



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0151101
(43) 공개일자 2022년11월14일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6874 (2018.01) C12Q 1/6832 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6874 (2018.05)
C12Q 1/6832 (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7043200</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년03월09일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년12월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/055939</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2021/180733
국제공개일자 2021년09월16일</p> <p>(30) 우선권주장
62/987,035 2020년03월09일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
일루미나, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200</p> <p>(72) 발명자
피스 재레드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200 일루미나 인코포레이티드</p> <p>보자노빅 마차도 클라라
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200 일루미나 인코포레이티드
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
리엔목특허법인</p> |
|---|--|

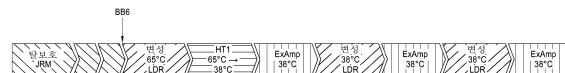
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **폴리뉴클레오티드를 서열분석하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 고처리율 핵산 서열분석 방법의 개선, 특히 페어와이즈(pairwise) 서열분석 동안 연장 반응을 수행하는 방법에 대한 개선에 관한 것이다. 본 발명은 페어와이즈 서열분석 동안 가닥 재합성 연장 반응을 수행하는 방법에 관한 것으로, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 제1 서열분석 판독과 제2 서열분석 판독 사이에서 수행되고, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 하나 이상의 고정된 프라이머를 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하여 제2 고정된 주형 가닥을 생성하고; 그러한 가닥 재합성 연장 반응은 55℃ 미만의 온도에서, 바람직하게는 38℃에서 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/101 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2531/101 (2013.01)

C12Q 2533/101 (2019.08)

C12Q 2537/1376 (2013.01)

C12Q 2565/50 (2013.01)

(72) 발명자

맥키너니 피터

미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이
5200 일루미나 인코퍼레이티드

부텔 조나단 마크

영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그레이트 애빙튼
그랜타 파크 19 일루미나 케임브리지 리미티드

명세서

청구범위

청구항 1

페어와이즈(pairwise) 서열분석 동안 가닥 재합성 연장 반응을 수행하는 방법으로서, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 제1 서열분석 판독과 제2 서열분석 판독 사이에서 수행되고, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 하나 이상의 고정된 프라이머를 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하여 제2 고정된 주형 가닥을 생성하고; 상기 가닥 재합성 연장 반응은 55℃ 미만의 온도에서 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 비-열안정성 폴리머라제는 55℃ 미만, 바람직하게는 50℃ 미만, 45℃ 미만, 40℃ 미만, 39℃ 미만, 38℃ 이하, 약 38℃ 또는 약 37℃; 특히 바람직하게는 약 38℃의 최적 인큐베이션 온도 및/또는 최적 활성 온도를 갖는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 연장 반응은 55℃ 미만, 바람직하게는 50℃ 미만, 바람직하게는 40℃ 미만, 바람직하게는 38℃ +/- 2℃, 바람직하게는 38℃ +/- 1℃, 바람직하게는 38℃의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비-열안정성 폴리머라제는 Bsu, phi29, Klenow, 및 DNA 폴리머라제 I(이. 콜라이(E. coli)), 바람직하게는 Bsu 또는 이의 기능적 단편인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 연장과 변성의 다중 사이클을 통해 반복되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15회 이상의 사이클; 바람직하게는 2 내지 5회 사이클, 2 내지 4회 사이클, 3 내지 5회 사이클, 3회 사이클 또는 4회 사이클; 가장 바람직하게는 3회 사이클을 포함하는, 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 각각의 사이클은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 또는 30분 동안 지속될 수 있는, 방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 연장과 변성의 사이클을 포함하는, 방법: 3x5분; 3x30분; 12x2분; 6x4분; 2x12분 또는 3x5분; 바람직하게는 12x2분.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 변성은 실질적으로 상기 연장 반응의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 10

제5항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 변성은 아세트산, HCl, 또는 질산과 같은 산성 핵산 변성제; NaOH와 같은 염기성 핵산 변성제; 또는 DMSO, 포름아미드, 베타인, 구아니딘, 소듐 살리실레이트, 프로필렌 글리콜 또는 우레아와 같은 다른 핵산 변성제; 바람직하게는 포름아미드 및 NaOH, 특히 바람직하게는 포름아미드를 사

용하여 수행되는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 상기 서열분석 판독 단계보다 낮은 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 주형 가닥은 클러스터인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 클러스터는 브리지 증폭에 의해 초기에 생성된 것인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 초기 클러스터 생성 및 상기 가닥 재합성 연장 반응 동안 동일한 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제가 사용되는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 주형 가닥은 상기 가닥 재합성 연장 반응에 사용된 상기 폴리머라제와 동일한 폴리머라제를 사용하는 증폭 반응에 의해 생성되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 프라이머 중 적어도 하나는 3' 말단에서 차단되고, 블록은 상기 가닥 재합성 연장 반응 전에 제거되는, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 블록은 인산기이며 상기 블록을 제거하기 위해 포스파타제로 처리되는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 가닥 재합성 연장 반응 전에 제한 효소로 처리하여 상기 고정된 프라이머를 단축시키고 연장을 위해 유리 3' 하이드록실을 방출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 고정된 프라이머는 상기 가닥 재합성 연장 반응 전에 연장되는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 고정된 프라이머는 5'-오버행을 갖는 비-고정된 상보적 서열의 혼성화에 의해 연장되고, 상기 고정된 프라이머는 상기 오버행을 복사하도록 연장되는, 방법.

청구항 21

표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 위한 방법으로서, 상기 제1 및 제2 영역은 동일한 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드에 있고, 상기 페어와이즈 서열분석은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 개시된 바와 같은 단계를 포함하는, 방법.

청구항 22

클러스터링된 어레이 상의 이중-가닥 주형의 각각으로부터 서열분석 정보의 2개의 연결된 또는 쌍을 이룬 판독을 획득하기 위한 제21항의 방법의 용도.

청구항 23

서열분석 반응의 데이터 품질을 개선하는 방법으로서, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 청구된 바와 같은 연장 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고처리율 핵산 서열분석 방법의 개선, 특히 페어와이즈(pairwise) 서열분석 동안 연장 반응을 수행하는 방법에 대한 개선에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 핵산 서열분석 방법은 다년간 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법 중 일부는 형광 표지된 핵산 유사체의 연속적인 혼입 사이클에 기초한다. 이러한 "합성에 의한 서열분석" 또는 "사이클 서열분석" 방법에서, 첨가된 염기의 동일성은 각각의 뉴클레오타이드 첨가 후에 형광 표지를 검출함으로써 결정된다.

[0003] 특히, US 5,302,509호는 주형 가닥에 상보적인 표지된 폴리뉴클레오타이드를 연속적으로 통합하기 위해 DNA 폴리머라제 또는 DNA 리가아제를 사용하여 다중 연장 반응을 수행하는 것을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 주형을 서열분석하는 방법을 기술한다. 이러한 "합성에 의한 서열분석" 반응에서, 주형 가닥에 기초한 쌍을 이루는 새로운 폴리뉴클레오타이드 가닥은 주형 가닥에 상보적인 개별 뉴클레오타이드의 연속적인 혼입에 의해 5'에서 3' 방향으로 구축된다. 서열분석 반응에 사용되는 기질 뉴클레오타이드 삼인산은 3' 위치에서 상이한 3' 표지로 표지되어, 연속적인 뉴클레오타이드가 추가됨에 따라 혼입된 뉴클레오타이드의 정체를 결정할 수 있다.

[0004] 정확한 서열분석을 수행하기 위해, 뉴클레오타이드가 제어된 방식으로 한 번에 하나씩 혼입되는 것을 보장하기 위해 가역적 사슬-종결 구조 변형 또는 "차단기(blocking group)"가 기질 뉴클레오타이드에 첨가될 수 있다. 각각의 단일 뉴클레오타이드가 혼입됨에 따라, 차단기는 폴리뉴클레오타이드 사슬 내로의 더 이상의 뉴클레오타이드의 혼입을 방지한다. 마지막으로 혼입된 표지된 뉴클레오타이드의 정체가 결정되면, 표지 모이어티와 차단기가 제거되어, 다음의 차단되고 표지된 뉴클레오타이드가 후속 라운드의 서열분석에 혼입될 수 있다.

[0005] "페어드-엔드(paired-end)" 또는 "페어와이즈" 서열분석 기술(이러한 용어는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용됨)은 대체적으로 분자 생물학 분야에, 특히 전체-게놈 샷건(shotgun) 서열분석의 맥락에서 공지되어 있다. 페어드-엔드 서열분석은 단일 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스 상의 두 위치로부터 2개의 "관독" 서열을 결정할 수 있게 한다. 페어드-엔드 접근법의 장점은 무작위 방식으로 2개의 독립적인 주형 각각으로부터 "n" 염기를 서열분석하는 것보다 단일 주형에서 "n" 염기 각각의 2개의 스트레치를 서열분석하여 얻을 수 있는 정보가 현저히 더 많다는 것이다. 서열 정보의 조립을 위한 적절한 소프트웨어 도구를 사용하면, "페어드 엔드" 서열이 완전히 무작위가 아니라 단일 듀플렉스에서 발생하는 것으로 알려져 있으므로, 게놈에서 결합되거나 짝을 이룬다는 지식을 활용하는 것이 가능하다. 이 정보는 전체 게놈 서열을 공통 서열로 조립하는 데 크게 도움이 되는 것으로 나타났다.

[0006] 페어드-엔드 서열분석은 전형적으로 특수 원형 샷건 클로닝 벡터를 사용하여 수행되었다. 특정 단일 부위에서 벡터를 절단한 후, 서열분석될 주형 DNA(전형적으로 게놈 DNA)가 벡터 내로 삽입되고 말단은 재밀봉되어 새로운 작제물을 형성한다. 삽입 DNA에 플랭킹하는(flaning) 벡터 서열은 반대 가닥 상의 삽입 DNA의 서열분석을 허용하는 서열분석 프라이머에 대한 결합 부위를 포함한다. 그러나, 주형 단편의 양 말단에서 서열분석 프라이머에 대한 필요성은 어레이-기반 서열분석 기술의 사용을 매우 어렵게 만든다. 일반적으로 단일 가닥 주형에 의존하는 어레이-기반 기술을 사용하면, 상보적 가닥이 표면에 부착되지 않기 때문에, 대체적으로 뉴클레오타이드 주형의 한쪽 말단으로부터만 서열분석이 가능하다.

[0007] 핵산 서열분석 반응의 처리량을 최대화하기 위해, 다수의 주형 분자를 병렬로 서열분석할 수 있는 것이 유리하다. 핵산 어레이 기술을 사용하여 다수의 주형의 병렬 처리가 달성될 수 있다. 이러한 어레이는 전형적으로 고체 지지체 물질 상에 고정된 폴리뉴클레오타이드의 고밀도 매트릭스로 이루어지며, 대체적으로 단일 가닥 주형에 의존한다.

[0008] 고체 지지체 상에서 수행될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 주형의 이중-말단 서열분석을 위한 다양한 방법이 보고되어 있다. 예를 들어, 복수의 동일한 고정된 폴리뉴클레오타이드 가닥 및 복수의 동일한 고정된 상보적 가닥으로부터 형성된 클러스터 또는 "콜로니"로 구성된 어레이를 형성하기 위해 증폭 산물이 고체 지지체 상에 고정되도록 하는 핵산 증폭 방법이 공지되어 있다. 이러한 방법에 따라 제조된 클러스터링된 어레이 상의 DNA 콜로니에

존재하는 핵산 분자는 서열분석 반응을 위한 주형을 제공할 수 있다.

[0009] WO 2008/041002호에는, (a) 5' 말단에서 고체 지지체에 결합된 상보성 제1 및 제2 주형 가닥으로부터 각각 형성된 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드가 그 위에 고정된 고체 지지체, 및 제1 주형 가닥의 3' 말단에 혼성화할 수 있는 하나 이상의 5'-말단 고정된 프라이머의 다중 카피를 제공하는 단계; (b) 제1 주형 가닥이 5'-말단 고정된 프라이머에 혼성화되도록 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드를 처리하는 단계; (c) 제1 서열분석 판독을 수행하여 주형 폴리뉴클레오티드의 제1 영역의 서열을 결정하는 단계; (d) 고정된 프라이머 중 하나 이상을 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하여 제2 고정된 주형 가닥을 생성하도록 연장 반응을 수행하는 단계; (e) 복수의 제1 및 제2 고정된 주형 가닥을 처리하여 고체 지지체로부터 제1 주형 가닥을 제거하는 단계; 및 (f) 제2 서열분석 판독을 수행하여 주형 폴리뉴클레오티드의 제2 영역의 서열을 결정하는 단계를 포함하는 페어와이즈 서열분석 방법이 기재되어 있으며, 여기서 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 서열을 결정하는 단계는 상기 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 상기 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 달성한다.

[0010] 실행 속도를 증가시키고/시키거나, 효율을 개선하고/하거나, 정확도를 증가시키고/시키거나 공정을 단순화하는 것을 포함하여, 서열분석 플랫폼을 개선할 필요가 계속 남아 있다.

발명의 내용

[0011] 본 발명의 일 태양에 따르면, 페어와이즈 서열분석 동안 가닥 재합성 연장 반응을 수행하는 방법이 제공되며, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 제1 서열분석 판독과 제2 서열분석 판독 사이에서 수행되고, 상기 가닥 재합성 연장 반응은 하나 이상의 고정된 프라이머를 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하여 제2 고정된 주형 가닥을 생성하고; 가닥 재합성 연장 반응은 55℃ 미만의 온도에서 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 일 태양에 따르면, 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석 동안 연장 반응을 수행하는 방법이 제공되며, 상기 제1 및 제2 영역은 동일한 표적 폴리뉴클레오티드에 있고, 상기 페어와이즈 서열분석은 다음 단계들:

[0013] (a) 제1 주형 가닥과 이의 상보체 또는 제2 주형 가닥과 이의 상보체로부터 각각 형성된 복수의 제1 및 제2 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드가 그 위에 고정된 고체 지지체를 제공하는 단계 - 여기서, 제1 및 제2 주형 가닥은 5' 말단에서 고체 지지체에 결합되고, 고체 지지체에 결합된 제1 또는 제2 주형 가닥은 5' 고정된 연장 프라이머를 추가로 포함함 -;

[0014] (b) 제1 및 제2 주형 가닥 상보체를 선택적으로 제거하고 제2 주형 가닥을 선택적으로 제거하여 제1 주형 가닥에 대한 제1 서열분석 프라이머의 혼성화를 가능하게 하는 단계;

[0015] (c) 합성에 의한 서열분석 기술에 의해 또는 라이게이션에 의한 서열분석 기술에 의해 제1 서열분석 판독을 수행하여 주형 폴리뉴클레오티드의 제1 영역의 서열을 결정하는 단계;

[0016] (d) 고정된 프라이머 중 하나 이상을 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하여 제2 고정된 주형 가닥을 생성하도록 연장 반응을 수행하는 단계;

[0017] (e) 제1 주형 가닥을 선택적으로 제거하여 단계 (d)에서 생성된 제2 주형 가닥에 대한 제2 서열분석 프라이머의 혼성화를 가능하게 하는 단계;

[0018] (f) 합성에 의한 서열분석 기술에 의해 또는 라이게이션에 의한 서열분석 기술에 의해 제2 서열분석 판독을 수행하여 주형 폴리뉴클레오티드의 제2 영역의 서열을 결정하는 단계 - 여기서, 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 서열을 결정하는 단계는 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 상기 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 달성함 - 를 포함하며;

[0019] 단계 (d) 연장 반응은 55℃ 미만의 온도에서 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 수행된다.

[0020] 놀랍게도 제1 서열 판독 후에 수행되는 연장 반응은 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 더 낮은 온도에서 수행될 수 있지만 여전히 높은 수준의 가닥 재합성을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하는 것은 또한 다음을 포함하는 추가의 이점을 초래할 수 있다: 더 빠른 재생 시간; 공정 단계의 감소를 포함하는 단순화된 프로토콜; 사용된 상이한 시약의 수 및/또는 사용된 시약의 양의 감소; 화학적 복잡성의 감소; 및/또는 방법을 수행하기 위해 사용되는 카트리지의 복잡성 감소.

[0021] 추가의 태양에 따르면, 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 위한 방법이 제공되

며, 상기 제1 및 제2 영역은 동일한 표적 폴리뉴클레오티드에 있고, 상기 페어와이즈 서열분석은 본 명세서에 기재된 바와 같은 연장 반응을 포함한다.

[0022] 추가의 태양에 따르면, 본 명세서에 기재된 바와 같은 연장 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 서열분석 반응의 데이터 품질을 개선하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1 내지 도 4는 본 발명에 따른 예시적인 연장 반응 워크플로우를 도시한다.

도 5는 본 발명에 따른 프로토콜의 재생 효율을 도시한다.

도 6a 및 도 6b는 본 발명에 따른 프로토콜에 대한 최적화 분석을 도시한다.

도 7은 페어드-엔드 재합성에 대한 브리지 증폭(bridge amplification)의 개략도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 하기 특징들이 본 발명의 모든 태양에 적용된다.

[0025] 서열분석은 대체적으로 4가지 핵심 단계를 포함한다: 1) 서열분석에 이용가능한 복수의 주형 폴리뉴클레오티드를 형성하기 위한 라이브러리 제조; 2) 증폭된 단일 주형 폴리뉴클레오티드의 어레이를 고체 지지체 상에 형성하기 위한 클러스터 생성; 3) 클러스터 어레이의 서열분석; 및 4) 표적 서열을 결정하기 위한 데이터 분석.

[0026] 본 발명은 페어와이즈 서열분석 공정 동안 제1 서열분석 단계와 제2 서열분석 단계 사이에서 수행되는 재생 단계(본 명세서에서 가닥 재합성 연장 반응 또는 클러스터 재생으로도 지칭됨)에 관한 것이다. 본 발명은 상기 연장 반응 동안의 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제의 용도에 관한 것이다.

[0027] 페어와이즈 서열분석의 전형적인 단계는 공지되어 있고 WO 2008/041002호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 그러나, 주요 단계가 간략하게 기술될 것이다. 본 발명에 적용 가능한 방법론은 WO 08/041002호, WO 07/052006호, WO 98/44151호, WO 00/18957호, WO 02/06456호, WO 07/107710호, WO05/068656호, US 13/661,524호 및 US 2012/0316086호에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 추가 정보는 US 20060024681호, US 200602926U호, WO 06110855호, WO 06135342호, WO 03074734호, WO07010252호, WO 07091077호, WO 00179553호 및 WO 98/44152호에서 찾을 수 있으며, 이들의 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0028] 서열분석에 적합한 주형은 핵산 콜로니를 생성하기 위해 고상 핵산 증폭에 의해 제조될 수 있다. 증폭될 (그리고 이어서 서열분석될) 주형은 대체적으로, 예를 들어, W007052006호(이의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 방법에 따라 제조된, 범용 프라이머를 포함하는 공지된 말단에 의해 플랭킹된 미지의 영역을 포함할 것이다. 예를 들어, 주형은 게놈 DNA의 샘플로부터, 또는 cDNA 라이브러리로부터 유래될 수 있다. 증폭은 WO 98/44151호, WO 00/18957호, WO0206456호 또는 WO07107710호에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 수행될 수 있으며, 상기 공개들의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 주형 핵산이 고상 핵산 증폭에 의해 형성되는 경우, 이러한 비-표적 서열은 증폭 반응에 사용된 프라이머로부터 유래될 수 있다. 대안적으로, 비-표적 서열은 단편화된 표적 서열에 라이게이션되어 이를 핵산 분자에 혼입시킬 수 있다.

[0029] 예를 들어, 범용 프라이머로 증폭될 적합한 핵산은 증폭될 표적 폴리뉴클레오티드의 5' 및 3' 말단에 대한 공지된 어댑터 서열의 첨가에 의해 증폭될 (그리고 서열분석될) 표적 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 변형함으로써 제조될 수 있다.

[0030] 어댑터는 전형적으로 통상적인 수단에 의해 합성될 수 있는 짧은 올리고뉴클레오티드이다. 어댑터는 다양한 수단(예를 들어, 서브클로닝, 라이게이션 등)에 의해 표적 핵산 단편의 5' 및 3' 말단에 부착될 수 있다. 더 구체적으로, 2개의 상이한 어댑터 서열이 증폭될 표적 핵산 분자에 부착되어, 하나의 어댑터는 표적 핵산 분자의 하나의 말단(즉, 5' 또는 3' 말단)에 부착되고 다른 어댑터는 표적 핵산 분자의 다른 말단(즉, 각각 3' 또는 5' 말단)에 부착된다. 어댑터에 의해 플랭킹된 표적 핵산 서열을 포함하는 생성된 작제물은 본 명세서에서 "기질 핵산 작제물" 또는 "주형 폴리뉴클레오티드" 또는 "주형 작제물"로 지칭될 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 유리하게는 어댑터 서열에 의한 변형 전에 크기-분할될 수 있다.

[0031] 어댑터 서열은 고체 지지체 상에 고정된 정방향 및 역방향 프라이머(예를 들어, S1 및 S2)를 사용하여 클러스터를 형성하기 위해 고체 지지체 상에 이러한 분자의 증폭을 허용하는 서열을 포함한다(이들의 일반적인 구조는

아래에 더 상세히 기재됨). 어댑터 내의 이들 서열은 본 명세서에서 "프라이머 결합 서열"로 지칭될 수 있다. 핵산 증폭을 위한 주형으로서 작용하기 위해, 주형 작제물의 단일 가닥은, 정방향 프라이머 분자가 결합하고 주형을 복사하여 상보적 가닥의 합성을 프라이밍할 수 있도록 정방향 증폭 프라이머(예를 들어, S1)에 상보적인 서열, 및 역방향 프라이머 분자가 다시 결합하고 제2 상보적 가닥의 합성을 프라이밍할 수 있도록 역방향 증폭 프라이머(예를 들어, S2)에 상보적인 서열을 함유하여야 한다. 고정된 프라이머 분자에 대한 혼성화를 허용하는 어댑터 내의 서열은 전형적으로 길이가 약 20 내지 40개의 뉴클레오타이드일 것이지만, 본 발명은 이 길이의 서열로 제한되지 않는다.

[0032] 증폭 프라이머에서의 서열 S1 및 S2의 정확한 동일성, 및 따라서 어댑터에서의 동족 서열은, 프라이머 분자가 PCR 증폭을 지시하도록 어댑터 서열과 상호작용할 수 있는 한, 대체적으로 본 발명에 중요하지 않다. PCR 프라이머의 설계에 대한 기준은 대체적으로 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0033] 주형 폴리뉴클레오타이드는 또한 태그 또는 인덱스 서열을 추가로 함유하도록 제조될 수 있다. 예를 들어, 그 내용이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 W005068656호에 기재된 바와 같은 태그 서열을 사용하면 각각의 샘플의 동일성을 보존하면서 다수의 상이한 샘플을 동일한 서열분석 실행에서 분석할 수 있다. 태그는 제1 판독의 종료 및/또는 제2 판독의 시작(또는 종료) 시에 판독될 수 있다. 본 발명은 클러스터당 2개의 판독으로 제한되지 않으며, 제1 연장된 서열분석 프라이머를 탈혼성화하고, 가닥 재합성 연장 반응 전 또는 후에 제2 프라이머를 재혼성화함으로써 클러스터당 3개 이상의 판독을 간단히 얻을 수 있다. 인덱싱을 위해 적합한 샘플을 제조하는 방법은, 예를 들어 US60/899221호에 기재되어 있다.

[0034] 일 예에서, 주형 폴리뉴클레오타이드는 5'에서 3' 방향으로, 제1 프라이머-결합 서열(예를 들어, P5), 인덱스 서열(예를 들어, i5), 제1 서열분석 결합 부위(예를 들어, SBS3), 삽입체, 제2 서열분석 결합 부위(예를 들어, SBS12'), 제2 인덱스 서열(예를 들어, i7') 및 제2 프라이머-결합 서열(예를 들어, P7')을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 주형은 3'에서 5' 방향으로, 제1 프라이머-결합 부위(예를 들어, P5에 상보적인 P5'), 인덱스 서열(예를 들어, I5에 상보적인 i5'), 제1 서열분석 결합 부위(예를 들어, SBS3에 상보적인 SBS3'), 삽입체, 제2 서열분석 결합 부위(예를 들어, SBS12에 상보적인 SBS12), 제2 인덱스 서열(예를 들어, I7에 상보적인 i7) 및 제2 프라이머-결합 서열(예를 들어, P7'에 상보적인 P7)을 포함한다. 어느 하나의 주형은 본 명세서에서 "주형 가닥" 또는 "주형 폴리뉴클레오타이드"로 지칭된다. 프라이머-결합 서열, 인덱스 서열 및 서열분석 결합 부위의 조합은 본 명세서에서 어댑터 서열로 지칭될 수 있고, 단일 삽입물은 5' 어댑터 서열 및 3' 어댑터 서열에 의해 플랭킹된다.

[0035] P5 프라이머-결합 서열의 서열은 서열 번호 1 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고, P5' 어댑터의 서열은 서열 번호 3 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고, P7 어댑터의 서열은 서열 번호 2 또는 이의 변이체를 포함할 수 있고, P7' 어댑터의 서열은 서열 번호 4 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 실시 형태에서, 변이체는 서열 번호 1, 2, 3 또는 4에 대해 적어도 80% 서열 동일성을 갖는다. 더 바람직하게는, 변이체는 서열 번호 1, 2, 3 또는 4에 대해 적어도 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 99% 전체 서열 동일성을 갖는다.

[0036] 서열 번호 1: P5 서열

[0037] AATGATACGGCGACCGAGATCTACAC

[0038] 서열 번호 2: P7 서열

[0039] CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT

[0040] 서열번호 3: P5' 서열(P5에 상보적임)

[0041] GTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCATT

[0042] 서열 번호 4: P7' 서열(P7에 상보적임)

[0043] ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

[0044] 라이브러리 제조 후의 다음 핵심 단계는, 증폭된 단일 주형 폴리뉴클레오타이드의 어레이를 고체 지지체 상에 형성하기 위한 클러스터 생성이다. 상기 설명된 바와 같이, 주형 폴리뉴클레오타이드의 증폭이 진행되도록 하기 위해, 적어도 2개의 증폭 프라이머의 혼합물이 적합한 고체 지지체의 표면 상에 고정되거나 "그래프팅된다".

[0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "고체 지지체"는 수성 액체에 불용성인 강성 기재(substrate)(또는 적어

도 기재가 액체를 흡수할 때 실질적으로 팽창하지 않고 액체가 건조에 의해 제거될 때 실질적으로 수축하지 않을 만큼 충분히 강성인 기재)를 지칭한다. 본 발명은, 예를 들어 생체 분자, 예컨대 폴리뉴클레오티드에 대한 공유 부착을 허용하는 반응성 기를 포함하는 중간 재료의 층 또는 코팅의 적용에 의해, "기능화된" 기재 또는 매트릭스(예를 들어, 유리 슬라이드, 중합체 비드 등)로 구성되는 고체 지지체를 사용할 수 있다. 고체 지지체는 평면 기재일 수 있다. 고체 지지체는 층상 기재일 수 있다. 고체 지지체는 비드일 수 있다. 본 발명의 구조화된 기재 또는 방법에 사용될 수 있는 물질의 추가의 예가 미국 특허 출원 제13/661,524호 및 미국 특허 출원 공개 제2012/0316086 A1호에 기재되어 있으며, 이들의 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0046] 고상 증폭에 의한 콜로니 생성의 제1 단계로서, 정방향 및 역방향 증폭 프라이머의 혼합물이 적합한 고체 지지체의 표면 상에 고정되거나 "그래프팅될" 수 있다.

[0047] 고체 지지체에 대한 분자(예를 들어, 핵산)의 고정 또는 부착을 언급할 때, 용어 "고정된" 및 "부착된"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 이들 용어는 모두 명시적으로 또는 문맥에 의해 달리 지시되지 않는 한 직접 또는 간접, 공유 또는 비공유 부착을 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 소정의 실시 형태에서, 공유 부착이 바람직할 수 있지만, 대체적으로 요구되는 바는, 분자(예를 들어, 핵산)가, 예를 들어 핵산 증폭 및/또는 서열분석을 필요로 하는 응용에서 지지체를 사용하도록 의도된 조건 하에서 지지체에 고정되거나 부착된 상태로 남아 있는 것이다. 다른 핵산에 대한 핵산의 부착을 언급할 때, 용어 "고정된" 및 "혼성화된"이 본 명세서에서 사용되며, 대체적으로 상보적 핵산 사이의 수소 결합을 지칭한다.

[0048] 일 예에서, 그래프팅 단계는 대체적으로 5' 말단에서 또는 그 근처에서 지지체에 대한 프라이머의 공유 부착을 수반하여, 프라이머 연장을 위해 3' 말단을 자유롭게 남겨둘 것이다.

[0049] 증폭 프라이머는 전형적으로 하기 구조를 갖는 올리고뉴클레오티드 분자이다:

[0050] 정방향 프라이머: A-L-S1

[0051] 역방향 프라이머: A-L-S2

[0052] 여기서, A는 고체 지지체에 대한 부착을 가능하게 하는 선택적 모이어티를 나타내고, L은 선택적 링커 모이어티를 나타내고, S1 및 S2는 (완전히 또는 부분적으로) 서열분석하고자 하는 표적 영역을 포함하는 기질 핵산 분자의 증폭을 허용하는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 증폭 프라이머에서 서열 S1 및 S2는 증폭하고자 하는 특정 표적 핵산에 특이적일 수 있지만, 다른 실시 형태에서, 서열 S1 및 S2는 범용 프라이머를 사용한 증폭을 가능하게 하도록 (예를 들어, 전술된 바와 같은 어댑터를 사용하여) 변형된 공지되거나 공지되지 않은 서열의 임의의 표적 핵산의 증폭을 가능하게 하는 "범용" 프라이머 서열일 수 있다.

[0053] 고체 지지체 상에 그래프팅된 프라이머의 혼합물은 대체적으로 실질적으로 동일한 양의 정방향 및 역방향 프라이머를 포함할 것이다.

[0054] 그룹 A는 고체 지지체에 대한 부착(바람직하게는 공유 부착)을 가능하게 하는 임의의 모이어티(비-뉴클레오티드 화학적 변형을 포함)일 수 있다. 그룹 A는 폴리뉴클레오티드 가닥의 5' 말단에 존재하는, 포스포로티오에이트와 같은, 황-함유 친핵체를 포함할 수 있다. 대안적으로, 그룹 A는 링커 또는 핵산을 고체 지지체에 직접 부착하기에 적합한 화학이 사용되는 경우 생략될 수 있다.

[0055] L은, 포함될 수 있지만 반드시 필요한 것은 아닌 링커 또는 스페이서를 나타낸다. 링커는 증폭 반응의 결과로서 생성된 고정된 폴리뉴클레오티드 분자에 존재하는 절단 부위가 고체 지지체로부터 최적의 거리에 위치하도록 보장하기 위해 포함될 수 있거나, 링커는 그 자체가 절단 부위를 함유할 수 있다.

[0056] 링커는 화학식 $(CH_2)_n$ 을 갖는 탄소-함유 사슬일 수 있으며, 상기 식에서 "n"은 1 내지 약 1500, 예를 들어 약 1000 미만, 바람직하게는 100 미만, 예를 들어 2 내지 50, 특히 5 내지 25이다. 그러나, 폴리뉴클레오티드가 후속적으로 사용되도록 의도된 조건, 예를 들어 DNA 증폭 및 서열분석에 사용되는 조건 하에서 링커가 안정하다는 그의 구조에 대한 유일한 제한을 두고 다양한 다른 링커가 사용될 수 있다.

[0057] 탄소 원자만으로 이루어지지 않은 링커가 또한 사용될 수 있다. 이러한 링커는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함할 수 있다.

[0058] 주로 탄소 원자의 사슬 및 PEG로부터 형성된 링커는 사슬에 개재된 작용기를 함유하도록 변형될 수 있다. 이러한 기의 예는 케톤, 에스테르, 아민, 아마이드, 에테르, 티오에테르, 설폭사이드, 설포를 포함한다. 이러한 작용기의 존재와 별도로 또는 조합하여 알켄, 알킨, 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티, 또는 환형 지방족 모이어

티(예를 들어, 사이클로헥실)가 사용될 수 있다. 예를 들어, 사이클로헥실 또는 페닐 고리는 1-위치 및 4-위치를 통해 PEG 또는 $(CH_2)_n$ 사슬에 연결될 수 있다.

[0059] 불포화 탄소 원자 또는 헤테로 원자가 선택적으로 개재된, 포화 탄소 원자의 선형 사슬에 주로 기초하는 전술된 링커에 대한 대안으로서, 핵산 또는 당당류 단위(예를 들어, 텍스트로스에 기초하는 다른 링커가 고려될 수 있다. 링커로서 펩티드를 이용하는 것도 본 발명의 범주 내에 있다.

[0060] 추가의 실시 형태에서, 링커는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이러한 뉴클레오타이드는 또한 본 명세서에서 "스페이스" 뉴클레오타이드로도 지칭될 수 있다. 전형적으로, 1 내지 20, 더 바람직하게는 1 내지 15 또는 1 내지 10, 더욱 특히 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 스페이스 뉴클레오타이드가 포함될 수 있다. 가장 바람직하게는, 프라이머는 10개의 스페이스 뉴클레오타이드를 포함할 것이다. 다른 뉴클레오타이드 및 이들의 조합이 사용될 수 있지만, 폴리T 스페이스를 사용하는 것이 바람직하다. 하나의 바람직한 실시 형태에서 프라이머는 10T 스페이스 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0061] 프라이머 그래프팅 반응을 진행하기 위해, 증폭 프라이머의 혼합물은 모이어티 A(존재하는 경우)와 지지체 사이, 또는 핵산과 지지체 사이의 반응을 허용하는 조건 하에서 고체 지지체에 적용된다. 고체 지지체는 모이어티 A를 통한 공유 부착을 허용하기에 적합하게 기능화될 수 있다. 그래프팅 반응의 결과는 고체 지지체의 적어도 일부에 걸친 프라이머의 실질적으로 균일한 분포이다. 고체 지지체가 나노웰을 포함하는 경우, 바람직한 실시 형태에서 프라이머는 나노웰의 위치로 제한되고, 고체 지지체의 틈새 영역에는 존재하지 않는다.

[0062] 증폭 프라이머의 부착 후, 고체 지지체는 주형과 고정된 프라이머 사이의 혼성화를 허용하는 조건 하에서 증폭될 주형 폴리뉴클레오타이드와 접촉된다. 상기에 주어진 예에서, 주형 폴리뉴클레오타이드의 P5' 및 P7' 프라이머-결합 서열은 고체 지지체의 표면 상에 존재하는 고정된 프라이머(각각 P5 및 P7)에 상보적이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "'"는 상보적 가닥을 나타낸다.

[0063] 통상적으로 주형은 숙련된 독자에게 명백할 적합한 혼성화 조건 하에서 자유 용액에 첨가된다. 전형적으로, 혼성화 조건은, 예를 들어, 40°C에서 5xSSC이다. 그 다음, 고상 증폭은 주형에 혼성화된 고정된 프라이머의 3' 말단에 뉴클레오타이드가 추가되어 완전히 연장된 고정된 상보적 가닥(또는 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스)을 생성하는 프라이머 연장 단계인 증폭의 제1 단계를 (예를 들어 WO 98/44151호의 것과 유사한 방법에 의해) 진행한다. 따라서, 이러한 상보적 가닥은 고체 지지체 상에 고정된 제2 프라이머 분자에 결합하거나 "브리지"할 수 있는 서열을 그의 3' 말단에 포함하여, 주형으로서 상보적 가닥을 사용하여 제2 고정된 프라이머의 연장에서 시작하는 새로운 증폭 라운드를 초래할 것이다.

[0064] 그 다음, 후속 증폭 반응은 실질적으로 WO 98/44151호 또는 WO 00/18957호에 기재된 바와 같이 진행될 수 있으며, "브리지된" 증폭 산물의 콜로니로 구성된 클러스터링된 어레이의 생성을 초래할 것이다. 여기서, 증폭 산물의 두 가닥은 5' 말단에서 또는 그 근처에서 고체 지지체 상에 고정될 것이고, 이 부착은 증폭 프라이머의 원래 부착으로부터 유래된다. 전형적으로, 각 콜로니 내의 증폭 산물은 단일 주형(표적) 분자의 증폭으로부터 유래될 것이다. 대안적으로, 클러스터를 생성할 때, 다른 증폭 절차가 사용될 수 있으며, 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들어, 증폭은 가닥 치환 폴리머라제를 사용하는 등온 증폭일 수 있거나; WO 2013/188582호에 기재된 바와 같은 배제 증폭일 수 있다.

[0065] 브리지된 증폭 산물의 후속 절단을 가능하게 하는데 필요한 변형이 증폭 프라이머 중 하나 또는 둘 모두에 유리하게 포함될 수 있다. 이러한 변형은 증폭 반응의 효율성에 중대한 정도로 영향을 미치지 않는 한 증폭 프라이머의 어디에나 배치될 수 있다. 따라서, 절단을 가능하게 하는 변형은 링커 영역 L의 일부 또는 서열 S1 또는 S2 중 하나 또는 둘 모두를 형성할 수 있다. 예로서, 증폭 프라이머는 특히 다이올 결합, 우라실 뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 메틸화된 뉴클레오타이드, 펩티드 링커, PCR 스톱퍼 또는 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열을 포함하도록 변형될 수 있다. 고상 증폭에 의해 제조된 모든 핵산 분자는 궁극적으로 증폭 프라이머로부터 유래된 서열을 포함할 것이기 때문에, 프라이머에서의 임의의 변형은 증폭된 산물로 이월될 것이다.

[0066] 이러한 맥락에서, 용어 "고상 증폭"은 정방향 및/또는 역방향 증폭 프라이머가 5' 말단에서 또는 그 근처에서 고체 지지체에 고정(예를 들어, 공유 부착)된다는 점을 제외하고는 표준 PCR과 유사한 증폭 반응을 지칭한다. 따라서, PCR 반응의 산물은 5' 말단에서 또는 그 근처에서 고체 지지체 상에 고정된 증폭 프라이머의 연장에 의해 유도된 연장된 가닥이다. 고상 증폭은 그 자체가, 예를 들어 WO 98/44151호 및 WO 00/18957호에 기재된 것과 유사한 절차를 사용하여 수행될 수 있다.

- [0067] 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스는 전형적으로 포스포다이에스테르 결합에 의해 연결된 데옥시리보뉴클레오타이드로 구성된 2개의 상보적인 폴리뉴클레오타이드 가닥으로부터 형성될 것이지만, 하나 이상의 리보뉴클레오타이드 및/또는 비-뉴클레오타이드 화학적 모이어티 및/또는 비-천연 발생 뉴클레오타이드 및/또는 비-천연 발생 백본 결합을 추가로 포함할 수 있다. 특히, 이중-가닥 핵산은 하나 또는 둘 모두의 가닥의 5' 말단에 비-뉴클레오타이드 화학적 모이어티, 예를 들어 링커 또는 스페이서를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 이중-가닥 핵산은 메틸화된 뉴클레오타이드, 우라실 염기, 포스포로티오에이트 기, 리보뉴클레오타이드, 다이올 결합, 다이설파이드 결합, 펩티드 등을 포함할 수 있다. 이러한 비-DNA 또는 비-천연 변형은, 절단을 허용하기 위해, 또는 일부 다른 바람직한 특성을 부여하기 위해, 예를 들어 고체 지지체에 대한 공유 부착을 가능하게 하기 위해, 또는 절단 부위를 고체 지지체로부터 최적의 거리로 위치시키는 스페이서로서 작용하기 위해 포함될 수 있다.
- [0068] 폴리뉴클레오타이드 가닥이 상보적 가닥에 부분적으로만 혼성화되는 경우 - 예를 들어, 짧은 뉴클레오타이드 프라이머에 혼성화된 긴 폴리뉴클레오타이드 가닥 -, 본 명세서에서 여전히 단일 가닥 핵산으로 지칭될 수 있다.
- [0069] 다음 핵심 단계는 클러스터 어레이를 서열분석하는 것이다.
- [0070] 서열분석을 용이하게 하기 위해, 가닥 중 하나가 표면으로부터 제거되어 나머지 고정된 가닥에 대한 서열분석 프라이머의 효율적인 혼성화를 가능하게 하는 것이 바람직하다 - 예를 들어 제2 가닥이 제거되어 제1 가닥이 남거나 그 반대도 마찬가지이다. 선형화에 적합한 방법은 후술되며, W007010251호에 더 상세히 기재되어 있고, 이의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0071] 변성 (및 절단된 가닥의 후속적인 재-어닐링)은 부분적으로 또는 실질적으로 단일-가닥인 서열분석 주형의 생성을 초래한다. 그 다음 주형의 단일-가닥 부분에 대한 서열분석 프라이머의 혼성화에 의해 서열분석 반응이 개시될 수 있다. 본 발명의 실시 형태에서, 서열분석은 후술되는 바와 같은 가닥-치환 폴리머라제 효소를 사용하여 수행될 수 있다.
- [0072] 방법은 2개의 서열분석 반응이 수행되는 것을 필요로 할 수 있다. 제1 서열분석 반응은 용액으로부터 첨가되는 제1 서열분석 프라이머에 의해 개시되고 제1 주형 가닥의 서열분석을 유도하거나, 고정된 듀플렉스 내에서 유리되는 고정된 프라이머의 3'-하이드록실 기에 의해 개시될 수 있다. 제2 서열분석 반응은 용액 중에 적용되거나 고정될 수 있는 제2 서열분석 프라이머에 의해 개시된다. (제1) 주형 가닥에 대한 용액 내 서열분석 프라이머의 혼성화는 주형에 대한 프라이머의 어닐링을 촉진하는 조건 하에서 프라이머와 주형 가닥을 접촉시킴으로써 달성된다. 이러한 조건은 대체적으로 분자 생물학 분야의 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다. 그럼에도 불구하고, 이 방법은 주형의 한 가닥으로부터 서열 판독을 얻고, 고정된 프라이머(아래에서 설명됨)를 사용하여 가닥을 복사하고, 제1 가닥을 방출하고, 복제된 제2 가닥을 서열분석함으로써 주형 폴리뉴클레오타이드의 양 말단으로부터 서열 데이터를 얻을 수 있다. 이것은 원본 단편의 양 말단으로부터 서열 판독을 제공한다.
- [0073] 이와 같이, 일 예에서, 본 발명은 서열 결정을 위한 제1 및 제2 영역으로 본 명세서에서 지칭되는, 폴리뉴클레오타이드 주형의 영역을 서열분석하는 방법에 관한 것이다. 서열 결정을 위한 제1 및 제2 영역은 폴리뉴클레오타이드 주형의 양 말단에 있다(주형 및 이의 상보체는 본 명세서에서 각각 제1 및 제2 주형 가닥으로 지칭된다). 일단 한 가닥의 서열이 알려져 있으면, 그의 상보적 가닥의 서열도 알려져 있으므로, 두 영역이라는 용어는 단일 가닥 주형의 양 말단 또는 이중 가닥 주형의 양 말단에 동일하게 적용될 수 있으며, 여기서 제1 영역 및 그의 상보체가 알려져 있고, 제2 영역 및 그의 상보체가 알려져 있다.
- [0074] 일 예에서, 제1 서열분석 판독은 제1 서열분석 결합 부위(예를 들어, SBS3')에 대한 제1 서열분석 프라이머(판독 1 서열분석 프라이머)의 결합에 이어서 상보적 가닥의 합성 및 서열분석을 포함할 수 있다. 이는 삽입체의 서열분석을 초래한다. 제2 단계에서, 인덱스 서열분석 프라이머(예를 들어, i7 서열분석 프라이머)가 제2 서열분석 결합 부위(예를 들어, SBS12)에 결합하여 인덱스 서열의 합성 및 서열분석(예를 들어, i7 프라이머의 서열분석)을 초래한다. (본 명세서에 기재된 바와 같은) 클러스터 재생 다음은 제2 서열 판독이다. 제2 서열분석 판독은 주형 상의 제1 서열분석 결합 부위의 상보체(예를 들어, SBS3)에 대한 인덱스 서열분석 프라이머(예를 들어, i5 서열분석 프라이머)의 결합 및 인덱스 서열(예를 들어, i5)의 합성 및 서열분석을 포함할 수 있다. 제2 단계에서, 제2 서열분석 프라이머(판독 2 서열분석 프라이머)가 제2 서열분석 결합 부위에 결합하는 프라이머(예를 들어, i7 서열분석 프라이머)의 상보체(예를 들어, SBS12')에 결합하여, 역방향으로의 삽입물의 합성 및 서열분석을 초래한다. 다시 말해, SBS3은 판독 1에 대한, SBS12는 판독 2에 대한, SBS3'은 i5에 대한, SBS12'는 i7에 대한 서열분석 프라이머이다.
- [0075] 서열분석은 임의의 적합한 "합성에 의한 서열분석" 기술을 사용하여 수행될 수 있으며, 여기서 뉴클레오타이드 또

는 올리고뉴클레오타이드는, 전형적으로 서열분석 프라이머의 어닐링에 의해 제공되는 유리 3' 하이드록실 기에 연속적으로 첨가되어, 5'에서 3' 방향으로 폴리뉴클레오타이드 사슬의 합성을 초래한다. 특정 실시 형태에서, 첨가된 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 특성이 각각의 첨가 후에 결정된다.

[0076] 하나의 특정 서열분석 방법은 가역적 사슬 종결자로서 작용할 수 있는 변형된 뉴클레오타이드의 사용에 의존한다. 적합한 뉴클레오타이드는 W004018497호에 기재되어 있다. 일단 변형된 뉴클레오타이드가 서열분석되는 주형의 영역에 상보적인 성장하는 폴리뉴클레오타이드 사슬 내에 혼입되었다면, 추가 서열 연장을 지시하는 데 이용가능한 유리 3'-OH 기가 없고, 따라서, 폴리머라제는 추가의 뉴클레오타이드를 첨가할 수 없다. 일단 성장하는 사슬에 혼입된 염기의 특성이 결정되었다면, 3' 블록은 다음 연속적인 뉴클레오타이드의 첨가를 가능하게 하기 위해 제거될 수 있다. 이러한 변형된 뉴클레오타이드를 사용하여 유래된 산물을 정리함으로써, DNA 주형의 DNA 서열을 추론할 수 있다. 각각의 혼입 단계에서 첨가된 염기들 사이의 구별을 용이하게 하는, 특정 염기에 상응하는 것으로 알려진 상이한 표지에 각각의 변형된 뉴클레오타이드가 부착되어 있는 경우, 이러한 반응은 단일 실험에서 수행될 수 있다. 적합한 라벨은 국제 특허 출원 PCT/GB/2007/001770호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 대안적으로, 개별적으로 첨가되는 변형된 뉴클레오타이드의 각각을 함유하는 별도의 반응이 수행될 수 있다.

[0077] 변형된 뉴클레오타이드는 또한 이들의 검출을 용이하게 하기 위해 표지를 가질 수 있다. 특정 실시 형태에서, 표지는 형광 표지이다. 각각의 뉴클레오타이드 유형은 상이한 형광 표지를 가질 수 있다. 그러나 검출 가능한 표지가 형광 표지일 필요는 없다. DNA 서열로의 뉴클레오타이드 혼입의 검출을 허용하는 임의의 표지가 사용될 수 있다.

[0078] 형광 표지된 뉴클레오타이드를 검출하기 위한 하나의 방법은 표지된 뉴클레오타이드에 대해 특이적인 파장의 레이저 광의 사용 또는 다른 적합한 조명원의 사용을 포함한다. 혼입된 뉴클레오타이드 상의 표지로부터의 형광은 CCD 카메라 또는 다른 적합한 검출 수단에 의해 검출될 수 있다. 적합한 검출 수단은 국제 특허 출원 PCT/US2007/007991호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 제1 서열분석 판독이 완료되고, 충분한 판독 길이가 결정되었으면, 가닥의 나머지가 복사될 수 있다. 3'-하이드록실 기가 원래 닉킹(nicking) 효소에 의해 생성되었다면, 동일한 위치에서 새로운 3'-하이드록실 기를 재-생성하고, 이 위치로부터 연장하는 것이 가능할 것이지만, 서열분석 반응의 일부로서 혼입된 뉴클레오타이드의 3'-하이드록실 기로부터 제1 주형 가닥을 계속 복사하는 것이 동일하게 가능하다. 4개의 비표지된 뉴클레오타이드 모두 및 폴리머라제를 사용한 이러한 연장 반응은 제1 주형의 모든 염기를 복사할 것이다. 고정된 프라이머는 닉킹 효소에 대한 제한 부위를 포함할 수 있으며, 제한 효소로의 처리는 고정된 프라이머, 또는 고정된 주형 듀플렉스를 단축하여 차단되지 않은 3' 하이드록실 기를 방출할 수 있다.

[0079] 듀플렉스의 하나의 가닥에서만 유리 3'-하이드록실을 생성하는 방법은 닉킹 효소로의 처리, 또는 특정 뉴클레오타이드를 제거하기 위한 화학적 처리를 포함한다. 적합한 닉킹 효소는 당업계에 잘 알려져 있으며, 바람직하게는 공지된 닉킹 부위로부터 유래하는 염기를 서열분석해야 하는 것을 피하기 위해 결합 부위에 대해 3'-원격인 부위에서 절단될 것이다. 닉킹 효소는 표면에 가장 가까운 말단에서, 가닥들 중 하나만을 절단해야 한다. 적합한 제한 효소의 예는 Nt.BstNBI 및 Nt.AIWl을 포함할 것이며, 이들은 방출된 3'-하이드록실을 넘어서는 정의된 서열의 염기를 갖지 않는다.

[0080] 제1 서열분석 실행 후, 뉴클레오타이드는 제2 서열분석 실행을 가능하게 하기 위해 (본 명세서에서 추가로 논의되는 바와 같은) 재생 단계를 거친다. 따라서, 뉴클레오타이드는 주형 가닥을 복사하는 추가 사이클을 허용하도록 탈보호될 수 있다. 뉴클레오타이드가 다이테옥시 변형을 보유하는 경우, 이는 엑소뉴클레아제, 또는 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라제를 사용하여 제거될 수 있다. 따라서, 클러스터는 기재된 바와 같은 2개의 그래프팅된 프라이머로 제조될 수 있으며, 사용되지 않은 프라이머는 제1 서열분석 반응 동안 차단되고, 이어서 주형 가닥의 추가 복사를 허용하도록 차단해제될 수 있다. 증폭 프라이머의 일부는 증폭 사이클에서 3' 하이드록실 이 연장되는 것을 차단하는 변형으로 표면에 부착될 수 있다. 이는 사실상 표면이 2개가 아닌 3개 이상의 증폭 프라이머로 처리됨을 의미한다. 증폭 프라이머 중 적어도 2개는 동일한 서열의 영역을 포함해야 하지만, 적어도 하나의 프라이머는 선형화 공정 동안 제2 프라이머를 제거하는 데 사용되는 조건에 민감하지 않을 것이며, 3'-차단 모이어티를 함유할 것이다. 차단 모이어티는 포스포닉 시약으로 제거될 수 있는 아지도메틸 기와 같은 화학 블록, 포스포타제로 제거될 수 있는 인산기와 같은 효소적으로 제거 가능한 화학적 블록의 형태를 취할 수 있거나, 3'-5' 외부 핵분해(exonucleolysis)를 사용하여 제거될 수 있는 뉴클레오시드 기의 형태일 수 있다. 이러한 뉴클레오시드 변형은 기재된 바와 같이 제거될 수 있는 무염기(abasic) 부위, 또는 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라제에 의해 제거될 수 있는 2', 3' 다이테옥시 뉴클레오타이드를 포함한다. 추가 변형은 제한 효

소에 대한 인식 서열과 함께 자기 상보적 영역을 형성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 서열을 사용하는 것을 포함한다. 제한 효소로의 처리는 헤어핀 가닥을 절단하고 유리 3' 하이드록실 기를 갖는 더 짧은 서열을 방출해야 한다. 제1 서열분석 실행이 완료된 후 프라이머를 차단해제하기 위한 표면의 처리는 탈보호된 프라이머에 나머지 제1 가닥이 혼성되게 하며 이미 서열분석된 가닥을 재복사할 수 있다.

[0081] 일단 제1 서열분석 판독의 서열분석 산물이 제거되면, 제1 주형 가닥은 고체 지지체 상에 고정된 상태로 유지될 것이다. 제1 주형 가닥은 이의 3' 말단에서 고체 지지체 상에 고정된 제2 프라이머에 상보적인 서열을 포함하므로, 제2 프라이머 분자에 결합 또는 "브리지"할 수 있다. 이어서, 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이 연장 반응이 수행되어, 고정된 프라이머 중 하나 이상을 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하고 제2 고정된 주형 가닥을 생성할 수 있으며, 이는 후속적으로 제2 서열 판독에서 서열분석된다. 따라서, 클러스터는 제2 서열 판독을 가능하기 위해 재생될 수 있다. 이 단계는 쌍을 이루는 말단 재합성을 얻기 위해 여러 번 반복될 수 있다. 도 7은 이 사이클의 일 예를 도시한다. 여기서, 브리지 증폭은 증식 라운드를 수행하기 위해 3가지 시약의 사이클링을 필요로 한다. 먼저, 변성제(LDR)를 사용하여 55°C에서 클러스터를 변성시킨다. 그 다음, 변성제의 제거를 용이하게 하기 위해 고체 지지체(예를 들어, 플로우 셀)를 가로질러 H₂O를 푸시(push)한다. 그 다음, 가닥-치환 폴리머라제 효소를 사용하여, 이용가능한 3' 표면 프라이머를 연장한다. 이 사이클은 페어드-엔드 재합성을 위해 후술되는 바와 같이 반복될 수 있다.

[0082] 다시, 이는 두 가닥이 모두 고정된 주형 듀플렉스를 재생한다. 페어와이즈 서열분석 동안(즉, 제1 서열분석 판독과 제2 서열분석 판독 사이)의 연장 반응과 관련하여, 연장은 가닥-치환 폴리머라제 효소를 사용하여 수행된다.

[0083] 추가 단계에서, 서열분석을 개시하기 전에 주형에 상보적인 복수의 염기로 유리 3'-하이드록실 프라이머를 연장하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 둘 모두는 고정된 듀플렉스의 용융 온도를 높이며, 클러스터 내에서 페이징(phasing) 문제를 일으키는, 서열분석 중에 주형 가닥이 다른 고정된 프라이머에 재-혼성화되는 것을 방지하는데 도움이 된다. 라이게이션 단계는 포스파타제 단계가 고정된 프라이머로부터 인산기를 제거한 후에 수행된다. 20 내지 30 염기의 서열의 첨가는 유리 3'-하이드록실에 인접하여 혼성화된 5'-포스페이트 변형 프라이머와의 라이게이션 반응에 의해 수행될 수 있다. 리가아제, 예컨대 T4 DNA 리가아제를 사용하여 겹을 밀봉할 수 있다. U 뉴클레오타이드를 제거하는 USER 처리의 경우, 프라이머의 5'-염기는 절단된 U를 대체하는 T일 것이다. 혼성화 단계가 효율적으로 수행되기 위해서는, 5'-비-고정된 가닥이 전술된 바와 같은 5'-3' 외부 핵분해 처리에 의해 제거되어야 한다. 유리 3'-하이드록실을 갖는 이러한 고정된, 연장된 프라이머는 연장된 5'-앵커링된(anchored) 또는 연장된 고정된 프라이머로 기재되며, 이러한 연장된 프라이머의 생성은 제1 주형 가닥이 그의 5'-말단에서 고체 지지체 상에 고정된 프라이머에 혼성화되도록 복수의 주형 폴리뉴클레오타이드를 처리하는 것과 관련된 단계 중 하나일 뿐이다.

[0084] 일 예에서, 전술된 연장 반응을 수행하기 전에, 고정된 프라이머를 연장하는 것이 유리할 수 있다. 연장은 고정된 프라이머의 3' 말단을 넘어서 연장되는 서열을 갖는 혼성화된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행될 수 있으며, 그의 서열은 또한 주형의 말단에서의 상응하는 영역과 동일한 서열이다. 이러한 연장된 부분은 고정된 프라이머의 연장을 위한 기초의 역할을 할 수 있으므로, 연장된 프라이머는 고정된 주형 가닥에 상보적이다. 연장된 프라이머는 그의 증가된 길이로 인해 가닥 재합성 단계의 효율을 개선할 수 있다. 일단 제1 가닥의 상보적 서열이 생성되면, 제1 가닥은 표면으로부터 제거될 수 있다.

[0085] 표면으로부터의 제1 주형의 제거는 새로 단일 가닥 제2 주형이 3' 말단으로부터 다시 서열분석될 수 있게 한다. 따라서, 원래의 고정된 주형의 양 말단이 서열분석될 수 있다. 제1 가닥은 적합한 직교 선형화 처리 단계, 예컨대 다이올 절단 또는 8-옥소-G 잔기의 제거에 의해 제거될 수 있으며, 제1 주형 가닥의 변성 후에, 제2 서열분석 프라이머가 제2 주형 가닥에 혼성화될 수 있고, 제2 주형 가닥은 서열분석될 수 있다. 이러한 직교 선형화 전략은 또한 주형의 양 말단으로부터의 판독을 가능하게 한다.

[0086] 제1 주형 가닥의 선택적 제거, 또는 선형화는 또한 다수의 다른 방식으로 달성될 수 있다. 용액 중에서의 서열분석 프라이머의 혼성화를 가능하게 하기 위한 선형화는 주형 가닥 상에 작용성 3'-하이드록실을 남길 필요가 없고, 한 가닥 또는 두 가닥 모두를 절단할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "선형화"는 상보적 가닥의 선택적 제거를 지칭한다. 증폭 프라이머 중 하나가 표면으로부터 절단될 수 있도록 고정되는 경우, 생성된 이중 가닥 DNA는 프라이머 혼성화 부위를 함유하는 단일 가닥 분자를 제공하기 위해 열 또는 화학적 변성 조건을 사용하여 단일 가닥으로 제조될 수 있다. 단일 가닥 분자는 용액 중에서 서열분석 프라이머와 혼성화되어, 고정된 주형 가닥의 서열분석 판독을 가능하게 할 수 있다. 상기 절단 부위는 화학적, 효소

적 또는 광화학적 수단에 의해 제1 주형 가닥의 제어된 절단을 가능하게 하는 부위이다. 임의의 적합한 효소적, 화학적 또는 광화학적 절단 반응이 절단하는 데 사용될 수 있다. 다수의 적합한 방법이 W007010251호에 기재되어 있으며, 이의 내용은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다. 절단 반응은 절단되는 가닥의 일부 또는 전체의 제거를 초래할 수 있다. 적합한 절단 수단은, 예를 들어, 제한 효소 분해(이 경우에 절단 부위는 듀플렉스 주형의 한 가닥 또는 두 가닥 모두의 절단을 지시하는 효소에 적절한 제한 부위임); RNase 분해 또는 데옥시리보뉴클레오타이드와 리보뉴클레오타이드 사이의 결합의 화학적 절단(이 경우 절단 부위는 하나 이상의 리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있음); 환원제(예를 들어, TCEP)를 사용한 다이설파이드 결합의 화학적 환원(이 경우 절단 부위는 적절한 다이설파이드 결합을 포함하여야 함); 과요오드산염을 사용한 다이올 결합의 화학적 절단(이 경우 절단 부위는 다이올 결합을 포함하여야 함); 무염기 부위의 생성 및 후속 가수분해 등을 포함한다.

[0087] 일 실시 형태에서, 절단은 비-천연 뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 또는 비-뉴클레오타이드 화학적 변형 중 하나 이상 또는 임의의 조합을 포함하는 주형 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스의 한 가닥 또는 두 가닥 모두에서의 절단 부위에서 발생할 수 있다.

[0088] 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 절단 기술은, W02008041002호에 상세히 기재되어 있는 다음을 포함하지만 이로 제한되지 않는다: i) 화학적 절단, ii) 무염기 부위의 절단, iii) 리보뉴클레오타이드의 절단, iv) 광화학적 절단, v) PCR 스톱퍼, vi) 펩티드 링커의 절단, vii) 효소적 분해.

[0089] 그 다음, 제2 서열분석 프라이머가 주형의 복사된 가닥에 혼성화되고 전술된 바와 같은 제2 서열분석 프라이머에 대한 뉴클레오타이드의 연속적인 첨가를 통해 서열분석 반응이 진행되어, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 영역의 서열이 결정된다.

[0090] 본 명세서에 기재된 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스는 다수의 이러한 제1 및 제2 듀플렉스로 구성된 단일 클러스터 또는 콜로니의 일부를 형성하고, 클러스터 또는 콜로니는 그 자체가 전형적으로 다수의 이러한 클러스터 또는 콜로니의 어레이의 일부를 형성할 것이다. 용어 "클러스터" 및 "콜로니"는 전체에 걸쳐 상호교환적으로 사용되며 복수의 동일한 고정된 핵산 가닥 및 복수의 동일한 고정된 상보적 핵산 가닥으로 구성된 고체 지지체 상의 별개의 부위를 지칭한다. 용어 "클러스터링된 어레이"는 이러한 클러스터 또는 콜로니로부터 형성된 어레이를 지칭한다. 어레이 상의 각각의 폴리뉴클레오타이드 듀플렉스는 동일한 범용 프라이머 인식 영역을 함유하여, 동일한 프라이머가 모든 클러스터를 서열분석하는데 사용될 수 있게 한다. 그 다음, 상기 설명된 바와 같이, 제1 서열분석 프라이머가 제1 주형 가닥에 혼성화되고 제1 서열분석 프라이머에 대한 뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드의 연속적인 혼입을 통해 서열분석 반응이 진행되어, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 영역의 서열이 결정된다.

[0091] 주요 특징은 클러스터링된 어레이 상의 동일한 클러스터 또는 콜로니에서 둘 모두의 서열분석 실행이 일어날 수 있다는 것이다. 이러한 어레이 상에서, 각각의 콜로니 내의 각각의 듀플렉스는 동일한 이중-가닥 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함할 것인 반면, 상이한 콜로니는 상이한 이중-가닥 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 듀플렉스로 형성될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 주어진 클러스터링된 어레이 상의 콜로니의 적어도 90%, 더욱 특히 적어도 95%는 상이한 이중-가닥 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 주형 듀플렉스로부터 형성될 것이지만, 어레이 상의 각각의 개별 콜로니 내에서, 모든 주형 듀플렉스는 동일한 이중-가닥 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함할 것이다.

[0092] 상기 개략된 서열분석 방법은 제한적이지 않으며 본질적으로 폴리뉴클레오타이드 사슬로의 뉴클레오타이드의 연속적인 혼입에 의존하는 임의의 서열분석 방법론이 사용될 수 있다. 적합한 기술은, 예를 들어, 파이로서열분석(Pyrosequencing(TM)), FISSEQ(형광 동소 서열분석), MPSS(대규모 병렬 시그니처 서열분석) 및 라이게이션-기반 방법에 의한 서열분석을 포함한다. 서열분석될 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드는 서열분석하고자 하는 임의의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 재-서열분석 응용에서와 같은, 알려져 있거나, 알려져 있지 않거나, 부분적으로 알려져 있는 서열일 수 있다. 아래에 상세히 기재된 주형 제조 방법을 사용하여, 알려져 있거나, 알려져 있지 않거나, 부분적으로 알려져 있는 서열의 본질적으로 임의의 이중 가닥 표적 폴리뉴클레오타이드로부터 시작하는 주형의 어레이를 제조하는 것이 가능하다. 어레이를 사용하면, 동일하거나 상이한 서열의 다수의 표적을 병렬로 서열분석하는 것이 가능하다. 페어와이즈 방법의 특정 적용은 게놈 DNA 단편의 서열분석에 있다. 이 방법을 사용하여 각각의 표적 분자에 대해 수득된 서열의 두 영역은 시작 표적 분자의 크기에 따라 게놈에서 서로 특정 거리 내에서 연결되는 것으로 알려져 있기 때문에, 이 방법은 게놈 재배열의 식별에 특별한 이점을 제공한다.

- [0093] 본 발명은 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제가 제1 서열분석 관독 후 및 제2 서열분석 관독 전에 재생 단계 동안 유리하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 다시 말해, 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제는 제1 주형 가닥의 서열분석 후 그의 상보적 가닥을 재합성하는데 사용될 수 있다. 상기에 설명된 바와 같이, 이것을 페어드-엔드 재합성이라고 한다.
- [0094] "비-열안정성 폴리머라제"는 더 낮은 온도에서 작동하도록 최적화되고 BST와 같은 열안정성 폴리머라제와는 대조되는 폴리머라제를 포함하도록 의도된다.
- [0095] "가닥 치환 폴리머라제"는 합성 동안 발생하는 하류 DNA를 치환하는 능력을 설명한다.
- [0096] 일 실시 형태에서, 본 발명에 따른 비-열안정성 폴리머라제는 최적 인큐베이션 온도가 55℃ 미만이다. 추가의 실시 형태에서, 본 발명에 따른 비-열안정성 폴리머라제는 최적 인큐베이션 온도가 50℃ 미만, 45℃ 미만, 40℃ 미만, 39℃ 미만, 38℃ 이하, 약 38℃ 또는 약 37℃이다. 특히 바람직한 비-열안정성 폴리머라제는 최적 인큐베이션 온도가 약 38℃이다.
- [0097] 추가의 실시 형태에서, 본 발명에 따른 비-열안정성 폴리머라제는 최적 활성 온도가 55℃ 미만이다. 추가의 실시 형태에서, 본 발명에 따른 비-열안정성 폴리머라제는 최적 활성 온도가 50℃ 미만, 45℃ 미만, 40℃ 미만, 39℃ 미만, 38℃ 이하, 약 38℃ 또는 약 37℃이다. 특히 바람직한 비-열안정성 폴리머라제는 최적 활성 온도가 약 38℃이다.
- [0098] 본 발명에 따른 적합한 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제는, 예를 들어, 뉴 잉글랜드 바이오랩스, 인크.(New England BioLabs, Inc.)를 통해 찾을 수 있으며, phi29, Bsu, Klenow, 및 DNA 폴리머라제 I(이. 콜라이) 및 이의 기능적 단편을 포함할 수 있다. 특히 바람직한 폴리머라제는 Bsu이다. 대안적인 실시 형태에서, 폴리머라제는 Bsu 대형 단편이다.
- [0099] 비-열안정성 폴리머라제를 사용함으로써, 연장 반응은 55℃ 미만, 바람직하게는 50℃ 미만, 바람직하게는 40℃ 미만, 바람직하게는 38℃ +/- 2℃, 바람직하게는 38℃ +/- 1℃, 바람직하게는 38℃의 온도에서 수행될 수 있다.
- [0100] 가닥 치환 폴리머라제의 사용은 또한 이점을 가져오고, 주형 가닥이 자체적으로 재어닐링되는 문제를 극복할 수 있다. 가닥 치환 폴리머라제의 사용은 주형 가닥이 관련 프라이머에 어닐링되어 효율적인 연장을 가능하게 하는 데 도움이 된다.
- [0101] 제1 서열분석 관독 후 재생 단계 동안 비-열안정성 폴리머라제의 사용은 다수의 이점을 가져온다. 예로서, 열안정성 BST의 사용은 이전에 이러한 재생 단계 동안 사용되어 왔으며, 이는 최적의 % 재합성을 달성하는 데 12회의 재생 사이클을 필요로 한다. 대조적으로, 비-열안정성 폴리머라제는 단지 3회 사이클 후 허용가능한 재합성을 달성하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 단지 3회 사이클 후 79.4% 재합성을 달성한 실시예에서의 PETv2 3x5m 프로토콜을 참조한다.
- [0102] 페어드 엔드 재합성 동안 비-열안정성 폴리머라제의 사용은 60 또는 65℃에서 작동할 수 있는 적합한 SBS 폴리머라제를 사용하여 고온에서 둘 모두 수행되는 두 서열분석 단계 사이에 단계가 있기 때문에 직관적이지 않다.
- [0103] 페어드 엔드 재합성 동안 비-열안정성 중합효소의 사용은 또한 초기 클러스터 증폭 동안 동일한 중합효소가 사용되어 후속적으로 서열분석되는 클러스터 어레이를 생성하는 경우 추가의 이점을 가져올 수 있다. 예로서, ExAmp(비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제 BSU를 포함하는 증폭 혼합물)가 초기 클러스터 생성 단계 및 페어드 엔드 재합성 단계 둘 모두에 사용되는 경우, 기계 내에 사용된 시약의 총 수가 감소되고 카트리지 복잡도가 또한 감소된다. 이러한 장점은 COGS 최적화 및 프로토콜 단순화로 이어질 수 있다.
- [0104] 일 실시 형태에서, 단계 (d)는 연장과 변성의 다중 사이클을 통해 반복된다. 이는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15회 이상의 사이클; 바람직하게는 2 내지 5회 사이클, 2 내지 4회 사이클, 3 내지 5회 사이클, 3회 사이클 또는 4회 사이클; 가장 바람직하게는 3회 사이클을 포함할 수 있다. 더 많은 수의 사이클을 필요로 하는 폴리머라제와 대조적으로, 본 발명은 재생 단계를 효율적으로 완료할 수 있다.
- [0105] 일 실시 형태에서, 각각의 사이클은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 또는 30분 동안 지속될 수 있다. 특히 바람직한 사이클 유형은 5분이다. 특정 실시 형태에서, 단계 (d)는 하기 연장과 변성의 사이클을 포함할 수 있다: 3x5분; 3x30분; 12x2분; 6x4분; 2x12분 또는 3x5분. 특정 실시 형태에서, 3x5분이 바람직하다.
- [0106] 바람직한 실시 형태에서, 페어와이즈 서열분석 동안 연장 반응은 연장과 변성의 사이클을 포함한다.

- [0107] 임의의 적합한 변성제가 본 발명에 포함된다. 적합한 변성제는 다음을 포함한다: 아세트산, HCl, 또는 질산과 같은 산성 핵산 변성제; NaOH와 같은 염기성 핵산 변성제; 또는 DMSO, 포름아미드, 베타인, 구아니딘, 소듐 살리실레이트, 프로필렌 글리콜 또는 우레아와 같은 다른 핵산 변성제. 바람직한 변성제는 포름아미드 및 NaOH, 바람직하게는 포름아미드이다.
- [0108] 일 실시 형태에서, 변성은 실질적으로 연장 반응의 온도에서 수행된다.
- [0109] 특히 바람직한 실시 형태에서, 연장/변성 사이클은 3회 연장 사이클과 그 사이의 2회 변성 사이클을 포함한다. 추가의 바람직한 실시 형태에서, 변성 사이클은 제1 연장 사이클 전에 수행된다. 이러한 실시 형태는 변성과 연장의 3회 교대 사이클을 포함한다. 포름아미드가 가장 바람직한 변성제이다.
- [0110] 일 실시 형태에서, 연장 반응 (d)는 서열분석 판독 단계보다 낮은 온도에서 수행된다. 서열분석 단계는 대체적으로 더 높은 온도에 최적화된 상이한 폴리머라제(예를 들어 SBS 폴리머라제)를 사용할 것이다.
- [0111] 일 실시 형태에서, 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는 연장 반응 단계 (d)에 사용된 폴리머라제와 동일한 폴리머라제를 사용하는 증폭 반응에 의해 생성된다.
- [0112] 단계 (a)에서 상기 고체 지지체 상에 고정된 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 클러스터일 수 있다. 본 발명은 상기 클러스터를 생성하는 임의의 방법을 포함하지만, 하나의 바람직한 방법론은 브리지 증폭을 사용한다. 바람직한 실시 형태에서, 클러스터를 생성하기 위한 상기 브리지 증폭은 단계 (d) 연장 반응에 사용되는 동일한 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용한다. 이러한 접근법은 공정 전반에 걸쳐 사용되는 증폭 혼합물을 전체적으로 최소화할 수 있기 때문에 방법론을 더욱 간소화한다.
- [0113] 따라서, 단일 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제는 고정된 주형 폴리뉴클레오티드를 생성하거나 재생하기 위한 모든 증폭 단계에 사용될 수 있다. 제2 폴리머라제는 서열분석 단계 동안 사용될 수 있으며, 이는 전체 공정이 2개의 폴리머라제로 완료될 수 있음을 의미한다. 이러한 간소화된 접근법은 다양한 공정 이점, 복잡성 감소 및 COGS 절감을 제공한다.
- [0114] 용어 "클러스터" 및 "콜로니"는 전체에 걸쳐 상호교환적으로 사용되며 복수의 동일한 고정된 핵산 가닥 및 복수의 동일한 고정된 상보적 핵산 가닥으로 구성된 고체 지지체 상의 별개의 부위를 지칭한다. 용어 "클러스터링된 어레이"는 이러한 클러스터 또는 콜로니로부터 형성된 어레이를 지칭한다.
- [0115] 본 발명은 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 위한 방법을 제공하며, 상기 제1 및 제2 영역은 동일한 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드에 있고, 상기 페어와이즈 서열분석은 본 명세서에 개시된 바와 같은 단계 (a) 내지 단계 (f)를 포함한다.
- [0116] 본 방법은 클러스터링된 어레이 상의 이중-가닥 주형의 각각으로부터 서열분석 정보의 2개의 연결된 또는 쌍을 이룬 판독을 획득하는데 사용될 수 있다.
- [0117] 본 발명은 본 명세서에 개시된 바와 같은 연장 반응을 수행하는 것을 포함하는, 서열분석 반응의 데이터 품질을 개선하는 방법을 제공한다.
- [0118] 본 발명은 이제 하기 비-제한적인 실시예에 의해 설명될 것이다.
- [0119] **실시예**
- [0120] 페어드 엔드 서열분석은 표적 단편의 제1 서열분석 단계 후에 후술되는 다음의 변경 사항을 가지고 WO 2008/041002호에 기재된 방법론(예를 들어, 실시예 13 참조)에 따라 수행될 수 있다. 판독 1 서열분석의 성공적인 완료 후:
- [0121] 1. 완충액 및 T4 폴리뉴클레오티드 키나제, 예컨대 일루미나, 인크.(Illumina, Inc.)로부터 입수가 가능한 JRM을 포함하는 재합성 혼합물을 사용하여, 플로우 셀 표면 결합된 i5 프라이머의 탈보호를 효소적으로 수행한다.
- [0122] 2. 다음으로, 플로우 셀을 일루미나 인크.로부터 입수가 가능한 이온성 완충액, 예를 들어 BB6 완충액으로 세척한다.
- [0123] 3. 클러스터를 저-편향 변성제(Low-bias Denaturation Reagent, LDR -100% 포름아미드)로 변성시켜 판독 1로부터 연장된 서열분석 프라이머를 제거한다.
- [0124] 4. 플로우 셀 온도를 38°C로 만든다.

- [0125] 5. 이중 가닥 클러스터를 재생하기 위해(재합성), LDR(100% 포름아미드) 및 ExAmp(비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제 BSU를 포함하는 증폭 믹스)의 3회 후속 라운드를 다음과 같이 38℃에서 등온적으로 사이클링시킨다. LDR 및 ExAmp는 일루미나, 인크.로부터 입수가가능하다.
- [0126] 5a. 플로우 셀의 내용물을 완전히 치환하도록 의도된 큰 플러시 계수로 LDR을 플로우 셀을 통해 플러싱한다.
- [0127] 5b. 다음으로, 큰 플러시 계수를 유지하면서 플로우 셀을 가로질러 ExAmp를 플러싱하고 5분 동안 인큐베이션한다.
- [0128] 5c. 단계 5a 및 단계 5b를 총 3 라운드의 증폭 동안 반복한다.
- [0129] 6. 다음으로, 새로운 이중 가닥 클러스터를 관독 2에 대해 선형화하고 WO 2008/041002호에서와 같이 프라이머 혼성화를 수행한다.
- [0130] 본 발명에 따른 워크플로우의 그래픽 표현이 도 1에 도시되어 있다. 워크플로우 PETv2는 JRM을 사용한 탈보호, 이어서 완충액 세척을 나타낸다. 그 다음, 클러스터를 LDR로 변성시킨 후, 38℃까지 열 사이클을 수행한다. 그 후, ExAmp(BSU 함유) 및 LDR(100% 포름아미드)을 사용하여 3 라운드의 재생과 변성을 수행한다.
- [0131] 대안적인 워크플로우 PETv1이 도 2에 도시되어 있으며, 이는 도 1의 워크플로우와 유사하지만, 재생 사이에서 LDR에 의한 변성을 포함하지 않고, 대신에 x3 연속 재생 라운드를 진행한다. 도 3 및 도 4는 도 1 및 도 2를 반영하지만 선형화를 추가로 포함한다.
- [0132] 실시 형태에서, SSC가 또한 본 발명에 따른 프로토콜에서 사용될 수 있다. 예를 들어, SSC로 재합성 전 및/또는 후에 클러스터를 세척할 수 있다.
- [0133] 다른 잠재적 워크플로우에 비해 이러한 워크플로우의 재생 효율을 평가하였고 그 결과가 도 5에 나타나 있으며, 이는 하기 표 1에 기재된 바와 같이 본 발명에 따른 페어드 엔드 턴 프로토콜을 사용한 HSX 서열분석 실행으로부터 계산된 % 재합성을 보여준다.
- [0134] [표 1]

세부사항	%재합성	SD	n
PETv1 3x5 분	64	2.6	(n=15)
PETv1 (연장됨) 3x30 분	84	NA	(n=1)
PETv2 12 사이클 - 2 분	101.2	4.9	(n=3)
PETv2 6 사이클 - 4 분	81	NA	(n=1)
PETv2 2 사이클 - 12 분	76.5	NA	(n=2)
PETv2 3 사이클 - 5 분	79.4	1.3	(n=3)
PETv2 12 사이클 - 2 분, LDR 없음	71	NA	(n=1)

- [0135]
- [0136] 시험된 초기 프로토콜은 3x5분 사이클 후 PETv1이었다. 이는 허용가능한 것으로 간주되지만 최적화되지는 않은 64% 재합성을 달성하였다. 인큐베이션 시간을 3x30분으로 늘리면 % 재합성이 84%로 개선되었고, 인큐베이션 시간과 화학 사이클 수를 모두 증가시키면 또한 % 재합성에 긍정적인 영향을 미쳤다('PETv2 12 사이클 - 2분, LDR 없음'은 % 재합성을 71%로 개선하였다).
- [0137] LDR을 사용한 예에서, 연속 재생/변성 사이클의 사용은 조건에 따라 % 재합성을 76.5 내지 101.2%로 추가로 개선하였다.
- [0138] ExAmp 인큐베이션 시간, 화학 사이클의 수 및/또는 LDR 사용 빈도를 증가시키는 것은 % 재합성에 긍정적인 영향을 초래한다는 것을 알 수 있다. 전형적으로, 선택된 프로토콜은 약 80% 이상의 재합성을 달성할 것이지만, 우선적인 프로토콜은 % 재합성 대 시간 대 프로토콜 복잡성 및 시약 사용을 절충한 것이다.
- [0139] 프로토콜 최적화는 또한 iBot 기반 DOE를 사용하여 고려되었고, 그 결과는 도 6a 및 도 6b에 도시되어 있다.
- [0140] 도 6a는 다음을 도시한다: i) LDR 사이클링을 포함하는 것은 % 재합성에 상당한 영향을 미친다; i) 사이클링 단계의 수를 증가시키면 % 재합성이 또한 개선된다. 이는 특히 LDR 사이클링이 사용되는 경우에 나타난다; iii)

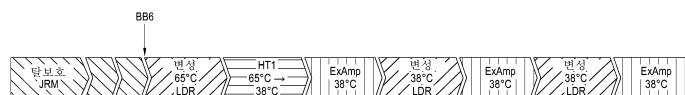
인큐베이션 시간을 증가시키는 것은 % 재합성에 대한 긍정적이지만 덜 뚜렷한 효과를 가지며, 이는 짧은 실행 시간이 허용됨을 시사한다.

- [0141] 도 6b는 다음과 같은 최적화된 파라미터를 식별하는 실험의 모델 적합도를 나타낸다: LDR = 있음; 4회 푸시; 및 8.7분의 인큐베이션 시간. 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 최종 최적화된 프로토콜은 % 재합성뿐만 아니라 속도, 시약 사용 및 효율의 관점에서 전반적인 최적화를 고려할 것이다.
- [0142] 결론적으로, 본 발명은 서열분석 실행 동안 주형을 재생하기 위한 페어와이즈 서열분석 동안의 연장 반응이 55℃ 미만의 온도에서 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 수행될 수 있음을 확인하였다. 이는 공정 이점으로 이어진다. 또한, 동일한 폴리머라제가 연장 반응 및 또한 초기 클러스터 생성 모두에 사용되는 경우, 전체 공정이 단순화될 수 있고, 시약 및 프로토콜 단계의 수가 감소될 수 있다.
- [0143] 본 발명의 실시 형태는 이제 하기 항목을 참조하여 설명될 수 있다:
- [0144] 1. 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드의 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석 동안 연장 반응을 수행하는 방법으로서, 상기 제1 및 제2 영역은 동일한 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드에 있고, 상기 페어와이즈 서열분석은 다음 단계:
- [0145] (a) 5' 말단에서 고체 지지체에 결합된 상보성 제1 및 제2 주형 가닥으로부터 각각 형성된 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오타이드가 그 위에 고정된 고체 지지체, 및 제1 주형 가닥의 3' 말단에 혼성화할 수 있는 하나 이상의 5'-말단 고정된 프라이머의 다중 카피를 제공하는 단계;
- [0146] (b) 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오타이드의 제2 주형 가닥을 선택적으로 제거하여 5'-말단 고정된 프라이머에 대한 제1 주형 가닥의 혼성화를 가능하게 하는 단계;
- [0147] (c) 합성에 의한 서열분석 기술에 의해 또는 라이게이션에 의한 서열분석 기술에 의해 제1 서열분석 판독을 수행하여 주형 폴리뉴클레오타이드의 제1 영역의 서열을 결정하는 단계;
- [0148] (d) 고정된 프라이머 중 하나 이상을 연장하여 제1 주형 가닥을 복사하여 제2 고정된 주형 가닥을 생성하도록 연장 반응을 수행하는 단계;
- [0149] (e) 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오타이드의 제1 주형 가닥을 선택적으로 제거하여 단계 (d)에서 생성된 주형 가닥에 대한 서열분석 프라이머의 혼성화를 가능하게 하는 단계;
- [0150] (f) 합성에 의한 서열분석 기술에 의해 또는 라이게이션에 의한 서열분석 기술에 의해 제2 서열분석 판독을 수행하여 주형 폴리뉴클레오타이드의 제2 영역의 서열을 결정하는 단계 - 여기서, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 및 제2 영역의 서열을 결정하는 단계는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 상기 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 달성함 - 를 포함하며;
- [0151] 단계 (d) 연장 반응은 55℃ 미만의 온도에서 비-열안정성 가닥 치환 폴리머라제를 사용하여 수행되는, 방법.
- [0152] 2. 항목 1에 있어서, 비-열안정성 폴리머라제는 55℃ 미만, 바람직하게는 50℃ 미만, 45℃ 미만, 40℃ 미만, 39℃ 미만, 38℃ 이하, 약 38℃ 또는 약 37℃; 특히 바람직하게는 약 38℃의 최적 인큐베이션 온도 및/또는 최적 활성 온도를 갖는, 방법.
- [0153] 3. 임의의 전술한 항목에 있어서, 연장 반응은 55℃ 미만, 바람직하게는 50℃ 미만, 바람직하게는 40℃ 미만, 바람직하게는 38℃ +/- 2℃, 바람직하게는 38℃ +/- 1℃, 바람직하게는 38℃의 온도에서 수행되는, 방법.
- [0154] 4. 임의의 전술한 항목에 있어서, 비-열안정성 폴리머라제는 Bsu, phi29, Klenow, 및 DNA 폴리머라제 I(이. 콜라이), 바람직하게는 Bsu 또는 이의 기능적 단편인, 방법.
- [0155] 5. 임의의 전술한 항목에 있어서, 단계 (d)는 연장과 변성의 다중 사이클을 통해 반복되는, 방법.
- [0156] 6. 항목 5에 있어서, 단계 (d)는 연장과 변성의 다중 사이클을 통해 반복되는, 방법.
- [0157] 7. 항목 5 또는 항목 6에 있어서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15회 이상의 사이클; 바람직하게는 2 내지 5회 사이클, 2 내지 4회 사이클, 3 내지 5회 사이클, 3회 사이클 또는 4회 사이클; 가장 바람직하게는 3회 사이클을 포함하는, 방법.
- [0158] 8. 항목 5 내지 항목 7 중 어느 한 항목에 있어서, 각각의 사이클은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 또는 30분 동안 지속될 수 있는, 방법.

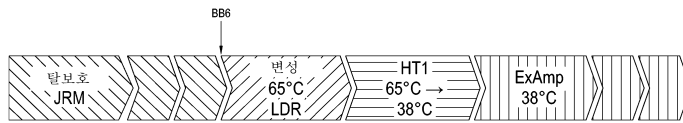
- [0159] 9. 항목 6에 있어서, 하기 연장과 변성의 사이클을 포함하는, 방법: 3x5분; 3x30분; 12x2분; 6x4분; 2x12분 또는 3x5분; 바람직하게는 12x2분.
- [0160] 10. 항목 6에 있어서, 변성은 실질적으로 연장 반응의 온도에서 수행되는, 방법.
- [0161] 11. 항목 5 내지 항목 9 중 어느 한 항목에 있어서, 변성은 아세트산, HCl, 또는 질산과 같은 산성 핵산 변성제; NaOH와 같은 염기성 핵산 변성제; 또는 DMSO, 포름아미드, 베타인, 구아니딘, 소듐 살리실레이트, 프로필렌 글리콜 또는 우레아와 같은 다른 핵산 변성제; 바람직하게는 포름아미드 및 NaOH, 특히 바람직하게는 포름아미드를 사용하여 수행되는, 방법.
- [0162] 12. 임의의 전술한 항목에 있어서, 연장 반응 (d)는 서열분석 판독 단계보다 낮은 온도에서 수행되는, 방법.
- [0163] 13. 임의의 전술한 항목에 있어서, 단계 (a)에서 상기 고체 지지체 상에 고정된 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는 클러스터인, 방법.
- [0164] 14. 항목 13에 있어서, 클러스터는 브리지 증폭에 의해 생성되는, 방법.
- [0165] 15. 항목 14에 있어서, 초기 클러스터 생성 및 연장 반응 단계 (d) 동안 동일한 비-열안정성 가닥 치환 폴리머 라제가 사용되는, 방법.
- [0166] 16. 임의의 전술한 항목에 있어서, 복수의 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는 연장 반응 단계 (d)에 사용된 폴리머라제와 동일한 폴리머라제를 사용하는 증폭 반응에 의해 생성되는, 방법.
- [0167] 17. 임의의 전술한 항목에 있어서, 고정된 프라이머 중 적어도 하나는 3' 말단에서 차단되고, 블록은 단계 (d) 전에 제거되는, 방법.
- [0168] 18. 항목 17에 있어서, 블록은 인산기이고, 표면은 블록을 제거하기 위해 포스파타제로 처리되는, 방법.
- [0169] 19. 임의의 전술한 항목에 있어서, 단계 (d) 전에 제한 효소로 처리하여, 고정된 프라이머를 단축시키고 연장을 위해 유리 3' 하이드록실을 방출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0170] 20. 임의의 전술한 항목에 있어서, 고정된 프라이머는 단계 (d) 전에 연장되는, 방법.
- [0171] 21. 항목 20에 있어서, 고정된 프라이머는 5'-오버행을 갖는 비-고정된 상보적 서열의 혼성화에 의해 연장되고, 고정된 프라이머는 오버행을 복사하도록 연장되는, 방법.
- [0172] 22. 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드의 제1 및 제2 영역의 페어와이즈 서열분석을 위한 방법으로서, 상기 제1 및 제2 영역은 동일한 표적 이중-가닥 폴리뉴클레오티드에 있고, 상기 페어와이즈 서열분석은 항목 1 내지 항목 21 중 어느 한 항목에 개시된 단계를 포함하는, 방법.
- [0173] 23. 클러스터링된 어레이 상의 이중-가닥 주형의 각각으로부터 서열분석 정보의 2개의 연결된 또는 쌍을 이룬 판독을 획득하기 위한 항목 22의 방법의 용도.
- [0174] 24. 서열분석 반응의 데이터 품질을 개선하는 방법으로서, 항목 1 내지 항목 21 중 어느 한 항목에 청구된 바와 같은 연장 반응을 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

도면

도면1



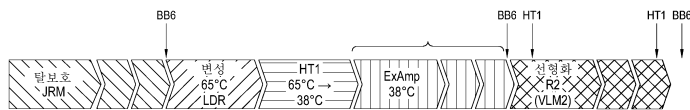
도면2



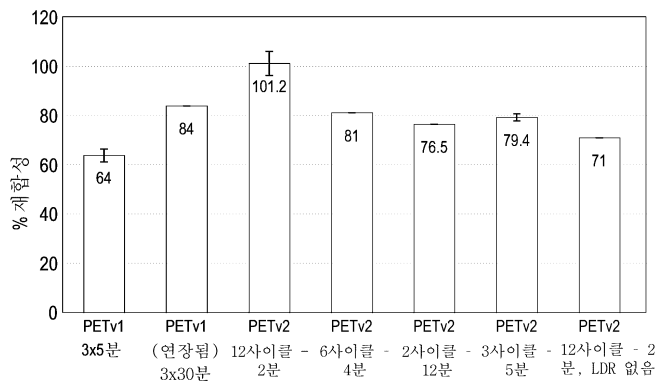
도면3



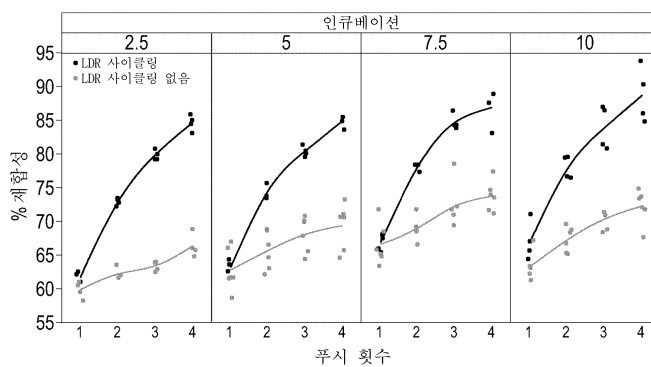
도면4



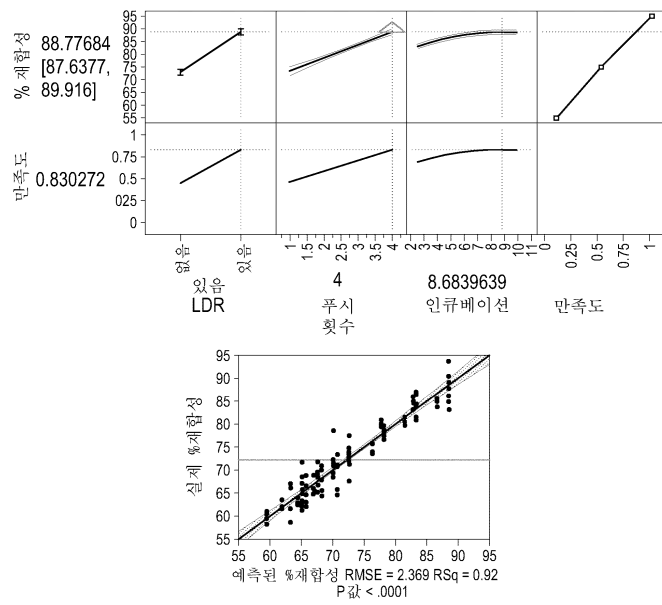
도면5



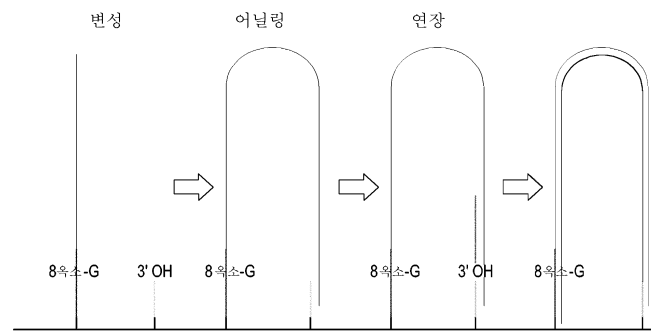
도면 6a



도면6b



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Illumina, Inc.

<120> Reagent Optimisation

<130> PC931329W0

<150> 62/987035

<151> 2020-03-09

<160> 4

<170> Patent In version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5 sequence

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga gatctacac 29

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P7 sequence

<400> 2

caagcagaag acggcatacg agat 24

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P5' sequence (complementary to P5)

<400> 3

gtgtagatct cggtaggtcgc cgtatcatt 29

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P7' sequence (complementary to P7)

<400> 4

atctcgtatg ccgtcttctg cttg 24