



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월05일
(11) 등록번호 10-1954343
(24) 등록일자 2019년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6844 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2017-7018769(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년06월12일
심사청구일자 2017년08월03일
(85) 번역문제출일자 2017년07월06일
(65) 공개번호 10-2017-0083643
(43) 공개일자 2017년07월18일
(62) 원출원 특허 10-2014-7029240
원출원일자(국제) 2013년06월12일
심사청구일자 2014년10월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/045491
(87) 국제공개번호 WO 2013/188582
국제공개일자 2013년12월19일
(30) 우선권주장
61/660,487 2012년06월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
US20070178516 A1
Genome Res. 2009. 19: 2334-2342
Lab Chip, 2010, 10, 202-210
Int J Biomed Sci. 2008 Dec; 4(4): 273-293

(73) 특허권자
일루미나, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
(72) 발명자
센, 민-주이 리차드
미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이 5200
보우텔, 조나단 마크
영국 씨비10 1엑스엘 니어 새프론 월튼 에섹스 리틀 체스터포드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 이준혁

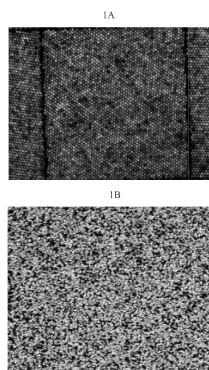
(54) 발명의 명칭 핵산 라이브러리의 역학적 배제 증폭

(57) 요약

(a) 부위 어레이 및 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 갖는 증폭 부위를 생성하는 단계를 포함하는 방법. 반응에는 핵산을 평균 운반 속도로 부위에 운반하고, 동시에 부위로 운반하는 핵산을 평균 증폭 속도로

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



증폭하는 것이 포함될 수 있고, 여기서 평균 증폭 속도는 평균 운반 속도를 초과한다. 반응에는 각 부위로 운반하는 핵산으로부터의 첫 번째 앰플리콘 생성 및 핵산이나 첫 번째 앰플리콘으로부터의 후속 앰플리콘의 생성이 포함될 수 있고, 여기서 후속 앰플리콘이 생성되는 평균 속도는 첫 번째 앰플리콘이 생성되는 평균 속도를 초과한다.

(72) 발명자

스티븐스, 캐스린 엠.

미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이
5200

로나지, 모스타파

미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이
5200

건더슨, 케빈 엘.

미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이
5200

벤카테산, 발라 무랄리

미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이
5200

보웬, 엠. 세인

미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이
5200

비자얀, 칸다스와미

미국 92122 캘리포니아 샌디에고 일루미나 웨이
5200

(30) 우선권주장

61/715,478 2012년10월18일 미국(US)

13/783,043 2013년03월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(a)(i) 표면의 간질 영역(interstitial region)에 의해 분리된, 표면 상의 인접하지 않은 특징부를 포함하는 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 생체분자를 포함하는 용액을 포함하는 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 시약을 반응시켜 생체분자를 특징부로 운반하고 개별 생체분자를 각각의 특징부에 부착하는 단계를 포함하는, 생체 분자의 패턴화 표면의 생성 방법으로서,

반응 동안 간질 영역으로부터 생체분자를 밀어내기 위해 간질 영역에 전기장이 적용되며, 상기 특징부는 비드, 웰, 구덩이(pit), 채널, 상승 영역(raised region), 융기, 돌출부, 마개, 말뚝(post) 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제2 전기장이 반응 동안 생체분자를 특징부로 능동 운반하기 위해 특징부에 적용되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 복수의 상이한 표적 생체분자가 복수의 상이한 표적 핵산을 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 용액 중 상이한 표적 핵산의 수가 어레이 중 특징부의 수를 초과하며, 상이한 표적 핵산은 복수의 특징부에 유체 접근할 수 있고, 각각의 특징부는 복수의 상이한 표적 핵산의 몇몇 표적 핵산에 의해 점유될 수 있는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 반응 동안 표적 핵산이 특징부로 운반되어 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터의 앰플리콘의 클론 모집단을 포함하는 복수의 특징부를 생성하며, 반응은 (i) 각각의 특징부로 운반하는 개별 표적 핵산으로부터 첫 번째 앰플리콘을 생성하고, (ii) 각각의 특징부로 운반하는 개별 표적 핵산으로부터 또는 첫 번째 앰플리콘으로부터 후속 앰플리콘을 생성하는 것을 포함하고, 생성된 앰플리콘이, 상이한 표적 핵산이 각각의 상기 특징부에 시딩되는 것을 방지하여, 각각의 상기 특징부에서 상기 상이한 표적 핵산으로부터 앰플리콘이 생성되는 것을 방지하도록 후속 앰플리콘이 특징부에서 생성되는 속도는 첫 번째 앰플리콘이 특징부에서 생성되는 속도를 초과하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 반응 동안 표적 핵산이 특징부에 운반되어 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터의 앰플리콘의 클론 모집단을 포함하는 복수의 특징부를 생성하며, 반응이 (i) 상이한 표적 핵산을 특징부로 운반하고, (ii) 각각의 특징부에서 앰플리콘이 생성되도록 상기 복수의 특징부에서 각각의 상기 특징부에 있는 표적 핵산을 증폭하는 것을 동시에 포함하고, 생성된 앰플리콘이, 상이한 표적 핵산이 각각의 상기 특징부에 시딩되는 것을 방지하여, 각각의 상기 특징부에서 상이한 표적 핵산의 사본이 생성되는 것을 방지하도록 증폭의 속도가 운반의 속도를 초과하는 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 각각의 특징부가 앰플리콘을 생성하는데 이용되는 복수의 프라이머를 포함하는 방법.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서, 시약이 폴리머라아제 및 dNTPs를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 시약이 재조합효소 및 단일쇄 결합 단백질을 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제5항 또는 제6항에 있어서, 특징부로 운반되는 표적 핵산의 증폭이 등온에서 일어나는 방법.

청구항 11

제5항 또는 제6항에 있어서, 특징부로 운반되는 표적 핵산의 증폭이 변성 사이클을 포함하지 않는 방법.

청구항 12

제5항 또는 제6항에 있어서, 애플리곤의 클론 모집단을 포함하는 복수의 특징부가 어레이 중 특징부의 40%를 초과하는 방법.

청구항 13

제3항에 있어서, 각각의 특징부가 용액 중 상이한 표적 핵산에 결합할 수 있는 복수의 캡처제 또는 용액 중 상이한 표적 핵산에 부착되는 리간드에 결합하는 수용체를 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 캡처제가 상이한 표적 핵산에 상보적인 캡처 핵산을 포함하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상이한 표적 핵산이 캡처 핵산에 상보적인 공통 서열을 포함하는 방법.

청구항 16

제3항에 있어서, 각각의 특징부에 대한 영역이 특징부로 운반되는 표적 핵산에 의해 점유되는 공간 부피의 지름보다 큰 방법.

청구항 17

제2항에 있어서, 전기장 및 제2 전기장이 어레이에 동시 적용되는 방법.

청구항 18

제2항에 있어서, 전기장 및 제2 전기장이 교대 반복으로 어레이에 적용되는 방법.

청구항 19

제1항 또는 제2항에 있어서, 각각의 특징부가 비드, 웰, 채널, 용기, 돌출부 또는 이들의 조합을 포함하는 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 전기장이 간질 영역 및 전해질에 걸쳐 적용되는 방법.

청구항 21

제2항에 있어서, 제2 전기장이 간질 영역 및 제2 전도성 표면에 걸쳐 적용되는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 전기장이 간질 영역으로의 교류 또는 직류의 적용에 의해 생성되는 방법.

청구항 23

제1항에 있어서, 전기장이 간질 영역에 대한 생체분자의 결합을 저해하기 위해 전하 반발에 의해 간질 영역에서

생체분자를 밀어내는 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 전기장이 간질 영역에서 생체분자의 전기화학적 손상에 의해 간질 영역에서 생체분자를 밀어내는 방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 각각 본원에 참조로 도입된 2012. 10. 18.에 출원된 U.S. 가출원 번호 61/715,478, 및 2012. 6. 15.에 출원된 U.S. 가출원 번호 61/660,487에 근거하고 그 이익을 청구하는 2013. 3. 1.에 출원한 U.S. 일련 번호 13/783,043을 우선권으로 청구한다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학, 보다 구체적으로는 핵산 합성 및 분석에 관한 것이다.

[0003] 유전적 분석은 현대 사회에서 점점 더 중요해지고 있다. 유전적 분석은 일부만 예를 들면 개인이 일부 질환에 걸리는 위험의 예측(진단), 특정 치료를 고려하는 개인에 대한 치료적 유익 대 부작용의 유해 가능성 결정(예후) 및 실종자, 범죄의 가해자, 범죄의 희생자 및 전쟁 사상자를 확인(법의학)하기 위해 유용한 것으로 이미 증명되었다. 그러나 여러 경우, 적절한 유전적 평가가 아직 이용가능하지 않거나 높은 오류율을 갖는다. 이러한 문제의 한 원인은 현재 진단, 예후 및 법의학을 위해 이용되는 다수의 유전적 평가가 개인 게놈의 일부만을 조사하는 기술에 의존한다는 것이다. 개인의 유전 형질은 30억 개를 초과하는 염기쌍을 함유하는 게놈에 의해 인코딩되지만, 대부분의 유전 평가는 이들 염기쌍에서 몇 개의 돌연변이만을 조사한다. 이상적으로는 게놈에서 전체 30억 개 염기쌍까지 포함시켜 조사되는 게놈의 분해를 증가시킴으로써, 유전 평가의 정확성이 개선될 수 있고, 더 많은 진단 및 예후 상황에 대한 유전 평가가 개발될 수 있다.

[0004] 여러 유전 평가의 기본 요소는 평가되는 유전 재료의 준비이다. 이는 전체 게놈을 캡처하고 그 온전성을 유지하고자 시도할 때 사소한 문제가 아니다. 다량의 유전 재료를 캡처하는데 현재 이용가능한 두 방법은 에멀션 폴리머라이제 연쇄 반응(ePCR) 및 클러스터 증폭(예로 가교 증폭을 통해)이다. 현재 이들의 임상 및 진단 적용에서의 이용은 제한되어 있다.

[0005] ePCR에 있어서, 수성 액적은 게놈 단편 및 담체 비드와 함께 오일상에서 형성된다. 각각의 액적이 개별 게놈 단편 및 단일 담체 비드를 단리할 가능성을 최적화하는 조건이 선택된다. 그 목표는 액적 간, 이에 따라 상이한 비드 간 게놈 단편의 확산을 방지하는 마이크로-반응기를 액적에 대해 형성하는 것이다. 이어서 각각의 액적에서 비드가 현존하는 게놈 단편의 클론 사본으로 코팅되도록 몇 사이클의 PCR 증폭을 벌크 에멀션에 대해 수행할 수 있다. 증폭 후, 비드는 분석 기기에서의 평가를 위해 검출 기제로 전달된다. ePCR의 하나의 어려움은 일부 비드가 게놈 단편이 없는 액적을 만들어서 빈 비드를 생성한다는 것이다. 분석 기기에서의 이용 전에 빈

비드를 제거하기 위해 비드 농축 단계를 수행할 수 있다; 그러나 이 공정은 일반적으로 번거롭고 비효율적이다. ePCR의 또 다른 어려움은 일부 액적이 둘 이상의 게놈 단편을 만들어서 혼합 클론의 비드를 생성한다는 것이다. 혼합 클론 비드가 종종 확인되고 분석 동안 무시될 수 있지만, 이들의 존재는 효율성을 그리고 일부 경우에는 분석의 정확도를 감소시킨다.

[0006] 클러스터 증폭은 유전 재료를 캡처하고 증폭하기 위한 보다 간결화된 접근을 제공한다. 상업적 구현예에서, 게놈 단편은 기재 표면 상에서 캡처되어 무작위 위치에 "시드"를 형성한다. 과량의 게놈 단편(즉, 캡처되지 않은 것)을 세척 제거한 후, 몇 사이클의 증폭을 수행하여 각 시드 주위 표면 상에 클러스터를 형성하는 클론 사본을 생성한다. ePCR 대비 클러스터 증폭의 장점에는 비드 농축 단계의 배제, 비드 전달 단계(에멀션에서 검출 기재로)의 배제, 및 번거롭고 종종 까다로운 오일 에멀션의 배제가 포함된다. 그러나 상업적 클러스터 증폭 기법의 잠재적인 어려움은 이들이 표면 상에 무작위 패턴의 클러스터를 형성한다는 것이다. 비록 무작위 배치된 클러스터를 확인하고 구별하기 위해 이미지 등록 프로토콜이 개발되었지만, 이러한 프로토콜은 분석 장치에 추가적인 분석 부담을 가중시킨다. 또한 무작위 배치된 클러스터는 공간적으로 조직화된 패턴의 클러스터에 있어서 이론적으로 가능한 것에 비해 덜 효율적으로 표면을 채우는 경향이 있다.

[0007] 따라서 진단, 예후 및 법의학 분석을 위해 유전 재료를 준비하기 위한 개선된 방법에 대한 필요성이 존재한다. 본 개시는 이러한 필요성을 해결하고, 다른 장점을 또한 제공한다.

발명의 내용

[0008] 간단한 요약

[0009] 본 개시는 핵산 증폭 방법을 제공한다. 방법에는 (a)(i) 증폭 부위 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 갖는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계가 포함될 수 있으며, 여기서 반응에는 동시에 (i) 상이한 표적 핵산을 평균 운반 속도로 증폭 부위로 운반하고, (ii) 증폭 부위에 있는 표적 핵산을 평균 증폭 속도로 증폭하는 것이 포함되고, 평균 증폭 속도는 평균 운반 속도를 초과한다. 특정 구현예에서, 용액 중 상이한 표적 핵산의 수는 어레이 중 증폭 부위의 수를 초과한다. 전형적으로, 상이한 표적 핵산은 복수의 증폭 부위에 유체 접근할 수 있다. 또한, 각각의 증폭 부위는 선택적으로 복수의 상이한 핵산에서 몇몇 핵산에 대한 용량을 가질 수 있다.

[0010] 또한, (a)(i) 증폭 부위 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 갖는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 방법이 제공되며, 여기서 반응에는 (i) 각각의 증폭 부위에서 개별 표적 핵산으로부터 첫 번째 앰플리콘을 생성하고, (ii) 각각의 증폭 부위의 개별 표적 핵산으로부터 또는 첫 번째 앰플리콘으로부터 후속 앰플리콘을 생성하는 것이 포함되고, 후속 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도는 첫 번째 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도를 초과한다. 특정 구현예에서, 용액 중 상이한 표적 핵산의 수는 어레이 중 증폭 부위의 수를 초과한다. 전형적으로, 상이한 표적 핵산은 복수의 증폭 부위에 유체 접근할 수 있다. 또한, 각각의 증폭 부위는 선택적으로 복수의 상이한 핵산에서 몇몇 핵산에 대한 용량을 가질 수 있다.

[0011] 본 개시는 (a)(i) 증폭 부위 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 갖는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 방법을 추가로 제공하며, 여기서 반응에는 동시에 (i) 상이한 표적 핵산을 평균 캡처 속도로 증폭 부위에서 캡처하고, (ii) 증폭 부위에서 캡처된 표적 핵산을 평균 증폭 속도로 증폭하는 것이 포함되며, 평균 증폭 속도는 평균 캡처 속도를 초과한다.

[0012] 또한, (a)(i) 증폭 부위 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 포함하는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 방법이 제공되며, 여기서 반응에는 (i) 증폭 부위에서 캡처된 개별 표적 핵산으로부터 첫 번째 앰플리콘을 생성하고, (ii) 각각의 증폭 부위에서 캡처된 개별 표적 핵산으로부터 또는 첫 번째 앰플리콘으로부터 후속 앰플리콘을 생성하는 것이 포함되고, 후속 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도는 첫 번째 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도를 초과한다.

[0013] 또한, 생체 분자의 패턴화 표면을 생성하는 방법이 제공되며, 여기서 방법에는 (a)(i) 표면의 간질 영역에 의해 분리된 표면 상의 비인접 특징부를 갖는 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 생체분자를 갖는 용액을 포함하는

시약을 제공하는 단계; 및 (b) 시약을 반응시켜 생체분자를 특징부로 운반하고 개별 생체분자를 각각의 특징부에 부착하는 단계가 포함될 수 있고, 여기서 간질 영역에서 생체분자를 밀어내기 위해 간질 영역에 전기장이 적용된다.

[0014] **상세한 설명**

[0015] 본 개시는 핵산 라이브러리 및 핵산 라이브러리의 제조 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 본 개시의 핵산 라이브러리는 부위의 어레이 형태이다.

[0016] 어레이는 특정 뉴클레오타이드 서열에 대해 클론인 부위를 가질 수 있다. 따라서 어레이에서의 개별 부위는 각각 단일 뉴클레오타이드 서열의 다중 사본을 가질 수 있다. 예를 들어, 부위는 생물학적 표본, 예컨대 게놈 또는 이들의 하위 분획(예로 엑솜), 또는 트랜스크립토(예로 mRNA 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리) 또는 이들의 하위 분획에서 유래된 핵산의 클론 사본을 가질 수 있다.

[0017] 클론인 어레이에서의 부위의 분율은 푸아송 분포에 의해 예측되는 분율을 초과할 수 있다. 따라서 본원에 나타난 방법에 의해 생성된 어레이는 클론 부위의 수퍼-푸아송 분포를 가질 수 있다. 수퍼-푸아송 분포는 어레이 합성 동안 그리고 후속 부위 농축 또는 부위 정제 단계가 필요 없이 생성될 수 있다(적어도 일부 구현예에서는 필요한 경우, 농축 및 정제 단계가 수행될 수 있다).

[0018] 일부 구현예에서, 부위는 기재 상의(또는 내의) 특징부로 존재할 수 있다. 이러한 구현예에서, 특징부는 클론일 수 있고, 클론인 어레이에서의 특징부의 분율은 푸아송 분포를 초과할 수 있고, 특징부는 반복 패턴으로 공간적으로 배열될 수 있다. 따라서 부위는, 예를 들어 직선형 격자, 육각형 격자 또는 다른 원하는 패턴으로 공간적으로 조직화될 수 있다.

[0019] 본 개시의 핵산 라이브러리는 역학적 배제를 활용하는 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 역학적 배제는 공정이 또 다른 사건 또는 공정 발생을 효과적으로 배제하기 위해 충분히 빠른 속도로 일어나는 경우에 일어날 수 있다. 핵산 어레이의 제조를 예로 들면, 어레이 부위는 용액으로부터의 표적 핵산으로 무작위 접촉되고 표적 핵산의 사본이 증폭 공정에서 생성되어 각각의 시딩된 부위를 용량에 맞춰 채운다. 본 개시의 역학적 배제 방법에 따르면, 접촉 및 증폭 공정은 증폭 속도가 접촉 속도를 초과하는 조건 하에 동시에 진행될 수 있다. 이와 같이, 첫 번째 표적 핵산에 의해 접촉되는 부위에서 사본이 제조되는 상대적으로 높은 속도는 두 번째 핵산이 증폭을 위한 부위에 접촉되는 것을 효과적으로 배제할 것이다.

[0020] 역학적 배제는 표적 핵산 또는 첫 번째 사본의 후속 사본을 제조하기 위한 상대적으로 빠른 속도 대비 표적 핵산의 첫 번째 사본을 제조하기 위한 상대적으로 느린 속도를 활용할 수 있다. 전술된 단락의 예에서, 역학적 배제는 핵산 시드의 사본으로 부위를 채우기 위해 증폭이 일어나는 상대적으로 빠른 속도 대비 표적 핵산 접촉의 상대적으로 느린 속도(예로 상대적으로 느린 확산 또는 운반)로 인해 일어난다. 또 다른 예시적 구현예에서, 역학적 배제는 부위를 채우기 위해 후속 사본이 제조되는 상대적으로 빠른 속도 대비 부위에 접촉된 표적 핵산의 첫 번째 사본의 형성 지연(예로 지연되거나 느린 활성화)으로 인해 일어날 수 있다. 상기 예에서, 개별 부위는 몇몇 상이한 표적 핵산으로 접촉될 수 있다(예로 몇몇 표적 핵산이 증폭 전에 각 부위에 존재할 수 있다). 그러나 임의의 주어진 표적 핵산에 대한 첫 번째 사본 형성은 첫 번째 사본 형성의 평균 속도가 후속 사본이 생성되는 속도에 비해 상대적으로 느리도록 무작위로 활성화될 수 있다. 이 경우에, 개별 부위는 몇몇 상이한 표적 핵산으로 접촉될 수 있지만, 역학적 배제는 이들 표적 핵산 중 하나만 증폭되도록 허용할 것이다. 보다 구체적으로, 첫 번째 표적 핵산이 증폭을 위해 활성화되면, 그 부위는 그 사본으로 용량까지 신속히 채워져서, 두 번째 표적 핵산의 사본이 그 부위에서 제조되는 것을 방지할 것이다.

[0021] 본원에 나타난 방법으로 생성된 어레이의 장점은 부위의 클론성이 후속 분석에서 정확성을 제공한다는 것이다. 이는 다른 경우 혼합 모집단을 갖는 부위를 검출할 때 발생할 혼동스러운 결과를 배제한다.

[0022] 어레이의 또 다른 장점은 이들이 클론 부위의 수퍼-푸아송 분포를 갖는다는 것이다. 이는 다른 경우 혼합 부위 내로의 격리로 인해 일어날 수 있는 유전 물질의 손실을 배제함으로써 라이브러리의 복잡성을 증가시킨다.

[0023] 본원에 나타난 방법 및 어레이의 추가 장점은 기재 상에 특징부를 갖는 어레이의 제공이며, 여기서 특징부는 반복 패턴으로 공간적으로 배열되어 있다. 전술된 바와 같이, 클론인 특징부의 분율은 푸아송 분포를 초과할 수 있다. 푸아송 분포는 37% 점유를 최대로 설정한다. 본원에 나타난 방법에 따르면, 클론인 특징부의 전량은 40%, 50%, 60%, 75% 이상을 초과할 수 있다. 본원에 나타난 방법으로 생성되는 어레이는 무작위 클러스터 어레이에 비해 보다 효율적인 기재 충전을 제공한다. 이러한 어레이는 또한 무작위 클러스터 어레이에 전형적으로

이용되는 이미지 등록 방법의 복잡성을 배제함으로써 분석적으로 평가하기 더 쉽다.

- [0024] 또한, 본원에 나타난 방법은 검출을 촉진하기 위해 패턴화 기재 상 어레이를 생성하기 유리하다. 예를 들어, 몇몇 시판 서열분석 플랫폼은 서열 검출 단계 동안 검출 시약(예로 454 LifeSciences(Roche, Basel Switzerland의 자회사)에서 입수가 가능한 플랫폼에서의 피로포스페이트 또는 Ion Torrent(Life Technologies, Carlsbad California의 자회사)에서 입수가 가능한 플랫폼에서의 양성자)의 확산에 대한 장벽을 제공하는 웰을 갖는 기재에 의존한다. 본원에 나타난 방법은 푸아송 제한될 표준 클러스터 증폭 방법에 비해 클론 모집단이 로딩된 웰의 수를 증가시키기 위해 유리할 수 있다. 본 개시의 방법은 에멀션의 취급 및 비드의 조작을 배제하여, ePCR 방법에 비해서도 유리하다.
- [0025] 본원에서 이용되는 용어는 달리 명시되지 않는 한 관련 분야에서의 이들의 일반적 의미를 취하는 것으로 이해될 것이다. 본원에서 이용되는 몇몇 용어 및 이들의 의미를 아래에 나타낸다.
- [0026] 본원에서 이용되는 용어 "활성 집중"은 한 위치를 향해 또는 이에서 벗어나 핵산(들)을 이동시키기 위해 하나 이상의 핵산 상에 부여되는 비확산력을 나타낸다. 위치는 어레이의 증폭 부위일 수 있다. 비확산력은 전기장 또는 자기장을 생성하는 것들과 같은 외부 원천 또는 반응 부피 내에 분자 밀집 또는 화학적 구배를 부여하는 제제에 의해 제공될 수 있다.
- [0027] 본원에서 이용되는 용어 "앰플리콘"은 핵산에 대해 이용되는 경우, 핵산 복제 산물을 의미하며, 여기서 산물은 핵산의 적어도 일부 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. 앰플리콘은, 예를 들어 폴리머라아제 연장, 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR), 순환원 증폭(RCA), 결찰 연장, 또는 결찰 연쇄 반응을 포함하는, 주형으로서 핵산 또는 이들의 앰플리콘을 이용하는 다양한 임의의 증폭 방법에 의해 생성될 수 있다. 앰플리콘은 특정 뉴클레오타이드 서열의 단일 사본(예로 PCR 산물) 또는 뉴클레오타이드 서열의 다중 사본(예로 RCA의 콘카타머 산물)을 갖는 핵산 분자일 수 있다. 표적 핵산의 첫 번째 앰플리콘은 전형적으로 상보적 사본이다. 후속 앰플리콘은 첫 번째 앰플리콘의 생성 후 표적 핵산으로부터 또는 첫 번째 앰플리콘으로부터 생성되는 사본이다. 후속 앰플리콘은 표적 핵산에 실질적으로 상보적이거나 표적 핵산과 실질적으로 동일한 서열을 가질 수 있다.
- [0028] 본원에서 이용되는 용어 "증폭 부위"는 하나 이상의 앰플리콘이 생성될 수 있는 어레이 내 또는 상의 부위를 나타낸다. 증폭 부위는 또한 부위에서 생성되는 적어도 하나의 앰플리콘을 함유하거나 보유하거나 부착하도록 배치될 수 있다.
- [0029] 본원에서 이용되는 용어 "어레이"는 상대적인 위치에 따라 서로 구분될 수 있는 부위의 모집단을 나타낸다. 어레이의 상이한 부위에 있는 상이한 분자는 어레이에서 부위의 위치에 따라 서로 구분될 수 있다. 어레이의 개별 부위에는 특정 유형의 하나 이상의 분자가 포함될 수 있다. 예를 들어, 부위에는 특정 서열을 갖는 단일 표적 핵산 분자가 포함될 수 있거나 부위에는 동일한 서열(및/또는 이들의 상보적 서열)을 갖는 몇몇 핵산 분자가 포함될 수 있다. 어레이의 부위는 동일한 기재 상에 배치된 상이한 특징부일 수 있다. 예시적 특징부에는 비제한적으로 기재 내의 웰, 기내 내 또는 상의 비드(또는 다른 입자), 기재로부터의 돌출부, 기재 상의 용기 또는 기재 내의 채널이 포함된다. 어레이의 부위는 각각 상이한 분자를 보유하는 별도의 기재일 수 있다. 별도의 기재에 부착된 상이한 분자는 기재가 연합되는 표면 상 기재의 위치에 따라 또는 액체 또는 겔 중 기재의 위치에 따라 확인될 수 있다. 별도의 기재가 표면 상에 배치된 예시적 어레이에는 비제한적으로 웰 내 비드를 갖는 것들이 포함된다.
- [0030] 본원에서 이용되는 용어 "용량"은 부위 및 핵산 재료에 대해 이용되는 경우, 부위를 점유할 수 있는 핵산 재료의 최대량을 의미한다. 예를 들어, 이 용어는 특정 조건에서 부위를 점유할 수 있는 핵산 분자의 전체 수를 나타낼 수 있다. 예를 들어 특정 조건에서 부위를 점유할 수 있는 특정 뉴클레오타이드 서열 사본의 전체 수 또는 핵산 재료의 전체 질량을 포함하는 다른 척도도 이용될 수 있다. 전형적으로 표적 핵산에 대한 부위의 용량은 표적 핵산의 앰플리콘에 대한 부위의 용량과 실질적으로 동등할 것이다.
- [0031] 본원에서 이용되는 용어 "캡처제"는 표적 분자(예로 표적 핵산)에 부착하거나, 보유하거나 또는 결합할 수 있는 재료, 화학물질, 분자 또는 이들의 모이어티를 나타낸다. 예시적 캡처제에는 비제한적으로 적어도 일부 표적 핵산에 상보적인 캡처 핵산, 표적 핵산(또는 이에 부착된 연결 모이어티)에 결합할 수 있는 수용체-리간드 결합 쌍의 구성원(예로 에비딘, 스트렙타비딘, 바이오틴, 렉틴, 탄수화물, 핵산 결합 단백질, 에피토프, 항체 등), 또는 표적 핵산(또는 이에 부착된 연결 모이어티)과 공유 결합을 형성할 수 있는 화학적 시약이 포함된다.
- [0032] 본원에서 이용되는 용어 "클론 모집단"은 특정 뉴클레오타이드 서열에 대해 동종성인 핵산 모집단을 나타낸다.

동종성 서열은 전형적으로 적어도 10 뉴클레오타이드 길이이지만, 예를 들어 적어도 50, 100, 250, 500 또는 1000 뉴클레오타이드 길이를 포함하여 더 길 수 있다. 클론 모집단은 단일 표적 핵산 또는 주형 핵산에서 유래될 수 있다. 전형적으로 클론 모집단에서의 모든 핵산은 동일한 뉴클레오타이드 서열을 가질 것이다. 클론성에서 벗어나지 않고 소수의 돌연변이(예로 증폭 인공물로 인한 것)가 클론 모집단에서 일어날 수 있음이 이해될 것이다.

[0033] 본원에서 이용되는 용어 "변성 사이클"은 상보적 핵산 가닥이 서로에 대해 분리될 수 있도록 증폭 반응 과정을 변화시키는 핵산 증폭 반응의 조작을 나타낸다. 예시적 조작에는 비제한적으로 핵산을 변성시키는 화학적 시약의 도입 또는 핵산을 변성시키기 위한 가열 또는 다른 조작에 의한 반응의 물리적 변경이 포함된다. 몇몇 변성 사이클이 순환형 증폭 반응에 포함될 수 있다. 프라이머가 핵산 가닥에 혼성화하도록 유도하기 위한 순환형 조작과 같은 몇몇 다른 사이클이 또한 포함될 수 있다. 하나 이상의 변성 사이클 또는 다른 사이클이 본원에 나타난 방법에서 생략될 수 있다. 이와 같이, 본 개시의 증폭 반응은 적어도 일부 구현예에서 순환형 조작 없이 수행될 수 있다.

[0034] 본원에서 이용되는 용어 "상이한"은 핵산에 대해 이용되는 경우, 핵산이 서로 동일하지 않은 뉴클레오타이드 서열을 가짐을 의미한다. 둘 이상의 핵산은 이들의 전체 길이에 걸쳐 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 대안적으로 둘 이상의 핵산은 이들 길이의 상당 부분에 걸쳐 상이한 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 둘 이상의 핵산은 서로 상이한 표적 뉴클레오타이드 서열 부분을 갖는 반면, 또한 서로 동일한 공통 서열 영역을 가질 수 있다.

[0035] 본원에서 이용되는 용어 "유체 접근"은 유체 중 분자 및 유체와 접촉하는 부위에 대해 이용되는 경우, 부위와 접촉하거나 들어가는 유체 중에서 또는 이를 통해 분자가 이동하는 능력을 나타낸다. 이 용어는 또한 분자가 용액에 들어가는 부위에서 분리되거나 또는 빠져나오는 능력을 나타낼 수 있다. 분자가 부위에 들어가는 것, 부위와 접촉하는 것, 부위에서 분리되는 것 및/또는 부위를 빠져나가는 것을 방지하는 장벽이 없는 경우, 유체 접근이 일어날 수 있다. 그러나 유체 접근은 그 접근이 절대적으로 방지되지 않는 한, 핵산이 지연되거나 감소되거나 변경되는 경우에도 존재하는 것으로 이해된다.

[0036] 본원에서 이용되는 용어 "이중쇄"는 핵산 분자에 대해 이용되는 경우, 핵산 분자에서 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 상보적 뉴클레오타이드에 수소 결합됨을 의미한다. 부분 이중쇄 핵산은 그 뉴클레오타이드의 적어도 10%, 25%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%가 상보적 뉴클레오타이드에 수소 결합될 수 있다.

[0037] 본원에서 이용되는 용어 "각각"은 항목의 집합에 대해 이용되는 경우, 집합에서의 개별 항목을 나타내기 위한 것이지만 문맥 상 명백히 달리 나타내지 않는 한, 반드시 집합에서의 모든 항목을 나타내는 것은 아니다.

[0038] 본원에서 이용되는 용어 "배제된 부피"는 다른 특정 분자의 배제를 위해 특정 분자에 의해 점유되는 공간 부피를 나타낸다.

[0039] 본원에서 이용되는 용어 "확장가능한" 또는 "확장가능한 상태"는 프라이머와 같은 핵산에 대해 이용되는 경우, 핵산이 뉴클레오타이드의 부가(예로 폴리머라아제 촉매작용을 통해) 또는 올리고뉴클레오타이드의 부가(예로 리가아제 촉매작용에 의해)에 적격임을 의미한다. "확장 불가능한" 또는 "확장 불가능한 상태"에 있는 핵산은, 예를 들어 연장 차단 모이어티의 존재 또는 3'-히드록실의 부재로 인해, 이처럼 적격이 아니다.

[0040] 본원에서 이용되는 용어 "간질 영역"은 기재 또는 표면의 다른 영역을 분리하는 기재 내 또는 표면 상 부위를 나타낸다. 예를 들어, 간질 영역은 어레이의 하나의 특징부를 어레이의 또 다른 특징부로부터 분리할 수 있다. 서로 분리된 두 영역은 서로 접촉이 없는 별개의 것일 수 있다. 또 다른 예에서, 간질 영역은 특징부의 제1 부분을 특징부의 제2 부분으로부터 분리할 수 있다. 간질 영역에 의해 제공되는 분리는 부분적이거나 완전한 분리일 수 있다. 간질 영역은 전형적으로 표면 상에서 특징부의 표면 재료와 상이한 표면 재료를 가질 것이다. 예를 들어, 어레이의 특징부는 간질 영역에 존재하는 양 또는 농도를 초과하는 캡처제 또는 프라이머의 양 또는 농도를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 캡처제 또는 프라이머는 간질 영역에 존재하지 않을 수 있다.

[0041] 본원에서 이용되는 용어 "폴리머라아제"는 당 분야에서의 그 이용과 일치하는 것이며, 예를 들어 주형 가닥으로 핵산을 이용하는 핵산 분자의 상보적 복제물을 생성하는 효소가 포함된다. 전형적으로, DNA 폴리머라아제는 주형 가닥에 결합한 뒤 주형 가닥을 따라 순차적으로 내려가면서 핵산의 자라나는 가닥의 3' 말단의 자유 히드록실기에 뉴클레오타이드를 부가한다. DNA 폴리머라아제는 전형적으로 DNA 주형으로부터 상보적 DNA 분자를 합성하며 RNA 폴리머라아제는 전형적으로 DNA 주형으로부터 RNA 분자를 합성한다(전사). 폴리머라아제는 가닥 성장을 개시하기 위해 프라이머로 불리는 짧은 RNA 또는 DNA 가닥을 이용할 수 있다. 일부 폴리머라아제는 이들이 사슬에 염기를 부가하는 부위의 상류 가닥을 변위시킬 수 있다. 이러한 폴리머라아제는 가닥 변위성으로 불리며,

이들이 폴리머라아제에 의해 읽히는 주형 가닥으로부터 상보적 가닥을 제거하는 활성을 가짐을 의미한다. 가닥 변위 활성을 갖는 예시적 폴리머라아제에는 비제한적으로 Bst(*바실러스 스테아로thermophilus*) 폴리머라아제의 큰 단편, 엑소-Klenow 폴리머라아제 또는 서열분석 등급의 T7 엑소-폴리머라아제가 포함된다. 일부 폴리머라아제는 이들 앞의 가닥을 분해하여 이를 뒤에서 자라는 사슬로 효과적으로 교체한다(5' 엑소뉴클레아제 활성). 일부 폴리머라아제는 이들 뒤의 가닥을 분해하는 활성을 갖는다(3' 엑소뉴클레아제 활성). 일부 유용한 폴리머라아제는 3' 및/또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 감소시키거나 제거하기 위해, 돌연변이 또는 다른 방법에 의해 개질되었다.

[0042] 본원에서 이용되는 용어 "핵산"은 당 분야에서의 그 이용과 일치하는 것이며, 천연 생성 핵산 또는 이들의 기능적 유사체가 포함된다. 특히 유용한 기능적 유사체는 서열 특이적 방식으로 핵산에 혼성화할 수 있거나 특정 뉴클레오타이드 서열의 복제를 위한 주형으로 이용될 수 있다. 천연 생성 핵산은 일반적으로 포스포디에스테르 결합을 함유하는 골격을 갖는다. 유사체 구조는 당분야에 공지된 임의의 다양한 것들을 포함하는 교대 골격 연결을 가질 수 있다. 천연 생성 핵산은 일반적으로 데옥시리보오스 당(예로 데옥시리보핵산(DNA)에서 발견되는 것들) 또는 리보오스 당(예로 리보핵산(RNA)에서 발견되는 것들)을 갖는다.

[0043] 핵산은 당분야에 공지된 이들 당 모이어티의 임의의 다양한 유사체를 함유할 수 있다. 핵산에는 천연 또는 비천연 염기가 포함될 수 있다. 이와 관련하여, 천연 데옥시리보핵산은 아데닌, 티민, 시토신 또는 구아닌으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 염기를 가질 수 있고 리보핵산은 우라실, 아데닌, 시토신 또는 구아닌으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 염기를 가질 수 있다. 핵산에 포함될 수 있는 유용한 비천연 염기는 당분야에 공지되어 있다. 용어 "표적"은 핵산에 대해 이용되는 경우, 본원에 나타난 방법 또는 조성물의 맥락에서 핵산에 대한 의미론적 식별자이며, 다른 경우 명시적으로 나타내는 것을 넘어서서 핵산의 구조 또는 기능을 제한하는 것은 아니다.

[0044] 본원에서 이용되는 용어 "속도"는 운반, 증폭, 캡처 또는 다른 화학적 공정에 대해 이용되는 경우, 화학적 역학 및 생화학적 역학에서의 그 의미와 일치하는 것이다. 두 공정에 대한 속도는 최대 속도(예로 포화 시), 항정 상태-전 속도(예로 평형 전), 역학적 속도 상수 또는 당분야에 공지된 다른 척도에 대해 비교될 수 있다. 특정 구현예에서, 특정 공정에 대한 속도는 공정 완료까지의 총 시간에 대해 결정될 수 있다. 예를 들어, 증폭 속도는 증폭이 종료되기까지 걸린 시간에 대해 결정될 수 있다. 그러나 특정 공정에 대한 속도가 공정 완료까지의 총 시간에 대해 결정되어야 하는 것은 아니다.

[0045] 본원에서 이용되는 용어 "재조합효소"는 당분야에서의 그 이용과 일치하는 것이며, 예를 들어 RecA 단백질, T4 uvsX 단백질, 임의의 문으로부터의 임의의 상동성 단백질 또는 단백질 복합체, 또는 이들의 기능성 변이체가 포함된다. 진핵생물 RecA 동족체는 일반적으로 이 그룹의 첫 번째 구성원이 확인된 후 Rad51로 명명되었다. 다른 비상동성 재조합효소, 예를 들어 RecT 또는 RecO가 RecA 대신 이용될 수 있다.

[0046] 본원에서 이용되는 용어 "단일쇄 결합 단백질"은, 예를 들어 조숙한 어닐링을 방지하기 위해, 뉴클레아제 소화로부터 단일쇄 핵산을 보호하기 위해, 핵산으로부터 이차 구조를 제거하기 위해, 또는 핵산의 복제를 촉진하기 위해 단일쇄 핵산에 결합하는 기능을 갖는 임의의 단백질을 나타낸다. 이 용어는 NC-IUBMB(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology)에서 단일쇄 결합 단백질로 공식 확인된 단백질을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예시적인 단일쇄 결합 단백질에는 비제한적으로 *E. coli* SSB, T4 gp32, T7 유전자 2.5 SSB, 파지 파이 29 SSB, 임의의 문으로부터의 임의의 상동성 단백질 또는 단백질 복합체, 또는 이들의 기능적 변이체가 포함된다.

[0047] 본원에서 이용되는 용어 "운반"은 유체를 통한 분자의 이동을 나타낸다. 용어에는 이들의 농도 구배에 따른 분자 이동과 같은 수동 운반(예로 수동 확산)이 포함될 수 있다. 용어에는 또한 분자가 이들의 농도 구배를 따라 또는 이들의 농도 구배에 반하여 움직일 수 있는 능동 운반이 포함될 수 있다. 따라서 운반에는 원하는 방향으로 또는 증폭 부위와 같은 원하는 위치로 하나 이상의 분자를 이동시키기 위한 에너지 적용이 포함될 수 있다.

[0048] 본원에서 이용되는 용어 "공통 서열"은 분자가 또한 서로 상이한 서열 영역을 갖는 둘 이상의 핵산 분자에 공통적인 서열 영역을 나타낸다. 분자 집합의 상이한 구성원들에 존재하는 공통 서열은 공통 서열에 상보적인 공통 캡처 핵산의 모집단을 이용하여 상이한 다중 핵산의 캡처를 허용할 수 있다. 유사하게, 분자 집합의 상이한 구성원에 존재하는 공통 서열은 공통 서열에 상보적인 공통 프라이머의 모집단을 이용하여 상이한 다중 핵산의 복제 또는 증폭을 허용할 수 있다. 따라서 공통 캡처 핵산 또는 공통 프라이머에는 공통 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있는 서열이 포함된다. 표적 핵산 분자는, 예를 들어 상이한 표적 서열의 하나 또는 두 말단에 공통 어댑터를 부착하도록 개질될 수 있다.

- [0049] 본 개시는 핵산 증폭 방법을 제공한다. 이 방법에는 (a)(i) 증폭 부위 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 갖는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계가 포함되며, 여기서 반응에는 동시에 (i) 상이한 표적 핵산을 평균 운반 속도로 증폭 부위로 운반하고, (ii) 증폭 부위에 있는 표적 핵산을 평균 증폭 속도로 증폭하는 것이 포함되고, 평균 증폭 속도는 평균 운반 속도를 초과한다. 특정 구현예에서, 용액 중 상이한 표적 핵산의 수는 어레이 중 증폭 부위의 수를 초과한다. 전형적으로, 상이한 표적 핵산은 복수의 증폭 부위에 유체 접근할 수 있다. 또한, 각각의 증폭 부위는 선택적으로 복수의 상이한 핵산에서 몇몇 핵산에 대한 용량을 가질 수 있다.
- [0050] 또한, (a)(i) 증폭 부위 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 핵산을 갖는 용액을 포함하는 증폭 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 증폭 시약을 반응시켜 각각 용액의 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 포함하는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계를 포함하는 핵산 증폭 방법이 제공되며, 여기서 반응에는 (i) 각각의 증폭 부위에서 개별 표적 핵산으로부터 첫 번째 앰플리콘을 생성하고, (ii) 각각의 증폭 부위에서 개별 표적 핵산으로부터 또는 첫 번째 앰플리콘으로부터 후속 앰플리콘을 생성하는 것이 포함되고, 후속 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도는 첫 번째 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도를 초과한다. 특정 구현예에서, 용액 중 상이한 표적 핵산의 수는 어레이 중 증폭 부위의 수를 초과한다. 전형적으로, 상이한 표적 핵산은 복수의 증폭 부위에 유체 접근할 수 있다. 또한, 각각의 증폭 부위는 선택적으로 복수의 상이한 핵산에서 몇몇 핵산에 대한 용량을 가질 수 있다.
- [0051] 본원에 나타난 방법에서 이용된 증폭 부위 어레이는 하나 이상의 기재로 존재할 수 있다. 어레이에 이용될 수 있는 기재 재료의 예시적 유형에는 유리, 개질 유리, 관능화 유리, 무기 유리, 마이크로스피어(예로 불활성 및/또는 자성 입자), 플라스틱, 다당류, 나일론, 니트로셀룰로오스, 세라믹, 수지, 실리카, 실리카-기반 재료, 탄소, 금속, 광섬유 또는 광섬유 번들, 중합체 및 멀티웰(예로 마이크로타이터) 플레이트가 포함된다. 예시적 플라스틱에는 아크릴, 폴리스티렌, 스티렌 및 다른 재료의 공중합체, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리부틸렌, 폴리우레탄 및 Teflon™이 포함된다. 예시적 실리카-기반 재료에는 실리콘 및 다양한 형태의 개질 실리콘이 포함된다. 특정 구현예에서, 기재는 웰, 튜브, 채널, 큐벳, 페트리 접시, 병 등과 같은 용기 내부에 있거나 그 일부일 수 있다. 특히 유용한 용기는, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 US 2010/0111768 A1 또는 [Bentley 등, *Nature* 456:53-59 (2008)]에 기재된 바와 같은 플로우 셀이다. 예시적 플로우 셀은 Illumina, Inc.(San Diego, CA)에서 시판되는 것들이다. 또 다른 특히 유용한 용기는 멀티웰 플레이트 또는 마이크로타이터 플레이트 내의 웰이다.
- [0052] 일부 구현예에서, 어레이 부위는 표면 상의 특징부로 배치될 수 있다. 특징부는 임의의 다양한 원하는 포맷으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 부위는 웰, 구덩이, 채널, 용기, 상승 영역, 마개, 말뚝 등일 수 있다. 전술된 바와 같이, 부위는 비드를 함유할 수 있다. 그러나 특정 구현예에서, 부위가 비드 또는 입자를 함유해야 하는 것은 아니다. 예시적 부위에는 454 LifeSciences(Roche, Basel Switzerland의 자회사) 또는 Ion Torrent(Life Technologies, Carlsbad California의 자회사)에서 판매되는 시판 서열분석 플랫폼을 위해 이용되는 기재에 존재하는 웰이 포함된다. 웰을 갖는 다른 기재에는, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 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 또는 PCT 공개 번호 WO 00/63437에 기재된 에칭된 섬유 옵틱 및 다른 기재가 포함된다. 몇몇 사례에서, 기재는 웰에서 비드를 이용하는 적용을 위해 이들 참고문헌에서 예시된다. 웰 함유 기재는 본 개시의 방법 또는 조성물에서 비드를 포함하거나 포함하지 않고 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 기재의 웰에는 본원에 참조로 도입된 US 가출원 번호 61/769,289에 나타난 겔 재료(비드 포함 또는 불포함)가 포함될 수 있다.
- [0053] 어레이 부위는 유리, 플라스틱 또는 위에 예시된 다른 재료와 같은 비금속 표면 상의 금속 특징부일 수 있다. 금속층은 당분야에 공지된 방법, 예컨대 습식 플라즈마 에칭, 건식 플라즈마 에칭, 원자층 증착, 이온 빔 에칭, 화학적 증착, 진공 스퍼터링 등을 이용하여 표면 상에 증착될 수 있다. 예를 들어 FlexAL®, OpAL®, Ionfab 300plus® 또는 Optofab 3000® 시스템(Oxford Instruments, UK)을 포함하는 임의의 다양한 시판 기기가 적절히 이용될 수 있다. 금속층은 또한 본원에 참조로 도입된 [Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977)]에 나타난 e-빔 증발 또는 스퍼터링에 의해 증착될 수 있다. 위에 예시된 것들과 같은 금속층 증착 기법은 표면 상에 금속 영역 또는 패치를 생성하기 위한 사진평판 기법과 조합될 수 있다. 금속층 증착 기법 및 사진평판 기법의 조합을 위한 예시적 방법이 아래 실시예 I 및 II, 그리고 본원에 참조로 도입된 US 일련 번호 US 13/492,661에 제공된다.

- [0054] 특징부 어레이는 점 또는 패치의 격자로 나타날 수 있다. 특징부는 반복 패턴으로 또는 불규칙 비반복 패턴으로 배치될 수 있다. 특히 유용한 패턴은 육각형 패턴, 직선형 패턴, 격자 패턴, 반사 대칭을 갖는 패턴, 회전 대칭을 갖는 패턴 등이다. 비대칭 패턴도 유용할 수 있다. 가장 가까운 인근 특징부의 상이한 패어 간 피치가 동일할 수 있거나 가장 가까운 인근 특징부의 상이한 패어 간 피치가 변할 수 있다. 특정 구현예에서, 어레이의 특징부는 각각 약 100nm^2 , 250nm^2 , 500nm^2 , $1\mu\text{m}^2$, $2.5\mu\text{m}^2$, $5\mu\text{m}^2$, $10\mu\text{m}^2$, $100\mu\text{m}^2$, 또는 $500\mu\text{m}^2$ 초과인 면적을 가질 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 어레이의 특징부는 각각 약 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 , 또는 100nm^2 미만인 면적을 가질 수 있다. 실제로, 영역은 상기 예시된 것에서 선택된 상한치 내지 하한치 범위의 크기를 가질 수 있다.
- [0055] 표면 상에 특징부 어레이를 포함하는 구현예에 있어서, 특징부는 간질 영역에 의해 분리되는 별개의 것일 수 있다. 특징부의 크기 및/또는 영역 간 거리는 어레이가 고밀도, 중밀도 또는 저밀도일 수 있도록 변할 수 있다. 고밀도 어레이는 약 $15\mu\text{m}$ 미만으로 분리된 영역을 갖는 것을 특징으로 한다. 중밀도 어레이는 약 15 내지 $30\mu\text{m}$ 분리된 영역을 갖는 반면, 저밀도 어레이는 $30\mu\text{m}$ 초과 분리된 영역을 갖는다. 본 발명에서 유용한 어레이는 $100\mu\text{m}$, $50\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$, $5\mu\text{m}$, $1\mu\text{m}$ 또는 $0.5\mu\text{m}$ 미만으로 분리된 영역을 가질 수 있다.
- [0056] 특정 구현예에서, 어레이에는 비드 또는 다른 입자의 집합이 포함될 수 있다. 입자는 용액 중에 현탁될 수 있거나 기재 표면 상에 배치될 수 있다. 용액 중 비드 어레이의 예는 Luminex(Austin, TX)에서 판매되는 것들이다. 표면 상에 배치된 비드를 갖는 어레이의 예에는 비드가 웰에 배치된 것들, 예컨대 BeadChip 어레이(Illumina Inc., San Diego CA) 또는 454 LifeSciences(Roche, Basel Switzerland의 자회사) 또는 Ion Torrent(Life Technologies, Carlsbad California의 자회사)의 서열분석 플랫폼에서 이용되는 기재가 포함된다. 표면 상에 배치된 비드를 갖는 다른 어레이는 각각 본원에 참조로 도입된 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 또는 PCT 공개 번호 WO 00/63437에 기재된다. 몇몇 상기 참고문헌은 어레이 기재 내 또는 상에 비드를 로딩하기 전에 비드에 표적 핵산을 부착하는 방법을 기재한다. 그러나 비드는 증폭 프라이머를 포함하도록 제조될 수 있고, 이어서 비드를 이용하여 어레이를 로딩함으로써 본원에 나타난 방법에 이용하기 위한 증폭 부위를 형성할 수 있음이 이해될 것이다. 본원에서 진술된 바와 같이, 기재는 비드 없이 이용될 수 있다. 예를 들어, 증폭 프라이머는 웰 내 겔 재료에 또는 웰에 직접 부착될 수 있다. 따라서 본원에 나타난 방법 및 조성물에 이용하기 위해 개질될 수 있는 예시적인 재료, 조성물 또는 장치가 참고된다.
- [0058] *어레이의 증폭 부위에는 표적 핵산에 결합할 수 있는 복수의 캡처제가 포함될 수 있다. 예시적 캡처제에는 그 예가 본원에서 앞에 나타난 표적 핵산에 부착된 각각의 결합 파트너를 갖는 수용체 및/또는 리간드가 포함된다. 특히 유용한 캡처제는 하나 이상의 표적 핵산의 서열에 상보적인 캡처 핵산이다. 예를 들어, 증폭 부위에 존재하는 캡처 핵산은 각 표적 핵산의 어댑터 서열에 존재하는 공통 서열에 상보적인 공통 캡처 서열을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 캡처 핵산은 또한 표적 핵산의 증폭을 위한 프라이머로 작용할 수 있다(공통 서열을 함유하는지 아닌지와 무관하게).
- [0059] 특정 구현예에서, 캡처제, 예컨대 캡처 핵산은 증폭 부위에 부착될 수 있다. 예를 들어, 캡처제는 어레이 특징부의 표면에 부착될 수 있다. 부착은 중간체 구조, 예컨대 비드, 입자 또는 겔을 통한 수 있다. 겔을 통한 캡처 핵산의 어레이로의 부착을 아래 실시예 I에 나타내며, Illumina Inc.(San Diego, CA)에서 시판된 플로우 셀에 의해 추가 예시되거나 본원에 참조로 도입된 WO 2008/093098에 기재된다. 본원에 나타난 방법 및 장치에서 이용될 수 있는 예시적 겔에는 비제한적으로 콜로이드 구조를 갖는 것들, 예컨대 아가로오스; 중합체 메쉬 구조를 갖는 것들, 예컨대 젤라틴; 또는 가교 중합체 구조를 갖는 것들, 예컨대 폴리아크릴아미드, SFA(예를 들어, 본원에 참조로 도입된 US 특허 출원 공개 번호 2011/0059865 A1 참고) 또는 PAZAM(예를 들어, 본원에 참조로 도입된 US 특허 가출원 일련 번호 61/753,833 참고)이 포함된다. 비드를 통한 부착은 설명에서 예시되고 본원에서 앞에 나타난 참고문헌에 언급된 바와 같이 달성될 수 있다.
- [0060] 일부 구현예에서, 어레이 기재 표면 상의 특징부는 인접하지 않으며 표면의 간질 영역에 의해 분리된다. 어레이의 특징부에 비해 실질적으로 더 낮은 양 또는 농도의 캡처제를 갖는 간질 영역이 유리하다. 캡처제가 없는 간질 영역이 특히 유리하다. 예를 들어, 간질 영역에서 캡처 모이어티의 상대적 소량 또는 부재는 표적 핵산, 및 후속 생성되는 클러스터의 원하는 특징부로의 편재를 선호한다. 특정 구현예에서, 특징부는 표면 내 오폭 특징부(예로 웰)일 수 있고, 특징부는 겔 재료를 함유할 수 있다. 겔-함유 특징부는 겔이 실질적으로 부재하지

나 존재하는 경우 겔이 실질적으로 핵산의 편제를 지지할 수 없는 경우, 표면 상 간질 영역에 의해 서로 분리될 수 있다. 특징부, 예컨대 웰을 함유하는 겔을 갖는 기재의 제조 및 이용 방법 및 조성물은 본원에 참조로 도입된 US 가출원 번호 61/769,289에 나타난다.

[0061] 본 개시의 방법 또는 조성물에서 이용되는 표적 핵산은 DNA, RNA 또는 이들의 유사체로 이루어질 수 있다. 표적 핵산의 원천은 게놈 DNA, 메신저 RNA, 또는 천연원으로부터의 다른 핵산일 수 있다. 일부 경우, 이러한 원천에서 유래된 표적 핵산은 본원에서 방법 또는 조성물에 이용하기 전에 증폭될 수 있다. 비제한적으로 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR), 순환원 증폭(RCA), 다중 변위 증폭(MDA), 또는 무작위 프라이밍 증폭(RPA)을 포함하는 임의의 다양한 공지 증폭 기법이 이용될 수 있다. 본원에 나타난 방법 또는 조성물에서 이용하기 전의 표적 핵산의 증폭은 선택적인 것임이 이해될 것이다. 이와 같이, 표적 핵산은 본원에 나타난 방법 또는 조성물의 일부 구현예에서 이용하기 전에 증폭되지 않을 것이다. 표적 핵산은 선택적으로 합성 라이브러리에서 유래될 수 있다. 합성 핵산은 천연 DNA 또는 RNA 조성을 가질 수 있거나 또는 이들의 유사체일 수 있다.

[0062] 표적 핵산이 유래될 수 있는 예시적 생물학적 표본에는, 예를 들어 포유류, 예컨대 설치류, 마우스, 래트, 토끼, 기니아픽, 유제류, 말, 양, 돼지, 염소, 소, 고양이, 개, 영장류, 인간 또는 비인간 영장류; 식물, 예컨대 아라비답시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*), 옥수수, 수수, 귀리, 밀, 쌀, 카놀라 또는 대두; 해조류, 예컨대 클라미도모나스 레인하르티(*Chlamydomonas reinhardtii*), 선충, 예컨대 캐노르함디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*); 곤충, 예컨대 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*), 모기, 초파리, 꿀벌 또는 거미; 어류, 예컨대 제브라다니오; 파충류; 양서류, 예컨대 개구리 또는 제노푸스 래비스(*Xenopus laevis*); 디티오스테리움 디스코이둠(*dictyostelium discoideum*); 진균, 예컨대 뉴모시스티스 카리니(*pneumocystis carinii*), 타키푸구 루브리페스(*Takifugu rubripes*), 효모, 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*); 또는 플라스모디움 팔시파룸(plasmodium falciparum) 유래의 것들이 포함된다. 표적 핵산은 또한 원핵생물, 예컨대 박테리아, 에스체리키아 콜리(*Escherichia coli*), 스태필로코키(*staphylococci*) 또는 미코플라스마 뉴모니아(*mycoplasma pneumoniae*); 원시세균; 바이러스, 예컨대 C형 간염 바이러스 또는 인간 면역결핍 바이러스; 또는 바이오이드에서 유래될 수 있다. 표적 핵산은 상기 개체의 동종성 배양물 또는 모집단에서 또는 대안적으로 몇몇 상이한 개체의 집합, 예를 들어 커뮤니티 또는 생태계에서 유래될 수 있다.

[0063] 표적 핵산이 천연 원천에서 유래되어야만 하는 것은 아니며, 대신에 공지된 기법을 이용하여 합성될 수도 있다. 예를 들어, 유전자 발현 탐침 또는 유전형 분석 탐침을 합성하고 이용하여 본원에 나타난 방법에서 어레이를 생성할 수 있다.

[0064] 일부 구현예에서, 표적 핵산은 하나 이상의 더 큰 핵산의 단편으로 수득될 수 있다. 단편화는, 예를 들어 분무화, 초음파 분쇄, 화학적 절단, 효소적 절단, 또는 물리적 절단을 포함하는 당분야에 공지된 임의의 다양한 기법을 이용하여 수행될 수 있다. 단편화는 또한 더 큰 핵산의 일부만을 복제하여 앰플리콘을 생성하는 특정 증폭 기법의 이용으로 생성될 수 있다. 예를 들어, PCR 증폭은 증폭에 이용되는 측면 프라이머들 사이의 단편 길이에 의해 정의되는 크기를 갖는 단편을 생성한다.

[0065] 표적 핵산 또는 이들의 앰플리콘의 모집단은 본원에 나타난 방법 또는 조성물의 특정 적용에 적절하거나 바람직한 평균 가닥 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 평균 가닥 길이는 약 100,000 뉴클레오티드, 50,000 뉴클레오티드, 10,000 뉴클레오티드, 5,000 뉴클레오티드, 1,000 뉴클레오티드, 500 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드, 또는 50 뉴클레오티드 미만일 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 평균 가닥 길이는 약 10 뉴클레오티드, 50 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드, 500 뉴클레오티드, 1,000 뉴클레오티드, 5,000 뉴클레오티드, 10,000 뉴클레오티드, 50,000 뉴클레오티드, 또는 100,000 뉴클레오티드 초과일 수 있다. 표적 핵산 또는 이들의 앰플리콘의 모집단에 대한 평균 가닥 길이는 상기 나타난 최대값 내지 최소값 범위일 수 있다. 증폭 부위에서 생성된 (또는 달리 제조되거나 본원에서 이용된) 앰플리콘은 상기 예시된 것들에서 선택되는 상한치 내지 하한치 범위의 평균 가닥 길이를 가질 수 있음이 이해될 것이다.

[0066] 일부 경우, 표적 핵산의 모집단은 그 구성원에 대해 최대 길이를 갖는 조건 하에 생성되거나 또는 다르게는 배치될 수 있다. 예를 들어, 본원에 나타난 방법의 하나 이상의 단계에서 이용되거나 특정 조성물에 존재하는 구성원에 대한 최대 길이는 약 100,000 뉴클레오티드, 50,000 뉴클레오티드, 10,000 뉴클레오티드, 5,000 뉴클레오티드, 1,000 뉴클레오티드, 500 뉴클레오티드, 100 뉴클레오티드 또는 50 뉴클레오티드 미만일 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 표적 핵산의 모집단 또는 이들의 앰플리콘은 그 구성원에 대해 최소 길이를 갖는 조건 하에 생성되거나 또는 다르게는 배치될 수 있다. 예를 들어, 본원에 나타난 방법의 하나 이상의 단계에서

이용되거나 특정 조성물에 존재하는 구성원에 대한 최소 길이는 약 10 뉴클레오타이드, 50 뉴클레오타이드, 100 뉴클레오타이드, 500 뉴클레오타이드, 1,000 뉴클레오타이드, 5,000 뉴클레오타이드, 10,000 뉴클레오타이드, 50,000 뉴클레오타이드, 또는 100,000 뉴클레오타이드 초과일 수 있다. 모집단에서 표적 핵산에 대한 최대 및 최소 가닥 길이는 상기 나타난 최대값 내지 최소값 범위일 수 있다. 증폭 부위에서 생성된(또는 달리 제조되거나 본원에서 이용된) 앰플리콘은 상기 예시된 것들에서 선택되는 상한치 내지 하한치 범위의 최대 및/또는 최소 가닥 길이를 가질 수 있음이 이해될 것이다.

[0067] 특정 구현예에서, 표적 핵산은, 예를 들어 역학적 배제를 촉진하기 위해 증폭 부위의 영역에 대비한 크기를 갖는다. 예를 들어, 어레이의 각각의 부위에 대한 영역은 역학적 배제를 달성하기 위해 표적 핵산의 배제 부피의 지름보다 클 수 있다. 표면 상의 특징부 어레이를 이용하는 구현예를 예로 들면, 각각의 특징부에 대한 영역은 증폭 부위로 운반되는 표적 핵산의 배제 부피의 지름보다 클 수 있다. 표적 핵산에 대한 배제 부피 및 그 지름은, 예를 들어 표적 핵산의 길이로부터 결정될 수 있다. 핵산의 배제 부피 및 배제 부피의 지름을 결정하는 방법은, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [US 7,785,790; Rybenkov 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5307-5311 (1993); Zimmerman 등, *J. Mol. Biol.* 222:599-620 (1991); 또는 Sobel 등, *Biopolymers* 31:1559-1564 (1991)]에 기재된다.

[0068] 어레이의 증폭 부위에는 표적 핵산으로부터 앰플리콘을 생성하는데 이용되는 복수의 프라이머가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 증폭 부위에 존재하는 프라이머는 각각의 표적 핵산의 어댑터 서열에 존재하는 공통 서열에 상보적인 공통 프라이밍 서열을 가질 수 있다. 특정 구현예에서, 복수의 프라이머는 증폭 부위로 부착될 수 있다. 프라이머는 캡처 핵산에 대해 위에 나타난 바와 같이 증폭 부위에 부착될 수 있다.

[0069] 본원에서 앞에 나타난 바와 같이, 어레이 기재 표면 상의 특징부는 인접하지 않으며 표면의 간질 영역에 의해 분리될 수 있다. 특정 구현예에서, 간질 영역은 어레이 특징부에 비해 실질적으로 더 낮은 양 또는 농도의 프라이머를 가질 것이다. 프라이머가 없는 간질 영역이 특히 유리하다. 예를 들어, 간질 영역에서 프라이머의 상대적 소량 또는 부재는 어레이 표면 상 특징부로의 앰플리콘 편재를 선호한다. 상기 구조는 각각의 어레이 특징부에 대한 경계를 생성하여 본원에 나타난 방법에서 집중된 표적 핵산의 증폭에 의해 생성되는 앰플리콘에 대한 유한한 용량을 특징부에 부여한다.

[0070] 본 개시의 방법에는 증폭 시약을 반응시켜 각각 부위에 집중된 개별 표적 핵산으로부터 앰플리콘의 클론 모집단을 포함하는 복수의 증폭 부위를 생성하는 단계가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 증폭 반응은 각각의 증폭 부위 용량을 채우도록 충분한 수의 앰플리콘이 생성될 때까지 진행된다. 이러한 방식으로 이미 집중된 부위를 용량까지 채우는 것은 후속 표적 핵산이 부위에 배치되는 것을 배제하여 그 부위에서 앰플리콘의 클론 모집단을 생성한다. 따라서 일부 구현예에서 앰플리콘이 증폭 부위의 용량을 채우도록 생성되는 속도가 개별 표적 핵산이 각각 개별 증폭 부위로 운반되는 속도를 초과하는 것이 바람직하다.

[0071] 일부 구현예에서, 두 번째 표적 핵산이 증폭 부위에 도달하기 전에 그 부위가 용량까지 채워지지 않은 경우에도 뚜렷한 클론성이 달성될 수 있다. 일부 조건 하에서, 첫 번째 표적 핵산의 증폭은 충분한 수의 사본이 부위로 운반되는 두 번째 표적 핵산으로부터 사본 생성을 효과적으로 이겨내거나 또는 압도하도록 제조되는 시점까지 진행될 수 있다. 예를 들어 지름이 500nm 미만인 원형 특징부 상의 가교 증폭 공정을 이용하는 하나의 구현예에서, 첫 번째 표적 핵산에 대한 14 사이클의 지수적 증폭 후, 동일한 부위에서 두 번째 표적 핵산으로부터의 오염은 Illumina 서열분석 플랫폼 상의 합성 중 서열분석에 부정적으로 영향을 미치는 충분하지 못한 수의 오염 앰플리콘을 생성할 것으로 결정되었다.

[0072] 상기 예에서 나타난 바와 같이, 어레이에서의 증폭 부위가 모든 구현예에서 완전히 클론일 필요는 없다. 오히려 일부 적용에 있어서, 개별 증폭 부위는 첫 번째 표적 핵산으로부터의 앰플리콘으로 우세하게 점유될 수 있고, 두 번째 표적 핵산으로부터의 오염 앰플리콘을 낮은 수준으로 가질 수도 있다. 어레이는 오염 수준이 어레이의 이후 이용에 허용불가능한 영향을 미치지 않는 한, 낮은 수준의 오염 앰플리콘을 갖는 하나 이상의 증폭 부위를 가질 수 있다. 예를 들어, 어레이가 검출 적용에서 이용되는 경우, 허용가능한 오염 수준은 검출 기법의 해상도 또는 노이즈 대비 신호에 허용불가능한 방식으로 영향을 미치지 않는 수준일 것이다. 따라서 명확한 클론성은 일반적으로 본원에 나타난 방법으로 제조된 어레이의 특정 용도 또는 적용에 관련된 것이다. 특정 용도를 위해 개별 증폭 부위에서 허용가능할 수 있는 예시적 오염 수준에는 비제한적으로 최대 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10% 또는 25%의 오염 앰플리콘이 포함된다. 어레이에는 이러한 예시적 수준의 오염 앰플리콘을 갖는 하나 이상의 증폭 부위가 포함될 수 있다. 예를 들어, 어레이에서 증폭 부위의 최대 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 또는 심지어 100%가 일부 오염 앰플리콘을 가질 수 있다.

- [0073] 특정 구현예에서, 본 개시의 방법은 동시에 (i) 표적 핵산을 평균 운반 속도로 증폭 부위로 운반하고 (ii) 증폭 부위에 있는 표적 핵산을 평균 증폭 속도로 증폭하기 위해 수행되며, 여기서 평균 증폭 속도는 평균 운반 속도를 초과한다. 따라서 역학적 배제는 상대적으로 느린 운반 속도를 이용하여 이러한 구현예에서 달성될 수 있다. 예를 들어, 충분히 낮은 농도의 표적 핵산이 원하는 평균 운반 속도를 달성하기 위해 선택될 수 있고, 더 낮은 농도는 더 느린 평균 운반 속도를 야기한다. 대안적으로 또는 부가적으로, 고점도 용액 및/또는 용액 중 분자 밀집화 시약의 존재가 운반 속도를 감소시키는데 이용될 수 있다. 유용한 분자 밀집화 시약의 예에는 비제한적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 피콜, 텍스트란 또는 폴리비닐 알코올이 포함된다. 예시적 분자 밀집화 시약 및 제형은 본원에 참조로 도입된 US 7,399,590에 나타난다. 원하는 운반 속도를 달성하기 위해 조정될 수 있는 또 다른 인자는 표적 핵산의 평균 크기이다.
- [0074] 방법의 일부 구현예에서, 표적 핵산은, 예를 들어 확산 또는 다른 공정에 의해 증폭 개시 전에 증폭 부위로 운반될 수 있다. 이 경우에서, 역학적 배제는 후속 앰플리콘이 제조되는 속도에 비해 첫 번째 앰플리콘의 상대적으로 느린 생성 속도를 활용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 상이한 앰플리콘 형성 속도는 처음에는 일시적으로 연장불가능한 상태에 있는 첫 번째 앰플리콘 형성을 위한 첫 번째 프라이머 및 증폭 반응을 통해 연장가능한 상태에 있는 후속 앰플리콘 형성을 위한 다른 프라이머를 이용하여 달성될 수 있다. 이와 같이, 첫 번째 프라이머의 연장가능한 상태로의 전환 지연은 첫 번째 앰플리콘 형성의 지연을 유도할 것인 반면, 후속 앰플리콘 형성은 그러한 지연을 겪지 않는다. 이러한 방식으로, 후속 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도는 첫 번째 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도를 초과한다.
- [0075] 상이한 앰플리콘 형성 속도를 통한 역학적 배제의 보다 상세한 예는 다음과 같다. 증폭 부위에는 여기에 부착된 3 프라이머 하위집단이 포함될 수 있다. 첫 번째 하위집단의 프라이머는 표적 핵산을 캡처하고(캡처 서열을 통해) 첫 번째 앰플리콘 형성을 위한 프라이머로 작용한다. 첫 번째 하위집단의 프라이머는, 예를 들어 3' 말단에서 디데옥시 뉴클레오타이드를 통해 가역적으로 연장이 차단된다. 두 번째 하위집단의 프라이머는 P5 프라이머 서열을 가질 수 있고, 세 번째 집단의 프라이머는 P7 프라이머 서열을 가질 수 있다. 첫 번째 및 두 번째 하위집단의 프라이머에는 디데옥시 뉴클레오타이드가 포함되지 않으므로 완전한 연장이 가능하다. 표적 핵산은 (5'에서 3'으로) P7 프라이머 결합 서열, 몇몇 상이한 표적 뉴클레오타이드 서열 중 하나, P5 프라이머 결합 서열, 및 캡처 서열 상보체를 포함하도록 구축될 수 있다. 몇몇 상이한 표적 핵산은 첫 번째 하위집단의 프라이머에(캡처 서열을 통해) 혼성화될 수 있다. 이어서 캡처 프라이머는, 예를 들어 가피로인산 분해 조건 하에(예로 과량의 피로포스페이트의 존재 하에) 폴리머라아제 처리에 의해 연장가능한 상태로 전환될 수 있다. 후속 앰플리콘이 증폭 부위를 채우도록 생성되는 시기 동안 평균 하나의 캡처 프라이머만 연장가능한 형태로 전환될 조건이 이용될 수 있다. 따라서 몇몇 잠재 오염 표적 핵산이 개별 증폭 부위에 존재할 수 있지만, 역학적 배제로 하나의 표적 핵산으로부터만 앰플리콘 형성이 유도되어 증폭 부위에서 앰플리콘의 클론 모집단을 생성할 것이다. 예시적 목적을 위해, 상기 예를 단일 증폭 부위에 대해 설명했으나, 반응에 증폭 부위 어레이에서의 표적 핵산 부착 및 증폭이 관여될 수 있음이 이해될 것이다.
- [0076] 임의의 다양한 일시적으로 연장불가능한 프라이머가 이들 프라이머를 연장가능한 상태로 전환하기 위한 각각의 기법 및 시약과 함께 본원에 나타난 방법에서 이용될 수 있다. 상기 예는 가피로인산 분해에 의해 제거되는 디데옥시 뉴클레오타이드의 이용을 기재한다. 다른 연장불가능한 뉴클레오타이드가 프라이머 상에 존재하고 가피로인산 분해에 의해 제거될 수 있다. 또한, 디데옥시 뉴클레오타이드 또는 다른 연장불가능한 뉴클레오타이드는, 예를 들어 폴리머라아제 또는 다른 적절한 효소의 엑소뉴클레아제 활성을 포함하는 다른 공지된 기법을 통해 제거될 수 있다. 다른 구현예에서, 프라이머에는 종료자-기반 합성 중 서열분석 방법에서 이용되는 것들과 같은 가역적 종료자가 포함될 수 있다. 가역적 종료자 및 이들의 제거 기법의 예는, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Bentley 등, *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, 및 US 2008/0108082]에 기재된다.
- [0077] 표적 핵산이 증폭 전 증폭 부위에 존재하는 구현예에 대해 상이한 첫 번째 앰플리콘 및 후속 앰플리콘 형성 속도를 유도하기 위한 상이한 활성의 프라이머의 이용이 위에 예시되었으나, 이 방법은 또한 증폭이 일어남에 따라 표적 핵산이 증폭 부위로 운반되는(예로 확산을 통해) 조건 하에서 수행될 수 있다. 따라서 역학적 배제는 후속 앰플리콘 형성에 비해 첫 번째 앰플리콘의 상대적으로 느린 운반 속도 및 상대적으로 느린 생성을 모두 활용할 수 있다. 따라서 본원에 나타난 증폭 반응은 표적 핵산이 (i) 첫 번째 앰플리콘의 생성, 및 (ii) 어레이의 다른 부위에서의 후속 앰플리콘의 생성과 동시에 용액으로부터 증폭 부위로 운반되도록 수행될 수 있다. 특정 구현예에서, 후속 앰플리콘이 증폭 부위에서 생성되는 평균 속도는 표적 핵산이 용액으로부터 증폭 부위로 운반되는 평균 속도를 초과할 수 있다. 일부 경우에 있어서, 각각의 증폭 부위의 용량을 채우기 위해 충분한

수의 앰플리콘이 개별 증폭 부위에서 단일 표적 핵산으로부터 생성될 수 있다. 앰플리콘이 각각의 증폭 부위의 용량을 채우기 위해 생성되는 속도는, 예를 들어 개별 표적 핵산이 용액으로부터 증폭 부위로 운반되는 속도를 초과할 수 있다.

[0078] 본원에 나타난 방법에서 이용되는 증폭 시약은 바람직하게는 증폭 부위에서 표적 핵산의 사본을 신속히 제조할 수 있다. 전형적으로 본 개시의 방법에서 이용되는 증폭 시약에는 폴리머라아제 및 뉴클레오타이드 3인산(NTP)이 포함될 것이다. 당분야에 공지된 임의의 다양한 폴리머라아제가 이용될 수 있지만, 일부 구현예에서 엑소뉴클레아제 활성이 없는 폴리머라아제를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. NTPs는 DNA 사본이 제조되는 구현예에 있어서 데옥시리보뉴클레오타이드 3인산(dNTPs)일 수 있다. 전형적으로 4개의 천연 중 dATP, dTTP, dGTP 및 dCTP가 DNA 증폭 시약에 존재할 것이지만, 필요한 경우 유사체가 이용될 수 있다. NTPs는 RNA 사본이 제조되는 구현예에 있어서 리보뉴클레오타이드 3인산(rNTPs)일 수 있다. 전형적으로 4개의 천연 중 rATP, rUTP, rGTP 및 rCTP가 RNA 증폭 시약에 존재할 것이지만, 필요한 경우 유사체가 이용될 수 있다.

[0079] 증폭 시약에는 앰플리콘 형성을 촉진하는, 일부 경우에는 앰플리콘 형성 속도를 증가시키는 추가 성분이 포함될 수 있다. 한 예는 재조합효소이다. 재조합효소는 반복 침범/연장을 허용하여 앰플리콘 형성을 촉진할 수 있다. 보다 구체적으로, 재조합효소는 앰플리콘 형성을 위한 주형으로 표적 핵산을 이용하여 폴리머라아제에 의한 표적 핵산의 침범 및 폴리머라아제에 의한 프라이머의 연장을 촉진할 수 있다. 상기 절차는 각 회의 침범/연장에서 생성된 앰플리콘이 후속 회의 주형으로 기능하는 연쇄 반응으로 반복될 수 있다. 이 공정은 변성 사이클(예로 가열 또는 화학적 변성을 통해)이 필요하지 않으므로 표준 PCR보다 더 빠르게 일어날 수 있다. 이와 같이, 재조합효소-촉진 증폭은 등온으로 수행될 수 있다. 일반적으로 증폭을 촉진하기 위해 재조합효소-촉진 증폭 시약에 ATP, 또는 다른 뉴클레오타이드(또는 일부 경우에는 가수분해가 불가능한 이들의 유사체)가 포함되는 것이 바람직하다. SSB는 증폭을 추가 촉진할 수 있으므로, 재조합효소 및 단일쇄 결합(SSB) 단백질의 혼합물이 특히 유용하다. 재조합효소-촉진 증폭을 위한 예시적 제형물에는 TwistDx(Cambridge, UK)에서 TwistAmp 키트로 판매되는 것들이 포함된다. 재조합효소-촉진 증폭 시약의 유용한 성분 및 반응 조건은 각각 본원에 참조로 도입된 US 5,223,414 및 US 7,399,590에 나타난다.

[0080] 앰플리콘 형성을 촉진하고, 일부 경우에는 앰플리콘 형성 속도를 증가시키기 위해 증폭 시약에 포함될 수 있는 성분의 또 다른 예는 헬리카아제이다. 헬리카아제는 앰플리콘 형성의 연쇄 반응을 허용함으로써 앰플리콘 형성을 촉진할 수 있다. 이 절차는 변성 사이클(예로 가열 또는 화학적 변성을 통해)이 필요하지 않으므로 표준 PCR보다 더 빠르게 일어날 수 있다. 이와 같이, 헬리카아제-촉진 증폭은 등온으로 수행될 수 있다. SSB는 증폭을 추가 촉진할 수 있으므로, 헬리카아제 및 단일쇄 결합(SSB) 단백질의 혼합물이 특히 유용하다. 헬리카아제-촉진 증폭을 위한 예시적 제형물에는 Biohelix(Beverly, MA)에서 IsoAmp 키트로 판매되는 것들이 포함된다. 또한 헬리카아제 단백질을 포함하는 유용한 제형물의 예는 각각 본원에 참조로 도입된 US 7,399,590 및 US 7,829,284에 기재된다.

[0081] 앰플리콘 형성을 촉진하고, 일부 경우에는 앰플리콘 형성 속도를 증가시키기 위해 증폭 시약에 포함될 수 있는 성분의 또 다른 예는 기원 결합 단백질이다.

[0082] 증폭 반응이 일어나는 속도는 증폭 반응의 하나 이상이 활성 성분의 농도 또는 양을 증가시켜 증가될 수 있다. 예를 들어, 증폭 속도를 증가시키기 위해 폴리머라아제, 뉴클레오타이드 3인산, 프라이머, 재조합효소, 헬리카아제 또는 SSB의 양 또는 농도가 증가될 수 있다. 일부 경우에서, 양 또는 농도가 증가된(또는 본원에 나타난 방법에서 다른 방식으로 조작된) 증폭 반응의 하나 이상의 활성 성분은 증폭 반응의 비핵산 성분이다.

[0083] 증폭 속도는 또한 온도를 조정하여 본원에 나타난 방법에서 증가될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 증폭 부위에서의 증폭 속도는 변성 또는 다른 해로운 이벤트로 인해 반응 속도가 감소하는 최대 온도까지 부위(들)에서 온도 증가에 의해 증가될 수 있다. 최적 또는 원하는 온도는 주어진 증폭 반응 혼합물에서 실험적으로 또는 이용 증폭 성분의 공지된 특성으로부터 결정될 수 있다. 증폭에 이용되는 프라이머의 특성도 증폭 속도를 증가시키기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 프라이머의 서열 및/또는 길이가 조정될 수 있다. 이러한 조정은 프라이머 용융 온도(T_m)의 실험적 예측에 기반하여 또는 실험적으로 수행될 수 있다.

[0084] 증폭 부위에서 증폭 속도를 증가시키기 위한 또 다른 옵션은 증폭 부위에서 증폭 반응의 하나 이상의 활성 성분의 국소 농도를 증가시키는 것이다. 활성 성분에는 하나 이상의 비핵산 성분이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 증폭 반응의 하나 이상의 활성 성분은 전기적 조작, 예컨대 전기영동, 등속전기영동, 전류 또는 전압의 직접 펄스화 등을 이용하여 증폭 부위로 유인될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 하나 이상의 증폭 성분에는 이것을 증폭 부위로 모집하는 친화도 태그가 포함될 수 있다. 친화도 태그는 전기적 조작이 적절히 태그

화된 성분을 증폭 부위로 유인하도록 하전될 수 있다. 하전되지 않은 친화도 태그도 이용될 수 있다. 예를 들어, 당분야에 공지된 임의의 다양한 리간드 또는 수용체, 예컨대 캡처제의 예로서 본원에 나타난 것들이 증폭 반응의 성분에 대한 친화도 태그로 이용될 수 있다. 핵산을 위해 이용되는 캡처제의 경우와 마찬가지로, 증폭 부위에는 증폭 성분의 친화도 태그에 대한 결합 파트너가 포함될 수 있다. 따라서 친화도 태그된 증폭 성분의 국소 농도는 증폭 부위에서 적절한 파트너와의 상호작용으로 인해 증가될 수 있다. 증폭 부위가 기재의 표면인 특정 구현예에서, 친화도 태그에 대한 결합 파트너는 표면에 부착될 수 있다.

[0085] 또한, 자성 또는 광학적 힘을 이용하여 증폭 시약의 국소 농도를 증가시킬 수 있다. 이러한 경우, 하나 이상의 증폭 시약에는 이러한 힘에 의해 조작될 수 있는 자성 태그 또는 광학 태그가 포함될 수 있다.

[0086] 증폭 반응이 일어나는 속도는 하나 이상의 증폭 시약의 활성을 증가시켜 증가될 수 있다. 예를 들어, 폴리머라아제의 연장 속도를 증가시키는 보조 인자가 폴리머라아제가 이용되는 반응에 첨가될 수 있다. 일부 구현예에서, 금속 보조 인자, 예컨대 마그네슘, 아연 또는 망간이 폴리머라아제 반응에 첨가될 수 있거나 베타인이 첨가될 수 있다.

[0087] 본원에 나타난 방법의 일부 구현예에서, 이중쇄인 표적 핵산 모집단을 이용하는 것이 바람직하다. 놀랍게도 역학적 배제 조건 하에 부위 어레이에서의 앰플리콘 형성이 이중쇄 표적 핵산에 대해 효율적인 것으로 관찰되었다. 예를 들어, 앰플리콘의 클론 모집단을 갖는 복수의 증폭 부위는 재조합효소 및 단일쇄 결합 단백질의 존재 하에 (동일한 농도에서 단일쇄 표적 핵산에 비해) 이중쇄 표적 핵산으로부터 더 효율적으로 생성될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 단일쇄 표적 핵산이 본원에 나타난 방법의 일부 구현예에서에서 이용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0088] 본원에 나타난 방법은 임의의 다양한 증폭 기법을 이용할 수 있다. 이용될 수 있는 예시적 기법에는 비제한적으로 폴리머라아제 연쇄 반응(PCR), 순환원 증폭(RCA), 다중 변위 증폭(MDA), 또는 무작위 프라이밍 증폭(RPA)이 포함된다. 일부 구현예에서, 예를 들어 증폭 부위가 원하는 용량을 갖는 부피로 앰플리콘을 함유할 수 있는 경우, 증폭은 용액 중에 수행될 수 있다. 바람직하게는, 본 개시의 방법에서 역학적 배제 조건 하에 이용되는 증폭 기법은 고상에서 수행될 것이다. 예를 들어, 증폭을 위해 이용되는 하나 이상의 프라이머는 증폭 부위에서 고상에 부착될 수 있다. PCR 구현예에서, 증폭을 위해 이용되는 프라이머의 하나 또는 둘 다는 고상에 부착될 수 있다. 이중쇄 앰플리콘이 복제되는 주형 서열에 인접하는 2개의 표면 부착 프라이머 간에 가교 유사 구조를 형성하므로, 표면에 부착된 2종의 프라이머를 이용하는 포맷은 종종 가교 증폭으로 불린다. 가교 증폭을 위해 이용될 수 있는 예시적 시약 및 조건은, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 U.S. 특허 번호 5,641,658; U.S. 특허 공개 번호 2002/0055100; U.S. 특허 번호 7,115,400; U.S. 특허 공개 번호 2004/0096853; U.S. 특허 공개 번호 2004/0002090; U.S. 특허 공개 번호 2007/0128624; 및 U.S. 특허 공개 번호 2008/0009420에 기재된다. 고상 PCR 증폭은 또한 고체 지지체에 부착된 하나의 증폭 프라이머 및 용액 중의 두 번째 프라이머로 수행될 수 있다. 표면 부착된 프라이머 및 가용성 프라이머의 조합을 이용하는 예시적 포맷은, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Dressman 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8817-8822 (2003), WO 05/010145, 또는 U.S. 특허 공개 번호 2005/0130173 또는 2005/0064460]에 기재된 에멀션 PCR이다. 에멀션 PCR은 예시적인 포맷이며, 본원에 나타난 방법의 목적을 위해 에멀션의 이용이 선택적이고 실제로 몇몇 구현예에 있어서 에멀션이 이용되지 않음이 이해될 것이다. 상기 예시된 PCR 기법은 증폭 속도를 증가시키거나 촉진하기 위해 본원에서 다른 곳에 예시된 성분을 이용하여 비순환형 증폭(예로 등온 증폭)을 위해 개질될 수 있다. 따라서 상기 예시된 PCR 기법은 역학적 배제 조건 하에 이용될 수 있다.

[0089] RCA 기법은 본 개시의 방법에 이용하기 위해 개질될 수 있다. RCA 반응에서 이용될 수 있는 예시적 성분 및 RCA가 앰플리콘을 생성하는 원리는, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Lizardi 등, *Nat. Genet.* 19:225-232 (1998) 및 US 2007/0099208 A1]에 기재된다. RCA를 위해 이용되는 프라이머는 용액 중에 있거나 증폭 부위에서 고체 지지체 표면에 부착될 수 있다. 상기 참고문헌에 예시된 RCA 기법은, 예를 들어 특정 용도에 적합하도록 증폭 속도를 증가시키기 위해, 본원에서 교시에 따라 개질될 수 있다. 따라서 RCA 기법은 역학적 배제 조건 하에 이용될 수 있다.

[0090] MDA 기법은 본 개시의 방법에 이용하기 위해 개질될 수 있다. MDA를 위한 일부 기본 원리 및 유용한 조건은, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Dean 등, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 99:5261-66 (2002); Lage 등, *Genome Research* 13:294-307 (2003); Walker 등, *Molecular Methods for Virus Detection*, Academic Press, Inc., 1995; Walker 등, *Nucl. Acids Res.* 20:1691-96 (1992); US 5,455,166; US 5,130,238; 및 US 6,214,587]에 기재된다. MDA에 이용되는 프라이머는 용액 중에 있거나 증폭 부위에서 고체 지지체 표면에 부착

될 수 있다. 상기 참고문헌에 예시된 MDA 기법은, 예를 들어 특정 용도에 적합하도록 증폭 속도를 증가시키기 위해, 본원에서 교시에 따라 개질될 수 있다. 따라서 MDA 기법은 역학적 배제 조건 하에 이용될 수 있다.

[0091] 특정 구현예에서, 상기 예시된 증폭 기법의 조합을 이용하여 역학적 배제 조건 하에 어레이를 제조할 수 있다. 예를 들어, RCA 및 MDA를 조합 이용할 수 있고, 여기서 RCA는 용액 중 콘카타머 앰플리콘을 생성하는데 이용된다(예로 용액상 프라이머를 이용하여). 이어서 앰플리콘은 증폭 부위에서 고체 지지체 표면에 부착된 프라이머를 이용하여 MDA를 위한 주형으로 이용될 수 있다. 상기 예에서, 조합된 RCA 및 MDA 단계 후에 생성되는 앰플리콘은 증폭 부위의 표면에 부착될 것이다.

[0092] 상기 몇몇 구현예에 대해 예시된 바와 같이, 본 개시의 방법이 순환형 증폭 기법을 이용할 필요는 없다. 예를 들어, 표적 핵산의 증폭은 변성 사이클 없이 증폭 부위에서 수행될 수 있다. 예시적 변성 사이클에는 증폭 반응에 대한 화학적 변성제의 도입 및/또는 증폭 반응의 온도 증가가 포함된다. 따라서 표적 핵산의 증폭은 표적 핵산 및 앰플리콘을 변성시키는 화학적 시약으로 증폭 용액을 교체하는 단계를 포함해야 하는 것은 아니다. 유사하게, 표적 핵산의 증폭은 표적 핵산 및 앰플리콘을 변성시키는 온도로 용액의 가열을 포함해야 하는 것은 아니다. 따라서 증폭 부위에서 표적 핵산의 증폭은 본원에 나타난 방법의 기간 동안 등온에서 수행될 수 있다. 실제로 본원에 나타난 증폭 방법은 표준 조건 하에 일부 증폭 기법에 대해 수행되는 하나 이상의 순환형 조작 없이 수행될 수 있다. 또한, 일부 표준 고상 증폭 기법에서, 세척은 표적 핵산이 기재 상에 로딩된 후 그리고 증폭이 개시되기 전에 수행된다. 그러나 본 발명의 방법의 구현예에서, 세척 단계가 반응 부위로의 표적 핵산의 운반 및 증폭 부위에서 표적 핵산의 증폭 전에 수행되어야만 하는 것은 아니다. 대신에, 운반(예로 확산을 통해) 및 증폭은 역학적 배제를 제공하기 위해 동시에 일어날 수 있다.

[0093] 일부 구현예에서, 역학적 배제 조건 하에 일어나는 증폭 사이클을 반복하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서 표적 핵산의 사본은 순환형 조작 없이 개별 증폭 부위에서 제조될 수 있지만, 증폭 부위의 어레이는 각 사이클 이후 앰플리콘을 함유하는 부위의 수를 증가시키도록 순환 처리될 수 있다. 특정 구현예에서, 증폭 조건은 사이클 별로 개질될 수 있다. 예를 들어, 운반 속도의 변경 또는 증폭 속도의 변경을 위해 상기 나타난 하나 이상의 조건이 사이클 별로 조정될 수 있다. 이와 같이, 운반 속도가 사이클 별로 증가될 수 있거나 운반 속도가 사이클 별로 감소될 수 있고, 증폭 속도가 사이클 별로 증가될 수 있거나 증폭 속도가 사이클 별로 감소될 수 있다.

[0094] 본원에 나타난 방법은 어레이 증폭 부위로 표적 핵산의 전기장(e^- 장) 보조 운반을 이용하도록 개질될 수 있다. 예를 들어, 어레이의 각 증폭 부위는 표적 핵산을 유인하는 전기적 전하를 생성하기 위한 전원에 전기적으로 커플링될 수 있다. 하나의 구조에서, 증폭 부위에서의 양 전하는 음으로 하전된 당-인산염 골격을 통해 핵산을 유인할 수 있다. 핵산을 어레이 부위로 유인하기 위한 전기장 보조를 이용하기 위한 예시적 방법 및 장치는 본원에 참조로 도입된 US 2009/0032401 A1에 기재된다. 전기장 보조는, 예를 들어 핵산 표적이 각 증폭 단계 동안 증폭 부위의 어레이에 유체 접근할 수 있도록 복수의 상이한 표적 핵산이 용액 중에 있는 조건 하에서, 본 개시의 방법에서 이용될 수 있다. 각 증폭 부위에서의 전하는 역학적 배제를 달성하기 위해 조정될 수 있다. 전하 조정에 대해 부가적으로 또는 대안적으로, 표적 핵산 운반 속도를 변경하거나 또는 증폭 속도를 변경하기 위해 본원에 나타난 다른 조건이 역학적 배제를 달성하기 위해 조정될 수 있다. 따라서 증폭이 어레이의 다양한 증폭 부위에서 동시에 일어나는 동안 어레이의 증폭 부위에서의 전하가 표적 핵산을 유인하도록 조정될 수 있고, 여기서 평균 증폭 속도는 표적 핵산이 증폭 부위로 운반되는(즉 전기장 보조 운반 하의) 평균 속도를 초과한다.

[0095] 표적 핵산의 증폭 부위에 대한 전기장 보조 운반을 이용하는 특정 구현예에서, 전기장은 증폭 반응 과정에 걸쳐 지속적으로 적용될 수 있다. 대안적으로, 전기장은 증폭 반응이 진행되고 증폭 부위가 앰플리콘으로 채워짐에 따라 변화(예로 증가 또는 감소)될 수 있다. 예를 들어, 전기장의 증가는 표적 핵산을 획득하는 증폭 부위의 수를 증가시키는 이점을 제공할 수 있다(이는 다시 각각의 부위에서 앰플리콘의 클론 모집단을 생성하도록 증폭된다). 전기장이 증가되는 속도 및 증가에 대한 크기 범위는 경시적인 표적 핵산 운반의 증가 속도와 동일한 시기에 걸쳐 효과적으로 충전되는 증폭 부위의 수 증가를 균형잡도록 선택될 수 있다. 또 다시, 방법에 의해 생성되는 어레이의 용도에 따라, 효과적인 충전은 증폭 부위가 첫 번째 표적 핵산의 사본으로 용량까지 충전되어 그 부위에서 임의의 두 번째 표적 핵산의 증폭을 방지하는 포인트일 수 있다. 대안적으로, 효과적인 충전은 특정 증폭 부위에서의 두 번째 표적 핵산의 증폭이 무시할 만하거나 또는 다르게는 원하는 어레이 용도에 허용 가능한 것으로 간주되도록 충분히 적은 일부 오염 앰플리콘을 생성할 포인트일 수 있다.

[0096] 일반적으로, 전기장 보조는 어레이의 하나 이상의 증폭 부위에 대한 표적 핵산의 운반에 대해 추가 수준의 제어

를 허용한다. 전기장 보조의 이용이 다양한 어레이 부위에서 일어나는 증폭과 동시에 표적 핵산의 증폭 부위 어레이로의 운반의 맥락에서 상기에 예시되었으나, 대안적 구현예에서, 전기장 보조는 부위에서의 증폭 개시 전에 증폭 부위로 표적 핵산을 운반하기 위해 이용될 수 있다. 전기장 보조는 표적 핵산 이외의 표적 생체분자를 관심 부위, 예컨대 어레이의 특징부로 운반하기 위해 본원에 나타난 방법 또는 조성물에서 이용될 수 있다.

[0097] 특정 구현예에서, 전기장은 어레이의 전체 증폭 부위에 실질적으로 균일하게 적용될 수 있다. 따라서 용액 중에 있는 표적 핵산은 임의의 주어진 증폭 부위로 운반될 동일한 개연성을 가질 것이다. 대안적 구현예에서, 전기장은 어레이에 존재하는 증폭 부위의 서브세트에만 적용될 수 있다. 이러한 방식으로, 전기장 보조는 다른 것에 비해 일부 부위를 선택적으로 채우기 위해 이용될 수 있다. 또한 필요한 경우, 부위의 제1 서브세트에 표적 핵산을 운반하기 위해 유인성 전하가 증폭 부위의 제1 서브세트에 적용될 수 있고, 그러면서 표적 핵산이 제2 서브세트 부위로 운반되는 것을 저해하거나 표적 핵산을 부위의 제2 서브세트에서 제거하기 위해(예로 탈착 또는 분해를 통해) 반발성 전하가 증폭 부위의 제2 서브세트에 적용될 수 있다. 유사하게, 표적 핵산이 간질 영역으로 운반되는 것을 저해하기 위해 또는 표적 핵산을 실시예 III 및 아래에 상세히 나타낸 바와 같이 간질 영역에서 제거하기 위해(예로 탈착 또는 분해를 통해) 반발성 전하가 어레이의 간질 영역에 적용될 수 있다.

[0098] 특정 구현예에서, 어레이의 간질 영역은 표적 핵산 또는 다른 생체분자의 결합을 저해하거나 제거하는 전기적 전하를 생성하기 위해 전원에 전기적으로 커플링될 수 있다. 하나의 구조에서, 간질 영역에서의 음 전하는 음으로 하전된 당-인산염 골격을 통해 핵산을 밀어낼 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 간질 영역에서의 전하는 핵산 및 생체분자를 전기화학적으로 손상시키는 표면-편재 pH 변화를 생성하는데 이용될 수 있다.

[0099] 전기장 반발은, 예를 들어 핵산 표적이 각각의 증폭 단계 동안 증폭 부위의 어레이에 유체 접근할 수 있도록 복수의 상이한 표적 핵산이 용액 중에 있는 조건 하에, 본 개시의 방법에서 이용될 수 있다. 어레이의 간질 영역에서의 전하는 핵산이 어레이의 특징부에서 캡처되고 선택적으로 역학적 배제 조건 하에 특징부에서 증폭되는 동안 핵산을 밀어내도록(예로 제거 또는 결합 저해에 의해) 조정될 수 있다. 전하 조정에 부가적으로 또는 대안적으로, 특징부에 대한 표적 핵산 운반 속도를 변경하거나 증폭 속도를 변경하기 위해 본원에 나타난 다른 조건이 역학적 배제를 달성하기 위해 조정될 수 있다. 따라서 어레이의 다양한 증폭 부위에서 증폭이 동시에 일어나는 동안 어레이의 간질 영역에서의 전하는 표적 핵산을 밀어내도록 조정될 수 있고, 여기서 평균 증폭 속도는 표적 핵산이 증폭 부위로 운반되는 평균 속도를 초과한다. 따라서 간질 영역에서의 전기장 반발은 핵산(또는 다른 생체분자)의 어레이의 특징부로 운반 및 역학적 배제의 달성을 위해 본원에 나타난 다른 방법과 조합 이용될 수 있다.

[0100] 본원에 나타난 장치 및 장치를 이용한 간질 영역에서의 전기장 반발은 간질 영역 대신에 특징부에서 핵산(또는 다른 생체분자)의 특이적 편재를 개선하는 장점을 제공할 수 있다. 이러한 장점은 반발이 핵산 또는 다른 생체분자의 결합을 저해하기 위해 전하 반발 기전을 통하는지, 핵산 및 생체분자의 표면 편재된 전기화학적 손상을 통하는지 아니면 다른 기전을 통하는지를 추적할 수 있다. 간질 영역에서의 전기장 반발은 특히 관심 특징부가 표면 편재된 전기화학적 손상에 도달하는 것보다 더 높은 높이를 갖는 경우, 관심 특징부에 대한 핵산 또는 다른 생체분자의 특이적 편재를 개선하는데 이용될 수 있다.

[0101] 일부 구현예는 어레이의 간질 영역에서 핵산(또는 다른 생체분자)의 전기장 보조 반발과의 조합으로 어레이의 특징부에 대한 핵산(또는 다른 생체분자)의 전기장 보조 운반을 이용할 수 있다. 유인성 전기장 및 반발성 전기장이 어레이에 동시 적용될 수도 있고, 또는 두 전기장이 별도로 적용될 수도 있다. 예를 들어, 두 전기장은 이 전기장들이 교대 반복으로 적용되도록 별도로 적용될 수 있다(예로, 유인성 전기장이 특징부에 적용되는 동안 반발성 전기장이 꺼질 수 있고, 이어서 유인성 전기장이 꺼지고 반발성 전기장이 간질 영역에 적용될 수 있으며, 이 순서가 1회 이상 반복될 수 있다).

[0102] 전기장은 어레이 및 전해질 영역에 걸쳐 적용될 수 있거나 어레이 및 제2 표면 영역에 걸쳐 적용될 수 있다. 예를 들어, 도 4A는 전기장이 전해질 및 어레이의 간질 영역에 걸쳐 적용될 수 있는 구조를 나타내며, 도 4B는 전기장이 제2 표면 및 어레이의 간질 영역에 걸쳐 적용될 수 있는 구조를 나타낸다. 유사한 구조가 어레이의 특징부에 유인성 장을 적용하기 위해 이용될 수 있다. 또한, 전기장은 특징부에 적용되건 또는 간질 영역에 적용되건, 적절한 어레이 영역에 교류 또는 직류를 적용하여 생성될 수 있다.

[0103] 따라서 본 개시는 생체분자의 패턴화 표면의 생성 방법을 제공하며, 여기서 방법에는 (a)(i) 표면의 간질 영역에 의해 분리된, 표면 상의 인접하지 않은 특징부를 갖는 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 생체분자를 갖는 용액을 포함하는 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 시약을 반응시켜 생체분자를 특징부로 운반하고 개별 생체분자를 각각의 특징부로 부착하는 단계가 포함될 수 있고, 여기서 전기장은 간질 영역에서 생체분자를 밀어내기 위

해 간질 영역에 적용된다. 방법에 이용하기 위해 특히 유용한 생체분자는 핵산이다. 핵산은 상기 방법에서 역학적 배제 조건 하에, 예컨대 본원에서 다른 곳에 나타난 것들과 같이 특정부에서 증폭될 수 있다. 전기장을 이용하는 일부 구현예에서, 어레이를 위해 이용되는 기체에는 한 층의 투명 전기 전도체가 포함될 수 있다. 전기 전도체층은 전원, 예컨대 전지 또는 신호 생성기를 연결하기 위한 전극으로 이용될 수 있다. 필요한 경우, 어레이의 특정부(예로 웰의 어레이에서 웰의 내부 표면)는 노출되거나 절연된 전도층을 함유할 수 있고, 여기서 전도층에 걸친 전압은 부위로의 운반, 부위에서의 캡처, 부위로부터의 제거 및/또는 부위에서의 증폭 속도를 제어하기 위해 핵산 및/또는 증폭 시약 상의 힘을 조작하기 위해 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 혈관벽을 통과하는 전기장이 혈관 내의 시약 상에 전기력을 유도하여 운반, 캡처, 제거 및/또는 증폭 속도에 대해 일정 정도의 제어를 제공하도록 전기장이 웰의 외부 표면 상에 적용될 수 있다.

[0104] 예를 들어 본원에 나타난 방법으로 생성된 본 개시의 어레이는 임의의 다양한 적용을 위해 이용될 수 있다. 특히 유용한 적용은 핵산 서열분석이다. 하나의 예는 합성 중 서열분석(SBS)이다. SBS에서, 핵산 주형(예로 표적 핵산 또는 이들의 앰플리콘)을 따른 핵산 프라이머의 연장은 주형에서 뉴클레오타이드 서열을 결정하기 위해 모니터링된다. 내재된 화학적 공정은 중합할 수 있다(예로 폴리머라아제 효소에 의해 촉매되는). 특정한 폴리머라아제-기반 SBS 구현예에서, 프라이머에 부가된 뉴클레오타이드의 순서 및 유형의 검출을 이용하여 주형의 서열을 결정할 수 있도록 형광 표시된 뉴클레오타이드가 주형 의존적 방식으로 프라이머에 부가된다(그리하여 프라이머를 연장시킴). 본원에 나타난 어레이의 상이한 부위에서의 복수의 상이한 주형은 상이한 주형에 대해 일어나는 이벤트가 어레이에서 이들의 위치로 인해 구별될 수 있는 조건 하에 SBS 기법을 거칠 수 있다.

[0105] 플로우 셀은 본 개시의 방법에 의해 생성되고 사이클에서 시약의 반복 전달이 관여되는 다른 검출 기법 또는 SBS를 거치는 어레이의 수용을 위해 편리한 포맷을 제공한다. 예를 들어, 첫 번째 SBS 사이클을 개시하기 위해, 하나 이상의 표시된 뉴클레오타이드, DNA 폴리머라아제 등이 핵산 주형의 어레이를 수용하는 플로우 셀 내로/이를 통해 흘러질 수 있다. 프라이머 연장이 표시된 뉴클레오타이드의 도입을 유도하는 이들 어레이의 부위가 검출될 수 있다. 선택적으로, 뉴클레오타이드에는 일단 뉴클레오타이드가 프라이머에 부가되면 추가적인 프라이머 연장을 종료시키는 가역적 종료 특성이 추가로 포함될 수 있다. 예를 들어, 가역적 종료자 모이어티를 갖는 뉴클레오타이드 유사체는 탈차단제가 전달되어 이 모이어티를 제거할 때까지 후속 연장이 일어날 수 없도록 프라이머에 부가될 수 있다. 따라서 가역적 종료를 이용하는 구현예에 있어서, 탈차단 시약이 플로우 셀로(검출이 일어나기 이전에 또는 이후에) 전달될 수 있다. 세척은 다양한 전달 단계 사이에 수행될 수 있다. 이어서 사이클은 프라이머를 n 개의 뉴클레오타이드만큼 연장시키도록 n 회 반복되어 길이 n 의 서열을 검출할 수 있다. 본 개시의 방법으로 생성되는 어레이와 이용하기 위해 쉽게 채택될 수 있는 예시적 SBS 절차, 유체 시스템 및 검출 플랫폼은, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Bentley 등, *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, 및 US 2008/0108082]에 기재된다.

[0106] 순환형 반응을 이용하는 다른 서열분석 절차, 예컨대 피로-서열분석이 이용될 수 있다. 피로-서열분석은 특정 뉴클레오타이드가 발생 핵산 가닥 내로 도입됨에 따라 무기 피로포스페이트(PPi)의 방출을 검출한다(각각 본원에 참조로 도입된 Ronaghi 등, *Analytical Biochemistry* 242(1), 84-9 (1996); Ronaghi, *Genome Res.* 11(1), 3-11 (2001); Ronaghi 등, *Science* 281(5375), 363 (1998); US 6,210,891; US 6,258,568 및 US 6,274,320). 피로-서열분석에서, 방출된 PPi는 ATP 설퍼릴라아제에 의해 아데노신 3인산(ATP)으로 즉시 전환되어 검출될 수 있고, 생성되는 ATP 수준은 루시페라아제 생성 광자를 통해 검출될 수 있다. 따라서 서열분석 반응은 발광 검출 시스템을 통해 모니터링될 수 있다. 형광 기반 검출 시스템에 이용되는 여기 방사원은 피로-서열분석 절차를 위해 필요하지 않다. 본 개시의 어레이에 피로-서열분석의 적용을 위해 이용될 수 있는 유용한 유체 시스템, 검출기 및 절차는, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 WIPO 특허 출원 일련 번호 PCT/US11/57111, US 2005/0191698 A1, US 7,595,883, 및 US 7,244,559에 기재된다.

[0107] 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Shendure 등, *Science* 309:1728-1732 (2005); US 5,599,675; 및 US 5,750,341]에 기재된 것들을 포함하는 결찰 중 서열분석 반응도 유용하다. 일부 구현예에는, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 [Bains 등, *Journal of Theoretical Biology* 135(3), 303-7 (1988); Drmanac 등, *Nature Biotechnology* 16, 54-58 (1998); Fodor 등, *Science* 251(4995), 767-773 (1995); 및 WO 1989/10977]에 기재된 혼성화 중 서열분석 절차가 포함될 수 있다. 결찰 중 서열분석 및 혼성화 중 서열분석 절차 모두에 있어서, 어레이의 부위에 존재하는 표적 핵산(또는 이들의 앰플리콘)은 올리고뉴클레오타이드 전달 및 검출의 반복 사이클을 거친다. 본원 또는 본원에서 언급된 참고문헌에 나타난 바와 같은 SBS 방법을 위한 유체 시스템이 결찰 중 서열분석 또는 혼성화 중 서열분석 절차를 위한 시약 전달을 위해 쉽게 채택될 수 있다. 전형적으로 올리고뉴

클레오티드는 형광 표지되며, 본원 또는 본원에서 언급된 참고문헌에 나타난 바와 같은 SBS 절차에 관해 기재된 것과 유사한 형광 검출기를 이용하여 검출될 수 있다.

[0108] 일부 구현에는 DNA 폴리머라아제 활성의 실시간 모니터링이 관여되는 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오티드 도입은 형광단 보유 폴리머라아제 및 γ -포스페이트 표지된 뉴클레오티드 간 형광 공명 에너지 전달 (FRET) 상호작용을 통해 또는 제로모드 웨이브가이드(ZMW)로 검출될 수 있다. FRET-기반 서열분석을 위한 기법 및 시약은, 예를 들어 그 개시가 본원에 참조로 도입된 [Levene 등, *Science* 299, 682-686 (2003); Lundquist 등, *Opt. Lett.* 33, 1026-1028 (2008); Korlach 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 1176-1181 (2008)]에 기재된다.

[0109] 일부 SBS 구현에는 연장 산물 내로 뉴클레오티드의 도입 시 방출되는 광자의 검출이 포함된다. 예를 들어, 방출된 광자의 검출에 기반한 서열분석은 Ion Torrent(Guilford, CT, Life Technologies의 자회사)에서 시판되는 전기 검출기 및 연관 기법 또는 각각 본원에 참조로 도입된 [US 2009/0026082 A1; US 2009/0127589 A1; US 2010/0137143 A1; 또는 US 2010/0282617 A1]에 기재된 서열분석 방법 및 시스템을 이용할 수 있다. 역학적 배제를 이용하는 표적 핵산의 증폭을 위해 본원에 나타난 방법은 광자 검출을 위해 이용되는 기체에 쉽게 적용될 수 있다. 보다 구체적으로, 본원에 나타난 방법은 광자 검출을 위해 이용되는 어레이 부위에서 애플리콘의 클론 모집단을 생성하기 위해 이용될 수 있다.

[0110] 예를 들어 본원에 나타난 방법으로 생성된, 본 개시의 어레이를 위한 또 다른 유용한 적용은 유전자 발현 분석이다. 유전자 발현은 RNA 서열분석 기법, 예컨대 디지털 RNA 서열분석으로 불리는 것을 이용하여 검출되거나 정량될 수 있다. RNA 서열분석 기법은 당분야에 공지된 서열분석 방법론, 예컨대 전술된 것들을 이용하여 수행될 수 있다. 유전자 발현은 또한 어레이에 대한 직접적 혼성화에 의해 수행되는 혼성화 기법을 이용하여 또는 멀티플렉스 분석을 이용하여 검출되거나 정량될 수 있고, 그 산물은 어레이 상에 검출된다. 예를 들어 본원에 나타난 방법에 의해 생성된, 본 개시의 어레이는 또한 하나 이상의 개인의 게놈 DNA 표본에 대한 유전형을 결정하기 위해 이용될 수 있다. 본 개시의 어레이 상에서 수행될 수 있는 어레이 기반 발현 및 유전형 분석을 위한 예시적 방법은 각각 본원에 참조로 도입된 US 특허 번호 7,582,420; 6,890,741; 6,913,884 또는 6,355,431 또는 US 특허 공개 번호 2005/0053980 A1; 2009/0186349 A1 또는 US 2005/0181440 A1에 기재된다.

[0111] 본원에 나타난 방법의 장점은 이들이 임의의 다양한 핵산 라이브러리로부터 신속하고 효율적인 어레이 생성을 제공한다는 것이다. 이에 따라 본 개시는 본원에 나타난 하나 이상의 방법을 이용하여 어레이를 제조할 수 있고, 당분야에 공지된 기법, 예컨대 상기 예시된 것들을 이용하여 어레이 상에서 핵산을 추가로 검출할 수 있는 통합 시스템을 제공한다. 따라서 본 개시의 통합 시스템에는 증폭 부위 어레이에 증폭 시약을 전달할 수 있는 유체 성분, 예컨대 펌프, 밸브, 저장소, 유체 라인 등이 포함될 수 있다. 특히 유용한 유체 성분은 플로우 셀이다. 플로우 셀은 본 개시의 어레이를 생성하고 어레이를 검출하기 위해 통합 시스템에 배치되고/되거나 이용될 수 있다. 예시적 플로우 셀은, 예를 들어 각각 본원에 참조로 도입된 US 2010/0111768 A1 및 US 일련 번호 13/273,666에 기재된다. 플로우 셀에 대해 예시된 바와 같이, 통합 시스템의 하나 이상의 유체 성분이 증폭 방법을 위해 그리고 검출 방법을 위해 이용될 수 있다. 핵산 서열분석 구현예를 예로 들면, 통합 시스템의 하나 이상의 유체 성분이 본원에 나타난 증폭 방법을 위해 그리고 상기 예시된 바와 같은 서열분석 방법에서 서열분석 시약의 전달을 위해 이용될 수 있다. 대안적으로, 통합 시스템에는 증폭 방법을 수행하고 검출 방법을 수행하기 위한 별도의 유체 시스템이 포함될 수 있다. 핵산의 어레이를 생성할 수 있고 또한 핵산의 서열을 결정할 수 있는 통합 서열분석 시스템의 예에는 비제한적으로 MiSeq 플랫폼(Illumina, Inc., San Diego, CA) 및 본원에 참조로 도입된 US 일련 번호 13/273,666에 기재된 장치가 포함된다. 이러한 장치는 본원에 나타난 지침에 따라 역학적 배제를 이용하여 어레이를 제조하기 위해 개질될 수 있다.

[0112] 본원에 나타난 방법을 수행할 수 있는 시스템에 검출 장치가 통합되어야만 하는 것은 아니다. 오히려 독립형 시스템 또는 다른 장치가 통합된 시스템도 가능하다. 통합 시스템의 맥락에서 상기 예시된 것들과 유사한 유체 성분이 이러한 구현예에서 이용될 수 있다.

[0113] 본원에 나타난 방법을 수행할 수 있는 시스템에는 검출 능력이 통합되건 그렇지 않건 무관하게 본원에 나타난 방법, 기법 또는 공정의 하나 이상의 단계를 수행하기 위한 지침 세트를 수행할 수 있는 시스템 컨트롤러가 포함될 수 있다. 예를 들어, 지침은 역학적 배제 조건 하에 어레이를 생성하기 위한 단계의 수행을 지시할 수 있다. 선택적으로, 지침은 본원에서 앞에 나타난 방법을 이용하여 핵산을 검출하기 위한 단계의 수행을 추가로 지시할 수 있다. 유용한 시스템 컨트롤러에는 마이크로컨트롤러, 감소 지침 세트 컴퓨터(RISC), 용도 특이적 통합 회로(ASICs), 현장에서 프로그래밍가능한 게이트 어레이(FPGAs), 논리 회로, 및 본원에 기재된 기능을 수

행할 수 있는 임의의 다른 회로 또는 프로세서를 이용하는 시스템을 포함하는 임의의 프로세서-기반 또는 마이크로프로세서-기반 시스템이 포함될 수 있다. 시스템 컨트롤러를 위한 지침 세트는 소프트웨어 프로그램의 형태일 수 있다. 본원에서 이용되는 용어 "소프트웨어" 및 "firmware"는 상호 교환가능하며, RAM 메모리, ROM 메모리, EPROM 메모리, EEPROM 메모리, 및 비휘발성 RAM(NVRAM) 메모리를 포함하여 컴퓨터에 의한 수행을 위해 메모리에 저장되는 임의의 컴퓨터 프로그램이 포함된다. 소프트웨어는 다양한 형태, 예컨대 시스템 소프트웨어 또는 애플리케이션 소프트웨어일 수 있다. 또한, 소프트웨어는 별도 프로그램의 집합 또는 더 큰 프로그램 내의 프로그램 모듈이나 프로그램 모듈의 일부인 형태일 수 있다. 소프트웨어에는 또한 오브젝트-향 프로그래밍 형태의 모듈형 프로그래밍이 포함될 수 있다.

[0114] 본 개시의 어레이를 위한 몇몇 용도가 앙상블 검출의 맥락에서 위에 예시되었으며, 여기서 각 증폭 부위에 존재하는 다중 애플리콘은 함께 검출된다. 대안적 구현예에서, 단일 핵산은 표적 핵산이건 또는 이들의 애플리콘이건 무관하게 각 증폭 부위에서 검출될 수 있다. 예를 들어, 증폭 부위는 검출될 표적 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단일 핵산 분자 및 복수의 충전제 핵산을 함유하도록 구성될 수 있다. 상기 예에서, 충전제 핵산은 증폭 부위의 용량을 채우는 기능을 하며, 이들이 반드시 검출되어야 하는 것은 아니다. 검출될 단일 분자는 충전제 핵산 배경에서 단일 분자를 구별할 수 있는 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어 증가된 게인으로 부위를 검출하기 위해 상기 나타난 앙상블 검출 기법의 개질을 포함하거나 또는 보다 민감한 표지를 이용하는 임의의 다양한 단일 분자 검출 기법이 이용될 수 있다. 이용될 수 있는 단일 분자 검출 방법의 다른 예는 각각 본원에 참조로 도입된 US 2011/0312529 A1; US 일련 번호 61/578,684; 및 US 일련 번호 61/540,714에 나타난다.

[0115] 단일 분자 핵산 검출에 유용한 어레이는 하기 개질과 함께 본원에 나타난 하나 이상의 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 복수의 상이한 표적 핵산은 충전제 애플리콘을 생성하기 위해 증폭될 하나 이상의 충전제 뉴클레오타이드 서열 및 검출될 표적 뉴클레오타이드 서열을 모두 포함하도록 구성될 수 있다. 복수의 상이한 표적 핵산에는 증폭 시약, 예컨대 본원에서 다른 곳에 나타난 것들이 포함되고 충전제 뉴클레오타이드 서열(들)이 증폭 부위를 채우도록 역학적 배제 조건 하에 증폭 부위 어레이와 반응될 수 있다. 표적 서열의 증폭을 억제하면서 충전제 서열이 증폭될 수 있도록 허용하기 위해 이용될 수 있는 예시적 구조에는, 예를 들어 증폭 부위에 존재하는 증폭 프라이머에 대한 결합 부위가 인접하는 충전제 서열을 갖는 제1 영역 및 인접 영역 외부에 표적 서열을 갖는 제2 영역을 갖는 단일 표적 분자가 포함된다. 또 다른 구조에서, 표적 핵산에는 각각 표적 서열 및 충전제 서열(들)을 수반하는 별도의 분자 또는 가닥이 포함될 수 있다. 별도의 분자 또는 가닥은 입자에 부착되거나 핵산 텐드리머 또는 다른 분기형 구조의 팔로 형성될 수 있다.

[0116] 특정 구현예에서, 각각 충전제 서열 및 표적 서열을 모두 함유하는 증폭 부위를 갖는 어레이는 프라이머 연장 분석 또는 합성 중 서열분석 기법을 이용하여 검출될 수 있다. 이러한 경우, 적절히 배치된 프라이머 결합 부위의 이용에 의해 다량의 충전제 서열과는 반대로 표적 뉴클레오타이드 서열에서 특이적 연장이 달성될 수 있다. 예를 들어, 서열분석 프라이머를 위한 결합 부위는 표적 서열 상류에 배치될 수 있고, 임의의 충전제 서열이 없을 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 표적 서열에는 표준 뉴클레오타이드에 수소 결합할 수 없는 하나 이상의 비천연 뉴클레오타이드 유사체가 포함될 수 있다. 비천연 뉴클레오타이드(들)는 프라이머 결합 부위(예로 표적 서열에서 또는 표적 서열 및 프라이머 결합 부위에 개입하는 영역에서)의 하류에 배치될 수 있고, 이와 같이 적절한 뉴클레오타이드 파트너(즉 표적 서열에서 비천연 유사체(들)에 수소 결합할 수 있는 것)가 부가될 때까지 연장 또는 합성 중 서열분석이 방지될 것이다. 뉴클레오타이드 유사체 이소시토신(isoC) 및 이소구아닌(isoG)은 이들이 서로 특이적으로 페어링하지만 대부분의 연장 및 합성 중 서열분석 기법에 이용되는 다른 표준 뉴클레오타이드와는 페어링하지 않으므로 특히 유용하다. 표적 서열 또는 표적 서열의 상류에서 isoC 및/또는 isoG를 이용하는 추가 이점은 증폭을 위해 이용되는 뉴클레오타이드 혼합물로부터 각각의 파트너를 생략하여 증폭 단계 동안 표적 서열의 원치않는 증폭을 방지하는 것이다.

[0117] 예를 들어 본원에 나타난 방법에 의해 생성된 본 개시의 어레이가 검출 방법을 위해서만 이용되어야 하는 것은 아님이 이해될 것이다. 오히려 어레이는 핵산 라이브러리를 보관하기 위해 이용될 수 있다. 따라서 어레이는 내부에 핵산을 보유하는 상태로 보관될 수 있다. 예를 들어, 어레이는 건조 상태, 냉동 상태(예로 액체 질소 중에) 또는 핵산에 보호성이 있는 용액 중에 보관될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 어레이는 핵산 라이브러리를 복제하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 어레이는 어레이 상의 하나 이상의 부위로부터 복제 애플리콘을 생성하기 위해 이용될 수 있다.

[0118] 본 발명의 몇몇 구현예가 어레이의 증폭 부위로 표적 핵산을 운반하고 증폭 부위에서 캡처된 표적 핵산의 사본을 제조하는 것에 관해 본원에서 예시되었다. 유사한 방법이 비핵산 표적 분자를 위해 이용될 수 있다. 따라서 본원에 나타난 방법은 예시된 표적 핵산 대신 다른 표적 분자와 함께 이용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시

의 방법은 상이한 표적 분자의 모집단에서 개별 표적 분자를 운반하기 위해 수행될 수 있다. 각각의 표적 분자는 캡처 부위에서 반응을 개시하기 위해 어레이의 개별 부위로 운반될(그리고 일부 경우에는 캡처될) 수 있다. 각 부위에서의 반응은, 예를 들어 캡처된 분자의 사본을 생성할 수 있거나 반응은 캡처된 분자를 단리 또는 격리하도록 부위를 변경시킬 수 있다. 어느 경우든, 최종 결과는 상이한 유형의 표적 분자를 함유하는 모집단에 존재하는 표적 분자의 유형에 대해 각각 순수한 어레이 부위가 될 수 있다.

[0119] 핵산 이외의 표적 분자를 이용하는 특정 구현예에서, 상이한 표적 분자의 라이브러리는 역학적 배제를 활용하는 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 표적 분자 어레이는 어레이 부위가 용액으로부터 표적 분자로 무작위 접촉되고 표적 분자의 사본이 각각의 접촉 부위를 용량까지 채우도록 생성되는 조건 하에 제조될 수 있다. 본 개시의 역학적 배제 방법에 따르면, 접촉 및 복제 절차는 사본이 제조되는 속도가 접촉 속도를 초과하는 조건 하에 동시에 진행될 수 있다. 이와 같이 첫 번째 표적 분자가 접촉된 부위에서 사본이 제조되는 상대적으로 빠른 속도는 두 번째 표적 분자가 그 부위를 접촉하는 것을 효과적으로 배제할 것이다. 일부 경우에서, 표적 분자의 접촉은 표적 분자의 복제와 다른 절차에 의해 부위를 용량까지 채우는 반응을 개시할 것이다. 예를 들어, 부위에서 표적 분자의 캡처는 결과적으로 부위가 두 번째 표적 분자를 캡처할 수 없도록 만드는 연쇄 반응을 개시할 수 있다. 연쇄 반응은 표적 분자가 캡처되는 속도를 초과하는 속도로 일어나서 역학적 배제의 조건 하에 일어날 수 있다.

[0120] 표적 핵산에 대해 예시된 바와 같이, 다른 표적 분자에 적용되는 경우 역학적 배제는 일단 개시된 반복 반응을 연속시키기 위한 상대적으로 빠른 속도에 대비하여 어레이 부위에서 반복 반응(예로 연쇄 반응)을 개시하기 위한 상대적으로 느린 속도를 활용할 수 있다. 앞 단락의 예에서, 역학적 배제는 예를 들어 표적 분자 시드의 사본으로 부위를 채우기 위한 반응이 일어나는 상대적으로 빠른 속도 대비 표적 분자 접촉의 상대적으로 느린 속도(예로 상대적으로 느린 확산)로 인해 일어난다. 또 다른 예시적 구현예에서, 역학적 배제는 후속 사본이 부위를 채우기 위해 제조되는 상대적으로 빠른 속도 대비 부위에 접촉된 표적 분자의 첫 번째 사본의 형성 지연(예로 지연되거나 느린 활성화)으로 인해 일어날 수 있다. 상기 예에서, 개별 부위에는 몇몇 상이한 표적 분자가 접촉될 수 있다. 그러나 임의의 주어진 표적 분자에 대한 첫 번째 사본 형성은 첫 번째 사본의 평균 형성 속도가 후속 사본이 생성되는 속도에 비해 상대적으로 느리도록 무작위 활성화될 수 있다. 이 경우, 개별 부위가 몇몇 상이한 표적 분자에 의해 접촉될 수 있지만, 역학적 배제는 이들 표적 분자 중 하나만이 복제될 수 있도록 할 것이다.

[0121] 따라서 본 개시는 (a)(i) 부위의 어레이, 및 (ii) 복수의 상이한 표적 분자를 갖는 용액을 포함하는 시약을 제공하는 단계; 및 (b) 시약을 반응시켜 각각 복수로부터 단일 표적 분자를 갖는 복수의 부위를 생성하거나 각각 용액의 개별 표적 분자로부터의 사본의 순수한 모집단을 갖는 복수의 부위를 생성하는 단계를 포함할 수 있는 분자 어레이의 제조 방법을 제공하며, 여기서 용액 중 표적 분자의 수는 어레이 중 부위의 수를 초과하며, 상이한 표적 분자는 복수의 부위에 유체 접근을 할 수 있고, 각각의 부위는 복수의 상이한 표적 분자에서 몇몇 표적 분자에 대한 용량을 포함하고, 반응에는 동시에 (i) 상이한 분자를 평균 운반 속도로 부위로 운반하고, (ii) 평균 반응 속도로 용량까지 부위를 채우는 반응을 개시하는 것이 포함되고, 평균 반응 속도는 평균 운반 속도를 초과한다. 일부 구현예에서, 단계 (b)는 대신에 각각 복수로부터 단일 표적 분자를 갖는 복수의 부위를 생성하거나 각각 용액의 개별 표적 분자로부터의 사본의 순수한 모집단을 갖는 복수의 부위를 생성하도록 시약을 반응시켜 수행될 수 있고, 여기서 반응에는 (i) 반복 반응(예로 연쇄 반응)을 개시하여 각각의 부위에서 표적 분자로부터 산물을 형성하고, (ii) 각각의 부위에서 반응을 계속하여 후속 산물을 형성하는 것이 포함되며, 반응이 부위에서 일어나는 평균 속도는 반응이 부위에서 개시되는 평균 속도를 초과한다.

[0122] 상기 비핵산 구현예에서, 표적 분자는 어레이의 각 부위에서 일어나는 반복 반응의 개시제일 수 있다. 예를 들어, 반복 반응은 다른 표적 분자가 부위를 점유하는 것을 배제하는 중합체를 형성할 수 있다. 대안적으로, 반복 반응은 부위로 운반된 표적 분자의 분자 사본을 구성하는 하나 이상의 중합체를 형성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0123] 도 1A는 역학적 배제에 의해 생성된 패턴화 플로우 셀에 대한 첫 번째 서열분석 사이클 후 수득된 복합 이미지(4컬러 채널)를 나타낸다.

도 1B는 무작위 배치된 클러스터를 갖는 표준 illumina 플로우 셀에 대한 1회 서열분석 사이클 후 수득된 복합 이미지(4컬러 채널)를 나타낸다.

도 2는 역학적 배제에 의해 생성된 패턴화 플로우 셀을 이용한 첫 번째 서열분석 사이클 후 수득된 복합 이미지

에 대한 PDF 및 NN 함수를 나타낸다.

도 3은 PhiX 게놈의 최초 5개 게놈 위치를 정렬하는 클러스터의 공간적 위치의 산란도를 나타낸다. 상이한 게놈 위치를 엑스포, 별표, 사각형, 삼각형 및 다이아몬드형으로 나타낸다.

도 4는 플로우 셀 표면으로부터의 종의 전기화학적 탈착을 위한 플로우 셀 설계를 나타낸다. 전위는 (a)에 나타난 바와 같이 하나의 전도성 표면 및 전해질에 걸쳐 또는 (b)에 나타난 바와 같이 2개의 전도성 표면에 걸쳐 적용될 수 있다. (b)에 나타난 플로우 셀 구조는 또한 (c)에 나타난 바와 같이 수 초 내에 전극 표면 상에서 100X 농도의 DNA에 걸쳐 달성되는 실시간 DNA의 전기장 보조 풀 다운을 위해 이용될 수 있다.

도 5는 생체분자 패턴의 전기장 보조 형성을 위한 예시적 워크플로우를 나타낸다.

도 6은 전기장의 존재 하에(a) 및 전기장 없이(b) ITO 배경 상에서 2 μ m Au 특징부 상에서 주형의 접촉 및 주형의 클러스터 증폭을 나타낸다. 선 프로파일은 표지된 영역에 걸친 형광 강도를 나타낸다.

도 7은 전기장의 존재 하에 접촉 및 클러스터링 후 대면적 형광 이미지를 나타낸다. (a) 플로우 셀 레인은 2 μ m Au 점을 함유하며; (b) 레인은 200nm Au 점을 함유한다. 클러스터는 마이크로- 및 나노-패턴화 특징부에 대해 대면적에 걸쳐 정렬되며, 이들 클러스터의 공간적으로 조직화된 성질은 대응하는 푸리에 변환(FFTs)에 의해 확인된다.

도 8은 전기장의 존재 하에 700nm 지름의 SiO₂ 부위 상에서의 DNA 클러스터 형성을 나타낸다. 클러스터는 간질 영역으로부터 형광이 거의 없이 고도로 조직화되어 있다.

도 9는 (a)(1) 전기장 보조 P5 및 P7 프라이머 그래프팅 이전, (2) 전기장 보조 P5 및 P7 프라이머 그래프팅 이후, (3) 전기장 보조 P5 및 P7 프라이머 그래프팅 및 P5 및 P7 프라이머의 재그래프팅 이후, 그리고 (4) 전기장 보조 P5 및 P7 프라이머 그래프팅, SFA 재코팅 및 P5 및 P7 프라이머 재그래프팅 이후, HiSeq 플로우셀에서의 혼성화 분석 결과; 및 (b) 각 단계 후 플로우셀 레인 별 중앙값 형광 강도를 나타낸다.

도 10은 (a) 전기장을 이용한 유전 부위 상에서의 직접적 혼성화의 모식적 표시; (b) 간질 영역에서 핵산-반발성 전기장의 존재 하에 형성된 공간적으로 패턴화된 클러스터 및 (c) 간질 영역에서 핵산-반발성 전기장의 부재 하에 형성된 무작위로 조직된 클러스터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0124] 다음 실시예는 본 발명을 예시하는 것이지만 제한하는 것이 아니다.

[0125] 실시예 I

[0126] 플로우 셀 상에서 클러스터 어레이의 수퍼-푸아송 형성

[0127] 본 실시예는 Illumina(San Diego, CA) 서열분석 플랫폼을 위한 플로우 셀 상의 클러스터 어레이의 수퍼-푸아송 형성을 달성하기 위한 방법을 기재한다. 본원에 기재된 방법은 특징부 상에 라이브러리 성분(예로 게놈 단편)을 캡처하고 라이브러리 성분을 동시에 클론적으로 증폭하기 위한 공정이다. 본 실시예의 공정의 주요 특징은 증폭 속도 대비 캡처 속도를 제어하고 균질한 공정에서 그렇게 하는 것이다. Illumina 플로우 셀의 고밀도 집종을 위해 개발된 여러 이전 공정에서는 클론 증폭 공정과 라이브러리 성분의 캡처를 분리한다. 본 실시예에서, 캡처 이벤트는 특징부 상에서의 클론 증폭 이벤트를 개시한다.

[0128] 패턴화 플로우 셀을 다음과 같이 제조한다. 유리 플로우 셀(Illumina, Inc., San Diego, CA)에 리프트-오프 접근을 이용해서 금 패치를 코팅한다. 간략하게, 포토레지스트층을 유리 플로우 셀의 표면에 걸쳐 균일하게 코팅하고, 포토레지스트 패치를 사진평판에 의해 제거하여 유리 표면의 패치를 노출시킨다. 이어서 금층을 표면 상에 증착하여 포토레지스트 영역 및 유리 패치에 걸쳐 연속 박막을 형성한다. 금은 본원에 참조로 도입된 [Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977)]에 나타난 e-빔 증발 또는 스퍼터링을 이용하여 증착될 수 있다. 이어서 포토레지스트층을 아세톤 리프트 오프로 제거하여 원형 모양이고 지름이 1마이크론 미만이며 유리 표면의 간질 영역에 의해 둘러싸인 금 패치가 남긴다. 이어서 금 패턴화 플로우 셀을 W0 2008/093098(본원에 도입됨)에 기재된 바와 같이 실란 비함유 아크릴아미드(SFA)로 코팅한다. P5 및 P7 프라이머를 니트로벤질 UV 절단성 모이어티(Glenn Research, Sterling, VA)를 통해 중합된 SFA로 그래프팅한다. 간질 영역에 걸쳐 부착된 임의의 프라이머가 UV광 노출로 인해 절단되는 동안 금 패치가 패치에 걸쳐 부착된 프라이머에 대한 마스크를 생성하도록 플로우 셀을 UV(302nm) 광원 상에 배치한다. 금 패치에 남아 있는 P5 및 P7 프라이머는 라이

브러리의 클론 증폭(P5/P7)을 지지할 수 있다.

- [0129] 라이브러리 성분을 다음과 같이 생성한다. 게놈 DNA(gDNA) 라이브러리를 단편화하고, Illumina의 시판 표본 제조 프로토콜에 따라 P5 및 P7 프라이머에 상보적인 프라이머 결합 부위를 갖는 포크형 어댑터를 gDNA 단편에 결합한다.
- [0130] 수퍼-푸아송 클러스터 어레이 형성을 다음과 같이 수행한다. 라이브러리 성분(이중쇄 형태) 및 TwistAmp Basic 시약(TwistDx, Cambridge UK)을 함유하는 용액을 제조한다. TwistAmp Basic 시약은 표면 상에서 주형 의존적 증폭을 뒷받침할 수 있는 효소 혼합물(DNA 폴리머라아제, 단일쇄 결합 단백질 및 재조합효소)을 함유한다. 용액 중 라이브러리 성분의 농도는 임의 특징부에 의한 라이브러리 성분의 혼성화 캡처 속도가 또 다른 라이브러리 성분을 캡처하기 위해 특징부 상에서 이용가능한 올리고의 충분한 소모 및 클론 증폭 속도보다 훨씬 낮도록 조절된다.
- [0131] 용액을 위한 라이브러리 성분의 최적 또는 달리 바람직한 농도는 Illumina 서열분석 장치(예로 GenomeAnalyzer™, HiSeq™ 또는 MiSeq™) 상에서 서열분석 수행이 뒤따르는 상기 수퍼-푸아송 클러스터 어레이 형성 프로토콜을 이용하여 적정에 의해 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0132] **실시예 II**
- [0133] **역학적 배제 조건 하에 생성되는 패턴화 클러스터 어레이의 분석**
- [0134] 본 실시예는 역학적 배제 조건을 이용하여 패턴화 특징부 상으로의 단일클론 클러스터의 수퍼 푸아송 로딩을 설명한다.
- [0135] 패턴화 플로우 셀을 다음과 같이 제조하였다. 유리 플로우 셀(Illumina, Inc., San Diego, CA)을 본원에 참조로 도입된 US 일련 번호 US 13/492,661에 기재된 바와 같은 리프트-오프 접근을 이용해서 금 패드로 코팅하였다. 간략하게, 포토레지스트층을 유리 플로우 셀의 표면에 걸쳐 균일하게 코팅하고, 포토레지스트 패치를 사진평판에 의해 제거하여 유리 표면의 패치를 노출시켰다. 이어서 금층을 표면 상에 증착하여 포토레지스트 영역 및 유리 패치에 걸쳐 연속 박막을 형성하였다. 금은 본원에 참조로 도입된 [Thornton, *Ann. Rev. Mater. Sci.* 7:239-60 (1977)]에 나타난 e-빔 증발 또는 스퍼터링을 이용하여 증착하였다. 이어서 포토레지스트층을 아세톤 리프트 오프로 제거하여 각각의 금 패드가 원형 모양이고 지름이 500nm이며 유리 표면의 간질 영역에 의해 둘러싸인 육각형 패턴의 금 패드를 남긴다. 이어서 금 패턴화 플로우 셀을 W0 2008/093098(본원에 도입됨)에 기재된 바와 같이 실란 비함유 아크릴아미드(SFA)로 코팅하였다. 프라이머를 니트로벤질 UV 절단성 모이어티(Glenn Research, Sterling, VA)를 통해 중합된 SFA로 그래프팅하였다. 간질 영역에 걸쳐 부착된 임의의 프라이머가 UV광 노출로 인해 절단되는 동안 금 패드가 패드에 걸쳐 부착된 프라이머에 대한 마스크를 생성하도록 플로우 셀을 UV(302nm) 광원 상에 배치하였다. 절단된 프라이머를 세척하여 금 패드에 부착된 프라이머를 남겼다.
- [0136] 클러스터를 다음과 같이 TwistAmp Basic 키트(TwistDx, Cambridge UK)를 이용하여 금 패드 상에서 성장시켰다. 이중쇄 PhiX DNA 라이브러리를 TwistAmp Basic 재수화 완충액 및 마그네슘 아세테이트 시약 중에 상이한 농도로 혼합하였다. 평가된 PhiX DNA의 농도는 72pM, 144pM, 432pM 및 864pM이었다. 이들 농도는 Illumina 플로우 셀의 표준 점종을 위해 이용되는 9-10pM DNA의 전형적 범위보다 과량이었다. 또한 PhiX DNA는 주형 DNA가 단일쇄 형태인 Illumina 플로우 셀의 표준 점종과는 대조적으로 이중쇄였다. PhiX DNA 함유 혼합물을 이용하여 TwistAmp Basic 냉동 건조 펠렛을 재수화한 뒤 38℃에서 패턴화 플로우 셀의 각 레인 내로 플러싱하였다. 38℃에서 1시간 동안 인큐베이션을 지속한 뒤 HT2 세척 완충액(Illumina, Inc., San Diego CA)으로 세척하고 SyBr Green으로 클러스터를 염색하였다. 이어서 클러스터를 30분 동안 LMX1 처리에 의해 서열분석을 위해 처리하여 클러스터 중 DNA를 선형화하고, 0.1N NaOH 변성 및 서열분석 프라이머로 혼성화하였다. 그 뒤 플로우 셀을 Illumina HiSeq® 2000 상에서 26사이클 동안 서열분석하였다.
- [0137] 플로우 셀 이미지의 시각적 검사는 클러스터가 표면 상 금 패드의 패턴에 대응하는 패턴으로 공간적으로 조직화되었음을 나타내었다. 도 1A는 상기 나타난 역학적 배제 방법으로 생성되는 플로우 셀을 이용하여 첫 번째 서열분석 사이클 후 수득되는 전체 4컬러 채널에 대한 복합 이미지를 나타낸다. 비교를 위해, 도 1B는 무작위 배치된 클러스터를 갖는 표준 illumina 플로우 셀에 대한 단회 서열분석 사이클 후 수득되는 복합 이미지를 나타낸다.
- [0138] 플로우 셀의 복합 이미지에 대한 페어 분포 함수(PDF) 및 가장 가까운 인근(NN) 함수의 분석도 고도의 조직화를 나타내었다. 미가공 클러스터 밀도는 이미지에 대해 평방 밀리미터 당 약 640,000 클러스터로 계산되었다. NN

함수를 이용하여 이미지에서 가장 가까운 인근 클러스터 간 평균 거리를 측정하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이, NN 함수는 주로 2.3픽셀 근처에서 단일 피크를 산출하였다. 이는 패드에 대해 예측된 1마이크론 피치 패턴과 일치하여 고도로 조직된 클러스터 어레이를 제시하였다. 대조적으로 무작위 클러스터링은 훨씬 더 넓은 피크를 생성하여 클러스터 피킹 알고리즘의 검출 한계(1.2 픽셀)에 접근하는 더 낮은 값을 갖는다. 도 2에서의 PDF는 조직화된 육각형 어레이에 대한 예측 구조와 일치한다. 예를 들어, PDF 함수는 2.66 픽셀에서 예측된 일차 피크를 나타내었으며 가장 가까운 것을 넘어서는 주변에 대응하는 더 높은 수준으로 조직화된 피크를 명확히 볼 수 있었고 예측되는 피크 비에 존재하였다. NN 및 PDF 함수 간에 피크 위치에서 약간의 이동만이 관찰되었다. 이러한 낮은 수준의 호트러짐은 이론적으로 완벽한 위치로부터의 이탈이 매우 적으며 충분히 허용가능한 수준 내임을 시사하였다.

[0139] 복합 4컬러 이미지의 시각적 검사는 또한 원치않는 패드 호핑(hopping)의 부재를 드러내었다. '패드 호핑'이란 몇몇 인근 패드가 동일한 주형 서열에서 증폭되는 공정을 나타낸다. 패드 호핑은 4컬러 이미지에서 동일한 컬러를 갖는 인접 클러스터 패치로서 시각적으로 분석된다. 본 실시예에 나타낸 역학적 배제 조건 하에서 생성된 플로우 셀에 대해 동일한 컬러 패치의 부재는 원치않는 수준의 패드 호핑이 일어나지 않았음을 시사하였다. 도 3은 패드 호핑이 문제가 되지 않음을 나타내는 클러스터 컬러 및 공간적 위치의 보다 정량적인 표시를 제공한다. 구체적으로, 도 3은 PhiX 게놈의 첫 번째 5 게놈 위치에 정렬하는 클러스터의 공간적 위치의 산란도를 나타낸다. 상이한 게놈 위치는 엑스포, 화살표, 사각형, 삼각형 및 다이아몬드형으로 나타난다. 5개의 기호 유형은 도면에서 무작위로 분포되어 있으며 뭉쳐 있지 않아서, 패드 호핑이 문제가 되지 않음을 시사한다.

[0140] 역학적 배제 조건을 이용하여 생성된 플로우 셀에 대해 26 사이클의 데이터에 대한 서열 분석을 수행하였다. 결과는 64%의 패드가 점유되었으며 56%의 패드가 클론인 클러스터를 가졌음을 시사하였다. 따라서 본 발명의 방법은 이들 중 64%가 점유되는 경우 패드의 36%가 클론일 것임을 예측하는 푸아송 로딩에서 예측되는 것에 비해 클론 클러스터에서 거의 2배 증가를 제공하였다. 이들 결과는 뚜렷이 수퍼 푸아송 부하를 나타내었다.

[0141] 실시예 III

[0142] 생체분자의 능동 전기 탈착 및 패턴화

[0143] 본 실시예는 전기장을 이용하여 생체분자를 공간적으로 패턴화하는 방법을 설명한다. 본 실시예에 기재된 방법은 표적 부위에 DNA를 신속히 집중하고 간질 영역에서 생체분자를 전기화학적으로 밀어내어 고도로 패턴화되고 주소를 지정할 수 있는 DNA 클러스터 어레이를 생성하였다. 여기에 나타낸 결과는 단일클론 핵산 클러스터 패턴을 갖는 플로우 셀의 형성을 나타낸다.

[0144] 본 실시예에 기재된 방법은 하나의 전도성 표면 및 전해질에 걸쳐 또는 2개의 전도성 표면에 걸쳐 적용되는 전기적 전위를 채용하여 전기적으로 편향된 표면 중 하나 또는 둘 다로부터 물리흡착되거나 화학적으로 콘주게이트된 분자를 능동 탈착한다. 이러한 능동 탈착 방법은 임의의 표면 화학/표면 개질을 필요로 하지 않으며, 분자를 매우 신속하게(5분 미만으로) 탈착할 수 있고, 수동 탈착 방법에 비해 공정 조건에 덜 민감하다. 전도성 표면은 금속성(예로 티탄, 산화인듐주석) 또는 반도체성 성질일 수 있고, 적용되는 전위는 AC 또는 DC일 수 있어서 전극/전해질 계면에서 전기화학적 반응을 일으킨다. 전기장의 적용은 크기 단위만큼 노이즈(간질 영역에서) 대비 신호(관심 부위에서)를 개선시킨다. 본 실시예에 기재된 방법은 또한 선택적 탈착, 전극의 선택적 재관능화 및 종들의 전기화학적 패턴화를 위해 평면 전극에 적용될 수 있다.

[0145] 플로우 셀 설계

[0146] 생체분자의 전기화학적 탈착에 대해 상기 기재된 2 설계를 도 4a 및 4b에서 예시한다. 구체적으로 산화인듐주석(ITO)을 전도성 투명 전극 재료로 이용하였다. ITO를 무선 주파수 스퍼터링을 통해 D263 표면 상에 증착하였다. 도 4a는 전도성 ITO층 및 전해질에 걸쳐 적용되는 전기적 전위를 나타낸다. 도 4b는 액체 매질에 의해 분리된 2개의 평행한 전도성 ITO 플레이트에 걸쳐 적용되는 전위를 나타낸다. 두 설계를 모두 이용하여 ITO 표면에서 종들을 전기적으로 탈착할 수 있다. 금(Au) 나노-패턴화 부위는 티올화 생체분자(예로 티올화 애비딘)의 표적화된 캡처에 유용하다. Au 부위는 Au 상에서의 전기화학을 방지하기 위해 유전체 스페이서(예로 SiO₂, SiN, 다이아몬드 유사 탄소)를 이용하여 내재된 ITO에서 분리된다.

[0147] 또한 도 4b의 설계를 이용하여 도 4c의 시간 경과 이미지에 나타낸 전기장을 이용하여 플로우 셀 표면에서 DNA를 동시에 신속히 농축할 수 있다(예로 100배). 이들 실험에서, 2V의 전위(V)를 두 ITO 표면을 분리하는 100 μ m 갭에 걸쳐 적용하였다. 도 4c에서 전체 내부 반사 형광(TIRF) 조영을 이용하여 관찰된 바와 같은 경시적인 형광 증가는 플로우 셀의 상부 표면에서 적용되는 전기장 하 PhiX 대조군 DNA(YOYO 염료로 표지됨)의 표면 농도에

서의 큰 증가 때문이다. 따라서 여기에 요약된 기법을 이용하여 신속한 접종을 촉진하는 것과 동시에 간질 영역으로부터 생체분자를 전기화학적으로 탈착할 수 있다.

[0148] **실험 워크플로우**

[0149] 능동 탈착 실험을 위한 실험 워크플로우를 도 5에 요약한다. 상기 방법에는 플로우 셀의 표면 상에 애비딘을 코팅한 뒤 실란 비합유 아크릴아미드(SFA)를 코팅하고 SFA로 프라이머를 그래프팅하는 것이 관여된다. SFA 코팅 및 P5 및 P7 프라이머의 그래프팅은 WO 2008/093098(본원에 도입됨)에 기재된 바와 같이 수행한다. 그러나 본 방법에서, 애비딘은 SFA 코팅 이전에 전기적 탈착 단계를 이용하여 플로우 셀 표면에 존재하는 Au 또는 유전 부위(ITO 간질 영역에 의해 분리됨) 상에 전기화학적으로 패터닝된다. 또한 P5 및 P7 프라이머 그래프팅에 이어 전기장을 적용하여 Au 또는 유전 부위 상에 DNA를 신속히 접종하고 또한 ITO 간질에서 생체분자(DNA, 애비딘, 프라이머)를 전기화학적으로 탈착한다. 전형적으로 2V를 적용하여 분자를 효과적으로 탈착한다. 5분 만큼 짧은 전기장 적용 시간으로 간질 영역에서 대부분의 분자를 효과적으로 탈착할 수 있다. 또한, 이 결과는 간질 영역에서의 프라이머 농도도 전기장 단계 이후 감소됨을 제시한다. 다음으로 클러스터 증폭을 [Bentley 등, *Nature* 456:53-59 (2008)]에 기재된 대로 수행한 후, ds DNA 삽입 염료를 이용하여 클러스터 염색, 이어서 현미경 조영을 수행한다. 그 다음 플로우 셀을 서열분석하여 HiSeq 2000 DNA 서열분석기(Illumina, Inc. San Diego)를 이용하여 클러스터 클론성을 결정하였다. 전기장 보조 접종 및 전기화학적 탈착의 효과를 나타내는 모식도를 도 5에 나타낸다.

[0150] **실험 결과**

[0151] 도 6은 전기장과 함께(도 6A) 및 전기장 없이(도 6B) 도 3b의 플로우 셀 설계를 이용하여 달성된 결과를 예시한다. 전기장의 존재 하에, 클러스터는 2 μ m Au 부위 내로 크게 한정되며, 간질 영역에서는 형광이 거의 보이지 않는다. 2 μ m 부위에서, 클러스터는 Au 패드의 큰 크기로 인해 매우 다중클론성이다. 다중클론성 정도는 패드 크기를 감소시켜 입체 배제를 통해 다중 주형의 접종을 저해함으로써 감소될 수 있거나 또는 다중클론성이 역학적 배제 조건을 이용하여 감소될 수 있다. 또한, 간질 영역에서의 픽셀 강도가 0에 가까움을 주지하라(도 6A의 라인 프로파일). 대조적으로, 전기장의 부재 시 클러스터는 Au 및 간질 ITO 표면 상에 모두 존재한다. 도 6A의 라인 프로파일에서 관찰된 주기적 패턴은 도 6B의 라인 프로파일에서 관찰되지 않아 클러스터 국한이 전기장의 결과임을 확인시킨다.

[0152] 전기장 기법을 이용하여 넓은 영역에 걸쳐 마이크론 크기의 부위뿐만 아니라 나노패턴화 부위 상에서 클러스터를 공간적으로 패터닝할 수 있다. 2 μ m 지름의 Au 부위 및 200nm 지름의 Au 부위 상에 접종된 패턴화 클러스터의 넓은 영역의 이미지를 각각 도 7A 및 7B에 이들의 대응 푸리에 변환(FFT)과 함께 예시한다. 클러스터는 ITO 간질 영역에서 비특이적 결합이 거의 없이 잘 정의되고 고도로 패터닝된다. 이는 FFT에서 나타나는 잘 정의된 점들에 의해 추가로 확인되어 조직화 또는 패터닝 네트워크를 제시한다. 도 4B에서 나노패턴화 특징부에서의 클러스터 점유는 약 40-50%이지만 더 높은 애비딘 농도를 이용하거나 또는 전압 파형을 조작하여 추가로 증가될 수 있다. 유전 부위 상에 높은 공간적 정밀도를 갖는 클러스터에도 동일한 화학/공정을 이용할 수 있다. 700nm 지름 SiO₂ 부위 상의 조직화된 클러스터를 도 8에 나타낸다.

[0153] **기전**

[0154] 데이터는 클러스터의 공간적 패터닝이 전기장의 존재 하에 촉진됨을 제시한다. 이는 간질 영역에서 생체분자(예로 DNA, 단백질 및 프라이머)의 전기화학적 제거에 기인할 수 있다. 그래프팅된 프라이머 강도는 Texas Red(TR)로 표지된 탐침을 이용한 혼성화 분석의 이용 시 나타나는 바와 같이 전기장이 적용되는 경우 감소하는 것으로 나타난다. 도 9는 전기장의 적용 이전 및 이후 플로우 셀에서 수행되는 혼성화 분석에 대한 TR 형광 강도를 나타내는 Typhoon 스캔을 예시한다. 형광 강도는 전기장 적용 이후 인수 2를 초과하여 감소되어, SFA로부터의 프라이머 제거를 확인시킨다. 클러스터 강도를 증가시키기 위해, 플로우 셀을 SFA로 재코팅하고 P5, P7 프라이머로 재그래프팅하였다. 이는 TR 강도의 상당한 증가를 일으켰다. 따라서 높은 강도의 공간적으로 패터닝된 클러스터를 수득하기 위해, DNA를 접종하고 간질 영역에서 비특이적으로 결합된 분자를 전기화학적으로 제거하고 SFA를 재코팅하고 프라이머를 재그래프팅할 수 있을 것이다.

[0155] **직접적 DNA 혼성화**

[0156] *클러스터의 공간적 패터닝은 P5, P7 프라이머 층에 phiX ssDNA의 직접적 혼성화가 관여되는 실험에서도 관찰되었다. 공정 모식도를 도 10A에 나타낸다. 이들 실험은 ITO 상의 2 μ m SiO₂ 부위 상에서 수행하였다. 동일한

절차를 부위를 형성하는 다양한 유전 재료로 나노패턴화 부위에 적용할 수 있다. 이들 실험에서는 바이틴화 DNA도 애비딘도 필요하지 않아 부위 상에서의 클러스터 특이성은 유지하면서 더 적은 화학 단계가 생성된다. 특이성은 간질 영역에서의 프라이머의 전기화학적 탈착의 결과일 수 있다. 도 10B는 직접적 혼성화 절차를 이용하여 전기장의 존재(2V, 0.1Hz) 하에 2 μ m SiO₂ 부위 상에 형성된 클러스터를 나타낸다. 잘 패터닝된 클러스터를 볼 수 있고 간질 영역에서는 거의 볼 수 없다. 도 10C는 전기장의 부재 하에서의 동일한 실험이며, 클러스터가 SFA 및 ITO 간질 영역 상에 모두 무작위 배향되어 있고 전기장의 부재 시 구별되는 조직이 존재하지 않음을 나타낸다. 이들 결과는 전기장을 이용하여 핵산 클러스터 형성의 공간적 패터닝을 보조할 수 있음을 확인시켜준다.

[0157] 본 출원에 걸쳐 다양한 공보, 특허 및 특허 출원이 참조되었다. 이들 공보의 개시는 본 발명이 속하는 분야의 상태를 보다 상세히 설명하기 위해 그 전문이 본 출원에서 참조로 도입된다.

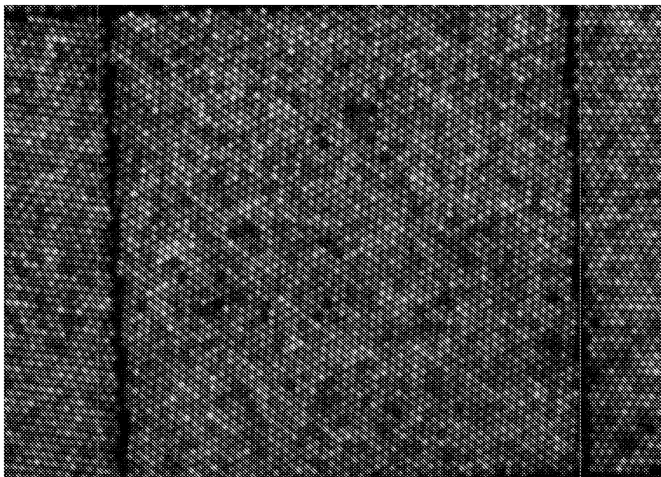
[0158] 용어 "포함하는"은 본원에서 언급된 성분뿐만 아니라 임의의 추가적 성분을 추가로 포괄하여 포함하는 개방형 종결부를 나타낸다.

[0159] 본 발명이 상기 제공된 실시예를 참조하여 기재되었으나, 본 발명에서 벗어나지 않고 다양한 개질이 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 따라서 본 발명은 특허청구범위에 의해서만 제한된다.

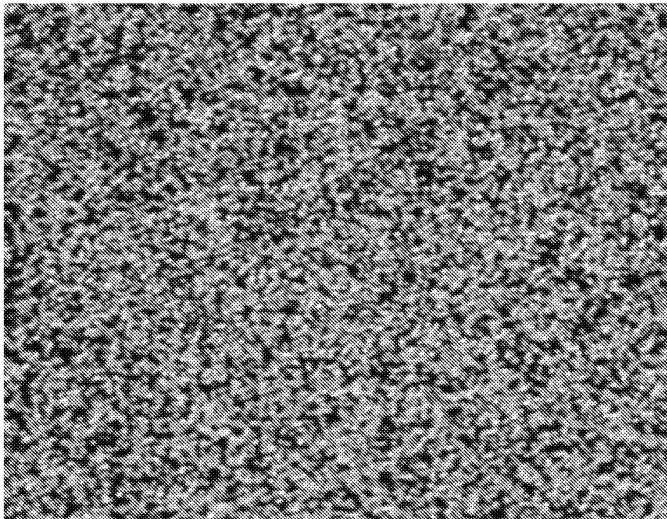
도면

도면1

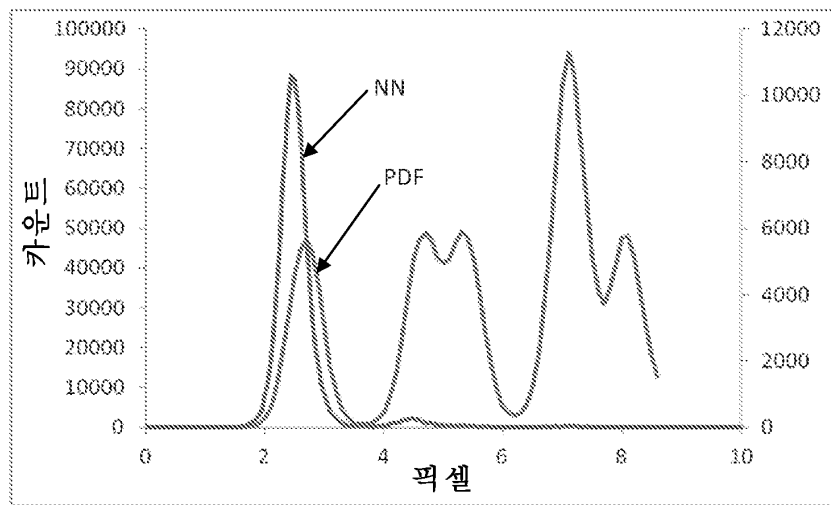
1A



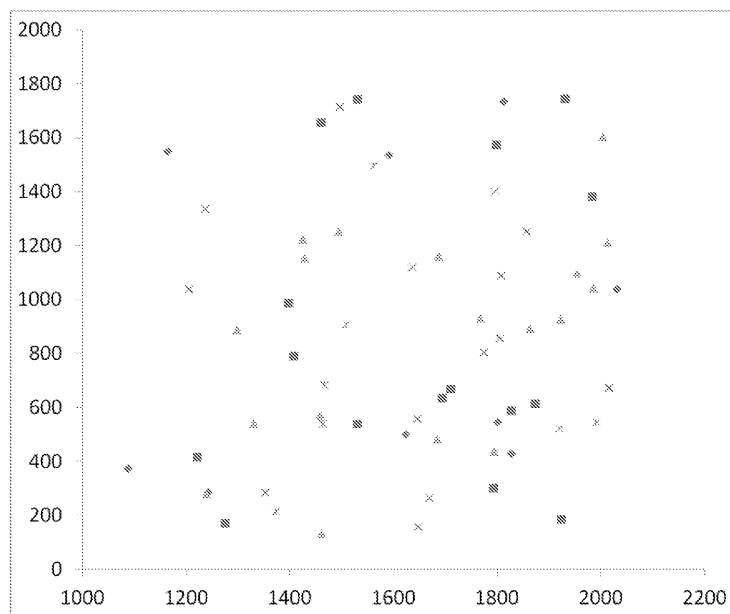
1B



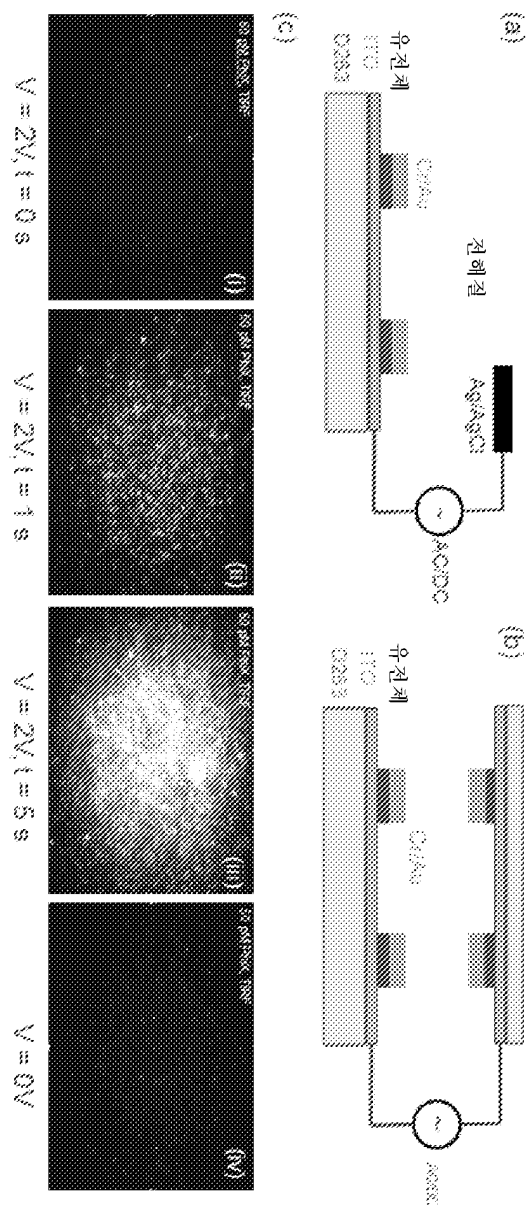
도면2



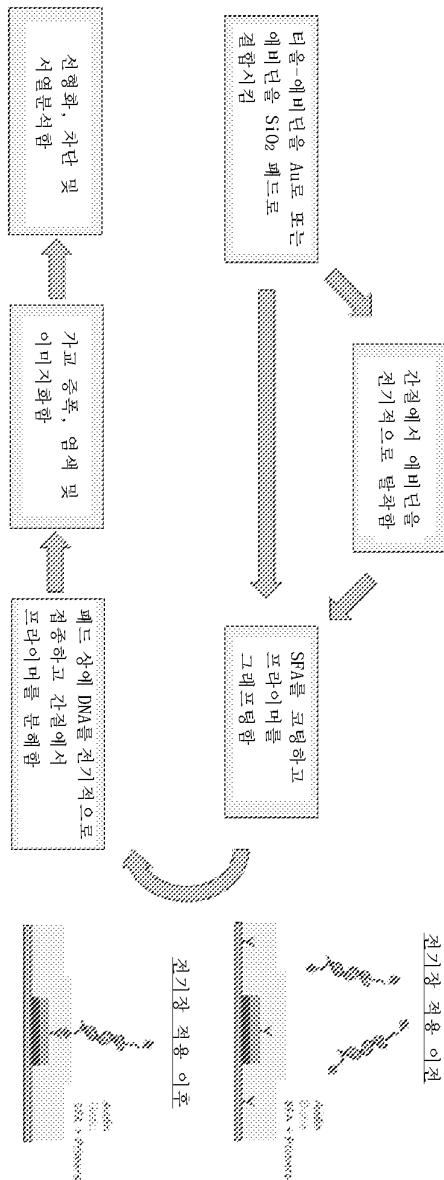
도면3



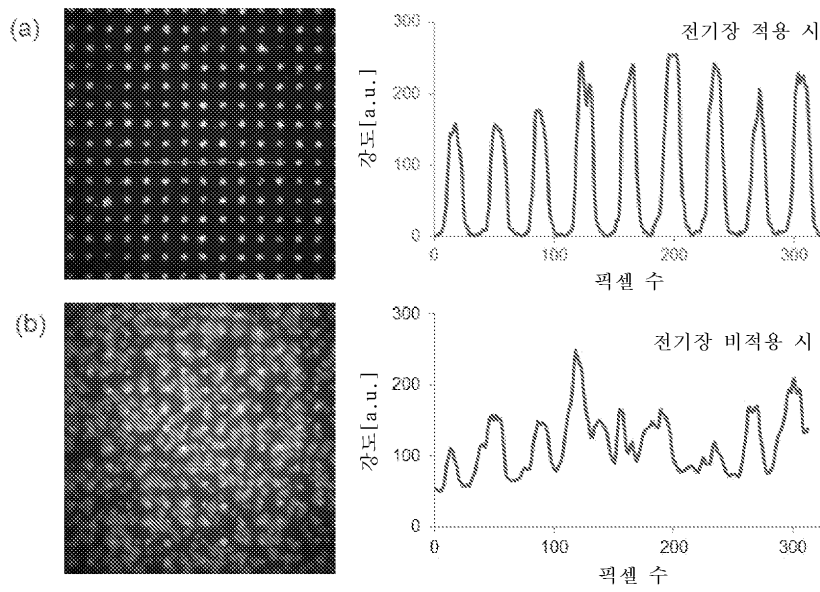
도면4



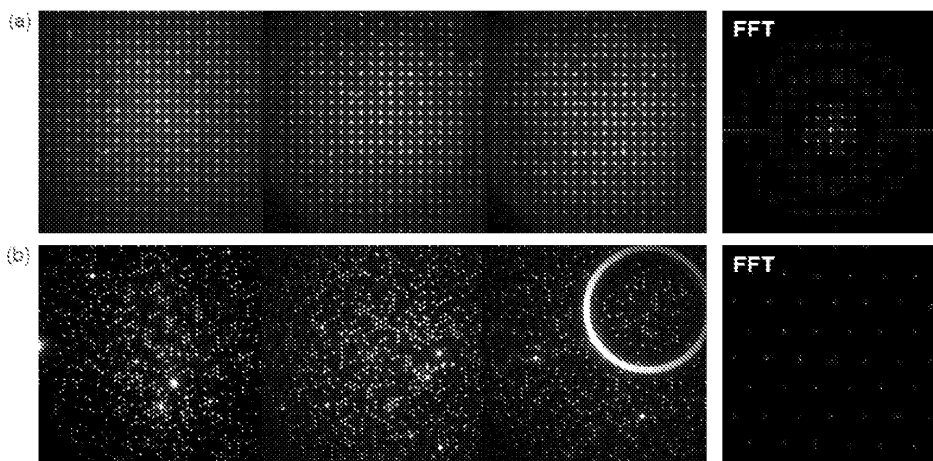
도면5



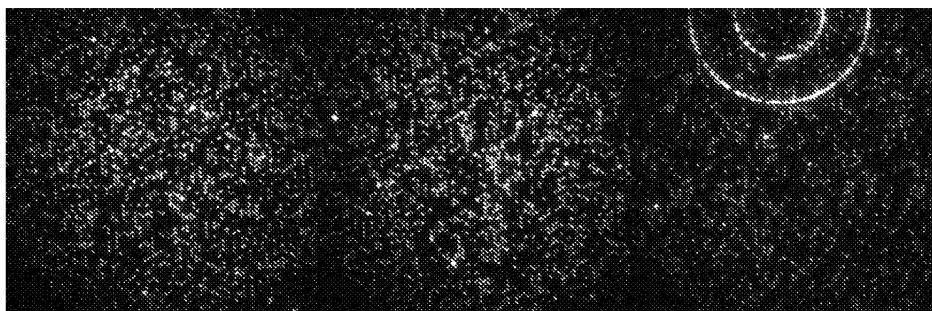
도면6



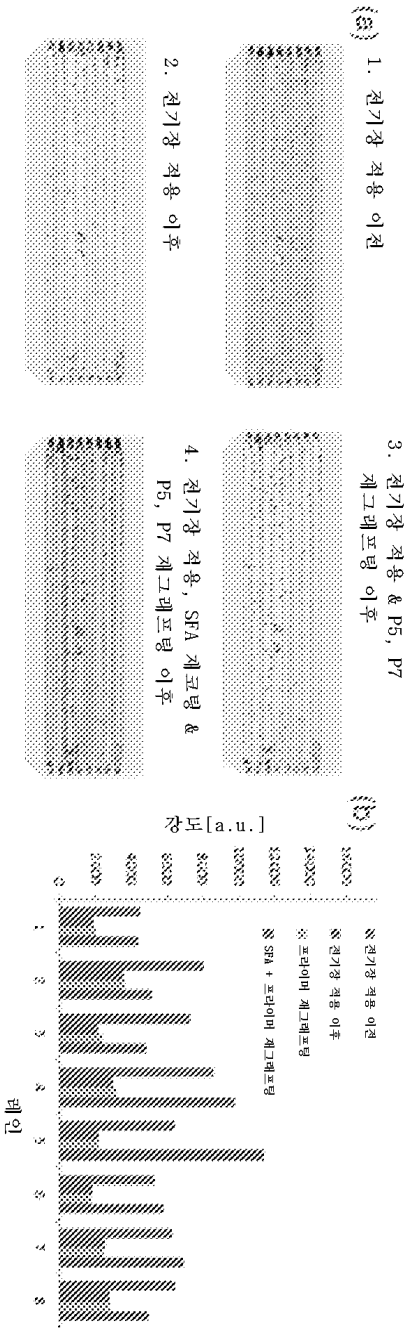
도면7



도면8



도면9



도면10

