(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0034113
(43) 공개일자 2025년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6855 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6855 (2018.05)
C12Q 2525/191 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7003467
(22) 출원일자(국제) 2023년07월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/069662
(87) 국제공개번호 WO 2024/011145
국제공개일자 2024년01월11일
(30) 우선권주장
63/358,491 2022년07월05일 미국(US)
63/508,833 2023년06월16일 미국(US)

(71) 출원인
엘리먼트 바이오사이언스, 인크.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 반스 캐년 로드 10055
(72) 발명자
자오 준화
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 반스 캐년 로드 10055 스위트 100 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내
레비 숀
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 반스 캐년 로드 10055 스위트 100 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내
치 시아오동
미국 92121 캘리포니아 샌디에고 반스 캐년 로드 10055 스위트 100 엘리먼트 바이오사이언스, 인크. 내
(74) 대리인
김진희, 김태홍

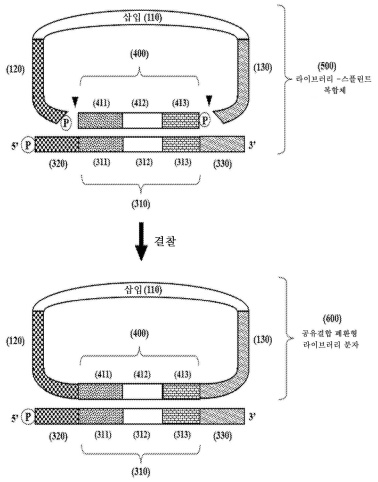
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **이중 가닥 스플린트 어댑터를 사용한 PCR 수행 없는 라이브러리 준비 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 개시내용은 핵산 이중 가닥 스플린트 어댑터를 포함하는 조성물, 키트 및 이중 가닥 스플린트 어댑터를 사용하는 방법, 예를 들어 PCR 수행 없는 작업흐름을 제공한다. 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 하나 이상의 새로운 어댑터 서열을 라이브러리 분자에 도입하기 위해 원-포트, 다중-효소 반응에서 사용될 수 있다. 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300)) 및 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))을 포함하며, 여기서, 제1 및 제2 스플린트 가닥은 함께 혼성화되어 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 형성한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 도입될 새로운 어댑터 서열(들), 예를 들어, 범용 결합 서열 및/또는 인덱스 서열을 지닌다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2535/122 (2019.08)

명 세 서

청구범위

청구항 1

복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법으로서,

a) 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 제공하는 단계 - 상기 복수의 개별 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하고, 상기 이중 가닥 스플린트 어댑터는 이중 가닥 영역과 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 포함하고, 상기 제1 스플린트 가닥은 제1 영역(320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함하고, 상기 제1 스플린트 가닥의 상기 내부 영역(310)은 상기 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화됨 -; 및

b) 상기 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터를 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)와 혼성화시키는 단계 - 개별 라이브러리 분자는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 제1 면에 측접되고 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 제2 면에 측접된 관심 서열(110)을 포함함 -를 포함하며,

이에 의해 상기 복수의 라이브러리 분자를 원형화하여 각각 2개의 틈을 갖는 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, (c) 상기 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 리가제와 접촉시켜 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 혼성화는 상기 라이브러리 분자의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 상기 범용 어댑터 서열에 상기 제1 스플린트 가닥의 상기 제1 영역(320)을 혼성화하기에 적합한 조건에서 수행되는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조건은 상기 라이브러리 분자의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 상기 범용 어댑터 서열에 상기 제1 스플린트 가닥의 상기 제2 영역(330)을 혼성화하는 데 적합한 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 스플린트 가닥(300)의 상기 내부 영역(310)은 적어도 3개의 하위 영역을 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 적어도 3개의 하위 영역은 하위 영역(311), 하위 영역(312) 및 하위 영역(313)을 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 하위 영역(311)은 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함하는 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 하위 영역(312)은 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고

유 분자 인덱스(UMI)를 포함하는 방법.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하위 영역(313)은 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함하는 방법.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)은 샘플 인덱스 서열을 포함하며, 상기 샘플 인덱스 서열은,

· 짧은 무작위 서열(NNN)이 결여된 샘플 인덱스 서열;

· 샘플 인덱스 서열 및 짧은 무작위 서열(NNN);

· 무염기성 염기로 전환될 수 있는 뉴클레오타이드 염기가 양쪽에 측접된 샘플 인덱스;

· 무염기성 염기로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 염기;

· 적어도 하나의 데옥시이노신;

· 18개 탄소 스페이서; 및/또는

· 18개 탄소 스페이서 및 적어도 하나의 데옥시이노신을 포함하는 방법.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

i) 상기 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머를 갖는 상기 지지체 상에 분배하여, 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 개별 고정된 표면 포획 프라이머에 혼성화하기에 적합한 조건에서 상기 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 상기 지지체에 고정하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 지지체는 상기 지지체에 고정된 복수의 표면 고정 프라이머를 더 포함하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

ii) 상기 복수의 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시켜, 상기 복수의 표면 포획 프라이머를 고정된 증폭 프라이머로 사용하고 상기 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 주형 분자로 사용하여 상기 지지체 상에서 회전환 증폭 반응을 수행하기에 적합한 조건에서,

상기 표면 포획 프라이머에 고정된 복수의 핵산 콘카타머 분자를 생성하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

iii) 상기 표면 포획 프라이머에 고정된 상기 복수의 핵산 콘카타머 분자를 서열분석하는 단계를 더 포함하며, 상기 서열분석은 (i) 상기 샘플 인덱스를 서열분석하는 것 및 (ii) 상기 관심 서열(110)을 서열분석하는 것을 포함하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

iv) 상기 표면 포획 프라이머에 고정된 상기 복수의 핵산 콘카타머 분자를 서열분석하는 단계를 더 포함하며,

상기 서열분석은 (A) 하나 이상의 짧은 무작위 서열 NNN을 서열분석하는 것, (B) 하나 이상의 샘플 인덱스를 서열분석하는 것 및 (C) 상기 관심 서열(110)을 서열분석하는 것을 포함하는 방법.

청구항 16

제7항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 스플린트 가닥(300)의 상기 내부 영역(310)은 하나의 샘플 인덱스를 포함하는 방법.

청구항 17

제7항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 스플린트 가닥(300)의 상기 내부 영역(310)은 하나의 샘플 인덱스와 짧은 무작위 서열(NNN)을 포함하는 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 라이브러리 분자(100)는 표 1에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 스플린트 가닥(300)은 표 2에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 스플린트 가닥(400)은 표 3에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2022년 7월 5일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/358,491호 및 2023년 6월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/508,833호에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 각각의 내용은 전문이 본원에 인용방식에 의해 원용된다.

[0002] 전자 서열 목록(ELEM-013_001WO_SeqListing_ST26.xml; 크기 50,242 바이트; 및 작성 날짜: 2023년 6월 30일)의 내용은 전문이 본원에 인용방식에 의해 원용된다.

[0003] 본 개시내용은 핵산 이중 가닥 스플린트 어댑터를 포함하는 조성물 및 이중 가닥 스플린트 어댑터를 사용하여 라이브러리를 준비하는 방법을 제공한다. 이중 가닥 스플린트 어댑터는 라이브러리 분자의 일부에 혼성화하여 틈을 갖는 라이브러리-스플린트 복합체를 형성할 수 있으며, 여기서, 틈은 결찰되어 공유결합 폐환형 분자를 형성할 수 있고, 이는 하류의 증폭 및 서열분석 작업흐름에 적용될 수 있다.

배 경 기 술

[0004] 전통적인 상거(Sanger) 스타일의 서열분석 방법에서 차세대 서열분석 방법으로 전환하여 서열분석 비용은 낮아졌지만, 이 차세대 서열분석 방법에는 상당한 한계가 남아 있다. 한 측면에서, 사용 가능한 서열분석 플랫폼은 비록 수가 많지만 상대적으로 짧은 서열분석 리드(sequencing read)를 생성하며, 이는 전체 관심 서열로의 컴퓨터 재조립이 필요할 수 있다. 사용 가능한 조립 방법은 느리고/느리거나, 힘들고/힘들거나, 비용이 많이 들고/들거나, 계산이 까다롭고/까다롭거나 유사한 개체(*예*: 바이러스)의 집단에는 적합하지 않을 수 있다. 이는 특히 복잡한 유전체의 서열분석의 경우에 그렇다. 부분적으로 짧은 리드(read)의 어셈블리와 관련된 서열분석 데이터 세트가 계속 증가함에 따라 어셈블리는 어려움을 겪고 있다. 이러한 데이터 세트는 컴퓨터 클러스터에 큰 부담을 줄 수 있다. 예를 들어, *신규* 아셈블리는 서열분석 리드(또는 이에서 파생된 k-mer)가 동시에 랜덤 액세스 메모리(RAM)에 저장되어야 할 수 있다. 대규모 데이터 세트의 경우 이 요구 사항은 사소한 것이 아니다. 더욱이 조립이 가능하더라도 중요한 하플로타입 정보를 복구할 수 없는 경우가 많다. 실제로, 사용 가능한 기술의 본질적인 한계는 현상 유지 서열분석 기술의 단점을 극복하기 위한 개선을 방해한다. 따라서 정확한 서열을

얻는 데 필요한 시간 및/또는 계산 요구사항을 줄이는 개선된 서열분석 방법 및 관련 조립 기술의 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용은 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법을 제공하며, 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 제공하는 단계 - 복수의 개별 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하고, 이중 가닥 스플린트 어댑터는 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 포함하고, 제1 스플린트 가닥은 제1 영역 (320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함하고, 제1 스플린트 가닥의 상기 내부 영역(310)은 상기 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화됨 -; 그리고 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터를 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)와 혼성화하는 단계 - 개별 라이브러리 분자는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 제1 면에 측접되고 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 제2 면에 측접된 관심 서열(110)을 포함함 -를 포함하여, 복수의 라이브러리 분자를 원형화하여 각각 2개의 틈(nick)을 갖는 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성한다.

[0006] 일부 실시형태에서, 이 방법은 다음을 더 포함한다: (c) 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 리가제와 접촉시켜 복수의 공유결합 폐환형(covalently closed circular) 라이브러리 분자(600)를 생성하는 단계.

[0007] 일부 실시형태에서, 혼성화는 라이브러리 분자의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)을 혼성화하는 데 적합한 조건에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 이 조건은 라이브러리 분자의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)을 혼성화하는 데 적합하다.

[0008] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)은 적어도 3개의 하위 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 3개의 하위 영역은 하위 영역(311), 하위 영역(312) 및 하위 영역(313)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하위 영역(311)은 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하위 영역(312)은 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 하위 영역(313)은 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다.

[0009] 일부 실시형태에서, 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)은 샘플 인덱스 서열을 포함하고, 여기서 샘플 인덱스 서열은 짧은 무작위 서열(NNN)이 없는 샘플 인덱스 서열; 샘플 인덱스 서열 및 짧은 무작위 서열(NNN); 무염기성 염기로 전환될 수 있는 뉴클레오타이드 염기가 양쪽에 측접된 샘플 인덱스; 무염기성 염기로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 염기; 적어도 하나의 데옥시이노신; 18개 탄소 스페이서; 및/또는 18개 탄소 스페이서 및 적어도 하나의 데옥시이노신을 포함한다.

[0010] 일부 실시형태에서, 방법은 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머를 갖는 상기 지지체 상에 분배하여, 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 개별 고정된 표면 포획 프라이머에 혼성화하기에 적합한 조건에서 상기 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 상기 지지체에 고정하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 복수의 표면 고정 프라이머를 더 포함한다.

[0011] 일부 실시형태에서, 방법은 고정된 증폭 프라이머로서 복수의 표면 포획 프라이머 및 주형 분자로서 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 사용하여 지지체 상에서 회전환 증폭 반응을 수행하는 데 적합한 조건에서, 복수의 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써, 표면 포획 프라이머에 고정된 복수의 핵산 콘카타머 분자를 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0012] 일부 실시형태에서, 방법은 iii) 표면 포획 프라이머에 고정된 복수의 핵산 콘카타머 분자를 서열분석하는 단계를 더 포함하며, 여기서 서열분석은 (i) 샘플 인덱스를 서열분석하는 것 및 (ii) 관심 서열(110)을 서열분석하는 것을 포함한다.

[0013] 일부 실시형태에서, 방법은 iv) 표면 포획 프라이머에 고정된 복수의 핵산 콘카타머 분자를 서열분석하는 단계를 더 포함하며, 서열분석은 (A) 하나 이상의 짧은 무작위 서열 NNN을 서열분석하는 것, (B) 하나 이상의 샘플 인덱스를 서열분석하는 것 및 (C) 관심 서열(110)을 서열분석하는 것을 포함한다.

[0014] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)은 하나의 샘플 인덱스를 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)은 하나의 샘플 인덱스 및 짧은 무작위 서열(NNN)을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자(100)는 표 1에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 표 2에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0018] 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 표 3에서 선택된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0019] 본 개시내용의 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 설명된다. 본 개시내용의 특징 및 이점의 더 나은 이해는 개시내용의 원리가 활용되는 예시적인 실시형태를 설명하는 다음의 상세한 설명 및 이하의 첨부 도면을 참조하여 얻어질 것이다:

도 1은 예시적인 선형 핵산 라이브러리 분자(100)를 보여주는 개략도이며, 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열이 한면에 측접된 삽입 영역(110)(*예*: 관심 서열) 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열이 다른 면에 측접된 삽입 영역(110)을 포함한다.

도 2는 제2 스플린트 가닥(짧은 가닥(400))에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(긴 가닥(300))을 포함하는 예시적 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)의 개략도이다.

도 3은 예시적인 라이브러리 원형화 작업흐름을 보여주는 개략도이며, 이는 선형 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)와 혼성화하여 라이브러리 분자를 원형화하여 두 개의 틈이 있는 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 단계를 포함한다.

도 4는 예시적인 결찰 반응을 보여주는 개략도이며, 이는 라이브러리-스플린트 복합체(500) 내의 틈에 효소 결찰 반응을 수행함으로써 틈을 닫고 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화되는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 형성하는 단계를 포함한다.

도 5는 증폭 프라이머에 혼성화된 예시적인 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 보여주는 개략도이다. 점선은 초기 연장 생성물을 나타낸다.

도 6은 다음을 포함하는 제1 스플린트 가닥(300; 긴 스플린트 가닥)의 핵산 서열의 여러 실시형태를 보여주는 개략도이다. 외부 제1 영역(320); 외부 제2 영역(330); 및 하위 영역(311), 하위 영역(312) 및 하위 영역(313)을 포함하는 3개의 내부 하위 영역. 이 개략도는 또한 다음을 포함하는 제2 스플린트 가닥(400; 짧은 스플린트 가닥)의 예시적인 핵산 서열을 보여준다. 하위 영역(411); 하위 영역(412); 및 하위 영역(413)을 포함하는 3개의 하위 영역.

도 7은 다음을 포함하는 제1 스플린트 가닥(300; 긴 스플린트 가닥)의 예시적인 핵산 서열을 보여주는 개략도이다. 외부 제1 영역(320); 외부 제2 영역(330); 및 하위 영역(311) 및 하위 영역(313)을 포함하는 2개의 내부 하위 영역. 이 개략도는 또한 다음을 포함하는 제2 스플린트 가닥(400; 짧은 스플린트 가닥)의 예시적인 핵산 서열을 보여준다. 하위 영역(411); 하위 영역(412); 및 하위 영역(413)을 포함하는 3개의 하위 영역. 하위 영역(412)의 루프는 제1 스플린트 가닥(300)의 하위 영역(312) 부족으로 인한 루프 형성을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8d는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열을 각각 보유하는 이중 가닥 핵산 어댑터의 다양한 실시형태를 보여주는 개략도 세트이다. **도 8a**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 이중 가닥 어댑터의 개략도이다. **도 8b**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 보유하는 이중 가닥 어댑터의 개략도이다. **도 8c**는 5' 오버행 말단(overhang end)을 갖는 이중 가닥 어댑터의 개략도이며, 여기서 어댑터 가닥 중 하나는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하고 다른 어댑터 가닥은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 보유한다. **도 8d**는 3' 오버행 말단을 갖는 이중 가닥 어댑터의 개략도이며, 여기서 어댑터 가닥 중 하나는 정방향 서열분석

프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 보유하고 다른 어댑터 가닥은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유한다.

도 9a 내지 도 9d는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열을 각각 보유하는 이중 가닥 핵산 어댑터의 다양한 실시형태를 보여주는 개략도 세트이다. **도 9a**는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 이중 가닥 어댑터의 개략도이다. **도 9b**는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 보유하는 이중 가닥 어댑터의 개략도이다. **도 9c**는 5' 오버행 말단(overhang end)을 갖는 이중 가닥 어댑터의 개략도이며, 여기서 어댑터 가닥 중 하나는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하고 다른 어댑터 가닥은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 보유한다. **도 9d**는 3' 오버행 말단을 갖는 이중 가닥 어댑터의 개략도이며, 여기서 어댑터 가닥 중 하나는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 보유하고 다른 어댑터 가닥은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유한다.

도 10a 내지 도 10d는 Y자형 어댑터의 다양한 실시형태를 보여주는 개략도 세트로, 각각은 함께 혼성화된 두 개의 올리고뉴클레오타이드로 구성되고 이중 가닥 어닐링 영역과 불일치 부분을 갖는다. **도 10a**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터의 개략도이다. **도 10b**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 갖는 제1 올리고뉴클레오타이드와 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터의 개략도이다. **도 10c**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 갖는 제1 올리고뉴클레오타이드와 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터의 개략도이다. **도 10d**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 절단된 서열을 갖는 제1 올리고뉴클레오타이드와 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터의 개략도이다.

도 11a 내지 도 11b는 트랜스포소솜의 실시형태를 보여주는 개략도 세트이다. **도 11a**는 두 개의 트랜스포소솜의 개략도이며, 제1 트랜스포소솜(위)은 트랜스포존 말단 서열과 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열을 포함하는 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드에 결합된 트랜스포사제를 포함한다. 트랜스포존 말단 서열은 트랜스포사제에 특이적으로 결합한다. 제2 트랜스포소솜(아래)은 트랜스포존 말단 서열 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열을 포함하는 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드에 결합된 트랜스포사제를 포함한다. 트랜스포존 말단 서열은 트랜스포사제에 특이적으로 결합한다. **도 11b**는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 트랜스포존 말단 서열과 범용 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드에 결합된 트랜스포사제를 포함하는 예시적인 트랜스포소솜의 개략도이고, 트랜스포사제는 트랜스포존 말단 서열과 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드에 결합된다. 트랜스포존 말단 서열은 트랜스포사제에 특이적으로 결합한다.

도 12는 Y자형 어댑터에 결합된 트랜스포사제를 포함하는 트랜스포소솜의 실시형태를 보여주는 개략도이다. 각각의 Y자형 어댑터는 함께 혼성화되고 이중 가닥 어닐링 영역과 불일치 부분을 갖는 두 개의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

도 13은 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자를 생성하기 위한 예시적인 어댑터 결찰 작업흐름을 보여주는 개략도이다. 이중 가닥 핵산 단편은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열을 보유하는 이중 가닥 어댑터에 한 쪽이 효소로 결찰된다. 이중 가닥 핵산 단편은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열을 운반하는 이중 가닥 어댑터에 다른 쪽이 효소로 결찰된다.

도 14는 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자를 생성하기 위한 예시적인 어댑터 결찰 작업흐름을 보여주는 개략도이다. 이중 가닥 핵산 단편은 한 쪽이 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터에 효소로 결찰된다. 이중 가닥 핵산 단편은 다른 쪽이 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터

서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터에 효소로 결찰된다.

도 15는 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자를 생성하기 위한 예시적인 어댑터 결찰 작업흐름을 보여주는 개략도이다. 이중 가닥 핵산 단편은 한 쪽이 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터에 효소로 결찰된다. 이중 가닥 핵산 단편은 다른 쪽이 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터에 효소로 결찰된다. 생성된 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자는 불일치 부분 중 하나에 혼성화하는 영역(*예*: (130))을 갖는 프라이머를 사용하여 프라이머 연장을 거치며, 프라이머는 또한 다른 쪽 끝에 샘플 인덱스 서열과 범용 표면 프라이머 결합 부위(SurfPBS)를 보유한다. 혼성화된 프라이머를 주형으로 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행하여 다음을 포함하는 연장된 라이브러리 분자를 생성한다. 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120); 삽입 서열(110); 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130); 샘플 인덱스 서열; 및 범용 표면 프라이머 결합 부위(SurfPBS).

도 16은 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자를 생성하기 위한 예시적인 어댑터 결찰 작업흐름을 보여주는 개략도이다. 이중 가닥 핵산 단편은 한 쪽이 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터에 효소로 결찰된다. 이중 가닥 핵산 단편은 다른 쪽이 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제1 올리고뉴클레오타이드 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 보유하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 Y자형 어댑터에 효소로 결찰된다. 생성된 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자는 3' 오버행 말단 및 무딘 말단을 갖는 선형 이중 가닥 어댑터와 혼성화된다. 3' 오버행 말단은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)를 갖는 불일치 부분과 혼성화할 수 있는 서열을 포함하며, 이는 틈이 있는(실선 삼각형) 부분적으로 이중 가닥 영역을 생성한다. 틈을 결찰하고 결찰되지 않은 가닥을 제거할 수 있다.

도 17은 복수의 트랜스포소솜을 사용하는 예시적인 태그화(tagmentation) 작업흐름의 개략도이다. 입력 이중 가닥 DNA는 복수의 트랜스포소솜과 접촉되며, 여기서 개별 트랜스포소솜은 트랜스포존 말단 서열과 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열을 포함하는 제1 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드에 결합된 트랜스포사제를 포함하고, 트랜스포사제는 트랜스포존 말단 서열과 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열을 포함하는 제2 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드에 결합된다.

도 18은 선형 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 제1 스플린트 가닥(200)과 혼성화함으로써 라이브러리 분자를 원형화하여 라이브러리 분자의 말단 사이에 갭이 있는 라이브러리 단일-스플린트 복합체(700)를 형성하는 것을 포함하는 예시적인 라이브러리 원형화 작업흐름의 개략도이다. 선형 핵산 라이브러리 분자(100)는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열이 한 쪽에 측접된 삽입 영역(110)(*예*: 관심 서열)과 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열이 다른 쪽에 측접된 삽입 영역(110)을 포함한다. 제1 스플린트 가닥(200)은 선형 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 한쪽 말단의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열과 혼성화하는 제1 영역(320)과 선형 단일 가닥 라이브러리 분자의 다른 쪽 말단의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열과 혼성화하는 제2 영역(330)을 포함한다. 이 갭은 중합효소-촉매 충전 반응과 효소 결찰 반응으로 닫혀 공유결합 폐환형 분자를 생성한다.

도 19는 짧은 3-량체 무작위 서열(NNN)을 포함하는 샘플 인덱스 서열의 뉴클레오타이드 염기 다양성을 나타내는 그래프이다. 그래프는 A 및 T 염기 호출의 경우 대략 30%, 및 C 및 G 염기 호출의 경우 대략 20%의 3-량체 무작위 서열(NNN)의 뉴클레오타이드 다양성을 나타낸다.

도 20은 짧은 3-량체 무작위 서열(NNN)을 결여하는 샘플 인덱스 서열의 뉴클레오타이드 염기 다양성을 나타내는 그래프이다. 그래프는 A 및 T 염기 호출의 경우 대략 40%, C 염기 호출의 경우 대략 15% 및 G 염기 호출의 경우 대략 5%의 뉴클레오타이드 다양성을 나타낸다.

도 21은 유리 기재(substrate)를 포함하는 예시적인 낮은 결합 지지체 및 유리에 공유 또는 비공유 접착되고, 올리고뉴클레오타이드 프라이머(*예*: 포획 올리고뉴클레오타이드)에 대한 부착 부위로서 작용하는 화학 반응성 작용기를 더 포함하는 친수성 코팅의 교번의 층의 개략도이다.

도 22는 다가 분자의 다양한 예시적인 입체배치의 개략도이다. **좌:** 스타버스트 또는 헬터-스켈터 입체배치를 갖는 다가 분자의 개략도. **중앙:** 덴드리머 입체배치를 갖는 다가 분자의 개략도. **우측:** 스트렙타비딘을 4-아암 또는 8-아암 PEG-NHS와 바이오틴 및 dNTP와 반응시킴으로써 형성된 다중 다가 분자의 개략도. 뉴클레오타이드 단위는 'N'로 표기되고, 바이오틴은 'B'로 표기되고, 스트렙타비딘은 'SA'로 표기된다.

도 23은 복수의 뉴클레오타이드-아암에 부착된 일반적 코어를 포함하는 예시적인 다가 분자의 개략도이다.

도 24는 복수의 뉴클레오타이드-아암에 부착된 덴드리머 코어를 포함하는 예시적인 다가 분자의 개략도이다.

도 25는 복수의 뉴클레오타이드-아암에 부착된 코어를 포함하는 예시적인 다가 분자의 개략도를 나타내며, 여기서, 뉴클레오타이드 아암은 바이오틴, 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 단위를 포함한다.

도 26은 코어 부착 모이어티, 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 단위를 포함하는 예시적인 뉴클렐오타이드-아암의 개략도이다.

도 27은 예시적인 스페이서의 화학 구조**(위)** 및 11-원자 링커, 16-원자 링커, 23-원자 링커 및 N3 링커를 포함하는 및 다양한 예시적인 링커의 화학 구조**(아래)**를 나타낸다.

도 28은 링커 1 내지 9를 포함하는 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 29는 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 30은 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 31은 뉴클레오타이드 단위에 결합/부착된 다양한 예시적인 링커의 화학 구조를 나타낸다.

도 32는 예시적인 바이오틴일화된 뉴클레오타이드-아암의 화학 구조를 나타낸다. 본 예에서, 뉴클레오타이드 단위는 피리미딘 염기의 5번 위치 또는 퓨린 염기의 7번 위치에서 프로파길 아민 부착을 통해 링커에 연결된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] **정의:**

[0021] 본 명세서에 제공된 표제는 본 개시내용의 다양한 양상의 제한이 아니며, 이의 양상은 전체로서 명세서에 참조에 의해 이해될 수 있다.

[0022] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 달리 정의되지 않는 한 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에 기재된 분자 생물학, 핵산 화학, 단백질 화학, 유전학, 미생물학, 유전자이식 세포 생산 및 혼성화의 기법에 관한 용어는 잘 공지되고 당업계에서 통상적으로 사용되는 것이다. 본 명세서에 기재된 기법 및 절차는 당업계에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 그리고 본 명세서 전체적으로 인용되고 논의되는 다양한 일반적 및 더 구체적인 참고문헌에 기재되는 바와 같이 일반적으로 수행된다. 예를 들어, 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (제3판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2000)]을 참조한다. 또한 문헌[Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)]을 참조한다. 본 명세서와 관련하여 이용되는 명명법 및 본 명세서에 기재된 실험 절차 및 기법은 당업계에 잘 알려지고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0023] 본 명세서의 내용에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수의 용어는 복수를 포함하며, 복수의 용어는 단수를 포함할 것이다. 단수의 형태 및 임의의 단어의 단수의 사용은 하나의 대상에 대해 달리 분명하게 그리고 모호하지 않게 제한되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0024] 대안 용어(*예*: "또는")의 사용은 대안 중 하나 또는 둘 다 또는 이들의 임의의 조합을 의미하기 위해 취해진다는 것이 이해된다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다른 것의 유무와 상관없이 명시된 특징 또는 구성성분 각각의 구체적인 개시내용을 의미하기 위해 취해질 것이다. 예를 들어, 본 명세서의 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"은 "A 및 B"; "A 또는 B"; "A"(A 단독); 및 "B"(B 단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 유사한 방식으로, "A, B 및/또는 C"와 같은 어구에서 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"은 다음의 양태 각각을 포괄하는 것으로 의도된다: "A, B, 및 C"; "A, B 또는 C"; "A 또는 C"; "A 또는 B"; "B 또는 C"; "A 및 B"; "B 및 C"; "A 및 C"; "A"(A 단독); "B"(B 단독); 및 "C"(C 단독).

[0026] 본 명세서 및 첨부하는 청구범위에서 사용되는 바와 같은 용어 "포함하는(comprising)", "포함하는(including)", "갖는" 및 "함유하는", 및 이들의 문법적 변형은 비제한적인 것으로 의도되며, 따라서, 목록에서 하나의 항목 또는 다수의 항목은 열거된 항목을 대체하거나 이에 부가되는 하나의 항목을 제외하지는 않는다. 본 명세서에서 양태이 "포함하는"이라는 언어로 기재된 경우에 "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진"에 관해 기재된 다른 유사한 양태가 또한 제공된다는 것이 이해된다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 값 또는 조성이 측정 또는 결정되는 방법, *즉*, 측정 시스템의 제한에 부분적으로 따르는 당업자에 의해 결정되는 바와 같은 특정 값 또는 조성에 대한 허용 가능한 오차 범위 내인 값 또는 조성을 지칭한다. 예를 들어, "약" 또는 "대략"은 당업계의 실행당 하나 이상의 표준 편차를 의미할 수 있다. 또는, "약" 또는 "대략"은 측정 시스템의 제한에 따라 최대 10%(*즉*, ±10%) 이상의 범위를 의미할 수 있다. 예를 들어, 약 5 mg은 4.5 mg과 5.5 mg 사이의 임의의 숫자를 포함할 수 있다. 더욱이, 특히 생물학적 시스템이나 과정과 관련하여, 이 용어는 최대 10배(an order of magnitude) 또는 최대 5배의 값을 의미할 수 있다. 특정 값 또는 조성이 본 개시내용에서 제공될 때, 달리 언급되지 않는 한, "약" 또는 "대략"은 특정 값 또는 조성에 대한 허용 가능한 오차 범위 이내인 것으로 추정되어야 한다. 또한, 값의 범위 및/또는 하위범위가 제공되는 경우에, 범위 및/또는 하위범위는 범위 및/또는 하위범위의 종점을 포함할 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 "펩타이드", "폴리펩타이드" 및 "단백질" 및 다른 관련 용어는 상호 호환 가능하게 사용되고, 아미노산의 중합체를 지칭하며, 임의의 특정 길이로 제한되지 않는다. 폴리펩타이드는 천연 및 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드는 재조합 또는 화학적으로 합성된 형태를 포함한다. 폴리펩타이드는 또한 번역 후 변형, 예컨대, 단백 분해 절단, 리보솜 스키핑(skipping)으로 인한 절단, 하이드록실화, 메틸화, 지질화, 아세틸화, 수모일화(SUMOylation), 유비퀴틴화, 글리코실화, 인산화 및/또는 이황화 결합 형성 아직 적용되지 않은 전구체 분자를 포함한다. 이러한 용어는 천연 및 인공 단백질, 단백질 단편 및 단백질 서열의 폴리펩타이드 유사체(예컨대, 뮤테인, 변이체, 키메라 단백질 및 융합 단백질)뿐만 아니라 번역 후 또는 달리 공유적 또는 비공유적으로 변형된 단백질을 포괄한다.

[0029] 용어 "세포의 생물학적 샘플"은 단일 세포, 복수의 세포, 조직, 기관, 유기체 또는 임의의 이러한 세포의 생물학적 샘플의 절편을 지칭한다. 세포의 생물학적 샘플은 유기체로부터 추출(*예를 들어*, 생검)되거나, 또는 액체 중에 또는 배양 접시에서 성장된 세포 배양물로부터 얻는다. 세포의 생물학적 샘플은 신선하거나, 냉동되거나, 신선 동결되거나 보관된(*예를 들어*, 포말린-고정 파라핀-포매; FFPE) 샘플을 포함한다. 세포의 생물학적 샘플은 왁스, 수지, 에폭시 또는 한천에 포매될 수 있다. 세포의 생물학적 샘플은 아세톤, 에탄올, 메탄올, 폼알데하이드, 파라폼알데하이드-Triton 또는 글루타르알데하이드 중 어느 하나, 또는 둘 이상의 임의의 조합에서 고정될 수 있다. 세포의 생물학적 샘플은 절편화 또는 비절편화될 수 있다. 세포의 생물학적 샘플은 염색, 탈염색 또는 비염색될 수 있다.

[0030] 관심의 핵산은 당업자에게 알려진 다수의 기법을 이용하여 세포 또는 세포의 생물학적 샘플로부터 추출될 수 있다. 예를 들어, 전형적인 DNA 추출 절차는 (i) DNA가 추출되는 세포 샘플 또는 조직 샘플의 수집, (ii) DNA 및 다른 세포질 구성성분을 방출시키는 세포막의 붕괴(*즉*, 세포 용해), (iii) 단백질, 지질 및 RNA를 침전시키기 위한 농축된 염 용액에 의한 용해된 샘플의 처리 후에, 침전된 단백질, 지질 및 RNA를 분리시키기 위한 원심분리, 및 (iv) 세포막 용해 동안 사용된 세정제, 단백질, 염 또는 다른 시약을 제거하기 위한 상청액으로부터의 DNA의 정제를 포함한다. 다양한 적합한 상업적 핵산 추출 밀 정제 키트는 본 명세서의 개시내용과 일치된다. 예는 (인간 샘플로부터의 유전체 DNA의 단리를 위한) QIAamp 키트 및 Qiagen(메릴랜드주 저먼타운 소재)으로부터의 (동물 또는 식물 샘플로부터 유전체 DNA의 단리를 위한) DNAeasy 키트 또는 Promega(위스콘신주 메디슨 소재)로부터의 Maxwell® 및 ReliaPrep™ 시리즈의 키트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 "중합효소" 및 이의 변이체는 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)에 결합하는 도메인을 포함하는 효소를 포함하며, 여기서, 중합효소는 주형 핵산 및 상보적 뉴클레오타이드를 갖는 복합체를 형성할 수 있다. 중합효소는 염기 유사체 검출 활성, DNA 중합 활성, 역전사효소 활성, DNA 결합, 가닥 전위 활성 및 뉴클레오타이드 결합 및 인식을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 활성을 가질 수 있다. 중합효소는 핵산 가닥에 뉴클레오타이드(이의 유사체 포함)의 중합을 촉매할 수 있는 임의의 효소일 수 있다. 반드시는 아니지만 전형적으로, 이러한 뉴클레오타이드 중합은 주형-의존적 방식으로 일어날 수 있다. 전형적으로, 중합효소는 뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레오타이드 중합의 촉매가 일어날 수 있는 1개 이상의 활성 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 다른 효소 활성, 예컨대, 3'에서 5'로의 엑소뉴클레아제 활성 또는 5'에서 3'로의 엑소뉴클레아제 활성을 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 가닥 전위 활성을 갖는다. 중합효소는 천연 유래 중합효소 및 임의의 서브유닛 및 이들의 절단, 돌연변이체 중합효소, 변이체 중합효

소, 재조합체, 융합 또는 다르게 조작된 중합효소, 화학적으로 개질된 중합효소, 합성 분자 또는 조립체, 및 뉴클레오타이드 중합을 촉매하는 능력을 보유하는 이들의 임의의 유사체, 유도체 또는 단편(*예를 들어*, 촉매적으로 활성인 단편)을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 중합효소는 촉매적 비활성 중합효소, 촉매적 활성 중합효소, 역전사효소 및 뉴클레오타이드 결합 도메인을 포함하는 다른 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 세포로부터 단리될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 기술 또는 화학적 합성 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 파지 유기체에서 발현될 수 있다. 일부 실시형태에서, 중합효소는 번역 후 변형된 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 중합효소는 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 파지로부터 유래될 수 있다. 중합효소는 DNA-전향적 DNA 중합효소 및 RNA-전향적 DNA 중합효소를 포함한다.

[0032] 용어 "가닥 전위"는 이중 가닥 핵산의 가닥을 국소로 분리시키고 주형-기반 방식으로 새로운 가닥을 합성하는 중합효소의 능력을 지칭한다. 가닥 전위 중합효소는 주형 가닥으로부터 상보적 가닥을 전위시키고, 새로운 가닥 합성을 촉매한다. 가닥 전위 중합효소는 중온성 및 호열성 중합효소를 포함한다. 가닥 전위 중합효소는 야생형 효소, 및 엑소뉴클레아제 마이너스 돌연변이체, 돌연변이체 형태, 키메라 효소 및 절단된 효소를 포함하는 변이체를 포함한다. 가닥 전위 중합효소의 예는 phi29 DNA 중합효소, Bst DNA 중합효소의 거대 단편, Bsu DNA 중합효소(엑소-)의 거대 단편, Bca DNA 중합효소(엑소-)의 거대 단편, 대장균(E. coli) DNA 중합효소의 클레노브 단편(Klenow fragment), T5 중합효소, M-MuLV 역전사효소, HIV 바이러스 역전사효소, 딥 벤트(Deep Vent) DNA 중합효소 및 KOD DNA 중합효소를 포함하나 이에 국한되지는 않는다. phi29 DNA 중합효소는 야생형 phi29 DNA 중합효소(*예*: Expedeon™의 MagniPhi™), 또는 변이체 EquiPhi29™ DNA 중합효소(*예*: Thermo Fisher Scientific™) 또는 키메라 QualiPhi™ DNA 중합효소(*예*: 4basebio™)일 수 있다.

[0033] 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드" 및 본 명세서에서 사용되는 기타 관련된 용어는 상호 호환적으로 사용되고, 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고, 임의의 특정 길이로 제한되지 않는다. 핵산은 재조합체이고, 화학적으로 합성된 형태를 포함한다. 핵산은 단리될 수 있다. 핵산은 DNA 분자(*예*: cDNA 또는 유전체 DNA), RNA 분자(*예*: mRNA), 뉴클레오타이드 유사체를 이용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체(*예*: 펩타이드 핵산 및 비천연 유래 뉴클레오타이드 유사체) 및 DNA 및 RNA를 함유하는 키메라 형태를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체를 포함하며, 여기서 뉴클레오타이드는 천연 또는 비천연 염기 및/또는 당을 포함할 수 있다. 핵산은 천연 유래 뉴클레오사이드간 결합, 예를 들어 포스포다이에스터 결합을 포함하되 이에 국한되지는 않는다. 핵산은 포스포로티오에이트, 포스포로티올에이트 및/또는 펩타이드 핵산(PNA) 결합을 포함하는 비천연 뉴클레오사이드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산은 한 가지 유형의 폴리뉴클레오타이드 또는 둘 이상의 상이한 유형의 폴리뉴클레오타이드의 혼합물을 포함한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "기능적으로 연결된" 및 "기능적으로 결합된" 또는 관련된 용어는 구성성분의 병치를 지칭한다. 병치된 구성성분은 공유적으로 함께 연결될 수 있다. 예를 들어, 2개의 핵산 성분은 함께 효소에 의해 결찰될 수 있으며, 여기서, 2개의 성분과 함께 결합되는 연결이 포스포다이에스터 결합을 포함한다. 제1 핵산 및 제2 핵산 성분은 함께 연결될 수 있으며, 여기서, 제1 핵산 성분은 제2 핵산 성분에 기능을 부여할 수 있다. 예를 들어, 프라이머 결합 서열과 관심 서열 사이의 연결은 프라이머에 결합할 수 있는 부분을 갖는 핵산 라이브러리 분자를 형성한다. 다른 예에서, 이식유전자(*예를 들어*, 폴리펩타이드 또는 핵산 관심 서열을 암호화하는 핵산)는 벡터에 결찰될 수 있으며, 여기서, 연결은 벡터에 함유된 이식유전자 서열의 발현 또는 기능화를 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 이식유전자는 이식유전자의 발현에 영향을 미치는 숙주 세포 조절 서열(*예*: 프로모터 서열)에 기능적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 벡터는 프로모터 서열, 인핸서, 전사 및/또는 번역 개시 서열, 전사 및/또는 번역 종결 서열, 폴리펩타이드 분비 신호 서열 등을 포함하는 적어도 1개의 숙주 세포 조절 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 숙주 세포 조절 서열은 이식유전자의 수준, 시기 및/또는 위치의 발현을 제어한다.

[0035] 용어 "연결된", "결합된", "부착된", "첨부된" 및 이들의 변형은 특정 절차에서의 사용을 견뎌내는 충분한 안정성을 갖는 화합물 또는 분자의 임의의 조합 사이의 임의의 유형의 융합, 결합, 부착 또는 회합을 포함한다. 절차에는 다음이 포함될 수 있지만 이에 국한되지는 않는다: 뉴클레오타이드 결합; 뉴클레오타이드 혼입; 탈차단(*예:* 사슬 종결 모이어티의 제거); 세탁; 제거; 유동; 검출; 이미징 및/또는 식별. 이러한 결합은, 예를 들어, 공유, 이온,수소, 쌍극자-쌍극자, 친수성, 소수성, 또는 친화도 결합, 반데르발스 힘을 수반하는 결합 또는 회합, 기계적 결합 등을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 이러한 결합은 분자내에서 일어나며, 예를 들어, 단일 가닥 또는 이중 가닥 선형 핵산 분자의 말단을 함께 연결하여 원형 분자를 형성한다. 일부 실시형태에서,

이러한 연결은 서로 다른 분자의 조합 사이에서, 또는 분자와 비분자 사이에서 일어날 수 있으며, 여기에는 핵산 분자와 고체 표면 사이의 연결; 단백질과 검출 가능한 리포터 모이어티 사이의 연결; 뉴클레오타이드와 검출 가능한 리포터 모이어티 사이의 연결; 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 연결의 일부 예는 예를 들어 Hermanson, G., "Bioconjugate Techniques", 제2판 (2008); Aslam, M., Dent, A., "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", London: Macmillan (1998); Aslam, M., Dent, A., "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", London: Macmillan (1998);에서 찾을 수 있다.

[0036] 용어 "프라이머" 및 본 명세서에서 사용된 관련된 용어는 DNA 및/또는 RNA 폴리뉴클레오타이드 주형과 혼성화하여 듀플렉스 분자를 형성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 프라이머는 이들의 전체 길이를 따라서 단일 가닥일 수 있거나, 단일 가닥 및 이중 가닥 부분을 가질 수 있다. 프라이머는 천연 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 프라이머는 재조합 핵산 분자일 수 있다. 프라이머는 임의의 길이를 가질 수 있지만, 전형적으로 4 내지 50개의 뉴클레오타이드의 범위일 수 있다. 일반적인 프라이머는 5' 말단과 3' 말단을 포함한다. 프라이머의 3' 말단은 중합효소-촉매된 프라이머 연장 반응에서 뉴클레오타이드 중합 개시 부위로서 작용하는 3' OH 모이어티를 포함할 수 있다. 또는, 프라이머의 3' 말단은 3' OH 모이어티를 결여할 수 있거나, 또는 중합효소-촉매된 반응에서 뉴클레오타이드 중합을 저해하는 말단의 3' 차단기를 포함할 수 있다. 프라이머의 길이를 따라서 임의의 1개의 뉴클레오타이드, 또는 1개 초과의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지될 수 있다. 프라이머는 용액 중에 있을 수 있거나(*예*: 가용성 프라이머) 또는 지지체(*예*: 포획 프라이머)에 고정될 수 있다.

[0037] 용어 "주형 핵산", "주형 폴리뉴클레오타이드", "표적 핵산" "표적 폴리뉴클레오타이드", "주형 가닥" 및 기타 변형은 본 명세서에 기재된 임의의 증폭 및/또는 서열분석 방법을 위한 기본 핵산 분자로서 작용하는 핵산 가닥을 지칭한다. 주형 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 또는 주형 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥 부분을 가질 수 있다. 주형 핵산은 천연 유래 공급원, 재조합 형태로부터 얻을 수 있거나 임의의 유형의 핵산 유사체를 포함하도록 화학적으로 합성될 수 있다. 주형 핵산은 선형, 콘카타머, 원형 또는 다른 형태일 수 있다.

[0038] 핵산 분자에 관해 사용될 때, 용어 "혼성화하다" 또는 "혼성화하는" 또는 "혼성화" 또는 다른 관련된 용어는 듀플렉스 핵산을 형성하는 두 상이한 핵산 사이의 수소 결합을 지칭한다. 혼성화는 또한 듀플렉스 영역을 갖는 자기-혼성화 분자를 형성하는 단일 핵산 분자의 두 상이한 영역 사이에 수소 결합을 포함한다. 혼성화는 듀플렉스 이중 가닥 핵산, 또는 핵산 분자 내의 이중 가닥 영역을 형성하는 왓슨-크릭 또는 후그스틴(Hoogstein) 결합을 포함할 수 있다. 이중 가닥 핵산, 또는 단일 핵산의 두 상이한 영역은 전체적으로 상보적이거나, 부분적으로 상보적일 수 있다. 상보적 핵산 가닥은 이들의 전체 길이에 걸쳐 서로 혼성화될 필요는 없다. 상보적 염기 짝짓기는 표준 A-T 또는 C-G 염기 짝짓기일 수 있거나, 또는 염기-짝짓기 상호작용의 다른 형태일 수 있다. 듀플렉스 핵산은 미스매칭된 염기 짝짓기된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0039] 핵산에 관해 사용될 때, 용어 "연장시키다", "연장시키는", "연장" 및 기타 변이체는 핵산 분자에 1개 이상의 뉴클레오타이드의 혼입을 지칭한다. 뉴클레오타이드 혼입은 핵산 가닥의 말단 3' OH에 1개 이상의 뉴클레오타이드의 중합을 포함하여, 핵산 가닥의 연장을 초래한다. 뉴클레오타이드 혼입은 천연 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체에 의해 수행될 수 있다. 반드시는 아니지만 전형적으로, 뉴클레오타이드 혼입은 주형-의존적 방식으로 일어난다. DNA 중합효소 또는 RNA 중합효소에 의해 촉매되는 프라이머 연장을 비롯한, 핵산 분자를 연장시키는 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다.

[0040] 용어 "뉴클레오타이드" 및 관련 용어는 방향족 염기, 오탄당(*예*: 리보스 또는 데옥시리보스) 및 적어도 1개의 포스페이트기를 포함하는 분자를 지칭한다. 표준 또는 비표준 뉴클레오타이드는 상기 용어의 사용과 일치된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드는 모노포스페이트, 다이포스페이트, 또는 트라이포스페이트, 또는 상응하는 포스페이트 유사체를 포함한다. 용어 "뉴클레오사이드"는 방향족 염기 및 당을 포함하는 분자를 지칭한다. 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드는 비표지되거나 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지될 수 있다.

[0041] 뉴클레오타이드(및 뉴클레오사이드)는 전형적으로 천연 유래, 치환, 변형 또는 조작된 변이체, 또는 이들의 유사체를 포함하는 핵산에서 통상적으로 발견되는 치환 또는 비치환된 질소-함유 모 헤테로방향족 고리를 포함하는 헤테로 환식 염기를 포함한다. 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)의 염기는 적절한 상보적 염기와 왓슨-크릭 및/또는 후그스틴 수소결합을 형성할 수 있다. 예시적인 염기에는 퓨린 및 피리미딘, 예를 들어, 2-아미노퓨린, 2,6-디아미노퓨린, 아데닌(A), 에테노아데닌, N^6-Δ^2-이소펜테닐아데닌(6iA), N^6-Δ^2-이소펜테닐-2-메틸티

오아데닌(2ms6iA), N^6-메틸아데닌, 구아닌(G), 이소구아닌, N^2-디메틸구아닌(dmG), 7-메틸구아닌(7mG), 2-티오피리미딘, 6-티오구아닌(6sG), 히폭산틴 및 O^6-메틸구아닌; 7-데아자아데닌(7-데아자-A), 및 7-데아자구아닌(7-데아자-G)과 같은 7-데아자-퓨린; 시토신(C), 5-프로피닐시토신, 이소시토신, 티민(T), 4-티오티민(4sT), 5,6-디히드로티민, O^4-메틸티민, 우라실(U), 4-티오우라실(4sU) 및 5,6-디히드로우라실(디히드로우라실; D)과 같은 피리미딘; 니트로인돌, 4-메틸인돌 등의 인돌; 니트로피롤과 같은 피롤; 네불라린; 이노신; 하이드록시메틸시토신; 5-메틸시토신; 염기(Y); 뿐만 아니라 메틸화, 글리코실화 및 아실화된 염기 모이어티; 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 추가적인 예시적인 염기는 문헌[Fasman, 1989, "Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", 제385-394페이지, CRC Press, Boca Raton, Fla]에서 찾을 수 있다.

[0042] 뉴클레오타이드(및 뉴클레오사이드)는 전형적으로 탄소환식 모이어티과 같은 당 모이어티(Ferraro 및 Gotor 2000 Chem. Rev. 100: 4319-48), 비환식 모이어티(Martinez, 등, 1999 Nucleic Acids Research 27: 1271-1274; Martinez, 등, 1997 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 제7권: 3013-3016) 및 기타 당 모이어티(Joeng 등, 1993 J. Med. Chem. 36: 2627-2638; Kim 등, 1993 J. Med. Chem. 36: 30-7; Eschenmosser 1999 Science 284:2118-2124; 및 미국 특허 제5,558,991호)을 포함한다. 당 모이어티는 다음을 포함한다: 리보실; 2'-데옥시리보실; 3'-데옥시리보실; 2',3'-디데옥시리보실; 2',3'-디데히드로디데옥시리보실; 2'-알콕시리보실; 2'-아지도리보실; 2'-아미노리보실; 2'-플루오로리보실; 2'-머캅토리복실; 2'-알킬티오리보실; 3'-알콕시리보실; 3'-아지도리보실; 3'-아미노리보실; 3'-플루오로리보실; 3'-머캅토리복실; 3'-알킬티오리보실 카르보사이클릭; 비환식 또는 기타 변형된 당.

[0043] 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드는 1, 2 또는 3개의 인 원자의 사슬을 포함하며, 사슬은 전형적으로 에스터 또는 포스포르아마이드 연결을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되는 인 사슬을 갖는 유사체이다. 일부 실시형태에서, 사슬의 인 원자는 O, S 또는 BH_3를 포함하는 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬은 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포르다이티오에이트 및 O-메틸포스포로아미다이트기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트기를 포함한다.

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드 단위" 또는 "뉴클레오타이드 모이어티"는 염기, 당 및 적어도 하나의 포스페이트기를 포함하는 뉴클레오타이드(*예*: dATP, dTTP, dGTP, dCTP 또는 dUTP) 또는 이의 유사체를 의미한다. 뉴클레오타이드 단위는 본 명세서에 기술된 서열분석 반응에 사용되는 다가 분자에 부착될 수 있다. 일반적으로, 동일한 다가 분자에 부착된 모든 뉴클레오타이드 단위는 동일한 동일성(*예*: 모든 A, 모든 T, 모든 C 또는 모든 G)을 가지지만, 당업자라면 서로 다른 동일성의 뉴클레오타이드 단위로 구성된 다가 분자가 유리한 상황이 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0045] 용어 "회전환 증폭"은 일반적으로 관심 표적 서열, 증폭 프라이머 결합 서열 및 선택적으로 하나 이상의 어댑터 서열, 예컨대, 서열분석 프라이머 결합 서열 및/또는 샘플 인덱스 서열을 포함하는 원형화된 핵산 주형 분자를 사용하는 증폭 방법을 지칭한다. 회전환 증폭 반응은 등온 증폭 조건하에 수행될 수 있고, 원형화된 핵산 주형 분자, 증폭 프라이머, 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드를 포함하여, 원형 주형 분자의 탠덤 반복 서열 및 본래의 원형화된 핵산 주형 분자에 존재하는 임의의 어댑터 서열을 포함하는 콘카타머를 생성한다. 콘카타머는 자기 붕괴되어 핵산 나노볼을 형성할 수 있다. 나노볼의 형상 및 크기는 원형 주형 분자에서 역위 반복 서열의 쌍을 포함함으로써, 또는 하나 이상의 압축 올리고뉴클레오타이드로 회전환 증폭 반응을 수행함으로써 추가로 압축될 수 있다. 서열분석 작업흐름을 위한 클론 앰플리콘을 생성 하기 위해 회전환 증폭을 사용하는 것의 이점 중 하나는 나노볼에서 표적 서열의 반복부 복제물이 신호 강도를 증가시키기 위해 동시에 서열분석될 수 있다는 것이다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응은 적어도 4개의 연속 구아닌(*예*: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 12개가 넘는 구아닌)을 갖는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행될 수 있다. 회전환 증폭 반응은 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 서열의 반복 복제물을 포함하는 콘카타머를 생성할 수 있다. 적어도 1개의 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 사분자를 형성할 수 있고, 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 서열에 혼성화되고, 얻어진 콘카타머는 폴딩되어 분자내 G-사중식 구조를 형성할 수 있다. 콘카타머는 자기 붕괴되어 조밀한 나노볼을 형성할 수 있다. 이론에 얽매이고 싶지는 않지만, 나노볼에서 구아닌 사분자 및 G-사중식의 형성은 나노볼의 안정성을 증가시켜 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 작업흐름을 수행하기 위한 시약의 반복된 흐름을 견뎌낼 수 있는 이들의 조밀한 크기 및 형상을 유지할 수 있다.

[0046] 핵산에 관해 사용될 때, 용어 "증폭시키다", "증폭하는", "증폭" 및 기타 관련 용어는 본래의 폴리뉴클레오타이드 주형 분자의 다중 복제물을 생산하는 것을 포함하며, 여기서, 복제물은 주형 서열과 상보적인 서열을 포함하고/하거나, 복제물은 주형 서열과 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제물은 주형 서열과 실질적으로 동일한 서열을 포함하고/하거나, 주형 서열에 상보적인 서열과 실질적으로 동일하다.

[0047] 용어 "리포터 모이어티", "리포터 모이어티" 또는 관련 용어는 검출 가능한 신호를 생성하거나 생성하도록 야기하는 화합물을 지칭한다. 리포터 모이어티는 때때로 "표지"로 불린다. 발광, 광발광, 전계발광, 생물발광, 화학발광, 형광, 인광, 발색단, 방사성동위원소, 전기화학, 질량분석법, 라만, 합텐, 친화도 태그, 원자 또는 효소를 포함하는 임의의 적합한 리포터 모이어티가 사용될 수 있다. 리포터 모이어티는 화학적 또는 물리적 변화(*예를 들어*, 열, 광, 전기, pH, 염 농도, 효소 활성 또는 근접 사건)으로부터 초래되는 검출 가능한 신호를 생성한다. 근접 사건은 서로 접근하는 또는 서로 회합하거나 서로 결합하는 2개의 리포터 모이어티를 포함한다. 당업자가 리포터 모이어티를 선택하는 것은 잘 공지되어 있어서 각각이 여기 방사선을 흡수하고/하거나 다른 리포터 모이어티와 구별 가능한 파장에서 형광을 방출하여 동일한 반응에서 또는 상이한 반응에서 상이한 리포터 모이어티의 존재의 모니터링을 가능하게 한다. 스펙트럼으로 별개인 방출 프로파일을 갖거나, 또는 최소 중복 스펙트럼 방출 프로파일을 갖는 2개 이상의 상이한 리포터 모이어티가 선택될 수 있다. 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드, 핵산, 효소(*예*: 중합효소 또는 역전사효소) 또는 지지체(*예*: 표면)에 연결(*예*: 기능적으로 연결)될 수 있다.

[0048] 리포터 모이어티(또는 표지)는 형광 표지 또는 형광단을 포함한다. 형광 표지 또는 형광단으로 작용할 수 있는 예시적인 형광 모이어티는 플루오레세인 및 플루오레세인 유도체, 예컨대, 카복시플루오레세인, 테트라클로로플루오레세인, 헥사클로로플루오레세인, 카복시나프토플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오사이아네이트, NHS-플루오레세인, 아이오도아세트아미도플루오레세인, 플루오레세인 말레이미드, SAMSA-플루오레세인, 플루오레세인 티오세미카바자이드, 카보하이드라지노메틸티오아세틸-아미노 플루오레세인, 로다민 및 로다민 유도체, 예컨대, TRITC, TMR, 리사민 로다민, Texas Red, 로다민 B, 로다민 6G, 로다민 10, NHS-로다민, TMR-아이오도아세트아마이드, 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드, 리사민 로다민 B 설포닐 하이드라진, Texas Red 설포닐 클로라이드, Texas Red 하이드라자이드, 쿠마린 및 쿠마린 유도체, 예컨대, AMCA, AMCA-NHS, AMCA-설포-NHS, AMCA-HPDP, DCIA, AMCE-하이드라자이드, BODIPY 및 유도체, 예컨대, BODIPY FL C3-SE, BODIPY 530/550 C3, BODIPY 530/550 C3-SE, BODIPY 530/550 C3 하이드라자이드, BODIPY 493/503 C3 하이드라자이드, BODIPY FL C3 하이드라자이드, BODIPY FL IA, BODIPY 530/551 IA, Br-BODIPY 493/503, Cascade Blue 및 유도체, 예컨대, Cascade Blue 아세틸 아자이드, Cascade Blue 카다베린, Cascade Blue 에틸렌다이아민, Cascade Blue 하이드라자이드, Lucifer Yellow 및 유도체, 예컨대, Lucifer Yellow 아이오도아세트아마이드, Lucifer Yellow CH, 시아닌 및 유도체, 예컨대, 인돌륨계 시아닌 염료, 벤조-인돌륨계 시아닌 염료, 피리듐계 시아닌 염료, 티오졸륨계 시아닌 염료, 퀴놀리늄계 시아닌 염료, 이미다졸륨계 시아닌 염료, Cy 3, Cy5, 란탄족 킬레이트 및 유도체, 예컨대, BCPDA, TBP, TMT, BHHCT, BCOT, 유로퓸 킬레이트, 터븀 킬레이트, Alexa Fluor 염료, DyLight 염료, Atto 염료, LightCycler Red 염료, CAL Flour 염료, JOE 및 이들의 유도체, Oregon Green 염료, WellRED 염료, IRD 염료, 피코에리트린 및 피콜빌린 염료, Malachite green, 스틸벤, DEG 염료, NR 염료, 근적외선 염료 및 당업계에 알려진 다른 것, 예컨대, 문헌[Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, Oreg.) 제6판; Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 제2판, Plenum Press New York (1999), 또는 Hermanson, Bioconjugate Techniques, 제2판]에 기재된 것, 또는 이들의 유도체 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 시아닌 염료는 설폰화된 또는 비-설폰화된 형태로 존재할 수 있고, 2개의 질소 원자 사이의 폴리메틴 브리지에 의해 분리되는 2종의 인돌레닌, 벤조-인돌륨, 피리듐, 티오졸륨 및/또는 퀴놀리늄기로 이루어진다. 상업적으로 입수 가능한 시아닌 형광단은, 예를 들어, Cy3(1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-2-(3-{1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-3,3-다이메틸-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴}프로프-1-엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌륨 또는 1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-2-(3-{1-[6-(2,5-다이옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-3,3-다이메틸-5-설포-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴}프로프-1-엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌륨-5-설포네이트를 포함할 수 있음), Cy5(1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-3,3-다이메틸-5-인돌린-2-일리덴)펜타-1,3-다이엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌-1-이움 또는 1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-다이옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-3,3-다이메틸-5-설포인돌린-2-일리덴)펜타-1,3-다이엔-1-일)-3,3-다이메틸-3H-인돌-1-이움-5-설포네이트를 포함할 수 있음) 및 Cy7(1-(5-카복시펜틸)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-에틸-1,3-다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴)헵타-1,3,5-트라이엔-1-일]-3H-인돌륨 또는 1-(5-카복시펜틸)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-에틸-5-설포-1,3-

다이하이드로-2H-인돌-2-일리덴)헵타-1,3,5-트라이엔-1-일]-3H-인돌륨-5-설포네이트를 포함할 수 있음)을 포함하며, "Cy"는 '사아닌'을 나타내고, 첫 번째 숫자는 2개의 인돌렌인기 사이의 탄소 원자 수를 식별한다. 인돌렌인보다는 옥사졸 유도체인 Cy2, 및 벤조-유도체화된 Cy3.5, Cy5.5 및 Cy7.5는 이런 규칙에 대한 예외이다.

[0049] 일부 실시형태에서, 리포터 모이어티는 FRET 쌍일 수 있으며, *예를 들어*, 단일 여기 및 이미징 단계에서 여러 분류를 수행할 수 있도록 한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, FRET는 여기 교환(Forster) 전달 또는 전자-교환(Dexter) 전달을 포함할 수 있다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "지지체"는 검정 및/또는 분석을 위한 생물학적 분자 또는 생물학적 샘플의 침착을 위해 설계된 기재를 지칭한다. 지지체 상에 침착될 생물학적 분자의 예는 핵산(*예*: DNA, RNA), 폴리펩타이드, 당류, 지질, 단세포 또는 다세포를 포함한다. 생물학적 샘플의 예는 타액, 가래, 점액, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 대변, 땀, 눈물 및 조직 또는 기관으로부터의 유체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0051] 일부 실시형태에서, 지지체는 고체, 반고체 또는 둘 다의 조합물이다. 일부 실시형태에서, 지지체는 다공성, 반다공성, 비다공성 또는 다공성의 임의의 조합이다. 일부 실시형태에서, 지지체는 실질적으로 평면, 오목, 볼록, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는, 예를 들어, 모세관 또는 모세관의 내면을 포함하는 원통형일 수 있다.

[0052] 일부 실시형태에서, 지지체의 표면은 실질적으로 매끄러울 수 있다. 일부 실시형태에서, 범프, 에칭, 기공, 3차원 스캐폴드 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 지지체는 규칙적 또는 불규칙적으로 질감처리될 수 있다.

[0053] 일부 실시형태에서, 지지체는 구체, 반구체, 원통형, 배럴형, 도넛형, 원판형, 막대형, 원뿔형, 삼각형, 입방체, 다각형, 관형 또는 와이어형을 포함하는 임의의 형상을 갖는 비드를 포함한다.

[0054] 지지체는 유리, 용융 실리카, 실리콘, 중합체(*예를 들어*, 폴리스타이렌(PS), 거대 다공성 폴리스타이렌(MPPS), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트(PC), 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌(PE), 고밀도 폴리에틸렌(HDPE), 환식 올레핀 중합체(COP), 환식 올레핀 공중합체(COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 물질로부터 제작될 수 있다. 유리와 플라스틱 기재 둘 다의 다양한 조성이 상정된다.

[0055] 일부 양태에서, 본 개시내용은 지지체에 고정된 복수(*예*: 둘 이상의)의 핵산 주형 분자를 제공한다. 일부 실시형태에서, 고정된 복수의 핵산 주형 분자는 동일한 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 고정된 복수의 핵산 주형 분자는 상이한 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 주형 분자에서 개개 핵산 주형 분자는 지지체 상의 다른 부위에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 주형에서 2개 이상의 개개 핵산 주형 분자는 지지체 상의 부위에 고정된다.

[0056] 용어 "어레이"는 지지체 상의 사전 결정된 위치에 위치되어 부위의 어레이를 형성하는 복수의 부위를 포함하는 지지체를 지칭한다. 부위는 분리될 수 있고, 사이 영역에 의해 분리될 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체 상의 사전 결정된 부위는 행 또는 열에 1차원으로 배열될 수 있거나, 또는 행 및 열에서 2차원으로 배열된다. 일부 실시형태에서, 복수의 사전 결정된 부위는 조직화된 방식으로 지지체 상에 배열된다. 일부 실시형태에서, 복수의 사전 결정된 부위는 직선형, 육각형 패턴, 그리도 패턴, 반사 대칭을 갖는 패턴, 회전 대칭을 갖는 패턴 등을 포함하는 임의의 유기체화된 패턴으로 배열된다. 부위의 상이한 쌍 사이의 피치(pitch)는 동일할 수도 있고 다를 수도 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 적어도 10^2개의 부위, 적어도 10^3개의 부위, 적어도 10^4개의 부위, 적어도 10^5개의 부위, 적어도 10^6개의 부위, 적어도 10^7개의 부위, 적어도 10^8개의 부위, 적어도 10^9개의 부위, 적어도 10^{10}개의 부위, 적어도 10^{11}개의 부위, 적어도 10^{12}개의 부위, 적어도 10^{13}개의 부위, 적어도 10^{14}개의 부위, 적어도 10^{15}개 이상의 부위를 포함하며, 부위는 지지체 상의 사전 결정된 위치에 위치된다. 일부 실시형태에서, 지지체 상의 미리 결정된 복수의 부위(*예*: 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상, *예를 들어* 10^2개 부위, 10^3개 부위, 10^4개 부위, 10^5개 부위, 10^6개 부위, 10^7개 부위, 10^8개 부위, 10^9개 부위, 10^{10}개 부위, 10^{11}개 부위, 10^{12}개 부위, 10^{13}개 부위, 10^{14}개 부위, 10^{15}개 부위 이상)가 핵산 주형 분자로 고정되어 핵산 주형 어레이를 형성한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 포획 프라이머 또는 핵산 주형 분자에 대한 혼성화에 의해 복수의 사전 결정된 부위에 고정된 핵산 주형 분자는 표면 포획 프라이머에 공유적으로 부착된다. 일부 실시형태에서, 복수의 미리 결정된 부위에 고정된 핵산 주형 분자는 예를 들어 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상(*예*: 10^2 내지 10^{15}개 부위 이

상, *예컨대* 10^2개 부위, 10^3개 부위, 10^4개 부위, 10^5개 부위, 10^6개 부위, 10^7개 부위, 10^8개 부위, 10^9개 부위, 10^{10}개 부위, 10^{11}개 부위, 10^{12}개 부위, 10^{13}개 부위, 10^{14}개 부위, 10^{15}개 부위 이상)에 고정된다. 일부 실시형태에서, 고정된 핵산 주형 분자는 복수의 사전 결정된 부위에서 고정된 핵산 클러스터를 생성한다. 일부 실시형태에서, 개개의 고정된 핵산 클러스터는 선형 클러스터를 포함하거나, 단일 가닥 또는 이중 가닥 콘카타머를 포함한다.

[0057] 일부 실시형태에서, 지지체 상의 무작위 위치에 위치된 복수의 부위를 포함하는 지지체는 본 명세서에서 그 위에 무작위로 위치된 부위를 갖는 지지체로서 지칭된다. 이러한 실시형태에서, 지지체 상의 무작위로 위치된 부위의 위치는 사전 결정되지 않는다. 결과적으로, 복수의 무작위로 위치된 부위는 불규칙적 및/또는 예측 가능하지 않은 방식으로 지지체 상에 배열된다. 일부 실시형태에서, 지지체는 적어도 10^2개의 부위, 적어도 10^3개의 부위, 적어도 10^4개의 부위, 적어도 10^5개의 부위, 적어도 10^6개의 부위, 적어도 10^7개의 부위, 적어도 10^8개의 부위, 적어도 10^9개의 부위, 적어도 10^{10}개의 부위, 적어도 10^{11}개의 부위, 적어도 10^{12}개의 부위, 적어도 10^{13}개의 부위, 적어도 10^{14}개의 부위, 적어도 10^{15}개 이상의 부위를 포함하며, 부위는 지지체 상에 무작위로 위치된다. 일부 실시형태에서, 지지체 상의 복수의 무작위로 위치한 부위(*예*: 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상, *예컨대* 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상, *예컨대* 10^2개 부위, 10^3개 부위, 10^4개 부위, 10^5개 부위, 10^6개 부위, 10^7개 부위, 10^8개 부위, 10^9개 부위, 10^{10}개 부위, 10^{11}개 부위, 10^{12}개 부위, 10^{13}개 부위, 10^{14}개 부위, 10^{15}개 부위 이상)에는 핵산 주형 분자가 고정된다. 일부 실시형태에서, 핵산 주형 분자는 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 혼성화에 의해 복수의 무작위로 위치된 부위에 고정되거나, 핵산 주형 분자는 표면 포획 프라이머에 공유적으로 부착된다. 일부 실시형태에서 복수의 무작위로 위치한 부위에 고정된 핵산 주형은 예를 들어 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상, *예컨대* 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상, *예컨대* 10^2개 부위, 10^3개 부위, 10^4개 부위, 10^5개 부위, 10^6개 부위, 10^7개 부위, 10^8개 부위, 10^9개 부위, 10^{10}개 부위, 10^{11}개 부위, 10^{12}개 부위, 10^{13}개 부위, 10^{14}개 부위, 10^{15}개 부위 이상에 고정된다. 일부 실시형태에서, 고정된 핵산 주형은 복수의 무작위로 위치된 부위에서 고정된 핵산 클러스터를 생성한다. 일부 실시형태에서, 개개의 고정된 핵산 클러스터는 선형 클러스터를 포함하거나, 단일 가닥 또는 이중 가닥 콘카타머를 포함한다.

[0058] 일부 실시형태에서, 지지체 상의(*예를 들어*, 지지체 상의 사전 결정된 또는 무작위 위치에 위치된) 복수의 고정된 표면 포획 프라이머는 지지체 상에 시약(*예를 들어*, 핵산 주형 분자, 가용성 프라이머, 효소, 뉴클레오타이드, 2가 양이온, 완충제 등)의 용액에 흐르는 것을 가능하게 하도록 서로 유체 연통되고, 따라서 지지체 상의 복수의 고정된 표면 포획 프라이머는 대량 병행 방식으로 시약과 본질적으로 동시에 반응될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 표면 포획 프라이머의 유체 연통은 복수의 고정된 표면 포획 프라이머 상에서 본질적으로 동시에 핵산 증폭 반응(*예*: RCA, MDA, PCR 및 브리지 증폭)을 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0059] 일부 실시형태에서, 지지체 상의 복수의 고정된 핵산 클러스터는 지지체 상에 시약(*예를 들어*, 효소, 뉴클레오타이드, 2가 양이온 등)의 용액이 흐르는 것을 가능하게 하도록 서로 유체 연통하여, 지지체 상의 복수의 고정된 핵산 클러스터는 대규모 병행 방식으로 시약과 본질적으로 동시에 반응될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 핵산 클러스터의 유체 연통은 뉴클레오타이드 결합 분석을 수행하고/하거나 복수의 고정된 핵산 콘카타머 클러스터 상에서 뉴클레오타이드 중합 반응(*예를 들어*, 프라이머 연장 또는 서열분석)을 본질적으로 동시에 수행하기 위해, 대규모 병행 서열분석을 위해 검출 및 이미징를 선택적으로 수행하기 위해 사용될 수 있다.

[0060] 일부 실시형태에서, 용어 "고정된" 및 관련된 용어는 공유 결합 또는 비-공유 상호작용을 통해 지지체에 부착되거나, 지지체 상의 코팅에 부착되거나, 지지체 상에서 코팅에 의해 형성된 기질 내에 파묻힌 핵산 분자를 지칭하며, 여기서, 핵산 분자는 표면 포획 프라이머, 핵산 주형 분자 및 포획 프라이머의 연장 산물을 포함한다. 포획 프라이머의 연장 산물은 핵산 콘카타머(*예를 들어*, 핵산 클러스터)를 포함할 수 있다. 핵산 분자는 지지체 상의 사전 결정된 또는 무작위 위치에 고정될 수 있다. 핵산 분자는 지지체 상의 사전 결정된 또는 무작위 위치에 또는 지지체 상에서 부동태화된 코팅 내에 고정될 수 있다.

[0061] 일부 실시형태에서, 용어 "고정된" 및 관련된 용어는 공유 결합 또는 비-공유 상호작용을 통해 지지체에 부착되거나, 지지체 상의 코팅에 부착되거나, 지지체 상에서 코팅에 의해 형성된 기질 내에 파묻힌 효소(*예를 들어*, 중합효소)를 지칭한다. 효소는 지지체 상의 사전 결정된 또는 무작위 위치에 고정될 수 있다. 효소는 지지체 상

의 사전 결정된 또는 무작위 위치에 또는 지지체 상에서 부동태화된 코팅 내에 고정될 수 있다.

[0062] 일부 실시형태에서, 1개 이상의 핵산 주형 분자가 지지체 상에 고정되고, 예를 들어, 지지체 상의 부위에 고정된다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 핵산 주형 분자는 클론-증폭된다. 일부 실시형태에서, 1개 이상의 핵산 주형 분자는 (*예를 들어*, 용액 중) 지지체에서 클론 증폭 오프되고, 이어서, 지지체 상에 침착되고, 지지체 상에 고정된다. 일부 실시형태에서, 1개 이상의 핵산 주형 분자의 클론 증폭 반응이 지지체 상에서 수행되어 지지체 상의 고정을 초래한다. 일부 실시형태에서, 1개 이상의 핵산 주형 분자는 중합효소 연쇄 반응(PCR), 다중 전위 증폭(MDA), 전사-매개 증폭 (TMA), 핵산 서열-기반 증폭(NASBA), 가닥 전위 증폭(SDA), 실시간 SDA, 브리지 증폭, 등온 브리지 증폭, 회전환 증폭(RCA), 원-대-원 증폭, 헬리카제 의존적 증폭, 재조합효소-의존적 증폭 및/또는 단일 가닥 결합(SSB) 단백질-의존적 증폭 중 어느 하나 또는 임의의 조합을 포함하는 핵산 증폭 반응을 이용해서 (*예를 들어*, 용액 중 또는 지지체 상에서) 클론 증폭된다.

[0063] 용어 "표면 프라이머" 및 관련 용어는 지지체 상에 고정되고 핵산 주형 분자의 적어도 일부에 혼성화될 수 있는 서열을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 표면 포획 프라이머는 혼성화를 통해 지지체에 주형 분자를 고정시키는 데 사용될 수 있다. 표면 포획 프라이머는 흐름, 세척, 흡입, 및 온도, pH, 염, 화학적 및/또는 효소적 조건의 변화 동안 프라이머 제거에 저항하는 방식으로 지지체에 고정될 수 있다. 전형적으로, 반드시는 아니지만, 표면 포획 프라이머의 5' 말단은 지지체에 또는 지지체 상의 코팅에 고정될 수 있다(또는 지지체 상의 코팅에 포매됨). 또는, 표면 포획 프라이머의 내부 일부 또는 3' 말단은 지지체에 고정될 수 있다.

[0064] 표면 프라이머의 서열은 핵산 주형 분자의 적어도 일부에 대해 이들의 길이를 따라서 전체적으로 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 지지체는 동일한 서열을 갖거나, 2개 이상의 상이한 서열을 갖는 복수의 고정된 표면 포획 프라이머를 포함할 수 있다. 표면 포획 프라이머는 임의의 길이, 예를 들어, 4 내지 50개의 뉴클레오타이드 또는 50 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 100 내지 150개의 뉴클레오타이드, 또는 더 긴 길이일 수 있다.

[0065] 표면 포획 프라이머는 뉴클레오타이드 중합(*예를 들어*, 중합효소 촉매된 중합)을 위해 연장 가능한 당 3' OH 모이어티를 갖는 종결 3' 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 표면 포획 프라이머는 뉴클레오타이드 중합을 저해하는 사슬-종결 모이어티에 연결된 3' 당 위치를 갖는 종결 3' 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 3' 사슬-종결 모이어티는 제거되어(*예를 들어*, 탈차단되어) 탈차단제를 이용해서 3' 말단을 연장 가능한 3' OH 말단으로 전환시킬 수 있다. 사슬 종결 모이어티의 예는 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아지드기, 아민기, 아미드기, 케토기, 이소시아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 이황화물기, 탄산기, 우레아기, 아세탈기 또는 실릴기 등이 있다. 아자이드 유형 사슬 종결 모이어티는 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기를 포함한다. 탈차단제의 예는 사슬-종결기 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기의 경우, 포스핀 화합물, 예컨대, 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 및 비스-설포 트라이페닐 포스핀 (BS-TPP)을 포함한다. 탈차단제의 예는 사슬 종결기 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴의 경우, 피페리딘과 함께 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)과 함께 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)($Pd(PPh_3)_4$)을 포함한다. 탈차단제의 예는 사슬-종결기 아릴 및 벤질에 대해 Pd/C를 포함한다. 탈차단제의 예는 사슬-종결기 아민, 아마이드, 케토, 아이소사이아네이트, 포스페이트, 티오 및 다이설파이드의 경우, 포스핀, 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오트리톨(DTT)을 포함한다. 탈차단제의 예는 탄산염 사슬-종결기에 대해, MeOH 중 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중 트라이에틸아민 및 아세트산 (AcOH) 중 Zn을 포함한다. 탈차단제의 예는 사슬-종결기 유레아 및 실릴의 경우, 암모늄 플루오라이드 및 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드와 함께 테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF를 포함한다.

[0066] 용어 "서열분석" 및 관련된 용어는 전형적으로 핵산 분자 내의 적어도 일부 뉴클레오타이드(이들의 핵염기 성분 포함)의 정체를 결정함으로써 핵산 분자로부터 뉴클레오타이드 서열 정보를 얻는 방법을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 핵산 분자의 주어진 영역의 서열 정보는 서열분석되는 영역 내의 각각의, 모든 뉴클레오타이드를 식별하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 정보는 뉴클레오타이드 영역의 일부만을 결정하는 한편, 일부 뉴클레오타이드의 정체는 결정되지 않거나 부정확하게 결정된 채로 남아있다. 서열분석의 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 서열분석은 무표지 또는 이온 기반 서열분석 방법을 포함할 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 서열분석은 표지 또는 염료-함유 뉴클레오타이드 또는 형광 기반 뉴클레오타이드 서열분석 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열분석은 폴로니-기반 서열분석 또는 브리지 서열분석 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열분석은 적어도 하나의 결합활성 복합체를 생성하기 위한 중합효소 및 다가 분자를 사용하되, 개개 다가 분자는 코어에 고정된 복수의 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열분석은 합성에 의한 서열분석을 수행하기 위해 중합효소 및 유리 뉴클레오타이드를 사용한다. 일부

실시형태에서, 서열분석은 결찰에 의한 서열을 수행하기 위해 리가제 효소 및 복수의 서열-특이적 올리뉴클레오타이드를 사용한다.

[0067] 일부 양태에서, 본 개시내용은 핵산 변성(탈혼성화) 및 서열분석을 수행하기 위한 다양한 시약 및 해당 시약을 사용하는 방법을 제공한다. 다양한 시약은 적어도 하나의 pH 완충제를 포함할 수 있다. 예시적이고 제한적이지 않은 pH 완충제의 전체 이름은 여기에 열거되어 있다.

[0068] 용어 "트리스"는 pH 완충제 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄을 지칭한다. 용어 "트리스-HCl"은 pH 완충제 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄 히드로클로라이드를 지칭한다. 용어 "트리스아세테이트"는 트리스(하이드록시메틸)-아미노메탄의 아세트산염을 포함하는 pH 완충제를 지칭한다.

[0069] 용어 "트라이신"은 pH 완충제 N-[트리스(하이드록시메틸)메틸]글리신을 지칭한다.

[0070] 용어 "바이신"은 pH 완충제 N,N-비스(2-하이드록시에틸)글리신을 지칭한다.

[0071] 용어 "비스-트리스 프로판"은 pH 완충제 1,3 비스[트리스(하이드록시메틸)메틸아미노]프로판을 지칭한다.

[0072] 용어 "HEPES"는 pH 완충제 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산을 지칭한다.

[0073] 용어 "MES"는 pH 완충제 2-(*N*-모르폴리노)에탄설폰산)을 지칭한다.

[0074] 용어 "MOPS"는 pH 완충제 3-(*N*-모르폴리노)프로판설폰산을 지칭한다.

[0075] 용어 "MOPSO"는 pH 완충제 3-(N-모르폴리노)-2-하이드록시프로판설폰산을 지칭한다.

[0076] 용어 "BES"는 pH 완충제 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에탄설폰산을 지칭한다.

[0077] 용어 "TES"는 pH 완충제 2-[(2-하이드록시-1,1비스(하이드록시메틸) 에틸)아미노]에탄설폰산)을 지칭한다.

[0078] 용어 "CAPS"는 pH 완충제 3-(사이클로헥실아미노)-1-프로판석신산을 지칭한다.

[0079] 용어 "TAPS"는 pH 완충제 N-[트리스(하이드록시메틸)메틸]-3-아미노 프로판 설폰산을 지칭한다.

[0080] 용어 "TAPSO"는 pH 완충제 N-[트리스(하이드록시메틸)메틸]-3-아미노-2-하이드록시프로판설폰산을 지칭한다.

[0081] 용어 "ACES"는 pH 완충제 *N*-(2-아세트아미도)-2-아미노에탄설폰산을 지칭한다.

[0082] 용어 "PIPES"는 pH 완충제 피페라진-1,4-비스(2-에탄설폰산)을 지칭한다.

[0083] 용어 "에탄올아민"은 2-아미노에탄올로도 알려진 pH 완충제를 지칭한다.

[0084] **소개: 이중 가닥 스플린트 어댑터**

[0085] 일부 양태에서, 본 개시내용은 키트를 포함하여 핵산 이중 가닥 스플린트 어댑터를 포함하는 조성물 및 이중 가닥 스플린트 어댑터를 사용하는 방법을 제공한다.

[0086] 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 하나 이상의 새로운 어댑터 서열을 라이브러리 분자에 도입하기 위해 원-포트, 다중-효소 반응에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300))과 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제1 및 제2 스플린트 가닥은 함께 혼성화되어 이중 가닥 영역 및 2개의 측접 단일 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 형성한다(*예*: **도 2**와 **도 3** *참조*). 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300))과 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))은 전체 길이를 따라 서로 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300))과 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))은 함께 혼성화되지 않는 부분을 포함한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 도입될 새로운 어댑터 서열(들), 예를 들어, 새로운 범용 결합 서열 및/또는 새로운 인덱스 서열을 보유할 수 있다. 제1 스플린트 가닥은 제1 영역(320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함할 수 있다. 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화될 수 있다. 이중 가닥 스플린트 어댑터의 2개의 측접하는 단일 가닥 영역(*예*: (320) 및 (330))은 관심 서열(110)을 갖는 단일 가닥 선형 라이브러리 분자(100)의 말단에서 범용 어댑터 서열에 혼성화하도록 설계된다. 예를 들어, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 라이브러리 분자의 하나의 말단(120)에 혼성화되고, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 라이브러리 분자의 다른 말단(130)에 혼성화됨으로써, 라이브러리 분자를 원형화하여 2개의 틈을 포함하는 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 생성한다(*예*: **도 3** *참조*).

[0087] 일부 실시형태에서, 선형 핵산 라이브러리 분자(100)는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용

어댑터 서열의 한 쪽에 측접된 삽입 영역(110)(*예*: 관심 서열) 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열의 다른 쪽에 측접된 삽입 영역(110)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(짧은 가닥(400))에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(긴 가닥(300))을 포함한다. 제1 스플린트 가닥은 선형 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 한쪽 말단에 있는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열과 혼성화되는 제1 영역(320)을 포함할 수 있고, 제1 스플린트 가닥은 선형 단일 가닥 라이브러리 분자의 다른 쪽 말단에 있는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열과 혼성화되는 제2 영역(330)을 포함할 수 있다. 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화할 수 있다. 틈은 효소로 결찰되어 공유결합 폐환형 분자(600)를 생성할 수 있고, 이때 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자의 양 말단에 공유적으로 결합되어, 라이브러리 분자에 새로운 어댑터 서열을 도입한다(*예*: **도 4** *참조*). 결찰 반응은 제2 스플린트 가닥(400)으로부터 라이브러리 분자(100)의 말단까지 서열을 결합할 수 있다.

[0088] 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 임의의 하위 영역은 증폭 프라이머에 혼성화되도록 설계될 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭 프라이머는 예를 들어 **도 5**에 도시된 바와 같이 프라이머 연장 반응을 개시하는 데 사용될 수 있는 연장 가능한 3' 말단을 갖는다. 일부 실시형태에서, 증폭 프라이머는 가용성 프라이머이거나 지지체(*예*: 표면 포획 프라이머)에 고정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 증폭 프라이머는 회전환 증폭 반응을 수행하여 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 상보적인 핵산 콘카타머 분자를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0089] 따라서 본원에 기재된 이중 가닥 스플린트 어댑터 및 방법을 사용하여 임의의 선형 라이브러리 분자를 공유결합 폐환형 분자로 전환할 수 있다. 제2 스플린트 가닥(400)은 적어도 하나의 새로운 범용 어댑터 서열(*예*: 새로운 표면 프라이머 서열)을 포함할 수 있어, 공유결합 폐환형 분자(600)가 그 위에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머를 갖는 지지체에 결합할 수 있도록 한다. 제2 스플린트 가닥(400)의 새로운 범용 어댑터 서열(들)은 증폭 및 서열분석 작업흐름에서 공유결합 폐환형 분자(600)의 사용을 허용한다.

[0090] 본 명세서에 기재된 방법은 또한 새로운 어댑터 서열을 도입하기 위한 갭 채우기 반응(gap fill-in reaction)보다는 결찰 반응을 사용하는 것의 이점을 제공한다. 결찰 반응은 0.25 pmol의 라이브러리 분자만으로도 높은 효율의 원형화를 제공한다.

[0091] 본원에 기재된 방법은 수동으로 수행할 수 있거나 자동화에 쉽게 적용될 수 있다. 왜냐하면 어닐링 및 다중 효소 반응이 일부 효소 반응(*예*: 인산화 및 결찰)을 결합하고 후속 효소(*예*: 외부 핵산효소)를 추가하는 방식으로 단일 반응 용기(원-포트)에서 수행될 수 있기 때문이다. 이 과정에서 알코올 침전이나 유기 추출이 개입되지 않는다.

[0092] **이중 가닥 스플린트 어댑터**

[0093] 일부 양태에서, 본 개시내용은 **(ii)** 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))에 혼성화된 **(i)** 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300))을 포함하는 핵산 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 제공한다(*예*: **도 2** 및 **도 3** *참조*). 제1 스플린트 가닥은 제1 영역(320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함할 수 있다. 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화되어 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 형성한다. 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)의 2개의 측접하는 단일 가닥 영역은 선형 핵산 라이브러리 분자(100)의 말단 서열에 혼성화하도록 설계될 수 있다. 선형 핵산 라이브러리 분자의 말단 서열은 각각 제1(120) 및 제2(130) 서열 범용 어댑터 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 선형 라이브러리 분자의 제1 및 제2 범용 어댑터 서열은 각각 정방향(120) 및 역방향(130) 서열분석 프라이머 결합 부위에 대한 결합 서열을 포함한다.

[0094] **도 2**에 예시된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥은 선형 단일 가닥 라이브러리 분자의 하나의 말단 상의 서열과 혼성화되는 제1 영역(320) 및 선형 단일 가닥 라이브러리 분자의 다른 말단 상의 서열과 혼성화되는 제2 영역(330)을 포함한다. 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화할 수 있다. 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)은 하위 영역 (311), (312) 및 (313)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함할 수 있다. 제2 스플린트 가닥(400)은 하위 영역 (411), (412) 및 (413)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하위 영역(311)은 하위 영역(411)에 혼성화된다. 또 다른 예에서, 하위 영역(312)은 하위 영역(412)에 혼성화된다. 또 다른 예에서, 하위 영역(313)은 하위 영역(413)에 혼성화된다. 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역은 임의의 조합, 임의의 순서로 다음 중 임의의 하나 이상을 포함할 수 있다: 표면 포획 프라이머에 대한 범용 프라이머 결합 서열, 표면 고정 프라이머에 대한 범용 프라이머

결합 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열.

[0095] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 선형 핵산 라이브러리 분자의 한 말단에서 제1 범용 결합 서열에 혼성화할 수 있는 제1 범용 어댑터 서열을 포함한다(*예*: **도 2** *참조*). 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 선형 핵산 라이브러리 분자의 다른 말단에서 제2 범용 결합 서열에 혼성화할 수 있는 제2 범용 어댑터 서열을 포함한다(*예*: **도 2** *참조*). 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 정방향 또는 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 정방향 또는 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제2 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 인산화 또는 비인산화된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 말단 3' OH 기 또는 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0096] 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함한다(*예*: **도 2와 도 3** *참조*). 제1 하위 영역(411)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제2 하위 영역(412)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제3 하위 영역(413)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예:* 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)의 삽입 서열(110)에 대한 혼성화가 감소되거나 혼성화되지 않도록 설계된다.

[0097] 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 예시적인 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0098] 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 예시적인 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함].

[0099] 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 예시적인 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(412)는 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0100] 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제2 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 보유하는 추가 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 추가 하위 영역은 하위 영역(411)과 하위 영역(412) 사이, 또는 하위 영역(412)과 하위 영역(413) 사이에 위치할 수 있다.

[0101] 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 20 내지 100개(*예*: 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 30 내지 80개(*예*: 약 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 또는 80개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 40 내지 60개(*예*: 약 40, 45, 50 또는 60개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 비인산화된다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함하고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' 차단기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 *예컨대* 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 또는 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0102] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 제4 하위 영역(311), 제5 하위 영역(312) 및 제6 하위 영역(313)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함하는 내부 영역(310)을 포함한다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 혼성화할 수 있다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 혼성화할 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 혼성화할 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제 4, 제5 및 제6 하위 영역은 관심 서열, 표면 포획 프라이머 또는 표면 고정 프라이머에 혼성화하지 않는다(또는 최소한 혼성화를 거의 나타내지 않는다).

[0103] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 하위 영역 중 하나는 인덱스 또는 무작위 서열, 예를 들어 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 예를 들어, 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)은 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다.

[0104] **도 6**에 도시된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 하위 영역(312)은 다음 중 하나 또는 두 개 이상의 임의의 조합을 포함한다: 샘플 인덱스 서열분석("S"로 표시); 무작위 서열분석("N"으로 표시); 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신); 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서(*예*: 18개 탄소 스페이서). **도 6**은 다음을 포함하는 제2 스플린트 가닥(400; 짧은 스플린트 가닥)의 대체 예시적 핵산 서열을 묘사한다: 하위 영역(411); 하위 영역(412); 및 하위 영역(413)을 포함하는 3개의 하위 영역.

[0105] 일부 실시형태에서, 인덱스 또는 무작위 서열을 포함하는 제1 스플린트 가닥 하위 영역은 다음 중 두 개 이상의 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다: 샘플 인덱스 서열("S"로 표시); 무작위 서열분석("N"으로 표시); 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신); 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다. 비제한적인 예는 **도 6**을 *참조*한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하며, 이 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)에 부분적으로 혼성화되고, 여기서 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 범용 긴 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)에 부분적으로만 혼성화되는 적어도 하나의 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 운반하는 하위 영역; 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다. 예시적인 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 **도 6**에 도시되어 있다.

[0107] 일부 실시형태에서, **도 7**에 도시된 바와 같이, 제1 스플린트 가닥은 하위 영역(312)이 없다. **도 7**은 또한 다음을 포함하는 제2 스플린트 가닥(400; 짧은 스플린트 가닥)의 예시적인 핵산 서열을 보여준다: 하위 영역(411); 하위 영역(412); 및 하위 영역(413)을 포함하는 3개의 하위 영역. 특정 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 제2 스플린트 가닥(400)과 혼성화될 때, 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역(412)은 제1 스플린트 가닥(300)에 하위 영역(312)이 없기 때문에 루프 아웃된다.

[0108] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)이 없기 때문에, 제1 스플

린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스는 루프 아웃되는 제2 스플린트 가닥의 일부를 갖는다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역(312)이 없으며, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화로 형성된 듀플렉스에서 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역(412)은 루프 아웃된다(*예*: **도 7** *참조*). 일부 실시형태에서, 하위 영역이 없는 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥(300)의 예이다.

[0109] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 50 내지 150개의 뉴클레오타이드 길이, 또는 60 내지 100개의 뉴클레오타이드 길이 또는 70 내지 90개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0110] 아래 **표 1 내지 표 6**은 라이브러리 분자(100)의 범용 어댑터 서열, 제1 스플린트 가닥의 서열(300), 제2 스플린트 가닥(400)의 서열, 고정된 표면 프라이머의 서열 및 서열분석 프라이머의 서열의 다양한 실시형태를 열거한다.

[0111] 일부 실시형태에서, **표 1**에 열거된 라이브러리 분자(100)의 범용 어댑터 서열 중 임의의 것은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절단은 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0112] 일부 실시형태에서, 서열분석 프라이머는 아래 **표 1**에 열거된 임의의 서열에 상보적인 서열을 포함한다.

[0113] 일부 실시형태에서, 서열분석 프라이머는 아래 **표 1**에 열거된 임의의 서열에 상보적인 서열을 포함하며, 여기서 서열분석 프라이머는 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단되고, 절단은 1 내지 12개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절단은 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0114] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 임의의 서열은 아래 **표 1 내지 표 6**에 열거된 임의의 서열에 상보적인 서열을 포함한다.

[0115] 일부 실시형태에서, **표 2 내지 표 3**에 열거된 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 임의의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절단은 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

표 1

[0116] 라이브러리 분자(100)의 범용 서열

서열 번호:	**라이브러리 분자(100)의 서열:**
1	정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120): 5'- CGTGCTGGATTGGCTCACCAGACACCTTCCGACAT -3'
2	정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120):5'- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT -3'
3	정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120):5'- TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG -3'
4	역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130):5'- ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT -3'
5	역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130):5'- AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC -3'
6	역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130):5'- CTGTCTCTTATACACATCTCCGAGCCCACGAGAC -3'
43	역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130):5'- ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGT -3'
44	역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130):5'- ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCG -3'

표 2

[0117] 제1 스플린트 가닥(300): 긴 스플린트 가닥의 서열

서열 번호:	제1 스플린트 가닥(300): 긴 스플린트 가닥의 서열:
7	긴 스플린트 가닥(300)의 제1 영역(320): 5'- ATGTCGGAAGGTGTCTGGTGAGCCAATCCAGCACG -3'
8	긴 스플린트 가닥(300)의 제1 영역(320):5'- GTGAGCCAATCCAGCACG -3'
9	긴 스플린트 가닥(300)의 제1 영역(320):5' - AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGT -3'
10	긴 스플린트 가닥(300)의 제1 영역(320):5'- CTGTCTCTTATACACATCTGACGCTGCCGACGA - 3'
11	긴 스플린트 가닥(300)의 제2 영역(330):5'- ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT -3'
12	긴 스플린트 가닥(300)의 제2 영역(330):5'- AGTTGACAAGCGGTAGCC -3'
13	긴 스플린트 가닥(300)의 제2 영역(330):5'- GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT -3'
14	긴 스플린트 가닥(300)의 제2 영역(330):5'- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG -3'
15	하위 영역(311)에서:(311)은 짧은 스플린트 가닥(400)에서 (411)의 서열에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 서열이다.
16	하위 영역(312)에서:(312)은 짧은 스플린트 가닥(400)에서 (412)의 서열에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 서열이다.
17	하위 영역(313)에서:(313)은 짧은 스플린트 가닥(400)에서 (413)의 서열에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 서열이다.
N/A	일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역(312)이 없다.

표 3

[0118] 제2 스플린트 가닥(400): 짧은 스플린트 가닥의 서열

서열 번호:	제2 스플린트 가닥(400): 짧은 스플린트 가닥의 서열:
18	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'-CTAGTCCACTCCGACGCTGCTGA -5'
19	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TAATGTACCTAGTCCACTCCGA -5'
20	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TAATGTACCTAGTCCACTCCGACGCTGCTGA -5'
21	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- CTCCGACGCTGCTGA -5'
45	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TAATGTACCTAGTCCACTCCGACGC -5'
46	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- CGTACTAATGTACCTAGTCCACTCCGA -5'
47	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TGGGACTTTCATGCACGTAATGTAC -5'
22	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *포획* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- GTTCGTCTTCTGCCGTATGCTCTA -5'
23	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *고정* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TGGGACTTTCATGCACGTAATGTAC -5'
48	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 고정 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TAATGTAC -5'

24	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *고정* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TGGGACTTTCATGCACG -5'
49	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 고정 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TGGGACTTTCATGCACGATTGC -5'
25	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *고정* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- TGGGACTTTCATGCACGTAATGTACCTAGTCCA -5'
26	짧은 스플린트 가닥(400)의 표면 *고정* 프라이머 결합 부위 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 3'- CTAGAGCCACCAGCGGCATAGTAA -5'
27	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'- GTAGGAGCCNNN -3'
28	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'- CCGCTGCTANNN -3'
29	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'-AACAACAAGNNN -3'
30	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'- GGTGGTCTANNN -3'
31	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'-TTGGCCAACNNN -3'
32	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'- CAGGAGTGCNNN -3'
33	짧은 스플린트 가닥(400)의 예시적인 샘플 인덱스 하위 영역에서: (411), (412) 또는 (413): 5'- ATCACACTANNN -3'

표 4

[0119] 고정된 표면 프라이머

서열:	**고정된 표면 프라이머:**
34	표면 *포획* 프라이머: 5'-GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT -3'
35	표면 *포획* 프라이머:5'- ATTACATG**GATCAGGTGAGGCT -3'**
36	표면 *포획* 프라이머:5'- GAGGCTGCGACGACT -3'
50	표면 포획 프라이머:5'- ATTACATGGATCAGGTGAGGCTGCG -3'
37	표면 *포획* 프라이머:5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3'
38	표면 *포획* 프라이머:5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'
39	표면*고정* 프라이머:5'- CATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT -3'
40	표면*고정* 프라이머:5'- ACCTGATCCATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT -3'
41	표면*고정* 프라이머:5'- AATGATACGGCGACCACCGA-3'
42	표면*고정* 프라이머:5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATC-3'

표 5

[0120]

서열 번호:	표 5: 서열분석 삽입물(110)용 서열분석 프라이머
51	정방향 서열분석 프라이머: 5'- CGTGCTGGATTGGCTCACCAGACACCTTCCGACAT -3'
52	역방향 서열분석 프라이머:5'- AGTTGACAAGCGGTAGCCTGCACACCTTCCGACAT **-3'**
53	역방향 서열분석 프라이머:5'- ACAAGCGGTAGCCTGCACACCTTCCGACAT -3'

표 6

[0121]

서열 번호:	표 6: 하위 영역 (411), (412) 또는 (413)의 서열분석 인덱스용 서열분석 프라이머
54	정방향 서열분석 프라이머: 5'- AGCCTCACCTGATCCATGTAAT -3'
55	정방향 서열분석 프라이머:5'- AGCCTCACCTGATCCATGTAATCATGC **-3''**
56	정방향 서열분석 프라이머:5'- AGTCGTCGCAGCCTCACCTGATC -3'
57	정방향 서열분석 프라이머:5'- AGTCGTCGCAGCCTCACCTGATCCATGTAAT -3'
58	정방향 서열분석 프라이머:5'- AGTCGTCGCAGCCTCACCTGATCCATGTAATCGTGA -3'
59	정방향 서열분석 프라이머:5'- AGTCGTCGCAGCCTCACCTGATCCATGTAATCATGC -3'
60	정방향 서열분석 프라이머:5' - ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT -3'
61	역방향 서열분석 프라이머:5'- ACCCTGAAAGTACGTGCATTACATG -3'
62	역방향 서열분석 프라이머:5'- ACCCTGAAAGTACGTGC -3'
63	역방향 서열분석 프라이머:5'- ACCCTGAAAGTACGTGCTAACG -3'
64	역방향 서열분석 프라이머:5'- ACCCTGAAAGTACGTGCATTACATGGATCAGGT -3'

[0122] **라이브러리-스플린트 복합체**

[0123] 일부 양태에서, 본 개시내용은 **(i)** 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열이 한 쪽에 측접된 삽입 영역(110)(*예*: 관심 서열)과 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열이 다른 쪽에 측접된 삽입 영역(110)을 포함하는 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100); 및 **(ii)** 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300))을 포함하는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 포함하는 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 제공하며, 여기서 제1 스플린트 가닥은 제1 영역(320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함한다. 특정 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화되어 이중 가닥 영역과 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 형성한다.

[0124] 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 샘플 인덱스 서열에 대한 범용 어댑터 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열이 결여되어 있다.

[0125] 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 라이브러리 분자의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화될 수 있고, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 라이브러리 분자의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화될 수 있으며, 이로써 라이브러리 분자를 원형화하여 라이브러리-스플린트를 복합체(500)를 생성할 수 있다(*예*: **도 3**과 **도 4** *참조*).

[0126] 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)를 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 적어도 하나의 범용 어댑터 서열, 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열 및 샘플 인덱스 서열과 근접시킬 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)를 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 포함하는 다른 서열과 근접시킨다.

[0127] 라이브러리-스플린트 복합체(500)는 라이브러리 분자의 5' 말단과 제2 스플린트 가닥의 3' 말단 사이에 제1 틈

을 포함한다. 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)는 또한 제2 스플린트 가닥의 5' 말단과 라이브러리 분자의 3' 말단 사이에 제2 틈을 포함한다(*예*: **도 3**과 **도 4** *참조*). 일부 실시형태에서, 제1 틈 및 제2 틈은 효소적으로 결찰 가능하다. 결찰 반응은 제2 스플린트 가닥(400)의 서열을 라이브러리 분자(100)의 말단까지 결합한다.

[0128] 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 이중 가닥 핵산 라이브러리 분자의 센스 또는 안티-센스 가닥에 혼성화할 수 있다. 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 이중 가닥 핵산 라이브러리 분자의 센스 또는 안티-센스 가닥에 혼성화할 수 있다. 이중 가닥 핵산 라이브러리 분자는 단일 가닥 센스 및 안티-센스 라이브러리 가닥을 생성하도록 변성될 수 있다.

[0129] 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않고, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않는다.

[0130] 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않고, 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않는다.

[0131] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된다. 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)은 하위 영역 (311), (312) 및 (313)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함할 수 있다. 제2 스플린트 가닥(400)은 하위 영역 (411), (412) 및 (413)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하위 영역(311)은 하위 영역(411)에 혼성화된다. 또 다른 예에서, 하위 영역(312)은 하위 영역(412)에 혼성화된다. 또 다른 예에서, 하위 영역(313)은 하위 영역(413)에 혼성화된다.

[0132] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 라이브러리-스플린트 복합체(500)는 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 포함하되, 복수 중 개개 라이브러리-스플린트 복합체의 관심 서열(110)은 동일한 관심 서열 또는 상이한 관심 서열을 포함한다.

[0133] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 5' 말단은 인산화된다. 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 5' 말단은 포스페이트기를 결여한다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 라이브러리 분자의 3' 말단은 말단 3' OH 기 또는 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0134] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 50 내지 150개(*예*: 약 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 60 내지 100개(*예*: 약 60, 70, 80, 90 또는 100)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 70 내지 90개(*예*: 약 70, 75, 80, 85 또는 90)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 인산화된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 포스페이트기를 결여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 말단 3' OH 기 또는 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 제4 하위 영역(311), 제5 하위 영역(312) 및 제6 하위 영역(313)을 포함하는 최소한 세 개의 하위 영역을 포함하는 내부 영역(310)을 포함한다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 혼성화할 수 있다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 혼성화할 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 혼성화할 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제4, 제5 및 제6 하위 영역은관심 서열, 표면 포획 프라이머 또는 표면 고정 프라이머에 혼성화하지 않는다(*예를 들어*, 혼성화가 거의 나타나지 않

는다).

[0136] 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 하위 영역 중 하나는 인덱스 또는 무작위 서열, 예를 들어 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 예를 들어, 그리고 제한 없이 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)은 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예:* 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다.

[0137] 일부 실시형태에서, 인덱스 또는 무작위 서열을 포함하는 제1 스플린트 가닥 하위 영역은 다음 중 두 개 이상의 임의의 하나 또는 임의의 조합을 포함한다: 샘플 인덱스 서열("S"로 표시); 무작위 서열분석("N"으로 표시); 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신); 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다.

[0138] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하며, 이 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)에 부분적으로 혼성화되고, 여기서 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 범용 긴 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)에 부분적으로만 혼성화되는 적어도 하나의 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 보유하는 하위 영역; 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다. 예시적인 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 **도 6**에 도시되어 있다.

[0139] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)이 결여되어 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스는 루프 아웃된 제2 스플린트 가닥의 일부를 갖는다. 예를 들어, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역(312)이 없고, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스에서 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역(412)이 루프 아웃된다(*예*: **도7** *참조*). 일부 실시형태에서, 하위 영역이 없는 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥(300)의 예이다.

[0140] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함한다(*예*: **도3** 및 **도 4** *참조*). 제1 하위 영역(411)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제2 하위 영역(412)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제3 하위 영역(413)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예:* 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)의 삽입 서열(110)에 대한 혼성화가 감소되거나 혼성화되지 않도록 설계된다.

[0141] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0142] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함].

[0143] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(412)는 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0144] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제2 샘플 인덱스 서열과 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 보유하는 추가 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 추가 하위 영역은 하위 영역 (411)과 (412) 사이 또는 하위 영역 (412)과 (413) 사이에 위치할 수 있다.

[0145] 일부 실시형태에서, 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 20 내지 100개(*예*: 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100)개인 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 30 내지 80개(*예*: 약 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 또는 80개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 40 내지 60개(*예*: 약 40, 45, 50 또는 60개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 비인산화된다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함하고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' 차단기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여, *예컨대* 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 또는 내부 위치에 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0146] 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)를 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 적어도 하나의 범용 어댑터 서열, 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열 및 샘플 인덱스 서열과 근접시킨다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)를 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 포함하는 다른 서열과 근접시킨다.

[0147] 위의 **표 1 내지 표 4**는 라이브러리 분자(100), 제1 스플린트 가닥(300) 및 제2 스플린트 가닥(400)을 포함하는 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 다양한 분자의 서열의 다양한 실시형태를 열거한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 서열은 **표 2 내지 표 3**에 열거된 서열과 상보적인 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, **표 2 내지 표 3**에 열거된 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 임의의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자에서, **표 1**에 열거된 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)의 서열 및/또는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0148] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 복수의 임의의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 복수의 본 명세서에 기재된 임의의 라이브러리-스플린트 복합체(500), 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 본 명세서에 기재된 복수의 임의의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 포함하고, T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 결여한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 복수의 본 명세서에 기재된 임의의 라이브러리-스플린트 복합체(500) 및 리가제 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 복수의 본 명세서에 기재된 임의의 라이

브러리-스플린트 복합체(500), 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 및 리가제 효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 반응 혼합물은 본 명세서에 기재된 복수의 임의의 라이브러리-스플린트 복합체(500)와 리가제 효소를 포함하고 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 결여한다. 일부 실시형태에서, 리가제 효소는 T7 DNA 리가제, T3 리가제, T4 리가제 또는 Taq 리가제를 포함한다.

[0149] **공유결합 폐환형 분자**

[0150] 일부 양태에서, 본 개시내용은 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 제공하며, 관심 서열(110), 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120), 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130) 및 제2 스플린트 가닥(400)의 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 한 쪽에 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)가 측접되고, 다른 쪽에 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)가 측접된 관심 서열(110)을 포함하며, 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)와 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)는 제2 스플린트 가닥(400)에 공유적으로 결합된다. 예시적인 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 **도 4** 및 **도 5**에 도시되어 있다.

[0151] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 더 포함하되, 복수의 개개의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 관심 서열(110)은 동일한 관심 서열을 포함한다. 또는, 일부 실시형태에서, 관심 서열(110)은 상이한 관심 서열을 포함한다.

[0152] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하여 적어도 세 개의 하위 영역을 포함한다(*예*: **도 4**와 **도 5** *참조*). 제1 하위 영역(411)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제2 하위 영역(412)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제3 하위 영역(413)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 다중 분석에서 서로 다른 샘플 소스의 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있는 5 내지 20개의 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있는 3 내지 20개의 염기를 포함한다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)의 삽입 서열(110)에 대한 혼성화가 감소되거나 혼성화되지 않도록 설계된다.

[0153] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 배열은 3'에서 5' 배향으로 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머를 결합하기 위한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 샘플 인덱스 서열과 선택적 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머를 결합하기 위한 범용 서열을 포함함].

[0154] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 3'에서 5' 배향으로 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함].

[0155] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 3'에서 5' 배향으로 다음을 포함한다: [(411)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(412)는 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0156] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제2 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 보유하는 추가 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 추가 하위 영역은 하위 영역(411)과 하위 영역(412) 사이, 또는 하위 영역(412)과 하위 영역(413) 사이에 위치할 수 있다.

[0157] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 20 내지 100개의 뉴클레오타이드 또는 길이가 30 내지 80개의 뉴클레오타이드 길이 또는 길이가 40 내지 60개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은

내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 또는 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0158] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화되거나 제1 스플린트 가닥(300)이 존재하지 않는다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 50 내지 150개(*예*: 약 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 60 내지 100개(*예*: 약 60, 70, 80, 90 또는 100개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 70 내지 90개(*예*: 약 70, 75, 80, 85 또는 90개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여, *예컨대* 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여, *예컨대* 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 포스페이트기를 결여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함하며; 또는, 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0159] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 제4 하위 영역(311), 제5 하위 영역(312) 및 제6 하위 영역(313)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함하는 내부 영역(310)을 포함한다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 혼성화할 수 있다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 혼성화할 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 혼성화할 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제4, 제5 및 제6 하위 영역은 관심 서열, 표면 포획 프라이머 또는 표면 고정 프라이머에 혼성화하지 않는다(*예를 들어*, 혼성화가 거의 나타나지 않는다).

[0160] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 하위 영역 중 하나는 인덱스 또는 무작위 서열, 예를 들어 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 예를 들어, 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)은 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 다중 분석에서 서로 다른 샘플 소스의 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있는 5 내지 20개의 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있는 3 내지 20개의 염기를 포함한다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다.

[0161] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 하위 영역(312)은 다음 중 어느 하나 또는 두 개 이상의 임의의 조합을 포함한다: 샘플 인덱스 서열("S"로 표시); 무작위 서열분석("N"으로 표시); 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신); 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다.

[0162] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)가 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화될 때, 제1 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)의 서열에 부분적으로 혼성화되고, 여기서 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 범용 긴 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)의 서열에 부분적으로만 혼성화되는 적어도 하나의 하위 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 보유하는 하위 영역; 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이

서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다. 예시적인 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 **도 6**에 도시되어 있다.

[0163] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)이 결여되어, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스가 루프 아웃되는 제2 스플린트 가닥의 일부를 갖게 한다. 예를 들어, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역(312)이 없고, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스에서 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역(412)이 루프 아웃된다(*예*: **도 7** *참조*). 일부 실시형태에서, 하위 영역이 없는 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥(300)의 예이다.

[0164] 일부 실시형태에서, 예시적인 공유결합 폐환형 분자(600)는 **(i)** 관심 서열(110); **(ii)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(140)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iii)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(150)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iv)** 표면 고정 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 411); **(v)** 표면 포획 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 413); 및 **(vi)** 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)(하위 영역 412)를 포함하며, 여기서 공유결합 폐환형 분자(600)는 선택적으로 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된다.

[0165] 일부 실시형태에서, 예시적인 공유결합 폐환형 분자(600)는 **(i)** 관심 서열(110); **(ii)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(140)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iii)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(150)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iv)** 표면 고정 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 411); **(v)** 표면 포획 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 412); 및 **(vi)** 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)(하위 영역 413)를 포함하며, 여기서 공유결합 폐환형 분자(600)는 선택적으로 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된다.

[0166] 일부 실시형태에서, 예시적인 공유결합 폐환형 분자(600)는 **(i)** 관심 서열(110); **(ii)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(140)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iii)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(150)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iv)** 표면 고정 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 412); **(v)** 표면 포획 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 413); 및 **(vi)** 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)(하위 영역 411)를 포함하며, 여기서 공유결합 폐환형 분자(600)는 선택적으로 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된다.

[0167] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 공유결합 폐환형 분자(600)는 복수의 공유결합 폐환형 분자(600)를 포함하되, 복수의 개별 공유결합 폐환형 분자(600)의 관심 서열(110)은 동일한 관심 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 개별 공유결합 폐환형 분자(600)의 관심 서열(110)은 상이한 관심 서열을 포함한다.

[0168] 위의 표 1 내지 4에는 라이브러리 분자(100), 제1 스플린트 가닥(300) 및 제2 스플린트 가닥(400)을 포함하여 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 형성하는 서열의 다양한 실시형태가 열거되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 서열은 **표 2 내지 표 3**에 열거된 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, **표 2 내지 표 3**에 열거된 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 임의의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자에서, **표 1**에 열거된 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)의 서열 및/또는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0169] 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 복수의 공유결합 폐환형 분자(600) 및 적어도 1종의 엑소뉴클레아제 효소를 포함하는 반응 혼합물을 제공한다. 일부 실시형태에서, 엑소뉴클레아제 효소는 엑소뉴클레아제 I, 열불안정성 엑소뉴클레아제 I 및/또는 T7 엑소뉴클레아제 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함한다.

[0170] 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열을 보유하는 이중 가닥 스플린트 어댑터를 사용하여 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 준비함으로써 다중 작업흐름이 가능해진다. 샘플 인덱스 서열은 다양한 공급원으로부터 단리된 입력 핵산을 사용하여 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 별도 배치(batch)를 준비하는 데 사용될 수 있다. 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 함께 풀링되어 다중 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600) 혼합물을 생성할 수 있고, 풀링된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자

(600)는 증폭 및/또는 서열분석될 수 있다. 삽입 영역의 서열분석과 샘플 인덱스 서열분석을 함께 사용하면 입력 핵산의 공급원을 식별할 수 있다. 일부 실시형태에서, 임의의 수의 배치의 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 풀링할 수 있는데, 예를 들어 2 내지 10개, 또는 10 내지 50개, 또는 50 내지 100개, 또는 100 내지 200개, 또는 200개가 넘는 배치의 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 풀링할 수 있다. 예시적인 핵산 공급원은 자연-발생적, 재조합 또는 화학적으로 합성된 공급원을 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 단일 세포, 복수의 세포, 조직, 생물학적 유체, 환경 샘플 또는 전체 유기체를 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 신선한, 냉동된, 신선 냉동된 또는 보관된(archived) 공급원(*예*: 포말린-고정 파라핀-포매; FFPE)을 포함한다. 당업자는 핵산이 다수의 다른 공급원으로부터 단리될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 핵산 라이브러리 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 제조될 수 있다.

[0171] **이중 가닥 스플린트 어댑터를 포함하는 키트**

[0172] 본 개시내용은 선형 핵산 라이브러리 분자에 하나 이상의 새로운 어댑터 서열을 도입하는 데 사용하기 위한 키트를 제공한다. 일부 실시형태에서, 키트는 한쪽에는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열(120)에 의해 측접되고 다른 쪽에는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 측접된 관심 서열(110)을 갖는 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자를 원형화하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 원형화된 라이브러리 분자는 공유결합 폐환형원형 분자로 전환될 수 있고, 이는 회전환 증폭(RCA) 반응이 가해져서 핵산 콘카타머를 생성할 수 있다. 콘카타머는 대규모 병행 서열분석을 위해 지지체에 고정될 수 있다.

[0173] 본 개시내용은 **(i)** 제1 스플린트 가닥(긴 스플린트 가닥(300)) 및 **(ii)** 제2 스플린트 가닥(짧은 스플린트 가닥(400))을 포함하는, 핵산 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 포함하는 키트를 제공한다. 제1 스플린트 가닥은 제1 영역(320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함한다. 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화되어 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 형성한다. 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)의 2개의 측접하는 단일 가닥 영역은 선형 핵산 라이브러리 분자(100)의 말단 서열에 혼성화하도록 설계된다. 선형 핵산 라이브러리 분자의 말단 서열은 각각 제1(120) 및 제2(130) 서열 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 선형 라이브러리 분자의 제1 및 제2 범용 어댑터 서열은 각각 정방향(120) 및 역방향(130) 서열분석 프라이머 결합 부위에 대한 결합 서열을 포함한다.

[0174] 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)의 작어도 일부는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화되어 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 갖는 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 형성한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 적어도 하나의 새로운 어댑터 서열을 포함한다. 라이브러리-스플린트 복합체(500)의 형성은 라이브러리 분자(100)를 적어도 하나의 새로운 범용 어댑터 서열, 예를 들어 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 서열, 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 서열, 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열과 근접하게 한다. 예시적인 이중 가닥 스플린트 어댑터는 **도 2**와 **도 3**에 도시되어 있다. 키트는 혼성화 또는 비혼성화 형태의 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400)을 포함한 용기가 포함될 수 있다. 키트는 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하는 제1 용기 및 제2 스플린트 가닥(400)을 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다.

[0175] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 선형 핵산 라이브러리 분자의 한쪽 말단에서 제1 범용 결합 서열에 혼성화될 수 있는 제1 범용 어댑터 서열을 포함한다(*예*: **도 2**와 **도 3** *참조*). 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 선형 핵산 라이브러리 분자의 다른 말단에서 제2 범용 결합 서열에 혼성화할 수 있는 제2 범용 어댑터 서열을 포함한다(*예*: **도 2**와 **도 3** *참조*). 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 정방향 또는 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 정방향 또는 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제2 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 비인산화된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함하고; 또는, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 말단 3' 차단기이다.

[0176] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함한다(*예*: **도 2**와 **도 3** *참조*). 제1 하위 영역(411)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유

분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제2 하위 영역(412)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제3 하위 영역(413)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)의 삽입 서열(110)에 대한 혼성화가 감소되거나 혼성화되지 않도록 설계된다.

[0177] 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 예시적인 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0178] 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 예시적인 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함].

[0179] 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역에 있는 서열의 예시적인 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(412)는 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0180] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 20 내지 100개(*예를 들어*, 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개) 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 30 내지 80개(*예*: 약 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 또는 80개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 40 내지 60개(*예*: 약 40, 45, 50 또는 60개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 비인산화된다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함하고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' 차단기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 *엔컨대* 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 또는 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0181] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 제4 하위 영역(311), 제5 하위 영역(312) 및 제6 하위 영역(313)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함하는 내부 영역(310)을 포함한다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 혼성화할 수 있다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 혼성화할 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 혼성화할 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제 4, 제5 및 제6 하위 영역은 관심 서열, 표면 포획 프라이머 또는 표면 고정 프라이머에 혼성화하지 않는다(또는 최소한 혼성화를 거의 나타내지 않는다).

[0182] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 하위 영역 중 하나는 인덱스 또는 무작위 서열, 예를 들어 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 예를 들어, 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)은 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서,

고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 키트에서, 인덱스 또는 무작위 서열을 포함하는 제1 스플린트 가닥 하위 영역은 다음 중 하나 또는 두 개 이상의 임의의 조합을 포함한다: 샘플 인덱스 서열("S"로 표시); 무작위 서열분석("N"으로 표시); 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신); 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다.

[0184] 일부 실시형태에서, 키트에서, 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 부분적으로 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하며, 여기서 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 범용 긴 스플린트 가닥은 제2 스플린트 가닥(400)에 부분적으로만 혼성화되는 적어도 하나의 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 운반하는 하위 영역; 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다. 예시적인 범용 긴 스플린트 가닥(300)은 **도 6**에 도시되어 있다.

[0185] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)이 결여되어, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스는 루프 아웃되는 제2 스플린트 가닥의 일부를 갖는다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역(312)이 없으며, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화로 형성된 듀플렉스에서 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역(412)은 루프 아웃된다(*예*: **도 7** *참조*). 일부 실시형태에서, 하위 영역이 없는 제1 스플린트 가닥(300)은 범용 긴 스플린트 가닥(300)의 예이다.

[0186] 일부 실시형태에서, 키트에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길기가 50 내지 150개뉴클레오타이드, 또는 60 내지 100개 뉴클레오타이드, 또는 70 내지 90개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에 또는 내부 위치에 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0187] 위의 **표 1 내지 표 4**에는 키트에 포함될 수 있는 라이브러리 분자(100), 제1 스플린트 가닥(300), 제2 스플린트 가닥(400) 및 고정된 표면 프라이머의 범용 어댑터 서열의 다양한 실시형태가 열거되어 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 키트에서, 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 서열은 **표 2 내지 표 3**에 열거된 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 키트에서, **표 2 내지 표 3**에 열거된 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 임의의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0188] 일부 실시형태에서, 키트는 핵산 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 포함하고, T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 리가제 효소를 더 포함하되, 선택적으로 리가제 효소는 T7 DNA 리가제, T3 리가제, T4 리가제 또는 Taq 리가제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 엑소뉴클레아제 I, 열불안정성 엑소뉴클레아제 I 및/또는 T7 엑소뉴클레아제 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함하는 적어도 하나의 엔도뉴클레아제를 더 포함한다.

[0189] 일부 실시형태에서, 키트는 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 핵산 라이브러리 분자(100)를 혼성화하기 위한 적어도 1종의 완충제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 (i) 제1 및/또는 제2 스플린트 가닥(*예*: (300) 및/또는 (400))의 5' 말단을 인산화하는 것, (ii) 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서 틈을 결찰하는 것 및/또는 (iii) 공유결합 폐환형 분자(600)로부터의 제1 스플린트 가닥(300)의 엑소뉴클레아제 분해 중 임의의 조합을 포함하는, 단일 반응 용기에서 다중 효소 반응을 수행하기 위한 1종의 완충제를 포함한다. 또는, 키트는 둘 이상의 별도의 완충제를 포함하며, *예를 들어*, 제1 완충제는 인산화 반응을 수행하는 데 사용될

수 있고, 제2 완충제는 결찰 반응을 수행하는 데 사용될 수 있고, 제3 완충제는 엑소뉴클레아제 분해 반응을 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0190] 일부 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 또는 본 명세서에 기재된 임의의 제1 및 제2 스플린트 가닥(300) 및 (400)를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 키트는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제, 적어도 1종의 리가제 및/또는 적어도 1종의 엑소뉴클레아제를 포함하는 하나 이상의 용기를 더 포함할 수 있다. 키트는 임의의 조합으로 임의의 이러한 성분을 포함할 수 있고, 단일 용기에 포함될 수 있거나, 별도의 용기에 포함될 수 있거나, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0191] 키트는 *예를 들어* 하나 이상의 새로운 어댑터 서열을 선형 핵산 라이브러리 분자에 도입하는 반응을 수행하기 위한 키트의 사용을 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0192] **복수의 라이브러리-스플린트 복합체를 형성하는 방법**

[0193] 일부 양태에서, 본 개시내용은 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하기 위한 방법을 제공하며, **(a)** 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 제공하는 단계를 포함하며, 복수의 개별 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하되, 이중 가닥 스플린트 어댑터는 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 포함하고, 제1 스플린트 가닥은 제1 영역 (320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함하고, 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된다. 예시적인 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 **도 2**와 **도 3**에 도시되어 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 내부 영역(310)의 일부는 제2 스플린트 가닥(400)의 일부에 혼성화되지 않는다.

[0194] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법은 **(b):** 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터와 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)를 혼성화하는 단계를 더 포함하며, 여기서 개별 라이브러리 분자는 한쪽에는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열(120)에 의해 측접되고 다른 쪽에는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 측접된 관심 서열(110)을 포함한다(*예*: **도 3**). 혼성화하는 단계는 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)을 라이브러리 분자의 일부(120)에 혼성화하는 데 적합한 조건에서 수행될 수 있고, 이 조건은 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)을 라이브러리 분자의 일부(130)에 혼성화함으로써, 복수의 라이브러리 분자를 원형화하여 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하게 한다.

[0195] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하기 위한 방법에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 선형 핵산 라이브러리 분자의 한 말단에서 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다.

[0196] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하기 위한 방법에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 선형 핵산 라이브러리 분자의 다른 말단에서 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다.

[0197] 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 인산화되거나, 포스페이트기를 결여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' OH 기 또는 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0198] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 라이브러리 분자의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화되고, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 라이브러리 분자의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화되어, 라이브러리 분자를 원형화하여 라이브러리-스플린트를 복합체(500)를 생성하게 한다. 라이브러리-스플린트 복합체(500)는 라이브러리 분자의 5' 말단과 제2 스플린트 가닥의 3' 말단 사이에 제1 틈을 포함한다(*예*: **도 3**과 **도 4**). 라이브러리-스플린트 복합체(500)는 또한 제2 스플린트 가닥의 5' 말단과 라이브러리 분자의 3' 말단 사이에 제2 틈을 포함할 수 있다(*예*: **도 3**과 **도 4**). 일부 실시형태에서, 제1 틈 및 제2 틈은 효소적으로 결찰 가능하다. 결찰 반응은 제2 스플린트 가닥(400)의 서열을 라이브러리 분자(100)의 말단까지 결합한다.

[0199] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 이중 가닥 핵산 라이브러리 분자의 센스 또는 안티-센스 가닥에 혼성화할 수 있다. 라이브러리-스플린트 복합체(500)에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 이중 가닥 핵산 라이브러리 분자의 센스 또는 안티-센스 가닥에 혼성화할 수 있다. 이중 가닥 핵산 라이브러리 분자는 단일 가닥 센스 및 안티-센스 라이브러

리 가닥을 생성하도록 변성될 수 있다.

[0200] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않고, 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않는다.

[0201] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않고, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 관심 서열(110)에 혼성화되지 않는다.

[0202] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 5' 말단은 포스페이트기를 결여한다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 라이브러리 분자의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함한다; 또는, 단일 가닥 라이브러리 분자의 3' 말단은 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0203] 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 표면 포획 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 샘플 인덱스 서열에 대한 범용 어댑터 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)에는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열이 결여되어 있다.

[0204] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함한다(*예*: **도 2**와 **도 3 참조**). 제1 하위 영역(411)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함한다. 제2 하위 영역(412)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 제3 하위 영역(413)은 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 고정된 표면 포획 프라이머, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다. 제2 스플린트 가닥(400)은 라이브러리 분자(100)의 삽입 서열(110)에 대한 혼성화가 감소되거나 혼성화되지 않도록 설계된다.

[0205] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함 프라이머].

[0206] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 다음을 포함한다:[(411)은 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(412)는 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함].

[0207] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 3'에서 5' 배향으로 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역의 서열 배열은 다음을 포함한다: [(411)은 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 포함함] - [(412)는 표면 고정 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함] - [(413)은 표면 포획 프라이머 결합에 대한 범용 서열을 포함함].

[0208] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 제2 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열 NNN을 보유하는 추가 하위 영역을 포함한다. 예를 들어, 추가 하위 영역은 하위 영역(411)과 하위 영역(412) 사이, 또는 하위 영역(412)과 하위 영역(413) 사이에 위치할 수 있다.

[0209] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제2 스플린트 가닥(400)은

길이가 20 내지 100개(*예:* 약 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100)인 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 30 내지 80개(*예*: 약 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 또는 80개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 길이가 40 내지 60개(*예*: 약 40, 45, 50 또는 60개)의 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 인산화되고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 5' 말단은 비인산화된다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' OH 기를 포함하고; 또는, 제2 스플린트 가닥(400)의 3' 말단은 말단 3' 차단기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 *예컨대* 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 5' 및/또는 3' 말단에서 또는 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0210] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 길이가 50 내지 150개 뉴클레오타이드, 또는 60 내지 100개 뉴클레오타이드, 또는 70 내지 90개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 5' 및/또는 3' 말단에 또는 내부 위치에 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 5' 말단은 인산화되거나, 포스페이트기를 결여한다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 말단 3' OH 기 또는 말단 3' 차단기를 포함한다.

[0211] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 제4 하위 영역(311), 제5 하위 영역(312) 및 제6 하위 영역(313)을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함하는 내부 영역(310)을 포함한다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 혼성화할 수 있다. 제4 하위 영역(311)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제1 하위 영역(411)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 혼성화할 수 있다. 제5 하위 영역(312)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제2 하위 영역(412)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 혼성화할 수 있다. 제6 하위 영역(313)은 제2 스플린트 가닥(400)의 제3 하위 영역(413)에 완전히 또는 부분적으로 상보적일 수 있다. 제 4, 제5 및 제6 하위 영역은 관심 서열, 표면 포획 프라이머 또는 표면 고정 프라이머에 혼성화하지 않는다(또는 최소한 혼성화를 거의 나타내지 않는다).

[0212] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함하는 하위 영역(312)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 5 내지 20개 염기(*예*: 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 염기)를 포함한다. 이는 다중 분석에서 다양한 샘플 소스로부터 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 3 내지 20개의 염기(*예:* 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 염기)를 포함한다. 이는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있다(*예*: 분자 태깅). 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI)는 무작위 서열을 포함한다.

[0213] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 하위 영역(312)은 다음 중 하나 또는 두 개 이상의 조합을 포함한다: 샘플 인덱스 서열(S로 표시); 무작위 서열분석("N"으로 표시); 무염기성 염기(진한 검정색 직사각형으로 표시)로 전환될 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드(*예*: 유리딘, 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(*예*: 8oxoG) 또는 데옥시이노신); 데옥시이노신("I"로 표시); 및/또는 스페이서. 일부 실시형태에서, 스페이서는 18개 탄소 스페이서(*예*: 헥사에틸렌글리콜 스페이서 포함),다중 C3 스페이서 포스포라미다이트 또는 트리메틸렌글리콜 스페이서를 포함하는 스페이서 9를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스페이서는 폴리에틸렌글리콜 스페이서, *예를 들어* PEG2, PEG3 또는 PEG4 스페이서를 포함한다.

[0214] 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법에서, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역 (311), (312) 또는 (313)이 결여되어, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화에 의해 형성된 듀플렉스가 루프 아웃되는 제2 스플린트 가닥의 일부를 갖게 한다. 예를 들어, 제1 스플린트 가닥(300)에는 하위 영역(312)이 없고, 제1 스플린트 가닥(300)과 제2 스플린트 가닥(400) 사이의 혼성화

에 의해 형성된 듀플렉스에서 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역(412)이 루프 아웃된다(*예*: **도 7** *참조*).

[0215] 위의 **표 1 내지 표 4**는 라이브러리 분자(100), 제1 스플린트 가닥(300) 및 제2 스플린트 가닥(400)을 포함하는 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 다양한 분자의 서열의 다양한 실시형태를 열거한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법 중 임의의 방법에서, 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 서열은 **표 2 내지 표 3**에 열거된 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 임의의 방법에서, **표 2 내지 표 3**에 열거된 제1 스플린트 가닥(300) 및/또는 제2 스플린트 가닥(400)의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절단은 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자에서, **표 1**에 열거된 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)의 서열 및/또는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)의 서열은 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 절단은 길이가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0216] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 임의의 방법은 인산화 반응, 결찰 반응 및/또는 엑소뉴클레아제 반응을 포함하는, 적어도 1종의 효소 반응을 더 포함할 수 있다. 효소 반응은 순차적으로 또는 본질적으로 동시에 수행될 수 있다. 효소 반응은 단일 반응 용기에서 수행될 수 있다. 또는, 제1 효소 반응은 제1 반응 용기에서 수행될 수 있고, 이어서, 제2 효소 반응이 수행되는 제2 반응 용기에 옮기고, 이어서, 제3 효소 반응이 수행되는 제3 반응 용기에 옮긴다.

[0217] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 임의의 방법은 별도의 반응 용기에서 수행되는 별도 및 순차적 인산화 및 결찰 반응을 수행하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법은 단계 **(c1):** 제1 반응 용기에서 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및/또는 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 5' 말단을 인산화하는 데 적합한 조건에서 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)를 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 효소와 접촉시키는 단계; 및 인산화 반응을 제2 반응 용기로 전달하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법은 단계 **(d1):** 제2 반응 용기에서, 제1 틈과 제2 틈을 효소로 결찰하는 데 적합한 조건에서 복수의 인산화된 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 인산화된 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)를 리가제와 접촉시킴으로써, 제1 스플린트 가닥(300)에 각각 혼성화된 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 리가제 효소는 T7 DNA 리가제, T3 리가제, T4 리가제 또는 Taq 리가제를 포함한다. 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하기 위한 예시적인 방법은 **도 4**에 도시되어 있다. 효소적 결찰 반응은 제2 스플린트 가닥(400)부터 라이브러리 분자(100)의 말단까지 서열을 결합할 수 있다. 이중 가닥 어댑터(200)는 프라이머 연장이나 PCR 반응을 수행할 필요 없이 새로운 범용 어댑터 서열과 샘플 인덱스 서열을 라이브러리 분자(100)의 양쪽 말단에 결합할 수 있다. 따라서 이중 가닥 어댑터(200)를 사용하는 PCR 수행 없는 작업흐름은 증폭 및 서열분석과 같은 다운스트림 작업흐름에 필요한 어댑터 서열을 갖는 공유적으로 원형화된 라이브러리 분자(600)를 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0218] **도 4**에 예시된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에서, 제2 스플린트 가닥(400)의 하위 영역은 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120) 및 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 공유적으로 결합된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 프라이머 연장 반응을 개시하는 데 사용될 수 있는 연장 가능한 3' 말단을 갖는다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥(300)은 회전환 증폭 반응을 수행하여 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 상보적인 핵산 콘카타머 분자를 생성하기 위한 증폭 프라이머로 사용될 수 있다.

[0219] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 임의의 방법은 동일한 반응 용기에서 순차적으로 수행되는 순차적 인산화 및 결찰 반응을 수행하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법은 단계 **(c2):** 제1 반응 용기에서 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및/또는 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 5' 말단을 인산화하는 데 적합한 조건에서 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)를 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 효소와 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법은 단계 **(d2):** 동일한 제1 반응 용기에서, 제1 틈과 제2 틈을 효소로 결

찰시키는 데 적합한 조건에서, 인산화된 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 인산화된 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)를 리가제와 접촉시킴으로써, 제1 스플린트 가닥(300)에 각각 혼성화된 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 리가제 효소는 T7 DNA 리가제, T3 리가제, T4 리가제 또는 Taq 리가제를 포함한다. 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하기 위한 예시적인 방법은 **도 4**에 도시되어 있다.

[0220] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 임의의 방법은 동일한 반응 용기에서 함께 수행되는 본질적으로 동시의 인산화 및 결찰 반응을 수행하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 방법은 단계 **(c3)**: 제1 반응 용기에서, 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 5' 말단을 인산화하는 데 적합한 조건에서, 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 및 복수의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)를 **(i)** T4 폴리뉴클레오타이드 키나제 효소 및 **(ii)** 리가제 효소와 접촉시키는 단계를 더 포함하며, 그리고 위 조건은 제1 틈과 제2 틈을 효소로 결찰하여, 제1 스플린트 가닥(300)에 각각 혼성화되는 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하는 데 적합하다. 일부 실시형태에서, 리가제 효소는 T7 DNA 리가제, T3 리가제, T4 리가제 또는 Taq 리가제를 포함한다. 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하기 위한 예시적인 방법은 **도 4**에 도시되어 있다.

[0221] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성하는 임의의 방법은 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)로부터 복수의 제1 스플린트 가닥(300)을 효소적으로 제거하는 선택적 단계를 더 포함하며, 이는 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 적어도 1종의 엑소뉴클레아제 효소와 접촉시켜 복수의 제1 스플린트 가닥(300)을 제거하고 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 유지하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 엑소뉴클레아제 반응은 인산화 및/또는 결찰 반응을 수행하기 위해 사용되는 동일한 반응 완충제에서, 또는 상이한 반응 완충제에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소뉴클레아제 반응은, 제1 반응 용기(c1)에서 인산화 반응을 수행하고, 제2 반응 용기(d1)에서 결찰 반응을 수행한 후에, 제3 반응 용기에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소뉴클레아제 반응은, 제1 반응 용기(c2)에서 인산화 반응을 수행하고, 제1 반응 용기(d2)에서 순차적 결찰 반응을 수행한 후에, 제1 반응 용기에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑소뉴클레아제 반응은 제1 반응 용기(c3)에서 본질적으로 동시에 인산화 및 결찰 반응을 수행한 후에 제1 반응 용기에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 1종의 엑소뉴클레아제 효소는 엑소뉴클레아제 I, 열불안정성 엑소뉴클레아제 I 및/또는 T7 엑소뉴클레아제 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함한다.

[0222] 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열을 보유하는 이중 가닥 스플린트 어댑터를 사용하여 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 준비함으로써 다중 작업흐름이 가능해진다. 샘플 인덱스 서열은 다양한 공급원으로부터 단리된 입력 핵산을 사용하여 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 별도 배치(batch)를 준비하는 데 사용될 수 있다. 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 함께 풀링되어 다중 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600) 혼합물을 생성할 수 있고, 풀링된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 증폭 및/또는 서열분석될 수 있다. 삽입 영역의 서열분석과 샘플 인덱스 서열분석을 함께 사용하면 입력 핵산의 공급원을 식별할 수 있다. 일부 실시형태에서, 임의의 수의 배치의 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 풀링할 수 있는데, 예를 들어 2 내지 10개, 또는 10 내지 50개, 또는 50 내지 100개, 또는 100 내지 200개, 또는 200개가 넘는 배치의 샘플-인덱싱된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 풀링할 수 있다. 예시적인 핵산 공급원은 자연-발생적, 재조합 또는 화학적으로 합성된 공급원을 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 단일 세포, 복수의 세포, 조직, 생물학적 유체, 환경 샘플 또는 전체 유기체를 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 신선한, 냉동된, 신선 냉동된 또는 보관된(archived) 공급원(*예*: 포말린-고정 파라핀-포매; FFPE)을 포함한다. 당업자는 핵산이 다수의 다른 공급원으로부터 단리될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 핵산 라이브러리 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 제조될 수 있다.

[0223] **회전환 증폭 방법**

[0224] 본 개시내용은 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 대해 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법을 제공한다. 회전환 증폭 반응은 인산화 및 결찰 반응 후에, 또는 결찰 반응 후에 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응은 엑소뉴클레아제 반응 후에 제1 스플린트 가닥(300)에 더 이상 혼성화되지 않는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 대해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응은 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 대해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체 상에 분배될 수 있고, 이어서, 회전환 증폭 반응이 가해진다. 일부 실시형

태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 용액 중 회전환 증폭 반응이 가해지고, 이어서, 지지체 상에 분배될 수 있다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응은 유지된 제1 스플린트 가닥(300)을 증폭 프라이머(*예*: **도 4**)로 사용할 수 있거나, 제1 스플린트 가닥(300)은 제거될 수 있고(*예*: 에그소뉴클레아제 분해를 통해) 가용성 증폭 프라이머(*예*: **도 5**)로 교체될 수 있다.

[0225] **지지체 상의 회전환 증폭**

[0226] 일부 실시형태에서, 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 결여하는 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 대해 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법이 제공되며, 복수의 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하며, 단계 **(a):** 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 개별 고정된 표면 포획 프라이머에 혼성화하기에 적합한 조건에서 지지체 상에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머를 갖는 지지체 상에 분배하여, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 지지체에 고정하는 단계를 포함한다.

[0227] 일부 실시형태에서, 복수의 표면 포획 프라이머는 **표 4**에 열거된 서열 중 어느 하나 또는 이의 상보적 서열을 포함한다.

[0228] 개별 표면 포획 프라이머는 표면 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 갖는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 혼성화될 수 있다.

[0229] 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법은 **단계 (b):** 고정된 증폭 프라이머로서 복수의 표면 포획 프라이머 및 주형 분자로서 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 사용하여 지지체 상에서 회전환 증폭 반응을 수행하는 데 적합한 조건에서, 복수의 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써, 표면 포획 프라이머에 고정된 복수의 핵산 콘카타머 분자를 생성하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 고정된 콘카타머는 개별 표면 포획 프라이머에 공유적으로 결합된다. 일부 실시형태에서, 복수의 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 표면 포획 프라이머 및 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하여 회전환 증폭 반응이 표면 포획 프라이머 및 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 의해 보유된 서열의 다중 탠덤 카피(tandem copy)를 갖는 콘카타머 분자를 생성한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 복수의 표면 고정 프라이머를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 콘카타머 분자의 적어도 일부를 지지체에 고정하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 비-연장 가능한 3' 말단을 갖고 증폭을 위해 사용될 수 없다. 일부 실시형태에서, 복수의 표면 고정 프라이머는 **표 4**에 열거된 서열 중 어느 하나 또는 이의 상보적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 콘카타머에 서열분석 반응이 가해질 수 있다.

[0230] 개별 표면 고정 프라이머는 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 갖는 콘카타머 분자의 일부에 혼성화할 수 있다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 콘카타머 분자의 적어도 일부를 지지체에 고정하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 비-연장 가능한 3' 말단을 갖고 증폭을 위해 사용될 수 없다. 일부 실시형태에서, 고정된 콘카타머에 서열분석 반응이 가해질 수 있다.

[0231] 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 하나 이상의 화합물로 코팅된 지지체 상에 분배되어 지지체 상에 부동태화된 층을 생성할 수 있다(*예*: **도 21**). 일부 실시형태에서, 부동태화 층은 다공성 또는 반다공성 층을 형성한다. 일부 실시형태에서, 표면 프라이머, 콘카타머 주형 분자 및/또는 중합효소 중 하나 이상의 유형은 지지체에 고정을 위해 부동태화 층에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 지지체 상에서 개선된 핵산 혼성화 및 증폭 성능을 가능하게 하는 낮은 비-특이적 결합 표면을 포함한다. 일반적으로, 지지체는 공유적 또는 비공유적으로 부착된 낮은-결합, 화학적 변형 층 중 1개 이상의 층, *예를 들어*, 실란층, 중합체 필름 및 지지체에 복수의 핵산 콘카타머 분자를 고정하기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 공유적 또는 비공유적으로 부착된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 지지체 상의 화학기를 통해 지지체의 적어도 일부에 공유 결합된 작용기화된 중합체 코팅층, 작용기화된 중합체 코팅에 접합된 프라이머 및 프라이머 상의 수용성 보호 코팅 및 작용기화된 중합체 코팅을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 작용기화된 중합체 코팅은 폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸)아크릴아마이드-코-아크릴아마이드(PAZAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅층 및 복수의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 층을 갖는 표면 코팅을 포함한다. 친수성 중합체 코팅층은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함할 수 있다. 친수성 중합체 코팅층은 적어도 4개의 분지를 갖는 분지된

PEG를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 낮은 비특이적 결합 코팅은 물 접촉각으로서 측정될 수 있는 친수성 정도를 갖고, 여기서, 물 접촉각은 45° 이하이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 또는 지지체 상의 코팅에 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 밀도는 ㎜^{2}당 약 10^2 내지 10^6(*예*: 약 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 또는 10^6)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 또는 지지체 상의 코팅에 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 밀도는 ㎜^{2}당 약 10^6 내지 10^9(*예*: 약 10^6, 10^7, 10^8 또는 10^9)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 또는 지지체 상의 코팅에 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 밀도는 ㎜^{2}당 약 10^9 내지 10^{12}(*예*: 약 10^9, 10^{10}, 10^{11} 또는 10^{12})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체 상(또는 지지체 상의 코팅 상)의 미리 결정된 부위의 지지체에 고정되거나 지지체 상의 코팅에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체 상(또는 지지체 상의 코팅 상)의 무작위 부위의 지지체에 고정되거나 지지체 상의 코팅에 고정된다.

[0232] **가용성 증폭 프라이머를 사용한 용액 내 회전환 증폭**

[0233] 일부 실시형태에서, 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)이 결여된 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 대해 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 복수의 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 정방향 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 서열 및 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하며, 이 방법은 **(a)** 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자 및 복수의 가용성 정방향 증폭 프라이머를 용액 내에서 혼성화하는 단계; 및 **(b)** 복수의 정방향 증폭 프라이머 및 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 주형 분자로 사용하여 용액 내에서 회전환 증폭 반응을 수행하는 데 적합한 조건에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써, 이들의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 여전히 혼성화된 부분을 갖는 복수의 핵산 콘카타머 분자를 생성하는 것에 의해 제1 회전환 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법은 단계 **(c):** 콘카타머의 적어도 일부를 복수의 고정된 표면 포획 프라이머에 혼성화함으로써 복수의 콘카타머 분자를 고정하는 데 적합한 조건에서, 그 위에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머를 갖는 지지체 상에 복수의 콘카타머 분자를 분배하는 단계를 더 포함한다. 복수의 고정된 콘카타머 분자는 여전히 이들의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법은 단계 **(d):** 주형 분자로서 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 사용하여 지지체 상에서 제2 회전환 증폭 반응을 수행하는 데 적합한 조건에서, 고정된 복수의 콘카타머 분자를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써, 복수의 고정된 핵산 콘카타머 분자를 연장시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개별 고정된 콘카타머는 개별 표면 포획 프라이머에 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 복수의 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 표면 포획 프라이머 및 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하여 회전환 증폭 반응이 표면 포획 프라이머 및 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 의해 보유된 서열의 다중 탠덤 카피를 갖는 콘카타머 분자를 생성한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 복수의 표면 고정 프라이머를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 콘카타머 분자의 적어도 일부를 지지체에 고정하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 비-연장 가능한 3' 말단을 갖고 증폭을 위해 사용될 수 없다. 일부 실시형태에서, 고정된 콘카타머에 서열분석 반응이 가해질 수 있다. 일부 실시형태에서, 가용성 정방향 증폭 프라이머는 표면 포획 프라이머와 동일한 서열을 갖는다.

[0234] 일부 실시형태에서, 복수의 표면 포획 프라이머는 **표 4**에 열거된 서열 중 어느 하나 또는 이의 상보적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 표면 고정 프라이머는 **표 4**에 열거된 서열 중 어느 하나 또는 이의 상보적 서열을 포함한다.

[0235] 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 지지체 상에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머는 서열 5'- GATCAGGTGAGGCTGCGACGACT -3'(서열 번호:34)를 포함한다.

[0236] 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법에서, 지지체 상에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머는 서열 5'- ATTACATG**GATCAGGTGAGGCT -3'**(서열 번호:35)를 포함한다.

[0237] 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 콘카타머 분자의 적어도 일부를 지지체에 고정하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 비-연장 가능한 3' 말단을 갖고 증폭을 위해 사용될 수

없다. 일부 실시형태에서, 고정된 콘카타머에 서열분석 반응이 가해질 수 있다.

[0238] 일부 실시형태에서, 단계 (c)의 복수의 콘카타머 분자는 하나 이상의 화합물로 코팅된 지지체 상에 분배되어 지지체(*예*: 유리) 상에 부동태화된 층을 생성할 수 있다(*예*: **도 21** *참조*). 대안의 실시형태에서, 지지체는 유리, 플라스틱 또는 중합체 물질과 같은 임의의 물질로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 부동태화 층은 다공성 또는 반다공성 층을 형성한다. 일부 실시형태에서, 표면 프라이머, 콘카타머 주형 분자 및/또는 중합효소 중 하나 이상의 유형은 지지체에 고정을 위해 부동태화 층에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 지지체 상에서 개선된 핵산 혼성화 및 증폭 성능을 가능하게 하는 낮은 비-특이적 결합 표면을 포함한다. 일반적으로, 지지체는 공유적 또는 비공유적으로 부착된 낮은-결합, 화학적 변형 층 중 1개 이상의 층, *예를 들어*, 실란층, 중합체 필름 및 지지체에 복수의 핵산 콘카타머 분자를 고정하기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 공유적 또는 비공유적으로 부착된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 지지체 상의 화학기를 통해 지지체의 적어도 일부에 공유 결합된 작용기화된 중합체 코팅층, 작용기화된 중합체 코팅에 접합된 프라이머 및 프라이머 상의 수용성 보호 코팅 및 작용기화된 중합체 코팅을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 작용기화된 중합체 코팅은 폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸)아크릴아마이드-코-아크릴아마이드(PAZAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅층 및 복수의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 층을 갖는 표면 코팅을 포함한다. 친수성 중합체 코팅층은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함할 수 있다. 친수성 중합체 코팅층은 적어도 4개의 분지(*예*: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 분지)를 갖는 분지형 PEG를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 낮은 비특이적 결합 코팅은 물 접촉각으로 측정될 수 있는 친수성 정도를 가지며, 물 접촉각은 45도 이하(*예*: 5도 이하, 10도 이하, 15도 이하, 20도 이하, 25도 이하, 30도 이하, 35도 이하, 40도 이하 또는 45도 이하)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 지지체 상의 코팅에 고정된 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^2 내지 10^6(*예*: 약 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 또는 10^6)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 지지체 상의 코팅에 고정된 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^6 내지 10^9(*예*: 약 10^6, 10^7, 10^8 또는 10^9)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 또는 지지체 상의 코팅에 고정된 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^9 내지 10^{12}(*예*: 약 10^9, 10^{10}, 10^{11} 또는 10^{12})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체에 고정되거나 지지체 상의 미리 결정된 부위(또는 지지체 상의 코팅)에서 지지체 상의 코팅에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 부위(또는 지지체 상의 코팅)에서 지지체 상의 코팅에 고정된다.

[0239] **제1 스플린트 가닥을 사용한 용액 내 회전환 증폭**

[0240] 일부 실시형태에서, 방법은 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자에 대해 회전환 증폭 반응을 수행하기 위한 것이되, 복수의 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하며, 이 방법은 **(a): 증폭 프라이머로 제1 스플린트 가닥(300)을 사용하여 제1 회전환 증폭 반응을 수행함으로써 그들의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 여전히 혼성화된 복수의 콘카타머 분자를 생성하는 데 적합한 조건에서 용액 내에 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다(*예*: 도 4 참조).**

[0241] 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법은 **단계 (b): 콘카타머의 적어도 일부를 복수의 고정된 표면 포획 프라이머에 혼성화함으로써 복수의 콘카타머 분자를 고정하는 데 적합한 조건에서, 복수의 표면 포획 프라이머가 고정된 지지체 상에 그들의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 혼성화된 복수의 콘카타머 분자를 분배하는 단계를 더 포함한다. 복수의 고정된 콘카타머 분자는 여전히 이들의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 혼성화된다.**

[0242] 일부 실시형태에서, 회전환 증폭 반응을 수행하는 방법은 **단계 (c): 주형 분자로서 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 사용하여 지지체 상에서 제2 회전환 증폭 반응을 수행하는 데 적합한 조건 하에, 복수의 고정된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자를 복수의 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써, 복수의 고정된 핵산 콘카타머 분자를 연장시키는 단계를 더 포함한다.**

[0243] 일부 실시형태에서, 제1 및/또는 제2 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개별 고정된 콘카타머는 개별 표면 포획 프라이머에 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 복수의 개별 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 표면 포획 프라이머 및 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하여 회전환 증폭 반응이

표면 포획 프라이머 및 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 의해 보유된 서열의 다중 탠덤 카피를 갖는 콘카타머 분자를 생성한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 복수의 표면 고정 프라이머를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 콘카타머 분자의 적어도 일부를 지지체에 고정하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 비-연장 가능한 3' 말단을 갖고 증폭을 위해 사용될 수 없다. 일부 실시형태에서, 고정된 콘카타머에 서열분석 반응이 가해질 수 있다.

[0244] 일부 실시형태에서, 복수의 표면 포획 프라이머는 **표 4**에 열거된 서열 중 어느 하나 또는 이의 상보적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 표면 고정 프라이머는 **표 4**에 열거된 서열 중 어느 하나 또는 이의 상보적 서열을 포함한다.

[0245] 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 콘카타머 분자의 적어도 일부를 지지체에 고정하는 역할을 한다. 일부 실시형태에서, 고정된 표면 고정 프라이머는 비-연장 가능한 3' 말단을 갖고, 증폭을 위해 사용될 수 없다. 일부 실시형태에서, 고정된 콘카타머에 서열분석 반응이 가해질 수 있다.

[0246] 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 콘카타머 분자는 하나 이상의 화합물로 코팅된 지지체 상에 분배되어 지지체 상에 부동태화된 층을 생성할 수 있다(*예*: **도 21**). 일부 실시형태에서, 부동태화 층은 다공성 또는 반다공성 층을 형성한다. 일부 실시형태에서, 표면 프라이머, 콘카타머 주형 분자 및/또는 중합효소는 지지체에 고정을 위해 부동태화 층에 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 지지체 상에서 개선된 핵산 혼성화 및 증폭 성능을 가능하게 하는 낮은 비-특이적 결합 표면을 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 공유적 또는 비공유적으로 부착된 낮은-결합, 화학적 변형 층 중 1개 이상의 층, *예를 들어*, 실란층, 중합체 필름, 및 지지체에 복수의 핵산 콘카타머 분자를 고정하기 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 공유적 또는 비공유적으로 부착된 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체는 지지체 상의 화학기를 통해 지지체의 적어도 일부에 공유 결합된 작용기화된 중합체 코팅층, 작용기화된 중합체 코팅에 접합된 프라이머 및 프라이머 상의 수용성 보호 코팅 및 작용기화된 중합체 코팅을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 작용기화된 중합체 코팅은 폴리(N-(5-아지도아세트아미딜펜틸)아크릴아마이드-코-아크릴아마이드(PAZAM)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅층 및 복수의 올리고뉴클레오타이드의 적어도 하나의 층을 갖는 표면 코팅을 포함한다. 친수성 중합체 코팅층은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함할 수 있다. 친수성 중합체 코팅층은 적어도 4개의 분지(*예*: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 분지)를 갖는

[0247] 분지된 PEG를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 낮은 비특이적 결합 코팅은 물 접촉각으로 측정될 수 있는 친수성 정도를 가지며, 물 접촉각은 45도 이하(*예*: 5도 이하, 10도 이하, 15도 이하, 20도 이하, 25도 이하, 30도 이하, 35도 이하, 40도 이하 또는 45도 이하)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 지지체 상의 코팅에 고정된 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^2 내지 10^6(*예*: 약 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 또는 10^6)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 지지체 상의 코팅에 고정된 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^6 내지 10^9(*예*: 약 10^6, 10^7, 10^8 또는 10^9)이다. 일부 실시형태에서, 지지체에 고정되거나 또는 지지체 상의 코팅에 고정된 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^9 내지 10^{12}(*예*: 약 10^9, 10^{10}, 10^{11} 또는 10^{12})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체에 고정되거나 지지체 상의 미리 결정된 부위(또는 지지체 상의 코팅)에서 지지체 상의 코팅에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 부위(또는 지지체 상의 코팅)에서 지지체 상의 코팅에 고정된다.

[0248] **압축 올리고뉴클레오타이드**

[0249] 일부 양태에서, 본 개시내용은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재 하에 회전환 증폭을 수행하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 압축 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥이며 5' 영역, 선택적인 내부 영역 및 3' 영역을 포함할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 영역은 콘카타머에 혼성화되어 콘카타머의 원위 부분을 함께 당겨서 콘카타머의 압축을 야기하고 나노구조를 형성할 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한없이, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카타머 분자의 제1 부분(*예*: 제1 범용 어댑터 서열)에 혼성화되도록 설계될 수 있고, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카타머 분자의 제2 부분(*예*: 제2 범용 어댑터 서열)에 혼성화되도록 설계될 수 있다. 회전환 증폭 동안 압축 올리고뉴클레오타이드를 포함하면 압축 올리고뉴클레오타이드가 없을 때 생성된 콘카타머에 비해 더 단단한 크기와 모양을 갖는 나노구조의 형성을 촉진할 수 있다. 핵산 나노구조의 컴팩트하고 안정적인 특성은 예를 들어 신호 강도를 증가시켜 서열분석 정확도를 개선하고 여러 서열분석 주기 동안 모양과 크기를 유지한다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의

3' 말단은 설계된 블록 프라이머 연장이다.

[0250] 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 DNA, RNA 또는 DNA와 RNA의 조합을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드이다. 압축 올리고뉴클레오타이드는 20 내지 150개의 뉴클레오타이드, *예를 들어* 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 또는 150개 뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 길이, 또는 이들 사이의 임의의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 길이가 30 내지 100개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 길이가 40 내지 80개 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0251] 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 5' 영역 및 3' 영역 및 선택적으로 5'와 3' 영역 사이의 개재 영역을 포함한다. 개재 영역은 임의의 길이, 예를 들어 길이가 약 2 내지 20개 뉴클레오타이드, *예를 들어* 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20, 또는 그들 사이의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 개재 영역는 연속적인 동일 염기(*예*: AAA, GGG, CCC, TTT 또는 UUU)를 갖는 동형중합체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개재 영역은 비-동형중합체 서열을 포함한다.

[0252] 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카타머 분자 중 제1 부분에 대해 길이를 따라 완전히 상보적이거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 표면 포획 프라이머 결합 부위, 표면 고정 프라이머 결합 부위, 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위 또는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위를 포함하는 **표 1 내지 표 3**에 열거된 범용 어댑터 서열에 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다.

[0253] 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카타머 분자 중 제2 부분에 대해 길이를 따라 완전히 상보적이거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 표면 포획 프라이머 결합 부위, 표면 고정 프라이머 결합 부위, 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위 또는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위를 포함하는 **표 1 내지 표 3**에 열거된 범용 어댑터 서열에 혼성화할 수 있는 서열을 포함한다.

[0254] 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카타머 분자 중 제1 범용 서열 부분에 혼성화할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카타머 분자 중 제2 범용 서열 부분에 혼성화할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 영역은 콘카타머에 혼성화되어 콘카타머의 원위 부분을 함께 당겨서 콘카타머의 압축을 야기하고 나노구조를 형성할 수 있다.

[0255] 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 동일한 서열을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 상이한 서열을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 5' 영역의 역방향 서열인 서열을 가질 수 있다.

[0256] 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 특정 기능성을 부여하기 위해 5' 또는 3' 말단에 하나 이상의 변형된 염기 또는 연결부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 *예를 들어* 엑소뉴클레아제 저항성을 부여하기 위해 그의 5' 및/또는 3' 말단에 적어도 하나의 포스포로티오에이트 연결부를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 말단 또는 그 근처의 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 엑소뉴클레아제 저항성을 부여하는 2' 플루오로 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단은 중합효소-촉매된 연장을 차단하는 적어도 하나의 2'-O-메틸 RNA 염기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 중합효소-촉매된 연장을 차단하는 그의 3' 말단에 3' 역전된 dT를 포함한다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 중합효소-촉매된 연장을 차단하는 3' 인산화를 포함한다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 내부 영역은 압축 올리고뉴클레오타이드를 콘카타머 분자에 혼성화함으로써 형성된 듀플렉스의 열 안정성을 증가시키는 적어도 하나의 잠금 핵산(LNA)을 포함한다.

[0257] 압축 올리고뉴클레오타이드는 연속 구아닌을 갖는 적어도 1개의 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드는 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 연속 구아닌을 갖는 적어도 1개의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 사분자 구조를 형성할 수 있는 4개의 연속 구아닌을 포함한다. 구아닌 사분자 구조는, *예컨대* 후그스틴(Hoogsteen) 수소 결합을 통해 안정화될 수 있다. 구아닌 사분자 구조는 중심 양이온, *예컨대* 칼륨, 나트륨, 리튬, 루비듐 또는 세슘을 포함하는 중심 양이온에 의해 안정화될 수 있다.

[0258] 회전환 증폭 반응은 적어도 4개의 연속 구아닌을 갖는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행될 수 있다. 얻어진 콘카타머는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 서열의 반복 복제물을 포함한다. 적

어도 1개의 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 사분자를 형성할 수 있고, 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 서열에 혼성화되고, 얻어진 콘카타머는 폴딩되어 분자내 G-사중식 구조를 형성할 수 있다. 콘카타머는 자체 붕괴되어 컴팩트한 나노구조를 형성할 수 있다. 나노구조에서 구아닌 사분자와 G-사중식을 형성하면 나노구조의 안정성이 높아져 pH, 온도 및/또는 시약의 반복적인 흐름에 견딜 수 있는 컴팩트한 크기와 모양을 유지할 수 있다.

[0259] **서열분석 방법**

[0260] 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 임의의 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 기재된 회전환 증폭 반응을 수행하는 임의의 방법은 지지체에 고정된 복수의 콘카타머 분자를 생성하는 데 사용될 수 있고, 고정된 콘카타머는 서열분석 반응이 가하질 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열분석 반응은 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 반응은 검출 가능하게 표지된 다가 분자에 결합하는 것, 및 뉴클레오타이드 유사체를 혼입시키는 것을 포함하는 2단계 서열분석 반응을 사용한다. 용어 콘카타머 분자와 주형 분자는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0261] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 회전환 증폭 반응(*예를 들어*, 지지체 상에서 또는 용액 중에서 수행된 RCA)은 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 존재하는 관심 서열 및 임의의 어댑터 서열의 탠덤 반복 단위를 각각 포함하는 고정된 콘카타머를 생성하기 위해 사용될 수 있다.

[0262] 일부 실시형태에서, 예시적인 탠덤 반복 단위는 **(i)** 표면 포획 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 413); **(ii)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(130)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iii)** 관심 서열(110); **(iv)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(120)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(v)** 표면 고정 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 411); 및 **(vi)** 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)(하위 영역 412)을 포함한다.

[0263] 일부 실시형태에서, 예시적인 탠덤 반복 단위는 **(i)** 표면 포획 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 412); **(ii)** 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)(하위 영역 413); **(iii)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(130)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iv)** 관심 서열(110); **(v)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(120)을 갖는 범용 어댑터 서열; 및 **(vi)** 표면 고정 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 411)을 포함한다.

[0264] 일부 실시형태에서, 예시적인 탠덤 반복 단위는 **(i)** 표면 포획 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 413); **(ii)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(150)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(iii)** 관심 서열(110); **(iv)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(140)을 갖는 범용 어댑터 서열; **(v)** 샘플 인덱스, 짧은 무작위 서열(NNN) 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)(하위 영역 412); 및 **(vi)** 표면 고정 프라이머에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(하위 영역 411)을 포함한다.

[0265] 고정된 콘카타머는 콤팩트한 핵산 나노볼로 자기-붕괴될 수 있다. RCA 반응 동안 1개 이상의 압축 올리고뉴클레오타이드의 포함은 나노볼의 크기 및/또는 형상을 추가로 압축시킬 수 있다. 주어진 콘카타머에서 탠덤 반복 단위 수의 증가는 중합효소-촉매 서열분석 반응에 대한 다중 개시 부위로서 작용하는 다중 서열분석 프라이머(*예를 들어*, 범용 서열을 갖는 서열분석 프라이머)에 혼성화하기 위해 콘카타머를 따라서 부위 수를 증가시킨다. 서열분석 반응이 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 검출 가능하게 표지된 다가 분자(*예를 들어*, 뉴클레오타이드 단위를 가짐)를 사용할 때, 콘카타머를 따라서 병행 서열분석에 참여하는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위에 의해 방출되는 신호는 각 콘카타머에 대해 증가된 신호 강도를 나타낼 수 있다. 주어진 콘카타머의 다중 부분은 동시에 서열분석될 수 있다. 더 나아가, 복수의 결합 복합체는 특정 콘카타머 분자를 따라서 형성할 수 있고, 각 결합 복합체는 다가 분자에 결합된 서열분석 중합효소를 포함하되, 복수의 결합 복합체는 해리 없이 안정하게 유지되어, 신호 강도를 증가시키고 이미징 시간을 감소시키는 증가된 지속 시간을 초래한다.

[0266] **엔지니어링 중합효소를 사용한 서열분석 방법**

[0267] 일부 양태에서, 본 개시내용은 표지된 또는 비표지된 사슬 종결 뉴클레오타이드를 사용하는 임의의 핵산 서열분석 방법을 사용하여 서열분석될 수 있는 콘카타머 주형 분자를 제공하며, 여기서 사슬 종결 뉴클레오타이드는 당 3' 위치에 3'-O-아지도기(또는 3'-O-메틸아지도기) 또는 임의의 다른 유형의 부피가 큰 차단기이다. 일부 실시형태에서, 콘카타머 주형 분자는 표지된 다가 분자 및 비표지된 사슬 종결 뉴클레오타이드를 사용하는 SBA(결합활성에 의한 서열분석) 방법을 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 콘카타머 주형 분자는 표지

된 사슬 종결 뉴클레오타이드를 사용하는 SBS(합성에 의한 서열분석) 방법을 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 콘카타머 주형 분자는 비표지된 사슬 종결 뉴클레오타이드를 사용하는 SBB(결합에 의한 서열분석 방법)을 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 콘카타머 주형 분자는 인산염 사슬 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 서열분석될 수 있다.

[0268] **뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 서열분석 방법**

[0269] 일부 양태에서 본 개시내용은 **단계 (a):** 서열분석 중합효소를 (i) 핵산 콘카타머 분자 및 (ii) 핵산 프라이머에 접촉시키는 단계를 포함하는 서열분석 방법을 제공하며, 접촉시키는 단계는 서열분석 중합효소를 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 콘카타머 분자에 결합하는 데 적합한 조건에서 수행되되, 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 콘카타머 분자는 핵산 듀플렉스를 형성한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소는 재조합 돌연변이체 서열분석 중합효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 프라이머는 3' 연장 가능한 말단을 포함한다.

[0270] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (b):** 핵산 듀플렉스에 결합되는 서열분석 중합효소에 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 결합하는 데 적합하고 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입에 적합한 조건하에 서열분석 중합효소를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소는 마그네슘 및/또는 망간을 포함하는 적어도 하나의 촉매 양이온의 존재하에 복수의 뉴클레오타이드와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 당 2' 또는 3' 위치에서 사슬 종결 모이어티를 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 사슬 종결 모이어티를 결여하는 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0271] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (c):** 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 혼입시키는 데 적합한 조건에서 연장 가능한 프라이머의 3' 말단에 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 혼입하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 중합효소에 뉴클레오타이드 결합을 위한 그리고 뉴클레오타이드 혼입을 위한 적합한 조건은 동일 또는 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드를 혼입시키는 데 적합한 조건은 마그네슘 및/또는 망간을 포함하는 적어도 1종의 촉매 양이온의 포함을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 서열분석 중합효소에 결합하고, 연장 가능한 프라이머의 3' 말단에 혼입한다. 일부 실시형태에서, 단계 (c)에서 프라이머의 3' 말단에 뉴클레오타이드의 혼입은 프라이머 연장 반응을 포함한다.

[0272] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d):** 단계 (c)의 연장 가능한 프라이머의 3' 말단에 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 적어도 1회 혼입시키는 것을 반복하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시형태에서, 형광단은 염기로부터 절단 가능/제거 가능한 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시형태에서, 복수 중 뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지되지 않는다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(*예를 들어*, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기(*예를 들어*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 단계 (c) 및/또는 (d)에서 적어도 1개의 혼입된 뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 단계 (c) 및/또는 (d)에서 적어도 1개의 혼입된 뉴클레오타이드를 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 콘카타머 분자의 서열은 서열분석 중합효소에 결합하는 뉴클레오타이드를 검출하고 식별하여, 콘카타머 분자의 서열을 결정함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 콘카타머 분자의 서열은 프라이머의 3' 말단에 혼입되는 뉴클레오타이드를 검출 및 식별하여, 콘카타머 분자의 서열을 결정함으로써 결정될 수 있다.

[0273] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법에서, 핵산 듀플렉스에 결합된 복수의 서열분석 중합효소는 적어도 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 갖는 복수의 복합체화된 중합효소를 포함하되, (a) 제1 복합체화된 중합효소는 제1 핵산 프라이머에 혼성화된 제1 핵산 주형 서열을 포함하는 제1 핵산 듀플렉스에 결합된 제1 서열분석 중합효소를 포함하고, (b) 제2 복합체화된 중합효소는 제2 핵산 프라이머에 혼성화된 제2 핵산 주형 서열을 포함하는 제2 핵산 듀플렉스에 결합된 제2 서열분석 중합효소를 포함하며, (c) 제1 및 제2 핵산 주형 서열은 동일 또는 상이한 서열을 포함하고, (d) 제1 및 제2 핵산 콘카타머는 클론-증폭되며, (e) 제1 및 제2 프라이머는 연장 가능한 3' 말단 또는 비-연장 가능 3' 말단을 포함하고, (f) 복수의 복합체화된 중합효소는 지지체에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 복합체화된 중합효소의 밀도는 지지체에 고정된 mm^2당 약 10^2 내지 10^{15}(*예*: 10^2 내지 10^{15} 이상, *예를 들어* 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15})의 복합체화된 중합

효소이다.

[0274] **핵산 서열분석을 위한 2단계 방법**

[0275] 일부 양태에서, 본 개시내용은 서열분석 핵산 분자에 대한 2단계 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 제1 단계는 일반적으로 다가 분자를 복합체화된 중합효소에 결합시켜 다가-복합체화된 중합효소를 형성하는 것, 및 다가-복합체화된 중합효소를 검출하는 것을 포함한다.

[0276] 일부 실시형태에서, 제1 단계는 **단계 (a)**: 복수의 제1 서열분석 중합효소를 (i) 복수의 핵산 콘카타머 분자 및 (ii) 복수의 핵산 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함하되, 상기 접촉시키는 단계는 복수의 제1 서열분석 중합효소를 복수의 핵산 콘카타머 분자 및 복수의 핵산 프라이머에 결합시키는 데 적합한 조건하에 수행되어, 핵산 듀플렉스에 결합된 제1 서열분석 중합효소를 각각 포함하는 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 형성하고, 핵산 듀플렉스는 핵산 프라이머에 혼성화된 핵산 콘카타머 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 중합효소는 재조합 돌연변이체 서열분석 중합효소를 포함한다.

[0277] 일부 실시형태에서, 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법에서, 프라이머는 3' 연장 가능한 말단 또는 3' 비-연장 가능한 말단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 콘카타머 분자는 증폭된 주형 분자(*예를 들어,* 클론 증폭된 주형 분자)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 콘카타머 분자는 관심 표적 서열의 1개의 복제물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 분자는 관심 표적 서열(*예를 들어*, 콘카타머)의 둘 이상의 탠덤 카피를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 콘카타머 분자의 핵산 콘카타머 분자는 관심의 동일한 표적 서열 또는 관심의 상이한 표적 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 콘카타머 분자 및/또는 복수의 핵산 프라이머는 용액 중이거나, 지지체에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 콘카타머 분자 및/또는 복수의 핵산 프라이머가 지지체에 고정될 때, 제1 서열분석 중합효소와의 결합은 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소를 생성한다. 일부 실시형태에서, 복수의 핵산 콘카타머 분자 및/또는 핵산 프라이머는 지지체 상에서 10^2 내지 10^{15}개의 상이한 부위에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자 및 핵산 프라이머와 복수의 제1 서열분석 중합효소의 결합은 지지체 상의 10^2 내지 10^{15}개의 서로 다른 부위(*예*: 10^2 내지 10^{15}개 부위 이상, *예컨대*, 10^2 부위, 10^3개 부위, 10^4개 부위, 10^5개 부위, 10^6개 부위, 10^7개 부위, 10^8개 부위, 10^9개 부위, 10^{10}개 부위, 10^{11}개 부위, 10^{12}개 부위, 10^{13}개 부위, 10^{14}개 부위, 10^{15}개 부위)에 고정된 복수의 제1 복합체화된 중합효소가 생성된다. 일부 실시형태에서, 지지체 상에서 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소는 지지체 상에서 사전 결정된 또는 무작위 부위에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 제1 복합체화된 중합효소는 지지체 상에 시약(*예를 들어*, 서열분석 중합효소, 다가 분자, 뉴클레오타이드 및/또는 2가 양이온을 포함하는 효소) 용액이 흐르도록 서로 유체 연통하고, 따라서, 지지체 상에서 복수의 고정된 복합체화된 중합효소는 대규모 병렬 방식으로 시약 용액과 반응된다.

[0278] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (b)**: 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 복수의 다가 분자와 접촉시켜 복수의 다가-복합체화된 중합효소(*예를 들어*, 결합 복합체)를 형성하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 다가 분자에서 개개 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 각각의 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드(*예를 들어*, 뉴클레오타이드 단위)에 부착된다(*예*: **도 22 내지 도 25**). 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 접촉은 복수의 제1 복합체화된 중합효소 중 적어도 둘에 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드를 결합시켜 복수의 다가-복합체화된 중합효소를 형성하는 데 적합한 조건에서 수행된다. 일부 실시형태에서, 조건은 복수의 다가-복합체화된 중합효소의 프라이머에 상보적 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 저해하는 데 적합하다. 일부 실시형태에서, 복수의 다가 분자는 각각 뉴클레오타이드 유사체(*예*: 뉴클레오타이드 유사체 단위)로 부착된 다중뉴클레오타이드 아암(*예*: **도 22 내지 도 25**)을 갖는 적어도 하나의 다가 분자를 포함하며, 여기서 뉴클레오타이드 유사체는 당 2' 및/또는 3' 위치에 사슬 종결 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 다가 분자는 사슬 종결 모이어티를 결여하는 뉴클레오타이드 단위와 각각 부착된 다중 뉴클레오타이드 아암을 포함하는 적어도 1개의 다가 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 다가 분자에서 다가 분자 중 적어도 1개는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다. 코어, 뉴클레오타이드 아암 또는 핵염기를 포함하는 다가 분자의 임의의 부분은 표지될 수 있다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, (b)의 접촉시키는 단계는 스트론튬, 바륨 및/또는 칼슘을 포함하는 적어도 하나의 비촉매 양이온의 존재하에 수행된다.

[0279] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (c)**: 복수의 다가-복합체화된 중합효소를 검출하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출하는 단계는 복합체화된 중합효소에 결합된 다가 분자를 검출하는 것을 포함

하며, 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 단위는 프라이머에 결합되지만, 상보적 뉴클레오타이드 단위의 혼입은 저해된다. 일부 실시형태에서, 다가 분자는 검출을 가능하게 하도록 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다. 일부 실시형태에서, 표지된 다가 분자는 다가 분자의 코어, 링커 및/또는 뉴클레오타이드 단위에 부착된 형광단을 포함한다.

[0280] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d):**복수의 제1 복합체화된 중합효소에 결합된 상보적 뉴클레오타이드 단위의 염기를 식별하여, 콘카타머 분자의 서열을 결정하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 다가 분자는 복수의 제1 복합체화된 중합효소에 결합된 상보적 뉴클레오타이드 단위(*예를 들어*, 뉴클레오타이드 염기 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 또는 우라실)의 식별을 가능하게 하도록 뉴클레오타이드 아암에 부착된 특정 뉴클레오타이드 단위에 상응하는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다.

[0281] 일부 실시형태에서, 2단계 서열분석 방법의 제2 단계는 일반적으로 뉴클레오타이드 혼입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (e):** 복수의 다가-복합체화된 중합효소를 해리시키고 복수의 제1 서열분석 중합효소 및 이들의 결합된 다가 분자를 제거하고, 복수의 핵산 듀플렉스를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0282] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 서열분석을 위한 방법은 **단계 (f):** 단계 (e)의 복수의 유지된 핵산 듀플렉스를 복수의 제2 서열분석 중합효소와 접촉시키는 단계로서, 접촉시키는 단계는 복수의 제2 서열분석 중합효소를 복수의 유지된 핵산 듀플렉스에 결합시켜, 유지된 핵산 듀플렉스에 결합된 제2 서열분석 중합효소를 각각 포함하는 복수의 제2 복합체화된 중합효소를 형성하는 데 적합한 조건하에 수행되는, 상기 접촉시키는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 서열분석 중합효소는 재조합 돌연변이체 서열분석 중합효소를 포함한다.

[0283] 일부 실시형태에서, 단계 (a)의 복수의 제1 서열분석 중합효소는 단계 (f)의 복수의 제2 서열분석 중합효소의 아미노산 서열과 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, 단계 (a)의 복수의 제1 서열분석 중합효소는 단계 (f)의 복수의 제2 서열분석 중합효소의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0284] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (g)**: 복수의 제2 복합체화된 중합효소를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 더 포함하되, 접촉시키는 단계는 복수의 뉴클레오타이드로부터의 상보적 뉴클레오타이드를 제2 복합체화된 중합효소 중 적어도 2개에 결합시켜 복수의 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소를 형성하는 데 적합하는 조건하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 단계 (g)의 접촉은 결합된 상보적 뉴클레오타이드가 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 프라이머에 중합효소-촉매된 혼입을 촉진시켜 복수의 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소를 형성하기에 적합한 조건하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 단계 (g)에서 프라이머의 3' 말단에 뉴클레오타이드의 혼입은 프라이머 연장 반응을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (g)의 접촉시키는 단계는 마그네슘 및/또는 망간을 포함하는 적어도 하나의 촉매 양이온의 존재하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 단계 (g)의 접촉은 마그네슘 및/또는 망간의 존재하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 천연 뉴클레오타이드(*예를 들어*, 비유사체 뉴클레오타이드) 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 제거 가능한 또는 제거 가능하지 않은 2' 및/또는 3' 사슬 종결 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시형태에서, 형광단은 염기로부터 절단 가능/제거 가능한 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착되거나, 염기로부터 제거되지 않는다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(*예를 들어*, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기(*예를 들어*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수 중 뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지되지 않는다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지되지 않는다.

[0285] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (h)**를 더 포함한다: 뉴클레오타이드가 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지될 때, 단계 (h)는 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 프라이머에 혼입된 상보적인 뉴클레오타이드를 검출하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출을 가능하게 하도록 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다. 일부 실시형태에서, 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법에서, 뉴클레오타이드가 표지되지 않은 경우 검출 단계가 생략된다.

[0286] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (i)**를 더 포함한다: 뉴클레오타이드가 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지될 때, 단계 (i)는 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 프라이머에 혼입된 상보적인 뉴클레오타이드의 염기를 식별하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (i)에서 혼입된 상보적 뉴클레오타이드의 식별은 단계 (d)에서 복수의 제1 복합체화된 중합효소에 결합된 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드의 동일성을 식별하

기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (i)를 식별하는 단계는 핵산 콘카타머 분자의 서열을 결정하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법에서 뉴클레오타이드가 표지되지 않은 경우 식별 단계가 생략된다.

[0287] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (j)**: 단계 (g)가 2' 및/또는 3' 사슬 종결 모이어티를 갖는 적어도 1개의 뉴클레오타이드를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드와 복수의 제2 복합체화된 중합효소를 접촉시킴으로써 수행될 때 혼입된 뉴클레오타이드로부터 사슬 종결 모이어티를 제거하는 단계를 더 포함한다.

[0288] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (k):** 단계 (a) 내지 (j)를 적어도 1회 반복하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 콘카타머 분자의 서열은 서열분석 중합효소에 결합하지만 단계 (c) 및 (d)의 프라이머의 3' 말단에 혼입되지 않는 다가 분자를 검출하고 식별하는 것에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 핵산 콘카타머 분자의 서열은 단계 (h) 및 (i)에서 프라이머의 3' 말단에 혼입되는 뉴클레오타이드를 검출하고 식별함으로써 결정(또는 확인)될 수 있다.

[0289] 일부 실시형태에서, 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 제1 복합체화된 중합효소와 복수의 다가 분자의 결합은 적어도 하나의 결합활성 복합체를 형성하며, 이 방법은 **(a)** 제1 핵산 프라이머, 제1 서열분석 중합효소 및 제1 다가 분자를 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하는 단계(여기서 제1 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 제1 서열분석 중합효소에 결합한다); 및 **(b)** 제2 핵산 프라이머, 제2 서열분석 중합효소 및 제1 다가 분자를 동일한 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하는 단계(여기서 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 제2 서열분석 중합효소에 결합하고, 동일한 다가 분자를 포함하는 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성한다)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 서열분석 중합효소는 임의의 야생형 또는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 중합효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 서열분석 중합효소는 임의의 야생형 또는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 중합효소를 포함한다. 콘카타머 주형 분자는 관심 서열 및 적어도 1개의 범용 서열분석 프라이머 결합 부위의 탠덤 반복 서열을 포함한다. 제1 및 제2 핵산 프라이머는 콘카타머 주형 분자를 따라서 서열분석 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 예시적인 다가 분자는 **도 22 내지 도 25**에 나타낸다.

[0290] 일부 실시형태에서, 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 이 방법은 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 복수의 다가 분자와 결합하여 적어도 하나의 결합활성 복합체를 형성하는 것을 포함하며, 이 방법은 **(a)** 복수의 서열분석 중합효소와 복수의 핵산 프라이머를 콘카타머 핵산 콘카타머 분자의 다른 부분과 접촉시켜 동일한 콘카타머 주형 분자 상에 적어도 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계; **(b)** 복수의 다가 분자를 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합하기에 적합한 조건에서 동일한 콘카타머 주형 분자 상의 적어도 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 복수의 다가 분자를 접촉하는 단계(여기서 적어도 단일 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 혼성화된 제1 프라이머를 포함하는 제1 복합체화된 중합효소에 결합되어 제1 결합 복합체(*예*: 제1 삼원 복합체)를 형성하고, 적어도 단일 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 혼성화된 제2 프라이머를 포함하는 제2 복합체화된 중합효소에 결합되어 제2 결합 복합체(*예*: 제2 삼원 복합체)를 형성하고, 위 접촉은 제1 및 제2 결합 복합체에 결합된 제1 및 제2 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 억제하기에 적합한 조건에서 수행되고, 동일한 다가 분자에 결합된 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성한다); 및 **(c)** 동일한 콘카타머 주형 분자에서 제1 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계 및 **(d)** 제1 결합 복합체의 제1 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 결정하고, 제2 결합 복합체의 제2 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 서열분석 중합효소는 임의의 야생형 또는 본 명세서에 기재된 돌연변이체 서열분석 중합효소를 포함한다. 콘카타머 주형 분자는 관심 서열 및 적어도 1개의 범용 서열분석 프라이머 결합 부위의 탠덤 반복 서열을 포함한다. 복수의 핵산 프라이머는 콘카타머 주형 분자를 따라서 서열분석 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 예시적인 다가 분자는 **도 22 내지 도 25**에 나타낸다.

[0291] **결합에 의한 서열분석**

[0292] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 임의의 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법을 제공하되, 서열분석 방법은 비표지된 사슬-종결 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 서열분석(SBB) 절차를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합에 의한 서열분석(SBB) 방법은 **(a)** 삼원 복합체 안정화 조건에서 프라이밍된 주형 핵산을 적어도 2개의 별도 혼합물과 순차적으로 접촉시키는 단계(여기서 적어도 2개의 별도 혼합물은 각각 중합효소와 뉴클레오타이드를 포함하며, 이에 의해 순차적으로 접촉시키는 결과 프라이밍된 주형 핵산이 삼중 복합

체 안정화 조건에서 주형의 제1, 제2 및 제3 염기 유형에 대한 뉴클레오타이드 동족체와 접촉된다); **(b)** 삼원 복합체가 형성되었는지를 결정하기 위해 적어도 2개의 별도 혼합물을 조사하는 단계; 및 **(c)** 프라이밍된 주형 핵산 분자에 대한 다음 정확한 뉴클레오타이드를 식별하는 단계(여기서 다음 정확한 뉴클레오타이드는 단계 (b)에서 삼원 복합체가 검출되는 경우 제1, 제2 또는 제3 염기 유형의 동족체로 식별되고, 다음 정확한 뉴클레오타이드는 단계 (b)에서 삼원 복합체의 부재에 기초하여 제4 염기 유형의 뉴클레오타이드 동족체인 것으로 추정된다); **(d)** (b) 단계 후에 프라이밍된 주형 핵산의 프라이머에 다음 정확한 뉴클레오타이드를 추가하여 확장된 프라이머를 생성하는 단계; 및 **(e)** 연장된 프라이머를 포함하는 프라이밍된 주형 핵산에 대해 단계 (a)부터 (d)를 적어도 한 번 반복하는 단계를 포함한다. 예시적인 결합에 의한 서열분석 방법은 미국 특허 출원 제 10,246,744호 및 제10,731,141호에 기재되어 있다(특허 둘 다의 내용은 이들의 전문이 본원에 인용방식에 의해 원용됨).

[0293] **포스페이트-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 서열분석 방법**

[0294] 본 개시내용은 비고정 주형 분자에 결합하는 비고정 서열분석 중합효소를 사용하여 서열분석하는 방법을 제공하되, 서열분석 반응은 포스페이트-사슬 표지된 뉴클레오타이드에 의해 수행된다. 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 고정되지 않은 주형 분자로 역할을 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (a)**: 복수의 서열분석 중합효소가 고정된 지지체를 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소는 진행성 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소는 야생형 또는, 예를 들어 제한없이, Phi29 DNA 중합효소를 포함하는, 돌연변이체 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 복수의 별개의 구획을 포함하고, 서열분석 중합효소는 구획 바닥에 고정된다. 일부 실시형태에서, 별개의 구획은 광이 투과할 수 있는 실리카 바닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 별개의 구획은 필름(*예를 들어*, 알루미늄 클래딩 필름)에 홀(hole)을 포함하는 나노광자 가둠 구조(nanophotonic confinement structure)로 구성된 실리카 바닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 금속 클래딩의 홀은 작은 조리개, 예를 들어, 대략 70 nm를 갖는다. 일부 실시형태에서, 나노광자 가둠 구조의 높이는 대략 100 nm이다. 일부 실시형태에서, 나노광자 가둠 구조는 제로 모드 도파관(ZMW)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 나노광자 가둠 구조는 액체를 함유한다.

[0295] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (b)**: 개별 고정된 서열분석 중합효소가 단일 가닥 환형 주형 분자에 결합하기에 적합하고, 개별 서열분석 프라이머가 개별 단일 가닥 환형 주형 분자에 혼성화하기에 적합한 조건에서 복수의 고정된 서열분석 중합효소를 복수의 단일 가닥 환형 핵산 주형 분자(*예:* 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)) 및 복수의 올리고뉴클레오타이드 서열분석 프라이머와 접촉시켜, 복수의 중합효소/주형/프라이머 복합체를 생성하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 개개 서열분석 프라이머는 단일 가닥 원형 주형 분자 상의 범용 서열분석 프라이머 결합 부위에 혼성화한다.

[0296] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (c)**: 복수의 중합효소/주형/프라이머 복합체를 방향족 염기, 오탄당(*예*: 리보스 또는 데옥시리보스) 및 3 내지 20개의 포스페이트기(*예:* 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 포스페이트기)를 포함하는 포스페이트 사슬을 각각 포함하는 복수의 포스페이트 사슬 표지 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 더 포함하며, 말단 포스페이트기는 검출 가능한 리포터 모이어티(*예*: 형광단)에 연결된다. 제1, 제2 및 제3 포스페이트기는 알파, 베타 및 감마 포스페이트기로도 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 말단의 포스페이트기에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드 염기(*예를 들어*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 핵-염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 중합효소/주형/프라이머 복합체는 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입에 적합한 조건하에 복수의 포스페이트 사슬 표지된 뉴클레오타이드와 접촉된다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소는 상보적 포스페이트 사슬 표지된 뉴클레오타이드에 결합하고 주형 분자에서 뉴클레오타이드에 마주보는 상보적 뉴클레오타이드을 혼입할 수 있다. 일부 실시형태에서, 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입 반응은 알파와 베타 포스페이트기 사이를 절단하여, 형광단에 연결된 다중-포스페이트 사슬을 방출한다.

[0297] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (d)**: 서열분석 중합효소에 의해 결합되고, 서열분석 프라이머의 말단(terminal end)에 혼입된 포스페이트기 사슬 표지된 뉴클레오타이드에 의해 방출된 형광 신호를 검출하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (d)는 서열분석 중합효소에 의해 결합되고, 서열분석 프라이머의 말단 말단에 혼입된 포스페이트기 사슬 표지된 뉴클레오타이드를 식별하는 것을 더 포함한다.

[0298] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (d)**: 단계 (c) 내지 (d)를 적어도 1회 반복하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 포스페이트기 사슬 표지된 뉴클레오타이드를 사용하는 서열분석 방법은 미국 특

허 제7,170,050호; 제7,302,146호; 및/또는 제7,405,281호에 기재된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0299] **다중화를 위한 기존 풀링 작업흐름**

[0300] 일 실시형태에서, 복수의 샘플 공급원으로부터 단리된 관심 서열의 다중 혼합물을 제조하는 방법은 다음을 포함한다: **(a)** 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 2개 이상의 집단을 제공하는 단계, 각 라이브러리 분자(100) 집단은 별도의 구획에 포함되고, 여기서 주어진 집단의 핵산 라이브러리 분자는 **(i)** 관심 서열(110); **(ii)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 결합 서열(120)을 갖는 범용 어댑터 서열; 및 **(iii)** 역방향 서열분석 프라이머(130)에 대한 결합 서열을 갖는 범용 어댑터 서열(*예*: **도 1**)을 포함한다.

[0301] 일부 실시형태에서, 복수의 샘플 공급원으로부터 단리된 관심 서열의 다중 혼합물을 제조하는 방법은 단계 **(b)**: 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 제공하는 단계를 더 포함하며, 여기서 개별 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함한다(*예*: **도 2**). 일부 실시형태에서, 제2 스플린트 가닥(400)은 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열 및 선택적으로 짧은 무작위 서열 NNN을 포함한다.

[0302] 일부 실시형태에서, 복수의 샘플 공급원로부터 단리된 관심 서열의 다중 혼합물을 제조하는 방법은 단계 **(c)**: 별도의 구획에서 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 집단을 복수의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)의 할당과 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 접촉은 제1 스플린트 가닥(300)의 일부를 라이브러리 분자(100)의 일부에 혼성화시킴으로써 라이브러리 분자를 원형화하여 라이브러리-스플린트 복합체(500)의 집단을 생성하는 데 적합한 조건에서 수행되어, 개별 제1 스플린트 가닥의 영역(320)은 개별 라이브러리 분자(100)의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화되고, 개별 제1 스플린트 가닥의 영역(330)은 개별 라이브러리 분자(100)의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 혼성화되고, 라이브러리-스플린트 복합체(500) 각각은 라이브러리 분자의 5' 단부와 제2 스플린트 가닥의 3' 말단(300) 사이에 제1 틈을 포함하고, 라이브러리-스플린트 복합체(500) 각각은 제2 스플린트 가닥(300)의 5' 말단과 라이브러리 분자(100)의 3' 말단 사이에 제2 틈을 포함하고, 제1 틈과 제2 틈은 효소로 결찰 가능하다(*예*: **도 3**과 **도 4** *참조*).

[0303] 일부 실시형태에서, 복수의 샘플 공급원로부터 단리된 관심 서열의 다중 혼합물을 제조하는 방법은 단계 **(d)**: 제1 틈과 제2 틈을 효소로 결찰시키는 데 적합한 조건하에, 별도의 구획에서 라이브러리-스플린트 복합체(500)의 집단을 리가제와 접촉시킴으로써, 제1 스플린트 가닥(300)에 각각 혼성화된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 집단을 생성하는 단계를 더 포함한다(*예*: **도 4** *참조*).

[0304] 일부 실시형태에서, 복수의 샘플 공급원로부터 단리된 관심 서열의 다중 혼합물을 제조하는 방법은 단계 **(e)**: 별도의 구획에서 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 집단을 함께 풀링하여 복수의 샘플 공급원으로부터 단리된 관심 서열의 다중 혼합물을 포함하는 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 다중 혼합물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0305] 일부 실시형태에서, 관심 서열은 둘 이상의 상이한 샘플 공급원(*예를 들어*, 2 내지 10, 10 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 250, 이들 사이의 임의의 범위, 또는 250개가 넘는 상이한 샘플 공급원)으로부터 단리될 수 있다. 예시적인 핵산 공급원은 자연-발생적, 재조합 또는 화학적으로 합성된 공급원을 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 단일 세포, 복수의 세포, 조직, 생물학적 유체, 환경 샘플 또는 전체 유기체를 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 신선한, 냉동된, 신선 냉동된 또는 보관된(archived) 공급원(*예*: 포말린-고정 파라핀-포매; FFPE)을 포함한다. 당업자는 핵산이 다수의 다른 공급원으로부터 단리될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 주어진 집단에서 관심 서열은 동일 또는 상이한 서열을 갖는다.

[0306] 일부 실시형태에서, 단계 (a)의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 집단 수는 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)의 2 내지 10, 10 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 250, 이들 사이의 임의의 범위, 또는 250개가 넘는 상이한 집단일 수 있다. 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 다수의 상이한 집단은 단계 (e)에서 함께 풀링될 수 있다. 예를 들어, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 2 내지 10, 10 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 200, 이들 사이의 임의의 범위, 또는 200개가 넘는 상이한 집단은 함께 풀링될 수 있다.

[0307] 당업자는 다수의 별도의 구획이 단계 (a)에서 사용될 수 있다(*예를 들어*, 2 내지 10, 10 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 250, 이들 사이의 임의의 범위, 또는 더 많은 별도의 구획)(*예를 들어*, 다중-웰 플레이트, 예컨대 96-웰 플레이트)는 것을 인식할 것이다.

[0308] 일부 실시형태에서, 단계 (d) 또는 (e)의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)의 3' 말단은 프라이머 연장 반응(*예를 들어*, 회전환 증폭 반응)에 대한 개시 지점으로서 작용할 수 있는 연장 가능한 3' OH 말단을 포함한다.

[0309] 일부 실시형태에서, 단계 (d) 또는 (e)에서 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 집단은 선택적으로 적어도 1종의 엑소뉴클레아제 효소와 반응되어 복수의 제1 스플린트 가닥(300)을 제거하고 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 유지할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 1종의 엑소뉴클레아제 효소는 엑소뉴클레아제 I, 열불안정성 엑소뉴클레아제 I 및/또는 T7 엑소뉴클레아제를 포함한다.

[0310] 일부 실시형태에서, 단계 (a)의 단일 가닥 핵산 라이브러리 분자(100)는 정방향 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 서열; 역방향 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 서열; 및/또는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 서열 중 2개 이상을 포함한다.

[0311] **개선된 염기 호출을 위한 샘플 인덱스**

[0312] 일반적으로, 지지체(*예*: 코팅된 플로우 셀) 상에 분배될 수 있는 핵산 라이브러리를 제조하는 것이 바람직하며, 라이브러리 분자는 대규모 병렬 서열분석을 지원하기 위해 고밀도로 고정된 주형 분자로 전환된다. 지지체 상의 무작위 위치에서 고밀도로 고정된 주형 분자에 대해서, 서열분석 실행 동안 정확한 염기 호출을 위해 고밀도 형광 영상을 해상하는 것(resolving)은 문제가 된다.

[0313] 고정된 주형 분자 집단의 뉴클레오타이드 다양성은 각 서열분석 주기에 존재하는 뉴클레오타이드 A, G, C 및 T의 상대 비율을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 최적의 높은 다양성 주형 분자는 서열분석 실행의 각 주기에 나타난 모두 4개의 뉴클레오타이드를 거의 동일한 비율로 갖는 관심 서열(삽입) 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 낮은 다양성 주형 분자는 높은 비율의 특정 뉴클레오타이드 및 낮은 비율의 다른 뉴클레오타이드를 갖는 관심 서열(삽입) 영역을 포함한다. 낮은 다양성 주형 분자의 문제를 극복하기 위해, PhiX 박테리오파지로부터 제조된 소량의 높은 다양성 분자를 관심 주형 분자(*예*: PhiX 스파이크-인 라이브러리)와 혼합하여, *예컨대* 동일한 플로우 셀에서 함께 시퀀싱할 수 있다. PhiX 스파이크-인 라이브러리가 뉴클레오타이드 다양성을 제공하며, 이는 또한 플로우 셀 상의 공간을 차지하여 관심 서열을 보유하는 주형 분자를 대체하고 주형 분자로부터 얻을 수 있는 서열분석 데이터의 양을 감소시킨다(*예를 들어*, 서열분석 처리량을 감소시킨다).

[0314] 낮은 다양성 주형 분자의 문제를 극복하는 또 다른 방법은 색상 균형을 맞추도록 설계된 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열을를 갖는 주형 분자를 준비하는 것이다. 그러나 매우 다수의 샘플 인덱스 세트, 예를 들어, 16-플렉스, 24-플렉스, 96-플렉스 또는 더 큰 플렉스 수준에 대한 단일 지표 샘플 서열 또는 짝지어진 지표 샘플 서열의 세트를 설계하는 것이 바람직할 수 있다. 모든 샘플 인덱스 서열의 색의 균형있는 큰 샘플 인덱스 세트에 대한 단일 지표 샘플 서열 또는 짝지어진 샘플 인덱스로서, 샘플 인덱스 서열을 설계하는 것은 어려울 수 있다(*예*: **도 19**와 **도 20** *참조*).

[0315] 본 명세서에 설명된 바와 같이, 낮은 다양성 주형 분자(*예*: 지지체 상에서 높은 밀도로)를 서열분석하는 과제를 극복하기 위한 대체 방법은 샘플 인덱스 서열 중 적어도 하나가 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)로 구성된 주형 분자를 제조하는 것이며, 여기서 짧은 무작위 서열(NNN)은 뉴클레오타이드 다양성과 색상 균형을 제공한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열은 샘플 인덱스 서열에 직접 연결된 짧은 무작위 서열(NNN)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN)은 샘플 인덱스 서열의 업스트림 또는 다운스트림이다. 일부 예시적인 샘플 인덱스 서열에는 다음이 포함되지만 이에 국한되지 않는다: NNNGTAGGAGCC; NNNCCGCTGCTA; NNNAACAACAAG; NNNGGTGGTCTA; NNNTTGGCCAAC; NNNCAGGAGTGC; 및 NNNATCACACTA(*예*: **표 3 참조**).

[0316] 당업자라면 범용 샘플 인덱스가 임의의 길이일 수 있고, 다중 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻어진 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있는 임의의 서열을 갖는다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어 제한 없이 NNNGTAGGAGCC와 같은 주어진 샘플 인덱스의 집단에서, 이 집단은 동일한 범용 샘플 인덱스 서열(*예를 들어*, GTAGGAGCC) 및 상이한 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 각각 보유하는 개별 샘플 인덱스 분자의 혼합물을 포함하며, 최대 64개의 상이한 짧은 무작위 서열이 주어진 샘플 인덱스의 집단에 존재할 수 있다.

[0317] 샘플-인덱싱된 주형 분자의 집단에서, 샘플 인덱스의 짧은 무작위 서열(NNN)은 서열분석 실행의 각 주기에서 표시될 모두 4개의 뉴클레오타이드(*예를 들어*, A, G, C, T 및/또는 U)의 거의 동일한 집단을 포함하는 높은 뉴클레오타이드 다양성을 제공한다(**도 19**와 **도 20** *참조*). 짧은 무작위 서열의 높은 뉴클레오타이드 다양성은 또한 서열분석 실행의 각 주기 동안에 색상 균형을 제공할 수 있다. 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 포함하는

샘플 인덱스를 설계하는 것의 이점은 주형 분자의 낮은-플렉스 집단(*예를 들어*, 2-플렉스 또는 4-플렉스)에서, 2 또는 4개의 상이한 샘플을 식별하는 범용 샘플 인덱스 서열이 뉴클레오타이드 다양성을 나타낼 필요가 없다는 것이다(*예*: **도 19**와 **도 20** *참조*). 추가로, 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)의 뉴클레오타이드 다양성은 PhiX 스파이크-인 라이브러리를 포함하기 위한 필요를 제거하거나, 플로우 셀 상에 분배되고 시퀀싱될 PhiX 스파이크-인 라이브러리의 감소된 양의 사용을 허용한다.

[0318] 주형 분자는 짧은 무작위 서열(NNN)을 포함하는 제1 샘플 인덱스 서열 및 짧은 무작위 서열이 없는 제2 샘플 인덱스 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN)이 있는 샘플 인덱스 서열만의 서열분석 데이터가 폴로니 매핑 및 주형 등록에 사용되는데, 그 이유는 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)가 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공하기 때문이다. 두 가지 유형의 샘플 인덱스 모두 다중 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻은 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있다.

[0319] 관심 서열 영역 및 샘플 인덱스 영역(들)의 서열분석 순서는 또한 낮은 다양성 주형 분자를 서열분석하는 것의 어려움을 개선시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한없이, 샘플 인덱스 영역은 관심 서열 영역을 서열분석하기 전에 처음에 서열분석될 수 있고, 샘플 인덱스 서열은 관심 서열 영역과 관련될 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한없이, 샘플 인덱스 영역은 처음에 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 서열분석하고, 선택적으로 범용 샘플 인덱스의 적어도 일부를 서열분석하고, 이어서, 관심 서열 영역을 서열분석하는 것을 포함하여, 서열분석될 수 있다. 샘플 인덱싱된 주형 분자의 집단에서, 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)은 주형 분자의 관심 서열 영역을 제공하지 않을 수도 있는 뉴클레오타이드 다양성을 제공할 수 있다. 샘플 인덱스의 서열은 폴로니 맵핑 및 주형 등록을 위한 개선된 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0320] 추가로, 처음에 샘플 인덱스 영역을 서열분석할 때, 서열분석된 샘플 인덱스 영역의 길이는 상대적으로 짧을 수 있으며(*예를 들어*, 30개 미만의 뉴클레오타이드 길이) 따라서 서열분석된 샘플 인덱스 영역 생성물의 탈혼성화는 더 완료된다. 주형 분자에 혼성화된 채로 남아있는 임의의 서열분석 생성물로부터 잔여 신호 수준을 감소시키는 서열분석된 샘플 인덱스 영역의 생성물 중 대부분 또는 모두를 제거하기 위해 보다 온화한 탈혼성화 조건이 사용될 수 있다. 대조적으로, 관심 서열 영역은 전형적으로 샘플 인덱스 영역보다 훨씬 더 길다(*예를 들어*, 100개 초과의 뉴클레오타이드 길이). 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 영역 전에 관심 서열 영역이 시퀀싱될 때, 시퀀싱된 관심 서열 영역의 생성물은 주형 분자를 손상시킬 수 있는 주형 분자에 혼성화된 채로 남아있는 임의의 생성물을 제거하기 위해 더 혹독한 탈혼성화 조건이 가해져야 한다.

[0321] 일부 양태에서, 본 개시내용은 다중 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻어진 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있는 적어도 1개의 샘플 인덱스 서열을 각각 포함하는 주형 분자를 제공하며, 여기서 적어도 1개의 샘플 인덱스 서열은 범용 샘플 인덱스 서열에 연결된 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 포함한다. 적어도 1개의 샘플 인덱스 서열은 개선된 염기 호출을 위해 서열 다양성을 포함할 수 있다. 적어도 1개의 샘플 인덱스 서열은 염기 호출 정확도를 개선시키기 위해 사용될 수 있다.

[0322] 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)은 범용 샘플 인덱스 서열 업스트림에 위치되며, 따라서 서열분석 실행 동안 무작위 서열 부분이 범용 샘플 인덱스 서열 전에 서열분석된다. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열은 범용 샘플 인덱스 서열 하류에 위치되며, 따라서 서열분석 실행 동안 무작위 부분이 범용 샘플 인덱스 서열 다음에 서열분석된다.

[0323] 일부 실시형태에서, 무작위 서열에서 주어진 위치의 각 염기 "N"은 A, G, C, T 또는 U로부터 독립적으로 선택된다. 일부 실시형태에서, 무작위 서열에는 예를 들어, 그리고 제한 없이 AA, TT, CC, GG, UU, AAA, TTT, CCC, GGG 또는 UUU와 같은 동일한 핵염기를 2개 또는 3개 갖는 연속 반복 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 주형 분자의 집단에서, 범용 샘플 인덱스 서열은 서열분석 실행의 각 주기에서 표시될 모두 4개의 뉴클레오타이드(*예를 들어*, A, G, C, T 및/또는 U)의 거의 동일한 비율을 포함하는 높은 다양성 서열을 갖는 짧은 무작위 서열을 포함한다.

[0324] 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)은 3 내지 20개 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 10개 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 8개 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 6개 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 5개 뉴클레오타이드, 또는 3 내지 4개 뉴클레오타이드 또는 이들 사이의 임의의 범위를 포함한다.

[0325] 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)은 AGC, AGT, GAC, GAT, CAT, CAG, TAG, TAC를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 당업자라면 무작위 서열의 주어진 위치에서 각 염기 "N"이 A, G, C, T 또는 U로부터 독립적으로 선택되는 다수의 더 많은 무작위 서열이 제조될 수 있다(*예를 들어*, 64개의 가능한 조합)는 것을

인식할 것이다.

[0326] 일부 실시형태에서, 범용 샘플 인덱스 서열은 5 내지 20개의 뉴클레오타이드, 또는 7 내지 18개의 뉴클레오타이드, 또는 9 내지 16개의 뉴클레오타이드 또는 이들 사이의 임의의 범위를 포함한다.

[0327] 일부 실시형태에서, 개별 샘플 인덱스 서열의 집단에서 개별 샘플 인덱스 서열은 범용 샘플 인덱스 서열 및 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서 짧은 무작위 서열은 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 서열분석하는 동안 각 서열분석 주기에서 뉴클레오타이드 다양성을 제공하기 위해 모두 4개의 뉴클레오타이드 염기(*예를 들어*, A, G, C 및 T/U)의 약 25% 또는 약 20 내지 30%의 전체 염기 조성을 갖는다.

[0328] 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서, 짧은 무작위 서열의 임의의 주어진 위치에서 아데닌(A)의 비율은 약 20 내지 30%, 약 15 내지 35%, 약 10 내지 40% 또는 이들 사이의 임의의 범위이다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서, 짧은 무작위 서열의 임의의 주어진 위치에서 구아닌(G)의 비율은 약 20 내지 30%, 약 15 내지 35%, 약 10 내지 40% 또는 이들 사이의 임의의 범위이다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서 짧은 무작위 서열의 임의의 주어진 위치에 있는 시토신(C)의 비율은 약 20 내지 30%, 약 15 내지 35%, 약 10 내지 40% 또는 이들 사이의 임의의 범위이다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서 짧은 무작위 서열의 임의의 주어진 위치에 있는 티민(T) 또는 우라실(U)의 비율은 약 20 내지 30%, 약 15 내지 35%, 약 10 내지 40% 또는 이들 사이의 임의의 범위이다.

[0329] 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서, 짧은 무작위 서열의 임의의 주어진 위치에서의 아데닌 (A) 및 티민(T)의 비율, 또는 아데닌 (A) 및 우라실(U)의 비율은 약 10 내지 65%이다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서, 짧은 무작위 서열의 임의의 주어진 위치에서의 구아닌 (G) 및 시토신(C)의 비율은 약 10 내지 65%이다.

[0330] 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열의 집단에서, 짧은 무작위 서열의 서열 다양성은 적어도 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)의 서열분석 동안 4개 미만의 상이한 뉴클레오타이드 염기에 의해 서열분석 주기가 제공되지 않는다는 것을 보장한다.

[0331] 일부 실시형태에서, 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)은 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및/또는 우라실의 균형비를 제공한다(**도 19** *참조*). 일부 실시형태에서, 샘플-인덱싱된 주형 분자의 집단에서, 범용 샘플 인덱스 서열의 적어도 일부와 함께 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)은 서열분석 실행의 각 주기에 표시된 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및/또는 우라실의 균형비를 제공한다.

[0332] 일부 실시형태에서, 서열분석 반응은 핵염기에 상응하는 상이한 형광단으로 표지된 뉴클레오타이드 (*예를 들어*, 뉴클레오타이드 유사체) 및 중합효소의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 서열분석하는 것은 서열분석 실행의 각 주기에서 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및/또는 우라실에 상응하는 형광 색의 균형비를 제공한다. 일부 실시형태에서, 표지된 뉴클레오타이드를 사용하여 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열의 적어도 일부를 서열분석하는 것은 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및/또는 우라실에 상응하는 형광 색의 균형 비를 제공한다(*예*: **도 19** *참조*). 표지된 뉴클레오타이드는 서열분석 반응 동안에 형광 신호를 방출한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 반응은 고정된 주형 분자에 대한 서열분석 반응으로부터의 형광 영상을 포착하는 검출기를 갖는 서열분석 장치 상에서 수행된다. 서열분석 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 이미징 데이터를 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자의 위치를 결정하도록(*예를 들어*, 맵핑하도록) 프로그래밍된 컴퓨터 시스템에 전달하도록 구성될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)만의 형광 이미징 데이터에 기반하거나, 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열의 적어도 일부에 기반하여 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성할 수 있다. 따라서, 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 선택적으로 범용 샘플 인덱스 서열의 일부를 서열분석하기 위해 사용되는 소수의 서열분석 주기는 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN), 또는 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 적어도 범용 샘플 인덱스 서열의 적어도 일부만의 형광 색 및 강도를 추출하도록 구성될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 삽입 영역(110)을 서열분석하는 동안 염기 호출을 위해 주어진 주형 분자(무작위 서열을 서열분석하는 동안 확립됨)와 관련된 형광 색 및 강도 및 주어진 고정된 주형 분자의 위치를 사용하도록 구성될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 무작위 서열 (*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열, 및 삽입 영역(110)을 서열분석하는 동안 위상 및 사전 위상화를 검출하도록 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각 서열분석 주기에서 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)에 의해 제공된 형광 색의 균형 비는 검출기에 의해 포착된 형광 영상으로부터 가공된 데이터의 품질을 개선시킬 수 있고, 결국 플로우 셀 상의 고정된

주형 분자의 위치, 및 색 및 강도를 결정하기 위해 컴퓨터 시스템에 의한 능력을 개선시킬 수 있으며, 이들 모두는 염기 호출 정확도 및 서열분석된 삽입 영역(110)의 품질 점수를 개선시킬 수 있다.

[0333] 일부 실시형태에서, 서열분석 반응은 주어진 다가 분자에서 뉴클레오타이드 아암에 부착된 뉴클레오타이드 단위의 핵염기(*예를 들어*, 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 또는 우라실)에 상응하는 상이한 형광단으로 표지된 다가 분자 및 중합효소의 사용을 포함한다. 일부 실시형태에서, 개개 다가 분자의 코어는 주어진 다가 분자에서 뉴클레오타이드 아암에 부착된 뉴클레오타이드 단위(*예를 들어*, 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 또는 우라실)에 상응하는 형광단에 부착된다(*예*: **도 22 내지 도 25** *참조*). 일부 실시형태에서, 다가 분자의 뉴클레오타이드 아암 중 적어도 하나는 형광단에 부착된 링커 및/또는 뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 주어진 링커 또는 뉴클레오타이드 염기에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(*예를 들어*, 아데닌, 구아닌, 시토신, 티민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시형태에서, 표지된 다가 분자를 사용하여 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 서열분석하는 것은 서열분석 실행의 각 주기에서 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및/또는 우라실에 상응하는 형광 색의 균형비를 제공한다. 일부 실시형태에서, 표지된 다가 분자를 사용하여 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열의 적어도 일부를 서열분석하는 것은 핵염기 아데닌, 시토신, 구아닌, 티민 및/또는 우라실에 상응하는 형광 색의 균형 비를 제공한다(*예*: **도 19 참조**). 표지된 다가 분자는 서열분석 반응 동안에 형광 신호를 방출한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 반응은 고정된 주형 분자에 대한 서열분석 반응으로부터의 형광 영상을 포착하는 검출기를 갖는 서열분석 장치 상에서 수행된다. 서열분석 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 이미징 데이터를 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자(폴로니)의 위치를 결정하도록(*예를 들어*, 맵핑하도록) 프로그래밍된 컴퓨터 시스템에 전달하도록 구성될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)만의 형광 이미징 데이터에 기반하거나, 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열의 적어도 일부에 기반하여 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성할 수 있다. 따라서, 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 선택적으로 범용 샘플 인덱스 서열의 일부를 서열분석하기 위해 사용되는 소수의 서열분석 주기는 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)에서만 형광색과 강도를 추출하거나, 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)과 범용 샘플 인덱스 서열의 형광색과 강도를 추출하도록 구성될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 삽입 영역(110)을 서열분석하는 동안 염기 호출을 위해 주어진 주형 분자(무작위 서열을 서열분석하는 동안 확립됨)와 관련된 형광 색 및 강도 및 주어진 고정된 주형 분자의 위치를 사용하도록 구성될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 무작위 서열 (*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열, 및 삽입 영역(110)을 서열분석하는 동안 위상 및 사전 위상화를 검출하도록 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 각 서열분석 주기에서 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)에 의해 제공된 형광 색의 균형 비는 검출기에 의해 포착된 형광 영상으로부터 가공된 데이터의 품질을 개선시킬 수 있고, 결국 플로우 셀 상의 고정된 주형 분자의 위치, 및 색 및 강도를 결정하기 위해 컴퓨터 시스템에 의한 능력을 개선시킬 수 있으며, 이들 모두는 염기 호출 정확도 및 서열분석된 삽입 영역(110)의 품질 점수를 개선시킬 수 있다.

[0334] **제1 실시형태: 샘플 인덱스 서열의 서열분석 순서**

[0335] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 (i) 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 하위 영역(411); (ii) 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제2 하위 영역(412); (iii) 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다(*예*: **도 4** *참조*). 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머에 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 혼성화함으로써 회전환 증폭을 거치는데, 여기서 표면 포획 프라이머는 증폭을 개시하여 각각 동족 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭은 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 역방향 서열분석 프라이머 및/또는 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열에서 콘카타머에 혼성화할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 포획 프라이머에는 우라실 염기가 결여되어 있다. 일부 실시형태에서 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하여 개별 콘카타머 분자가 무작위로 분배된 우라실 염기를 포함하는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서 고정된 콘카타머의 적어도 일부는 서열분석된다.

[0336] 일부 실시형태에서, 서열분석 순서는 다음을 포함한다: **(1)** 콘카타머의 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하는 단계; 및 **(2)** 콘카타머의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 추가로 포함한다: **(3)** 고정된 콘카타머 분자가 콘카타머 분자에 상보적인

고정된 제2 가닥으로 대체되도록 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; 및 **(4)** 제2 가닥 상의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)의 서열분석은 폴로니 매핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0337] 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법은 **단계 (a)**: 콘카타머 분자를 제3 하위 영역(413)의 적어도 일부에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 제3 하위 영역(413)의 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화되는 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물은 짧은 무직위 서열(*예*: NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열에 상보적이다.

[0338] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (b)**: 제1 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 제거하고 고정된 콘카타머 분자를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0339] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (c)**: 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 유지된 고정 콘카타머 분자를 혼성화하고 삽입 영역(110)을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0340] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d)**: 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 대체하여 고정된 포획 프라이머를 포함하는 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 제2 가닥 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0341] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (e)**: 우라실 부위에서 고정된 콘카타머 분자에 무염기성 부위를 생성하고 무염기성 부위에서 갭을 생성함으로써 고정된 콘카타머 분자를 제거하여 갭-포함 콘타카머 분자를 생성하면서 개별 제2 가닥 연장 생성물이 고정된 포획 프라이머에 혼성화되는 것에 의해 유지되는 단계 (d)에서 생성된 제2 가닥 연장 생성물을 유지하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 쌍방향 회전은 단계 (d)와 (e)를 수행함으로써 달성된다.

[0342] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (f)**: 유지된 제2 가닥 연장 생성물을 역방향 서열분석 프라이머(130)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 삽입 영역(110)의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 더 포함한다.

[0343] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(110)의 서열, (ii) 샘플 인덱스 서열(170)에 할당하여, 삽입 영역이 제1 공급원으로부터 얻은 것으로 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 할당은 단계 (c) 및/또는 (f) 후에 수행될 수 있다.

[0344] 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 포름아미드가 있거나 없는 SSC(*예*: 식염수-구연산나트륨) 완충액을 포함하는 변성 시약을 사용하여 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예컨대 50 내지 90℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 예컨대 50 내지 90℃와 같이 핵산 변성을 촉진하는 온도에서 탈혼성화 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다.

[0345] 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 표지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 비표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 본원에 기재된 인산-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 임의의 서열분석 방법 또는 임의의 서열분석 방법 중 하나를 수행하는 것을 포함한다.

[0346] 일부 실시형태에서 지지체에 고정된 복수의 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^2 내지 10^{15}(*예*: 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체 상에 고정된다.

[0347] **제2 실시형태: 샘플 인덱스 서열의 서열분석 순서**

[0348] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 (i) 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 하위 영역(411); (ii) 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제2 하위 영역(412); (iii) 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다(예: 도 4 참조). 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머에 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 혼성화함으로써 회전환 증폭을 거치는데, 여기서 표면 포획 프라이머는 증폭을 개시하여 각각 동족 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭은 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 역방향 서열분석 프라이머 및/또는 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열에서 콘카타머에 혼성화할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 포획 프라이머에는 우라실 염기가 결여되어 있다. 일부 실시형태에서 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하여 개별 콘카타머 분자가 무작위로 분배된 우라실 염기를 포함하는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서 고정된 콘카타머의 적어도 일부는 서열분석된다.

[0349] 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 포함한다: **(1)** 콘카타머의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계; 및 **(2)** 콘카타머의 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하는 단계. 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 추가로 포함한다: **(3)** 고정된 콘카타머 분자가 콘카타머 분자에 상보적인 고정된 제2 가닥으로 대체되도록 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; 및 **(4)** 제2 가닥 상의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)의 서열분석은 폴로니 매핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0350] 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법은 **단계 (a):** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 고정된 콘카타머 분자를 혼성화하고 삽입 영역(110)을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 생성하는 단계를 포함한다.

[0351] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (b):** 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 제거하고 고정된 콘카타머 분자를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0352] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (c):** 콘카타머 분자를 제3 하위 영역(413)의 적어도 일부에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 제3 하위 영역의 범용 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화되는 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함하며, 여기서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물은 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열에 상보적이다.

[0353] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d)**: 가닥-전위 중합효소와 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 대체하여 고정된 포획 프라이머를 포함하는 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 제2 가닥 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0354] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (e):** 우라실 부위에서 고정된 콘카타머 분자에 무염기성 부위를 생성하고 무염기성 부위에서 갭을 생성함으로써 고정된 콘카타머 분자를 제거하여 갭-포함 콘타카머 분자를 생성하면서 개별 제2 가닥 연장 생성물이 고정된 포획 프라이머에 혼성화되는 것에 의해 유지되는 단계 (d)에서 생성된 제2 가닥 연장 생성물을 유지하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 쌍방향 회전은 단계 (d)와 (e)를 수행함으로써 달성된다.

[0355] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (f)**: 유지된 제2 가닥 연장 생성물을 역방향 서열분석 프라이머(130)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 삽입 영역(110)의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 더 포함한다.

[0356] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(110)의 서열, (ii) 샘플 인덱스 서열에 할당하여, 삽입 영역이 제1 공급원으로부터 얻은 것으로 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 할당은 단계 (c) 및/또는 (f) 후에 수행될 수 있다.

[0357] 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 포름아미드가 있거나 없는 SSC(*예*: 식염수-구연산나트륨) 완충액을 포함하는 변성 시약을 사용하여 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예컨대 50 내지 90℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 예컨대 50 내지 90℃와 같이 핵산 변성을 촉진하는 온도에서 탈혼성화 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다.

[0358] 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 표지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 비표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 본원에 기재된 인산-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 임의의 서열분석 방법 또는 임의의 서열분석 방법 중 하나를 수행하는 것을 포함한다.

[0359] 일부 실시형태에서 지지체에 고정된 복수의 콘카타머 분자의 밀도는 mm^2당 약 10^2 내지 10^{15}(*예*: 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체 상에 고정된다.

[0360] **제3 실시형태: 서열분석 순서**

[0361] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 (i) 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 하위 영역(411); (ii) 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제2 하위 영역(412); (iii) 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다(*예*: **도 4** *참조*). 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머에 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 혼성화함으로써 회전환 증폭을 거치는데, 여기서 표면 포획 프라이머는 증폭을 개시하여 각각 동족 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭은 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 역방향 서열분석 프라이머 및/또는 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열에서 콘카타머에 혼성화할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 포획 프라이머에는 우라실 염기가 결여되어 있다. 일부 실시형태에서 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하여 개별 콘카타머 분자가 무작위로 분배된 우라실 염기를 포함하는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서 고정된 콘카타머의 적어도 일부는 서열분석된다.

[0362] 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 포함한다: **(1)** 콘카타머의 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기를 서열분석하는 단계; **(2)** 콘카타머의 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하는 단계; 및 **(3)** 콘카타머의 삽입 영역(110)의 나머지 부분을 서열분석하는 단계. 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 추가로 포함한다: **(4)** 고정된 콘카타머 분자가 콘카타머 분자에 상보적인 고정된 제2 가닥으로 대체되도록 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; 및 **(5)** 제2 가닥 상의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계. 콘카타머의 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기의 서열분석은 폴로니 맵핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)의 서열분석은 폴로니 매핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0363] 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법은 **단계 (a):** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 고정된 콘카타머 분자를 혼성화하고 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기를 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(110)에 상보적이다. 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개의 염기의 서열은 폴로니 맵핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 서열 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0364] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (b):** 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하고 고정된 콘카타머 분자를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0365] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (c):** 콘카타머 분자를 제3 하위 영역(413)의 적어도 일부에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 제3 하위 영역의 범용 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화되는 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함하며, 여기서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물은 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열에 상보적이다.

[0366] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d)**: 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 제거하고 고정된 콘카타머 분자를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0367] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (e):** 정방향 서열분석 프라이머(120)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 유지된 콘카타머 분자를 혼성화하고, 삽입 영역(110)의 나머지를 서열분석하거나, 삽입 영역(110)의 전장을 서열분석하여, 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함하며, 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(110)에 상보적이다. 일부 실시형태에서, 단계 (e)에서, 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기는 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 표지된 다가 분자를 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (e)에서, 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기는 비표지된 뉴클레오타이드 및/또는 비표지된 다가 분자를 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (e)에서, 삽입 영역(110)의 나머지는 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 표지된 다가 분자를 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (e)에서, 삽입 영역(110)의 전장은 표지된 뉴클레오타이드 및/또는 표지된 다가 분자를 사용하여 서열분석될 수 있다.

[0368] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (f)**: 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 대체하여 고정된 포획 프라이머를 포함하는 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 제2 가닥 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0369] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (g):** 우라실 부위에서 고정된 콘카타머 분자에 무염기성 부위를 생성하고 무염기성 부위에서 갭을 생성함으로써 고정된 콘카타머 분자를 제거하여 갭-포함 콘타카머 분자를 생성하면서 개별 제2 가닥 연장 생성물이 고정된 포획 프라이머에 혼성화되는 것에 의해 유지되는 단계 (f)에서 생성된 제2 가닥 연장 생성물을 유지하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 쌍방향 회전은 단계 (f) 및 (g)를 수행함으로써 달성된다.

[0370] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (h)**: 유지된 제2 가닥 연장 생성물을 역방향 서열분석 프라이머(130)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 삽입 영역(110)의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 더 포함한다.

[0371] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(110)의 서열, (ii) 샘플 인덱스 서열에 할당하여, 삽입 영역이 제1 공급원으로부터 얻은 것으로 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 할당은 단계 (c), (e) 및/또는 (h) 후에 수행될 수 있다.

[0372] 일부 실시형태에서, 단계 (b)와 (d)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 포름아미드가 있거나 없는 SSC(예: 식염수-구연산나트륨) 완충액을 포함하는 변성 시약을 사용하여 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예컨대 50 내지 90℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (b)와 (d)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 예컨대 50 내지 90℃와 같이 핵산 변성을 촉진하는 온도에서 탈혼성화 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다.

[0373] 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 표지된 또는 비표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (e)의 서열분석은 본원에 기재된 인산-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 임의의 서열분석 방법 또는 임의의 서열분석 방법 중 하나를 수행하는 것을 포함한다.

[0374] 일부 실시형태에서 지지체에 고정된 복수의 콘카타머 분자의 밀도는 ㎜^{2}당 약 10^{2} 내지 10^{15}(*예*: 10^{2}, 10^{3}, 10^{4}, 10^{5}, 10^{6}, 10^{7}, 10^{8}, 10^{9}, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체 상에 고정된다.

[0375] **제4 실시형태: 서열분석 순서**

[0376] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 (i) 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 하위 영역(411); (ii) 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제2 하위 영역(412); (iii) 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다(*예:* **도 4 참조**). 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머에 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 혼성화함으로써 회전환 증폭을 거치는데, 여기서 표면 포획 프라이머는 증폭을 개시하여 각각 동족 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭은 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 역방향 서열분석 프라이머 및/또는 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열에서 콘카타머에 혼성화할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 포획 프라이머에는 우라실 염기가 결여되어 있다. 일부 실시형태에서 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하여 개별 콘카타머 분자가 무작위로 분배된 우라실 염기를 포함하는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서 고정된 콘카타머의 적어도 일부는 서열분석된다.

[0377] 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 포함한다: **(1)** 콘카타머의 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기를 서열분석하는 단계; 및 **(2)** 콘카타머의 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하는 단계. 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 추가로 포함한다: **(3)** 고정된 콘카타머 분자가 콘카타머 분자에 상보적인 고정된 제2 가닥으로 대체되도록 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; 및 **(4)** 제2 가닥 상의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계. 콘카타머의 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기의 서열분석은 폴로니 맵핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(412)의 서열분석은 폴로니 매핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0378] 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법은 **단계 (a):** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 고정된 콘카타머 분자를 혼성화하고 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개 염기를 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 복수의 삽입 연장 생성물은 관심 서열(110)에 상보적이다. 삽입 영역(110)의 처음 3 내지 5개의 염기의 서열은 폴로니 맵핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 서열 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0379] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (b):** 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하고 고정된 콘카타머 분자를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0380] 일부 실시형태에서, 서열분석 방법은 **단계 (c):** 콘카타머 분자를 제3 하위 영역(413)의 적어도 일부에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 제3 하위 영역의 범용 샘플 인덱스 서열(412)을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화되는 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함하며, 여기서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물은 짧은 무직위 서열(*예*: NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열에 상보적이다.

[0381] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d)**: 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 대체하여 고정된 포획 프라이머를 포함하는 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 제2 가닥 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0382] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (e):** 우라실 부위에서 고정된 콘카타머 분자에 무염기성 부위를 생성하고 무염기성 부위에서 갭을 생성함으로써 고정된 콘카타머 분자를 제거하여 갭-포함 콘타카머 분자를 생성하면서 개별 제2 가닥 연장 생성물이 고정된 포획 프라이머에 혼성화되는 것에 의해 유지되는 단계 (d)에서

생성된 제2 가닥 연장 생성물을 유지하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 쌍방향 회전은 단계 (d)와 (e)를 수행함으로써 달성된다.

[0383] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (f)**: 유지된 제2 가닥 연장 생성물을 역방향 서열분석 프라이머(130)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 삽입 영역(110)의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 더 포함한다.

[0384] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(110)의 서열, (ii) 샘플 인덱스 서열에 할당하여, 삽입 영역이 제1 공급원으로부터 얻은 것으로 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 할당은 단계 (c) 및/또는 (f) 후에 수행될 수 있다.

[0385] 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 포름아미드가 있거나 없는 SSC(*예*: 식염수-구연산나트륨) 완충액을 포함하는 변성 시약을 사용하여 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예컨대 50 내지 90℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 예컨대 50 내지 90℃와 같이 핵산 변성을 촉진하는 온도에서 탈혼성화 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다.

[0386] 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 표지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 비표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 본원에 기재된 인산-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 임의의 서열분석 방법 또는 임의의 서열분석 방법 중 하나를 수행하는 것을 포함한다.

[0387] 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 복수의 콘카타머 분자의 밀도는 ㎟당 약 10^2 내지 10^{15}이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체 상에 고정된다.

[0388] **제5 실시형태: 샘플 인덱스 서열의 서열분석 순서**

[0389] 일부 실시형태에서, 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 (i) 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제1 하위 영역(411); (ii) 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함하는 제2 하위 영역(412); (iii) 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다(*예*: **도 4 참조**).

[0390] 일부 실시형태에서, 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)는 지지체에 고정된 복수의 표면 포획 프라이머에 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 혼성화함으로써 회전환 증폭을 거치는데, 여기서 표면 포획 프라이머는 증폭을 개시하여 각각 동족 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서, 회전환 증폭은 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열, 역방향 서열분석 프라이머 및/또는 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열에서 콘카타머에 혼성화할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에 수행된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 포획 프라이머에는 우라실 염기가 결여되어 있다. 일부 실시형태에서 회전환 증폭 반응은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하여 개별 콘카타머 분자가 무작위로 분배된 우라실 염기를 포함하는 복수의 고정된 콘카타머를 생성한다. 일부 실시형태에서 고정된 콘카타머의 적어도 일부는 서열분석된다.

[0391] 일부 실시형태에서, 서열분석 순서는 다음을 포함한다: **(1)** 콘카타머의 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(413)을 서열분석하는 단계; 및 **(2)** 콘카타머의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서 서열분석 순서는 다음을 추가로 포함한다: **(3)** 고정된 콘카타머 분자가 콘카타머 분자에 상보적인 고정된 제2 가닥으로 대체되도록 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; 및 **(4)** 제2 가닥 상의 삽입 영역(110)을 서열분석하는 단계. 일부 실시형태에서, 짧은 무작위 서열(NNN) 및 샘플 인덱스 서열(413)의 서열분석은 폴로니 매핑 및 콘카타머 등록을 위해 충분한 뉴클레오타이드 다양성 및 색상 균형을 제공할 수 있다.

[0392] 일부 실시형태에서, 지지체에 고정된 콘카타머 분자를 서열분석하는 방법은 **단계 (a)**: 콘카타머 분자를 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130)의 적어도 일부에 혼성화하는 제1 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 짧은 무작위 서열(*예*: NNN) 및 제3 하위 영역(413)의 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화되는 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 생성하는 단계를 포함하며, 여기서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물은 짧은 무직위 서열(*예*: NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열에 상보적이다.

[0393] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (b)**: 제1 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 제거하고 고정된 콘카타머 분자를 유지하는 단계를 더 포함한다.

[0394] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (c)**: 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)에 혼성화하는 제2 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 유지된 고정 콘카타머 분자를 혼성화하고 삽입 영역(110)을 서열분석하여 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0395] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (d)**: 가닥-전위 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 복수의 삽입 서열 연장 생성물을 대체하여 고정된 포획 프라이머를 포함하는 고정된 콘카타머 분자에 혼성화된 제2 가닥 연장 생성물을 생성하는 단계를 더 포함한다.

[0396] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (e)**: 우라실 부위에서 고정된 콘카타머 분자에 무염기성 부위를 생성하고 무염기성 부위에서 갭을 생성함으로써 고정된 콘카타머 분자를 제거하여 갭-포함 콘타카머 분자를 생성하면서 개별 제2 가닥 연장 생성물이 고정된 포획 프라이머에 혼성화되는 것에 의해 유지되는 단계 (d)에서 생성된 제2 가닥 연장 생성물을 유지하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 쌍방향 회전은 단계 (d)와 (e)를 수행함으로써 달성된다.

[0397] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 **단계 (f)**: 유지된 제2 가닥 연장 생성물을 역방향 서열분석 프라이머(130)에 대한 범용 결합 서열에 혼성화하는 제3 복수의 가용성 서열분석 프라이머와 혼성화하고 삽입 영역(110)의 적어도 일부를 서열분석하는 단계를 더 포함한다.

[0398] 일부 실시형태에서, 서열분석을 위한 방법은 (i) 삽입 영역(110)의 서열, (ii) 샘플 인덱스 서열에 할당하여, 삽입 영역이 제1 공급원으로부터 얻은 것으로 식별하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 할당은 단계 (c) 및/또는 (f) 후에 수행될 수 있다.

[0399] 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 포름아미드가 있거나 없는 SSC(*예*: 식염수-구연산나트륨) 완충액을 포함하는 변성 시약을 사용하여 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예컨대 50 내지 90℃에서 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 단계 (b)의 복수의 서열분석 연장 생성물의 제거는 예컨대 50 내지 90℃와 같이 핵산 변성을 촉진하는 온도에서 탈혼성화 시약을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다.

[0400] 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 서열분석 중합효소 및 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및 표지된 뉴클레오타이드 유사체 또는 비표지된 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 본 명세서에 기재된 임의의 2단계 서열분석 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단계 (a), (c) 및 (f)의 서열분석은 본원에 기재된 인산-사슬 표지 뉴클레오타이드를 사용하는 결합에 의한 임의의 서열분석 방법 또는 임의의 서열분석 방법 중 하나를 수행하는 것을 포함한다.

[0401] 일부 실시형태에서 지지체에 고정된 복수의 콘카타머 분자의 밀도는 $㎜^2$당 약 10^2 내지 10^{15}(*예*: 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15})이다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체 상에 고정된다.

[0402] **탈혼성화 시약**

[0403] 일부 양태에서, 본 개시내용은 임의의 2개의 핵산 가닥 사이의 핵산 변성을 촉진할 수 있는 하나 이상의 핵산

탈혼성화 시약을 제공한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 핵산 주형 분자와 핵산 연장 생성물 사이의 핵산 변성을 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 고정된 콘카타머 분자를 유지하면서 콘카타머 분자와 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물 사이의 핵산 변성을 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 고정된 콘카타머 분자를 유지하면서 콘카타머 분자와 복수의 삽입 연장 생성물 사이의 핵산 변성을 촉진할 수 있다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 고정된 제2 가닥 분자를 유지하면서 제2 가닥 분자와 복수의 삽입 연장 생성물 사이의 핵산 변성을 촉진할 수 있다.

[0404] 일부 양태에서, 본 개시내용은 하나 이상의 핵산 탈혼성화 시약(*예*: 변성 시약) 및 핵산 탈혼성화 시약을 사용하는 방법을 제공하며, 여기서 방법은 임의의 순서의 서열분석 작업흐름을 포함한다. 예를 들어, 서열분석 작업흐름의 순서는 위에서 설명한 것, 예를 들어 고정된 콘카타머 분자에서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 제거하는 단계, 고정된 콘카타머 분자에서 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하는 단계 및/또는 고정된 제2 가닥 분자로부터 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하는 단계를 포함하는 방법을 포함할 수 있다.

[0405] 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 약 5 내지 5.25의 pH 범위, 또는 약 5.25 내지 5.5의 pH 범위, 또는 약 5.5 내지 5.75의 pH 범위, 또는 약 5.75 내지 6의 pH 범위 또는 그들 사이의 임의의 범위에 있다.

[0406] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 탈혼성화 시약은 시약의 pH를 핵산 혼성화에 적합한 범위로 유지할 수 있는 pH 완충제를 포함할 수 있다. pH 완충제는 트리스, 트리스-HCl, 트리스-아세테이트, 트라이신, 바이신, 비스-트리스 프로판, HEPES, MES, MOPS, MOPSO, BES, TES, CAPS, TAPS, TAPSO, ACES, PIPES, 에탄올아민(2-아미노 메탄올이라고도 함; MEA), 시트레이트 화합물, 시트레이트 혼합물, NaOH 및/또는 KOH 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, pH 완충제는 본원에 기재된 탈혼성화 시약 중 어느 것에나 약 1 내지 100 mM, 또는 약 10 내지 50 mM, 또는 약 10 내지 25 mM 또는 그들 사이의 임의의 범위의 농도로 존재할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 시약에 존재하는 pH 완충제의 pH는 약 4 내지 9.5 pH, 또는 약 5 내지 9 pH, 또는 약 5 내지 8 pH, 또는 약 5.5 내지 7 pH 또는 그들 사이의 임의의 범위로 조정될 수 있다.

[0407] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 탈혼성화 시약은 DTT(디티오트레이톨), 2-베타 머캅토에탄올, TCEP(트리스(2-카복시에틸)포스핀), 포름아마이드, DMSO(디메틸설폭사이드), 디티오나이트나트륨($Na_2S_2O_4$), 글루타치온, 메티오닌, 베타인, 트리스(3-하이드록시프로필)포스핀(THPP) 및/또는 N-아세틸 시스테인을 포함하는 하나 이상의 환원제를 포함할 수 있다. 탈혼성화 시약은 약 0.1 내지 0.5 M, 또는 약 0.5 내지 1 M, 또는 약 1 내지 2 M, 또는 이들 사이의 임의 범위의 농도로 환원제를 포함할 수 있다. 탈혼성화 시약은 약 0.01 내지 0.1 mM, 약 0.1 내지 1 mM, 약 1 내지 2.5 mM, 약 2.5 내지 5 mM, 약 5 내지 7.5 mM 또는 7.5 내지 9 mM, 또는 약 9 내지 12 mM, 또는 약 12 내지 25 mM, 또는 약 25 내지 50 mM 또는 이들 사이의 임의의 범위의 농도로 환원제를 포함할 수 있다. 탈혼성화 시약은 약 1% 내지 5%, 또는 약 5% 내지 10%, 또는 약 10% 내지 20%, 또는 약 20% 내지 30%, 또는 약 30% 내지 40%, 또는 약 40% 내지 50% 또는 그들 사이의 임의의 범위의 농도로 환원제를 포함할 수 있다.

[0408] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 탈혼성화 시약은 NaCl, KCl, NH_2SO_4 및/또는 글루타민산칼륨을 포함하는 적어도 하나의 1가 염을 포함할수 있다. 탈혼성화 시약은 약 25 내지 500 mM, 약 50 내지 250 mM, 약 100 내지 200 mM, 약 500 mM 내지 750 mM, 또는 약 750 mM 내지 1 M, 또는 약 1 M 내지 1.5 M 또는 그들 사이의 임의의 범위의 농도의 1가 염을 포함할 수 있다.

[0409] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 탈혼성화 시약은 분자 크라우딩을 증가시키는 크라우딩제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 크라우딩제는 폴리에틸렌 글리콜(PEG, *예를 들어*, 1 내지 50K 분자량), 덱스트란, 덱스트란 설페이트, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스(HPMC), 하이드록시에틸 메틸 셀룰로스(HEMC), 하이드록시부틸 메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 메틸셀룰로스 및 하이드록실 메틸 셀룰로오스를 포함한다. 크라우딩제는 혼성화 시약의 총 부피를 기준으로 약 1 내지 10%, 약 10 내지 25%, 약 25 내지 50% 또는 더 높은 부피 백분율로 탈혼성화 시약에 존재할 수 있다.

[0410] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 임의의 탈혼성화 시약은 수소 결합 또는 반데르발스 힘(Van der Waals force)과 같은 비공유 결합을 파괴할 수 있는 카오트로픽제를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 카오트로픽제는 SDS(도데실 황산나트륨), 우레아, 티오우레아, 염화 구아니디늄, 염산 구아니딘, 구아니딘

티오시아네이트, 구아니딘 이소티오시아네이트, 구아니딘 이소티오네이트, 티오시아산 칼륨, 염화 리튬, 요오드화 나트륨 또는 과염소산 나트륨을 포함한다. 탈혼성화 시약은 약 0.5 내지 1 M, 약 0.1 내지 1 M, 약 1 내지 2 M, 약 2 내지 3 M, 약 3 내지 4 M, 약 4 내지 5 M 또는 그들 사이의 임의의 범위 농도의 카오트로픽제를 포함할 수 있다.

[0411] 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 **(a)** 복수의 고정된 콘카타머 분자 및 **(b)** 하위 영역 (411), (412) 또는 (413)에 혼성화하는 복수의 가용성 서열분석 프라이머를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 콘카타머 분자는 탠덤 반복 폴리뉴클레오타이드 단위를 포함하며, 여기서 각 단위는 (i) 제1 하위 영역(411); (ii) 제2 하위 영역(412); (iii) 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다.

[0412] 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 **(a)** 복수의 고정된 콘카타머 분자 및 **(b)** 각각 하위 영역 (411), (412) 또는 (413)의 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN) 및 범용 샘플 인덱스 서열을 포함하는 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 추더 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 콘카타머 분자는 탠덤 반복 폴리뉴클레오타이드 단위를 포함하며, 여기서 각 단위는 (i) 제1 하위 영역(411); (ii) 제2 하위 영역(412); (iii) 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다.

[0413] 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 **(a)** 복수의 고정된 콘카타머 분자 및 **(b)** 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)에 혼성화하는 복수의 가용성 서열분석 프라이머를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 콘카타머 분자는 탠덤 반복 폴리뉴클레오타이드 단위를 포함하며, 여기서 각 단위는 (i) 제1 하위 영역(411); (ii) 제2 하위 영역(412); (iii) 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다.

[0414] 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 **(a)** 복수의 고정된 콘카타머 분자 및 **(b)** 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130)에 혼성화하는 복수의 가용성 서열분석 프라이머를 더 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 콘카타머 분자는 탠덤 반복 폴리뉴클레오타이드 단위를 포함하며, 여기서 각 단위는 (i) 제1 하위 영역(411); (ii) 제2 하위 영역(412); (iii) 제3 하위 영역(413); (iv) 역방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(130); (v) 삽입 서열(110); 및 (vi) 정방향 서열분석 프라이머에 대한 범용 결합 서열(120)을 포함한다.

[0415] 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 복수의 서열분석 중합효소 및 복수의 검출가능하게 표지된 다가 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 복수의 서열분석 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 유사체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드 유사체는 표지되지 않는다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드 유사체는 검출가능하게 표지된다. 일부 실시형태에서, 복수의 뉴클레오타이드 유사체는 표지되지 않은 뉴클레오타이드 유사체와 검출가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체의 혼합물을 포함한다.

[0416] 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 콘카타머 분자는 mm^2당 약 10^2 내지 10^{15}(*예*: 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 10^{13}, 10^{14}, 10^{15})의 밀도로 지지체에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 고정된 콘카타머 분자는 약 45 내지 50도의 물 접촉각을 갖는 친수성 폴리머 코팅으로 부동태화된 지지체에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 지지체 상의 무작위 위치에 고정된다. 일부 실시형태에서, 복수의 콘카타머 분자는 사전결정된 패턴으로 지지체 상에 고정된다.

[0417] **탈혼성화 시약을 포함하는 키트**

[0418] 일부 양태에서, 본 개시내용은 위에 설명된 서열분석 작업흐름을 수행하기 위한 키트를 제공하며, 예를 들어 고정된 콘카타머 분자에서 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 제거하는 단계, 고정된 콘카타머 분자에서 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하는 단계 및/또는 고정된 제2 가닥 분자로부터 복수의 삽입 연장 생성물을 제거하는 단계를 포함하는 방법을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 pH 완충제, 환원제, 1가 염 및 크라우딩제를 포함하는 탈혼성화 시약을 포함한다. 일부 실시형태에서, 탈혼성화 시약은 카오트로픽제를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 키트는 삽입 영역의 서열분석을 위한 복수의 정방향 서열분석 프라이머, 삽입 영역의 서열분석을 위한 복수의 역방향 서열분석 프라이머, 하위 영역 (411), (412) 또는 (413)에 혼성화하는 복수의 서열분석 프라이머, 복수의 서열분석 중합효소, 복수의 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 유사체, 복수의 비표

지된 뉴클레오타이드 유사체, 복수의 검출 가능하게 표지된 다가 분자 및/또는 뉴클레오타이드 유사체의 2' 당 위치 또는 3' 당 위치에서 사슬 종결 모이어티(*예*: 차단 모이어티)를 제거할 수 있는 절단 시약 중 하나 또는 두 개 이상의 임의의 조합을 포함한다.

[0419] **폴로니 맵을 생성하기 위한 3-량체 무작위 서열의 서열분석**

[0420] 일부 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 핵산 서열분석 방법을 제공한다: **(a)** 지지체 상에 고정된(*예를 들어*, 무작위 또는 미리 결정된 위치에 고정됨) 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계, 여기서 개별 고정된 주형 분자는 삽입 서열 영역 및 하나의 샘플 인덱스를 포함하고, 각각의 샘플 인덱스는 삽입 서열의 샘플 공급원을식별하는 범용 샘플 인덱스 서열에 연결된 3-량체 무작위 서열(*예를 들어*, 짧은 무작위 서열 NNN)를 포함하고, 다른 고정된 주형 분자는 다른 3-량체 무작위 서열과 동일한 범용 샘플 인덱스 서열을 갖고, 고정된 주형 분자는 서로 다른 삽입 서열을 가짐; **(b)** 서로 다른 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 검출 가능하게 표지된 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자의 3-량체 무작위 서열의 3주기의 중합효소 매개 서열분석 반응을 수행하는 단계, 여기서 뉴클레오타이드 시약은 각각의 서로 다른 유형의 핵염기에 해당하는 서로 다른 검출 가능한 색상 라벨을 포함하며, 3주기의 서열분석에는 고정된 주형 분자에 결합된 검출가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에서 방출된 광학 색상 신호를 검출하고 이미징하여 복수의 고정된 주형 분자의 개별 주형 분자에서 3-량체 무작위 서열의 서열을 결정하는 것이 포함되고, A, G, C 및 T/U의 균형 잡힌 핵염기 다양성이 복수의 고정된 주형 분자 중에서 제1, 제2 및 제3 서열분석 주기 각각에서 검출되고 이미징됨; 및 **(c)** 단계 (b)에서 획득된 이미지를 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계, 여기서, 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않음.

[0421] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 방법에서, 단계 (b)의 균형 다양성은 제1, 제2 및 제3 서열분석 주기 각각에서 검출 및 이미징된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75% 또는 그들 사이의 임의의 범위이다.

[0422] 일부 실시형태에서, 핵산 서열분석 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(c)** 단계 (b)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 단계 (a)에서 얻은 동일한 주어진 주형 분자로부터의 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0423] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 방법에서, 복수의 핵산 주형 분자는 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제2 샘플 인덱스를 더 포함하고, 제2 샘플 인덱스는 짧은 무작위 서열을 결여한다.

[0424] 일부 실시형태에서, 핵산 서열분석 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 3-량체 무작위 서열을 서열분석하여 A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 잡힌 다양성을 얻고 각각의 제1, 제2 및 제3 서열분석 주기에서 이를 검출하여 이미지화하여 복수의 고정된 주형 분자의 위치 맵을 생성하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(c)** 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(d)** 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(e)** 단계 (c)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 단계 (a) 및 (b)에서 얻은 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0425] 본 개시내용은 다음을 포함하는 핵산 서열분석 방법을 제공한다: **(a)** 지지체 상에 고정된(*예를 들어*, 무작위 또는 미리 결정된 위치에 고정됨) 복수의 핵산 주형 분자를 제공하는 단계, 여기서 개별 고정된 주형 분자는 삽입 서열 영역 및 *하나의* 샘플 인덱스를 포함하고, 각각의 샘플 인덱스는 삽입 서열의 샘플 공급원을식별하는 범용 샘플 인덱스 서열에 결합된 3-량체 무작위 서열(*예를 들어*, 짧은 무작위 서열 NNN)를 포함하고, 범용 샘플 인덱스 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 다른 고정된 주형 분자는 다른 3-량체 무작위 서열과 동일한 범용 샘플 인덱스 서열을 갖고, 고정된 주형 분자는 서로 다른 삽입 서열을 가짐; **(b)** 서로 다른 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 검출 가능하게 표지된 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 복수의 고정된 주형 분자의 3-량체 무작위 서열과 범용 샘플 인덱스 서열의 제1 염기 위치의 4주기의 중합효소 매개 서열분석 반응을 수행하는 단계, 여기서 뉴클레오타이드 시약은 각각의 서로 다른 유형의 핵염기에 해당하는 서로 다른 검출 가능한 색상 라벨을 포함하며, 4주기의 서열분석에는 고정된 주형 분자에 결합된 검출가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에서 방출된 광학 색상 신호를 검출하고 이미징하여 복수의 고정된 주형 분자의 개별 주형 분자에서 3-량체 무작위 서열과 범용 샘플 인덱스 서열의 제1 염기 위치의 서열을 결정하는 것이 포함되고, A, G, C 및 T/U의 균형 잡힌 핵염기 다양성이 복수의 고정된 주형 분자 중에서 제1, 제2, 제3 및 제4 서

열분석 주기 각각에서 검출되고 이미징됨; 및 **(c)** 단계 (b)에서 획득된 4주기의 중합효소 매개 서열분석 반응 이미지를 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계, 여기서 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않음.

[0426] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 방법에서, 단계 (b)의 균형 다양성은 제1, 제2, 제3 및 제4 서열분석 주기 각각에서 검출 및 이미징된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75% 또는 그들 사이의 임의의 범위이다.

[0427] 일부 실시형태에서, 핵산 서열분석 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 범용 샘플 인덱스 서열의 나머지 염기 위치를 서열분석하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(c)** 단계 (b)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 단계 (a)에서 얻은 동일한 주어진 주형 분자로부터의 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0428] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 방법에서, 복수의 핵산 주형 분자는 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 포함하는 제2 샘플 인덱스를 더 포함하고, 제2 샘플 인덱스는 무작위 서열을 결여한다.

[0429] 일부 실시형태에서, 핵산 서열분석 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 3-량체 무작위 서열과 범용 샘플 인덱스 서열의 제1 염기 위치를 서열분석하여 A, G, C 및 T/U의 핵염기의 균형 잡힌 다양성을 얻고 각각의 제1, 제2, 제3 및 제4 서열분석 주기에서 이를 검출하여 이미지화하여 복수의 고정된 주형 분자의 위치 맵을 생성하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 인덱스 서열의 나머지 염기 위치를 서열분석하는 단계; **(c)** 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(d)** 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(e)** 단계 (c)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 단계 (a) 및 (b)에서 얻은 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0430] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 플로우 셀 채널, 플로우 셀 또는 모세관 내강 상에서 구성된다. 일부 실시형태에서, 지지체는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅에 의해 부통태화된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈) (PVP), 폴리(아크릴산) (PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록실에틸 메타크릴레이트)(PHEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 덱스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분지를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함한다.

[0431] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열과 1개의 샘플 인덱스의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열의 1개의 복제물 및 1개의 샘플 인덱스의 1개의 복제물을 갖는 복수의 상이한 클러스터링된 주형 분자를 포함하되, 클러스터링된 주형 분자는 브리지 증폭을 통해 생성된다. 일부 실시형태에서, 지지체 상의 무작위 또는 사전 결정된 위치에 배치된 고정된 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2당 10^4 내지 10^8 또는 그들 사이의 임의의 범위이다. 일부 실시형태에서, 삽입 서열의 샘플 공급원은 유전체 DNA, 이중 가닥 cDNA 또는 무세포 순환 DNA이다.

[0432] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 사슬 종결기를 갖는 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 각각 포함하는 다가 분자를 포함하되, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이

드 단위에 부착된다.

[0433] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 단계 (b)에서 고정된 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 서열분석 프라이머에 혼성화된 개개 고정된 주형 분자를 포함하여 듀플렉스를 형성하고, 듀플렉스는 중합효소에 결합되어 복합체화된 중합효소를 형성하고, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합된다. 일부 실시형태에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드를 혼성화된 서열분석 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드를 혼성화된 서열분석 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 사슬 종결기를 갖는 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되고, 조건은 뉴클레오타이드 혼입을 저해하는 데 적합하되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 **(1)** 코어, **(2)** 복수의 뉴클레오타이드 아암, 및 **(3)** 적어도 1개의 형광단을 포함하는 다가 분자를 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.

[0434] 일부 실시형태에서, 핵산을 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 복수의 서열분석 프라이머에 혼성화된 고정된 콘카타머 분자를 포함하여 동일한 콘카타머 분자 상에 적어도 제1 및 제2 듀플렉스를 형성하며, 제1 듀플렉스는 제1 중합효소에 결합되고 제2 듀플렉스는 제2 중합효소에 결합되어 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하고, 상기 방법은 **(a)** 복수의 다가 분자를 동일한 콘카타머 주형 분자 상의 제1 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계이며, 여기서 개별 다가 분자는 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하고, 개별 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착되고, 접촉은 복수로부터의 단일 다가 분자를 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건에서 수행되고, 단일 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 혼성화된 제1 서열분석 프라이머를 포함하는 제1 복합체화된 중합효소에 결합되어 제1 결합 복합체를 형성하고, 단일 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 혼성화된 제2 서열분석 프라이머를 포함하는 제2 복합체화된 중합효소에 결합되어 제2 결합 복합체를 형성하고, 동일한 다가 분자에 결합된 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성하고, 접촉은 제1 및 제2 결합 복합체에서 결합된 제1 및 제2 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 억제하는 데 적합한 조건에서 수행됨; **(b)** 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 제1 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계; **(c)** 동일한 콘카타머 주형 분자 상에 제1 및 제2 결합 복합체를 형성하는 검출 가능하게 표지된 다가 분자로부터 방출된 광학 색 신호를 이미징하는 단계; 및 **(d)** 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 결정하고, 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0435] **폴로니 맵을 생성하기 위한 3-량체 무작위 서열의 다중 서열분석**

[0436] 일부 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 핵산의 다중 서열분석 방법을 제공한다: **(a)** 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계, 복수의 각 분자는 (i) 제1 샘플 공급원에서 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제1 범용 샘플 인덱스 서열에 결합된 3-량체 무작위 서열(*예*: 짧은 무작위 서열 NNN)을 갖는 제1 샘플 인덱스 및 (iii) 무작위 서열이 없는 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 갖는 제2 샘플 인덱스를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 범용 샘플 인덱스 서열의 조합은 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 다른 제1 라이브러리 분자는 다른 3-량체 무작위 서열을 갖고 다른 삽입 서열을 가짐; **(b)** 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계, 복수의 각 분자는 (i) 제2 샘플 공급원에서 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제3 범용 샘플 인덱스 서열에 결합된 3-량체 무작위 서열을 갖는 제3 샘플 인덱스 및 (iii) 무작위 서열이 없는 제4 범용 샘플 인덱스 서열을 갖는 제4 샘플 인덱스를 포함하며, 여기서 제3 및 제4 범용 샘플 인덱스 서열의 조합은 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 다른 제2 라이브러리 분자는 다른 3-량체 무작위 서열을 갖고 다른 삽입 서열을 가짐; **(c)**

제1 및 제2 복수의 라이브러리 분자를 풀링하는 단계; **(d)** 풀링된 라이브러리 분자를 지지체 상에 분배하고 증폭 반응을 수행하여 지지체에 고정된(*예를 들어*, 무작위 또는 미리 결정된 위치에 고정된) 복수의 클론증폭 주형 분자를 생성하는 단계; **(e)** 서로 다른 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 검출 가능하게 표지된 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 제1 및 제3 샘플 인덱스의 3-량체 무작위 서열의 3주기의 중합효소 매개 서열분석 반응을 수행하는 단계, 여기서 뉴클레오타이드 시약은 각각의 서로 다른 유형의 핵염기에 해당하는 서로 다른 검출 가능한 색상 라벨을 포함하며, 3주기의 서열분석에는 고정된 증폭 주형 분자에 결합된 검출가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에서 방출된 광학 색상 신호를 검출하고 이미징하여 복수의 고정된 주형 분자의 개별 주형 분자에서 3-량체 무작위 서열의 서열을 결정하는 것이 포함되고, A, G, C 및 T/U의 균형 잡힌 핵염기 다양성이 복수의 고정된 증폭 주형 분자 중에서 제1, 제2 및 제3 서열분석 주기 각각에서 검출되고 이미징됨; 및 **(f)** 단계 (e)에서 획득된 이미지를 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계, 여기서 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않음.

[0437] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 방법에서, 단계 (e)의 균형 다양성은 제1, 제2 및 제3 서열분석 주기 각각에서 검출 및 이미징된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75% 또는 그들 사이의 임의의 범위이다.

[0438] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하는 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(c)** 제1 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(d)** 단계 (c)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0439] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하는 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 제3 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 제4 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(c)** 제2 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(d)** 단계 (c)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제3 및 제4 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0440] 일부 양태에서, 본 개시내용은 다음을 포함하는 핵산의 다중 서열분석 방법을 제공한다: **(a)** 제1 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계, 복수의 각 분자는 (i) 제1 샘플 공급원에서 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제1 범용 샘플 인덱스 서열에 결합된 3-량체 무작위 서열(*예*: 짧은 무작위 서열 NNN)을 갖는 제1 샘플 인덱스 및 (iii) 무작위 서열이 없는 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 갖는 제2 샘플 인덱스를 포함하며, 여기서 제1 및 제2 범용 샘플 인덱스 서열의 조합은 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 제1 범용 샘플 인덱스 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타드(*예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드)를 포함하고, 다른 제1 라이브러리 분자는 다른 3-량체 무작위 서열을 갖고 다른 삽입 서열을 가짐; **(b)** 제2 복수의 라이브러리 분자를 제공하는 단계, 복수의 각 분자는 (i) 제2 샘플 공급원에서 유래된 삽입 서열 영역, (ii) 제3 범용 샘플 인덱스 서열에 결합된 3-량체 무작위 서열을 갖는 제3 샘플 인덱스 및 (iii) 무작위 서열이 없는 제4 범용 샘플 인덱스 서열을 갖는 제4 샘플 인덱스를 포함하며, 여기서 제3 및 제4 범용 샘플 인덱스 서열의 조합은 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 고유하게 식별하고, 제3의 범용 샘플 인덱스 서열은 3 내지 20개의 뉴클레오타이드(*예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드)를 포함하고, 다른 제2 라이브러리 분자는 다른 3-량체 무작위 서열을 갖고 다른 삽입 서열을 가짐; **(c)** 제1 및 제2 복수의 라이브러리 분자를 풀링하는 단계; **(d)** 풀링된 라이브러리 분자를 지지체 상에 분배하고 증폭 반응을 수행하여 지지체에 고정된(*예를 들어*, 무작위 또는 미리 결정된 위치에 고정된) 복수의 클론증폭 주형 분자를 생성하는 단계; **(e)** 서로 다른 유형의 핵염기 A, G, C 및 T/U의 혼합물을 포함하는 검출 가능하게 표지된 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 제1 및 제3 샘플 인덱스의 3-량체 무작위 서열에 대한 중합효소 매개 서열분석 반응의 4주기를 수행하고 제1 및 제3 범용 샘플 인덱스 서열의 제1 염기 위치를 서열분석하는 단계, 여기서 뉴클레오타이드 시약은 각각의 서로 다른 유형의 핵염기에 해당하는 서로 다른 검출 가능한 색상 라벨을 포함하며, 3주기의 서열분석에는 고정된 증폭 주형 분자에 결합된 검출가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에서 방출된 광학 색상 신호를 검출하고 이미징하여 복수의 고정된 주형 분자의 개별 주형 분자에서 3-량체 무작위 서열을 결정하는 것이 포함되고, A, G, C 및 T/U의 균형 잡힌 핵염기 다양성이 복수의 고정된 증폭 주형 분자 중에서 제1, 제2, 제3 및 제4 서열분석 주기 각각에서 검출되고 이미징됨; 및 **(f)** 단계 (e)에서 획득된 이미지를 사용하여 복수의 고정된 주형 분자 위치의 맵을 생성하는 단계, 여기서 삽입 영역의 서열은 맵을 생성하는 데 사용되지 않음.

[0441] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 방법에서, 단계 (e)의 균형 다양성은 제1, 제2, 제3 및 제4 서열분석 주기 각각에서 검출 및 이미징된 핵염기 A, G, C 및 T/U 각각의 약 5 내지 85%, 또는 약 5 내지 60%, 또는 약 10 내지 50%, 또는 약 15 내지 55%, 또는 약 25 내지 75% 또는 그들 사이의 임의의 범위이다.

[0442] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하는 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 제1 범용 샘플 인덱스 서열의 나머지 염기 위치를 서열분석하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 제2 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(c)** 제1 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(d)** 단계 (c)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제1 및 제2 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 제1 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0443] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하는 방법에서, 방법은 **(a)** 복수의 고정된 주형 분자의 제3 범용 샘플 인덱스 서열의 나머지 염기 위치를 서열분석하는 단계; **(b)** 복수의 고정된 주형 분자의 제4 범용 샘플 인덱스 서열을 서열분석하는 단계; **(c)** 제2 라이브러리 분자로부터 유래된 복수의 고정된 주형 분자의 삽입 서열 영역을 서열분석하는 단계; 및 **(d)** 단계 (c)에서 얻은 주어진 주형 분자의 삽입 서열을 동일한 주어진 주형 분자로부터의 제3 및 제4 범용 샘플 인덱스 서열과 할당하여 주어진 삽입 서열의 제2 샘플 공급원을 식별하는 단계를 더 포함한다.

[0444] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 지지체는 유리 또는 플라스틱 기재를 포함한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 플로우 셀 채널, 플로우 셀 또는 모세관 내강 상에서 구성된다. 일부 실시형태에서, 지지체는 45도 이하의 물 접촉각을 갖는 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅에 의해 부통태화된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅은 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리(비닐 피리딘), 폴리(비닐 피롤리돈) (PVP), 폴리(아크릴산) (PAA), 폴리아크릴아마이드, 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드)(PNIPAM), 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMA), 폴리(2-하이드록실에틸 메타크릴레이트)(PHEMA), 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트)(POEGMA), 폴리글루탐산(PGA), 폴리-라이신, 폴리-글루코사이드, 스트렙타비딘 및 덱스트란으로 이루어진 군으로부터 선택된 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅은 적어도 4개의 분지를 갖는 분지된 친수성 중합체 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 친수성 중합체 코팅은 적어도 1000 달톤의 분자량을 갖는 중합체 분자를 포함한다.

[0445] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열과 1개의 샘플 인덱스의 탠덤 반복 서열을 갖는 복수의 고정된 콘카타머 분자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 고정된 주형 분자는 삽입 서열의 1개의 복제물 및 1개의 샘플 인덱스의 1개의 복제물을 갖는 복수의 상이한 클러스터링된 주형 분자를 포함하되, 클러스터링된 주형 분자는 브리지 증폭을 통해 생성된다. 일부 실시형태에서, 지지체 상의 (*예를 들어*, 무작위 또는 사전 결정된 위치에 고정된) 고정된 핵산 주형 분자의 밀도는 mm^2당 10^4 내지 10^8이다. 일부 실시형태에서, 삽입 서열의 샘플 공급원은 유전체 DNA, 이중 가닥 cDNA 또는 무세포 순환 DNA이다.

[0446] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 사슬 종결기를 갖는 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 각각 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 **(1)** 코어, **(2)** 복수의 뉴클레오타이드 아암 및 **(3)** 적어도 1개의 형광단을 각각 포함하는 다가 분자를 포함하되, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.

[0447] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 단계 (e)에서 고정된 주형 분자에 결합된 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 서열분석 프라이머에 혼성화된 개개 고정된 주형 분자를 포함하여 듀플렉스를 형성하고, 듀플렉스는 중합효소에 결합되어 복합체화된 중합효소를 형성하고, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합된다. 일부 실시형태에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드를 혼성화된 서열분석 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이

드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합하고 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드를 혼성화된 서열분석 프라이머에 혼입하기 위한 적합한 조건에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 방향족 핵염기, 3' 탄소 당 위치에서 사슬 종결기를 갖는 오탄당 모이어티, 1 내지 10개의 포스페이트기 및 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복합체화된 중합효소는 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약을 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건에서 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약에 결합되고, 조건은 뉴클레오타이드 혼입을 저해하는 데 적합하되, 검출 가능하게 표지된 뉴클레오타이드 시약은 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암, 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하는 다가 분자를 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되며, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다.

[0448] 일부 실시형태에서, 핵산을 다중 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 고정된 주형 분자는 복수의 서열분석 프라이머에 혼성화된 고정된 콘카타머 분자를 포함하여 동일한 콘카타머 분자 상에 적어도 제1 및 제2 듀플렉스를 형성하며, 제1 듀플렉스는 제1 중합효소에 결합되고, 제2 듀플렉스는 제2 중합효소에 결합되어 제1 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하고, 여기서 이 방법은 다음 단계를 포함한다: **(a)** 복수의 다가 분자를 동일한 콘카타머 주형 분자 상의 제1 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계이며, 여기서 개별 다가 분자는 (1) 코어, (2) 복수의 뉴클레오타이드 아암 및 (3) 적어도 1개의 형광단을 포함하고, 개별 뉴클레오타이드 아암은 (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착되며, 접촉은 복수의 단일 다가 분자를 제1 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합하는 데 적합한 조건에서 수행되고, 단일 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 혼성화된 제1 서열분석 프라이머를 포함하는 제1 복합체화된 중합효소에 결합되어 제1 결합 복합체를 형성하고, 단일 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 혼성화된 제2 서열분석 프라이머를 포함하는 제2 복합체화된 중합효소에 결합되어 제2 결합 복합체를 형성하고, 동일한 다가 분자에 결합된 제1 및 제2 결합 복합체는 결합활성 복합체를 형성하고, 접촉은 제1 및 제2 결합 복합체에서 결합된 제1 및 제2 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매된 혼입을 억제하는 데 적합한 조건에서 수행됨; **(b)** 동일한 콘카타머 주형 분자 상에서 제1 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계; **(c)** 동일한 콘카타머 주형 분자 상에 제1 및 제2 결합 복합체를 형성하는 검출 가능하게 표지된 다가 분자로부터 방출된 광학 색 신호를 이미징하는 단계; 및 **(d)** 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 결정하고, 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 단위를 식별하여 콘카타머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 결정하는 단계를 포함한다.

[0449] **라이브러리 분자**

[0450] 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 핵산 라이브러리 분자(100), 라이브러리-스플린트 복합체(500) 및 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600) 및 이들을 제조하는 방법을 제공한다. 핵산 라이브러리 분자는 DNA, RNA, cDNA 또는 키메라 DNA/RNA를 포함한다. 핵산 라이브러리 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 단일 가닥 또는 이중 가닥 부분을 포함할 수 있다. 핵산 라이브러리 분자는 선형, 콘카타머, 공유결합 폐환형, 덤벨, 헤어핀 또는 다른 형태일 수 있다.

[0451] 본 명세서에 기재된 핵산 라이브러리 분자는 전형적으로 적어도 하나의 범용 어댑터 서열(*예를 들어*, (120) 및 (130))에 공유적으로 결합된 관심 서열(*예를 들어*, 삽입(100))을 각각 포함하는 핵산 분자의 집단을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 집단 내의 개별 라이브러리 분자는 추가적인 범용 어댑터 서열, 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 추가로 포함하거나 결여한다. 집단에서 개개 라이브러리 분자는 집단의 다른 라이브러리 분자와 동일 또는 상이한 관심 서열을 가질 수 있다.

[0452] 일부 실시형태에서, 핵산 라이브러리 분자의 삽입 영역은 생물학적 샘플(*예를 들어*, 신선한 샘플 또는 살아있는 샘플), 예컨대, 단일 세포, 복수의 세포 또는 조직을 포함하는 임의의 공급원으로부터 추출된 관심 서열을 포함한다. 삽입 영역은 건강한 또는 질환 세포 또는 조직으로부터 단리될 수 있다. 삽입 영역은 신선 동결 파라핀 포매(FFPE) 샘플과 같은 보관 샘플로부터, 또는 바늘 생검, 순환 종양 세포, 무세포 순환 DNA로부터(*예를 들어*, 종양 세포 또는 태아로부터) 얻을 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포 또는 조직은 이들의 DNA 및 RNA를 방출하기 위해 용해 완충제로 처리되고, 목적하는 핵산은 단백질과 같은 목적하지 않는 거대 분자로부터 분리된다.

[0453] 핵산 라이브러리 분자의 삽입 영역은 염색체, 유전체(*예를 들어*, 전체 유전체), 세포소기관 (*예를 들어*, 미토콘

드리아, 엽록체 또는 리보솜), 재조합 분자, 클로닝 또는 증폭을 포함하는 임의의 형태로 단리될 수 있다. 핵산 라이브러리 분자의 삽입 영역은 메틸화 또는 비메틸화될 수 있다.

[0454] 삽입 영역은 바이러스, 진균, 원핵생물 또는 진핵생물을 포함하는 임의의 유기체로부터 단리될 수 있다. 삽입 영역은 인간, 시미안, 유인원, 개, 고양이, 소, 말, 뮤린, 돼지, 염소, 이리, 두꺼비, 물고기, 식물, 곤충 또는 박테리아를 포함하는 임의의 유기체로부터 단리될 수 있다. 삽입 영역은 공기, 물, 토양 또는 식품에 보유된 유기체로부터 단리될 수 있다.

[0455] 삽입 영역은 혈액, 소변, 혈청, 림프, 종양, 타액, 항문 분비물, 질 분비물, 양막 샘플, 땀, 정액, 환경 샘플 또는 배양 샘플을 포함하는 임의의 생물학적 유체로부터 단리될 수 있다. 삽입 영역은 두부, 경부, 뇌, 유방, 난소, 자궁경부, 결장, 직장, 자궁내막, 담낭, 장, 방광, 전립선, 고환, 간, 폐, 신장, 식도, 췌장, 갑상선, 뇌하수체, 흉선, 피부, 심장, 후두 또는 다른 기관을 포함하는 임의의 기관으로부터 단리될 수 있다.

[0456] 삽입 영역은 벡터 클로닝, 유전자이식 숙주 세포 제조, 숙주 세포 배양 및/또는 PCR 증폭의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 재조합 핵산 기술을 이용해서 제조될 수 있다.

[0457] 삽입 영역은 적어도 하나의 범용 어댑터 서열에 대해 하나의 단부 또는 양 단부에 현수되어 재조합 핵산 라이브러리 분자를 형성할 수 있다. 범용 어댑터 서열은 효소 분해에 대한 저항성, 또는 증가된 열 안정성을 포함하는 특정 특성을 부여하는 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 뉴클레오타이드 결합 유무와 상관없이 천연 뉴클레오타이드를 이용하여 화학 합성 절차를 사용해서 제조될 수 있다. 뉴클레아제 분해를 저해하는 뉴클레오타이드 유사체 및 변형된 뉴클레오타이드 결합의 예는 포스포로티오에이트, 2'-O-메틸 RNA, 역위 dT 및 2' 3' 다이데옥시-dT를 포함한다. 잠금 핵산(LNA)을 포함하는 삽입 영역은 증가된 열 안정성을 갖는다.

[0458] 삽입 영역은 단편화 또는 비단편화 형태일 수 있다. 단편화된 삽입 영역은 기계력 또는 효소 또는 화학적 단편화 방법에 의해 얻을 수 있다. 단편화된 삽입 영역은 중복 서열 또는 비중복 서열을 갖는 단편 집단을 수득하는 절차를 이용해서 생성될 수 있다.

[0459] 기계적 단편화는 전형적으로 무작위 단편화된 핵산 분자를 생성한다. 기계적 파편화 방법에는 예를 들어 유체 전단, 일정 전단 및 맥동 전단과 같은 기계적 전단이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 기계적 단편화 방법은 또한 음파처리, 분무화 및 음향 공동현상을 포함하는 기계적 응력을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 집중된 음향 에너지는 핵산 분자를 무작위로 단편화하는 데 사용될 수 있다. 집중된 음향 에너지를 사용하여 핵산 분자를 단편화하는 데 시판 장치(*예*: Covaris™)를 사용할 수 있다.

[0460] 효소 단편화 절차는 무작위 또는 비무작위로 단편화된 핵산 분자를 생성하기에 적합한 조건하에 수행될 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한없이, 비무작위로 단편화된 핵산 분자를 생성하기 위해 제한 엔도뉴클레아제 효소 분해가 완료까지 수행될 수 있다. 또는, 무작위 단편화된 핵산 분자를 생성하기 위해 부분적 또는 불완전한 제한효소 분해가 수행될 수 있다. 제한효소를 이용하는 효소 단편화는 I형, II형, IIs형, IIB형, III형 또는 IV형 제한효소로 이루어진 군으로부터 선택된 2종 이상의 제한 엔도뉴클레아제 효소 중 어느 하나 또는 임의의 조합을 포함할 수 있다. 효소적 단편화에는 Not I, Asc I, Bae I, AspC I, Pac I, Fse I, Sap I, Sfi I 또는 Psr I을 포함하는 희귀-절단 제한 효소를 사용한 핵산의 소화가 포함될 수 있다. 효소적 단편화에는 틈내기 제한 효소, 엔도뉴클레아제 및/또는 엑소뉴클레아제를 임의로 조합하여 사용하는 것이 포함될 수 있다. 효소 단편화는 틈 번역 반응을 수행함으로써 달성될 수 있다.

[0461] 일부 실시형태에서, 효소적 단편화는 핵산을 효소 혼합물, 예를 들어 단일 가닥 틈을 생성하는 효소 및 이중 가닥 절단을 촉매하는 다른 효소와 반응시킴으로써 달성될 수 있다. 예시적인 효소 혼합물은 FRAGMENTASE™(*예*: New England Biolabs™의)이다.

[0462] 삽입 영역의 단편은 알려진 단편 길이 및 서열을 갖는 삽입 영역을 생성하기 위해 입력 DNA 샘플에서 표적 영역에 혼성화되는 서열-특이적 프라이머를 이용해서 PCR에 의해 생성될 수 있다.

[0463] CRISPR/Cas9를 사용한 표적 단편화 방법은 유전체 DNA 또는 기타 입력 DNA 공급원으로부터 단편화된 삽입 영역을 생성하는 데 사용될 수 있다.

[0464] 삽입 부분의 단편은 또한 NEXTERA™(Epicentre™의)를 이용하는 트랜스포사제-기반 태그화를 이용해서 생성될 수 있다.

[0465] 일부 실시형태에서, 입력 DNA는 트랜스포사제 효소에 결합하여 DNA-트랜스포사제 복합체(*예를 들어* 트랜스포소솜)를 형성할 수 있는 서열을 갖는 이중 가닥 DNA를 포함하는 트랜스포존 말단 서열을 사용하는 Tn5 트랜스포사

제 기반 작업흐름을 사용하여 단편화될 수 있다. 여기서 복합체는 *시험관 내* 태그화 반응에서 트랜스포존 말단 서열을 DNA로 전치/삽입할 수 있다. 트랜스포존 말단 서열은 제1 및 제2 DNA 가닥을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 DNA 가닥은 19개의 염기 전달 말단 서열 5'AGATGTGTATAAGAGACAG 3'(서열 번호:3)을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 제2 DNA 가닥은 5' 말단에서 인산화될 수 있는 19개 염기 비-전달 말단 서열 5' CTGTCTCTTATACACATCT 3'(서열 번호:6)을 포함한다.

[0466] Tn5 트랜스포사제 기반 작업흐름(*예*: 태그화 작업흐름)을 사용하여 입력 DNA를 단편화하고 어댑터를 추가하는것이 바람직한 경우, 제1 트랜스포존 DNA 가닥은 어댑터 서열의 제1 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제2 트랜스포존 DNA 가닥은 어댑터 서열의 제2 가닥을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 어댑터 서열은 그 길이를 따라 완전히 상보적이어서 선형 이중 가닥 트랜스포존-말단-어댑터 분자를 형성한다(**도 11**). 일부 실시형태에서, **도 11**에 도시된 바와 같이, 트랜스포존 말단 서열은 트랜스포사제에 특이적으로 결합한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 어댑터 서열은 그 길이를 따라 부분적으로 상보적이어서 Y자형 이중 가닥 트랜스포존-말단-어댑터 분자를 형성한다(**도 12**). Y자형 어댑터 내에서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 트랜스포존 말단 서열과 범용 어댑터 서열을 포함할 수 있고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 트랜스포존 말단 서열과 범용 어댑터 서열을 포함할 수 있다. 트랜스포존 말단 서열은 트랜스포사제에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, Y자형 이중 가닥 트랜스포존-말단-어댑터 분자는 전장 또는 뭉툭한 Y자형 어댑터일 수 있다.

[0467] 일부 실시형태에서, 복수의 Tn5 트랜스포사제 및 복수의 이중 가닥 트랜스포존 말단 어댑터 분자는 이중 가닥 트랜스포존 말단 어댑터 분자를 트랜스포사제 효소 상에 결합/적재하기에 적합한 조건에서 함께 혼합되어 복수의 DNA-트랜스포사제 복합체(*예*: 트랜스포소솜)(*예*: **도 11**과 **도 12**).

[0468] 일부 실시형태에서, 입력 DNA(*예*: 이중 가닥 DNA)는 트랜스포존 말단 서열을 입력 DNA의 무작위 부위로 전치/삽입하기에 적합한 조건에서 복수의 트랜스포소솜과 혼합될 수 있으며, 이는 입력 DNA를 단편화하고 전이된 말단 서열을 입력 DNA의 한 가닥의 5' 말단에 공유 결합하고, 전이되지 않은 말단 서열은 상보적 입력 DNA 가닥의 3' 말단에 갭(*예*: 9개 염기 갭)을 두고 전이된 말단 서열에 혼성화된다. 갭은 중합효소-촉매 충전 반응 및 효소 결찰을 거쳐 갭이 없고 양 말단에 어댑터를 보유하는 태그가 부착된 이중 가닥 DNA를 생성할 수 있다(**도** 17). 트랜스포존 말단 서열은 트랜스포사제에 특이적으로 결합할 수 있다. 입력 DNA와 복수의 트랜스포소솜을 접촉시키는 것은 트랜스포존 말단 서열과 이들의 범용 어댑터 서열을 입력 DNA의 무작위 부위에 삽입하는 데 적합할 수 있으며, 이를 통해 제1 단편 가닥의 한쪽 끝에 공유 결합된 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열과 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 결합된 범용 어댑터 서열에 어닐링된 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열 및 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열과 제2 단편 가닥 사이에 갭(열린 삼각형)을 갖는 입력 DNA의 이중 가닥 단편을 생성한다. 트랜스포손 말단 서열의 삽입은 또한 제2 단편 가닥의 한쪽 끝에 공유 결합된 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열과 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 결합된 범용 어댑터 서열에 어닐링된 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열과 제1 단편 가닥 사이에 갭(열린 삼각형)을 갖는 입력 DNA의 이중 가닥 단편을 생성한다. 갭은 중합효소-촉매 충전 반응 및 효소적 결찰을 수행하여 닫을 수 있으며, 이는 각각 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 한 쪽에 측접된 삽입 영역(110)(*예*: 관심 서열)을 포함하는 제1 및 제2 DNA 가닥을 포함하는 이중 가닥 DNA 라이브러리 분자를 생성하며, 삽입 영역(110)은 반대 쪽에 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열에 의해 다른 쪽에 측접한다.

[0469] 트랜스포사제 기반 태그화 작업흐름은 미국 특허 제10,184,122호, 제10,287,574호, 제11,028,438호 및 공개된 미국 출원 번호 제2019/0194737호에 설명된 방법 중 하나를 사용하여 수행할 수 있으며, 이러한 모든 문서의 내용은 그 전체가 인용방식에 의해 원용된다.

[0470] 일부 실시형태에서, 삽입 영역은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 실시형태에서, 위에서 설명한 단편화 방법 중 임의의 방법을 사용하여 한쪽 또는 양쪽 말단이 무딘 말단이거나, 5' 오버행 말단을 갖거나, 3' 오버행 말단을 갖거나, 이들의 조합을 갖는 DNA 단편을 생성할 수 있다.

[0471] 일부 실시형태에서, 단편화된 핵산은 말단 복구 및/또는 A-꼬리화를 위한 효소 반응을 거칠 수 있다. 단편화된 핵산의 말단 중 하나 또는 둘 다는 말단의 전달효소 반응을 사용함으로써 비-주형 A 꼬리를 생성하는 효소 꼬리화 반응을 거칠 수 있다. 단편화된 핵산은 무딘 말단의 5' 인산화 말단을 갖는 핵산 단편을 생성하는 데 적합한

조건에서 복수의 효소와 접촉될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 효소는 3' 말단에 비-주형 A-꼬리를 갖는 무딘-말단 단편을 생성한다. 복수의 효소는 핵산 말단-복구, 인산화 및/또는 A-꼬리화를 촉매할 수 있는 2종 이상의 효소를 포함한다. 말단-복구 효소는 DNA 중합효소(*예를 들어*, T4 DNA 중합효소) 및 클레노브 단편(Klenow fragment)을 포함한다. 5' 말단 인산화 효소는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제를 포함할 수 있다. A-꼬리화 효소는 Taq 중합효소(*예를 들어*, 비-교정(non-proof-reading) 중합효소) 및 dATP를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 단편화, 단부-수선, 인산화 및 A-꼬리화는 효소 혼합물을 사용하여 원-포트 반응으로 수행될 수 있다. 단편화된 핵산의 말단은 적어도 하나의 어댑터에 결합하기에 적합할 수 있다.

[0472] 삽입 영역은 임의의 길이일 수 있고, 예를 들어, 삽입 영역은 길이가 약 50 내지 250, 또는 약 250 내지 500, 또는 약 500 내지 750, 또는 약 750 내지 1000개의 염기, 또는 이들 사이의 임의의 범위 또는 염기쌍일 수 있다.

[0473] 삽입 영역을 포함하는 단편에 크기 선택 공정을 가할 수 있거나, 단편은 선택되지 않는다. 예를 들어, 단편은 겔 전기영동 및 겔 슬라이스 추출에 의해 선택된 크기일 수 있다. 단편은 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리알킬렌 글리콜 유무와 상관없이 특정 이온 강도 조건에서 핵산과 상호작용하는 화학적 작용기로 코팅된 마이크로 상자성 비드를 전형적으로 사용하는 고체상 접착/고정 방법을 사용하여 선택된 크기일 수 있다. 시판 고체상 접착 비드에는 Beckman Coulter™의 SPRI™(Solid Phase Reversible Immobilization) 비드(AMPUR XP™ 상자성 비드, 카탈로그 번호 B23318), MAGNA PURE™ 자성 유리 입자(Roche Diagnostics™, 카탈로그 번호 03003990001), Promega™의 MAGNASIL™ 상자성 비드(카탈로그 번호 MD1360), Precision System Science의 MAGTRATION™ 상자성 비드 및 시스템(카탈로그 번호 A1120 및 A1060), Omega Bio-Tek™의 MAG-BIND™(카탈로그 번호 M1378-01), Millipore™의 MAGPREP™ 실리카(카탈로그 번호 101193), Bangs Laboratories의 SNARE DNA 정제 시스템(카탈로그 번호 BP691, BP692 및 BP693), Perkin Elmer™의 CHEMAGEN M-PVA™ 비드 (카탈로그 번호 CMG-200)이 포함된다.

[0474] **단편화된 핵산에 어댑터 추가**

[0475] 일부 양태에서, 본 개시내용은 단편화된 핵산에 하나 이상의 어댑터 서열을 추가하는 데 사용되는 시약, 키트 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 개별 단편화된 핵산은 라이브러리 준비를 위한 적어도 하나의 범용 어댑터 서열에 공유 결합될 것이다. 일반적으로, 핵산 단편은 양쪽 말단에서 하나 이상의 범용 어댑터에 공유 결합되어 왼쪽 어댑터-삽입-오른쪽 어댑터 배열을 갖는 선형 라이브러리 분자를 생성한다. 일부 실시형태에서, 단편화된 핵산 집단 중 적어도 하나의 단편은 관심 서열을 포함한다. 라이브러리 분자 집단 내의 개별 라이브러리 분자는 집단 내의 다른 라이브러리 분자와 동일하거나 다른 삽입 영역을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 약 1 내지 10 ng, 또는 약 10 내지 50 ng, 또는 약 50 내지 100 ng, 또는 이들 사이의 임의의 범위의 입력 단편화된 핵산을 하나 이상의 범용 어댑터에 추가하여 선형 라이브러리를 생성할 수 있다.

[0476] 일부 실시형태에서, 어댑터는 표적 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 결찰(추가)될 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 어댑터는 함께 결합된 어댑터-표적 분자에 기능을 부여한다. 어댑터는 DNA, RNA, 키메라 DNA/RNA 또는 이들의 유사체를 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 1개의 리보뉴클레오사이드 잔기를 포함할 수 있다. 어댑터는 단일 가닥, 이중 가닥일 수 있거나, 또는 단일 가닥 및/또는 이중 가닥 부분을 가질 수 있다. 어댑터는 선형(*예*: **도 8**과 **도 9**), 스템 루프형, 헤어핀형 또는 Y자형(*예*: **도 10**)으로 구성될 수 있다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터(*예*: **도 10**에 도시된 바와 같음) 중 하나는 샘플 인덱스 서열과 선택적 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)가 하나 또는 두 개의 불일치 부분(들)을 또한 포함한다. 어댑터는 4 내지 100개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 길이일 수 있다. 어댑터는 평활 말단, 돌출부 말단, 또는 둘 다의 조합을 가질 수 있다. 오버행 말단에는 5' 오버행과 3' 오버행 말단이 포함된다. 단일 가닥 어댑터의 5' 말단, 또는 이중 가닥 어댑터 중 1개의 가닥은 5' 포스페이트기를 갖거나 5' 포스페이트기를 결여할 수 있다. 어댑터는 표적 폴리뉴클레오타이드(*예를 들어*, 꼬리가 달린 어댑터)에 혼성화되지 않는 5' 꼬리를 포함할 수 있거나, 어댑터는 꼬리가 없을 수 있다. 어댑터의 적어도 일부는 알려진 서열 및 사전 결정된 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 증폭 프라이머 결합 부위, 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위, 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위, 표면 포획 프라이머 결합 부위 및/또는 표면 고정 프라이머 결합 부위의 적어도 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 다중 분석에서 폴리뉴클레오타이드(*예*: 삽입 서열)를 상이한 샘플 공급원과 구별하기 위해 사용될 수 있는 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 무작위 서열 또는 축퇴 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 1개의 이노신 잔기를 포함할 수 있다. 어댑터는 어댑터가 첨부된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있는 적어도 하나의 고유 분자 인덱스(*예*: UMI, 분자 태그)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 고유 식별 서열은 알려진 서열을 갖는 2 내지 12개 이상의 뉴클레오타이드를 포함한다. 예를 들

어, 그리고 제한 없이, 고유 식별 서열은 각 위치의 뉴클레오타이드가 염기 A, G, C, T 또는 U를 갖는 뉴클레오타이드에서 무작위로 선택된 알려진 무작위 서열을 포함한다. 어댑터는 유형 I, 유형 II, 유형 III, 유형 IV, 유형 Hs 또는 유형 IIB로 구성된 군에서 선택된 하나 또는 두 개 이상의 임의의 조합을 포함하여 적어도 하나의 제한 효소 인식 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 1개의 포스포로티오에이트, 포스포로티올에이트 및/또는 포스포르아미데이트 연결을 포함할 수 있다.

[0477] 일부 실시형태에서, 어댑터는 폴리뉴클레오타이드 분자 집단 내의 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 분자들 사이에 공통인 핵산 분자 내의 서열인 범용 서열을 포함한다. 예를 들어, 그리고 제한 없이, 공동 결합된 분자의 집단이 동일한 범용 어댑터 서열을 지니도록 범용 서열을 갖는 어댑터는 복수의 폴리뉴클레오타이드에 기능적으로 결합될 수 있다. 범용 어댑터 서열의 예에는 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위, 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위 및 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위가 포함되지만 이에 국한되지는 않는다.

[0478] 일부 실시형태에서, 어댑터는 적어도 하나의 샘플 인덱스 서열을 포함한다. 샘플 인덱스는 다양한 공급원에서 분리된 입력 핵산을 사용하여 별도의 샘플-인덱싱된 선형 라이브러리를 준비하는 데 사용될 수 있다. 샘플-인덱싱된 라이브러리는 함께 풀링되어 다중 라이브러리 혼합물을 생성할 수 있고, 풀링된 라이브러리는 원형화, 증폭 및/또는 서열분석될 수 있다. 삽입 영역(110)의 서열과 하나 이상의 샘플 인덱스 서열은 입력 핵산의 공급원을 식별하는 데 사용될 수 있다. 샘플 인덱스 서열은 다중 분석에서 상이한 샘플 공급원으로부터 얻은 관심 서열을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 3 내지 10개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스는 샘플 인덱스 서열의 업스트림 또는 다운스트림에 위치할 수 있는 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)을 포함한다. 예시적인 샘플 인덱스는 위의 **표 3**에 열거되어 있다. 일부 실시형태에서, 다수의 샘플-인덱싱된 라이브러리는 함께 풀링될 수 있고, 예를 들어, 2 내지 10, 또는 10 내지 50, 또는 50 내지 100, 또는 100 내지 200, 이들 사이의 임의의 범위 또는 200개가 넘는 샘플-인덱싱된 라이브러리가 함께 풀링될 수 있다. 예시적인 핵산 공급원은 자연-발생적, 재조합 또는 화학적으로 합성된 공급원을 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 단일 세포, 복수의 세포, 조직, 생물학적 유체, 환경 샘플 또는 전체 유기체를 포함한다. 예시적인 핵산 공급원은 신선한, 냉동된, 신선 냉동된 또는 보관된(archived) 공급원(*예*: 포말린-고정 파라핀-포매; FFPE)을 포함한다. 당업자는 핵산이 다수의 다른 공급원으로부터 단리될 수 있다는 것을 인식할 것이다. 샘플-인덱싱된 선형 라이브러리 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 제조될 수 있다.

[0479] 일부 실시형태에서, 어댑터는 효소 분해에 대한 저항성, 또는 증가된 열 안정성을 포함하는 특정 특성을 부여하는 뉴클레오타이드 유사체 또는 변형된 뉴클레오타이드 결합 유무와 상관없이 천연 뉴클레오타이드를 이용하여 화학 합성 절차를 사용해서 제조될 수 있다. 뉴클레아제 분해를 저해하는 뉴클레오타이드 유사체 및 변형된 뉴클레오타이드 결합의 예는 포스포로티오에이트, 2'-O-메틸 RNA, 역위 dT 및 2' 3' 다이데옥시-dT를 포함한다. 잠금 핵산(LNA)을 포함하는 삽입 영역은 증가된 열 안정성을 갖는다.

[0480] 일부 실시형태에서, 어댑터는 함께 혼성화된 2개의 올리고뉴클레오타이드 가닥을 갖는 이중 가닥 선형 어댑터를 포함한다(*예*: **도 8**과 **도 9**). 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한쪽 또는 양쪽 말단은 무딘 말단, 5' 오버행 말단 또는 3' 오버행 말단을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한쪽 또는 양쪽 말단은 핵산 단편 상의 오버행 말단에 상보적인 적어도 하나의 염기 오버행(*예*: A-염기 오버행)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한쪽 또는 양쪽 말단은 인산화되거나 인산화되지 않은 말단 5' 말단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한쪽 또는 양쪽 말단은 중합효소 촉매 프라이머 연장 반응으로 연장될 수 있는 말단 3' 말단을 포함하거나, 말단 3' 말단은 차단되어 연장할 수 없다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한 가닥 또는 두 가닥 모두 5' 및/또는 3' 말단에 하나 이상의 인산티오에이트 결합을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한 가닥 또는 두 가닥 모두 내부 위치에 하나 이상의 인산로티오에이트 결합을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터의 한 가닥 또는 두 가닥 모두는 5' 및/또는 3' 말단 또는 내부 위치에 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0481] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터는 적어도 하나의 어댑터 서열을 포함한다. 예를 들어, 이중 가닥 선형 어댑터는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다(*예*: **도 8**). 일부 실시형태에서, 이중 가닥 핵산 어댑터(*예*: **도 8**에 도시된 바와 같음) 중 어느 것도 샘플 인덱스 서열과 선택적인 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)(*예*: **도 9**)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 핵산 어댑터(*예*: **도 9**에 도시된 바와 같음) 중 어느 것도 샘플 인덱스

서열과 선택적인 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터는 샘플 인덱스 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터에는 핵산 단편에 추가될 추가 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터에는 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위 및/또는 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터에는 샘플 인덱스에 대한 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 선형 어댑터에는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열에 대한 서열이 결여된다.

[0482] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 이중 가닥 선형 어댑터는 위 **표 1**에 열거된 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120) 또는 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)를 포함하거나, 위 **표 1**에 열거된 서열과 상보적이다. 일부 실시형태에서, **표 1**에 열거된 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120) 또는 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130) 중 어느 것이든 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0483] 일부 실시형태에서, 어댑터는 두 개의 올리고뉴클레오타이드 가닥을 갖는 Y자형 어댑터를 포함하며, 이 두 가닥은 함께 혼성화되어 이중 가닥 어닐링 영역과 불일치 영역을 형성한다(*예*: **도 10**). 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 어닐링된 부분은 무딘 말단, 5' 오버행 말단 또는 3' 오버행 말단을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 어닐링된 부분은 핵산 단편 상의 오버행 말단에 상보적인 적어도 하나의 염기 오버행(*예*: A-염기 오버행)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 어닐링된 부분은 인산화되거나 비인산화된 말단 5' 말단을 포함한다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 어닐링된 부분은 중합효소 촉매 프라이머 연장 반응으로 연장될 수 있는 말단 3' 말단을 포함하거나, 말단 3' 말단은 차단되어 연장할 수 없다. 일부 실시형태에서, 어닐링된 부분 및/또는 불일치 부분은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 결찰을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 어닐링된 부분 및/또는 불일치 부분은 내부 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 결찰을 포함하여 엔도뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 어닐링된 부분 및/또는 불일치 부분은 5' 및/또는 3' 말단에서 또는 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸시토신 염기를 포함한다.

[0484] 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 어닐링된 부분 및/또는 불일치 부분은 적어도 하나의 어댑터 서열을 포함한다. 예를 들어, Y자형 어댑터의 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다. **도 10**은 예시적인 Y자형 어댑터를 도시한다.

[0485] 일부 실시형태에서, 복수의 Y자형 어댑터는 적어도 제1 및 제2 Y자형 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수의 Y자형 어댑터는 동일하고, 동일한 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥을 갖는다. 일부 실시형태에서, 복수의 Y자형 어댑터는 상이하고, 상이한 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥을 갖는다.

[0486] 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터는 "뭉특한" Y자형 어댑터인데, Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥에는 핵산 단편에 추가될 추가 서열이 없거나, 뭉특한 Y자형 어댑터에는 부분 길이의 범용 어댑터 서열이 있다. 일부 실시형태에서, 전장 Y자형 어댑터 또는 뭉툭한 Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 샘플 인덱스 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 샘플 인덱스 서열은 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 불일치 영역에 위치한다. 일부 실시형태에서, 전장 Y자형 어댑터 또는 뭉툭한 Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 고유 분자 인덱스(UMI) 서열은 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 불일치 영역에 위치한다. 일부 실시형태에서, 전장 Y자형 어댑터 또는 뭉툭한 Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위 및/또는 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 전장 Y자형 어댑터 또는 뭉툭한 Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 샘플 인덱스에 대한 서열이 없다. 일부 실시형태에서, 전장 Y자형 어댑터 또는 뭉툭한 Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 고유 분자 인덱스(UMI) 서열에 대한 서열이 없다. 더 짧은 뭉툭한 Y자형 어댑터를 사용하는 이점은 더 긴 Y자형 어댑터의 결합 효율에 비해 뭉툭한 Y자형 어댑터의 결찰 효율이 더 높다는 것이다.

[0487] 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터는 핵산 단편의 말단에 결찰되어 관심 서열의 양쪽 말단에 어댑터 서열이 첨부

된 라이브러리 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가 어댑터 서열은 꼬리가 달린 프라이머(*예*: 꼬리가 달린 PCR 프라이머)를 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 추가 될 수 있다. 예를 들어, 프라이머 연장 반응은 이제 결찰된 Y자형 어댑터의 불일치 부분을 추가 어댑터 서열을 갖는 꼬리가 달린 프라이머와 접촉/혼성화하고, 적어도 하나의 프라이머 연장 반응을 수행하는 것을 포함한다(*예*: **도 15**). 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Y자형 어댑터는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 동일한 범용 어댑터 서열을 갖고, 역방형 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 동일한 범용 어댑터 서열을 갖는다. 생성된 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자는 불일치 부분 중 하나에 혼성화하는 영역(*예*: (130))을 갖는 프라이머를 사용하여 프라이머 연장을 거칠 수 있고, 프라이머는 또한 다른 쪽 말단에 샘플 인덱스 서열과 범용 표면 프라이머 결합 부위(SurfPBS)를 가질 수 있다. 프라이머 연장 반응은 혼성화된 프라이머를 주형으로 사용하여 수행되어 다음을 포함하는 연장된 라이브러리 분자를 생성할 수 있다: 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120); 삽입 서열(110); 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130); 샘플 인덱스 서열; 및 범용 표면 프라이머 결합 부위(SurfPBS). 일부 실시형태에서, 연장된 라이브러리 분자는 불일치 부분 중 하나(*예*: (120))에 혼성화되는 영역을 갖는 제2 프라이머를 사용하여 또 다른 프라이머 연장 반응을 거칠 수 있으며, 프라이머는 또한 범용 표면 프라이머 결합 부위(SurfPBS)와 선택적 샘플 인덱스 서열을 다른 쪽 끝에 가질 수 있다. 제2 혼성화된 프라이머를 주형으로 사용하여 프라이머 연장 반응을 수행한다.

[0488] **도 16**에 도시된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Y자형 어댑터는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 동일한 범용 어댑터 서열을 갖고, 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 동일한 범용 어댑터 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터는 또한 샘플 인덱스 서열과 선택적인 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)를 하나 또는 두 개의 불일치 부분(들)에 포함한다. 생성된 이중 가닥 선형 핵산 라이브러리 분자는 3' 오버행 말단 및 무딘 말단을 갖는 선형 이중 가닥 어댑터와 혼성화될 수 있다. 3' 오버행 말단은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)를 갖는 불일치 부분과 혼성화할 수 있는 서열을 포함하며, 이는 틈이 있는(실선 삼각형) 부분적으로 이중 가닥 영역을 생성한다. 틈을 결찰하고 결찰되지 않은 가닥을 제거할 수 있다.

[0489] 꼬리가 달린 프라이머는 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위, 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위, 샘플 인덱스 서열 및/또는 고유 분자 인덱스(UMI)를 포함하는 추가 어댑터 서열 중 어느 하나 또는 임의의 조합을 가질 수 있다.

[0490] 일부 실시형태에서, 제1 꼬리가 달린 PCR 프라이머는 제1 프라이머 연장 반응을 수행하는 데 사용될 수 있고, 제2 꼬리가 달린 PCR 프라이머는 제2 프라이머 연장 반응을 수행하는 데 사용되어 양쪽에 적어도 하나의 추가 어댑터가 첨부된 삽입 영역을 포함하는 라이브러리 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 꼬리가 달린 PCR 프라이머는 다중 PCR 주기(*예*: 약 5 내지 20 PCR 주기)를 수행하여 적어도 하나의 추가 어댑터가 양쪽에 첨부된 삽입 영역을 포함하는 라이브러리 분자를 생성하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 작업 흐름은 제1 또는 제2 꼬리가 달린 PCR 프라이머를 사용하는 PCR을 포함하지 않는다.

[0491] 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 일부인 본원에 기재된 제1 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥 중 임의의 것은 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)(또는 그의 상보적 서열) 또는 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)(또는 이의 상보적 서열)는 위 **표 1**에 열거되어 있다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제1 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥에서, **표 1**에 열거된 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120) 또는 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130) 중 어느 것이든 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0492] 일부 실시형태에서, 어댑터는 이중 가닥인 분자내 어닐링 영역 및 단일 가닥 비상보적 루프 부분을 갖는 하나의 올리고뉴클레오타이드 가닥을 갖는 헤어핀 어댑터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 이중 가닥 부분은 무딘 말단, 5' 오버행 말단 또는 3' 오버행 말단을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 이중 가닥 부분은 핵산 단편 상의 오버행 말단에 상보적인 적어도 하나의 염기 오버행(*예*: A-염기 오버행)을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 이중 가닥 부분은 인산화되거나 비인산화된 말단 5' 말단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 이중 가닥 부분은 중합효소 촉매 프라이머 연장 반응으로 연장될 수 있는 말단 3' 말단을 포함하거나, 말단 3' 말단은 차단되어 연장할 수 없다. 일부 실시형태에서, 루프 부분은 엔도뉴클레아제 제한 효소 부위, 무염기성 부위 및/또는 리보뉴클레오타이드를 포함하는 적어도 하나의 절단 가능 부위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 무염기성 부위는 하나 이상의 유리딘, 데옥시-8-옥소-구아닌 트리포스페이트(d-8-oxoG); 8-옥소-7,8-디히드로구아닌(8oxoG) 또는 데옥시이노신을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 부분 및/또는 루프 부분은 5' 및/또는 3' 말단에서 하나 이상의 포스포로티오에이트

연결을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 부분 및/또는 루프 부분은 내부 위치에 하나 이상의 인산로티오에이트 결합을 포함하여 엑소뉴클레아제 저항성을 부여한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 부분 및/또는 루프 부분은 5' 및/또는 3' 말단에서 또는 내부 위치에서 하나 이상의 2'-O-메틸 시토신 염기를 포함한다.

[0493] 일부 실시형태에서, 이중 가닥 부분 및/또는 루프 부분은 적어도 하나의 어댑터 서열을 포함한다. 예를 들어, 헤어핀 어댑터의 이중 가닥 부분 중 한 가닥은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 이중 가닥 부분의 다른 가닥은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 루프 부분의 한 영역은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 루프 부분의 또 다른 영역은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터는 샘플 인덱스 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터에는 핵산 단편에 추가될 추가 서열이 결여되어 있다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터에는 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위 및/또는 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터에는 샘플 인덱스에 대한 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터에는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열에 대한 서열이 결여된다.

[0494] 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 일부인 본원에 기재된 임의의 올리고뉴클레오타이드 가닥은 위의 **표 1**에 열거된 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120) 및 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 어댑터의 일부인 본원에 기재된 임의의 올리고뉴클레오타이드 가닥은 위의 **표 1**에 열거된 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)의 보체 서열 및/또는 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)의 보체 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 헤어핀 가닥의 일부인 제1 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥에서, **표 1**에 열거된 범용 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120) 또는 범용 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130) 중 어느 것이든 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 절단될 수 있으며, 여기서 절단은 1 내지 12개 뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 말단은 절단된다. 특정 실시형태에서, 3' 말단은 절단된다.

[0495] 개별 핵산 단편은 한쪽 또는 양쪽 말단에 적어도 하나의 범용 어댑터 서열을 추가하여, 왼쪽 어댑터-삽입-오른쪽 어댑터의 일반 배열을 갖는 재조합 핵산 선형 라이브러리 분자를 형성할 수 있다.

[0496] 일부 실시형태에서, 핵산 단편은 리가제 효소 및/또는 프라이머 연장 반응을 사용하여 하나 이상의 범용 어댑터 서열에 한쪽 또는 양쪽 말단을 결합하여 선형 라이브러리 분자를 생성할 수 있다. 핵산 단편과 범용 어댑터(들) 사이의 공유 결합은 DNA 리가제 또는 RNA 리가제를 사용하여 달성할 수 있다. 이중 가닥 DNA 분자를 결찰할 수 있는 예시적인 DNA 리가제는 T4 DNA 리가제 및 T7 DNA 리가제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 범용 어댑터 서열은 5' 영역에 범용 어댑터 서열을 포함하고 핵산 단편의 일부에 상보적인 3' 영역을 갖는 꼬리가 달린 프라이머를 사용하는 프라이머 연장 또는 PCR을 통해 핵산 단편에 추가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 추가 범용 어댑터 서열을 갖는 5' 영역과 제1 또는 제2 범용 어댑터 서열의 일부에 상보적인 3' 영역을 갖는 꼬리가 달린 프라이머를 사용하여 범용 어댑터 서열은 프라이머 연장 또는 PCR을 통해 한쪽 또는 양쪽에 제1 및 제2 범용 어댑터 서열이 측접된 삽입 서열에 추가될 수 있다.

[0497] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자(100)는 결찰 반응을 사용한 후 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 사용하여 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 생성함으로써 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 다음을 포함한다: **(a)** 관심 서열(*예*: 이중 가닥 삽입 영역(110))을 포함하는 이중 가닥 핵산 단편을 제공하는 단계; 및 **(b)** 이중 가닥 삽입 영역(110)의 제1 말단을 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열을 갖는 제1 이중 가닥 선형 어댑터에 결합하고, 이중 가닥 삽입 영역(110)의 제2 말단을 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열을 갖는 제2 이중 가닥 선형 어댑터에 연결하는 단계, 여기서 결합은 이중 가닥 재조합 라이브러리 분자(100)를 생성하기 위해 DNA 리가제 효소를 사용하여 수행된다(*예*: **도 13**). 이중 가닥 핵산 단편은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 어댑터 서열을 갖는 이중 가닥 어댑터의 반대쪽에 효소로 결찰될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 어댑터 중 하나 또는 둘 모두는 샘플 인덱스 서열 및 선택적인 짧은 무작위 서열(*예를 들어*, NNN)을 포함할 수도 있다.

[0498] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **단계 (c)**: 이중 가닥 재조합 라이브러리 분자(100)를

변성시켜 2개의 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 단일 가닥 라이브러리 분자(100) 둘 모두는 본원에 기재된 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 중 하나와 혼성화되어 아래 단계 (d)에 기재된 바와 같이 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 생성할 수 있다.

[0499] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **단계 (d)**: 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 본원에 기재된 복수의 임의의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)와 혼성화하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하며, 이중 가닥 스플린트 어댑터는 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 포함하고, 제1 스플린트 가닥은 제1 영역 (320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함하고, 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 라이브러리 분자(100)의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열과 혼성화하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 라이브러리 분자(100)의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열과 혼성화하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, 단계 (c)의 혼성화는 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)을 단일 가닥 라이브러리 분자(120)의 적어도 일부에 혼성화하기에 적합한 조건에서 수행되고, 이 조건은 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)을 단일 가닥 라이브러리 분자(130)의 적어도 일부에 혼성화하는 데 적합하며, 이로써 단일 가닥 라이브러리 분자를 원형화하여 각각 두 개의 틈을 갖는 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성한다(*예*: **도 3**).

[0500] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **단계 (e)**: 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 리가제와 접촉시켜 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하는 단계를 포함한다(*예*: **도 4**).

[0501] 일부 실시형태에서, 단계 (b) 이후에는 이중 가닥 재조합 라이브러리 분자(100)에 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위, 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위, 샘플 인덱스 또는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 포함한 추가 어댑터 서열을 결합하기 위한 프라이머 연장 또는 PCR 반응이 수행되지 않는다.

[0502] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자(100)는 결찰 반응을 사용한 후 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)를 사용하여 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 생성함으로써 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **(a)** 관심 서열(*예*: 이중 가닥 삽입 영역(110))을 포함하는 이중 가닥 핵산 단편을 제공하는 단계를 포함한다.

[0503] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **(b)**: 이중 가닥삽입 영역(110)의 제1 말단을 제1 Y자형 어댑터에 결합하고, 이중 가닥 삽입 영역(110)의 제2 말단을 제2 Y자형 어댑터에 결합하는 단계를 포함하며, 여기서 결합은 DNA 리가제 효소를 사용하여 수행되어 이중 가닥 재조합 라이브러리 분자(100)를 생성한다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Y자형 어댑터는 동일하고, 각각은 두 개의 올리고뉴클레오타이드 가닥을 포함하며, 이 가닥은 함께 혼성화되어 이중 가닥 어닐링 영역과 불일치 영역을 형성한다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥은 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다(*예*: **도 14**). 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥은 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 포함한다(*예*: **도 14**). 이중 가닥 핵산 단편은 반대쪽에서 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 갖는 제1 올리고뉴클레오타이드와 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위에 대한 범용 어댑터 서열의 전장 서열을 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드(130)를 포함하는 제2 Y자형 어댑터에 효소로 결찰될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제1 및 제2 Y자형 어댑터는 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 동일한 범용 어댑터 서열을 갖고, 역방형 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 동일한 범용 어댑터 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터는 또한 샘플 인덱스 서열과 선택적인 짧은 무작위 서열(*예*: NNN)를 하나 또는 두 개의 불일치 부분(들)에 포함한다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥에는 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위 및/또는 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위에 대한 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥에는 샘플 인덱스에 대한 서열이 결여된다. 일부 실시형태에서, Y자형 어댑터의 제1 및/또는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥에는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열에 대한 서열이 결여된다.

[0504] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **단계 (c)**: 이중 가닥 재조합 라이브러리 분자(100)를 변성시켜 2개의 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 단일 가닥 라이브러리 분자(100) 둘 모두는 본원에 기재된 이중 가닥 스플린트 어댑터(200) 중 하나와 혼성화되어 아래 단계 (d)에 기재

된 바와 같이 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 생성할 수 있다.

[0505] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **단계 (d)**: 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 본원에 기재된 복수의 임의의 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)와 혼성화하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 개별 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하며, 이중 가닥 스플린트 어댑터는 이중 가닥 영역 및 2개의 측접하는 단일 가닥 영역을 포함하고, 제1 스플린트 가닥은 제1 영역 (320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함하고, 제1 스플린트 가닥의 내부 영역(310)은 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 라이브러리 분자(100)의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열과 혼성화하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 라이브러리 분자(100)의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열과 혼성화하도록 설계된다. 일부 실시형태에서, 단계 (c)의 혼성화는 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)을 단일 가닥 라이브러리 분자(120)의 적어도 일부에 혼성화하기에 적합한 조건에서 수행되고, 이 조건은 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)을 단일 가닥 라이브러리 분자(130)의 적어도 일부에 혼성화하는 데 적합하며, 이로써 단일 가닥 라이브러리 분자를 원형화하여 각각 두 개의 틈을 갖는 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 형성한다(*예*: **도 3**).

[0506] 일부 실시형태에서, 라이브러리 분자를 생성하는 방법은 **단계 (e)**: 복수의 라이브러리-스플린트 복합체(500)를 리가제와 접촉시켜 복수의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하는 단계를 포함한다(*예*: **도 4**).

[0507] 일부 실시형태에서, 단계 (b) 이후에는 이중 가닥 재조합 라이브러리 분자(100)에 범용 증폭 프라이머 결합 부위, 범용 표면 포획 프라이머 결합 부위, 범용 표면 고정 프라이머 결합 부위, 샘플 인덱스 또는 고유 분자 인덱스(UMI) 서열을 포함한 추가 어댑터 서열을 결합하기 위한 프라이머 연장 또는 PCR 반응이 수행되지 않는다.

[0508] **낮은 비특이적 결합 코팅을 갖는 지지체**

[0509] 일부 양태에서, 본 개시내용은 복수의 표면 프라이머가 고정된 지지체를 사용하는 서열분석을 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 지지체는 낮은 비특이적 결합 코팅으로 부동태화된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 표면 코팅은 핵산 포획, 증폭 및 서열분석 작업흐름, 예컨대, 염료, 뉴클레오타이드, 효소 및 핵산 프라이머에 대해 전형적으로 사용되는 시약에 대해 매우 낮은 비-특이적 결합을 나타낸다. 표면 코팅은 통상적인 표면 코팅에 비해서 낮은 배경 형광 신호 또는 높은 콘트라스트 대 노이즈(contrast-to-noise: CNR) 비를 나타낼 수 있다.

[0510] 일부 실시형태에서, 지지체는 기재(또는 지지체 구조), 공유적 또는 비공유적으로 부착된 낮은-결합의 1개 이상의 층, 화학적 개질층, *예를 들어*, 실란층, 중합체 필름, 및 단일 가닥 표적 핵산(들)을 지지체 표면에 테더링하기 위해 사용될 수 있는 1개 이상의 공유적 또는 비공유적으로 부착된 프라이머 표면을 포함한다. 일부 실시형태에서, 단백질, 핵산 분자 및 기타 혼성화 및 증폭 반응 구성성분의 지지체 표면에 대한 비특이적 결합이 비슷한 단일층에 비해 최소화되거나 감소되도록 표면의 제형, *예를 들어*, 1개 이상의 층의 화학적 조성물, 지지체 표면에 1개 이상의 층을 그리고/또는 서로에 대해 가교하는 데 사용되는 결합 화학 및 층의 총 수는 달라질 수 있다. 종종, 지지체 표면 상의 비특이적 혼성화가 비슷한 단일층에 비해 최소화 또는 감소되도록 표면의 제형은 달라질 수 있다. 지지체 표면 상의 비특이적 증폭이 비슷한 단일층에 비해 최소화 또는 감소되도록 표면의 제형은 달라질 수 있다. 표면 상의 특이적 증폭률 및/또는 수율이 최대화되도록 표면의 제형은 달라질 수 있다. 검출에 적합한 증폭 수준은 본 명세서에 개시된 일부 경우에 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 또는 30보다 더 많은 수의 증폭 주기 이하로 달성된다.

[0511] 1개 이상의 화학적으로 변형된 층, *예를 들어*, 낮은 비특이적 결합 중합체의 층을 포함하는 기재 또는 지지체 구조는 독립적일 수 있거나 다른 구조 또는 조립체에 통합될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 기재 또는 지지체 구조는 통합 또는 조립된 미세유체 플로우 셀 내에 1개 이상의 표면을 포함할 수 있다. 기재 또는 지지체 구조는 마이크로플레이트 형식 내의 1개 이상의 표면, *예를 들어*, 마이크로플레이트에서 웰의 하부 표면을 포함할 수 있다. 위에서 주목한 바와 같이, 일부 바람직한 실시형태에서, 기재 또는 지지체 구조는 모세관 내면(예컨대, 내강 표면)을 포함한다. 대안의 바람직한 실시형태에서, 기재 또는 지지체 구조는 평면 칩으로 에칭된 모세관 내면(예컨대, 내강 표면)을 포함한다.

[0512] 표면에 제1 화학적 개질층을 접합시키기 위해 사용되는 부착 화학은 일반적으로 표면이 제작된 물질과 층의 화학적 특성 모두에 따를 것이다. 일부 실시형태에서, 제1 층은 표면에 공유적으로 부착될 수 있다. 일부 실시

형태에서, 제1 층은 비공유적으로 부착될 수 있으며, *예를 들어*, 제1 층의 표면과 분자 구성성분 사이의 정전기적 상호작용, 수소 결합 또는 반데르발스 상호작용과 같은 비공유적 상호작용을 통해 표면에 흡착될 수 있다. 두 경우 중 하나에, 기재 표면은 제1 층의 부착 또는 증착 전에 처리될 수 있다. 당업자에게 알려진 임의의 다양한 표면 제조 기법은 표면을 세정 또는 처리하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 유리 또는 실리콘 표면은 피라냐 용액(Piranha solution)(황산(H_2SO_4)과 과산화수소(H_2O_2)의 혼합물), KOH 및 NaOH 중 염기 처리를 이용해서 산 세척될 수 있고/있거나 산소 플라즈마 처리 방법을 이용해서 세정될 수 있다.

[0513] 실란 화학은 유리 또는 실리콘 표면 상의 실란기를 공유적으로 개질시켜 더 반응성인 작용기(*예를 들어*, 아민 또는 카복실기)를 부착하고, 이어서, 표면에 대한 결합 링커 분자(*예를 들어*, 다양한 길이의 선형 탄화수소 분자, 예컨대, C6, C12, C18 탄화수소 또는 선형 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 분자) 또는 층 분자(*예를 들어*, 분지된 PEG 분자 또는 다른 중합체)에서 사용될 수 있는 하나의 비제한적 접근을 구성한다. 임의의 개시된 낮은 결합 표면을 생성하는 데 사용될 수 있는 적합한 실란의 예는 (3-아미노프로필) 트라이메톡시실란 (APTMS), (3-아미노프로필) 트라이에톡시실란(APTES), 임의의 다양한 PEG-실란(*예를 들어*, 1K, 2K, 5K, 10K, 20K 등의 분자량 포함), 아미노-PEG 실란(*즉*, 유리 아미노 작용기 포함), 말레이미드-PEG 실란, 바이오틴-PEG 실란 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0514] 아미노산, 펩타이드, 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드, 기타 단량체 또는 중합체 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 당업자에게 알려진 임의의 다양한 분자는 표면 상에 하나 이상의 화학적으로 개질된 층을 생성하는 데 사용될 수 있으며, 여기서, 사용되는 구성성분의 선택은 표면의 하나 이상의 특성, *예를 들어*, 작용기 및/또는 고정된 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 표면 밀도, 표면의 친수성/소수성, 또는 표면의 3차원 특성(*즉*, "두께")을 변경시키도록 변화될 수 있다. 임의의 개시된 표면에서 낮은 비특이적 결합 물질의 하나 이상의 층을 생성하는 데 사용될 수 있는 바람직한 중합체의 예는 다양한 분자량 및 분지 구조의 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 스트렙타비딘, 폴리아크릴아마이드, 폴리에스터, 덱스트란, 폴리-라이신 및 폴리-라이신 공중합체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 표면에 물질(*예를 들어*, 중합체 층)의 하나 이상의 층을 접합시키고/시키거나 층을 서로에 대해 가교하는 데 사용될 수 있는 접합 화학의 예는 바이오틴-스트렙타비딘 상호작용(또는 이들의 변형), his 태그 -Ni/NTA 접합 화학, 메톡시 에터 접합 화학, 카복실레이트 접합 화학, 아민 접합 화학, NHS 에스터, 말레이미드, 티올, 에폭시, 아자이드, 하이드라자이드, 알카인, 아이소사이아네이트 및 실란을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0515] 낮은 비특이적 결합 표면 코팅은 기재를 가로질러 균일하게 도포될 수 있다. 대안적으로, 화학적 개질층이 기재의 하나 이상의 별도의 영역에 국한되도록 표면 코팅이 패턴화될 수 있다. 예를 들어, 표면은 표면 상에서 화학적 개질 영역의 규칙적 어레이 또는 무작위 패턴을 생성하도록 포토리소그래피 기법을 이용해서 패턴화될 수 있다. 대안으로 또는 조합하여, 기재 표면은, *예를 들어*, 밀착 인화 및/또는 잉크젯 인쇄 기법을 이용해서 패턴화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 화학적 개질 영역의 규칙적 어레이 또는 무작위 패턴은 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 또는 10,000개 이상의 별도의 영역을 포함할 수 있다.

[0516] 낮은 비특이적 결합 표면을 달성하기 위해, 친수성 중합체는 표면에 비특이적으로 흡착되거나, 공유적으로 접합될 수 있다. 전형적으로, 폴리(에틸렌 글리콜)(폴리에틸렌 옥사이드(PEO) 또는 폴리옥시에틸렌으로도 알려진 PEG) 또는, 예를 들어, 실란 화학을 이용해서 표면에 연결된 상이한 분자량 및 말단기를 갖는 다른 친수성 중합체를 이용해서 부동태화가 수행된다. 표면으로부터 원위의 말단기는 바이오틴, 메톡시 에터, 카복실레이트, 아민, NHS 에스터, 말레이미드 및 비스-실란을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 친수성 중합체, *예를 들어*, 선형 중합체, 분지된 중합체 또는 다중-분지된 중합체의 둘 이상의 층은 표면 상에 증착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 둘 이상의 층이 서로 공유결합될 수 있거나 얻어진 표면의 안정성을 개선시키도록 내부 가교될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상이한 염기 서열 및 염기 변형(또는 다른 생체분자, *예를 들어*, 효소 또는 항체)을 갖는 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 얻어진 표면 층에 다양한 표면 밀도로 고정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, 표면 작용기 밀도와 올리고뉴클레오타이드 농도는 둘 다 특정 프라이머 밀도 범위를 표적화하도록 달라질 수 있다. 추가적으로, 프라이머 밀도는 동일한 작용기를 지니는 다른 분자로 올리고뉴클레오타이드를 희석시킴으로써 제어될 수 있다. 예를 들어, 그리고 제한없이, 아민-표지된 올리고뉴클레오타이드는 최종 프라이머 밀도를 감소시키는 NHS-에스터 코팅 표면과의 반응에서 아민-표지된 폴리에틸렌 글리콜로 희석될 수 있다. 혼성화 영역과 부착 작용기 사이에서 상이한 길이의 링커를 갖는 표면 프라이머는 표면 밀도를 제어하는 데 적용될 수 있다. 적합한 링커의 예로는 프라이머의 5' 말단의 폴리-T 및 폴리-A 가닥(*예*: 0 내지 20개 염기, *예*: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는

20개), PEG 링커(*예*: 3 내지 20개 단량체 단위, *예*: 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 단량체 단위) 및 탄소-사슬(*예*: C6, C12, C18 *등*)이 포함된다. 프라이머 밀도를 측정하기 위해, 형광 표지된 프라이머는 표면에 고정될 수 있고, 이어서, 형광 판독은 알려진 농도의 염료 용액에 대한 것과 비교된다.

[0517] 프라이머 표면 밀도를 조정하고 친수성 또는 양쪽성 표면에 추가적인 치수를 더하기 위해, PEG 및 다른 친수성 중합체의 다중층 코팅을 포함하는 표면이 개발되었다. 아래에 기재하는 중합체/공중합체 물질을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 친수성 및 양쪽성 표면 층화 접근을 이용함으로써, 표면 상의 프라이머 로딩 밀도를 유의미하게 증가시킬 수 있다. 전통적인 PEG 코팅 접근은 단일층 프라이머 증착을 사용하며, 이는 일반적으로 단일 분자 접근을 위해 보고되었지만, 핵산 증폭 적용을 위한 높은 복제수를 수득하지 않는다. 본 명세서에서 기재된 바와 같은 "층화(layering)"는 둘 이상의 고도로 가교된 층을 포함하는 표면이 순차적으로 구성될 수 있도록 임의의 적합한 중합체 또는 단량체 서브유닛에 의한 전통적인 가교 접근을 이용하여 달성될 수 있다. 적합한 중합체의 예는 스트렙타비딘, 폴리 아크릴아마이드, 폴리에스터, 덱스트란, 폴리-라이신, 및 폴리-라이신과 PEG의 공중합체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 상이한 층은 바이오틴-스트렙타비딘 결합, 아자이드-알카인 클릭 반응, 아민-NHS 에스터 반응, 티올-말레이미드 반응 및 양으로 하전된 중합체와 음으로 하전된 중합체 사이의 이온성 상호작용을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 다양한 접합 반응을 통해 서로 부착될 수 있다. 일부 실시형태에서, 높은 프라이머 밀도 물질은 용액 중에서 구성될 수 있고, 후속적으로 다단계로 표면 상에 층화될 수 있다.

[0518] 앞서 설명한 바와 같이, 본 개시내용의 낮은 비특이적 결합 코팅은 단백질, 핵산, 및 고체상 핵산 증폭을 위해 사용되는 혼성화 및/또는 증폭 제형의 다른 구성성분의 감소된 비특이적 결합을 나타낸다. 주어진 지지체 표면에 의해 나타내는 비특이적 결합 정도는 정량적 또는 정성적으로 평가될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 표준화된 조건 세트 하의 형광 염료(*예를 들어*, 시아닌 염료, 예컨대, Cy3, 또는 Cy5 *등*, 플루오레세인, 쿠마린, 로다민 *등* 또는 본 명세서에 개시된 다른 염료), 형광 표지된 뉴클레오타이드, 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드 및/또는 형광 표지된 단백질(*예를 들어*, 중합효소)에 대한 표면의 노출, 다음에, 명시된 린스 프로토콜 및 형광 이미징는 상이한 표면 제형을 포함하는 지지체 상에서의 비특이적 결합의 비교를 위한 정량적 도구로서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표준화된 조건 세트 하의 형광 염료, 형광 표지된 뉴클레오타이드, 형광 표지된 올리고뉴클레오타이드 및/또는 형광 표지된 단백질(*예를 들어*, 중합효소)에 대한 표면의 노출, 다음에, 명시된 린스 프로토콜 및 형광 이미징는 상이한 표면 제형을 포함하는 지지체 상의 비특이적 결합의 비교를 위한 정량적 도구로서 사용될 수 있다 - 단, 형광 신호가 (*예를 들어*, 형광단의 신호 포화 및/또는 자기-소광이 문제되지 않는 조건하에) 지지체 표면 상의 형광단 수와 선형으로 관련되고(또는 예측 가능한 방식으로 관련되고) 적합한 교정 표준이 사용되는 조건하에 형광 이미징가 수행된다는 것을 보장하는 것을 주의하였다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 상이한 지지체 표면 제형에 의해 비특이적 결합이 나타나는 정도로 정량적 평가를 위해 당업자에게 알려진 다른 기법, 예를 들어, 방사성동위원소 표지 및 계수 방법이 사용될 수 있다.

[0519] 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단의 특이적 결합 대 비특이적 결합의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐있는 임의의 중간 값의 Cy3을 나타낸다. 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단의 특이적 형광 대 비특이적 형광의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐있는 임의의 중간 값의 Cy3을 나타낸다.

[0520] 언급한 바와 같이, 일부 실시형태에서, 개시된 낮은-결합 지지체로 나타내는 비특이적 결합 정도는 인큐베이션 및 린스 조건의 표준화된 세트 하에서, 표면과 표지된 단백질(*예를 들어*, 소 혈청 알부민(BSA), 스트렙타비딘, DNA 중합효소, 역전사효소, 헬리카제, 단일 가닥 결합 단백질(SSB) *등*, 또는 이들의 임의의 조합), 표지된 뉴클레오타이드, 표지된 올리고뉴클레오타이드 *등*을 접촉시키기 위한 표준화된 프로토콜을 이용해서 평가될 수 있고, 이어서, 표면 상에 남아있는 표지 양의 검출 및 이들로부터 얻어진 신호와 적절한 교정 표준의 비교의 검출이 이어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 표지는 형광 표지를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표지는 방사성동위원소를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표지는 당업자에게 알려진 임의의 다른 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 따라서 주어진 지지체 표면 제형에 의해 나타나는 비특이적 결합 정도는 단위 구역당 비특이적으로 결합된 단백질 분자(또는 다른 분자) 수에 관해 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 낮은-결합 지지체는 μm^2당 0.001개 미만의 분자, μm^2당 0.01개 미만의 분자, μm^2당

0.1개 미만의 분자, μm^2당 0.25개 미만의 분자, μm^2당 0.5개 미만의 분자, μm^2당 1개 미만의 분자, μm^2당 10개 미만의 분자, μm^2당 100개 미만의 분자 또는 μm^2당 1000개 미만의 분자의 비특이적 단백질 결합(또는 다른 명시된 분자(*예를 들어*, 시아닌 염료, 예컨대, Cy3 또는 Cy5 등, 플루오레세인, 쿠마린, 로다민 등 또는 본 명세서에 개시된 다른 염료)의 비특이적 결합)을 나타낼 수 있다. 당업자라면 본 개시내용의 주어진 지지체 표면이 이 범위 내의 어디에나 속하는, 예를 들어, μm^2당 86개 미만의 분자의 비특이적 결합을 나타낼 수 있다는 것을 인식할 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 일부 개질된 표면은 15분 동안 포스페이트 완충 식염수(PBS) 완충제 중 Cy3 표지된 스트렙타비딘(GE Amersham)의 1 μM 용액과 접촉된 후, 탈이온수로 3회 린스된 후에 0.5개 미만의 분자/μm^2의 비특이적 단백질 결합을 나타낸다. 본 명세서에 개시된 일부 개질된 표면은 μm^2당 0.25개 미만의 분자의 Cy3 염료 분자의 비특이적 결합을 나타낸다. 독립적인 비특이적 결합 분석에서, 1 μM 표지된 Cy3 SA(ThermoFisher), 1 μM Cy5 SA 염료(ThermoFisher), 10 μM 아미노알릴-dUTP - ATTO-647N(Jena Biosciences), 10 μM 아미노알릴-dUTP - ATTO-Rho11(Jena Biosciences), 10 μM 아미노알릴-dUTP -ATTO-Rho11(Jena Biosciences), 10 μM 7-프로파길아미노-7-데아자-dGTP - Cy5(Jena Biosciences) 및 10 μM 7-프로파길아미노-7-데아자-dGTP - Cy3(Jena Biosciences)을 384개 웰 플레이트 형식으로 15분 동안 37℃에서 낮은 결합 기재 상에서 인큐베이션시켰다. 각각의 웰은 50 ul 탈이온 Rnase/Dnase 무함유 워터로 2 내지 3회 세척되고, 25 mM ACES 완충제 pH 7.4로 2 내지 3회 세척된다. 800의 PMT 획득 설정(gain setting) 및 50 내지 100 μm의 분해능에서 제조업자에 의해 명시되는 바와 같이 Cy3, AF555, 또는 Cy5 필터 세트(수행된 염료 시험에 따름)를 이용해서 384 웰 플레이트를 GE Typhoon 기기 상에서 영상화하였다. 더 높은 해상도 이미징을 위해, 내부 전반사 형광(total internal reflectance fluorescence: TIRF) 대물렌즈(100배, 1.5 NA, Olympus), CCD 카메라(*예*: Olympus EM-CCD 흑백 카메라, Olympus XM-10 흑백 카메라 또는 Olympus DP80 칼라 및 흑백 카메라), 조명원(*예*: Olympus 100W Hg 램프, Olympus 75W Xe 램프 또는 Olympus U-HGLGPS 형광 광원), 및 532 nm 또는 635 nm의 여기 파장을 갖춘 Olympus IX83 현미경(Olympus Corp., Center Valley, PA)에서 이미지를 수집하였다. 이색성 거울은 Semrock(IDEX Health & Science, LLC, Rochester, New York)에서 구입했다, *예를 들어* 405, 488, 532 또는 633 nm 이색성 반사기/빔 분할기를 사용했고, 대역 통과 필터는 적절한 여기 파장에 맞춰 532 LP 또는 645 LP를 선택했다. 본 명세서에 개시된 일부 개질된 표면은 μm^2당 0.25개 미만의 분자의 염료 분자의 비특이적 결합을 나타낸다.

[0521] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단의 특이적 결합 대 비특이적 결합의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐있는 임의의 중간 값의 Cy3을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 일부 표면은 형광단에 대한 특이적 형광 신호 대 비특이적 형광 신호의 비, 예컨대, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 또는 100 초과, 또는 본 명세서의 범위에 걸쳐있는 임의의 중간 값의 Cy3을 나타낸다.

[0522] 본 명세서의 개시내용과 일치되는 낮은 배경 표면은 특이적 염료 부착(*예*: Cy3 부착) 대 비특이적 염료 흡착(*예*: Cy3 염료 흡착) 비율이 적어도 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 또는 비특이적으로 흡착된 분자당 부착된 50개 이상의 특이적 염료 분자를 나타낼 수 있다. 유사하게, 여기 에너지를 가할 때, 형광단, *예를 들어*, Cy3이 부착된 본 명세서의 개시내용과 일치되는 낮은-배경 표면은 특이적 형광 신호(*예를 들어*, 표면에 부착된 Cy3-표지 올리고뉴클레오타이드로부터 생김) 대 비특이적 흡착 염료 형광 신호의 비율이 최소 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1 또는 50:1을 초과할 수 있다.

[0523] 일부 실시형태에서, 개시된 지지체 표면의 친수성(또는 수용액에 의한 "습윤성") 정도는, 예를 들어, 작은 물방울이 표면에 위치되는 물 접촉각의 측정을 통해 평가될 수 있고, 표면과 이의 접촉각은, *예를 들어*, 광학 텐시오미터를 이용하여 측정된다. 일부 실시형태에서, 정적 접촉각이 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 전진 또는 후진 접촉각이 결정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 친수성, 낮은-결합 지지체 표면에 대한 물 접촉각은 약 0도 내지 약 30도의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 친수성, 낮은-결합 지지체 표면에 대한 물 접촉각은 50도, 40도, 30도, 25도, 20도, 18도, 16도, 14도, 12도, 10도, 8도, 6도, 4도, 2도 또는 1도 이하일 수 있다. 다수의 경우에 접촉각은 40도 이하이다. 당업자라면 본 개시내용의 주어진 친수성, 낮은 결합 지지체 표면이 이 범위 내의 다른 것의 값을 갖는 물 접촉각을 나타낼 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0524] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 친수성 표면은 종종 낮은-결합 표면에 대한 생체분자의 감소된 비특이적 결합으로 인해 생물검정에 대해 감소된 세척 시간을 촉진시킨다. 일부 실시형태에서, 적절한 세척 단계는 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 미만, 또는 10초 미만으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 적절한 세척 단계는 30초 미만으로 수행될 수 있다.

[0525] 본 개시내용의 낮은 결합 표면은 용매 및 상승된 온도, 또는 반복된 주기의 용매 노출 또는 온도 변화에 대한 장기간 노출의 안정성 또는 내구성의 유의미한 개선을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 개시된 표면의 안정성은 표면 상의 작용기 또는 표면 상의 고정된 생체분자(*예를 들어*, 올리고뉴클레오타이드 프라이머)를 형광 표지하고, 용매 및 상승된 온도에, 또는 반복된 주기의 용매 노출 또는 온도 변화에 장기간 노출 전, 노출 동안 및 노출 후에 형광 신호를 모니터링함으로써 시험될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표면 품질을 평가하기 위해 사용되는 형광 변화 정도는 용매 및/또는 상승된 온도에 대해 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 10분, 20분, 30분, 40분, 50분, 60분, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 15시간, 20시간, 25시간, 30시간, 35시간, 40시간, 45시간, 50시간 또는 100시간 노출의 시간 기간에 걸쳐 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 미만(또는 이러한 시간 기간에 걸쳐 측정된 바와 같은 이러한 백분율의 임의의 조합)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표면 품질을 평가하기 위해 사용되는 형광의 변화 정도는 용매 변화 및/또는 온도 변화에 대한 5주기, 10주기, 20주기, 30주기, 40주기, 50주기, 60주기, 70주기, 80주기, 90주기, 100주기, 200주기, 300주기, 400주기, 500주기, 600주기, 700주기, 800주기, 900주기 또는 1,000주기의 반복된 노출에 걸쳐 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 미만(또는 이러한 주기 범위에 걸쳐 측정된 바와 같은 이러한 백분율의 임의의 조합)일 수 있다.

[0526] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 표면은 특이적 신호 대 비특이적 신호 또는 다른 배경의 높은 비를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 핵산 증폭을 위해 사용될 때, 일부 표면은 표면의 인접한 비집단 영역의 신호보다 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100배, 또는 100보다 더 큰 수의 배수 초과로 증폭 신호를 나타낼 수 있다. 유사하게, 일부 표면은 표면의 인접한 증폭 핵산 집단 영역의 신호보다 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100배 또는 100보다 더 큰 수의 배수 초과로 증폭 신호를 나타낸다.

[0527] 일부 실시형태에서, (*예*: 형광단으로 직접 또는 간접적으로 표지된) 혼성화되거나 클론 증폭된 핵산 분자의 클러스터를 생성하기 위해 핵산 혼성화 또는 증폭 적용에서 사용될 때 개시된 낮은 배경 표면의 형광 이미지는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 210, 220, 230, 240, 250 또는 250을 초과하는 콘트라스트 대 노이즈 비(CNR)를 나타낸다.

[0528] 한 가지 유형의 프라이머(*예를 들어*, 포획 올리고뉴클레오타이드 및/또는 원형화 올리고뉴클레오타이드)가 지지체 표면에 부착 또는 고정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 한 가지 이상 유형의 어댑터 또는 프라이머는 스페이서 서열, 어댑터-결찰 표적 라이브러리 핵산 서열에 대한 혼성화를 위한 어댑서 서열, 정방향 증폭 프라이머, 역방향 증폭 프라이머, 서열분석 프라이머 및/또는 분자 바코딩 서열, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 1 프라이머 또는 어댑터 서열은 표면의 적어도 1개의 층에 고정될 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 초과의 상이한 프라이머 또는 어댑터 서열은 표면의 적어도 1개의 층에 고정될 수 있다.

[0529] 일부 실시형태에서, 고정된 어댑터 및/또는 프라이머 서열은 약 10개의 뉴클레오타이드 내지 약 100개의 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 고정된 어댑터 및/또는 프라이머 서열은 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 60, 적어도 70, 적어도 80, 적어도 90 또는 적어도 100개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 고정된 어댑터 및/또는 프라이머 서열은 최대 100, 최대 90, 최대 80, 최대 70, 최대 60, 최대 50, 최대 40, 최대 30, 최대 20, 또는 최대 10개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 이 단락에 기재된 임의의 하한값 및 상한값은 조합되어 본 개시내용 내에 포함된 범위를 형성할 수 있고, 예를 들어, 일부 실시형태에서, 고정된 어댑터 및/또는 프라이머 서열의 길이는 약 20 뉴클레오타이드 내지 약 80 뉴클레오타이드의 범위일 수 있다. 당업자라면 고정된 어댑터 및/또는 프라이머 서열의 길이는 이 범위 내의 임의의 값, *예를 들어*, 약 24개의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0530] 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 낮은 결합 지지체 표면 상의 프라이머의 얻어진 표면 밀도는 μm^2당 약 100개의 프라이머 분자에서 μm^2당 약 100,000개의 프라이머 분자의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 낮은 결합 지지체 표면 상의 프라이머의 얻어진 표면 밀도는 μm^2당 약 100,000개의 프라이머 분자에서 μm^2당 약 10^{15}개의 프라이머 분자의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프라이머의 표면 밀도는 μm^2당 적어도

1,000, 적어도 10,000, 적어도 100,000 또는 적어도 10^{15}개의 프라이머 분자일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프라이머의 표면 밀도는 μm^2당 최대 10,000, 최대 100,000, 최대 1,000,000, 또는 최대 10^{15}개의 분자일 수 있다. 본 단락에 기재된 임의의 하한값 및 상한값은 조합되어 본 개시내용 내에 포함된 범위를 형성할 수 있고, 예를 들어, 일부 실시형태에서 프라이머의 표면 밀도는 μm^2당 약 10,000개의 분자에서 μm^2당 약 10^{15}개의 분자의 범위일 수 있다. 당업자라면 프라이머 분자의 표면 밀도가 이 범위 내의 임의의 값, *예를 들어*, μm^2당 약 455,000개의 분자를 가질 수 있다는 것을 인식할 것이다. 일부 실시형태에서, 지지체 표면 상의 어댑터 또는 프라이머 서열에 초기에 혼성화된 표면 라이브러리 핵산 서열의 표면 밀도는 고정된 프라이머의 표면 밀도에 대해 나타난 것보다 적거나 동일할 수 있다. 일부 실시형태에서, 지지체 표면 상의 어댑터 또는 프라이머 서열에 혼성화된 클론 증폭된 표면 라이브러리 핵산 서열의 표면 밀도는 고정된 프라이머의 표면 밀도에 나타낸 것과 동일한 범위에 걸쳐 있을 수 있다.

[0531] 표면이, 예를 들어, μm^2당 500,000의 올리고 밀도를 갖는 영역을 포함하는 한편, 또한 실질적으로 상이한 국소 밀도를 갖는 적어도 제2 영역을 포함할 수 있도록, 위에 열거한 바와 같은 국소 밀도는 표면에 걸쳐 밀도의 변동을 불가능하지 않는다.

[0532] 낮은 비특이적 결합 코팅은 다중층 표면 코팅의 하나 이상의 층을 포함하고, 분지된 중합체를 포함하거나, 선형일 수 있다. 적합한 분지된 중합체의 예는 분지된 PEG, 분지된 폴리(비닐 알코올) (분지된 PVA), 분지된 폴리(비닐 피리딘), 분지된 폴리(비닐 피롤리돈) (분지된 PVP), 분지된), 폴리(아크릴산) (분지된 PAA), 분지된 폴리아크릴아마이드, 분지된 폴리(N-아이소프로필아크릴아마이드) (분지된 PNIPAM), 분지된 폴리(메틸 메타크릴레이트) (분지된 PMA), 분지된 폴리(2-하이드록실에틸 메타크릴레이트) (분지된 PHEMA), 분지된 폴리(올리고(에틸렌 글리콜) 메틸 에터 메타크릴레이트) (분지된 POEGMA), 분지된 폴리글루탐산 (분지된 PGA), 분지된 폴리-라이신, 분지된 폴리-글루코사이드 및 덱스트란을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0533] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 다중층 표면 중 하나 이상의 층을 생성하기 위해 사용되는 분지된 중합체는 적어도 4개의 분지, 적어도 5개의 분지, 적어도 6개의 분지, 적어도 7개의 분지, 적어도 8개의 분지, 적어도 9개의 분지, 적어도 10개의 분지, 적어도 12개의 분지, 적어도 14개의 분지, 적어도 16개의 분지, 적어도 18개의 분지, 적어도 20개의 분지, 적어도 22개의 분지, 적어도 24개의 분지, 적어도 26개의 분지, 적어도 28개의 분지, 적어도 30개의 분지, 적어도 32개의 분지, 적어도 34개의 분지, 적어도 36개의 분지, 적어도 38개의 분지 또는 적어도 40개의 분지를 포함할 수 있다.

[0534] 본 명세서에 개시된 임의의 다중층 표면 중 하나 이상의 층을 생성하기 위해 사용되는 선형, 분지 또는 다중-분지된 중합체는 적어도 500, 적어도 1,000, 적어도 2,000, 적어도 3,000, 적어도 4,000, 적어도 5,000, 적어도 10,000, 적어도 15,000, 적어도 20,000, 적어도 25,000, 적어도 30,000, 적어도 35,000, 적어도 40,000, 적어도 45,000 또는 적어도 50,000 달톤의 분자량을 가질 수 있다.

[0535] 일부 실시형태에서, *예를 들어*, 다중층 표면의 적어도 1개의 층은 분지된 중합체를 포함하고, 침착 중인 층의 분지된 중합체 분자와 이전 층의 분자 사이의 공유 결합의 수는 분자당 약 1개의 공유 결합 내지 분자당 약 32개의 공유 결합의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 새로운 층의 분지된 중합체 분자와 이전 층의 분자 사이의 공유 결합의 수는 분자당 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20, 적어도 22, 적어도 24, 적어도 26, 적어도 28, 적어도 30 또는 적어도 32개의 공유 결합일 수 있다.

[0536] 표면에 물칭층의 결합 후에 남아있는 임의의 반응성 작용기는 고수율 결합 화학을 이용하여 작은, 비활성 분자를 결합시킴으로써 선택적으로 차단될 수 있다. 예를 들어, 이전의 물질층에 새로운 물질 층을 부착하기 위해 아민 결합 화학을 사용하는 경우에, 임의의 잔여 아민기는 후속적으로 글리신과 같은 소형 아미노산과의 결합에 의해 아세틸화 또는 탈아세틸화될 수 있다.

[0537] 표면 상에 침착된 낮은 비특이적 결합 물질, *예를 들어*, 친수성 중합체 물질 층의 수는 1 내지 약 10의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 층의 수는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5, 적어도 6, 적어도 7, 적어도 8, 적어도 9 또는 적어도 10이다. 일부 실시형태에서, 층의 수는 최대 10, 최대 9, 최대 8, 최대 7, 최대 6, 최대 5, 최대 4, 최대 3, 최대 2, 또는 최대 1개일 수 있다. 본 단락에 기재된 임의의 하한값 및 상한값은 조합되어 본 개시내용 내에 포함된 범위를 형성할 수 있고, 예를 들어, 일부 실시형태에서, 층의 수는 약 2 내지 약 4의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 모든 층은 동일한 물질을 포함할 수 있다. 일부 실시

형태에서, 각각의 층은 상이한 물질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 층은 복수의 물질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 적어도 1개의 층은 분지된 중합체를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 모든 층은 분지된 중합체를 포함할 수 있다.

[0538] 낮은 비특이적 결합 물질 중 1개 이상의 층은, 일부 경우에, 극성 양성자성 용매, 극성 또는 극성 비양성자성 용매, 비극성 용매, 또는 이들의 임의의 조합을 이용해서 기재 표면 상에 침착 및/또는 접합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 층 침착 및/또는 결합을 위해 사용되는 용매는 알코올(*예를 들어*, 메탄올, 에탄올, 프로판올 등), 다른 유기 용매(*예를 들어*, 아세토나이트릴, 다이메틸 설폭사이드(DMSO), 다이메틸 폼아마이드(DMF) 등), 물, 수성 완충제 용액(*예를 들어*, 포스페이트 완충제, 포스페이트 완충 식염수, 3-(N-몰폴리노)프로판설폰산(MOPS) 등) 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 사용되는 용매 혼합물의 유기 구성성분은 전체 중 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 포함할 수 있고, 나머지는 물 또는 수성 완충 용액으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 사용되는 용매 혼합물의 구성 구성성분은 전체의 적어도 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%를 포함할 수 있으며, 나머지는 유기 용매로 구성된다. 사용되는 용매 혼합물의 pH는 6 미만, 약 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 또는 pH 9 초과일 수 있다.

[0539] 형광 영상화는 당업자에게 알려진 임의의 다양한 형광단, 형광 영상화 기법 및 형광 영상화 기기를 사용하여 수행될 수 있다. (*예를 들어*, 뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 또는 단백질에 접합에 의해) 사용될 수 있는 적합한 형광 염료의 예는 플루오레세인, 로다민, 쿠마린, 시아닌 및 시아닌 유도체 시아닌 염료-3(Cy3), 시아닌 염료-5(Cy5), 시아닌 염료-7(Cy7) 등을 포함하는 이들의 유도체를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 사용될 수 있는 형광 이미징 기술의 예로는 형광 현미경 이미징, 형광 공초점 이미징, 2-광자 형광 등이 있지만 이들로 제한되지 않는다. 사용할 수 있는 형광 이미징 기기의 예로는 이미지 센서 또는 카메라가 장착된 형광 현미경, 공초점 형광 현미경, 2-광자 형광 현미경 또는 광원, 렌즈, 거울, 프리즘, 이색성 반사경, 조리개 및 이미지 센서 또는 카메라 등을 적절히 선택한 맞춤형 기기를 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다. 개시된 저-결합 지지 표면 및 그 위에 혼성화된 주형 핵산 서열의 클론-증폭 콜로니(폴로니)의 이미지를 획득하도록 장착된 형광 현미경의 비제한적 예로는 20배, 0.75 NA, 532 nm 광원, 532 nm 장파장 여기 및 Cy3 형광 방출 필터에 최적화된 대역 통과 및 이색성 거울 필터 세트, Semrock 532 nm 이색성 반사경 및 신호 포화를 피하기 위해 여기 광 강도를 조정하는 카메라(Andor sCMOS, Zyla 4.2)가 장착된 Olympus IX83 반전 형광 현미경이다. 종종, 이미지가 획득되는 동안 지지체 표면은 완충제(*예*: 25 mM ACES, pH 7.4 완충제) 중에 침지될 수 있다.

[0540] 일부 예에서, 개시된 반응 제형 및 낮은 비-특이적 결합 지지체를 이용하는 핵산 혼성화 및/또는 증폭 반응의 수행은 형광 영상화 기법을 이용해서 평가될 수 있으며, 여기서, 영상의 콘트라스트 대 노이즈 비(CNR)는 지지체 상의 증폭 특이성 및 비특이적 결합을 평가함에 있어서 중요한 측정 기준을 제공한다. CNR은 일반적으로 CNR = (신호 - 배경) / 노이즈로 정의된다. 배경 용어는 통상적으로, 명시된 관심 영역(region of interest: ROI)에서 특정 특징(회절 제한 스팟, DLS)을 둘러싸는 사이 영역에 대해 측정된 신호로 간주된다. 신호 대 노이즈 비(SNR)는 종종 전체 신호 품질의 기준점인 것으로 간주되지만, 개선된 CNR이 아래의 실시형태에 나타내는 바와 같이 빠른 영상 포획을 필요로 하는 적용(*예를 들어*, 주기 시간이 최소화되는 서열분석 적용)에서 신호 품질에 대한 배경으로서 SNR에 대한 유의미한 이점을 제공할 수 있다는 것으로 나타날 수 있다. 본 개시내용의 표면은 또한 본 명세서에 전문이 인용방식에 의해 원용된 공동 계류 중인 국제 특허 출원 일련 번호 PCT/US2019/061556에 제공된다.

[0541] 대부분의 앙상블-기반 서열분석 접근에서, 배경 용어는 전형적으로 '사이(interstitial)' 영역과 관련된 신호로서 측정된다. "사이" 배경(B_{inter})에 추가로, "내재(intrastitial)" 배경(B_{intra})은 증폭된 DNA 콜로니에 의해 점유되는 영역 내에 존재한다. 이러한 두 배경 신호의 조합은 달성 가능한 CNR에 영향을 주고, 후속적으로 광학 기기 요건, 아키텍처 비용, 시약 비용, 실행 시간, 비용/게놈, 및 궁극적으로 환식 어레이 기반 서열분석 적용에 대한 정확도 및 데이터 품질에 직접 영향을 미친다. B_{inter} 배경 신호는 다양한 공급원에서 발생하며; 몇 가지 예에는 소모성 플로우 셀의 자동-형광, ROI의 신호를 모호하게 할 수 있는 허위 형광 신호를 수득하는 검출 분자의 비특이적 흡착, 비특이적 DNA 증폭 산물의 존재(*예*: 프라이머 이량체로부터 생기는 것)이 포함된다. 전형적인 차세대 서열분석(NGS) 적용에서, 현재 시계(field-of-view: FOV)에서 이런 배경 신호를 시간에 따라 평균 내고, 차감한다. 개별 DNA 콜로니로부터 생기는 신호(즉, FOV에서 (S) - B_{inter})는 분류될 수 있는 식별 가능한 특징을 수득한다. 일부 예에서, 내재 배경(B_{intra})은 관심 표적에 특이적이지 않은 교락 형광 신호에 기여할 수 있지만, 동일한 ROI에 존재하고, 따라서 평균 내고 차감하는 것을 훨씬 더 어렵게 만든다.

[0542] 본 개시내용의 낮은-결합 기재에 대한 핵산 증폭의 실행은 비특이적 결합을 감소시킴으로써 B_{inter} 배경 신호를 감소시킬 수 있고, 특이적 핵산 증폭의 개선을 야기할 수 있으며, 사이 영역과 내재 영역 둘 다로부터 생긴 배경 신호에 영향을 미칠 수 있는 비특이적 증폭의 감소를 야기할 수 있다. 일부 실시형태에서, 개시된 혼성화 완충제 제형과 조합하여 선택적으로 사용되는 개시된 낮은-결합 지지체 표면은 통상적인 지지체 및 혼성화, 증폭 및/또는 서열분석 프로토콜을 이용하여 달성된 것보다 2, 5, 10, 100 또는 1000배만큼 CNR의 개선을 야기할 수 있다. 판독 또는 검출 방식으로서 형광 영상화를 사용하는 것과 관련하여 본 명세서에 기재되어 있지만, 광학 검출 방식과 비광학 검출 방식을 모두 포함하는 다른 검출 방식에 대해서도 개시된 낮은 비특이적 결합 코팅 지지체 및 핵산 혼성화 및 증폭 제형의 사용에 대한 동일한 원칙이 적용된다.

[0543] 선택적으로 개시된 혼성화 및/또는 증폭 프로토콜과 조합하여 사용되는 개시된 낮은-결합 지지체는 (i) 단백질 및 기타 반응 성분의 무시할 만한 비특이적 결합(따라서 기재 배경을 최소화함), (ii) 무시할 만한 비특이적 핵산 증폭 산물을 나타내고, (iii) 조정 가능한 핵산 증폭 반응을 제공하는 고체상 반응을 수득한다.

[0544] 일부 실시형태에서, (*예를 들어*, 직접적으로 또는 형광단으로 간접적으로 표지된) 혼성화된 또는 클론 증폭된 핵산 분자의 폴로니를 생성하기 위해 핵산 혼성화 또는 증폭 적용에서 사용될 때 개시된 낮은 배경 표면의 형광 영상는 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 20, 210, 220, 230, 240, 250 또는 250이 넘는 수의 콘트라스트 대 노이즈 비(CNR)를 나타낸다.

[0545] 일부 실시형태에서, 샘플 핵산 분자 또는 이의 상보적 서열이 시아닌 염료-3 (Cy3) 형광단으로 표지될 때, 그리고 표면이 완충제(*예*: 25 mM ACES, pH 7.4 완충제) 중에 침지되는 동안 비-신호 포화 조건하에 20 × 0.75 NA 대물렌즈, 532 nm 광원, 532 nm 여기 및 Cy3 형광 방출에 최적화된 대역통과 및 다이크로익 거울 필터 세트 및 카메라(*예*: Andor sCMOS, Zyla 4.2)가 있는 도립 형광 현미경(*예*: Olympus IX83)을 사용하여 형광 영상이 획득될 때, 표면의 형광 영상은 적어도 20의 콘트라스트-대-노이즈비(CNR)를 나타낸다.

[0546] **서열분석 중합효소**

[0547] 일부 양태에서, 본 개시내용은 핵산 분자를 서열분석하는 방법을 제공하며, 본 명세서에 기재된 임의의 서열분석 방법은 서열분석 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 유형을 사용하거나, 서열분석 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 및 복수의 다가 분자 중 적어도 하나의 유형을 사용한다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소(들)는 콘카타머 주형 분자에서 뉴클레오타이드에 마주보는 상보적 뉴클레오타이드에 혼입할 수 있다. 일부 실시형태에서, 서열분석 중합효소(들)는 콘카타머 주형 분자에서 뉴클레오타이드에 마주보는 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 단위에 결합할 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수의 서열분석 중합효소는 재조합 돌연변이체 중합효소를 포함한다.

[0548] 뉴클레오타이드 및/또는 다가 분자를 이용하는 서열분석에서 사용하기 위한 적합한 중합효소의 예는 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다: Klenow DNA 중합효소; 써머스 아쿠아티쿠스 DNA 중합효소 I(Taq 중합효소); KlenTaq 중합효소; 잠정 알티아르케알레스 고균류; 잠정 하데스고균 옐로스톤종; 하데스 고균류; 유리아케오타 고균류; 써모플라스마타 고균류; 써모코커스 중합효소(예: 써모코커스 리토랄리스, 박테리오파지 T7 DNA 중합효소); 인간 알파, 델타 및 엡실론 DNA 중합효소; T4, RB69, phi29 박테리오파지 DNA 중합효소와 같은 박테리오파지 중합효소; 피로코커스 퓨리오서스 DNA 중합효소(Pfu 중합효소); 바실러스 서브틸리스 DNA 중합효소 III; *대장균* DNA 중합효소 III 알파 및 엡실론; 9도 N 중합효소; HIV M형 또는 O형 역전사효소와 같은 역전사효소; 조류 골수아세포종 바이러스 역전사효소; 몰로니 쥐 백혈병 바이러스 (MMLV) 역전사효소; 또는 텔로머라제. DNA 중합효소의 추가적인 비제한적 예는 다양한 고세균 속, 예컨대, 에로피룸(Aeropyrum), 아카에글로부스(Archaeglobus), 데설퓨로코커스(Desulfurococcus), 파이로바쿨룸(Pyrobaculum), 파이로코커스(Pyrococcus), 파이롤로부스(Pyrolobus), 파이로딕티움(Pyrodictium), 스타필로써무스(Staphylothermus), 스테테리아, 설폴로부스(Sulfolobus), 써모코커스(Thermococcus) 및 불카니사에타(Vulcanisaeta) 등 또는 이들 변이체의 중합효소를 포함하며, 9도 N, VENT, DEEP VENT, THERMINATOR, Pfu, KOD, Pfx, Tgo 및 RB69 중합효소와 같은 당업계에 알려진 것과 같은 중합효소를 포함한다.

[0549] **뉴클레오타이드**

[0550] 일부 양태에서, 본 개시내용은 뉴클레오타이드를 사용하여 핵산 분자를 서열분석하는 방법을 제공하되, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 염기, 당 및 적어도 1개의 포스페이트기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 방향족 염기, 오탄당 (*예를 들어*, 리보스 또는 데옥시리보스) 및 1개 이상의 포스페이트기(*예를 들어*, 1 내지 10개의 포스페이트기)를 포함한다. 복수의 뉴클레오타이

드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체가 아니다. 일부 실시형태에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

[0551] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 1, 2 또는 3개의 인 원자의 사슬을 포함하며, 사슬은 전형적으로 에스터 또는 포스포르아마이드 연결을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시형태에서, 복수 중 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되는 인 사슬을 갖는 유사체이다. 일부 실시형태에서, 사슬의 인 원자는 O, S 또는 BH_3를 포함하는 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬은 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포르다이티오에이트 및 O-메틸포스포로아미다이트기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트기를 포함한다.

[0552] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 사슬 종결 모이어티(*예를 들어*, 차단 모이어티)를 갖는 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 초기 가닥에서 후속 뉴클레오타이드 단위 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소-촉매된 혼입을 저해할 수 있다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 3' 당 하이드록실 위치에 부착되고, 당은 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장 가능한 3'OH 당기를 갖는 뉴클레오타이드를 생성하는 3' 당 하이드록실 위치로부터 제거 가능/절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 알킬기, 알켄일기, 알킨일기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아자이드기, 아민기, 아마이드기, 케토기, 아이소사이아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 다이설파이드기, 카보네이트기, 우레아기, 아세탈기 또는 실릴기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는, 예를 들어, 사슬 종결 모이어티를 화학제제, pH 변화, 광 또는 열과 반응시킴으로써, 뉴클레오타이드로부터 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴은 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0) ($Pd(PPh_3)_4$)에 의해, 피페리딘에 의해 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논 (DDQ)에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C로 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 아민, 아마이드, 케토, 아이소사이아네이트, 포스페이트, 티오, 다이설파이드는 포스핀에 의해 또는 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오트리톨(DTT)을 포함하는 티올기에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중 탄산칼륨(K_2CO_3)에 의해, 피리딘 중 트라이에틸아민에 의해, 또는 아세트산(AcOH) 중 Zn에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 유레아 및 실릴은 테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF에 의해, 암모늄 플루오라이드에 의해 또는 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드에 의해 절단 가능하다.

[0553] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드에서 적어도 1개의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 사슬 종결 모이어티(*예를 들어*, 차단 모이어티)를 갖는 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 아자이드, 아지도 또는 아지도메틸기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 3'-O 아지도 또는 3'-O-아지도메틸기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기는 포스핀 화합물에 의해 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트라이-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트라이-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP) 또는 비스-설포 트라이페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트라이(하이드록시프로필)포스핀 (THPP)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단제는 4-다이메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0554] 일부 실시형태에서, 본원에 기재된 핵산 분자의 임의의 서열분석 방법에서, 뉴클레오타이드는 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-디데옥시뉴클레오타이드, 3'-메틸,3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에티닐, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-디플루오로메틸, 3'-트리플루오로메틸, 3'-술포닐, 3'-말로닐, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-술히드랄, 3 '-아미노메틸, 3'-에틸, 3'부틸, 3'-*tert* 부틸, 3'-플루오레닐메틸옥시카르보닐, 3' *tert*-부틸옥시카르보닐, 3'-O-알킬 하이드록실아미노기, 3'-포스포로티오에이트 및

3-O-벤질 또는 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 사슬 종결 모이어티를 포함한다.

[0555] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시형태에서, 형광단은 염기로부터 절단 가능/제거 가능한 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시형태에서, 복수 중 뉴클레오타이드 중 적어도 하나는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지되지 않는다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(*예를 들어*, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기(*예를 들어*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0556] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 서열분석 핵산 분자에 대한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상에서 절단 가능한 링커는 알킬기, 알켄일기, 알킨일기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아자이드기, 아민기, 아마이드기, 케토기, 아이소사이아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 다이설파이드기, 카보네이트기, 우레아기, 아세탈기 또는 실릴기를 포함하는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 염기 상의 절단 가능한 링커는 절단 가능한 모이어티를 화학 제제, pH 변화, 광 또는 열과 반응시킴으로써 염기로부터 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, 절단 가능 모이어티 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴은 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0) ($Pd(PPh_3)_4$)에 의해, 피페리딘에 의해 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 절단 가능한 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C로 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 절단 가능 모이어티 아민, 아마이드, 케토, 아이소사이아네이트, 포스페이트, 티오, 다이설파이드는 포스핀에 의해 또는 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오트리톨(DTT)을 포함하는 티올기에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 절단 가능 모이어티 카보네이트는 MeOH 중 탄산칼륨(K_2CO_3)에 의해, 피리딘 중 트라이에틸아민에 의해, 또는 아세트산(AcOH) 중 Zn에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 절단 가능 모이어티 유레아 및 실릴은 테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF에 의해, 암모늄 플루오라이드에 의해 또는 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드에 의해 절단 가능하다.

[0557] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능 링커는 아자이드, 아지도 또는 아지도메틸기를 포함하는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단 가능 모이어티 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기는 포스핀 화합물에 의해 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트라이-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트라이-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트라이페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트라이(하이드록시프로필)포스핀 (THPP)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단제는 4-다이메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0558] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 사슬 종결 모이어티(*예를 들어*, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에서) 및 제거 가능 링커는 동일 또는 상이한 제거 가능 모이어티를 갖는다. 일부 실시형태에서, (*예를 들어*, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에서) 사슬 종결 모이어티 및 염기에 연결된 검출 가능한 리포터 모이어티는 동일한 화학 제제에 의해 화학적으로 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, (*예를 들어*, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에서) 사슬 종결 모이어티 및 염기에 연결된 검출 가능한 리포터 모이어티는 상이한 화학 제제에 의해 화학적으로 절단 가능/제거 가능하다.

[0559] **다가 분자**

[0560] 일부 양태에서, 본 개시내용은 다가 분자를 사용하는 핵산 분자를 서열분석하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 다가 분자는 코어에 부착되고 스타버스트, 헬터 스켈터 또는 보틀 브러쉬 입체구조를 포함하는 임의의 입체구조를 갖는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함한다(*예*: **도 22**). 일부 실시형태에서, 다가 분자는 (1) 코어; 및 (2) (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커, 및 (iv) 뉴클레오타이드 단위를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함하며, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되며, 링커는 뉴클레오타이드 단위에 부착된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 단위는 염기, 당 및 적어도 1개의 포스페이트기를 포함하며, 링커는 염기를 통해 뉴클레오타이드 단위에 부착된다. 일부 실시형태에서, 링커는 지방족 사슬 또는 올리고 에틸렌 글리콜 사슬을 포함하며, 링커 사슬 둘 다 2 내지 6개의 서브유닛을 갖는다. 일부 실시형태에서, 링커는 또한 방향족 모이어티를 포함한다. 예시적인 뉴클레오타이드 아암은 **도 26**에 도시되어 있다. 예시적인 다가 분자는 **도 22 내지 도 25**에 나타낸다. 예시적인 스페이서는 **도 27**(위)에 나타내고, 예시적인 링커는 **도 27**(아래) 및 **도 28**에 도시되어 있다. 링커에 부착된 예

시적인 뉴클레오타이드는 **도 29 내지 도 31**에 도시되어 있다. 예시적인 바이오틴일화된 뉴클레오타이드 아암은 **도 32**에 나타낸다.

[0561] 일부 실시형태에서, 다가 분자 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 다중 뉴클레오타이드 아암은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 유형의 뉴클레오타이드 단위를 갖는다.

[0562] 일부 실시형태에서, 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하며, 여기서, 각 아암은 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 뉴클레오타이드 단위는 방향족 염기, 오탄당(*예를 들어*, 리보스 또는 데옥시리보스), 및 1개 이상의 포스페이트기(*예를 들어*, 1 내지 10개의 포스페이트기)를 포함한다. 복수의 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 유형의 뉴클레오타이드 단위를 갖는 하나의 유형의 다가 분자를 포함할 수 있다. 복수의 다가 분자는 둘 이상의 유형의 다가 분자의 임의의 조합을 혼합물을 포함할 수 있으며, 혼합물 중의 개개 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 단위를 포함한다.

[0563] 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 단위는 1, 2 또는 3개의 인 원자의 사슬을 포함하며, 사슬은 전형적으로 에스터 또는 포스포르아마이드 연결을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시형태에서, 적어도 1개의 뉴클레오타이드 단위는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되는 인 사슬을 갖는 뉴클레오타이드 유사체이다. 일부 실시형태에서, 사슬의 인 원자는 O, S 또는 BH_3를 포함하는 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬은 포스포르아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포르다이티오에이트 및 O-메틸포스포로아미다이트기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트기를 포함한다.

[0564] 일부 실시형태에서, 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 개개 뉴클레오타이드 아암은 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서 또는 당 2' 및 3' 위치에서 사슬 종결 모이어티(*예를 들어*, 차단 모이어티)를 갖는 뉴클레오타이드 유사체인 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 단위는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서 또는 당 2' 및 3' 위치에서 사슬 종결 모이어티(*예를 들어*, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 초기 가닥에서 후속 뉴클레오타이드 단위 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소-촉매된 혼입을 저해할 수 있다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 3' 당 하이드록실 위치에 부착되고, 당은 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 중합효소-촉매된 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장 가능한 3'OH 당기를 갖는 뉴클레오타이드를 생성하는 3' 당 하이드록실 위치로부터 제거 가능/절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 알킬기, 알켄일기, 알킨일기, 알릴기, 아릴기, 벤질기, 아자이드기, 아민기, 아마이드기, 케토기, 아이소사이아네이트기, 포스페이트기, 티오기, 다이설파이드기, 카보네이트기, 우레아기, 아세탈기 또는 실릴기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는, 예를 들어, 사슬 종결 모이어티를 화학 제제, pH 변화, 광 또는 열과 반응시킴으로써, 뉴클레오타이드 단위로부터 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 알킬, 알켄일, 알킨일 및 알릴은 테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0) ($Pd(PPh_3)_4$)에 의해, 피페리딘에 의해 또는 2,3-다이클로로-5,6-다이사이아노-1,4-벤조-퀴논 (DDQ)에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C로 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 아민, 아마이드, 케토, 아이소사이아네이트, 포스페이트, 티오, 다이설파이드는 포스핀에 의해 또는 베타-머캅토에탄올 또는 다이티오트리톨(DTT)을 포함하는 티올기에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중 탄산칼륨(K_2CO_3)에 의해, 피리딘 중 트라이에틸아민에 의해, 또는 아세트산(AcOH) 중 Zn에 의해 절단 가능하다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 유레아 및 실릴은 테트라뷰틸암모늄 플루오라이드, 피리딘-HF에 의해, 암모늄 플루오라이드에 의해 또는 트라이에틸아민 트라이하이드로플루오라이드에 의해 절단 가능하다.

[0565] 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 단위는 당 2' 위치에서, 당 3' 위치에서 또는 당 2' 및 3' 위치에서 사슬 종결 모이어티(*예를 들어*, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 아자이드, 아지도 또는 아지도메틸기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티는 3'-O 아지도 또는 3'-O-아지도메틸기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 사슬 종결 모이어티 아자이드, 아지도 및 아지도메틸기는 포스핀 화합물에 의해 절단 가능/제거 가능하다. 일부 실시형태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트라이-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트라이-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시형태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP) 또는 비스-설포 트라이페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트라이(하이드록시프로필)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 절단제는 4-다이메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0566] 일부 실시형태에서, 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-디데옥시뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에티닐, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-디플루오로메틸, 3'-트리플루오로메틸, 3'-술포닐, 3'-말로닐, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-술프하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'부틸, 3'-*tert* 부틸, 3'-플루오레닐메틸옥시카르보닐, 3'-*tert*-부틸옥시카르보닐, 3'-O-알킬히드록실아미노 그룹, 3'-포스포로티오에이트 및 3-O-벤질 또는 이들의 유도체로 이루어진 군에서 선택된 사슬 종결 모이어티를 포함한다.

[0567] 일부 실시형태에서, 다가 분자는 다중 뉴클레오타이드 아암에 부착되는 코어를 포함하되, 뉴클레오타이드 아암은 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 단위를 포함하고, 코어, 링커 및/또는 뉴클레오타이드 단위는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지된다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(*예를 들어*, 형광단)는 뉴클레오타이드 단위의 염기(*예를 들어*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0568] 일부 실시형태에서, 다가 분자의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 아암은 검출 가능한 리포터 모이어티에 부착된 뉴클레오타이드 단위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시형태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시형태에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(*예를 들어*, 형광단)는 뉴클레오타이드 단위의 염기(*예를 들어*, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응하여 뉴클레오타이드 염기의 검출 및 식별을 가능하게 할 수 있다.

[0569] 일부 실시형태에서, 다가 분자의 코어는 아비딘-유사 또는 스트렙타비딘-유사 모이어티를 포함하고, 코어 부착 모이어티는 바이오틴을 포함한다. 일부 실시형태에서, 코어는 아비딘 단백질을 포함하는 스트렙타비딘-형 또는 아비딘-형 모이어티뿐만 아니라 임의의 유도체, 유사체 및 적어도 1개의 바이오틴 모이어티에 결합할 수 있는 아비딘의 다른 비천연 형태를 포함한다. 아비딘 모이어티의 다른 형태는 천연 및 재조합 아비딘 및 스트렙타비딘뿐만 아니라 유도체화된 분자뿐만 아니라 유도체화된 분자, *예를 들어*, 비글리코실화된 아비딘 및 절단된 스트렙타비딘을 포함한다. 예를 들어, 아비딘 모이어티는 아비딘의 탈글리코실화된 형태, *스트렙토마이세스* (Streptomyces) (*예*: *스트렙토마이세스 아비디니*(Streptomyces avidinii))에 의해 생성된 박테리아 스트렙타비딘뿐만 아니라 유도체화된 형태, *예를 들어*, N-아실 아비딘, 예컨대 N-아세틸, N-프탈일 및 N-석신일 아비딘 및 시판 제품인 EXTRAVIDIN™, CAPTAVIDIN™, NEUTRAVIDIN™ 및 NEUTRALITE AVIDIN™을 포함할 수 있다.

[0570] 일부 실시형태에서, 서열분석 본 명세서에 기재된 핵산 분자를 서열분석하기 위한 임의의 방법은 결합 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서, 결합 복합체는 (i) 중합효소, 프라이머와 듀플렉스화된 핵산 콘카타머 분자 및 뉴클레오타이드를 포함하거나, 결합 복합체는 (ii) 중합효소, 프라이머와 듀플렉스화된 핵산 콘카타머 분자 및 다가 분자의 뉴클레오타이드 단위를 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 복합체는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1초 초과의 지속 시간을 갖는다. 결합 복합체는 약 0.1 내지 0.25초, 또는 약 0.25 내지 0.5초, 또는 약 0.5 내지 0.75초, 또는 약 0.75 내지 1초, 또는 약 1 내지 2초, 또는 약 2 내지 3초, 또는 약 3 내지 4초, 또는 약 4 내지 5초 초과의 지속 시간을 갖고/갖거나, 상기 방법은 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 35℃ 이상, 37℃ 이상, 42℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상 또는 72℃ 이상, 또는 80℃ 이상에서 또는 임의의 앞서 언급한 것에 의해 정해진 범위 내에서 수행될 수 있다. 결합 복합체(*예를 들어*, 삼원 복합체)는 임의의 중합효소, 주형 분자, 프라이머 및/또는 뉴클레오타이드 단위 또는 뉴클레오타이드 사이의 해리를 야기하는 조건을 가할 때까지 안정하게 남아있다. 예를 들어, 해리 조건은 결합 복합체를 세정제, EDTA 및/또는 물 중 어느 하나 또는 임의의 조합과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 방법을 제공하되, 결합 복합체는 검출 단계에서 콘트라스트 대 노이즈비를 20 초과로 나타내는 표면에 침착되거나, 부착되거나, 혼성화된다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 방법을 제공하되, 접촉은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위가 주형 핵산의 다음 염기에 상보적일 때 결합 복합체를 안정화하고, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단위가 주형 핵산의 다음 염기에 상보적이 아닐 때 결합 복합체를 탈안정화시키는 조건하에 수행된다.

[0571] **실시예**

[0572] 다음의 실시예는 예시적인 것으로 의도되며, 본 개시내용의 실시형태를 추가로 이해하기 위해 사용할 수 있고, 본 교시의 범주를 어떤 방식으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0573] **실시예 1: 입력 DNA 단편화**

[0574] 유전체 DNA는 두 가지 다른 방법을 사용하여 단편화되었다. 효소 FRAGMENTASE ULTRA™(New England Biolabs™의)를 사용하여 유전체 DNA를 단편화하였다. 1 ng/μL 내지 1000 ng/μL을 포함하는 다양한 입력량의 유전체 DNA를 시험하였다. 가장 낮은 범위에서, 1 ng의 유전체 DNA만을 시험하였다. 단편화 반응에는 FRAGMENTASE™ 반응 완충액 7 μL, FRAGMENTASE™ 효소 2 μL, 유전체 DNA 26 μL가 포함되었다. 단편화 반응물을 37℃에서 15분 동안 인큐베이션시켰고, 65℃에서 30분 동안 가열 사멸시켰다. 평균 단편화된 DNA는 대략 250 bp였다. 단편화된 DNA를 효소 단부-수선 및 A-꼬리화 반응으로 처리하였다.

[0575] Covaris를 사용하여 전단함으로써 유전체 DNA를 또한 단편화하여 약 200, 250, 350 및 400 bp의 삽입 크기를 달성했다. 선형 라이브러리 분자를 제조하기 위해 입력된 단편화 핵산의 양은 50 ng, 100 ng, 500 ng 및 1 ug을 포함하였다.

[0576] **실시예 2: 라이브러리 분자 준비**

[0577] 단편화된 이중 가닥 DNA는 양쪽 말단이 Y자 모양의 어댑터에 결찰되었다. Y자형 어댑터는 각각 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이 서열을 갖는 제1 올리고뉴클레오타이드 가닥 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열의 전체 길이 또는 부분 길이를 갖는 제2 올리고뉴클레오타이드 가닥을 포함했다. 예시적인 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열 및 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열은 **표 1**에 열거되어 있다. 생성된 이중 가닥 라이브러리 분자(100)를 열 변성시켜 복수의 단일 가닥 라이브러리 분자(100)를 생성하였다. 예시적인 단일 가닥 라이브러리 분자(100)는 **도 1**과 **도 3**에 도시되어 있다.

[0578] **실시예 3: 이중 가닥 스플린트 어댑터 준비**

[0579] 이중 가닥 스플린트 어댑터는 제2 스플린트 가닥(400)에 혼성화된 제1 스플린트 가닥(300)을 포함하였다. 예시적인 이중 가닥 스플린트 어댑터를 **도 2**에 도시되어 있다. 이중 가닥 스플린트 어댑터는 NaOH를 사용하여 실온에서 5분간 변성시킨 후 37℃에서 5분간 어닐링했다. 또는, 이중 가닥 스플린트 어댑터를 열 변성시킨 다음 37℃에서 5분간 어닐링했다.

[0580] 제1 스플린트 가닥은 제1 영역(320), 내부 영역(310) 및 제2 영역(330)을 포함했다. 제1 스플린트 가닥의 제1 영역(320)은 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 정방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열에 혼성화할 수 있다. 제1 스플린트 가닥의 제2 영역(330)은 단일 가닥 라이브러리 분자(100)의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열에 혼성화할 수 있다. 제1 스플린트 가닥의 영역 (320) 및 (330)에 대한 예시적인 서열은 **표 2**에 열거되어 있다.

[0581] **실시예 4: 라이브러리-스플린트 복합체 준비**

[0582] 단일 가닥 라이브러리 분자(100)는 열 순환기 장치에서 100 mM 아세트산 칼륨과 30 mM HEPES(pH 7.5)를 함유하는 어닐링 완충액에서 이중 가닥 스플린트 어댑터(200)(*예*: **도 3**)에 어닐링되었다. 어닐링 프로그램은 95℃에 5분, 37℃에 5분을 포함하고, 37℃에서의 유지를 포함하였다.

[0583] 라이브러리-스플린트 복합체의 제1 실시형태에서, 개별 단일 가닥 라이브러리 분자(100)는 인간 유전체 서열을 포함하는 삽입 영역(110), 서열 5'-CGTGCTGGATTGGCTCACCAGACACCTTCCGACAT-3'(서열 번호:51)를 갖는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열 및 5'- ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT -3'(서열 번호:4)를 갖는 역방향 시퀀싱 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열을 포함했다. 제2 스플린트 가닥(400)은 제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함했다. 제1 하위 영역(411)은 서열 3'-TGGGACTTTCATGCACG-5'(서열 번호:24)를 갖는 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함했다. 제2 하위 영역(412)은 짧은 무작위 서열(NNN)과 4개의 샘플 인덱스 서열 중 하나를 포함했다. 제3 하위 영역(413)은 서열 3'- TAATGTACCTAGTCCACTCCGA -5'(서열 번호:19)를 갖는 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함했다. 표면 포획 프라이머 결합 서열, 표면 고정 프라이머 결합 서열 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 짧은 스플린트 가닥(400)의 다른 예시적인 서열은 **표 3**에 열거되어 있다.

[0584] 라이브러리-스플린트 복합체의 제2 실시형태에서, 개별 단일 가닥 라이브러리 분자(100)는 인간 유전체 서열을 포함하는 삽입 영역(110), 서열 5'-CGTGCTGGATTGGCTCACCAGACACCTTCCGACAT-3'(서열 번호:1)를 갖는 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(120)에 대한 범용 서열 및 5'- ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT -3'(서열 번호:4)를 갖는 역방향 시퀀싱 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열을 포함했다. 제2 스플린트 가닥(400)은

제1, 제2 및 제3 하위 영역을 포함하는 적어도 3개의 하위 영역을 포함했다. 제1 하위 영역(411)은 서열 3'-TGGGACTTTCATGCACGTAATGTAC-5'(서열 번호:7)을 갖는 고정된 표면 고정 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함했다. 제2 하위 영역(412)은 서열 3'-CTAGTCCACTCCGACGCTGCTGA-5'(서열 번호:18)을 갖는 고정된 표면 포획 프라이머에 대한 범용 결합 서열을 포함했다. 제3 하위 영역(413)은 짧은 무작위 서열(NNN)과 4개의 샘플 인덱스 서열 중 하나를 포함했다. 이 제2 실시형태에서, 공유결합 폐환형 분자(600)를 생성하기 위한 결찰 반응 후, 하위 영역(413)의 짧은 무작위 서열(NNN)과 샘플 인덱스 서열이 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)의 역방향 서열분석 프라이머 결합 부위(130)에 대한 범용 서열에 결합되었다(*예*: 아래의 실시예 5 *참조*). 표면 포획 프라이머 결합 서열, 표면 고정 프라이머 결합 서열 및 샘플 인덱스 서열에 대한 다른 예시적인 서열은 **표 3**에 열거되어 있다.

[0585] **실시예 5: 공유결합 폐환형 라이브러리 분자의 제조**

[0586] 어닐링 혼합물 T7 DNA 리가제 및 T4 폴리뉴클레오타이드 키나제에 T4 DNA 리가제 반응 완충제를 첨가함으로써 실시예 4로부터의 어닐링 혼합물에 효소적 결찰 및 인산화 반응을 가하였다. 효소 혼합물을 75℃로 설정된 가열 뚜껑이 있는 열 순환 장치에서 배양했다. 열 순환 장치 프로그램에는 37도에서 10분, 65도에서 10분, 4도에서 유지가 포함되었다. 결찰 및 인산화 반응은 제1 스플린트 가닥(300)에 혼성화된 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(600)를 생성하였다(*예*: **도 4**).

[0587] 결찰/인산화 반응 혼합물 T7 엑소뉴클레아제 및 열불안정 엑소뉴클레아제에 첨가함으로써 효소 엑소뉴클레아제 분해를 수행하였다. 엑소뉴클레아제 반응 혼합물을 37℃에서 10분, 80℃에서 2분 및 4℃에서의 유지로 프로그래밍된 열 순환 장치에서 인큐베이션시켰다.

[0588] 엑소뉴클레아제 반응 혼합물에 SPRI SELECT™ 비드(Beckman Coulter™의)를 사용하여 여러 주기의 세정을 거쳤다.

[0589] Qubit 또는 qPCR을 사용하여 공유결합 폐환형 라이브러리 분자(*예*: 단일 가닥 분자)의 세정된 제제의 수율을 정량화하였다.

[0590] **실시예 6: 회전환 증폭 및 서열분석**

[0591] 실시형태 5으로부터의 공유결합 폐환형 라이브러리 분자를 고효율 혼성화 완충제의 존재하에 낮은 비특이적 결합 코팅에 의해 부동태화된 지지체 상에 분배되었고, 지지체 상의 회전환 증폭을 가하여 고정된 콘카타머를 생성하였다. 낮은 비특이적 결합 코팅은 복수의 고정된 표면 포획 프라이머와 표면 고정 프라이머를 포함했다. 예시적인 표면 포획 및 고정 프라이머는 **표 4**에 열거되어 있다.

[0592] **실시예 7: 다가 분자와 뉴클레오타이드를 사용한 서열분석**

[0593] 제1 단계의 형광-표지된 다가 분자 및 제2 단계의 비표지된 뉴클레오타이드 유사체(*예*: 3' 사슬 종결자 차단기)를 사용하여 콘카타머에 반복적 2단계 서열분석 반응을 가하였다.

[0594] 복수의 콘카타머 주형 분자가 고정된(*예*: 고정된 폴로니) 플로우 셀 상에서 2단계 서열분석 반응을 수행하였다.

[0595] 플로우 셀에 고정된 콘카타머 주형 분자에 복수의 가용성 서열분석 프라이머를 혼성화시켜 고정된 프라이머-콘카타머 듀플렉스를 형성함으로써 제1 단계 서열분석 반응을 수행하였다. 복수의 제1 서열분석 중합효소를 플로우 셀에 흐르게 하고(*예*: 고정된 프라이머-콘카타머 듀플렉스와 접촉시킴), 서열분석 중합효소를 듀플렉스에 결합시키기에 적합한 조건에서 인큐베이션시켜 복합체화된 중합효소를 형성했다. (*예*: 약 20 내지 100 nM의 상이한 농도에서) 형광 표지된 다가 분자의 혼합물을 비-촉매 양이온(*예*: 스트론튬, 바륨 및/또는 칼슘)을 포함하는 완충제의 존재하에 플로우 셀 상에 흐르게 하였고, 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 단위를 복합체화된 중합효소에 결합시키는 데 적합한 조건에서 인큐베이션시켜 뉴클레오타이드 단위의 중합효소-촉매 혼입 없이 결합활성 복합체를 형성했다. 형광 표지된 다가 분자를 이들의 코어에서 표지하였다. 복합체화된 중합효소를 세척하였다. 복합체화된 중합효소에 결합된 채로 남은 형광 표지된 다가 분자의 이미지를 얻었다. 제1 서열분석 중합효소 및 다가 분자를 제거하는 한편, 세정제를 포함하는 완충제로 세척함으로써 고정된 콘카타머(듀플렉스 보유)에 혼성화된 서열분석 프라이머를 유지하였다.

[0596] 제1 단계 서열분석 반응은 콘카타머 주형 분자(*예*: 폴로니) 상에서 복수의 결합활성 복합체를 형성하는 데 적합하였다. 예를 들어, 제1 단계 서열분석 반응은 다음을 포함한다: **(a)** 제1 핵산 프라이머, 제1 중합효소 및 제1 다가 분자를 콘카타머 주형 분자의 제1 부분에 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하기, 여기서 제1 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 단위는 제1 중합효소에 결합되었다; 및 **(b)** 제2 핵산 프라이머, 제2 중합효소 및 제1 다가

분자를 동일한 콘카타머 주형 분자의 제2 부분에 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하기, 여기서 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 단위는 제2 중합효소에 결합하고, 동일한 다가 분자를 포함하는 제1 및 제2 결합 복합체는 제1 결합활성 복합체를 형성했다.

[0597] 유지된 듀플렉스를 복수의 제2 서열분석 중합효소와 접촉시킴으로써 제2 단계 서열분석 반응을 수행하여 복합체화된 중합효소를 형성했다. (*예를 들어*, 약 1 내지 5 μM의 상이한 농도에서) 비표지된뉴클레오타이드 유사체(*예*: 3'O-메틸아지도 뉴클레오타이드)의 혼합물을 촉매 양이온(*예*: 마그네슘 및/또는 망간)을 포함한 완충제의 존재하에 복합체화된 중합효소에 첨가하였고, 상보적 뉴클레오타이드를 복합체화된 중합효소에 결합하는 데 적합한 조건에서 인큐베이션시키고, 뉴클레오타이드의 중합효소-촉매 혼입을 촉진시켜 초기 연장된 서열분석 프라이머를 생성하였다. 복합체화된 중합효소를 세척하였다. 획득된 영상은 없었다. 혼입된 비표지 뉴클레오타이드 유사체를 3' O-메틸아지도 기를 제거하고 연장 가능한 3'OH 기를 생성하는 절단 시약과 반응시켰다.

[0598] 제2 서열분석 중합효소를 제거하는 한편, 세정제를 포함하는 완충제로 세척함으로써 콘카타머(듀플렉스 보유)에 혼성화된 초기의 연장된 서열분석 프라이머를 유지하였다. 제1 단계 및 제2 단계 서열분석 반응의 다회 주기를 수행함으로써 반복 서열분석 반응을 수행하여 연장된 정방향 서열분석 프라이머 가닥을 생성하였다.

[0599] 위의 예 4에 기재된 라이브러리-스플린트 복합체의 제1 실시형태에서 생성된 고정된 콘카타머의 경우, 서열분석 순서는 다음을 포함한다: (1) 정방향 서열분석 프라이머를 사용하여 삽입 영역(110)을 서열분석하여 복수의 정방향 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계; (2) 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; (3) 역방향 서열분석 프라이머를 사용하여 삽입 영역(110)을 서열분석하여 복수의 역방향 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계; 및 (4) 서열 5'- ACCCTGAAAGTACGTGC -3'을 갖는 역방향 서열분석 프라이머를 사용하여 짧은 무작위 서열(NNN)과 샘플 인덱스 서열을 서열분석하여 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물을 생성하는 단계. 서열분석 결과는 아래 **표 A**에 열거되어 있다.

[0600] [표 A]

원형 라이브러리 로딩 농도	원시 읽기(백만)	통과 필터 속도	R1 Q30	R2 Q30	인덱스 할당율
9 pM	883 M	96.2%	99.0%	97.7%	95%
9 pM	750 M	95.3%	94.8%	91.5%	94.4%

[0601]

[0602] 위의 실시예 4에 설명된 라이브러리-스플린트 복합체의 제2 실시형태에서 생성된 고정된 콘카타머의 경우, 서열분석 순서에는 다음이 포함된다: (1) 서열을 갖는 정방향 서열분석 프라이머를 사용하여 짧은 무작위 서열(NNN)과 샘플 인덱스 서열의 서열분석 5' - ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT -3'(서열 번호:4)를 갖는 정방향 시퀀싱 프라이머를 사용하여 서열분석하여 복수의 샘플 인덱스 연장 생성물 생성하는 단계; (2) 정방향 서열분석 프라이머를 사용하여 삽입 영역(110)을 서열분석하여 복수의 정방향 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계; (3) 쌍방향 회전 반응을 수행하는 단계; 및 (4) 역방향 서열분석 프라이머를 사용하여 삽입 영역(110)을 서열분석하여 복수의 역방향 삽입 연장 생성물을 생성하는 단계. 서열분석 결과는 아래 **표 B**에 열거되어 있다.

[0603] [표 B]

원형 라이브러리 로딩 농도	원시 읽기(백만)	통과 필터 읽기(백만)	통과 필터 속도	R1 Q30	R2 Q30
12 pM	1116 M	994.3	89.1%	94.4%	93.4%
12 pM	1126 M	991.6	88/0%	94.3%	92.9%

[0604]

[0605] **인용방식에 의한 원용**

[0606] 본 출원 전체적으로 다양한 간행물, 특허 및/또는 특허 출원이 언급된다. 간행물, 특허 및/또는 특허 출원의 개시내용은 본 개시내용이 속하는 기술분야를 더 완전하게 설명하기 위해 본 출원에 이들의 전문이 인용방식에 의해 원용된다.

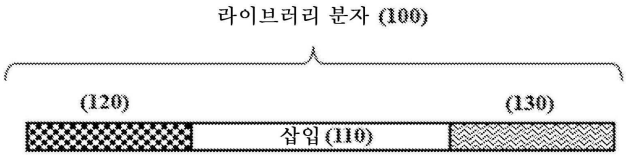
[0607] **동등물**

[0608] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태의 상세사항은 위 설명에서 첨부되어 있다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 개시내용의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 이제 바람직한 방법 및 재료가 기술된다. 본 개시내용의 다른 특징, 목적 및 장점은 설명 및 청구항으로부터 명백해질 것이다. 명세서와 첨부된 청구항에서 단수형은 문맥상 명백하게 달리 규정되지 않는 한 복수형의 지시 대상을 포함한다. 다르게 정의되지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어들은 본 개시내용이 속하는 분야에서 통상의 기술을 가진 자가 공통적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 간행물은 인용방식에 의해 원용된다.

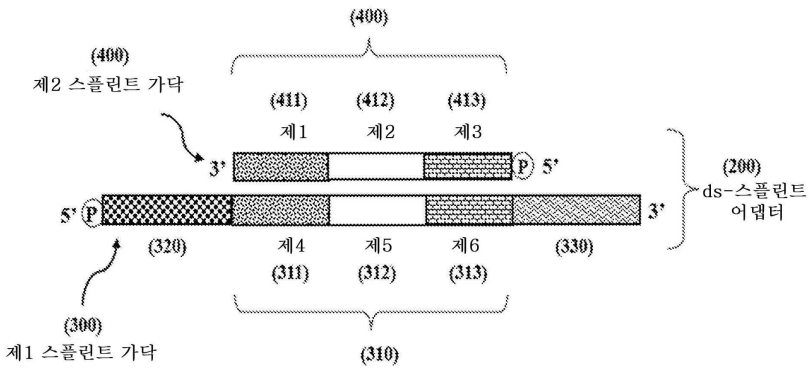
[0609] 앞서 설명한 내용은 예시 목적으로만 제시되었으며, 개시된 정확한 형태가 아닌 여기에 첨부된 청구항에 의해 개시내용이 제한되도록 의도된 것이 아니다.

도면

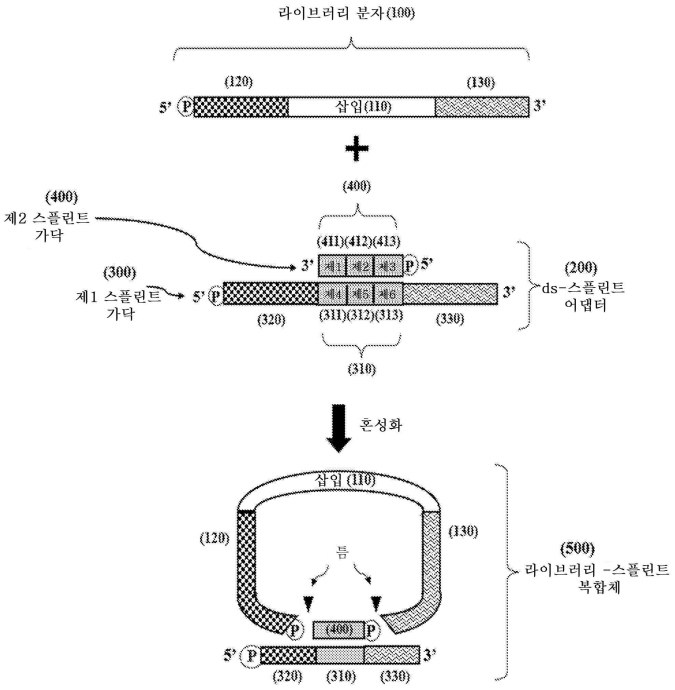
도면1



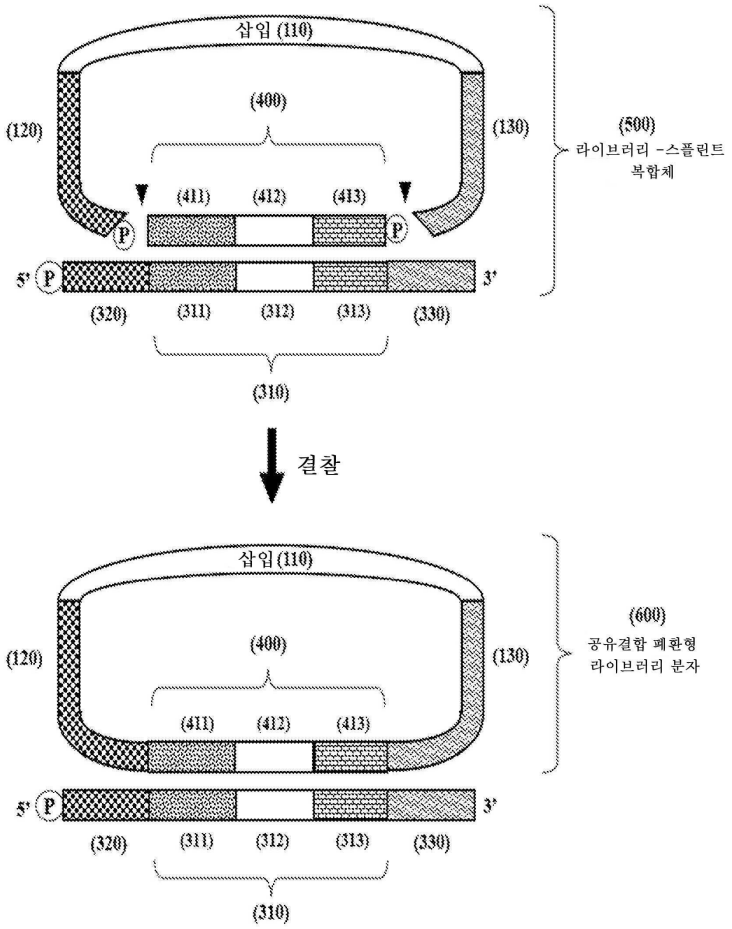
도면2



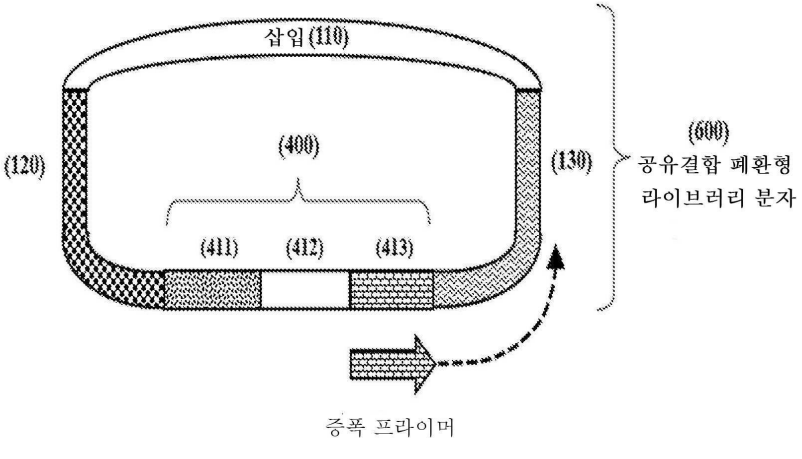
도면3


라이브러리 분자(100)
(120)
(130)
5'
P
삽입(110)
3'
(400)
제2 스플린트
가닥
(400)
(411)(412)(413)
3'
제1
제2
제3
P
5'
(300)
제1 스플린트
가닥
5'
P
제4
제5
제6
3'
(200)
ds-스플린트
어댑터
(320)
(311)(312)(313)
(330)
(310)
혼성화
삽입 (110)
(120)
(130)
(500)
라이브러리 -스플린트
복합체
P
(400)
P
5'
P
3'
(320)
(310)
(330)

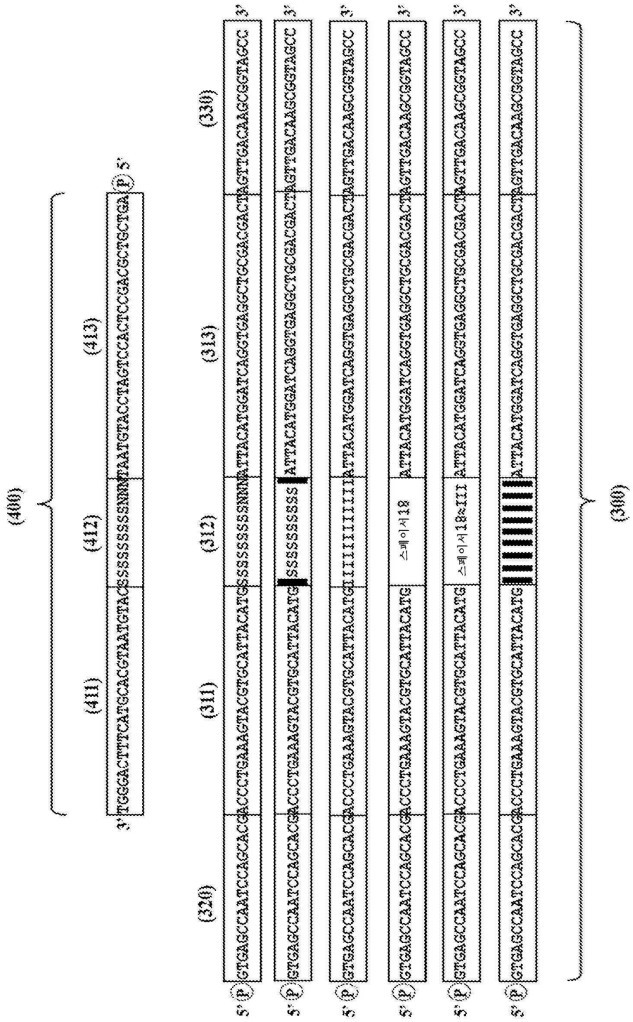
도면4


삽입 (110)
(400)
(120)
(130)
(411)
(412)
(413)
P
P
5'
P
3'
(320)
(311)
(312)
(313)
(330)
(310)
(500)
라이브러리 -스플린트
복합체
결찰
삽입 (110)
(400)
(120)
(130)
(411)
(412)
(413)
5'
P
3'
(320)
(311)
(312)
(313)
(330)
(310)
(600)
공유결합 폐환형
라이브러리 분자

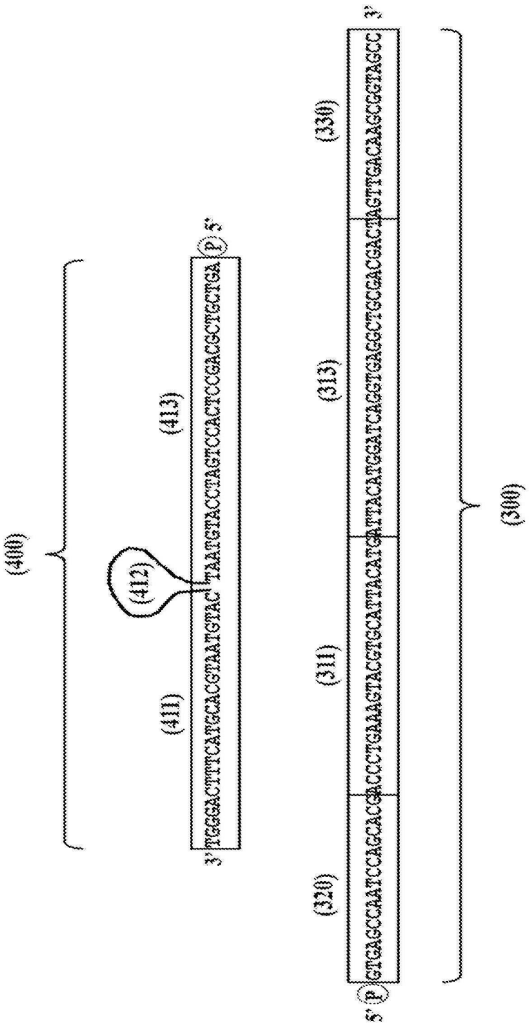
도면5


삽입 (110)
(400)
(120)
(130)
(411)
(412)
(413)
(600)
공유결합 폐환형
라이브러리 분자
증폭 프라이머

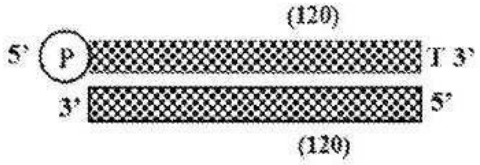
도면6



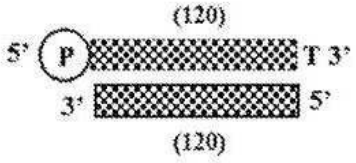
도면7



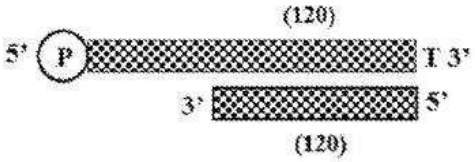
도면8a



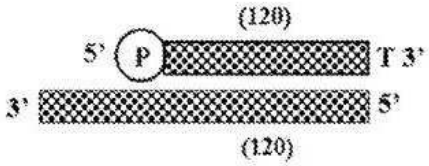
도면8b



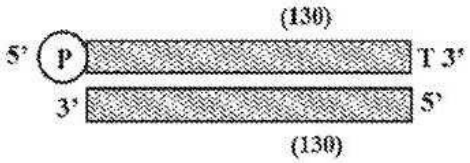
도면8c



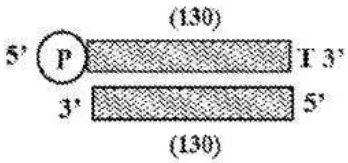
도면8d



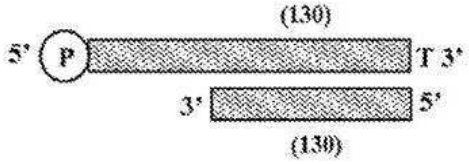
도면9a



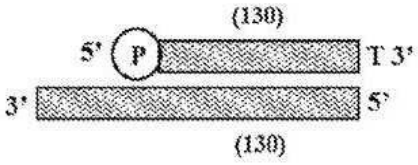
도면9b



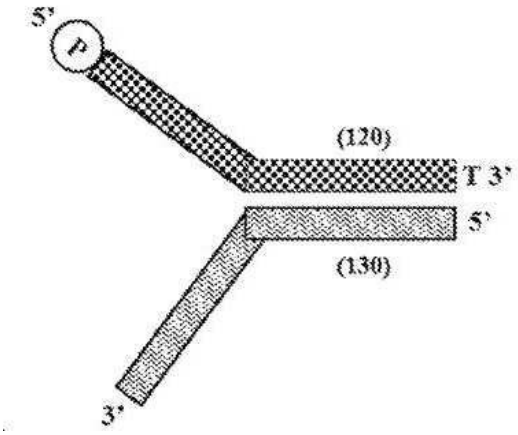
도면9c



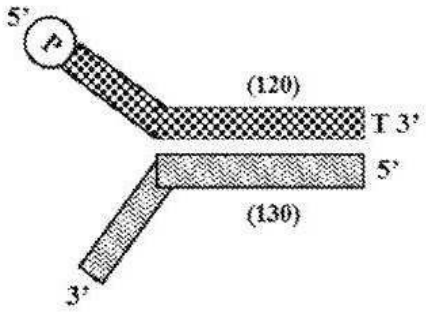
도면9d



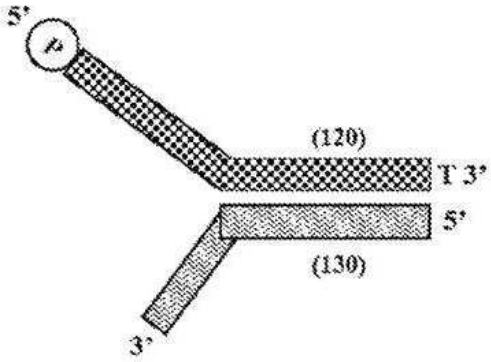
도면10a



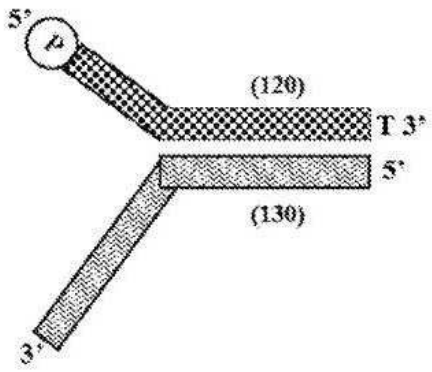
도면10b



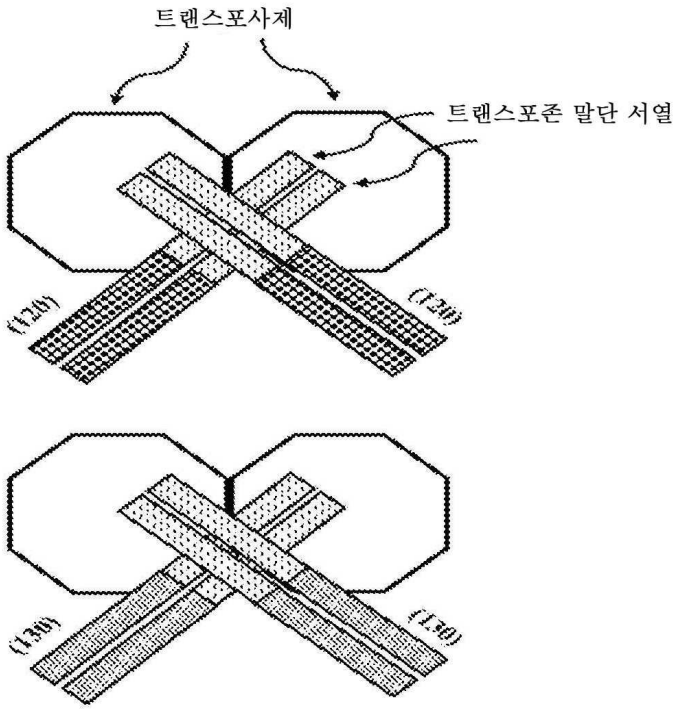
도면10c



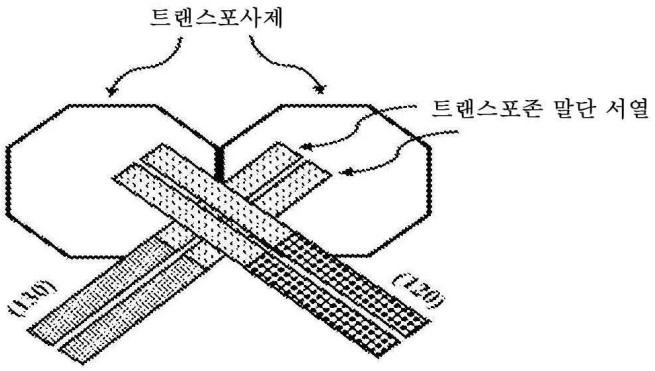
도면10d



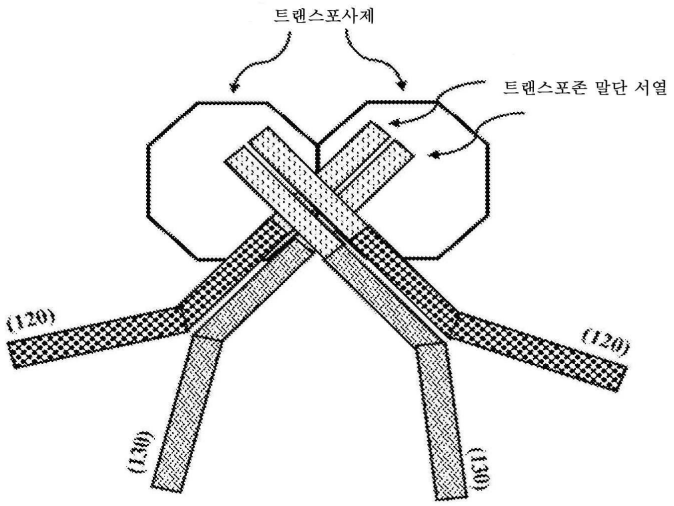
도면11a



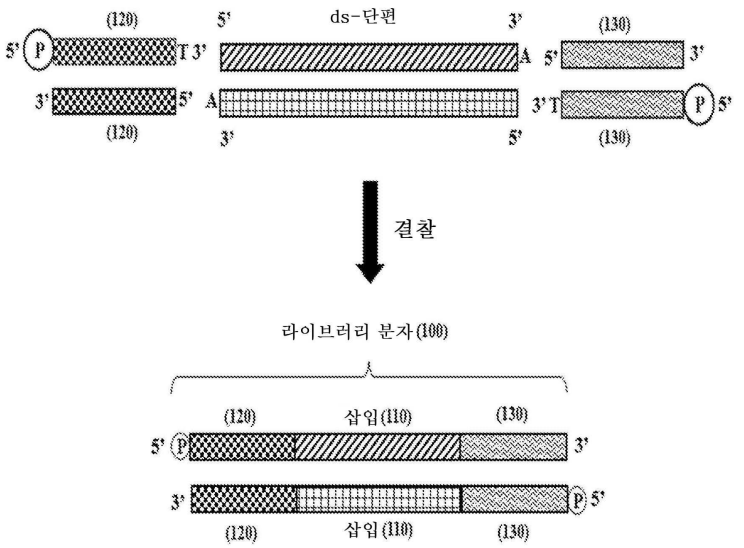
도면11b



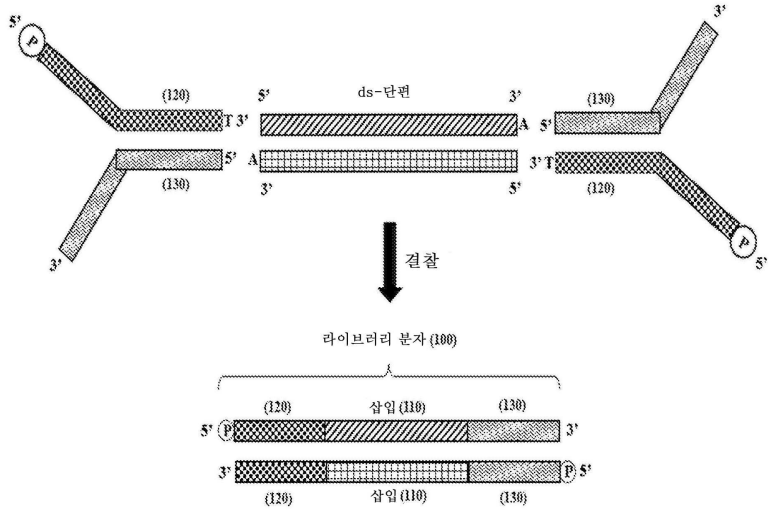
도면12



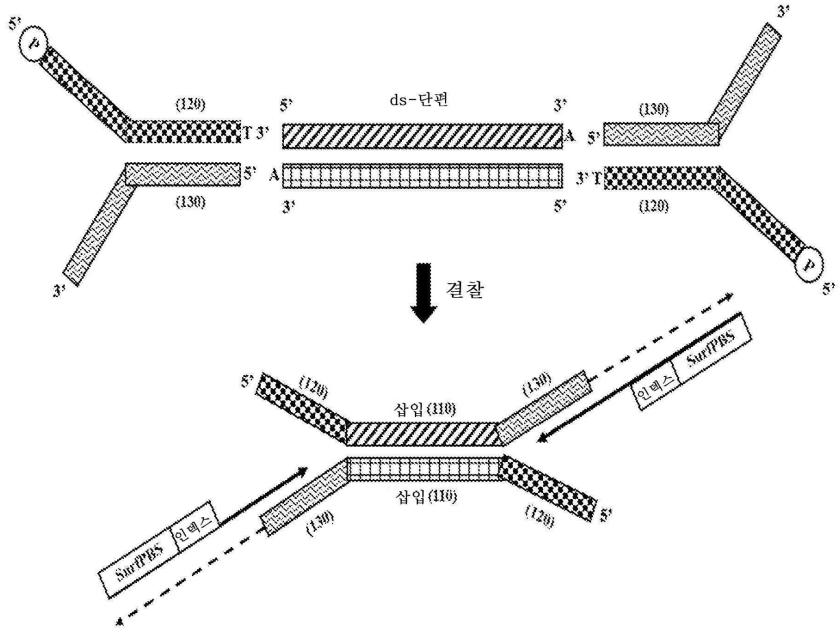
도면13


(120)
5'
ds-단편
3'
(130)
5'
P
T 3'
A
5'
3'
3'
5'
A
3' T
P
5'
(120)
3'
5'
(130)
결찰
라이브러리 분자(100)
(120)
삽입(110)
(130)
5'
P
3'
3'
P
5'
(120)
삽입(110)
(130)

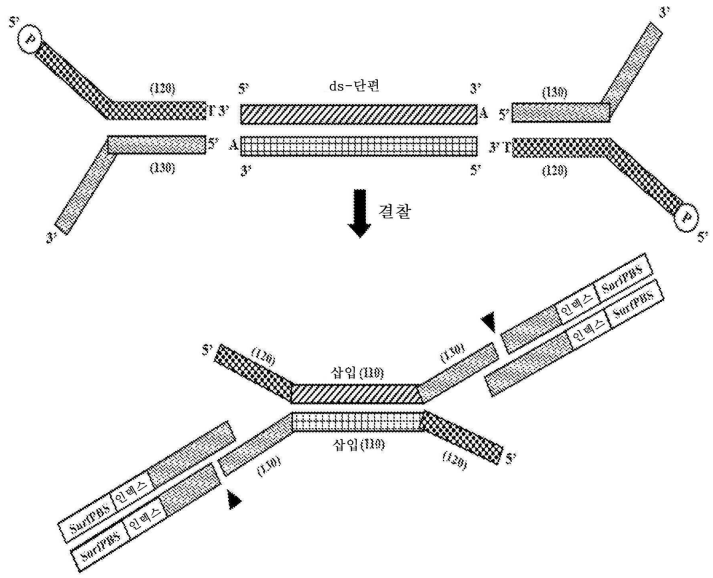
도면14


5'
P
3'
(120)
5'
ds-단편
3'
(130)
T 3'
A
5'
(130)
5'
A
3' T
3'
3'
5'
(120)
P
5'
결찰
라이브러리 분자(100)
(120)
삽입(110)
(130)
5'
P
3'
3'
P
5'
(120)
삽입(110)
(130)

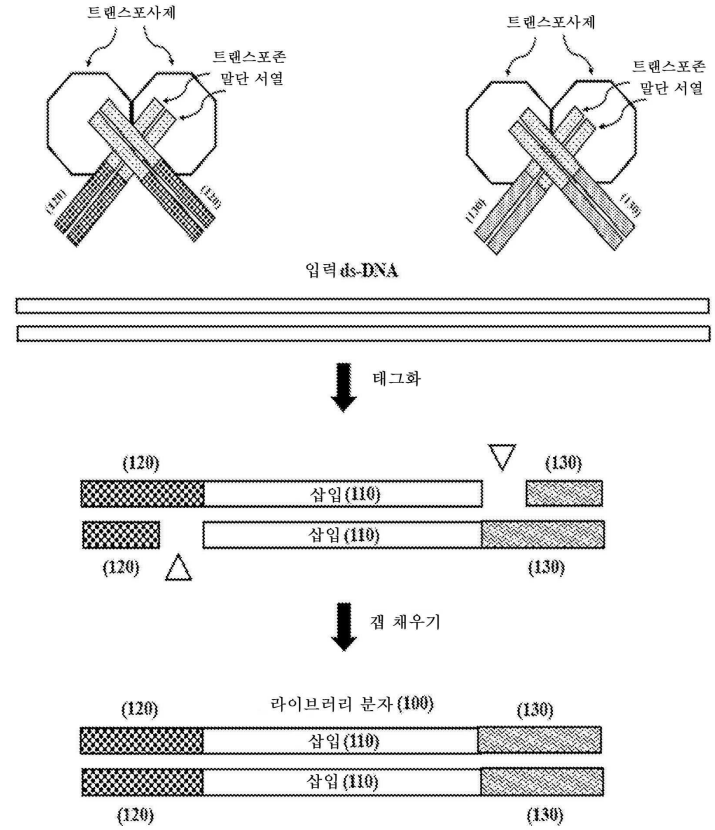
도면15


ds-단편
(120)
(130)
결찰
삽입(110)
인덱스
SurfPBS

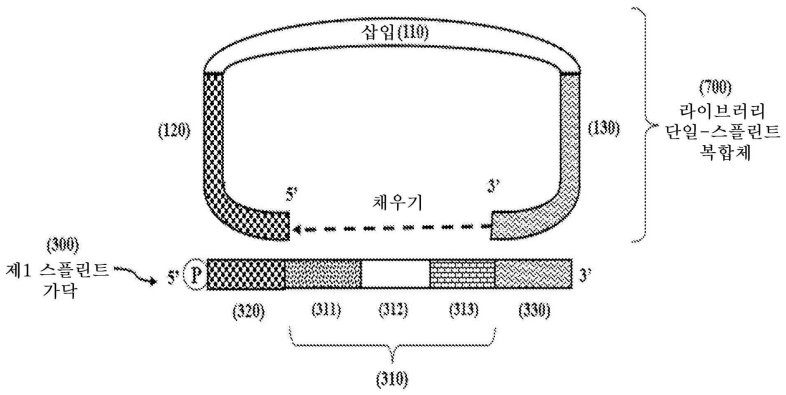
도면16


ds-단편
(120)
(130)
결찰
삽입(110)
인덱스
SurfPBS

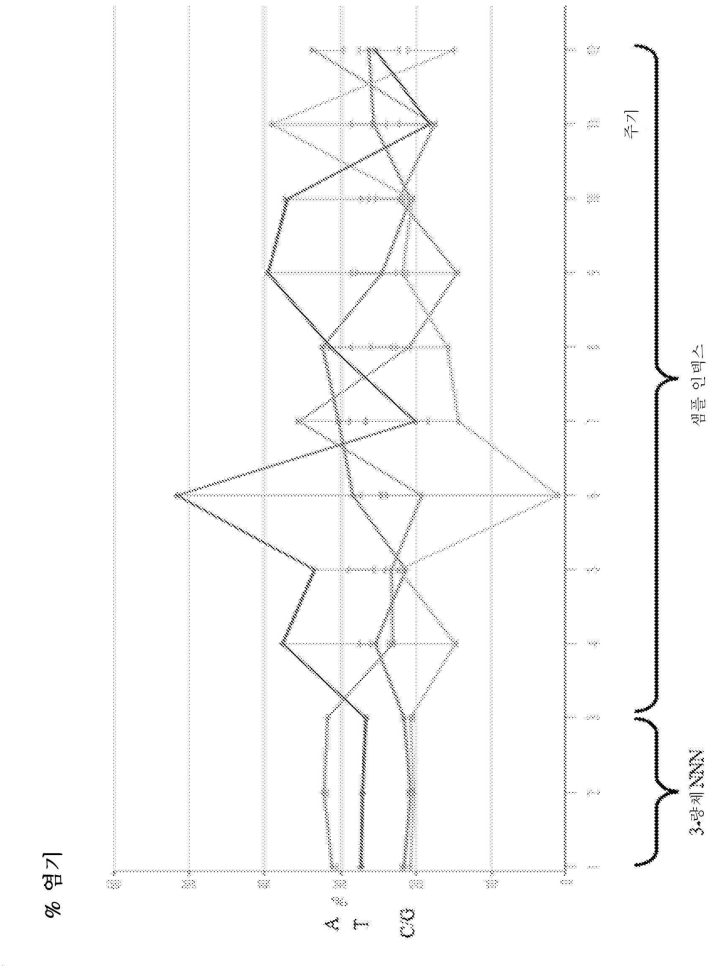
도면17


트랜스포사제
트랜스포존
말단 서열
트랜스포사제
트랜스포존
말단 서열
입력 ds-DNA
태그화
(120)
삽입 (110)
(130)
삽입 (110)
(120)
(130)
갭 채우기
라이브러리 분자 (100)
(120)
삽입 (110)
(130)
삽입 (110)
(120)
(130)

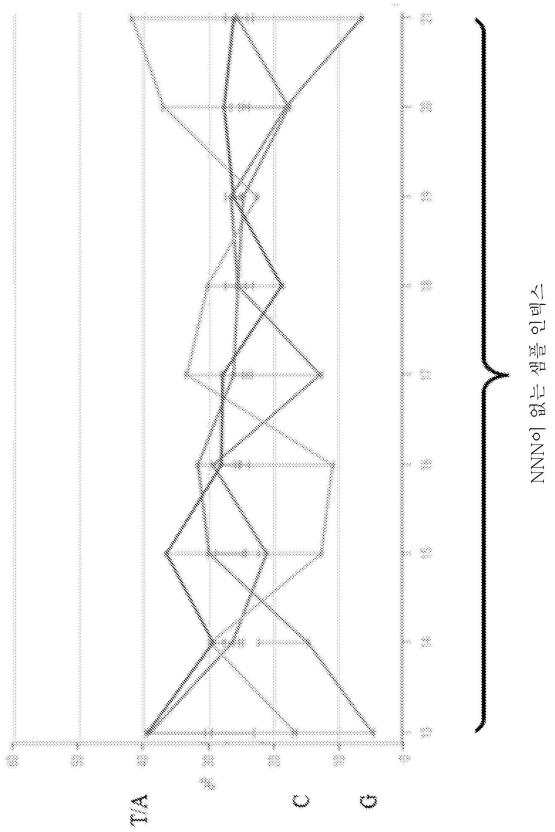
도면18


삽입 (110)
(120)
(130)
(700)
라이브러리
단일-스플린트
복합체
5'
채우기
3'
(300)
제1 스플린트
가닥
5'
P
3'
(320)
(311)
(312)
(313)
(330)
(310)

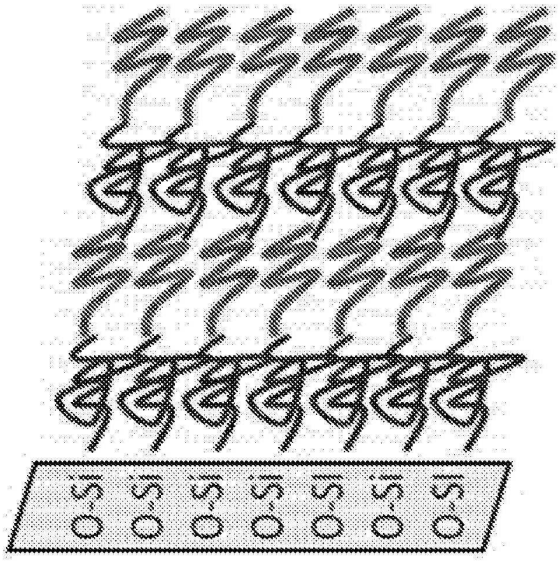
도면19



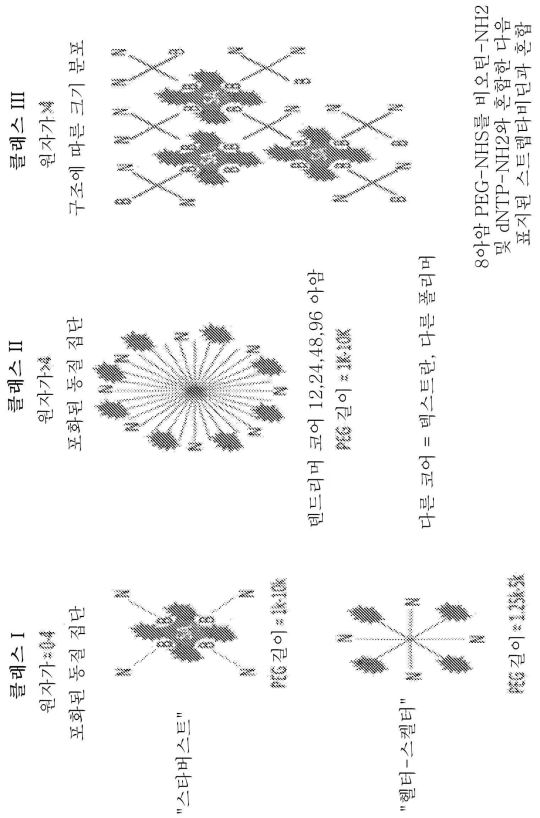
도면20



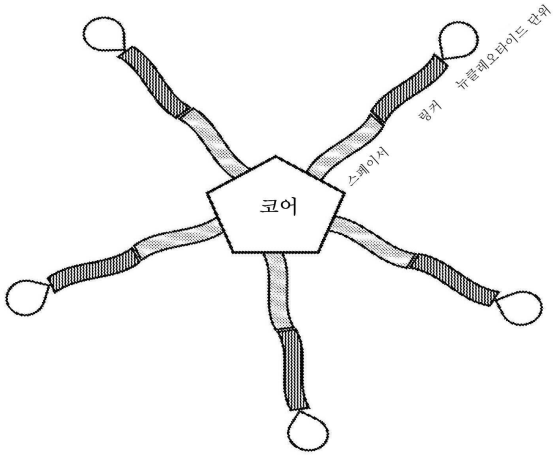
도면21



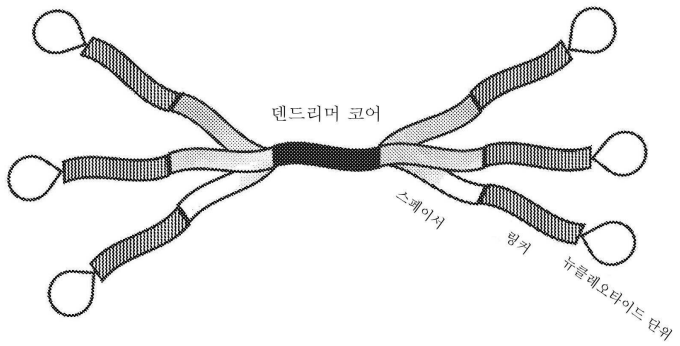
도면22


클래스 I
원자가:4
포화된 동질 집단
"스타버스트"
PEG 길이:1K,10K
클래스 II
원자가:4
포화된 동질 집단
덴드리머 코어 12,24,48,96 아암
PEG 길이:1K,10K
다른 코어 = 덱스트란, 다른 폴리머
"햄터-스켈터"
PEG 길이:1.2K,5K
클래스 III
원자가:4
구조에 따른 크기 분포
8아암 PEG-NHS를 비오틴-NH2
및 dNTP-NH2와 혼합한 다음
표지된 스트렙타비딘과 혼합

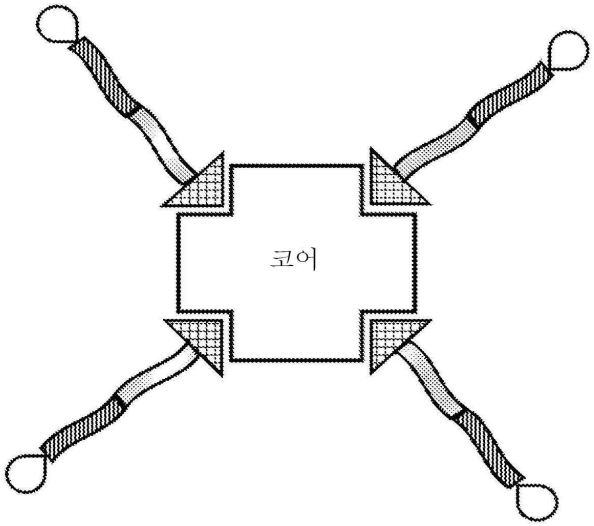
도면23


코어
스페이서
링커
뉴클레오타이드 단위

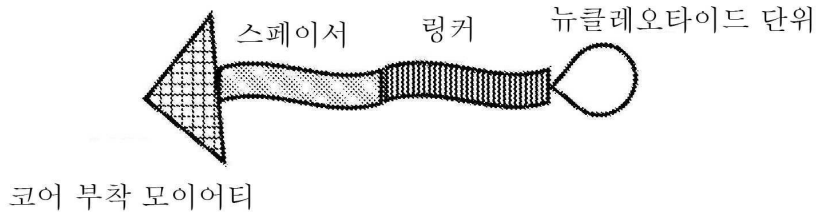
도면24



도면25

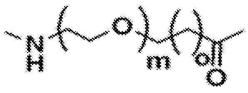


도면26



도면27

스페이서:

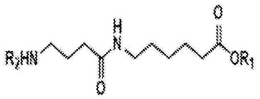


링커:

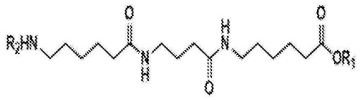
11원자 링커:



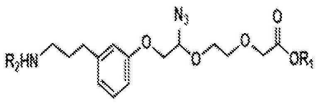
16 원자 링커:



23 원자 링커:

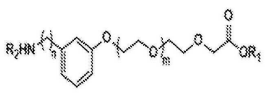


N3 링커:

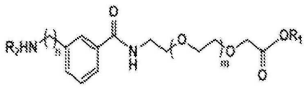


도면28

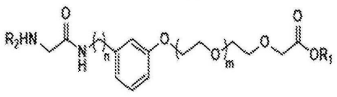
링커 1:



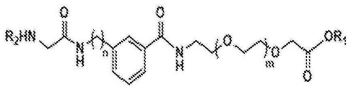
링커 2:



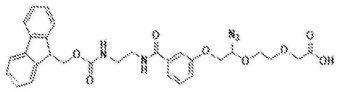
링커 3:



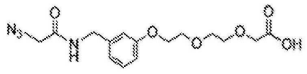
링커 4:



링커 5:

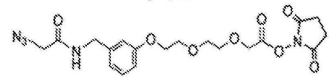


링커 6:



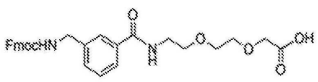
분자량: 352.35

링커 7:



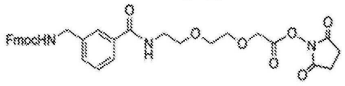
분자량: 449.42

링커 8:



분자량: 518.57

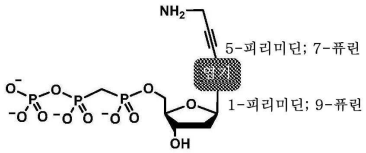
링커 9:



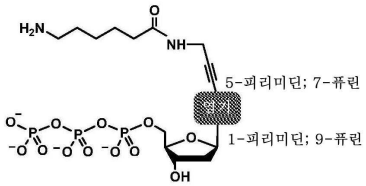
분자량: 615.64

도면29

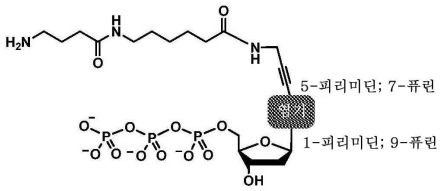
dNTP-PA-NH_2:



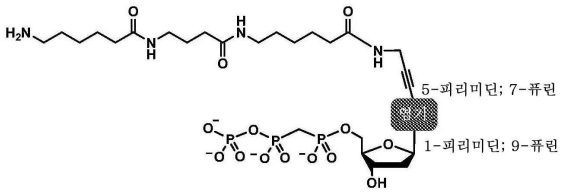
dNTP-PA-11 원자 링커 **-NH_2:**



dNTP-PA-16 원자 링커 **-NH_2:**

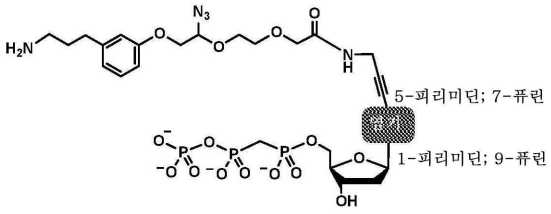


dNTP-PA-23 원자 링커 **-NH_2:**

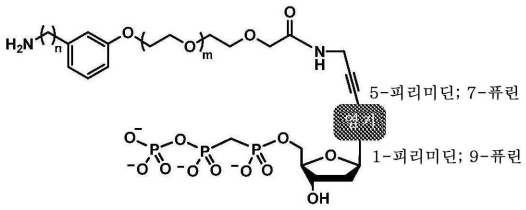


도면30

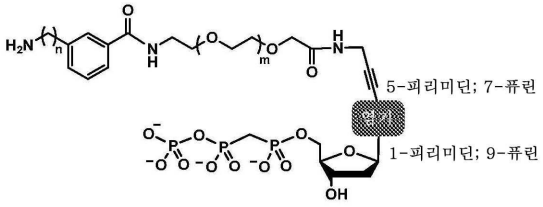
dNTP-PA-N3 링커 -NH_2:



dNTP-PA-링커 1-NH_2:

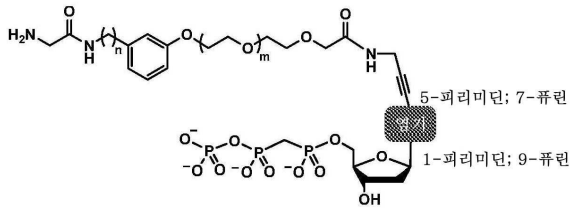


dNTP-PA-링커 2-NH_2:

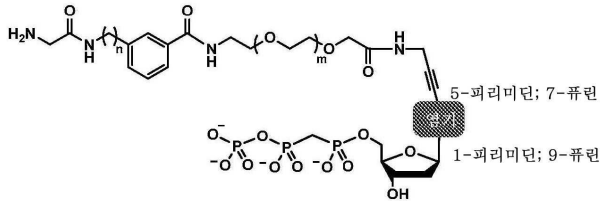


도면31

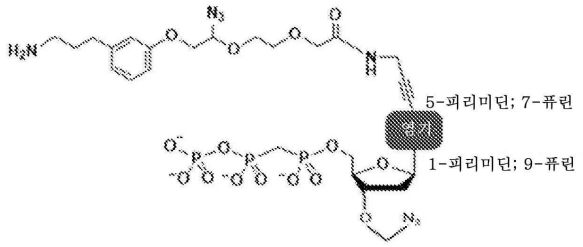
dNTP-PA-링커 3-NH_2:



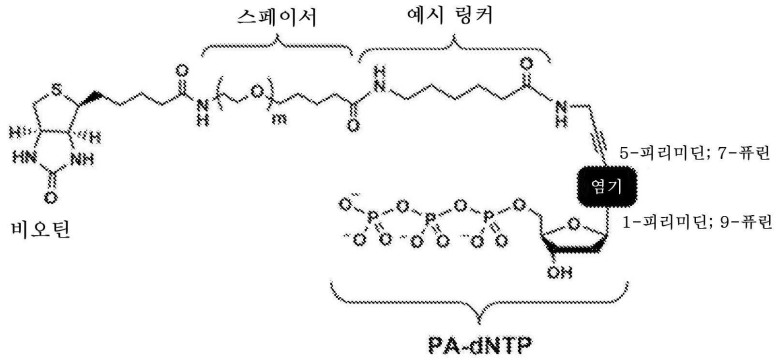
dNTP-PA-링커 4-NH_2:



dNTP-PA-N3 링커 -NH_2:



도면32



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.