



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I776830 B

(45)公告日：中華民國 111 (2022) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：106142960

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 07 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/68 (2018.01)

(30)優先權：2017/01/05 美國 62/442,680

2017/03/24 英國 1704754.9

(71)申請人：美商伊路米納有限公司 (美國) ILLUMINA, INC. (US)

美國

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

英國

(72)發明人：杭特 善恩 E HUNTER, SHAUN E. (US)；馬克納尼 彼得 MCLNERNEY, PETER

(US)；鮑特爾 喬納森 馬克 BOUTELL, JOHNATHAN MARK (GB)；貝維斯

馬特 克萊爾 BEVIS-MOTT, CLAIRE (GB)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

WO 2011/156852A1

WO 2013/188582A1

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：13 項 圖式數：14 共 87 頁

(54)名稱

核酸庫之動力排除擴增

(57)摘要

例示性方法包括使第一溶液與不同的第二溶液於流量槽上反應，其係藉由使該第一溶液從該流量槽上之擴增位點上流過且隨後使該第二溶液從該等擴增位點上流過。該第一溶液包括目標核酸及包含核苷三磷酸及複製酶的第一試劑混合物。該第一溶液中之該等目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至該等擴增位點。該第一試劑混合物擴增與該等擴增位點結合的該等目標核酸，產生源自相應目標核酸之擴增子純系群體。該等擴增子係以超過該運輸速率之擴增速率產生。該第二溶液包括第二試劑混合物且不含該等目標核酸。該第二溶液係用於增加該等擴增位點處之該等擴增子之數目。

An example method includes reacting a first solution and a different, second solution on a flow cell by flowing the first solution over amplification sites on the flow cell and subsequently flowing the second solution over the amplification sites. The first solution includes target nucleic acids and a first reagent mixture that comprises nucleoside triphosphates and replication enzymes. The target nucleic acids in the first solution transport to and bind to the amplification sites at a transport rate. The first reagent mixture amplifies the target nucleic acids that are bound to the amplification sites to produce clonal populations of amplicons originating from corresponding target nucleic acids. The amplicons are produced at an amplification rate that exceeds the transport rate. The second solution includes a second reagent mixture and lacks the target nucleic acids. The second solution is to increase a number of the amplicons at the amplification sites.

指定代表圖：

符號簡單說明：

- 100 . . . 方法
- 102 . . . 步驟
- 104 . . . 步驟
- 106 . . . 步驟
- 108 . . . 步驟
- 110 . . . 步驟
- 112 . . . 步驟
- 114 . . . 步驟
- 116 . . . 步驟

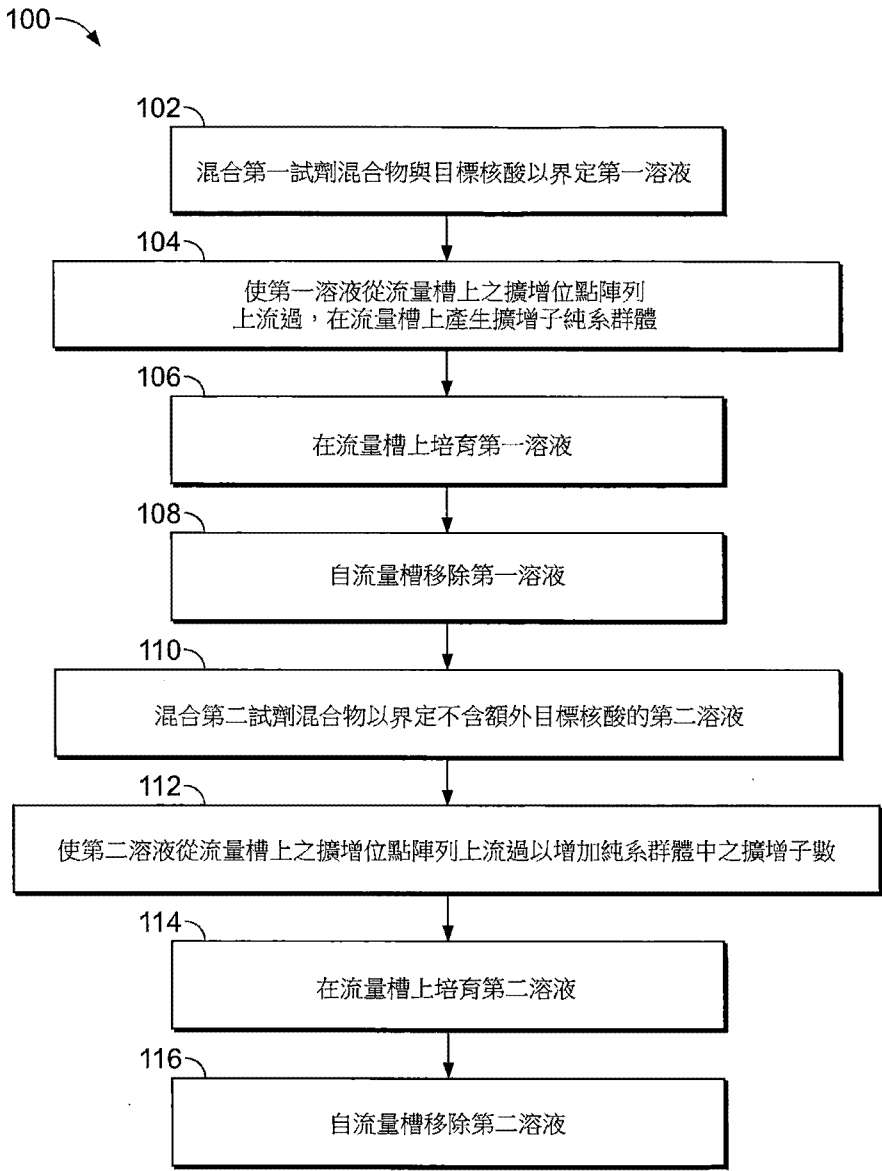


圖11

I776830

【發明摘要】

【中文發明名稱】 核酸庫之動力排除擴增

【英文發明名稱】 KINETIC EXCLUSION AMPLIFICATION OF NUCLEIC
ACID LIBRARIES

【中文】

例示性方法包括使第一溶液與不同的第二溶液於流量槽上反應，其係藉由使該第一溶液從該流量槽上之擴增位點上流過且隨後使該第二溶液從該等擴增位點上流過。該第一溶液包括目標核酸及包含核苷三磷酸及複製酶的第一試劑混合物。該第一溶液中之該等目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至該等擴增位點。該第一試劑混合物擴增與該等擴增位點結合的該等目標核酸，產生源自相應目標核酸之擴增子純系群體。該等擴增子係以超過該運輸速率之擴增速率產生。該第二溶液包括第二試劑混合物且不含該等目標核酸。該第二溶液係用於增加該等擴增位點處之該等擴增子之數目。

【英文】

An example method includes reacting a first solution and a different, second solution on a flow cell by flowing the first solution over amplification sites on the flow cell and subsequently flowing the second solution over the amplification sites. The first solution includes target nucleic acids and a first reagent mixture that comprises nucleoside triphosphates and replication enzymes. The target nucleic acids in the first solution transport to and bind to the amplification sites at a transport rate. The first reagent mixture amplifies the target nucleic acids that are bound to the amplification sites to produce clonal populations of amplicons originating from

corresponding target nucleic acids. The amplicons are produced at an amplification rate that exceeds the transport rate. The second solution includes a second reagent mixture and lacks the target nucleic acids. The second solution is to increase a number of the amplicons at the amplification sites.

【指定代表圖】 圖11

【代表圖之符號簡單說明】

100：方法

102：步驟

104：步驟

106：步驟

108：步驟

110：步驟

112：步驟

114：步驟

116：步驟

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 核酸庫之動力排除擴增

【英文發明名稱】 KINETIC EXCLUSION AMPLIFICATION OF NUCLEIC
ACID LIBRARIES

〔相關申請案之交叉引用〕

【0001】 本申請案主張2017年1月5日申請之美國臨時申請案第62/442,680號之權益，且主張2017年3月24日申請之大不列顛（Great Britain，GB）專利申請案第1704754.9號之優先權，其本身主張2017年1月5日申請之美國臨時申請案第62/442,680號之優先權，其中每一者之內容皆以全文引用之方式併入本文中。

【技術領域】

【0002】 本申請案係關於核酸庫之動力排除擴增。

【先前技術】

【0003】 在現代社會，遺傳分析愈發呈現出重要性。僅舉幾例，遺傳分析已被證實適用於預測人患一些疾病的風險（診斷）、在考慮某些治療時判定人的可能的治療益處對比副作用風險（預後），以及鑑別失蹤人員、罪案之犯罪者、罪案之受害者及戰爭傷亡（法醫學）。然而，在多數情況下，仍然沒有適當的遺傳檢測（genetic test）可供使用或遺傳檢測具有高錯誤率。此等問題的一個原因係目前用於診斷、預後及法醫學的遺傳檢測多數依賴於僅探測人體基因組之一部分的技術。人的遺傳性狀由含有超過30億個鹼基對的基因組編碼，但大部分遺傳檢測僅研究此等鹼基對中少數幾個的突變。藉由提高基因組的探測分數，理想地高達且包括基因組中所有30億個鹼基對，遺傳檢測之準確性可得以改良且可開發出用於更多診斷及預後情況的遺傳檢測。

【0004】 諸多遺傳檢測之組成部分為製備待檢測的遺傳物質。當試圖捕捉

整個基因組且維持其完整性時，這並不是一件小事。目前可用於捕捉大量遺傳物質的兩種方法為乳液聚合酶鏈反應(emulsion polymerase chain reaction, ePCR)及簇擴增(例如經由橋式擴增)。此等方法目前在臨床及診斷應用中之使用有限。

【0005】 關於ePCR，連同基因組片段及載體珠粒一起在油相中形成水性微滴。對條件進行選擇，使得各微滴將個別基因組片斷與單個載體珠粒分離的可能性最佳化。目標為微滴形成微型反應器，該等微型反應器防止基因組片段在微滴之間擴散且從而防止基因組片段在不同珠粒之間擴散。隨後可對本體乳液進行若干PCR擴增循環，使得珠粒在各微滴中塗上現有基因組片斷之純系複本。在擴增之後，將珠粒轉移至偵測基板中，在分析儀器中進行評估。ePCR的一個難題在於一些珠粒以不含基因組片斷之微滴結束，從而產生空白珠粒。雖然可在用於分析儀器中之前進行珠粒富集方法來移除空白珠粒；但是此方法繁瑣且低效。ePCR的另一個難題在於一些微滴以超過一個基因組片斷結束，從而產生混合的純系珠粒。雖然常常能夠在分析過程中鑑別且隨後忽略混合的純系珠粒，但是其存在會降低分析效率，且在一些情況下，降低分析之準確性。

【0006】 簇擴增提供一種用於捕捉且擴增遺傳物質的更加流線式的方法。在商業實施例中，捕捉基因組片段於基板表面上，在隨機位置形成「種子(seeds)」。在洗掉過量基因組片段(亦即，尚未捕捉之基因組片段)之後，進行若干擴增循環，產生純系複本，在表面上在各種子周圍形成簇。簇擴增相比於ePCR之優勢包括避免珠粒富集步驟、避免珠粒轉移步驟(自乳液轉移至偵測基板)及避免髒亂的且常常棘手的油性乳液。然而，商業簇擴增技術之潛在難題在於其於表面上形成簇之隨機圖案。雖然已開發出影像對準方案(image registration protocol)來定位及辨別隨機定位的簇，但是該等方案給分析裝置增加了額外的分析負荷。此外，隨機定位的簇往往不會像簇之空間有序圖案在理論上可能的那樣有效地填充表面。

【0007】 因此，需要改良用於診斷、預後及法醫學分析之遺傳物質的製備方法。本發明解決此需要且亦提供其他優勢。

【發明內容】

【0008】 在一實施例中，提供一種方法（例如，用於擴增核酸庫），該方法包括使第一溶液與不同的第二溶液於流量槽上反應，其係藉由使第一溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過且隨後使第二溶液從擴增位點陣列上流過。第一溶液包括多個目標核酸及包含核苷三磷酸（nucleoside triphosphate，NTP）及一或多種複製酶的第一試劑混合物。第一溶液中之目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至擴增位點。第一試劑混合物擴增與擴增位點結合的目標核酸，產生源自相應目標核酸之擴增子純系群體。擴增子係以超過運輸速率之擴增速率產生。第二溶液包括第二試劑混合物且不含目標核酸。第二溶液係用於增加在擴增位點處之純系群體中之擴增子的數目。

【0009】 在此方法之一實施例中，第二試劑混合物包括第一試劑混合物之NTP及一或多種複製酶。

【0010】 在此方法之一實施例中，流量槽包括複數個在擴增位點處連接至流量槽的引子，其中第一溶液於流量槽上反應以使目標核酸及擴增子與引子之第一子組結合，且其中第二溶液於流量槽上反應以產生額外擴增子且使額外擴增子與不同於第一子組的暴露的引子子組中之引子中的至少一些結合。

【0011】 此方法可進一步包括在第二溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過之前自流量槽移除第一溶液，使得當第二溶液從擴增位點陣列上流過時流量槽上僅有的目標核酸結合至流量槽且不在第一溶液內自由浮動。

【0012】 在此方法之一實施例中，擴增位點陣列沿著流量槽之表面設置，其中第一溶液經由流量槽之入口流過流量槽之表面，且其中第二溶液隨後經由入口流過流量槽之表面。

【0013】 在此方法之一實施例中，流量槽包括複數個在擴增位點處連接至流量槽的引子，其中引子中之至少一些作為第一溶液從擴增位點陣列上流過之反應而結合至第一溶液中之目標核酸，且其中不含目標核酸之第二溶液隨後從擴增位點陣列上流過不會導致引子與目標核酸之額外結合。

【0014】 在一實施例中，目標核酸僅在第一溶液之情況下從流量槽上之擴增位點陣列上流過。在此方法之另一實施例中，第一溶液及第二溶液從擴增位點陣列上等溫流過。

【0015】 在一些實施例中，第二試劑混合物包括NTP及聚合酶，且在其他實施例中，第二試劑混合物包括解旋酶及重組酶中之一或多者，且在另外其他實施例中，第二試劑混合物包括具有P5引子序列或P7引子序列中之至少一者的引子。

【0016】 在此方法之一實施例中，擴增位點為沿著流量槽之表面的孔，該等孔藉由沿著該表面的間隙區域相互隔開。

【0017】 此方法之一實施例進一步包含使用以下中之一或多者控制目標核酸至擴增位點之運輸速率：控制第一溶液中之目標核酸之濃度，控制第一溶液之黏度，控制目標核酸之平均大小，以及控制第一溶液中之分子擁擠試劑的存在或不存在。

【0018】 此方法之另一實施例進一步包含使用以下中之一或多者控制目標核酸之擴增速率：控制第一試劑混合物中之NTP之濃度，控制第一試劑混合物中之一或多種複製酶之濃度，以及控制擴增位點處之溫度。

【0019】 應理解，該方法之任何特徵可以任何所期望的方式及/或組態組合在一起。

【0020】 在另一實施例中，提供一種流體系統（例如，用於擴增核酸庫），該流體系統包括試劑歧管及控制器。試劑歧管包括至少一個與包括擴增位點陣

列之流量槽的入口流體連通的閥門。試劑歧管進一步包括複數個在至少一個閥門與相應試劑儲集器之間流體連接的通道。控制器包括一或多個處理器。控制器係用於控制至少一個閥門及泵，使第一溶液經由入口從流量槽上之擴增位點陣列上流過且隨後使不同的第二溶液經由入口從流量槽上之擴增位點陣列上流過。第一溶液包括多個目標核酸及包含核苷三磷酸（NTP）及一或多種複製酶的第一試劑混合物。第一溶液中之目標核酸之數目超過陣列中之擴增位點之數目。第一溶液於流量槽上反應，在擴增位點處產生源自相應目標核酸之擴增子純系群體。第一溶液中之目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至擴增位點。第一試劑混合物擴增與擴增位點結合之目標核酸，以超過運輸速率之擴增速率產生擴增子。第二溶液包括第二試劑混合物且不含目標核酸。第二溶液於流量槽上反應以增加在擴增位點處之擴增子純系群體中之擴增子的數目。

【0021】 在此流體系統之一實施例中，第二試劑混合物與第一試劑混合物具有相同組成。

【0022】 在此流體系統之一實施例中，控制器係用於控制至少一個閥門及泵，混合包括目標核酸之樣品模板與第一試劑混合物以形成第一溶液，且其中控制器係用於控制至少一個閥門及泵，藉由將第二試劑混合物混合在一起來形成第二溶液，不需要混合樣品模板與第二試劑混合物。在此流體系統之另一實施例中，控制器係用於控制至少一個閥門及泵，在第二溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過之前自流量槽移除第一溶液，使得當第二溶液從擴增位點陣列上流過時，所存在的僅有的目標核酸結合至流量槽且不在第一溶液內自由浮動。

【0023】 應理解，流體系統之任何特徵可以任何所期望的方式組合在一起。此外應理解，流體系統及/或方法之特徵的任何組合可一起使用，及/或來自此等態樣中之任一者或兩者的任何特徵可與本文所揭示之實施例中之任一者組合。

【0024】 在另一實施例中，提供一種方法（例如，用於擴增核酸庫），該方法包括在儲集器內混合第一試劑混合物與一定量的目標核酸以界定第一溶液。第一試劑混合物包含核苷三磷酸（NTP）及一或多種複製酶。該方法亦包括使來自儲集器之第一溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過。第一溶液中之目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至擴增位點。第一試劑混合物擴增與擴增位點結合的目標核酸，產生源自相應目標核酸之擴增子純系群體。擴增子係以超過運輸速率之擴增速率產生。在來自儲集器之第一溶液流過之後，方法包括在儲集器內混合第二試劑混合物以界定第二溶液，而無需向儲集器中添加額外量的目標核酸。第二試劑混合物包含新的數量的NTP及一或多種複製酶。方法進一步包括使來自儲集器之第二溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過。第二試劑混合物與擴增子反應以增加在擴增位點處之純系群體中之擴增子的數目。

【0025】 在此方法之一實施例中，第一試劑混合物及第二試劑混合物均包括緩衝劑組分，第二試劑混合物相對於第一試劑混合物包括更大數量之緩衝劑組分以補償在第二溶液內沒有添加額外量的目標核酸。

【0026】 應理解，該方法之此實施例之任何特徵可以任何所期望的方式組合在一起。此外應理解，來自此方法及/或流體系統及/或其他方法之特徵的任何組合可一起使用，及/或來自此等態樣中之任一者或所有態樣的任何特徵可與本文所揭示之實施例的特徵中之任一者組合。

【圖式簡單說明】

【0027】 參考以下實施方式及附圖，本發明之實施例之特徵將變得顯而易見，在附圖中，類似的圖式元件符號對應於類似但或許不相同的組件。出於簡潔起見，具有先前所述功能之圖式元件符號或特徵可以或可以不結合出現該等圖式元件符號或特徵之其他附圖來描述。

【0028】 圖1A顯示藉由動力排除產生之例示性圖案化流量槽在第一定序

循環之後獲得的合成影像（四色通道）。

【0029】 圖1B顯示具有隨機定位的簇的例示性流量槽在單個定序循環之後獲得的合成影像（四色通道）。

【0030】 圖2顯示使用藉由動力排除產生之例示性圖案化流量槽，在第一次定序循環之後獲得的合成影像之成對分佈函數（pair distribution function，PDF）及最近鄰（nearest neighbor，NN）函數。

【0031】 圖3顯示在一個實施例中，與PhiX基因組之前5個基因組位置比對的簇之空間位置的散佈圖。不同基因組位置由x、星號、正方形、三角形及菱形指示。

【0032】 圖4在（a）及（b）中顯示用於使物種自流量槽表面電化學脫附之例示性流量槽架構的示意性部分截面視圖，且亦在（c）中顯示來自（b）中所示之流量槽組態之電極表面在使用該流量槽組態進行去氧核糖核酸（deoxyribonucleic acid，DNA）之場輔助下拉（field assisted pull down）之後的全內反射螢光（total internal reflection fluorescence，TIRF）顯微鏡術影像。可如（a）中所見跨一個傳導面與電解質或如（b）中所示跨兩個傳導面施加電位。（b）中所示之流量槽組態亦可用於DNA之即時場輔助下拉，如（c）中所示，在幾秒之內於電極表面上達成超過100×之DNA濃度。

【0033】 圖5顯示電場輔助形成生物分子圖之例示性工作流程，及例示性工作流程在電場施加之前及之後的示意性部分截面視圖。

【0034】 圖6顯示，在一個實施例中，在電場存在下（a）及在不存在電場之情況下（b），氧化銦錫（indium tin oxide，ITO）背景上2 μm金（Au）特徵上之模板接種（seeding）及模板簇擴增。相應的線輪廓顯示標記區域內之螢光強度。

【0035】 圖7顯示，在一個實施例中，在電場存在下在接種及成簇之後的

大面積螢光影像。(a)顯示含有2 μm Au點的流量槽泳道；且(b)顯示含有200 nm Au點的泳道。比對大區域上之簇與微米圖案化及奈米圖案化特徵，藉由相應的傅立葉變換(Fourier Transform, FFT)確認此等簇之空間有序性質。

【0036】 圖8顯示在電場存在下於直徑700 nm之 SiO_2 位點形成例示性DNA簇。簇高度有序，來自間隙區域之螢光極少。

【0037】 圖9顯示，在一個實施例中，(a)流量槽(1)在電場輔助P5及P7引子接枝(primer grafting)之前，(2)在電場輔助P5及P7引子接枝之後，(3)在電場輔助P5及P7引子接枝及P5及P7引子再接枝之後，及(4)在電場輔助P5及P7引子接枝、無矽烷丙烯醯胺(silane-free acrylamide, SFA)再塗佈及P5及P7引子再接枝之後，在HISEQ®儀器中之雜交分析結果；及(b)描繪在各步驟之後，每個流量槽泳道之中值螢光強度(任意單位，a.u.)的圖。

【0038】 圖10顯示，在一個實施例中，(a)使用電場直接雜交於介電位點上之示意性圖示；(b)在核酸相斥電場(nucleic acid-repellant electric field)存在下在間隙區域形成的空間圖案化簇；及(c)在不存在核酸相斥電場的情況下在間隙區域形成的隨機有序簇。

【0039】 圖11為用於根據本文所揭示之實施例產生基因簇之方法的流程圖。

【0040】 圖12為條形圖，顯示在一個實施例中，關於不同簇產生方法，流量槽上之基因簇的信號強度(任意單位，a.u.)。

【0041】 圖13為條形圖，顯示在一個實施例中，圖12中所示之簇產生方法的篩選通過百分比(percent passing filter, PF%)值。

【0042】 圖14為根據本文所揭示之實施例產生基因簇之流體系統的圖解說明。

【實施方式】

【0043】 本發明提供核酸庫及核酸庫之製造方法。在特定實施例中，本發明之核酸庫採用位點陣列的形式。

【0044】 本申請案中所引用的所有文獻及類似材料，包括（但不限於）專利、專利申請案、文章、著作、論文及網頁，不管該等文獻及類似材料之形式如何，皆明確以全文引用之方式併入本文中。在所併入之文獻及類似材料中之一或者與本申請案不同或相矛盾的情況下，包括（但不限於）所定義之術語、術語用法、所描述之技術或其類似者，以本申請案為準。

【0045】 陣列可具有就特定核苷酸序列而言係純系的位點。因此，陣列中之個別位點可各自具有單核苷酸序列之多個複本。舉例而言，位點可具有源自生物樣品之核酸的純系複本，諸如基因組或其亞部分（例如外顯子組），或轉錄組（例如mRNA庫或cDNA庫）或其亞部分。

【0046】 陣列中之純系位點之分數可超過藉由葛瓦松分佈（Poisson distribution）所預測之分數。因此，藉由本文所闡述之方法產生之陣列可具有純系位點之超葛瓦松分佈（super-Poisson distribution）。超葛瓦松分佈可在陣列合成過程中產生且不需要後續位點富集或位點純化步驟（儘管在至少一些實施例中可在必要時進行富集及純化步驟）。

【0047】 在一些實施例中，位點可作為特徵存在於基板上（或基板中）。在該等實施例中，特徵可以係純系的，陣列中之純系特徵的分數可超過葛瓦松分佈，且特徵可以重複圖案進行空間排列。因此，位點可例如以直線網格、六邊形網格或其他所期望的圖案進行空間排序。

【0048】 本發明之核酸庫可使用利用動力排除之方法製得。當一過程以足夠快的速率發生，從而有效地排除另一事件或過程發生時，即發生動力排除。舉例而言，在擴增製程中產生這樣的核酸陣列，其中陣列之位點自目標核酸之溶液及複本隨機接種目標核酸，填滿接種位點中之每一者的容量。根據本發明

之動力排除方法，接種及擴增製程可在擴增速率超過接種速率的條件下同時進行。因此，在已接種第一目標核酸之位點處相對較快的複本產生速率將有效地排除第二核酸接種於該位點上進行擴增。用於擴增核酸庫之額外動力排除方法描述於US 2016/0053310 A1中，其以全文引用的方式併入本文中。

【0049】 動力排除可利用相對較慢的速率產生目標核酸之第一複本，對比相對較快的速率產生目標核酸或第一複本之後續複本。在上一段之實施例中，因為相對較慢的目標核酸接種速率（例如，相對較慢的擴散或運輸）對比相對較快的發生擴增以在位點填充核酸種子之複本的速率，所以發生動力排除。在另一實施例中，因為接種於位點之目標核酸之第一複本的形成延遲（例如延遲或緩慢活化）對比用於填充位點之後續複本之相對較快的產生速率，所以發生動力排除。在此實施例中，可在個別位點接種若干不同的目標核酸（例如，在擴增之前，可在各位點存在若干目標核酸）。然而，任何給定目標核酸之第一複本形成可隨機活化，使得第一複本之平均形成速率相比於後續複本之產生速率而言相對較慢。在此情況下，雖然可在個別位點接種若干不同目標核酸，但是動力排除將使得彼等目標核酸中僅一者得以擴增。更具體而言，一旦第一目標核酸經活化用於擴增，其複本將迅速填滿位點之容量，從而防止在該位點產生第二目標核酸之複本。

【0050】 藉由本文所闡述之方法產生的陣列之優勢在於，位點之純系性質在後續分析中提供準確性。這避免了在偵測具有混合群體之位點時本來可能出現的混雜結果。

【0051】 本文所闡述之陣列的另一優勢在於其具有純系位點之超葛瓦松分佈。這藉由避免本來可能因為隔離於混合位點中而發生的遺傳內容之缺失，增加了庫之複雜性。

【0052】 本文所闡述之方法及陣列的進一步優勢在於在基板上提供具有

特徵之陣列，其中特徵以重複圖案進行空間排列。如上文所闡述，純系特徵之分數可超過葡瓦松分佈。葡瓦松分佈設定最大約37%之佔有率。根據本文所闡述之方法，純系特徵之補數可超過約40%、約50%、約60%、約75%或更大。藉由本文所闡述之方法產生之陣列相比於隨機簇陣列提供更有效的基板填充。該等陣列亦藉由避免隨機簇陣列所用之影像對準方法之複雜性，更容易進行分析評估。

【0053】 此外，本文所闡述之方法有利於在圖案化基板上形成陣列以促進偵測。舉例而言，若干市售定序平台依賴於具有孔的基板，該等孔提供在序列偵測步驟期間偵測試劑（例如可自454 LifeSciences（Roche之子公司, Basel Switzerland）購得之平台中之焦磷酸鹽或可自Ion Torrent（Life Technologies之子公司, Carlsbad Calif.）購得之平台中之質子）擴散的屏障。相比於將受葡瓦松限制之標準簇擴增方法，本文所闡述之方法可有利於增加加載有純系群體之孔的數目。本發明方法亦藉由避免乳液操作及珠粒操控而優於ePCR方法。

【0054】 除非另外規定，否則本文所用之術語應理解為取其在相關技術領域中之普通含義。本文所用之若干術語及其含義闡述於下文中。

【0055】 如本文所用之術語「活性接種（active seeding）」係指強加於一或多個核酸上以朝向或遠離一位置移動核酸的非擴散力。位置可為陣列之擴增位點。非擴散力可由外部來源提供，諸如產生電場或磁場者，或在反應體積內強加分子擁擠或化學梯度的試劑。

【0056】 如本文所用之術語「擴增子（amplicon）」當關於核酸使用時意謂核酸之複製產物，其中產物具有與核酸之核苷酸序列之至少一部分相同或互補的核苷酸序列。擴增子可藉由使用核酸或其擴增子作為模板的各種擴增方法中之任一者產生，包括例如聚合酶延伸、聚合酶鏈反應（polymerase chain reaction, PCR）、滾環擴增（rolling circle amplification, RCA）、連接延伸或連接

鏈反應。擴增子可為具有特定核苷酸序列之單個複本（例如PCR產物）或核苷酸序列之多個複本（例如RCA之多聯產物）的核酸分子。目標核酸之第一擴增子可為互補複本。後續擴增子為在第一擴增子產生之後由目標核酸或由第一擴增子形成的複本。後續擴增子可具有與目標核酸至少實質上互補或與目標核酸至少實質上相同的序列。

【0057】 如本文所用之術語「擴增位點（amplification site）」係指在陣列中或在陣列上的可產生一或多個擴增子的位點。擴增位點可進一步經組態以含有、固定或連接至少一個在該位點處產生的擴增子。

【0058】 如本文所用之術語「陣列（array）」係指可根據相對位置相互區分的位點群體。在陣列不同位點處之不同分子可根據位點在陣列中之位置而相互區分。陣列之個別位點可包括一或多個特定類型的分子。舉例而言，位點可包括單個具有特定序列之目標核酸分子或位點可包括若干具有相同序列（及/或其互補序列）之核酸分子。陣列位點可為位於同一基板上之不同特徵。例示性特徵包括（但不限於）基板中之孔、基板中或基板上之珠粒（或其他顆粒）、基板之凸起、基板之脊線或基板中之通道。陣列位點可為各自攜帶不同分子的各別基板。連接至各別基板的不同分子可根據基板在與基板相關的表面上之位置或根據基板在液體或凝膠中之位置來鑑別。各別基板位於表面上之例示性陣列包括（但不限於）在孔中具有珠粒的陣列。

【0059】 如本文所用之術語「容量（capacity）」當關於位點及核酸材料使用時，意謂核酸材料可佔據位點之最大量。舉例而言，術語可指可在特定條件下佔據位點之核酸分子的總數。亦可使用其他量度，包括例如可在特定條件下佔據位點之核酸材料之總質量或特定核苷酸序列之複本的總數。位點關於目標核酸的容量可至少實質上等於位點關於目標核酸之擴增子的容量。

【0060】 如本文所用之術語「捕捉劑（capture agent）」係指能夠連接、持

留或結合至目標分子（例如目標核酸）的材料、化學物質、分子或其部分。例示性捕捉劑包括（但不限於）與目標核酸之至少一部分互補的捕捉核酸，能夠結合至目標核酸（或與其連接之連接部分）的受體-配體結合對之成員（例如抗生物素蛋白（**avidin**）、抗生蛋白鏈菌素（**streptavidin**）、生物素、凝集素、碳水化合物、核酸結合蛋白、抗原決定基、抗體等），或能夠與目標核酸（或與其連接之連接部分）形成共價鍵的化學試劑。

【0061】 如本文所用之術語「純系群體（**clonal population**）」係指就特定核苷酸序列而言係均質的核酸群體。均質序列可為至少約10個核苷酸長，但是可甚至更長，包括例如至少約50、約100、約250、約500或約1000個核苷酸長。純系群體可源自單個目標核酸或模板核酸。純系群體中之大部分（若非全部）核酸具有相同核苷酸序列。應理解，可在純系群體中出現少量突變（例如，因為擴增假影）而不背離純系性（**clonality**）。

【0062】 如本文所用之術語「變性循環（**denaturation cycle**）」係指操控核酸擴增反應，改變擴增反應之過程，使得互補核酸股變成相互分離。例示性操控包括例如引入使核酸變性的化學試劑，或藉由加熱或其他操控以物理方式更改反應，從而使核酸變性。可在循環擴增反應中包括若干變性循環。亦可包括若干其他循環，諸如用於誘導引子與核酸股雜交的循環操控。在本文所闡述之方法中，可省略一或多個變性循環或其他循環。因此，在至少一些實施例中，本發明之擴增反應無需循環操控即可進行。

【0063】 如本文所用之術語「不同」當關於核酸使用時，意謂核酸具有彼此不相同的核苷酸序列。兩個或更多個核酸可具有沿著其整個長度不同的核苷酸序列。或者，兩個或更多個核酸可具有沿著其長度之大部分不同的核苷酸序列。舉例而言，兩個或更多個核酸可具有彼此不同，但亦具有彼此相同的通用序列區域的目標核苷酸序列部分。

【0064】 如本文所用之術語「流體接近 (fluidic access)」當關於流體中之分子及與流體接觸之位點使用時，係指分子在流體中移動或移動穿過流體以接觸或進入位點的能力。術語亦可指分子與位點分離或離開位點進入溶液的能力。當不存在防止分子進入位點、接觸位點、與位點分離及/或離開位點的屏障時，即發生流體接近。然而應理解，即使擴散延緩、減少或改變，只要接近沒有絕對防止，就存在流體接近。

【0065】 如本文所用之術語「雙股」當關於核酸分子使用時，意謂核酸分子中之至少實質上所有核苷酸皆氫鍵鍵結至互補核苷酸。在部分雙股核酸中，其核苷酸之至少約10%、約25%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或約95%可氫鍵鍵結至互補核苷酸。

【0066】 如本文所用之術語「各 (each)」當關於項目集合使用時，意欲用於鑑別集合中之個別項目，但是除非上下文另外清楚地指示，否則不一定係指集合中之每一個項目。

【0067】 如本文所用之術語「約 (about)」當關於數值使用時指示所規定的大概值，諸如在值之 $\pm 5\%$ 內。

【0068】 如本文所用之術語「至少實質上 (at least substantially)」當關於修飾形容詞使用時，指示在主題形容詞或其附近的程度，諸如在 $\pm 5\%$ 容限之內。舉例而言，短語「至少實質上所有核酸」可指所有（例如100%）核酸或不到所有核酸，在指定容限之內，諸如核酸之95%-99.99%。

【0069】 如本文所用之術語「痕量 (trace amount)」係指混合物或溶液中之分析物之極低濃度，諸如小於或等於約100 ppm。

【0070】 如本文所用之術語「排除體積 (excluded volume)」係指由特定分子所佔據以排除其他此類分子的空間的體積。

【0071】 如本文所用之術語「可延伸的 (extendible)」或「可延伸狀態

(extendible state)」當關於諸如引子之核酸使用時，意謂核酸能勝任核苷酸的添加（例如經由聚合酶催化）或寡核苷酸的添加（例如經由連接酶催化）。因此，「非可延伸的（non-extendible）」或呈「非可延伸狀態（non-extendible state）」的核酸無法勝任，舉例而言係因為存在延伸阻斷部分或不存在3'羟基。

【0072】 如本文所用之術語「間隙區域（interstitial region）」係指基板中或表面上與基板或表面之其他區域隔開的區域。舉例而言，間隙區域可將陣列之一個特徵與陣列之另一特徵隔開。相互隔開的兩個區域可以係離散的，相互不接觸。在另一實施例中，間隙區域可將特徵之第一部分與特徵之第二部分隔開。由間隙區域提供之隔開可為部分隔開或完全隔開。間隙區域可具有不同於表面上之特徵之表面材料的表面材料。舉例而言，陣列之特徵所具有的捕捉劑或引子之量或濃度可超過間隙區域中所存在的量或濃度。在一些實施例中，捕捉劑或引子可不存在於間隙區域。

【0073】 如本文所用之術語「聚合酶（polymerase）」意欲與其在此項技術中之用法一致且包括例如使用核酸作為模板股產生核酸分子之互補複製的酶。DNA聚合酶可結合至模板股，且隨後沿模板股向下移動，向核酸之生長股之3'端的自由羟基依序添加核苷酸。DNA聚合酶自DNA模板合成互補DNA分子，且核糖核酸（ribonucleic acid，RNA）聚合酶自DNA模板合成RNA分子（轉錄）。聚合酶可使用稱為引子的短RNA或DNA股開始股生長。一些聚合酶可使位點上游之股移位，其中其向鏈中添加鹼基。該等聚合酶被稱為股移位，意謂其具有自模板股移除由聚合酶讀取之互補股的活性。具有股移位活性之例示性聚合酶包括例如脂肪嗜熱芽孢桿菌（*Bacillus stearothermophilus*，Bst）聚合酶、外克列諾聚合酶（exo-Klenow polymerase）或定序級T7外聚合酶之大片斷。一些聚合酶將其前面的股降解，有效地用後面的生長鏈替換該股（5'核酸外切酶活性）。一些聚合酶具有降解其後面之股的活性（3'核酸外切酶活性）。一些適用的聚合

酶已藉由突變或以其他方式進行修飾，以降低或消除3'及/或5'核酸外切酶活性。

【0074】 如本文所用之術語「核酸 (nucleic acid)」意欲與其在此項技術中之用法一致且包括天然存在的核酸或其功能性類似物。尤其適用的功能性類似物能夠以序列特異性方式與核酸雜交或能夠用作特定核苷酸序列之複製模板。天然存在的核酸一般具有含有磷酸二酯鍵的主鏈。類似物結構可具有替代性主鏈鍵聯，包括此項技術中已知之各種主鏈鍵聯中之任一者。天然存在的核酸一般具有去氧核糖（例如，去氧核糖核酸（DNA）中所發現的）或核糖（例如，核糖核酸（RNA）中所發現的）。核酸可含有此項技術中已知的此等糖部分之各種類似物中之任一者。核酸可包括天然或非天然鹼基。就此而言，天然去氧核糖核酸可具有一或多個選自由腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或鳥嘌呤組成之群的鹼基，且核糖核酸可具有一或多個選自由尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鳥嘌呤組成之群的鹼基。可包括在核酸中的適用的非天然鹼基為此項技術中已知的。術語「目標 (target)」當關於核酸使用時，意欲作為在本文所闡述之方法或組成物的情況下的核酸的語義標識符，且不一定限制核酸之結構或功能，超出明確指示的內容。

【0075】 如本文所用之術語「速率 (rate)」當關於運輸、擴增、捕捉或其他化學製程使用時，意欲與其在化學動力學及生化動力學中之含義一致。可相對於最大速率（例如在飽和時）、穩態前速率（例如在平衡之前）、動力學速率常數或此項技術中已知的其他量度，比較兩種製程之速率。在特定實施例中，特定製程之速率可根據完成該製程之總時間來判定。舉例而言，擴增速率可根據完成擴增所需之時間來判定。然而，特定製程之速率不必根據完成該製程之總時間來判定。

【0076】 如本文所用之術語「重組酶 (recombinase)」意欲與其在此項技術中之用法一致且包括例如RecA蛋白、T4 uvsX蛋白、來自任何門的任何同源蛋

白質或蛋白質複合物、或其功能變異體。真核RecA同源物一般在此組中所鑑別之第一成員之後命名Rad51。可採用其他非同源重組酶替代RecA，例如RecT或RecO。

【0077】 如本文所用之術語「單股結合蛋白（single stranded binding protein）」意欲指任何具有與單股核酸結合之功能的蛋白質，例如防止提前黏合、保護單股核酸不被核酸酶消化、自核酸移除二級結構或促進核酸之複製。該術語意欲包括例如由國際生物化學與分子生物學聯合會命名委員會（Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology，NC-IUBMB）正式鑑別為單股結合蛋白的蛋白質。例示性單股結合蛋白包括例如大腸桿菌（*E. coli*）SSB、T4 gp32、T7基因2.5 SSB、噬菌體phi 29 SSB、來自任何門的任何同源蛋白質或蛋白質複合物、或其功能變異體。

【0078】 如本文所用之術語「運輸（transport）」係指分子經由流體之移動。該術語可包括被動運輸，諸如分子沿著其濃度梯度移動（例如被動擴散）。該術語亦可包括主動運輸，其中分子可沿著其濃度梯度或逆著其濃度梯度移動。因此，運輸可包括施加能量以使一或多個分子沿著所期望的方向移動或移動至所期望的位置，諸如擴增位點。

【0079】 如本文所用之術語「通用序列（universal sequence）」係指兩個或更多個核酸分子共用的序列區域，其中分子亦具有彼此不同的序列區域。存在於分子集合之不同成員中之通用序列可允許使用與通用序列互補之通用捕捉核酸群體捕捉多個不同核酸。類似地，存在於分子集合之不同成員中之通用序列可允許使用與通用序列互補之通用引子群體複製或擴增多個不同核酸。因此，通用捕捉核酸或通用引子包括可專門雜交至通用序列之序列。目標核酸分子可經修飾以連接通用接頭（universal adapter），例如在不同目標序列之一端或兩端。

【0080】 本發明揭示一種用於擴增核酸之方法。方法包括（a）提供擴增試劑，擴增試劑包括（i）擴增位點陣列，及（ii）具有複數個不同目標核酸之溶液；及（b）使擴增試劑反應，產生複數個各自具有來自溶液之個別目標核酸之擴增子純系群體的擴增位點，其中反應包括同時（i）以平均運輸速率運輸不同目標核酸至擴增位點，及（ii）在擴增位點以平均擴增速率擴增目標核酸，其中平均擴增速率超過平均運輸速率。在特定實施例中，溶液中之不同目標核酸之數目超過陣列中之擴增位點之數目。不同目標核酸對複數個擴增位點具有流體接近。此外，擴增位點中之每一者可視情況具有用於複數個不同核酸中之若干核酸的容量。

【0081】 亦揭示一種用於擴增核酸之方法，該方法包括（a）提供擴增試劑，擴增試劑包括（i）擴增位點陣列，及（ii）具有複數個不同目標核酸之溶液；及（b）與擴增試劑反應，產生複數個各自包括來自溶液之個別目標核酸之擴增子純系群體的擴增位點，其中反應包括（i）在擴增位點中之每一者自個別目標核酸產生第一擴增子，及（ii）在擴增位點中之每一者自個別目標核酸或自第一擴增子產生後續擴增子，其中在擴增位點產生後續擴增子之平均速率超過在擴增位點產生第一擴增子之平均速率。在特定實施例中，溶液中之不同目標核酸之數目超過陣列中之擴增位點之數目。不同目標核酸對複數個擴增位點具有流體接近。此外，擴增位點中之每一者可視情況具有用於複數個不同核酸中之若干核酸的容量。

【0082】 本發明進一步揭示一種用於擴增核酸之方法，該方法包括（a）提供擴增試劑，擴增試劑包括（i）擴增位點陣列，及（ii）具有複數個不同目標核酸之溶液；及（b）使擴增試劑反應，產生複數個各自具有來自溶液之個別目標核酸之擴增子純系群體的擴增位點。反應包括同時（i）在擴增位點以平均捕捉速率捕捉不同目標核酸，及（ii）以平均擴增速率擴增在擴增位點所捕捉的目

標核酸。平均擴增速率超過平均捕捉速率。

【0083】 亦揭示一種用於擴增核酸之方法，該方法包括（a）提供擴增試劑，擴增試劑包括（i）擴增位點陣列，及（ii）具有複數個不同目標核酸之溶液；及（b）使擴增試劑反應，產生複數個各自包括來自溶液之個別目標核酸之擴增子純系群體的擴增位點。反應包括（i）自擴增位點所捕捉的個別目標核酸產生第一擴增子，及（ii）自擴增位點中之每一者所捕捉的個別目標核酸或自第一擴增子產生後續擴增子。在擴增位點產生後續擴增子之平均速率超過在擴增位點產生第一擴增子之平均速率。

【0084】 進一步揭示一種用於形成生物分子之圖案化表面的方法，該方法包括（a）提供一種試劑，該試劑包括（i）在表面上具有非相鄰特徵以使得特徵由表面之間隙區域隔開的陣列，及（ii）具有複數個不同目標生物分子之溶液；及（b）使試劑反應以將生物分子運輸至特徵且將個別生物分子連接至特徵中之每一者。向間隙區域施加電場以使生物分子與間隙區域排斥。

【0085】 本文所闡述之方法中所用的擴增位點陣列可作為一或多個基板而存在。可用於陣列之基板材料之實例包括玻璃（例如改質玻璃、功能化玻璃、無機玻璃）、微球體（例如惰性及/或磁性顆粒）、塑膠、多醣、耐綸（nylon）、硝化纖維素、陶瓷、樹脂、二氧化矽、基於二氧化矽之材料、碳、金屬、光纖或光纖束、聚合物及多孔（例如微量滴定）盤。例示性塑膠包括丙烯酸塑膠、聚苯乙烯、苯乙烯與其他材料之共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚胺甲酸酯及聚四氟乙烯（例如來自DuPont之TEFLON®）。例示性基於二氧化矽之材料包括矽及各種形式之改質矽。

【0086】 在特定實施例中，基板可在容器內或為容器之一部分，諸如孔、管、通道、光析管、培養皿（Petri plate）、瓶或其類似物。尤其適用的容器為流量槽，例如如美國專利公開案第2010/0111768 A1號或Bentley等人，*Nature*

456:53-59 (2008)中所述，其各自以全文引用的方式併入本文中。例示性流量槽為可購自Illumina公司 (San Diego, Calif.) 之流量槽。另一尤其適用的容器為多孔盤或微量滴定盤中之孔。

【0087】 在一些實施例中，陣列位點可經組態為表面上之特徵。特徵可以各種所期望的形式中之任一者存在。舉例而言，位點可為孔、凹坑、通道、脊線、凸起區域、釘、柱或其類似物。如上文所闡述，位點可含有珠粒。然而，在特定實施例中，位點不必含有珠粒或顆粒。例示性位點包括存在於由454 LifeSciences (Roche之子公司，Basel Switzerland) 或Ion Torrent (Life Technologies之子公司，Carlsbad Calif.) 所出售之商業定序平台所用之基板中的孔。其他具有孔之基板包括例如蝕刻光纖及以下各者中所述之其他基板：美國專利第6,266,459號；美國專利第6,355,431號；美國專利第6,770,441號；美國專利第6,859,570號；美國專利第6,210,891號；美國專利第6,258,568號；美國專利第6,274,320號；美國專利公開案第2009/0026082 A1號；美國專利公開案第2009/0127589 A1號；美國專利公開案第2010/0137143 A1號；美國專利公開案第2010/0282617 A1號或PCT公開案第WO 00/63437號，其各自以全文引用的方式併入本文中。在若干情況下，此等參考文獻中舉例說明的基板係用於在孔中使用珠粒的應用。在本發明之方法或組成物中可使用含孔基板，含或不含珠粒。在一些實施例中，基板之孔可包括凝膠材料 (含或不含珠粒)，如美國專利第9,512,422號中所闡述，其以全文引用的方式併入本文中。

【0088】 陣列位點可為非金屬表面上之金屬特徵，非金屬表面諸如玻璃、塑膠或以上舉例說明的其他材料。可使用此項技術中已知之方法在表面上沈積金屬層，該等方法諸如濕式電漿蝕刻、乾式電漿蝕刻、原子層沈積、離子束蝕刻、化學氣相沈積、真空濺鍍或其類似方法。適當時可使用各種商業儀器中之任一者，包括例如FLEXAL®、OPAL™、IONFAB® 300plus或OPTOFAB® 3000

系統(Oxford Instruments, UK)。亦可如以全文引用的方式併入本文中之Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977)中所闡述，藉由電子束蒸發或濺鍍沈積金屬層。金屬層沈積技術，諸如以上舉例說明的金屬層沈積技術，可與光刻技術組合在表面上產生金屬區域或片。用於組合金屬層沈積技術與光刻技術之例示性方法提供在下文實施例I及II中及美國專利第8,778,848號中，其以全文引用的方式併入本文中。

【0089】 特徵陣列可表現為點或片之網格。特徵可以重複圖案或以不規則非重複圖案定位。尤其適用的圖案為六邊形圖案、直線圖案、網格圖案、具有反射對稱性之圖案、具有旋轉對稱性之圖案或類似圖案。不對稱圖案亦可為適用的。不同的最近鄰特徵對之間的間距可相同或不同的最近鄰特徵對之間的間距可不同。在特定實施例中，陣列之特徵所具有之面積可各自大於約 100 nm^2 、約 250 nm^2 、約 500 nm^2 、約 $1\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $2.5\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $5\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $10\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $100\text{ }\mu\text{m}^2$ 或約 $500\text{ }\mu\text{m}^2$ 。或者或另外，陣列之特徵所具有之面積可各自小於約 1 mm^2 、約 $500\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $100\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $25\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $10\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $5\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 $1\text{ }\mu\text{m}^2$ 、約 500 nm^2 或約 100 nm^2 。實際上，區域所具有之大小可在選自以上舉例說明之值的上限及下限之間的範圍內。

【0090】 關於在表面上包括特徵之陣列的實施例，特徵可為離散的，由間隙區域隔開。特徵及/或區域之間的間隔大小可不同，使得陣列可為高密度、中等密度或較低密度。高密度陣列之特徵在於具有間隔小於約 $15\text{ }\mu\text{m}$ 之區域。中等密度陣列具有間隔約 15 至約 $30\text{ }\mu\text{m}$ 之區域，而低密度陣列具有間隔大於約 $30\text{ }\mu\text{m}$ 之區域。適用於一或多個實施例中之陣列可具有間隔小於約 $100\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $50\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $10\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、約 $1\text{ }\mu\text{m}$ 或約 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 之區域。

【0091】 在特定實施例中，陣列可包括珠粒或其他顆粒之集合。顆粒可懸浮於溶液中或其可位於基板表面上。在溶液中之珠粒陣列之實例為Luminex

(Austin, Tex.)之商業化珠粒陣列。珠粒位於表面上之陣列的實例包括如下陣列，其中珠粒位於孔中，諸如BEADCHIP™陣列 (Illumina公司, San Diego Calif.)，或來自454 LifeSciences(Roche之子公司, Basel Switzerland)或Ion Torrent (Life Technologies之子公司, Carlsbad Calif.)之定序平台中所用之基板中。珠粒位於表面上之其他陣列描述於以下各者中：美國專利第6,266,459號；美國專利第6,355,431號；美國專利第6,770,441號；美國專利第6,859,570號；美國專利第6,210,891號；美國專利第6,258,568號；美國專利第6,274,320號；美國專利公開案第2009/0026082 A1號；美國專利公開案第2009/0127589 A1號；美國專利公開案第2010/0137143 A1號；美國專利公開案第2010/0282617 A1號或PCT公開案第WO 00/63437號，其各自以全文引用的方式併入本文中。以上若干參考文獻描述用於在將珠粒加載於陣列基板中或陣列基板上之前使目標核酸與珠粒連接的方法。然而，應理解，可使珠粒包括擴增引子且隨後可用該等珠粒加載陣列，從而形成用於本文所闡述之方法中的擴增位點。如本文先前所闡述，可使用不含珠粒之基板。舉例而言，可將擴增引子直接連接至孔或孔中之凝膠材料。因此，參考文獻為可經改質以用於本文所闡述之方法及組成物中的材料、組成物或設備的舉例說明。

【0092】 陣列之擴增位點可包括複數種能夠結合至目標核酸之捕捉劑。例示性捕捉劑包括具有連接至目標核酸之各別結合搭配物 (binding partner) 的受體及/或配體，其實例如本文先前所闡述。尤其適用的捕捉劑為與一或多個目標核酸之序列互補的捕捉核酸。舉例而言，存在於擴增位點之捕捉核酸可具有與各目標核酸之接頭序列中所存在的通用序列互補的通用捕捉序列。在一些實施例中，捕捉核酸亦可用作用於擴增目標核酸之引子 (無論其是否亦含有通用序列)。

【0093】 在特定實施例中，捕捉劑，諸如捕捉核酸，可連接至擴增位點。

舉例而言，捕捉劑可連接至陣列特徵之表面。該連接可經由諸如珠粒、顆粒或凝膠之中間結構。捕捉核酸與陣列經由凝膠之連接顯示於以下實施例I中且藉由可購自Illumina公司（San Diego, Calif.）或描述於以全文引用的方式併入本文中之WO 2008/093098中之流量槽進一步舉例說明。可用於本文所闡述之方法及設備中之例示性凝膠包括（但不限於）具有以下結構的凝膠：膠狀結構，諸如瓊脂糖；聚合物網狀結構，諸如明膠；或交聯聚合物結構，諸如聚丙烯醯胺、SFA（參見例如美國專利公開案第2011/0059865 A1號，其以全文引用的方式併入本文中）或聚（N-(5-疊氮基乙醯胺基戊基)丙烯醯胺-共-丙烯醯胺（poly(N-(5-azidoacetamidylpentyl) acrylamide-co-acrylamide, PAZAM）（參見例如美國專利第9,012,022號，其以全文引用的方式併入本文中）。經由珠粒之連接可如本說明書中舉例說明且本文先前所闡述之參考文獻中所列舉般達成。

【0094】 在一些實施例中，陣列基板表面上之特徵為非相鄰的，藉由表面之間隙區域隔開。相比於陣列特徵，具有實質上較低數量或濃度之捕捉劑的間隙區域為有利的。缺乏捕捉劑之間隙區域尤其有利。舉例而言，間隙區域相對較小量之捕捉部分或不存在捕捉部分有利於目標核酸定位於所期望之特徵上，且隨後產生簇。在特定實施例中，特徵可為表面中之凹入特徵（例如孔）且特徵可含有凝膠材料。含凝膠特徵可藉由表面上之間隙區域相互隔開，其中凝膠至少實質上不存在，或者若存在，則凝膠至少實質上不能支撐核酸之定位。用於製造及使用具有諸如孔之含凝膠特徵之基板的方法及組成物闡述於美國專利第9,512,422號中，其以全文引用的方式併入本文中。

【0095】 本發明之方法或組成物中所用的目標核酸可由DNA、RNA或其類似物組成。目標核酸之來源可為基因組DNA、信使RNA或其他來自天然來源之核酸。在一些情況下，源自此類來源之目標核酸可在用於本文中之方法或組成物中之前擴增。可使用各種已知擴增技術中之任一者，包括（但不限於）聚

合酶鏈反應（PCR）、滾環擴增（RCA）、多重置換擴增（multiple displacement amplification, MDA）或隨機引發擴增（random prime amplification, RPA）。應理解，目標核酸在用於本文所闡述之方法或組成物中之前擴增係視情況而定的。因此，在本文所闡述之方法及組成物之一些實施例中，目標核酸將不在使用之前擴增。目標核酸可視情況源自合成庫。合成核酸可具有天然DNA或RNA組成或可為其類似物。

【0096】 可獲得目標核酸之例示性生物樣品包括例如來自以下各者之生物樣品：哺乳動物，諸如啮齒類、小鼠、大鼠、兔、天竺鼠（guinea pig）、有蹄類、馬、羊、豬、山羊、牛、貓、狗、靈長類、人類或非人類靈長類；植物，諸如阿拉伯芥（*Arabidopsis thaliana*）、玉米、高粱、燕麥、小麥、水稻、芥花或大豆；藻類，諸如萊茵衣藻（*Chlamydomonas reinhardtii*）；線蟲，諸如秀麗隱桿線蟲（*Caenorhabditis elegans*）；昆蟲，諸如黑腹果蠅（*Drosophila melanogaster*）、蚊子、果蠅、蜜蜂或蜘蛛；魚，諸如斑馬魚；爬蟲類；兩棲類，諸如蛙或有爪蟾蜍（*Xenopus laevis*）；盤基網柄菌（*dictyostelium discoideum*）；真菌，諸如肺囊蟲（*pneumocystis carinii*）、虎河魴（*Takifugu rubripes*）、酵母、釀酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）或粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）；或惡性瘧原蟲（*plasmodium falciparum*）。目標核酸亦可源自原核生物，諸如細菌、大腸桿菌（*Escherichia coli*）、葡萄球菌（*staphylococci*）或肺炎黴漿菌（*mycoplasma pneumoniae*）；古細菌；病毒，諸如C型肝炎病毒或人類免疫缺乏病毒；或類病毒。目標核酸可源自以上生物之均質培養物或群體或者源自若干不同生物之集合，例如群落或生態系統。

【0097】 目標核酸不必源自天然來源且相反可使用已知技術合成。舉例而言，可合成並使用基因表現探針或基因分型探針產生本文所闡述之方法中之陣列。

【0098】 在一些實施例中，目標核酸可以一或多個較大核酸之片段形式獲得。可使用此項技術中已知之各種技術中之任一者進行片段化，包括例如霧化、音波處理、化學裂解、酶促裂解或物理剪切。片段化亦可藉由使用特定擴增技術產生，該特定擴增技術藉由僅複製較大核酸之一部分來產生擴增子。舉例而言，PCR擴增產生片段，該等片段所具有的大小由介於用於擴增之側接引子之間的片斷長度界定。

【0099】 目標核酸或其擴增子之群體可具有所期望的或適合於本文所闡述之方法或組成物之特定應用的平均股長度。舉例而言，平均股長度可小於約100,000個核苷酸、約50,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約1,000個核苷酸、約500個核苷酸、約100個核苷酸或約50個核苷酸。或者或另外，平均股長度可大於約10個核苷酸、約50個核苷酸、約100個核苷酸、約500個核苷酸、約1,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約50,000個核苷酸或約100,000個核苷酸。目標核酸或其擴增子之群體的平均股長度可在上文所闡述之最大值與最小值之間的範圍內。應理解，產生於擴增位點處（或以其他方式製得或本文所用）的擴增子可具有在選自以上舉例說明之值的上限與下限之間的範圍內的平均股長度。

【0100】 在一些情況下，目標核酸之群體可在一定條件下產生或以其他方式經組態以使其成員具有最大長度。舉例而言，本文所闡述之方法中所用的或特定組成物中所存在的成員的最大長度可小於約100,000個核苷酸、約50,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約5,000個核苷酸、約1,000個核苷酸、約500個核苷酸、約100個核苷酸或約50個核苷酸。或者或另外，目標核酸或其擴增子之群體可在一定條件下產生或以其他方式經組態以使其成員具有最小長度。舉例而言，本文所闡述之方法中所用的或特定組成物中所存在的成員的最小長度可大於約10個核苷酸、約50個核苷酸、約100個核苷酸、約500個核苷酸、約1,000個

核苷酸、約5,000個核苷酸、約10,000個核苷酸、約50,000個核苷酸或約100,000個核苷酸。群體中之目標核酸之最大及最小股長度可在上文所闡述之最大值與最小值之間的範圍內。應理解，產生於擴增位點處（或以其他方式製得或本文所用）的擴增子可具有在以上舉例說明之上限與下限之間的範圍內的最大及/或最小股長度。

【0101】 在特定實施例中，相對於擴增位點之面積設定目標核酸之大小以例如促進動力排除。舉例而言，陣列位點中之每一者的面積可大於目標核酸之排除體積之直徑以便達成動力排除。舉例而言，就利用表面上之特徵陣列之實施例而言，特徵中之每一者的面積可大於轉移至擴增位點之目標核酸之排除體積的直徑。目標核酸之排除體積及其直徑可例如由目標核酸之長度決定。用於確定核酸之排除體積及排除體積之直徑的方法描述於例如美國專利第7,785,790號；Rybenkov等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5307-5311 (1993)；Zimmerman等人, *J. Mol. Biol.* 222:599-620 (1991)；或Sobel等人, *Biopolymers* 31:1559-1564 (1991)中，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0102】 陣列之擴增位點可包括複數個用於自目標核酸產生擴增子的引子。在一些實施例中，存在於擴增位點之引子可具有與各目標核酸之接頭序列中所存在的通用序列互補的通用引發序列。在特定實施例中，可將複數個引子連接至擴增位點。引子可如上文關於捕捉核酸所闡述般連接至擴增位點。

【0103】 如本文先前所闡述，陣列基板之表面上之特徵可為非相鄰的，由表面之間隙區域隔開。在特定實施例中，相比於陣列特徵，間隙區域將具有實質上較低數量或濃度之引子。缺乏引子之間隙區域尤其有利。舉例而言，間隙區域相對較小量之引子或不存在引子有利於擴增子定位於陣列表面上之特徵上。此組態為各陣列特徵形成了邊界，從而賦予特徵有限的擴增子容量，擴增子藉由本文所闡述之方法中所接種的目標核酸之擴增產生。

【0104】 本發明方法可包括使擴增試劑反應產生複數個擴增位點，該等擴增位點各自包括來自已接種於位點上之個別目標核酸的擴增子純系群體。在一些實施例中，擴增反應一直進行到產生足夠數目之擴增子填充各別擴增位點之容量為止。以此方式填充已接種位點之容量不包括後續目標核酸連接於該位點，從而在該位點產生擴增子純系群體。因此，期望在一些實施例中，產生擴增子以填充擴增位點之容量的速率超過個別目標核酸分別轉移至個別擴增位點之速率。

【0105】 在一些實施例中，即使擴增位點在第二目標核酸到達該位點之前仍未填滿容量，仍可達成表觀純系性。在一些條件下，第一目標核酸之擴增可繼續進行至如此程度，其產生足夠數目之複本以有效勝過或完全蓋過轉移至該位點之第二目標核酸之複本的產生。舉例而言，在對直徑小於約500 nm之圓形特徵使用橋式擴增方法的實施例中，已確定，在第一目標核酸之14個指數擴增循環之後，同一位點處來自第二目標核酸之污染所產生的污染性擴增子之數目將不足以不利地影響在Illumina定序平台上的合成定序 (sequencing-by-synthesis) 分析。

【0106】 如以上實施例所證明，在所有實施例中，陣列中之擴增位點不必完全是純系的。相反地，針對一些應用，個別擴增位點可主要填入來自第一目標核酸之擴增子且亦可具有低含量之來自第二目標核酸的污染性擴增子。陣列可具有一或多個具有低含量污染性擴增子之擴增位點，只要污染程度對陣列之後續使用不造成不可接受的影響即可。舉例而言，當陣列係用於偵測應用中時，可接受的污染程度將為不以不可接受的方式影響偵測技術之信號對雜訊或解析度的程度。因此，表觀純系性一般將與由本文所闡述之方法製得的陣列之特定用途或應用有關。特定應用在個別擴增位點處可接受的例示性污染程度包括（但不限於）至多約0.1%、約0.5%、約1%、約5%、約10%或約25%的污染性擴增子。

陣列可包括一或多個具有此等例示性含量之污染性擴增子的擴增位點。舉例而言，陣列中之擴增位點之至多約5%、約10%、約25%、約50%、約75%或甚至約100%可具有一些污染性擴增子。

【0107】 在特定實施例中，執行本發明方法以同時（i）將目標核酸以平均運輸速率運輸至擴增位點，及（ii）以平均擴增速率擴增在擴增位點處的目標核酸，其中平均擴增速率超過平均運輸速率。因此，在該等實施例中，可藉由使用相對較慢的運輸速率達成動力排除。舉例而言，可選擇足夠低的目標核酸濃度來達成所期望的平均運輸速率，較低的濃度導致較慢的平均運輸速率。或者或另外，可使用高黏度溶液及/或在溶液中存在分子擁擠試劑（本文中稱為擁擠劑）來降低運輸速率。適用的擁擠試劑之實例包括（但不限於）聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）、FICOLL®、聚葡萄糖或聚乙烯醇。例示性擁擠試劑及調配物闡述於美國專利第7,399,590號中，其以全文引用的方式併入本文中。可經過調整以達成所期望的運輸速率的另一因素為目標核酸之平均大小。

【0108】 在方法之一些實施例中，目標核酸在開始擴增之前可例如藉由擴散或其他方法轉移至擴增位點。在此情況下，動力排除可藉由利用相比於後續擴增子之產生速率而言相對較慢的第一擴增子形成速率來達成。舉例而言，可藉由使用最初呈臨時非可延伸狀態的第一引子用於第一擴增子形成且使用在整個擴增反應中呈可延伸狀態的其他引子用於後續擴增子形成來達成不同的擴增子形成速率。因此，第一引子至可延伸狀態之轉換延遲將引起第一擴增子形成延遲，然而後續擴增子形成不經歷該延遲。以此方式，在擴增位點產生後續擴增子之平均速率超過在擴增位點產生第一擴增子之平均速率。

【0109】 接下來為經由不同的擴增子形成速率達成之動力排除的更詳細的實施例。擴增位點可包括與其連接之三個引子亞群。第一引子亞群用於捕捉目標核酸（經由捕捉序列）且作為用於第一擴增子形成之引子。舉例而言，經

由3'端之二去氧基核苷酸可逆地阻斷第一引子亞群之延伸。第二引子亞群可具有P5引子序列且第三引子群體可具有P7引子序列。第一及第二亞群之引子不包括二去氧基核苷酸且因此可勝任完全延伸。目標核酸可構築成包括（自5'至3'）P7引子結合序列、若干不同目標核苷酸序列中之一者、P5引子結合序列及捕捉序列互補序列。若干不同目標核酸可與第一引子亞群雜交（經由捕捉序列）。隨後可將捕捉引子轉換為可延伸狀態，例如藉由用聚合酶在焦磷酸解條件下（例如，在過量焦磷酸鹽存在下）處理。可使用這樣的條件，其中在產生後續擴增子以填充擴增位點的一段時間內，捕捉引子中平均僅一者轉換為可延伸形式。因此，雖然在個別擴增位點可能存在若干可能污染性目標核酸，但是動力排除將導致僅自目標核酸中之一者形成擴增子，從而在擴增位點處形成擴增子純系群體。為達成說明之目的，此實施例係關於單個擴增位點來加以描述，但是應理解，反應可涉及擴增位點陣列處之目標核酸連接及擴增。

【0110】 可在本文所闡述之方法中連同用於將彼等引子轉換為可延伸狀態之各別技術及試劑一起使用各種臨時非可延伸引子中之任一者。以上實施例描述藉由焦磷酸解移除之二去氧基核苷酸的用途。可在引子上存在其他非可延伸的核苷酸且藉由焦磷酸解移除。此外，二去氧基核苷酸或其他非可延伸的核苷酸可經由其他已知技術移除，包括例如聚合酶或其他適當酶之核酸外切酶活性。在其他實施例中，引子可包括可逆終止劑，諸如基於終止劑之合成定序法中所用之可逆終止劑。可逆終止子及其移除技術的實例描述於例如以下各者中：Bentley等人, Nature 456:53-59 (2008)；WO 04/018497；美國專利第7,057,026號；WO 91/06678；WO 07/123744；美國專利第7,329,492號；美國專利第7,211,414號；美國專利第7,315,019號；美國專利第7,405,281號及美國專利公開案第2008/0108082號，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0111】 雖然上文在目標核酸在擴增之前存在於擴增位點這一實施例中

舉例說明了使用不同活性的引子以引起第一擴增子及後續擴增子的不同形成速率，但是方法亦可在如下條件下進行，其中目標核酸在正發生擴增時轉移（例如經由擴散）至擴增位點。因此，動力排除可利用相對較慢之運輸速率及相對於後續擴增子形成而言相對較慢的第一擴增子產生。因此，可進行本文所闡述之擴增反應，使得目標核酸自溶液轉移至擴增位點，同時（i）產生第一擴增子，及（ii）在陣列之其他位點產生後續擴增子。在特定實施例中，在擴增位點產生後續擴增子之平均速率可超過目標核酸自溶液轉移至擴增位點之平均速率。在一些情況下，可在個別擴增位點由單個目標核酸產生足夠數目之擴增子以填滿各別擴增位點之容量。產生擴增子以填滿各別擴增位點之容量的速率可例如超過個別目標核酸自溶液轉移至擴增位點之速率。

【0112】 本文所闡述之方法中所用的擴增試劑較佳能夠在擴增位點迅速地製造目標核酸之複本。本發明方法中所用之一或多種擴增試劑將包括聚合酶及核苷三磷酸（NTP）。可使用此項技術中已知之各種聚合酶中之任一者，但是在一些實施例中，可能期望使用核酸外切酶陰性聚合酶。NTP可為去氧核苷三磷酸（deoxyribonucleoside triphosphate，dNTP），例如其中製得DNA複本。dNTP之四種天然物種包括dATP、dTTP、dGTP及dCTP，可存在於DNA擴增試劑中；然而，必要時可使用類似物。NTP可為核苷三磷酸（ribonucleoside triphosphate，rNTP），例如其中製得RNA複本。rNTP之四種天然物種包括rATP、rUTP、rGTP及rCTP，可存在於RNA擴增試劑中；然而，必要時可使用類似物。

【0113】 擴增試劑可包括促進擴增子形成且在一些情況下增加擴增子形成速率的另外組分。實例為重組酶。重組酶可藉由允許重複侵入/延伸而促進擴增子形成。更具體而言，重組酶可藉由聚合酶促進目標核酸之侵入及藉由聚合酶，使用目標核酸作為擴增子形成之模板，促進引子之延伸。此方法可以鏈反應形式重複，在鏈反應中，由各輪侵入/延伸產生之擴增子充當後一輪中之模板。

因為不需要變性循環（例如經由加熱或化學變性），所以該方法可比標準PCR更迅速地進行。因此，由重組酶促進之擴增可等溫進行。一般期望在由重組酶促進之擴增試劑中包括ATP或其他核苷酸（或在一些情況下，其不可水解的類似物）來促進擴增。重組酶與單股結合（single stranded binding，SSB）蛋白質之混合物尤其適用，因為SSB可進一步促進擴增。由重組酶促進之擴增的例示性調配物包括由TwistDx（Cambridge, UK）以TWISTAMP®套組在商業上出售的調配物。由重組酶促進之擴增試劑的適用組分及反應條件闡述於美國專利第5,223,414號及美國專利第7,399,590號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0114】 可包括於擴增試劑中以促進擴增子形成且在一些情況下增加擴增子形成速率的組分之另一實例為解旋酶。解旋酶可藉由允許擴增子形成之鏈反應而促進擴增子形成。因為不需要變性循環（例如經由加熱或化學變性），所以該方法可比標準PCR更迅速地進行。因此，由解旋酶促進之擴增可等溫進行。解旋酶與單股結合（SSB）蛋白質之混合物尤其適用，因為SSB可進一步促進擴增。用於由解旋酶促進之擴增的例示性調配物包括由Biohelix（Beverly, Mass.）以ISOAMP®套組在商業上出售的調配物。此外，包括解旋酶蛋白之適用調配物的實例描述於美國專利第7,399,590號及美國專利第7,829,284號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0115】 可包括於擴增試劑中以促進擴增子形成且在一些情況下增加擴增子形成速率的組分之另一實例為起始結合蛋白（origin binding protein）。

【0116】 可藉由增加擴增反應之活性組分中之一或多者的濃度或量來增加擴增反應之發生速率。舉例而言，可增加聚合酶、核苷三磷酸、引子、重組酶、解旋酶或SSB之量或濃度來增加擴增速率。在一些情況下，擴增反應中量或濃度增加（或在本文所闡述之方法中以其他方式操控）的一或多種活性組分為擴增反應之非核酸組分。

【0117】 亦可在本文所闡述之方法中藉由調整溫度來增加擴增速率。舉例而言，一或多個擴增位點之擴增速率可藉由將位點溫度增加至最大溫度來增加，其中反應速率因為變性或其他不良事件而降低。最佳的或所期望的溫度可根據使用中之擴增組分之已知特性來確定或關於給定擴增反應混合物憑經驗確定。亦可調整用於擴增之引子之特性以增加擴增速率。舉例而言，可調整引子之序列及/或長度。該等調整可基於引子解鏈溫度（melting temperature, T_m ）之先驗預測或憑經驗進行。

【0118】 用於增加擴增位點之擴增速率的另一選擇方案為增加擴增位點處之擴增反應之一或多種活性組分的局部濃度。活性組分可包括一或多種非核酸組分。在一些實施例中，擴增反應之一或多種活性組分可使用電操控吸引至擴增位點，諸如電泳、等速電泳、電流或電壓之直接脈衝或類似方式。或者或另外，擴增組分中之一或多者可包括募集至擴增位點之親和標籤。親和標籤可帶電，使得電操控將恰當標記之組分吸引至擴增位點。亦可使用非帶電親和標籤。舉例而言，可使用此項技術中已知之各種配體或受體中之任一者作為擴增反應組分之親和標籤，諸如本文作為捕捉劑之實例所闡述之彼等。正如用於核酸之捕捉劑的情況一樣，擴增位點可包括用於擴增組分之親和標籤的結合搭配物。因此，因為在擴增位點與適當搭配物之相互作用，所以親和標記擴增組分之局部濃度可增加。在擴增位點為基板表面之特定實施例中，親和標籤之結合搭配物可連接至表面。

【0119】 此外，可使用磁力或光學力來增加擴增試劑之局部濃度。在該等情況下，一或多種擴增試劑可包括可藉由該等力操控之磁性標籤或光學標籤。

【0120】 可藉由增加一或多種擴增試劑之活性來增加擴增反應之發生速率。舉例而言，可向使用聚合酶之反應中添加增加聚合酶之延伸速率的輔因子。在一些實施例中，可向聚合酶反應中添加諸如鎂、鋅或錳之金屬輔因子，或者

在其他實施例中，可添加甜菜鹼。

【0121】 在本文所闡述之方法之一些實施例中，期望使用雙股目標核酸群體。已意外觀察到，在動力排除條件下在位點陣列之擴增子形成可有效用於雙股目標核酸。舉例而言，複數個具有擴增子純系群體之擴增位點可更有效地由雙股目標核酸（相比於相同濃度的單股目標核酸）在重組酶及單股結合蛋白存在下產生。然而應理解，在本文所闡述之方法之一些實施例中，可使用單股目標核酸。

【0122】 本文所闡述之方法可使用各種擴增技術中之任一者。可使用的例示性技術包括（但不限於）聚合酶鏈反應（PCR）、滾環擴增（RCA）、多重置換擴增（MDA）或隨機引發擴增（RPA）。在一些實施例中，擴增可在溶液中進行，例如當擴增位點能夠在具有所期望之容量的體積中含有擴增子時。在本發明方法中在動力排除條件下使用之擴增技術較佳於固相上進行。舉例而言，用於擴增之一或多個引子可在擴增位點連接至固相。在PCR實施例中，用於擴增之引子中之一者或兩者可連接至固相。利用連接至表面之引子的兩個物種的形式常常稱為橋式擴增，因為雙股擴增子在側接於已複製之模板序列的兩個表面連接引子之間形成橋狀結構。可用於橋式擴增之例示性試劑及條件描述於例如以下各者中：美國專利第5,641,658號；美國專利公開案第2002/0055100號；美國專利第7,115,400號；美國專利公開案第2004/0096853號；美國專利公開案第2004/0002090號；美國專利公開案第2007/0128624號；及美國專利公開案第2008/0009420號，其各自以全文引用的方式併入本文中。亦可藉由連接至固體載體之擴增引子中之一者及溶液中之第二引子進行固相PCR擴增。使用表面連接引子與可溶性引子之組合的例示性形式為乳液PCR，如例如Dressman等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8817-8822 (2003)、WO 05/010145或美國專利公開案第2005/0130173號或第2005/0064460號中所述，其各自以全文引用的方式併入本文

中。乳液PCR為該形式之舉例說明且應理解，出於本文所闡述之方法的目的，乳液之使用為視情況而定的，且實際上，若干實施例不使用乳液。以上舉例說明之PCR技術可使用本文其他地方用於促進或增加擴增速率所舉例說明之組分進行修改，用於非循環擴增（例如等溫擴增）。因此，可在動力排除條件下使用以上舉例說明之PCR技術。

【0123】 RCA技術可經過修改用於本發明方法中。可用於RCA反應中之例示性組分及RCA產生擴增子之原理描述於例如Lizardi等人，Nat. Genet. 19:225-232 (1998)及美國專利公開案第2007/0099208 A1號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。用於RCA之引子可在溶液中或在擴增位點連接至固體載體表面。以上參考文獻中舉例說明的RCA技術可根據本文中之教示進行修改，例如用於增加擴增速率以適合特定應用。因此，可在動力排除條件下使用RCA技術。

【0124】 MDA技術可經過修改用於本發明方法中。MDA之一些基本原理及適用條件描述於例如以下各者中：Dean等人，Proc Natl. Acad. Sci. USA 99:5261-66 (2002)；Lage等人，Genome Research 13:294-307 (2003)；Walker等人，Molecular Methods for Virus Detection，學術出版社公司（Academic Press, Inc.），1995；Walker等人，Nucl. Acids Res. 20:1691-96 (1992)；美國專利第5,455,166號；美國專利第5,130,238號及美國專利第6,214,587號，其各自以全文引用的方式併入本文中。用於MDA之引子可在溶液中或在擴增位點連接至固體載體表面。以上參考文獻中舉例說明的MDA技術可根據本文中之教示進行修改，例如用於增加擴增速率以適合特定應用。因此，可在動力排除條件下使用MDA技術。

【0125】 在特定實施例中，可在動力排除條件下使用以上舉例說明之擴增技術的組合得到陣列。舉例而言，可組合使用RCA及MDA，其中RCA用於在溶液中產生多聯擴增子（例如使用溶液相引子）。擴增子可隨後用作MDA之模板，

使用在擴增位點連接至固體載體表面之引子。在此實施例中，在組合之RCA及MDA步驟之後產生的擴增子將連接至擴增位點之表面。

【0126】 如關於以上若干實施例所舉例說明，本發明方法不必使用循環擴增技術。舉例而言，可在不存在變性循環的情況下在擴增位點進行目標核酸之擴增。例示性變性循環包括向擴增反應中引入化學變性劑及/或增加擴增反應之溫度。因此，目標核酸之擴增不必包括用使目標核酸及擴增子變性的化學試劑替換擴增溶液。類似地，目標核酸之擴增不必包括將溶液加熱至使目標核酸及擴增子變性的溫度。因此，在本文所闡述之方法的持續期間，擴增位點處之目標核酸之擴增可等溫進行。實際上，無需一或多個針對一些擴增技術在標準條件下所進行的循環操控即可進行本文所闡述之擴增方法。此外，在一些標準固相擴增技術中，在目標核酸加載於基板上之後且在開始擴增之前，進行洗滌。然而，在本發明方法之實施例中，不必在目標核酸至反應位點之運輸與目標核酸在擴增位點處之擴增之間進行洗滌步驟。相反，允許運輸（例如經由擴散）及擴增同時進行以提供動力排除。

【0127】 在一些實施例中，可能期望重複在動力排除條件下進行的擴增循環。因此，雖然無需涉及化學變性劑或施加熱量之循環操控即可經由動力排除擴增在個別擴增位點製得目標核酸之複本，但是可對擴增位點陣列進行循環處理以增加在動力排除擴增之各循環之後含有擴增子之位點的數目及/或在各位點處之擴增子的數目。在本文所述之一或多個實施例中，參看圖11至圖14，可在初始排除擴增之後，藉由使包括不含目標核酸之試劑（例如活性組分）的新鮮無目標溶液（target-less solution）從擴增位點上流過，進行第二擴增或增強擴增（boost）。無目標溶液中之試劑可增加擴增位點處之純系簇中之擴增子的數目。因為無目標溶液中缺乏目標核酸，所以試劑不會引起目標核酸於擴增位點處之額外接種。在特定實施例中，自一個循環至下一循環，可修改擴增條件。舉例

而言，可在各循環之間調整上文關於更改運輸速率或更改擴增速率所闡述之條件中之一或多者。因此，可在各週期之間增加運輸速率，可在各週期之間降低運輸速率，可在各週期之間增加擴增速率，或可在各週期之間降低擴增速率。

【0128】 本文所闡述之方法可修改成使用電場（**e**場）輔助目標核酸運輸至陣列之擴增位點。舉例而言，陣列之各擴增位點可電耦合於電源，產生電荷，吸引目標核酸。在一種組態中，擴增位點之正電荷可經由帶負電之磷酸糖主鏈吸引核酸。使用**e**場輔助將核酸吸引至陣列位點之例示性方法及設備描述於美國專利公開案第2009/0032401 A1號中，其以全文引用的方式併入本文中。可在本發明方法中使用**E**場輔助，例如在如下條件下，其中複數個不同目標核酸在溶液中，使得核酸目標在各擴增步驟過程中對擴增位點陣列具有流體接近。可調整各擴增位點之電荷以達成動力排除。相對於調整電荷而言，另外又或者，可調整本文所闡述之用於更改目標核酸運輸速率或用於更改擴增速率之其他條件以達成動力排除。因此，可在陣列之各個擴增位點同時進行擴增時調整陣列擴增位點之電荷以吸引目標核酸，其中平均擴增速率超過目標核酸轉移（亦即，在**e**場輔助運輸下）至擴增位點之平均速率。

【0129】 在利用**e**場輔助運輸目標核酸至擴增位點之特定實施例中，可在擴增反應之整個過程中始終施加**e**場。或者，可隨著擴增反應進行且隨著擴增子填充擴增位點，改變（例如增加或減少）**e**場。舉例而言，增加**e**場可提供以下益處：增加獲取目標核酸之擴增位點之數目（目標核酸又在各位點擴增產生擴增子純系群體）。**e**場之增加速率及增加之幅度範圍可經過選擇以平衡目標核酸隨時間遞增之運輸速率與在同一段時間內已被有效填充之擴增位點之遞增數目。此外，視藉由該方法產生之陣列的應用而定，有效填充可為如下程度：擴增位點已經第一目標核酸之複本填滿容量，從而防止任何第二目標核酸在彼位點擴增。或者，有效填充可為如下程度：第二目標核酸在特定擴增位點之擴增將產

生足夠低的污染性擴增子分數，以致於可忽略不計或相反對於所期望的陣列用途而言係可接受的。

【0130】 一般而言，**e**場輔助允許對目標核酸至陣列之一或多個擴增位點之運輸的另一種程度的控制。雖然上文已在陣列之各個位點發生擴增的同時將目標核酸運輸至擴增位點陣列的情況下舉例說明**e**場輔助之用途，但是在替代性實施例中，可在擴增位點開始擴增之前，使用**e**場輔助將目標核酸運輸至擴增位點。可在本文所闡述之方法或組成物中使用**E**場輔助將除目標核酸以外的目標生物分子運輸至相關位點，諸如陣列之特徵。

【0131】 在特定實施例中，可至少實質上均一地對陣列之所有擴增位點施加**e**場。因此，在溶液中之目標核酸將具有相等的轉移至任何給定擴增位點之可能性。在替代性實施例中，可僅對陣列中所存在之擴增位點之子組施加**e**場。以此方式，可使用**e**場輔助，相對於其他位點選擇性填充一些位點。此外，必要時，可在擴增位點之第一子組施加吸引性電荷以便將目標核酸運輸至位點之第一子組，且同時可對擴增位點之第二子組施加排斥性電荷以抑制目標核酸轉移至彼等位點或自位點之第二子組移除（例如經由脫附或降解）目標核酸。類似地，可對陣列之間隙區域施加相斥的電荷以抑制目標核酸轉移至間隙區域或自間隙區域移除（例如經由脫附或降解）目標核酸，如下文及實施例III中進一步詳細闡述。

【0132】 在特定實施例中，可將陣列之間隙區域電耦合於電源，產生電荷，抑制目標核酸或其他生物分子之結合或移除目標核酸或其他生物分子。在一種組態中，間隙區域之負電荷可經由帶負電之磷酸糖主鏈排斥核酸。或者或另外，可在間隙區域中使用電荷產生表面局部pH改變，以電化學方式破壞核酸及生物分子。

【0133】 可在本發明方法中使用**E**場排斥，例如在如下條件下，其中複數

個不同目標核酸在溶液中，使得核酸目標在各擴增步驟過程中對擴增位點陣列具有流體接近。可調整陣列之間隙區域處之電荷以排斥核酸（例如，藉由移除或結合抑制），同時捕捉陣列特徵處之核酸，且視情況在動力排除條件下在該等特徵處進行擴增。相對於調整電荷而言，另外或或者，可調整本文所闡述之用於更改目標核酸至特徵之運輸速率或用於更改擴增速率之其他條件以達成動力排除。因此，可在陣列之各個擴增位點處同時進行擴增時調整陣列之間隙區域處之電荷以排斥目標核酸，其中平均擴增速率超過目標核酸轉移至擴增位點之平均速率。因此，可結合本文所闡述之其他方法在間隙區域使用電場排斥以將核酸（或其他生物分子）運輸至陣列特徵且達成動力排除。

【0134】 使用本文所闡述之方法及設備，在間隙區域處之電場排斥可提供改善核酸（或其他生物分子）在特徵處而非在間隙區域處之特異性定位的優勢。該等優勢可理解排斥係經由電荷排斥以抑制核酸或其他生物分子之結合的機制、經由核酸及生物分子之表面局部電化學破壞或經由其他機制起作用的。可在間隙區域處使用電場排斥來改善核酸或其他生物分子於相關特徵之特異性定位，尤其是當相關特徵所具有的高度高於表面局部電化學破壞之可及點時。

【0135】 一些實施例可利用電場輔助將核酸（或其他生物分子）運輸至陣列特徵，且結合電場輔助使核酸（或其他生物分子）排斥陣列之間隙區域。引力電場及斥力電場可同時施加給陣列或這兩個場可分開施加。舉例而言，兩個場可分開施加，使得該等場以交替重複形式施加（例如，可對特徵施加引力場同時關閉斥力場，隨後可關閉引力場同時對間隙區域施加斥力場，且此順序可重複一或多次）。

【0136】 可跨陣列區域與電解質施加電場或可跨陣列區域與第二表面施加電場。舉例而言，圖4（a）顯示一種組態，其中可跨陣列之間隙區域與電解質施加電場；且圖4（b）顯示一種組態，其中可跨陣列之間隙區域與第二表面

施加電場。可使用類似組態對陣列特徵施加引力場。此外，施加給特徵或間隙區域之電場可藉由對陣列之適當區域施加交流電（alternating current，AC）或直流電（direct current，DC）產生。

【0137】 因此，本發明提供一種形成生物分子之圖案化表面的方法，其中該方法可包括（a）提供一種試劑，該試劑包括（i）具有非相鄰特徵於表面上之陣列，該等特徵由表面之間隙區域隔開，及（ii）具有複數個不同的目標生物分子的溶液；及（b）使試劑反應，將生物分子運輸至特徵且使個別生物分子連接至特徵中之每一者，其中向間隙區域施加電場以使生物分子排斥間隙區域。尤其適用於該方法之生物分子為核酸。可在此方法中在動力排除條件下，諸如本文其他地方所闡述之彼等條件下，在該等特徵處擴增核酸。在使用電場之一些實施例中，用於陣列之基板可包括透明電導體層。電導體層可作為電極用於連接電源，諸如電池或信號發生器。必要時，陣列特徵（例如孔陣列中之孔之內表面）可含有暴露的或絕緣的傳導層，其中可跨傳導層使用電壓來操控對核酸及/或擴增試劑之力，控制運輸至位點、在位點捕捉、自位點移除及/或在位點擴增的速率。在特定實施例中，可在孔之外表面上施加電場，使得穿透容器壁之電場對容器內之試劑感應出電力，對運輸、捕捉、移除及/或擴增之速率提供一定程度的控制。

【0138】 舉例而言，已藉由本文所闡述之方法產生之本發明陣列可用於各種應用中之任一者。尤其適用的應用為核酸定序。一個實例為合成定序（sequencing-by-synthesis，SBS）。在SBS中，監測核酸引子沿著核酸模板（例如目標核酸或其擴增子）之延伸以測定模板中之核苷酸之序列。潛在化學製程可為聚合（例如，如藉由聚合酶催化）。在特定的基於聚合酶之SBS實施例中，以模板依賴性方式向引子中添加經螢光標記之核苷酸（從而延伸引子），使得可使用添加至引子中之核苷酸之順序及類型的偵測來測定模板之序列。複數個不同

模板可在本文所闡述之陣列之不同位點處在一定條件下經歷SBS技術，其中不同模板所發生的事件可根據其在陣列中之位置來區分。

【0139】 流量槽提供用於容納陣列之適宜形式，該陣列藉由本發明方法產生且經歷過SBS或涉及試劑之循環重複遞送的其他偵測技術。舉例而言，為引發第一SBS循環，一或多個標記核苷酸、DNA聚合酶等可流動至容納有核酸模板陣列之流量槽中/流動穿過該流量槽。可偵測陣列之彼等位點，其中引子延伸導致標記核苷酸被併入。視情況，核苷酸可進一步包括可逆終止特性，一旦核苷酸已添加至引子中，即終止進一步引子延伸。舉例而言，可向引子中添加具有可逆終止劑部分之核苷酸類似物，使得後續延伸不能進行，直至遞送去阻斷劑（deblocking agent）移除該部分為止。因此，關於使用可逆終止之實施例，可向流量槽遞送去阻斷劑（在偵測發生之前或之後）。可在各個遞送步驟之間進行洗滌。隨後可重複循環n次以使引子延伸n個核苷酸，從而偵測長度n之序列。可容易地調適成與藉由本發明方法產生之陣列一起使用的例示性SBS程序、流體系統及偵測平台描述於例如以下各者中：Bentley等人, *Nature* 456:53-59 (2008)；WO 04/018497；美國專利第7,057,026號；WO 91/06678；WO 07/123744；美國專利第7,329,492號；美國專利第7,211,414號；美國專利第7,315,019號；美國專利第7,405,281號及美國專利公開案第2008/0108082號，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0140】 可使用其他使用循環反應之定序程序，諸如焦磷酸根定序法（pyrosequencing）。焦磷酸根定序法偵測特定核苷酸併入新生核酸股中時無機焦磷酸鹽（inorganic pyrophosphate，PPi）之釋放（Ronaghi等人, *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996)；Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001)；Ronaghi等人 *Science* 281(5375), 363 (1998)；美國專利第6,210,891號；美國專利第6,258,568號及美國專利第6,274,320號，其各自以全文引用的方式併入本文

中)。在焦磷酸根定序法中，所釋放的PPi可藉由立即藉由ATP硫酸化酶轉化為腺苷三磷酸（adenosine triphosphate，ATP）來偵測，且可經由螢光素酶產生之光子偵測所產生之ATP的含量。因此，可經由發光偵測系統監測定序反應。用於基於螢光之偵測系統的激勵輻射源並非焦磷酸根定序法程序所必需的。可用於向本發明陣列施加焦磷酸根定序法的適用流體系統、偵測器及程序描述於例如以下各者中：美國專利第9,096,899號、美國專利公開案第2005/0191698 A1號、美國專利第7,595,883號及美國專利第7,244,559號，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0141】 連接定序（Sequencing-by-ligation）反應亦為適用的，包括例如在Shendure等人 *Science* 309:1728-1732 (2005)；美國專利第5,599,675號；及美國專利第5,750,341號中所述的彼等，其各自以全文引用的方式併入本文中。一些實例可包括雜交定序（sequencing-by-hybridization）程序，如例如以下各者中所述：Bains等人, *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988)；Drmanac等人, *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998)；Fodor等人, *Science* 251(4995), 767-773 (1995)；及WO 1989/10977，其各自以全文引用的方式併入本文中。在連接定序及雜交定序程序中，存在於陣列位點之目標核酸（或其擴增子）經歷重複的寡核苷酸遞送及偵測循環。用於如本文或本文所引用之參考文獻中所闡述之SBS方法的流體系統可容易地調適成用於遞送用於連接定序或雜交定序程序之試劑。寡核苷酸可經螢光標記且使用螢光偵測器偵測，該等螢光偵測器類似於本文或本文所引用之參考文獻中關於SBS程序所述之彼等螢光偵測器。

【0142】 一些實施例可利用涉及即時監測DNA聚合酶活性之方法。舉例而言，可經由含螢光團聚合酶與經 γ -磷酸鹽標記之核苷酸之間的螢光共振能量轉移（fluorescence resonance energy transfer，FRET）相互作用或藉由零模波導（zeromode waveguide，ZMW）偵測核苷酸併入。用於基於FRET之定序的技術

及試劑描述於例如以下各者中：Levene等人 *Science* 299, 682-686 (2003)；Lundquist等人 *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008)；Korlach等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008)，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0143】 一些SBS實例包括偵測在核苷酸併入延伸產物中之後釋放的質子。舉例而言，基於所釋放質子之偵測的定序可使用電偵測器，且相關技術可購自Ion Torrent (Guilford, Conn., Life Technologies子公司)，或定序方法及系統描述於美國專利公開案第2009/0026082 A1號；美國專利公開案第2009/0127589 A1號；美國專利公開案第2010/0137143 A1號；或美國專利公開案第2010/0282617 A1號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。可容易地對用於偵測質子之基板施加本文所闡述之使用動力排除擴增目標核酸的方法。更具體而言，本文所闡述之方法可用於在用於偵測質子之陣列的位點處產生擴增子純系群體。

【0144】 例如已藉由本文所闡述之方法產生的本發明陣列之另一適用應用為基因表現分析。基因表現可使用RNA定序技術偵測或定量，諸如稱為數位RNA定序之RNA定序技術。可使用此項技術中已知之定序方法，諸如上文所闡述之定序方法進行RNA定序技術。亦可使用藉由直接與陣列雜交進行之雜交技術或使用多重分析來偵測或定量基因表現，偵測陣列上之多重分析產物。例如已藉由本文所闡述之方法產生的本發明陣列亦可用於測定來自一或多個個體之基因組DNA樣品的基因型。可對本發明陣列進行的基於陣列之表現及基因分型分析的例示性方法描述於美國專利第7,582,420號；第6,890,741號；第6,913,884號或第6,355,431號或美國專利公開案第2005/0053980 A1號；第2009/0186349 A1號或第2005/0181440 A1號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0145】 本文所闡述之方法的優勢在於其可自各種核酸庫中之任一者快速且有效地產生陣列。因此，本發明提供整合系統，其能夠使用本文所闡述之方法中之一或多者製造陣列且進一步能夠使用此項技術中已知之技術，諸如以

上舉例說明之彼等技術來偵測陣列上之核酸。因此，本發明之整合系統可包括能夠將擴增試劑遞送至擴增位點陣列的流體組件，諸如泵、閥門、儲集器、流體管線及類似組件。尤其適用的流體組件為流量槽。流量槽可經組態及/或用於整合系統中，用於產生本發明陣列及偵測陣列。例示性流量槽描述於例如美國專利公開案第2010/0111768 A1號及美國專利第8,951,781號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。如關於流量槽所舉例說明，整合系統之流體組件中之一或多者可用於擴增方法及偵測方法。舉核酸定序的例子，整合系統之流體組件中之一或多者可用於本文所闡述之擴增方法及用於定序方法，諸如以上舉例說明之彼等定序方法中之定序試劑的遞送。或者，整合系統可包括單獨的流體系統來進行擴增方法及進行偵測方法。能夠形成核酸陣列且亦能夠測定核酸序列之整合定序系統的實例包括（但不限於）MISEQ®儀器平台（Illumina公司, San Diego, Calif.）及美國專利第8,951,781號（以上所提到的）中所述之裝置。該等裝置可經過修改，根據本文所闡述之指導，使用動力排除製得陣列。

【0146】 能夠進行本文所闡述之方法的系統不必與偵測裝置整合。相反地，獨立系統或與其他裝置整合之系統亦為可能的。可在該等實施例中使用類似於上文在整合系統的情況下舉例說明的流體組件的流體組件。

【0147】 能夠進行本文所闡述之方法的系統，無論是否與偵測能力整合，都可包括能夠執行指令集的系統控制器，該指令集用於進行本文所闡述之一或多種方法、技術或製程。舉例而言，該等指令可指導用於在動力排除條件下形成陣列之步驟的效能。視情況，該等指令可進一步指導使用本文先前所闡述之方法偵測核酸之步驟的效能。適用的系統控制器可包括任何基於處理器或基於微處理器之系統，包括使用以下之系統：微控制器、精簡指令集電腦（reduced instruction set computers, RISC）、特定應用積體電路（application specific integrated circuits, ASIC）、現場可程式閘陣列（field programmable gate array, FPGA）、邏

輯電路及任何其他能夠執行本文所述之功能的電路或處理器。用於系統控制器之指令集可呈軟體程式的形式。如本文所用，術語「軟體」及「韌體」為可互換的，且包括任何儲存在用於由電腦執行之記憶體中之電腦程式，記憶體包括RAM記憶體、ROM記憶體、EPROM記憶體、EEPROM記憶體及非揮發性RAM（non-volatile RAM，NVRAM）記憶體。軟體可呈各種形式，諸如系統軟體或應用軟體。此外，軟體可呈分離程式之集合、或較大程式內之程式模組或程式模組之一部分的形式。軟體亦可包括呈物件導向程式設計形式的模組程式設計。

【0148】 上文已在集合偵測（ensemble detection）的情況下舉例說明本發明陣列之若干應用，其中存在於各擴增位點之多個擴增子一起偵測。在替代性實施例中，可在各擴增位點偵測單個核酸，無論目標核酸或其擴增子。舉例而言，擴增位點可以經組態以含有具有待偵測之目標核苷酸序列的單個核酸分子及複數個填充劑核酸。在此實施例中，填充劑核酸用於填滿擴增位點之容量且不一定打算偵測該等填充劑核酸。待偵測之單分子可藉由能夠在填充劑核酸的背景下游分單分子的方法偵測。可使用各種單分子偵測技術中之任一者，包括例如修改上文所闡述之集合偵測技術以增加增益或使用更靈敏的標記偵測位點。可使用的單分子偵測方法之其他實例闡述於美國專利公開案第2011/0312529 A1號；美國專利第9,279,154號；及美國專利公開案第2013/0085073 A1號中，其各自以全文引用的方式併入本文中。

【0149】 適用於單分子核酸偵測之陣列可使用本文所闡述之方法中之一或多者，伴隨以下修改而產生。複數個不同目標核酸可經組態以包括待偵測的目標核苷酸序列及一或多個待擴增以產生填充劑擴增子的填充劑核苷酸序列。複數個不同目標核酸可包括於擴增試劑中，諸如本文其他地方所闡述之擴增試劑，且與擴增位點陣列在動力排除條件下反應，使得填充劑核苷酸序列填充擴增位點。可用以允許填充劑序列擴增同時阻止目標序列擴增的例示性組態包括

例如單目標分子，其具有第一區域及第二區域，第一區域具有用於存在於擴增位點之擴增引子的藉由結合位點側接的填充劑序列，第二區域具有在側接區域外部的目標序列。在另一組態中，目標核酸可包括分別攜帶目標序列及填充劑序列的單獨的分子或股。單獨的分子或股可連接至顆粒或形成為核酸樹狀體或其他分枝結構之臂。

【0150】 在特定實施例中，具有各自含有填充劑序列及目標序列之擴增位點的陣列可使用引子延伸分析或合成定序技術偵測。在該等情況下，可藉由使用恰當置放的引子結合位點，與大量填充劑序列相反，在目標核苷酸序列達成特異性延伸。舉例而言，用於定序引子之結合位點可置放於目標序列之上游且可不存在於填充劑序列中之任一者中。或者或另外，目標序列可包括一或多種不能夠氫鍵鍵合至標準核苷酸的非天然核苷酸類似物。非天然核苷酸可置放於引子結合位點之下游（例如，在目標序列中或在插入於目標序列及引子結合位點之區域中），且因此將防止延伸或合成定序，直至添加適當核苷酸搭配物（亦即，能夠氫鍵鍵合至目標序列中之非天然類似物者）。核苷酸類似物異胞嘧啶（isocytosine，isoC）及異鳥嘌呤（isoguanine，isoG）尤其適用，因為這兩者彼此特異性成對，但是不與大部分延伸及合成定序技術中所用的其他標準核苷酸成對。在目標序列中或在目標序列上游使用isoC及/或isoG之另一益處為藉由自用於擴增之核苷酸混合物省略各別搭配物，防止目標序列在擴增步驟過程中不合需要的擴增。

【0151】 應理解，例如已藉由本文所闡述之方法產生的本發明陣列不必用於偵測方法。相反地，陣列可用於儲存核酸庫。因此，可以將核酸保藏在其中的狀態儲存陣列。舉例而言，可以乾燥狀態、冷凍狀態（例如，在液氮中）或在保護核酸之溶液中儲存陣列。或者或另外，陣列可用於複製核酸庫。舉例而言，陣列可用於自陣列上之位點中之一或多者產生複製擴增子。

【0152】 本文已關於將目標核酸運輸至陣列之擴增位點及製造在擴增位點捕捉的目標核酸之複本舉例說明若干實施例。可對非核酸目標分子使用類似方法。因此，可用其他目標分子替代舉例說明的目標核酸，使用本文所闡述之方法。舉例而言，可進行本發明方法以運輸來自不同目標分子之群體的個別目標分子。各目標分子可轉移至（且在一些情況下，捕捉於）陣列之個別位點，以引發該捕捉位點處之反應。各位點之反應可例如產生所捕捉分子之複本或反應可更改位點以分離或隔離所捕捉之分子。在任一情況下，最終結果可為各自關於來自含有不同類型之目標分子的群體的目標分子之類型係純的陣列位點。

【0153】 在使用不同於核酸之目標分子的特定實施例中，可使用利用動力排除之方法製得不同目標分子之庫。舉例而言，可在如下條件下製得目標分子陣列，其中陣列位點隨機接種來自溶液之目標分子且產生目標分子之複本以填滿接種位點中之每一者的容量。根據本發明之動力排除方法，接種及複製製程可在複本產生速率超過接種速率的條件下同時進行。因此，在已接種第一目標分子之位點處相對較快的複本產生速率將有效地排除第二目標分子接種該位點。在一些情況下，目標分子之接種將藉由不同於目標分子之複製的製程引發反應，填滿位點之容量。舉例而言，捕捉位點處之目標分子可引發鏈反應，最後使得位點不能捕捉第二目標分子。鏈反應可以超過目標分子之捕捉速率的速率進行，從而在動力排除之條件下進行。

【0154】 如關於目標核酸所舉例說明，動力排除當施加給其他目標分子時可利用陣列位點處相對較慢的重複反應（例如鏈反應）之引發速率對比在重複反應引發之後相對較快的繼續速率。在上一段之實施例中，因為相對較慢的目標分子接種速率（例如，相對較慢的擴散）對比相對較快的反應發生速率，例如發生反應以用目標分子種子之複本填充位點，所以發生動力排除。在另一實施例中，因為接種於位點之目標分子之第一複本的形成延遲（例如延遲或緩慢

活化) 對比用於填充位點之後續複本之相對較快的產生速率, 所以發生動力排除。在此實施例中, 個別位點可已接種若干不同目標分子。然而, 任何給定目標分子之第一複本形成可隨機活化, 使得第一複本之平均形成速率相比於後續複本之產生速率而言相對較慢。在此情況下, 雖然可在個別位點接種若干不同目標分子, 但是動力排除將使得彼等目標分子中僅一者得以複製。

【0155】 因此, 本發明提供一種用於製造分子陣列之方法, 該方法可包括 (a) 提供一種試劑, 該試劑包括 (i) 位點陣列, 及 (ii) 具有複數個不同目標分子之溶液, 其中溶液中之目標分子之數目超過陣列中之位點之數目, 其中不同目標分子對複數個位點具有流體接近, 且其中位點中之每一者包含用於複數個不同目標分子中之若干目標分子的容量; 及 (b) 使試劑反應, 產生複數個各自具有來自複數個目標分子之單一目標分子的位點或產生複數個各自具有來自溶液之個別目標分子之複本的純群體的位點, 其中反應包括同時 (i) 以平均運輸速率將不同分子運輸至位點, 及 (ii) 以平均反應速率引發反應, 填滿位點之容量, 其中平均反應速率超過平均運輸速率。在一些實施例中, 步驟 (b) 可藉由使試劑反應產生複數個各自具有來自複數個目標分子之單一目標分子的位點或產生複數個各自具有來自溶液之個別目標分子之複本的純群體的位點而相反地進行, 其中反應包括 (i) 引發重複反應 (例如鏈反應), 在位點中之每一者處自目標分子形成產物, 及 (ii) 在位點中之每一者處繼續反應, 形成後續產物, 其中在位點處發生之反應的平均速率超過在位點處引發之反應的平均速率。

【0156】 在以上非核酸實施例中, 目標分子可為在陣列之各位點處發生的重複反應的引發劑。舉例而言, 重複反應可形成排除其他目標分子佔據位點的聚合物。或者, 重複反應可形成一或多個聚合物, 該一或多個聚合物構成轉移至位點之目標分子的分子複本。

【0157】 以下實施例意欲說明而非限制本發明主題。

【0158】 實施例I**【0159】 簇陣列於流量槽上之超葡瓦松形成**

【0160】 此實施例描述一種用於達成簇陣列於用於Illumina (San Diego, Calif.) 定序平台之流量槽上之超葡瓦松形成的方法。本文所述之方法為一種用於捕捉特徵上之庫要素(例如基因組片斷)且同時純系擴增庫要素的方法。此實施例中之方法的關鍵特徵為用於控制捕捉速率對比擴增速率且以均質方法進行該控制。先前針對Illumina流量槽之高密度接種所開發的諸多方法將庫要素之捕捉與純系擴增製程分開。在此實施例中,捕捉事件引發特徵上之純系擴增事件。

【0161】 如下製備圖案化流量槽。使用起離方法(lift-off approach),用金片塗佈玻璃流量槽(Illumina公司, San Diego, Calif.)。簡言之,將光阻劑層均勻地塗佈在玻璃流量槽之表面上且藉由光刻移除數片光阻劑,暴露出數片玻璃表面。隨後將金屬沈積於表面上,在光阻劑區域及玻璃片上形成連續薄膜。可如以全文引用的方式併入本文中之Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7:239-60 (1977)中所闡述,使用電子束蒸發或濺鍍沈積金。隨後藉由丙酮起離移除光阻劑層,留下形狀圓形、直徑小於1微米且由玻璃表面之間隙區域包圍的金片。隨後如WO 2008/093098(其併入本文中)中所述,用無矽烷丙烯醯胺(SFA)塗佈金圖案化流量槽。經由硝基苄基UV可裂解部分(Glenn Research, Sterling, Va.),將P5及P7引子接枝於聚合SFA上。將流量槽定位於UV(302 nm)光源上,使得金片為連接於金片上之引子產生遮罩,而連接於間隙區域上之任何引子因為UV曝光而裂解。保留在金片處之P5及P7引子能夠支撐庫(P5/P7)之純系擴增。

【0162】 如下產生庫要素。根據Illumina商業樣品製備方案,使基因組DNA(genomic DNA, gDNA)庫片段化且將具有與P5及P7引子互補之引子結合位點的分叉接頭連接至gDNA片段。

【0163】 如下進行超葡瓦松簇陣列形成。製備含有庫要素（呈雙股形式）及TWISTAMP®基本試劑（TwistDx, Cambridge UK）之溶液。TWISTAMP®基本試劑含有可支持表面上之模板依賴性擴增的酶混合物（DNA聚合酶、單股結合蛋白及重組酶）。控制溶液中之庫要素之濃度，使得任何特徵對庫要素之雜交捕捉速率遠低於純系擴增速率且使得特徵上可供用於捕捉另一庫要素之寡核苷酸（oligos）足夠耗盡。

【0164】 溶液之庫要素的最佳濃度或其他所期望的濃度可藉由使用以上超葡瓦松簇陣列形成方案滴定，繼之以在Illumina定序裝置（例如GENOMEANALYZER®、HISEQ®或MISEQ®儀器）上執行定序，憑經驗判定。

【0165】 實施例II

【0166】 在動力排除條件下產生之圖案化簇陣列的特性

【0167】 此實施例說明使用動力排除條件，將單株簇超葡瓦松加載於圖案化特徵上。

【0168】 如下製備圖案化流量槽。使用如以全文引用的方式併入本文中之美國專利第8,778,848號中所述的起離方法，用金墊片塗佈玻璃流量槽（Illumina公司, San Diego, Calif.）。簡言之，將光阻劑層均勻地塗佈在玻璃流量槽之表面上且藉由光刻移除數片光阻劑，暴露出數片玻璃表面。隨後將金屬沈積於表面上，在光阻劑區域及玻璃片上形成連續薄膜。如以全文引用的方式併入本文中之Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7:239-60 (1977)中所闡述，使用電子束蒸發沈積金。隨後藉由丙酮起離移除光阻劑層，留下六邊形金墊片圖案，其中金墊片中之每一者之形狀為圓形，具有500 nm之直徑，且由玻璃表面之間隙區域包圍。隨後如WO 2008/093098（其併入本文中）中所述，用無矽烷丙烯醯胺（SFA）塗佈金圖案化流量槽。經由硝基苄基UV可裂解部分（Glenn Research, Sterling, Va.），將引子接枝於聚合SFA上。將流量槽定位於UV（302 nm）光源上，使得

金墊片為連接於墊片上之引子產生遮罩，而連接於間隙區域上之任何引子因為UV曝光而裂解。洗掉裂解的引子，留下連接於金墊片上之引子。

【0169】 如下使用TWISTAMP®基本試劑盒（TwistDx, Cambridge UK），使簇於金墊片上生長。將不同濃度之雙股PhiX DNA庫混合於TWISTAMP®基本復水緩衝劑及乙酸鎂試劑中。PhiX DNA之測試濃度為約72 pM、約144 pM、約432 pM及約864 pM。此等濃度超過Illumina流量槽之標準接種所用的典型範圍約9-10 pM DNA。此外，PhiX DNA為雙股的，與模板DNA呈單股形式的Illumina流量槽之標準接種相反。使用含有PhiX DNA之混合物使TWISTAMP®基本冷凍乾燥集結粒復水，且隨後在約38°C下沖洗至圖案化流量槽之各別泳道中。在約38°C下繼續培育約1小時，隨後用HT2洗滌緩衝劑（Illumina公司, San Diego Calif.）洗滌且對簇進行SyBr綠色染色。隨後藉由LMX1處理約30分鐘以使簇中之DNA線性化、約0.1 N NaOH變性及定序引子雜交，將簇處理成用於定序。隨後在Illumina HiSeq® 2000儀器上對流量槽進行定序，持續26個循環。

【0170】 流量槽影像之目視檢查顯示，在對應於表面上之金墊片圖案的圖案中，簇空間有序。圖1（a）顯示在使用藉由上文所闡述之動力排除方法產生之流量槽進行第一定序循環之後獲得的所有四色通道的合成影像。為了比較，圖1（b）顯示具有隨機定位的簇的標準流量槽在單個定序循環之後獲得的合成影像。

【0171】 流量槽之合成影像的成對分佈函數（PDF）及最近鄰（NN）函數之分析亦指示高有序度。影像之原始簇密度經過計算為約640,000個簇/平方毫米。使用NN函數量測影像中之最近鄰簇之間的平均距離。如圖2中所示，NN函數主要在約2.3像素處產生單峰。這與所期望的墊片圖案的1微米間距一致，從而表明簇之高度有序陣列。相比之下，隨機成簇產生寬得多的峰，其中下限值接近簇拾取演算法（cluster picking algorithm）之偵測極限（1.2像素）。圖2中之PDF

與所期望的有序六邊形陣列結構一致。舉例而言，PDF函數顯示在約2.66像素處之所期望的第一位峰，且對應於比最近點遠的相鄰點的較高順序的峰清楚可見且以所期望的峰比率呈現。觀察到在NN與PDF函數之間峰位置只有輕微位移。這種低程度的抖動指示，與理論完美位置之偏差非常低且完全在可接受的程度內。

【0172】 合成四色影像之目視檢查亦揭示不存在不合需要的墊片跳躍（pad hopping）。墊片跳躍係指若干相鄰墊片自同一模板序列擴增之過程。根據目測，墊片跳躍之特徵在於四色影像作為具有相同顏色之簇的相鄰片。如此實施例中所闡述在動力排除條件下產生之流量槽不存在相同顏色的片指示，未發生不適宜程度的墊片跳躍。圖3提供簇顏色及空間位置之較為定量的表示，指示墊片跳躍不是問題。特定言之，圖3顯示與PhiX基因組之前5個基因組位置比對的簇之空間位置的散佈圖。不同基因組位置由x、星號、正方形、三角形及菱形指示。5種符號類型隨機分佈於圖中且不叢集，其指示墊片跳躍不是問題。

【0173】 對使用動力排除條件產生之流量槽進行26個資料循環之序列分析。結果指示，墊片之約64%被佔據且墊片之約56%具有純系簇。因此，方法所產生的純系簇相對於葡瓦松加載所期望的而言幾乎增加2倍，根據葡瓦松加載，若墊片之約64%被佔據，則預測墊片之約36%將為純系的。此等結果清楚顯示超葡瓦松加載。

【0174】 實施例III

【0175】 生物分子之主動電脫附及圖案化

【0176】 此實施例說明一種使用電場使生物分子空間圖案化的方法。此實施例中所述之方法將DNA迅速接種於目標位點且使生物分子電化學排斥間隙區域，產生DNA簇之高度圖案化可定址陣列。此處所示之結果證明具有單株核酸簇圖案之流量槽的形成。

【0177】 此實施例中所述之方法採用跨一個傳導面與電解質施加或跨兩個傳導面施加的電勢，使物理吸附或化學結合的分子自電偏壓表面中之一者或兩者主動脫附。此主動脫附方法不需要任何表面化學反應/表面改質，可非常快地（不到5分鐘）脫附分子且對處理條件不如被動脫附方法敏感。傳導面在性質上可為金屬的（例如鈦、氧化銦錫）或半導體的，且所施加的電勢可為AC或DC，在電極/電解質界面引起電化學反應。施加電場可使信號（相關位點處）對雜訊（來自間隙區域）提高一個數量級。此實施例中所述之方法亦可應用於平面電極，用於電極之選擇性脫附、選擇性再功能化及物種之電化學圖案化。

【0178】 流量槽架構

【0179】 上文關於生物分子之電化學脫附所述之兩種架構在圖4（a）及4（b）中加以說明。特定言之，使用氧化銦錫（ITO）作為傳導性透明電極材料。經由射頻濺鍍將ITO沈積於D263表面上。圖4（a）顯示跨傳導性ITO層及電解質施加的電勢。圖4（b）顯示跨兩個並行的藉由液體介質隔開的傳導性ITO板施加的電勢。兩種架構均可用於自ITO之表面電脫附物種。金（Au）奈米圖案化位點適用於硫醇化生物分子（例如硫醇化抗生物素蛋白）之定向捕捉。使用介電隔片（例如SiO₂、SiN、類鑽石）隔開Au位點與底層ITO，以防止Au上之電化學反應。

【0180】 亦可使用圖4（b）中之架構，使用如圖4（c）之時間流逝影像中所示之電場，同時迅速地濃縮流量槽表面之DNA（例如100倍）。在此等實驗中，跨隔開兩個ITO表面之約100 μm之間隔施加約2 V之電勢（V）。如在圖4（c）中使用全內反射螢光（TIRF）成像所觀察到，螢光隨時間增加，此係因為在流量槽之頂表面施加電場的情況下，PhiX對照DNA（經YOYO染料標記）之表面濃度大大增加。因此，在此所概述之技術可用於在促進快速接種時，同時使生物分子自間隙區域電化學脫附。

【0181】 實驗工作流程

【0182】 主動脫附實驗之實驗工作流程概述於圖5中。方法涉及塗佈抗生物素蛋白於流量槽之表面上，繼之以用無矽烷丙烯醯胺（SFA）塗佈且將引子接枝於SFA上。SFA塗佈及P5及P7引子之接枝如WO 2008/093098（其以全文引用的方式併入本文中）所述進行。然而，在本發明方法中，在SFA塗佈之前，使用電脫附步驟，使抗生物素蛋白在存在於流量槽表面上之Au或介電位點（由ITO間隙區域隔開）上電化學圖案化。此外，在P5及P7引子接枝之後，施加電場以將DNA迅速接種於Au或介電位點上且使生物分子（DNA、抗生物素蛋白、引子）自ITO間隙電化學脫附。在一實施例中，施加約2 V以有效地脫附分子。少至約5分鐘之場持續時間即可有效地脫附間隙區域中之大部分分子。此外，結果表明，間隙區域中之引子濃度亦在電場步驟之後降低。接著如Bentley等人 Nature 456:53-59 (2008)中所述進行簇擴增，繼之以使用dsDNA嵌入染料進行簇染色，隨後進行顯微鏡成像。隨後使用HISEQ® 2000 DNA定序儀器（Illumina公司 San Diego）對流量槽進行定序以測定簇純系性。顯示場輔助接種及電化學脫附之作用的示意圖顯示於圖5中。

【0183】 實驗結果

【0184】 圖6說明使用來自圖4（b）之流量槽架構，使用電場（圖6（a））及不使用電場（圖6（b））達成的結果。在電場存在下，簇被高度限於約2 μm Au位點，在間隙區域中觀察到極少的螢光。在約2 μm 位點中，簇係高度多株的，因為Au墊片之尺寸大。可藉由減小墊片尺寸，經由立體排除抑制多個模板接種來降低多株程度，或使用動力排除條件降低多株性。亦注意，間隙區域中之像素強度接近0（圖6（a）之線輪廓）。相比之下，在不存在電場的情況下，簇存在於Au及ITO間隙表面上。未在圖6（b）之線輪廓中觀察到在圖6（a）之線輪廓中觀察到的週期性圖案，確認簇限制為電場之結果。

【0185】 可使用電場技術使簇在大區域上之微米大小的位點上以及奈米圖案化位點上空間圖案化。接種於約2 μm 直徑Au位點及約200 nm直徑Au位點上之圖案化簇的大面積影像連同其相應的傅立葉變換（FFT）一起分別圖示於圖7（a）及7（b）中。簇輪廓分明且高度圖案化，且ITO間隙區域中之非特異性結合極少。此藉由FFT中所見之輪廓分明的點進一步確認，該等輪廓分明的點表明有序的或圖案化網狀結構。圖7（b）中之奈米圖案化特徵之簇佔有率為約40-50%，但是可藉由使用較高抗生物素蛋白濃度或藉由操控電壓波形進一步增加。亦可對介電位點上具有高空間精確性之簇使用相同的化學反應/方法。直徑約700 nm之 SiO_2 位點上之有序簇顯示於圖8中。

【0186】 機制

【0187】 資料表明，在電場存在下，簇之空間圖案化得到促進。因為電化學移除間隙區域中之生物分子（例如DNA、蛋白質及引子），所以這是可能的。發現所接枝之引子強度在施加電場時降低，如藉由經德克薩斯紅（Texas Red，TR）標記之探針，使用雜交分析所見。圖9（a）說明Typhoon掃描，顯示在施加電場之前及之後在流量槽中進行之雜交分析的TR螢光強度（其在圖9（b）中進行定量）。在施加電場之後，螢光強度降低超過兩倍，確認引子自SFA移除。為增加簇強度，流量槽經SFA再塗佈且經P5、P7引子再接枝。此導致TR強度明顯增加。因此，有可能接種DNA，電化學移除間隙區域中非特異性結合的分子，再塗佈SFA及再接枝引子，從而獲得高強度空間圖案化簇。

【0188】 直接DNA雜交

【0189】 亦在涉及phiX ssDNA與P5、P7引子苔（lawn）之直接雜交的實驗中觀察到簇之空間圖案化。方法示意圖顯示於圖10（a）中。對ITO上約2 μm Sift位點執行此等實驗。可用形成位點之各種介電材料對奈米圖案化位點應用相同方法。在此等實驗中既不需要生物素標記之DNA，亦不需要抗生物素蛋白，因

此導致化學步驟較少，但仍能維持位點上之簇特異性。特異性可能為間隙區域中之引子之電化學脫附的結果。圖10（b）顯示在約2 μm Sift位點上在電場（約2 V，約0.1 Hz）存在下使用直接雜交方法形成的簇。可看到間隙區域極小的充分圖案化的簇。圖10（c）為在不存在電場的情況下的相同實驗且顯示在不存在電場的情況下，簇於SFA及ITO間隙區域上朝向隨機，不呈現獨特的順序。此等結果確認可使用電場輔助核酸簇形成之空間圖案化。

【0190】 圖11為根據一實施例於流量槽上產生基因簇之方法100的流程圖。方法100根據本文所述之教示進行。在102，混合第一試劑混合物與一定量的目標核酸以界定第一溶液。第一溶液在本文中亦稱為目標溶液，因為第一溶液包括大量的而非痕量的目標核酸。

【0191】 目標核酸可為來自待定序基因庫之DNA。目標核酸製備為兩端具有接頭的股，該等接頭經組態以結合至流量槽之擴增位點處的相應引子。第一試劑混合物由各種試劑組分組成，該等試劑組分包括（但不限於）NTP及一或多種複製酶。一或多種複製酶可包括聚合酶、重組酶、解旋酶及/或類似酶。試劑混合物可包括除NTP及一或多種複製酶之外的額外試劑組分，諸如引子、單股結合蛋白、用於流體運輸之緩衝劑（例如水、界面活性劑等）、擁擠劑、鎂及/或類似物。在一個實施例中，在流體連接至流量槽之試劑歧管上的混合或貯藏儲集器中混合第一試劑混合物與目標核酸。目標核酸在目標溶液內自由浮動。

【0192】 在104，目標溶液從流量槽上之擴增位點陣列流過，在流量槽上產生擴增子純系群體。根據本文所述之動力排除擴增條件，目標溶液從擴增位點上流過，在擴增位點產生擴增子純系群體。擴增子純系群體在本文中亦稱為純系簇及基因簇。在一實施例中，目標溶液自試劑歧管之混合儲集器流至流量槽且經由流量槽之入口接觸擴增位點陣列。

【0193】 擴增位點可位於沿著流量槽表面之結構特徵處。結構特徵在一個

實施例中為沿著表面之凹孔，但是在其他實施例中可為其他特徵，諸如珠粒。孔藉由流量槽表面之間隙區域相互隔開。在一實施例中，在目標溶液從擴增位點上流過之前，藉由使P5及P7引子連接至流量槽表面之擴增位點製備流量槽。在一個實施例中，可經由用無矽烷丙烯醯胺（SFA）塗佈圖案化流量槽，且隨後經由硝基苄基UV可裂解部分將引子接枝於聚合SFA上，使引子連接至流量槽。可視情況藉由e場輔助運輸將引子引導至擴增位點且遠離間隙區域。或者，可將引子接枝於孔及間隙區域，但是間隙區域之引子因為UV曝光、拋光或自間隙區域移除引子之另一方法而被移除，但不移除位於孔內之引子。所製備的流量槽包括在擴增位點中之每一者處（例如，在孔中之每一者內）的引子苔且在間隙區域內若有，亦僅有少量引子。

【0194】 可使用一或多個泵使目標溶液主動從擴增位點上流過，泵需要能源來推動目標溶液相對於流量槽向前。在另一實施例中，可藉由打開一或多個閥門且藉由重力及/或擴散使目標溶液在擴增位點上移動，使目標溶液被動地從擴增位點上流過。當目標溶液從擴增位點上流過時，目標核酸在目標溶液內自由浮動。目標溶液中之目標核酸之數目超過擴增位點之數目，擴增位點諸如流量槽上之孔。

【0195】 在106，在流量槽上培育目標溶液。目標溶液藉由保持與流量槽上之擴增位點陣列在指定條件（例如溫度、壓力、濕度等）下接觸指定的一段時間來進行培育。舉例而言，目標溶液可在流量槽上在介於約20°C與約50°C之間、諸如介於約30與約42°C之間的溫度下，培育介於約30分鐘與約90分鐘之間的時間，諸如約40分鐘或約60分鐘。替代實施例中之培育條件可以不同。

【0196】 在培育過程中，目標溶液於流量槽上反應，在擴增位點產生擴增子純系群體。擴增子純系群體源自相應目標核酸。舉例而言，經由接頭末端與引子之間的雜交，使目標核酸連接至流量槽，從而使目標核酸結合至連接於擴

增位點上之引子。將目標核酸以一運輸速率轉移至擴增位點且結合至引子。運輸速率描述在諸如孔之擴增位點接種目標核酸的速率。運輸速率可視從擴增位點上流過的目標溶液中之目標核酸的濃度而定。舉例而言，相比於由目標溶液中較低濃度之目標核酸產生的運輸速率，目標溶液中較大濃度之目標核酸的運輸速率有所提高。運輸速率可藉由控制目標溶液中之目標核酸的濃度來控制。運輸速率亦可藉由控制目標溶液之黏度、控制目標核酸之平均大小、及/或確定是否在目標溶液中添加分子擁擠試劑來控制。舉例而言，可藉由增加目標溶液之黏度、增加目標核酸之平均大小或股長度及/或添加分子擁擠試劑（其妨礙自由浮動的核酸移動並結合至擴增位點處之引子的能力）來減小運輸速率。可藉由減小目標溶液之黏度、減小目標核酸之平均大小及/或不使用分子擁擠試劑來增加運輸速率。

【0197】 在目標溶液中存在試劑混合物允許同時將目標核酸運輸至擴增位點且擴增已經與擴增位點結合之目標核酸。舉例而言，酶使用NTP之核苷酸產生擴增子，擴增子為目標核酸之複本。擴增子與擴增位點結合。擴增子以擴增速率產生，擴增速率可基於第一試劑混合物內之試劑組分的濃度，諸如NTP及一或多種複製酶的濃度來進行控制。舉例而言，相對於由較低濃度之聚合酶及重組酶產生的擴增速率，較大濃度之聚合酶及重組酶的擴增速率有所增加。亦可藉由控制擴增位點之溫度及/或控制擴增位點處之引子的特性來影響擴增速率。舉例而言，引子之序列、長度及/或類型可經過修改或選擇以影響擴增速率。

【0198】 控制擴增速率超過運輸速率以便提供動力排除擴增。舉例而言，擴增速率可顯著超過運輸速率，使得在第一目標核酸結合至擴增位點處之一個引子之後，在其他目標核酸能夠結合至同一擴增位點處之引子之前，在擴增位點處之其他引子上形成源自第一目標核酸之多個擴增子。結果係在擴增位點處源自第一目標核酸之擴增子純系群體（或簇）。不同擴增位點具有源自不同目標

核酸之擴增子純系群體，使得在第二擴增位點處之擴增子純系群體源自不同於第一目標核酸之第二目標核酸。因此，沿著流量槽之一個孔可由源自目標溶液中之第一目標核酸之擴增子填充，且第二孔可由源自第二目標核酸之擴增子填充。擴增速率超過運輸速率預定的量或程度，使得動力排除在第一目標核酸到達特定擴增位點之後到達該位點的後續目標核酸接種於彼特定位點。

【0199】 使用空間分離的擴增子純系簇進行遺傳定序。舉例而言，可在接受螢光標記之核苷酸的合成定序程序中使用擴增子股作為模板。螢光標記之核苷酸在激勵之後發射特徵信號，其係用於測定目標核酸之序列。

【0200】 在108，自流量槽移除目標溶液。舉例而言，自流量槽移除目標溶液，使得沿著流量槽之表面不存在不與表面結合的自由浮動的目標核酸。因此，將從流量槽上洗去目標溶液內不與流量槽表面上之引子中之一者雜交的目標核酸。可藉由自流量槽抽走目標溶液、用中性溶液沖洗流量槽以自流量槽洗去目標溶液、使用重力自流量槽排出目標溶液及/或類似手段來移除目標溶液。在移除目標溶液之後，擴增位點處之擴增子純系簇及與流量槽結合的目標核酸仍然留在流量槽上。

【0201】 在一實施例中，在初始排除擴增步驟之後進行第二排除擴增步驟以便增加在流量槽上之擴增位點處的純系簇中之擴增子的數目。在合成定序過程中，相比於擴增子較少的簇，擴增位點處之簇中擴增子數目增加可提供更多信號及較佳的信號對雜訊比。舉例而言，因為簇中之擴增子數目較大，所以信號強度增加，同時背景雜訊保持恆定，所以得到較佳的信號對雜訊比。較佳的信號對雜訊比允許更準確且更有效的定序，因為在鹼基層面上之錯誤可能性較低。

【0202】 在110，混合第二試劑混合物以界定不含額外目標核酸的第二無目標溶液。在一個實施例中，無目標溶液沒有目標核酸。舉例而言，可在第二

混合儲集器中混合第二試劑混合物，第二混合儲集器不同於用於混合第一試劑混合物與目標核酸以界定目標溶液的混合儲集器。雖然此混合步驟110在方法100中顯示為在自流量槽移除目標溶液之後，但是可視情況在自流量槽移除目標溶液之前混合第二試劑混合物，諸如與混合第一試劑混合物與目標核酸以界定目標溶液並行地，在流量槽上培育目標溶液時，或類似情況。在一個實施例中，無目標溶液為不包括已從擴增位點上流過之目標溶液的任何再循環部分的新鮮溶液。

【0203】 在替代實施例中，無目標溶液可包括非零、痕量目標核酸。舉例而言，當第一目標溶液自混合儲集器流至流量槽時，剩餘量之目標溶液可保留在混合儲集器內，不流至流量槽。此外，隨後可在同一混合儲集器內混合第二試劑混合物，使得剩餘量之目標溶液與第二試劑混合物混合以界定無目標溶液。所得無目標溶液可含有來自混合儲集器中之剩餘量的目標溶液的痕量目標核酸。無目標溶液中之目標核酸之濃度小於100 ppm，該濃度足夠低以致於對無目標溶液在擴增位點上產生額外擴增子之反應的影響可忽略不計。

【0204】 無目標溶液中之第二試劑混合物可包括與目標溶液中之第一試劑混合物相同或不同類型的試劑組分。舉例而言，第二試劑混合物可包括與第一試劑混合物相同類型之NTP及相同類型之複製酶。應注意，雖然兩種溶液可使用相同類型試劑組分中之至少一些，但是第二試劑混合物由新的量的試劑組分組成。舉例而言，第一目標溶液在流動通過流量槽之後，沒有任何部分被回收至混合儲集器中，從而界定無目標溶液。

【0205】 第二試劑混合物中之試劑組分可包括以下中之一或多者：NTP、聚合酶、重組酶、解旋酶、單股結合蛋白、擁擠劑、緩衝劑及/或類似物。第二試劑混合物可包括與目標溶液中之第一試劑混合物不同量及/或不同濃度的試劑組分。舉例而言，第二試劑混合物相對於第一試劑混合物可包括較大濃度之複

製酶，諸如聚合酶、重組酶及/或解旋酶，以便增大在擴增位點形成擴增子之複製速率。在另一實施例中，相對於第一試劑混合物，第二試劑混合物可包括較大數量之緩衝劑組分（例如水、界面活性劑或水-界面活性劑混合物）以補償沒有向第二試劑混合物中添加目標核酸。第二試劑混合物可視情況包括一或多種與第一試劑混合物不同類型的試劑組分，諸如不同的蛋白質、引子或其類似物。舉例而言，第二試劑混合物可包括不存在於第一試劑混合物中之引子。引子可為具有P5引子序列之P5引子及/或具有P7引子序列之P7引子。

【0206】 在112，無目標溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過。無目標溶液可自含有無目標溶液之各別儲集器抽走或排出至流量槽。如上所述，無目標溶液可完全沒有目標核酸，或者因為用於製備無目標溶液之混合儲集器中所保留的剩餘量的目標溶液，所以可僅包括痕量目標核酸。因為無目標溶液不會包括超過痕量的目標核酸，所以無目標溶液從擴增位點上流過不會造成顯著量的目標核酸額外接種於擴增位點。更具體而言，沒有額外的目標核酸結合至擴增位點處之引子。基因庫之目標核酸一般僅在目標溶液流過流量槽時結合至擴增位點處之引子。

【0207】 在114，在流量槽上培育無目標溶液。可保持無目標溶液與流量槽上之擴增位點陣列在某些指定條件（例如溫度、濕度、壓力等）下接觸指定的一段時間。這段時間及/或條件可與目標溶液之培育類似或相同。在一個實施例中，無目標溶液可在流量槽上在約38℃之溫度下培育約20至約60分鐘，但是在其他實施例中，培育條件可以不同。

【0208】 無目標溶液在流量槽上之培育使擴增位點處之純系群體或簇中之擴增子的數目增加，從而提供更完全的成簇擴增。舉例而言，在初始排除擴增反應過程中，目標核酸及所產生之擴增子可結合至各擴增位點處之引子中的一些而非所有。因此，在擴增位點可存在大量未與目標核酸或擴增子結合且暴

露的可供結合的引子。該等引子確定各擴增位點處的暴露的引子子組。無目標溶液中之試劑混合物在暴露的引子上產生額外擴增子，減少了暴露的子組中之引子的數目。舉例而言，第二試劑混合物與純系簇中現有的擴增子反應，產生結合至暴露的引子的新擴增子。

【0209】 代替在擴增位點之預先存在的暴露引子上產生擴增子或除此之外，第二試劑混合物可包括額外引子。在一個實施例中，第二試劑混合物包括引子，諸如P5引子。在無目標溶液從流量槽上流過之前，線性化且移除擴增位點處之現有P5引子（包括簇中之擴增子之P5股），主要留下簇中之擴增子之P7股及任何剩餘的、暴露的（例如未使用的）表面結合的P7引子。因為無目標溶液包括來自該溶液中之第二試劑混合物之P5引子，所以無目標溶液從流量槽上流過有助於暴露的表面結合的P7引子上之簇的進一步擴增。因為DNA簇股需要架橋跨接（bridge over）且保持在兩個末端處與表面結合，所以表面P7引子中的一些在初始排除擴增之後暴露出來。位阻會限制對所有可供使用的暴露的表面引子的接近。藉由在使用第一目標溶液進行初始排除擴增步驟之後自表面移除引子中之一者（例如P5引子），對留在表面上之其他引子（例如P7引子）之可接近性增加。此外，不再需要擴增子簇股之一端表面結合來進行擴增。

【0210】 在另一實施例中，第二擴增可藉由不含額外引子之第二試劑混合物實現。舉例而言，表面結合的P5引子可在無目標溶液流過之前經線性化且自擴增位點移除，不使擴增子簇變性，使得簇之P5股保持表面結合。在此狀態下無目標溶液從擴增位點上流過，經由股侵入，使用未使用的P7引子，可以線性擴增方式產生更多P5股複本。此實施例中之第二擴增藉由使簇一端線性化，從而使得未使用的P7引子變得更可接近來實現。

【0211】 第二試劑混合物視情況包括連接至流量槽表面之引子，類似於第二接枝步驟，尤其是在適用於接枝之穩定條件下。舉例而言，可在水中或在低

鹽緩衝條件下，將雙環壬炔（bicyclononyne，BCN）連接的P5/P7接枝於PAZAM上。此第二接枝步驟可在第一目標溶液流過之後且在第二無目標溶液流過之前進行。或者，此第二接枝步驟中之引子可混合至第二試劑混合物中，只要接枝與第二試劑混合物相容即可。無目標溶液中之引子增加了擴增位點處之引子的總數且提供可形成額外擴增子以增加簇中之擴增子數的新位置。

【0212】 因為不使用額外的目標核酸來形成無目標溶液，所以簇中之擴增子數不需要額外遺傳物質即會增加，額外遺傳物相對於試劑組分來說獲得起來相對比較困難及/或成本相對較高。

【0213】 在116，在用流量槽進行後續定序步驟以進行基因庫定序之前，自流量槽移除第二無目標溶液。舉例而言，無目標溶液可自流量槽抽走，使用中性溶液自流量槽沖洗掉，或自流量槽排出。

【0214】 目標溶液及無目標溶液視情況在等溫條件下從擴增位點上流過，使得溶液及流量槽均不被主動加熱。此外，形成純系簇時不使用化學變性劑來使流量槽上之目標核酸及擴增子變性。因此，方法100可提高流量槽上之純系簇中之核苷酸股的產量及/或品質，而不需要施加熱或化學變性劑，這不同於其他某些擴增技術，諸如橋式擴增、RCA技術及MDA技術。

【0215】 在用於產生純系簇之方法100的替代實施例中，在向流量槽中引入第二無目標溶液之前，不自流量槽移除第一目標溶液。因此，方法100可跳過關於自流量槽移除目標溶液的步驟108。相反，在步驟106培育流量槽上之目標溶液第一段時間之後，在112，無目標溶液從流量槽上之擴增位點陣列上流過，而目標溶液仍留在流量槽上。舉例而言，在向流量槽中引入無目標溶液之前，可使目標溶液在流量槽上培育約20分鐘、約40分鐘、約60分鐘或類似時間。一旦無目標溶液在112從擴增位點陣列上流過，無目標溶液即與流量槽上之目標溶液混合。無目標溶液內之第二試劑混合物使流量槽內之試劑之總濃度增加，這

可增加產生擴增子之擴增速率。在114，在目標溶液存在下，使無目標溶液在流量槽上培育第二段時間。因此，目標溶液在流量槽上培育的總時間量為在106之第一段時間與在114之第二段時間的總和。在用流量槽進行後續定序步驟之前，在116，自流量槽移除由第一目標溶液及第二無目標溶液組成的組合溶液，諸如藉由抽走、用中性溶液沖洗、排出或類似手段。

【0216】 圖12為條形圖200，顯示在一個實施例中，針對不同簇產生方法，流量槽上之基因簇的信號強度。圖200說明當不同簇產生方法在類似環境條件下進行時，該等方法之信號強度的比較結果。圖200係對該等方法進行相對比較且不代表實際測試結果。y軸202表示當具有螢光標記之核苷酸的簇受到激勵時，在合成定序過程中所偵測到的簇信號強度，且該信號強度標記為200-550。比較三種不同的簇產生方法且該等方法在圖200上由相應的長條表示。長條204表示不進行任何額外擴增步驟來增加簇中之擴增子數的動力排除擴增（kinetic exclusion amplification, ExAmp）長條206表示動力排除擴增之後跟著習知橋式擴增。長條208表示根據本文所述之實施例的動力排除擴增，其中在第一輪動力排除擴增之後，使用不含目標核酸之無目標溶液進行第二輪動力排除擴增。

【0217】 如圖12中所示，排除擴增之後跟著第二輪排除擴增（例如長條208）具有最大強度，其次為橋式擴增（例如長條206），且沒有第二擴增的排除擴增（例如長條204）具有最低強度。舉例而言，若在204的單輪動力排除擴增產生信號強度約285的基因簇，則在206的動力排除擴增之後跟著橋式擴增將產生信號強度約320的基因簇，且在208的動力排除擴增之後跟著第二輪排除擴增將產生信號強度約420的基因簇。較大的信號強度指示，排除擴增之後跟著第二輪排除擴增能夠得到比其他兩種方法更好的信號對雜訊比。更好的信號對雜訊比可相對於其他兩種方法增加基因庫之定序及分析的準確性及/或效率。

【0218】 圖13為條形圖300，顯示在一個實施例中，與條形圖200相同的簇

產生方法的篩選通過百分比（PF%）值。圖300說明當不同簇產生方法在類似環境條件下進行時，可歸因於該等方法之PF%值的比較結果。圖300係對該等方法進行相對比較且不代表實際測試結果。y軸302表示藉由超出指定簡潔篩選條件的三種方法中之每一者產生之簇的百分比，指示彼等簇具有足夠進行定序的品質，且標記為60%-78%。長條304表示無第二擴增步驟的動力排除擴增，長條306表示動力排除擴增之後跟著橋式擴增，且長條308表示動力排除擴增之後跟著第二輪動力排除擴增。如圖13中所示，若在304之單輪動力排除擴增產生簇之約65%通過篩選的基因簇，則在306之動力排除擴增之後跟著橋式擴增將產生簇之約71%通過篩選的基因簇，且在208之動力排除擴增之後跟著第二輪排除擴增將產生簇之約73%通過篩選的基因簇。因此，在類似環境條件下，在排除擴增之後使用無目標溶液進行第二輪排除擴增可相對於其他成簇方法得到最大產量的品質簇。

【0219】 圖14為根據一實施例產生純系簇之流體系統400的圖解說明。可使用流體系統400進行方法100。流體系統400可類似於以全文引用之方式併入本文中的美國專利第9,410,977號中所闡述的流體系統。在所說明之實施例中之流體系統400包括圖案化流量槽402、試劑歧管404、試劑托盤或試劑盒406、控制器408及泵410。或者，流體系統400可相對於所說明之實施例包括額外組件、較少組件及/或至少一個不同組件。

【0220】 流量槽402包括多個泳道412，該等泳道在流量槽402之入口414與出口416之間延伸且流體連接至該入口及出口。泳道412可在其表面上包括孔或其他特徵以界定產生擴增子之純系群體或簇的擴增位點。試劑歧管404包括與流量槽402之入口414流體連通（例如流體連接）的閥門418。閥門418可包括或連接至至少一個混合儲集器（在本文中亦稱為貯藏儲集器），圖14中未示出。試劑歧管404進一步包括複數個通道420及孔口422。通道420在孔口422與閥門418

（及任何與閥門418有關的混合儲集器）之間延伸且將該等孔口流體連接至該閥門。在其他實施例中，試劑歧管404可具有多個閥門418。雖然未示出，但是試劑歧管404可包括設置於相應孔口422中的吸管。

【0221】 試劑托盤406包括多個含有不同試劑的試劑儲集器（未示出）。將試劑歧管404安裝於試劑托盤406上，使吸管與試劑儲集器對齊，使得吸管進入相應試劑儲集器且接觸其中的試劑。吸管自托盤406之試劑儲集器提取試劑，經由通道420及閥門418為流量槽402供應試劑。

【0222】 控制器408包括一或多個處理器（未示出）或其他基於邏輯之裝置，其基於儲存於有形的、非暫時性電腦可讀儲存媒體或記憶體（未示出）上之指令執行操作。控制器408可另外或或者包括一或多個基於裝置之硬佈線邏輯執行操作的硬佈線裝置。控制器408可表示基於軟體或硬佈線指令操作的硬體、指導硬體執行操作的軟體或其組合。控制器408與泵410及閥門418通信耦合（例如經由一或多個有線或無線連接）。舉例而言，控制器408能夠藉由使控制信號沿著有線或無線連接與各別裝置通信來控制泵410及閥門418之操作。控制器408可藉由控制允許通道420中之哪個通道能使通道420中之流體流動通過閥門418至流量槽402來控制閥門418。控制器408藉由控制由泵410產生之壓差推動流體沿著流體系統400向前來控制泵410。在所說明的實施例中，泵410可操作地耦合至流量槽402，但是泵410或者可連接至試劑歧管404。

【0223】 在一實施例中，控制器408控制泵410及閥門418來混合第一目標溶液且使其經由入口414從流量槽402上之擴增位點陣列上流過。目標溶液包括目標核酸及第一試劑混合物。目標核酸可與試劑歧管404內，諸如與閥門418有關的混合儲集器（未示出）中之一者內的第一試劑混合物組合。舉例而言，通道420之第一通道420A可含有基因樣品模板，其包括目標核酸於諸如水或另一溶劑之緩衝劑中。樣品模板可藉由吸管自試劑托盤406提取，或者可自不同於托盤

406之另一來源流入通道420A中。通道420之第二通道420B可含有第一試劑混合物之一或多種試劑組分，諸如NTP、聚合酶、單股結合蛋白及一或多種緩衝劑（例如，水、界面活性劑或類似物質）。第三通道420C及第四通道420D可含有第一試劑混合物之其他試劑組分，諸如在第三通道420C內含有重組酶且在第四通道420D內含有鎂及擁擠劑。雖然沒有專門提及，但是所有試劑組分皆可溶解於諸如水或另一緩衝劑之溶劑中。在準備使用目標溶液之前一直保持試劑組分中的一些分離可提高試劑混合物之使用壽命，因為試劑組分中的一些在與其他試劑組分混合時會不穩定。

【0224】 在一個實施例中，控制器408控制泵410及閥門418來混合某些指定數量之樣品模板與不同通道420A-D內之試劑組分，從而界定歧管404內之目標溶液，隨後使目標溶液流入流量槽402之入口414。舉例而言，可在混合儲集器中之一個混合儲集器內混合目標溶液之組分。或者，在允許目標溶液之組分在連接閥門418與入口414之入口管道（例如管子、導管或通道）424內或在流量槽402內混合之前，該等組分一直分離。

【0225】 如上所述，目標溶液在流量槽402上反應，在擴增位點產生源自相應目標核酸之擴增子純系群體。在排除擴增製程期間，將目標核酸轉移至擴增位點，同時擴增已與擴增位點結合之目標核酸以產生擴增子。控制器408可操控泵410及/或閥門418來控制目標核酸之濃度及目標溶液中之第一試劑混合物之濃度以便擴增速率超過運輸速率。舉例而言，控制器408可減小樣品模板之濃度及/或增加第一試劑混合物之一種或多種組分之濃度以便將擴增速率維持在明顯大於運輸速率之速率下來進行動力排除。

【0226】 控制器408亦可經組態以控制目標溶液在流量槽402上之培育條件，諸如流量槽402內之溫度、壓力、濕度及類似條件。在指定量的培育時間之後，控制器408可控制泵410自流量槽402移除目標溶液。目標溶液可經由出口416

流入廢棄物儲集器426中。視情況，目標溶液之一部分可經由管道428再循環至試劑歧管404及/或托盤406，以用於重新抽取或類似操作。自流量槽402移除目標溶液，使得在移除目標溶液之後，流量槽402中不存在自由浮動的目標核酸。舉例而言，在移除目標溶液之後，擴增位點處所存在的所有目標核酸皆與純系簇內之引子結合。

【0227】 在一實施例中，在目標溶液流經流量槽402之後，控制器408控制泵410及/或閥門418來混合無目標溶液且使其經由入口414從流量槽402上之擴增位點陣列上流過。無目標溶液包括第二試劑混合物且不含（例如沒有）額外目標核酸。舉例而言，控制器408可控制歧管404上之混合儲集器（未示出）內之第二、第三及第四通道420B-D內的試劑組分的混合以界定無目標溶液。控制器408控制閥門418來防止第一通道420A內之樣品模板添加至混合儲集器中，使得所得無目標溶液不包括額外目標核酸。在一個實施例中，可在一混合儲集器中混合第二試劑混合物，該混合儲集器不同於用於混合第一試劑混合物與樣品模板以界定目標溶液的混合儲集器。在替代實施例中，在先前含有目標溶液之同一個混合儲集器內混合第二試劑混合物，使得無目標溶液內可存在剩餘量之目標溶液（包括痕量目標核酸）。因此，第二無目標溶液沒有目標核酸或包括痕量目標核酸，痕量目標核酸不會在流量槽402之擴增位點處引起額外接種。

【0228】 第二試劑混合物可在試劑組分之類型、量及/或濃度方面不同於第一試劑混合物。舉例而言，第一試劑混合物及第二試劑混合物均可包括緩衝劑組分，諸如水、界面活性劑或水-界面活性劑溶液。因為無目標溶液不含樣品模板，所以控制器408可視情況在無目標溶液內包括較大數量之緩衝劑組分，相對於第一試劑混合物內之相同緩衝劑組分之量而言。額外量之緩衝劑補償因為缺乏樣品模板而減少的體積。因為緩衝劑體積增加，所以無目標溶液之體積可與目標溶液之體積類似或相同。此外，控制緩衝劑之量亦影響第二試劑混合物

中之試劑組分之濃度，因此可將濃度控制成與目標溶液內之試劑組分之濃度類似或相同。視情況，控制器408可相對於第一試劑混合物改變第二試劑混合物之試劑組分的類型（例如，不同的酶、蛋白質、寡核苷酸或類似物）、量及/或濃度中之至少一些，諸如修改擴增速率。

【0229】 控制器408控制泵410及/或閥門418使無目標溶液流至流量槽402。在流量槽402上培育無目標溶液，其中溶液與流量槽402中之擴增位點處之擴增子反應，在純系簇中產生額外擴增子。如上所述，第二輪排除擴增使用無目標溶液，相對於無目標溶液不流經隨後槽402而言，產生較大產量的具有通過品質的簇。品質簇之產量增加可提高定序準確性及/或效率，因為在合成定序過程中，簇中存在額外核苷酸股產生螢光信號。第二輪排除擴增亦無需使用額外量之包括目標核酸的樣品模板即可達成。

補充說明

【0230】 本申請案通篇有提及各種公開案、專利及專利申請案。為了更充分地描述本發明主題所屬領域之目前先進技術，此等公開案之揭示內容以全文引用的方式併入本申請案中。

【0231】 本文在說明書及申請專利範圍中所用之術語「包含（comprise）」、「包括（include）」、「含有（contain）」等以及其變化形式意欲為開放式的，不僅包括所敘述之要素，而且進一步涵蓋任何額外要素。本說明書通篇提及「一個實施例（one example）」、「另一實施例（another example）」、「一實施例（an example）」等時意謂結合該實施例描述之特定要素（例如特徵、結構及/或特性）包括於本文所述之至少一個實施例中，且可或可不存在於其他實施例中。此外應理解，除非上下文另外明確規定，否則關於任何實施例所述之要素可在各種實施例中以任何適合方式組合。

【0232】 應瞭解，涵蓋以上概念及下文更詳細論述之額外概念的所有組合

（假設此等概念並不相互矛盾）作為本文所揭示之本發明主題的一部分。詳言之，涵蓋出現在本發明結尾處的所主張主題的所有組合作為本文所揭示之本發明主題的一部分。亦應瞭解，本文中明確採用的亦可出現在以引用方式併入之任何揭示案中的術語應符合與本文所揭示之特定概念大部分一致的含義。

【0233】 應理解，本文所提供的範圍包括所陳述的範圍及陳述範圍內的任何值或子範圍。舉例而言，在約20°C與約50°C之間的範圍應理解為不僅包括在約20°C與約50°C之間明確列舉的極限值，而且包括個別值，諸如約28°C、約35°C、約46.5°C等，及子範圍，諸如約25°C至約49°C、約30°C至約40°C等。此外，當用「約（about）」及/或「實質上（substantially）」來描述值時，其意指涵蓋所陳述值之微小變化（至多+/-10%）。

【0234】 雖然已詳細描述若干實施例，但應理解，所揭示之實施例可加以修改。因此，以上說明應視為非限制性的。雖然已關於以上所提供之實施例描述本發明主題，但是應理解，可在不背離本發明主題之範圍的情況下，對實施例進行各種修改。因此，本發明主題之範圍僅受申請專利範圍限制。

【符號說明】

【0235】

100：方法

102：步驟

104：步驟

106：步驟

108：步驟

110：步驟

112：步驟

114：步驟

116：步驟

200：圖

202：Y軸

204：長條

206：長條

208：長條

300：圖

302：Y軸

304：長條

306：長條

308：長條

400：系統

402：流量槽

404：試劑歧管

406：試劑托盤

408：控制器

410：泵

412：泳道

414：入口

416：出口

418：閥門

420：通道

420A：第一通道

420B：第二通道

420C：第三通道

420D：第四通道

422：孔口

424：入口導管

426：廢棄物儲集器

428：管道

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種在擴增位點處產生純系群體（clonal population）及在所述擴增位點處增加所述純系群體中之擴增子之數目之方法，其包含：

使第一溶液與不同的第二溶液於流量槽上反應，其中該流量槽包括複數個在所述擴增位點處連接至該流量槽的引子，其係藉由使該第一溶液從該流量槽上之擴增位點之陣列上流過且隨後使該第二溶液從該擴增位點之陣列上流過；

該第一溶液包括多個目標核酸及第一試劑混合物，該第一試劑混合物包含核苷三磷酸（NTP）及一或多種複製酶，該第一溶液中之目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至所述擴增位點，其中該第一溶液在該流量槽上反應以使所述目標核酸及擴增子與引子之第一子組（subset）結合，該第一試劑混合物擴增所述與擴增位點結合之目標核酸以產生源自相應目標核酸之擴增子之純系群體，所述擴增子以超過該運輸速率之擴增速率產生；

且該第二溶液包括第二試劑混合物但不含所述目標核酸，該第二試劑混合物包含該第一試劑混合物之NTP及一或多種複製酶，該第二溶液在該流量槽上反應，在所述擴增位點處產生額外數量的所述純系群體中之擴增子，且

使所述額外的擴增子與不同於該第一子組的所述引子之被暴露的子組中之引子中的至少一些結合，所述額外的擴增子由排除擴增以超過該運輸速率之擴增速率產生。

【第2項】如申請專利範圍第1項之方法，其進一步包含在該第二溶液從該流量槽上之擴增位點之陣列上流過之前，自該流量槽移除該第一溶液，使得當該第二溶液從該擴增位點之陣列上流過時，該流量槽上僅有的目標核酸結合至該流量槽且不在該第一溶液內自由浮動。

【第3項】如申請專利範圍第1項之方法，其中該擴增位點之陣列沿著該流量槽之表面設置，其中該第一溶液經由該流量槽之入口流過該流量槽之表面，

且其中該第二溶液隨後經由該入口流過該流量槽之表面。

【第4項】如申請專利範圍第1項之方法，其中該流量槽包括複數個在所述擴增位點處連接至該流量槽的引子，其中所述引子中之至少一些作為該第一溶液從該擴增位點之陣列上流過之反應而結合至該第一溶液中之目標核酸，且其中該不含目標核酸之第二溶液隨後從該擴增位點之陣列上流過不會導致所述引子與所述目標核酸之額外結合。

【第5項】如申請專利範圍第1項之方法，其中該第二試劑混合物包括聚合酶。

【第6項】如申請專利範圍第1項之方法，其中該第二試劑混合物包括解旋酶及重組酶（*recombinase*）中之一或多者。

【第7項】如申請專利範圍第1項之方法，其中所述擴增位點為沿著該流量槽之表面的孔，所述孔藉由沿著該表面的間隙區域彼此分開。

【第8項】如申請專利範圍第1項之方法，其進一步包含使用以下者中之一或多者控制所述目標核酸至所述擴增位點之運輸速率：控制該第一溶液中之目標核酸之濃度、控制該第一溶液之黏度、控制所述目標核酸之平均大小、以及控制該第一溶液中之分子擁擠試劑（*molecular crowding reagent*）的存在或不存在。

【第9項】如申請專利範圍第1項之方法，其進一步包含使用以下者中之一或多者控制所述目標核酸之擴增速率：控制該第一試劑混合物中之NTP之濃度、控制該第一試劑混合物中之一或多種複製酶之濃度、以及控制所述擴增位點處之溫度。

【第10項】如申請專利範圍第1項之方法，其中該第一溶液及該第二溶液從該擴增位點之陣列上等溫流過。

【第11項】一種使用第一試劑混合物及第二試劑混合物產生核酸文庫之陣

列之流體系統，其中該第一試劑混合物在流量槽上反應以在擴增位點處產生源自相應目標核酸的擴增子之純系群體且其中該第二試劑混合物在該流量槽上反應以在該擴增位點處在所述擴增子之純系群體中增加多個擴增子，其中其試劑歧管包括複數個在其至少一個閥門與至少一包含第一試劑混合物的第一試劑儲集器及一包含第二試劑混合物的第二試劑儲集器之間流體連接的通道，其包含：

試劑歧管，其包括至少一個與包括擴增位點之陣列之流量槽的入口流體連通的閥門，其中該流量槽包括複數個在所述擴增位點處連接至該流量槽的引子，該試劑歧管進一步包括複數個在該至少一個閥門與相應試劑儲集器之間流體連接的通道，第一試劑儲集器包含第一溶液，該第一溶液包括多個目標核酸及第一試劑混合物，該第一試劑混合物包含核苷三磷酸（NTP）及一或多種複製酶，第二試劑儲集器包含第二溶液，該第二溶液包含第二試劑混合物但不含含目標核酸相應第一及第二溶液，該第二試劑混合物包含該第一試劑混合物之NTP及一或多種複製酶；及

包括一或多個處理器之控制器，該控制器用於控制該至少一個閥門及泵，其中該泵可操作地耦合至該流量槽，以界定該試劑歧管內的溶液使第一溶液經由該入口從該流量槽上之擴增位點之陣列上流過且隨後使不同的第二溶液經由該入口從該流量槽上之擴增位點之陣列上流過；

其中該第一溶液包括多個目標核酸及第一試劑混合物，該第一試劑混合物包含核苷三磷酸（NTP）及一或多種複製酶，該第一溶液中之目標核酸之數目超過該陣列中之擴增位點之數目，該第一溶液於該流量槽上反應以使所述目標核酸及擴增子結合至引子之第一子組以在所述擴增位點處產生源自相應目標核酸之擴增子之純系群體，該第一溶液中之目標核酸以一運輸速率運輸至且結合至所述擴增位點，該第一試劑混合物擴增所述與擴增位點結合之目標核酸以以超過該運輸速率之擴增速率產生所述擴增子；

且其中該第二溶液包括第二試劑混合物但不含所述目標核酸，該第二試劑混合物包含該第一試劑混合物之NTP及一或多種複製酶，該第二溶液於該流量槽上反應，在所述擴增位點處產生額外的多個所述純系群體中之擴增子，

且使所述額外的擴增子與不同於該第一子組的所述引子之被暴露的子組中的引子中的至少一些結合，所述額外的擴增子由排除擴增以超過該運輸速率之擴增速率產生。

【第12項】如申請專利範圍第11項之流體系統，其中該控制器係用於控制該至少一個閥門及該泵來混合包括所述目標核酸之樣品模板與該第一試劑混合物以形成該第一溶液，且其中該控制器係用於控制該至少一個閥門及該泵以藉由混合該第二試劑混合物而不混合該樣品模板與該第二試劑混合物來形成該第二溶液。

【第13項】如申請專利範圍第11項之流體系統，其中該控制器係用於控制該至少一個閥門及該泵以在該第二溶液從該流量槽上之擴增位點之陣列上流過之前自該流量槽移除該第一溶液，使得當該第二溶液從該擴增位點之陣列上流過時，所存在的僅有的目標核酸結合至該流量槽且不在該第一溶液內自由浮動。

【發明圖式】

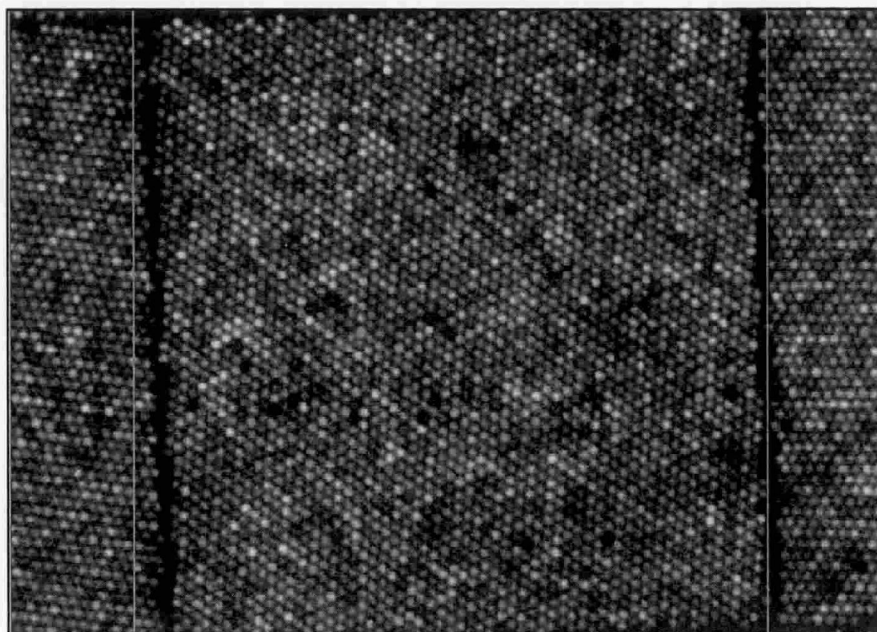


圖1A

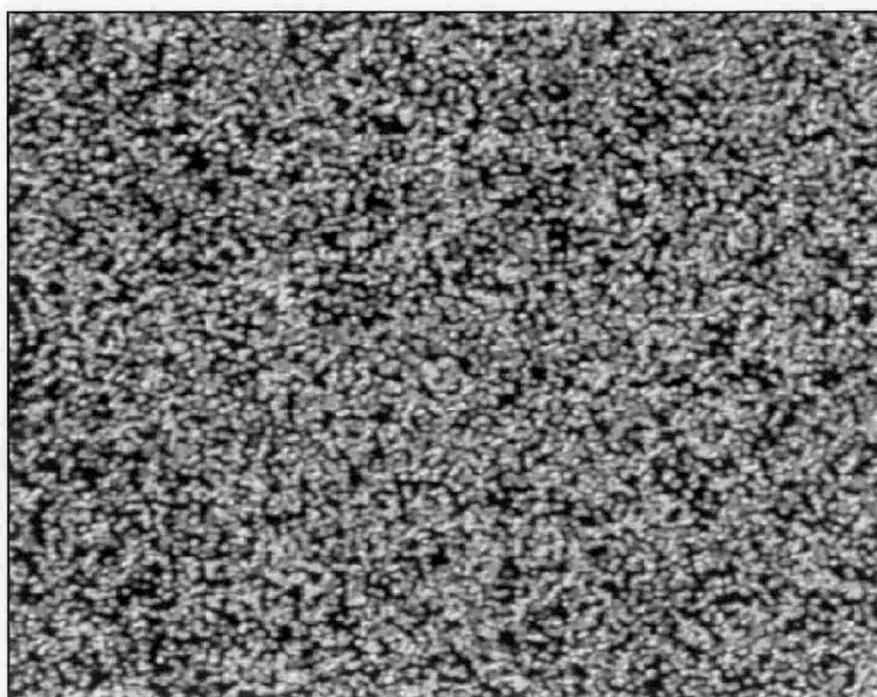


圖1B

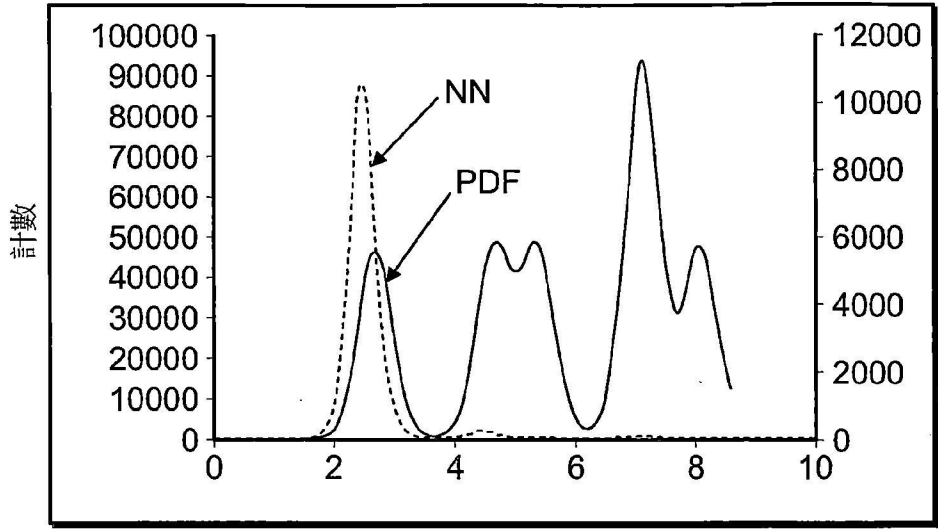


圖2

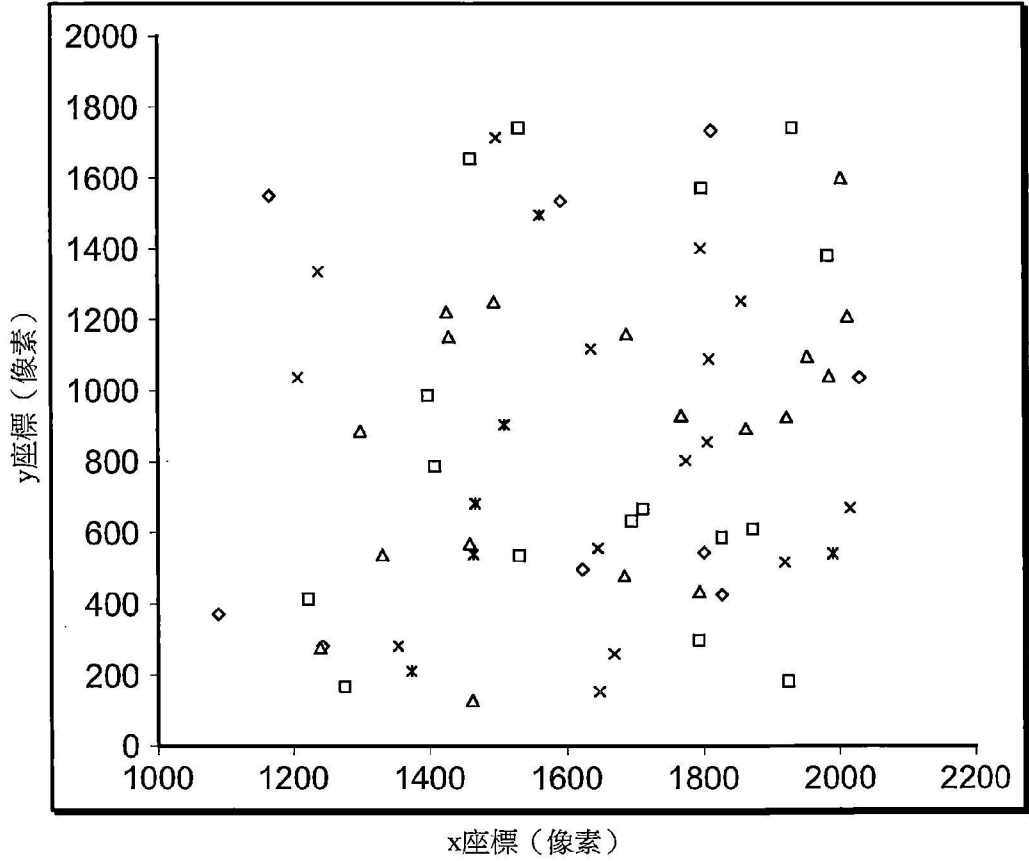


圖3

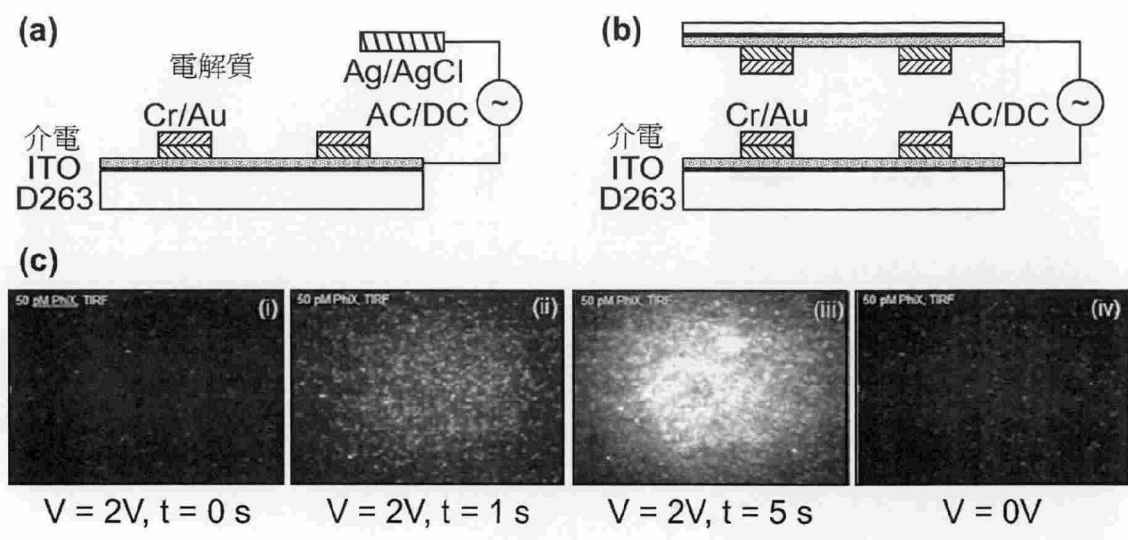


圖4

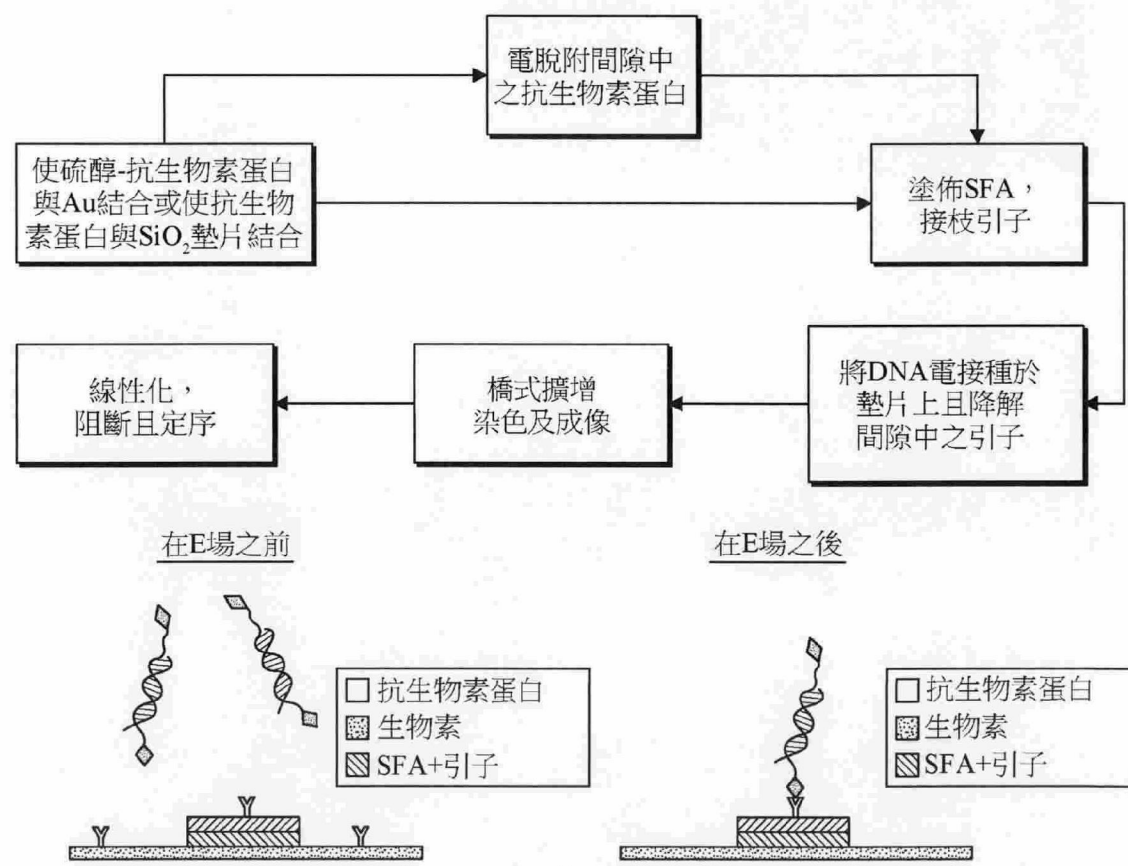


圖5

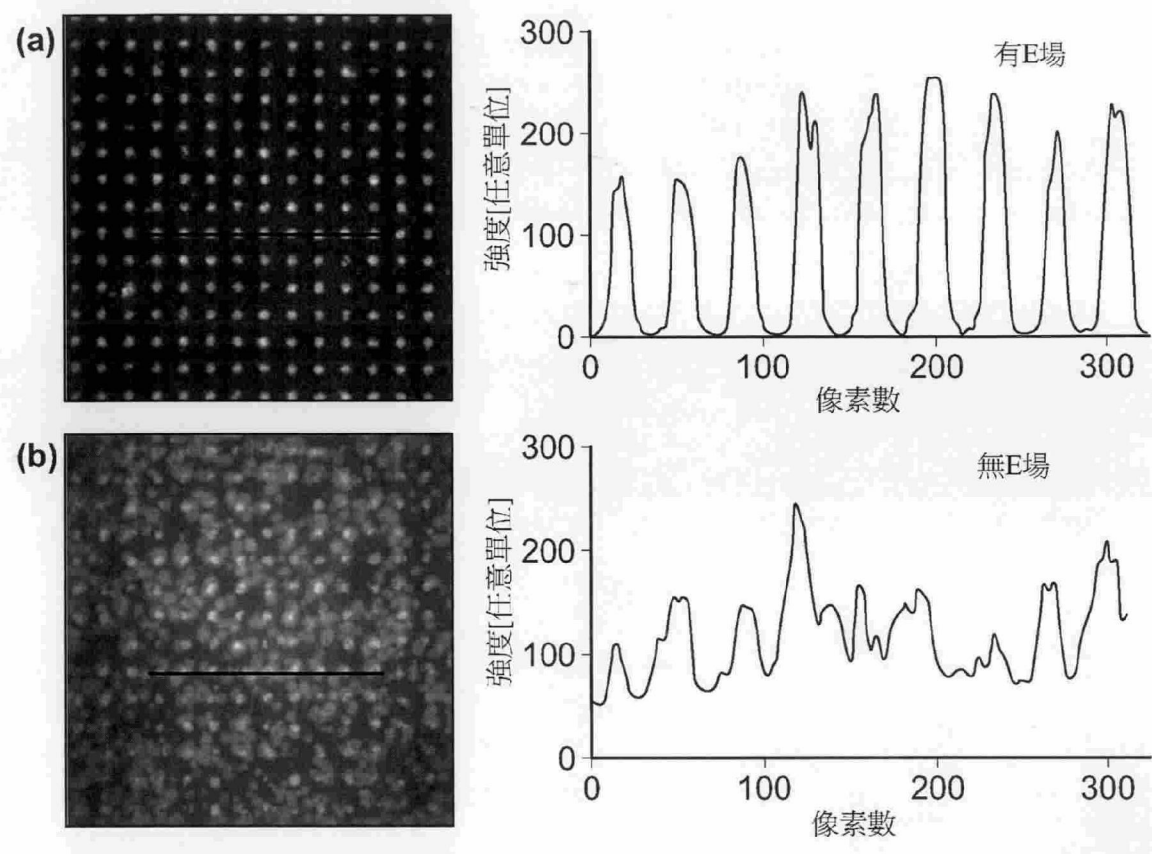


圖6

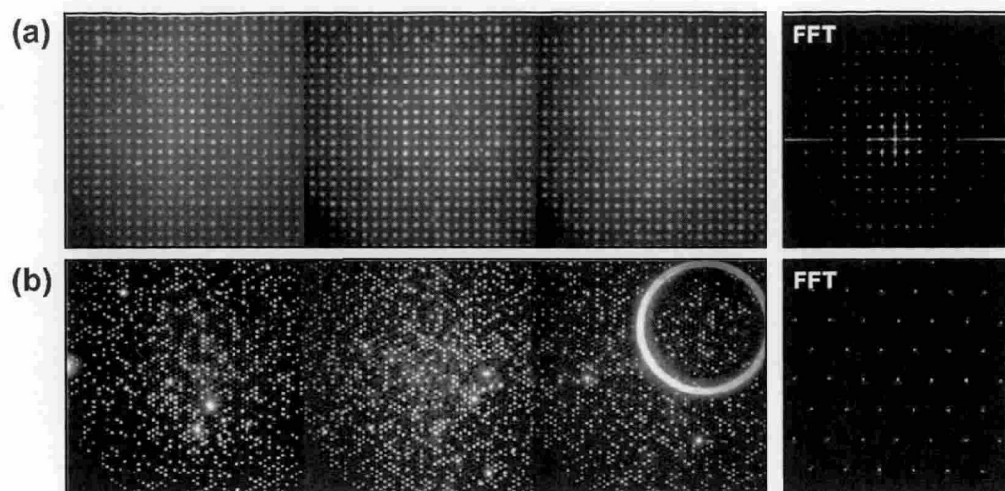


圖7

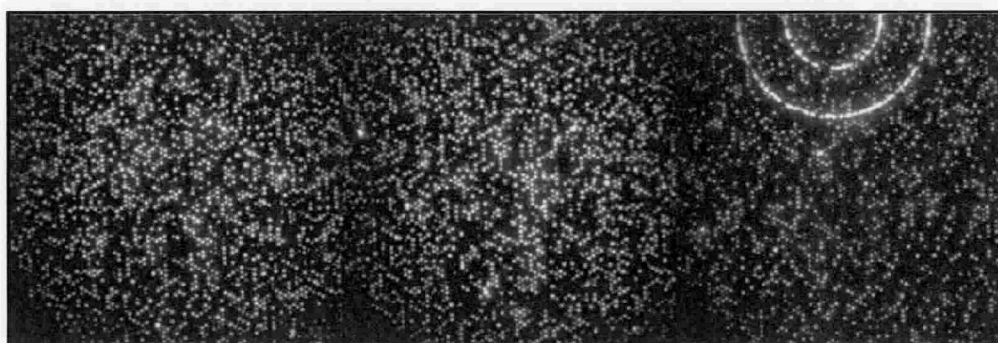
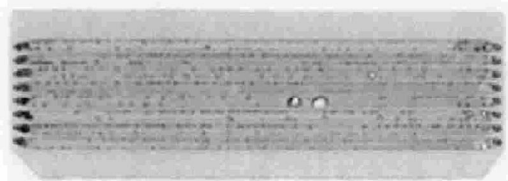
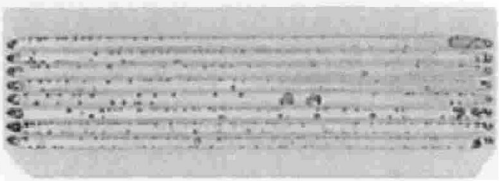


圖8

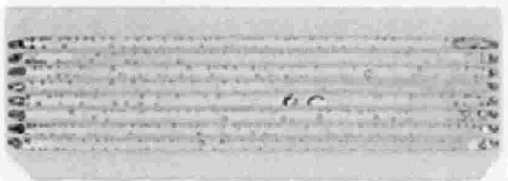
(a) 1. 在E場之前



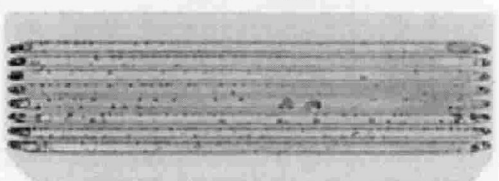
3. 在E場及P5、P7再接枝之後



2. 在E場之後



4. 在E場、SFA再塗佈及P5、P7再接枝之後



(b)

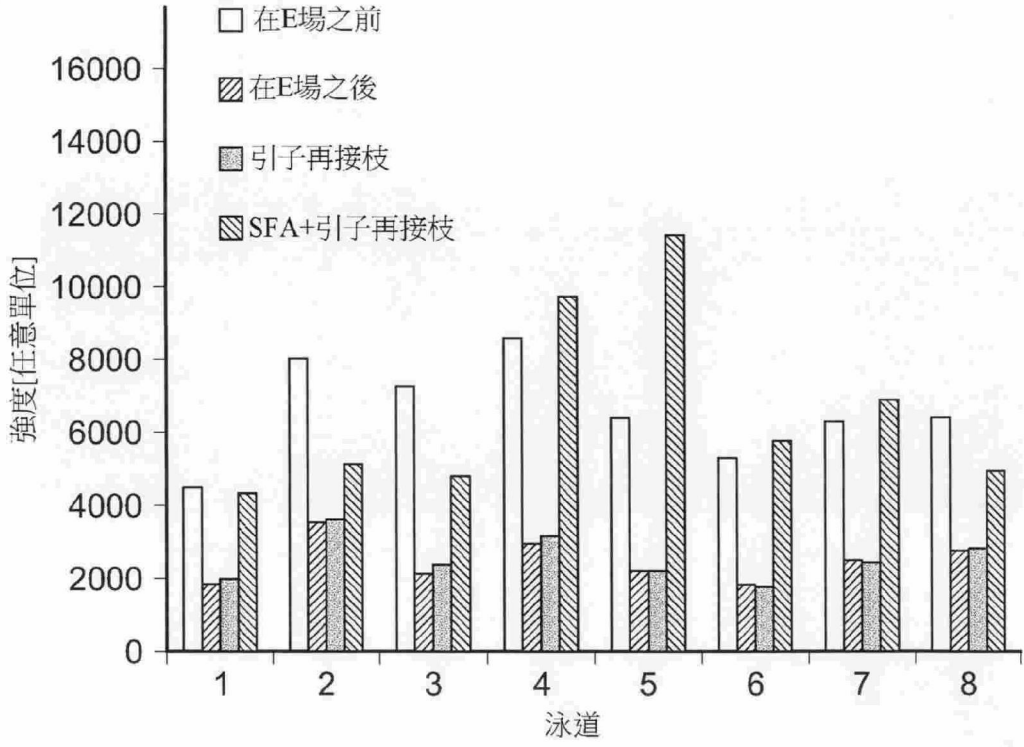


圖9

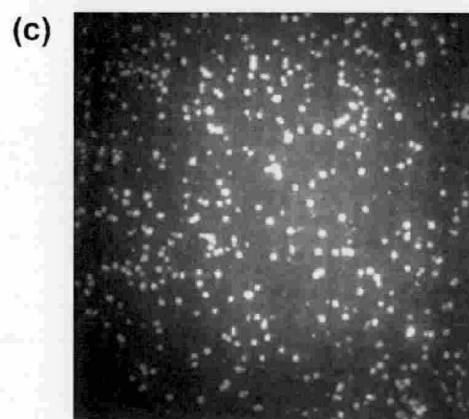
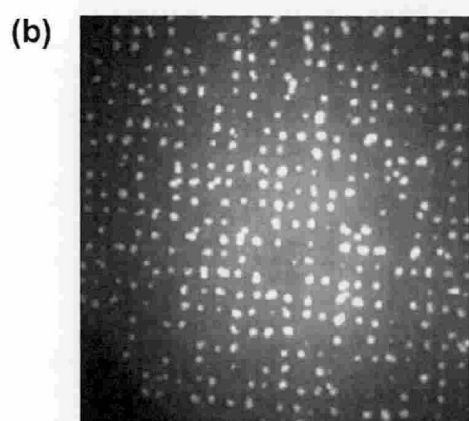
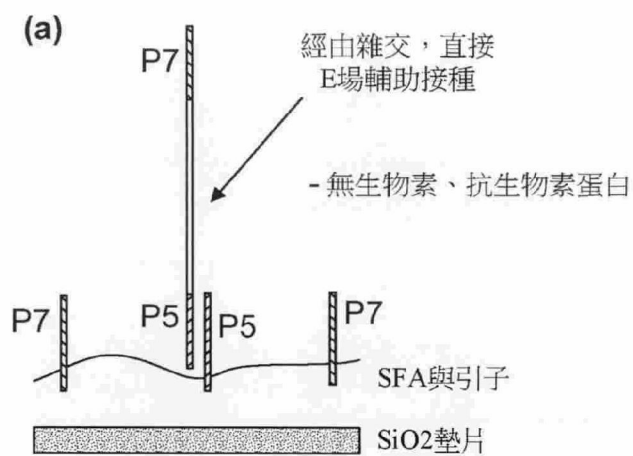


圖10

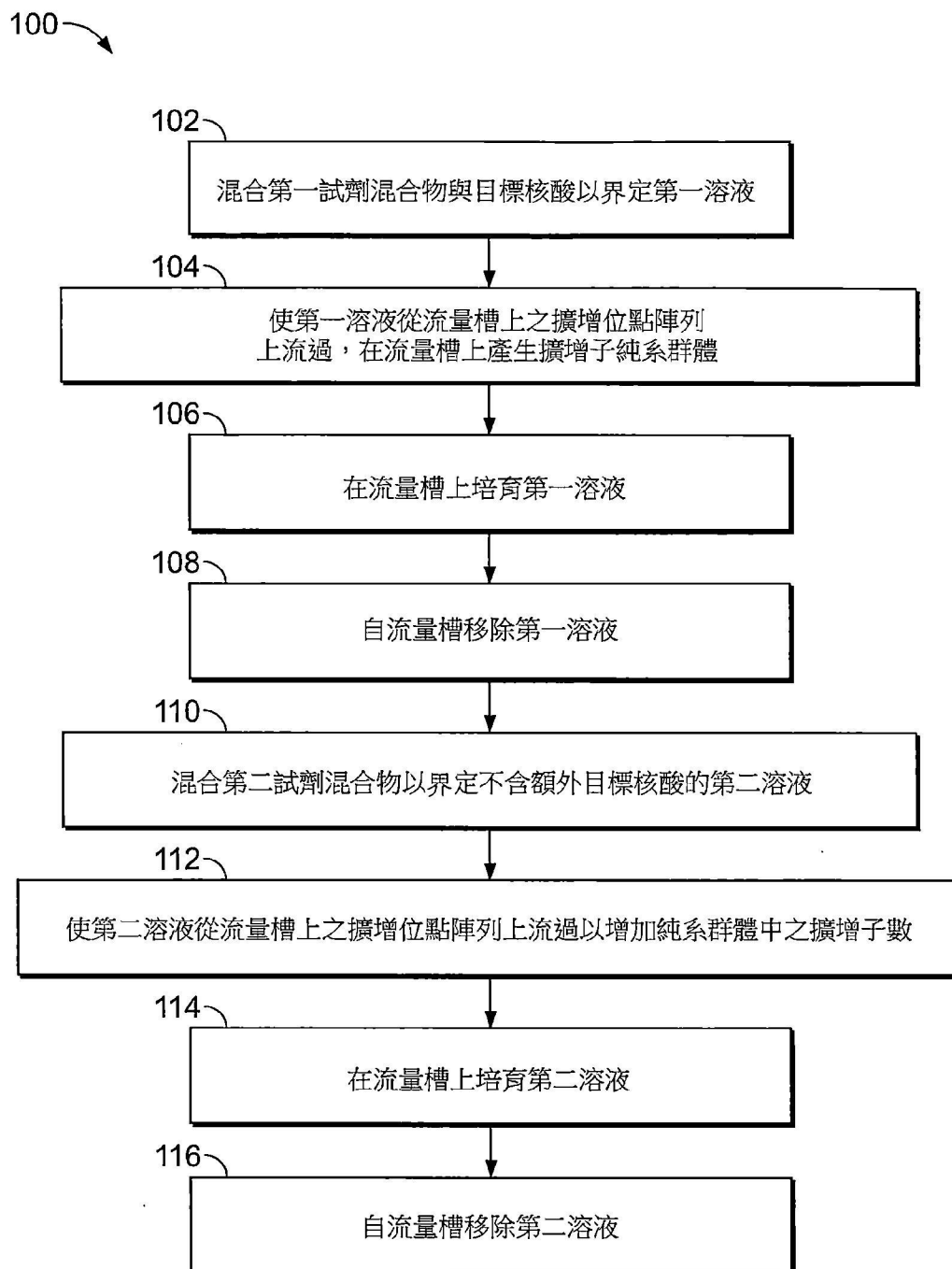


圖11

200

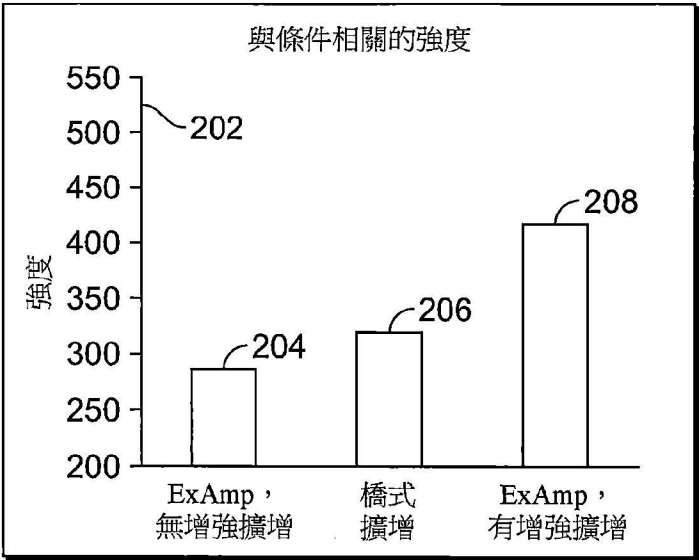


圖12

300

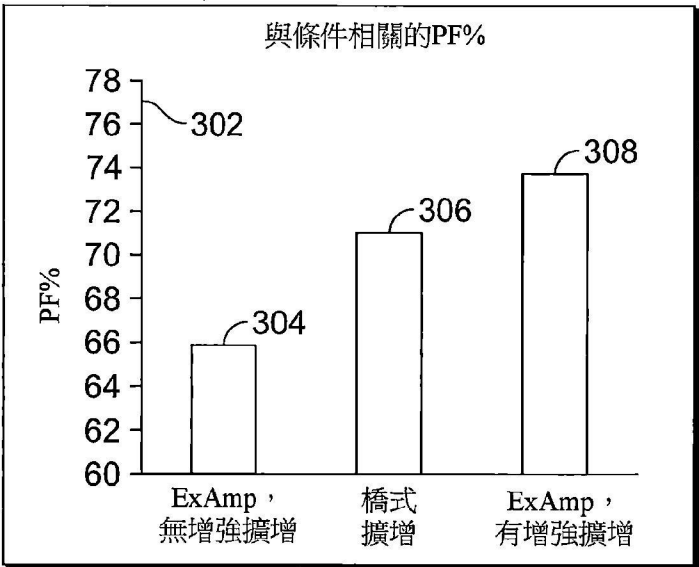


圖13

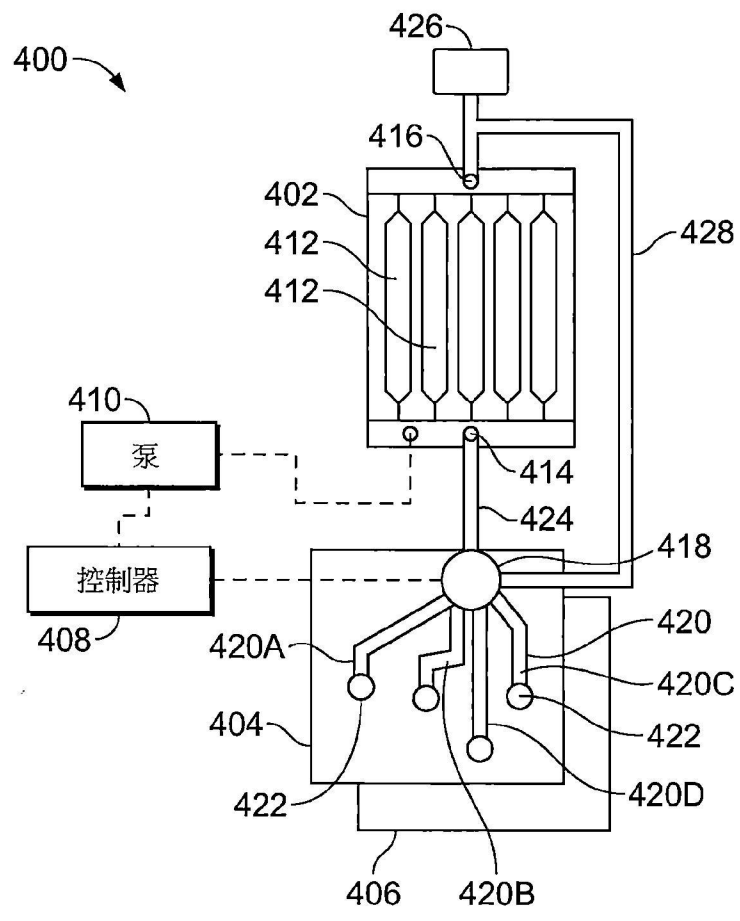


圖14