



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115803453 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 14

(21) 申请号 202180041929.7

(22) 申请日 2021.12.20

(30) 优先权数据

63/128,675 2020.12.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/064342 2021.12.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/140254 EN 2022.06.30

(71) 申请人 伊鲁米纳公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H·布莱克 E·阿米霍

M·莱萨德-维格

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平 赵磊

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6837 (2006.01)

C12Q 1/6832 (2006.01)

C12Q 1/6853 (2006.01)

权利要求书4页 说明书21页

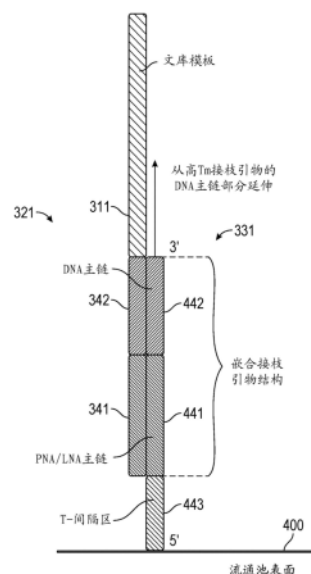
序列表9页 附图14页

(54) 发明名称

使用经修饰的捕获引物捕获和扩增靶多核苷酸的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于在底物的表面处捕获靶多核苷酸的组合物。该组合物可包含多个捕获引物，该多个捕获引物与该底物的该表面偶联并且包含经修饰的核酸；和多个正交捕获引物，该多个正交捕获引物与该底物的该表面偶联并且包含经修饰的核酸。这些捕获引物的这些经修饰的核酸可包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。这些正交捕获引物的这些经修饰的核酸可包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。



1. 一种用于在底物的表面处捕获靶多核苷酸的组合物,所述组合物包含:
多个捕获引物,所述多个捕获引物与所述底物的所述表面偶联,每个捕获引物包含经修饰的核酸;和
多个正交捕获引物,所述多个正交捕获引物与所述底物的所述表面偶联,每个正交捕获引物包含经修饰的核酸。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述捕获引物的所述经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的组合物,其中所述捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述经修饰的核酸和所述DNA分布在所述捕获引物的5'端和3'端之间。
5. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述经修饰的核酸设置在所述捕获引物的5'端,并且所述DNA设置在所述捕获引物的3'端。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述正交捕获引物的所述经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述正交捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述经修饰的核酸和所述DNA分布在所述捕获引物的5'端和3'端之间。
9. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述经修饰的核酸设置在所述正交捕获引物的5'端,并且所述DNA设置在所述正交捕获引物的3'端。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含:
第一靶多核苷酸,所述第一靶多核苷酸各自包含与所述捕获引物互补的第一接头和与所述正交捕获引物互补的第二接头;和第二靶多核苷酸,所述第二靶多核苷酸与所述第一靶多核苷酸中的相应第一靶多核苷酸互补。
11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的所述第一接头与所述捕获引物中的相应捕获引物杂交以形成第一双链体,并且其中所述第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的所述第二接头与所述正交捕获引物中的相应正交捕获引物杂交以形成第二双链体。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有的熔融温度(T_m)大于第三双链体的 T_m ,所述第三双链体将通过所述第二靶多核苷酸和所述第一靶多核苷酸中的与所述第二靶多核苷酸互补的所述相应第一靶多核苷酸杂交形成。
13. 根据权利要求11或权利要求12所述的组合物,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有介于约80°C和约110°C之间的熔融温度(T_m)。
14. 根据权利要求11至13中任一项所述的组合物,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有介于约85°C和约105°C之间的熔融温度(T_m)。
15. 根据权利要求11至14中任一项所述的组合物,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有介于约90°C和约100°C之间的熔融温度(T_m)。
16. 根据权利要求11至15中任一项所述的组合物,其中基本上没有所述第二靶多核苷

酸在溶液中与所述第一靶多核苷酸中的任一者杂交。

17. 根据权利要求11至16中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含约1%至约1000%的甲酰胺(%v/v)。

18. 根据权利要求11至17中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含约5%至约80%的甲酰胺(%v/v)。

19. 根据权利要求11至18中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含约100mM至约800mM的Na⁺。

20. 根据权利要求11至19中任一项所述的组合物,所述组合物进一步包含约200mM至约800mM的Na⁺。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的组合物,其中所述捕获引物是经修饰的P5捕获引物,并且其中所述正交捕获引物是经修饰的P7捕获引物。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的组合物,其中所述捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的所述经修饰的核酸,并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的所述经修饰的核酸。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的组合物,其中所述捕获引物中的每一者包含至少约九个所述经修饰的核酸,并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含至少约九个所述经修饰的核酸。

24. 根据权利要求1至23中任一项所述的组合物,其中所述捕获引物中的每一者包含至少约十二个所述经修饰的核酸,并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含至少约十二个所述经修饰的核酸。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的组合物,其中所述捕获引物中的每一者包含至少约十五个所述经修饰的核酸,并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含至少约十五个所述经修饰的核酸。

26. 一种用于在底物的表面处捕获和扩增靶多核苷酸的方法,所述方法包括:

使组合物与流体接触,其中所述组合物包含:

多个捕获引物,所述多个捕获引物与所述底物的所述表面偶联,每个捕获引物包含经修饰的核酸;和

多个正交捕获引物,所述多个正交捕获引物与所述底物的所述表面偶联,每个正交捕获引物包含经修饰的核酸;并且

其中所述流体包含:

第一靶多核苷酸,所述第一靶多核苷酸各自包含与所述捕获引物互补的第一接头和与所述正交捕获引物互补的第二接头;和

第二靶多核苷酸,所述第二靶多核苷酸与所述第一靶多核苷酸中的相应第一靶多核苷酸互补;

在抑制所述流体中所述第二靶多核苷酸与所述第一靶多核苷酸杂交的同时:

使所述第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的所述第一接头与所述捕获引物中的相应捕获引物杂交以形成第一双链体;

使所述第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的所述第二接头与所述正交捕获引物中的相应正交捕获引物杂交以形成第二双链体;并且然后

扩增所述第一靶多核苷酸,所述扩增包括生成所述第一靶多核苷酸的相应扩增子。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述捕获引物的所述经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。

28. 根据权利要求26或权利要求27所述的方法,其中所述捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述经修饰的核酸和所述DNA分布在所述捕获引物的5'端和3'端之间。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述经修饰的核酸设置在所述捕获引物的5'端,并且所述DNA设置在所述捕获引物的3'端。

31. 根据权利要求26至30中任一项所述的方法,其中所述正交捕获引物的所述经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述正交捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述经修饰的核酸和所述DNA分布在所述捕获引物的5'端和3'端之间。

34. 根据权利要求32所述的方法,其中所述经修饰的核酸设置在所述正交捕获引物的5'端,并且所述DNA设置在所述正交捕获引物的3'端。

35. 根据权利要求26至34中任一项所述的方法,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有的熔融温度(T_m)大于第三双链体的 T_m ,所述第三双链体将通过所述第二靶多核苷酸和所述第一靶多核苷酸中的与所述第二靶多核苷酸互补的所述相应第一靶多核苷酸杂交形成。

36. 根据权利要求26至35中任一项所述的方法,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有介于约80°C和约110°C之间的熔融温度(T_m)。

37. 根据权利要求26至36中任一项所述的方法,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有介于约85°C和约105°C之间的熔融温度(T_m)。

38. 根据权利要求26至37中任一项所述的方法,其中所述第一双链体和所述第二双链体各自具有介于约90°C和约100°C之间的熔融温度(T_m)。

39. 根据权利要求26至38中任一项所述的方法,其中基本上没有所述第二靶多核苷酸在溶液中与所述第一靶多核苷酸中的任一者杂交。

40. 根据权利要求26至39中任一项所述的方法,其中所述杂交在约1%至约100%的甲酰胺(%v/v)中进行。

41. 根据权利要求26至40中任一项所述的方法,其中所述杂交在约5%至约80%的甲酰胺(%v/v)中进行。

42. 根据权利要求26至41中任一项所述的方法,其中所述杂交在约100mM至约800mM的 Na^+ 中进行。

43. 根据权利要求26至42中任一项所述的方法,其中所述杂交在约200mM至约800mM的 Na^+ 中进行。

44. 根据权利要求26至43中任一项所述的方法,其中所述捕获引物是经修饰的P5捕获引物,并且其中所述正交捕获引物是经修饰的P7捕获引物。

45. 根据权利要求26至44中任一项所述的方法, 其中所述捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的所述经修饰的核酸, 并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的所述经修饰的核酸。

46. 根据权利要求26至45中任一项所述的方法, 其中所述捕获引物中的每一者包含至少约九个所述经修饰的核酸, 并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含至少约九个所述经修饰的核酸。

47. 根据权利要求26至46中任一项所述的方法, 其中所述捕获引物中的每一者包含至少约十二个所述经修饰的核酸, 并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含至少约十二个所述经修饰的核酸。

48. 根据权利要求26至47中任一项所述的方法, 其中所述捕获引物中的每一者包含至少约十五个所述经修饰的核酸, 并且其中所述正交捕获引物中的每一者包含至少约十五个所述经修饰的核酸。

使用经修饰的捕获引物捕获和扩增靶多核苷酸的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年12月21日提交的名称为“Compositions and Methods for Capturing and Amplifying Target Polynucleotides Using Modified Capture Primers”的美国临时专利申请第63/128,675号的权益,该专利申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本专利申请包含已以ASCII格式电子提交的序列表,该序列表据此全文以引用方式并入。所述ASCII副本命名为IP-2054-PCT_SL.txt,大小为4,174字节。

技术领域

[0005] 本申请涉及簇扩增。

背景技术

[0006] 簇扩增是扩增多核苷酸的方法,例如用于基因测序。靶多核苷酸由流通池中与底物表面偶联的引物(例如,P5和P7捕获引物)捕获,并且在该表面上的随机位置处形成“种子”。执行扩增循环以在每个种子周围的表面上形成簇。簇包括种子多核苷酸的拷贝和互补拷贝(它们一起可称为“扩增子”)。例如,图1示意性地示出了底物上多核苷酸的扩增。底物区域101上的单个种子111的捕获和扩增可产生单克隆簇121,该单克隆簇可用种子111的扩增子充分填充该底物区域,并且可容易地用于边合成边测序或SBS(虚线圆圈和点状线圆圈旨在表示该簇随时间推移的扩大)。在一些情况下,将底物图案化以便限定结合不同簇的区域,诸如可填充有相应簇的孔。

发明内容

[0007] 本文提供的示例涉及使用经修饰的捕获引物捕获和扩增靶多核苷酸。公开了用于执行此类捕获和扩增的组合物和方法。

[0008] 在一些示例中,本文提供了用于在底物的表面处捕获靶多核苷酸的组合物。该组合物可包含多个捕获引物,该多个捕获引物与底物的表面偶联。每个捕获引物可包含经修饰的核酸。该组合物还可包含多个正交捕获引物,该多个正交捕获引物与底物的表面偶联。每个正交捕获引物可包含经修饰的核酸。

[0009] 在一些示例中,捕获引物的经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。在一些示例中,捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。在一些示例中,经修饰的核酸和DNA分布在捕获引物的5'端和3'端之间。在一些示例中,经修饰的核酸设置在捕获引物的5'端,并且DNA设置在捕获引物的3'端。

[0010] 在一些示例中,正交捕获引物的经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。在一些示例中,正交捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。在一些示例中,经

修饰的核酸和DNA分布在捕获引物的5'端和3'端之间。在一些示例中,经修饰的核酸设置在正交捕获引物的5'端,并且DNA安置在正交捕获引物的3'端。

[0011] 在一些示例中,该组合物进一步包含第一靶多核苷酸,这些第一靶多核苷酸各自包含与捕获引物互补的第一接头和与正交捕获引物互补的第二接头。该组合物进一步可包含第二靶多核苷酸,这些第二靶多核苷酸与第一靶多核苷酸中的相应第一靶多核苷酸互补。

[0012] 在一些示例中,第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的第一接头与捕获引物中的相应捕获引物杂交以形成第一双链体,并且第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的第二接头与正交捕获引物中的相应正交捕获引物杂交以形成第二双链体。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有的熔融温度(T_m)大于第三双链体的 T_m ,这些第三双链体将通过第二靶多核苷酸和第一靶多核苷酸中的与第二靶多核苷酸互补的相应第一靶多核苷酸杂交形成。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有介于约80°C和约110°C之间的 T_m 。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有介于约85°C和约105°C之间的 T_m 。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有介于约90°C和约100°C之间的 T_m 。

[0013] 在一些示例中,基本上没有第二靶多核苷酸在溶液中与第一靶多核苷酸中的任一者杂交。

[0014] 在一些示例中,该组合物进一步包含约1%至约100%的甲酰胺(%v/v)或约5%至约80%的甲酰胺(%v/v)。

[0015] 在一些示例中,该组合物进一步包含进一步包含约100mM至约800mM的 Na^+ 或约200mM到约800mM的 Na^+ 。

[0016] 在一些示例中,捕获引物是经修饰的P5捕获引物,并且正交捕获引物是经修饰的P7捕获引物。

[0017] 在一些示例中,捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的经修饰的核酸。

[0018] 在一些示例中,捕获引物中的每一者包含至少约九个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含至少约九个经修饰的核酸;或者捕获引物中的每一者包含至少约十二个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含至少约十二个经修饰的核酸;或者捕获引物中的每一者包含至少约十五个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含至少约十五个经修饰的核酸。

[0019] 在一些示例中,本文提供了一种用于在底物的表面处捕获和扩增靶多核苷酸的方法。该方法可包括使组合物与流体接触。该组合物可包含多个捕获引物,该多个捕获引物与底物的表面偶联,每个捕获引物包含经修饰的核酸;和多个正交捕获引物,该多个正交捕获引物与底物的表面偶联,每个正交捕获引物包含经修饰的核酸。该流体可包含第一靶多核苷酸,这些第一靶多核苷酸各自包含与捕获引物互补的第一接头和与正交捕获引物互补的第二接头;和第二靶多核苷酸,这些第二靶多核苷酸与第一靶多核苷酸中的相应第一靶多核苷酸互补。该方法可包括在抑制流体中第二靶多核苷酸与第一靶多核苷酸杂交的同时:使第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的第一接头与捕获引物中的相应捕获引物杂交以形成第一双链体;使第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的第二接头与正交捕获引物中的相应正交捕获引物杂交以形成第二双链体;并且然后扩增第一靶多核苷酸,该扩

增包括生成第一靶多核苷酸的相应扩增子。

[0020] 在一些示例中,捕获引物的经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。在一些示例中,捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。在一些示例中,经修饰的核酸和DNA分布在捕获引物的5'端和3'端之间。在一些示例中,经修饰的核酸设置在捕获引物的5'端,并且DNA设置在捕获引物的3'端。

[0021] 在一些示例中,正交捕获引物的经修饰的核酸包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T。在一些示例中,正交捕获引物进一步包含脱氧核糖核酸(DNA)。在一些示例中,经修饰的核酸和DNA分布在捕获引物的5'端和3'端之间。在一些示例中,经修饰的核酸设置在正交捕获引物的5'端,并且DNA安置在正交捕获引物的3'端。

[0022] 在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有的熔融温度(T_m)大于第三双链体的 T_m ,这些第三双链体将通过第二靶多核苷酸和第一靶多核苷酸中的与第二靶多核苷酸互补的相应第一靶多核苷酸杂交形成。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有介于约80°C和约110°C之间的 T_m 。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有介于约85°C和约105°C之间的 T_m 。在一些示例中,第一双链体和第二双链体各自具有介于约90°C和约100°C之间的 T_m 。

[0023] 在一些示例中,基本上没有第二靶多核苷酸在溶液中与第一靶多核苷酸中的任一者杂交。

[0024] 在一些示例中,该杂交以约1%至约100%的甲酰胺(%v/v)或约5%至约80%的甲酰胺(%v/v)进行。

[0025] 在一些示例中,该杂交以约100mM至约800mM的 Na^+ 或约200mM至约800mM的 Na^+ 进行。

[0026] 在一些示例中,捕获引物是经修饰的P5捕获引物,并且正交捕获引物是经修饰的P7捕获引物。

[0027] 在一些示例中,捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含介于约五个和约二十个之间的经修饰的核酸。在一些示例中,捕获引物中的每一者包含至少约九个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含至少约九个经修饰的核酸;或者捕获引物中的每一者包含至少约十二个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含至少约十二个经修饰的核酸;或者捕获引物中的每一者包含至少约十五个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者包含至少约十五个经修饰的核酸。

[0028] 应当理解的是,如本文所述的本公开的每个方面的任何相应特征/示例可以以任何合适的组合一起实施,并且来自这些方面中的任何一个或多个方面的任何特征/示例可以与如本文所述的其他方面的任何特征一起以任何组合实施以实现如本文所述的有益效果。

附图说明

[0029] 图1示意性地示出了底物上多核苷酸的扩增。

[0030] 图2A至图2C示意性地示出了用于使用先前已知的捕获引物在底物上捕获多核苷酸的工艺流程中的组合物和操作。

[0031] 图3A至图3H示意性地示出了使用本发明的捕获引物在底物上捕获和扩增多核苷酸的示例工艺流程中的示例组合物和操作。

[0032] 图4示意性地示出了根据一些示例的多核苷酸和本发明的捕获引物中的一者之间的示例双链体。

[0033] 图5A至图5C是示出条件对通过本发明的捕获引物捕获多核苷酸的示例影响的图。

[0034] 图6示出了用于使用本发明的捕获引物捕获和扩增多核苷酸的方法中的操作的示例流程。

具体实施方式

[0035] 本文提供的示例涉及使用经修饰的捕获引物捕获和扩增多核苷酸。公开了用于执行此类捕获和扩增的组合物和方法。

[0036] 本文提供的经修饰的捕获引物可比先前已知的捕获引物更强地与靶多核苷酸杂交,并且因此可提高在底物上捕获靶多核苷酸的效率。说明性地,由于结合较强,因此与先前已知的捕获引物相比,可使用较低浓度的靶多核苷酸在底物上制备簇。例如,以诸如下文参考图2A至图2C进一步所述的方式,使用先前已知的引物的多核苷酸捕获和扩增可在表面杂交和基于溶液的退火作为使多核苷酸中的一些多核苷酸不可用于捕获或扩增的竞争工艺操作的条件下进行。相比之下,以诸如参考图3A至图3H、图4、图5A至图5C和图6所述的方式,本发明的捕获引物允许在减少或抑制作为竞争工艺的基于溶液的退火的条件下执行多核苷酸捕获和扩增,并且因此可基本上增加用于捕获和扩增的多核苷酸的可用性,与先前已知的捕获引物相比可允许使用较高浓度的靶多核苷酸以在底物上制备簇,并且可减少整体接种时间。

[0037] 首先,将简要解释本文使用的一些术语。然后,将描述用于使用本发明的捕获引物捕获和扩增多核苷酸的一些示例组合物和示例方法。

[0038] 术语

[0039] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与本领域的普通技术人员通常理解的含义相同。术语“包括”以及其他形式(诸如“包括(include/includes/included)”)的使用不是限制性的。术语“具有”以及其他形式(诸如“具有(have/has/had)”)的使用不是限制性的。如本说明书中所用,无论是在过渡短语中还是在权利要求的正文中,术语“包含(comprise(s))”和“包含(comprising)”都将被解释为具有开放式含义。即,上述术语应与短语“至少具有”或“至少包括”同义地解释。例如,当在过程的上下文中使用时,术语“包含”表示该过程至少包括所列举的步骤,但是也可包括额外步骤。当在化合物、组合物或设备的上下文中使用时,术语“包含”是指该化合物、组合物或设备至少包含所列举的特征或组分,但是也可包含额外特征或组分。

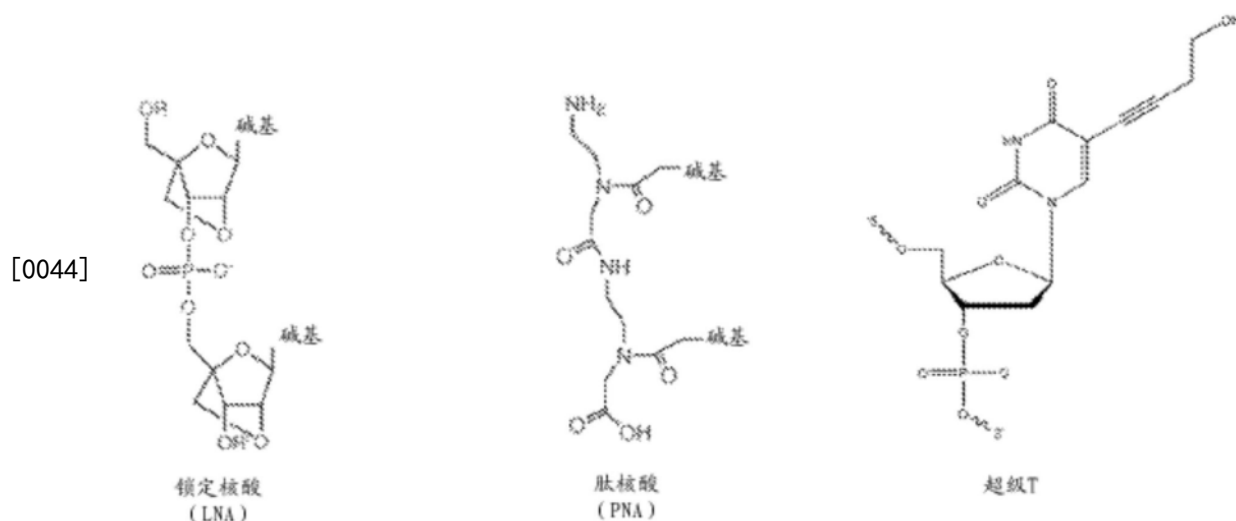
[0040] 在本说明书通篇中使用的术语“基本上”、“大致”和“约”用于描述和说明小的波动,诸如由于处理中的变化所引起的小的波动。例如,它们可指小于或等于 $\pm 10\%$,诸如小于或等于 $\pm 5\%$,诸如小于或等于 $\pm 2\%$,诸如小于或等于 $\pm 1\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.5\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.2\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.1\%$,诸如小于或等于 $\pm 0.05\%$ 。

[0041] 如本文所用,“杂交”旨在表示沿那些多核苷酸的长度使第一多核苷酸非共价缔合到第二多核苷酸以形成双链的“双链体”。例如,两个DNA多核苷酸链可以通过互补碱基配对

缔合。第一多核苷酸与第二多核苷酸之间的缔合强度随着这些多核苷酸内的核苷酸序列之间的互补性而增加。多核苷酸之间的杂交强度可通过熔融温度 (T_m) 来表征,在该熔融温度下,50%的双链体具有彼此解离的多核苷酸链。彼此“部分”杂交的多核苷酸是指它们具有彼此互补的序列,但是此类序列仅沿它们的长度的一部分彼此杂交以形成部分双链体。“不能”杂交的多核苷酸包括彼此物理分离的那些多核苷酸,使得它们的碱基的数量不够以彼此杂交的方式彼此接触。

[0042] 如本文所用,术语“核苷酸”旨在表示包含糖部分、包括至少一个磷酸基团的主链组分,并且在一些示例中还包括核碱基的分子。缺乏核碱基的核苷酸可称为“无碱基的”。核苷酸包括脱氧核糖核苷酸、经修饰的脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核糖核苷酸、肽核苷酸、经修饰的肽核苷酸、经修饰的磷酸糖主链核苷酸,以及它们的混合物。核苷酸的示例包括腺苷一磷酸 (AMP)、腺苷二磷酸 (ADP)、腺苷三磷酸 (ATP)、胸苷一磷酸 (TMP)、胸苷二磷酸 (TDP)、胸苷三磷酸 (TTP)、胞苷一磷酸 (CMP)、胞苷二磷酸 (CDP)、胞苷三磷酸 (CTP)、鸟苷一磷酸 (GMP)、鸟苷二磷酸 (GDP)、鸟苷三磷酸 (GTP)、尿苷一磷酸 (UMP)、尿苷二磷酸 (UDP)、尿苷三磷酸 (UTP)、脱氧腺苷一磷酸 (dAMP)、脱氧腺苷二磷酸 (dADP)、脱氧腺苷三磷酸 (dATP)、脱氧胸苷一磷酸 (dTMP)、脱氧胸苷二磷酸 (dTDP)、脱氧胸苷三磷酸 (dTTP)、脱氧胞苷二磷酸 (dCDP)、脱氧胞苷三磷酸 (dCTP)、脱氧鸟苷一磷酸 (dGMP)、脱氧鸟苷二磷酸 (dGDP)、脱氧鸟苷三磷酸 (dGTP)、脱氧尿苷一磷酸 (dUMP)、脱氧尿苷二磷酸 (dUDP) 和脱氧尿苷三磷酸 (dUTP)。

[0043] 如本文所用,术语“核苷酸”还旨在包括任何“核苷酸类似物”,该核苷酸类似物旨在指与天然存在的核苷酸相比,包含经修饰的核碱基、糖部分和/或主链组分(诸如磷酸酯或酰胺)的一类核苷酸。核苷酸类似物还可称为“经修饰的核酸”。示例性经修饰的核碱基包括肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤、异胞嘧啶、异鸟嘌呤、2-氨基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、2-氨基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鸟嘌呤、2-丙基鸟嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、2-硫胞嘧啶、15-卤尿嘧啶、15-卤胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、8-卤代腺嘌呤或鸟嘌呤、8-氨基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-巯基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-硫代烷基腺嘌呤或鸟嘌呤、8-羟基腺嘌呤或鸟嘌呤、5-卤代尿嘧啶或胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤、8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、7-脱氮腺嘌呤、3-脱氮鸟嘌呤、3-脱氮腺嘌呤等。如本领域已知的,某些核苷酸类似物无法掺入多核苷酸中,例如核苷酸类似物,诸如腺苷5'-磷酸硫酸。核苷酸的主链组分可包括任何合适数量的磷酸根,例如三个、四个、五个、六个或多于六个磷酸根。核苷酸类似物还包括锁定核酸 (LNA)、肽核酸 (PNA) 和5-羟基丁炔-2'-脱氧尿苷(“超级T”)。LNA包括RNA样主链,其中核糖部分包括连接2'氧和4'碳的另外的桥。PNA包括主链,该主链包括通过肽键连接的重复N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元和经由亚甲基桥和羰基基团偶联到主链的核碱基。超级T包括5-羟基丁炔-2'-脱氧尿苷核碱基。LNA、PNA和超级T的示例结构如下所示:



[0045] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指包含彼此结合的核苷酸序列的分子。多核苷酸是聚合物的一个非限制性示例。多核苷酸的示例包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)和它们的类似物,诸如锁定核酸(LNA)和肽核酸(PNA)。多核苷酸可以是核苷酸的单链序列(诸如RNA或单链DNA)、核苷酸的双链序列(诸如双链DNA),或者可包括核苷酸的单链序列和双链序列的混合物。双链DNA(dsDNA)包括基因组DNA,以及PCR和扩增产物。可以将单链DNA(ssDNA)转化为dsDNA,并且反之亦然。多核苷酸可包括非天然存在的DNA,诸如对映异构的DNA、LNA或PNA。多核苷酸中的核苷酸的精确序列可以是已知的或未知的。以下是多核苷酸的示例:基因或基因片段(例如,探针、引物、经表达的序列标签(EST)或基因表达系列分析(SAGE)标签)、基因组DNA、基因组DNA片段、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、合成多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针、核酸引物或任一前述多核苷酸的扩增拷贝。多核苷酸可具有“嵌合体”结构,该结构包括不同类型的多核苷酸的邻接部分,诸如DNA和RNA的邻接部分、DNA和PNA的邻接部分或PNA和RNA的邻接部分等。

[0046] 如本文所用,“聚合酶”旨在表示具有通过将核苷酸聚合至多核苷酸中来组装多核苷酸的活性位点的酶。聚合酶可结合经引发的单链靶多核苷酸,并且可顺序地将核苷酸添加到生长的引物,以形成具有与该靶多核苷酸的序列互补的序列的“互补拷贝”多核苷酸。然后,另一种聚合酶或相同的聚合酶可通过形成该互补拷贝多核苷酸的互补拷贝来形成该靶核苷酸的拷贝。此类拷贝中的任一个拷贝在本文中可称为“扩增子”。DNA聚合酶可结合到靶多核苷酸,并且然后向下移动靶多核苷酸,从而顺序地将核苷酸添加到生长的多核苷酸链(生长扩增子)的3'端处的游离羟基。DNA聚合酶可从DNA模板合成互补DNA分子,并且RNA聚合酶可从DNA模板合成RNA分子(转录)。聚合酶可使用短RNA或DNA链(引物)来开始链生长。一些聚合酶可置换位点上游的链,在那里它们将碱基添加到链中。此类聚合酶可称为链置换,是指它们具有从聚合酶读取的模板链去除互补链的活性。具有链置换活性的示例性聚合酶包括但不限于Bst(嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*))聚合酶、exo-Klenow聚合酶或测序级T7 exo-聚合酶的大片段。一些聚合酶降解它们前面的链,有效地用后面生长的链置换该前面的链(5'核酸外切酶活性)。一些聚合酶具有降解它们后面的链的活性(3'核酸外切酶活性)。一些有用的聚合酶已经通过突变或以其他方式进行修饰以减少或消除3'和/或5'核酸外切酶活性。

[0047] 如本文所用,术语“引物”定义为可通过游离3'OH基团向其添加核苷酸的多核苷酸。引物可包括3'封闭基团,该封闭基团能够防止聚合直到去除该封闭基团为止。引物可包括在5'末端处的修饰以允许偶联反应或使该引物偶联到另一部分。引物可包括一个或多个部分,诸如8-氧代鸟嘌呤(8-oxo-G),该一个或多个部分可在合适的条件(诸如UV光、化学、酶等)下裂解。引物长度可以是任何合适数量的碱基长度并且可包括天然核苷酸和非天然核苷酸的任何合适组合。靶多核苷酸可包括与引物杂交的“接头”(具有与引物互补的序列),并且可通过向引物的游离3'OH基团添加核苷酸来扩增以便生成互补拷贝多核苷酸。“捕获引物”旨在表示偶联到底物并且可与靶多核苷酸的第一接头杂交的引物,而“正交捕获引物”旨在表示偶联到底物并且可与该靶多核苷酸的第二接头杂交的引物。第一接头可具有与捕获引物的序列互补的序列,并且第二接头可具有与正交捕获引物的序列互补的序列。捕获引物和正交捕获引物可具有彼此不同且独立的序列。另外,捕获引物和正交捕获引物可在至少一种其他特性中彼此不同。例如,捕获引物和正交捕获引物可具有彼此不同的长度;捕获引物或正交捕获引物可包括该捕获引物或该正交捕获引物中的另一者缺乏的非核酸部分(诸如封闭基团或切除部分);或此类特性的任何合适组合。“经修饰的捕获引物”是捕获引物或正交捕获引物,其包括多个核酸类似物,诸如但不限于LNA、PNA或超级T。经修饰的捕获引物另外可包括多个天然存在的核酸,诸如但不限于DNA。

[0048] 如本文所用,术语“基底”是指用作本文所述的组合物的载体的材料。示例性基底材料可包括玻璃、二氧化硅、塑料、石英、金属、金属氧化物、有机硅酸盐(例如,多面体有机倍半硅氧烷(POSS))、聚丙烯酸酯、氧化钽、互补金属氧化物半导体(CMOS),或它们的组合。POSS的示例可以是Kehagias等人在Microelectronic Engineering 86(2009)第776-778页中所述的POSS,该文献以引用方式全文并入。在一些示例中,本申请中使用的基底包括基于二氧化硅的基底,诸如玻璃、熔融二氧化硅或其他含二氧化硅的材料。在一些示例中,底物可包括硅、氮化硅或四氢化硅。在一些示例中,本申请中使用的基底包含塑料材料或组分,诸如聚乙烯、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、聚丙烯、尼龙、聚酯、聚碳酸酯和聚(甲基丙烯酸甲酯)。示例性塑料材料包括聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚苯乙烯和环状烯烃聚合物基底。在一些示例中,基底是或包含基于硅石的材料或塑料材料,或它们的组合。在特定示例中,基底具有包含玻璃或硅基聚合物的至少一个表面。在一些示例中,底物可包括金属。在一些此类示例中,金属是金。在一些示例中,基底具有包含金属氧化物的至少一个表面。在一个示例中,表面包括氧化钽或氧化锡。丙烯酰胺、烯酮或丙烯酸酯也可以用作基底材料或组分。其他底物材料可包括但不限于砷化镓、磷化铟、铝、陶瓷、聚酰亚胺、石英、树脂、聚合物和共聚物。在一些示例中,底物和/或底物表面可以是石英或包括石英。在一些其他示例中,底物和/或底物表面可以是半导体或包括半导体,诸如GaAs或ITO。前述列表旨在说明但不限于本申请。底物可包括单一材料或多种不同材料。底物可以是复合物或层合物。在一些示例中,基底包括有机硅酸盐材料。底物可以是平坦的、圆形的、球形的、棒状的或任何其他合适形状。基底可以是刚性的或柔性的。在一些示例中,基底是珠粒或流通池。

[0049] 在一些示例中,底物包括图案化表面。“图案化表面”是指在底物的暴露层中或该暴露层上的不同区域的布置。例如,这些区域中的一个或多个区域可以是存在一种或多种捕获引物的特征部。特征部可由不存在捕获引物的间隙区域隔开。在一些示例中,图案可以是呈行和列形式的特征部的x-y格式。在一些示例中,图案可以是特征部和/或间隙区域的

重复布置。在一些示例中,图案可以是特征部和/或间隙区域的随机布置。在一些示例中,底物在表面中包括孔(凹陷)的阵列。孔可由基本上竖直的侧壁提供。孔可如本领域通常已知的那样使用多种技术来制造,这些技术包括但不限于光刻法、压印技术、模制技术和微蚀刻技术。本领域的技术人员将会知道,所使用的技术将取决于阵列基板的组成和形状。

[0050] 底物的图案化表面上的特征部可包括在具有图案化的共价连接的凝胶的玻璃、硅、塑料或其他合适材料上的孔阵列(例如,微孔或纳米孔)中的孔,该凝胶诸如聚(N-(5-叠氮基乙酰氨基戊基)丙烯酸胺-共-丙烯酸胺)(PAZAM)。该方法产生用于测序的凝胶垫,该凝胶垫在具有大量循环的测序运行中可以是稳定的。聚合物与孔的共价连接可有助于在多种用途期间在结构化底物的整个寿命期间将凝胶保持在结构化特征部中。然而,在许多示例中,凝胶无需共价连接到孔。例如,在一些条件下,未共价附接到结构化底物的任何部分的不含硅烷的丙烯酸胺(SFA)可用作凝胶材料。

[0051] 在特定示例中,结构化底物可通过以下方法来制备:将合适材料图案化为具有孔(例如,微孔或纳米孔),用凝胶材料(例如,PAZAM、SFA或其化学改性的变体,诸如SFA的叠氮化版本(叠氮-SFA))涂覆图案化材料,并且例如通过化学或机械抛光来抛光已涂覆凝胶的材料表面,从而将凝胶保持在孔中,而从孔之间的结构化底物的表面上的间隙区域去除基本上所有凝胶或使基本上所有凝胶失活。引物可附接到凝胶材料。然后可使包括多个靶多核苷酸(例如,片段化的人基因组或其部分)的溶液与已抛光的底物接触,使得单个靶多核苷酸将通过与附接到凝胶材料的引物的相互作用而接种到单个孔中;然而,由于不存在凝胶材料或该凝胶材料失活,靶多核苷酸将不占用间隙区域。靶多核苷酸的扩增将被限制在孔中,因为间隙区域中不存在凝胶或凝胶失活可抑制生长的簇向外迁移。该过程是可制造方便地的且具有可扩展性的,并且利用常规的微米或纳米制造方法。

[0052] 图案化底物可包括例如蚀刻到载玻片或芯片中的孔。孔的蚀刻图案和几何形状可采取各种不同的形状和大小,并且此类特征部可彼此物理上或功能上分离。具有此类结构化特征部的特别有用的底物包括可选择固体颗粒(诸如微球)的大小的图案化底物。具有这些特征的示例性图案化底物是与小珠阵列技术(Illumina有限公司, San Diego, Calif.)结合使用的蚀刻底物。

[0053] 在一些示例中,本文所述的基底形成流通池的至少一部分或位于流通池中或偶联至流通池。流通池可以包括分成多个泳道或多个扇区的流动室。可用于本文所阐述的方法和组合物中的示例性流通池和用于制造这些流通池的底物包括但不限于可从Illumina有限公司(San Diego, Calif.)商购获得的那些流通池和底物。

[0054] 如本文所用,当参考覆盖底物的表面的层使用时,术语“直接”等旨在表示该层覆盖底物的表面而没有明显的中间层,诸如例如粘合层或聚合物层。直接覆盖表面的层可通过任何化学或物理相互作用(包括共价键或非共价粘附)附接到该表面。

[0055] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“固定”旨在表示通过共价键或非共价键直接或间接附接到底物。在某些示例中,可使用共价附接或任何其他合适附接,其中多核苷酸旨在使用底物的条件下(例如在多核苷酸扩增或测序中)保持固定或附接到底物。待用作捕获引物或用作靶多核苷酸的多核苷酸可被固定,使得3'-端可用于酶促延伸,并且序列的至少一部分能够与互补序列杂交。固定可通过与表面附接的寡核苷酸杂交而发生,在这种情况下,所固定的寡核苷酸或多核苷酸可处于3'-5'取向。替代地,固定可通过除碱基

配对杂交之外的方式(诸如共价附接)发生。说明性地,化学官能团可经由化学接头并入本发明的捕获引物中的一者的5'端。捕获引物上的化学官能团能够经由一种或多种非共价相互作用(例如,静电、金属-配体结合、杂交等)或共价相互作用(例如,铜点击化学反应、无铜点击化学反应等)的任何合适组合附接到底物表面。

[0056] 如本文所用,术语“阵列”是指可根据相对位置彼此区分的一组底物区域。位于阵列的不同区域处的不同分子(诸如多核苷酸)可根据这些区域在该阵列中的位置而彼此区分。阵列的单个区域可包括一种或多种特定类型的分子。例如,底物区域可包括具有特定序列的单个靶多核苷酸,或底物区域可包括具有相同序列(或其互补序列)的若干多核苷酸。阵列的区域可分别包括相同底物上的彼此不同的特征部。示例性特征包括但不限于基板中的孔、基板中或基板上的小珠(或其他颗粒)、基板的突出部、基板上的脊或基板中的通道。阵列的区域可分别包括彼此不同的底物上的不同区域。可根据底物在与底物相关联的表面上的位置,或者根据底物在液体或凝胶中的位置,来识别附接到单独底物的不同分子。其中单独的基板位于表面上的示例性阵列包括但不限于在孔中具有小珠的那些阵列。

[0057] 如本文所用,术语“多个”旨在表示两个或更多个不同成员的组。多个的大小范围可从小、中、大到非常大。小多个的大小范围可例如从几个成员到几十个成员。中多个的大小范围可例如从几十个成员到约100个成员或几百个成员。大多个的范围可例如从约几百个成员到约1000个成员、到几千个成员和高达几万个成员。非常大多个的范围可例如从几万个成员到约几十万、一百万、几百万、几千万和高达或超过几亿个成员。因此,多个的以成员数量来测量的大小范围可从两个到远远超过一亿个成员,以及在上述示例性范围之间和超过上述示例性范围的所有大小。示例性多核苷酸的多个包括例如约 1×10^5 或更多、 5×10^5 或更多或者 1×10^6 或更多个不同的多核苷酸。因此,术语的定义旨在包括大于两个的所有整数值。可例如通过样品中多核苷酸序列的理论多样性来设置多个的上限。

[0058] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“双链”旨在表示多核苷酸中的所有核苷酸或基本上所有核苷酸都与互补多核苷酸中的相应核苷酸氢键合。“部分”双链多核苷酸可具有其与互补多核苷酸中的核苷酸氢键合的至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约95%的核苷酸,但少于其与互补多核苷酸中的核苷酸氢键合的所有核苷酸。

[0059] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“单链”是指多核苷酸中的核苷酸基本上都没有与互补多核苷酸中的相应核苷酸氢键合。“不能”与另一多核苷酸杂交的多核苷酸可以是单链的。

[0060] 如本文所用,术语“靶多核苷酸”旨在表示作为分析或动作的目的的多核苷酸,并且还可称为“文库多核苷酸”、“模板多核苷酸”或“文库模板”。该分析或作用包括使多核苷酸进行捕获、扩增、测序和/或其他程序。靶多核苷酸可包括除待分析的靶序列之外的核苷酸序列。例如,靶多核苷酸可包括一个或多个接头,包括充当位于待分析的靶多核苷酸序列侧翼的引物结合位点的接头。与捕获引物杂交的靶多核苷酸可包括以并非所有靶多核苷酸都易于延伸的方式来延伸超过捕获寡核苷酸的5'端或3'端的核苷酸。在特定示例中,靶多核苷酸可具有彼此不同的序列,但是可具有彼此相同的第一接头和第二接头。可位于特定靶多核苷酸序列侧翼的两个接头可具有彼此相同的序列,或彼此互补的序列,或者这两个接头可具有不同的序列。因此,多个靶多核苷酸中的种类可包括已知序列的区域,该区域位

于将通过例如测序(例如,SBS)来评估的未知序列区域的侧翼。在一些示例中,靶多核苷酸在单个末端携带接头,并且此类接头可位于靶多核苷酸的3'端或5'端。可在没有任何接头的情况下使用靶多核苷酸,在这种情况下,引物结合序列可直接源自靶多核苷酸中发现的序列。

[0061] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”在本文中可互换使用。除非以其他方式具体指示,否则不同的术语不旨在表示大小、序列或其他特性中的任何特定差异。为了描述的清楚起见,术语可用于在描述包括若干多核苷酸种类的特定方法或组合物时区分一种多核苷酸种类与另一种多核苷酸种类。

[0062] 如本文所用,当参考多核苷酸使用时,术语“扩增子”旨在表示拷贝该多核苷酸的产物,其中该产物具有与该多核苷酸的核苷酸序列的至少一部分基本上相同或基本上互补的核苷酸序列。“扩增”(Amplification/amplifying)是指制备多核苷酸的扩增子的过程。靶多核苷酸的第一扩增子可以是互补拷贝。额外扩增子是在生成第一扩增子后,由靶多核苷酸或由第一扩增子形成的拷贝。后续的扩增子可具有与靶多核苷酸基本上互补或与靶多核苷酸基本上相同的序列。应当理解,多核苷酸的少量突变(例如,由于扩增假象)可在生成该多核苷酸的扩增子时发生。

[0063] 基本上仅包括给定多核苷酸的扩增子的底物区域可称为“单克隆的”,而包括具有彼此不同序列的多核苷酸的扩增子的底物区域可称为“多克隆的”。底物的多克隆区域可包括其中分别是单克隆的不同子区域。每个此类单克隆区域,无论在较大的多克隆区域内还是单独存在,都可相当于从“种子”生成的“簇”。“种子”可指单个靶多核苷酸,而“簇”可指该靶多核苷酸的扩增子的集合。

[0064] 用于捕获和扩增多核苷酸的组合物和方法

[0065] 本文提供的示例涉及使用经修饰的捕获引物捕获和扩增多核苷酸的组合物和方法,这些经修饰的捕获引物可在减少或抑制基于溶液的退火的条件下使用,同时允许经修饰的捕获引物从溶液中捕获靶多核苷酸。相比之下,先前已知的捕获引物可在其中基于溶液的退火与从溶液中捕获靶多核苷酸竞争的条件下使用,并且此类竞争减少了用于捕获的靶多核苷酸的可用性。

[0066] 例如,图2A至图2C示意性地示出了用于使用先前已知的捕获引物在底物上捕获多核苷酸的工艺流程中的组合物和操作。图2A中所示的组合物2000包含具有捕获引物231和与其偶联的正交捕获引物232的底物200,以及含有靶多核苷酸(例如,旨在使用边合成边测序(SBS)捕获、扩增和测序的多核苷酸)的流体(溶液)。靶多核苷酸可包括双链体(说明性地,双链体D1、D2和D3)或可以双链体的形式提供,这些双链体在具有彼此互补的序列的靶多核苷酸之间。例如,双链体D1可包括:第一靶多核苷酸,该第一靶多核苷酸包括序列211、第一接头221和第二接头222;和第二靶核苷酸,该第二靶核苷酸与第一靶多核苷酸互补,例如包括互补序列211'、第一互补接头221'和第二互补接头222'。类似地,双链体D2可包括:第一靶多核苷酸,该第一靶多核苷酸包括序列212、第一接头221和第二接头222;和第二靶核苷酸,该第二靶核苷酸与第一靶多核苷酸互补,例如包括互补序列212'、第一互补接头221'和第二互补接头222'。类似地,双链体D3可包括:第一靶多核苷酸,该第一靶多核苷酸包括序列213、第一接头221和第二接头222;和第二靶核苷酸,该第二靶核苷酸与第一靶多核苷酸互补,例如包括互补序列212'、第一互补接头221'和第二互补接头222'。序列211、

212和213可彼此不同,并且可期望使用SBS确定那些序列。第一接头221可与捕获引物231互补,以便能够在合适的条件下与其杂交,并且第二接头222可与正交捕获引物232互补,以便能够在合适的条件下与其杂交。尽管未具体说明,但是每个捕获引物231或每个正交捕获引物232可包括可裂解部分,诸如8-氧代鸟嘌呤(8-oxo-G)。

[0067] 捕获引物231可例如是P5捕获引物,并且正交捕获引物232可例如是P7捕获引物。可从Illumina有限公司(San Diego, CA)商购获得的P5捕获引物具有序列5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'(SEQ ID NO:1)。也可从Illumina有限公司商购获得的P7捕获引物具有序列5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'(SEQ ID NO:2)。第一接头221可以是例如互补P5接头(cP5),并且第二接头222可以是例如互补P7接头(cP7)。可从Illumina有限公司(San Diego, CA)商购获得的互补P5接头具有序列5'-TCGGTGGTCGCGTATCATT-3'(SEQ ID NO:3)。可从Illumina有限公司(San Diego, CA)商购获得的互补P7接头可具有序列5'-TCGTATGCCGTCTTCTGCTTG-3'(SEQ ID NO:4)。

[0068] 在试图捕获底物200上的靶多核苷酸以供稍后扩增和测序之前,双链体D1、D2和D3以诸如图2B所示的方式熔融,以便获得具有第一接头221和第二接头222的单链靶多核苷酸,这些第一接头可用于与捕获引物231杂交,这些第二接头可用于与正交捕获引物232杂交。例如,可通过改变其中设置有双链体D1、D2和D3的溶液的温度和/或组成来执行此类熔融。例如,双链体D1、D2和D3可暴露于溶液中足够量的甲酰胺,例如约1%至100%的甲酰胺(%v/v),或约5%至约80%的甲酰胺(%v/v),或约10%至约50%的甲酰胺(%v/v),或约1%至约20%的甲酰胺(%v/v),以使双链体在当前溶液温度下解离。另外或替代地,在当前溶液组成下,溶液的温度可增加到双链体的熔融温度(T_m)以上。应当理解,双链体的特定 T_m 可取决于溶液的组成(例如,盐(Na^+)浓度和甲酰胺浓度(如果有的话))以及双链体中多核苷酸的长度和序列。

[0069] 在将双链体D1、D2和D3熔融(诸如参考图2B所述)之后,第一接头221可用于与捕获引物231杂交,并且第二接头222可用于与正交捕获引物232杂交。然而,引起这种熔融的溶液和温度条件还可抑制第一接头221与捕获引物231杂交,并且可抑制第二接头222与正交捕获引物232杂交。为了促进此类杂交并且因此促进靶多核苷酸在底物200上的捕获,可改变其中再次设置靶多核苷酸的溶液的温度和/或组成。例如,可在当前溶液温度下,从溶液中去掉足够量的甲酰胺。另外或替代地,在当前溶液组成下,溶液的温度可降低到(a)第一接头221和捕获引物231与(b)第二接头222和正交捕获引物232之间的双链体的熔融温度(T_m)以下。

[0070] 在图2C所示的非限制性示例中,这种条件(例如溶液温度和/或组成)的另外变化促进了与序列211偶联的第二接头222和捕获引物232中的一者之间的杂交;以及与序列213偶联的第一接头221和捕获引物231中的一者之间的杂交。然而,这种条件的另外变化也有助于溶液中靶多核苷酸之间的退火。例如,分别包含彼此互补的序列的第一靶多核苷酸和第二靶多核苷酸可沿它们的长度彼此重新退火,说明性地,诸如沿它们的长度再退火以重新形成双链体D2的序列212和212'。另外,包括彼此不互补的序列的第一靶多核苷酸和第二靶多核苷酸可彼此部分退火,例如在接头221和221'处,并且在接头222和222'处,说明性地,诸如基本上仅在它们的接头处退火以诸如以图2C所示的方式形成双链体D4的非互补序列214和211'。在溶液中退火以形成双链体的靶多核苷酸,说明性地,在图2C所示的非限制

性示例中包括序列212和214的靶多核苷酸不可用于与捕获引物231或正交捕获引物232杂交,并且因此可能不被捕获,更不用说扩增或测序。

[0071] 相比之下,本发明的经修饰的捕获引物可在溶液中基本上可能不发生退火的条件下与靶多核苷酸的接头杂交,例如,在溶液中基本上可能不发生退火的盐浓度、甲酰胺含量和/或温度下进行。因此,靶多核苷酸基本上可能不会在此类溶液中退火以形成双链体,并且因此可保持用于与本发明的捕获引物杂交,随后它们可进行扩增和测序或根据需要以其他方式使用。另外,在溶液中抑制靶多核苷酸与捕获引物或接头的任何非特异性或非生产性杂交的条件下,本发明的经修饰的捕获引物可与靶多核苷酸的接头杂交,并且因此可预期基本上所有杂交事件将是生产性的并且将导致可被测序的双链体。

[0072] 图3A至图3H示意性地示出了使用本发明的捕获引物在底物上捕获和扩增多核苷酸的示例工艺流程中的示例组合物和操作。图3A中所示的组合物3000包含具有捕获引物331和与其偶联的正交捕获引物332的底物300,以及含有靶多核苷酸(例如,旨在使用边合成边测序(SBS)捕获、扩增和测序的多核苷酸)的流体(溶液)。靶多核苷酸可包括双链体(说明性地,双链体D5、D6和D7)或可以双链体的形式提供,这些双链体在具有彼此互补的序列的靶多核苷酸之间。例如,以类似于参考图2A所述的方式,双链体D5可包括:第一靶多核苷酸,该第一靶多核苷酸包括序列311、第一接头321和第二接头322;和第二靶核苷酸,该第二靶核苷酸与第一靶多核苷酸互补,例如包括互补序列311'、第一互补接头321'和第二互补接头322'。类似地,双链体D6可包括:第一靶多核苷酸,该第一靶多核苷酸包括序列312、第一接头321和第二接头322;和第二靶核苷酸,该第二靶核苷酸与第一靶多核苷酸互补,例如包括互补序列312'、第一互补接头321'和第二互补接头322'。类似地,双链体D7可包括:第一靶多核苷酸,该第一靶多核苷酸包括序列313、第一接头321和第二接头322;和第二靶核苷酸,该第二靶核苷酸与第一靶多核苷酸互补,例如包括互补序列312'、第一互补接头321'和第二互补接头322'。序列311、312和313可彼此不同,并且可期望使用SBS确定那些序列。第一接头321可与捕获引物331互补,以便能够在合适的条件下进行杂交,并且第二接头322可与经修饰的正交捕获引物332互补,以便能够在合适的条件下与其杂交。

[0073] 捕获引物331中的每一者可包括多个核酸,与第一接头321和互补第一接头321'之间的双链体的 T_m 相比,该多个核酸增加了捕获引物331和第一接头321之间的双链体的 T_m 。例如,捕获引物331的经修饰的核酸可包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T,与第一接头321和互补第一接头321'之间的双链体的 T_m 相比,其中的每一者可预期增加了捕获引物331和第一接头321之间双链体的 T_m 。捕获引物331进一步可包括DNA。经修饰的核酸和DNA可分布在捕获引物的5'端和3'端之间。例如,捕获引物331的序列可包括一个或多个DNA分子,随后是一个或多个经修饰的核酸,随后是一个或多个DNA分子,随后是一个或多个经修饰的核酸,以此类推。替代地,经修饰的核酸可设置在捕获引物的5'端,并且DNA设置在捕获引物的3'端,例如以诸如下文参考图4所述的方式。尽管未具体说明,但是每个捕获引物331还可包括可裂解部分,诸如8-氧代鸟嘌呤(8-oxo-G)。

[0074] 类似地,正交捕获引物332中的每一者可包括多个经修饰的核酸,与第二接头322和互补第二接头322'之间的双链体的 T_m 相比,该多个经修饰的核酸增加了正交捕获引物332和第二接头322之间的双链体的 T_m 。例如,正交捕获引物332的经修饰的核酸可包括锁定核酸(LNA)、肽核酸(PNA)或超级T,与第二接头322和互补第二接头322'之间的双链体的 T_m

相比,其中的每一者可预期增加了正交捕获引物332和第二接头322之间双链体的 T_m 。正交捕获引物332进一步可包括脱氧核糖核酸(DNA)。经修饰的核酸和DNA可分布在正交捕获引物的5'端和3'端之间。例如,正交捕获引物332的序列可包括一个或多个DNA分子,随后是一个或多个经修饰的核酸,随后是一个或多个DNA分子,随后是一个或多个经修饰的核酸,以此类推。替代地,经修饰的核酸可设置在捕获引物的5'端,并且DNA设置在捕获引物的3'端,例如以诸如下文参考图4所述的方式。尽管未具体说明,但是每个正交捕获引物332还可包括可裂解部分,诸如8-氧代鸟嘌呤(8-oxo-G)。

[0075] 注意,捕获引物331的经修饰的核酸可以是但不必必须是正交捕获引物332的相同类型的经修饰的核酸。说明性地,捕获引物331和正交捕获引物332可包括LNA;捕获引物331和正交捕获引物332可包括PNA;或者捕获引物331和正交捕获引物332可包括超级T。替代地,捕获引物331可包括LNA,而正交捕获引物332可包括PNA或超级T;捕获引物331可包括PNA,而正交捕获引物332可包括LNA或超级T;或者捕获引物331可包括超级T,而正交捕获引物332可包括LNA或PNA。在其他示例中,正交捕获引物332可包括LNA,而捕获引物331可包括PNA或超级T;正交捕获引物332可包括PNA,而捕获引物331可包括LNA或超级T;或者正交捕获引物332可包括超级T,而捕获引物331可包括LNA或PNA。

[0076] LNA与DNA非常相似,唯一的变化是连接2'和4'碳的接头。PNA与具有羧酸基团和氨基的多肽结构类似。超级T包括具有丁炔基团的经修饰的胸苷碱基。在LNA和超级T碱基修饰的情况下,与DNA/DNA双链体(321-321'或322-322')相比,分子结构和较强碱基堆积的增加的刚性可增加双链体相互作用(321-331或322-332)的结合能量。另一方面,与DNA/DNA双链体(321-321'或322-322')相比,含有不带电PNA的双链体(321-331或322-332)的熔点可能会由于静电排斥的降低而升高。当捕获引物序列被修饰成包括此类经修饰的核酸时,可使表面/溶液双链体(321-331或322-332)之间的熔点显著高于溶液/溶液DNA双链体(321-321'或322-322')的熔点。这允许在不允许溶液中接头再退火的一组条件(例如,盐浓度、甲酰胺浓度和温度)下接种靶多核苷酸311、312、313。因此,可接种靶多核苷酸311、312、313,其中基本上没有来自接头重新退火的损失,诸如参考图2C所述。

[0077] 在试图捕获底物300上的靶多核苷酸以供稍后扩增和测序之前,双链体D5、D6和D7以诸如图3B所示的方式熔融,以便获得具有第一接头321和第二接头322的单链靶多核苷酸,这些第一接头可用于与捕获引物331杂交,这些第二接头可用于与正交捕获引物332杂交。以类似于参考图2B所述的方式,例如,可通过改变其中设置有双链体D5、D6和D7的溶液的温度和/或组成来执行此类熔融。例如,双链体D5、D6和D7可暴露于溶液中足够量的甲酰胺,例如约1%至100%的甲酰胺(%v/v),或约5%至约80%的甲酰胺(%v/v),或约10%至约50%的甲酰胺(%v/v),或约1%至约20%的甲酰胺(%v/v),以使双链体在当前溶液温度下解离。另外或替代地,在当前溶液组成下,溶液的温度可增加到双链体的熔融温度(T_m)以上。应当理解,双链体的特定 T_m 可取决于溶液的组成(例如,盐(Na^+)浓度和甲酰胺浓度(如果有的话))以及双链体中多核苷酸的长度和序列。

[0078] 以如图3C所示的方式,在用于熔融双链体D5、D6和D7的相同条件下,在将双链体D5、D6和D7熔融(诸如参考图3B所述)之后,第一接头321可与捕获引物331杂交,并且第二接头322可与正交捕获引物332杂交。即,引起这种熔融的溶液和温度条件可能无法抑制第一接头321与捕获引物331杂交,并且可能无法抑制第二接头322与正交捕获引物332杂交。相

反,此类条件可抑制接头321和互补接头321'之间的任何退火以及接头322和互补接头322'之间的任何重新退火,并且因此可抑制任何双链体的形成,诸如参考图2C所述。因此,靶多核苷酸中的每一者可保持用于捕获,并且可在底物上捕获,而不必改变用于熔融双链体D5、D6和D7的条件,例如,不必降低甲酰胺的浓度并且不必降低溶液温度。

[0079] 在图3C所示的非限制性示例中,在抑制溶液中靶多核苷酸之间的退火的条件下,靶多核苷酸中的一些靶多核苷酸的第一接头321与捕获引物331中的相应捕获引物杂交以形成第一双链体,并且靶多核苷酸的一些靶多核苷酸的第二接头322与正交捕获引物332中的相应正交捕获引物杂交以形成第二双链体。第一双链体和第二双链体各自可具有的熔融温度(T_m)大于第三双链体的 T_m ,这些第三双链体将通过第二靶多核苷酸和第一靶多核苷酸中的与第二靶多核苷酸互补的相应第一靶多核苷酸杂交形成。说明性地,与序列312偶联的第一接头321与捕获引物331中的一者杂交以形成双链体D8;与序列311偶联的第二接头322与正交捕获引物332中的一者杂交以形成双链体D9;并且与序列313偶联的第二接头322与正交捕获引物332中的一者杂交以形成双链体D10。

[0080] 第一接头321和捕获引物331之间的双链体的 T_m 可大于第一接头321和互补第一接头321'之间的双链体的 T_m ,例如,可超过第一接头321和互补第一接头321'之间的双链体的 T_m 至少约5°C、至少约10°C、至少约15°C、至少约20°C或至少约25°C。类似地,第二接头322和正交捕获引物332之间的双链体的 T_m 可大于第二接头322和互补第二接头322'之间的双链体的 T_m ,例如,可超过第一接头321和互补第一接头321'之间的双链体的 T_m 至少约5°C、至少约10°C、至少约15°C、至少约20°C或至少约25°C。因此,在低于第一接头321和捕获引物331之间的双链体的 T_m ,以及低于第二接头322和正交捕获引物332之间的双链体的 T_m ,以及高于第一接头321和互补第一接头321'之间的双链体的 T_m ,以及高于第二接头322和互补第二接头322'之间的双链体的 T_m 的温度下,靶多核苷酸可适当地在底物300上捕获。

[0081] 说明性地,图3C中所示的双链体D8、D9和D10的 T_m 可大于参考图2A和图2C所述的双链体D1、D2、D3和D4中的任一者的 T_m 。例如,双链体D8、D9和D10各自的熔融温度(T_m)可介于约80°C和约110°C之间,例如介于约85°C和约105°C之间,或介于约90°C和约100°C之间。相比之下,双链体D1、D2、D3和D4的 T_m 可低于约80°C,例如低于约75°C、低于约70°C、低于约65°C或低于约60°C。作为与溶液中接头之间的双链体的 T_m 相比,接头和表面引物之间的双链体的显著不同 T_m 的结果,基本上没有第二靶多核苷酸在溶液中与第一靶多核苷酸中的任一者杂交。因此,双链体D8、D9和D10可在某些条件下容易形成,在这些条件下双链体D1、D2、D3和D4可能不会形成。双链体可在底物300的表面上形成,例如根据泊松分布。尽管未具体示出,但是应当理解,底物300可被图案化,例如,以便限定不同的区域,在这些区域中可分别形成双链体,并且在这些区域中随后可使用扩增形成簇。另外,尽管示出了参考图3A至图3H描述的示例以便建议使用平坦底物,但是显而易见的是,可使用更复杂的底物,例如,包括分别由靶多核苷酸接种的孔并且在其中可形成基本上单克隆的簇。

[0082] 如图3D所示,在参考图3C描述的初始杂交之后,可扩增靶多核苷酸311、312、313中的每一者,以便分别形成相应扩增子311'、312'和313'。在此类扩增之后,靶多核苷酸311、312、313可以诸如图3E中所示的方式去杂交,而扩增子311'、312'和313'保持共价结合到底物300。注意,不一定执行此类去杂交。例如,代替使靶多核苷酸311、312、313去杂交,此类多核苷酸可保持与底物杂交,并且可使用诸如本领域已知的链侵入过程来进一步扩增并且可

称为ExAmp。

[0083] 如图3F中所示,在参考图3D至图3E描述的初始扩增之后,所得扩增子可弯曲以便与底物300上的其他捕获引物或正交捕获引物潜在地杂交。例如,扩增子311'的互补第一接头321'可与捕获引物331中的一者杂交;扩增子312'的互补第二接头322'可与正交捕获引物332中的一者杂交;并且扩增子313'的互补第一接头321'可与捕获引物331中的一者杂交。扩增子的接头和相应捕获引物或正交捕获引物之间的双链体可具有与双链体D8、D9和D10相似或相同的 T_m ,并且因此可保持杂交,以便促进靶多核苷酸的进一步扩增。

[0084] 图3G示出了在另一扩增操作之后的图3F的组合物。可看出,该组合物包含扩增子311'的额外扩增子311;扩增子312'的额外扩增子312;和扩增子313'的额外扩增子313。此类额外扩增子可与产生它们的扩增子杂交。可增加溶液以便使扩增子的接头与捕获引物或正交捕获引物以诸如图3H所示的方式去杂交。扩增操作可重复任何合适的次数,以便产生扩增子311、311'、312、312'、313和313'的另外扩增子。扩增操作可形成任何合适的次数,以便基本上填充具有基本上单克隆簇的相应底物区域(未具体示出),例如,分别具有靶多核苷酸311、312或313的扩增子。例如,底物区域中的每一个底物区域内的扩增子各自可包括一个所选择的靶多核苷酸的至少约60%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约70%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约80%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约90%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约95%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约98%扩增子,或一个所选择的靶多核苷酸的至少约99%扩增子或一个所选择的靶多核苷酸的至少约100%扩增子。

[0085] 如上所述,在一些示例中,某些捕获引物和正交捕获引物可包括非核苷酸部分。此类非核苷酸部分可包括但不限于切除部分,经由该切除部分可选择性地去除捕获引物的一部分。切除部分可位于沿任何合适的引物长度的任何合适位置处,并且可以是但不一定是彼此相同类型的切除部分。按照诸如参考图3E至图3H描述的所需数量的额外扩增操作,可通过使合适的酶或试剂与切除部分反应来去除捕获引物331或正交捕获引物332的部分。

[0086] 本发明的捕获引物和正交捕获引物可包括任何合适数量、类型和排列的经修饰的核酸,这充分增加了那些捕获引物或正交捕获引物和靶多核苷酸的接头之间的双链体的 T_m 。图4示意性地示出了根据一些示例的多核苷酸和本发明的捕获引物中的一者之间的示例双链体。在图4所示的非限制性示例中,经修饰的核酸441(诸如PNA或LNA)设置在捕获引物331的5'端,并且DNA 442设置在捕获引物的3'端。任选的T-间隔区443设置在DNA 442和底物400的表面之间(例如,流通池)。可认为经修饰的核酸441和DNA 442一起提供了“嵌合”接枝引物结构。靶多核苷酸可包括与接头321偶联的文库模板311,该接头包括与经修饰的核酸441的序列互补的第一子序列341和与DNA 442的序列互补的第二子序列342。替代地,经修饰的核酸(诸如PNA、LNA或超级T)和DNA以诸如上文进一步描述的方式分布在捕获引物的5'端和3'端之间。正交捕获引物332可以与图4中所示的捕获引物331类似地配置,例如,可包含嵌合接枝引物结构,但具有不同的序列。替代地,经修饰的核酸(诸如PNA、LNA或超级T)和DNA可以诸如上文进一步描述的方式分布在正交捕获引物的5'端和3'端之间。

[0087] 在一些示例中,捕获引物331中的每一者可包含介于约五个和约二十个之间的经修饰的核酸,并且正交捕获引物332中的每一者可包含介于约五个和约二十个之间的经修饰的核酸。然而,应当理解,可适当地调节经修饰的核酸的数量以获得适当的 T_m ,用于抑制

溶液中的双链体形成同时允许在底物表面处的双链体形成的条件,并且捕获引物和正交捕获引物不需要包含彼此相同数量、类型或分布的经修饰的核酸。说明性地,捕获引物中的每一者可包含至少约九个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者可包含至少约九个经修饰的核酸;或者捕获引物中的每一者可包含至少约十二个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者可包含至少约十二个经修饰的核酸;或者捕获引物中的每一者可包含至少约十五个经修饰的核酸,并且正交捕获引物中的每一者可包含至少约十五个经修饰的核酸。

[0088] 注意,尽管捕获引物331和正交捕获引物332包括经修饰的核酸,但是它们另外可具有与捕获引物231和232相似或相同的序列。即,捕获引物331可以是经修饰的P5捕获引物,并且其中正交捕获引物是经修饰的P7捕获引物。例如,捕获引物331可以是或包括具有本文其他地方提供的序列的P5引物,其中P5 DNA碱基中的至少一些碱基被其PNA、LNA或超级T类似物替换。另外或替代地,正交捕获引物332可以是或包括具有本文其他地方提供的序列的P7引物,其中P7 DNA碱基中的至少一些碱基被其PNA、LNA或超级T类似物替换。嵌合P5和P7序列的非限制性示例包括不同长度的LNA,嵌合P5或P7序列和它们相应接头cP5或cP7 (750mM Na⁺) 之间的双链体的计算T_m提供于下表1中,其中粗体文本指示LNA,并且非粗体文本指示DNA。提供了可商购获得的P5和P7序列以及P5或P7序列和它们相应接头cP5或cP7之间的双链体的计算T_m以供参考。

[0089] 表1.高T_m DNA/LNA嵌合P5/P7

类型	序列	T _m (°C)
标准 P5 (SEQ ID NO: 5)	TTTTTT AATGA TACGG CGACC ACCGA GAUCT ACAC	78.1
LNA-mod. P5 (SEQ ID NO: 6)	TTTTTT AATGA TACGG CGACC ACCGA GAUCT ACAC	99.1
LNA-mod. P5 (SEQ ID NO: 7)	TTTTTT AATGA TACGG CGACC ACCGA GAUCT ACAC	94.1
LNA-mod. P5 (SEQ ID NO: 8)	TTTTTT AATGA TACGG CGACC ACCGA GAUCT ACAC	89.1
标准 P7 (SEQ ID NO: 9)	TTTTTT CAAGC AGAAG ACGGC ATAC(8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)) AGAT	72.1
LNA-mod. P7 (SEQ ID NO: 10)	TTTTTT CAAGC AGAAG ACGGC ATAC(8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)) AGAT	93.2
LNA-mod. P7 (SEQ ID NO: 11)	TTTTTT CAAGC AGAAG ACGGC ATAC(8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)) AGAT	89.1
LNA-mod. P7 (SEQ ID NO: 12)	TTTTTT CAAGC AGAAG ACGGC ATAC(8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)) AGAT	84.7

[0091] 从表1中提供的示例中可以理解,对于P5序列,用LNA替换十五个DNA碱基可增加该

序列和cP5接头之间的双链体的 T_m 约21℃；用LNA替换十二个DNA碱基可增加该序列和cP5接头之间的双链体的 T_m 约16℃；并且用LNA替换九个DNA碱基可增加该序列和cP5接头之间的双链体的 T_m 约11℃。另外，从表1中提供的示例中可以理解，对于P7序列，用LNA替换十五个DNA碱基可增加该序列和cP7接头之间的双链体的 T_m 约21℃；用LNA替换十二个DNA碱基可增加该序列和cP7接头之间的双链体的 T_m 约17℃；并且用LNA替换九个DNA碱基可增加该序列和cP7接头之间的双链体的 T_m 约12℃。应当理解任何序列中经修饰的核酸的数量，以便提供用于诸如本文所提供的捕获引物或正交捕获引物的任何合适的 T_m 。

[0092] 用于实施本发明的经修饰的捕获引物的一个考虑因素是此类引物与合适的酶（诸如重组酶、单链结合蛋白和聚合酶）相容，如可用于簇生成和测序。包括PNA或LNA的嵌合结构，诸如参考图4所述，预期以类似于以下参考文献中所述的方式与此类酶相容，其全部内容以引用方式并入本文：Levin等人，“Position-dependent effects of locked nucleic acid (LNA) on DNA sequencing and PCR primers”，*Nucleic Acids Research*，第34卷第20期：e142，第11页，2006年；和Misra等人，“Polyamide nucleic acid-DNA chimera lacking the phosphate backbone are novel primers for polymerase reaction catalyzed by DNA polymerases”，*Biochemistry*，第37卷：第1917-1925页，1998年。关于LNA的另外的信息可在以下中找到：Braasch等人，“Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA”，*Chemistry&Biology*，第8卷：第1-7页，2001年，其全部内容以引用方式并入本文。在嵌合体结构的3'端提供DNA，诸如参考图4所述，可通过将未经修饰的DNA碱基定位在其中酶可能相互作用的位置处来帮助维持预期的酶活性，同时在嵌合体结构的5'端提供经修饰的核酸可增强与接头结合的程度。

[0093] 另外，如本文其他地方所述，并且如本领域技术人员将理解的，任何给定双链体的 T_m 可基于其中设置有双链体的溶液的组成而变化。例如，将甲酰胺添加到溶液可降低给定双链体的 T_m ，同时将盐添加到溶液中可增加给定双链体的 T_m 。因此，本文提供的示例 T_m （和 T_m 之间的差异）纯粹是说明性的，并且可基于设置有双链体的溶液的特定组成而变化。图5A至图5C是示出条件对通过本发明的捕获引物捕获多核苷酸的示例影响的图。在图5A所示的非限制性示例中，在包含0% v/v甲酰胺和750mM Na⁺的溶液中，双链DNA (dsDNA) 的百分比显示为对于通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的温度函数（曲线501）以及对于通过的cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的温度函数（曲线502）。经LNA修饰的P7捕获引物具有序列CAAGC AGAAG ACGGC ATAC (8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)) AGAT (SEQ ID NO:13)，其中粗体文本指示LNA，并且当与cP7双链化时被建模为具有20℃的 T_m 。

[0094] 在图5A中可以看出，约77℃的温度对应于通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的 T_m （曲线501），而约91℃的温度对应于通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的 T_m （曲线502）。在高于约85℃的温度下，曲线501显示，对于通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体，dsDNA百分比变得不显著（例如，小于1%）。另外，在低于约90℃的温度下，曲线501显示，对于通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体，dsDNA百分比为大约100%。因此，从图5A可以理解，在约85℃至90℃的温度下，cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交可基本上完全抑制，而cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成了高度稳定的双链体。因此，在该温度范围内，可以

高效率从溶液中捕获模板多核苷酸,并且基本上不与来自基于溶液的退火工艺竞争,诸如参考图2C所述。应当理解,适于执行此类操作的特定温度范围可根据溶液的特定组成而变化。可以预期,任何其他捕获引物和接头序列将表现出双链体形成对温度的类似依赖性。

[0095] 例如,在图5B所示的非限制性示例中,对于750mM Na⁺的盐浓度,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线503)和通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线504)显示为甲酰胺浓度(%v/v)的函数。类似地,如在图5A中可以看出,对于0%v/v甲酰胺,约77°C的温度对应于通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线503),而约91°C的温度对应于通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线504)。随着甲酰胺浓度的增加,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体,以及通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体两者的T_m均降低。例如,在约5%v/v甲酰胺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约69°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约88°C。在约10%v/v甲酰胺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约66°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约85°C。在约15%v/v甲酰胺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约63°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约82°C。在约20%v/v甲酰胺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约58°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约79°C。

[0096] 因此,从图5B可以理解,在任何给定浓度的甲酰胺下(例如,浓度为约1%至约20%的甲酰胺(%v/v)或约5%至约20%甲酰胺(%v/v)),存在cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交可基本上完全抑制的温度范围,而cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成了高度稳定的双链体。因此,在该温度范围内,可以高效率从溶液中捕获模板多核苷酸,并且基本上不与来自基于溶液的退火工艺竞争,诸如参考图2C所述。可以预期,任何其他捕获引物和接头序列将表现出双链体形成对甲酰胺浓度的类似依赖性。

[0097] 又如,在图5C所示的非限制性示例中,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线505)和通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线506)显示为盐浓度(mM Na⁺)的函数。可以看出,对于750mM Na⁺,约72°C的温度对应于通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线505),而约89°C的温度对应于通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m(曲线506)。随着盐浓度的降低,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体,以及通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体两者的T_m均降低。例如,在约500mM Na⁺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约70°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约87°C。在约100mM Na⁺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约55°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约77°C。在约0mM Na⁺的浓度下,通过cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交形成的双链体的T_m降低到约42°C,并且通过cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成的双链体

的 T_m 降低到约58℃。

[0098] 因此,从图5C可以理解,在任何给定浓度的盐下(例如,浓度为约100mM至约800mM的 Na^+ 或浓度为200mM至约800mM的 Na^+),存在cP7和P7标准文库捕获引物之间的杂交可基本上完全抑制的温度范围,而cP7和经LNA修饰的P7捕获引物之间的杂交形成了高度稳定的双链体。因此,在该温度范围内,可以高效率从溶液中捕获模板多核苷酸,并且基本上不与来自基于溶液的退火工艺竞争,诸如参考图2C所述。可以预期,任何其他捕获引物和接头序列将表现出双链体形成对盐浓度的类似依赖性。

[0099] 应当理解,诸如本文所述的示例性组合物可在用于捕获和扩增多核苷酸的任何合适的方法中使用。例如,图6示出了用于使用本发明的经修饰的引物捕获和扩增多核苷酸的方法600中的操作的示例流程。尽管方法600可使用参考图3A至图3H所述的组合物3000来实施,但是方法600可使用任何其他合适的组合物来实施。

[0100] 现在参考图6,方法600可包括提供组合物,该组合物包含(a)多个捕获引物,该多个捕获引物与底物的表面偶联,每个捕获引物包含经修饰的核酸;和(b)多个正交捕获引物,该多个正交捕获引物与底物的表面偶联,每个正交捕获引物包括经修饰的核酸(操作610)。该组合物可类似于参考图3A所述的组合物3000,例如,可包含与底物300偶联的捕获引物331和正交捕获引物332。

[0101] 图6中所示的方法600进一步可包括提供流体,该流体包含(a)第一靶多核苷酸,这些第一靶多核苷酸各自包含与捕获引物互补的第一接头和与正交捕获引物互补的第二接头;和(b)第二靶多核苷酸,这些第二靶多核苷酸与第一靶多核苷酸中的相应第一靶多核苷酸互补。该流体可如参考图3A所述类似地配置,例如,可包含靶多核苷酸311、312、313,这些靶多核苷酸中的每一者与第一接头321和第二接头322偶联,并且可包含互补靶多核苷酸311'、312'、313',这些互补靶多核苷酸中的每一者与互补第一接头321'和互补第二接头322'偶联。

[0102] 图6中所示的方法600进一步可包括使组合物与流体接触(操作630)。例如,操作610中提供的组合物可与操作620中提供的流体接触。说明性地,组合物可提供于流通池中,并且流体流动成与流通池内的组合物接触。

[0103] 图6所示的方法600进一步可包括,在抑制流体中第二靶多核苷酸与第一靶多核苷酸杂交的同时,(a)使第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的第一接头与捕获引物中的相应捕获引物杂交以形成第一双链体,以及(b)使第一靶多核苷酸中的一些第一靶多核苷酸的第二接头与正交捕获引物中的相应正交捕获引物杂交以形成第二双链体(操作640)。例如,以诸如参考图3B至图3C所述的方式,第一接头与捕获引物的杂交和第二接头与正交捕获引物的杂交可在抑制第一靶多核苷酸和第二靶多核苷酸彼此退火的条件下进行。本文其他地方提供了示例条件。注意,相同的一组条件可用于使第一多核苷酸和第二多核苷酸彼此解离,并且促进第一多核苷酸的接头与本发明的捕获引物杂交。相比之下,使用先前已知的捕获引物可涉及两组条件,第一条件引起第一多核苷酸和第二多核苷酸彼此解离,随后第二条件促进第一多核苷酸的接头与先前已知的捕获引物杂交。

[0104] 图6中所示的方法600进一步可包括扩增第一靶多核苷酸,该扩增包括生成第一靶多核苷酸的相应扩增子(操作650)。参考图3D至图3H提供了其中可产生此类扩增子的方式的非限制性示例。

[0105] 因此,虽然可在溶液中形成非生产性再杂交复合物的条件下使用先前已知的捕获引物,但是通过使用包含经修饰的核酸的序列,本发明的经修饰的捕获引物(包括正交捕获引物)克服了这个问题,与溶液/溶液双链体相比,这些经修饰的核酸赋予了表面/溶液双链体更强的结合(和高 T_m)。可通过使用可例如包括LNA、PNA、超级T或这些的任何组合的经修饰的捕获引物序列来实现表面/溶液和溶液/溶液双链体之间 T_m 的差异。通过将碱基修饰结合到捕获引物,存在其中靶多核苷酸的接头能够与表面杂交但不能与溶液中其他接头杂交的温度方案。

[0106] 因此,本发明的经修饰的捕获引物提供以下益处中的一者或多者:

[0107] A) 文库捕获更有效。在适当的情况下,可使用较低的靶多核苷酸的输入浓度;

[0108] B) 表面捕获后“在流通池上”变性可在较高温度下进行,这可减少或消除以便及时达到有利于杂交的温度而整合主动冷却的需要;并且/或者

[0109] C) 需要大量文库的流通池可利用多次流体推动进行接种,这大大增加了周转时间(TAT),例如从样品制备开始到获得测序数据的时间。由于通过本发明的捕获引物提供了较高接种效率,因此有可能使用较高浓度的靶多核苷酸和较少的流体推动。这可能在接种期间节省时间。

[0110] 应当理解,本发明的组合物和方法不限于与上文所描述的特定操作一起使用。例如,尽管图3A至图3H可被认为是与“桥式扩增”或“表面结合的聚合酶链式反应”一致的所述操作,但是应当理解,本发明的组合物和方法可容易地适于与其他扩增模式一起使用。一种此类扩增模式是“排除扩增”或ExAmp。排除扩增方法可允许每个底物区域扩增单个靶多核苷酸和在底物区域中产生基本上单克隆的扩增子群体。例如,相对于在底物区域处的靶多核苷酸的更慢的转运和捕获速率,在底物区域内的第一捕获的靶多核苷酸的扩增速率可更快。因此,在底物区域中捕获的第一靶多核苷酸可快速扩增并填充整个底物区域,因此抑制相同底物区域中的额外靶多核苷酸的捕获。替代地,如果在第一多核苷酸之后第二靶多核苷酸附接到相同底物区域,则第一多核苷酸的相对快速扩增可填充足够的底物区域以产生足够强以执行边合成边测序的信号。排除扩增的使用也可能导致单克隆底物区域的超泊松分布;即,在基本上单克隆的阵列中的底物区域的分数可超过由泊松分布预测的分数。

[0111] 增加有用簇的超泊松分布是有用的,因为更多基本上单克隆的底物区域可能产生更高质量的信号,并且因此改进的SBS;然而,将靶多核苷酸接种到底物区域可遵循空间泊松分布,其中用于增加占用的底物区域的数量数的折衷方案是增加多克隆底物区域的数量。获得较高超泊松分布的一种方法是使接种快速发生,然后在接种的靶多核苷酸之中延迟。由于延迟(术语称为“动力学延迟”)被认为是通过生物化学反应动力学而产生的,所以其给出了一种接种的靶多核苷酸(与其他接种的靶标相比更早开始)。当重组酶介导序列匹配时,排除扩增通过使用重组酶促进引物(例如,附接到底物区域的引物)侵入到双链DNA(例如,靶多核苷酸)中来工作。本发明的组合物和方法可适于与重组酶一起使用以在重组酶介导序列匹配时促进本发明的捕获引物和正交捕获引物侵入到靶多核苷酸中。实际上,本发明的组合物和方法可适于与任何基于表面的多核苷酸扩增方法一起使用,诸如热PCR、化学变性PCR和酶促介导的方法(其也可称为重组酶聚合酶扩增(RPA)或ExAmp)。

[0112] 附加注释

[0113] 虽然上文描述了各种例示性示例,但是对于本领域技术人员显而易见的是,在不

脱离本发明的情况下可以在其中进行各种改变和修改。所附权利要求旨在涵盖落入本发明的真实精神和范围内的所有此类改变和修改。

[0114] 应当理解的是,如本文所述的本公开的每个方面的任何相应特征/示例可以以任何合适的组合一起实施,并且来自这些方面中的任何一个或多个方面的任何特征/示例可以与如本文所述的其他方面的任何特征一起以任何组合实施以实现如本文所述的有益效果。

序列表

<110> ILLUMINA, INC.

<120> 使用经修饰的捕获引物捕获和扩增靶多核苷酸的组合物和方法

<130> IP-2054-PCT

<150> US 63/128,675

<151> 2020-12-21

<160> 13

<170> PatentIn 3.5 版

[0001]

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> P5 捕获引物

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga

20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> P7 捕获引物	
	<400> 2	
	caagcagaag acggcatacg a	21
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0002]	<220>	
	<223> 互补 P5 接头	
	<400> 3	
	tcggtggtcg ccgtatcatt	20
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 互补 P7 接头	
	<400> 4	

	tcgtatgccg tcttctgctt g	21
	<210> 5	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 高 T _m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-标准 P5	
	<220>	
[0003]	<221> 尚未分类的特性	
	<222> (29).. (29)	
	<223> n = u	
	<400> 5	
	ttttttaatg atacggcgac caccgaganc tacac	35
	<210> 6	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 高 T _m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-LNA-mod. P5	

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (7).. (21)

<223> 锁定核酸 (LNA)

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (29).. (29)

<223> n = u

<400> 6

ttttttaatg atacggcgac caccgaganc tacac

35

[0004]

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 高 T_m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-LNA-mod. P5

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (7).. (18)

<223> 锁定核酸 (LNA)

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (29).. (29)

<223> n = u

<400> 7

ttttttaatg atacggcgac caccgaganc tacac

35

<210> 8

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 高 T_m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-LNA-mod. P5

[0005]

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (7).. (15)

<223> 锁定核酸 (LNA)

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (29).. (29)

<223> n = u

<400> 8

ttttttaatg atacggcgac caccgaganc tacac

35

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 高 T_m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-标准 P7

<220>

<221> 尚未分类的特性

<222> (26).. (26)

<223> n = 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)

<400> 9

[0006]

ttttttcaag cagaagacgg catacnagat

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 高 T_m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-LNA-mod. P7

<220>

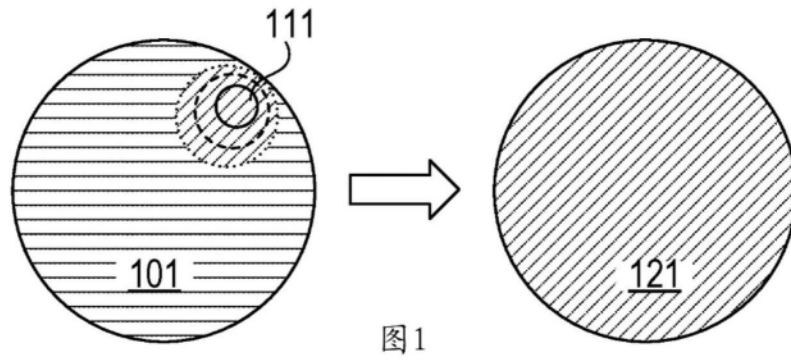
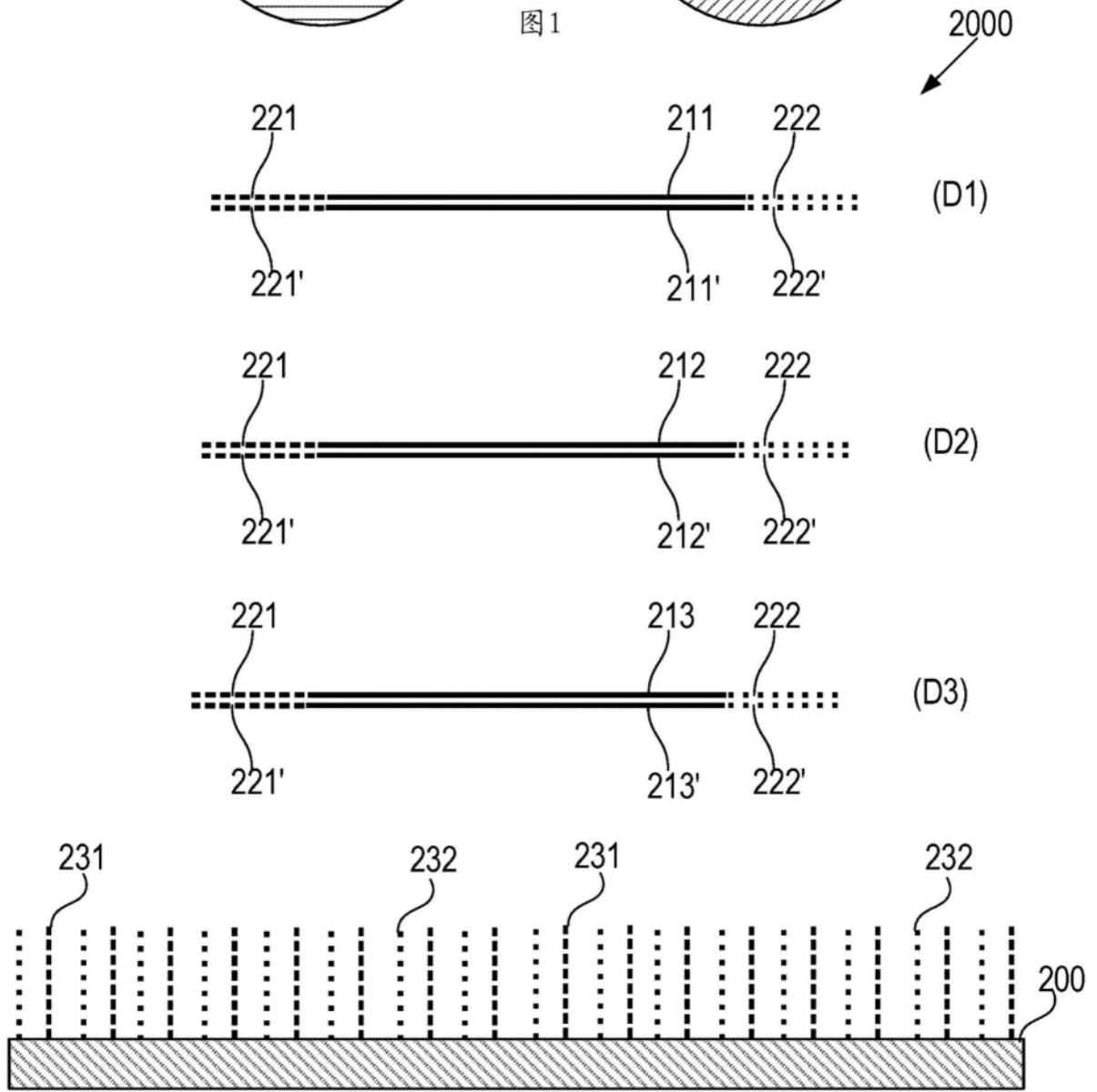
<221> 尚未分类的特性

<222> (7).. (21)

	<223> 锁定核酸 (LNA)	
	<220>	
	<221> 尚未分类的特性	
	<222> (26).. (26)	
	<223> n = 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)	
	<400> 10	
	ttttttcaag cagaagacgg catacnagat	30
	<210> 11	
	<211> 30	
	<212> DNA	
[0007]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 高 T _m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-LNA-mod. P7	
	<220>	
	<221> 尚未分类的特性	
	<222> (7).. (18)	
	<223> 锁定核酸 (LNA)	
	<220>	
	<221> 尚未分类的特性	
	<222> (26).. (26)	
	<223> n = 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)	

	<p><400> 11</p> <p>ttttttcaag cagaagacgg catacnagat</p>	30
	<p><210> 12</p> <p><211> 30</p> <p><212> DNA</p> <p><213> 人工序列</p>	
	<p><220></p> <p><223> 高 T_m DNA/LNA 嵌合 P5/P7-LNA-mod, P7</p>	
[0008]	<p><220></p> <p><221> 尚未分类的特性</p> <p><222> (7).. (15)</p> <p><223> 锁定核酸 (LNA)</p>	
	<p><220></p> <p><221> 尚未分类的特性</p> <p><222> (26).. (26)</p> <p><223> n = 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)</p>	
	<p><400> 12</p> <p>ttttttcaag cagaagacgg catacnagat</p>	30
	<p><210> 13</p> <p><211> 24</p> <p><212> DNA</p>	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 经 LNA 修饰的 P7 捕获引物	
	<220>	
	<221> 尚未分类的特性	
	<222> (1).. (15)	
[0009]	<223> 锁定核酸 (LNA)	
	<220>	
	<221> 尚未分类的特性	
	<222> (20).. (20)	
	<223> n = 8-氧代鸟嘌呤 (8-oxoG)	
	<400> 13	
	caagcagaag acggcatacn agat	24



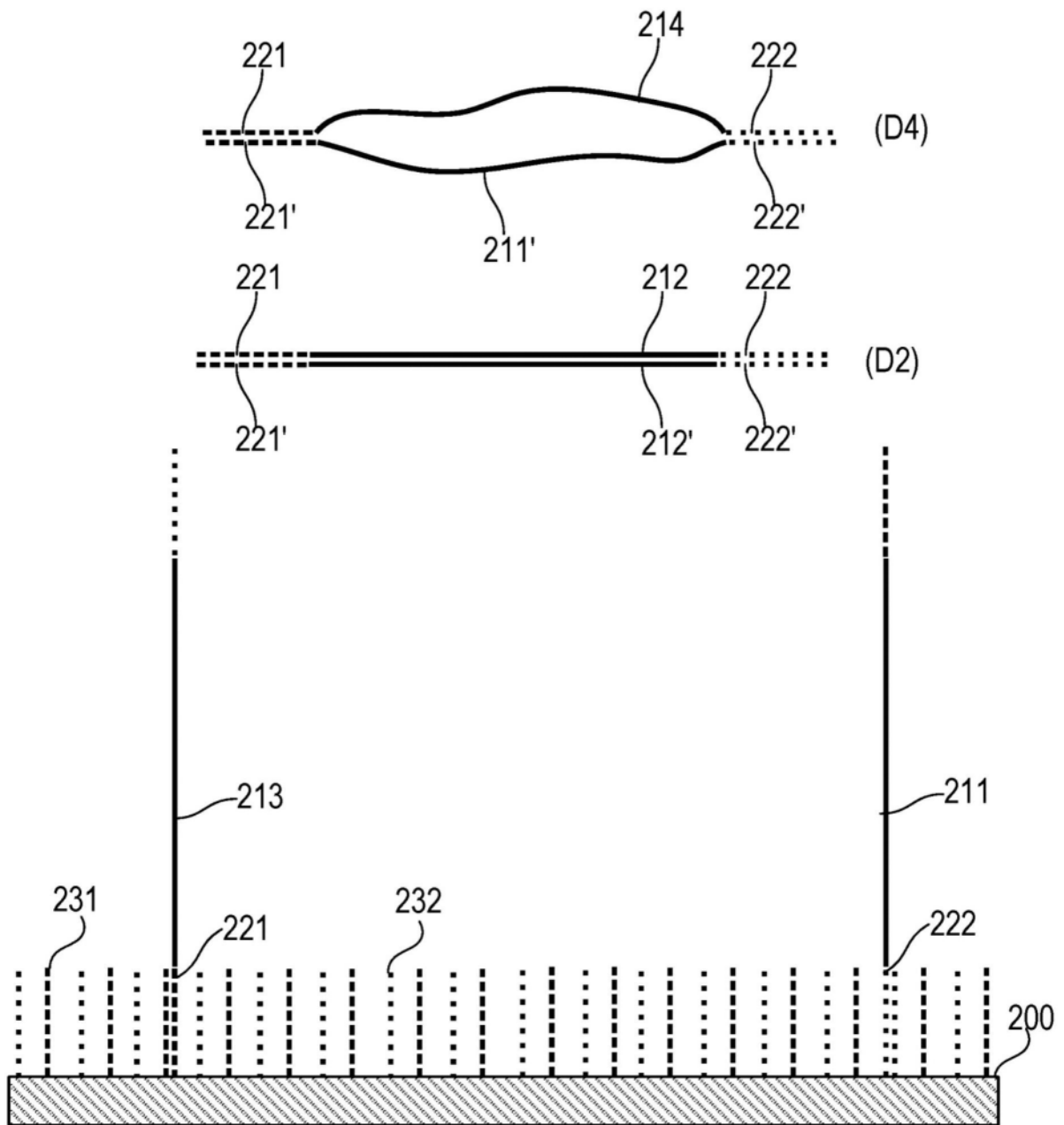


图2C

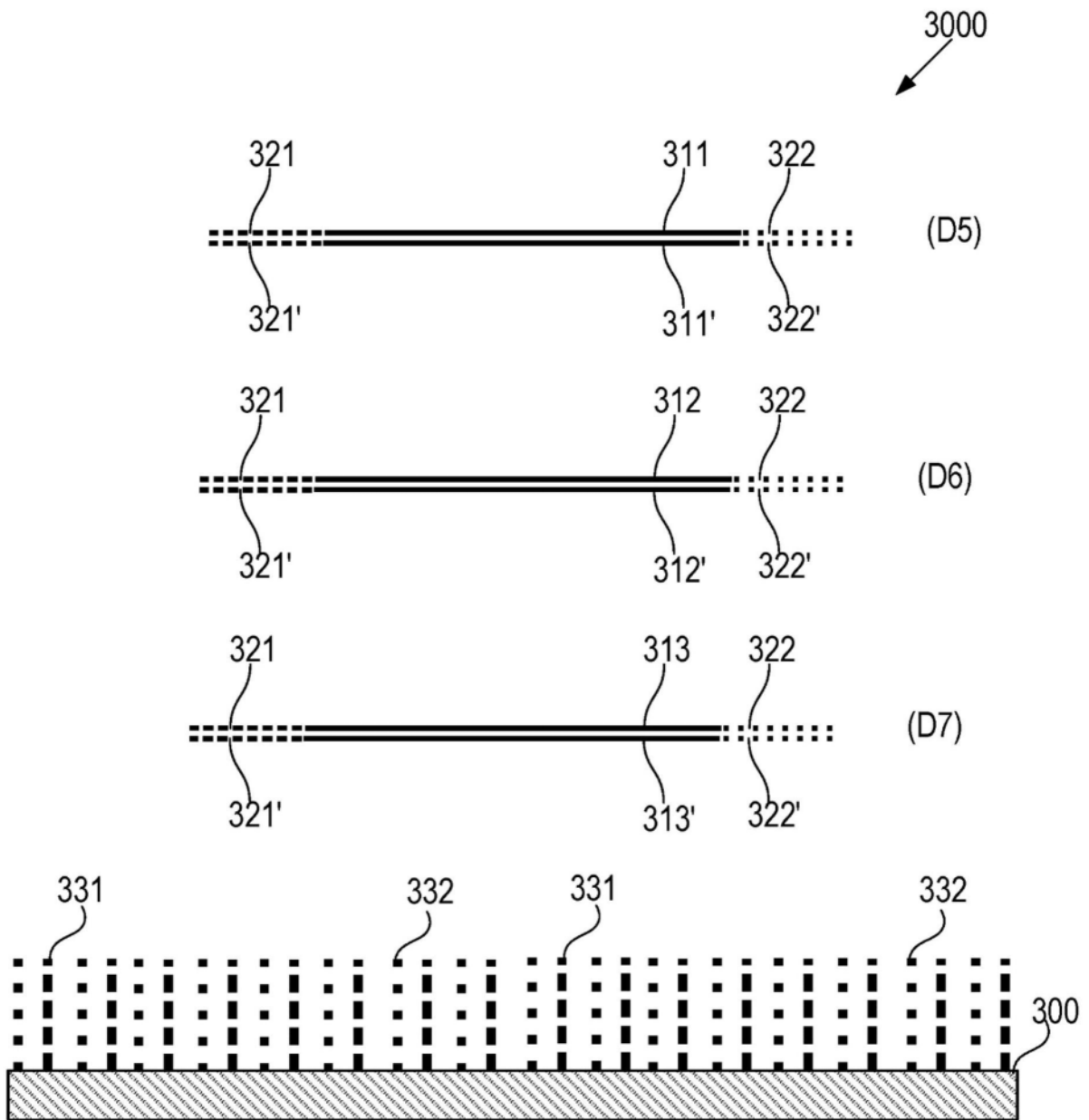


图3A

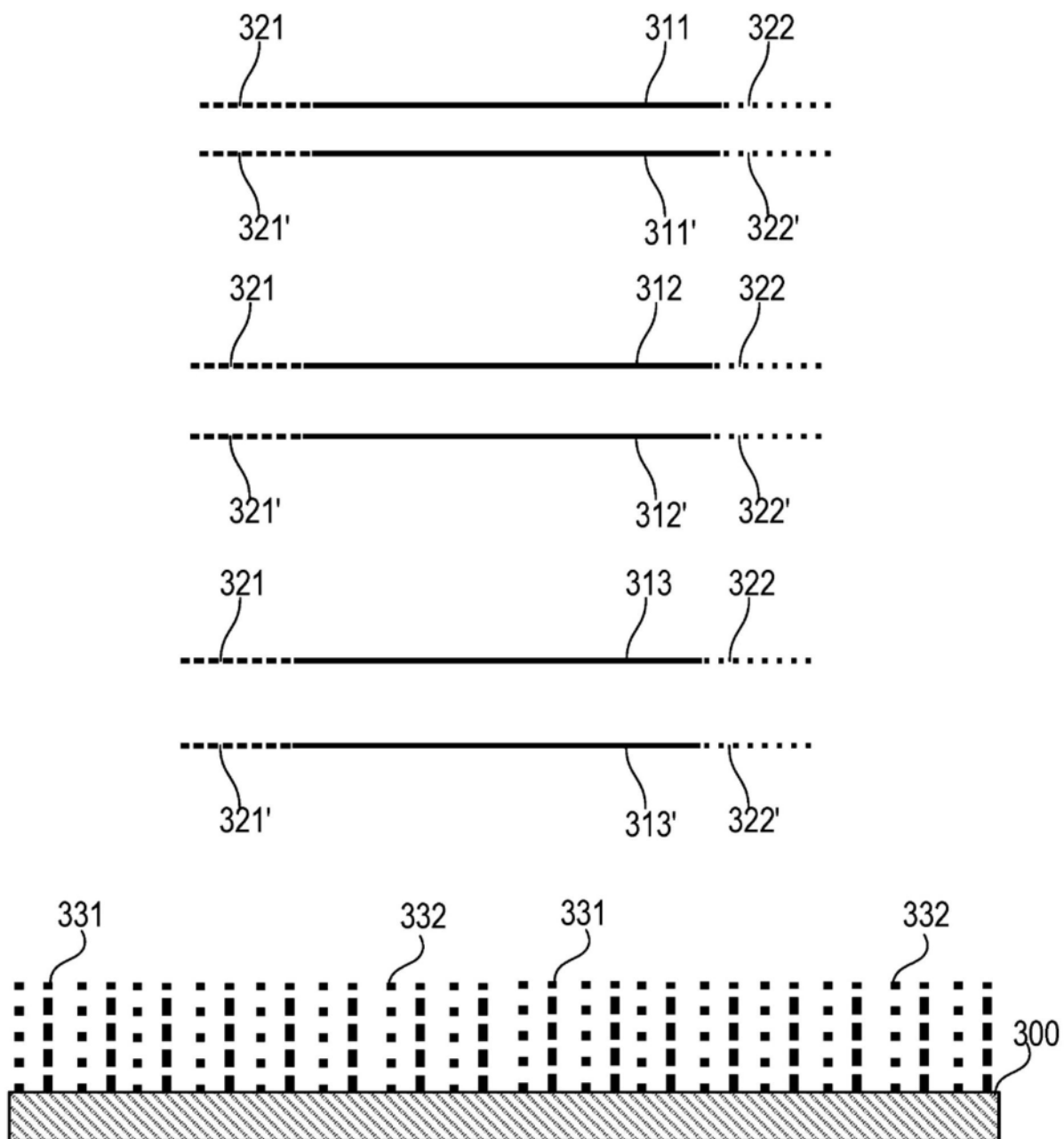


图3B

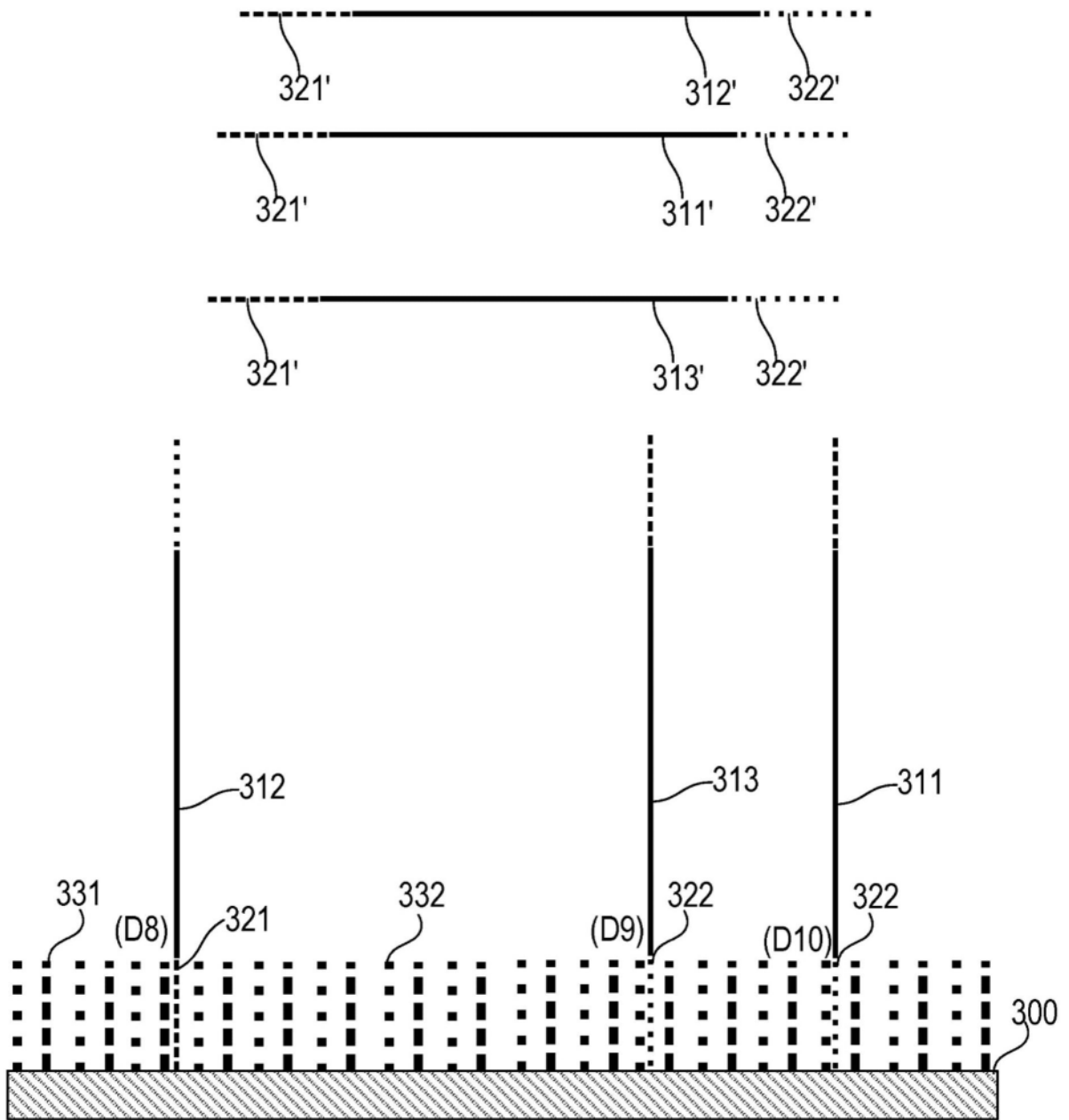


图3C

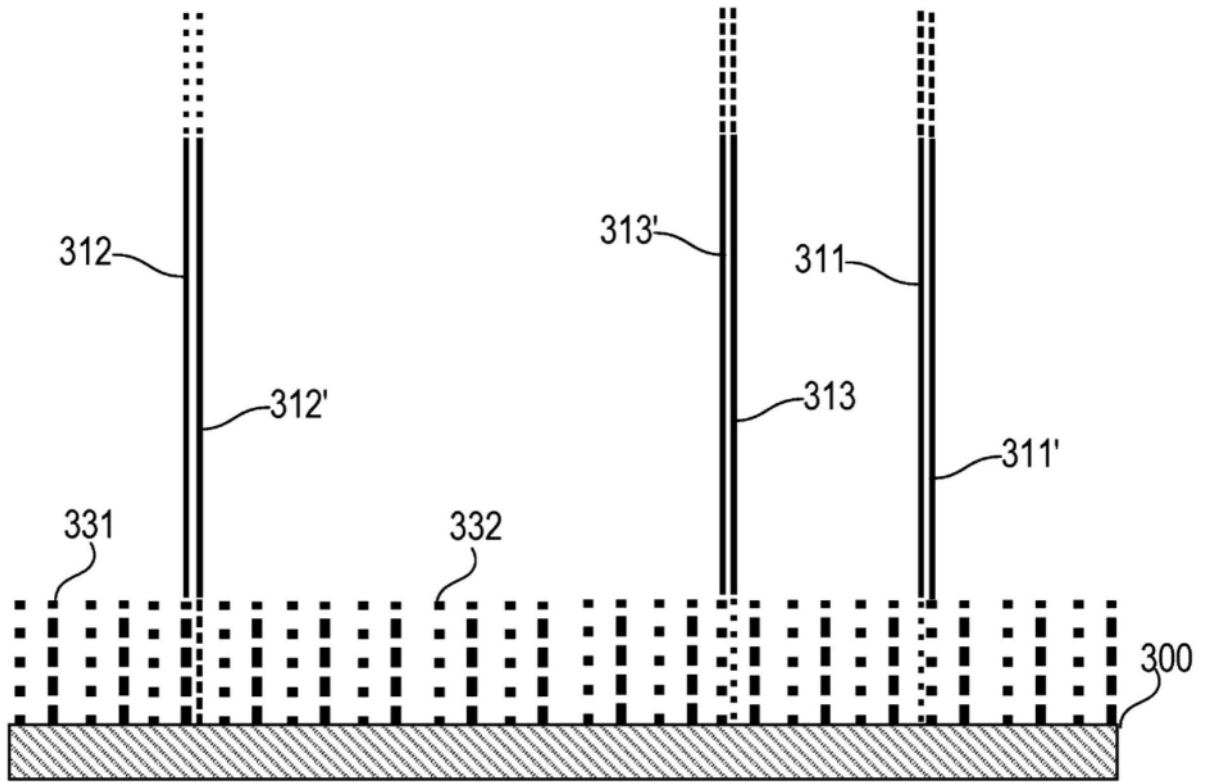


图3D

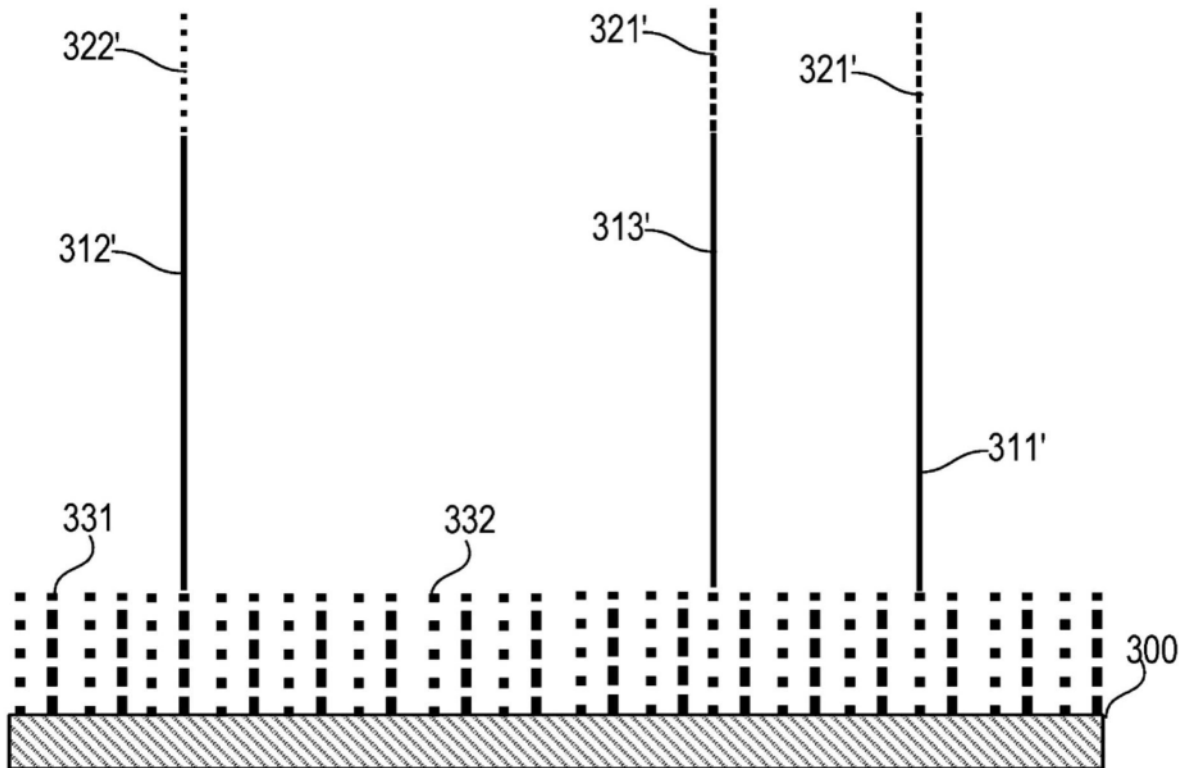


图3E

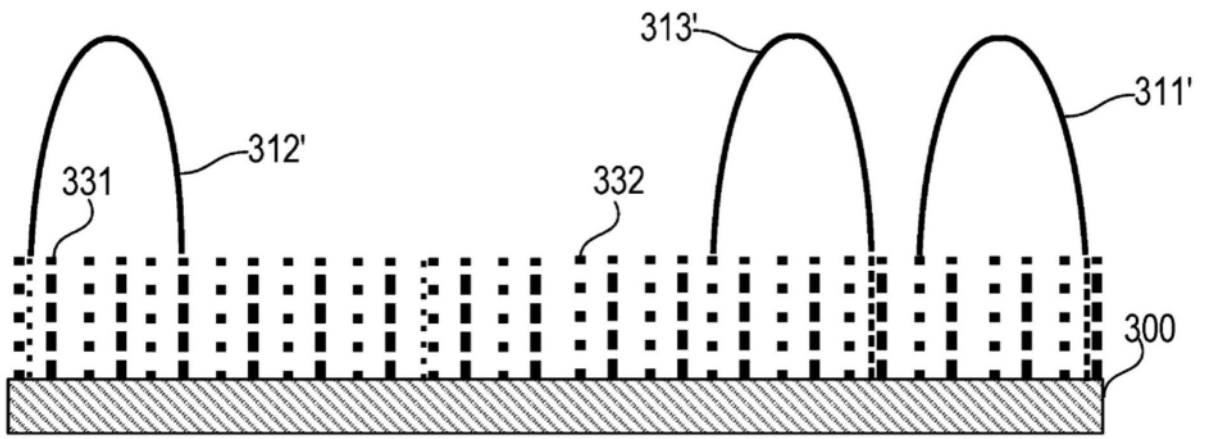


图3F

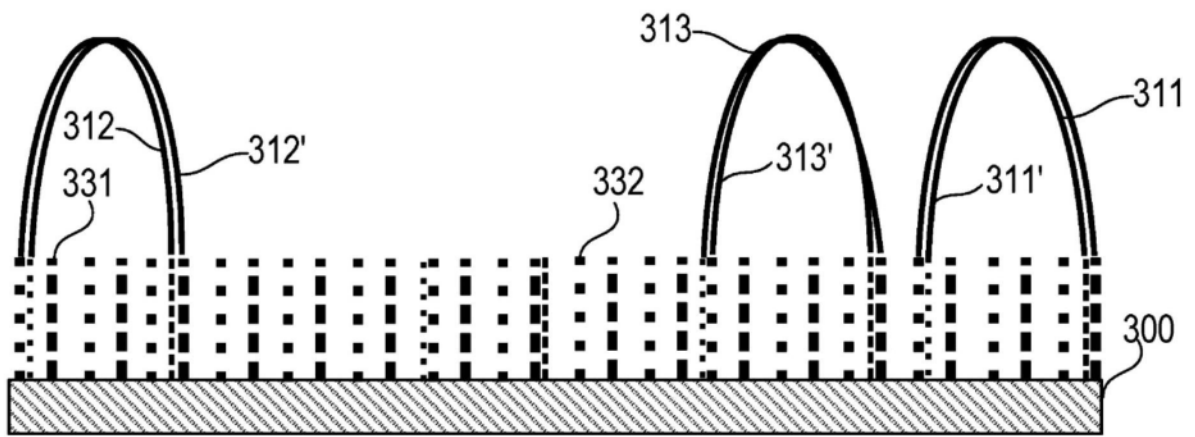


图3G

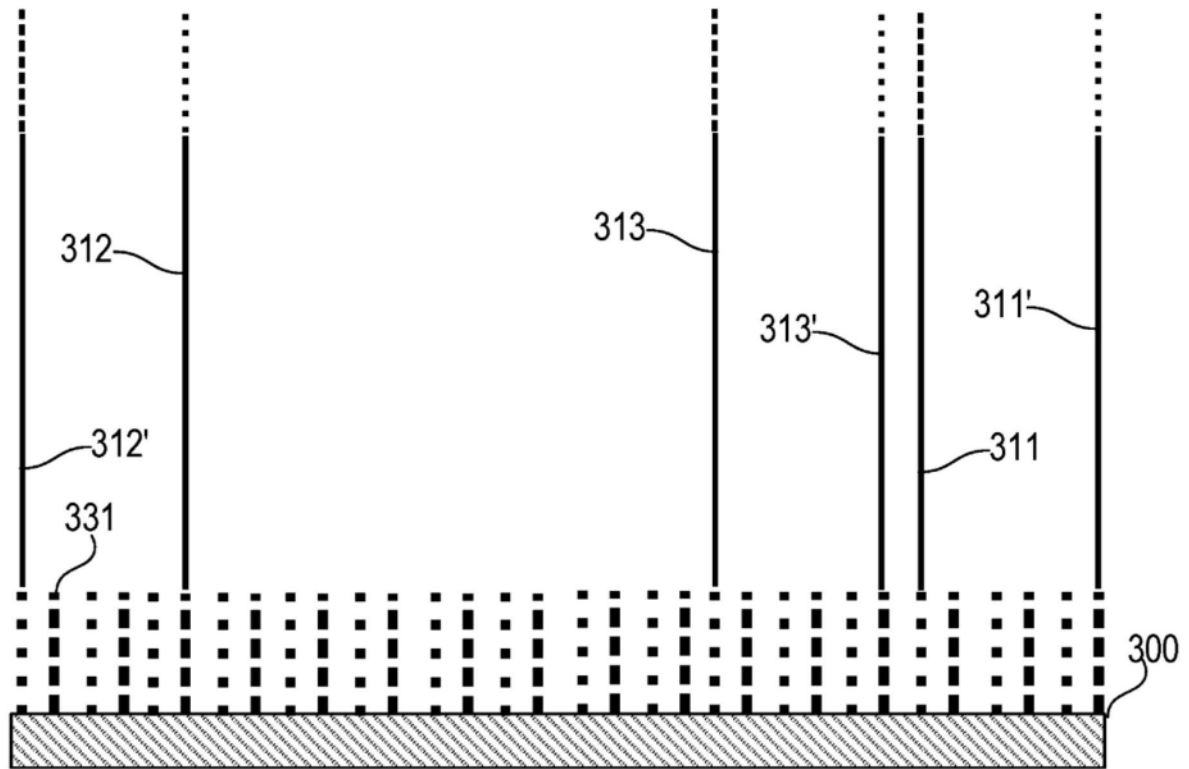


图3H

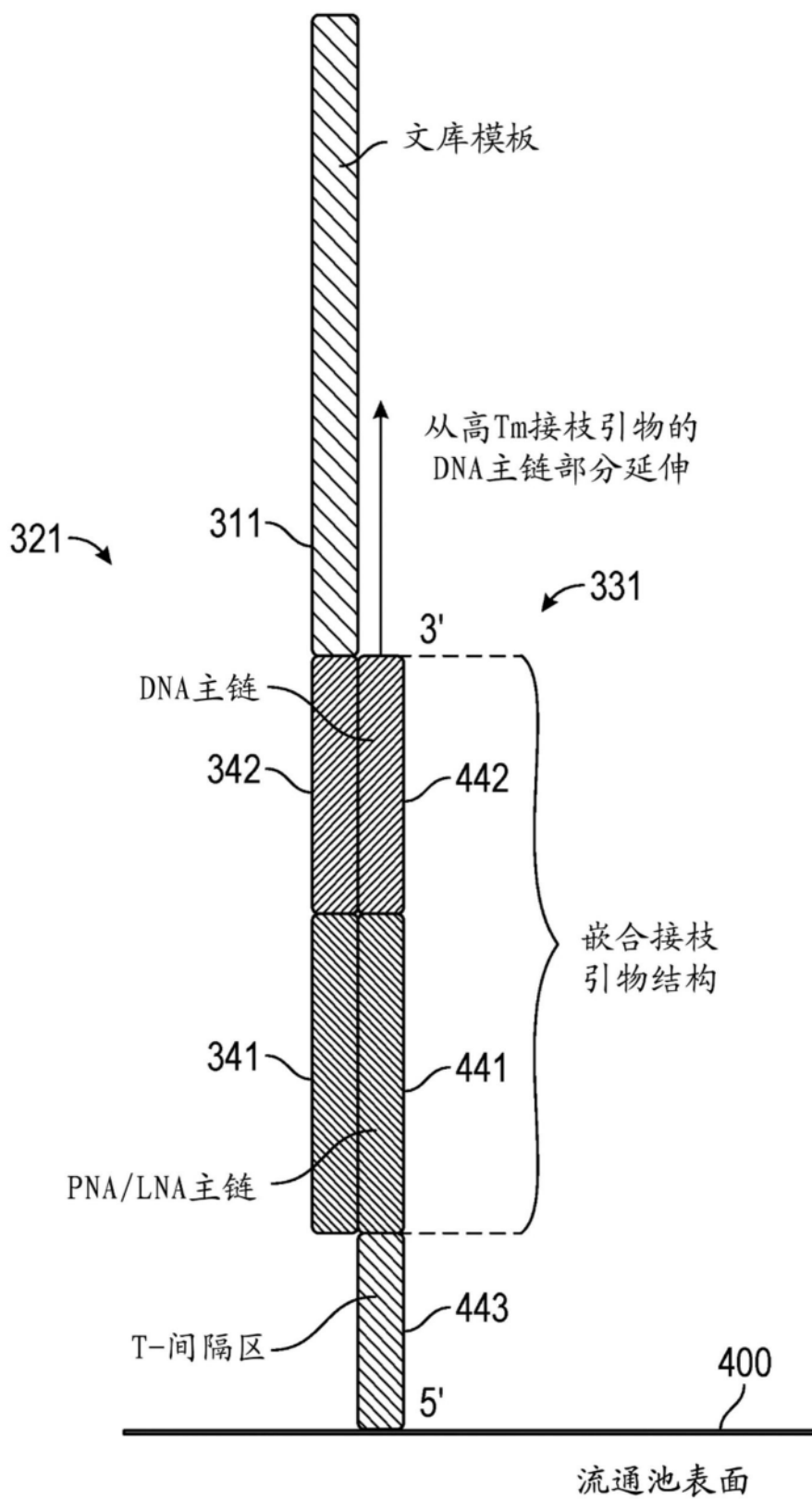


图4

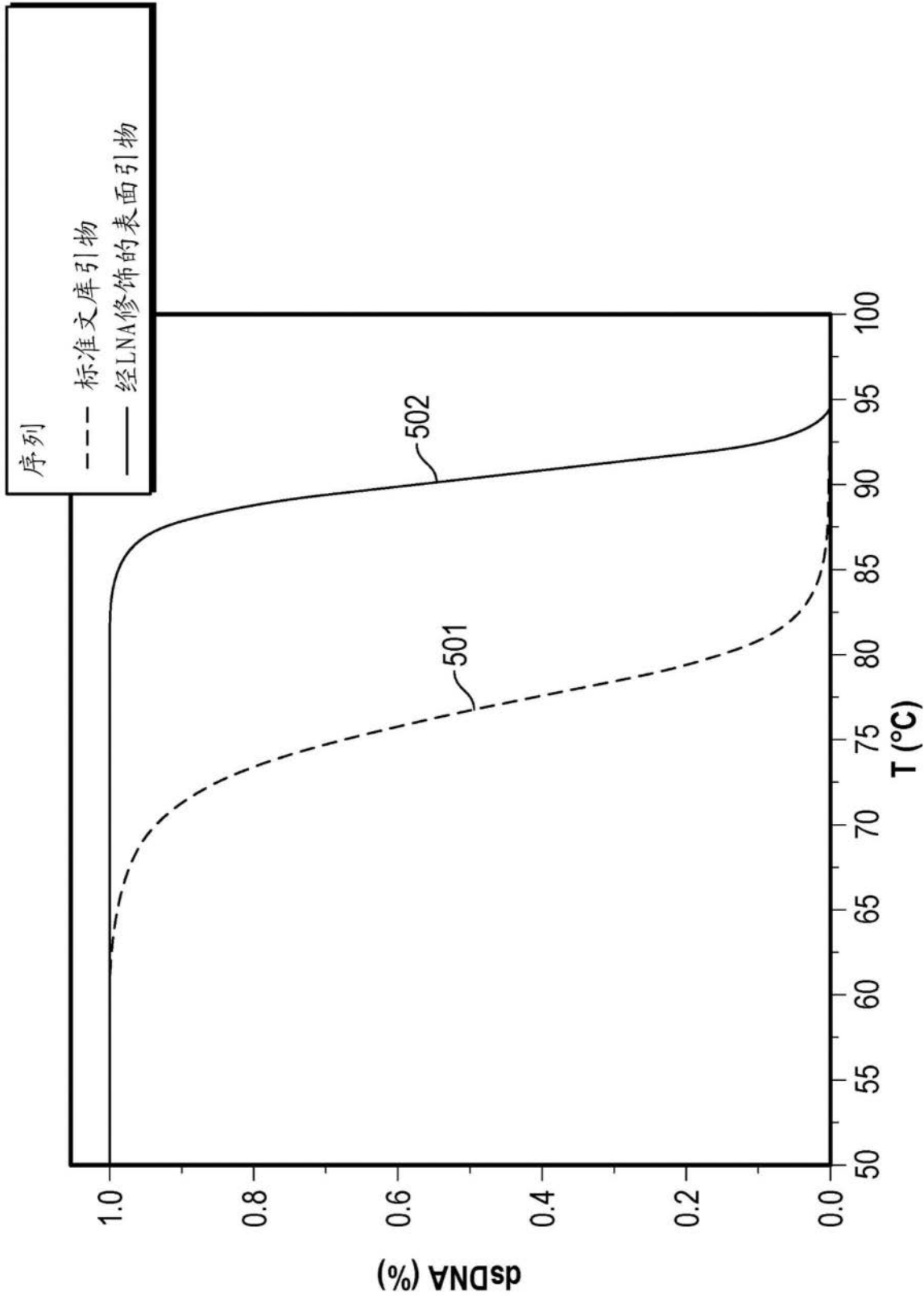


图5A

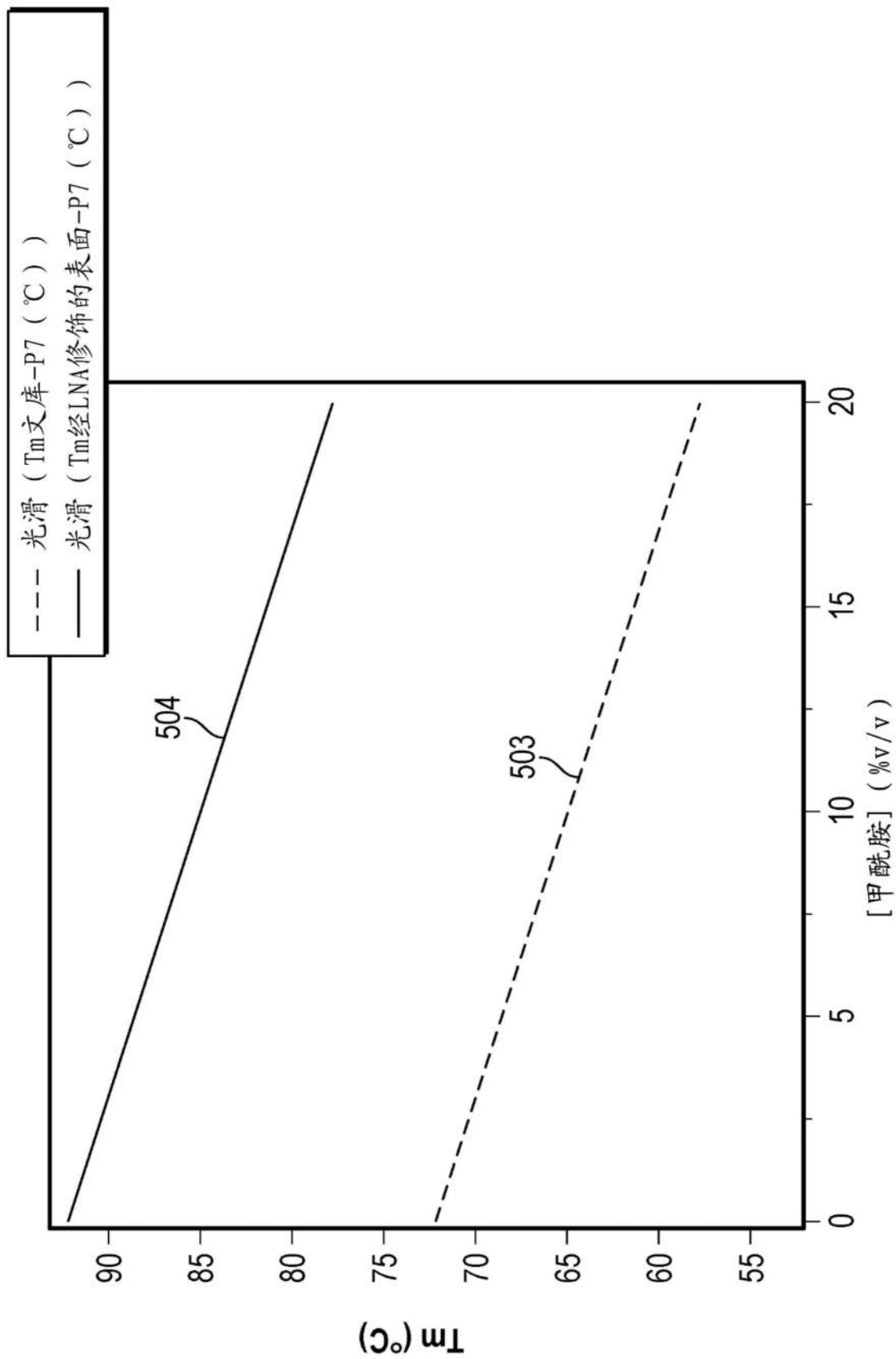


图5B

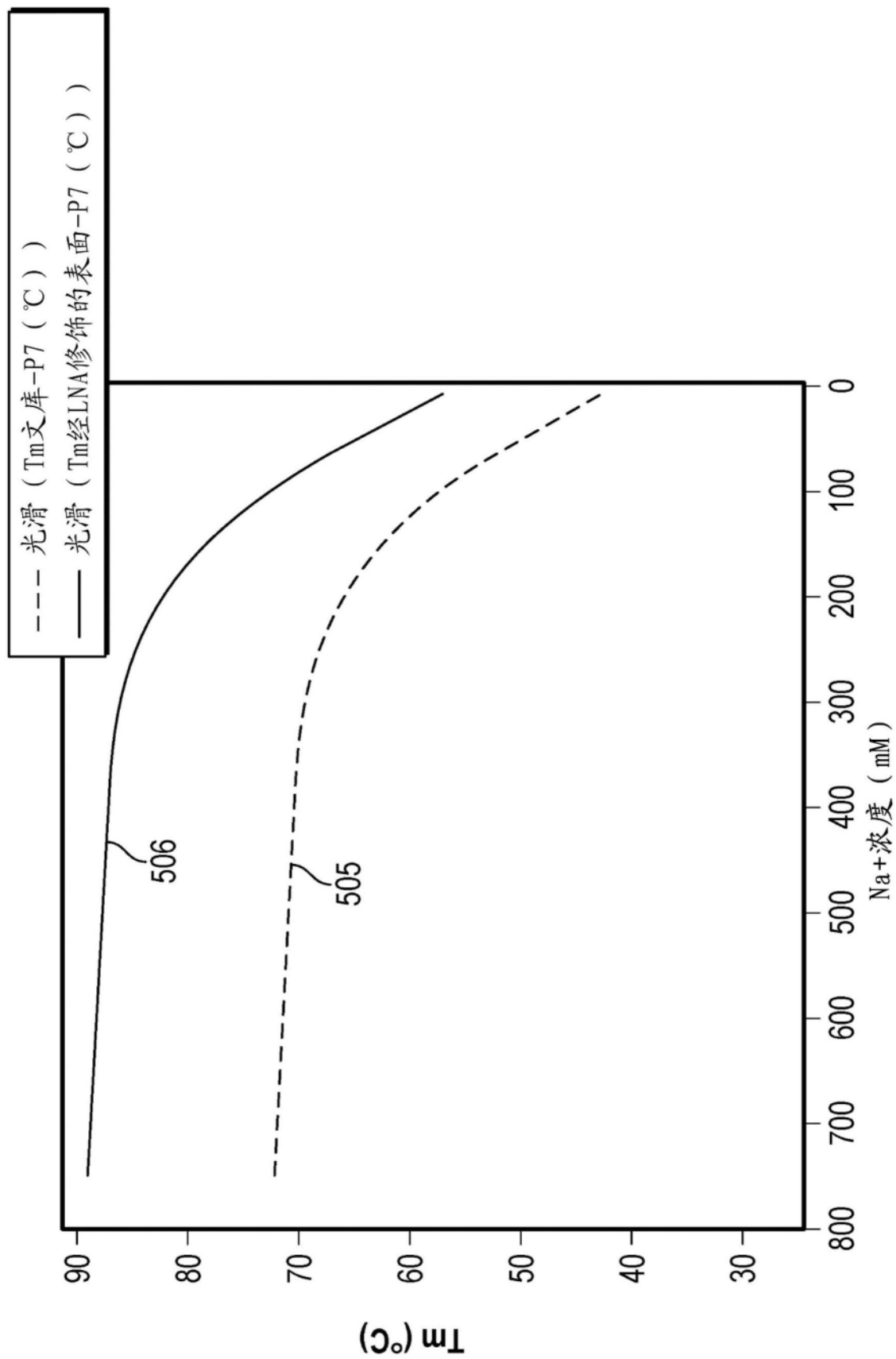


图5C

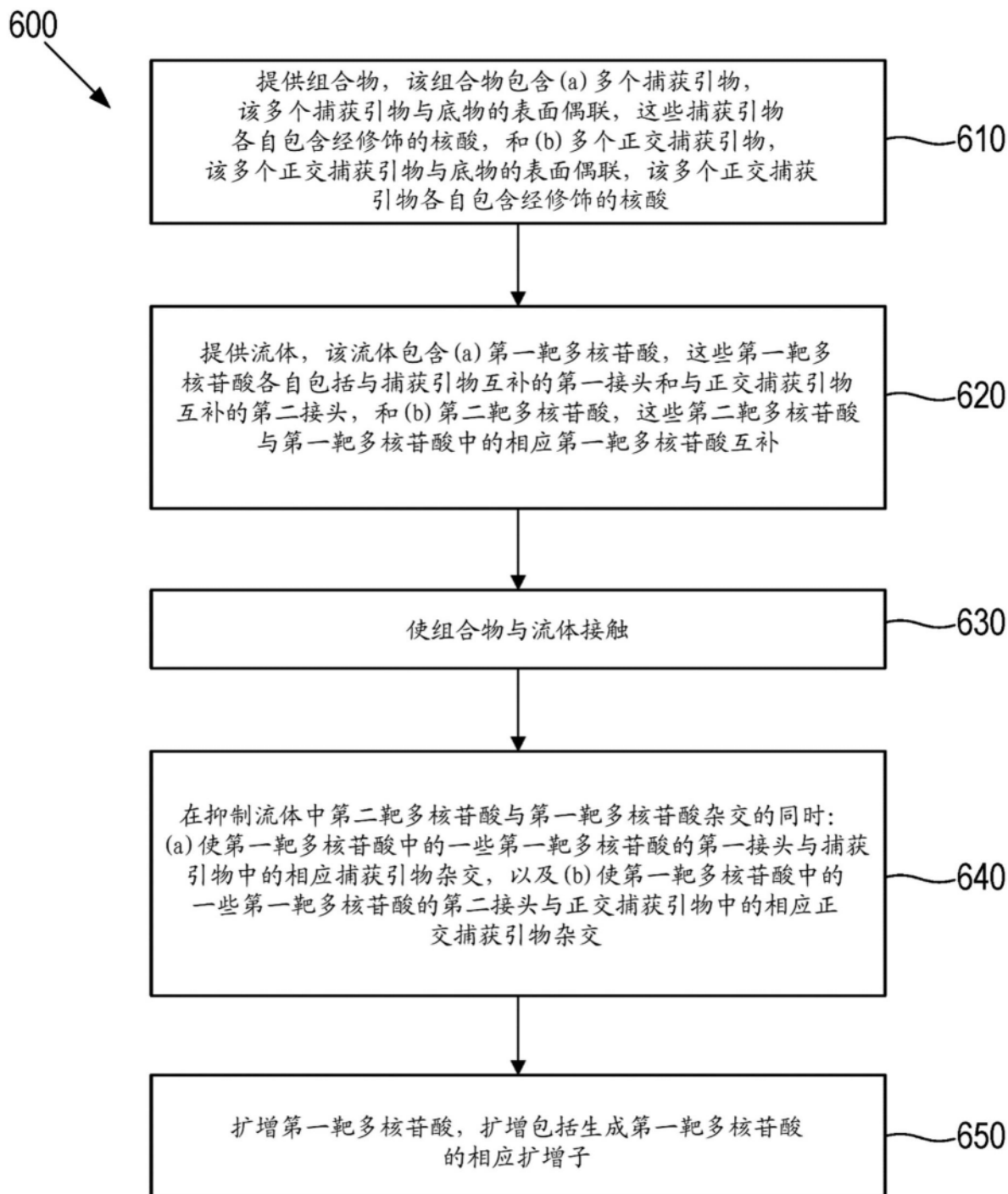


图6