	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2015-0119353 (43) 공개일자 2015년10월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <b>C12Q 1/68</b> (2006.01) (52) CPC특허분류 <b>C12Q 1/6869</b> (2013.01) <b>C12Q 2521/101</b> (2013.01) (21) 출원번호 <b>10-2015-7025411</b> (22) 출원일자(국제) <b>2014년02월20일</b> 심사청구일자 <b>없음</b> (85) 번역문제출일자 <b>2015년09월16일</b> (86) 국제출원번호 <b>PCT/US2014/017419</b> (87) 국제공개번호 <b>WO 2014/130686</b> 국제공개일자 <b>2014년08월28일</b> (30) 우선권주장 61/766,925 2013년02월20일 미국(US)		(71) 출원인 <b>이브 바이오메디컬, 인크.</b> 미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 프라이스 애비뉴 620 (72) 발명자 <b>코트세로글루, 테로필로스</b> 미국 94010 캘리포니아주 힐즈버로우 사우쓰다운 로드 1383 <b>파파디미트리우, 스테파노스</b> 미국 94086 캘리포니아주 서니베일 라 메사 테라 스 955-에프 (74) 대리인 <b>양영준, 김영</b>

전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **나노구조-기반 핵산 서열분석을 위한 방법 및 조성물**

# (57) 요약

본원은 나노구조-기반 서열분석 방법 및 시스템을 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2521/119 (2013.01)

C12Q 2521/543 (2013.01)

C12Q 2563/143 (2013.01)

C12Q 2565/631 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

폴리머라제를 표적 핵산 분자와 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 서열분석 조건은 적어도 1종의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 상기 폴리머라제는 고체 기판 상에 고정되어 있는 것인 단계;

나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계;

접촉시키는 단계 및 검출하는 단계를 다수회 반복하는 단계; 및

순차적으로, 적어도 1종의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재 하에 이동에서의 변화의 존재 또는 부재를 기반으로 하여, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계

를 포함하는, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 서열분석 조건이 단일 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 서열분석 조건이 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오시드 트리포스페이트가 속도-제한량으로 존재하는 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 고체 기판이 유리인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 폴리머라제가 RNA 폴리머라제인 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, RNA 폴리머라제가 박테리오파지 RNA 폴리머라제 및 박테리아 RNA 폴리머라제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 박테리오파지 RNA 폴리머라제가 T7 RNA 폴리머라제 및 T3 RNA 폴리머라제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 박테리아 RNA 폴리머라제가 이. 콜라이(*E. coli*) RNA 폴리머라제인 방법.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 폴리머라제가 DNA 폴리머라제인 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, DNA 폴리머라제가 phi29, T7 DNA 폴리머라제, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) DNA 폴리머라제, 및 Taq DNA 폴리머라제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 폴리머라제가 His-태그를 통해 고체 표면 상에 고정된 것인 방법.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 폴리머라제가 하나 이상의 비오틴-스트렙타비딘 결합을 통해 고체 표면 상에 고정된 것인 방법.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 진핵생물의 것인 방법.

**청구항 14**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 이중-가닥인 방법.

**청구항 15**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 단일-가닥인 방법.

**청구항 16**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 생물학적 샘플 내에 포함되어 있는 것인 방법.

**청구항 17**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 폴리머라제 프로모터 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자가 자기 태그를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 나노구조가 나노포어, 나노튜브 및 나노와이어로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 나노구조가 생물학적 나노구조, 고체 상태 나노구조 또는 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 검출하는 단계가 나노구조의 전류에서의 변화를 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 검출하는 단계가 나노구조의 이온 전도에서의 변화를 측정하는 것을 포함하는 것인 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 검출하는 단계가 CMOS 기반 제작 나노구조 및 전자기기 상에서 이동을 포획하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 표적 핵산 분자에 지향력을 적용하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 지향력이 자석에 의해 생성되는 것인 방법.

**청구항 26**

제24항에 있어서, 지향력이 유동 또는 압력에 의해 생성되는 것인 방법.

#### 청구항 27

폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계;

폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제1 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오시드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계;

제1 서열분석 조건 하에, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및

이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제1 뉴클레오시드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계

를 포함하는, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법.

#### 청구항 28

제27항에 있어서,

폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계;

폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제2 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제2 뉴클레오시드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계;

제2 서열분석 조건 하에 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및

이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제2 뉴클레오시드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계가 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계와 동시에 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 30

제28항에 있어서, 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계가 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계 전 또는 후에 순차적으로 수행되는 것인 방법.

#### 청구항 31

제28항에 있어서,

폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계;

폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제3 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제3 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제3 뉴클레오시드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계;

제3 서열분석 조건 하에 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및

이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제3 뉴클레오시드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 32

제31항에 있어서,

표적 핵산 분자 내에서 제1, 제2 및 제3 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 위치 정보로부터 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 33

제31항에 있어서,

폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계;

폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제4 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제4 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제4 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계;

제4 서열분석 조건 하에 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및

이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제4 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 34

표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법으로서,

1종 이상의 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계;

1종 이상의 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제1 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하는 것인 단계; 및

제1 서열분석 조건 하에, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동에서의 변화가 발생하는지 여부를 검출하는 단계이며,

여기서 이동에서의 변화가 발생하는 경우에, 방법은 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하고,

여기서 이동에서의 변화가 발생하지 않는 경우에, 방법은 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 제2 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제2 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고,

여기서 이동에서의 변화가 발생하는 경우에, 방법은 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하고,

여기서 이동에서의 변화가 발생하지 않는 경우에, 방법은 제3 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 제3 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제3 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하는 것인 단계;

순차적으로, 제1, 제2 또는 제3 서열분석 조건 하에 이동에서의 변화 발생을 기반으로 하여, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계

를 포함하는 방법.

### 청구항 35

다수의 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 포함하며,

여기서 고체 기판은 다수의 나노구조를 포함하는 것인 제조품.

### 청구항 36

제35항에 있어서, 고체 기판이 구리 및 PEG로 코팅된 것인 제조품.

**청구항 37**

제35항에 있어서, 고체 기판이 니켈 및 PEG로 코팅된 것인 제조품.

**청구항 38**

제35항에 있어서, 고체 기판이 Ni-NTA로 코팅된 것인 제조품.

**청구항 39**

제35항에 있어서, 고체 기판이 CMOS 또는 CCD인 제조품.

**청구항 40**

제35항에 있어서, 다수의 폴리머라제가 RNA 폴리머라제, DNA 폴리머라제 또는 그의 조합을 포함하는 것인 제조품.

**청구항 41**

제35항에 있어서, 폴리머라제 프로모터 서열을 추가로 포함하는 제조품.

**청구항 42**

제35항에 있어서, 비오틴화 핵산 테더 서열을 추가로 포함하는 제조품.

**청구항 43**

제35항에 있어서, 1종 이상의 뉴클레오시드 트리포스페이트를 추가로 포함하는 제조품.

**청구항 44**

제35항에 있어서, 나노구조가 나노포어, 나노튜브 및 나노와이어로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 제조품.

**청구항 45**

제35항에 있어서,

나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 확인하는 것;

뉴클레오시드 트리포스페이트의 이동 및 존재를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 컴파일하는 것; 또는 지향력을 적용하는 것

에 대한 지침을 추가로 포함하는 제조품.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 지침이 전자 형태로 제공되는 것인 제조품.

**청구항 47**

고체 기판 상에 고정된 다수의 폴리머라제 및 다수의 나노구조를 포함하는 고체 기판을 수용하는 용기;

장력이 표적 핵산 분자에 적용되어 이것이 고체 표면 상에 고정된 다수의 폴리머라제에 의해 중합되도록 하는 방향으로 충분하게 지향력을 제공하는 공급원; 및

나노구조의 전류 / 이온 전도에서의 변화를 결정하는 수단

을 포함하는 서열분석 모듈을 포함하는,

표적 핵산 분자의 단일-염기 서열분석을 위한 장치.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 컴퓨터 프로세서를 추가로 포함하는 장치.

**청구항 49**

제47항에 있어서,

핵산을 서열분석하는데 수반되는 시약 및 완충제를 담고 운반하기 위한 마이크로유체기기를 추가로 포함하는 장치.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 시약이 뉴클레오시드 트리포스페이트로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 장치.

**청구항 51**

제49항에 있어서, 완충제가 세척 완충제, 효소-결합 완충제 및 서열분석 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 장치.

**청구항 52**

제47항에 있어서, 지향력을 제공하는 공급원이 자석을 포함하는 것인 장치.

**청구항 53**

제47항에 있어서, 지향력을 제공하는 공급원이 액체의 유동을 포함하는 것인 장치.

**청구항 54**

제47항에 있어서,

생물학적 샘플을 수용하는 용기; 및

서열분석을 위한 핵산을 단리하고 제조하는데 수반되는 시약 및 완충제를 담고 운반하기 위한 유체기기를 포함하는 샘플 제조 모듈을 추가로 포함하는 장치.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 시약이 세포 용해 시약 및 절단 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 장치.

**청구항 56**

제54항에 있어서, 완충제가 용해 완충제 및 세척 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 장치.

**청구항 57**

제54항에 있어서,

폴리머라제 프로모터 서열을 핵산 분자에 부착시키는데 수반되는 시약 및 완충제를 담고 운반하기 위한 유체기기

를 포함하는 주형 마감 모듈을 추가로 포함하는 장치.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 시약이 리가제 효소, 분자 모터-결합 서열 및 테더로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 장치.

**청구항 59**

제57항에 있어서, 완충제가 리가제 완충제, 자기 태그-결합 완충제 및 효소-결합 완충제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 장치.

**청구항 60**



표적 핵산 분자의 제1 위치에 대한 제1 데이터를 수신하며, 여기서 제1 데이터는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동의 존재 또는 부재 및/또는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 가닥(들)의 이동 속도를 나타내는 것인 단계;

표적 핵산 분자의 제1 위치에 대한 제2 데이터를 수신하며, 여기서 제2 데이터는 중합 동안 이용가능한 1종 이상의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 및/또는 양을 나타내는 것인 단계;

표적 핵산 분자의 제2 위치에 대한 또 다른 제1 데이터 및 또 다른 제2 데이터를 수신하는 단계;

표적 핵산 분자의 제3 위치에 대한 또 다른 제1 데이터 및 또 다른 제2 데이터를 수신하는 단계;

표적 핵산 분자의 제4 및 후속 위치에 대한 제1 데이터 및 제2 데이터를 수신하는 단계를 반복하는 단계; 및 각각의 위치에 대해 수신된 제1 데이터 및 제2 데이터를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함하는, 표적 핵산 분자의 중합 동안 획득되는 데이터를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법.

## 청구항 61

제60항에 있어서, 제1 데이터 및 제2 데이터가 표시된 위치에서 뉴클레오타이드로서 기록되는 것인 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 2013년 2월 20일에 출원된 미국 출원 번호 61/766,925에 대한 이익을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 개시내용은 일반적으로 핵산 서열분석 시스템 및 방법, 및 이러한 시스템 및 방법에 사용될 수 있는 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0005] 나노구조 DNA 서열분석은 비용-효과적이고, 긴 판독 및 정확한 전체 인간 게놈 서열분석 및 효율적인 박테리아 게놈 서열분석 및 다른 서열분석 적용을 가능하게 할 수 있는 하나의 DNA 서열분석 방법이다. 본 개시내용은 기존 나노구조 서열분석 기술에 비해 다수의 개선을 제공하고, 예를 들어 임상 적용 및 고처리량 환경에서 나노구조-기반 서열분석 방법의 사용을 제약하는 많은 한계들을 해결한다.

### 발명의 내용

[0006] 나노구조 기반 서열분석은 나노구조 부근의 고체 표면에 대해 고정되어 있는 폴리머라제에 의존한다. 폴리머라제에 의한 염기 혼입 및 연장의 결과로서, 핵산은 폴리머라제 효소 내에서, 그리고 그 결과로서 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 전위된다. 나노구조를 횡단하는 전자 신호에서의 변화가 효소-의존적 전위의 결과로서 관찰된다. 본원에 기재된 서열분석 방법은 2가지 접근법을 포괄한다. 제1 접근법은 염기-대-염기(base-by-base) 서열분석으로, 여기서 공지된 염기 첨가는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조에 걸친 단일 염기 중합 및 전위 (즉, 이동)로 이어진다. 제2 접근법에서, 모든 4종의 뉴클레오타이드는 속도-제한량으로 존재하는 뉴클레오타이드 중 1종과 함께 존재한다. 폴리머라제에 의한 4종의 뉴클레오타이드 중 3종의 혼입 및 후속 연장 동안, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 이동이 정상 효소 속도로 발생한다. 그러나, 속도-제한 뉴클레오타이드에 상응하는 핵산 내 위치에서 연장/전위, 및 이에 따른 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 이동은 속도가 느려지거나 일시정지된다. 각각의 뉴클레오타이드와 속도-제한 농도에서의 반복 반응은 완전한 서열분석의 생물정보학적 어셈블리를 가능하게 한다.

[0007] 한 측면에서, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로, 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 서열분석 조건은 적어도 1종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 상기 폴리머라제는 고체 기판 상에 고정되어 있는 것인 단계; 나노구조를

통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계를 다수회 반복하는 단계; 및 순차적으로, 적어도 1종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에 이동에서의 변화의 존재 또는 부재를 기반으로 하여, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석 조건은 단일 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하며, 여기서 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재한다.

[0008]

대표적인 고체 기판은 유리이다. 한 실시양태에서, 폴리머라제는 RNA 폴리머라제이다. 대표적인 RNA 폴리머라제는 예를 들어 박테리오파지 RNA 폴리머라제 (예를 들어, T7 RNA 폴리머라제 및 T3 RNA 폴리머라제) 및 박테리아 RNA 폴리머라제 (예를 들어, 이. 콜라이(E. coli) RNA 폴리머라제)를 포함한다. 한 실시양태에서, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제이다. 대표적인 DNA 폴리머라제는 예를 들어 phi29 DNA 폴리머라제, T7 DNA 폴리머라제, 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis) DNA 폴리머라제 및 Taq DNA 폴리머라제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 His-태그를 통해 또는 하나 이상의 비오틴-스트렙타비딘 결합을 통해 고체 표면 상에 고정된다.

[0009]

일부 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 진핵생물의 것이다. 표적 핵산 분자는 이중-가닥 또는 단일-가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 생물학적 샘플 내에 또는 그의 일부로서 포함된다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 폴리머라제 프로모터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 자기태그를 추가로 포함한다.

[0010]

대표적인 나노구조는, 예를 들어 생물학적 나노구조, 고체 상태 나노구조 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출하는 단계는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 전류에서의 변화를 측정하는 것 및/또는 나노구조의 이온 전도에서의 변화를 측정하는 것을 포함한다. 검출하는 단계는 CMOS 기반 제작 나노구조 및 전자기기 상에서 이동을 포획하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산 분자에 지향력을 적용하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 지향력은 자석에 의해 생성된다. 일부 실시양태에서, 지향력은 유동 또는 압력에 의해 생성된다.

[0011]

또 다른 측면에서, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로, 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계; 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제1 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계; 제1 서열분석 조건 하에, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및 이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제1 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계; 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제2 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제2 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계; 제2 서열분석 조건 하에 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및 이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제2 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계는 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계와 동시에 수행된다. 일부 실시양태에서, 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계는 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 검출하는 단계 전 또는 후에 순차적으로 수행된다. 이러한 방법은 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계; 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제3 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제3 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제3 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계; 제3 서열분석 조건 하에 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및 이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제3 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 방법은 전형적으로, 표적 핵산 분자 내에서 제1, 제2 및 제3 뉴클레오타이드 트리포스페이트에 대한 위치 정보로부터 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 이러한 방법은 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계; 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제4 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제4 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하고, 여기서 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제4 뉴

클레오시드 트리포스페이트는 속도-제한량으로 존재하는 것인 단계; 제4 서열분석 조건 하에 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 검출하는 단계; 및 이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자를 따라 제4 뉴클레오시드 트리포스페이트의 위치 정보를 결정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0012]

또 다른 측면에서, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 전형적으로, 1종 이상의 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 제공하는 단계; 1종 이상의 폴리머라제를 표적 핵산 분자와 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키며, 여기서 제1 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함하는 것인 단계; 및 제1 서열분석 조건 하에, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동에서의 변화가 발생하는지 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 이동에서의 변화가 발생하는 경우에, 방법은 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하지만, 이동에서의 변화가 발생하지 않는 경우에, 방법은 제2 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 제2 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제2 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함한다. 이동에서의 변화가 발생하는 경우에, 방법은 제1 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하지만, 이동에서의 변화가 발생하지 않는 경우에, 방법은 제3 서열분석 조건 하에 접촉시키는 단계 및 후속 단계를 반복하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 제3 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오시드 트리포스페이트 중 제3 뉴클레오시드 트리포스페이트의 존재를 포함한다. 마지막으로, 방법은 순차적으로, 제1, 제2 또는 제3 서열분석 조건 하에 이동에서의 변화 발생을 기반으로 하여, 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0013]

또 다른 측면에서, 제조품이 제공된다. 이러한 제조품은 일반적으로 다수의 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 기판을 포함하며, 여기서 고체 기판은 다수의 나노구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 기판은 구리 및 PEG로 코팅된다. 일부 실시양태에서, 고체 기판은 니켈 및 PEG로 코팅된다. 일부 실시양태에서, 고체 기판은 Ni-NTA로 코팅된다. 일부 실시양태에서, 고체 기판은 CMOS 또는 CCD이다. 일부 실시양태에서, 다수의 폴리머라제는 RNA 폴리머라제, DNA 폴리머라제 또는 그의 조합을 포함한다. 이러한 제조품은 추가로 폴리머라제 프로 모터 서열, 비오틴화 핵산 테더 서열 및/또는 1종 이상의 뉴클레오시드 트리포스페이트를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 제조품은 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동을 확인하는 것; 뉴클레오시드 트리포스페이트의 이동 및 존재를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 컴파일하는 것; 및/또는 지향력을 적용하는 것에 대한 지침을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 지침은 전자 형태로 제공된다.

[0014]

또 다른 측면에서, 표적 핵산 분자의 단일-염기 서열분석을 위한 장치가 제공된다. 이러한 장치는 전형적으로 서열분석 모듈을 포함한다. 서열분석 모듈은 일반적으로, 고체 기판 상에 고정된 다수의 폴리머라제 및 다수의 나노구조를 포함하는 고체 기판을 수용하는 용기; 장력이 표적 핵산 분자에 적용되어 이것이 고체 표면 상에 고정된 다수의 폴리머라제에 의해 중합되도록 하는 방향으로 충분히 지향력을 제공하는 공급원; 및 나노구조의 전류 및/또는 이온 전도에서의 변화를 결정하는 수단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 추가로 컴퓨터 프로세서를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 장치는 핵산을 서열분석하는데 수반되는 시약 및 완충제를 담고 운반하기 위한 마이크로유체기기를 추가로 포함할 수 있다. 대표적인 시약은 뉴클레오시드 트리포스페이트를 포함할 수 있다. 대표적인 완충제는 세척 완충제, 효소-결합 완충제 및/또는 서열분석 완충제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 지향력을 제공하는 공급원은 자석 및/또는 액체의 유동을 포함한다.

[0015]

이러한 장치는 또한 생물학적 샘플을 수용하는 용기; 및 서열분석을 위한 핵산을 단리하고 제조하는데 수반되는 시약 및 완충제를 담고 운반하기 위한 유체기기를 포함할 수 있는 샘플 제조 모듈을 포함할 수 있다. 대표적인 시약은 세포 용해 시약 및 절단 효소를 포함한다. 대표적인 완충제는 용해 완충제 및 세척 완충제를 포함한다.

[0016]

이러한 장치는 또한 폴리머라제 프로 모터 서열을 핵산 분자에 부착시키는데 수반되는 시약 및 완충제를 담고 운반하기 위한 유체기기를 포함할 수 있는 주형 마감 모듈을 포함할 수 있다. 대표적인 시약은 리가제 효소, 분자 모터-결합 서열 및 테더를 포함한다. 대표적인 완충제는 리가제 완충제, 자기 태그-결합 완충제 및 효소-결합 완충제를 포함한다.

[0017]

또 다른 측면에서, 표적 핵산 분자의 중합 동안 획득되는 데이터를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은, 표적 핵산 분자의 제1 위치에 대한 제1 데이터를 수신하며, 여기서 제1 데이터는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자 및/또는 1개 이상의 신생 가닥(들)의 이동의 존재 또는 부재 및/또는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 가

닥(들)의 이동 속도를 나타내는 것인 단계; 표적 핵산 분자의 제1 위치에 대한 제2 데이터를 수신하며, 여기서 제2 데이터는 중합 동안 이용가능한 1종 이상의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 및/또는 양을 나타내는 것인 단계; 표적 핵산 분자의 제2 위치에 대한 또 다른 제1 데이터 및 또 다른 제2 데이터를 수신하는 단계; 표적 핵산 분자의 제3 위치에 대한 또 다른 제1 데이터 및 또 다른 제2 데이터를 수신하는 단계; 표적 핵산 분자의 제4 및 후속 위치에 대한 제1 데이터 및 제2 데이터를 수신하는 단계를 반복하는 단계; 및 각각의 위치에 대해 수신된 제1 데이터 및 제2 데이터를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 데이터 및 제2 데이터는 표시된 위치에서 뉴클레오타이드로서 기록된다.

[0018]

달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 과학 용어는 시스템, 방법 및 물질의 조성물이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 시스템, 방법 및 물질의 조성물의 실시 또는 시험에 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 시스템, 방법 및 재료가 사용될 수 있지만, 적합한 시스템, 방법 및 재료를 하기에 기재한다. 또한, 시스템, 재료, 방법 및 실시에는 단지 예시적인 것이지, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 하기 언급되는 임의의 공개, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

### 도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 단일-분자 나노구조-기반 서열분석 복합체의 실시양태를 제시한다. 효소, 본 실시양태에서 T7 RNA 폴리머라제는 His-태그 또는 다른 방법을 통해, 본 실시양태에서 나노포어의 한 측면 상의 관능화 표면에 부착되고, 핵산은 나노구조를 통해 스레딩된다. 본원에 기재된 바와 같이 서열분석이 수행되고, 효소를 통해 및 본 실시양태에서 나노포어를 통해 핵산이 전위된다.

도 2는 본 실시양태에서 DNA 폴리머라제를 사용한 단일-분자 나노구조-기반 서열분석 복합체의 실시양태를 제시한다. 효소는 본 실시양태에서 나노포어의 한 측면 상의 관능화 고체 표면에 부착된다. 핵산은 나노구조를 통해 스레딩되고 신장된다. 서열분석이 본원에 기재된 바와 같이 수행되고, 핵산은 본 실시양태에서 나노포어를 통해 전위된다.

도 3은 핵산을 신장시키고 핵산에 장력을 적용하기 위해 자기 비드 및 자기력이 사용된 단일-분자 나노구조-기반 서열분석 복합체의 실시양태를 제시한다. 효소, 본 실시양태에서 T7 RNA 폴리머라제는 본 실시양태에서 나노포어 근처의 관능화 고체 표면에 부착된다. 자기 비드는 핵산 말단에 또는 그 근처에 부착되고, 자기력을 사용한 장력이 적용되고, 핵산이 신장된다. 서열분석이 본원에 기재된 바와 같이 수행되고, 핵산은 본 실시양태에서 나노포어를 통해 전위된다.

도 4는 표적 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 예시적인 과정을 예시하는 흐름도이다.

도 5는 DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제를 사용할 수 있는 단일-분자 나노구조-기반 서열분석 복합체의 실시양태를 제시한다. 효소는 본 실시양태에서 나노튜브 (예를 들어, 탄소 나노튜브)의 관능화 고체 표면에 부착된다. 서열분석이 본원에 기재된 바와 같이 수행되고, 핵산은 나노구조를 통해 전위된다. 효소 주위 및 나노구조 근처 (예를 들어, 데바이(Debye) 영역 내) 이온 농도에서의 변화로부터 생성된 전기 신호가 측정된다. 폴리머라제 효소는 주형과 상호작용함에 따라 다양한 입체형태를 취하고 신생 가닥에 염기를 혼입시키기 때문에, 나노튜브를 통한 전자 신호를 사용하여 효소의 운동, 위치 및/또는 형상과 상호관련시킬 수 있다. 따라서, 효소가 1종의 뉴클레오타이드의 속도-제한량으로의 존재 하에 일시정지하는 경우에, 전자 신호는 일시정지의 특성을 제시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

본 개시내용은 복잡성, 비용, 확장성, 및 궁극적으로는 더 긴 관독 길이, 더 높은 처리량 및 증진된 정확도를 비롯하여, 기존 단일 분자 서열분석 시스템의 제약 중 많은 것이 완화된 단일 분자 나노구조-기반 서열분석 시스템을 기재한다. 본원에 기재된 실시간 단일 분자 나노구조-기반 서열분석 방법 및 시스템은 고도의 연작용 효소의 사용 및 나노구조 기술로 인해 매우 짧은 시간 내에 높은 정확도로 수천개의 뉴클레오타이드를 서열분석할 수 있다.

[0021]

본 나노구조-기반 서열분석 시스템의 이점이 다수 존재한다. 예를 들어, 이중-가닥 핵산 또는 단일-가닥 핵산이 주형으로서 사용될 수 있고, 이는 샘플 제조를 위한 요건을 최소화 및 감소시킨다. 또한, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 전위를 사용하여 검출이 수행되기 때문에 표지된 뉴클레오타이드가 필요하지 않고, 이는 또한 비용을 유의하게 감소시킨다. 또한, 야생형 폴리머라제 효소가 사용될 수 있으며; 효소



에 대해 어떠한 특별한 변형도 필요하지 않고, 표면 화학 및 효소 고정 기술은 또한 통상적인 것이다. 본 나노구조-기반 서열분석 시스템 및 방법은 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 전위가 각각의 뉴클레오타이드에 대해 검출될 수 있기 때문에 단독중합체 서열에 적합하다. 따라서, 뉴클레오타이드가 동일한 경우에도 이동은 다중 뉴클레오타이드 상에 누적된다. 본 나노구조-기반 서열분석 시스템 및 방법은 또한 다중 나노구조가 단일 고체 표면 상에서 사용될 수 있기 때문에 고처리량 서열분석을 위해 용이하게 적용가능하다. 특히, 폴리머라제 효소는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 전위 속도를 조절하고, 이는 현재의 나노구조-기반 서열분석 시스템 및 방법에서의 유의한 문제점이지만, 본 시스템 및 방법에서는 궁극적으로 훨씬 더 많은 처리량으로 이어질 수 있다.

[0022] 나노구조-기반 서열분석의 개관

[0023] 나노구조-기반 서열분석은 폴리머라제 효소에 의한 표적 핵산 분자의 연장 및 전위에 의존하고, 이는 또한 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자의 전위를 유발한다. 한 실시양태에서, 폴리머라제는 고체 표면 상에 고정되고, 표적 핵산은 한쪽 말단에서 폴리머라제에 부착되는 한편 다른 말단은 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 스레딩된다. 고체 상태 나노구조, 예컨대 나노포어 또는 나노튜브는 전형적으로 생물학적 나노구조보다 더 큰 개구부를 갖고, 따라서 이중-가닥 핵산을 수용할 수 있다. 나노구조는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 이동 동안 비대칭 이온 반응을 검출할 수 있고, 이는 뉴클레오타이드 염기의 연장 및 전위를 신호전달한다.

[0024] 한 실시양태에서, 염기-대-염기 (또는 동기식) 서열분석 반응이 수행될 수 있으며, 여기서는 단일 뉴클레오타이드가 존재한다. 이어서 다른 뉴클레오타이드 사이에서 반복되는 반응이 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 비동기식 서열분석 반응이 수행될 수 있고, 여기서는 모든 4종의 뉴클레오타이드가 존재하지만, 4종의 뉴클레오타이드 중 1종은 속도-제한량으로 제공된다. 이는 속도-제한 뉴클레오타이드의 혼입을 시도할 때 폴리머라제에 의한 일시정지를 일으키고, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 전위 (즉, 이동)에서의 변화는 그 위치에서의 속도-제한 뉴클레오타이드의 존재를 나타낸다. 이어서 예를 들어 4종의 염기 중 1종이 속도-제한량으로 제공되는 4개의 상이한 반응을 사용하여 전체 서열을 생물정보학적으로 컴파일할 수 있다. 다양한 유형의 서열분석 반응이 하기에서 보다 상세하게 논의된다.

[0025] 도 1 및 2는 본원에 기재된 바와 같은 단일-분자 나노구조-기반 서열분석 복합체를 제시한다. 도 1은 T7 RNA 폴리머라제 (예를 들어, T7 RNAP)를 포함하는 나노구조-기반 서열분석 복합체의 실시양태이며, 도 2는 DNA 폴리머라제 (예를 들어, Phi29)를 포함하는 나노구조-기반 서열분석 복합체의 실시양태이다. 하기에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 폴리머라제 효소는 His-태그 또는 다른 방법을 통해 나노구조 부근의 관능화 표면 상에 고정될 수 있다. 표적 핵산 분자는 효소가 고체 기판 상에 고정되기 전에 효소와 복합체화될 수 있거나, 또는 표적 핵산 분자는 효소가 고체 표면 상에 고정된 후에 효소와 복합체화될 수 있다. 표적 핵산 분자는 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 스레딩되거나 공급되고, 상기 기재된 바와 같이 염기-대-염기 방식 또는 비동기식 방식으로 서열분석이 개시된다. 폴리머라제 효소에 의한 염기 혼입의 각각의 단계 동안, 핵산은 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 전위되고, 이것이 검출된다. 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법에서, 나노구조는 폴리머라제에 의한 염기 혼입으로 인한 핵산에 의한 이동을 검출하고; 나노구조는 뉴클레오타이드 염기를 구별하는데 사용되지 않는다.

[0026] 나노구조-기반 서열분석 반응의 각각의 특성이 하기에서 보다 상세하게 논의된다.

[0027] 고체 표면

[0028] 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법을 위해, 효소 (RNA 폴리머라제 또는 DNA 폴리머라제)는 고체 표면 상에 고정된다. 본원에 기재된 일부 실시양태에서, 고체 표면은 실리카-기재 유리 (예를 들어, 보로실리케이트 유리, 용융 실리카 또는 석영)로 제조된다. 다른 실시양태에서, 반도체 기술분야에서 기판 또는 기판 상 층으로서 사용되는 산화알루미늄, 규소, 그래핀 또는 다른 표면. 그러나, 다른 물질 (예를 들어, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 규소, 질화규소, 및 다른 중합체 또는 그의 복합물)이 또한, 본원에 기재된 서열분석에 사용하기에 적합하다는 단서 하에 사용될 수 있다.

[0029] 고체 표면에 1종 이상의 폴리머라제를 고정하기 전에, 폴리머라제를 수용하고 이것이 결합되도록 일반적으로 고체 표면을 변형시킨다 (예를 들어, 관능화한다). 효소를 고정시키기 위해 고체 표면을 관능화하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 고체 표면은 구리 또는 니켈로 관능화될 수 있는 한편, 일부 실시양태에서 고체 표면은 Ni-NTA (예를 들어, 문헌 [Paik et al., 2005, Chem. Commun. (Camb), 15:1956-8])

참조) 또는 Cu-NTA로 관능화될 수 있다. 대안적으로, 코발트 등과 같은 금속을 사용하여 고정을 위한 고체 표면을 변형시킬 수 있다.

[0030] 고체 표면을 변형시키기 전에, 예를 들어 PEG 모이어티로 고체 표면을 처리할 수 있다. 이러한 전략은 고체 표면 상의 폴리머라제의 밀도를 조절하는데 사용될 수 있고, 또한 고체 표면 상에 폴리머라제의 균일한, 반-규칙적 또는 무작위 어레이와 같은 폴리머라제의 패턴을 생성하는데 사용될 수 있다. PEG 환경은 효소와 표면 사이에 최소한의 상호작용을 일으키고 (N- 또는 C-말단 상의 결합 태그 제외), 궁극적으로 고정된 효소의 천연 입체 형태에 대해 최소한의 교란을 일으킨다. 또한, 표면 패시베이션 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 고체 표면을 소 혈청 알부민 (BSA)으로 처리하는 것을 포함할 수 있다.

[0031] 고체 표면은 나노구조와 관련하여 바람직한 효소 부착 위치가 달성될 수 있도록 하는 어레이 포맷으로 관능화될 수 있다. 이러한 위치는, 일부 실시양태에서 나노구조에 인접하거나, 바로 그 옆이거나, 또는 그 주변일 수 있다. 일부 경우에, 효소는 나노구조와 부분적으로 중첩될 수 있거나 또는 나노구조와 하나 이상의 시약 또는 완충제 사이에 유체 소통을 허용하는 채널 내에 부착될 수 있다. 효소를 특정한 위치에 배열하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 효소를 나노구조와 관련하여 위치설정하는 것은 또한 관련 기술분야에 공지되어 있는 방법 (예를 들어, TEM, SEM, AFM)을 사용하여 실현가능하다. 대략적 위치 관독을 위해, 특히 관능 영역이 형광 모이어티로 태깅될 수 있고, 이어서 이것이 효소를 위한 공간을 만들기 위해 절단될 수 있거나 또는 효소가 근방에 위치하고 있는 장소로 남겨질 수 있는 경우에, 고해상도 광학 영상화가 적절할 수 있다.

[0032] 폴리머라제 효소

[0033] 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법은 임의의 유형의 폴리머라제 효소를 사용할 수 있다. 폴리머라제 (EC 2.7.7.6; EC 2.7.7.7; EC 2.7.7.19; EC 2.7.7.48; 또는 EC 2.7.7.49)는 단일-가닥 또는 이중-가닥 주형 DNA 또는 RNA로부터 1 또는 2개의 새로운 DNA 또는 RNA 가닥을 합성한다. 적합한 폴리머라제는, 예를 들어 DNA 폴리머라제 및 RNA 폴리머라제를 포함한다.

[0034] 대표적인 DNA 폴리머라제는 phi29이다. 다른 DNA 폴리머라제가 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 형광에 의존한 단일 분자 서열분석 플랫폼에서 사용되어 온 많은 것이 또한 본 나노구조-기반 서열분석 방법에 사용하는데 적합할 것이다. 대표적인 DNA 폴리머라제는, 제한 없이, T7 DNA 폴리머라제, 바실루스 서브틸리스 DNA 폴리머라제, 및 Taq DNA 폴리머라제를 포함한다.

[0035] 임의의 개수의 RNA 폴리머라제 효소가 본 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 다중-서브유닛 RNA 폴리머라제 (예를 들어, 이. 콜라이 또는 다른 원핵 RNA 폴리머라제 또는 진핵 RNA 폴리머라제 중 1종)가 본원에 기재된 서열분석 방법에서 사용될 수 있다. 그러나, 박테리오파지로부터의 것과 같은 소형의, 단일-서브유닛 RNA 폴리머라제가 특히 적합하다는 것이 이해될 것이다. 단일 서브유닛 RNA 폴리머라제 또는 이러한 효소를 코딩하는 유전자는 T3, T7, SP6, 또는 K11 박테리오파지로부터 수득될 수 있다.

[0036] 박테리오파지 RNA 폴리머라제는 많은 다중-서브유닛 RNA 폴리머라제에 비해 매우 연작용성이고 정밀하며, 종종 더 적은 결실-삽입 오류를 일으킨다. 또한, 박테리오파지로부터의 RNA 폴리머라제는 이. 콜라이로부터의 RNA 폴리머라제와 같은 다중-서브유닛 대응물에 비해 후진하는 경향이 유의하게 덜하다. 여러 상이한 박테리오파지로부터의 RNA 폴리머라제가 기재되어 있다. 간단한 예로서, T7 RNA 폴리머라제는 99 kDa의 분자량을 갖는 단일 폴리펩티드로 구성되고, T7 RNA 폴리머라제를 코딩하는 유전자의 클로닝 및 발현은 미국 특허 번호 5,693,489에 기재되어 있다. T7 RNA 폴리머라제의 구조는 3.3 옹스트롬 수준까지 해상되어 있으며, 하기 4종의 상이한 결정 구조가 밝혀져 있다: T7 RNA 폴리머라제 단독 (비복합체화), 핵산 프로모터에 결합된 T7 RNA 폴리머라제, 전체 개시 복합체 (핵산 프로모터 및 하나 이상의 전사 인자에 결합된 T7 RNA 폴리머라제), 및 억제제에 의해 결합된 T7 RNA 폴리머라제.

[0037] 고체 표면 상의 폴리머라제의 밀도 및/또는 분포는, 예를 들어 수행되는 특정한 서열분석 반응을 최적화하기 위해 제어 또는 조작될 수 있다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이, 생물학적 분자의 어레이는 패턴으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 분자의 어레이는 예를 들어 본원에 기재된 관능화를 사용하여 고체 표면 상에 무작위로 분포되거나, 균일하게 분포되거나, 또는 규칙적 또는 반-규칙적인 방식으로 분포될 수 있다. 일부 실시양태에서, 고체 표면은 고체 표면 상에 고정된 100개 초과 폴리머라제 또는 1000개 초과 폴리머라제 (예를 들어, 10,000개 초과 폴리머라제, 100,000개 초과 폴리머라제, 또는 1,000,000개 초과 폴리머라제)를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 고체 표면은  $\sim 5 \mu\text{m}^2$  당 고정된 적어도 1개의 폴리머라제 (예를 들어,  $\sim 2.5 \mu\text{m}^2$ ,  $\sim 1 \mu\text{m}^2$ ,  $\sim 0.5 \mu\text{m}^2$ , 또는  $\sim 0.1 \mu\text{m}^2$  당 고정된 적어도 1개의 폴리머라제)를 가질 수 있다.

고체 표면 상의 폴리머라제의 밀도는, 적어도 부분적으로, 서열분석되는 표적 핵산 분자의 크기 뿐만 아니라 나노구조의 개수, 위치 및 크기에 의존할 수 있음이 이해될 것이다. 본원에 나타내어진 바와 같이, 폴리머라제 효소는 나노구조에 인접하여, 바로 그 옆에, 그와 중첩하여, 또는 그 주변에 위치할 수 있다.

[0038] 폴리머라제 효소는 임의의 수의 공지된 수단을 사용하여 고체 표면 상에 고정될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 His-태그 (예를 들어, 4개의 His 잔기, 6개의 His 잔기 또는 10개의 His 잔기를 갖는 His 태그)를 함유한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 1개 이상의 비오틴-스트렙타비딘 결합을 통해 고체 표면 상에 고정된다. His-태그, 비오틴-스트렙타비딘 결합 쌍 또는 다른 적합한 수단은 상기 논의된 표면 화학 (예를 들어, 관능화)과 상용성이라는 단서 하에 사용될 수 있다. 폴리머라제는 나노구조에 인접하여 고체 표면에 고정될 수 있거나, 또는 폴리머라제는 나노구조와 동일한 위치에서 고체 표면에 고정될 수 있다.

[0039] 표적 핵산 분자

[0040] 나노구조-기반 서열분석을 위한 핵산 분자는 진핵생물, 박테리아 및 고세균을 비롯하여 실질적으로 임의의 공급원으로부터 수득될 수 있다. 진핵 핵산은 인간 또는 다른 포유동물 (예를 들어, 영장류, 말, 소, 개, 고양이 및 설치류), 또는 비-포유동물 (예를 들어, 조류, 파충류 (예를 들어, 뱀, 거북이, 악어 등) 및 어류)로부터의 것일 수 있는 한편, 원핵 핵산은 박테리아 (예를 들어, 병원성 박테리아, 예컨대 제한 없이 스트렙토코쿠스 (Streptococcus), 이. 콜라이, 슈도모나스(Pseudomonas) 및 살모넬라(Salmonella)) 또는 고세균 (예를 들어, 크렌아르카에오타(Crenarchaeota), 및 유리아르카에오타(Euryarchaeota))로부터의 것일 수 있다.

[0041] 나노구조-기반 서열분석을 위한 핵산 분자는 임의의 수의 생물학적 샘플 내에 함유되어 있을 수 있다. 대표적인 생물학적 샘플은, 제한 없이, 체액 (예를 들어, 혈액, 소변, 정액) 및 조직 (예를 들어, 기관, 피부, 점막 및 종양)을 포함한다.

[0042] 본원에 논의된 바와 같이, 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법의 이점 중 하나는 이중-가닥 또는 단일-가닥 핵산이 주형으로서 사용될 수 있다는 것이다. 이는 샘플 및 핵산을 조작할 필요성을 감소시키며, 생물학적 샘플로부터 핵산을 수득하는데 사용되는 많은 방법은 바람직하지 않은 핵산의 절단, 전단 또는 파괴를 야기하기 때문에 특히 길이가 1 킬로베이스를 초과하는 (Kb; 예를 들어, 2 Kb 초과, 5 Kb 초과, 10 Kb 초과, 20 Kb 초과, 또는 50 Kb 초과, 또는 75 Kb 초과, 또는 100 Kb 초과, 또는 150 Kb 초과) 핵산을 서열분석하는 경우에 유의한 이점이다. 단일-가닥 핵산 (또는 단일-가닥 핵산을 함유하는 샘플)은 본 방법에서 바로 사용될 수 있거나 또는 이중-가닥 핵산으로 전환될 수 있다. 이중-가닥 핵산을 제조하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 단일-가닥 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA)의 속성에 의존할 것이다. 이러한 방법은 전형적으로 널리 공지된 DNA 폴리머라제 및/또는 역전사효소의 사용을 포함한다. 다양한 효소가 다양한 주형 (예를 들어, DNA 또는 RNA, 단일-가닥 또는 이중-가닥)을 사용하고, 고체 표면 상에 고정할 폴리머라제의 선택은, 적어도 부분적으로, 서열분석될 표적 핵산에 의존할 것임이 이해될 것이다.

[0043] 샘플 제조는 공급원에 의존할 것이지만, 전형적으로 핵산 단리에 이은 프로모터 라이게이션을 포함할 것이다. 본원에 기재된 서열분석 방법에 사용되는 핵산 주형은 임의의 특별한 제조를 필요로 하지 않으며, 따라서 표준 DNA 단리 방법이 사용될 수 있다. 또한, 특정한 폴리머라제에 의해 인식되는 프로모터 서열은 표적 핵산 분자에 라이게이션되어야 한다. DNA 및 RNA 폴리머라제 둘 다의, 수많은 폴리머라제에 의해 인식되는 프로모터 서열이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 널리 사용된다. 또한, 하나의 핵산 분자 (예를 들어, 프로모터 서열)를 또 다른 핵산 분자 (예를 들어, 미지의 서열을 갖는 표적 핵산 분자)에 라이게이션하는 방법이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 수많은 리가제 효소가 상업적으로 입수가 가능하다.

[0044] 또한, 단리된 핵산은 임의적으로 단편화될 수 있고, 원하는 경우에, 특정한 크기가 선택되거나 분획화될 수 있다. 예를 들어, 단리된 핵산은 초음파처리를 사용하여 단편화될 수 있고, 원하는 경우에, 통상적인 겔 전기영동 방법론을 사용하여 크기-선택될 수 있다. 또한, 표적 핵산은 임의적으로, 서열분석이 원형 표적 상에서 반복적 또는 재귀적 방식으로 수행될 수 있도록, 예를 들어 플라스미드로 원형화될 수 있다.

[0045] 다른 모이어티 (예를 들어, 태그)가 테더를 사용하여 표적 핵산 분자에 부착될 수 있다. 이들 모이어티는 표적 핵산 분자가 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 스테딩 후에 부착될 수 있다. 이러한 모이어티는, 예를 들어 표적 핵산 분자에 대해 힘을 가하기 위해 (하기에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같음), 형광을 발하기 위해, 전사와 함께 회전시키기 위해, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자의, 또는 나노구조 영역 외부의 또는 여기서 배출된 표적 핵산 분자의 절편의 위치 또는 이동을 추론하는 것을 돕는 효소/표적 핵산의 위치, 또는 다른 관능가를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

- [0046] 모이어티 (예를 들어, 태그)를 표적 핵산 분자에 부착시키는 테더는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 제한 없이, 화학적 연결 (예를 들어, 가교, 반 데르 발스 또는 수소 결합) 또는 단백질 연결 (예를 들어, 비오틴-스트렙타비딘 결합 쌍, 디곡시게닌 및 인식 항체, 히드라진 결합 또는 His-태깅)을 포함한다. 예를 들어 일부 실시양태에서, 모이어티는 적어도 부분적으로 스트렙타비딘으로 코팅될 수 있는 한편, 비오틴화 핵산 테더는 표적 핵산 분자에 라이게이션될 수 있다. 일부 실시양태에서는, 비오틴-표지된 핵산 (예를 들어, 약 500 염기쌍 (bp))이 표적 핵산 분자의 한쪽 말단에 라이게이션될 수 있다. 이어서, 비오틴-표지된 테더를 갖는 표적 핵산 분자는 스트렙타비딘-코팅된 모이어티와 조합될 수 있다. 한 실시양태에서, 본원에 사용된 바와 같은 모이어티는 비드로 지칭될 수 있다. 표적 핵산 분자를 테더링하고/거나 제2 모이어티를 결합시키는데 사용될 수 있는 다양한 화합물질로 코팅되거나 부분적으로 코팅된, 자기 비드를 비롯한 상업적으로 입수가능한 수많은 비드가 존재한다 (예를 들어, 디날(Dynal), 인비트로젠(Invitrogen), 스페로테크(Spherotech), 키스케르 인크.(Kisker Inc.), 방스 레보라토리즈 인크.(Bangs Laboratories Inc.)).
- [0047] 핵산 분자에 대한 장력
- [0048] 표적 핵산 분자에 대한 장력은 더 긴 표적 핵산 분자에서 중요해지며, 이는 더 긴 핵산 분자는 그 자체가 폴딩되거나 붕괴될 수 있기 때문이다. 표적 핵산 분자의 임의의 유형의 비정상적 나선 구조는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 이동을 둔화시키거나 차폐할 수 있고, 따라서 서열분석 신호를 둔화시키거나 차폐할 수 있다.
- [0049] 표적 핵산 분자에 적용되는 지향력은, 특히 표적 핵산 분자의 말단이 폴리머라제로부터 수천 또는 수십만 뉴클레오타이드 떨어져 있는 경우에, 상기 논의된 표적 핵산 분자의 폴딩 또는 붕괴를 회피하도록 충분할 필요가 있다. 그러나, 표적 핵산 분자에 적용되는 지향력은 연장/전위가 임의의 방식으로 방해받거나 표적 핵산 분자의 백본이 파괴될 정도로 강할 수는 없다 (즉, 너무 큰 장력이 적용될 수는 없다). 표적 핵산 분자에 대한 이러한 장력은 또한 긴 표적 핵산 분자의 자유 말단에서 발생할 수 있는 브라운 운동 또는 다른 노이즈 효과 (예를 들어, 열유동적 노이즈 효과)를 감소시켜, 구조를 통한, 구조 상에서의 또는 구조를 거친 전위 (즉, 이동)의 검출 정확도를 증가시킬 수 있다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 장력 공급원 (또는 지향력 공급원)은 자석일 수 있다. 이러한 경우에서, 표적 핵산 분자는 자기성인 모이어티 (예를 들어, 자기 태그)로 표지될 수 있다. 예를 들어, 도 3을 참조한다. 자기 태그 (예를 들어, 비드, 로드 등)는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어 약 1 pN의 크기로 z-축 방향으로 균일한 공간적 힘을 제공하는 자기력을 적용함으로써, 표적 핵산 분자를 적절하게 신장시키고 임의의 루프화를 회피할 수 있다. 동시에, 이러한 자석은 x-축 방향으로는 미미한 힘만을 생성시킨다. 이들 특성은 이동 (즉, 폴리머라제 효소를 통한, 및 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 표적 핵산 분자의 연장 및 전위)을 방해하지 않는 한편, 표적 핵산 분자의 자유 말단(들)의 임의의 브라운 운동을 안정화한다. 일부 실시양태에서, 장력 공급원은 예를 들어 액체 (예를 들어, 물 또는 완충제) 또는 공기의 지향 유동의 결과일 수 있다.
- [0051] 표적 핵산 분자에 적용되는 장력의 양은 표준 유체 방법론을 사용하여 보정될 수 있고, 데이터 획득 및 분석 과정 또는 염기 결정 알고리즘에 통합될 수 있다. 예를 들어, 이러한 보정은 효소 주변 완충제의 다양한 이온 농도에서, 표면 위의 다양한 위치에서, 표면의 평면에 대해 다양한 각도로, 및/또는 상이한 유동 또는 자장에서 표면 상에 고정되어 있는 폴리머라제에 의해 관측되는 핵산 분자의 브라운 운동을 모니터링하는 것을 포함할 수 있다.
- [0052] 특정 실시양태에서 상기 기재된 것과 동일한 기술을 사용하여, 장력을 신생 가닥의 한쪽 또는 양쪽에 적용할 수 있다.
- [0053] 나노구조 스테딩
- [0054] 본원에 논의된 바와 같이, 폴리머라제 효소는 주형 핵산과 복합체화되기 전 또는 후에, 나노구조에 대해 직접 또는 그에 인접하여 고체 표면 상에 고정될 수 있다. 주형 핵산 및 나노구조가 서로 근접해 있으면, 핵산은 예를 들어 확산 또는 전류를 비롯한 임의의 수의 방법을 사용하여 나노구조로 도입되거나 스테딩될 수 있다. 샘플이 나노구조에 진입하는 능력에 엔트로피력이 영향을 미칠 수 있고, 확산과 엔트로피 사이의 연관성은 핵산의 길이 및 나노구조의 크기와 같은 파라미터에 의존한다는 것이 통상의 기술자에게 이해될 것이다. 예를 들어, 참고로 문헌 [He et al. (2013, ACS Nano, 7:538-46)]을 참조한다.
- [0055] 상이한 유형의 나노구조 (예를 들어, 나노튜브, 나노포어)는 상이한 크기의 개구부를 갖는다는 것은 관련 기술



분야에 공지되어 있다. 간단한 예로서, 생물학적 나노구조는 약 1 nm의 개구부를 가질 수 있고, 그래핀 나노구조는 약 0.5 nm의 개구부를 가질 수 있고, 질화규소 나노구조는 개구부가 약 2 nm의 소형으로 제조되어 왔다. 따라서, 핵산의 유형 및 폴리머라제의 유형은 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법에 사용되는 특정한 나노구조를 결정할 수 있음이 인식될 것이다. 예를 들어, 이중 가닥 핵산은 통상적으로 너무 커서 예를 들어 1 nm의 개구부를 갖는 나노구조 (예를 들어, 생물학적 나노구조)에 적합하지 않을 것이고; 따라서, 이러한 나노구조는 단일-가닥 핵산 (예를 들어, 단일-가닥 DNA 또는 단일-가닥 RNA)의 전위를 검출하는데 사용될 수 있다. 또한, 나노구조는 복합체 내의 임의의 수의 다양한 핵산의 전위를 검출할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 나노구조는 주형 가닥 (예를 들어, 단일- 또는 이중-가닥 RNA 또는 DNA)이 효소에 의해 전진됨에 따라 그의 전위를 검출할 수 있고; 일부 경우에, 나노구조는 신생 가닥(들) (예를 들어, 단일- 또는 이중-가닥 RNA 또는 DNA)이 효소에 의해 생산됨에 따라 그의 전위를 검출할 수 있다. 또한, 주형 가닥의 전위는 효소 전방의 또는 효소 후방에 남겨진 나노구조에 의해 검출될 수 있음이 이해될 것이다.

[0056] 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법은 나노구조가 핵산을 포획할 가능성이 증가되도록 핵산과 나노구조가 효율적으로 취합되도록 설계된다.

[0057] 나노구조 및 나노구조-기반 서열분석

[0058] 나노구조는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 제한 없이, 나노포어, 나노튜브, 및 나노와이어를 포함한다. 나노구조는 생물학적 물질 (예를 들어, 단백질, 예를 들어, 포어-형성 단백질), 합성 또는 고체-상태 물질 (예를 들어, 규소, 그래핀, 질화규소, 산화알루미늄), 또는 그의 조합을 사용하여 생성될 수 있다. 나노구조 배후 원리는 전압이 적용됨에 따라 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 통과하는 이온 전류를 모니터링하는 것을 기반으로 한다. 분자의 통과, 또는 본 경우에 핵산 분자의 전위 이동은 전류 수준의 중단 또는 변화를 유발한다. 통상의 기술자는 나노구조가 존재하는 완충제의 이온 농도가 전류의 증가 또는 감소가 관찰되는지 여부를 결정할 수 있음을 인식할 것이다 (예를 들어, 문헌 [Smeets et al., 2006, NanoLett., 6:89-95] 참조). 따라서, 일부 실시양태에서, 낮은 이온 농도가 사용될 수 있고; 일부 실시양태에서, 높은 이온 농도가 사용될 수 있다.

[0059] 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법에서, 나노구조는 반응에 수반되는 핵산 중 1개 이상의 이동을 검출할 수 있다. 예를 들어, 나노구조는 주형 핵산 분자의 전위 (즉, 이동)를 폴리머라제 효소에의 진입 전, 폴리머라제 효소에서 배출 후, 또는 둘 다에서 검출할 수 있다. 또한, 나노구조는 폴리머라제에 의해 생산된 신생 가닥(들) 중 1개 이상의 전위 (즉, 이동)를 검출할 수 있다. 특정한 배위는, 적어도 부분적으로, 특정한 폴리머라제 (예를 들어, 주형의 바람직한 가닥수, 합성 방향, 새롭게-생산되는 핵산의 가닥수)에 의존할 것이다.

[0060] 기존 나노구조-기반 서열분석 방법의 근원은 나노구조 (예를 들어, 생물학적 또는 고체 상태 또는 하이브리드)를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 전위로, 이는 각각의 4개의 염기 사이에 특정 방식으로의 차이, 예를 들어 각각의 염기에 대한 특정 보정에 대해 감수성이다. 기존 나노구조-기반 서열분석 방법에 대한 한 가지 유의한 장애물은 각각의 염기에 대한 구조의 차별적 감수성이다. 현재, 단지 생물학적 포어만이 염기 사이를 구별하는데 적절한 감수성 및 차이를 갖는 것으로 제시되어 있다. 그러나, 생물학적 포어의 경우에도 데이터가 종종 모호하기 때문에 (예를 들어, 단일 위치에서 나노구조가 1개 초과 염기를 확인함) 소프트웨어 알고리즘이 사용된다. 따라서, 기존 나노구조-기반 서열분석 방법은 상이한 염기 사이를 충분히 구별하는 능력이 부족하다.

[0061] 낮은 정확도를 제공하는 기존 나노구조-기반 서열분석 방법의 또 다른 한계는 전위가 너무 빨리 일어난다는 것이다. 이러한 경우에, 염기는 다른 3개의 염기와 관련하여 그의 평균 신호 서명을 기반으로 하여 구별하는데 충분히 길게 나노구조 부근에 잔류하지 않는다. 일부 경우에, 이에 대항하여, 전위 속도를 늦추고 나노구조 내에서 각각의 염기에 의해 유발되는 전자 신호의 정확한 검출이 가능하도록 분자 모터가 도입되었다. 그러나, 분자 모터가 폴리머라제인 경우에도 (예를 들어, 문헌 [Manrao et al., 2012, Nat. Biotech., 30:349-53] 참조), 염기 판별은 나노구조에서 여전히 발생한다.

[0062] 기존 나노구조-기반 서열분석 기술의 또 다른 한계는 샘플 제조와 관련된다. 나노구조-기반 서열분석 기술은 매우 긴 관독 길이를 생성할 수 있지만 (예를 들어, 50 kb 이상), 최대 감수성을 달성하기 위해서는 단일-가닥 핵산이 바람직하다. 그러나, 긴 단일-가닥 핵산은 생산하기 어려울 수 있다. 이중-가닥 핵산은 보다 안정하고 보다 쉽게 제조된다. 그러나, 생물학적 나노구조가 소형이기 때문에, 이중-가닥 핵산은 생물학적 나노구조를 사용하는 나노구조-기반 서열분석 시스템에서 서열분석되기 전에 추가의 방법 및 효소를 사용하여 단일-가닥 핵산으로 전환되어야 한다. 한편, 고체-상태 나노구조는 더 크고 이중-가닥 핵산을 수용할 수 있지만, 보다 큰

구조를 횡단하는 2개의 뉴클레오타이드 (즉, 각각의 가닥에 대해 1개)를 관독하는 정확도는 유의하게 떨어진다.

[0063] 본 나노구조-기반 서열분석 방법은 각각의 특정 염기를 확인하기 위해 나노구조에 대해 요구되는 사항을 제거한다. 현행 나노구조-기반 서열분석 방법에서 폴리머라제는 염기 확인과 관련하여 정확하게 기능하고, 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 이동 속도를 단순히 늦추지 않는다. 대신, 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법은 폴리머라제에 제공되는 염기에 의존하고, 서열을 결정하기 위해 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 전위 (예를 들어, 전위의 존재 또는 부재, 또는 전위 속도 또는 패턴에서의 변화)를 사용한다.

[0064] 서열분석 조건

[0065] 나노구조-기반 서열분석 복합체는 임의의 수의 다양한 방식으로 생성될 수 있음이 통상의 기술자에게 이해될 것이다. 한 실시양태에서, 프로모터-결합된 표적 핵산 분자 (또한 주형 또는 주형 핵산으로도 지칭됨)가, 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 표면에 제공될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 표적 핵산 분자는 표적 핵산 분자가 고정된 폴리머라제와 복합체화되기 전 또는 후에 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 공급될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 폴리머라제 및 프로모터-결합된 표적 핵산 분자가 조합된 후 폴리머라제가 고체 표면 상에 고정될 수 있다. 이전의 실시양태와 유사하게, 표적 핵산 분자는 폴리머라제가 제공되어 후속해서 고정되기 전 또는 후에 나노구조를 통해, 나노구조 상에서 또는 나노구조를 거쳐 공급될 수 있다. 복합체 형성의 순서는 예를 들어, 제한 없이, 추가의 모이어티가 프로모터-결합 말단 반대편의 표적 핵산 분자의 말단에 부착되는지 여부를 비롯한 여러 인자에 의존할 것이다.

[0066] 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석은 표적 핵산 분자의 서열을 결정하기 위해 비동기식 (즉, 속도-제한) 방식 또는 동기식 (즉, 염기-대-염기) 방식, 또는 그의 임의의 조합으로 수행될 수 있다. 최소한, 본원에 사용된 "서열분석 조건"은 적어도 1종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 지칭하며, 이는 표적 핵산 분자의 서열을 결정하기 위해 하기 기재된 바와 같이 사용될 수 있다. 본원에서 보다 상세하게 논의되는 바와 같은 적어도 1종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재에 더하여, 서열분석 반응이 수행되는 조건은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 효소를 위한 적합한 환경을 제공하기 위해 적절한 완충제 성분 (예를 들어, KCl, 트리스-HCl, MgCl<sub>2</sub>, DTT, 트윈(Tween)-20, BSA)이 사용될 수 있다. 본원에 사용된 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 리보스-함유 NTP 또는 데옥시리보스-함유 dNTP를 지칭한다. 통상의 기술자는 특정한 서열분석 반응에 사용되는 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 특정한 폴리머라제(들)에 의해 좌우될 것임을 이해할 것이다.

[0067] a) 비동기식 서열분석

[0068] 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법은 뉴클레오타이드의 비동기식 혼입을 기반으로 하여 표적 핵산을 서열분석하는데 사용될 수 있다. 비동기식 실시양태의 경우에, 최초 반응이 일어나는 서열분석 조건 (즉, 제1 서열분석 조건)은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함하며, 여기서 뉴클레오타이드 트리포스페이트는 그 중 적어도 1종이 속도-제한적이고 적어도 1종은 속도-제한적이지 아닌 상이한 양으로 존재한다. 예를 들어, 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 1종은 속도-제한량으로 (예를 들어, 다른 3종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 양 미만인 양으로) 제공된다. 이러한 반응에서, 폴리머라제는 그것이 속도-제한량으로 제공된 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 전사체에 도입하려고 하는 시점마다 효과적으로 일시중지될 것이고, 이러한 일시중지는 본원에 기재된 바와 같은 이동 패턴으로 관찰될 수 있다.

[0069] 유의하게, 각각의 일시중지 사이의 염기의 수는 일시중지 사이의 이동의 누적량을 검출함으로써 정확하게 결정될 수 있다. 따라서, 예를 들어 표적 핵산 분자의 서열 상에서 각각의 구아닌 (G) 뉴클레오타이드의 정확한 위치는 G 뉴클레오타이드 트리포스페이트가 속도-제한량으로 제공되었을 때 이동에서의 변화로 인해 간단하게 결정될 수 있다. 유사한 반응이 제2, 제3, 및 원하는 경우에 제4 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 서열분석 조건 하에 수행될 수 있고, 이때 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 각각 제2, 제3 및 제4 뉴클레오타이드 트리포스페이트가 속도-제한량으로 존재한다. 서로 동시에 수행되는지 또는 서로 순차적으로 이어서 수행되는지에 관계없이, 4종의 반응으로부터의 조합된 정보는 표적 핵산 분자의 완전한 서열을 제공한다.

[0070] 4종의 뉴클레오타이드 중 1종의 위치 서열을 생성하는 단일 반응으로부터의 패턴도 핵산 데이터베이스와 비교될 수 있고, 높은 신뢰 수준으로 핵산 분자를 확인하는데 사용될 수 있다. 또한, 일단 다른 3종의 뉴클레오타이드가 공지되면 서열에서 제4 뉴클레오타이드의 위치 정보가 추론될 수 있기 때문에, 통상의 기술자는 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 3종으로부터 생성된 위치 정보를 사용하여 표적 핵산 분자의 서열이 컴파일될 수 있음을 이해할 것이다.

[0071]

b) 동기식 또는 염기-대-염기 서열분석

[0072]

본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법은, 달리 염기-대-염기 서열분석으로 공지될 수 있는, 동기식 패턴으로 핵산을 서열분석하는데 사용될 수 있다. 동기식 또는 염기-대-염기 실시양태의 경우에, 최초 반응이 일어나는 서열분석 조건 (즉, 제1 서열분석 조건)은 단일 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함한다. 이러한 반응에서, 폴리머라제에 의한 전사는 표적 핵산이 그 위치에서 상보적인 염기를 함유하는 경우에만 진행될 것이고, 이는 본원에 기재된 바와 같은 핵산의 이동에서의 변화로 관찰될 수 있다. 이러한 반응 조건은 이동이 변화되지 않을 때까지 계속된다. 이동에서의 누적 변화를 사용하여 제1 뉴클레오타이드 트리포스페이트가 순차적으로 신생 가닥에 혼입되는 (예를 들어, 표적 핵산 분자의 단일중합체 영역에서) 횡수를 정확하게 결정할 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0073]

제1 서열분석 조건 (즉, 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제1 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재) 하에 핵산의 이동에서 더 이상 변화가 관찰되지 않을 때, 또는 제1 서열분석 조건 하에 이동에서의 변화가 관찰되지 않으면, 제2 서열분석 조건 하에 반응을 수행한다. 제2 서열분석 조건은 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제2 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 포함한다. 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 이동에서의 변화는 폴리머라제에 의한 신생 가닥으로의 염기 혼입을 나타내고, 핵산 이동에서의 변화의 부재는 어떠한 염기 혼입도 발생하지 않았음을 나타낸다.

[0074]

제1 서열분석 조건, 제2 서열분석 조건, 제3 서열분석 조건 (즉, 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제3 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재), 또는 제4 서열분석 조건 (즉, 4종의 뉴클레오타이드 트리포스페이트 중 제4 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재) 하에서의 이러한 반응은 각 서열분석 조건 각각 하에 핵산의 이동에서의 변화를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열이 순차적으로 결정되는 방식으로 수행될 수 있다. 통상의 기술자는, 상이한 서열분석 조건을 도입하기 전에 한 서열분석 조건 하에서의 잔여 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 제거하는 단계가 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 상이한 뉴클레오타이드 트리포스페이트를 도입하기 전에, 폴리머라제가 고정되어 있는 표면을 세척 또는 플러싱할 수 있다. 이러한 세척 단계가 필요한 것은 아니지만, 이러한 단계가 결과적인 서열 정보의 정확도를 증가시킬 것임이 이해될 것이다.

[0075]

c) 추가의 서열분석 방법론

[0076]

본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법은, 예를 들어 제한 없이, 서열분석 정보의 정확도를 추가로 증가시키고 서열분석 반응에서 수득되는 정보의 양을 추가로 증가시키기 위해 사용될 수 있는 수많은 다양한 변경 및 통상의 변형을 받을 수 있다.

[0077]

예를 들어, 특정 폴리머라제, 통상적으로 RNA 폴리머라제는 "가닥-전환" 또는 "선회" 능력을 갖는다. 이러한 특징은 생성되는 서열 정보의 정확도를 증가시키기 위해 본원에 기재된 방법에서 유리하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 폴리머라제가 표적 핵산의 말단에 도달하는 경우에, 폴리머라제는 반대편 가닥으로 "점프"하여 전사를 계속할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [McAllister et al. (US 2007/0077575) 및 Rong et al. (1998, J. Biol. Chem., 273(17):10253-60)]을 참조한다. 또한, 특정 RNA 폴리머라제는 이중-가닥 DNA 주형으로부터 하이브리드 DNA-RNA 전사체로 "점프"하고, DNA 가닥의 전사를 재개할 수 있다. 또한, 표적 핵산 분자의 이러한 유형의 재귀적 서열분석은 폴리머라제가 결합하여 양쪽 가닥을 전사하도록 표적 핵산 분자의 각 말단에 폴리머라제 프로모터를 도입 (예를 들어, 라이게이션)하는 것에 의해 유전자 조작될 수 있다.

[0078]

또한, 1개 이상의 상이한 폴리머라제 (예를 들어, 상이한 유기체로부터의 폴리머라제 또는 동일한 유기체로부터의 상이한 폴리머라제)가 고체 표면 상에 고정될 수 있다. 관련 기술분야에 공지되어 있는 바와 같이, 상이한 폴리머라제는 상이한 프로모터 서열을 인식하고 이에 결합한다. 따라서, 1개 이상의 상이한 폴리머라제 프로모터는 상이한 표적 핵산 분자 집단에 라이게이션될 수 있고, 조합된 표적 핵산 분자 집단은 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법을 사용하여 고체 표면에 고정되어 있는 1개 이상의 상이한 폴리머라제에 의해 서열분석될 수 있다. 예를 들어 상이한 폴리머라제 또는 상이한 표적 핵산 분자 집단을 차별적으로 표지하는 것에 의해 (예를 들어, 상이한 파장을 방출하는 비드, 형광 태그 또는 형광-표지된 항체를 사용), 하나의 표적 핵산 분자 집단의 서열을 또 다른 표적 핵산 분자 집단의 서열과 구별할 수 있다. 이러한 방법을 사용하면, 상이한 표적 핵산 분자 집단에 대한 서열분석 반응이 동시에 이루어질 수 있다.

[0079]

일부 실시양태에서는, 폴리머라제 및 표적 핵산 분자 집단을 둘 다 차별적으로 표지할 수 있다. 표적 핵산 분자를 표지하는 것은 핵산을 통해, 또는 예를 들어 표적 핵산 분자에 결합된 추가의 모이어티를 통해 직접 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 서열분석 반응의 여러 수준에서 차별적으로 표지하는 이러한 능력은 예를

들어, 예를 들어 단일중합체 영역 또는 메틸화 영역을 확인할 수 있는, 동일한 서열을 갖는 표적 핵산 분자에 대한 상이한 폴리머라제의 연관성을 비교하거나, 또는 1종을 초과하는 폴리머라제에 의한 상이한 서열을 갖는 표적 핵산 분자의 중합을 비교하는데 사용될 수 있다.

[0080] 간단한 예로서, 적절한 핵산 프로모터 서열과 함께 (예를 들어, 박테리오파지 중 1종 이상, 1종 이상의 원핵생물, 또는 1종 이상의 진핵생물로부터의) 폴리머라제 효소의 임의의 조합이 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 방법에 사용될 수 있다. 본원에 논의된 바와 같이, 이러한 특징은 서열분석 반응의 멀티플렉스화를 가능하게 한다. 그의 특정 프로모터 서열과 함께 상이한 폴리머라제를 사용할 뿐만 아니라 차별적-표지화 기술을 사용하는 다른 변경이 본원에서 고려된다.

[0081] 일부 실시양태에서, 2개의 비동기식 나노구조-기반 서열분석 반응이 동일한 서열분석 조건 (예를 들어, 제1 서열분석 조건) 하에 수행될 수 있다. 일단 충분한 뉴클레오티드 수 (예를 들어, 적어도 100 nt, 500 nt, 1,000 nt, 5,000 nt, 또는 10,000 nt 또는 20000 nt 또는 50000 nt 또는 100000 nt 또는 1500000 nt)에 대한 서열분석이 진행되고 나면, 반응 중 하나의 서열분석 조건을 바꾸고 (예를 들어, 제2 서열분석 조건으로), 나노구조-기반 서열분석을 계속할 수 있다. 제1 서열분석 조건 하에 수득된 결과적인 서열 정보를 사용하여 제1 반응에서의 특정한 표적 핵산 분자를 제2 반응에서의 동일한 특정한 표적 핵산 분자와 정렬시킬 수 있고, 이는 서열분석 조건이 바뀌었을 때 특정한 표적 핵산 분자 내의 2개의 뉴클레오티드에 대해 위치 서열 정보가 수득되게 한다.

[0082] 통상의 기술자는, 특히 폴리머라제 효소가 연장 및 전위 동안 핵산 분자에 대해 비틀림을 가하기 때문에, 나노구조의 크기 및/또는 나노구조 주변 완충체의 이온 함량이 서열분석 반응의 효율 및 정확도에 영향을 미칠 수 있음을 이해할 것이다. 일부 경우에, 폴리머라제의 로딩 및/또는 나노구조가 서열분석의 속도에 유리한 영향을 미치도록 사용될 수 있는 폴리머라제 및/또는 서열분석 조건이 존재할 수 있지만, 대부분의 경우에, 통상의 기술자는 이들 영향을 최소화하는 것을 선호할 것이다.

[0083] 제조품 / 키트

[0084] 제조품 (예를 들어, 키트)이 본원에 제공된다. 제조품은 다수의 폴리머라제 효소가 고정되어 있는, 본원에 논의된 바와 같은 고체 기판을 포함할 수 있다. 다수의 폴리머라제 효소는 적어도 10개의 폴리머라제 (예를 들어, 적어도 20, 50, 75, 또는 100개의 효소), 적어도 100개의 폴리머라제 (예를 들어, 적어도 200, 500, 또는 1,000개의 효소), 또는 적어도 1,000개의 폴리머라제 (예를 들어, 적어도 약 2,500, 5,000, 10,000, 50,000개의 효소 또는 그 초과)를 지칭한다.

[0085] 제조품은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 포장 재료 (예를 들어, 블리스터 팩, 병, 튜브, 바이알 또는 용기)를 포함할 수 있으며, 폴리머라제가 고정되어 있는 고체 표면에 더하여, 1개 이상의 추가의 성분을 포함할 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, 제조품은 폴리머라제 프로모터에 상응하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 본원에 논의된 바와 같이, 폴리머라제에 의한 전사를 지시하는 프로모터는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용된다.

[0087] 일부 실시양태에서, 제조품은 테더를 포함할 수 있다. 본원에 논의된 바와 같이, 테더는 표적 핵산 분자를 모이더티 (예를 들어, 태그)에 부착시키는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 테더는 그것이 예를 들어 스트렙타비딘-표지된 태그에 결합되도록 예를 들어 비오티닐화될 수 있는 핵산 서열을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 제조품은 1종 이상의 뉴클레오시드 트리포스페이트를 포함할 수 있다. 1종을 초과하는 뉴클레오시드 트리포스페이트가 제공되는 경우에, 이는 조합되어 (예를 들어, 단일 용기 내에) 또는 개별적으로 (예를 들어, 개별 용기 내에) 제공될 수 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, 제조품은 지침을 추가로 포함한다. 지침은 종이 형태로, 또는 임의의 수의 전자 형태로 (예를 들어, CD 또는 플래시 드라이브 상의 예를 들어 전자 파일, 또는 인터넷 상의 위치에 대한 안내 (예를 들어, 링크)) 제공될 수 있다. 이러한 지침은 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 이동을 확인하고/거나, 뉴클레오시드 트리포스페이트의 이동 및 존재를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 컴파일하고/거나; 핵산에 적절한 장력을 적용하는데 사용될 수 있다.

[0090] 나노구조-기반 서열분석 시스템

[0091] 본원에 기재된 바와 같은 나노구조-기반 서열분석 시스템은 적어도 서열분석 모듈을 포함한다. 표적 핵산 분자



를 서열분석하기 위한 서열분석 모듈은 전형적으로 고체 기판을 수용하는 용기, 지향력을 제공하기 위한 장력 공급원, 및 나노구조를 횡단하는 전류에서의 변화를 결정하는 수단을 포함한다. 고체 기판 및 장력 공급원은 상기 논의되었고, 전류에서의 변화를 결정하거나 검출하는 수단은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 이러한 수단은 예를 들어 이온 전류 측정을 사용하는 것 (예를 들어, 전압 클램프 증폭기 (예를 들어, 악소패치 (Axopatch))를 사용하는 것) 또는 횡전기장 (예를 들어, 드래깅, 터널링)을 사용하는 것 (예를 들어, 문헌 [Tsutsui et al., 2012, Sci. Rep., 2:394])을 포함할 수 있다. 고체 기판을 수용하는 용기는 예를 들어 오픈한 챔버로 구성될 수 있다. 서열분석 모듈은 또한 컴퓨터 프로세서, 또는 컴퓨터 프로세서와 접속하기 위한 수단을 포함할 수 있다. 또한, 주요 분석 소프트웨어가 서열분석 모듈의 일부로서 제공될 수 있다.

[0092]

또한, 서열분석 모듈은 가열 및 냉각 소자, 및 서열분석 반응의 온도를 변화시키고 조절하기 위한 온도 제어 시스템을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 서열분석 모듈은 유체기기 (예를 들어, 1종 이상의 시약 또는 완충제를 반응 챔버로 전달하기 위한 1종 이상의 시약 또는 완충제 저장소 및 배관)를 추가로 포함할 수 있다. 1종 이상의 시약 또는 완충제를 전달하기 위한 유체기기는 또한 제한 없이 적어도 1개의 펌프를 포함할 수 있다. 제한 없이, 서열분석 반응에 사용될 수 있는 예시적인 시약은 예를 들어 뉴클레오시드 트리포스페이트 및/또는 효소 (폴리머라제)를 포함할 수 있다. 또한 제한 없이, 서열분석 반응에 사용될 수 있는 예시적인 완충제는 예를 들어 세척 완충제, 효소-결합 완충제 및 서열분석 완충제를 포함할 수 있다.

[0093]

본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석 시스템은 단일 뉴클레오타이드 분해능을 갖는 대규모의 평행 단일 분자 분석을 기반으로 하여 현장 진단학 및 계능학을 유의하게 진전시킬 수 있다. 상기 시스템은 내재적으로 고도로 멀티플렉스화된 표적 확인에 적합하며, 상이한 핵산 표적, 예를 들어 병원체 및 인간 바이오마커를 동시에 또는 순차적으로 조사하기 위해 재구성될 수 있음에 있어서 무한한 유연성을 갖는다. 핵산을 서열분석하는 현행 PCR- 및 마이크로어레이-기반 방법은 양성 확인을 위해 특정 세트의 시약 (프라이머 및 프로브)이 요구되기 때문에, 공지되어 있는 서열 또는 감염원(들)만을 검출할 수 있다는 한계가 있다.

[0094]

예를 들어 고처리량 임상 진단학 또는 현장 진단학을 위해 설계된 시스템의 경우에, 본원에 기재된 바와 같은 나노구조-기반 서열분석 시스템은 샘플 제조 모듈 및 주형 마감 모듈과 커플링될 수 있다.

[0095]

샘플 제조 모듈은 세포를 용해하여 핵산을 방출하도록 구성될 수 있으며, 샘플 제조 모듈은 또한 핵산을 전달/단편화하는 능력을 가질 수 있다. 샘플 제조 모듈은 전형적으로 생물학적 샘플을 수용하기 위한 용기; 및 1종 이상의 시약 또는 완충제를 생물학적 샘플로 전달하기 위한 유체기기를 포함한다. 샘플 제조 모듈은 다양한 여러 생물학적 샘플을 수용하도록 구성될 수 있거나, 또는 샘플 제조 모듈은 특정 유형의 생물학적 샘플 (예를 들어, 면봉, 조직 샘플, 혈액 또는 혈장 샘플, 타액, 또는 배양물의 일부), 또는 특정 형태로 (예를 들어, 바이알 또는 튜브 내, 또는 블롯팅 페이퍼 상) 제공되는 생물학적 샘플을 수용하도록 구성될 수 있다. 서열분석 제조 모듈은 또한 예를 들어 필터, 칼럼, 자석, 면역학적 방법 또는 그의 조합 (예를 들어, 병원체 포획 시스템, 나노MR 인크.(NanoMR Inc.))를 사용하여 생물학적 샘플 (예를 들어, 박테리아 세포, 바이러스 등)로부터 특정 분자를 포획하도록 구성될 수 있다.

[0096]

샘플 제조 모듈은 생물학적 샘플로부터 핵산을 수득하여 서열분석을 위한 핵산을 제조하는데 수반되는 시약 또는 완충제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열분석을 위한 핵산을 수득하는데 수반되는 시약은 세포 용해 시약, 핵산 절단 효소, DNA 폴리머라제, 올리고뉴클레오타이드, 및/또는 DNA 결합제 (예를 들어, 표적 핵산 분자에 결합하여 세척되는 비드 또는 고체 매트릭스)를 포함하고, 서열분석을 위한 핵산을 수득하는데 수반되는 완충제는 용해 완충제, 세척 완충제, 용리 완충제, 또는 결합 완충제를 포함한다. 샘플 제조 모듈의 많은 기능적 구성요소는 상업적으로 입수가능하다 (예를 들어, 실리카 겔 막 (퀴아젠(Qiagen) 또는 암비온(Ambion) 키트), 또는 팔라듐 시스템 (인테그레이티드 나노 테크놀로지스 인크.(Integrated Nano Technologies Inc.))의 통합된 일부로서). 또한, 핵산 주형의 효소 절단에 대한 대안으로서, 핵산을 단편화하는 기기가 상업적으로 입수가능하다 (예를 들어, 코바리스(Covaris)).

[0097]

주형 마감 모듈은 폴리머라제 프로모터 서열을 표적 핵산 분자에 부착시키도록 구성될 수 있다. 주형 마감 모듈은 전형적으로 1종 이상의 시약 또는 완충제를 표적 핵산 분자에 전달하기 위한 유체기기를 포함한다. 예를 들어, 주형 마감 모듈은 폴리머라제 프로모터 서열을 표적 핵산 분자에 라이게이션시키기 위한 시약 및 완충제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 프로모터 서열을 표적 핵산 분자에 라이게이션시키는데 수반되는 시약은, 분명히 프로모터 서열을 포함하지만, 또한 예를 들어 리가제 효소, 테더 또는 PCR 시약을 포함할 수 있고, 프로모터 서열을 표적 핵산 분자에 라이게이션시키는데 수반되는 완충제는 라이게이션 완충제, 효소-결합 완충제, 세척 완충제 및 서열분석 완충제를 포함한다.

- [0098] 본원에 기재된 바와 같은 나노구조-기반 서열분석 시스템의 구성에 의존하여, 프로모터-결합된 표적 핵산 분자를 도입하기 전에 다수의 폴리머라제를 고체 표면 상에 고정시킬 수 있다. 대안적으로, 다수의 폴리머라제를 프로모터-결합된 표적 핵산 분자와 조합하고, 전체 복합체를 고체 표면 상에 증착시킬 수 있다. 폴리머라제 및 그의 상응하는 프로모터 서열에 대한 결합 동역학이 매우 빠르고, 효율적이고, 특이적이기 때문에, 후자의 절차는 실현가능하다.
- [0099] 나노구조-기반 서열분석 후 서열 결정
- [0100] 도 4는 표적 핵산 분자의 서열을 결정하기 위한 예시적인 프로세스 1100을 예시한 흐름도이다. 일부 예에서, 프로세스 1100은 하나 이상의 컴퓨팅 디바이스를 사용하여 실행되는 하나 이상의 컴퓨터 프로그램 어플리케이션을 사용하여 실행될 수 있다. 예시 목적으로, 폴리머라제에 의한 표적 핵산 분자의 연장 동안 획득되는 데이터를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열을 결정하는 것에 관한 비제한적 예시 내용이 제공된다.
- [0101] 프로세스 1100은 본원에 기재된 나노구조-기반 서열분석을 사용하여 서열분석되는 표적 핵산 분자에서 확인된 위치를 현재 핵산 위치로 설정하는 것 (1110)으로 시작된다. 확인된 위치는 예를 들어 프로모터 서열 내에 혼입/연장된 제1 뉴클레오타이드, 표적 핵산 분자로부터 혼입/연장된 (즉, 프로모터 서열 이후의) 제1 뉴클레오타이드, 또는 표적 핵산 분자 상의 임의의 뉴클레오타이드 위치일 수 있다.
- [0102] 표적 핵산 분자 내 확인된 위치에서 제1 데이터 (즉, 제1 정보)가 나노구조-기반 서열분석 시스템으로부터 수신되거나 (1120) 또는 나노구조-기반 서열분석 작업으로부터의 정보를 기반으로 하여 제공되고, 표적 핵산 분자 내 확인된 위치에서 제2 정보 (즉, 제2 데이터)가 제공되거나 수신된다 (1120). 예를 들어, 제1 데이터는 나노구조를 통한, 나노구조 상에서의 또는 나노구조를 거친 핵산의 전위 (즉, 이동)에 관한 정보일 수 있다. 예를 들어, 제1 데이터는 전위 속도, 전위의 존재 또는 부재의 결정, 또는 전위의 확립된 패턴에서의 변화일 수 있다. 예를 들어, 제2 데이터는 서열분석 반응에서 1종 이상의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 및/또는 이용가능성 (예를 들어, 농도)에 관한 정보일 수 있다.
- [0103] 이어서, 확인된 위치에서 뉴클레오타이드가 제1 및 제2 데이터를 기반으로 하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 제1 데이터가 전위 속도에서의 변화를 나타내고 제2 데이터가 반응에서 구아닌 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 나타내는 경우에, 표적 핵산 분자 내 확인된 위치에서의 뉴클레오타이드는 시토신인 것으로 결정된다. 유사하게, 제1 데이터가 전위 속도에서의 변화의 부재를 나타내고, 제2 데이터가 반응에서 구아닌 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재를 나타내는 경우에, 표적 핵산 분자 내 표시된 위치에서의 뉴클레오타이드는 비-구아닌 (즉, 아데닌, 구아닌, 또는 티민)인 것으로 결정된다.
- [0104] 확인된 위치가 다음 위치로 진행할 수 있는 것으로 결정되는 경우에 (1140), 확인된 위치는 표적 핵산 분자 내 다음 핵산 위치와 동등하게 설정되고 (1150), 프로세스 1100이 계속된다 (1120). 확인된 위치가 다음 위치로 진행할 수 없는 것으로 결정되는 경우에 (1140), 각각의 확인된 위치에서 수신된 제1 정보 및 제2 정보를 기반으로 하여 표적 핵산 분자의 서열이 컴파일되고 (1160), 프로세스 1100은 종료된다. 예를 들어 표적 핵산 분자의 중합의 완료 또는 폴리머라제 활성의 만료 (예를 들어, 효소 활성의 붕괴로 인한)로 인해 연장이 더 이상 일어날 수 없는 경우에, 확인된 위치는 다음 위치로 진행될 수 없다.
- [0105] 본 명세서에 기재된 주제 및 작업 실시양태는 디지털 전자 회로에서, 또는 컴퓨터 소프트웨어, 펌웨어 또는 하드웨어에서, 또는 이들 중 1종 이상의 조합에서 실행될 수 있다. 본원에 기재된 주제의 실시양태는 1종 이상의 컴퓨터 프로그램, 즉 데이터 프로세싱 장치에 의한 실행을 위해, 또는 그의 작동을 제어하도록 컴퓨터 저장 매체에 코딩되어 있는 1종 이상의 컴퓨터 프로그램 명령어의 모듈로서 실행될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 프로그램 명령어는 인공적으로 생성된 전파용 신호, 예를 들어 데이터 프로세싱 장치에 의한 실행을 위한 적합한 수신 장치로의 전달을 위해 정보를 코딩하도록 생성된 기계-생성 전기, 광학 또는 전자기 신호 상에 코딩될 수 있다. 컴퓨터 저장 매체는 컴퓨터-판독가능 저장 디바이스, 컴퓨터-판독가능 저장 기관, 임의 또는 순차 접근 메모리 어레이 또는 디바이스, 모바일 통신 디바이스, 또는 이들 중 1종 이상의 조합일 수 있거나, 또는 이에 포함될 수 있다. 또한, 컴퓨터 저장 매체가 전파되는 신호는 아니지만, 컴퓨터 저장 매체는 인공적으로 생성되는 전파 신호에 코딩되어 있는 컴퓨터 프로그램 명령어의 공급원 또는 목적지일 수 있다. 컴퓨터 저장 매체는 또한 1종 이상의 개별 물리적 구성요소 또는 매체 (예를 들어, 다중 CD, 디스크 또는 기타 저장 디바이스)일 수 있거나, 또는 이에 포함될 수 있다.
- [0106] 본원에 기재된 작업은 하나 이상의 컴퓨터-판독가능 저장 디바이스에 저장되어 있거나 다른 공급원으로부터 수신되는 데이터 상에서 데이터 프로세싱 장치에 의해 수행되는 작업으로서 실행될 수 있다. 용어 "데이터 프로

세칭 장치"는 예로서 프로그램가능 프로세서, 모바일 통신 디바이스, 컴퓨터, 칩상 시스템, 또는 상기한 것 중 다중의 것 또는 조합을 비롯한, 데이터 프로세싱을 위한 모든 종류의 장치, 디바이스, 및 기계를 포괄한다. 장치는 특별한 목적의 논리 회로, 예를 들어 FPGA (필드 프로그램가능 게이트 어레이) 또는 ASIC (어플리케이션 특이적 통합 회로)를 포함할 수 있다. 장치는 또한 하드웨어에 더하여, 해당 컴퓨터 프로그램을 위한 실행 환경을 생성하는 코드, 예를 들어 프로세서 펌웨어, 프로토콜 스택, 데이터베이스 관리 시스템, 작업 시스템, 크로스-플랫폼 실행시간 환경, 가상 기계, 또는 이들 중 1종 이상의 조합을 구성하는 코드를 포함할 수 있다. 장치 및 실행 환경은 웹 서비스, 분산 컴퓨팅 및 그리드 컴퓨팅 인프라구조와 같은 다양한 여러 컴퓨팅 모델 인프라구조를 구현할 수 있다.

[0107]

컴퓨터 프로그램 (또한 프로그램, 소프트웨어, 소프트웨어 어플리케이션, 스크립트 또는 코드로도 공지됨)은 컴파일되거나 해석된 언어, 진술형 또는 절차형 언어를 비롯한 임의의 형태의 프로그래밍 언어로 기록될 수 있으며, 임의의 형태로, 예를 들어 독립형 프로그램으로서, 또는 모듈, 구성요소, 서브루틴, 항목 또는 기타 컴퓨팅 환경에서 사용하기에 적합한 유닛으로서 배포될 수 있다. 컴퓨터 프로그램은 파일 시스템의 파일에 해당할 수 있지만, 그러한 필요는 없다. 프로그램은 다른 프로그램 또는 데이터 (예를 들어, 마크업 언어 문서에 저장되는 하나 이상의 스크립트)를 보유하는 파일의 일부에, 해당 프로그램 전용 단일 파일로, 또는 다중 통합 파일 (예를 들어, 하나 이상의 모듈, 서브 프로그램 또는 코드의 일부를 저장하는 파일)로 저장될 수 있다. 컴퓨터 프로그램은 하나의 컴퓨터 상에서, 또는 한 위치에 배치되어 있거나 다수의 위치에 걸쳐 분산되어 통신 네트워크에 의해 연결되는 다수의 컴퓨터 상에서 실행되도록 배포될 수 있다.

[0108]

본원에 기재된 프로세스 및 논리 흐름은 입력 데이터에 대해 작동하여 출력을 생성시킴으로써 작업을 수행하기 위해 하나 이상의 컴퓨터 프로그램을 실행하는 하나 이상의 프로그램가능 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 상기 프로세스 및 논리 흐름은 또한 특별한 목적의 논리 회로, 예를 들어 FPGA 또는 ASIC에 의해 수행될 수 있으며, 장치 역시 그것으로 실행될 수 있다.

[0109]

컴퓨터 프로그램의 실행에 적합한 프로세서는, 예로서 일반 목적 및 특수 목적 둘 다의 마이크로프로세서, 및 임의의 종류의 디지털 컴퓨터의 어느 하나 이상의 프로세서를 포함한다. 일반적으로, 프로세서는 읽기 전용 메모리 또는 임의 접근 메모리 또는 둘 다로부터의 명령어 및 데이터를 수신할 것이다. 컴퓨터의 필수 요소는 명령어에 따라 작업을 수행하기 위한 프로세서, 및 명령어 및 데이터를 저장하기 위한 하나 이상의 메모리 디바이스이다. 일반적으로, 컴퓨터는 또한 데이터를 저장하기 위한 하나 이상의 대용량 저장 디바이스, 예를 들어 자기, 자기 광 디스크, 또는 광 디스크를 포함하거나, 또는 그로부터 데이터를 수신하거나, 그곳으로 데이터를 전달하거나, 또는 둘 다를 하도록 작동가능하게 커풀링될 것이다. 그러나, 컴퓨터가 이러한 디바이스를 가질 필요는 없다. 또한, 컴퓨터는 또 다른 디바이스, 예를 들어 모바일 통신 디바이스, 개인 정보 단말기 (PDA), 모바일 오디오 또는 비디오 플레이어, 게임 콘솔, 위성 위치확인 시스템 (GPS) 수신기, 또는 휴대용 저장 디바이스 (예를 들어, 범용 직렬 버스 (USB) 플래시 드라이브) 등에 내장될 수 있다. 컴퓨터 프로그램 명령어 및 데이터를 저장하는데 적합한 디바이스는 예로서 반도체 메모리 디바이스, 예를 들어 EPROM, EEPROM 및 플래시 메모리 디바이스; 자기 디스크, 예를 들어 내장 하드 디스크 또는 이동식 디스크; 자기 광 디스크; 및 CD ROM 및 DVD-ROM 디스크를 포함하여, 모든 형태의 비휘발성 메모리, 매체 및 메모리 디바이스를 포함한다. 프로세서 및 메모리에 특수 목적의 논리 회로가 보충될 수 있거나 또는 프로세서 및 메모리가 특수 목적의 논리 회로에 통합될 수 있다.

[0110]

사용자와의 상호작용을 제공하기 위해, 본 명세서에 기재된 주제의 실시양태는 사용자에게 정보를 표시해주기 위한 디스플레이 디바이스, 예를 들어 CRT (음극선관) 또는 LCD (액정 디스플레이) 모니터, 및 사용자가 컴퓨터에 입력을 제공할 수 있는 키보드 및 포인팅 디바이스, 예를 들어 마우스 또는 트랙볼을 갖는 컴퓨터에서 실행될 수 있다. 또한, 컴퓨터는 사용자에 의해 사용되는 디바이스로 문서를 전송하고 그로부터 문서를 수신함으로써; 예를 들어 웹 브라우저로부터 수신된 요청에 반응하여 사용자의 클라이언트 디바이스에서 웹 브라우저로 웹 페이지를 전송함으로써 사용자와 상호작용할 수 있다.

[0111]

본 명세서에 기재된 주제의 실시양태는 예를 들어 데이터 서버로서 백 엔드 구성요소를 포함하거나, 미들웨어 구성요소, 예를 들어 어플리케이션 서버를 포함하거나, 또는 프론트 엔드 구성요소, 예를 들어 그래픽 유저 인터페이스, 또는 사용자가 본 명세서에 기재된 주제의 실행과 상호작용할 수 있는 웹 브라우저를 갖는 클라이언트 컴퓨터를 포함하거나, 또는 1개 이상의 이러한 백 엔드, 미들웨어 또는 프론트 엔드 구성요소의 임의의 조합을 포함하는 컴퓨팅 시스템에서 실행될 수 있다. 시스템의 구성요소는 임의의 형태 또는 매체의 디지털 데이터 통신, 예를 들어 통신 네트워크에 의해 연결될 수 있다. 통신 네트워크의 예는 근거리 통신망 ("LAN") 및 광역 네트워크 ("WAN"), 인터넷-네트워크 (예를 들어, 인터넷), 및 피-투-피 네트워크 (예를 들어, ad hoc 피-투-피 네

트위크)를 포함한다.

- [0112] 컴퓨팅 시스템은 클라이언트 및 서버를 포함할 수 있다. 클라이언트 및 서버는 일반적으로 서로 원거리에 있으며, 전형적으로 통신 네트워크를 통해 상호작용한다. 클라이언트와 서버의 관계는 각 컴퓨터에서 전개되어 서로 클라이언트-서버 관계를 갖는 컴퓨터 프로그램에 의해 발생한다. 일부 실시양태에서, 서버는 데이터 (예를 들어, HTML 페이지)를 클라이언트 디바이스 (예를 들어, 클라이언트 디바이스에 데이터를 표시하고, 그와 상호 작용하는 사용자로부터 사용자 입력을 수신하기 위한 목적)에 전송한다. 클라이언트 디바이스에서 생성되는 데이터 (예를 들어, 사용자 상호작용의 결과)는 서버에서 클라이언트 디바이스로부터 수신될 수 있다.
- [0113] 본 발명에 따르면, 관련 기술분야에 속하는 통상의 분자 생물학, 미생물학, 생화학 및 재조합 DNA 기술이 사용될 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기재될 것이며, 이는 특허청구범위에 기재된 방법 및 물질의 조성물의 범위를 제한하지 않는다.
- [0114] 실시예
- [0115] 실시예 1-고체 표면 제조
- [0116] NTA 단층을 기재되어 있는 바와 같이 제조하였다 (문헌 [Paik et al., 2005, Chem. Commun., 15:1956-58] 참조). NTA-관능화 기판을 0.1 M  $\text{NiCl}_2$ 를 함유하는 10 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 8.0)에 30분 동안 침지시켜 Ni-NTA 표면을 획득하였다. 이어서 기판을 밀리(Milli)-Q 수로 수회 세정하고, 질소 스트림 하에 건조시켰다.
- [0117] 새로이 세정된 기판을 1% (v/v) 3-글리시딜옥시프로필 트리메톡시실란을 함유하는 증류 톨루엔 용액에 아르곤 하에 2일 동안 침지시켰다. 기판을 용액으로부터 제거한 후에, 증류 톨루엔으로 세정하고, 질소 스트림 하에 건조시켰다. 에폭시-종결 SAM으로 관능화된 기판을 2.5 mM N,N 비스(카르복시메틸)-L-리신 (NTA)을 함유하는 10 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 8.0)에서 60°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 기판을 밀리-Q 수로 세정하고, 미세접촉 인쇄를 대비하여 건조시켰다.
- [0118] NTA SAM에 대한 His-태그부착된 단백질의 제한된 비특이적 결합 효과가 관찰됨으로써, NTA SAM이 미세접촉 인쇄 및 덤-펜 나노리소그래피 기술을 사용하여 Ni(II) 이온 패턴을 제조하는데 적합한 표면임이 입증되었다.
- [0119] 실시예 2-His-태그부착된 RNA 폴리머라제의 클로닝 및 정제
- [0120] 주형으로서 pTAGk19를 사용하고 프라이머로서 합성 DNA 올리고머 RP46 및 RP47 (하기 참조)을 사용하는 PCR에 의해, 38개 아미노산의 SBP-태그를 코딩하는 DNA 단편을 합성하였다. 단편을 NcoI를 사용하여 소화시키고 pBH16117에 라이게이션시켜, pRP6을 생성시켰다.
- [0121] SBP-His-RNA 폴리머라제 및 His-RNA 폴리머라제를 앞서 기재된 바와 같이 발현시키고 정제하였다 (He et al., 1997, J. Protein Expression Purif., 9:142-51; 및 Keefe et al., 2001, J. Protein Expression Purif., 23:440-46).
- [0122] 실시예 3-폴리머라제의 고정
- [0123] Si(111)에의 RNA 폴리머라제 분자의 고정을 위해 하기 반응 계획을 따랐다: (a) 40%  $\text{NH}_4\text{F}$ , 10분, 25°C; (b)  $\text{Cl}_2$  기체, 20분, 100°C; (c) mPEG, 밤새, 진공, 150°C; (d) DSC, DEIDA, DMAP, DMF, 밤새, 25°C; (f) BBTO, 디에틸 에테르, 6시간, 25°C; (g)  $\text{CuSO}_4$ , 에탄올 20분, 25°C; (h) 6x His-태그부착된 단백질 인큐베이션.
- [0124] 실시예 4-미세접촉 인쇄 ( $\mu\text{CP}$ ) 및 복합체 형성
- [0125] 폴리(디메틸실록산) (PDMS) 및 경화제 (실가드(Sylgard) 184, 다우 코닝(Dow Corning))의 10:1 (v/v) 혼합물을 패턴화된 규소 마스터에 캐스팅하여 3 및 10 마이크로미터 선 특징 간격 및 5 마이크로미터의 간격을 갖는 5 마이크로미터 선 특징의 PDMS 스탬프를 제조하였다. 비-산화된 PDMS 스탬프를 0.1 M  $\text{NiCl}_2$ 를 함유하는 10 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 8.0) 중에서 약 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 질소 스트림으로 건조시켰다. 스탬프를 NTA-종결 기판과 3분 동안 접촉시켰다. 스탬프를 벗겨낸 후, Ni(II)-인쇄된 기판을 ds-DNA, 프로모터, 및 스트렙타비딘-비오틴 결합을 통해 부착된 자기 태그와 함께 100 nM의 His-T7 RNAP를 함유하는 약 200  $\mu\text{L}$ 의 25 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 7.5) 중에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 10 mM 트리스-HCl 완충제 (pH 8.0) 및 밀리-Q 수로 세정하여 과량의 단백질을 제거하였다.
- [0126] 실시예 5-테더링



[0127] 2.8 마이크로미터 SA-접합 비드 (디날(Dynal)) 및 1.0 마이크로미터 비오틴화 비드를 PBS 중에 희석하고 (각각 1:20 및 1:200), 실온에서 15분 동안 혼합하였다. Ni<sup>2+</sup>-NTA HRP 접합체 (쿼젠)로 커버슬립을 코팅하고, 이전에 기재된 바와 같이 약간 떨어진 커버슬립과 함께 정렬함으로써, 유동 챔버를 조립하였다 (문헌 [Noji et al., 1997, Nature, 386:299-302] 참조).

[0128] 실시예 6-주형 제조

[0129] T7 프로모터를 보유하는 4.6 kb 파지 T7 DNA 단편 및 람다 DNA의 0.5 kb 비오틴화 단편을 서로 연결시켜, 전사에 의해 서열분석하기 위한 DNA 주형을 제조하였다. 4.6 kb 단편은 3' 말단에 XbaI 인식 부위를 함유하는 #T7pPK13 정방향 프라이머 및 # T7phi17REV 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 생성하였다. 0.5 kb PCR 단편은 비오틴-16-dUTP (로슈(Roche))의 존재 하에 #F3 및 #R3 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 생성하였다. PCR이 완료된 후, 정제된 PCR 생성물은 NheI로 소화시키고, 쿼퀵(QIAquick) PCR 정제 키트 (쿼젠)로 세척하였다.

[0130] XbaI에 의한 PCR 생성물의 소화 후에, 4.6 kb 조각을 NheI에 의해 소화된 0.5 kb 비오틴화 PCR 단편과 15°C에서의 밤샘 라이게이션에 의해 연결시켰다. 생성된 5.1 kb의 라이게이션 생성물을 0.7% 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분해하고, 쿼퀵 겔 추출 키트 (쿼젠)를 사용하여 겔로부터 추출하였다. 이 DNA를 전사 및 서열분석 실험에 사용하였다.

[0131] PCR을 위해 하기 프라이머를 사용하였다: # T7pPK13: GCA GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GGG AGG GAT GGA GCC TTT AAG GAG GTC AAA TGG CTA ACG (서열 1; T7 프로모터 서열은 밑줄로 표시함, 볼드체 **G**는 +1이고 볼드체 **C**는 위치 +20에서의 일시정지 부위임); # T7phi17REV: GGC A-T CTA GA- TGC ATC CCT ATG CAG TCC TAA TGC (서열 2; Xba 부위를 함유함); #F3: GGC AGC TAG CTA AAC ATG GCG CTG TAC GTT TCG C (서열 3; 5' 말단에서 NheI 제한 부위를 함유함); 및 #R3: AGC CTT TCG GAT CGA ACA CGA TGA (서열 4).

[0132] 하기 표는 T7 프로모터를 함유하는 T7 파지로부터 4.6 Kb 단편을 제조하는데 사용된 반응 혼합물을 제시한다. PCR 증폭은 하기 순환 조건 하에 수행하였다: 30" 동안 94°C; 10" 동안 94°C, 30" 동안 55°C, 4'10" 동안 65°C, 10' 동안 65°C의 32 순환; 이어서 4°C 유지.

성분	부피
Mg를 함유하는 5x 통앰프 완충제 (뉴잉글랜드 바이오랩스)	60 µl
25 mM NTP (각각)	3.6 ul
10 mM # T7pPK13	12 µl (0.4 mM 최종)
10 mM #T7phi17REV	12 µl (0.4 mM 최종)
(50 ng/µl)	6 µl
H <sub>2</sub> O	194.4 µl
통앰프 폴리머라제 (NEB)	12 µl
총 반응 부피	300 µl

[0133]

[0134] 하기 표는 다수의 비오틴을 함유하는 0.5 Kb 람다 단편을 제조하는데 사용된 반응 혼합물을 제시한다. PCR 증폭은 하기 순환 조건 하에 수행하였다: 10' 동안 94°C; 10" 동안 94°C, 30" 동안 55°C, 1' 동안 72°C, 7' 동안 72°C에서 32 순환; 이어서 4°C에서 유지.

성분	부피
10x 태콜드 완충제 w/o Mg (어플라이드 바이오시스템즈)	10 $\mu$ l
10 $\mu$ M F3	6 $\mu$ l
10 $\mu$ M R3	6 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 $\mu$ l
람다 DNA (50 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
1 mM dGTP	10 $\mu$ l
1 mM dCTP	10 $\mu$ l
1 mM dATP	10 $\mu$ l
1 mM dTTP	6.5 $\mu$ l
1 mM 바이오-16-dUTP	3.5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	21 $\mu$ l
태콜드 폴리머라제	5 $\mu$ l
총 반응 부피	100 $\mu$ l

[0135]

[0136]

실시에 7-복합체 형성 및 서열분석 반응

[0137]

완충제 B + 1% BSA를 사용하여 PEG-Cu<sup>++</sup> 관능화 유리 슬라이드 (마이크로서페이스스, 인크(MicroSurfaces, Inc))를 패시베이션하였다.

[0138]

하기 반응을 실온에서 설정하고, 37℃에서 3분 동안 인큐베이션하였다.

성분	부피
10x 완충제 A	0.5 $\mu$ l
주형 (5.1 kb PT7pK13-바이오 DNA) 6 ng/ $\mu$ l, 1.93 fmol/ $\mu$ l, 또는 2 nM (최종 0.8 nM)	2 $\mu$ l
3 종의 NTP (0.3 mM ATP + 0.3 mM GTP + 0.1 mM UTP)의 10x 믹스	1 $\mu$ l
4 $\mu$ M His-T7RNAP (최종 0.8 $\mu$ M; 원액으로부터 완충제 A 중에 희석하여 제조됨)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	0.5 $\mu$ l
총 반응 부피	5 $\mu$ l

[0139]

[0140]

주형의 위치 +20에서 중단된 T7 RNAP-DNA 연장 복합체를 함유하는 반응 믹스에 45  $\mu$ l의 완충제 B를 첨가하고, 5분에 걸쳐 혼합물을 유동 세포에 주입하였다.

[0141]

유동 세포를 완충제 B로 세척하고, 1  $\mu$ M SA 자기 비드 (46  $\mu$ l 완충제 B + 완충제 B 중 6  $\mu$ l 세척 비드와 혼합된 0.1% BSA + 0.1% BSA)를 12분에 걸쳐 주입하였다. 유동 세포를 완충제 B + 0.1% BSA로 세척하였다.

[0142]

0.8 마이크로미터 폴리스티렌 비오틴화 비드 (2  $\mu$ l 세척 비드 + 48  $\mu$ l 1xB/0.1% BSA)를 유동 세포에 주입하고, 15분 동안 인큐베이션하여, 표면 테더링된 자기 SA 비드를 포함하는 이중-입자를 형성하였다. 유동 세포를 완충제 B로 세척하여 비결합 0.8 마이크로미터 폴리스티렌 비드를 제거하였다.

[0143]

완충제 B + 250  $\mu$ M NTP + 10 mM DTT를 유동 세포에 주입함으로써 전사/서열분석을 개시하였다. 4종의 상이한 NTP 믹스 (각각 1종의 뉴클레오타이드를 덜 함유함)를 4종의 상이한 유동 세포에서 사용하였다.

1x 완충제 A		1x 완충제 B
20 mM 트리스 pH8.0		20 mM 트리스 pH8.0
14 mM MgCl <sub>2</sub>		4 mM MgCl <sub>2</sub>
10 mM DTT		0.1 mM DTT
0.1 mM EDTA		0.1 mM EDTA
20 mM NaCl		20 mM NaCl
1.5% 글리세롤		20 $\mu$ g/ml BSA
20 $\mu$ g/ml BSA		

[0144]

[0145]

시스템, 방법 및 물질의 조성물이 수많은 상이한 측면과 연계되어 본원에 기재되어 있지만, 다양한 측면에 대한 상기 기재는 예시를 위해 의도되는 것이지, 시스템, 방법 및 물질의 조성물의 범위를 제한하고자 하는 것은 아

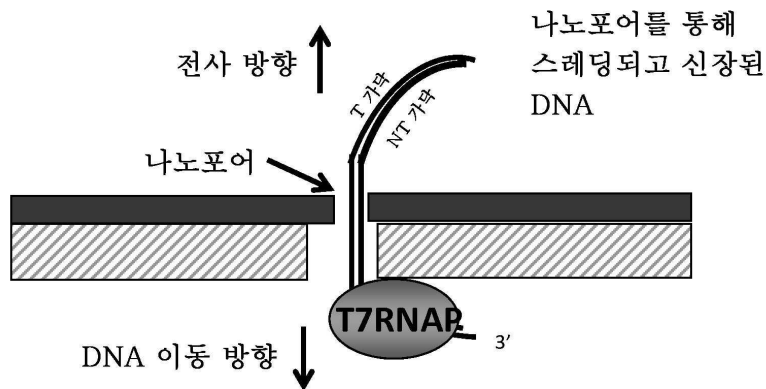
니라는 것이 이해되어야 한다. 다른 측면, 이점 및 변형은 하기 특허청구범위의 범위에 포함된다.

[0146]

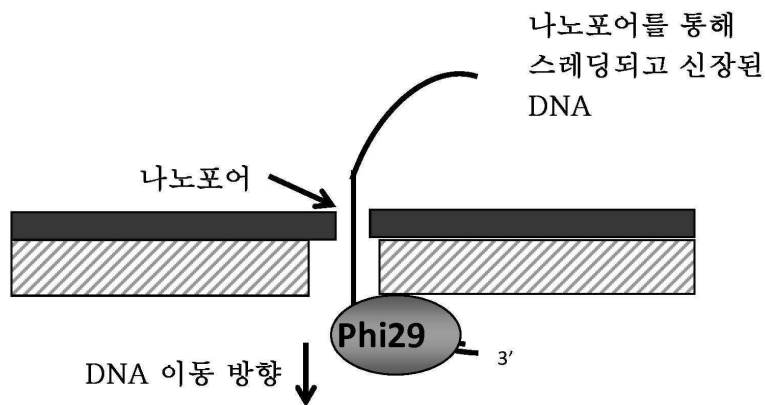
개시된 시스템, 방법 및 조성물에 대해 사용될 수 있거나, 그와 연계되어 사용될 수 있거나, 그의 제조를 위해 사용될 수 있거나, 또는 그의 생성물인 시스템, 방법 및 조성물이 개시되어 있다. 이들 및 다른 물질이 본원에 개시되어 있고, 이들 시스템, 방법 및 조성물의 조합, 하위세트, 상호작용, 군 등이 개시되어 있는 것으로 이해된다. 즉, 이들 조성물 및 방법의 각각의 다양한 개별적이고 종합적인 조합 및 순열에 대해 구체적 언급이 분명하게 개시되어 있지 않을 수 있지만, 각각은 본원에서 구체적으로 고려되고 기재된다. 예를 들어, 특정한 시스템 부분, 물질의 조성물 또는 특정한 방법이 개시 및 논의되어 있고, 다수의 시스템 부분, 조성물 또는 방법이 논의되어 있다면, 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 시스템 부분, 조성물 및 방법의 각각 및 모든 조합 및 순열이 구체적으로 고려된다. 마찬가지로, 이들의 임의의 하위세트 또는 조합이 또한 구체적으로 고려되고 개시된다.

## 도면

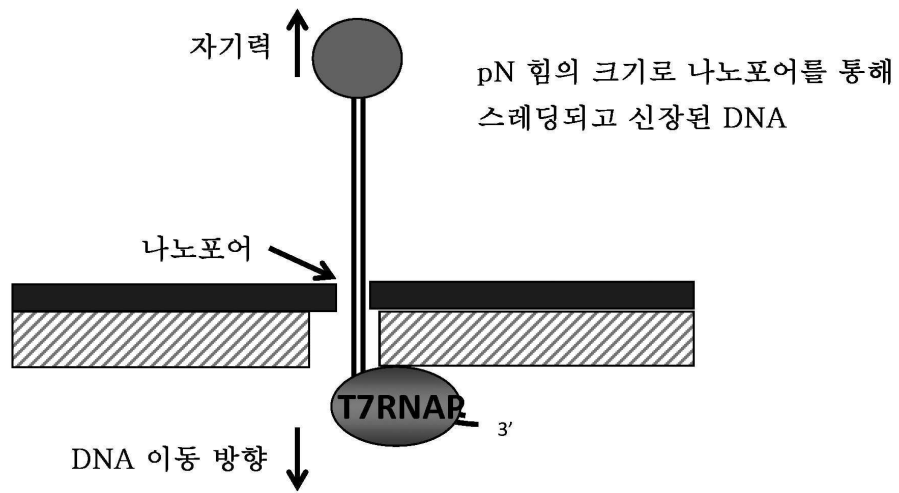
### 도면1



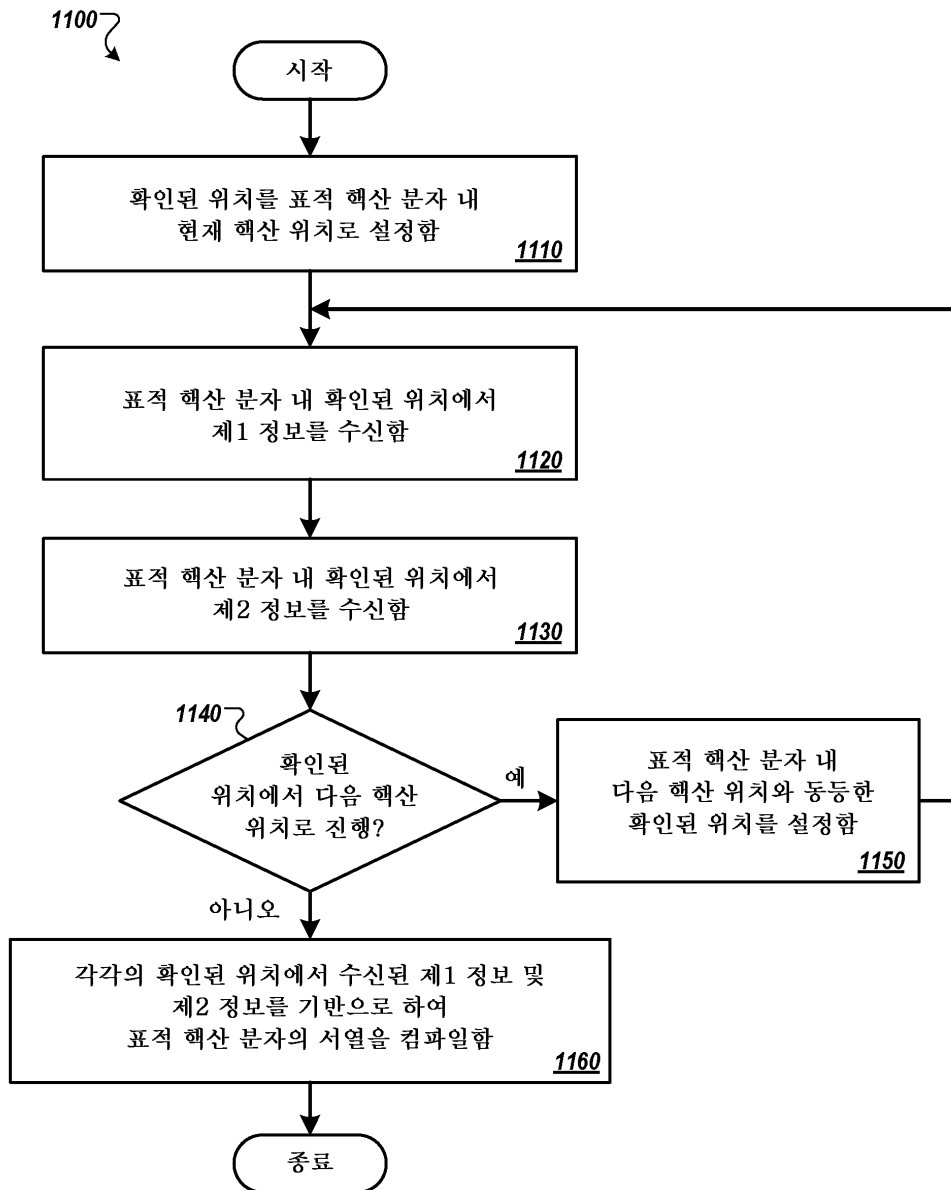
### 도면2



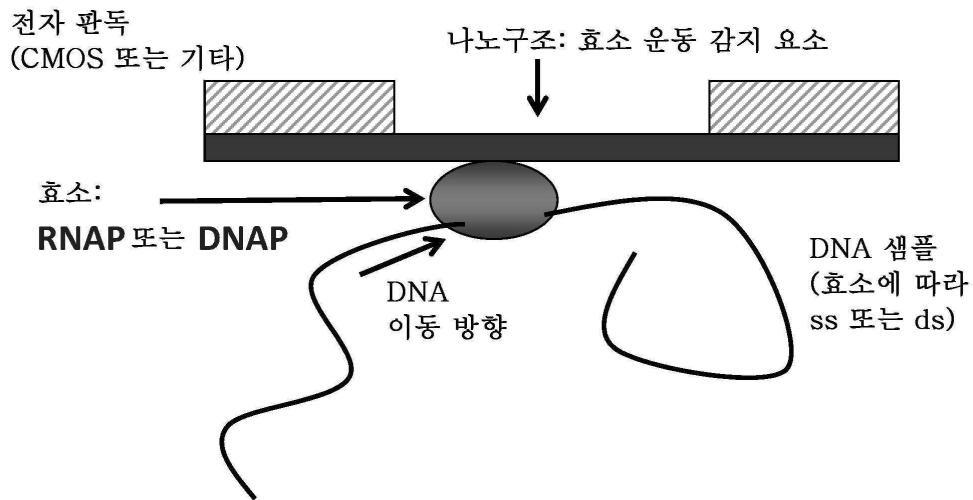
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Eve Biomedical, Inc.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR  
NANOSTRUCTURE-BASED NUCLEIC ACID SEQUENCING

<130> 36166-0003W01

<140> PCT/US2014/017419

<141> 2014-02-20

<150> 61/766,925

<151> 2013-02-20

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleotide

<400> 1

gcagtaatac gactcactat agggagaggg agggatggag cctttaagga ggtcaaattg 60

ctaacg

66

<210> 2  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> oligonucleotide  
 <400> 2  
 ggcatctaga tgcattcccta tgcagtccta atgc 34  
 <210> 3  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> oligonucleotide  
 <400> 3  
 ggagcttagc taaacatggc gctgtacgtt tcgc 34  
 <210> 4  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> oligonucleotide  
 <400> 4  
 agcctttcgg atcgaacacg atga 24