



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108351349 A

(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201580084421.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.09.10

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.08

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/049341 2015.09.10

(87)PCT国际申请的公布数据
W02017/044100 EN 2017.03.16

(71)申请人 因斯利克萨公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 奥尔延·哈斯比 卡沙玛·吉拉格
阿伦·马尼卡姆 瑞图哈·辛格

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 刘晓杰

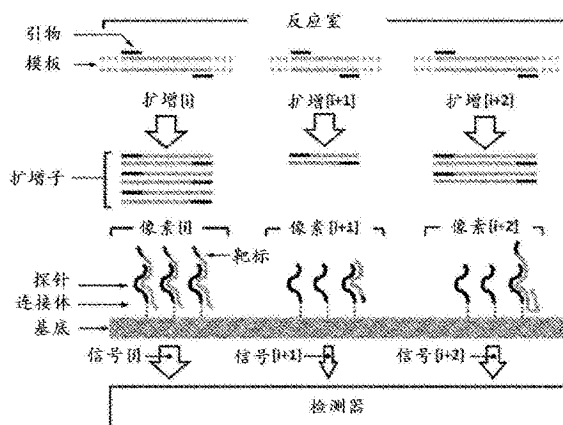
权利要求书5页 说明书26页 附图17页

(54)发明名称

用于多路定量核酸扩增的方法和系统

(57)摘要

本公开内容提供了在单个反应室中实现同时多路化扩增反应和实时检测的方法、装置和系统。本公开内容的方面提供了用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的方法。在本文提供的方面的一些实施方案中,在探针与所述靶核酸分子和/或限制引物结合时产生至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,反应混合物包含多种模板核酸分子,并且所述探针与作为所述多种模板核酸分子的扩增产物的多种靶核酸分子特异性结合。



1. 一种用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的方法,该方法包括:

(a) 提供包含疑似含有所述至少一种模板核酸分子的核酸样品、引物对和聚合酶的反应混合物,其中所述引物对与所述模板核酸分子具有序列互补性,并且其中所述引物对包含限制引物和过量引物;

(b) 在产生所述至少一种靶核酸分子作为所述模板核酸分子的扩增产物的条件下,使所述反应混合物进行核酸扩增反应;

(c) 使所述反应混合物与传感器阵列接触,该传感器阵列具有(i) 基底,其包含固定于所述基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子和/或所述限制引物,以及(ii) 检测器阵列,其被配置为检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子和/或所述限制引物的所述存在或不存在;

(d) 在所述核酸扩增反应过程中的多个时间点,使用所述检测器阵列检测来自一个或多个所述可寻址位置的所述至少一种信号;以及

(e) 基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子和/或所述限制引物的所述存在或不存在。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述探针与所述靶核酸分子和/或所述限制引物结合时产生所述至少一种信号。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述反应混合物包含多种模板核酸分子,并且所述探针与作为所述多种模板核酸分子的扩增产物的多种靶核酸分子特异性结合。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述反应混合物包含具有不同核酸序列的多个限制引物,并且所述探针与所述多个所述限制引物特异性结合。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中在反应室中提供所述反应混合物,该反应室被配置为容纳所述反应混合物并允许所述探针与所述靶核酸分子和/或所述限制引物结合。

6. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括通过分析所述探针与所述靶核酸分子或所述限制引物的结合速率,将在多个时间点检测到的所述至少一种信号与所述至少一种模板核酸分子的初始浓度相关联。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述探针为寡核苷酸。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶核酸分子在与单独探针杂交时形成发夹环。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种信号为指示能量受体与能量供体之间相互作用的光信号。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述能量受体猝灭所述能量供体的光学活性。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述能量受体与所述过量引物和/或所述限制引物偶联。

13. 根据权利要求10所述的方法,其中所述能量受体与所述靶核酸分子偶联。

14. 根据权利要求10所述的方法,其中所述能量受体为猝灭剂。

15. 根据权利要求10所述的方法,其中所述能量供体为荧光团。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种信号为指示光学活性种类的活性的光信号。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述光学活性种类为嵌入剂。
18. 根据权利要求16所述的方法,其中所述光学活性种类为荧光团。
19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一种信号为指示电极与氧化还原标记物之间相互作用的电信号。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述氧化还原标记物与所述过量引物和/或所述限制引物偶联。
21. 根据权利要求19所述的方法,其中所述氧化还原标记物与所述靶核酸分子偶联。
22. 根据权利要求1所述的方法,其中(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的增加。
23. 根据权利要求1所述的方法,其中(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的减少。
24. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的至少一个光检测器。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。
26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的至少一个电检测器。
27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。
28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述探针经由连接体固定于所述表面。
29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述连接体包含选自氨基酸、多肽、核苷酸和寡核苷酸的种类。
30. 根据权利要求1所述的方法,其中以至少约90%的灵敏度检测所述靶核酸分子。
31. 根据权利要求1所述的方法,其中当包含所述靶核酸分子的所述反应混合物与所述传感器阵列流体接触时,检测所述至少一种信号。
32. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括检测来自所述传感器阵列的至少一种对照信号。
33. 根据权利要求1所述的方法,其中实时检测所述至少一种信号。
34. 一种用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的方法,该方法包括:
 - (a) 提供包含核酸样品、引物对、聚合酶和用报道分子标记的核苷酸的反应混合物,其中所述核酸样品疑似含有所述至少一种模板核酸分子,并且其中所述引物对与所述模板核酸分子具有序列互补性;
 - (b) 在产生所述至少一种靶核酸分子作为所述模板核酸分子的扩增产物的条件下,使所述反应混合物进行核酸扩增反应,该核酸扩增反应将所述核苷酸并入所述模板核酸分子中;
 - (c) 使所述反应混合物与传感器阵列接触,该传感器阵列包含(i) 基底,其包含固定于所述基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子,以及(ii) 检测器阵列,其被配置为在所述报道分子与至少一种所述探针相互作用时检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子的

所述存在或不存在的;

(d) 在所述核酸扩增反应过程中的多个时间点,使用所述检测器阵列检测来自一个或多个所述可寻址位置的所述至少一种信号;以及

(e) 基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子的所述存在或不存在的。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中在所述探针与包含所述报道分子的所述靶核酸分子结合时产生所述至少一种信号。

36. 根据权利要求34所述的方法,其中在反应室中提供所述反应混合物,该反应室被配置为容纳所述反应混合物并允许所述探针与所述靶核酸分子结合。

37. 根据权利要求34所述的方法,其中所述核苷酸为脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)。

38. 根据权利要求34所述的方法,其中所述探针为寡核苷酸。

39. 根据权利要求34所述的方法,其中所述靶核酸分子在与单独探针杂交时形成发夹环。

40. 根据权利要求34所述的方法,其中所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器。

41. 根据权利要求34所述的方法,其中所述报道分子为能量受体。

42. 根据权利要求34所述的方法,其中所述至少一种信号为指示所述能量受体与能量供体之间相互作用的光信号。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述能量受体猝灭所述能量供体的光学活性。

44. 根据权利要求42所述的方法,其中所述能量受体为猝灭剂。

45. 根据权利要求42所述的方法,其中所述能量供体为荧光团。

46. 根据权利要求34所述的方法,其中所述至少一种信号为指示光学活性种类的活性的光信号。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述光学活性种类为嵌入剂。

48. 根据权利要求46所述的方法,其中所述光学活性种类为荧光团。

49. 根据权利要求34所述的方法,其中所述报道分子为氧化还原标记物。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述至少一种信号为指示电极与所述氧化还原标记物之间相互作用的电信号。

51. 根据权利要求34所述的方法,其中(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的增加。

52. 根据权利要求34所述的方法,其中(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的减少。

53. 根据权利要求34所述的方法,其中所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的光检测器。

54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。

55. 根据权利要求34所述的方法,其中所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的电检测器。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。

57. 根据权利要求34所述的方法,其中所述探针经由连接体固定于所述表面。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述连接体包含选自氨基酸、多肽、核苷酸和寡核苷酸的种类。

59. 根据权利要求34所述的方法,其中以至少约90%的灵敏度检测所述靶核酸分子。

60. 根据权利要求34所述的方法,进一步包括检测来自所述传感器阵列的至少一种对照信号。

61. 根据权利要求34所述的方法,其中实时检测所述至少一种信号。

62. 根据权利要求34所述的方法,其中所述报道分子为猝灭剂。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述探针用荧光团进行标记。

64. 根据权利要求34所述的方法,其中所述报道分子为荧光团。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述探针用猝灭剂进行标记。

66. 一种用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的系统,该系统包含:

(a) 反应室,其被配置为(i) 容纳包含疑似含有所述至少一种模板核酸分子的核酸样品、与所述模板核酸分子具有序列互补性的引物对和聚合酶的反应混合物,其中所述引物对包含限制引物和过量引物,以及(ii) 促进所述反应混合物的核酸扩增反应,以产生作为所述模板核酸的扩增产物的至少一种靶核酸分子;

(b) 传感器阵列,其包含(i) 基底,其包含固定于所述基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子和/或所述限制引物;以及(ii) 检测器阵列,其被配置为检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子和/或所述限制引物的存在或不存在;以及

(c) 计算机处理器,其与所述传感器阵列耦合并被编程为(i) 使所述反应混合物进行所述核酸扩增反应,以及(ii) 在所述核酸扩增反应过程中的多个时间点检测来自一个或多个所述可寻址位置的所述至少一种信号。

67. 根据权利要求66所述的系统,其中所述计算机处理器被编程为当包含所述靶核酸分子的所述反应混合物与所述传感器阵列流体接触时检测所述至少一种信号。

68. 根据权利要求66所述的系统,其中所述计算机处理器被编程为实时检测所述至少一种信号。

69. 根据权利要求66所述的系统,其中所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的光检测器。

70. 根据权利要求69所述的系统,其中所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。

71. 根据权利要求66所述的系统,其中所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的电检测器。

72. 根据权利要求71所述的系统,其中所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。

73. 根据权利要求66所述的系统,其中所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器。

74. 根据权利要求66所述的系统,其中所述计算机处理器被编程为基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子和/或所述限制引物的所述存在或不存在。

75. 一种用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的系统,该系统包含:

(a) 反应室,其被配置为(i) 容纳包含疑似含有所述至少一种模板核酸分子的核酸样

品、与所述模板核酸分子具有序列互补性的引物对、聚合酶和用报道分子标记的核苷酸的反应混合物,以及(ii)促进所述反应混合物的核酸扩增反应,以产生作为所述模板核酸的扩增产物的至少一种靶核酸分子,该核酸扩增反应将所述核苷酸并入所述模板核酸分子中;

(b) 传感器阵列,其包含(i)基底,其包含固定于所述基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子,以及(ii)检测器阵列,其被配置为在所述报道分子与至少一种所述探针相互作用时检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子的所述存在或不存在;以及

(c) 计算机处理器,其与所述传感器阵列耦合并被编程为(i)使所述反应混合物进行所述核酸扩增反应,以及(ii)在所述核酸扩增反应过程中的多个时间点检测来自所述可寻址位置的所述至少一种信号。

76. 根据权利要求75所述的系统,其中所述计算机处理器被编程为当包含所述靶核酸分子的所述反应混合物与所述传感器阵列流体接触时检测所述至少一种信号。

77. 根据权利要求75所述的系统,其中所述计算机处理器被编程为实时检测所述至少一种信号。

78. 根据权利要求75所述的系统,其中所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的光检测器。

79. 根据权利要求78所述的系统,其中所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。

80. 根据权利要求75所述的系统,其中所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的电检测器。

81. 根据权利要求80所述的系统,其中所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。

82. 根据权利要求75所述的系统,其中所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器。

83. 根据权利要求75所述的系统,其中所述计算机处理器被编程为基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子的所述存在或不存在。

用于多路定量核酸扩增的方法和系统

背景技术

[0001] 核酸靶标扩增测定如聚合酶链反应过程 (PCR) 可在体外扩增 (即, 复制) DNA 模板的特定核酸序列。由于靶标扩增测定可在大约数小时内选择性地使靶分子的拷贝数从仅几个增加到数十亿个, 从而使得靶标容易被检测到, 因此靶标扩增测定可能成为分子生物学和基因组学中强有力且广泛使用的工具。尽管在大多数情况下, 这种扩增和后续检测通常针对每一个反应体积的一种靶核酸分子进行, 但是在同一反应体积中有效地使测定多路化, 并允许在同一反应室内进行多个并行的靶标扩增和检测是十分令人感兴趣的。这样的方法不仅可以更好地利用“稀少的”原始 DNA 样品, 而且还可以显著降低与用于运行多个单重 (single-plex) 反应的流控技术和液体处理程序有关的任何复杂性。

发明内容

[0002] 本文认识到目前可用的多重 PCR 方法所存在的各种问题。例如, 虽然多路化大量靶标扩增反应 (例如, 多重 PCR) 可能是可行的, 但同时检测多种扩增子并不简单。迄今为止, 多重 Q-PCR 方法 (被定义为在单个反应室中同时扩增和检测多个核酸序列的过程) 已应用于少数种扩增子, 通常少于十种。因此, 本文认识到对于实现多路核酸扩增和实时定量检测的方法和系统的需要。

[0003] 本公开内容提供了用于在单个反应室中扩增多种核酸序列并实时监测扩增过程以及定量地评估生成的产物的方法、装置和系统。

[0004] 本公开内容的一个方面提供了用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的方法, 该方法包括: (a) 提供包含疑似含有至少一种模板核酸分子的核酸样品、引物对和聚合酶的反应混合物, 其中所述引物对与所述模板核酸分子具有序列互补性, 并且其中所述引物对包含限制引物和过量引物; (b) 在产生所述至少一种靶核酸分子作为所述模板核酸分子的扩增产物的条件下, 使所述反应混合物进行核酸扩增反应; (c) 使所述反应混合物与传感器阵列接触, 该传感器阵列具有 (i) 基底, 其包含固定于基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针, 其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子和/或所述限制引物, 以及 (ii) 检测器阵列, 其被配置为检测来自所述可寻址位置的至少一种信号, 其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子和/或所述限制引物的存在或不存在; (d) 在核酸扩增反应过程中的多个时间点, 使用所述检测器阵列检测来自一个或多个所述可寻址位置的至少一种信号; 以及 (e) 基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子和/或所述限制引物的存在或不存在。

[0005] 在本文提供的方面的一些实施方案中, 在所述探针与所述靶核酸分子和/或所述限制引物结合时产生所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中, 所述反应混合物包含多种模板核酸分子, 并且所述探针与作为所述多种模板核酸分子的扩增产物的多种靶核酸分子特异性结合。在本文提供的方面的一些实施方案中, 所述反应混合物包含具有不同核酸序列的多个限制引物, 并且所述探针与所述多个限制引物特异性结合。在本文提供的方面的一些实施方案中, 在反应室中提供所述反应混合物, 该反应室被配置为容纳所述反应混合物并允许所述探针与所述靶核酸分子和/或所述限制引物结合。在本文提

供的方面的一些实施方案中,所述方法进一步包括通过分析所述探针与所述靶核酸分子或所述限制引物的结合速率,将在多个时间点检测到的至少一种信号与所述至少一种模板核酸分子的初始浓度相关联。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述探针为寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述靶核酸分子在与单独探针杂交时形成发夹环。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器、至少约500个集成传感器、至少约1,000个集成传感器、至少约2,000个集成传感器、至少约5,000个集成传感器或至少约10,000个集成传感器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号为指示能量受体与能量供体之间相互作用的光信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量受体猝灭所述能量供体的光学活性。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量受体与所述过量引物和/或所述限制引物偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量受体与所述靶核酸分子偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量受体为猝灭剂。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量供体为荧光团。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号为指示光学活性种类的活性的光信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光学活性种类为嵌入剂。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光学活性种类为荧光团。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号为指示电极与氧化还原标记物之间相互作用的电信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述氧化还原标记物与所述过量引物和/或所述限制引物偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述氧化还原标记物与所述靶核酸分子偶联。在本文提供的方面的一些实施方案中,(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的增加。在本文提供的方面的一些实施方案中,(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的减少。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的至少一个光检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的至少一个电检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述探针经由连接体固定于所述表面。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述连接体包含选自氨基酸、多肽、核苷酸和寡核苷酸的种类。在本文提供的方面的一些实施方案中,以至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.9%或至少约99.99%的灵敏度检测所述靶核酸分子。在本文提供的方面的一些实施方案中,当包含所述靶核酸分子的反应混合物与所述传感器阵列流体接触时,检测所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述方法进一步包括检测来自所述传感器阵列的至少一种对照信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,实时检测所述至少一种信号。

[0006] 本公开内容的另一个方面提供了用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的方法,该方法包括:(a)提供包含核酸样品、引物对、聚合酶和用报告分子标记的核苷酸的反应混合物,其中所述核酸样品疑似含有至少一种模板核酸分子,并且其中所述引物对与所述模板核酸分子具有序列互补性;(b)在产生所述至少一种靶核酸分子作为所述模板核酸分子的扩增产物的条件下,使所述反应混合物进行核酸扩增反应,该核酸扩增反应将所述核苷酸并入所述模板核酸分子中;(c)使所述反应混合物与传感器阵列接触,该传感器阵列包含(i)基底,其包含固定于基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述

探针能够捕获所述靶核酸分子,以及(ii)检测器阵列,其被配置为在所述报道分子与至少一种探针相互作用时检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子的存在或不存在;(d)在核酸扩增反应过程中的多个时间点,使用所述检测器阵列检测来自一个或多个所述可寻址位置的至少一种信号;以及(e)基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子的存在或不存在。

[0007] 在本文提供的方面的一些实施方案中,在所述探针与包含所述报道分子的靶核酸分子结合时产生所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,在反应室中提供所述反应混合物,该反应室被配置为容纳所述反应混合物并允许所述探针与所述靶核酸分子结合。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述核苷酸为脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述探针为寡核苷酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述靶核酸分子在与单独探针杂交时形成发夹环。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器、至少约500个集成传感器、至少约1,000个集成传感器、至少约2,000个集成传感器、至少约5,000个集成传感器或至少约10,000个集成传感器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述报道分子为能量受体。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号为指示所述能量受体与能量供体之间相互作用的光信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量受体猝灭所述能量供体的光学活性。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量受体为猝灭剂。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述能量供体为荧光团。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号为指示光学活性种类的活性的光信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光学活性种类为嵌入剂。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光学活性种类为荧光团。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述报道分子为氧化还原标记物。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号为指示电极与所述氧化还原标记物之间相互作用的电信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的增加。在本文提供的方面的一些实施方案中,(d)包括测量所述至少一种信号相对于背景的减少。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的光检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含检测所述至少一种信号的电检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述探针经由连接体固定于所述表面。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述连接体包含选自氨基酸、多肽、核苷酸和寡核苷酸的种类。在本文提供的方面的一些实施方案中,以至少约90%、至少约95%、至少约98%、至少约99%、至少约99.9%或至少约99.99%的灵敏度检测所述靶核酸分子。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述方法进一步包括检测来自所述传感器阵列的至少一种对照信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,实时检测所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述报道分子为猝灭剂。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述探针用荧光团进行标记。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述报道分子为荧光团。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述探针用猝灭剂进行标记。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述至少一种信号指示所述猝灭剂与给定的一种荧光团之间的相互作用。

[0008] 本公开内容的另一个方面提供了用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的系统,该系统包含:(a)反应室,其被配置为(i)容纳包含疑似含有至少一种模板核酸分子的核酸样品、与所述模板核酸分子具有序列互补性的引物对和聚合酶的反应混合物,其中所述引物对包含限制引物和过量引物,以及(ii)促进所述反应混合物的核酸扩增反应,以产生作为所述模板核酸的扩增产物的至少一种靶核酸分子;(b)传感器阵列,其包含(i)基底,其包含固定于基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子和/或所述限制引物;以及(ii)检测器阵列,其被配置为检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子和/或所述限制引物的存在或不存在;以及(c)计算机处理器,其与所述传感器阵列耦合并被编程为(i)使所述反应混合物进行核酸扩增反应,以及(ii)在核酸扩增反应过程中的多个时间点检测来自一个或多个所述可寻址位置的至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述计算机处理器被编程为当包含所述靶核酸分子的反应混合物与所述传感器阵列流体接触时检测所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述计算机处理器被编程为实时检测所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的光检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的电检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述电检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器、至少约500个集成传感器、至少约1000个集成传感器、至少约2000个集成传感器、至少约5000个集成传感器或至少约10,000个集成传感器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述计算机处理器被编程为基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子和/或所述限制引物的存在或不存在。

[0009] 本公开内容的另一个方面提供了用于测定至少一种靶核酸分子的存在或不存在的系统,该系统包含:(a)反应室,其被配置为(i)容纳包含疑似含有至少一种模板核酸分子的核酸样品、与所述模板核酸分子具有序列互补性的引物对、聚合酶和用报道分子标记的核苷酸的反应混合物,以及(ii)促进所述反应混合物的核酸扩增反应,以产生作为所述模板核酸的扩增产物的至少一种靶核酸分子,该核酸扩增反应将所述核苷酸并入所述模板核酸分子中;(b)传感器阵列,其包含(i)基底,其包含固定于基底的表面上不同的单独可寻址位置的多个探针,其中所述探针能够捕获所述靶核酸分子,以及(ii)检测器阵列,其被配置为在所述报道分子与至少一种探针相互作用时检测来自所述可寻址位置的至少一种信号,其中所述至少一种信号指示所述靶核酸分子的存在或不存在;以及(c)计算机处理器,其与所述传感器阵列耦合并被编程为(i)使所述反应混合物进行核酸扩增反应,以及(ii)在核酸扩增反应过程中的多个时间点检测来自所述可寻址位置的至少一种信号。

[0010] 在本文提供的方面的一些实施方案中,所述计算机处理器被编程为当包含所述靶核酸分子的反应混合物与所述传感器阵列流体接触时检测所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述计算机处理器被编程为实时检测所述至少一种信号。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含能够检测所述至少一种信号的光检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述光检测器包含互补金属氧化物半导体(CMOS)器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含能够检测所述至

少一种信号的电检测器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述电检测器包含互补金属氧化物半导体 (CMOS) 器件。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述传感器阵列包含至少约100个集成传感器、至少约500个集成传感器、至少约1000个集成传感器、至少约2000个集成传感器、至少约5000个集成传感器或至少约10,000个集成传感器。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述计算机处理器被编程为基于所述至少一种信号鉴定所述靶核酸分子的存在或不存在。

[0011] 根据其中仅示出和描述了本发明的说明性实施方案的以下详细描述,本发明的附加方面和优势将对本领域技术人员变得显而易见。如将认识到的,本发明能够具有其他和不同的实施方案,并且其若干细节能够在各个明显的方面进行修改,所有这些均不脱离本发明。因此,附图和描述在本质上被认为是说明性的,而非限制性的。

援引并入

[0012] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用而并入本文,其程度犹如特别地且单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用而并入。

附图说明

[0013] 本发明的新颖特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下对利用本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述以及附图(本文也称为“图”),将获得对本发明的特征和优点的更好理解,在这些附图中:

[0014] 图1示意性地示出了示例性多路扩增和检测系统;

[0015] 图2示意性地示出了包括引物标记的示例性光学检测方法;

[0016] 图3示意性地示出了包括非标记扩增子的示例性光学检测方法;

[0017] 图4示意性地示出了包括受体标记的脱氧核苷酸三磷酸 (dNTP) 的示例性光学检测方法;

[0018] 图5示意性地示出了包括引物标记的示例性电检测方法;

[0019] 图6示意性地示出了包括非标记扩增子的示例性电检测方法;

[0020] 图7示意性地示出了包括氧化还原标记的脱氧核苷酸三磷酸 (dNTP) 的示例性电检测方法;

[0021] 图8显示了示例性不对称PCR扩增和常规PCR扩增方法中引物和扩增子的浓度;

[0022] 图9A-图9D显示了在示例性不对称PCR扩增和常规PCR扩增方法中测量的信号和鉴定的循环阈值 (C_t);

[0023] 图10显示了光学生物芯片检测器的示例性图像和示意图;

[0024] 图11显示了示例性光学生物芯片电路架构;

[0025] 图12显示了电生物芯片检测器的示例性图像和示意图;

[0026] 图13显示了示例性电生物芯片电路架构;

[0027] 图14A-图14C显示了检测芯片上PCR扩增的示例性方法;

[0028] 图15显示了示例性引物互补和对照互补的序列;

[0029] 图16显示了示例性阵列中测量的数据;

[0030] 图17显示了示例性阵列中测量的扩增数据;

[0031] 图18显示了示例性阵列中测量的信号;以及

[0032] 图19显示了被编程或以其他方式配置为实施本文提供的方法的示例性计算机控制系统。

具体实施方式

[0033] 尽管本文中已经示出并描述了本发明的各个实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下可想到多种变化、改变和替代。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案均可使用。

[0034] 如本文所用的术语“定量PCR”或“Q-PCR”通常是指可用于核酸序列的定性和定量测定的聚合酶链反应(PCR)过程。在一些情况下,Q-PCR与实时PCR同义。Q-PCR可涉及测量作为扩增循环的函数的扩增产物(或扩增子)的量,以及使用该信息来确定与原始样品中存在的扩增子相对应的核酸序列的量。

[0035] 如本文所用的术语“探针”通常是指可与特定靶核酸序列结合的分子种类或其他标志物。探针可以是任何类型的分子或颗粒。探针可包含分子,并且可直接或经由连接体分子与基底或其他固体表面结合。

[0036] 如本文所用的术语“检测器”通常是指通常包含可检测信号的光学和/或电子组件的装置。

[0037] 如本文所用的术语“突变”通常是指基因突变或序列变异,诸如点突变、单核苷酸多态性(SNP)、插入、缺失、置换、转座、易位、拷贝数变异,或另一种基因突变、改变或序列变异。

[0038] 如本文所用的术语“约”或“近”通常是指在指定量的 $\pm 15\%$ 、 10% 、 9% 、 8% 、 7% 、 6% 、 5% 、 4% 、 3% 、 2% 或 1% 内。

[0039] 如本文所用的术语“标记物”是指可与靶分子衔接,以使得通过提供靶分子不固有的独特特征来使靶分子可区分且可追踪的特定分子结构。

[0040] 如本文在化学或生物反应的上下文中所用的术语“限制”通常是指在给定反应体积中限制量(例如,化学计量上限制的)的种类,使得在化学或生物反应(例如,PCR)完成时,在反应体积中可能不存在所述种类。

[0041] 如本文在化学或生物反应的上下文中所用的术语“过量”通常是指在给定反应体积中过量(例如,化学计量上限制的)的种类,使得在化学或生物反应(例如,PCR)完成时,在反应体积中可能存在所述种类。

[0042] 如本文所用的术语“核苷酸”通常是指可充当核酸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)的单体或亚单位的分子。核苷酸可以是脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)或其类似物,例如在磷酸链中具有多个磷酸,如2、3、4、5、6、7、8、9或10个磷酸的分子。核苷酸通常可包括腺苷(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)或其变体。核苷酸可包括可并入增长的核酸链中的任何亚单位。这样的亚单位可以为A、C、G、T或U,或对于一个或多个互补性A、C、G、T或U特异的,或与嘌呤(即,A或G,或其变体)或嘧啶(即,C、T或U,或其变体)互补的任何其他亚单位。亚单位可以使单独的核酸碱基或成组碱基(例如,AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA或其尿嘧啶对应物)得到解析。核苷酸可以是标记或未标记的。标记的核苷酸可产生可检测信号,如光信号、静电信号或电化学信号。

[0043] 可在以下非限制性实例中描述Q-PCR过程。采用被设计为扩增样品中的给定核酸序列的引物对进行PCR反应。向反应中添加合适的酶和核苷酸如脱氧核苷酸三磷酸(dNTP),并使反应进行多个扩增循环。检测从每个循环生成的扩增子的量,但在早期循环中,扩增子的量可能低于检测阈值。扩增可以在两个阶段,即指数期和随后的非指数平稳期中发生。在指数期,每个循环中PCR产物的量大约增加一倍。然而,随着反应进行,反应组分被消耗,并且最终一种或多种组分变得为限制的。此时,反应减慢并进入平稳期。最初,扩增子的量保持在背景水平或低于背景水平,并且无法检测到增加量(即使扩增子产物以指数方式积累)。最终,扩增的产物积累到足以产生可检测的信号。产生可检测信号时的循环数被称为循环阈值或 C_t 。因为 C_t 值是在试剂没有受到限制时的指数期中测得的,所以Q-PCR可以用于可靠且准确地计算反应中存在的模板的初始量。反应的 C_t 可主要通过扩增反应开始时存在的扩增子对应的核酸序列的量来确定。如果在反应开始时存在大量的模板,则可能需要相对较少的扩增循环来积累足够产物以得到高于背景的信号。因此,该反应可具有低的或早的 C_t 。相反,如果在反应开始时存在少量的模板,则可能需要更多的扩增循环来产生高于背景的荧光信号。因此,该反应可具有高的或晚的 C_t 。本文提供的方法和系统允许在单个扩增反应中测量单一流体中的多种扩增子的积累,从而允许采用上述Q-PCR方法测定同一样品中的多种核酸序列的量。

[0044] 如本文所用的术语“实时”通常是指在瞬时阶段或在生物化学平衡中在反应发生的同时测量反应的状态。与在反应固定之后进行的测量相反,实时测量与监测、测量或观测的进行中的事件同时进行。因此,“实时”测定或测量通常不仅含有测量的定量的结果,如荧光,而且还在不同的时间点,即纳秒、微秒、毫秒、秒、分钟、小时等,将其表示出来。“实时”可包括检测信号的动态产生,包括采集多个读数以表征一段时间内的信号。例如,实时测量可包括测定分析物的量的增加或减少的速率。虽然信号的实时测量可用于通过测量信号的变化来测定速率,但在一些情况下,测量到信号无变化也可能是有用的。例如,信号随着时间缺乏变化可能指示反应(例如,结合,杂交)已经达到稳定状态。

[0045] 如本文所用的术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核苷酸”、“核酸”和“核酸分子”通常是指各种长度(例如,20个碱基至5000千碱基)的聚合形式的核苷酸(多核苷酸),其可为核糖核苷酸(RNA)或脱氧核糖核苷酸(DNA)。该术语可仅指分子的一级结构。因此,该术语可包括三链、双链和单链DNA以及三链、双链和单链RNA。该术语还可包括修饰,如通过甲基化和/或通过加帽的修饰,以及多核苷酸的未修饰形式。

[0046] 核酸可包含磷酸二酯键(即天然核酸),核酸可包括可具有替代骨架的核酸类似物,该替代骨架包括例如磷酰胺(参见例如Beaucage等人,Tetrahedron 49(10):1925(1993),和美国专利号5,644,048)、二硫代磷酸酯(参见例如Briu等人,J. Am. Chem. Soc. 111:2321(1989))、0-甲基亚磷酰胺键(参见例如Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press)以及肽核酸(PNA)骨架和键(参见例如Carlsson等人,Nature 380:207(1996))。核酸可包括其他核酸类似物,包括具有阳性骨架(参见例如Denpcy等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097(1995))、非离子骨架(参见例如美国专利号5,386,023、5,637,684、5,602,240、5,216,141和4,469,863; Kiedrowshi等人,Angew. Chem. Intl. Ed. English 30:423(1991); Letsinger等人,J. Am. Chem. Soc. 110:4470(1988); Letsinger等人,Nucleoside&Nucleotide 13:1597

(1994);第2章和第3章,ASC Symposium Series 580,“Carbohydrate Modifications in Antisense Research”,Y.S.Sanghui和P.Dan Cook编著;Mesmaeker等人,Bioorganic & Medicinal Chem.Lett.4:395(1994);Jeffs等人,J.Biomolecular NMR34:17(1994);Tetrahedron Lett.37:743(1996))和非核糖骨架(参见例如美国专利号5,235,033和5,034,506,以及第6章和第7章,ASC Symposium Series 580,“Carbohydrate Modifications in Antisense Research”,Y.S.Sanghui和P.Dan Cook编著)的核酸类似物。核酸可包含一种或多种碳环糖(参见例如Jenkins等人,Chem.Soc.Rev.(1995)169-176页)。核糖-磷酸骨架的这些修饰可促进标记物的添加,或增加这样的分子在生理环境中的稳定性和半衰期。

[0047] 如本文所用的术语“扩增子”通常是指由核苷酸序列的扩增如通过PCR生成的分子种类。扩增子可以是多核苷酸如RNA或DNA或其混合物,其中扩增子中核苷酸的序列可与生成该扩增子的核苷酸序列的序列相关(即,与该序列相对应或互补)。扩增子可以是单链或双链。在一些情况下,可通过使用并入扩增子中的一种或多种引物来生成扩增子。在一些情况下,可在聚合酶链反应或PCR扩增中生成扩增子,其中可以使用两种引物来产生一对互补的单链扩增子或双链扩增子。

[0048] 如本文所用的术语“探针”通常是指可与核酸序列结合的分子种类或标志物。探针可以是任何类型的分子或颗粒。探针可包含分子并且可直接或经由连接体分子与基底或表面结合。

[0049] 除非上下文另有明确规定,否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数引用。

概述

[0050] 可基于测量从具有与生成的PCR产物相关的信号强度的荧光报道分子发出的光强度或谱型(例如,频率、频率分布或强度分布)来进行扩增过程中的扩增子定量,即实现Q-PCR。这些过程中测量的光强度可用作扩增的序列和扩增过程的实际数目的指示。在单重PCR或其他扩增过程中,所使用的方法中的一些可包括可与双链DNA(dsDNA)结合的嵌入剂荧光团染料如SYBR绿,或以杂交或TaqMan探针的形式与短修饰DNA序列结合的嵌入剂荧光团染料。

[0051] 创建多重Q-PCR方法的尝试一直受到同时检测单个样品中不同核酸序列的实际问题的困扰。可行的方法是在PCR反应过程中将不同的报道分子(例如,荧光染料)与个体扩增子相关联,该PCR反应可通过不同的“颜色”实现各个报道分子的平行检测。虽然这种方法在理论上可以提供平行检测,但其局限在于(i)可获得的不同报道分子的数目;和(ii)能够区分不同信号的成像器和检测器的可用性。目前的Q-PCR系统可通过使用至数十种不同的荧光报道分子实现检测至数十种扩增子。另一种提供多路化能力的可行方法是划分感兴趣的生物样品并使用流体系统将其物理地放入分开的、单个的且分离的扩增室中。虽然该方法可通过进行多个单重(即,每个隔室一种扩增子)Q-PCR反应有效地创建多重Q-PCR,但它可能不是最佳的,因为当原始样品具有低浓度时该方法可能减少每个隔室中核酸靶序列的数目,这可能在所得数据中产生随机异常(Poisson噪声)。此外,该方法需要复杂的流体处理程序。

[0052] 可通过采用分析平台,如DNA微阵列或下一代DNA测序仪(而非Q-PCR或等同方法)进行样品中DNA序列的高度多路化检测。具体地,微阵列为大规模并行的基于亲和力的生物

传感器,其中从在固体表面上不同的可寻址坐标(例如,像素)处的同一样品中选择性地捕获核酸靶标。每个可寻址坐标可具有唯一的捕获DNA或RNA探针,其互补于样品中待检测的靶标特异性序列。虽然微阵列可提供高度多路化能力,但它们是半定量的,并且由于其端点检测性质(即,非实时检测)以及它们缺乏任何靶标扩增,因此在检测极限(LOD)和检测动态范围(DDR)方面较差。

[0053] 本公开内容提供了可在具有Q-PCR方法的LOD和DDR的同时获得微阵列的多路化能力的方法、装置和系统。本文提供的方法和系统可用于创建独特的核酸检测平台,并且可用于广泛的应用,如分子诊断、DNA取证和病原体基因分型等。

[0054] 本文描述的方法、装置和系统可用于同时进行多个反应(例如,生物化学反应、化学反应),以及经由例如检测和/或测定单个反应室中一种或多种靶物质(例如,分析物、试剂和/或产物,包括引物、扩增子、核酸序列)的存在或不存在、量、数量、浓度、活性和/或结合特征来实时监测反应的进展。可通过检测靶物质与多个独立可寻址位置内含有的探针之间发生结合时产生的信号,来监测和/或测定靶物质的量、数量、浓度、活性和/或结合特征。采用本公开内容提供的方法和系统,可以以高灵敏度和/或特异性测定靶物质的存在或不存在。例如,可以以至少约50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%或99.9999%的灵敏度测定或检测靶分析物的存在或不存在。类似地,本文提供的方法的灵敏度可以为至少约50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%或99.9999%。

[0055] 本文提供的系统和方法可包括芯片,该芯片进一步包含集成传感器阵列。该传感器阵列可包含基底和附接或固定至该基底的表面的多个探针(例如,探针的阵列)。该传感器阵列还可包含单个或多个集成传感器,该集成传感器可以能够检测或捕获探针与反应混合物中的一种或多种分析物(例如,靶核酸分子、模板核酸分子、引物、扩增子、聚合酶)结合时所产生的信号。如本文提供的,可以使用任何数目的传感器。在一些情况下,可以包括小数目传感器。在一些情况下,可以使用大数目的传感器。在一些情况下,系统可包含少于或等于约1,000,000、750,000、500,000、250,000、100,000、75,000、50,000、25,000、10,000、7,500、5,000、2,500、1,000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、80、60、40、20、5或1个传感器。在一些情况下,系统可包含至少约1、10、30、50、70、90、100、300、500、700、900、1,100、1,500、2,000、4,000、6,000、8,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、250,000或500,000个传感器。该传感器可以是集成传感器。该传感器可以是单独(或独立)可寻址的。在一些情况下,系统中包含的传感器的数目可以在本文描述的任何两个值之间,例如,约12,500。

[0056] 图1显示了本公开内容的示例性多路扩增和检测系统。如图1所示,该系统包含具有核酸扩增反应所需的多种试剂(例如,引物、模板核酸分子)的反应室、具有三个独立可寻址位置(即,像素[i]、[i+1]和[i+2])的探针阵列和能够实时检测每个像素中产生的信号的检测器。探针经由连接体附接至探针阵列的基底。对于每个可寻址位置,包含可与单一类型的靶物质(即,每个位置内产生的扩增子[i]、[i+1]和[i+2])特异性结合的不同类型的探针。在扩增子与探针结合时,可生成反映每个像素上的结合事件的信号(即,信号[i]、[i+1]和[i+2]),并通过检测器捕获该信号。通过分析检测到的信号,可平行测定每个位置内的扩

增反应的进展。

[0057] 本文提供的方法、装置和系统可使用实时微阵列系统。这样的系统的实例可见于例如美国专利公开号2010/0122904、2013/0345065、2014/0001341、2014/0318958、2014/0011710、2012/0168306、2013/0225441、2012/0077692、2007/0099198、2008/0081769、2008/0176757和2008/0039339,以及美国专利号8,637,436、8,048,626和8,518,329,上述各专利或申请均通过引用而整体并入本文。

[0058] 本公开内容的系统可包含至少一个反应室、探针阵列和检测系统。该反应室可被配置为执行一个或多个反应(例如,核酸扩增过程或PCR)的功能。核酸扩增过程可包括生物化学过程,该生物化学过程可在单个反应室中特定增加特定核苷酸序列的拷贝数并用报道分子(即,“标记物”)标记生成的产物(即,扩增子)。该反应室可包括水性环境,在该水性环境中存在多种自由移动的分析物(例如,待检测的核酸序列)或试剂(例如,引物、探针、化学表面改性剂和聚合酶)。所述探针阵列可在固体表面上的独立可寻址位置处包含多个核酸探针。每个可寻址位置(例如,“像素”)可包含可在反应室中与特定扩增子和/或其他核酸序列特异性地杂交或结合的多个相同的核酸序列(或“探针”)。可用一种或多种报道分子(例如,能量受体、能量供体)标记探针和/或分析物。在一些实例中,可用能量受体标记探针。能量受体可以为猝灭剂。在这种情况下,可用能量供体标记分析物(如dNTP、引物)。能量供体可以为荧光团。作为替代方案,可用能量供体标记探针。能量供体可以为荧光团。在这种情况下,可用能量受体标记分析物。能量受体可以为猝灭剂。

[0059] 所述检测系统可包含一个或多个检测器。该检测器可实时测量指示反应进展的在每个可寻址位置处平行产生的信号。例如,对于PCR反应,检测到的信号可以反映随着反应进行和探针/靶序列相互作用发生时其附近报道分子的存在和活性。

反应室

[0060] 本公开内容的方法、装置和系统可包括单个反应室或多个反应室。该反应室可包含彼此流体连通的多个子反应室。该反应室可与探针阵列和检测系统分离。该反应室可与探针阵列和/或检测系统集成。该反应室可包含至少一个样品入口。该反应室可进一步与被配置为改变、控制和/或维持反应室中的温度的温度控制模块进行电通信。该反应室可被配置为容纳反应混合物以及促进反应混合物中的一种或多种靶分析物的扩增反应。该反应混合物可包含分析物如待扩增的模板核酸分子、引物对、限制引物、过量引物、聚合酶、核苷酸、溶剂或反应可能需要的任何其他试剂。可通过一种或多种报道分子标记反应混合物中的任何分析物。探针与包含报道分子的分析物的结合可产生可被集成传感器捕获或检测的信号。这样的信号可指示反应混合物或反应过程中一种或多种分析物的存在或不存在。可在单个时间点或多个时间点检测信号。还可以实时监测信号。在检测来自反应混合物的信号时,该反应混合物可以与或不与传感器接触。在一些情况下,检测信号包括测量或测定信号相对于背景的增加。在一些情况下,检测信号包括测量或观测信号相对于背景的减少。背景信号可指结合事件发生之前检测到或获得的信号。所述检测还可包括测量或检测至少一种对照信号。在探针与具有已知序列的对照样品结合时可产生对照信号。

[0061] 反应室可包含封闭的储室。该反应室可具有约100mL至约1nL的容积。在一些情况下,反应室容积为约100 μ L至约1 μ L。

[0062] 反应室可含有溶液(例如,水溶液)。反应室内的水溶液可包含基于盐水的缓冲溶

液,诸如包含弱酸及其共轭碱(反之亦然)的混合物的水溶液。该溶液可包含多种靶物质(例如,核酸序列)。如该语境中所用的术语“核酸序列”或“核苷酸序列”是指需要了解其存在和/或量的具有给定核苷酸序列的核酸分子。该核苷酸序列可包括RNA或DNA或来源于RNA或DNA的序列。核苷酸序列的实例是对应于天然或合成的RNA或DNA的序列,包括基因组DNA和信使RNA。所述序列的长度可以是可扩增成扩增子的任何长度,例如长度为至多约5、10、20、50、100、200、300、400、500、600、700、800、1,000、1,200、1,500、2,000、5,000、10,000个或超过10,000个核苷酸。

[0063] 在一些情况下,靶分析物可包含报道分子(例如,标记物)。报道分子可包含一旦附接至核酸序列便提供不是这些核酸分子所固有的区别特征的分子结构。实例为产生独特光学特征的标记物。

探针阵列

[0064] 如本文所述的术语“阵列”和“微阵列”可互换使用。探针阵列可包含其上附接有多个探针的表面,其中所述阵列可用于实时测量和/或检测多种分析物(例如,扩增子)的存在、量、浓度和/或结合特征。在一些情况下,一个或多个探针可位于多个离散的、分离的和独立可寻址的位置。

[0065] 所述基底可以为固体或半固体。该基底可以是生物的、非生物的、有机的、无机的或这些的任何组合,其以颗粒、线股、沉淀物、凝胶、片材、管材、球体、容器、毛细管、衬垫、薄片、薄膜、板、载玻片、半导体集成芯片等的形式存在。该基底可以呈现任何表面结构(例如,平坦的)。例如,该基底可含有凸起或凹陷的区域,在该区域上可发生合成或沉积。在一些情况下,可选择该基底来提供合适的吸光特征。例如,该基底可以为聚合Langmuir Blodgett膜、功能化玻璃、Si、Ge、GaAs、Gap、SiO₂、SiN₄、改性硅或多种凝胶或聚合物中的任一种,如(聚)四氟乙烯、(聚)偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯或其组合。

[0066] 所述基底可以是尺寸比探针大得多的均质固体和/或静止物质。在一些情况下,可将探针限制和/或固定在基底的一定距离内。基底的质量可以是探针质量的至少100倍。基底的表面可以是平面的或非平面的。非平面的基底的实例可包括球形磁珠、球形玻璃珠和固体金属和/或半导体和/或电介质颗粒。在基底包含平面的情况下,表面的粗糙度可以变化。在一些情况下,基底表面的粗糙度可小于或等于约1000纳米(nm)、750nm、500nm、250nm、100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、5nm、1nm、0.75nm、0.5nm、0.25nm、0.1nm、0.05nm、0.25nm、0.01nm、0.005nm或0.001nm。在一些情况下,基底表面的粗糙度可大于或等于约0.0001nm、0.0005nm、0.001nm、0.005nm、0.01nm、0.05nm、0.1nm、0.5nm、1nm、5nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、200nm、300nm、400nm或500nm。在一些情况下,基底表面的粗糙度可以在本文描述的任何两个值之间,例如,约75nm。

[0067] 基底可以是光学透明的,以允许光通过基底透射,以及当光穿过基底时进行激发和/或检测。基底还可以是半透明或不透明的。在一些情况下,基底可以是反射的,以允许光穿过含有探针的表面层并反射回检测器。

[0068] 在一些情况下,可将阵列并入发生扩增反应的反应室中。阵列可以是隔室的壁或底部的一部分。阵列可与其他组件紧密配合,以形成密封并创建用于进行扩增反应的反应室。

[0069] 基底可由多种材料制成。材料的非限制性实例可包括二氧化硅、硅、塑料、玻璃、金属、金属合金、纳米孔、聚合物和尼龙。可在附接探针之前用化学物质层来处理基底的表面，以在使用期间增强结合和/或抑制非特异性结合。例如，基底可包含载玻片，该载玻片可涂覆自组装单层 (SAM) 涂层，如氨基烷基硅烷的涂层，或聚合物材料如丙烯酰胺和蛋白质的涂层。可以使用多种材料，例如，3D-link® (Surmodics)、EZ-Rays® (Mosaic Technologies)、Fastslides® (Schleicher和Schuell)、Superaldehyde® 和 Superamine® (CEL Technologies)。

[0070] 探针可与基底缔合、附接或结合。探针的缔合、附接或结合可以是可逆的或不可逆的。探针的缔合、附接或结合可以是化学的、生物的或生物化学的。在一些情况下，探针可经由连接体与基底缔合、附接或结合。该连接体可以是能够连接探针与底物的任何类型的分子 (化学或生物的)。在一些情况下，该连接体可以是化学键。例如，探针可共价附接至基底的表面。

[0071] 可将多种不同的化学表面改性剂添加至基底，以将探针附接至基底。化学表面改性剂的实例可包括但不限于N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 基团、胺、醛、环氧化物、羧基基团、羟基基团、酰肼、疏水性基团、膜、马来酰亚胺、生物素、链霉亲和素、硫醇基团、镍螯合物、光敏基团、硼基团、硫酸酯、半胱氨酸、二巯基、烷基和酰基卤基团、谷胱甘肽、麦芽糖、叠氮化物、磷酸酯、膦及其组合。在一种情况下，可利用对胺具有反应性的基底表面。这样的表面的实例可包括NHS-酯、醛、环氧化物、酰基卤和硫酸酯。具有游离胺基团的分子 (例如，蛋白质、肽、糖肽) 可与此类表面反应以与该表面形成共价键。还可以合成具有内部或末端胺基团的核酸探针 (例如，来自IDT或Operon)，并使用类似的化学法 (例如，共价或非共价地) 结合至表面。

[0072] 基底表面对于胺可以具有或不具有反应性。在需要胺反应性基底的情况下，基底表面可转化成具有涂层的胺反应性基底。涂层的非限制性实例可包括胺涂层 (其可以与双NHS交联剂和其他试剂反应)、硫醇涂层 (其可以与马来酰亚胺-NHS交联剂等反应)、金涂层 (其可以与NHS-硫醇交联剂等反应)、链霉亲和素涂层 (其可以与双NHS交联剂、马来酰亚胺-NHS交联剂、生物素-NHS交联剂等反应)、BSA涂层 (其可以与双NHS交联剂、马来酰亚胺-NHS交联剂等反应) 或其组合。或者，在一些情况下，探针而不是基底可与特定的化学改性剂反应以使其对于各自的表面具有反应性。

[0073] 可使用多种多功能交联剂将一种类型的表面的化学反应性转化为另一种。所述试剂可以是同功能性或异功能性的。所述试剂可以是双功能性、三功能性或四功能性的，例如，双功能性交联剂X-Y-Z，其中X和Z为两种反应性基团，且Y为连接的连接体。此外，如果X和Z是相同基团，如NHS-酯，则得到的交联剂NHS-Y-NHS为同种双功能性交联剂并且可连接胺表面与含胺基团的分子。如果X为NHS-酯且Z为马来酰亚胺基团，则得到的交联剂NHS-Y-马来酰亚胺为异种双功能性交联剂并且可连接胺表面 (或硫醇表面) 与含硫代基团 (或氨基基团) 的探针。这类试剂的实例可包括但不限于NHS-酯、硫酸酯、烷基卤、酰基卤 (例如，碘乙酰胺)、硫醇、胺、半胱氨酸、组氨酸、二硫化物、马来酰亚胺、顺式二醇、硼酸、异羟肟酸、叠氮化物、肼、膦、光敏基团 (例如葱醌、二苯甲酮)、丙烯酰胺 (例如，acrydite)、亲和基团 (例如生物素、链霉亲和素、麦芽糖、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽、谷胱甘肽-S-转移酶)、醛、酮、羧酸、磷酸酯、疏水性基团 (例如苯基、胆固醇) 及其组合。这类交联剂可与表面或探针或与表面和

探针二者反应,以将探针缀合至表面。

[0074] 另外或备选地,基底可包含硫醇反应性表面如丙烯酸酯、马来酰亚胺、酰基卤和硫酯表面。此类表面可经由硫醇基团共价连接蛋白质、肽、糖肽等。还可以容易地合成含有侧链硫醇基团的核酸探针。

[0075] 在本公开内容中可以利用多种替代表面改性技术,例如,光交联表面和热交联表面。这类技术的实例可包括Mosaic Technologies (Waltham,Mass.)、Exiqon™ (Vedbaek, Denmark)、Schleicher和Schuell (Keene,N.H.)、Surmodics™ (St.Paul,Minn.)、Xenopore™ (Hawthorne,N.J.)、Pamgene (Netherlands)、Eppendorf (Germany)、Prolinx (Bothell, Wash.)、Spectral Genomics (Houston,Tex.)和Combimatrix™ (Bothell,Wash.)。

[0076] 可使用多种材料制作所述基底的表面。示例性材料可包括玻璃、金属(例如,金、硅、铜、钛和铝)、金属氧化物(例如,氧化钛、氧化铁)、基于硅的材料(例如,硅、二氧化硅)、塑料、聚合物(例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯)、沸石及其组合。在一些情况下,本文提供的装置和系统可包含LED(发光二极管)和OLED(有机发光二极管)表面。在探针阵列的底部可使用LED或OLED的阵列。这样的系统可能是有利的,因为其提供了结果读出的简单光电方法。在一些情况下,所述结果可以利用肉眼读出。

[0077] 可使用接触式打印方法,利用固体针、羽毛针(quill-pin)、喷墨系统、环-针系统(ring-and-pin system)等(参见,例如,美国专利号6,083,763和6,110,426),或非接触式打印方法,利用压电、气泡喷射、注射、电动、机械或声波方法,将探针沉积到基底上,例如,沉积到改性表面上。可用于将探针沉积并分布到基底表面上的示例性装置可包括例如由Packard Instruments生产的装置或用于将探针沉积,例如,散布到基底上的装置,其包括固体针或羽毛针(Telechem/Biorobotics)。

[0078] 如本文别处所述,所述多个探针可位于基底上的多个独立可寻址位置(或区域)上。可寻址位置可均匀或非均匀地分布在基底上。在一些情况下,每个可寻址位置可含有至少一个探针。在一些情况下,只有一定百分比的可寻址位置可含有探针。没有探针的可寻址位置可充当对照点,以便例如通过利用与该点的结合来评估和校正非特异性结合来提高测量的质量。在一些情况下,少于或等于约1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000或1,000,000个可寻址区域可含有探针。在一些情况下,多于或等于约1、10、25、50、75、100、200、400、600、800、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000或1,000,000个可寻址区域可含有探针。在一些情况下,含有探针的可寻址位置的数目可以在本文描述的任何两个值之间,例如,约30,000。

[0079] 包含在每个占用的可寻址位置(即,具有至少一个探针的可寻址位置)中的探针的数目可以变化。在一些情况下,每个占用的可寻址位置可含有相同数目的探针。在一些情况下,每个占用的可寻址位置可含有不同数目的探针。在一些情况下,一定百分比的占用的可寻址位置可包含相同或不同数目的探针,例如,约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的占用的可寻址位置可含有相同或不同数目的探针。

[0080] 在使用超过一种类型的探针的情况下,包含在占用的可寻址位置中的探针的类型

可以变化。在一些情况下,可优选包含在每个占用的可寻址位置中的探针具有不同的类型。在一些情况下,具有一定百分比的含有相同或不同类型的探针的占用的可寻址位置可能是必要的,例如,约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的占用的可寻址位置可含有相同或不同类型的探针。

[0081] 在一些情况下,具有与另一个可寻址位置具有相同的探针的冗余可寻址位置可能是有用的。具有这样的可寻址位置组合的探针阵列可能不太受到制作非理想因素和测量误差的影响。

[0082] 每个可寻址位置的横截面的形状可以变化,例如,正方形、圆形、椭圆形、三角形、长方形、多边形或者任何其他任意形状。

[0083] 可寻址位置的横截面尺寸可以变化。在一些情况下,可寻址位置可具有大的横截面尺寸。在一些情况下,可使用具有小横截面尺寸的可寻址位置。在一些情况下,可寻址位置的横截面的每个边可小于或等于约1毫米(mm)、750微米(μm)、500 μm 、250 μm 、100 μm 、50 μm 、25 μm 、10 μm 、1 μm 、750nm、500nm、250nm、100nm、75nm、50nm、25nm、10nm、5nm、1nm、0.5nm、0.1nm、0.05nm或0.01nm。在一些情况下,可寻址位置的横截面的每个边可大于或等于约0.001nm、0.005nm、0.0075nm、0.1nm、0.5nm、0.75nm、1nm、25nm、50nm、75nm、100nm、250nm、500nm、750nm、1微米(μm)、10 μm 、20 μm 、50 μm 、75 μm 、100 μm 、250 μm 、500 μm 、750 μm 或1mm。在一些情况下,可寻址位置的每个边可具有落在本文描述的任何值之间的尺寸,例如,约5 μm 。正如所理解的,每个可寻址位置可以具有或不具有相同的横截面尺寸。

[0084] 本公开内容中的探针可以用或可以不用报道分子进行标记。报道分子可通过多种方法如杂交与探针结合。在一些情况下,除了并入的标记物以外,还可将特定的标记物附接至可寻址位置内的探针。在这样的系统中,捕获的靶标可导致该位置中的两个标记物彼此亲密靠近。标记物之间的这种相互作用可产生独特的可检测信号。例如,当靶标和探针上的标记物分别为可参与荧光共振能量转移(FRET)现象的荧光供体和受体部分时,可以检测到FRET信号。然而,在一些情况下,该相互作用不是FRET。

[0085] 在一些情况下,用第一类型的报道分子标记反应混合物中的分析物(例如,dNTP),而用第二类型的报道分子标记阵列的表面,其中所述第二类型的报道分子不与探针连接或缔合(例如,与表面结合的报道分子)。分析物与探针的结合将会使两种类型的报道分子靠近,并因此导致从阵列的表面或反应混合物检测到的信号的变化(例如,增加或减少)。这种信号变化随后可用来例如确定分析物的存在或不存在。例如,可用猝灭剂和发光报道分子(例如,荧光团)分别标记分析物和阵列表面,并且在分析物与探针结合时使来自表面上的荧光团的荧光猝灭(或削弱)。虽然猝灭剂不发射光信号,但没有来自反应混合物(或溶液)的信号干扰来自阵列的信号,所述来自阵列的信号随后大量地减小阵列表面处的噪声并实现阵列表面处信号的实时测量。或者,在一些实例中,将猝灭部分(例如,猝灭剂)附接至阵列表面并用发光报道分子(例如,荧光标记物)标记分析物。在分析物与表面结合探针结合时,可以检测到来自反应混合物的荧光信号的减少。

检测系统

[0086] 本文还提供了具有被配置为捕获、检测和/或监测来自阵列的信号的至少一个检测器的检测系统。可以产生多种信号,如光、电、电化学、磁、机械、声或电磁信号。所述信号可与一个或多个种类(例如,引物、扩增子、核酸序列、报道分子、聚合酶、dNTP或任何其他分

析物和试剂)的存在、量、浓度和/或结合特征相关。所述信号可反映或指示一种或多种反应(例如,PCR扩增)的进展。可在单个时间点或多个时间点或实时检测信号。

[0087] 检测系统可包含单个检测器或多个检测器(例如,检测器阵列)。该检测器可以是固定的或可移动的。在反应过程中检测器可扫描探针阵列,使得给定的检测器检测来自阵列的不同可寻址位置的信号。在检测系统中包含多个检测器的情况下,检测器数目可对应于探针阵列中包含的相同独立可寻址位置。例如,可使用固定的检测器阵列,其中每个检测器可对应于探针阵列的单个可寻址位置。可在如本文所提供的检测系统中使用任何数目的检测器,例如,约1、10、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、25,000、50,000、75,000、100,000、250,000、500,000、750,000或1,000,000个检测器。所述检测器可包含在传感器阵列的集成传感器中。根据待检测的信号的类型,可以使用多种类型的检测器,例如,光检测器、电检测器、电化学检测器或静电检测器。光检测器的实例可包括但不限于电荷耦合器件(CCD)阵列(包括冷却的CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)成像器、n型金属氧化物半导体(NMOS)、有源像素传感器(APS)或光电倍增管(PMT)。检测器还可包含波长选择性组件,如滤光器,以允许测量选择性波长。其他检测器的实例包括电极。

[0088] 检测器可以以至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、90、120、150、180、210、240、270、300、400、500、1000、10,000或100,000次/分钟的速率进行取样(例如,获得测量值)。检测器可以以至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115或120Hz的速率进行取样。

[0089] 所述检测系统可包含光源。该光源可包含至少一个灯,诸如白炽灯、卤素灯、荧光灯、气体放电灯、电弧灯或发光二极管(LED)。该光源可包括激光器。该光源可产生特定的波长或特定范围的波长,诸如UV。该光源可包括用于控制一种或多种输出波长的滤光器。该光源可包括可单独或组合使用的属于相同或不同类型的多个光源。

[0090] 所述检测器可包含各种光学元件,包括但不限于滤光器、透镜、准直器、镜子、反射器、分束器和扩散器。该检测器可包含一种或多种滤光器,包括但不限于滤波器(例如,滤色器、UV滤光器、IR滤光器)、二向色滤光器和偏振滤光器。该滤光器可包括可单独或组合使用的属于相同或不同类型的多个滤光器。该检测器可包含用于去除诸如桶形或鱼眼畸变、枕形畸变、胡须畸变、单色像差(例如,活塞、倾斜、散焦、球面像差、彗形像差、像散、像场弯曲、图像畸变)或色像差(例如,轴向、纵向、侧向、横向)等图像畸变或像差的元件(例如,信号处理单元)。这样的元件可包含被编程用于实现用于部分或完全校正图像畸变的指令的计算机系统。例如,Brown畸变模型或Brown-Conrady模型可用于校正径向畸变和切向畸变。在一些实例中,所述检测器可测量从单独可寻址位置发射的光子。这些光子可与该位置中报道分子的存在和/或活性相关。

[0091] 如本文别处所讨论的,可通过在特定像素处用能量供体(例如,荧光团)标记的固定探针与反应室中存在的用能量受体(例如,猝灭剂)标记的靶标之间的相互作用,进行作

为温度的函数的核酸(例如,DNA)杂交反应的实时平行检测。检测还可通过嵌入剂和相互作用的探针与相似设置的靶标之间的相互作用来进行。反应室的温度可以变化,而光检测器连续地实时测量信号,以捕获单个像素处的杂交靶标的量并评估杂交反应在该给定温度下在该像素处是否是有利的。

[0092] 在一些情况下,指示杂交反应的信号仅在可寻址阵列的像素处产生,并且局限于可寻址阵列的像素,同时包含所有靶标的反应体积几乎不产生背景光信号。这种独特的特性不但改善了可检测的信干比(或信噪比),而且由于像素水平测量保持彼此独立使得多路化能力成为可能。尽管它们仍共享反应室和含水样品。

[0093] 图2-图4示出了本公开内容的示例性光学检测方法。如图2所示,可用报道分子(例如,能量受体、供体和/或猝灭剂)标记用于以下扩增反应的引物。随着扩增反应的进行,报道分子可并入扩增的产物(即,扩增子)中。可通过检测扩增子或引物与探针杂交/结合时的信号变化,来实时监测扩增反应的进展。在示例性方法A中,在结合之前,探针上的供体活跃地辐射信号。一旦探针与靶标(即,猝灭剂标记的扩增子)结合,与靶标结合的猝灭剂将来自与探针结合的能量供体的信号猝灭,这导致信号的减少或消除。在示例性方法B中,能量供体标记的探针保持发射/辐射信号,直到在受体并入的扩增子与探针之间发生结合。可在扩增子中形成发夹结构以促进扩增子与探针之间的结合。一旦完成杂交/结合,就可检测到能量供体信号的减少,这指示扩增反应正在进行。在方法C中,探针被设计和配置为与引物结合,而不是与扩增的产物结合。引物与探针之间的结合可导致在结合之前由供体标记的探针所产生的信号的减少。随着扩增反应的进行,可消耗更多的引物。可检测溶液中游离的引物的量的这种减少,并因此指示反应的进展。

[0094] 如本文别处所讨论的,在一些情况下,可经由使用其他分子,例如嵌入剂来实现靶物质的检测。在这样的情况下,不需要对引物或扩增子进行标记,这极大地减少了由反应溶液产生的背景噪声。如图3所示,在方法A中,嵌入剂是无活性的并且在不存在结合的情况下不产生或几乎不产生信号。一旦未标记的扩增子与探针之间发生杂交/结合,嵌入剂便会激活并辐射信号。在方法B中,可通过在不与靶物质结合的情况下不产生或几乎不产生信号的去活化的能量受体标记探针。探针与扩增子之间的结合随后可使嵌入剂和去活化的受体极为靠近。嵌入剂与受体之间的能量转移可导致信号增加。在方法C中,用供体标记探针并且在溶液中可存在自由移动的去活化的受体。在扩增子与探针结合之前,由于供体与受体之间的距离远,探针上的供体可活跃地辐射信号。扩增子与探针的结合可使受体与探针上的能量供体极为靠近,从而导致信号的减少或消失。

[0095] 图4显示了通过使用标记的dNTP的示例性光学检测方法。如图4所示,可用报道分子例如受体标记一个或多个dNTP。随着扩增反应的进行以及模板核酸序列被复制和延长,标记的dNTP并入扩增的产物(即,扩增子)中。扩增子可以能够与用不同类型的报道分子,例如,供体标记的探针结合。在探针被供体标记的情况下,探针可在不与任何其他物质结合的情况下产生或发射信号。一旦扩增子与探针结合,产生的信号可减少或减弱。

[0096] 图5-图7显示了本公开内容的示例性电检测方法。在这样的方法中,可用一种或多种报道分子(例如,氧化还原物质)标记靶物质(例如,引物、扩增子、dNTP)和/或探针,所述报道分子能够产生或生成有待通过检测系统检测的电信号。在一些情况下,靶物质和探针均不用报道分子进行标记,而是可以使用其他分子例如嵌入剂生成信号。对于利用电检测

方法的方法和系统,可使用一个或多个电极获得信号。电极可与探针阵列分离或与探针阵列相关联。电极可与探针阵列和/或检测系统集成。电极可进一步与被配置为实施本文提供的方法的计算机控制系统集成。在一些情况下,电极可嵌入探针阵列的基底中并对应于阵列的每个可寻址位置(例如,像素)。可平行地实时检测和/或监测每个位置产生的信号。

[0097] 图5显示了通过使用标记的引物的示例性电检测方法。如图所示,可用氧化还原物质标记引物,该氧化还原物质随后可在扩增反应开始时并入扩增的产物中。在方法A中,在结合之前,探针不产生或几乎不产生信号。随着扩增反应的进行以及扩增子开始与探针结合,扩增子的杂交/结合导致信号的增加,这进而指示扩增反应的进展。在方法B中,可在扩增子中形成发夹结构以促进扩增子与探针之间的结合。或者,可能需要发夹环的形成以使扩增子与探针极为靠近,使得在结合发生时可产生可检测信号。通过检测信号的变化和/或强度,可测定扩增反应的进展和/或程度。在方法C中,标记的引物而不是扩增子被探针捕获或与探针结合。可通过监测经由引物与探针之间的结合而生成的信号强度的变化容易地测定反应混合物中引物的数量或量。然后,引物的数量或量的减少可反映扩增反应的进展。

[0098] 对于图6中示出的方法,不需要进行标记。如该图所示,在结合之前,电化学嵌入剂在反应混合物中自由流动且不产生或几乎不产生信号,并且探针和扩增子中不包含或几乎不包含报道分子。因此,在结合发生之前,没有从反应混合物检测到信号。随着扩增反应的进行以及扩增子开始与探针结合,嵌入剂可被激活并开始产生信号以供检测。

[0099] 如本文别处所提供的,可用一种或多种报道分子标记反应混合物中的任何物质。在图7中所示的方法中,可用报道分子(例如,电化学氧化还原标记物)标记dNTP。随后随着扩增反应的进行,这些标记物可并入扩增子中。如图7所示,在结合之前,探针不产生或几乎不产生信号。一旦发生杂交/结合,便可产生和检测到信号。

[0100] 本公开内容的系统可包含具有多个集成生物传感器的集成生物传感器阵列。使用集成生物传感器而不是常规检测设备的示例性优势是大小大幅减小和成本降低。此外,可使用可提供无与伦比的可靠性、大批量制造和可靠性的半导体集成电路(IC)微制造工艺如互补金属氧化物半导体(CMOS)来制造集成生物传感器阵列。可与本发明的集成生物传感器阵列一起使用的传感器的实例提供于美国专利公开号2010/0122904、2013/0345065、2014/0001341、2014/0318958、2014/0011710、2012/0168306、2013/0225441、2012/0077692、2007/0099198、2008/0081769、2008/0176757和2008/0039339,以及美国专利号8,637,436、8,048,626和8,518,329中,上述各专利或申请均通过引用而整体并入本文。

[0101] 在这样的布置中,每个传感器元件可以是可寻址的,并且可包含其自身的探针。这样的传感器元件可以是生物传感器。阵列可包含许多个单个生物传感器,诸如至少约100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、15000、20000、25000、30000、35000、40000、45000、50000、55000、60000、65000、70000、75000、80000、85000、90000、95000或100000个集成生物传感器。阵列中单个生物传感器的密度可以是至少约100、200、300、400、500、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000个生物传感器像素/mm²。

[0102] 阵列中的生物传感器可包括光传感器如光电二极管。每个生物传感器还可与温度控制元件如加热器和温度传感器(例如,热电偶、热敏电阻)相关联。生物传感器阵列可包含光传感器与反应室或阵列像素之间的滤光器,诸如发射滤光器,例如描述于美国专利公开

号2010/0122904、2013/0345065、2014/0001341、2014/0318958、2014/0011710、2012/0168306、2013/0225441和2008/0081769,以及美国专利号8,637,436和8,518,329中的滤光器,上述各专利或申请均通过引用而整体并入本文。

[0103] 图10显示了包含 32×32 光学生物传感器阵列(图10,右上)的光学CMOS生物芯片检测器(图10,左上)。每个光学生物传感器为约100平方微米(mm^2)。光学生物传感器阵列的每个边的长度为约3.2mm。每个生物传感器均包含光电二极管传感器,并且发射滤光器位于生物传感器的CMOS基底与相关联的阵列像素的反应室之间(图10,左下)。可通过加热器(图10,右下)控制阵列的热量。

[0104] 图11示出了用于光学CMOS生物芯片的示例性电路架构。1024个像素中的每一个均包含与光电二极管电路相关联的反应室(由发射滤光器隔开)。每个像素进一步包含加热器、数字控制器以及用于校准和数据收集的信号输入/输出。生物芯片进一步包含数字控制器。数字控制器与能够进行生物芯片像素的行/列选择的扫描模块接合,以用于接收数据。数字控制器还与能够控制芯片上温度的热控制器接合。电源管理系统(例如,5伏)为像素和热控制器提供电力。

[0105] 图12中显示了电CMOS生物芯片检测器。示例性生物芯片检测器(图12,左上)包含 32×32 电生物传感器阵列(图12,右上)。每个电生物传感器为约100平方微米(mm^2)。生物传感器阵列的每个边的长度为约3.2mm。每个生物传感器均包含位于生物传感器的CMOS基底与相关联的阵列像素的反应室之间的探针阵列(图12,左下)。每个生物传感器均可包含在工作电极(W)下面的参考电极(R)、布置在两个加热器层之间的对电极(C)。可通过加热器(图12,右下)控制阵列的热量。

[0106] 图13显示了电CMOS生物芯片的示例性电路架构。如图所示,1024个像素中的每一个均包含与具有工作电极、参考电极和对电极的电检测电路相关联的反应室。每个像素进一步包含加热器、数字控制器和用于校准和数据收集的信号输入/输出。生物芯片进一步包含数字控制器。数字控制器与能够进行生物芯片像素的行/列选择的扫描模块接合,以用于接收数据。数字控制器还与能够控制芯片上温度的热控制器接合。电源管理系统(例如,5伏)为像素和热控制器提供电力。

核酸扩增

[0107] 本文提供的方法、装置和系统可用于对与布置在多个独立可寻址位置中的探针阵列接触的流体中的多个核苷酸序列进行核酸扩增反应。随着反应的进行,可同时实时地检测和监测每个含探针的可寻址位置内扩增产物(即,扩增子)的存在、数量和/或结合活性。扩增方法可包括例如聚合酶链反应(PCR)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)以及滚环扩增(RCA)。

[0108] 扩增方法可以是温度循环的或等温的。扩增方法可以是指数式的或线性的。对于温度循环的扩增,温度循环通常可对应于扩增循环。在一些情况下,等温扩增可具有扩增循环,如变性循环,而在其他情况下,等温扩增反应将在没有任何特定扩增循环的情况下单调地发生。

[0109] 扩增方法可用于扩增特定区域(即,靶区域)或核酸分子(例如,DNA、RNA)的核苷酸序列。该区域可以为例如单个基因、基因的一部分或非编码序列。

[0110] 扩增方法可包括:(1)含有待扩增的核酸序列的区域的模板;(2)一个或多个引物,

其在待扩增的区域的5'和3'端互补于靶区域；(3)聚合酶(例如Taq聚合酶)，其用于合成待扩增的区域的拷贝；(4)脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)；(5)缓冲溶液，其为聚合酶的最佳活性和稳定性提供合适的化学环境；和/或(6)二价阳离子，如镁离子或锰离子。

[0111] 引物可以为核酸链，或充当核酸复制的起始点的有关分子。通常可能需要引物，因为一些核酸聚合酶不能从零开始合成新链，而是仅能向现有的核苷酸链添加。引物的长度可以变化。根据应用，可以使用具有较长或较短长度的引物。例如，在一些情况下，长度为约10至约30个碱基的化学合成的DNA分子可用作引物。在一些情况下，引物的长度可以为例如约20-30个核苷酸，并且引物的序列互补于待扩增的靶片段的起始和末端。引物可在这些起点和终点与模板退火(附着)，聚合酶在此处结合并开始新链的合成。在一些情况下，可使用简并引物。简并引物包含类似但不相同的引物的混合物。

[0112] 在一些情况下，可使用不对称(或非对称)扩增过程(例如，不对称PCR)。包含限制引物和过量引物的引物对可用于不对称扩增过程。限制引物可以以比过量引物低得多的浓度存在。通过使用针对扩增所靶向的链的过量引物，不对称扩增过程可优先扩增双链核酸模板中的一条链。随着扩增反应的进行，限制引物可被用尽。

[0113] 如本公开内容中所提供的，引物可以用或可以不用报道分子(例如，标记物)进行标记。可将标记的引物配置为促进和/或实现引物、扩增子或其他分析物的存在、数量、浓度或结合活性的检测和/或监测。随着扩增反应的进行，报道分子可并入扩增的产物中。可用一种或多种报道分子标记引物。报道分子可以是光学的、电的或电化学的。报道分子的实例可包括但不限于荧光、猝灭剂、荧光团、荧光共振能量转移(FRET)对的成员、氧化还原物质或其组合。

[0114] 在使用不对称扩增过程的情况下，可用相同或不同类型的报道分子标记引物对中的每个引物。如本文别处所述，本公开内容的系统、装置和方法可包括具有多个独立可寻址位置(例如，像素)的阵列。每个可寻址位置可以含有或可以不含有被配置为能够在反应室中捕获一个或多个种类(例如，引物、扩增子、聚合酶、dNTP或任何其他分析物和试剂)的一种或多种探针。可以用或可以不用一种或多种报道分子标记探针。标记的探针可以能够或不能产生可通过本公开内容中提供的检测系统检测或监测的信号(例如，光、电、电化学、磁、机械、声或电磁信号)。检测到的信号可以指示或反映反应的进展(例如，核酸扩增进展)。在一些情况下，每个可寻址位置可包含相同类型的探针，例如能够捕获特定的靶核酸序列的探针。在一些情况下，可以优选其中每个可寻址位置含有不同类型的探针的阵列。每种类型的探针可用于特异性地捕获某一类型的靶物质(例如，引物、扩增子等)，从而随着反应的进行检测/监测所述某一类型的靶物质(例如，引物、扩增子等)。在一些情况下，具有能够捕获和/或检测至少两种不同类型的靶物质的至少两种不同类型的探针可能是有用的。

[0115] 图8显示了本公开内容的示例性扩增方法以及该方法中引物和扩增子的浓度曲线图。如图8所示，在扩增反应中，使用引物对。根据引物的浓度之间是否存在差异，可以使用不对称PCR扩增或常规扩增方法。例如，如果对于一对中的两个引物，[P(+)]与[P(-)]相同或基本上相同，则进行常规扩增反应。然而，如果一个引物的浓度很大程度上不同于该引物对中的另一个，例如，[P(+)] \ll [P(-)]，则使用不对称扩增方法。如本文别处所述，可采用本公开内容的方法和系统实时检测或监测反应混合物中含有的一种或多种靶物质(例如，引

物、扩增子、dNTP)的数量、量和/或浓度。通过追踪或监测至少一种物质的数量/浓度变化,可测定扩增反应的进展(图8,左下和右下)。

[0116] 可在本公开内容中使用很多种荧光分子(例如,小分子、荧光蛋白和量子点)。荧光分子(或荧光团)的非限制性实例可包括:1,5IAEDANS;1,8-ANS;4-甲基伞形酮;5-羧基-2,7-二氯荧光素;5-羧基荧光素(5-FAM);5-羧基萘荧光素;5-羧基四甲基罗丹明(5-TAMRA);5-FAM(5-羧基荧光素);5-HAT(羟基色胺);5-羟基色胺(HAT);5-ROX(羧基-X-罗丹明);5-TAMRA(5-羧基四甲基罗丹明);6-羧基罗丹明6G;6-CR 6G;6-JOE;7-氨基-4-甲基香豆素;7-氨基放线菌素D(7-AAD);7-羟基-4-甲基香豆素;9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶;ABQ;酸性品红;ACMA(9-氨基-6-氯-2-甲氧基吡啶);吡啶橙;吡啶红;吡啶黄(Acridine Yellow);Acriflavin;Acriflavin Feulgen SITS;水母素(Photoprotein);AFP—自体荧光蛋白—(Quantum Biotechnologies);Alexa Fluor 350TM;Alexa Fluor 430TM;Alexa Fluor 488TM;Alexa Fluor 532TM;Alexa Fluor 546TM;Alexa Fluor 568TM;Alexa Fluor 594TM;Alexa Fluor 633TM;Alexa Fluor 647TM;Alexa Fluor 660TM;Alexa Fluor 680TM;Alizarin Complexion;茜素红;别藻蓝蛋白(APC);AMC、AMCA-S;AMCA(氨基甲基香豆素);AMCA-X;氨基放线菌素D;氨基香豆素;氨基甲基香豆素(AMCA);苯胺蓝;硬脂酸葱(Anthrocylistearate);APC(别藻蓝蛋白);APC-Cy7;APTRA-BTC;APTS;Astrazon亮红4G;Astrazon橙R;Astrazon红6B;Astrazon黄7 GLL;Atabrine;ATTO-TAGTMCBQCA;ATTO-TAGTMFQ;槐黄;Aurophosphine G;Aurophosphine;BAO 9(二氨基苯基噁二唑);BCECF(高pH);BCECF(低pH);硫酸黄连素; β -内酰胺酶;Bimane;二苯甲酰胺;双苯甲亚胺(Hoechst);二-BTC;Blancophor FFG;Blancophor SV;BOBOTM-1;BOBOTM-3;Bodipy 492/515;Bodipy 493/503;Bodipy 500/510;Bodipy 505/515;Bodipy 530/550;Bodipy 542/563;Bodipy 558/568;Bodipy 564/570;Bodipy 576/589;Bodipy 581/591;Bodipy 630/650-X;Bodipy 650/665-X;Bodipy 665/676;Bodipy FI;Bodipy FL ATP;Bodipy FI-神经酰胺;Bodipy R6G SE;Bodipy TMR;Bodipy TMR-X缀合物;Bodipy TMR-X,SE;Bodipy TR;Bodipy TR ATP;Bodipy TR-X SE;BO-PROTM-1;BO-PROTM-3;Brilliant Sulphoflavin FF;BTC;BTC-SN;钙黄绿素;钙黄绿素蓝;Calcium CrimsonTM;Calcium Green;Calcium Green-1Ca²⁺染料;Calcium Green-2Ca²⁺;Calcium Green-SN Ca²⁺;Calcium Green-C18Ca²⁺;Calcium Orange;Calcofluor White;羧基-X-罗丹明(5-ROX);Cascade BlueTM;Cascade Yellow;儿茶酚胺;CCF2(GeneBlazer);CFDA;叶绿素;色霉素A;色霉素A;CL-NERF;CMFDA;香豆素鬼笔环肽;C-藻青素(C-phycoyanine);CPM甲基香豆素;CTC;CTC甲贖(CTC Formazan);Cy2TM;Cy3.1 8;Cy3.5TM;Cy3TM;Cy5.1 8;Cy5.5TM;Cy5TM;Cy7TM;环AMP氟传感器(cyclic AMP Fluorosensor)(FiCRhR);Dabcyl;丹磺酰;丹磺酰胺;丹磺酰尸胺;丹磺酰氯;丹磺酰DHPE;丹磺酰氟;DAPI;Dapoxyl;Dapoxyl 2;Dapoxyl 3'DCFDA;DCFH(二氯二氢荧光素二乙酸酯);DDAO;DHR(二氢罗丹明123);Di-4-ANEPPS;Di-8-ANEPPS(非比率);DiA(4-Di-16-ASP);二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH);DiD—亲脂性示踪剂;DiD(DiIC18(5));DIDS;二氢罗丹明123(DHR);Di1(DiIC18(3));二硝基苯酚;DiO(DiOC18(3));DiR;DiR(DiIC18(7));DM-NERF(高pH);DNP;多巴胺;DTAF;DY-630-NHS;DY-635-NHS;ELF 97;曙红;赤藓红;赤藓红ITC;溴化乙锭;乙啡啶同质二聚体-1(EthD-1);Euchrysin;EukoLight;氯化铊(III);EYFP;固蓝;FDA;Feulgen(副品红);FIF(甲醛诱发荧光);FITC;Flazo橙;Fluo-3;Fluo-4;荧光素(FITC);荧光素二乙酸

酯;Fluoro-Emerald;荧光金(羟芪巴脒);Fluor-Ruby;Fluor X;FM 1-43TM;FM 4-46;Fura RedTM(高pH);Fura RedTM/Fluo-3;Fura-2;Fura-2/BCECF;Genacryl亮红B;Genacryl亮黄10GF;Genacryl粉红3G;Genacryl黄5GF;GeneBlazer (CCF2);Gloxalic Acid;粒状蓝;血卟啉;Hoechst 33258;Hoechst 33342;Hoechst 34580;HPTS;羟基香豆素;羟芪巴脒(荧光金);羟色胺;Indo-1,高钙;Indo-1,低钙;吡啶二碳菁(DiD);吡啶三碳菁(DiR);Intrawhite Cf;JC-1;J0-J0-1;J0-PRO-1;LaserPro;Laurodan;LDS 751 (DNA);LDS 751 (RNA);Leucophor PAF;Leucophor SF;Leucophor WS;丽丝胺罗丹明;丽丝胺罗丹明B;钙黄绿素/乙吡啶同质二聚体;LOLO-1;LO-PRO-1;萤光黄(Lucifer Yellow);Lyso Tracker蓝;Lyso Tracker蓝白;Lyso Tracker绿;Lyso Tracker红;Lyso Tracker黄;LysoSensor蓝;LysoSensor绿;LysoSensor黄/蓝;Mag绿;Magdala红(Phloxin B);Mag-Fura红;Mag-Fura-2;Mag-Fura-5;Mag-indo-1;Magnesium Green;Magnesium Orange;孔雀绿;Marina Blue;Maxilon Brilliant Flavin 10GFF;Maxilon Brilliant Flavin 8GFF;部花青(Merocyanin);甲氧基香豆素;Mitotracker绿FM;Mitotracker橙;Mitotracker红;光辉霉素;单溴二胺(Monobromobimane);单溴二胺(mBBr-GSH);单氯二胺(Monochlorobimane);MPS(甲基绿派若宁二苯乙烯);NBD;NBD胺;尼罗红;硝基苯并噁二唑(Nitrobenzoxadidole);去甲肾上腺素;核固红;核黄;Nylosan Brilliant lavin E8G;Oregon Green;Oregon Green 488-X;Oregon GreenTM;Oregon GreenTM488;Oregon GreenTM500;Oregon GreenTM514;海水蓝;副品红(Feulgen);PBFI;PE-Cy5;PE-Cy7;PerCP;PerCP-Cy5.5;PE-PE-TexasRed[Red 613];Phloxin B(Magdala Red);Phorwite AR;Phorwite BKL;Phorwite Rev;Phorwite RPA;磷3R;光刻胶;藻红蛋白B[PE];藻红蛋白R[PE];PKH26(Sigma);PKH67;PMIA;Pontochrome蓝黑;POPO-1;POPO-3;PO-PRO-1;PO-PRO-3;樱草黄;Procion黄;Propidium Iodid(PL);PyMPO;苾;派若宁;派若宁B;Pyrozal Brilliant Flavin 7GF;QSY 7;奎纳克林芥;Red 613[PE-TexasRed];试卤灵;RH 414;Rhod-2;罗丹明;罗丹明110;罗丹明123;罗丹明5GLD;罗丹明6G;罗丹明B;罗丹明B 200;罗丹明B extra;罗丹明BB;罗丹明BG;罗丹明Green;罗丹明Phallicidine;罗丹明鬼笔环肽;罗丹明红;罗丹明WT;玫瑰红;R-藻青素(R-phycoyanine);R-藻红蛋白(PE);S65A;S65C;S65L;S65T;SBFI;血清素;Sevron亮红2B;Sevron亮红4G;Sevron亮红B;Sevron橙;Sevron黄L;SITS;SITS(樱草黄);SITS(二苯乙烯异硫代磺酸(Stilbene Isothiosulphonic Acid));SNAFL钙黄绿素;SNAFL-1;SNAFL-2;SNARF钙黄绿素;SNARF1;Sodium Green;SpectrumAqua;SpectrumGreen;SpectrumOrange;Spectrum Red;SPQ(6-甲氧基-N-(3-磺丙基)喹啉鎓);二苯乙烯;磺酰罗丹明B can C;磺酰罗丹明Extra(Sulphorhodamine Extra);SYTO 11;SYTO 12;SYTO 13;SYTO 14;SYTO 15;SYTO 16;SYTO 17;SYTO 18;SYTO 20;SYTO 21;SYTO 22;SYTO 23;SYTO 24;SYTO 25;SYTO 40;SYTO 41;SYTO 42;SYTO 43;SYTO 44;SYTO 45;SYTO 59;SYTO 60;SYTO 61;SYTO 62;SYTO 63;SYTO 64;SYTO 80;SYTO 81;SYTO 82;SYTO 83;SYTO 84;SYTO 85;SYTOX蓝;SYTOX绿;SYTOX橙;四环素;四甲基罗丹明(TRITC);Texas RedTM;Texas Red-XTM缀合物;硫代二碳花青(Thiadicyanocyanine)(DiSC3);噻嗪红;噻嗪橙;硫黄素5;硫黄素S;硫黄素TCN;Thiolyte;噻嗪橙;Tinopol CBS(Calcofluor白);TMR;TO-PRO-1;TO-PRO-3;TO-PRO-5;TOTO-1;TOTO-3;TriColor(PE-Cy5);TRITC四甲基罗丹明异硫氰酸酯;True Blue;TruRed;Ultralite;荧光素钠B;Uvitex SFC;WW 781;X-罗丹明;

XRITC;二甲苯橙;Y66F;Y66H;Y66W;YO-PRO-1;YO-PRO-3;YOYO-1;YOYO-3、Sybr绿、噻唑橙(嵌入染料)、Alexa Fluor染料系列(例如,Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700和750)、Cy染料荧光团系列(例如,Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7)、Oyster染料荧光团(例如,Oyster-500、-550、-556、645、650、656)、DY-标记物系列(例如,DY-415、-495、-505、-547、-548、-549、-550、-554、-555、-556、-560、-590、-610、-615、-630、-631、-632、-633、-634、-635、-636、-647、-648、-649、-650、-651、-652、-675、-676、-677、-680、-681、-682、-700、-701、-730、-731、-732、-734、-750、-751、-752、-776、-780、-781、-782、-831、-480XL、-481XL、-485XL、-510XL、-520XL、-521XL)、ATTO荧光标记物(例如,ATTO 390、425、465、488、495、520、532、550、565、590、594、610、611X、620、633、635、637、647、647N、655、680、700、725、740)、CAL Fluor和Quasar染料(例如,CAL Fluor Gold 540、CAL Fluor Orange 560、Quasar 570、CAL Fluor Red 590、CAL Fluor Red 610、CAL Fluor Red 635、Quasar 670)、量子点(例如,Qdot 525、Qdot565、Qdot585、Qdot605、Qdot655、Qdot705、Qdot 800)、荧光素、罗丹明、藻红蛋白或其组合。

[0117] 可在FRET中使用的分子可包括如上所述的荧光团、荧光素、5-羧基荧光素(FAM)、2'7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、罗丹明、6-羧基罗丹明(R6G)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸(DABCYL)和5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)。

[0118] 在一些情况下,FRET对的受体可用于猝灭供体的荧光。受体可不具有或几乎不具有荧光。在一些情况下,用于猝灭的FRET受体可称为猝灭剂。猝灭剂的非限制性实例可包括Black Hole猝灭剂染料(例如,BHQ-0、BHQ-1、BHQ-2、BHQ-3、BHQ-10)、QSY染料荧光猝灭剂(例如,QSY7、QSY9、QSY21、QSY35)、Dabcyl和Dabsyl、Cy5Q、Cy7Q、深色花青染料(其可以例如与供体荧光剂如Cy3B、Cy3或Cy5联合使用)、DY-猝灭剂(例如,DYQ-660和DYQ-661)、ATTO荧光猝灭剂(例如,ATTO 540Q、580Q、612Q)或其组合。

靶物质/探针结合

[0119] 本文提供的方法、装置和系统可用于实时地测量、监测和/或检测多种靶物质(例如,扩增子、引物、dNTP或任何其他试剂和/或分析物)与多种探针的杂交或结合特征。可配置和/或设计探针,使得一种或多种类型的靶物质可与一种或多种类型的探针特异性地结合或杂交。如本文所用的,探针与特定的靶分子“特异性地结合”,条件是该探针与该分子结合的亲和力大于其与样品中其他物质结合的亲和力。如本文别处所提供的,某些类型的探针可包含在一定百分比的独立可寻址位置内,并且在靶物质与位置内的探针结合时,由此检测或收集的信号可指示或反映特定类型的物质的存在、量、数量、活性和/或结合特征。

[0120] 探针与靶物质之间的结合可发生在溶液(例如,水溶液)中。靶物质与探针之间的结合和信号检测可同时或顺序发生。例如,在一些情况下,探针与靶物质之间的结合可在信号检测之前发生。

[0121] 在一些情况下,探针与靶物质可通过杂交彼此特异性地结合。在一些情况下,该结合可通过其他分子识别机制实现。分子识别可涉及检测分子间的结合事件。结合的程度可称为“亲和力”。生物分子之间的亲和力可能受到非共价分子间相互作用,例如,氢键结合、疏水相互作用、静电相互作用和范德华力的影响。在多路结合事件中,可涉及多种靶物质和

探针。例如,在一些情况下,可测试多种不同的核酸分子和/或不同蛋白质之间的结合。在这种情况下,具有优先与探针结合的靶物质可能是优选的,所述靶物质对于该探针具有更大的结合亲和力。因此,确定特定探针是否参与结合事件可指示样品中靶物质的存在,该靶物质对于探针具有足够的亲和力以满足正在使用的检测系统的检测阈值水平。可以根据探针与物质之间结合的特异性和强度确定结合配偶体的身份。

[0122] 所述特异性结合可以是例如受体-配体、酶-底物、抗体-抗原或杂交相互作用。探针/靶物质结合对可以是核酸与核酸,例如DNA/DNA、DNA/RNA、RNA/DNA、RNA/RNA。探针/靶物质结合对可以是多肽与核酸,例如多肽/DNA和多肽/RNA,如序列特异性DNA结合蛋白质。探针/靶物质结合对可以是能够进行序列特异性DNA或RNA识别的任何核酸和合成DNA/RNA结合配体(如聚酰胺)。探针/靶物质结合对可包含天然结合化合物如天然的酶和抗体,以及合成结合化合物。探针/靶物质结合可包含适配体,该适配体为通常通过重复轮的体外选择或等效的SELEX(通过指数式富集进行配体的系统性进化)已经工程化为具有特异性结合特性的核酸或多肽种类。

[0123] 杂交或结合可导致信号变化。信号可能与杂交或结合的物质有关(例如,成比例)。例如,靶物质浓度相差5倍的测定可导致信号强度相差3至6倍。信号可能与探针与靶物质之间的结合亲和力有关。信号强度可用于鉴别不同类型的靶物质。可以测定对照样品并与待检测的靶物质进行比较,或者可以不进行。在需要更精确定量的情况下,可运行对照来校正如本文所述的样品制备和杂交中引入的变化。

计算机控制系统

[0124] 本公开内容提供了被编程为实施本公开内容的方法的计算机控制系统。图19显示了计算机系统1901,其被编程或以其他方式配置为执行本公开内容的方法和系统的多种功能,例如执行扩增反应、实时检测和/或监测靶物质(例如,引物、扩增子)与探针阵列的结合,鉴定扩增反应的循环阈值(C_t)和/或监测反应的进展。计算机系统1901可调控同时执行至少一个扩增反应和检测由探针阵列产生的信号变化的多个方面,例如,温度控制、试剂处理和信号检测。计算机系统1901可与本公开内容提供的系统集成。

[0125] 计算机系统1901包含中央处理器(CPU,在本文中也称为“处理器”和“计算机处理器”)1905,其可以是单核或多核处理器,或用于平行处理的多个处理器。计算机系统1901还包括存储器或存储器位置1910(例如,随机存取存储器、只读存储器、闪存存储器)、电子存储单元1915(例如,硬盘)、用于与一个或多个其他系统通信的通信接口1920(例如,网络适配器)和外围设备1925,如高速缓冲存储器、其他存储器、数据存储和/或电子显示适配器。存储器1910、存储单元1915、接口1920和外围设备1925通过通信总线(实线)如主板与CPU 1905通信。存储单元1915可以是用于存储数据的数据存储单元(或数据储存库)。计算机系统1901可在通信接口1920的辅助下可操作地耦合至计算机网络(“网络”)1930。网络1930可以是因特网、互联网和/或外联网、或与因特网通信的内联网和/或外联网。在一些情况下,网络1930是电信和/或数据网络。网络1930可包含一个或多个计算机服务器,其可实现分布式计算,如云计算。在一些情况下,网络1930可借助计算机系统1901实现对等网络,其可使耦合到计算机系统1901的装置作为客户端或服务器。

[0126] CPU 1905可执行一系列的机器可读指令,该机器可读指令可体现在程序或软件中。指令可存储于存储器位置,如存储器1910中。指令可被引导至CPU 1905,其随后可对CPU

1905进行编程或以其他方式配置以实现本发明的方法。由CPU 1905执行的操作的实例可包括获取、解码、执行和写回。

[0127] CPU 1905可以是电路如集成电路的一部分。系统1901中的一个或多个其他组件可包括在电路中。在一些情况下,该电路是专用集成电路(ASIC)。

[0128] 存储单元1915可存储文件,如驱动程序、库和保存的程序。存储单元1915可存储用户数据,例如用户偏好和用户程序。在一些情况下,计算机系统1901可包括在计算机系统1901外部,诸如位于通过内联网或因特网与计算机系统1901通信的远程服务器上的一个或多个附加数据存储单元。

[0129] 计算机系统1901可通过网络1930与一个或多个远程计算机系统通信。例如,计算机系统1901可与用户(例如,实验室技术人员、医生)的远程计算机系统通信。远程计算机系统的实例包括个人计算机(例如便携式PC)、板型或平板PC(例如,Apple® iPad、Samsung® Galaxy Tab)、电话、智能电话(例如Apple® iPhone、支持Android的装置、Blackberry®)或个人数字助理。用户可经由网络1930访问计算机系统1901。

[0130] 如本文所述的方法可通过机器(例如,计算机处理器)可执行代码来实现,该机器可执行代码存储在计算机系统1901的电子存储位置,诸如存储器1910或电子存储单元1915上。该机器可执行代码或机器可读代码可以以软件的形式提供。在使用期间,代码可由处理器1905执行。在一些情况下,代码可从存储单元1915检索并存储在存储器1910上,以便处理器1905迅速存取。在一些情况下,可排除电子存储单元1915,并且机器可执行指令存储在存储器1910上。

[0131] 所述代码可被预编译并被配置用于与具有适于执行该代码的处理器机器一起使用,或可在运行时进行编译。所述代码可以以可被选择用于使代码以预编译或编译方式执行的编程语言提供。

[0132] 本文所提供的系统和方法的各方面,如计算机系统1901,可在编程中体现。该技术的各个方面可被认为是“产品”或“制品”,其通常为在机器可读介质类型中执行或体现的机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据的形式。机器可执行代码可存储于电子存储单元,例如存储器(例如,只读存储器、随机存取存储器、闪存存储器)或硬盘上。“存储”型介质可包括计算机、处理器等的任何或所有有形存储器,或其相关模块,如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等,其可在任何时间为软件编程提供非暂时性存储。该软件的全部或部分有时可通过因特网或各种其他电信网络进行通信。例如,这样的通信可使得软件能够从一个计算机或处理器加载到另一个,例如从管理服务器或主计算机加载到应用服务器的计算机平台。因此,可承载软件元件的另一种类型的介质包括光波、电波和电磁波,诸如通过有线和光学陆上网络以及各种空中链路在本地设备之间的物理接口中使用的。携带这样的波的物理元件,如有线或无线链路、光链路等,还可被认为是携带该软件的介质。如本文所用的,除非限于非暂时性有形“存储”介质,否则诸如计算机或机器“可读介质”的术语是指参与向处理器提供用于执行的指令的任何介质。

[0133] 因此,机器可读介质如计算机可执行代码可采取多种形式,包括但不限于有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质包括例如光盘或磁盘,诸如任何计算机中的任何存储装置等,诸如可用于实现图中所示的数据库等。易失性存储介质包括动态

存储器,诸如这样的计算机平台的主存储器。有形传输介质包括同轴电缆;铜线和光纤,包括包含计算机系统内的总线的电线。载波传输介质可采取电或电磁信号或者声波或光波的形式,诸如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间所生成的信号。因此,计算机可读介质的常见形式包括例如:软盘、柔性盘、硬盘、磁带、任何其他磁介质、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡片纸带、具有孔图案的任何其他物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储器芯片或匣盒、传输数据或指令的载波、传输这样的载波的电缆或链路、或计算机可从中读取编程代码和/或数据的任何其他介质。这些形式的计算机可读介质中的许多可涉及将一个或多个指令的一个或多个序列携带到处理器用于执行。

[0134] 计算机系统1901可包括电子显示器1935或与电子显示器1935进行通信,该电子显示器包括用于提供例如温度值、温度控制、检测器数据和试剂处理的用户界面(UI) 1940。UI的实例包括但不限于图形用户界面(GUI)和基于网络的用户界面。本发明的方法和系统可通过一种或多种算法来实现。算法可在中央处理器1905执行时通过软件实现。该算法可以例如控制每个可寻址位置的温度,收集信号并分析收集的数据。

实施例

实施例1:循环阈值(C_t) 鉴定

[0135] 可采用本公开内容的方法、装置和系统测量循环阈值(C_t) 即扩增曲线与阈值线之间的交叉点,以及扩增反应中靶物质的浓度的相对测量值。图9A-图9D中的左侧两图和右侧两图分别示出了示例性不对称扩增反应和常规扩增反应中测定的 C_t 。在不对称扩增反应(图9A和图9B)中,使用了限制引物,即限制引物的浓度比引物对的另一个引物的浓度低得多。可用报道分子(例如,能量受体)标记引物对的两个引物。随着扩增反应的进行,引物对中的两个引物均被消耗。由于其较低的起始浓度,限制引物比它的配对物更快耗尽。一些探针可被设计为与限制引物特异性结合,并且探针与限制引物之间结合时的信号变化指示扩增反应的进展。如图9B所示,在扩增的早期阶段,仅有很少的限制引物(即P(+)) 参与扩增反应,并且限制引物与探针之间的结合/杂交不产生或几乎不产生信号。随着扩增反应的进行,越来越多的限制引物参与扩增反应,并且在反应混合物中可发现较少的结合对(即,限制引物和探针)。结合对数目的减少导致来自探针的信号增加,并且随着限制引物耗尽可很快达到平稳期。根据信号随着循环数的变化,可容易地鉴定出循环阈值(C_t) 。

[0136] 另一方面,在常规的扩增方法(图9C和图9D)中,具有基本相同浓度的引物对用于扩增靶核酸序列。在这样的方法中,应用供体标记的探针。这种标记的探针在其与扩增的产物结合之前可发射/生成信号。在扩增反应的早期阶段,产生极少的扩增子,并且由探针产生的信号较少受到影响。然后,扩增子随着热循环数而以指数方式积累并与大量探针结合。扩增子与探针之间的这种结合导致探针所产生的信号降低。通过绘制信号与循环数的图,可确定循环阈值(C_t) 。

实施例2:用于检测芯片上扩增反应的引物耗尽法

[0137] 图14A-图14C显示了检测芯片上扩增反应的示例性引物耗尽法。如图14A所示,提供了具有多个探针的探针阵列。每个探针用报道分子(例如,能量供体)进行标记,并被配置为能够与引物对中的限制引物结合。可用另一种类型的报道分子标记限制引物,使得在引物与探针结合时,探针最初所产生的信号可减少或消除。随着扩增反应的进行,越来越多的

限制引物被消耗并且可存在较少的结合对,从而导致从探针阵列检测到的信号增加。正如所理解的,从探针阵列检测或获得的信号的总强度可高度依赖于热循环数。通过使用热控制模块,可精确地控制温度曲线,如图14C所示。随后可通过检测探针的总信号强度来实时监测扩增反应的进展(图14B)。

[0138] 图15-图18显示了通过本公开内容的引物耗尽法获得的示例性数据。如图15所示,使用了至少两种探针,每种探针可与引物序列和对照序列特异性地结合。以这样一种方式设计对照序列,使得该对照序列不参与扩增反应,因此由对照序列-探针结合对产生的信号与扩增反应的进展无关。

[0139] 图16显示了检测到的荧光和扩增反应的温度的时间依赖性。如图16所示,针对对照序列检测到的荧光信号的减少是由光漂白引起的。而对于引物序列,观察到时间常数 τ 的增加,这可能是由引物浓度的降低引起的。通过绘制测量的时间常数 τ 对循环数的图,可监测扩增反应的进展。

[0140] 通过采用本文提供的方法和系统,可实时监测扩增反应(图17),并且可鉴定循环阈值(C_t)与模板浓度之间的相关性或关联(图18)。

[0141] 尽管本文中已经示出并描述了本发明的优选实施方案,但对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。并不意在通过说明书中提供的具体实例来限制本发明。虽然已经参考前述说明书对本发明进行了描述,但对本文的实施方案的描述和说明并不意在解释为限制意义。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到多种变化、改变和替代。此外,应当理解,本发明的所有方面不限于取决于多种条件和变量的本文所阐述的具体描述、配置或相对比例。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。因此,预期本发明还将涵盖任何这样的替代、修改、变化或等同项。以下权利要求旨在限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同项。

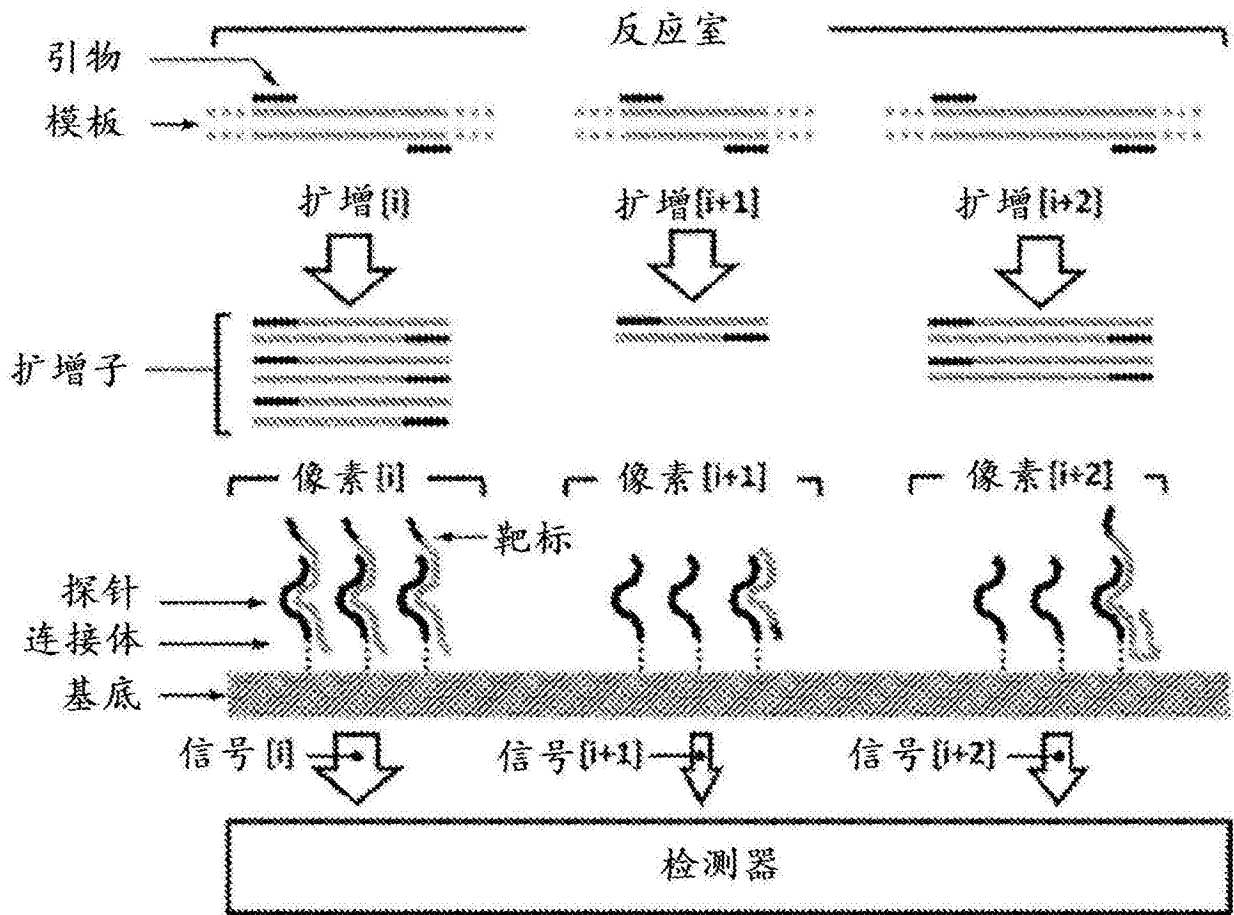


图1

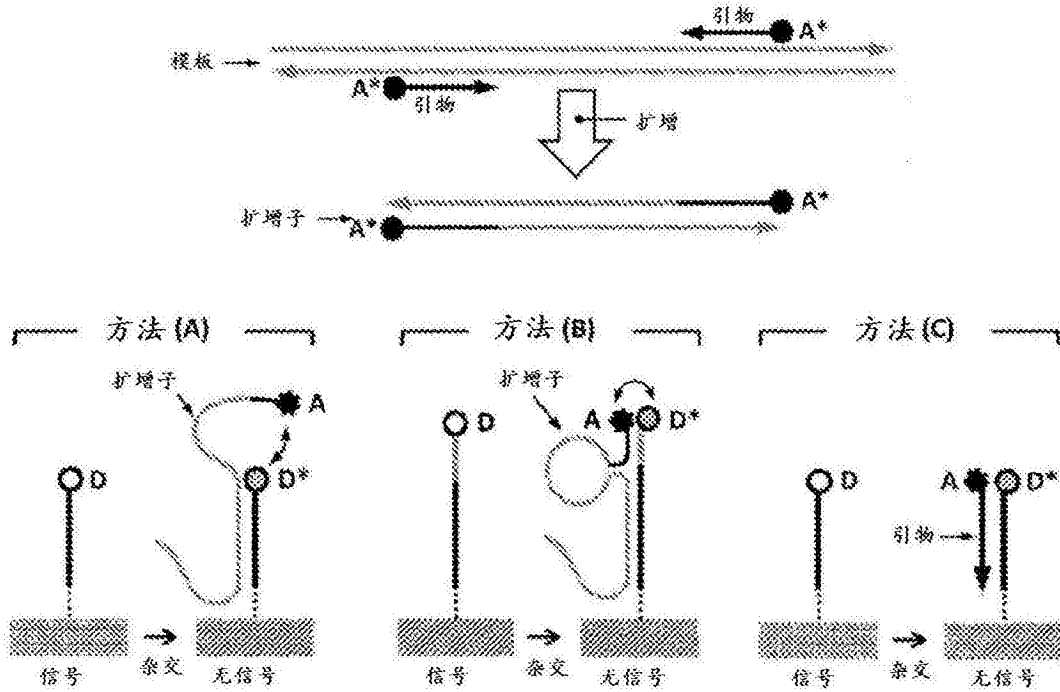


图2

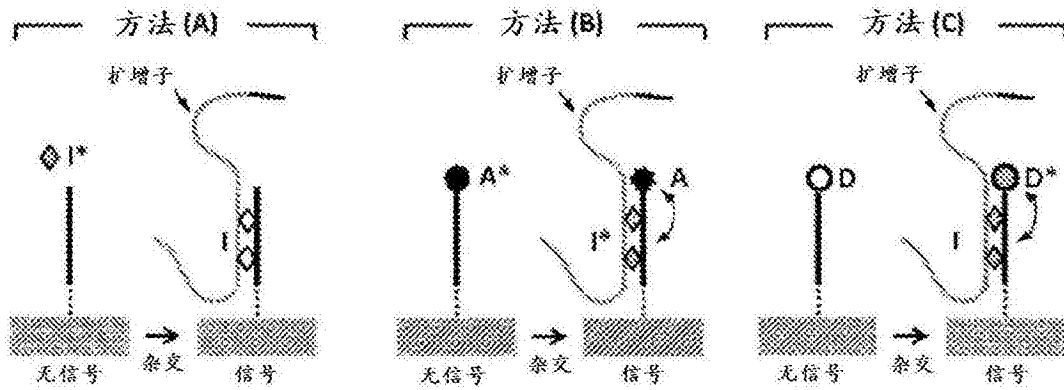
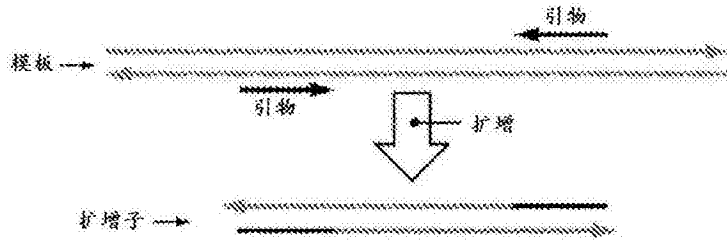
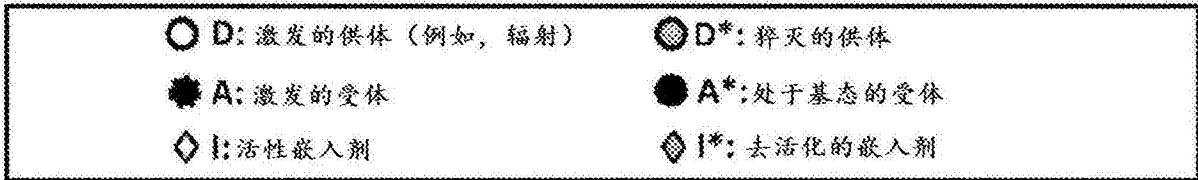


图3

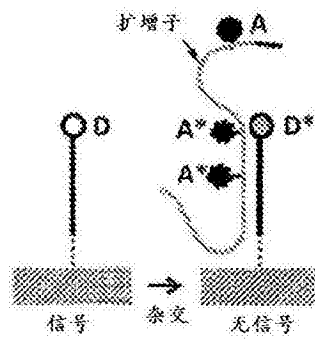
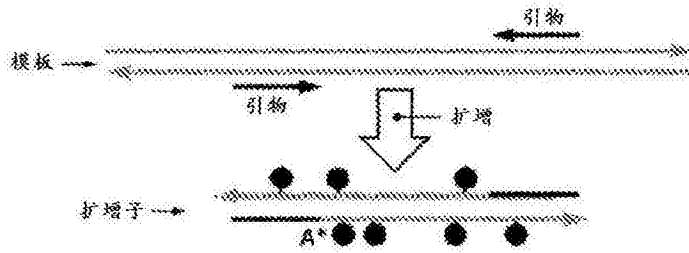
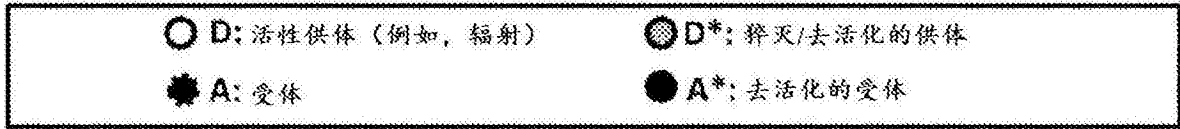


图4

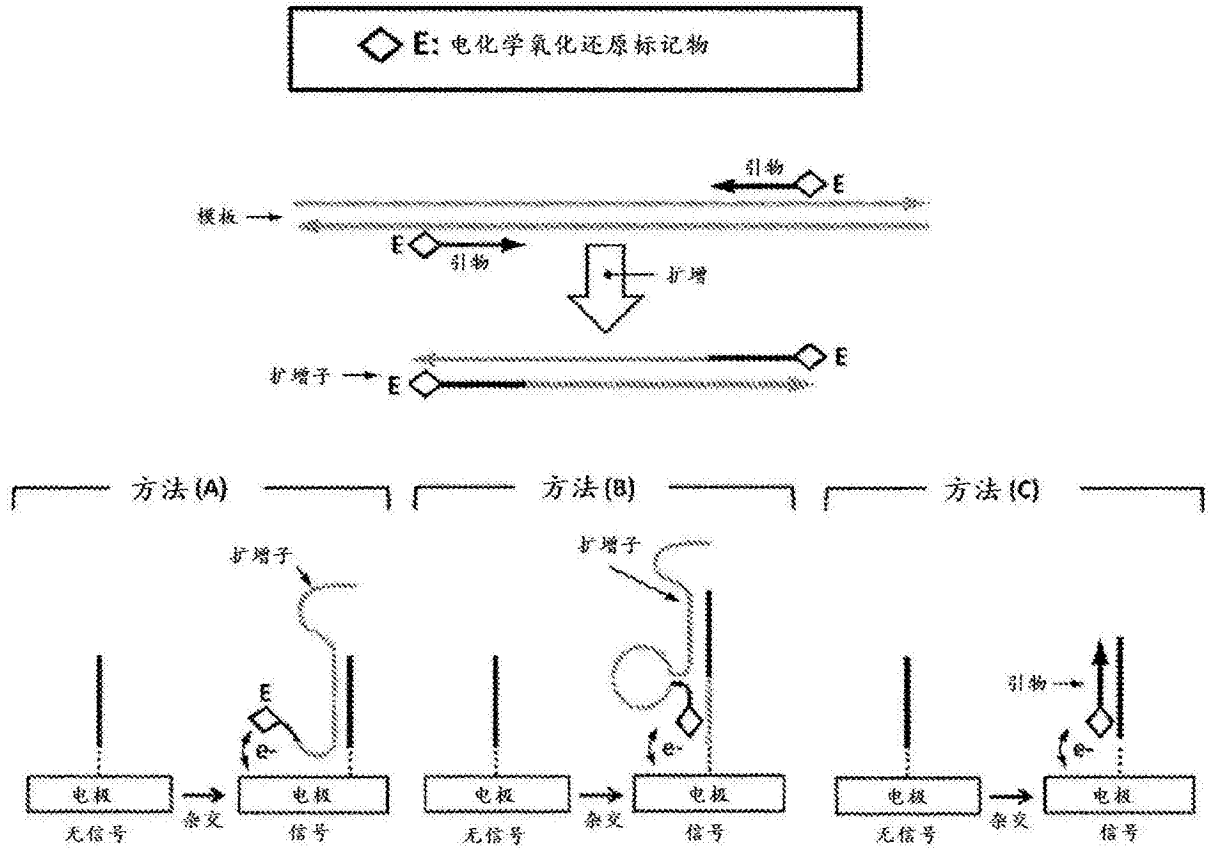


图5

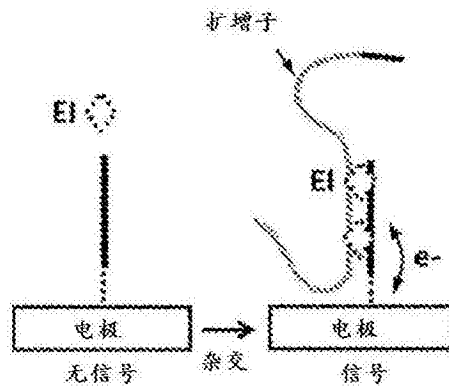
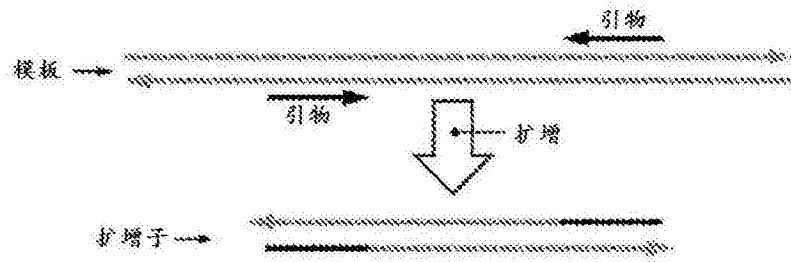


图6

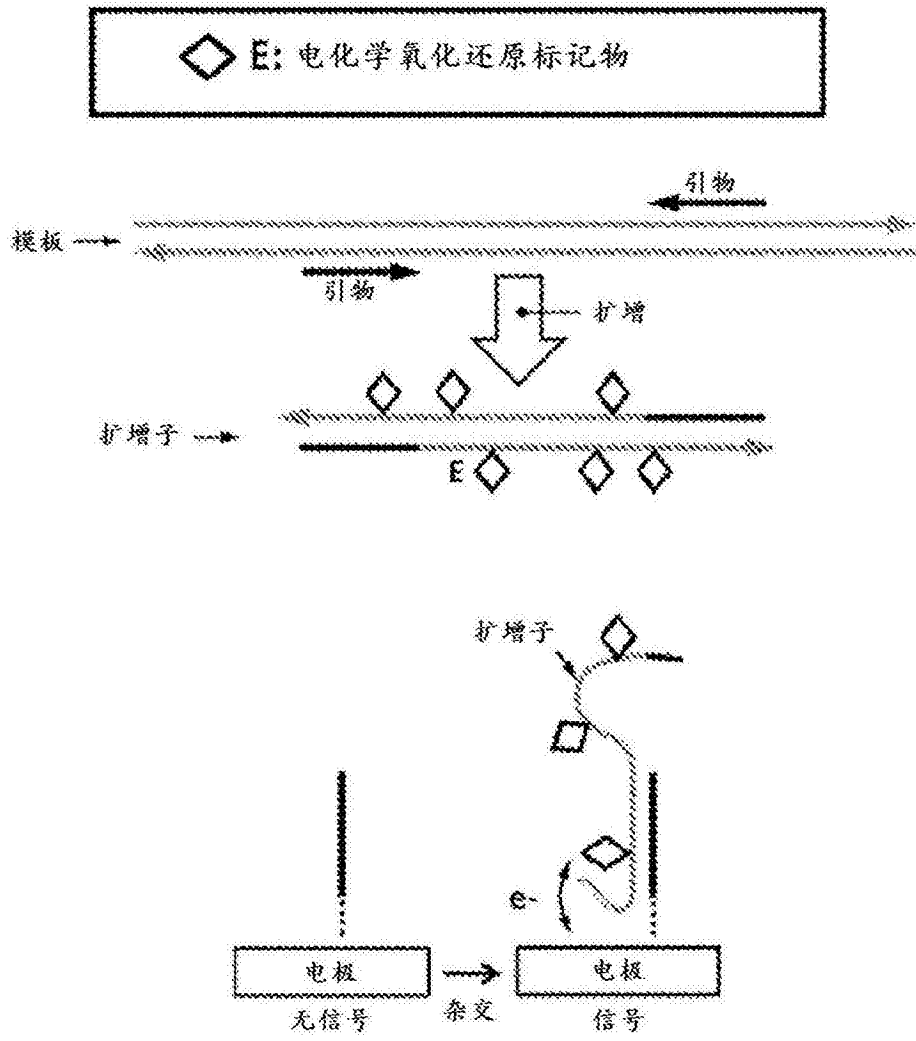


图7

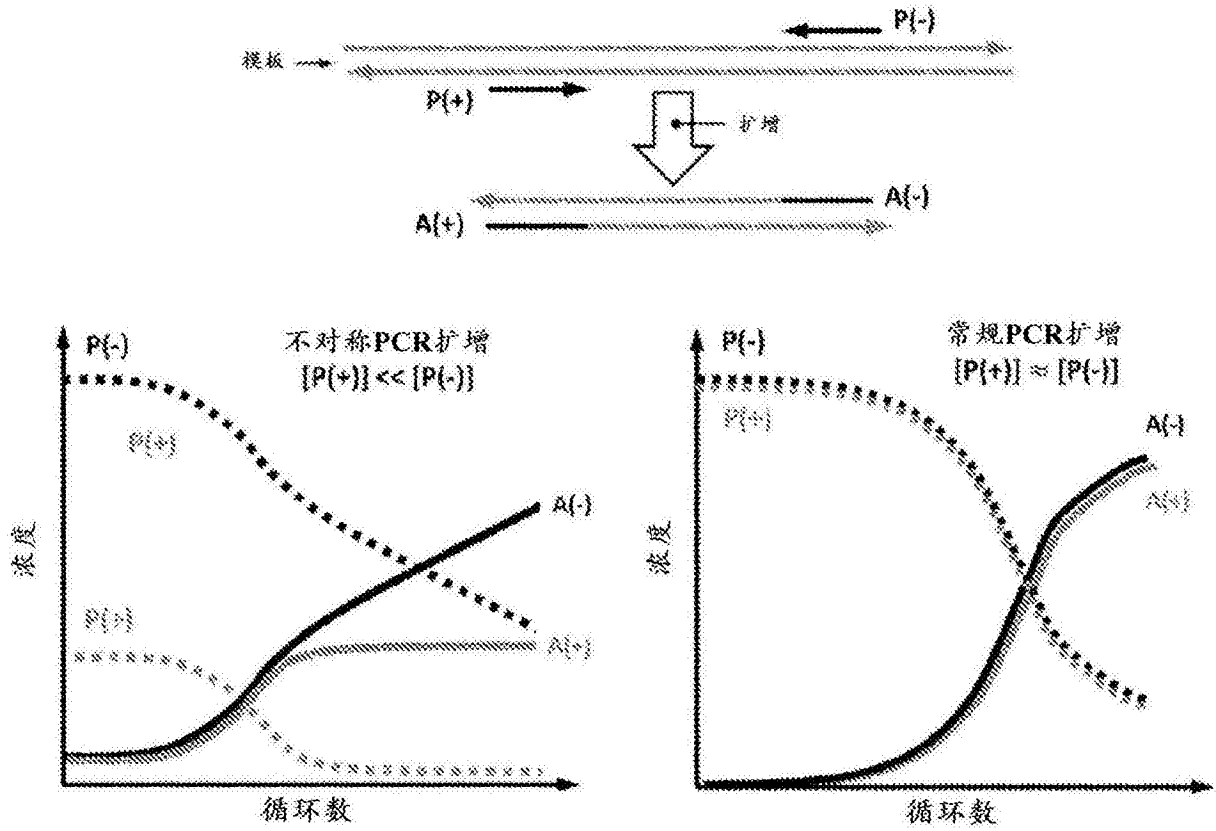


图8

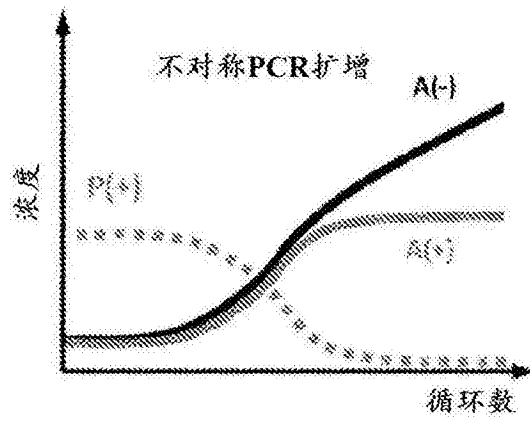


图9A

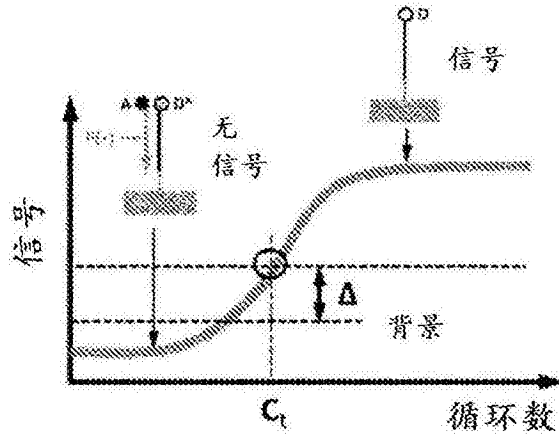


图9B

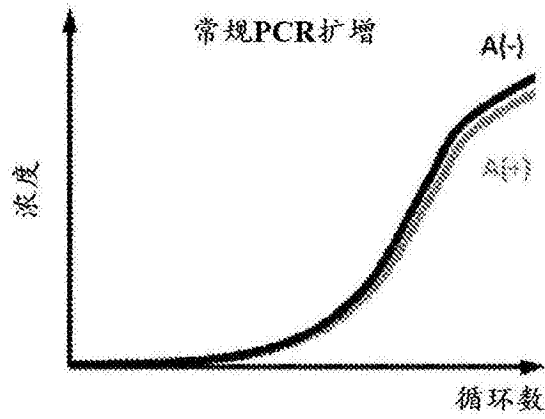


图9C

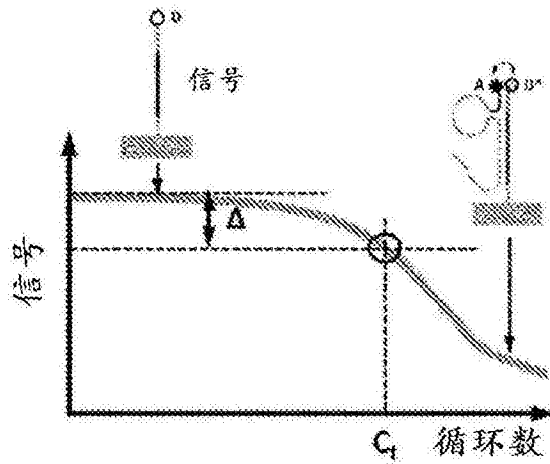


图9D

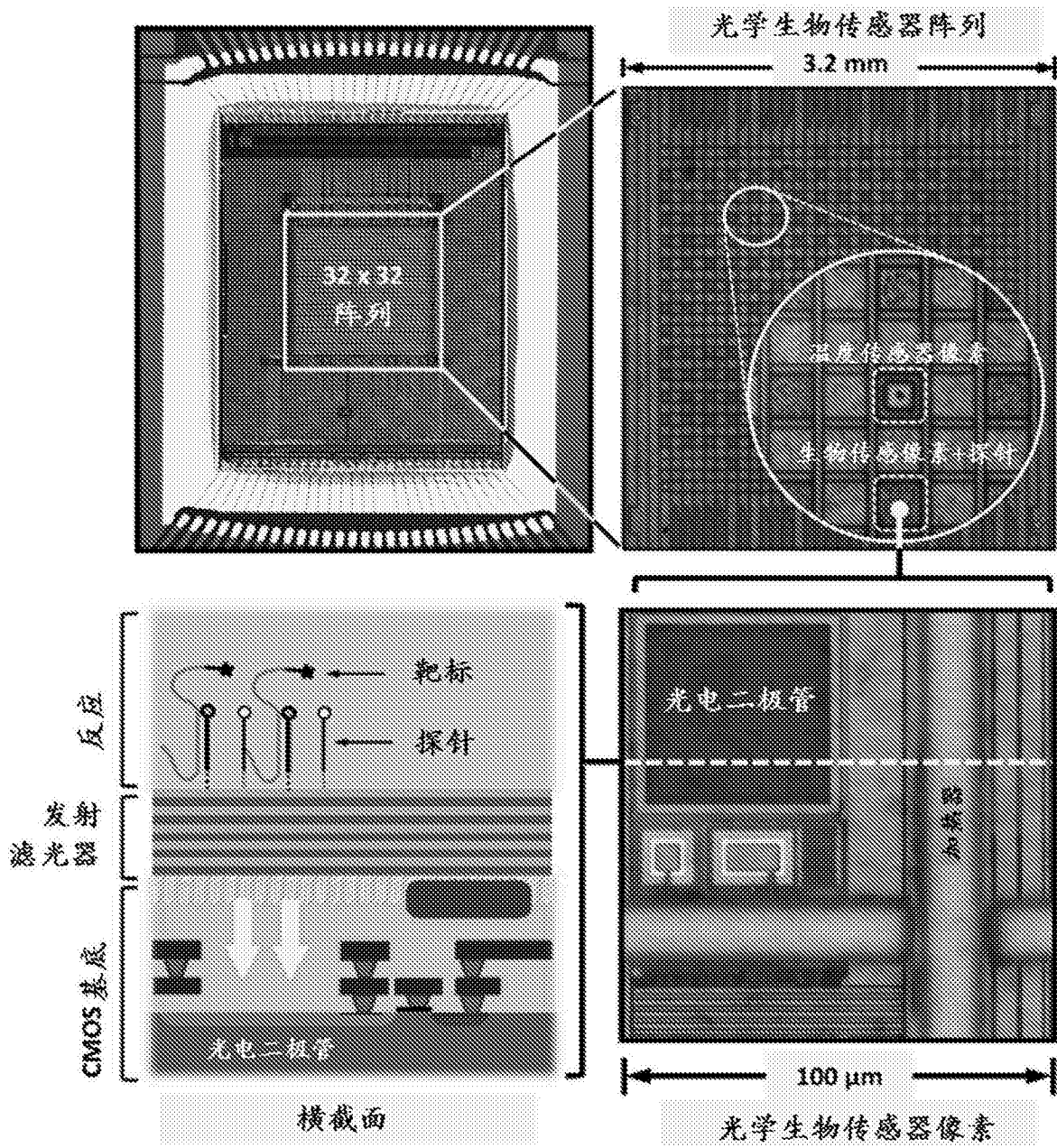


图10

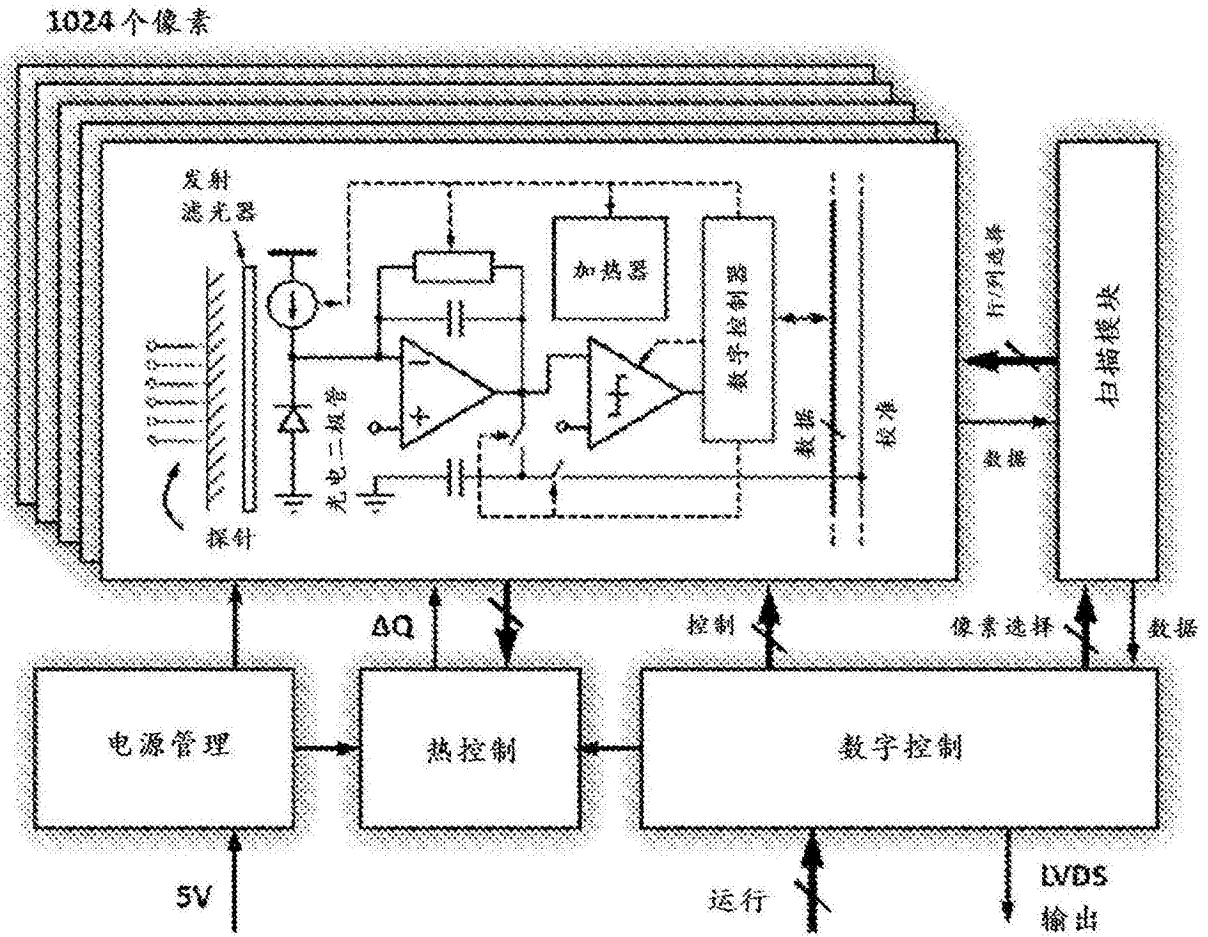


图11

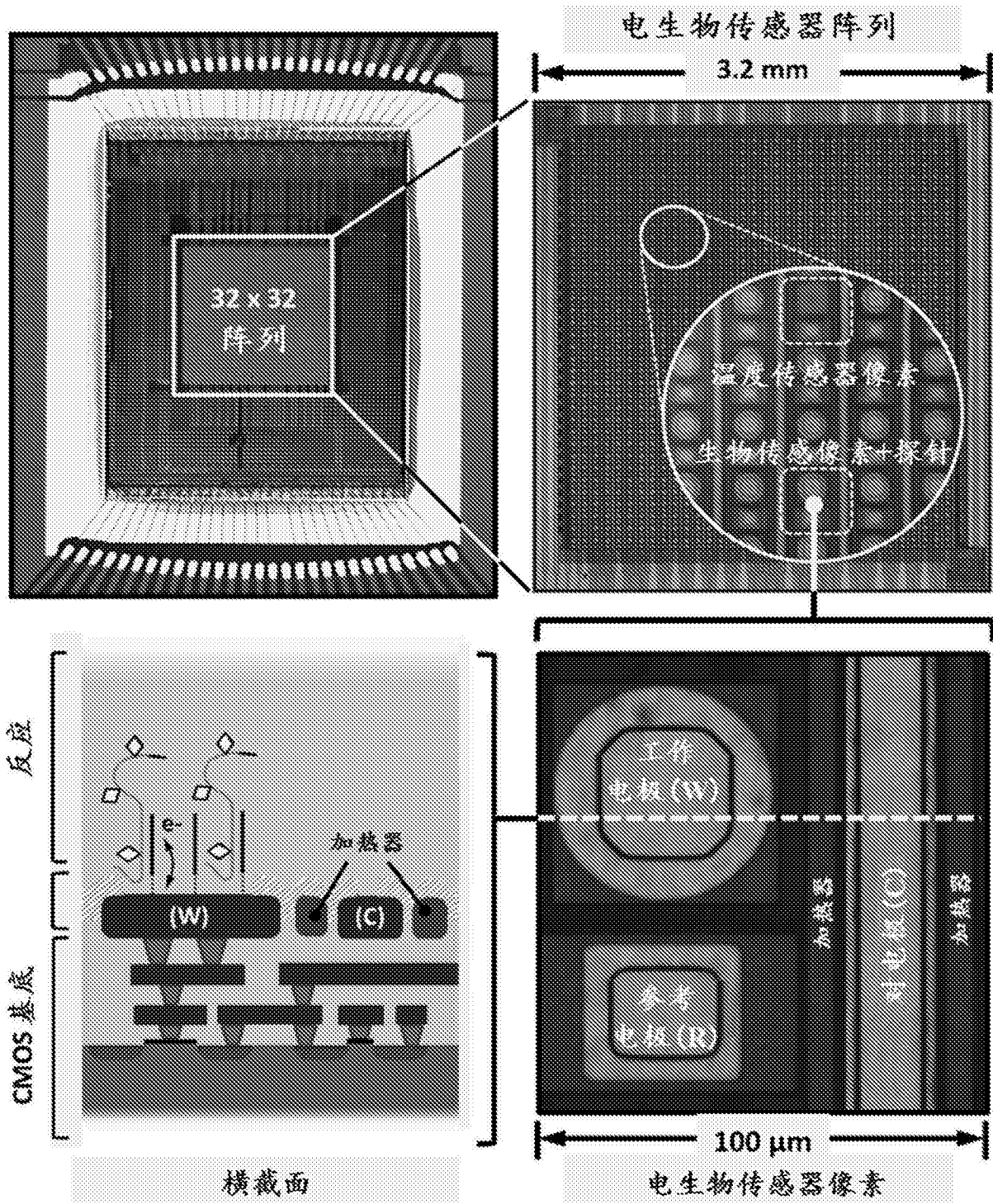


图12

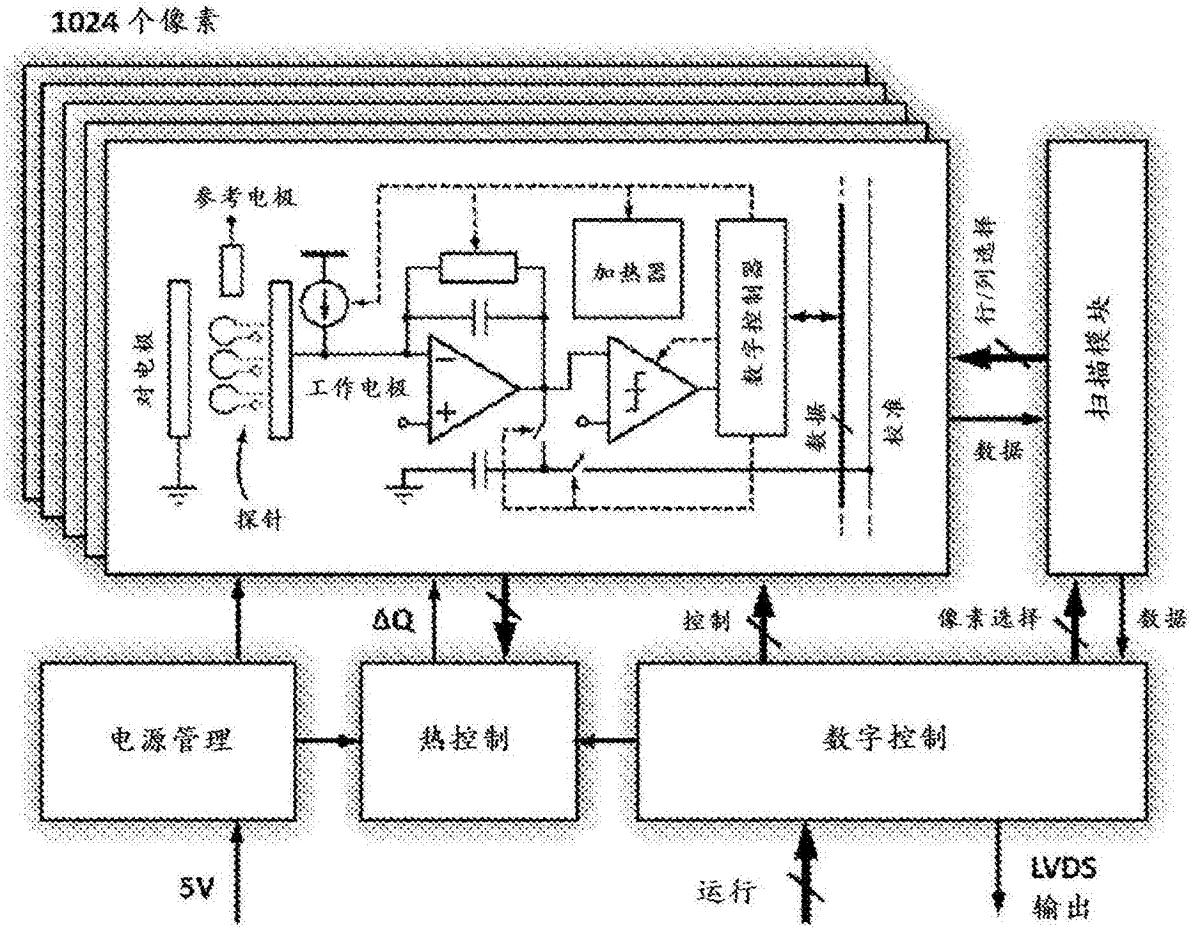


图13

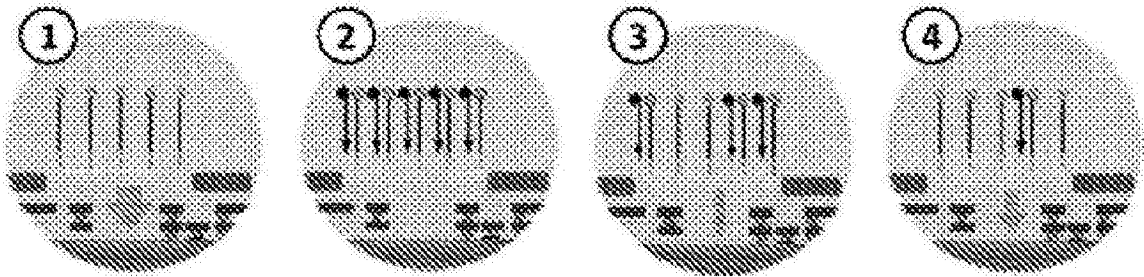


图14A

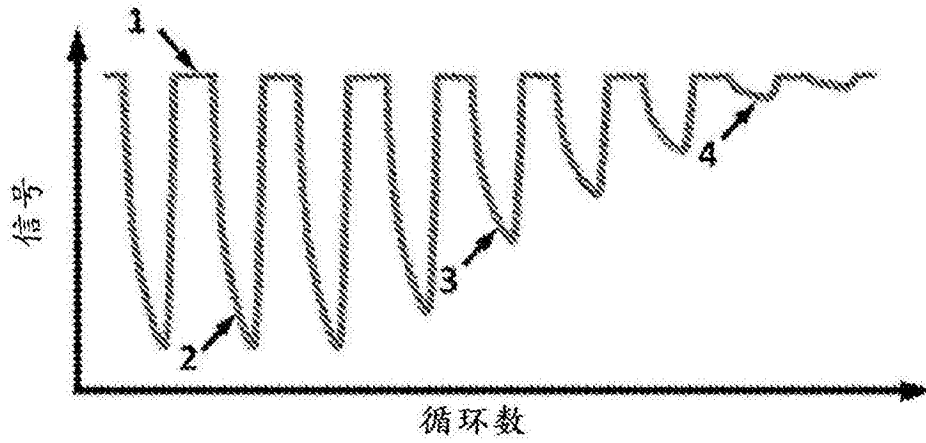


图14B

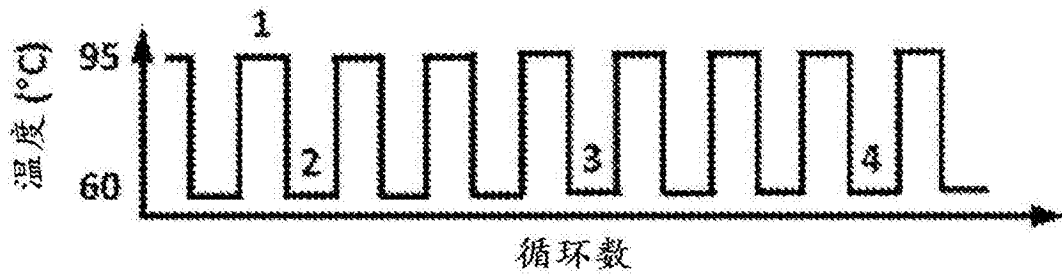


图14C

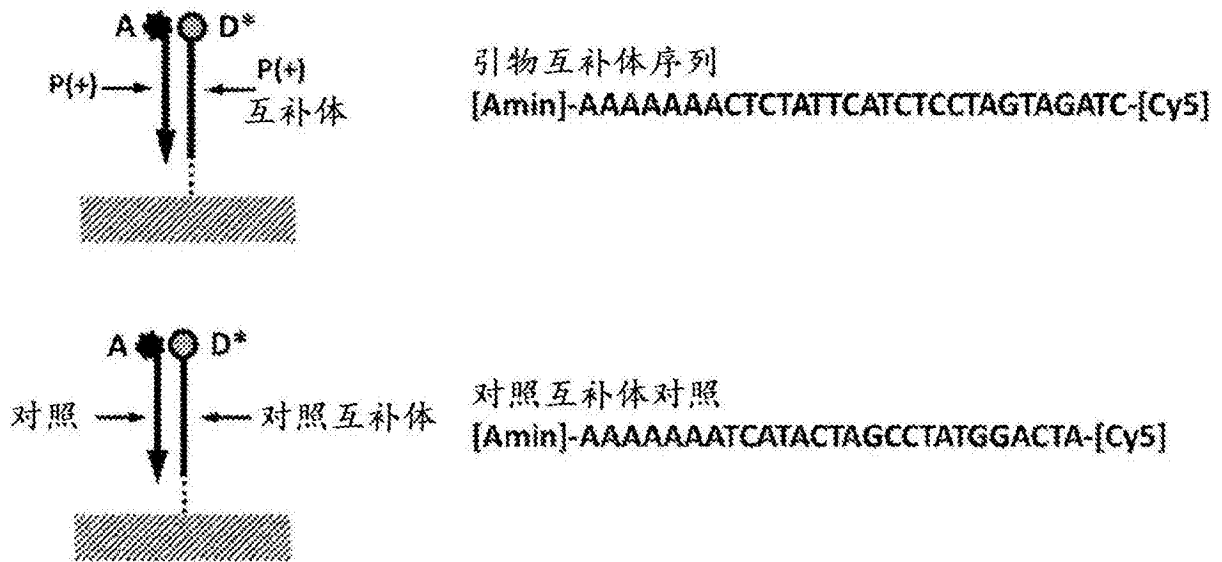


图15

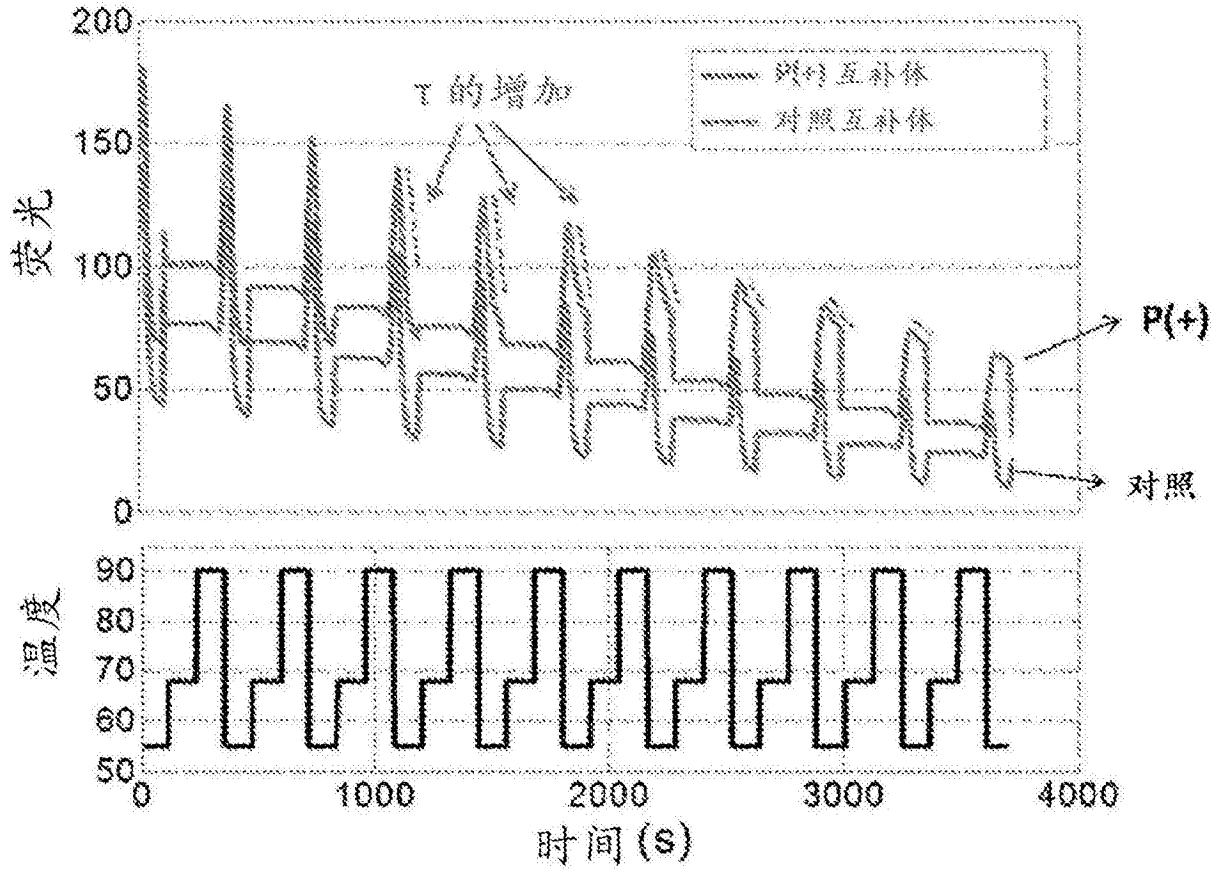


图16

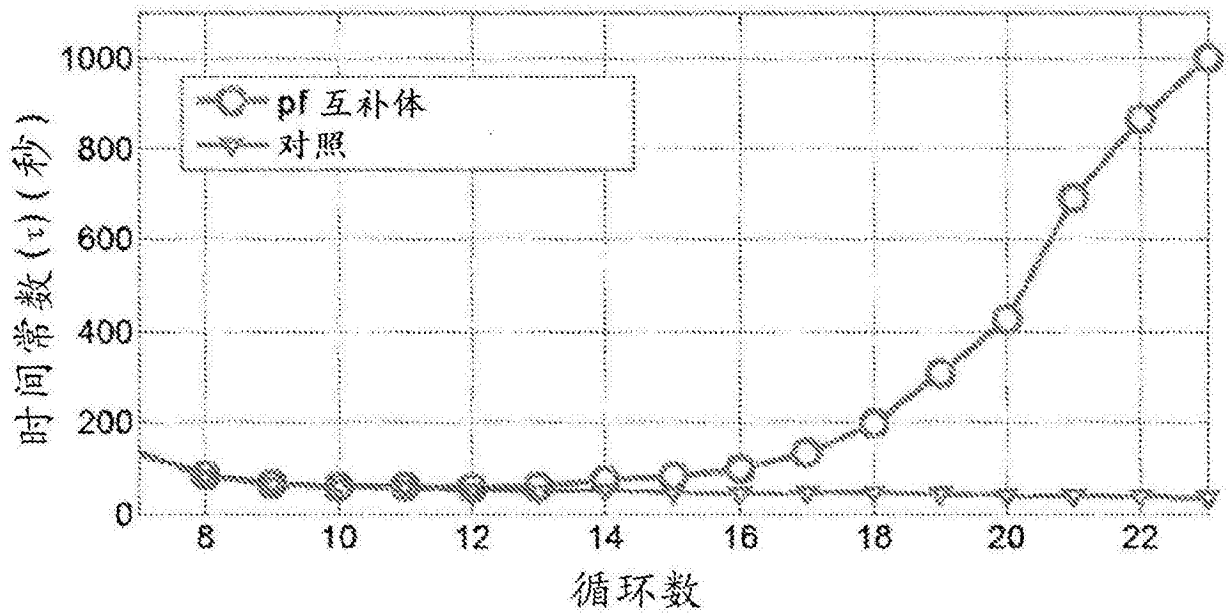


图17

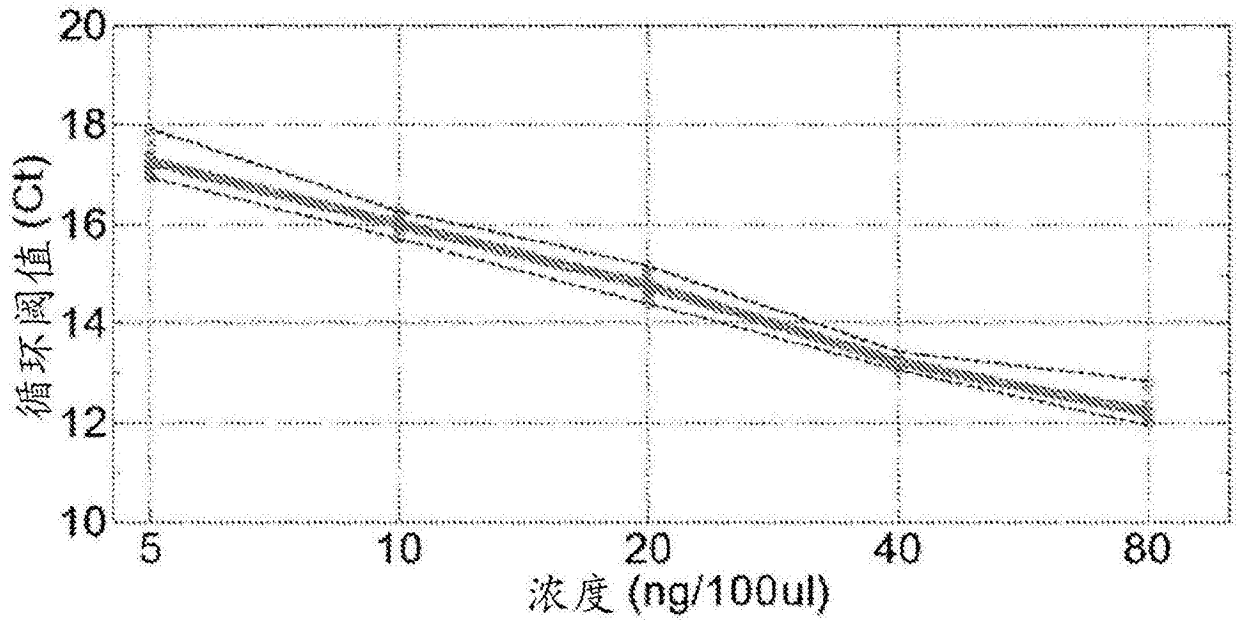


图18

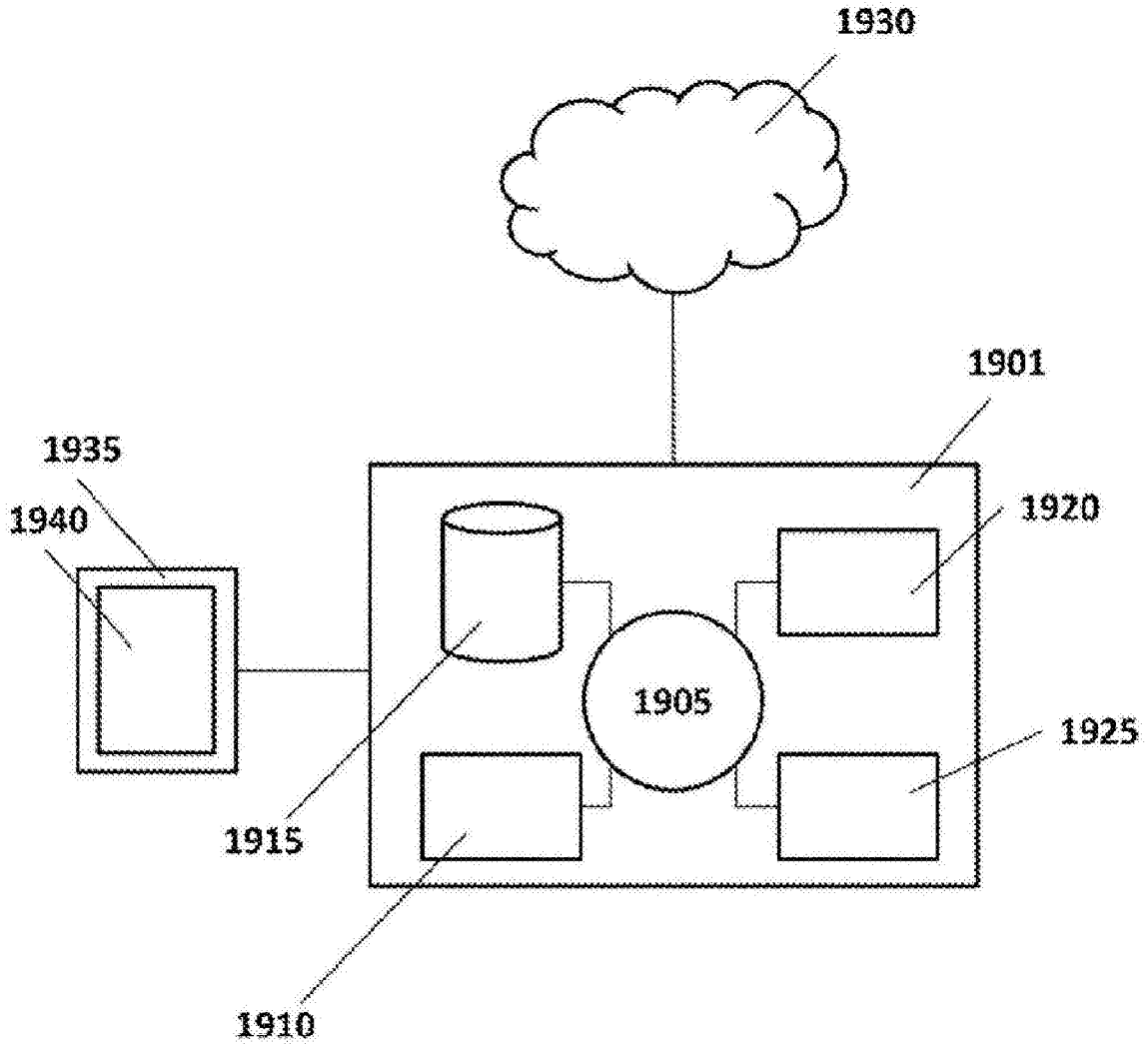


图19