



(21)申請案號：110147785

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 20 日

(51)Int. Cl. : C12Q1/6869 (2018.01)

C12Q1/6876 (2018.01)

(30)優先權：2020/12/21 美國

63/128,669

(71)申請人：美商宜曼達股份有限公司(美國) ILLUMINA, INC. (US)

美國

(72)發明人：佳茂 卡珊卓 CHAMOUN, CASSANDRA (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：42 項 圖式數：4 共 48 頁

(54)名稱

利用定序選擇適體(APTAMERS)

(57)摘要

本發明提供用於從複數個候選適體(aptamer)選擇適體之方法及系統。使標靶偶合於經配置於基板中之複數個阱之各阱中。使各阱與包含複數個候選適體之流體接觸。於至少一阱中，使對該標靶具有選擇性之任何候選適體偶合至該標靶。移除未偶合至該標靶的任何候選適體。於該等阱中，定序在移除之後保留的任何候選適體以識別對該標靶具有選擇性之任何適體。

Methods and systems for selecting an aptamer from a plurality of aptamer candidates are provided. A target is coupled within each well of a plurality of wells that is disposed within a substrate. Each of the wells is contacted with a fluid comprising a plurality of aptamer candidates. Within at least one of the wells, any aptamer candidate that is selective for the target is coupled to the target. Any aptamer candidates that are not coupled to the target are removed. Within the wells, any aptamer candidates are sequenced that remain after the removing to identify any aptamers that are selective for the target.

指定代表圖：

符號簡單說明：

400:方法

410:操作

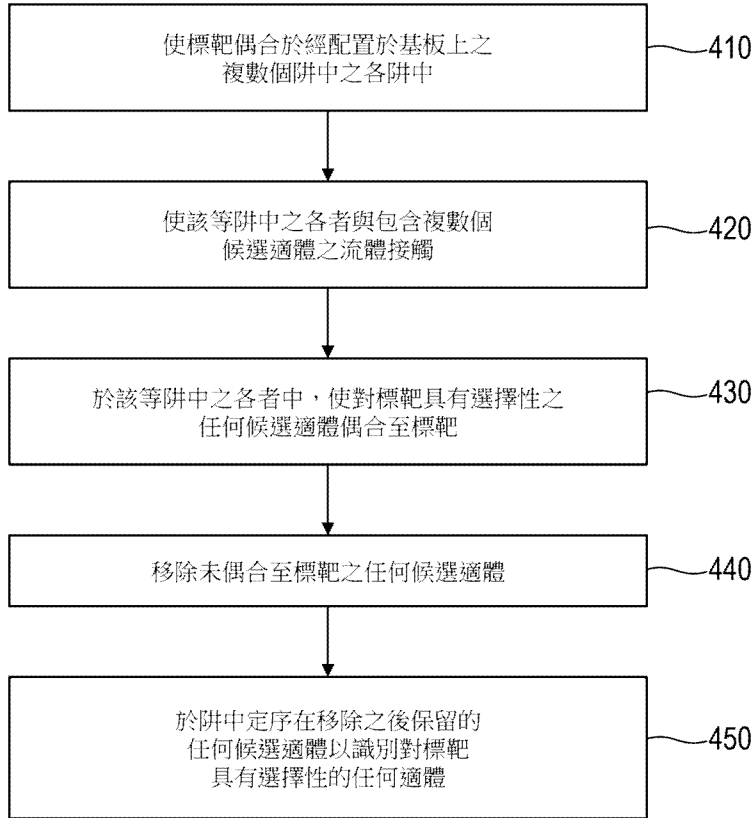
420:操作

430:操作

440:操作

450:操作

400



【圖4】

【發明摘要】

【中文發明名稱】

利用定序選擇適體(APTAMERS)

【英文發明名稱】

SELECTING APTAMERS USING SEQUENCING

【中文】

本發明提供用於從複數個候選適體 (aptamer) 選擇適體之方法及系統。使標靶偶合於經配置於基板中之複數個阱之各阱中。使各阱與包含複數個候選適體之流體接觸。於至少一阱中，使對該標靶具有選擇性之任何候選適體偶合至該標靶。移除未偶合至該標靶的任何候選適體。於該等阱中，定序在移除之後保留的任何候選適體以識別對該標靶具有選擇性之任何適體。

【英文】

Methods and systems for selecting an aptamer from a plurality of aptamer candidates are provided. A target is coupled within each well of a plurality of wells that is disposed within a substrate. Each of the wells is contacted with a fluid comprising a plurality of aptamer candidates. Within at least one of the wells, any aptamer candidate that is selective for the target is coupled to the target. Any aptamer candidates that are not coupled to the target are removed. Within the wells, any aptamer candidates are sequenced that remain after the removing to identify any aptamers that are selective for the target.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

400:方法

410: 操作

420: 操作

430: 操作

440: 操作

450: 操作

【發明說明書】

【中文發明名稱】

利用定序選擇適體(APTAMERS)

【英文發明名稱】

SELECTING APTAMERS USING SEQUENCING

【技術領域】

【0001】 本發明係關於用於選擇適體(aptamers)之方法及系統。

【先前技術】

【0002】 可存在於生物樣本中的特異性核酸序列之偵測已用作一種用於(作為一些實例)識別且分類微生物，診斷感染性疾病，偵測且表徵遺傳異常，識別與癌症相關之遺傳變化，研究對疾病之遺傳易感受性，及測定對各種類型之治療之反應之方法。結合至特異性標靶分子之核酸序列可稱為「適體」，且可是合成的或可來自生物樣本。用於偵測特異性核酸序列(無論是合成的還是來自生物樣本)之常見技術係核酸定序。

【0003】 核酸定序方法已從Maxam及Gilbert使用的化學降解方法及Sanger使用的股伸長方法演化而來。現在正在使用允許於單個流動池(flow cell)上並行處理數百萬個或甚至數十億個核酸之幾種定序方法。一些平臺包括基於珠粒之形式及微陣列形式，其中二氧化矽珠粒係經探針功能化，取決於此類形式於應用(包括定序、基因分型或基因表現圖譜分析)中之應用。一些定序系統(無論是用於「合成定序(sequencing-by-synthesis)」還是用於基因分型)使用基板，包括攜載用於定序操作之不同試劑之複數個不同儲庫。

【發明內容】

【0004】 本文所提供的實例係關於利用定序選擇適體。揭示用於進行此種選擇之設備及方法。

【0005】 本文的一些實例提供一種從複數個候選適體選擇適體之方法。該方法可包括使標靶偶合於經配置於基板中之複數個阱中之各阱中。該方法可包括使該等阱之各者與包含複數個候選適體之流體接觸。該方法可包括於該等阱中之至少一者中，使對標靶具有選擇性之任何候選適體偶合至標靶。該方法可包括移除未偶合至標靶的任何候選適體。該方法可包括於該等阱中定序在移除之後保留的任何候選適體以識別對標靶具有選擇性之任何適體。

【0006】 在一些實例中，使標靶偶合於複數個阱中之各阱中包括使第一部分偶合於該等阱中之各者中；使複數個第二部分偶合至標靶之各別標靶；及使該第二部分偶合至該等阱中之各者中之該第一部分。在一些實例中，該第一部分包含鏈黴親和素及該第二部分包含生物素。在一些實例中，該第一部分係藉由捕捉引子偶合於該等阱中之各者中。在一些實例中，在進行定序之前自捕捉引子分離該第一部分。

【0007】 在一些實例中，基板包括用於定序在移除之後保留的候選適體之偵測電路。

【0008】 在一些實例中，該複數個阱包括流體平行流過的流動池。

【0009】 在一些實例中，對標靶具有選擇性之任何候選適體均具有當變成偶合至標靶時變化的三級結構。

【0010】 在一些實例中，該方法進一步包括產生對標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子。在一些實例中，產生對標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子包括：使該候選適體自標靶解偶；及使用該候選適體利

用聚合酶鏈反應(PCR)以產生擴增子。在一些實例中，在不同於阱的擴增腔室中進行PCR。在一些實例中，該方法進一步包括使該等阱中之各者與包含擴增子之流體接觸；於該等阱中之各者中，使對標靶具有選擇性之任何擴增子偶合至標靶；及移除未偶合至標靶的任何擴增子。在一些實例中，經定序之任何候選適體包含在移除未偶合至標靶的任何擴增子之後保留的任何擴增子。在一些實例中，該方法進一步包括產生對標靶具有選擇性之任何擴增子之另外擴增子。

【0011】 在一些實例中，定序任何候選適體包括：使移除之後保留的任何候選適體偶合至經配置於阱中之捕捉引子；於該等阱中進行擴增以產生經偶合至捕捉引子之擴增子；及定序偶合至捕捉引子之擴增子。在一些實例中，標靶經由捕捉引子中之各別捕捉引子偶合於阱中。在一些實例中，捕捉引子將第一部分偶合於該等阱中，且將第二部分偶合至該第一部分繼而偶合至該等阱中之標靶。在一些實例中，使捕捉引子與標靶分開地偶合至阱。在一些實例中，候選適體中之各者包含與各別捕捉引子互補的第一及第二適體。在一些實例中，候選適體中之各者進一步包含第一間隔子經配置於該第一適體與為欲對標靶具有選擇性之候選者的區域之間、及第二間隔子經配置於該第二適體與為欲對標靶具有選擇性之候選者之區域之間。

【0012】 在一些實例中，候選適體中之各者包含寡核苷酸。

【0013】 本文的一些實例提供一種用於從複數個候選適體選擇適體之系統。該系統可包括包含複數個阱之基板。該系統可包括經偶合於該等阱中之各者中之標靶。該系統可包括流體，該流體包含複數個候選適體且接觸該等阱中之各者，其中對標靶具有選擇性之任何候選適體變成偶合至

標靶。該系統可包括於該等阱中定序任何候選適體以識別對標靶具有選擇性之任何適體之偵測電路。

【0014】 在一些實例中，使第一部分偶合於該等阱中之各者中。在一些實例中，使複數個第二部分偶合至標靶之各別標靶。在一些實例中，使該第二部分偶合至該等阱中之各者中之該第一部分以使標靶偶合於該等阱中之各者中。在一些實例中，該第一部分包含鏈黴親和素及該第二部分包含生物素。在一些實例中，該第一部分係藉由捕捉引子偶合於該等阱中之各者中。在一些實例中，該第一部分係可自捕捉引子分離的。

【0015】 在一些實例中，該複數個阱係配置於偵測電路上。

【0016】 在一些實例中，該複數個阱包括流體平行流過的流動池。

【0017】 在一些實例中，對標靶具有選擇性之任何候選適體均具有當變成偶合至標靶時變化的三級結構。

【0018】 在一些實例中，產生對標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子。在一些實例中，利用包括以下之步驟來產生對標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子：使該候選適體自標靶解偶；及使用該候選適體利用聚合酶鏈反應(PCR)以產生擴增子。在一些實例中，該系統包括不同於阱之擴增腔室以進行PCR。

【0019】 在一些實例中，該系統進一步包括包含擴增子且接觸該等阱中之各者之流體，其中對標靶具有選擇性之任何擴增子變成偶合至標靶。在一些實例中，經定序之任何候選適體包含在移除未偶合至標靶的任何擴增子之後保留的任何擴增子。在一些實例中，該系統進一步包含對標靶具有選擇性之任何擴增子之另外擴增子。

【0020】 在一些實例中，該系統進一步包含經配置於阱中且經偶合

至在移除之後保留的任何候選適體之捕捉引子；及經偶合至捕捉引子之候選適體之擴增子。偵測電路可定序經偶合至捕捉引子之擴增子。在一些實例中，標靶係經由捕捉引子中之各別捕捉引子偶合於阱中。在一些實例中，捕捉引子將第一部分偶合於該等阱中，且將第二部分偶合至該第一部分繼而偶合至該等阱中之標靶。在一些實例中，使捕捉引子與標靶分開地偶合至阱。在一些實例中，候選適體中之各者包含與各別捕捉引子互補的第一及第二適體。在一些實例中，候選適體中之各者進一步包含第一間隔子經配置於該第一適體與為欲對標靶具有選擇性之候選者的區域之間、及第二間隔子經配置於該第二適體與為欲對標靶具有選擇性之候選者之區域之間。

【0021】 在一些實例中，候選適體中之各者包含寡核苷酸。

【0022】 應理解，如本文所述的本揭示之各態樣之任何各別特徵/實例可一起以任何適宜組合實施，及來自任何一或多個此等態樣之任何特徵/實例可與如本文所述的其他態樣之任何特徵一起以任何適宜組合實施以達成如本文所述的益處。

【圖式簡單說明】

【0023】 圖1A至1I示意性地繪示用於利用定序選擇適體的流程之實例設備及操作。

【0024】 圖2A至2F示意性地繪示用於利用定序選擇適體的替代流程之實例設備及操作。

【0025】 圖3示意性地繪示用於諸如參考圖1A-1I或2A-2F描述的設備或流程中之實例候選適體。

【0026】 圖4示意性地繪示利用定序選擇適體之流程中之實例操

作。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

【0027】本申請案主張2020年12月21日申請且題為「Selecting Aptamers Using Sequencing」之美國臨時專利申請案第63/128,669號之權益，該案之全部內容係以引用之方式併入本文中。

【0028】本文所提供的實例係關於利用定序選擇適體。揭示用於進行此種選擇之設備及方法。

【0029】一些適體為以高選擇性結合至標靶分子(諸如酵素、抗體、單細胞或所關注的任何其他分子標靶)之寡核苷酸股。在此種選擇性結合期間，適體可達成三級結構。SELEX (或藉由指數富集之配體系統演化(Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment))係一種選擇適體之程序。先前已知的SELEX程序通常係在習知固相基板(諸如含有標靶偶合的介質之管柱)上進行。使包含候選適體之流體流過基板。對標靶具有選擇性之任何適體變成偶合至標靶而其他適體沒有偶合且因此從基板流出。然後使對標靶具有選擇性之適體自標靶解偶且例如在96阱板中利用聚合酶鏈反應(PCR)擴增。PCR產物再次可流過基板且擴增，以提供進一步的富集。然後定序經擴增之適體以識別變成偶合至標靶之適體且因此係最「成功的」。此等程序可為時間及勞動密集型的。

【0030】比較而言，如本文所提供，本設備及方法可透過利用定序來精簡及簡化SELEX程序。更具體言之，在一些實例中，用於選擇及定序適體之操作可於相同阱中，例如於定序系統中之基板之阱中進行。其上進行選擇程序之基板可包括用於定序適體之偵測電路。例示性地，可將標

靶偶合於該等阱中之各者中，且複數個適體流入至該等阱之各者中。對標靶具有選擇性之任何適體可變成偶合至標靶，且可移除任何其他適體。對標靶具有選擇性之適體可經擴增，且然後可例如使用亦偶合於該等阱中之各者中之捕捉引子定序於阱中。因此，本設備及方法可提供相較於先前已知的SELEX程序顯著減少材料使用及浪費之顯著精簡且簡化之程序。

【0031】 首先，將簡要解釋本文所使用的一些術語。然後，將描述用於利用定序選擇適體之一些實例方法及相關設備。

術語

【0032】 除非另有定義，否則本文所使用的所有技術及科學術語具有與此項技術中之一般技術者通常所理解相同的含義。術語「包括(including)」以及其他形式(諸如「包括(include)」、「包括includes)」及「包括(included)」的使用係非限制性的。術語「具有(having)」以及其他形式(諸如「具有(have)」、「具有(has)」及「具有(had)」)的使用係非限制性的。如本說明書中所用，無論是在過渡片語中或在技術方案主體中，術語「包含(comprise(s))」及「包含(comprising)」應被解釋為具有開放式含義。亦即，以上術語應與片語「具有至少」或「包括至少」同義地解釋。例如，當用於程序之上下文中時，術語「包含」意指該程序包括至少所引述的步驟，但可包括另外步驟。當用於化合物、組合物或裝置之上下文中，術語「包含」意指化合物、組合物或裝置包括至少所引述的特徵或組件，但亦可包括另外特徵或組件。

【0033】 用於本說明書全文中之術語「實質上」、「近似」及「約」用於描述及說明小的波動，諸如由於處理中之變化。例如，其可指小於或等於 $\pm 10\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 5\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 2\%$ ，諸如小

於或等於 $\pm 1\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.5\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.2\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.1\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 0.05\%$ 。

【0034】 如本文所用，「雜交」欲意指使第一聚核苷酸沿著彼等聚合物之長度非共價結合至第二聚核苷酸以形成雙股「雙鏈體(duplex)」。

例如，兩個DNA聚核苷酸股可透過互補鹼基配對結合。該第一與第二聚核苷酸之間的結合之強度隨著彼等聚核苷酸中之核苷酸之序列之間的互補性而增加。聚核苷酸之間的雜交之強度可藉由50%的雙鏈體彼此解離的熔融溫度(T_m)來表徵。

【0035】 如本文所用，術語「核苷酸」欲意指包含糖及至少一個磷酸酯基，且在一些實例中亦包含核苷鹼基之分子。缺乏核苷鹼基之核苷酸可稱為「無鹼基」。核苷酸包含去氧核糖核苷酸、經修飾去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核糖核苷酸、肽核苷酸、經修飾肽核苷酸、經修飾磷酸酯糖主鏈核苷酸及其混合物。核苷酸之實例包括腺苷單磷酸(AMP)、腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)、胸苷單磷酸(TMP)、胸苷二磷酸(TDP)、胸苷三磷酸(TTP)、胞苷單磷酸(CMP)、胞苷二磷酸(CDP)、胞苷三磷酸(CTP)、鳥苷單磷酸(GMP)、鳥苷二磷酸(GDP)、鳥苷三磷酸(GTP)、尿苷單磷酸(UMP)、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷三磷酸(UTP)、去氧腺苷單磷酸(dAMP)、去氧腺苷二磷酸(dADP)、去氧腺苷三磷酸(dATP)、去氧胸苷單磷酸(dTMP)、去氧胸苷二磷酸(dTDP)、去氧胸苷三磷酸(dTTP)、去氧胞苷二磷酸(dCDP)、去氧胞苷三磷酸(dCTP)、去氧鳥苷嘌呤單磷酸(dGMP)、去氧鳥苷嘌呤二磷酸(dGDP)、去氧鳥苷嘌呤三磷酸(dGTP)、去氧尿苷單磷酸(dUMP)、去氧尿苷二磷酸(dUDP)及去氧尿苷三磷酸(dUTP)。

【0036】 如本文所用，術語「核苷酸」亦意欲涵蓋任何核苷酸類似物，其係一類與天然存在之核苷酸相比包含經修飾核苷鹼基、糖及/或磷酸酯部分之核苷酸。實例經修飾核苷鹼基包括肌苷、黃嘌呤、次黃嘌呤、異胞嘧啶、異鳥嘌呤、2-胺基嘌呤、5-甲基胞嘧啶、5-羥基甲基胞嘧啶、2-胺基腺嘌呤、6-甲基腺嘌呤、6-甲基鳥嘌呤、2-丙基鳥嘌呤、2-丙基腺嘌呤、2-硫基尿嘧啶、2-硫基胸腺嘧啶、2-硫基胞嘧啶、15-鹵基尿嘧啶、15-鹵基胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、5-丙炔基胞嘧啶、6-偶氮尿嘧啶、6-偶氮胞嘧啶、6-偶氮胸腺嘧啶、5-尿嘧啶、4-硫基尿嘧啶、8-鹵基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-胺基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-硫醇基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-硫基烷基腺嘌呤或鳥嘌呤、8-羥基腺嘌呤或鳥嘌呤、5-鹵基取代之尿嘧啶或胞嘧啶、7-甲基鳥嘌呤、7-甲基腺嘌呤、8-氮雜鳥嘌呤、8-氮雜腺嘌呤、7-去氮雜鳥嘌呤、7-去氮雜腺嘌呤、3-去氮雜鳥嘌呤、3-去氮雜腺嘌呤或類似物。如此項技術中已知的，某些核苷酸類似物不能變成併入至聚核苷酸(例如核苷酸類似物，諸如腺苷5'-磷酸硫酸)中。核苷酸可包含任何適宜數目之磷酸酯基，例如三個、四個、五個、六個或超過六個磷酸酯基。

【0037】 如本文所用，術語「聚核苷酸」係指包含彼此結合的核苷酸之序列之分子。聚核苷酸係聚合物之一個非限制性實例。聚核苷酸之實例包括去氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)及其類似物。聚核苷酸可為核苷酸之單股序列(諸如RNA或單股DNA)、核苷酸之雙股序列(諸如雙股DNA)，或可包含核苷酸之單股及雙股序列之混合物。雙股DNA (dsDNA) 包含基因組DNA、及PCR及擴增產物。單股DNA (ssDNA)可經轉化成dsDNA且反之亦然。聚核苷酸可包含非天然存在之DNA，諸如對映異構

體DNA。核苷酸在聚核苷酸中之精確序列可為已知或未知的。以下為聚核苷酸之實例：基因或基因片段(例如探針、引子、經表現之序列標籤(EST)、或基因表現(SAGE)標籤之連續分析)、基因組DNA、基因組DNA片段、外顯子、內含子、信使RNA (mRNA)、轉移RNA、核糖體RNA、核酶、cDNA、重組聚核苷酸、合成聚核苷酸、分支鏈聚核苷酸、質體、載體、經分離之任何序列之DNA、經分離之任何序列之RNA、核酸探針、引子或任何前述之擴增拷貝。

【0038】如本文所用，「聚合酶」欲意指具有活性位之酵素，其藉由使核苷酸聚合成聚核苷酸來組裝聚核苷酸。聚合酶可結合經引發之單股標靶聚核苷酸，且可依序將核苷酸添加至生長引子以形成具有與標靶聚核苷酸之序列互補序列之「互補拷貝」聚核苷酸。然後，另一聚合酶(或相同聚合酶)可藉由形成該互補拷貝聚核苷酸之互補拷貝來形成標靶核苷酸之拷貝。任何此類拷貝在本文中可稱為「擴增子」。DNA聚合酶可結合至標靶聚核苷酸且然後依序向下移動標靶聚核苷酸而將核苷酸添加至生長聚核苷酸股(生長擴增子)的3'端的游離羥基。DNA聚合酶可自DNA模板合成互補DNA分子及RNA聚合酶可自DNA模板合成RNA分子(轉錄)。聚合酶可使用短RNA或DNA股(引子)，以開始股生長。一些聚合酶可取代其添加鹼基至鏈的位點上游的股。此種聚合酶可稱為股置換，意指其具有自該聚合酶讀取的模板股移除互補股之活性。具有股置換活性之實例聚合酶包括(但不限於)Bst (嗜熱脂肪芽孢桿菌；*Bacillus stearothermophilus*)聚合酶、外Klenow聚合酶或定序級T7外聚合酶之大片段。一些聚合酶降解在其前面的股，有效地以後面的生長鏈替換(5'核酸外切酶活性)。一些聚合酶具有降解其後面股之活性(3'核酸外切酶活性)。一些有用的聚合酶已

藉由突變或其他方式修飾，以減少或消除3'及/或5'核酸外切酶活性。

【0039】 如本文所用，術語「引子」係指可經由游離3' OH基添加核苷酸之聚核苷酸。引子長度可為任何適宜數目鹼基長且可包含天然及非天然核苷酸之任何適宜組合。標靶聚核苷酸(諸如(但不限於)適體)可包含與引子雜交(具有與引子互補的序列)之「適體」，且可經擴增以藉由添加核苷酸至引子之游離3' OH基來產生互補拷貝聚核苷酸。可將引子偶合至基板。彼此「互補」的引子可沿著實質上其全部長度彼此雜交，而彼此「正交(orthogonal)」的引子實質上不彼此雜交，其擴增子亦不彼此雜交。「捕捉引子」欲意指經偶合至基板且可與標靶聚核苷酸之第一適體雜交之引子，而「正交捕捉引子」欲意指經偶合至基板且可與該標靶聚核苷酸之第二適體雜交之引子。該第一適體可具有與捕捉引子之序列互補的序列，及該第二適體可具有與正交捕捉引子之序列互補的序列。捕捉引子及正交捕捉引子可具有彼此不同且獨立之序列。

【0040】 在一些實例中，捕捉引子為可購自Illumina, Inc.之P5或P7引子。P5及P7引子為彼此正交的引子之非限制性實例。在一些實例中，P5及P7引子序列可具有以下序列：

成對讀取組：

P5 : 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGAUCTACAC-3' (SEQ ID NO:1)

P7 : 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACTGAG*AT-3' (SEQ ID NO:2)

單一讀取組：

P5 : 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' (SEQ ID NO:3)

P7 : 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACTGA3' (SEQ ID NO:4)

其中G*為G或8-側氧基鳥嘌呤。

【0041】 在一些實例中，所附接的寡核苷酸(諸如引子或P5或P7引子)包含連接子或間隔子於5'端。可包含此種連接子或間隔子以便允許化學或酶促裂解，或賦予一些其他所需性質，例如使得能夠共價附接至聚合物或撐體，或充作間隔子以定位裂解位點距撐體的最佳距離。在某些情況下，10個間隔子核苷酸可定位在P5或P7引子對聚合物或撐體的附接點之間。在一些實例中，使用polyT間隔子，然而亦可使用其他核苷酸及其組合。在一個實例中，間隔子為6T至10T間隔子。在一些實例中，連接子包含可裂解之核苷酸，其包含可化學裂解之官能基，諸如鄰二醇或烯丙基T。

【0042】 如本文所用，術語「擴增子」在提及聚核苷酸使用時欲意指複製聚核苷酸之產物，其中該產物具有與聚核苷酸之核苷酸序列之至少一部分實質上相同或實質上互補的核苷酸序列。「擴增(Amplification)」及「擴增(amplifying)」係指製備聚核苷酸之擴增子之過程。標靶聚核苷酸之第一擴增子可為互補拷貝。另外擴增子為在產生第一擴增子之後自標靶聚核苷酸或自第一擴增子建立的拷貝。隨後的擴增子可具有與標靶聚核苷酸實質上互補或與標靶聚核苷酸實質上相同之序列。應理解，聚核苷酸之少數突變(例如由於擴增人工產物(artifact))可在產生該聚核苷酸之擴增子時發生。

【0043】 如本文所用，術語「基板」係指用作本文所述的組合物之撐體之材料。實例基板材料可包含玻璃、二氧化矽、塑膠、石英、金屬、金屬氧化物、有機矽酸酯(例如多面體有機矽倍半氧烷(POSS))、聚丙烯酸酯、氧化鋁、互補金屬氧化物半導體(CMOS)或其組合。POSS之一個實

例可為描述於Kehagias等人，*Microelectronic Engineering* 86 (2009)，第776至778頁中者，該案係以全文引用之方式併入。在一些實例中，用於本申請案中之基板包含基於二氧化矽之基板，諸如玻璃、熔融二氧化矽或其他含二氧化矽材料。在一些實例中，基板可包含矽、氮化矽或氫化矽。在一些實例中，用於本申請案中之基板包含塑膠材料或組分，諸如聚乙烯、聚苯乙烯、聚(氯乙烯)、聚丙烯、尼龍(nylon)、聚酯、聚碳酸酯及聚(甲基丙烯酸甲酯)。實例塑膠材料包含聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚苯乙烯及環狀烯烴聚合物基板。在一些實例中，基板為或包含基於二氧化矽之材料或塑膠材料或其組合。在特定實例中，基板具有至少一個包含玻璃或矽基聚合物之表面。在一些實例中，基板可包含金屬。在一些此類實例中，金屬為金。在一些實例中，基板具有至少一個包含金屬氧化物之表面。在一個實例中，表面包含氧化鉍或氧化錫。丙烯醯胺、烯酮或丙烯酸酯亦可用作基板材料或組分。其他基板材料可包括但不限於砷化鎵、磷化銻、鋁、陶瓷、聚醯亞胺、石英、樹脂、聚合物及共聚物。在一些實例中，基板及/或基板表面可為或包含石英。在一些其他實例中，基板及/或基板表面可為或包含半導體，諸如GaAs或ITO。前述清單意欲說明但不限於本申請案。基板可包含單一材料或複數種不同材料。基板可為複合物或層壓物。在一些實例中，基板包含有機矽酸酯材料。基板可為平坦、圓形、球形、棒形或任何其他適宜形狀。基板可為剛性或撓性的。在一些實例中，基板為珠粒或流動池。

【0044】 在一些實例中，基板包含圖案化表面。「圖案化表面」係指不同區域於基板之暴露層中或之上之排列。例如，該等區域中之一者或多者可為其中存在一或多個捕捉引子之特徵。該等特徵可藉由不存在捕捉

引子的間隙區域分離。在一些實例中，圖案可為在列及行中的特徵之x-y形式。在一些實例中，圖案可為特徵及/或間隙區域之重複排列。在一些實例中，圖案可為特徵及/或間隙區域之無規排列。在一些實例中，基板包含阱(凹入)陣列於表面中。該等阱可由實質上垂直側壁提供。阱可如此項技術中一般已知使用各種技術，包括但不限於微影術、衝壓技術、模製技術及微蝕刻技術來製造。如熟習此項技術者所瞭解，所使用的技術將取決於陣列基板之組成及形狀。

【0045】 基板之圖案化表面中之特徵可包含具有圖案化、共價連接之凝膠(諸如聚(N-(5-疊氨基乙醯胺基戊基)丙烯醯胺-共聚-丙烯醯胺)(PAZAM))之玻璃、矽、塑膠或其他適宜材料上的阱(例如微阱或奈米阱)陣列中之阱。該程序建立用於定序的凝膠墊，其可在具有大量循環之定序運行中穩定。聚合物與阱之共價連接可有助於在各種使用期間在結構化基板之整個壽命維持結構化特徵中之凝膠。然而，在諸多實例中，凝膠不需要共價連接至阱。例如，在一些條件下，不共價附接至結構化基板之任何部分之無矽烷丙烯醯胺(SFA)可用作凝膠材料。

【0046】 在特定實例中，結構化基板可藉由用阱(例如微阱或奈米阱)使適宜材料圖案化，用凝膠材料(例如PAZAM、SFA或其化學修飾變體，諸如SFA之疊氨基化變體(疊氨基-SFA))塗佈圖案化材料及例如經由化學或機械拋光拋光經凝膠塗佈的材料之表面，由此將凝膠保留在阱中但自介於阱之間的結構化基板之表面上的間隙區域移除或去活化實質上所有凝膠來製造。可將引子附接至凝膠材料。然後，可使包含複數個標靶聚核苷酸(例如片段化人類基因組或其部分)之溶液與經拋光基板接觸，使得個別標靶聚核苷酸將經由與經附接至凝膠材料之引子相互作用接種個別阱；

然而，標靶聚核苷酸將不由於凝膠材料之不存在或無活性而佔用間隙區域。標靶聚核苷酸之擴增可限於阱，因為凝膠於間隙區域中之不存在或無活性可抑制生長簇之向外遷移。該程序可方便地製造，係可擴展的且利用習知微製造或奈米製造方法。

【0047】 圖案化基板可包含例如經蝕刻至玻片 (slide) 或晶片中之阱。阱之蝕刻及幾何形狀之圖案可採取各種不同形狀及尺寸，且此種特徵可為物理或功能上彼此可分離的。具有此種結構特徵之特別有用的基板包含可選擇固體粒子(諸如微球體)之尺寸之圖案化基板。具有此等特性之一個實例圖案化基板為與BEAD ARRAY技術(Illumina, Inc., San Diego, Calif.)結合使用的經蝕刻基板。

【0048】 在一些實例中，基板形成流動池之至少一部分或定位在流動池中或偶合至流動池。流動池可包含被分成複數個泳道或複數個扇區之流動腔室。可用於本文所述的方法及系統中的實例流動池及用於流動池之製造之基板包括但不限於彼等購自Illumina, Inc. (San Diego, CA)者。

【0049】 如本文所用，術語「複數」欲意指兩個或更多個不同成員之群體。複數在尺寸上可在小、中、大至極大之範圍內。小複數之尺寸可在例如幾個成員至數十個成員之範圍內。中尺寸化複數可在例如數十個成員至約100個成員或數百個成員之範圍內。大複數可在例如約數百個成員至約1000個成員、至數千個成員且多達數萬個成員之範圍內。極大複數可在例如數萬個成員至約數十萬個、一百萬個、數百萬個、數千萬個且多達或多於數億個成員之範圍內。因此，複數個在尺寸上可在兩個至超過一億個成員之範圍內以及所有尺寸(如藉由成員數測定)在上文實例範圍之間及大於上文實例範圍。實例聚核苷酸複數包括例如約 1×10^5 或更多個、

5×10^5 個或更多個、或 1×10^6 或更多個不同聚核苷酸之群體。因此，該術語之定義意欲包括大於2之所有整數值。複數的上限可例如藉由樣本中聚核苷酸序列之理論多樣性來設定。

【0050】 術語「聚核苷酸」及「寡核苷酸」在本文中可互換使用。除非另外具體指明，否則不同術語並非意欲表示在尺寸、序列或其他性質上之任何特定差異。為了描述之清晰度，當描述包括幾個聚核苷酸物種之特定方法或組合物時，術語可用於將一個聚核苷酸物種與另一個聚核苷酸物種區分。

【0051】 如本文所用，術語「定序系統」係指經結構設計成測定聚核苷酸之序列之系統。多種定序系統可購買獲得。例示性地，定序系統可為或包含iSEQ™ 100定序系統，可購自Illumina, Inc. (San Diego, CA)。iSEQ™ 100定序系統為使用包含儲存不同定序試劑之儲庫之預填充式匣進行合成定序之臺面型系統。定序系統之其他非限制性實例包括購自Illumina, Inc.之cBot 2、NovaSeq 6000及MiniSeq系統、以及來自其他來源之定序系統。

【0052】 如本文所用，「適體」欲意指具有引起寡核苷酸對標靶具有選擇性之三級結構之寡核苷酸，而「候選適體」欲意指潛在地可對標靶具有選擇性之寡核苷酸。對標靶具有「選擇性」意指偶合至該標靶而不是偶合至不同標靶。因此，在給定的複數個候選適體中，一或多個候選適體潛在地可對給定標靶具有選擇性且因此可為針對該標靶之適體。然而，應瞭解，任何給定的複數個候選適體不一定包含針對給定標靶之適體。候選適體可定義為使用包含將候選適體偶合至標靶(指示選擇性)及定序候選適體之操作而對標靶具有選擇性之適體。候選適體之擴增子可本身為候選適

體，無論擴增子為候選適體之拷貝還是互補拷貝。適體之擴增子可本身為適體，例如，其中該擴增子為適體之拷貝(與適體之互補拷貝相反，該互補拷貝可為候選適體但不一定為適體)。適體可包含任何適宜類型之寡核苷酸，例如諸如本文其他地方例舉的DNA、RNA及/或核酸類似物。適體可透過相互作用之任何適宜組合，例如透過靜電相互作用、疏水相互作用及形成三級結構之任何適宜組合變成偶合至標靶。

【0053】 如本文所用，「標靶」欲意指希望選擇其適體之化學元件。標靶可包含不為核苷酸之化學實體。一個實例標靶為蛋白質標靶。一種蛋白質包含折疊成結構之一系列多肽。另一個實例標靶為代謝產物標靶。代謝產物標靶為在代謝期間形成或使用的化學元件。另外實例標靶包括但不限於碳水化合物、脂肪酸、糖(諸如葡萄糖)、胺基酸、核苷、神經傳導物質、磷脂及重金屬。在本揭示中，在任何適宜應用，諸如分析疾病狀態、分析代謝健康、分析微生物組、分析藥物相互作用、分析藥物反應、分析毒性、或分析感染性疾病之情況下，可針對標靶選擇分析物。例示性地，代謝產物可包含應疾病而上調或下調之化學元件。標靶之非限制性實例包括激酶、絲胺酸水解酶、金屬蛋白酶、疾病特異性生物標誌物(諸如特定疾病之抗原)及葡萄糖。

【0054】 如本文所用，具有「三級結構」之寡核苷酸欲意指經折疊成三維三級結構之寡核苷酸，該三維三級結構具有固持折疊到位之內部交聯。相比之下，具有一級結構(例如經連接在一起的核酸之特定序列)及二級結構(例如局部結構)但無固持折疊到位之內部交聯之寡核苷酸將不被認為具有如本文使用的術語之三級結構。當適體變成偶合至標靶時，適體之三級結構可變化。

【0055】如本文所用，元件係「不同的」欲意指元件中之一者相對於另一元件具有至少一種變化，使得元件彼此可辨別。例如，彼此不同的寡核苷酸可具有相對於彼此變化至少一個核酸之核酸序列。作為另一個實例，彼此不同的蛋白質可具有相對於彼此變化至少一個肽之肽序列。作為另一個實例，代謝產物可相對於彼此變化至少一個化學基團。如本文所提供，可使用本設備及方法為不同標靶選擇不同適體。

【0056】如本文所用，術語「螢光團」欲意指應不同於第一波長之第二波長之光之激發而發射該第一波長之光之分子。由螢光團發射的光可稱為「螢光」且可藉由適宜光學偵測電偵測。

【0057】螢光可使用任何適宜光學偵測電路偵測，該光學偵測電路可包含基於自螢光團接收的光來產生電信號之光學偵測器、及使用該電信號測定光係自螢光團接收之電子電路。作為一個實例，光學偵測器可包括主動-像素感測器(APS)，包括經結構設計成基於藉由光偵測器接收的光產生電信號之經放大之光偵測器之陣列。APSs可基於此項技術中已知的互補金屬氧化物半導體(CMOS)技術。基於CMOS之偵測器可包括場效電晶體(FETs)，例如金屬氧化物半導體場效電晶體(MOSFETs)。在特定實例中，可使用具有單光子崩潰二極體之CMOS成像器(CMOS-SPAD)，例如以進行螢光壽命成像(FSIM)。在其他實例中，光學偵測器可包括光二極體，諸如崩潰光二極體、電荷耦合裝置(CCD)、低溫光子偵測器、反向偏置發光二極體(LED)、光敏電阻器、光電晶體、光伏打電池、光倍增管(PMT)、量子點光導體或光二極體、或類似物。光學偵測電路進一步可包括硬體及軟體之任何適宜組合與光學偵測器可操作地連通以便自其接收電信號，且經結構設計成基於此信號，例如基於偵測來自螢光團之光之光學

偵測器偵測螢光。例如，電子電路可包括記憶體及經耦合至記憶體之處理器。記憶體可儲存用於引起處理器接收來自光學偵測器之信號且使用此信號偵測螢光團之指令。例如，指令可引起處理器使用來自光學偵測器之信號測定螢光是在光學偵測器之視野內發射並使用此種測定確定存在螢光團。基板可包括光學偵測電路，例如，可包括其上可配置一或多個用於利用定序選擇適體之阱之光學偵測器。

利用定序選擇適體

【0058】 如上所述且如下文更詳細地描述，本設備及方法可用於利用定序選擇適體。標靶可經偶合於複數個阱中之各者中，於各阱中將進行適體選擇及適體定序。可將複數個候選適體(例如SELEX適體文庫)引入至阱以使標靶與候選適體接觸，且對標靶具有選擇性之任何候選適體變成偶合至標靶同時保持候選適體保持不偶合至標靶且可被洗掉。變成偶合至標靶的候選適體可經擴增，且可於阱中經定序以識別對標靶具有選擇性之適體。

【0059】 例如，圖1A至1I示意地繪示用於利用定序選擇適體的流程之實例設備及操作。繪示於圖1A中之設備100可包括包含複數個儲庫之基板110。在繪示於圖1A中之非限制性實例中，儲庫可包含阱121、122、123、124，其彼此提供於共同、一體地形成之基板110中。然而，應瞭解，阱121、122、123、124中之一者或多者及實際上阱121、122、123、124的全部可彼此物理地分離且不需要彼此形成於共同基板中。可提供具有任何適宜尺寸及排列之任何適宜數目之阱。例如，基板110可包含數千、數萬、數十萬或甚至數百萬個阱。阱121、122、123、124中之各者可包含複數個各第一及第二捕捉引子111、112，其可用於以諸如下

文參考圖1H至1I進一步描述之方式擴增且定序候選適體。設備100進一步可包括偵測電路190以定序阱中之任何候選適體以例如以諸如參考圖1I描述之方式識別對標靶具有選擇性之任何適體。阱121、122、123、124可配置於偵測電路190上或以其他方式耦合至偵測電路190。在一個非限制性實例中，偵測電路190包括CMOS光學偵測器，阱121、122、123、124包括流體可平行流過的流動池，且CMOS在流動池中之寡核苷酸之定序期間偵測螢光。

【0060】 例示性地，設備100可用於定序系統中以利用定序選擇適體。例示性地，定序系統可為或包含iSEQ™ 100定序系統，可購自Illumina, Inc. (San Diego, CA)。iSEQ™ 100定序系統為使用包含儲存不同定序試劑之儲庫之預填充匣以類似於繪示於圖1A至1B中之設備100之方式進行合成定序之桌上型系統(benchtop system)。然而，應瞭解，設備100適宜地可適用於任何其他定序系統，諸如購自Illumina, Inc.之cBot 2、NovaSeq 6000或MiniSeq系統，或來自另一來源之定序系統。

【0061】 標靶(可能需要找到針對其之適體)可經耦合於阱121、122、123、124之各阱中。在本文其他地方提供標靶之非限制性實例。標靶可經由任何適宜連接，例如經由捕獲引子以諸如下文參考圖2A至2F進一步描述之方式直接耦合。或者，標靶可經由彼此相互作用的部分間接耦合。例如，以諸如繪示於圖1A中之方式，第一部分130可例如經由任何適宜連接耦合於阱121、122、123、124之各阱中。可使阱121、122、123、124與包含複數個分子140之流體接觸，該等分子各可包含經由任何適宜連接彼此耦合的第二部分150及標靶160，該連接視需要可裂解。第一部分130與阱121、122、123、124之間及第二部分150與標靶160之間

的各別連接可經由任何適宜相互作用(諸如NTA-His-Tag、Spytag-Spycatcher、寡核苷酸雜交至互補寡核苷酸、銅(I)催化之點擊反應，或應變促進之疊氮化物-炔環加成)形成。任何適宜數目之此類連接可包含可裂解部分，諸如8-側氧基-G，或可使用蛋白酶裂解的蛋白質，該蛋白酶可以諸如下文更詳細描述之方式用於自基板去偶合一或多個元件。

【0062】 以諸如繪示於圖1B中之方式，第二部分150可變成偶合至第一部分130以便將標靶160偶合於阱121、122、123、124中之各者中。可為第一及第二部分130、150提供彼此共價或非共價相互作用之任何適宜部分。在一個非限制性實例中，第一部分130包含鏈黴親和素及第二部分150包含生物素。在另一個非限制性實例中，第一部分130包含生物素及第二部分150包含鏈黴親和素。或者，標靶160可經由任何適宜相互作用，諸如NTA-His-Tag、Spytag-Spycatcher、寡核苷酸雜交至互補寡核苷酸、銅(I)催化之點擊反應，或應變促進之疊氮化物-炔環加成，視需要包含可裂解部分，諸如8-側氧基-G，或可使用蛋白酶裂解的蛋白質偶合於阱121、122、123、124中之各者中。雖然為簡單起見，單個第一部分130、單個第二部分150及單個標靶160經繪示為在該等阱中之各者中，但應瞭解，任何適宜數目之第一及第二部分及標靶可經偶合於該等阱中之各者中，且各阱可具有相同數目或不同數目之經偶合於其中之部分或標靶。在諸如繪示於圖1B中之實例中，可將捕捉引子111、112分別地自標靶160偶合至阱121、122、123、124。

【0063】 以諸如繪示於圖1C中之方式，系統100可包括包含複數個候選適體171、172、173、174且接觸阱121、122、123、124中之各者之流體。候選適體171、172、173、174中之各者可包含適體181、182，經

由適體181、182，候選適體分別地可偶合至捕捉引子111或112以用於以諸如下文參考圖1H描述之方式擴增。對標靶具有選擇性之任何候選適體變成偶合至標靶160。例如，如圖1D中所繪示，候選適體174係經偶合至阱124中的標靶160，而候選適體171、172、173保持不偶合至阱121、122、123中的標靶160且可以諸如繪示於圖1E中之方式，例如藉由使緩衝液流過阱121、122、123、124移除。在一些實例中，對靶標160具有選擇性的任何候選適體均具有當變成偶合至標靶時變化的三級結構。如圖1D表明，候選適體171、172、173、174中之至少一些可包含髮夾結構，該髮夾結構包含單股環及單股莖，可在候選適體對該標靶具有選擇性時偶合至標靶160。

【0064】 可產生對標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子。例如，產生對靶標具有選擇性的任何候選適體之擴增子可包括使該候選適體自標靶解偶及利用PCR使用該候選適體以產生擴增子。例如，繪示於圖1E中之候選適體174可自標靶160去偶合，且進行PCR以產生該候選適體之擴增子。候選適體174與標靶160之間的此種去偶合可使用破壞標靶與適體之間的相互作用之任何適宜反應條件(諸如熱或其中鹽濃度或pH變成不利於適體的三級結構或穩定適體-標靶界面的力的緩衝液交換)進行。在一些實例中，設備100可包含遠離阱121、122、123、124的擴增腔室以進行PCR。然後，在諸如繪示於圖1F中之方式，使阱121、122、123、124中之各者中之標靶160與包含候選適體174之擴增子174之流體接觸。請注意，本文中使用的相同參考數字來指代擴增子174及候選適體174，因為其為等效結構；例如，擴增子174亦為針對標靶160之候選適體且預期變成與候選適體174相似地偶合至其。以類似於參考圖1D描述之方式，對標靶

具有選擇性之任何擴增子174變成偶合至例如諸如顯示於圖1G中之標靶，其中複數個擴增子174經偶合至各別標靶160。然而，請注意，可省略用於使候選適體自標靶去偶合且使用PCR使用候選適體以產生擴增子之另外操作。

【0065】 然後，可使用設備100以定序候選適體174（包括其任何組合）。例如，在移除未偶合至標靶160之候選適體之後，可定序保持偶合至標靶150之任何候選適體。可將繪示於圖1G中之候選適體174（包括其任何擴增子）以諸如參考圖1E描述之方式自標靶160去偶合，及簇擴增可用於產生候選適體174之擴增子，包括產生對標靶具有選擇性之任何擴增子之另外擴增子。例如，如上文參考圖1A所述，可將捕捉引子111、112配置於阱121、122、123、124中。捕捉引子111及捕捉引子112可彼此正交，例如，捕捉引子111可包含P5引子及捕捉引子112可包含P7引子。捕捉引子111、112可經偶合至在移除未變成偶合至標靶160之任何候選適體（及擴增子）之後留下的任何候選適體（包括其任何擴增子）174。例如，如上文參考圖1A所述，候選適體171、172、173、174可包含適體181、182，經由適體181、182，該候選適體分別地可經偶合至捕捉引子111或112以用於擴增。

【0066】 以諸如繪示於圖1I中之方式，候選適體174（或其擴增子）之適體181可經偶合至捕捉引子111，且候選適體之適體182可經偶合至捕捉引子112。可使用橋式擴增或其他適宜的基於表面之擴增程序以諸如繪示於圖1I中之方式產生候選適體（或擴增子）174之擴增子174、174'之簇。請注意，為了簡單起見，圖1I省略第二部分150及標靶160，且任一者可保持在阱中或可經移除，例如藉由將連接子連繫標靶160裂解至部分

130或將連接子裂解部分130裂解至表面。偵測電路190可為例如使用合成定序以諸如此項技術中已知的方式定序經偶合至捕捉引子之擴增子174、174'。例示性地，聚合酶可用於使用標記(例如螢光標記)核苷酸基於各別擴增子174、174'之序列來延伸引子111或112，且偵測電路190可識別其中使用藉由彼等核苷酸之標記產生的信號添加此類核苷酸之序列。經定序的候選適體(或其擴增子174)可被視為針對標靶160之適體，例如，因為此類候選適體已透過多重操作偶合至標靶160，指示針對標靶之選擇性。

【0067】 如上文參考圖1A所述，用於適體選擇程序之標靶可以任何適宜方式，諸如使用捕捉引子偶合於阱中。例如，圖2A至2F示意性地示繪示用於利用定序選擇適體的替代流程之實例設備及操作。在繪示於圖2A中之實例中，該第一部分藉由捕捉引子偶合於該等阱中之各者中，例如，第一部分230經由捕捉引子211偶合至基板210，而第一部分230'經由捕捉引子212偶合至基板210。捕捉引子211及捕捉引子212可彼此正交，例如，捕捉引子211可包含P5引子及捕捉引子212可包含P7引子。可使第一部分230、230'與包含分子140(包括第二部分150及標靶160)之流體以諸如參考圖1A描述之方式接觸。如圖2B中所繪示，第二部分150可變成偶合至第一部分230以便經由捕捉引子211將標靶分子160偶合至基板210(例如於阱中，未具體繪示)，而另一第二部分150可變成偶合至第一部分230'以便經由捕捉引子212將標靶分子160偶合至基板210(例如於相同阱或另一阱中，未具體繪示)。如圖2C中所繪示，對標靶160具有選擇性之候選適體(或其擴增子)174可例如以諸如參考圖1D及1G描述之方式偶合至其。如圖2C中所繪示，可將候選適體174以諸如參考圖1E描述之方式自標靶160去偶合以用於擴增。

【0068】 在一些實例中，第一部分230、230'可為可自捕捉引子211、212分離的。因此，以諸如繪示於圖2E中之方式，第一部分230、230'、第二部分150及標靶160可藉由使第一部分230、230'自其各別捕捉引子211、212分離而自基板210去偶合。例示性地，捕捉引子211、212可包含可裂解部分諸如8-側氧基-G，其可在進行定序之前經裂解以分離第一部分230、230'、及與其偶合之任何元件。例如，如圖2F中所繪示可使候選適體174及其擴增子174'之適體181、181'與各別捕捉引子211雜交，及可使候選適體及其擴增子之適體182、182'與各別捕捉引子212雜交以用於諸如參考圖1H至1I描述般擴增及定序。或者，在諸如提供於本揭示全文中之實例中，標靶160、連接子、第一部分及第二部分中之任何適宜者可包含可使用蛋白酶消化且因此自基板及/或捕捉引子去偶合之蛋白質。

【0069】 應瞭解，與標靶接觸的候選適體可包含任何適宜序列及組分。例如，圖3示意性地繪示用於諸如參考圖1A-1I或2A-2F描述的設備或流程中之實例候選適體。在顯示於圖3中之非限制性實例中，候選適體171、172、173、174各包含潛在地可針對標靶具有選擇性之寡核苷酸子序列(區域)171''、172''、173''、174''、以及經偶合至寡核苷酸子序列之適體181及182。寡核苷酸子序列171''、172''、173''、174''可彼此不同。各適體181可包含可選間隔子300、與捕捉引子111互補的捕捉引子適體311，及若適宜且若此類操作包括在流程中則可用於進行候選適體之PCR擴增之可選PCR適體320。類似地，各適體182可包含可選間隔子300、與捕捉引子112互補的捕捉引子適體312，及若適宜且若此類操作包括在流程中則可用於進行候選適體之PCR擴增之可選PCR適體320。間隔子300可在寡核苷酸子序列171''、172''、173''、174''與捕捉引子適體311或312

之間提供適宜距離使得捕捉引子適體311可不抑制寡核苷酸子序列適宜地偶合至標靶160。例示性地，間隔子300可包含5個或更多個核苷酸、10個或更多個核苷酸或15個或更多個核苷酸。

【0070】 應瞭解，可使用任何適宜系統、方法及組合物基於本教示來選擇適體。例如，圖4示意性地繪示利用定序選擇適體之流程中之實例操作。繪示於圖4中之方法400包括使標靶偶合於經配置於基板中之複數個阱中之各阱中(操作410)。例如，參考圖1A描述之標靶160可例如經由適宜連接子(諸如捕捉引子)以諸如參考圖2A描述之方式直接偶合至各阱中之基板。或，例如，標靶160可經由經偶合至基板之第一部分及經偶合至標靶之第二部分且變成以諸如參考圖1A至1B描述之方式偶合至該第一部分而間接偶合至各阱中的基板。繪示於圖4中之方法400亦包括使該等阱中之各者與包含複數個候選適體之流體接觸(操作420)。例如，該等阱可以諸如參考圖1C描述之方式與適體文庫171、172、173、174接觸，或可以諸如參考圖1F描述之方式與適體174之擴增子接觸。繪示於圖4中之方法400包括於該等阱中之至少一者中，使對標靶具有選擇性之任何候選適體偶合至標靶(操作430)。例如，候選適體174 (或其任何擴增子)可變成以諸如參考圖1D、1G或2C描述之方式偶合至標靶160。繪示於圖4中之方法400包括移除未偶合至標靶之任何候選適體(操作440)。例如，以諸如參考圖1E描述之方式，候選適體171、172、173可藉由使緩衝液流過阱而移除，而候選適體174儘管如此流動仍保持偶合至標靶160。繪示於圖4中之方法400包括於阱中定序在移除之後保留的任何候選適體以識別對標靶具有選擇性的任何適體(操作450)。例如，可產生候選適體174 (或其擴增子)之擴增子，且定序此類擴增子。

另外評價

【0071】 應理解，如本文所述的本揭示之各態樣之任何各別特徵/實例可一起以任何適宜組合實施，及來自任何一或多個此等態樣之任何特徵/實例可與如本文所述的其他態樣之任何特徵一起以任何適宜組合實施以達成如本文所述的益處。

【0072】 雖然上文描述各種例示性實例，但熟習此項技術者當明白，可在其中在不脫離本發明下進行各種變化及修改。隨附申請專利範圍意欲涵蓋落在本發明之真實精神及範疇內的所有此類變化及修改。

【符號說明】

【0073】

100: 設備

110: 基板

111: 第一捕捉引子

112: 第二捕捉引子

121: 阱

122: 阱

123: 阱

124: 阱

130: 第一部分

140: 分子

150: 第二部分

160: 標靶

171: 候選適體

171": 寡核苷酸子序列

172: 候選適體

172": 寡核苷酸子序列

173: 候選適體

173": 寡核苷酸子序列

174: 候選適體

174': 擴增子

174": 寡核苷酸子序列

181: 適體

182: 適體

181': 適體

182': 適體

190: 偵測電路

210: 基板

211: 捕捉引子

212: 捕捉引子

230: 第一部分

230': 第一部分

300: 間隔子

311: 捕捉引子適體

312: 捕捉引子適體

320: PCR適體

400: 方法

410: 操作

420: 操作

430: 操作

440: 操作

450: 操作

【序列表】

<110> 美商宜曼達股份有限公司(ILLUMINA, INC.)

<120> 利用定序選擇適體(APTAMERS)

<140> TW 110147785

<141> 2021-12-20

<150> US 63/128,669

<151> 2020-12-21

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n爲U

<400> 1

aatgatacgg cgaccaccga ganctaac

29

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(22)

<223> G*爲G或8-側氧基鳥嘌呤

<400> 2

caagcagaag acggcatacg anat

24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<400> 3

aatgatacgg cgaccaccga

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成聚核苷酸

<400> 4

caagcagaag acggcatacg a

21

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種自複數個候選適體(*aptamer*)選擇適體之方法，該方法包括：

使標靶偶合於配置於基板中之複數個阱之各阱中；

使各阱與包含複數個候選適體之流體接觸；

於至少一阱中，使對該標靶具有選擇性之任何候選適體偶合至該標靶；

移除未偶合至該標靶之任何候選適體；及

於該等阱中，定序在移除之後保留的任何候選適體以識別對該標靶具有選擇性之任何適體。

【請求項2】

如請求項1之方法，其中使該標靶偶合於該複數個阱之各阱中包括：

使第一部分偶合於各阱中；

使複數個第二部分偶合至該標靶之各別部分；及

使該第二部分偶合至各阱中之該第一部分。

【請求項3】

如請求項2之方法，其中該第一部分包含鏈黴親和素(*streptavidin*)及該第二部分包含生物素。

【請求項4】

如請求項2或3之方法，其中該第一部分係藉由捕捉引子偶合於各阱中。

【請求項5】

如請求項4之方法，該方法包括在進行該定序之前使該第一部分自該

捕捉引子分離。

【請求項6】

如請求項1至3中任一項之方法，其中該基板包含偵測電路，該偵測電路用於定序在移除之後保留的候選適體。

【請求項7】

如請求項1至3中任一項之方法，其中該複數個阱包含流體平行流過的流動池(flow cell)。

【請求項8】

如請求項1至3中任一項之方法，其中對該標靶具有選擇性之任何候選適體具有當偶合至該標靶時變化之三級結構。

【請求項9】

如請求項1至3中任一項之方法，其進一步包括產生對該標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子。

【請求項10】

如請求項9之方法，其中產生對該標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子包括：

使該候選適體自該標靶去偶合；及

使用該候選適體利用聚合酶鏈反應(PCR)以產生該等擴增子。

【請求項11】

如請求項10之方法，其中該PCR係在不同於該等阱之擴增腔室中進行。

【請求項12】

如請求項9之方法，該方法進一步包括：

使各阱與包含該等擴增子之流體接觸；

於各阱中，使該對標靶具有選擇性之任何擴增子偶合至該標靶；及
移除未偶合至該標靶之任何擴增子。

【請求項13】

如請求項12之方法，其中經定序之任何候選適體包含在移除未偶合至該標靶之任何擴增子之後保留的任何擴增子。

【請求項14】

如請求項12之方法，該方法進一步包括產生對該標靶具有選擇性之任何擴增子之另外擴增子。

【請求項15】

如請求項1至3中任一項之方法，其中定序任何候選適體包括：

使在移除之後保留的任何候選適體偶合至配置於該等阱中之捕捉引子；

於該等阱中進行擴增以產生偶合至該等捕捉引子之擴增子；及

定序經偶合至該等捕捉引子之該等擴增子。

【請求項16】

如請求項15之方法，其中該標靶係經由各別捕捉引子偶合於該等阱中。

【請求項17】

如請求項16之方法，其中該等捕捉引子將第一部分偶合於該等阱中，且將第二部分偶合至該第一部分及偶合至該等阱中之標靶。

【請求項18】

如請求項15之方法，其中該等捕捉引子係與該標靶分開地偶合至該

阱。

【請求項19】

如請求項15之方法，其中各候選適體包含與各別捕捉引子互補的第一及第二適體。

【請求項20】

如請求項19之方法，其中各候選適體進一步包含第一間隔子經配置於該第一適體與對該標靶具有選擇性之候選區域之間，及第二間隔子經配置於該第二適體與對該標靶具有選擇性之候選區域之間。

【請求項21】

如請求項1至3中任一項之方法，其中各候選適體包含寡核苷酸。

【請求項22】

一種用於從複數個候選適體選擇適體之系統，該系統包括：

包含複數個阱之基板；

經偶合於各阱中之標靶；

包含複數個候選適體且接觸各阱之流體，其中對該標靶具有選擇性之任何候選適體偶合至該標靶；及

於該等阱中定序任何候選適體以識別對該標靶具有選擇性之任何適體之偵測電路。

【請求項23】

如請求項22之系統，其中：

第一部分係偶合於各阱中；

複數個第二部分係偶合至各別標靶；且

該第二部分係偶合至各阱中之該第一部分以將標靶偶合於各阱中。

【請求項24】

如請求項23之系統，其中該第一部分包含鏈黴親和素及該第二部分包含生物素。

【請求項25】

如請求項23或24之系統，其中該第一部分係藉由捕捉引子偶合於各阱中。

【請求項26】

如請求項25之系統，其中該第一部分可自該捕捉引子分離。

【請求項27】

如請求項22至24中任一項之系統，其中該複數個阱係配置於該偵測電路上。

【請求項28】

如請求項22至24中任一項之系統，其中該複數個阱包含流體平行流過的流動池。

【請求項29】

如請求項22至24中任一項之系統，其中對該標靶具有選擇性之任何候選適體具有當偶合至該標靶時變化之三級結構。

【請求項30】

如請求項22至24中任一項之系統，其中產生對該標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子。

【請求項31】

如請求項30之系統，其中使用包含以下之步驟產生對該標靶具有選擇性之任何候選適體之擴增子：

使該候選適體自該標靶去偶合；及

使用該候選適體利用聚合酶鏈反應(PCR)以產生擴增子。

【請求項32】

如請求項31之系統，其包括擴增腔室，該擴增腔室不同於該等阱以進行該PCR。

【請求項33】

如請求項30之系統，其進一步包含：

流體，其包含該等擴增子且接觸各阱，其中對該標靶具有選擇性之任何擴增子偶合至該標靶。

【請求項34】

如請求項33之系統，其中經定序之任何候選適體包含在移除未偶合至該標靶的任何擴增子之後保留的任何擴增子。

【請求項35】

如請求項34之系統，其進一步包含對該標靶具有選擇性之任何擴增子之另外擴增子。

【請求項36】

如請求項22至24中任一項之系統，其進一步包含：

經配置於該等阱中且偶合至在移除之後保留的任何候選適體之捕捉引子；及

偶合至該等捕捉引子之候選適體之擴增子，

其中該偵測電路係定序經偶合至該等捕捉引子之擴增子。

【請求項37】

如請求項36之系統，其中該標靶係經由各別捕捉引子偶合於該等阱

中。

【請求項38】

如請求項37之系統，其中該等捕捉引子將第一部分偶合於該等阱中，且將第二部分偶合至該第一部分及偶合至該等阱中之標靶。

【請求項39】

如請求項36之系統，其中該等捕捉引子係與該標靶分開地偶合至該阱。

【請求項40】

如請求項36之系統，其中各候選適體包含與各別捕捉引子互補的第一及第二適體。

【請求項41】

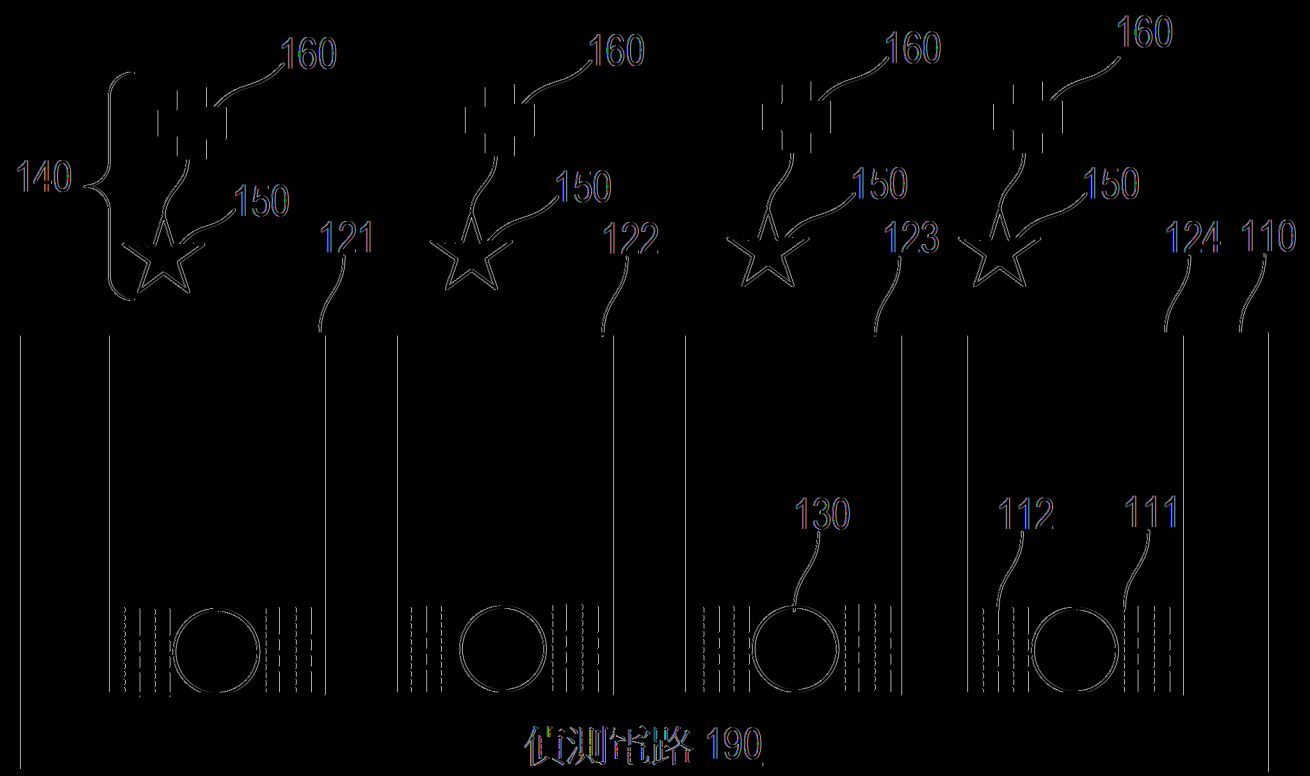
如請求項40之系統，其中各候選適體進一步包含第一間隔子經配置於該第一適體與對該標靶具有選擇性之候選區域之間，及第二間隔子經配置於該第二適體與對該標靶具有選擇性之候選區域之間。

【請求項42】

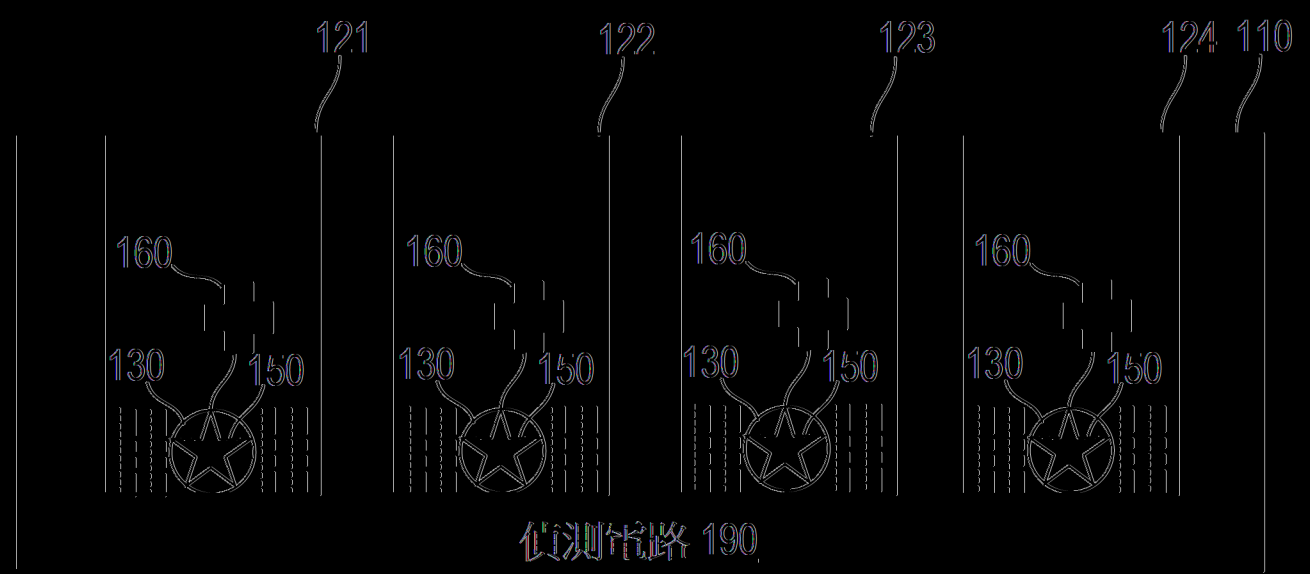
如請求項22至24中任一項之系統，其中各候選適體包含寡核苷酸。

(發明圖式)

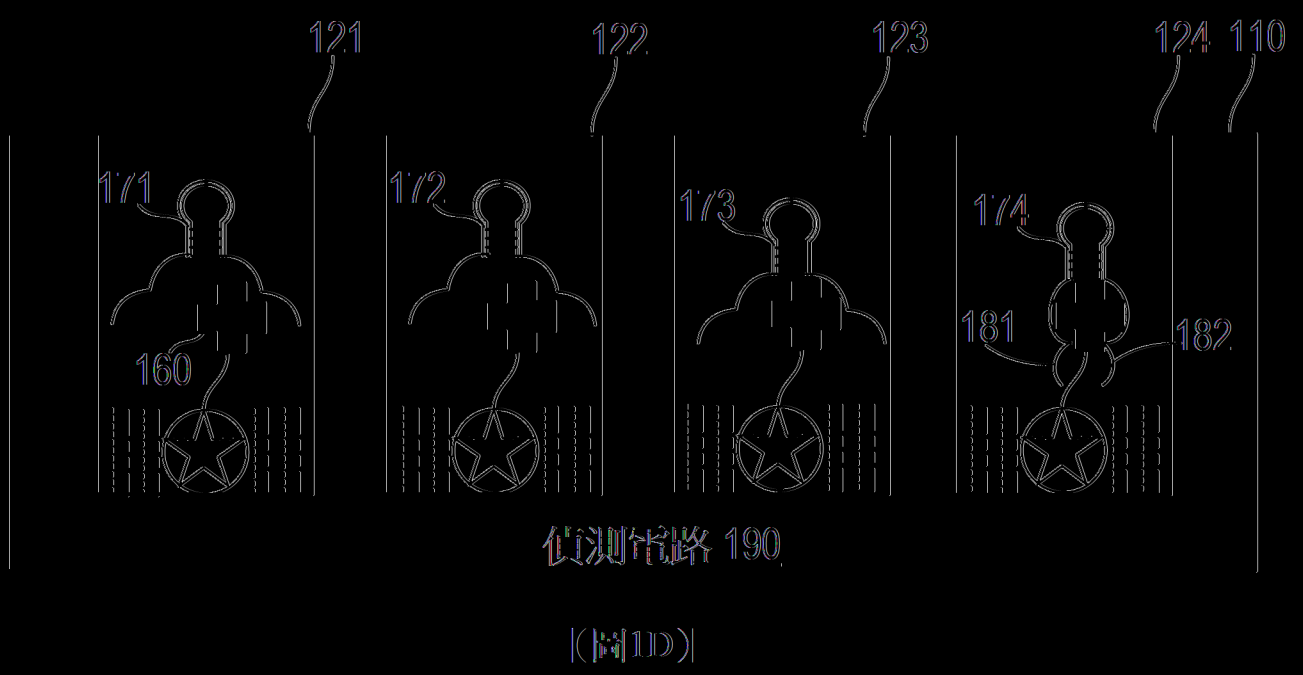
100

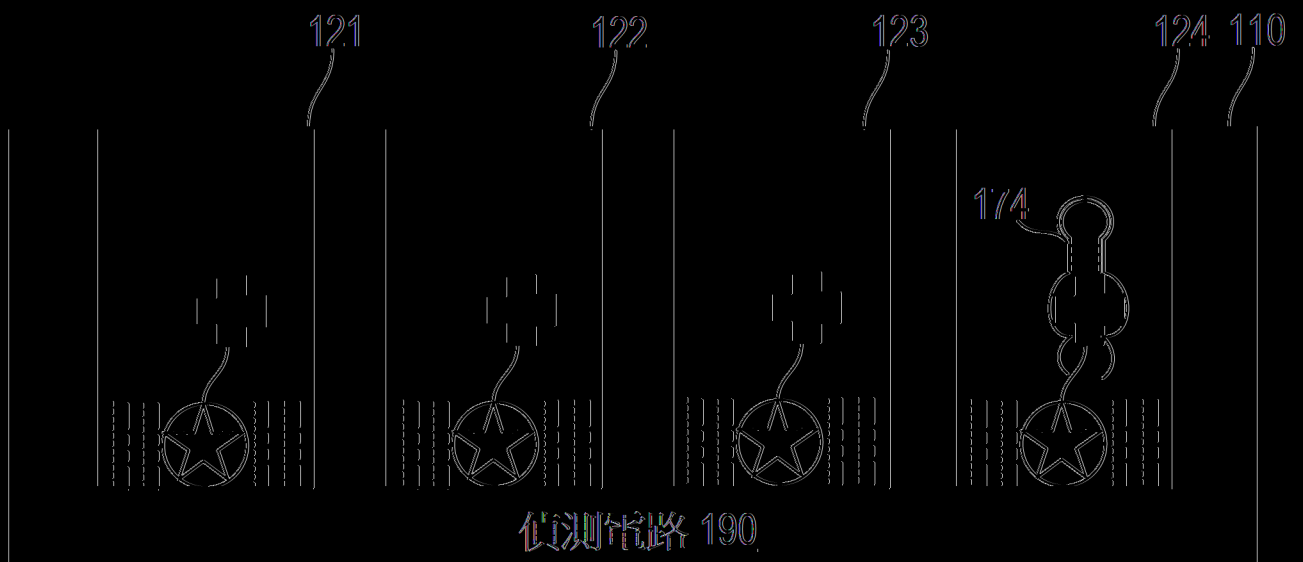


偵測電路 190
[圖1A]



偵測電路 190
[圖1B]





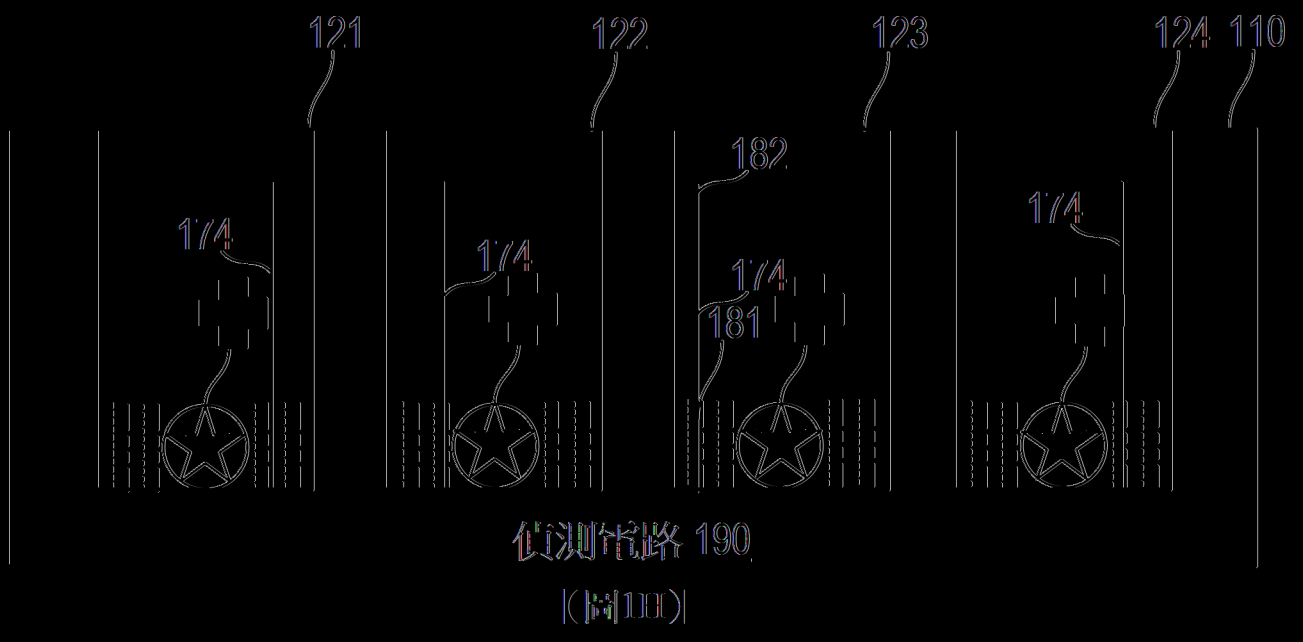
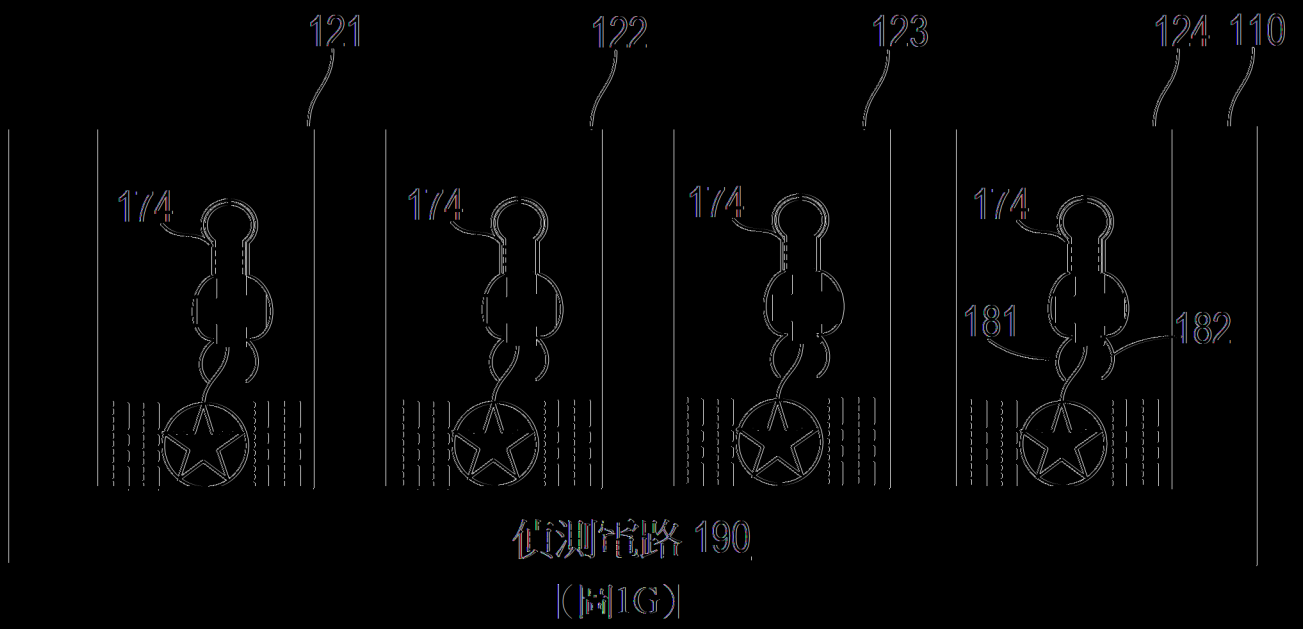
偵測電路 190

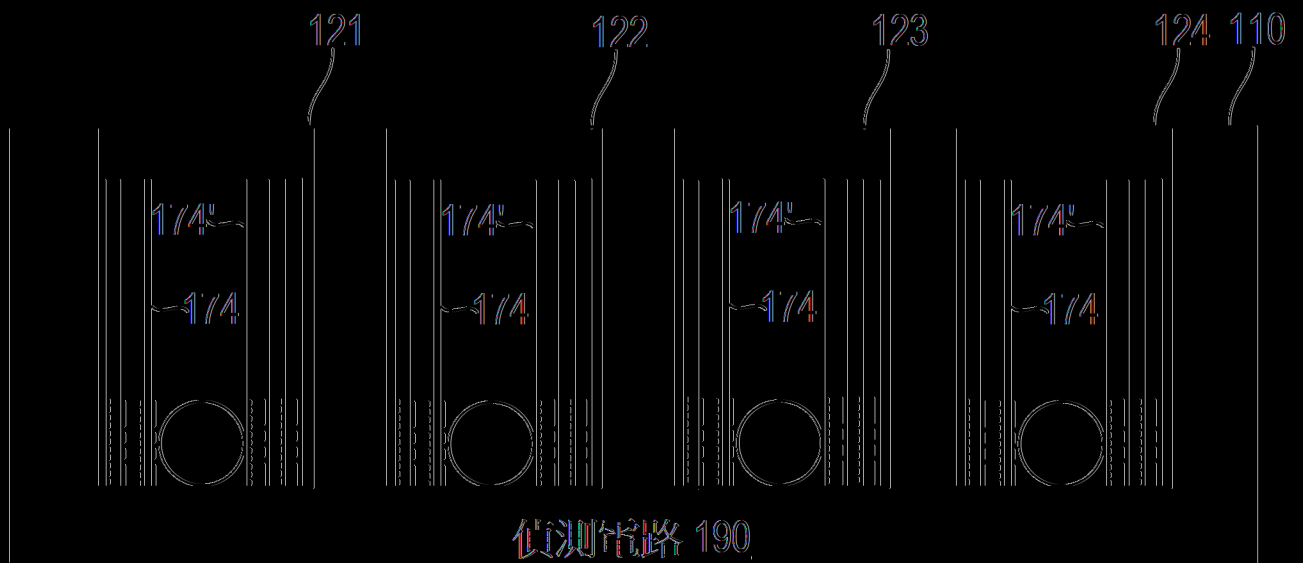
(圖10)



偵測電路 190

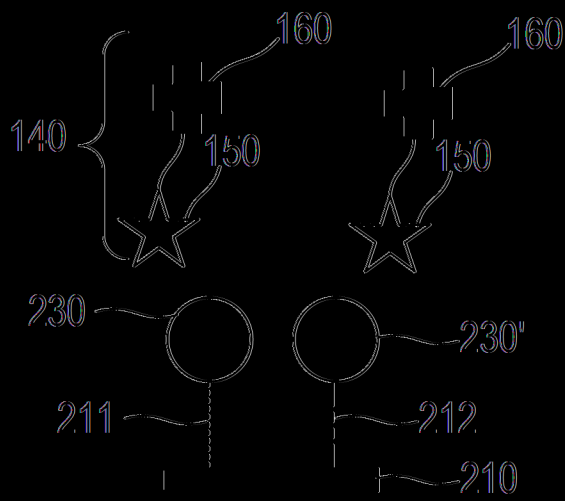
(圖11)



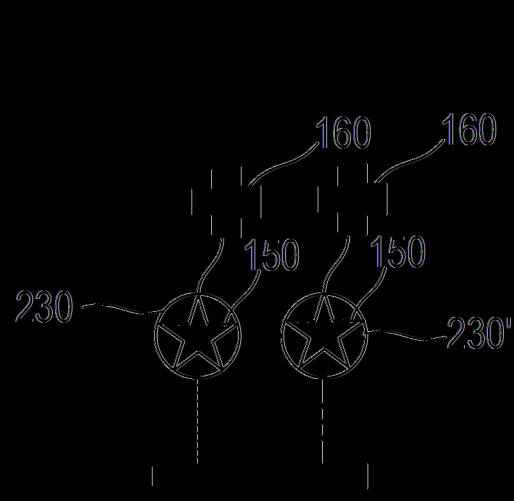


偵測電路 190

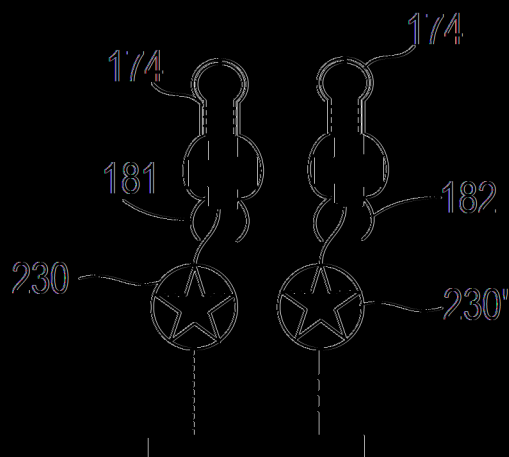
(圖10)



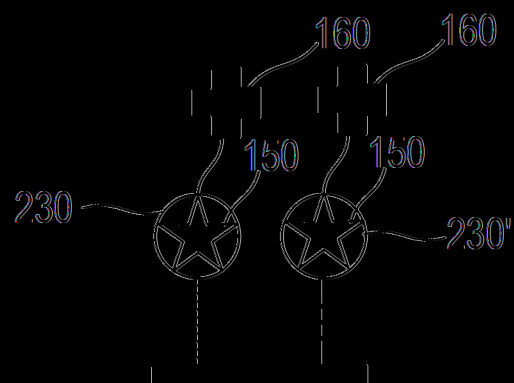
(圖2A)



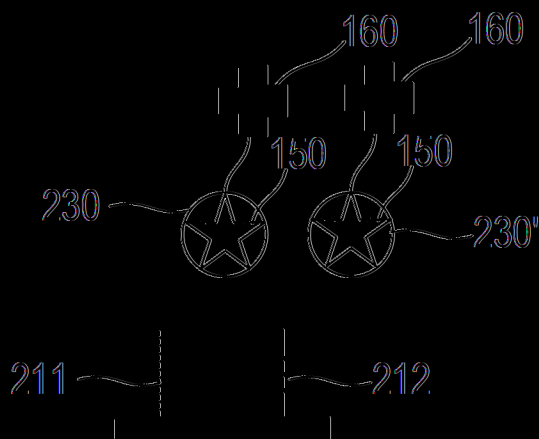
(圖2B)



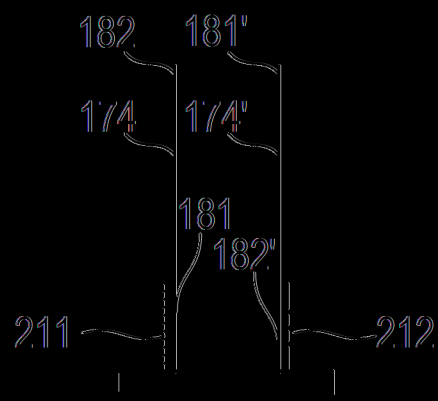
(圖2C)



(圖2D)

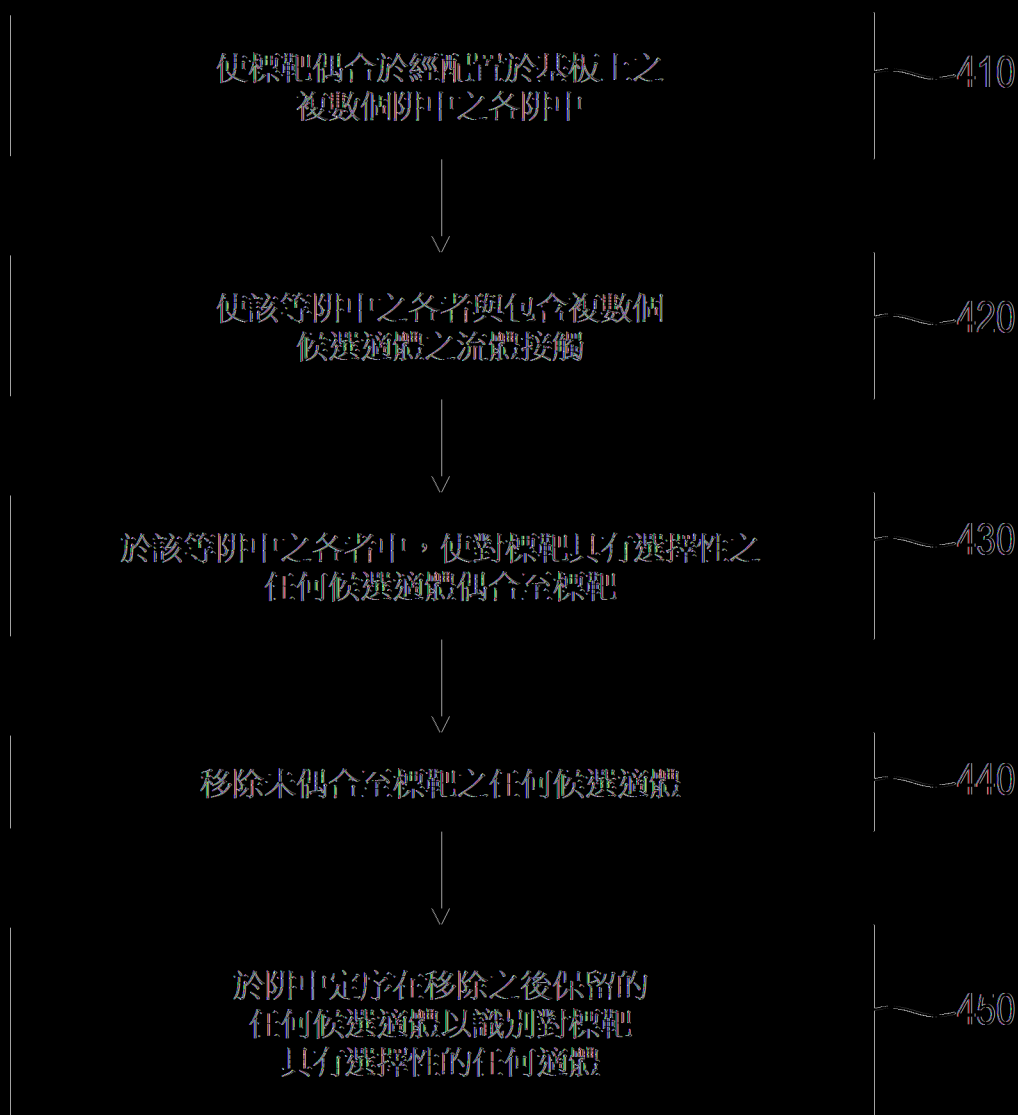


(圖2E)



(圖2F)

400



(圖4)