



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107570092 B

(45)授权公告日 2020.03.17

(21)申请号 201710698877.6

(22)申请日 2013.06.12

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107570092 A

(43)申请公布日 2018.01.12

(30)优先权数据

61/660,487 2012.06.15 US

61/715,478 2012.10.18 US

13/783,043 2013.03.01 US

(62)分案原申请数据

201380031043.X 2013.06.12

(73)专利权人 伊鲁米那股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 敏-瑞·理查德·沈

乔纳森·马克·鲍特尔

凯瑟琳·M·斯蒂芬斯

M·罗纳格希 凯文·L·冈德森

巴拉·穆拉利·文卡特桑

M·谢恩·鲍恩

坎达斯瓦弥·维加严

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.

B01J 19/00(2006.01)

C12Q 1/6844(2018.01)

(56)对比文件

CN 101449161 A, 2009.06.03,

CN 101437954 A, 2009.05.20,

US 2007178516 A1, 2007.08.02,

CN 102212621 A, 2011.10.12,

WO 2011008217 A1, 2011.01.20,

审查员 杨鹏远

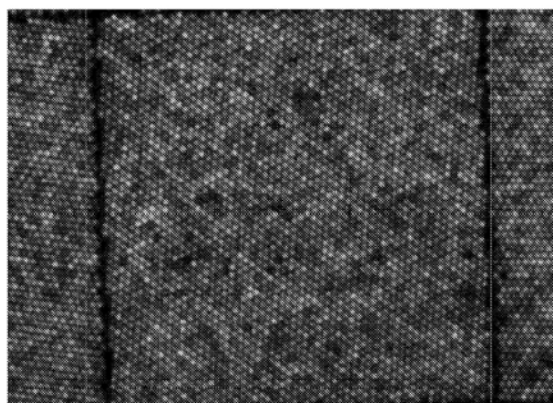
权利要求书1页 说明书32页 附图5页

(54)发明名称

核酸文库的动力学排除扩增

(57)摘要

本申请涉及核酸文库的动力学排除扩增。一种方法,所述方法包括(a)提供包括位点的阵列的扩增反应物,和具有不同的靶核酸的溶液;及(b)使扩增反应物反应,以产生各自具有来自溶液中的靶核酸的扩增子的克隆群的扩增位点。反应可以包括同时地:以平均转运速率转运核酸至位点,及以平均扩增速率扩增转运至位点的核酸,其中平均扩增速率超过平均转运速率。反应可以包括从转运到每个位点的核酸产生第一扩增子,及从核酸或从第一扩增子产生后续的扩增子,其中产生后续的扩增子的平均速率超过产生第一扩增子的平均速率。



1. 一种用于扩增核酸的方法,所述方法包括
 - (a) 提供扩增反应物,所述扩增反应物包括
 - (i) 扩增位点的阵列,及
 - (ii) 包括多个不同的靶核酸的溶液,其中在所述溶液中所述不同的靶核酸的数量超过在所述阵列中扩增位点的数量,其中所述不同的靶核酸具有流体通路至多个扩增位点,且其中每个所述扩增位点包括容纳所述多个不同的靶核酸中的数个核酸的容量;及
 - (b) 使所述扩增反应物反应以产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自包括来自所述溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,其中所述反应包括 (i) 从转运到每个所述扩增位点的单个靶核酸产生第一扩增子,及 (ii) 从转运到每个所述扩增位点的所述单个靶核酸或从所述第一扩增子产生后续的扩增子,其中在所述扩增位点产生所述后续的扩增子的平均速率超过在所述扩增位点产生所述第一扩增子的平均速率。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中每个所述扩增位点包括被用于在 (b) 中产生所述扩增子的多个引物。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述第一扩增子的所述产生包括将至少一个所述引物从非可延伸状态转化为可延伸状态。
4. 根据权利要求2所述方法,其中所述扩增位点的阵列包括在表面上的特征的阵列。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述特征是非连续的且被缺乏被用于在 (b) 中产生所述扩增子的所述引物的所述表面的间隙区域间隔。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述反应包括与 (i) 所述第一扩增子的所述产生,及 (ii) 所述后续的扩增子的所述产生同时地,将靶核酸从所述溶液转运到所述扩增位点。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中在 (i) 所述第一扩增子的所述产生,及 (ii) 所述后续的扩增子的所述产生之前将所述靶核酸从所述溶液转运到所述扩增位点。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中每个所述扩增位点包括能够结合所述溶液中的所述不同的靶核酸的多个捕获剂。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述扩增位点的阵列包括在表面上的特征的阵列。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中每个所述特征的面积大于被转运至每个所述扩增位点的所述单个靶核酸的排除体积的平均直径。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述特征是非连续的且被缺乏所述捕获剂的所述表面的间隙区域间隔。
12. 根据权利要求9所述的方法,其中每个所述特征包括珠、孔、通道、脊、突起、或其组合。
13. 根据权利要求8所述的方法,其中所述捕获剂包括与所述不同的靶核酸互补的捕获核酸。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述不同的靶核酸包括与所述捕获核酸互补的通用序列。
15. 根据权利要求8所述的方法,其中所述捕获剂包括与连接于所述不同的靶核酸的配体结合的受体。

核酸文库的动力学排除扩增

[0001] 本申请是申请日为2013年06月12日,申请号为201380031043.X,发明名称为“核酸文库的动力学排除扩增”的申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2013年3月1日提交的美国序列号13/783,043的优先权,其基于,并要求2012年10月18日提交的美国临时申请号61/715,478,及2012年6月15日提交的美国临时申请号61/660,487的权益,其每个通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明一般地涉及分子生物学,且更具体的涉及核酸合成和分析。

背景技术

[0004] 遗传分析在现代社会中具有日益增加的重要性。仅举几例,遗传分析已经证明对于预测人感染某些疾病的风险(诊断),对于正考虑某些治疗的人确定治疗的益处对比副作用的风险的可能性(预后),及鉴定失踪人员、犯罪的罪犯、犯罪的受害者和战争伤亡(法医学)有用。然而,在许多情况下,适当的遗传测试还未可得或受高错误率困扰。这些问题的一个来源是,许多目前用于诊断、预后和法医学的遗传测试依赖于仅探测人的基因组中一部分的技术。人的遗传性状是由包含超过30亿个碱基对的基因组编码的,然而大多数遗传测试仅研究这些碱基对的少数突变。通过增加被探测的基因组的部分,理想地直至且包括基因组中所有30亿个碱基对,遗传测试的精度可被提高且遗传测试可被开发用于更多的诊断和预后情况。

[0005] 许多遗传测试的基本组成部分是待测试的遗传材料的制备。当试图捕获完整的基因组并保持其完整性时,这不是一件小事。目前可用于捕获大量的遗传材料的两种方法是乳液聚合酶链式反应(ePCR)和簇扩增(例如经由桥式扩增)。它们目前仅限于临床和诊断应用。

[0006] 对于ePCR,在连同基因组片段和载体珠的油相中形成水微滴。选择条件,以优化每个微滴将分离单个基因组片段和单一载体珠的可能性。目标是使微滴形成微反应器,防止微滴之间及因此不同的珠之间的基因组片段的扩散。然后可以对大批乳液进行几个循环的PCR扩增,使得在每个微滴中,珠被现存的基因组片段的克隆拷贝包被。扩增后,珠被转移至检测基底,用于在分析仪器中评价。伴随ePCR的一个复杂因素是,一些珠在微滴中终止而没有基因组片段,从而产生空白珠。在分析仪器中使用前可以进行珠富集步骤以去除空白珠;然而,这个过程通常是麻烦且低效的。伴随ePCR的另一个复杂因素是,一些微滴以多于一个基因组片段结束,从而产生混合克隆珠。虽然混合克隆珠通常可被鉴定,且然后在分析期间被忽略,其存在降低了效率,且在某些情况下降低了分析的精度。

[0007] 簇扩增提供了捕获和扩增遗传材料的更简化的方法。在商业的实施方案中,基因组片段被捕获至基底表面上,在随机位置形成“种子”。洗去过量的基因组片段(即那些没有被捕获的)后,进行几个循环的扩增,以创建在每个种子周围的表面上形成簇的克隆拷贝。相比ePCR,簇扩增的优点包括避免珠富集步骤、避免珠转移步骤(从乳液至检测基底)、及避

免杂乱的且通常繁琐的油乳液。然而,商业的簇扩增技术的潜在复杂因素在于它们在表面上形成簇的随机图案。虽然,已开发图像配准方案以定位和区分随机定位的簇,但这样的方案对分析设备放置了额外的分析负担。此外,相比对于簇的空间地有序的图案理论地可能的,随机定位的簇趋向于更低效率地填充表面。

[0008] 因此,存在制备用于诊断、预后和法医学分析的遗传材料的改进的方法的需要。本公开内容满足了这种需要,且还提供了其它优点。

发明内容

[0009] 本公开内容提供了扩增核酸的方法。方法可包括以下步骤:(a) 提供包括以下的扩增反应物(amplification reagent):(i) 扩增位点的阵列,和(ii) 具有多个不同的靶核酸的溶液;及(b) 使扩增反应物反应以产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自具有来自溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,其中反应包括同时地(i) 以平均转运速率转运不同的靶核酸至扩增位点,及(ii) 以平均扩增速率扩增在扩增位点的靶核酸,其中平均扩增速率超过平均转运速率。在具体的实施方案中,在溶液中不同的靶核酸的数量超过在阵列中扩增位点的数量。典型地,不同的靶核酸具有流体通路至多个扩增位点。此外,每个扩增位点可任选地具有容纳多个不同的核酸中的数个核酸的容量(a capacity for several nucleic acids in the plurality of different nucleic acids)。

[0010] 还提供了用于扩增核酸的方法,该方法包括以下步骤:(a) 提供扩增反应物,所述扩增反应物包括(i) 扩增位点的阵列,和(ii) 具有多个不同的靶核酸的溶液,及(b) 使扩增反应物反应以每个产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自包括来自溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,其中反应包括(i) 从在每个扩增位点的单个靶核酸产生第一扩增子,及(ii) 从在每个扩增位点的单个靶核酸或从第一扩增子产生后续的扩增子,其中在扩增位点产生后续的扩增子的平均速率超过在扩增位点产生第一扩增子的平均速率。在具体的实施方案中,在溶液中不同的靶核酸的数量超过在阵列中扩增位点的数量。典型地,不同的靶核酸具有流体通路至多个扩增位点。此外,每个扩增位点可任选地具有容纳多个不同的核酸中的数个核酸的容量。

[0011] 本公开内容还提供用于扩增核酸的方法,该方法包括以下步骤:(a) 提供包括以下的扩增反应物(i) 扩增位点的阵列,和(ii) 具有多个不同的靶核酸的溶液;及(b) 使扩增反应物反应以产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自包括来自溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,其中反应包括同时地(i) 以平均捕获速率在扩增位点捕获不同的靶核酸,及(ii) 以平均扩增速率扩增在扩增位点捕获的靶核酸,其中平均扩增速率超过平均捕获速率。

[0012] 还提供了用于扩增核酸的方法,该方法包括以下步骤:(a) 提供扩增反应物,所述扩增反应物包括(i) 扩增位点的阵列,和(ii) 具有多个不同的靶核酸的溶液,及(b) 使扩增反应物反应以产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自包括来自溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,其中反应包括(i) 从在扩增位点捕获的单个靶核酸产生第一扩增子,及(ii) 从在每个扩增位点捕获的单个靶核酸或从第一扩增子产生后续的扩增子,其中在扩增位点产生后续的扩增子的平均速率超过在扩增位点产生第一扩增子的平均速率。

[0013] 还提供了用于扩增核酸的方法,所述方法包括:

- [0014] (a) 提供扩增反应物,所述扩增反应物包括
- [0015] (i) 扩增位点的阵列,及
- [0016] (ii) 包括多个不同的靶核酸的溶液,
- [0017] 其中在所述溶液中所述不同的靶核酸的数量超过在所述阵列中所述扩增位点的数量,
- [0018] 其中所述不同的靶核酸具有流体通路至所述多个扩增位点,且
- [0019] 其中每个所述扩增位点包括容纳所述多个不同的核酸中的数个核酸的容量;及
- [0020] (b) 使所述扩增反应物反应以产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自包括来自所述溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,
- [0021] 其中所述反应包括同时:(i) 以平均转运速率转运所述不同的靶核酸至所述扩增位点,及(ii) 以平均扩增速率扩增在所述扩增位点的所述靶核酸,其中所述平均扩增速率超过所述平均转运速率。
- [0022] 在一个具体实施方式中,每个所述扩增位点可包括能够结合所述溶液中的所述不同的靶核酸的多个捕获剂。
- [0023] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括在表面上的特征的阵列。
- [0024] 在一个具体实施方式中,每个所述特征的面积可大于被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的排除体积的直径。
- [0025] 在一个具体实施方式中,所述特征可以是非连续的且被缺乏所述捕获剂的所述表面的间隙区域间隔。
- [0026] 在一个具体实施方式中,每个所述特征可包括珠、孔、通道、脊、突起、或其组合。
- [0027] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括在溶液中的珠或在表面上的珠。
- [0028] 在一个具体实施方式中,所述捕获剂可包括与所述不同的靶核酸互补的捕获核酸。
- [0029] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可包括与所述捕获核酸互补的通用序列。
- [0030] 在一个具体实施方式中,所述捕获剂可包括与连接于所述不同的靶核酸的配体结合的受体。
- [0031] 在一个具体实施方式中,每个所述扩增位点可包括被用于在(b)中产生所述扩增子的多个引物。
- [0032] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括在表面上的特征的阵列。
- [0033] 在一个具体实施方式中,所述特征可以是非连续的且被缺乏被用于在(b)中产生所述扩增子的所述引物的所述表面的间隙区域间隔。
- [0034] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括聚合酶和dNTP。
- [0035] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括重组酶和单链结合蛋白。
- [0036] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括分子排挤剂。
- [0037] 在一个具体实施方式中,被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的所述扩增可等温地发生。
- [0038] 在一个具体实施方式中,被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的所述扩增可不包

括变性循环。

[0039] 在一个具体实施方式中,被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的所述扩增可不包括将所述溶液置换为在所述扩增过程中使所述靶核酸和所述扩增子变性的化学试剂。

[0040] 在一个具体实施方式中,被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的所述扩增可不包括将所述溶液加热至在所述扩增期间使所述靶核酸和所述扩增子变性的温度。

[0041] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可为双链DNA分子。

[0042] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可具有小于1,000个核苷酸的平均链长度。

[0043] 在一个具体实施方式中,在(b)期间包括扩增子的克隆群的所述多个扩增位点可超过所述不同的靶核酸对其具有流体通路的所述扩增位点的40%。

[0044] 在一个具体实施方式中,在(b)期间在单个扩增位点从所述单个靶核酸可分别产生足够数量的扩增子以填充各自的扩增位点的所述容量。

[0045] 在一个具体实施方式中,所述扩增子被产生以填充各自扩增位点的所述容量的速率可超过所述单个靶核酸被分别转运到所述单个扩增位点的速率。

[0046] 在一个具体实施方式中,通过应用电场辅助,所述不同的靶核酸可被主动地转运至所述扩增位点。

[0047] 在一个具体实施方式中,所述电场可随反应进行的时间而增大。

[0048] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括表面上的非连续的特征的阵列,所述特征可被所述表面的间隙区域间隔。

[0049] 在一个具体实施方式中,每个所述特征的面积可大于被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的排除体积的直径。

[0050] 在一个具体实施方式中,通过应用第二电场,所述不同的靶核酸可被主动地从所述间隙区域排斥。

[0051] 在一个具体实施方式中,所述电场和所述第二电场可被同时地应用于所述阵列。

[0052] 在一个具体实施方式中,所述电场和所述第二电场可交替重复地应用于所述阵列。

[0053] 在一个具体实施方式中,跨所述间隙区域及电解质可应用所述第二电场。

[0054] 在一个具体实施方式中,跨所述间隙区域及第二表面可应用所述第二电场。

[0055] 在一个具体实施方式中,所述第二电场可通过向所述间隙区域应用交流电或直流电产生。

[0056] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括表面上的非连续的特征的阵列,所述特征可被所述表面的间隙区域间隔。

[0057] 在一个具体实施方式中,每个所述特征的面积可大于被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的排除体积的直径。

[0058] 在一个具体实施方式中,通过应用电场,所述不同的靶核酸可被主动地从所述间隙区域排斥。

[0059] 在一个具体实施方式中,所述转运可包括被动扩散。

[0060] 还提供了用于扩增核酸的方法,所述方法包括:

[0061] (a) 提供扩增反应物,所述扩增反应物包括

- [0062] (i) 扩增位点的阵列, 及
- [0063] (ii) 包括多个不同的靶核酸的溶液,
- [0064] 其中在所述溶液中所述不同的靶核酸的数量超过在所述阵列中所述扩增位点的数量,
- [0065] 其中所述不同的靶核酸具有流体通路至所述多个扩增位点, 且
- [0066] 其中每个所述扩增位点包括容纳所述多个不同的核酸中的数个核酸的容量; 及
- [0067] (b) 使所述扩增反应物反应以产生多个扩增位点, 所述多个扩增位点各自包括来自所述溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,
- [0068] 其中所述反应包括 (i) 从转运到每个所述扩增位点的单个靶核酸产生第一扩增子, 及 (ii) 从转运到每个所述扩增位点的所述单个靶核酸或从所述第一扩增子产生后续的扩增子, 其中在所述扩增位点产生所述后续的扩增子的平均速率超过在所述扩增位点产生所述第一扩增子的平均速率。
- [0069] 在一个具体实施方式中, 每个所述扩增位点可包括被用于在 (b) 中产生所述扩增子的多个引物。
- [0070] 在一个具体实施方式中, 所述第一扩增子的所述产生可包括将至少一个所述引物从非可延伸状态转化为可延伸状态。
- [0071] 在一个具体实施方式中, 所述非可延伸状态可以是由于在所述引物的3'端的延伸阻断部分的存在。
- [0072] 在一个具体实施方式中, 所述延伸阻断部分可包括双脱氧核苷酸, 且所述转化可包括焦磷酸解以从所述至少一个引物除去所述双脱氧核苷酸。
- [0073] 在一个具体实施方式中, 所述扩增位点的阵列可包括在表面上的特征的阵列。
- [0074] 在一个具体实施方式中, 所述特征可以是非连续的且被缺乏被用于在 (b) 中产生所述扩增子的所述引物的所述表面的间隙区域间隔。
- [0075] 在一个具体实施方式中, 所述反应可包括与 (i) 所述第一扩增子的所述产生, 及 (ii) 所述后续的扩增子的所述产生同时地, 将靶核酸从所述溶液转运到所述扩增位点。
- [0076] 在一个具体实施方式中, 在所述扩增位点产生所述后续的扩增子的平均速率可超过从所述溶液转运所述靶核酸至所述扩增位点的平均速率。
- [0077] 在一个具体实施方式中, 在 (b) 期间在单个扩增位点从所述单个靶核酸可分别产生足够数量的扩增子以填充各自的扩增位点的所述容量。
- [0078] 在一个具体实施方式中, 所述扩增子被产生以填充各自扩增位点的所述容量的速率可超过所述单个靶核酸从所述溶液被转运到所述扩增位点的速率。
- [0079] 在一个具体实施方式中, 在 (i) 所述第一扩增子的所述产生, 及 (ii) 所述后续的扩增子的所述产生之前可将所述靶核酸从所述溶液转运到所述扩增位点。
- [0080] 在一个具体实施方式中, 每个所述扩增位点可包括能够结合所述溶液中的所述不同的靶核酸的多个捕获剂。
- [0081] 在一个具体实施方式中, 所述扩增位点的阵列可包括在表面上的特征的阵列。
- [0082] 在一个具体实施方式中, 每个所述特征的面积可大于被转运至每个所述扩增位点的所述单个靶核酸的排除体积的平均直径。
- [0083] 在一个具体实施方式中, 所述特征可以是非连续的且被缺乏所述捕获剂的所述表

面的间隙区域间隔。

[0084] 在一个具体实施方式中,每个所述特征可包括珠、孔、通道、脊、突起、或其组合。

[0085] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括在溶液中的珠或在表面上的珠。

[0086] 在一个具体实施方式中,所述捕获剂可包括与所述不同的靶核酸互补的捕获核酸。

[0087] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可包括与所述捕获核酸互补的通用序列。

[0088] 在一个具体实施方式中,所述捕获剂可包括与连接于所述不同的靶核酸的配体结合的受体。

[0089] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括聚合酶和dNTP。

[0090] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括重组酶和单链结合蛋白。

[0091] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括分子排挤剂。

[0092] 在一个具体实施方式中,所述反应可等温地发生。

[0093] 在一个具体实施方式中,所述反应可不包括变性循环。

[0094] 在一个具体实施方式中,所述反应可不包括将所述溶液置换为在所述反应过程中使所述靶核酸和所述扩增子变性的化学试剂。

[0095] 在一个具体实施方式中,所述反应可不包括将所述溶液加热至在所述反应过程中使所述靶核酸和所述扩增子变性的温度。

[0096] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可以为双链DNA分子。

[0097] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可具有小于1,000个核苷酸的平均链长度。

[0098] 在一个具体实施方式中,包括扩增子的克隆群的所述多个扩增位点可超过在所述阵列中所述扩增位点的40%。

[0099] 在一个具体实施方式中,在(b)期间在单个扩增位点从所述单个靶核酸可分别产生足够数量的扩增子以填充各自的扩增位点的所述容量。

[0100] 在一个具体实施方式中,通过应用电场辅助,所述靶核酸可被主动地转运至扩增位点。

[0101] 在一个具体实施方式中,所述电场可随反应进行的时间而增大。

[0102] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括表面上的非连续的特征的阵列,所述特征可被所述表面的间隙区域间隔。

[0103] 在一个具体实施方式中,每个所述特征的面积可大于被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的排除体积的直径。

[0104] 在一个具体实施方式中,通过应用第二电场,所述不同的靶核酸可被主动地从所述间隙区域排斥。

[0105] 在一个具体实施方式中,所述电场和所述第二电场可被同时地应用于所述阵列。

[0106] 在一个具体实施方式中,所述电场和所述第二电场可交替重复地应用于所述阵列。

[0107] 在一个具体实施方式中,跨所述间隙区域及电解质可应用所述第二电场。

- [0108] 在一个具体实施方式中,跨所述间隙区域及第二表面可应用所述第二电场。
- [0109] 在一个具体实施方式中,所述第二电场可通过向所述间隙区域应用交流电或直流电产生。
- [0110] 在一个具体实施方式中,所述扩增位点的阵列可包括表面上的非连续的特征的阵列,所述特征可被所述表面的间隙区域间隔。
- [0111] 在一个具体实施方式中,每个所述特征的面积可大于被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的排除体积的直径。
- [0112] 在一个具体实施方式中,通过应用电场,所述不同的靶核酸可被主动地从所述间隙区域排斥。
- [0113] 在一个具体实施方式中,所述转运可包括被动扩散。
- [0114] 还提供了创建生物分子的图案化表面的方法,其中方法可包括以下步骤:(a)提供反应物,所述反应物包括(i)在表面上具有非连续的特征的阵列,特征被表面的间隙区域间隔,和(ii)具有多个不同的靶生物分子的溶液;及(b)使反应物反应以转运生物分子至特征,并连接单个生物分子至每个特征,其中电场被应用至间隙区域以从间隙区域排斥生物分子。
- [0115] 在一个具体实施方式中,在所述反应期间第二电场可被应用至所述特征以主动地转运所述生物分子至所述特征。
- [0116] 在一个具体实施方式中,所述多个不同的靶生物分子可包括多个不同的靶核酸。
- [0117] 在一个具体实施方式中,在所述溶液中所述不同的靶核酸的数量可超过在所述阵列中特征的数量,其中所述不同的靶核酸具有流体通路至所述多个特征,且其中每个所述特征可包括容纳所述多个不同的核酸中的数个核酸的容量。
- [0118] 在一个具体实施方式中,在所述反应期间所述靶核酸可被转运至所述特征以产生各自包括来自所述溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群的多个特征,其中所述反应可包括(i)从转运至每个所述特征的单个靶核酸产生第一扩增子,和(ii)从转运到每个所述特征的所述单个靶核酸或从所述第一扩增子产生后续的扩增子,其中在所述特征产生所述后续的扩增子的平均速率可超过在所述特征产生所述第一扩增子的平均速率。
- [0119] 在一个具体实施方式中,在所述反应期间所述靶核酸可被转运至所述特征以产生各自包括来自所述溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群的多个特征,其中所述反应可包括同时地(i)以平均转运速率转运所述不同的靶核酸至所述特征,及(ii)以平均扩增速率扩增在所述特征的所述靶核酸,其中所述平均扩增速率可超过所述平均转运速率。
- [0120] 在一个具体实施方式中,每个所述特征可包括被用于产生所述扩增子的多个引物。
- [0121] 在一个具体实施方式中,所述反应物还可包括聚合酶和dNTP。
- [0122] 在一个具体实施方式中,所述扩增反应物还可包括重组酶和单链结合蛋白。
- [0123] 在一个具体实施方式中,被转运至所述特征的所述靶核酸的所述扩增可等温地发生。
- [0124] 在一个具体实施方式中,被转运至所述特征的所述靶核酸的所述扩增可不包括变性循环。
- [0125] 在一个具体实施方式中,包括扩增子的克隆群的所述多个扩增位点可超过所述阵

列中所述特征的40%。

[0126] 在一个具体实施方式中,每个所述特征可包括能够与所述溶液中所述不同的靶核酸结合或与连接于溶液中所述不同的靶核酸的配体的受体结合的多个捕获剂。

[0127] 在一个具体实施方式中,所述捕获剂可包括与所述不同的靶核酸互补的捕获核酸。

[0128] 在一个具体实施方式中,所述不同的靶核酸可包括与所述捕获核酸互补的通用序列。

[0129] 在一个具体实施方式中,每个所述特征的面积可大于被转运至所述扩增位点的所述靶核酸的排除体积的直径。

[0130] 在一个具体实施方式中,所述电场和所述第二电场可被同时地应用于所述阵列。

[0131] 在一个具体实施方式中,所述电场和所述第二电场可交替重复地应用于所述阵列。

[0132] 在一个具体实施方式中,每个所述特征可包括珠、孔、通道、脊、突起、或其组合。

[0133] 在一个具体实施方式中,跨所述间隙区域及电解质可应用所述电场。

[0134] 在一个具体实施方式中,跨所述间隙区域及第二表面可应用所述电场。

[0135] 在一个具体实施方式中,所述电场可以通过向所述间隙区域应用交流电或直流电产生的。

[0136] 在一个具体实施方式中,所述电场可通过电荷排斥从所述间隙区域排斥所述生物分子以抑制所述生物分子对所述间隙区域的结合。

[0137] 在一个具体实施方式中,所述电场可通过电化学损害在所述间隙区域中的所述生物分子从所述间隙区域排斥所述生物分子。

附图说明

[0138] 图1A显示了通过动力学排除产生的图案化的流动池在第一测序循环后获得的复合图像(四种颜色通道)。

[0139] 图1B显示了具有随机定位的簇的标准的illumina流动池在单一测序循环后获得的复合图像(四种颜色通道)。

[0140] 图2显示了使用通过动力学排除产生的图案化的流动池在第一测序循环后获得的复合图像的PDF和NN函数。

[0141] 图3显示了对准PhiX基因组的前5个基因组位置的簇的空间位置的散点图。不同的基因组位置通过叉、星号、正方形、三角形和菱形指示。

[0142] 图4显示了用于电化学脱附来自流动池表面的物质的流动池结构。电势可以如(a)中所示跨一个导电表面和电解质应用,或如(b)所示跨两个导电表面应用。(b)中所示的流动池的配置也可以用于场辅助的实时的DNA的拉下(pull down),如图(c)所示,实现了在数秒钟内在电极表面上超过100X的DNA浓度。

[0143] 图5显示了电场辅助的生物分子图案的形成的示例性的工作流程。

[0144] 图6显示了在电场存在下(a),及没有电场下(b),在ITO背景上在2 μ m的Au特征上模板的接种及模板的簇扩增。谱线图显示了跨越标记的区域的荧光强度。

[0145] 图7显示了在电场存在下在接种和成簇后的大面积的荧光图像。(a)包含2 μ m Au点

的流动池泳道；(b) 包含200nm Au点的泳道。簇在大面积上与微米和纳米图案化特征对准，这些簇的空间地有序的特性通过相应的傅立叶变换(FFT)证实。

[0146] 图8显示了在电场的存在下，在700nm直径的SiO₂位点上DNA簇的形成。簇是高度有序的，来自间隙面积的荧光极少。

[0147] 图9显示了(a)在HiSeq流动池中杂交测定的结果(1)电场辅助P5和P7引物接枝前，(2)电场辅助P5和P7引物接枝后，(3)电场辅助P5和P7引物接枝并再接枝P5和P7引物后，和(4)电场辅助P5和P7引物接枝，SFA重新包被并再接枝P5和P7引物后；和(b)在每个步骤后，每个流动池泳道的中值荧光强度。

[0148] 图10显示了(a)表示使用电场，在电介质位点上直接杂交的示意图；(b)在间隙区域中存在核酸排斥电场下形成的空间图案化的簇，及(c)在间隙区域中不存在核酸排斥电场下形成的随机排序的簇。

具体实施方式

[0149] 本公开内容提供了核酸文库和用于制备核酸文库的方法。在具体的实施方案中，本公开内容的核酸文库是以位点的阵列的形式。

[0150] 阵列可具有为关于具体的核苷酸序列的克隆的位点。因此，阵列中的单个位点可各自具有单一核苷酸序列的多个拷贝。例如，位点可以具有来源于生物样品的核酸的克隆拷贝，诸如基因组或其亚部分(例如，外显子组)，或转录组(例如，mRNA文库或cDNA文库)或其亚部分。

[0151] 位点在为克隆的阵列中的部分可以超过由泊松分布预测的部分。因此，通过本文所阐述的方法产生的阵列可以具有超泊松分布的克隆位点。超泊松分布可以在阵列的合成期间产生，且无需后续的位点富集或位点纯化步骤(虽然在至少一些实施方案中，如果需要可以进行富集和纯化步骤)。

[0152] 在一些实施方案中，位点可以作为在基底上(或其中)的特征存在。在此类实施方案中，特征可以是克隆，特征在为克隆的阵列中的部分可超过泊松分布，且特征可被空间地布置在重复图案中。因此，位点可以是空间地有序的，例如，以直线网格、六边形网格或其它所需的图案。

[0153] 本公开内容的核酸文库可以使用利用动力学排除的方法制备。当以有效地排除另一个事件或过程发生的足够快的速率发生一个过程时，可发生动力学排除。举例来说，制备核酸阵列，其中阵列的位点被随机地以来自溶液的靶核酸接种，且在扩增过程中生成靶核酸的拷贝以填充每个接种的位点的容量。按照本公开内容的动力学排除方法，接种和扩增过程可以在其中扩增速率超过接种速率的条件下同时进行。因此，在已被第一靶核酸接种的位点制备拷贝的相对快的速率将有效地排除第二核酸接种该位点用于扩增。

[0154] 动力学排除可以利用相对低的速率用于制备靶核酸的第一拷贝对比相对快的速率用于制备靶核酸或第一拷贝的后续的拷贝。在前面段落的实例中，动力学排除的发生归因于靶核酸接种的相对慢的速率(例如相对慢的扩散或转运)对比扩增发生以核酸种子的拷贝填充位点的相对快的速率。在另一个示例性的实施方案中，动力学排除的发生可归因于已接种位点的靶核酸的第一拷贝的形成中的延迟(例如，延迟或缓慢的活化)对比制备后续的拷贝以填充位点的相对快的速率。在这个实例中，单一的位点可能已接种有数个不同

的靶核酸(例如,扩增前几个靶核酸可以存在于每个位点)。然而,对于任何给定的靶核酸,第一拷贝形成可被随机地激活,使得相比生成后续拷贝的速率,第一拷贝形成的平均速率是相对慢的。在这种情况下,虽然单一位点可能已接种有数个不同靶核酸,动力学排除将仅允许那些靶核酸中的一个被扩增。更具体地,一旦第一靶核酸已被激活用于扩增,位点将迅速地以其拷贝填充容量,从而防止了第二靶核酸的拷贝在位点被制备。

[0155] 通过本文所阐述的方法制备的阵列的优点在于,位点的克隆性质提供了在后续的分析中的精度。这避免了当检测具有混合的群的位点时本来将出现的混淆的结果。

[0156] 阵列的另一个优点是,它们具有克隆位点的超泊松分布。这通过避免遗传内容的丢失增加了文库的复杂性,否则遗传内容的丢失可能因为整合进入混合的位点而发生。

[0157] 本文所阐述的方法和阵列的进一步的优点是,具有在基底上特征的阵列的提供,其中特征被空间地布置在重复图案中。如上所述,为克隆的特征的部分可超过泊松分布。泊松分布设置最大37%的占有率。根据本文所阐述的方法,为克隆的特征的补足物(complement)可超过40%、50%、60%、75%或更多。相比随机簇阵列,通过本文阐述的方法产生的阵列提供了对基底的更有效的填充。通过避免通常用于随机簇阵列的图像配准方法的复杂性,这样的阵列也更容易分析地评估。

[0158] 此外,本文所阐述的方法对于在基底上创建被图案化的以便检测的阵列是有利的。例如,在序列检测步骤期间,一些市售的测序平台依赖于具有提供了对检测试剂(例如,由454 LifeSciences (Roche的子公司,Basel Switzerland)供应的平台中的焦磷酸盐、或由Ion Torrent (Life Technologies的子公司,Carlsbad California)供应的平台中的质子)的扩散的屏障的孔的基底。相比将被泊松局限的标准的簇扩增方法,本文所阐述的方法对于增加装载有克隆群的孔的数量可以是有利的。通过避免处理乳液和操作珠,本公开内容的方法也优于ePCR方法。

[0159] 除非另有规定,本文所用的术语将被理解为采用其在相关领域中的普通含义。本文中使用的几个术语及其含义列于下文。

[0160] 如本文所用,术语“活性接种”是指在一个或更多个核酸上施加非扩散力以移动核酸朝向或远离位置。位置可以是阵列的扩增位点。非扩散力可以由外源提供,例如产生电场或磁场的那些,或反应体积内施加分子排挤(molecular crowding)或化学梯度的试剂。

[0161] 如本文所用,当在提及核酸时使用的术语“扩增子”,是指拷贝核酸的产物,其中产物具有与核酸的核苷酸序列的至少一部分相同或互补的核苷酸序列。扩增子可以通过使用核酸、或其扩增子作为模板的多种扩增方法的任一种产生,包括例如,聚合酶延伸、聚合酶链式反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、连接延伸、或连接链式反应。扩增子可以是具有特定核苷酸序列的单一拷贝(例如,PCR产物),或该核苷酸序列的多拷贝(例如,RCA的多联体产物)的核酸分子。靶核酸的第一扩增子典型地是互补拷贝。生成第一扩增子后,从靶核酸或从第一扩增子创建的后续的扩增子,被拷贝。后续的扩增子可以具有与靶核酸基本上互补,或与靶核酸基本相同的序列。

[0162] 如本文所用,术语“扩增位点”是指在阵列中或其上的位点,可以在此处生成一个或更多个扩增子。扩增位点还可以被配置为包含、容纳或连接在位点生成的至少一个扩增子。

[0163] 如本文所用,术语“阵列”是指位点的群,其可以根据相对位置从彼此区分。在阵列

的不同位点的不同的分子可根据阵列中位点的位置从彼此区分。阵列的单个位点可包括特定类型的一个或更多个分子。例如,位点可以包括具有特定序列的单一的靶核酸分子,或位点可以包括具有相同序列的数个核酸分子(和/或其互补序列)。阵列的位点可以是位于相同的基底上的不同特征。示例性特征包括但不限于,基底中的孔、基底中或其上的珠(或其它颗粒)、从基底的突起、基底上的脊或基底中的通道。阵列的位点可以是每个承载不同分子的单独的基底。连接于单独的基底的不同的分子可以根据与基底相关联的表面上基底的位置,或根据在液体或凝胶中基底的位置被鉴定。单独的基底位于表面上的示例性的阵列包括,但不限于,在孔中具有珠的那些。

[0164] 如本文所用,术语“容量”,当提及位点和核酸材料使用时,是指可以占据位点的核酸材料的最大数量。例如,该术语可指在特定的条件下可以占据位点的核酸分子的总数。还可以使用的其它量度包括,例如,可以在特定的条件下占据位点的核酸材料的总质量或特定核苷酸序列的拷贝的总数。通常,对于靶核酸的位点的容量将基本上等同于对于靶核酸的扩增子的位点的容量。

[0165] 如本文所用,术语“捕获剂”是指能够连接、保持或结合至靶分子(例如靶核酸)的材料、化学品、分子或其部分。示例性的捕获剂包括,但不限于,与靶核酸的至少一部分互补的捕获核酸、能够结合至靶核酸(或与其连接的连接部分)的受体-配体结合配对的成员(例如亲和素、链霉抗生物素、生物素、凝集素、碳水化合物、核酸结合蛋白、表位、抗体等)、或能够与靶核酸(或与其连接的连接部分)形成共价键的化学试剂。

[0166] 如本文所用,术语“克隆群”是指相对于特定的核苷酸序列同质的核酸的群。同质的序列通常是至少10个核苷酸长,但可以是甚至更长的,例如包括至少50、100、250、500或1000个核苷酸长。克隆群可衍生自单一靶核酸或模板核酸。通常,克隆群中所有的核酸将具有相同的核苷酸序列。将可以理解,少量的突变(例如,由于扩增人为产物)可以在克隆群发生而不偏离克隆性。

[0167] 如本文所用,术语“变性循环”是指改变扩增反应的过程,使得互补的核酸链成为彼此分离的核酸扩增反应的操作。示例性的操作包括,但不限于,引入使核酸变性的化学试剂,或通过加热或其它操作物理地改变反应,以使核酸变性。数个变性循环可以被包括在循环扩增反应中。也可以包括数个其它循环,例如循环操作,以诱导引物与核酸链杂交。可以在本文所阐述的方法中省略一个或更多个变性循环或其它循环。因此,在至少一些实施方案中,可以进行本公开的扩增反应而没有循环的操作。

[0168] 如本文所用,术语“不同”,当提及核酸使用时,是指核酸具有不与彼此相同的核苷酸序列。两种或更多种核酸可具有沿着其完整长度不同的核苷酸序列。可替代地,两种或更多种核酸可具有沿着其长度的基本部分不同的核苷酸序列。例如,两种或更多种核酸可具有彼此不同的靶核苷酸序列部分,同时还具有彼此相同的通用序列区。

[0169] 如本文所用,术语“流体通路”,当提及在流体中的分子和与流体相接触的位点使用时,是指分子移动到流体或通过流体以接触或进入位点的能力。该术语还可以指分子从位点分离或退出,进入溶液的能力。当不存在阻止分子进入位点、接触位点、从位点分离和/或离开位点的屏障时,可以发生流体通路。然而,即使扩散被延迟、降低或改变,只要通路不是绝对被阻止,理解为存在流体通路。

[0170] 如本文所用,术语“双链”,当提及核酸分子使用时,是指核酸分子中基本上所有的

核苷酸与互补的核苷酸成氢键。部分双链的核酸可以具有至少10%、25%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的其核苷酸与互补核苷酸成氢键。

[0171] 如本文所用,术语“每个”,当提及项目的集合使用时,意指鉴定集合中的单个项目,但除非上下文另有明确说明并不一定是指集合中的每一个项目。

[0172] 如本文所用,术语“排除体积”是指由特定分子所占据的排除其它此类分子的空间的体积。

[0173] 如本文所用,术语“可延伸的”或“可延伸状态”,当提及核酸例如引物使用时,是指核酸对于添加核苷酸(例如,经由聚合酶催化)或添加寡核苷酸(例如,经由连接酶催化)是感受态的。“非可延伸的”或“非可延伸状态”的核酸不是那么感受态,例如,由于延伸阻断部分的存在或不存在3'羟基。

[0174] 如本文所用,术语“间隙区域”是指在基底中或表面上分隔基底或表面的其它区域的区域。例如,间隙区域可从阵列的另一个特征分隔阵列的一个特征。彼此分隔的两个区域可以是离散的,缺乏彼此接触。在另一个实例中,间隙区域可从特征的第二部分分隔特征的第一部分。通过间质区域提供的分隔可以是部分的或完全的分隔。间隙区域将典型地具有不同于表面上的特征的表面材料的表面材料。例如,阵列的特征可以具有超过在间隙区域存在的数量或浓度的捕获剂或引物的数量或浓度。在一些实施方案中,捕获剂或引物可不在间隙区域存在。

[0175] 如本文所用,术语“聚合酶”意图与其在本领域中使用时的一致,且包括,例如,使用核酸作为模板链产生核酸分子的互补的复制的酶。通常,DNA聚合酶结合模板链,且然后沿着模板链移动,顺序地将核苷酸添加到核酸的增长链的3'末端的自由羟基。DNA聚合酶通常从DNA模板合成互补的DNA分子,且RNA聚合酶通常从DNA模板合成RNA分子(转录)。聚合酶可以使用短的RNA或DNA链,称为引物,开始链增长。一些聚合酶可以在其添加碱基至链处取代位点上游的链。这样的聚合酶被称为链置换,意味着其具有从由被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的聚合酶包括但不限于,Bst(嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*))聚合酶的大片段、外切Klenow聚合酶或测序级的T7外切聚合酶。有些聚合酶降解在其前方的链,有效地以其后的增长链替代(5'核酸外切酶活性)。有些聚合酶具有降解其后的链的活性(3'核酸外切酶活性)。一些有用的聚合酶已被修饰,通过突变或其它方式,以降低或消除3'和/或5'核酸外切酶活性。

[0176] 如本文所用,术语“核酸”意图与其在本领域中使用时的一致,并包括天然存在的核酸或其功能的类似物。特别有用的功能的类似物能够以序列特异的方式杂交至核酸,或能够被作为特定核苷酸序列的复制的模板使用。天然存在的核酸通常具有含有磷酸二酯键的骨架。类似物结构可以具有替代的骨架连接,包括本领域已知的多种那些的任一种。天然存在的核酸通常具有脱氧核糖(例如,在脱氧核糖核酸(DNA)中发现的)或核糖(例如,在核糖核酸(RNA)中发现的)。

[0177] 核酸可以包含本领域已知的多种这些糖部分的类似物的任一种。核酸可以包括天然或非天然碱基。在这方面,天然脱氧核糖核酸可以具有选自由腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或鸟嘌呤所构成的组中的一个或更多个碱基,且核糖核酸可以具有选自由尿嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶或鸟嘌呤所构成的组中的一个或更多个碱基。可以包括在核酸中的有用的非天然的碱基是本领域已知的。术语“靶”,当提及核酸使用时,意图作为本文所阐述的方法或组合物

的上下文内的核酸的语义标识符,且不一定限制核酸的结构或功能超出另外明确说明的。

[0178] 如本文所用,术语“速率”,在提及转运、扩增、捕获或其它化学过程中使用时,意图与其在化学动力学和生化动力学中的意思一致。两个过程的速率可以关于最大速率(例如,在饱和时)、前稳态率(例如在平衡之前)、动力学速率常数、或在本领域中已知的其它量度进行比较。在具体实施方案中,特定过程的速率可以关于过程完成的总时间被确定。例如,扩增速率可以关于待完成的扩增采用的时间被确定。然而,特定过程的速率不需要关于过程完成的总时间被确定。

[0179] 如本文所用,术语“重组酶”意图与其在本领域中使用的一致,且包括,例如,RecA蛋白质、T4UvsX蛋白质、来自任何门的任何同源蛋白质或蛋白质复合物,或其功能的变体。该组的第一个成员被鉴定后,真核RecA同源物通常命名为Rad51。其它非同源物重组酶可被用于替代RecA,例如,RecT或RecO。

[0180] 如本文所用,术语“单链结合蛋白质”意指具有结合到单链核酸的功能的任何蛋白质,例如,以防止过早退火、保护单链核酸不受核酸酶消化、从核酸去除二级结构、或为方便核酸的复制。该术语意在包括但不一定限于,被生物化学与分子生物学国际联合会的命名委员会(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB)正式确定为单链结合蛋白质的蛋白质。示例性的单链结合蛋白质,包括但不限于大肠杆菌(*E. coli*) SSB、T4gp32、T7基因2.5SSB、噬菌体 π 29SSB、来自任何门的任何同源蛋白质或蛋白质复合物,或其功能变体。

[0181] 如本文所用,术语“转运”是指分子通过流体的移动。术语可包括被动转运,如分子沿着其浓度梯度的移动(例如,被动扩散)。该术语还可以包括主动转运,分子可以藉以沿着其浓度梯度或逆着其浓度梯度移动。因此,转运可包括应用能量以移动一个或更多个分子至希望的方向或至希望的位置,例如扩增位点。

[0182] 如本文所用,术语“通用序列”是指两个或更多个核酸分子共有的序列的区域,其中分子还具有彼此不同的序列的区域。存在于分子的集合的不同成员中的通用序列,可允许使用与通用序列互补的通用捕获核酸的群捕获多个不同的核酸。相似地,存在于分子的集合的不同成员中的通用序列可允许使用与通用序列互补的通用引物的群复制或扩增多个不同的核酸。因此,通用捕获核酸或通用引物包括能够特异性地杂交通用序列的序列。靶核酸分子可以被修饰以连接通用衔接子,例如,在不同的靶序列的一端或两端。

[0183] 本公开内容提供了扩增核酸的方法。方法包括以下步骤:(a)提供包括以下的扩增反应物(i)扩增位点的阵列,和(ii)具有多个不同的靶核酸的溶液;及(b)使扩增反应物反应以产生多个扩增位点,所述多个扩增位点各自具有来自溶液中的单个靶核酸的扩增子的克隆群,其中反应包括同时地(i)以平均转运速率转运不同的靶核酸至扩增位点,及(ii)以平均扩增速率扩增在扩增位点的靶核酸,其中平均扩增速率超过平均转运速率。在具体的实施方案中,在溶液中不同的靶核酸的数量超过在阵列中扩增位点的数量。典型地,不同的靶核酸具有流体通路至多个扩增位点。此外,每个扩增位点可任选地具有容纳多个不同的核酸中的数个核酸的容量。

[0184] 还提供了用于扩增核酸的方法,包括以下步骤:(a)提供扩增反应物,所述扩增反应物包括(i)扩增位点的阵列,和(ii)具有多个不同的靶核酸的溶液,及(b)使扩增反应物反应以产生多个扩增位点,多个扩增位点各自包括来自溶液中的单个靶核酸的扩增子的克

隆群,其中反应包括(i)从在每个扩增位点的单个靶核酸产生第一扩增子,及(ii)从在每个扩增位点的单个靶核酸或从第一扩增子产生后续的扩增子,其中在扩增位点产生后续的扩增子的平均速率超过在扩增位点产生第一扩增子的平均速率。在具体的实施方案中,在溶液中不同的靶核酸的数量超过在阵列中扩增位点的数量。典型地,不同的靶核酸具有流体通路至多个扩增位点。此外,每个扩增位点可任选地具有容纳多个不同的核酸中的数个核酸的容量。

[0185] 在本文所阐述的方法中使用的扩增位点的阵列可以作为一个或多个基底存在。可用于阵列的基底材料的示例性类型包括玻璃、改性的玻璃、官能化的玻璃、无机玻璃、微球体(例如惰性和/或磁性颗粒)、塑料、多糖、尼龙、硝化纤维素、陶瓷、树脂、二氧化硅、二氧化硅基材料、碳、金属、光纤或光纤束、聚合物和多孔(例如,微量滴定)板。示例性的塑料包括丙烯酸、聚苯乙烯、苯乙烯和其它材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨基甲酸酯和Teflon™。示例性二氧化硅基材料包括硅和各种形式的改性硅。在具体的实施方案中,基底可以在容器内或为容器的部分,所述容器诸如孔、管、通道、比色皿、培养皿、瓶或类似物。特别有用的容器是流动池,例如,如US2010/0111768 A1或Bentley等,Nature 456:53-59 (2008)中描述的,其每个通过参考并入本文。示例性流动池是可商购自Illumina, Inc. (San Diego, CA)的那些。另一种特别有用的容器是在多孔板或微量滴定板中的孔。

[0186] 在一些实施方案中,阵列的位点可以被配置为表面上的特征。特征可以以多种希望的格式的任一种存在。例如,位点可以是孔、凹坑、通道、脊、凸起的区域、钉、柱或类似物。如前上所述,位点可以包含珠。但是,在具体实施方案中,位点不需要包含珠或颗粒。示例性的位点包括存在于用于商业的测序平台的基底的孔,所述测序平台由454 LifeSciences (Roche的子公司,Basel Switzerland)或Ion Torrent (Life Technologies的子公司, Carlsbad California)销售。具有孔的其它基底包括,例如蚀刻光纤和在US 6,266,459;US 6,355,431;US 6,770,441;US 6,859,570;US 6,210,891;US 6,258,568;US 6,274,320;US 2009/0026082 A1;US 2009/0127589 A1;US 2010/0137143 A1;US 2010/0282617 A1或PCT公布号W0 00/63437中描述的其它基底,其每个通过参考并入本文。在一些情况下,列举于这些参考文献的应用的基底在孔中使用珠。包含孔的基底,在本公开内容的方法或组合物中可以使用或不使用珠。在一些实施方案中,基底的孔可以包括凝胶材料(有或没有珠),如美国临时申请号61/769,289中阐述的,其通过参考并入本文。

[0187] 阵列的位点可以是在非金属表面上的金属特征,所述非金属表面诸如玻璃、塑料或以上例举的其它材料。金属层可以使用本领域中已知的方法沉积在表面上,诸如湿等离子体蚀刻、干法等离子体蚀刻、原子层沉积、离子束蚀刻、化学气相沉积、真空溅射法等等。可以适当地使用多种商用仪器的任一种,包括例如, FlexAL®、OpAL®、Ionfab 300plus®、或Optofab3000®系统(Oxford Instruments, UK)。金属层还可以通过电子束蒸发或溅射沉积,如在Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7:239-60 (1977)中阐述的,其通过参考并入本文。诸如以上例举的那些金属层的沉积技术,可以与光刻技术相结合,以在表面上创建金属区域或斑块(patch)。在下文的实施例I和II和美国序列号US 13/492,661中提供了用于结合金属层沉积技术和光刻技术的示例性方法,美国序列号US 13/492,661通过参考并入本文。

[0188] 特征的阵列可以表现为斑点或斑块的网格。特征可以位于重复的图案或不规则的非重复的图案中。特别有用的图案为六角形图案、直线图案、网格图案、具有反射对称性的图案、具有旋转对称性的图案、或类似物。非对称图案也可以是有用的。最近相邻特征的不同配对间的间距可以是相同的,或最近相邻特征的不同配对间的间距可以是不同的。在具体实施方案中,阵列的特征可以各自具有大于约 100nm^2 、 250nm^2 、 500nm^2 、 $1\mu\text{m}^2$ 、 $2.5\mu\text{m}^2$ 、 $5\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、或 $500\mu\text{m}^2$ 的面积。可替代地或另外地,阵列的特征可以各自具有小于约 1mm^2 、 $500\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、 $25\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 、 $5\mu\text{m}^2$ 、 $1\mu\text{m}^2$ 、 500nm^2 、或 100nm^2 的面积。事实上,区域可以具有选自上文例举的那些的上限和下限之间的范围内的尺寸。

[0189] 对于包括在表面上的特征的阵列的实施方案,特征可以是离散的,被间隙区域间隔。区域之间特征和/或间隔的尺寸可以不同,使得阵列可以是高密度、中密度或低密度的。高密度阵列的特征在于具有被小于约 $15\mu\text{m}$ 间隔的区域。中密度阵列具有被约 15 至 $30\mu\text{m}$ 间隔的区域,而低密度阵列具有被大于 $30\mu\text{m}$ 间隔的区域。可用于发明的阵列可具有被小于 $100\mu\text{m}$ 、 $50\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 或 $0.5\mu\text{m}$ 间隔的区域。

[0190] 在具体实施方案中,阵列可以包括珠或其它颗粒的集合。颗粒可以在溶液中悬浮,或其可位于基底的表面上。在溶液中珠阵列的实例是由Luminex (Austin, TX) 商业化的那些。具有位于表面上的珠的阵列的实例包括其中珠位于孔中的那些,诸如BeadChip阵列 (Illumina Inc., San Diego CA) 或在来自454 LifeSciences (Roche的子公司, Basel Switzerland), 或Ion Torrent (Life Technologies的子公司, Carlsbad California) 的测序平台中使用的基底。具有位于表面上的珠的其它阵列在US 6,266,459; US 6,355,431; US 6,770,441; US 6,859,570; US 6,210,891; US 6,258,568; US 6,274,320; US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; US 2010/0282617 A1或PCT公布号WO 00/63437中描述,其每个通过参考并入本文。几个上述参考文献描述了在装载珠于阵列基底中或其上之前,将靶核酸连接于珠的方法。然而将应当理解,珠可被制成包括扩增引物,且然后珠可以用来装载阵列,从而形成在本文阐述的方法中使用的扩增位点。如本文之前阐述的,基底可以无珠地使用。例如,扩增引物可被直接连接于孔或在孔中的凝胶材料。因此,参考文献是可以被修改为在本文所阐述的方法和组合物中使用的材料、组合物或装置的说明。

[0191] 阵列的扩增位点可包括多个能够结合到靶核酸的捕获剂。示例性的捕获剂包括具有连接到靶核酸的相应的结合配偶体的受体和/或配体,其实例在本文之前阐述。特别有用的捕获剂是捕获核酸,其与一种或更多种靶核酸的序列互补。例如,存在于扩增位点的捕获核酸可以具有与通用序列互补的通用捕获序列,所述通用序列存在于每个靶核酸的衔接子序列中。在一些实施方案中,捕获核酸还可以作为用于靶核酸扩增的引物起作用(不论其是否还包含通用序列)。

[0192] 在具体的实施方案中,捕获剂,诸如捕获核酸,可被连接至扩增位点。例如,捕获剂可被连接至阵列的特征的表面。连接可以经由中间结构,诸如珠、颗粒或凝胶。捕获核酸经由凝胶连接于阵列如下文实施例I所示,且进一步通过从Illumina Inc. (San Diego, CA) 可商购的或在通过参考并入本文的WO2008/093098中描述的流动池举例说明。可在本文所阐述的方法和装置中使用的示例性的凝胶,包括但不限于,具有胶体结构的那些,诸如琼脂糖;聚合物网状结构,诸如明胶;或交联的聚合物结构,诸如聚丙烯酰胺、SFA (参见,例如,美

国专利申请公布号2011/0059865 A1,其通过参考并入本文)或PAZAM(参见,例如,美国临时专利申请序列号61/753,833,其通过参考并入本文)。经由珠的连接可以如本文前面阐述的描述和引用的参考文献中所列举的实现。

[0193] 在一些实施方案中,阵列基底的表面上的特征是不连续的,被表面的间隙区域间隔。相比阵列的特征,具有相当低的捕获剂的量或浓度的间隙区域是有利的。缺少捕获剂的间隙区域是特别有利的。例如,在间隙区域相对少量的或不存在的捕获部分有利于靶核酸,及后续生成的簇,定位至希望的特征。在具体实施方案中,特征可以是在表面(例如孔)中凹的特征,且特征可以包含凝胶材料。包含凝胶的特征可以被表面上的间隙区域彼此间隔,在那里凝胶基本上不存在,或如果存在,凝胶基本上不能支持核酸的定位。用于制备和使用具有包含凝胶的特征如孔的基底的方法和组合物,列于美国临时申请号61/769,289,其通过参考并入本文。

[0194] 本公开内容的方法或组合物中使用的靶核酸可以包括DNA、RNA或其类似物。靶核酸的来源可以是基因组DNA、信使RNA、或来自天然来源的其它核酸。在某些情况下,来自这些来源的靶核酸可以在本文的方法或组合物中使用之前被扩增。可以使用多种已知的扩增技术的任一种,包括但不限于,聚合酶链式反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)、或随机引物扩增(RPA)。应当理解,在本文阐述的方法或组合物中使用之前扩增靶核酸是任选的。因此,在本文阐述的方法和组合物的一些实施方案中,在使用之前不扩增靶核酸。靶核酸可任选地来自于合成文库。合成的核酸可以具有天然DNA或RNA组成,或可以是其类似物。

[0195] 靶核酸可以来源的示例性的生物样品包括,例如,来自哺乳类的那些诸如啮齿目,小鼠、大鼠、兔、豚鼠,有蹄类,马、绵羊、猪、山羊、牛、猫、狗,灵长类,人和非人的灵长类;植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、玉米、高粱、燕麦、小麦、大米、油菜、或大豆;藻类诸如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*);线虫类诸如秀丽线虫(*Caenorhabditis elegans*);昆虫诸如黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、蚊子、果蝇、蜜蜂或蜘蛛;鱼类如斑马鱼;爬行类;两栖类诸如青蛙或非洲爪蟾(*Xenopus laevis*);盘基网柄菌(*dictyostelium discoideum*);真菌诸如卡氏肺孢子虫(*pneumocystis carinii*)、红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)、酵母、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);或恶性疟原虫(*plasmodium falciparum*)。靶核酸还可以来自原核生物,诸如细菌、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、葡萄球菌(*staphylococci*)、或肺炎支原体(*mycoplasma pneumoniae*);古细菌;病毒诸如丙型肝炎病毒或人免疫缺陷病毒;或类病毒。靶核酸可以来自以上生物的同质的培养物或群,或可替代地来自几个不同的生物的集合,例如,在群落或生态系统中。

[0196] 靶核酸不需要来自天然来源,且而是可以使用已知的技术合成。例如,可以合成基因表达探针或基因分型探针,并用于创建本文阐述的方法中的阵列。

[0197] 在一些实施方案中,靶核酸可以作为一个或更多个较大的核酸的片段被获得。可以使用本领域已知的多种技术的任一种进行片段化,例如,雾化、声处理、化学裂解、酶裂解、或物理剪切。从使用通过复制较大的核酸的仅一部分产生扩增子的特定扩增技术也可导致片段化。例如,PCR扩增,产生了具有通过用于扩增的侧翼引物之间的片段的长度定义的尺寸的片段。

[0198] 靶核酸或其扩增子的群,可以具有本文所阐述的方法或组合物的特定应用希望的或适当的平均链长度。例如,平均链长度可以小于约100,000个核苷酸、50,000个核苷酸、10,000个核苷酸、5,000个核苷酸、1,000个核苷酸、500个核苷酸、100个核苷酸、或50个核苷酸。可替代地或另外地,平均链长度可以大于约10个核苷酸、50个核苷酸、100个核苷酸、500个核苷酸、1,000个核苷酸、5,000个核苷酸、10,000个核苷酸、50,000个核苷酸、或100,000个核苷酸。靶核酸或其扩增子的群的平均链长度可以在上文记述的最大和最小值之间的范围内。应当理解的是,在扩增位点生成的扩增子(或以其它方式制成或本文使用的)可以具有选自上文例举的那些的上限和下限之间的范围内的平均链长度。

[0199] 在一些情况下,靶核酸的群可以在条件下产生或以其它方式配置为具有其成员的最大长度。例如,在本文阐述的方法的一个或更多个步骤中使用的,或在特定的组合物中存在的成员的最大长度可以小于约100,000个核苷酸、50,000个核苷酸、10,000个核苷酸、5,000个核苷酸、1,000个核苷酸、500个核苷酸、100个核苷酸或50个核苷酸。可替代地或另外地,靶核酸或其扩增子的群,可以在条件下产生或以其它方式配置为具有其成员的最小长度。例如,在本文阐述的方法的一个或更多个步骤中使用的,或在特定的组合物中存在的成员的最小长度可以大于约10个核苷酸、50个核苷酸、100个核苷酸、500个核苷酸、1,000个核苷酸、5,000个核苷酸、10,000个核苷酸、50,000个核苷酸、或100,000个核苷酸。群中靶核酸的最大和最小链长度可以在上文记述的最大和最小值之间的范围内。应当理解的是,在扩增位点生成的扩增子(或以其它方式制成或本文使用的)可以具有在上文例举的上限和下限之间的范围内的最大和/或最小链长度。

[0200] 在具体实施方案中,相对于扩增位点的面积对靶核酸进行尺寸确定,例如,以促进动力学排除。例如,阵列的每个位点的面积可以大于靶核酸的排除体积的直径(the area for each of the sites of an array can be greater than the diameter of the excluded volume of the target nucleic acids in order to achieve kinetic exclusion),以实现动力学排除。例如,考虑利用表面上的特征的阵列的实施方案,每个特征的面积可以大于被转运到扩增位点的靶核酸的排除体积的直径。可以确定靶核酸的排除体积及其直径,例如,从靶核酸的长度。用于确定核酸的排除体积和排除体积的直径的方法描述于,例如,US 7,785,790;Rybenkov等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90:5307-5311 (1993);Zimmerman等人,J.Mol.Biol.222:599-620 (1991);或Sobel等人,Biopolymers 31:1559-1564 (1991),其每个通过参考并入本文。

[0201] 阵列的扩增位点可以包括用于从靶核酸产生扩增子的多个引物。在一些实施方案中,存在于扩增位点的引物可以具有与通用序列互补的通用引物序列,所述通用序列存在于每个靶核酸的衔接子序列中。在具体的实施方案中,多个引物可连接于扩增位点。引物可以被连接于扩增位点,如以上对捕获核酸阐述的。

[0202] 如本文前述,阵列基底的表面上的特征可以是不连续的,被表面的间隙区域间隔。在具体实施方案中,相比阵列的特征,间隙区域将具有相当低的引物的量或浓度。缺少引物的间隙区域是特别有利的。例如,在间隙区域相对少量的或不存在的引物有利于扩增子定位至阵列的表面上的特征。这种配置为每个阵列特征创建了边界,从而赋予了特征对通过本文所阐述的方法中接种的靶核酸的扩增产生的扩增子的有限容量。

[0203] 本公开内容的方法可以包括使扩增反应物反应以产生多个扩增位点的步骤,扩增

位点各自包括来自已接种位点的单个靶核酸的扩增子的克隆群。在一些实施方案中,扩增反应进行直到产生足够数量的扩增子,以填充各自扩增位点的容量。以这样填充已经接种的位点至容量排除了后续的靶核酸在该位点装载,因此在该位点产生了扩增子的克隆群。因此,在一些实施方案中,希望产生扩增子以填充扩增位点的容量的速率超过单个靶核酸被分别转运到单个扩增位点的速率。

[0204] 在一些实施方案中,在第二靶核酸到达位点前,即使扩增位点未被填充至容量,可以实现表观的克隆性(apparent clonality)。在某些情况下,第一靶核酸的扩增可进行到制备了足够数量的拷贝的点,以有效地超出或压倒来自被转运到位点的第二靶核酸的拷贝的产生。例如,在使用小于500nm的直径的圆形特征的桥式扩增过程的实施方案中,已经确定在第一靶核酸的指数扩增14个循环后,来自相同位点的第二靶核酸的污染将产生不充分数量的污染的扩增子,对Illumina测序平台上的合成测序法分析产生不利影响。

[0205] 如通过上述实例证明的,在所有实施方案中阵列中的扩增位点不必是完全地克隆的。而是,对于一些应用,单个扩增位点可主要被来自第一靶核酸的扩增子填充,且也可以具有来自第二靶核酸的低水平的污染扩增子。阵列可以具有具有低水平的污染扩增子的一个或更多个扩增位点,只要污染水平不具有对后续阵列的使用的不可接受的影响。例如,当阵列将在检测应用中使用,可接受水平的污染将是不以不可接受的方式影响检测技术的信噪比或分辨率的水平。因此,表观的克隆性将通常与由本文所阐述的方法制备的阵列的特定用途或应用相关。对于特定应用,在单个扩增位点可以是可接受的污染的示例性水平,包括但不限于,至多0.1%、0.5%、1%、5%、10%或25%的污染扩增子。阵列可以包括具有这些示例性水平的污染扩增子的一个或更多个扩增位点。例如,阵列中高达5%、10%、25%、50%、75%、或甚至100%的扩增位点可以具有一些污染扩增子。

[0206] 在特定的实施方案中,本公开内容的方法同时地进行:(i)以平均转运速率转运靶核酸至扩增位点,及(ii)以平均扩增速率扩增在扩增位点的靶核酸,其中平均扩增速率超过平均转运速率。因此,动力学排除可以在此类实施方案中通过使用转运的相对慢的速率实现。例如,可以选择足够低浓度的靶核酸以实现希望的平均转运速率,较低的浓度导致了转运的较慢的平均速率。可替代地或另外地,高粘度的溶液和/或溶液中存在分子排挤剂(molecular crowding agent)可被用于降低转运速率。有用的分子排挤剂的实例包括,但不限于,聚乙二醇(PEG)、ficoll、葡聚糖、或聚乙烯醇。示例性的分子排挤剂和制剂列于US 7,399,590,其通过参考并入本文。可以调节以实现希望的转运速率的另一个因素是靶核酸的平均尺寸。

[0207] 在方法的某些实施方案中,在扩增起始前,靶核酸可例如通过扩散或其它过程被转运至扩增位点。在这种情况下,动力学排除可以通过利用相比后续的扩增子被制备的速率,相对慢的产生第一扩增子的速率来实现。例如,扩增子形成的不同的速率可以通过在整个扩增反应中,使用以暂时非可延伸的状态起始的第一引物用于第一扩增子的形成,和以可延伸的状态的其它引物用于后续的扩增子的形成被实现。像这样,第一引物至可延伸的状态转化的延迟将导致第一个扩增子形成的延迟,而后续的扩增子的形成不经历这样的延迟。以这种方式,在扩增位点产生后续的扩增子的平均速率超过在扩增位点产生第一扩增子的平均速率。

[0208] 经由扩增子形成的差别速率的动力学排除的更详细的实例如下。扩增位点可包括

连接其的3个亚群的引物。引物的第一亚群功能为捕获靶核酸(经由捕获序列)及作为第一扩增子的形成的引物。第一亚群的引物被可逆地自延伸阻断,例如,经由在3'端的双脱氧核苷酸。第二亚群的引物可以具有P5引物序列,且第三群的引物可以具有P7引物序列。第一和第二亚群的引物不包括双脱氧核苷酸,且因此是充分地延伸感受态的。靶核酸可以被构造为包括(从5'至3')P7引物结合序列、数个不同的靶核苷酸序列之一、P5引物结合序列、和捕获序列互补序列。数个不同的靶核酸可杂交至第一亚群的引物(通过捕获序列)。然后捕获引物可被转化为可延伸的状态,例如,通过在焦磷酸解的条件下以聚合酶处理(例如,在过量的焦磷酸盐的存在下)。可以使用条件,其中在产生后续的扩增子以填充扩增位点的时间段期间,平均仅一个捕获引物将转化为可延伸的形式。因此,尽管在单个扩增位点可能存在数个潜在的污染靶核酸,动力学排除会导致仅从靶核酸之一形成扩增子,从而在扩增位点创建扩增子的克隆群。为了说明的目的,此实例已经关于单个扩增位点描述,但应当理解的是,反应可包括在扩增位点的阵列的靶核酸的连接和扩增。

[0209] 多种暂时不可延伸的引物的任一种连同用于将这些引物转化至可延伸的状态的各自的技术和试剂可用于本文所阐述的方法。上文的实例描述了使用通过焦磷酸解去除的双脱氧核苷酸。其它不可延伸的核苷酸可以存在于引物中并通过焦磷酸解去除。此外,双脱氧核苷酸或其它非可延伸的核苷酸可以经由其它已知的技术,包括例如,聚合酶或其它合适的酶的外切酶活性去除。在其它实施方案中,引物可以包括可逆终止子,如基于终止子的合成测序方法中使用的那些。可逆的终止子和用于除去它们的技术的实施描述于,例如, Bentley等人, Nature 456:53-59 (2008)、WO 04/018497; US 7,057,026; WO 91/06678; WO 07/123744; US 7,329,492; US 7,211,414; US 7,315,019; US 7,405,281、及US 2008/0108082,其每个通过参考并入本文。

[0210] 虽然使用不同地活化的引物以导致第一扩增子和后续的扩增子的形成的不同的速率已对在扩增前靶核酸存在于扩增位点的实施方案在上文例证,方法还可以在扩增发生时靶核酸被转运(例如经由扩散)到扩增位点的条件下进行。因此,动力学排除可以利用相对于后续的扩增子的形成相对较慢的转运速率和相对较慢的产生第一扩增子两者。因此可以进行本文阐述的扩增反应,使得与靶核酸从溶液被转运到扩增位点同时地(i)第一扩增子的产生,及(ii)在阵列的其它位点后续的扩增子的产生。在特定的实施方案中,在扩增位点产生后续的扩增子的平均速率可以超过从溶液转运靶核酸至扩增位点的平均速率。在某些情况下,在单个扩增位点可以从单一的靶核酸生成足够数量的扩增子以填充各自扩增位点的容量。扩增子被产生以填充各自扩增位点的容量的速率,例如,可以超过单个靶核酸从溶液被转运到扩增位点的速率。

[0211] 用于本文阐述的方法的扩增反应物优选能够在扩增位点迅速地制备靶核酸的拷贝。典型地,本公开内容的方法中使用的扩增反应物将包括聚合酶和核苷酸三磷酸(NTP)。可以使用本领域中已知的多种聚合酶的任一种,但在一些实施方案中,可优选使用核酸外切酶阴性的聚合酶。对于其中制备DNA拷贝的实施方案,NTP可以是脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)。典型地,四种天然的种类,dATP、dTTP、dGTP和dCTP,将存在于DNA扩增反应物中;然而,如果需要可以使用类似物。对于其中制备RNA拷贝的实施方案,NTP可以是核苷酸三磷酸(rNTP)。典型地,四种天然的种类,rATP、rUTP、rGTP和rCTP,将存在于RNA扩增反应物中;然而,如果需要可以使用类似物。

[0212] 扩增反应物还可包括促进扩增子的形成,及在某些情况下增加扩增子形成的速率的组分。一个实例是重组酶。重组酶可通过允许重复侵入/延伸促进扩增子的形成。更具体地,通过使用靶核酸作为扩增子的形成的模板的聚合酶,重组酶通过聚合酶和引物的延伸可以促进靶核酸的侵入。此过程可以重复作为链式反应,其中从每一轮的侵入/延伸产生的扩增子作为在后续一轮中的模板。由于不需要变性循环(例如,经由加热或化学变性),该过程可以比标准PCR更迅速地发生。因此,重组酶促进的扩增可以等温地进行。通常希望在重组酶促进的扩增反应物中包括ATP、或其它核苷酸(或在某些情况下,非可水解的其类似物),以促进扩增。重组酶和单链结合(SSB)蛋白质的混合物是特别有用的,因为SSB可以进一步促进扩增。重组酶促进的扩增的示例性的制剂包括由TwistDx (Cambridge,UK) 市售为TwistAmp试剂盒的那些。重组酶促进的扩增反应物的有用组分和反应条件列于US 5,223,414和US 7,399,590,其每个通过参考引入本文。

[0213] 可以被包括在扩增反应物中以促进扩增子的形成及在某些情况下增加扩增子的形成速率的组分的另一个实例是解旋酶。解旋酶可以通过允许扩增子的形成的链式反应促进扩增子的形成。由于不需要变性循环(例如,经由加热或化学变性),该过程可以比标准PCR更迅速地发生。因此,解旋酶促进的扩增可以等温地进行。解旋酶和单链结合(SSB)蛋白质的混合物是特别有用的,因为SSB可以进一步促进扩增。解旋酶促进的扩增的示例性的制剂包括来自Biohelix (Beverly,MA) 市售为IsoAmp试剂盒的那些。此外,包括解旋酶蛋白质的有用的制剂的实例描述于US 7,399,590和US 7,829,284,其每个通过参考引入本文。

[0214] 可以被包括在扩增反应物中以促进扩增子的形成及在某些情况下增加扩增子的形成速率的组分的还另一个实例是起点结合蛋白。

[0215] 扩增反应发生的速率可通过增加扩增反应的一个或更多个活性组分的浓度或数量而增加。例如,可以增加聚合酶、核苷酸三磷酸、引物、重组酶、解旋酶或SSB的数量或浓度以增加扩增速率。在一些情况下,数量或浓度(或在本文阐述的方法中以其它方式操纵)增加的扩增反应的一个或更多个活性组分是扩增反应的非核酸组分。

[0216] 还可以通过调节温度增加本文阐述的方法中的扩增速率。例如,在一个或更多个扩增位点的扩增速率可以通过增加在位点的温度至最高温度被增加,在此处由于变性或其它不良事件反应速度下降。最佳的或希望的温度可以从使用的扩增组分的已知特性或对于给定的扩增反应混合物凭经验被确定。也可以调节用于扩增的引物的特性以增加扩增速率。例如,可调节引物的序列和/或长度。这样的调节可以基于先验预测的引物解链温度(T_m)或凭经验进行。

[0217] 用于增加在扩增位点的扩增速率的另一个选择是增加在扩增位点的扩增反应的一个或更多个活性组分的局部浓度。活性组分可以包括一个或更多个非核酸组分。在一些实施方案中,使用电操作,诸如电泳、等速电泳、电流或电压的直接脉冲或类似的,扩增反应的一个或更多个活性组分可被吸引至扩增位点。可替代地或另外地,一个或更多个扩增组分可包括能将其补充至扩增位点的亲和标签。亲和标签可以带电,使得电操作将吸引适当地加标签的组分至扩增位点。也可以使用非带电的亲和标签。例如,本领域中已知的多种配体或受体的任一种,如本文阐述的作为捕获剂的实例的那些,可作为用于扩增反应的组分的亲和标签。如在用于核酸的捕获剂的情况下,扩增位点可包括用于扩增组分的亲和标签的结合配偶体。因此,由于在扩增位点的适当的配偶体的相互作用,可以增加亲和标签的

扩增组分的局部浓度。在其中扩增位点是基底的表面的具体实施方案中,亲和标签的结合配偶体可被连接于表面。

[0218] 此外,可以使用磁性或光学力增加扩增反应物的局部浓度。在这种情况下,一个或更多个扩增反应物可包括可以被这样的力操作的磁性标签或光学标签。

[0219] 扩增反应发生的速率可通过增加一个或更多个扩增反应物的活性而增加。例如,可以向使用聚合酶的反应中添加增加聚合酶的延伸速率的辅因子。在一些实施方案中,可以向聚合酶反应中添加如镁、锌或锰的金属辅因子,或可以添加甜菜碱。

[0220] 在本文阐述的方法的一些实施方案中,希望使用双链的靶核酸的群。已经令人惊讶地观察到,在动力学排除的条件下,在位点的阵列的扩增子的形成对双链靶核酸是有效的。例如,在重组酶和单链结合蛋白的存在下,具有扩增子的克隆群的多个扩增位点可以从双链靶核酸更有效地产生(相比在相同浓度的单链靶核酸)。然而,应当理解的是,单链靶核酸可在本文阐述的方法的一些实施方案中使用。

[0221] 本文阐述的方法可以使用多种扩增技术的任一种。可以使用的示例性的技术,包括但不限于,聚合酶链式反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)、或随机引物扩增(RPA)。在一些实施方案中,扩增可以在溶液中进行,例如,当扩增位点能够在具有希望的容量的体积中包含扩增子时。优选地,在本公开内容的方法中动力学排除的条件下使用的扩增技术将对固相进行。例如,用于扩增的一个或更多个引物可以连接于在扩增位点的固相。在PCR实施方案中,用于扩增的一个或两个引物可以被连接至固相上。利用连接于表面的两个种类的引物的格式通常被称为桥式扩增,因为双链扩增子在侧接已复制的模板序列的两个表面连接的引物之间形成桥状结构。可用于桥式扩增的示例性试剂和条件描述于,例如,美国专利号5,641,658;美国专利公布号2002/0055100;美国专利号7,115,400;美国专利公布号2004/0096853;美国专利公布号2004/0002090;美国专利公布号2007/0128624;和美国专利公布号2008/0009420,其每个通过参考并入本文。固相PCR扩增也可以以连接于固相支持物的扩增引物之一和溶液中的第二引物进行。使用表面连接的引物和可溶的引物的组合的示例性格式是乳液PCR,例如,描述于,Dressman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 100:8817-8822(2003)、WO 05/010145、或美国专利公布号2005/0130173或2005/0064460,其每个通过参考并入本文。乳液PCR是该格式的说明,且将被理解的是,为了本文阐述的方法的目的,乳液的使用是任选的,且事实上在几个实施方案中不使用乳液。使用在本文其它地方示例的用于促进或增加扩增的速率的组分,上述列举的PCR技术可被修改用于非循环扩增(例如等温扩增)。相应地,上述列举的PCR技术可在动力学排除的条件下使用。

[0222] 可以修改RCA技术用于在本公开内容的方法中使用。在RCA反应中可以使用的示例性组分和RCA产生扩增子的原理描述于,例如,Lizardi等人,Nat.Genet.19:225-232(1998)和US 2007/0099208 A1,其每个通过参考并入本文。用于RCA的引物可以在溶液中或在扩增位点连接于固相支持物表面。根据本文的教导,可以修改上述参考文献中列举的RCA技术,例如,以增加扩增的速率以适应特定的应用。因此,RCA技术可在动力学排除的条件下使用。

[0223] 可以修改MDA技术用于在本公开内容的方法中使用。MDA的一些基本原理和有利的条件描述于,例如Dean等人,Proc Natl.Acad.Sci.USA 99:5261-66(2002);Lage等人,Genome Research 13:294-307(2003);Walker等人,Molecular Methods for Virus Detection,Academic Press,Inc.,1995;Walker等人,Nucl.Acids Res.20:1691-96

(1992);US 5,455,166;US 5,130,238;和US 6,214,587,其每个通过参考并入本文。用于MDA的引物可以在溶液中或在扩增位点连接于固相支持物表面。根据本文的教导,可以修改上述参考文献中例举的MDA技术,例如,以增加扩增的速率以适应特定的应用。相应地,MDA技术可在动力学排除的条件下使用。

[0224] 在特定实施方案中,上述例举的扩增技术的组合可用于在动力学排除条件下制备阵列。例如,RCA和MDA可以组合使用,其中RCA被用于在溶液中产生多联体扩增子(如使用溶液相引物)。然后扩增子可作为模板,用于使用连接于扩增位点的固相支持物表面的引物的MDA。在此实例中,组合的RCA和MDA步骤后产生的扩增子将被连接于扩增位点的表面。

[0225] 如关于上述若干实施方案例证的,本公开内容的方法不需要使用循环扩增技术。例如,靶核酸的扩增可以在扩增位点进行,而不存在变性循环。示例性的变性循环包括引入化学变性剂至扩增反应和/或增加扩增反应的温度。因此,靶核酸的扩增不需要包括以使靶核酸和扩增子变性的化学试剂代替扩增溶液的步骤。类似地,靶核酸的扩增不需要包括将溶液加热至使靶核酸和扩增子变性的温度。因此,可以等温地进行在扩增位点扩增靶核酸,持续本文阐述的方法的持续时间。事实上,在本文阐述的扩增方法可发生而没有在标准条件下对一些扩增技术进行的一个或更多个循环操作。此外,在一些标准的固相扩增技术中,在靶核酸被装载到基底上之后,且在扩增被起始之前进行洗涤。然而,在本方法的实施方案中,不需要在转运靶核酸至反应位点和在扩增位点扩增靶核酸之间进行洗涤步骤。而是,允许同时发生转运(如经由扩散)和扩增,以提供动力学排除。

[0226] 在一些实施方案中,可能希望重复在动力学排除条件下发生的扩增循环。因此,虽然可以在单个扩增位点制备靶核酸的拷贝而没有循环操作,扩增位点的阵列可以被循环地处理,以增加每个循环后包含扩增子的位点的数目。在具体的实施方案中,从一个循环至下一个循环,扩增条件可以修改。例如,如上所述用于改变转运速率或改变扩增速率的一个或更多个条件可在循环之间调节。就此,转运速率可以从循环至循环增加,转运速率可以从循环至循环减少,扩增速率可以从循环至循环增加,或扩增速率可以从循环至循环减少。

[0227] 本文阐述的方法可以被修改为使用电场(e-场)辅助的转运靶核酸至阵列的扩增位点。例如,阵列的每个扩增位点可以被电学地耦合到电源以产生吸引靶核酸的电荷。在一个配置中,在扩增位点的正电荷可经由带负电荷的糖-磷酸骨架吸引核酸。用于使用e-场辅助吸引核酸至阵列的位点的示例性方法和装置描述于US 2009/0032401 A1中,其通过参考并入本文。e-场辅助可在本公开内容的方法中使用,例如,在多个不同的靶核酸在溶液中的条件下,使得核酸靶在每个扩增步骤期间具有至扩增位点的阵列的流体通路。在每个扩增位点的电荷可被调节,以达到动力学排除。可替代地或另外地,为了调节电荷,可以调节本文阐述的用于改变靶核酸转运速率或用于改变扩增速率的其它条件,以达到动力学排除。相应地,可以调节在阵列的扩增位点的电荷以吸引靶核酸,而在阵列的多个扩增位点同时发生扩增,其中平均扩增速率超过靶核酸被转运(即在e-场辅助下转运)到扩增位点的平均速率。

[0228] 在利用e-场辅助的转运靶核酸到扩增位点的特定的实施方案中,e-场可以一致地应用于整个扩增反应过程。可替代地,随着扩增反应的进行,且随着扩增位点填充以扩增子,e-场可被改变(例如增加或减少)。例如,增加e-场可以提供增加获得靶核酸(即在每个位点转而被扩增以产生扩增子的克隆群)的扩增位点的数目的益处。e-场的增加速率,及增

加的幅度范围,可被选择以平衡随着时间的靶核酸转运的增加速率与随着同一时期的已成为有效地被填充的扩增位点的增加数目。再次,取决于通过方法产生的阵列的应用,有效的填充可以是在扩增位点已成为以第一靶核酸的拷贝填充至容量的点,由此防止任何第二靶核酸在该位点扩增。可替代地,有效的填充可以是在特定的扩增位点第二靶核酸的扩增会产生被认为是可忽略不计的或对于阵列的希望的使用以其它方式可接受的足够低的污染扩增子的部分的点。

[0229] 通常,e-场辅助允许对靶核酸至阵列的一个或更多个扩增位点的转运的进一步水平的控制。虽然e-场的辅助的使用已在上述在转运靶核酸至阵列的扩增位点同时地在阵列的不同位点发生扩增的内容中例举,在替代的实施方案中,e-场辅助可被用于在该位点的扩增起始前,转运靶核酸至扩增位点。e-场辅助可用于本文所阐述的方法或组合物,以转运靶核酸以外的靶生物分子至感兴趣的位点,例如至阵列的特征。

[0230] 在具体的实施方案中,e-场可以基本均一地应用到阵列的所有扩增位点。因此,在溶液中的靶核酸将具有被转运到任何给定的扩增位点的相同概率。在替代实施方案中,e-场可以应用到存在于阵列中的扩增位点的仅一个子集。以这种方式,e-场辅助可用于选择性地优于其它位点填充一些位点。此外,如果需要,引力电荷可在扩增位点的第一子集应用,为了转运靶核酸至扩增位点的第一子集,且与此同时,排斥电荷可被应用至扩增位点的第二子集,以抑制靶核酸被转运到这些位点或从位点的第二子集去除(例如通过解吸或降解)靶核酸。类似地,排斥电荷可被应用于阵列的间隙区域,以抑制靶核酸被转运到间隙区域或从间隙区域去除(例如,经由解吸或降解)靶核酸,如下文及实施例III中进一步详细阐述的。

[0231] 在具体实施方案中,阵列的间隙区域可以电学地耦合到电源以产生抑制靶核酸或其它生物分子结合或去除靶核酸或其它生物分子的电荷。在一个配置中,在间隙区域的负电荷可经由带负电荷的糖-磷酸骨架排斥核酸。可替代地或另外地,在间隙区域中的电荷可被用于创建电化学地损坏核酸和生物分子的表面定位的pH变化。

[0232] e-场排斥可在本公开内容的方法中使用,例如,在多个不同的靶核酸在溶液中的条件下,使得核酸靶在每个扩增步骤期间具有至扩增位点的阵列的流体通路。当在阵列的特征捕获核酸,和任选的,在动力学排除的条件下在特征扩增核酸时,可以调节在阵列的间隙区域的电荷以排斥核酸(例如,通过去除或结合抑制)。对调节电荷可替代地或另外地,可以调节本文阐述的用于改变靶核酸至特征转运速率或用于改变扩增速率的其它条件,以达到动力学排除。相应地,可以调节在阵列的间隙区域的电荷以排斥靶核酸,而在阵列的不同扩增位点同时发生扩增,其中平均扩增速率超过靶核酸被转运到扩增位点的平均速率。相应地,在间隙区域的电场的排斥,可以与本文阐述的用于转运核酸(或其它生物分子)至阵列的特征并实现动力学排除的其它方法结合使用。

[0233] 使用本文阐述的方法和装置的在间隙区域的电场的排斥可以提供改善在特征而不是在间隙区域的核酸(或其它生物分子)的特异性定位的优点。此优点可以按照排斥是否经由电荷排斥以抑制核酸或其它生物分子的结合的机制、经由核酸和生物分子的表面定位的电化学损坏或经由其它机制工作。在间隙区域的电场的排斥可以用于改善核酸或其它生物分子的特异性定位至感兴趣的特征,特别是当感兴趣的特征具有比表面定位的电化学损坏的范围更高的高度。

[0234] 一些实施方案可以利用与电场辅助的从阵列的间隙区域排斥核酸(或其它生物分子)相结合的电场辅助的转运核酸(或其它生物分子)至阵列的特征。引力电场和排斥电场可以同时应用于阵列,或两个场可被分别应用。例如,两个场可被分别应用,使得以交替重复应用场(例如,引力场可被应用于特征,而排斥场是关闭的,然后引力场可被关闭,而排斥场应用于间隙区域,且该顺序可被重复一次或多次)。

[0235] 电场可以跨阵列的区域和电解质被应用,或可以跨阵列的区域和第二表面被应用。例如,图4a显示了电场可跨阵列的间隙区域和电解质被应用的配置,且图4b显示了电场可跨阵列的间隙区域和第二表面被应用的配置。类似的配置可以用于应用引力场至阵列的特征。此外,电场,不论应用至特征或间隙区域,可以通过向阵列的适当区域应用交流电流或直流电流创建。

[0236] 相应地,本公开内容提供了创建生物分子的图案化表面的方法,其中方法可包括以下步骤:(a)提供反应物,所述反应物包括(i)在表面上具有非连续的特征的阵列,特征被表面的间隙区域间隔,和(ii)具有多个不同的靶生物分子的溶液;及(b)使反应物反应以转运生物分子至特征,并连接单个生物分子至每个特征,其中电场被应用至间隙区域以从间隙区域排斥生物分子。在该方法中使用的特别有用的生物分子是核酸。在该方法中在动力学排除的条件下,核酸可在特征被扩增,所述条件如在本文其它地方阐述的那些。在使用电场的某些实施方案中,用于阵列的基底可包括透明的导电体层。导电体层可以被用作连接诸如电池或信号发生器的电源的电极。如果需要,阵列的特征(例如在孔的阵列中的孔的内表面)可以包含裸露或绝缘的导电层,其中跨导电层的电压可被用于操作核酸和/或扩增反应物上的力,以控制至位点的转运速率,在位点捕获,从位点去除和/或在位点扩增。在具体实施方案中,电场可被应用于孔的外表面上,使得穿透容器壁的电场对管内反应物诱导了电力,对传输的速率、捕获、去除和/或扩增提供了一定程度的控制。

[0237] 本公开内容的阵列,例如,通过本文阐述的方法已经产生的,可以用于多种应用的任一种。特别有用的应用是核酸测序。一个实例是合成测序法(SBS)。在SBS中,监测核酸引物沿核酸模板(例如,靶核酸或其扩增子)的延伸,以确定模板中核苷酸的序列。内在的化学过程可以是聚合(例如,通过聚合酶以催化)。在特定的基于聚合酶的SBS实施方案中,将荧光标记的核苷酸以模板依赖的方式加入引物(由此延伸引物),使得加入到引物的核苷酸的顺序和类型的检测可被用于确定模板的序列。在对于不同模板发生的事件可以由于其在阵列中的位置被区别的条件下,可对在本文阐述的阵列的不同位点的多个不同的模板进行SBS技术。

[0238] 流动池提供了用于容纳通过本公开内容的方法产生的阵列的方便的格式,且其经受SBS或包括循环中反应物的重复递送的其它检测技术。例如,为了起始第一SBS循环,一个或多个标记的核苷酸、DNA聚合酶、等等,可以流入/穿过容纳核酸模板的阵列的流动池。可检测引物延伸导致标记的核苷酸被掺入的阵列的那些位点。任选地,核苷酸还可以包括可逆终止特性,一旦核苷酸已被添加到引物其还终止引物延伸。例如,具有可逆的终止子部分的核苷酸类似物可被添加到引物,使得不能发生后续的延伸,直到递送去阻断剂(deblocking agent)以去除该部分。因此,对于使用可逆终止的实施方案,去阻断剂可被递送到流动池(检测发生前或后)。洗涤可以在各种递送步骤间进行。然后,循环可被重复n次以由引物延伸n个核苷酸,从而检测出长度为n的序列。可以容易地适合由本公开内容的方

法所产生的阵列使用的示例性的SBS程序、流体系统和检测平台描述于,例如,Bentley等人,Nature 456:53-59 (2008)、WO 04/018497;US 7,057,026;WO 91/06678;WO 07/123744;US 7,329,492;US 7,211,414;US 7,315,019;US 7,405,281,和US 2008/0108082,其每个通过参考并入本文。

[0239] 可以使用使用循环反应的其它测序方法,诸如焦磷酸测序。焦磷酸测序检测随着特定的核苷酸被掺入新生核酸链,无机焦磷酸 (PPi) 的释放 (Ronaghi, 等人, *Analytical Biochemistry* 242 (1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11 (1), 3-11 (2001); Ronaghi 等人 *Science* 281 (5375), 363 (1998); US 6,210,891; US 6,258,568 和 US 6,274,320, 其每个通过参考并入本文。在焦磷酸测序中,释放的PPi可以通过立即地被ATP硫酸化酶转化成腺苷三磷酸 (ATP) 被检测,且可经由荧光素酶产生的光子检测生成的ATP的水平。因此,测序反应可经由发光检测系统被监测。用于基于荧光检测系统的激发辐射源不是焦磷酸程序必需的。可用于本公开内容的阵列的焦磷酸测序的应用的有用的流体系统、检测器及程序描述于,例如,WIPO专利申请序列号PCT/US11/57111,US 2005/0191698A1,US 7,595,883,和US 7,244,559,其每个通过参考并入本文。

[0240] 连接测序 (Sequencing-by-ligation) 反应也是有用的,包括,例如,描述于 Shendure 等人, *Science* 309:1728-1732 (2005); US 5,599,675; 和 US 5,750,341 的那些,其每个通过参考并入本文。一些实施方案可以包括杂交测序 (sequencing-by-hybridization) 程序,例如,描述于 Bains 等人, *Journal of Theoretical Biology* 135 (3), 303-7 (1988); Drmanac 等人, *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor 等人, *Science* 251 (4995), 767-773 (1995); 和 WO 1989/10977, 其每个通过参考并入本文。在连接测序和杂交测序程序两者中,存在于阵列的位点的靶核酸 (或其扩增子) 经受寡核苷酸递送和检测的重复循环。如本文或本文引用的参考文献中阐述的SBS方法的流体系统可以容易地适合用于连接测序和杂交测序程序的反应物的递送。典型地,寡核苷酸被荧光标记,且可以使用与本文或本文引用的参考文献中关于SBS程序描述的那些类似的荧光检测器检测。

[0241] 一些实施方案可以利用包括实时监测DNA聚合酶活性的方法。例如,核苷酸掺入可以通过含荧光团的聚合酶和 γ 磷酸-标记的核苷酸之间的荧光共振能量转移 (FRET) 相互作用,或以零模式波导 (ZMW) 检测。用于基于FRET测序的技术和试剂描述于,例如,Levene 等人, *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist 等人, *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008), 其公开内容通过参考并入本文。

[0242] 一些SBS实施方案包括检测在核苷酸掺入延伸产物后释放的质子。例如,基于释放的质子的检测的测序可使用可从 Ion Torrent (Guilford, CT, Life Technologies 的子公司) 商购的电探测器及相关的技术,或描述于 US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; 或 US 2010/0282617 A1 的测序方法和系统,其每个通过参考并入本文。本文阐述的使用动力学排斥扩增靶核酸的方法可以容易地应用到用于检测质子的基底。更具体地,本文阐述的方法可在用于检测质子的阵列的位点用于产生扩增子的克隆群。

[0243] 已通过本文阐述的方法产生的,本公开内容的阵列的另一个有用的应用,例如,是基因表达的分析。使用RNA测序技术,诸如称为数字RNA测序的那些,基因表达可被检测或定量。可以使用本领域中已知的测序方法,如上面列出的那些,进行RNA测序技术。使用通过直

接杂交到阵列进行的杂交技术,或使用在阵列上检测其产物的多路测定,也可以检测或定量基因表达。已通过本文阐述的方法产生的,本公开内容的阵列,例如,也可以被用于确定来自一个或更多个个体的基因组DNA样品的基因型。可以对本公开内容的阵列进行的基于阵列的表达和基因分型分析的示例性的方法,描述于美国专利号7,582,420;6,890,741;6,913,884或6,355,431或US专利公布号2005/0053980 A1;2009/0186349 A1或US 2005/0181440 A1,其每个通过参考并入本文。

[0244] 本文阐述的方法的优点是,它们提供了从多种核酸文库的任一种快速和高效地创建阵列。相应地,本公开内容提供了能够使用本文阐述的一个或更多个方法制备阵列,且还能够使用本领域中已知的技术如上面例举的那些,检测阵列上的核酸的集成系统。因此,本公开内容的集成系统可包括能够递送扩增反应物至扩增位点的阵列的流体组分,如泵、阀、蓄水池、流体管线等。特别有用的流体组分是流动池。流动池可被配置于和/或在集成系统中使用,以创建本公开内容的阵列并检测阵列。示例性的流动池描述于,例如,US 2010/0111768 A1和US序列号13/273,666,其每个通过参考并入本文。如对流动池例举的,集成系统的一个或更多个流体组分可被用于扩增方法和检测方法。将核酸测序实施方案作为例子,集成系统的一个或更多个流体组分可被用于本文阐述的扩增方法,并在诸如上文例举的那些的测序方法中用于测序试剂的递送。可替代地,集成系统可包括单独的流体系统以进行扩增方法和进行检测方法。能够创建核酸阵列,并还能够确定核酸的序列的集成测序系统的实例,包括但不限于,MiSeq平台(Illumina, Inc., San Diego, CA)和描述于美国序列号13/273,666中的设备,其通过参考并入本文。这样的设备可以被修改,以按照本文阐述的指导使用动力学排除制备阵列。

[0245] 能够进行本文阐述的方法的系统不需要与检测装置集成在一起。而是,独立的系统或与其它设备集成的系统也是可能的。类似于在上文例举的集成系统的内容中的那些的流体组分可以在这样的实施方案中使用。

[0246] 无论是否与检测能力集成,能够进行本文阐述的方法的系统,可包括系统控制器,其能够执行一组指令以进行本文阐述的方法、技术或过程的一个或更多个步骤。例如,指令可以指导步骤的进行,以在动力学排除条件下创建阵列。任选地,指令还可以指导步骤的进行,用于使用本文前述的方法检测核酸。有用的系统控制器可包括任何基于处理器或基于微处理器的系统,包括使用微控制器、精简指令集计算机(RISC)、专用集成电路(ASIC)、现场可编程门阵列(FPGA)、逻辑电路、及能够执行本文描述的功能的任何其它电路或处理器的系统。用于系统控制器的一组指令可以以软件程序的形式。如本文所用,术语“软件”和“固件”是可互换的,且包括通过存储在存储器中用于被计算机执行的任何计算机程序,包括RAM存储器、ROM存储器、EPROM存储器、EEPROM存储器、及非易失性RAM(NVRAM)存储器。软件可以是各种形式,诸如系统软件或应用软件。此外,软件可以以独立程序的集合的形式,或在较大程序中的程序模块或程序模块的部分的形式。软件还可以包括以面向对象编程的形式的模块化编程。

[0247] 本公开内容的阵列的几个应用已经在上文的总体检测的内容中例举,其中存在于每个扩增位点的多个扩增子一起被检测。在替代的实施方案中,单一核酸,无论是靶核酸或其扩增子,可在每个扩增位点被检测。例如,扩增位点可以被配置为包含具有待检测的靶核苷酸序列的单一核酸分子和多个填充物核酸。在此实例中,填充物核酸作用为填充扩增位

点的容量,且其非必须旨在被检测到。待检测的单一分子可以通过能够区分填充物核酸的背景中的单一分子的方法被检测。可以使用多种单一分子检测技术的任一种,包括例如,上文阐述的总体检测技术的修改形式以增加的增益或使用更灵敏的标记检测位点。可以使用的单一分子检测方法的其它实例列于US 2011/0312529 A1;美国序列号61/578,684;和美国序列号61/540,714,其每个通过参考并入本文。

[0248] 对单一分子核酸检测有用的阵列可使用具有以下修改的本文阐述的一种或更多种方法创建。多个不同的靶核酸可被配置为包括待检测的靶核苷酸序列及待扩增的一种或更多种填充物核苷酸序列两者,以创建填充物扩增子。多个不同的靶核酸可包括在扩增反应物中,例如本文其它地方阐述的那些,并在动力学排除条件下与扩增位点的阵列反应,使得填充物核苷酸序列填充扩增位点。可用于使得填充物序列被扩增而禁止靶序列的扩增的示例性的配置,包括例如,具有被存在于扩增位点的扩增引物的结合位点侧接的填充物序列的第一区域、及具有在侧接区域之外的靶序列的第二区域的单一靶分子。在另一个配置中,靶核酸可包括分别携带靶序列和填充物序列的单独的分子或链。单独的分子或链可被连接于颗粒或形成为核酸树枝状聚合物或其它支化结构的臂。

[0249] 在特定的实施方案中,使用引物延伸测定或合成测序技术可以检测具有各自包含填充物序列和靶序列两者的扩增位点的阵列。在这种情况下,通过使用适当放置的引物结合位点,在靶核苷酸序列而不是在大量填充物序列下,可以实现特异的延伸。例如,测序引物的结合位点可被放置在靶序列的上游,且任何填充物序列可以缺失。可替代地或另外地,靶序列可以包括不能够以氢键结合标准核苷酸的一个或更多个非天然的核苷酸类似物。非天然核苷酸可被放置在引物结合位点的下游(例如在靶序列中或在靶序列和引物结合位点中间的区域),且因此将阻止延伸或合成测序直到合适的核苷酸配偶体(即,能够以氢键结合靶序列中的非天然类似物的核苷酸配偶体)被加入。核苷酸类似物异胞嘧啶(isoC)和异鸟嘌呤(isoG)是特别有用的,因为它们彼此特异性配对,但不与在大多数延伸和合成测序技术中使用的其它标准的核苷酸配对。在靶序列中或靶序列的上游使用isoC和/或isoG的进一步的益处是,通过从用于扩增的核苷酸混合物省略各自的配偶体,在扩增步骤期间阻止靶序列的不希望的扩增。

[0250] 可以理解的是,本公开内容的阵列,例如,已经通过本文阐述的方法产生的,不需要用于检测方法。而是,阵列可以被用于储存核酸文库。相应地,阵列可以在其中保留核酸的状态被储存。例如,阵列可以以干燥的状态、冷冻的状态(例如在液氮中)、或在核酸保护性的溶液中被储存。可替代地或另外地,阵列可以被用于复制核酸文库。例如,阵列可被用于从阵列上的一个或更多个位点创建复制扩增子。

[0251] 关于转运靶核酸至阵列的扩增位点,和在扩增位点制备捕获的靶核酸的拷贝的本发明的几个实施方案已在本文中例举。类似的方法可以用于非核酸靶分子。因此,本文阐述的方法可以以其它靶分子代替例举的靶核酸地使用。例如本公开内容的方法可以进行以从不同的靶分子的群转运单个靶分子。每个靶分子可被转运至(且在某些情况下捕获在)阵列的单个位点,以在捕获位点起始反应。在每个位点的反应可以,例如,产生捕获的分子的拷贝,或反应可以改变位点以分离或整合捕获的分子。在任一情况下,最终结果可以是阵列的位点各自关于存在的靶分子的类型为纯的,所述靶分子来自含有不同类型的靶分子的群。

[0252] 在使用核酸以外的靶分子的具体实施方案中,可以使用利用动力学排除的方法制

备不同的靶分子的文库。例如,可以在以下条件下制备靶分子阵列,其中阵列的位点被随机地以来自溶液的靶分子接种,且生成靶分子的拷贝以填充每个接种的位点至容量。按照本公开内容的动力学排除方法,接种和拷贝过程可以在其中制备拷贝的速率超过接种速率的条件下同时进行。因此,在已被第一靶分子接种的位点制备拷贝的相对快的速率将有效地排除第二靶分子接种位点。在某些情况下,靶分子的接种将起始填充位点至容量的反应,通过拷贝靶分子以外的过程。例如,在位点的靶分子的捕获可以起始最终致使该部位不能捕获第二靶分子的链式反应。链式反应可以超过靶分子被捕获的速率的速率发生,从而在动力学排除的条件下发生。

[0253] 如对靶核酸例举的,当应用到其它靶分子时,动力学排除可以利用在阵列的位点的相对慢的速率以起始重复反应(例如,链式反应)对比起始后以相对快的速率继续重复反应。在前面段落的实例中,动力学排除的发生归因于靶分子接种的相对慢的速率(例如相对慢的扩散)对比反应发生,例如,以靶分子种子的拷贝填充位点的相对快的速率。在另一个示例性的实施方案中,动力学排除的发生可归因于已接种位点的靶分子的第一拷贝的形成中的延迟(例如,延迟或缓慢的活化)对比制备以填充位点的后续的拷贝的相对快的速率。在这个实例中,单个位点可能已接种有数个不同的靶分子。然而,对于任何给定的靶分子,第一拷贝形成可被随机地激活,使得相比生成后续拷贝的速率,第一拷贝形成的平均速率是相对慢的。在这种情况下,虽然单一位点可能已接种有数个不同靶分子,动力学排除将仅允许那些靶分子中的一个被拷贝。

[0254] 相应地,本公开内容提供了制备分子的阵列的方法,所述方法可以包括以下步骤:(a)提供包括以下的反应物(i)位点的阵列,和(ii)具有多个不同的靶分子的溶液,其中在溶液中靶分子的数量超过在阵列中位点的数量,其中不同的靶分子具有流体通路至多个位点,且其中每个位点包括在多个不同的靶分子中数个靶分子的容量;及(b)使反应物反应以产生各自具有来自多个的单个靶分子的多个位点,或以产生各自具有来自溶液中的单个靶分子的拷贝的纯的群的多个位点,其中反应包括同时:(i)以平均转运速率转运不同的分子至位点,及(ii)以平均反应速率起始填充位点至容量的反应,其中平均反应速率超过平均转运速率。在一些实施方案中,步骤(b)可由以下替代地进行:使反应物反应以产生各自具有来自多个的单个靶分子的多个位点,或以产生各自具有来自溶液中的单个靶分子的拷贝的纯的群的多个位点,其中反应包括(i)起始重复反应(例如,链式反应)以从在每个位点的靶分子形成产物,及(ii)继续在每个位点的反应以形成后续的产物,其中在位点发生反应的平均速率超过在位点反应起始的平均速率。

[0255] 在上文的非核酸的实施方案中,靶分子可以是发生在阵列的每个位点的重复反应的引发剂。例如,重复反应可以形成排除其它靶分子占据位点的聚合物。可替代地,重复反应可以形成构成被转运至位点的靶分子的分子拷贝的一个或更多个聚合物。

[0256] 以下实施例旨在说明而不是限制本发明。

[0257] 实施例I

[0258] 流动池上簇阵列的超泊松形成

[0259] 本实施例描述了实现Illumina (San Diego, CA) 测序平台的流动池上簇阵列的超泊松形成的方法。本文描述的方法是在特征上捕获文库元件(例如,基因组片段),并同时克隆地扩增文库元件的过程。在本实施例中过程的主要特征是,控制捕获的速率对比扩增的

速率,且在同质的过程中这样处理。对Illumina流动池的高密度接种开发了许多现有技术的过程,从克隆扩增过程分隔文库元件的捕获。在本实施例中,捕获事件起始特征上的克隆扩增事件。

[0260] 图案化的流动池的制备如下。玻璃流动池 (Illumina, Inc., San Diego, CA) 使用剥离方法被金斑块包被。简单地说,在玻璃流动池的表面均匀地包被光阻剂层,且通过光刻除去光阻剂的斑块以暴露玻璃表面的斑块。然后,在表面上沉积一层金,在光阻剂区域和玻璃斑块上形成连续的薄膜。金可以使用通过电子束蒸发或溅射来沉积,如在Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7:239-60 (1977) 中阐述的,其通过参考并入本文。然后通过丙酮剥离除去光阻剂层,留下形状为圆形的金斑块,具有小于1微米的直径,且被玻璃表面的间隙区域围绕。然后以如W02008/093098 (其并入本文) 中所述的无硅烷丙烯酸酰胺 (SFA) 包被金图案化的流动池。P5和P7引物经由硝基苄基UV可裂解部分被接枝到聚合的SFA (Glenn Research, Sterling, VA)。流动池被放置在UV (302nm) 光源上,使得金斑块创建了附着在斑块上的引物罩,而附着在间隙区域上的任何引物由于UV曝光被裂解。留在金斑块的P5和P7引物能够支持文库的克隆扩增 (P5/P7)。

[0261] 文库元件制备如下。基因组DNA (gDNA) 文库被片段化,且互补于P5和P7引物的具有引物结合位点的叉状的衔接子被连接到gDNA片段,根据Illumina商业样品制备方案。

[0262] 超泊松簇阵列形成按如下方法进行。制备含有文库元件 (以双链形式) 和TwistAmp Basic试剂 (TwistDx, Cambridge UK) 的溶液。TwistAmp Basic试剂含有酶混合物,其可以支持表面上的模板依赖的扩增 (DNA聚合酶,单链结合蛋白和重组酶)。控制溶液中的文库元件的浓度,使得文库元件被任意特征杂交捕获的速率比克隆扩增的速率低得多,且充分耗尽在特征上可利用的寡聚物以捕获另外的文库元件。

[0263] 溶液的文库元件的最佳浓度或其它方式所需的浓度可以经验地使用上述超泊松簇阵列形成方案,随后在Illumina测序设备 (例如GenomeAnalyzer™、HiSeq™或MiSeq™) 上的测序运行通过滴定被确定。

[0264] 实施例II

[0265] 在动力学排除条件下创建的图案化的簇阵列的表征

[0266] 本实施例证明了使用动力学排除条件将单克隆簇超泊松装载于图案化的特征上。

[0267] 图案化的流动池制备如下。玻璃流动池 (Illumina, Inc., San Diego, CA) 使用剥离方法被金垫包被,如描述于美国序列号US 13/492,661,其通过参考并入本文。简单地说,在玻璃流动池的表面均匀地包被光阻剂层,且通过光刻除去光阻剂的斑块以暴露玻璃表面的斑块。然后,在表面上沉积一层金,在光阻剂区域和玻璃斑块上形成连续的薄膜。金使用电子束蒸发来沉积,如在Thornton, Ann. Rev. Mater. Sci. 7:239-60 (1977) 中阐述的,其通过参考并入本文。然后通过丙酮剥离除去光阻剂层,留下六边形图案的金垫,其中每个金垫形状为圆形,具有500nm的直径,且被玻璃表面的间隙区域围绕。然后如W02008/093098 (其并入本文) 中所述的以无硅烷丙烯酸酰胺 (SFA) 包被金图案化的流动池。引物经由硝基苄基UV可裂解部分被接枝到聚合的SFA (Glenn Research, Sterling, VA)。流动池被放置在UV (302nm) 光源上,使得金垫创建了附着在垫上的引物罩,而附着在间隙区域上的任何引物由于UV曝光被裂解。裂解的引物被冲走,留下附着在金垫上的引物。

[0268] 使用TwistAmp Basic试剂盒 (TwistDx, Cambridge UK) 如下在金垫上生长簇。在

TwistAmp Basic再水合缓冲液和醋酸镁试剂中,以不同的浓度混合双链PhiX DNA文库。测试的PhiX DNA的浓度在72pM、144pM、432pM和864pM。这些浓度对于用于Illumina流动池的标准接种的9-10pM DNA的典型范围是过量的。另外,PhiX DNA是双链的,不同于与Illumina流动池的标准播种,其中模板DNA是单链形式。含有PhiX DNA的混合物用于再水合TwistAmp Basic冷冻干燥沉淀,且然后在38℃冲入图案化流动池的各自的泳道。在38℃继续温育1小时后,以HT2洗涤缓冲液(Illumina, Inc., San Diego CA)洗涤并以SyBr Green染色簇。然后处理簇用于测序,通过LMX1处理30分钟以线性化簇中的DNA,0.1N NaOH变性和杂交测序引物。然后在Illumina HiSeq®2000上测序流动池,进行26个循环。

[0269] 流动池图像的目测显示,簇以对应于表面上的金垫的图案的图案空间地排序。图1A显示了通过上文阐述的动力学排除方法产生的使用流动池的第一测序循环后获得的所有四种颜色通道的复合图像。与之相比,图1B显示了对于具有随机定位的簇的标准的illumina流动池在单一测序循环后获得的复合图像。

[0270] 流动池的复合图像的成对分布函数(PDF)和最近相邻(NN)函数的分析也表明高程度的有序。原始簇密度计算为每平方毫米图像约640,000簇。NN函数用于测量图像中最近相邻的簇之间的平均距离。如图2所示,NN函数得到主要为约2.3像素的单峰。这与垫的预期1微米间距的图案相一致,从而表明簇的高度有序的阵列。相比之下,随机聚类产生广的多的峰,较低的值接近聚类拾取算法(cluster picking algorithm)的检测极限(1.2像素)。图2中的PDF与有序六边形阵列的预期结构相一致。例如,PDF函数显示了在2.66像素的预期主峰,及对应于最近的以外的相邻的较高的有序的峰清晰可见且以预期峰比存在。在NN和PDF函数之间的峰位置仅观察到轻微的位移。此低水平的抖动表示,与理论的理想位置的偏差相当低,且完全在可接受的水平中。

[0271] 四种颜色复合图像的目测还揭示了不需要的垫跳跃的不存在。‘垫跳跃(pad hopping)’是指几个相邻的垫从同一模板序列被扩增的过程。作为具有相同颜色的簇的连续的斑块,垫跳跃在四种颜色图像中被视觉地表征。在如本实施例中阐述的动力学排除的条件下产生的流动池的相同颜色的斑块不存在表示,没有发生垫跳跃的不需要的水平。图3提供了簇颜色和空间位置的更为定量的示意图,表示了垫跳跃不是问题。具体地,图3显示了对准PhiX基因组的前5个基因组位置的簇的空间位置的散点图。不同的基因组位置通过叉(exes)、星号、正方形、三角形和菱形指示。5种符号类型随机地分布在图中,且不成团,这表明了垫跳跃不是问题。

[0272] 数据的26个循环的序列分析在使用动力学排除条件下产生的流动池进行。结果表明,64%的垫被占据,且56%的垫具有为克隆的簇。因此,对比从泊松装载预期的,方法产生克隆簇的接近2倍的增加,如果64%的垫被占据,泊松装载将预测36%的垫被克隆。这些结果清楚地显示了超泊松装载。

[0273] 实施例III

[0274] 活性电子脱附和生物分子的图案化

[0275] 此实施例证明了使用电场空间地图案化生物分子的方法。本实施例中所描述的方法迅速地在靶位点接种DNA,并电化学地从间隙区域排斥生物分子,产生DNA簇的高度图案化的、可寻址的阵列。本文所示的结果证明了具有单克隆核酸簇图案的流动池的形成。

[0276] 本实施例中所描述的方法采用电势,其跨一个导电表面和电解质、或跨两个导电

表面应用,从一个或两个电偏压表面主动地脱附物理吸附或化学地共轭的分子。这一主动脱附方法不需要任何表面化学/表面修饰,可以非常迅速地(少于5分钟)脱附分子,且相比被动脱附方法,对处理条件较不敏感。导电表面可以是金属(如钛、铟锡氧化物)或半导体性质的,且应用的电势可以是AC或DC,导致在电极/电解质界面的电化学反应。应用电场改善了信(在目标的位点)噪(来自间隙区域)比一个数量级。在本实施例中描述的方法也可以应用到平面电极用于选择性脱附、电极的选择性再功能化和物质的电化学图案化。

[0277] 流动池结构

[0278] 上文描述的用于生物分子的电化学脱附的两种结构示于图4a和4b。具体地,铟锡氧化物(ITO)用作导电的、透明电极材料。经由射频溅射将ITO沉积在D263表面上。图4a显示了跨导电的ITO层和电解质应用的电势。图4b显示了跨通过液体介质隔开的两个平行的导电的ITO板应用的电势。两种结构可用于从ITO的表面电学地脱附物质。金(Au)纳米图案化的位点对硫醇化的生物分子(例如,硫醇化的亲和素)的靶向捕获是有用的。使用电介质间隔物(例如SiO₂、SiN、类金刚石碳)从下面的ITO间隔Au位点,以防止在Au上的电化学反应。

[0279] 使用电场,图4b中的结构也可被用于在流动池表面同时地快速地浓缩DNA(例如,100倍),如图4c的时间推移图像所示的。在这些实验中,2V的电位(V)跨分隔两个ITO表面的100 μ m的间隙应用。如使用全内反射荧光(TIRF)成像在图4c中观察到的,荧光随时间的增加,是由于在流动池的顶部表面上应用电场下,PhiX对照DNA(以YOYO染料标记)的表面浓度的大量增加。因此,此处概述的技术可以用于同时地电化学地从间隙区域脱附生物分子,同时促进快速接种。

[0280] 实验流程

[0281] 在图5中概述了主动脱附实验的实验流程。方法包括在流动池的表面上包被亲和素,随后以无硅烷丙烯酰胺(SFA)包被并将引物接枝到SFA上。SFA包被及P5和P7引物接枝如WO 2008/093098(其并入本文)中所述的进行。然而,在本方法中,在SFA包被之前使用电学的脱附步骤,亲和素被电化学地在存在于流动池表面上的Au或电介质位点(由ITO间隙区域隔开)上图案化。此外,在P5和P7引物接枝后,电场被应用以快速地在Au或电介质位点接种DNA及从ITO间隙电化学地脱附生物分子(DNA、亲和素、引物)两者。通常2V被应用以有效地脱附分子。少至5分钟的场持续时间可在间隙区域有效地脱附大多数分子。此外,结果表明,间隙区域中的引物浓度在电场步骤后也降低。接着进行簇扩增,如描述于Bentley等人Nature 456:53-59(2008),随后使用dsDNA嵌入染料簇染色,然后显微镜成像。然后使用HiSeq2000DNA测序仪(Illumina, Inc. San Diego)测序流动池,以确定簇克隆性。显示了场辅助的接种及电化学脱附的作用的示意图示于图5。

[0282] 实验结果

[0283] 图6显示了使用来自图4b的流动池结构实现的结果,具有电场(图6a)和无电场(图6b)两者。在电场存在下,簇高度地被限制在2 μ m Au位点,在间隙区域观察到非常少的荧光。在2 μ m的位点,由于Au垫的大尺寸,簇高度地为多克隆的。多克隆性的程度可以通过降低垫尺寸以经由空间排阻抑制多个模板接种被降低,或多克隆性可以使用动力学排除条件被降低。还注意到,在间隙区域中的像素强度接近于0(图6a的谱线图)。与之相比,在不存在电场下,簇存在在Au和间隙ITO表面两者。图6a的谱线图中观察到的周期性的图案未在图6b的谱线图中观察到,证实簇限制是电场的结果。

[0284] 电场技术可被用于在大面积的微米尺寸的位点及纳米图案化的位点两者上空间地图案化簇。接种于2 μ m直径的Au位点和200nm直径的Au位点上的图案化的簇的大面积图像,连同其相应的傅里叶变换(FFT)分别示于图7a和7b。簇被良好定义且高度地图案化,在ITO空隙区域中具有非常小的非特异性结合。这通过在FFT中观察到的良好定义的斑点被进一步证实,表明有序的或图案化的网络。在图4b中纳米图案化的特征中簇占据是大约40-50%,但可以通过使用较高的亲和素浓度或通过操作电压波形进一步增加。相同的化学反应/过程也可用于电介质位点上具有高空间精度的簇。在700nm直径的SiO₂位点上的有序的簇示于图8。

[0285] 机理

[0286] 数据表明,在电场的存在下,簇的空间图案化变得容易。这可能是由于在间隙区域中,生物分子(例如DNA、蛋白质和引物)的电化学去除。当应用电场时观察到接枝的引物强度降低,如使用以Texas Red (TR) 标记的探针的杂交测定观察到的。图9阐述了Typhoon扫描,显示在流动池中在应用电场之前和之后进行的杂交测定的TR荧光强度。应用电场之后,荧光强度降低超过两倍,确认了从SFA去除引物。为了提高簇强度,流动池被以SFA重新包被并重新接枝P5、P7引物。这导致了TR强度的明显增加。因此,有可能能够接种DNA,在间隙区域电化学地除去非特异性结合的分子,重新包被SFA并重新接枝引物,以获得高强度的、空间地图案化的簇。

[0287] 直接DNA杂交

[0288] 簇的空间图案化也在包括直接杂交phiX ssDNA到P5、P7引物底(lawn)的实验中观察到。该过程的示意图示于图10a中。这些实验在ITO上的2 μ m SiO₂位点上进行。相同的过程可被应用于纳米图案化的位点,以各种电介质材料形成位点。在这些实验中既不需要生物素化的DNA,也不需要亲和素,导致较少的化学反应步骤,同时保持位点上的簇特异性。特异性可能是在间隙区域中引物的电化学脱附的结果。图10b显示了使用直接杂交方法,在电场(2V, 0.1Hz)的存在下在2 μ m SiO₂位点上形成的簇。良好图案化的簇是可见的,非常少的在间隙区域中。图10c为在不存在电场下的相同实验,且显示了在不存在电场下簇是随机地面向SFA和ITO间隙区域两者,没有明显的顺序存在。这些结果证实,电场可以用于协助核酸簇形成的空间图案化。

[0289] 遍及本申请已引用各种出版物、专利和专利申请。这些出版物的公开内容通过引用以其整体特此并入本申请,以更全面地描述本发明从属的本领域的状态。

[0290] 本文中术语“包括”是指开放式的,不仅包括所列举的元件,还包括任意的另外元件。

[0291] 虽然本发明已参考以上提供的实施例描述,但应当理解的是,可以进行各种修改而不偏离本发明。因此,本发明仅由权利要求书限定。

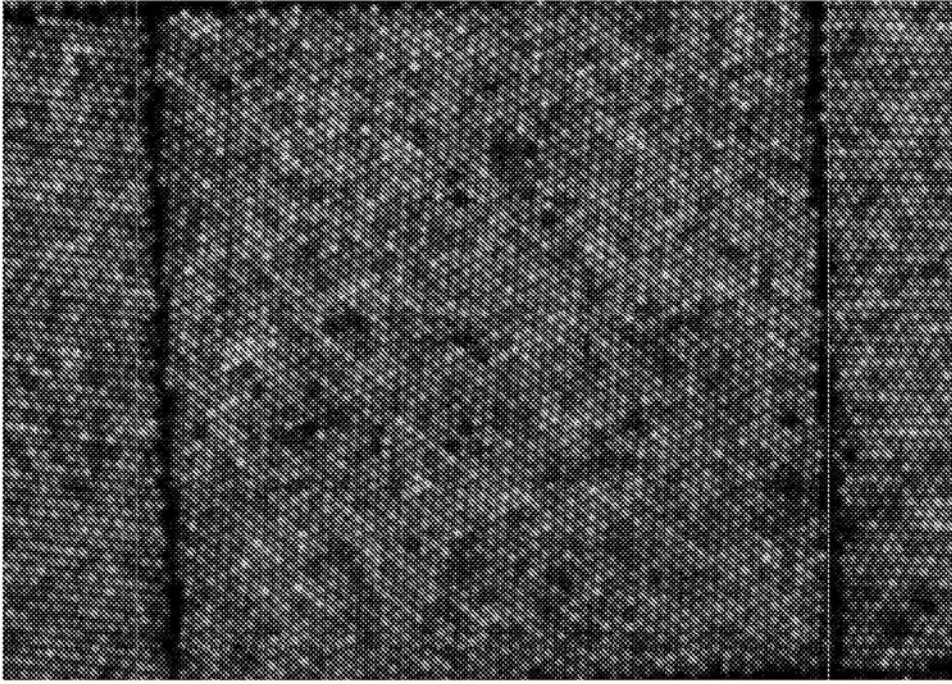


图1A

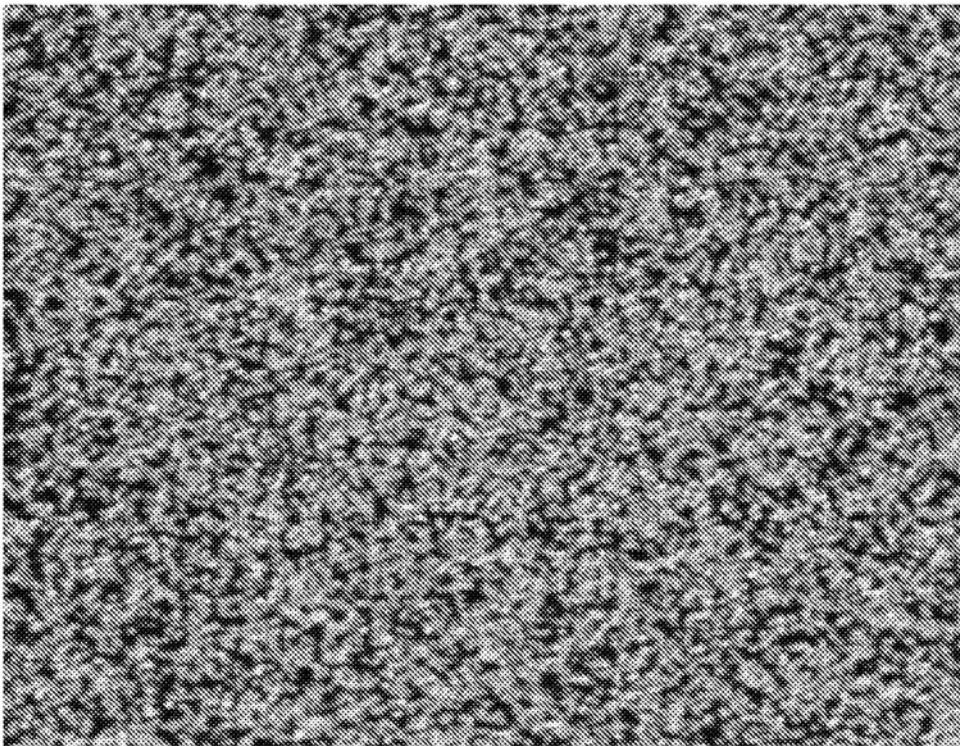


图1B

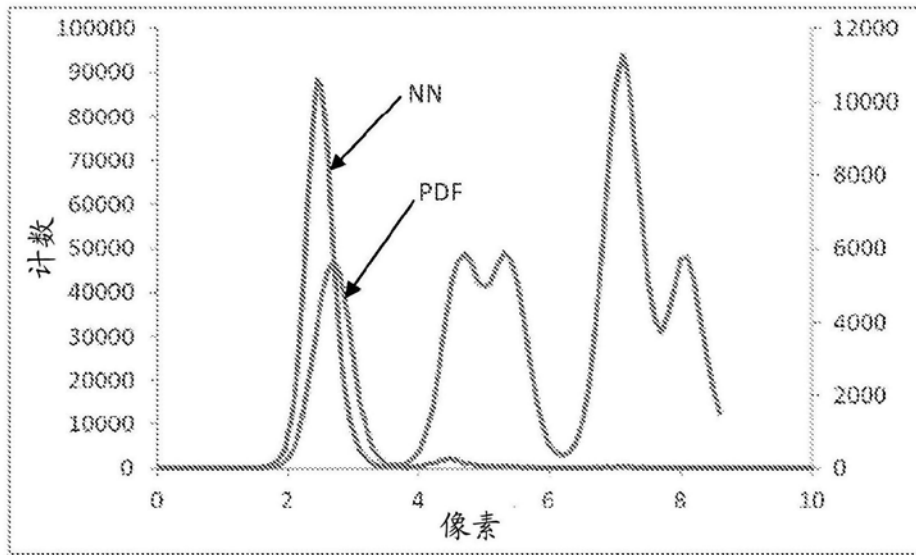


图2

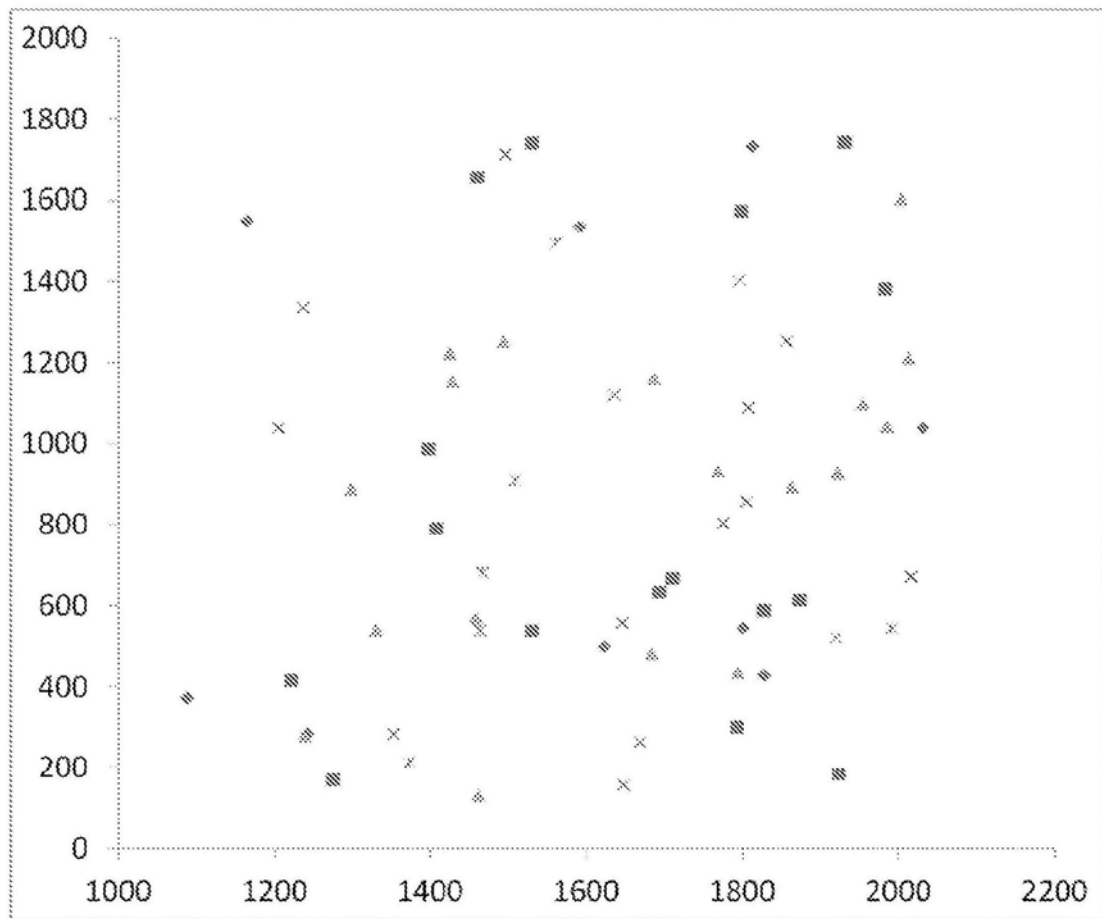


图3

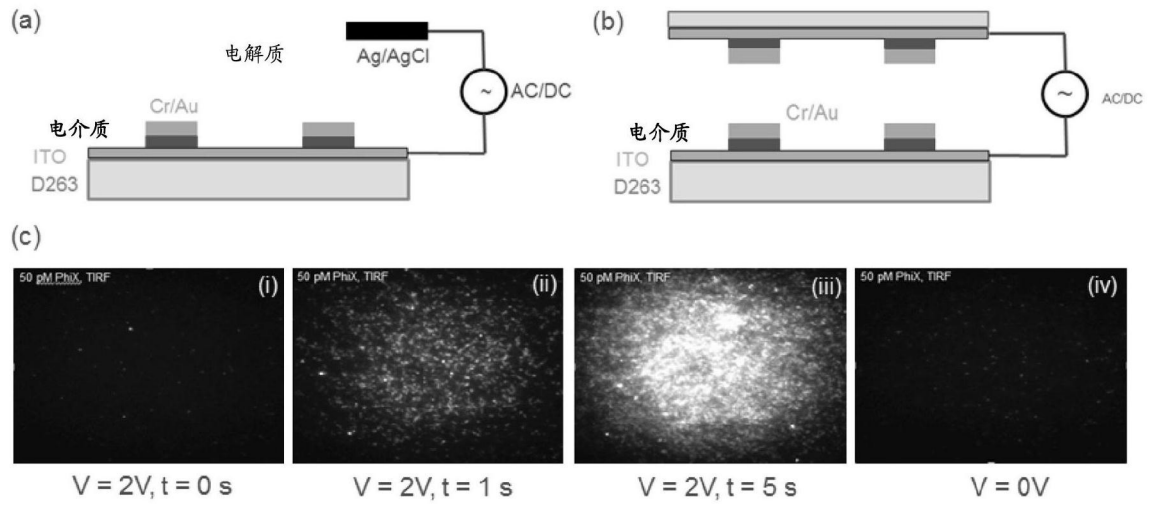


图4

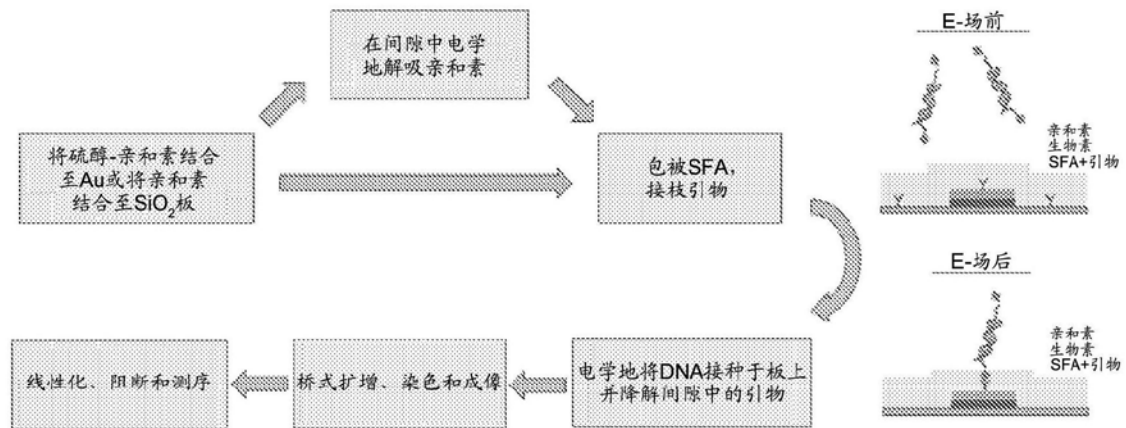


图5

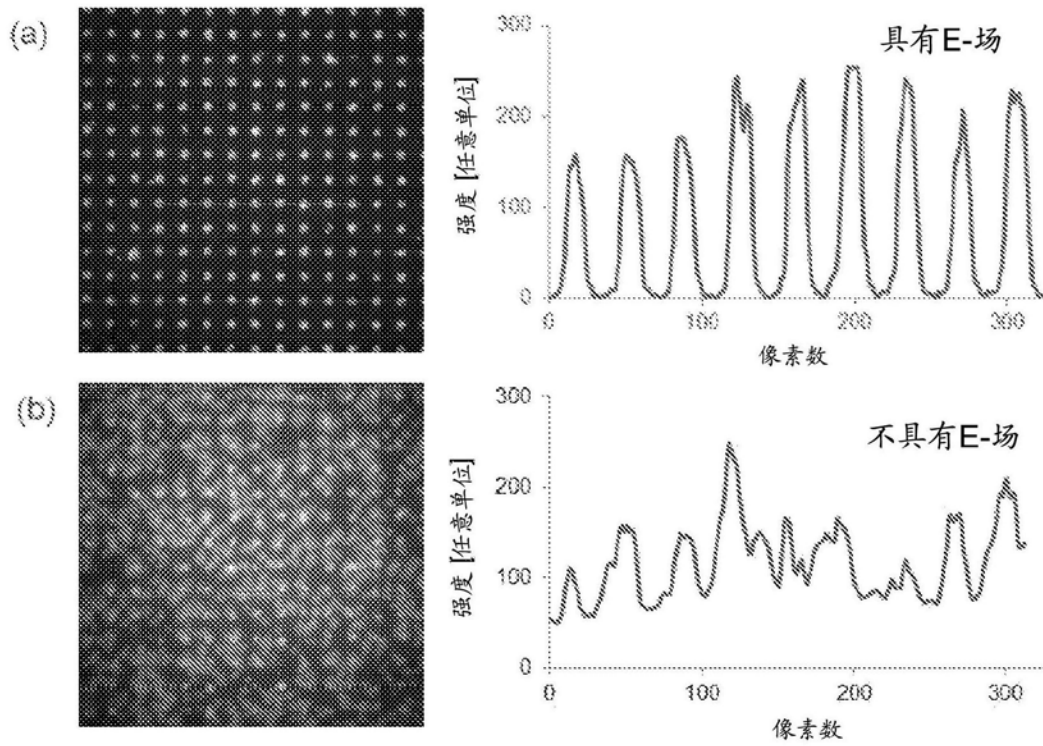


图6

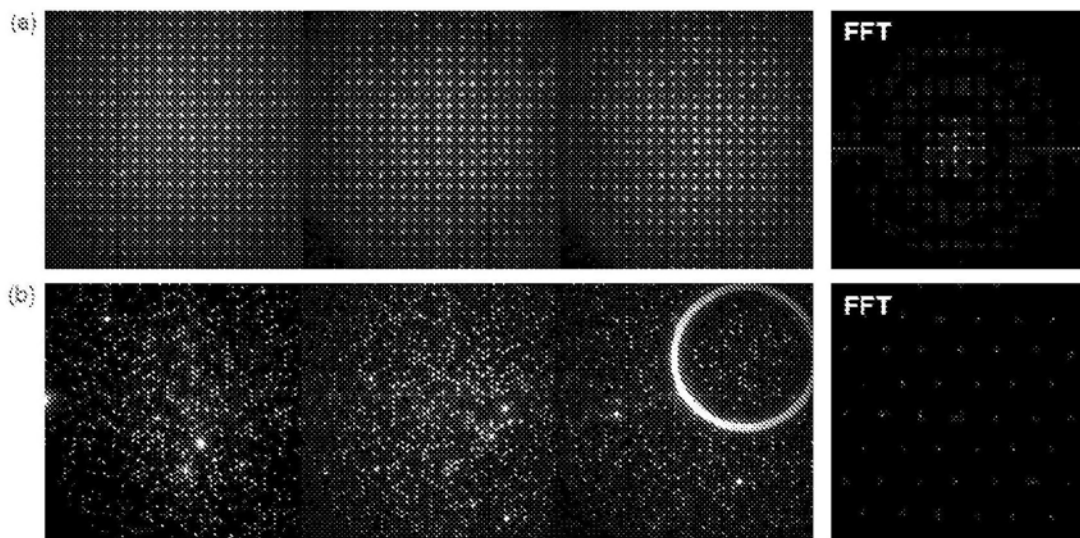


图7

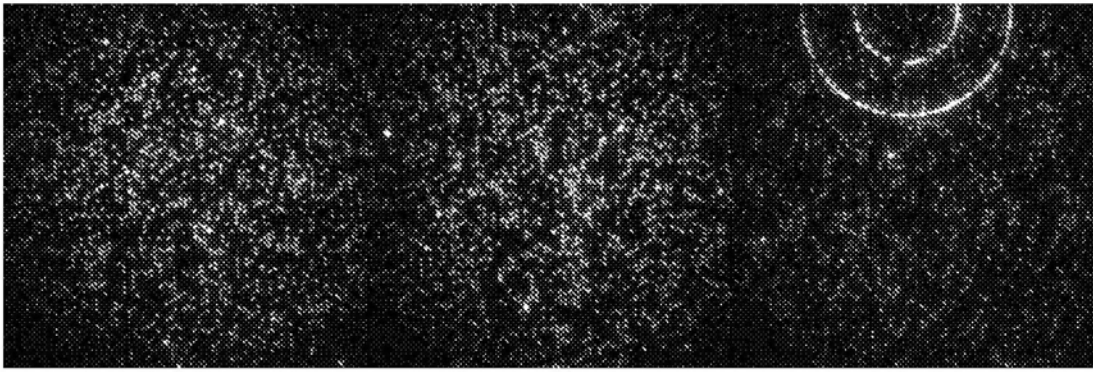


图8

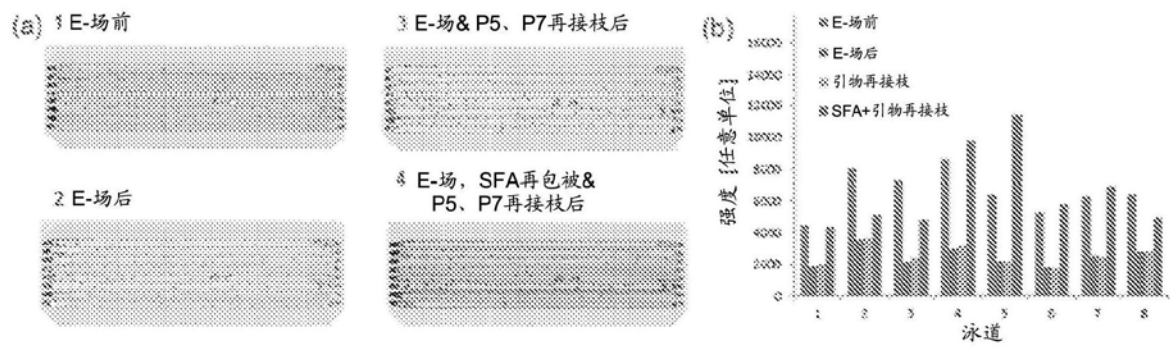


图9

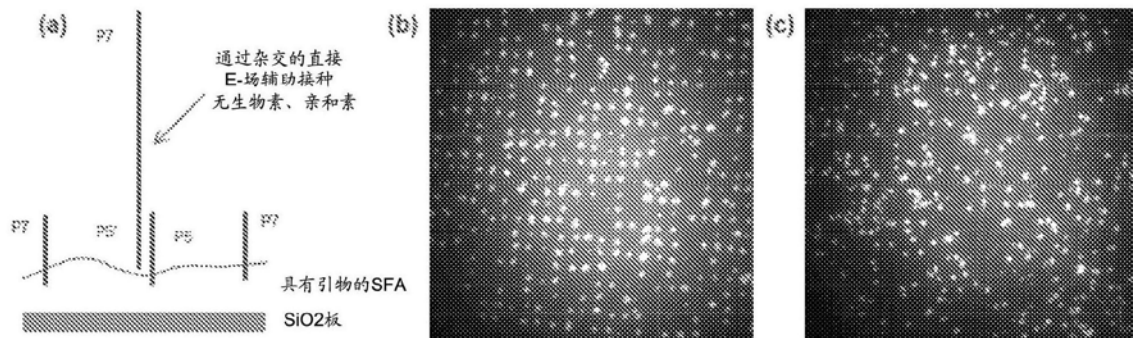


图10