



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0069047
(43) 공개일자 2023년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12Q 1/6844 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-7045843
(22) 출원일자(국제) 2021년08월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년12월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/048064
(87) 국제공개번호 WO 2022/055729
국제공개일자 2022년03월17일
(30) 우선권주장
63/077,857 2020년09월14일 미국(US)

(71) 출원인
일루미나, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
일루미나 케임브리지 리미티드
영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크
(72) 발명자
피셔, 제프리
미국 캘리포니아 92122 샌디에고 일루미나 웨이 5200
베틀리, 제이슨
영국 케임브리지 씨비21 6디에프 그렛 애빙턴 19 그랜타 파크
(74) 대리인
특허법인 광장리앤코

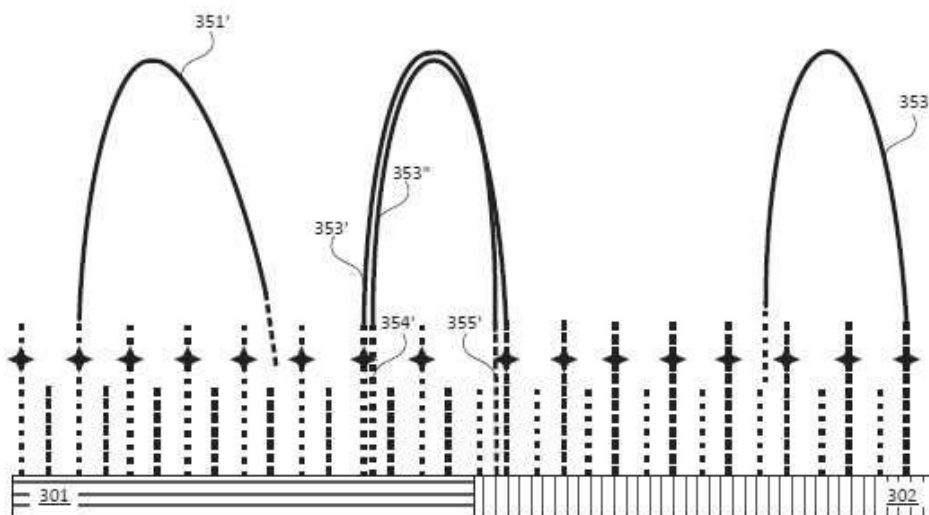
전체 청구항 수 : 총 68 항

(54) 발명의 명칭 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기판을 포함하는, 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 조성물이 제공된다. 복수의 제1 포획 프라이머가 기판의 제1 영역에 결합된다. 복수의 제2 포획 프라이머는 기판의 제2 영역에 결합된다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 더 길다. 복수의 제1 직교 포획 프라이머가 기판의 제1 영역에 결합된다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머가 기판의 제2 영역에 결합된다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧다.

대표도 - 도3f



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6869 (2018.05)

C12Q 2525/186 (2019.08)

C12Q 2525/191 (2013.01)

C12Q 2525/204 (2013.01)

C12Q 2527/107 (2019.08)

C12Q 2565/543 (2019.08)

명세서

청구범위

청구항 1

폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 조성물로서,

제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머;

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머로서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 더 긴, 상기 복수의 제2 포획 프라이머;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머; 및

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머로서, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧은, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머를 포함하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유체를 추가로 포함하되, 각각의 표적 폴리뉴클레오티드는 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함하는, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧고, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 짧음, 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머에 혼성화되거나, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머들 중 제1 포획 프라이머에 혼성화되는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터와 상기 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖는, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제1 앰플리콘을 추가로 포함하고, 상기 제1 앰플리콘은 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화되는 제2 어댑터를 갖는, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제2 앰플리콘을 추가로 포함하되, 상기 제2 앰플리콘은 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화되는 제1 어댑터를 갖는, 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제3 앰플리콘을 추가로 포함하되, 상기 제3 앰플리콘은 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 임의의 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없는 제2 어댑터를 갖는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 제2 어댑터의 상기 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 상기 제3 앰플리콘의 증폭을 억제하는, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제3 앰플리콘의 제2 어댑터와 상기 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머 사이의 임의의 부분 이중체는 약 20°C 미만의 용융 온도(T_m)를 갖는, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제4 앰플리콘을 추가로 포함하되, 상기 제4 앰플리콘은 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없는 제1 어댑터를 갖는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제1 어댑터의 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 상기 제4 앰플리콘의 증폭을 억제하는, 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머인, 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 단축된 P5 포획 프라이머이고, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 단축된 P7 포획 프라이머인, 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 짧고, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 짧은, 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역에 인접하는, 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역을 둘러싸는, 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제2 영역은 상기 기관의 제1 영역을 둘러싸는, 조성물.

청구항 21

폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 조성물로서,

제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머;

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머;

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머;

상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 결합된 복수의 제1 제거가능한 차단기, 및

상기 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 결합된 복수의 제2 제거가능한 차단기를 포함하는, 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유체를 추가로 포함하되, 각각의 표적 폴리뉴클레오티드는 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함하는, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이고, 상기 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 조성물.

청구항 24

제22항 또는 제23항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되거나, 상기 표적 폴리뉴클레오티드들 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되는, 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터와 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖거나, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터와 상기 직교 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖는, 조성물.

청구항 26

제22항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되거나, 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되는, 조성물.

나에 혼성화되는, 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 포획 프라이머 중 하나에 결합된 상기 제거가능한 차단기는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제하거나, 상기 직교 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제하는, 조성물.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 앰플리콘을 추가로 포함하되, 상기 앰플리콘은 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제2 어댑터를 갖는, 조성물.

청구항 29

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 앰플리콘을 추가로 포함하되, 상기 앰플리콘은 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제1 어댑터를 갖는, 조성물.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머인, 조성물.

청구항 31

제21항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 조성물.

청구항 32

제21항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 조성물.

청구항 33

제21항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역에 인접하는, 조성물.

청구항 34

제21항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 상기 제2 영역을 둘러싸는, 조성물.

청구항 35

제21항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제2 영역은 상기 기관의 제1 영역을 둘러싸는, 조성물.

청구항 36

폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 방법으로서,

조성물을 유체와 접촉시키는 단계로서, 상기 조성물이

제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머;

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머로서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이

머는 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 더 긴, 상기 복수의 제2 포획 프라이머;

상기 기관의 상기 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머; 및

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머로서, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧은, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머를 포함하고,

상기 유체는,

표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 각각의 표적 폴리뉴클레오타이드는 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함하는, 상기 접촉 단계;

상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터를 상기 복수의 제1 또는 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화시키는 단계, 또는 상기 표적 뉴클레오타이드 중 제1 표적 뉴클레오타이드의 제2 어댑터를 상기 복수의 제1 또는 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화시키는 단계, 및 그 후,

상기 표적 폴리뉴클레오타이드들 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계 -상기 증폭 단계는 상기 표적 폴리뉴클레오타이드들 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함-를 포함하는, 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧고, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 짧은, 방법.

청구항 38

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터와 상기 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과의 용융 온도 (T_m)를 갖는, 방법.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 앰플리콘은 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화되는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 탈혼성화시킨 후, 상기 앰플리콘을 증폭시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 41

제36항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 앰플리콘을 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 단계, 및 상기 제1 앰플리콘의 제2 어댑터를 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

제36항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 앰플리콘을 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 단계, 및 상기 제2 앰플리콘의 제1 어댑터를 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 43

제36항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 앰플리콘을 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 단계를 추가로 포함하되, 상기 제3 앰플리콘의 제2 어댑터를 상기 복수의

제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 완전히 혼성화할 수 없는, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 제2 어댑터의 상기 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 상기 제3 앰플리콘의 증폭을 억제하는, 방법.

청구항 45

제36항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 앰플리콘의 제2 어댑터와 상기 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머 사이의 임의의 부분 이중체는 약 20°C 미만의 용융 온도(T_m)를 갖는, 방법.

청구항 46

제36항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 제4 앰플리콘을 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 단계를 추가로 포함하되, 상기 제4 앰플리콘의 제1 어댑터는 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 제1 어댑터의 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 상기 제4 앰플리콘의 증폭을 억제하는, 방법.

청구항 48

제36항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머인, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 단축된 P5 포획 프라이머이고, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 단축된 P7 포획 프라이머인, 방법.

청구항 50

제36항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 짧고, 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 짧은, 방법.

청구항 51

제36항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 방법.

청구항 52

제36항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 방법.

청구항 53

제36항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역에 인접한, 방법.

청구항 54

제36항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역을 둘러싸는, 방법.

청구항 55

제36항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제2 영역은 상기 기관의 제1 영역을 둘러싸는, 방법.

청구항 56

폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 방법으로서,

조성물을 유체와 접촉시키는 단계로서, 상기 조성물이

제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머;

상기 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머;

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머;

상기 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머;

상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 결합된 복수의 제1 제거가능한 차단기, 및

상기 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 결합된 복수의 제2 제거가능한 차단기를 포함하고,

상기 유체는 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함하되, 각각의 상기 표적 폴리뉴클레오타이드는 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함하는, 상기 접촉 단계;

상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터를 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머에 혼성화하는 단계, 또는

상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터를 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 제1 포획 프라이머에 혼성화하는 단계;

상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계-상기 증폭 단계는 상기 기관의 제1 영역에서 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함-;

복수의 제1 및 제2 제거가능한 차단기를 제거하는 단계; 및 이어서

상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 추가로 증폭시키는 단계-상기 증폭 단계는 상기 기관의 제2 영역에서 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 추가 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함-를 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이고, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 방법.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터와 상기 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과의 용융 온도(T_m)를 갖거나, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터와 상기 직교 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과의 용융 온도(T_m)를 갖는, 방법.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 상기 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되거나, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되는, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 상기 포획 프라이머 중 하나에 결합된 상기 제거가능한 차단기는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제하거나, 상기 직교 포획 프라이머 중 하나에 결합된 상기 제거가능한 차단기는 상기 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제하는, 방법.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 더 포함하되, 상기 앰플리콘은 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제2 어댑터를 갖는, 방법.

청구항 62

제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 추가로 포함하되, 상기 앰플리콘은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제1 어댑터를 갖는, 방법.

청구항 63

제56항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 상기 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머인, 방법.

청구항 64

제56항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 방법.

청구항 65

제56항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 상기 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이인, 방법.

청구항 66

제56항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역에 인접하는, 방법.

청구항 67

제56항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제1 영역은 상기 기관의 제2 영역을 둘러싸는, 방법.

청구항 68

제56항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기관의 제2 영역은 상기 기관의 제1 영역을 둘러싸는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 9월 14일자로 출원되고 발명의 명칭이 "폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 조성물 및 방법"인 미국 가특허 출원 제63/077,857호의 이익을 주장하며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 서식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된다. 2021년 8월 26일자로 생성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 IP-1997-PCT SL.txt이며, 크기는 2,300 바이트이다.

배경 기술

[0005] 클러스터 증폭은, 예를 들어, 유전자 서열분석에 사용하기 위해 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 접근법이다. 표적 폴리뉴클레오티드는 플로우셀에서 기관 표면에 결합된 프라이머(예를 들어, P5 및 P7 프라이머)에 의해 포획되고, 표면 상의 무작위 위치에서 "시드"를 형성한다. 각각의 시드 주위의 표면 상에 클러스터를 형성하기 위해 증폭 사이클이 수행된다. 클러스터는 시드 폴리뉴클레오티드의 카피 및 상보적 카피를 포함한다. 일부 상황에서, 기관은 각각의 클러스터로 충전될 수 있는 웰과 같은 상이한 클러스터가 결합하는 영역을 정의하도록 패턴화된다.

발명의 내용

[0006] 본원에 제공된 예는 폴리뉴클레오티드의 증폭에 관한 것이다. 이러한 증폭을 수행하기 위한 조성물 및 방법이 개시된다.

[0007] 일부 실시예에서, 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 조성물이 제공된다. 조성물은 제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관; 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머; 및 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 길 수 있다. 조성물은 또한 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머; 및 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧을 수 있다.

[0008] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머에 혼성화되거나; 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 제1 포획 프라이머에 혼성화된다. 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터와, 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과의 용융 온도(T_m)를 갖는다.

[0009] 일부 실시예에서, 조성물은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제1 앰플리콘을 추가로 포함하되, 제1 앰플리콘은 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제2 어댑터를 갖는다.

[0010] 일부 실시예에서, 조성물은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제2 앰플리콘을 추가로 포함하되, 제2 앰플리콘은 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제1 어댑터를 갖는다.

[0011] 일부 실시예에서, 조성물은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제3 앰플리콘을 추가로 포함하되, 제3 앰플리콘은 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없는 제2 어댑터를 갖는다. 제2 어댑터의 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은, 일부 실시예에서, 제3 앰플리콘의 증폭을 억제할 수 있다. 일부 실시예에서, 제3 앰플리콘의 제2 어댑터와 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머 사이의 임의의 부분 이중체는 약 20°C 미만의 용융 온도(T_m)를 갖는다.

[0012] 일부 실시예에서, 조성물은 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 제4 앰플리콘을 추가로 포함하되, 제4 앰플리콘은 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 임의의 직교 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없는 제1 어댑터를 갖는다. 일부 실시예에서, 제1 어댑터의 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 제4 앰플리콘의 증폭을 억제한다.

[0013] 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머이다. 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 단축된 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 단축된 P7 포획 프라이머이다.

[0014] 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 더 짧고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 더 짧다.

[0015] 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이

머와 대략 동일한 길이이다. 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다.

- [0016] 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역에 인접한다. 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역을 둘러싼다. 일부 실시예에서, 기관의 제2 영역은 기관의 제1 영역을 둘러싼다.
- [0017] 일부 실시예에서, 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 또 다른 조성물이 제공된다. 조성물은 제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관; 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머; 및 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 조성물은 또한 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머; 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머; 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 결합된 복수의 제1 제거가능한 차단기, 및 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 결합된 복수의 제2 제거가능한 차단기를 포함할 수 있다.
- [0018] 일부 실시예에서, 조성물은 표적 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유체를 추가로 포함하되, 각각의 표적 폴리뉴클레오티드는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함한다. 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이고, 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다.
- [0019] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되거나, 표적 폴리뉴클레오티드들 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화된다. 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터와 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖거나, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터와 직교 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖는다.
- [0020] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터는 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되거나, 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화된다. 일부 실시예에서, 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제하거나, 직교 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 표적 폴리뉴클레오티드 중 제2 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제한다.
- [0021] 일부 실시예에서, 조성물은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 앰플리콘을 추가로 포함하되, 앰플리콘은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제2 어댑터를 갖는다.
- [0022] 일부 실시예에서, 조성물은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합된 앰플리콘을 추가로 포함하되, 앰플리콘은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제1 어댑터를 갖는다.
- [0023] 일부 실시예에서, 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머이다.
- [0024] 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다. 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다.
- [0025] 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역에 인접한다. 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역을 둘러싼다. 일부 실시예에서, 기관의 제2 영역은 기관의 제1 영역을 둘러싼다.
- [0026] 일부 실시예에서, 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 방법이 제공된다. 방법은 조성물을 유체와 접촉시키는 단계를 포함한다. 조성물은 제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관; 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 포획 프라이머; 및 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 길 수 있다. 조성물은 또한 기관의 제1 영

역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머; 및 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧을 수 있다. 유체는 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있되, 각각의 표적 폴리뉴클레오타이드는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함한다. 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터를 복수의 제1 또는 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 혼성화하는 단계, 또는 그 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터를 복수의 제1 또는 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 혼성화하는 단계; 및, 이어서, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 포함할 수 있되, 증폭 단계는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함한다.

[0027] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧고, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 짧다.

[0028] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터와 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과의 용융 온도(T_m)를 갖는다. 일부 실시예에서, 앰플리콘은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화된다. 일부 실시예에서, 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 탈혼성화시킨 후 앰플리콘을 증폭시키는 단계를 포함한다.

[0029] 일부 실시예에서, 방법은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 제1 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계, 및 제1 앰플리콘의 제2 어댑터를 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화하는 단계를 포함한다.

[0030] 일부 실시예에서, 방법은 제2 앰플리콘을 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 단계, 및 제2 앰플리콘의 제1 어댑터를 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화하는 단계를 포함한다.

[0031] 일부 실시예에서, 방법은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 제3 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 포함하되, 제3 앰플리콘의 제2 어댑터는 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없다. 일부 실시예에서, 제2 어댑터의 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 제3 앰플리콘의 증폭을 억제한다. 일부 실시예에서, 제3 앰플리콘의 제2 어댑터와 복수의 제1 포획 프라이머 중 임의의 포획 프라이머 사이의 임의의 부분 이중체는 약 20°C 미만의 용융 온도(T_m)를 갖는다.

[0032] 일부 실시예에서, 방법은 제4 앰플리콘을 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 단계를 포함하되, 제4 앰플리콘의 제1 어댑터는 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 완전히 혼성화될 수 없다. 일부 실시예에서, 제1 어댑터의 복수의 제2 직교 포획 프라이머 중 임의의 직교 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 제4 앰플리콘의 증폭을 억제한다.

[0033] 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머이다. 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 단축된 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 단축된 P7 포획 프라이머이다. 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 더 짧고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 적어도 5개의 염기가 더 짧다. 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다. 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다.

[0034] 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역에 인접한다. 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역을 둘러싼다. 일부 실시예에서, 기관의 제2 영역은 기관의 제1 영역을 둘러싼다.

[0035] 일부 실시예에서, 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 또 다른 방법이 제공된다. 이러한 방법은 조성물을 유체와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 조성물은 제1 영역 및 제2 영역을 포함하는 기관; 기관의 제1 영역에 결합

된 복수의 제1 포획 프라이머; 및 기관의 제1 영역에 결합된 복수의 제1 직교 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 조성물은 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 포획 프라이머; 기관의 제2 영역에 결합된 복수의 제2 직교 포획 프라이머; 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 결합된 복수의 제1 제거가능한 차단기, 및 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 결합된 복수의 제2 제거가능한 차단기를 포함할 수 있다. 유체는 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있되, 각각의 표적 폴리뉴클레오타이드는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터를 포함한다. 이러한 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터를 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 제1 직교 포획 프라이머에 혼성화하는 단계, 또는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터를 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머들 중 제1 포획 프라이머에 혼성화하는 단계를 포함할 수 있다. 방법은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 포함할 수 있되, 증폭 단계는 기관의 제1 영역에서 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함한다. 방법은 복수의 제1 및 제2 제거가능한 차단기를 제거하는 단계; 및 다음으로 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 추가로 증폭시키는 단계를 포함할 수 있으며, 증폭 단계는 기관의 제2 영역에서 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 추가적인 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함한다.

[0036] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이고, 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다.

[0037] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터와 포획 프라이머 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖거나, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터와 직교 포획 프라이머들 중 하나 사이의 혼성화로부터 형성된 이중체는 약 40°C 초과 용융 온도(T_m)를 갖는다.

[0038] 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화되거나, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화된다. 일부 실시예에서, 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 억제하거나, 직교 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 억제한다.

[0039] 일부 실시예에서, 방법은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 추가로 포함하되, 앰플리콘은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제2 어댑터를 갖는다.

[0040] 일부 실시예에서, 방법은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 추가로 포함하되, 앰플리콘은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화된 제1 어댑터를 갖는다.

[0041] 일부 실시예에서, 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 P7 포획 프라이머이다. 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다. 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머와 대략 동일한 길이이다.

[0042] 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역에 인접한다. 일부 실시예에서, 기관의 제1 영역은 기관의 제2 영역을 둘러싼다. 일부 실시예에서, 기관의 제2 영역은 기관의 제1 영역을 둘러싼다.

[0043] 본 명세서에서 설명되는 바와 같은 본 개시의 양태 각각의 임의의 각각의 특징부/에는 본 명세서에서 설명된 바와 같은 결과를 달성하기 위해 임의의 적절한 조합으로 함께 구현될 수 있고, 이러한 양태들 중 임의의 하나 이상으로부터의 임의의 특징부/에는 여기에서 설명된 바와 같은 이점을 달성하기 위해 임의의 조합으로 본 명세서에서 설명된 바와 같은 다른 양태(들)의 임의의 특징부와 함께 구현될 수 있음을 이해할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044]

도 1a 내지 도 1c는 기관 상에서 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 예를 개략적으로 도시한다.

도 2a 내지 도 2d는 기관 상에서 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 추가적인 예를 개략적으로 도시한다.

도 3a 내지 도 3j는 제1 및 제2 기관 영역에서 상이한 길이의 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 공정 흐름에서의 예시적인 조성물 및 작업을 개략적으로 도시한다.

도 4a 내지 도 4i는 제1 기관 영역에서 비차단된 프라이머 및 제2 기관 영역에서 제거 가능하게 차단된 프라이머를 사용하는 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 공정 흐름에서의 예시적인 조성물 및 작업을 개략적으로 도시한다.

도 5a 내지 도 5d는 제1 및 제2 기관 영역에서 상이한 길이의 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 데 사용하기 위한 추가의 예시적인 조성물을 개략적으로 도시하고 있다.

도 6a 내지 도 6d는 제1 기관 영역에서 비차단된 프라이머 및 제2 기관 영역에서 제거가능하게 차단된 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는데 사용하기 위한 추가의 예시적인 조성물을 개략적으로 도시한다.

도 7은 제1 및 제2 기관 영역에서 상이한 길이의 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 방법에서 작업의 예시적인 흐름을 도시한다.

도 8은 제1 기관 영역에서 비차단된 프라이머 및 제2 기관 영역에서 제거가능하게 차단된 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 방법에서 작업의 예시적인 흐름을 도시한다.

도 9는 증폭 효율에 대한 포획 프라이머 길이의 효과를 특성화하기 위한 용액-기반 모델 조성물을 개략적으로 도시한다.

도 10은 상이한 길이의 포획 프라이머를 이용한 증폭으로부터 생성된 형광 강도를 보여주는 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

본원에 제공된 예는 폴리뉴클레오티드의 증폭에 관한 것이다. 이러한 증폭을 수행하기 위한 조성물 및 방법이 개시된다.

[0046]

표적 폴리뉴클레오티드(들)의 증폭으로부터 생성되는 클러스터의 단일클론성은 그 클러스터의 표적 폴리뉴클레오티드(들)가, 예를 들어 합성에 의한 서열분석(SBS)을 사용하여 후속적으로 서열분석될 수 있는 용이성에 영향을 미칠 수 있다. 서로 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 "단일클론"인 것으로 간주되는 반면, 상이한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 "다중클론"으로 간주된다. 클러스터의 단일클론성이 클수록-즉, 그 클러스터에서 서로 동일한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드의 수가 많을수록- 그 클러스터 내의 폴리뉴클레오티드의 양상 불로부터의 신호가 SBS를 사용하여 가장 큰 수의 애플리콘을 갖는 폴리뉴클레오티드를 올바르게 서열분석하기에 충분할 가능성이 더 커진다. 클러스터가 다중클론일 수 있더라도, 폴리뉴클레오티드가 올바르게 서열분석되기에 충분한 갯수의 동일한 폴리뉴클레오티드의 애플리콘을 갖는 클러스터는 "기능적 단일클론"인 것으로 간주된다. 예시적으로, 약 60% 이상의 SBS 신호가 특정 폴리뉴클레오티드의 애플리콘으로부터 유래하고, 하나 이상의 다른 폴리뉴클레오티드의 애플리콘으로부터 약 40% 이하의 SBS 신호가 유래하는 클러스터는 기능적으로 단일클론일 수 있으며, 따라서 SBS를 사용하여 정확하게 서열분석될 수 있다. 일부 실시예에서, SBS 신호의 양은 폴리뉴클레오티드의 양과 대략 선형이 되는 규모이고, 이처럼 약 60% 이상의 특정 폴리뉴클레오티드의 애플리콘 및 약 40% 이하의 하나 이상의 다른 폴리뉴클레오티드의 애플리콘을 갖는 클러스터는 기능적으로 단일클론일 수 있다.

[0047]

주어진 클러스터가 단일클론인 정도는 다수의 인자와 관련될 수 있다. 예를 들어, 도 1a 내지 도 1c는 기관 상에서 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 예를 개략적으로 도시한다. 도 1a에 도시된 바와 같이, 기관 영역(101) 상 단일 시드(111) 포획 및 증폭은 기관 영역을 채울 수 있고 SBS에 용이하게 사용될 수 있는 단일클론 클러스터(121)를 생성할 수 있다(점선 및 점선 원은 시간에 따른 클러스터의 확장을 나타내도록 의도됨). 비교하면, 도 1b에 도시된 바와 같이, 기관 영역(101)상 2개의 시드(112, 113)의 포획 및 증폭은 시드(112)의 증폭으로부터 생긴 제1 영역(122) 및 시드(113)의 증폭으로부터 생긴 제2 영역(123)을 갖는 다중클론 클러스터를 생성할 수 있다. 이 예시에서, 클러스터가 다중클론인 정도는 클러스터가 SBS에 유용할 수 있을 만큼 충분히 낮을 수 있다. 예를 들어, 기관 영역(101)으로부터의 신호의 약 60% 이상은 제1 영역(122) 내 시드(112)의 애플리콘으로부터 유래될 수 있고, 기관 영역(101)으로부터의 신호의 약 40% 이하의 제2 영역(123) 내 시드(113)의 애플리콘으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 기관 영역(101)의 약 60% 이상은 제1 영역(122) 내 시드(112)의 애플리콘

리콘에 의해 커버될 수 있고, 기관 영역(101)의 약 40% 이하는 제2 영역(123) 내 시드(113)의 앰플리콘에 의해 커버될 수 있다. 이처럼 다중클론 클러스터(122, 123)는 기능적으로 단일클론일 수 있다.

[0048] 그러나, 기관 상의 상이한 시드의 상대적 위치는 클러스터가 다중클론인 정도와 클러스터가 SBS에 사용될 수 있는 정도에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 도 1c에 도시된 바와 같이, 기관 영역(101) 상 2개의 시드(114, 115)의 캡처 및 증폭은 시드(112)의 증폭으로 인한 제1 영역(124), 및 시드(115)의 증폭으로 인한 제2 영역(125)을 갖는 다중클론 클러스터를 초래하지만, 제2 영역(125)은 시드(115)가 시드(113)보다 더 중앙에 위치하기 때문에 도 1b의 제2 영역(123)보다 더 크다. 예를 들어, 기관 영역(101)으로부터의 신호의 약 60% 미만은 제1 영역(124) 내 시드(114)의 앰플리콘으로부터 유래할 수 있고, 기관 영역(101)으로부터의 신호의 약 40% 초과는 제2 영역(125) 내 시드(115)의 앰플리콘으로부터 유래할 수 있으며, 그러한 다중클론 클러스터(124, 125)는 기능적으로 단일클론이 아닐 수 있다. 예를 들어, 기관 영역(101)의 약 60% 미만은 제1 영역(124) 내 시드(114)의 앰플리콘에 의해 커버될 수 있고, 기관 영역(101)의 약 40% 초과는 제2 영역(125) 내 시드(115)의 앰플리콘에 의해 커버될 수 있다. 이와 같이, 다중클론 클러스터(124, 125)는 기능적으로 단일클론이 아닐 수 있다. 이 예에서, 클러스터가 다중클론인 정도는 클러스터가 SBS에 유용하기에 너무 높을 수 있다.

[0049] 주어진 기관 영역에서 전달되는 것으로 예상되는 시드의 수는 기관의 크기에 따라 증가할 수 있다. 기관 패턴화는 클러스터가 다중클론인 정도와 이러한 클러스터가 SBS에 유용한 정도에 추가로 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 도 2a 내지 도 2d는 기관 상에 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 추가적인 예를 개략적으로 도시한다. 기관은 제1 영역(201) 및 제2 영역(202)을 포함할 수 있으며, 이는 도 3a를 참조하여 설명된 바와 같은 방식으로 서로 상이한 표면 처리를 가질 수 있다. 관독의 신뢰성을 향상시키기 위해, 예를 들어 영역(201)에서 제1 방향으로 그리고 영역(202)에서 반대 방향으로 카피에 대한 SBS 관독을 수행한 다음 결과를 정렬하는 소프트웨어를 사용함으로써 서로 상보적이어야 하고, 그 결과 서로 동일한 서열을 나타내는 동일한 표적 뉴클레오티드의 카피에 대한 동시적 쌍을 이룬 말단 관독을 영역(201, 202) 둘 다에서 수행하는 것이 바람직할 수 있다. 도 2a에 도시된 바와 같이, 기관 영역(202)((또는, 동등하게, 기관 영역(201))의 단일 시드(211)의 포획 및 증폭은 제1 영역(221) 및 제2 영역(222) 내 단일클론 클러스터를 생성하며, 이는 두 기관 영역을 충전할 수 있고, 동시에 쌍을 이룬 말단 관독에 용이하게 사용될 수 있다.

[0050] 비교하면, 도 2b에 도시된 바와 같이, 기관 영역(201, 202)을 가교하는 제1 시드(212) 및 기관 영역(201) 상 제2 시드(213)의 포획 및 증폭은 기관 영역(201) 내 시드(212)의 증폭으로부터 기인한 제1 영역(223) 및 기관 영역(201) 내 시드(213)의 증폭으로부터 기인한 제2 영역(225)을 갖는 기관 영역(201) 내 다중클론 클러스터 및 기관 영역(202) 내 시드(212)의 증폭으로부터 기인한 기관 영역(202) 내 단일클론 클러스터(224)를 생성한다. 이 실시예에서, 클러스터가 다중클론인 정도는 기관 영역(201)이 기능적으로 단일클론일 수 있을 만큼 충분히 낮다. 이와 같이, 영역(201 및 202)은 함께 기능적으로 단일클론일 수 있고, 클러스터(223, 224)는 동시적 쌍을 이룬 말단 관독에 유용할 수 있다. 예를 들어, 동시적 쌍을 이룬 말단 관독의 경우, 기관 영역 둘 다가 독립적으로 적어도 기능적 단일클론이고, 기관 영역 둘 다가, 또한, 함께 적어도 기능적 단일클론인 것이 유용할 수 있다.

[0051] 도 1b 내지 도 1c를 참조하여 설명된 예시들과 유사하게, 기관 상의 상이한 시드들의 상대적인 위치는, 특히 동시적 쌍을 이룬 말단 관독의 경우에서 클러스터가 다중클론인 정도와, 클러스터가 SBS에 사용가능할 수 있는 정도에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 도 2c에 도시된 바와 같이, 기관 영역(201, 202)을 가교하는 제1 시드(214) 및 기관 영역(201) 상 제2 시드(215)는 기관 영역(201) 내 시드(214)의 증폭으로부터 기인한 제1 영역(226) 및 기관 영역(201)내 시드(215)의 증폭으로부터 기인한 제2 영역(228)을 갖는 기관 영역(201) 내 다중클론 클러스터 및 기관 영역(202) 내 시드(214)의 증폭으로부터 기인한 기관 영역(202) 내 단일클론 클러스터(227)를 생성한다. 도 2c의 예에서, 제2 영역(228)은 시드(215)가 시드(213)보다 더 중앙에 위치하기 때문에 도 2b의 제2 영역(225)보다 더 크다. 이 예에서, 기관 영역(201)은 기능적으로 단일클론이 없는 다중클론인 반면, 기관 영역(202)은 단일클론이다. 이와 같이, 영역(201 및 202)은 함께 기능적으로 단일클론이 아닐 수 있고, 클러스터(226, 228)가 동시적 쌍을 이룬 말단 관독에 유용하기에는 클러스터가 다중클론인 정도가 너무 높을 수 있다. 또한, 영역(201)이 기능적으로 단일클론이 아니기 때문에, 영역(201)은 서열분석에 유용하지 않을 수 있는 반면, 영역(202)은 서열분석을 위해 독립적으로 사용될 수 있다.

[0052] 다른 예에서, 도 2d에 도시된 바와 같이, 기관 영역(202) 상 제1 시드(216) 및 기관 영역(201) 상 제2 시드(217)는 기관 영역(201) 내 시드(217)의 증폭으로부터 기인한 기관 영역(201) 내 단일클론 클러스터(229) 및 기관 영역(202) 내 시드(216)의 증폭으로부터 기인한 기관 영역(202) 내 제2 단일클론 클러스터를 생성한다. 클러스터(229, 230)는 각각 단일클론이지만, 이들은 서로 상이한 표적 폴리뉴클레오티드의 복제물을 갖고, 소프트

웨어를 사용하여 서로 정렬되지 않을 수 있기 때문에 동시적 쌍을 이론-말단 판독에 유용하지 않을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 각각의 클러스터(229, 230)는 단일클론 또는 적어도 기능적으로 단일클론이기 때문에, 2개의 클러스터 내의 서열이 서로 상보적이지 않더라도, 이들 클러스터는 서열분석을 위해 독립적으로 사용될 수 있다.

[0053] 본원에 제공된 예는 표준 P5 및 P7 프라이머의 사용으로 달성될 수 있는 단일클론성과 비교하여 변형된 프라이머의 사용을 통해 클러스터가 (이에 제한되지 않으나, 복합 표면을 갖는 기관 상을 포함함) 단일클론인 정도를 향상시킬 수 있다. 이러한 변형된 프라이머는 변형된 서열, 변형된 길이, 비-뉴클레오타이드 모이어티의 사용 및 다른 변형된 프라이머와 함께 사용 중 하나 이상의 임의의 적합한 조합을 포함할 수 있다. 변형된 프라이머는 클러스터 단일클론성을 향상시키기 위해 효과적인 증폭 면적을 감소시키거나, 달리 증폭을 편향시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 도 1a 내지 도 1c 및 도 2a 내지 도 2d를 참조하여 설명된 것과 같은 예시에서 기관의 주어진 영역에서 증폭될 것으로 예상될 수 있는 시드의 수는 푸와송 분포를 따를 것으로 예상될 수 있다. 비교하면, 본원에 제공된 바와 같은 변형된 프라이머의 사용은 푸와송 분포에 의해 예측될 수 있는 것을 초과하는 단일클론성을 제공할 수 있다.

[0054] 먼저, 본원에서 사용되는 일부 용어들이 간략하게 설명될 것이다. 이어서, 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키기 위한 일부 예시적인 조성물 및 예시적인 방법을 기재할 것이다.

[0055] **용어**

[0056] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 용어 "포함하는"뿐만 아니라 "포함하다", "포함한다", 및 "포함된"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 용어 "갖는"뿐만 아니라 "갖다", "갖는다", 및 "가진"과 같은 다른 형태의 사용은 제한적이지 않다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 청구항의 전제부에서든 또는 본문에서든, 용어 "포함한다" 및 "포함하는"은 개방형(open-ended) 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 어구 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"과 동의어로 해석되어야 한다. 예를 들어, 공정과 관련하여 사용되는 경우, 용어 "포함하는"은 공정이 적어도 언급된 단계들을 포함하지만, 추가의 단계들을 포함할 수 있음을 의미한다. 화합물, 조성물 또는 장치와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "포함하는"은 화합물, 조성물 또는 장치가 적어도 언급된 특징부들 또는 구성요소들을 포함하지만, 또한 추가의 특징부들 또는 구성요소들을 포함할 수 있음을 의미한다.

[0057] 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어 "실질적으로", "대략", 및 "약"은, 예를 들어 가공에서의 변동으로 인한 작은 변동을 기재하고 설명하는 데 사용된다. 예를 들어, 변동은 $\pm 10\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 5\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 2\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 1\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 0.5\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 0.2\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 0.1\%$ 이하, 예를 들어 $\pm 0.05\%$ 이하를 지칭할 수 있다.

[0058] 본원에 사용된 바와 같이, "혼성화"는 이중 가닥 "이중체"를 형성하기 위해 이들 중합체의 길이를 따라 제1 폴리뉴클레오타이드를 제2 폴리뉴클레오타이드에 비공유결합으로 결합시키는 것을 의미하고자 한다. 예를 들어, 2개의 DNA 폴리뉴클레오타이드 가닥은 상보적 염기 쌍을 통해 결합할 수 있다. 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드 사이의 결합의 강도는 이들 폴리뉴클레오타이드 내의 뉴클레오타이드의 서열 사이의 상보성에 따라 증가한다. 폴리뉴클레오타이드 간의 혼성화의 강도는, 이중체의 50% 가 서로 해리된 폴리뉴클레오타이드 가닥을 갖는 용융 온도(T_m)를 특징으로 할 수 있다. 서로 "부분적으로"혼성화된 폴리뉴클레오타이드는 이들이 서로 상보적인 서열을 갖지만 이러한 서열은 이들의 길이의 일부만을 따라 서로 혼성화되어 부분 이중체를 형성한다는 것을 의미한다. 혼성화에 대한 "불능성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 불충분한 수의 염기가 서로 혼성화하기 위한 방식으로 서로 접촉할 수 있도록 서로 물리적으로 분리된 것들을 포함한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드"는 당 및 적어도 하나의 포스페이트기를 포함하는 분자를 의미하고자 하는 것으로, 일부 실시예에서 또한 핵염기를 포함한다. 핵 염기가 결합된 뉴클레오타이드는 "무염기"로 지칭될 수 있다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 변형된 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 리보뉴클레오타이드, 펩티드 뉴클레오타이드, 변형된 펩티드 뉴클레오타이드, 변형된 포스페이트 당 골격 뉴클레오타이드, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 뉴클레오타이드의 예는 아데노신 모노포스페이트(AMP), 아데노신 디포스페이트(ADP), 아데노신 트리포스페이트(ATP), 티미딘 모노포스페이트(TMP), 티미딘 디포스페이트(TDP), 티미딘 트리포스페이트(TTP), 시티딘 모노포스페이트(CMP), 시티딘 디포스페이트(CDP), 시티딘 트리포스페이트(CTP), 구아노신 모노포스페이트(GMP), 구아노신 디포스페이트(GDP), 구아노신 트리포스페이트(GTP), 우리딘 모노포스페이트(UMP), 우리딘 디포스페이트(UDP), 우리딘 트리포스페이트(UTP), 데옥시아데노신 모노포스페이트(dAMP),

데옥시아데노신 디포스페이트(dADP), 데옥시아데노신 트리포스페이트(dATP), 데옥시티미딘 모노포스페이트(dTMP), 데옥시티미딘 디포스페이트(dTDP), 데옥시티미딘 트리포스페이트(dTTP), 데옥시시티딘 디포스페이트(dCDP), 데옥시티딘 트리포스페이트(dCTP), 데옥시구아노신 모노포스페이트(dGMP), 데옥시구아노신 디포스페이트(dGDP), 데옥시구아노신 트리포스페이트(dGTP), 데옥시우리딘 모노포스페이트(dUMP), 데옥시우리딘 디포스페이트(dUDP) 및 데옥시우리딘 트리포스페이트(dUTP)를 포함한다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "뉴클레오타이드"는 또한 자연 발생 뉴클레오타이드와 비교하여 변형된 핵 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티를 포함하는 뉴클레오타이드의 유형인 임의의 뉴클레오타이드 유사체를 포함하도록 의도된다. 예시적인 변형된 핵염기는 이노신, 잔타닌, 하이포잔틴, 이소시토신, 이소구아닌, 2-아미노퓨린, 5-메틸시토신, 5-하이드록시메틸 시토신, 2-아미노아데닌, 6-메틸 아데닌, 6-메틸 구아닌, 2-프로필 구아닌, 2-프로필 아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 2-티오시토신, 15-할로우라실, 15-할로시토신, 5-프로필 우라실, 5-프로필 시토신, 6-아조 우라실, 6-아조 시토신, 6-아조 티민, 5-우라실, 4-티오우라실, 8-할로 아데닌 또는 구아닌, 8-아미노 아데닌 또는 구아닌, 8-티올 아데닌 또는 구아닌, 8-티오알킬 아데닌 또는 구아닌, 8-하이드록실 아데닌 또는 구아닌, 5-할로 치환 우라실 또는 시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌, 8-아자아데닌, 7-테아자구아닌, 7-테아자아데닌, 3-테아자구아닌, 3-테아자아데닌 등을 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 특정 뉴클레오타이드 유사체는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 아데노신 5'-포스포셀레이트와 같은 뉴클레오타이드 유사체에 혼입될 수 없다. 뉴클레오타이드는 임의의 적합한 수의 포스페이트, 예를 들어, 3개, 4개, 5개, 6개, 또는 6개 초과 포스페이트를 포함할 수 있다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 서로 결합된 뉴클레오타이드의 서열을 포함하는 분자를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 중합체의 하나의 비제한적인 예이다. 폴리뉴클레오타이드의 예는 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA) 및 이들의 유사체를 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드의 단일 가닥 서열, 예컨대 RNA 또는 단일 가닥 DNA, 이중 가닥 DNA와 같은 뉴클레오타이드의 이중 가닥 서열일 수 있거나, 뉴클레오타이드의 단일 가닥 서열과 이중 가닥 서열의 혼합물을 포함할 수 있다. 이중 가닥 DNA(dsDNA)는 게놈 DNA, 및 PCR 및 증폭 생성물을 포함한다. 단일 가닥 DNA(ssDNA)는 dsDNA로 전환될 수 있으며, 그 반대도 마찬가지이다. 폴리뉴클레오타이드는 거울상이성질체 DNA와 같은 비천연 발생 DNA를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드의 정확한 서열은 공지되거나 공지되지 않을 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 예이다: 유전자 또는 유전자 단편(예를 들어, 프로브, 프라이머, 발현된 서열 태그(EST) 또는 유전자 발현의 연속 분석(SAGE) 태그), 게놈 DNA, 게놈 DNA 단편, 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 트랜스퍼 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 합성 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 프라이머 또는 전술한 것 중 어느 하나의 증폭된 카피.

[0062] 본원에 사용된 바와 같이, "중합효소"는 뉴클레오타이드를 폴리뉴클레오타이드로 중합시켜 폴리뉴클레오타이드를 조립하는 활성 부위를 갖는 효소를 의미하는 것으로 의도된다. 중합효소는 프라이밍된 단일 가닥 표적 폴리뉴클레오타이드에 결합할 수 있고, 성장하는 프라이머에 뉴클레오타이드를 순차적으로 첨가하여 표적 폴리뉴클레오타이드의 서열에 상보적인 서열을 갖는 "상보적 카피"폴리뉴클레오타이드를 형성할 수 있다. 그 후, 다른 중합효소 또는 동일한 중합효소가 상보적 카피 폴리뉴클레오타이드의 상보적 카피를 형성함으로써 표적 뉴클레오타이드의 카피를 형성할 수 있다. 임의의 이러한 카피는 본원에서 "앰플리콘"으로 지칭될 수 있다 DNA 중합효소는 표적 폴리뉴클레오타이드에 결합한 다음, 성장하는 폴리뉴클레오타이드 가닥(성장 앰플리콘)의 3' 말단에서 유리 하이드록실기에 뉴클레오타이드를 순차적으로 첨가하여 표적 폴리뉴클레오타이드 아래로 이동할 수 있다. DNA 중합효소는 DNA 주형으로부터 상보적 DNA 분자를 합성할 수 있고, RNA 중합효소는 DNA 주형으로부터 RNA 분자를 합성할 수 있다(전사). 중합효소는 가닥 성장을 시작하기 위해 짧은 RNA 또는 DNA 가닥(프라이머)을 사용할 수 있다. 일부 중합효소는 이들이 사슬에 염기를 첨가하고 있는 부위 상류의 가닥을 치환할 수 있다. 이러한 중합효소는 가닥 치환인 것으로 언급될 수 있으며, 이는 중합효소에 의해 관독되는 주형 가닥으로부터 상보적 가닥을 제거하는 활성을 갖는 것을 의미한다. 가닥 치환 활성을 갖는 예시적인 중합효소는, 제한 없이, Bst(바실러스 스테아로써 모필루스) 중합효소, 엑소-클레나우 중합효소 또는 서열분석 등급 T7 엑소-중합효소의 큰 단편을 포함한다. 일부 중합효소는 이들 전방의 가닥을 분해하여, 후방의 성장하는 사슬로 효과적으로 대체(5' 엑소뉴클레아제 활성)한다. 일부 중합효소는 이들 뒤의 가닥을 분해하는 활성(3' 엑소뉴클레아제 활성)을 갖는다. 일부 유용한 중합효소는 돌연변이에 의해 또는 그렇지 않으면 3' 및/또는 5' 엑소뉴클레아제 활성을 감소시키거나 제거하기 위해 변형되었다.

[0063] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "프라이머"는 뉴클레오타이드가 유리 3'OH기를 통해 첨가될 수 있는 폴리뉴클레오타이드로 정의된다. 프라이머는 블록이 제거될 때까지 중합을 방지하는 3'블록을 포함할 수 있다. 프라이머는

커플링 반응을 허용하거나 프라이머를 또 다른 모이어티에 결합시키기 위해 5'말단에 변형을 포함할 수 있다. 프라이머는 UV 광, 화학, 효소 등과 같은 적합한 조건 하에서 절단될 수 있는 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다. 프라이머 길이는 임의의 적합한 수의 염기만큼 길 수 있으며, 임의의 적합한 천연 및 비천연 뉴클레오타이드의 조합을 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 프라이머에 혼성화하는 (프라이머에 상보적인 서열을 가지는) "어댑터"를 포함할 수 있고, 프라이머의 유리 3' OH기에 뉴클레오타이드를 첨가함으로써 상보적 카피 폴리뉴클레오타이드를 생성하도록 증폭될 수 있다. "포획 프라이머"는 기관에 결합되고 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터에 혼성화될 수 있는 프라이머를 의미하고자 하는 반면, "직교 포획 프라이머"는 기관에 결합되고 그 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터에 혼성화될 수 있는 프라이머를 의미하는 것으로 의도된다. 제1 어댑터는 직교 포획 프라이머의 서열에 상보적인 서열을 가질 수 있고, 제2 어댑터는 포획 프라이머의 서열에 상보적인 서열을 가질 수 있다. 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 서로 상이하고 독립적인 서열을 가질 수 있다. 추가적으로, 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 적어도 하나의 다른 특성에서 서로 상이할 수 있다. 예를 들어, 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 서로 다른 길이를 가질 수 있거나; 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머 중 하나는 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머 중 다른 것에서는 결여된 비핵산 모이어티(예컨대, 차단기 또는 절제 모이어티)를 포함할 수 있거나; 이러한 특성의 임의의 적합한 조합.

[0064]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "기관"은 본원에 기재된 조성물에 대한 지지체로서 사용되는 물질을 지칭한다. 예시적인 기관 재료는 유리, 실리카, 플라스틱, 석영, 금속, 금속 산화물, 유기-실리케이트(예를 들어, 다면체 유기 실세스퀴옥산(POSS)), 폴리아크릴레이트, 탄탈륨 옥사이드, 상보적 금속 산화물 반도체(CMOS), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. POSS의 예는 그 전체가 참조로서 포함된 Kehagias 등의 문헌[Microelectronic Engineering 86 (2009), pp. 776-778]에 기재된 것일 수 있다. 일부 실시예에서, 본 출원에 사용된 기관은 유리, 용융 실리카, 또는 다른 실리카-함유 물질과 같은 실리카계 기관을 포함한다. 일부 실시예에서, 기관은 실리콘, 실리콘 질화물, 또는 실리콘 수소화물을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본 출원에 사용된 기관은 플라스틱 물질 또는 구성요소, 예컨대 폴리에틸렌, 폴리스티렌, 폴리(비닐 클로라이드), 폴리프로필렌, 나일론, 폴리에스테르, 폴리카보네이트, 및 폴리(메틸 메타크릴레이트)를 포함한다. 예시적인 플라스틱 물질은 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리스티렌, 및 사이클릭 올레핀 중합체 기관을 포함한다. 일부 실시예에서, 기관은 실리카계 물질 또는 플라스틱 물질 또는 이들의 조합이거나 이를 포함한다. 특정 실시예에서, 기관은 유리 또는 규소계 중합체를 포함하는 적어도 하나의 표면을 갖는다. 일부 실시예에서, 기관은 금속을 포함할 수 있다. 일부 이러한 실시예에서, 금속은 금이다. 일부 실시예에서, 기관은 금속 산화물을 포함하는 적어도 하나의 표면을 갖는다. 일 실시예에서, 표면은 산화탄탈륨 또는 산화주석을 포함한다. 아크릴아미드, 예는 또는 아크릴레이트도 또한 기관 물질 또는 성분으로서 사용될 수 있다. 다른 기관 재료는, 이에 제한되지는 않으나, 갈륨 비소, 인듐 포스파이드, 알루미늄, 세라믹, 폴리이미드, 석영, 수지, 중합체 및 공중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 기관 및/또는 기관 표면은 석영일 수 있거나, 이를 포함할 수 있다. 일부 다른 실시예에서, 기관 및/또는 기관 표면은 GaAs 또는 ITO와 같은 반도체일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 전술한 목록은 본 출원을 예시하는 것으로 의도되며, 이들로 제한하고자 함이 아니다. 기관은 단일 재료 또는 복수의 상이한 재료를 포함할 수 있다. 기관은 복합체 또는 라미네이트일 수 있다. 일부 실시예에서, 기관은 유기-실리케이트 물질을 포함한다. 기관은 편평한, 둥근, 구형, 막대 형상, 또는 임의의 다른 적합한 형상일 수 있다. 기관은 강성 또는 가요성일 수 있다. 일부 실시예에서, 기관은 비드 또는 플로 셀이다.

[0065]

일부 실시예에서, 기관은 패터화된 표면을 포함한다. "패터화된 표면"은 기관의 노출된 층 상 또는 그 안의 상이한 영역들의 배열을 지칭한다. 예를 들어, 영역들 중 하나 이상은 하나 이상의 포획 프라이머가 존재하는 특징부일 수 있다. 특징부는 포획 프라이머가 존재하지 않는 틈새 영역(interstitial region)에 의해 분리될 수 있다. 일부 실시예에서, 패터는 행과열인 특징부의 x-y 포맷일 수 있다. 일부 실시예에서, 패터는 특징부 및/또는 틈새 영역의 반복 배열일 수 있다. 일부 실시예에서, 패터는 특징부 및/또는 틈새 영역의 무작위 배열일 수 있다. 일부 실시예에서, 기관은 표면에 웰의 어레이(함몰부)를 포함한다. 웰은 실질적으로 수직 측벽에 의해 제공될 수 있다. 웰은, 포토리소그래피, 스탬핑 기법, 몰딩 기법 및 마이크로예칭 기법을 포함하지만 이로 한정되지 않는 다양한 기법들을 사용하여 당업계에 일반적으로 알려진 바와 같이 제조될 수 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 사용되는 기법은 어레이 기재의 조성 및 형상에 의존할 것이다.

[0066]

기관의 패터화된 표면 내의 특징부는 유리, 실리콘, 플라스틱 또는 패터화된, 공유 결합된 겔을 갖는 다른 적합한 물질(들), 예컨대 폴리(N-(5-아지도아세트아미드헨틸)아크릴아미드-코-아크릴아미드)(PAZAM) 상의 웰의 어레이(예를 들어, 마이크로웰 또는 나노웰)내 웰을 포함할 수 있다. 공정은 다수의 사이클을 갖는 서열분석 실행에 걸쳐서 안정적인 수 있는 서열분석을 위해 사용되는 겔 패드들을 생성한다. 웰에 대한 중합체의 공유 결합은 다양한 사용 중 구조화된 기관의 수명 전체에 걸쳐서 구조화된 특징부 내에 겔을 유지하는 데 도움이 된다.

그러나, 많은 실시예들에서, 겔이 웰에 공유 결합될 필요는 없다. 예를 들어, 일부 조건에서, 구조화된 기관의 어느 부분에도 공유결합으로 부착되지 않은 실란 비함유 아크릴아미드(SFA)가 겔 물질로서 사용될 수 있다.

[0067] 특정 실시예에서, 구조화된 기관은 적합한 물질로 웰(예를 들어, 마이크로웰 또는 나노웰)을 패터닝시키고, 패터닝된 물질을 겔 물질(예를 들어, PAZAM, SFA 또는 이들의 화학적으로 변형된 변이체, 예컨대 SFA의 아지도 분해된(azidolyzed) 버전(아지도-SFA))로 코팅하고, 예를 들어, 화학적 또는 기계적 연마를 통해서 겔 코팅된 물질의 표면을 연마하여 웰 내에 겔을 보유시키지만 웰들 사이의 구조화된 기관의 표면 상의 틈새 영역로부터 실질적으로 모든 겔을 제거하거나 불활성화시킴으로써 제조될 수 있다. 프라이머는 겔 물질에 부착될 수 있다. 다음으로, 복수의 표적 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 단편화된 인간 게놈 또는 이의 부분)를 포함하는 용액은 개별 표적 폴리뉴클레오티드가 겔 물질에 부착된 프라이머와의 상호작용을 통해 개별 웰에 시딩하도록 연마된 기관과 접촉될 수 있다; 그러나, 겔 재료의 부재 또는 불활성으로 인해 표적 폴리뉴클레오티드는 틈새 영역을 점유하지 않을 것이다. 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭은 틈새 영역 내 겔의 부재 또는 비활성이 성장하는 클러스터의 외향 이동을 방지할 수 있기 때문에 웰로 한정될 것이다. 공정은 편리하게 제조가능하고, 확장가능하며, 종래의 마이크로-제조 또는 나노-제조 방법을 활용한다.

[0068] 패터닝된 기관은 예를 들어 슬라이드 또는 칩으로 에칭된 웰을 포함할 수 있다. 웰의 에칭 및 기하학적 구조의 패턴은 다양한 상이한 형상 및 크기를 취할 수 있고, 이러한 특징부는 물리적으로 또는 기능적으로 서로 분리 가능할 수 있다. 이러한 구조적 특징부를 갖는 특히 유용한 기관은 미소구체와 같은 고체 입자의 크기를 선택할 수 있는 패터닝된 기관을 포함한다. 이러한 특성을 갖는 예시적인 패터닝된 기관은 BEAD 어레이 기술(Illumina, Inc., San Diego, Calif.)과 관련하여 사용되는 에칭된 기관이다.

[0069] 일부 실시예에서, 본원에 설명된 기관은 플로우 셀의 적어도 일부를 형성하거나 플로우 셀에 위치되거나 또는 그에 결합된다. 플로우 셀은 복수의 라인 또는 복수의 섹터로 분할되는 유동 챔버를 포함할 수 있다. 본원에 제시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 플로우 셀의 제조를 위한 예시적인 플로우 셀 및 기관은, 이에 제한되지는 않으나, Illumina, inc.(San Diego, CA)로부터 상업적으로 입수 가능한 것을 포함한다.

[0070] 본원에 사용된 바와 같이, 기관의 표면을 덮는 층과 관련하여 사용될 때 용어 "직접"은 층이 예를 들어 접착제 층 또는 중합체 층과 같은 특정한 중간 층 없이 기관의 표면을 덮는 것을 의미하도록 의도된다. 표면을 직접 덮는 층은 공유 결합 또는 비공유 접착을 포함하는 임의의 화학적 또는 물리적 상호작용을 통해 이 표면에 부착될 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용될 때 용어 "고정된"은 공유 또는 비공유 결합(들)을 통한 기관에 대한 직접 또는 간접 부착을 의미하도록 의도된다. 특정 실시예에서, 공유결합 부착이 사용될 수 있거나, 기관을 사용하도록 의도된 조건 하에, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 증폭 또는 서열분석 시, 폴리뉴클레오티드가 고정되거나 기관에 부착된 상태로 유지되는 임의의 다른 적합한 부착이 사용될 수 있다. 포획 프라이머로서 또는 표적 폴리뉴클레오티드로서 사용되는 폴리뉴클레오티드는, 3'-말단이 효소 연장에 이용 가능하고 서열의 적어도 일부가 상보적 서열에 혼성화될 수 있도록 고정될 수 있다. 고정화는 표면 부착된 올리고뉴클레오티드에 대한 혼성화를 통해 발생할 수 있으며, 이 경우 고정된 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드는 3'-5' 배향될 수 있다. 대안적으로, 고정화는 공유결합적 부착과 같은 염기쌍 혼성화 이외의 수단 에 의해 발생할 수 있다.

[0072] 본 명세서에 사용되는 용어 "어레이"는 상대적 위치에 따라 서로 구별될 수 있는 기관 영역의 집단을 지칭한다. 어레이의 다른 부위에 있는 다른 분자(예를 들어, 폴리뉴클레오티드)는 어레이 내의 영역의 위치에 따라 서로 구별될 수 있다. 어레이의 개별 부위는 특정 유형의 하나 이상의 분자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 기관 영역은 특정 서열을 갖는 단일 표적 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 기관 영역은 동일한 서열(또는 이의 상보적 서열)을 갖는 몇몇 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 어레이의 영역은 동일한 기관 상에서 서로 상이한 특징부를 각각 포함할 수 있다. 예시적인 특징부는, 제한 없이, 기관 내의 웰, 기관 내 또는 기관 상의 비드(또는 다른 입자), 기관으로부터의 돌출부, 기관 상의 릿지(ridge) 또는 기관 내의 채널을 포함한다. 어레이의 영역은 각각 서로 상이한 기관 상에 상이한 영역을 포함할 수 있다. 별도의 기관에 부착된 상이한 분자는 기관이 결합된 표면 상의 기관의 위치에 따라, 또는 액체 또는 겔 중의 기관의 위치에 따라 식별될 수 있다. 별도의 기관이 표면에 위치하는 예시적인 어레이는 웰에 비드를 갖는 어레이를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0073] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "복수"는 둘 이상의 상이한 부재의 집단을 의미하도록 의도된다. 복수는 작은, 중간, 큰, 매우 큰 크기의 범위일 수 있다. 작은 복수의 크기는, 예를 들어, 수 개의 부재 내지 수십

개의 부재의 범위일 수 있다. 중간 크기의 복수는, 예를 들어, 수십 개의 부재 내지 약 100개의 부재 또는 수백 개의 부재의 범위일 수 있다. 큰 복수는, 예를 들어, 약 수백개의 부재 내지 약 1000개의 부재, 수천 개의 부재 및 최대 수만 개의 부재의 범위일 수 있다. 매우 큰 복수는, 예를 들어, 수만 개의 부재 내지 약 수십만, 백만, 수백만, 수천만 및 최대 수억을 초과하는 부재의 범위일 수 있다. 따라서, 복수는 크기에서 2개에서부터 억을 초과하는 부재뿐 아니라 부재의 수에 의해 측정된 바와 같은, 그 사이, 그리고 전술한 예시적인 범위보다 더 큰 모든 크기의 범위일 수 있다. 예시적인 폴리뉴클레오타이드 복수는, 예를 들어, 약 1×10^5 이상, 5×10^5 이상, 또는 1×10^6 이상의 상이한 폴리뉴클레오타이드의 집단을 포함한다. 따라서, 이러한 용어의 정의는 2를 초과하는 모든 정수 값을 포함하도록 의도된다. 복수의 상한은, 예를 들어, 샘플 내 폴리뉴클레오타이드 서열의 이론적 다양성에 의해 설정될 수 있다.

[0074] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "이중 가닥"은 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때, 폴리뉴클레오타이드 내 모든 또는 실질적으로 모든 뉴클레오타이드가 상보적 폴리뉴클레오타이드 내 각각의 뉴클레오타이드에 수소 결합됨을 의미하고자 한다. "부분" 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드는 이의 뉴클레오타이드의 적어도 약 10%, 적어도 약 25%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%, 그러나 이의 전체 뉴클레오타이드보다는 적게 가지며 상보적 폴리뉴클레오타이드 내 뉴클레오타이드에 수소 결합된다.

[0075] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단일 가닥"은 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때, 본질적으로 폴리뉴클레오타이드 내 뉴클레오타이드 중 어느 것도 상보적 폴리뉴클레오타이드 내 각각의 뉴클레오타이드에 수소 결합되지 않음을 의미한다. 다른 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하는 "불능성"을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥일 수 있다.

[0076] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "표적 폴리뉴클레오타이드"는 분석 또는 작용의 대상인 폴리뉴클레오타이드를 의미하도록 의도된다. 분석 또는 작용은 폴리뉴클레오타이드를 증폭, 서열분석 및/또는 다른 절차에 적용하는 것을 포함한다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 분석될 표적 서열에 추가적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오타이드는 분석될 표적 폴리뉴클레오타이드 서열의 옆에 위치하는 프라이머 결합 부위로서 기능하는 어댑터를 포함하는 하나 이상의 어댑터를 포함할 수 있다. 포획 프라이머에 혼성화된 표적 폴리뉴클레오타이드는 표적 폴리뉴클레오타이드 전부가 연장될 수는 없는 방식으로 포획 올리고뉴클레오타이드의 5' 또는 3' 말단을 넘어 연장되는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 서로 상이한 서열을 가질 수 있지만, 서로 동일한 제1 및 제2 어댑터를 가질 수 있다. 특정 표적 폴리뉴클레오타이드 서열의 측면에 위치할 수 있는 2개의 어댑터는 서로 동일한 서열, 또는 서로 상보적 서열을 가질 수 있거나, 2개의 어댑터는 상이한 서열을 가질 수 있다. 따라서, 복수의 표적 폴리뉴클레오타이드에서의 종은, 예를 들어, 서열분석(예를 들어, SBS)에 의해 평가될 미지의 서열의 영역 옆에 위치하는 공지된 서열의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오타이드는 단일 말단에 어댑터를 보유하고, 이러한 어댑터는 표적 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단 또는 5' 말단에 위치할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 어떠한 어댑터도 없이 사용될 수 있으며, 이 경우 프라이머 결합 서열은 표적 폴리뉴클레오타이드 내에서 발견되는 서열로부터 직접 유래할 수 있다.

[0077] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 본 원에서 상호교환가능하게 사용된다. 상이한 용어는 달리 구체적으로 지시되지 않는 한 크기, 서열 또는 다른 특성의 임의의 특정 차이를 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 설명의 명확성을 위해, 여러 폴리뉴클레오타이드 종을 포함하는 특정 방법 또는 조성물을 설명할 때 하나의 폴리뉴클레오타이드 종을 다른 것으로부터 구별하기 위해 용어가 사용될 수 있다.

[0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "앰플리콘"은, 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 사용될 때, 폴리뉴클레오타이드를 카피하는 산물을 의미하며, 여기서 산물은 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열의 적어도 일부와 실질적으로 동일하거나 실질적으로 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 갖는다. "증폭" 및 "증폭하는"은 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘을 제조하는 공정을 지칭한다. 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 앰플리콘은 상보적 카피일 수 있다. 추가 앰플리콘은 제1 앰플리콘의 생성 후에, 표적 폴리뉴클레오타이드로부터 또는 제1 앰플리콘으로부터 생성된 카피이다. 후속 앰플리콘은 표적 폴리뉴클레오타이드에 실질적으로 상보적이거나 표적 폴리뉴클레오타이드와 실질적으로 동일한 서열을 가질 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 소수의 돌연변이(예를 들어, 증폭 아티팩트에 기인함)가 그 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘을 생성할 때 발생할 수 있음을 이해할 것이다.

[0079] 주어진 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘만을 실질적으로 포함하는 기관 영역은 "단일클론"으로 지칭될 수 있는 반면, 서로 상이한 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘을 포함하는 기관 영역은 "다중클론"으로 지칭될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드를 서열분석하기 위해 사용될 주어진 폴리뉴클레오타이드의 충분한 수의 앰플리콘을 포함하는 기관 영역은 "기능적 단일클론"으로 지칭될 수 있다. 예시적으로, 약 60% 이상의 앰플리콘이 주어진 폴리뉴

클레오티드의 것인 기관 영역은 "기능적 단일클론"인 것으로 간주될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 약 60% 이상의 신호가 주어진 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘으로부터 유래한 것인 기관 영역은 "기능적 단일클론"인 것으로 간주될 수 있다. 기관의 다중클론 영역은 각각이 단일클론인 상이한 서브영역들을 그 안에 포함할 수 있다. 각각의 이러한 단일클론 영역은 더 큰 다중클론 영역 내에 또는 그 자체든지 간에 "시드"로부터 생성된 "클러스터"에 상응할 수 있다. "시드"는 단일 표적 폴리뉴클레오타이드를 지칭할 수 있는 반면, "클러스터"는 그 표적 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘의 집합을 지칭할 수 있다.

[0080] **폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 조성물 및 방법**

[0081] 본원에 제공된 실시예는 클러스터가 생성될 기관 영역(들)에서 선택된 특성을 갖는 포획 프라이머를 제공함으로써 실질적으로 단일클론인 클러스터를 생성하는 것에 관한 것이다. 본원의 실시예는, 증폭된 폴리뉴클레오타이드의 서열이 제1 기관 영역에서 SBS를 사용하여 판독되고, 폴리뉴클레오타이드의 상보적 서열은 서로 병렬로 제2 기관에서 SBS를 사용하여 판독되는 동시적 쌍을 이룬-말단 판독에 사용하기 위한 클러스터를 생성하는 데 특히 적합하지만, 이러한 실시예는 일반적으로 임의의 유형의 클러스터에 적용가능하다는 것을 이해해야 한다.

[0082] 일부 실시예에서, 다양한 폴리뉴클레오타이드를 이용한 시딩이 푸와송 분포에 따라 제1 및 제2 기관 영역 상의 어디에서나 발생할 수 있지만, 제1 및 제2 영역에서 기관에 결합된 포획 프라이머는, 포획될 표적 폴리뉴클레오타이드가 이들 영역 사이의 경계에 충분히 가까워서 경계로부터 멀리서 포획되는 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 우선적으로 증폭되도록 선택될 수 있다. 이러한 우선적 증폭은, 일부 실시예에서, 제1 영역 내 다른 포획 프라이머(예를 들어, 전장 P7 프라이머)와 비교하여 제1 영역 내 포획 프라이머(예를 들어, P5*프라이머)의 서브세트를 단축시킴으로써, 다른 포획 프라이머(예를 들어, 전장 P5 프라이머)와 비교하여 제2 영역 내 다른 포획 프라이머(예를 들어, P7* 프라이머)의 서브세트를 단축시킴으로써, 그리고 짧은 어댑터(예를 들어, cP5 및 cP7의 단축된 버전)를 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드를 제공함으로써 달성될 수 있다. 하기에 더 자세히 설명되는 바와 같이, 이러한 다양한 단축된 포획 프라이머 및 단축된 어댑터는 기관에 결합될 수 있는 특정 표적 폴리뉴클레오타이드에 대한 증폭을 편향시킬 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 영역 사이의 경계에서 시드를 형성하는 표적 폴리뉴클레오타이드는 경계로부터 충분히 멀리서 시드를 형성하는 폴리뉴클레오타이드보다 더 쉽게 증폭될 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드와 비교하여 생성된 앰플리콘은 전장 어댑터(예를 들어, 전장 cP5 및 cP7 어댑터)를 포함하도록 연장되어, 기관의 제1 및 제2 영역 모두에 걸쳐 그 앰플리콘의 후속 증폭을 용이하게 할 수 있다.

[0083] 예를 들어, 도 3a 내지 도 3j는 제1 및 제2 기관 영역에서 상이한 길이의 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키기 위한 공정 흐름에서의 예시적인 조성물 및 작업을 개략적으로 예시한다. 먼저 도 3a를 참조하면, 조성물(300)은 기관(300) 및 이에 결합된 복수의 프라이머를 포함한다. 이 예시에서, 기관(300)은 서로 인접할 수 있는 제1 영역(301) 및 제2 영역(302)을 포함한다. 선택적으로, 제1 영역(301) 및 제2 영역(302)은 서로 상이한 표면 처리, 예를 들어 서로 상이한 중합체, 또는 서로 동일하지만 이에 부착된 모이어티(상이한 포획 프라이머가 선택적으로 결합될 수 있음)가 상이한 중합체를 가질 수 있다. 아래에서 설명되는 바와 같이, 제1 및 제2 영역(301, 302)에 각각 결합된 프라이머는 적어도 하나의 특징에서 서로 상이한 적어도 하나의 포획 프라이머 및 적어도 하나의 특징에서 서로 상이한 직교 포획 프라이머를 포함할 수 있으며, 따라서 제1 및 제2 영역 사이의 경계(310)로부터 충분히 멀리 떨어진 영역에서 이러한 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머에 혼성화하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 억제한다.

[0084] 예를 들어, 복수의 제1 포획 프라이머(331)가 기관(300)의 제1 영역(301)에 결합될 수 있고, 복수의 제2 포획 프라이머(341)가 기관(300)의 제2 영역(302)에 결합될 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(331)보다 길 수 있다. 복수의 제1 직교 포획 프라이머(332)는 기관(300)의 제1 영역(301)에 결합될 수 있고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머(342)는 기관의 제2 영역(302)에 결합될 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(342)는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)보다 짧을 수 있다.

[0085] 예시적으로, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(331)는, 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)보다 적어도 2개의 염기가 더 짧을 수 있으며, 예를 들어, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)보다 적어도 3개의 염기가 더 짧거나, 적어도 4개의 염기가 더 짧거나, 적어도 5개의 염기가 더 짧거나, 적어도 6개의 염기가 더 짧거나, 적어도 7개의 염기 더 짧거나, 적어도 8개의 염기가 더 짧거나, 적어도 9개의 염기가 더 짧거나, 적어도 10개 이상의 염기가 더 짧을 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(342)는, 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)보다 적어도 2개의 염기가 더 짧을 수 있으며, 예를 들어, 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)보다 적어

도 3개의 염기가 더 짧거나, 적어도 4개의 염기가 더 짧거나, 적어도 5개의 염기가 더 짧거나, 적어도 6개의 염기가 더 짧거나, 적어도 7개의 염기가 더 짧거나, 적어도 8개의 염기가 더 짧거나, 적어도 9개의 염기가 더 짧거나 적어도 10개의 염기가 더 짧을 수 있다.

[0086] 기관(300)에 결합된 모든 프라이머가 서로 상이한 길이일 필요는 없다. 예를 들어, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(331)는, 일부 실시예에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(342)와 대략 동일한 길이일 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)는, 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)와 대략 동일한 길이일 수 있다. 그러나, 임의의 적합한 각각의 길이의 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머가 기관(300)의 적합한 영역에서 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 아래에 더 자세히 기재된 바와 같이, 제1 및 제2 영역에서 서로 상이한 길이의 포획 프라이머(331, 341) 및 제1 및 제2 영역에서 서로 상이한 길이의 포획 프라이머(332, 342)는 경계(310)로부터 충분히 멀리 있는 표적 폴리뉴클레오티드와 비교하여 제1 및 제2 영역 사이의 경계(310)에 충분히 가까운 표적 폴리뉴클레오티드가 우선적으로 증폭되도록 할 수 있다. 이어서, 아래에서 더 상세히 설명되는 바와 같이 이러한 앰플리콘은 경계(310)로부터 충분히 멀리 위치하는 표적 폴리뉴클레오티드와 비교하여 제1 및 제2 영역 전체에 걸쳐 더 우선적으로 증폭될 수 있다.

[0087] 도 3a에 도시된 바와 같이, 조성물(3000)은 표적 폴리뉴클레오티드(351, 352, 353), 예를 들어, 증폭되고 결국 서열분석되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유체를 추가로 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드(351, 352, 353) 각각은 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332, 342)에 상보적인 제1 어댑터(354) 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(331, 341)에 상보적인 제2 어댑터(355)를 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드(351, 352, 353)의 제1 어댑터(354)는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)보다 짧을 수 있고, 일부 실시예에서, 직교 포획 프라이머(332)보다 적어도 2개의 염기가 짧을 수 있고, 예를 들어, 직교 포획 프라이머(332)보다 적어도 3개의 염기가 짧거나, 적어도 4개의 염기가 짧거나, 적어도 5개의 염기가 짧거나, 적어도 6개의 염기가 짧거나, 적어도 7개의 염기가 짧거나, 적어도 8개의 염기가 짧거나, 적어도 9개의 염기가 짧거나 적어도 10개의 염기가 짧을 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드(351, 352, 353)의 제2 어댑터(355)는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)보다 짧을 수 있고, 일부 실시예에서, 포획 프라이머(341)보다 적어도 2개의 염기가 짧을 수 있으며, 예를 들어, 포획 프라이머(341)보다 적어도 3개의 염기가 더 짧거나, 적어도 4개의 염기가 더 짧거나, 적어도 5개의 염기가 더 짧거나, 적어도 6개의 염기가 더 짧거나, 적어도 7개의 염기가 더 짧거나, 적어도 8개의 염기가 더 짧거나, 적어도 9개의 염기가 더 짧거나, 적어도 10개의 염기가 더 짧을 수 있다. 제1 및 제2 어댑터(354, 355)는 서로 동일한 길이일 수 있지만 반드시 그럴 필요는 없다.

[0088] 하나의 비제한적인 예시에서, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)는 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)는 P7 포획 프라이머이다. Illumina, Inc.(San Diego, CA)로부터 상업적으로 입수 가능한 P5 포획 프라이머는 서열 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'(서열번호 1)을 갖는다. Illumina, Inc.로부터 또한 상업적으로 입수 가능한 P7 포획 프라이머는 서열 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'(서열번호 2)를 갖는다. 일부 실시예에서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(331)는 단축된 P5 포획 프라이머(본원에서 P5*로 지정될 수 있음)이고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 본원에서 단축된 P7 포획 프라이머(P7*로 지정될 수 있음)이다. 예를 들어, P5 및 P7에 대한 위에서 주어진 서열은 3'-말단으로부터 약 2 내지 10개의 염기만큼 단축되어 단축된 P5 포획 프라이머(P5*) 및 단축된 P7 포획 프라이머(P7*)를 각각 형성할 수 있다. 일부 실시예에서, 단축된 P7 포획 프라이머(P7*)는 서열 5'-TTTTTCAAGCAGAAGACGGC-3'(서열번호 3)을 가질 수 있다. 일부 실시예에서, 단축된 P5 포획 프라이머(P5*)는 서열 5'-TTTTTAATGATACGGCGACCA-3'(서열번호 4)을 가질 수 있다.

[0089] 제2 어댑터(355)는 단축된 상보적 P5 어댑터(본원에서 cP5*로 지정될 수 있음)일 수 있고, 예를 들어, 전장 상보적 P5 어댑터(본원에서 cP5로 지정될 수 있음)의 단축된 버전일 수 있다. 전장 상보적 P5 어댑터(cP5)는 서열 5'-TCGGTGGTCGCGTATCATT-3'(서열번호 5)을 가질 수 있고, illumina, Inc.로부터 상업적으로 입수 가능하다. 단축된 상보적 P5 어댑터(cP5*)는 서열 3'-GCGACCACCGAGATCTACAC-5'(서열번호 6)을 가질 수 있다. 제1 어댑터(354)는 단축된 상보적 P7 어댑터(본원에서 cP7*로 지정될 수 있음)일 수 있으며, 예를 들어, 전장 상보적 P7 어댑터(본원에서 cP7로 지정될 수 있음)의 단축된 버전일 수 있다. 전장 상보적 P7 어댑터(cP7)는 서열 5'-TCGTATGCCGCTCTTCTGCTTG-3'(서열번호 7)을 가질 수 있고, Illumina, Inc.로부터 상업적으로 입수 가능하다. 단축된 상보적 P7 어댑터(cP7*)는 서열 3'-GACGGCATACGAGAT-5'(서열번호 8)을 가질 수 있고, 여기서 볼드체로 표시된 G는, 일부 실시예에서, 본원의 다른 곳에서 기술된 것과 같은 절단가능한 모이어티일 수 있는 8-옥소-G일 수 있다. 예시적으로, cP5 및 cP7에 대한 위 서열은 3'-말단 또는 5'-말단으로부터, 또는 3'-말단 및

- [0093] 비교하면, 제3 앰플리콘(353')이 기관(300)의 제1 및 제2 영역(301, 302) 사이의 경계(310)에 충분히 가깝다는 것은, 그 앰플리콘의 제2 어댑터(355)가 경계를 교차하여 기관(300)의 제2 영역(302)에서 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)와 완전히 혼성화되도록 하여 이중체(366)를 형성할 수 있다. 예를 들어, 포획 프라이머(341)가 전체 길이이기 때문에, 어댑터(355)가 비교적 짧을지라도, 제3 앰플리콘(353')은 충분히 멀리 구부러져서 어댑터(355)의 서열을 포획 프라이머(341)의 서열과 정렬시킬 수 있다. 제3 앰플리콘(353')의 제2 어댑터(355)의 포획 프라이머(341)에 대한 혼성화는 제3 앰플리콘(353')의 증폭을 촉진할 수 있고, 따라서 표적 폴리뉴클레오타이드(353)의 추가 증폭을 촉진할 수 있다.
- [0094] 예를 들어, 제3 앰플리콘(353')의 어댑터(355)와 포획 프라이머(341)의 사이의 혼성화로 인한 이중체(366)는 약 40°C 초과, 예를 들어, 약 45°C 초과, 또는 약 50°C 초과, 또는 약 55°C 초과, 또는 약 60°C 초과, 또는 약 65°C 초과, 또는 약 70°C 초과와 용융 온도(T_m)를 가질 수 있다. 이와 같이, 반응 온도에서, 이중체(366)(뿐만 아니라 도 3b를 참조하여 기술된 이중체(363))도 중합효소(구체적으로 도시되지 않음)가 포획 프라이머(341)를 이러한 증폭에 대한 프라이머로 사용하여 제3 앰플리콘(353')의 앰플리콘의 형성을 시작하기에 충분한 시간 동안 형성될 수 있다.
- [0095] 이와 같이, "경계 근처에 충분히 근접한"것으로 간주될 수 있는 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 이의 앰플리콘)는 경계(310)의 한 측면에서 포획 프라이머에 혼성화될 수 있고, 경계(310)의 다른 측면에서 직교 포획 프라이머에 혼성화될 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)가 더 길수록, 경계로부터 더 멀고, 이는 경계(310)의 한 측면에서 포획 프라이머와 그리고 경계(310)의 다른 측면에서 직교 포획 프라이머와 혼성화될 수 있게 함을 이해할 것이다. 예시적으로, 500개 염기의 길이를 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)는 대략 150 nm 길이일 수 있다. 이와 같이, 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)가 초기에 어디서 혼성화되는지에 따라, 경계(310)의 양측에서 최대 약 150 nm가 그 폴리뉴클레오타이드에 대해 "경계 근처에 충분히 근접한"것일 수 있다. 반대로, 250개 염기의 길이를 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)는 대략 75 nm 길이일 수 있는 반면, 1000개 염기의 길이를 갖는 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)는 대략 300 nm 길이일 수 있다. 임의의 이러한 예시에서, 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)가 도달할 수 있고, 따라서 우선적으로 증폭될 수 있는 경계(310)를 가로지르는 거리는 그 표적 폴리뉴클레오타이드(또는 앰플리콘)의 물리적 길이와 관련된다.
- [0096] 도 3f는 다른 증폭 작업 이후의 도 3e의 조성물을 도시한다. 조성물이 앰플리콘(353')의 추가 앰플리콘(353')을 포함하는 것이 보일 수 있다. 이러한 추가적인 앰플리콘은 앰플리콘(353')에 혼성화될 수 있다. 도 3f에 도시된 바와 같이, 증폭 작업은 추가 앰플리콘(353')의 제1 및 제2 어댑터(354, 355)를 각각 제1 직교 포획 프라이머(332) 및 제2 포획 프라이머(341)의 서열을 사용하여 연장하여 연장된(예를 들어, 전장) 어댑터(354', 355')를 형성할 수 있다. 비교하면, 조성물은, 예를 들어, 앰플리콘 어댑터의 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머에 대한 불충분한 혼성화가 이들 앰플리콘의 임의의 증폭을 억제할 수 있기 때문에 앰플리콘(351', 352')의 임의의 추가 앰플리콘을 포함하지 않을 수 있다. 증폭 작업은 임의의 적합한 횟수로 반복되어, 적절하게는, 각각의 단축된 포획 프라이머(331, 342) 또는 전장 포획 프라이머(332, 341)와 용이하게 혼성화될 수 있는 전장 어댑터(354', 355')인 앰플리콘의 추가 앰플리콘(353', 353")을 생성할 수 있다. 예를 들어, 도 3g에 도시된 바와 같이, 앰플리콘(353')의 전장 제1 어댑터(354')는 제1 영역(301)에서 복수의 제1 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)와 혼성화될 수 있고, 앰플리콘(353")의 전장 제2 어댑터(355')는 제2 영역(302)에서 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)와 혼성화될 수 있다. 도 3h에 도시된 바와 같이, 다른 증폭 작업 후, 표적 폴리뉴클레오타이드(353)의 추가적인 앰플리콘(356', 356")이 형성될 수 있다. 제1 및 제2 기관 영역(401, 402)이 가득찰 때까지 증폭 작업이 반복되는 경우, 생성된 앰플리콘의 두 어댑터는 반드시 상응하는 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머에 혼성화될 필요는 없으며, 이처럼 앰플리콘은 도 3i에 도시된 바와 같이 기관으로부터 선형으로 멀리 연장될 수 있다.
- [0097] 증폭 작업은 임의의 적합한 횟수로 형성될 수 있어서, 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오타이드(353)의 앰플리콘을 갖는 적어도 기능적 단일클론 클러스터, 그리고 일부 실시예에서, 실질적으로 단일클론 클러스터를 갖는 제1 및 제2 기관 영역(301, 302) 둘 다를 실질적으로 채운다. 예를 들어, 각각의 제1 및 제2 기관 영역(301, 302) 내의 앰플리콘은 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드 각각 적어도 약 60%의 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 70%의 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 80% 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 90% 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 95% 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 98% 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 적어도 약 99%의 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오타이드의 약 100% 앰플리콘을 포함할 수 있다. 위에서 언급된 바와 같이, 일부 실시예에서, 특정 포

획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 비뉴클레오티드 모이어티를 포함할 수 있다. 이러한 비뉴클레오티드 모이어티는, 이에 제한되지는 않으나, 이를 통해 포획 프라이머의 일부가 선택적으로 제거될 수 있는 절제 모이어티, 또는 도 4a 내지 도 4l을 참조하여 하기에 추가로 기재된 바와 같은 차단기를 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 3a 내지 도 3i에 도시된 바와 같이, 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)는 절제 모이어티(333)를 포함할 수 있고, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)는 절제 모이어티(343)를 포함할 수 있다. 절제 모이어티(333, 343)는 임의의 적합한 프라이머(들)의 길이를 따라 임의의 적합한 위치에 위치할 수 있고, 반드시 그럴 필요는 없지만, 서로 동일한 유형의 절제 모이어티일 수 있다. 도 3e 내지 도 3i를 참조하여 설명된 바와 같은 원하는 수의 추가 증폭 작업에 이어서, 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(332)의 부분은 적합한 효소 또는 시약과 절제 모이어티(333)를 반응시킴으로써 제거될 수 있고, 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(341)의 부분은 적합한 효소 또는 시약과 절제 모이어티(343)를 반응시킴으로써 제거될 수 있다. 절제 모이어티(333)와 함께 사용되는 효소 또는 시약은 절제 모이어티(343)와 함께 사용되는 효소 또는 시약과 동일하거나 상이할 수 있다. 도 3j에 예시된 바와 같이, 절제 모이어티(333)의 반응은 제1 기관 영역(301)에서 하나의 배향의 폴리뉴클레오티드를 제거하고, 절제 모이어티(334)의 반응은 제2 기관 영역(302)에서 다른 배향의 폴리뉴클레오티드를 제거하여, 동시적 쌍을 이룬-말단 판독이 2개의 기관 영역에서 수행될 수 있다. 제1 및 제2 기관 영역(301, 302)에서 생성된 선형화된 앰플리콘은 적어도 기능적으로 단일클론일 수 있고, 실질적으로 단일클론일 수 있다.

[0098] 기관의 실질적으로 단일클론 영역을 생성하는 다른 방법이 본원에 제공된다. 예시적으로, 본원에 제공된 다른 실시예에서, 표적 폴리뉴클레오티드를 이용한 시딩 및 증폭은 기관의 제1 영역에서 수행되는 반면, 기관의 제2 영역의 프라이머는 차단되어 이러한 증폭이 초기에 그 영역에서 수행되지 않을 수 있다. 이어서, 제2 영역 내 프라이머를 차단해제한다. 제1 영역에서 가장 많이 증폭된 표적 폴리뉴클레오티드는 제2 영역에서 추가로 증폭될 것으로 예상되어, 단일클론성을 개선할 수 있다.

[0099] 예를 들어, 도 4a 내지 도 4l은 제1 기관 영역에서 비차단된 프라이머 및 제2 기관 영역에서 제거가능하게 차단된 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 공정 흐름에서의 예시적인 조성물 및 작업을 개략적으로 예시한다. 도 4a에 도시된 조성물(4000)은 도 3a를 참조하여 설명된 것과 유사할 수 있는 제1 영역(401) 및 제2 영역(402)을 포함하는 기관(400)을 포함한다. 복수의 제1 포획 프라이머(431)는 기관(400)의 제1 영역(401)에 결합될 수 있고, 복수의 제1 직교 포획 프라이머(432)는 기관(400)의 제1 영역(401)에 결합될 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머(441)가 기관(400)의 제2 영역(402)에 결합될 수 있고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머(442)가 기관의 제2 영역(402)에 결합될 수 있다. 도 4a에 도시된 예시에서, 모든 프라이머는 서로 동일한 길이일 수 있다. 예를 들어, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(431)는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(441)와 대략 동일한 길이일 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(441)는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(432)와 대략 동일한 길이일 수 있다. 대안적으로, 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는, 예를 들어, 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 기술된 바와 같은 방식으로, 기관의 상이한 영역에서 서로 상이한 길이일 수 있다.

[0100] 복수의 제1 제거가능한 차단기(444)는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(441)와 결합될 수 있고, 복수의 제2 제거가능한 차단기(445)는 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(442)와 결합될 수 있다. 하기에 기재된 바와 같이, 차단기(444, 445)는 제1 영역(401) 내의 증폭이 실질적으로 완료될 때까지 제2 영역(402)에서 임의의 표적 폴리뉴클레오티드의 증폭을 억제하도록 사용될 수 있고; 이어서, 이러한 차단기가 제거되어 제1 영역(401)에서 생성된 특정 앰플리콘만의 증폭을 가능하게 함으로써 제2 영역(402) 내 단일클론성을 개선할 수 있다. 하나의 비제한적인 예시에서, 차단기(444, 445)는 적합한 효소, 예컨대, 포스파타제 또는 키나제를 (역활성으로) 사용하여 제거될 수 있는 3'-포스페이트기를 포함한다. 또 다른 비제한적인 예시에서, 차단기(444, 445)는 디데옥시뉴클레오티드(ddNTP)에 의해 중결된 알릴-T기를 포함하고, 적합한 시약, 예컨대 팔라듐을 사용하여 제거될 수 있다. 또 다른 비제한적인 예시에서, 차단기(444, 445)는 환원제와 같은 적합한 시약을 사용하여 제거될 수 있는 3'-O-아지드 모이어티를 포함한다. 또 다른 비제한적인 예시에서, 차단기(444, 445)는 적합한 시약, 예컨대, 완충된 (pH 5.2) 질산나트륨을 사용하여 제거될 수 있는 3'-O-NH₂모이어티를 포함한다. 또 다른 비제한적인 예시에서, 차단기(444, 445)는 적합한 시약, 예컨대 팔라듐을 사용하여 제거될 수 있는 3'-O-알릴 모이어티를 포함한다. 또 다른 비제한적인 예시에서, 차단기(444, 445)는 적합한 효소, 예컨대 에스테라제를 사용하여 제거될 수 있는 3'-에스테르 모이어티를 포함한다.

[0101] 유사하게 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 설명된 바와 같이, 조성물(4000)은 표적 폴리뉴클레오티드(451, 452, 453)를 포함하는 유체를 추가로 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오티드(451, 452, 453) 각각은 복수의 제1 및

제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(432, 442)에 상보적인 제1 어댑터(454) 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(431, 441)에 상보적인 제2 어댑터(455)를 포함할 수 있다. 도 4a에 도시된 비제한적인 예시에서, 표적 폴리뉴클레오티드(451, 452, 453)의 제1 어댑터(454)는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(432, 442)와 대략 동일한 길이이고, 표적 폴리뉴클레오티드(451, 452, 453)의 제2 어댑터(455)는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 포획 프라이머(431, 441)와 대략 동일한 길이이다.

[0102] 하나의 순수하게 예시적인 예시에서, 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(431, 441)는 P5 포획 프라이머이고, 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(432, 443)는 전술된 바와 같은 P7 포획 프라이머이다. 제1 어댑터(454)는 cP7 어댑터일 수 있고, 제2 어댑터(455)는 전술한 바와 같은 cP5 어댑터일 수 있다. 포획 프라이머, 직교 포획 프라이머 및 어댑터는 모두 전장 서열일 수 있거나, 또는 이중 특정한 하나가 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 설명된 바와 같은 방식으로 단축된 것일 수 있다.

[0103] 도 3b를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로, 표적 폴리뉴클레오티드의 어댑터(454, 455)는 예를 들어 푸와 송 분포에 따라 포획 프라이머(431, 441) 또는 직교 포획 프라이머(432, 442) 중 각각의 하나에 무작위로 혼성화될 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드(451)의 제1 어댑터(454)는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(432)와 혼성화되어 이중체(461)를 형성할 수 있고; 표적 폴리뉴클레오티드(453)의 제1 어댑터(454)는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(432)와 혼성화되어 이중체(463)를 형성할 수 있고; 표적 폴리뉴클레오티드(452)의 제2 어댑터(455)는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(442)와 혼성화되어 이중체(462)를 형성할 수 있다. 어댑터와 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머 사이의 이러한 초기 혼성화로부터 생성된 이중체는 약 40°C 초과, 예를 들어, 약 45°C 초과, 또는 약 50°C 초과, 또는 약 55°C 초과, 또는 약 60°C 초과, 또는 약 65°C 초과, 또는 약 70°C 초과와 용융 온도(T_m)를 가질 수 있고, 예를 들어, 반응 온도 또는 조성물(4000)이 유지되는 다른 온도에서 비교적 안정할 수 있다. 하기에 기재된 바와 같이, 표적 폴리뉴클레오티드(451, 453)는 제1 기관 영역(401)에서 쉽게 증폭될 수 있는 반면, 제2 기관 영역(402) 내 차단기(444, 445)는 표적 폴리뉴클레오티드(402)의 증폭을 억제할 수 있다.

[0104] 예를 들어, 도 4c에 도시된 바와 같이, 도 4b를 참조하여 설명된 초기 혼성화 후, 제1 및 제3 표적 폴리뉴클레오티드(451, 453)는 증폭되어, 예를 들어 각각 제1 앰플리콘(451') 및 제3 앰플리콘(453')을 형성할 수 있는 반면, 차단기(444)는 제2 표적 폴리뉴클레오티드(452)의 증폭을 억제할 수 있다. 이러한 증폭 후, 제1, 제2 및 제3 표적 폴리뉴클레오티드(451, 452, 453)는 도 4d에 예시된 바와 같은 방식으로 탈혼성화될 수 있는 반면, 제1 및 제3 앰플리콘(451', 453')은 기관(400)에 공유 결합된 상태로 유지된다.

[0105] 도 4e에 도시된 바와 같이, 제1 앰플리콘(451')의 제2 어댑터(455)는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 포획 프라이머(431)와 혼성화되어 이중체(464)를 형성할 수 있다. 제3 앰플리콘(453')의 제2 어댑터(455)는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(431)와 혼성화되어 이중체(465)를 형성할 수 있다. 도 3e를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로, 포획 프라이머(431)에 대한 앰플리콘 (451', 453')의 제2 어댑터(455)의 혼성화는 앰플리콘(451', 453')의 증폭을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 앰플리콘(451', 453')의 각각의 어댑터(455)와 포획 프라이머(431) 사이의 혼성화로 인한 이중체는 약 40°C 초과, 예를 들어, 약 45°C 초과, 또는 약 50°C 초과, 또는 약 55°C 초과, 또는 약 60°C 초과, 또는 약 65°C 초과, 또는 약 70°C 초과와 용융 온도(T_m)를 가질 수 있다. 이와 같이, 증폭을 위한 반응 온도에서, 이중체(464, 465)(뿐 아니라 도 4b를 참조하여 기술된 이중체(461, 463))는 중합효소(구체적으로 도시되지 않음)가 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머를 이러한 증폭을 위한 프라이머로 사용하여 앰플리콘(451', 453')의 각각의 앰플리콘을 형성하기 시작하기에 충분한 시간 동안 형성될 수 있다.

[0106] 도 4f에 도시된 바와 같이, 증폭 작업은 앰플리콘(451')의 추가 앰플리콘(451'') 및 앰플리콘(453')의 추가 앰플리콘(453'')을 생성하는 반면, 제2 기관 영역(402)은 추가로 증폭될 수 있는 어떠한 앰플리콘도 포함하지 않을 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드(또는 앰플리콘) 중 하나의 제1 어댑터(455)가 직교 포획 프라이머(442) 중 하나에 혼성화되더라도, 이러한 직교 포획 프라이머에 결합된 제거가능한 차단기(445)가 그 표적 폴리뉴클레오티드(또는 앰플리콘)의 증폭을 억제할 수 있다. 다른 예로서, 표적 폴리뉴클레오티드(또는 앰플리콘) 중 하나의 제2 어댑터가 포획 프라이머(441) 중 하나에 혼성화되더라도, 그 포획 프라이머에 결합된 제거가능한 차단기(444)는 그 표적 폴리뉴클레오티드(또는 앰플리콘)의 증폭을 억제할 수 있다. 예를 들어, 차단기 (444, 445)는 포획 프라이머(441) 또는 직교 포획 프라이머(442)를 이러한 증폭을 위한 프라이머로서 사용하여 중합효소가 표적 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 표적 폴리뉴클레오티드(452))의 앰플리콘을 형성하기 시작할 수 있는 것을 억제할 수 있다. 대안적으로, 이러한 증폭 억제는 제거가능한 차단기(444) 및 제거가능한 차단기(445) 중

단지 하나를 사용하거나 제거가능한 차단기(444) 및 제거가능한 차단기(445) 둘 모두를 사용하여 달성될 수 있다는 점에 유의한다.

[0107] 추가의 증폭 작업은 제1 기관 영역(401)에서 표적 폴리뉴클레오티드(들)의 추가 앰플리콘을 생성하기 위해 사용될 수 있는 반면, 차단기(444, 445)는 제2 기관 영역(402)에서 증폭의 억제를 계속한다. 예를 들어, 도 4g에 도시된 바와 같이, 앰플리콘(451', 451", 453', 453")의 어댑터는 상이한 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머에 혼성화될 수 있고, 후속적으로 도 4h에 예시된 바와 같이 추가의 앰플리콘을 생성하기 위해 증폭될 수 있다. 제1 기관 영역(401)이 채워질 때까지 증폭 작업이 반복되는 경우, 표적 폴리뉴클레오티드 및 앰플리콘의 어댑터 둘 다가 반드시 상응하는 포획 프라이머 또는 직교 포획 프라이머에 혼성화될 필요는 없으며, 이러한 표적 폴리뉴클레오티드 및 앰플리콘은 기관로부터 선형으로 연장될 수 있다.

[0108] 이러한 증폭 후, 도 4i에 도시된 바와 같이, 복수의 제1 제거가능한 차단기(444)가 제거될 수 있고, 복수의 제2 제거가능한 차단기(445)도 제거될 수 있다. 차단기(444) 제거는, 예를 들어 차단기(444, 445)가 서로 동일한 유형의 모이어티를 포함하는 경우, 차단기(445) 제거와 동시적일 수 있다. 대안적으로, 차단기(444)는, 예를 들어 차단기(444, 445)가 서로 상이한 유형의 모이어티를 포함하는 경우, 차단기(445)와 별도의 단계에서 제거될 수 있다. 도 4j에 도시된 바와 같이, 복수의 제1 및 제2 제거가능한 차단기(444, 445)를 제거하는 것에 후속하여, 표적 폴리뉴클레오티드(451, 453) 중 하나의 앰플리콘의 제1 어댑터(454)는 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(442), 예를 들어, 이전에 차단된 직교 포획 프라이머에 혼성화된다. 또한, 도 4j에 도시된 바와 같이, 복수의 제1 및 제2 제거가능한 차단기(444, 445)를 제거하는 것에 후속하여, 표적 폴리뉴클레오티드(451, 453) 중 하나의 앰플리콘의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머(441), 예를 들어, 이전에 차단된 포획 프라이머에 혼성화된다. 따라서, 포획 프라이머(441) 및 직교 포획 프라이머(442)로부터 차단기를 제거하는 것은 제2 기관 영역(402)이 제1 기관 영역(401)을 사용하여 생성된 앰플리콘의 추가 증폭에 이용 가능하게 만들 수 있음을 이해할 수 있다. 다양한 앰플리콘은 추가로 증폭되어, 도 4k에 도시된 바와 같은 조성물을 생성할 수 있다.

[0109] 추가적으로, 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(431)는 절제 모이어티(433)를 포함할 수 있고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(442)는 절제 모이어티(433)를 포함할 수 있다. 절제 모이어티(433, 443)는, 반드시 그럴 필요는 없지만, 서로 동일한 유형의 절제 모이어티일 수 있다. 도 4f 내지 도 4k를 참조하여 설명된 바와 같은 원하는 수의 증폭 작업에 이어서, 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머(431)의 일부는 적합한 효소 또는 시약과 절제 모이어티(433)를 반응시킴으로써 제거될 수 있고, 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머(442)의 일부는 적합한 효소 또는 시약과 절제 모이어티(443)를 반응시킴으로써 제거될 수 있다. 절제 모이어티(433)와 함께 사용되는 효소 또는 시약은 절제 모이어티(443)와 함께 사용되는 효소 또는 시약과 동일하거나 상이할 수 있다. 도 4l에 도시된 바와 같이, 절제 모이어티(433)의 반응은 제1 기관 영역(401)에서 하나의 배향의 폴리뉴클레오티드를 제거하고, 절제 모이어티(434)의 반응은 제2 기관 영역(402)에서 다른 배향의 폴리뉴클레오티드를 제거하여, 동시적 쌍을 이룬-말단 판독이 2개의 기관 영역에서 수행될 수 있다. 기관 영역(401, 402) 각각은 동시적 쌍을 이룬-말단 판독을 허용하기에 충분한 단일클론일 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 기관 영역(401, 402) 내의 각각의 앰플리콘은 각각 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 60%의 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 70%의 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 80% 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 95% 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 99%의 앰플리콘, 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 적어도 약 99% 앰플리콘 또는 하나의 선택된 표적 폴리뉴클레오티드의 약 100% 앰플리콘을 포함할 수 있다.

[0110] 도 3a 내지 도 3j 및 도 4a 내지 도 4l을 참조하여 설명된 예들은 서로 인접한 제1 및 제2 영역들을 갖는 편평한 기관의 사용을 제안하도록 예시되지만, 더 복잡한 기관들이 사용될 수 있다는 것이 명백해야 한다. 예를 들어, 도 5a 내지 도 5d는 제1 및 제2 기관 영역에서 상이한 길이의 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 데 사용하기 위한 추가의 예시적인 조성물을 개략적으로 도시한다. 도 5a 내지 도 5d를 참조하여 설명된 바와 같은 조성물은, 예를 들어, 선택된 영역에서 더 효율적인 증폭을 편향시키기 위해, 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로 사용될 수 있다. 도 5a에 단면으로 그리고 도 5cdp 평면으로 도시된 예시에서, 기관의 제1 영역(501)이 기관의 제2 영역(502)을 둘러싸는 기관(500)은 웰을 제공하는 하나 이상의 수직 측벽(503)을 포함할 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(503)은 실질적으로 원통형이고, 제1 영역(501) 및 제2 영역(502) 모두를 둘러쌀 수 있고, 제1 영역(501)은 실질적으로 환형일 수 있고, 제2 영역(502)은 실질적으로 원형일 수 있음). 대안적으로, 기관의 제2 영역(502)은 기관의 제1 영역(501)을 둘러쌀 수 있다(예를 들어, 수

직 측벽(503)은 실질적으로 원통형이고 제1 영역(501) 및 제2 영역(502) 모두를 둘러쌀 수 있고, 제2 영역(502)은 실질적으로 환형일 수 있고, 제1 영역(501)은 실질적으로 원형일 수 있음). 또 다른 대안으로서, 수직 측벽(503)은 생략될 수 있고, 기관(500)은 도시된 영역에서 실질적으로 평면일 수 있다. 제1 및 제2 영역(501, 502)은 서로에 대해 임의의 적합한 형상 및 위치를 가질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 제2 영역(502)은 반드시 실질적으로 원형일 필요는 없고, 반드시 제1 영역(501)의 중간에 배치될 필요는 없다. 유사하게, 제1 영역(501)은 반드시 실질적으로 환형일 필요는 없으며 반드시 제2 영역을 대칭적으로 둘러쌀 필요는 없다. 임의의 이러한 예시에서, 도 3a를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로, 상대적으로 짧은 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 제1 영역(501)에서 기관(500)에 결합될 수 있는 한편, 더 긴 (예를 들어, 전장) 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 제2 영역(502)에서 기관(500)에 결합될 수 있다. 이와 같이, 증폭은 중앙에 위치될 수 있고 더 긴 프라이머가 기관(500)에 부착되는 제2 영역(502)에서 더 효율적인 것으로 편향될 수 있다.

[0111] 도 5b의 단면도 및 도 5d의 평면도에 도시된 예시에서, 기관(500')은 기관의 제2 영역 (502')을 포함하고 기관의 제1 영역 (501')에 의해 둘러싸인 웰을 제공하는 하나 이상의 수직 측벽 (503')을 포함할 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(503')은 실질적으로 원통형일 수 있고, 실질적으로 원형인 제2 영역(502')를 둘러쌀 수 있는 반면, 제1 영역(501')은 실질적으로 환형이고 수직 측벽(503') 및 제2 영역(502')을 둘러쌀 수 있음). 대안적으로, 기관의 제1 영역(501')은 기관의 제2 영역 (502')을 둘러쌀 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(503')은 실질적으로 원통형이고 실질적으로 원형인 제1 영역 (501')을 둘러쌀 수 있는 반면, 제2 영역 (502')은 실질적으로 환형이고 수직 측벽(503') 및 제1 영역 (501')을 둘러쌀 수 있음). 또 다른 대안으로서, 수직 측벽(503')은 생략될 수 있고, 기관(500)은 도시된 영역에서 실질적으로 평면일 수 있다. 제1 및 제2 영역(501', 502')은 서로에 대해 임의의 적합한 형상 및 위치를 가질 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 제2 영역(502')은 반드시 실질적으로 원형일 필요는 없고, 반드시 제1 영역(501')의 중간에 배치될 필요는 없다. 유사하게, 제1 영역(501')은 반드시 실질적으로 환형일 필요는 없으며 반드시 제2 영역을 대칭적으로 둘러쌀 필요는 없다. 임의의 이러한 예시에서, 도 3a를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로, 상대적으로 짧은 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 제1 영역(501')에서 기관(500)에 결합될 수 있는 반면, 더 긴(예를 들어, 전장) 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 제2 영역(502')에서 기관 (500')에 결합될 수 있다. 이와 같이, 증폭은 중앙에 위치될 수 있고 더 긴 프라이머가 기관 (500')에 부착될 수 있는 제2 영역 (502')에서 더 효율적인 것으로 편향될 수 있다.

[0112] 도 6a 내지 도 6d는 제1 기관 영역에서 비차단된 프라이머 및 제2 기관 영역에서 제거가능하게 차단된 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는데 사용하기 위한 추가의 예시적인 조성물을 개략적으로 도시한다. 도 6a 내지 도 6d를 참조하여 기술된 바와 같은 조성물은, 예를 들어, 선택된 영역에서 더 효율적인 증폭으로 편향되도록, 도 4a 내지 도 4i를 참조하여 설명된 것과 유사한 방식으로 사용될 수 있다. 도 6a에 단면으로 그리고 도 6c에 평면으로 도시된 예시에서, 기관의 제1 영역(601)이 기관의 제2 영역(602)을 둘러싸는 기관(600)은 웰을 제공하는 하나 이상의 수직 측벽(603)을 포함할 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(603)은 실질적으로 원통형이고 제1 영역(601) 및 제2 영역(602) 모두를 둘러쌀 수 있고, 제1 영역(601)은 실질적으로 환형일 수 있고, 제2 영역(602)은 실질적으로 원형일 수 있음). 대안적으로, 기관의 제2 영역(602)은 기관의 제1 영역(601)을 둘러쌀 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(603)은 실질적으로 원통형이고 제1 영역(601) 및 제2 영역(602) 모두를 둘러쌀 수 있고, 제2 영역(602)은 실질적으로 환형일 수 있고, 제1 영역(601)은 실질적으로 원형일 수 있음). 또 다른 대안으로서, 수직 측벽(603)은 생략될 수 있고, 기관(600)은 도시된 영역에서 실질적으로 평면일 수 있다. 제1 및 제2 영역(601, 602)은 서로에 대해 임의의 적합한 형상 및 위치를 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 제2 영역(602)은 반드시 실질적으로 원형일 필요는 없고, 반드시 제1 영역(601)의 중간에 배치될 필요는 없다. 유사하게, 제1 영역(601)은 반드시 실질적으로 환형일 필요는 없으며 반드시 제2 영역을 대칭적으로 둘러쌀 필요는 없다. 임의의 이러한 예시에서, 도 4a를 참조하여 기술된 것과 유사한 방식으로, 이에 결합된 차단기를 갖는 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 제1 영역(601)에서 기관(600)에 결합될 수 있는 반면, 비차단된 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머는 제2 영역(602)에서 기관(600)에 결합될 수 있다. 이와 같이, 증폭은 중앙에 위치될 수 있고 차단기(601)가 생략될 수 있는 제2 영역(602)에서 더 효율적인 것으로 편향될 수 있다.

[0113] 도 6b의 단면도 및 도 6d의 평면도에 도시된 예시에서, 기관(600')은 기관의 제2 영역 (602')을 둘러싸고 기관의 제1 영역 (601')에 의해 둘러싸인 웰을 제공하는 하나 이상의 수직 측벽(603')을 포함할 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(603')은 실질적으로 원통형이고 실질적으로 원형인 제2 영역(602')을 둘러쌀 수 있는 반면, 제1 영역(601')은 실질적으로 환형이고 수직 측벽(603') 및 제2 영역(602')을 둘러쌀 수 있음). 대안적으로, 기관의 제

1 영역(601')은 기관의 제2 영역(602')을 둘러쌀 수 있다(예를 들어, 수직 측벽(603')은 실질적으로 원통형이고 실질적으로 원형인 제1 영역(601')을 둘러쌀 수 있는 반면, 제2 영역(602')은 실질적으로 환형이고 수직 측벽(603') 및 제1 영역(601')을 둘러쌀 수 있음). 또 다른 대안으로서, 수직 측벽(603')은 생략될 수 있고, 기관(600)은 도시된 영역에서 실질적으로 평면일 수 있다. 제1 및 제2 영역(601, 602)은 서로에 대해 임의의 적합한 형상 및 위치를 가질 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 제2 영역(602)은 반드시 실질적으로 원형일 필요는 없고, 반드시 제1 영역(601)의 중간에 배치될 필요는 없다. 유사하게, 제1 영역(601)은 반드시 실질적으로 환형일 필요는 없으며 반드시 제2 영역을 대칭적으로 둘러쌀 필요는 없다. 임의의 이러한 예시에서, 도 4a를 참조하여 기술된 것과 유사한 방식으로, 차단된 포획 프라이머 및 차단된 직교 포획 프라이머는 제1 영역(601')에서 기관(600')에 결합될 수 있는 반면, 비차단된 포획 프라이머 및 비차단된 직교 포획 프라이머는 제2 영역(602')에서 기관(600')에 결합될 수 있다. 이와 같이, 증폭은 중앙에 위치될 수 있고 차단기(601')가 생략될 수 있는 제2 영역(602')에서 더 효율적인 것으로 편향될 수 있다.

[0114] 본 명세서에 기재된 바와 같은 예시적인 조성물은 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 임의의 적합한 방법에 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 도 7은 제1 및 제2 기관 영역에서 상이한 길이의 프라이머를 사용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭시키기 위한 방법(700)에서의 작업의 예시적인 흐름을 도시한다. 방법(700)은 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 설명된 조성물(3000) 또는 도 5a 내지 도 5d를 참조하여 설명된 조성물을 사용하여 구현될 수도 있지만, 방법(700)은 임의의 다른 적합한 조성물을 사용하여 구현될 수 있다.

[0115] 이제 도 7을 참조하면, 방법(700)은 조성물을 유체와 접촉시키는 단계를 포함한다(작업(710)). 일부 실시예에서, 조성물은 도 3a, 도 5a, 또는 도 5b를 참조하여 기술된 것과 같은 것일 수 있다. 예시적으로, 조성물은 제1 영역 및 제2 영역, 예를 들어, 제1 영역(301, 501, 또는 501') 및 제2 영역(302, 502, 또는 502')을 포함하는 기관을 포함할 수 있다. 복수의 제1 포획 프라이머는 기관의 제1 영역, 예를 들어, 포획 프라이머(331), 또는 제1 영역(501 또는 501') 내의 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머는 기관의 제2 영역, 예를 들어 포획 프라이머(341), 또는 제2 영역(502 또는 502') 내의 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머는 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머보다 길 수 있다. 복수의 제1 직교 포획 프라이머는 기관의 제1 영역, 예를 들어, 직교 포획 프라이머(332), 또는 제1 영역(501 또는 501') 내 직교 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머는 기관의 제2 영역, 예를 들어, 직교 포획 프라이머(342), 또는 제2 영역(502 또는 502') 내의 직교 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머는 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머보다 짧을 수 있다.

[0116] 유체는 표적 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 각각의 표적 폴리뉴클레오티드는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터, 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터, 예를 들어, 도 3a를 참조하여 기술된 제1 및 제2 어댑터(354, 355)를 포함할 수 있다.

[0117] 방법(700)은 표적 폴리뉴클레오티드들 중 제1 표적 폴리뉴클레오티드의 제1 어댑터를 복수의 제1 또는 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 혼성화하는 단계, 또는 그 표적 폴리뉴클레오티드의 제2 어댑터를 복수의 제1 또는 제2포획 프라이머의 포획 프라이머에 혼성화하는 단계(작업 720)를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 3b를 참조하여 설명한 바와 같이, 표적 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 푸아송 분포에 따라 기관 표면에 걸쳐 분포될 수 있다. 그러나, 도 3e 내지 도 3i를 참조하여 기술된 바와 같이, 제1 및 제2 기관 영역 사이의 경계로부터 멀리 충분히 멀리 혼성화하는 표적 폴리뉴클레오티드의 경우, 기관의 해당 영역에서 단축된 포획 프라이머 또는 단축된 직교 포획 프라이머는 이러한 폴리뉴클레오티드의 다른 어댑터의 혼성화를 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있다. 비교하면, 제1 및 제2 기관 영역 사이의 경계에 충분히 가깝게 혼성화하는 표적 폴리뉴클레오티드의 경우, 다수의 앰플리콘이 생성될 수 있다.

[0118] 방법(700)은 표적 폴리뉴클레오티드를 증폭시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 증폭 단계는 이러한 표적 폴리뉴클레오티드의 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함한다(작업 730)). 예를 들어, 도 3e 내지 도 3i를 참조하여 기술한 바와 같이, 기관의 제1 및 제2 영역 사이의 경계에 충분히 가까운 표적 폴리뉴클레오티드의 앰플리콘은 더 증폭될 수 있는 반면, 경계로부터 충분히 멀리 있는 표적 폴리뉴클레오티드의 앰플리콘은 추가로 증폭되지 않을 수 있다. 예시적으로, 방법(700)은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 제1 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계, 및 예를 들어, 앰플리콘이 기관의 제1 영역과 제2 영역 사이의 경계를 가교함으로써 추가로 증폭될 수 있도록, 제1 앰플리콘의 제2 어댑터를 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 방법(700)은 복수의 제1 포획 프라이머

의 포획 프라이머 중 하나에 제2 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계, 및 예를 들어, 앰플리콘이 기관의 제1 및 제2 영역 사이의 경계를 가교함으로써 추가로 증폭될 수 있도록, 제2 앰플리콘의 제1 어댑터를 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화하는 단계를 포함할 수 있다.

[0119] 방법(700)은 또한 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 제3 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 포함할 수 있되, 제3 앰플리콘의 제2 어댑터를 복수의 제1 포획 프라이머의 임의의 포획 프라이머에 완전히 혼성화할 수 없다. 복수의 제1 포획 프라이머의 임의의 포획 프라이머에 대한 제2 어댑터의 완전히 혼성화의 불능성은, 예를 들어, 앰플리콘이 기관의 제1 영역 및 제2 영역 사이의 경계를 가교하지 않을 수 있는 제3 앰플리콘의 증폭을 할 수 있다. 일부 실시예에서, 제3 앰플리콘의 제2 어댑터와 복수의 제1 포획 프라이머의 임의의 포획 프라이머 사이의 임의의 부분 이중체는 약 20°C 미만의 용융 온도(T_m)를 갖는다. 방법(700)은, 또한, 또는 대안적으로, 제4 앰플리콘을 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 공유 결합시키는 것을 포함할 수 있고, 제4 앰플리콘의 제1 어댑터를 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 임의의 직교 포획 프라이머에 완전히 혼성화할 수 없다. 제1 어댑터의 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 임의의 직교 포획 프라이머에 대한 완전한 혼성화의 불능성은 제4 앰플리콘을 증폭 할 수 있다. 이와 같이, 제1 또는 제2 앰플리콘은 추가로 증폭될 수 있는 반면, 제3 및 제4 앰플리콘은 추가로 증폭되지 않을 수 있다.

[0120] 도 8은 제1 기관 영역에서 차단된 프라이머 및 제2 기관 영역에서 제거가능하게 차단하는 프라이머를 사용하여 제거가능하게 차단하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키기 위한 방법(800)에서의 작업의 예시적인 흐름을 도시한다. 방법(800)은 도 4a 내지 도 4l 조하여 설명된 조성물(4000) 또는 도 6a 내지 도 6d를 참조하여 설명된 조성물을 사용하여 구현될 수 있지만, 방법(800)은 임의의 다른 적합한 조성물을 사용하여 구현될 수 있다.

[0121] 이제 도 8을 참조하면, 방법(800)은 조성물을 유체와 접촉시키는 단계(작업(810))를 포함할 수 있다. 일부 실시예에서, 본원의 다른 곳에서 설명된 바와 같은 방식으로, 조성물은 제1 영역 및 제2 영역, 예를 들어, 제1 영역(401, 601, 또는 601') 및 제2 영역(402, 602, 또는 602')을 포함하는 기관을 포함할 수 있다. 복수의 제1 포획 프라이머는 기관의 제1 영역, 예를 들어, 포획 프라이머(431), 또는 제1 영역(601 또는 601')내의 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제1 직교 포획 프라이머는 기관의 제1 영역, 예를 들어, 직교 포획 프라이머(432), 또는 제1 영역(601 또는 601')내의 직교 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 포획 프라이머는 기관의 제2 영역, 예를 들어, 포획 프라이머(441), 또는 제2 영역(602 또는 602') 내의 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 직교 포획 프라이머는 기관의 제2 영역, 예를 들어, 직교 포획 프라이머(442), 또는 제2 영역(602 또는 602') 내의 직교 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제1 제거가능한 차단기(예를 들어, 차단기(444))는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 복수의 제2 제거가능한 차단기(예를 들어, 차단기(445))는 복수의 제2 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 결합될 수 있다. 유체는 표적 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 각각의 표적 폴리뉴클레오타이드는 복수의 제1 및 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머에 상보적인 제1 어댑터 및 복수의 제1 및 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머에 상보적인 제2 어댑터, 예를 들어, 도 4a를 참조하여 기술된 제1 및 제2 어댑터(454, 455)를 포함할 수 있다.

[0122] 방법(800)은 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터를 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 각각 혼성화시키는 단계, 또는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터를 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화시키는 단계(작업(820))를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 도 4b를 참조하여 기술한 바와 같이, 표적 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 푸와송 분포에 따라 기관 표면을 가로질러 분포될 수 있고, 이러한 영역에 결합된 프라이머와 혼성화될 수 있다. 이러한 표적 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상은 프라이머가 차단기를 포함하는 영역에 존재할 수 있고, 이러한 표적 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상(예를 들어, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드)은 프라이머가 차단기를 포함하지 않는 영역에 존재할 수 있다.

[0123] 방법(800)은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 증폭 단계는 기관의 제1 영역에서 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 앰플리콘을 생성하는 단계를 포함한다(작업(830)). 예를 들어, 기관의 제1 영역 내 프라이머는 차단기가 결여되어 있기 때문에, 도 4f 내지 도 4h를 참조하여 기술된 바와 같은 방식으로 제1 영역에서 증폭이 용이하게 수행될 수 있다. 예를 들어, 방법(800)은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를 포함할 수 있으며, 앰플리콘은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화되는 제2 어댑터를 갖는다. 이러한 앰플리콘은 기관의 제1 영역에서 쉽게 추가로 증폭될 수 있다. 대안적으로, 방법(800)은 복수의 제1 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 앰플리콘을 공유 결합시키는 단계를

포함할 수 있으며, 앰플리콘은 복수의 제1 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 완전히 혼성화되는 제1 어댑터를 갖는다. 이러한 앰플리콘은 기관의 제1 영역에서 쉽게 추가로 증폭될 수 있다.

[0124] 비교하면, 기관의 제2 영역 내 프라이머가 차단기를 포함하기 때문에, 증폭은 제2 영역에서 억제될 수 있다. 차단기는 기관의 제2 영역에서 혼성화되는 임의의 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 억제할 수 있다. 예를 들어, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 제1 어댑터는 복수의 제2 직교 포획 프라이머의 직교 포획 프라이머 중 하나에 혼성화될 수 있거나, 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 제2 어댑터는 복수의 제2 포획 프라이머의 포획 프라이머 중 하나에 혼성화된다. 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 억제할 수 있거나, 직교 포획 프라이머 중 하나에 결합된 제거가능한 차단기는 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제2 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭을 억제할 수 있다.

[0125] 방법(800)은, 예를 들어, 도 4i를 참조하여 설명된 바와 같은 방식으로, 복수의 제1 및 제2 제거가능한 차단기를 제거하는 단계(작업(840))를 포함할 수 있다. 그런 다음, 방법(800)은 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드를 추가로 증폭시키는 단계를 더 포함할 수 있되, 증폭 단계는, 예를 들어, 도 4j 내지 도 4k를 참조하여 설명된 바와 같은 방식으로, 기관의 제2 영역에서 표적 폴리뉴클레오타이드 중 제1 표적 폴리뉴클레오타이드의 추가 앰플리콘을 생성하는 단계(작업(850))를 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법은 전술한 특정 작업에 사용되는 것으로 제한되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 도 3a 내지 도 3j 및 도 4a 내지 도 4i는 "가교 증폭" 또는 "표면-결합 중합효소 연쇄 반응"과 일치하는 작업으로 간주될 수 있지만, 본 발명의 조성물 및 방법은 다른 증폭 양식과 함께 사용하도록 쉽게 적응될 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 증폭 양식 중 하나는 "배제 증폭" 또는 ExAmp이다. 배제 증폭 방법은 기관 영역 당 단일 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭 및 기관 영역에서 실질적으로 앰플리콘의 단일클론 집단의 생성을 허용할 수 있다. 예를 들어, 기관 영역 내에서 제1 포획된 표적 폴리뉴클레오타이드의 증폭 속도는 기관 영역에서 표적 폴리뉴클레오타이드의 훨씬 더 느린 이송 및 포획의 속도에 비해 더 신속할 수 있다. 이와 같이, 기관 영역에 포획된 제1 표적 폴리뉴클레오타이드는 신속하게 증폭되고 전체 기관 영역을 채우므로, 동일한 기관 영역에서 추가적인 표적 폴리뉴클레오타이드의 포획을 억제한다. 대안적으로, 제2 표적 폴리뉴클레오타이드가 제1 폴리뉴클레오타이드 이후에 동일한 기관 영역에 부착되는 경우, 제1 폴리뉴클레오타이드의 상대적으로 신속한 증폭은 기관 영역을 채우기에 충분하여 합성에 의한 서열분석을 수행하기에 충분히 강한 신호를 초래할 수 있다(예를 들어, 기관 영역은 적어도 기능적으로 단일클론일 수 있음). 배제 증폭의 사용은 또한 단일클론 기관 영역의 초파송 분포를 초래할 수 있다; 즉, 기능적으로 단일클론인 어레이 내 기관 영역의 분획은 파와송 분포에 의해 예측된 분획을 초과할 수 있다.

[0126] 더욱 기능적으로 단일클론인 기관 영역이 더 높은 품질 신호를 초래할 수 있고 따라서 SBS를 개선시킬 수 있기 때문에 유용한 클러스터의 초파송 분포를 증가시키는 것이 유용하다; 그러나, 표적 폴리뉴클레오타이드를 기관 영역에 시딩하는 것은 공간적 파와송 분포를 따를 수 있으며, 여기서 점유된 기관 영역의 수를 증가시키기 위한 트레이드오프는 다중클론 기관 영역의 수를 증가시킨다. 더 높은 초파송 분포를 얻는 한 가지 방법은 시딩이 신속하게 발생하고, 이어서 시딩된 표적 폴리뉴클레오타이드 사이에 지연이 후속되는 것이다. 생화학적 반응 속도를 통해 발생하는 것으로 생각되기 때문에, "운동학적 지연"이라고 하는 지연은 하나의 시딩된 표적 폴리뉴클레오타이드에 다른 시딩된 표적보다 빠른 시작을 제공한다. 배제 증폭은 재조합효소가 서열 매칭을 매개할 때 이중 가닥 DNA(예를 들어, 표적 폴리뉴클레오타이드) 내로 프라이머 (예를 들어, 기관 영역에 부착된 프라이머)의 침습을 용이하게 하기 위해 재조합효소를 사용함으로써 작용한다. 본 발명의 조성물 및 방법은 재조합효소가 서열 매칭을 매개할 때 본 발명의 포획 프라이머 및 직교 포획 프라이머의 본 표적 폴리뉴클레오타이드로의 침입을 용이하게 하기 위해 재조합효소와 함께 사용하도록 조정될 수 있다. 실제로, 본 발명의 조성물 및 방법은 임의의 표면 기반 폴리뉴클레오타이드 증폭 방법, 예컨대 열 PCR, 화학적으로 변성된 PCR, 및 효소적으로 매개된 방법(재조합효소 중합효소 증폭(RPA) 또는 ExAmp로도 지칭될 수 있음)과 함께 사용하도록 조정될 수 있다.

[0127] 실시예

[0128] 하기 실시예는 순수하게 예시적인 것으로 의도되며, 어떠한 방식으로든 제한하지 않는다.

[0129] 도 9는 증폭 효율에 대한 포획 프라이머 길이의 효과를 특성화하기 위한 해법-기반 모델 조성물을 개략적으로 도시한다. 보다 구체적으로, 모델 조성물은 소광제가 형광단의 형광을 억제하도록 소광제(블랙 정공 센터, BHQ)에 결합된 P5 프라이머를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드에 혼성화된, 형광단(플루오레센, FAM)에 결합된 제1 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 이중체를 포함하였다. P5 어댑터, 재조합효소, 중합효소, 및 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 재조합효소 중합효소 증폭(RPA 또는 ExAmp) 공정에서 제1 올리고뉴클레오타이드와 제2 올리고

고뉴클레오티드 사이에 이중체를 침입시켜, 침입 P5 프라이머의 연장 및 제1 올리고뉴클레오티드로부터의 제2 올리고뉴클레오티드의 해리를 유발하여 형광단이 형광을 발하도록 하였다.

[0130] 도 10은 상이한 길이의 포획 프라이머를 이용한 증폭으로부터 생성된 형광 강도를 보여주는 도표이다. 보다 구체적으로, 트래이스(1001)는 29 염기 길이인 전장 P5 프라이머를 사용하여 도 9를 참조하여 설명된 모델 조성물로부터의 측정된 형광 강도이며; 트래이스(1002)는 15개 염기 길이인 변형된 P5 프라이머를 사용하여 그 시스템으로부터의 측정된 강도이고; 트래이스(1003)는 10개 염기 길이인 변형된 P5 프라이머를 사용하여 그 시스템으로부터의 측정된 강도이고; 트래이스(1004)는 13개의 염기 길이인 변형된 P5 프라이머를 사용하는 그 시스템으로부터의 측정된 강도이고, 트래이스(1005)는 침입 P5 프라이머를 사용하지 않고 그 시스템으로부터의 측정된 강도(음성 대조군)이다. 도 10으로부터, 전장 P5 프라이머를 사용하는 모델 조성물로부터의 초기 형광 강도가 가장 높았으며, 이는 이 프라이머가 가장 효과적으로 증폭되어 형광단으로부터의 소광제의 해리를 가장 많이 야기하였음을 나타낼 수 있다. 15개 염기 길이인 변형된 P5 프라이머를 사용하는 모델 조성물로부터의 형광 강도는 전장 P5 프라이머를 사용한 값보다 상당히 낮은 값으로 시작되었지만, 전장 P5 프라이머를 사용하는 값과 유사한 값으로 점진적으로 증가하였다. 13개 및 10개 염기의 길이인 변형된 P5 프라이머를 사용한 모델 조성물로부터의 형광 강도는 서로 유사하였다. 침입 P5 프라이머의 사용하지 않은 모델 조성물(음성 대조군)로부터의 형광 강도는 가장 낮았다. 도 10으로부터, 더 짧은 프라이머가 더 낮은 증폭 효율을 갖는 것으로 예상될 수 있다는 것이 이해될 수 있다. 이와 같이, 도 3a 내지 도 3j를 참조하여 기술된 바와 같은 조성물의 경우, 표적 폴리뉴클레오티드가 실질적으로 단축된 프라이머만 접근할 수 있는 영역에서는 표적 폴리뉴클레오티드가 더 긴 프라이머에 접근할 수 있는 경계 영역에서보다 증폭이 덜 효율적일 것으로 예상될 수 있다는 것이 예상될 수 있다.

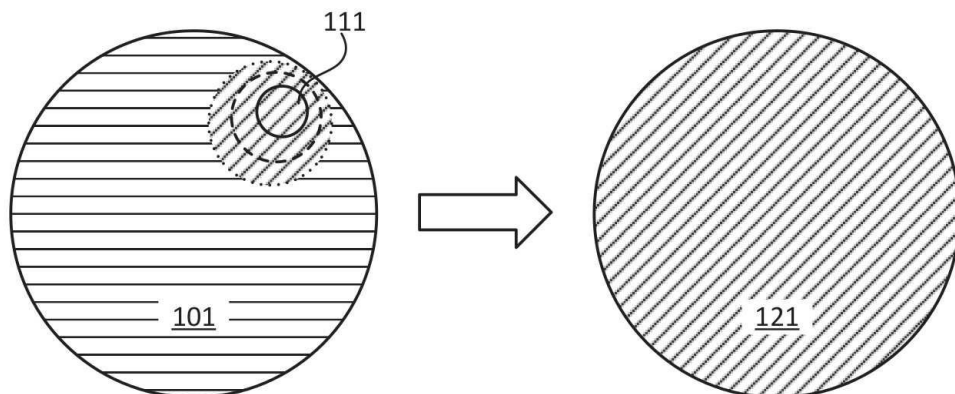
[0131] **추가 주석**

[0132] 다양한 예시적인 예가 위에서 설명되어 있지만, 본 발명을 벗어나지 않고 다양한 변경 및 수정이 이루어질 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 조성물은 조성물(3000) 및 조성물(4000)로부터의 성분들의 임의의 적합한 조합을 포함할 수 있고, 방법은 방법(700) 및 방법(800)으로부터의 작동들의 임의의 적합한 조합을 포함할 수 있다. 첨부된 청구범위는 본 발명의 진정한 사상 및 범위 내에 속하는 이러한 모든 변경 및 수정을 포함하도록 의도된다.

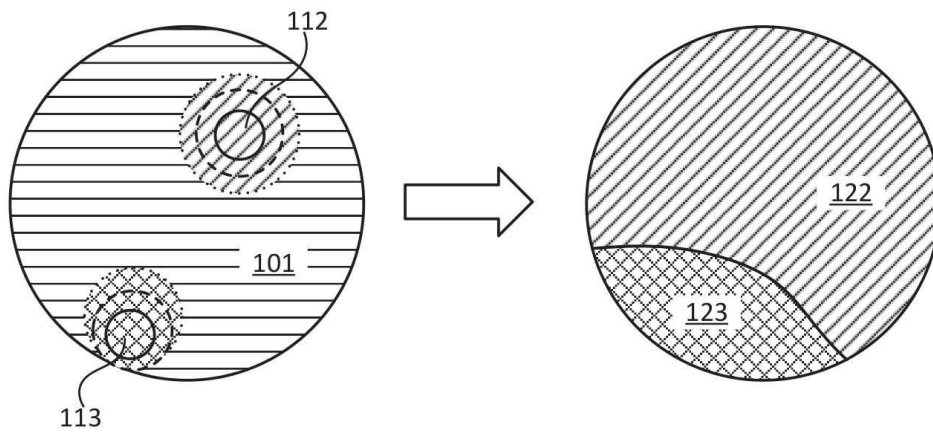
[0133] 본 명세서에서 설명되는 바와 같은 본 개시의 양태 각각의 임의의 각각의 특징부/에는 본 명세서에서 설명된 바와 같은 결과를 달성하기 위해 임의의 적절한 조합으로 함께 구현될 수 있고, 이러한 양태들 중 임의의 하나 이상으로부터의 임의의 특징부/에는 여기에서 설명된 바와 같은 이점을 달성하기 위해 임의의 조합으로 본 명세서에서 설명된 바와 같은 다른 양태(들)의 임의의 특징부와 함께 구현될 수 있음을 이해할 것이다.

도면

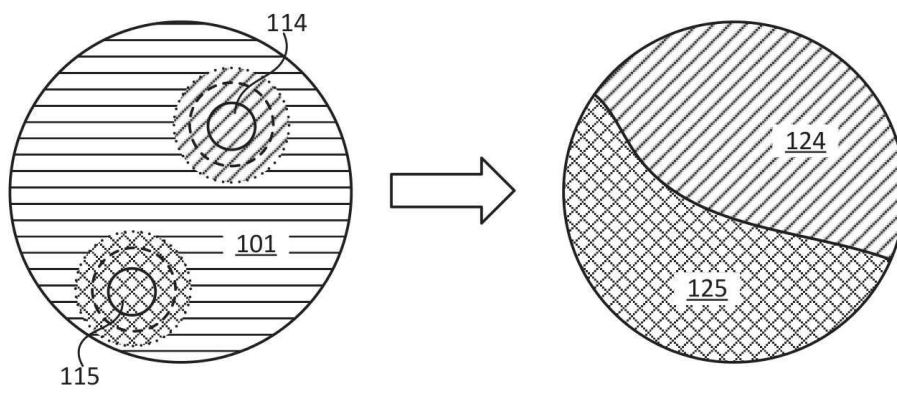
도면1a



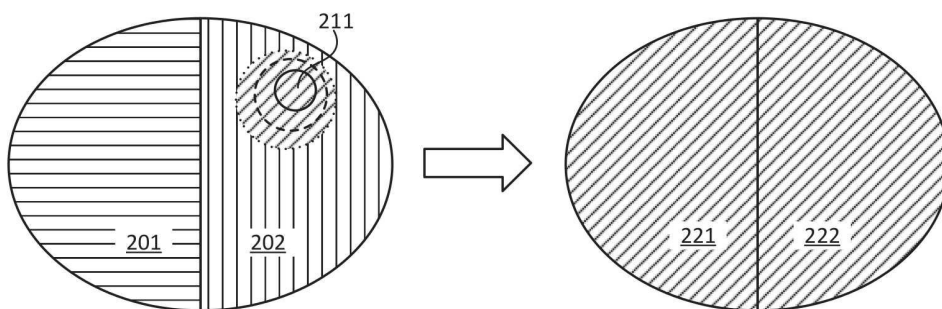
도면1b



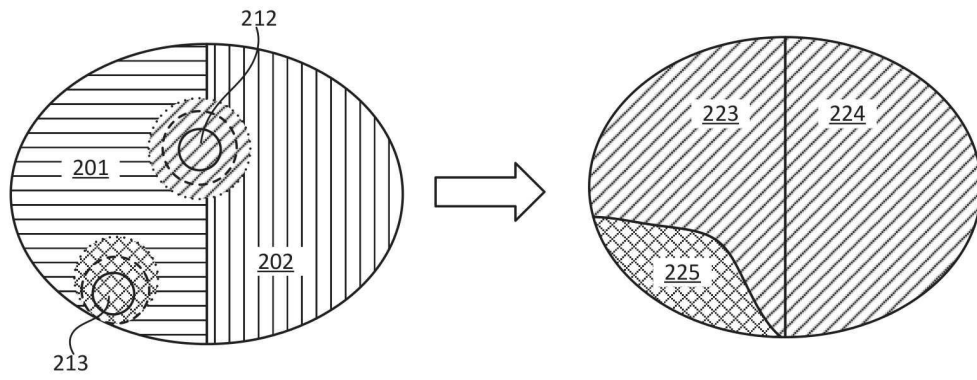
도면1c



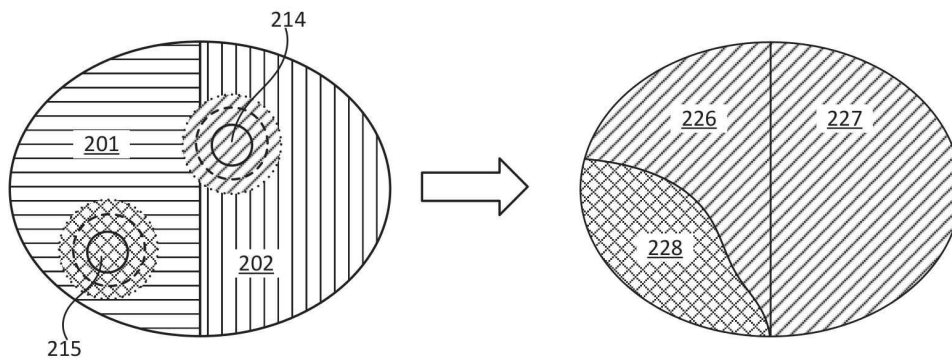
도면2a



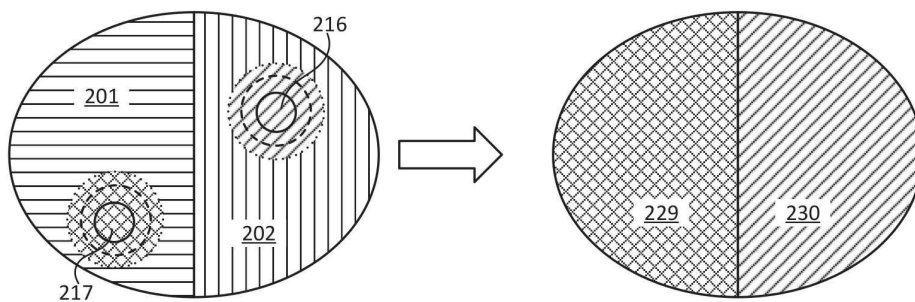
도면2b



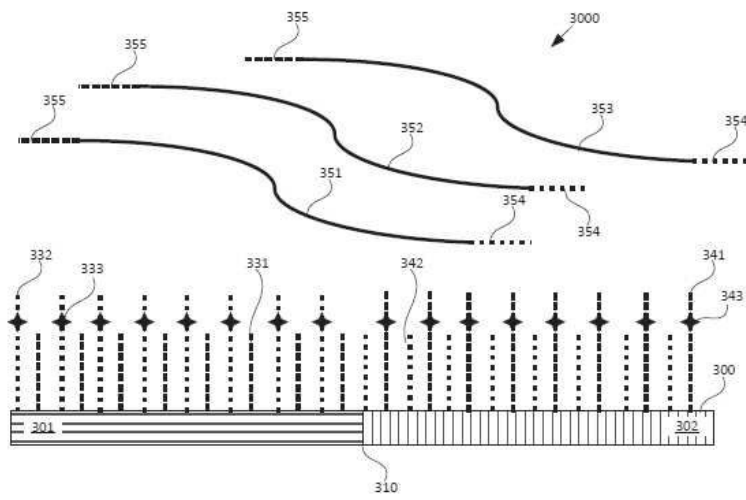
도면2c



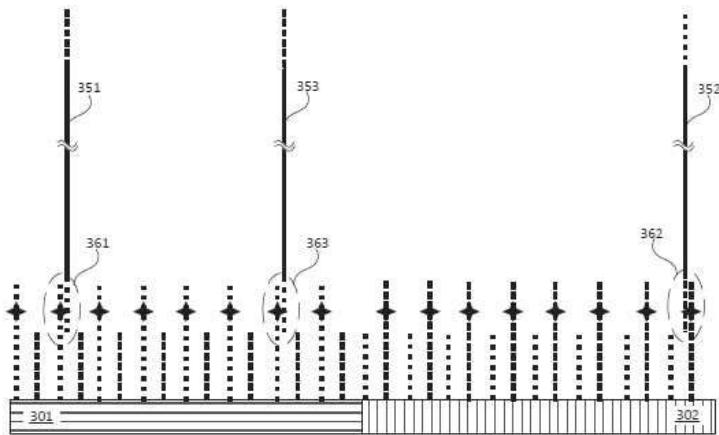
도면2d



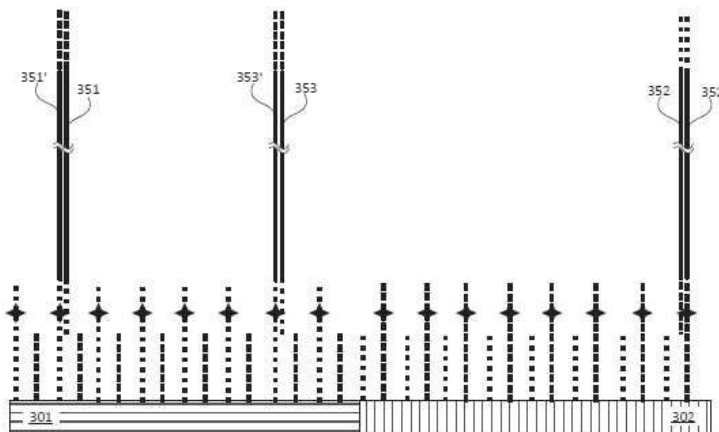
도면3a



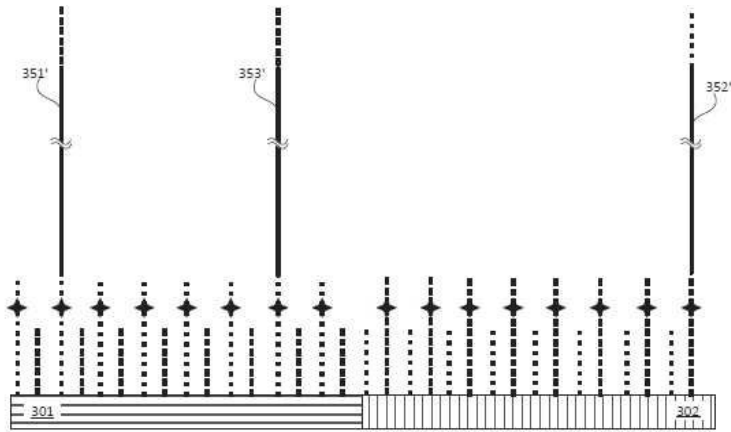
도면3b



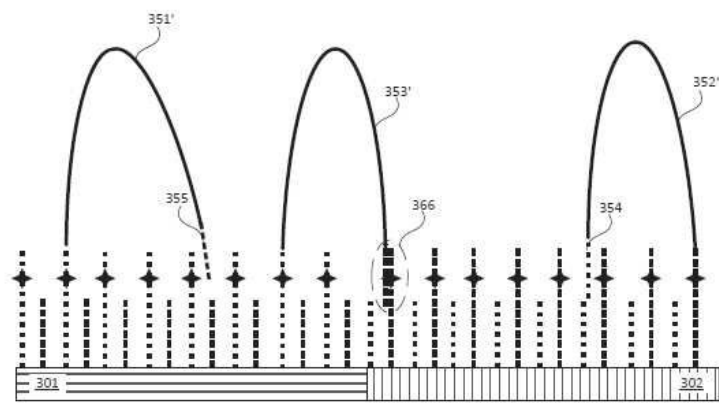
도면3c



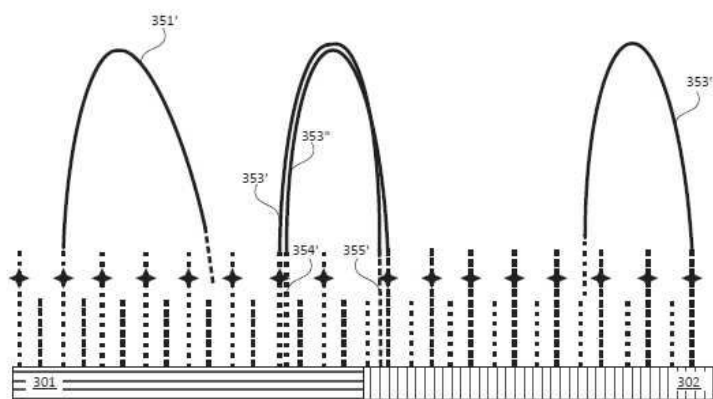
도면3d



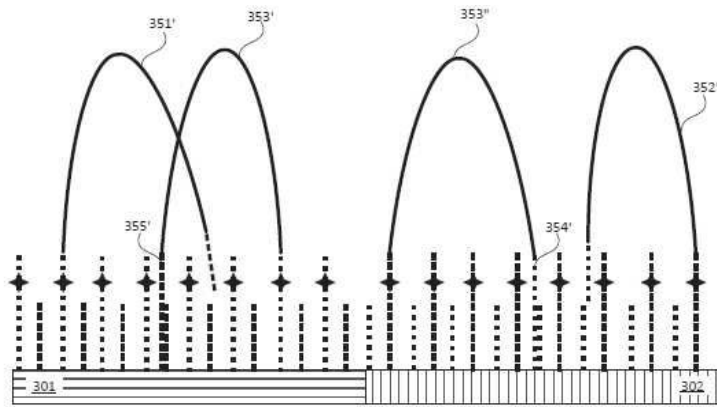
도면3e



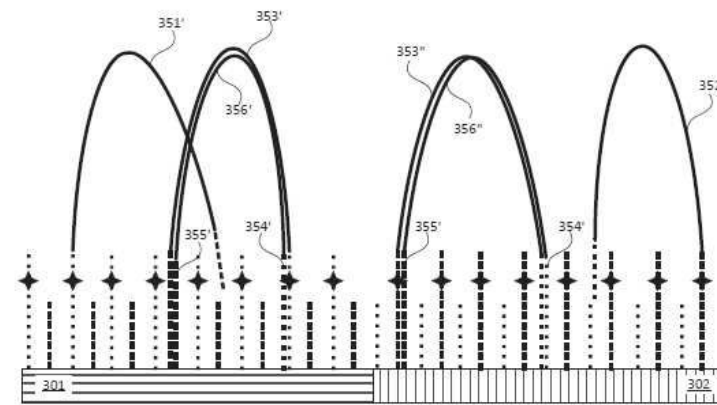
도면3f



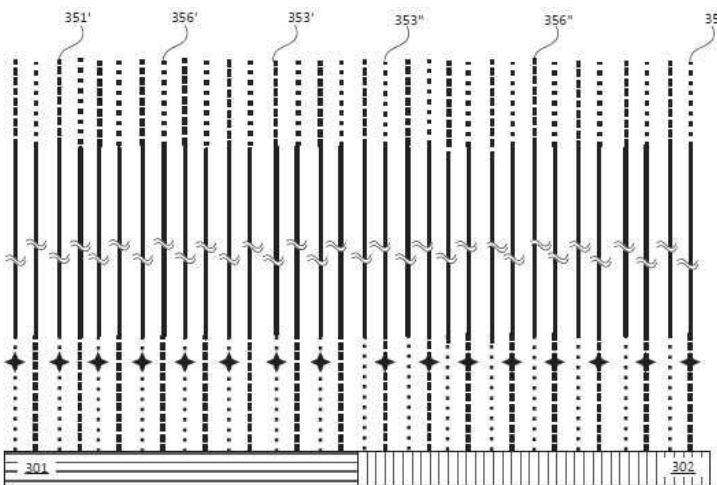
도면3g



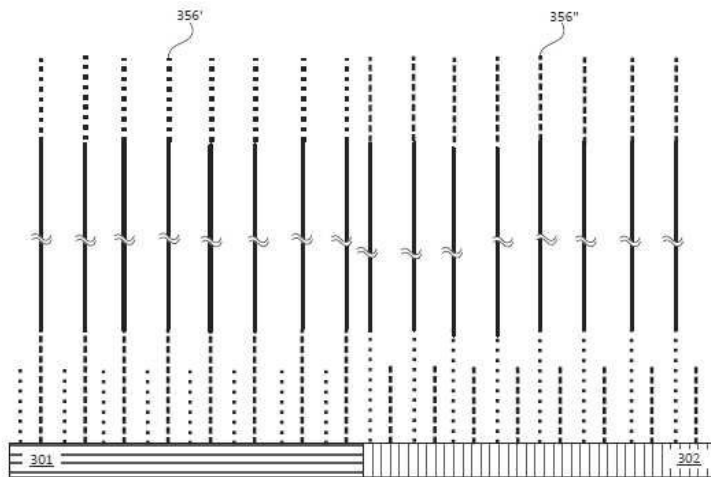
도면3h



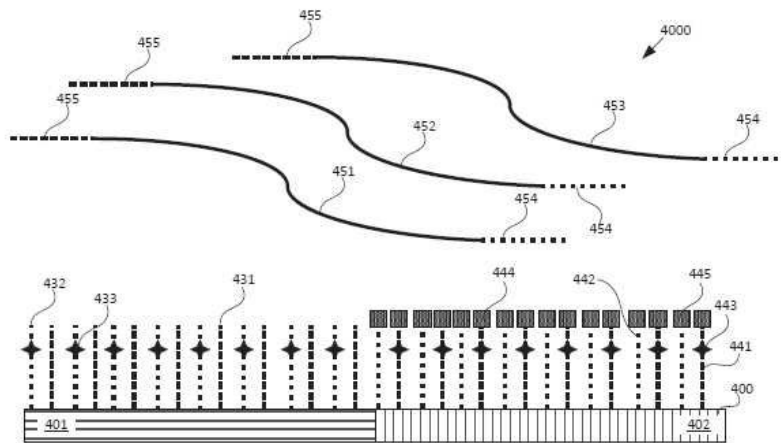
도면3i



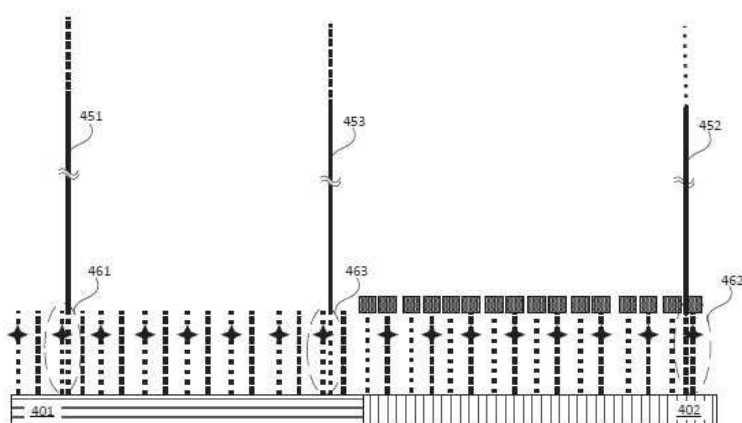
도면3j



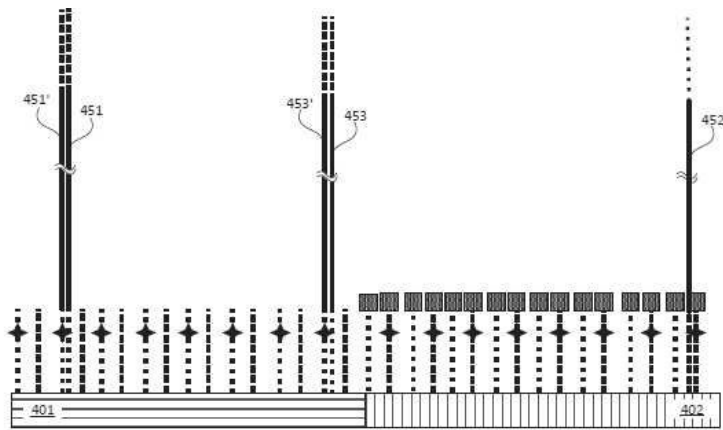
도면4a



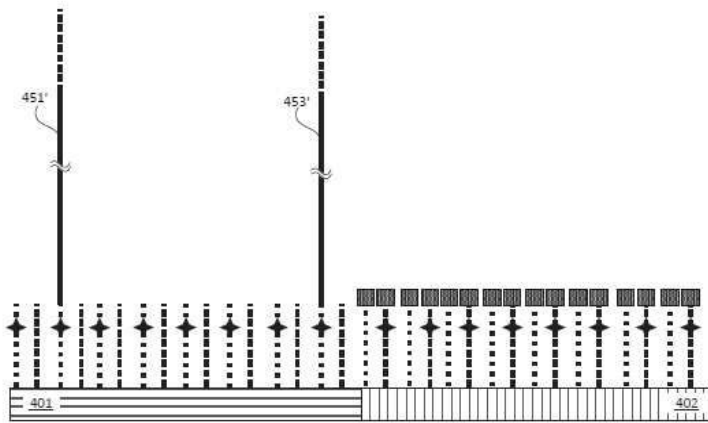
도면4b



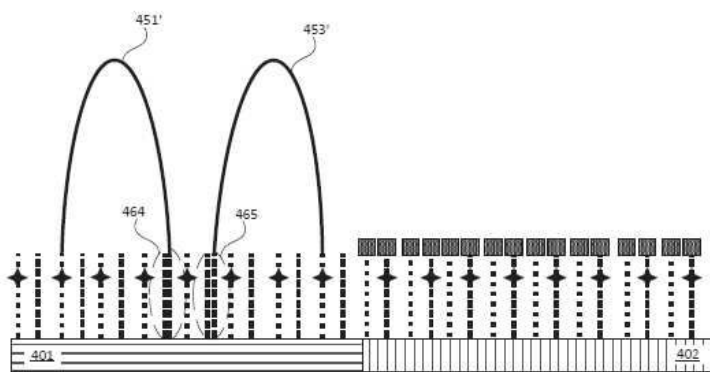
도면4c



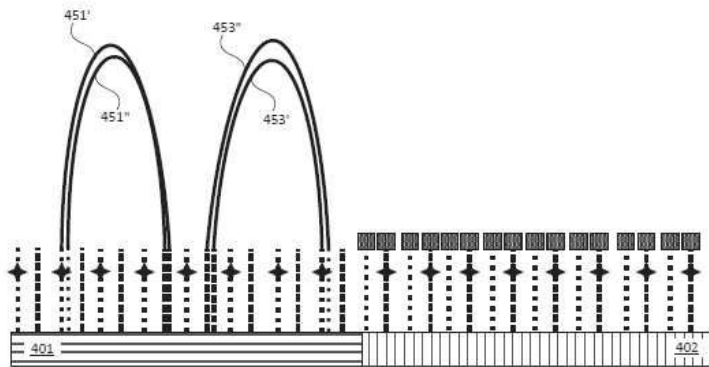
도면4d



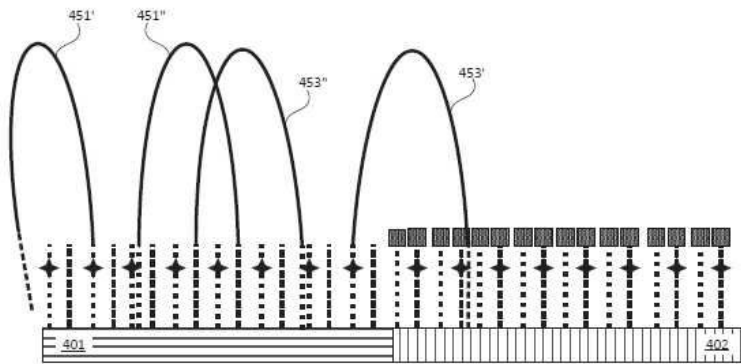
도면4e



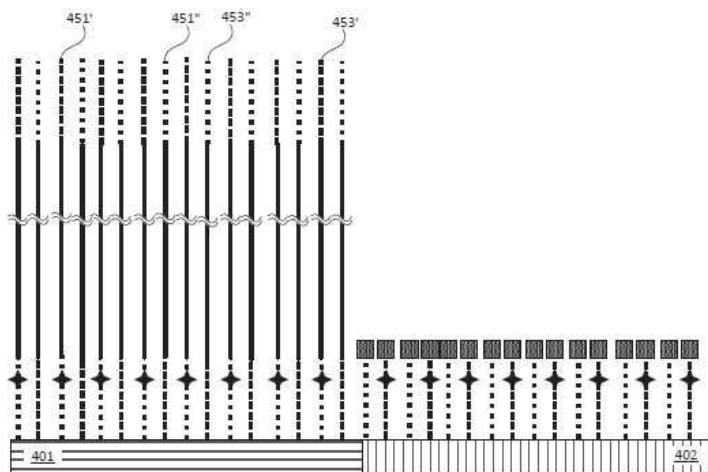
도면4f



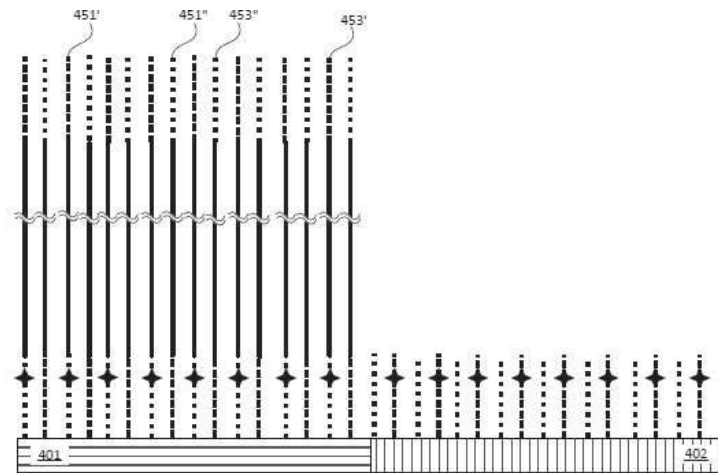
도면4g



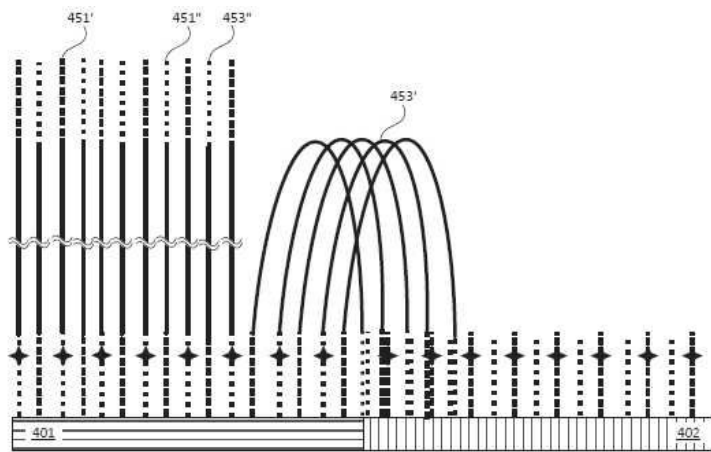
도면4h



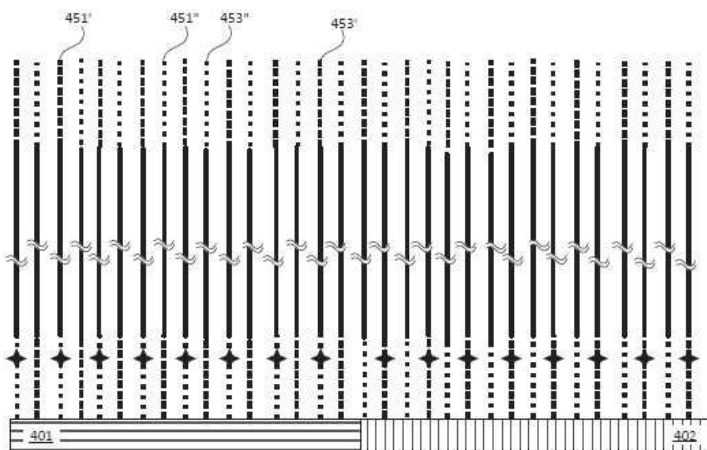
도면4i



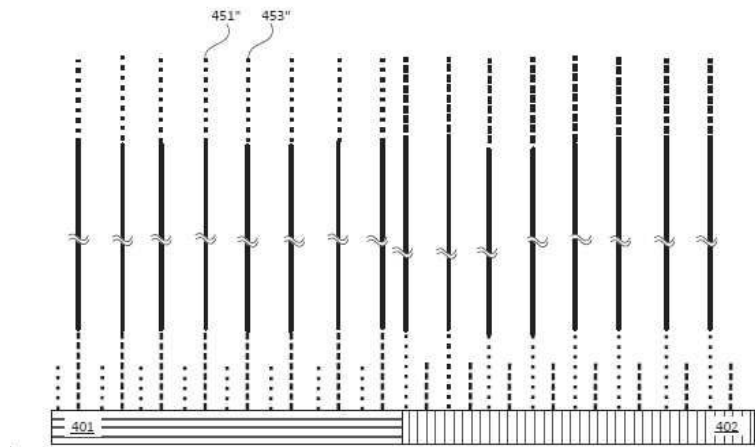
도면4j



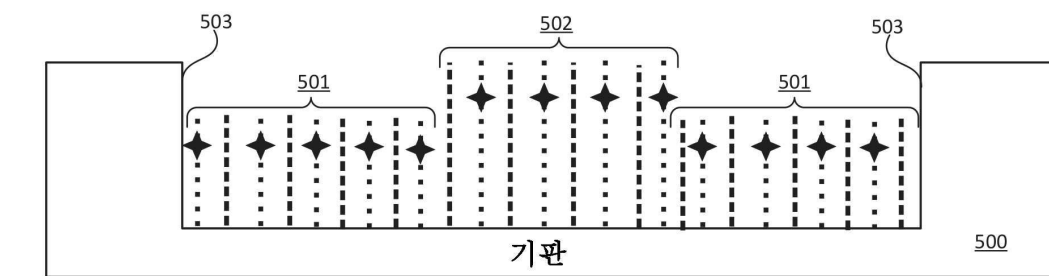
도면4k



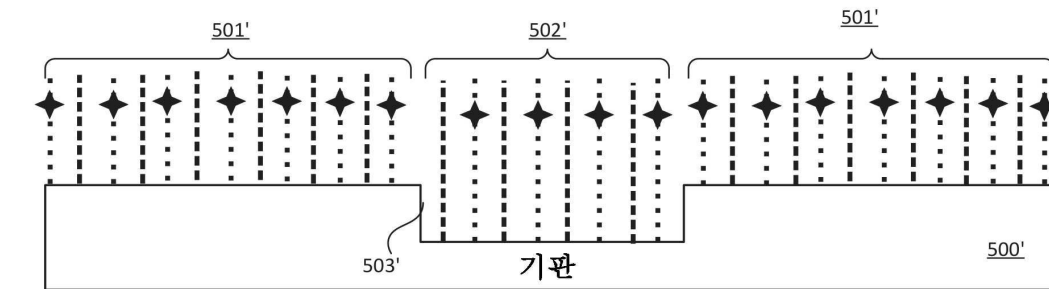
도면41



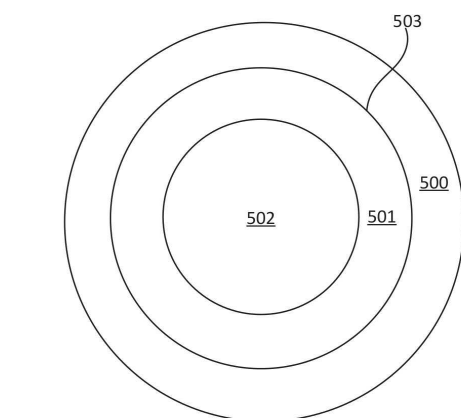
도면5a



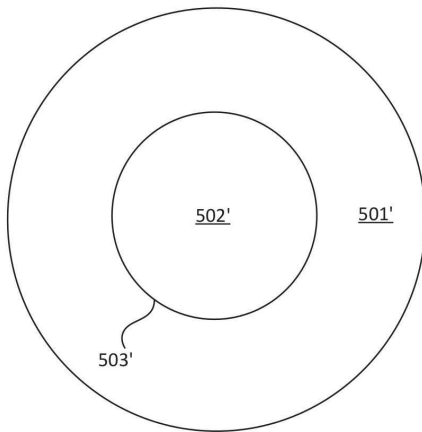
도면5b



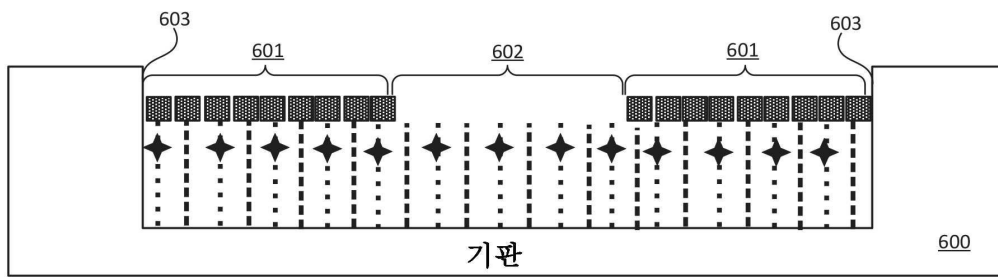
도면5c



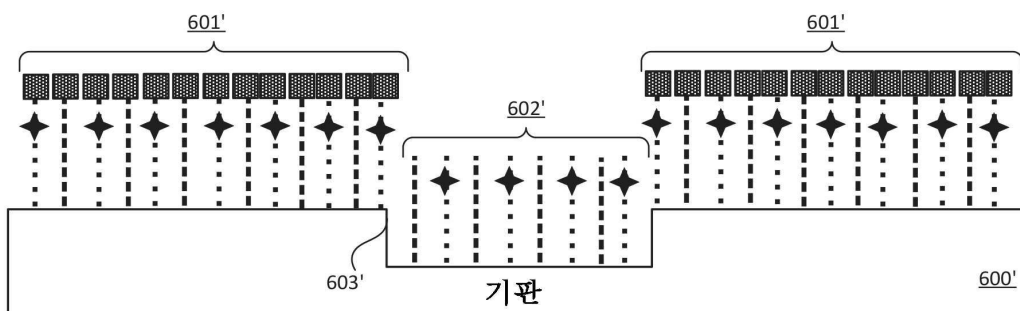
도면5d



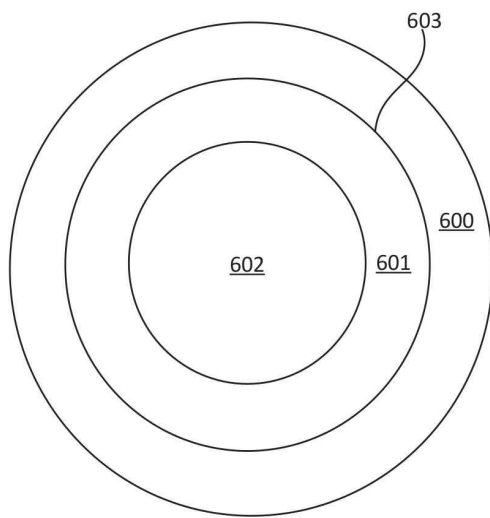
도면6a



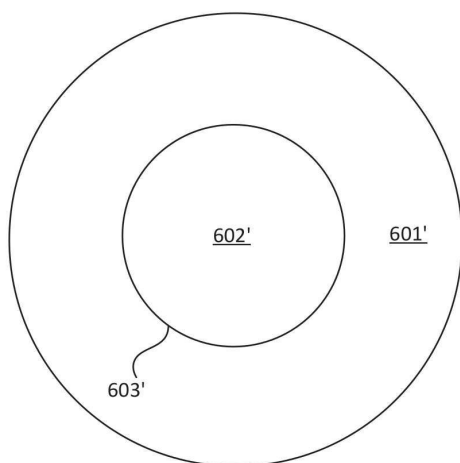
도면6b



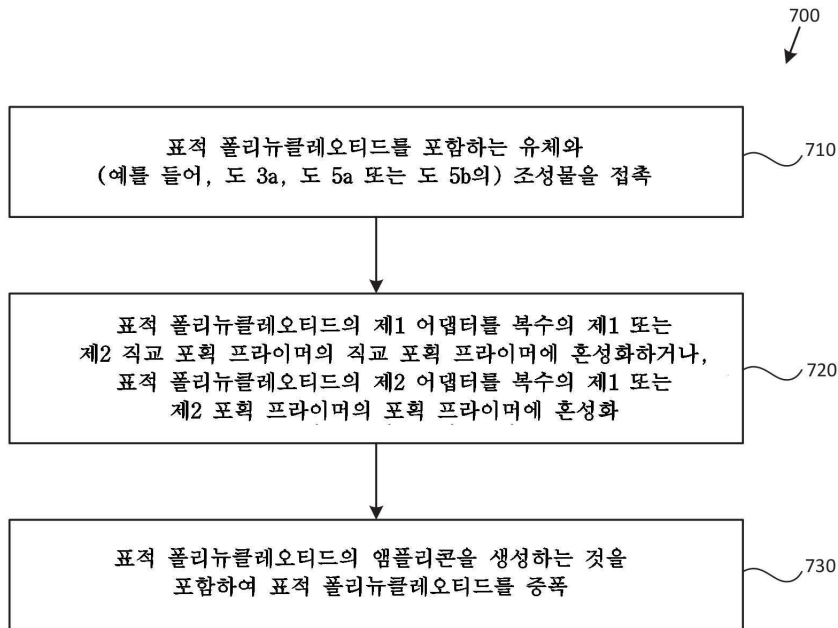
도면6c



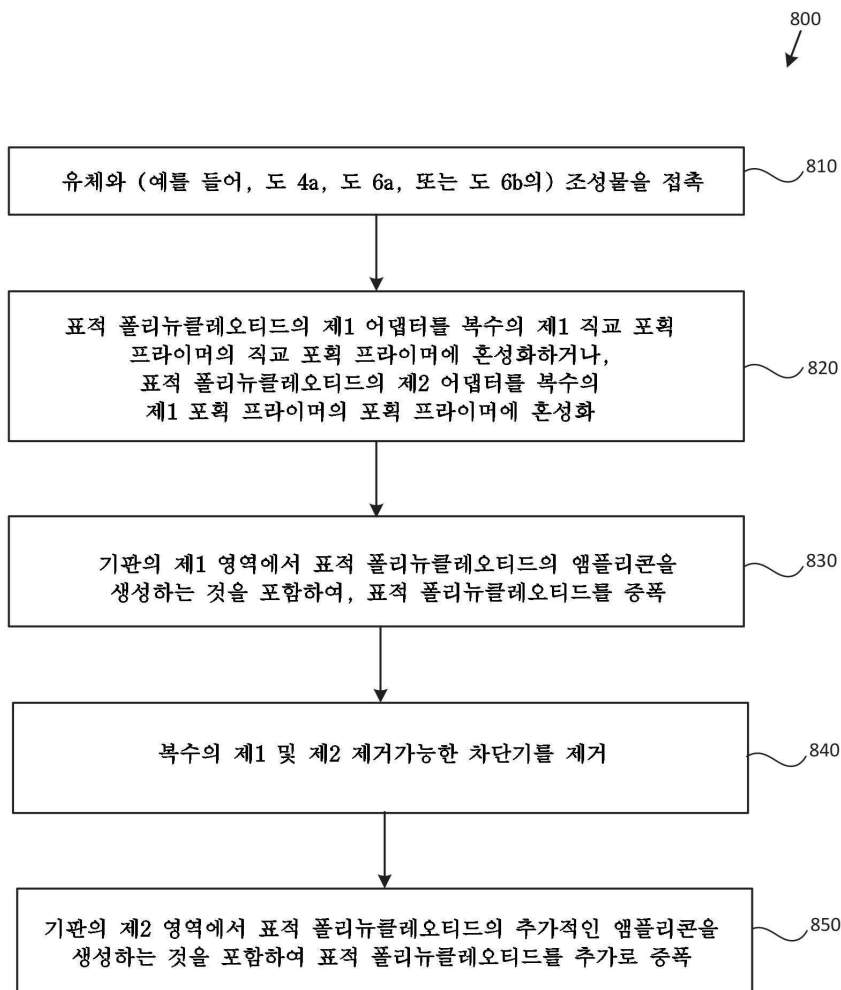
도면6d



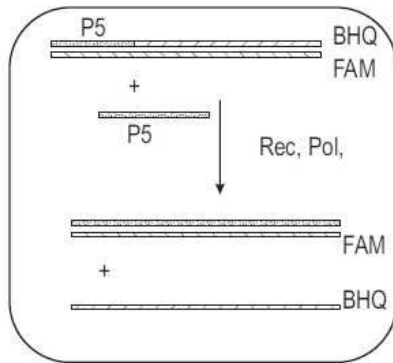
도면7



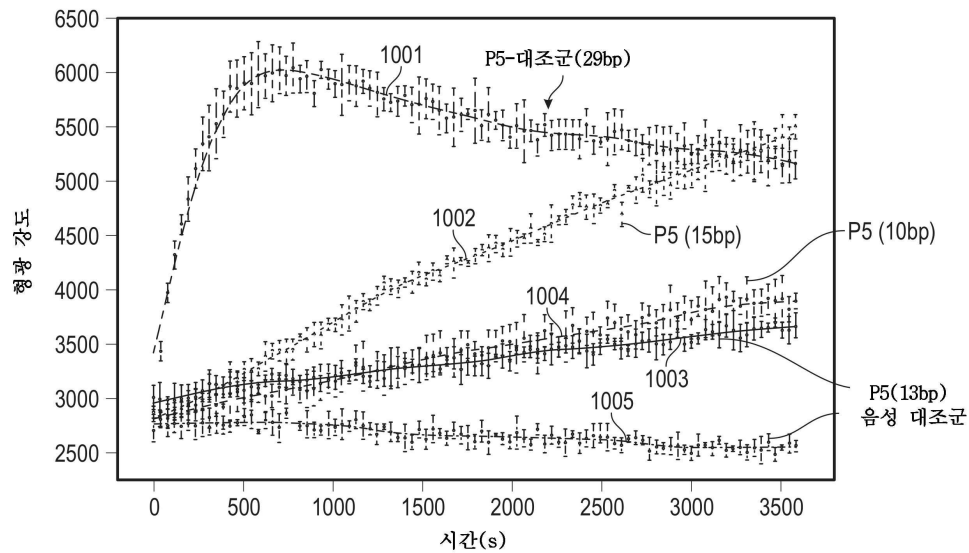
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ILLUMINA, INC.

ILLUMINA CAMBRIDGE LIMITED

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR AMPLIFYING POLYNUCLEOTIDES

<130> IP-1997-PCT

<140><141><150> 63/077,857

<151> 2020-09-14

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 1
 aatgatacgg cgaccaccga 20
 <210> 2
 <
 211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 2
 caagcagaag acggcatacg a 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"
 <400> 3
 ttttttcaag cagaagacgg c 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <
 213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer"

<400> 4
 tttttaatga tacggcgacc a 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 5
 tcggtggtcg ccgtatcatt 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 6
 cacatctaga gccaccagcg 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 7
 tcgtatgccg tcttctgctt g 21
 <210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 8

tagagcatac ggcag

15