



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110997934 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201880050628.9

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(22)申请日 2018.05.31

代理人 武晶晶

(30)优先权数据

62/512,855 2017.05.31 US

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6806(2018.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12Q 1/6825(2018.01)

2020.02.03

C12Q 1/6837(2018.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/035282 2018.05.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/222800 EN 2018.12.06

(71)申请人 生捷科技控股公司

地址 开曼群岛大开曼

(72)发明人 周巍 格伦·麦克加尔 梅蕊

菲利普·克洛诺哥拉克

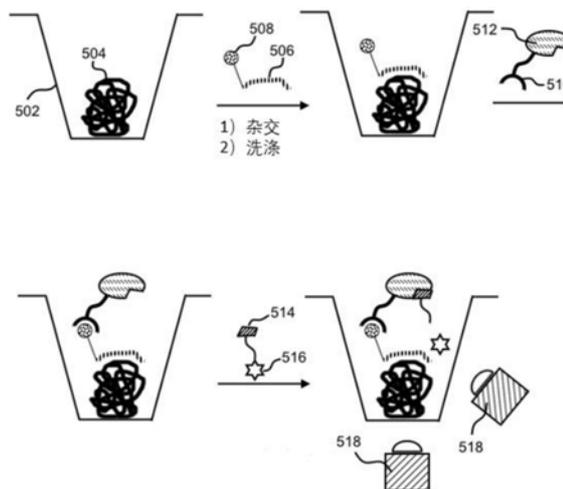
权利要求书2页 说明书23页 附图4页

(54)发明名称

具有电子检测系统的寡核苷酸探针阵列

(57)摘要

本公开提供了用于杂交检测核酸靶标的方法,装置和系统。该检测可以使用具有可寻址微孔的探针阵列。每个微孔可以保留一个探针的多个拷贝,该探针可以与特定核酸靶标的一部分互补。探针的多个拷贝可以通过扩增技术从探针序列的合并文库中产生,所述扩增技术包括滚环扩增和乳液PCR。杂交的检测可能依赖于使用离子敏感场效应晶体管(ISFET)和光学检测器的方法来检测指示核酸靶标存在的信号。



1. 一种用于分析样品中靶核酸的存在的方法,包括:
 - (a) 提供芯片,所述芯片包括与样品室相邻的传感器,其中所述样品室被配置为保留探针的多个拷贝,其中所述探针选择性地偶联至所述靶核酸,并且其中该传感器检测至少一个指示所述样品室中是否存在所述靶核酸的信号;
 - (b) 在允许所述探针选择性偶联至所述靶核酸的条件下在所述样品室中提供所述样品;
 - (c) 测量所述至少一个信号;和
 - (d) 在所述探针的多个拷贝不通过共价键连接到所述样品室的表面的条件下,确定所述样品中所述靶核酸的存在与否。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器在所述芯片中多个传感器的阵列中,其中所述样品室在所述芯片中多个样品室的阵列中,且其中所述多个样品室中的每一个与所述多个传感器的阵列中的至少一个传感器相邻。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶核酸是第一核酸的片段。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述探针是多个探针的文库的一部分。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述探针包括:
 - 1) 与所述靶核酸的至少一部分互补的核酸片段的序列;和
 - 2) 附接至1)中所述核酸片段序列的第一末端的条形码序列。
6. 根据权利要求5所述的方法,还包括:在(b)之前,
 - (a1) 环化偶联接头的探针模板;和
 - (a2) 扩增所述偶联接头的探针模板以形成线性扩增的包含多个拷贝的所述探针的串联体分子。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述条形码序列的长度为3至30个核苷酸。
8. 根据权利要求5所述的方法,还包括:在(b)之前,
 - (a1) 将所述探针的模板的单份拷贝,或包含所述探针的双链核酸的单份拷贝递送至在油包水乳液中的水性微反应器中,其中所述微反应器中包含多个能够与所述探针退火的引物,单个微珠,所述微珠能够与所述探针的模板结合,并扩增出与所述微珠表面附接的所述探针的第一拷贝,以及含有足以实施核酸扩增反应的试剂的扩增反应溶液;
 - (a2) 在可以产生所述探针的第一拷贝的条件下,使微反应器进行核酸扩增反应;
 - (a3) 重复步骤(a2)多次;和
 - (a4) 破坏所述油包水乳液,并产生附接至所述微珠的所述探针的多个拷贝。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品包括含有所述靶核酸的多个靶核酸分子。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述传感器是多个传感器的阵列的一部分,其中所述多个传感器中的每一个检测所述多个靶核酸分子中的至少一个的存在或不存在,并且其中所述多个传感器的阵列中的每个传感器都可单独寻址。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中每个探针包括:
 - 1) 与所述靶核酸中一个的一部分互补的核酸片段的序列;和
 - 2) 与所述核酸片段序列的第一末端附接的条形码序列;且其中所述方法在(d)中进一步包括:
 - (d1) 解码保留在与所述可单独寻址传感器相连的相应样品室中的探针上的所述条形

码序列。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述芯片包括另外的传感器,其中所述样品包含所述靶核酸和另外的靶核酸,并且其中所述另外的传感器检测所述另外的靶核酸。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述另外的传感器与另外的样品室相邻,其中所述另外的样品室被配置为保留所述另外的探针的多个拷贝,其中所述另外的探针选择性地偶联至所述另外的靶核酸。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器包括离子敏感场效应晶体管。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器包括化学敏感的场效应晶体管。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传感器包括光学传感器。

17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述至少一个信号包括pH的变化。

18. 一种用于分析样品中靶核酸的存在的系统,该系统包括:

(a) 芯片,所述芯片包括与样品室相邻的传感器,其中所述样品室被配置为保留具有所述靶核酸的所述样品和探针的多个拷贝,其中所述探针选择性地偶联至所述靶核酸,其中所述探针的多个拷贝未通过共价键附接至所述样品室的表面,并且其中所述传感器从所述样品中检测至少一种信号,该至少一种信号指示所述靶核酸的存在或不存在;以及

(b) 偶联到所述芯片的计算机处理器,其被编程为(i) 在使所述芯片与所述样品接触的同时测量至少一个信号;和(ii) 确定所述样品中所述靶核酸的存在或不存在。

19. 根据权利要求18所述的系统,其中所述传感器在所述芯片中多个传感器的阵列中,其中所述样品室在所述芯片中多个样品室的阵列中,其中所述多个样品室中的每一个与所述多个传感器的阵列中的至少一个传感器相邻,并且其中每个传感器是可单独寻址的。

20. 根据权利要求18所述的系统,其中所述传感器是离子敏感的场效应晶体管,化学敏感的场效应晶体管或光学传感器。

21. 根据权利要求19所述的系统,其中所述计算机处理器进一步被编程为(iii) 映射所述可单独寻址的传感器的阵列;和(iv) 当所述探针包含条形码序列时,将所述条形码序列与所述相应的可单独寻址的传感器相关联。

22. 根据权利要求18所述的系统,其中所述芯片包括另外的传感器,并且其中所述样品包括另外的靶核酸。

23. 根据权利要求22所述的系统,其中所述另外的传感器检测指示所述另外的靶核酸存在或不存在的至少一个另外的信号。

24. 根据权利要求19所述的系统,其中所述多个传感器的阵列包括至少96个传感器。

具有电子检测系统的寡核苷酸探针阵列

交叉引用

[0001] 本申请要求于2017年5月31日提交的第62/512,855号美国临时专利申请的权益，其通过引用整体并入本文。

背景技术

[0002] 在许多领域中，包括鉴定微生物，诊断传染病，检测遗传异常，鉴定与各种癌症相关的生物标志物，评估对所选疾病的遗传易感性以及评估病人对医学治疗的反应，在生物样品中检测不同的核酸序列是至关重要的。核酸杂交是检测不同核酸序列的一种常用技术。

[0003] 核酸杂交可以一种分子生物学技术，其中单链脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 分子与互补的DNA或RNA序列退火。具体而言，该技术可以测量DNA聚合物 (多核苷酸) 之间的序列相似度。杂交的基本原理可能是建立包括特定含氮核碱基 (鸟嘌呤“G”，腺嘌呤“A”，胸腺嘧啶“T”和胞嘧啶“C”) 的DNA聚合物单元 (即核苷酸)，它们都能够与互补核碱基配对 (A与T配对，C与G配对) 以形成氢键 (A-T之间的两 (2) 个氢键和C-G之间的三 (3) 个氢键)。其结果是，具有互补序列的两个单链DNA部分可以彼此结合 (杂交) 并形成DNA二聚体 (双链DNA结构)。

[0004] 经由探针及其靶标成功杂交后由标记探针生成的信号，该杂交的序列依赖性特征可以是许多研究和诊断应用的基础。这种方法已使得对固相印迹上的DNA/RNA进行检测和定量，对细胞上DNA/RNA细胞遗传学进行定位，对特定DNA进行检测和纯化以及比较基因表达分析等其他应用成为可能。最近，核酸杂交的原理已经与下一代测序技术相结合，用于创建强大的新分析平台，以期扩展基因组学和个性化医学的研究工具。因此，生物医学领域对新的杂交方法可能是感兴趣的。

发明内容

[0005] 使用本公开中提供的方法，装置和系统，可以使用固体表面上的探针阵列和配套的传感器阵列在单个样品室中检测靶核酸和多个拷贝的探针之间的杂交。样品室和配套的传感器阵列可以单独寻址。此外，探针阵列不必与固体表面上的相同的寻址位置永久地关联。

[0006] 本公开的一个方面提供了一种用于分析样品中靶核酸的是否存在的方法，该方法包括：(a) 提供芯片，所述芯片包括与样品室相邻的传感器，其中所述样品室被配置为保留探针的多个拷贝，其中所述探针选择性地偶联至所述靶核酸，并且其中该传感器检测至少一个指示所述样品室中是否存在所述靶核酸的信号；(b) 在允许所述探针选择性偶联至所述靶核酸的条件下在所述样品室中提供所述样品；(c) 测量所述至少一个信号；(d) 在所述探针的多个拷贝不通过共价键连接到所述样品室的表面的条件下，确定所述样品中所述靶核酸的存在与否。

[0007] 在本文提供的一些实施方案中，所述传感器在所述芯片中多个传感器的阵列中。

另外,所述样品室在所述芯片中多个样品室的阵列中。此外,所述多个样品室中的每一个与所述多个传感器的阵列中的至少一个传感器相邻。在本文提供的一些实施方案中,靶核酸是较大核酸的片段。在本文提供的一些实施方案中,探针是多个探针的文库的一部分。

[0008] 在本文提供的一些实施方案中,探针包含:1)与所述靶核酸的至少一部分互补的核酸片段的序列;2) 附接至1)中所述核酸片段序列的第一末端的条形码序列。在本文提供的一些实施方案中,该方法还包括在步骤(b)之前:(a1)环化偶联接头的探针模板;(a2)扩增所述偶联接头的探针模板以形成线性扩增的包含多个拷贝的所述探针的串联体分子。在本文提供的一些实施方案中,条形码序列的长度为3至30个核苷酸。在本文提供的一些实施方案中,该方法进一步包括在步骤(b)之前:(a1)将所述探针的模板的单份拷贝,或包含所述探针的双链核酸的单份拷贝递送至在油包水乳液中的水性微反应器中,其中所述微反应器中包含多个能够与所述探针退火的引物,单个微珠,所述微珠能够与所述探针的模板结合,并扩增出与所述微珠表面附接的所述探针的第一拷贝,以及含有足以实施核酸扩增反应的试剂的扩增反应溶液;(a2)在可以产生所述探针的第一拷贝的条件下,使微反应器进行核酸扩增反应;(a3)重复步骤(a2)多次;(a4)破坏所述油包水乳液,并产生附接至所述微珠的所述探针的多个拷贝。微反应器可以是珠粒,分隔区域,孔等。

[0009] 在本文提供的方面的一些实例中,所述样品包括含有靶核酸的多个靶核酸分子。在本文提供的方面的一些实例中,所述传感器是多个传感器的阵列的一部分,其中所述多个传感器中的每一个检测所述多个靶核酸分子中的至少一个的存在或不存在,并且其中所述多个传感器的阵列中的每个传感器都可单独寻址。在本文提供的方面的一些实例中,每个探针包括:1)与所述靶核酸中一个的一部分互补的核酸片段的序列;和2)与所述核酸片段序列的第一末端附接的条形码序列;且其中所述方法在(d)中进一步包括:(d1)解码保留在与所述可单独寻址传感器相连的相应样品室中的探针上的所述条形码序列。

[0010] 在本文提供的方面的一些实施方案中,其中所述芯片包括另外的传感器,其中所述样品包含所述靶核酸和另外的靶核酸,并且其中所述另外的传感器检测所述另外的靶核酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,所述另外的传感器与另外的样品室相邻,其中所述另外的样品室被配置为保留所述另外的探针的多个拷贝,其中所述另外的探针选择性地偶联至所述另外的靶核酸。

[0011] 在本文提供的方面的一些实施方案中,传感器包括离子敏感场效应晶体管(ISFET)。在本文提供的方面的一些实施方式中,传感器包括化学敏感的场效应晶体管(chemFET)。在本文提供的方面的一些实施方案中,传感器包括光学传感器。在本文提供的方面的一些实施方案中,至少一个信号包括pH的变化。

[0012] 本公开的另一方面提供了一种用于分析样品中靶核酸的存在的系统,该系统包括:芯片,所述芯片包括与样品室相邻的传感器,其中所述样品室被配置为保留具有所述靶核酸的所述样品和探针的多个拷贝,其中所述探针选择性地偶联至所述靶核酸,其中所述探针的多个拷贝未通过共价键附接至所述样品室的表面,并且其中所述传感器从所述样品中检测至少一种信号,该至少一种信号指示所述靶核酸的存在或不存在;偶联到所述芯片的计算机处理器,其被编程为(i)在使所述芯片与所述样品接触的同时测量至少一个信号;和(ii)确定所述样品中所述靶核酸的存在或不存在。

[0013] 在本文提供的一些实施方案中,传感器在所述芯片中多个传感器的阵列中。另外,

样品室在所述芯片中多个样品室的阵列中。此外,多个样品室中的每一个与所述多个传感器的阵列中的至少一个传感器相邻,并且其中每个传感器是可单独寻址的。在本文提供的方面的一些实施方案中,计算机处理器进一步被编程为(iii)映射所述可单独寻址的传感器的阵列;和(iv)当所述探针包含条形码序列时,将所述条形码序列与所述相应的可单独寻址的传感器相关联。在本文提供的方面的一些实施方案中,多个传感器所构成的阵列包括至少96个传感器。

[0014] 在本文提供的方面的一些实施方案中,传感器是离子敏感场效应晶体管(ISFET),化学敏感场效应晶体管(chemFET)或光学传感器。在本文提供的方面的一些实施方案中,芯片包括一个另外的传感器,并且其中样品包括另外的靶核酸。在本文提供的方面的一些实施方案中,另外的传感器检测至少一个另外的信号,所述另外的信号指示所述另外的靶核酸的存在或不存在。

[0015] 根据下面的详细描述,本公开的其他方面和优点对于本领域技术人员将变得显而易见。其中仅示出和描述了本公开的说明性实施方案。正如将会被认识到的,本公开能够包括其他的、不同的实施方案,并且其若干细节能够在各种明显的方面进行修改,所有这些都脱离本公开。因此,附图和描述本质上应被认为是说明性的,而不是限制性的。

援引并入

[0016] 本文所提及的所有出版物,专利和专利申请都以相同的程度通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物,专利或专利申请被明确地、单独地指出并通过引用并入一样。在通过引用并入的出版物、专利或专利申请与本文中公开的公开内容相矛盾时,本文旨在取代和/或优先于任何这样的矛盾材料。

附图说明

[0017] 在所附权利要求中具体阐述了本发明的新颖特征。通过参考以下对本发明的说明性实施方案,方案所使用的原理,以及附图(也称为“图”或“图示”)的详细描述,将获得对本发明的特征和优点更好的理解。其中:

[0018] 图1展示了根据本公开的示例探针100。

[0019] 图2展示了根据本公开的用于合成探针文库的环状DNA模板100'的非排他性的示例。

[0020] 图3展示了根据本公开的芯片200的说明性示例。

[0021] 图4展示了根据本公开的样品室202A和202B的说明性示例。

[0022] 图5展示了根据本公开检测指示探针与靶核酸杂交的信号示意图。

[0023] 图6展示了根据本公开对乳液聚合酶链式反应的示意图。

[0024] 图7展示了被编程或以其他方式配置,以实现本文提供的方法的计算机系统的示例示意图。

发明详述

[0025] 尽管在此已经示出和描述了本发明的各种实施方案,但是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。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员可以提出许多变化,改变和替代。应当理解,可以采用本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案。

[0026] 在将数值描述为范围的情况下,应当理解的是,该公开内容包括在该范围内的所有可能的子范围,以及落入该范围内的特定数值,无论明确说明的是特定数值或特定的子范围。

[0027] 科学家和研究人员可以通过临床方法或材料方法以不同的方式使用核苷酸序列信息来改善人类的生活,例如提高农作物产量,生产更好的燃料,生产更好的疫苗,生产更有效的药物,预防疾病或预防危险病原体的爆发。(参见:Ansorge,W.,“Next-generation DNA sequencing techniques,”*New Biotech.*,25(4):195-203,2009)。在这一努力中,特定核苷酸序列的确定和/或检测可能是至关重要的。核苷酸序列的杂交测定可能是此类研究的重要工具。

[0028] 在许多核酸靶分子的杂交检测中,探针或探针的多个拷贝可以直接附接或结合至与检测器相邻的表面。这可以在探针的序列和相应的检测器捕获的信号之间提供一对一的相关性。在一些杂交检测中,因为靶核酸分子在原始样品中的浓度非常低,核酸扩增反应可以用于产生更高的拷贝数和/或更高的浓度的靶核酸分子以促进杂交检测。

[0029] 核酸扩增的一种类型可以是聚合酶链式反应(PCR),其包括使DNA的模板链变性,将匹配的引物对退火至DNA模板以及通过DNA聚合酶从引物延伸DNA等步骤的重复循环。DNA文库构建中使用的一种流行的PCR方法被称为带有微珠的乳液PCR(e-PCR)。Roche的454(Margulies等,“Genome Sequencing in Microfabricated High-density Picolitre Reactors,”*Nature* 437(7057):376-380,2005)和Life Technologies的SOLiD(Valouev A等,“A High-resolution,Mucleosome Position Map of *C.elegans* Reveals a Lack of Universal Sequence-dictated Positioning,”*Genome Res.*18(7):1051-1063,2008)和Ion Torrent(Rothberg等,“An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-optical Genome Sequencing,”*Nature* 475(7356):348-352,2011)等平台都可使用E-PCR方法。E-PCR可能需要对数十亿个微珠进行PCR,每个微珠都分离在自己的乳液微滴中,然后在测序前进行乳液破碎,模板富集和微珠沉积。

[0030] 另一种类型的核酸扩增可以是等温条件下的滚环扩增(RCA)。RCA技术可以使用Phi29 DNA聚合酶扩增环状模板核酸,以提供较长(有时长于10kb)的单链线性DNA分子,该分子包含模板核酸序列的串联拷贝。(Blanco等,“Highly Efficient DNA Synthesis by the Phage ϕ 29 DNA Polymerase,”*J.Biol.Chem.*264,8935,1989;Drmanac等,“Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays,”*Science* 327(5961):78-81,2010)。如此形成的产物可以包括所需核酸序列的数百个串联拷贝,以形成用于增强来自随后的杂交反应信号强度的串联体。此外,所述的串联体可以包含内部序列,这些内部序列会促进二级结构的形成,从而通过内部杂交导致致密化。(Drmanac等,2010)。所得的核酸分子串联体的致密结构有时可称为“纳米球”(NB)。核酸纳米球通常可以指在至少一维具有纳米尺度的核酸颗粒。

[0031] 在法医学,诊断和医学操作中可能需要对生物样品中的多个靶核酸进行大规模的多重分析。因此,可能需要一种具有更好性能,例如更好的信噪比的测定装置和方法。

[0032] 当面对样品中靶核酸分子浓度低的问题时,当前可能的方法包括使用PCR或其他扩增技术来制备靶核酸分子的多个拷贝,并使扩增子经受探针以进行检测。这种靶扩增(amplification-of-target)方法的一个好处是可以使靶核酸分子的扩增子具有与探针杂

交的更好机会。但是,扩增反应可能需要时间和专用设备才能完成。在杂交测定之前进一步处理样品可以延长测定的响应时间。最好进行杂交试验,直接使用样品,而无需扩增靶核酸分子的步骤。

[0033] 经过大量的实验,申请人发现了一种用于靶核酸杂交测定的新装置和方法。例如,可以扩增探针以产生多个拷贝,以代替扩增靶核酸分子,这些探针可以被定位到检测设备上的特定位置,从而即使样品中靶核酸分子的浓度可能较低,由于该位点上探针的绝对高数量,靶核酸分子可能会找到探针的拷贝并且与之杂交。

[0034] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,单数形式的“一个”,“一种”和“该”包括复数引用,除非上下文另外明确指出。因此,例如,提及“一个分子”包括多个这样的分子,等等。

[0035] 如本文所用,术语“片段”通常是指特定区域的原始DNA序列或RNA序列的一部分。

[0036] 如本文所用,术语“靶核酸”通常是指用于使用本公开的杂交方法进行检测的靶核酸片段。靶核酸的来源可以从包括哺乳动物的生物体或包括病毒和细菌在内的待鉴定病原体中分离出来。另外,靶核酸也可以来自合成来源。靶核酸可以通过或不通过标准复制/扩增步骤扩增以产生核酸序列。

[0037] 如本文所用,术语“核酸序列”或“核苷酸序列”通常是指具有给定核苷酸序列的核酸分子,可能希望测定给定核苷酸序列的存在与否或数量。核苷酸序列可以包含核糖核酸(RNA)或DNA,或衍生自RNA或DNA的序列。核苷酸序列的实例是对应于天然或合成RNA或DNA的序列,包括基因组DNA和信使RNA。序列的长度可以是可扩增成核酸扩增产物或扩增子的任何长度,例如最多约20、50、100、200、300、400、500、600、700、800、1,000、1,200、1,500、2,000、5,000、10,000或超过10,000个核苷酸的长度。

[0038] 如本文所用,术语“模板”通常是指单个多聚核苷酸分子,可以通过核酸聚合酶从其合成另一种核酸,包括互补核酸链。另外,模板可以是多聚核苷酸的一条或两条链,其能够充当由核酸聚合酶催化的模板依赖性核酸聚合反应的模板。该术语的使用不能被视为将本公开的范围限制于实际上在随后的酶催化的聚合反应中用作模板的多聚核苷酸。

[0039] 如本文所用,术语“分析物”通常是指要通过本公开的方法检测或测定的物质。可广义地将其解释为要检测、鉴定或表征的任何感兴趣的化合物、分子或其他物质。分析物可包括核酸片段,其中包括DNA, RNA或其合成类似物。其他类型的分析物可以在添加靶核酸之前,之中或之后的样品或分析溶液中的化学物质,包括离子。可以在核酸分析物上掺入一个或多个反应性的配体,其可能可以作为结合对的成员。此类配体掺入分析物中的方式使得配体能够与结合对的第二成员反应。配体可以在核酸分析物的3'端,5'端或3'和5'端之间的任何点偶联。另外,报告分子部分也可以以类似于配体掺入的方式掺入核酸分析物中。核酸分析物可以是不含配体的,但也可以掺入与测定系统内包含的其他试剂的核酸片段互补的序列片段。

[0040] 如本文所用,术语“配体”通常是指已经被掺入到核酸分析物中的结合对的一个成员,并且可以包括但不限于抗体,凝集素,受体,结合蛋白或化学试剂。

[0041] 如本文所用,术语“结合对”通常可以指任何类型的免疫型结合对,例如抗原/抗体或半抗原/抗半抗原系统;以及任何类型的非免疫型结合对,例如生物素/抗生物素蛋白;生物素/链亲和素;叶酸/叶酸结合蛋白;互补核酸片段;蛋白A或G/免疫球蛋白;以及形成共价

键的结合对,例如巯基反应性基团,包括马来酰亚胺和卤代乙酰基衍生物,以及胺反应性基团,例如异三氰酸酯,琥珀酰亚胺基酯和磺酰卤。(参见Bobrow等,“Catalyzed reporter deposition,a novel method of signal amplification.Application to immunoassays,”*J.Immunol.Methods*,125:279-85,1989)。

[0042] 具体来说,对于免疫型结合对,可以通过各种方法产生结合对的抗体成员,无论是多克隆的,单克隆或其免疫反应性片段。如本文所用,术语“免疫反应性抗体片段”或“免疫反应性片段”通常是指含有抗体结合区的片段。此类片段可以是被定义为缺乏Fc部分的Fab型片段,例如,Fab,Fab'和F(ab')₂片段,也可以是通过还原裂解连接完整抗体的重链组分的二硫键获得的所谓的“半分子”片段。如果特异性结合对的抗原成员不是免疫原性的,例如半抗原,则可以将其与载体蛋白共价偶联以使其具有免疫原性。非免疫结合对是指包括两个彼此共享天然亲和力但不是抗体的组分的系统。

[0043] 如本文所用,术语“报告缀合物”通常是指包含偶联至结合对的一个成员的酶,荧光分子或放射性标记的缀合物。结合对的成员可以是抗体,核酸序列或一些免疫反应性或亲和反应性底物。

[0044] 如本文所用,术语“报告分子”或“报告部分”通常是指能够通过酶促方法或能量发射检测的任何实体;包括但不限于荧光部分,化学发光部分,颗粒,酶,放射性标签或发光部分或分子。

[0045] 如本文所用,术语“颗粒”通常是指被染色,亚微米级尺寸且均匀的乳胶颗粒,但是也包括其他能够检测的颗粒。

[0046] 如本文所用,术语“缀合物”通常是指共价连接成较大结构的两个或更多个分子(和/或诸如纳米颗粒的材料)。在一些实施方案中,缀合物包含与一种或多种其他分子共价连接的一种或多种生物分子(例如肽,抗体,核酸,蛋白质,酶,糖,多糖,脂质,糖蛋白,生物聚合物(例如PEG)和脂蛋白),其他分子例如一种或多种其他生物分子。在其他实施方案中,缀合物包括共价连接至一个或多个可检测标记(例如荧光分子,荧光纳米颗粒,半抗原,酶及其组合)的一个或多个特异性结合分子(例如抗体和/或核酸序列)。

[0047] 如本文所用,术语“信号”通常是指与所测定的样品的一种或多种性质相关的随时间变化的变量。信号在时域中可以是连续的,也可以是离散的。

[0048] 如本文所用,术语“PCR”或“聚合酶链式反应”通常是指核酸的酶促复制,其使用例如热循环来使核酸变性,延伸和退火。

[0049] 如本文所用,术语“探针”、“捕获探针”或“捕获分子”通常是指可以结合至特定靶核酸序列的分子种类或其他标记。探针可以是任何类型的分子或颗粒。探针可以包含分子,并且可以直接或通过接头分子与底物或其他固体表面结合。在本公开中,如下所述,探针可以不通过共价键直接或间接地结合到样品室的表面。然而,探针可能被限制在探针所在的样品室的范围内移动。该限制可由电荷-电荷相互作用或磁相互作用引起。当探针是核酸序列时,它可以是单链序列或包含目的单链序列的双链序列。

[0050] 两个多核苷酸在例如在相关测定条件下缔合以形成稳定的双链体,可以称为“杂交”。核酸可由于多种众所周知的物理化学力而杂交,例如氢键,溶剂排斥,碱基堆积等。在Tijssen所著的《生物化学和分子生物学实验室技术-用核酸探针杂交》(1993)第I部分第2章“杂交原理概述和核酸探针测定策略”(纽约州爱思唯尔)可以找到详尽的关于核酸杂交

的指导。

[0051] 如本文所用,术语“传感器”或“检测器”通常是指可以检测信号的包括光学,磁性或电子组件的设备。一般而言,传感器是指可以用来感测分析物的是否存在的设备。特别来说,传感器可以是环境感测设备,例如离子敏感和化学敏感设备,其基于被测样品中分析物的存在或浓度而产生电信号(例如,电流,电势或电导率)。光学传感器可以是另一类型的传感器。

[0052] 如本文所使用的术语“大约”或“几乎”通常是指在 $\pm 15\%$,指定数值的10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,或1%。

[0053] 如本文所用,术语“标记”通常是指可以附接至靶标分子,并通过为提供靶标分子非固有的独特特征而使靶标分子可区分和可追溯的特定分子结构。标记可以包含一旦附接到核酸序列就为那些核酸分子提供不固有的独特特征的分子结构。例如可以创建独特的光学特性的标签。有时,可以使用光学标签。光学标签可以单独作为一个信号生成实体,或者在双分子报告体系中,作为能量供体、能量受体,或其他方式。受体和供体可以都是荧光团分子。荧光团是供体还是受体,取决于其激发和发射光谱,以及与之配对的荧光团。

[0054] 在某些情况下,可以使用掺入的非放射性标记物用于核酸的检测。例如,可以使用用生物素修饰的核酸(美国专利号4,687,732;欧洲专利号063879),地高辛(欧洲专利号173251)和其他半抗原修饰的核酸。例如,美国专利第5,344,757号使用含有至少一种半抗原作为标记的核酸探针,以与结合至固体膜的互补靶核酸杂交。这些测定法的敏感性和特异性可以基于通过扩增反应掺入单个标记物,并用对标记物特异性的抗体来检测。某些情况下可能涉及与酶偶联的抗体。在某些情况下,添加底物会产生量热或荧光变化,并可用仪器检测。

[0055] 术语“互补”是指在相关测定条件下与其“互补物”形成稳定双链体的多核苷酸。彼此互补的两个多核苷酸序列约有少于20%碱基的错配,约有少于10%碱基的错配,约有少于5%碱基的错配,或没有错配。

[0056] “多核苷酸序列”、“核苷酸序列”或“核酸序列”是核苷酸的聚合物(寡核苷酸,DNA,核酸等)或代表核苷酸聚合物的字符串,取决于上下文。从任何指定的多核苷酸序列,可以确定给定的核酸或互补的多核苷酸序列(例如,互补核酸)。

[0057] 如本文所用,术语“DNA聚合酶”通常是指用核苷酸结构单元合成DNA分子的细胞或病毒酶。

[0058] 如本文所用,术语“化学敏感的场效应晶体管”或“chemFET”通常是指检测器的类型,而与该设备适合的,或相作用的特定化学系统无关。chemFET可以是一种化学传感器,可通过检测受设备的通道电导调制影响的阈值电压来检测目标化学过程。

[0059] 本文所使用的术语“离子敏感场效应晶体管”或“ISFET”通常是指被配置为选择性地测量溶液中的离子活性(例如,溶液中的氢离子)的阻抗变换装置。ISFET的一种工作原理在“ISFET学的三十年:过去30年发生的事情以及未来30年可能发生的事情”(Bergveld, Sens. Actuators, 88:1-20 (2003))中给出。本公开内容不限于任何特定类别的chemFET或ISFET,并且这些术语的使用不能以限制性的意义来解释。

[0060] 当在描述设备,系统,传感器,样品室等时,本文使用的术语“阵列”通常是指一维或二维微结构集。阵列可以是任何形状。例如,阵列可以是排列成一条线的一系列微结构,

例如正方形阵列。阵列可以布置成正方形或矩形网格。阵列的某些部分可能与其他部分之间在空间上隔开。阵列可以具有其他形状。例如,阵列可以是排列在一系列同心圆,一系列同心正方形,一系列同心三角形,一系列曲线等中的一系列微结构。任何阵列中各部分之间或微结构之间的间距可以是规则的,或者在特定部分之间或在特定的微结构对之间可以不同。本公开的微结构阵列可以包括具有零维,一维或二维形状的微结构。具有二维形状的微结构可以具有诸如正方形,矩形,圆形,平行四边形,五边形,六边形,不规则形状等形状。

设备和方法

[0061] 本公开提供了能够对核酸杂交反应进行多重检测的方法,设备和系统。本公开的方法,设备和系统可以包含的组件,包括但不限于:

1. 样品室,其中可以包括水性环境,在该水性环境中存在待分析的多个自由移动的靶核酸。可能存在样品室阵列。阵列中的每个样品室可以在固体表面上的可单独寻址的位置。每个可寻址位置(或“像素”)可保留可与特定靶标特异性杂交的核酸序列的多个拷贝。如下所述,每个可寻址位置可能不会容纳一种以上的核酸探针。样品室的阵列可以是半导体芯片上的微孔的阵列。

2. 探针阵列,其可以包含多个核酸探针。探针阵列可以与样品室阵列对接,使得每个探针对应于一个样品室,因此变得可单独寻址。每个探针可包含可与特定靶特异性杂交的核酸序列的多个拷贝;和

3. 传感器,可以并行测量在每个像素处生成的信号。随着杂交事件的进展,信号可能与标记或报告物在其附近的存在和活动有关。信号可以是离散的(例如,单独可分辨的)信号。

[0062] 探针阵列可包括可独立寻址的位置,每个位置具有一个或多个探针。在阵列的给定的独立可寻址位置处的探针可以与在阵列的其他独立可寻址位置处的探针相同或不同。在某些情况下,阵列中一组位置的探针可能相同。

[0063] 另外,该设备可以包括计算机系统。

[0064] 本公开的方法,设备和系统可以采用组装在一起的上述组件的变体来创建能够并行测量核酸杂交反应的系统。

用于分析的靶标

[0065] 可用作本公开内容的靶标的遗传物质可包括但不限于DNA和RNA。可能存在许多不同类型的RNA和DNA,所有这些类型一直都是并将继续成为大量研究和实验的主题。DNA的靶标可能包括但不限于基因组DNA(gDNA),染色体DNA,线粒体DNA(mtDNA),质粒DNA,古DNA(adNA),所有形式的DNA,包括A-DNA,B-DNA和Z-DNA,支链DNA和非编码DNA。可以使用本发明的方法和组合物测序的RNA形式包括但不限于信使RNA(mRNA),核糖体RNA(rRNA),微小RNA,小RNA,snRNA和非编码RNA。(参见Limbach等,“Summary:The modified nucleosides of RNA,”Nuc.Acids Res.,22(12):2183-2196,1994)。

[0066] 核苷酸可以包括但不限于天然存在的核苷酸G,C,A,T和U,以及稀有形式,例如肌苷,黄嘌呤,7-甲基鸟苷,二氢尿苷,5-甲基胞嘧啶,和假尿苷,包括甲基化形式的G,A,T和C等。(参见,例如,Korlach等,“Going beyond five bases in DNA sequencing,”Curr.Op.Struct.Biol.,22(3):251-261,2012;和美国专利号5,646,269)。核苷也可以是非天然存在的分子,例如包含7-脱氮嘌呤,吡唑并[3,4-d]嘧啶,丙炔基-dN或其他类似物或衍生物分子。示例性核苷包括核糖核苷,脱氧核糖核苷,双脱氧核糖核苷,碳环核苷等。

样品

[0067] 通常来说,任何含有具有目的核苷酸序列的遗传物质的样品都可以适用于本公开。样品可以从真核生物,原核生物和古细菌获得。例如,包含可使用本公开确定其序列的遗传物质的样品可获得自例如细菌,噬菌体,病毒,转座子,哺乳动物,植物,鱼,昆虫等。

[0068] 样品可以是人类来源的,并且可以从任何包含遗传物质的人类组织获得。通常,样品可以是流体样品,例如但不限于正常的和病理的体液以及这些流体的抽吸物。

用于分析的DNA样品的纯化/分离

[0069] 为了制备用于确定或检测其中包含的遗传信息序列的样品,可以从原始样品中的其他成分中分离和/或纯化出遗传物质。可能存在从样品中纯化核酸材料的方法。(例如,参见Kennedy,S.,“Isolation of DNA and RNA from soil using two different methods optimized with Inhibitor Removal **Technology**[®] (IRT),”*BioTechniques*,p.19, Nov.2009;《分子克隆-实验室手册》(第四版)Green,M.和J.Sambrook,冷泉港实验室出版社,美国,2012年;生物科学和医学中的方法和工具,分子系统和进化技术,DeSalle等编,2002年, **Birkhäuser** 出版社 (Verlag Basel/Switzerland);Keb-Llanes等人,《植物分子生物学报道》,20:299a-299e,2002)。

片段化DNA样品以产生用于分析的靶标

[0070] 可以在利用本公开中公开的各种方法和装置之前进行DNA样品中多核苷酸靶的片段化。这些方法可包括进行超声处理,雾化,液压剪切和用其他机械方法剪切,例如使用微珠,针头剪切,弗氏压碎器和声波剪切等,限制性内切酶消化和其他酶促方法,例如使用核酸酶的各种组合(DNA酶,核酸外切酶,核酸内切酶等),以及基于转座子的方法。(参见Knierim等,“用于下一代测序的长距离PCR产物片段化的三种方法的系统比较,”*PLoS One*, 6(11):e28240,2011;Quail,MA,“DNA:机械断裂,”Nov.15,2010,eLS;Sambrook,J.,“DNA的雾化破碎”,*Cold Spring Harb.Protoc.*,doi:10.1101/pdb.prot4539,2006)。通常,目标可以根据所选择的测定方法获得适合的碱基对(bp)大小范围的多核苷酸。例如,片段可以是大约50bp,大约100bp,大约200bp,大约300bp,大约400bp,大约500bp,大约600bp,大约700bp,大约800bp,大约900bp,大约1000bp,大约1100bp,大约1200bp,大约1300bp,大约1400bp,大约1500bp或更高。

[0071] 在一个实施方案中,可以通过化学,酶促或物理方法进行DNA样品的片段化。片段化可以通过酶促或机械方法进行。机械方法可以是超声处理或物理剪切。酶促方法可以通过用核酸酶(例如,脱氧核糖核酸酶I(DNase I))或一种或多种限制性核酸内切酶消化来进行。在一些实施方案中,片段化可能导致其末端序列未知。

[0072] 在另一个实施方案中,酶促方法可以使用DNA酶I。DNA酶I可以是非特异性裂解双链DNA(dsDNA)以释放5'-磷酸化的二聚,三聚和寡聚核苷酸产物的酶。DNA酶I在含有Mn²⁺, Mg²⁺和Ca²⁺的缓冲液中可能具有活性。DNA酶I消化步骤的目的可能是将大的DNA基因组片段化为较小片段组成的文库。当使用基于锰的缓冲液时,DNA酶I的切割特性可能会导致底物DNA的随机消化(即消化对DNA分子的序列没有偏好),并且当使用基于镁的缓冲液时,可能导致末端为平端的双链DNA片段占优势(Melgar和Goldthwaite,“脱氧核糖核酸酶II.金属对脱氧核糖核酸酶I作用机理的影响”,*J.Biol.Chem.*243(17):4409-16,1968)。DNase I处理基因组模板后产生的产物大小范围可能取决于三个因素:i)酶的使用量(酶活单位);

ii) 消化温度(°C);iii) 孵育时间(分钟)。可以优化DNA酶I消化以产生大小范围为约50至约700bp的基因组文库。

[0073] 在一个实施方案中,DNA酶I可以消化大底物DNA或整个基因组DNA约1或约2分钟,以产生片段化的多核苷酸群体。在另一个实施方案中,DNA酶I消化可以在约10°C至约37°C之间的温度下进行。在另一个实施方案中,消化的DNA片段的长度可以在50bp至700bp之间。

[0074] 此外,在一些实施方案中,在Mn²⁺存在下用DNA酶I消化基因组DNA(gDNA)底物可以产生平端或末端突出的长度为一个或两个核苷酸的DNA片段。在一个实施方案中,可以用Pfu DNA聚合酶增加产生的平端的数量。使用Pfu DNA聚合酶进行片段抛光可能会导致5'突出端的填充。此外,Pfu DNA聚合酶可能会去除单核苷酸和双核苷酸延伸,从而进一步增加可用于连接接头的平端DNA片段的数量(Costa和Weiner,“用于克隆和分析PCR产生的平端DNA片的实验方案”,PCR Methods Appl 3(5):S95-106,1994;Costa等人,“PCR产生的DNA片段的克隆和分析”,PCR Methods Appl 3(6):338-45,1994;Costa和Weiner,“用T4或Pfu聚合酶进行抛光可提高PCR产物的克隆效率”Nucleic Acids Res.22(12):2423,1994)。

核酸序列的扩增

[0075] 扩增遗传物质的方法可以包括全基因组扩增(WGA)(参见,例如,Lovmar等人,“多重置换扩增以创建用于基因研究的长效DNA来源”,Hum.Mutat.,27:603-614,2006)。核酸序列的扩增可采用多种PCR技术和非PCR技术中的任何一种,包括但不限于e-PCR,RCA,以转录介导的方式同时靶向RNA和DNA进行扩增,基于核酸序列的扩增(NASBA)用于恒温扩增,解旋酶依赖性恒温扩增,链置换扩增(SDA),基于Q-beta复制酶的方法,连接酶链反应,环介导的恒温扩增(LAMP)和反应置换嵌合(RDC)。

样品室

[0076] 样品室可具有约10纳升(nL)至约10毫升(mL)的体积。在一些情况下,样品室体积可以为约10nL至约100nL,约100nL至约200nL,约200nL至约500nL,约500nL至约1微升(μ L),以及约1 μ L至100 μ L。样品室体积可以为至少约10nL,100nL,1 μ L,10 μ L,100 μ L,1mL或10mL。在考虑以下因素时,可以控制样品室的深度:1) 每个样品室保留的纳米球或微珠的尺寸;2) 允许进入样品室以促进杂交和洗涤步骤的溶液量,以及3) 在保留纳米球或微珠与杂交步骤后洗去未结合的靶核酸等之间的平衡。样品室的深度可以是大约50nm,大约100nm,大约200nm,大约300nm,大约400nm,约500nm,约1000nm或大于1000nm。

[0077] 样品室可以包含水溶液。样品室内的水溶液可以包括基于缓冲盐的溶液,例如包含弱酸与其共轭碱的混合物的水溶液,反之亦然。溶液可以包含多个靶核酸序列,在本文中通常称为“靶”。样品室可以容纳探针的多个拷贝。样品室可以保留一个探针的多个拷贝,并且可能不容纳两个不同的探针,其中每个探针都有多个拷贝。样品室可以采用任何3-D形状,其被配置为保持一个探针的多个拷贝。例如,当考虑要保留的多个探针的平均尺寸时,可以调整腔室的体积。此外,样品室的设计可以包括用于相关联的传感器的容纳部位,使得可以通过相关联的传感器检测到指示探针和样品室范围内的靶核酸之间的杂交产生的信号。每个样品室及其相关的传感器可以作为一个像素单独寻址。

[0078] 样品室可以与其他部件以流体接触,包括但不限于微流体通道。它还可以允许添加其他非流体对象,例如微珠或纳米球(NB)。

探针阵列

[0079] 本公开的一个特征可以是该设备具有动态探针阵列而不是静态/固定探针阵列。许多杂交测定法可以通过共价化学键将探针或同一探针的拷贝附接在像素表面上来构建其测定平台。这样获得的探针阵列可以是静态的或固定的,探针可以永久地与相同的物理位置以及特定的像素关联,在不同的检测方法之间不会变化。因此,当需要不同的探针阵列时,可能必须重建新芯片并且旧芯片可能被丢弃。

[0080] 与之相反的是,本发明可以采用动态探针阵列,即每个探针或每个探针的拷贝可在不同的方法之间改变其在芯片上的物理位置,或像素,因此在采用不同的检测方法时无需弃用阵列。因此,与一个或多个探针相关联的像素可能不是永久固定的,可能会在每次检测过程中被分别确定。确定与特定测定法的一个或多个探针相关联的像素的一种方式可以是在将一个或多个探针保留在特定样品室内之后,依靠利用附接于每个探针的条形码序列。其他确定与一个或多个探针相关联的像素的方式是可能存在的。

[0081] 在某些情况下,可以用寡核苷酸作为探针。如本文所用的“寡核苷酸”可以包含一个单链核酸。寡核苷酸的长度可以为2至约1000个核苷酸,2至约500个核苷酸,10至约100个核苷酸,或20至约50个核苷酸。在本公开的方法,设备和系统中,探针可以附接于固体基质,或者可以不附接于固体基质。探针可以直接或通过接头与基质结合。接头可包含例如氨基酸,多肽,核苷酸或寡核苷酸。

[0082] 探针所结合的固体基质可以是生物性的,非生物性的,有机的,无机的或上述的任意组合。基质可以例如以一种或多种颗粒,段,沉淀物,凝胶,片,管,球,容器,毛细管,垫,切片,薄膜,板或玻片的形式存在。但基质可能不是样品室的一面或传感器/检测器的表面。固体基质可以是平坦的,或者可以有其他的表面构造。例如,固体基质可包含在其上发生合成或沉积后形成的凸起或凹陷区域。在一些示例中,可以选择固体基质以提供适当的光吸收特性。例如,基质可以是聚合的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何一种,例如聚碳酸酯,(聚)四氟乙烯,聚苯乙烯,(聚)偏二氟乙烯或其组合。

[0083] 每个探针或复数个探针的中的每一个可以被保持在一个可寻址的样品室中,该样品室在芯片上被标识为或称为“像素”。在某些情况下,芯片可以包含至少约2、3、4、5、6或7-10、10-50、50-100、100-500、500-1,000、1,000-5,000、5,000-10,000、10,000-50,000、50,000-100,000、100,000-500,000、500,000-1,000,000或1,000,000以上保留探针的像素。在某些情况下,芯片可以包含最多约2、3、4、5、6或7-10、10-50、50-100、100-500、500-1,000、1,000-5,000、5,000-10,000、10,000-50,000、50,000-100,000、100,000-500,000、500,000-1,000,000或1,000,000像素以上保留探针的像素。在某些情况下,芯片可以包含大约2、3、4、5、6或7-10、10-50、50-100、100-500、500-1,000、1,000-5,000、5,000-10,000、10,000-50,000、50,000-100,000、100,000-500,000、500,000-1,000,000或1,000,000像素以上保留探针的像素。

[0084] 在某些情况下,使一些像素不保留探针可能是有用的。此类像素可以充当对照点,以提高测量质量,例如,通过使用与位点的结合来估计和校正分析物的非特异性结合。在某些情况下,此类对照点可用于表示背景信号。

[0085] 在某些情况下,使用具有与另一个像素相同的探针序列,但是在物理位置上可能不与另一个像素相邻或不邻近的冗余像素可能是有用的。由这样的探针阵列获取的数据可

能不太容易受到非理想的制造和测量误差的影响。

检测器和检测系统

[0086] 本公开提供了可用于检测信号的检测器。这样的信号可以用于监测核酸杂交的进程。这样的检测器可以是用于测量光信号的光学检测器,用于测量电化学信号的电化学检测器或用于测量电荷的静电检测器。

[0087] 由检测器检测到的信号可以包括传达关于标记物的存在与否和/或数量的信息,其中包括在所有像素处标记物的活性水平。信号可以是光学信号,例如荧光或化学发光。信号可以是电信号,例如电化学信号,静电信号,电阻,电容或电感。信号可以被处理,包括根据背景信号进行规范化。

[0088] 光学检测器的示例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)。检测器还可以包括波长选择组件, 例如滤光器, 以允许选择波长进行测量。其他检测器的示例包括电极。

[0089] 检测器可以每分钟至少约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次的速率取样 (例如获得测量)。

[0090] 检测器可以包括光源。光源可以例如用于激发荧光和/或比色标记。光源可以包括至少一个灯, 例如白炽灯, 卤素灯, 荧光灯, 气体放电灯, 电弧灯或发光二极管 (LED)。光源可以包括激光器。光源可以产生特定的波长或波长范围, 例如UV。光源可以包括用于控制输出光谱, 单个波长或多个波长的滤光器。光源可以包括相同或不同类型的多个光源, 其可以分开或组合使用。

[0091] 检测器可以包括各种光学元件, 包括但不限于过滤器, 透镜, 准直器, 镜子, 反射镜, 分束器和扩散器。检测器可以包括一个或多个过滤器, 包括但不限于波长过滤器 (例如, 彩色过滤器, UV过滤器, IR过滤器), 二向色过滤器光片和偏振过滤器。过滤器可以包括相同或不同类型的多个过滤器, 其可以分开或组合使用。检测器可以包括用于消除图像失真或像差, 例如镜筒或鱼眼失真, 枕形失真, 胡须失真, 单色像差 (例如Piston, 倾斜, 散焦, 球面像差, 彗形像差, 像散, 像场弯曲, 图像失真) 或色差 (例如轴向, 纵向, 横向, 横向) 的元件 (例如, 信号处理单元)。这样的元件可以包括被编程为用于实现用于部分或完全校正图像失真的指令的计算机系统。例如, 可以使用Brown的变形模型或Brown-Conrady模型来校正径向变形和切向变形。

[0092] 在一些示例中, 检测器可以测量来自各个像素发射的光子。这些光子可以与该区域中光学标记的存在和/或活性相关。

[0093] 在某些情况下, 检测器可以包括集成的生物传感器阵列, 其可以使用CMOS集成电路 (IC) 的制造工艺来构建 (Plummer等人, “硅技术: 基础知识, 实践和建模,” Prentice Hall 电子和VLSI系列, 2000年)。在本文称为“CMOS生物芯片”的这种系统中, 样品室阵列可以放置在CMOS生物芯片的顶部。

[0094] 本文还提供了一种检测系统, 其具有至少一个检测器, 该检测器被配置为可捕获, 检测和/或监测来自探针阵列的信号。可以产生各种信号, 例如光, 电, 电化学, 磁, 机械, 声

或电磁信号。信号可以与一种或多种分析物和试剂的存在,量,浓度和/或结合特征相关。信号可以反映的或指示一种或多种反应(例如,杂交)的进展。可以在单个时间点、多个时间点或实时检测信号。

[0095] 检测系统可以包括单个或多个检测器(例如,检测器阵列)。检测器可以是固定的或可移动的。检测器可以扫描探针阵列,使得给定的检测器在杂交过程中检测到来自芯片的不同可寻址位置的信号。在检测系统中包括多个检测器的情况下,每个检测器在检测或测量信号时可以记录与保留的探针的多个拷贝相关联的信号的特定位址。

[0096] 取决于要检测的信号的类型,在检测系统中可以使用各种类型的检测器。它可以包括例如光学检测器,电检测器,电化学检测器或静电检测器。光学检测器的示例可以包括但不限于chemFET, ISFET, 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)。检测器还可以包括波长选择组件,例如滤光器,以允许选择波长的测量。其他检测器的示例可以包括电极。

[0097] 检测系统可以包括光源。光源可以包括至少一个灯,例如白炽灯,卤素灯,荧光灯,气体放电灯,电弧灯或发光二极管(LED)。光源可以包括激光器。光源可以产生特定的波长或一个或多个特定波长,例如紫外光UV。光源可以包括用于控制输出光谱,单个波长或多个波长的滤光器。光源可以包括相同或不同类型的多个光源,其可以分开或组合使用。

传感器

[0098] 各种传感器可以用于本公开。它们可以包括但不限于chemFET, ISFET, 电子传感器,磁传感器和光学传感器。

1. ChemFET

[0099] 电化学检测可能是有吸引力的,因为它可以提供高灵敏度,小尺寸,低成本,快速响应以及与微细加工技术的兼容性。这些特性导致了基于安培,电位和阻抗信号的各种传感器的发展,并将传感器组装成用于化学,生化和细胞应用的阵列格式。

[0100] 在化学过程的检测中可以使用多种类型的化学传感器。一种类型可以是化学敏感的场效应晶体管(chemFET)。一个chemFET可以包括由沟道区分开的源极和漏极,以及耦合到沟道区的化学敏感区。chemFET的操作可能基于通道电导的调制,该调制是由于附近发生化学反应而在敏感区域的电荷变化引起的。通道电导的调制可以改变chemFET的阈值电压,可以对其进行测量以检测和/或确定目标化学反应的特征。

[0101] 例如,以阵列格式布置的chemFET可以用于监测生物或化学过程。这样的chemFET阵列可以涉及溶液中分析物的检测和/或结合到与chemFET的活性区域耦合的表面的电荷的检测。在一些系统中,分析物可以分布在一系列限制区域中,例如微孔中,其中每个限制区域可以与至少一个chemFET耦合。

2. ISFET

[0102] 离子敏感场效应晶体管(ISFET)可以是chemFET的一种类型。ISFET可以在chemFET的化学敏感区域整合一个离子敏感层。由于由分析物溶液中存在的离子引起的表面电荷基团的质子化或去质子化,分析物溶液中离子的存在可改变离子敏感层与分析物溶液之间的界面处的表面电势。ISFET的化学敏感区的表面电势变化可能会影响器件的阈值电压。可以测量阈值电压以指示分析物溶液中离子的存在和/或浓度。阈值电压的变化或不变化可以

指示离子的存在或不存在。

[0103] 基于对反应期间离子的存在,产生或使用的检测,ISFET阵列可用于监测化学反应,例如DNA测序反应。参见,例如,Rothberg等人的美国专利号7,948,015,其通过引用并入本文。更一般而言,可以使用大型的chemFET或其他类型的化学传感器在各种过程中检测和测量各种形式的分析物(例如氢离子,其他离子,化合物等)的静态和/或动态的量或浓度。这些过程例如可以是生物或化学反应,细胞或组织培养,或者监测神经活动,核酸测序等。

3. 光学传感器

[0104] 在某些实施方案中,荧光和光散射标记可以用于指示探针和靶核酸的成功杂交。合适的荧光标记的例子可以包括但不限于荧光染料,例如5-荧光素(FITC),四氯荧光素(TET)和六氯荧光素(HEX);绿色荧光蛋白,特别是增强的GFP(eGFP);罗丹明染料,如四甲基罗丹明(TMR)和羧四甲基罗丹明(TAMRA);Cy3和Cy5;和Qdot®纳米晶体(Quantum Dot Corp.,Hayward,CA)。荧光标记的核苷酸和定制探针可从许多供应商(例如,Synthegen,Houston Tex.;Qiagen,Valencia,CA)商购获得。合适的光散射标记可以包括发光标记,金属纳米颗粒,例如金纳米颗粒(Storhoff等,“基于金纳米颗粒探针的比色散射的未扩增基因组DNA序列的均质检测”,Nat Biotechnol.22:883-87,2004)和胶体银等离子体激元共振颗粒(PRP)(Schultz等人,“使用非漂白多色光学免疫标记物进行单靶分子检测”,Proc Natl Acad Sci USA 97:996-1001,2000)。

[0105] 荧光标记可以在靶/探针杂交之前或杂交之后掺入到靶核酸中。标记可以直接结合或掺入靶核酸中,或者可以通过诸如生物素-链霉亲和素的接头附接至靶核酸。在一个实施方案中,标记物可以是荧光的,其通过不同的接头附接至靶核酸。在检测步骤中,可以基于不同接头对标记物的不同光学影响来区分标记物。在另一个实施方案中,标记物可以是荧光的,并通过不同的接头附接至靶核酸。在检测步骤中,可以基于不同接头对标记物的不同光学影响来区分标记物,其中接头可以是具有不同长度的碳链,并且偏振标记物的荧光强度与标记物的长度成反相关。

[0106] 为了检测荧光信号,可以通过光照射标记,例如使用高强度汞蒸气灯,激光器等。在一些情况下,光照方法可以是具有在488至550nm之间的波长的照明光束的激光器。在其他情况下,染料多核苷酸可以由氩离子激光器产生的激光照射,特别是氩离子激光器的488和514nm发射线,或者钕固态YAG激光器的532发射线照射。几种氩离子激光器可以在市场上买到,并且可以同时发出以上几种辐射线。例如,Cyonics,Ltd(加利福尼亚州Sunnyvale)生产的2001型等。荧光可以由光敏检测器例如光电倍增管,带电耦合装置等检测。

[0107] 如上所述,冷发光是来自发光原子或分子的激发电子态的发射光。冷发光通常是指除白炽以外所有类型的发光,并且可以包括光致发光,化学发光和电化学发光等。在包括荧光和磷光的光致发光中,通过吸收电磁辐射来产生激发的电子态。在包括生物发光的化学发光中,激发的电子态是通过化学能的转移而产生的。在电化学发光中,通过电化学过程产生激发的电子态。在本公开中,光致发光可以,但非限制性的,与冷发光和荧光互换使用,并且发光体可与荧光团互换使用。

[0108] 在此,冷发光是由与掺入靶核酸中的报告分子相关的发光体发出的。发光体的发光寿命可能较短(0.1-10纳秒)或较长(10纳秒-1+秒)。这样的发光体可以是外在的,例如花青染料,菲啶类(例如溴化乙锭),吡啶类(例如吡啶橙),吡啶类(例如DAPI),咪唑,补骨脂素

和发光金属-配体,镧系元素复合物和草酸盐(clyptates),以及其他。在Richard P.Haugland的《荧光探针和研究化学手册》(第六版,1996年)中列出了其他发光体,在此出于所有目的将其并入本文作为参考。外源发光体可以与多核苷酸共价或非共价结合。发光团可以使用各种反应性基团共价结合,尤其是如果在合成过程中将胺或硫醇掺入核苷酸中时。发光体可以通过特异性结合或非共价结合,例如抗生物素蛋白和生物素,蛋白A和免疫球蛋白,凝集素和糖(例如伴刀豆球蛋白A和葡萄糖)。发光体还可以通过插入多核苷酸中或与多核苷酸中的螺旋槽结合来进行非共价结合。

[0109] 发光体可用于多种发光测定中,包括荧光偏振(FP),荧光共振能量转移(FRET),荧光寿命(FLT),全内反射(TIR)荧光,荧光相关光谱(FCS),以及漂白后的荧光恢复(FRAP),以及它们在磷光和高跃迁中的类似物。

探针阵列的制备

[0110] 可以个根据合成的寡核苷酸捕获探针的集合文库设计和合成探针阵列。如图1所示。参照图1,捕获探针100的每个拷贝可以包括5'-端接头A1,作为非相互作用的探针地址的与A1相邻的编码序列CS,与特定靶核酸互补的探针序列PS,和3'端接头A2。

[0111] 为了制备探针阵列,可以制备核酸模板的文库。可以扩增核酸模板以形成合成寡核苷酸捕获探针文库,通常可能包括开环或闭环核酸模板分子。“闭环”可以是共价闭合的环状核酸分子,例如环状DNA或RNA分子。“开环”可以是具有5'磷酸基和3'羟基的线性单链核酸分子。

[0112] 在一个实施方案中,单链核酸模板可以包含特定核酸模板序列的至少一个拷贝。在一些实施方案中,开环可以由线性双链核酸分子在原位形成。给定的开环核酸分子的末端可以通过DNA连接酶连接。开环分子的5'和3'端的序列可以与第二核酸分子中的两个由相邻核苷酸形成的区域互补,例如锚定引物的接头区域(有时称为接头区),或在第二DNA分子中几乎相邻的两个区域。因此,可以使用DNA连接酶连接开环分子的末端,或者在缺口填充反应中通过DNA聚合酶延伸。开环分子在Lizardi的美国专利No.5,854,033中有详细描述,该文出于所有目的并入本文。在DNA连接酶(对于DNA)或RNA连接酶的存在下,可以将开环转变为闭环,在例如将开环退火并结合引物之后。

[0113] 可以用单链或双链核酸模板分子构建一个起始核酸模板文库,条件是该核酸序列包括一个区域,如果该文库中存在该区域,该区域可用于,或可能可以用于退火结合一个锚定引物序列。例如,当用作滚环扩增的模板时,双链模板的区域可以至少瞬时是单链的,以便成为锚定引物的延伸模板。

[0114] 文库模板可包括多个元件,包括但不限于与锚定引物互补的一个或多个区域。例如,模板文库可包括与测序引物互补的区域,对照核苷酸区域和由随后要表征的测序模板组成的插入序列。例如,对照核苷酸区域可用于校准副产物的量和掺入的核苷酸数目之间的关系。

[0115] 在一个实施方案中,可将索引寡核苷酸或条形码序列附接至模板文库中的成员,以允许模板核酸及其扩增产物,即探针,在随后与衍生出模板核酸的核酸群体产生后续关联。例如,可以使用例如限制性消化或超声处理的方法分别将一个或多个起始DNA群体的样品片段化。将特异性标识每个样品的索引寡核苷酸序列附接在,例如连接在,片段化群体成员的末端。索引寡核苷酸可用于环化,扩增以及可选地测序步骤,这使其可以用于索引或编

码核酸,从而可以鉴定其来源的起始样品。由于链复制时核酸链的互补性,附接在模板上的条形码可能会导致另一个条形码附接在扩增的探针上。

[0116] 可以将用多种可区分的索引引物制成的不同模板文库混合在一起,以用于随后的反应。确定文库中成员的序列可以允许鉴定对应于索引寡核苷酸的序列。基于该信息,可以推断任何给定片段的来源。

[0117] 末端接头A1和A2的设计可以根据各种因素而变化,包括例如选择用于制备捕获探针的多个拷贝的扩增方法。可以针对每个探针阵列定制探针序列,以使合并的文库可以选择性地结合并捕获所需的靶核酸并进行检测。

[0118] 此外,通过本公开的检测方法,可以放大在芯片的每个可寻址位置处的探针的拷贝数以产生足够数量的探针的拷贝,以便产生可检测的信号。可以使用任何合适的核酸扩增方法。

[0119] 已经有许多体外核酸扩增技术被描述。这些扩增方法可以区分为以下几类方法:(i) 需要温度循环的-聚合酶链式反应(PCR)(参见例如Saiki等,Science 230:1350-54,1995),连接酶链反应(参见例如,Barany,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193,1995;Barringer等,Gene 89:117-122,1990)和基于转录的扩增(参见例如Kwoh等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-77,1989)和(ii)等温扩增系统-自我持续,序列复制(参见例如Guatelli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-78,1990);QB复制酶系统(参见,例如,Lizardi等,BioTechnology 6:1197-1202,1988);链置换扩增(参见例如Walker等人,Nucleic Acids Res.20(7):1691-96,1992)。

1. 滚环扩增

[0120] 滚环扩增(RCA)可以使用独特的DNA和RNA聚合酶(用于DNA的Phi29,Bst和Vent Exo-DNA聚合酶,以及用于RNA的T7 RNA聚合酶)生成长单链DNA和RNA。在RCA中,聚合酶可以连续地将核苷酸添加到结合至环形模板的引物上。最终结果可能是带有许多重复的长单链DNA(ssDNA)。在一个实施方案中,探针序列或其片段可以用作RCA引物。在另一个实施方案中,探针序列或其片段可以用作连接模板以环化用于RCA的环形模板的挂锁序列。RCA的环状DNA模板可以以酶促或化学的方法,通过末端磷酸和核糖羟基的分子内连接合成。例如,可以使用模板介导的酶促连接,例如T4 DNA连接酶,或使用例如CircLigase的无模板连接来构建RCA的环状DNA模板。

[0121] 如果使用RCA扩增合并的文库,则接头A1和/或A2的模板可整合进用于实现串联复制相对长的合成探针序列所需的序列。此外,一个或多个辅助序列可以包含与接头A1和A2的模板互补的序列,以便所需捕获探针的线性模板可以通过碱基填充和连接来环化以形成单链环化模板核酸(“环状DNA模板”)用于RCA反应。图2展示了环状DNA模板100'的非排他性实例。序列PS'可以是探针序列PS的模板;序列CS'可以是编码序列CS的模板,序列A1'可以是接头A1的模板;序列A2'可以是接头A2的模板。

[0122] 在适当的引物和扩增溶液的存在下,通过RCA反应,可以用Phi29 DNA聚合酶扩增所得的环状DNA模板文库,以形成捕获探针的串联体。

[0123] 如本文所用,术语DNA“纳米球”或“rolony”通常是指单克隆的,由等温扩增DNA模板分子产生的致密的串联体分子。如上所述,在本公开中,RCA技术可以是扩增环状模板核酸以产生捕获探针的长单链线性DNA串联体的方法之一。

[0124] 在一个实施方案中,可以在3'和5'端上连接接头序列以修饰可以作为捕获探针模板的线性单链DNA(“ssDNA”)。如此修饰的模板ssDNA的5'端可以被进一步修饰以包含磷酸基团。在一些实施方案中,可以将接头序列特别地设计成包括期望的特征,包括但不限于促进与模板ssDNA的末端的定向连接。

[0125] 在将接头连接至模板单链DNA的两端后,可通过可从Epicenter Biotechnologies (Illumina公司,威斯康星州麦迪逊)购买的CircLigase连接酶将线性单链DNA的3'和5'相连,转化为一个环形模板。

[0126] 在某些情况下,线性ssDNA可被环化以产生环形模板ssDNA。例如,CIRCLIGASE™II ssDNA连接酶可用于环化线性模板ssDNA。该连接酶是热稳定的连接酶,可催化具有5'-单磷酸和3'-羟基的单链DNA(ssDNA)底物的分子内连接(即环化)。环化条件可以根据制造商提供的方法制定。例如,在总体积为10 μ L的含33mM Tris-乙酸盐(pH7.5),66mM乙酸钾和0.5mM DTT的反应缓冲液中,组分的浓度可以为0.5 μ mol/ μ L单链DNA,2.5mM MnCl₂、1M三甲基甘氨酸(Betaine),5U/ μ L CIRCLIGASE™II单链DNA。可以在60 $^{\circ}$ C下孵育反应1小时或更长时间。环化完成后,可以将反应液在60 $^{\circ}$ C下孵育10分钟以灭活连接酶。

[0127] 然后,可以将与环状模板单链DNA的接头区域互补的正向扩增引物退火至模板上,以产生环状模板单链DNA。退火的引物可以在具有高链置换活性的聚合酶(例如Phi29 DNA聚合酶)存在下进行延伸,以产生多个串联形式的捕获探针。捕获探针的一种串联形式可以具有约100,约200,约500和约1000个拷贝或更多的探针序列。

[0128] 在某些情况下,可以放大以上获得的环形模板。放大可以是滚环放大(RCA)。例如,可在含有脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)混合物(每个dNTP为1mM;Fermentas),并增加了单链结合蛋白T4基因32浓度(0-100ng/ μ l,NEB)的1 \times Phi29反应缓冲液(33mM Tris-乙酸盐,10mM乙酸镁,66mM乙酸钾,0.1% (v/v) Tween 20,1mM二硫苏糖醇(DTT);Fermentas)中使用Phi29 DNA聚合酶(0.5U/ μ l,Fermentas),在30 $^{\circ}$ C下孵育24h以扩增环形模板单链DNA(0.25ng/ μ l)。

[0129] 分子内氢键或杂交可在接头区域之间形成,所述区域具有适合的氢键形成序列或互补序列用于杂交。探针序列也可以包含适合形成分子内氢键的区域。因此,线性串联体可以折叠成二级结构,该二级结构将线性单链DNA压缩成非常紧凑的三维纳米球结构。适当的缓冲条件也可能有助于将线性单链DNA串联体压缩成致密的纳米球。这样的纳米球可以具有约50nm,约100nm,约150nm或约200nm的半径。形成的纳米球的大小可以通过改变添加到RCA反应中的三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)的量来调节。

[0130] 在一个实施方案中,线性串联体中的接头可包含短回文序列,其可以通过可逆的分子内杂交帮助形成紧密的纳米球,从促进单链DNA串联体的卷曲。

[0131] 在纳米球被保留在芯片上的可寻址位置,并与包含所需靶核酸的拷贝的溶液接触之后,捕获探针串联体的纳米球可以与不止一个拷贝的靶核酸杂交。因此,使用靶向期望的靶核酸的捕获探针的辅酶的纳米球可以提供信号扩增,指示与靶核酸的成功杂交。因此,使用串联体纳米球来靶向期望的靶核酸,可以提供信号扩增并且促进探针与靶核酸杂交的成功率。

2. 微珠乳液PCR扩增

[0132] 在本公开的一个实施方案中,可以通过将待扩增的核酸模板(例如,DNA模板)附接至通常为球形微珠形式的固相支持物来进行微珠乳液的扩增。微珠可以与大量与模板DNA

的一个区域互补的单个引物连接。作为扩增的结果,珠粒可以与所需捕获探针的许多拷贝连接,其是在微珠上的附接引物延伸模板DNA取得的扩增产物。或者,珠粒可以与化学基团(例如生物素)连接,该化学基团可以与模板DNA上包含的化学基团(例如链霉亲和素)结合。再次,作为扩增的结果,珠粒可以连接至所需捕获探针的许多拷贝,其是模板DNA的扩增拷贝。可以将珠粒悬浮在水性反应混合物中,然后封装在油包水乳液中。模板DNA可以在乳化之前与珠粒结合,或者模板DNA可以包含在扩增反应混合物的溶液中。在一个实施方案中,可以在将核酸模板分配至珠乳液PCR扩增过程之前进行扩增步骤。

[0133] 代表性乳液PCR (e-PCR) 技术的一个实例在图6中示出。用于e-PCR的核酸模板600可以包括两个接头A2' 和A1', 用于探针序列的模板序列PS' 和用于编码序列的模板序列CS'。在合成了核酸模板600的文库之后,可以采用e-PCR方法将探针序列的多个拷贝附接到单个珠粒上。如图6所示,这可以通过划分一个核酸模板600,具有多个连接的第一引物P1(例如,n个引物,其中n是大于2的整数)的微珠602,第二引物P2和用于PCR的其他试剂(例如,dNTP)在同一进行e-PCR的微反应器中(例如液滴或乳剂的微囊)来实现。在根据核酸模板600延伸引物P1的扩增结束时,可以获得微珠604,在微珠604上可以附接m个拷贝的核酸序列606(m是大于2的整数,但不大于n)。核酸序列606可以包含引物P1,编码序列CS,探针序列PS和引物序列A2。探针序列PS可以被设计为与选择的靶核酸序列互补。

[0134] 在某些实施方案中,乳液可以由离散的水相微滴组成,例如平均直径为约60 μm 至约200 μm ,并被热稳定的油相包围的微滴。每个微滴可包含扩增反应溶液(即,足以用于核酸扩增的试剂)。扩增反应溶液的一个例子可以包含PCR反应混合物(聚合酶,盐和dNTP)和一对PCR引物。在某些情况下,模板DNA可包含在反应混合物中。微滴中的一个子集可以包括DNA珠粒和模板。这个微滴的子集可能是乳液PCR扩增的基础。其余的微胶囊可能不包含模板DNA,并可能不参与扩增。

[0135] 在一个实施方案中,所用的扩增技术可以是PCR,并且PCR引物可以以8:1或16:1的比例存在(即,8或16的一种引物相对于1的第二引物),以实施不对称PCR。在另一个实施方案中,PCR引物的比例可以与正常PCR基本相等。在一些实施方案中,在可用dNTP的存在下,热稳定的聚合酶可以合成固定在微珠上的单链DNA扩增子,所述扩增子即是捕获探针。

[0136] 在PCR之后,可以破坏乳液。并且可以在一定条件(NaOH,低离子强度或热处理等)下处理固定有许多拷贝的捕获探针的微珠,以获得单链DNA形式的捕获探针。

样品室设计

[0137] 样品室可以根据探针的拷贝的特征来设计,以保留探针的多个拷贝。

1. 用于纳米球的样品室

[0138] 本公开的芯片可以被设计为在每个具有可寻址位置的样品室内保留一个纳米球。如图3所示,芯片200可以包括样品室阵列202。如图3和图4所示,样品室202的形状可以是具有圆形横截面,倾斜的侧壁204以及在底部206处的平坦表面的中空圆柱体。

[0139] 两个相邻样品室的中心之间的距离可以是大约700nm,大约800nm,大约900nm,大约1000nm,大约1100nm,大约1200nm,大约1300nm或大约700nm至大约1300nm。圆形底部的直径可以是大约300nm,大约400nm,大约500nm,大约600nm,大约700nm,大约800nm或大约300nm至大约800nm。

[0140] 此外,如图4所示,样品室202A可具有倾斜的侧壁204A和圆形底部206A。每个圆形

底部206A可以包括直径为约250nm至约300nm的圆形的“着陆点”208A。该着陆区208A可以通过化学修饰而带正电,使得它可以通过电荷相互作用保留直径为约250nm至约300nm的探针的纳米球212A。可以注意到,除了着陆部位区域208A之外,空心圆柱体的表面210A的其余部分或芯片的顶表面没有带正电,因此空心圆柱体的其余表面或芯片的顶表面可以不与探针的纳米球212A形成电荷-电荷相互作用。样品室202A的这些表面性质确保着陆部位208A可以帮助保持以纳米球212A形式存在的探针的多个拷贝,并且每个样品室202A可以保持一个这样的纳米球212A。着陆点可以占据样品室202A的整个底表面。在图4所示的样品室202B的另一个实施方案中,着陆位点208B可以占据样品室202B的底表面206B的一部分以保持一个探针的纳米球212B,而芯片的顶表面和中空圆柱体的其余表面210B没有带正电,并且不能保留探针的纳米球212B。着陆点可包括样品室的垂直壁上的区域。

[0141] 在一些实施方案中,纳米球可以附接于树状载体或其他类型的颗粒,例如微珠。载体可以是多孔的或部分多孔的。如果载体是多孔的或部分多孔的,则孔的大小可以足够大以允许核酸(例如DNA),聚合酶,dNTPs和其他可用于引物延伸测序或其他适当应用的组分自由移动。

[0142] 在一些实施方案中,纳米球可以被临时固定在表面上,例如样品室的表面,传感器,电极的表面,载体的表面(例如,微珠)等。这样的表面可以具有任意形状,如球形、平面、矩形、晶体状、井状等。在一些实施方案中,纳米球附接的表面的基底材料可包括例如硅,硅基材料,玻璃,经过修饰的功能化玻璃,磁性材料,塑料,金属,陶瓷,凝胶,丙烯酸树脂,生物材料等。纳米球可以通过任何合适的方法附接于表面,其非限制性实例包括核酸杂交,生物素链霉亲和素结合,硫醇结合,光活化结合,共价结合,非共价结合,抗体-抗原,由水凝胶或其他多孔聚合物实现的物理限制等,或其组合。在某些情况下,可以用核酸酶(例如DNA核酸酶)消化纳米球,以产生较小的纳米球或纳米球的片段。

[0143] 在一个制备玻片表面以保留DNA纳米球的实施方案中,可以在标准硅晶片(Silicon Quest International,Santa Clara,CA)的表面上生长一层二氧化硅。钛层可以沉积在二氧化硅层上,并且钛层可以利用常规的光刻和干蚀刻技术用基准标记图案化。可以通过气相沉积将六甲基二硅氮烷(HMDS)层(Gelest Inc.,莫里斯维尔,宾夕法尼亚州)添加到基底表面,然后通过离心力将深紫外线,正性光刻胶材料涂覆到表面上。可以用选定的阵列图案和248nm光刻工具对所得的光刻胶表面进行曝光。如此便产生了光抗蚀性,可以在HMDS上产生具有离散区域的阵列。

[0144] 暴露孔中的HMDS层可以通过等离子蚀刻工艺去除,并且可以气相沉积氨基硅烷,例如(3-氨基丙基)-三乙氧基硅烷(APTES)在暴露孔中以提供用于DNA纳米球的着陆点。可以在所得表面上涂覆一层光刻胶,并切成75mm x 25mm的基底,然后通过超声处理将所有光刻胶从基底表面剥离。接下来,可以将大约50 μ m的聚苯乙烯珠和聚氨酯胶的混合物以一组平行线的方式施加到每个基底切块的表面,然后将盖玻片压入胶线以形成多泳道,例如六泳道的,重力/毛细管驱动的流通片。在基底上的氨基硅烷图案或斑块可充当各个DNA纳米球的着陆点,而HMDS可抑制DNA纳米球着陆在图案/斑块之间。可以通过吸移比玻片上可用的着陆点数量多2至3倍的纳米球到玻片上,将经过RCA过程制备的DNA纳米球装载到流动载玻片泳道中。装载后的玻片可在密闭室内于23 $^{\circ}$ C孵育2小时,然后漂洗以中和pH值并去除未结合的DNA纳米球。

[0145] 在另一个实施方案中,可以将几个步骤添加到上述实施方案中。首先,可以对硅晶片进行预处理,以便在生长氧化硅层之前,具有所需形状(例如中空圆柱体)和尺寸的图案化微孔可以存在于玻片上。第二,当用248nm光刻工具以选定的阵列图案对光刻胶表面进行曝光时,选定的阵列图案可导致随后在微孔底部产生暴露的HMDS的离散区域。

2. 用于珠粒乳液PCR扩增的样品室

[0146] 可以按照与上述用于纳米球的样品室的程序相似的程序来制造这些样品室。但是,表面处理可能会有所不同,因为具有适当尺寸的微孔(允许获得一个微珠,但不允许获得两个微珠)可能不会经过表面处理,以保留探针的多个拷贝。如图所示。图5是用于微珠的样品室的示例。同样,样品室的尺寸可能取决于几个因素,包括:1) 每个样品室所保留的微珠的尺寸;2) 样品室中允许进行杂交和洗涤步骤的溶液量,以及3) 保留微珠与杂交步骤后洗去未结合的靶核酸之间的平衡等。

探针序列的解码

[0147] 如上所示,具有多个探针拷贝的纳米球或微珠可以随机地分布到样品室(微孔)。为了使探针与包含探针的样品室产生关联,保留在每个样品室中的探针序列可以通过解码附接至每个探针序列PS的编码序列CS来识别。例如,基于高通量杂交的解码程序,如Gunderson等人在“解码随机排序的DNA阵列”,*Genome Res.*, 14(5):870-77, 2004所描述的程序,可以实现解码的目的。Gunderson的方法可以提供一种通过使用杂交来识别大量条形码序列相关对象的集合中的每个成员的算法,并且该方法可以应用于在孔中的随机组装的微珠阵列的制造。

检测探针与靶标之间的杂交

[0148] 如上所述,在某些情况下,DNA样品可以被片段化,抛光,与接头连接,在内部或在3'端用生物素或其他合适的半抗原标记,包括但不限于洋地黄毒苷,荧光素,2,4-二硝基苯基(DNP)等。

[0149] 如图5所示,探针阵列可以在允许互补探针和片段化的靶核酸分析物之间杂交的条件下,暴露于带有标记的、片段化的靶核酸分析物。随后的洗涤可去除未结合的(未杂交的)片段化的靶核酸分析物。可以控制洗涤条件,以使残留的微珠或纳米球不会被洗掉,而未结合的核酸分析物会被洗掉。可以通过许多方法来检测与探针杂交的分析物的存在。以下是一些非排他性的说明性示例:

1. ISFET传感器

[0150] 在一个实施方案中,当使用ISFET检测方法时,可通过将杂交产物暴露于与质子信号产生部分连接的半抗原结合分子(例如,链霉亲和素,抗地高辛配体等)来检测结合的靶核酸的存在。如上所述,片段化的靶核酸用合适的半抗原标记。如图5所示,在将探针的纳米球504保留在样品室502中之后,可以使靶核酸506及其相关的半抗原508与纳米球504杂交。在完成杂交步骤之后,可以将杂交产物至少洗涤一次以除去未结合的纳米球和靶核酸。然后可以使半抗原结合分子510以及与之连接的质子信号产生部分512与样品室502中结合的靶核酸506上的半抗原508反应。然后,可以释放至少一个质子信号516的底物514被加入样品室502。质子信号产生部分512处理底物514之后,释放的质子信号516可以由可寻址并与样品室502相邻的检测器518检测到。需注意的是,在同一样品室内,可能有多个靶核酸与同一个探针纳米球结合。这可能产生相比一个靶核酸与纳米球结合更强的信号。

[0151] 在本公开中,如本文所用,术语“质子信号产生部分”通常是指产生酸或碱作为酶的底物或辅因子的催化转换的副产物,从而引起样品室内可测量的pH变化的酶。

[0152] 质子信号产生部分的非排他性说明性实例包括:

- 水解酶,例如酯酶(例如,乙酰胆碱酯酶),脂肪酶,磷酸酶和焦磷酸酶(例如,无机焦磷酸酶,ATP水解酶(“apyrase”)),这些酶由于生物转化而产生质子作为副产物;
- 磷酸转移酶,例如核苷激酶,丙酮酸激酶等,由于生物转化,它们都产生质子作为副产物;
- 脱氢酶,例如醛脱氢酶,醇脱氢酶,葡萄糖-t-磷酸脱氢酶(G6PDH),由于生物转化,它们都会产生质子作为副产物;
- 氧化酶如黄嘌呤氧化酶,葡萄糖氧化酶和过氧化物酶等也可能由于这些酶的活性而引起pH值变化;
- 脱氨基酶诸如L-谷氨酰胺酶和脲酶,由于生物转化可能产生副产物氨(NH₃)。

[0153] 实际上,如图4所示,在杂交和洗涤步骤之后,可以将与半抗原结合分子缀合的质子信号产生部分添加到样品室中,然后添加质子信号产生部分所需的底物。如果有的话,由此产生的pH变化可以由ISFET检测器在相关的可寻址位置捕获并记录。

2. 发光检测器

[0154] 在另一个实施方案中,当使用发光传感器时,可以通过将探针阵列暴露于与发光信号产生部分连接半抗原结合分子(例如,链霉亲和素,抗地高辛配体等)来检测与探针杂交的靶核酸的存在。

[0155] 发光信号产生部分可以从底物的催化转化产生荧光或化学发光产物的酶。在一个实施方案中,一种酶可以将底物转化为当被特定波长的光激发时发荧光的反应产物。能够产生荧光信号的酶的非排他性说明性实例包括当合适的底物存在时的碱性磷酸酶, β -D-半乳糖苷酶和过氧化物酶。在另一个实施方案中,酶可以将底物转化为发射光子的反应产物,而不是显现出可见的颜色。能够产生发光信号的酶的非排他性说明性实例包括当合适的底物存在时的碱性磷酸酶, β -D-半乳糖苷酶和过氧化物酶。

[0156] 计算机系统

[0157] 本公开提供了被编程为可实现本公开的方法的计算机控制系统。图7示出了被编程或以其他方式配置为可执行本公开的方法和系统的各种功能,例如,执行扩增反应,检测和/或监测靶标物质(例如靶核酸)与探针阵列的结合,和/或监控杂交或扩增反应的进度的计算机系统700。计算机系统700可以调节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的变化,例如温度控制,试剂处理和信号检测的多个方面。计算机系统700可以与本公开中提供的系统集成。

[0158] 计算机系统700包括中央处理单元(CPU,在本文中也称为“处理器”和“计算机处理器”)702,其可以是单核或多核处理器,或用于并行处理的多个处理器。计算机系统700还包括用于通信的存储器或存储器位置704(例如,随机存取存储器,只读存储器,闪存),电子存储单元706(例如,硬盘),用于与一个或多个设备通信的通信接口708(例如,网络适配器),外围设备710,例如高速缓存,其他存储器,数据存储和/或电子显示适配器。存储器704,存储单元706,接口708和外围设备710通过诸如主板的通信总线(实线)与CPU 702通信。存储单元706可以是用于存储数据的数据存储单元(或数据存储库)。可以借助于通信接口708将

计算机系统700可操作地连接到计算机网络(“网络”)712。网络712可以是因特网,内部网和/或外部网,或者是正在和因特网通信的内部网和/或外部网。在某些情况下,网络712是电信和/或数据网络。网络712可以包括一个或多个计算机服务器,其可以启用分布式计算,例如云计算。在某些情况下,网络712可以在计算机系统700的帮助下实现对等网络,该对等网络可以使连接到计算机系统700的设备能够充当客户端或服务器。

[0159] CPU 702可以执行一系列机器可读指令,其可以内嵌在程序或软件中。指令可以存储在诸如存储器704的存储器位置中。指令可以被定向到CPU 702,CPU 702可以随后对CPU 702进行编程或以其他方式配置CPU 702以实现本公开的方法。CPU 702执行的操作的示例可以包括获取,解码,执行和写回。

[0160] CPU 702可以是电路的一部分,例如集成电路。系统700的一个或多个其他组件可以被包括在电路中。在某些情况下,该电路是专用集成电路(ASIC)。

[0161] 存储单元706可以存储文件,例如驱动程序,库和保存的程序。存储单元706可以存储用户数据,例如,用户偏好和用户程序。在某些情况下,计算机系统700可以包括在计算机系统700外部的一个或多个附加数据存储单元,例如位于通过内部网与计算机系统700通信的远程服务器上或因特网。

[0162] 计算机系统700可以通过网络712与一个或多个远程计算机系统通信。例如,计算机系统700可以与用户(例如,实验室技术员,医师)的远程计算机系统通信。远程计算机系统的示例包括个人计算机(例如,便携式PC),平板电脑或平板电脑(例如, **Apple®**iPad, **Samsung®**Galaxy Tab),电话,智能电话(例如, **Apple®**iPhone,支持Android的设备, **Blackberry®**)或个人数字助理。用户可以通过网络712访问计算机系统700。

[0163] 本文所述的方法可以通过存储在计算机系统700的电子存储位置,例如,存储器704或电子存储单元706上的机器(例如,计算机处理器)可执行代码来实现。机器可执行或机器可读代码可以以软件的形式提供。在使用期间,代码可以由处理器702执行。在某些情况下,可以从存储单元706中检索代码并将其存储在存储器704中,以供处理器1905随时访问。在某些情况下,电子存储单元706可以被排除,并且将机器可执行指令存储在存储器704中。

[0164] 可以对代码进行预编译,并将其配置为可以在具有合适执行该代码的处理器机器上使用,或者可以在运行时进行编译。可以通过选择提供代码的编程语言,使代码能够以预编译或即时编译(as-compiled)的方式执行。

[0165] 本文提供的系统和方法,例如计算机系统700,可以在编程中具体体现。可以将技术的各个方面视为机器(或处理器)可执行代码和/或在某种类型的机器可读介质上携带或体现的关联数据的“产品”或“制品”形式。机器可执行代码可以存储在电子存储单元上,例如存储器(例如,只读存储器,随机存取存储器,闪存)或硬盘。“存储”类型的介质可以包括计算机,处理器等的任何或所有有形存储器,或其相关模块,例如可以提供非暂时性存储以便随时进行软件编程的各种半导体存储器,磁带驱动器,磁盘驱动器等。软件的全部或部分有时可以通过因特网或各种其他电信网络进行通信。例如,这样的通信能够将软件从一个计算机或处理器加载到另一计算机或处理器,例如从管理服务器或主机加载到应用服务器的计算机平台。因此,可以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,

例如通过有线和光学座机网络并通过各种空中链路跨本地设备之间的物理接口使用的光波。诸如有线或无线链路,光学链路等之类的携带此类波的物理元件也可以被视为承载软件的介质。如本文所使用的,除非限于非暂时性的有形“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指令以供执行的任何介质。

[0166] 因此,诸如计算机可执行代码的机器可读介质可以采取许多形式,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,诸如任何计算机等中的任何存储设备等,诸如可以用于实现附图中所示的数据库等。易失性存储介质包括动态存储器,例如这种计算机平台的主存储器。有形的传输介质包括同轴电缆。铜线和光纤,包括构成计算机系统内总线的电线。载波传输介质可以采用电信号或电磁信号或声波或光波的形式,例如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间生成的那些。因此,计算机可读介质的常见形式包括:软盘,软盘,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,打孔卡纸磁带,带孔图案的任何其他物理存储介质,RAM,ROM,PROM和EPROM,FLASH-EPROM,任何其他存储芯片或盒带,用于传输数据或指令的载波,用于传输此类载体的电缆或链接,或计算机可以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能涉及将一个或多个指令的一个或多个序列传送给处理器以执行。

[0167] 计算机系统700可以包括电子显示器714或与之通信,该电子显示器包括用户界面(UI)716,该用户界面用于提供例如循环次数,温度值,温度控制,检测器数据和试剂处理。UI的示例包括但不限于图形用户界面(GUI)和基于Web的用户界面。

[0168] 本公开的方法和系统可以通过一种或多种算法来实现。可以由中央处理单元702在执行时通过软件来实现算法。该算法可以例如控制每个可寻址位置的温度,将探针的条形码分配给每个可寻址位置,收集信号并分析收集的数据。

[0169] 尽管在此已经示出和描述了本发明的优选实施方案,但是对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方案仅通过示例的方式提供。并非意图通过专利说明书中提供的特定示例来限制本发明。尽管已经根据前述专利说明书描述了本发明,但是本文中实施方案的描述和图示并不意味着以限制性的意义来解释。在不背离本发明的情况下,本领域技术人员将想到许多变化,改变和替代。此外,应当理解,本发明的所有方面不限于本文所阐述的具体描述,构造或相对比例,其取决于各种条件和变量。应当理解,本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案可以用于实施本发明。因此,可以预期的是,本发明还将覆盖任何这样的替代,修改,变化或等同形式。所附权利要求的意图是定义本发明的范围,并且由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

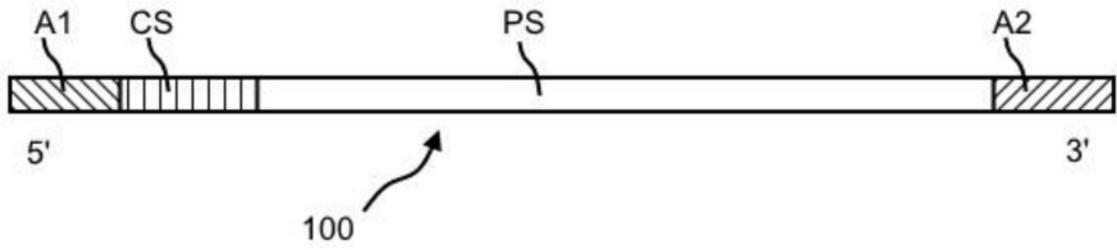


图1

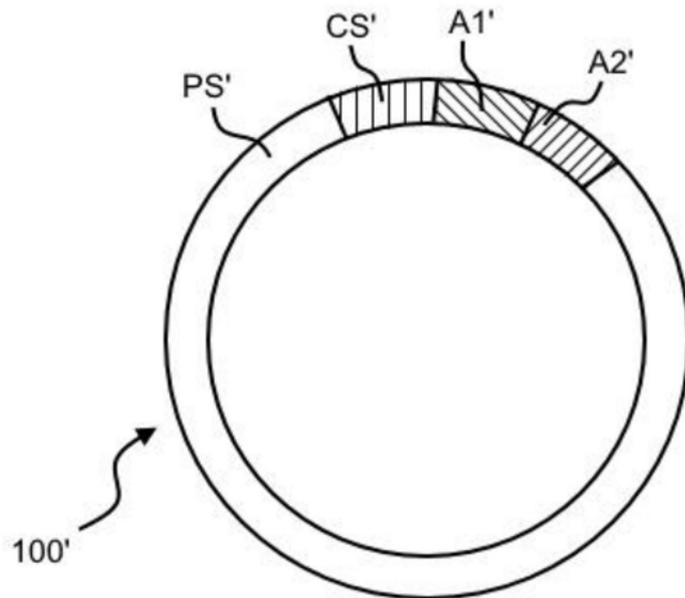


图2

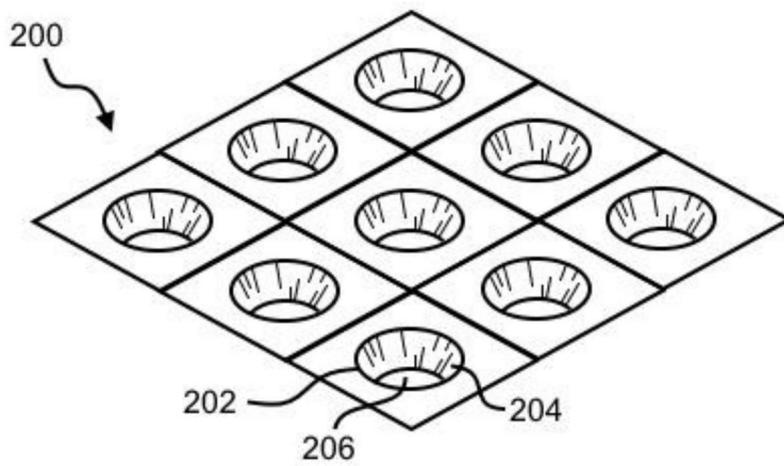


图3

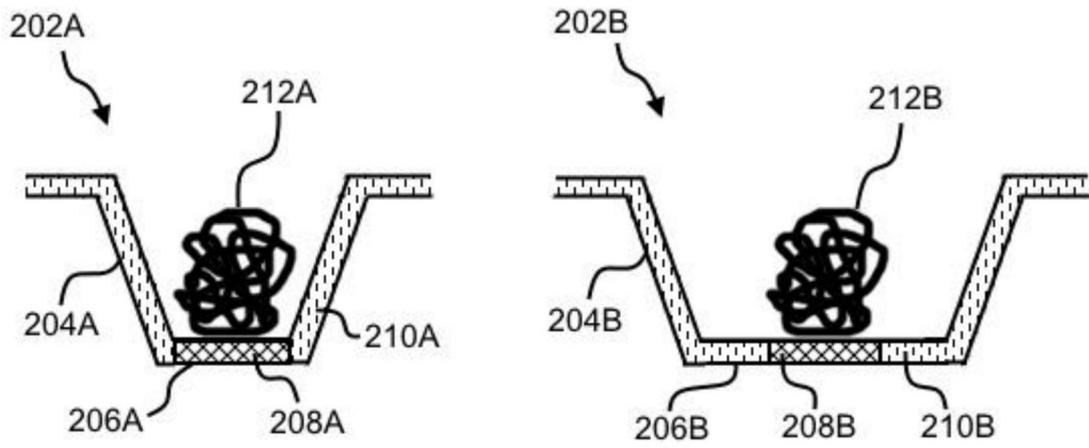


图4

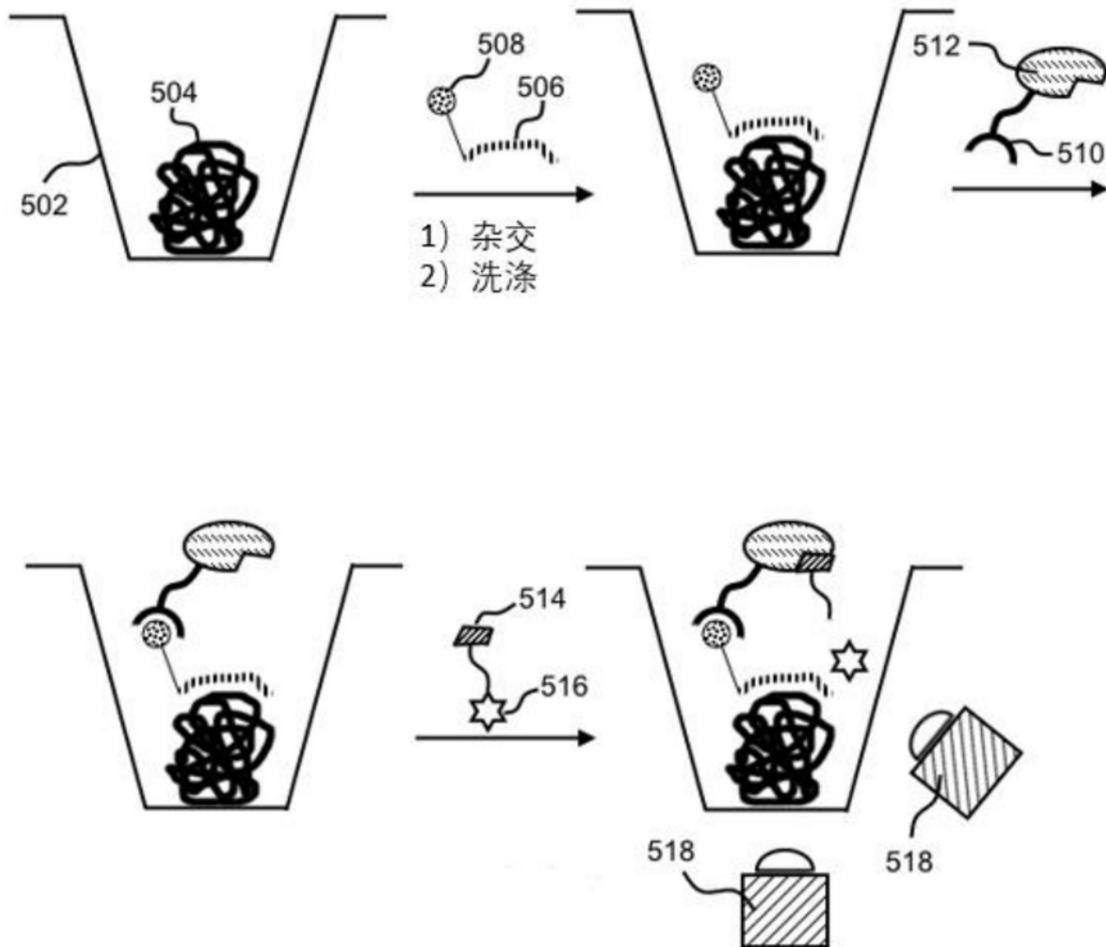


图5

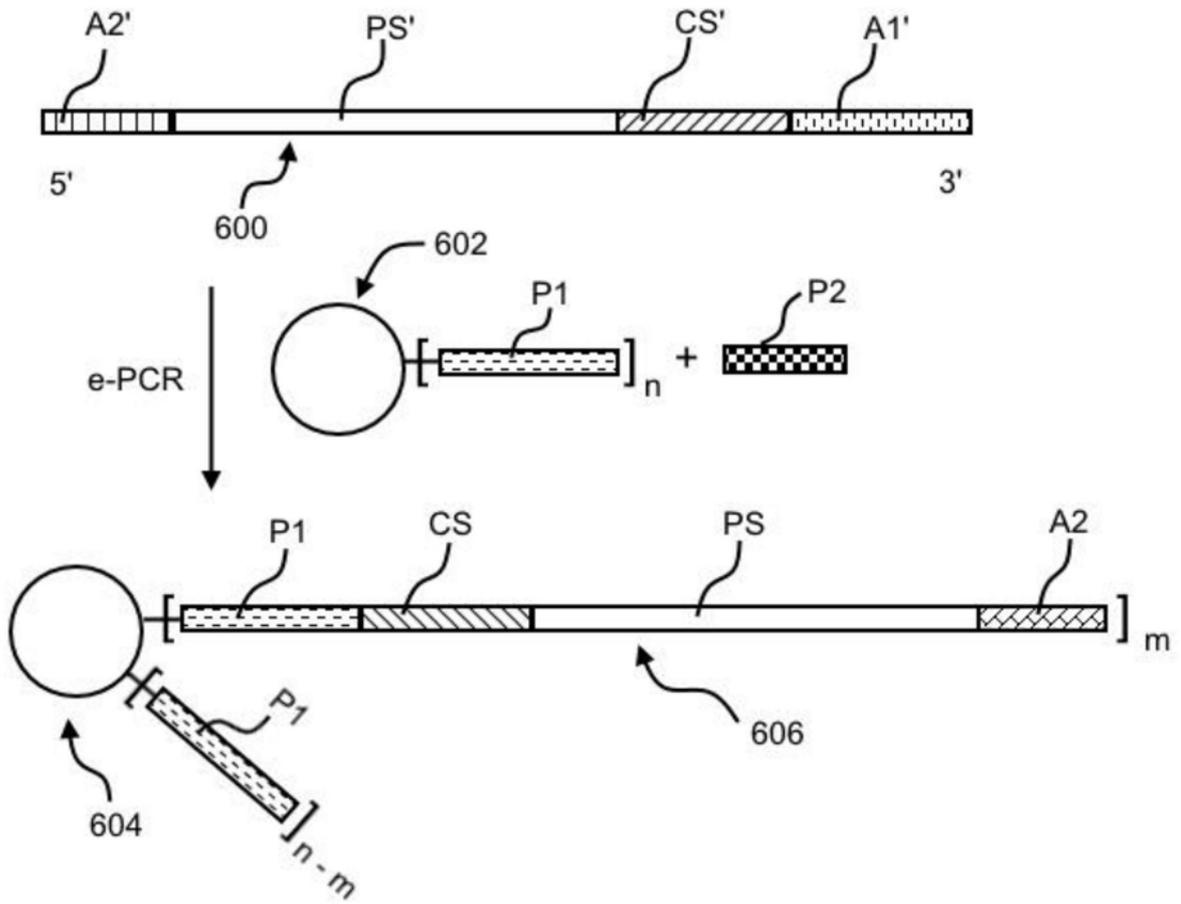


图6

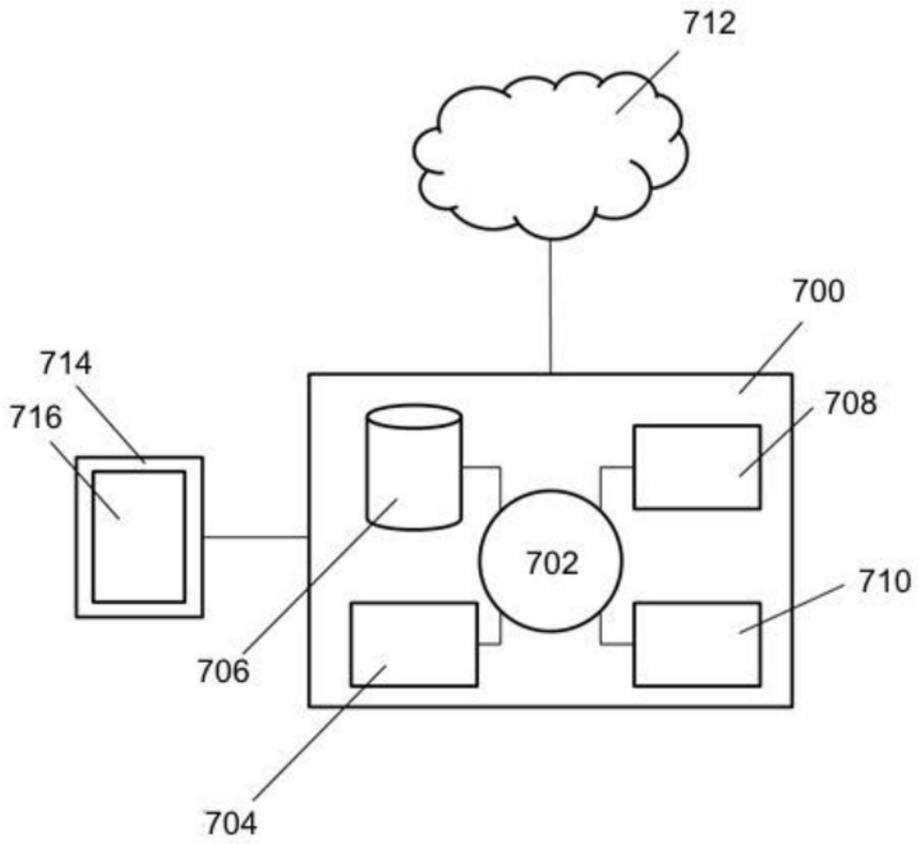


图7