



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101910399 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200880123537. X

(22) 申请日 2008. 10. 30

(30) 优先权数据

60/983, 886 2007. 10. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 06. 30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/081818 2008. 10. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/059022 EN 2009. 05. 07

(73) 专利权人 考利达基因组股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 阿诺德·欧力分特

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

C12M 1/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 7010964 2006. 03. 14,

US 7238323 B2, 2007. 07. 03,

US 7270784 2007. 09. 18,

审查员 王超

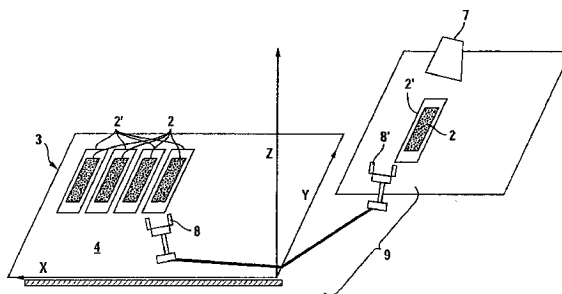
权利要求书1页 说明书14页 附图4页

(54) 发明名称

用于核酸高通量测序的装置

(57) 摘要

用于自动化高通量核酸测序的可扩展反应与检测系统,所述自动化高通量核酸测序涉及化学过程和独立于化学过程的观测过程的组合。分离的功能单元可以以如下方式配置,所述方式允许所述系统互换使用联合用于光学图像采集和/或分析的分离的设备组件的不同的测序反应组件。



1. 用于高通量核酸测序的系统,其包括:

反应子系统,包括至少一个反应平台,被配置成用于在反应单元中对核酸样品进行生化测序反应,所述反应子系统在第一速率运行;

分离的检测子系统,包括一个或多个光学部件,用于独立于测序反应捕捉待用于光学图像分析的测序反应光学图像,所述检测子系统以不同于第一速率的第二速率运行;

运载器件,其被配置以在所述至少一个反应平台与所述检测子系统之间转移所述含核酸样品的反应单元,从而最小化反应子系统的样品制备和检测子系统的提取中的障碍;和

隔震器,其被配制成将检测子系统与震动隔离,该震动是由反应子系统和运载器件中的移动部分所产生的,

借此,所述至少一个反应平台和所述检测子系统在可逆集成的系统中是物理上松散联接的,从而最小化以不同速率运行的样品制备和数据提取中的障碍。

2. 如权利要求 1 所述的系统,其中所述反应子系统被配置成包括至少一个反应平台,作为运载所述反应单元的第一反应平台,以及经配置以允许多个分离的反应平台互换使用的另一反应平台。

3. 如权利要求 2 所述的系统,其中每一所述多个分离的反应平台包括:

含微阵列的至少一个流动池,其被放置在并可从其自身的分离的反应平台上去除。

4. 如权利要求 3 所述的系统,其中所述运载器件包含夹持机构,所述夹持机构是可操作的,以从所述至少一个反应平台选择和运输所述反应单元至所述检测子系统,所述选择和运输独立于任何其它分离的反应平台。

5. 如权利要求 4 所述的系统,其中所述夹持机构包括可移动的臂,所述臂可绕垂直于所述至少一个反应平台的工作区的轴旋转。

6. 如权利要求 4 所述的系统,还包括:

用于储存检测试剂和处理试剂以及用于将所述检测试剂和处理试剂转移至所述至少一个流动池的流体学子系统,所述流体学子系统独立于所述反应子系统和检测子系统运行,从而最小化以不同于转移速率的速率运行的样品制备和数据提取的障碍。

7. 如权利要求 4 所述的系统,其中多个所述的分离的反应平台相对于所述检测子系统彼此邻近地并排放置。

8. 如权利要求 4 所述的系统,其中多个所述的分离的反应平台相对于所述检测子系统彼此邻近地首尾放置。

9. 如权利要求 4 所述的系统,其中所述的第一反应平台是可操作的,以将所述核酸样品制备为荧光测序反应产物用于光学观测,和其中所述的检测子系统是可操作的,以捕捉多个荧光反应产物的彩色图像用于计算机辅助识别。

用于核酸高通量测序的装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据美国法案 35 篇 119 条 e 项要求于 2007 年 10 月 30 日提交的题为“用于核酸高通量测序的装置 (Apparatus For High Throughput Sequencing Of Nucleic Acids)”的第 60/983,886 号美国临时申请的权益,其内容通过其全文引用并入本文。

[0003] 关于联邦资助研究或开发所完成发明的权利的声明

[0004] 不适用

[0005] 对光盘提交的《序列表》、表格或计算机程序表附件的引用

[0006] 不适用

[0007] 发明背景

[0008] 本发明一般地涉及核酸的自动化光学检测领域。本发明一般涉及用于核酸自动化高通量测序的可扩展的反应和检测系统。

[0009] 人类基因组计划的到来需要开发改进的方法,用于诸如 DNA(脱氧核糖核酸)和 RNA(核糖核酸)的核酸的测序。人类基因组全部的 3,000,000,000 碱基序列的测定已为鉴定众多疾病的遗传基础提供了依据。然而,仍需要做大量工作以鉴定关联每种疾病的遗传变异,并且为每个个体(二倍体人类基因组大小)测序 6,000,000,000 碱基的现有成本不仅仍然极其困难,而且高不可攀。

[0010] 随着 DNA 测序系统的发展,许多公司已经着手高通量 DNA 测序的挑战。虽然这样的系统已经降低了成本,并增加了 DNA 测序的效率,但这些系统通常是具有多个互相依赖的组件的整装单元。这样的单一单元测序系统有许多局限,包括有限的可扩展性,在特定组件上引入创新的时间延滞,和整个系统的功能对系统每个组件的直接依赖性。

[0011] 已知用于测序反应和分析的流动池。这样的流动池的实例包括含有为测序反应性能所用的任意基质的那些流动池,诸如在本文中较为详尽叙述的那些,以及记载于美国专利号 5,958,760、6,403,376、6,960,437、7,025,935、7,118,910、7,220,549、7,244,559、7,264,929、W001/35088 和公开的美国专利申请号 2007/0128610 中的那些。

[0012] 本发明解决了已知现有技术的局限。

[0013] 定义

[0014] 为了在当前技术上具备足够的背景,有助地是,理解下列技术术语。

[0015] “扩增子”指多核苷酸扩增反应的产物,即,自一条或多条起始序列复制得到的多核苷酸群。扩增子可以通过多种扩增反应来生成,包括但不限于聚合酶链式反应(PCR),线性聚合酶反应,基于核酸序列的扩增,滚环扩增等等(参阅如美国专利号 4,683,195、4,965,188、4,683,202、4,800,159、5,210,015、6,174,670、5,399,491、6,287,824 和 5,854,033;以及美国公开号 2006/0024711)。

[0016] “阵列”或“微阵列”是指具有表面、优先但非排他地平面或基本上平面的表面的固相支持物,其携带含有核酸的位点集合,使得该集合的每个位点在空间上是确定的、不与该阵列的其他位点重叠;即,所述位点在空间上是分离的。阵列或微阵列还可以包括具有表面的非平面可询结构(interrogatable structure)如珠或孔。所述阵列的寡核苷酸或多核苷

酸可以共价结合于固相支持物,或者它可以非共价结合。常规微阵列技术综述于如 Schena 编(2000),*Microarrays: A Practical Approach*(微阵列:实践方法)(IRL Press, Oxford)。在用于本文时,“随机阵列”或“随机微阵列”是一类微阵列,其中,寡核苷酸或多核苷酸的身份至少起初不能根据其位置辨别,但可以通过对该阵列的特定生物化学检测技术测定。参阅如美国专利号 6,396,995、6,544,732、6,401,267 和 7,070,927;世界知识产权组织出版物 WO 2006/073504 和 2005/082098;美国公开号 2007/0207482 和 2007/0087362。

[0017] “杂交”指两条单链多核苷酸非共价结合以形成稳定的双链多核苷酸的过程。术语“杂交”还可以指三链杂交。(通常)所得的双链多核苷酸是“杂合物(hybrid)”或“双链体(duplex)”。“杂交条件”通常会包括低于大约 1M、更通常的是低于大约 500mM 和低于大约 200mM 的盐浓度。“杂交缓冲液”是指缓冲盐溶液,诸如 5×SSPE 等等。杂交温度可以低至 5°C,但通常高于 22°C,更通常的是高于大约 30°C,并且优选高于大约 37°C。杂交通常在严谨条件下进行,即探针会与其靶物子序列杂交的条件。严谨条件是序列依赖性的,在不同情况下是不同的。较长的片段可能需要较高的杂交温度以实现特异性杂交。因为其他因素(包括互补链的碱基组成和长度、有机溶剂的存在和碱基错配的程度)可影响到杂交的严谨性,参数的组合比任何单独一项的绝对度量更为重要。严谨条件一般选择为比特定序列在限定的离子强度和 pH 的 T_m 低大约 5°C。示例性的严谨条件包括 pH 7.0 至 8.3 下至少 0.01M 至不高于 1M Na 离子浓度(或其他盐)的盐浓度,和至少 25°C 的温度。例如,5×SSPE(750mM NaCl,50mM 磷酸钠,5mM EDTA, pH 7.4)的条件和 25–30°C 的温度适合于等位基因特异性探针杂交。关于严谨条件,参阅如 Sambrook, Fritsche 和 Maniatis, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*(分子克隆:实验室手册)第 2 版, Cold Spring Harbor Press(1989) 和 Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*(核酸杂交)第 1 版, BIOS Scientific Publishers Limited(1999)。

[0018] “与... 特异性杂交(hybridizing specifically to)”或“与... 特异性杂交(specifically hybridizing to)”或类似表述指,当该序列以复合混合物(例如全细胞的)DNA 或 RNA 存在时,在严谨条件下,分子实质上与或仅与一种或多种特定核苷酸序列的结合、双链化(duplexing)或杂交。

[0019] “连接”意指在模板驱动的反应中,在两条或更多条核酸(例如寡核苷酸和/或多核苷酸)的末端之间形成共价键或联接(linkage)。所述键或联接的本质可以广泛多样,而且连接可以是酶促或化学进行的。在用于本文时,连接一般通过酶促进行,以在一条寡核苷酸的末端核苷酸的 5' 碳与另一条寡核苷酸的 3' 碳之间形成磷酸二酯联接。多种模板驱动的连接反应记载于下列参考文献:Whitely 等,美国专利 4,883,750; Letsinger 等,美国专利 5,476,930; Fung 等,美国专利 5,593,826; Kool, 美国专利 5,426,180; Landegren 等,美国专利 5,871,921; Xu 与 Kool, *Nucleic Acids Research*, 27:875–881(1999); Higgins 等, *Methods in Enzymology*, 68:50–71(1979); Engler 等, *The Enzymes*, 15:3–29(1982); 与 Namsaraev, 美国专利公开 2004/0110213。酶促连接通常发生在连接酶缓冲液中,其是含有所采用的特定连接酶所需要的任何二价阳离子、辅因子等等的缓冲盐溶液。

[0020] “错配”意指 Watson-Crick 碱基对 G-C 和 A-T 之外的任意两个碱基 A、T(或 RNA 时的 U)、G 和 C 之间的碱基对。八个可能的错配是 A-A、T-T、G-G、C-C、T-G、C-A、T-C 和 A-G。

[0021] “聚合酶链式反应”或“PCR”,意指通过 DNA 互补链的同步引物延伸的用于体外扩

增特定 DNA 序列的反应。换言之, PCR 指用于制备侧翼为引物结合位点的靶核酸的多个拷贝或复制物的反应, 这样的反应包括一次或多次重复以下步骤: (i) 使靶核酸变性, (ii) 使引物与引物结合位点退火, 和 (iii) 在核苷三磷酸存在时通过核酸聚合酶使引物延伸。通常, 所述反应在热循环设备中经由为每个反应条件优化的不同温度而循环。特定温度、持续时间和各反应之间变化的速率取决于本领域技术人员公知的许多因素, 例如参考文献: McPherson 等编, PCR: A Practical Approach (PCR: 实践方法) 和 PCR2: A Practical Approach (PCR2: 实践方法) (IRL Press, Oxford 分别于 1991 和 1995) 所示例的。例如, 在使用 Taq DNA 聚合酶的常规 PCR 中, 可使双链靶核酸在 $> 90^{\circ}\text{C}$ 的温度下变性, 使引物在 $50\text{--}75^{\circ}\text{C}$ 范围的温度下退火, 并使引物在 $72\text{--}78^{\circ}\text{C}$ 范围的温度下延伸。如上述, 术语“PCR”涵盖该反应的衍生形式, 包括但不限于 RT-PCR、实时 PCR、巢式 PCR、定量 PCR、多重 PCR、诸如此类。反应体积的范围从几百纳升 (例如 200nL) 到几百微升 (例如 $200\ \mu\text{L}$)。

[0022] “核酸”和“寡核苷酸”用于本文指核苷酸单体的聚合物。用于本文时, 该术语也可以指双链的形式。构成核酸和寡核苷酸的单体能经由规则样式的单体-单体相互作用、诸如 Watson-Crick 型碱基配对、碱基堆积、Hoogsteen 或反向 Hoogsteen 型碱基配对等等, 与天然多核苷酸特异性结合, 以形成双链体或三链体形式。这样的单体及其核苷间联接可以是天然存在的, 或者可以是它们的类似物, 例如天然存在的或非天然存在的类似物。非天然存在的类似物可包括肽核酸 (peptide nucleic acids)、锁核酸 (locked nucleic acids)、硫代磷酸酯核苷间联接 (phosphorothioate internucleosidic linkages)、含有容许诸如荧光团或半抗原的标记物附着的连接基团的碱基、诸如此类。每当寡核苷酸或核酸的使用需要酶促加工时, 诸如使用聚合酶的延伸、使用连接酶的连接等等, 本领域技术人员会理解, 那些情况下的寡核苷酸或核酸不会在任何或某些位置含有核苷间联接、糖部分或碱基的某些类似物 (当这样的类似物与酶促反应不相容时)。核酸大小范围通常是自几个单体单元 (例如 $5\text{--}40$ 个, 此时它们通常称为“寡核苷酸”) 至数百千个或更多单体单元。每当核酸或寡核苷酸以 (大写的或小写的) 字母序列代表时, 例如“ATGCCTG”, 应理解, 核苷酸从左向右是 $5' \rightarrow 3'$ 次序, 而且“A”表示脱氧腺苷酸, “C”表示脱氧胞嘧啶, “G”表示脱氧鸟苷酸, 而“T”表示脱氧胸腺嘧啶, “I”表示脱氧次黄苷, “U”表示尿嘧啶, 除非另有说明或根据上下文显而易见。除非另有说明, 术语学和原子编号规定将遵循 Strachan 与 Read, Human Molecular Genetics 2 (人类分子遗传学 2) (Wiley-Liss, New York, 1999) 中所公开的。核酸通常包含通过磷酸二酯联接相连的天然核苷 (例如对于 DNA 是脱氧腺苷酸、脱氧胞嘧啶、脱氧鸟苷酸、脱氧胸腺嘧啶, 或者对于 RNA 是它们的核糖对应物); 然而, 它们还可以包含非天然核苷类似物, 例如经过修饰的碱基、糖或核苷间联接。对于本领域技术人员来说, 若酶的活性具有特定的寡核苷酸或核酸底物要求, 例如单链 DNA、RNA/DNA 双链体等等, 则寡核苷酸或核酸底物的适宜组成的选择完全在本领域技术人员的知识之内, 尤其是来自专著和指导, 所述专著诸如 Sambrook 等, 分子克隆第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989) 和类似的参考文献。

[0023] “引物”指在与多核苷酸模板形成双链体时, 能够充当核酸合成的起始点, 并自其 $3'$ 末端沿模板延伸, 从而形成延伸的双链体的寡核苷酸, 其或是天然的或是合成的。延伸过程中添加的核苷酸的序列是由模板多核苷酸的序列决定的。引物通常由 DNA 聚合酶延伸。引物的长度范围通常是 $9\text{--}40$ 个核苷酸, 或者在一些实施方式中是 $14\text{--}36$ 个核苷酸。

[0024] “探针”用于本文时指用于查询未知序列核酸中的互补序列的寡核苷酸，其或是天然的或是合成的。特定探针与靶多核苷酸的杂交表明靶多核苷酸序列内与所述探针互补的特定序列。

[0025] “读出 (readout)”指可表示为数字、数值或其他用于评价的标记的测量和 / 或检测的一项或多项参数。在一些语境中，读出可以指这样采集或记录的数据的实际数字表示。例如，来自微阵列的荧光强度信号的读出指在微阵列的每个杂交位点所产生的信号的位置和荧光强度；如此，这样的读出可以以多种方式登记或存储，所述方式例如微阵列的图像、数表等等。

[0026] “固体支持物”和“支持物”可互换使用，指具有一个或多个刚性或半刚性表面的一种或一组物质。微阵列通常包含至少一个平面固相支持物，诸如显微镜载玻片。

[0027] 用于本文时，术语“ T_m ”即“熔解温度”。该熔解温度指双链核酸分子群中有一半解离成单链时的温度。本领域公知用于计算核酸 T_m 的数个方程。如标准参考文献所示， T_m 值的简单估算可通过如下方程来计算： $T_m = 81.5 + 0.41(\% G+C)$ ，当核酸存在于 1M NaCl 水性溶液中时（参阅如 Anderson 和 Young, Quantitative Filter Hybridization (定量过滤杂交)，于 Nucleic Acid Hybridization (1985)）。其他参考文献（例如 Allawi, H. T. & Santa Lucia, J., Jr., Biochemistry 36 :10581-94 (1997)）包括在计算 T_m 时考虑结构和环境以及序列特征的替代计算方法。

[0028] 作为说明，除非另有定义，本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员通常理解相同的含义。

[0029] 当提供值的范围时，应理解介于所述范围的上限与下限之间的每一居中值（除非上下文另有明确规定，否则精确到下限单位的十分之一）和所述范围内的任意其他指出的值或居中值都涵盖于本发明中。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在所述较小范围中，这也涵盖于本发明中，其从属于所述范围中的任意特定排除的界限。当所述范围包括两个界限中的一个或两个时，排除那些所包括的界限中的一个或两个的范围也包括在本发明中。

[0030] 在以下描述中，众多具体细节被加以陈述以提供对本发明更为彻底的理解。然而，对于本领域技术人员而言显而易见的是，本发明可在没有这些具体细节中的一个或多个下实施。在其它实例中，为避免掩盖本发明，没有描述本领域技术人员所公知的特征和程序。

[0031] 通常，除另有所指，涉及本发明的分子生物学和测序分析在其基本方面是受雇于相关领域的技术人员的技能范围内的常规方法。这些技术全部在文献中得到充分说明，参阅如 Maniatis, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning :A Laboratory Manual (分子克隆：实验室手册) (1982) 和 Sambrook, Russell 和 Sambrook, Molecular Cloning : A Laboratory Manual (分子克隆：实验室手册) (2001)。用于本文的核酸化学、生物化学、遗传学和分子生物学术语与符号遵循以下标准专著和本领域文本，例如 Kornberg 和 Baker, DNA Replication (DNA 复制)，第 2 版 (W. H. Freeman, New York, 1992) ;Lehninger, Biochemistry (生物化学)，第 2 版 (Worth Publishers, New York, 1975) ;Strachan 和 Read ;Human Molecular Genetics (人类分子遗传学)，第 2 版 (Wiley-Liss, New York, 1999) ;Eckstein 编, Oligonucleotides and Analogs :A Practical Approach (寡核苷酸及类似物：实践方法) (Oxford University Press, New York, 1991) ;Gait 编,

Oligonucleotide Synthesis :A Practical Approach(寡核苷酸合成:实践方法)(IRL Press, Oxford, 1984) 等等。

[0032] 发明概述

[0033] 根据本发明,用于为基因组分析进行核酸测序的系统包括例如用于样品制备和用于观测的分离的功能单元,该系统可以以允许不同的测序反应组件与分离的用于光学图像采集和/或分析的设备组件互换使用的方式配置,以最小化在以不同速度运行的样品制备和数据提取上的阻碍。

[0034] 本发明提供了用于未知序列核酸的序列测定的高通量系统。根据本发明的系统包括多个基于目的的、分离的组件,所述组件在这样的系统内是物理上松联接(coupled)的,并且是可逆集成的,以用于序列查询和分析。该系统的松联接和可逆集成性质在多种系统组件的使用中提供了更高的效率和通用性,从而允许了基于时间要求和每个组件能力的系统的优化。这允许改进的可扩展性,给系统增加改进的容易性,和比起本领域当前可得的全集成系统,具有增强的用户灵活性的多个系统配置的建立。

[0035] 使系统元件处于松联接和可逆集成提供了许多益处,包括便于需要在系统单一组件上进行的任何修复而不干扰整个系统的其它组件。而且,独立系统组件的联接策略便于引入对单一组件的任何改进,从而促进新的创新的使用和对整个系统提供最新态的技术创新。

[0036] 在本发明的具体实施方式中,更高的通量可通过在施行核酸测序所需的各个活动中使用多个组件而实现。例如,使用多个光学检测仪器和/或多个测序反应组件能大大增加测定序列的数量和减少做此事所需的时间。

[0037] 在实施方式之一中,提供了用于测序的单一反应设备和单一光学检测与分析仪器,该反应设备与光学仪器是物理上松联接和可逆集成的。

[0038] 在另一实施方式中,提供了多个生化组件和单一光学检测仪器以用于不同的测序反应组件,例如通过合成指向测序的组件和通过探针连接指向测序的组件。这样的系统的测序反应组件能保持为分离的单元,每个单元与光学成像系统在物理上可逆地相互连结。这允许单一系统利用不同的测序技术,并从在单一器件配置中的多个不同测序方法的优势中受益。光学仪器能在具有分析组件的单一系统中设置,或者它们作为整个系统的两个单独的组件加以配置。

[0039] 在一具体的实施方式中,所述系统可包括三个分隔化组件:(i)用于存放和转移检测与处理试剂(detection and processing reagents)的流体学系统,例如探针、洗液等等;(ii)用于在系列反应室中或在一个或多个流动池中实施生化测序反应的反应平台;和(iii)用于捕捉测序反应的光学图像和这些图像的分析的分离的照射和检测系统。

[0040] 用于生化测序反应的反应平台优选具有包括单个流动池的多个反应单元和用于在生化测序反应完成后,将每个流动池从反应设备转移至照射和检测系统的机构。

[0041] 在多个实施方式的优选方面,流动池包括附着于固体表面(例如玻片或诸如胶片或膜的柔性材料)的未知序列的核酸阵列。在另一实施方式中,每个流动池包括附着于珠的未知序列的核酸阵列,所述珠任选地附着于固体或半固体表面。

[0042] 在本发明实施方式的某方面,系统的测序反应组件提供了供处理样品使用的多个流动池。在优选方面,每个流动池包括基本上密闭的室,所述室具有流体入口和流体出口,

以分别引入和去除测序反应中所用的流体。

[0043] 在具体实施方式中,两个或更多个测序反应平台可与单一光学成像系统相互连结,所述成像系统能记录和分析来自每个反应单元的单体的测序信息。在具体方面,在多个反应平台上的每个反应单元和流动池被设计为在多个流动池上实施同样的高通量核酸测序生化。在另一方面,不同的反应平台和流动池被设计为使不同的生化方法适用于高通量核酸测序,每个反应平台优化为实施具体的流动池测序反应。使已优化的测序反应平台和流动池生化反应单元(各设计为供给测序方法的具体生物化学)与单一照射和分析系统相互可逆连接的能力,提供了空间和运行时间的最适利用,且比拥有用于每一潜在的生化测序应用的单体的完整系统更有成本效益。

[0044] 在某些实施方式的特定方面,每个流动池内表面部分由支持物携带样品的表面确定,所述布置的优势在于最小化涉及流动池组装的组件的数量。

[0045] 在具体实施方式中,特定测序反应单元的流动池各自通过在两个固体平面表面之间夹入玻璃和垫圈来包括未知序列的靶核酸的阵列。一平面具有足够大小的开口,以允许成像,和用于盖玻片的索引槽(indexing pocket)。另一平面具有用于垫圈的索引槽、流体接口、和任选择的温度控制系统。

[0046] 在本发明的一具体方面,为与测序反应单元的具体使用而设计的流动池包括1"平方、170毫米厚的盖玻片。在优选的实施方式中,该流动池具有一个为高通量、基因组规模测序已衍生为结合未知序列大分子生物结构的表面。

[0047] 在本发明某些具体方面,流动池可包括连接到具有影响流体自流动池的进入或流出的能力的器件(例如注射泵)的流体接口。

[0048] 在本发明的另一具体方面,流动池包括连接到混合室的接口,所述混合室任选地装备有液位传感器。需用于测序反应的溶液被分配至该室中,在需要时混合,然后被吸入流动池中。在优选方面,室在性质上为圆锥形,并作为漏斗起作用。在本发明的实施方式的某些方面,每个流动池包括温度控制子系统,其具有将温度维持在约5-95°C、或更特别地10-85°C的范围内的能力,并能以每秒约0.5-2°C的速率改变温度。

[0049] 在本发明某些实施方式的又一方面,系统还提供了用于处理支撑在支持物上的样品、特别是生物样品的自动化设备,所述设备包含:用于抓持一个或多个支持物的支持物抓持装置,在所述的或每个支持物上的样品存在于各自基本上密闭的室内;用于将处理流体输送至所述的或每个室的流体输送装置;用于从所述的或每个室去除流体的废液收集装置;和用于监测测序反应的计算机控制装置。所述设备优选地与一个或多个以上定义的流动池联合使用。

[0050] 当阅读如下更充分地描述的方法细节时,本发明将更好为本领域技术人员所理解。

[0051] 附图简述

[0052] 图1是示出本发明测序反应平台基本格式的图。

[0053] 图2是示出包括测序反应平台和光学成像器件的系统的第二实施方式的图。

[0054] 图3是示出包括测序反应平台和光学成像器件的系统的第二实施方式的图。

[0055] 图4是示出包括含有伸缩臂的测序反应平台和光学成像器件的系统的第三实施方式的图。

[0056] 图 5 是示出包括平行配置的测序反应平台的系统的图。

[0057] 图 6 是示出根据本发明的系统细节的图。

[0058] 发明详述

[0059] 图 1 显示示例性的具有反应工作区的测序反应平台的侧视示意图,其纵向尺寸为 X,宽度尺寸为 Y,高度尺寸为 Z。

[0060] 图 2 显示本发明测序系统实施方式的一个优选方面的第一个测序反应平台的顶视示意图。这种性质的平台也在美国专利号 7,264,432 中有所公开。该反应平台 3 包括置于分离的固体支持物 2' 上且位于至少一个基本上水平的、纵向尺寸为 X、宽度尺寸为 Y 的桌 4 上的流动池 2。该反应平台 3 包括至少一个平行于 X 方向延伸的轨道 5 和至少一个具有运载器件 9 的位移单元 6,所述运载器件 9 可与该位移单元沿轨道 5 一起移动,以在 X 方向上转移目的物。运载器件 9 在这里以运载板 11(其可与位移单元 6 一起沿轨道 5 移动)和用于抓取并移动每个分离的支持物 2 至联接的光学表征工具 7 的机动夹持机构 8 而实施。使用夹持机构 8 时,支持物 2' 和流动池 2 拖拽在运载板 11 上,并利用运载器件 9 沿 X 方向转移至观测工具 7,即成像器件。

[0061] 被接收的具有流动池 2 的分离的支持物 2' 依照运载板 11 的位置 X,可分配至其在工作区域 4 上的初始位置。运载板 11 的位置 X 和用于抓取目的物的夹持机构 8 的移动路径(目的物初始位置 Y)的这种检测是通过合适的用于检测线性移动的传感器(未显示)来进行的,其为来自相关技术领域的领域技术人员所知。源自这些传感器的信息的处理、用于运载板 11 沿 X 方向和夹持机构 8 沿 Y 方向移动的驱动控制、和目的物初始位置 X/Y 的信息的分配优选数字计算机(未显示)实施的合适的程序化控制器进行,所述数字计算机也是本系统的联接部分。

[0062] 由于在未知核酸的测序中,包含于流动池中的所有样品将在某种程度上可变,整个平台 3 的所有流动池支持物 2 的识别是期望且有益的。这也可能对于通过软件应用追踪一系列流动池的个体序列是重要的。反应平台上的流动池的确定的位置和定向允许了每组测序样品的识别和由此而来的出于后期的交叉核实和组装目的样品追踪。

[0063] 在这些实施方式的具体方面,流动池 2 和支持物 2' 是以单一集成构造而形成的。在图 3 中说明的具体实施方式中,系统 3 进一步提供了诸如条形码阅读器的表征工具 12。该表征工具能读取一个或多个支持物 2' 的识别元件,并确定在相应流动池中的样品的身份。这种识别优选当支持物 2' 拖拽在运载器件 9 的运载板 11 上进行。

[0064] 图 4 说明了沿 Z 方向转移至与反应平台 3 不在同一平面的成像系统的包含流动池 2 的支持物 2'。于一位置包括元件 8 且于另一位置包括元件 8' 的夹持机构在这里以伸缩臂实施;作为其替代物,也可以以关节臂实施。运载器件 9 可以角度转动,所述角度优选为 +180° 和 / 或 -180°,以垂直于水平工作场 4 的 Z 轴为参考。夹持机构(未显示)的进一步的可选择实施方式包括具有履带的沿 Y 方向运行的轨道,例如其可以被升高和 / 或降低以抓取和 / 或陈放运载器。使用该运载器件 9 时,包含流动池 2 的支持物 2' 可以沿 X 方向转移,然后用夹持机构 8 陈放于观测工具 7 视野内的位置,所述位置不同于目的物在工作区 4 的初始位置,所述工作区 4 明显为在观测之前进行化学的区域。同时,当夹持机构 8 被移出时,优选地,样品和 / 或目的物的身份再次被检测,并且流动池 2 和支持物 2' 的新的 X/Y 位置储存于系统的联接计算机组件。

[0065] 从前面的记述中可以看到支持物 2' 不仅可以使使用夹持机构 8' 抓取、平面转移、和再次陈放,支持物 2' 还可以从一个平面沿 Z 方向转移至位于其上或下的平面并陈放于此以使用本发明的系统的照射、检测和分析组件进一步分析。当这些转移任务被执行时,对于每一目的物有益但不是绝对必要的是,使用表征工具 12 对其识别或表征(图 3)。

[0066] 多于两个的工作平台可以联合为高级别系统,如图 5 所示。工作区 4、4' 可相互平行、首尾串联或重叠放置,并且可以以水平平面上的任意角度旋转(未显示)。

[0067] 本发明一方面及时和高效地支持反应组件的自动化测序。该过程可涉及为未知序列的核酸生化查询而优化的多个测序反应系统组件。不同的生化测序反应能适用于本发明系统,包括但不限于,诸如美国专利号 6,864,052、6,309,824 和 6,401,267 和美国专利公开 2005/0191656 中公开的基于杂交的方法;诸如美国专利号 6,210,891、6,828,100、6,833,246、6,911,345;文章 Ronaghi 等(1998), Science, 281 :363-365;和 Li 等 Proc. Natl. Acad. Sci., 100 :414-419(2003) 中公开的通过合成方法测序;和如例如国际专利申请 W01999019341、W02005082098、W02006073504 和文章 Shendure 等(2005), Science, 309 : 1728-1739 中所公开的基于连接的方法。

[0068] 在特定实施方式中,所述系统的测序反应组件包括一个或多个流动池 2(例如反应室)(图 6),在所述流动池中发生实际的生化测序反应。在本发明的优选实施方式中,系统的测序反应组件的流动池 2 包括例如由光学显微镜载玻片 20、22 所构成的支持结构 2' 中的室,所述载玻片 20、22 由插入流动池室 2 的间隔部件 23、24、26、28 所间隔,每个室具有入口 30、出口 32 和具有示例性区域 34、36 的表面,所述示例性区域 34、36 已经被制成或经处理以允许核酸在以液体输送被注射通过该入口 30 时附着于此。流动池任选地包括附着于流动池的表面区域 34、36 的核酸或引物,所述核酸或引物或是作为随机阵列,或是处于预定的微位点阵列中,以至于每条核酸的身份都能通过反应过程而被监测。核酸或引物可以被附着于所述表面,以致当通过支持结构 2' 的壁而观察时,所述核酸或引物的至少一部分个体地是光学可溶的。

[0069] 在一优选实施方式中,流动池 2 包括具有未知序列核酸固定其上的固体支持物或至少地支撑(backing)的、基本上密闭的室。流动池 2 优选地与支持物锁紧件(桌或盒)相连,以在本系统测序反应组件中放置固体支持物或支撑。流动池 2 在测序反应系统组件上可以例如并排式或一前一后式地布置。在固体支持物 2' 包括 / 是显微镜载玻片 22 的情况下,支持物锁紧件通常会有这样的尺寸大小,即它可适用于常规大小载玻片(例如通常为约 25.4mm 乘 76.2mm 的载玻片)。在支持物为膜的情况下,锁紧件的尺寸将类似于这样的尺寸大小,即它可适用于常规大小(通常地 80mm 乘 120mm)膜,尽管膜比载玻片在大小上可变得多。

[0070] 流动池的结构方面通常是通过粘附剂(与间隔元件 23、24、26、28 相联)或通过夹取装置 40、42 保持在一起。在本发明实施方式的某些方面,夹取装置 40、42 能将多个流动池的部分夹在一起。通常地,从一个到约十二或十六个流动池可被单个夹取装置同时夹取。流动池能以基本上水平或基本上垂直的方式以夹取装置布置,尽管这两个位置之间的任何中间位置都是可能的。

[0071] 作为替代、或除了夹取之外,流动池可具有连接流动池组件的偏置结构。偏置结构可包括一个或多个弹簧偏置件 46、48、50、52。在特定实施方式中,支持物通过装有弹簧的安

装订附着于夹取件上,以致流动池的形成使装有弹簧的安装钉的弹簧受压,弹簧因此连接流动池组件。

[0072] 在本发明实施方式的其它具体方面,通过夹取装置和 / 或偏置装置施于流动池结构的作用力有助于确保支持物与支持物锁紧件之间的防液密闭。

[0073] 在某些方面,通常优选的是,流动池另外包括密闭装置以协助基本上密闭的室的形成。密闭装置可以是支持物锁紧件的不可或缺的部分,或者可以作为流动池单独组件而提供。所述密闭装置通常包括垫圈,其可由硅橡胶或其他合适的材料制成。在一实施方式中,密闭装置包括 O 环垫圈,其形状通常是位于支持物锁紧件一部中的槽中的框型边形状。在一可选择实施方式中,密闭装置包括扁平的框型边垫圈(约 100 至 150 μm 厚)。在其他具体方面,垫圈或其他间隔部件材料能用粘合剂粘附。

[0074] 垫圈类型或者可在单次使用后弃去(如果例如污染有放射性探针),或者需要时可再次利用。扁平垫圈实施方式特别适于作一次性垫圈,以在单次使用后弃去。明显的是,垫圈的厚度(容易通过交换垫圈而改变)部分地可以确定基本上密闭的室的体积。

[0075] 在本发明的另一方面,在测序反应中使用小量时,流动池组件通过粘合剂的使用而直接连接。粘合剂优选引入提供了多种流动池组件间(例如包括阵列的载玻片和盖玻片)最适粘附的表面。

[0076] 流体入口 30 允许将所需流体引入基本上密闭的室,以处理支持物上的样品。通常地,这类流体是缓冲液、溶剂(例如乙醇/甲醇,二甲苯)、试剂(例如含引物或探针的溶液)等等。流体出口允许处理流体从样品中去除(例如为洗涤,或以允许后续试剂的加入)。优选的是,当支持物正被处理时,它们的方向是这样的,以至流体入口位于基本上密闭的室的底部,而且流体出口位于基本上密闭的室的顶部。

[0077] 通常地,在核酸样品支撑在载玻片 22 上的情况下,基本上密闭的室具有 50 μl 至 300 μl 、优选 100–150 μl 的体积。这样的小体积允许试剂节约使用和(在涉及温度调节的情况下)快速的热响应时间。在样品支撑在膜上的情况下,室通常将更大(大至 2–3mls)。

[0078] 在特定方面,流动池 2 可配置为适于对附着于支持物的样品进行扩增(例如滚换扩增或聚合酶链式反应扩增)。在这样的实施方式中,流动池一定具有开口以允许进一步的试剂加入。该开口一定经设计以便其为短暂的,而且任何新液体的流动非常严密地受到控制以防止任何自流动池的渗漏,并防止流动池在加入任何新试剂时的污染。

[0079] 在某些实施方式的特定方面,例如涉及为用于需要严格控制的温度调节的 PCR 或其他反应的那些,流动池装备了温度控制装置以允许样品和 PCR 混合物的快速加热和冷却(例如热循环)。通常地,流动池具备电气加热元件或帕尔帖(Peltier)器件。流动池也可经配置(例如通过冷却装置的提供)以提供改进的空气冷却。温度控制在 3 $^{\circ}\text{C}$ –105 $^{\circ}\text{C}$ 范围内对于大多数用途是足够的。

[0080] 可涉及用于适当的流体传输装置的许多布置。在优选的实施方式中,提供许多处理流体(例如缓冲液、染色剂等)的储液器,每个储液器连接至抽吸机构。优选的抽吸机构包括但不限于注射泵 60,诸如由 Hook 和 Tucker(Croydon, Surrey, 英国)制造的那些,或具有搏出量 1ml 至 10ml 的 Kloen。可为每个处理流体储液器提供一个这样的泵 60,或者可提供单个泵以利用多接口阀门布局从多个储液器的各个中抽吸流体至可与入口 30 排列的多个注射针头 62、64、66、68。

[0081] 每个注射泵 60 相反能诸如通过通用连接器连接至中心管汇 (central manifold) 70 (诸如通用连接器)。优选地,中心管汇 70 通向选择性多出口阀门 72,以便于需要时,在多个样品正被同时处理的情况下,每个样品可用不同的处理流体或处理流体的组合处理。合适的选择性多出口阀门是转动阀门,诸如由 Omnifit (剑桥,英国) 供应的 10 出口转动阀门。因而,来自多出口阀门 72 的每个出口可连接至单独的流动池。需要时可并入一个或多个过滤器。通常地,过滤器位于每个储液器和其相联的注射泵之间。

[0082] 可通过计算机控制装置单独驱动每个注射泵 60,或者可同时驱动两个或更多个泵以提供两种或更多种处理流体混合物。控制每个泵 60 的运转率将因此控制所产生处理流体混合物的组成。

[0083] 在可选择实施方式中,流体输送装置包括两个或更多个活塞 /HPLC 型泵,每个泵由多个处理流体储液器通过多入口阀门供应。合适的泵可以从例如 Anachem (Luton, Bed, 英国) 得到。多入口阀门将是转动阀门。每个泵将通向为本领域技术人员熟知类型的转动混合器中,从而在需要时允许产生处理流体的可变组成混合物。

[0084] 在某些方面,处理流体或处理流体混合物然后穿过内置过滤器,接着在注入流动池前通过选择性多阀门出口 (诸如转动阀门)。

[0085] 作为以上定义的处理流体的通常“并行”供应的替代,处理流体可以被“串行”地供应,以便于,例如,液体自一基本上密闭的室通过至另一室。该实施方式具有优点,即最小化所需试剂的量。

[0086] 在包括一个或多个阀门的本发明方面,通常地,阀门将是具有两个入口和一个通向基本上密闭的流动池的出口的三向阀门。阀门入口之一间接地由处理流体储液器供给。第二入口由通常是注射器、吸液管或微吸液管 (一般 100-5000 μ l 体积) 的本地储液器 (local reservoir) 供给。该本地储液器可以被计算机控制装置控制,或者可以人工控制。本地储液器通常用在试剂罕见或昂贵的情况下。这样的本地储液器的提供最小化所需试剂的量,简化了清洗,并提供了额外的灵活性,这样每个流动池在需要时可以被单独处理。

[0087] 在本发明的某些实施方式的具体方面,用于流动池反应的“流动”是通过重力、例如流动池成一定角度的放置、或者通过应用在流动池出口 32 上的吸附材料的使用而实现的。在实施方式的其他方面,使用或是机械的、或是电的装置产生流动,例如将抽真空设备引入流动池的出口边缘。在这样的实施方式中的流动池可以是基本上密闭的,或者可具有可用的入口和出口两者,以通过流动池转移流体。

[0088] 在本发明实施方式的另一具体方面,流体在底部进入流动池,向上移动并通过顶部的流体出口流出流动池。然而,在优选方面,流体从顶部进入流动池并通过重力被运载通过反应,从而通过底部的流体出口而流出流动池。流体出口能排空至普通的收集管道,所述管道排干至收集容器中。期望地是,该容器是可从设备上去除的,以允许定期的排空和 / 或清洗。

[0089] 根据本发明,为适应多种不相容的反应速度和待处理材料的体积,测序反应组件基本上是模块化的,以致,如果大量流动池和 / 或所支撑样品需要处理,附加的元件能容易地加至已有的装备上。在这样的实施方式中,系统的观测组件以及测序反应组件能优选地接受模块化的流动池阵列,无论样品是支撑在载玻片还是膜上。

[0090] 测序反应组件至本系统的可逆集成可包括至计算机控制装置的连结,这能协同进

行本系统功能元件的不同活动。计算机控制装置能任选地控制两个或更多个以下参数：选择驱动哪个或哪几个泵；处理流体通过已开动的泵（多个泵）的绝对体积和流速；选择向哪个流动池供给处理流体；设备内所支持样本的温度；流动池自本系统测序反应设备向成像组件的移动；和不同事件的时机。

[0091] 本发明还涉及本发明流动池和/或设备的制造和本发明流动池和/或设备在处理支持物上样品中的用途，以致本发明提供：使用以上定义的流动池和/或自动化测序反应设备处理支持物上的样品的方法；制备流动池的方法；和根据本发明制备松联接的、可逆集成的、包括测序反应组件的系统的方法。

[0092] 本发明提供了用于本发明系统的测序反应组件结果鉴定的检测组件。用于信号的检测系统可取决于所用的标记部分，所述标记部分能被现有化学定义。可使用适于所运用的、能用在本发明系统检测组件中的标记类型的任何检测方法。因此，示例性检测方法包括放射性检测，光吸收检测（例如紫外可见光吸收检测），光发射检测（例如荧光或化学照射）。光学设置包括近场扫描显微术，远场共聚焦显微术，宽视野表面照射，光散射，暗视野显微镜，光转化，单光子和/或多光子激发，光谱波长识别，荧光团鉴定，隐失波照射和全内反射荧光（TIRF）显微术。

[0093] 标记的核酸分子能通过同步或次序（取决于所用的扫描方法）扫描全部或部分各基质而在基质上检测到。为了荧光标记，基质上所选区域可用荧光显微设备逐个或逐行顺序扫描，诸如 Fodor（美国专利号 5,445,934）和 Mathies 等（美国专利号 5,091,652）所记载。能在应用这类分析和检测表面上纳米级结构的技术的文献中找到指南，如通过下列参考文献所显示：Reimer 等编，Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis（扫描电镜：成像物理学和微分析），第 2 版（Springer, 1998）；Nie 等，Anal. Chem., 78:1528-1534(2006)；Hecht 等，Journal Chemical Physics, 112:7761-7774(2000)；Zhu 等编，Near-Field Optics: Principles and Applications（近场光学：原则及应用）（World Scientific Publishing, Singapore, 1999）；Drmanac, 国际专利公开 W02004/076683；Lehr 等，Anal. Chem., 75:2414-2420(2003)；Neuschafer 等，Biosensors & Bioelectronics, 18:489-497(2003)；Neuschafer 等，美国专利 6,289,144，等等。

[0094] 用于本发明的一种具体成像技术是全内反射荧光（TIRF）显微术，其能用于使单荧光团（Cy-3 或 Cy-5 标记的 dNTPs）可视化。TIRF 显微术使用全内反射激发光，并且检测一般用隐失波照射和 TIRF 显微术进行。隐失光场能在表面建立，以使例如荧光标记的核酸分子成像。当激光束在液体与固体基质（如玻璃）之间的界面全反射时，激发光束仅穿透一小段距离的液体。换言之，光场在反射界面处并不会突然结束，但其强度随距离指数性减少。该表面电磁场称为“隐失波”，在液体中近界面处能选择性地激发荧光分子。界面处的弱的隐失光场提供了低背景，并利于高信噪比下的单分子的可见波长检测。这种技术的实例由 Neuschafer 等，美国专利 6,289,144；Lehr 等（上述引用的）；和 Drmanac, 国际专利公开 W02004/076683 所公开。

[0095] EPI- 荧光照射也能运用在本发明的检测组件中。EPI- 荧光显微术是涉及用称为荧光染料的、特殊类型的组织染色剂染色的技术，所述荧光染料在荧光标记的互补 DNA 序列杂交中被掺入。

[0096] TIRF 和 EPI 照射都允许使用几乎任何光源。光源可以是光栅的、扩展束、相干的、不相干的和源于单或多谱源的。在实施方式的一具体方面,成像可用 Zeiss 共聚焦显微镜 200 (Zeiss Axiovert 200) 的使用 TIRF 或 EPI 照射的 100× 物镜和 1.3 百万像素 Hamamatsu orca-er-ag 或类似的系统组件来完成。

[0097] 荧光共振能量转移 (FRET) 也能用作检测方案。在测序情况下, FRET 一般记载于 Braslavsky 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 100 :3960-3964 (2003), 通过引用并入本文。本质上, 在一实施方式中, 供体荧光团连接于引物、聚合酶或模板。为整合至引物所添加的核苷酸包括在两者接近时被供体活化的受体荧光团。

[0098] 用于基于荧光的信号的、适当的照射和检测系统为装备有 TIRF 载玻片的、联接至 80 毫瓦 532nm 固态激光器的 Zeiss 共聚焦显微镜 200。载玻片通过以正确的 TIRF 照射角度安置的物镜照射基质。TIRF 也能在没有使用物镜下、经由光学联接至基质的棱镜照射该基质而完成。平面波导也能用以在基质上实施 TIRF。

[0099] 用于本成像系统的一实施方式含有具有 1.25mm 视场的 20× 透镜, 随之检测通过用 10 百万像素相机而完成。这样的系统使附着于 1 微米间距下的模式阵列的约 1.5 百万核酸分子成像。在这布局下, 每核酸分子有约 6.4 像素。每核酸分子的像素数量能通过增加或减少物镜视野而被调节。例如, 1mm 视野将生成值为 10 的每核酸分子像素, 并且 2mm 视野将生成值为 2.5 的每核酸分子像素。相对于物镜的放大率和 NA, 可调节该视野, 以生成能被光学和图像分析软件分辨的最低像素计数核酸分子。可通过减少物镜放大能力、使用网格模式阵列和在每副图像中增加所采集数据的像素数量改进成像速度。

[0100] 为获取光学信号, 光纤或电荷耦合器 (charged couple device (CCD)) 的组合能用在测序反应的检测中。因而, 在特定实施方式中, 由测序反应形成的阵列上的杂交模式用具有诸如 Yershov 等, Proc. Natl. Aca. Sci. 93 :4913 (1996) 中所记载的适当的光学器件 (Ploem, in Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity (荧光和发光生物活性探针) Mason, T. G. Ed., Academic Press, Landon, pp. 1-11 (1993)) 的 CCD 相机 (例如型号 TE/CCD512SF, Princeton Instruments, Trenton, NJ.) 扫描, 这允许极大量的标记靶核酸的同步扫描。

[0101] 在具体实施方式中, 测序系统的效率可通过多成像系统组件的使用而提高。例如, 在系统成像组件中, 优选在 10-16 百万像素范围内, 可以使用到多达 4 个或更多个相机。多带通滤光片 (Multiple band pass filters) 和二向色镜也可用以采集跨多达 4 个或更多发射光谱的像素数据。为补偿放大率减小的物镜的较低的光采集能力, 可以增加激发光源的能量。可通过使用一个或多个具有各自相机的流动池增加通量, 以至当正杂交 / 反应样品时成像系统不是闲置的。因为阵列的探针术可以是非连续的, 所以可用多于一个的成像系统以采集来自一组阵列的数据, 进一步减少阵列时间。

[0102] 一种照射模式是在成像器之间共享常见的一组单色光源 (约四种激光器以获取 6-8 种颜色)。每个成像器在任意给定时间采集不同波长下的数据, 而光源会通过光学转换系统转换至成像器。在这样的实施方式中, 照射源优选产生至少六种、但更优选八种不同的波长。这样的光源包括气体激光器、通过纤维偶联器组合的多二极管泵浦固态激光器 (multiple diode pumped solid state lasers), 滤过的氙弧灯, 可调谐激光器, 或更新颖的很快由 Tidal Photonics 提供的谱线光引擎 (Spectralum Light Engine)。谱线光引擎

使用棱镜来从谱线上分离光。光谱被投射在 Texas Instruments 数字光处理器上,其能选择性地反射任意部分光谱入纤维或光学连接器中。该系统能监测并校准跨单个波长的能量输出以使其一致,以便自动地补偿在灯泡老化时或灯泡变化间的强度差异。

[0103] 成像过程期间,基质必须保持对焦。保持对焦的一些关键因素是基质的平面性、基质与焦平面的正交性、和基质上的可使其形变的机械作用力。基质平面性能够很好地控制,因为容易获得超过 1/4 波平性的玻璃板。基质上不平均的机械作用力能通过恰当的杂交室设计而最小化。与焦平面的正交性能够通过良好调节的、高精度的镜台而实现。在每个成像获得后,它将会用快速的算法来分析以确定图像是否对焦。如果图像焦点没对准,自动对焦系统将储存焦点没对准的图像的位置信息,以便那阵列部分能在下一个成像周期中重成像。通过基质上不同地点的位置作图,能减少用于基质图像获取所需的时间。

[0104] 所测信号能人工或者优选地通过适当的计算机方法分析以将结果制成表。基质和反应条件可包括适当的用于验证杂交完整性和延伸条件和需要时用于提供关于定量的标准曲线的对照。例如,对照核酸能被加入样品。

[0105] 在大规模的测序运行中,基于 16 百万像素 CCD 的 300 毫秒曝光时间,每个成像器优选获取约 200,000 幅图像 / 天。因此,用于本发明系统的照射和检测组件仪器设计可包括四个成像器,每个服务于四组四元流动池(总计 16 个流动池)。每个成像器可包括具有 10 百万像素的 CCD 探测器,并用于粗略 300 毫秒曝光时间。当其他荧光团正被成像时,被光源无意的光漂白能通过保持低照射能量和最短曝光时间来减少。

[0106] 通过使用强化的 CDD (ICCD),用比标准 CCD 低数量级的照射强度和曝光时间采集几乎同样质量的数据。ICCD 一般在 1-1.4 百万像素范围内可获得。因为它们需要短得多的曝光时间,一百万像素的 ICCD 能在标准 CCD 获取一副图像的时间内获取十副或更多的图像。与快速滤光轮和高速流动池镜台联合使用时,一百万像素的 ICCD 能采集与 10 百万像素标准 CCD 同样量的数据。

[0107] 在具体的实施方式中,电子倍增 CCD (EMCCD) 用以核酸成像。EMCCD 是定量数码相机技术,能检测单个光子事件同时保持高量子效率,其可经由装入传感器的独特的电子倍增结构而实现。不同于常规 CCD, EMCCD 不受输出放大器的读出噪声限制,即使在高读出速度下操作时。这是通过添加固态电子倍增 (EM) 寄存器至正常串联寄存器的末端而实现的;该寄存器使弱信号在任意读出噪声通过输出放大器添入前被倍增,因此使读出噪声变得微不足道。EM 寄存器有数百个使用高于正常时钟电压的级。当电荷通过各级转移时,可利用碰撞电离现象以产生二次电子,并因此而 EM 增加。当这通过数百个级而完成时,所导致的增加可以被(软件)控制从一倍到上百或甚至上千倍。

[0108] EMCCD 系统可与 TIFRM 技术联合,通过多谱线激光器系统的整合,优选地具有声光可调谐滤波器 (Acousto-Optical Tunable Filter, AOTF) 调节的固态激光器方案,用以多荧光团标记成像。该技术可容易为 FRET 分析所调整,优选通过发射侧的合适的光束分离器件的整合。

[0109] 在高分辨率和高速成像和测序化学相关的读出中考虑到的因素为移动部件所导致的结果波动,震动如果不加以控制或隔离,能干扰图像捕捉并导致图像分辨率差。为最小化因移动部件(特别是具有机动夹持机构 8, 8' 的运载工具 9) 震动的影响,包括光学组件的表征工具 7 与反应平台 3 特意为物理上松联接。特别地,它们通过隔震器等在物理上互

相分开,即使它们在运行上是并行的。这需要有控制和传感机构作为运载工具 9 的部分,以及位置登记机构作为表征工具 7 的部分。多种这样的机构是在相关领域技术的教导内。例如机器人技术,其中电子眼、可被感知的比对标记等等用于确保转移精确,不会引起过量的震动进入表征工具灵敏的视野,以允许连续或近乎连续的运行。目标是在连接两种或更多种技术(包括有关力学、电子、光学和生化方面的批次处理)时,精确高效地采集并处理大量数据,迄今为止,所述技术还没有被统一到高效的连续运行的分析方法中。

[0110] 虽然本发明由许多不同形式的实施方式满足(如关于本发明优选实施方式所详述),但是应理解,本公开内容被认为是本发明原则的示例,并非意在将本发明限于本文所示和所述的具体实施方式。本领域技术人员可以进行众多变形而不偏离本发明精神。本发明范围将仅通过任意相应专利申请和其等价物的权利要求书所衡量。摘要和名称不应解释为对本发明范围的限制,因为其目的是使有关机构以及公众能快速确定本发明的一般性质。在任意相应的专利申请的权利要求书中,除非使用术语“装置”,否则该文所引用的特征或元件均不应被解释为依据 35U. S. C § 112, ||6 的装置加功能限定。

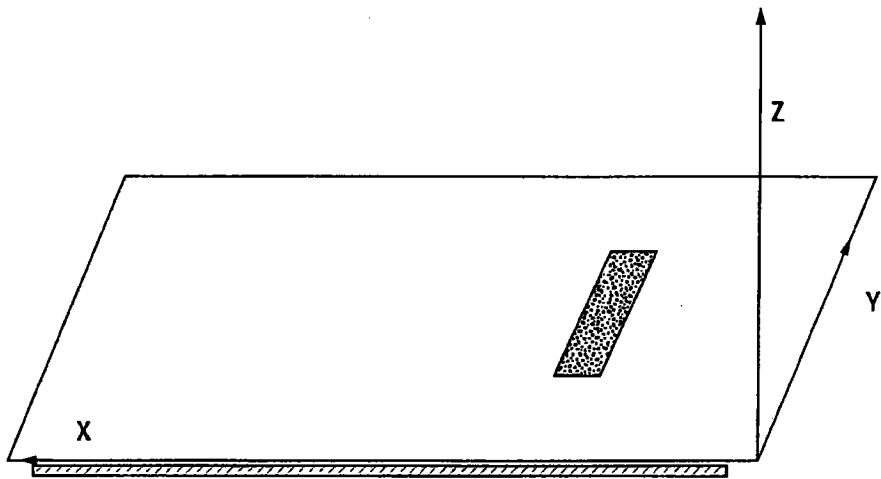


图 1

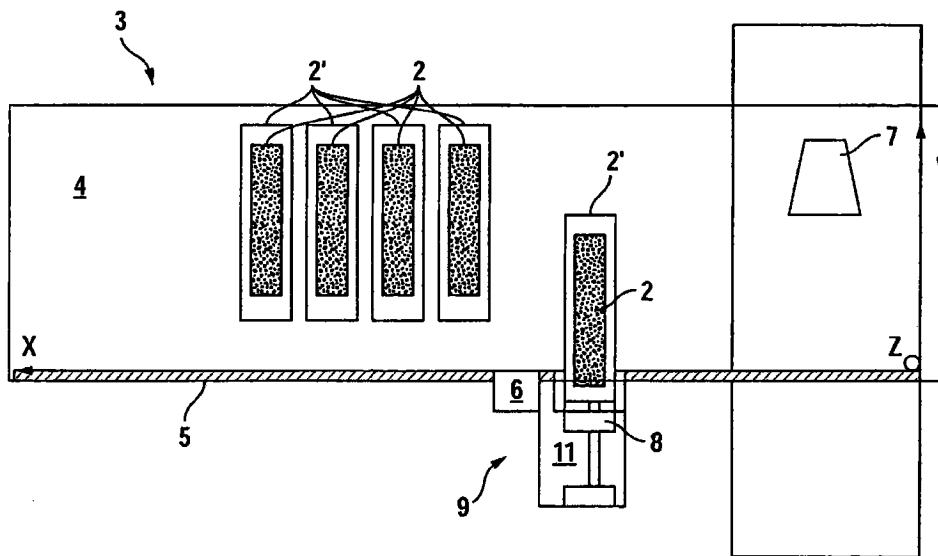


图 2

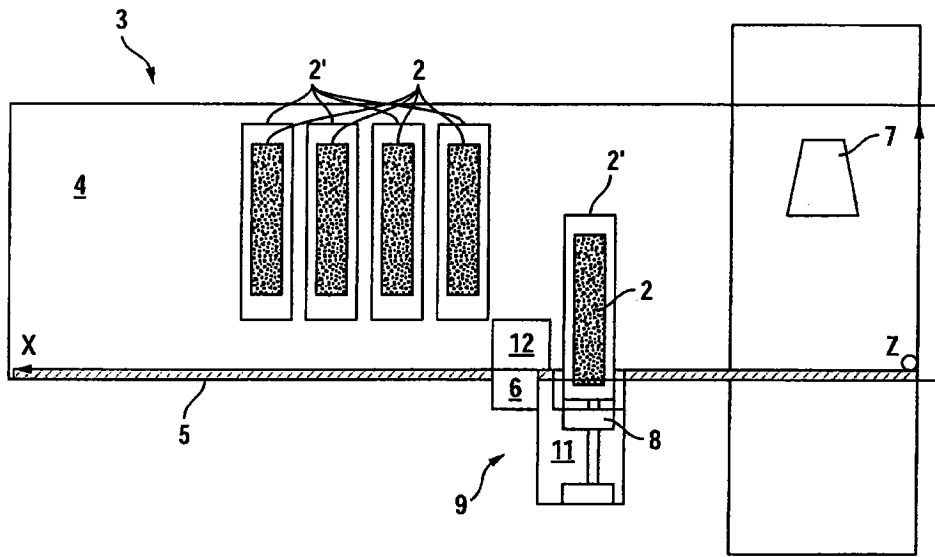


图 3

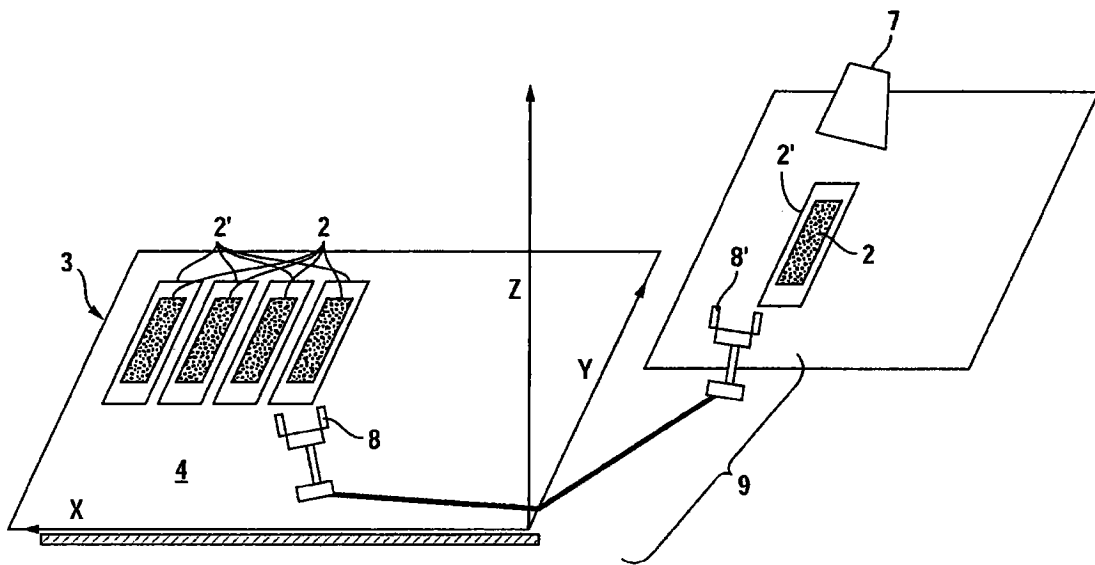


图 4

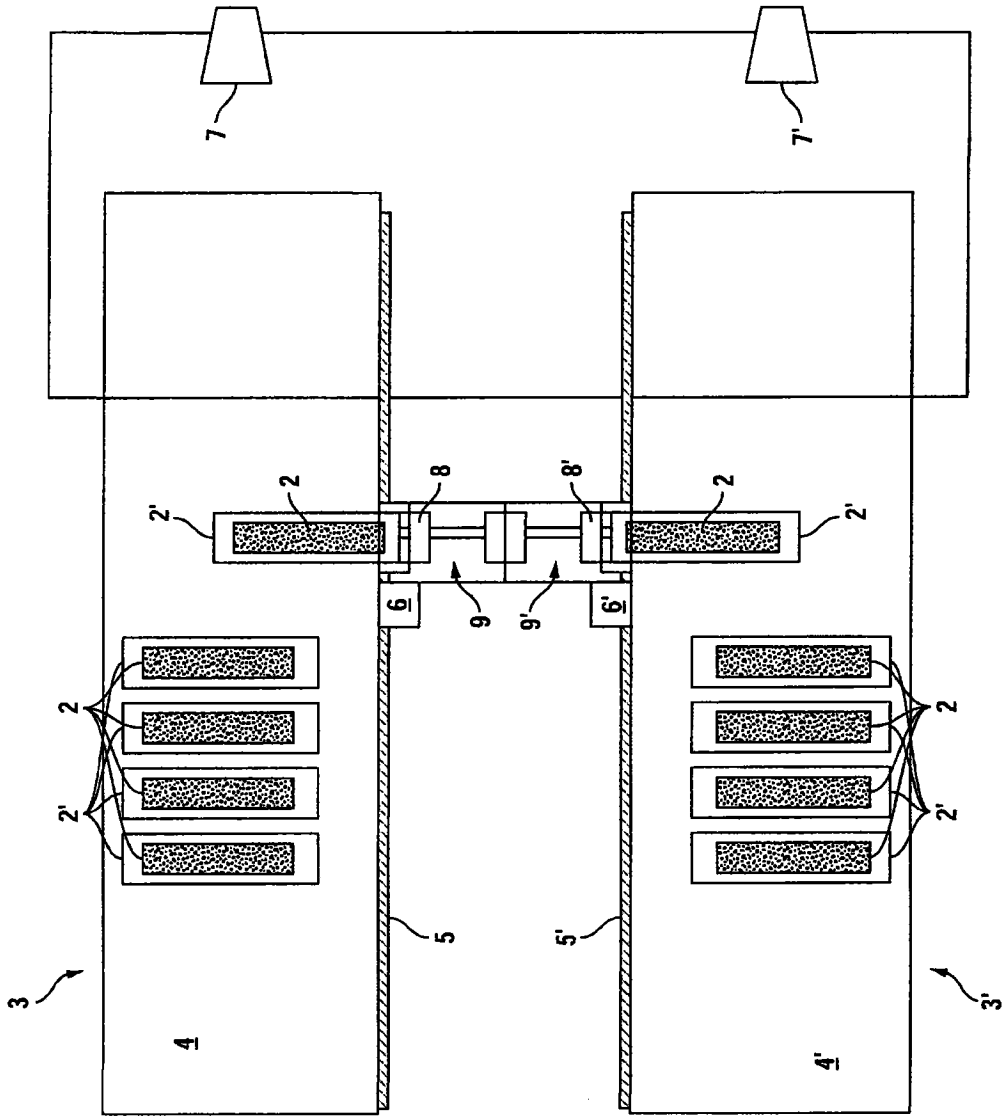


图 5

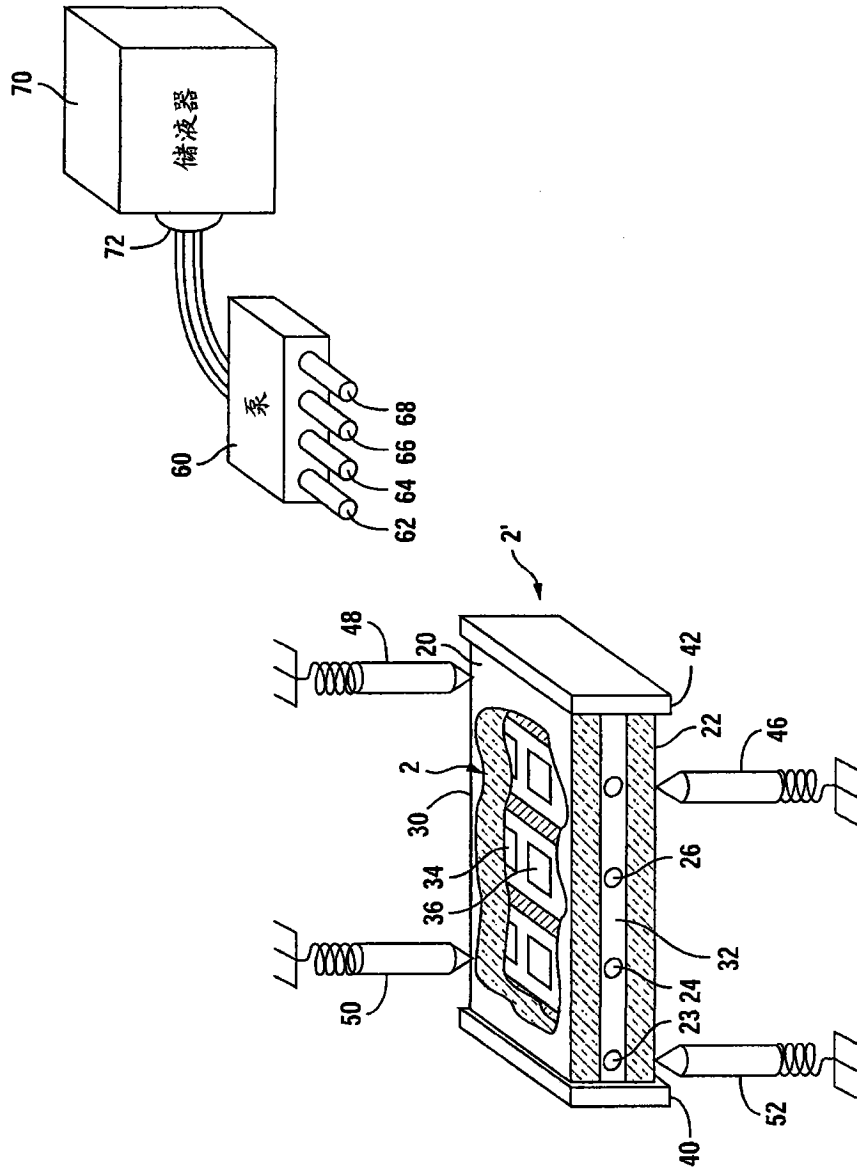


图 6