



# (12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 211311438 U

(45)授权公告日 2020.08.21

(21)申请号 201922144436.9

(74)专利代理机构 深圳市世纪恒程知识产权代理  
事务所 44287

(22)申请日 2019.12.02

代理人 晏波

(30)优先权数据

62/774,998 2018.12.04 US

62/883,276 2019.08.06 US

62/930,688 2019.11.05 US

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/04(2006.01)

(73)专利权人 欧姆尼欧美公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 阿诺德·奥利芬特

亚历克斯·涅米罗斯基

朱利安·阿尔伯尼

迈克尔·埃里克斯塔德

丽贝卡·麦金利 乍得·弗莱舍

埃里克·比利亚雷亚尔

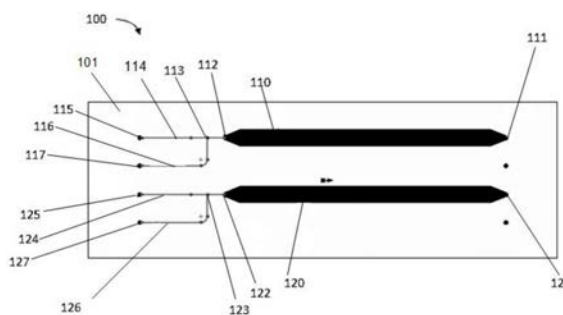
权利要求书2页 说明书34页 附图13页

(54)实用新型名称

流动池

(57)摘要

本实用新型提供了一种流动池,其包括:固定在流动池通道内的三元复合物,所述三元复合物包括聚合酶、引发的模板核酸和用于所述模板的下一个正确的核苷酸;以及与所述流动池通道中的三元复合物接触的流体泡沫,所述流体泡沫包括多个在液体中的气泡,所述流体泡沫包括的气泡的体积分数至少为流动池通道中流体泡沫总体积的25%,以及所述气泡的平均有效直径至多为流动池通道直径的95%。



1. 一种流动池,包括:

固定在流动池通道内的三元复合物,其中,所述三元复合物包括聚合酶、引发的模板核酸和用于所述模板的下一个正确的核苷酸;以及

与所述流动池通道中的三元复合物接触的流体泡沫,其中,所述流体泡沫包括多个在液体中的气泡,其中,所述流体泡沫包括的气泡的体积分数至少为流动池通道中流体泡沫总体积的25%,以及其中,所述气泡的平均有效直径至多为流动池通道直径的95%。

2. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述聚合酶包括外源发光标记。

3. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述下一个正确的核苷酸包括外源发光标记。

4. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述三元复合物存在于阵列的位点。

5. 如权利要求4所述的流动池,其中,所述阵列包括至少 $1 \times 10^3$ 个位点,所述位点包括固定的三元复合物。

6. 如权利要求5所述的流动池,其中,每个位点的平均面积小于25平方微米。

7. 如权利要求6所述的流动池,其中,每个位点都包括引发的模板核酸的集合,其中,所述引发的模板核酸具有共同的模板序列。

8. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述三元复合物通过所述引发的模板核酸附着到所述流动池通道的内表面而固定。

9. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述三元复合物通过将所述引发的模板核酸附着到所述流动池通道内的珠粒而固定。

10. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流体泡沫能够经由正排液力流过所述流动池通道。

11. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述气泡包括惰性气体或稀有气体,其中所述气泡基本上不含氧气。

12. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述气泡包括大气。

13. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流体泡沫包括浓度为至少50nM的游离核苷酸。

14. 如权利要求13所述的流动池,其中,所述游离核苷酸包括外源发光标记。

15. 如权利要求13或14所述的流动池,其中,所述游离核苷酸包括封闭部分。

16. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流体泡沫包括浓度为至少5单位/ml的游离聚合酶。

17. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流动池通道的横截面面积至多为 $100\text{mm}^2$ 。

18. 如权利要求17所述的流动池,其中,所述流动池通道的横截面面积至少为 $100\mu\text{m}^2$ 。

19. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流动池通道的体积至多为1ml。

20. 如权利要求19所述的流动池,其中所述流动池通道的体积至少为 $1\mu\text{l}$ 。

21. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流动池通道包括光学透明的窗口,所述三元复合物通过所述窗口显露出。

22. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述引发的模板核酸包括可逆终止的引物。

23. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述流体泡沫中的气泡的平均直径小于 $500\mu\text{m}$ 。

24. 如权利要求23所述的流动池,其中,所述流体泡沫中的气泡的平均直径大于500nm。

25. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述三元复合物包括稳定的三元复合物。

26. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述三元复合物中的聚合酶催化将下一个正确的核苷酸共价添加至所述引发的模板核酸。

27. 如权利要求1所述的流动池,其中,所述液体包括表面活性剂。

## 流动池

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是基于并且要求2019年11月5日提交的美国临时申请号62/930,688,2019年8月6日提交的美国临时申请号62/883,276以及2018年12月4日提交的美国临时申请号62/774,998的权益,每一个均通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开总体上涉及分子测定,并且对核酸测序程序具有特定的适用性。

### 背景技术

[0004] 模板核酸链的准确序列确定对于分子诊断很重要。从在已知位置的替代物中鉴定单个核苷酸碱基可以用作分析单个核苷酸多态性(即“SNP”)的基础。SNP又可以用于确定个体的表型,例如对疾病的易感性或具有期望性状的倾向。检测患者的遗传变异可以表明某些药物治疗患者的功效或在用某些药物治疗患者时出现不良反应的风险。

[0005] 市售的核酸测序载物台极大地增加了我们对可操作性状的遗传基础的了解。测序生物化学和检测硬件的改进仍在继续。然而,尽管在研究实验室中广泛使用,但是当前可用的测序载物台的成本抑制了临床中测序的采用。同样,测序载物台在根据患者和治疗他们的期望的时间范围内提供诊断或预后答案方面相对较慢。本公开提供了减少测序时间,降低测序成本,减少试剂体积并且还提供相关优点的流体系统和方法。本公开的系统和方法可以用于核酸测序以外的化学和生物学测定。

### 实用新型内容

[0006] 本公开提供了一种测序系统,包括:载物台、液体输送部件、气体输送部件、气泡发生器部件和光学检测部件。所述载物台被配置为支撑具有检测通道的流动池,所述光学检测部件被配置为检测所述检测通道的内部,所述液体输送部件被配置为将液体从多个容器输送到所述检测通道,所述气体输送部件被配置为将气体从一个或多个源输送到所述气泡发生器部件,以及所述气泡发生器部件被配置为在所述多个容器的下游且在所述流动池的上游的位置处将来自所述气体输送部件的气泡引入到来自所述液体输送部件的液体中,从而将包括来自所述气体输送部件的气体气泡的流体泡沫输送至所述检测通道。

[0007] 本公开还提供了一种流动池,包括:固定在流动池通道内的三元复合物。所述三元复合物包括聚合酶、引发的模板核酸和用于所述模板的下一个正确的核苷酸;以及与所述流动池通道中的三元复合物接触的流体泡沫。所述流体泡沫包括多个在液体中的气泡,所述流体泡沫包括的气泡的体积分数至少为流动池通道中流体泡沫总体积的25%,气泡的平均有效直径至多为流动池通道直径的95%。

### 附图说明

[0008] 图1示出了具有两个检测通道的流动池,每个检测通道流体地连接到气体混合部

件,该气体混合部件使用T形接头来连接液体通道和气体通道。

[0009] 图2示出了具有两个检测通道的流动池,每个检测通道流体地连接到气体混合部件,该气体混合部件使用Y形接头来连接液体通道和气体通道。

[0010] 图3示出了具有T形接头和具有用于气体管线的螺纹接头的气泡发生器。

[0011] 图4示出了具有T形接头以及具有用于气体管线和液体管线的螺纹接头的气泡发生器。

[0012] 图5示出了具有Y形接头和在该接头处具有用作气体电阻器的疏水性滤膜的气泡发生器。

[0013] 图6示出了用于将流体泡沫输送至流动池的流体回路。

[0014] 图7示出了使用试剂的液体递送(图7A)或试剂的流体泡沫递送(图7B)的测序运行的信号强度对测序循环的图。

[0015] 图8示出了核酸测序系统的功能部件的图示。

[0016] 图9示出了核酸测序系统的几个部件的组件的透视图。

[0017] 图10示出了流体连接至吸管阵列的路由歧管的俯视图。

[0018] 图11示出了与旋转阀接合的路由歧管的仰视图。

[0019] 图12A示出了核酸测序系统和流动池之间的流体连接的透视图;图12B显示了相同的透视图,但连接器已断开。

[0020] 图13示出了流动池与核酸测序系统的液体输送部件之间的连接。

[0021] 图14A和14B示出了包括气泡发生器的流体连接器的分解图。

[0022] 图15A示出了气泡产生器,图15B示出了气泡产生器的分解图,图15C示出了一个气泡产生器的内部,图15D示出了另一个气泡产生器。

## 具体实施方式

[0023] 已知气泡对分子分析(例如核酸测序过程和蛋白质活性测定)有不利影响。因此,避免或去除气泡先前已经是分子分析中使用的方法和设备的设计目标和用户需求。通常配置为避免气泡的分析方法包括,例如,在蛋白质与分析物结合或蛋白质催化分析物变化的条件下,将蛋白质与目标分析物接触的方法。结合或催化可产生信号或其他可检测的事件,其指示蛋白质和/或分析物的存在、数量、组成、功能或其他特征。分析方法通常在配制用于维持反应组分(尤其是蛋白质)稳定性的液体中进行。人们认为气泡会由于气液界面的表面变性而损坏蛋白质。参见,例如Clarkson et al.,*J Colloid Interface Sci.*215(2):323-332(1999),其通过引用并入本文。结果,在分子分析中避免了气泡,尤其是那些利用蛋白质的气泡。

[0024] 气泡还会对用于许多分子分析(例如核酸测序过程和蛋白质活性测定)的检测设备造成干扰。例如,进入发光检测器的光路的气泡将散射本来会被检测到的光。许多测序过程和其他分析测定法都利用固相底物。在这些测定中,液体试剂与表面上的分析物相互作用以产生可检测的产物或信号。但是,附着在表面上的气泡会散射光信号,并可能至少暂时阻止液体试剂与分析物接触,并可能因干燥而永久损坏分析物。

[0025] 在分子分析(例如核酸测序过程和蛋白质活性测定)中,通常会避免产生气泡,原因是人们认为会出现问题,例如上述问题。本公开提供了利用气泡在核酸测序过程和其他

分析方法中良好使用的系统。令人惊讶地发现,可以将气泡引入液体流中以产生流体泡沫,该流体泡沫又能够参与核酸测序反应的一个或多个步骤。可以在受控条件下将气泡引入液流中,以产生各种所需效果并避免产生不良结果。例如,流体泡沫可用于洗涤在其上发生测序反应的固体载体,例如,提供相对有效地去除先前递送的溶液并用新溶液代替。

[0026] 此外,通过通道的流体泡沫流与液体层流具有不同的轮廓。层流具有抛物线速度分布(中心更快,外部更慢)。在流体泡沫流中,气泡可以例如通过适当地选择流速而保持在锁定步骤中,并一起流动。这有助于将一种流体交换为另一种流体,因为泡沫可以保持平坦的前部,而不管泡沫在系统中的传播程度如何。减少近端流动流体之间的扩散以及降低速度剪切,可以帮助保留每种流体试剂块,当它通过流动池或其他流体通道传送时,并且,与非泡沫流体实现用于相同流体试剂的相同交换水平所需的时间相比,这两种效果可以减少实现特定水平流体交换所需的时间量。

[0027] 此外,气泡可促进溶液内的混合,以增加流体泡沫与固体支持物表面之间试剂转移的效率。气泡附近的快速对流扩散可通过补充(或完全破坏)耗尽区来提高表面附近扩散受限动力学的反应速率。使用气泡的另一个优点是减少了所用流体的体积或数量而降低了试剂成本。更具体地说,由于用于产生气泡的气体比许多用于核酸测序的试剂便宜,并且由于执行测序反应的特定步骤可能需要相对大量的液体,因此向液体中添加气泡可以充当惰性填充剂,以减少有效执行特定步骤所需的试剂液体量。如本文所述,气泡的受控输送和去除可以允许在需要时从流动池清除气泡,例如,以促进光学检测流动池内部。

[0028] 气泡可用于改善温度调节,例如,在将溶液预平衡至流动池或其他流体通道的温度时。例如,可以通过引入分别加热或冷却的气体来升高或降低液体试剂的温度。所得泡沫中的气泡提供了与本体液相接触的高表面积,这可以促进本体液体中试剂温度的快速有效改变。

[0029] 流体泡沫也可以用于去除其他气泡,例如那些难以从表面移出的表面气泡。与在类似于泡沫的本体相的组成的均质液体相比,泡沫在某些情况下能够更有效地驱除表面气泡。气泡还可为确定流动池中的流速提供有用的视觉辅助。

[0030] 除非另有说明,否则本文中使用的术语应理解为具有相关领域中的普通含义。下面列出本文中使用的几个术语及其含义。

[0031] 如本文所使用的,术语“阵列”是指附着在一个或多个固体支持物上的分子群,从而可以将一个位点的分子与其他位点的分子区分开。阵列可以包括不同的分子,每个不同的分子位于固体支持物的不同可寻址位置。或者,阵列可以包括单独的固体支持物,每个固体支持物充当带有不同分子的位点,其中可以根据固体支持物在其上附着的表面上的位置,或根据固体支持物在液体例如流体流中的位置来识别不同的分子。阵列的分子可以是例如核苷酸、核酸引物、核酸模板、引物核酸模板或核酸酶,例如聚合酶、连接酶、核酸外切酶或其组合。

[0032] 如本文所使用的,术语“附接”是指两个东西彼此接合、紧固、粘附、连接或结合的状态。例如,反应组分,例如引发的模板核酸或聚合酶,可以通过共价或非共价键连接至固相组分。共价键的特征是原子之间共享电子对。非共价键是不涉及电子对共享的化学键,非共价键可以包括例如氢键、离子键、范德华力、亲水相互作用和疏水相互作用。

[0033] 如本文所使用的,当提及核苷酸时,术语“封闭部分”是指在核酸聚合反应期间抑

制或阻止核苷酸的3'氧形成与下一正确核苷酸的共价键的核苷酸的一部分。可以从核苷酸类似物中去除“可逆终止子”核苷酸的封闭部分,或对其进行修饰,以使核苷酸的3'-氧共价连接至下一个正确的核苷酸。该过程称为“解封闭”核苷酸类似物。这种封闭部分在本文中称为“可逆终止子部分”。示例性的可逆终止子部分在美国专利号7,427,673、7,414,116、7,057,026、7,544,794或8,034,923或PCT公开号W0 91/06678或W0 07/123744中有所阐述,每一个均通过引用并入本文。具有封闭部分或可逆终止子部分的核苷酸可以在核酸的3'末端(例如引物),也可以是未共价结合至核酸的单体。

[0034] 如本文所使用的,术语“气泡”是指液体或固体内的气体小滴。由于气体与周围液体相比具有不同的折射率,因此可以在流体中观察到气泡。完全被液体包围的气泡称为“大气泡”。附着在固相表面上的气泡称为“表面气泡”。

[0035] 如本文所使用的,术语“催化金属离子”是指通过聚合酶促进核酸(例如引物)的3'-氧与进入的核苷酸的磷酸之间形成磷酸二酯键的金属离子。“二价催化金属阳离子”是化合价为2的催化金属离子。催化金属离子可以在稳定聚合酶、核苷酸和引发的模板核酸之间的复合物形成的浓度下存在,该浓度被称为不发生磷酸二酯键形成的金属离子的非催化浓度。金属离子的催化浓度是指足以使聚合酶催化核酸(例如引物)的3'-氧与进入的核苷酸的磷酸部分之间的反应的金属离子的量。示例性催化金属离子包括 $Mg^{2+}$ 和 $Mn^{2+}$ 。

[0036] 术语“包括”在本文中旨在是开放式的,不仅包括所列举的要素,而且还包括任何其他要素。

[0037] 如本文所使用的,当提及项目的集合时,术语“每个”旨在标识该集合中的单个项目,但是不一定指代该集合中的每个项目。如果明确的披露或上下文另有明确规定,则可能会发生异常。

[0038] 如本文所使用的,“平衡”是指由于反作用力的相等作用而产生的平衡状态。例如,当三元复合物的形成速率由其解离速率平衡时,在引发的模板核酸、聚合酶和同源核苷酸之间形成的三元复合物与未结合的聚合酶和未结合的核苷酸处于平衡状态。在这种条件下,可逆结合反应停止改变其产物(例如三元复合物)与反应物(例如聚合酶、核苷酸和核酸)的净比率。如果正反应(例如三元复合物形成)的速率与逆反应(例如三元复合物的离解)的速率相平衡,则产物与反应物的比例没有净变化。

[0039] 如本文所使用的,当提及分子的部分时,术语“外源的”是指在分子的天然类似物中不存在的化学部分。例如,核苷酸的外源标记是天然存在的核苷酸上不存在的标记。类似地,在聚合酶的天然环境中未发现存在于聚合酶上的外源标记。

[0040] 如本文所使用的,当提及核酸时,术语“延伸”是指在核酸的3'末端添加至少一个核苷酸的过程。当提及核酸时,术语“聚合酶延伸”是指将至少一个核苷酸添加至核酸的3'端的聚合酶催化的过程。通过延伸添加到核酸中的核苷酸或寡核苷酸被认为掺入到核酸中。因此,术语“掺入”可用于指通过形成磷酸二酯键将核苷酸或寡核苷酸连接至核酸的3'端的过程。

[0041] 如本文所使用的,当提及核苷酸时,术语“可延伸的”是指该核苷酸在3'位置具有一个氧或羟基部分,并且当并入核酸时能够与下一个正确的核苷酸形成共价键。可延伸核苷酸可以在引物的3'位置,也可以是单体核苷酸。可延伸的核苷酸将缺乏封闭部分,例如可逆终止子部分。

[0042] 如本文所使用的,“流动池”是包括一个或多个将流体引导至检测区域的通道的反应室。检测区域可以在功能上耦合至检测器,使得可以观察到在反应室中发生的反应。例如,流动池可包括栓接到表面的引发的模板核酸分子,在其上反复施加核苷酸和辅助试剂并洗去。流动池可以包括透明材料,该透明材料允许在发生期望的反应之后使样品成像。例如,流动池可以包括含有检测通道的玻璃或塑料载玻片,通过该检测通道可以泵送聚合酶、dNTP和缓冲液。通道内的玻璃或塑料可以用一个或多个待测序的引发的模板核酸分子修饰。可以放置外部成像系统以在检测通道中的检测区域或检测通道中的表面上检测分子。示例性流动池,其制造方法和使用方法在美国专利申请号2010/0111768A1或2012/0270305A1或W0 05/065814中进行了描述,每一个均通过引用并入本文。

[0043] 如本文所使用的,术语“流体”是指能够流动并改变其形状以填充容器的液体或气体。在许多情况下,当受到趋于改变其形状的力作用时,流体将以稳定的速率改变形状。

[0044] 如本文所使用的,术语“流体泡沫”是指包括气泡的液体。液体用作分散相,而气泡用作分散相。示例性的分散相液体包括那些含有试剂或反应产物例如结合反应、核酸测序反应或在分析测定中使用的反应的液体。水性液体提供了特别有用的分散相。示例性气体包括惰性气体,例如氮气(N<sub>2</sub>)或稀有气体。有用的稀有气体包括例如氦气(He)、氖气(Ne)、氩气(Ar)、氪气(Kr)和氙气(Xe)。另一种有用的气体是地球大气。流体泡沫可包括大气泡(即被液体包围的气泡)和表面气泡(与固体支持物表面(如流动池表面)接触的气泡)中的一个或两个。在一些配置中,流体泡沫可基本上没有大气泡或表面气泡。流体小微气泡将具有平均直径等于或小于1微米的气泡,而流体大微气泡将具有平均直径大于1微米的气泡。

[0045] 如本文所使用的,在提及两种事物时,术语“流体耦合”,是指一种流体或该流体中的溶质能够从一种事物转移到另一种事物。例如,容器可以通过流体可以流过的管流体地耦合到流动池。在另一示例中,如果阵列位于液体中,则阵列中的两个位点流体耦合,以使得溶质可以从一个位点扩散到另一个位点。

[0046] 如本文所使用的,当提及能够在结合反应中形成复合物的组分时,术语“游离”或“未结合”是指未处于结合状态的组分。举例来说,平衡结合反应可包括产物(例如三元复合物)和未结合在产物中的反应物(例如游离聚合酶、游离核酸或游离核苷酸)。

[0047] 如本文所使用的,术语“抑制性金属离子”是指在存在聚合酶的情况下抑制将核苷酸化学结合到引物中所需的磷酸二酯键形成的金属离子。与催化金属离子相比,抑制性金属离子可以例如通过竞争性结合与聚合酶相互作用。“二价抑制性金属离子”是化合价为2的抑制性金属离子。二价抑制性金属离子的实例包括但不限于Ca<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>和Sr<sup>2+</sup>。三价Eu<sup>3+</sup>和Tb<sup>3+</sup>离子是化合价为3的抑制性金属离子。

[0048] 如本文所使用的,当提及分子时,术语“固定的”是指分子与固体支持物的直接或间接、共价或非共价连接。在一些构型中,共价附着可能是优选的,但是通常所需要的只是使分子(例如核酸)在打算使用支持物的条件下保持固定或附着在支持物上,例如,在利用核酸或聚合酶固定在传感器上或附近的应用中。

[0049] 如本文所使用的,术语“标记”是指提供可检测特征的分子或其部分。可检测的特征可以是例如光信号,例如辐射的吸收、发光或荧光发射、发光或荧光寿命、发光或荧光偏振等;瑞利和/或米氏散射;对配体或受体的结合亲和力;磁特性;电特性;电荷;质量;放射性等。示例性标记包括但不限于荧光团、发光团、发色团、纳米粒子(例如金、银、碳纳米管)、



重原子、放射性同位素、质量标记、电荷标记、自旋标记、受体、配体等。

[0050] 如本文所使用的,当提及流体时,术语“混合相”是指包括气泡、液滴或与液体不溶混的固体颗粒的悬浮液的液体。示例性混合相流体包括但不限于流体泡沫(液体中的气泡)、流体乳液(与周围的第二液体不混溶的第一液体的液滴)、流体浆液(液体中的固体颗粒)。示例性液体包括含有试剂或反应(例如结合反应、核酸测序反应、合成反应或用于分析测定的反应)产物的液体。

[0051] 如本文所使用的,术语“下一个正确的核苷酸”是指将在引物的3'端结合和/或掺入以互补与该引物杂交的模板链中的碱基的核苷酸类型。模板链中的碱基称为“下一个碱基”,紧接在模板中与引物3'端杂交的碱基的5'处。下一个正确的核苷酸可以称为下一个碱基的“同源”,反之亦然。在三元复合物或双链核酸中彼此特异性相互作用的同源核苷酸称为彼此“配对”。具有与下一个模板碱基不互补的碱基的核苷酸称为“不正确”、“错配”或“非同源”核苷酸。

[0052] 如本文所使用的,术语“核苷酸”可用于指天然核苷酸或其类似物。示例包括但不限于核苷酸三磷酸酯(NTP),例如核糖核苷酸三磷酸酯(rNTP)、脱氧核糖核苷酸三磷酸酯(dNTP)、外源标记的核苷酸或其非天然类似物,例如双脱氧核糖核苷酸三磷酸(ddNTPs)或可逆终止的核苷酸三磷酸(rtNTPs)。

[0053] 如本文所使用的,术语“聚合酶”可用于指核酸合成酶,包括但不限于DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶、引物酶和转移酶。通常,聚合酶具有一个或多个活性位点,在该位点可能发生核苷酸结合和/或催化核苷酸聚合。聚合酶可以催化核苷酸聚合到双链核酸分子的第一链的3'末端。例如,聚合酶通过磷酸二酯键催化将下一个正确的核苷酸添加到双链核酸分子第一条链的3'氧基团上,从而将核苷酸共价结合到双链核酸分子的第一链上。任选地,聚合酶不需要能够在本文所述方法中使用的一种或多种条件下核苷酸掺入。例如,突变型聚合酶可能能够形成三元复合物,但是不能催化核苷酸掺入。流体中聚合酶的量可以以活性单位来定量。例如,聚合酶的单位可以等于在特定温度下在30分钟内催化将10nmol的dNTP掺入DNA的酶的量。例如,可以在75°C下测量热稳定的聚合酶,而可以在37°C下测量热不稳定的聚合酶。

[0054] 如本文所使用的,当提及系统的功能特性时,术语“预定义”指的是该特性是对旨在产生该特性的系统进行操纵的已知、可预测或预期的结果。例如,流体的泡沫性是使用诸如气液混合系统之类的气泡发生器将气泡引入液体中的已知和预期结果。系统的示例性预定义特性可以可选地包括在本体相中形成分散相的速率、引入本体相中的分散相的量、系统产生的分散相和本体相的相对比例、系统产生的分散相元素(例如气泡、颗粒或液滴)的大小等。

[0055] 如本文所使用的,术语“引发的模板核酸”是指具有双链区的核酸杂合体,使得其中一条链具有可通过聚合酶延伸的3'末端。两条链可以是连续核酸分子(例如发夹结构)的一部分,或者两条链可以是彼此不共价连接的可分离分子。

[0056] 如本文所使用的,术语“引物”是指具有与模板序列处或附近的核酸序列结合的序列的核酸。通常,引物以允许模板复制的构型结合,例如通过引物的聚合酶延伸。引物可以是与核酸分子的第二部分结合的核酸分子的第一部分,第一部分是引物序列,第二部分是引物结合序列(例如发夹引物)。或者,引物可以是与具有模板序列(例如可解离的引物)的

第二核酸分子结合的第一核酸分子。引物可以由DNA、RNA或其类似物组成。引物可以在3'端封闭,也可以延伸。

[0057] 如本文所使用的,当提及阵列时,术语“位点”是指阵列中存在特定分子的位置。一个位点只能包括一个分子,也可以包括几个相同物种的分子(即这些分子的集合)。或者,位点可包括一群不同物种的分子(例如,一群具有不同模板序列的三元复合物)。阵列的位点通常是离散的。离散的位点可以是连续的,也可以在彼此之间具有间隙。可用于本文的阵列可具有例如小于100微米、50微米、10微米、5微米、1微米或0.5微米的位点。替代地或另外,阵列可以具有被至少0.5微米、1微米、5微米、10微米、50微米或100微米分开的位点。位点各自可以具有小于1平方毫米、500平方微米、100平方微米、25平方微米、1平方微米或更小的面积。当提及阵列时,术语“特征”旨在与术语“位点”同义。

[0058] 如本文所使用的,术语“固体支持物”是指不溶于水性液体的刚性基质。基质可以是无孔的或多孔的。基质可以任选地能够吸收液体(例如由于孔隙),但是通常将具有足够的刚性,以使基质在吸收液体时基本上不膨胀,并且在通过干燥除去液体时基本上不收缩。无孔固体支持物通常对液体或气体是不可渗透的。示例性固体支持物包括但不限于玻璃和改性或功能化的玻璃、塑料(包括丙烯酸、聚苯乙烯以及苯乙烯与其他材料的共聚物、聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯、Teflon™、环烯烃、聚酰亚胺等)、尼龙、陶瓷、树脂、Zeonor™、二氧化硅或二氧化硅基材料,包括硅和改性硅、碳、金属、无机玻璃、光纤束和聚合物。

[0059] 如本文所使用的,术语“基本上没有”是指没有有效或可检测量的特定事物或特征。例如,没有气泡的流体,具有太小或太少而无法在特定系统中观察到的气泡的流体,具有太小或太少而无法在特定方法中观察到的气泡的流体,具有太小或太少而对反应(例如对结合反应或测序反应)没有显著影响的气泡的流体,都可以表征为基本上没有气泡的流体。作为另一示例,不具有分子氧的气体(例如,双氧(O<sub>2</sub>)、三氧或臭氧(O<sub>3</sub>)或单重态氧),在本文所述的系统或方法中无法检测到的分子氧浓度的气体,或对反应(例如对结合反应或测序反应)没有重大影响的分子氧浓度的气体,可将其表征为基本上不含分子氧的气体。

[0060] 如本文所使用的,术语“表面”是指固体支持物接触流体的一部分。流体可以是气体或液体。该表面可以是基本平坦的或平面的。或者,表面可以是圆形的或波形的。可以包括在表面上的示例性轮廓是井、凹陷、柱、脊、槽等。可以用作固体支持物的示例性材料包括但不限于玻璃,例如改性或功能化玻璃;塑料,例如丙烯酸、聚苯乙烯或苯乙烯与另一种材料的共聚物,聚丙烯、聚乙烯、聚丁烯、聚氨酯或特氟隆™;尼龙;硝酸纤维素;树脂;二氧化硅或二氧化硅基材料,包括硅和改性硅;碳纤维;金属;无机玻璃;光纤束等。

[0061] 如本文所使用的,术语“三元复合物”是指聚合酶、双链核酸和核苷酸之间的分子间结合。通常,聚合酶促进下一个正确的核苷酸与引发的核酸的模板链之间的相互作用。下一个正确的核苷酸可以通过Watson-Crick氢键与模板链相互作用。术语“稳定的三元复合物”是指具有促进或延长的存在的三元复合物或已抑制破坏的三元复合物。通常,三元复合物的稳定化防止三元复合物的核苷酸组分共价结合到三元复合物的引发的核酸组分中。

[0062] 如本文所使用的,术语“类型”或“种类”用于识别具有相同化学结构的分子。例如,核苷酸的混合物可以包括几个dCTP分子。dCTP分子应理解为彼此相同的核苷酸类型(或种类),但与dATP、dGTP、dTTP等相比则是不同的核苷酸类型。类似地,具有相同核苷酸序列的单个DNA分子是相同类型(或种类)的DNA,而具有不同序列的DNA分子则是不同类型(或种

类)的DNA。术语“类型”或“种类”也可以标识具有相同化学结构的部分。例如,模板核酸中的胞嘧啶碱基将理解为彼此具有相同类型(或种类)的碱基,而与它们在模板序列中的位置无关。

[0063] 鉴于以上定义,可以理解以下阐述并在权利要求中叙述的实施例。

[0064] 本公开提供了一种测序系统,其包括:载物台、用于液相的输送部件、用于第二相的输送部件和相混合部件。液相与第二相不混溶,载物台配置为接受流动池,液体输送部件配置为将液体从一个或多个容器输送到相混合部件,用于第二相的输送部件配置为将第二相供给相混合部件,以及相混合部件配置为将来自液体输送部件的液体与第二相混合,以将混合相流体输送至流动池的内部,混合相流体在液体中包括第二相的气泡。

[0065] 系统可以配置为整体设备,例如,将用于特定目的的所有子系统或部件包括在单个壳体中。或者,本文描述的子系统或部件中的一个或多个可以远离其他部件定位,或者可以方便地与其他部件分离。例如,核酸测序系统可以包括一起维持在单个壳体中的流体部件和检测部件,而可操作地连接到流体部件和检测部件的计算机处理单元可以物理地位于单独的壳体中。尽管如此,可以通过硬件(例如,流体线、光纤或电线)或无线通信在功能上将彼此分离或远离的部件联网。

[0066] 本公开的系统可以配置为使用流动池。流动池是一种可以包括检测通道的设备,在该检测通道中可以观察到感兴趣的分析反应。分析反应可以在流动池内的本体溶液中进行。例如,可以混合两种溶液,并且可以在检测通道中观察到混合物的产物。或者,分析反应可以在检测通道内的固体支持物上发生。例如,可以使试剂溶液流过附着在诸如核酸之类的感兴趣的分析物上的固体支持物,并且可以在该固体支持物上观察到所产生的反应。流动池通过使溶液通过入口开口,进入检测通道并通过出口开口流出内部空间,实现了方便的流体操作。该检测通道还具有观察区域或体积,例如可以透过其观察光信号的透光窗口,可以通过其观察电子信号的电触点等。特别有用的流动池具有一个窗口,该窗口对于用于发光检测的激发辐射和发射辐射是透明的。例如,在美国专利申请公开号2010/0111768A1, WO 05/065814,或美国专利申请公开号2012/0270305A1中描述了可用于本文阐述的系统或方法的示例性流动池,每一个均通过引用并入本文。

[0067] 流动池或类似设备可以具有一个或多个检测通道。检测通道可以对大气(或其他周围环境,例如紧邻围绕流动池的局部环境)封闭,例如在流动池结构内部形成管子或通道。检测通道可具有多种横截面形状中的任何一种,包括例如圆形、椭圆形、三角形、正方形、矩形、多面体或其他闭合形状。检测通道的横截面在其整个长度上可以是均匀的。例如,圆形横截面在通道长度上均匀的检测通道将具有圆柱形状,而圆形横截面的横截面在通道的长度上增加或减少的检测通道将具有圆锥形或漏斗形。检测通道的横截面积可以为至少约 $1\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、 $1\text{mm}^2$ 、 $10\text{mm}^2$ 或 $100\text{mm}^2$ 或更大。替代地或附加地,检测通道的横截面积可以至多为约 $100\text{mm}^2$ 、 $10\text{mm}^2$ 、 $1\text{mm}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 、 $1\mu\text{m}^2$ 或更小。流动池中检测通道的体积可以至少约为 $1\text{nL}$ 、 $10\text{nL}$ 、 $100\text{nL}$ 、 $1\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $1\text{mL}$ 或更多。替代地或附加地,流动池中的检测通道的体积最多为约 $1\text{mL}$ 、 $100\mu\text{L}$ 、 $10\mu\text{L}$ 、 $1\mu\text{L}$ 、 $100\text{nL}$ 、 $10\text{nL}$ 、 $1\text{nL}$ 或更小。

[0068] 本实用新型的流动池可具有一个或多个用于流体传输的开口。在特定的配置中,第一开口可以用作流体的入口,第二开口可以用作流体的出口。或者,流动池可以具有既用作入口又用作出口的单个开口。流体可以是液体、气体或混合相流体。流动池还可包括检测

分析物的区域。流体可以通过入口流入流动池，然后流经该区域，然后流出出口以流出流动池。作为说明性示例，可以通过流动池中的窗口检查或检测该区域。例如，光学检测器可以通过流动池的光学透明窗口观察流动池的内部区域。流动池的区域可以通过光学技术以外的技术来检查或观察，所述光学技术包括例如本文所述的检测技术。因此，流动池可以具有将信号从流动池的区域传输到适当的检测器装置的传输表面。将理解的是，流动池不需要被配置用于检测分析物。例如，流动池可提供用于发生反应的腔室，并且反应产物可从流动池中流出以用于后续使用或检测。因此，流动池不需要具有光学透明的窗口或配置用于传输分析信号的其他表面。

[0069] 在一些配置中，流动池是流体系统的固定部件，例如，需要专门的工具和/或专门的培训才能将其移除。或者，流动池可以是流体系统的可移动部件。例如，本公开的系统可以包括被配置为便于流动池的放置和移除的载物台。因此，流动池可以是专用于第一分析测试的消耗部件，然后被移除以被用于第二分析测试的第二流动池代替。两个流动池可以彼此相似地配置，例如，包括相似的分析物、相似的样品或特定样品的子级分。

[0070] 载物台可以配置用于检测流动池。载物台可以在位置上固定或可以平移。例如，可平移载物台可以相对于检测器沿由笛卡尔坐标系定义的一个或多个方向线性移动。例如，流动池可以沿第一方向（例如，沿y方向扫描流动池的条带）、第二方向（例如，使流动池沿x方向移动以对齐流动池的第二条带以进行扫描）和第三方向（例如，将流动池沿z方向移动以使其进入检测器的焦点）中的一个或多个平移。可平移载物台的示例在美国专利8,951,781或10,227,636中阐明，每一个均通过引用并入本文。在美国专利9,650,669中阐述了可能有用的位置固定的载物台的示例，将其通过引用并入本文。当不使用扫描检测或通过移动检测器而不是流动池实现扫描时，位置固定的载物台会很有用。固定的载物台还可以配置为提供一个与流动池接触的参考表面，以使其相对于检测器对齐，流动池相对于参考表面移动，例如，通过在流动池与参考表面接触的同时滑动该流动池。在美国专利申请公开号2019/0055598A1或美国专利申请62/807,934中阐述了配置有参考表面和用于使流动池沿参考表面滑动的机构的示例性系统，每一个均通过引用并入本文。

[0071] 本文所述的流动池或其他容器中可以存在多种分析物中的任何一种。分析物可以与混合相流体接触。当与分析物接触时，混合相流体可以是流动的或静态的。示例性分析物包括但不限于本文或本文引用的参考文献中列举的分析物。特别有用的分析物参与核酸测序过程。因此，流动池可包括一种或多种核酸、聚合酶、聚合酶抑制剂、聚合酶辅因子（例如催化金属离子）、三元复合物稳定剂（例如抑制性金属离子）、核苷酸、核酸结合蛋白、核苷酸解封闭剂等。

[0072] 流动池中可能存在的其他分析物包括，例如，生物组织、生物细胞；细胞器；基于蛋白质的酶；基于蛋白质的受体，例如抗体、凝集素或链霉亲和素；肽；RNA分子；适体或类似物。流动池的内容物可以可选地与混合相流体（例如流体泡沫）接触。可以使用的示例性基于蛋白质的酶包括但不限于聚合酶、转座酶、连接酶、重组酶、激酶、磷酸酶、核酸外切酶、核酸内切酶、硫酸化酶、腺苷三磷酸酶、萤光素酶、绿色荧光蛋白（GFP）或藻胆蛋白（例如藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白或藻红蛋白）。将理解的是，在本文中阐述的方法的一个或多个步骤中，本公开中阐述的或生物学或化学分析领域中已知的一种或多种分析物可以避免与混合相流体接触。

[0073] 在一些方面,提供了流动池或其他容器,该流动池包括固定在流动池内部的稳定的三元复合物,其中稳定的三元复合物包括聚合酶、引发的模板核酸和模板的下一个正确的核苷酸;以及在液体中包括多个气泡的混合相流体,其中,该混合相流体与稳定的三元复合物接触。

[0074] 在本文阐述的系统的某些配置中,例如某些核酸测序系统,在使用稳定的三元复合物的某些步骤中使用混合相流体(例如流体泡沫),但在使用稳定的三元复合物的其他步骤中不使用混合相流体。在示例性配置中,混合相流体可以任选地与将形成三元复合物或已经从三元复合物解离的组分接触。

[0075] 在本公开的系统使用的流动池或其他容器可以包括聚合酶。聚合酶可以与混合相流体(例如流体泡沫)接触。可以使用多种聚合酶中的任何一种。除非另有说明,否则对特定聚合酶的引用,例如在整个本公开中所举例说明的那些,应理解为包括其功能性变体。聚合酶的特别有用的功能包括三元复合物的形成,引物的延伸以引入核苷酸(例如可逆终止的核苷酸),或使用现有核酸作为模板催化核酸链的聚合。

[0076] 可以基于结构同源性将聚合酶分类,例如将聚合酶分类为鉴定为A、B、C、D、X、Y和RT的家族。A族中的DNA聚合酶包括,例如,T7 DNA聚合酶、真核线粒体DNA聚合酶 $\gamma$ 、大肠杆菌DNA Pol I、水生栖热菌Pol I和嗜热脂肪芽孢杆菌Pol I。B族的DNA聚合酶包括,例如,真核DNA聚合酶 $\alpha$ 、 $\delta$ 和 $\epsilon$ ;DNA聚合酶 $\zeta$ ;T4 DNA聚合酶;Phi29 DNA聚合酶;和RB69噬菌体DNA聚合酶。C族包括例如大肠杆菌DNA聚合酶III $\alpha$ 亚基。B族古细菌DNA聚合酶包括例如Vent、Deep Vent、Pfu和9 $^{\circ}$ N(例如,来自New England BioLabs Inc.;Ipswich,MA的Therminator<sup>TM</sup> DNA聚合酶)聚合酶。D家族包括例如衍生自古细菌的广古菌亚结构域的聚合酶。X家族的DNA聚合酶包括例如真核聚合酶Pol $\beta$ 、Pol $\sigma$ 、Pol $\lambda$ 和Pol $\mu$ 以及酿酒酵母Pol $\lambda$ 。Y家族的DNA聚合酶包括例如Pol $\eta$ 、Pol $\iota$ 、Pol $\kappa$ 、大肠杆菌Pol IV (DINB) 和大肠杆菌Pol V (UmuD'2C)。DNA聚合酶的RT(逆转录酶)家族包括例如逆转录病毒逆转录酶和真核端粒酶。示例性的RNA聚合酶包括但不限于病毒RNA聚合酶,例如T7 RNA聚合酶;真核RNA聚合酶,例如RNA聚合酶I、RNA聚合酶II、RNA聚合酶III、RNA聚合酶IV和RNA聚合酶V;以及古细菌RNA聚合酶。

[0077] 具有固有的3'-5'校对核酸外切酶活性的聚合酶可用于本文所述系统的某些应用。基本上缺乏3'-5'校对核酸外切酶活性的聚合酶也可用于某些配置,例如,用于大多数的测序系统。核酸外切酶活性的缺乏可以是野生型特征或由变体或工程聚合酶结构赋予的特征。

[0078] 可以在本文阐述的系统中使用的聚合酶包括天然存在的聚合酶及其修饰的变体,包括但不限于,突变体、重组体、融合体、遗传修饰、化学修饰、合成物和类似物。用于三元复合物形成和检测的有用的聚合酶不限于具有催化聚合反应能力的聚合酶。任选地,有用的聚合酶将具有在至少一种在稳定的三元复合物的形成或检查过程中不使用的条件下催化聚合反应的能力。可用于形成稳定的三元复合物的示例性聚合酶包括例如美国专利申请公开号2017/0314072A1或2018/0155698A1或美国专利申请号16/567,476中列出的野生型和突变型聚合酶,每一个通过引用并入本文。

[0079] 可以用于检测聚合酶的包括外源标记部分(例如,外源发光体)的聚合酶可以在一些实施例中有用。任选地,外源标记部分可以化学连接至聚合酶。外源标记部分也可以通过蛋白质融合连接到聚合酶上。可以通过蛋白质融合连接的示例性标记部分包括,例如,绿色

荧光蛋白(GFP)、藻胆蛋白(例如藻蓝蛋白和藻红蛋白)或GFP或藻胆蛋白的波长移位变体。

[0080] 聚合酶可以以至少约1nM、10nM、100nM、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M或更高的浓度存在于混合相流体(例如流体泡沫)中。替代地或另外地,混合相流体中聚合酶的浓度可以为至多约100 $\mu$ M、10 $\mu$ M、1 $\mu$ M、100nM、10nM、1nM或更低。聚合酶浓度可根据活性单位(U)确定。例如,聚合酶可以以至少约5U/ml、10U/ml、25U/ml、50U/ml、75U/ml、100U/ml或更高的浓度存在于混合相流体中。替代地或另外地,混合相流体中聚合酶的浓度可以为至多约100U/ml、75U/ml、50U/ml、25U/ml、10U/ml、5U/ml或更低。

[0081] 在本公开的系统或方法中使用的流动池或其他容器可以包括核酸。核酸可以与混合相流体(例如流体泡沫)接触。在一些配置中,单个核酸分子将被操纵或检测。核酸分子可以被递送至容器,并且可以任选地附着至容器中的表面。在一些实施例中,在单个分子彼此分离的条件下对该分子进行检测(例如单分子测序)。或者,可以制备核酸的多个拷贝,并且可以检测所得的集合或对其进行测序。例如,核酸集合体可以附着于表面(例如在流动池的内壁上)。

[0082] 在多个实施例中,操纵或检测多个不同的核酸分子(即具有多种不同序列的群体)。分子可以任选地附接到流动池或其他容器中的表面。核酸可以附着在表面上的独特位点,并且可以在空间上区分彼此的单个核酸分子可以被检测或平行测序。备选地,核酸集合体可以在空间上彼此区分,并且可以被平行地修饰、检测或测序。

[0083] 流动池或其他容器可以包括多种核酸扩增技术中的任何一种的核酸产物。混合相流体可以与核酸接触。可以使用的示例性技术包括但不限于聚合酶链反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、多位移扩增(MDA)、桥扩增或随机引物扩增(RPA)。混合相流体可以与引物、模板或其他扩增试剂例如本文或本文引用的参考文献中的那些接触。在特定的实施例中,可将一种或多种用于扩增的引物附着于流动池中的表面。在这样的实施例中,表面附着的引物沿着模板核酸的延伸将导致模板的拷贝附着在表面上。因此,双链核酸的一条或两条链可以连接至流动池中的表面。

[0084] 在本文的方法或组合物中使用的核酸模板可以是DNA,例如基因组DNA、合成DNA、扩增的DNA、互补DNA(cDNA)等。也可以使用RNA,例如mRNA、核糖体RNA、tRNA等。核酸类似物也可用作本文的模板。本文使用的引物可以是DNA、RNA或其类似物。

[0085] 本文的装置中使用的核酸可以是线性的,例如,侧接3'端和5'端。或者,核酸可以是环状的,从而缺少3'和5'末端。无论是线性、环状还是任何其他构象,本文所用的核酸可以具有特定用途所需的大小,或者是对该核酸进行操作的结果。例如,核酸的长度可以是至少50个碱基、100个碱基、1 $\times 10^3$ 个碱基、1 $\times 10^4$ 个碱基、1 $\times 10^5$ 个碱基、1 $\times 10^6$ 个碱基或更长。替代地或另外地,核酸长度可以是至多1 $\times 10^6$ 个碱基、1 $\times 10^5$ 个碱基、1 $\times 10^4$ 个碱基、1 $\times 10^3$ 个碱基、100个碱基、50个碱基或更短。当使用核酸群时,该群的平均长度可以具有选自那些范围的下限和/或上限。

[0086] 在本公开的系统或方法中使用的流动池或其他容器可以包括核酸、蛋白质或其他分析物的阵列。在特定配置中,稳定的三元复合物存在于阵列的一个或多个位点。分析物阵列可以与混合相流体(例如流体泡沫)接触。

[0087] 阵列具有对分析物进行多重处理的优势,从而可以并行操作或检测多种不同类型的分析物。阵列可以包括至少2、10、100、1 $\times 10^3$ 、1 $\times 10^4$ 、1 $\times 10^5$ 、1 $\times 10^6$ 、1 $\times 10^9$ 或更多的不

同分析物位点。替代地或另外,阵列可以包括至多 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^3$ 、100、10、2个或更少的不同分析物位点。

[0088] 阵列可以附接到流动池壁的内表面或流动池内部的固体支持物上。流动池或固体支持物可由用于分析生物化学的多种材料中的任何一种制成。合适的材料可包括玻璃、聚合物材料、硅、石英(熔融石英)、浮法玻璃、硅石、硅石基材料、碳、金属、光纤或光纤束、蓝宝石或塑料材料。可以基于特定用途所需的特性来选择材料。例如,对于所需辐射波长透明的材料可用于利用该波长辐射的分析技术。相反,可能希望选择一种不通过特定波长辐射的材料(例如不透明、吸收性或反射性的材料)。可以利用的材料的其他性质是对下游工艺中使用的某些试剂(例如本文所述的试剂)的惰性或反应性,或易于操作或制造成本低。

[0089] 用于流动池或其他容器的特别有用的固体支持物是颗粒,例如珠或微球。珠群可用于附着分析物群,例如稳定的三元复合物或能够形成复合物的组分(例如聚合酶、模板、引物或核苷酸)。在一些配置中,每个珠粒具有本文或本文引用的参考文献中所述的稳定的三元复合物的单一类型,或者能够形成复合物的组分的单一类型,或者其他某些分析物的单一类型。例如,单个珠粒可以附着于单一类型的三元复合物、单一类型的模板等位基因、单一类型的模板基因座、单一类型的引物或单一类型的核苷酸。或者,不同类型的组分不需要逐个珠粒地分开。这样,单个珠粒可以带有多种不同类型的:三元复合物、模板核酸、引物、引发的模板核酸和/或核苷酸。珠粒的组成可以根据例如所使用的形式、化学和/或附着方法而变化。示例性的珠组合物包括,例如,塑料、陶瓷、玻璃、聚苯乙烯、三聚氰胺、甲基苯乙烯,丙烯酸类聚合物、顺磁性材料、氧化钽溶胶、碳石墨、二氧化钛、可控孔玻璃(CPG)、乳胶或交联葡聚糖,例如Sepharose™、纤维素、尼龙、交联胶束和Teflon™,以及来自Bangs Laboratories, Fishers Ind的“微球检测指南”中阐述的其他材料,将其通过引用并入本文。

[0090] 珠粒可以具有对称的形状,例如球形、多面体、圆柱形或类似形状。或者,珠粒可以具有不规则或不对称的形状。本文中使用的珠粒的示例性尺寸可具有至少约10nm、100nm、1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、100 $\mu$ m、1mm或更大的平均直径。替代地或另外地,本文使用的珠粒可以具有至多约1mm、100 $\mu$ m、10 $\mu$ m、5 $\mu$ m、1 $\mu$ m、100nm、10nm、1nm或更小的平均直径。这些尺寸范围的珠粒可用作阵列特征或用作流体浆液中的颗粒。

[0091] 可用于制造微珠阵列的示例性组合物和技术包括但不限于用于可从Illumina, Inc.获得的BeadChip™阵列的那些,以及在美国专利号6,266,459、6,355,431、6,770,441、6,859,570或7,622,294,或PCT公开号W0 00/63437中描述的那些,其每一个都通过引用并入本文。珠粒可以位于固体支持物上的离散位置(例如孔),从而每个位置都可以容纳单个珠粒。替代地,珠粒所驻留的离散位置可各自包括多个珠粒,如美国专利公开号2004/0263923A1、2004/0233485A1、2004/0132205A1或2004/0125424A1所述,其每一个都通过引用并入本文。

[0092] 其他有用的阵列包括在核酸测序应用中使用的阵列。例如,用于固定基因组片段的扩增子(通常称为簇)的阵列可能特别有用。可在本文中使用的核酸测序阵列的示例包括Bentley等,Nature 456:53-59(2008)、PCT公开号W0 91/06678、W0 04/018497或W0 07/123744;美国专利号7,057,026、7,211,414、7,315,019、7,329,492或7,405,281;或美国专利申请号2008/0108082中描述的那些,其每一个都通过引用并入本文。

[0093] 核酸或其他分析物可以以提供单分子水平或整体水平检测的方式连接到阵列。例如,可以将多种不同的核酸连接到阵列上,使得可以将阵列中一个核酸分子上形成的单个稳定的三元复合物与在阵列中形成的所有相邻三元复合物区分开。或者,本公开的阵列可以包括多个集合体,集合体是相同类型的分析物的群体,例如具有共同模板序列的核酸的群体。阵列可具有多个集合体,每个集合体使用本领域已知的方法形成,例如桥扩增、乳液PCR或本文阐述的其他方法。

[0094] 在本公开的系统或方法中使用的流动池或其他容器可以包括核苷酸。核苷酸可以与混合相流体(例如流体泡沫)接触。根据需要,核苷酸可以是天然核苷酸、核苷酸类似物或改性的核苷酸,以适合方法的特定应用或配置。这样的核苷酸可以存在于三元复合物中或用于测序方法中。

[0095] 任选地,核苷酸类似物具有含氮碱基、五碳糖和磷酸基团,其中与天然核苷酸相比,核苷酸的任何部分可以被修饰、去除和/或替换。核苷酸类似物可以是不可掺入的核苷酸(即不能与引物的3'氧反应形成共价键的核苷酸)。不能掺入的核苷酸包括,例如,单磷酸和二磷酸核苷酸、含有使核苷酸不可结合的对三磷酸酯基团进行修饰的核苷酸、 $\alpha$ -磷酸修饰的核苷酸、 $\alpha$ - $\beta$ 核苷酸类似物、 $\beta$ -磷酸修饰的核苷酸、 $\beta$ - $\gamma$ 核苷酸类似物、 $\gamma$ -磷酸修饰的核苷酸或笼状核苷酸。

[0096] 在本文的装置或系统中使用的核苷酸类似物可包括终止子,该终止子可逆地阻止随后的核苷酸在引物的3'端掺入引物。例如,美国专利7,544,794和美国专利8,034,923(这些专利的公开内容通过引用并入本文)描述了可逆性终止子,其中3'-OH基团在该终止子中被3'-ONH<sub>2</sub>部分代替。另一种类型的可逆终止子连接到核苷酸的含氮碱基上,例如,在美国专利8,808,989中所述(其公开内容通过引用并入本文)。可以类似地与本文所述方法结合使用的其他可逆终止子包括在3'位置的叠氮基甲基部分或本文其他地方或美国专利7,956,171、美国专利8,071,755和美国专利9,399,798中描述的那些(这些美国专利的公开内容通过引用并入本文)。在某些实施例中,可逆终止子部分可以在被称为“解封闭”的过程中从引物中去除,从而允许随后的核苷酸掺入。

[0097] 或者,核苷酸类似物不可逆地阻止核苷酸掺入已掺入的引物的3'端。不可逆的核苷酸类似物包括2',3'-二脱氧核苷酸(ddNTP,例如ddGTP、ddATP、ddTTP、ddCTP)。双脱氧核苷酸缺乏dNTP的3'-OH基团,否则它们会参与聚合酶介导的引物延伸。因此,3'位具有氢部分而不是天然羟基部分。

[0098] 在特定实施例中,本文用于例如参与形成稳定的三元复合物的核苷酸类似物不包括保护基团(例如可逆终止子)。

[0099] 在一些实施例中,本文用于例如参与形成稳定的三元复合物的核苷酸可包括外源标记。外源标记的核苷酸可以包括可逆或不可逆的终止子部分,外源标记的核苷酸可以是不可掺入的,外源标记的核苷酸可以缺少终止子部分,外源标记的核苷酸可以是可掺入的,或者外源标记的核苷酸可以是可掺入的和未终止的。当用于与非标记的聚合酶形成稳定的三元复合物时,外源标记的核苷酸可能特别有用。

[0100] 或者,例如,本文用于参与形成三元复合物的核苷酸可以缺少外源标记(即该核苷酸可以是“未标记的”)。未标记的核苷酸可以包括可逆或不可逆的终止子部分,未标记的核苷酸可以是不可结合的,未标记的核苷酸可以缺少终止子部分,未标记的核苷酸可以是可



结合的,或者未标记的核苷酸可以是可结合的和非终止的。将理解的是,核苷酸部分或功能的缺失是指不具有此类功能或部分的核苷酸。但是,这也将被理解为,在本文阐述的方法或组合物中,可以具体省略本文中针对核苷酸或其类似物所阐述的一个或多个功能或部分,或者在本领域中对于核苷酸或其类似物是已知的其他方式。

[0101] 或者,在形成稳定的三元复合物期间或之后,混合物中存在核苷酸(例如天然核苷酸或核苷酸类似物)。例如,可以存在至少1、2、3、4或更多个核苷酸类型。替代地或另外地,可以存在最多4、3、2或1个核苷酸类型。类似地,存在的一种或多种核苷酸类型可以与模板核酸中的至少1、2、3或4个碱基类型互补。替代地或另外地,存在的一种或多种核苷酸类型可以与模板核酸中的至多4、3、2或1个碱基类型互补。通过在不同核苷酸上存在不同的外源标记,可以识别出不同的碱基类型。或者,两种或多种核苷酸类型可以具有不可区分的外源标记。

[0102] 核苷酸可以以至少约1nM、10nM、100nM、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ M或更高的浓度存在于混合相流体(例如流体泡沫)中。替代地或另外地,混合相流体中核苷酸的浓度可以至多约100 $\mu$ M、10 $\mu$ M、1 $\mu$ M、100nM、10nM、1nM或更小。先前的浓度可以应用于流体中出现的单一类型核苷酸的浓度或流体中出现的两种或更多种类型核苷酸的总浓度。

[0103] 采用光学检测器的本公开的系统可以进一步在待检测的反应物或产物上采用光学可检测的标记。在许多情况下,标记是添加到反应物或产物(例如聚合酶、核酸或核苷酸)的外源标记。有用的外源标记的示例包括但不限于放射性标记部分、发光体部分、荧光团部分、量子点部分、生色团部分、酶部分、电磁自旋标记的部分、纳米粒子光散射部分以及本领域已知的多种其他信号产生部分中的任何一种。合适的酶部分包括例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶。示例性的荧光团标记包括但不限于,对甲氨基酚;试卤灵;香豆素;咕吨;吡啶;荧光素;罗丹明;赤霉素;花青素;苯二醛;萘胺;氟胺;苯并二唑;二苯乙烯昔;苾;吡啶;硼聚氮杂双炔;喹啉酮;曙红;赤藓红;孔雀石绿;CY染料(GE Biosciences),包括Cy3(及其衍生物)、Cy5(及其衍生物)和Cy7(及其衍生物);DYOMICS和DYLIGHT染料(Dyomics),包括DY-547、DY-630、DY-631、DY-632、DY-633、DY-634、DY-635、DY-647、DY-649、DY-652、DY-678、DY-680、DY-682、DY-701、DY-734、DY-752、DY-777和DY-782;荧光黄;级联蓝色;德克萨斯红;BODIPY(硼二吡咯甲烷)(分子探针)染料,包括BODIPY 630/650和BODIPY 650/670;ATTO染料(Atto-Tec),包括ATTO 390、ATTO 425、ATTO 465、ATTO 610 611X、ATTO 610、ATTO 635;ALEXA荧光粉包括ALEXA FLUOR 633、ALEXA FLUOR 647、ALEXA FLUOR 660、ALEXA FLUOR 700、ALEXA FLUOR 750和ALEXA FLUOR 680(分子探针);DDAO(7-羟基-9H-(1,3-二氯-9,9-二甲基ac啉-2-酮或其任何衍生物)(分子探针);QUASAR染料(Biosearch);IRDYES染料(LiCor),包括IRDYE 700DX(NHS酯)、IRDYE 800RS(NHS酯)和IRDYE 800CW(NHS酯);EVOBLUE染料(Evotech Biosystems);JODA 4染料(Applied Biosystems);HILYTE染料(AnaSpec);MR121和MR200染料(Roche);赫斯特染料33258和33242(Invitrogen);FAIR OAKS红(Molecular Devices);SUNNYVALE红(Molecular Devices);LIGHT CYCLER红(Roche);EPOCH(Glen Research)染料,包括EPOCH REDMOND红、EPOCH YAKIMA黄、EPOCH GIG HARBOR绿;Tokyo绿(M. Kamiya, et al., 2005Angew.Chem.Int.Ed.44:5439-5441);以及CF染料,包括CF647和CF555(Biotium),和本领域已知的其它荧光团标记,诸如Joseph R.Lakowicz(编辑),Plenum Pub Corp,第二版

(1999年7月)的“荧光光谱原理(Principles of Fluorescence Spectroscopy)”和Richard P.Hoagland所著的《分子探针手册(Molecular Probes Handbook)》第六版所述。

[0104] 在替代实施例中,反应物或产物可缺少外源标记。例如,稳定的三元复合物和所有参与形成稳定三元复合物的组分(例如聚合酶、模板核酸、引物和/或同源核苷酸)可缺少本文,或本文引用和并入的参考文献中所述的一种、几种或全部外源标记。在这样的实施例中,可以基于稳定的三元复合物的固有性质,例如质量、电荷、固有光学性质等来检测三元复合物。在共有的美国专利申请公开号2017/0022553 A1、PCT申请号PCT/US16/68916、或美国专利申请号62/375,379或15/677,870中提出了用于检测未标记的三元复合物的示例性检测装置,其每一个通过引用并入本文。

[0105] 本公开的系统可使用气泡发生器部件将气体输送到液体,从而形成流体泡沫。气泡发生器部件可以配置成输送具有期望的尺寸(例如,以直径或体积测量)和/或数量(例如,以浓度或计数测量)的大量气泡。

[0106] 气泡可以具有各种尺寸,包括例如有效直径在约1nm至100nm之间的小纳米气泡、有效直径大于100nm且小于500nm的大纳米气泡、有效直径在0.5 $\mu\text{m}$ 至100 $\mu\text{m}$ 之间的小微气泡,以及有效直径大于100 $\mu\text{m}$ 且小于1mm的大微气泡。由于它们在液体中的相对稳定性,例如有效直径小于500 $\mu\text{m}$ 、250 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 、40 $\mu\text{m}$ 、30 $\mu\text{m}$ 、20 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 或1 $\mu\text{m}$ 的气泡可能是有用的。由于增加的稳定性和由于比通常用于发光检测的光的波长小,所以甚至更小的气泡,例如具有小于500nm、100nm、50nm或10nm的有效直径的气泡也是有用的。作为这些示例性上限的替代或补充,作为示例性下限,气泡可以具有大于10nm、50nm、100nm、500nm、1 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、25 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、250 $\mu\text{m}$ 或500 $\mu\text{m}$ 的有效直径。一组气泡可以具有由上面举例说明的上限和下限之一或两者所限定的平均直径、平均有效直径、最大直径或最小直径。

[0107] 可以理解,气泡的“有效”直径是球形时气泡的量度。如果气泡是薄煎饼(例如被流动池的壁压扁)或其他形状,薄煎饼气泡的有效直径将被理解为当气泡转换成相同体积的球形时的直径的量度。

[0108] 在特定配置中,流体泡沫中的气泡可具有相对于在流动池中的特定检测区域处的检测通道的尺寸测量的平均直径、最大直径或最小直径。通常,气泡优选小于气泡将流过的流动池的检测通道。例如,气泡的平均有效直径、最大有效直径或最小直径可以最大为检测通道区域的相关尺寸的99%、95%、90%、75%、50%、25%、10%、5%、1%、0.1%或0.01%以下。替代地或另外地,在检测点处,气泡的平均有效直径、最大有效直径或最小有效直径可以是检测通道的相关尺寸的至少0.01%、0.1%、1%、5%、10%、25%、50%、75%、90%、95%、99%或更大。相关尺寸可以是例如通道的宽度(例如x尺寸,其中y尺寸是流体流动的方向,z尺寸是通道的深度或通过通道进行光学检测的焦点尺寸)。相关尺寸可以是在z尺寸上的通道深度,或者相关尺寸可以沿y尺寸的通道深度。相关尺寸可以是通道的横截面积。

[0109] 在一些配置中,气泡可形成团或团块,其占据了气泡所处的流动池通道的整个横截面面积。气泡团或团块可用于从流动池中清除特定的流体,例如携带本文所述方法中出现的一种或多种试剂或分析物的流体。这样,输送到流动池的不同液体可以通过气泡团或团块分离。尽管流动池的横截面将限制气泡团或团块的最大横截面,但较大的气泡将通过通道变形而被容纳。随着气泡的体积增加,气泡所占据的通道的长度将增加。例如,气泡团或团块可具有处于未变形状态(即球形)的体积,其最大横截面面积至少比其所处通道的横

截面面积大1倍、2倍、5倍、10倍或100倍。具有较大体积的气泡块可以增加两种流体的物理分离。这可以提供降低检测或流体输送步骤所需的精度的优点。较小体积的气泡块可提供流体分离,同时减少流动池表面暴露于气体的时间。当阵列或其他活动流动池表面对暴露于气体中的干燥或其他影响敏感时,这种减少的暴露可能是有益的。

[0110] 混合相流体中的大量气泡可以是单分散或多分散的。单分散的群体将具有均匀大小的气泡,例如,尺寸变异系数(CV)不超过10%。在一些配置中,甚至更紧密的均匀性可能是有用的,包括例如,尺寸CV不大于平均值的1%或5%。气泡的多分散总体的尺寸CV可以在例如大于10%到最大约25%、50%、100%、2倍、5倍、10倍、100倍或更大的范围内。在某些情况下,会发生较程度的多分散性,因此,气泡的尺寸CV可以为至少约25%、50%、75%、100%、2倍、5倍、10倍、100倍或更大。多分散体中的气泡的尺寸可以在例如上述范围内。

[0111] 可以针对特定应用选择流体泡沫中气泡的浓度。在某些情况下,可以通过气泡发生器部件来控制流体泡沫中气泡的浓度。例如,流体泡沫中气泡的浓度(即体积分数)可以至少为特定容器(例如流动池的检测通道)中流体泡沫总体积的0.01%、0.1%、1%、5%、10%、25%、50%、75%、90%、95%、99%或更多。与原始液体试剂相比,增加流体中气泡的体积分数可提供减少试剂消耗的优点,而不必降低泡沫中试剂的有效浓度。这可以降低成本,尤其是在使用相对昂贵的试剂时。下面的实施例1提供了由于将气泡引入用于核酸测序的各种试剂溶液中而节省试剂的演示。增加流体泡沫中气泡浓度的另一个优点是随之减少了要运输、储存、丢弃或以其他方式处理的液体的体积。

[0112] 作为上述示例性可选下限的替代或补充,流体泡沫中气泡的浓度最多可以是特定容器(例如流动池的检测通道)中流体泡沫总体积的99%、95%、90%、75%、50%、25%、10%、5%、1%、0.1%或0.01%或更少。减少气泡分数可以在相同体积的流体中提供大量的特定试剂的输送。

[0113] 气泡发生器可以配置成输送具有各种气泡尺寸、气泡浓度或气泡多分散性的流体泡沫,例如,在以上示例的范围内。替代地或附加地,气泡发生器部件可以配置成输送期望数量的气泡。例如,气泡发生器部件可以以至少 $1\text{sec}^{-1}$ 、 $5\text{sec}^{-1}$ 、 $10\text{sec}^{-1}$ 、 $50\text{sec}^{-1}$ 、 $100\text{sec}^{-1}$ 、 $250\text{sec}^{-1}$ 、 $500\text{sec}^{-1}$ 或更高的速率产生或输送气泡。替代地或另外地,气泡产生或输送的速率可以至多为 $500\text{sec}^{-1}$ 、 $250\text{sec}^{-1}$ 、 $100\text{sec}^{-1}$ 、 $50\text{sec}^{-1}$ 、 $10\text{sec}^{-1}$ 、 $5\text{sec}^{-1}$ 、 $1\text{sec}^{-1}$ 或更低。再次,本公开的气泡发生器部件可以配置为产生大量气泡,这些气泡的气泡数量在上述示例性范围内,并且气泡尺寸在上述示例性范围内。

[0114] 图1中示出了可用于制造流体泡沫的示例性气泡发生器部件。流动池100包括两个检测通道110和120以及集成在流动池基座101中的气泡发生器部件。检测通道可任选地具有几厘米至数厘米的长度(沿流动方向)、几微米至数毫米的宽度以及几微米至数毫米的深度。为了简洁起见,将在括号中参照通道120一起描述通过检测通道110和120的流体路径。液体进入入口115(125),并通过液体通道114(124)到达与气体通道116(126)形成的T形接头113(123),气体已经由入口117(127)进入系统。气体通道116(126)的横截面面积小于检测通道110(120)。气体通道可选地是圆形的,其直径在大约1微米至200微米之间,但是在其他配置中可以更大,例如,最大至500微米。T形接头可以具有变窄的点以形成文丘里管,在该文丘里管中气体和液体混合以形成流体泡沫。然后,流体泡沫穿过通道,经由连接件112(122)进入检测通道110(120)。然后,流体泡沫通过出口111(121)离开检测通道110(120)。

[0115] 另一种配置的流动池如图2所示。流动池200包括两个检测通道,每个检测通道均从集成到流动池基板201中的相混合部件中馈入流体泡沫。上部检测通道210经由相混合部件被供给流体泡沫,该相混合部件在检测通道210的开口处具有Y形接头212。这样,液体进入入口215,并流经通道214到达Y形接头212,在此处它与通过入口217进入流动池的气体混合,然后沿通道216流动以进入Y形接头212。然后,流体泡沫穿过检测通道210并通过出口211离开。下部检测通道220通过相混合部件被供给流体泡沫,该相混合部件在检测通道220的开口222的上游具有Y形接头223。这样,液体进入入口225,并流经通道224到达Y形接头223,在这里它与通过入口227进入流动池并沿着通道226进入Y形接头223的气体混合。然后,流体泡沫穿过流体通道224的其余部分,通过检测通道220进入检测通道入口222,并经由出口221离开。

[0116] 流动池200中的Y形接头由以锐角相遇的入口通道形成。例如,流体通道214和216在Y形接头212处形成锐角。与通道226和224在Y形接头223处相交所形成的锐角相比,该角相对较小。可以调节角度以产生流体泡沫所需的特性,例如平均气泡尺寸和气泡数(即气泡的浓度)。

[0117] 如图1和2所示的设备所示,气泡发生器可以是流动池或其他容器的组成部分。在替代配置中,气泡发生器可以是相对于流动池或其他容器的单独或可分离的部件。可与其他流体部件分离的气泡发生器300的示例在图3中示出。气泡发生器300包括具有内部管道的主体301,该管道可通过液体入口315、气体入口326和泡沫出口311进入。直通道314将液体入口315连接到泡沫出口311。气体入口326经由通道316连接到通道314,两个通道形成T形接头323。从气体入口326流出的气体可以在T形接头323处引入从液体入口315流出的液体,以形成从泡沫出口311流出的流体泡沫。通道314在位置330和331处变窄以产生变窄的区域310。T形接头323出现在直通道314的狭窄区域310中。气源可以通过螺纹连接器326连接到气泡发生器300。内部的螺纹325形成凹形配件,该凹形配件被配置成接纳用于气体管线的带螺纹的凸形连接器。应当理解,气体管线与气泡发生器300的连接可以采用相反的配件(即,气泡发生器上的凸形配件和气体管线上的凹形配件)或无螺纹配件。例如,连接可以采用压力配件、管道配件、粘合剂介导的配件、夹紧件或流体技术和管道技术领域中的其他配件。液体管线可以经由配件302连接到入口315。例如,配件302形成可插入到挠性管中以形成连接的凸形配件。可以进行类似的连接以使配件303将泡沫从出口311转移到流动池或其他流体部件。

[0118] 图4示出了具有本体401和内部T形接头423的气泡发生器400,其构造类似于图3中所示的构造。T形接头423将通道414与通道416连接起来,从而使通过气体入口426引入的气体可以与从液体入口415引入的液体混合,以产生从泡沫出口411流出的泡沫。通道414在位置430和431处变窄以产生变窄的区域410。气体入口配件426和泡沫出口配件403与图3中的相似。气体源可以通过螺纹连接器426连接到气泡发生器400。内部的螺纹425形成凹形配件,该凹形配件配置成接纳用于气体管线的带螺纹的凸形连接器。用于液体入口的配件402是凸形螺纹配件。螺纹接头可以方便地连接到流体管线;然而,可以替代地使用其他类型的配件,例如以上在图3的上下文中示例的那些。

[0119] 气泡发生器不一定必须采用T形接头(即,载气通道以直角与线性通道相交,该线性通道的一端有流体入口,而另一端有泡沫出口)。而是,通道可以以非正交的角度相交。可

以将交角配置成实现用于特定用途的泡沫的期望特性。在另一替代方案中,可以配置T形接头,使得载液通道以直角与线性通道相交,该线性通道的一端具有气体入口,而另一端具有泡沫出口。

[0120] 图5示出了具有Y形接头518的气泡发生器500。气体从气体入口526流到Y形接头518,在此处它接触从液体入口515流过通道514的液体。产生的泡沫流经通道513并流出泡沫出口511。通道514和513是弯曲的,但是可以是线性的。气泡发生器500包括用于气体入口526的带螺纹的凹形配件525,用于液体入口515的无螺纹的凸形配件502和用于泡沫出口511的无螺纹的凸形配件503。气泡发生器500包括滤膜550,该滤膜550具有在疏水材料552中用作气体扩散器的孔551的图案。膜550可以放置在进气口526的桶内。

[0121] 图5所示的膜550是示例性的。该膜配置为充当经历Young-Laplace压降的孔的阵列。Young-Laplace方程是一个非线性偏微分方程,它描述了由于表面张力现象而在两种静态流体(如液体和气体)之间的界面上维持的毛细管压力差。该方程还可以描述壁很薄时由于壁张力现象而在两种静态流体之间的界面上维持的毛细管压力差。Young-Laplace方程将压力差与表面或壁的形状相关联。这是在界面处遇到的静态流体的法向应力平衡的陈述,其中界面被视为表面(零厚度):

$$\begin{aligned}
 \Delta p &= -\gamma \nabla \cdot \hat{n} \\
 &= 2\gamma H \\
 [0122] \quad &= \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)
 \end{aligned}$$

[0123] 对于上面的方程1,  $\Delta p$ 是拉普拉斯压力,即流体界面上的压差; $\gamma$ 是表面张力(或壁面张力), $\hat{n}$ 是指向表面的单位法线, $H$ 是平均曲率, $R_1$ 和 $R_2$ 是主曲率半径。膜550或类似装置可用于本文所述的其他气泡发生器,包括例如采用图1至图4所示的结构或功能元件的那些。

[0124] 膜厚度可以是任何获得混合相流体所需特性的厚度。例如,膜可以具有至少100nm、500nm、1 $\mu$ m、10 $\mu$ m、100 $\mu$ m、500 $\mu$ m或更厚的厚度。可以基于混合相流体的期望特性来确定膜厚度的上限。例如,作为上述范围的示例性下限的替代或补充,厚度可以为至多500 $\mu$ m、100 $\mu$ m、10 $\mu$ m、1 $\mu$ m、500nm、100nm或更小。当然,使用膜是一种选择。在一些配置中,相混合部件可以缺少膜。

[0125] 作为调节膜厚度的替代或补充,可以调节膜中孔的数量、大小和间距,以提供具有所需性能的泡沫。通常,在1微米至80微米之间的孔尺寸可用于提供分别通过气压和油流速的差异来控制气泡分数的手段。例如,对于通过带有1 $\mu$ m孔的膜的气体,在15psi至50psi的范围内改变气压,可以控制气泡分数和多分散性。当膜上有5 $\mu$ m孔时,可控制气泡分数和多分散性的气压范围为5psi到30psi。尽管具有80 $\mu$ m孔的膜能够产生气泡,但气泡分数和多分散性对气压变化的响应较小。因此,例如在需要可变控制泡沫特性的配置中,通常优选具有小于约80微米的孔的膜。当要使泡沫特性的变化最小时,可以使用较大的孔尺寸。

[0126] 用于收集膜中的孔的平均节距可以是多种长度中的任何一种,包括例如至少1 $\mu$ m、5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、25 $\mu$ m、50 $\mu$ m、100 $\mu$ m或更大。可替代地或另外地,用于特定孔的膜的节距可以可选地为至多100 $\mu$ m、50 $\mu$ m、25 $\mu$ m、10 $\mu$ m、5 $\mu$ m、1 $\mu$ m或更小。通常,增加孔的间距可以增加气泡分数

和多分散性对所施加气体的压力的响应性。当期望泡沫特性的较小变化时,减小间距可能是期望的。

[0127] 膜的其他特性也会影响泡沫的特性。例如,通常优选将疏水性材料用于膜。可以用于膜的示例性材料包括但不限于聚碳酸酯和聚四氟乙烯(PTFE)。另一个示例性特征是膜的表面积。已经观察到气相和液相之间较大的表面积可以更好地控制泡沫发生器中的气体分数和气泡多分散性。用于产生泡沫的膜的面积可以为至少约 $10\mu\text{m}^2$ 、 $50\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、 $500\mu\text{m}^2$ 或 $1\text{mm}^2$ 或更大。替代地或另外地,用于产生泡沫的膜的面积可以至多约 $1\text{mm}^2$ 、 $500\mu\text{m}^2$ 、 $100\mu\text{m}^2$ 、 $50\mu\text{m}^2$ 、 $10\mu\text{m}^2$ 或更小。

[0128] 上述阻气膜是可选的,不需要使用。是否使用阻气膜。在相混合接头处与液体管线相交的进气口的尺寸可以从几微米变化到几百微米。例如,对于上述膜的表面积,用于相混合设备的接头可以具有在上述范围内的横截面。

[0129] 可以使用各种气泡发生器系统中的任何一种来产生气泡,例如Garstecki等, *Bulletin of the Polish Academy of Sciences* 53:361-372 (2005) 提出的那些,将其通过引用并入本文。在特定配置中,通道接头可用于将气泡引入液体。在这种几何形状中,气体被送入承载液体的主通道。液体优先润湿通道壁,并且当气相进入主导管时,它会破裂成气泡。另一个示例性的气泡发生器使用的几何形状是,迫使液体通过主通道中的狭窄颈缩,而从紧靠颈缩上游的喷嘴分配的气体通过会聚的液体流线集中到此孔中。有用的气泡发生器包括本领域已知的那些,如气泡注射器、乳化剂(例如超声乳化剂)、文丘里注射器和气泡扩散器。

[0130] 在一些配置中,可以在流体系统中位于储液器(例如含有核酸测序试剂的储液器)下游和用于分析检测或合成反应的容器(例如包括要测序的核酸阵列的流动池)上游的位置在流体系统中形成混合相流体。与单独的液相的体积相比,这种配置提供了避免相对较大的容器来容纳混合相流体体积的优点。将分散相引入容器的下游还可以减少对分散相的材料敏感的试剂的损坏。在替代配置中,在将液体转移出容器之前,可以将气泡引入包括各种液体的容器中以在容器中产生流体泡沫。

[0131] 混合相流体可以在单个方向上流入和流出流动池。或者,可以将混合相流体拨入和拨出流动池,例如以实现混合或清除不想要的物质。可以通过改变施加在混合相流体上的压力的方向来实现切换。在下面的示例1中提供了一个切换(也称为“摆动”)流体泡沫的示例。

[0132] 本公开的系统可以包括加热器或冷却器,该加热器或冷却器配置为控制用于在混合相流体中产生分散相的材料的温度。例如,可以使用加热器来升高用于在流体泡沫中产生气泡的气体的温度。加热的分散相与本体相具有高的接触面积,因此在加热本体相时可以非常有效。在其他示例中,可以使用冷却器来降低用于在流体泡沫中产生气泡的气体的温度。同样,由于分散相和本体相之间的接触面积高,可以有效地实现冷却。

[0133] 当材料存在于流体容器、流体输送通道、容器或其他流体部件中时,可以放置加热器或冷却器以控制材料的温度。在特定配置中,加热或冷却的位置可以在流体容器的下游和相混合部件的上游。替代地或另外地,可以在发生相混合的位置(即,在相混合部件的位置)进行加热或冷却。这样,可以在第一温度(例如,提供稳定性的温度)下将液体试剂存储在容器中,并且可以稍后改变试剂的部分馏分的温度以用于下游过程。

[0134] 当用于混合相流体的期望温度高于其形成时的液相温度时,可以将将形成分散相的气体加热到高于期望温度的温度。例如,加热器的设定点至少要比下游流动池中的流体所需温度高至少约5℃、10℃、15℃或更高。更具体地,在流动池上游的加热器的设定点可以高于用于调节流动池温度的加热器或冷却器的设定点。可以选择温度差以解决混合相流体在流向流动池时可能发生的冷却。可以根据混合相的热容量、流体组分的绝缘水平、环境温度与流动池之间的温差以及混合相流体将花费在流动池中加热和使用之间的时间,可选择温差。

[0135] 当用于混合相流体的期望温度低于形成它的液相的温度时,可以将将形成分散相的气体冷却至低于期望温度的温度。例如,冷却器的设定点至少比下游流动池中流体的期望温度低约15℃、10℃、5℃或更低。更具体地说,在流动池上游的冷却器的设定点可以低于调节流动池温度的加热器或冷却器的设定点。可以选择温度差以解决混合相流体行进到流动池时可能发生的热量。可以基于与以上示例的用于加热的性质相似的性质来选择温度差。

[0136] 在一些配置中,可以加热或冷却将形成本体相的液相(例如,携带试剂、分析物等的液相)。替代地或附加地,可以在相混合部件的下游加热或冷却混合相流体,包括例如在将混合相流体输送到流动池和/或在流动池或其他容器的通道中的流体管线中。

[0137] 可以使用多种传热机制中的任何一种来实现加热或冷却,这些传热机制包括但不限于焦耳加热、对流、珀耳帖控制或辐射。在美国专利申请号62/782,565中提出了用于加热或冷却流动池上游的流体并且可以被修改以与混合相流体一起使用的设备和系统,将其通过引用并入本文。

[0138] 阀、加热器、冷却器或相混合部件或气泡发生器部件的其他元件可以由控制模块控制。控制模块的示例性配置在下面进一步详细阐述。作为示例,控制模块可以编程为打开阀以允许气体与分散液混合,从而将混合相流体输送到流动池,控制模块也可以编程为关闭阀门,以将单相流体输送到流动池。

[0139] 气泡产生器部件和流动池通道中的流体管线的内表面可以是亲水的或疏水的。因此,可以调节表面以减少或防止气泡粘附到表面上。当使用水性液体时,使用具有亲水性表面的部件(例如流动池和管)可能是有益的。亲水性有助于防止气泡附着在表面上。表面活性剂可包括在泡沫中,以进一步抑制气泡附着在表面上。特别有用的表面是由环状烯烃共聚物(COP)制成的,当与含有表面活性剂的水溶液接触时,其表现出有用的亲水特性。

[0140] 可以在压力下将液体输送到相混合部件、气泡发生器部件和/或流动池。通常,液体是在正压下输送的,但在某些配置中,可以使用负压。有用的泵包括例如引起流体动压的泵,例如根据机械原理运行的泵(例如:外部注射泵、气动隔膜泵、振动隔膜泵、真空装置、离心力、压电/超声波泵和声力);电磁原理(例如,电渗流、电动泵、铁磁塞、电动液力泵、利用磁力的吸引或排斥力和磁液力泵);重力;静电力(例如,电渗流);离心流(将基板放置在光盘上并旋转);磁力(例如,振荡离子会引起流动);磁流体动力;和真空或压力差。

[0141] 可将本文所述系统中使用的液体配制成包括所需的反应性试剂,包括例如在测序过程中所述的反应性试剂。液体试剂可以储存在容器中。例如,本文阐述的系统中的一个或多个容器可以包括聚合酶、核苷酸、核酸、解封剂、聚合酶辅因子、聚合酶抑制剂、三元复合物稳定剂等。

[0142] 一种或多种液体可进一步包括表面活性剂,例如,当液体用于生产混合相流体时,以抑制气泡聚结。表面活性剂可以是阴离子、阳离子、非离子或两性离子的。示例性表面活性剂包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)、吐温20(聚山梨酯20)、吐温80(聚山梨酯80)、溴化十六烷铵、十六烷基三甲基溴化铵、Triton X-100、CHAPS或NP-40。表面活性剂可以帮助稳定流体泡沫中的气泡。表面活性剂还可以帮助稳定泡沫的其他组分,例如蛋白质或核酸。相对低浓度的表面活性剂可用于混合相流体中。例如,混合相流体可包括至少0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、5%或更多的表面活性剂。对于某些用途,表面活性剂的量将受到限制,例如,以防止与混合相流体中的其他组分发生不必要的相互作用。例如,混合流体相流体中表面活性剂的浓度可以为至多5%、1%、0.5%、0.1%、0.05%、0.01%、0.005%或更少的表面活性剂。

[0143] 作为表面活性剂存在的替代或补充,一种或多种液体可包括增加或降低粘度的溶质。例如,可以通过添加多元醇或糖类(例如甘油、赤藓糖醇、琼脂糖、阿拉伯糖醇、山梨糖醇、甘露醇、木糖醇、甘露糖甘露醇、葡萄糖基甘油、葡萄糖、果糖、蔗糖、海藻糖或异氟糖苷);或聚合物(例如葡萄聚糖、果聚糖、明胶或聚乙二醇),来增加粘度。纳米颗粒还可用于稳定气泡。

[0144] 气体输送部件通常将配置成在正压下将气体输送至气泡发生器部件或流动池。但是,在某些配置中,可以在负压下输送气体。惰性气体(例如 $N_2$ 或稀有气体)特别有益,因为它们降低了与生物成分(例如酶和核酸)发生不利相互作用的风险。在一些配置中,本公开的系统,特别是气体输送部件,将配置成防止分子氧进入流体泡沫。例如,该系统及其流体部件可以配置成排除大气中的氧气。这样,流体泡沫中的气泡可基本上不含分子氧。例如,流体泡沫中的气泡可包括小于20%、10%、1%、0.5%、0.1%、100ppm、10ppm或更少的分子氧。或者,如果特定应用需要,则系统或气体输送部件可以配置成输送分子氧或大气氧。在一些配置中,气体是大气,可以在进入液体流之前将其任选地过滤。过滤器可用于空气或其他气体,以去除微粒和其他杂质。

[0145] 图6示出了示例性的流体回路,该流体回路包括用于将泡沫输送至流动池的泡沫发生器(“起泡器”)。储液器包括试剂或其他液体,并且向大气开放(ATM)。可以在容积泵的作用下将液体输送到气泡发生器。大气(ATM)在可调节的气压源的作用下输送到气泡发生器(起泡器)。流体回路可以包括可选的气体电阻器(如图6所示)。在一些配置中,在气泡发生器内或在气泡发生器上游的气体管线中的膜将用作气体电阻器。作为膜的使用的替代或补充,可以将其他类型的气体电阻器放置在气体管线的上游,其示例包括微孔(例如,可从O'Keefe Controls Co., Monroe CT获得)或毛细管电阻器。由于气泡发生器中气体和液体的混合,形成了流体泡沫。流体泡沫流到流动池,然后流到中间废液容器。气体可以从中间废液容器中排出,液体可以在泵的作用下移动到下游废液容器中。下游废液容器向大气开放(ATM)。

[0146] 如图6所示,可通过改变液体的体积流量( $Q_l$ )和气体的体积流量( $Q_g$ )来调节流体泡沫的体积流量( $Q_f$ )。流量可使用Poiseuille方程针对可压缩流体进行调整或评估。对于管中的可压缩流体,沿着管的体积流量和线速度不是恒定的。流量通常以出口压力表示。当流体被压缩或膨胀时,工作便完成并且流体被加热或冷却。这意味着流速取决于与流体之间的热传递。对于等温情况下的理想气体,允许流体的温度与其周围环境保持平衡,并且当管



两端之间的压差较小时,管出口处的体积流量由方程2给出:

$$[0147] \quad Q = \frac{dV}{dt} = v\pi R^2 = \frac{\pi R^4 (P_i - P_o)}{8\mu L} \times \frac{P_i + P_o}{2P_o} = \frac{\pi R^4}{16\mu L} \left( \frac{P_i^2 - P_o^2}{P_o} \right)$$

[0148] 其中 $P_i$ 是入口压力, $P_o$ 是出口压力, $L$ 是管的长度, $\mu$ 是粘度, $R$ 是管的半径, $V$ 是在出口压力下的流体体积, $v$ 是在出口压力下的流体速度。

[0149] 本公开的系统可以可选地包括光学检测部件,该光学检测部件配置为检测流动池的内部,例如流动池中的检测通道的内部。特别有用的光学检测部件包括在子系统发现的那些部件或核酸测序系统的部件。多个这样的检测设备被配置用于光学检测,例如,发光信号的检测。因此,光学检测部件可以包括被配置为照射流动池通道的内部的激发系统。光学检测部件可以进一步包括发射系统,该发射系统配置成从流动池通道的内部检测发光。发光的检测可以使用本领域已知的与核酸阵列或核酸测序有关的检测设备来进行。可以基于多种发光性质中的任何一种来检测发光体,所述发光性质包括例如发射波长、激发波长、荧光共振能量转移(FRET)强度、猝灭、各向异性或寿命。

[0150] 可以在本文的系统或方法中使用的检测设备及其部件的示例在例如美国专利申请号2010/0111768 A1或美国专利号7,329,860、8,951,781或9,193,996中进行了描述,其每一个都通过引用并入本文。其他检测设备包括商业化用于核酸测序的检测设备,例如Illumina™,Inc.(例如HiSeq™、MiSeq™、NextSeq™或NovaSeq™系统)、Life Technologies™(例如ABI PRISM™或SOLiD™系统)、Pacific Biosciences(例如使用SMRT™技术的系统,如Sequel™或RS II™系统)或Qiagen(例如Genereader™系统)提供的检测设备。其它有用的检测器在美国专利号5,888,737、6,175,002、5,695,934、6,140,489或5,863,722,和美国专利公开号2007/007991A1、2009/0247414A1或2010/0111768或W02007/123744中进行了描述,其每一个通过引用并入本文。

[0151] 尽管在本文的多个示例性实施例中在光学检测的背景下示出了本公开的系统和方法,但是应当理解,可以附加地或替代地使用其他检测方式。例如,检测器可以是用于检测质子或焦磷酸盐的电子检测器(例如,参见美国专利公开号2009/0026082A1、2009/0127589A1、2010/0137143A1或2010/0282617A1,其每一个都通过引用并入本文,或可从马萨诸塞州沃尔瑟姆的ThermoFisher购买的Ion Torrent™系统),或用于检测纳米孔(例如由英国牛津Oxford Nanopore™商业化的纳米孔)的电子检测器(例如MinION™或PromethION™系统),或美国专利7,001,792、Soni&Meller,Clin.Chem.53,1996-2001(2007)、Healy,Nanomed.2,459-481(2007)或Cockroft,et al.J.Am.Chem.Soc.130,818-820(2008)中描述的那些,其每一个都通过引用并入本文。可以使用FET检测器,例如美国专利申请号62/767,712、美国专利申请公开号2017/0240962 A1、2018/0051316 A1、2018/0112265 A1、2018/0155773 A1或2018/0305727 A1或美国专利号9,164,053、9,829,456、10,036,064或10,125,391中所述的一种或多种,其每一个都通过引用并入本文。

[0152] 系统部件的控制,例如气泡发生器或相混合部件,可以利用通用处理器、数字信号处理器(DSP)、专用集成电路(ASIC)、现场可编程门阵列(FPGA)或其他可编程逻辑设备、分立门或晶体管逻辑、分立硬件部件或其任何组合,旨在执行本文描述的功能。通用处理器可以是微处理器,但可替代地,处理器可以是任何常规处理器、控制器、微控制器或状态机。处理器还可以被实现为计算设备的组合,例如,DSP和微处理器的组合、多个微处理器、与DSP

核心结合的一个或多个微处理器,或任何其他这样的配置。例如,可以对处理器或其他设备进行编程,以致动控制颗粒、气体或液体流入相混合部件的阀或其他流体部件,从而产生具有所需数量的气泡、所需尺寸或组成的气泡或其他所需特性的气泡的混合相流体。作为控制形成混合相流体分散相的材料流的替代方法或补充,处理器或其他装置可以被编程为致动阀或其他流体部件,该阀或其他流体部件控制将形成混合相流体的本体相的液体的流动。用于控制流体的相同或不同的处理器可以与系统交互以获取、存储和处理信号(例如,使用本文阐述的装置检测到的信号)。在特定实施例中,处理器可用于根据信号确定存在于模板核酸中特定位置的核苷酸的同源性。在某些情况下,处理器将从检测到的信号中识别出模板的核苷酸序列。

[0153] 处理器的存储器架构可以包括至少一个程序产品,该程序产品具有被实现为可执行指令的至少一个程序模块,该程序模块被配置为操作本文所述的系统的一个或多个部件。例如,可执行指令可以包括操作系统、一个或多个应用程序、其他程序模块和程序数据。通常,程序模块可以包括执行本文阐述的特定任务的例程、程序、对象、部件,逻辑、数据结构等,例如控制气泡的浓度、数量、尺寸、多分散性或气泡组成,这些气泡会输送到液体中以形成混合相流体。

[0154] 可以在本文所述的系统或装置上进行的特别有用的测序过程是采用试剂递送的重复循环的循环过程。每个循环可以包括一个步骤或多个步骤。例如,每个循环可包括检测模板核酸中单个核苷酸位置所需的所有步骤。一些测序过程采用循环可逆终止剂(CRT)化学方法,其中每个循环包括以下步骤:(i)添加单个可逆终止的核苷酸,以将新生引物增加至要检测的核苷酸位置;(ii)检测单核苷酸位置上的核苷酸,和(iii)解封新生引物以允许返回步骤(i)以开始随后的循环。这些步骤中的一个或多个可以在诸如流体泡沫的混合相流体中进行。在一些配置中,所有三个步骤都在混合相流体中进行。混合相流体可用于输送和/或除去这些步骤中一个或多个的试剂或产物。下文和下文引用的参考文献中列出了可在使用混合相流体的CRT工艺中使用的反应步骤、试剂和产物的示例。或者,可以在不存在混合相流体的情况下进行一种或多种示例性步骤、试剂或产物。

[0155] 有用的CRT核酸测序过程的一个特定示例是通过Binding<sup>TM</sup>(SBB<sup>TM</sup>)反应测序,例如,如共同拥有的美国专利申请号2017/0022553A1、2018/0044727A1、2018/0187245A1、或2018/0208983A1中所述,其每一个都通过引用并入本文。通常,用于确定模板核酸分子序列的SBB<sup>TM</sup>方法可以基于在特定条件下稳定的三元复合物(聚合酶、引物核酸和同源核苷酸之间)的形成。该方法可以包括检查阶段和核苷酸掺入阶段。可以使用混合相流体(例如流体泡沫)进行一个或多个测序阶段。

[0156] 可以对至少一种用引物、聚合酶和至少一种核苷酸类型引发的模板核酸分子进行SBB<sup>TM</sup>方法的检查阶段。可以在核苷酸未共价添加到引物的条件下观察到聚合酶和核苷酸与引发的模板核酸分子的相互作用。并且可以基于观察到的相互作用来鉴定每个模板核酸中的下一个碱基。例如,核苷酸可以包括可检测的标记。在一些实施例中,可以标记聚合酶。在检查阶段,可以使用多种条件和试剂来稳定三元复合物。例如,引物可包括防止核苷酸共价连接的可逆性封闭部分;和/或延伸所需的聚合酶辅因子(例如二价金属离子)可能不存在;和/或可以存在抑制基于聚合酶的引物延伸的抑制性二价阳离子;检测阶段中存在的聚合酶可以具有抑制引物延伸的化学修饰和/或突变;和/或核苷酸可以具有抑制掺入的化学修

饰。

[0157] 延伸阶段可以通过创造条件来进行,其中可以在每个模板核酸分子上的引物中添加核苷酸。在一些实施例中,这涉及去除在检查阶段中使用的试剂,并用有助于扩展的试剂代替它们。例如,检查试剂可以用聚合酶和可逆终止的核苷酸代替。

[0158] 另一个有用的CRT测序过程是合成测序(SBS)。SBS通常涉及通过针对与该引物杂交的模板链的核苷酸的迭代添加来迭代地增加新生引物的酶促延伸。简而言之,可以通过使引发的靶核酸与一种或多种标记的核苷酸、DNA聚合酶等接触来启动SBS。引物将掺入可以检测的标记核苷酸。任选地,标记的核苷酸可以进一步包括可逆终止子部分。这样,单个可逆终止的核苷酸将被添加到引物中,使得随后的延伸不会发生,直到递送解封剂以从引物中除去可逆终止子部分。可以进行n次SBS循环以使引物延伸n个核苷酸,从而检测长度为n的序列。描述了可以容易地适于与本文的系统或设备一起使用的示例性SBS程序、试剂和检测部件,例如,Bentley et al.,*Nature* 456:53-59(2008),WO 04/018497、WO 91/06678、WO 07/123744、美国专利号7,057,026;7,329,492、7,211,414、7,315,019或7,405,281和美国专利申请公开号2008/0108082A1,其每一个都通过引用并入本文。还可从Illumina公司(San Diego,CA)商购的SBS方法也是有用的。

[0159] 一些SBS实施例是环状的,但是不需要采用可逆的终止子核苷酸。这样的方法也可以采用混合相流体。一种特别有用的方法包括检测将核苷酸掺入延伸产物后释放的质子。例如,基于释放的质子的检测的测序可以使用可购自Thermo Fisher(Waltham,MA)或在美国专利申请公开号2009/0026082 A1、2009/0127589 A1、2010/0137143 A1或2010/0282617 A1中描述的试剂和电检测器,其每一个都通过引用并入本文。不需要使用可逆终止子核苷酸的另一种循环测序方法是焦磷酸测序。焦磷酸测序检测将核苷酸掺入与模板核酸链杂交的新生引物中的无机焦磷酸盐(PPi)的释放(Ronaghi,et al.,*Analytical Biochemistry* 242(1),84-9(1996);Ronaghi,*Genome Res.*11(1),3-11(2001);Ronaghi et al.*Science* 281(5375),363(1998);美国专利号6,210,891、6,258,568和6,274,320,其每一个都通过引用并入本文)。

[0160] 连接测序反应也是有用的,包括例如在Shendure et al.*Science*309:1728-1732(2005)、美国专利号5,599,675、或美国专利号5,750,341中描述的那些,其每一个均通过引用并入本文。杂交测序程序可按以下说明使用,例如在Bains et al.,*Journal of Theoretical Biology* 135(3),303-7(1988);Drmanac et al.,*Nature Biotechnology* 16,54-58(1998);Fodor et al.,*Science* 251(4995),767-773(1995)或WO 1989/10977中描述的,其每一个均通过引用并入本文。在通过连接测序和通过杂交测序两者中,例如,使用荧光标记的寡核苷酸,通过寡核苷酸连接使与核酸模板杂交的引物经受重复的延伸循环。

[0161] 示例1

[0162] 具有和没有气泡的核酸测序

[0163] 该示例提供了使用液体递送试剂或液体泡沫递送试剂进行核酸测序的比较。该比较表明,可以使用液体泡沫代替液体泡沫,以便在测序运行期间将测序试剂递送至核酸阵列。结果还表明,使用液体泡沫代替液体输送介质可大大减少试剂的消耗,从而降低试剂成本并减少废液量。使用液体泡沫输送测序试剂获得的测序数据的质量与使用液体泡沫输送

试剂获得的结果的质量相差无几。

[0164] 材料和方法

[0165] 如下使用液体试剂制备含有引发的模板核酸的流动池。制备了在12个PCR反应中合成的模板核酸链,然后独立地与珠粒结合。这导致了12种珠粒类型的种群,其中每个珠粒都包括12个模板链之一的同质集合。接下来将带有固定模板链的珠粒附着到流动池的内表面。流动池的内表面经过亲水处理,以防止气泡粘附到流动池表面。接下来,将测序引物流入流动池,并使其与固定的模板链杂交,以形成固定的引物-模板杂交体。

[0166] 循环进行测序,其中每个循环均包括以下步骤:(i) 延伸:将可逆终止的核苷酸添加到固定的引物-模板杂种的引物中,(ii) 检查:在可逆终止的固定引物-模板杂种上形成和检测稳定的三元复合物,和(iii) 激活:从延伸的引物中切割出可逆终止子。每个循环导致添加单个核苷酸并检测随后的核苷酸位置。这样,循环数与每个珠粒读取的序列的长度直接相关。表1显示了在液相中进行的对照测序运行的每个单独循环中执行的步骤,以及每个步骤的时间,每个步骤中流体试剂的流量和消耗的液体试剂的总体积。

[0167] 表1:用于液相测序的测序循环(无气泡)

步骤	时间(SEC)	液相流量( $\mu\text{L}/\text{SEC}$ )	消耗的液相总体积( $\mu\text{L}$ )
<b>RTS</b>	5	32	160
<b>RTS</b>	30	1	30
<b>NSB</b>	5	32	160
<b>EXT</b>	5	32	160
<b>PAUSE</b>	15	0	0
<b>IMG</b>	7	32	224
<b>DETECT</b>	1	0	0
<b>NSB</b>	5	32	160
<b>EXA</b>	5	32	160
<b>PAUSE</b>	15	0	0
<b>IMG</b>	7	32	224
<b>DETECT</b>	1	0	0
<b>NSB</b>	5	32	160
<b>EXC</b>	5	32	160
<b>PAUSE</b>	15	0	0
<b>IMG</b>	7	32	224
<b>DETECT</b>	1	0	0
<b>NSB</b>	5	32	160
<b>EXG</b>	5	32	160
<b>PAUSE</b>	15	0	0
<b>IMG</b>	7	32	224
<b>DETECT</b>	1	0	0
<b>NSB</b>	5	32	160
<b>CLV</b>	5	32	160
<b>CLV</b>	12	1	12
<b>IMG</b>	5	32	160

[0169] 通过在固定的引物-模板杂种的引物的3'-末端掺入可逆终止子核苷酸来启动测序循环。这是通过RTS步骤完成的,其中在M15聚合酶存在下,流动池与dATP、dGTP、dCTP和dTTP的未标记的可逆终止的核苷酸类似物接触(参见美国专利申请号62/732,510,其通过引用并入本文)。在该示例性方法中使用的可逆终止子核苷酸包括3'-ONH<sub>2</sub>可逆终止子部分。该可逆终止子核苷酸的描述可以在美国专利号7,544,794中找到,其通过引用并入本文。

[0170] 进行NSB步骤以从RTS溶液中去掉dNTP,并洗涤流动池。更具体地说,对于NSB步骤,将包括异丙醇、吐温80、羟胺和EDTA的溶液流过流动池。NSB步骤保留了M15聚合酶(参见美国专利申请序列号16/518,321,其通过引用并入本文)。

[0171] 然后以检查子程序继续该循环,其中四个不同核苷酸的每一个分别递送至流动池(EXT、EXA、EXC和EXG,分别递送Cy5标记的dTTP、Cy5标记的dATP、Cy5标记的dCTP和Cy5标记的dGTP),系统暂停流体流动以允许形成三元复合物,通过递送IMG试剂从流动池中除去游离核苷酸,然后检查流动池在固定的引物-模板杂交体上三元复合物的形成。IMG试剂包括LiCl、甜菜碱、Tween-80、KCl、硫酸铵、羟胺和EDTA,它们在去除游离核苷酸后稳定了三元复合物(参见美国专利号10,400,272,其通过引用并入本文)。通过荧光显微镜对流动池成像,以检测包括标记核苷酸的三元复合物,该标记核苷酸是每个模板核酸中下一个正确核苷酸的同源物。引物链3'核苷酸上的可逆终止子部分阻止了三元复合物形成和检测步骤中的核苷酸掺入。

[0172] 在检查子程序之后,进行NSB洗涤以从检查子程序中清除核苷酸的流动池。然后,测序循环继续进行CLV步骤,其中使用如美国专利号7,544,794中所述的乙酸钠和亚硝酸钠从引物中除去可逆终止子部分,将其通过引用并入本文。然后将流动池在IMG溶液中洗涤。通过CLV和IMG步骤除去了检查步骤中的聚合酶。然后通过返回下一个循环的第一步,测序过程进行到下一个核苷酸位置。

[0173] 表2显示了在流体泡沫中进行的测序运行的每个单独循环中执行的步骤。该表显示了每个步骤的持续时间、液体试剂流速、液体体积消耗和气压。每个步骤的液相与对照测序操作中相同名称的液相相同,如上文表1中所述。但是,如图5所示,使用具有Y形接头和气体扩散器的气泡发生器,将液相与气体混合进行了多个步骤。气泡发生器置于装有液体试剂的储液器的下游,并位于流动池的上游。当压力高于2PSI(磅/平方英寸)时,气泡发生器会产生泡沫。对于检测步骤,将气压降低到2PSI以忽略气泡。因此,如表1的对照测序运行中所进行的,在液体试剂中没有泡沫的情况下进行检测。

[0174] 表2:用于流体泡沫测序的测序循环(有气泡)

步骤	时间(SEC)	液相流量( $\mu\text{L}/\text{SEC}$ )	消耗的液相总体积( $\mu\text{L}$ )	气相压力(PSI)
RTS	5	10	50	15
RTS WIGGLE	30	0	0	2
NSB	5	10	50	10
NSB WIGGLE	5	0	0	2
EXT	5	10	50	20
EXT	1.5	-10	0	2
PAUSE	15	0	0	2
IMG	5	10	50	15
IMG	1	50	50	2
IMG	1.5	-10	0	2
DETECT	1	0	0	2
NSB	5	10	50	10
NSB WIGGLE	5	0	0	2
EXA	5	10	50	20
EXA	1.5	-10	0	2
PAUSE	15	0	0	2
IMG	5	10	50	15
IMG	1	50	50	2
IMG	1.5	-10	0	2
DETECT	1	0	0	2
NSB	5	10	50	10
NSB WIGGLE	5	0	0	2
EXC	5	10	50	20
EXC	1.5	-10	0	2
PAUSE	15	0	0	2
IMG	5	10	50	15
IMG	1	50	50	2
IMG	1.5	-10	0	2
DETECT	1	0	0	2
NSB	5	10	50	10
NSB WIGGLE	5	0	0	2

[0175]

步骤	时间(SEC)	液相流量( $\mu\text{L}/\text{SEC}$ )	消耗的液相总体积( $\mu\text{L}$ )	气相压力(PSI)
EXG	5	10	50	20
EXG	1.5	-10	0	2
PAUSE	15	0	0	2
IMG	5	10	50	15
IMG	1	50	50	2
IMG	1.5	-10	0	2
DETECT	1	0	0	2
NSB	5	10	50	10
NSB WIGGLE	5	0	0	2
CLV	3	10	30	15
CLV	2	10	20	2
CLV	12	1	12	2
IMG	5	10	50	15

[0176]

[0177] 表2中列出的几个步骤包括一个“摆动”，其中流体泡沫的流动方向来回切换，以允许在流动池中混合。几个步骤还包括使流体泡沫或液体试剂的流动方向持续反向。逆流由流速列中的负值和流过流动池的流体总体积的零值表示。

[0178] 结果

[0179] 图7示出了使用试剂的液体输送(图7A)或流体的泡沫试剂输送(图7B)的测序方案的信号强度对测序循环的图。针对每种核苷酸类型检测到的“on”强度以及每种核苷酸类型

检测到的“off”强度均显示了单独的迹线。对于每个循环中的每个珠粒,将产生最高信号的核苷酸类型识别为“on”信号,将其他三种核苷酸类型识别为“off”信号。每种核苷酸类型的“on”信号是在给定周期内检测到的所有珠粒类型的平均值,并绘制所有周期的中值强度(使用试剂的液体输送进行100个循环(图7A)和使用试剂的流体泡沫输送进行了150个循环(图7B)),以获取图中所示的每个“on”信号迹线。以每个周期为基础,对所有珠粒类型的信号强度进行类似的平均计算,得出图7所示的“off”强度迹线。

[0180] 通过将迹线拟合到由以下方程定义的曲线,可以评估“on”迹线上的信号衰减:

$$[0181] \quad I = I_0 e^{-(n/\tau)} \quad (\text{方程3})$$

[0182] 其中,I是信号强度,n是循环数, $\tau$ 是信号约为 $I_0$ (初始信号强度)的37%时的循环。较高的 $\tau$ 表示信号衰减率降低,这通常是优选的,因为它表示增加的读取长度和测序精度,而较高的信号衰减率则具有较低的 $\tau$ 值。将拟合优度计算为确定系数 $R^2$ 。较高的 $R^2$ 值与测序过程中降低的信号强度方差相关。图7A所示的试剂液体输送迹线的平均 $\tau$ 为83,平均 $R^2$ 为0.97;并且图7B中所示的用于试剂的流体泡沫输送的迹线的平均 $\tau$ 为66,平均 $R^2$ 为0.97(对所有四种核苷酸类型的迹线取平均值)。如 $\tau$ 值所示,虽然使用试剂的液体泡沫输送代替液体试剂输送对读取长度产生了较小的影响,但是使用液体泡沫仍允许较长的读取长度。此外, $R^2$ 值与在有气泡和无气泡的情况下进行的测序运行均具有可比性,表明使用液体泡沫来传递测序试剂对信号强度的变化影响不大。

[0183] 表3显示了使用试剂的液体输送进行测序运行的后处理结果,如图7A所示。表4显示了使用液体输送进行测序的测序结果,如图7B所示。每个表格的第一列显示了从分析中忽略的观察到的珠粒的百分比,其中“PNN”包括所有观察到的珠粒,P01忽略了数据质量最低的1%,P02忽略了数据质量最低的2%,依此类推,直到P06忽略了数据质量最低的6%。对于每一行,将显示“无检出”、“正确检出”和“错误检出”的数目,以及“总检出”列中显示的这三列的总和。显示错误百分比以及在Q%列中为每个值计算的相关Q分数。

[0184] 在核酸测序应用中,根据以下方程,Q分数是与碱基检出错误概率(P)对数相关的属性:

$$[0185] \quad Q = -10 \log(P) \quad (\text{方程4})$$

[0186] 例如,用于特定碱基检出的Q分数20(Q20)等于该碱基检出不正确的概率为百分之一。这意味着碱基检出准确度(即正确的碱基检出概率)为99.0%。Q30的Q分数表示较高的碱基检出准确率99.9%,并且指示错误的碱基检出概率为千分之一。Q40表示碱基检出准确度为99.99%(即错误的碱基检出概率为10,000分之一),Q50表示更高的碱基检出准确度为99.999%(即错误的碱基检出概率为100,000分之一)。当前可用的高通量测序平台(即“下一代”测序平台,例如可从加利福尼亚州圣地亚哥的Illumina公司获得的测序平台)通常使用Q30作为质量基准。较高的Q分数表明变量检出的准确性提高,从而提高了结论的准确性,并降低了验证实验的成本。

[0187] 如表3的结果所示,当使用液体试剂进行测序时,在不丢弃任何观察到的数据的情况下获得了接近Q50的Q分数。忽略最低质量的分析数据的1%将产生Q70的Q分数(即错误的碱基检出概率为10,000,000分之一)。相比之下,在泡沫流体而不是液体中输送试剂会产生约38的Q分数,而不会丢弃任何数据。通过仅删除6%的数据就获得了Q70的分数。因此,使用泡沫流体递送测序试剂导致高度精确的测序。

[0188] 表3:测序结果(无气泡)

Q%	无检出	正确检出	错误检出	总检出	错误率	Q 分数
PNN	25	789688	8	789696	0.001	49.94
P00	0	789688	8	789696	0.001	49.94
P01	0	781846	0	781846	0	70
P02	0	774056	0	774056	0	70
P03	0	767193	0	767193	0	70
P04	0	767193	0	767193	0	70
P05	0	756686	0	756686	0	70
P06	0	756686	0	756686	0	70

[0190] 表4:测序结果(有气泡)

Q%	无检出	正确检出	错误检出	总检出	错误率	Q 分数
PNN	966	1029434	160	1029594	0.016	38.09
P00	0	1029434	160	1029594	0.016	38.09
P01	0	1019277	21	1019298	0.002	46.86
P02	0	1008994	8	1009002	0.001	51.01
P03	0	998703	3	998706	0	55.22
P04	0	988407	3	988410	0	55.18
P05	0	978112	2	978114	0	56.89
P06	0	967818	0	967818	0	70

[0192] 表5显示了每个步骤和测序循环消耗的液体试剂。通过向液体试剂中添加气泡来产生泡沫流体。这样,气泡占据了流体泡沫中的体积,与相同体积的液体试剂相比,这有效地减少了给定体积的流体泡沫中试剂的总量。然而,如在流动池表面上的核酸所经历的,流体泡沫的液相中的试剂浓度与液体试剂中的表观试剂浓度相同。因此,即使在添加气泡以使液体发泡时每个测序循环消耗的试剂总量会减少,使表面上的核酸与测序试剂接触,测序试剂在流体泡沫中的浓度与在非泡沫液体试剂中的“表观”浓度相同。

[0193] 表5:每个步骤和每个循环消耗的试剂

试剂	有气泡 消耗的液体	无气泡 消耗的液体	试剂节省量
RTS	50	190	74%
NSB	250	800	69%
EXT	50	160	69%
EXA	50	160	69%
EXC	50	160	69%
EXG	50	160	69%
IMG	500	1056	53%
CLV	62	172	64%
总计	1062	2858	63%

[0195] 表5的结果表明,通过向测序试剂中添加气泡,可以节省53%至74%的试剂。每个循环的总试剂节省量为63%。然而,如图7以及表3和4的结果所示,使用流体泡沫进行测序



所产生的读取长度和读取质量与在测序平台中使用液相试剂产生的读取长度和读取质量相当。

[0196] 示例2

[0197] 利用流体泡沫的核酸测序系统

[0198] 本示例描述了一种核酸测序系统,其包括载物台、液体输送部件、气体输送部件、气泡发生器部件和光学检测部件。所述载物台被配置为支撑具有检测通道的流动池。所述光学检测部件被配置为检测所述检测通道的内部。所述液体输送部件被配置为将液体从多个容器输送到所述检测通道。所述气体输送部件被配置为将气体从一个或多个源输送到所述气泡发生器部件。所述气泡发生器部件被配置为在所述多个容器的下游且在所述流动池的上游的位置处将来自所述气体输送部件的气泡引入到来自所述液体输送部件的液体中,从而将包括来自所述气体输送部件的气体气泡的流体泡沫输送至所述检测通道。

[0199] 核酸测序系统的一些部件和功能在下面进一步详细阐述。应该理解,该系统是示例性的。例如,如本文中其他地方所述,下面阐述的一个或多个部件可以省略或替换为其他部件。可以将本文阐述的其他部件添加到示例性系统,而不必替换下面示例的部件。

[0200] 核酸测序系统1000的框图在图8中示出。流体连接和流体通常在系统1000中流动的方向由箭头指示,其中实线箭头指示液体或泡沫的流动,而虚线箭头指示气体的流动。在某些情况下,例如,当摆动流体时,流体可以沿相反的方向移动。该框图示出了流体连接,但并不意图一定反映部件的物理位置、流体管线的长度或部件的物理结构。

[0201] 核酸测序系统1000包括吸管阵列1300,其与多个试剂容器1400中的液体接触。吸管阵列1300流体地连接至路由歧管1500,该路由歧管1500将液体从吸管阵列1300的各个吸管引导至气泡发生器1100或气泡发生器1155(气泡发生器也称为气泡产生部件)。气泡发生器1100和1155将气体与液体混合以形成泡沫。气泡发生器1100流体连接到流动池1200的检测通道1201的入口1211。气泡发生器1155流体连接到流动池1200的检测通道1202的入口1221。气体通过气体输送部件被引导至气泡发生器1100和1155,该气体输送部件包括压缩空气源1350,该压缩空气源1350将气体引导通过气动控制器1300,通过歧管1500中的专用管线到达气泡发生器。由于由泵1050或1051在液体输送部件中位于多个试剂容器1400与气泡发生器1100和1155之间的位置处施加到液体上的位移力,由气泡发生器1100产生的泡沫被引导到检测通道1201。用于检测通道1201的出口1212和出口1222流体连接到路由歧管1500,使得来自检测通道1201和1202的泡沫可以分别通过流体传感器阵列1600或1601向下游传输,然后通过下游选择阀1700传输到废液箱1800。下游的选择阀1700允许分别通过检测通道1201和检测通道1202的流体系统被选择性地打开或关闭。

[0202] 核酸测序系统1000还包括检测器1900。在该示例中,检测器1900是光学检测器,其包括配置成照射流动池1200内部的检测通道的激发系统和配置成检测来自流动池内部的检测通道的发光的发射系统。流动池1200相对于流体部件并相对于检测器1900由载物台1950定位。核酸测序系统1000还包括加热器1650,该加热器1650被配置为在多个试剂容器1400与气泡产生部件1100之间的位置处加热液体输送部件中的液体。

[0203] 图9示出了核酸测序系统1000的几个部件的组件的透视图。系统1000由基座1009和框架1010支撑。框架1010的顶部中间区域配置为供用户访问系统,以将流动池1200放置在载物台1950上。通过预加载1951将流动池1200压至载物台1950。这样,流动池1200被定位

成由光学检测器1900检测。流动池1200通过平移部件1955沿载物台1950进行平移,并固定在载物台1950上的参考表面上,以允许检测流动池1200内的核酸(或其他分析样品)阵列。预加载1951、扫描系统1955和光学检测器1900的部件和操作在美国专利申请公开号2019/0055596A1中提出,其通过引用并入本文。该系统还包括通风管1920和风扇1921,用于排出由光学检测器产生的热量。

[0204] 如图8和9所示,核酸测序系统1000进一步包括蠕动泵1050和1051,其配置为在液体输送部件中位于多个容器1400与气泡发生器1100和1155之间的位置处施加排液力(例如,正压、正排量等),从而将液体从液体输送部件输送到流动池1200。在示例性系统1000中,泵可以被配置成在旋转阀和气泡发生器部件之间的位置处将排液力施加到液体输送部件,从而将液体从液体输送部件输送到流动池。在图9的视图中,路由歧管1500和流动池1200之间的流体连接已被移除,并且在图12A和12B中示出。当容器被吸管阵列1300接合时,示出了多个容器1400。还示出了抽屉1402和1403,其允许用户替换容器中的液体。所述容器可以充满用于核酸测序过程的试剂。在核酸测序的背景下,示例性试剂包括但不限于在示例2、本文其他地方或本文引用的参考文献中列出的聚合酶、核苷酸和其他试剂。或者,核苷酸和/或聚合酶可以例如用发光体外源标记,例如本文所述或本文引用的参考文献中的那些。

[0205] 图10示出了流体连接到吸管歧管1302和吸管歧管1303的路由歧管1500的俯视图。吸管附接到吸管歧管,使得由吸管从容器汲取的液体通过吸管歧管通过专用通道转移到路由歧管1500。例如,吸管歧管1303包括吸管附接点1310、1311、1313,它们与吸管歧管1303内的流体管线1314至1316流体连接。流体管线1314至1316经由连接件1500连接到路由歧管1500中的相应管线,以将试剂输送到旋转阀1560。图10还示出了路由歧管1500上的连接件1510,其连接到吸管歧管1302上的相应连接件,使得通过吸管吸取的流体可以被引导至旋转阀1550。类似地,在路由歧管1500上的连接件1511连接到吸管歧管1303上的各个连接件,使得通过吸管吸取的流体可以被引导至旋转阀1560。旋转阀1550和1560在图11中可见,其示出了路由歧管1500的仰视图。图10还示出了出口端口1178、流体入口端口1176以及气体出口端口1177;出口端口1178将旋转阀1550的出口连接至气泡发生器1100,流体入口端口1176将流动池通道1202(图8)的出口连接至废液箱1800(图8),气体出口端口1177将气体从压缩空气源1350(图8)输送到气泡发生器1100(图8)。对于旋转阀1560存在类似的流体端口。

[0206] 图12A示出了核酸测序系统1000与流动池1200之间的流体连接的透视图。图12B示出了相同的透视图,但是连接器是断开的并且稍微移位了。图13显示了流动池1200与核酸测序系统1000的液体输送部件之间的连接。

[0207] 如图12A和12B所示,流动池1200流体地连接到仪器。仪器连接器1110与仪器连接端口1172接合。仪器连接端口1172包括气体出口端口1177(图12B)、流体入口1176(图12B)和液体出口1178(图12B)。仪器连接器1110的通道1116和1117分别通过挠性管1191和1192流体连接到流动池连接器1180。仪器连接器1110可以用手与仪器连接端口1172接合,因为连接器1110具有可压缩的挂钩1120(图12B),该挂钩可与仪器连接端口1176上的互补闩锁配合。

[0208] 图12A中还示出了蠕动泵1050,蠕动泵1050具有转子,该转子与挠性管1193接触,

以在气泡发生器1100(图8)的上游施加正压。挠性管1193从仪器连接器1110的孔1130穿过蠕动泵1050的转子,然后进入仪器连接器1110的孔1131。在图12A和图12B中还示出了预加载1951。

[0209] 关于图13,流动池1200包括与流动池端口1190接合的流动池连接器1180。流动池连接器1180包括用于检测通道1201(图8)的入口1211和用于检测通道1202(图8)的出口1222。仪器连接器1110被配置为将挠性管1191流体地连接到通道入口1211并且将挠性管1192连接到通道出口1222。类似地,流动池连接器1180可以用手与流动池连接端口1190接合,因为连接器1180具有适合于闩锁1198的可压缩挂钩1181和闩锁1195的可压缩挂钩1185。

[0210] 图14A示出了左侧仪器连接器1110的分解图,其将系统1000的流体部件连接至流动池。图14B示出了右侧仪器连接器1160的分解图,其将系统1000的流体部件连接至流动池。为了便于说明,仪器连接器1160的几个元件与仪器连接器1110中具有相似功能的元件编号相同。仪器连接器1100包括两个塑料件1121和1122,它们可以被组装以容纳气泡发生器1100。这两部分可以卡在一起,通过压缩配件固定在适当的位置。零件1122上的压缩配件1113-1115的凸形部件卡入零件1121上的凹形配件1133-1135。气泡发生器1100装配在部件1121上的袋1111内,并装配在部件1122上的类似袋内。

[0211] 当连接器1100被组装时,气泡发生器1100的液体入口端口1161与挠性管1193(图12A和12B)流体连通。挠性管1193(图12A和12B)通过出口端口1178(图10)连接到旋转阀1550(图11),穿过连接器1110的通道1119,然后穿出孔1130(图12A)以绕蠕动泵1050(图12A)上的转子循环。然后,挠性管1193(图12A和12B)通过孔1131(图12A)重新进入连接器1110,并穿过通道1118,在此通道中挠性管1193(图12A和12B)连接到气泡发生器1100上的液体入口端口1161。连接器1110的通道1116连接到挠性管1191(图13),使得在流体端口1162处离开气泡发生器1100的泡沫被引导到检测通道1201(图8)的入口1211(图8和13)。仪器连接器1110还包括通道1112,该通道将核酸测序系统1000的气体传输部件连接到气泡发生器1100。更具体地,来自气体输送部件的气体从气体出口端口1177(图10)通过通道1112转移到气泡发生器1100上的气体入口端口1163(图15A)。

[0212] 仪器连接器1110上还包括通道1117,通道1117将挠性管1192(图13)连接到仪器流体入口端口1176(图10)。这样,经由出口1222(图8)离开检测通道1202(图8)的泡沫可以穿过挠性管1192(图13),然后穿过通道1117(图14A),然后穿过仪器流体入口端口1176(图10)到达通向流体传感器1600或1601(图8)的路由歧管,然后是下游的选择阀1700(图8)到达废液箱1800(图8)。

[0213] 图15A示出了气泡发生器1100,图15B示出了气泡发生器1100的分解图,图15C示出了气泡发生器1100的零件1169的内部,图15D示出了气泡发生器1100的零件1168。气泡发生器1100的两个外部零件1168和1169(图15B)通过在脊1170(图15B和15C)和槽1171(图15D)之间的压缩配合而装配在一起。外部零件1169包括进气口1163(图15B和15C)。外部零件1168包括液体入口端口1161和泡沫出口端口1162(图15A、15B和15D)。当组装时,两个零件覆盖垫圈1164(图15B)和具有孔阵列的疏水膜1165(图15B)。膜上的孔的直径在 $1\mu\text{m}$ 至 $80\mu\text{m}$ 之间,在该图的分辨率下不可见。如图15B所示,垫圈1164具有细长的狭缝,当其夹在上部零件1168的表面1166和薄膜1165之间时,形成一条流体通道,以使液体从液体入口端口1161

和泡沫出口端口1162流出。通过垫圈形成的通道的液体将吸收从膜1165进入通道的气泡，从而产生泡沫。

[0214] 气体从诸如包括惰性气体或稀有气体的气体罐的压缩空气源1350进入核酸测序系统1000。或者，压缩空气源1350是配置成将大气空气输送到气泡发生器1100的空气压缩机。压缩空气源1350在输送到气泡发生器的气体上产生正压。有用的空气压缩机是Eagle EA 2000，它具有115V、44dBA、3.5Amp单相电动机；并且具有单级、无油、50%占空比的泵，其CFM额定值为90PSI，最大PSI为125。来自压缩空气源1350的气体被输送到气动控制器1300，气动控制器1300被配置为调节和修改从一个或多个源到液体中的气体的输送。气动控制器1300被配置为例如在2至50psi之间的范围内改变气体的压力。

[0215] 示例3

[0216] 内部具有流体泡沫的流动池

[0217] 一种示例性的流动池包括固定在流动池通道内的三元复合物。所述三元复合物包括聚合酶、引发的模板核酸和用于所述模板的下一个正确的核苷酸；以及与所述流动池通道中的三元复合物接触的流体泡沫。所述流体泡沫在液体中包括多个气泡。所述流体泡沫包括的气泡的体积分数至少为流动池通道中流体泡沫总体积的25%。气泡的平均有效直径至多为流动池通道横截面直径的95%。

[0218] 可选地，流动池中的聚合酶附着于外源发光标记。替代地或另外地，下一个正确的核苷酸可以附着于外源发光标记。

[0219] 无论是否具有标记的组分，三元复合物都可以存在于固定在流动细胞通道内部的核酸阵列的位点。可选地，阵列包括至少 $1 \times 10^3$ 个具有固定的三元复合物的位点。可选地，阵列中每个位点的平均面积小于25平方微米。每个位点可包括一组核酸，每个组包括具有共同模板序列的核酸。

[0220] 三元复合物可通过将引发的模板核酸附着到流动池通道的内表面而固定在流动池中。例如，三元复合物可通过将引发的模板核酸附着至流动池通道内的珠粒而固定。可以通过与引物5'端连接，与模板3'端连接或与模板5'端连接来固定引物模板核酸。

[0221] 流体泡沫可以在正压下流过流动池通道。然而，在使用过程中，流体泡沫在至少一段时间内可能是静态的。流体泡沫中的气泡可以基本上不含氧气，例如代替包括惰性气体或稀有气体。替代地，流体泡沫可以由包括大气或氧气的气泡组成。

[0222] 除了固定的组分外，流动池还可以包括在流体泡沫的液相中溶剂化的自由组分。例如，流体泡沫可以包括游离核苷酸。游离核苷酸可以以任何期望的浓度存在，例如以至少50nM的浓度存在。游离核苷酸可具有外源发光标记、封闭部分（例如可逆终止子部分），两种类型的部分或没有两种类型的部分。无论流体泡沫是否包括游离核苷酸，流体泡沫都可以包括游离聚合酶。聚合酶可以任何期望的浓度存在，例如，至少5单位/ml的浓度。

[0223] 可选地，检测通道的横截面面积最多为 $100\text{mm}^2$ 。替代地或附加地，检测通道的横截面积至少为 $100\mu\text{m}^2$ 。可以调节检测通道的长度和横截面积，以容纳所需体积的流体泡沫。例如，检测通道的体积最多可以为1ml。替代地或另外地，检测通道的体积为至少 $1\mu\text{l}$ 。可以例如以本领域已知的规模使用其他通道尺寸，例如微流体规模或纳米流体规模。

[0224] 流动池的检测通道可以可选地包括光学透明的窗口，通过该窗口可以看到三元复合物。该窗口对于用于检测的光的波长可以是光学透明的。例如，窗口可以对紫外光、可见

光或红外光中的一种或多种透明。

[0225] 三元复合物的引发的模板核酸可以包括可逆终止的引物或具有可延伸的3'末端的引物(即,引物可以具有3'羟基部分)。可选地,三元复合物可以是稳定的三元复合物。然而,三元复合物也可以在将下一个正确核苷酸掺入引物中的反应过程中形成。这样,三元复合物无需稳定或被抑制参与聚合酶催化的引物延伸。

[0226] 可选地,流体泡沫中的气泡可以具有小于500 $\mu\text{m}$ 的平均有效直径。替代地或附加地,流体泡沫中的气泡可以具有大于500nm的平均有效直径。流体泡沫可以包括表面活性剂、粘度剂或其他化学物质,其改变泡沫中气泡的稳定性、尺寸或其他性质。

[0227] 在整个本申请中,已经引用了各种出版物、专利和/或专利申请。这些文件的全部公开内容通过引用结合在本申请中。

[0228] 已经描述了多个实施例。然而,将理解,可以进行各种修改。因此,其他实施例在所附权利要求的范围内。

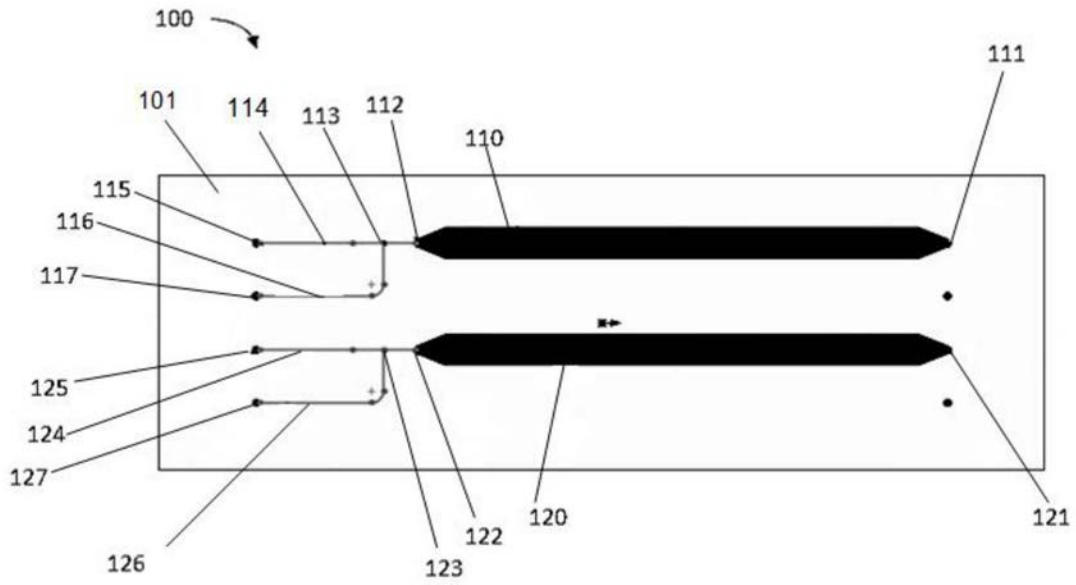


图1

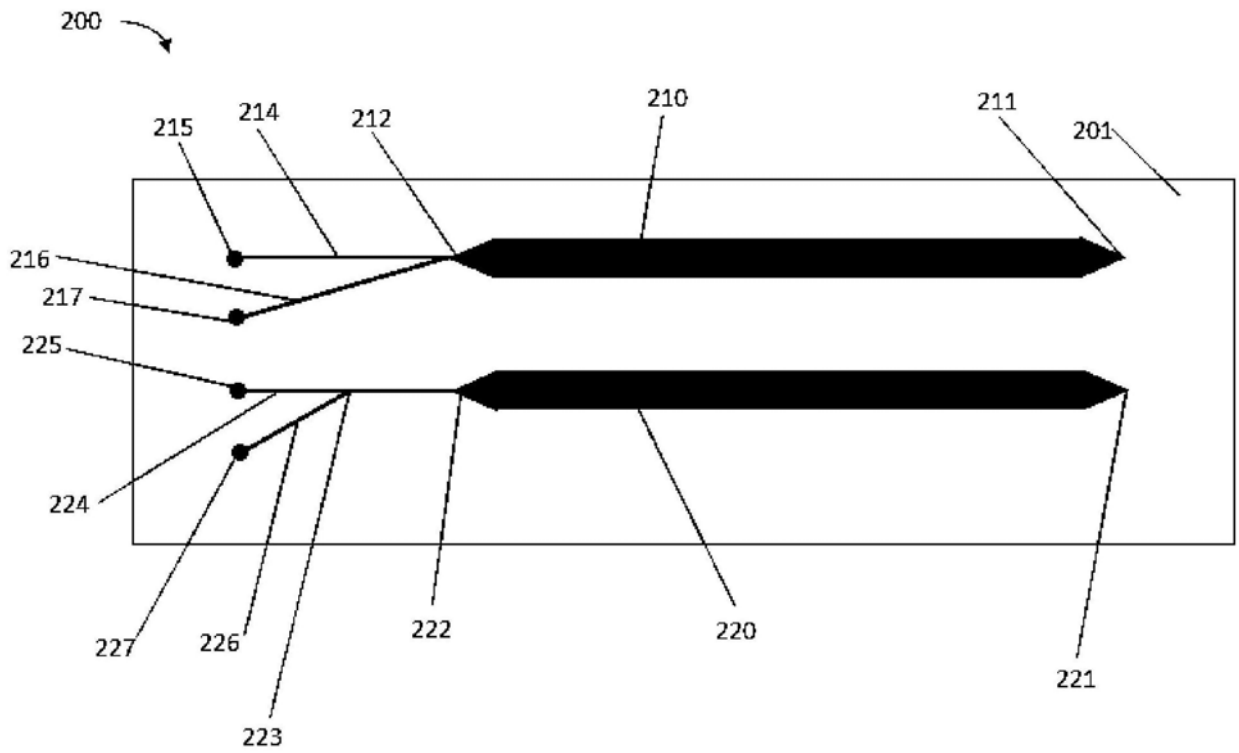


图2

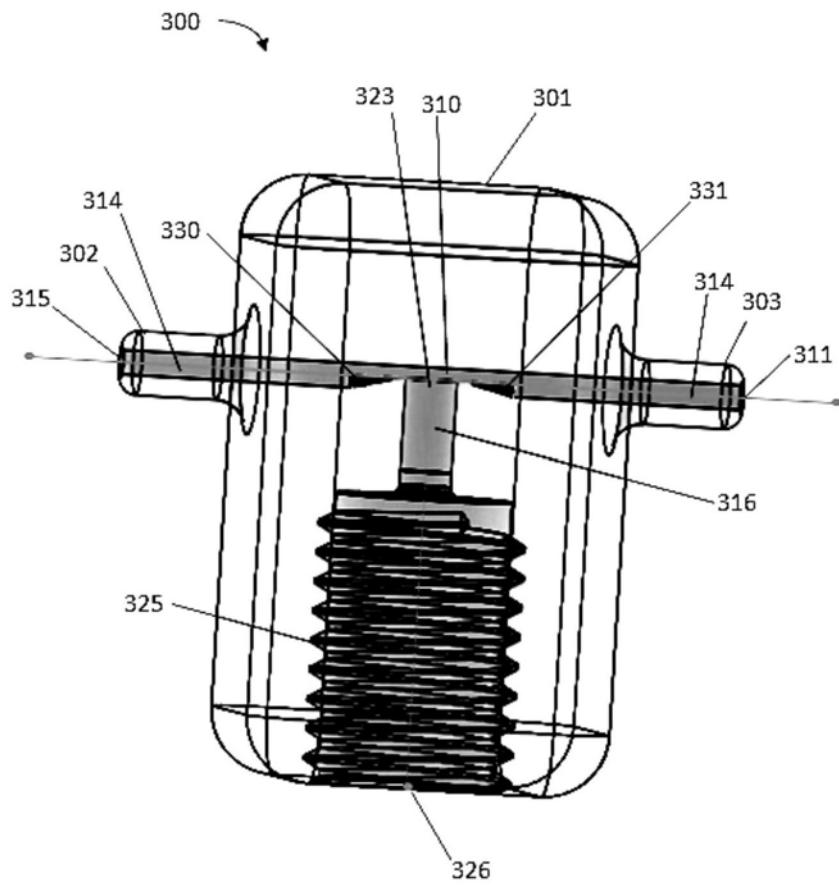


图3

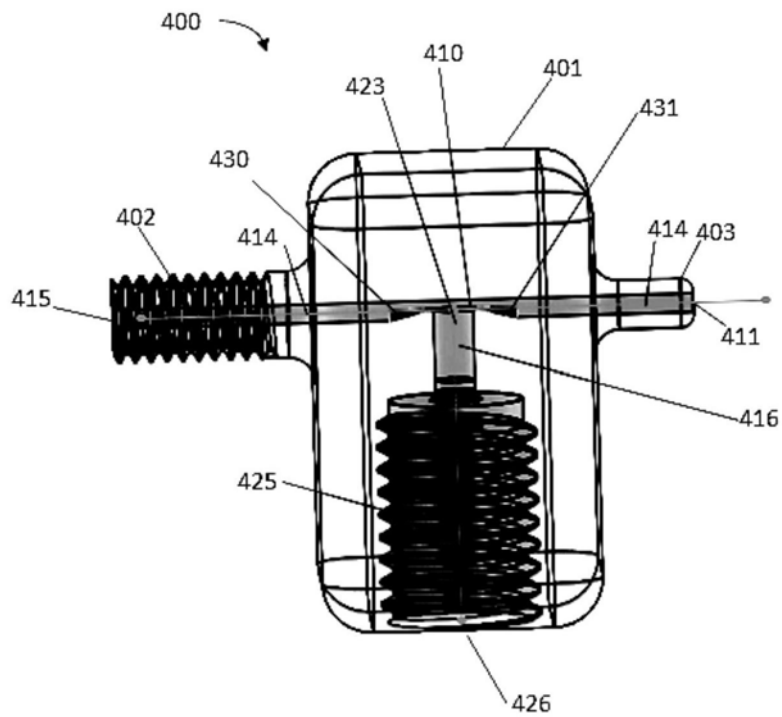


图4

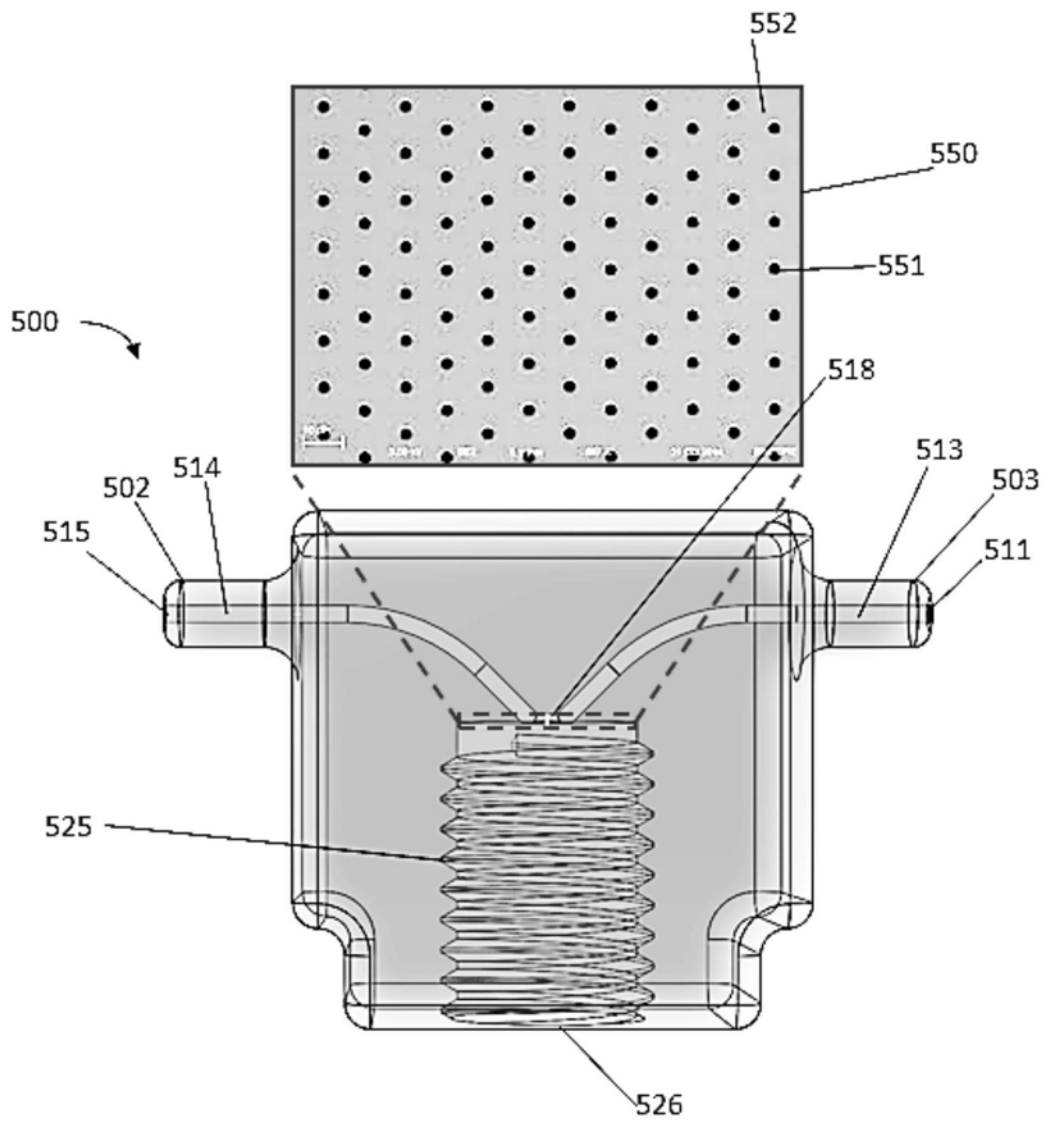


图5



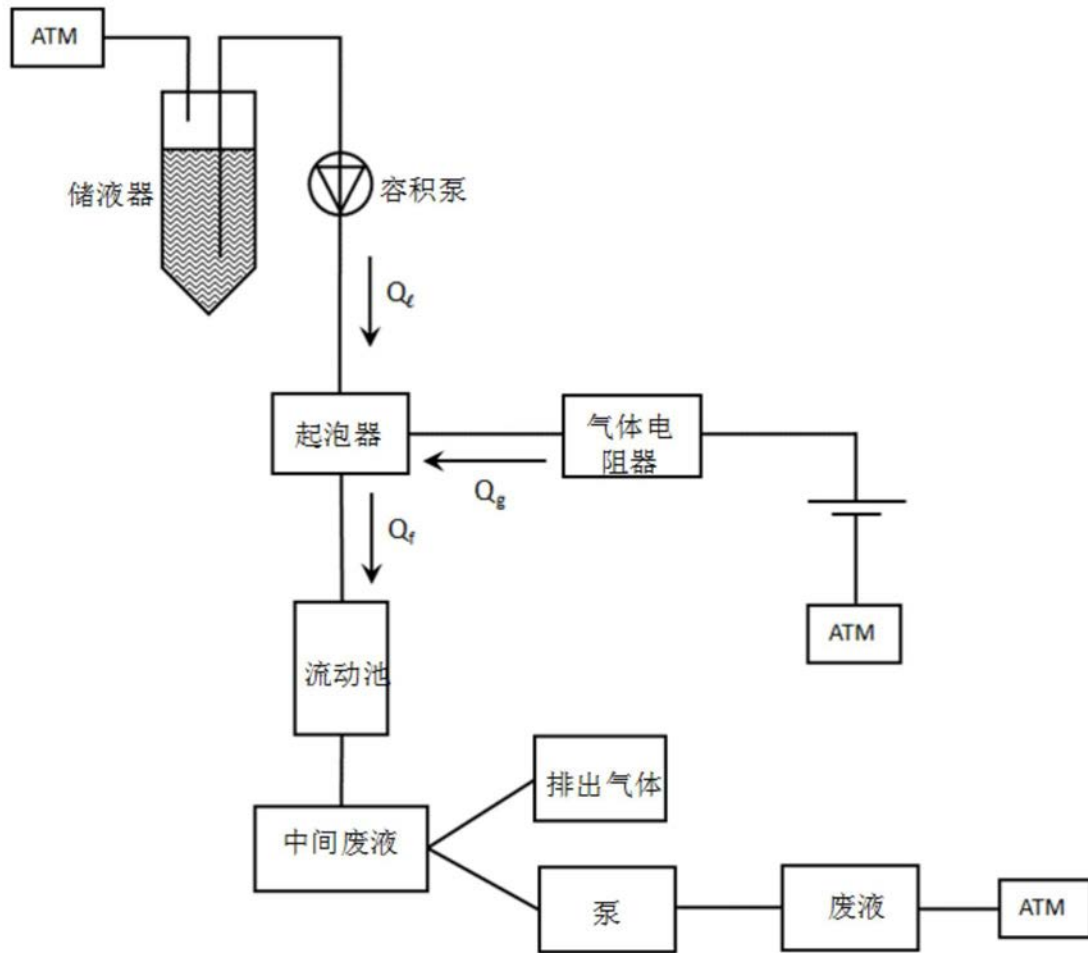
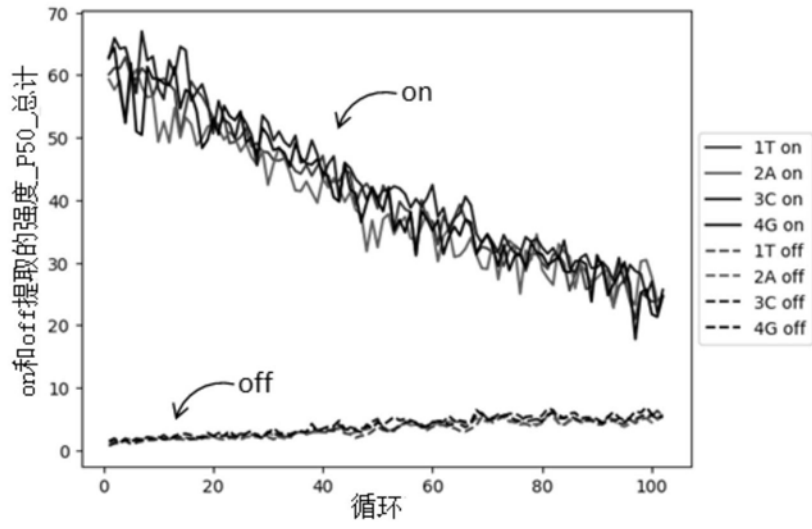


图6

A ( 无气泡 )



B ( 有气泡 )

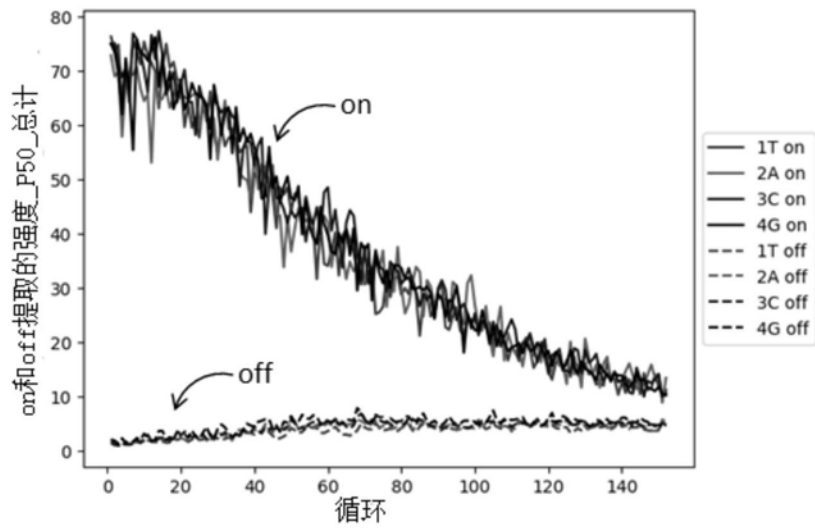


图7

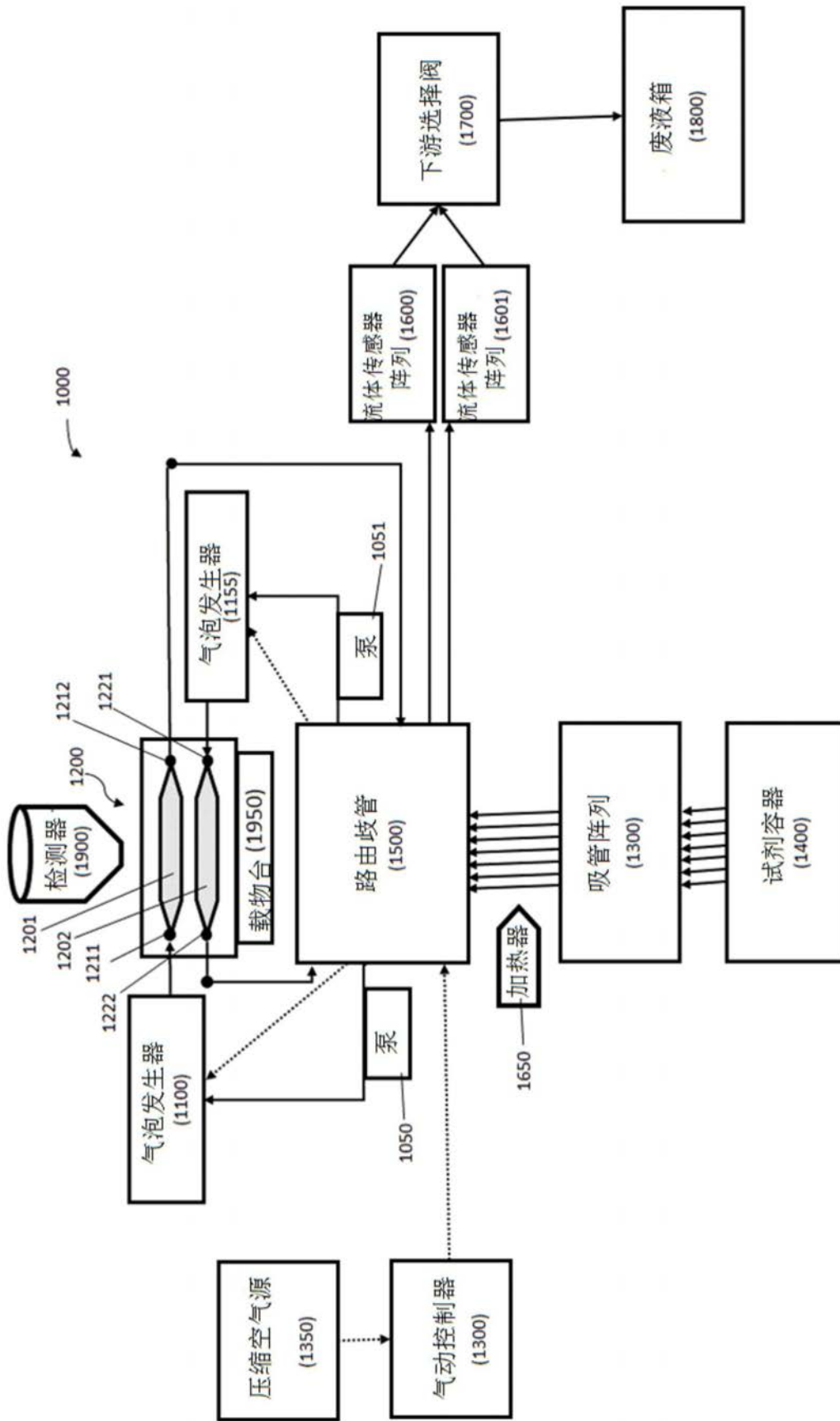


图8

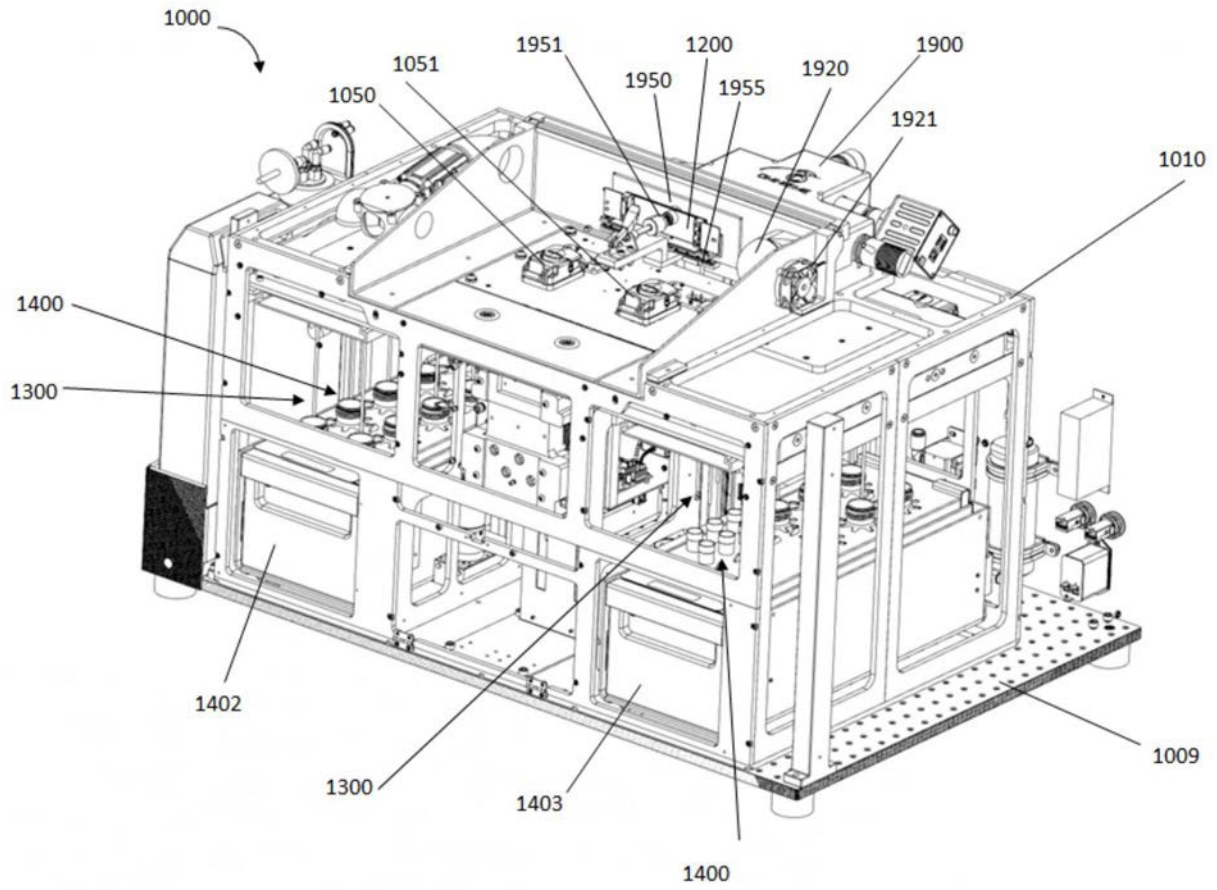


图9

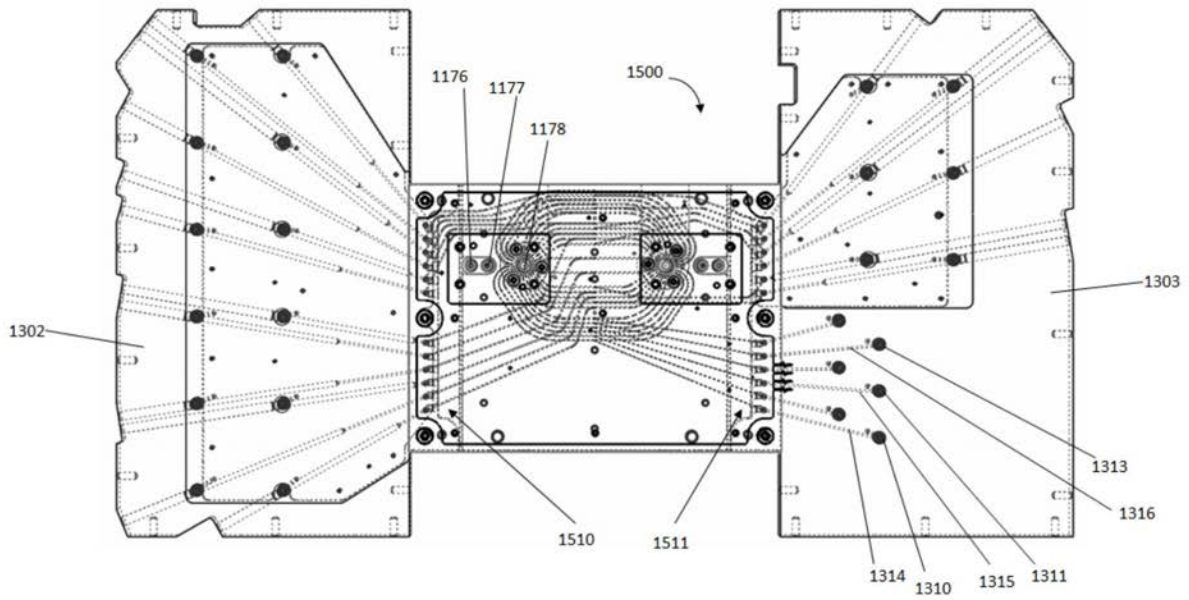


图10

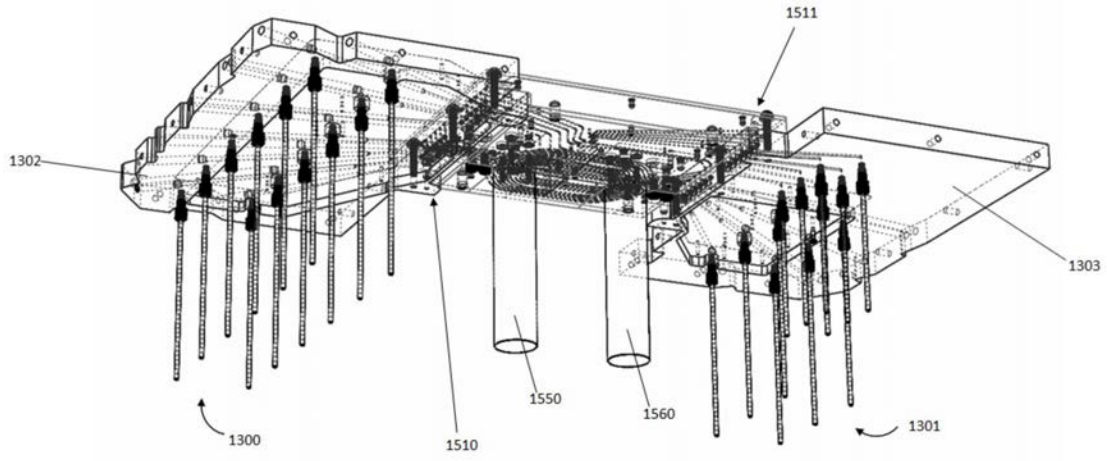


图11

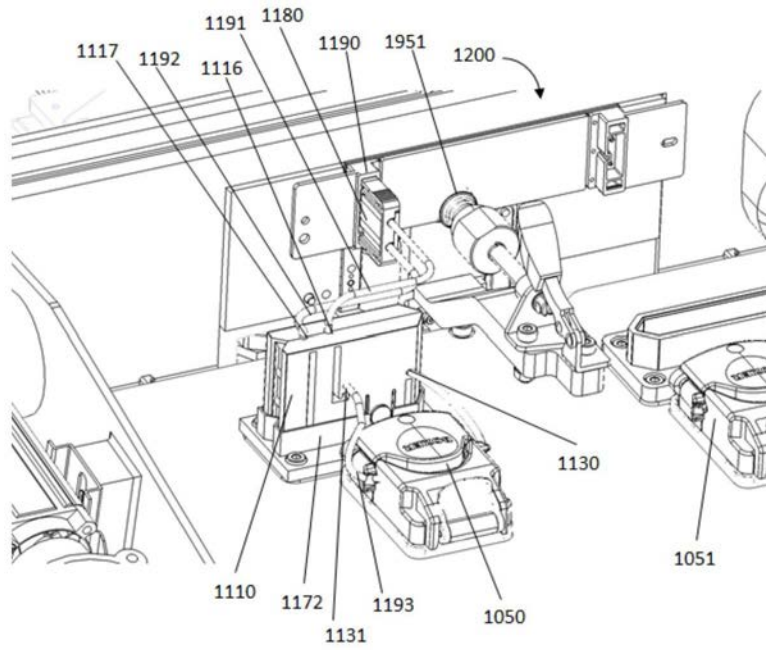


图12A

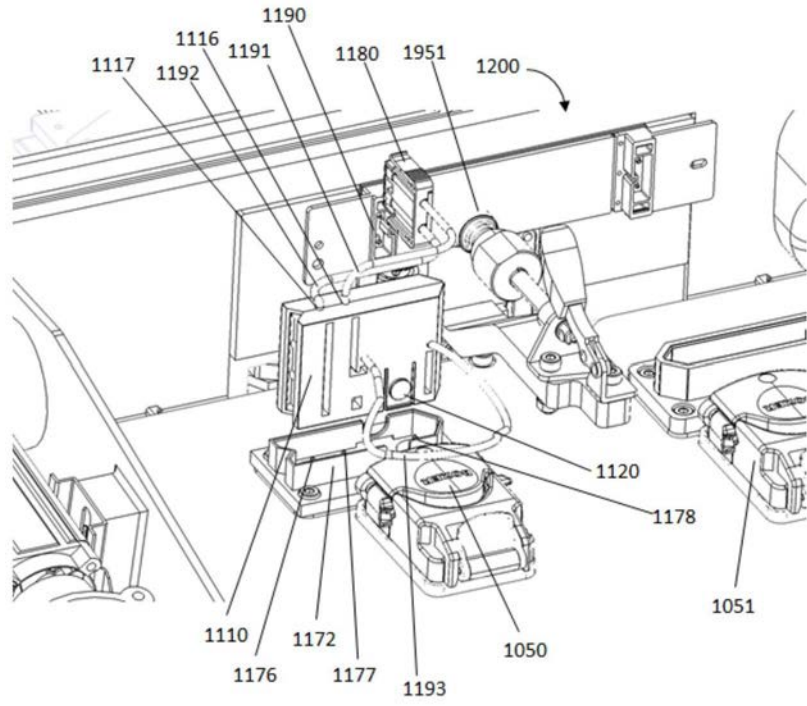


图12B

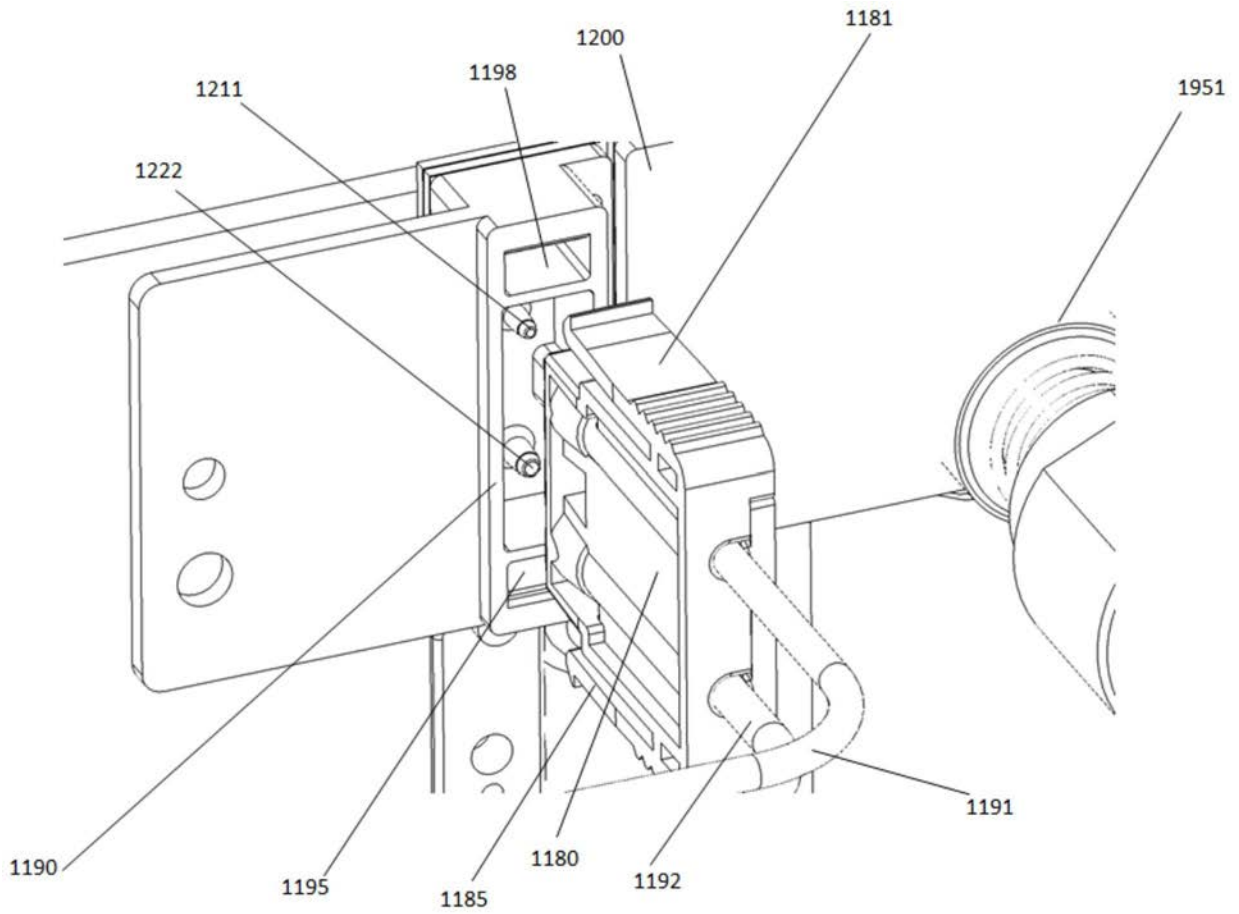


图13

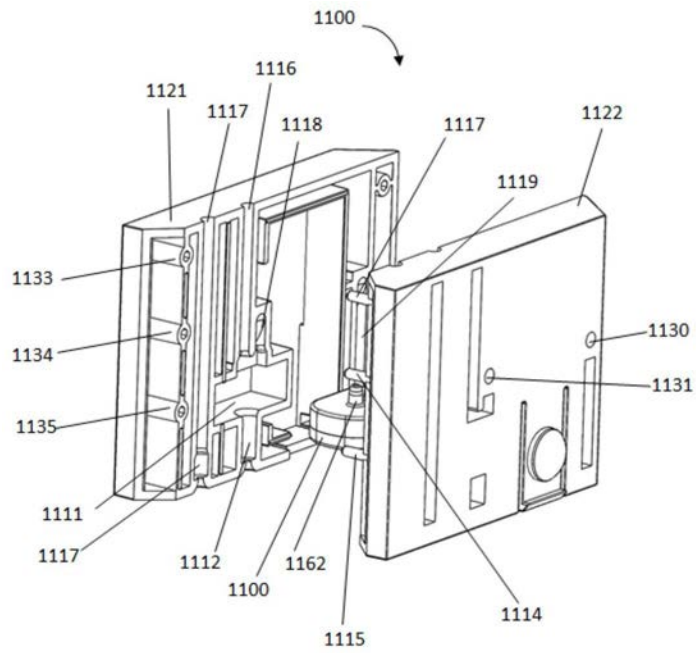


图14A

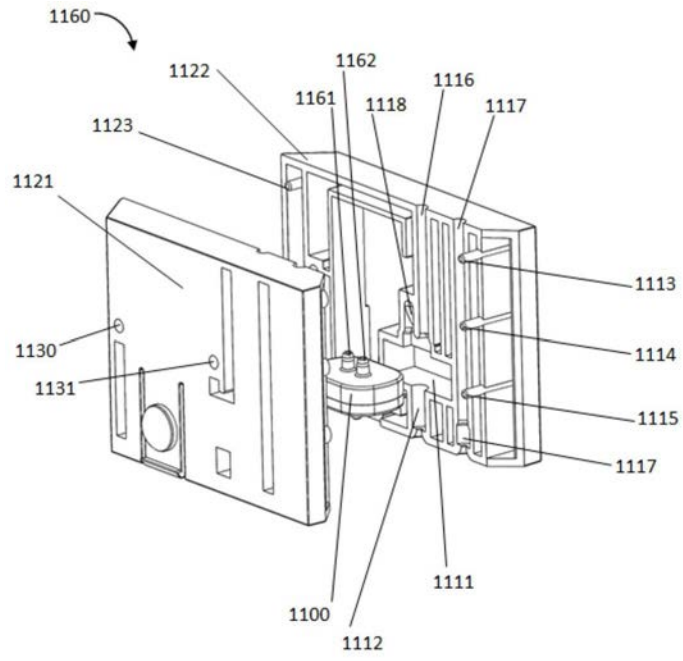


图14B

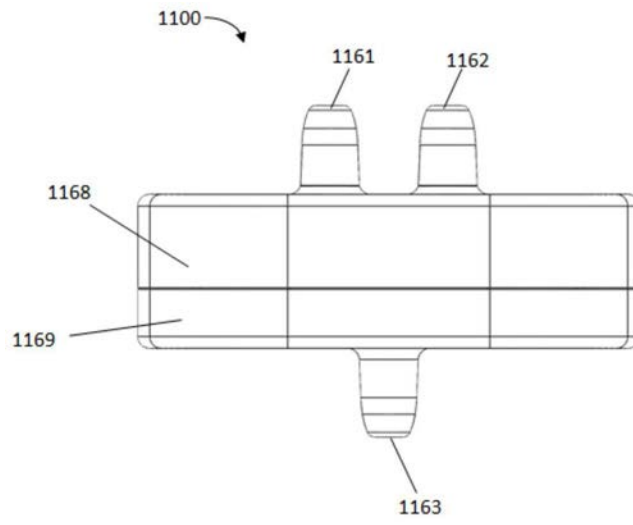


图15A



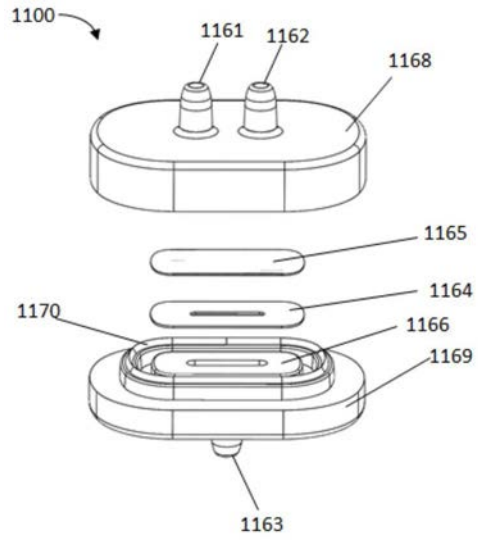


图15B

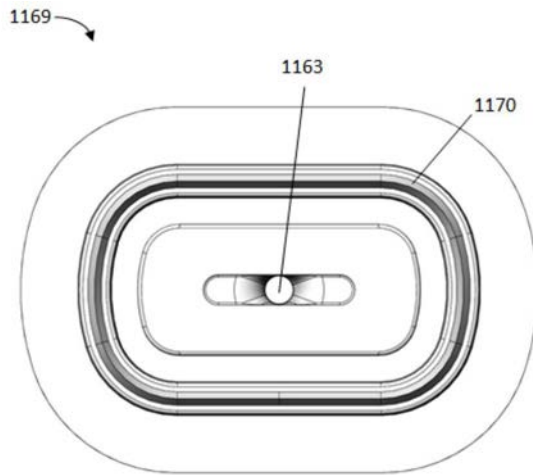


图15C

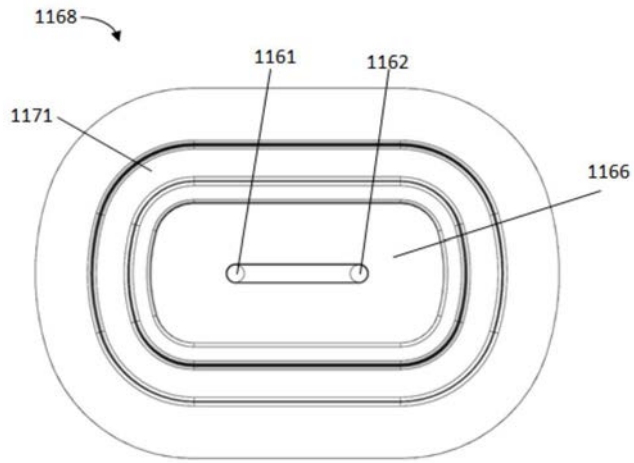


图15D