



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104703700 B

(45)授权公告日 2018.01.12

(21)申请号 201380051830.0

萨姆·怀特豪斯

(22)申请日 2013.08.05

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104703700 A

代理人 张国梁

(43)申请公布日 2015.06.10

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

B01L 3/00(2006.01)

61/680,212 2012.08.06 US

B82Y 15/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.02

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/487(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2013/002168 2013.08.05

(56)对比文件

WO 2010/026488 A2,2010.03.11,

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/024041 EN 2014.02.13

CN 102242062 A,2011.11.16,

(73)专利权人 康特姆斯集团有限公司
地址 英国纽卡斯尔

CN 101765462 A,2010.06.30,

CN 102203288 A,2011.09.28,

CN 102186989 A,2011.09.14,

CN 202284206 U,2012.06.27,

(72)发明人 乔纳森·奥汉隆
克里斯托弗·亚当斯 乔·赫德利

审查员 赵婵

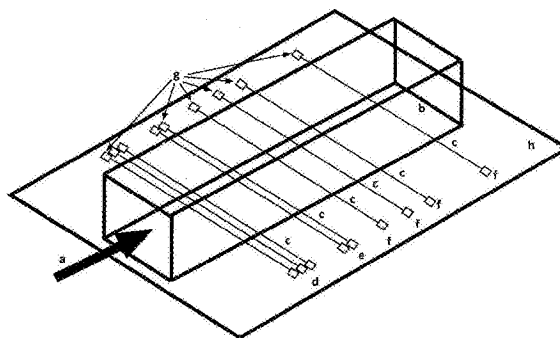
权利要求书4页 说明书24页 附图12页

(54)发明名称

用于核酸测序的方法和试剂盒

(57)摘要

本公开内容的多种实施方案一般涉及用于
测序长的单个多核苷酸分子的分子生物学实验
方案、装置和试剂。



1. 一种用于多核酸分子测序的装置,所述装置包括:
纳米通道,其具有小于100nm的高度和宽度;和
在所述纳米通道内的至少两个纳米结构传感器的阵列,每个所述纳米结构传感器具有灵敏的测定区域,以使由通过所述灵敏的测定区域的多核酸的单个碱基导致的扰动形成由所述传感器产生的特异性信号;
其中所述纳米通道以包含介电性或绝缘性材料表面层的壁为边界;和
其中所述装置包括确定通过所述纳米通道的多核酸的流速的装置,从而能够确定所述多核酸的第一和第二核苷酸碱基之间的长度。
2. 权利要求1的装置,其中所述纳米通道以包含 Al_2O_3 、 SiN 、 Si 、石墨烯、聚合材料、光致抗蚀剂和 SiO_2 中的至少一种的壁为边界。
3. 权利要求1的装置,其中所述纳米通道包括封盖层。
4. 权利要求1的装置,其中所述纳米结构传感器包括选自由下述组成的组的一个或多个:纳米线,碳纳米管,石墨烯,和FET装置。
5. 权利要求1的装置,其中所述纳米结构传感器检测选自由下述组成的组的一种或多种:电荷,缓冲溶液电位,荧光,缓冲液置换,和热。
6. 权利要求1的装置,其中所述纳米结构传感器检测高电荷结构部分。
7. 权利要求1的装置,其中放置所述纳米结构传感器来检测经过所述传感器的多核苷酸分子的单个碱基的扰动。
8. 权利要求1的装置,其中所述纳米通道能够容纳溶液。
9. 权利要求8的装置,其中所述溶液传导将多核酸的单个碱基吸取到所述纳米通道中或使多核酸的单个碱基通过所述纳米通道的电流。
10. 权利要求1的装置,其中所述装置进行大小调整并且设置为手持式的。
11. 权利要求1的装置,其中所述纳米结构传感器以不同规格的距离几何间隔,以允许区分并鉴定单个碱基、或一组单个碱基、或与一个或多个单个碱基连接的报告物结构部分、或与单个碱基杂交的探针。
12. 测序多核酸分子的方法,所述方法包括:
吸取包含所述多核酸分子的溶液通过至少两个纳米结构传感器的阵列,所述纳米结构传感器具有灵敏的测定区域,所述阵列在纳米通道内,所述纳米通道以包含介电性或绝缘性材料表面层的壁为边界;并且
测量在所述灵敏的测定区域中的扰动,
还包括检测分别与第一和第二核苷酸碱基相关的第一信号和第二信号,其中在所述纳米通道中延伸的多核酸分子的流速是已知的,以便可以确定所述第一与第二核苷酸碱基之间的长度,
其中所述扰动与所述多核酸分子的单个碱基相对应。
13. 权利要求12的方法,其中所述扰动包括选自由下述组成的组的一种或多种:所述灵敏的测定区域中的电荷,所述灵敏的测定区域中的体积移位,所述灵敏的测定区域中的溶液电位,所述灵敏的测定区域中的荧光,和所述灵敏的测定区域中的热。
14. 权利要求12的方法,其中吸取所述多核酸通过所述灵敏的测定区域包括经由所述溶液传送电流。

15. 权利要求12的方法,其中吸取所述多核酸通过所述灵敏的测定区域包括建立通过所述灵敏的测定区域的所述溶液的流。

16. 权利要求12的方法,其中所述纳米结构传感器以不同规格的距离几何间隔,以允许区分并鉴定单个碱基、或一组单个碱基、或与一个或多个单个碱基连接的报道物结构部分、或与单个碱基杂交的探针。

17. 权利要求12的方法,其中所述方法还包含从所述至少两个纳米结构传感器的每一个集合数据。

18. 一种测序靶标多核苷酸的方法,所述方法包括:

在测定区域内提供至少两个灵敏检测的纳米结构传感器的阵列,所述纳米结构传感器的每一个产生与流过所述测定区域内的所述阵列的核苷酸的特性相关的信号,其中所述测定区域包括纳米流体通道,并且其中所述纳米流体通道以包含介电性或绝缘性材料表面层的壁为边界;

使所述靶标多核苷酸延伸通过所述纳米流体通道,以使所述靶标多核苷酸在至少两个灵敏检测的纳米结构传感器的阵列的可操作区域内通过;

检测所述测定区域内所述靶标多核苷酸中至少一个核苷酸所特有的信号的变化;

还包括检测分别与第一和第二核苷酸碱基相关的第一信号和第二信号,其中在所述测定区域中延伸的靶标多核酸的流速是已知的,以便可以确定所述第一与第二核苷酸碱基之间的长度。

19. 权利要求18的方法,其中所述特性包括选自由下述组成的组中的一种或多种:电荷、荧光、导电性、体积和热。

20. 权利要求18的方法,其中所述纳米结构传感器以不同规格的距离几何间隔,以允许区分并鉴定单个碱基、或一组单个碱基、或与一个或多个单个碱基连接的报道物结构部分、或与单个碱基杂交的探针。

21. 权利要求18的方法,其中所述方法还包含从所述至少两个灵敏检测的纳米结构传感器的每一个集合数据。

22. 一种微流体盒,所述微流体盒包括:

样品接收元件,其用于将包含靶标多核苷酸的生物样品引入到所述盒中;

裂解室,其用于分解所述生物样品以释放包含核酸和其他分子的可溶级分;

核酸分离室,其用于将所述核酸与所述可溶级分中的其他分子分离;

扩增室,其用于扩增所述靶标多核苷酸;

纳米通道,其具有小于100nm的高度和宽度;

在纳米通道内的测定区域,其包括至少两个灵敏检测的纳米结构的阵列,所述纳米结构响应所述纳米结构特性中的改变产生信号,其中所述测定区域设置为允许所述靶标多核苷酸与所述纳米结构之间的相互作用,并且其中所述纳米通道以包含介电性或绝缘性材料表面层的壁为边界;和

传导元件,其用于将所述信号传导至检测器;和

确定通过所述纳米通道的多核酸的流速的装置。

23. 权利要求22的微流体盒,其中所述灵敏检测的纳米结构以不同规格的距离几何间隔,以允许区分并鉴定所述靶标多核苷酸的单个碱基、或所述靶标多核苷酸的一组单个碱

基、或与所述靶标多核苷酸的一个或多个单个碱基连接的报道物结构部分、或与所述靶标多核苷酸的单个碱基杂交的探针。

24. 测序多核酸分子的装置,所述装置包含:

具有高度和宽度少于100nm的纳米通道;和

在所述纳米通道内的至少两个纳米结构传感器的阵列,每个所述纳米结构传感器具有灵敏的测定区域,以使由通过所述灵敏的测定区域的多核酸的单个碱基导致的扰动形成由所述传感器产生的特异性信号;

其中所述纳米通道可以包含溶液,并且所述溶液传导将多核酸的单个碱基吸取到所述纳米通道中或使多核酸的单个碱基通过所述纳米通道的电流;和

其中所述装置包括确定通过所述纳米通道的多核酸的流速的装置,从而能够确定所述多核酸的第一和第二核苷酸碱基之间的长度。

25. 测序多核酸分子的方法,所述方法包含

吸取包含所述多核酸分子的溶液通过至少两个纳米结构传感器的阵列,所述纳米结构传感器具有灵敏的测定区域,所述阵列在纳米通道内;并且

测量在所述灵敏的测定区域中的扰动,

还包括检测分别与第一和第二核苷酸碱基相关的第一信号和第二信号,其中在所述纳米通道中延伸的多核酸分子的流速是已知的,以便可以确定所述第一与第二核苷酸碱基之间的长度,

其中所述扰动与所述多核酸分子的单个碱基相对应,和

其中吸取所述多核酸通过所述灵敏检测区包括经由所述溶液运行电流。

26. 测序靶标多核苷酸的方法,其包含

在测定区域提供至少两个灵敏检测的纳米结构传感器的阵列,每个灵敏检测纳米结构传感器产生与核苷酸性能相关的信号,所述核苷酸流经所述测定区域内的阵列,其中所述测定区域包含纳米流体通道;

延长所述靶标多核苷酸通过所述纳米流体通道,以使靶标多核苷酸在至少两个灵敏检测的纳米结构传感器阵列的操作领域内通过;

检测所述测定区域内的所述靶标多核苷酸内至少一种核苷酸所特有的信号的变化;和
分别检测与第一和第二核苷酸碱基相关的第一和第二信号;

其中在所述测定区域中延长的靶标多核酸的流速是已知,由此可以确定在第一和第二核苷酸碱基之间的长度。

27. 微流体盒,其包含:

样品接收元件,用于将包含靶标多核苷酸的生物样品引入到所述盒中;

裂解室,其用于分解所述生物样品以释放包含核酸和其他分子的可溶级分;

核酸分离室,其用于将所述核酸与所述可溶级分中的其他分子分离;

扩增室,其用于扩增所述靶标多核苷酸;

纳米通道,其具有小于100nm的高度和宽度;

纳米通道内的测定区域,其包括至少两个灵敏检测的纳米结构的阵列,所述灵敏检测纳米结构产生应答于所述纳米结构的性能改变的信号,

其中所述测定区被配置为允许所述靶标多核苷酸和所述纳米结构之间的相互作用,和

其中所述纳米通道可以包含溶液,并且所述溶液传导将多核酸的单个碱基吸取到所述纳米通道中或使多核酸的单个碱基通过所述纳米通道的电流;和
传导元件,其用于将所述信号传导至检测器;和
确定通过所述纳米通道的多核酸的流速的装置。

用于核酸测序的方法和试剂盒

[0001] 相关申请

[0002] 本发明要求于2012年8月6日提交的美国临时申请系列号61/680,212 的优先权，其通过引用完全结合在本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及用于测序单一核酸(基因组DNA, RNA, cDNA等)分子和其他分子的分子生物学方法和传感器设计、制造和应用,例如,以允许高度平行的、高通量的单一分子和长读取长度的DNA测序和片段长度分析。

[0004] 发明背景

[0005] DNA(脱氧核糖核酸)通常是由称为核苷酸的亚基组成的长的聚合物。这些单个亚基的链形成称为核酸的分子,其中DNA和RNA(核糖核酸)是目前自然中最常见的实例。天然的脱氧核糖核酸由沿着核糖/磷酸骨架的四个碱基(腺嘌呤(A),胞嘧啶(C),鸟嘌呤(G)和胸腺嘧啶(T))中的一种构成。在天然存在的核糖核苷酸群体中,胸苷被替换为尿嘧啶(U)。当通过在核糖骨架的5'和3'位置形成磷酸二酯键聚合时,核酸可以携带细胞中的遗传信息。核酸中的碱基能够与另一个碱基形成氢键,促使稳定的双链分子的形成,在DNA的情形中,其每一半是另一半的反向互补物。DNA包含两个含有四种不同核苷酸碱基的长的核苷酸链(例如,AGTCATCGT...等),具有的糖和磷酸基团的骨架通过酯键连接,扭曲成双螺旋并且通过互补核苷酸之间的氢键连接(A通过氢键结合相反的链中的T,C和相反链中的G氢键结合)。沿着骨架的核苷酸碱基的序列可以携带丰富量的信息,并且可以包含巨大部分的遗传信息,如个体遗传特征。

[0006] 分子生物学的中心法则通常是如下述描述生物学信息的正常流转:DNA可以复制成DNA,DNA中的遗传信息可以‘转录’成RNA,如信使RNA(“mRNA”),并且可以由mRNA中的信息翻译成蛋白。在翻译过程中,使得蛋白亚基(氨基酸)以mRNA的序列并且最终以其所转录的DNA所示的顺序足够接近以键合。这一过程涉及称为tRNA(“转运RNA”)的氨基酸适体RNA的碱基配对,在核糖体的存在,每个tRNA携带由其针对mRNA序列的序列决定的特定的氨基酸,核糖体本身是在rRNA(“核糖体RNA”)周围构建的蛋白复合物。通过这一过程,遗传DNA序列利用mRNA中间物和tRNA与rRNA组分指定了要组装成多肽的氨基酸的序列。

[0007] 术语核酸测序通常包括用于确定DNA或RNA分子中的核苷酸碱基(即,腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶)的顺序的生物化学方法。DNA的序列组成细胞核、线粒体和叶绿体中的遗传性遗传信息,其形成活生物体的发育程序的基础。遗传变异可能引起疾病,赋予增加的疾病的危险或赋予有益的特性。这些变异可能是遗传的(传承自父母)或获得性的(成年时发育,如通过DNA复制中的错误发展)。因此,知晓这些遗传分子的序列对于获得对生命、分子系统和疾病的更好的理解是特别重要的。

[0008] DNA分析最初被广泛誉为DNA谱分析(DNA指纹),并且在1987年成为商业可用的,那时化学公司Imperial Chemical Industries(ICI)在英格兰开设了血液检测中心。该技术最先由英格兰莱斯特大学的Sir Alec Jeffreys报道,现在成为数个国立DNA数据库的基

础,包括美国的CODIS 组。该技术利用称为变数串联重复序列(variable number tandem repeats, VNTRs)的高度可变的重复(“重复”)序列,特别是短的串联重复(short tandem repeats, STRs)。VNTR基因座在血缘密切的人之间是非常相似的,但是如此可变,以致没有血缘关系的个体极不可能具有相同的VNTRs。扩增和随后的扩增子的片段长度分析提供了关于个体的身份或血缘关系的有力的遗传信息。

[0009] DNA测序的出现已经显著加快了生物学研究和发现,并且将DNA 测试的应用从简单的概图扩展到疾病诊断,甚至是疾病预测。利用现代 DNA测序技术可获得的快速的测序速度已经成为人类基因组计划中的大规模测序人类基因组的手段。相关计划已经产生了多种动物、植物、病毒和微生物基因组的完整的DNA序列。

[0010] RNA测序从技术原因上来讲比DNA测序容易操作,其是最早的核苷酸测序形式之一。溯及重组DNA之前的时代, RNA测序的主要里程碑是第一个完整的基因的序列,然后是噬菌体MS2的完整的基因组,其由根特大学(比利时根特)的Walter Fiers与其同事在1972-1976年鉴定并且公布。

[0011] 由Frederick Sanger与其同事在1975年开发的链终止方法是第一个大规模应用的DNA测序方法。在二十世纪七十年代早期由英格兰的Sanger 和哈佛的Walter Gilbert与Allan Maxam开发快速DNA测序法之前,使用多种费力的方法,如由Gilbert和Maxam于1973年提出的摇摆点分析(wandering-spot analysis),其报道了24个碱基对的测序。

[0012] 在1976-1977年,Allan Maxam和Walter Gilbert基于DNA的化学修饰和后续在特定碱基的切割开发了一种DNA测序法。该方法需要在DNA 链的一个末端进行放射性或荧光标记以及纯化要测序的DNA片段。在四个核苷酸碱基中的一个处、有时在两个处产生不常见的断点,并且这在四个反应中重复(G,A+G,C,C+T)。这产生一系列标记的片段,在每个分子中从放射性标记的末端到第一个‘切割’位点,并且通过凝胶电泳按尺寸分离,其中四种反应并排排列。Maxam-Gilbert测序由于其技术复杂性、有害化学品的广泛应用和规模放大的困难而不容易采用。另外,该方法不能容易地定制在标准分子生物学试剂盒中进行应用。

[0013] 链终止或Sanger法需要单链DNA模板、DNA引物、DNA聚合酶、放射性或荧光标记的核苷酸,和修饰的核苷酸,即终止DNA链延长的双脱氧核苷酸三磷酸(ddNTPs)。将DNA样品分到四个独立的测序反应中,每个反应含有四种标准脱氧核苷酸(dATP, dGTP, dCTP和dTTP)和DNA 聚合酶。向这四种独立的测序反应的每一个中仅加入四种双脱氧核苷酸(ddATP, ddGTP, ddCTP或ddTTP)中的一种。这些双脱氧核苷酸是链终止核苷酸,其缺少在DNA链延伸过程中在两个核苷酸之间形成磷酸二酯键所需要的3'-OH核糖基集团。因此,在新生的(延长的)DNA链中掺入双脱氧核苷酸终止DNA链延伸,产生多个不同长度的DNA片段,这些片段中的每一个在双脱氧核苷酸的结合位点终止。由此,如果已知双脱氧核苷酸的性质,则所产生的片段的长度将表示该双脱氧碱基在序列中的位置。双脱氧核苷酸以比标准脱氧核苷酸低的浓度加入,以允许足够序列分析的链延长。

[0014] 新合成和标记的DNA片段进行热变性并在变性聚丙烯酰胺尿素凝胶上通过凝胶电泳进行大小(具有仅一个核苷酸的分辨率)分离。四种DNA 合成反应中的每一个在四个单独的泳道(泳道A,T,G,C)中的一个泳道中运行;然后,通过放射自显影或紫外光显现DNA条带,且DNA序列可在X射线胶片或凝胶图像直接读出。将X射线胶片暴露于凝胶,并且当显色时,深色条带对应于不同长度的DNA片段。泳道中的深色条带表示双脱氧核苷酸(ddATP、ddGTP、

ddCTP或ddTTP)掺入之后链终止产生的DNA片段。末端核苷酸碱基可根据在产生该条带的反应中添加了何种双脱氧核苷酸进行鉴定。然后四个泳道中不同条带的相对位置用于读取(从底部至顶部)所示的DNA序列。

[0015] DNA片段可通过使用引物上的放射性标记物或荧光标记物,在新的DNA链中,用标记的dNTP或用标记的ddNTP进行标记。链终止测序存在一些技术变通。在一个方法中,DNA片段用含有用于放射性标记的放射性磷的核苷酸进行标记。备选地,在5'端用荧光染料标记的引物用于标记。仍然需要四个单独的反应,但是具有染料标记物的DNA片段可使用光学系统读出,有助于更快和更经济的分析和自动化。这种方法被称为‘染料-引物测序’。由L Hood和同事后来开发的荧光标记的ddNTP和引物开创了自动化、高通量DNA测序的阶段。

[0016] 不同的链终止方法大大简化了DNA测序所需的工作量和计划。例如,来自USB Biochemicals(USB生化药剂)的基于链终止的“测序酶(Sequenase)”试剂盒包含测序所需的大多数试剂,这些试剂是事先等分的且随时可用的。用Sanger方法可出现一些测序问题,诸如引物与DNA的非特异性结合,影响DNA序列的准确读出。此外,DNA模板内的二级结构,或污染在DNA模板的随机引发(priming)的RNA也可能影响所获得序列的保真性。其它影响反应的污染物可由外来DNA或DNA聚合酶抑制剂组成。

[0017] 引物标记的替代是标记链终止子,其是通常被称作‘染料-终止子测序’的方法。这种方法的一个主要优势是可在单个反应中进行测序,而不是如在标记引物方法中的四个反应中进行测序。在染料终止子测序中,四种双脱氧核苷酸链终止子的每种用不同的荧光染料进行标记,每种荧光染料在不同的波长发荧光。这种方法有吸引力,因为它具有更大的方便和速度,并且其是目前用计算机控制的序列分析仪(见下文)的自动化测序中的主要方法。其潜在的限制包括由于染料标记的链终止子引入至DNA片段的不同而引起的染料效应,其导致毛细管电泳后电子DNA序列示踪色谱中的不等的峰高和形状。

[0018] 在常规临床中,核苷酸聚合物(DNA和RNA)的分析已经变得重要起来。然而,成本和复杂性仍然是广泛全面采用的主要障碍。对此的一个原因是分析的复杂性,所述分析需要能够随着实验进行灵敏地测量至多四种不同的荧光通道的昂贵的装置。其他原因包括高的试剂成本,长久和复杂的样品制备步骤和熟练的生物信息学家所具有的广博的计算能力,以将得到的短的读取序列组装成临床相关的构建体。较便宜的备选方案可能需要熟练的技术人员来运行和解释低等技术设备,如电泳,但是这也可能是昂贵的,并且不能产生足够的DNA数据用于高通量全基因组测序应用。

[0019] 发明概述

[0020] 按照本发明的实施方案,公开了测序多种多核苷酸分子的新方法。在一些实施方案中,所述方法可以用于解决复杂性、成本、时间和需要长读取长度和高通量DNA测序的问题。联系本公开内容应用的多个实施方案旨在使用新型的测序技术在成本有效的装置中进行长读取长度、高度平行的、单分子DNA测序。在一些技术实施方案中,本发明可以用于分析DNA片段的长度。

[0021] 一些实施方案包括用于测序或分析多核苷酸分子的长度的装置。在一些方面中,所述装置包括具有nm范围内尺寸的纳米通道。在一些方面中,实施方案记述具有小于3 μ m的宽度和小于100nm的高度的通道。在一些实施方案中,所述通道直径小于50nm。在其他实施方案中,所述通道的直径小于5nm;并且纳米结构传感器阵列与所述纳米通道垂直或平行排

列,其在所述纳米通道内具有灵敏的测定区域,以致由多核酸分子的通过片段 (passing fragment) 或单个碱基产生扰动。在一些实施方案中,每个碱基通过所述纳米结构传感器时直接导致所述传感器产生的特异性的信号,或通过置换经由所述灵敏的测定区域的多核酸的离子而导致所述传感器产生的特异性的信号,此时每个碱基将提供独特的电子特征。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测电荷。在一些方面中,所述纳米结构检测高电荷结构部分。在一些方面中,所述高电荷结构部分是图7A-G或图8 的结构部分。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测缓冲液电位。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测荧光。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测缓冲液置换。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测热。在一些方面中,所述纳米结构检测应力。

[0022] 在一些方面中,所述纳米通道以典型地包含Al₂O₃、SiN、Si、石墨烯、聚合材料、光致抗蚀剂和SiO₂中的一种或多种的壁为边界。在一些方面中,所述纳米通道以包含至少一种前面没有列出的组分的壁为边界。在一些方面中,所述纳米通道包括封盖层 (capping layer)。在一些方面中,所述纳米结构传感器包括与纳米通道垂直或平行的纳米线 (nanowires) 阵列。在一些方面中,纳米结构传感器包括与纳米通道垂直或平行的碳纳米管阵列。在一些方面中,所述传感器包括与纳米通道垂直或平行排列的石墨烯薄片阵列。在本发明的一些方面中,石墨烯薄片这样朝向,以致其在所述纳米通道中直立,提供单碱基区分的能力。在一些方面中,所述薄片的宽度为1个原子厚,在一些实施方案中,由于碱基与碱基的距离是 3.4埃,因此其可以单碱基分辨率容易地确定核苷酸序列。在一些方面中,在所述纳米通道中排列的纳米结构传感器包括一个或多个个体的寻址 FET器件。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测电荷。在一些方面中,所述纳米结构检测高电荷结构部分。在一些方面中,所述高电荷结构部分是图7A-G或图8的结构部分。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测缓冲液电位。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测荧光。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测缓冲液置换。在一些方面中,所述纳米结构传感器检测热。在一些方面中,所述纳米结构检测应力。在一些方面中,所述装置包括多个所述纳米结构传感器。在一些方面中,所述装置包括单个纳米结构传感器。在一些方面中,放置所述纳米结构传感器以检测经过所述传感器的多核苷酸分子的单个碱基的扰动。在一些方面中,所述纳米结构传感器以三个一簇进行操作。在一些方面中,所述纳米结构传感器以两个一簇进行操作。在一些方面中,所述纳米结构传感器单个进行操作。在一些方面中,所述装置包括传送所述信号的传送器。在一些方面中,所述纳米通道包括溶液,并且该溶液可以是凝胶。在一些方面中,所述溶液导电。在一些方面中,所述溶液传导电流,所述电流将多核酸吸取到所述纳米通道中或通过所述纳米通道。在一些方面中,所述溶液流动通过所述纳米通道。在一些方面中,所述装置包括多个纳米通道。在一些方面中,所述装置可以是手持的。

[0023] 一些实施方案包括测序单个多核酸分子的方法。在一些方面中,所述方法包括提供在溶液中的分离的多核酸分子;提供具有灵敏的测定区域的纳米结构传感器;吸取所述分离的多核酸分子通过所述纳米结构传感器的所述灵敏的测定区域;并且测量所述灵敏的测定区域中的扰动,其中所述扰动对应于所述分离的多核酸分子的单个碱基。在一些方面中,所述扰动是所述灵敏的测定区域中的电荷。在一些方面中,所述扰动是所述灵敏的测定区域中的体积移位 (volume displacement)。在一些方面中,所述扰动是所述灵敏的测定区域中的荧光。在一些方面中,所述多核酸分子包含核苷酸-碱基特异性的修饰。在一些方面

中,所述碱基-特异性的修饰对应于所述灵敏的测定区域中的碱基-特异性的扰动。在一些方面中,所述碱基-特异性的修饰包括图7A-G或图8的分子的碱基特异性添加。在一些方面中,所述碱基-特异性的修饰在模板-引导的核苷酸聚合反应过程中结合到所述多核酸分子中。在一些方面中,吸取所述分离的多核酸分子通过所述纳米结构传感器的所述灵敏的测定区域包括经由所述溶液运行电流或电压。在一些方面中,吸取所述分离的多核酸分子通过所述纳米结构传感器的所述灵敏的测定区域包括建立通过所述灵敏的测定区域的所述溶液的流。在一些方面中,所述灵敏的测定区域包含在纳米通道中。在一些方面中,所述纳米通道具有小于 $2.5\mu\text{m}$ 的宽度和小于 70nm 的高度。在一些方面中,所述方法包括将标记的探针针对所述分离的多核酸分子退火。在一些方面中,所述标记的探针包括DNA、RNA、肽核酸(PNA)、吗啉代、锁核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)或合成的核苷酸聚合物。在一些方面中,所述标记的探针是六聚体。在一些方面中,所述标记的探针是五聚体。在一些方面中,所述标记的探针是四聚体。在一些方面中,所述标记的探针是末端标记的。

[0024] 一些实施方案包括测序靶标多核苷酸的方法。在一些方面中,所述方法包括:在测定区域内提供灵敏的检测纳米结构传感器阵列,其产生与通过所述测定区域内的阵列的分析物的特征相关的信号,其中所述测定区域可以是纳米流体通道;延长DNA或RNA分子通过所述纳米流体通道,以使靶标多核苷酸在所述灵敏的纳米结构传感器操作领域内通过;检测所述测定区域内的信号变化,所述变化是DNA或RNA聚合物链中的至少一种核苷酸所特有的。在一些方面中,所述方法包括,当靶标DNA或RNA聚合物通过所述测定区域移动时,持续检测和测量所述测定区域内的环境,由此将所述聚合物中的每个单体每次一个暴露于所述测定区域。在一些方面中,所述特征是电荷。在一些方面中,所述特征是荧光。在一些方面中,所述特征是热。在一些方面中,所述纳米流体通道使蛋白通过所述灵敏的纳米结构阵列。在一些方面中,所述纳米流体通道使代谢物通过所述灵敏的纳米结构阵列。在一些方面中,所述纳米流体通道使气体通过所述灵敏的纳米结构阵列。在一些方面中,所述纳米流体通道使金属离子通过所述灵敏的纳米结构阵列。在一些方面中,反应实体主动使DNA或RNA多核酸分子聚合物通过测定区域。在一些方面中,反应实体被动使DNA或RNA多核酸分子聚合物通过测定区域。在一些方面中,反应实体是纳米孔。在一些方面中,反应实体是纳米流体通道。在一些方面中,在测序之前,向DNA或RNA聚合物的核苷酸中加入报道物结构部分。在一些方面中,核苷酸单体携带核苷酸(A,G,C和T)种类特有的电荷物质报道物结构部分(charge mass reporter moiety)。在一些方面中,该电荷物质报道物结构部分设置为可除去的。在一些方面中,该电荷物质报道物结构部分在检测信号后从所添加的核苷酸中除去,由此允许结合下述核苷酸单体。在一些方面中,该电荷物质报道物结构部分设置为不影响新生链通过聚合酶的聚合。在一些方面中,该电荷物质报道物结构部分设置为从该新生链突出(protrude out)从而能够进入所述测定区域。在一些方面中,所加入的核苷酸还包含在5'磷酸基团的可切割的封端分子(cap molecule),以便在去除所述可切割的封端之前防止添加另外的核苷酸。在一些方面中,在所加入的核苷酸的5'磷酸基团上结合接头,由此作为封端。在一些方面中,所述灵敏检测的纳米结构选自由下述组成的组:纳米线(nanowire)、纳米管(nanotube)、纳米间隙(nanogap)、纳米珠(nanobead)、纳米孔(nanopore)、场效应晶体管(FET)-型生物传感器(field effect transistor (FET)-type biosensor)、平面场效应晶体管(planar field effect transistor)、FinFET、chemFET、

ISFET、基于石墨烯的传感器和任意传导纳米结构 (conducting nanostructures), 包括, 例如, 能够感应电荷、荧光、应力 (stress)、压力 (pressure) 或热变化的纳米结构。在一些方面中, 所述靶标多核苷酸和引物包括选自由下述组成的组的分子: DNA、RNA、肽核酸 (PNA)、吗啉代 (morpholino)、锁核酸 (LNA)、乙二醇核酸 (GNA)、苏糖核酸 (TNA)、合成核苷酸聚合物及其衍生物。在一些方面中, 所添加的核苷酸优选地包括选自由下述各项组成的组的分子: 脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、肽核苷酸、吗啉代、锁核苷酸、乙二醇核苷酸、苏糖核苷酸、合成核苷酸及其衍生物。在一些方面中, 检测该信号的方式选自由下述各项组成的组: 压电检测 (piezoelectric detection)、电化学检测 (electrochemical detection)、电磁检测 (electromagnetic detection)、光检测 (photodetection)、机械检测 (mechanical detection)、声波检测 (acoustic detection) 和重量分析检测 (gravimetric detection)。

[0025] 一些实施方案包括用于测序靶标多核苷酸的装置。在一些方面中, 所述装置包括微流体盒, 其包括样品接收元件, 其用于将包含所述靶标多核苷酸的生物样品引入到所述盒中; 裂解室, 其用于分解所述生物样品以释放包含核酸和其他分子的可溶级分; 核酸分离室, 其用于将所述核酸与所述可溶级分中的其他分子分离; 扩增室, 其用于扩增所述靶标多核苷酸; 测定区域, 其包括一个或多个灵敏检测的纳米结构的阵列, 所述纳米结构产生与所述纳米结构的特征相关的信号, 其中所述测定区域设置为允许所述靶标多核苷酸与所述纳米结构的可操作性的偶联; 和传导元件, 其用于将所述信号传导至检测器。在一些方面中, 所述生物样品包括任意体液、细胞及其提取物、组织及其提取物以及包含所述靶标多核苷酸的任意其他的生物样品。在一些方面中, 所述装置进行大小调整并且设置为手持式的 (handheld)。

[0026] 在一些方面中, 所述装置进行大小调整并且设置为适配移动电话、智能电话、iPad、iPod、膝上型电脑或其他便携的装置。在一些方面中, 所述装置包括至少10个测定区域。在一些方面中, 所述装置包括至少100个测定区域。在一些方面中, 所述装置包括至少1000个测定区域。在一些方面中, 所述装置包括至少10,000个测定区域。在一些方面中, 所述装置包括至少100,000个测定区域。在一些方面中, 所述装置包括1,000,000个或更多于1,000,000个测定区域。在一些方面中, 所述通道使用聚焦离子束结合。在一些方面中, 所述通道使用接触或非接触光刻法或阴影蒙图技术构造。在一些方面中, 所述通道使用纳米印记、纳米浮雕和纳米冲压技术中的一种或多种构造。在一些方面中, 构造包括电子束、纳米油墨或蘸水笔纳米石版印刷工具、湿法化学蚀刻、干燥气体蚀刻、热氧化、化学氧化、离子轰击或两种或多种所述技术的组合。在一些方面中, 实现多层平面。在一些方面中, 所述层通过选择性研磨、包含升华化学品和进一步的层沉积产生。在一些方面中, 所述一条或多条纳米线与进入的流体流平行。

[0027] 在一些实施方案中, 方法包括: 提供灵敏检测的纳米结构传感器的阵列, 如纳米线或纳米管FET传感器的阵列, 其产生与纳米结构的特征相关的信号。在一些实施方案中, 该阵列是在测定区域内或外壳内。在一些实施方案中, 所述纳米结构传感器在整个纳米流体通道中排列。所述通道可以具有这样的尺寸, 以使多核苷酸, 如DNA或RNA, 通过所述通道延伸。通道中的传感器可以似乎足够灵敏的, 并且能够在分子靠近所述传感器通过时测量单个多核苷酸 (如DNA或RNA) 分子中的碱基。所述纳米结构传感器可以是以不同规格的距离几何间隔, 以允许区分并鉴定每个碱基、或一组碱基、或与一个或多个碱基连接的报道物结构

部分、或与所述碱基杂交的探针。在一些实施方案中,这在延伸的多核苷酸(如DNA 或RNA)流动、或另外被吸取穿过、通过或被迫通过通道而通过所述灵敏的纳米结构传感器时而发生。

[0028] 在一些实施方案中,所述测序装置是纳米通道纳米线测序(NNS)装置。在一些实施方案中,所述测序装置包括至少一个或多个、多至灵敏的纳米结构传感器的阵列。这些传感器可以可操作性的偶联在纳米流体通道上。在一些实施方案中,当多核苷酸(如DNA或RNA)通过所述纳米流体通道时发生感应。在一些实施方案中,灵敏的纳米结构传感器的阵列可以区分在多核苷酸(如DNA或RNA多核酸分子聚合物)中的不同的核苷酸携带的电荷、或共价加入的报道基团、或杂交的寡聚体标记。在一些实施方案中,碱基读出(base calling)可以是来自所述一个或多个传感器(如灵敏的纳米结构传感器)中的每一个传感器的数据集合的函数。在一些实施方案中,碱基读出可以使用算法计算,由此允许多核苷酸(如 DNA或RNA序列)的碱基读出。

[0029] 本公开内容的一些实施方案描述通常可以用于所述装置的新型的生物传感器、化学试剂和合成的核苷酸。与本公开内容联系使用的多个实施方案描述包括灵敏的纳米规格的检测装置的新型生物传感器。在一些实施方案中,所述装置能够检测在其表面上或附近存在的电荷(或与核苷酸连接的报道物结构部分的电荷),如通过纳米流体通道的单一核苷酸,或与核酸分子单链内的单一核苷酸连接的报道物结构部分,所述纳米通道可以使用多种方法构造,如实施例中所提示的。当多核苷酸(如DNA或RNA)通过时,所述灵敏的检测装置又监测传感器表面环境的变化(如,但不限于,电场变化,或由于存在或不在于某些分子(如核苷酸或核苷酸碱基)引起的缓冲液的电位变化)。

[0030] 在一些实施方案中,传感器,如灵敏的纳米结构传感器,能够检测环境的微小变化,如由多核苷酸(如DNA或RNA分子)在其通过时引起的变化。在一些实施方案中,传感器,如灵敏的纳米结构传感器,能够检测每个碱基或碱基组特有的电子特征。在一些实施方案中,所述传感器是检测器,如纳米线,原子厚度的石墨烯,或碳纳米管FET器件。

[0031] 在一些实施方案中,多核苷酸(如DNA或RNA)可以完全或部分包含合成的核苷酸单体。在一些实施方案中,这些合成的单体与天然存在的多核苷酸组分是不同的。在一些实施方案中,每个核苷酸携带报道物结构部分,以增加用于灵敏检测传感器的信号。例如,这些合成的核苷酸可以包含至少一些标准的核苷酸(或任意修饰或同种型)。这些合成的核苷酸可以包含一个或多个高负电荷物质报道物结构部分。每个核苷酸碱基可以携带不同的高电荷物质报道物结构部分,由此允许所述灵敏纳米结构传感器(如纳米线、原子厚度的石墨烯或碳纳米管FET传感器)区分所述核苷酸聚合物中每一种不同的核苷酸碱基。

[0032] 在所述方法的一些优选的实施方案中,灵敏纳米结构传感器的检测方法的特征是电荷。

[0033] 在所述方法的一些优选的实施方案中,灵敏纳米结构传感器的检测方法的特征是缓冲液置换。

[0034] 在所述方法的一些优选的实施方案中,灵敏纳米结构传感器的特征是荧光。

[0035] 在所述方法的一些优选的实施方案中,灵敏纳米结构传感器的特征是反应热。

[0036] 附图简述

[0037] 图1:纳米通道纳米线测序(NNS)装置的示例性的实施方案。

- [0038] 图2:在标准单孔(unwelled)装置中结合纳米通道结构所需要的处理的示意图。
- [0039] 图3:纳米构造纳米通道结构的步骤。
- [0040] 图4:使用标记的寡核苷酸引物序列和标记的双脱氧核苷酸的测序反应。
- [0041] 图5:使用标记的六聚体探针的基于探针的序列检测。
- [0042] 图6:使用标记的核苷酸的基于扩增的序列检测。
- [0043] 图7A-G:用于标记碱基进行基于电荷的检测的示例性的高电荷物质结构部分。
- [0044] 图7A. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0045] 图7B. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0046] 图7C. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0047] 图7D. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0048] 图7E. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0049] 图7F. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0050] 图7G. 示例性的高电荷物质结构部分。
- [0051] 图8:示例性的肝电荷接头和带电荷的种类。
- [0052] 图9A:通过装置的面观察的构造的纳米通道的图像。
- [0053] 图9B:在纳米通道凹槽下方观察的9A的纳米通道的图像。
- [0054] 图10:通过装置的面观察的构造的纳米通道的图像。
- [0055] 图11:示意性的纳米通道的垂直截面视图。
- [0056] 图12:示例性的纳米通道的垂直截面视图。
- [0057] 图13:示例性的纳米通道的图像。
- [0058] 图14A. 在顶部、中部和底部具有十字形所示的纳米线的纳米通道的水平截面视图。
- [0059] 图14B. 14A中的纳米通道的三个区域的三个连续垂直截面。截面对应于用十字形标记的区域。
- [0060] 图15:成功吸取通过纳米通道的Cy3标记的DNA的图像。
- [0061] 图16以每秒约5 μm 的可控方式通过纳米通道转运的DNA。
- [0062] 图17通过纳米通道转运的DNA的电读取。
- [0063] 详述
- [0064] 本公开内容的各方面描述一种新型测序技术。测序技术可以是通用术语,用于通过生长新生的、反向互补链并检测在所生产的聚合物中每个新的核苷酸的添加、或者使双链或单链DNA或RNA分子通过检测装置、在检测装置上或在检测装置附近以便能够检测整个多核苷酸(如DNA或 RNA多核酸分子聚合物)中的核苷酸序列而确定多核苷酸(如DNA或 RNA分子)单链序列。使用上文描述的更现代的方法(Helicos使用的方法, 454 Life Sciences和Solexa),这可通过如下进行:在聚合酶和聚合所需的其它要素存在下,使用连接到核苷酸的荧光报道物结构部分,单独地添加每种单独核苷酸(腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶),并然后使用灵敏光学检测设备观察荧光。如果在正确光谱中存在关于该核苷酸添加步骤的荧光,则‘碱基读出(base calling)’生物信息程序可在序列中添加适当的碱基。然后可以洗涤该反应并且可以添加循环中的下一个核苷酸(其中四种核苷酸腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶或胸腺嘧啶(或对于RNA来说尿嘧啶)的每种顺次添加)。可重复这种循环直至对于每

种反应获得相当于大约25bp至900bp或更长(例如取决于使用何种方法)的序列数据。为进行全基因组测序,可平行进行数以千计的这些反应。

[0065] 现代的染料-终止子或链-终止测序可产生的序列可能在前15-40个碱基具有较差的质量,具有700-900个碱基的高质量区域,然后质量快速降低。执行这些方法的自动化的DNA测序仪器(DNA测序仪)可以以单一批次(运行)测序多至384种荧光标记的样品,并且每天进行多至24次运行。然而,自动化的DNA测序仪仅可以进行基于DNA尺寸的分选(通过毛细管电泳,用于关于DNA谱分析(DNA profiling)的DNA片段长度分析的相同的技术)、检测和记录染料荧光和作为荧光峰示踪色谱的数据输出。通过热循环的测序反应、清除和在装载到测序仪之前重悬浮在缓冲溶液中可单独进行。

[0066] 在过去的5年以来,已经出现了所谓的下一代(NextGen)测序技术。这些技术中的一些是基于焦磷酸测序(pyrosequencing)、纳米孔测序、可逆的终止化学等,并且这些新的高通量方法使用平行化测序过程的方法,同时产生几千或几百万的序列。

[0067] 由于对于单一分子测序,分子检测方法常常不够灵敏(Helicos、Pacific Biosciences和Oxford纳米孔法可能是个例外),所以大部分方法使用体外克隆步骤以产生每种分子的许多拷贝。乳液PCR是一种这样的方法,其分离油相内水泡中的单独的DNA分子连同引物包被的珠子。然后通过聚合酶链反应(PCR)用分离的文库分子的克隆拷贝包被每个珠子,并且这些珠子随后固定进行此后的测序。在Marguilis等人.(由454 Life Sciences 商业化,被Roche获得),Shendure和Porreca等人.(也称为“polony测序”)公开的方法中和在SOLiD测序(由Agencourt开发并被Applied Biosystems 获得)中使用乳液PCR。体外克隆扩增的另一种方法是“桥式PCR(bridge PCR)”,其中片段在引物附着于固体表面时扩增,该方法由Solexa开发并使用(现在归Illumina所有)。这些方法都产生许多物理上分离的位置,每个位置含有单一片段的许多拷贝。

[0068] 一旦DNA序列物理上局部化于表面上分离的位置,可使用多种测序方法来平行确定所有位置的DNA序列。“通过合成测序(Sequencing by synthesis)”,如流行的染料-终止电泳测序一样,使用通过DNA聚合酶的DNA合成过程来鉴定存在于互补DNA分子中的碱基。可逆终止子法(Reversible terminator methods)(由Illumina和Helicos使用)使用可逆形式的染料-终止子,其每次添加一个核苷酸,检测对应于该位置的荧光,然后除去封闭基团以允许另一个核苷酸的聚合。焦磷酸测序(由454使用)也使用DNA聚合来添加核苷酸,每次添加一种类型的核苷酸,然后通过所附着的焦磷酸盐的释放发出的光来检测和定量添加到给定位置的核苷酸的数目。“连接测序(Sequencing by ligation)”是另一种酶促测序法,其使用DNA连接酶而非聚合酶来鉴定目标序列。在polony法和Applied Biosystems提供的SOLiD技术中使用,这种方法使用固定长度的、根据被测序的位置标记的所有可能寡核苷酸的集合。寡核苷酸进行退火和连接;DNA连接酶为匹配序列引起的优先连接产生对应于该位置处互补序列的信号。

[0069] 其它DNA测序方法在效率或准确性方面可能具有优势。如传统的染料-终止子测序一样,它们局限于测序单一分离的DNA片段。“杂交测序(Sequencing by hybridization)”是使用DNA阵列的非酶方法。在这种方法中,未知DNA的单一集合可被荧光标记并与已知序列的阵列杂交。如果未知DNA可与阵列上给定点强烈杂交,导致其“点亮”,则推断该序列存在于被测序的未知DNA内。也可使用质谱法测序DNA分子;常规的链-终止反应产生不同长

度的DNA分子,然后这些片段的长度可通过它们之间的质量差异进行确定(而非使用凝胶分离)。

[0070] 这些技术公知为‘下一代(NextGen)’测序技术。它们依赖于高度平行的短片段测序,有时多次测序同一碱基。然后,利用生物信息学组装来自这些短的读取(来自25bp-500bp)的数据,其使用构架测序(如公布的人类基因组)为指导将序列片段构建成整体。该方法难以解析重要的结构元件,甚至其他基因型元件。其不是用于从头组装基因组的技术,由于这些显著的局限性,不存在关于所述基因组的构架。此外,这些技术中的大部分固有的克隆扩增可能引入误差。

[0071] 因此,为了基因组或其他大DNA片段的准确的从头组装,需要单分子长读取长度测序。

[0072] 存在关于DNA测序的新的提议,它们正在开发中但是尚待证明。这些包括标记DNA聚合酶(Life Technologies‘星光’策略,原来的Visigen),当一条或多条DNA链或具有与DNA杂交或连接的标记的DNA链穿过纳米孔时读取序列,或使用在伸长且固定的ssDNA上呈亚-埃(sub-Angstrom)分辨率阶梯的纳米-边界(nano-edge)探针阵列(Reveo)读取序列,这是一种使用单光子检测、荧光标记和DNA电泳的技术,其检测使用胞质基因(plasmonic)纳米结构(base4innovation)和基于显微镜的技术(如AFM或电子显微镜),它们通过用于可视检测和记录的更重元素(例如卤素)标记的核苷酸来鉴定长DNA片段内各核苷酸的位置。

[0073] Helicos,Pacific Biosciences和Oxford Nanopore已经开发了测序单一分子的技术,因此,它们不需要该步骤。Quake实验室开发的单分子方法(后来由Helicos商业化)省略了该扩增步骤,直接将DNA分子固定在表面上。由Oxford Nanopore,Genia,Nabsys和其他公司商业化的纳米孔方法在核苷酸或核苷酸组通过纳米孔转运时感应所述核苷酸或核苷酸组。Pacific Bioscience已经开发了Zero型波长装置(Zero Mode Wavelength devices)和用于在其中固定单一聚合酶的方法,由此允许检测由单一聚合物的聚合反应所发出的荧光。

[0074] 除了使用质谱(mass spec)、纳米孔和基于显微镜的技术的方法之外,目前可获得的或正在开发的数种方法一般需要使用昂贵的光学仪器和复杂的软件。此外,质谱(mass spec)和基于显微镜的技术可能需要庞大的仪器,这可能限制它们的开发并且当然使费用更高。

[0075] 人类基因组测序和随后的研究以前已经证明知道人的DNA序列的重大价值。通过基因组DNA序列分析获得的信息可以提供关于个人发生某些疾病(如乳腺癌和BRCA 1和2基因)的相对风险的信息。此外,分析来自于肿瘤的DNA可提供关于阶段和分级的信息。然而,迄今为止,由于现有的下一代DNA测序技术的短的读取,如上所述,仅能够解析短的序列片段,并且因此不适合解析大规模的结构变异,我们不能解析人类基因组中的多种结构变异。因此,多种基因组变异仍然尚未得到解析。

[0076] 传染性疾病(如由病毒或细菌导致的那些疾病)也在核苷酸聚合物基因组(DNA或RNA)中携带它们的遗传信息。这些中的许多现在已经被测序,(或它们基因组的足够部分被测序从而允许产生诊断或药物敏感性测试),并且对来自于临床样品的传染性疾病的基因组的分析(被称为分子诊断学的领域)已经成为灵敏地且特异性诊断疾病的重要方法之一。

[0077] 测量样品中mRNA种类的存在或不存在以及其丰度可提供关于个体的健康状况的

信息,疾病阶段、预后和药物遗传学和药物基因组学信息。这些表达阵列是抵抗复杂疾病中的快速合适的工具,并且随着价格开始下降可以获得普及。

[0078] 在一些实施方案中,所述直接测序方法和成分可以在多核苷酸由于流动作用或其他移动延长的、线性细长的、解螺旋的或支链的DNA或RNA 分子通过纳米流体通道的方法通过灵敏的纳米结构传感器时检测多核苷酸(如DNA或RNA分子)中的单个碱基,所述纳米流体通道将所述DNA 供应到灵敏的纳米结构传感器阵列上、附近或通过该阵列,以使所述DNA或RNA内的个体核苷酸碱基充分接近,以在所述灵敏的纳米结构传感器的阵列中引起每个碱基或碱基组所特有的特性的变化。排成阵列的灵敏的纳米结构传感器(如纳米线、原子厚度的石墨烯或纳米管FET传感器) 检测每个核苷酸碱基或核苷酸碱基组的电荷,并且当所述多核苷酸(如 DNA或RNA)通过所述灵敏的纳米结构传感器时,这些在所述灵敏的纳米结构传感器中的特性(如传导性)变化可以用来以单个的灵敏的纳米结构传感器或与阵列中所有灵敏的纳米结构传感器组合来解析该聚合物的碱基序列。

[0079] 在其他使用纳米线纳米通道测序仪(NNS)装置的方法中,通过PCR 或其他方法将携带报道物(如共价或以其他方式连接到核苷酸上的‘高电荷物质’报道物结构部分)的合成的核苷酸或合成的碱基结合在DNA或 RNA聚合物中,与天然核苷酸本身相比,所携带的报道物结构部分引起所述灵敏的纳米结构传感器的特性的较大变化。这些核苷酸可以通过PCR或另外的方法结合在DNA或RNA多核酸分子聚合物中。它们可以作为单一核苷酸加入,如胞嘧啶,以使所述DNA或RNA多核酸分子聚合物中的所有胞嘧啶携带合成的报道物结构部分。然后,可以对每一种其他核苷酸重复此。所述一种或多种报道物结构部分可以在多核苷酸合成过程中加入或通过对已有多核苷酸的修饰而加入。然后,可以在NNS装置中对每一组进行测序,并且生物信息学可以通过计算四种不同的报道物结构部分中的每一种的位置和当其通过纳米流体通道时的DNA或RNA的流动速度而构建序列读取。另一方面,所有四种合成的核苷酸都可以结合到单一通道中,并且由此报道物起作用放大来自所述DNA或RNA聚合物中的每一个核苷酸的信号。

[0080] 在用于使用NNS装置的其他方法中,可以使用改变的Sanger染料终止子测序方法。在该方法中,用于每次测序的引物将共价或以其他方式连接到独特的报道物结构部分上。此外,在反应混合物中,用四种核苷酸中的每一种所特有的报道物结构部分终止核苷酸可以与其共价连接或以其他方式连接。如在标准Sanger测序PCR反应中,终止核苷酸以可获得长读取的浓度存在。将多个不同的序列片段引入通过NNS装置,并且,相对于引物报道物结构部分和流过纳米通道的速率,生物信息学确定终止碱基。因此,可以构建与每个独特的引物相缔合的序列。由于数百万个NNS 装置可以排列在单个芯片上,这提供进行大量平行Sanger测序的能力。此外,由于引物报道物结构部分的独特特征,这一测序方法可以在单个反应中进行多个序列测序(仅由可用的或可以开发的独特的报道物结构部分的数目限制)。

[0081] 灵敏的纳米结构传感器可以是纳米线FET传感器,并且可以使用标准CMOS(互补金属氧化物半导体)加工或熟悉本领域的技术人员公知的其他构造方法(如涉及光刻、阴影蒙图、电子束石版印刷、纳米印制、浮雕、模塑、抛光、蚀刻、氧化、掺杂、沉积,包括化学(或化学增强的)、溅射、蒸发沉积和结构生长)产生。在一些实施方案中,所述传感器可以是单个传感器;在其他实施方案中,所述传感器以多于至少两个的阵列排列。在其他实施方案中,它们可以以数百个排成阵列。在更多实施方案中,它们可以以数千个排除阵列。在其他实施方

案中,它们可以以数百万个排成阵列。在其他实施方案中,它们可以以数十亿个或更多个排成阵列。

[0082] 在实施方案的一些方面中,“灵敏检测的纳米结构”用在本文中通常是能够响应测定区域内纳米结构的特征变化而产生信号的任意结构(纳米规格或不是纳米规格)。“测定区域”用在本文中通常是指这样的范围或区域,其中,一个纳米结构或多个纳米结构至少部分存在并且使得DNA或RNA刚好在足够接近的物理邻近处以在DNA或RNA多核酸分子聚合物从所述灵敏的纳米结构上通过、从中通过、从下通过或在其中时响应所述DNA或RNA多核酸分子聚合物中的不同核苷酸表现出特性改变并且产生信号。在优选的实施方案中,所述特性改变可能是由于测定区域内带电荷的分子(如DNA或RNA聚合物中的核苷酸)或由于缓冲液置换引起的电荷变化或缓冲液的电势变化。典型地,所述纳米结构对在其表面上或表面附近的变化敏感(如使用纳米线或碳纳米管FET生物传感器),或者当分子通过其时敏感(如纳米孔生物传感器)——尽管测定区域可以延伸超出纳米结构的表面,从而包括所述纳米结构的敏感性区域内的整个区域。纳米结构优选地还与检测器偶联,所述检测器设置为测量信号并且提供与测量的信号相关的输出。在沿着纳米结构的长度的任一点,其可以具有至少一个小于约500纳米,典型地小于约200纳米,更典型地小于约150纳米,更典型地小于约100纳米,更典型地小于约50纳米,甚至更典型地小于约20纳米,更典型地小于约10纳米,甚至小于约5 纳米的横截面尺寸。在其他实施方案中,至少一个横截面尺寸可以是小于约2纳米,或约1纳米。在一组实施方案中,所述灵敏检测的纳米结构可以是至少一个约0.5纳米至约200纳米范围内的横截面尺寸。

[0083] 如在多个实施方案中所用,纳米线是细长的纳米规格的半导体,在沿着其长度的任意点,其具有至少一个横截面尺寸,并且,在一些实施方案中,具有两个小于500纳米,优选地小于200纳米,更优选地小于150 纳米,更优选地小于100纳米,甚至更优选地小于70,更优选地小于50 纳米,甚至更优选地小于20纳米,更优选地小于10纳米,甚至小于5 纳米的正交横截面尺寸。在其他实施方案中,横截面尺寸可以小于2纳米或1纳米。在一组实施方案中,纳米线具有至少一个在0.5纳米至200纳米范围内的横截面尺寸。在描述具有核心和外部区域的纳米线的情形中,上述尺寸涉及核心的尺寸。细长的半导体的横截面可以具有任意形状,包括,但不限于,环形,矩形,长方形,椭圆形,管形,不规则碎片形或树枝状。包括规则和不规则的形状。可以制成本发明的纳米线的材料的非限制性实例列表在下文中显示。纳米管是可在本发明中使用的一种类型的纳米线,并且在一个实施方案中,本发明的装置包括与纳米管尺寸相当的线。用于本文时,“纳米管”是具有空心核心或不同于纳米线的材料的核心材料的纳米线,并且包括本领域普通技术人员已知的那些纳米管。“非-纳米管纳米线”是任何不是纳米管的纳米线,如石墨烯片材。在本发明的一组实施方案中,具有未经修饰的表面(不包括其所放置的环境中非纳米管所固有的任何辅助反应实体)的非-纳米管纳米线在本文描述的其中可使用纳米线或纳米管的任何本发明的排列中使用。“线”是指具有至少半导体或金属的传导率的任何材料。例如,术语“电传导性”或“导体”或“电导体”当关于“传导”线或纳米线使用时,是指该线使电荷通过其自身的能力。优选的电传导材料具有低于大约 10^{-3} ,更优选地低于大约 10^{-4} ,且最优选地低于大约 10^{-6} 或 10^{-7} 欧姆-米(ohmmeter)的电阻率。

[0084] 纳米孔一般在电隔离的或绝缘膜中具有一个或多个小孔。纳米孔一般是其中带有

一个或多个孔的纳米尺寸的球状结构,但不限于此。根据一些方面,纳米孔由碳或任何传导材料制造。

[0085] 纳米珠一般是纳米尺度大小的球状结构。纳米珠的形状一般是球形,但也可以是环形、正方形、矩形、椭圆形和管形。包括规则和不规则的形状。在一些实例中,纳米珠可以具有内部的孔。

[0086] 纳米通道一般是具有纳米或纳米对个尺寸的一个尺度的通道。纳米通道的形状一般是细长的和直的,但是也可以采用任何其他形式因素,只要高和宽的尺度是纳米规格的即可。包括规则和不规则的形状,并且取决于所用的制造方法,包括这样的实例:通道从任意起点到终点的长度大于所述点之间的矢量距离(vector distance)。

[0087] 纳米间隙一般用于生物传感器中,其由纳米范围中两个接触(contact)之间的间隔组成。当靶标分子或很多靶标分子在两个接触之间杂交或结合从而允许电信号通过该分子传送时,纳米间隙产生感应。

[0088] 序列(名词)是多核酸分子中核酸碱基的性质和顺序。测序(动词)是确定多核酸分子中核酸碱基的性质和顺序。

[0089] 灵敏的测定区域是这样的区域,其中,传感器,如纳米传感器,可以检测所感应的可能与多核酸分子中单个碱基的性质相关的属性或特征的扰动。

[0090] 扰动是所感应的属性或特征的任意变化,如灵敏的测定区域内的变化。

[0091] 传送器是将来自传感器的信息,如检测到的扰动,传导或传送到接收装置的装置,所述接受装置可以由NNS组成。

[0092] 特异性的信号是由传感器响应可能与灵敏的测定区域中已知性质的碱基的存在独特相关的扰动而产生的信号。

[0093] 溶液是一种液体,多核酸分子可溶于其中,并且具有与通过NNS流动相容的粘度。在本文的一些实施方案中,溶液导电。

[0094] 本文所定义的高是纳米通道的最小横截面测量。

[0095] 本文所定义的宽是纳米通道的第二小的横截面测量,并且与纳米通道的高垂直或几乎垂直测量。

[0096] 描述了前述纳米结构,即纳米线、纳米管、纳米孔、纳米珠和纳米间隙,以提供一些实施方案的直接示例,并不限制本发明的范围。除了前述实例以外,具有纳米尺度大小并适合用于本申请中公开的核酸测序方法和仪器的任何纳米结构应当认为包括在本发明的范围中。

[0097] 传感器

[0098] 总之,用纳米结构或纳米传感器的核苷酸测序策略是:感应表面处或其附近,或横跨纳米间隙或纳米孔的电荷,该电荷导致它们的性质(如场效应晶体管、纳米间隙或压电纳米传感器)的可测量的变化。纳米结构感应的电荷可直接来源于DNA或RNA聚合物中的核苷酸。在一些实施方案中,在DNA或RNA多核酸聚合物中的一个或全部核苷酸连接到高电荷物质报道物结构部分(其在本说明书的其它部分详细描述)上。

[0099] 在一些实施方案中,传感器是纳米结构传感器,如纳米线,原子厚度的石墨烯或纳米管FET传感器,其产生与纳米结构的特性相关的信号。在一些实施方案中,纳米结构传感器在整个纳米流体通道中排成阵列。所述通道可以具有多核苷酸(如DNA或RNA)延伸通过通

道的尺度。通道中的传感器可以足够灵敏,并且能够在分子通过所述传感器附近时测量单个多核苷酸分子(如DNA或RNA)中的碱基。所述纳米结构传感器可以是以不同规格的距离几何间隔,以允许区分并鉴定每个碱基、或一组碱基、或与一个或多个碱基连接的报道物结构部分、或与所述碱基杂交的探针。在一些实施方案中,这在细长的多核苷酸(如DNA或RNA)流动、或另外被吸取穿过、通过或被迫通过通道而通过所述灵敏的纳米结构传感器时而发生。

[0100] 在一些实施方案中,当多核苷酸(如DNA或RNA)通过检测器,如纳米、或碳纳米管FET装置时,所述传感器,如灵敏的纳米结构传感器,能够检测环境中的微小变化。

[0101] 在所述方法的一些优选的实施方案中,所述灵敏的纳米结构传感器的检测方法的特性是电荷、荧光、反应热、样品的导电性或纳米通道的内容物的导电性。

[0102] 场效应一般是指实验上可观察的感兴趣的中心和远端单极或偶极之间的分子内库伦相互作用的效应,用F表示(对于反应率等),其通过空间而非通过键直接作用。场效应(或‘直接’效应)的量级可取决于单极电荷/偶极矩、偶极方向、感兴趣的中心和远端单极或偶极之间的最短距离,并取决于有效介电常数。这在用于计算机的晶体管中进行了开发并且最近在用作纳米传感器的DNA场效应晶体管中进行了开发。

[0103] 场效应晶体管(FET)通常是这样的晶体管,其由于生物分子的部分电荷可使用场效应作为生物传感器。除了门结构,FETs的结构可与金属-氧化物-半导体场效应晶体管(MOSFETs)的结构相似,其在生物传感器FETs中可被充当表面受体的固定的探针分子层代替。

[0104] 在一些实施方案中,传感器检测选自由下述组成的组的一种或多种信号:压电信号、电化学信号、电磁信号、光子信号、机械信号、声波信号、热信号和重量分析信号。

[0105] 底物-制备和检测

[0106] 在一些实施方案中,直接的测序可以通过简单引入、或流入或另外使得或允许单多核酸分子(如DNA或RNA多核酸分子聚合物)在灵敏的纳米结构传感器上输送、通过其输送或经由其输送而开始;每个核苷酸彼此不同地改变传感器的特性,由此所述传感器能够检测DNA/RNA聚合物中核苷酸的序列。

[0107] 在一些实施方案中,可以通过延伸分子通过纳米通道和使分子转位通过纳米通道而确定DNA、RNA、蛋白或其他分子片段的长度。当分子的前段进入纳米通道中的纳米结构传感器的感应区域时,产生信号。当转运分子的末端从纳米结构传感器的感应区出来时,该信号终止。通过在纳米通道中具有两个以上的纳米结构传感器,可以确定转运速度,并且因此确定分子的长度(DNA具有3.4埃的碱基到碱基间距离)。

[0108] 在一些实施方案中,底物可以是在其合成时进入纳米结构的延伸的多核酸分子序列。在一些实施方案中,所述核酸是单链的。在一些实施方案中,所述核酸是双链的。在一些实施方案中,所述核酸包含底物和退火的已知序列的标记探针。

[0109] 在一些实施方案中,测序反应可以通过引入与多核酸分子(如DNA或RNA聚合物)的互补序列特异性杂交的已知序列的探针而开始。多核酸分子(如DNA或RNA),利用其可以引入、流过或另外迫使这些杂交的探针通过纳米通道,并且灵敏的纳米结构传感器的阵列可以检测其位置,并且利用关于流动速度的信息,计算解析其位置。通过对覆盖所有序列组合的多个探针重复此,该方法可以解析多至整个多核苷酸片段的序列,并且包括引入、流过或另外迫使其通过你们通道的全长染色体的序列。在一些实施方案中,所述探针可以具有

与其连接的独特的报道物结构部分,以使所有或一些探针可以在同一反应中以多路运行。

[0110] 这些探针(短核酸分子,通常称为寡核苷酸)通常可以是单链核苷酸聚合物分子,ssDNA, RNA, PNA, 吗啉代,或其它合成核苷酸。此外,‘探针’序列通常可以是与待测序的“靶标”核酸分子反向互补的,并且足够长以便促进杂交。通常,探针长度为6个碱基对。在一些方法中,探针序列可以是5个碱基对,并且在其他方法中,探针是4个、3个或2个碱基对。在更多方法变化中,探针序列可以是7、8、9或10个碱基对。在其他方法中,探针长度可以是11-100个碱基对。

[0111] 探针优选地包括选自由下述组成的组的分子:DNA、RNA、肽核酸(PNA)、吗啉代、锁核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、合成的核苷酸聚合物或它们的衍生物。

[0112] 在一些实施方案中,短的衔接体(adaptamer)(另一种已知序列的短的寡核苷酸)可一般被连接到靶标多核苷酸上。这能够对不同的序列编条码,所述序列如罪犯或临床序列,以使人们能够一次运行多个不同的样品。以这种方法,每个衔接体将具有于与其连接的独特的报道物结构部分,以允许其缔合序列可与其他序列区分开来。

[0113] 在一些实施方案中,编码的或标记的PCR引物可以用于产生多个扩增子,所述扩增子可以在NNS装置中进行分析。所述分析可以包括每个扩增子内碱基对的直接测序。所述分析可以包括扩增子长度分析。

[0114] 在多个实施方案中,在将多核酸分子(如DNA或RNA聚合物)引入到NNS装置中之前,可以将标记的核苷酸结合到所述多核酸分子中。当这些多核苷酸(如DNA或RNA聚合物)通过纳米结构传感器时检测它们。在一些实施方案中,这些核苷酸可以是天然的核苷酸。纳米结构传感器,所述核苷酸是合成的,并且包括连接报道物结构部分的核苷酸、腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶、加上这些碱基的异构体(如肌昔)中的一种或多种,例如,所述报道物结构部分连接在嘧啶的C5位置或嘌呤的C7位置。

[0115] 在一些实施方案中,本公开内容描述与高度带电荷的报道分子共价连接的合成的核苷酸用于放大转运的分子或所述分子内的碱基的信号的应用。报道物结构部分可以因每个核苷酸而不同,从而携带不同的电荷,以允许所述灵敏检测的纳米结构基于电荷区分核苷酸。

[0116] 在一些实施方案中,所述高电荷物质结构部分包含,但不限于,芳香族的和/或脂肪族的骨架,所述骨架包含氨基、炔烃、叠氮化物、醇羟基、酚羟基、羧基、硫醇基或带电荷金属种类中的一种或多种,或顺磁性种类或磁性种类或它们的任意组合。所述高电荷物质结构部分可以包含图7A-G中所示的一种或多种基团或其衍生物。高电荷结构部分在2011年7月7日公布的美国专利申请公布号2011/0165572 A1(其通过引用完全结合于此)中、2011年12月1日公布的美国专利申请公布号2011/0294685 A1(其通过引用完全结合于此)中和2011年7月7日公开的美国专利申请号2011/0165563 A1(其通过引用完全结合于此)中有进一步的讨论。在一些实施方案中,核苷酸用图7A-7G中的一种或多个标记进行标记。例如,在一些实施方案中,核苷酸A是未标记的,T用7A中的结构部分标记,G用7B中的结构部分标记,C用7C中的结构部分标记。备选地,G可以是未标记的,C可以用7D中的结构部分标记,A可以用7E中的结构部分标记,并且T可以用7F中的结构部分标记。标记每种核苷酸的结构部分没有限制,条件是四种核苷酸中的三种被标记,以使所有四种碱基在通过纳米通道时每一种都有独特的可测量的信号。

[0117] 在一些实施方案中,所述碱基特异性的报道物结构部分是荧光团。本领域中已知多种可以用来标记特定核苷酸的荧光团。多种荧光团是可商购的,例如,购自德国的 MoBiTec GmbH或Life Technologies。一些荧光团包括2'-(或-3')-O-(N-甲基氨基苝酰)NTP, 2'-(或-3')-O-(三硝基苯基)NTP, **BODIPY**® FL 2'-(或-3')-O-(N-(2-氨基乙基)氨基甲酸乙酯)NTP, Alexa **Fluor**® 4888-(6-氨基己基)氨基NTP,或ATTO 425, ATTO 488, ATTO 495, ATTO 532, ATTO 552, ATTO 565, ATTO 590, ATTO 620, ATTO 655, ATTO 680。在每种 ATTO染料中,数字后缀表示吸光度光谱。因此,可以使用多种荧光染料,以便特异性的染料标记每种碱基用。

[0118] 在一些实施方案中,所述碱基特异性的报道物结构部分是FRET,其供体或接受体固定在纳米结构传感器上。不同的FRET分子可以与四种碱基中的每一种缔合。

[0119] 在所述方法的特定的实施方案中,碱基可以结合接头。示例性的接头包括核苷酸修饰,如N⁶-(6-氨基)己基-, 8-[(6-氨基)己基]-氨基-, EDA(乙二胺), 氨基烯丙基-, 和5-炔丙基氨基-接头。

[0120] 接头可以包括下述通式的分子:

[0121] R-L_x-R

[0122] 其中,L包括直链或支链,其包括但不限于,烷基、氧基烷基、炔、腙、肽接头或它们的组合,并且R可以包括核苷酸或核苷或多核酸分子,与其连接的或标记。

[0123] 在一些实施方案中,L可以包含直链。该链的长度由1-1800个重复单位组成,但不限于此。即,该链可以包含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, 58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71, 72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89, 90,91,92,93,94,95,96, 97,98,99,100,101,102,103,104, 105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115, 116,117, 118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130, 131,132,133, 134,135,136,137,138,139,140,141,142,143, 144,145,146,147,148,149,150,151,152, 153,154,155,156, 157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169, 170, 171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182, 183,184,185,186,187,188,189, 190,191,192,193,194,195, 196,197,198,199,200,210,220,230,240,250,260,270,280, 290,300,310,320,330,340,350,360,370,380,390,400,410, 420,430,440,450,460,470, 480,490,500,510,520,530,540, 550,560,570,580,590,600,610,620,630,640,650,660, 670, 680,690,700,710,720,730,740,750,760,770,780,790,800, 850,900,950,1,000, 1,100,1,200,1,300,1,400,1,500,1,600,1,700 或1,800个重复单位。

[0124] 在一些实施方案中,带电荷种类或荧光团可以通过沿着链结合某些带电荷种类而整合到接头中。图8中给出了这样的实例,其使用,但不限于,氨基酸重复单位,其结合其中所示的R基团,所述R基团可以携带可能影响FET器件的电荷。这些种类还可以能够作为螯合基团,从而结合其他种类,如磁性或顺磁性离子或颗粒。

[0125] 在一些实施方案中,通过合成反应的测序可以在纳米通道中进行,待测序的DNA或RNA分子被捕获(通过电场,或连接)在所述纳米通道中,并且测序缓冲液、dNTPs和聚合酶流入所述通道。在加入到NNS装置中之前掺加到DNA聚合物中的核苷酸还可以包含可切割的封

端分子,以便在去除所述可切割的封端(如酯)之前防止添加另外的核苷酸。在一些其他的实施方案中,由此作用为封端。封端的NTPs的部分列表包括 5-(3-氨基-1-丙炔基)-2'-和 7-(3-氨基-1-丙炔基)-7-脱氮-2'-NTP修饰。可切割的荧光核苷酸的综述提供在Turcatti等,Nucleic Acids Res.(核酸研究) 2008年3月;36(4):e25(2008年2月7日在线公开)中,其通过引用完全结合于此。

[0126] 靶标多核苷酸优选地包含选自由下述组成的组的分子:DNA、RNA、肽核酸(PNA)、吗啉代、锁核酸(LNA)、乙二醇核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、合成核苷酸聚合物及其衍生物。添加的核苷酸优选包含选自由下述组成的组的分子:脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、肽核苷酸、吗啉代、锁核苷酸、乙二醇核苷酸、苏糖核苷酸、合成核苷酸及其衍生物。

[0127] 底物可以被吸取或迫使通过纳米通道。包括多种吸取底物通过纳米通道的方法。多核苷酸可以通过流经纳米通道的流动流体、通过驱动流体通过纳米通道的压力流、通过电磁力(如正电荷)、通过重力或其他方式被吸取通过所述纳米通道。

[0128] 底物的检测

[0129] 在一些实施方案中,所述灵敏检测的纳米结构选自由下述组成的组:纳米线、纳米管、纳米间隙、纳米珠、纳米孔、场效应晶体管(FET)-型生物传感器、平面场效应晶体管、原子厚度的石墨烯、石墨烯晶体管和任意传导纳米结构。

[0130] 在一些实施方案中,检测的信号选自由下述组成的组:压电检测,电化学检测,电磁检测,光检测,机械检测,声波检测,热检测,重量分析检测,和纳米通道中样品缓冲液的置换。

[0131] 装置-另外的特征

[0132] 按照本发明的其他实施方案公开了用于测序靶标多核苷酸的设备。所述设备可以包括:测定区,其包括灵敏检测的纳米结构传感器,所述纳米结构传感器能够产生由在所述纳米结构表面上和附近的改变引起的信号(如电场或荧光等),和纳米通道,其作为使核苷酸聚合物足够接近所述灵敏检测的纳米结构传感器的装置,以使所述聚合物中的每个核苷酸在其通过所述传感器时引起所述灵敏检测的纳米结构传感器表面上或附近的变化(如电场)。在一些实施方案中,所述设备可以进一步包括皮孔(pico-well)或微流体通道,或流动池,其具有排成阵列的灵敏检测的纳米结构传感器,其中所述生物样品包括任意体液、细胞及其提取物、组织及其提取物、和包含核苷酸的任意其他生物样品、提取的DNA、PCR(或其他扩增方法,如LAMP、RPA和其他等温方法)扩增的样品、合成的寡聚物、或任意其他含有核苷酸聚合物的样品。

[0133] 在一些实施方案中,所述设备可以包括微流体盒。所述微流体盒可以包括样品接受元件,用于将包含靶标多核苷酸的生物样品引入到所述盒中;裂解室,其用于分解所述生物样品以释放包含核酸和其他分子的可溶级分;核酸分离室,其用于将所述核酸与所述可溶级分中的其他分子分离;扩增室,其用于扩增所述靶标多核苷酸;测定区域,其包括一个或多个 NNS器件的阵列。在一些实例中,所述设备可以用于生物样品或临床样品,其可以是任意体液、细胞及其提取物、组织及其提取物、和包含靶标多核苷酸的任意其他生物样品或临床样品。在本文的一些实施方案中公开的用于测序的设备可以进行大小调整并且设置为手持式的、低通量台式(用于临床应用)或高通量的。

[0134] 样品来源

[0135] 在一些实施方案中,用本领域已知用于核酸提取的方法来提取样品。在一些实施方案中,在测序分析之前将样品溶解或裂解。在一些实施方案中,原始样品可以在所述设备中运行,以使传感器不需要样品预处理,如裂解、提取、PCR等,并且可以测序未提取的样品中游离的DNA。在一些实施方案中,样品进行提取,并且多核苷酸如本文所述那样进行标记。

[0136] 本文所述的样品包括,但不限于,血液、尿、一般犯罪现场材料、精液、环境样品、废水、海洋水、淡水、植物材料、溶解的组织和其他样品基质。

[0137] 纳米通道

[0138] 在一些实施方案中,包含待测序的多核苷酸的样品通过纳米通道,如纳米构造的芯片上的纳米通道,引导、运行或延伸通过纳米通道。与本公开内容一致的纳米通道可以是横截面为矩形、正方形、椭圆形、半椭圆形、环形、半环形、三角形、梯形、多边形或v型的,并且可以具有锐角转角或圆边。孔可以是顶端开放的,或者可以包封在纳米构造芯片中。

[0139] 在其最宽的点上纳米通道可以为约2 μm 宽。备选地,孔的宽度可以小于0.1 μm ,0.1 μm ,0.2 μm ,0.3 μm ,0.4 μm ,0.5 μm ,0.6 μm ,0.7 μm ,0.8 μm ,0.9 μm ,1.0 μm ,1.1 μm ,1.2 μm ,1.3 μm ,1.4 μm ,1.5 μm ,1.6 μm ,1.7 μm ,1.8 μm ,1.9 μm ,2.0 μm ,2.1 μm ,2.2 μm ,2.3 μm ,2.4 μm ,2.5 μm ,2.6 μm ,2.7 μm ,2.8 μm ,2.9 μm ,3.0 μm ,3.1 μm ,3.2 μm ,3.3 μm ,3.4 μm ,3.5 μm ,3.6 μm ,3.7 μm ,3.8 μm ,3.9 μm ,4.0 μm ,4.1 μm ,4.2 μm ,4.3 μm ,4.4 μm ,4.5 μm ,4.6 μm ,4.7 μm ,4.8 μm ,4.9 μm ,5.0 μm ,或大于5.0 μm 。

[0140] 纳米通道可以是高度为约5nm至约80nm,宽度为约5nm至约8nm,或者高和宽准确地或大约小于4nm,5nm,6nm,7nm,8nm,9nm,10nm,11nm,12nm,13nm,14nm,15nm,16nm,17nm,18nm,19nm,20nm,21nm,22nm,23nm,24nm,25nm,26nm,27nm,28nm,29nm,30nm,31nm,32nm,33nm,34nm,35nm,36nm,37nm,38nm,39nm,40nm,41nm,42nm,43nm,44nm,45nm,46nm,47nm,48nm,49nm,50nm,51nm,52nm,53nm,54nm,55nm,56nm,57nm,58nm,59nm,60nm,61nm,62nm,63nm,64nm,65nm,66nm,67nm,68nm,69nm,70nm,71nm,72nm,73nm,74nm,75nm,76nm,77nm,78nm,79nm,80nm,81nm,82nm,83nm,84nm,85nm,86nm,87nm,88nm,89nm,90nm,91nm,92nm,93nm,94nm,95nm,96nm,97nm,98nm,99nm,100nm,101nm,102nm,103nm,104nm,105nm,106nm,107nm,108nm,109nm,110nm,111nm,112nm,113nm,114nm,115nm,116nm,117nm,118nm,119nm,120nm,121nm,122nm,123nm,124nm,125nm,126nm,127nm,128nm,129nm,130nm,131nm,132nm,133nm,134nm,135nm,136nm,137nm,138nm,139nm,140nm,141nm,142nm,143nm,144nm,145nm,146nm,147nm,148nm,149nm,150nm,151nm,152nm,153nm,154nm,155nm,156nm,157nm,158nm,159nm,160nm,161nm,162nm,163nm,164nm,165nm,166nm,167nm,168nm,169nm,170nm,171nm,172nm,173nm,174nm,175nm,176nm,177nm,178nm,179nm,180nm,181nm,182nm,183nm,184nm,185nm,186nm,187nm,188nm,189nm,190nm,191nm,192nm,193nm,194nm,195nm,196nm,197nm,198nm,199nm,200nm,或大于200nm。

[0141] 构造

[0142] 本公开内容包括用于构造硅NWs的方法。其还涉及纳米通道和纳米孔的构造。本发明还提示取样和操作DNA的方法,其还提议通过一个或多个所包括的或相邻的NW装置或NW感应元件的阵列来检测所构造的纳米通道中包含的电荷的方法。在一个实施方案中,NW通道的长度小于DNA碱基对的长度,在另一个实施方案中,延伸超出完整的DNA序列,在另一

个实施方案中,其在长度上与长读取长度DNA序列相当,在另一个实施方案中,其可以促进鸟枪测序,在另一个实施方案中,其是多个平行的通道。

[0143] NWs和纳米通道典型地使用负载在基底绝缘材料上的活性硅层来构造。这典型地是,但不限于,绝缘体(SOI)薄片上的硅(或多晶硅),其中在一个实施方案中,在活性装置层或纳米通道上最小的特征小于500nm,在另一个实施方案中,小于100nm,在另一个实施方案中,小于50nm,在另一个实施方案中,小于30nm,在另一个实施方案中,小于10nm,在另一个实施方案中,小于5nm,在另一个实施方案中,小于2nm,在另一个实施方案中,小于1nm。

[0144] 对于NW装置,在一种情形中,电导可以是利用植入多种材料而进行体积修饰的,以增加电子掺杂。在另一种情形中,这可以选择性地限定NW区域,在另一种情形中,这可以作为单一的步骤发生,在另一种情形中,这可以通过多个掺杂步骤。在另一种情形中,通过选择性植入或掺杂,导电性在一个区域中可能增加,并且可能在另一个区域减少。

[0145] 关于NWs和纳米通道的特征使用并且不限于连接预先确定的模具、化学蒸汽沉积、物理蒸汽沉积、氧化、溅射、蒸发沉积、光刻图案技术(photolithographic patterning technique)而定义在活性装置表面上,所述光刻图案技术可以包括紫外石版印刷、干涉石版印刷、电子束石版印刷、阴影蒙图、纳米冲压(nanostamping)、纳米浮雕和纳米油墨直接打印。然后,化学或物理去除不需要的特征,以实现或保留合乎需要的特征高度和通道宽度尺度。

[0146] 可以实现、靶向和补充原子层的选择性去除,但是不限于化学特异性,并且包括能量离子轰击。一个这样的实施方案包括聚焦离子束研磨(Focused Ion Beam milling, FIB)。一些实施方案包括气态反应离子蚀刻或等离子体蚀刻。一些实施方案不限于湿性离子蚀刻,并且将结合穿过特异性几何放置的纳米管、原子厚度石墨烯层或纳米线FET阵列的纳米流体通道,并且,在一些实施方案中,这可以使纳米线变得‘整齐’,从而减小其尺度。在一些实施方案中,这可以改变表面,从而增加其灵敏性。在一个实施方案中,可以通过氧化性和还原性表面化学进一步影响NW和纳米通道尺度。在一些实施方案中,通过本领域技术人员熟悉的技术去除原子层厚,可以沉积另外的表面层。一些实施方案可以组合两种以上的上述方法,多至并且包括所有上述方法。

[0147] 一些实施方案具有在纳米通道内彼此电独立的所有NW器件。一些实施方案具有在纳米通道内彼此平行连接的多个NW。

[0148] 一个实施方案具有沉积的介电性(或绝缘性)材料,所述沉积不限于原子层沉积、化学气相沉积、物理蒸汽沉积、溅射、分子束外延和纳米浸渍光刻(Nano dip lithography)。所述表面沉积的材料的实例不排除聚合物材料、Al₂O₃、SiN、TiO₂、热生长的SiO₂、天然SiO₂层的天然演化。

[0149] 在一些实施方案中,提议包括与进入的溶液的流动平行的电活性NWs。在一个实施方案中,排列可以与‘十柱保龄球’的球排列相似,并且以1,2,3,4,5...N的排列延伸,并且存在于单个面上。另一个将具有局限在通道宽度尺度内但是存在于基底绝缘性或介电性材料面上的斐波那契增量排列顺序(Fibonacci incremental arrangement sequence)。另一个实施方案具有存在于基底材料面上的六角密集排列的NWs。一些实施方案具有数学不规则的NWs排列。一些实施方案具有随机分布的NWs。一些实施方案具有几何规则性排列的NWs。

[0150] 一些实施方案具有彼此分离的多于一个纳米通道的面。一种这样的实现是作为纳米线的上表面的上部和下部通道和与NW的背侧接界的基底通道。以这种方式,可以通过多于一种独立的化学影响同一纳米线的多个功能方面。

[0151] 在一些实施方案中,使用石墨烯晶体管作为纳米结构构造纳米通道纳米线测序仪。这些可以作为在纳米通道底部上的扁平薄片、或竖立,以使单原子宽度的石墨烯与通道垂直,以允许单碱基解析。一些实施方案以水平轴与垂直轴之间的角度和具有石墨烯晶体管或导体。

[0152] 在一些实施方案中,靶标DNA序列可以在与灵敏检测的纳米结构排成阵列的纳米流体通道(如同在火车轨道上的枕木)中测序。

[0153] 基因组或其他核苷酸聚合物分子样品可以解开(unraveled)并且延伸到纳米流体通道中,以其天然形式,或者分解成>1kb或>10kb或>1mb 或>1gb的片段,或从端粒到端粒的完整的染色体(T2T测序)进行。在一些实施方案中,通道的尺度是这样的,以使DNA或其他聚合物分子,如RNA,不能折叠或形成其他的3D形式或结构,并且线性地通过所述通道。此外,通道的尺度是这样的,以使DNA通过灵敏的纳米阵列区域的测定区域,由此允许DNA聚合物中的每个核苷酸在所述灵敏的纳米结构传感器中引起特性的独特变化,由此允许测序。

[0154] 在一些实施方案中,核酸外切酶可以从通道中截留的(机械地、电子地或其他方式)DNA分子上切割末端核苷酸。随着切割的核苷酸通过传感器,所述传感器记录其独特的特征。

[0155] 在一些实施方案中,本发明可以用在手持式装置中。在其他实施方案中,该手持式装置可以测序人类基因组。

[0156] 在本公开内容的其他实施方案中,本发明可以结合在移动电话中。在其他实施方案中,该移动电话装置可以测序人类基因组。

[0157] 在一些实施方案中,使用纳米打印、浮雕或直接打印而产生纳米通道。在其他实施方案中,使用光刻蒙图技术(photolithographic masking techniques)限定纳米通道,所述光刻蒙图技术包括但不限于,接触蒙图(contact masking),凸版蒙图(projection masking),阴影蒙图,介电蒙图,隔离石版印刷(spacer lithography),电子束石版印刷,其用于显微构造纳米通道。备选地或组合地,纳米通道,如深度或宽度小于100 nm的安谧通道,可以限定成、蚀刻成或研磨成预先限定的纳米构造结构。这种修饰可以回顾性地(retrospectively)产生于本文的公开内容相一致的孔或通道。依照这种方法,可以加入另外的拓扑特征或结构,例如,以辅助核酸如DNA的转运。

[0158] 在一些实施方案中,使用机械性磨损来蚀刻适当的基底的表面。这种磨损可以递送沿着基底的表面递送,例如,使用力控制的悬臂沿着基底表面刻画。机械磨损、研磨、开槽或其他机械磨损可以通过操作应用的末端压力(tip pressure)、角度、末端速率和末端材料而进行控制。与本公开内容相一致的末端材料是硅、石英和钻石,尽管也包括其他末端材料。

[0159] 另外地或组合地,可以利用化学磨损来蚀刻表面。在一些实施方案中,如上文所述,化学蚀刻基底位于机械蚀刻装置的末端(在一些实施方案中,略似在羽管笔或钢笔上油墨的末端),并且可以选择性地以所述末端的焦点施加到表面上。其中所用的化学基底可以增强蚀刻过程,或者可以积极地影响材料从表面的转运,并且更好地限制通道尺度,或者既

增强蚀刻又积极地影响转运。

[0160] 再参考附图,从图1看出本公开内容的示意性的纳米通道纳米线测序装置。延伸的单链多核苷酸分子(a)流入并且通过纳米通道(b)。所述纳米通道的基底或侧面或顶端的内衬是灵敏的纳米结构传感器(c)。在所示的实例中,传感器是纳米线FET传感器。这些灵敏的纳米结构传感器特异性地几何间隔,以使该系统能够在它们通过时最佳地检测通过其的聚合物(DNA或RNA)中单个的碱基,单独地或作为组合的有来自多个纳米线的信号推测或计算的信号进行检测,所述信号通过碱基对纳米线的可操作的附近的局部电磁环境的影响产生。纳米线可以以3个一簇(d)、2个一簇(e)、单个一簇(e)或以任意量的纳米线簇的其他组合来操作。纳米线通过接触垫(g)和构造在标准硅芯片(h)上的完整装置与电子器件接触。

[0161] 从图2观察制造本发明的实施方案的多个视图。在上部观察到标准装置。在中间观察到已经蚀刻刀标准装置中的纳米孔提高灵敏性。在下部观察到水平视图,其俯视在中部观察的装置的蚀刻的孔。

[0162] 从图3观察制造本文涉及的纳米通道的一系列步骤。在沿着装置的表面包含FIB纳米通道后(a),包含大体积材料以填充通道(b),以使其可以支持并且保护NW区域,用于封闭步骤和纳米通道结构的完成。表面可以进行抛光或蚀刻(c)以去除纳米通道踪迹外的大体积材料。沿着装置的上表面加入封闭层的附着(d)。在处理装置的最后阶段,去除纳米通道中的材料,产生具有覆盖的、中空的纳米通道的装置(e)。

[0163] 从图4观察应用标记的寡聚核苷酸引物序列和标记的链终止核苷酸进行的测序反应。在图(a),对模板DNA分子设计Sanger测序引物,沿着目的区域的长度设计多个引物。每个引物具有独特的报道物结构部分(基于电荷报道-或者,如果缓冲液置换是所用的检测模式,则基于尺寸报道)。所述引物和模板与dNTPs一起加入到测序混合中,所述混合物中的一些dNTPs是链终止dNTPs。每个链终止dNTPs携带独特的报道物结构部分。链终止dNTPs的浓度是这样的,以使如同Sanger测序,扩增(b)(使用标准的热循环,或等温)不同长度(c)的链。引入这些不同的长度通过纳米通道(d),由此使每个扩增的片段与纳米线的阵列接触(在该图片中仅显示一个纳米线,然而,在所述装置的在一些实施方案中,存在数百至数千个纳米线)e)。当第一核苷酸(链终止核苷酸)及其报道物结构部分通过灵敏检测的纳米结构传感器(在该情形中,是纳米线),对其进行检测。接着,连接在引物上的第二报道物结构部分通过传感器,并且也被检测。在一些实施方案中,可能是这样的,即,链终止核苷酸先通过,然后是引物末端,不影响分析。由于通过纳米通道流动的速度是已知的或者可以用已知长度的对照DNA片段校正,第一报道物检测事件与第二报道物检测事件之间的时间提供所述片段的长度的信息。引物上的报道物表示靶标DNA分子上的起点位置,链终止核苷酸上的报道物表示在该特定位置的碱基,如通过长度分析或校正确定的。

[0164] 从图5观察与本文公开的纳米通道装置相一致的备选的序列测定。该序列测定方法涉及使用标记的六聚体探针的基于探针的序列检测。(a)合成短的寡聚体探针(可以使用2,3,4,5或6聚体;该图显示6聚体)的所有变异形式。可以合成不具有报道物结构部分的探针,或者连接有其他配体的探针,或者每个可以携带不同的报道分子。将这些探针加入到含有DNA的溶液中。将所述溶液加热,以使DNA解链,然后冷却,以允许所述探针沿着ssDNA靶标分子的长度杂交。b)然后,将连接有探针的一个或多个靶标分子或引入到纳米通道中。灵敏的纳米结构的结构(例如,纳米线FET)检测所述探针,和/或连接到所述探针上的报道物结

构部分。由于DNA经过一个和/或多个传感器的速度是已知的,可以沿着靶标分子绘制所述探针的位置。由于探针的序列是已知的,这些可以推论到靶标分子上。靶标分子通过纳米通道测序仪的多次通过允许计算建立完整的序列。

[0165] 从图6观察使用标记的核苷酸的基于扩增的序列检测。(a)用携带独特的碱基特异性报道物结构部分的dNTPs扩增(b)靶标分子,以产生具有标记的核酸碱基的所述靶标分子的互补物(c,左侧)。备选地,使用标准核苷酸和连接有独特的报道物结构部分的GTP、CTP、TTP或ATP中的一个进行四个独立的反应(c,右侧)。每种备选方案将产生扩增子(c),沿着聚合物的每个核苷酸都连接有报道物结构部分(左侧),或聚合物上GTP、CTP、TTP或ATP中的一个连接有独特的报道物结构部分(右侧)。(d)然后,将这些扩增的聚合物引入通过纳米通道测序仪。(e)观察到通过纳米通道的单个碱基的输出。e的上方,如在c左侧中标记的产物,在聚合物具有所有四种携带报道物结构部分的核苷酸的情形中,直接读出每种扩增的聚合物的序列。e的下方,在聚合物仅具有连接有独特的报道物结构部分的GTP、CTP、TTP或ATP中的一个的情形中,将读出单个的碱基,并且由于已知聚合物通过灵敏的纳米结构传感器(例如,纳米线FETs)的速度而间隔出现,并且当所有四种聚合物(表示四种核苷酸中的全部)测序后生物信息学建立完整的序列。

[0166] 从图7(整体参见图7A-7G)观察与本文的NNS检测装置相一致的高电荷结构部分的多个实例。

[0167] 从图8观察包含氨基酸重复单位的示例性的接头结构部分,所述氨基酸重复单位结合其中所示的R基团,所述R基团可以携带能够影响FET器件的电荷。多肽接头,在该实例中是聚甘氨酸,与包含氨基酸残基天冬氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、丙氨酸和甘氨酸(其可以包含带电荷的种类)中的一个或多个的带电荷种类融合。这些种类也可以能够作为螯合基团,从而结合其他的种类,如磁性或顺磁性离子或颗粒。

[0168] 从图9A-14B观察到与本文公开的装置和方法相一致的示例性的纳米通道的图片和测量。纳米通道的高度和宽度是一致地、均一地重复的。

[0169] 从图15观察到在纳米通道末端的室内累积的Cy3-标记的DNA样品。该图证明核酸可以被吸取通过与本文公开的装置和方法相一致的纳米通道。

[0170] 在图16中,通过在硅片上打印线宽1.5 μm 、高50nm和长3mm的拓扑连续的结构改造模板。将液体聚合物脱气,并应用到表面上,然后固化。去除聚合物后,将通道水解。在该图中可以看出,所述通道以每秒约5 μm 的可控方式引导含有DNA的溶液。通过比较图16的左图、中间图和右图观察到溶液通过通道的进展,该图表示包含缓冲液的携带CY3*DNA的样品通过所述纳米通道的进展的时程。

[0171] 在图17,将DNA(10 μm)注射到放置的纳米尺度的通道的一个末端,以通过NW阵列。由于硬件的限制,取样速率为10Hz。除了浓度梯度影响,建立介电电泳梯度,以向通道中的DNA中引入另外的移动性。通过其在350-450s对电流 I_{sd} (A)的影响观察到DNA通过纳米线阵列的通过,上图所示。中间图观察到如在中间示意图左侧所示的纳米通道中多核酸分子位置的示意图。每个中间示意图中的箭头对应测量的电流。下图显示电泳梯度的方向。

实施例

[0172] 下述是本公开内容的一些实施方案的一些示例性的且非限制性的实施例。

[0173] 实施例1-CMOS合成

[0174] 为了开发纳米孔或纳米通道,在活性NW区域沉积较厚的Al₂O₃(或 SiO₂)层,厚度典型地为,但不限于35nm。构造一些设计,以在基底氧化物上具有35nm高的NWs。3nm Al₂O₃介电层是沉积的覆盖物,产生所述装置的纳米线间的区域(谷),具有在氧化物上的3nm Al₂O₃层和35nm NW,合起来高度为38nm。

[0175] 按照这种构造方法,沉积第二个35nm Al₂O₃(或SiO₂),产生氧化物上38nm Al₂O₃的谷高度和包括Al₂O₃和NW的约70nm的高度。一个非限制性的实施方案使用聚焦离子束(FIB)来去除Al₂O₃中通道的谷区域中 20nm的材料和NW上的50nm,使得通道平整。这可以具有这样的作用:在Al₂O₃中包含20nm的流体通道,并且使NW变薄至20nm(从表面上去除15nm的Si和35nm的Al₂O₃)。使NW变薄以两种方式提高灵敏性。首先,沿着NW的‘挤压的(pinched)’区域发展聚焦的E场;其次,出现穿过通道的点的局部导电性的减少。

[0176] 当已经获得NW和纳米通道装置的尺度时,所述装置在边缘处的导电特性可以增加,以连接外部电路。

[0177] 实施例2-下一代Sanger测序(NSS)

[0178] 针对模板DNA分子设计Sanger测序引物,沿着目的区域的长度涉及多个引物。每个引物具有独特的报道物结构部分(基于电荷报道-或者,如果缓冲液置换是所用的检测模式,则基于尺寸报道)。所述引物和模板与dNTPs一起加入到测序混合中,所述混合物中的一些dNTPs是链终止 dNTPs。四个链终止dNTPs中的每一个携带独特的报道物结构部分。链终止dNTPs的浓度是这样的,以使如同Sanger测序,扩增(使用标准的热循环,或等温)(图4,b)不同长度的链(图4,c)。引入这些不同的长度通过纳米通道(图4,d),由此使每个扩增的片段与纳米线的阵列接触(在该图片中仅显示一个纳米线,然而,在最终装置中,存在数百至数千个纳米线)(图4,e)。当第一个核苷酸(链终止核苷酸)及其报道物结构部分通过所述灵敏检测的纳米结构传感器(在该情形中,是纳米线)时,对其进行检测。接着,连接到引物上的第二报道物结构部分通过传感器,并且也得到检测。注意,可能是这样的,即,链终止核苷酸先通过,然后是引物末端,这对分析没有产生差别。由于通过纳米通道流动的速度是已知的(或者可以用已知长度的对照DNA片段校正),第一报道物检测事件与第二报道物检测事件之间的时间提供所述片段的长度的信息。引物上的报道物表示靶标DNA分子上的起点位置,链终止核苷酸上的报道物表示在该特定位置的碱基,如通过长度分析或校正确定的。

[0179] 实施例3-下一代基于探针的测序(NPS)

[0180] 合成短的寡聚体探针(2,3,4,5或6聚体)的所有变异形式。任选地合成不连接报道物结构部分或其他配体的探针,或者每种可以携带不同的报道分子。将这些探针加入到含有DNA的溶液中。将所述溶液加热,以使DNA解链,然后冷却,以允许所述探针沿着ssDNA靶标分子的长度杂交。(图5,b)然后,将连接有探针的一个或多个靶标分子或引入到纳米通道中。灵敏的纳米结构的结构(例如,纳米线FET)检测所述探针,和/或连接到所述探针上的报道物结构部分。由于DNA经过一个和/或多个传感器的速度是已知的,可以沿着靶标分子绘制所述探针的位置。由于探针的序列是已知的,这些可以推论到靶标分子上。靶标分子通过纳米通道测序仪的多次通过允许计算建立完整的序列。

[0181] 实施例4-下一代标记的核苷酸测序(NTN)

[0182] 用携带独特的报道物结构部分的dNTPs扩增靶标分析(图6,b)。或者使用标准核苷

酸和连接有独特的报道物结构部分的GTP、CTP、TTP 或ATP中的一个进行四个独立的反应。这将产生聚合物的每个核苷酸都连接有报道物结构部分的扩增子(图6,c),或具有连接有报道物结构部分的GTP、CTP、TTP或ATP中的一个的聚合物(图6,d)。然后,将这些扩增的聚合物引入通过纳米通道测序仪。(图6,e)在聚合物具有所有四种携带报道物结构部分的核苷酸的情形中,直接读出每种扩增的聚合物的序列。在聚合物仅具有连接有独特的报道物结构部分的GTP、CTP、TTP 或ATP中的一个的情形中,将读出单个的碱基,并且由于已知聚合物通过灵敏的纳米结构传感器(例如,纳米线FETs)的速度而间隔出现,并且当所有四种聚合物(表示四种核苷酸中的全部)测序后生物信息学建立完整的序列。

[0183] 实施例5-吸取通过纳米通道的多核酸分子

[0184] 将DNA分子用Cy3标记,并且吸取通过与本公开内容相一致的纳米通道。在纳米通道末端,红色荧光在纳米通道末端处的池中积聚,这证明核酸能够被吸取通过纳米通道,如本文所述。

[0185] 实施例6-构造石墨烯NNS器件

[0186] 开始通过在表面上沉积石墨烯薄片,然后进行材料的层沉积(物理地、化学地或原子地),所述材料诸如,但不限于,氧化硅,氮化硅,聚合物, kapton和包含化学品, SU8或其他光致抗蚀剂等,直至人们建立可被3.4 埃(DNA中碱基到碱基的距离)整除的充分的高度,而构造纳米通道纳米线测序仪。然后,在顶部沉积、生长或以其他方式操作第二层石墨烯。进行进一步的层沉积(包括但不限于前文提及的技术),并且建立另外的石墨烯层,直到存在1-1,000层石墨烯。然后,任选地将这些层切成小块并且旋转90度。任选地,可以使用这些层,如由构造方法所限定的。在层中形成与石墨烯垂直的纳米通道,然后将石墨烯堆或柱偶联到含有多个离散的(或其他电学可用的排列)源极和漏极的CMOS芯片上,以使石墨烯片层与所述电极连接并且形成纳米结构传感器。

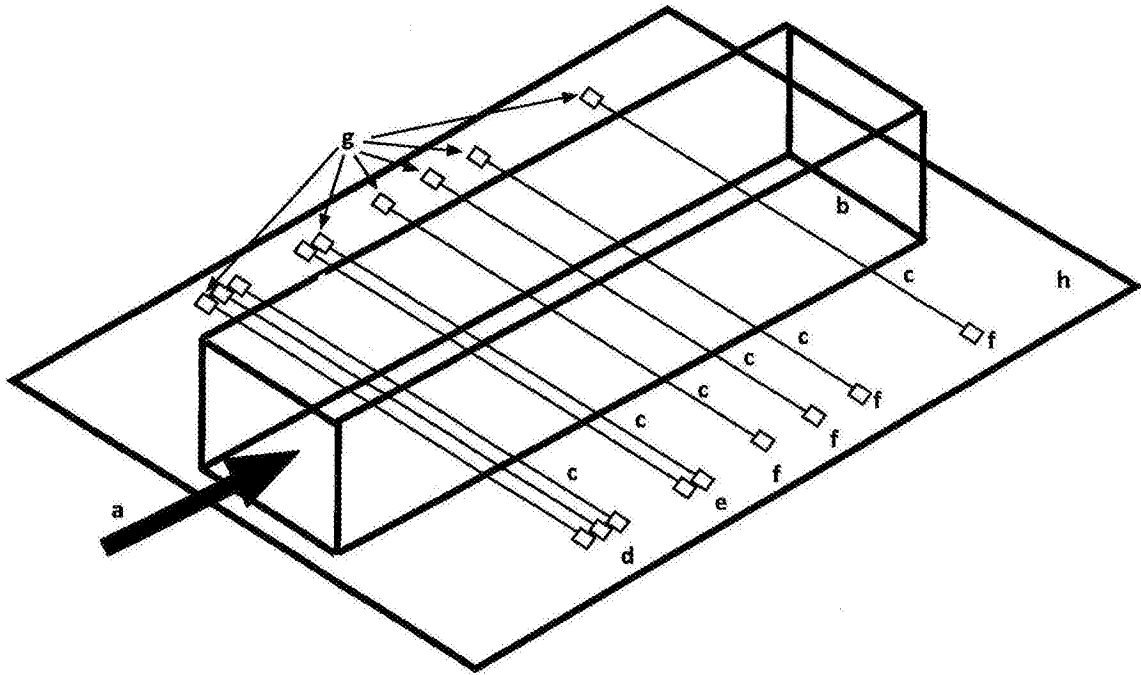
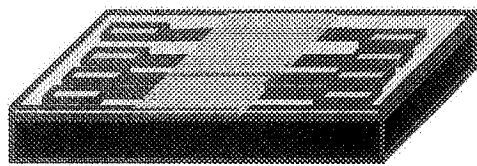
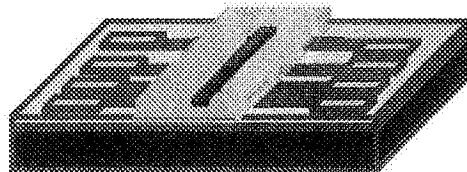


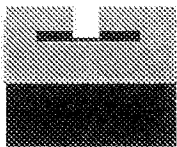
图1



标准装置



在 NW 区域具有较厚的氧化物和蚀刻的通道的装置



与 NW 的长方向垂直的面。
注意 NW 区域的选择性打薄。

图2

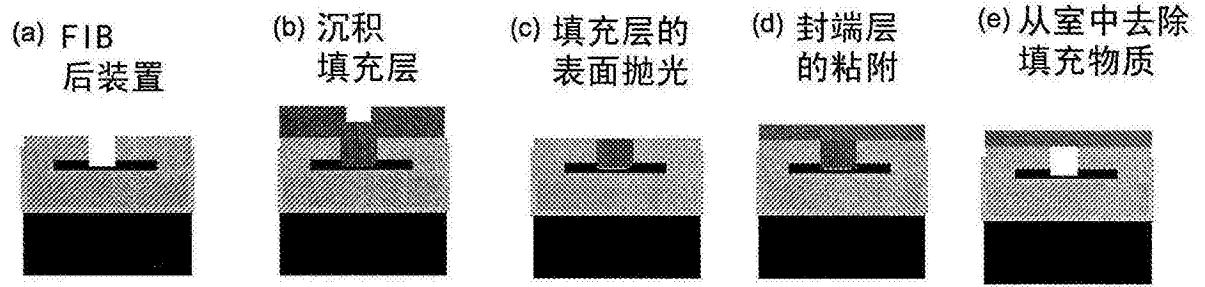


图3

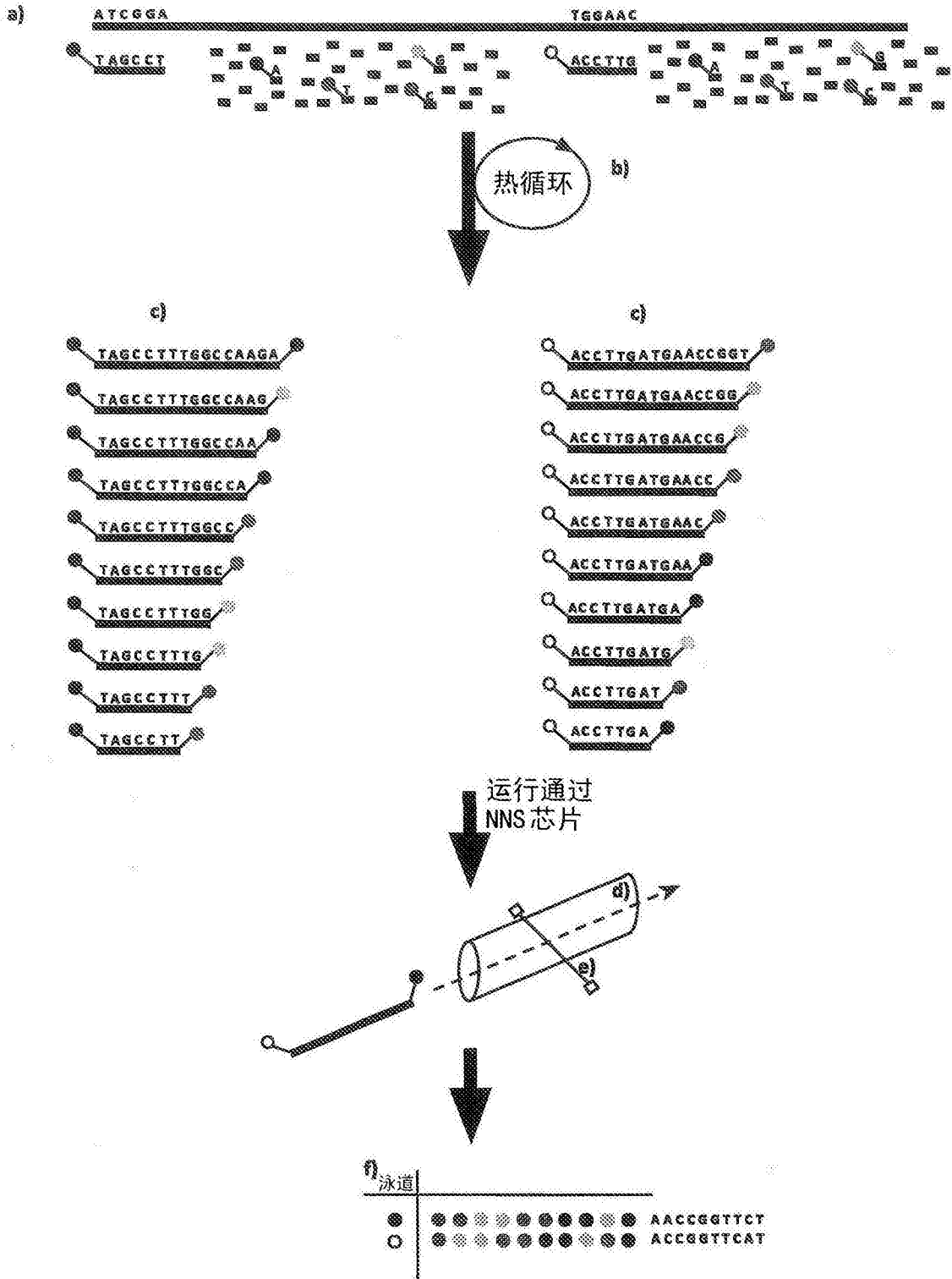


图4

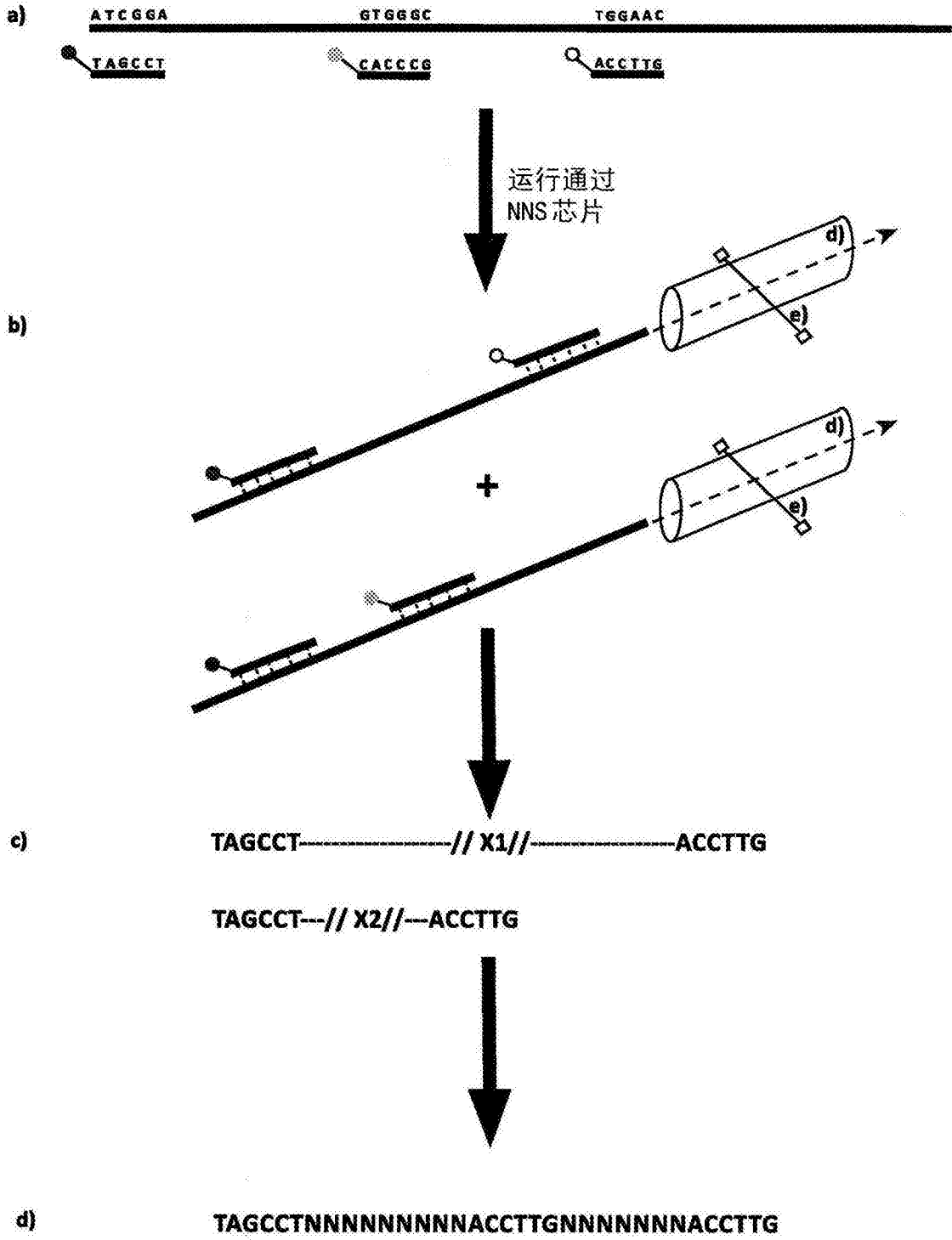


图5

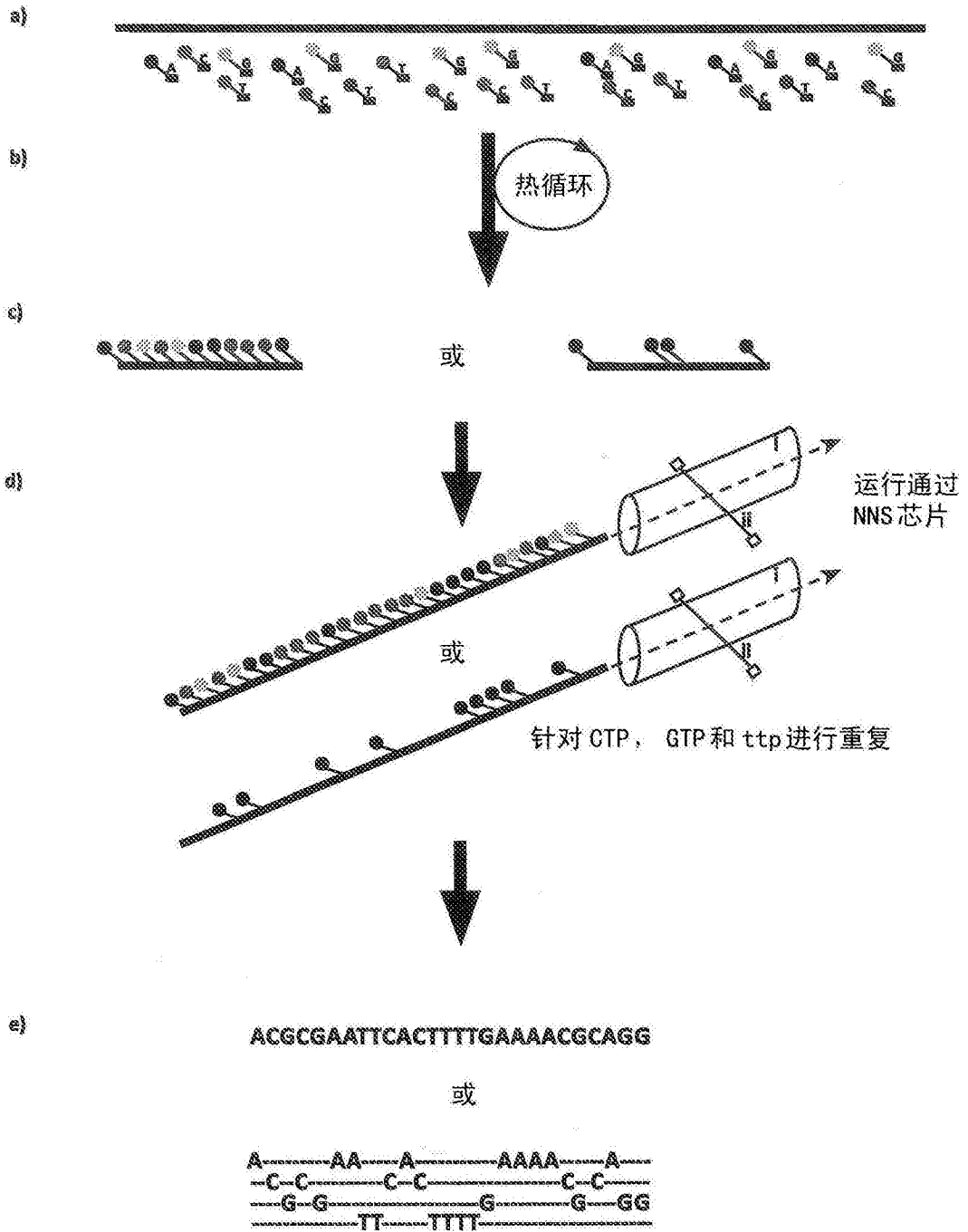
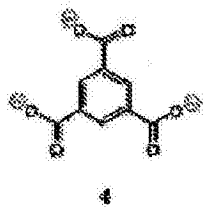
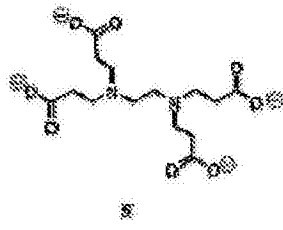


图6

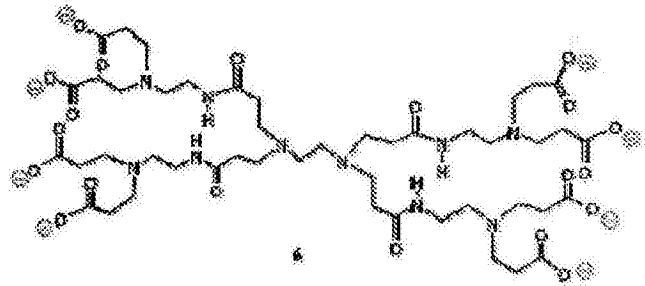
7A.



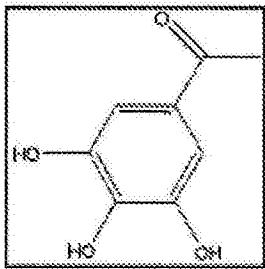
7B.



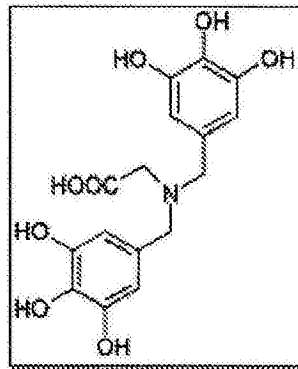
7C.



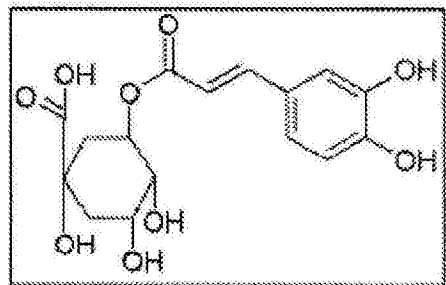
7D.



7E.



7F.



7G.

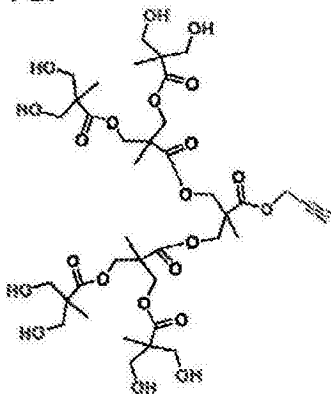


图7

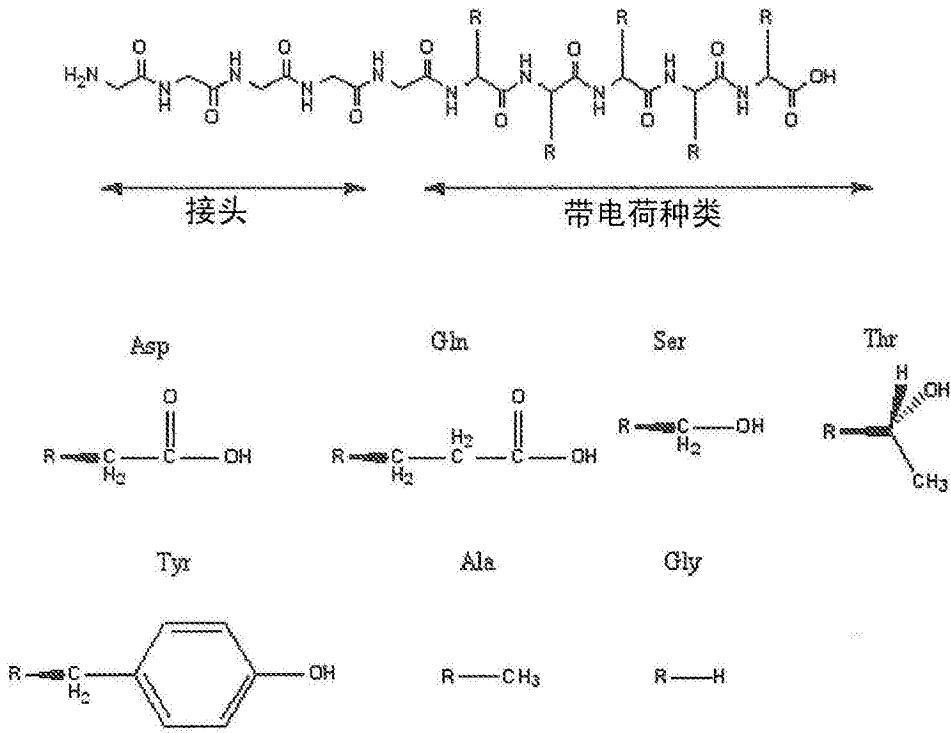


图8

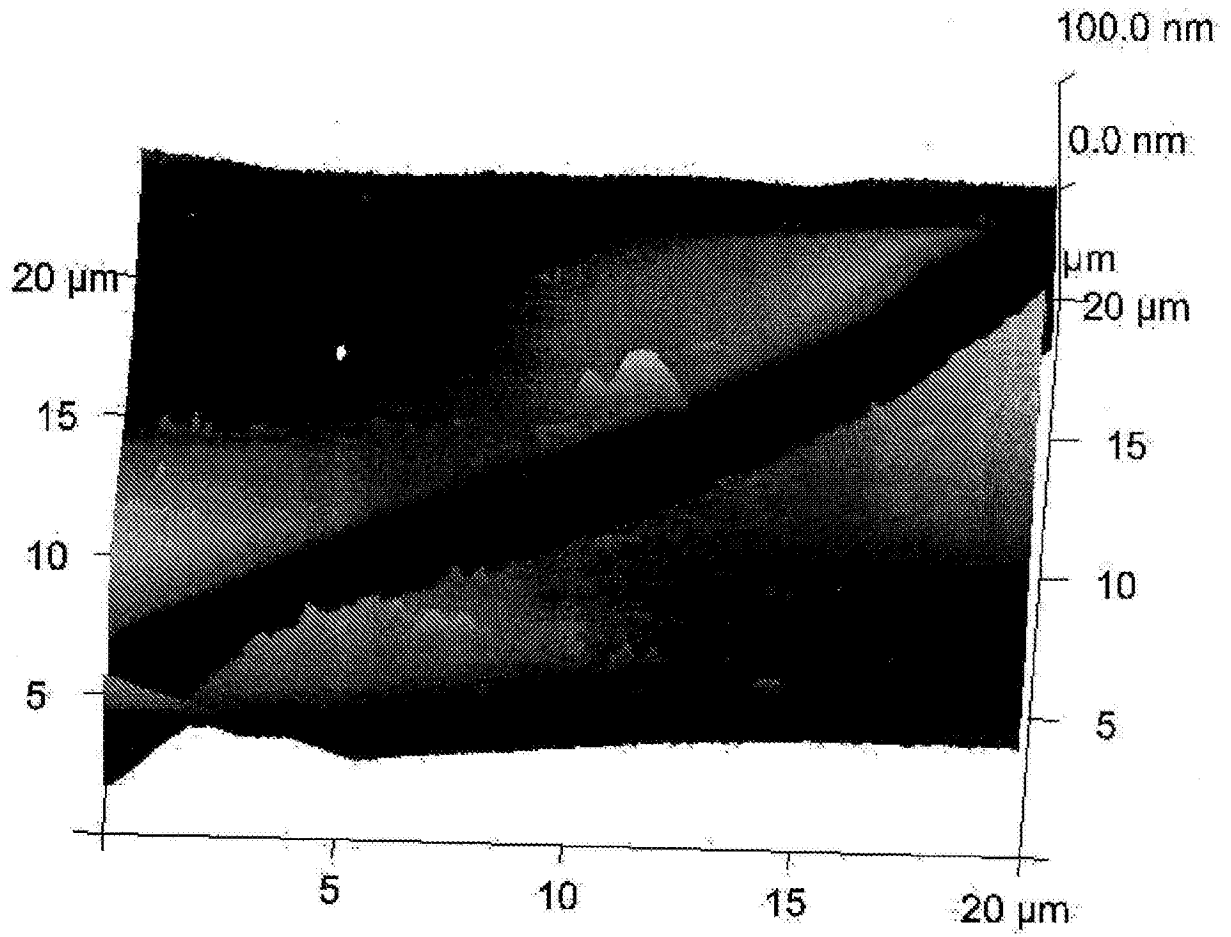


图9A

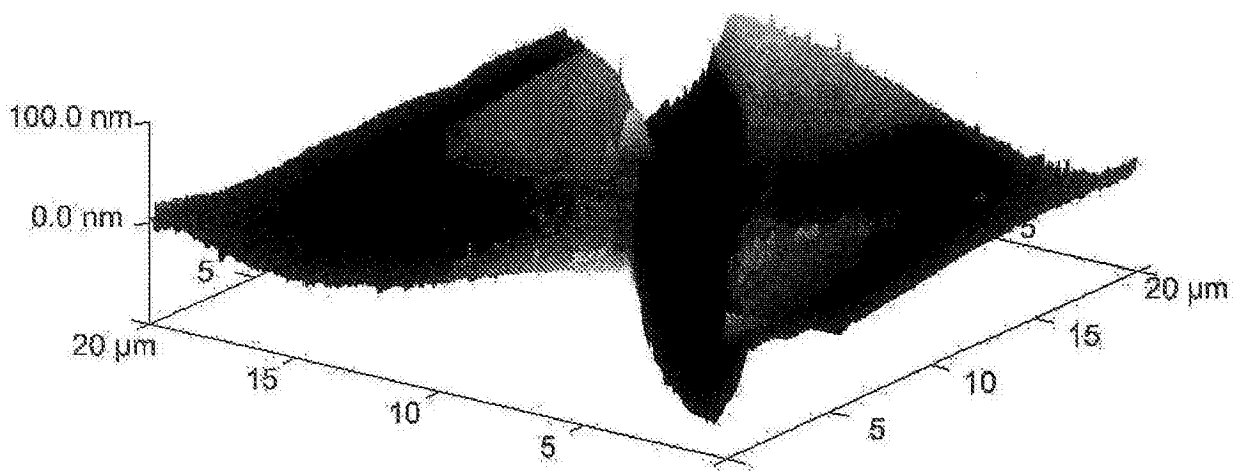


图9B

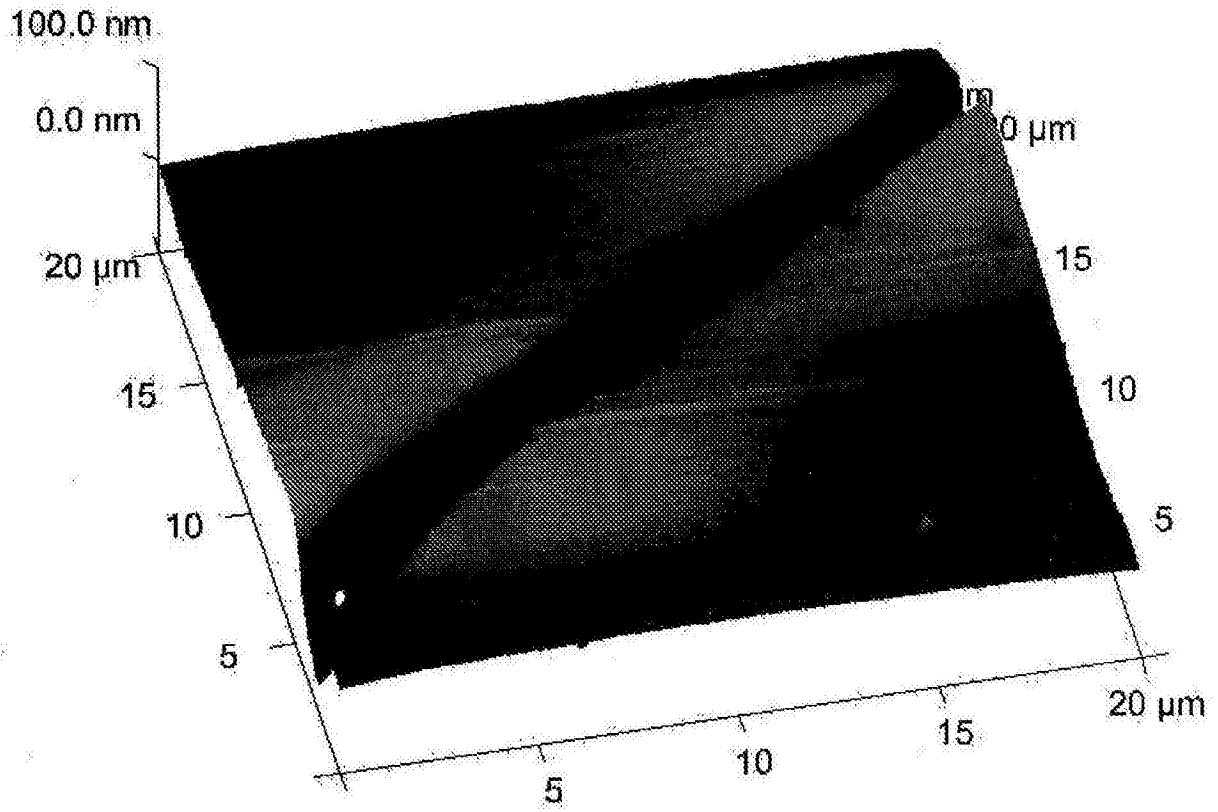


图10

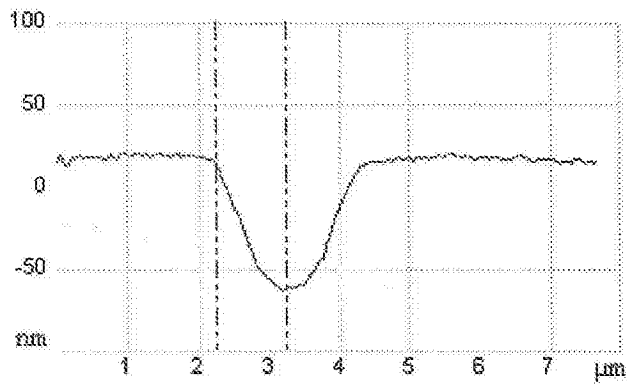


图11

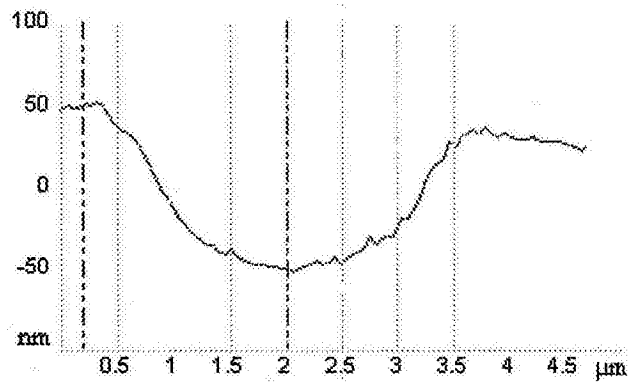


图12

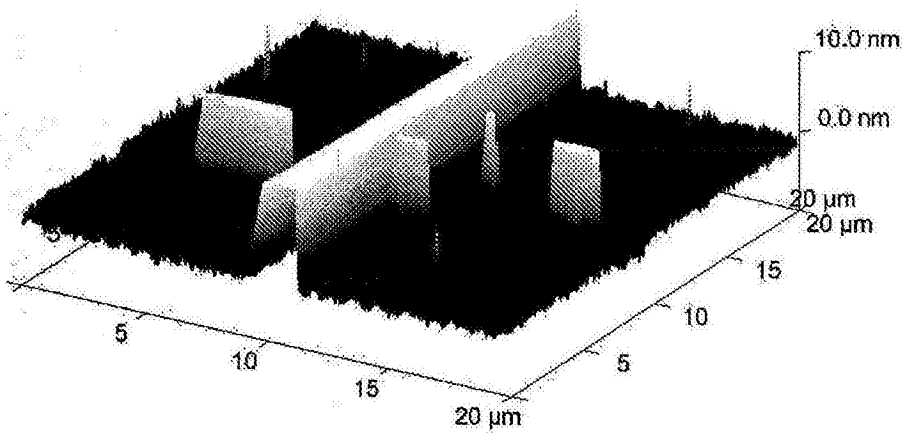


图13

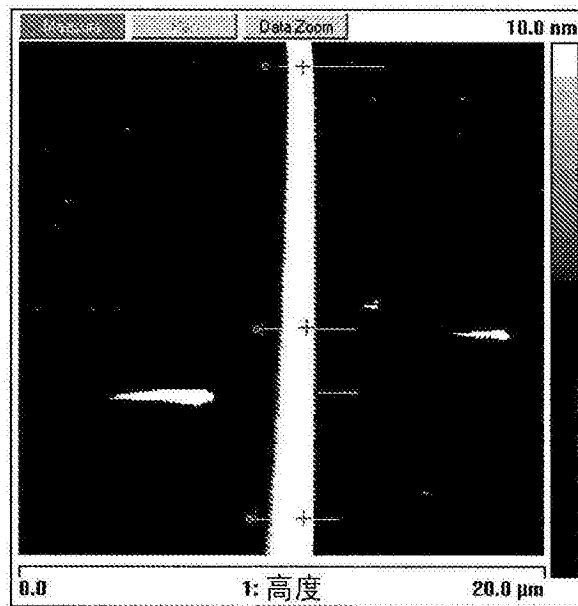


图14A

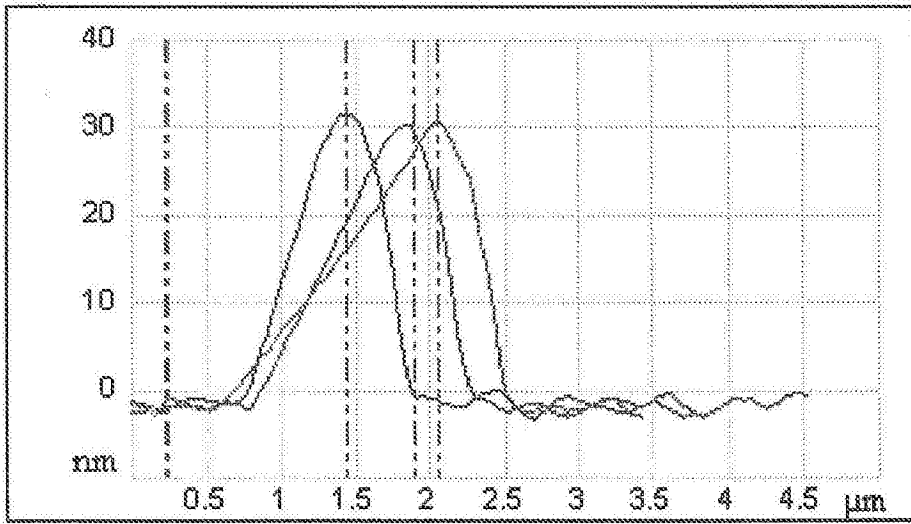


图14B

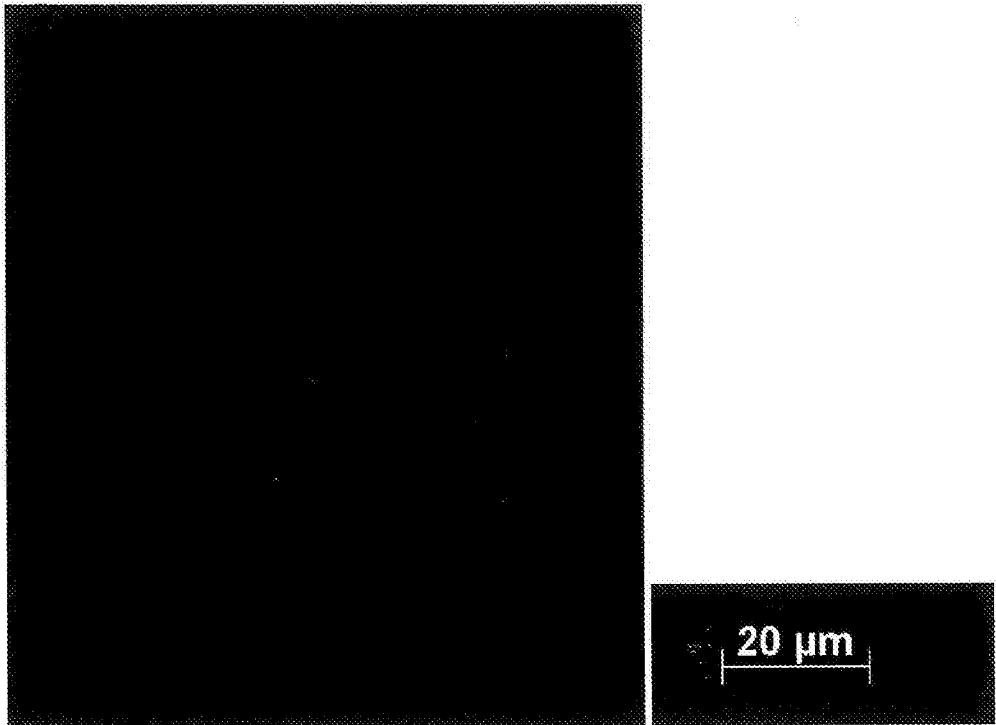
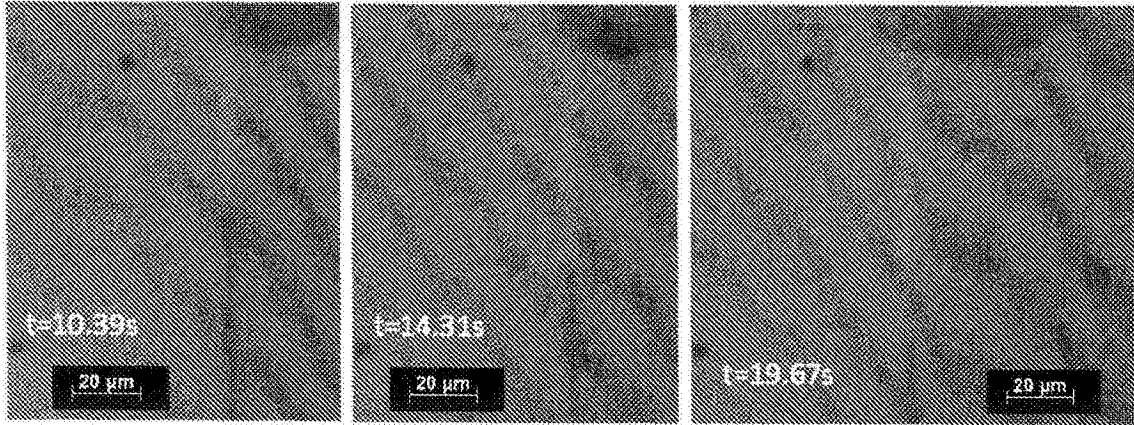


图15

1.5 μm宽和 30nm高的通道



流下聚合物纳米通道的携带 CY3*DNA 的缓冲液

图16

过纳米尺度的通道的 DNA 转运

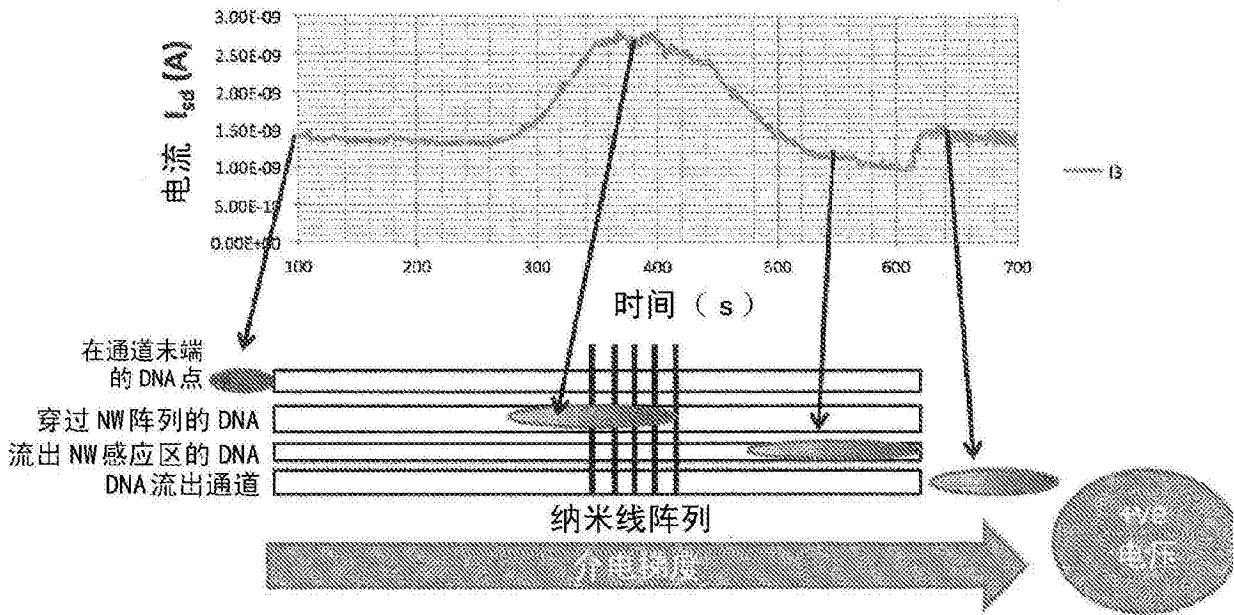


图17