至32個支鏈。在一些實施例中，使用共價醯胺鍵使親水性聚合物層之至少第一層及第二層彼此繫栓。在一些實施例中，藉由每個聚合物分子至少兩個共價鍵使親水性聚合物層之至少第一層及第二層彼此繫栓。在一些實施例中，藉由每個聚合物分子至少四個共價鍵使親水性聚合物層之至少第一層及第二層彼此繫栓。在一些實施例中，藉由每個聚合物分子至少八個共價鍵使親水性聚合物層之至少第一層及第二層彼此繫栓。在一些實施例中，所繫栓之寡核苷酸之表面密度為每平方微米至少50,000個分子。在一些實施例中，所繫栓之寡核苷酸之表面密度為每平方微米至少100,000個分子。在一些實施例中，表面呈現CY3染料之非特異性結合低於0.25個分子/μm^2。在一些實施例中，表面進一步包含經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本之團簇，其中基本上所有經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本包含在第一位置處黏接之Cy3標記之核苷酸，且其中表面之螢光影像呈現的對比雜訊(CNR)比為至少20。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少50。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少100。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少150。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少200。在一些實施例中，使用橋式

擴增方案製備經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本。在一些實施例中，使用等溫橋式擴增方案製備經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本。在一些實施例中，使用滾環式擴增(RCA)方案製備經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本。在一些實施例中，使用解螺旋酶依賴性擴增方案製備經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本。在一些實施例中，使用重組酶依賴性擴增方案製備經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本。在一些實施例中，使用單股結合(SSB)蛋白依賴性擴增方案製備經黏接之目標寡核苷酸之經選殖擴增之複本。在一些實施例中，該表面包含毛細管腔之表面或流動槽之至少一個內表面。在一些實施例中，毛細管腔或流動槽經結構設計以用於進行核酸雜交、擴增或定序反應或其任何組合。

【0021】 本文揭示進行固相核酸雜交之方法，該方法包含：a)提供本文所揭示之表面中之任一者；及b)進行固相核酸雜交反應，其中模板核酸分子經黏接至所繫栓之寡核苷酸。本文亦揭示進行固相核酸擴增之方法，該方法包含：a)提供本文所揭示之表面中之任一者；及b)使用與所繫栓之寡核苷酸雜交之模板核酸分子進行固相核酸擴增反應。

【0022】 在一些實施例中，固相核酸擴增包含熱循環。在一些實施例中，固相核酸擴增包含等溫擴增。在一些實施例中，固相核酸擴增包含滾環式擴增。在一些實施例中，固相核酸擴增包含橋式擴增。在一些實施例中，固相核酸擴增包含等溫橋式擴增。在一些實施例中，固相核酸擴增包含多重置換擴增。在一些實施例中，固相核酸擴增包含解螺旋酶處理。在一些實施例中，固相核酸擴增包含重組酶處理。在一些實施例中，在固相核酸擴增反應之至少30個循環內所繫栓之寡核苷酸之表面密度無變化。在一些實施例中，在固相核酸擴增反應之至少40個循環內所繫栓之寡核苷

酸之表面密度無變化。在一些實施例中，在固相核酸擴增反應之至少50個循環內所繫栓之寡核苷酸之表面密度無變化。

【0023】 本文揭示進行核酸序列測定之方法，該方法包含：a)提供本文所揭示之表面中之任一者；b)使用與所繫栓之寡核苷酸雜交之模板核酸分子進行固相核酸擴增反應；及c)進行單核苷酸結合或合併反應之循環系列，其中核苷酸用可偵測標籤標記。

【0024】 在一些實施例中，可偵測標籤為螢光團。在一些實施例中，螢光團為Cy3，且其中在第一Cy3標記之核苷酸之結合或合併呈現的對比雜訊(CNR)比為至少20之後，在非信號飽和條件下如本文中其他處所述獲得表面之螢光影像。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少50。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少100。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少150。在一些實施例中，對比雜訊比(CNR)為至少200。在一些實施例中，固相核酸擴增反應包含橋式擴增反應。在一些實施例中，固相核酸擴增反應包含等溫橋式擴增反應。在一些實施例中，固相核酸擴增反應包含滾環式擴增(RCA)反應。在一些實施例中，固相核酸擴增反應包含解螺旋酶依賴性擴增反應。在一些實施例中，固相核酸擴增反應包含重組酶依賴性擴增反應。

【0025】 本文揭示進行核酸擴增之裝置，該裝置包含：a)本文所揭示之表面中之任一者；其中該表面包含毛細管腔之表面或流動槽之至少一個內表面。

【0026】 在一些實施例中，該裝置進一步包含至少一個進入毛細管腔之流體入口。在一些實施例中，該裝置進一步包含至少一個流體出口。在一些實施例中，該裝置進一步包含至少一個泵。在一些實施例中，該裝

置進一步包含至少一個流體混合歧管。在一些實施例中，該裝置進一步包含至少一個溫度控制元件。在一些實施例中該裝置進一步包含至少一個光學窗。

【0027】 本文揭示進行核酸定序之系統，該系統包含：a)本文所揭示之裝置中之至少一者；b)流體控制模組；及c)成像模組。

以引用之方式併入

【0028】 本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案在本文中以全文引用之方式併入本文中，達到如同每一個別公開案、專利或專利申請案經具體且個別地指示為以引用之方式併入本文中之相同程度。若本文中之術語與併入之參考文獻中之術語之間有衝突，則以本文中之術語為準。

【圖式簡單說明】

【0029】 本專利或申請案檔案含有至少一張彩製圖。在請求且支付必要費用後，專利局將提供具有彩色圖式之本專利或專利申請公開案之複本。

【0030】 本發明之新穎特點在隨附申請專利範圍中細緻闡述。將參考闡述利用本發明原理之說明性實施例及其附圖的以下詳細描述來獲得對本發明之特點及優勢的更佳理解：

【0031】 **圖1**提供本公開之低結合固體基材之一個實施例之示意圖，其中基材包含玻璃基板及親水性塗層之交替層，該等親水性塗層之交替層共價或非共價黏附於玻璃上，且其進一步包含充當寡核苷酸引子之連接位點的化學反應性官能基。

【0032】 **圖2**提供使用矽烷反應使第一聚合物與基板(例如，玻璃)表

面共價偶合以形成第一聚合物層之示意圖。

【0033】 **圖3**提供使分支鏈聚合物與諸如**圖2**中所說明之表面共價偶合以在基板表面上形成第二聚合物層之示意圖。

【0034】 **圖4**提供用於將一或多個寡核苷酸銜接子或引子序列(例如，序列1 (點線)及及2 (虛線))與分支鏈聚合物共價連接之偶合反應之示意圖。

【0035】 **圖5**提供將包含共價連接之寡核苷酸銜接子或引子序列之分支鏈聚合物與諸如**圖3**中所說明之表面共價偶合以在基板表面上形成第三聚合物層之示意圖。

【0036】 **圖6A-B**提供模擬螢光強度資料之實例，其說明在核酸定序及鹼基識別應用中使用信號雜訊比(SNR)與對比雜訊比(CNR)作為資料質量之量度之間的差異。**圖6A**：模擬資料之實例，其中SNR = 2且CNR = 1.25。**圖6B**：模擬資料之實例，其中SNR = 2且CNR = 12.29。

【0037】 **圖7**提供改善CNR如何影響固體基材上經選殖擴增之核酸群落之準確偵測及信號分類(鹼基識別)所需之成像時間之實例。

【0038】 **圖8**說明由於併入各經選殖擴增之模板分子之互補股中之不同的經標記之核苷酸，針對在固體基材上進行之核酸定序反應之不同循環所獲得的不同影像。該圖亦說明偵測平台之總偵測信號之不同背景貢獻，該等偵測平台藉由區分核苷酸特異性信號與雜訊隙間背景及隙內背景影像需要迭代點偵測。

【0039】 **圖9**提供來自用於測定綠色螢光染料與根據不同表面修飾方案處理之玻璃基板表面之非特異性結合的相對含量的研究之影像資料之實例。

【0040】 **圖10**提供來自用於測定紅色螢光染料與根據不同表面修飾方案處理之玻璃基板表面之非特異性結合的相對含量的研究之影像資料之實例。

【0041】 **圖11**提供根據不同表面修飾方案處理之基板表面之寡核苷酸引子接枝資料之實例。

【0042】 **圖12**提供在根據不同表面修飾方案處理之基板表面之非特異性結合測試期間獲得之複製影像之實例。

【0043】 **圖13**提供定序染料混合物與根據不同表面修飾方案處理之基板表面之非特異性結合的資料之實例。出於比較目的，在定序染料混合物與用Cy3標記之寡核苷酸接枝之單個珠粒之非特異性結合的同一組實驗條件下量測之螢光強度為約1,500個計數。

【0044】 **圖14**提供綠色及紅色螢光染料與根據不同表面修飾方案處理之基板表面之非特異性結合的影像及資料之實例。出於比較目的，在偶合單個經Cy3標記之核苷酸鹼基之後，在同一組實驗條件下量測之經選殖擴增之模板群落之螢光強度為約1,500個計數。

【0045】 **圖15**提供藉由改變基板上之寡核苷酸引子密度證明低結合固體基材上「可調諧」核酸擴增之影像及資料之實例。藍色直方圖：低引子密度。紅色直方圖：高引子密度。藉由調整寡核苷酸引子密度之低的非特異性結合及可調諧核酸擴增效率之組合產生高CNR，且核酸定序效能後續改善。

【0046】 **圖16**提供本發明之低結合固體基材之螢光影像之實例，在本發明之低結合固體基材上所繫栓之寡核苷酸已使用不同引子密度、等溫擴增方法及擴增緩衝液添加劑來擴增。

【0047】 **圖17**提供證明藉由使用擴增緩衝液添加劑減少非特異性核酸擴增同時維持目標序列之特異性擴增之凝膠影像之實例。凝膠影像揭示對應於目標(箭頭)及其他凝膠定量擴增產物之特異性擴增的條帶。

【0048】 **圖18**提供證明用於改善擴增特異性之調配物變化對低結合基材表面之影響到螢光影像之實例。

【0049】 **圖19A-B**提供證明可以藉由再形成用於如本文所述之固相核酸擴增之雜交緩衝液來實現的雜交嚴格度、速度及功效之改善的影像資料之非限制性實例。**圖19A**提供兩種不同雜交緩衝液調配物及方案之影像資料之實例。**圖19B**提供使用標準雜交緩衝液及方案所獲得之相應影像資料之實例。

【0050】 **圖20**說明使用所揭示之低結合基材及本發明之擴增反應調配物之核酸定序的工作流及可以實現之處理時間之非限制性實例。

【0051】 **圖21**提供本發明之低結合基材之螢光影像及強度資料之實例，在本發明之低結合基材上進行固相核酸擴增以形成模板寡核苷酸序列之經選殖擴增之團簇。

【0052】 **圖22**提供本發明之低結合基材之螢光影像及強度資料之第二實例，在本發明之低結合基材上進行固相核酸擴增以形成模板寡核苷酸序列之經選殖擴增之團簇。

【0053】 **圖23**提供本發明之低結合基材之螢光影像及強度資料之實例，在本發明之低結合基材上進行固相核酸擴增以形成模板寡核苷酸序列之經選殖擴增之團簇。

【0054】 **圖24**提供用於估計繫栓至基材表面之引子寡核苷酸之表面密度之螢光校準曲線之實例。

【0055】 **圖25A-B**提供具有包含經螢光標記之核苷酸之結合擴增子之本發明之經修飾玻璃及聚合物表面之非限制性實例。**圖25A**：經修飾玻璃表面。在插圖處，吾人看見表面產生226之CNR。**圖25B**：經修飾塑膠表面。在插圖處，吾人看見表面產生109之CNR。

【0056】 **圖26A-B**提供**圖25A**及**圖25B**上之影像之分析。在**圖26A**上，吾人看見玻璃及塑膠表面中之各者之信號強度(左)及背景強度(右)。對於每一者，信號強度基本上大於背景強度。在**圖26B**處，吾人看見玻璃及塑膠表面中之各者之CNR值之圖解描繪。在左圖，玻璃產生226之CNR，而在右圖，塑膠產生109之CNR，與圖25A及圖25B之插圖一致。

【0057】 **圖27**提供關於其資料之準確度之表面之分析。資料在兩個通道中收集，且自(上圖)以散射圖描繪，且自左至右針對市售低CNR及高CNR表面中之各者定量(下圖)。

【0058】 **圖28**提供雜交至包含高表面密度之寡核苷酸銜接子或引子分子(左)之表面且雜交至包含寡核苷酸銜接子或引子分子之下表面密度(右)之表面的多聚目標寡核苷酸序列之示意圖。

【0059】 **圖29**提供對本發明之低結合基材表面進行傳統雜交反應且對本發明之低結合基材表面進行最佳化雜交反應的實驗結果之比較。

【0060】 **圖30**提供在本發明之低結合基材上進行傳統雜交反應，繼之以進行RCA或橋式擴增之實驗結果之說明。

【0061】 **圖31**提供在本發明之低結合基材上進行最佳化雜交反應繼之以進行RCA或橋式擴增之實驗結果之說明。

【0062】 **圖32**提供用於傳統商業定序裝置(例如，聚丙烯醯胺)之表面及在本發明之低結合基材上使用最佳化雜交反應製備且為將寡核苷酸銜

接子或引子分子連接至表面而使用改善偶合化學物質製備，繼之以進行RCA或橋式擴增之表面之螢光影像之比較定說明。

【0063】 **圖33**提供用於傳統商業定序裝置(例如，聚丙烯醯胺)之基材表面、使用傳統偶合化學物質經修飾之低結合基材表面；及使用本文所述之改善偶合化學物質、雜交方法及擴增方法製備之本發明之低結合基材表面的螢光影像之非限制性實例。繪圖說明自影像量測之對比雜訊比，該等影像諸如與改善固相核酸擴增方法組合提供於傳統基材表面、改善傳統基材表面及本發明之低結合基材表面之實例中之影像。

【實施方式】

交叉引用

【0064】 本申請案主張2018年11月14日申請之美國臨時申請案第62/767,343號、2018年12月7日申請之美國臨時申請案第62/776,898號及2019年3月25日申請之美國申請案16/363,842之權益，該等申請案中之各者以全文引用之方式併入本文中。

【0065】 本文揭示用於固相核酸擴增及定序或其他生物分析應用之新穎固體基材。本文所揭示之固體基材呈現蛋白質及其他擴增反應組分之非特異性低結合，及反覆暴露於不同溶劑、溫度變化、諸如低pH之化學侵襲(chemical affront)或長期儲存之改善穩定性。

【0066】 單獨或與改善核酸雜交及擴增方案組合，本文所揭示之一些基材引起以下中之一或多者：(i)必要起始材料之量之需要減少，(ii)等溫或緩慢升溫擴增方案之溫度需要減少，(iii)擴增速率提高，(iv)擴增特異性增加(亦即，在減少表面引子及引子-二聚體之非特異性擴增時經擴增群落之單股模板分子之擴增更具選擇性)，及(v)允許更大程度上區分序列

特異性信號與背景信號(諸如，由隙間及隙內背景產生之信號)，從而提供與習知核酸擴增及定序方法相比改善的對比雜訊比(CNR)及鹼基識別準確度。

【0067】 實現前述改善或其任何組合之起始點為所揭示之低非特異性結合基材，其包含一或多個聚合物塗層，例如PEG聚合物膜，其使蛋白質及經標記之核苷酸與固體基材之非特異性結合降至最低。可以藉由以下本發明之額外態樣中之一或多者實現改善核酸雜交及擴增速率及特異性之後續證實：(i)引子設計(序列及/或修飾)，(ii)在固體基材上繫栓引子密度之控制，(iii)固體基材之表面組合物，(iv)固體基材之表面聚合物密度，(v)在擴增之前及期間改善雜交條件之用途，及/或(vi)降低非特異性引子擴增或提高模板擴增效率之改善擴增調配物之用途。

【0068】 所揭示之低的非特異性結合基材及相關雜交及擴增方法之優勢對任何定序系統賦予以下額外優勢中之一或多者：(i)流體洗滌時間減少(由於非特異性結合減少，且因此定序循環時間更快)，(ii)成像時間減少(且因此分析讀取及定序循環之回轉時間更快)，(iii)總的工作流動時間需要減少(由於循環時間減少)，(iv)偵測儀器費用降低(由於CNR改善)，(v)讀取(鹼基識別)準確度改善(由於CNR改善)，(vi)試劑穩定性改善及試劑使用需要減少(且因此試劑費用減少)，及(vii)由於核酸擴增失敗而運行時間失敗較少。

【0069】 藉由使用以下之任何組合形成表面生物分析(例如基因型分析及定序分析)之低的結合親水性表面(多層及/或單層)。

【0070】 在基板表面上沈積及/或偶合直鏈或多分支鏈親水性聚合物子單元之極性質子、極性非質子及/或非極性溶劑。一些多分支鏈親水性

聚合物子單元可含有促進與其他聚合物子單元之共價偶合或非共價結合相互作用之官能端基。適合官能端基之實例包括生物素、甲氧基醚、羧酸酯、胺、酯化合物、疊氮化物、炔烴、順丁烯二醯亞胺、硫醇及矽烷基。

【0071】 直鏈、分支鏈或多分支鏈聚合物子單元之任何組合經由可包括個別子單元之經修飾之偶合化學物質/溶劑/緩衝系統藉由後續分層添加與正交末端偶合化學物質或各別組合中之任一者偶合，使得所得表面為親水性的且呈現蛋白質及其他分子分析組分之低的非特異性結合。在一些情形下，本發明之親水性官能化基板表面呈現接觸角量測值不超過35度。

【0072】 除了前述溶劑之外之相容性緩衝系統，其所需pH範圍為5-10。實例包括但不限於磷酸鹽緩衝鹽水、磷酸鹽緩衝液、TAPS、MES、MOPS或此等之任何組合。

【0073】 經由下文所述之各種個別接合化學或其任何組合在低結合/親水性基材上之(例如，蛋白質、肽、核酸、寡核苷酸或細胞之)後續生物分子連接。層沈積及/或結合反應可以使用可含有任何比率之以下組分之溶劑混合物進行：乙醇、甲醇、乙腈、丙酮、DMSO、DMF、H_2O及其類似物。另外，5-10之所需pH範圍中之相容性緩衝系統可用於控制沈積及偶合之速率及效率，由此可以實現偶合速率超過基於習知水性緩衝液之方法之偶合速率的5倍。

【0074】 *定義：*除非另外定義，否則本文所用之所有技術術語均具有與本發明所屬領域之一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。

【0075】 除非上下文另外清晰地指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍所使用之單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個參考物。除非另外陳述，否則本文中「或」之任何參考意欲涵蓋「及/或」。

【0076】 如本文所使用，術語『約』某數字係指該數字加或減該數字之10%。術語『約』當用於範圍之情形時係指該範圍減其最低值之10%及加其最大值之10%。

【0077】 如本文所用，在一系列之上下文中短語『至少一個』涵蓋包括該等系列之單個成員、該等系列之兩個成員直至且包括該等系列之所有成員之清單，單獨或在一些情況下與未列出之組分組合。

【0078】 如本文所用，若螢光由螢光團產生，則螢光『具有特異性』，該等螢光團黏接或以其他方式繫栓至表面，諸如藉由具有反向互補區域之核酸黏接或以其他方式繫栓至表面上之寡聚物之相應鏈段，且黏接至該相應鏈段。此螢光與由不藉由此類黏接方法繫栓至表面，或在一些情況下繫栓至表面之背景螢光的螢光團產生之螢光對比。

【0079】 *核酸：*如本文所用，「核酸」(亦稱為「聚核苷酸」、「寡核苷酸」、核糖核酸(RNA)或脫氧核糖核酸(DNA))為藉由共價核苷間鍵接合之兩種或更多種核苷酸之直鏈聚合物或其變體或官能性片段。在核酸之天然存在之實例中，核苷間鍵通常為磷酸二酯鍵。然而，其他實例視情況包含其他核苷間鍵，諸如硫代磷酸酯鍵，且可包含或可能不包含磷酸酯基。核酸包括雙股及單股DNA，以及雙股及單股RNA、DNA/RNA雜合體、肽核酸(PNA)、PNA與DNA或RNA之間之雜合體，且亦可包括其他類型之核酸修飾。

【0080】 如本文所用，「核苷酸」係指核苷酸、核苷或其類似物。在一些情況下，核苷酸為嘌呤或嘧啶鹼基之N-醣苷或C-醣苷(例如，含有2-脫氧-D-核糖之脫氧核苷或含有D-核糖之核苷)。其他核苷酸類似物之實例包括但不限於硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、對掌性膦酸甲酯、

2-O-甲基核糖核苷酸及其類似物。

【0081】 核酸可視情況連接至一或多個非核苷酸部分，諸如標記及其他小分子、大分子(諸如蛋白質、脂質、糖等)，及固體或半固體基材，例如藉由與核酸之5'端或3'端之共價或非共價鍵。標記包括可使用熟習此項技術者已知之各種偵測方法中之任一者偵測的任何部分，且因此使經連接之寡核苷酸或核酸類似地可偵測。一些標記發射在光學上可偵測或可見之電磁輻射。替代地或組合地，一些標記包含塊狀標籤，其使經標記之寡核苷酸或核酸在質譜資料中可見，或氧化還原標籤，其使經標記之寡核苷酸或核酸可藉由安培法或伏安法偵測。一些標記包含磁性標籤，其有助於分離及/或純化經標記之寡核苷酸或核酸。核苷酸或聚核苷酸通常不連接至標記，且直接偵測寡核苷酸或核酸之存在。

【0082】 所揭示之低的非特異性結合基材及相關核酸雜交及擴增方法可用於分析來源於熟習此項技術者已知之各種不同細胞、組織或樣品類型中之任一者之核酸分子。舉例而言，核酸可以自來源於真核生物(諸如動物、植物、真菌、原生生物)、太古細菌或真細菌之細胞或包含一或多種類型之細胞之組織樣品中提取。在一些情況下，核酸可以自原核或真核細胞，諸如黏附或非黏附真核細胞中提取。核酸不同地自例如初級或永生化嚙齒動物、豬、貓、犬、牛、馬、靈長類動物或人類細胞株中提取。核酸可以自各種不同細胞、器官或組織類型(例如，白血細胞、紅血球、血小板、上皮細胞、內皮細胞、神經元、膠細胞、星形膠質細胞、纖維母細胞、骨胳肌肉細胞、平滑肌細胞、配子或來自心臟、肺、腦、肝、腎、脾臟、胰臟、胸腺、膀胱、胃、結腸或小腸之細胞)中之任一者中提取。核酸可以自正常或健康細胞中提取。替代地或組合地，酸自病變細胞，諸如

癌細胞中提取，或自使宿主感染之致病細胞中提取。一些核酸可以自不同亞組之細胞類型，例如免疫細胞(諸如T細胞、細胞毒性(殺手) T細胞、輔助T細胞、αβ T細胞、γδ T細胞、T細胞祖細胞、B細胞、B細胞祖細胞、淋巴幹細胞、骨髓祖細胞、淋巴細胞、粒細胞、自然殺手細胞、漿細胞、記憶細胞、嗜中性白血球、嗜伊紅白血球、嗜鹼性球、肥大細胞、單核球、樹突狀細胞及/或巨噬細胞或其任何組合)、未分化型人類幹細胞、已誘導分化之人類幹細胞、稀有細胞(例如，循環腫瘤細胞(CTC)、循環上皮細胞、循環內皮細胞、循環子宮內膜細胞、骨髓細胞、祖細胞、泡沫細胞、間葉細胞或滋養層)中提取。其他細胞涵蓋在本文之揭示內容中且與本文之揭示內容一致。

【0083】 來自細胞或其他生物樣品之核酸提取可以使用熟習此項技術者已知之多種技術中之任一者進行。舉例而言，典型DNA提取程序包含(i)收集應自其提取DNA之細胞樣品或組織樣品，(ii)破壞細胞膜(亦即，細胞溶解)以釋放DNA及其他細胞質組分，(iii)用濃鹽溶液處理裂解樣品以沈澱蛋白質、脂質及RNA，隨後離心以分離出沈澱蛋白質、脂質及RNA，及(iv)純化來自清液層之DNA以移除在細胞膜裂解步驟期間所用之洗滌劑、蛋白質、鹽或其他試劑。

【0084】 各種適合之商業核酸提取及純化套組與本文之揭示內容一致。實例包括但不限於來自Qiagen (Germantown, MD)之QIAamp套組(用於分離來自人類樣品之基因組DNA)及DNAeasy套組(用於分離來自動物或植物樣品之基因組DNA)或來自Promega (Madison, WI)之套組之Maxwell®及ReliaPrep™系列。

【0085】 *固相核酸雜交及擴增之低的非特異性結合基材：*本文揭示

包含允許改善核酸雜交及擴增效能之低的非特異性結合表面組合物之固體基材。大體而言，所揭示之基材可包含基板(或基材結構)、一或多個共價或非共價連接之低結合化學修飾層(例如矽烷層、聚合物膜)及一或多個共價或非共價連接之引子序列，其可用於將單股模板寡核苷酸繫栓至基材表面(**圖1**)。在一些情形下，表面之調配物，例如一或多個層之化學組合物，用於使一或多個層交聯至基材表面及/或彼此交聯之偶合化學物質及層總數可以變化，以使得蛋白質、核酸分子及其他雜交及擴增反應組分與基材表面之非特異性結合相對於可比較單層降至最低或減少。通常，表面之調配物可以變化，以使得基材表面上之非特異性雜交相對於可比較單層降至最低或減少。表面之調配物可以變化，以使得基材表面上之非特異性擴增相對於可比較單層降至最低或減少。表面之調配物可以變化，以使得基材表面上之特異性擴增速率及/或產量最大化。在本文所揭示之一些情況下，在不超過2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30或超過30次擴增循環中實現適用於偵測之擴增程度。

【0086】 基板或基材結構可以自其製造之材料之實例包括但不限於玻璃、熔融二氧化矽、矽、聚合物(例如，聚苯乙烯(PS)、大孔聚苯乙烯(MPPS)、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚碳酸酯(PC)、聚丙烯(PP)、聚乙烯(PE)、高密度聚乙烯(HDPE)、環烯烴聚合物(COP)、環烯烴共聚物(COC)、聚對苯二甲酸伸乙酯(PET))或其任何組合。涵蓋玻璃及塑膠基材兩者之各種組合物。

【0087】 基板或基材結構可以熟習此項技術者已知之各種幾何結構及尺寸中之任一者呈現，且可包含熟習此項技術者已知之各種材料中之任一者。舉例而言，在一些情形下，基板或基材結構可以為局部平面的(例

如，包含顯微鏡載片或顯微鏡載片之表面)。總體地，基板或基材結構可以為圓柱形的(例如，包含毛細血管或毛細血管內表面)、球形的(例如，包含無孔珠粒外表面)或不規則的(例如，包含不規則形狀、無孔珠粒或顆粒之外表面)。在一些情形下，用於核酸雜交及擴增之基板或基材結構之表面可以為固體無孔表面。在一些情形下，用於核酸雜交及擴增之基板或基材結構之表面可以為多孔的，以使得本文所述之塗層滲透多孔表面，且於其上進行之核酸雜交及擴增反應可以出現在孔內。

【0088】 包含一或多個經化學修飾之層(例如低的非特異性結合聚合物層)之基板或基材結構可以為非依賴性的或整合至另一結構或組裝中。舉例而言，在一些情形下，基板或基材結構可包含一或多個整合或組裝之微流體流動槽內之表面。基板或基材結構可包含一或多個微量盤形式內之表面，例如微量盤中之孔之下表面。如上所指出，在一些較佳實施例中，基板或基材結構包含毛細血管內表面(諸如內腔表面)。在替代性較佳實施例中，基板或基材結構包含蝕刻至平面晶片中之毛細血管內表面(諸如內腔表面)。

【0089】 化學修飾層可以均勻地塗覆在基板或基材結構之表面上。替代地，基板或基材結構之表面可以不均勻地分佈或圖案化，以使得化學修飾層受限於一或多個基板之離散區。舉例而言，基板表面可以使用光刻技術圖案化以在表面上形成經化學修飾之區域之有序陣列或無規圖案。替代地或組合地，基板表面可以使用例如接觸印刷及/或噴墨印刷技術圖案化。在一些情形下，經化學修飾之離散區之有序陣列或無規圖案可包含至少1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、

6000、7000、8000、9000或10,000個或更多個離散區，或橫跨本文中之範圍之任何中間數。

【0090】 為實現低的非特異性結合表面(在本文中亦稱為「低結合」或「鈍化」表面)，親水性聚合物可以非特異性吸附或共價接枝至基板或基材表面。通常，利用聚(乙二醇) (PEG，亦稱為聚環氧乙烷(PEO)或聚氧化乙烯)、聚(乙烯醇) (PVA)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基吡咯啶酮) (PVP)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚丙烯醯胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMA)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)、聚麩胺酸 (PGA)、聚離胺酸、聚葡糖苷、抗生物素蛋白鏈菌素、聚葡萄糖或具有不同分子量及使用例如矽烷化學物質連接至表面之端基之其他親水性聚合物進行鈍化。遠離表面之端基可包括但不限於生物素、甲氧基醚、羧酸酯、胺、NHS酯、順丁烯二醯亞胺及雙矽烷。在一些情形下，親水性聚合物，例如直鏈聚合物、分支鏈聚合物或多分支鏈聚合物之兩層或更多層可以沈積在表面上。在一些情形下，兩層或更多層可以彼此共價偶合或內部交聯以改善所得表面之穩定性。在一些情形下，具有不同鹼基序列及鹼基修飾之寡核苷酸引子(或其他生物分子，例如酶或抗體)可以各種表面密度繫栓至所得表面層。在一些情形下，例如，表面官能基密度及寡核苷酸濃度均可以變化以靶向某一引子密度範圍。另外，引子密度可藉由用攜帶相同官能基之其他分子稀釋寡核苷酸來控制。舉例而言，經胺標記之寡核苷酸可以在與經NHS酯塗佈之表面之反應中用經胺標記之聚乙二醇稀釋以降低最終引子密度。亦可應用在雜交區域與表面連接官能基之間具有不同長度之連接子之引子以控制表面密度。適合連接子之實例包括引子之5'端處之聚

-T及聚-A股(例如，0至20個鹼基)、PEG連接子(例如，3至20個單體單元)及碳鏈(例如，C6、C12、C18等)。為量測引子密度，螢光標記之引子可以繫栓至表面，且隨後將螢光讀數與已知濃度之染料溶液之螢光讀數進行比較。

【0091】 在一些實施例中，親水性聚合物可為交聯聚合物。在一些實施例中，交聯聚合物可包括與另一類型之聚合物交聯之一種類型之聚合物。交聯聚合物之實例可包括與選自以下之另一種聚合物交聯之聚(乙二醇)：聚環氧乙烷(PEO)或聚氧化乙烯)、聚(乙烯醇) (PVA)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基吡咯啶酮) (PVP)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚丙烯醯胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMA)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)、聚麩胺酸(PGA)、聚離胺酸、聚葡糖苷、抗生物素蛋白鏈菌素、聚葡萄糖或其他親水性聚合物。在一些實施例中，交聯聚合物可為與聚丙烯醯胺交聯之聚(乙二醇)。

【0092】 由於本文所揭示之表面鈍化技術，蛋白質、核酸及其他生物分子不「黏」至該等基板，亦即，其呈現低的非特異性結合(NSB)。在不同玻璃製備條件下使用標準單層表面製劑如下展示實例。已鈍化以實現蛋白質及核酸之超低NSB之親水性表面需要新穎反應條件以改善引子沈積反應效率、雜交效能，且誘導有效擴增。所有此等方法需要寡核苷酸連接及後續蛋白質結合，且遞送至低結合表面。如下文所述，新穎引子表面結合調配物(Cy3寡核苷酸接枝滴定)及所得超低非特異性背景(使用紅色及綠色螢光染料進行之NSB官能性測試)之組合得到結果，其證明所揭示之途徑之可行性。本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3螢光團之特異性(例

如，與所繫栓之引子或探針雜交)與非特異性結合(例如，B_{inter})之比為至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、50:1、75:1、100:1或大於100:1，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3之螢光團之特異性與非特異性螢光信號(例如，針對特異性雜交與非特異性結合標記之寡核苷酸，或針對特異性擴增與非特異性結合(B_{inter})或非特異性擴增(B_{intra})標記之寡核苷酸或其組合(B_{inter} + B_{intra}))之比為至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、50:1、75:1、100:1或大於100:1，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。

【0093】 為按比例縮放引子表面密度及將額外維度添加至親水性或兩性表面，已開發出包含多層PEG及其他親水性聚合物塗層之基材。藉由使用親水性及兩性表面成層途徑，其包括但不限於下文所述之聚合物/共聚物材料，有可能顯著增加表面上之引子負載密度。傳統PEG塗佈途徑使用單層引子沈積，其通常已報導用於單分子應用，但不產生核酸擴增應用之高複本數。如本文所述之「成層」可以使用利用任何相容性聚合物或單體子單元之傳統交聯途徑實現，以使得可以依序建構包含兩個或更多個高度交聯層之表面。適合聚合物之實例包括但不限於抗生物素蛋白鏈菌素、聚丙烯醯胺、聚酯、聚葡萄糖、聚離胺酸及聚離胺酸及PEG之共聚物。在一些情形下，不同層可以藉由各種結合反應中之任一者彼此連接，該等結合反應包括但不限於生物素-抗生物素蛋白鏈菌素結合、疊氮化物-炔烴點擊反應、胺-NHS酯反應、硫醇-順丁烯二醯亞胺反應及帶正電聚合物與帶

負電聚合物之間之離子相互作用。在一些情形下，高引子密度材料可以在溶液中構造且在多個步驟中隨後分層至表面上。

【0094】 **圖2**提供將第一親水性聚合物層接枝至基板，例如玻璃基板之一個非限制性實例之示意圖。在使用熟習此項技術者已知之各種方法中之任一者(例如，用食人魚溶液(Piranha solution)處理、電漿清潔等)清潔玻璃表面之後，基板用矽烷溶液(例如，矽烷PEG 5K溶液)處理、沖洗、乾燥及在高溫下固化以與表面形成共價鍵。遠離表面之聚合物之端可包含各種化學反應性官能基或受保護官能基中之任一者。在**圖2**中說明胺反應性NHS基團。

【0095】 **圖3**提供使包含具有諸如**圖2**中所說明之NHS官能基的第一聚合物層之衍生基板與一級胺官能化分支鏈聚合物(例如，16個支鏈或32個支鏈PEG聚合物(亦分別稱為16個臂或32個臂PEG))偶合以形成包含過量未反應之官能基之第二親水性聚合物層之一個非限制性實例之示意圖。

【0096】 **圖4**提供使包含反應性官能基(例如，4個支鏈之NHS-PEG)之分支鏈聚合物與一或多個寡核苷酸銜接子或引子序列在溶液(例如，如由點線及虛線所說明，包含一級胺之寡核苷酸)中反應，隨後在基板表面上沈積以形成包含經共價連接之寡核苷酸分子之親水性層的一個非限制性實例之示意圖。藉由改變寡核苷酸分子(或待繫栓之其他生物分子，例如肽、蛋白質、酶、抗體等)與分支鏈聚合物之莫耳比，一者可以受控方式改變經連接之寡核苷酸序列之所得表面密度。在一些情形下，在層已沈積在表面上之後，一或多個寡核苷酸分子(或其他生物分子)可以共價繫栓至現有聚合物層。

【0097】 **圖5**提供使包含共價連接之寡核苷酸引子之分支鏈聚合物

與諸如**圖3**中所說明之分層親水性表面偶合之一個非限制性實例之示意圖。在此實例中，包含兩種不同寡核苷酸引子(由點線及虛線表示)及胺反應性NHS基團之分支鏈聚合物與前一層之一級胺偶合以形成多層三維親水性表面，其包含所繫栓之寡核苷酸引子之受控表面密度。

【0098】 用於將第一經化學修飾層接枝至基材表面之連接化學物質通常將視自其製造基材之材料及層之化學性質兩者而定。在一些情形下，第一層可以與基材表面共價連接。在一些情形下，第一層可以藉由非共價相互作用，諸如表面與第一層之分子組分之間之靜電相互作用、氫鍵結或凡得瓦相互作用(van der Waals interaction)非共價連接，例如吸附至表面。在任一情況下，可以在連接或沈積第一層之前處理基板表面。熟習此項技術者已知之各種表面製備技術中之任一者可用於清潔或處理基材表面。舉例而言，玻璃或矽表面可以使用強食人魚溶液(硫酸(H_2SO_4)及過氧化氫(H_2O_2)之混合物)進行酸洗滌及/或使用氧電漿處理方法進行清潔。

【0099】 矽烷化學物質構成一種非限制性途徑，其用於共價修飾玻璃或矽表面上之矽烷醇基團以連接更多反應性官能基(例如，胺或羧基)，其可隨後用於將連接分子(例如，各種長度之直鏈烴分子，諸如C6、C12、C18烴或直鏈聚乙二醇(PEG)分子)或層分子(例如，分支鏈PEG分子或其他聚合物)偶合至表面。可用於形成所揭示之低結合基材表面中之任一者的適合矽烷之實例包括但不限於(3-胺丙基)三甲氧基矽烷(APTMS)、(3-胺丙基)三乙氧基矽烷(APTES)、各種PEG-矽烷(例如，包含1K、2K、5K、10K、20K等之分子量)、胺基-PEG矽烷(亦即，包含游離胺基官能基)、順丁烯二醯亞胺-PEG矽烷、生物素-PEG矽烷中之任一者及其類似物。

【0100】 熟習此項技術者已知之各種分子中之任一者(包括，但不限於，胺基酸、肽、核苷酸、寡核苷酸、其他單體或聚合物，或其組合)可用於在基材表面上形成一或多個經化學修飾層，其中所用組分之選擇可以變化以改變基材表面之一或多個性質，例如官能基及/或所繫栓之寡核苷酸引子之表面密度、基材表面之親水性/疏水性，或基材表面之三維性質(亦即「厚度」)。可用於所揭示基材表面之任一者中形成一或多層非特異性低結合材料之較佳聚合物之實例包括(但不限於)各種分子量及分支鏈結構之聚乙二醇(PEG)、抗生物素蛋白鏈菌素、聚丙烯醯胺、聚酯、聚葡萄糖、聚離胺酸及聚離胺酸共聚物，或其任何組合。可用於將一或多層材料(例如聚合物層)接枝至基材表面及/或使該等層彼此交聯之接合化學之實例包括(但不限於)生物素-抗生物素蛋白鏈菌素相互作用(或其變化)、his標籤-Ni/NTA接合化學、甲氧基醚接合化學、羧酸酯接合化學、胺接合化學、NHS酯、順丁烯二醯亞胺、硫醇、環氧樹脂、疊氮化物、醯肼、炔烴、異氰酸酯及矽烷。

【0101】 多層表面之一或多層可包含分支鏈聚合物或可為直鏈。適合之分支鏈聚合物之實例包括(但不限於)分支鏈PEG、分支鏈聚(乙烯醇)(分支鏈PVA)、分支鏈聚(乙烯基吡啶)、分支鏈聚(乙烯基吡咯啶酮) (分支鏈PVP)、分支聚(丙烯酸) (分支鏈PAA)、分支鏈聚丙烯醯胺、分支鏈聚(N-異丙基丙烯醯胺) (分支鏈PNIPAM)、分支鏈聚(甲基丙烯酸甲酯) (分支鏈PMA)、分支鏈聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (分支鏈PHEMA)、分支鏈聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (分支鏈POEGMA)、分支鏈聚麩胺酸(分支鏈PGA)、分支鏈聚離胺酸、分支鏈聚葡糖苷及聚葡萄糖。

【0102】 在一些情形下，用於形成本文所揭示多層表面中任一者之

一或多層之分支鏈聚合物可包含至少4個支鏈、至少5個支鏈、至少6個支鏈、至少7個支鏈、至少8個支鏈、至少9個支鏈、至少10個支鏈、至少12個支鏈、至少14個支鏈、至少16個支鏈、至少18個支鏈、至少20個支鏈、至少22個支鏈、至少24個支鏈、至少26個支鏈、至少28個支鏈、至少30個支鏈、至少32個支鏈、至少34個支鏈、至少36個支鏈、至少38個支鏈或至少40個支鏈。分子通常呈現『2次方』數目個支鏈，諸如2、4、8、16、32、64或128個支鏈。

【0103】 例示性PEG多層包括在偶合步驟期間暴露於兩層7uM寡核苷酸引子預負載且呈現總數2,000,000至10,000,000個分子於表面上之PEG-胺-APTES上之PEG (8K,16K,8K)。使用星形PEG-胺置換啞鈴狀16聚體及64聚體聚合物對暴露於8 uM引子之PEG-胺-APTES上3層多臂PEG (8K,16K,8K)及(8K,16K,8K)及3層多臂PEG (8,8,8)觀測到類似濃度。亦涵蓋具有相當第一、第二及第三PEG層之PEG多層。

【0104】 用於形成本文所揭示之多層表面中之任一者之一或多個層之直鏈、分支鏈或多分支鏈聚合物之分子量可為至少500、至少1,000、至少1,500、至少2,000、至少2,500、至少3,000、至少3,500、至少4,000、至少4,500、至少5,000、至少7,500、至少10,000、至少12,500、至少15,000、至少17,500、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000或至少50,000道爾頓。在一些情形下，用於形成本文所揭示之多層表面中之任一者之一或多個層之直鏈、分支鏈或多分支鏈聚合物之分子量可為至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多17,500、至多15,000、至多12,500、至多10,000、至多7,500、至多5,000、至多

4,500、至多4,000、至多3,500、至多3,000、至多2,500、至多2,000、至多1,500、至多1,000或至多500道爾頓。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，用於形成本文所揭示之多層表面中之任一者之一或多個層之直鏈、分支鏈或多分支鏈聚合物之分子量可以在約1,500至約20,000道爾頓之範圍內。熟習此項技術者將認識到，用於形成本文所揭示之多層表面中之任一者之一或多個層之直鏈、分支鏈或多分支鏈聚合物之分子量之任何值可在此範圍內，例如約1,260道爾頓。

【0105】 在一些情形下，例如，其中多層表面之至少一個層包含分支鏈聚合物，所沈積之層之分支鏈聚合物分子與前一層之分子之間之共價鍵數目可以在每分子約一個共價鍵與每分子約32個共價鍵之範圍內。在一些情形下，新穎層之分支鏈聚合物分子與前一層之分子之間之共價鍵數目可以為每分子至少1個、至少2個、至少3個、至少4個、至少5個、至少6個、至少7個、至少8個、至少9個、至少10個、至少12個、至少14個、至少16個、至少18個、至少20個、至少22個、至少24個、至少26個、至少28個、至少30個或至少32或超過32個共價鍵。在一些情形下，新穎層之分支鏈聚合物分子與前一層之分子之間之共價鍵數目可以為至多32個、至多30個、至多28個、至多26個、至多24個、至多22個、至多20個、至多18個、至多16個、至多14個、至多12個、至多10個、至多9個、至多8個、至多7個、至多6個、至多5個、至多4個、至多3個、至多2個或至多1個。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，新穎層之分支鏈聚合物分子與前一層之分子之間之共價鍵數目可以在約4個至約16個之範圍內。熟習此項技術

者將認識到，新穎層之分支鏈聚合物分子與前一層之分子之間之共價鍵數目之任何值可在此範圍內，例如在一些情形下約11，或在其他情形下平均數目為約4.6。

【0106】 在將材料層與基材表面偶合之後保留之任何反應性官能基可視情況藉由使用高產率偶合化學物質使小的惰性分子偶合阻斷。舉例而言，在胺偶合化學物質用於將新穎材料層連接至前一層之情況下，任何殘餘胺基可以隨後藉由與小的胺基酸(諸如甘胺酸)偶合而乙醯化或失活。

【0107】 沈積在所揭示之低結合基材之表面上之低的非特異性結合材料，例如親水性聚合物材料之層數目可以在1至約10之範圍內。在一些情形下，層數目為至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10。在一些情形下，層數目可以為至多10、至多9、至多8、至多7、至多6、至多5、至多4、至多3、至多2或至多1。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，層數目可以在約2至約4之範圍內。在一些情形下，所有層可包含相同材料。在一些情形下，各層可包含不同材料。在一些情形下，該複數個層可包含複數種材料。在一些情形下，至少一個層可包含分支鏈聚合物。在一些情形下，所有層可包含分支鏈聚合物。

【0108】 一或多個低的非特異性結合材料層可以在一些情況下使用極性質子溶劑、極性非質子溶劑、非極性溶劑或其任何組合沈積在基板表面上及/或結合於基板表面上。在一些情形下，用於層沈積及/或偶合之溶劑可包含醇(例如，甲醇、乙醇、丙醇等)、另一種有機溶劑(例如，乙腈、二甲亞碸(DMSO)、二甲基甲醯胺(DMF)等)、水、緩衝水溶液(例如，磷酸酯緩衝液、磷酸鹽緩衝鹽水、3-(N-嗎啉基)丙磺酸(MOPS)等)或

其任何組合。在一些情形下，所用溶劑混合物之有機組分可占總的至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%，或橫跨或接近本文之範圍之任何百分比，其中其餘部分由水或緩衝水溶液組成。在一些情形下，所用溶劑混合物之水性組分可占總的至少1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%，或橫跨或接近本文之範圍之任何百分比，其中其餘部分由有機溶劑組成。所用溶劑混合物之pH可以低於5、5、5、5、6、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10或大於10，或橫跨或接近本文所述之範圍之任何值。

【0109】 在一些情形下，一或多個低的非特異性結合材料層可以使用有機溶劑之混合物沈積在基板表面上及/或結合於基板表面，其中至少一種組分之介電常數低於40，且按體積計構成總混合物之至少50%。在一些情形下，至少一種組分之介電常數可以低於10、低於20、低於30、低於40。在一些情形下，至少一種組分按體積計構成總混合物之至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%。

【0110】 如所指出，本發明之低的非特異性結合基材呈現用於固相核酸擴增之雜交及/或擴增調配物之蛋白質、核酸及其他組分之非特異性結合減少。藉由給定基材表面呈現之非特異性結合之程度可以定性或定量地評定。舉例而言，在一些情形下，在一組標準化條件下將表面暴露於螢光染料(例如，Cy3、Cy5等)、螢光標記之核苷酸、螢光標記之寡核苷酸及/或螢光標記之蛋白質(例如，聚合酶)繼之以指定沖洗方案及螢光成像可

用作用於比較包含不同表面調配物之基材上之非特異性結合的定性工具。在一些情形下，在一組標準化條件下將表面暴露於螢光染料、螢光標記之核苷酸、螢光標記之寡核苷酸及/或螢光標記之蛋白質(例如，聚合酶)繼之以指定沖洗方案及螢光成像可用作用於比較包含不同表面調配物之基材上之非特異性結合的定量工具-其限制條件為已注意確保在螢光信號與基材表面上之螢光團數目線性相關(或以可預測方式相關)之條件下(例如，在螢光團之信號飽和及/或自身淬滅不為問題之條件下)進行螢光成像，且使用適合校準標準物。在一些情形下，熟習此項技術者已知之其他技術，例如放射性同位素標記及計數法可用於定量評定藉由本發明之不同基材表面調配物呈現非特異性結合之程度。

【0111】 本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3之螢光團之特異性與非特異性結合之比為至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100或大於100，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3之螢光團之特異性與非特異性螢光之比為至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100或大於100，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。

【0112】 如所指出，在一些情形下，針對在一組標準化培育及沖洗條件下使表面與經標記蛋白質(例如，牛血清白蛋白(BSA)、抗生物素蛋白鏈菌素、DNA聚合酶、逆轉錄酶、解螺旋酶、單股結合蛋白(SSB)等或其任何組合)、經標記核苷酸、經標記寡核苷酸等接觸，繼之以偵測殘留在表面上之標記之量及比較自其所獲得之信號與適當的校準標準物，由所揭示之低結合基材呈現之非特異性結合程度可以使用標準化方案評定。在

一些情形下，標記可包含螢光標記。在一些情形下，標記可包含放射性同位素。在一些情形下，標記可包含熟習此項技術者已知之任何其他可偵測標記。在一些情形下，就每單位面積非特異性結合蛋白分子(或其他分子)之數目而言，可以因此評定由給定基材表面調配物呈現之非特異性結合之程度。在一些情形下，本發明之低結合基材可以呈現非特異性蛋白質結合(或其他指定分子，例如Cy3染料之非特異性結合)低於0.001個分子/μm^2、低於0.01個分子/μm^2、低於0.1個分子/μm^2、低於0.25個分子/μm^2、低於0.5個分子/μm^2、低於1個分子/μm^2、低於10個分子/μm^2、低於100個分子/μm^2或低於1,000個分子/μm^2。熟習此項技術者將認識到，本發明之給定基材表面可以呈現非特異性結合在此範圍內之任何處，例如低於86個分子/μm^2。舉例而言，在與經Cy3標記之抗生物素蛋白鏈菌素(GE Amersham)於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)緩衝液中之1 uM溶液接觸15分鐘，繼之以用去離子水沖洗3次之後，本文所揭示之一些經修飾之表面呈現非特異性蛋白質結合低於0.5個分子/um^2。本文所揭示之一些經修飾之表面呈現Cy3染料分子之非特異性結合低於0.25個分子/um^2。在非依賴性非特異性結合分析中，以384孔盤在37℃下在低結合基材上將1 uM經標記Cy3 SA (ThermoFisher)、1 uM Cy5 SA染料(ThermoFisher)、10 uM胺基烯丙基-dUTP - ATTO-647N (Jena Biosciences)、10 uM胺基烯丙基-dUTP - ATTO-Rho11 (Jena Biosciences)、10 uM胺基烯丙基-dUTP - ATTO-Rho11 (Jena Biosciences)、10 uM 7-炔丙基胺基-7-脫氮-dGTP-Cy5 (Jena Biosciences)及10 uM 7-炔丙基胺基-7-脫氮-dGTP-Cy3 (Jena Biosciences)培育15分鐘。各孔用50 ul無去離子RNase/DNase水沖洗2-3次，且用25 mM ACES緩衝液pH 7.4沖洗2-3次。使用如由製造商指定之

Cy3、AF555或Cy5濾光片組(根據所進行之染料測試)在GE Typhoon (GE Healthcare Lifesciences, Pittsburgh, PA)儀器上使384孔盤成像，PMT增益設定為800，且解析度為50-100 μm。對於更高解析度成像，在具有全內反射螢光(TIRF)物鏡(20×，0.75 NA或100×，1.5 NA，Olympus)、CCD相機(例如，Olympus EM-CCD單色相機、Olympus XM-10單色相機或Olympus DP80彩色及單色相機)、照明源(例如，Olympus 100W Hg燈、Olympus 75W Xe燈或Olympus U-HGLGPS螢光光源)且激發波長為532 nm或635 nm之Olympus IX83顯微鏡(Olympus Corp., Center Valley, PA)上收集影像。二向色鏡係購自(IDEX Health & Science, LLC, Rochester, New York)，例如405、488、532或633 nm二向色反射器/分束器及帶通濾光片選為與適當激發波長一致之532 LP或645 LP。本文所揭示之一些經修飾之表面呈現染料分子之非特異性結合低於0.25個分子/μm^2。

【0113】在一些情形下，本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3之螢光團之特異性與非特異性結合之比為至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100或大於100，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。在一些情形下，本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3之螢光團之特異性與非特異性螢光信號之比為至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100或大於100，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。

【0114】與本文之揭示內容一致之低背景表面可以呈現特異性染料連接(例如，Cy3連接)與非特異性染料吸附(例如，Cy3染料吸附)之比為至

少3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、50:1，或每個非特異性吸附之分子超過50個所連接之特異性染料分子。類似地，當經歷激發能量時，例如Cy3之螢光團已與其連接之與本文之揭示內容一致的低背景表面可以呈現特異性螢光信號(例如，由連接至表面之經Cy3標記之寡核苷酸產生)與非特異性吸附之染料螢光信號之比為 至 少3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、15:1、20:1、30:1、40:1、50:1或超過50:1。

【0115】 在一些情形下，所揭示之基材表面之親水度(或與水溶液之「可濕性」)可以例如藉由量測水接觸角評定，其中將小的水液滴置放於表面上且使用例如光學張力計來量測其與表面接觸之角度。在一些情形下，可以測定靜電接觸角。在一些情形下，可以測定前進或後退接觸角。在一些情形下，本文所揭示之親水性低結合基材表面的水接觸角可以在約0度至約50度之範圍內。在一些情形下，本文所揭示之親水性低結合基材表面之水接觸角可以不超過50度、45度、40度、35度、30度、25度、20度、18度、16度、14度、12度、10度、8度、6度、4度、2度或1度。在許多情況下，接觸角不超過此範圍內之任何值，例如不超過40度。熟習此項技術者將認識到，本發明之給定親水性低結合基材表面可以呈現水接觸角之值在此範圍內之任何處，例如約27度。

【0116】 在一些情形下，通常由於生物分子與低結合表面之非特異性結合減少，本文所揭示之親水性表面有助於減少生物分析之洗滌時間。在一些情形下，足夠的洗滌步驟可以在少於60、50、40、30、20、15、10或少於10秒內進行　舉例而言，在一些情形下，足夠的洗滌步驟可以在少於30秒內進行。

【0117】本發明之一些低結合表面呈現對長時間暴露於溶劑及高溫或溶劑暴露或溫度變化之反覆循環之穩定性或耐久性顯著改善。舉例而言，在一些情形下，所揭示之表面之穩定性可以藉由螢光標記表面上之官能基或表面上之所繫栓之生物分子(例如，寡核苷酸引子)及在長時間暴露於溶劑及高溫或溶劑暴露或溫度變化之反覆循環之前、期間及之後監測螢光信號進行測試。在一些情形下，用於評定表面質量之螢光變化程度可以在暴露於溶劑及/或高溫之1分鐘、2分鐘、3分鐘、4分鐘、5分鐘、10分鐘、20分鐘、30分鐘、40分鐘、50分鐘、60分鐘、2小時、3小時、4小時、5小時、6小時、7小時、8小時、9小時、10小時、15小時、20小時、25小時、30小時、35小時、40小時、45小時、50小時或100小時之時間段內低於1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25%(或如在此等時間段內量測之此等百分比之任何組合)。在一些情形下，用於評定表面質量之螢光變化程度可以在反覆暴露於溶劑變化及/或溫度變化之5次循環、10次循環、20次循環、30次循環、40次循環、50次循環、60次循環、70次循環、80次循環、90次循環、100次循環、200次循環、300次循環、400次循環、500次循環、600次循環、700次循環、800次循環、900次循環或1,000次循環內低於1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%或25% (或如在此循環範圍內量測之此等百分比之任何組合)。

【0118】在一些情形下，本文所揭示之表面可以呈現特異性信號與非特異性信號或其他背景之比率較高。舉例而言，當用於核酸擴增時，一些表面可以呈現擴增信號比表面之相鄰非密集區域之信號大至少3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍或超過100倍。類似地，一些表面呈現擴增信號比表面

之相鄰經擴增核酸群體區域之信號大至少3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍或超過100倍。

【0119】 螢光激發能量在特定螢光團及方案中變化，且可在低於400 nm至超過800 nm之激發波長之範圍內，這與本文所揭示之表面之用途之螢光團選擇或其他參數或一致。

【0120】 因此，如本文所揭示之低背景表面呈現相對於此項技術中已知之表面低的背景螢光信號或高的對比雜訊(CNR)比。舉例而言，在一些情形下，在包含核酸分子之雜交團簇或經由熱循環藉由例如核酸擴增之20次循環產生之核酸分子之經選殖擴增之團簇的表面(例如，表面之經標記之點、團簇、離散區、子部分或子組)上空間不同或自經標記特點移除之位置處的表面之背景螢光可以比在進行該雜交或核酸擴增之該等20次循環在相同位置處量測之背景螢光大不超過20倍、10倍、5倍、2倍、1倍、0.5倍、0.1倍或低於0.1倍。

【0121】 在一些情形下，在用於核酸雜交或擴增應用以形成雜交或經選殖擴增之核酸分子之團簇(例如，其已直接或間接用螢光團標記)中時，所揭示之低背景表面之螢光影像呈現的對比雜訊比(CNR)為至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、20、210、220、230、240、250或大於250。

【0122】 *寡核苷酸引子及銜接子序列：*大體而言，低的非特異性結合材料中之一或多個層之至少一個層可包含用於共價或非共價連接寡核苷酸分子，例如銜接子或引子序列之官能基，或至少一個層在其沈積在基材表面上時可已經包含共價或非共價連接之寡核苷酸銜接子或引子序列。在

一些情形下，繫栓至至少一個第三層之聚合物分子之寡核苷酸可以複數種深度分佈在該層中。

【0123】在一些情形下，寡核苷酸銜接子或引子分子與溶液中之聚合物共價偶合，亦即，隨後將聚合物偶合或沈積在表面上。在一些情形下，寡核苷酸銜接子或引子分子在其已與表面偶合或沈積在表面上之後與聚合物共價偶合。在一些情形下，至少一個親水性聚合物層包含複數個共價連接之寡核苷酸銜接子或引子分子。在一些情形下，親水性聚合物之至少兩個、至少三個、至少四個或至少五個層包含複數個共價連接之銜接子或引子分子。

【0124】在一些情形下，可以使用熟習此項技術者已知之各種適合之接合化學中之任一者使寡核苷酸銜接子或引子分子與親水性聚合物之一或多個層偶合。舉例而言，寡核苷酸銜接子或引子序列可包含可與胺基、羧基、硫醇基及其類似基團反應之部分。可使用之適合之胺反應性接合化學之實例包括但不限於涉及異硫氰酸酯基團、異氰酸酯基團、醯基疊氮基團、NHS酯基團、磺醯氯基團、醛基團、乙二醛基團、環氧化物基團、環氧乙烷基團、碳酸酯基團、芳基鹵基團、亞胺酯基團、碳化二亞胺基團、酸酐基團及氟苯基酯基團之反應物。適合之羧基反應性接合化學之實例包括但不限於涉及碳化二亞胺化合物之反應，例如水溶性EDC (1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳二醯亞胺·HCL)。適合之巰基反應性接合化學之實例包括順丁烯二醯亞胺、鹵乙醯及吡啶基二硫化物。

【0125】一或多種類型之寡核苷酸分子可以連接或繫栓至基材表面。在一些情形下，一或多種類型之寡核苷酸銜接子或引子可包含間隔序列、用於雜交至銜接子接合之模板庫核酸序列之銜接子序列、正向擴增引

子、反向擴增引子、定序引子及/或分子條形碼序列或其任何組合。在一些情形下，1個引子或銜接子序列可以繫栓至表面之至少一個層。在一些情形下，至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或超過10個不同引子或銜接子序列可以繫栓至表面之至少一個層。

【0126】 在一些情形下，所繫栓之寡核苷酸銜接子及/或引子序列之長度可以在約10個核苷酸至約100個核苷酸之範圍內。在一些情形下，所繫栓之寡核苷酸銜接子及/或引子序列之長度可以為至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90或至少100個核苷酸。在一些情形下，所繫栓之寡核苷酸銜接子及/或引子序列之長度可以為至多100、至多90、至多80、至多70、至多60、至多50、至多40、至多30、至多20或至多10個核苷酸。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，所繫栓之寡核苷酸銜接子及/或引子序列之長度可以在約20個核苷酸至約80個核苷酸之範圍內。熟習此項技術者將認識到所繫栓之寡核苷酸銜接子及/或引子序列之長度之任何值可在此範圍內，例如約24個核苷酸。

【0127】 在一些情形下，所繫栓之銜接子或引子序列可包含經設計以有助於如在低結合基材上進行之核酸擴增之特異性及效率的修飾。舉例而言，在一些情形下，引子可包含聚合酶終止點，以使得表面結合點與修飾位點之間之引子序列之鏈段始終呈單股形式，且在一些解螺旋酶依賴性等溫擴增方法中充當5'至3'解螺旋酶之負載位點。可用於形成聚合酶終止點之引子修飾之其他實例包括但不限於將PEG鏈插入兩個核苷酸之間之引子朝向5'端之主鏈中，插入無鹼基核苷酸(亦即，既不具有嘌呤亦不具有嘧啶鹼基之核苷酸)，或可以由解螺旋酶繞過之病灶位點。

【0128】 如將在以下實例中進一步論述，可能需要改變基材表面上所繫栓之寡核苷酸銜接子或引子之表面密度及/或所繫栓之銜接子或引子離基材表面之間距(例如，藉由改變用於將銜接子或引子繫栓至表面之連接分子之長度)以在使用給定擴增方法時為最佳效能而「調諧」基材。如以下所指出，調整所繫栓之寡核苷酸銜接子或引子之表面密度可影響以根據所選擴增方法變化之方式在基材上觀測到之特異性及/或非特異性擴增之程度。在一些情形下，所繫栓之寡核苷酸銜接子或引子之表面密度可以藉由調整用於形成基材表面之分子組分之比而變化。舉例而言，在寡核苷酸引子-PEG結合物用於形成低結合基材之最終層情況下，寡核苷酸引子-PEG結合物與未結合PEG分子之比可以變化。所繫栓之引子分子之所得表面密度可隨後使用熟習此項技術者已知之各種技術中之任一者來估算或量測。實例包括但不限於使用放射性同位素標記及計數方法，共價偶合包含光學可偵測標籤(例如，螢光標籤)之可裂解分子，該光學可偵測標籤可以自界定區域之基材表面裂解，以適當溶劑之固定體積收集，且隨後藉由比較螢光信號與已知光學標籤濃度之校準溶液之螢光信號進行定量，或使用螢光成像技術，其限制條件為已注意標記反應條件及影像獲取設置以確保螢光信號與表面上之螢光團數目線性相關(例如，在表面上不存在螢光團之顯著自身淬滅)。

【0129】 在一些情形下，本發明之低結合基材表面上之寡核苷酸銜接子或引子之所得表面密度可以在約100個引子分子/μm^2至約1,000,000個引子分子/μm^2範圍內。在一些情形下，寡核苷酸銜接子或引子之表面密度可為至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1,000、至少1,500、至少2,000、至少

2,500、至少3,000、至少3,500、至少4,000、至少4,500、至少5,000、至少5,500、至少6,000、至少6,500、至少7,000、至少7,500、至少8,000、至少8,500、至少9,000、至少9,500、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000、至少100,000、至少150,000、至少200,000、至少250,000、至少300,000、至少350,000、至少400,000、至少450,000、至少500,000、至少550,000、至少600,000、至少650,000、至少700,000、至少750,000、至少800,000、至少850,000、至少900,000、至少950,000或至少1,000,000個分子/μm^2。在一些情形下，寡核苷酸銜接子或引子之表面密度可為至多1,000,000、至多950,000、至多900,000、至多850,000、至多800,000、至多750,000、至多700,000、至多650,000、至多600,000、至多550,000、至多500,000、至多450,000、至多400,000、至多350,000、至多300,000、至多250,000、至多200,000、至多150,000、至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多10,000、至多9,500、至多9,000、至多8,500、至多8,000、至多7,500、至多7,000、至多6,500、至多6,000、至多5,500、至多5,000、至多4,500、至多4,000、至多3,500、至多3,000、至多2,500、至多2,000、至多1,500、至多1,000、至多900、至多800、至多700、至多600、至多500、至多400、至多300、至多200

或至多100個分子/μm^2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，銜接子或引子之表面密度可以在約10,000個分子/μm^{2}至約100,000個分子/μm^{2}之範圍內。熟習此項技術者將認識到，銜接子或引子分子之表面密度之任何值可在此範圍內，例如在一些情形下約3,800個分子/μm^2，或在其他情形下約455,000個分子/μm^2。在一些情形下，如將在下文進一步論述，首先雜交至基材表面上之銜接子或引子序列的模板庫核酸序列(例如，樣品DNA分子)之表面密度可以小於或等於針對所繫栓之寡核苷酸引子之表面密度所指定的表面密度。在一些情形下，如亦將在下文進一步論述，雜交至基材表面上之銜接子或引子序列的經選殖擴增之模板庫核酸序列之表面密度可以橫跨與針對所繫栓之寡核苷酸銜接子或引子之表面密度所指定的表面密度相同的範圍或不同的範圍。

【0130】 如上文所列之銜接子或引子分子之局部表面密度不排除表面上之密度改變，以使得表面可包含寡聚物密度為例如500,000/um^{2}之區域，同時亦至少包含具有基本上不同的局部密度之第二區域。

【0131】 *將核酸分子雜交至低結合基材：*在本發明之一些態樣中，描述雜交緩衝液調配物，其與所揭示之低結合基材組合提供改善雜交速率、雜交特異性(或嚴格度)及雜交效率(或產率)。如本文所用，雜交特異性為所繫栓之銜接子序列、引子序列或寡核苷酸序列通常僅正確雜交至完全互補序列之能力的量度，而雜交效率為通常雜交至互補序列之總的可獲得的所繫栓之銜接子序列、引子序列或寡核苷酸序列之百分比之量度。

【0132】 改善雜交特異性及/或效率可以藉由最佳化與所揭示之低結合表面一起使用之雜交緩衝液調配物實現，且將更詳細地在以下實例中論

述。可經調整以實現改善效能之雜交緩衝液組分之實例包括但不限於緩衝液類型、有機溶劑混合物、緩衝液pH、緩衝液黏度、洗滌劑及兩性離子組分、離子強度(包括調整單價及二價離子濃度)、抗氧化劑及還原劑、碳水化合物、BSA、聚乙二醇、硫酸聚葡萄糖、甜菜鹼、其他添加劑及其類似物。

【0133】 藉助於非限制性實例，用於調配雜交緩衝液之適合緩衝液可包括但不限於磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)、丁二酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸、乙酸鹽、Tris、TAPS、MOPS、PIPES、HEPES、MES及其類似物。適當緩衝液之選擇通常將視雜交緩衝溶液之目標pH而定。大體而言，緩衝溶液之所需pH將在約pH 4至約pH 8.4之範圍內。在一些實施例中，緩衝液pH可以為至少4.0、至少4.5、至少5.0、至少5.5、至少6.0、至少6.2、至少6.4、至少6.6、至少6.8、至少7.0、至少7.2、至少7.4、至少7.6、至少7.8、至少8.0、至少8.2或至少8.4。在一些實施例中，緩衝液pH可以為至多8.4、至多8.2、至多8.0、至多7.8、至多7.6、至多7.4、至多7.2、至多7.0、至多6.8、至多6.6、至多6.4、至多6.2、至多6.0、至多5.5、至多5.0、至多4.5或至多4.0。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，所需pH可以在約6.4至約7.2之範圍內。熟習此項技術者將認識到緩衝液pH之任何值可在此範圍內，例如約7.25。

【0134】 適用於雜交緩衝液調配物之洗滌劑包括但不限於兩性離子洗滌劑(例如，1-十二醯基-sn-甘油基-3-磷酸膽鹼、3-(4-第三丁基-1-吡啶基)-1-丙磺酸酯、3-(N,N-二甲基十四烷基銨基)丙磺酸酯、3-(N,N二甲基十四烷基銨基)丙磺酸酯、ASB-C80、C7BzO、CHAPS、CHAPS水合

物、CHAPSO、DDMAB、二甲基乙基銨丙烷磺酸酯、N,N-二甲基十二胺N氧化物、N-十二烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙磺酸酯或N-十二烷基-N,N-二甲基-3-銨基-1-丙磺酸酯)及陰離子、陽離子及非離子洗滌劑。非離子洗滌劑之實例包括聚(氧化乙烯)醚及相關聚合物(例如，Brij®、TWEEN®、TRITON®、TRITON X-100及IGEPAL® CA-630)、膽汁鹽及醣苷洗滌劑。

【0135】 單獨或與最佳化緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以產生相對雜交速率，其在比習知雜交方案之雜交速率快約2倍至約20倍之範圍內。在一些情形下，相對雜交速率可以為習知雜交方案之雜交速率的至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少12倍、至少14倍、至少16倍、至少18倍、至少20倍、至少25倍、至少30倍或至少40倍。

【0136】 在一些情形下，單獨或與最佳化緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材對於此等完成量度中之任一者可以產生低於60分鐘、50分鐘、40分鐘、30分鐘、20分鐘、15分鐘、10分鐘或5分鐘之總雜交反應時間(亦即，達至雜交反應之完成的90%、95%、98%或99%所需的時間)。

【0137】 在一些情形下，單獨或與最佳化緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材與習知雜交方案相比可以產生改善雜交特異性。在一些情形下，可以實現之雜交特異性優於10次雜交事件中1個鹼基失配、20次雜交事件中1個鹼基失配、30次雜交事件中1個鹼基失配、40次雜交事件中1個鹼基失配、50次雜交事件中1個鹼基失配、75次雜交事件中1個鹼基失配、100次雜交事件中1個鹼基失配、200次雜交事件中1個鹼基失配、

300次雜交事件中1個鹼基失配、400次雜交事件中1個鹼基失配、500次雜交事件中1個鹼基失配、600次雜交事件中1個鹼基失配、700次雜交事件中1個鹼基失配、800次雜交事件中1個鹼基失配、900次雜交事件中1個鹼基失配、1,000次雜交事件中1個鹼基失配、2,000次雜交事件中1個鹼基失配、3,000次雜交事件中1個鹼基失配、4,000次雜交事件中1個鹼基失配、5,000次雜交事件中1個鹼基失配、6,000次雜交事件中1個鹼基失配、7,000次雜交事件中1個鹼基失配、8,000次雜交事件中1個鹼基失配、9,000次雜交事件中1個鹼基失配或10,000次雜交事件中1個鹼基失配。

【0138】 在一些情形下，單獨或與最佳化緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材與習知雜交方案相比可以產生改善雜交效率(例如，與目標寡核苷酸序列成功雜交之基材表面上可獲得的寡核苷酸引子部分)。在一些情形下，對於下文指定之輸入目標寡核苷酸濃度中之任一者及在上文指定之雜交反應時間中之任一者中，可以實現之雜交效率高於50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在例如其中雜交效率低於100%之一些情形下，雜交至基材表面之目標核酸序列之所得表面密度可以低於表面上之寡核苷酸銜接子或引子序列之表面密度。

【0139】 在一些情形下，使用習知雜交(或擴增)方案或最佳化雜交(或擴增)方案之所揭示之低結合基材用於核酸雜交(或擴增)應用之用途可導致對與基材表面接觸之目標(或樣品)核酸分子之輸入濃度的要求降低。舉例而言，在一些情形下，目標(或樣品)核酸分子可以與濃度在約10 pM至約1 μM (亦即，在黏接或擴增之前)之範圍內之基材表面接觸。在一些情形下，目標(或樣品)核酸分子可以至少10 pM、至少20 pM、至少30 pM、至少40 pM、至少50 pM、至少100 pM、至少200 pM、至少300

pM、至少400 pM、至少500 pM、至少600 pM、至少700 pM、至少800pM、至少900 pM、至少1 nM、至少10 nM、至少20 nM、至少30 nM、至少40 nM、至少50 nM、至少60 nM、至少70 nM、至少80 nM、至少90 nM、至少100 nM、至少200 nM、至少300 nM、至少400 nM、至少500 nM、至少600 nM、至少700 nM、至少800 nM、至少900 nM或至少1 μM之濃度投與。在一些情形下，目標(或樣品)核酸分子可以至多1 μM、至多900 nM、至多800 nm、至多700 nM、至多600 nM、至多500 nM、至多400 nM、至多300 nM、至多200 nM、至多100 nM、至多90 nM、至多80 nM、至多70 nM、至多60 nM、至多50 nM、至多40 nM、至多30 nM、至多20 nM、至多10 nM、至多1 nM、至多900 pM、至多800 pM、至多700 pM、至多600 pM、至多500 pM、至多400 pM、至多300 pM、至多200 pM、至多100 pM、至多90 pM、至多80 pM、至多70 pM、至多60 pM、至多50 pM、至多40 pM、至多30 pM、至多20 pM或至多10 pM之濃度投與。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，目標(或樣品)核酸分子可以約90 pM至約200 nM之範圍內之濃度投與。熟習此項技術者將認識到目標(或樣品)核酸分子可以任何值在此範圍內，例如約855 nM之濃度投與。

【0140】 在一些情形下，單獨或與最佳化雜交緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以使雜交目標(或樣品)寡核苷酸分子(亦即，在進行任何後續固相或選殖擴增反應之前)之表面密度在約0.0001個目標寡核苷酸分子/μm^2至約1,000,000個目標寡核苷酸分子/μm^2之範圍內。在一些情形下，雜交目標寡核苷酸分子之表面密度可以為至少0.0001、至少

0.0005、至少0.001、至少0.005、至少0.01、至少0.05、至少0.1、至少0.5、至少1、至少5、至少10、至少20、至少30、至少40、至少50、至少60、至少70、至少80、至少90、至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600、至少700、至少800、至少900、至少1,000、至少1,500、至少2,000、至少2,500、至少3,000、至少3,500、至少4,000、至少4,500、至少5,000、至少5,500、至少6,000、至少6,500、至少7,000、至少7,500、至少8,000、至少8,500、至少9,000、至少9,500、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000、至少100,000、至少150,000、至少200,000、至少250,000、至少300,000、至少350,000、至少400,000、至少450,000、至少500,000、至少550,000、至少600,000、至少650,000、至少700,000、至少750,000、至少800,000、至少850,000、至少900,000、至少950,000或至少1,000,000個分子/μm^2。在一些情形下，雜交目標寡核苷酸分子之表面密度可以為至多1,000,000、至多950,000、至多900,000、至多850,000、至多800,000、至多750,000、至多700,000、至多650,000、至多600,000、至多550,000、至多500,000、至多450,000、至多400,000、至多350,000、至多300,000、至多250,000、至多200,000、至多150,000、至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多

10,000、至多9,500、至多9,000、至多8,500、至多8,000、至多7,500、至多7,000、至多6,500、至多6,000、至多5,500、至多5,000、至多4,500、至多4,000、至多3,500、至多3,000、至多2,500、至多2,000、至多1,500、至多1,000、至多900、至多800、至多700、至多600、至多500、至多400、至多300、至多200、至多100、至多90、至多80、至多70、至多60、至多50、至多40、至多30、至多20、至多10、至多5、至多1、至多0.5、至多0.1、至多0.05、至多0.01、至多0.005、至多0.001、至多0.0005或至多0.0001個分子/μm^2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，雜交目標寡核苷酸分子之表面密度可以在約3,000個分子/μm^2至約20,000個分子/μm^2之範圍內。熟習此項技術者將認識到雜交目標寡核苷酸分子之表面密度之任何值可在此範圍內，例如約2,700個分子/μm^2。

【0141】 換言之，在一些情形下，單獨或與最佳化雜交緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以使雜交目標(或樣品)寡核苷酸分子(亦即，在進行任何後續固相或選殖擴增反應之前)之表面密度在約100個雜交目標寡核苷酸分子/mm^2至約1×10^{12}個雜交目標寡核苷酸分子/mm^2之範圍內。在一些情形下，雜交目標寡核苷酸分子之表面密度可以為至少100、至少500、至少1,000、至少5,000、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000、至少100,000、至少150,000、至少200,000、至少250,000、至少300,000、至少350,000、至少400,000、至少450,000、至少500,000、至

少550,000、至少600,000、至少650,000、至少700,000、至少750,000、至少800,000、至少850,000、至少900,000、至少950,000、至少1,000,000、至少5,000,000、至少1 × 10^7、至少5 × 10^7、至少1 × 10^8、至少5 × 10^8、至少1 × 10^9、至少5 × 10^9、至少1 × 10^{10}、至少5 × 10^{10}、至少1 × 10^{11}、至少5 × 10^{11}或至少1 × 10^{12}個分子/mm^2。在一些情形下，雜交目標寡核苷酸分子之表面密度可以為至多1 × 10^{12}、至多5 × 10^{11}、至多1 × 10^{11}、至多5 × 10^{10}、至多1 × 10^{10}、至多5 × 10^9、至多1 × 10^9、至多5 × 10^8、至多1 × 10^8、至多5 × 10^7、至多1 × 10^7、至多5,000,000、至多1,000,000、至多950,000、至多900,000、至多850,000、至多800,000、至多750,000、至多700,000、至多650,000、至多600,000、至多550,000、至多500,000、至多450,000、至多400,000、至多350,000、至多300,000、至多250,000、至多200,000、至多150,000、至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多10,000、至多5,000、至多1,000、至多500或至多100個分子/mm^2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，雜交目標寡核苷酸分子之表面密度可以在約5,000個分子/mm^2至約50,000個分子/mm^2之範圍內。熟習此項技術者將認識到雜交目標寡核苷酸分子之表面密度之任何值可在此範圍內，例如約50,700個分子/μm^2。

【0142】在一些情形下，雜交至與低結合基材表面連接之寡核苷酸銜接子或引子分子的目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)之長度可以

在約0.1千鹼基(kb)至約20 kb之範圍內。在一些情形下，目標寡核苷酸分子之長度可以為至少0.1 kb、長度為至少0.2 kb、長度為至少0.3 kb、長度為至少0.4 kb、長度為至少0.5 kb、長度為至少0.6 kb、長度為至少0.7 kb、長度為至少0.8 kb、長度為至少0.9 kb、長度為至少1 kb、長度為至少2 kb、長度為至少3 kb、長度為至少4 kb、長度為至少5 kb、長度為至少6 kb、長度為至少7 kb、長度為至少8 kb、長度為至少9 kb、長度為至少10 kb、長度為至少15 kb、長度為至少20 kb、長度為至少30 kb或長度為至少40 kb，或橫跨本文所述之範圍之任何中間值，例如長度為至少0.85 kb。

【0143】在一些情形下，目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)可包含單股或雙股多聚核酸分子，其進一步包含重複之規律出現單體單元。在一些情形下，單股或雙股多聚核酸分子之長度可以為至少0.1 kb、長度為至少0.2 kb、長度為至少0.3 kb、長度為至少0.4 kb、長度為至少0.5 kb、長度為至少1 kb、長度為至少2 kb、長度為至少3 kb、長度為至少4 kb、長度為至少5 kb、長度為至少6 kb、長度為至少7 kb、長度為至少8 kb、長度為至少9 kb、長度為至少10 kb、長度為至少15 kb或長度為至少20 kb、長度為至少30 kb或長度為至少40 kb，或橫跨本文所述之範圍之任何中間值，例如長度為約2.45 kb。

【0144】在一些情形下，目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)可包含單股或雙股多聚核酸分子，其包含約2至約100個規律重複單體單元之複本。在一些情形下，規律重複單體單元之複本數可以為至少2、至少3、至少4、至少5、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至

少75、至少80、至少85、至少90、至少95及至少100。在一些情形下，規律重複單體單元之複本數可以為至多100、至多95、至多90、至多85、至多80、至多75、至多70、至多65、至多60、至多55、至多50、至多45、至多40、至多35、至多30、至多25、至多20、至多15、至多10、至多5、至多4、至多3或至多2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，規律重複單體單元之複本數可以在約4至約60之範圍內。熟習此項技術者將認識到規律重複單體單元之複本數之任何值可在此範圍內，例如約17。因此，在一些情形下，關於每單位面積基材表面目標序列之複本數，雜交目標序列之表面密度可以超過寡核苷酸引子之表面密度，即使雜交效率低於100%。

【0145】 *核酸表面擴增(NASA)*：如本文所用，短語「核酸表面擴增」(NASA)可與短語「固相核酸擴增」(或僅「固相擴增」)互換使用。在本發明之一些態樣中，描述核酸擴增調配物，其與所揭示之低結合基材組合提供改善擴增速率、擴增特異性及擴增效率。如本文所用，特異性擴增係指已共價或非共價繫栓至固體基材之模板庫寡核苷酸股之擴增。如本文所用，非特異性擴增係指引子-二聚體或其他非模板核酸之擴增。如本文所用，擴增效率為在給定擴增循環或擴增反應期間成功擴增的基材表面上所繫栓之寡核苷酸之百分比的量度。在本文所揭示之表面上進行之核酸擴增可以獲得至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或大於95%，諸如98%或99%之擴增效率。

【0146】 各種熱循環或等溫核酸擴增流程中之任一者可與所揭示之低結合基材一起使用。可以與所揭示之低結合基材一起使用之核酸擴增方法之實例包括但不限於聚合酶鏈反應(PCR)、多重置換擴增(MDA)、轉錄

介導擴增(TMA)、基於核酸序列之擴增(NASBA)、股置換擴增(SDA)、實時SDA、橋式擴增、等溫橋式擴增、滾環式擴增、環至環擴增、解螺旋酶依賴性擴增、重組酶依賴性擴增或單股結合(SSB)蛋白依賴性擴增。

【0147】 通常，可以單獨或與擴增反應組分之調配物組合使用所揭示之低結合基材實現擴增速率、擴增特異性及擴增效率之改善。除了包括核苷酸、一或多種聚合酶、解螺旋酶、單股結合蛋白等(或其任何組合)之外，可以多種方式調整擴增反應混合物以實現改善效能，其包括但不限於選擇緩衝液類型、緩衝液pH、有機溶劑混合物、緩衝液黏度、洗滌劑及兩性離子組分、離子強度(包括調整單價及二價離子濃度)、抗氧化劑及還原劑、碳水化合物、BSA、聚乙二醇、硫酸聚葡萄糖、甜菜鹼、其他添加劑及其類似物。

【0148】 單獨或與最佳化擴增反應調配物組合使用所揭示之低結合基材與使用習知基材及擴增方案所獲得之彼等相比可以產生提高之擴增速率。在一些情形下，可以實現之相對擴增速率可以為使用上文所述之方法擴增中之任一者之習知基材及擴增方案的擴增速率的至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少12倍、至少14倍、至少16倍、至少18倍或至少20倍。

【0149】 在一些情形下，對於此等完成量度中之任一者，單獨或與最佳化緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以產生少於60分鐘、50分鐘、40分鐘、30分鐘、20分鐘、15分鐘、10分鐘或5分鐘之擴增反應總時間(亦即，達至擴增反應之完成的90%、95%、98%或99%所需之時間)。

【0150】 本文所揭示之一些低結合基材表面呈現諸如Cy3之螢光團

之特異性結合與非特異性結合之比為至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、50:1、75:1、100:1或大於100:1，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。本文所揭示之一些表面呈現諸如Cy3之螢光團之特異性與非特異性螢光信號之比為至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、25:1、30:1、35:1、40:1、50:1、75:1、100:1或大於100:1，或橫跨本文中之範圍之任何中間值。

【0151】 在一些情形下，單獨或與最佳化擴增緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以允許不超過60分鐘、50分鐘、40分鐘、30分鐘、20分鐘或10分鐘之擴增反應總時間(亦即，達至擴增反應之完成的90%、95%、98%或99%所需之時間)。類似地，在一些情況下，單獨或與最佳化緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以允許擴增反應在不超過2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或不超過30次循環內完成。

【0152】 在一些情形下，單獨或與最佳化擴增反應調配物組合使用所揭示之低結合基材與使用習知基材及擴增方案所獲得的相比可以產生提高之特異性擴增及/或減少之非特異性擴增。在一些情形下，可以實現之特異性擴增與非特異性擴增之所得比率為至少4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、200:1、300:1、400:1、500:1、600:1、700:1、800:1、900:1或1,000:1。

【0153】 在一些情形下，單獨或與最佳化擴增反應調配物組合使用低結合基材與使用習知基材及擴增方案所獲得之擴增效率相比可以產生提

高之擴增速率。在一些情形下，在上文指定之擴增反應時間中之任一者中，可以實現之擴增效率高於50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。

【0154】在一些情形下，雜交至與低結合基材表面連接之寡核苷酸銜接子或引子分子的經選殖擴增之目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)之長度可以在約0.1千鹼基(kb)至約20 kb之範圍內。在一些情形下，經選殖擴增之目標寡核苷酸分子之長度可以為至少0.1 kb、長度為至少0.2 kb、長度為至少0.3 kb、長度為至少0.4 kb、長度為至少0.5 kb、長度為至少1 kb、長度為至少2 kb、長度為至少3 kb、長度為至少4 kb、長度為至少5 kb、長度為至少6 kb、長度為至少7 kb、長度為至少8 kb、長度為至少9 kb、長度為至少10 kb、長度為至少15 kb或長度為至少20 kb，或橫跨本文所述之範圍之任何中間值，例如長度為至少0.85。

【0155】在一些情形下，經選殖擴增之目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)可包含單股或雙股多聚核酸分子，其進一步包含重複之規律出現單體單元。在一些情形下，經選殖擴增之單股或雙股多聚核酸分子之長度可以為至少0.1 kb、長度為至少0.2 kb、長度為至少0.3 kb、長度為至少0.4 kb、長度為至少0.5 kb、長度為至少1 kb、長度為至少2 kb、長度為至少3 kb、長度為至少4 kb、長度為至少5 kb、長度為至少6 kb、長度為至少7 kb、長度為至少8 kb、長度為至少9 kb、長度為至少10 kb、長度為至少15 kb或長度為至少20 kb，或橫跨本文所述之範圍之任何中間值，例如長度為約2.45 kb。

【0156】在一些情形下，經選殖擴增之目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)可包含單股或雙股多聚核酸分子，其包含約2至約100個規律

重複單體單元之複本。在一些情形下，規律重複單體單元之複本數可以為至少2、至少3、至少4、至少5、至少10、至少15、至少20、至少25、至少30、至少35、至少40、至少45、至少50、至少55、至少60、至少65、至少70、至少75、至少80、至少85、至少90、至少95及至少100。在一些情形下，規律重複單體單元之複本數可以為至多100、至多95、至多90、至多85、至多80、至多75、至多70、至多65、至多60、至多55、至多50、至多45、至多40、至多35、至多30、至多25、至多20、至多15、至多10、至多5、至多4、至多3或至多2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，規律重複單體單元之複本數可以在約4至約60之範圍內。熟習此項技術者將認識到規律重複單體單元之複本數之任何值可在此範圍內，例如約12。因此，在一些情形下，關於每單位面積基材表面目標序列之複本數，經選殖擴增之目標序列之表面密度可以超過寡核苷酸引子之表面密度，即使雜交及/或擴增效率低於100%。

【0157】 在一些情形下，單獨或與最佳化擴增反應調配物組合使用所揭示之低結合基材與使用習知基材及擴增方案所獲得之純系複本數相比可以產生提高之純系複本數。在例如其中經選殖擴增之目標(或樣品)寡核苷酸分子包含連環多聚重複之單體目標序列之一些情形下，純系複本數與使用習知基材及擴增方案所獲得之純系複本數相比可能基本上較小。因此，在一些情形下，純系複本數可以在每個擴增群落約1個分子至約100,000個分子(例如，目標序列分子)之範圍內。在一些情形下，純系複本數可以為每個擴增群落至少1、至少5、至少10、至少50、至少100、至少500、至少1,000、至少2,000、至少3,000、至少4,000、至少5,000、至

少6,000、至少7,000、至少8,000、至少9,000、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000或至少100,000個分子。在一些情形下，純系複本數可以為每個擴增群落至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多10,000、至多9,000、至多8,000、至多7,000、至多6,000、至多5,000、至多4,000、至多3,000、至多2,000、至多1,000、至多500、至多100、至多50、至多10、至多5或至多1個分子。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，純系複本數可以在約2,000個分子至約9,000個分子之範圍內。熟習此項技術者將認識到純系複本數之任何值可在此範圍內，例如在一些情形下約2,220個分子，或在其他情形下約2個分子。

【0158】 如上所指出，在一些情形下，經擴增之目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)可包含連環多聚重複之單體目標序列。在一些情形下，經擴增之目標(或樣品)寡核苷酸分子(或核酸分子)可包含複數個分子，其各者包含單個單體目標序列。因此，單獨或與最佳化擴增反應調配物組合使用所揭示之低結合基材可以使目標序列複本之表面密度在約100個目標序列複本/mm^2至約1×10^{12}個目標序列複本/mm^2之範圍內。在一些情形下，目標序列複本之表面密度可以為至少100、至少500、至少

1,000、至少5,000、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000、至少100,000、至少150,000、至少200,000、至少250,000、至少300,000、至少350,000、至少400,000、至少450,000、至少500,000、至少550,000、至少600,000、至少650,000、至少700,000、至少750,000、至少800,000、至少850,000、至少900,000、至少950,000、至少1,000,000、至少5,000,000、至少1×10^7、至少5×10^7、至少1×10^8、至少5×10^8、至少1×10^9、至少5×10^9、至少1×10^{10}、至少5×10^{10}、至少1×10^{11}、至少5×10^{11}或至少1×10^{12}個目標序列複本/mm^2。在一些情形下，目標序列複本之表面密度可以為至多1×10^{12}、至多5×10^{11}、至多1×10^{11}、至多5×10^{10}、至多1×10^{10}、至多5×10^9、至多1×10^9、至多5×10^8、至多1×10^8、至多5×10^7、至多1×10^7、至多5,000,000、至多1,000,000、至多950,000、至多900,000、至多850,000、至多800,000、至多750,000、至多700,000、至多650,000、至多600,000、至多550,000、至多500,000、至多450,000、至多400,000、至多350,000、至多300,000、至多250,000、至多200,000、至多150,000、至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多10,000、至多5,000、至多1,000、至多500或至多100個目標序列複本/mm^2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者

可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，目標序列複本之表面密度可以在約1,000個目標序列複本/mm^2至約65,000個目標序列複本/mm^2之範圍內。熟習此項技術者將認識到目標序列複本之表面密度之任何值可在此範圍內，例如為約49,600個目標序列複本/mm^2。

【0159】在一些情形下，單獨或與最佳化擴增緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以使經選殖擴增之目標(或樣品)寡核苷酸群落(或團簇)之表面密度在約100個群落/mm^2至約1 × 10^{12}個群落/mm^2之範圍內。在一些情形下，經選殖擴增之群落之表面密度可以為至少100、至少500、至少1,000、至少5,000、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000、至少100,000、至少150,000、至少200,000、至少250,000、至少300,000、至少350,000、至少400,000、至少450,000、至少500,000、至少550,000、至少600,000、至少650,000、至少700,000、至少750,000、至少800,000、至少850,000、至少900,000、至少950,000、至少1,000,000、至少5,000,000、至少1 × 10^7、至少5 × 10^7、至少1 × 10^8、至少5 × 10^8、至少1 × 10^9、至少5 × 10^9、至少1 × 10^{10}、至少5 × 10^{10}、至少1 × 10^{11}、至少5 × 10^{11}或至少1 × 10^{12}個群落/mm^2。在一些情形下，經選殖擴增之群落之表面密度可以為至多1 × 10^{12}、至多5 × 10^{11}、至多1 × 10^{11}、至多5 × 10^{10}、至多1 × 10^{10}、至多5 × 10^9、至多1 × 10^9、至多5 × 10^8、至多1 × 10^8、至多5 × 10^7、至多1 × 10^7、至多5,000,000、至多1,000,000、至多950,000、至多900,000、至多850,000、至多800,000、至多750,000、至

多700,000、至多650,000、至多600,000、至多550,000、至多500,000、至多450,000、至多400,000、至多350,000、至多300,000、至多250,000、至多200,000、至多150,000、至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多10,000、至多5,000、至多1,000、至多500或至多100個群落/mm^2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，經選殖擴增之群落之表面密度可以在約5,000個群落/mm^2至約50,000個群落/mm^2之範圍內。熟習此項技術者將認識到經選殖擴增之群落之表面密度之任何值可在此範圍內，例如約48,800個群落/mm^2。

【0160】在一些情形下，單獨或與最佳化擴增緩衝液調配物組合使用所揭示之低結合基材可以使經選殖擴增之目標(或樣品)寡核苷酸群落(或團簇)之表面密度在約100個群落/cm^2至約1×10^{12}個群落/cm^2之範圍內。在一些情形下，經選殖擴增之群落之表面密度可以為至少100、至少500、至少1,000、至少5,000、至少10,000、至少15,000、至少20,000、至少25,000、至少30,000、至少35,000、至少40,000、至少45,000、至少50,000、至少55,000、至少60,000、至少65,000、至少70,000、至少75,000、至少80,000、至少85,000、至少90,000、至少95,000、至少100,000、至少150,000、至少200,000、至少250,000、至少300,000、至少350,000、至少400,000、至少450,000、至少500,000、至少550,000、至少600,000、至少650,000、至少700,000、至少750,000、至少

800,000、至少850,000、至少900,000、至少950,000、至少1,000,000、至少5,000,000、至少1×10^7、至少5×10^7、至少1×10^8、至少5×10^8、至少1×10^9、至少5×10^9、至少1×10^{10}、至少5×10^{10}、至少1×10^{11}、至少5×10^{11}或至少1×10^{12}個群落/cm^2。在一些情形下，經選殖擴增之群落之表面密度可以為至多1×10^{12}、至多5×10^{11}、至多1×10^{11}、至多5×10^{10}、至多1×10^{10}、至多5×10^9、至多1×10^9、至多5×10^8、至多1×10^8、至多5×10^7、至多1×10^7、至多5,000,000、至多1,000,000、至多950,000、至多900,000、至多850,000、至多800,000、至多750,000、至多700,000、至多650,000、至多600,000、至多550,000、至多500,000、至多450,000、至多400,000、至多350,000、至多300,000、至多250,000、至多200,000、至多150,000、至多100,000、至多95,000、至多90,000、至多85,000、至多80,000、至多75,000、至多70,000、至多65,000、至多60,000、至多55,000、至多50,000、至多45,000、至多40,000、至多35,000、至多30,000、至多25,000、至多20,000、至多15,000、至多10,000、至多5,000、至多1,000、至多500或至多100個群落/cm^2。此段落中所述之較低及較高值中之任一者可以組合以形成包括於本發明內之範圍，例如，在一些情形下，經選殖擴增之群落之表面密度可以在約5,000個群落/cm^2至約50,000個群落/cm^2之範圍內。熟習此項技術者將認識到經選殖擴增之群落之表面密度之任何值可在此範圍內，例如約48,800個群落/cm^2。

【0161】在一些情況下，單獨或與最佳化擴增反應調配物組合使用所揭示之低結合基材可以自經擴增及經標記核酸群體產生信號(例如，螢光信號)，其變化係數不超過50%，諸如50%、40%、30%、20%、15%、

10%、5%或低於5%。

【0162】 在一些情況下，如本文所揭示之基材表面及方法實現在升高之延伸溫度下擴增，諸如在15℃、20℃、25℃、30℃、40℃或更高溫度下，或例如在約21℃或23℃下。

【0163】 在一些情況下，使用如本文所揭示之基材表面及方法實現簡化擴增反應。舉例而言，在一些情況下，使用不超過1、2、3、4或5種離散試劑進行擴增反應。

【0164】 在一些情況下，使用如本文所揭示之基材表面及方法允許在擴增期間使用簡化溫度分佈，以使得反應物在15℃、20℃、25℃、30℃或40℃之低溫至40℃、45℃、50℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃或高於80℃之高溫之範圍，例如20℃至65℃之範圍內之溫度下執行。

【0165】 亦改善擴增反應以使得較低量模板(例如，目標或樣品分子)足以在表面上產生可辨別的信號，諸如1 pM、2 pM、5 pM、10 pM、15 pM、20 pM、30 pM、40 pM、50 pM、60 pM、70 pM、80 pM、90 pM、100 pM、200 pM、300 pM、400 pM、500 pM、600 pM、700 pM、800 pM、900 pM、1,000 pM、2,000 pM、3,000 pM、4,000 pM、5,000 pM、6,000 pM、7,000 pM、8,000 pM、9,000 pM、10,000 pM或大於10,000pM之樣品，諸如500nM。在例示性實施例中，輸入約100 pM足以產生信號以用於可靠信號測定。

【0166】 *基材表面之螢光成像：*所揭示之固相核酸擴增反應調配物及低結合基材可用於各種核酸分析應用中之任一者中，例如核酸鹼基鑑別、核酸鹼基分類、核酸鹼基識別、核酸偵測應用、核酸定序應用及基於核酸(基因及基因組)之診斷性應用。在此等應用中之多者中，螢光成像技

術可用於監測在低結合基材上進行之雜交、擴增及/或定序反應。

【0167】 可以使用熟習此項技術者已知之各種螢光團、螢光成像技術及螢光成像儀器中之任一者進行螢光成像。可(例如，藉由結合至核苷酸、寡核苷酸或蛋白質)使用之適合螢光染料之實例包括但不限於螢光素、羅丹明、香豆素、花青及其衍生物，包括花青衍生物花青染料-3 (Cy3)、花青染料-5 (Cy5)、花青染料-7 (Cy7)等。可使用之螢光成像技術之實例包括但不限於螢光顯微鏡成像、螢光共聚焦成像、雙光子螢光及其類似技術。可使用之螢光成像儀器之實例包括但不限於配備有影像感測器或相機之螢光顯微鏡、共聚焦螢光顯微鏡、雙光子螢光顯微鏡或定製儀器，其包含光源、透鏡、反射鏡、稜鏡、二向色反射器、光圈及影像感測器或相機等之適當選擇。經配備以獲得所揭示之低結合基材表面及於其上雜交之目標核酸序列之經選殖擴增之群落(或團簇)之影像之螢光顯微鏡之非限制性實例為Olympus IX83倒置螢光顯微鏡，其配備有全內反射螢光(TIRF) 20×物鏡、100W Hg燈、針對Cy3螢光激發及發射濾光片最佳化之帶通及雙色鏡濾光片組(例如，使用532 nm寬帶或532 nm短波通濾光片、Semrock 532 nm二向色反射器等)及CCD相機(例如，Olympus EM-CCD相機)，其中調整激發光強度以避免信號飽和。通常，在獲得影像時基材表面可以浸入緩衝液中(例如，25 mM ACES，pH 7.4緩衝液)。

【0168】 在一些情形下，使用所揭示之反應調配物及低結合基材之核酸雜交及/或擴增反應之效能可以使用螢光成像技術評定，其中影像之對比雜訊比(CNR)在評定基材上之擴增特異性及非特異性結合中提供關鍵量度。CNR通常定義為：CNR = (信號-背景) /雜訊。背景術語通常視為針對指定相關區域(ROI)中之特定特點(繞射受限點，DLS)周圍之隙間區

域量測之信號。儘管信號雜訊比(SNR)通常視為總信號質量之基準，其可以展示改善CNR可提供優於SNR之顯著優勢作為用於需要快速影像捕獲(例如，循環時間必須降至最低之定序應用)之應用中之信號質量之基準，如以下實例中所示。如**圖6A**及**圖6B**中所說明，在高CNR下，即使在CNR中等改善之情況下，達至準確鑑別(及因此在定序應用之情況下準確鹼基識別)所需之成像時間可以顯著減少。**圖6A**及**圖6B**提供隨CNR (在**圖6A**中CNR = 1.25且在**圖6B**中12.49)及整合時間(在兩個圖中SNR = 2)變化量測之信號及背景強度(實線)及整合平均值(虛線)的模擬資料，其說明可以藉由使用CNR作為信號質量量度來實現之鑑別得到改善。**圖7**提供影像資料中之改善CNR對準確檢測特點(諸如基材表面上之經選殖擴增之核酸群落)所需之成像整合時間之影響的實例。

【0169】 在大多數基於整體之定序方法中，背景術語通常以與「隙間(interstitial)」區域相關之信號測量(參見**圖8**)。除了「隙間」背景(B_{inter})之外，「隙內(intrastitial)」背景(B_{intra})存在於擴增DNA群落佔據之區域內。此兩種背景信號之組合指示可實現的CNR，且隨後直接影響光學儀器需要、架構費用、試劑費用，操作時間、成本/基因組，且最終影響基於循環陣列之定序應用之準確度及資料品質。B_{inter}背景信號由各種來源產生；幾個實例包括來自可消耗流動槽之自體螢光、產生可能混淆信號與ROI之偽螢光信號之偵測分子之非特異性吸附、非特異性DNA擴增產物(例如由引子二聚體產生之產物)之存在。在典型下一代定序(NGS)應用中，在當前視野(FOV)中之此背景信號隨時間平均及減去。由個別DNA群落產生之信號(亦即FOV中$(S)-B_{inter}$)產生可分類之可辨別特點。在一些情形下，隙內背景(B_{intra})可能貢獻混淆螢光信號，其對相關目標不具有特異

性，但存在於相同ROI中，因此使其極難平均及減去。

【0170】 如在以下實例中證明，本發明之低結合基材上之核酸擴增之實施可藉由減少非特異性結合而減少B_{inter}背景信號，可使特異性核酸擴增改善，且可導致可能影響由隙間及隙內區域產生之背景信號的非特異性擴增減少。在一些情形下，所揭示之低結合基材表面，視情況與所揭示之雜交及/或擴增反應調配物組合使用，比使用習知基材及雜交、擴增及/或定序方案達成者，可導致CNR改善2、5、10、100或1000倍。儘管本文中描述使用螢光成像作為讀出或偵測模式，但相同原理亦適用於使用所揭示之低結合基材及核酸雜交及擴增調配物於其他偵測模式，包括光學及非光學偵測模式兩者。

【0171】 所揭示之低結合基材，視情況與所揭示之雜交及/或擴增方案組合使用，產生固相反應，其呈現：(i)蛋白質及其他反應組分之可忽略的非特異性結合(因此將基板背景降至最低)，(ii)可忽略的非特異性核酸擴增產物，及(iii)提供可調諧核酸擴增反應。儘管本文所述主要在核酸雜交、擴增及定序分析，但熟習此項技術者應理解所揭示之低結合基材可用於多種其他生物分析形式，包括(但不限於)夾心免疫分析、酶聯免疫吸附分析(ELISA)等之任一者中。

【0172】 *系統*：本文提供使用本文所述之表面進行鹼基鑑別或鹼基分類反應之系統。亦提供進行本文所揭示之任何定序方法之一或多個步驟的系統。視情況，系統包括偶合寡核苷酸分子、雜交樣品或目標核酸至經連接之寡核苷酸分子及在表面上偵測信號或使信號成像所必需之組分及試劑。

【0173】 亦提供進行本文所揭示之任何定序方法之一或多個步驟的

系統。視情況，系統包括在基於偵測螢光核苷酸或寡核苷酸之該等定序技術中分析核酸之序列所必需的組分及試劑。用於讀取該等陣列上之螢光信號之偵測儀器可基於落謝螢光或全內反射顯微鏡。已提出使用光學合成定序讀取器之一種偵測儀器。讀取器可包括自流動槽之水通道內之樣品誘發螢光之雷射。螢光由包含一或多個物鏡及管透鏡之成像光學裝置發射及收集。除其他之外，光學成像器包括照明相關區域中之樣品的光源、一或多種偵測器及自相關區域將光直射入偵測器之光學組件。光學成像器亦可包括聚焦機制，其將光學組件之焦點維持在相關區域上以將在偵測器處接收之光接收在焦點中。

【0174】 *鹼基對表徵之方法*：本文提供進行核酸鹼基對鑑別或鹼基對表徵之方法，該方法包含：a)提供表面；其中該表面包含：i)基板；ii)至少一個親水性聚合物塗層；iii)複數個連接至至少一個親水性聚合物塗層之寡核苷酸分子；及iv)至少一個該表面之離散區，其包含黏接至該複數個經連接之寡核苷酸分子的複數個經選殖擴增之樣品核酸分子，其中該複數個經黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少10,000個分子/mm^2之表面密度存在，b)在將樣品核酸分子黏接至該複數個寡核苷酸分子之前或之後在樣品核酸分子上進行核酸擴增反應；及c)進行單核苷酸結合或合併反應之循環系列，其中該等核苷酸用可偵測標籤標記。

【0175】 本文所提供的亦包括藉由利用本文所述之表面或系統進行核酸定序之方法。在一些實施例中，可偵測標籤為螢光團。在一些實施例中，可偵測標籤為花青染料-3 (Cy3)，且其中在第一Cy3標記核苷酸之結合或合併之後，將該表面浸沒在緩衝液中的同時，使用配備有全內反射螢光(TIRF) 20×、0.75 NA物鏡、100W Hg燈、針對532 nm激發及Cy3螢光

發射最佳化之帶通及雙色鏡濾光片組以及CCD相機之Olympus IX83倒置螢光顯微鏡在非信號飽和條件下獲得該表面之螢光影像呈現對比雜訊(CNR)比為至少20。

【0176】 在一些實施例中，核酸擴增反應包含橋式擴增反應。在一些實施例中，核酸擴增反應包含等溫橋式擴增反應。在一些實施例中，核酸擴增反應包含滾環式擴增(RCA)反應。在一些實施例中，核酸擴增反應包含解螺旋酶依賴性擴增反應。在一些實施例中，核酸擴增反應包含重組酶依賴性擴增反應。在一些實施例中，至少一個親水性聚合物塗層呈現水接觸角小於50度。

實例

【0177】 此等實例僅出於說明之目的提供且不限制本文所提供之申請專利範圍之範疇。

實例1-親水性基板

【0178】 進行研究以使用不同分子量及官能性端基之聚(乙二醇)(PEG)分子製備及評估低非特異性結合基材表面。一或多個PEG層經由偶合至官能性端基之矽烷連接至玻璃表面。可用於偶合之官能基之實例包括但不限於生物素、甲氧基醚、羧酸酯、胺、NHS酯、順丁烯二醯亞胺及雙矽烷。具有不同鹼基序列及鹼基修飾之寡核苷酸引子隨後以各種密度繫栓至表面層。表面官能基密度及寡核苷酸濃度均變化以靶向某些引子密度範圍。另外，引子密度可藉由用攜帶相同官能基之其他分子稀釋寡核苷酸來控制。舉例而言，經胺標記之寡核苷酸可以在與經NHS酯塗佈之表面之反應中用經胺標記之聚乙二醇稀釋以降低最終引子密度。亦可應用在雜交區域與表面連接官能基之間具有不同長度之連接子之引子以控制密度。實例

連接子包括引子之5'端處之聚-T及聚-A股(長度為0至20個鹼基)、PEG連接子(長度為3至20個單元)及各種長度之烴鏈連接子(例如，C6、C12、C18等)。為量測引子密度，螢光標記之引子固定至表面，且將螢光讀數與已知濃度之染料溶液之螢光讀數進行比較。

【0179】 需要低非特異性結合(在本文中亦稱為「鈍化」)基板表面以使得諸如蛋白質及核酸之生物分子不「黏」至表面。下文提供使用標準單層表面製劑及各種玻璃表面製劑製備之低非特異性結合(低NSB)表面之實例。在鈍化表面上成功進行核酸擴增形成獨特難題。因為鈍化親水性表面呈現蛋白質及核酸之超低NSB，必須使用新穎條件以實現高鈍化，改善引子沈積反應效率、雜交條件，且誘導有效核酸擴增。固相核酸雜交及擴增方法需要核酸模板連接至低結合或鈍化表面，及後續蛋白質遞送及結合至表面。新穎引子表面結合調配物(藉由Cy3寡核苷酸接枝滴定鑑別)及所得超低非特異性背景(如使用紅色及綠色螢光染料之NSB官能性測試結果評估)之組合證明此等途徑之可行性。

【0180】 為按比例縮放引子密度及將額外維度添加至親水性或兩性表面，已使用PEG及其他親水性聚合物應用及測試多層塗層。藉由使用親水性及兩性表面成層途徑，其包括但不限於本文所述之聚合物/共聚物材料，有可能顯著增加基材表面上之引子負載。使用單層引子沈積方法之習知PEG塗佈之基材已報導用於單分子定序應用，但其不產生針對核酸擴增之高複本數。本文中，吾等揭示「成層」可以使用傳統交聯途徑及化學物質相容性單體或聚合物子單元實現以使得一或多種高度交聯層可以依序建構。適用於用途之聚合物之非限制性實例包括抗生物素蛋白鏈菌素、聚丙烯醯胺、聚酯、葡聚糖、聚離胺酸、聚乙二醇及聚離胺酸共聚物聚丙烯醯

胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯)、(PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯(POEGMA)、聚酯、聚葡萄糖、聚離胺酸、聚乙二醇(PEG)、聚丙烯酸(PAA)、聚(乙烯吡啶)、聚(乙烯基咪唑)及聚離胺酸共聚物。不同層可以使用各種共價或非共價反應中之任一者彼此連接，該等共價或非共價反應包括但不限於生物素-抗生物素蛋白鏈菌素結合、疊氮化物-炔烴點擊反應、胺-NHS酯反應、硫醇-順丁烯二醯亞胺反應及帶正電聚合物與帶負電聚合物之間之離子相互作用。亦可以想到，此等高引子密度材料可以在溶液中構造且在多個步驟中隨後分層至表面上。藉由此方法，有可能產生低NSB/低背景基板表面(**圖9-13**)用於進行固相核酸擴增及定序化學物質，從而提供顯著改善核酸擴增，以使得可調諧信號與背景比率以滿足特異性定序應用之需求(**圖14**及**圖15**)。**圖9**提供來自用於測定綠色螢光染料與根據不同表面修飾方案處理之玻璃基板表面之非特異性結合的相對含量的研究之影像資料之實例。**圖10**提供來自用於測定紅色螢光染料與根據不同表面修飾方案處理之玻璃基板表面之非特異性結合的相對含量的研究之影像資料之實例。**圖11**提供根據不同表面修飾方案處理之基板表面之寡核苷酸引子接枝資料之實例。

【0181】*用硫醇-順丁烯二醯亞胺化學物質製備2層PEG表面之方法：*玻璃載片使用2M KOH處理劑在室溫下清潔30分鐘，洗滌，且隨後表面矽烷醇基團使用氧電漿活化。以乙醇中0.1%之濃度應用Silane-PEG5K-Thiol (Creative PEGWorks, Inc., Durham, NC)。2小時塗佈反應之後，載片用乙醇及水徹底洗滌，且隨後與2.5 mM之含戊酸順丁烯二醯亞胺-PEG-丁二醯亞胺酯(MW = 20K)之二甲基甲醯胺(DMF)反應30分鐘。所得表面經洗滌且在室溫下與5'-胺標記之寡核苷酸引子即時反應2小時。過量丁二

醯亞胺基酯藉由在引子固定之後與100 mM甘胺酸(pH9)反應而失活。

【0182】*用NHS酯-胺化學物質製備多層PEG表面之方法：*玻璃載片藉由2M KOH處理劑在室溫下清潔30分鐘，洗滌，且隨後表面矽烷醇基團使用氧電漿活化。以乙醇中0.5%之濃度應用Silane-PEG2K-amine (Nanocs, Inc., New York, NY)。2小時塗佈反應之後，載片用乙醇及水徹底洗滌。在溶劑組合物中在室溫下引入100 uM之8臂PEG NHS (MW = 10K, Creative PEGWorks, Inc., Durham, NC)維持20分鐘，該溶劑組合物可包括 5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%有機溶劑及5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%低離子強度緩衝液。所得表面經洗滌且與20 μM多臂PEG胺(MW = 10K, Creative PEGWorks, Inc., Durham, NC)反應2小時。所得胺-PEG表面隨後以不同濃度與多臂PEG-NHS及胺標記之寡核苷酸引子之混合物反應。可以重複此過程以在表面上產生額外PEG層。

【0183】*固相等溫擴增：*考慮到各種等溫擴增方法，可以展示各等溫擴增方法具有獨特最佳引子密度範圍，其需要可調諧表面塗層以最大化擴增效率。在一些情況下，較高引子表面密度隨較大模板複本數按比例縮放(**圖15**)。在一些情況下，儘管引子之較高表面密度可以針對一些擴增途徑產生高前景信號(亦即，序列特異性信號)，但其可產生高背景信號，且因此證實對其他擴增途徑有害。在**圖16**中，引子沈積濃度在圖之頂部展示，同時所測試之各種解螺旋酶等溫擴增調配物在等溫擴增反應之後所得表面之所獲影像中指定。若特異性擴增出現，則預期各表面之影像呈現紅色。如自**圖16**中之調配物「58」之影像系列顯而易見，隨著引子密度提高，顏色自紅色淡化成綠色，因此指示特異性擴增減少。另外，可看出，

在擴增反應調配物中包括甜菜鹼(常見緩衝液添加劑)降低非特異性擴增有利於特異性擴增的程度，從而使信號更亮且CNR得到改善。低結合分層基材表面之組合、引子之可調諧表面密度、雜交及/或擴增反應調配物之改善(包括緩衝液組分及添加劑之調整(例如，緩衝液、pH、溶劑、離子強度、洗滌劑、甲醯胺、甜菜鹼、擁擠劑及其他添加劑等之選擇)及擴增速率及特異性之所得改善應導致核酸之下一代定序之前所未有的改善。

【0184】 本發明解決實現用於需要信號增強之各種應用(諸如核酸偵測、定序及診斷應用)之親水性基板上的庫核酸股之高度單株擴增之難題。用於產生庫核酸股之單株團簇之核酸擴增之習知等溫方法受限且具有缺陷。其效能限制之實例包括長的簇聚時間(例如，2+小時)、高溫(例如，60℃或更高)要求、無法在某些表面上有效擴增/簇聚、費用高、多克隆性問題、試劑穩定性問題等。儘管文獻中描述大量等溫擴增方法，但僅有一或兩個方法已成功應用於商業定序應用。本文中，吾等提出等溫擴增策略，其成功產生用於諸如DNA定序之應用之庫DNA片段(或其他核酸)之單株複本之團簇且消除或緩解前述問題。

【0185】 發展整體DNA擴增/DNA定序組合物變化以減少背景信號(B_{inter}及B_{intra})且有助於低結合基板上之受控DNA擴增之設計標準包括：(i)與傳統/先前技術途徑相比減少隙間區域(B_{inter})中之非特異性DNA擴增(例如，由於引子二聚體擴增)，(ii)與傳統/先前技術途徑相比減少特異性DNA群落內(B_{intra})非特異性DNA擴增產物(例如，引子二聚體)之量，(iii)增加低結合基板上之特異性DNA擴增(例如，反應時間、循環時間、引子表面密度滴定、引子表面密度、引子序列等)之控制，以使得信號與背景(S/B)比降低，即使在不存在雜交及擴增調配物改善下。

實例2-具有改善特異性之低結合表面上之解螺旋酶依賴性擴增

【0186】 眾所周知，解螺旋酶依賴性擴增高度易於非特異性擴增，諸如引子二聚體形成。吾等可以藉由以下方法之任何組合減少表面上之此非特異性擴增：(i)設計產生較少引子二聚體之寡核苷酸引子，(ii)調整多層基材表面上之引子表面密度，(iii)在較高溫度下使用嗜熱性酶進行反應，(iv)組合使用諸如上文提及之彼等之擴增緩衝液添加劑及非自吸式引子序列，及(v)引入一或多個完整核酸變性及引子雜交步驟。

【0187】 *在SSB蛋白不存在下低NSB表面上之特異性解螺旋酶依賴性擴增：*直鏈模板股之解螺旋酶依賴性擴增可以利用低結合表面上之減少之非特異性擴增及高度有效選殖擴增來實現。表面上之正向引子在單股模板庫股上使用含有聚合酶及解螺旋酶之擴增反應混合物延伸。隨後，視情況，使模板股變性且洗掉。可替代地，雙螺旋體可藉由解螺旋酶活動展開。任一方法使得自表面結合之引子延伸之正向股部分地或完全地呈單股形式。隨後，表面繫栓之反向引子雜合至此正向股，且亦延伸，從而形成雙股橋結構。反應混合物中存在之解螺旋酶使中間雙股擴增子股展開，該等中間雙股擴增子股隨後可用以再雜交至其他自由表面繫栓之引子以用於後續輪的擴增。為此發生，展開程度不需要為廣泛的-恰好足以將引子雜交區域轉化為單股組分(末端磨損)以允許後續表面結合之引子之雜交。用於此反應之解螺旋酶應能夠自橋結構之末端開始展開，且可為3'至5'解螺旋酶或5'至3'解螺旋酶。在一些情況下，其可為超家族1、2、3、4、5或6解螺旋酶。在一些情況下，其可為高度進行性解螺旋酶(亦即，能夠展開多種連續鹼基對而不釋放單股或雙股結構)或具有受限持續合成能力之解螺旋酶。呈現較高持續合成能力之超家族1解螺旋酶之某些突變體，諸如

解螺旋酶UvrD之UvrD303突變體可用於此擴增方案中。

【0188】 為促進藉由5'至3'解螺旋酶展開，一個或兩個表面繫栓之引子之全部或一部分可包括修飾以形成5'至3'解螺旋酶之特異性負載位點。在自此類引子延伸之模板核酸上，修飾位點將充當聚合酶終止點，從而使表面結合點與修飾位點之間之引子序列之鏈段始終呈單股形式。此鏈段將充當具有5'至3'方向性之解螺旋酶之負載位點，因為許多解螺旋酶具有好得多的單股核酸結合親和力，引導及促進基材表面上之解螺旋酶依賴性擴增所需的5'至3'解螺旋酶展開活動。可使用之引子修飾之實例包括但不限於將PEG鏈插入兩個核苷酸之間之引子朝向5'端之主鏈中，插入無鹼基核苷酸(亦即，既不具有嘌呤亦不具有嘧啶鹼基之核苷酸)，或可以由解螺旋酶繞過之病灶位點。

【0189】 多種解螺旋酶具有輔助因子蛋白質及特異性構形，其活化或增強解螺旋酶活性活性。實例包括但不限於來自Bst之PcrA解螺旋酶之RepD蛋白、大腸桿菌(*E. coli*) Rep解螺旋酶之φ X基因蛋白A及UvrD解螺旋酶之MutL蛋白。此等輔助蛋白之添加可以使所需展開活性更有效地，且因此進一步促進解螺旋酶依賴性等溫擴增。此等輔助因子中之一些具有可以添加至引子以引導展開活性之特異性結合序列或部分。

【0190】 當使用缺乏單股結合(SSB)蛋白(例如，內部參考調配物58號)之嗜溫性解螺旋酶及股置換聚合酶調配物時，解螺旋酶擴增調配物展示減弱之非特異性擴增。不同於大多數解螺旋酶依賴性擴增途徑之情況，觀測到自調配物排除單股結合蛋白(其通常用於破壞瞬時非特異性雜交)減少非特異性擴增。展示各種調配物變化以緩和低結合表面上之非特異性雜交之增加。

【0191】 *改善解螺旋酶依賴性擴增之調配物組合物改變：*通常已知諸如甜菜鹼之添加劑減少在溶液中進行之等溫擴增反應之非特異性擴增。標準變得更具限制性，因為需要高引子表面密度來支持可調諧擴增及模板核酸群落之高複本數。在高引子密度下，非特異性擴增開始助長所得群落中之高模板複本數之益處(**圖16**)。因此，已發現額外添加劑調配物，其助長模板核酸群落內之非特異性擴增。在**圖16**中所示之實例中，可以明確看出，將甜菜鹼添加至調配物58號在較高引子密度表面上形成更特異性擴增(由紅色指示)。除了甜菜鹼之外，有可能組合多種不同反應調配物組分以實現溶液中及低結合表面上(**圖17**及**圖18**)之較高擴增特異性。

【0192】 有機溶劑，諸如乙腈、DMSO、DMF、乙醇、甲醇及類似化合物藉由寡核苷酸脫水方法改變單股及雙股核酸之結構。已知諸如2-吡咯啶酮及甲醯胺之化合物降低核酸之熔融溫度，且減少來自高GC含量寡核苷酸之二級結構。亦已知擁擠劑穩定核酸結構。在低pH緩衝液中，鹼基配對中之雜交及氫鍵結變得更有利。當組合此等各別調配物中之各者之不同屬性時，與傳統途徑相比有可能使寡核苷酸序列之特異性黏接增加超過2個數量級。藉由組合此等化合物及將其添加下文所述之擴增調配物，諸如由引子二聚體產生之非特異性擴增顯著減弱，且在溶液中(**圖17**)及在所揭示之低NSB表面(**圖18**)上仍然觀測到良好產率之特異性擴增產物。

實例3-經修飾滾環式多重置換擴增(經修飾RCA-MDA)

【0193】 核酸庫片段接合至銜接子序列(其含有正向、反向及定序引子，及任何鑑別/條形碼序列)且在溶液中或在低結合表面上環化。

【0194】 環化ssDNA隨後在溶液中或在表面上由正向表面引子捕獲或雜交至正向表面引子，且藉由股置換聚合酶在RCA反應中延伸，這製得

庫核酸及銜接子序列之單股連環複本。反向引子在多個位置處雜交至此連環正向模板，且藉由RCA反應混合物延伸，從而製得連環反向複本。在此過程期間反向股彼此置換。上游反向股延伸將置換下游延伸，因此形成單股連環反向股。添加解螺旋酶可能產生核酸之單股區域，其持續足夠長以重啟雜交且觸發置換級聯，這可以相對受控方式增加擴增複本數。可替代地，添加重組酶及輔助蛋白可在稱為股侵入之方法中使引子雜交至雙螺旋DNA之同源區域中。此將重啟置換及雜交級聯，且增加群落複本數。

【0195】 RCA-MDA群落之複本數藉由引子表面密度來測定，其指示初始連環體或置換連環體如何常常及成功地與正向及反向引子雜交。已證實低結合表面上提高之引子密度在此等團簇中產生較高擴增複本數(**圖15**)。總而言之，使用以下方法中之一種或組合有可能增加複本數或特異性擴增，且減少低結合表面上之非特異性擴增：(i)特異性複本數可以利用藉由調配物變化來提高引子模板雜交之效率而增加(**圖16**)，(ii)特異性複本數可以藉由提高低結合基板上之引子密度而增加(**圖14**及**圖15**)，(iii)引子二聚體之非特異性擴增或嵌合DNA產生可以藉由使用上文所述之添加劑減少，(iv)擴增培育溫度可以使用熱穩定酶以及如先前所述之調配物變化而升高從而減少非特異性擴增，(v)包含非自身雜交引子序列之引子組合物可與添加劑及/或升高之擴增培育溫度組合使用以減少非特異性引子二聚體擴增。

實例4-單股DNA結合(SSB)蛋白介導之等溫擴增

【0196】 SSB蛋白可解析核酸股中之二級結構，穩定展開之後之單股DNA，防止或破壞兩條核酸股之瞬時非廣泛雜交(前驅體至引子二聚體擴增)，促進短寡核苷酸特異性雜交至目標寡核苷酸中之正確互補區，且

使酶與單股及雙股核酸之分叉接合點相互作用且引導酶至單股及雙股核酸之分叉接合點。SSB中之C端截短突變據報導移除與ssDNA之協作結合，同時其單體呈現與ssDNA更強的結合，且降低dsDNA之熔融溫度。舉例而言，與野生型蛋白質之效能相比，噬菌體SSB蛋白之C端截短突變T4 gp32產生使dsDNA之熔融溫度降低數十度的蛋白質(gp32ΔC)。

【0197】 在此擴增方案中，吾等將此等蛋白質用於包含截短及野生型SSB蛋白兩者(及股置換聚合酶)之調配物中以瞬時熔融雙股核酸橋中間物之末端且允許表面引子雜交及引子延伸。即使SSB減緩核酸雜交，已知其通常促進特異性雜交。因此，舉例而言，使用截短SSB蛋白，諸如T4 gp32ΔC可使橋接核酸結構中之3'端更高效地雜交至其他自由表面繫栓之引子。儘管此亦將破壞新近形成之引子模板複合物，但最佳化調配物應藉由股置換聚合酶使該等複合物延伸。在多種噬菌體(例如T4 gp32)、細菌、古菌、真菌及真核生物中發現SSB蛋白。一些為熱穩定SSB蛋白，其中C端截短形式可允許在最佳化較高溫度下更高效核酸末端熔融，因此在較高溫度下利用較低非特異性擴增時允許SSB依賴性嗜熱性擴增。

【0198】 藉由使用諸如上文提及之彼等的添加劑、引子序列設計及特異性雜交及/或與適當溫度及化學耐受性酶及蛋白質一起使用的擴增調配物及最佳化溫度，可以調適此擴增方法以驅使高度特異性擴增，同時消除非特異性擴增。

【0199】 此方案可用於擴增環狀DNA以及線性DNA，其中藉由股置換聚合酶各自開始延伸可導致多個後續多重置換擴增事件，其產生環狀DNA模板之連環複本(參見以上經修飾RCA-MDA之部分)。

【0200】 吾等已發現環狀庫DNA之SSB介導之擴增(使用例如phi29

SSB)比傳統RCA快得多(例如需要僅30分鐘至1小時之擴增時間對比對於傳統RCA的2至3小時)。在溶液中進行之SSB介導之擴增之產物以連環梯形式在凝膠上操作。

實例5-低結合表面上之低溫熱循環橋式擴增

【0201】 藉由使用改善雜交及/或擴增調配物、熱穩定SSB蛋白及/或截短SSB蛋白之添加劑之組合，已開發出可以在比Mullis之原PCR揭示案中概述之傳統方法更低的溫度下熱循環。在此方案中，可使用驅使核酸雜交之添加劑及低於其傳統值之去雜交溫度。舉例而言，甲醯胺常用於降低DNA之熔融溫度(T_m)，且可在約60度之溫度下進行後續DNA去雜交。另一方面，再黏接溫度通常亦需要高溫(95℃)至接近室溫之溫度勻變。有可能形成調配物，以使得再黏接溫度嚴格度可以顯著降低。使用此類調配物將構成優於傳統橋式擴增法之顯著改善，以使得溫度勻變可在20與60度之間進行。低結合基板上之溫度勻變需要及改善雜交嚴格度之降低可產生優於傳統橋式擴增之以下優點：(i)減少擴增時間；(ii)簡化儀器設計，(iii)藉由更快及更特異性雜交減少試劑使用，產生更高效的擴增速率，及(iv)減少試劑費用。亦有可能展示改善雜交之嚴格度將減少基材表面上之擴增所需的擴增循環數。

【0202】 **圖19A-B**提供說明雜交效率之改善之資料之實例，其與習知雜交調配物(**圖19B**)之彼等相比可以使用低非特異性結合基材及本發明之改善雜交調配物(**圖19A**)獲得。

【0203】 **圖20**說明使用所揭示之低結合基材及本發明之雜交/擴增反應調配物之核酸定序的工作流及從而可以實現之處理時間之非限制性實例。

實例6-用硫醇-順丁烯二醯亞胺化學物質製備2層PEG表面

【0204】 化學處理玻璃載片以移除有機物且活化用於矽烷偶合(各種方法包括電漿處理、食人魚溶液蝕刻、鹼洗滌、鹼浴、高溫玻璃黏接及其任何組合)之羥基。Silane-PEG5K-Thiol (Creative PEGWorks, Inc)以乙醇溶液中0.1%之濃度應用。2小時塗佈反應之後，載片用乙醇及水徹底洗滌，且隨後與2.5 mM之含戊酸順丁烯二醯亞胺-PEG-丁二醯亞胺酯(MW 20K)之DMF反應30分鐘。所得表面經洗滌且在室溫下與5'-胺標記之寡核苷酸引子即時反應2小時。過量丁二醯亞胺基酯利用在引子固定之後PH9下之100 mM甘胺酸失活。此途徑經由超過傳統方法之有效引子及聚合物迭代偶合，賦予可忽略的低結合固體基材表面達幾乎2個數量級。

實例7-用NHS酯胺化學物質製備多層PEG表面

【0205】 化學處理玻璃載片以移除有機物且活化用於矽烷偶合(各種方法包括電漿處理、食人魚溶液蝕刻、鹼洗滌、鹼浴、高溫玻璃黏接及其任何組合)之羥基。Silane-PEG-amine (Nanocs, Inc)以乾淨的乙醇溶液中0.1% - 2%之濃度應用。2小時塗佈反應之後，載片用乙醇及水徹底洗滌。經5-30分鐘在室溫下將多臂PEG NHS引入溶劑組合物中，該溶劑組合物可包括5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%有機溶劑及5、10、20、30、40、50、60、70、80或90%低離子強度緩衝液。所得表面經洗滌且與多臂PEG胺(MW 10k, Creative PEGWorks, Inc)反應。所得胺-PEG表面隨後以不同濃度與多臂PEG NHS及胺標記之寡核苷酸引子之混合物反應。可以重複此過程以在表面上產生額外PEG層。此途徑經由超過傳統方法之有效引子及聚合物迭代偶合，賦予可忽略的低結合固體基材表面達幾乎2個數量級。

實例8-團簇資料上之CNR之計算

【0206】 通常，當螢光偵測用於固相分析時，由繫栓及/或擴增分子產生之信號與報導子染料分子偶合或繼之以連接報導子染料分子。此方法產生特異性及非特異性信號。非特異性組分通常稱作非特異性雜訊或背景(由隙間或隙內貢獻產生)，其干擾特異性信號之量測，且降低對比雜訊比(CNR)。

【0207】 非特異性背景可以自非特異性吸附至基材表面之染料分子或自例如表面上之引子-二聚體配對之非特異性擴增產生。當螢光報導子用於標記所關注之特異性分子時，兩種機制產生實質上螢光背景。

【0208】 所揭示之低結合基材表面及所用相關方法證明在將非特異性背景降至最低方面的顯著改善。如下文所述之實例中所示，估算之非特異性背景遠低於使用指定擴增方法及基材表面之總信號的10%。另一方面，習知擴增方法及基材表面通常產生總信號之30%至50%之背景信號。

【0209】 應注意，如本文所用，非特異性背景或雜訊為總系統雜訊之僅一種組分，其亦可包括來自偵測系統之其他貢獻，諸如光子散粒雜訊、自體螢光背景、影像感測器雜訊、照明雜訊(例如，由照明強度之波動產生)等。就此而言，或許有可能藉由新穎基材表面及相關雜交及擴增方法延伸用於CNR改善之所揭示之途徑，以藉由例如在多個分析反應循環內校正可以諸如藉由使用預定相及定相由傳統合成定序產生之信號雜質，以及校正藉由損失DNA股及/或由嚴格的洗滌條件或解塊(可逆終止子移除)產生之DNA受損發生之誤差來實現用於NGS及其他生物分析技術之甚至更大的改善。

【0210】 大體而言，用於量測固相生物分析之CNR之分析包括以下

步驟：

【0211】(1)製備所揭示之低結合基板以用相關受體、目標及/或捕獲寡核苷酸官能化。

【0212】(2)捕獲受體、目標及/或捕獲寡核苷酸，其可以直接經標記或可為後續標記反應之前驅體。若不需要擴增或額外探針標記步驟，則吾人前進至步驟5。若需要探針標記步驟以形成報導子，則吾人前進至步驟4。否則，吾人前進至步驟3。

【0213】(3)經由傳統免疫分析信號擴增、寡核苷酸複製擴增(例如，使用橋式擴增、等溫擴增、RCA擴增策略、HDA擴增或RCA-MDA擴增策略)進行受體、目標及/或捕獲寡核苷酸之擴增。

【0214】(4)用報導子標記(例如，藉由使用螢光物種或其他類型之報導子)探測經擴增目標。此步驟適用於基於任何表面之生物分析，包括但不限於基因型分析、核酸定序或基於表面之目標/受體鑑別。

【0215】(5)進行適當的偵測方法。對於螢光成像，偵測方法可以各種方式經結構設計。舉例而言，傳統光學顯微法將包括以下組分之所有或子組：照明或激發光源、物鏡、樣品、其他光學組件(諸如管透鏡、光學濾光片、二向色反射器等)，及偵測模式(例如，使用EMCCD相機、CCD相機、sCMOS、CMOS、PMT、APD或用於量測光度(light level)之其他傳統方法)。對於基於非光之偵測，可使用各種方式量測電信號，該等方式包括但不限於場效電晶體(FET)偵測、電信號(直流或交流)之基於電極之量測、穿隧電流、磁性信號之量測等。

【0216】使用來自指定視野(FOV)之成像及信號處理來計算CNR在**圖8**中進行說明，其中如圖中所說明，CNR = (信號- 背景)/(雜訊)，且其

中背景= ($B_{隙間}$+ $B_{隙內}$)。

【0217】 對於本發明之低結合基材上之核酸序列之經選殖擴增之團簇地CNR之計算之以下實例，影像分析程式用於發現代表性前景明亮的點(「團簇」)。通常，點定義為呈現高於某一強度臨限值之光強度地影像像素之小的連接區域。僅將包含屬於指定範圍內之總像素計數之連接區域視為點或團簇。忽略就像素數目而言過大或過小之區域。

【0218】 一旦已鑑別數個點或團簇，便計算平均點或前景強度及其他信號統計資料，例如，可計算最大強度、平均強度及/或內插最大強度。所有點強度之中值或平均值用於表示點前景強度。

【0219】 可以使用不同若干方法中之一者測定背景區域強度之代表性估計值。一種方法為將影像分成各自包括例如25 × 25個像素之多個小「塊」。各平鋪區內，丟棄最亮像素之某一百分比(例如，25%)，且針對殘留像素計算強度統計資料。用於測定背景強度之另一方法為選擇至少500個像素或更大之區域，該區域不含任何前景「點」(如前一步驟中所定義)，且隨後計算強度統計資料。對於此等方法中之任一者，隨後計算代表性背景強度(中值或平均值)及標準差。將選定區域中之強度之標準差用作代表性背景變化。

【0220】 對比雜訊比(CNR)隨後計算為(前景強度-背景強度) / (背景標準差)。

【0221】 **圖21-23**提供原始影像資料及強度資料直方圖之實例，其用於計算核酸擴增方法及本文所述之低結合基材之差異組合的CNR。在此等實例中之每一者中，上部直方圖為背景像素強度直方圖，下部直方圖為前景點強度直方圖，且亦包括原影像之一部分。應注意，影像不在相同強

度等級上，因此視覺亮度感知不表示實際強度。

【0222】 對於此等實例，使用先前論述之方法形成低結合固體基材。使用所揭示之方法在不同密度下接枝寡核苷酸引子(視所用擴增方案而定之一或兩個引子序列)。此等實驗中之每一者之表面密度估計為大約100K個引子/μm^2。使用以下方法估算引子表面密度：(i)螢光滴定曲線使用GE Typhoon (GE Healthcare Lifesciences, Pittsburgh, PA)及含有已知濃度之Cy3-dCTP之已知面積(40 mm^2)、高度(0.5 mm)及體積(200 μl)之毛細管流動槽製備，(ii)接枝至低結合基材之引子使用習知雜交方案(在37℃下或在室溫(RT)下3次鹽水檸檬酸鈉(SSC)；雜交條件應表徵完整性)雜交至經Cy3標記之互補寡核苷酸，使用用於產生校準曲線之相同GE Typhoon儀器來量測表面上之所得信號的螢光強度，(iii)且基於所量測表面信號與校準曲線之比較計算每單位面積表面所繫栓之引子分子數目。

【0223】 DNA庫序列隨後雜交至所繫栓之引子。用於庫雜交步驟之雜交方案可視表面特性而變化，但需要受控庫輸入以形成可解析的DNA擴增群落。

【0224】 DNA擴增針對此實例使用以下方案進行：(i)在28次循環下之橋式擴增，其中引子密度為大約100K個引子/um^2，(ii)在28次循環下之橋式擴增，其中較高引子密度> 500K個引子/um^2，且(iii)滾環式擴增(RCA) 90分鐘，其中引子密度為大約100K個引子/um^2。

【0225】 擴增後，經擴增DNA與互補「定序」引子雜交，且添加包含經Cy3標記之dNTP(「第一鹼基」分析)之定序反應混合物以測定用於各別方法中之各者之第一鹼基CNR。用於「第一鹼基分析」之定序反應混合物可包括經標記核苷酸(以使得可以區分4個鹼基)、合併經修飾之三磷酸

核苷酸(dNTP)之酶及相關合併緩衝液、金屬陽離子及輔因子等之任何組合。

【0226】 在第一鹼基合併之後，定序反應混合物與緩衝液交換，使用相同GE Typhoon儀器進行成像，且在所得影像上計算CNR。

【0227】 **圖21**提供本發明之低結合基材之螢光影像及強度資料之實例，在本發明之低結合基材上固相核酸擴增使用引子密度為大約100K個引子/um^2之在28次循環下的橋式擴增進行以形成模板寡核苷酸序列之經選殖擴增之團簇。在此實例中，背景強度為592個計數(標準差為66.5個計數)，前景強度為1047.3個計數，且經計算CNR = (1047.3-592)/66.5 = 455.3/66.5 = 6.8。估算非特異性雜訊= (592-100)/(1047-100) = 52%。

【0228】 **圖22**提供本發明之低結合基材之螢光影像及強度資料之第二實例，在本發明之低結合基材上固相核酸擴增使用較高引子密度>500K個引子/um^2之在28次循環下的橋式擴增進行以形成模板寡核苷酸序列之經選殖擴增之團簇。在此實例中，背景強度為680個計數(其中標準差為118.2個計數)，前景強度為1773個計數，且經計算CNR = (1773-680)/118.2 = 1093/118.2 = 9.2。估算非特異性雜訊= (680-100)/(1773-100) = 35%。

【0229】 **圖23**提供本發明之低結合基材之螢光影像及強度資料之實例，在本發明之低結合基材上固相核酸擴增使用引子密度為大約100 K個引子/um^2之滾環式擴增(RCA)進行90分鐘以形成模板寡核苷酸序列之經選殖擴增之團簇。在此實例中，背景強度為254個計數(其中標準差為22.7個計數)，前景強度為6161個計數，且經計算CNR = (6161-254)/22.7 = 5907/22.7 = 260。注意，經由使用低結合表面積及擴增方案之此組合實

現之CNR顯著改善。估算非特異性雜訊= (254-100)/(6161-100) = 3%。

實例9-聚合物基材表面之修飾

【0230】 出於本文所揭示之目的之表面之修飾涉及製造針對多種化學基團(-R)，包括胺具有反應性的表面。當在適當的基板上製備時，此等反應性表面可以在室溫下長期儲存，例如至少3個月或更久。該等表面可以進一步與如本文中其他處所述之核酸之表面擴增上的R-PEG及R-引子低聚物接枝。塑膠表面，諸如環烯烴聚合物(COP)可以使用許多此項技術中已知之方法中之任一者修飾。舉例而言，其可以用Ti:藍寶石雷射切除、UV介導之乙二醇甲基丙烯酸酯光接枝、電漿處理或機械攪動(例如，噴砂或拋光等)處理以形成可針對多種化學基團，諸如胺保持反應性數個月的親水性表面。此等基團可隨後允許鈍化聚合物(諸如PEG)或生物分子(諸如DNA或蛋白質)之結合而無生物化學活性損失。舉例而言，DNA引子寡聚物之連接允許鈍化塑膠表面上之DNA擴增，同時使蛋白質、螢光團分子或其他疏水性分子之非特異性吸附降至最低。

【0231】 另外，表面修飾可以與例如雷射印刷或UV遮蓋合併以形成經圖案化表面。此允許DNA寡聚物、蛋白質或其他部分之圖案化連接，提供基於表面之酶活性、結合、偵測或處理。舉例而言，DNA寡聚物可用於僅在圖案化特點內擴增DNA，或以圖案化方式捕獲經擴增長的DNA連環體。在一些實施例中，酶島狀物可以在能夠與基於溶液之基板反應的圖案化區域中產生。因為塑膠表面尤其易受此等處理模式影響，在一些實施例中，如本文中涵蓋，塑膠表面可以識別為尤其有利的。

【0232】 此外，塑膠可以注射模製、軋花或3D印刷以形成任何形狀，包括比玻璃基板容易得多的微流體裝置，且因此可用於形成結合及分

析多個結構設計中之生物樣品之表面，例如用於生物標籤偵測或DNA定序之樣品-所得微流體芯片。

【0233】 已實現經修飾塑膠表面上之特異性局部DNA擴增，其在用螢光標記探測時產生具有超高對比度雜訊比及非常低的背景之點。

【0234】 吾等已使代表性親水性及胺反應性環烯烴聚合物表面與胺-引子及胺-PEG接枝，且發現其支持滾環式擴增。吾等隨後發現在用螢光團標記之引子探測時，或在經標記之dNTP藉由聚合酶添加至雜交引子時，觀測到DNA擴增子之亮點呈現高於100之雜訊比，其中背景極其低，指示高度特異性擴增，及超低程度之蛋白質及疏水性螢光團結合，其標誌著高準確度偵測系統，諸如基於螢光之DNA定序器。

【0235】 本文中，測試塑膠流動槽，其填入所繫栓之DNA團簇且針對庫序列之第1鹼基進行探測。對於具有DNA之表面之群體，如在實例1及7及中本文中其他處先前描述，對於PEG-NHS塗佈之玻璃表面，親水性環烯烴聚合物(COP)塑膠表面與25聚體胺-引子1、胺-引子2及胺-5K PEG接枝。除了庫插入序列之外還含有引子2序列、定序引子序列及與引子1互補之序列的5 pM環化DNA庫隨後雜交至表面維持15分鐘。滾環式擴增(RCA)隨後如實例2-5中及本文中其他處所述進行以形成長度為至多0.5-1 Mb之連環序列DNA卷。雜交定序引子，且使用經螢光團標記之dNTP組使第1鹼基與聚合酶合併以標記如**圖25A**中所示具有3種不同顏色的團簇。

【0236】 進行使用相同參數之平行實驗，以玻璃起始而非COP表面(具有如實例7中所述之表面製劑)以提供鈍化玻璃與鈍化COP表面之間之比較。如**圖25A-B**中所示，藉由合併第一經螢光標記之基於COP之表面產生之信號與在類似處理之玻璃表面上所獲得的相當，兩者均就觀測到的點

之強度及解析度而言。此表明本文所揭示之方法提供製備用於固定、擴增及偵測核酸之表面之通用方法。

【0237】 針對玻璃及塑膠測定強度及CNR。吾人在**圖26A**處看到，玻璃及塑膠在基本上高於背景之偵測條件下呈現信號之強度。對於玻璃及塑膠兩者，信號之強度在左側，且在右側描繪背景。吾人在**圖26B**處看到，玻璃及塑膠之CNR在所分析之條件下高於50。

實例10-表面產生

【0238】 呈現可忽略的非特異性結合至有機染料及蛋白質、呈現至多高達至少95℃之穩定性、對高pH (0.1 M NaOH)、低pH (> 5.0)；有機溶劑(甲醇、乙醇、乙腈、甲醯胺、氧化劑、膦)之化學穩定性、長期儲存穩定性、低輸入庫需要及可調式引子負載的表面如下產生。該方法包含清潔及矽烷化或鈍化表面。

【0239】 表面使用2M KOH以及alconox/hellmanex洗滌劑洗滌且使用乙醇沖洗。隨後將表面加熱至560℃以暴露OH基團。表面交替或組合經歷電漿處理。

【0240】 表面使用5 mg/mL Silane-5kPEG-NHS (99.9%乙醇/0.01%乙酸)矽烷化，且加熱至65℃，且使用KOH/洗滌劑/熱清潔表面測試。替代地或組合地，表面使用10 mg/mL Silane-5kPEG-NHS (90% DMF/10% 100mM MES PH 5.5)矽烷化，且加熱至25℃，且使用KOH/清潔劑/熱清潔表面或用電漿處理表面來測試。

【0241】 多種染料與此等表面相容，諸如Cy3-C、R11-U、Cy3.5C、647N-A、Cy5-G、660-U、Cy5.5-C (注意；僅200 nM下之染料)。例示性染料混合物包含Cy3-A、Cy3.5-C、Cy5-U、AHO690-G。

【0242】 在低濃度(5.0×10^4個引子/um^2)下、在高濃度(1.0×10^7個引子/um^2)下且在由此範圍之此等端點或之外界定之範圍內的值之濃度下，該等表面可調諧地負載有引子。

【0243】 濃度視情況如下量測。製造不同濃度之Cy3-dCTP溶液，用GE Typhoon (GE Healthcare Lifesciences, Pittsburgh, PA)或具有固定尺寸(0.5 mm × 5 mm或其他面積)之毛細管中之適合儀器量測FL強度。當面積已知且分子數目為已知時，此產生引子負載。

【0244】 已使用此途徑來量測呈80,000、160,000、320,000、640,000、1,300,000、2,600,000及5,100,000個引子/um^2之濃度，且容易地可達到由此範圍之此等端點或之外界定的範圍內地值之其他濃度。此等密度藉由存在如本文所揭示之多層PEG或其他表面來促進。

【0245】 可見表面在一週儲存期間未展示穩定性之顯著降低。

【0246】 針對多個表面變體量測密度且結果看起來如下。暴露於7 uM引子預負載之兩個層的PEG胺-APTES上之3層多臂PEG (8,16,8)呈現表面上之濃度為2,000,000至10,000,000。使用星形PEG-胺置換啞鈴形16聚體及64聚體針對在暴露於8 uM引子之PEG胺-APTES上之3層多臂PEG (8,16,8)及(8,64,8)及3層多臂PEG (8,8,8)觀測到類似濃度。

【0247】 使用此等途徑，觀測到增加之引子密度產生較高前景強度、較高群落密度及較高CNR。舉例而言，10 pM輸入在引子密度<1.0×10^4個引子/um^2之表面上產生10之CNR，而類似輸入在引子密度>1.0×10^6個引子/um^2下產生40-60之CNR。

實例11-高CNR表面產生高品質資料。

【0248】 關於其在對應於第一及第二染料之第一通道及第二通道處

所偵測之螢光，測試當前目前先進技術表面，及低及高CNR表面，諸如本文所揭示之彼等表面。

【0249】 吾人觀測到，隨著CNR增加，吾人看到個別偵測事件之更清晰解析度。此等偵測事件沿著對應於染料發射光譜之不同軸線對準，而非與如圖27之頂部三個檔案中所見之較高誤差『雲』對準。 轉至圖27之底部三個檔案，此更準確資料收集自身表現為在特定預期波長下之更窄較高峰及在中間位置處之更少資料點。此更清晰地解析之資料集轉化為由在高CNR表面上進行之分析產生的更準確的基於螢光之鹼基識別。

實例12-經選殖擴增之多聚目標寡核苷酸分子

【0250】 **圖28**提供與包含高表面密度之寡核苷酸銜接子或引子分子之表面(左)雜交且與包含較低表面密度之寡核苷酸銜接子或引子分子之表面(右)雜交的經選殖擴增之多聚目標寡核苷酸序列之示意圖，且說明可實現的CNR之所得改善。製備若干表面以具有高於2000個分子/uM^2之寡核苷酸密度，且表面之螢光影像具有大於20之對比雜訊比。

實例13-輸入核酸需要減少

【0251】 **圖29**提供對本發明之低結合基材表面進行傳統雜交反應且對本發明之低結合基材表面進行最佳化雜交反應的實驗結果之比較。在使寡核苷酸引子連接至低結合基材表面之後，目標核酸與寡核苷酸引子之有效雜交可能在低結合表面上遭受碰撞頻率下降。至少部分地，由於先前技術表面上捕獲寡核苷酸之偶合降低，用於將目標DNA添加至表面結合之引子的傳統雜交方法需要高達10 nM之輸入DNA濃度(參見**圖29左**，展示經標記之目標寡核苷酸與傳統表面之結合)。即使在此等高濃度下，目標寡核苷酸之偶合亦為有限的。藉由比較，使用已開發之新雜交反應條件，

目標核酸序列在低至50 pM之目標核酸之輸入濃度下雜交至表面連接寡核苷酸。目標核酸輸入濃度之下降指示雜交效率之大約200倍增加(參見**圖29右**，展示經標記目標寡核苷酸與所揭示之低結合表面之結合)，其為所揭示之低結合基材表面提供顯著優勢以用於其中輸入庫DNA可能稀少之定序技術。有效引子偶合方法及雜交條件可允許製備具有低非特異性結合及高表面密度之寡核苷酸引子的表面，該表面使用此項技術中描述之傳統引子偶合化學物質或雜交條件將不會實現。圖28之右側提供與使用如左側上所示之習知雜交方案實現之結果相比，使用所揭示之具有減少量之輸入DNA及縮短之雜交時間的雜交方法在低結合表面上實現之改善之雜交的實例。

【0252】 在以90度報導之濃度下，使用緩慢冷卻方法(2小時)直至達至37度以2次-5次鹽水-檸檬酸鈉(SSC)緩衝液(標準)用雜交報導子探針(用5'端處之Cy™3螢光團標記的互補寡核苷酸序列)測試傳統或標準條件。用於兩種測試條件之表面為具有小於約0.25個分子/μm2之非特異性Cy3染料吸收之水準的超低非特異性結合表面。用50 mM Tris pH 8.0；50 mM NaCl洗滌孔。在樣品浸入緩衝液(25 mM ACES，pH 7.4緩衝液)中時，在非信號飽和條件下維持1 s (雷射量子，在該樣品下Gem 532，< 1 W/cm2)使用配備有100 × TIRF物鏡、NA = 1.4 (Olympus)、針對532 nm光最佳化之雙色鏡(Semrock, Di03-R532-t1-25×36)、針對Cy3發射最佳化之帶通濾光片(Semrock, FF01-562/40-25)及相機(sCMOS, Andor Zyla)的倒置顯微鏡(Olympus IX83)獲得影像。選擇具有1 μm寡核苷酸接枝物濃度之條件50% ACN + MES及具有5.1 uM寡核苷酸接枝物濃度之25% ACN + MES + 20% PEG + 10%甲醛以測試此等條件之可行性以改善關於低結合

基板之現有標準表面雜交方案。以指定濃度添加寡核苷酸探針且在50℃下進行雜交2分鐘。如上文所描述收集影像且在圖中展示結果。

實例14-在低結合基材面上比較傳統寡引子偶合化學物質、雜交反應條件及擴增技術

【0253】 **圖30-32**提供對本發明之低結合基材進行傳統雜交反應或改善雜交反應的實驗結果之比較，其中寡引子使用習知偶合化學物質或改善偶合化學物質連接，且其中雜交反應之後進行RCA或橋式擴增。藉由基於PCR之(「橋」)或藉由滾動環擴增之寡核苷酸引子表面密度小於不同表面密度臨限值的低結合基材上之目標DNA之擴增產生細長或擴散之目標分子，其形成兩個難題：1)經減小之封裝密度，及2)經減弱之信號。因此，基於此類表面按比例調整用於高產量定序應用之系統大幅度受損。**圖30**展示使用傳統寡核苷酸偶合化學物質在低結合表面上PCR擴增(「橋」；右)及滾環式擴增(左)之結果。在此等影像中，可看到經標記之擴增目標DNA，假定延長構形將對在定序應用中之成像呈現嚴重困難。相比之下，**圖31**展示PCR/「橋式」擴增之結果，且**圖32**展示表面上滾環式擴增(RCA)之結果，該等表面之寡核苷酸引子表面密度為至少1,000個分子/μm^2。此等表面支持經擴增目標DNA壓緊至高度局部區域中，該高度局部區域自連接標記及成像中之小像素區域產生高螢光強度。高螢光強度尤其在計算定序應用之點強度時引起信號增加。重要地，由使用本文揭示之低結合表面產生之增強的對比雜訊比為由擴增目標DNA之此壓緊產生之極高信號及親水性塗佈表面提供之極低背景兩者之功能。

實例15-低結合基材表面上擴增反應之比較

【0254】 **圖33**提供傳統基材表面之螢光影像及目標寡核苷酸已雜交

及擴增之本發明之低結合基材表面的非限制性實例。為了促進定序準確性，各擴增之目標核酸必須明顯地與基材表面之影像中之其他目標核酸分離。在定序循環期間，各目標核酸亦必須呈現與序列中各核苷酸之鑑別相關(過程稱為「鹼基識別」)之信號(諸如螢光信號)。在許多情況下僅僅為由連接至目標核酸分子之標記提供之螢光強度之此鹼基識別信號必須明顯地及準確地在雜訊(點或目標內之信號變化)及背景(非特異性地由於形成實驗環境之材料之特徵產生之雜訊)以上解析。對比與雜訊(「CNR」)之間的比率界定準確確定何種鹼基存在於目標核酸序列中之各位置，以及定序系統之讀段長度、再現性及通量的能力。本發明所揭示之低結合基材表面提供減少之非特異性蛋白質及染料結合，由此產生較低背景信號及更緊湊、更亮前景信號，由此產生增強之CNR且促進優異的鹼基識別導致定序應用。圖32展示一般根據習知方法製備且視需要適用於結合經選殖擴增之目標DNA (頂部，「傳統」)的經PEG塗佈之表面與本發明之低結合基材表面(頂部，「元件電流」)之間的比較。自影像清楚，本發明所揭示之表面特別展示比習知表面更尖銳、更密集的經選殖擴增之DNA之量測點。點強度(可歸因於經選殖擴增之目標DNA之螢光，等效於定序信號)及背景強度之定量量測展示所揭示之低結合基材表面(底部，「最佳元件電流」)的CNR遠遠超過使用習知表面(底部，「傳統」)可實現之CNR，甚至在理想成像條件下，諸如當使用改善雜交條件結合目標DNA (底部，『傳統改善」)時。CNR之此增加大於可使用習知基材表面合理地預期之增加，且表示相對於先前技術表面之定性及定量改善兩者。此等改善藉由產生滿足若干標準之基材表面來實現，該等標準例如降低之非特異性蛋白質及染料結合、寡核苷酸與表面之校正密度之連接，及經選殖擴增之目標核酸與表

面之雜交/結合以產生在定序應用中能夠增強鹼基識別的具有極高CNR之影像。

實例16-使用其他聚合物製備低結合基材之預示性實例

【0255】 玻璃載片經物理或化學處理(例如，使用電漿處理、食人魚溶液清潔步驟、酸洗滌、鹼洗滌、高溫玻璃黏接或其任何組合)以移除有機污染物且活化表面羥基以用於矽烷偶合。隨後使所製備之玻璃表面與矽烷反應以共價連接第一層官能基(例如一級胺)及/或親水性聚合物層。在一些情況下，舉例而言，使用標準方案使諸如(3-胺丙基)三甲氧基矽烷(APTMS)或(3-胺丙基)三乙氧基矽烷(APTES)或(3-丙烯丙基)三甲氧基矽烷之矽烷與表面反應以將一級胺官能基共價連接至表面。在其他情況下，經矽烷修飾之聚合物(例如在一端包含矽烷基且在另一端包含第二官能基(例如一級胺、羧基等)之親水性異型雙官能聚合物)可與表面直接反應(例如藉由在乙醇中在0.1%-2%之濃度下使清潔玻璃表面與經矽烷修飾之聚合物接觸約1至2小時，隨後用乙醇及水沖洗)。適合的經矽烷修飾之聚合物之實例包括但不限於矽烷-PEG-NH_2 (聚乙二醇(PEG)分子量為例如1000、2000、3400、5000或10K道爾頓)、矽烷-PEG-COOH (PEG分子量為例如1000、2000、3400、5000或10K道爾頓)、矽烷-PEG-順丁烯二醯亞胺(PEG分子量為例如1000、2000、3400、5000或10K道爾頓)、矽烷-PEG-生物素(PEG分子量為例如1000、2000、3400、5000或10K道爾頓)、矽烷-PEG-丙烯酸酯(PEG分子量為例如1000、2000、3400、5000或10K道爾頓)、矽烷-PEG-矽烷(PEG分子量為例如1000、2000、3400、5000或10K道爾頓)、包含額外官能基之各種分子量之經矽烷修飾之聚丙二醇(PPG)包含額外反應性官能基之各種分子量之經矽烷修飾之聚(乙烯醇) (PVA)、包

含額外反應性官能基之各種分子量之經矽烷修飾之聚乙烯亞胺(PEI)、包含額外反應性官能基之各種分子量之經矽烷修飾之聚(離胺酸)及其類似物或其任何組合。

【0256】 在一些情形下，在使表面與矽烷或經矽烷修飾之聚合物初始反應之後，至少一個額外親水性聚合物層與玻璃表面偶合或沈積在玻璃表面上。可使用熟習此項技術者已知之多種親水性聚合物中之任一者，包括但不限於聚乙二醇(PEG)、聚(乙烯醇) (PVA)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基吡咯啶酮) (PVP)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚丙烯醯胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMA)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)、聚麩胺酸(PGA)、聚離胺酸、聚葡糖苷、抗生物素蛋白鏈菌素、聚葡萄糖或其任何組合，其中在共價偶合之情況下，選擇包含適當的單官能、同型雙官能及/或異型雙官能反應性基團之聚合物以與所選接合化學相容。在一些情況下，使用衍生聚合物，諸如PEG-胺、PEG-NHS或PEG-丙烯酸酯。在一些情況下，使用雙官能PEG衍生物，諸如丙烯酸酯-PEG-NHS。在一些情況下，藉由在室溫下在乙醇或乙醇/緩衝水溶液中使表面與0.1%-2%聚合物接觸約5分鐘至約1小時，繼之以用乙醇或乙醇/水性緩衝液沖洗，此等額外親水性聚合物層可以與前一層偶合或沈積在前一層上。

【0257】 在一些情形下，親水性聚合物之第二、第三、第四、第五或更多額外層可以與基材表面之初始層偶合或沈積在基材表面之初始層上。在一些情形下，層內聚合物分子可以使用適當的同型官能或雜官能交聯試劑彼此交聯。在一些情形下，不同層中之聚合物分子可以彼此交聯。在一些情形下，親水性聚合物層中之一或多者可包含分支鏈聚合物，例如

分支鏈PEG、分支鏈聚(乙烯醇) (分支鏈PVA)、分支鏈聚(乙烯基吡啶)、分支鏈聚(乙烯基吡咯啶酮) (分支鏈PVP)、分支鏈聚(丙烯酸) (分支鏈PAA)、分支鏈聚丙烯醯胺、分支鏈聚(N-異丙基丙烯醯胺) (分支鏈PNIPAM)、分支鏈聚(甲基丙烯酸甲酯) (分支鏈PMA)、分支鏈聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (分支鏈PHEMA)、分支鏈聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (分支鏈POEGMA)、分支鏈聚麩胺酸(分支鏈PGA)、分支鏈聚離胺酸、分支鏈聚葡糖苷、分支鏈聚葡萄糖或其任何組合。

【0258】 親水性聚合物層中之一或多個可包含複數個共價連接之寡核苷酸銜接子或引子分子，其中寡核苷酸分子使用熟習此項技術者已知之各種適合接合化學中之任一者與聚合物共價偶合。在一些情形下，寡核苷酸銜接子或引子分子與溶液中之聚合物共價偶合，亦即，隨後將聚合物偶合或沈積在表面上。在一些情形下，寡核苷酸銜接子或引子分子在其已與表面偶合或沈積在表面上之後與聚合物共價偶合。在一些情形下，至少一個親水性聚合物層包含複數個共價連接之寡核苷酸銜接子或引子分子。在一些情形下，親水性聚合物之至少兩個、至少三個、至少四個或至少五個層包含複數個共價連接之銜接子或引子分子。

【0259】 所用聚合物之選擇、層數目、層內及之間之交聯程度、包含共價連接之寡核苷酸銜接子或引子分子之層數目及寡核苷酸銜接子或引子分子之局部濃度或表面密度可以獨立地或共同地調整以「調諧」表面之特性以實現所需表面可濕性(如所指示，例如藉由低於50度之水接觸角)、在長時間暴露於定序/基因型分析試劑及重複熱循環下的所需表面穩定性及寡核苷酸銜接子或引子分子(例如，至少1,000個銜接子或引子分子/μm^2)之所需表面密度，其又提供染料分子或其他其他經標記定序/基因型

分析試劑之極其低的非特異性結合、改善雜交效率、改善擴增效率及經選殖擴增之目標序列之特異性最佳密度(就每單位面積純系群落數目、每單位面積目標序列之複本數目或每單位面積經擴增目標分子數目而言)、基材表面之影像(例如，螢光影像)中之較高對比雜訊比(CNR)(例如，CNR > 20)及基因型分析及定序應用中最終改善的偵測準確度或鹼基識別準確度。

【0260】 雖然本文已展示及描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將明白，該等實施例僅藉助於實例提供。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現將想到許多變化形式、改變及取代。應瞭解，本文所述之本發明實施例之各種替代方案可以任何組合用於實踐本發明。希望以下申請專利範圍限定本發明之範疇，且從而覆蓋此等申請專利範圍及其等效物之範疇內的方法及結構。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種進行核酸序列測定之方法，該方法包含，

a)提供表面；其中該表面包含：

i)基板；

ii)至少一個親水性聚合物塗層；

iii)連接至至少一個親水性聚合物塗層之複數個寡核苷酸分子；及

iv)該表面之至少一個離散區，其包含黏接至該複數個連接寡核苷酸分子的複數個經選殖擴增之樣品核酸分子，其中該複數個黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少5000個分子/mm^2之表面密度存在，

b)在將樣品核酸分子黏接至該複數個寡核苷酸分子之前或之後在該等樣品核酸分子上進行核酸擴增反應；及

c)進行一循環系列的單核苷酸結合或合併反應，其中該等核苷酸用可偵測標籤標記。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該可偵測標籤為螢光團。

【請求項3】

如請求項1或請求項2之方法，其中該可偵測標籤為花青染料-3(Cy3)，且其中在第一Cy3標記核苷酸之結合或合併之後，將該表面浸沒在緩衝液中的同時，使用配備有全內反射螢光(TIRF) 20×、0.75 NA物鏡、100W Hg燈、針對532 nm激發及Cy3螢光發射最佳化之帶通及雙色鏡濾光片組以及CCD相機之Olympus IX83倒置螢光顯微鏡在非信號飽和條

件下獲得該表面之螢光影像呈現對比雜訊(CNR)比為至少20。

【請求項4】

如請求項1之方法，其中該等黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少10000個分子/mm^2之表面密度存在。

【請求項5】

如請求項1之方法，其中該等黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少25000個分子/mm^2之表面密度存在。

【請求項6】

如請求項3之方法，其中該等黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少50000個分子/mm^2之表面密度存在。

【請求項7】

如請求項1至6中任一項之方法，其中該核酸擴增反應包含橋式擴增反應。

【請求項8】

如請求項1至7中任一項之方法，其中該核酸擴增反應包含等溫橋式擴增反應。

【請求項9】

如請求項1至7中任一項之方法，其中該核酸擴增反應包含滾環式(rolling circle)擴增(RCA)反應。

【請求項10】

如請求項1至7中任一項之方法，其中該核酸擴增反應包含解螺旋酶依賴性擴增反應。

【請求項11】

如請求項1至7中任一項之方法，其中該核酸擴增反應包含重組酶依賴性擴增反應。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之方法，其中該至少一個親水性聚合物塗層呈現低於50度之水接觸角。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之方法，其中該至少一個親水性聚合物塗層包含選自由以下組成之群之分子：聚乙二醇(PEG)、聚(乙烯醇) (PVA)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基吡咯啶酮) (PVP)、聚(丙烯酸) (PAA)、聚丙烯醯胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMA)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)、聚麩胺酸(PGA)、聚離胺酸、聚葡糖苷、抗生物素蛋白鏈菌素(streptavidin)及聚葡萄糖。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之方法，其中該至少一個親水性聚合物塗層包含PEG。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之方法，其包含第二親水性聚合物塗層。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之方法，其中至少一個親水性聚合物塗層包含分子量為至少1,000道爾頓之聚合物。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之方法，其中至少一個親水性聚合物層包含

具有至少4個支鏈之分支鏈親水性聚合物。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之方法，其中該複數個寡核苷酸分子以至少4,000個分子/μm^2之表面密度存在。

【請求項19】

如請求項1至18中任一項之方法，其中該複數個寡核苷酸分子包含包括聚合酶終止點之序列。

【請求項20】

如請求項1至19中任一項之方法，其中在黏接及選殖擴增之前，藉由使該表面與濃度不超過500 nM之樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項21】

如請求項1至20中任一項之方法，其中在黏接及選殖擴增之前，藉由使該表面與濃度不超過20 pM之樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項22】

如請求項1至21中任一項之方法，其中在黏接至該複數個寡核苷酸分子之前，該等樣品核酸分子經選殖擴增。

【請求項23】

如請求項1至22中任一項之方法，其中該等樣品核酸分子包含單股多聚核酸分子，其包含重複之規律出現單體單元。

【請求項24】

如請求項23之方法，其中該等單股多聚核酸分子之長度為至少10

kb。

【請求項25】

如請求項23之方法，其進一步包含該規律出現單體單元之雙股單體複本。

【請求項26】

如請求項1至25中任一項之方法，其中該等經選殖擴增之樣品核酸分子之表面密度大於該複數個寡核苷酸分子之表面密度。

【請求項27】

如請求項1至26中任一項之方法，其中該等經選殖擴增之樣品核酸分子之表面密度為至少40,000個分子/mm^2。

【請求項28】

如請求項1至26中任一項之方法，其中樣品核酸分子目標序列之表面密度為至少40,000個複本/mm^2。

【請求項29】

如請求項1至28中任一項之方法，其中該表面位於流動通道、流動槽(flow cell)或毛細管腔之內部上。

【請求項30】

如請求項29之方法，其中該流動通道、流動槽或毛細管腔經結構設計以用於進行核酸雜交、擴增或定序反應或其任何組合。

【請求項31】

如請求項1至30中任一項之方法，其中該複數個寡核苷酸分子以跨越該表面之均勻表面密度存在。

【請求項32】

如請求項1至26中任一項之方法，其中該複數個寡核苷酸分子在該表面上之第一位置以至少4,000個分子/μm^2之表面密度存在，且在該表面上之第二位置以第二局部表面密度存在。

【請求項33】

如請求項1至32中任一項之方法，其中在該選殖擴增之前，在該表面自該至少一個離散區橫向移位之區域量測之背景螢光強度不超過在該至少一個離散區量測之強度的2倍。

【請求項34】

如請求項1至33中任一項之方法，其中該表面包含第一層，其包含繫栓至該基板表面之單層聚合物分子；第二層，其包含繫栓至該第一層之聚合物分子的聚合物分子；及視情況第三層，其包含繫栓至該第二層之聚合物分子的聚合物分子，其中至少一層包含分支鏈聚合物分子。

【請求項35】

如請求項34之方法，其中該第二層或第三層進一步包含繫栓至該第二層或第三層之聚合物分子的寡核苷酸。

【請求項36】

如請求項35之方法，其中繫栓至該第二層或第三層之聚合物分子之該等寡核苷酸以複數種深度分佈在該第二層或第三層中。

【請求項37】

如請求項36之方法，其進一步包含第四層，其包含繫栓至該第三層之聚合物分子的分支鏈聚合物分子；及視情況第五層，其包含繫栓至該第四層之分支鏈聚合物分子的聚合物分子。

【請求項38】

如請求項37之方法，其中該第四層或第五層之聚合物分子進一步包含繫栓至該第四層或第五層之聚合物分子的寡核苷酸。

【請求項39】

如請求項38之方法，其中繫栓至該第四層或第五層之聚合物分子之該等寡核苷酸以複數種深度分佈在該第四層或第五層中。

【請求項40】

一種表面，其包含：

a)基板；

b)至少一個親水性聚合物塗層；

c)連接至至少一個親水性聚合物塗層之複數個寡核苷酸分子；及

d)該表面之至少一個離散區，其包含已黏接至該複數個連接寡核苷酸分子的複數個經選殖擴增之樣品核酸分子，且

其中該複數個黏接之經選殖擴增之樣品核酸分子以至少10,000個分子/mm^2之表面密度存在。

【請求項41】

如請求項40之表面，其中當該等樣品核酸分子或其互補序列經花青染料-3 (Cy3)螢光團標記時，且在該表面浸入緩衝液中，使用配備有全內反射螢光(TIRF) 20×、0.75 NA物鏡、100W Hg燈、針對532 nm激發及Cy3螢光發射最佳化之帶通及雙色鏡濾光片組以及CCD相機之Olympus IX83倒置螢光顯微鏡在非信號飽和條件下獲得螢光影像時，該表面之螢光影像呈現至少20之對比雜訊比(CNR)。

【請求項42】

如請求項40或請求項41之表面，其中該表面之螢光影像呈現至少40

之對比雜訊比(CNR)。

【請求項43】

如請求項40至42中任一項之表面，其中該表面之螢光影像呈現至少60之對比雜訊比(CNR)。

【請求項44】

如請求項40至43中任一項之表面，其中該基板包含玻璃、熔融二氧化矽、塑膠或其任何組合。

【請求項45】

如請求項40至44中任一項之表面，其中該至少一個親水性聚合物塗層呈現低於50度之水接觸角。

【請求項46】

如請求項40至45中任一項之表面，其中該至少一個親水性聚合物塗層包含選自由以下組成之群之分子：聚乙二醇(PEG)、聚(乙烯醇)(PVA)、聚(乙烯基吡啶)、聚(乙烯基吡咯啶酮) (PVP)、聚(丙烯酸)(PAA)、聚丙烯醯胺、聚(N-異丙基丙烯醯胺) (PNIPAM)、聚(甲基丙烯酸甲酯) (PMA)、聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯) (PHEMA)、聚(寡(乙二醇)甲醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)、聚麩胺酸(PGA)、聚離胺酸、聚葡糖苷、抗生物素蛋白鏈菌素及聚葡萄糖。

【請求項47】

如請求項40至46中任一項之表面，其中該至少一個親水性聚合物塗層包含PEG。

【請求項48】

如請求項40至47中任一項之表面，其包含第二親水性聚合物塗層。

【請求項49】

如請求項40至48中任一項之表面，其中至少一個親水性聚合物塗層包含分子量為至少1,000道爾頓之聚合物。

【請求項50】

如請求項40至49中任一項之表面，其中至少一個親水性聚合物層包含具有至少4個支鏈之分支鏈親水性聚合物。

【請求項51】

如請求項40至50中任一項之表面，其中該複數個寡核苷酸分子以至少4,000個分子/μm^2之表面密度存在。

【請求項52】

如請求項40至51中任一項之表面，其中該複數個寡核苷酸分子包含包括聚合酶終止點之序列。

【請求項53】

如請求項40至52中任一項之表面，其中在黏接及選殖擴增之前，藉由使該表面與濃度不超過500 nM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項54】

如請求項40至53中任一項之表面，其中在黏接及選殖擴增之前，藉由使該表面與濃度不超過20 pM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項55】

如請求項40至54中任一項之表面，其中在黏接至該複數個寡核苷酸分子之前，該等樣品核酸分子經選殖擴增。

【請求項56】

如請求項40至55中任一項之表面，其中該等樣品核酸分子包含單股多聚核酸分子，其包含重複之規律出現單體單元。

【請求項57】

如請求項56之表面，其中該等單股多聚核酸分子之長度為至少10 kb。

【請求項58】

如請求項56之表面，其進一步包含該規律出現單體單元之雙股單體複本。

【請求項59】

如請求項40至58中任一項之表面，其中該等經選殖擴增之樣品核酸分子之表面密度大於該複數個寡核苷酸分子之表面密度。

【請求項60】

如請求項40至59中任一項之表面，其中該等經選殖擴增之樣品核酸分子之表面密度為至少40,000個分子/mm^2。

【請求項61】

如請求項40至59中任一項之表面，其中樣品核酸分子目標序列之表面密度為至少40,000個複本/mm^2。

【請求項62】

如請求項40至61中任一項之表面，其中該表面位於流動通道、流動槽或毛細管腔之內部上。

【請求項63】

如請求項62之表面，其中該流動通道、流動槽或毛細管腔經結構設

計以用於進行核酸雜交、擴增或定序反應或其任何組合。

【請求項64】

如請求項40至63中任一項之表面，其中該複數個寡核苷酸分子以跨越該表面之均勻表面密度存在。

【請求項65】

如請求項40至64中任一項之表面，其中該複數個寡核苷酸分子在該表面上之第一位置以至少4,000個分子/μm^2之表面密度存在，且在該表面上之第二位置以第二局部表面密度存在。

【請求項66】

如請求項40至65中任一項之表面，其中在該選殖擴增之前，在該表面自該至少一個離散區橫向移位的之區域量測之背景螢光強度不超過在該至少一個離散區量測之強度的2倍。

【請求項67】

如請求項40至66中任一項之表面，其中該表面包含第一層，其包含繫栓至該基板之表面之單層聚合物分子；第二層，其包含繫栓至該第一層之聚合物分子的聚合物分子；及視情況第三層，其包含繫栓至該第二層之聚合物分子的聚合物分子，其中至少一層包含分支鏈聚合物分子。

【請求項68】

如請求項67之表面，其中該第二層或第三層進一步包含繫栓至該第二層或第三層之該等聚合物分子的寡核苷酸。

【請求項69】

如請求項68之表面，其中繫栓至該第二層或第三層之聚合物分子之該等寡核苷酸以複數種深度分佈在該第二層或第三層中。

【請求項70】

如請求項69之表面，其進一步包含第四層，其包含繫栓至該第三層之聚合物分子的分支鏈聚合物分子；及視情況第五層，其包含繫栓至該第四層之分支鏈聚合物分子的聚合物分子。

【請求項71】

如請求項70之表面，其中該第四層或第五層之聚合物分子進一步包含繫栓至該第四層或第五層之聚合物分子的寡核苷酸。

【請求項72】

如請求項71之表面，其中繫栓至該第四層或第五層之聚合物分子之該等寡核苷酸以複數種深度分佈在該第四層或第五層中。

【請求項73】

如請求項41之表面，其中當經選殖擴增之樣品核酸分子或其互補序列經花青染料-3標記時，該表面之影像呈現經選殖擴增之花青染料-3標記之樣品核酸分子或其互補序列與非特異性花青染料-3染料吸附背景(B_{inter})之螢光強度比為至少3:1。

【請求項74】

如請求項73之表面，其中該表面之影像呈現經特異性擴增之花青染料-3標記之樣品核酸分子或其互補序列及非特異性花青染料-3染料吸附背景與非特異性擴增背景($B_{inter} + B_{intra}$)組合之螢光強度比為至少3:1。

【請求項75】

如請求項41之表面，其中當經選殖擴增之樣品核酸分子或其互補序列經花青染料-3標記時，該表面之影像呈現經選殖擴增之花青染料-3標記之樣品核酸分子或其互補序列與非特異性染料吸附背景(B_{inter})之螢光強度

比為至少5:1。

【請求項76】

如請求項75之表面，其中該表面之影像呈現經選殖擴增之花青染料-3標記之樣品核酸分子或其互補序列及非特異性Cy3染料吸附背景與非特異性擴增背景(B_{inter} + B_{intra})組合之螢光強度比為至少5:1。

【請求項77】

如請求項40至76中任一項之表面，其中該表面呈現非特異性花青染料-3染料吸附程度低於約0.25個分子/μm^2。

【請求項78】

一種將寡核苷酸連接至基板表面上之方法，該方法包含：

a)使第一親水性聚合物與該基板表面在第一層中結合；

b)使第二親水性聚合物與該第一層結合以形成第二層，其中該第二層之親水性聚合物分子藉由每分子至少兩個共價鍵聯接合至該第一層；及

c)使最外層親水性聚合物與該第二層結合，其中該等最外層親水性聚合物分子在與該第二層結合之前包含與其共價連接之寡核苷酸分子。

【請求項79】

如請求項78之方法，其中該第二層之親水性聚合物分子藉由每分子至少四個共價鍵聯接合至該第一層。

【請求項80】

如請求項78或請求項79之方法，其中該第二層之親水性聚合物分子藉由每分子至少八個共價鍵聯接合至該第一層。

【請求項81】

如請求項78至80中任一項之方法，其進一步包含使該最外層親水性

聚合物與該第二層直接結合。

【請求項82】

如請求項78至81中任一項之方法，其進一步包含使第三親水性聚合物與該第二層結合以形成第三層，且經由該第三層使該最外層親水性聚合物與該第二層結合。

【請求項83】

如請求項78至82中任一項之方法，其進一步包含使第三親水性聚合物與該第二層結合以形成第三層，使第四親水性聚合物與該第三層結合以形成第四層，且經由該第四層及該第三層使該最外層親水性聚合物與該第二層結合。

【請求項84】

如請求項78至83中任一項之方法，其中該第一親水性聚合物包含PEG。

【請求項85】

如請求項78至84中任一項之方法，其中該第一親水性聚合物包含PGA。

【請求項86】

如請求項78至85中任一項之方法，其中該第二親水性聚合物為分支鏈。

【請求項87】

如請求項86之方法，其中該第二親水性聚合物包含至少4個支鏈。

【請求項88】

如請求項86之方法，其中該第二親水性聚合物包含至少8個支鏈。

【請求項89】

如請求項86之方法，其中該第二親水性聚合物包含16至32個支鏈。

【請求項90】

如請求項82至89中任一項之方法，其中該第四層之親水性聚合物分子藉由每分子至少兩個共價鍵聯接合至該第三層。

【請求項91】

如請求項82至90中任一項之方法，其中該第四層之親水性聚合物分子藉由每分子至少四個共價鍵聯接合至該第三層。

【請求項92】

如請求項82至91中任一項之方法，其中該第四層之親水性聚合物分子藉由每分子至少八個共價鍵聯接合至該第三層。

【請求項93】

如請求項78至92中任一項之方法，其中在包含乙醇之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項94】

如請求項78至93中任一項之方法，其中在包含甲醇之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項95】

如請求項78至94中任一項之方法，其中在包含二甲亞碸(DMSO)之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項96】

如請求項78至95中任一項之方法，其中在包含乙腈之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項97】

如請求項78至96中任一項之方法，其中在包含緩衝磷酸鹽之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項98】

如請求項78至97中任一項之方法，其中在包含緩衝3-(N-嗎啉基)丙磺酸(MOPS)之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項99】

如請求項78至98中任一項之方法，其中在包含75%乙腈、25%磷酸鹽緩衝液之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項100】

如請求項78至99中任一項之方法，其中在包含90%甲醇、10% MOPS緩衝液之溶劑中將該第一親水性聚合物遞送至該基板表面。

【請求項101】

一種進行固相核酸雜交之方法，該方法包含：

a)提供如請求項40至76中任一項之表面；及

b)進行固相核酸雜交反應，其中樣品核酸分子黏接至該複數個寡核苷酸。

【請求項102】

如請求項101之方法，其中藉由使該表面與濃度不超過500 nM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項103】

如請求項101之方法，其中藉由使該表面與濃度不超過20 pM之該等

樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項104】

如請求項101之方法，其中在黏接至該複數個寡核苷酸分子之前，該等樣品核酸分子經選殖擴增。

【請求項105】

如請求項101至104中任一項之方法，其中該等樣品核酸分子包含單股多聚核酸分子，其包含重複之規律出現單體單元。

【請求項106】

如請求項105之方法，其中該等單股多聚核酸分子之長度為至少10 kb。

【請求項107】

如請求項106之方法，其進一步包含該規律出現單體單元之雙股單體複本。

【請求項108】

如請求項101至107中任一項之方法，其中該等經選殖擴增之樣品核酸分子之表面密度為至少40,000個分子/mm^2。

【請求項109】

如請求項101至108中任一項之方法，其中樣品核酸分子目標序列之表面密度為至少40,000個複本/mm^2。

【請求項110】

一種進行固相核酸擴增之方法，該方法包含：

a)提供如請求項40至76中任一項之表面；及

b)進行固相核酸雜交反應，其中樣品核酸分子黏接至該複數個寡核苷酸；及

c)進行核酸擴增反應以產生該等樣品核酸分子之經選殖擴增之複本。

【請求項111】

如請求項110之方法，其中藉由使該表面與濃度不超過500 nM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項112】

如請求項110之方法，其中藉由使該表面與濃度不超過20 pM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項113】

如請求項110之方法，其中在黏接至該複數個寡核苷酸分子之前，該等樣品核酸分子經選殖擴增。

【請求項114】

如請求項110之方法，其中藉由使該表面與濃度不超過500 nM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項115】

如請求項110之方法，其中藉由使該表面與濃度不超過20 pM之該等樣品核酸分子接觸，使該等樣品核酸分子黏接至該複數個連接寡核苷酸分子。

【請求項116】

如請求項110至115中任一項之方法，其中該等樣品核酸分子包含單股多聚核酸分子，其包含重複之規律出現單體單元。

【請求項117】

如請求項116之方法，其中該等單股多聚核酸分子之長度為至少10 kb。

【請求項118】

如請求項116或請求項117之方法，其進一步包含該規律出現單體單元之雙股單體複本。

【請求項119】

如請求項110至118中任一項之方法，其中該等經選殖擴增之樣品核酸分子之表面密度為至少40,000個分子/mm^2。

【請求項120】

如請求項110至119中任一項之方法，其中樣品核酸分子目標序列之表面密度為至少40,000個複本/mm^2。

【請求項121】

如請求項110至120中任一項之方法，其中該核酸擴增包含熱循環。

【請求項122】

如請求項110至120中任一項之方法，其中該核酸擴增包含等溫擴增。

【請求項123】

如請求項110至122中任一項之方法，其中該核酸擴增包含滾環式擴增。

【請求項124】

如請求項110至122中任一項之方法，其中該核酸擴增包含橋式擴增。

【請求項125】

如請求項110至120中任一項之方法，其中該核酸擴增包含等溫橋式擴增。

【請求項126】

如請求項110至120中任一項之方法，其中該核酸擴增包含多重置換擴增。

【請求項127】

如請求項110至126中任一項之方法，其中該核酸擴增包含解螺旋酶處理。

【請求項128】

如請求項110至126中任一項之方法，其中該核酸擴增包含重組酶處理。

【請求項129】

如請求項110至128中任一項之方法，其中黏接之樣品核酸分子之表面密度在該核酸擴增反應至少30個循環內無變化。

【請求項130】

如請求項110至129中任一項之方法，其中黏接之樣品核酸分子之表面密度在該核酸擴增反應至少40個循環內無變化。

【請求項131】

如請求項110至130中任一項之方法，其中黏接之樣品核酸分子之表面密度在該核酸擴增反應至少50個循環內無變化。

【請求項132】

一種進行核酸擴增之裝置，該裝置包含：

a)如請求項40至76中任一項之表面；

其中該表面包含毛細管腔之表面或流動槽之至少一個內表面。

【請求項133】

如請求項132之裝置，其進一步包含至少一個與該毛細管腔或該流動槽之內部流體連通之流體入口。

【請求項134】

如請求項132或請求項133之裝置，其包含至少一個流體出口。

【請求項135】

如請求項132至134中任一項之裝置，其進一步包含至少一個溫度控制元件。

【請求項136】

如請求項132至135中任一項之裝置，其進一步包含至少一個光學窗。

【請求項137】

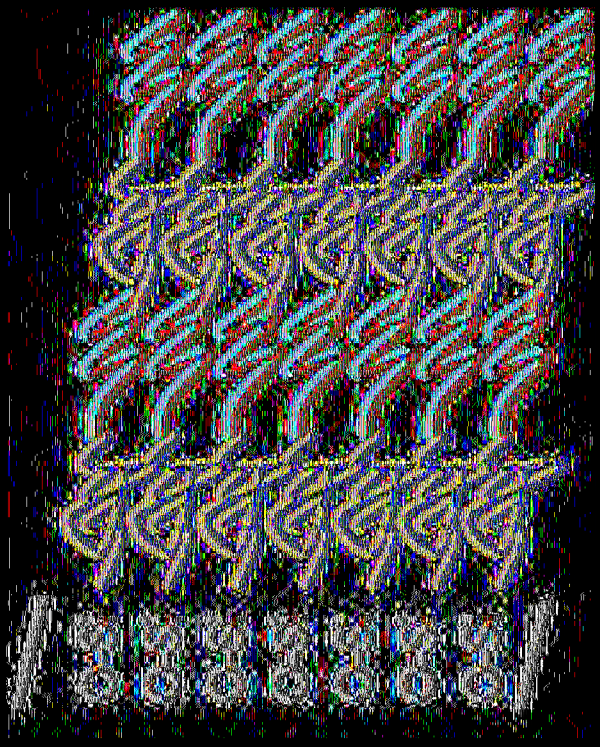
一種進行核酸定序之系統，該系統包含：

a)如請求項132至136中任一項之裝置；

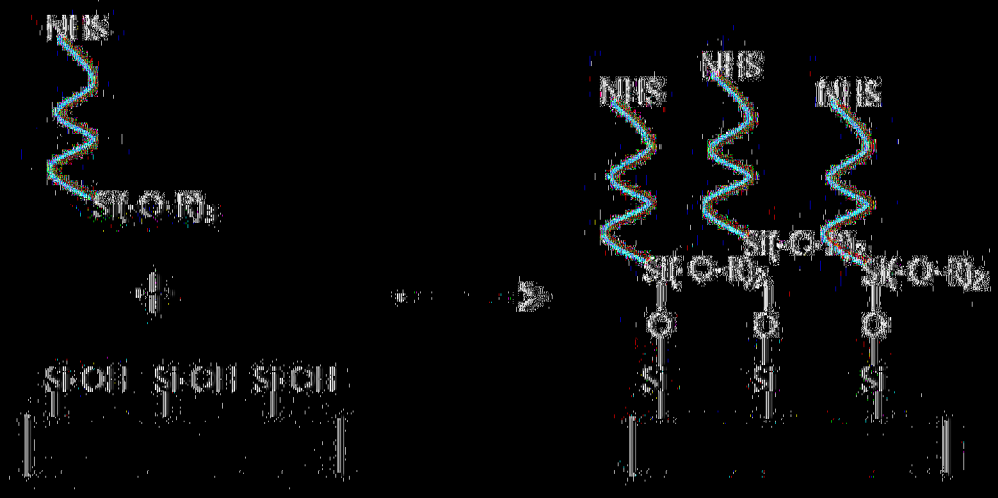
b)流體控制模組；及

c)成像模組。

【發明圖式】



【圖1】


NH2
Si(-O-R)3
Si-OH
Si-OH
Si-OH
NH2
NH2
NH2
Si(-O-R)3
Si(-O-R)3
Si(-O-R)3
O
O
O
Si
Si
Si

圖(圖2)

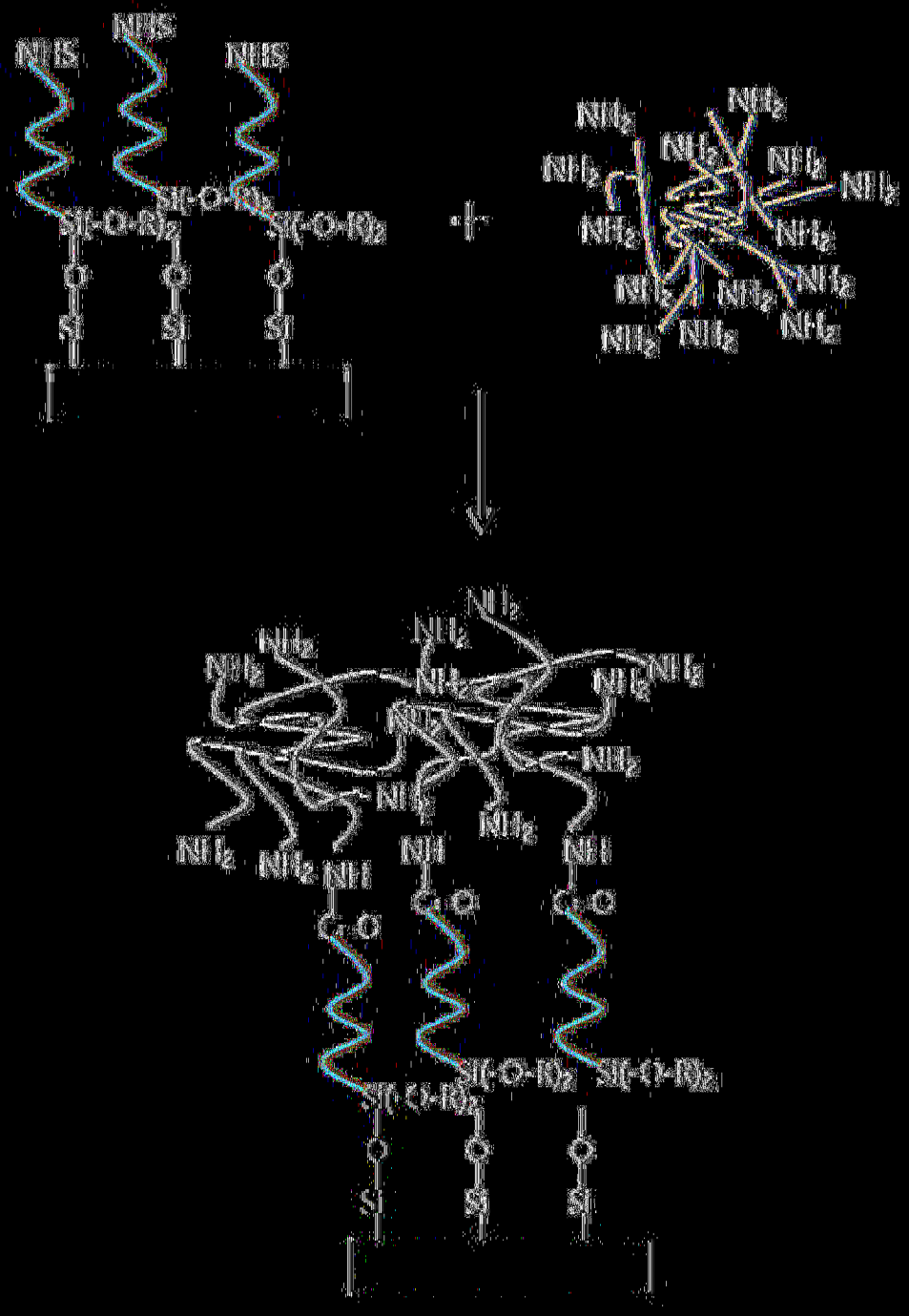
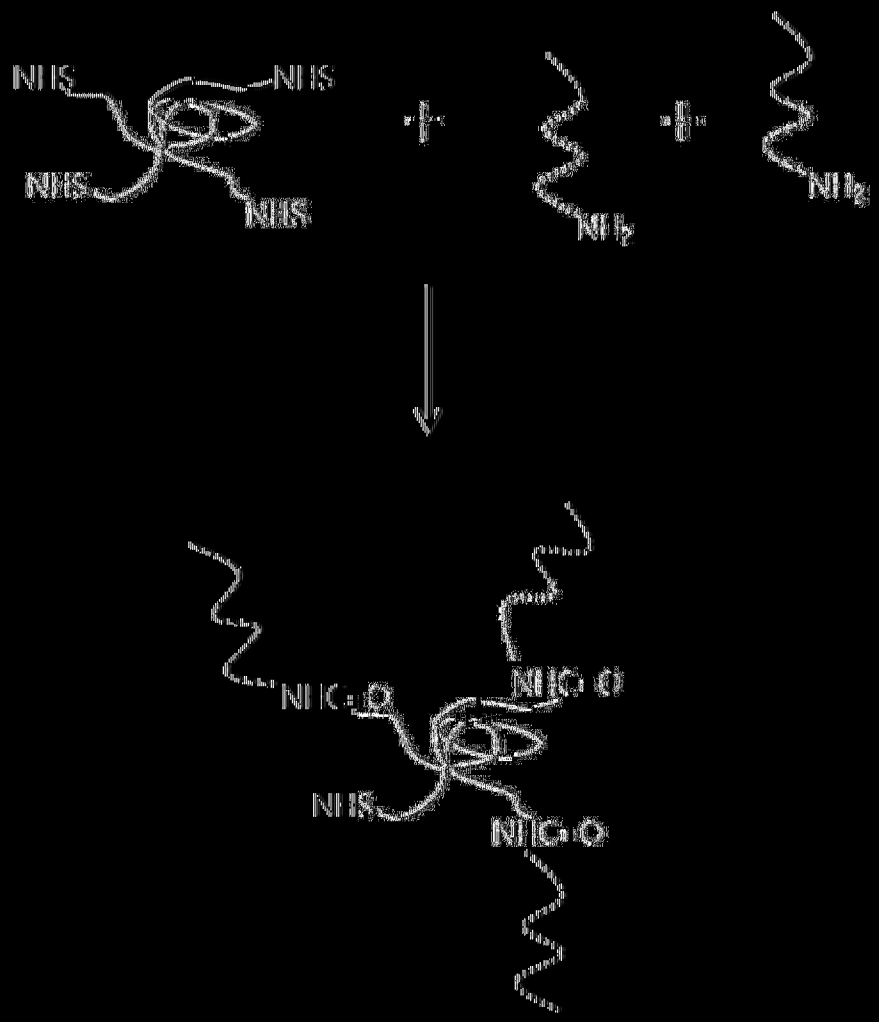
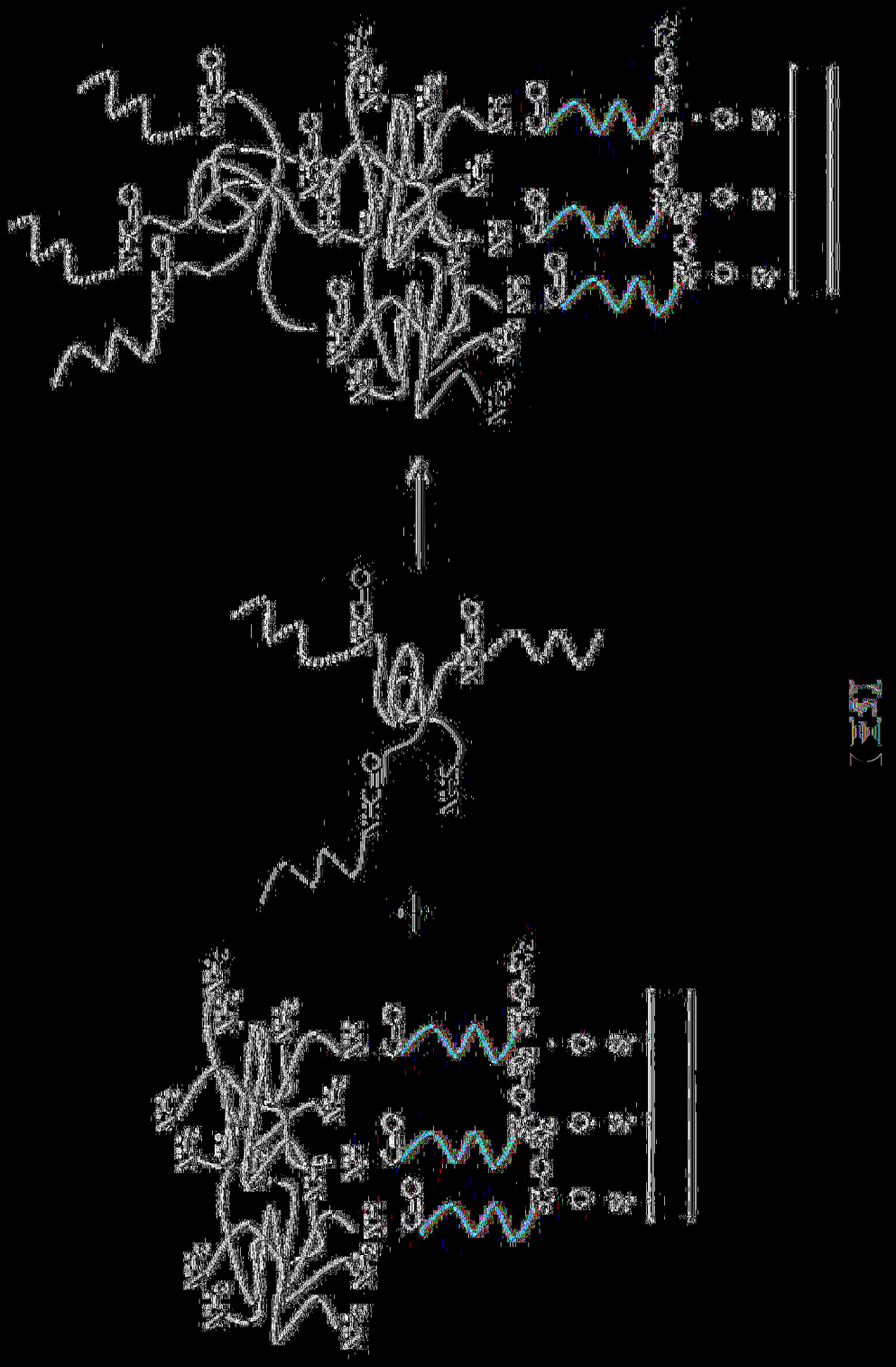


圖3



[圖4]



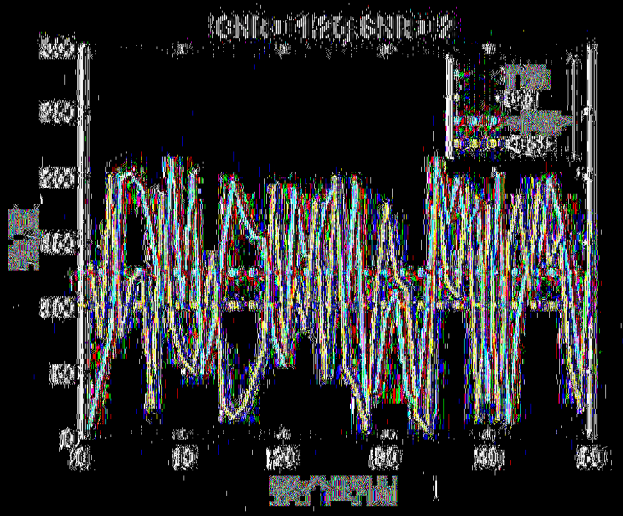


圖 6A

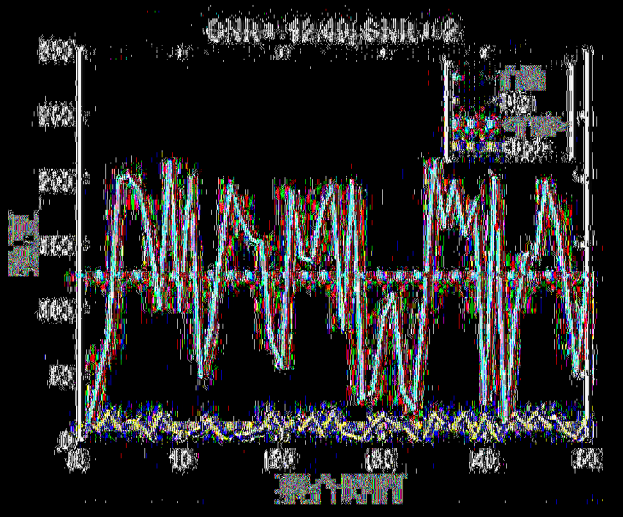
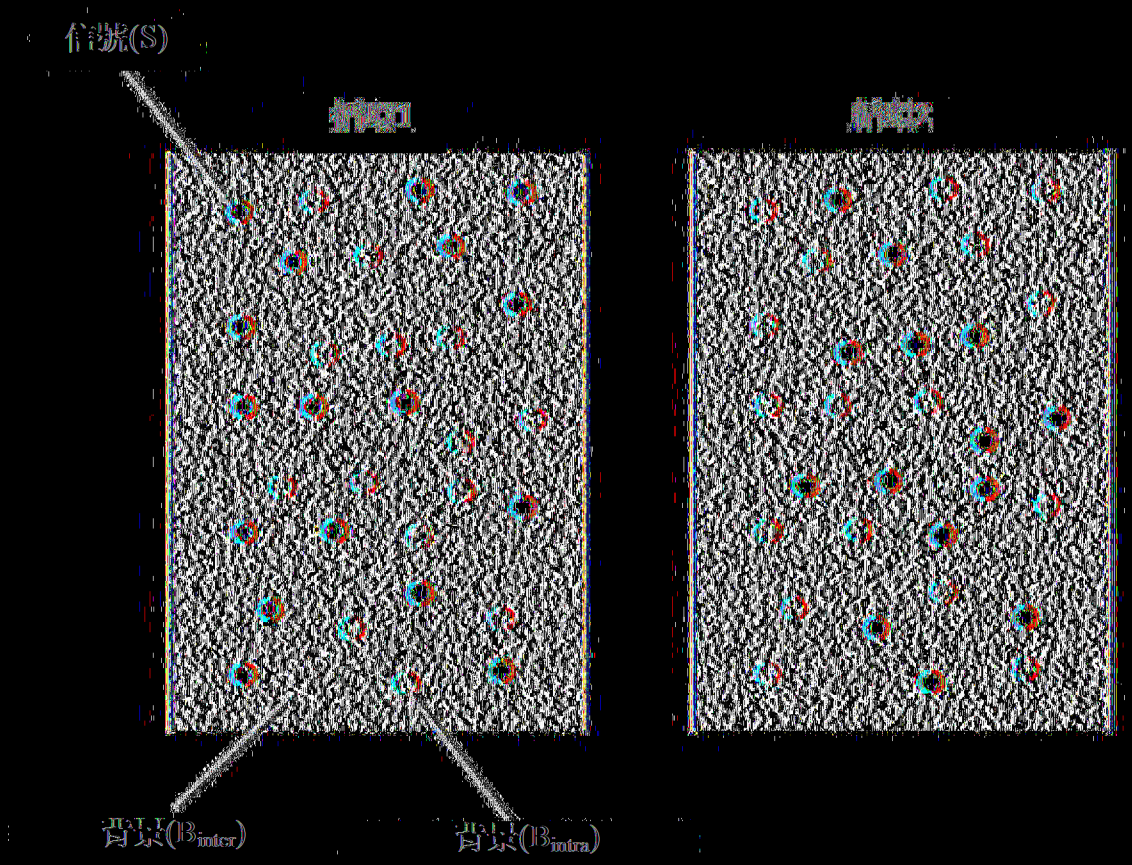
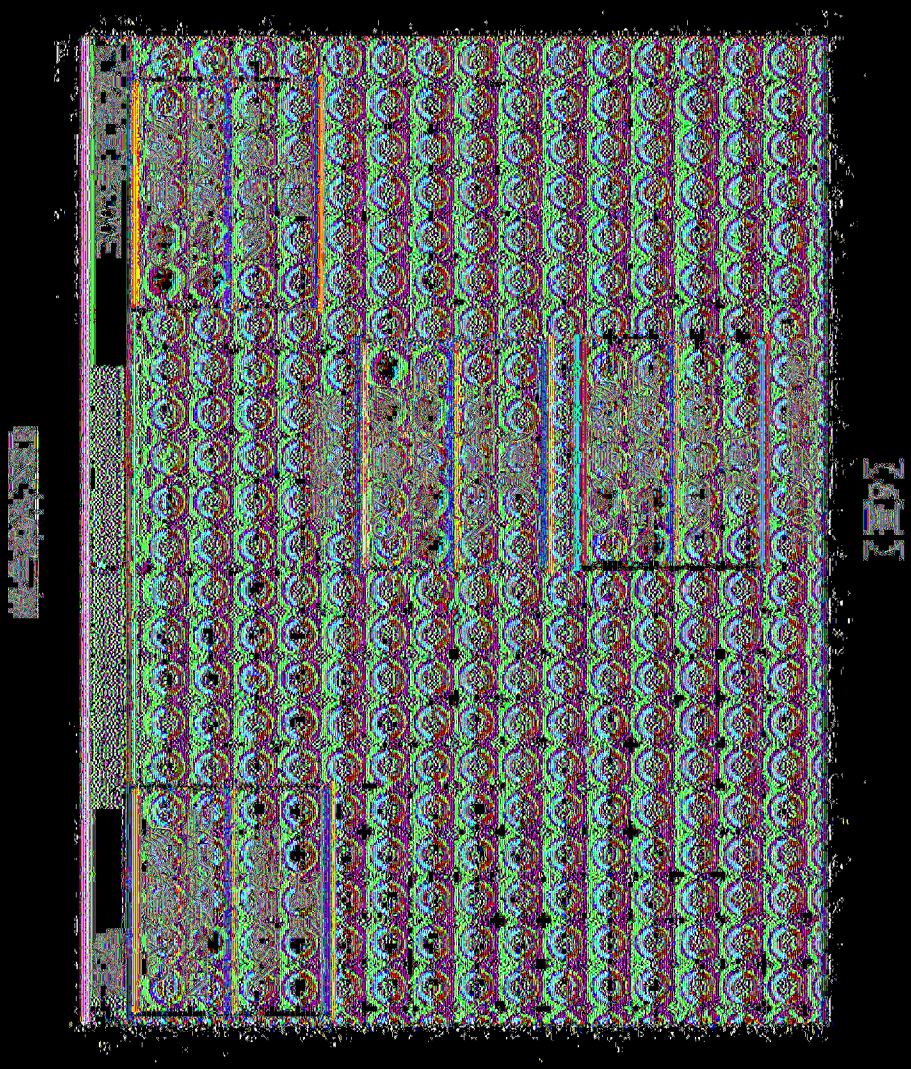


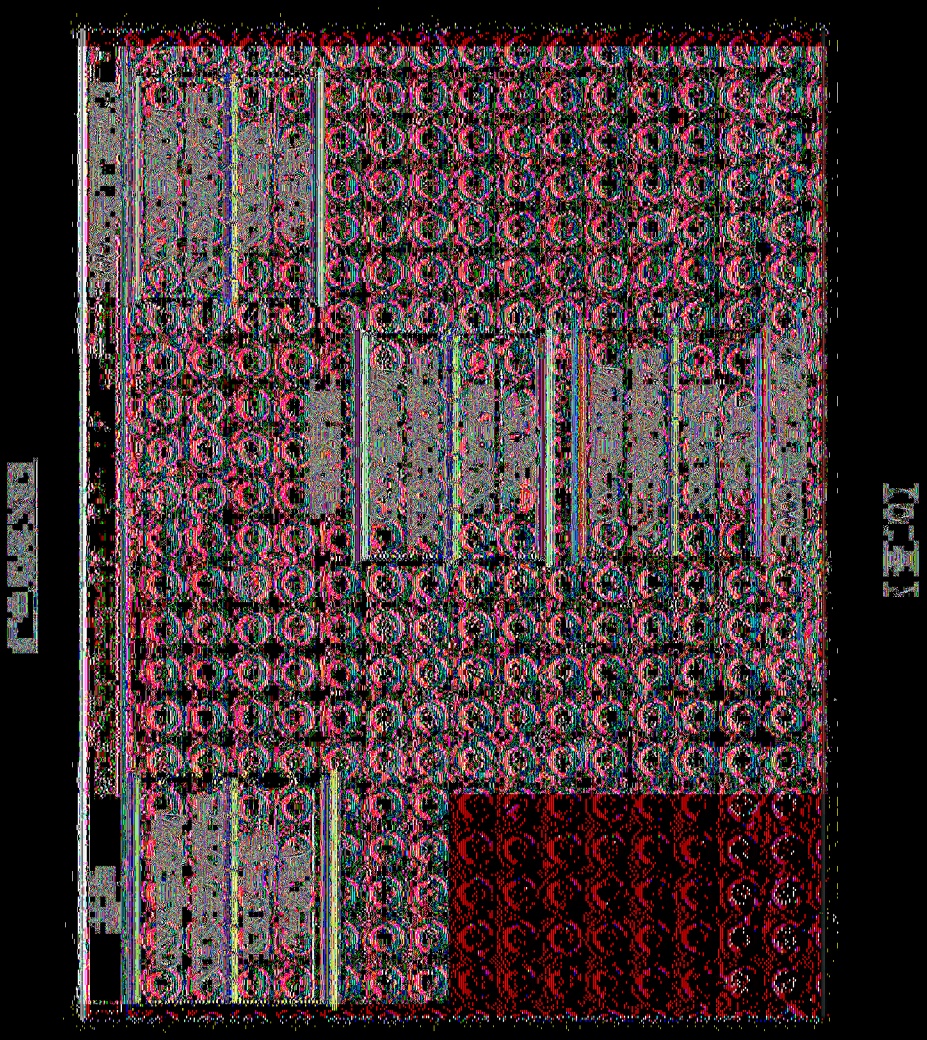
圖 6B

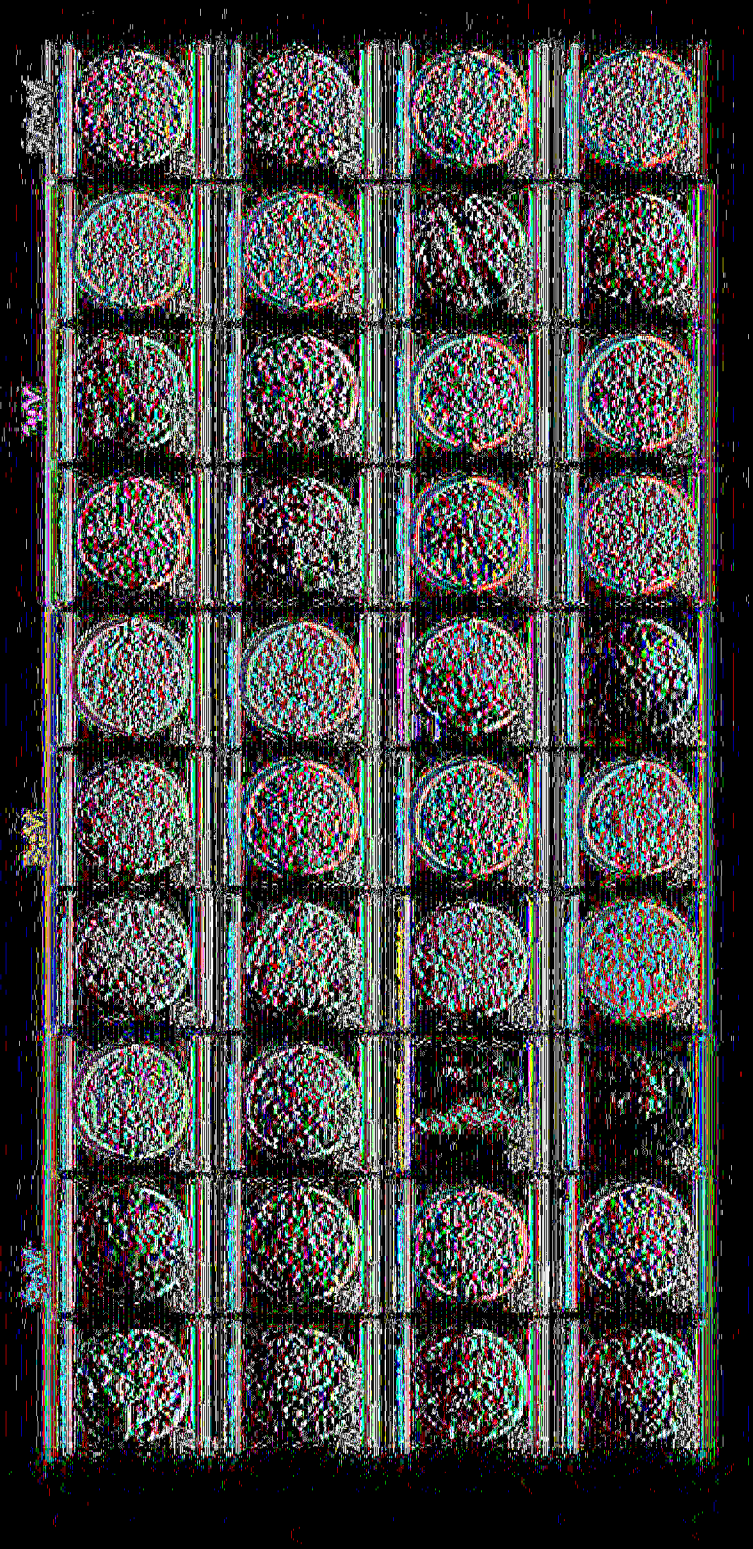
CNR=100
CNR=8
CNR=2

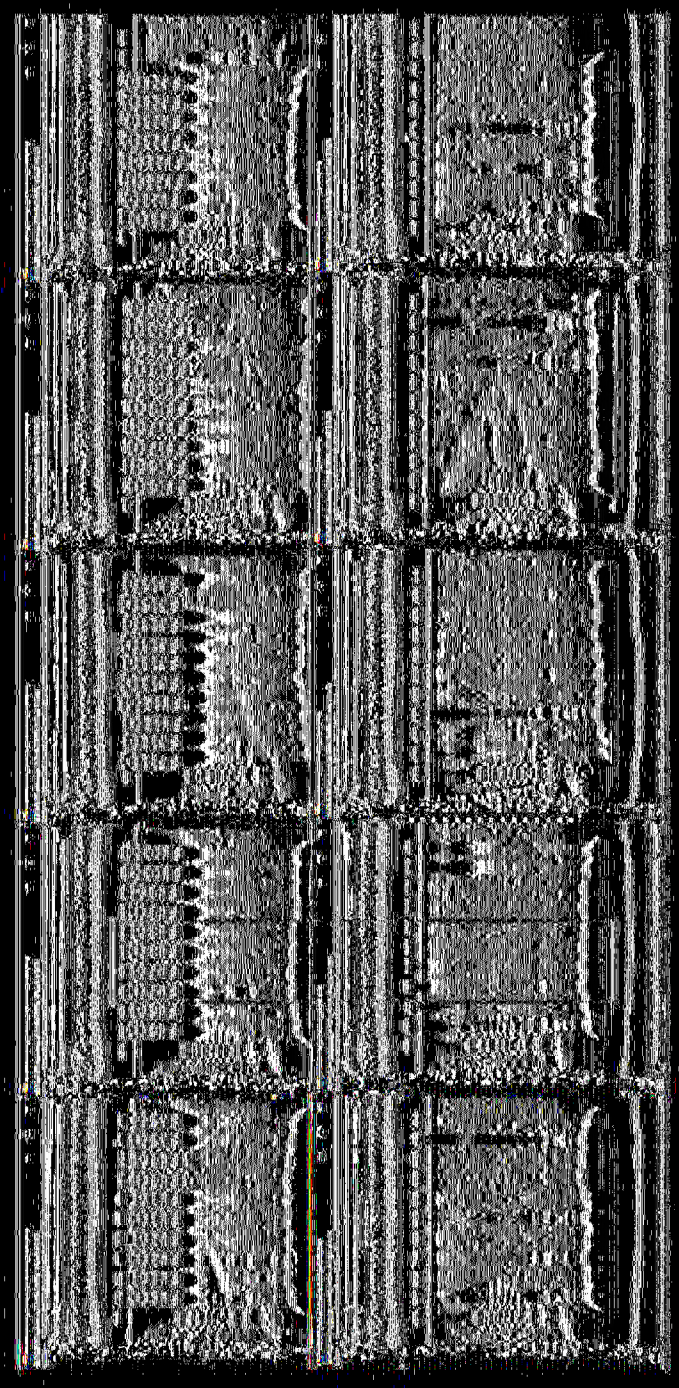


圖(8)









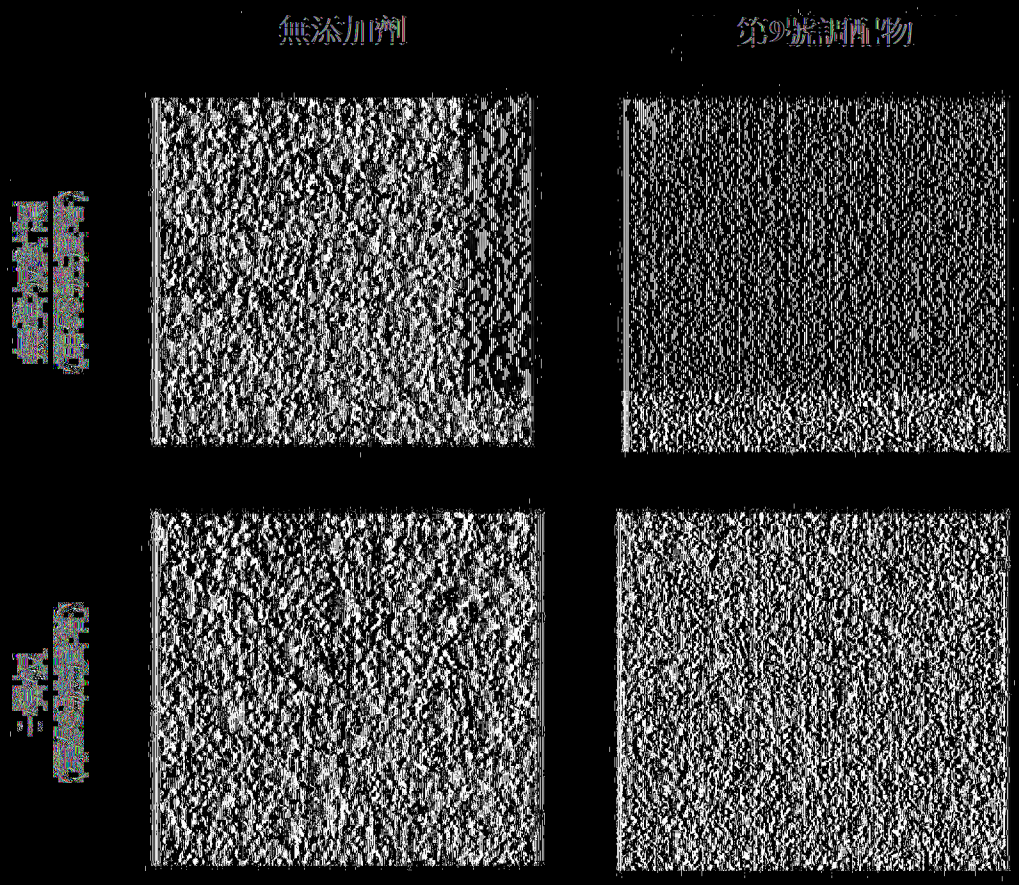
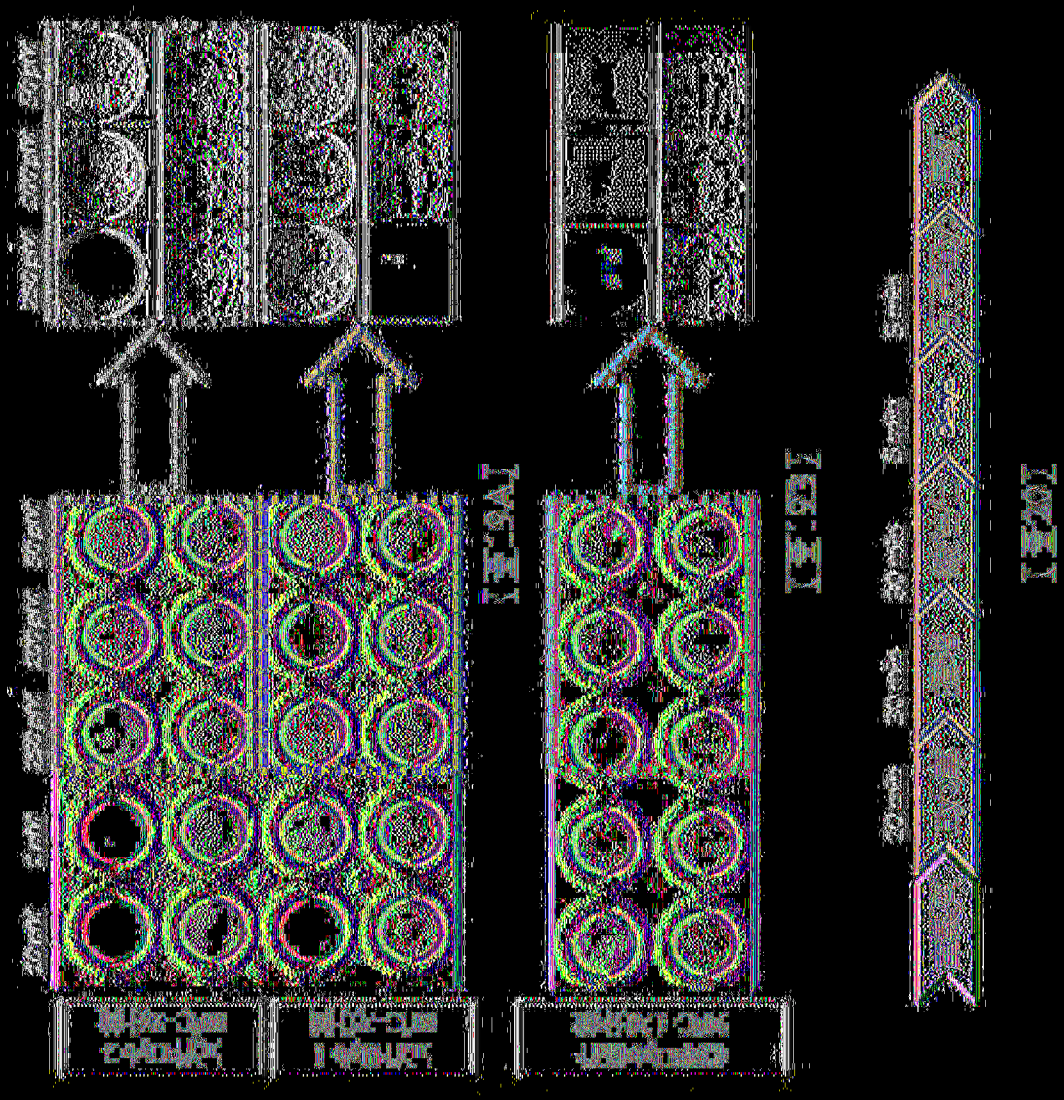


圖18



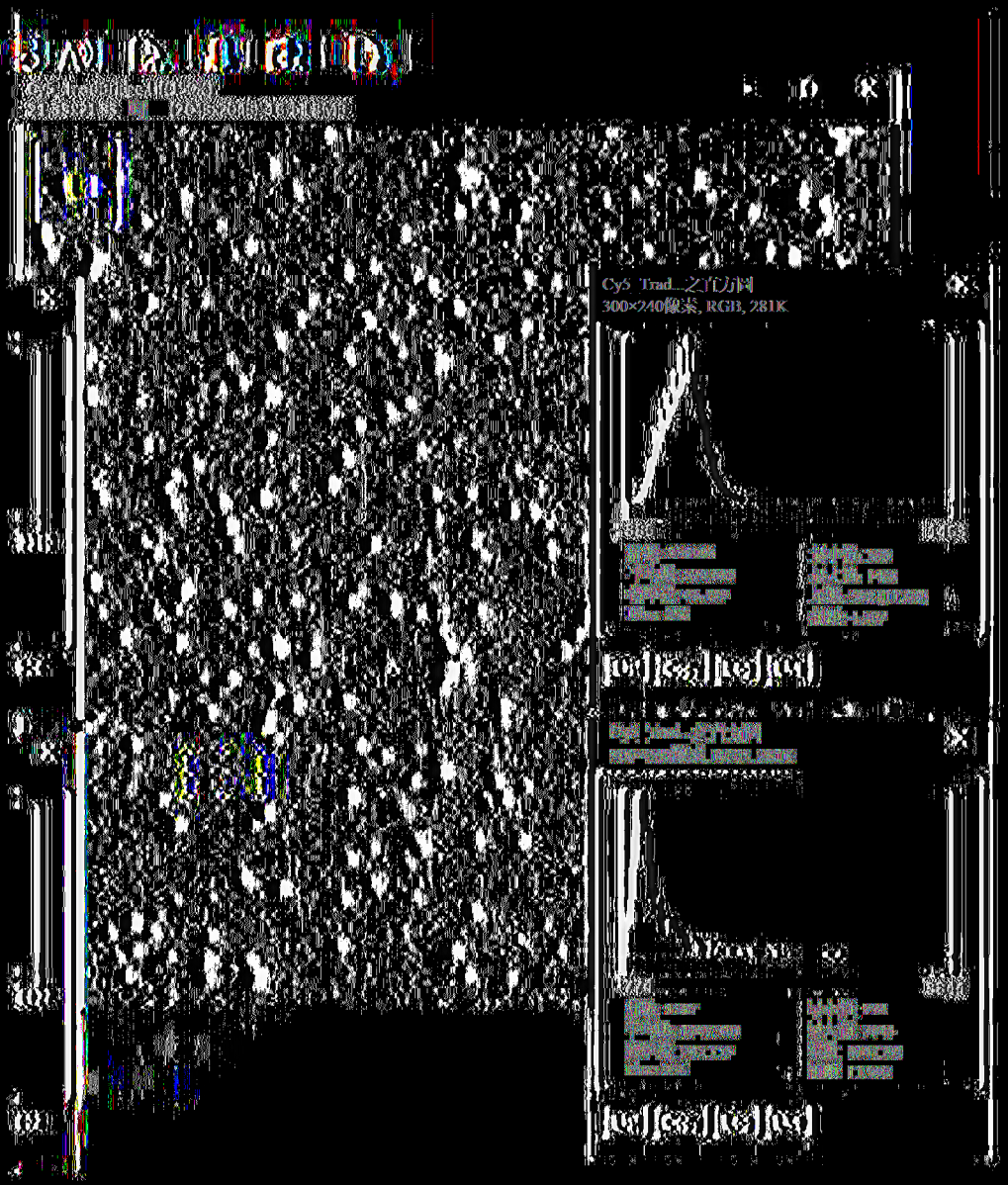


圖21

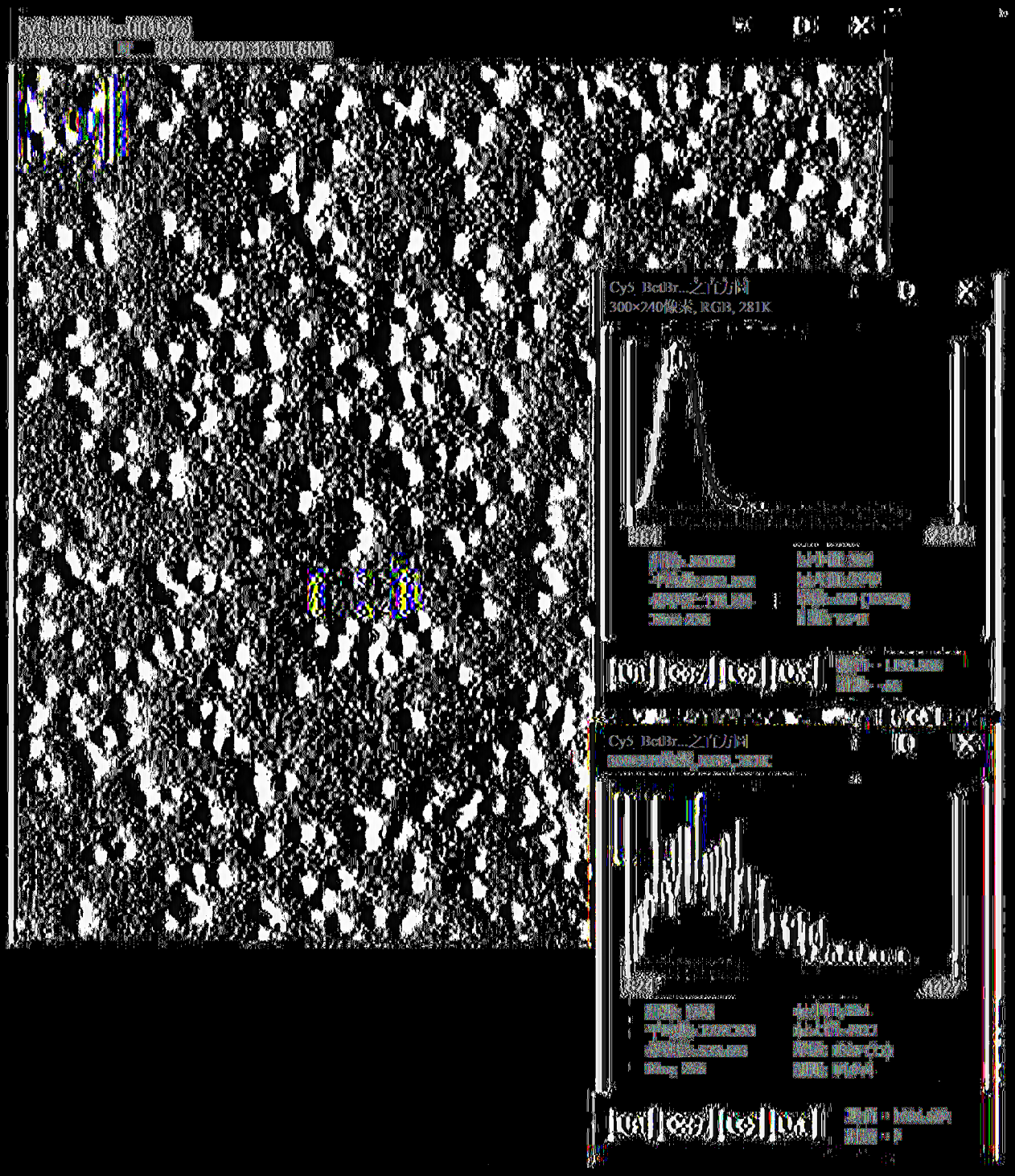
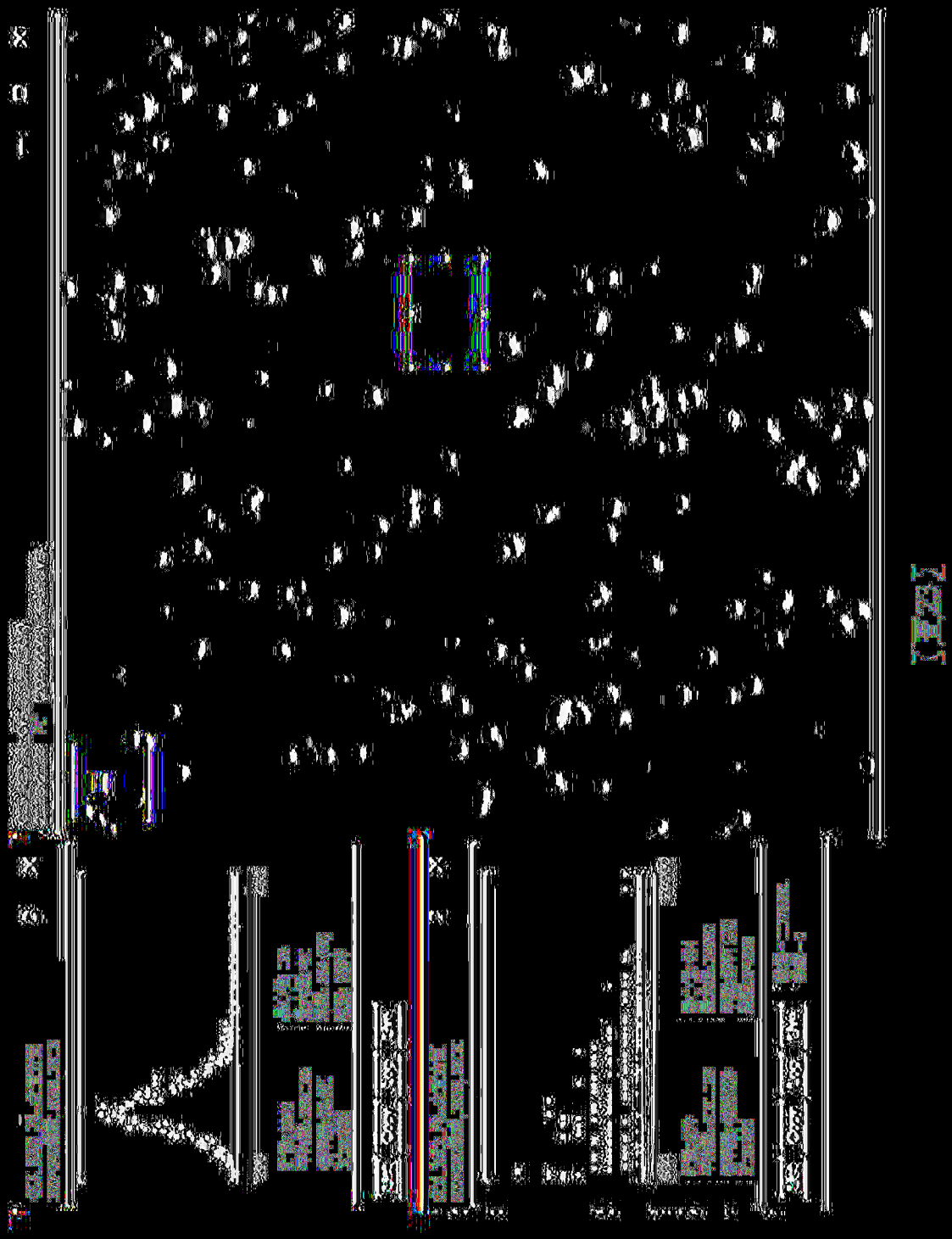
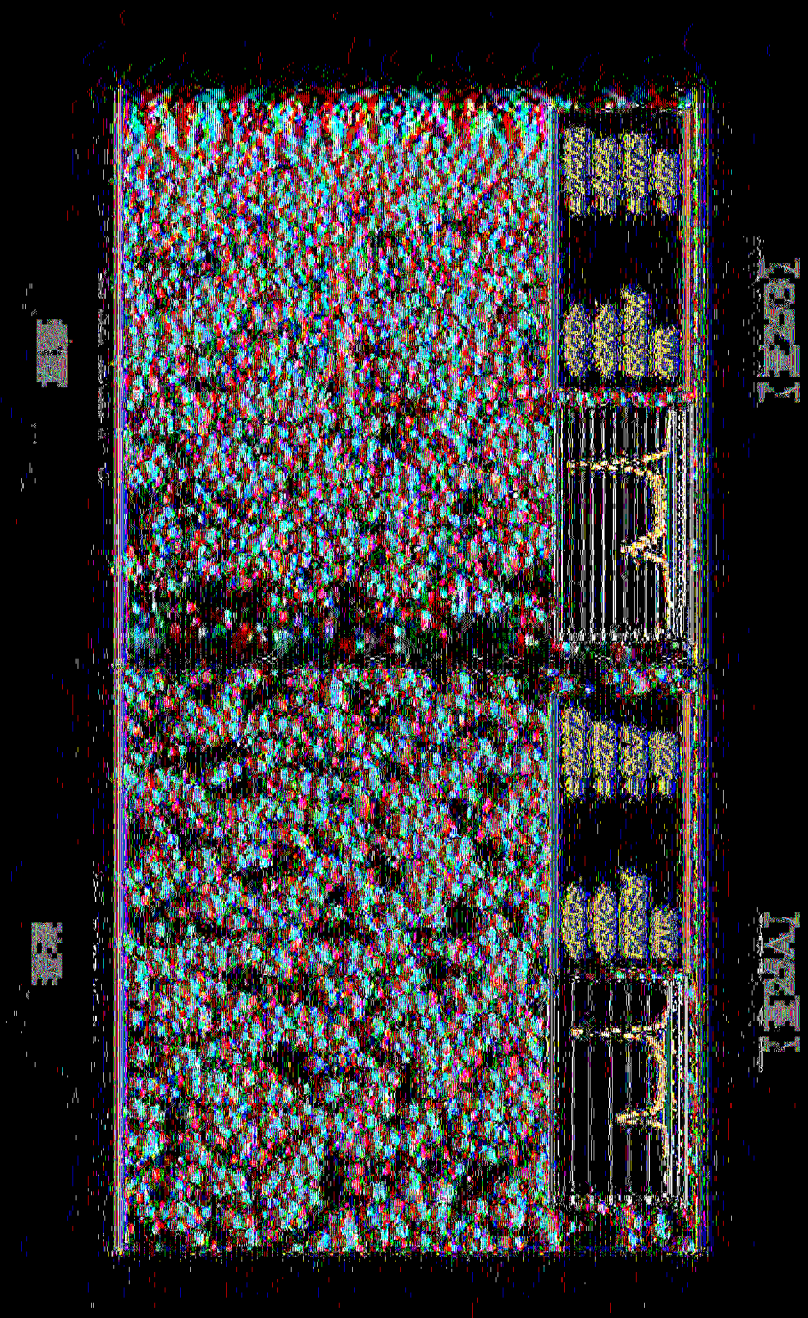


圖22



Cy3染料濃度(μM)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
Cy3染料濃度-500 nM
Cy3染料濃度-400 nM
Cy3染料濃度-300 nM
Cy3染料濃度-200 nM
Cy3染料濃度-100 nM
Cy3染料濃度-50 nM
Cy3染料濃度-25 nM
Cy3染料濃度-12.5 nM
Cy3染料濃度-6.25 nM
Cy3染料濃度-0 nM

圖 24



（第263圖）

（第264圖）

（327）

第一實施例
第二實施例
第一透鏡
第二透鏡
第三透鏡
第四透鏡
第五透鏡
第六透鏡
第七透鏡
第八透鏡
第九透鏡
第十透鏡
第十一透鏡
第十二透鏡
第十三透鏡
第十四透鏡
第十五透鏡
第十六透鏡
第十七透鏡
第十八透鏡
第十九透鏡
第二十透鏡
第二十一透鏡
第二十二透鏡
第二十三透鏡
第二十四透鏡
第二十五透鏡
第二十六透鏡
第二十七透鏡
第二十八透鏡
第二十九透鏡
第三十透鏡
第三十一透鏡
第三十二透鏡
第三十三透鏡
第三十四透鏡
第三十五透鏡
第三十六透鏡
第三十七透鏡
第三十八透鏡
第三十九透鏡
第四十透鏡
第四十一透鏡
第四十二透鏡
第四十三透鏡
第四十四透鏡
第四十五透鏡
第四十六透鏡
第四十七透鏡
第四十八透鏡
第四十九透鏡
第五十透鏡
第五十一透鏡
第五十二透鏡
第五十三透鏡
第五十四透鏡
第五十五透鏡
第五十六透鏡
第五十七透鏡
第五十八透鏡
第五十九透鏡
第六十透鏡
第六十一透鏡
第六十二透鏡
第六十三透鏡
第六十四透鏡
第六十五透鏡
第六十六透鏡
第六十七透鏡
第六十八透鏡
第六十九透鏡
第七十透鏡
第七十一透鏡
第七十二透鏡
第七十三透鏡
第七十四透鏡
第七十五透鏡
第七十六透鏡
第七十七透鏡
第七十八透鏡
第七十九透鏡
第八十透鏡
第八十一透鏡
第八十二透鏡
第八十三透鏡
第八十四透鏡
第八十五透鏡
第八十六透鏡
第八十七透鏡
第八十八透鏡
第八十九透鏡
第九十透鏡
第九十一透鏡
第九十二透鏡
第九十三透鏡
第九十四透鏡
第九十五透鏡
第九十六透鏡
第九十七透鏡
第九十八透鏡
第九十九透鏡
第一百透鏡
第一百一透鏡
第一百二透鏡
第一百三透鏡
第一百四透鏡
第一百五透鏡
第一百六透鏡
第一百七透鏡
第一百八透鏡
第一百九透鏡
第一百十透鏡
第一百十一透鏡
第一百十二透鏡
第一百十三透鏡
第一百十四透鏡
第一百十五透鏡
第一百十六透鏡
第一百十七透鏡
第一百十八透鏡
第一百十九透鏡
第一百二十透鏡
第一百二十一透鏡
第一百二十二透鏡
第一百二十三透鏡
第一百二十四透鏡
第一百二十五透鏡
第一百二十六透鏡
第一百二十七透鏡
第一百二十八透鏡
第一百二十九透鏡
第一百三十透鏡
第一百三十一透鏡
第一百三十二透鏡
第一百三十三透鏡
第一百三十四透鏡
第一百三十五透鏡
第一百三十六透鏡
第一百三十七透鏡
第一百三十八透鏡
第一百三十九透鏡
第一百四十透鏡
第一百四十一透鏡
第一百四十二透鏡
第一百四十三透鏡
第一百四十四透鏡
第一百四十五透鏡
第一百四十六透鏡
第一百四十七透鏡
第一百四十八透鏡
第一百四十九透鏡
第一百五十透鏡
第一百五十一透鏡
第一百五十二透鏡
第一百五十三透鏡
第一百五十四透鏡
第一百五十五透鏡
第一百五十六透鏡
第一百五十七透鏡
第一百五十八透鏡
第一百五十九透鏡
第一百六十透鏡
第一百六十一透鏡
第一百六十二透鏡
第一百六十三透鏡
第一百六十四透鏡
第一百六十五透鏡
第一百六十六透鏡
第一百六十七透鏡
第一百六十八透鏡
第一百六十九透鏡
第一百七十透鏡
第一百七十一透鏡
第一百七十二透鏡
第一百七十三透鏡
第一百七十四透鏡
第一百七十五透鏡
第一百七十六透鏡
第一百七十七透鏡
第一百七十八透鏡
第一百七十九透鏡
第一百八十透鏡
第一百八十一透鏡
第一百八十二透鏡
第一百八十三透鏡
第一百八十四透鏡
第一百八十五透鏡
第一百八十六透鏡
第一百八十七透鏡
第一百八十八透鏡
第一百八十九透鏡
第一百九十透鏡
第一百九十一透鏡
第一百九十二透鏡
第一百九十三透鏡
第一百九十四透鏡
第一百九十五透鏡
第一百九十六透鏡
第一百九十七透鏡
第一百九十八透鏡
第一百九十九透鏡
第二百透鏡
第二百一透鏡
第二百二透鏡
第二百三透鏡
第二百四透鏡
第二百五透鏡
第二百六透鏡
第二百七透鏡
第二百八透鏡
第二百九透鏡
第二百十透鏡
第二百十一透鏡
第二百十二透鏡
第二百十三透鏡
第二百十四透鏡
第二百十五透鏡
第二百十六透鏡
第二百十七透鏡
第二百十八透鏡
第二百十九透鏡
第二百二十透鏡
第二百二十一透鏡
第二百二十二透鏡
第二百二十三透鏡
第二百二十四透鏡
第二百二十五透鏡
第二百二十六透鏡
第二百二十七透鏡
第二百二十八透鏡
第二百二十九透鏡
第二百三十透鏡
第二百三十一透鏡
第二百三十二透鏡
第二百三十三透鏡
第二百三十四透鏡
第二百三十五透鏡
第二百三十六透鏡
第二百三十七透鏡
第二百三十八透鏡
第二百三十九透鏡
第二百四十透鏡
第二百四十一透鏡
第二百四十二透鏡
第二百四十三透鏡
第二百四十四透鏡
第二百四十五透鏡
第二百四十六透鏡
第二百四十七透鏡
第二百四十八透鏡
第二百四十九透鏡
第二百五十透鏡
第二百五十一透鏡
第二百五十二透鏡
第二百五十三透鏡
第二百五十四透鏡
第二百五十五透鏡
第二百五十六透鏡
第二百五十七透鏡
第二百五十八透鏡
第二百五十九透鏡
第二百六十透鏡
第二百六十一透鏡
第二百六十二透鏡
第二百六十三透鏡
第二百六十四透鏡
第二百六十五透鏡
第二百六十六透鏡
第二百六十七透鏡
第二百六十八透鏡
第二百六十九透鏡
第二百七十透鏡
第二百七十一透鏡
第二百七十二透鏡
第二百七十三透鏡
第二百七十四透鏡
第二百七十五透鏡
第二百七十六透鏡
第二百七十七透鏡
第二百七十八透鏡
第二百七十九透鏡
第二百八十透鏡
第二百八十一透鏡
第二百八十二透鏡
第二百八十三透鏡
第二百八十四透鏡
第二百八十五透鏡
第二百八十六透鏡
第二百八十七透鏡
第二百八十八透鏡
第二百八十九透鏡
第二百九十透鏡
第二百九十一透鏡
第二百九十二透鏡
第二百九十三透鏡
第二百九十四透鏡
第二百九十五透鏡
第二百九十六透鏡
第二百九十七透鏡
第二百九十八透鏡
第二百九十九透鏡
第三百透鏡
第三百一透鏡
第三百二透鏡
第三百三透鏡
第三百四透鏡
第三百五透鏡
第三百六透鏡
第三百七透鏡
第三百八透鏡
第三百九透鏡
第三百十透鏡
第三百十一透鏡
第三百十二透鏡
第三百十三透鏡
第三百十四透鏡
第三百十五透鏡
第三百十六透鏡
第三百十七透鏡
第三百十八透鏡
第三百十九透鏡
第三百二十透鏡
第三百二十一透鏡
第三百二十二透鏡
第三百二十三透鏡
第三百二十四透鏡
第三百二十五透鏡
第三百二十六透鏡
第三百二十七透鏡
第三百二十八透鏡
第三百二十九透鏡
第三百三十透鏡
第三百三十一透鏡
第三百三十二透鏡
第三百三十三透鏡
第三百三十四透鏡
第三百三十五透鏡
第三百三十六透鏡
第三百三十七透鏡
第三百三十八透鏡
第三百三十九透鏡
第三百四十透鏡
第三百四十一透鏡
第三百四十二透鏡
第三百四十三透鏡
第三百四十四透鏡
第三百四十五透鏡
第三百四十六透鏡
第三百四十七透鏡
第三百四十八透鏡
第三百四十九透鏡
第三百五十透鏡
第三百五十一透鏡
第三百五十二透鏡
第三百五十三透鏡
第三百五十四透鏡
第三百五十五透鏡
第三百五十六透鏡
第三百五十七透鏡
第三百五十八透鏡
第三百五十九透鏡
第三百六十透鏡
第三百六十一透鏡
第三百六十二透鏡
第三百六十三透鏡
第三百六十四透鏡
第三百六十五透鏡
第三百六十六透鏡
第三百六十七透鏡
第三百六十八透鏡
第三百六十九透鏡
第三百七十透鏡
第三百七十一透鏡
第三百七十二透鏡
第三百七十三透鏡
第三百七十四透鏡
第三百七十五透鏡
第三百七十六透鏡
第三百七十七透鏡
第三百七十八透鏡
第三百七十九透鏡
第三百八十透鏡
第三百八十一透鏡
第三百八十二透鏡
第三百八十三透鏡
第三百八十四透鏡
第三百八十五透鏡
第三百八十六透鏡
第三百八十七透鏡
第三百八十八透鏡
第三百八十九透鏡
第三百九十透鏡
第三百九十一透鏡
第三百九十二透鏡
第三百九十三透鏡
第三百九十四透鏡
第三百九十五透鏡
第三百九十六透鏡
第三百九十七透鏡
第三百九十八透鏡
第三百九十九透鏡
第四百透鏡
第四百一透鏡
第四百二透鏡
第四百三透鏡
第四百四透鏡
第四百五透鏡
第四百六透鏡
第四百七透鏡
第四百八透鏡
第四百九透鏡
第四百十透鏡
第四百十一透鏡
第四百十二透鏡
第四百十三透鏡
第四百十四透鏡
第四百十五透鏡
第四百十六透鏡
第四百十七透鏡
第四百十八透鏡
第四百十九透鏡
第四百二十透鏡
第四百二十一透鏡
第四百二十二透鏡
第四百二十三透鏡
第四百二十四透鏡
第四百二十五透鏡
第四百二十六透鏡
第四百二十七透鏡
第四百二十八透鏡
第四百二十九透鏡
第四百三十透鏡
第四百三十一透鏡
第四百三十二透鏡
第四百三十三透鏡
第四百三十四透鏡
第四百三十五透鏡
第四百三十六透鏡
第四百三十七透鏡
第四百三十八透鏡
第四百三十九透鏡
第四百四十透鏡
第四百四十一透鏡
第四百四十二透鏡
第四百四十三透鏡
第四百四十四透鏡
第四百四十五透鏡
第四百四十六透鏡
第四百四十七透鏡
第四百四十八透鏡
第四百四十九透鏡
第四百五十透鏡
第四百五十一透鏡
第四百五十二透鏡
第四百五十三透鏡
第四百五十四透鏡
第四百五十五透鏡
第四百五十六透鏡
第四百五十七透鏡
第四百五十八透鏡
第四百五十九透鏡
第四百六十透鏡
第四百六十一透鏡
第四百六十二透鏡
第四百六十三透鏡
第四百六十四透鏡
第四百六十五透鏡
第四百六十六透鏡
第四百六十七透鏡
第四百六十八透鏡
第四百六十九透鏡
第四百七十透鏡
第四百七十一透鏡
第四百七十二透鏡
第四百七十三透鏡
第四百七十四透鏡
第四百七十五透鏡
第四百七十六透鏡
第四百七十七透鏡
第四百七十八透鏡
第四百七十九透鏡
第四百八十透鏡
第四百八十一透鏡
第四百八十二透鏡
第四百八十三透鏡
第四百八十四透鏡
第四百八十五透鏡
第四百八十六透鏡
第四百八十七透鏡
第四百八十八透鏡
第四百八十九透鏡
第四百九十透鏡
第四百九十一透鏡
第四百九十二透鏡
第四百九十三透鏡
第四百九十四透鏡
第四百九十五透鏡
第四百九十六透鏡
第四百九十七透鏡
第四百九十八透鏡
第四百九十九透鏡
第五百透鏡
第五百一透鏡
第五百二透鏡
第五百三透鏡
第五百四透鏡
第五百五透鏡
第五百六透鏡
第五百七透鏡
第五百八透鏡
第五百九透鏡
第五百十透鏡
第五百十一透鏡
第五百十二透鏡
第五百十三透鏡
第五百十四透鏡
第五百十五透鏡
第五百十六透鏡
第五百十七透鏡
第五百十八透鏡
第五百十九透鏡
第五百二十透鏡
第五百二十一透鏡
第五百二十二透鏡
第五百二十三透鏡
第五百二十四透鏡
第五百二十五透鏡
第五百二十六透鏡
第五百二十七透鏡
第五百二十八透鏡
第五百二十九透鏡
第五百三十透鏡
第五百三十一透鏡
第五百三十二透鏡
第五百三十三透鏡
第五百三十四透鏡
第五百三十五透鏡
第五百三十六透鏡
第五百三十七透鏡
第五百三十八透鏡
第五百三十九透鏡
第五百四十透鏡
第五百四十一透鏡
第五百四十二透鏡
第五百四十三透鏡
第五百四十四透鏡
第五百四十五透鏡
第五百四十六透鏡
第五百四十七透鏡
第五百四十八透鏡
第五百四十九透鏡
第五百五十透鏡
第五百五十一透鏡
第五百五十二透鏡
第五百五十三透鏡
第五百五十四透鏡
第五百五十五透鏡
第五百五十六透鏡
第五百五十七透鏡
第五百五十八透鏡
第五百五十九透鏡
第五百六十透鏡
第五百六十一透鏡
第五百六十二透鏡
第五百六十三透鏡
第五百六十四透鏡
第五百六十五透鏡
第五百六十六透鏡
第五百六十七透鏡
第五百六十八透鏡
第五百六十九透鏡
第五百七十透鏡
第五百七十一透鏡
第五百七十二透鏡
第五百七十三透鏡
第五百七十四透鏡
第五百七十五透鏡
第五百七十六透鏡
第五百七十七透鏡
第五百七十八透鏡
第五百七十九透鏡
第五百八十透鏡
第五百八十一透鏡
第五百八十二透鏡
第五百八十三透鏡
第五百八十四透鏡
第五百八十五透鏡
第五百八十六透鏡
第五百八十七透鏡
第五百八十八透鏡
第五百八十九透鏡
第五百九十透鏡
第五百九十一透鏡
第五百九十二透鏡
第五百九十三透鏡
第五百九十四透鏡
第五百九十五透鏡
第五百九十六透鏡
第五百九十七透鏡
第五百九十八透鏡
第五百九十九透鏡
第六百透鏡
第六百一透鏡
第六百二透鏡
第六百三透鏡
第六百四透鏡
第六百五透鏡
第六百六透鏡
第六百七透鏡
第六百八透鏡
第六百九透鏡
第六百十透鏡
第六百十一透鏡
第六百十二透鏡
第六百十三透鏡
第六百十四透鏡
第六百十五透鏡
第六百十六透鏡
第六百十七透鏡
第六百十八透鏡
第六百十九透鏡
第六百二十透鏡
第六百二十一透鏡
第六百二十二透鏡
第六百二十三透鏡
第六百二十四透鏡
第六百二十五透鏡
第六百二十六透鏡
第六百二十七透鏡
第六百二十八透鏡
第六百二十九透鏡
第六百三十透鏡
第六百三十一透鏡
第六百三十二透鏡
第六百三十三透鏡
第六百三十四透鏡
第六百三十五透鏡
第六百三十六透鏡
第六百三十七透鏡
第六百三十八透鏡
第六百三十九透鏡
第六百四十透鏡
第六百四十一透鏡
第六百四十二透鏡
第六百四十三透鏡
第六百四十四透鏡
第六百四十五透鏡
第六百四十六透鏡
第六百四十七透鏡
第六百四十八透鏡
第六百四十九透鏡
第六百五十透鏡
第六百五十一透鏡
第六百五十二透鏡
第六百五十三透鏡
第六百五十四透鏡
第六百五十五透鏡
第六百五十六透鏡
第六百五十七透鏡
第六百五十八透鏡
第六百五十九透鏡
第六百六十透鏡
第六百六十一透鏡
第六百六十二透鏡
第六百六十三透鏡
第六百六十四透鏡
第六百六十五透鏡
第六百六十六透鏡
第六百六十七透鏡
第六百六十八透鏡
第六百六十九透鏡
第六百七十透鏡
第六百七十一透鏡
第六百七十二透鏡
第六百七十三透鏡
第六百七十四透鏡
第六百七十五透鏡
第六百七十六透鏡
第六百七十七透鏡
第六百七十八透鏡
第六百七十九透鏡
第六百八十透鏡
第六百八十一透鏡
第六百八十二透鏡
第六百八十三透鏡
第六百八十四透鏡
第六百八十五透鏡
第六百八十六透鏡
第六百八十七透鏡
第六百八十八透鏡
第六百八十九透鏡
第六百九十透鏡
第六百九十一透鏡
第六百九十二透鏡
第六百九十三透鏡
第六百九十四透鏡
第六百九十五透鏡
第六百九十六透鏡
第六百九十七透鏡
第六百九十八透鏡
第六百九十九透鏡
第七百透鏡
第七百一透鏡
第七百二透鏡
第七百三透鏡
第七百四透鏡
第七百五透鏡
第七百六透鏡
第七百七透鏡
第七百八透鏡
第七百九透鏡
第七百十透鏡
第七百十一透鏡
第七百十二透鏡
第七百十三透鏡
第七百十四透鏡
第七百十五透鏡
第七百十六透鏡
第七百十七透鏡
第七百十八透鏡
第七百十九透鏡
第七百二十透鏡
第七百二十一透鏡
第七百二十二透鏡
第七百二十三透鏡
第七百二十四透鏡
第七百二十五透鏡
第七百二十六透鏡
第七百二十七透鏡
第七百二十八透鏡
第七百二十九透鏡
第七百三十透鏡
第七百三十一透鏡
第七百三十二透鏡
第七百三十三透鏡
第七百三十四透鏡
第七百三十五透鏡
第七百三十六透鏡
第七百三十七透鏡
第七百三十八透鏡
第七百三十九透鏡
第七百四十透鏡
第七百四十一透鏡
第七百四十二透鏡
第七百四十三透鏡
第七百四十四透鏡
第七百四十五透鏡
第七百四十六透鏡
第七百四十七透鏡
第七百四十八透鏡
第七百四十九透鏡
第七百五十透鏡
第七百五十一透鏡
第七百五十二透鏡
第七百五十三透鏡
第七百五十四透鏡
第七百五十五透鏡
第七百五十六透鏡
第七百五十七透鏡
第七百五十八透鏡
第七百五十九透鏡
第七百六十透鏡
第七百六十一透鏡
第七百六十二透鏡
第七百六十三透鏡
第七百六十四透鏡
第七百六十五透鏡
第七百六十六透鏡
第七百六十七透鏡
第七百六十八透鏡
第七百六十九透鏡
第七百七十透鏡
第七百七十一透鏡
第七百七十二透鏡
第七百七十三透鏡
第七百七十四透鏡
第七百七十五透鏡
第七百七十六透鏡
第七百七十七透鏡
第七百七十八透鏡
第七百七十九透鏡
第七百八十透鏡
第七百八十一透鏡
第七百八十二透鏡
第七百八十三透鏡
第七百八十四透鏡
第七百八十五透鏡
第七百八十六透鏡
第七百八十七透鏡
第七百八十八透鏡
第七百八十九透鏡
第七百九十透鏡
第七百九十一透鏡
第七百九十二透鏡
第七百九十三透鏡
第七百九十四透鏡
第七百九十五透鏡
第七百九十六透鏡
第七百九十七透鏡
第七百九十八透鏡
第七百九十九透鏡
第八百透鏡
第八百一透鏡
第八百二透鏡
第八百三透鏡
第八百四透鏡
第八百五透鏡
第八百六透鏡
第八百七透鏡
第八百八透鏡
第八百九透鏡
第八百十透鏡
第八百十一透鏡
第八百十二透鏡
第八百十三透鏡
第八百十四透鏡
第八百十五透鏡
第八百十六透鏡
第八百十七透鏡
第八百十八透鏡
第八百十九透鏡
第八百二十透鏡
第八百二十一透鏡
第八百二十二透鏡
第八百二十三透鏡
第八百二十四透鏡
第八百二十五透鏡
第八百二十六透鏡
第八百二十七透鏡
第八百二十八透鏡
第八百二十九透鏡
第八百三十透鏡
第八百三十一透鏡
第八百三十二透鏡
第八百三十三透鏡
第八百三十四透鏡
第八百三十五透鏡
第八百三十六透鏡
第八百三十七透鏡
第八百三十八透鏡
第八百三十九透鏡
第八百四十透鏡
第八百四十一透鏡
第八百四十二透鏡
第八百四十三透鏡
第八百四十四透鏡
第八百四十五透鏡
第八百四十六透鏡
第八百四十七透鏡
第八百四十八透鏡
第八百四十九透鏡
第八百五十透鏡
第八百五十一透鏡
第八百五十二透鏡
第八百五十三透鏡
第八百五十四透鏡
第八百五十五透鏡
第八百五十六透鏡
第八百五十七透鏡
第八百五十八透鏡
第八百五十九透鏡
第八百六十透鏡
第八百六十一透鏡
第八百六十二透鏡
第八百六十三透鏡
第八百六十四透鏡
第八百六十五透鏡
第八百六十六透鏡
第八百六十七透鏡
第八百六十八透鏡
第八百六十九透鏡
第八百七十透鏡
第八百七十一透鏡
第八百七十二透鏡
第八百七十三透鏡
第八百七十四透鏡
第八百七十五透鏡
第八百七十六透鏡
第八百七十七透鏡
第八百七十八透鏡
第八百七十九透鏡
第八百八十透鏡
第八百八十一透鏡
第八百八十二透鏡
第八百八十三透鏡
第八百八十四透鏡
第八百八十五透鏡
第八百八十六透鏡
第八百八十七透鏡
第八百八十八透鏡
第八百八十九透鏡
第八百九十透鏡
第八百九十一透鏡
第八百九十二透鏡
第八百九十三透鏡
第八百九十四透鏡
第八百九十五透鏡
第八百九十六透鏡
第八百九十七透鏡
第八百九十八透鏡
第八百九十九透鏡
第九百透鏡
第九百一透鏡
第九百二透鏡
第九百三透鏡
第九百四透鏡
第九百五透鏡
第九百六透鏡
第九百七透鏡
第九百八透鏡
第九百九透鏡
第九百十透鏡
第九百十一透鏡
第九百十二透鏡
第九百十三透鏡
第九百十四透鏡
第九百十五透鏡
第九百十六透鏡
第九百十七透鏡
第九百十八透鏡
第九百十九透鏡
第九百二十透鏡
第九百二十一透鏡
第九百二十二透鏡
第九百二十三透鏡
第九百二十四透鏡
第九百二十五透鏡
第九百二十六透鏡
第九百二十七透鏡
第九百二十八透鏡
第九百二十九透鏡
第九百三十透鏡
第九百三十一透鏡
第九百三十二透鏡
第九百三十三透鏡
第九百三十四透鏡
第九百三十五透鏡
第九百三十六透鏡
第九百三十七透鏡
第九百三十八透鏡
第九百三十九透鏡
第九百四十透鏡
第九百四十一透鏡
第九百四十二透鏡
第九百四十三透鏡
第九百四十四透鏡
第九百四十五透鏡
第九百四十六透鏡
第九百四十七透鏡
第九百四十八透鏡
第九百四十九透鏡
第九百五十透鏡
第九百五十一透鏡
第九百五十二透鏡
第九百五十三透鏡
第九百五十四透鏡
第九百五十五透鏡
第九百五十六透鏡
第九百五十七透鏡
第九百五十八透鏡
第九百五十九透鏡
第九百六十透鏡
第九百六十一透鏡
第九百六十二透鏡
第九百六十三透鏡
第九百六十四透鏡
第九百六十五透鏡
第九百六十六透鏡
第九百六十七透鏡
第九百六十八透鏡
第九百六十九透鏡
第九百七十透鏡
第九百七十一透鏡
第九百七十二透鏡
第九百七十三透鏡
第九百七十四透鏡
第九百七十五透鏡
第九百七十六透鏡
第九百七十七透鏡
第九百七十八透鏡
第九百七十九透鏡
第九百八十透鏡
第九百八十一透鏡
第九百八十二透鏡
第九百八十三透鏡
第九百八十四透鏡
第九百八十五透鏡
第九百八十六透鏡
第九百八十七透鏡
第九百八十八透鏡
第九百八十九透鏡
第九百九十透鏡
第九百九十一透鏡
第九百九十二透鏡
第九百九十三透鏡
第九百九十四透鏡
第九百九十五透鏡
第九百九十六透鏡
第九百九十七透鏡
第九百九十八透鏡
第九百九十九透鏡
第一千透鏡
第一千一透鏡
第一千二透鏡
第一千三透鏡
第一千四透鏡
第一千五透鏡
第一千六透鏡
第一千七透鏡
第一千八透鏡
第一千九透鏡
第一千十透鏡
第一千十一透鏡
第一千十二透鏡
第一千十三透鏡
第一千十四透鏡
第一千十五透鏡
第一千十六透鏡
第一千十七透鏡
第一千十八透鏡
第一千十九透鏡
第一千二十透鏡
第一千二十一透鏡
第一千二十二透鏡
第一千二十三透鏡
第一千二十四透鏡
第一千二十五透鏡
第一千二十六透鏡
第一千二十七透鏡
第一千二十八透鏡
第一千二十九透鏡
第一千三十透鏡
第一千三十一透鏡
第一千三十二透鏡
第一千三十三透鏡
第一千三十四透鏡
第一千三十五透鏡
第一千三十六透鏡
第一千三十七透鏡
第一千三十八透鏡
第一千三十九透鏡
第一千四十透鏡
第一千四十一透鏡
第一千四十二透鏡
第一千四十三透鏡
第一千四十四透鏡
第一千四十五透鏡
第一千四十六透鏡
第一千四十七透鏡
第一千四十八透鏡
第一千四十九透鏡
第一千五十透鏡
第一千五十一透鏡
第一千五十二透鏡
第一千五十三透鏡
第一千五十四透鏡
第一千五十五透鏡
第一千五十六透鏡
第一千五十七透鏡
第一千五十八透鏡
第一千五十九透鏡
第一千六十透鏡
第一千六十一透鏡
第一千六十二透鏡
第一千六十三透鏡
第一千六十四透鏡
第一千六十五透鏡
第一千六十六透鏡
第一千六十七透鏡
第一千六十八透鏡
第一千六十九透鏡
第一千七十透鏡
第一千七十一透鏡
第一千七十二透鏡
第一千七十三透鏡
第一千七十四透鏡
第一千七十五透鏡
第一千七十六透鏡
第一千七十七透鏡
第一千七十八透鏡
第一千七十九透鏡
第一千八十透鏡
第一千八十一透鏡
第一千八十二透鏡
第一千八十三透鏡
第一千八十四透鏡
第一千八十五透鏡
第一千八十六透鏡
第一千八十七透鏡
第一千八十八透鏡
第一千八十九透鏡
第一千九十透鏡
第一千九十一透鏡
第一千九十二透鏡
第一千九十三透鏡
第一千九十四透鏡
第一千九十五透鏡
第一千九十六透鏡
第一千九十七透鏡
第一千九十八透鏡
第一千九十九透鏡
第一千一百透鏡
第一千一百一透鏡
第一千一百二透鏡
第一千一百三透鏡
第一千一百四透鏡
第一千一百五透鏡
第一千一百六透鏡
第一千一百七透鏡
第一千一百八透鏡
第一千一百九透鏡
第一千一百十透鏡
第一千一百十一透鏡
第一千一百十二透鏡
第一千一百十三透鏡
第一千一百十四透鏡
第一千一百十五透鏡
第一千一百十六透鏡
第一千一百十七透鏡
第一千一百十八透鏡
第一千一百十九透鏡
第一千一百二十透鏡
第一千一百二十一透鏡
第一千一百二十二透鏡
第一千一百二十三透鏡
第一千一百二十四透鏡
第一千一百二十五透鏡
第一千一百二十六透鏡
第一千一百二十七透鏡
第一千一百二十八透鏡
第一千一百二十九透鏡
第一千一百三十透鏡
第一千一百三十一透鏡
第一千一百三十二透鏡
第一千一百三十三透鏡
第一千一百三十四透鏡
第一千一百三十五透鏡
第一千一百三十六透鏡
第一千一百三十七透鏡
第一千一百三十八透鏡
第一千一百三十九透鏡
第一千一百四十透鏡
第一千一百四十一透鏡
第一千一百四十二透鏡
第一千一百四十三透鏡
第一千一百四十四透鏡
第一千一百四十五透鏡
第一千一百四十六透鏡
第一千一百四十七透鏡
第一千一百四十八透鏡
第一千一百四十九透鏡
第一千一百五十透鏡
第一千一百五十一透鏡
第一千一百五十二透鏡
第一千一百五十三透鏡
第一千一百五十四透鏡
第一千一百五十五透鏡
第一千一百五十六透鏡
第一千一百五十七透鏡
第一千一百五十八透鏡
第一千一百五十九透鏡
第一千一百六十透鏡
第一千一百六十一透鏡
第一千一百六十二透鏡
第一千一百六十三透鏡
第一千一百六十四透鏡
第一千一百六十五透鏡
第一千一百六十六透鏡
第一千一百六十七透鏡
第一千一百六十八透鏡
第一千一百六十九透鏡
第一千一百七十透鏡
第一千一百七十一透鏡
第一千一百七十二透鏡
第一千一百七十三透鏡
第一千一百七十四透鏡
第一千一百七十五透鏡
第一千一百七十六透鏡
第一千一百七十七透鏡
第一千一百七十八透鏡
第一千一百七十九透鏡
第一千一百八十透鏡
第一千一百八十一透鏡
第一千一百八十二透鏡
第一千一百八十三透鏡
第一千一百八十四透鏡
第一千一百八十五透鏡
第一千一百八十六透鏡
第一千一百八十七透鏡
第一千一百八十八透鏡
第一千一百八十九透鏡
第一千一百九十透鏡
第一千一百九十一透鏡
第一千一百九十二透鏡
第一千一百九十三透鏡
第一千一百九十四透鏡
第一千一百九十五透鏡
第一千一百九十六透鏡
第一千一百九十七透鏡
第一千一百九十八透鏡
第一千一百九十九透鏡
第一千二百透鏡
第一千二百一透鏡
第一千二百二透鏡
第一千二百三透鏡
第一千二百四透鏡
第一千二百五透鏡
第一千二百六透鏡
第一千二百七透鏡
第一千二百八透鏡
第一千二百九透鏡
第一千二百十透鏡
第一千二百十一透鏡
第一千二百十二透鏡
第一千二百十三透鏡
第一千二百十四透鏡
第一千二百十五透鏡
第一千二百十六透鏡
第一千二百十七透鏡
第一千二百十八透鏡
第一千二百十九透鏡
第一千二百二十透鏡
第一千二百二十一透鏡
第一千二百二十二透鏡
第一千二百二十三透鏡
第一千二百二十四透鏡
第一千二百二十五透鏡
第一千二百二十六透鏡
第一千二百二十七透鏡
第一千二百二十八透鏡
第一千二百二十九透鏡
第一千二百三十透鏡
第一千二百三十一透鏡
第一千二百三十二透鏡
第一千二百三十三透鏡
第一千二百三十四透鏡
第一千二百三十五透鏡
第一千二百三十六透鏡
第一千二百三十七透鏡
第一千二百三十八透鏡
第一千二百三十九透鏡
第一千二百四十透鏡
第一千二百四十一透鏡
第一千二百四十二透鏡
第一千二百四十三透鏡
第一千二百四十四透鏡
第一千二百四十五透鏡
第一千二百四十六透鏡
第一千二百四十七透鏡
第一千二百四十八透鏡
第一千二百四十九透鏡
第一千二百五十透鏡
第一千二百五十一透鏡
第一千二百五十二透鏡
第一千二百五十三透鏡
第一千二百五十四透鏡
第一千二百五十五透鏡
第一千二百五十六透鏡
第一千二百五十七透鏡
第一千二百五十八透鏡
第一千二百五十九透鏡
第一千二百六十透鏡
第一千二百六十一透鏡
第一千二百六十二透鏡
第一千二百六十三透鏡
第一千二百六十四透鏡
第一千二百六十五透鏡
第一千二百六十六透鏡
第一千二百六十七透鏡
第一千二百六十八透鏡
第一千二百六十九透鏡
第一千二百七十透鏡
第一千二百七十一透鏡
第一千二百七十二透鏡
第一千二百七十三透鏡
第一千二百七十四透鏡
第一千二百七十五透鏡
第一千二百七十六透鏡
第一千二百七十七透鏡
第一千二百七十八透鏡
第一千二百七十九透鏡
第一千二百八十透鏡
第一千二百八十一透鏡
第一千二百八十二透鏡
第一千二百八十三透鏡
第一千二百八十四透鏡
第一千二百八十五透鏡
第一千二百八十六透鏡
第一千二百八十七透鏡
第一千二百八十八透鏡
第一千二百八十九透鏡
第一千二百九十透鏡
第一千二百九十一透鏡
第一千二百九十二透鏡
第一千二百九十三透鏡
第一千二百九十四透鏡
第一千二百九十五透鏡
第一千二百九十六透鏡
第一千二百九十七透鏡
第一千二百九十八透鏡
第一千二百九十九透鏡
第一千三百透鏡
第一千三百一透鏡
第一千三百二透鏡
第一千三百三透鏡
第一千三百四透鏡
第一千三百五透鏡
第一千三百六透鏡
第一千三百七透鏡
第一千三百八透鏡
第一千三百九透鏡
第一千三百十透鏡
第一千三百十一透鏡
第一千三百十二透鏡
第一千三百十三透鏡
第一千三百十四透鏡
第一千三百十五透鏡
第一千三百十六透鏡
第一千三百十七透鏡
第一千三百十八透鏡
第一千三百十九透鏡
第一千三百二十透鏡
第一千三百二十一透鏡
第一千三百二十二透鏡
第一千三百二十三透鏡
第一千三百二十四透鏡
第一千三百二十五透鏡
第一千三百二十六透鏡
第一千三百二十七透鏡
第一千三百二十八透鏡
第一千三百二十九透鏡
第一千三百三十透鏡
第一千三百三十一透鏡
第一千三百三十二透鏡
第一千三百三十三透鏡
第一千三百三十四透鏡
第一千三百三十五透鏡
第一千三百三十六透鏡
第一千三百三十七透鏡
第一千三百三十八透鏡
第一千三百三十九透鏡
第一千三百四十透鏡
第一千三百四十一透鏡
第一千三百四十二透鏡
第一千三百四十三透鏡
第一千三百四十四透鏡
第一千三百四十五透鏡
第一千三百四十六透鏡
第一千三百四十七透鏡
第一千三百四十八透鏡
第一千三百四十九透鏡
第一千三百五十透鏡
第一千三百五十一透鏡
第一千三百五十二透鏡
第一千三百五十三透鏡
第一千三百五十四透鏡
第一千三百五十五透鏡
第一千三百五十六透鏡
第一千三百五十七透鏡
第一千三百五十八透鏡
第一千三百五十九透鏡
第一千三百六十透鏡
第一千三百六十一透鏡
第一千三百六十二透鏡
第一千三百六十三透鏡
第一千三百六十四透鏡
第一千三百六十五透鏡
第一千三百六十六透鏡
第一千三百六十七透鏡
第一千三百六十八透鏡
第一千三百六十九透鏡
第一千三百七十透鏡
第一千三百七十一透鏡
第一千三百七十二透鏡
第一千三百七十三透鏡
第一千三百七十四透鏡
第一千三百七十五透鏡
第一千三百七十六透鏡
第一千三百七十七透鏡
第一千三百七十八透鏡
第一千三百七十九透鏡
第一千三百八十透鏡
第一千三百八十一透鏡
第一千三百八十二透鏡
第一千三百八十三透鏡
第一千三百八十四透鏡
第一千三百八十五透鏡
第一千三百八十六透鏡
第一千三百八十七透鏡
第一千三百八十八透鏡
第一千三百八十九透鏡
第一千三百九十透鏡
第一千三百九十一透鏡
第一千三百九十二透鏡
第一千三百九十三透鏡
第一千三百九十四透鏡
第一千三百九十五透鏡
第一千三百九十六透鏡
第一千三百九十七透鏡
第一千三百九十八透鏡
第一千三百九十九透鏡
第一千四百透鏡
第一千四百一透鏡
第一千四百二透鏡
第一千四百三透鏡
第一千四百四透鏡
第一千四百五透鏡
第一千四百六透鏡
第一千四百七透鏡
第一千四百八透鏡
第一千四百九透鏡
第一千四百十透鏡
第一千四百十一透鏡
第一千四百十二透鏡
第一千四百十三透鏡
第一千四百十四透鏡
第一千四百十五透鏡
第一千四百十六透鏡
第一千四百十七透鏡
第一千四百十八透鏡
第一千四百十九透鏡
第一千四百二十透鏡
第一千四百二十一透鏡
第一千四百二十二透鏡
第一千四百二十三透鏡
第一千四百二十四透鏡
第一千四百二十五透鏡
第一千四百二十六透鏡
第一千四百二十七透鏡
第一千四百二十八透鏡
第一千四百二十九透鏡
第一千四百三十透鏡
第一千四百三十一透鏡
第一千四百三十二透鏡
第一千四百三十三透鏡
第一千四百三十四透鏡
第一千四百三十五透鏡
第一千四百三十六透鏡
第一千四百三十七透鏡
第一千四百三十八透鏡
第一千四百三十九透鏡
第一千四百四十透鏡
第一千四百四十一透鏡
第一千四百四十二透鏡
第一千四百四十三透鏡
第一千四百四十四透鏡
第一千四百四十五透鏡
第一千四百四十六透鏡
第一千四百四十七透鏡
第一千四百四十八透鏡
第一千四百四十九透鏡
第一千四百五十透鏡
第一千四百五十一透鏡
第一千四百五十二透鏡
第一千四百五十三透鏡
第一千四百五十四透鏡
第一千四百五十五透鏡
第一千四百五十六透

【圖29】



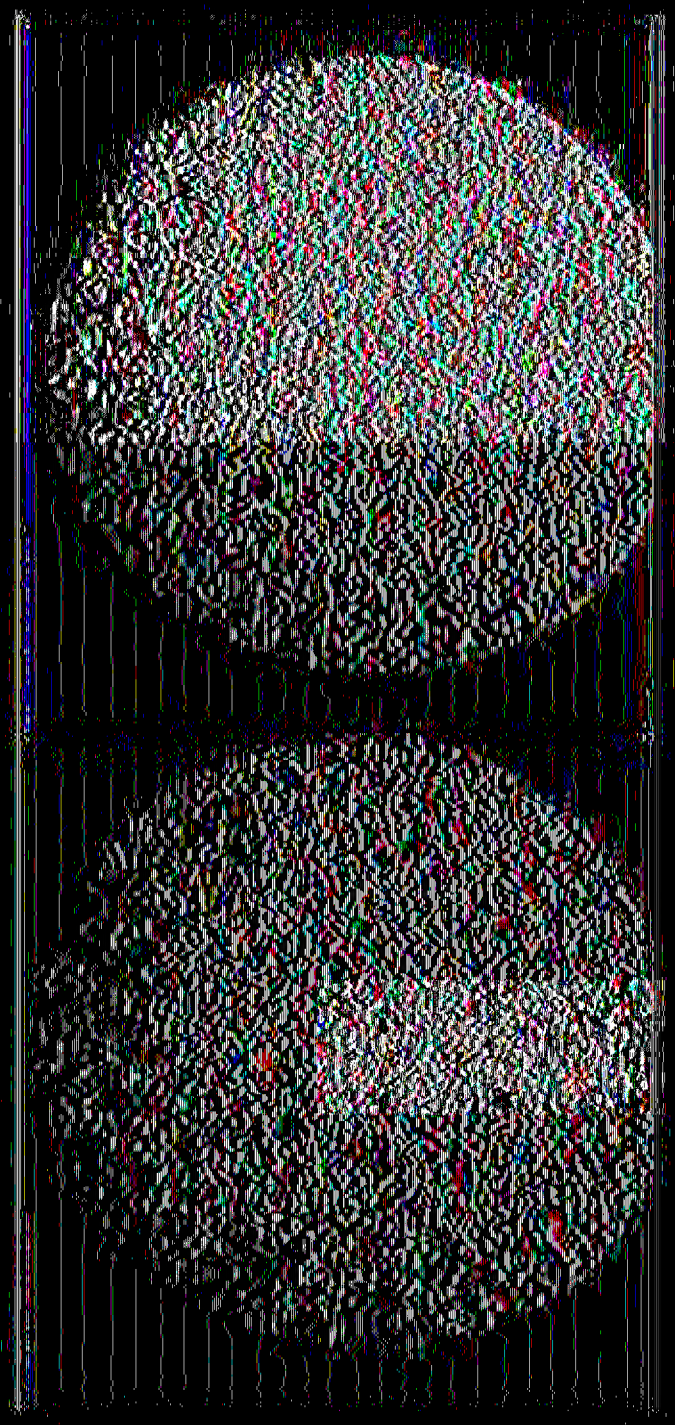
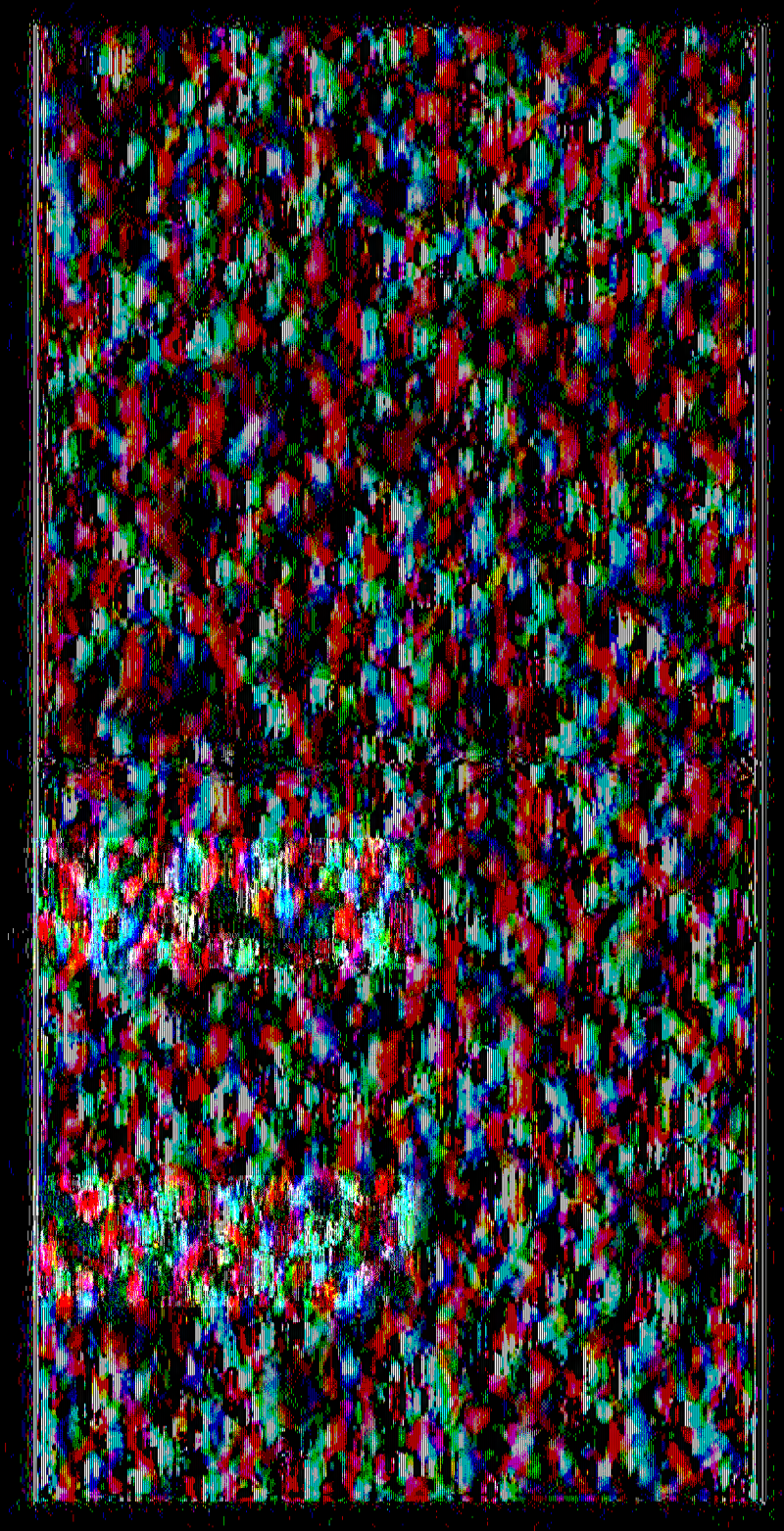


圖 3(c)



【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種核酸定序之方法，其包含：

(a) 提供表面，其具有與其偶合之至少一個聚合物塗層，該聚合物塗層包含與第一核酸分子偶合之聚合物；

(b) 將該第一核酸分子與第二核酸分子接觸，使該第二核酸分子與該第一核酸分子偶合；

(c) 於(b)之後，擴增該第二核酸分子或其衍生物；

(d) 獲得該表面之螢光影像，

其中當在該表面浸入緩衝液中，並使用倒置顯微鏡及相機在非信號飽和條件下獲得該表面之該螢光影像時，於(b)之後之該表面之該螢光影像呈現對比雜訊比為大於或等於10，且其中該第二核酸分子包含為螢光染料之可偵測標籤，及

其中在該擴增之前，在該表面之區域量測之背景螢光強度，該區域係自具有該至少一個聚合物塗層之該表面之離散區橫向移位之區域，不超過在離散區量測之強度的2倍。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中該聚合物為親水性聚合物。

【請求項3】

如請求項1之方法，其中當獲得該螢光影像時，該表面之該螢光影像在(b)之後呈現對比雜訊比為大於或等於40。

【請求項4】

如請求項1之方法，其中當獲得該螢光影像時，該表面之該螢光影像

在(b)之後呈現對比雜訊比為大於或等於20。

【請求項5】

如請求項1之方法，其中該至少一個聚合物塗層包含至少一個與該表面偶合之第一聚合物塗層，以及與該第一聚合物塗層偶合之第二聚合物塗層。

【請求項6】

如請求項1之方法，其中該至少一個聚合物塗層包含具有至少8個支鏈之分支鏈聚合物。

【請求項7】

如請求項1之方法，其中當該第二核酸分子或其衍生物經擴增及經花青染料-3標記時，且在該表面浸入該緩衝液中，並使用該倒置顯微鏡及該相機在非信號飽和條件下獲得該表面之該螢光影像時，該表面之該螢光影像呈現前景螢光強度與非特異性染料吸附背景(B_{inter})之螢光強度比為至少5:1。

【請求項8】

如請求項1之方法，其中該序列經由定序該第二核酸分子或其衍生物來確定。

【請求項9】

如請求項1之方法，其中該至少一個聚合物塗層包含：

(i) 包含與該表面偶合之第一單層聚合物分子之第一塗層；

(ii) 包含與該第一單層聚合物分子偶合之第二單層聚合物分子之第二塗層；

(iii) 包含與該第二單層聚合物分子偶合之第三單層聚合物分子之第三塗

層，其中該第一塗層、該第二塗層及該第三塗層之該等聚合物分子包含分支鏈聚合物分子。

【請求項10】

如請求項1之方法，其中該第一核酸分子係以大於或等於2,000個分子/μm^2之表面密度存在。

【請求項11】

如請求項1之方法，其中該第一核酸分子係以大於或等於10,000個分子/μm^2之表面密度存在。

【請求項12】

如請求項1之方法，其中該第一核酸分子係以小於或等於15,000個分子/μm^2之表面密度存在。

【請求項13】

如請求項1之方法，其中(b)包含使該表面與包含該第二核酸分子之溶液接觸，其中在該溶液中該第二核酸分子係呈低於1 nM之濃度。

【請求項14】

如請求項1之方法，其中(b)包含使該表面與包含該第二核酸分子之溶液接觸，其中在該溶液中該第二核酸分子係呈不大於或等於50 pM之濃度。

【請求項15】

如請求項1之方法，其中該第二核酸分子為包含重複之規律出現單體單元之單股多聚核酸分子。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中該單股多聚核酸分子之長度為至少10 kb。

【請求項17】

如請求項1之方法，其中該第二核酸分子為包含重複之規律出現單體單元之雙股多聚核酸分子。

【請求項18】

如請求項1之方法，其中該第一核酸分子係以跨越該表面之均勻表面密度存在。

【請求項19】

如請求項1之方法，其中該第一核酸分子在該表面之第一位置以第一局部表面密度存在，且在該表面之第二位置以第二局部表面密度存在，其中該第一局部表面密度不同於該第二局部表面密度。