(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월27일
(11) 등록번호 10-2425463
(24) 등록일자 2022년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6816 (2018.01) *C07H 21/00* (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2018.05)
C07H 21/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7036561
(22) 출원일자(국제) 2017년05월20일
심사청구일자 2020년05월20일
(85) 번역문제출일자 2018년12월17일
(65) 공개번호 10-2019-0007495
(43) 공개일자 2019년01월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/033706
(87) 국제공개번호 WO 2017/201514
국제공개일자 2017년11월23일
(30) 우선권주장
62/339,790 2016년05월20일 미국(US)
62/426,144 2016년11월23일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2002543847 A*
US20100317005 A1*
WO2009114182 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
퀀텀-에스아이 인코포레이티드
미국 06437 코네티컷주 길포드 올드 화이트필드 스트리트 530
(72) 발명자
로스버그, 조나단, 엠.
미국 06437 코네티컷주 길포드 운카스 포인트 로드 215
래키, 제레미
미국 06437 코네티컷주 길포드 노튼타운 로드 636
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

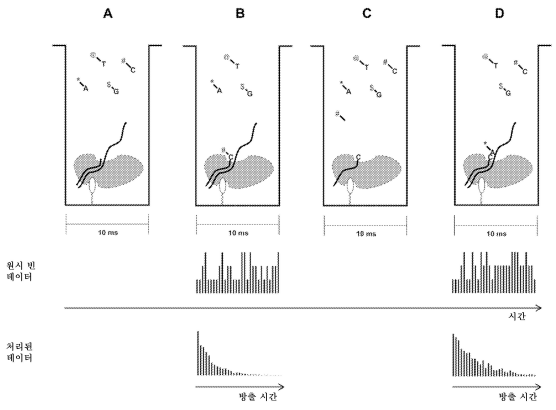
전체 청구항 수 : 총 21 항 심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 **핵산 서열분석을 위한 표지된 뉴클레오티드 조성물 및 방법**

(57) 요 약

발광 수명 및/또는 강도에 기초하여 분자를 서열분석하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, 핵산을 서열분석하는 방법은 핵산 서열분석 반응 동안 혼입된 일련의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명, 및 임의로 발광 강도를 결정하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 조성물을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
C12Q 2525/101 (2013.01)
C12Q 2525/197 (2013.01)
C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2563/103 (2013.01)
(72) 발명자
리드, 브라이언
미국 06443 코네티컷주 매디슨 홀 로드 94
시, 싱화
미국 06443 코네티컷주 매디슨 라일 드라이브 9
후앙, 하이동
미국 06643 코네티컷주 매디슨 세닉 로드 71
도드, 데이비드
미국 06437 코네티컷주 길포드 하이 스트리트 43

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) 표적 체적에서 주형 핵산, 프라이머, 및 중합 효소를 포함하는 복합체를 복수의 유형의 발광 표지된 분자에 노출시키는 단계이며, 여기서 각각의 유형의 발광 표지된 분자는 핵산 링커를 통해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결된 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 발광 표지된 분자를 포함하고, 여기서 핵산 링커는 보호 요소를 포함하고, 적어도 1종의 유형의 발광 표지된 분자의 보호 요소가 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 위치한 1개 이상의 비표지된 줄기 루프를 포함하는 것인 단계;

(ii) 1개 이상의 여기 에너지의 일련의 펄스를 표적 체적 부근으로 향하게 하는 단계;

(iii) 프라이머를 포함하는 핵산에의 뉴클레오티드의 순차적 혼입 동안 발광 표지된 분자로부터 복수의 방출된 광자를 검출하는 단계; 및

(iv) 방출된 광자의 타이밍 및 임의로 주파수를 결정함으로써 혼입된 뉴클레오티드의 서열을 식별하는 단계

를 포함하는, 주형 핵산의 서열을 결정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 적어도 1종의 유형의 발광 표지된 분자의 1개 이상의 발광 표지 중 적어도 1개가 1개 이상의 비표지된 줄기 루프에 의해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에서 분리된 줄기 루프의 루프에 부착된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 핵산 링커가 단일 가닥 또는 이중 가닥인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 핵산 링커가 이중 가닥이고,

제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 따라 어느 한 쪽에 1개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 내부 위치에 부착된 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥; 및

1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드 가닥이며, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 어닐링된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥

을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 2개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 핵산 링커에 부착되고, 2개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 각각 복수의 티미딘 뉴클레오티드를 포함하는 링커를 통해 부착되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 티미딘 링커가 분지형 티미딘 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 적어도 1종의 유형의 발광 표지된 분자의 보호 요소가 적어도 1종의 에너지 흡수 변형을 포함하고, 적어도 1종의 에너지 흡수 변형이 삼중항 상태 켄처; 덴드론 변형; 또는 모노사카라이드-TEG, 디사카라이드, N-아세틸 모노사카라이드, TEMPO-TEG, 트롤록스-TEG, 또는 글리세롤 덴드리머를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 핵산 링커가 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개에 어닐링된 제3 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 핵산 링커가 제1, 제2, 및 제3 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개에 어닐링된 제4 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 가닥이 홀리데이 접합부를 형성하는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 적어도 1종의 유형의 발광 표지된 분자의 보호 요소가 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 위치한 2개의 비표지된 줄기 루프를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

핵산 링커를 통해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결된 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 발광 표지된 분자이며, 여기서 핵산 링커는 보호 요소를 포함하고, 보호 요소가 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 위치한 1개 이상의 비표지된 줄기 루프를 포함하는 것인 발광 표지된 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 핵산 링커가 단일 가닥 또는 이중 가닥인 발광 표지된 분자.

청구항 14

제13항에 있어서, 핵산 링커가 이중 가닥이고,

제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 따라 어느 한 쪽에 1개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 내부 위치에 부착된 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥; 및

1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드 가닥이며, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 어닐링된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥

을 포함하는 것인 발광 표지된 분자.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 핵산 링커에 부착되고, 2개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 각각 복수의 티미딘 뉴클레오티드를 포함하는 링커를 통해 부착되는 것인 발광 표지된 분자.

청구항 16

제15항에 있어서, 티미딘 링커가 분지형 티미딘 링커를 포함하는 것인 발광 표지된 분자.

청구항 17

제12항에 있어서, 1개 이상의 발광 표지 중 적어도 1개가 1개 이상의 비표지된 줄기 루프에 의해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에서 분리된 줄기 루프의 루프에 부착된 것인 발광 표지된 분자.

청구항 18

제14항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개에 어닐링된 제3 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함하는 발광 표지된 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 제1, 제2, 및 제3 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개에 어닐링된 제4 올리고뉴클레오티

드 가닥을 추가로 포함하는 발광 표지된 분자.

청구항 20

제19항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 가닥이 홀리데이 접합부를 형성하는 것인 발광 표지된 분자.

청구항 21

제12항에 있어서, 보호 요소가 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 위치한 2개의 비표지된 줄기 루프를 포함하는 것인 발광 표지된 분자.

청구항 22

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2016년 11월 23일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/426,144, 및 2016년 5월 20일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/339,790에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 출원의 분야

[0004] 본 출원은 일반적으로, 생물학적 및/또는 화학적 샘플의 신속한, 대규모 병렬, 정량 분석을 수행하기 위한 방법, 조성물, 및 디바이스, 및 상기 디바이스를 제작하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 생물학적 샘플의 검출 및 분석은 생물학적 검정 ("생물검정")을 사용하여 수행될 수 있다. 생물검정은 통상적으로 크고 값비싼 실험실 장비를 수반하고, 그 장비를 작동시키고 생물검정을 수행하도록 훈련받은 연구 과학자를 필요로 한다. 또한, 생물검정은 통상적으로 대량으로 수행되므로 검출 및 정량화를 위해 다량의 특정한 유형의 샘플이 필요하다.

[0006] 일부 생물검정은 샘플을 특정한 파장의 광을 방출하는 발광 마커로 태그부착하는 것에 의해 수행된다. 마커는 발광을 유발하는 광원으로 조명되고, 발광 광은 광검출기에 의해 검출되어 마커에 의해 방출된 발광 광의 양이 정량화된다. 발광 마커를 사용하는 생물검정은 통상적으로 샘플을 조명하기 위한 값비싼 레이저 광원과, 조명된 샘플로부터의 발광을 수집하기 위한 복잡한 발광 검출 광학기기 및 전자기기를 수반한다.

발명의 내용

[0007] 다른 측면 중에서, 본 개시내용은 핵산을 통해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결된 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 발광 표지된 뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 핵산은 보호 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 보호 요소는 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 폴리머라제의 활성 부위 내 또는 그 근처에 존재하는 경우에 폴리머라제를 1개 이상의 발광 표지로부터의 손상 효과로부터 보호하는 핵산의 1종 이상의 특색 및/또는 그에 대한 변형에 관한 것이다.

[0008] 일부 실시양태에서, 핵산은 단일-가닥이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 이중-가닥이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 이중-가닥 핵산은 제1 올리고뉴클레오티드 가닥을 따라 어느 한 쪽에 1개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 내부 위치에 부착된 1개 이상의 발광 표지를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 가닥, 및 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드 가닥이며, 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 어닐링된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 발광 표지된 뉴클레오티드는 복수의 티미딘 뉴클레오티드를 포함하는 링커를 통해 핵산에 부착된 2개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 분지형 링커, 예를 들어, 분지형 티미딘 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분지형 링커는 분지형 티미딘 링커를

포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 각각의 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 화학식 Nu-T(T)$_n$T-R의 티미딘 링커를 포함하며, 여기서 Nu는 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 나타내고, T는 티미딘 뉴클레오티드를 나타내고, n은 1 내지 30의 값을 갖는 정수이고, R은 1개 이상의 추가의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 연결하는 수렴 지점을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 수렴 지점은 핵산의 올리고뉴클레오티드 가닥에 추가로 직접적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 수렴 지점은 올리고뉴클레오티드 가닥에, 예를 들어, 추가의 티미딘 링커 및/또는 추가의 수렴 지점을 통해 추가로 간접적으로 부착된다.

[0010] 일부 실시양태에서, 핵산의 보호 요소는 적어도 1종의 에너지-흡수 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 에너지-흡수 변형은 삼중항 상태 켄처를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 에너지-흡수 변형은 덴드론 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 에너지-흡수 변형은 모노사카라이드-TEG, 디사카라이드, N-아세틸 모노사카라이드, TEMPO-TEG, 트롤록스-TEG, 또는 글리세롤 덴드리머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 보호 요소는 1개 이상의 줄기-루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 줄기-루프는 비표지되며, 예를 들어, 1개 이상의 줄기-루프는 줄기-루프의 루프 및/또는 줄기에 부착된 발광 표지를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 줄기-루프는 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 사이에 있는 핵산에 위치한다. 이러한 실시양태에서, 1개 이상의 비표지된 줄기-루프는 폴리머라제-보호 효과를 제공하는 입체 장벽 및/또는 흡수 장벽을 제공할 수 있다.

[0011] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지는 적어도 1개 이상의 줄기-루프의 루프에 부착될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 보호 요소, 예를 들어 1개 이상의 비표지된 줄기-루프는 1개 이상의 발광 표지를 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트로부터 분리한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드의 핵산은 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개에 어닐링된 제3 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 제1, 제2, 및 제3 올리고뉴클레오티드 가닥 중 적어도 1개에 어닐링된 제4 올리고뉴클레오티드 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥은 홀리데이 접합부를 형성한다.

[0013] 일부 측면에서, 본 개시내용은 주형 핵산의 서열을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 체적에서 주형 핵산, 프라이머, 및 중합 효소를 포함하는 복합체를 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드에 노출시키는 것을 포함하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 핵산을 통해 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결된 1개 이상의 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 보호 요소를 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트 조성물 중 임의의 것을 사용한 핵산 서열분석 방법을 제공한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 방법은 1개 이상의 여기 에너지의 일련의 펄스를 표적 체적 부근으로 향하게 하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 프라이머를 포함하는 핵산에의 순차적 혼입 동안 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 복수의 방출된 광자를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 방출된 광자의 타이밍 및 임의로 주파수를 결정함으로써 혼입된 뉴클레오티드의 서열을 식별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 반응 혼합물 중 4종의 상이한 유형의 뉴클레오티드 (예를 들어, 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민/우라실)는 각각 1개 이상의 발광 분자 (예를 들어, 1개 이상의 발광 표지)로 표지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 유형의 뉴클레오티드는 1개 초과의 동일한 발광 분자에 연결될 수 있다 (예를 들어, 2개 이상의 동일한 형광 염료가 뉴클레오티드에 연결된다). 일부 실시양태에서, 각각의 발광 분자는 1개 초과의 뉴클레오티드 (예를 들어, 2개 이상의 동일한 뉴클레오티드)에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 초과의 뉴클레오티드는 1개 초과의 발광 분자에 (예를 들어, 1개 이상의 보호 요소를 포함하는 핵산 링커를 통해) 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 모든 4종의 뉴클레오티드는 동일한 스펙트럼 범위 (예를 들어, 520-570 nm) 내에서 흡수 및 방출하는 발광 분자로 표지된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 방향족 또는 헤테로방향족 화합물을 포함하는 염료로부터 선택될 수 있고, 피렌, 안트라센, 나프탈렌, 아크리딘, 스틸벤, 인돌, 벤즈인돌, 옥사졸, 카르바졸, 티아졸, 벤조티아졸, 페난트리딘, 페녹사진, 포르피린, 퀴놀린, 에티듐, 벤즈아미드, 시아닌, 카르보시아닌, 살리실레이트, 안트라닐레이트, 쿠마린, 플루오로세인, 로다민, 또는 다른 유사 화합물일 수 있다. 예시적인 염료는 크산텐 염료, 예컨대 플루오레세인 또는 로다민 염료, 나프탈렌 염료, 쿠마린 염료, 아크리딘 염료, 시아닌 염료, 벤족사졸 염료, 스틸벤 염료, 피렌 염료, 프탈로시아닌 염료, 피코빌리단백질 염료, 스쿠아레인 염료,

바디피(BODIPY) 염료 등을 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 546, Cy®3B, 알렉사 플루오르® 555 및 알렉사 플루오르® 555, 및 FRET 쌍 알렉사 플루오르® 555 및 Cy®3.5를 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 알렉사 플루오르® 555, Cy®3.5, 알렉사 플루오르® 546, 및 딜라이트(DyLight)® 554-R1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 알렉사 플루오르® 555, Cy®3.5, ATTO Rho6G, 및 딜라이트® 554-R1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 알렉사 플루오르® 555, Cy®3B, ATTO Rho6G, 및 딜라이트® 554-R1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 알렉사 플루오르® 555, Cy®3B, ATTO 542, 및 딜라이트® 554-R1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 알렉사 플루오르® 555, Cy®3B, ATTO 542, 및 알렉사 플루오르® 546을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드 세트 중 발광 표지는 Cy®3.5, Cy®3B, ATTO Rho6G, 및 딜라이트® 554-R1을 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 유형, 적어도 2종의 유형, 적어도 3종의 유형, 또는 적어도 4종의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 6-TAMRA, 5/6-카르복시로다민 6G, 알렉사 플루오르® 546, 알렉사 플루오르® 555, 알렉사 플루오르® 568, 알렉사 플루오르® 610, 알렉사 플루오르® 647, 아베리어 스타(Aberrior Star) 635, ATTO 425, ATTO 465, ATTO 488, ATTO 495, ATTO 514, ATTO 520, ATTO Rho6G, ATTO 542, ATTO 647N, ATTO Rho14, 크로미스(Chromis) 630, 크로미스 654A, 크로메오(Chromeo)™ 642, CF™514, CF™532, CF™543, CF™546, CF™546, CF™555, CF™568, CF™633, CF™640R, CF™660C, CF™660R, CF™680R, Cy®3, Cy®3B, Cy®3.5, Cy®5, Cy®5.5, 디오믹스(Dyomics)-530, 디오믹스-547P1, 디오믹스-549P1, 디오믹스-550, 디오믹스-554, 디오믹스-555, 디오믹스-556, 디오믹스-560, 디오믹스-650, 디오믹스-680, 딜라이트® 554-R1, 딜라이트® 530-R2, 딜라이트® 594, 딜라이트® 635-B2, 딜라이트® 650, 딜라이트® 655-B4, 딜라이트® 675-B2, 딜라이트® 675-B4, 딜라이트® 680, 하이라이트(HiLyte)™ 플루오르 532, 하이라이트™ 플루오르 555, 하이라이트™ 플루오르 594, 라이트사이클러(LightCycler)® 640R, 세타(Seta)™ 555, 세타™ 670, 세타™700, 세타™u 647, 및 세타™u 665로 이루어진 군으로부터 선택된 발광 염료를 포함하거나, 또는 본원에 기재된 바와 같은 화학식 (염료 101), (염료 102), (염료 103), (염료 104), (염료 105), 또는 (염료 106)을 갖는다.

[0019] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 유형, 적어도 2종의 유형, 적어도 3종의 유형, 또는 적어도 4종의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 알렉사 플루오르® 546, 알렉사 플루오르® 555, Cy®3B, Cy®3.5, 딜라이트® 554-R1, 알렉사 플루오르® 546, ATTO Rho6G, ATTO 425, ATTO 465, ATTO 488, ATTO 495, ATTO 514, ATTO 520, ATTO Rho6G, 및 ATTO 542로 이루어진 군으로부터 선택된 발광 염료를 포함한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 546을 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3B를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 2개의 알렉사 플루오르® 555를 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 555 및 Cy®3.5를 포함한다.

[0021] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 555를 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3.5를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 546을 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 딜라이트® 554-R1을 포함한다.

[0022] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 555를 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3.5를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 ATTO Rho6G를 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 딜라이트® 554-R1을 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 555를 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3B를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 ATTO Rho6G를 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 딜라이트® 554-R1을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 555를 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3B를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 ATTO 542를 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 딜라이트® 554-R1을 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 555를 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3B를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 ATTO 542를 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 546을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 제1 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 Cy®3.5를 포함하고, 제2 유형의 발광 표지된 뉴클

레오티드는 Cy®3B를 포함하고, 제3 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 ATTO Rho6G를 포함하고, 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 딜라이트® 554-R1을 포함한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 유형, 적어도 2종의 유형, 적어도 3종의 유형, 또는 적어도 4종의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 532, 알렉사 플루오르® 546, 알렉사 플루오르® 555, 알렉사 플루오르® 594, 알렉사 플루오르® 610, CF™532, CF™543, CF™555, CF™594, Cy®3, 딜라이트® 530-R2, 딜라이트® 554-R1, 딜라이트® 590-R2, 딜라이트® 594, 딜라이트® 610-B1로 이루어진 군으로부터 선택된 발광 염료를 포함하거나, 화학식 (염료 101), (염료 102), (염료 103), (염료 104), (염료 105), 또는 (염료 106)을 갖는다.

[0028] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 532, 알렉사 플루오르® 546, 알렉사 플루오르® 555, CF™532, CF™543, CF™555, Cy®3, 딜라이트® 530-R2, 딜라이트® 554-R1로 이루어진 군으로부터 선택된 발광 염료를 포함하고, 제3 및 제4 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드는 알렉사 플루오르® 594, 알렉사 플루오르® 610, CF™594, 딜라이트® 590-R2, 딜라이트® 594, 딜라이트® 610-B1로 이루어진 군으로부터 선택된 발광 염료를 포함하거나, 또는 화학식 (염료 101), (염료 102), (염료 103), (염료 104), (염료 105), 또는 (염료 106)을 갖는다.

[0029] 특정 실시양태에서, 적어도 1종의 유형, 적어도 2종의 유형, 적어도 3종의 유형, 또는 적어도 4종의 유형의 발광-표지된 뉴클레오티드 분자는 TagBFP, mTagBFP2, 아주라이트(Azurite), EBFP2, 엠칼라마1(mKalama1), 시리우스(Sirius), 사파이어(Sapphire), T-사파이어, ECFP, 세루레안(Cerulean), SCFP3A, 엠터퀴이즈(mTurquoise), 엠터퀴이즈2, 단량체 미도리이시-시안(Midoriishi-Cyan), TagCFP, mTFP1, EGFP, 에메랄드(Emerald), 슈퍼폴더(Superfolder) GFP, 단량체 아자미 그린(Azami Green), TagGFP2, mUKG, 엠와사비(mWasabi), 클로버(Clover), 엠네온그린(mNeonGreen), EYFP, 시트린(Citrine), 베누스(Venus), SYFP2, TagYFP, 단량체 쿠사비라-오렌지(Kusabira-Orange), mKOK, mKO2, 엠오렌지(mOrange), 엠오렌지2, 엠라즈베리(mRaspberry), 엠체리(mCherry), 엠스트로베리(mStrawberry), 엠탄제린(mTangerine), 티디토마토(tdTomato), TagRFP, TagRFP-T, 엠애플(mApple), 엠루비(mRuby), 엠루비2, 엠플럼(mPlum), 에이치씨레드-탠덤(HcRed-Tandem), 엠케이트2(mKate2), 엠넵튠(mNeptune), NirFP, TagRFP657, IFP1.4, iRFP, 엠케이마 레드(mKeima Red), LSS-엠케이트1, LSS-엠케이트2, mBeRFP, PA-GFP, PA엠체리1, PATagRFP, 카에데(Kaede) (녹색), 카에데 (적색), KikGR1 (녹색), KikGR1 (적색), PS-CFP2, 엠에오스2(mEos2) (녹색), 엠에오스2 (적색), PS엠오렌지, 또는 드론파(Dronpa)로 이루어진 군으로부터 선택된 발광 단백질을 포함한다.

[0030] 본 출원의 측면은 식별하고자 하는 분자 (예를 들어, 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트)에 여기 에너지를 전달하고, 여기 후에 방출된 광자를 검출하기 위한 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 검출하는 것은 각각의 검출된 발광에 대해 발광과 여기 에너지의 이전 펄스 사이의 시간 기간을 기록하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출하는 것은 복수의 검출된 발광 각각에 대해 발광과 여기 에너지의 이전 펄스 사이의 시간 기간을 기록하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 여기 에너지의 복수의 펄스가 전달된다. 식별하고자 하는 분자의 발광 마커 (예를 들어, 1개 이상의 발광 표지)는 각각의 펄스 또는 일부의 펄스에 의해 여기될 수 있다. 특정 실시양태에서, 복수의 발광은 1개 이상의 센서에 의해 검출된다. 식별하고자 하는 분자의 발광 마커는 각각의 여기 또는 일부의 여기 후에 발광을 방출할 수 있다. 발광을 발생시키는 여기 이벤트의 분율은 마커의 발광 양자 수율에 기초한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지의 수를 증가시키는 것은 양자 수율을 증가시킬 수 있다 (예를 들어, 발광 방출의 수를 증가시킬 수 있다). 추가적으로 마커에 의해 방출된 모든 발광이 검출되지는 않을 것이고, 예를 들어 일부 발광은 센서에서 벗어나게 될 것이다. 특정 실시양태에서, 여기 에너지 또는 에너지들은 흡수 스펙트럼 및 마커가 주어진 스펙트럼 범위에서의 여기 후에 광자를 방출하는 파장을 포함한, 발광 마커의 발광 특성에 기초하여 선택된다.

[0031] 특정 실시양태에서, 펄스 여기 에너지의 주파수는 검출하고자 하는 발광 표지된 분자 (예를 들어, 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트)의 발광 특성 (예를 들어, 발광 수명)에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 펄스 사이의 갭은 여기되는 1개 이상의 발광 표지된 분자의 발광 수명보다 길다. 일부 실시양태에서, 갭은 여기되는 1개 이상의 발광 표지된 분자의 발광 수명보다 약 2배 내지 약 10배, 약 10배 내지 약 100배, 또는 약 100배 내지 약 1000배 더 길다. 일부 실시양태에서, 갭은 여기되는 1개 이상의 발광 표지된 분자의 발광 수명보다 약 10배 더 길다.

[0032] 특정 실시양태에서, 펄스 여기 에너지의 주파수는 모니터링되는 화학적 공정에 기초하여 선택된다. 서열분석 반응의 경우에, 발광 표지된 뉴클레오티드가 혼입되는 동안 표적 체적에 전달되는 펄스의 수는 부분적으로, 검

출되는 방출된 광자의 수를 결정할 것이다. 일부 실시양태에서, 주파수는 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입 동안 충분한 수의 광자가 검출되도록 선택되고, 여기서 충분한 수는 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 발광 표지된 뉴클레오티드를 구별하는데 필요한 광자의 수이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 방출된 광자의 파장에 기초하여 구별된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 발광 방출 수명, 예를 들어, 펄스 여기 및 방출 검출 사이의 시간에 기초하여 구별된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 방출된 광자의 파장 및 발광 방출 수명에 기초하여 구별된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 방출 신호의 발광 강도에 기초하여 (예를 들어, 방출의 주파수 또는 시간 기간 내에서의 방출 이벤트의 총 수에 기초하여) 구별된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 방출 신호의 발광 강도 및 발광 수명에 기초하여 구별된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 발광 강도 및 파장에 기초하여 구별된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 발광 강도, 파장, 및 발광 수명에 기초하여 구별된다.

[0033] 본 출원의 또 다른 측면에 따르면, 표적 핵산을 서열분석하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산을 서열분석하는 방법은 (i) (a) 상기 표적 핵산, (b) 상기 표적 핵산에 상보적인 프라이머, (c) 핵산 폴리머라제, 및 (d) 상기 표적 핵산에 상보적인 신장 핵산 가닥에의 혼입을 위한 뉴클레오티드를 포함하는 혼합물을 제공하는 단계이며, 여기서 상기 뉴클레오티드는 상이한 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 상기 발광 표지된 뉴클레오티드는 상기 신장 핵산 가닥에의 순차적인 혼입 동안 검출가능한 신호를 생성하고, 상기 상이한 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드에 대한 검출가능한 신호는 (예를 들어, 검출가능한 신호의 타이밍 및/또는 주파수를 결정함으로써) 시간 도메인 내에서 서로를 차별화가능하게 하는 것인 단계; (ii) 상기 (i)의 혼합물을 상기 프라이머의 연장에 의해 상기 신장 핵산 가닥을 생성하는데 충분한 조건 하에 중합 반응에 적용하는 단계; (iii) 상기 신장 핵산 가닥에의 순차적 혼입 동안 상기 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 상기 검출가능한 신호를 측정하는 단계; 및 (iv) 상기 신장 핵산 가닥에의 순차적 혼입 시 상기 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 상기 측정된 검출가능한 신호의 타이밍 및/또는 주파수를 결정하여 상기 신장 핵산 가닥에의 상기 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입의 시간 순서를 식별함으로써, 상기 표적 핵산의 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0034] 일부 실시양태에서, 표적 핵산 또는 핵산 폴리머라제는 지지체에 부착된다. 일부 실시양태에서, 혼입의 시간 순서는 (i)의 혼합물을 중합 반응에 적용하는 단계에 후속하여 식별된다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 신호는 광학 신호이다. 일부 실시양태에서, 광학 신호는 발광 신호이다. 일부 실시양태에서, 측정된 검출가능한 신호의 타이밍 및/또는 주파수를 결정하는 단계는 (i) 1개 이상의 센서에서 상기 검출가능한 신호를 수신하는 것; 및 (ii) 상기 1개 이상의 센서에 수신된 상기 검출가능한 신호에 반응하여 생성된 복수의 전하 캐리어의 전하 캐리어를, 상기 전하 캐리어가 생성된 시간에 기초하여 적어도 1개의 전하 캐리어 저장 영역으로 선택적으로 향하게 하는 것을 포함한다.

[0035] 일부 실시양태에서, 상기 측정된 검출가능한 신호의 타이밍 및/또는 주파수는 붕괴 수명의 측정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 측정된 검출가능한 신호의 타이밍 및/또는 주파수는 검출가능한 신호를 검출하는 1개 이상의 센서에서의 검출가능한 신호의 도달 시간의 측정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 검출가능한 신호에 의해 생성된 전하 캐리어를 검출가능한 신호의 도달 시간에 기초하여 1개 이상 센서와 연관된 빈으로 분리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 측정된 검출가능한 신호의 타이밍 및/또는 주파수는 비-스펙트럼 측정이다.

도면의 간단한 설명

[0036] 통상의 기술자는 본원에 기재된 도면이 예시 목적만을 위한 것임을 이해할 것이다. 일부 경우에 본 발명의 다양한 측면이 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해 과장되어 또는 확대되어 제시될 수 있다는 것이 이해된다. 도면에서, 유사 참조 문자가 다양한 도면 전체에서 유사 특색, 기능적으로 유사한 및/또는 구조적으로 유사한 요소를 일반적으로 지칭한다. 도면은 반드시 척도화된 것은 아니고, 대신 본 교시의 원리를 예시하는데 강조를 두었다. 도면은 어떠한 방식으로도 본 발명의 교시의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

본 발명의 특색 및 이점은 도면과 함께 이해할 때, 하기에 제시된 상세한 설명으로부터 더욱 명백해 질 것이다.

도면을 참조하여 실시양태를 기재할 때, 방향 언급 ("위", "아래", "상부", "저부", "좌측", "우측", "수평", "수직" 등)이 사용될 수 있다. 이러한 언급은 단지 통상의 배향으로 도면을 보는 독자를 돕기 위한 것이다. 이들 방향 언급은 구현된 디바이스의 바람직한 또는 유일한 배향을 기재하는 것으로 의도되지 않는다. 디바이

스는 다른 배향으로 구현될 수 있다.

상세한 설명으로부터 명백한 바와 같이, 도면 (예를 들어, 도 1-9)에 도시되고 본 출원 전반에 걸쳐 예시의 목적으로 추가로 기재된 예는 비제한적 실시양태를 기재하고, 일부 경우에 보다 분명한 예시의 목적으로 특정 공정을 단순화하거나 특색 또는 단계를 생략할 수 있다.

도 1은 핵산 서열분석을 위한 다양한 컴포넌트를 함유하는 샘플 웰의 비제한적 개략도를 보여준다.

도 2는 4개의 스테이지; (A) 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입 전; (B) 제1 혼입 이벤트; (C) 제1 및 제2 혼입 이벤트 사이의 기간; 및 (D) 제2 혼입 이벤트 동안의 핵산 서열분석의 비제한적, 예시적인 실험을 스테이지 (A)-(D) 동안의 원시 및 처리된 데이터의 상응하는 예와 함께 보여준다.

도 3은 상이한 발광 수명을 갖는 4종의 발광 분자에 대한 비제한적 신호 vs. 방출 시간 및 붕괴 확률에 대한 정규화된 누적 분포 함수를 도시한다.

도 4는 예시적인 발광 표지된 뉴클레오티드에 대한 발광 수명의 비제한적 차트 및 발광 강도의 차트를 보여준다.

도 5는 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드를 사용한 비제한적 서열분석 실험을 도시한다: (A) 녹색 및 적색 펄스로부터 검출된 발광의 트레이스; (B) 각각의 뉴클레오티드 혼입의 발광 수명 및 강도에 기초한 녹색 펄스로부터의 데이터의 감소; 및 (C) 실험적으로 결정된 서열과 주형 서열의 정렬.

도 6은 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드를 사용한 비제한적 서열분석 실험을 도시한다: (A) 녹색 펄스로부터 검출된 발광의 트레이스; (B) 각각의 뉴클레오티드 혼입의 발광 수명 및 강도에 기초한 녹색 펄스로부터의 데이터의 감소; 및 (C) 실험적으로 결정된 서열과 주형 서열의 정렬.

도 7은 비제한적 서열분석 실험을 도시하며, 여기서 발광-표지된 뉴클레오티드의 발광 특성은 서열분석 반응에 혼입되는 염기를 식별하는데 사용된다.

도 8a 및 도 8b는 핵산 보호 분자에 의해 분리된 발광 분자 및 뉴클레오티드의 비제한적 예를 도시한다.

도 8c는 폴리머라제 활성 부위에 도킹된, 비제한적 핵산 보호 분자를 포함하는 발광 표지된 뉴클레오티드를 도시한다. 제시된 바와 같이, 염료 분자는 5'-아민-염료 링커를 통해 핵산에 부착되고, 뉴클레오티드는 아지도-프로판올 링커를 통해 핵산에 부착된 뉴클레오시드 헥사포스페이트를 포함한다.

도 8d는 핵산 보호 분자의 비제한적 예를 도시한다.

도 8e는 15-염기-쌍 핵산 보호 분자를 포함하는 발광 표지된 데옥시티미딘 헥사포스페이트로 수행된 서열분석 반응의 비제한적 예를 도시한다.

도 8f는 각각 25-염기-쌍 핵산 보호 분자를 포함하는 Cy3-표지된 아데노신 및 알렉사플루오르-546-표지된 시티딘으로 수행된 서열분석 반응의 비제한적 예를 도시한다.

도 8g는 20-염기-쌍 핵산 보호 분자 상의 내부 발광 표지 또는 외부 발광 표지를 사용하여 수득된 강도 트레이스의 비제한적 비교를 도시한다.

도 8h는 동일한 올리고뉴클레오티드 가닥의 대향하는 단부에 부착된 발광 표지 및 뉴클레오티드를 갖는 핵산 보호 분자의 비제한적 예를 도시한다.

도 8i는 상이한 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 발광 표지 및 뉴클레오티드를 갖는 핵산 보호 분자의 비제한적 예를 도시한다.

도 8j는 핵산 보호 분자의 가닥에 다수개의 염료를 부착시키는 비제한적 방법을 도시한다.

도 8k는 올리고뉴클레오티드 가닥의 백본 내에 부착된 3개의 줄기 루프 및 2개의 Cy3.5 염료를 포함하는 비제한적 단일-가닥 핵산 보호 분자를 도시한다.

도 8l은 폴리머라제를 염료로부터 보호하기 위해 염료와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 거리 및/또는 벌크 구조를 제공할 수 있는 줄기 루프 구조를 포함하는 비제한적 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 보호 분자를 도시한다.

도 8m은 홀리데이 접합부를 형성하는 핵산 보호 분자의 비제한적 예를 도시한다.

도 8n은 이중-가닥 핵산 보호 분자를 포함하는 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 비제한적 구성을 도시한다.

도 8o는 분지형 티미딘 올리고뉴클레오티드 링커를 통해 뉴클레오티드 도메인 내에 1개 초과의 뉴클레오티드(Nu)를 갖는 비제한적 비표지된 가닥 구성을 도시한다.

도 8p-8q는 복수의 에너지-흡수 변형을 갖는 비제한적 올리고뉴클레오티드 구조를 도시한다 (올리고뉴클레오티드 가닥의 5' 단부에 부착된 변형의 비제한적 예가 제시됨).

도 9는 뉴클레오티드 링커 합성 및 예시적인 구조에 대한 비제한적 반응식을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 개시내용의 측면은 뉴클레오시드 폴리포스페이트에의 발광 표지의 부착을 위한 핵산 링커에 관한 것이다. 이러한 조성물은 반응 기질로서 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 사용을 수반하는 기술에서 유리하게 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 DNA 서열분석 기술은 합성 반응에 의한 서열분석 시 폴리머라제 효소의 사용을 수반할 수 있고, 그에 의해 신장 가닥에의 특정 유형의 표지된 뉴클레오티드의 혼입에 기인한 고유 신호에 기초하여 서열 정보가 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제 활성은 서열분석 결과의 강건성에 결정적일 수 있다. 따라서, 예를 들어, 판독 파라미터 예컨대 판독 길이 및 정확도를 최적화하기 위해 적절한 기능성 및 전체적 활성을 보존하기 위해, 폴리머라제를 광-유발 손상으로부터 보호하는 것이 종종 바람직하다. 따라서, 본원에 기재된 핵산 링커는 발광 표지된 뉴클레오티드가 폴리머라제 활성 부위에 매우 근접하여 위치하는 것으로부터 달리 발생할 수 있는 광-유발 손상을 제거하거나 최소화하는 폴리머라제-보호 기능성을 제공한다.

[0038] 일부 측면에서, 본 개시내용은 핵산 링커를 통해 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착된 발광 표지를 포함하는 발광 표지된 뉴클레오티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 합성 반응에서 폴리머라제 기질로서의 역할을 하고, 핵산 링커는 발광 표지된 뉴클레오티드에 대해 폴리머라제-보호 특성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 표지와 폴리머라제 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 수반하는 효소 촉매 반응 동안의 다른 효소 사이에서의 상호작용의 정도를 최소화하기 위해 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 분리 거리를 제공한다. 그러나, 본 발명자들은 보호 효과를 제공할 수 있는 핵산 링커의 추가의 특색을 추가로 인식하고 인지하였다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 폴리머라제 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 수반하는 효소 촉매 반응 동안 다른 효소를 추가로 보호하기 위해 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 위치한 1개 이상의 보호 요소를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 핵산 링커는 추가의 폴리머라제-보호 효과를 제공하기 위해 1개 이상의 구조적 모티프 (예를 들어, 줄기-루프, 홀리데이 접합부), 복수의 혼성화된 올리고뉴클레오티드 가닥, 혼성화된 영역 내 (예를 들어, 발광 표지를 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 연결하는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드 가닥 사이) 1개 이상의 가교된 염기 쌍, 및/또는 1개 이상의 에너지-흡수 변형 (예를 들어, 삼중항-상태 켄처, 분지형 중합체 구조, 분지형 수지상 구조)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 링커 (및 회합된 표지된 뉴클레오티드)는 물질의 입자에 부착되지 않는다 (예를 들어, 금속성, 자기성, 중합체, 또는 다른 물질의 입자에 부착되지 않음). 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 선형 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 원형 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 (예를 들어, 줄기-루프 구조의 존재 또는 부재 하에) 단일 가닥이다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 (예를 들어, 줄기 루프 구조의 존재 또는 부재 하에) 이중 가닥이다. 일부 실시양태에서, 이중 가닥 핵산 링커의 2개의 가닥은 (상보적 서열로 인해) 혼성화되고, 공유 부착되지 않는다. 그러나, 일부 실시양태에서, 이중 가닥 링커의 2개의 가닥을 공유 부착시키기 위해 (예를 들어, 1개 이상의 화학적 링커를 사용하여) 1개 이상의 공유 결합을 도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 본원에 기재된 바와 같은 1개 이상의 추가의 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 i) 당 포스페이트 백본 내에 또는 단부(들)에 1개 이상의 추가의 모이어티, ii) 1개 이상의 변형 (예를 들어, 1개 이상의 변형된 염기 또는 당), 또는 i) 및 ii)의 조합을 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서 핵산 링커는 i), ii) 또는 i) 또는 ii) 중 어느 것도 포함하지 않는다.

[0039] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 입체 장벽을 제공하는 1개 이상의 구조적 모티프, 예컨대 줄기 루프를 포함한다. 줄기-루프 또는 헤어핀 루프는 올리고뉴클레오티드 가닥이 폴딩되어 동일한 가닥의 또 다른 섹션과 염기 쌍을 형성할 때 형성되는, 올리고뉴클레오티드 가닥 상의 뉴클레오티드의 쌍형성되지 않은 루프이다. 일부 실시양태에서, 줄기-루프의 쌍형성되지 않은 루프는 3 내지 10개의 뉴클레오티드를 포함한다. 따라서, 줄기-루프는 혼성화하여 줄기를 형성하는 역전된 상보적 서열을 갖는 올

리고뉴클레오티드 가닥의 2개의 영역에 의해 형성될 수 있고, 여기서 2개의 영역은 비쌍형성된 루프를 형성하는 3 내지 10개의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, 줄기는 1개 이상의 G/C 뉴클레오티드를 갖도록 설계될 수 있고, 이는 A/T 뉴클레오티드와 비교하여 형성되는 추가의 수소 결합 상호작용에 의해 추가적 안정성을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 줄기는 쌍형성되지 않은 루프 서열에 바로 인접한 G/C 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 줄기는 쌍형성되지 않은 루프 서열에 인접한 처음 2, 3, 4 또는 5개의 뉴클레오티드 내에 G/C 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지는 줄기-루프의 쌍형성되지 않은 루프에 부착되며, 줄기 영역은 1개 이상의 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 강성 및 거리를 제공한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지는 줄기-루프의 줄기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 줄기-루프는 발광 표지를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 줄기-루프는 줄기 내에 쌍형성되지 않은 영역 (예를 들어, "돌출")을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비표지된 구조적 모티프, 예컨대 줄기-루프가 핵산 링커에 (예를 들어, 1개 이상의 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 사이에 있는 핵산 링커의 위치에) 포함된다. 이러한 실시양태에서, 1개 이상의 비표지된 구조적 모티프는 폴리머라제-보호 효과를 제공하는 입체 장벽 및/또는 흡수 장벽을 제공할 수 있다.

[0040] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 폴리머라제에 대한 광-유발 손상을 흡수하거나 또는 달리 완화시키기 위해 1개 이상의 에너지-흡수 변형, 예컨대 켄칭 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 폴리머라제 보호 효과를 제공하는 추가의 특색을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 링커 상의 발광 표지의 부착 위치는 폴리머라제 보호 효과를 제공하기 위해 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 표지가 말단-연결된 표지에 비해 핵산 링커에 더 큰 정도로 근접하여 유지되도록 핵산 링커 상의 내부 부위에 부착된다. 이러한 실시양태에서, 발광 표지는 폴리머라제와 상호작용하는 그의 이용가능성에 있어서 공간상 상대적으로 제한된다.

[0041] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 이중-가닥이다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 핵산 링커는 발광 표지에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥 및 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 가닥은 어닐링된 제1 올리고뉴클레오티드 가닥의 발광 표지에 인접한 1개 이상의 에너지-흡수 변형을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 뉴클레오시드 폴리포스페이트보다 발광 표지에 보다 매우 근접하여 위치한다. 따라서, 이러한 실시양태에서, 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 발광 분자에 의해 방출되는 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 봉쇄하는 입체 및/또는 흡수 장벽으로서의 역할을 한다.

[0042] 본원에 사용된 "핵산 링커"는 뉴클레오시드 폴리포스페이트에 발광 표지를 연결하는 핵산을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 폴리머라제-보호 효과를 제공한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 대안적으로 "핵산 보호 분자"로 지칭되거나, 또는 보다 일반적으로 "보호 분자"로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 용어 핵산 및 올리고뉴클레오티드는 문맥에 따라 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 이와 같이, 핵산 링커, 올리고뉴클레오티드 링커, 핵산 보호 분자, 및 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 동일하거나 유사한 개념을 지칭할 수 있다.

[0043] 핵산 링커 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 이량체)와 관련하여, 그에 부착되는 "뉴클레오티드" 또는 "뉴클레오시드 폴리포스페이트"는 (예를 들어, 서열분석 반응 동안) 신장 핵산 가닥 내로 혼입되도록 구성된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 포스페이트)를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 1개 이상의 뉴클레오시드 모노포스페이트 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트 (예를 들어, 뉴클레오시드 디- 또는 트리포스페이트, 또는 3개 초과의 5' 포스페이트를 갖는 뉴클레오시드 등)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오시드 포스페이트 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 말단 포스페이트를 통해 본 출원에 기재된 바와 같은 보호 분자의 일부를 형성하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥)에 부착될 수 있다. 본 출원에 기재된 조성물 또는 방법 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 포스페이트의 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의) 포스페이트 부분 (예를 들어, 폴리포스페이트 부분)은 1개 이상의 포스페이트 또는 그의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 포스페이트의 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의) 포스페이트 부분 (예를 들어, 폴리포스페이트 부분)은 포스페이트 에스테르, 티오에스테르, 포스포르아미데이트, 알킬 포스포네이트 연결, 다른 적합한 연결, 또는 1개 초과의 이러한 변형, 또는 그의 2종 이상의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커의 표지된 가닥 및 비표지된 가닥은 서로 실질적으로 상보적이다 (예를 들어, 이량체화 도메인의 길이에 걸쳐, 여기서 이량체화 도메인 내의 가닥은 서로, 예를 들어, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 상보성을

가질 수 있음).

[0044] 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용의 측면은 폴리머라제-보호 효과를 갖는 조성물에 관한 것이다. 진료의가 폴리머라제-보호 효과를 평가할 수 있는 다양한 파라미터가 존재한다는 것이 인지될 것이다. 일반적으로, 보호 요소의 효과는 보호 요소를 갖는 조성물과 보호 요소가 결여된 조성물 사이에 비교 평가를 수행함으로써 평가될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 폴리머라제 보호 요소는 서열 판독 길이를 증가시킬 수 있다 (예를 들어, 1개 이상의 보호 요소가 결여된 것을 제외하고 달리 유사하거나 동일한 핵산 링커에 의해 동일한 조건 및 동일한 시약 하에 수행된 서열분석 반응에 비해 10%-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100%, 또는 100% 초과만큼, 예를 들어 약 2배, 3배, 4배, 5배 또는 그 초과 만큼). 일부 실시양태에서, 보호 요소는 서열 정확도를 증가시킬 수 있다 (예를 들어, 상기 기재된 바와 같은 비교 조건 하에 수행된 서열분석 반응에 비해 약 5%, 약 10%, 약 15% 또는 그 초과만큼). 일부 실시양태에서, 폴리머라제의 보호는 상기 기재된 비교 조건 하에 평가된 바와 같은 가닥 합성 동안 폴리머라제가 광-유발 손상에 의해 불활성화된 정도에서의 감소에 의해 (예를 들어, 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 그 초과만큼) 측정될 수 있다.

[0045] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 분자의 1종 이상의 발광 특성에 기초하여 단일 분자를 식별하기 위한 신규 방법 및 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 분자 (예를 들어, 발광 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 그의 발광 수명, 흡수 스펙트럼, 방출 스펙트럼, 발광 양자 수율, 발광 강도, 또는 그의 2 이상의 조합에 기초하여 식별된다. 식별하는 것은 분자의 정확한 분자 아이덴티티를 할당하는 것을 의미할 수 있거나, 또는 가능한 분자의 세트로부터 특정한 분자를 구별 또는 차별화하는 것을 의미할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자는 상이한 발광 수명, 흡수 스펙트럼, 방출 스펙트럼, 발광 양자 수율, 발광 강도, 또는 그의 2 이상의 조합에 기초하여 서로 구별될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자는 분자를 일련의 분리된 광 펄스에 노출시키고 분자로부터 방출된 각각의 광자의 타이밍 또는 다른 특성을 평가함으로써 식별된다 (예를 들어, 다른 분자와 구별된다). 일부 실시양태에서, 단일 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자에 대한 정보는 분자를 식별하기 위해 모아서 평가된다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자로부터 결정되고, 발광 수명은 분자를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 강도는 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자로부터 결정되고, 발광 강도는 분자를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명 및 발광 강도는 분자로부터 순차적으로 방출된 복수의 광자로부터 결정되고, 발광 수명 및 발광 강도는 분자를 식별하는데 사용될 수 있다.

[0046] 본 출원의 측면은 1종 이상의 생물학적 또는 화학적 분자를 검출하고/거나 식별하는데 유용하다. 일부 실시양태에서, 화학적 또는 생물학적 반응은 1개 이상의 시점에서 1종 이상의 시약 또는 생성물의 존재 또는 부재를 결정함으로써 평가될 수 있다.

[0047] 본 출원의 측면은 분자를 광에 노출시키고 분자로부터 방출된 1개 이상의 광자의 1종 이상의 특성을 결정함으로써 분자를 조사한다. 특정 실시양태에서, 분자는 분자를 광의 펄스에 노출시키고 분자로부터 방출된 광자의 1종 이상의 특성을 결정함으로써 조사된다. 일부 실시양태에서, 분자는 복수의 분리된 광 펄스 이벤트에 노출되고, 분리된 광 펄스 이벤트 후에 방출된 분리된 광자의 1종 이상의 특성이 결정된다. 일부 실시양태에서, 분자는 각각의 광 펄스에 반응하여 광자를 방출하지 않는다. 그러나, 복수의 방출된 광자는 분자를 일련의 분리된 광 펄스에 노출시키고 광 펄스 이벤트의 하위세트 후에 방출된 분리된 광자 (예를 들어, 펄스 이벤트의 약 10% 후에 방출된 광자, 또는 펄스 이벤트의 약 1% 후에 방출된 광자)를 평가함으로써 평가될 수 있다.

[0048] 본 출원의 측면은 1개 이상의 시점에 1종 이상의 시약, 중간체 및/또는 반응 생성물의 존재 또는 부재를 결정함으로써 화학적 또는 생물학적 반응을 모니터링하는데 유용하다. 일부 실시양태에서, 시간의 경과에 따른 반응의 진행은 반응 샘플을 일련의 분리된 광 펄스에 노출시키고 각각의 광 펄스 후에 검출된 임의의 방출된 광자를 분석함으로써 분석될 수 있다.

[0049] 따라서, 본 출원의 일부 측면에서, 반응 샘플은 복수의 분리된 광 펄스에 노출되고, 일련의 방출된 광자는 검출되고 분석된다. 일부 실시양태에서, 일련의 방출된 광자는 실험 시간에 걸쳐 반응 샘플에 존재하고 변화되지 않은 단일 분자에 대한 정보를 제공한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 일련의 방출된 광자는 반응 샘플에서 (예를 들어, 반응 또는 공정 진행으로서) 상이한 시간에 존재하는 일련의 상이한 분자에 대한 정보를 제공한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 본 출원의 측면은 예를 들어 샘플에서 1개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 서열을 결정하고/거나 샘플에서 1개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 변이체 (예를 들어, 관심 유전자에서 1개 이상의 돌연변이)의 존재 또는 부재를 결정하기 위해, 생물학적 샘플을 검정하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시험은 진단, 예후 및/또는 치료 목적을 위해 핵산 서열 정보를 제공하거나, 또는 1개 이상의 관심 핵산의 존재 또는 부

재를 결정하기 위해 환자 샘플 (예를 들어, 인간 환자 샘플)에 대해 수행될 수 있다. 일부 예에서, 진단 시험은 예를 들어 대상체의 생물학적 샘플에서 세포 유리 데옥시리보핵산 (DNA) 분자 및/또는 발현 생성물 (예를 들어, 리보핵산 (RNA))을 서열분석하는 것에 의한, 대상체의 생물학적 샘플에서 핵산 분자를 서열분석하는 것을 포함할 수 있다.

[0051] 일부 실시양태에서, 발광 수명 및/또는 강도를 사용하여 분석될 (예를 들어, 조사 및/또는 식별될) 1개 이상의 분자는 표지된 분자 (예를 들어, 1종 이상의 발광 마커로 표지된 분자)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 생체분자의 개별 서브유닛은 마커를 사용하여 식별될 수 있다. 일부 예에서, 발광 마커는 생체 분자의 개별 서브유닛을 식별하는데 사용된다. 일부 실시양태는 발광 마커 (본원에서 "마커"로도 언급됨)를 사용하며, 이는 외인성 또는 내인성 마커일 수 있다. 외인성 마커는 발광 표지를 위한 리포터 및/또는 태그로서 사용되는 외부의 발광 마커일 수 있다. 외인성 마커의 예는 형광 분자, 형광단, 형광 염료, 형광 염색, 유기 염료, 형광 단백질, 형광 공명 에너지 전달 (FRET)에 참여하는 종, 효소, 및/또는 양자점을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 다른 외인성 마커가 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 이러한 외인성 마커는 특정한 표적 또는 컴포넌트에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 관능기 (예를 들어, 분자, 이온, 및/또는 리간드)에 접합될 수 있다. 외인성 태그 또는 리포터를 프로브에 부착하는 것은 외인성 태그 또는 리포터의 존재의 검출을 통한 표적의 식별을 가능하게 한다. 프로브의 예는 단백질, 핵산 (예를 들어, DNA, RNA) 분자, 지질 및 항체 프로브를 포함할 수 있다. 외인성 마커와 관능기의 조합은, 분자 프로브, 표지된 프로브, 혼성화 프로브, 항체 프로브, 단백질 프로브 (예를 들어, 비오틴-결합 프로브), 효소 표지, 형광 프로브, 형광 태그, 및/또는 효소 리포터를 포함한, 검출에 사용되는 임의의 적합한 프로브, 태그, 및/또는 표지를 형성할 수 있다.

[0052] 본 개시내용은 발광 마커에 대해 언급하지만, 다른 유형의 마커가 본원에 제공된 디바이스, 시스템 및 방법과 함께 사용될 수 있다. 이러한 마커는 질량 태그, 정전기 태그, 전기화학적 표지, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다.

[0053] 외인성 마커가 샘플에 첨가될 수 있고, 한편 내인성 마커는 이미 샘플의 일부일 수 있다. 내인성 마커는 여기 에너지의 존재 하에 발광 또는 "자가형광"할 수 있는 존재하는 임의의 발광 마커를 포함할 수 있다. 내인성 형광단의 자가형광은 외인성 형광단의 도입을 필요로 하지 않으면서 무표지 비침습적 표지를 제공할 수 있다. 이러한 내인성 형광단의 예는, 예로서 제한 없이, 헤모글로빈, 옥시헤모글로빈, 지질, 콜라겐 및 엘라스틴 가교, 환원된 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 (NADH), 산화 플라빈 (FAD 및 FMN), 리포푸신, 케라틴, 및/또는 포르피린을 포함할 수 있다.

[0054] 단일 분자 검출 및/또는 핵산 서열분석을 수행하기 위한 단순한, 덜 복잡한 장치에 대한 필요를 인식하고, 본 발명자들은 상이한 분자를 표지하기 위해, 발광 태그 (예를 들어, 발광 마커, 발광 표지)의 세트를 사용하여 단일 분자를 검출하는 기술을 고안하였다. 이러한 단일 분자는 태그를 갖는 뉴클레오티드 또는 아미노산일 수 있다. 태그는, 단일 분자에 결합된 동안, 단일 분자로부터 방출 시, 또는 단일 분자에 결합된 동안 및 이로부터 방출 시 검출될 수 있다. 일부 예에서, 태그는 발광 태그이다. 선택된 세트 내의 각각의 발광 태그는 각각의 분자와 회합된다. 예를 들어, 4개의 태그의 세트가 DNA에 존재하는 핵염기를 "표지"하는데 사용될 수 있고 - 세트의 각각의 태그는 상이한 핵염기와 회합되며, 예를 들어, 제1 태그는 아데닌 (A)과 회합되고, 제2 태그는 시토신 (C)과 회합되고, 제3 태그는 구아닌 (G)과 회합되고, 제4 태그는 티민 (T)과 회합된다. 또한, 태그의 세트 내의 발광 태그 각각은 세트의 제1 태그를 세트 내의 다른 태그와 구별하기 위해 사용될 수 있는 상이한 특성을 갖는다. 이러한 방식으로, 각각의 태그는 이들 구별되는 특징 중 1종 이상을 사용하여 고유하게 식별가능하다. 예로서 제한 없이, 하나의 태그를 또 다른 것과 구별하기 위해 사용될 수 있는 태그의 특징은 여기 에너지에 반응하여 태그에 의해 방출되는 광의 방출 에너지 및/또는 파장, 특정한 태그를 여기 상태에 두기 위해 그 태그에 의해 흡수되는 여기 광의 파장, 및/또는 태그의 방출 수명을 포함할 수 있다.

[0055] 서열분석

[0056] 본 출원의 일부 측면은 생물학적 중합체, 예컨대 핵산 및 단백질을 서열분석하는데 유용하다. 일부 실시양태에서, 본 출원에 기재된 방법, 조성물, 및 디바이스는 (예를 들어, 일련의 표지된 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체의 혼입의 시간-경과를 검출하는 것에 의해) 핵산 또는 단백질에 혼입된 일련의 뉴클레오티드 또는 아미노산 단량체를 식별하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 출원에 기재된 방법, 조성물 및 디바이스를 사용하여, 폴리머라제 효소에 의해 합성된 주형-의존 핵산 서열분석 반응 생성물에 혼입된 일련의 뉴클레오티드를 식별할 수 있다.

[0057] 특정 실시양태에서, 주형-의존 핵산 서열분석 생성물은 자연 발생 핵산 폴리머라제에 의해 이루어진다. 일부

실시양태에서, 폴리머라제는 자연 발생 폴리머라제의 돌연변이체 또는 변형된 변이체이다. 일부 실시양태에서, 주형-의존 핵산 서열 생성물은 주형 핵산 가닥에 상보적인 1개 이상의 뉴클레오티드 절편을 포함할 것이다. 한 측면에서, 본 출원은 주형 (또는 표적) 핵산 가닥의 상보적 핵산 가닥의 서열을 결정함으로써 그의 서열을 결정하는 방법을 제공한다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "폴리머라제"는 일반적으로 중합 반응을 촉매할 수 있는 임의의 효소 (또는 중합 효소)를 지칭한다. 폴리머라제의 예는, 비제한적으로, 핵산 폴리머라제, 트랜스크립타제 또는 리가제를 포함한다. 폴리머라제는 중합 효소일 수 있다.

[0059] 단일 분자 핵산 연장 (예를 들어, 핵산 서열분석의 경우)에 대한 실시양태는 표적 핵산 분자에 상보적인 핵산을 합성할 수 있는 임의의 폴리머라제를 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 리버스 트랜스크립타제, 및/또는 이들 중 1종 이상의 돌연변이체 또는 변경된 형태일 수 있다.

[0060] 폴리머라제의 예는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 열안정성 폴리머라제, 야생형 폴리머라제, 변형된 폴리머라제, 이. 콜라이(E. coli) DNA 폴리머라제 I, T7 DNA 폴리머라제, 박테리오파지 T4 DNA 폴리머라제 ϕ29 (psi29) DNA 폴리머라제, Taq 폴리머라제, Tth 폴리머라제, Tli 폴리머라제, Pfu 폴리머라제, Pwo 폴리머라제, 벤트(VENT) 폴리머라제, 딥벤트(DEEPVENT) 폴리머라제, EX-Taq 폴리머라제, LA-Taq 폴리머라제, Sso 폴리머라제, Poc 폴리머라제, Pab 폴리머라제, Mth 폴리머라제, ES4 폴리머라제, Tru 폴리머라제, Tac 폴리머라제, Tne 폴리머라제, Tma 폴리머라제, Tca 폴리머라제, Tih 폴리머라제, Tfi 폴리머라제, 플래티늄(Platinum) Taq 폴리머라제, Tbr 폴리머라제, Tfl 폴리머라제, Tth 폴리머라제, 푸투보(Pfutubo) 폴리머라제, 피로베스트(Pyrobest) 폴리머라제, Pwo 폴리머라제, KOD 폴리머라제, Bst 폴리머라제, Sac 폴리머라제, 클레나우(Klenow) 단편, 3'에서 5' 엑소뉴클레아제 활성을 갖는 폴리머라제, 및 그의 변이체, 변형된 생성물 및 유도체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 단일 서브유닛 폴리머라제이다. DNA 폴리머라제의 비제한적 예 및 그의 특성은 특히 문헌 [DNA Replication 2nd edition, Kornberg and Baker, W. H. Freeman, New York, N.Y. (1991)]에 상세하게 기재되어 있다.

[0061] 표적 핵산의 핵염기와 상보적 dNTP 사이의 염기 쌍형성 시, 폴리머라제는 새로이 합성되는 가닥의 3' 히드록실 단부와 dNTP의 알파 포스페이트 사이에 포스포디에스테르 결합을 형성함으로써 새로이 합성되는 가닥으로 dNTP를 혼입시킨다. dNTP에 접합된 발광 태그가 형광단인 예에서, 그의 존재는 여기에 의해 신호전달되고 방출의 펄스는 혼입 단계 동안 또는 그 후에 검출된다. dNTP의 말단 (감마) 포스페이트에 접합된 검출 표지의 경우에, 새로이 합성되는 가닥에의 dNTP의 혼입은 베타 및 감마 포스페이트와 샘플 웰에서 자유롭게 확산되는 검출 표지의 방출을 발생시켜, 형광단으로부터 검출되는 방출의 감소를 발생시킨다.

[0062] 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 높은 진행성을 갖는 폴리머라제이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 감소된 진행성을 갖는 폴리머라제이다. 폴리머라제 진행성은 일반적으로 핵산 주형을 방출하지 않으면서 핵산 내로 dNTP를 연속적으로 혼입시킬 수 있는 폴리머라제의 능력을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 낮은 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성 및/또는 3'-5' 엑소뉴클레아제를 갖는 폴리머라제이다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 상응하는 야생형 폴리머라제에 비해 감소된 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성 및/또는 3'-5' 활성을 갖도록 (예를 들어, 아미노산 치환에 의해) 변형된다. DNA 폴리머라제의 추가의 비제한적 예는 9° Nm™ DNA 폴리머라제 (뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)), 및 클레나우 엑소- 폴리머라제의 P680G 변이체 (Tuske et al. (2000) JBC 275(31):23759-23768)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 감소된 진행성을 갖는 폴리머라제는 뉴클레오티드 반복부 (예를 들어, 동일한 유형의 2개 이상의 순차적 염기)의 1개 이상의 스트레치를 함유하는 서열분석 주형에 대해 증가된 정확도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 비-표지된 핵산보다 표지된 뉴클레오티드에 대해 더 높은 친화도를 갖는 폴리머라제이다.

[0063] 또 다른 측면에서, 본 출원은 복수의 핵산 단편을 서열분석함으로써 표적 핵산을 서열분석하는 방법을 제공하며, 여기서 표적 핵산은 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 방법은 모 표적 핵산에 대한 서열 또는 부분 서열을 제공하기 위해 복수의 단편 서열을 조합하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조합하는 단계는 컴퓨터 하드웨어 및 소프트웨어에 의해 수행된다. 본원에 기재된 방법은 전체 염색체 또는 게놈과 같은 관련된 표적 핵산의 세트가 서열분석되게 할 수 있다.

[0064] 서열분석 동안, 중합 효소는 표적 핵산 분자의 프라이밍 위치에 커플링 (예를 들어, 부착)할 수 있다. 프라이밍 위치는 표적 핵산 분자의 일부와 상보적인 프라이머일 수 있다. 대안으로서 프라이밍 위치는 표적 핵산 분자의 이중 가닥 절편 내에 제공되는 갭 또는 닉이다. 갭 또는 닉은 길이가 0 내지 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 또는 40개 뉴클레오티드일 수 있다. 닉은 이중 가닥 서열 중 1개의 가닥에 절단점을 제

공할 수 있고, 이는 예를 들어 가닥 치환 폴리머라제 효소와 같은, 중합 효소에 대한 프라이밍 위치를 제공할 수 있다.

[0065] 일부 경우에, 서열분석 프라이머는 표적 핵산 분자에 어닐링될 수 있고, 이는 고체 지지체에 고정될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다. 고체 지지체는, 예를 들어, 핵산 서열분석에 사용되는 칩 상의 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구, 반응 챔버)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열분석 프라이머는 고체 지지체에 고정될 수 있고, 표적 핵산 분자의 혼성화는 또한 표적 핵산 분자를 고체 지지체에 고정한다. 일부 실시양태에서, 폴리머라제는 고체 지지체에 고정되고, 가용성 프라이머 및 표적 핵산은 폴리머라제에 접촉된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 폴리머라제, 표적 핵산 및 프라이머를 포함하는 복합체는 용액 중에 형성되고, 복합체는 (예를 들어, 폴리머라제, 프라이머 및/또는 표적 핵산의 고정을 통해) 고체 지지체에 고정된다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구, 반응 챔버) 내의 어떠한 컴포넌트도 고체 지지체에 고정되지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 폴리머라제, 표적 핵산, 및 프라이머를 포함하는 복합체는 용액 중에 형성되고, 복합체는 고체 지지체에 고정되지 않는다.

[0066] 적절한 조건 하에서, 어닐링된 프라이머/표적 핵산에 접촉된 폴리머라제 효소는 프라이머에 1개 이상의 뉴클레오티드를 부가 또는 혼입시킬 수 있고, 뉴클레오티드는 프라이머에 5'에서 3' 주형-의존 방식으로 부가될 수 있다. (예를 들어, 폴리머라제의 작용을 통한) 프라이머에의 뉴클레오티드의 이러한 혼입은 일반적으로 프라이머 연장 반응으로 지칭될 수 있다. 각각의 뉴클레오티드는 핵산 연장 반응 동안 (예를 들어, 그의 발광 수명 및/또는 다른 특징에 기초하여) 검출 및 식별될 수 있는 검출가능한 태그와 회합될 수 있고, 연장되는 프라이머 내로 혼입된 각각의 뉴클레오티드, 및 그에 따라 새로이 합성된 핵산 분자의 서열을 결정하는데 사용될 수 있다. 새로이 합성된 핵산 분자의 서열 상보성을 통해 표적 핵산 분자의 서열을 또한 결정할 수 있다. 일부 경우에, 서열분석 프라이머의 표적 핵산 분자에의 어닐링 및 서열분석 프라이머에의 뉴클레오티드의 혼입은 유사한 반응 조건 (예를 들어, 동일한 또는 유사한 반응 온도)에서 또는 상이한 반응 조건 (예를 들어, 상이한 반응 온도)에서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 합성 방법에 의한 서열분석은 표적 핵산 분자의 집단 (예를 들어, 표적 핵산의 카피)의 존재 및/또는 표적 핵산의 집단을 달성하기 위한 표적 핵산의 증폭 단계를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 합성에 의한 서열분석은 평가되는 각각의 반응에서 단일 분자의 서열을 결정하는데 사용된다 (및 핵산 증폭은 서열분석을 위한 표적 주형을 제조하는데 필요하지 않다). 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자 서열분석 반응은 본 출원의 측면에 따라 (예를 들어, 단일 칩 상에서) 병렬로 수행된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 복수의 단일 분자 서열분석 반응은 단일 칩 상의 분리된 반응 챔버 (예를 들어, 나노개구, 샘플 웰)에서 각각 수행된다.

[0067] 실시양태는 높은 정확도 및 긴 판독 길이, 예컨대 적어도 약 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99%, 99.999%, 또는 99.9999%의 정확도, 및/또는 약 10 염기 쌍 (bp), 50 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 1000 bp, 10,000 bp, 20,000 bp, 30,000 bp, 40,000 bp, 50,000 bp, 또는 100,000 bp 이상의 판독 길이로 단일 핵산 분자를 서열분석할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자 서열분석에 사용되는 표적 핵산 분자는, 샘플 웰의 저부 또는 측벽과 같은 고체 지지체에 고정되거나 부착된 서열분석 반응의 적어도 1종의 추가의 컴포넌트 (예를 들어, 폴리머라제, 예컨대 DNA 폴리머라제, 서열분석 프라이머)를 함유하는 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구)에 부가되거나 고정된 단일 가닥 표적 핵산 (예를 들어, 데옥시리보핵산 (DNA), DNA 유도체, 리보핵산 (RNA), RNA 유도체) 주형이다. 표적 핵산 분자 또는 폴리머라제는 샘플 벽, 예컨대 샘플 웰의 저부 또는 측벽에 직접적으로 또는 링커를 통해 부착될 수 있다. 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구)은 또한 프라이머 연장 반응을 통한 핵산 합성에 필요한 임의의 다른 시약, 예컨대 예를 들어 적합한 완충제, 보조-인자, 효소 (예를 들어, 폴리머라제), 및 발광 태그, 예컨대 형광단을 포함하는 데옥시리보뉴클레오시드 폴리포스페이트, 예컨대, 예를 들어, 데옥시아데노신 트리포스페이트 (dATP), 데옥시시티딘 트리포스페이트 (dCTP), 데옥시구아노신 트리포스페이트 (dGTP), 데옥시우리딘 트리포스페이트 (dUTP) 및 데옥시티미딘 트리포스페이트 (dTTP) dNTP를 포함한 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 부류의 dNTP (예를 들어, 아데닌-함유 dNTP (예를 들어, dATP), 시토신-함유 dNTP (예를 들어, dCTP), 구아닌-함유 dNTP (예를 들어, dGTP), 우라실-함유 dNTP (예를 들어, dUTP) 및 티민-함유 dNTP (예를 들어, dTTP))는 태그로부터 방출된 광의 검출이 새로이 합성된 핵산에 혼입된 dNTP의 아이덴티티를 나타내도록 별개의 발광 태그에 접합된다. 발광 태그로부터 방출된 광은 본원의 다른 곳에 기재된 디바이스 및 검출 방법을 포함한 임의의 적합한 이러한 디바이스 및/또는 방법을 통해 검출될 수 있고, 그의 적절한 발광 태그 (및, 이에 따라 회합된 dNTP)에 기인할 수 있다. 발광 태그는 발광 태그의 존재가 새로이 합성되는 핵산 가닥으로의 dNTP의 혼입 또는 폴리머라제의 활성을 억제하지 않도록 하는 임의의 위치에서 dNTP에 접합될 수 있다. 일부

실시양태에서, 발광 태그는 dNTP의 말단 포스페이트 (예를 들어, 감마 포스페이트)에 접합된다.

[0068] 일부 실시양태에서, 단일-가닥 표적 핵산 주형을 서열분석 프라이머, dNTP, 폴리머라제 및 핵산 합성에 필요한 다른 시약과 접촉시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, dNTP의 혼입이 연속해서 발생할 수 있도록 모든 적절한 dNTP을 단일-가닥 표적 핵산 주형과 동시에 접촉시킬 수 있다 (예를 들어, 모든 dNTP이 동시에 존재한다). 다른 실시양태에서, dNTP는 단일-가닥 표적 핵산 주형과 순차적으로 접촉될 수 있고, 이 경우 단일-가닥 표적 핵산 주형은 각각의 적절한 dNTP와 개별적으로 접촉되고, 단일-가닥 표적 핵산 주형과 상이한 dNTP와의 접촉 사이에 세척 단계가 존재한다. 단일-가닥 표적 핵산 주형을 각각의 dNTP와 개별적으로 접촉시키고 이어서 세척하는 이러한 사이클은, 식별하고자 하는 단일-가닥 표적 핵산 주형의 각각의 연속적인 염기 위치에 대해 반복될 수 있다.

[0069] 일부 실시양태에서, 서열분석 프라이머는 단일-가닥 표적 핵산 주형에 어닐링되고, 폴리머라제는 단일-가닥 표적 핵산 주형에 기초하여 dNTP (또는 다른 데옥시리보뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 프라이머에 연속적으로 혼입시킨다. 각각의 혼입된 dNTP와 회합된 고유의 발광 태그는 dNTP의 프라이머에의 혼입 동안 또는 그 후에 적절한 여기 광에 의해 여기될 수 있고, 후속해서 그의 방출은 본원의 다른 곳에 기재된 디바이스 및 검출 방법을 포함한 임의의 적합한 디바이스(들) 및/또는 방법(들)을 사용하여 검출될 수 있다. (예를 들어, 특정한 방출 수명, 강도, 스펙트럼 및/또는 그의 조합을 갖는) 광의 특정한 방출의 검출은 혼입된 특정한 dNTP에 기인할 수 있다. 이어서, 검출된 발광 태그의 수집으로부터 수득된 서열은 서열 상보성을 통해 단일-가닥 표적 핵산 주형의 서열을 결정하는데 사용될 수 있다.

[0070] 본 개시내용은 dNTP에 대해 언급하지만, 본원에 제공된 디바이스, 시스템 및 방법은 다양한 유형의 뉴클레오티드, 예컨대 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드 (예를 들어, 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 포스페이트 기를 갖는 데옥시리보뉴클레오시드 폴리포스페이트)와 함께 사용될 수 있다. 이러한 리보뉴클레오티드 및 데옥시리보뉴클레오티드는 다양한 유형의 태그 (또는 마커) 및 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 동시-계류 미국 특허 출원 번호 14/543,865, 14/543,867, 14/543,888, 14/821,656, 14/821,686, 14/821,688, 15/161,067, 15/161,088, 15/161,125, 15/255,245, 15/255,303, 15/255,624, 15/261,697, 15/261,724, 62/289,019, 62/296,546, 62/310,398, 62/339,790, 62/343,997, 62/344,123, 및 62/426,144에 기재된 기술에 유리하게 사용될 수 있는 방법 및 조성물을 제공하며, 상기 각각의 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0071] 핵산 서열분석의 예

[0072] 하기 예는 본원에 기재된 방법, 조성물 및 디바이스의 일부를 예시하기 위한 것으로 의도된다. 예의 모든 측면은 비제한적이다. 도 1은 단일 분자 핵산 서열분석 방법의 설정을 개략적으로 예시한다. (1-110)은 핵산 폴리머라제(1-101), 서열분석하기 위한 표적 핵산(1-102), 및 프라이머(1-104)를 포함하는 단일 복합체를 함유하도록 구성된 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구, 반응 챔버)이다. 이러한 예에서, 샘플 웰(1-110)의 저부 영역은 표적 체적 (예를 들어, 여기 영역)(1-120)으로 도시된다.

[0073] 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 표적 체적은 여기 에너지가 향하는 체적이다. 일부 실시양태에서, 체적은 샘플 웰 체적, 및 샘플 웰에의 여기 에너지의 커플링 둘 다의 특성이다. 표적 체적은 표적 체적 내에 국한되는 분자 또는 복합체의 수를 제한하도록 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 체적은 단일 분자 또는 복합체를 국한하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 표적 체적은 단일 폴리머라제 복합체를 국한하도록 구성된다. 도 1에서 폴리머라제(1-101)를 포함하는 복합체는 표적 체적(1-120) 내에 국한된다. 복합체는 샘플 웰의 표면에의 부착에 의해 임의로 고정될 수 있다. 샘플 웰 표면 제조 및 관능화를 위한 예시적인 공정이 본 출원의 다른 곳에서 추가로 상세하게 논의되어 있다. 이러한 예에서 복합체는 폴리머라제(1-101)에 링커를 부착시키는데 적합한 1종 이상의 생체분자 (예를 들어, 비오틴)를 포함하는 링커(1-103)에 의해 고정된다.

[0074] 개구의 체적은 또한 적합한 용매, 완충제, 및 폴리머라제 복합체가 핵산 가닥을 합성하는데 필요한 다른 첨가제를 함유하는 반응 혼합물을 함유한다. 반응 혼합물은 또한 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 함유한다. 각각의 유형의 뉴클레오티드는 기호 *-A, @-T, $-G, #-C에 의해 나타내어지고, 여기서 A, T, G 및 C는 뉴클레오티드 염기를 나타내고, 기호 *, @, $, 및 #는 링커 -를 통해 각각의 뉴클레오티드에 부착된 고유의 발광 표지를 나타낸다. 도 1에서, #-C 뉴클레오티드는 상보적 가닥(1-102)에 현재 혼입되고 있는 것이다. 혼입된 뉴클레오티드는 표적 체적(1-120) 내에 있다.

[0075] 도 1은 또한 표적 체적 부근으로 전달되는 여기 에너지, 및 검출기를 향해 방출되는 발광의 개념을 화살표로 나

타낸다. 화살표는 개략적이고, 여기 에너지 전달 또는 발광의 특정한 배향을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 광원으로부터의 광의 펄스이다. 여기 에너지는 광원과 표적 체적 부근 사이를, 1종 이상의 디바이스 컴포넌트, 예컨대 도파관 또는 필터를 통해 이동할 수 있다. 방출 에너지는 또한 발광 분자와 검출기 사이를, 1종 이상의 디바이스 컴포넌트, 예컨대 도파관 또는 필터를 통해 이동할 수 있다. 일부 발광은 검출기로 향하지 않는 벡터 상에 (예를 들어, 샘플 웰의 측벽을 향해) 방출될 수 있고, 검출되지 않을 수 있다.

[0076] 도 2는 단일 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구)에서의 서열분석 공정을 시간의 경과에 따라 개략적으로 예시한다. 스테이지 A 내지 D는 도 1에서와 같은 폴리머라제 복합체를 함유하는 샘플 웰을 도시한다. 스테이지 A는 임의의 뉴클레오티드가 프라이머에 첨가되기 전의 초기 상태를 도시한다. 스테이지 B는 발광 표지된 뉴클레오티드 (#-C)의 혼입 이벤트를 도시한다. 스테이지 C는 혼입 이벤트 사이의 기간을 도시한다. 이러한 예에서, 뉴클레오티드 C가 프라이머에 첨가되고, 발광 표지된 뉴클레오티드 (#-C)에 이전에 부착된 표지 및 링커가 절단된다. 스테이지 D는 발광 표지된 뉴클레오티드 (*-A)의 제2 혼입 이벤트를 도시한다. 스테이지 D 이후의 상보적 가닥은 프라이머, C 뉴클레오티드 및 A 뉴클레오티드로 이루어진다.

[0077] 스테이지 A 및 C는 둘 다 혼입 이벤트 전 또는 그 사이의 기간을 도시하며, 이러한 예에서 약 10 밀리초 동안 지속되는 것으로 표시된다. 스테이지 A 및 C에서, 어떠한 뉴클레오티드도 혼입되지 않기 때문에 표적 체적 내에 어떠한 발광 표지된 뉴클레오티드도 존재하지 않지만 (도 2에 도시되지 않음), 혼입되지 않은 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 배경 발광 또는 허위 발광이 검출될 수 있다. 스테이지 B 및 D는 상이한 뉴클레오티드 (각각 #-C 및 *-A)의 혼입 이벤트를 보여준다. 이러한 예에서 이들 이벤트는 또한 약 10 밀리초 동안 지속되는 것으로 표시된다.

[0078] "원시 빈 데이터"로 라벨링된 행은 각각의 스테이지 동안 생성된 데이터를 도시한다. 예시적인 실험을 통해, 복수의 펄스의 광이 표적 체적 부근으로 전달된다. 각각의 펄스에 대해 검출기는 검출기에 의해 수신된 임의의 방출된 광자를 기록하기 위해 구성된다. 방출된 광자가 검출기에 의해 수신되었을 때 이는 복수의 시간 빈 중 1개로 분리되며, 이러한 예에서 이는 3개 존재한다. 일부 실시양태에서, 검출기는 2 내지 16개의 시간 빈으로 구성된다. "원시 빈 데이터"는 최단, 중간 및 최장 빈에 각각 상응하는 1 (최단 막대), 2 (중간 막대) 또는 3 (최장 막대)의 값을 기록한다. 각각의 막대는 방출된 광자의 검출을 나타낸다.

[0079] 스테이지 A 또는 C의 경우에 표적 체적에 발광 표지된 뉴클레오티드가 존재하지 않기 때문에, 어떠한 광자도 검출되지 않는다. 각각의 스테이지 B 및 D의 경우에 복수의 광자 방출 이벤트 (본원에 사용된 발광 이벤트 또는 "발광")가 혼입 이벤트 동안 검출된다. 발광 표지 #는 발광 표지 *보다 더 짧은 발광 수명을 갖는다. 따라서, 스테이지 B 데이터는 빈 값이 더 높은 스테이지 D보다 더 낮은 평균 빈 값을 기록한 것으로 도시된다.

[0080] "처리된 데이터"로 라벨링된 행은 각각의 펄스와 관련된 시간에 방출된 광자의 수 (카운트)를 나타내기 위해 처리된 원시 데이터를 도시한다. 각각의 막대는 특정한 시간 빈의 광자 카운트에 상응하기 때문에, 처리된 데이터를 도시하는 예시적인 곡선은 도면에 기재된 3개의 시간 빈보다 더 많은 시간 빈을 포함하는 원시 빈 데이터에 상응한다. 이러한 예에서, 데이터는 단지 발광 수명을 결정하기 위해 처리되지만, 데이터는 또한 다른 발광 특성, 예컨대 발광 강도 또는 흡수되거나 방출된 광자의 파장에 대해 평가될 수 있다. 예시적인 처리된 데이터는 표적 체적 내의 발광 표지의 발광 수명에 특징적인 지수 붕쇠 곡선을 근사화한다. 발광 표지 #는 발광 표지 *보다 짧은 발광 수명을 갖기 때문에, 스테이지 B의 경우에 처리된 데이터는 더 긴 시간 기간에 더 적은 카운트를 갖는 반면, 스테이지 D의 경우에 처리된 데이터는 더 긴 시간 기간에 상대적으로 더 많은 카운트를 갖는다.

[0081] 도 2의 예시적인 실험은 상보적 가닥에 부가된 처음 2개의 뉴클레오티드를 CA로 식별할 것이다. DNA의 경우에, 프라이머에 어닐링된 영역 바로 다음의 표적 가닥의 서열은 따라서 GT로 식별될 것이다. 이러한 예에서 뉴클레오티드 C 및 A는 발광 수명에만 기초하여 복수의 C, G, T 및 A로부터 구별될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 강도 또는 흡수되거나 방출된 광자의 파장과 같은 다른 특성이 1개 이상의 특정한 뉴클레오티드를 구별하는 데 필요할 수 있다.

[0082] 뉴클레오티드의 혼입 시 방출된 신호는 메모리에 저장되고 표적 핵산 주형의 서열을 결정하기 위해 나중의 시점에 처리될 수 있다. 이것은 신호를 참조 신호와 비교하여 혼입된 뉴클레오티드의 아이덴티티를 시간의 함수로서 결정하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 뉴클레오티드의 혼입 시 방출된 신호가 수집되고 (예를 들어, 뉴클레오티드 혼입 시) 실시간으로 처리되어, 표적 핵산 주형의 서열을 실시간으로 결정할 수 있다.

[0083] 본원에 사용된 용어 "핵산"은 일반적으로 1개 이상의 핵산 서브유닛을 포함하는 분자를 지칭한다. 핵산은 아데닌 (A), 시토신 (C), 구아닌 (G), 티민 (T), 및 우라실 (U), 또는 그의 변이체로부터 선택된 1개 이상의 서브유닛을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 핵산은 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA) 또는 그의 유도체이다. 핵산은 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산은 원형일 수 있다.

[0084] 본원에 사용된 용어 "뉴클레오티드"는 일반적으로 A, C, G, T 또는 U, 또는 그의 변이체 또는 유사체를 포함할 수 있는 핵산 서브유닛을 지칭한다. 뉴클레오티드는 신장 핵산 가닥에 혼입될 수 있는 임의의 서브유닛을 포함할 수 있다. 이러한 서브유닛은 A, C, G, T 또는 U, 또는 1개 이상의 상보적 A, C, G, T 또는 U에 특이적이거나 퓨린 (예를 들어, A 또는 G, 또는 그의 변이체 또는 유사체) 또는 피리미딘 (예를 들어, C, T 또는 U, 또는 그의 변이체 또는 유사체)에 상보적인 임의의 다른 서브유닛일 수 있다. 서브유닛은 개별 핵산 염기 또는 염기의 군 (예를 들어, AA, TA, AT, GC, CG, CT, TC, GT, TG, AC, CA, 또는 그의 우라실-대응물)이 해석될 수 있게 한다.

[0085] 뉴클레오티드는 일반적으로 뉴클레오시드 및 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 포스페이트 (PO_3) 기를 포함한다. 뉴클레오티드는 핵염기, 5-탄당 (리보스 또는 데옥시리보스) 및 1개 이상의 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 리보뉴클레오티드는 당이 리보스인 뉴클레오티드이다. 데옥시리보뉴클레오티드는 당이 데옥시리보스인 뉴클레오티드이다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드 모노포스페이트 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트일 수 있다. 뉴클레오티드는 검출가능한 태그, 예컨대 발광 태그 또는 마커 (예를 들어, 형광단)를 포함하는 데옥시리보뉴클레오시드 폴리포스페이트, 예컨대 예를 들어, 데옥시아데노신 트리포스페이트 (dATP), 데옥시시티딘 트리포스페이트 (dCTP), 데옥시구아노신 트리포스페이트 (dGTP), 데옥시우리딘 트리포스페이트 (dUTP) 및 데옥시티미딘 트리포스페이트 (dTTP) dNTP로부터 선택될 수 있는 데옥시리보뉴클레오시드 트리포스페이트일 수 있다.

[0086] 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 'n'개의 포스페이트 기를 가질 수 있고, 여기서 'n'은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 이상의 수이다. 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 예는 뉴클레오시드 디포스페이트 및 뉴클레오시드 트리포스페이트를 포함한다. 뉴클레오티드는 말단 포스페이트 표지된 뉴클레오시드, 예컨대 말단 포스페이트 표지된 뉴클레오시드 폴리포스페이트일 수 있다. 이러한 표지는 발광 (예를 들어, 형광 또는 화학발광) 표지, 형광원성 표지, 착색 표지, 발색 표지, 질량 태그, 정전기적 표지 또는 전기화학적 표지일 수 있다. 표지 (또는 마커)는 링커를 통해 말단 포스페이트에 커플링될 수 있다. 링커는 천연 또는 변형된 뉴클레오티드의 말단 포스페이트에서 예를 들어 포스페이트 에스테르, 티오에스테르, 포스포르아미데이트 또는 알킬 포스포네이트 연결을 형성하는데 적합할 수 있는, 예를 들어 적어도 하나의 또는 복수의 히드록실 기, 술프히드릴 기, 아미노 기 또는 할로알킬 기를 포함할 수 있다. 링커는, 예컨대 중합 효소의 도움에 의해 말단 포스페이트로부터 표지를 분리하도록 절단가능할 수 있다. 뉴클레오티드 및 링커의 예는 미국 특허 번호 7,041,812에 제공되고, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0087] 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오티드 폴리포스페이트)는 메틸화 핵염기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 메틸화 뉴클레오티드는 핵염기에 부착된 (예를 들어, 핵염기의 고리에 직접적으로 부착된, 핵염기의 고리의 치환기에 부착된) 1개 이상의 메틸 기를 포함하는 뉴클레오티드일 수 있다. 예시적인 메틸화 핵염기는 1-메틸티민, 1-메틸우라실, 3-메틸우라실, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, 1-메틸아데닌, 2-메틸아데닌, 7-메틸아데닌, N6-메틸아데닌, N6,N6-디메틸아데닌, 1-메틸구아닌, 7-메틸구아닌, N2-메틸구아닌, 및 N2,N2-디메틸구아닌을 포함한다.

[0088] 본원에 사용된 용어 "프라이머"는, 일반적으로 A, C, G, T 및/또는 U, 또는 그의 변이체 또는 유사체를 포함하는 서열을 포함할 수 있는 핵산 분자 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드)를 지칭한다. 프라이머는 DNA, RNA, PNA 또는 그의 변이체 또는 유사체를 포함하는 합성 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 프라이머는 그의 뉴클레오티드 서열이 표적 가닥에 상보적이도록 설계될 수 있거나, 또는 프라이머는 무작위 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 꼬리 (예를 들어, 폴리-A 꼬리, 인덱스 어댑터, 분자 바코드 등)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머는 5 내지 15개의 염기, 10 내지 20개의 염기, 15 내지 25개의 염기, 20 내지 30개의 염기, 25 내지 35개의 염기, 30 내지 40개의 염기, 35 내지 45개의 염기, 40 내지 50개의 염기, 45 내지 55개의 염기, 50 내지 60개의 염기, 55 내지 65개의 염기, 60 내지 70개의 염기, 65 내지 75개의 염기, 70 내지 80개의 염기, 75 내지 85개의 염기, 80 내지 90개의 염기, 85 내지 95개의 염기, 90 내지 100개의 염기, 95 내지 105개의 염기, 100 내지 150개의 염기, 125 내지 175개의 염기, 150 내지 200개의 염기, 또는 200개 초과의 염기를 포함할 수 있다.

[0089] 발광 특성

[0090] 본원에 기재된 바와 같이, 발광 분자는 1개 이상의 광자를 흡수하고, 후속해서 하나 이상의 시간 기간 후에 1개 이상의 광자를 방출할 수 있는 분자이다. 분자의 발광은 발광 수명, 흡수 스펙트럼, 방출 스펙트럼, 발광 양자 수율 및 발광 강도를 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 파라미터에 의해 기재된다. 용어 흡수 및 여기는 본 출원 전반에서 상호교환가능하게 사용된다. 전형적 발광 분자는 다수의 파장의 광을 흡수할 수 있거나, 또는 그에 의해 여기를 겪을 수 있다. 특정 파장에서의 또는 특정 스펙트럼 범위 내에서의 여기가 발광 방출 이벤트에 의해 이완될 수 있는 한편, 특정의 다른 파장 또는 스펙트럼 범위에서의 여기는 발광 방출 이벤트에 의해 이완되지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 분자는 단일 파장에서의 또는 단일 스펙트럼 범위 내에서의 발광의 경우에만 적합하게 여기된다. 일부 실시양태에서, 발광 분자는 2 이상의 파장에서의 또는 2 이상의 스펙트럼 범위 내에서의 발광의 경우에 적합하게 여기된다. 일부 실시양태에서, 분자는 여기 광자 또는 흡수 스펙트럼의 파장을 측정함으로써 식별된다.

[0091] 발광 방출 이벤트로부터 방출되는 광자는 가능한 파장의 스펙트럼 범위 내에서의 파장에서 방출될 것이다. 전형적으로, 방출된 광자는 여기 광자의 파장과 비교하여 더 긴 파장을 갖는다 (예를 들어, 더 낮은 에너지를 갖거나 적색-시프트된다). 특정 실시양태에서, 분자는 방출된 광자의 파장을 측정함으로써 식별된다. 특정 실시양태에서, 분자는 복수의 방출된 광자의 파장을 측정함으로써 식별된다. 특정 실시양태에서, 분자는 방출 스펙트럼을 측정함으로써 식별된다.

[0092] 발광 수명은 여기 이벤트와 방출 이벤트 사이의 시간 기간을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발광 수명은 지수 붕괴 방정식의 상수로서 표현된다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지를 전달하는 1개 이상의 펄스 이벤트가 존재하는 경우에, 시간 기간은 펄스와 후속 방출 이벤트 사이의 시간이다.

[0093] 분자의 "발광 수명을 결정하는 것"은 임의의 적합한 방법을 사용하여 (예를 들어, 적합한 기술을 사용하여 수명을 측정하는 것에 의해 또는 방출의 시간-의존성 특징을 결정하는 것에 의해) 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 1개 이상의 분자 (예를 들어, 서열분석 반응에서의 상이한 발광 표지된 뉴클레오티드)와 관련하여 수명을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 참조물과 관련하여 수명을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 수명 (예를 들어, 형광 수명)을 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명을 결정하는 것은 수명을 나타내는 하나 이상의 시간적 특징을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 여기 펄스와 관련하여 하나 이상의 시간-게이팅 윈도우를 가로질러 발생한 복수의 방출 이벤트 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 또는 그 초과의 방출 이벤트)의 분포에 기초하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 단일 분자의 발광 수명은 여기 펄스와 관련하여 측정된 광자 도달 시간의 분포에 기초하여 상이한 발광 수명을 갖는 복수의 분자와 구별될 수 있다.

[0094] 단일 분자의 발광 수명은 단일 분자가 여기 상태에 도달한 후에 방출된 광자의 타이밍을 나타내고, 단일 분자는 광자의 타이밍을 나타내는 정보에 의해 구별될 수 있다는 것이 인식될 것이다. 일부 실시양태는 분자에 의해 방출된 광자와 연관된 시간을 측정함으로써 분자의 발광 수명에 기초하여 복수의 분자로부터 분자를 구별하는 것을 포함할 수 있다. 시간의 분포는 분포로부터 결정될 수 있는 발광 수명의 지표를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 분자는 시간의 분포에 기초하여, 예컨대 시간의 분포를 공지된 분자에 상응하는 참조 분포와 비교함으로써 복수의 분자로부터 구별가능하다. 일부 실시양태에서, 발광 수명에 대한 값은 시간의 분포로부터 결정된다.

[0095] 발광 양자 수율은 방출 이벤트로 이어지는 주어진 파장에서의 또는 주어진 스펙트럼 범위 내에서의 여기 이벤트의 분율을 지칭하며, 전형적으로 1 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자의 발광 양자 수율은 0 내지 약 0.001, 약 0.001 내지 약 0.01, 약 0.01 내지 약 0.1, 약 0.1 내지 약 0.5, 약 0.5 내지 0.9, 또는 약 0.9 내지 1이다. 일부 실시양태에서, 발광 양자 수율을 결정 또는 추정함으로써 분자가 식별된다.

[0096] 단일 분자에 대해 본원에 사용된 바와 같이, 발광 강도는 펄스 여기 에너지의 전달에 의해 여기되는 분자에 의해 방출된, 단위 시간당 방출된 광자의 수를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발광 강도는 펄스 여기 에너지의 전달에 의해 여기되는 분자에 의해 방출되고 특정한 센서 또는 센서의 세트에 의해 검출된, 단위 시간당 방출된 광자의 검출된 수를 지칭한다.

[0097] 발광 수명, 발광 양자 수율, 및 발광 강도는 상이한 조건 하에서 주어진 분자에 대해 각각 달라질 수 있다. 일

부 실시양태에서, 단일 분자는 분자 집단과 상이한 관측 발광 수명, 발광 양자 수율, 또는 발광 강도를 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 샘플 웰 (예를 들어, 나노개구) 내에 국한된 분자는 샘플 웰에 국한되지 않은 분자와 상이한 관측 발광 수명, 발광 양자 수율 또는 발광 강도를 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 또 다른 분자에 부착된 발광 표지 또는 발광 분자는 또 다른 분자에 부착되지 않은 발광 표지 또는 발광 분자와 상이한 발광 수명, 발광 양자 수율, 또는 발광 강도를 가질 것이다. 일부 실시양태에서, 거대분자 복합체 (예를 들어, 단백질 복합체 (예를 들어, 핵산 폴리머라제))와 상호작용하는 분자는 거대분자 복합체와 상호작용하지 않는 분자와 상이한 발광 수명, 발광 양자 수율, 또는 발광 강도를 가질 것이다.

[0098] 특정 실시양태에서, 본 출원에 기재된 발광 분자는 1개의 광자를 흡수하고, 시간 기간 후에 1개의 광자를 방출한다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 시간 기간을 측정함으로써 결정 또는 추정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 다수의 펄스 이벤트 및 방출 이벤트에 대해 복수의 시간 기간을 측정함으로써 결정 또는 추정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 시간 기간을 측정함으로써 복수의 유형의 분자의 발광 수명과 차별화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자의 발광 수명은 다수의 펄스 이벤트 및 방출 이벤트에 대해 복수의 시간 기간을 측정함으로써 복수의 유형의 분자의 발광 수명과 차별화될 수 있다. 특정 실시양태에서, 분자는 분자의 발광 수명을 결정 또는 추정함으로써 복수의 유형의 분자에서 식별 또는 차별화된다. 특정 실시양태에서, 분자는 분자의 발광 수명을 복수의 유형의 분자의 복수의 발광 수명과 차별화함으로써 복수의 유형의 분자에서 식별 또는 차별화된다.

[0099] 특정 실시양태에서, 발광 방출 이벤트는 형광이다. 특정 실시양태에서, 발광 방출 이벤트는 인광이다. 본원에 사용된 용어 발광은 형광 및 인광 둘 다를 포함한 모든 발광 이벤트를 포괄한다.

[0100] 한 측면에서, 본 출원은 표적 체적에 발광 분자를 제공하는 것; 여기 에너지의 복수의 펄스를 표적 체적 부근으로 전달하는 것; 및 발광 분자로부터 복수의 발광을 검출하는 것을 포함하는, 단일 발광 분자의 발광 수명을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 각각의 쌍의 펄스와 발광 사이에서 복수의 시간 기간의 분포를 평가하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 체적에 단일 발광 분자를 고정하는 것을 추가로 포함한다.

[0101] 또 다른 측면에서, 본 출원은 표적 체적에 복수의 발광 분자를 제공하는 것; 여기 에너지의 복수의 펄스를 표적 체적 부근으로 전달하는 것; 및 발광 분자로부터 복수의 발광을 검출하는 것을 포함하는, 복수의 분자의 발광 수명을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 각각의 쌍의 펄스와 발광 사이에서 복수의 시간 기간의 분포를 평가하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 체적에 발광 분자를 고정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수는 2 내지 약 10개의 분자, 약 10 내지 약 100개의 분자, 또는 약 100 내지 약 1000개의 분자로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 복수는 약 1000 내지 약 10^6개의 분자, 약 10^6 내지 약 10^9개의 분자, 약 10^9 내지 약 10^{12}개의 분자, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}개의 분자, 또는 약 10^{15} 내지 약 10^{18}개의 분자로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 복수의 모든 분자는 동일한 유형의 분자이다.

[0102] 도 3은 상이한 발광 수명을 갖는 (최장에서 최단, 상부에서 저부) 4종의 발광 분자에 대한 예시적인 붕괴 프로파일(3-1)을 보여준다. 진폭은 많은 분자를 포함하는 샘플로부터의 발광의 강도를 지칭할 수 있고, 이는 발광 수명에 기초하여 초기 여기 후 시간의 경과에 따라 지수적으로 감소한다. 진폭은 대안적으로 예를 들어 단일 분자에 대한, 여기 에너지의 복수의 펄스 후 시간 기간 후에 검출된 방출의 수 또는 카운트를 지칭할 수 있다. 정규화된 누적 분포 함수(3-2)는 상이한 발광 수명을 갖는 (최단에서 최장, 상부에서 저부) 4종의 발광 분자에 대한 (3-1)에 상응한다. CDF는 발광 수명에 기초하여 초기 여기 후 시간의 경과에 따라 0에 도달할 발광 진폭의 정규화된 확률 (예를 들어, 발광된 모든 여기 분자의 누적 확률)을 나타낼 수 있다. CDF는 대안적으로 단일 펄스 후 또는 여기 에너지의 복수의 펄스의 각각 후 특정 시간 기간에 발광을 방출하는 단일 분자의 정규화된 확률을 나타낼 수 있다.

[0103] 한 측면에서, 본 출원은 표적 체적에 발광 분자를 제공하는 것; 여기 에너지의 복수의 펄스를 표적 체적 부근으로 전달하는 것; 및 발광 분자로부터 복수의 발광을 검출하는 것을 포함하는, 단일 발광 분자의 발광 강도를 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 단위 시간당 복수의 검출된 발광의 수를 결정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 체적에 단일 발광 분자를 고정하는 것을 추가로 포함한다.

[0104] 또 다른 측면에서, 본 출원은 표적 체적에 복수의 발광 분자를 제공하는 것; 여기 에너지의 복수의 펄스를 표적 체적 부근으로 전달하는 것; 및 발광 분자로부터 복수의 발광을 검출하는 것을 포함하는, 복수의 분자의 발광 강도를 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 단위 시간당 복수의 검출된 발광의 수를 결정하

는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 체적에 발광 분자를 고정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수는 2 내지 약 10개의 분자, 약 10 내지 약 100개의 분자, 또는 약 100 내지 약 1000개의 분자로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 복수는 약 1000 내지 약 10^6개의 분자, 약 10^6 내지 약 10^9개의 분자, 약 10^9 내지 약 10^{12}개의 분자, 약 10^{12} 내지 약 10^{15}개의 분자, 또는 약 10^{15} 내지 약 10^{18}개의 분자로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 복수의 모든 분자는 동일한 유형의 분자이다.

[0105] 여기 에너지

[0106] 본원에 기재된 방법의 한 측면에서, (예를 들어 서열분석 반응 동안) 식별 또는 구별하고자 하는 분자의 발광 표지를 여기시키기 위해 1종 이상의 여기 에너지가 사용된다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 가시 스펙트럼 내에 있다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 자외선 스펙트럼 내에 있다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 적외선 스펙트럼 내에 있다. 일부 실시양태에서, 1종의 여기 에너지가 발광 표지된 분자를 여기시키는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 2종의 여기 에너지가 발광 표지된 분자를 여기시키는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 3종 이상의 여기 에너지가 발광 표지된 분자를 여기시키는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 각각의 발광 표지된 분자는 전달된 여기 에너지 중 오직 1종에 의해서만 여기된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 분자는 전달된 여기 에너지 중 2종 이상에 의해 여기된다. 특정 실시양태에서, 여기 에너지는 단색일 수 있거나, 또는 스펙트럼 범위에 국한될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스펙트럼 범위는 약 0.1 nm 내지 약 1 nm, 약 1 nm 내지 약 2 nm, 또는 약 2 nm 내지 약 5 nm의 범위를 갖는다. 일부 실시양태에서 스펙트럼 범위는 약 5 nm 내지 약 10 nm, 약 10 nm 내지 약 50 nm, 또는 약 50 nm 내지 약 100 nm의 범위를 갖는다.

[0107] 특정 실시양태에서, 여기 에너지는 광의 펄스로서 전달된다. 특정 실시양태에서, 여기 에너지는 광의 복수의 펄스로서 전달된다. 특정 실시양태에서, 2종 이상의 여기 에너지가 발광 표지된 분자를 여기시키는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 각각의 여기 에너지는 동시에 (예를 들어, 각각의 펄스로) 전달된다. 일부 실시양태에서, 각각의 여기 에너지는 상이한 시간에 (예를 들어, 각각의 에너지의 분리된 펄스로) 전달된다. 상이한 여기 에너지는 표적 분자로부터 발광의 검출을 가능하게 하는데 충분한 임의의 패턴으로 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2종의 여기 에너지는 각각의 펄스로 전달된다. 일부 실시양태에서, 제1 여기 에너지 및 제2 여기 에너지는 교대 펄스로 전달된다. 일부 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 일련의 순차적 펄스로 전달되고, 제2 여기 에너지는 순차적 펄스의 후속 시리즈로, 또는 이러한 시리즈의 교대 패턴으로 전달된다.

[0108] 특정 실시양태에서, 광의 펄스의 주파수는 발광 표지된 분자의 발광 특성에 기초하여 선택된다. 특정 실시양태에서, 광의 펄스의 주파수는 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 특성에 기초하여 선택된다. 특정 실시양태에서, 광의 펄스의 주파수는 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명에 기초하여 선택된다. 일부 실시양태에서, 주파수는 펄스 사이의 갭이 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명보다 더 길도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 주파수는 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드의 최장 발광 수명에 기초하여 선택된다. 예를 들어, 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명이 0.25, 0.5, 1.0, 및 1.5 ns인 경우에, 광의 펄스의 주파수는 펄스 사이의 갭이 1.5 ns를 초과하도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭은 여기되는 1종 이상의 발광 표지된 분자의 발광 수명보다 약 2배 내지 약 10배, 약 10배 내지 약 100배, 또는 약 100배 내지 약 1000배 더 길다. 일부 실시양태에서, 갭은 여기되는 1종 이상의 발광 표지된 분자의 발광 수명보다 약 10배 더 길다. 일부 실시양태에서, 갭은 약 0.01 ns 내지 약 0.1 ns, 약 1 ns 내지 약 5 ns, 약 5 ns 내지 약 15 ns, 약 15 ns 내지 약 25 ns, 또는 약 25 ns 내지 약 50 ns이다. 일부 실시양태에서, 갭은 펄스에 의해 여기된 분자가 발광 붕괴될, 또는 여기 상태가 또 다른 메카니즘에 의해 완화될 확률이 50%, 75%, 90%, 95%, 또는 99% 존재하도록 선택된다.

[0109] 특정 실시양태에서, 다수의 여기 에너지가 존재하는 경우에, 각각의 여기 에너지에 대한 펄스의 주파수는 동일하다. 특정 실시양태에서, 다수의 여기 에너지가 존재하는 경우에, 각각의 여기 에너지에 대한 펄스의 주파수는 상이하다. 예를 들어, 적색 레이저가 0.2 및 0.5 ns의 수명으로 발광 분자를 여기시키는데 사용되고 녹색 레이저가 5 ns 및 7 ns의 수명으로 발광 분자를 여기시키는데 사용되는 경우에, 각각의 적색 레이저 펄스 후의 갭은 각각의 녹색 레이저 펄스 후의 갭 (예를 들어, 20 ns)보다 더 짧을 수 있다 (예를 들어, 5 ns).

[0110] 특정 실시양태에서, 펄스 여기 에너지의 주파수는 모니터링할 화학적 공정에 기초하여 선택된다. 서열분석 반응의 경우에 주파수는 펄스의 수가 검출하고자 하는 방출된 광자의 충분한 수의 검출을 가능하게 하는데 충분히 전달되도록 선택될 수 있다. 검출된 광자와 관련하여 충분한 수는 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 발광 표지된 뉴클레오티드를 식별 또는 구별하는데 필요한 광자의 수를 지칭한다. 예를 들어, DNA 폴리머라제는 평균 20 밀리초마다 1회, 추가의 뉴클레오티드를 혼입할 수 있다. 발광 표지된 뉴클레오티드가 복합체와 상호

작용하는 시간은 약 10 밀리초일 수 있고, 발광 마커가 절단된 때와 다음 발광 표지된 뉴클레오티드가 상호작용하기 시작하는 사이의 시간은 약 10 밀리초일 수 있다. 이어서 펄스 여기 에너지의 주파수는 발광 표지된 뉴클레오티드가 혼입될 때 10 밀리초 동안 충분한 수의 방출된 광자가 검출되도록 10 밀리초 내내 충분한 펄스를 전달하기 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 100 MHz의 주파수에서, 10 밀리초 (혼입 이벤트의 대략적인 길이) 내에 1백만개의 펄스가 존재할 것이다. 이들 펄스 중 0.1%가 검출된 광자로 이어지면, 혼입된 발광 표지된 뉴클레오티드의 아이덴티티를 결정하기 위해 분석될 수 있는 1,000개의 발광 데이터 지점이 존재할 것이다. 임의의 상기 값은 비제한적이다. 일부 실시양태에서 혼입 이벤트는 1 ms 내지 20 ms, 20 ms 내지 100 ms, 또는 100 ms 내지 500 ms 걸릴 수 있다. 다수의 여기 에너지가 개별 시한성 펄스로 전달되는 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 단지 일부의 펄스에 의해서만 여기될 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 여기 에너지의 펄스의 주파수 및 패턴은 펄스의 수가 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드 중 어느 하나를 여기시켜 충분한 수의 방출된 광자가 검출되도록 하기에 충분하게 선택된다.

[0111] 일부 실시양태에서, 펄스의 주파수는 약 1 MHz 내지 약 10 MHz이다. 일부 실시양태에서, 펄스의 주파수는 약 10 MHz 내지 약 100 MHz이다. 일부 실시양태에서, 펄스의 주파수는 약 100 MHz 내지 약 1 GHz이다. 일부 실시양태에서, 펄스의 주파수는 약 50 MHz 내지 약 200 MHz이다. 일부 실시양태에서, 펄스의 주파수는 약 100 MHz이다. 일부 실시양태에서, 주파수는 확률론적이다.

[0112] 특정 실시양태에서, 여기 에너지는 약 500 nm 내지 약 700 nm이다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 약 500 nm 내지 약 600 nm, 또는 약 600 nm 내지 약 700 nm이다. 일부 실시양태에서, 여기 에너지는 약 500 nm 내지 약 550 nm, 약 550 nm 내지 약 600 nm, 약 600 nm 내지 약 650 nm, 또는 약 650 nm 내지 약 700 nm이다.

[0113] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 2개의 여기 에너지의 전달을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2개의 여기 에너지는 약 5 nm 내지 약 20 nm, 약 20 nm 내지 약 40 nm, 약 40 nm 내지 약 60 nm, 약 60 nm 내지 약 80 nm, 약 80 nm 내지 약 100 nm, 약 100 nm 내지 약 150 nm, 약 150 nm 내지 약 200 nm, 약 200 nm 내지 약 400 nm, 또는 적어도 약 400 nm 분리된다. 일부 실시양태에서, 2개의 여기 에너지는 약 20 nm 내지 약 80 nm, 또는 약 80 nm 내지 약 160 nm 분리된다.

[0114] 여기 에너지가 특정 범위 내에 있는 것으로 지칭되는 경우에, 여기 에너지는 파장이 범위의 종점 사이 또는 범위의 종점에 있는 단일 파장을 포함할 수 있거나, 또는 여기 에너지는 최대 강도가 범위의 종점 사이 또는 범위의 종점에 있는 최대 강도를 갖는 파장의 스펙트럼을 포함할 수 있다.

[0115] 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 500 nm 내지 550 nm, 550 nm 내지 600 nm, 600 nm 내지 650 nm, 또는 650 nm 내지 700 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 500 nm 내지 550 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm, 550 nm 내지 600 nm, 600 nm 내지 650 nm, 또는 650 nm 내지 700 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 550 nm 내지 600 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm, 500 nm 내지 550 nm, 600 nm 내지 650 nm, 또는 650 nm 내지 700 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 600 nm 내지 650 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm, 500 nm 내지 550 nm, 550 nm 내지 600 nm, 또는 650 nm 내지 700 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 650 nm 내지 700 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm, 500 nm 내지 550 nm, 550 nm 내지 600 nm, 또는 600 nm 내지 650 nm의 범위 내이다.

[0116] 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 500 nm 내지 550 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 550 nm 내지 600 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 450 nm 내지 500 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 600 nm 내지 670 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 500 nm 내지 550 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 550 nm 내지 600 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 500 nm 내지 550 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 600 nm 내지 670 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 550 nm 내지 600 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 600 nm 내지 670 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 470 nm 내지 510 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 510 nm 내지 550 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 470 nm 내지 510 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 550 nm 내지 580 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 470 nm 내지 510 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 580 nm 내지 620 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 470 nm 내지 510 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 620 nm 내지 670 nm의 범위 내이다. 특

정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 510 nm 내지 550 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 550 nm 내지 580 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 510 nm 내지 550 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 580 nm 내지 620 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 510 nm 내지 550 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 620 nm 내지 670 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 550 nm 내지 580 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 580 nm 내지 620 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 550 nm 내지 580 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 620 nm 내지 670 nm의 범위 내이다. 특정 실시양태에서, 제1 여기 에너지는 580 nm 내지 620 nm의 범위 내이고, 제2 여기 에너지는 620 nm 내지 670 nm의 범위 내이다.

[0117] 표적 체적에 여기 에너지 펄스를 전달하기 위한 여기 에너지원 및 디바이스의 특정 실시양태는 본원의 다른 곳에 기재되어 있다.

[0118] 발광 표지된 뉴클레오티드

[0119] 한 측면에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 1개 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드 (예를 들어, 1개 이상의 보호 요소를 포함하는 핵산 링커를 통해 1개 이상의 표지에 연결된 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 데옥시리보스 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 모든 뉴클레오티드는 데옥시리보스 뉴클레오시드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 리보스 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 모든 뉴클레오티드는 리보스 뉴클레오시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 변형된 리보스 당 또는 리보스 유사체 (예를 들어, 잠금 핵산)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 자연 발생 염기 (예를 들어, 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민, 우라실)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민 또는 우라실의 유도체 또는 유사체를 포함한다.

[0120] 특정 실시양태에서, 방법은 폴리머라제 복합체를 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드에 노출시키는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물 또는 디바이스는 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드를 포함하는 반응 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오티드는 4종의 유형의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 유형의 뉴클레오티드 각각은 시토신, 구아닌, 아데닌 및 티민 중 1종을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4종의 유형의 뉴클레오티드 각각은 시토신, 구아닌, 아데닌 및 우라실 중 1종을 포함한다.

[0121] 특정 실시양태에서, 반응 혼합물 중 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드의 농도는 약 50 nM 내지 약 200 nM, 약 200 nM 내지 약 500 nM, 약 500 nM 내지 약 1 μM, 약 1 μM 내지 약 50 μM, 또는 약 50 μM 내지 250 μM이다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물 중 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드의 농도는 약 250 nM 내지 약 2 μM이다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물 중 각각의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드의 농도는 약 1 μM이다.

[0122] 특정 실시양태에서, 반응 혼합물은 서열분석 반응에 유용한 추가의 시약을 함유한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 완충제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 3-(N-모르폴리노)프로판술폰산 (MOPS)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 약 1 mM 내지 약 100 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, MOPS의 농도는 약 50 mM이다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 1종 이상의 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염은 아세트산칼륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아세트산칼륨의 농도는 약 140 mM이다. 일부 실시양태에서, 염은 약 1 mM 내지 약 200 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 마그네슘 염 (예를 들면, 마그네슘 아세테이트)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마그네슘 아세테이트의 농도는 약 20 mM이다. 일부 실시양태에서, 마그네슘 염은 약 1 mM 내지 약 50 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 환원제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 환원제는 디티오트레이톨 (DTT)이다. 일부 실시양태에서, 환원제는 약 1 mM 내지 약 50 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, DTT의 농도는 약 5 mM이다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 1종 이상의 광안정화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응 혼합물은 항산화제, 산소 스캐빈저 또는 삼중항 상태 켄처를 포함한다. 일부 실시양태에서, 광안정화제는 프로토카테큐산 (PCA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 광안정화제는 4-니트로벤질 알콜 (NBA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 광안정화제는 약 0.1 mM 내지 약 20 mM의 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, PCA의 농도는 약 3 mM이다. 일부 실시양태에서, NBA의 농도는 약 3 mM이다. 광안정화제 (예를 들어, PCA)를 함유하는 혼합물은 또한, 광안정화제를 재생하기 위한 효소 (예를 들어, 프로토카테큐산 디옥시게나제 (PCD))를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PCD의 농도는 약 0.3 mM이다.

[0123] 본 출원은 복수의 뉴클레오티드 중에서 뉴클레오티드를 차별화하기 위한 상이한 방법을 고려한다. 특정 실시양

태에서, 각각의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖는다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 2종 이상은 동일한 발광 수명 또는 실질적으로 동일한 발광 수명 (예를 들어, 방법 또는 디바이스에 의해 구별될 수 없는 수명)을 갖는다.

[0124] 특정 실시양태에서, 각각의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 2종은 동일한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 3종은 동일한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 4종 이상은 동일한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 2종은 상이한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 3종은 상이한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 4종 이상은 상이한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다.

[0125] 특정 실시양태에서, 각각의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 2종은 동일한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 3종은 동일한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 4종 이상은 동일한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 2종은 상이한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 3종은 상이한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 4종 이상은 상이한 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다.

[0126] 특정 실시양태에서, 각각의 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖는다. 특정 실시양태에서, 2종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출하고, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출한다. 일부 실시양태에서, 각각의 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖고 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 제4 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출한다. 일부 실시양태에서, 각각의 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 제3 및 제4 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 상이한 발광 수명을 갖고, 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다.

[0127] 특정 실시양태에서, 각각의 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 강도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 2종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출한다. 일부 실시양태에서, 각각의 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 제4 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출한다. 일부 실시양태에서, 각각의 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 제3 및 제4 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 상이한 발광 강도를 갖고, 제2 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출한다.

[0128] 특정 실시양태에서, 각각의 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 2종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출한다. 일부 실시양태에서, 각각의 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 제4 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 흡수 및/또는 방출한다. 일부 실시양태에서, 각각의 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출하고, 제3 및 제4 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제2 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출한다.

[0129] 특정 실시양태에서, 2종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수하고, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 일부 실시양태에서, 각각의 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수하고, 제4 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 일부 실시양태에서, 각각의 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명을 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수하고, 제3 및 제4 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 상이한 발광 수명을 갖고,

제2 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다.

[0130] 특정 실시양태에서, 2종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수하고, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 일부 실시양태에서, 각각의 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수하고, 제4 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다. 일부 실시양태에서, 각각의 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수하고, 제3 및 제4 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 상이한 발광 수명 또는 발광 강도를 갖고, 제2 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수한다.

[0131] 서열분석 동안 뉴클레오티드를 식별하는 방법은 서열 내의 다양한 염기 쌍 사이에서 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 2종의 유형의 뉴클레오티드는 제1 여기 에너지에서 흡수하도록 표지될 수 있고, 그러한 2종의 유형의 뉴클레오티드 (예를 들어, A, G)는 상이한 발광 강도에 기초하여 구별되는 반면에, 2종의 추가의 유형의 뉴클레오티드 (예를 들어, C, T)는 제2 여기 에너지에서 흡수하도록 표지될 수 있고, 그러한 2종의 추가의 유형의 뉴클레오티드는 상이한 발광 수명에 기초하여 구별된다. 이러한 실시양태의 경우에, 서열분석 동안 서열의 특정 절편은 오직 발광 강도에 기초해서만 결정될 수 있는 반면에 (예를 들어, 오직 A 및 G만이 혼입된 절편), 서열의 다른 절편은 오직 발광 수명에 기초해서만 결정될 수 있다 (예를 들어, 오직 C 및 T만이 혼입된 절편). 일부 실시양태에서, 2 내지 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 발광 수명에 기초하여 차별화된다. 일부 실시양태에서, 2 내지 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 발광 강도에 기초하여 차별화된다. 일부 실시양태에서, 2 내지 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 발광 수명 및 발광 강도에 기초하여 차별화된다.

[0132] 도 4는 예시적인 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명(4-1) 및 동일한 예시적인 뉴클레오티드에 대한 발광 강도(4-2)를 제시한다. 예를 들어, 제4 행은 형광단 알렉사 플루오르® 555 (AF555)에 연결된 데옥시티미딘 헥사포스페이트 (dT6P) 뉴클레오티드에 대한 데이터를 제시한다. 이러한 발광 표지된 뉴클레오티드는 수명이 대략 0.25 ns이고, 대략 20000 카운트/s의 발광 강도를 나타낸다. 임의의 발광 표지된 뉴클레오티드의 관측된 발광 수명 및 발광 강도는, 일반적으로 (4-1) 및 (4-2)에 대한 것에서와 같이, 혼입 조건 (예를 들어, 단일 분자 복합체에서, 나노개구에서) 대 다른 보다 전형적인 조건 하에서 뉴클레오티드에 대해 상이할 수 있다.

[0133] 발광 검출

[0134] 본원에 기재된 방법의 한 측면에서, 방출된 광자 (발광) 또는 복수의 방출된 광자는 1개 이상의 센서에 의해 검출된다. 복수의 발광 표지된 분자 또는 뉴클레오티드의 경우에, 각각의 분자는 단일 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출할 수 있거나, 또는 일부의 분자는 제1 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출할 수 있고 또 다른 일부의 분자는 제2 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출할 수 있다. 특정 실시양태에서, 방출된 광자는 단일 센서에 의해 검출된다. 특정 실시양태에서, 방출된 광자는 다수의 센서에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 제1 스펙트럼 범위 내에서 방출된 광자는 제1 센서에 의해 검출되고, 제2 스펙트럼 범위 내에서 방출된 광자는 제2 센서에 의해 검출된다. 일부 실시양태에서, 복수의 스펙트럼 범위 각각에서 방출된 광자는 상이한 센서에 의해 검출된다.

[0135] 특정 실시양태에서, 각각의 센서는 여기 에너지와 방출된 광자 사이의 시간 기간에 기초하여 방출된 광자에게 시간 빈을 할당하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 보다 짧은 시간 기간 후에 방출된 광자는 보다 이른 시간 빈에 할당될 것이고, 보다 긴 기간 후에 방출된 광자는 보다 늦은 시간 빈에 할당될 것이다.

[0136] 일부 실시양태에서, 여기 에너지의 복수의 펄스가 표적 체적 부근으로 전달되고, 광자 방출 이벤트를 포함할 수 있는 복수의 광자가 검출된다. 일부 실시양태에서, 복수의 발광 (예를 들어, 광자 방출 이벤트)은 핵산 생성물 내로의 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입에 상응한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입은 약 1 ms 내지 약 5 ms, 약 5 ms 내지 약 20 ms, 약 20 ms 내지 약 100 ms, 또는 약 100 ms 내지 약 500 ms 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입 동안 약 10 내지 약 100, 약 100 내지 약 1000, 약 1000 내지 약 10000, 또는 약 10000 내지 약 100000개의 발광이 검출된다.

[0137] 특정 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드가 혼입되지 않은 경우에 어떠한 발광도 검출되지 않는다. 일부 실시양태에서, 발광 배경이 존재한다. 일부 실시양태에서, 어떠한 발광 표지된 뉴클레오티드도 혼입되지 않고 있을 때 허위 발광이 검출된다. 이러한 허위 발광은 여기 에너지의 펄스 동안 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드가 표적 체적 내에 있지만 (예를 들어, 표적 체적 내로 확산되거나, 또는 폴리머라제와 상호작용하되 혼

입되지 않음), 서열분석 반응에 의해 혼입되지 않고 있는 경우에 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 체적 내의 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 검출되지만 혼입되고 있지 않는 복수의 발광은 발광 표지된 뉴클레오티드로부터의 복수의 발광보다 (예를 들어, 10배, 100배, 1000배, 10000배) 더 적다.

[0138] 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입에 상응하는 복수의 검출된 발광 각각에 대해, 발광은 펄스와 방출된 광자 사이의 시간 기간에 기초하여 시간 빈에 할당된다. 이러한 복수의 혼입 이벤트를 본원에서 "버스트"라고 지칭한다. 일부 실시양태에서, 버스트는 기준선 (예를 들어, 잡음 임계 값) 초과의 일련의 신호 (예를 들어, 측정치)를 지칭하며, 여기서 신호는 발광 표지된 뉴클레오티드가 여기 영역 내에 있는 경우에 발생한 복수의 방출 이벤트에 상응한다. 일부 실시양태에서, 버스트는 기준선을 나타내는 신호의 시간 간격에 의해 선행 및/또는 후속 버스트와 분리된다. 일부 실시양태에서, 버스트는 복수의 시간 기간에 기초하여 발광 수명을 결정함으로써 분석된다. 일부 실시양태에서, 버스트는 시간 단위당 검출된 발광의 수에 기초하여 발광 강도를 결정함으로써 분석된다. 일부 실시양태에서, 버스트는 검출된 발광의 스펙트럼 범위를 결정함으로써 분석된다. 일부 실시양태에서, 버스트 데이터를 분석하는 것은 혼입된 발광 표지된 뉴클레오티드의 아이덴티티의 할당을 가능하게 하거나, 또는 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드로부터 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 차별화를 가능하게 할 것이다. 할당 또는 차별화는 발광 수명, 발광 강도, 방출된 광자의 스펙트럼 범위, 또는 그의 임의의 조합 중 어느 하나에 의존할 수 있다.

[0139] 도 5는 예시적인 주형 핵산의 서열분석을 도시한다. 서열분석 실험을 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드를 사용하여 실행하였다: 알렉사 플루오르® 647에 연결된 데옥시아데노신 (A-AF647), 알렉사 플루오르 555에 연결된 데옥시티미딘 (T-AF555), 딜라이트® 554-R1에 연결된 데옥시구아니딘 (G-D554R1), 및 딜라이트® 530-R2에 연결된 데옥시시티딘 (C-D530R2). 뉴클레오티드 A-AF647은 적색 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지에 의해 여기되고, T, G, 및 C 뉴클레오티드는 녹색 스펙트럼 범위 내의 여기에 의해 여기된다. ~200 s의 서열분석 반응에 걸쳐 검출된 광자의 수를 강도 트레이스(5-1)에 제시한다. 각각의 스파이크는 검출된 발광의 버스트에 상응하고, 도트로 표시된다. 각각의 버스트는 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입에 상응할 수 있고, 수천개의 검출된 발광을 포함한다. 상이한 여기 펄스를 나타내기 위해 상이한 색상의 트레이스가 사용될 수 있다. 예를 들어, 녹색 여기 펄스에 대해 자주색 트레이스가 사용될 수 있고, 적색 여기 펄스에 대해 청색 트레이스가 사용될 수 있다. 청색 트레이스로부터의 버스트는 뉴클레오티드 A-AF647의 혼입에 할당될 수 있다 (이러한 예에서 적색 발광 분자를 갖는 유일한 뉴클레오티드).

[0140] 도 5는 강도 대 수명 플롯(5-2)을 사용하여 동일한 색상의 버스트 (예를 들어, T, G, 및 C 사이의 자주색 트레이스 내의 버스트)를 차별화하기 위해 원시 데이터를 감소시키는 하나의 방법을 제시한다. 각각의 원형은 자주색 트레이스로부터의 버스트를 나타낸다. 각각의 버스트는 펄스와 각각의 검출된 광자의 방출 사이의 시간 기간에 기초하여 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명을 결정하기 위해 분석된다. 추가적으로, 각각의 버스트는 초당 검출된 광자의 수에 기초하여 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 강도를 결정하기 위해 분석된다. 혼입 이벤트는 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각에 상응하는 3개의 그룹으로 클러스터링된다. 플롯의 하부 (파선 아래 플롯 영역)의 어두운 클러스터는 최장 발광 수명 및 최저 발광 강도를 갖는 C-D530R2에 할당된다. 플롯의 하부 (파선 아래 플롯 영역)의 밝은 클러스터는 중간 정도의 수명 및 강도를 갖는 G-D554R1에 할당된다. 그리고 플롯의 상부 (파선 위 플롯 영역)의 밝은 클러스터는 최단 수명 및 최고 강도를 갖는 T-AF555에 할당된다. 도 5는 주형 핵산의 데이터로부터 결정된 서열과 공지된 서열 사이의 정렬(5-3)을 제시한다. 수직 막대는 실험적으로 결정된 염기와 표적 서열 사이의 매칭을 나타낸다. 대시는 결정된 서열에서 어떠한 뉴클레오티드도 할당되지 않은 주형 서열에서의 위치, 또는 주형 서열 내 어떠한 위치에도 상응하지 않는 결정된 서열에서의 여분 위치를 나타낸다.

[0141] 도 6은 주형 핵산의 서열분석을 위한 제2 예를 도시한다. 서열분석 실험을 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드를 사용하여 실행하였다: 알렉사 플루오르® 647에 연결된 데옥시아데노신 (A-AF647), 알렉사 플루오르 555에 연결된 데옥시티미딘 (T-AF555), 알렉사 플루오르® 647에 연결된 데옥시구아니딘 (G-AF647), 및 알렉사 플루오르® 546에 연결된 데옥시시티딘 (C-AF546). 뉴클레오티드 A-AF647 및 G-AF647은 적색 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지에 의해 여기되고, T 및 C 뉴클레오티드는 녹색 스펙트럼 범위 내의 여기에 의해 여기된다. 이러한 실험에서, A 및 G는 동일한 발광 마커를 갖고, 구별되지 않는다. 도 6은 강도 트레이스(6-1)에서 ~300 s의 서열분석 반응에 걸쳐 검출된 광자의 수를 제시한다. 각각의 스파이크는 검출된 발광의 버스트에 상응하고, 도트로 표시된다. 각각의 버스트는 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입에 상응할 수 있고, 수천개의 검출된 발광을 포함한다. 트레이스는 녹색 여기 펄스에 대해 검출된 발광을 제시한다 (염기 T 및 C에 상응한다).

[0142] 도 6은 강도 대 수명 플롯(6-2)을 사용하여 T 및 C를 차별화하기 위해 원시 데이터를 감소시키는 하나의 방법을

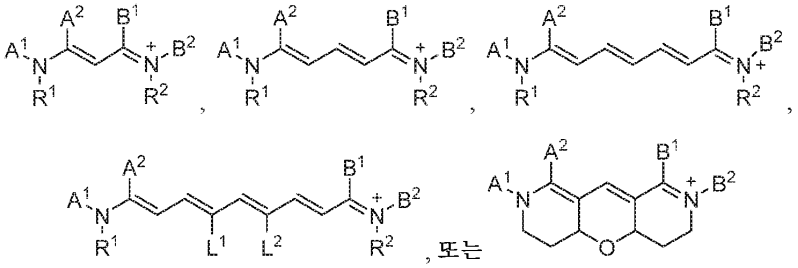
제시한다. 각각의 원형은 강도 트레이스(6-1)로부터의 버스트를 나타낸다. 각각의 버스트는 펄스와 각각의 검출된 광자의 방출 사이의 시간 기간에 기초하여 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 수명을 결정하기 위해 분석된다. 추가적으로, 각각의 버스트는 초당 검출된 광자의 수에 기초하여 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 강도를 결정하기 위해 분석된다. 혼입 이벤트는 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각에 상응하는 2개의 그룹으로 클러스터링된다. 플롯의 오른쪽 부분 (파선의 오른쪽 플롯 영역)의 어두운 클러스터는 최장 발광 수명 및 최저 발광 강도를 갖는 C-AF546에 할당된다. 플롯의 오른쪽 부분 (파선의 오른쪽 플롯 영역)의 밝은 클러스터는 최단 수명 및 최고 강도를 갖는 T-AF555에 할당된다. 도 6은 주형 핵산의 데이터로부터 결정된 서열과 공지된 서열 사이의 정렬(6-3)을 제시한다. 수직 막대는 실험적으로 결정된 염기와 표적 서열 사이의 매칭을 나타낸다. 대시는 결정된 서열에서 어떠한 뉴클레오티드도 할당되지 않은 주형 서열에서의 위치, 또는 주형 서열 내 어떠한 위치에도 상응하지 않는 결정된 서열에서의 여분 위치를 나타낸다.

[0143] 발광 표지

[0144] 용어 발광 태그, 발광 표지 및 발광 마커는 전체에 걸쳐 상호교환가능하게 사용되고, 1개 이상의 발광 분자를 포함하는 분자에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 혼입된 분자는 예를 들어 별개의 발광 표지의 부착이 없는 발광 분자이다. 전형적인 뉴클레오티드 및 아미노산은 발광성이 아니거나, 여기 및 방출 에너지의 적합한 범위 내에서 발광하지 않는다. 특정 실시양태에서, 혼입된 분자는 발광 표지를 포함한다. 특정 실시양태에서, 혼입된 분자는 발광 표지된 뉴클레오티드이다. 특정 실시양태에서, 혼입된 분자는 발광 표지된 아미노산 또는 발광 표지된 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드 및 발광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 뉴클레오티드, 발광 표지 및 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 형광단이다.

[0145] 특정 실시양태에서, 발광 표지, 및 임의로 링커는 혼입된 분자에 부착된 채로 남아있다. 특정 실시양태에서, 발광 표지, 및 임의로 링커는 혼입 과정 동안 또는 그 후에 분자로부터 절단된다.

[0146] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 시아닌 염료 또는 그의 유사체이다. 일부 실시양태에서, 시아닌 염료는 하기 화학식을 갖거나:



[0147] , 또는

[0148] 또는 그의 염, 입체이성질체 또는 호변이성질체이고, 여기서

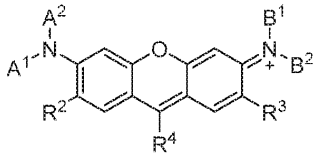
[0149] A^1 및 A^2는 연결되어 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족, 모노시클릭 또는 폴리시클릭, 헤테로시클릭 고리를 형성하고;

[0150] B^1 및 B^2는 연결되어 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족, 모노시클릭 또는 폴리시클릭, 헤테로시클릭 고리를 형성하고;

[0151] 각각의 R^1 및 R^2는 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬이고;

[0152] 각각의 L^1 및 L^2는 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬이거나, 또는 L^1 및 L^2는 연결되어 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족, 모노시클릭 또는 폴리시클릭, 카르보시클릭 고리를 형성한다.

[0153] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 로다민 염료 또는 그의 유사체이다. 일부 실시양태에서, 로다민 염료는 하기 화학식을 갖거나:



[0154]

[0155] 또는 그의 염, 입체이성질체 또는 호변이성질체이고, 여기서

[0156] 각각의 A^1 및 A^2는 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 방향족 또는 비-방향족 헤테로시클릴, 임의로 치환된 방향족 또는 비-방향족 카르보시클릴, 또는 임의로 치환된 카르보닐이거나, 또는 A^1 및 A^2는 연결되어 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족, 모노시클릭 또는 폴리시클릭, 헤테로시클릭 고리를 형성하고;

[0157] 각각의 B^1 및 B^2는 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족 헤테로시클릴, 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족 카르보시클릴, 또는 임의로 치환된 카르보닐이거나, 또는 B^1 및 B^2는 연결되어 임의로 치환된, 방향족 또는 비-방향족, 모노시클릭 또는 폴리시클릭, 헤테로시클릭 고리를 형성하고;

[0158] 각각의 R^2 및 R^3은 독립적으로 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 아릴, 또는 임의로 치환된 아실이고;

[0159] R^4는 수소, 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된, 임의로 치환된 방향족 또는 비-방향족 헤테로시클릴, 임의로 치환된 방향족 또는 비-방향족 카르보시클릴, 또는 임의로 치환된 카르보닐이다.

[0160] 일부 실시양태에서, R^4는 임의로 치환된 페닐이다. 일부 실시양태에서, R^4는 임의로 치환된 페닐이며, 여기서 적어도 1개의 치환기는 임의로 치환된 카르보닐이다. 일부 실시양태에서, R^4는 임의로 치환된 페닐이며, 여기서 적어도 1개의 치환기는 임의로 치환된 술포닐이다.

[0161] 전형적으로, 발광 표지는 방향족 또는 헤테로방향족 화합물을 포함하고, 피렌, 안트라센, 나프탈렌, 아크리딘, 스틸벤, 인돌, 벤즈인돌, 옥사졸, 카르바졸, 티아졸, 벤조티아졸, 페난트리딘, 페녹사진, 포르피린, 퀴놀린, 에티듐, 벤즈아미드, 시아닌, 카르보시아닌, 살리실레이트, 안트라닐레이트, 쿠마린, 플루오로세인, 로다민 또는 다른 유사 화합물일 수 있다. 예시적인 염료는 5-카르복시플루오레세인 (FAM), 2'7'-디메톡시-4'5'-디클로로-6-카르복시플루오레세인 (JOE), 테트라클로로플루오레세인 (TET), 6-카르복시로다민 (R6G), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카르복시로다민 (TAMRA), 6-카르복시-X-로다민 (ROX)을 포함한 크산텐 염료, 예컨대 플루오레세인 또는 로다민 염료를 포함한다. 예시적인 염료는 또한 알파 또는 베타 위치에서 아미노 기를 갖는 나프틸아민 염료를 포함한다. 예를 들어, 나프틸아미노 화합물은 1-디메틸아미노나프틸-5-술포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 술포네이트 및 2-p-톨루이디닐-6-나프탈렌 술포네이트, 5-(2'-아미노에틸)아미노나프탈렌-1-술폰산 (EDANS)을 포함한다. 다른 예시적인 염료는 쿠마린, 예컨대 3-페닐-7-이소시아네이토쿠마린; 아크리딘, 예컨대 9-이소티오시아네이토아크리딘 및 아크리딘 오렌지; N-(p-(2-벤족사졸릴)페닐)말레이미드; 시아닌, 예컨대 인도디카르보시아닌 3 (Cy®3), (2Z)-2-[(E)-3-[3-(5-카르복시펜틸)-1,1-디메틸-6,8-디술포벤조[e]인돌-3-윰-2-일]프로프-2-에닐리덴]-3-에틸-1,1-디메틸-8-(트리옥시다닐술파닐)벤조[e]인돌-6-술포네이트 (Cy®3.5), 2-{2-[(2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시]-2-옥소에틸}-16,16,18,18-테트라메틸-6,7,7a,8a,9,10,16,18-옥타히드로벤조[2",3"]인돌리지노[8",7":5',6']피라노[3',2':3,4]피리도[1,2-a]인돌-5-윰-14-술포네이트 (Cy®3B), 인도디카르보시아닌 5 (Cy®5), 인도디카르보시아닌 5.5 (Cy®5.5), 3-(-카르복시-펜틸)-3'-에틸-5,5'-디메틸옥사카르보시아닌 (CyA); 1H,5H,11H,15H-크산테노[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']디퀴놀리진-18-윰, 9-[2(또는 4)-[[[6-[2,5-디옥소-1-피롤리디닐)옥시]-6-옥소헥실]아미노]술포닐]-4(또는 2)-술포페닐]-2,3,6,7,12,13,16,17-옥타히드로-내부 염 (TR 또는 텍사스 레드(Texas Red)®); 바디피(BODIPY)® 염료; 벤족사졸; 스틸벤; 피렌; 등을 포함한다.

[0162] 뉴클레오티드 서열분석을 위해, 발광 표지된 뉴클레오티드의 특정 조합이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다.

일부 실시양태에서, 적어도 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드 각각은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 제4 발광 표지된 뉴클레오티드는 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 제3, 및 임의로 제4, 발광 표지된 뉴클레오티드는 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 3종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 제3, 및 임의로 제4, 발광 표지된 뉴클레오티드는 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함한다.

[0163] 일부 실시양태에서, 적어도 1종의 표지된 뉴클레오티드는 2종 이상의 염료 (예를 들어, 동일한 염료의 2개 이상의 카피 및/또는 2종 이상의 상이한 염료)에 연결된다.

[0164] 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 적어도 2종의 추가의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 시아닌 염료 또는 그의 유사체를 포함하고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 로다민 염료 또는 그의 유사체를 포함한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 약 1 ns 미만의 발광 수명을 갖고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 1 ns 초과의 발광 수명을 갖는다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 약 1 ns 미만의 발광 수명을 갖고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 1 ns 초과의 발광 수명을 갖는다. 일부 실시양태에서, 적어도 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제1 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 약 1 ns 미만의 발광 수명을 갖고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 1 ns 초과의 발광 수명을 갖고, 적어도 추가의 2종의 발광 표지된 뉴클레오티드는 제2 여기 에너지를 흡수하며, 여기서 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 약 1 ns 미만의 발광 수명을 갖고, 발광 표지된 뉴클레오티드 중 적어도 1종은 1 ns 초과의 발광 수명을 갖는다.

[0166] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 표 1로부터 선택된 염료이다. 표 1에 열거된 염료는 비제한적이고, 본 출원의 발광 표지는 표 1에 열거되지 않은 염료를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 1로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 1로부터 선택된다.

[0167] 표 1. 예시적인 형광단.

형광단		
5/6-카르복시로다민 6G	크로미스 678C	딜라이트® 655-B1
5-카르복시로다민 6G	크로미스 678Z	딜라이트® 655-B2
6-카르복시로다민 6G	크로미스 770A	딜라이트® 655-B3
6-TAMRA	크로미스 770C	딜라이트® 655-B4
알렉사 플루오르® 350	크로미스 800A	딜라이트® 662Q
알렉사 플루오르® 405	크로미스 800C	딜라이트® 675-B1
알렉사 플루오르® 430	크로미스 830A	딜라이트® 675-B2
알렉사 플루오르® 480	크로미스 830C	딜라이트® 675-B3
알렉사 플루오르® 488	Cy®3	딜라이트® 675-B4
알렉사 플루오르® 514	Cy®3.5	딜라이트® 679-C5
알렉사 플루오르® 532	Cy®3B	딜라이트® 680
알렉사 플루오르® 546	Cy®5	딜라이트® 683Q
알렉사 플루오르® 555	디오믹스-350	딜라이트® 690-B1
알렉사 플루오르® 568	디오믹스-350XL	딜라이트® 690-B2
알렉사 플루오르® 594	디오믹스-360XL	딜라이트® 696Q
알렉사 플루오르® 610-X	디오믹스-370XL	딜라이트® 700-B1
알렉사 플루오르® 633	디오믹스-375XL	딜라이트® 700-B1
알렉사 플루오르® 647	디오믹스-380XL	딜라이트® 730-B1
알렉사 플루오르® 660	디오믹스-390XL	딜라이트® 730-B2
알렉사 플루오르® 680	디오믹스-405	딜라이트® 730-B3
알렉사 플루오르® 700	디오믹스-415	딜라이트® 730-B4
알렉사 플루오르® 750	디오믹스-430	딜라이트® 747
알렉사 플루오르® 790	디오믹스-431	딜라이트® 747-B1
AMCA	디오믹스-478	딜라이트® 747-B2
ATTO 390	디오믹스-480XL	딜라이트® 747-B3
ATTO 425	디오믹스-481XL	딜라이트® 747-B4
ATTO 465	디오믹스-485XL	딜라이트® 755
ATTO 488	디오믹스-490	딜라이트® 766Q
ATTO 495	디오믹스-495	딜라이트® 775-B2
ATTO 514	디오믹스-505	딜라이트® 775-B3
ATTO 520	디오믹스-510XL	딜라이트® 775-B4
ATTO 532	디오믹스-511XL	딜라이트® 780-B1
ATTO 542	디오믹스-520XL	딜라이트® 780-B2
ATTO 550	디오믹스-521XL	딜라이트® 780-B3
ATTO 565	디오믹스-530	딜라이트® 800
ATTO 590	디오믹스-547	딜라이트® 830-B2
ATTO 610	디오믹스-547P1	이플루오르® 450
ATTO 620	디오믹스-548	에오신
ATTO 633	디오믹스-549	FITC
ATTO 647	디오믹스-549P1	플루오레세인

[0168]

[0169]

형광단		
ATTO 647N	디오믹스-550	하이라이트™ 플루오르 405
ATTO 655	디오믹스-554	하이라이트™ 플루오르 488
ATTO 665	디오믹스-555	하이라이트™ 플루오르 532
ATTO 680	디오믹스-556	하이라이트™ 플루오르 555
ATTO 700	디오믹스-560	하이라이트™ 플루오르 594
ATTO 725	디오믹스-590	하이라이트™ 플루오르 647
ATTO 740	디오믹스-591	하이라이트™ 플루오르 680
ATTO Oxa12	디오믹스-594	하이라이트™ 플루오르 750
ATTO Rho101	디오믹스-601XL	IRDye® 680LT
ATTO Rho11	디오믹스-605	IRDye® 750
ATTO Rho12	디오믹스-610	IRDye® 800CW
ATTO Rho13	디오믹스-615	JOE
ATTO Rho14	디오믹스-630	라이트사이클러® 640R
ATTO Rho3B	디오믹스-631	라이트사이클러® 레드 610
ATTO Rho6G	디오믹스-632	라이트사이클러® 레드 640
ATTO Thio12	디오믹스-633	라이트사이클러® 레드 670
BD 호리존™ V450	디오믹스-634	라이트사이클러® 레드 705
바디피® 493/501	디오믹스-635	리사민 로다민 B
바디피® 530/550	디오믹스-636	나프토플루오레세인
바디피® 558/568	디오믹스-647	오레곤 그린® 488
바디피® 564/570	디오믹스-647P1	오레곤 그린® 514
바디피® 576/589	디오믹스-648	퍼시픽 블루™
바디피® 581/591	디오믹스-648P1	퍼시픽 그린™
바디피® 630/650	디오믹스-649	퍼시픽 오렌지™
바디피® 650/665	디오믹스-649P1	PET
바디피® FL	디오믹스-650	PF350
바디피® FL-X	디오믹스-651	PF405
바디피® R6G	디오믹스-652	PF415
바디피® TMR	디오믹스-654	PF488
바디피® TR	디오믹스-675	PF505
C5.5	디오믹스-676	PF532
C7	디오믹스-677	PF546
CAL 플루오르® 골드 540	디오믹스-678	PF555P
CAL 플루오르® 그린 510	디오믹스-679P1	PF568
CAL 플루오르® 오렌지 560	디오믹스-680	PF594
CAL 플루오르® 레드 590	디오믹스-681	PF610
CAL 플루오르® 레드 610	디오믹스-682	PF633P
CAL 플루오르® 레드 615	디오믹스-700	PF647P
CAL 플루오르® 레드 635	디오믹스-701	퀴사르® 570
캐스케이드® 블루	디오믹스-703	퀴사르® 670
CF™350	디오믹스-704	퀴사르® 705
CF™405M	디오믹스-730	로다민 123

형광단		
CF™405S	디오믹스-731	로다민 6G
CF™488A	디오믹스-732	로다민 B
CF™514	디오믹스-734	로다민 그린
CF™532	디오믹스-749	로다민 그린-X
CF™543	디오믹스-749P1	로다민 레드
CF™546	디오믹스-750	ROX
CF™555	디오믹스-751	ROX
CF™568	디오믹스-752	세타™ 375
CF™594	디오믹스-754	세타™ 470
CF™620R	디오믹스-776	세타™ 555
CF™633	디오믹스-777	세타™ 632
CF™633-V1	디오믹스-778	세타™ 633
CF™640R	디오믹스-780	세타™ 650
CF™640R-V1	디오믹스-781	세타™ 660
CF™640R-V2	디오믹스-782	세타™ 670
CF™660C	디오믹스-800	세타™ 680
CF™660R	디오믹스-831	세타™ 700
CF™680	딜라이트® 350	세타™ 750
CF™680R	딜라이트® 405	세타™ 780
CF™680R-V1	딜라이트® 415-Co1	세타™ APC-780
CF™750	딜라이트® 425Q	세타™ PerCP-680
CF™770	딜라이트® 485-LS	세타™ R-PE-670
CF™790	딜라이트® 488	세타™646
크로메오™ 642	딜라이트® 504Q	세타™u 380
크로미스 425N	딜라이트® 510-LS	세타™u 425
크로미스 500N	딜라이트® 515-LS	세타™u 647
크로미스 515N	딜라이트® 521-LS	세타™u 405
크로미스 530N	딜라이트® 530-R2	술포로다민 101
크로미스 550A	딜라이트® 543Q	TAMRA
크로미스 550C	딜라이트® 550	TET
크로미스 550Z	딜라이트® 554-R0	텍사스 레드®
크로미스 560N	딜라이트® 554-R1	TMR
크로미스 570N	딜라이트® 590-R2	TRITC
크로미스 577N	딜라이트® 594	야키마 옐로우™
크로미스 600N	딜라이트® 610-B1	제논®
크로미스 630N	딜라이트® 615-B2	Zy3
크로미스 645A	딜라이트® 633	Zy5
크로미스 645C	딜라이트® 633-B1	Zy5.5
크로미스 645Z	딜라이트® 633-B2	Zy7
크로미스 678A	딜라이트® 650	아베리어®® 스타 635
스퀘어 635	스퀘어 650	스퀘어 660
스퀘어 672	스퀘어 680	아베리어® 스타 440SXP
아베리어® 스타 470SXP	아베리어® 스타 488	아베리어® 스타 512

[0170]

형광단		
아베리어® 스타 520SXP	아베리어® 스타 580	아베리어® 스타 600
아베리어® 스타 635	아베리어® 스타 635P	아베리어® 스타 레드

[0171]

[0172] 염료는 또한 최대 흡광도의 파장 또는 방출된 발광에 기초하여 분류될 수 있다. 표 2는 최대 흡광도의 대략적인 파장에 따라 열로 그룹화한 예시적인 형광단을 제공한다. 표 2에 열거된 염료는 비제한적이고, 본 출원의 발광 표지는 표 2에 열거되지 않은 염료를 포함할 수 있다. 정확한 최대 흡광도 또는 방출 파장은 표시된 스펙트럼 범위에 상응하지 않을 수 있다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 2에 열거된 "적색" 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 2에 열거된 "녹색" 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드의 발광 표지는 표 2에 열거된 "황색/오렌지색" 그룹으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 모두 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 또는 "녹색" 그룹 중 1종으로부터 선택되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 3종이 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제1 그룹으로부터 선택되고, 제4가 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및

"녹색" 그룹의 제2 그룹으로부터 선택되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 2종이 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제1로부터 선택되고, 제3 및 제4가 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제2 그룹으로부터 선택되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4종의 뉴클레오티드의 발광 표지는 2종이 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제1로부터 선택되고, 제3이 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제2 그룹으로부터 선택되고, 제4가 표 2에 열거된 "적색", "황색/오렌지색", 및 "녹색" 그룹의 제3 그룹으로부터 선택되도록 선택된다.

[0173] 표 2. 스펙트럼 범위에 의한 예시적인 형광단.

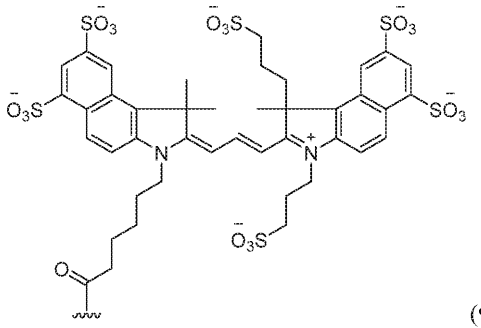
"녹색" 520-570 nm	" 황색/오렌지색" 570-620 nm	"적색" 620-670 nm
5/6-카르복시로다민 6G	알렉사 플루오르® 594	알렉사 플루오르® 633
6-TAMRA	알렉사 플루오르® 610-X	알렉사 플루오르® 647
알렉사 플루오르® 532	ATTO 590	알렉사 플루오르® 660
알렉사 플루오르® 546	ATTO 610	ATTO 633
알렉사 플루오르® 555	ATTO 620	ATTO 647
알렉사 플루오르® 568	바디피® 576/589	ATTO 647N
ATTO 520	바디피® 581/591	ATTO 655
ATTO 532	CF™594	ATTO 665
ATTO 542	CF™620R	ATTO 680
ATTO 550	크로미스 570N	ATTO Rho14
ATTO 565	크로미스 577N	바디피® 630/650
바디피® 530/550	크로미스 600N	바디피® 650/665
바디피® 558/568	디오믹스-590	CAL 플루오르® 레드 635
바디피® 564/570	디오믹스-591	CF™ 633-V1
CF™514	디오믹스-594	CF™ 640R-V1
CF™532	디오믹스-601XL	CF™633
CF™543	디오믹스-605	CF™640R
CF™546	디오믹스-610	CF™640R-V2
CF™555	디오믹스-615	CF™660C
CF™568	딜라이트® 590-R2	CF™660R
크로미스 530N	딜라이트® 594	CF™680
크로미스 550A	딜라이트® 610-B1	CF™680R
크로미스 550C	딜라이트® 615-B2	CF™680R-V1
크로미스 550Z	하이라이트™ 플루오르 594	크로메오™ 642
크로미스 560N	라이트사이클러®® 레드 610	크로미스 630N
Cy®3	PF594	크로미스 645A
Cy®3.5	PF594	크로미스 645A
Cy®3B	PF610	크로미스 645C
디오믹스-530	퀴사르® 570	크로미스 645Z
디오믹스-547	아베리어® 스타 580	Cy®5
디오믹스-547P1	아베리어® 스타 600	Cy®5.5
디오믹스-548		디오믹스-630
디오믹스-549P1		디오믹스-631
디오믹스-550		디오믹스-632
디오믹스-554		디오믹스-633
디오믹스-555		디오믹스-634
디오믹스-556		디오믹스-635
디오믹스-560		디오믹스-636
딜라이트® 521-LS		디오믹스-647

[0174]

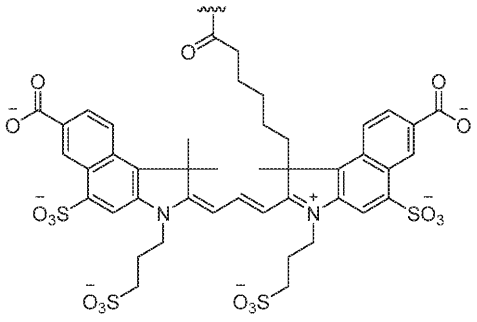
“녹색” 520-570 nm	“황색/오렌지색” 570-620 nm	“적색” 620-670 nm
딜라이트® 530-R2		디오믹스-647P1
딜라이트® 543Q		디오믹스-648
딜라이트® 550		디오믹스-648P1
딜라이트® 554-R0		디오믹스-649
딜라이트® 554-R1		디오믹스-649P1
하이라이트™ 플루오르 532		디오믹스-650
하이라이트™ 플루오르 555		디오믹스-651
PF532		디오믹스-652
PF546		디오믹스-654
PF555P		딜라이트® 633
PF568		딜라이트® 633-B1
세타™ 555		딜라이트® 633-B2
아베리어® 스타 520SXP		딜라이트® 650
		딜라이트® 655-B1
		딜라이트® 655-B2
		딜라이트® 655-B3
		딜라이트® 655-B4
		딜라이트® 662Q
		딜라이트® 680
		딜라이트® 683Q
		하이라이트™ 플루오르 647
		하이라이트™ 플루오르 680
		라이트사이클러®® 640R
		라이트사이클러® 레드 640
		라이트사이클러® 레드 670
		PF633P
		PF647P
		퀘사르® 670
		세타™ 632
		세타™ 633
		세타™ 650
		세타™ 660
		세타™ 670
		세타™Tau 647
		스퀘어 635
		스퀘어 650
		스퀘어 660
		아베리어® 스타 635
		아베리어® 스타 635P
		아베리어® 스타 레드

[0175]

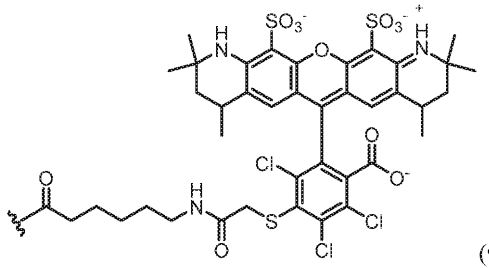
[0176] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 하기 화학식 (NHS 에스테르 형태)의 (염료 101), (염료 102), (염료 103), (염료 104), (염료 105), 또는 (염료 106) 또는 그의 유사체일 수 있다:



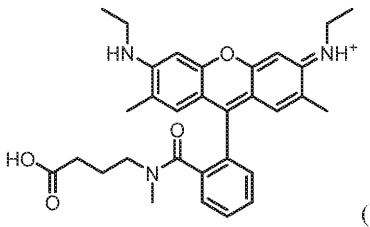
(염료 101),



(염료 102),

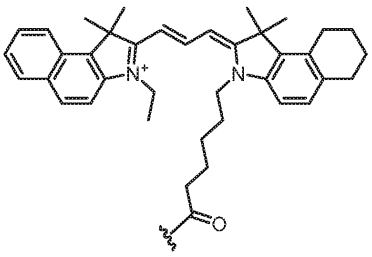


(염료 103),

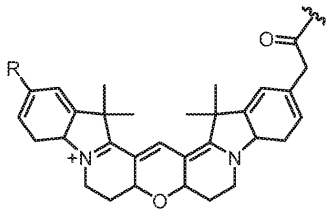


(염료 104),

[0177]



(염료 105),



(염료 106)

[0178]

[0179] 일부 실시양태에서, 각각의 술포네이트 또는 카르복실레이트는 독립적으로 임의로 양성자화된다. 일부 실시양태에서, 상기 염료는 표시된 부착 지점에서 아미드 결합의 형성에 의해 링커 또는 뉴클레오티드에 부착된다.

[0180] 특정 실시양태에서, 발광 표지는 제1 및 제2 발색단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 발색단의 여기 상태는 에너지 전달을 통해 제2 발색단으로 완화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 에너지 전달은 포스터 공명 에너지 전달 (FRET)이다. 이러한 FRET 쌍은 표지가 복수의 발광 표지로부터 보다 용이하게 차별화되게 하는 특성을 갖는 발광 표지를 제공하는데 유용할 수 있다. 특정 실시양태에서, FRET 쌍은 제1 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수할 수 있고, 제2 스펙트럼 범위 내에서 발광을 방출할 수 있다.

[0181] 발광 표지된 분자 (예를 들어, 발광 표지된 뉴클레오티드)의 세트의 경우에, 발광 표지된 FRET 쌍의 특성은 복수의 구별가능한 분자 (예를 들어, 뉴클레오티드)의 선택을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 발광 수명을 갖는다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 발광 강도를 갖는다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 발광 수명 및 발광 강도를 갖는다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제2 발색단은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 스펙트럼 범위 내에서 광자를 방출한다. 일부 실시양태에서, FRET 쌍의 제1 발색단은 복수의 발광 표지된 분자와 별개의 발광 수명을 갖는다. 특정 실시양태에서, FRET 쌍은 복수의 다른 발광 표지된 분자와 별개의 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수할 수 있다. 특정 실시양태에서, FRET 쌍은 복수의 다른 발광 표지된 분자 중 1종 이상과 동일한 스펙트럼 범위 내의 여기 에너지를 흡수할 수 있다.

[0182] 일부 실시양태에서, 2개 이상의 뉴클레오티드는 발광 표지에 연결될 수 있고, 여기서 뉴클레오티드는 발광 표지 상의 별개의 위치에 연결된다. 비제한적 예는 뉴클레오티드 유사체 상의 반응성 모이어티와 상용성인 2종의 독립적인 반응성 화학적 모이어티 (예를 들어, 아지도 기, 아세틸렌 기, 카르복실 기, 아미노 기)를 함유하는 발광 분자를 포함할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 발광 표지는 독립적 연결을 통해 2종의 뉴클레오티드 분자에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 2개 이상의 뉴클레오티드에 대해 2개 이상의 독립적 연결을 포함할 수 있다.

[0183] 일부 실시양태에서, 2개 이상의 뉴클레오티드는 링커 (예를 들어, 분지형 링커 또는 뉴클레오티드 및/또는 염료가 부착될 수 있는 2개 이상의 반응성 부위를 갖는 링커)를 통해 발광 염료에 연결될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 2개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)는 2개 이상의 염료 (예를 들어, 동일한 유형)에 연결될 수 있다.

[0184] 일부 실시양태에서, 발광 표지는 발광 특성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 발광 단백질에 연결된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 단백질의 별개의 부위에의 연결을 통해 발광 단백질에 연결된다. 특정 실시양태에서, 4개의 뉴클레오티드의 발광 표지는 1개의 뉴클레오티드가 형광 단백질로 표지되고 나머지 3개의 뉴클레오티드가 형광 염료 (예를 들어, 표 1 및 2에서의 비제한적 예)로 표지되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4개의 뉴클레오티드의 발광 표지는 2개의 뉴클레오티드가 형광 단백질로 표지되고 나머지 2개의 뉴클레오티드가 형광 염료 (예를 들어, 표 1 및 2에서의 비제한적

예)로 표지되도록 선택된다. 특정 실시양태에서, 4개의 뉴클레오티드의 발광 표지는 3개의 뉴클레오티드가 형광 단백질로 표지되고 나머지 뉴클레오티드가 형광 염료 (예를 들어, 표 1 및 2에서의 비제한적 예)로 표지되도록 선택된다. 일부 실시양태에서, 4개의 뉴클레오티드의 발광 표지는 모든 4개의 뉴클레오티드가 형광 단백질로 표지되도록 선택된다.

[0185] 본 출원의 일부 측면에 따르면, 발광 표지 (예를 들어 염료, 예를 들어 형광단)는 여기 광에 노출되는 서열분석 반응에서 폴리머라제를 손상시킬 수 있다. 일부 측면에서, 이러한 손상은 발광 표지된 뉴클레오티드의 혼입 동안, 발광 분자가 폴리머라제 효소에 매우 근접하여 유지될 때 발생한다. 손상 반응의 비제한적 예는 폴리머라제와 발광 분자 사이의 공유 결합의 형성 및 발광 분자로부터 효소로의 방사성 또는 비-방사성 붕괴의 방출을 포함한다. 이는 폴리머라제의 유효성을 단축시키고 서열분석 실행의 길이를 감소시킬 수 있다.

[0186] 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 및 발광 표지는 표지된 뉴클레오티드의 혼입 동안 폴리머라제로부터 발광 표지가 떨어져 있게 하는 상대적으로 긴 링커 또는 링커 구성에 의해 연결된다. 용어 "링커 구성"은 발광 분자(들)를 뉴클레오티드(들)에 연결시키는 전체 구조를 지칭하는 것으로 본원에 사용되고, 발광 분자(들) 또는 뉴클레오티드(들)를 포괄하지 않는다.

[0187] 일부 실시양태에서, 단일 링커는 발광 분자를 뉴클레오티드에 연결한다. 일부 실시양태에서, 링커는 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 뉴클레오티드가 각각의 발광 분자에 연결되거나, 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 발광 분자가 각각의 뉴클레오티드에 연결되거나, 또는 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 뉴클레오티드가 2개 이상 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과)의 발광 분자에 연결되도록 1개 이상의 분기점을 함유한다.

[0188] 일부 실시양태에서, 링커 구성은 발광 표지와 뉴클레오티드 사이의 거리를 결정한다. 일부 실시양태에서, 거리는 약 1 nm 또는 2 nm 내지 약 20 nm이다. 예를 들어, 2 nm 초과, 5 nm 초과, 5-10 nm, 10 nm 초과, 10-15 nm, 15 nm 초과, 15-20 nm, 20 nm 초과. 그러나, 뉴클레오티드가 효소의 활성 부위 내에서 유지될 때 발광 표지는 여기될 조명 체적 내에 있을 것이 필요하기 때문에 발광 표지와 뉴클레오티드 사이의 거리는 너무 길 수 없다. 따라서, 일부 실시양태에서, 전체적 링커 길이는 30 nm 미만, 25 nm 미만, 약 20 nm, 또는 20 nm 미만이다.

[0189] 일부 실시양태에서, 링커 구성 내에 보호 분자가 포함된다. 보호 분자는 효소와 발광 표지 사이에 발생할 수 있는 손상 반응으로부터 폴리머라제를 보호할 수 있다. 보호 분자의 비제한적 예는 핵산 (예를 들어, 데옥시리보핵산, 리보핵산), 예를 들어 1개 이상의 보호 요소를 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 보호 분자는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 올리고뉴클레오티드, RNA 올리고뉴클레오티드, 또는 그의 변이체)이다.

[0190] 일부 실시양태에서, 보호 분자는 1개 이상의 발광 분자 및 1개 이상의 뉴클레오티드 분자에 연결된다. 본원에 사용된 바와 같이, 이와 관련하여 뉴클레오티드는 예를 들어 서열분석 반응과 관련하여 신장 핵산 내로 혼입될 수 있는 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발광 분자(들)는 뉴클레오티드(들)에 인접하지 않는다. 예를 들어, 1개 이상의 발광 분자는 보호 분자의 제1 측면에 연결될 수 있고, 1개 이상의 뉴클레오티드는 보호 분자의 제2 측면에 연결될 수 있으며, 여기서 보호 분자의 제1 및 제2 측면은 서로 떨어져 있다. 일부 실시양태에서, 이들은 보호 분자의 대략 대향하는 측면에 존재한다.

[0191] 보호 분자가 발광 표지에 연결된 지점 및 보호 분자가 뉴클레오티드에 연결된 지점 사이의 거리는 공간을 통한 선형 측정치 또는 보호 분자의 표면을 가로지른 비-선형 측정치일 수 있다. 보호 분자 상의 발광 표지 및 뉴클레오티드 연결 지점 사이의 거리는 보호 분자의 3차원 구조를 모델링함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 거리는 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 nm 또는 그 초과일 수 있다. 대안적으로, 보호 분자 상의 발광 표지 및 뉴클레오티드의 상대적 위치는 보호 분자의 구조를 2차 표면 (예를 들어, 타원체, 타원형 원주)으로 취급함으로써 기재될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및 뉴클레오티드는 보호 분자를 나타내는 타원 형상 둘레의 거리의 적어도 1/8인 거리만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및 뉴클레오티드는 보호 분자를 나타내는 타원 형상 둘레의 거리의 적어도 1/4인 거리만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및 뉴클레오티드는 보호 분자를 나타내는 타원 형상 둘레의 거리의 적어도 1/3인 거리만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및 뉴클레오티드는 보호 분자를 나타내는 타원 형상 둘레의 거리의 1/2인 거리만큼 분리된다.

[0192] 보호 분자가 핵산 (예를 들어, 1개 이상의 보호 요소를 갖는 핵산 링커)을 포함하는 일부 실시양태에서, 핵산 상의 발광 표지 (예를 들어, 1개 이상의 발광 표지)와 뉴클레오티드 (예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트) 부착 지점 사이의 거리는 발광 표지와 뉴클레오티드 사이에 발생한 핵산 내의 염기의 수에 기초하여 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 부착 지점으로부터 표지의 부착 지점을 분리하는 링커의 핵산 서브유닛의 수 (예를 들어, 단일-가닥 링커의 뉴클레오티드 또는 이중-가닥 링커의 염기 쌍의 수)는 10-100개 (예를 들어, 10-25, 25-50, 50-75, 75-100개) 또는 그 초과일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 이중-가닥이다. 이러한 실시양태에서, 발광 표지와 뉴클레오티드의 부착 지점 사이의 거리는 이중-가닥 핵산 내에 발생한 염기 쌍 (예를 들어, 핵산 링커의 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 가닥의 핵염기 사이의 염기 쌍형성)의 수에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커 (예를 들어, 선형 핵산 링커) 상의 발광 표지 및 뉴클레오티드 부착 지점은 적어도 5개 염기 쌍, 5 내지 10개 염기 쌍, 적어도 10개 염기 쌍, 10 내지 15개 염기 쌍, 적어도 15개 염기 쌍, 15 내지 20개 염기 쌍, 적어도 20개 염기 쌍, 20 내지 25개 염기 쌍, 적어도 25개 염기 쌍, 25 내지 30개 염기 쌍, 적어도 30개 염기 쌍, 30 내지 35개 염기 쌍, 적어도 35개 염기 쌍, 35 내지 40개 염기 쌍, 적어도 40개 염기 쌍, 40 내지 45개 염기 쌍, 적어도 45개 염기 쌍, 45 내지 50개 염기 쌍, 적어도 50개 염기 쌍, 50 내지 75개 염기 쌍, 적어도 75개 염기 쌍, 75 내지 100개 염기 쌍, 또는 그 초과만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 구조적 모티프 보호 요소 (예를 들어, 줄기-루프)의 포함은 발광 표지와 뉴클레오티드 사이에 보다 많은 수의 염기 및/또는 염기 쌍이 생성되게 할 수 있는 것으로 고려된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 핵산 링커 상의 발광 표지 및 뉴클레오티드 부착 지점은 적어도 50개 염기 쌍, 50 내지 60개 염기 쌍, 적어도 60개 염기 쌍, 60 내지 70개 염기 쌍, 적어도 70개 염기 쌍, 70 내지 80개 염기 쌍, 적어도 80개 염기 쌍, 80 내지 90개 염기 쌍, 적어도 90개 염기 쌍, 90 내지 100개 염기 쌍, 적어도 100개 염기 쌍, 100 내지 150개 염기 쌍, 적어도 150개 염기 쌍, 150 내지 200개 염기 쌍, 적어도 200개 염기 쌍, 또는 그 초과만큼 분리된다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 핵산 링커의 염기 쌍 (또는 단일-가닥 핵산 링커의 뉴클레오티드)의 수는 500개 미만, 450개 미만, 400개 미만, 350개 미만, 300개 미만, 또는 250개 미만이다.

[0193] 보호 분자, 예컨대 1개 이상의 보호 요소를 포함하는 핵산 링커는 발광 표지가 폴리머라제에 점점 가까워지는 것을 방지하는 입체 장벽을 제공하는데 유용할 수 있다. 보호 분자는 발광 분자에 의해 방출되는 방사성 및 비-방사성 붕괴를 흡수하거나, 또는 그로부터 폴리머라제를 보호하는데 유용할 수 있다. 보호 분자는 발광 표지와 폴리머라제 사이에 입체 장벽 및 붕괴 장벽 둘 다를 제공하는데 유용할 수 있다.

[0194] 보호 분자의 크기는 뉴클레오티드가 효소의 활성 부위 내에서 유지될 때 발광 표지가 폴리머라제와 직접적으로 접촉할 수 없거나 그러할 가능성이 없도록 하는 크기이어야 한다. 보호 분자의 크기는 또한 뉴클레오티드가 효소의 활성 부위 내에서 유지될 때 부착된 발광 표지가 여기될 조명 체적 내에 있도록 하는 크기이어야 한다. 보호 분자의 크기는 발광 표지를 보호 분자에 연결하기 위해 선택된 링커 및 뉴클레오티드를 보호 분자에 연결하기 위해 선택된 링커를 고려하여 선택되어야 한다. 발광 표지 및 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 연결하는데 사용되는 보호 분자 및 링커는 링커 구성을 포함하며, 여기서 링커 구성의 크기는 뉴클레오티드가 효소의 활성 부위 내에서 유지될 때 발광 표지가 폴리머라제와 직접적으로 접촉할 수 없도록 하는 크기이어야 한다.

[0195] 보호 분자 (및/또는 보호 분자를 포함하는 링커 구성)는 바람직하게는 수용성이다. 일부 실시양태에서, 보호 분자 (및/또는 보호 분자를 포함하는 링커 구성)는 알짜 음전하를 갖는 것이 바람직하다.

[0196] 도 7은 서열분석 실험의 비제한적 예 및 고유한 발광 특성이 복수의 발광 표지된 뉴클레오티드(7-1)를 구별하는데 어떻게 사용될 수 있는지 추가로 예시한다. 각각의 염기 (티민, 아데닌, 시토신, 구아닌)에 연결된 발광 표지는 각각의 표지된 뉴클레오티드가 복수의 표지된 뉴클레오티드와 구별가능하게 하는 발광 특성 (예를 들어, 발광 수명, 발광 강도, 및/또는 방출 파장)을 갖는다. 동일한 유형의 다수의 뉴클레오티드를 포함시키는 것은 서열분석 반응에서 혼입 속도를 가속시키는 기능을 한다.

[0197] 발광 표지된 뉴클레오티드(7-1)를 사용한 서열분석 실험은 예시적인 반응 용기(7-2)에서 수행될 수 있다. 반응은 도파관 상부의 챔버에서 일어나고, 도파관은 여기 에너지에 대한 도관으로서 역할하여, 도파관으로부터 에바네센트 파에 의해 반응 챔버의 저부 내의 샘플로 여기 에너지를 전달한다. 개구는 도파관으로부터 벌크 샘플로 방사되는 광 및 주변광 및/또는 미광을 센서로부터 차단할 뿐만 아니라, 반응 챔버에 대한 제작 경로를 제공한다. 반응 챔버는 샘플을 저부 위 및 도파관의 에바네센트 파로부터 높은 여기 영역 내에 두는 에칭 구조이다. 선택적 표면 화학은 샘플이 반응 챔버의 저부에 선택적으로 국재화될 수 있도록 상이한 조성을 갖는 반응 챔버

의 저부 및 측벽을 제공하기 위해 사용된다.

[0198] 일부 실시양태에서, 예를 들어 예시적인 반응 용기(7-2)에 일반적으로 도시된 바와 같이, 선택적 표면 관능화 및/또는 표면 패시베이션에 대한 상이한 기술을 사용하여 선택적 표면 화학을 달성할 수 있다. 예를 들어, 반응 용기(7-2)는 금속 스택을 포함할 수 있고, 여기서 측벽 표면의 금속의 노출된 부분은 금속 산화물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 금속 산화물 표면은 그것을 관능화제 및/또는 샘플에 대해 불활성이거나 또는 최소한으로 반응성이게 하기 위해 패시베이션될 수 있다. 제시된 바와 같이, "산화물" 층은, 일부 실시양태에서, 그의 노출된 표면(들) 상에 실리카로 구성된 투명 층을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 산화물 또는 실리카 표면은 반응 용기(7-2)의 저부 표면으로 또는 그 근처로 샘플을 국한시키기 위해 선택적으로 관능화될 수 있다.

[0199] 특정 뉴클레오티드의 혼입은 예시적인 작업흐름당 서열분석 반응 동안 4종의 발광 표지된 뉴클레오티드 사이에서 구별될 수 있다(7-3). 실험 과정 전반에, 2개의 별개의 기간: 펄스 기간 및 검출 기간이 존재한다. 20 피코초 동안 지속되는 펄스 기간 동안, 어떠한 방출 광도 수집되지 않는다. 펄스 기간 다음은 10 나노초 동안 지속되는 검출 기간이고, 여기서 4개의 시간 빈은 검출 기간의 경과에 따라 발생하는 방출 이벤트를 포획한다(i). 펄스 및 검출 기간은 1개의 사이클을 구성한다. 방출 이벤트는 연속적으로 비닝되고, 1백만개의 사이클 과정의 경과에 따라 축적된다(ii). 시간 빈에 걸친 방출 이벤트의 전반적 분포는 발광 수명을 나타내고, 이는 특정한 세트의 데이터를 공지된 수명 분포와 매칭시키는데 사용될 수 있다(iii). 일부 실시양태에서, 방출 이벤트의 분포 (예를 들어, 발광 수명)는 1종의 발광 표지된 염기를 복수의 다른 표지된 분자와 구별하지 못한다. 방출 이벤트의 분포에 더하여, 방출 이벤트의 양 (예를 들어, 발광 강도)이 단일 분자를 복수의 다른 것들로부터 식별하는데 사용될 수 있다.

[0200] 도 8a는 비-단백질 (예를 들어, 핵산) 보호 분자(101)에 의해 분리된 발광 분자 및 뉴클레오티드의 비제한적 예이다. 비-단백질 보호 분자의 비제한적 예는 핵산 분자, 예를 들어 데옥시리보핵산, 리보핵산, 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 보호 분자는 1개 이상의 보호 요소를 포함한다 (예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오티드와 1개 이상의 표지의 부착 부위 사이에 위치함). 제시된 바와 같이, 발광 분자 및 뉴클레오티드는 비-단백질 보호 분자에 직접적으로 부착된다 (예를 들어, 공유 부착된다). 일부 실시양태에서, 발광 분자 및 뉴클레오티드는 비-단백질 보호 분자의 인접 부분에 직접적으로 부착된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 비-단백질 보호 분자는 핵산 분자이고, 발광 분자 및/또는 뉴클레오티드는 핵산 분자의 뉴클레오티드에 직접적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 발광 분자 및/또는 뉴클레오티드는 비-단백질 보호 분자의 인접 부분이 아닌, 링커를 통해 비-단백질 보호 분자에 부착된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 비-단백질 보호 분자는 핵산 분자이고, 발광 분자 및/또는 뉴클레오티드는 링커를 통해 핵산에 부착된다.

[0201] 일부 실시양태에서, 도 8b에 도시된 바와 같이, 발광 분자 및 뉴클레오티드는 반응성 모이어티를 통해 비-단백질 (예를 들어, 핵산) 보호 분자에 부착될 수 있다. 이러한 예에서, 발광 분자 상의 반응성 모이어티(550)는 비-단백질 보호 분자 상의 상응하는 반응성 모이어티(500)를 통해 비-단백질 보호 분자에 공유 부착된다. 뉴클레오티드 상의 반응성 모이어티(551)는 비-단백질 보호 분자 상의 상응하는 반응성 모이어티(501)를 통해 비-단백질 보호 분자(101)에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 반응성 모이어티(500) 및/또는 반응성 모이어티(501)는 비-단백질 보호 분자의 인접 부분에 직접적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 반응성 모이어티(500) 및/또는 반응성 모이어티(501)는 비-단백질 보호 분자의 인접 부분이 아닌, 링커를 통해 비-단백질 보호 분자에 부착된다.

[0202] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지 및/또는 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트는 관련 기술분야에 공지된 화학적 커플링 기술을 사용하여 핵산 링커 (예를 들어, 비-단백질 보호 분자)에 부착될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 클릭 화학 기술 (예를 들어, 구리-촉매화된, 변형-촉진된, 구리-무함유 클릭 화학 등)이 핵산에 1개 이상의 발광 표지 및 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트를 부착시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 도 8b에 도시된 반응성 모이어티 쌍(501/551 및 500/550)은, 일부 실시양태에서, 반응성 아민, 아지드, 알킨, 니트론, 알켄 (예를 들어, 시클로알켄), 테트라진, 테트라졸, 및 클릭 반응 및 유사한 커플링 기술에 적합한 다른 반응성 모이어티를 포함할 수 있다.

[0203] 일부 실시양태에서, 비-단백질 보호 분자는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 올리고뉴클레오티드, RNA 올리고뉴클레오티드 또는 그의 변이체)이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드의 한 단부 (예를 들어, 5' 단부 또는 3' 단부)에 직접적으로 또는 간접적으로 부착되고, 1개 이상의 뉴클레오티드는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드의 다른 단부 (예를 들어, 3' 단부 또는 5' 단부)에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 예를 들어, 단일-가닥 올리고뉴클레오

티드는 올리고뉴클레오티드의 5' 단부에 부착된 발광 표지 및 올리고뉴클레오티드의 3' 단부에 부착된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 단일-가닥 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 3' 단부에 부착된 발광 표지 및 올리고뉴클레오티드의 5' 단부에 부착된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)를 포함할 수 있다.

[0204] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 이중-가닥이다 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 2개의 어닐링된, 상보적 올리고뉴클레오티드 가닥을 포함함). 일부 실시양태에서, 발광 표지는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 한 단부에 직접적으로 또는 간접적으로 부착되고, 1개 이상의 뉴클레오티드는 이중-가닥 뉴클레오티드의 다른 단부에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드의 한 가닥에 직접적으로 또는 간접적으로 부착되고, 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)는 이중-가닥 뉴클레오티드의 다른 가닥에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다. 예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 한 가닥의 5' 단부에 부착된 발광 표지 및 다른 가닥의 5' 단부에 부착된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 한 가닥의 3' 단부에 부착된 발광 표지 및 다른 가닥의 3' 단부에 부착된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)를 포함할 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지 및/또는 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 동일한 유형)는 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 상의, 올리고뉴클레오티드의 1개 이상의 말단 및/또는 내부 위치를 포함한 1개 이상의 상이한 위치에 부착될 수 있다.

[0206] 발광 표지된 뉴클레오티드가 올리고뉴클레오티드 보호 분자를 포함하는 예시적인 실시양태가 도 8c에 도시된다. 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드가 폴리머라제에 결합될 때 발광 표지 (예를 들어, 1개 이상의 염료)와 폴리머라제 사이에 거리를 제공한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 발광 표지와 폴리머라제 사이의 상호작용을 막거나 그 정도를 제한하는 입체 장벽으로서 기능하는데 유용할 수 있다. 추가적으로, 올리고뉴클레오티드는 발광 분자에 의해 방출되는 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 흡수할 수 있다. 이러한 기능성은 유리하게는 폴리머라제가 분해되거나 기능을 상실하는 것으로부터 보호할 수 있다.

[0207] 도 8c에 제시된 비제한적 예는 1개의 가닥의 한 단부 (예를 들어, 5' 단부)에 부착된 발광 표지 및 동일한 가닥의 다른 단부 (예를 들어, 3' 단부)에 부착된 뉴클레오티드를 포함하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 보호 분자를 도시한다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드는, 도 8d에 도시된 바와 같이, 제1 가닥에 부착된 발광 표지 및 제2 가닥에 부착된 1개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 제시된 바와 같이, 핵산(815) (예를 들어, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드)은 15개 염기 쌍을 포함한다. 핵산(815)은 링커(815-2)를 통해 핵산의 제1 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 발광 표지(815-1) 및 링커(815-4)를 통해 핵산의 제2 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된 뉴클레오티드(815-3) (예를 들어, 뉴클레오시드 헥사포스페이트로 도시된 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 포함한다. 뉴클레오티드(815-3)를 핵산(815)에 부착시키는 링커(815-4)의 화학 구조가 도 9-2에 제시되어 있지만, 본원의 다른 곳에 기재된 링커 분자에 따라 임의의 적합한 링커가 설계될 수 있다.

[0208] 도 8d는 각각 20개 염기 쌍을 갖는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 포함하는 핵산(820 및 822)을 추가로 도시한다. 제시된 바와 같이, 핵산(820)은 외부 발광 표지(820-1)를 포함한다. 일부 실시양태에서, "외부" 발광 표지는 올리고뉴클레오티드 가닥의 말단 (예를 들어, 5' 또는 3') 단부에 부착된 발광 표지를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 외부 발광 표지는 올리고뉴클레오티드 가닥의 5'-최말단 또는 3'-최말단 염기에 부착된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 가닥은 오버행잉 영역으로서 추가의 염기를 포함할 수 있으며, 여기서 추가의 염기는 대향하는 핵산 가닥과 염기 쌍형성하지 않는다. 이러한 실시양태에서, 외부 발광 표지는 대향하는 가닥과 5'-최말단 또는 3'-최말단 염기 쌍형성을 형성하는 올리고뉴클레오티드 가닥의 염기에 부착되는 것으로 언급될 수 있다. 핵산(822)은 내부 발광 표지(822-1)를 포함한다. 일부 실시양태에서, "내부" 발광 표지는 올리고뉴클레오티드 가닥을 따라 어느 한 쪽에 1개 이상의 염기-쌍형성된 뉴클레오티드를 갖는 올리고뉴클레오티드 가닥 내의 위치에 부착된 발광 표지를 지칭한다. 따라서, 가닥을 따라 부착 부위로부터 적어도 1개의 뉴클레오티드 상류 및 적어도 1개의 뉴클레오티드 하류가 대향하는 가닥과 염기-쌍형성된 경우에, 발광 표지는 내부 발광 표지인 것으로 언급될 수 있다. 일부 실시양태에서, 내부 발광 표지는 무염기성 부위 또는 핵염기를 통해 올리고뉴클레오티드 가닥에 부착된다. 일부 실시양태에서, 내부 발광 표지는 올리고뉴클레오티드 백본 내에 통합된다.

[0209] 도 8d에서 예시적인 구축물의 다양한 길이에 의해 제시된 바와 같이 (예를 들어, 15개 염기-쌍 핵산(815), 20개 염기-쌍 핵산(820), 30개 염기-쌍 핵산(830), 및 45개 염기-쌍 핵산(845)), 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 임

의의 길이일 수 있는 것으로 인지될 것이다. 예를 들어, 15개 염기 쌍 및 25개 염기 쌍으로 이루어진 예시적인 올리고뉴클레오티드가 서열분석 실험으로부터의 예시적인 결과와 함께 각각 도 8e 및 도 8f에 제시된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 약 10개 이상, 약 20개 이상, 약 30개 이상, 약 40개 이상, 약 50개 이상, 약 60개 이상, 약 70개 이상, 약 80개 이상, 약 90개 이상, 약 100개 이상, 약 125개 이상, 약 150개 이상, 약 175개 이상, 약 200개 이상, 약 250개 이상, 약 300개 이상, 약 350개 이상, 약 400개 이상, 약 450개 이상, 약 500개 이상의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 20개 미만, 30개 미만, 40개 미만, 50개 미만, 60개 미만, 70개 미만, 80개 미만, 90개 미만, 100개 미만, 125개 미만, 150개 미만, 175개 미만, 200개 미만, 250개 미만, 300개 미만, 350개 미만, 400개 미만, 450개 미만, 500개 미만, 또는 600개 염기 미만의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 링커는 올리고뉴클레오티드 링커에 부착된 표지로부터의 방사로부터 폴리머라제를 보호하기에 충분히 길면서, 한편 표지가 서열분석 반응 동안 여기되고 검출되게 하기에 충분히 짧다.

[0210] 발광 표지 및/또는 1개 이상의 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 내의 임의의 위치에 부착될 수 있는 것으로 인지될 것이다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 및/또는 1개 이상의 뉴클레오티드는 5' 또는 3' 단부에 또는 대략 5' 또는 3' 단부에 부착된다. 일부 실시양태에서, 발광 표지는 발광 표지가 올리고뉴클레오티드의 보다 큰 부분에 매우 근접하도록 올리고뉴클레오티드의 내부 위치에 부착된다. 예를 들어, 도 8g는 내부 염료를 포함하는 예시적인 올리고뉴클레오티드 및 외부 염료를 포함하는 예시적인 올리고뉴클레오티드를, 서열분석 실험에서 어느 하나를 사용한 예시적인 결과와 함께 도시한다. 일부 실시양태에서, 내부 발광 표지 (예를 들어, 내부 염료)는 일반적으로, 외부 발광 표지 (예를 들어, 외부 염료)와 비교하여 올리고뉴클레오티드의 보다 큰 부분에 의해 매우 근접하여 둘러싸인 발광 표지를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지를 둘러싸는 올리고뉴클레오티드의 보다 큰 부분은 발광 표지에 의해 방출되는 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 흡수하는 보다 큰 장벽을 제공한다.

[0211] 올리고뉴클레오티드 보호 분자를 포함하는 발광 표지된 뉴클레오티드는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 도 8h는 하나의 비제한적 접근법을 도시하며, 여기서 발광 표지 및 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 동일한 가닥의 대향하는 단부에 부착된다. 이러한 실시양태에서, 발광 표지 및 뉴클레오티드는 반응성 기 화학을 사용하여 제1 가닥에 부착되고 제2, 상보적 가닥은 후속해서 제1 가닥에 어닐링된다. 상기 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 발광 표지 및 1개 이상의 뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 보호 분자의 상이한 가닥 (예를 들어, 3' 및/또는 5' 단부)에 부착될 수 있다. 도 8i는 발광 표지를 포함하는 제1 가닥을 뉴클레오티드를 포함하는 제2, 상보적 가닥에 어닐링하는 예시적인 방법을 도시한다.

[0212] 본원에 기재된 바와 같이, 보호 분자는 발광 표지 (예를 들어, 1개 이상의 염료를 갖는 표지)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 보호 분자는 발광 표지로부터 방출되는 방사성 및/또는 비-방사성 붕괴를 흡수하는 데 유용한 1개 이상의 모이어티 (예를 들어, 에너지-흡수 모이어티)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 8j는 예시적인 올리고뉴클레오티드 보호 분자의 가닥에 다수개의 염료를 부착시키는 비제한적 방법을 도시하며, 여기서 2개의 염료를 올리고뉴클레오티드 상의 링커에 공유 부착시키는데 반응성 기 화학이 사용된다. 제시된 바와 같이, 링커는 삼중항 상태 켄처를 포함하며, 이는 발광 표지가 고도로 반응성인 상태로 여기되는 것으로부터 발생하는 임의의 잠재적으로 유해한 효과를 흡수할 수 있다. 도 8j에 제시된 예에서, 에너지-흡수 모이어티는 발광 표지 (예를 들어, 염료 분자)와 동일한 가닥에 공유 부착되는 것으로 제시된다. 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 모이어티는 발광 표지에 인접할 수 있지만, 하기 기재된 바와 같이 발광 표지를 갖는 가닥에 어닐링된 상보적 가닥에 부착될 수 있다.

[0213] 폴리머라제 보호 효과를 제공하는 화학적 모이어티에 더하여, 올리고뉴클레오티드 구조적 모티프가 본원에서 고려된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비표지된 구조적 모티프 (예를 들어, 안정한 줄기-루프 또는 다른 구조를 형성할 수 있는 올리고뉴클레오티드 서열)는 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이의 핵산 링커에 위치한다 (예를 들어, 비표지된 줄기 구조는 표지의 위치와 뉴클레오시드 폴리포스페이트의 위치 사이에 존재함). 예를 들어, 도 8k는 3개의 줄기 루프 구조를 포함하는 올리고뉴클레오티드 보호 분자를 도시한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 1개 이상의 줄기 루프 구조 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개, 또는 그 초과)를 포함할 수 있고, 단일-가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 1개 이상의 줄기 루프 구조 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개, 또는 그 초과)를 포함할 수 있고, 이중-가닥일 수 있다. 예를 들어, 도 8l은 줄기 루프 구조를 포함하는 예시적인 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 보호 분자를 도시한다. 일부 실시양태에서, 줄기 루프에 의해 제공된 발광 표지와 1개 이상의 뉴클레오티드 사이의 영역에서의 증가된 구조는 올리고뉴클레오티드가 발광 표지와 폴리머라제 사이의 상호작용을 입체적으로

방해하는 보다 큰 구역을 제공한다.

[0214] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 1개의 줄기 루프 (예를 들어, 헤어핀 구조)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 2개의 줄기 루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 3개의 줄기 루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 4개의 줄기 루프를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과의 줄기 루프를 포함한다.

[0215] 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 보호 분자에 대해 추가의 핵산 구조적 모티프가 고려된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 3개 이상의 핵산 가닥 (예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개 또는 그 초과의 핵산 가닥)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 4개의 핵산 가닥을 포함한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 보호 분자는 도 8m에 도시된 바와 같은 홀리데이 접합부를 포함할 수 있다. 1개 이상의 구조적 모티프 (예를 들어, 줄기 루프, 홀리데이 접합부)는, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자의 강성을 증가시켜 발광 표지와 폴리머라제 사이의 평균 거리를 최대화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관련 평균 거리는 표지에 부착된 뉴클레오시드 폴리포스페이트가 폴리머라제 활성 부위에 존재할 때 (예를 들어, 신장 가닥으로의 혼입 동안) 발광 표지와 폴리머라제 사이의 거리를 지칭한다.

[0216] 일부 실시양태에서, 추가의 구조적 모티프 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 보호 분자의 서열에 의해 부여된 물리적 특성에 기초하고/거나 올리고뉴클레오티드 보호 분자의 1개 이상의 부분의 1종 이상의 화학적 변형에 기초함)는, 예를 들어 강성을 증가시키기 위해 또는 특정한 3-차원 구성을 제공하기 위해, 단일-가닥 또는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 보호 분자에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 어닐링된 영역 (예를 들어, 줄기 구조, 또는 2개의 올리고뉴클레오티드의 혼성화된 상보적 영역)은 (예를 들어, 공유 변형에 의해) 안정화될 수 있다.

[0217] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 보호 분자 상의 1개 이상의 위치는 1개 이상의 에너지 흡수 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 에너지 흡수 모이어티는 표지가 부착된 것과 동일한 핵산 가닥에 부가될 수 있다 (비제한적 예로서 도 8j 참조). 일부 실시양태에서, 1개 이상의 에너지 흡수 모이어티는, 예를 들어 하기의 보다 상세한 설명에 기재된 바와 같이, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 보호 분자와 관련하여 표지된 가닥과 상이한 가닥에 부가될 수 있다 (예를 들어, 1개 이상의 에너지 흡수 모이어티는 1개 이상의 뉴클레오티드에 부착된 상보적 가닥에 포함될 수 있음).

[0218] 따라서, 일부 실시양태에서, 발광 표지된 뉴클레오티드는 도 8n에 도시된 일반적 형태(8-100)로 제공될 수 있다. 제시된 바와 같이, 발광 표지 도메인 (별 형상, 점선)은 이량체화 도메인을 통해 뉴클레오티드 도메인 (원 형상, 점선)에 비-공유 연결된다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 발광 표지 도메인과 뉴클레오티드 도메인 사이에 비-공유 연결을 제공하는 영역을 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 일반적 구조(8-100)는 발광 표지 도메인을 포함하는 표지된 올리고뉴클레오티드 가닥(8-110) 및 뉴클레오티드 도메인을 포함하는 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥(8-120)을 포함하는 상보적 올리고뉴클레오티드 이량체이다. 올리고뉴클레오티드 보호 분자 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 이량체)와 관련하여, 뉴클레오티드 도메인은 (예를 들어, 서열분석 반응 동안) 신장 핵산 가닥 내로 혼입되도록 구성된 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 뉴클레오시드 포스페이트)를 지칭하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오티드는 1개 이상의 뉴클레오시드 모노포스페이트 또는 뉴클레오시드 폴리포스페이트 (예를 들어, 뉴클레오시드 디- 또는 트리포스페이트, 또는 3개 초과의 5' 포스페이트를 갖는 뉴클레오시드 등)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 뉴클레오시드 포스페이트 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트)는 본 출원에 기재된 바와 같이 보호 분자의 일부를 형성하는 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥)에 말단 포스페이트를 통해 부착될 수 있다. 본 출원에 기재된 조성물 또는 방법 중 임의의 것의 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 포스페이트의 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의) 포스페이트 부분 (예를 들어, 폴리포스페이트 부분)은 1개 이상의 포스페이트 또는 그의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 포스페이트의 (예를 들어, 뉴클레오시드 폴리포스페이트의) 포스페이트 부분 (예를 들어, 폴리포스페이트 부분)은 포스페이트 에스테르, 티오에스테르, 포스포르아미데이트, 알킬 포스포네이트 연결, 다른 적합한 연결, 또는 1개 초과의 이러한 변형, 또는 그의 2종 이상의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지된 가닥 및 비표지된 가닥은 서로 실질적으로 상보적이다 (예를 들어, 이량체화 도메인의 길이에 걸쳐, 여기서 이량체화 도메인 내의 가닥은 서로, 예를 들어 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 상보성을 가질 수 있음). 이러한 실시양태에서, 표지된 가닥 및 비표지된 가닥은 어닐링되어 이중-가닥 구축물을 형성할 수 있고, 여기서 어닐링된 부분은 이량체화 도메인

을 구성하고, 2개의 가닥의 어닐링은 발광 표지된 뉴클레오티드(8-100)를 생산한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 예를 들어 하기 비제한적 크기 중 임의의 것의 조합에 기초하여, 5 내지 100개 염기 쌍, 예를 들어 10 내지 50개 염기 쌍, 15 내지 45개 염기 쌍 또는 다른 범위의 염기 쌍을 함유한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개, 적어도 45개, 적어도 50개, 적어도 55개, 적어도 60개, 적어도 65개, 적어도 70개, 적어도 75개, 적어도 100개, 적어도 250개의 염기 쌍을 함유한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 500개 이하, 300개 이하, 200개 이하, 150개 이하, 100개 이하, 75개 이하, 70개 이하, 65개 이하, 60개 이하, 55개 이하, 50개 이하, 45개 이하, 40개 이하, 35개 이하, 30개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 15개 이하, 10개 이하의 염기 쌍을 함유한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 15개 염기 쌍을 함유한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 30개 염기 쌍을 함유한다. 일부 실시양태에서, 이량체화 도메인은 45개 염기 쌍을 함유한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 발광 표지 도메인 및 뉴클레오티드 도메인은 유리하게는 이량체화 도메인에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 일반적 형태(8-100)가 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 구축물을 지칭하는 일부 실시양태에서, 발광 표지 도메인 및 뉴클레오티드 도메인은 어닐링된 올리고뉴클레오티드 이량체의 대향하는 단부에 도시된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 발광 표지 도메인 및 뉴클레오티드 도메인은 각각 표지된 가닥 및 비표지된 가닥의 3' 단부에 또는 그 근처에 각각 부착된다 (예를 들어, 3'-최말단 뉴클레오티드에 부착됨, 올리고뉴클레오티드 서열에서 3'-최말단 뉴클레오티드의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 45% 내에 위치한 뉴클레오티드에 부착됨). 일부 실시양태에서, 발광 표지 도메인 및 뉴클레오티드 도메인은 각각 표지된 가닥 및 비표지된 가닥의 5' 단부에 또는 그 근처에 각각 부착된다 (예를 들어, 5'-최말단 뉴클레오티드에 부착됨, 올리고뉴클레오티드 서열에서 5'-최말단 뉴클레오티드의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 45% 내에 위치한 뉴클레오티드에 부착됨).

[0220] 도 8n에 제시된 바와 같이, 표지된 가닥(8-110)은 발광 표지 도메인 (별 형상, 점선)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 발광 표지 도메인은 1개 이상의 발광 분자를 갖는 표지된 가닥의 영역을 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 표지된 가닥(8-111)의 발광 표지 도메인은 1개의 발광 분자 (별 형상, 실선)로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 표지된 가닥(8-112)의 발광 표지 도메인은 2개의 발광 분자로 이루어진다. 구조(8-112)에 도시된 바와 같이, 1개 초과의 발광 분자를 갖는 발광 표지 도메인은 분지형 구조와 유사할 수 있다. 단일 표지된 가닥에 포함될 발광 분자의 수는 목적하는 특성 (예를 들어, 발광 특성 예컨대 수명, 강도, 양자 수율 등)에 기초하여 진료의에게 달려있을 수 있다는 것이 인지될 것이다. 발광 표지 도메인에 부착되는 발광 분자의 수의 비제한적 예는 2-10개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개), 10-15개, 15-20개, 또는 다른 적합한 수를 포함한다. 발광 분자는 선형, 분지형, 선형과 분지형의 조합, 또는 다른 구성으로 부착될 수 있다. 따라서, 일반적 표지된 가닥(8-113)은 제1 발광 분자, 및 각각 1개 이상의 발광 분자를 갖는 발광 표지 모이어티인 2개의 추가의 분지형 발광 표지 모이어티 (점선)를 갖는 발광 표지 도메인으로 제시된다.

[0221] 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥의 뉴클레오티드 도메인이 유사한 방식으로 설계될 수 있다. 예를 들어, 도 8n에 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥(8-120)은 뉴클레오티드 도메인 (원 형상, 점선)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 도메인은 1개 이상의 뉴클레오티드 (예를 들어, 1개 이상의 뉴클레오시드 폴리포스페이트)를 갖는 비표지된 가닥의 영역을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥(8-121)의 뉴클레오티드 도메인은 1개의 뉴클레오티드 (원 형상, 실선)로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥(8-122)의 뉴클레오티드 도메인은 2개의 뉴클레오티드로 이루어진다. 구조(8-122)에 도시된 바와 같이, 1개 초과의 뉴클레오티드를 갖는 뉴클레오티드 도메인은 분지형 구조와 유사할 수 있다. 단일 비표지된 가닥의 뉴클레오티드 도메인에 포함될 뉴클레오티드의 수는 목적하는 특성 (예를 들어, 핵산 서열분석 반응에서의 특성, 예컨대 반응 동역학, 판독 길이, 중합 효소에 대한 근접성 등)에 기초하여 진료의에게 달려있을 수 있다는 것이 인지될 것이다. 뉴클레오티드 도메인에 부착되는 뉴클레오티드의 수의 비제한적 예는 2-10개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개), 10-15개, 15-20개 또는 다른 적합한 수를 포함한다. 뉴클레오티드는 선형, 분지형, 선형과 분지형의 조합, 또는 다른 구성으로 부착될 수 있다. 따라서, 일반적 비표지된 가닥(8-123)은 제1 뉴클레오티드, 및 각각 1개 이상의 뉴클레오티드를 갖는 2개의 추가의 분지형 뉴클레오티드 모이어티 (점선)를 갖는 뉴클레오티드 도메인으로 제시된다. 분지형 뉴클레오티드의 비제한적 예가 도 8o에 제시되며, 이는 분지형 티미딘 올리고뉴클레오티드 링커를 통해 뉴클레오티드 도메인에서 1개 초과의 뉴클레오티드 (Nu)를 갖는 다양한 비표지된 가닥 구성을 도시한다. 티미딘이 예로서 링커로 도시되어 있지만, 일부 실시양태에서, 대안적 올리고뉴클레오티드 링커가 사용될 수 있다 (예를 들어, 시티딘, 우리딘, 아데노신, 구아노신 또는 그의 임의의 조합). 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥은 예를 들어 핵산 서열분석 반응에서 유용할

수 있는 추가의 변형을 포함할 수 있다.

[0222] 도 8n에 도시된 바와 같이, 뉴클레오티드 도메인을 포함하는 비표지된 가닥(8-131)은 에너지-흡수 변형 (정사각형 형상, 실선)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형은 핵산 서열분석 반응의 완전성을 (예를 들어, 표지의 여기 상태에 의해 생성되는 반응성 종의 폴리머라제에 대한 손상 효과로부터) 보호하는 임의의 화학적 모이어티를 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형은 하기 중 임의의 것에 의해 서열분석 반응의 완전성을 보호한다: 반응성 종 (예를 들어, 반응성 산소 종, 자유 라디칼, 또는 임의의 삼중항 상태 분자)의 효과를 흡수, 켄칭 또는 달리 완화시키는 것; 발광 표지 도메인과 뉴클레오티드 도메인 사이에 입체 장벽을 제공하는 것; 에너지-흡수 변형의 부재 하에 수행된 반응과 비교하여 서열분석 반응에서 판독 길이를 증가시키는 것; 에너지-흡수 변형의 부재 하에 수행된 반응과 비교하여 서열분석 반응에서 판독 정확도를 증가시키는 것; 또는 그의 임의의 조합.

[0223] 제시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형은 뉴클레오티드 도메인으로부터 대향하는 비표지된 가닥의 단부에서 또는 그 근처에서 이루어진다. 일반적 올리고뉴클레오티드 이량체(8-100)로부터 인지될 바와 같이, 비표지된 가닥(8-131)의 에너지-흡수 변형은 유리하게는 어닐링된 구축물에서 발광 표지 도메인에 인접하여 위치할 수 있다. 따라서, 발광 표지 도메인 및 뉴클레오티드 도메인이 그의 각각의 가닥의 3' 단부에 또는 그 근처에 부착된 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형은 비표지된 가닥의 5' 단부에 또는 그 근처에 부착된다 (예를 들어, 5'-최말단 뉴클레오티드에 부착됨, 올리고뉴클레오티드 서열에서 5'-최말단 뉴클레오티드의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 45% 내에 위치한 뉴클레오티드에 부착됨). 발광 표지 도메인 및 뉴클레오티드 도메인이 그의 각각의 가닥의 5' 단부에 또는 그 근처에 부착된 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형은 비표지된 가닥의 3' 단부에 또는 그 근처에 부착된다 (예를 들어, 3'-최말단 뉴클레오티드에 부착됨, 올리고뉴클레오티드 서열에서 3'-최말단 뉴클레오티드의 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 45% 내에 위치한 뉴클레오티드에 부착됨). 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥은 1개 초과의 에너지-흡수 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형(들)은 상보적 이량체화 도메인의 일부가 아닌 올리고뉴클레오티드 오버행 (예를 들어, 3' 또는 5' 오버행) 내에 포함될 수 있다. 오버행은 임의의 적합한 길이, 예를 들어 1 내지 10개 (예를 들어, 약 5개), 또는 10 내지 20개 뉴클레오티드 길이 (또는 다른 적합한 길이)를 가질 수 있다.

[0224] 예를 들어, 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥(8-132)은 2개의 에너지-흡수 변형을 포함한다. 구조(8-132)에 도시된 바와 같이, 1개 초과의 에너지-흡수 변형을 갖는 비표지된 가닥은 분지형 구조와 유사할 수 있다. 비표지된 가닥은 임의의 수의 에너지-흡수 변형을 포함할 수 있고, 이는 예를 들어 주어진 에너지-흡수 변형의 특성 또는 발광 표지 도메인 내의 발광 분자(들)의 특성 및/또는 수에 따라 달라질 수 있다는 것이 인지될 것이다. (예를 들어, 어느 하나 또는 둘 다의 가닥에 부착된) 에너지-흡수 변형의 수의 비제한적 예는 2-10개 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개), 10-15개, 15-20개, 또는 다른 적합한 수를 포함한다. 에너지-흡수 변형은 선형, 분지형, 선형과 분지형의 조합, 또는 다른 구성으로 부착될 수 있다. 따라서, 일반적 비표지된 가닥(8-133)은 제1 에너지-흡수 변형, 및 각각 1개 이상의 에너지-흡수 변형을 갖는 에너지-흡수 도메인인 2개의 추가의 분지형 에너지-흡수 도메인 (점선)으로 제시된다.

[0225] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 도 8p-8q에 도시된 비제한적 구조에 따라 비표지된 가닥에 대해 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 하기 도시된 비제한적 구조에 따라 비표지된 가닥에 대해 이루어질 수 있다. 이들 예에서, 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 올리고뉴클레오티드 가닥 (예를 들어, 비표지된 올리고뉴클레오티드 가닥)의 5' 단부에 부착된 것으로 제시된다.

[0226] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 1개 이상의 에너지-흡수 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 복수의 켄칭 모이어티 (예를 들어, 삼중항-상태 켄처)를 포함한다. 켄칭 모이어티는 본원에 기재된 1개 이상의 발광 표지로부터의 방출을 검출가능하게 켄칭할 수 있는 임의의 염료 분자를 포함할 수 있다. 적합한 켄칭 모이어티는 1개 이상의 발광 표지의 염료 분자(들)의 특정 유형에 기초하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 적절한 켄칭 모이어티는 발광 표지의 방출 밴드와 적어도 일부의 스펙트럼 중첩을 나타내는 흡수 밴드를 보유한다. 일부 실시양태에서, 이러한 중첩은, 충분한 스펙트럼 중첩이 존재하는 경우, 켄칭 모이어티의 최대 흡광도 파장보다 더 낮거나 심지어 더 높은 파장 방출 최대치에서 발생하는 공여자의 방출과 함께 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자의 방출이 수용자의 보다 높은 전자 상태로 전달되는 것을 통해 에너지 전달이 또한 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적절한 켄칭 모이어티는 폴리머라제에게 손상을 입힐 수 있는 1개 이상의 발광 표지로부터의 특정한 에너지 준위의 방출을 흡수할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 켄칭 모이어티는, (예를 들어, 서열분석 반응 동안) 신호로서 검출되는 방출 스펙트럼의

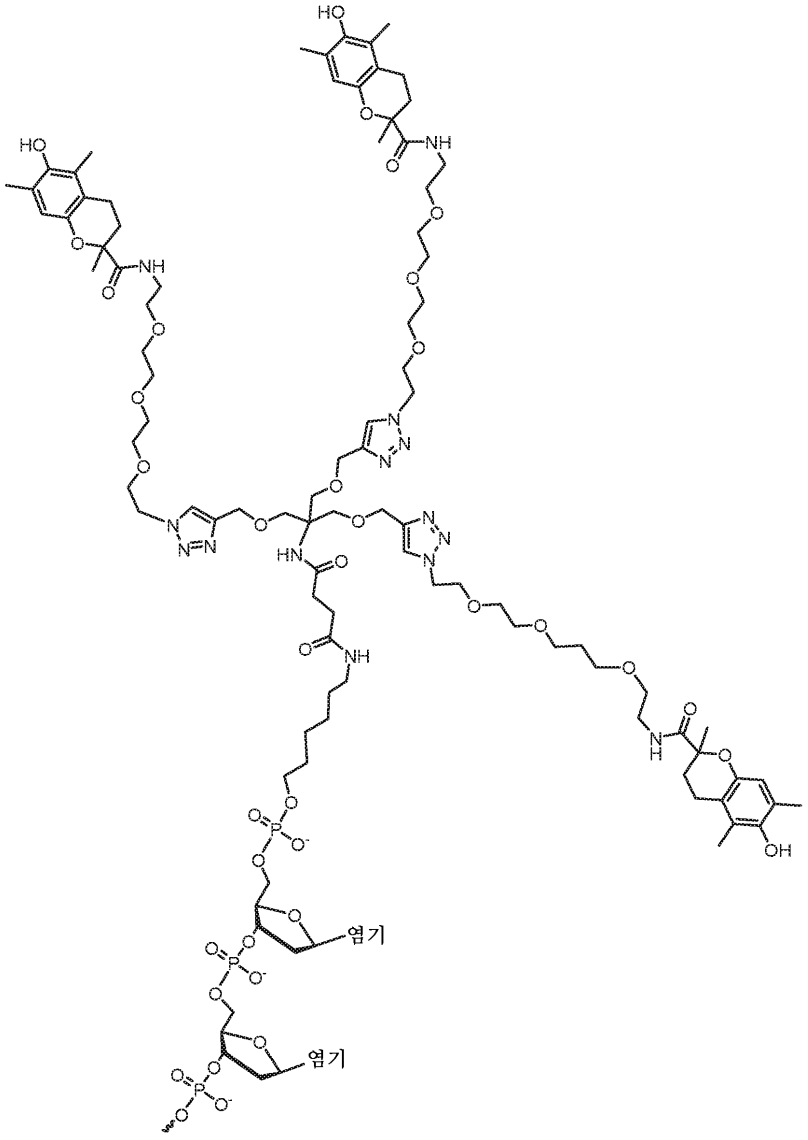
부분의 흡수의 부재 하에서는 폴리머라제에 대해 잠재적으로 손상을 입히는, 방출 에너지 준위를 포함하는 방출 스펙트럼의 부분을 우세하게 (예를 들어, 선택적으로) 흡수하도록 선택될 수 있다.

[0227] 켄칭 모이어티로서 사용하기에 적합한 매우 다양한 화학적 반응성 염료 및 형광단이 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [MOLECULAR PROBES HANDBOOK, Sixth Ed., Richard P. Haugland, ed. (1996), in particular Chapters 1-3; MOLECULAR PROBES HANDBOOK, Seventh Ed., Richard P. Haugland, ed.; BIOPROBES 26 (October 1997); BIOPROBES 27 (February 1998); BIOPROBES 28 (May 1998); BIOPROBES 29 (November 1998); BIOPROBES 30 (January 1999); BIOPROBES 31 (May 1999): BIOPROBES 32 (December 1999); 및 BIOPROBES 33 (February 2000)] 참조; 모두 본원에 참조로 포함됨). 용액 중에서의 또는 올리고뉴클레오티드에 접합되었을 때의 후보 염료의 스펙트럼 특성은 공지되어 있거나, 또는 분광형광계를 사용하여 용이하게 측정된다.

[0228] 일부 실시양태에서, 켄칭 모이어티는 피렌, 안트라센, 나프탈렌, 아크리딘, 스틸벤, 인돌 또는 벤즈인돌, 옥사졸 또는 벤족사졸, 티아졸 또는 벤조티아졸, 4-아미노-7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸 (NBD), 시아닌, 카르보시아닌, 카르보스티릴, 포르피린, 살리실레이트, 안트라닐레이트, 아줄렌, 페릴렌, 피리딘, 퀴놀린, 쿠마린 (히드록시쿠마린 및 아미노쿠마린 및 그의 플루오린화 및 술폰화 유도체 포함 (본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,830,912 (Gee et al. (1998)) 및 미국 특허 번호 5,696,157 (Wang et al. (1997))에 기재된 바와 같음)), 폴리아자인다센 (예를 들어 미국 특허 번호 4,774,339 (Haugland, et al. (1988)); 미국 특허 번호 5,187,288 (Kang, et al. (1993)); 미국 특허 번호 5,248,782 (Haugland, et al. (1993)); 미국 특허 번호 5,274,113 (Kang, et al. (1993)); 5,433,896 (Kang, et al.(1995)); 미국 특허 번호 6,005,113 (Wu et al. (1999)), 모두 본원에 참조로 포함됨), 크산텐, 옥사진 또는 벤족사진, 카르바진 (미국 특허 번호 4,810,636 (Corey (1989)), 참조로 포함됨), 또는 페날레논 또는 벤즈페날레논 (미국 특허 번호 4,812,409 (Babb et al. (1989)), 참조로 포함됨)이다.

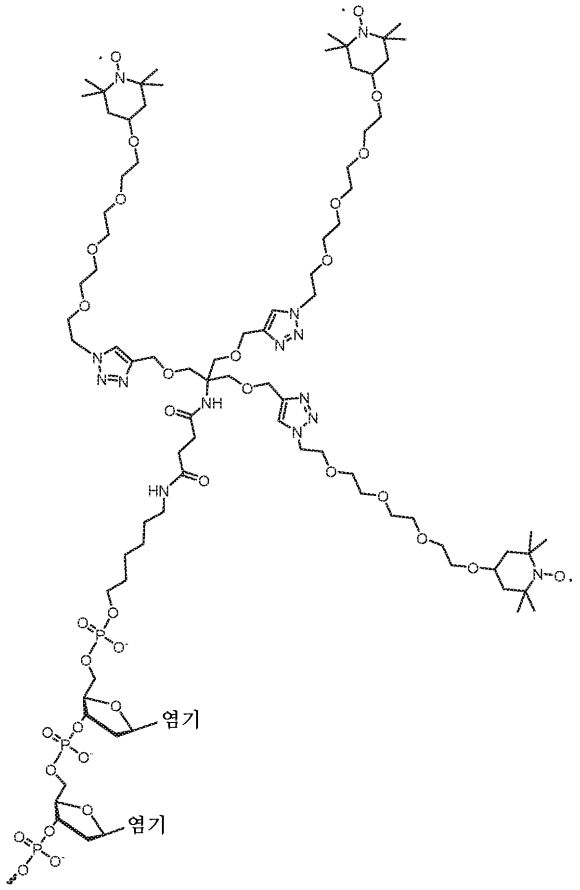
[0229] 일부 실시양태에서, 켄칭 모이어티는 비-형광 염료이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 켄칭 모이어티는 아조 염료 (예컨대 답실(DABCYL) 또는 답실(DABSYL) 염료 및 그들의 구조적 유사체), 트리아릴메탄 염료 예컨대 말라카이트 그린 또는 페놀 레드, 4',5z-디에테르 치환된 플루오레세인 (미국 특허 번호 4,318,846 (1982)), 또는 비대칭 시아닌 염료 켄처 (PCT 국제 출원 WO 99 37,717 (1999))로부터 선택될 수 있다.

[0230] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 2개 이상 (예를 들어, 3개)의 켄칭 모이어티를 갖는 비표지된 가닥을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 비표지된 가닥은 하기 도시된 트리스-트롤록스 변형된 가닥을 포함한다. 그러나, 다른 유사한 구조가 사용될 수 있고, 핵산 링커 내로 혼입될 수 있다 (예를 들어, 발광 표지(들)와 뉴클레오시드 폴리포스페이트(들) 사이의 위치).



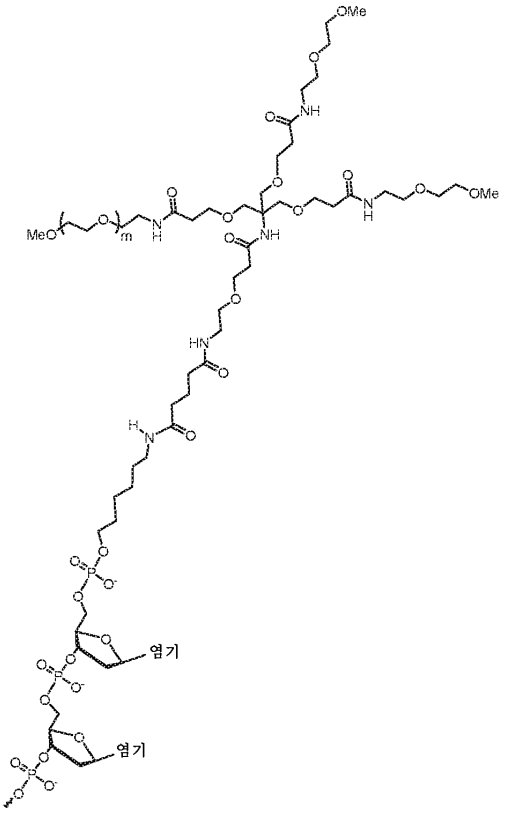
[0231]

[0232] 일부 실시양태에서, 3개의 켄칭 모이어티를 포함하는 비표지된 가닥은 트리스-tempo 변형된 가닥이다:



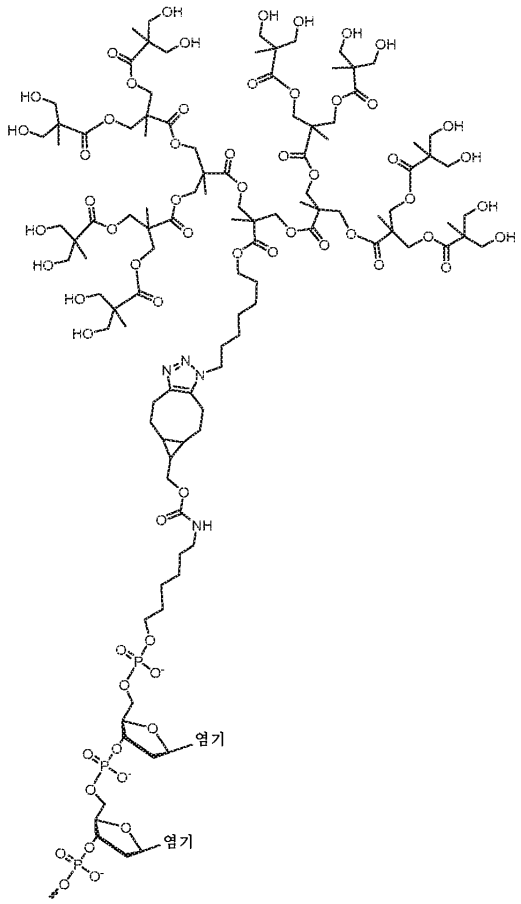
[0233]

[0234] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 발색단으로서 기능하지 않는 1개 이상의 에너지-흡수 변형을 포함한다. 이러한 실시양태에서, 1개 이상의 에너지-흡수 변형은 발광 표지가 폴리머라제와 상호작용하는 것을 방지하는, 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이에 입체 장벽을 제공함으로써 기능할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 입체 장벽으로서 기능하는 분지형 중합체 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분지형 중합체 구조는 2개 이상의 폴리에테르-기반 구조를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 분지형 중합체 구조는, 비표지된 가닥의 말단 변형을 도시한 하기 구조에 제시된 바와 같은, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)-기반 구조를 포함한다. 그러나, 다른 유사한 분지화 구조가 사용될 수 있고, 핵산 링커 내로 혼입될 수 있다는 것이 인지될 것이다 (예를 들어, 발광 표지와 뉴클레오시드 폴리포스페이트 사이의 위치).



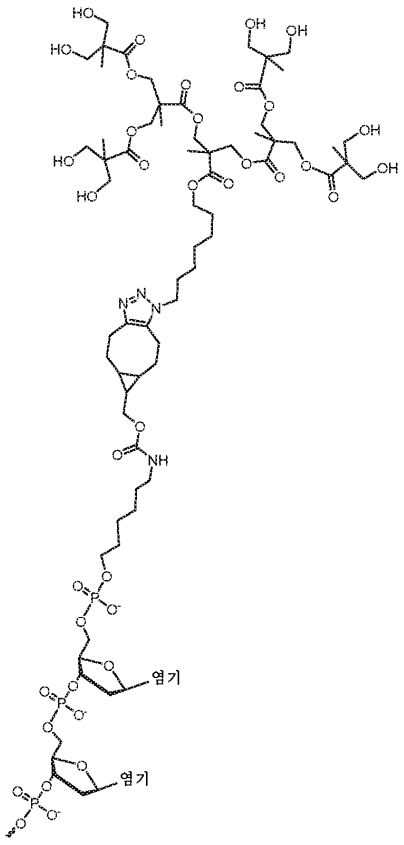
[0235]

[0236] 일부 실시양태에서, 핵산 링커는 입체 장벽으로서 기능하는 수지상 구조를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 핵산 링커는, 말단-변형된 비표지된 가닥을 도시한 하기 구조에 제시된 바와 같이, 폴리에스테르-16-히드록실 비스-MPA 덴드론 변형을 갖는 비표지된 가닥을 포함한다. 분지의 수는 특정한 표지된 뉴클레오티드 구성에 따라 최적화될 수 있기 때문에, 이들 및 유사한 실시양태에 사용하기 위해 임의의 수의 분지가 구상된다는 것이 인지될 것이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 복수의 발광 표지를 갖는 핵산 링커는 단일 발광 표지를 갖는 유사한 링커에 비해 더 큰 입체 장벽을 제공하기 위해 더 많은 수의 분지를 필요로 할 수 있다.



[0237]

[0238] 일부 실시양태에서, 말단-변형된 비표지된 가닥은 폴리에스테르-8-히드록실 비스-MPA 덴드론 변형된 가닥이다:



[0239]

[0240] 상기 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 에너지-흡수 변형은 서열분석 반응의 완전성을 보호하는 비표지된 가닥에 대한 변형이다. 본 개시내용에 제공된 기술에 따라, 핵산 서열분석 반응은 복수의 유형의 발광 표지된 뉴클레오티드를 사용하여 수행될 수 있으며, 여기서 뉴클레오티드의 발광 특성은 특정 유형의 뉴클레오티드에 대해 고유하다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이들 고유한 발광 특성 중 1종 이상의 검출은 특정 유형의 뉴클레오티드의 식별을 가능하게 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 1개 이상의 발광 표지된 뉴클레오티드에 대해 이루어진 임의의 에너지-흡수 변형은 각각의 고유한 발광 특성에 기초하여 특정 유형의 뉴클레오티드를 검출하는 능력을 방해해서는 안된다. 예를 들어, 다양한 염료 (크로미스530N, 딜라이트554R1, 및 Cy3B)가 각각 표지된 가닥에 부착되고, 각각의 표지된 가닥은 6-글리코스-오버행 에너지-흡수 변형 또는 6-글리세롤 덴드리머 오버행 에너지 흡수 변형을 갖는 비표지된 가닥에 어닐링되고, 각각의 올리고뉴클레오티드 이량체에 대해 발광 강도 및 수명 값이 측정된다. 표 3에 나타내어진 결과에 제시된 바와 같이, 에너지-흡수 변형으로 인한 발광 특성에서의 임의의 변화는 염료 분자에 걸쳐 대략 척도화된다. 따라서 발광 표지된 올리고뉴클레오티드 이량체는 혼합물에서 각각의 식별을 가능하게 할 고유한 발광 특성을 보유하였다.

[0241] 표 3. 표지된 올리고뉴클레오티드에 대한 에너지-흡수 변형의 효과.

정규화된 강도			
	크로미스530N	딜라이트554R1	Cy3B
표준 듀플렉스	0.60 ± 0.05	0.36 ± 0.06	1.00 ± 0.17
6-글리코스- 오버행으로 변형됨	0.66 ± 0.05	0.38 ± 0.05	1.00 ± 0.12
6-글리세롤 덴드리머 오버행으로 변형됨	0.75 ± 0.13	0.38 ± 0.06	1.00 ± 0.20
수명 (ns)			
	크로미스530N	딜라이트554R1	Cy3B
표준 듀플렉스	4.0 ± 0.2	3.3 ± 0.2	2.5 ± 0.2
6-글리코스- 오버행으로 변형됨	4.3 ± 0.2	3.3 ± 0.2	2.6 ± 0.1
6-글리세롤 덴드리머 오버행으로 변형됨	4.6 ± 0.4	4.0 ± 0.4	2.9 ± 0.3

[0242]

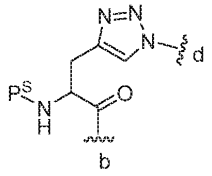
[0243] 따라서, 발광 표지는 분자에 직접적으로, 예를 들어 결합에 의해 부착될 수 있거나, 링커 또는 링커 구성을 통해 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 1개 이상의 포스페이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드는 1개 이상의 포스페이트를 포함하는 링커에 의해 발광 표지에 연결된다. 1개 이상의 포스페이트를 갖는 것으로 기재된 링커는 링커 구조 내에 존재하는 1개 이상의 포스페이트를 포함하는 (뉴클레오티드의 1개 이상의 포스페이트에 직접적으로 부착된 것은 아닌) 링커를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드는 3개 이상의 포스페이트를 포함하는 링커에 의해 발광 표지에 연결된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드는 4개 이상의 포스페이트를 포함하는 링커에 의해 발광 표지에 연결된다.

[0244] 특정 실시양태에서, 링커는 지방족 쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 $-(CH_2)_n-$을 포함하며, 여기서 n은 1 내지 20의 정수이다. 일부 실시양태에서, n은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, 링커는 헤테로지방족 쇄을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리프로필렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 $-(CH_2CH_2O)_n-$을 포함하며, 여기서 n은 1 내지 20의 정수이다. 일부 실시양태에서, 링커는 $-(CH_2CH_2O)_n-$을 포함하며, 여기서 n은 1 내지 10의 정수이다. 특정 실시양태에서, 링커는 $-(CH_2CH_2O)_4-$을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 1개 이상의 아릴렌을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 1개 이상의 페닐렌 (예를 들어, 파라-치환된 페닐렌)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 키랄 중심을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 프롤린 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 프롤린 육량체 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 쿠마린 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 나프탈렌 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 안트라센 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴

리페닐아미드 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 크로마논 또는 그의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 4-아미노프로파르길-L-페닐알라닌 또는 그의 유도체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커는 폴리펩티드를 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, 링커는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 2개의 어닐링된 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드들은 데옥시리보스 뉴클레오티드, 리보스 뉴클레오티드 또는 잠금 리보스 뉴클레오티드를 포함한다.

[0246] 특정 실시양태에서, 링커는 광안정화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 하기 화학식을 갖는다:

[0247] 

[0248] 여기서 P^S는 광안정화제이고, d로 표지된 위치는 발광 표지에 부착되고, b로 표지된 위치는 뉴클레오티드에 부착된다. 일부 실시양태에서, d로 표지된 위치는 본원에 기재된 바와 같은 링커에 의해 발광 표지에 부착된다. 일부 실시양태에서, b로 표지된 위치는 본원에 기재된 바와 같은 링커에 의해 뉴클레오티드에 부착된다.

[0249] 특정 실시양태에서, 링커는 1개 이상의 포스페이트, 지방족 쇄, 헤테로지방족 쇄, 및 1개 이상의 아미드 (예를 들어, -C(=O)NH-)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 1개 이상의 포스페이트 및 지방족 쇄를 포함하는 링커는 도 9에 도시된 예시적인 반응식 9-1을 통해 합성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 1개 이상의 관능화가능한, 반응성 모이어티 (예를 들어, 아세틸렌 기, 아지도 기)를 함유한다.

[0250] 등가물 및 범주

[0251] 본 출원의 다양한 측면이 단독으로, 조합하여, 또는 상기 기재된 실시양태에서 구체적으로 논의되지 않은 다양한 배열로 사용될 수 있고, 따라서 그의 적용은 상기 설명에 제시되거나 도면에 예시된 컴포넌트의 세부설명 및 배열로 제한되지 않는다. 예를 들어, 한 실시양태에 기재된 측면은 다른 실시양태에 기재된 측면과 임의의 방식으로 조합될 수 있다.

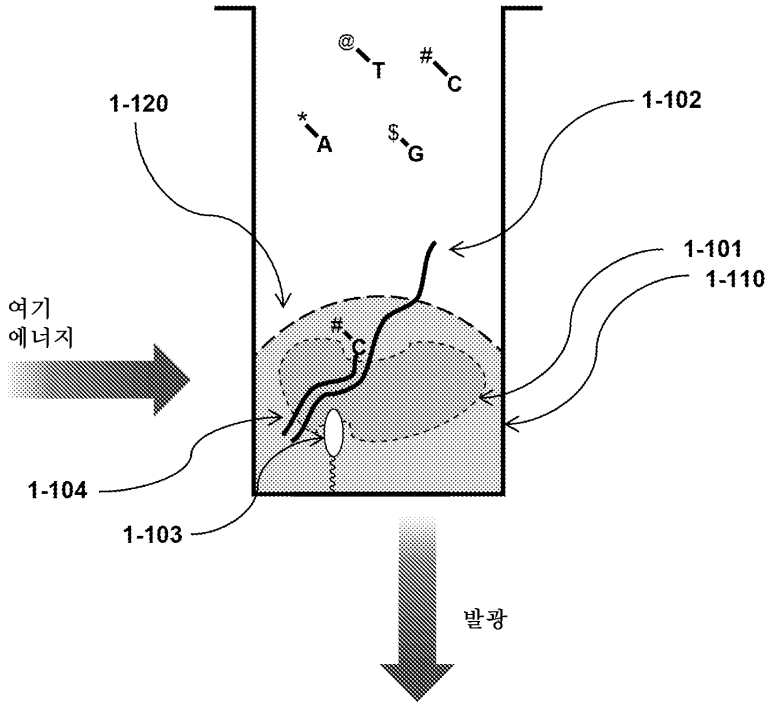
[0252] 또한, 본 발명은 방법으로 구현될 수 있고, 그 중 적어도 하나의 예가 제공된다. 방법의 부분으로서 수행되는 동작은 임의의 적합한 방식으로 순서화될 수 있다. 따라서, 동작이 예시된 것과 상이한 순서로 수행되는 실시양태가 구축될 수 있으며, 예시적인 실시양태에서 순차적 동작으로서 제시됨에도 불구하고, 일부 작동을 동시에 수행하는 것을 포함할 수 있다.

[0253] 청구항에서 "제1," "제2," "제3" 등과 같은 서수 용어를 사용하여 청구항 요소를 수식하는 것은 그 자체에 의해 한 청구항 요소의 또 다른 청구항 요소에 대한 임의의 우선순위, 우위 또는 순서, 또는 방법을 수행하는 동작에서의 시간적 순서를 내포하는 것이 아니라, 단지 특정 명칭을 갖는 하나의 청구항 요소를 (서수 용어 사용을 제외하고는) 동일한 명칭을 갖는 또 다른 요소와 구별하여 청구항 요소를 구별하기 위한 라벨로서만 사용된다.

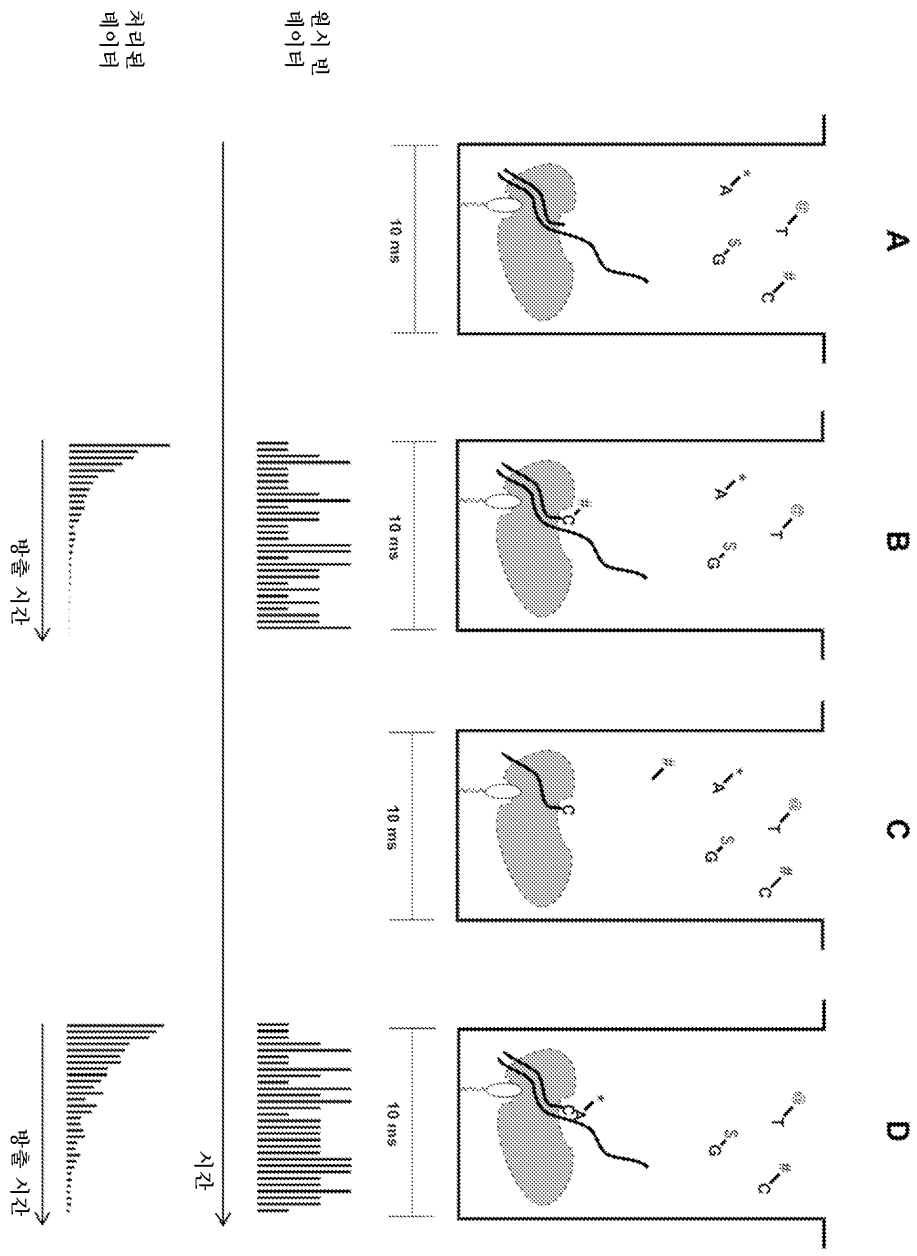
[0254] 또한, 본원에 사용된 어구 및 용어는 기재를 위한 것이고, 제한하는 것으로서 간주되어서는 안된다. 본원에서 "포함한", "포함하는" 또는 "갖는", "함유하는", "수반하는" 및 그의 변형의 사용은 이전에 열거된 항목 및 그의 등가물, 뿐만 아니라 추가의 항목을 포괄하는 것으로 의도된다.

도면

도면1

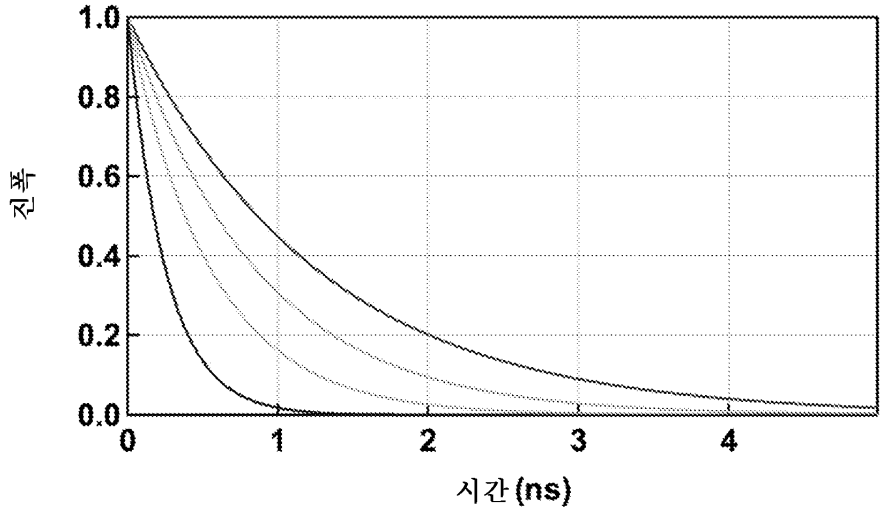


도면2

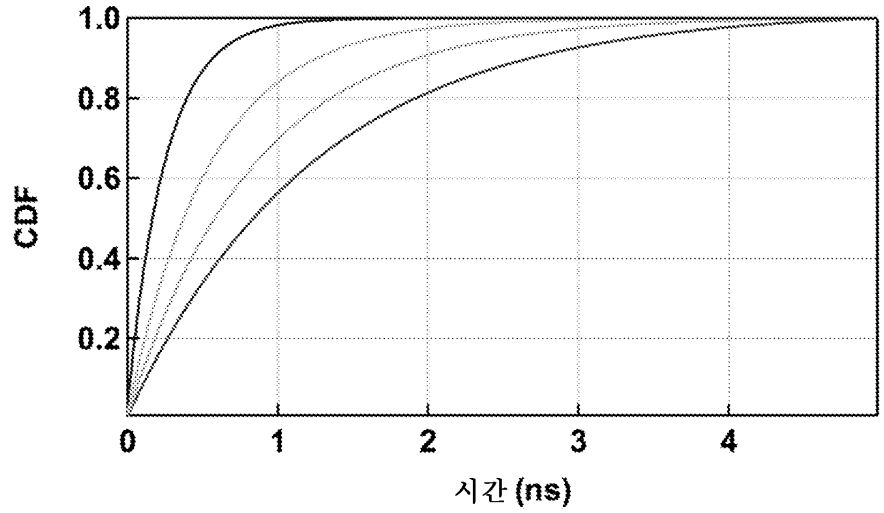


도면3

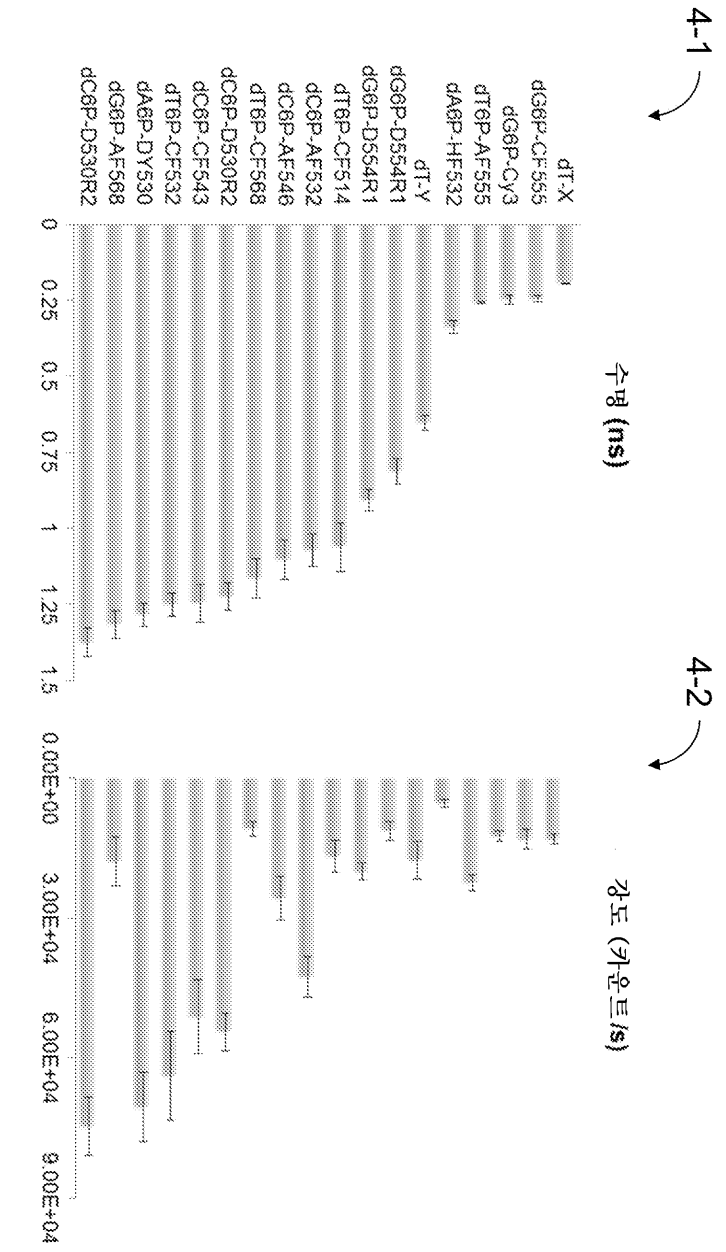
3-1



3-2

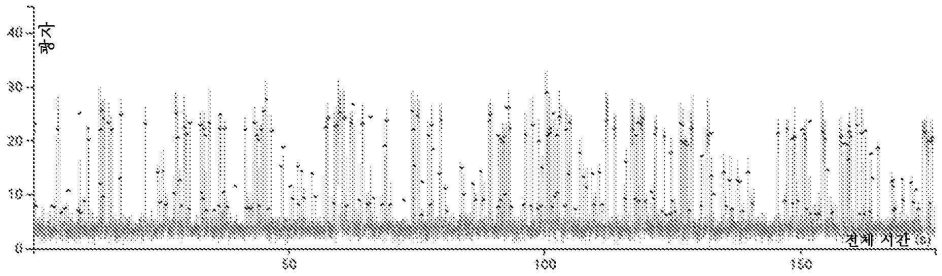


도면4

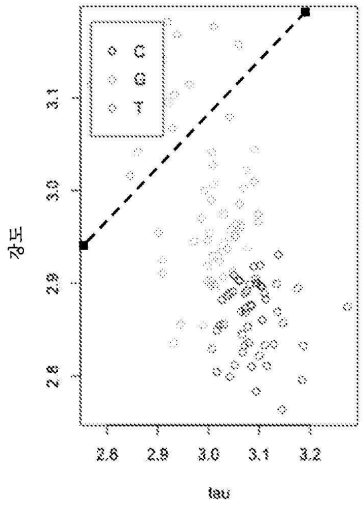

4-1
수명 (ns)
dT-X
dG6P-CF555
dG6P-Cy3
dT6P-AF555
dA6P-HF532
dT-Y
dG6P-D554R1
dG6P-D554R1
dT6P-CF514
dC6P-AF532
dC6P-AF546
dT6P-CF568
dC6P-D530R2
dC6P-CF543
dT6P-CF532
dA6P-DY530
dG6P-AF568
dC6P-D530R2
0
0.25
0.5
0.75
1
1.25
1.5
4-2
강도 (카운트/s)
0.00E+00
3.00E+04
6.00E+04
9.00E+04

도면5

5-1



5-2

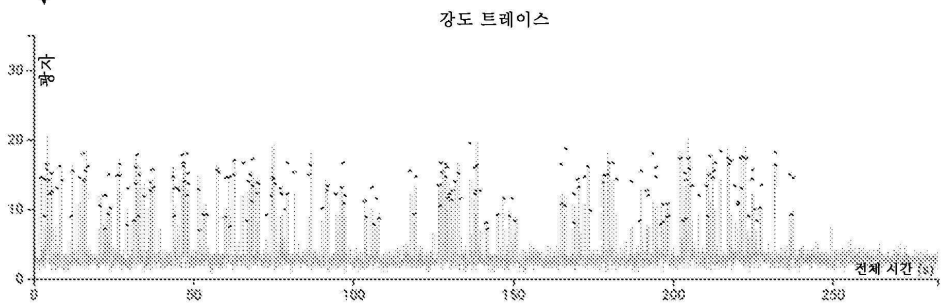


5-3

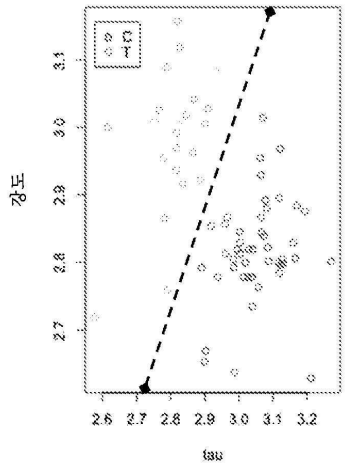
```
P1          1 AACCCACC-CC-CCAAA-CACA-ACATAATCTCTAATCA-CAACAACCAACACCAACACCACCAAA-CA-A-ACATATCT   72
              ||||||||| || ||||| |||| ||||| |||||  ||| ||||||| ||| ||| |||||||||| || | |||||||| 
S1        118 AACCCACCACCACCAAAACACACACATA-TCTCTC-TCAACAACAAC-AAC-CCACCACCACCAAAACACACACATATCT  185

P1         73 CTCTCAACAA--ACA---CAACCACC-CCAACACAAACACATACCTCTC-CAACAACAACAAACCAC-AC-ACTAAAACAC  144
              |||||||||  |||  | |||||| |||| ||| |||||||| ||||| |||||||||||| |||| || || |||||||
S1        186 CTCTCAACAACAACAACCCACCACCACCAAAACACACACATATCTCTCTCAACAACAACAACCCACCACCACCAAAACAC  265

P1        145 ACACATACATCTCTCAACAACAACAACCCAACACCACCAAAAAACACA-ATATCTCTTCTCA-CAACAACAAACCCCAAT  222
              |||||||  ||||||||||||||||||||||| |||||||||||| ||||| |||||||| |||| |||||||||| || | |
S1        266 ACACATATCTCTCTCAACAACAACAACCCACCACCACCAAAACACACACATATCTCT-CTCAACAACAACAACCCACCAC  344

P1        223 CA-AAAAAAACACACATATTCTCTCTCAACAA    253 서열식별번호 1
              ||  |||| |||||||||| ||||||||||||
S1        345 CACCAAAACACACACATAT-CTCTCTCAACAA    375 서열식별번호 2
```

도면6

6-1



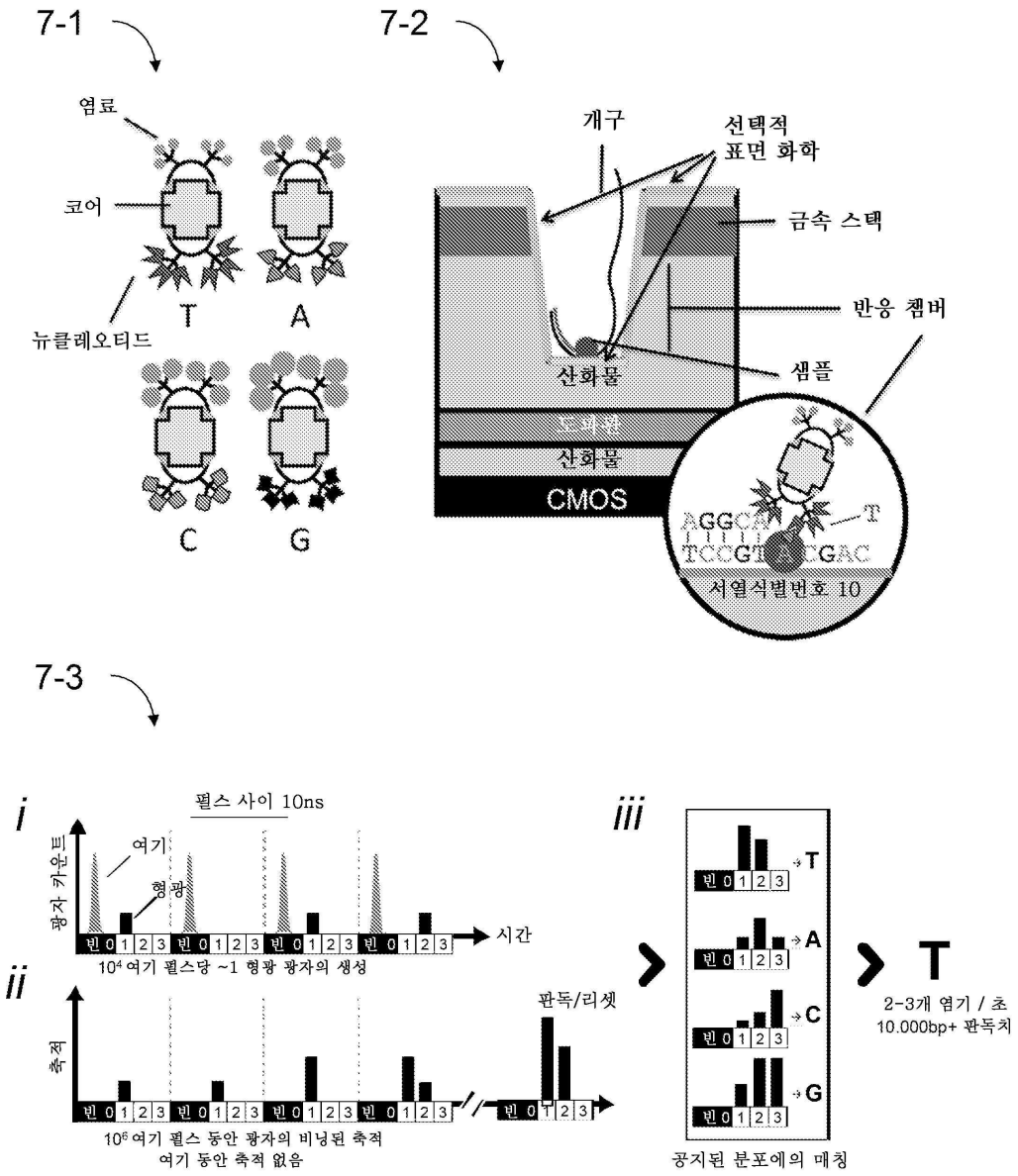
6-2



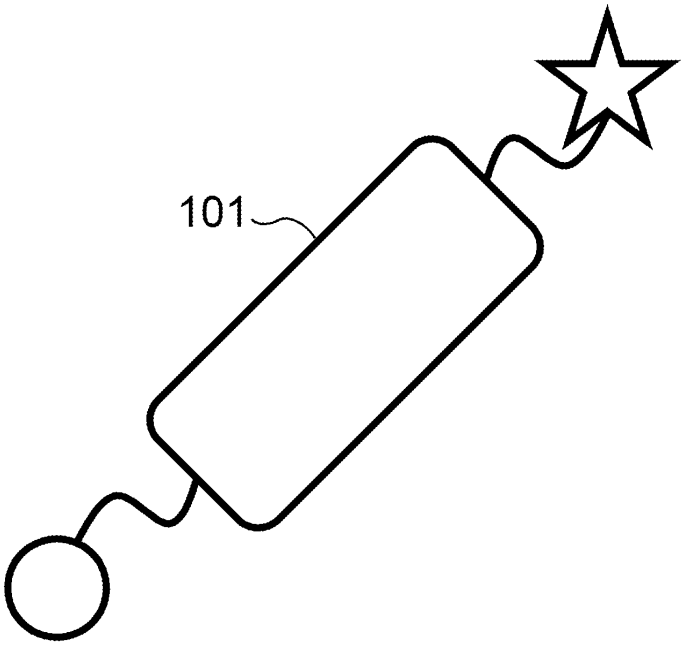
6-3

```
P1          1 ACACCAACAATAAAAAAAAAAAA-ACCTCTC-CAA---AC-ACAACACAAA--------AAAAAAAAAAAAATA-CTC-C-CAAC   66
S1         69 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAAC  148

P1         67 AACAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCA-CAACAACAAC---------AAAAAAAAAAAAAATA  137
S1        149 AACAA-CAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATA  227

P1        138 TCCCTCTCAACA-CA-CAACAATAAAAAAAAAAAA----------TCTC-CTCA-CAACAA-AACAAAAAAAAAAAAAAA  202
S1        228 TCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAA  307

P1        203 AAA-------AT-T-TCTCTAAACA-C    219 서열식별번호 3
S1        308 AAAAAAAAATATCTCTCTCAACAAC    331 서열식별번호 4
```

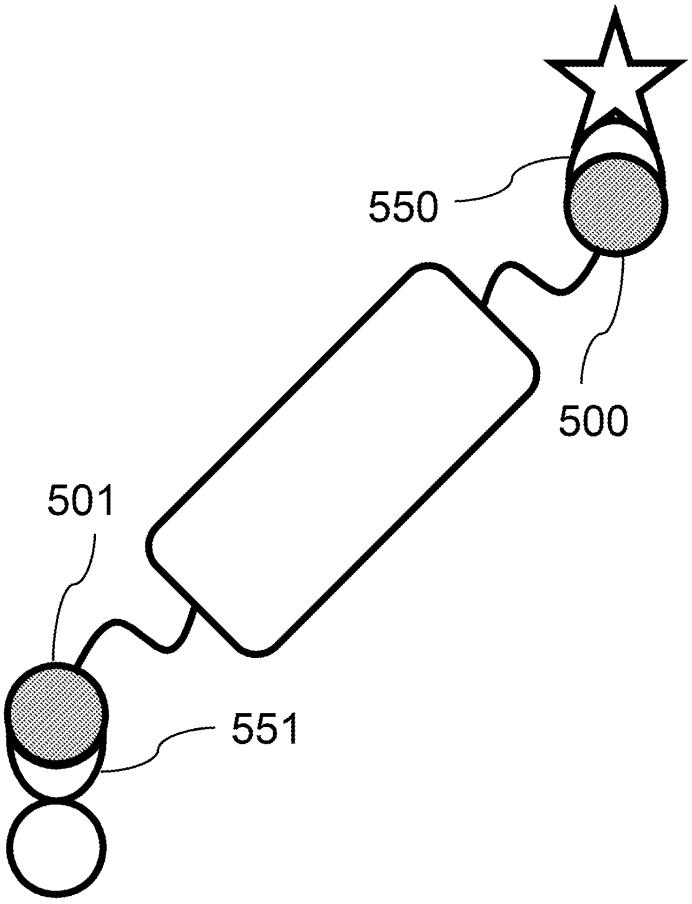
도면7


7-1
염료
코어
뉴클레오티드
T
A
C
G
7-2
개구
선택적
표면 화학
금속 스택
반응 챔버
샘플
산화물
CMOS
서열식별번호 10
7-3
i
펄스 사이 10ns
광자 카운트
여기
형광
시간
10⁴ 여기 펄스당 ~1 형광 광자의 생성
ii
축적
판독/리셋
10⁶ 여기 펄스 동안 광자의 비닝된 축적
여기 동안 축적 없음
iii
공지된 분포에의 매칭
2-3개 염기 / 초
10.000bp+ 판독치

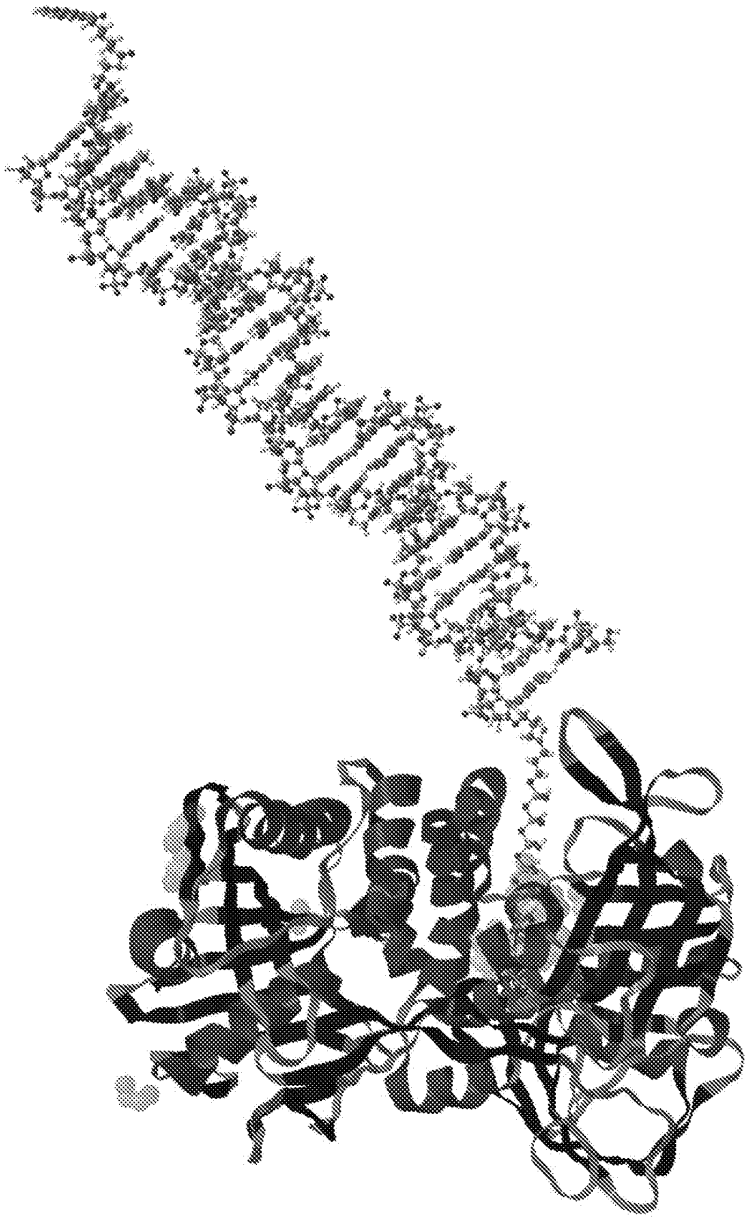
도면8a



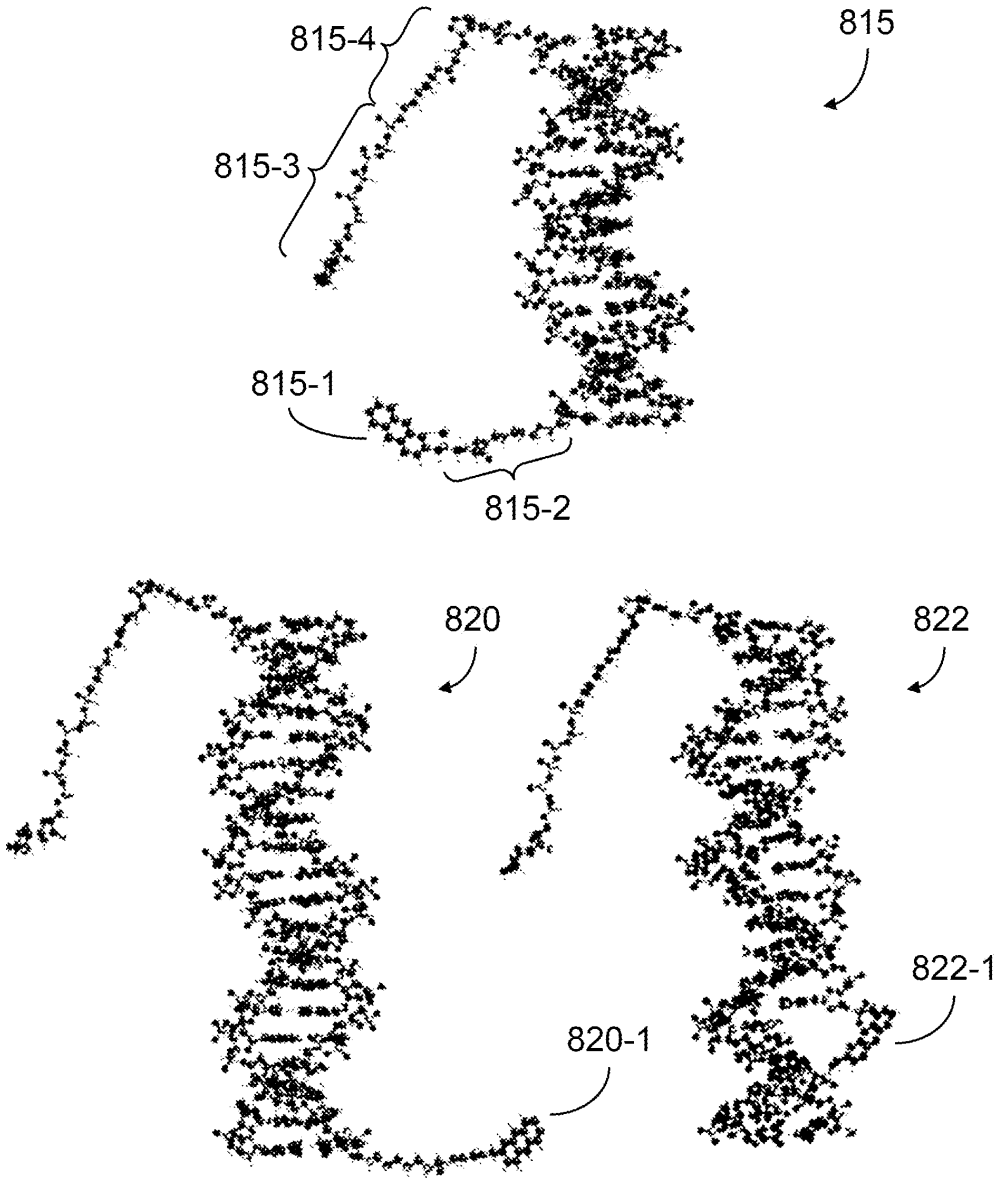
도면8b



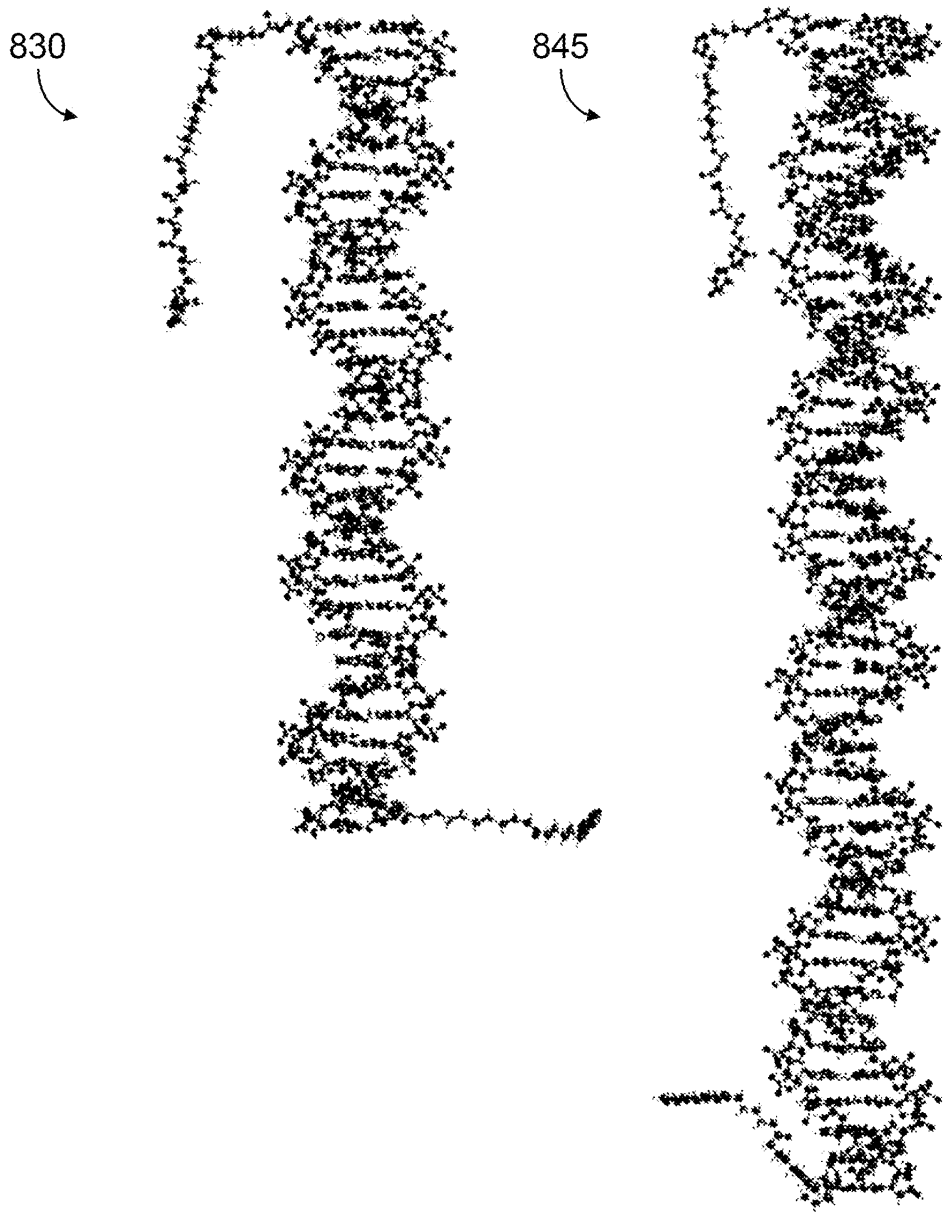
도면8c



도면8da



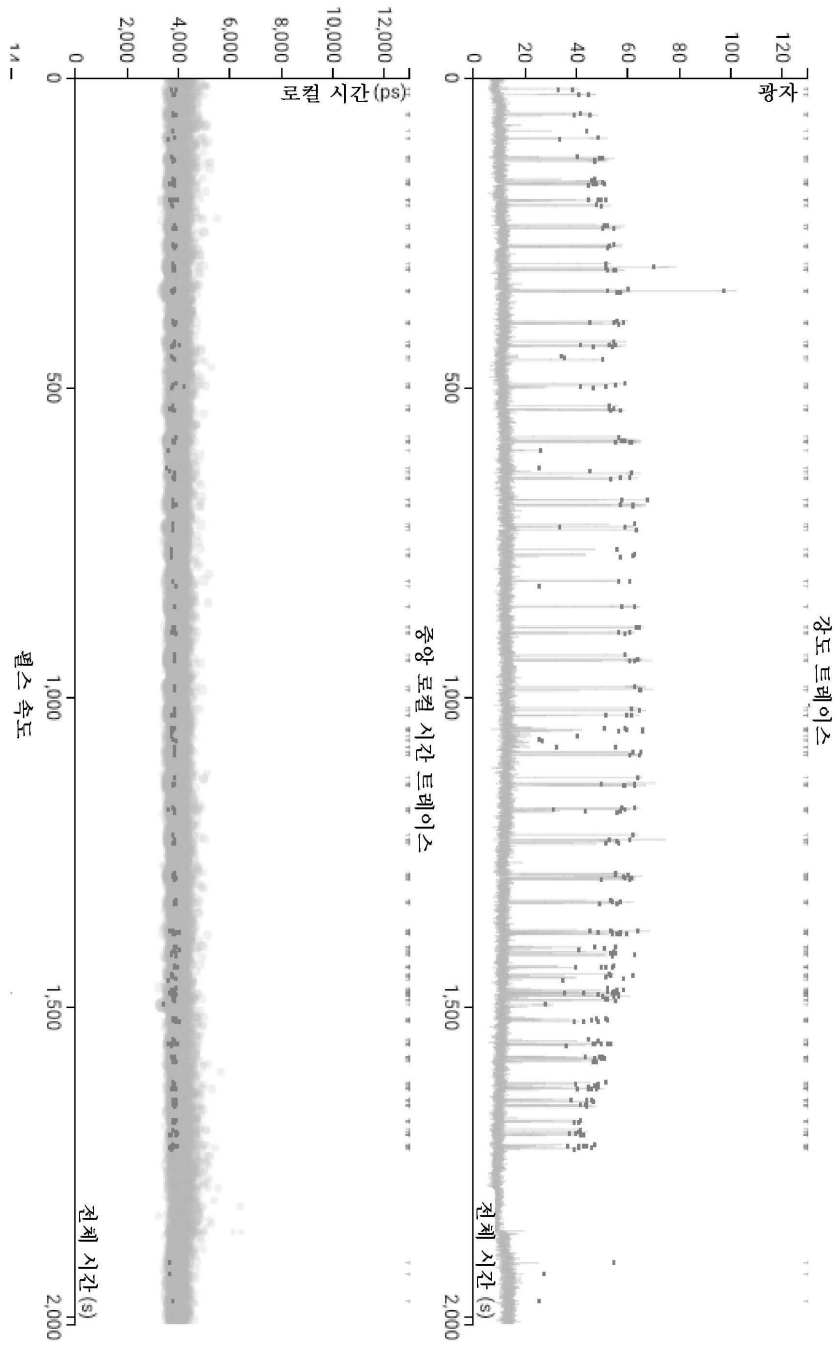
도면8db



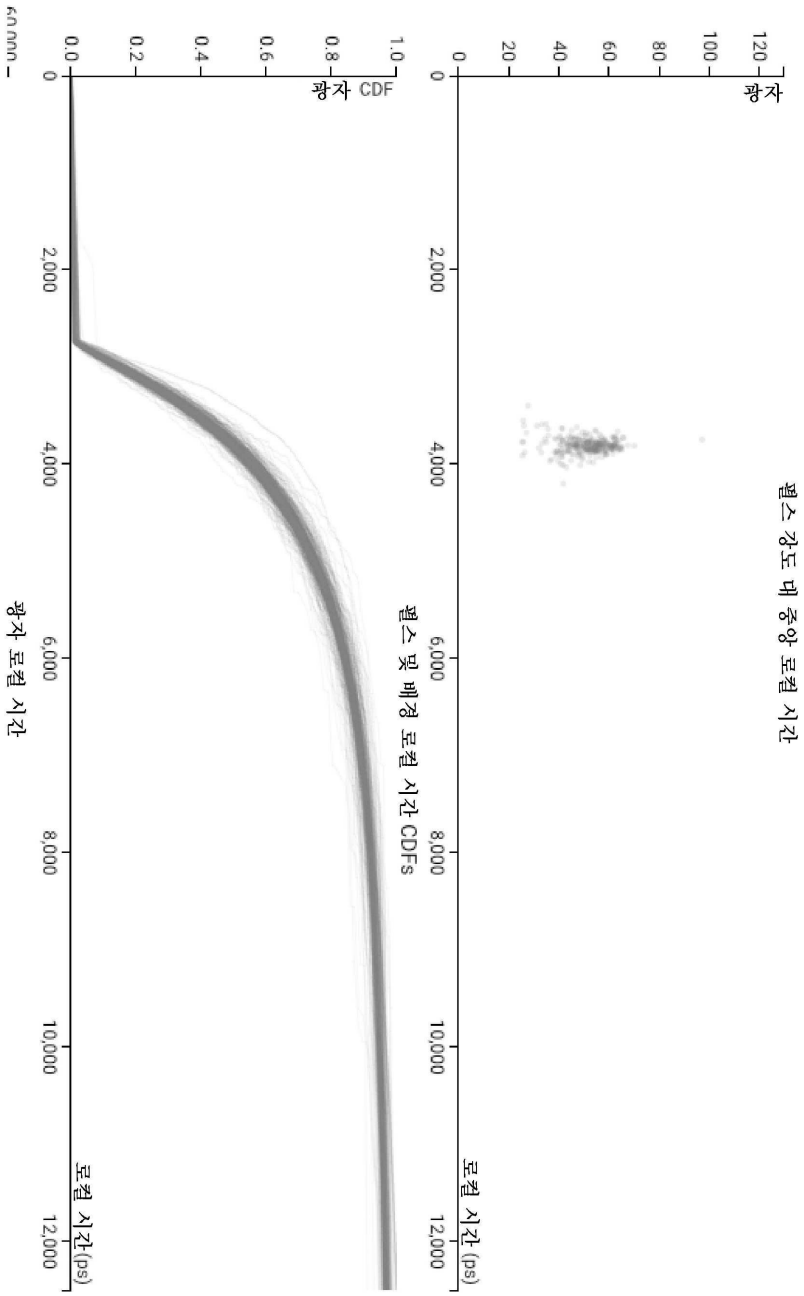
도면8e

삭제

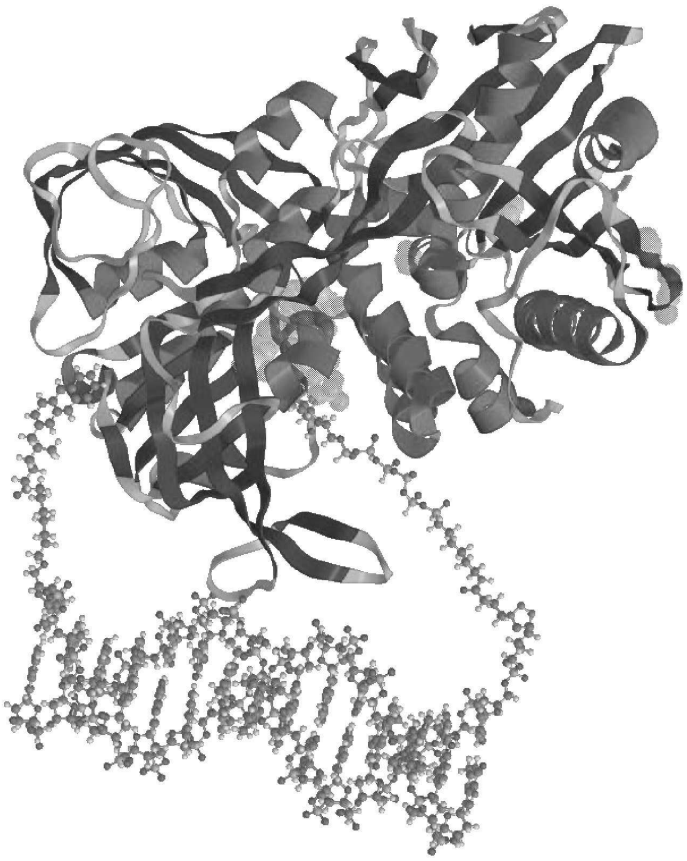
도면8ea


강도 트레이스
광자
120
100
80
60
40
20
0
0
500
1,000
1,500
2,000
전체 시간 (s)
중앙 로컬 시간 트레이스
로컬 시간 (ps)
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0
500
1,000
1,500
2,000
전체 시간 (s)
펄스 속도

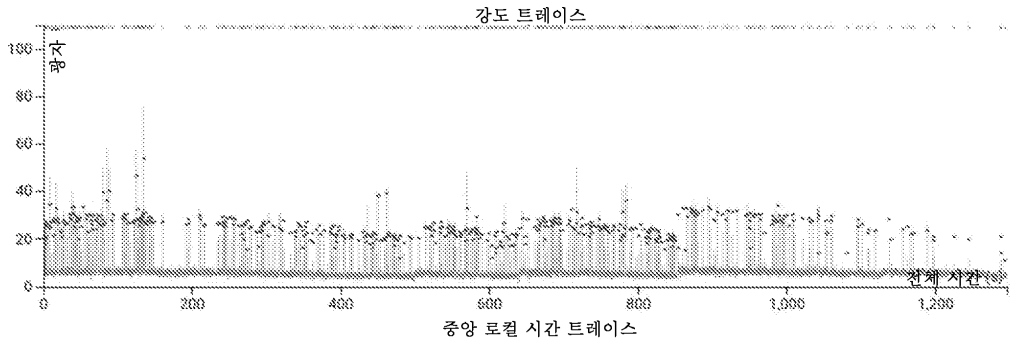
도면8eb



도면8ec



도면8f

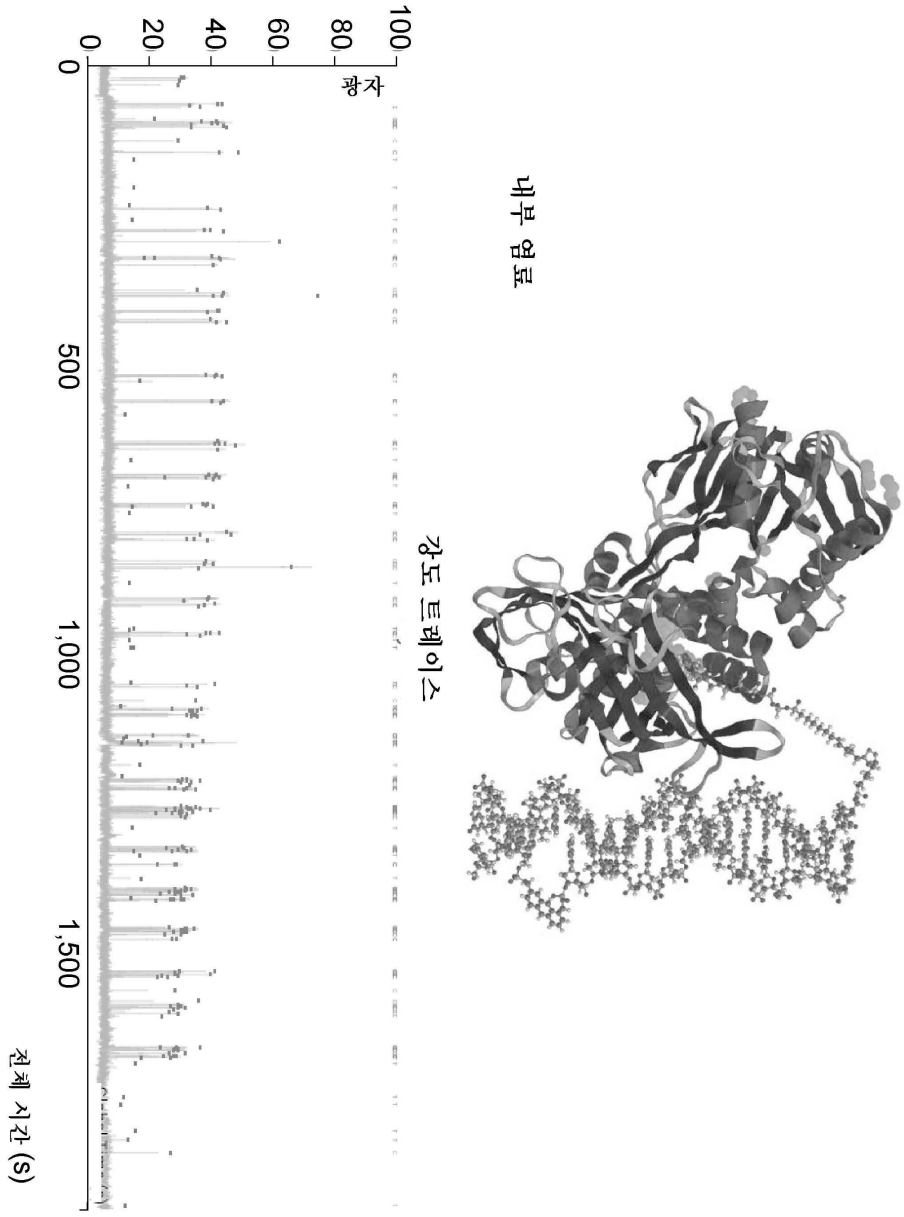

강도 트레이스
강도
100
80
60
40
20
0
0
200
400
600
800
1,000
1,200
전체 시간
중앙 로컬 시간 트레이스



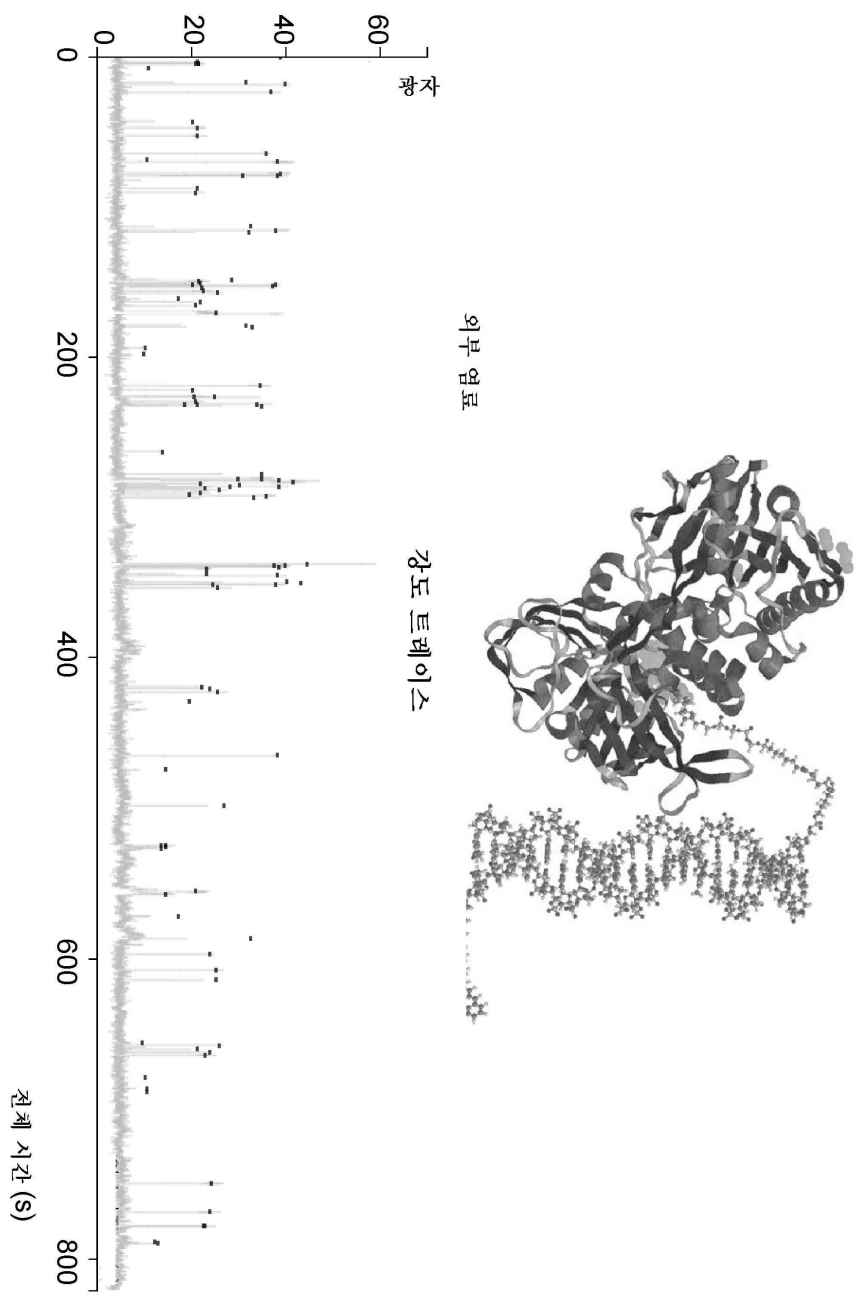
도면8g

삭제

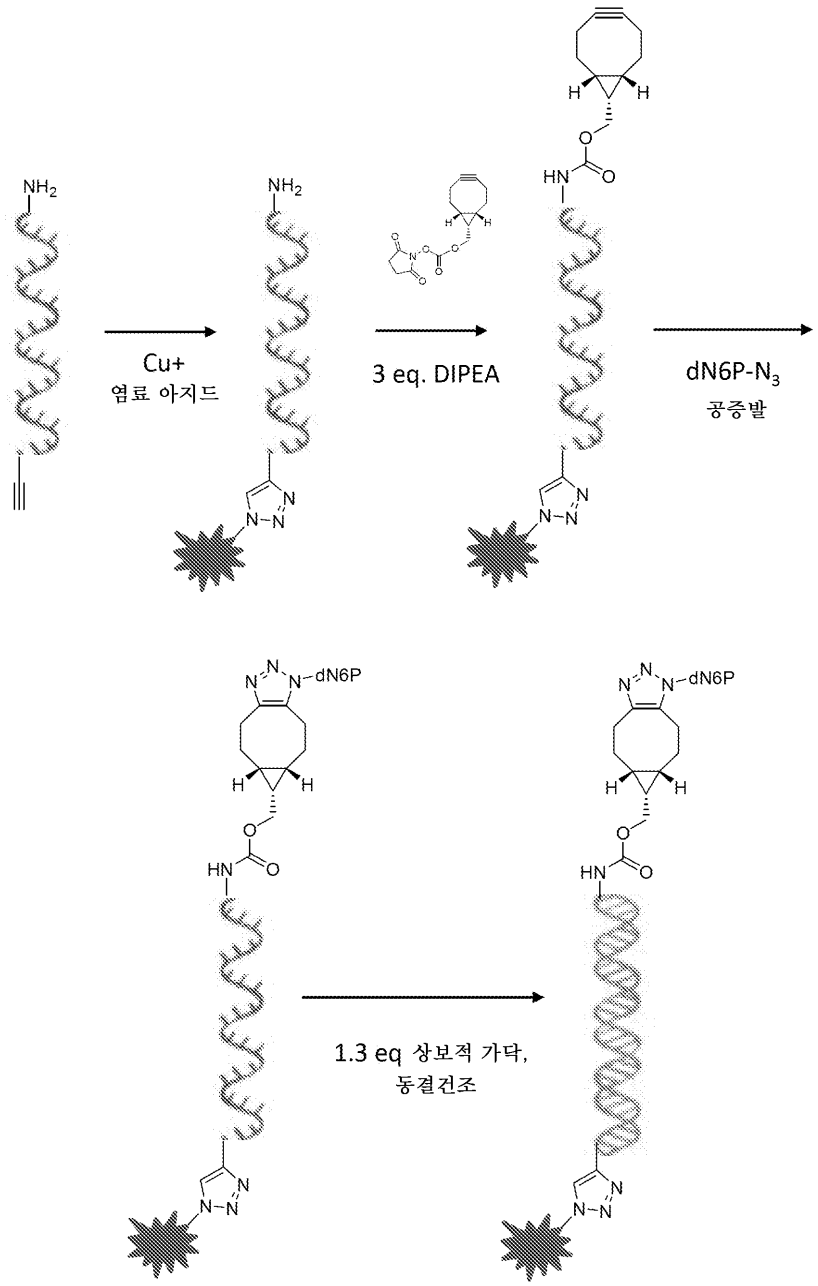
도면8ga



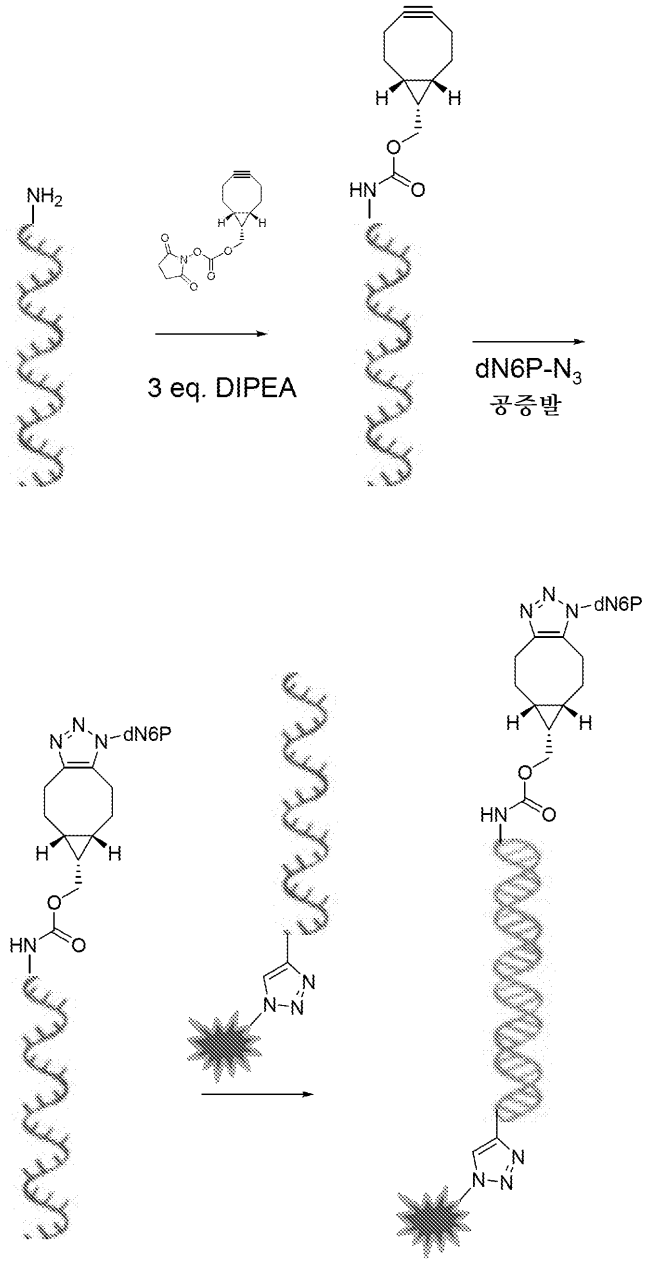
도면8gb



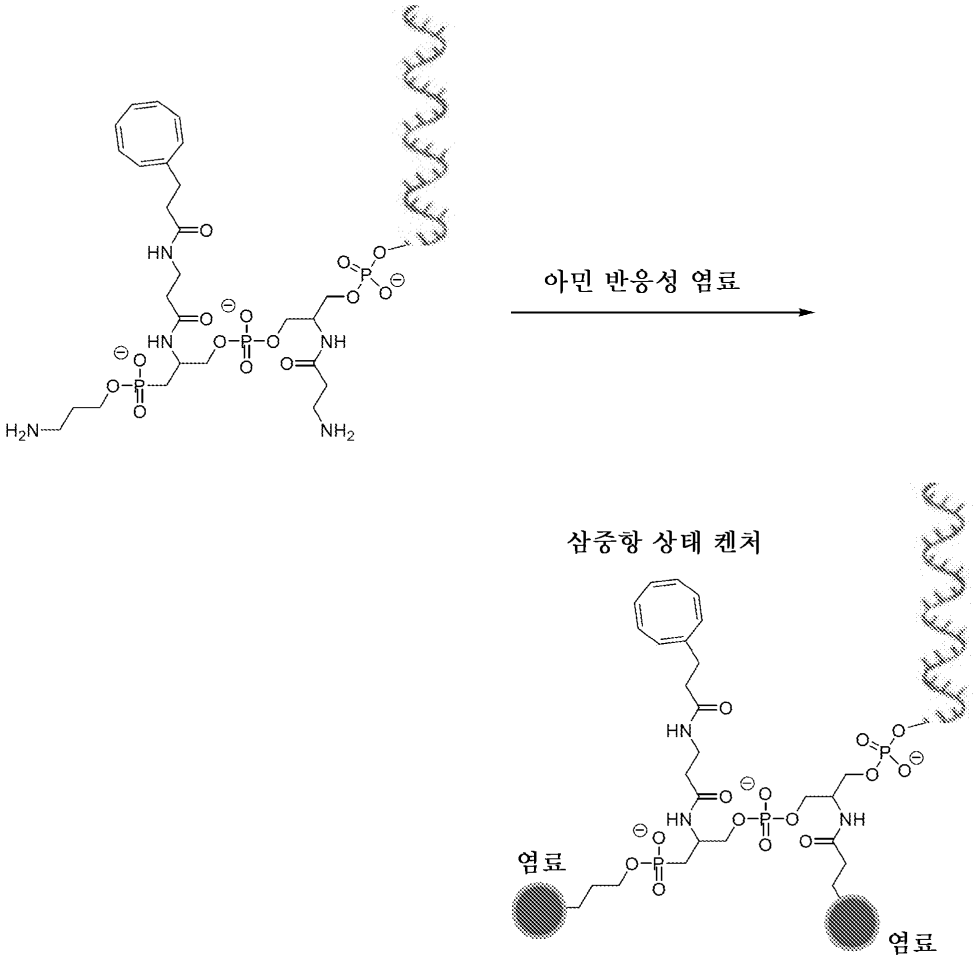
도면8h



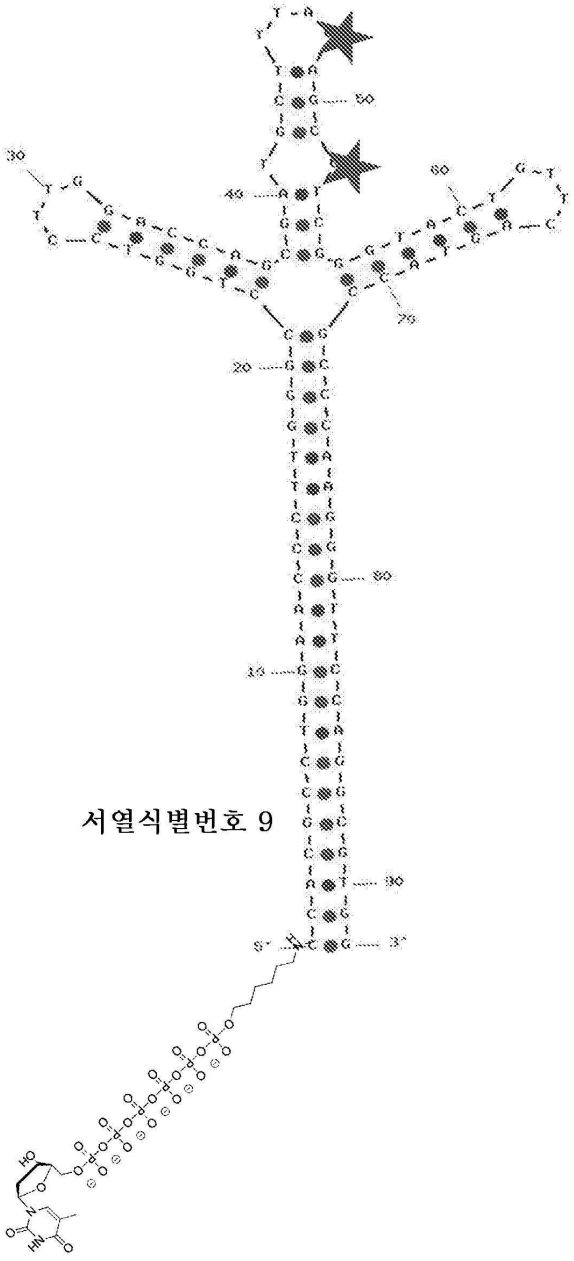
도면8i



도면8j



도면8k



서열식별번호 9

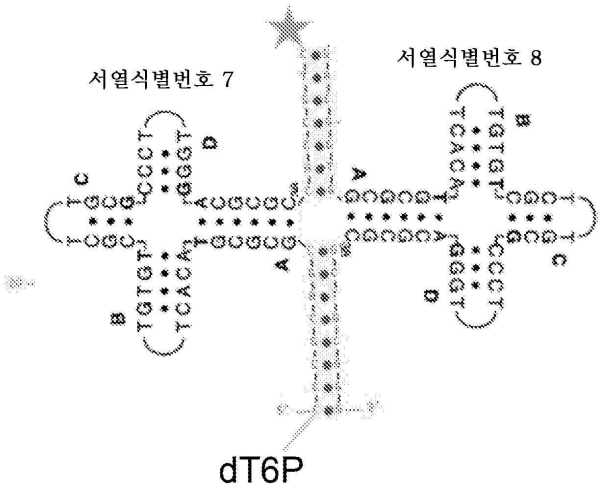
도면81

dT6P----5'-CCACGCGTGGAACACTTGTG 서열식별번호 5

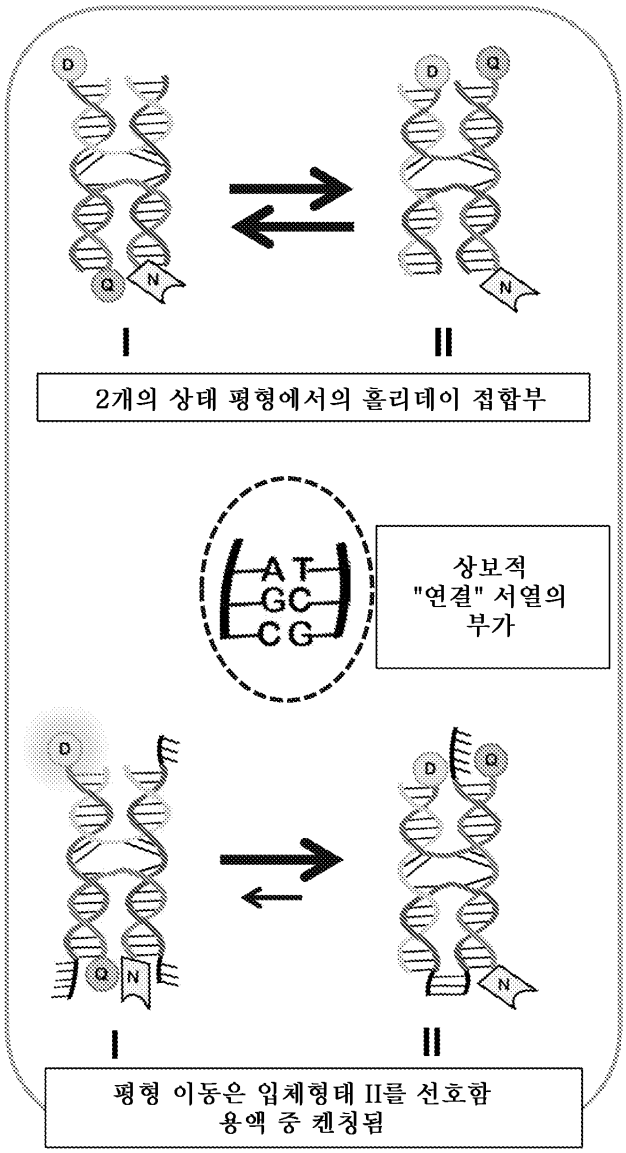
+

5'-CACAAGCC/iCy3/GGTTCCAGGCAGGCGTTCGCCTGTGTTCCACGCGTGG 서열식별번호 6

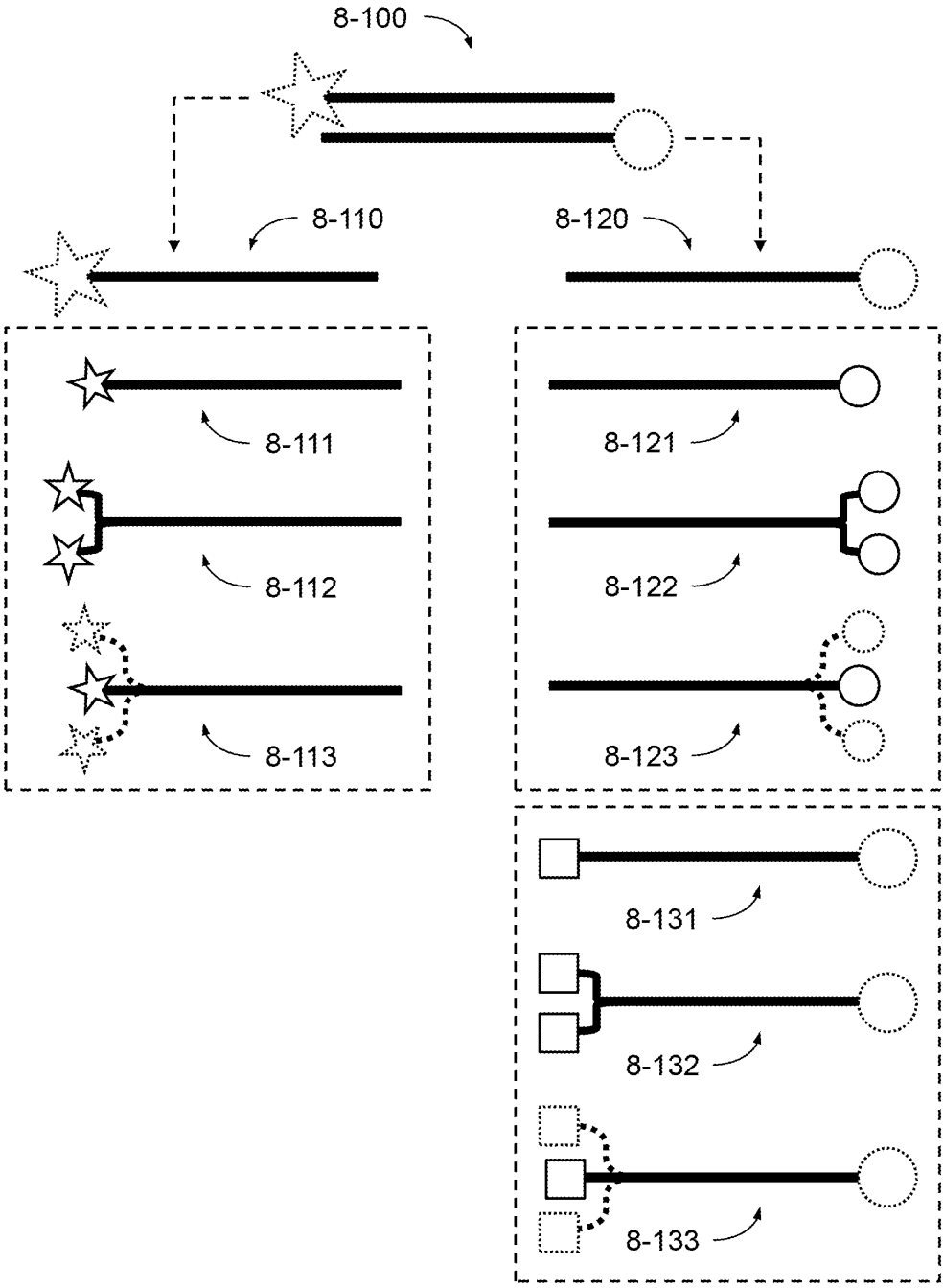




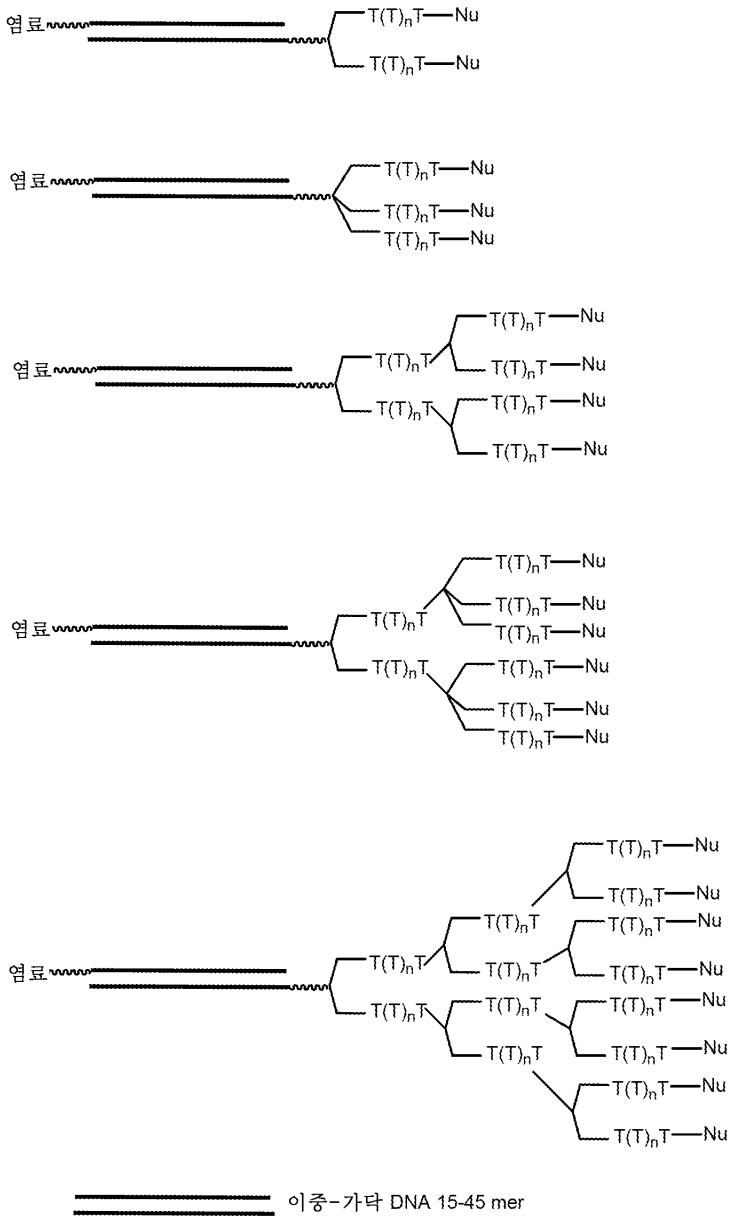
도면8m


D
Q
N
I
II
2개의 상태 평형에서의 홀리데이 접합부
AT
GC
CG
상보적
"연결" 서열의
부가
평형 이동은 입체형태 II를 선호함
용액 중 켄칭됨

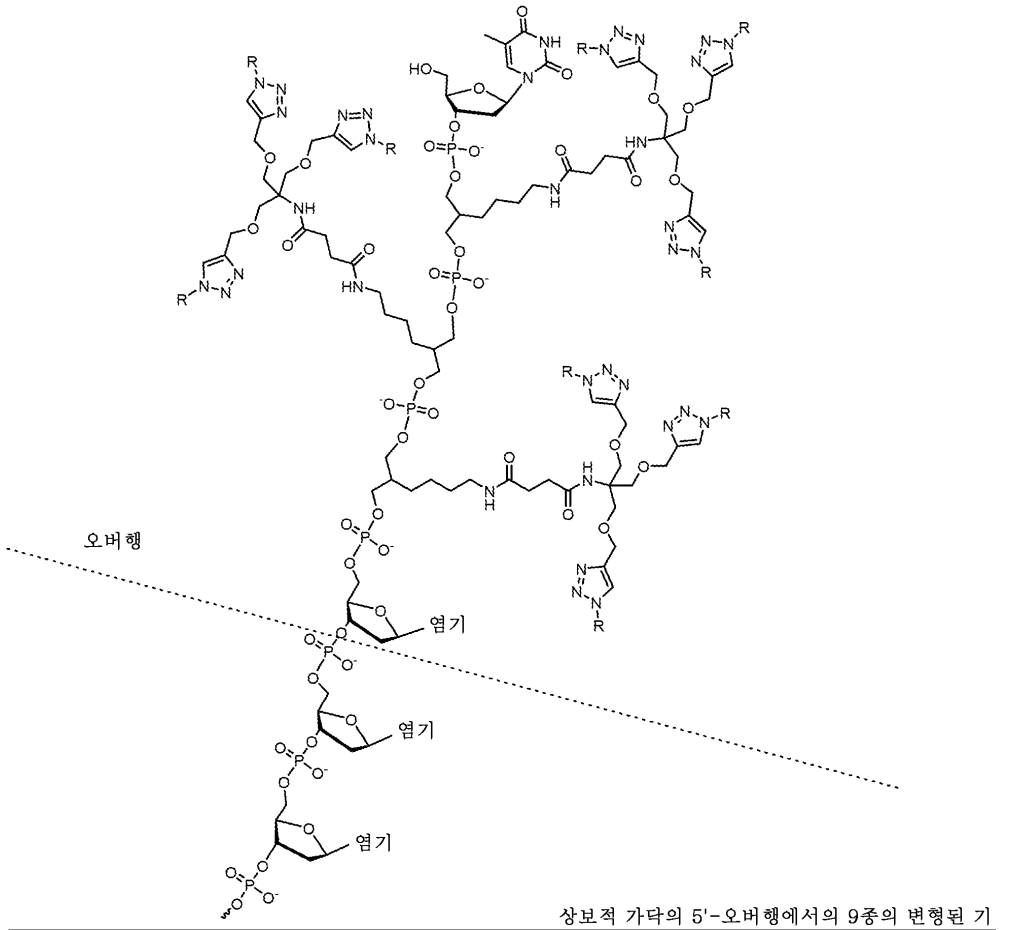
도면8n



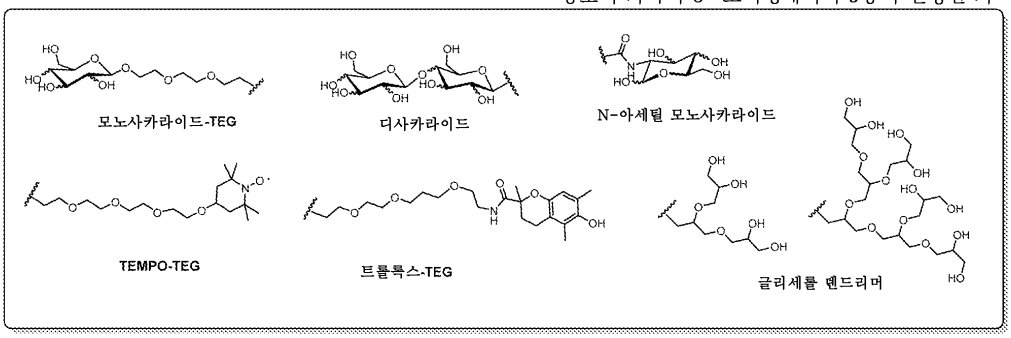
도면80



도면8p

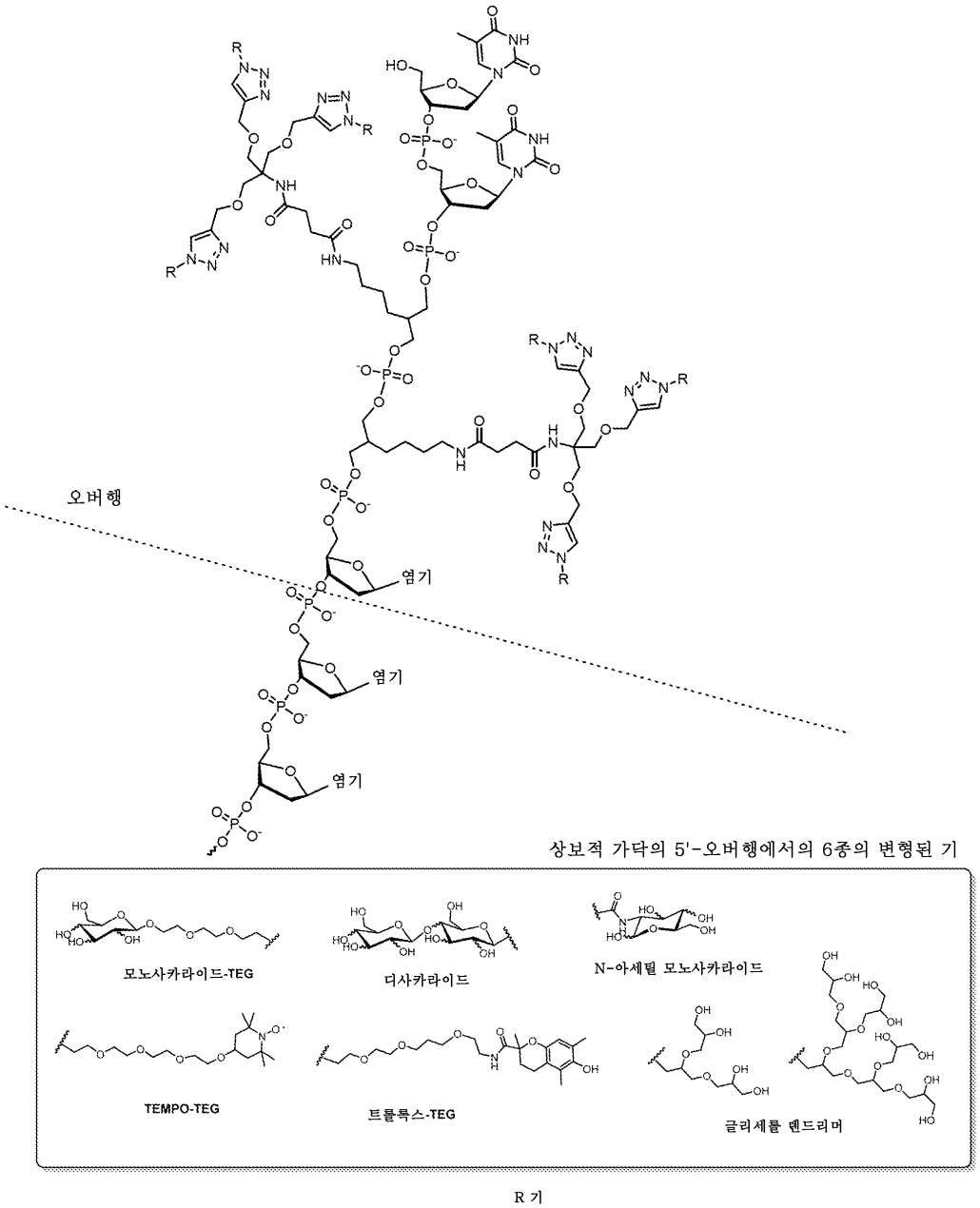


상보적 가닥의 5'-오버행에서의 9종의 변형된 기



R 기

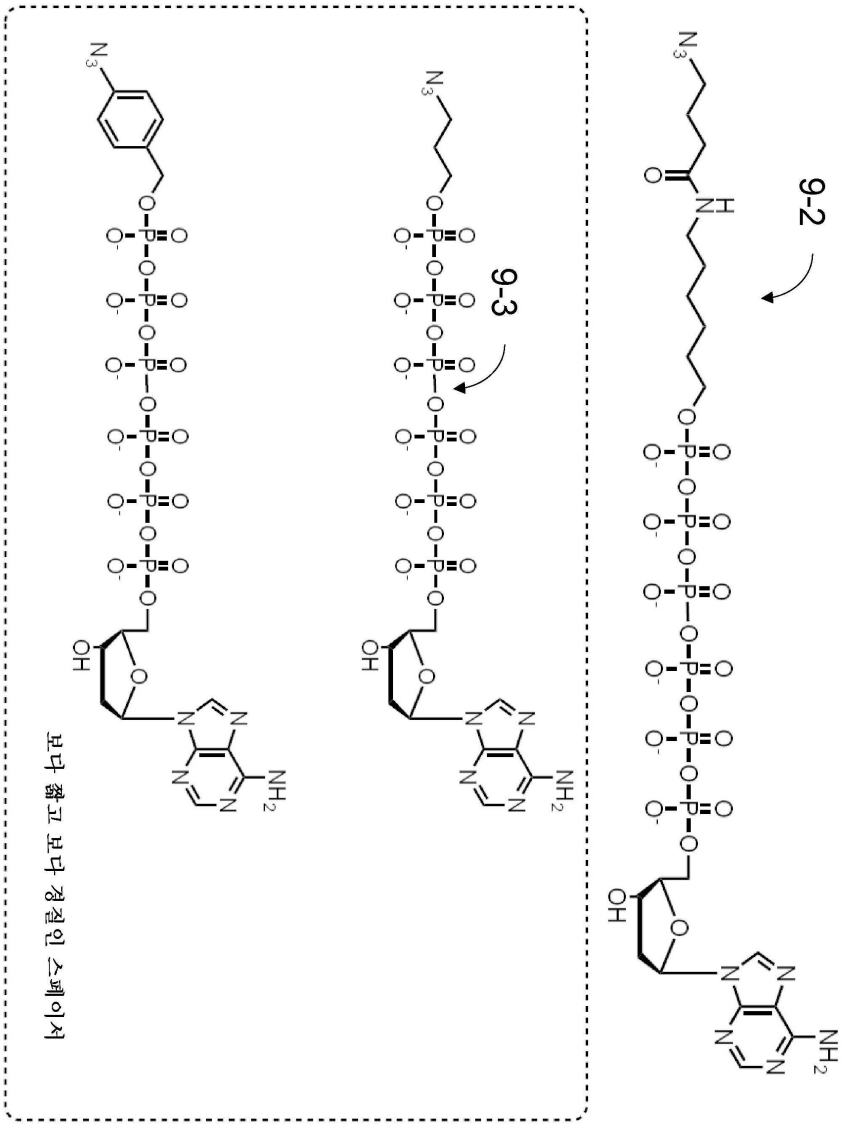
도면8q


오버행
염기
염기
염기
상보적 가닥의 5'-오버행에서의 6종의 변형된 기
모노사카라이드-TEG
디사카라이드
N-아세틸 모노사카라이드
TEMPO-TEG
트롤록스-TEG
글리세롤 덴드리머
R 기

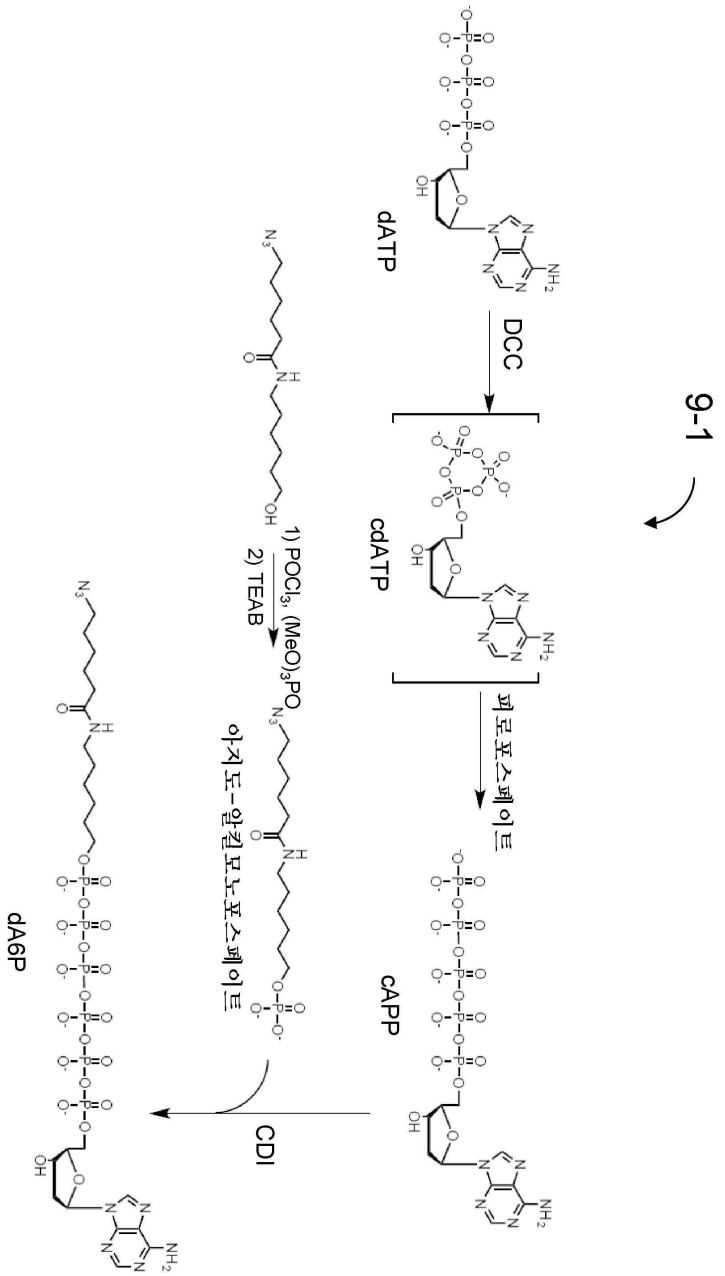
도면9

삭제

도면9ii



도면9i



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Quantum-Si Incorporated

<120> LABELED NUCLEOTIDE COMPOSITIONS AND METHODS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING

<130> R0708.70018WO00

<140> PCT/US2017/033706

<141> 2017-05-20

<150> US 62/426,144

<151> 2016-11-23

<150> US 62/339,790

<151> 2016-05-20

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 253

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 1

aacccacccc ccaaacacaa cataatctct aatcacaaca accaacacca acaccaccaa 60

acaaacatat ctctctcaac aaacacaacc accccaacac aaacacatac ctctccaaca 120

acaacaaacc acacactaaa acacacacat acatctctca acaacaacaa cccaacacca 180

ccaaaaaaca caatatctct tctcacaaca acaaacccca atcaaaaaaa acacacatat 240

tctctctcaa caa 253

<210> 2

<211> 266

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 2

aacccaccac caccaaaaca cacacatatc tctctcaaca acaacaaccc accaccacca 60

aaacacacac atatctctct caacaacaac aacccaccac caccaaaaca cacacatatc 120

tctctcaaca acaacaaccc accaccacca aaacacacac atatctctct caacaacaac 180

aacccaccac caccaaaaca cacacatatc tctctcaaca acaacaaccc accaccacca 240

aaacacacac atatctctct caacaa 266

<210> 3

<211> 219

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 3

acaccaacaa taaaaaaaaa aaacctctcc aaacacaaca caaaaaaaaa aaaaaatact 60

cccaacaaca aacaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atatctctca caacaacaac 120

aaaaaaaaaa aaaaatatcc ctctcaacac acaacaataa aaaaaaaaaa tctcctcaca 180

acaaaacaaa aaaaaaaaaa aaaaaatttc tctaaacac 219

<210> 4

<211> 263

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 4

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatatctctc tcaacaacaa caacaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaatat ctctctcaac aacaacaaca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatatctctc 120

tcaacaacaa caacaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaatat ctctctcaac aacaacaaca 180

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aatatctctc tcaacaacaa caacaaaaaa aaaaaaaaaa 240

aaaaaaatat ctctctcaac aac 263

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 5

ccacgcgtgg aacacttgtg 20

<210> 6

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (8)..(9)

<223> Modified by iCy3

<400> 6

cacaagccgg ttccaggcag gcgttcgcct gtgttccacg cgtgg 45

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<222> (53)..(53)

<223> Modified by a luminescent label

<400> 7

cccgcagcgc gcgtacactt gtgtcgcttg cgcccttggg acgcgccacc gtc 53

<210> 8

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 8

gacggtggcg cgtacacttg tgtcgcttgc gcccttggga cgcgcgctgc ggg 53

<210> 9

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220

><221> misc_feature

<222> (47)..(48)

<223> Modified by iCy3

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(51)

<223> Modified by iCy3

<400> 9

ccacgcctgg aacccttggg cctggtcctt ggaccagcga tgctttaagc tcgggtactg 60

ttcagtaccg cccaagggtt ccaggcgtgg 90

<210> 10

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<400> 10

tccgtacgac 10