



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116848266 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 03

(21) 申请号 202180093794.9

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司  
11332

(22) 申请日 2021.12.15

专利代理师 刘明海 胡彬

(30) 优先权数据

63/125,634 2020.12.15 US

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6874 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/063637 2021.12.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/132979 EN 2022.06.23

(71) 申请人 宽腾矽公司

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 布莱恩·瑞德 李安

奥马尔·阿德 黄海冬 陈国钧

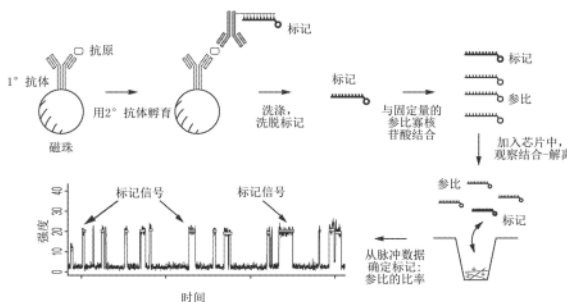
权利要求书8页 说明书27页 附图22页

(54) 发明名称

超灵敏生物传感器方法

(57) 摘要

本文提供了用于超灵敏检测生物样品中的靶分子(例如靶核酸或靶蛋白)的方法和装置。在一些实施方案中,方法和装置能够超灵敏确定靶分子的浓度。



1. 一种确定样品中靶分子的浓度的方法,所述方法包括:

(i) 使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物,其中所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面;

(ii) 使所述多个第一复合物与对第一复合物具有结合亲和力的多个第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的多个第二复合物,其中所述第二亲和剂的至少一部分与标记分子连接;

(iii) 任选地去除未结合的第二亲和剂和/或分离所述多个第二复合物;

(iv) 任选地从所述多个第二复合物的结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段;

(v) 将标记分子的所述区段与已知浓度的参比分子相结合;

(vi) 确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及

(vii) 至少部分地基于所述标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中靶分子的浓度。

2. 一种确定样品中靶分子的浓度的方法,所述方法包括:

(i) (a) 使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物;

(i) (b) 将所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面;

(ii) 使所述多个第一复合物与对第一复合物具有结合亲和力的多个第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的多个第二复合物,其中所述第二亲和剂的至少一部分与标记分子连接;

(iii) 任选地去除未结合的第二亲和剂和/或分离所述多个第二复合物;

(iv) 任选地从所述多个第二复合物的结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段;

(v) 将分离的标记分子的区段与已知浓度的参比分子相结合;

(vi) 确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及

(vii) 至少部分地基于所述标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中靶分子的浓度。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述样品是生物样品。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述生物样品是单细胞、哺乳动物细胞组织、动物样品、真菌样品或植物样品。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述生物样品是血液样品、唾液样品、痰液样品、粪便样品、尿液样品、口腔拭子样品、羊膜样品、精液样品、滑液样品、脊髓样品或胸腔积液样品。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述靶分子是蛋白质、小分子或核酸。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述核酸是DNA和/或RNA分子。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中(i)和/或(ii)所述的接触在4-37°C,任选地4-25°C的温度下进行。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中(i)和/或(ii)的所述接触进行5分钟

至4小时。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一亲和剂是抗体或适体,所述靶分子是抗原,任选地,其中所述抗原是蛋白质、肽或多糖。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第一亲和剂是抗体或适体,所述靶分子是蛋白质,所述抗体或适体与靶分子的表位特异性结合。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到固相珠、微流体通道、纳米孔、树脂、基质、膜、聚合物、塑料、金属或玻璃的表面。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述固相珠是磁珠。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述第二亲和剂是抗体。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个标记分子与至少一个荧光团连接。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个标记分子与2、3、4或5个不同的荧光团连接。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个标记分子与2、3、4或5个相同的荧光团连接。

18. 根据权利要求1-14中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包括在(iv)之后将至少一个荧光团与每个标记分子化学连接。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个标记分子包括与至少一个荧光团连接的化学接头。

20. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中每个标记分子包括与至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。

21. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中每个标记分子包括与核酸和至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。

22. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中每个标记分子是标记核酸,其中每个第二亲和剂与所述标记核酸的第一链连接,并且任选地,其中所述第一链的长度为5-50个核碱基。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述标记核酸的第一链通过生物素-链霉亲和素复合物与第二亲和剂连接。

24. 根据权利要求22或23所述的方法,其中所述标记核酸是单链核酸。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述单链核酸包括形成发夹环的区域。

26. 根据权利要求24或25所述的方法,其中所述单链核酸与至少一个荧光团连接。

27. 根据权利要求22或23所述的方法,其中所述标记核酸是包含第一链和第二链的双链核酸,所述第二链包括与第一链互补的区域。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述第二链与至少一个荧光团连接。

29. 根据权利要求22或23所述的方法,其中所述标记核酸包括第一链和核酸哑铃,其中所述核酸哑铃的第一区域与第一链互补。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述核酸哑铃与至少一个荧光团连接。

31. 根据权利要求29所述的方法,其中所述标记核酸进一步包括与核酸哑铃的第二区域互补的第二单链核酸。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述第二单链核酸与至少一个荧光团连接。
33. 根据权利要求22或23所述的方法,其中所述标记核酸包括第一链和第二单链核酸,其中所述第一链包括形成发夹环的区域。
34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述第二单链核酸与至少一个荧光团连接。
35. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中(i)和(ii)同时或串联发生。
36. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中(iii)包括通过用洗涤缓冲液洗涤样品来去除未结合的第二亲和剂。
37. 根据权利要求36所述的方法,其中洗涤缓冲液是磷酸盐缓冲盐水。
38. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中(iv)包括通过用洗脱缓冲液洗涤样品来从结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段。
39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述洗脱缓冲液是高盐缓冲液。
40. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中(iv)包括通过改变样品的温度(例如升高温度)来从结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段。
41. 根据权利要求22、23、27或28中任一项所述的方法,其中所述标记核酸是双链标记核酸,其中所述第二亲和剂与所述双链标记核酸的第一链连接,并且其中分离的标记核酸的区段是双链标记核酸的第二链。
42. 根据权利要求41所述的方法,其中(iv)包括通过用过量的与双链标记核酸的第一链互补的单链核酸洗涤样品来分离出双链标记核酸的第二链。
43. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个参比分子与至少一个荧光团连接,其中与参比分子连接的所述荧光团不同于与标记分子连接的至少一个荧光团。
44. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述与参比分子连接的至少一个荧光团和所述与标记分子连接的至少一个荧光团可以被相同的激发波长激发。
45. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个参比分子是参比核酸。
46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述参比核酸是单链或双链核酸。
47. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个参比分子与所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到同一表面。
48. 根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中每个参比分子固定到不同于固定所述多个第一亲和剂的至少一部分的表面的表面。
49. 根据权利要求1-45中任一项所述的方法,其中每个参比分子与第一亲和剂连接。
50. 根据权利要求47-49中任一项所述的方法,其中每个参比分子是复合物,所述复合物包括固定到表面或与第一亲和剂连接的单链核酸和包含与单链核酸互补的区域的哑铃状核酸。
51. 根据权利要求47-49中任一项所述的方法,其中所述参比分子在(iv)期间分离。
52. 根据权利要求1-51中任一项所述的方法,其中所述标记分子是标记核酸,所述参比分子是参比核酸,并且所述标记核酸和参比核酸在(iv)期间扩增,任选地使用滚环扩增。
53. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在(v)中将分离的标记分子的区段和已知浓度的参比分子在检测芯片中相结合。
54. 根据权利要求53所述的方法,其中所述检测芯片包括有序的样品孔阵列。
55. 根据权利要求54所述的方法,其中每个样品孔的深度为50-500nm,任选地约300nm。

56. 根据权利要求54或55所述的方法,其中每个样品孔的内部基底的直径为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地约100nm。

57. 根据权利要求54所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被含硅烷的化合物功能化。

58. 根据权利要求54或57所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被生物素-链霉亲和素复合物功能化。

59. 根据权利要求55-58中任一项所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被带正电荷的分子功能化。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被40-300个正电荷/1000nm<sup>2</sup>功能化。

61. 根据权利要求59或60所述的方法,其中所述带正电荷的分子是聚赖氨酸分子。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述多赖氨酸分子包括10-200个赖氨酸氨基酸,任选地20-100个赖氨酸氨基酸,进一步任选地50个赖氨酸氨基酸。

63. 根据权利要求59或60所述的方法,其中所述带正电荷的分子是带正电荷的封端硅烷分子。

64. 根据权利要求54-58中任一项所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸功能化。

65. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中标记分子相对于参比分子的比率是使用荧光测量确定的。

66. 根据权利要求54-65中任一项所述的方法,其中标记分子相对于参比分子的比率是使用样品孔中标记分子和参比分子的荧光测量确定的。

67. 根据权利要求54-65中任一项所述的方法,其中标记分子相对于参比分子的比率是部分地基于标记分子和参比分子在样品孔中的停留时间确定的。

66. 根据权利要求66或67所述的方法,其中标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处的带正电荷的分子的静电相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。

67. 根据权利要求66或67所述的方法,其中标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸的相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。

68. 根据权利要求66或67所述的方法,其中标记分子和参比分子通过重力或磁场被递送到样品孔并保持在样品孔中。

69. 根据权利要求66或67所述的方法,其中标记分子和参比分子使用填充试剂被递送到样品孔并保持在样品孔中,任选地,其中所述填充试剂是糖分子、甲基纤维素、聚乙二醇、葡聚糖、ficoll、牛血清白蛋白或海藻糖。

70. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中样品中靶分子的浓度是利用从包含已知浓度的标记分子和参比分子的标准样品的测量值得出的标准曲线确定的。

71. 一种检测芯片,其包括样品孔阵列,其中每个样品孔的基底被带正电荷的分子功能化,任选地,其中所述基底是内部基底。

72. 根据权利要求71所述的芯片,其中所述样品孔阵列是有序阵列。

73. 根据权利要求71或72所述的芯片,其中每个样品孔的深度为50-500nm,任选地约

300nm。

74. 根据权利要求71-73中任一项所述的芯片,其中每个样品孔的内部基底的直径为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地100nm。

75. 根据权利要求71-74中任一项所述的芯片,其中所述带正电荷的分子使用含硅烷的化合物附着至每个样品孔的内部基底。

76. 根据权利要求71-75中任一项所述的芯片,其中所述带正电荷的分子使用生物素-链霉亲和素复合物附着至每个样品孔的内部基底。

77. 根据权利要求71-76中任一项所述的芯片,其中每个样品孔的内部基底被40-300个正电荷/1000nm<sup>2</sup>功能化。

78. 根据权利要求71-77任一项所述的芯片,其中所述带正电荷的分子是聚赖氨酸分子。

79. 根据权利要求78所述的芯片,其中所述多赖氨酸分子包括10-200个赖氨酸氨基酸,任选地20-100个赖氨酸氨基酸,进一步任选地50个赖氨酸氨基酸。

80. 根据权利要求71-77中任一项所述的芯片,其中所述带正电荷的分子是带正电荷的封端硅烷分子。

81. 一种确定样品中标记的靶分子的浓度的方法,所述方法包括:

将含有标记的靶分子的样品与已知浓度的参比分子相结合;

确定标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及

至少部分基于标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率,确定样品中标记的靶分子的浓度。

82. 根据权利要求81所述的方法,其中所述标记的靶分子是蛋白质、小分子或核酸。

83. 根据权利要求82所述的方法,其中所述核酸是DNA和/或RNA分子。

84. 根据权利要求81-83中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子与至少一个荧光团连接。

85. 根据权利要求81-84中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子与2、3、4或5个不同的荧光团连接。

86. 根据权利要求81-84中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子与2、3、4或5个相同的荧光团连接。

87. 根据权利要求81-86中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子包括与至少一个荧光团连接的化学接头。

88. 根据权利要求81-86中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子包括与至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。

89. 根据权利要求81-86中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子包括与核酸和至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。

90. 根据权利要求81-89中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子是单链核酸。

91. 根据权利要求90所述的方法,其中所述单链核酸包括形成发夹环的区域。

92. 根据权利要求81-89中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子是包含第一链和第二链的双链核酸,所述第二链包括与第一链互补的区域。

93. 根据权利要求81-89中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子是包含第一链和

核酸哑铃的核酸,其中所述核酸哑铃的第一区域与第一链互补。

94. 根据权利要求93所述的方法,其中所述标记的靶分子进一步包括与核酸哑铃的第二区域互补的第二单链核酸。

95. 根据权利要求81-89中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子包括第一链和第二单链核酸,其中所述第一链包括形成发夹环的区域。

96. 根据权利要求81-95中任一项所述的方法,其中每个参比分子与至少一个荧光团连接,其中与参比分子连接的荧光团不同于与标记的靶分子连接的至少一个荧光团。

97. 根据权利要求81-96中任一项所述的方法,其中与参比分子连接的至少一个荧光团和与标记的靶分子连接的至少一个荧光团可以被相同的激发波长激发。

98. 根据权利要求81-97中任一项所述的方法,其中每个参比分子是参比核酸。

99. 根据权利要求98所述的方法,其中所述参比核酸是单链或双链核酸。

100. 根据权利要求81-99中任一项所述的方法,其中每个标记的靶分子固定到表面。

101. 根据权利要求81-100中任一项所述的方法,其中每个参比分子固定到表面。

102. 根据权利要求101所述的方法,其中每个参比分子固定到不同于固定标记的靶分子的表面的表面。

103. 根据权利要求81-102中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子是标记核酸,所述参比分子是参比核酸。

104. 根据权利要求81-103中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子和已知浓度的参比分子在检测芯片中相结合。

105. 根据权利要求104所述的方法,其中所述检测芯片包括有序的样品孔阵列。

106. 根据权利要求105所述的方法,其中每个样品孔的深度为50-500nm,任选地约300nm。

107. 根据权利要求105或106所述的方法,其中每个样品孔的内部基底的直径为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地约100nm。

108. 根据权利要求107所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被含硅烷的化合物功能化。

109. 根据权利要求107或108所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被生物素-链霉亲和素复合物功能化。

110. 根据权利要求107-109中任一项所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被带正电荷的分子功能化。

111. 根据权利要求110所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被40-300个正电荷/ $1000\text{nm}^2$ 功能化。

112. 根据权利要求110或111所述的方法,其中所述带正电荷的分子是聚赖氨酸分子。

113. 根据权利要求112所述的方法,其中所述多赖氨酸分子包括10-200个赖氨酸氨基酸,任选地20-100个赖氨酸氨基酸,进一步任选地50个赖氨酸氨基酸。

114. 根据权利要求110或111所述的方法,其中所述带正电荷的分子是带正电荷的封端硅烷分子。

115. 根据权利要求107-114中任一项所述的方法,其中每个样品孔的内部基底被与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸功能化。

116. 根据权利要求81-115中任一项所述的方法,其中标记的靶分子相对于参比分子的比率是使用荧光测量确定的。

117. 根据权利要求105-116中任一项所述的方法,其中标记的靶分子相对于参比分子的比率是使用样品孔中标记和参比分子的荧光测量确定的。

118. 根据权利要求105-117中任一项所述的方法,其中标记的靶分子相对于参比分子的比率是部分基于标记分子和参比分子在样品孔中的停留时间确定的。

119. 根据权利要求117或118所述的方法,其中标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处的带正电荷的分子的静电相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。

120. 根据权利要求117或118所述的方法,其中标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸的相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。

121. 根据权利要求117或118所述的方法,其中标记分子和参比分子通过重力或磁场被递送到样品孔并保持在样品孔中。

122. 根据权利要求117或118所述的方法,其中标记分子和参比分子利用填充试剂被递送到样品孔并保持在样品孔中,任选地,其中所述填充试剂是糖分子、甲基纤维素、聚乙二醇、葡聚糖、ficoll、牛血清白蛋白或海藻糖。

123. 根据权利要求81-122中任一项所述的方法,其中样品中靶分子的浓度是利用从包含已知浓度的标记的靶分子和参比分子的标准样品的测量值得出的标准曲线确定的。

124. 根据权利要求1-70中任一项所述的方法,其中所述标记的靶分子或标记分子进一步包括分子条形码。

125. 一种确定靶分子身份的方法,所述方法包括:

(i) 使靶分子与对靶分子具有结合亲和力的第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的第一复合物,其中所述第一亲和剂固定到固相珠的表面,并且其中标记分子附着至固相珠的表面;

(ii) 使第一复合物与表面固定化的对靶分子具有结合亲和力的第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的第二复合物;

(iii) 任选地洗涤所述第二复合物;

(iv) 分离所述标记分子;

(v) 使分离的标记分子与包含样品孔的检测芯片接触,其中已知分子附着至样品孔;以及

(vi) 利用荧光、发光和/或动力学测量确定所述标记分子的身份,从而鉴定所述靶分子。

126. 一种确定靶分子身份的方法,所述方法包括:

(i) 使靶分子与对靶分子具有结合亲和力的第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的第一复合物,其中所述第一亲和剂固定到固相珠的表面;

(ii) 使所述第一复合物与对靶分子具有结合亲和力的第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的第二复合物,其中所述第二亲和剂附着至标记分子;

(iii) 任选地洗涤所述第二复合物;

(iv) 分离所述标记分子;

(v) 使分离的标记分子与包含样品孔的检测芯片接触,其中已知分子附着至样品孔;以及

(vi) 利用荧光、发光和/或动力学测量确定所述标记分子的身份,从而鉴定所述靶分子。

127. 根据权利要求125或126所述的方法,其中所述标记分子是标记核酸。

128. 根据权利要求127所述的方法,其中所述已知分子是已知核酸,任选地,其中所述已知核酸与标记核酸互补。

129. 根据权利要求125-128中任一项所述的方法,其中动力学测量包括标记分子在样品孔中的停留时间。

130. 根据权利要求125-129中任一项所述的方法,其中所述靶分子是蛋白质、小分子或核酸。

131. 根据权利要求130所述的方法,其中所述核酸是DNA或RNA。

132. 根据权利要求125-129中任一项所述的方法,其中所述第一亲和剂是抗体或适体,所述靶分子是抗原,任选地,其中所述抗原是蛋白质、肽或多糖。

133. 根据权利要求125-132中任一项所述的方法,其中所述固相珠是塑料、聚合物、玻璃或磁珠。

134. 根据权利要求125-133中任一项所述的方法,其中所述第二亲和剂是抗体。

135. 根据权利要求125-134中任一项所述的方法,其中所述标记分子与至少一个荧光团连接。

136. 根据权利要求125-135中任一项所述的方法,其中所述检测芯片包括有序的样品孔阵列。

137. 根据权利要求136所述的方法,其中每个样品孔的深度为50-500nm,任选地约300nm。

138. 根据权利要求136或137所述的方法,其中每个样品孔的内部基底的直径为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地约100nm。

139. 根据权利要求125-138中任一项所述的方法,其中所述标记分子进一步包括分子条形码。

## 超灵敏生物传感器方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求于2020年12月15日提交的美国临时专利申请号63/125,634的优先权,其全部内容通过引用的方式并入本文。

### 背景技术

[0003] 对于学术和工业研究、环境评估、食品安全、医疗诊断以及化学、生物和/或放射性战争剂的检测来说,能够快速准确地检测并在某些情况下量化样品中的靶分析分子的方法和系统是必不可少的分析测量手段。以前用于量化样品中的低水平分析分子的大多数技术都使用放大程序来增加报告分子的数量,以便能够提供可测量的信号。例如,这些已知方法包括在基于抗体的测定中用于放大信号的酶联免疫吸附测定(ELISA),以及在基于DNA的测定中用于放大靶DNA链的聚合酶链式反应(PCR)。

[0004] 这些已知方法和/或系统都基于集合反应,其中许多分析分子会产生测量信号。大多数检测方案都要求在集合中存在大量分子,以使集合信号高于检测阈值。这一要求限制了大多数检测技术的灵敏度和动态范围(例如可检测的浓度范围)。许多已知方法还存在非特异性结合的问题,这会导致背景信号增加,从而限制了可准确或可重复检测的最低浓度。

[0005] 因此,需要改进方法来检测和量化样品中的靶分子,特别是在此类分子或颗粒以极低浓度存在的样品中。

### 发明内容

[0006] 本公开的各个方面提供了方法、组合物、装置和/或盒(cartridge)或检测芯片,其用于工艺中,例如,以确定样品中靶分子的数量(如浓度)。本公开的一些方面提供了一种确定样品中靶分子(例如标记的靶分子)的浓度的方法。

[0007] 在一些实施方案中,确定样品中靶分子的浓度的方法包括:(i)使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物,其中所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面;(ii)使所述多个第一复合物与对第一复合物具有结合亲和力的多个第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的多个第二复合物,其中第二亲和剂的至少一部分与标记分子连接;(iii)去除未结合的第二亲和剂和/或分离多个第二复合物;(iv)任选地从所述多个第二复合物的结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段;(v)将标记分子区段与已知浓度的参比分子相结合;(vi)确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及(vii)至少部分地基于所述标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中靶分子的浓度。

[0008] 在一些实施方案中,确定样品中靶分子的浓度的方法包括:(i) (a)使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物;(i) (b)将所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面;(ii)使所述多个第一复合物与对第一复合物具有结合亲和力的多个第二亲和剂接触,以产

生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的多个第二复合物,其中第二亲和剂的至少一部分与标记分子连接;(iii)去除未结合的第二亲和剂和/或分离多个第二复合物;(iv)任选地从所述多个第二复合物的结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段;(v)使分离的标记分子区段与已知浓度的参比分子结合;(vi)确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及(vii)至少部分地基于所述标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中靶分子的浓度。

[0009] 在一些实施方案中,确定样品中标记的靶分子的浓度的方法包括:使含有标记的靶分子的样品与已知浓度的参比分子结合;确定标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及至少部分地基于所述标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中标记的靶分子的浓度。

[0010] 在一些实施方案中,所述样品是生物样品。在一些实施方案中,所述生物样品是单细胞、哺乳动物细胞组织、动物样品、真菌样品或植物样品。在一些实施方案中,所述生物样品是血液样品、唾液样品、痰液样品、粪便样品、尿液样品、口腔拭子样品、羊膜样品、精液样品、滑液样品、脊髓样品或胸腔积液样品。

[0011] 在一些实施方案中,所述靶分子是蛋白质、小分子或核酸。在一些实施方案中,所述核酸是DNA和/或RNA分子。

[0012] 在一些实施方案中,(i)和/或(ii)的接触是在4-37°C,任选地4-25°C的温度下进行的。在一些实施方案中,(i)和/或(ii)的接触进行5分钟至4小时。

[0013] 在一些实施方案中,所述第一亲和剂是抗体或适体,所述靶分子是抗原,任选地,其中所述抗原是蛋白质、肽或多糖。在一些实施方案中,所述第一亲和剂是抗体或适体,所述靶分子是蛋白质,所述抗体或适体与靶分子的表位特异性结合。

[0014] 在一些实施方案中,所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到固相珠、微流体通道、纳米孔、树脂、基质、膜、聚合物、塑料、金属或玻璃的表面。在一些实施方案中,所述固相珠是磁珠。

[0015] 在一些实施方案中,所述第二亲和剂是抗体。

[0016] 在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)与至少一个荧光团连接。在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)与2、3、4或5个不同的荧光团连接。在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)与2、3、4或5个相同的荧光团连接。

[0017] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在(iv)之后将至少一个荧光团与每个标记分子(例如标记的靶分子)化学连接。

[0018] 在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)包含与至少一个荧光团连接的化学接头。在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)包含与至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)包含与核酸和至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。在一些实施方案中,每个标记分子(例如标记的靶分子)是标记核酸,其中每个第二亲和剂与标记核酸的第一链连接,任选地,其中第一链的长度为5-50个核碱基。

[0019] 在一些实施方案中,标记核酸的第一链通过生物素-链霉亲和素复合物与第二亲和剂连接。在一些实施方案中,标记核酸是单链核酸。在一些实施方案中,单链核酸包含形成发夹环的区域。在一些实施方案中,单链核酸与至少一个荧光团连接。

[0020] 在一些实施方案中,标记核酸是包含第一链和第二链的双链核酸,所述第二链包含与第一链互补的区域。在一些实施方案中,第二链与至少一个荧光团连接。

[0021] 在一些实施方案中,标记核酸包括第一链和核酸哑铃(nucleic acid dumbbell),其中核酸哑铃的第一区域与第一链互补。在一些实施方案中,核酸哑铃与至少一个荧光团连接。在一些实施方案中,标记核酸进一步包括与核酸哑铃的第二区域互补的第二单链核酸。在一些实施方案中,第二单链核酸与至少一个荧光团连接。

[0022] 在一些实施方案中,标记核酸包括第一链和第二单链核酸,其中第一链包括形成发夹环的区域。在一些实施方案中,第二单链核酸与至少一个荧光团连接。

[0023] 在一些实施方案中,(i)和(ii)同时发生或串联发生。在一些实施方案中,(iii)包括通过用洗涤缓冲液洗涤样品来去除未结合的第二亲和剂。在一些实施方案中,洗涤缓冲液是磷酸盐缓冲盐水。在一些实施方案中,(iv)包括通过用洗脱缓冲液洗涤样品从结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子(例如标记的靶分子)的至少一个区段。在一些实施方案中,洗脱缓冲液是高盐缓冲液。在一些实施方案中,(iv)包括通过改变样品的温度(例如升高温度)来从结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子(例如标记的靶分子)的至少一个区段。

[0024] 在一些实施方案中,标记核酸是双链标记核酸,其中第二亲和剂与双链标记核酸的第一链连接,并且其中分离的标记核酸区段是双链标记核酸的第二链。

[0025] 在一些实施方案中,(iv)包括通过用过量的与双链标记核酸的第一链互补的单链核酸洗涤样品来分离出双链标记核酸的第二链。

[0026] 在一些实施方案中,每个参比分子与至少一个荧光团连接,其中与参比分子连接的荧光团不同于与标记分子连接的至少一个荧光团。在一些实施方案中,与参比分子连接的至少一个荧光团和与标记分子(例如标记的靶分子)连接的至少一个荧光团可以被相同的激发波长激发。在一些实施方案中,每个参比分子是参比核酸。在一些实施方案中,参比核酸是单链或双链核酸。在一些实施方案中,每个参比分子与多个第一亲和剂的至少一部分固定到同一表面。在一些实施方案中,每个参比分子固定到不同于固定所述多个第一亲和剂的至少一部分的表面的表面。在一些实施方案中,每个参比分子与第一亲和剂连接。在一些实施方案中,每个参比分子是包含固定到表面或与第一亲和剂连接的单链核酸和哑铃状核酸的复合物,所述哑铃状核酸包含所述单链核酸的互补区。在一些实施方案中,所述参比分子在(iv)期间分离。

[0027] 在一些实施方案中,所述标记分子(例如标记的靶分子)是标记核酸,所述参比分子是参比核酸,所述标记核酸和参比核酸在(iv)期间扩增,任选地使用滚环扩增。

[0028] 在一些实施方案中,所述标记分子(例如标记的靶分子)(或标记分子的区段)和已知浓度的参比分子在检测芯片中相结合。在一些实施方案中,所述检测芯片包含有序的样品孔阵列。

[0029] 在一些实施方案中,每个样品孔的深度为50-500nm,任选地约300nm。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底直径为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地约100nm。

[0030] 在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底被含硅烷的化合物功能化。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底被生物素-链霉亲和素复合物功能化。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底被带正电荷的分子功能化。在一些实施方案中,每个样品孔的内

部基底被40-300个正电荷/1000nm<sup>2</sup>功能化。在一些实施方案中,带正电荷的分子是聚赖氨酸分子。在一些实施方案中,聚赖氨酸分子包括10-200个赖氨酸氨基酸,任选地20-100个赖氨酸氨基酸,进一步任选地50个赖氨酸氨基酸。在一些实施方案中,带正电荷的分子是带正电荷的封端硅烷分子。

[0031] 在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底被与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸功能化。

[0032] 在一些实施方案中,使用荧光测量来确定标记分子(例如标记的靶分子)相对于参比分子的比率。在一些实施方案中,使用样品孔中标记分子和参比分子的荧光测量来确定标记分子(例如标记的靶分子)相对于参比分子的比率。在一些实施方案中,基于标记分子和参比分子在样品孔中的停留时间来确定标记分子(例如标记的靶分子)相对于参比分子的比率。

[0033] 在一些实施方案中,标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处的带正电荷的分子的静电相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。在一些实施方案中,标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸的相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。在一些实施方案中,标记分子和参比分子通过重力或磁场被递送到样品孔并保持在样品孔中。在一些实施方案中,标记分子和参比分子利用填充试剂被递送到样品孔并保持在样品孔中,任选地,其中填充试剂是糖分子、甲基纤维素、聚乙二醇、葡聚糖、ficoll、牛血清白蛋白或海藻糖。

[0034] 在一些实施方案中,样品中靶分子的浓度是利用从包含已知浓度的标记分子(例如标记的靶分子)和参比分子的标准样品的测量值中得出的标准曲线确定的。

[0035] 本公开的一些方面提供了一种检测芯片,其包括样品孔阵列,其中每个样品孔的内部基底被带正电荷的分子功能化。

[0036] 在一些实施方案中,样品孔阵列是有序阵列。在一些实施方案中,每个样品孔的深度为50-500nm,任选地约300nm。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底的直径为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地100nm。

[0037] 在一些实施方案中,使用含硅烷的化合物将带正电荷的分子附着至每个样品孔的内部基底。在一些实施方案中,使用生物素-链霉亲和素复合物将带正电荷的分子附着至每个样品孔的内部基底。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底用40-300个正电荷/1000nm<sup>2</sup>功能化。在一些实施方案中,带正电荷的分子是聚赖氨酸分子。在一些实施方案中,聚赖氨酸分子包括10-200个赖氨酸氨基酸,任选地20-100个赖氨酸氨基酸,进一步任选地50个赖氨酸氨基酸。在一些实施方案中,带正电荷的分子是带正电荷的封端硅烷分子。

[0038] 在一些实施方案中,标记的靶分子或标记分子进一步包括分子条形码。

[0039] 本公开的一些方面提供了一种确定靶分子的身份的方法。

[0040] 在一些实施方案中,确定靶分子的身份的方法包括:(i)使靶分子与对靶分子具有结合亲和力的第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的第一复合物,其中所述第一亲和剂固定到固相珠的表面,并且其中标记分子附着至固相珠的表面;(ii)使所述第一复合物与表面固定化的对靶分子具有结合亲和力的第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的第二复合物;(iii)任选地洗涤第二复合物;(iv)分离标记分子;(v)使分离的标记分子与包含样品孔的检测芯片接触,其中已知分子附着至样品

孔;以及(vi)利用荧光、发光和/或动力学测量来确定标记分子的身份,从而鉴定靶分子。

[0041] 在一些实施方案中,确定靶分子的身份的方法包括:(i)使靶分子与对靶分子具有结合亲和力的第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的第一复合物,其中第一亲和剂固定到固相珠的表面;(ii)使第一复合物与对靶分子具有结合亲和力的第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的第二复合物,其中第二亲和剂附着至标记分子;(iii)任选地洗涤第二复合物;(iv)分离标记分子;(v)使分离的标记分子与包含样品孔的检测芯片接触,其中已知分子附着至样品孔;以及(vi)利用荧光、发光和/或动力学测量确定标记分子的身份,从而鉴定靶分子。

[0042] 在一些实施方案中,所述标记分子是标记核酸。在一些实施方案中,所述已知分子是已知核酸,任选地,其中已知核酸与标记核酸互补。

[0043] 在一些实施方案中,动力学测量包括标记分子在样品孔中的停留时间。

[0044] 在一些实施方案中,所述靶分子是蛋白质、小分子或核酸。在一些实施方案中,所述核酸是DNA或RNA。

[0045] 在一些实施方案中,所述第一亲和剂是抗体或适体,所述靶分子是抗原,任选地,其中所述抗原是蛋白质、肽或多糖。

[0046] 在一些实施方案中,所述固相珠是塑料、聚合物、玻璃或磁珠。

[0047] 在一些实施方案中,所述第二亲和剂是抗体。

[0048] 在一些实施方案中,所述标记分子与至少一个荧光团连接。

[0049] 在一些实施方案中,所述检测芯片包含有序的样品孔阵列。每个样品孔的深度可以为50-500nm,任选地约300nm。每个样品孔的内部基底的直径可以为50-250nm,任选地75-125nm,进一步任选地约100nm。

[0050] 在一些实施方案中,所述标记分子进一步包括分子条形码。

## 附图说明

[0051] 图1显示了利用单链标记和参比核酸的本公开方法的示例工作流程。

[0052] 图2显示了利用双链标记和参比核酸的本公开方法的示例工作流程。

[0053] 图3显示了利用哑铃标记和参比核酸的本公开方法的示例工作流程。

[0054] 图4显示了参比分子相对于标记分子的示例位置(左)和标记分子的几种实施方案(右)。

[0055] 图5显示了标记分子和参比分子的示例构造。

[0056] 图6显示了将标记分子和参比分子递送到样品孔的几种方法示例。

[0057] 图7显示了样品孔表面固定化的示例。

[0058] 图8显示了用聚赖氨酸功能化的检测芯片的内部基底的示例。

[0059] 图9显示了用带正电荷的硅烷功能化的检测芯片的内部基底的示例。

[0060] 图10A-10D显示了使用本文所述的检测芯片的动态脉冲行为。图10A显示了代表性的孔径轨迹。图10B显示了15分钟期间内脉冲计数的直方图(脉冲速率)。图10C显示了用荧光团标记的两种不同核酸的簇分离,其中脉冲持续时间大于0.3的脉冲在bin比值上有明显差异。图10D显示了脉冲持续时间的直方图。

[0061] 图11A-11B显示了用含环辛炔分子(图11A)和生物素-链霉亲和素复合物(图11B)

修饰抗体的示例方法。

[0062] 图12A-12D显示了从包含第一亲和剂和第二亲和剂的复合物(例如三明治抗体-抗原复合物)中洗脱核酸分子(例如标记分子)的示例策略。

[0063] 图13显示了一个示例轨迹,表明在加入标记的dsDNA后,由于dsDNA与纳米孔底部处的PLL功能化表面的可逆结合,启动了脉冲。

[0064] 图14显示了在检测各含有Cy3和Atto-Rho6G标记的25pM dsDNA的样品运行期间,在互补金属-氧化物-半导体(CMOS)传感器的寿命敏感性时间bin中收集的相对信号的测量值,所述测量值与染料的荧光寿命(bin比值)相对应。

[0065] 图15A-15B提供了本公开方法所用到的示例工作流程。

### 具体实施方式

[0066] 在一些方面,本公开提供了生物传感器检测方法(例如,准确确定靶分子的量,如浓度)。在一些实施方案中,生物传感器检测方法(例如,确定样品中标记的靶分子的浓度)包括将含有标记的靶分子的样品与已知浓度的参比分子相结合;确定标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及至少部分基于标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中标记的靶分子的浓度。在一些实施方案中,生物传感器检测方法包括确定靶分子的身份。

[0067] 在一些实施方案中,生物传感器检测方法(例如,确定样品中靶分子的浓度)包括:

[0068] (i) 使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物,其中所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面;

[0069] (ii) 使所述多个第一复合物与对第一复合物具有结合亲和力的多个第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的多个第二复合物,其中第二亲和剂的至少一部分与标记分子连接;

[0070] (iii) 去除未结合的第二亲和剂和/或分离多个第二复合物;

[0071] (iv) 任选地从所述多个第二复合物的结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段;

[0072] (v) 将标记分子区段与已知浓度的参比分子相结合;

[0073] (vi) 确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及

[0074] (vii) 至少部分地基于所述标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中靶分子的浓度。

[0075] 在一些实施方案中,步骤(i)包括:(i) (a) 使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物,以及(i) (b) 将所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面。

[0076] 靶分子

[0077] 靶分子可以是任何蛋白质、小分子或核酸。在一些实施方案中,靶分子是天然存在的分子。在一些实施方案中,靶分子是合成分子。在一些实施方案中,靶分子来源于生物样品或从生物样品中获得。靶分子可以是抗原。在一些实施方案中,靶分子是抗原,其中所述抗原是蛋白质、肽或多糖。

[0078] 生物样品可以是单细胞、哺乳动物细胞组织、动物样品、真菌样品或植物样品。在一些实施方案中,生物样品可以是血液样品、唾液样品、痰液样品、粪便样品、尿液样品、口腔拭子样品、羊膜样品、精液样品、滑液样品、脊髓样品或胸腔积液样品。

[0079] 在一些实施方案中,样品可以是纯化样品、细胞裂解物、单细胞、细胞群或组织。在一些实施方案中,生物样品来自人类、非人类灵长类动物、啮齿动物、狗、猫、马或任何其他哺乳动物。在一些实施方案中,生物样品来自细菌细胞培养物(例如大肠杆菌细菌细胞培养物)。细菌细胞培养物可以包括革兰氏阳性细菌细胞和/或革兰氏阴性细菌细胞。在一些实施方案中,样品是先前通过用户开发的方法从元基因组样品或环境样品中提取的核酸或蛋白质的纯化样品。血液样品可以是受试者(例如人类受试者)新鲜抽取的血液样品,或者是干燥的血液样品(例如保存在固体介质(如Guthrie卡)上)。血液样品可以包括全血、血清、血浆、红细胞和/或白细胞。

[0080] 在一些实施方案中,样品(例如,包含细胞或组织的样品)可以在本领域技术人员已知的方法中制备,例如,裂解(例如,破坏、降解和/或以其他方式消化)。在一些实施方案中,待制备,例如裂解的样品,包括培养的细胞、活检组织样品(例如癌症患者,如人类癌症患者的肿瘤活检)或任何其他临床样品。在一些实施方案中,使用任何一种已知的物理或化学方法裂解包含细胞或组织的样品,以从所述细胞或组织中释放靶分子(例如,靶核酸或靶蛋白)。在一些实施方案中,可以使用电解法、酶促法、基于去污剂的方法和/或机械均质法裂解样品。在一些实施方案中,样品(例如复合组织、革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌)可能需要串联执行多种裂解方法。在一些实施方案中,如果样品不包含细胞或组织(例如包含纯化的核酸的样品),则可省略裂解步骤。在一些实施方案中,对样品进行裂解以分离靶核酸。在一些实施方案中,对样品进行裂解以分离靶蛋白。在一些实施方案中,裂解方法进一步包括使用研磨机研磨样品、超声、表面声波(SAW)、冻融循环、加热、添加去污剂、添加蛋白质降解剂(例如酶,如水解酶或蛋白酶)和/或添加细胞壁消化酶(例如溶菌酶或zymolase)。用于裂解的示例性去污剂(例如非离子去污剂)包括聚氧乙烯脂肪醇醚、聚氧乙烯烷基苯醚、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物、聚山梨醇酯和烷基酚乙氧基化物,优选壬基酚乙氧基化物、烷基葡萄糖苷和/或聚氧乙烯烷基苯醚。在一些实施方案中,裂解方法包括在所需温度(例如至少60°C、至少70°C、至少80°C、至少90°C或至少95°C)下加热样品至少1-30分钟、1-25分钟、5-25分钟、5-20分钟、10-30分钟、5-10分钟、10-20分钟或至少5分钟。

[0081] 亲和剂

[0082] 本文所述的第一亲和剂是对靶分子具有结合亲和力的分子(例如抗体或适体)。在一些实施方案中,第一亲和剂对靶分子的结合亲和力在 $1 \times 10^{-3}$  M至 $1 \times 10^{-4}$  M、 $1 \times 10^{-4}$  M至 $1 \times 10^{-5}$  M、 $1 \times 10^{-5}$  M至 $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-6}$  M至 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M至 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M至 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M至 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M至 $1 \times 10^{-10}$  M或 $1 \times 10^{-10}$  M至 $1 \times 10^{-12}$  M之间。在一些实施方案中,第一亲和剂与靶分子(例如靶蛋白)的特定表位特异性结合。在一些实施方案中,第一亲和剂是一抗。

[0083] 第一亲和剂可固定到表面。在一些实施方案中,第一亲和剂在与其具有结合亲和力的同源靶分子接触(例如结合)之前固定到表面。在其他实施方案中,第一亲和剂在与其具有结合亲和力的同源靶分子接触(例如结合)之后,例如第一亲和剂与靶分子之间已形成复合物,固定到表面。在一些实施方案中,第一亲和剂固定到固相珠(例如磁珠,如

Dynabead)、微流体通道、纳米孔、树脂、基质、膜、聚合物、塑料、金属或玻璃。

[0084] 本文所述的第二亲和剂通常是对包含与其同源靶分子结合的第一亲和剂的复合物具有结合亲和力的分子(例如抗体或适体)。在一些实施方案中,第二亲和剂对包含与其同源靶分子结合的第一亲和剂的复合物的结合亲和力在 $1 \times 10^{-3}$  M至 $1 \times 10^{-4}$  M、 $1 \times 10^{-4}$  M至 $1 \times 10^{-5}$  M、 $1 \times 10^{-5}$  M至 $1 \times 10^{-6}$  M、 $1 \times 10^{-6}$  M至 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-7}$  M至 $1 \times 10^{-8}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M至 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M至 $1 \times 10^{-9}$  M、 $1 \times 10^{-9}$  M至 $1 \times 10^{-10}$  M或 $1 \times 10^{-10}$  M至 $1 \times 10^{-12}$  M之间。

[0085] 标记分子和参比分子

[0086] 在一些实施方案中,标记分子是与第二亲和剂连接的分子。在本文所述方法的一些实施方案中,标记分子用于表示样品中靶分子的总数量或总量(例如浓度)。可以检测标记分子以准确确定样品中靶分子的总数量或总量(例如浓度)。标记分子的检测可以使用测序技术(例如蛋白质测序或核酸测序)或荧光测量进行。

[0087] 标记分子可以包括核酸。在一些实施方案中,标记分子是标记核酸。在一些实施方案中,标记分子包括与核酸和至少一个荧光团连接的生物素-链霉亲和素复合物。在一些实施方案中,标记分子是包含两条互补链的标记核酸,其中第一链与第二亲和剂连接。

[0088] 在一些实施方案中,标记核酸的长度为5-200、5-150、5-100、5-50、5-25、10-200、10-100、10-50、25-200、25-100、25-50、50-200、50-100或100-200个核苷酸。标记核酸可以是单链或双链核酸。标记核酸可以包括二级或三级结构元件。在一些实施方案中,标记核酸包括形成发夹环的区域。在一些实施方案中,标记核酸是哑铃状核酸。在一些实施方案中,标记核酸是包含第一链和第二链的双链核酸,所述第二链包含与第一链互补的区域。

[0089] 标记分子可以如图4所示。例如,在一些实施方案中,标记核酸包括第一链和核酸哑铃,其中核酸哑铃的第一区域与第一链互补。在一些实施方案中,包含第一链和核酸哑铃的标记核酸进一步包括与核酸哑铃的第二区域互补的第二单链核酸。

[0090] 在一些实施方案中,标记分子与至少一个荧光团连接。在一些实施方案中,标记分子与1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个荧光团连接。在一些实施方案中,标记分子与1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同的荧光团(例如,每个荧光团由不同的激发波长激发)连接。在一些实施方案中,标记分子与1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个相同的荧光团(例如,每个荧光团由相同的激发波长激发)连接。

[0091] 荧光团可以在标记分子与第二亲和剂连接之前或之后与标记分子连接(例如化学连接)。在一些实施方案中,荧光团通过基于碳的化学连接与标记分子连接。在一些实施方案中,荧光团通过生物素-链霉亲和素复合物与标记分子连接。

[0092] 在一些实施方案中,参比分子是被用作样品中的内标(例如,由操作者以确定的已知量添加到样品中)的分子。在一些实施方案中,参比分子是参比核酸(例如,单链或双链核酸)。参比分子可以固定到表面(例如,与第一亲和剂相同的表面)。在一些实施方案中,参比分子与第一亲和剂连接。在一些实施方案中,参比分子不固定到任何表面。

[0093] 在一些实施方案中,参比分子是一种复合物,其包括固定到表面或与第一亲和剂连接的单链核酸和包含与单链核酸互补的区域的哑铃状核酸。

[0094] 标记分子和参比分子的检测事件的比率的确定

[0095] 在本公开的方法中,靶分子的量(例如浓度)是基于标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率来确定的,其中标记分子的检测事件代表靶分子的存在。在一些

实施方案中,检测事件可以使用测序(例如蛋白质测序或核酸测序)或荧光测量来确定。在本公开的方法中,在确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率时,参比分子的量(例如浓度)是已知的。在一些实施方案中,将样品(例如生物样品)中标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率绘制成标准曲线(例如使用已知量的标记分子和参比分子的混合物生成的标准曲线)。在一些实施方案中,标准曲线是从包含已知浓度的标记分子和参比分子的标准样品的测量值中得出的。

[0096] 在一些涉及荧光测量的实施方案中,将分离的标记分子区段和已知浓度的参比分子在检测芯片中相结合,以确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率。在一些涉及测序测量的实施方案中,将分离的标记分子区段和已知浓度的参比分子结合到待测序的样品中,以确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率。

[0097] 在一些实施方案中,标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率是使用检测芯片的样品孔中标记分子和参比分子的荧光测量来确定的。

[0098] 标记分子相对于参比分子的比率可部分基于标记分子和参比分子在检测芯片的样品孔中的停留时间来确定。在一些实施方案中,标记分子和参比分子在检测芯片中的停留时间可与样品中(以及检测芯片的样品孔中)标记分子和参比分子的浓度直接相关。在一些实施方案中,分子的停留时间可以减慢,例如,以提高信号置信度和降低检测限。在一些实施方案中,标记分子和参比分子通过与每个样品孔的内部基底处的带正电荷的分子(例如聚赖氨酸)的静电相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。在一些实施方案中,标记核酸和参比核酸通过与每个样品孔的内部基底处与标记核酸和/或参比核酸互补的核酸的相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中。在一些实施方案中,标记蛋白和参比蛋白通过与每个样品孔的内部基底的抗体的相互作用被递送到样品孔并保持在样品孔中,所述抗体对标记核酸和/或参比核酸具有结合亲和力。在一些实施方案中,标记分子和参比分子通过重力或磁场(例如,如果标记分子和参比分子与例如固相珠(如磁珠)的固体表面保持链接)被递送到样品孔并保持在样品孔中。在一些实施方案中,标记分子和参比分子利用填充试剂被递送到样品孔并保持在样品孔中。例如,填充试剂可以包括糖分子(例如蔗糖或海藻糖)、甲基纤维素、聚乙二醇、葡聚糖、ficoll或蛋白质(例如牛血清白蛋白)。

[0099] 可以使用任何合适的缓冲液来测量停留时间。在一些实施方案中,可以使用NaCl 200-350mM、KCl 10-30mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3mM、KHP0<sub>4</sub> 1mM、4-硝基苯甲酸5mM、D-葡萄糖50mM、0.1%吐温-20(pH=7.5)来测量停留时间。

[0100] 在一些实施方案中,使用脉冲调用来分析荧光测量(例如停留时间)。在一些实施方案中,标记分子和参比分子与检测芯片的正电荷表面的可逆结合会产生瞬时脉冲,然后可根据其特性(例如脉冲持续时间、单帧脉冲)进行调用和过滤。在一些实施方案中,单帧脉冲低的脉冲会被丢弃。然后,在一些实施方案中,操作员可以生成合格脉冲的统计数据,例如脉冲/孔径和脉冲持续时间的直方图,和/或生成bin比值的直方图,以显示标记和参比簇的分离,并在此基础上可以实现分子(例如分子的荧光团)的量化。

[0101] 方法条件

[0102] 本方法可在任何合理的温度下进行。例如,所述方法的任何步骤(例如使第一亲和剂与样品接触)可在4-40°C、4-37°C、4-30°C、4-25°C、4-15°C、4-10°C、10-40°C、15-37°C、15-25°C或室温下进行。同样,所述方法的任何步骤可在任何合理的时间段内进行。例如,所

述方法的任何步骤(例如使第一亲和剂与样品接触)可进行5-60分钟、5-300分钟、5-200分钟、5-100分钟、30-180分钟、1-4小时、1-3小时或1-2小时。

[0103] 在一些实施方案中,样品与第一亲和剂接触,然后与第二亲和剂接触。在其他实施方案中,样品同时与第一亲和剂和第二亲和剂接触。

[0104] 通过用洗涤缓冲液洗涤样品来去除样品中未结合的第二亲和剂。洗涤缓冲液可以是高盐洗涤缓冲液、低盐洗涤缓冲液或磷酸盐缓冲盐水。分离包含第一亲和剂、第二亲和剂和标记分子的第二复合物(例如,与表面连接的第二复合物)可以通过过滤样品或手动去除与第二复合物连接的表面(例如珠子)来进行。

[0105] 从结合的第二亲和剂中分离标记分子可以通过用洗脱缓冲液洗涤样品来进行。洗脱缓冲液可以是高盐缓冲液、pH与样品不同的缓冲液或本领域技术人员已知的任何洗脱缓冲液。在一些实施方案中,通过改变样品的温度(例如升高温度)来从结合的第二亲和剂中分离出标记分子。

[0106] 在一些实施方案中,使用图12A-12D所示的方法分离标记核酸。图12A-12B显示,可以通过用与双链标记核酸的报告链互补的过量单链核酸(即置换链)洗涤样品来分离标记核酸(即报告链)。图12C显示,可以通过用与双链标记核酸的第一链(即捕获链)互补的过量单链核酸(即置换链)洗涤样品来分离标记核酸(即报告链)。图12D显示,可以通过使样品与切割标记核酸的切口酶接触来分离标记核酸(即报告物)。

[0107] 在一些实施方案中,如果参比分子在分离标记分子之前就与样品表面连接或以其他方式存在于样品中,则参比分子可与标记分子同时分离。在一些实施方案中,标记核酸和参比核酸在从样品中分离出来的过程中或之后被扩增。核酸可以使用任何已知的扩增技术(例如滚环扩增)进行扩增。

[0108] 盒或检测芯片

[0109] 在另一方面,提供了盒或检测芯片。在一些实施方案中,检测芯片包括样品孔阵列(例如,有序的样品孔阵列)。在一些实施方案中,检测芯片可以收集荧光测量值。检测芯片可以用带正电荷的分子功能化,例如在每个样品孔的内部基底(即样品孔的底部)处。

[0110] 在一些实施方案中,检测芯片中样品孔的深度为50-500nm、25-250nm、50-400nm、50-300nm、50-200nm、50-150nm、50-100nm、75-150nm、100-250nm、100-300nm、250-500nm或250-350nm。在一些实施方案中,检测芯片中样品孔的深度为约50nm、75nm、100nm、125nm、150nm、175nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm或500nm。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底的直径为50-250nm、50-200nm、50-150nm、50-100nm、75-150nm、75-200nm、100-150nm、100-200nm或150-250nm。在一些实施方案中,每个样品孔的内部基底的直径为约50nm、75nm、100nm、125nm、150nm、175nm、200nm或250nm。

[0111] 在一些实施方案中,检测芯片包括附着至样品孔的内部基底的带正电荷的分子。在一些实施方案中,带正电荷的分子是用含硅烷的化合物或生物素-链霉亲和素复合物附着的。在一些实施方案中,样品孔的内部基底用20-500、30-400、50-350、50-300、50-250、50-200、50-100、100-400或100-200个正电荷/1000nm<sup>2</sup>功能化。

[0112] 在一些实施方案中,带正电荷的分子是聚赖氨酸分子。聚赖氨酸分子可以包括赖氨酸氨基酸的线性链或支链。在一些实施方案中,聚赖氨酸分子包含10-200、10-150、10-100、25-200、25-150、25-100、20-100、20-75、25-50或50-100个赖氨酸氨基酸。在一些实施

方案中,聚赖氨酸分子包含约10、25、50、75、100、125、150、175、200或225个赖氨酸氨基酸。在一些实施方案中,聚赖氨酸分子如图8所示。

[0113] 在一些实施方案中,带正电荷的分子是带正电荷的封端硅烷分子。在一些实施方案中,带正电荷的封端硅烷分子如图9所示。

[0114] 在一些实施方案中,盒或检测芯片包括基层,所述基层具有包含通道的表面,并且至少一些通道的至少一部分:(1)具有基本呈三角形的截面,所述截面在通道基底具有单个顶点,在基层表面具有另外两个顶点;以及(2)具有包含弹性体的表面层,所述表面层被设置为基本密封通道的表面开口。

[0115] 在一些实施方案中,盒或检测芯片包括基层。在一些实施方案中,基层具有包含一个或多个通道的表面。如本文所用,术语“通道”为本领域普通技术人员所熟知,可指被设置为容纳和/或输送流体的结构。通道一般包括:壁;基底(例如,与壁连接和/或由壁形成的基底);以及可在通道的一个或多个部分开放、覆盖和/或密封的表面开口。

[0116] 如本文所用,术语“微通道”是指包括尺寸小于或等于1000微米的至少一个维度的通道。例如,微通道可以包括尺寸小于或等于1000微米(例如,小于或等于10微米、小于或等于10微米、小于或等于5微米)的至少一个维度(例如宽度、高度)。在一些实施方案中,微通道包括大于或等于1微米(例如,大于或等于2微米、大于或等于10微米)的至少一个维度。上述范围的组合也是可能的(例如,大于或等于1微米且小于或等于1000微米、大于或等于10微米且小于或等于100微米)。其他范围也是可能的。在一些实施方案中,微通道的水力直径小于或等于1000微米。如本文所用,术语“水力直径”(DH)为本领域普通技术人员所熟知,并且可按以下方式确定: $DH=4A/P$ ,其中A是流体流经通道的截面积,P是截面的润湿周长(流体接触的通道的截面的周长)。

[0117] 在一些实施方案中,至少一些通道的至少一部分具有基本呈三角形的截面。在一些实施方案中,至少一些通道的至少一部分具有基本呈三角形的截面,所述截面在通道基底具有单个顶点,并且在基层表面具有另外两个顶点。再参考图24,在一些实施方案中,至少一些通道102的至少一部分具有基本呈三角形的截面,所述截面在通道基底具有单个顶点,并且在基层表面具有另外两个顶点。

[0118] 如本文所用,术语“三角形”用于指一种形状,其中三角形可以被内切或外切以近似或等于实际形状,而不纯粹局限于三角形。例如,三角形截面可以包括一个或多个部分处的非零曲率。

[0119] 三角形截面可以包括楔形。如本文所用,术语“楔形”为本领域普通技术人员所熟知,是指具有粗端并逐渐变窄至细端的形状。在一些实施方案中,楔形具有从粗端到细端的对称轴。例如,楔形可以具有粗端(例如通道的表面开口)并逐渐变窄至细端(例如通道的基底),并且可以具有从粗端到细端的对称轴。

[0120] 此外,在某些实施方案中,基本呈三角形的截面(即“v形槽”)可以具有各种纵横比。如本文所用,v形槽的术语“纵横比”是指高与宽的比率。例如,在一些实施方案中,v形槽的纵横比可以小于或等于2、小于或等于1、或小于或等于0.5、和/或大于或等于0.1、大于或等于0.2、或大于或等于0.3。上述范围的组合也是可能的(例如,介于或等于0.1和2之间、介于或等于0.2和1之间)。其他范围也是可能的。

[0121] 在一些实施方案中,至少一些通道的至少一部分具有截面,所述截面包括基本呈

三角形的部分和向基本呈三角形的部分开口并相对于通道表面延伸至基本呈三角形的部分下方的第二部分。在一些实施方案中,第二部分的直径(例如平均直径)明显小于基本呈三角形的部分的平均直径。在一些实施方案中,沿通道长度的一部分可能同时具有基本呈三角形的部分和第二部分(“深部”),而沿通道长度的不同部分仅具有所述基本呈三角形的部分。在一些这样的实施方案中,当设备(例如辊)与同时具有基本呈三角形的部分和第二部分(深部)的部分啮合时,由于没有实现与表面层的密封,因此不会启动泵动作。然而,当设备沿着通道的长度方向啮合时,当设备使仅具有大致呈三角形的部分的通道的一部分处的表面层变形时,泵开始工作,因为该部分处缺少第二部分(深部)使得可以形成密封(进而产生压差)。因此,在一些情况下,沿着盒或检测芯片的通道长度上是否有深部可以控制通道的哪些部分在与设备啮合时能够进行泵动作。

[0122] 包含这种“深部”作为盒或检测芯片的至少一些通道的第二部分可以带来任何各种潜在的好处。例如,在一些情况下,这种“深部”有助于减少蠕动泵过程中的泵体积。在一些这样的情况下,泵体积可以减少两倍或更多,以获得更高的体积分辨率。在一些情况下,这种深部还能为泵体积提供一个明确的起点,而这个起点并不是由辊落在通道上的位置确定的。例如,在一些情况下,具有基本呈三角形的部分和第二部分(深部)的通道部分与仅具有基本呈三角形的部分的通道部分之间的界面可用作明确的泵体积起点,因为只有占据后一通道部分的体积的流体才能被泵送。在一些情况下,辊落在通道上的位置可能会具有一些误差,这取决于任何各种因素,例如盒或检测芯片的注册。在一些情况下,包含深部可以减少或消除与此类误差相关的泵体积变化。

[0123] 如本文所用,通道的基本呈三角形的部分的平均直径可以测量为从基本呈三角形的部分的顶点到通道表面的z轴上的平均值。

[0124] 装置和模块

[0125] 通常提供了用于本文所述方法的装置或模块,其包括设备、盒或检测芯片(例如,包括通道(如微流体通道))和/或泵(如蠕动泵)。根据本公开,装置可用于促进生物样品中靶分子的量(例如浓度)的准确确定。装置和相关方法可用于执行化学和/或生物反应,包括按照本文其他地方所述生物传感器检测方法的任何步骤进行核酸和/或蛋白质处理的反应。

[0126] 在一些实施方案中,本公开的装置可以执行任意数量的以下步骤:将含有标记的靶分子的样品与已知浓度的参比分子相结合;确定标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率;以及至少部分地基于所述标记的靶分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率确定样品中标记的靶分子的浓度。

[0127] 在一些实施方案中,本公开的装置可以执行任意数量的以下步骤:

[0128] (i) 使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触,以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物,其中所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面;

[0129] (ii) 使所述多个第一复合物与对第一复合物具有结合亲和力的多个第二亲和剂接触,以产生包含与第一复合物结合的第二亲和剂的多个第二复合物,其中第二亲和剂的至少一部分与标记分子连接;

[0130] (iii) 去除未结合的第二亲和剂和/或分离多个第二复合物;

[0131] (iv) 任选地从所述多个第二复合物的结合的第二亲和剂中分离出每个标记分子的至少一个区段；

[0132] (v) 将标记分子区段与已知浓度的参比分子相结合；

[0133] (vi) 确定标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率；以及

[0134] (vii) 至少部分基于标记分子的检测事件相对于参比分子的检测事件的比率，确定样品中靶分子的浓度。

[0135] 在一些实施方案中，步骤(i)包括：(i) (a) 使包含靶分子的样品与对靶分子具有结合亲和力的多个第一亲和剂接触，以产生包含与第一亲和剂结合的靶分子的多个第一复合物；以及(i) (b) 将所述多个第一亲和剂的至少一部分固定到表面。

[0136] 在一些实施方案中，本公开的装置执行所有步骤(i) - (vii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(i)，并任选地执行任意数量的步骤(ii) - (vii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(ii)，并任选地执行任意数量的步骤(i) 和/或(iii) - (vii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(iii)，并任选地执行任意数量的步骤(i)、(ii) 和/或(iv) - (vii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(iv)，并任选地执行任意数量的步骤(i) - (iii) 和/或(v) - (vii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(v)，并任选地执行任意数量的步骤(i) - (iv)、(vi) 或(vii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(vi)，并任选地执行任意数量的步骤(i) - (v)、(vii) 和/或(viii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(vii)，并任选地执行任意数量的步骤(i) - (vi) 和/或(viii)。在一些实施方案中，本公开的装置执行步骤(viii)，并任选地执行任意数量的步骤(i) - (vii)。可根据实验需要改变步骤顺序。在一些实施方案中，任何一个步骤会与手动步骤穿插进行。这种灵活性使用户能够处理多种样品类型和检测平台。

[0137] 在一些实施方案中，本公开的装置被设置为向检测模块或装置递送或输送标记分子和/或参比分子。在一些实施方案中，本公开的装置直接连接(例如，物理连接)或间接连接至检测装置或模块。

[0138] 在一些实施方案中，盒或检测芯片包括一个或多个贮液器或反应容器，其被设置为接收流体和/或容纳生物传感器方法中使用的一种或多种试剂。在一些实施方案中，盒或检测芯片包括一个或多个通道(例如微流体通道)，其被设置为容纳和/或输送生物传感器方法中使用的流体(例如，包含一种或多种试剂的流体)。试剂包括缓冲液、酶试剂、聚合物基质、捕获试剂、尺寸特异性选择试剂、序列特异性选择试剂和/或纯化试剂。用于生物传感器方法的其他试剂是本领域技术人员已知的。

[0139] 在一些实施方案中，盒或检测芯片包括一种或多种储存试剂(例如，适合重组为液体形式的液体或冻干形式的储存试剂)。盒或检测芯片的储存试剂包括适用于执行所需方法的试剂和/或适用于处理所需样品类型的试剂。在一些实施方案中，盒或检测芯片是一次性使用的盒或检测芯片(例如，一次性盒或检测芯片)或多次使用的盒或检测芯片(例如，可重复使用的盒或检测芯片)。在一些实施方案中，盒或检测芯片被设置为接收用户提供的样品。用户提供的样品可在盒或检测芯片被装置接收之前或之后添加到盒或检测芯片中，例如，由用户手动添加或在自动过程中添加。

[0140] 根据本公开的装置通常包含机械、电子和/或光学部件，其可用于操作本文所述的盒或检测芯片。在一些实施方案中，装置部件的作用是在盒或检测芯片上或在盒或检测芯

片的特定区域达到并保持特定温度。在一些实施方案中,装置部件的作用是在特定时段内向盒或检测芯片的电极施加特定电压。在一些实施方案中,装置部件的作用是将液体移入、移出盒或检测芯片的贮液器和/或反应容器,或在贮液器和/或反应容器之间移动液体。在一些实施方案中,装置部件的作用是将液体通过盒或检测芯片的通道,例如,移入、移出盒或检测芯片的贮液器和/或反应容器,或在贮液器和/或反应容器之间移动液体。在一些实施方案中,装置部件通过蠕动泵机构(例如设备)移动液体,所述蠕动泵机构与盒或检测芯片的弹性、试剂特异性贮液器或反应容器相互作用。在一些实施方案中,装置部件通过蠕动泵机构(例如设备)移动液体,所述蠕动泵机构被设置为与与盒或检测芯片的通道相关联的弹性部件(例如,包含弹性体的表面层)相互作用,以泵送流体通过通道。装置部件可以包括计算机资源,例如,以驱动用户界面,在用户界面上可输入样品信息、可选择特定过程并且可报告运行结果。

[0141] 在一些实施方案中,装置或模块(例如,样品制备装置;测序装置;组合的样品制备和测序这种)被设置为以明确定义的流体流量分辨率精确输送小体积的流体,并在一些情况下以明确定义的流速输送。在一些实施方案中,装置或模块被设置为以大于或等于 $0.1\mu\text{L/s}$ 、大于或等于 $0.5\mu\text{L/s}$ 、大于或等于 $1\mu\text{L/s}$ 、大于或等于 $2\mu\text{L/s}$ 、大于或等于 $5\mu\text{L/s}$ 或更高的流速输送流体。在一些实施方案中,本文的装置或模块被设置为以小于或等于 $100\mu\text{L/s}$ 、小于或等于 $75\mu\text{L/s}$ 、小于或等于 $50\mu\text{L/s}$ 、小于或等于 $30\mu\text{L/s}$ 、小于或等于 $20\mu\text{L/s}$ 、小于或等于 $15\mu\text{L/s}$ 或更小的流速输送流体。这些范围的组合是可能的。例如,在一些实施方案中,本文的装置或模块被设置为以大于或等于 $0.1\mu\text{L/s}$ 且小于或等于 $100\mu\text{L/s}$ 、或大于或等于 $5\mu\text{L/s}$ 且小于或等于 $15\mu\text{L/s}$ 的流速输送流体。例如,在某些实施方案中,本文的系统、装置和模块的流体流量分辨率为数十微升或数百微升。有关流体流量分辨率的更多描述,请参见本文其他部分。在某些实施方案中,系统、装置和模块被设置为通过盒或检测芯片的至少一部分输送小体积的流体。

[0142] 在一些实施方案中,盒或检测芯片能够处理小体积的流体(例如, $1-10\mu\text{L}$ 、 $2-10\mu\text{L}$ 、 $4-10\mu\text{L}$ 、 $5-10\mu\text{L}$ 、 $1-8\mu\text{L}$ 或 $1-6\mu\text{L}$ 流体)。在一些实施方案中,测序盒或检测芯片与本公开的装置物理嵌入或相关联(例如,允许将制备的样品递送到反应混合物中进行测序。在一些实施方案中,与本公开的装置物理嵌入或相关联的测序盒或检测芯片包括微流体通道,所述微流体通道具有面密封垫圈或锥形压配(例如鲁尔接头)形式的流体接口。在一些实施方案中,流体接口然后可以在制备的样品递送后断开,以便将测序盒或检测芯片与本公开的装置物理分离。

[0143] 以下非限制性示例旨在说明本文所述装置、方法和组合物的各个方面。根据本公开使用本公开的装置时,可进行以下所述的一个或多个步骤。用户可以打开装置的盖子,并插入支持所需过程的盒或检测芯片。然后,用户可以向盒或检测芯片上的样品端口添加样品,所述样品可以与特定的裂解液结合。然后,用户可以盖上装置盖子,通过装置上的触摸屏界面输入任何特定的样品信息,选择任何特定的过程参数(例如,所需的尺寸选择范围、靶分子捕获所需的同源性程度等),并启动生物传感器方法运行。运行后,用户可收到相关的运行数据(例如,运行成功完成的确认、具体的运行指标等)以及具体的过程信息(例如,生成的样品量、特定靶序列的存在或不存在等)。运行产生的数据可用于后续的生物信息学分析,这种分析可以是本地的或基于云的。根据过程的不同,可从盒或检测芯片中提取完成

的样品,供后续使用(例如基因组测序、qPCR定量、克隆等)。然后可以打开装置,然后可以取出盒或检测芯片。

[0144] 在一些实施方案中,生物传感器检测模块包括泵。在一些实施方案中,所述泵是蠕动泵。一些这样的泵包括一个或多个本文所述的用于流体处理的发明部件。例如,泵可以包括设备和/或盒或检测芯片。在一些实施方案中,泵的设备包括辊、曲柄和摇杆。在一些这样的实施方案中,曲柄和摇杆被设置为与辊连接的曲柄-摇杆机构。在一些情况下,将曲柄-摇杆机构与设备的辊耦合起来可以实现本文所述的某些优点(例如,设备与盒或检测芯片轻松脱离,冲程量计量良好)。在某些实施方案中,泵的盒或检测芯片包括通道(例如微流体通道)。在一些实施方案中,盒或检测芯片的通道的至少一部分具有特定的截面形状和/或表面层,所述截面形状和/或表面层可以有助于实现本文所述的一系列优点中的任何优点。

[0145] 在一些情况下,可提供某些优点的一些盒或检测芯片的一个非限制性方面是在盒或检测芯片中包含具有特定截面形状的通道。例如,在一些实施方案中,盒或检测芯片包括v形通道。形成这种v形通道的一种可能方便但不受限制的方法是在盒或检测芯片中模压或加工v形槽。在某些实施方案中,设备的辊与盒或检测芯片啮合以使流体流过通道,在这些实施方案中包括v形通道(本文也称为v形槽或具有基本呈三角形的截面的通道)具有公认的优点。例如,在一些情况下,v形通道在尺寸上对辊不敏感。换句话说,在一些情况下,设备的辊(例如楔形辊)没有必须遵守的单一尺寸,以便与v形通道适当地啮合。与此相反,通道的某些常规截面形状(例如半圆形)可能要求辊具有特定的尺寸(例如半径),以便与通道适当地啮合(例如,在蠕动泵过程中形成流体密封以产生压差)。在一些实施方案中,包含在尺寸上对辊不敏感的通道可使硬件部件的制造更简单、成本更低,并提高可设置性/灵活性。

[0146] 在某些方面,盒或检测芯片包括表面层(例如,平的表面层)。一个示例性方面涉及潜在的有利实施方案,包括在v形槽上方分层铺设包含弹性体(例如硅树脂)(例如基本上由弹性体组成)的膜(本文也称为表面层),以产生实际上半个柔性管。然后,在一些实施方案中,通过将包含弹性体的表面层变形到通道中以形成夹缝,然后通过平移夹缝,可在夹缝的后缘产生负压,从而产生吸力,并在夹缝的前缘产生正压,将流体向夹缝前缘的方向泵送。在某些实施方案中,这种泵送是将盒或检测芯片(包含具有表面层的通道)与包含辊的设备接口,该设备被设置为执行辊的运动,包括辊与表面层的一部分啮合,以将表面层的一部分与相关通道的壁和/或基底夹紧,以滚动运动方式沿相关通道的壁和/或基底平移辊,从而将表面层的夹紧部分相对于壁和/或基底平移,和/或使辊与表面层的第二部分脱离。在某些实施方案中,将曲柄摇杆机构并入设备中,以实现辊的这种运动。

[0147] 荧光检测

[0148] 从测序装置或模块外的一个或多个光源向测序装置或模块提供激发光。测序装置或模块的光学部件可以接收来自光源的激发光并将光(例如通过波导)引导到测序装置或模块的样品孔阵列并照亮样品孔内的照明区域。在一些实施方案中,样品孔可以具有允许靶分子或包含多个分子的样品保持在样品孔表面附近的构造,这可以容易地将激发光递送到样品孔和检测来自靶分子和包含多个分子的样品的发射光。位于照明区域内的靶分子或包含多个分子的样品可以响应于被激发光照亮而发射光。例如,可以用荧光标志物标记核酸或蛋白质(或其多个),所述荧光标志物响应于通过激发光的照射实现激发态而发射光。由靶分子或包含多个分子的样品发射的发射光然后可以由对应于样品孔的像素内的一

个或多个光检测器检测,其中靶分子或包含多个分子的样品被分析。根据一些实施方案,当在数量范围可以在大约10,000像素到1,000,000像素之间的样品孔阵列上执行时,可以并行分析多个样品孔。

[0149] 测序装置或模块可以包括用于接收激发光并将激发光引导到样品孔阵列之间的光学系统。光学系统可以包括一个或多个被设置为将激发光耦合到测序装置或模块并将激发光引导到其他光学部件的光栅耦合器。光学系统可以包括将来自光栅耦合器的激发光引导到样品孔阵列的光学部件。这样的光学部件可以包括分光器、光学组合器和波导。在一些实施方案中,一个或多个分光器可以耦合来自光栅耦合器的激发光并将激发光递送到至少一个波导。根据一些实施方案,分光器可以具有允许激发光在所有波导上基本均匀地传递的构造,使得每个波导接收基本相似量的激发光。这样的实施方案可以通过提高测序装置或模块的样品孔接收的激发光的均匀性来提高测序装置或模块的性能。例如,用于将激发光耦合到样品孔和/或将发射光引导到光检测器以包括在测序装置或模块中的合适部件的示例描述于2015年8月7日提交的题为“INTEGRATED DEVICE FOR PROBING, DETECTING AND ANALYZING MOLECULES”的美国专利申请号14/821,688;2014年11月17日提交的题为“INTEGRATED DEVICE WITH EXTERNAL LIGHT SOURCE FOR PROBING, DETECTING, AND ANALYZING MOLECULES”的美国专利申请号14/543,865;和2020年6月26日提交的题为“OPTICAL AND ELECTRICAL SECONDARY PATH REJECTION”的国际专利申请号PCT/US2020/039868中,每一项的全部内容均通过引用的方式并入本文。可以在测序装置或模块中实施的合适的光栅耦合器和波导的示例在2017年12月15日提交的题为“OPTICAL COUPLER AND WAVEGUIDE SYSTEM”的美国专利申请号15/844,403中进行了描述,其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0150] 另外的光激性结构可以定位在样品孔和光检测器之间,并且被设置为减少或防止激发光到达光检测器,否则这可能会导致检测发射光时的信号噪声。在一些实施方案中,可以充当测序装置或模块的电路的金属层也可以充当空间滤光器。合适的光激性结构的示例可以包括光谱滤光器、偏振滤光器和空间滤光器,并且在2018年7月23日提交的题为“OPTICAL REJECTION PHOTONIC STRUCTURES”的美国专利申请号16/042,968中进行了描述,其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0151] 位于测序装置或模块之外的部件可用于将激发源定位和对准到测序装置或模块。这样的部件可以包括光学部件,包括透镜、镜子、棱镜、窗口、孔径、衰减器和/或光纤。所述仪器中可以包括另外的机械部件,以允许控制一个或多个对准部件。这样的机械部件可以包括致动器、步进电机和/或旋钮。合适的激发源和对准机构的示例在2016年5月20日提交的题为“PULSED LASER AND SYSTEM”的美国专利申请号15/161,088中进行了描述,其全部内容通过引用的方式并入本文。光束控制模块的另一个示例在2017年12月14日提交的题为“COMPACT BEAM SHAPING AND STEERING ASSEMBLY”的美国专利申请号15/842,720中进行了描述,其通过引用的方式并入本文。合适的激发源的另外的示例在2015年8月7日提交的题为“INTEGRATED DEVICE FOR PROBING, DETECTING AND ANALYZING MOLECULES”的美国专利申请号14/821,688中进行了描述,其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0152] 与测序装置或模块的单个像素一起定位的光检测器可以被设置和定位以检测来自像素的相应样品孔的发射光。合适的光检测器的示例在2015年8月7日提交的题为

“INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS”的美国专利申请号 14/821,656 中进行了描述,其全部内容通过引用的方式并入本文。在一些实施方案中,样品孔及其相应的光检测器可以沿着公共轴线对齐。以这种方式,光检测器可以与像素内的样品孔重叠。

[0153] 检测到的发射光的特征可以提供用于鉴定与发射光相关的标志物的指示。这样的特征可以包括任何合适类型的特征,包括由光检测器检测到的光子的到达时间、由光检测器随时间累积的光子量和/或跨两个或更多个光检测器的光子分布。在一些实施方案中,光检测器可以具有允许检测与样品的发射光(例如,发光寿命)相关的一个或多个时序特性的构造。在激发光脉冲传播通过测序装置或模块之后,光检测器可以检测光子到达时间的分布,并且到达时间的分布可以提供样品发射光的时序特性的指示(例如,发光寿命的代表)。在一些实施方案中,一个或多个光检测器提供由标志物发射的发射光的概率(例如,发光强度)的指示。在一些实施方案中,多个光检测器的尺寸和布置可被设置为捕获发射光的空间分布。来自一个或多个光检测器的输出信号然后可用于将标志物与多个标志物区分开来,其中所述多个标志物可用于鉴定样品内的样品。在一些实施方案中,样品可以被多种激发能量激发,并且样品响应多种激发能量而发射的发射光和/或发射光的时序特性可以将标志物与多个标志物区分开来。

[0154] 在操作中,样品孔内的样品的并行分析是通过使用激发光激发孔内的一些或所有样品并用光检测器检测来自样品发射的信号来进行的。来自样品的发射光可以由相应的光检测器检测并转换为至少一个电信号。电信号可以沿着测序装置或模块的电路中的导线传输,所述导线可以连接到与测序装置或模块接口的仪器。随后可以处理和/或分析电信号。电信号的处理和/或分析可以在位于仪器上或仪器外的合适的计算设备上进行。

[0155] 所述仪器可以包括用于控制仪器和/或测序装置或模块的操作的用户界面。用户界面可以被设置为允许用户将信息输入到仪器中,例如用于控制仪器功能的命令和/或设置。在一些实施方案中,用户界面可以包括用于语音命令的按钮、开关、拨号盘和/或麦克风。用户界面可以允许用户接收关于仪器和/或测序装置或模块的性能的反馈,例如同轴度(proper alignment)和/或通过来自测序装置或模块上的光检测器读出信号获得的信息。在一些实施方案中,用户界面可以使用扬声器提供听觉反馈来提供反馈。在一些实施方案中,用户界面可以包括用于向用户提供视觉反馈的指示灯和/或显示屏。

[0156] 在一些实施方案中,本文所述的仪器或装置可以包括被设置为与计算设备连接的计算机接口。计算机接口可以是USB接口、火线接口或任何其他合适的计算机接口。计算设备可以是任何通用计算机,例如膝上型计算机或台式计算机。在一些实施方案中,计算设备可以是经由合适的计算机接口在无线网络上可访问的服务器(例如,基于云的服务器)。计算机接口可以促进仪器和计算设备之间的信息通信。用于控制和/或设置仪器的输入信息可以被提供给计算设备并通过计算机接口传输给仪器。由仪器生成的输出信息可以通过计算机接口由计算设备接收。输出信息可以包括关于仪器性能、测序装置或模块的性能和/或从光检测器的读出信号产生的数据的反馈。

[0157] 在一些实施方案中,所述仪器可以包括被设置为分析从测序装置或模块的一个或多个光检测器接收的数据和/或将控制信号传输到激发源的处理装置。在一些实施方案中,处理装置可以包括通用处理器和/或专门适配的处理器(例如,中央处理单元(CPU),例如一

个或多个微处理器或微控制器内核、现场可编程门阵列(FPGA)、专用集成电路(ASIC)、定制集成电路、数字信号处理器(DSP)或其组合)。在一些实施方案中,来自一个或多个光检测器的数据的处理可以由仪器的处理装置和外部计算设备两者来执行。在其他实施方案中,可以省略外部计算设备,并且可以仅由测序装置或模块的处理装置执行来自一个或多个光检测器的数据处理。

[0158] 根据一些实施方案,被设置为基于发光发射特性来分析靶分子或包含多个分子的样品的仪器可以检测不同发光分子之间的发光寿命和/或强度的差异,和/或相同发光分子在不同环境中的寿命和/或强度之间的差异。发明人已经认识到并理解,发光发射寿命的差异可用于辨别不同发光分子的存在与否和/或辨别发光分子所经受的不同环境或条件。在一些情况下,根据寿命(例如,而不是发射波长)辨别发光分子可以简化系统的方面。作为实例,当基于寿命辨别发光分子时,波长区分光学器件(例如波长过滤器、每个波长的专用检测器、不同波长的专用脉冲光源和/或衍射光学器件)可以在数量上减少或被消除。在一些情况下,以单一特征波长操作的单一脉冲光源可用于激发在光谱的相同波长区域内发射但具有可测量的不同寿命的不同发光分子。使用单个脉冲光源而不是在不同波长下工作的多个光源来激发和辨别在相同波长范围内发射的不同发光分子的分析系统操作和维护的复杂度可能更低,可能更紧凑,并且可能以更低的成本制造。

[0159] 尽管基于发光寿命分析的分析系统可能具有某些好处,但通过允许另外的检测技术可以增加由分析系统获得的信息量和/或检测准确性。例如,所述系统的一些实施方案可以另外被设置成基于发光波长和/或发光强度来辨别样品的一种或多种特性。在一些实施方式中,发光强度可以另外地或替代地用于区分不同的发光标签。例如,一些发光标签可以以显著不同的强度发射或在它们的激发概率上有显著差异(例如,至少约35%的差异),即使它们的衰减率可能相似。通过将分箱信号参考测量的激发光,可以根据强度水平区分不同的发光标签。

[0160] 根据一些实施方案,不同的发光寿命可以用被设置为在发光标签激发之后对发光发射事件进行时间分箱(time-bin)的光检测器来区分。时间分箱可以发生在光检测器的单个电荷累积周期期间。电荷累积周期是读出事件之间的间隔,在该期间光生载流子累积在时间分箱的光检测器的仓中。时间分箱的光检测器的示例在2015年8月7日提交的题为“INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS”的美国专利申请号14/821,656中进行了描述,其通过引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,时间分箱的光检测器可以在光子吸收/载流子产生区域中产生电荷载流子并且将电荷载流子直接转移到电荷载流子存储仓中的电荷载流子存储仓。在这样的实施方案中,时间分箱的光检测器可以不包括载流子行进/捕获区域。这样的时间分箱的光检测器可以被称为“直接分箱像素”。包括直接分箱像素的时间分箱的光检测器的示例在2017年12月22日提交的题为“INTEGRATED PHOTODETECTOR WITH DIRECT BINNING PIXEL”的美国专利申请号15/852,571中进行了描述,其通过引用的方式整体并入本文。

[0161] 在一些实施方案中,同一类型的不同数量的荧光团可以与靶分子(例如,靶核酸或靶蛋白)或存在于样品中的多个分子(例如,多个核酸或多个蛋白质)的不同组分连接,从而可以基于发光强度来鉴定每种单个分子。例如,两个荧光团可以与第一标记的分子连接,四个或更多个荧光团可以与第二标记的分子连接。由于不同数量的荧光团,可能存在与不同

分子相关的不同激发和荧光团发射概率。例如,在信号累积间隔期间,第二标记的分子可能有更多的发射事件,因此仓的表现强度明显高于第一标记的分子。

[0162] 发明人已经认识到并理解,基于荧光团衰减率和/或荧光团强度区分核酸或蛋白质可以简化光激发和检测系统。例如,可以用单波长源(例如,产生一个特征波长而不是多个源的源或以多个不同特征波长操作的源)来执行光激发。此外,检测系统中可能不需要波长识别光学器件和滤光器。此外,每个样品孔可以使用单个光检测器来检测来自不同荧光团的发射。短语“特征波长”或“波长”用于指代有限辐射带宽内的中心或主要波长。例如,有限辐射带宽可以包括脉冲光源输出的20nm带宽内的中心或峰值波长。在一些情况下,“特征波长”或“波长”可用于指代源辐射输出的总带宽内的峰值波长。

[0163] 测序装置或模块

[0164] 在一些方面,根据本公开进行的核酸或蛋白质测序可以使用允许单分子分析的系统来执行。所述系统可以包括测序装置或模块,以及被设置为与测序装置或模块接口的仪器。测序装置或模块可以包括像素阵列,其中单个像素包括样品孔和至少一个光检测器。测序装置或模块的样品孔可以在测序装置或模块的表面上形成或穿过测序装置或模块的表面形成,并被设置为接收放置在测序装置或模块的表面的样品。

[0165] 在一些实施方案中,样品孔是可插入装置的盒或检测芯片(例如一次性或一次性使用的盒或检测芯片)的部件。总体而言,样品孔可以被视作样品孔阵列。多个样品孔可以具有合适的尺寸和形状,使得样品孔的至少一部分可以接收单个靶分子或包含多个分子(例如靶核酸或靶蛋白)的样品。在一些实施方案中,样品孔内的分子数量可在测序装置或模块的样品孔之间分布,使得一些样品孔包含一个分子(例如靶核酸或靶蛋白),而其他样品孔包含零个、两个或多个分子。

[0166] 分子条形码

[0167] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括使分子条形码与结合分子条形码上的一个或多个位点的条形码识别分子接触。在一些实施方案中,条形码识别分子结合多个分子条形码上的一个或多个位点。因此,在一些实施方案中,条形码识别分子可用于破译混合物中多个不同单分子(例如,包含相同或不同分子条形码的不同分析物)的条形码内容。作为说明性和非限制性的示例,多重混合物可以包括附着至分子条形码的多个分析物。这些分子条形码中的一些可以包括样品索引,所述样品索引指示附着在其上的分析物的样品来源,并且结合样品索引的条形码识别分子可用于确定哪些分析物来源于相应的样品。

[0168] 在一些实施方案中,单分子构建体包括分子条形码(例如动力学条形码)。在一些实施方案中,本公开的分子条形码是核酸条形码(例如单链核酸)。在一些实施方案中,核酸条形码包括DNA、RNA、PNA和/或LNA。在一些实施方案中,分子条形码是多肽条形码。

[0169] 在一些实施方案中,分子条形码包括一系列索引序列。例如,在一些实施方案中,分子条形码是包含一系列索引序列的核酸条形码。在一些实施方案中,每个索引序列不同于该系列中的任何其他索引序列。在一些实施方案中,该系列中的至少两个索引序列是相同的。在一些实施方案中,该系列索引序列与一系列条形码识别分子结合位点对应。在一些实施方案中,条形码识别分子与包含该系列中的两个索引序列的分子条形码上的位点结合。在一些实施方案中,每个索引序列提供的条形码内容信息各不相同。

[0170] 此外,在一些实施方案中,分子条形码附着至分析物(例如有效载荷分子、检测器

分子)。在一些实施方案中,分析物来自生物来源或合成来源。在一些实施方案中,分析物来自血清样品、血液样品、组织样品或单细胞。在一些实施方案中,分析物是生物大分子。在一些实施方案中,分析物是核酸或多肽。在一些实施方案中,分析物是核酸适体、蛋白质或蛋白质片段。在一些实施方案中,分析物是小分子、代谢物或抗体。在一些实施方案中,分子条形码通过接头附着至分析物。在一些实施方案中,接头包括裂解位点(例如光可裂解位点)。因此,在一些实施方案中,包含裂解序列的单分子构建体可去除分析物,以简化基底表面(例如芯片)上的装载和/或分析。

[0171] 同样,在一些实施方案中,分子条形码包括附着分子。在一些实施方案中,附着分子是适合分子条形码表面固定的任何部分或连接基团。在一些实施方案中,附着分子包括共价或非共价连接基团。在一些实施方案中,附着分子包括生物素部分。在一些实施方案中,附着分子包括双生物素部分。连接基团和其他用于表面固定的组合物和方法在本文其他地方有更详细的描述,并且是本领域已知的。

[0172] 在一些实施方案中,裂解位点是任选的组分,其可以不并入单分子构建体中,这取决于所需的实施方案。在一些实施方案中,附着分子可以与分析物相邻,使得分子条形码就可以通过分析物附着至表面。本文其他部分提供了单分子构建体的其他构造和连接策略的示例。

[0173] 在一些方面,本公开的方法涉及条形码解卷积方法,所述方法涉及破译分子身份、样品来源和/或单分子在阵列上的位置。在一些实施方案中,本文提供的方法可有利地用于解卷积多重样品中的分子条形码信息。例如,本公开的方法可应用于单细胞多肽测序技术。在一些实施方案中,根据本公开,可通过多肽测序(例如动态肽测序)和条形码识别来分析所得到的单分子构建体。

[0174] 在一些实施方案中,本文所述的标记分子可附着或连接至本文所述的条形码(例如分子条形码)。在一些实施方案中,本文所述的参比分子可附着或连接至本文所述的条形码(例如分子条形码)。在一些实施方案中,本文所述的亲和剂可附着或连接至本文所述的条形码(例如分子条形码)。

[0175] 在一些实施方案中,检测靶分子的方法涉及使用图15A所述的工作流程。例如,如图15A所示,在第一步中,固相珠(例如磁珠)可首先装载有一抗(例如1°抗体)和表面相关的标记分子(报告物)。标记分子可以是标记核酸。标记分子可附着或连接至本文所述的条形码(例如分子条形码)。在第二步中,可将包含靶分子(例如,其中靶分子是抗原)的样品添加到包含表面固定化抗体的珠子上。在一些实施方案中,样品包括与表面固定化抗体结合(例如特异性结合)的抗原。第三步中,可将珠子添加到包含表面固定化二抗(2°抗体)的表面上,以生成复合物,所述复合物包含结合到表面固定化二抗的靶分子,以及表面固定化二抗和附着至珠子的一抗之间的靶分子,其中珠子与表面相关的标记分子连接。在第四步中,使用洗涤液或缓冲液洗涤复合物。在第五步中,去除(或裂解)标记分子(报告物),并将其从珠子中分离出来。在第六步中,将标记分子添加到检测芯片(例如,包括多个样品孔)中,其中检测芯片包括附着至芯片的已知分子(例如,已知核酸或“已知读出寡核苷酸”)。标记分子具有对已知分子的结合亲和力。标记分子与已知分子之间的结合关联和动力学可确定标记分子的身份。标记分子身份的这种确定可以鉴定与该标记分子相关的可溶性抗体(例如二抗(2°抗体)),随后可以鉴定能够与可溶性抗体结合的抗原。

[0176] 在一些实施方案中,检测靶分子的方法涉及使用图15B所述的工作流程。例如,如图15B所示,在第一步中,磁性固相珠可首先装载有表面固定化抗体(例如一抗(1°抗体))。在第二步中,可将包含靶分子(例如,其中靶分子是抗原)的样品添加到包含表面固定化抗体的珠子上。在一些实施方案中,样品包括与表面固定化抗体结合(例如特异性结合)的抗原。在第三步中,可将与标记分子(报告物)连接的可溶性抗体(例如二抗(2°抗体))添加到珠子上,以生成复合物,所述复合物包含结合到表面固定化抗体的靶分子,以及表面固定化抗体和连接至标记分子的可溶性抗体之间的靶分子,其中标记分子任选地为核酸。在第四步中,使用洗涤液或缓冲液洗涤珠子。在第五步中,使用磁铁分离珠子,并从可溶性抗体中去除(或裂解)标记分子(报告物)。标记分子随后被分离出来。在第六步中,将标记分子添加到检测芯片(例如,包含多个样品孔)中,其中检测芯片包括附着至芯片的已知分子(例如,已知核酸或“已知读出寡核苷酸”)。标记分子具有对已知分子的结合亲和力。标记分子与已知分子之间的结合关联和动力学可确定标记分子的身份。标记分子身份的这种确定可以鉴定与该标记分子相关的可溶性抗体(例如二抗(2°抗体)),随后可以鉴定能够与可溶性抗体结合的抗原。在一些实施方案中,标记分子附着或连接至本文所述的条形码(例如分子条形码)。

[0177] 本公开的各个方面涉及鉴定分子条形码的内容。如本文所用,在涉及分子条形码时,“鉴定”、“识别”和类似术语包括确定分子条形码的部分身份(例如部分序列信息)以及完整身份(例如完整序列信息)。在一些实施方案中,该术语包括确定或推断分子条形码的至少一部分的核苷酸序列(例如,根据与寡核苷酸探针的互补性)。在另一些实施方案中,该术语包括确定或推断分子条形码的某些特征,例如在分子条形码的一个或多个位点上存在或不存在特定的索引序列。因此,在一些实施方案中,本文使用的术语“条形码内容”、“条形码身份”和类似术语可以指与分子条形码有关的定性信息,而限于对分子条形码进行生化表征的特定序列信息(例如索引的核苷酸序列)。

[0178] 在一些实施方案中,条形码识别是通过观察条形码识别分子与分子条形码之间的不同关联事件来进行的,其中每个关联事件产生持续一个时段的信号幅度变化。在一些实施方案中,这些幅度变化被检测为一系列信号脉冲或信号轨迹输出中的一系列脉冲。如本文所述,信号脉冲信息可用于根据一系列信号脉冲中的条形码特异性模式鉴定条形码内容。在一些实施方案中,条形码特异性模式包括多个信号脉冲,每个信号脉冲包括脉冲持续时间。在一些实施方案中,多个信号脉冲可由条形码特异性模式中的脉冲持续时间分布的概括统计(例如平均值、中位数、时间衰减常数)来表征。在一些实施方案中,条形码特异性模式的平均脉冲持续时间在约1毫秒至约10秒之间(例如,约1ms至约1s之间、约1ms至约100ms之间、约1ms至约10ms之间、约10ms至约10s之间、约100ms至约10s之间、约1秒至约10s之间、约10ms至约100ms之间或约100ms至约500ms之间)。在一些实施方案中,平均脉冲持续时间在约50毫秒至约2秒之间、约50毫秒至约500毫秒之间或约500毫秒至约2秒之间。

[0179] 在一些实施方案中,对应于不同条形码内容的不同条形码特异性模式可根据概括统计的统计学显著差异彼此区分开来。例如,在一些实施方案中,一种条形码特异性模式可根据至少10毫秒(例如,约10ms至约10s之间、约10ms至约1s之间、约10ms至约100ms之间、约100ms至约10s之间、约1s至约10s之间或约100ms至约1s之间)的平均脉冲持续时间差值与另一种条形码特异性模式区分开来。在一些实施方案中,平均脉冲持续时间的差值为至少

50ms、至少100ms、至少250ms、至少500ms或更多。在一些实施方案中,平均脉冲持续时间的差值在约50ms至约1s之间、约50ms至约500ms之间、约50ms至约250ms之间、约100ms至约500ms之间、约250ms至约500ms之间或约500ms至约1s之间。在一些实施方案中,一种条形码特异性模式的平均脉冲持续时间与另一种条形码特异性模式的平均脉冲持续时间相差约10-25%、25-50%、50-75%、75-100%或100%以上,例如相差约2倍、3倍、4倍、5倍或更多。应当理解的是,在一些实施方案中,不同条形码特异性模式之间的平均脉冲持续时间的较小差异可能需要每个条形码特异性模式内更多的脉冲持续时间,从而以统计置信度彼此区分开来。

[0180] 在一些实施方案中,条形码特异性模式通常是指条形码识别分子与分子条形码之间的多个关联(例如结合)事件。在一些实施方案中,条形码特异性模式包括至少10个关联事件(例如,至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个或更多关联事件)。在一些实施方案中,条形码特异性模式包括约10至约1,000个关联事件(例如,约10至约500个关联事件,约10至约250个关联事件,约10至约100个关联事件,或约50至约500个关联事件)。在一些实施方案中,多个关联事件被检测为多个信号脉冲。

[0181] 在一些实施方案中,条形码特异性模式是指多个信号脉冲,其可通过本文所述的概括统计进行表征。在一些实施方案中,条形码特异性模式包括至少10个信号脉冲(例如,至少25个、至少50个、至少75个、至少100个、至少250个、至少500个、至少1000个或更多信号脉冲)。在一些实施方案中,条形码特异性模式包括约10至约1,000个信号脉冲(例如,约10至约500个信号脉冲,约10至约250个信号脉冲,约10至约100个信号脉冲,或约50至约500个信号脉冲)。

[0182] 在一些实施方案中,条形码特异性模式是指条形码识别分子与分子条形码之间在一个时间间隔内发生的多个关联(例如结合)事件。在一些实施方案中,条形码识别可以通过迭代清洗循环来进行,在迭代清洗循环中,分子条形码在不同的时段内暴露于不同的条形码识别分子组。在一些实施方案中,条形码特异性模式的时间间隔在约1分钟至约30分钟之间(例如,约1分钟至约20分钟之间、约1分钟至10分钟之间、约5分钟至约20分钟之间、约5分钟至约15分钟之间或约5分钟至约10分钟之间)。

[0183] 在一些实施方案中,可以对实验条件进行设置,以实现允许足够的关联事件的时间间隔,这些关联事件提供了条形码特异性模式的所需置信度水平(例如,在给定的一组条形码识别分子在清洗周期中被移除之前)。这可以例如通过基于以下各种特征设置反应条件来实现,包括:试剂浓度、一种试剂与另一种试剂的摩尔比(例如,条形码识别分子与分子条形码的比率、一种条形码识别分子与另一种条形码识别分子的比率)、不同试剂类型的数量(例如,不同类型的条形码识别分子的数量)、结合特性(例如,条形码识别分子结合的动力学和/或热力学结合参数)、试剂修饰(例如,多元醇修饰和可改变相互作用动力学的其他蛋白质修饰)、反应混合物组分(例如一种或多种组分,如pH、缓冲剂、盐、二价阳离子、表面活性剂和本文所述的其他反应混合物组分)、反应温度以及本领域技术人员显而易见的各种其他参数及其组合。反应条件可根据本文所述的一个或多个方面进行设置,包括例如信号脉冲信息(例如脉冲持续时间、脉冲间持续时间、幅度变化)、标记策略(例如荧光团、连接基团的数量和/或类型)、表面修饰(例如样品孔表面修饰,包括分子条形码固定)、样品制备(例如分析物尺寸、用于固定的分子条形码修饰)以及本文所述的其他方面。

[0184] 条形码识别分子

[0185] 在一些方面,本公开提供了条形码识别分子及其使用方法。在一些实施方案中,可根据与条形码位点的期望结合动力学选择或设计条形码识别分子。例如,在一些方面,本文所述的方法可以以多重格式执行,其中多个位点必须根据每个位点的结合相互作用彼此区分开来。因此,一个位点上的结合相互作用应与另一个位点上的结合相互作用有足够大的差异,使得可以根据信号脉冲信息以更高的置信度区分不同的位点。

[0186] 不希望囿于理论的,条形码识别分子根据由关联速率或结合的“开启”速率( $k_{on}$ )和解离速率或结合的“关闭”速率( $k_{off}$ )定义的结合亲和力( $K_D$ )与条形码位点结合。速率常数 $k_{off}$ 和 $k_{on}$ 分别是脉冲持续时间(例如,对应于可检测关联事件的时间)和脉冲间持续时间(例如,可检测关联事件之间的时间)的关键决定因素。在一些实施方案中,可以设计这些动力学速率常数,以实现给出最佳准确性的脉冲持续时间和脉冲频率(例如,信号脉冲的频率)。

[0187] 在一些实施方案中,条形码识别分子可以由本领域技术人员使用常规已知技术进行设计。在一些实施方案中,理想的特性可以包括以较低至中等亲和力(例如, $K_D$ 为约50nM或更高,例如,约50nM至约50 $\mu$ M、约100nM至约10 $\mu$ M、约500nM至约50 $\mu$ M)与分子条形码上的一个或多个位点结合的能力。例如,在一些方面,本公开提供了通过检测可逆结合相互作用来进行条形码识别的方法,并且与高亲和力结合相互作用相比,以较低至中等亲和力可逆结合分子条形码的条形码识别分子有利地提供了更多信息的结合数据,并且确定性更高。

[0188] 在一些实施方案中,条形码识别分子以小于约 $10^{-6}$ M(例如,小于约 $10^{-7}$ M、小于约 $10^{-8}$ M、小于约 $10^{-9}$ M、小于约 $10^{-10}$ M、小于约 $10^{-11}$ M、小于约 $10^{-12}$ M、至低至 $10^{-16}$ M)的解离常数( $K_D$ )结合分子条形码上的一个或多个位点,而不与其他非靶标(例如,非互补)位点显著结合。在一些实施方案中,条形码识别分子以小于约100nM、小于约50nM、小于约25nM、小于约10nM或小于约1nM的 $K_D$ 结合分子条形码上的一个或多个位点。在一些实施方案中,条形码识别分子以约50nM至约50 $\mu$ M之间(例如,约50nM至约500nM之间、约50nM至约5 $\mu$ M之间、约500nM至约50 $\mu$ M之间、约5 $\mu$ M至约50 $\mu$ M之间或约10 $\mu$ M至约50 $\mu$ M之间)的 $K_D$ 结合分子条形码上的一个或多个位点。在一些实施方案中,条形码识别分子以约50nM的 $K_D$ 结合分子条形码上的一个或多个位点。

[0189] 在一些实施方案中,条形码识别分子以至少 $0.1s^{-1}$ 的解离速率( $k_{off}$ )结合分子条形码上的一个或多个位点。在一些实施方案中,解离速率在约 $0.1s^{-1}$ 至约 $1,000s^{-1}$ 之间(例如,约 $0.5s^{-1}$ 至约 $500s^{-1}$ 之间、约 $0.1s^{-1}$ 至约 $100s^{-1}$ 之间、约 $1s^{-1}$ 至约 $100s^{-1}$ 之间或约 $0.5s^{-1}$ 至约 $50s^{-1}$ 之间)。在一些实施方案中,解离速率在约 $0.5s^{-1}$ 至约 $20s^{-1}$ 之间。在一些实施方案中,解离速率在约 $2s^{-1}$ 至约 $20s^{-1}$ 之间。在一些实施方案中,解离速率在约 $0.5s^{-1}$ 至约 $2s^{-1}$ 之间。

[0190] 在一些实施方案中, $K_D$ 或 $k_{off}$ 的值可以是已知的文献值,或者该值可以凭经验确定。例如, $K_D$ 或 $k_{off}$ 的值可以在单分子测定或集合测定中测量。在一些实施方案中, $k_{off}$ 的值可以根据本文其他地方所述的单分子测定中获得的信号脉冲信息凭经验确定。例如, $k_{off}$ 的值可以用平均脉冲持续时间的倒数来近似确定。在一些实施方案中,条形码识别分子结合两个或更多个化学上不同的条形码位点,这两个或更多个位点中的每一个的 $K_D$ 或 $k_{off}$ 均不同。在一些实施方案中,第一位点的第一 $K_D$ 或 $k_{off}$ 与第二位点的第二 $K_D$ 或 $k_{off}$ 相差至少10%(例如至少25%、至少50%、至少100%或更多)。在一些实施方案中, $K_D$ 或 $k_{off}$ 的第一和第二值相差约10-25%、25-50%、50-75%、75-100%或100%以上,例如相差约2倍、3倍、4倍、5倍

或更多。

[0191] 如本文所述,条形码识别分子可以是能够结合分子条形码上的一个或多个位点而非其他条形码位点的任何生物分子。识别分子包括例如寡核苷酸、核酸和蛋白质,其中任何一种可以是合成的或重组的。

[0192] 在一些实施方案中,条形码识别分子是寡核苷酸(例如寡核苷酸探针)。在一些实施方案中,本文提供的方法可通过使核酸条形码与结合核酸条形码上的一个或多个位点的寡核苷酸探针接触来执行。在一些实施方案中,寡核苷酸探针与核酸条形码之间的结合是通过杂交或退火进行的。在一些实验条件(例如浓度、温度)之外,结合特性在很大程度上受寡核苷酸探针的长度和含量及其与核酸条形码上与之结合(例如杂交或退火)的位点的互补程度的影响。因此,在一些实施方案中,寡核苷酸探针提供了多种用于调节信号脉冲特性的可调节特征,包括但不限于长度、核苷酸含量(例如G/C含量、具有不同结合特性的核苷酸类似物,如LNA或PNA类似物)、互补程度以及实验因素,如浓度、温度、缓冲条件(例如pH、盐、镁)和DNA变性或稳定溶剂。

[0193] 在一些实施方案中,寡核苷酸探针的长度为至少4个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸探针的长度为至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少12个、至少15个、至少20个、至少25个或至少30个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸探针的长度少于30个核苷酸(例如,长度少于25个、少于20个、少于15个、少于12个、少于10个核苷酸)。在一些实施方案中,寡核苷酸探针的长度在约3至约30个核苷酸之间(例如,长度在约3至约10个核苷酸之间、约3至约8个核苷酸之间、约5至约25个核苷酸之间、约5至约15个核苷酸之间或约5至10个核苷酸之间)。在一些实施方案中,寡核苷酸探针的长度为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或50个核苷酸。

[0194] 在一些实施方案中,寡核苷酸探针可与一个或多个与寡核苷酸探针不完全互补的条形码位点结合,并为其提供条形码内容信息。例如,在一些实施方案中,寡核苷酸探针与一个或多个条形码位点结合,所述条形码位点的序列与寡核苷酸的互补性小于100%(例如,小于99%、小于98%、小于95%、小于90%、小于85%、小于80%、小于75%、小于70%、小于65%、小于60%、小于55%、小于50%、小于45%、小于40%、小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于5%、小于1%或更少)。

[0195] 除寡核苷酸外,根据本公开内容,核酸适体也可用作条形码识别分子。核酸适体是经过设计以所需的亲和力和选择性结合靶标的核酸分子。因此,可以使用本领域已知的选择和/或富集技术将核酸适体设计为与所需的条形码位点结合。在一些实施方案中,条形码识别分子包括核酸适体,如DNA适体或RNA适体。

[0196] 在一些实施方案中,条形码识别分子是蛋白质或多肽。在一些实施方案中,识别分子是抗体或抗体的抗原结合部分、含SH2结构域的蛋白质或其片段或失活的酶促生物分子,例如肽酶、氨基转移酶、核酶、适体酶(apozyme)或tRNA合成酶,包括2016年9月2日提交的题为“MOLECULES AND METHODS FOR ITERATIVE POLYPEPTIDE ANALYSIS AND PROCESSING”的美国专利申请号15/255,433中所述的氨酰tRNA合成酶。

[0197] 在一些实施方案中,条形码识别分子是氨基酸识别分子。例如,在一些实施方案中,分子条形码包括多肽条形码,并且氨基酸识别分子可用于从多肽中破译条形码内容。在

一些实施方案中,氨基酸识别分子结合一种或多种类型的具有不同动力学结合特性的末端氨基酸。在一些实施方案中,氨基酸识别分子结合具有不同动力学结合特性的多肽的不同区段。例如,在一些实施方案中,氨基酸识别分子与在N-末端或C-末端包含相同类型的氨基酸但在倒数第二个位置(例如n+1)和/或随后的位置相对于末端氨基酸的氨基酸内容不同(例如在第二、三、四、五或更高位置中的一个或多个位置处的氨基酸类型不同)的多肽区段结合。这些概念(例如,基于仅在倒数第二个位置或更高位置处的氨基酸内容差异的不同结合动力学)和氨基酸识别分子的其他示例在2019年11月15日提交的题为“METHODS AND COMPOSITIONS FOR PROTEIN SEQUENCING”的PCT国际公开号W02020102741A1号中有更全面的描述,其全部内容通过引用的方式并入本文。

[0198] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括使分子条形码与一个或多个条形码识别分子接触。出于本讨论的目的,本文所述方法的上下文中的一个或多个条形码识别分子可以被替代地称为一组条形码识别分子。在一些实施方案中,一组条形码识别分子包括至少两个至多二十个(例如,2至15个之间、2至10个之间、5至10个之间、10至20个之间)条形码识别分子。在一些实施方案中,一组条形码识别分子包括二十个以上(例如20至25个、20至30个)条形码识别分子。然而,应当理解的是,根据本公开的方法,可以使用任意数量的条形码识别分子以适应所需的用途。

[0199] 根据本公开,在一些实施方案中,分子条形码的内容可以通过检测连接至条形码识别分子的标签的发光来鉴定。在一些实施方案中,标记的条形码识别分子包括结合至少一个分子条形码的条形码识别分子和具有与条形码识别分子相关联的发光的光标签。这样,发光(例如,发光寿命、发光强度和本文其他地方所述的其他发光特性,包括基于发光的动力学结合数据)可与条形码识别分子的结合相关联,以鉴定至少一个分子条形码。在一些实施方案中,在根据本公开的方法中可以使用多种类型的标记的条形码识别分子,其中每种类型包含发光标签,所述发光标签的发光在多种类型中是可独特地鉴定的。合适的发光标签可以包括发光分子,如荧光团染料,以及在本文其他地方有描述。

[0200] 在一些实施方案中,条形码识别分子包括具有受结合诱导的发光的光标签。例如,在一些实施方案中,标记的适体可以包括供体标签和受体标签。作为游离和未结合的分子,标记的适体采用一种构象,其中供体标签和受体标签之间的距离限制了标签之间的可检测的FRET(例如,约10nm或更多)。在与条形码位点结合后,标记的适体采用一种构象,其中供体标签和受体标签之间的距离可促进标签之间的可检测的FRET(例如,约10nm或更小)。在另一些实施方案中,标记的适体可以包括淬灭部分,其功能类似于分子信标,其中作为游离分子在内部淬灭发光,并在与条形码位点结合后恢复发光(参见Hamaguchi, et al. (2001) *Analytical Biochemistry* 294,126-131)。对于本领域技术人员来说,类似的和替代的标记策略是显而易见的,例如在标记的适体和标记的分子条形码之间使用FRET。不希望囿于理论的,据信这些和其他类型的受结合诱导的发光机制可以有利地减少或消除背景发光,从而提高本文所述方法的整体灵敏度和准确性。

[0201] 在一些实施方案中,分子条形码内容可以通过检测标记的条形码识别分子的一个或多个电特性来鉴定。在一些实施方案中,标记的条形码识别分子包括结合至少一个分子条形码的条形码识别分子和与条形码识别分子相关联的电导标签。这样,所述一个或多个电特性(例如电荷、电流振荡颜色和其他电特性,包括基于电导率的动力学结合数据)可与

条形码识别分子的结合相关联,以鉴定至少一个分子条形码。在一些实施方案中,多种类型的标记的条形码识别分子可用于根据本公开的方法中,其中每种类型包括电导标签,所述电导标签产生在多种类型中可独特地鉴定的电信号变化(例如电导率的变化,如电导率振幅的变化和条形码特异模式的电导率转换)。在一些实施方案中,多种类型的标记的条形码识别分子各自包括具有不同数量的带电基团(例如不同数量的带负电和/或带正电基团)的电导标签。因此,在一些实施方案中,电导标签是电荷标签。电荷标签的示例包括树枝状聚合物、纳米颗粒、核酸和其他具有多个带电基团的聚合物。在一些实施方案中,电导标签可通过其净电荷(例如净正电荷或净负电荷)、其电荷密度和/或其带电基团的数量进行独特地鉴定。

[0202] 实施例

[0203] 参考以下实施例进一步描述本公开的实施方案,这些实施例旨在是说明性的而非限制性性质。

[0204] 实施例1. 制备链霉亲和素固定化的PLL表面并检测低浓度下染料标记的dsDNA分子的结合事件

[0205] 如下产生图8所示的检测芯片(例如,包含功能化到每个样品孔的内部基底上的带正电荷的分子):

[0206] 1. 用70%异丙醇(3次)、0.1%吐温-20(3次)和1X结合缓冲液(50mM MOPS、75mM KOAc、10mM DTT、0.03%吐温-20,pH 7.5)(3次)润湿底部表面含有用生物素-PEG-硅烷功能化的纳米孔的互补金属-氧化物-半导体(CMOS)芯片。

[0207] 2. 将芯片与20nM链霉亲和素在1X结合缓冲液中室温孵育30分钟。

[0208] 3. 用SC-6缓冲液(NaCl 200-350mM、KCl 10-30mM、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3mM、KHPO<sub>4</sub> 1mM、4-硝基苯甲酸5mM、D-葡萄糖50mM、0.1% Tween-20、pH=7.5)洗涤芯片5次。

[0209] 4. 通过在SC-6中加入100nM的生物素-聚赖氨酸(PLL),室温孵育30分钟,并用SC-6洗涤5次,使芯片功能化。用这种方法产生的检测芯片平均每1000nm<sup>2</sup>提供2-3个生物素,随后的聚赖氨酸附着每1000nm<sup>2</sup>提供约40-300个正电荷,这取决于所用聚赖氨酸的长度。

[0210] 5. 将反应缓冲液(含有氧清除系统的SC-6缓冲液)加入芯片中,开始检测运行。

[0211] 6. 检测10分钟后,向反应缓冲液中加入25bp Atto-Rho6G标记的dsDNA分子,最终浓度为25pM,继续检测50分钟。

[0212] 7. 从检测运行中收集的轨迹显示出一种清晰的脉冲行为模式,这种模式是在加入染料标记的dsDNA分子后开始的,这表明以这种方式制备的芯片能成功检测到单个染料标记的DNA分子在极低浓度下的可逆结合事件。

[0213] 图13显示了从检测运行中收集的示例轨迹。该示例轨迹(由CMOS芯片的荧光寿命敏感操作产生的两个时间bin之间的分割)显示,由于dsDNA与纳米孔底部的PLL功能化表面的可逆结合,在加入标记的dsDNA后开始出现脉冲。实施例2. 制备链霉亲和素固定化的PLL表面,检测低浓度下不同标记的dsDNA分子,并确定染料比率。

[0214] 用实施例1中的方法产生的检测芯片用于显示在极低浓度下检测染料标记的dsDNA分子的比率,具体如下:

[0215] 1. 分别制备两种类型的含有可区分荧光团的dsDNA分子(20-40bp)(一种含有Cy3,另一种含有Atto-Rho6G,在Quantum-Si CMOS芯片上可通过荧光寿命区分)。这两种类型的

标记的dsDNA分子以1:1的比率混合,并在反应缓冲液(含有氧清除系统的SC-6缓冲液)中各自稀释至25pM的最终浓度。

[0216] 2.将样品加入如实施例1所制备的CMOS芯片中,并进行1小时的检测运行。

[0217] 3.从检测运行中收集的数据由包含信号脉冲的轨迹组成,这些信号脉冲与标记的dsDNA分子与带正电荷的PLL表面的可逆结合事件相对应。根据CMOS芯片在脉冲期间检测到的荧光寿命信息,对信号脉冲进行鉴定,并将每个脉冲分配给Cy3或Atto-Rho6G。

[0218] 如图14所示,与以1:1的比率混合两种类型的标记的dsDNA分子相一致,Cy3脉冲和Atto-Rho6G脉冲被确定为以大致相等的量(52%对48%)存在。确定了每个脉冲的“bin比值”(CMOS传感器的寿命敏感时间bin内收集的相对信号的量度,与染料的荧光寿命相对应),并且应用于bin比值分布的高斯混合物模型用于将每个脉冲分类为Cy3或Atto-Rho6G的检测事件。

[0219] 实施例3.检测染料标记的dsDNA分子在包含直接与带正电荷的胺封端硅烷耦合的表面的芯片上的可逆结合事件。

[0220] 如下制备包含带正电荷的胺封端硅烷的检测芯片:

[0221] 1.如图9所示,通过硅烷表面钝化化学用胺封端硅烷分子制备CMOS芯片。该过程将带正电荷的胺封端分子直接耦合到位于纳米孔底部的玻璃表面(也如图9所示)。

[0222] 2.用70%异丙醇(3次)、0.1%吐温-20(3次)润湿芯片,并用缓冲液SC-6洗涤5次。

[0223] 3.分别制备两种类型的含有可区分荧光团的dsDNA分子(20-40bp)(一种含有Cy3,另一种含有Atto-Rho6G,在Quantum-Si CMOS芯片上可通过荧光寿命区分)。两种类型的标记的dsDNA分子以1:1的比率混合,并在反应缓冲液(含有氧清除系统的SC-6缓冲液)中各自稀释至25pM的最终浓度。

[0224] 4.将样品加入CMOS芯片中,并进行1小时的检测。

[0225] 5.观察到成功的动态脉冲行为。使用这些检测芯片收集的代表性数据见图10A-10D。

[0226] 通过上述方法生产的检测芯片通过可用孔开口面积提供有限的电荷密度,估计电荷密度为每1000nm<sup>2</sup>80-120个计数。

[0227] 本公开的其他方面

[0228] 上述示例性实施方案和实施例的各个方面可以以各种组合和子组合进行组合,以产生本公开的其他实施方案。在上述示例性实施方案和实施例的各个方面并非相互排斥的情况下,旨在所有这些组合和子组合都在本公开的范围内。对于本领域技术人员来说,本公开的实施方案显然包括许多方面。因此,权利要求的范围不应受描述和实施例中所述的优选实施方案的限制,而应给予与作为整体的描述相一致的最宽泛的解释。

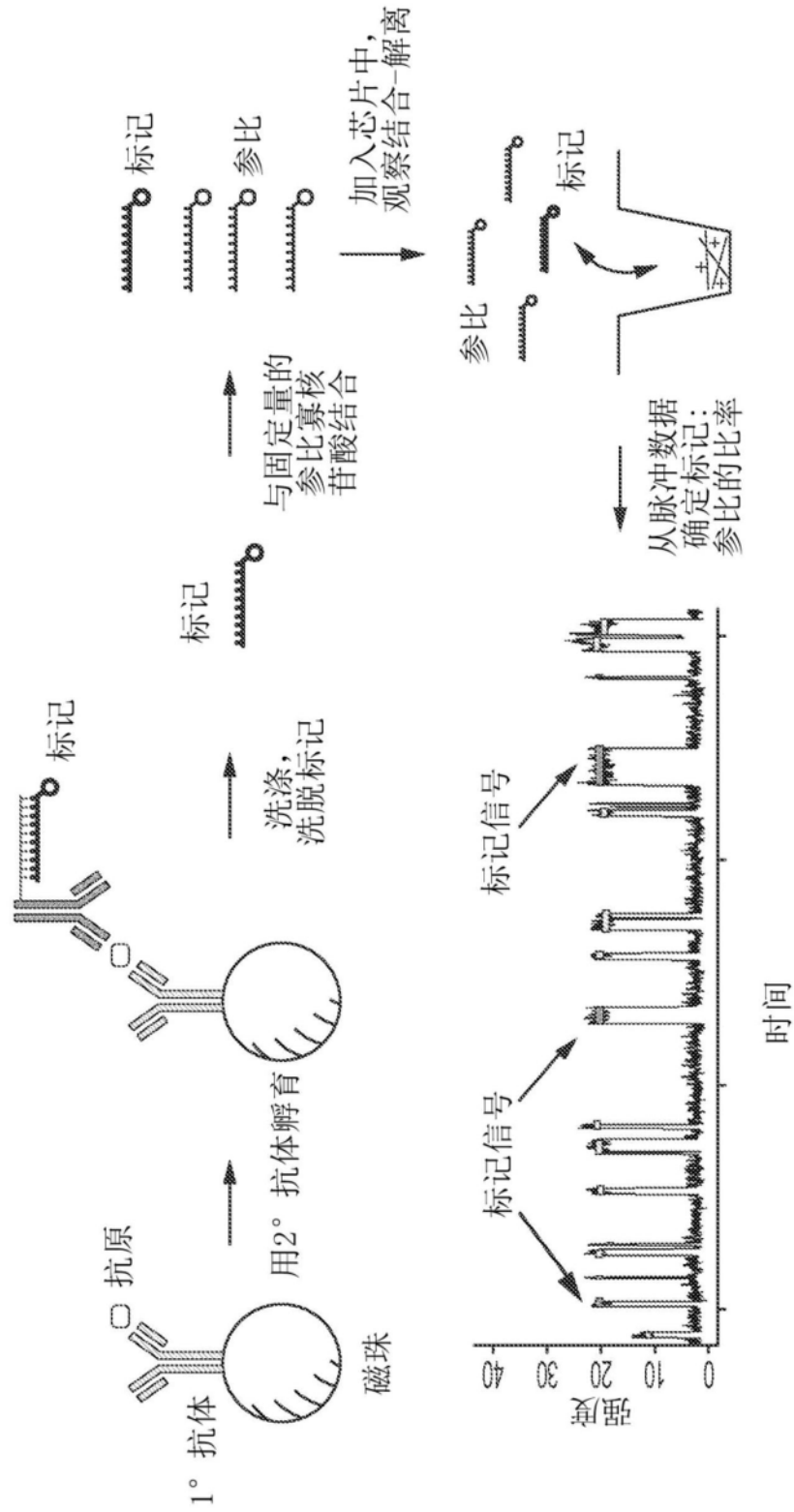


图1

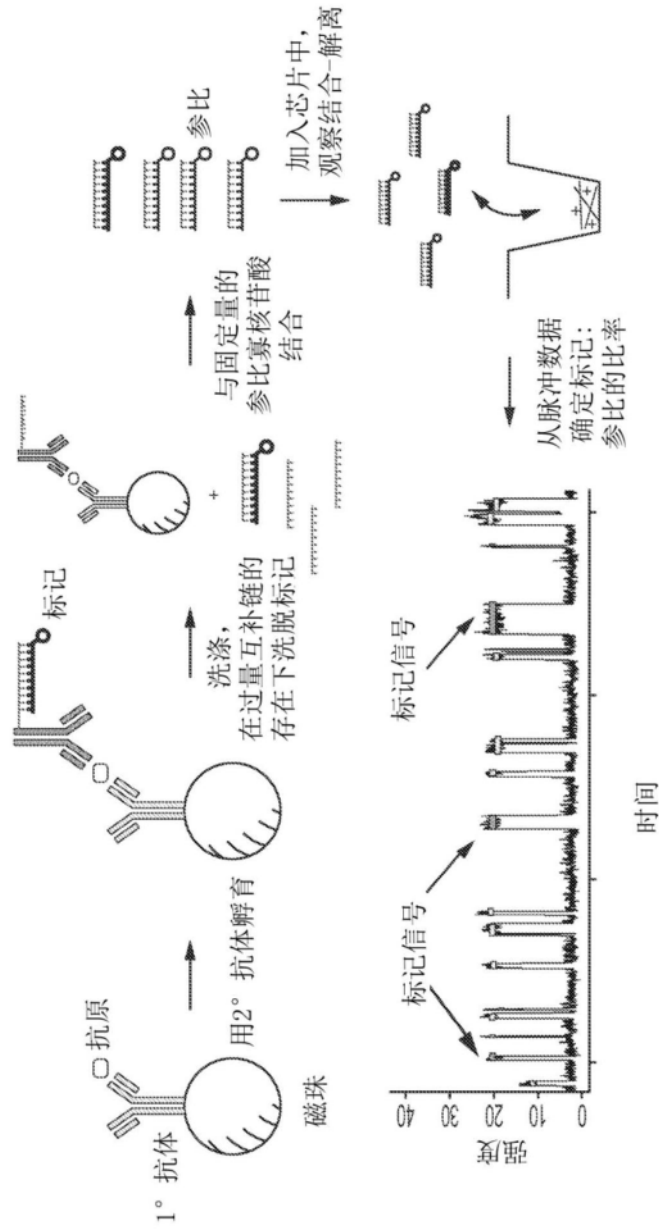


图2

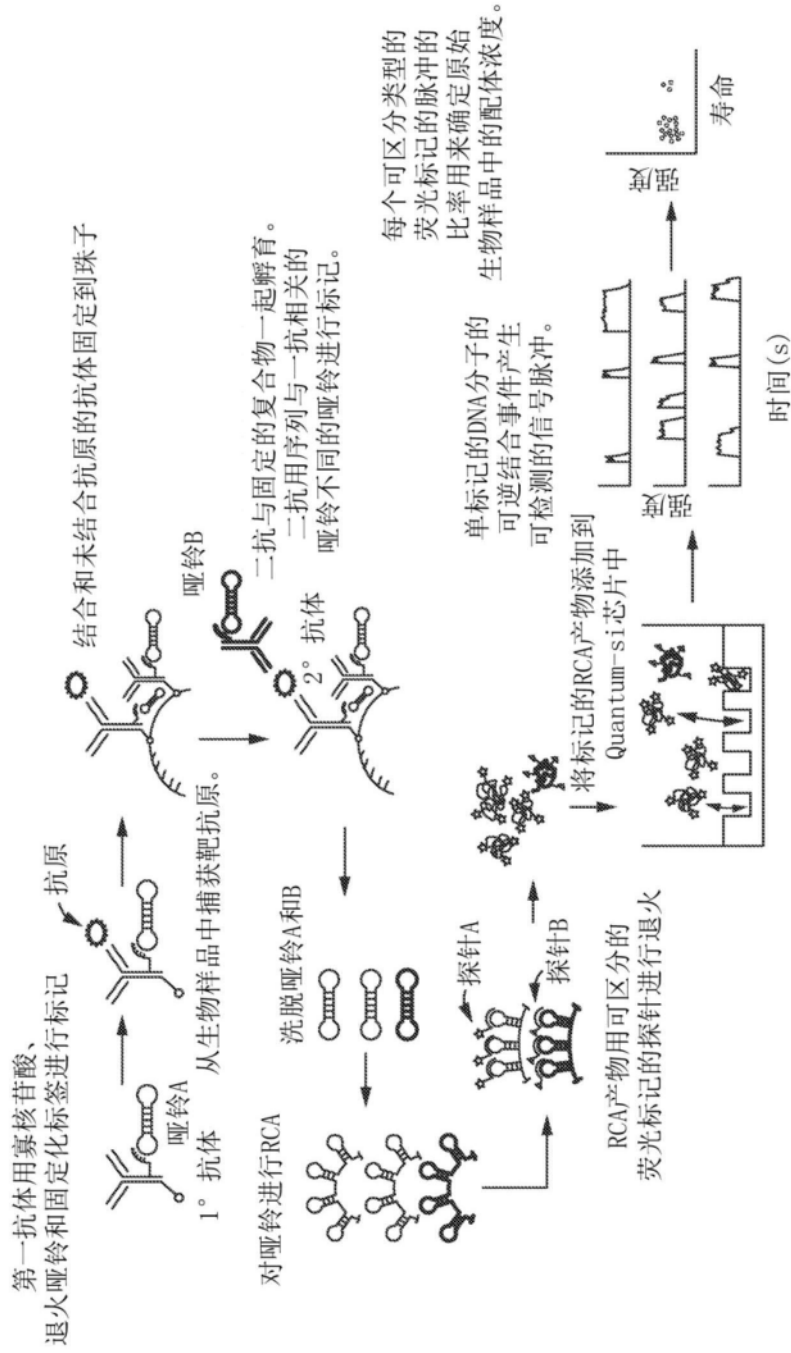


图3

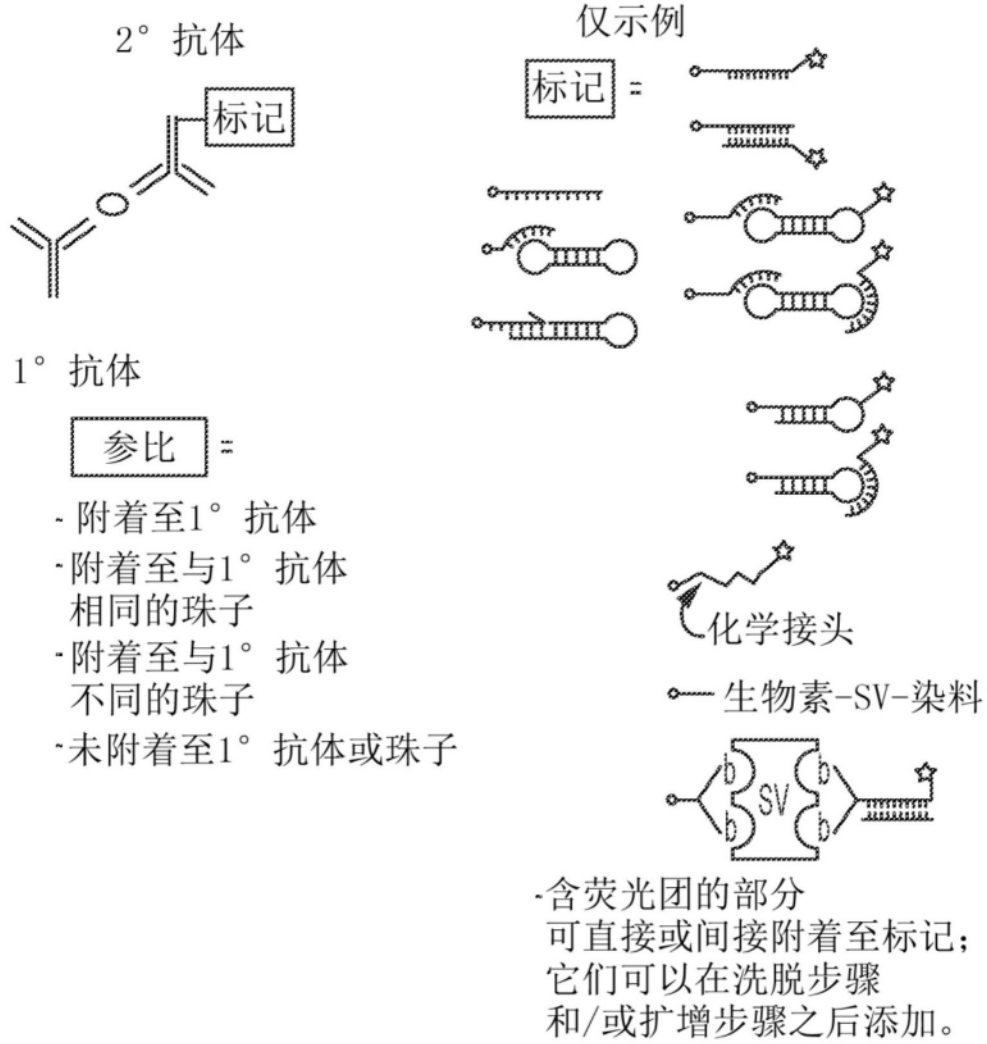


图4

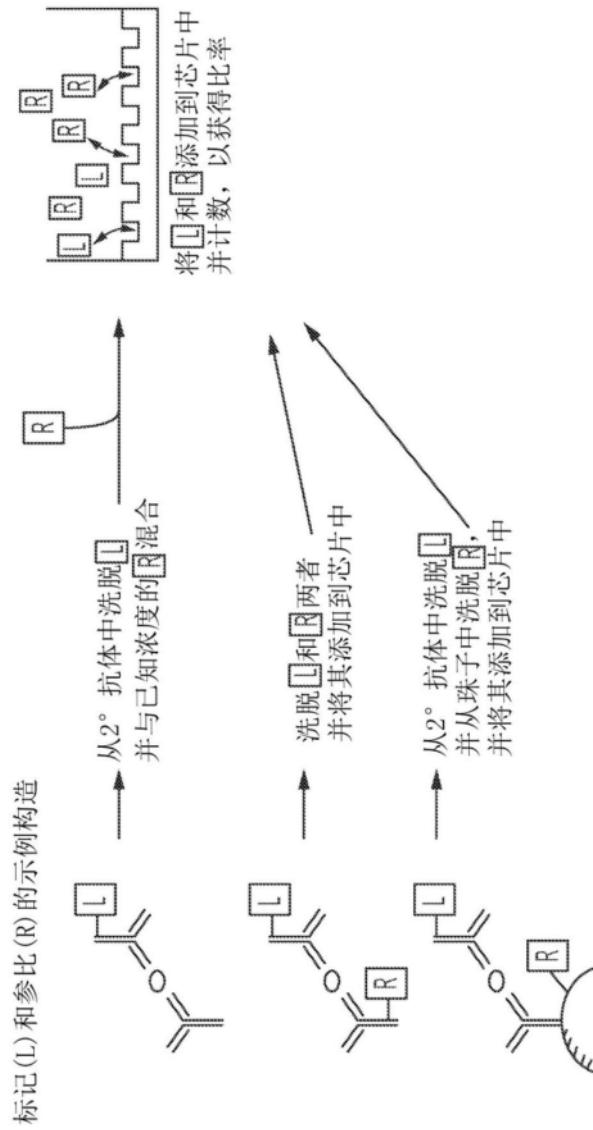


图5

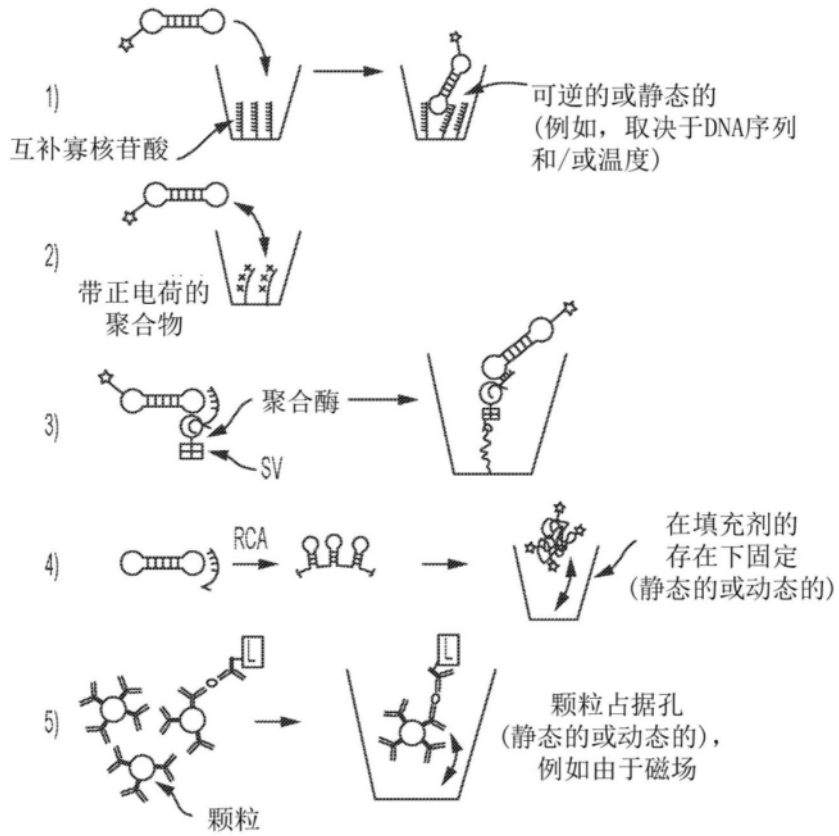


图6

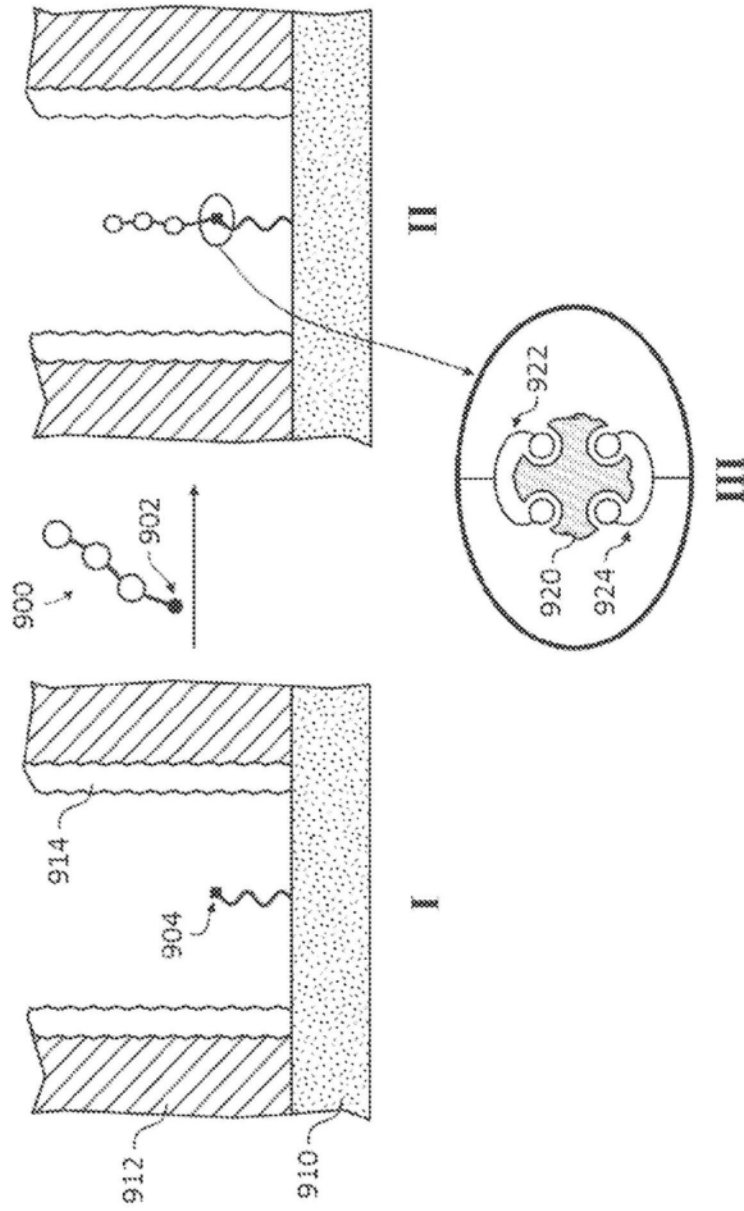


图7

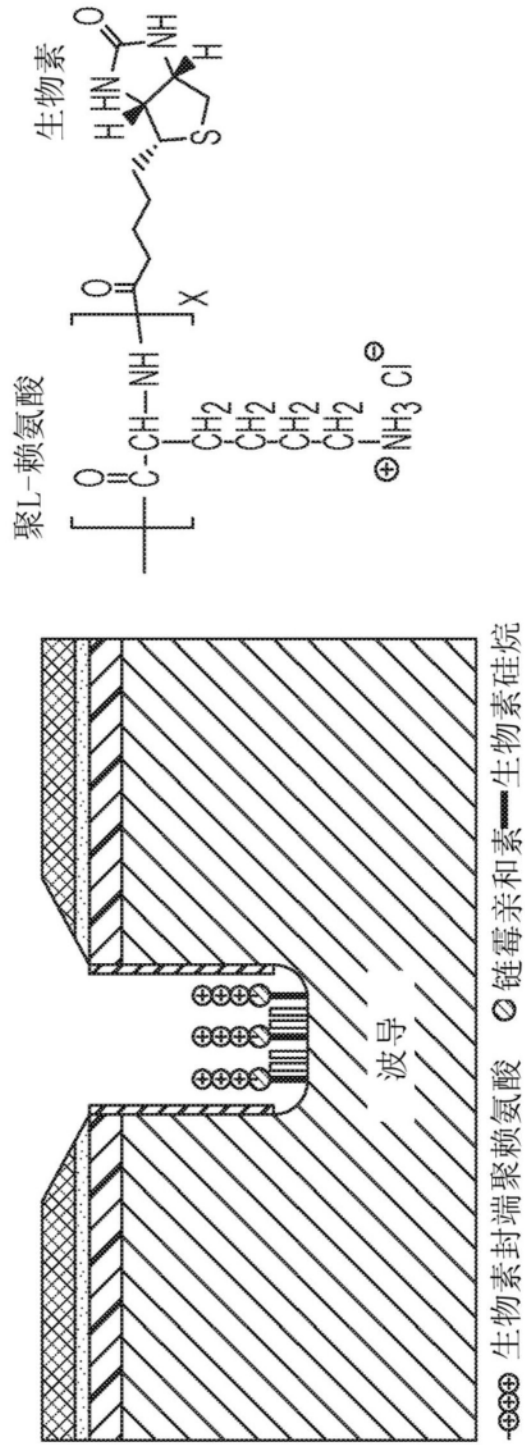


图8

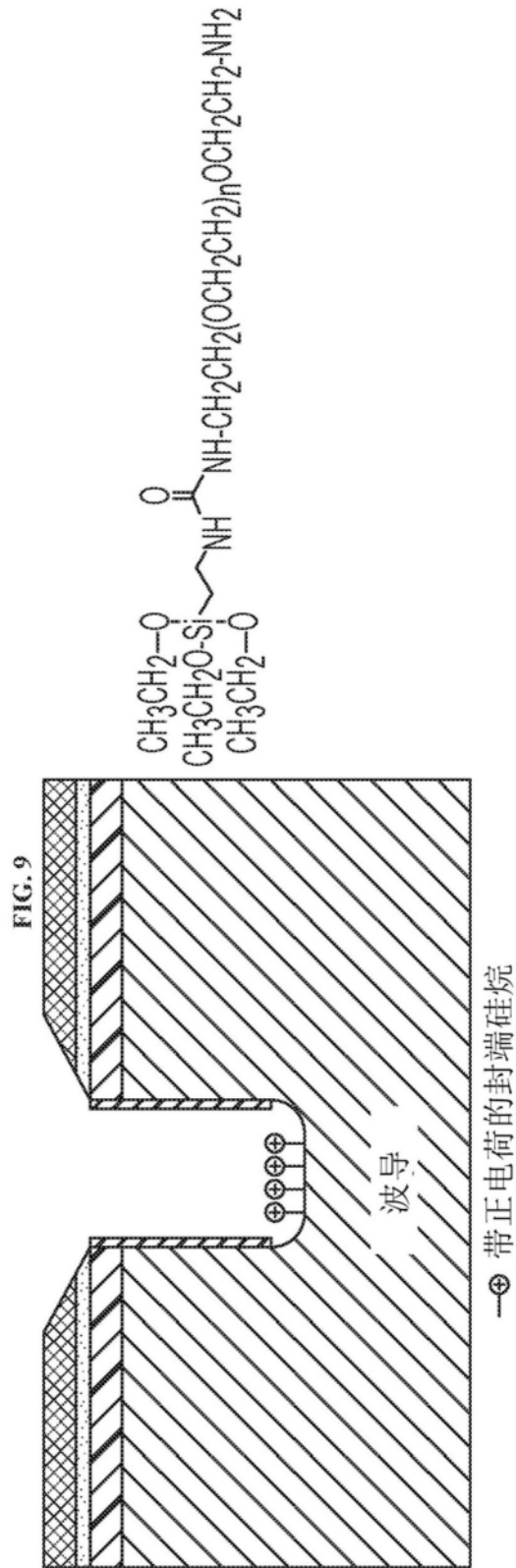


图9

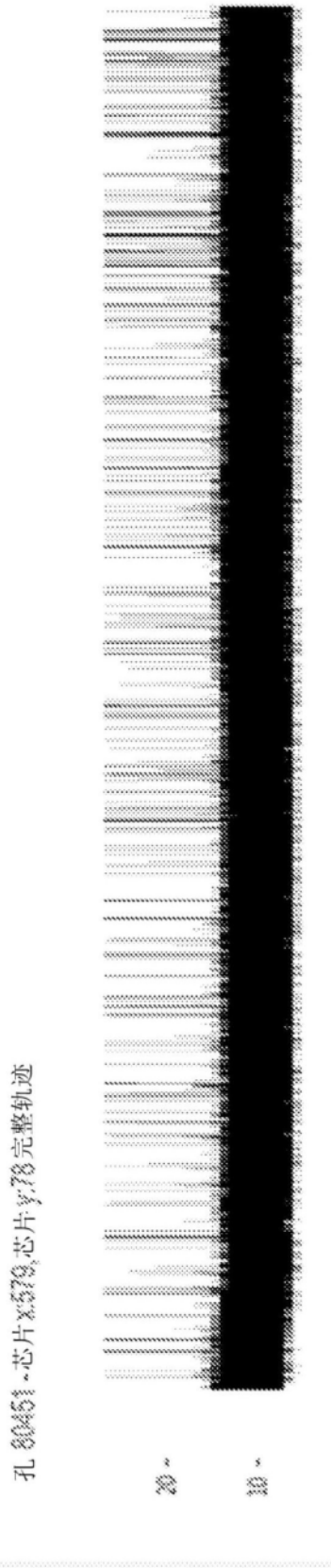


图10A

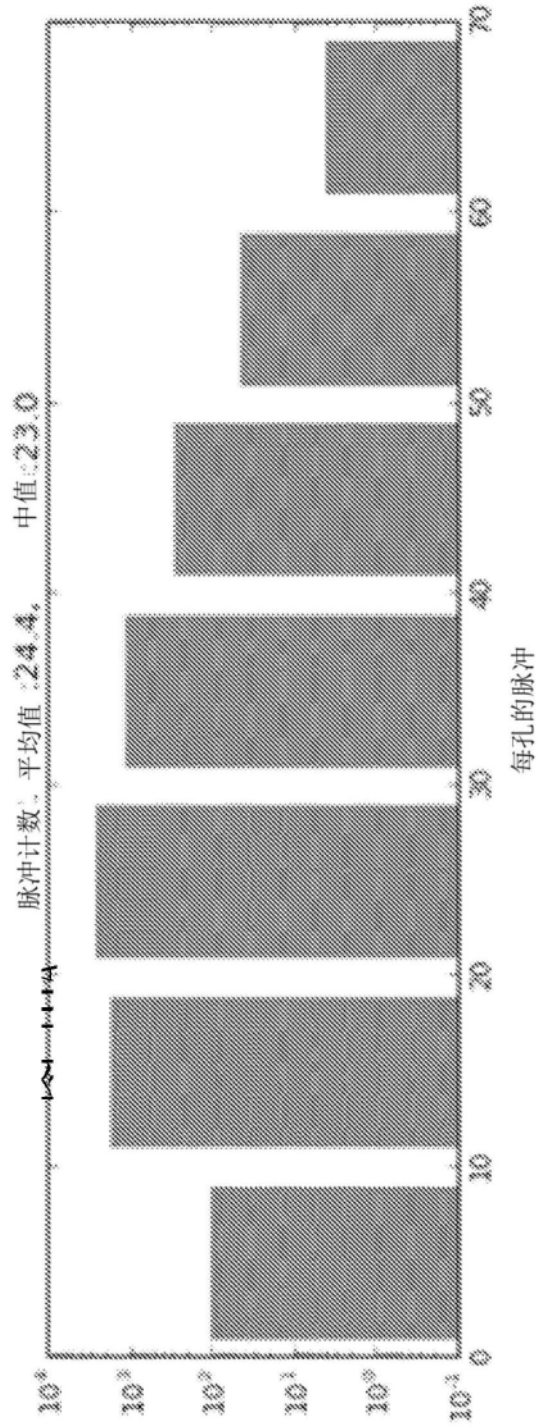


图10B

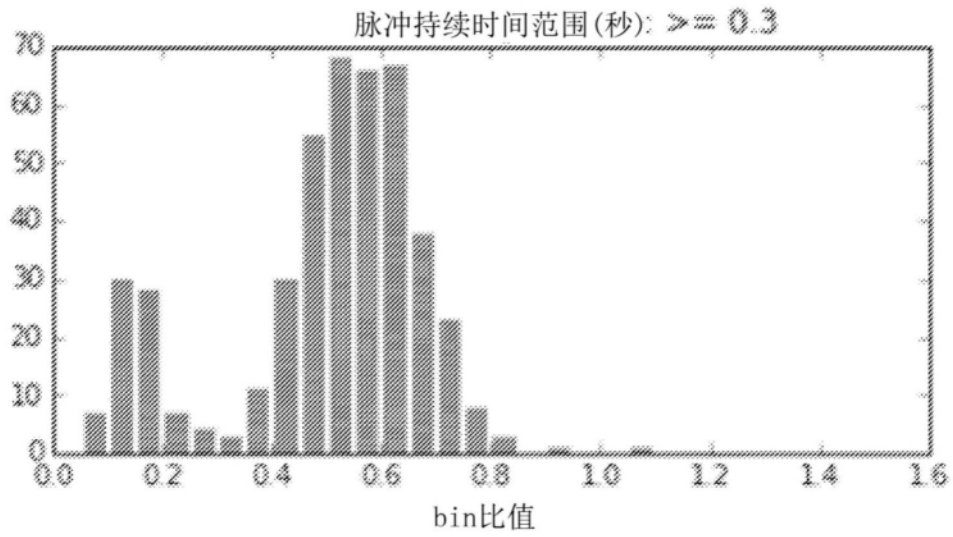


图10C

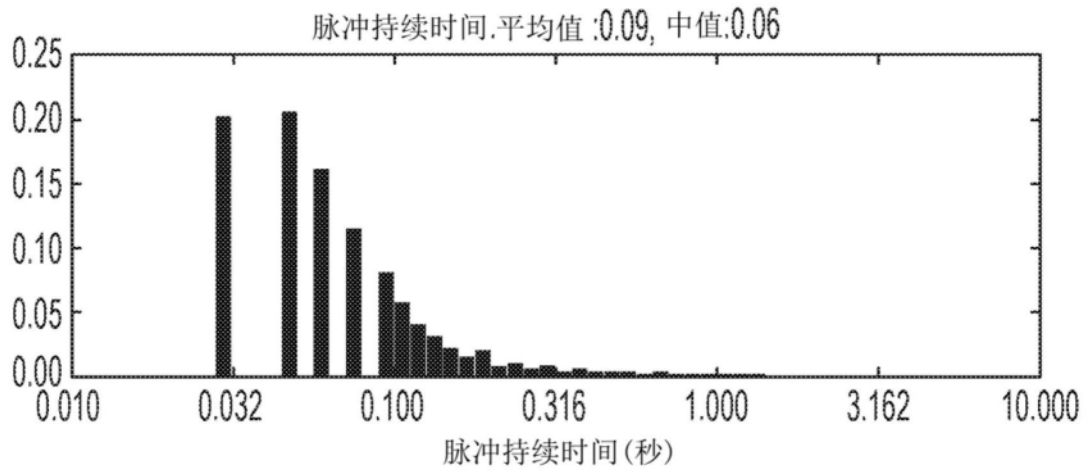


图10D

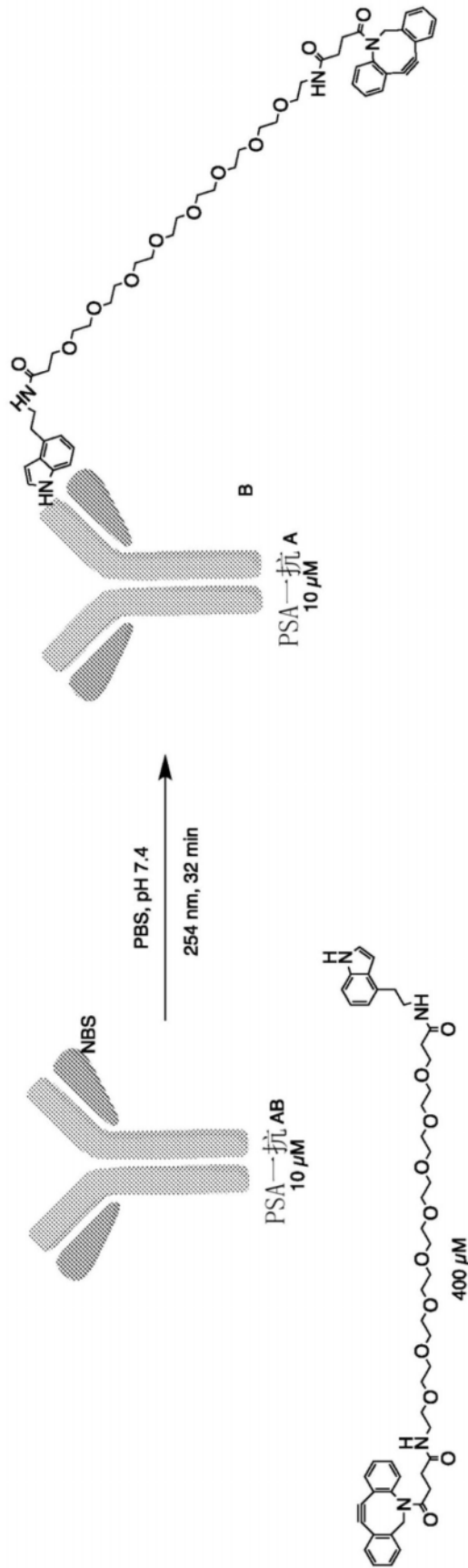


图11A

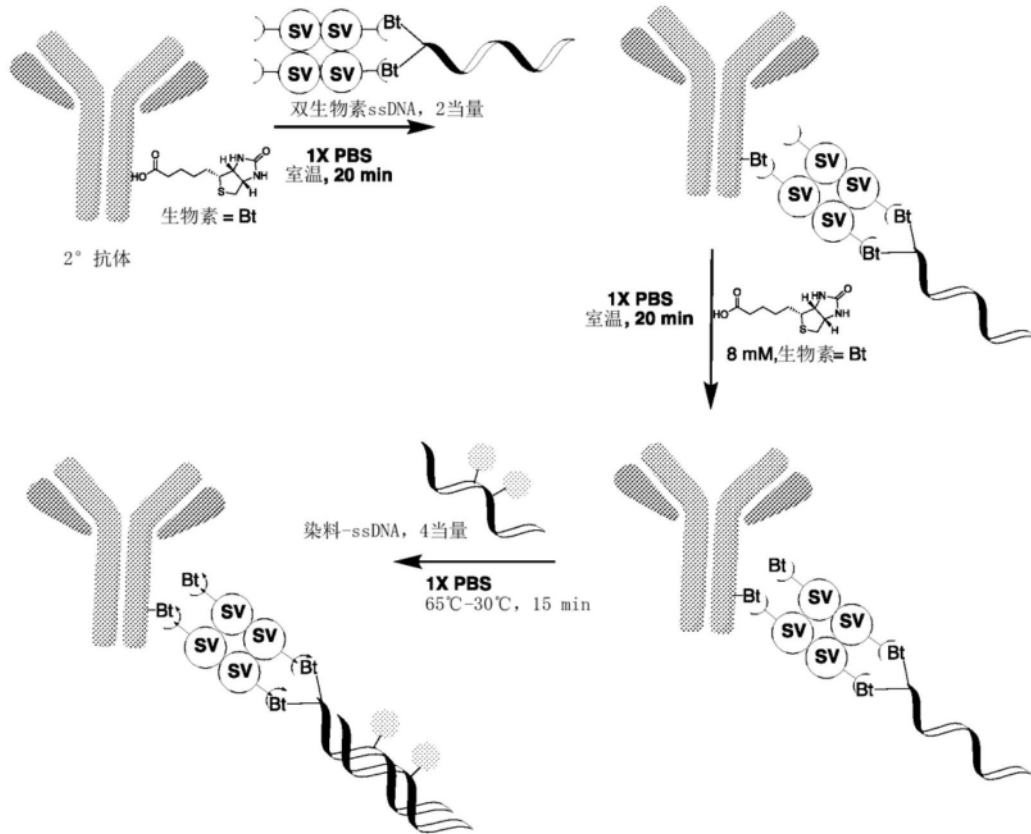


图11B

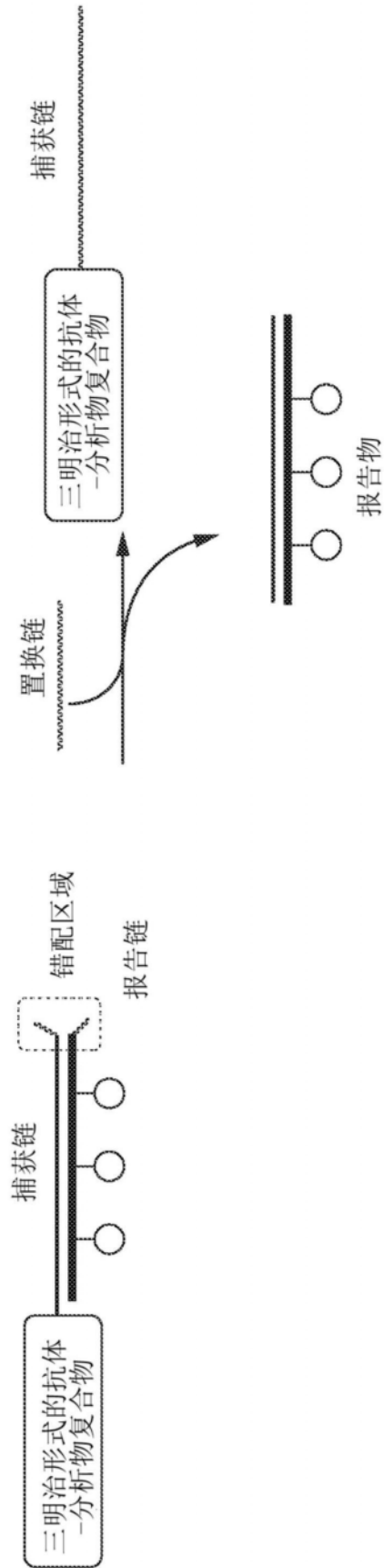


图12A

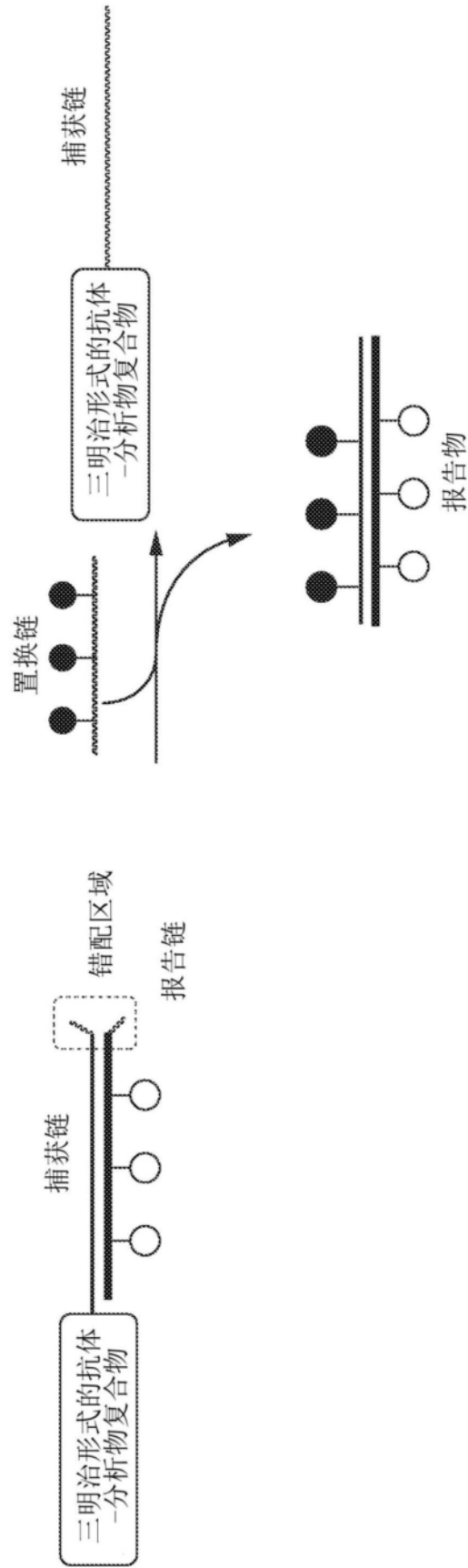


图12B

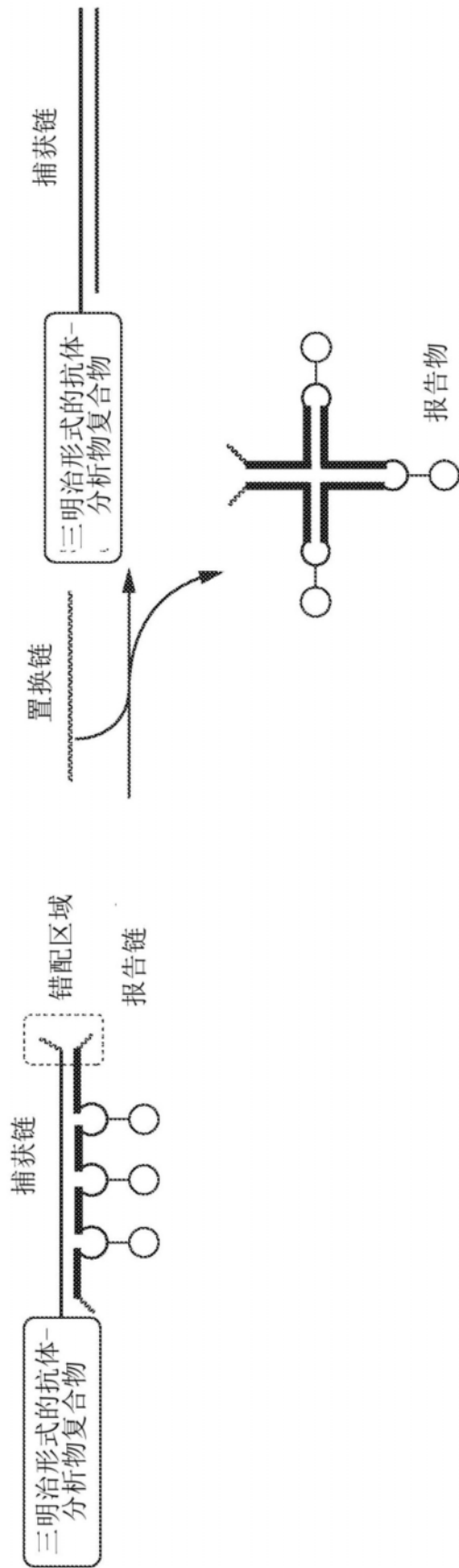


图12C

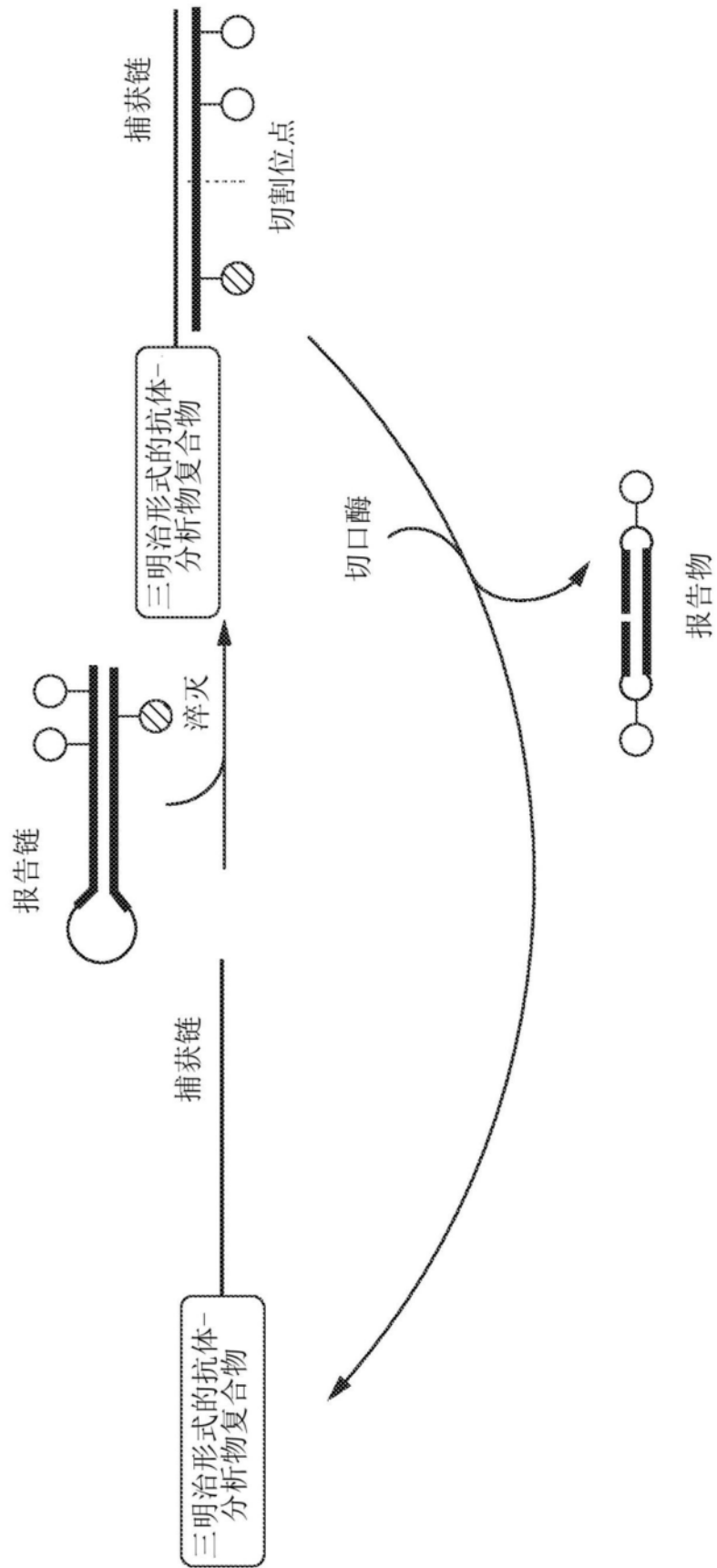


图12D

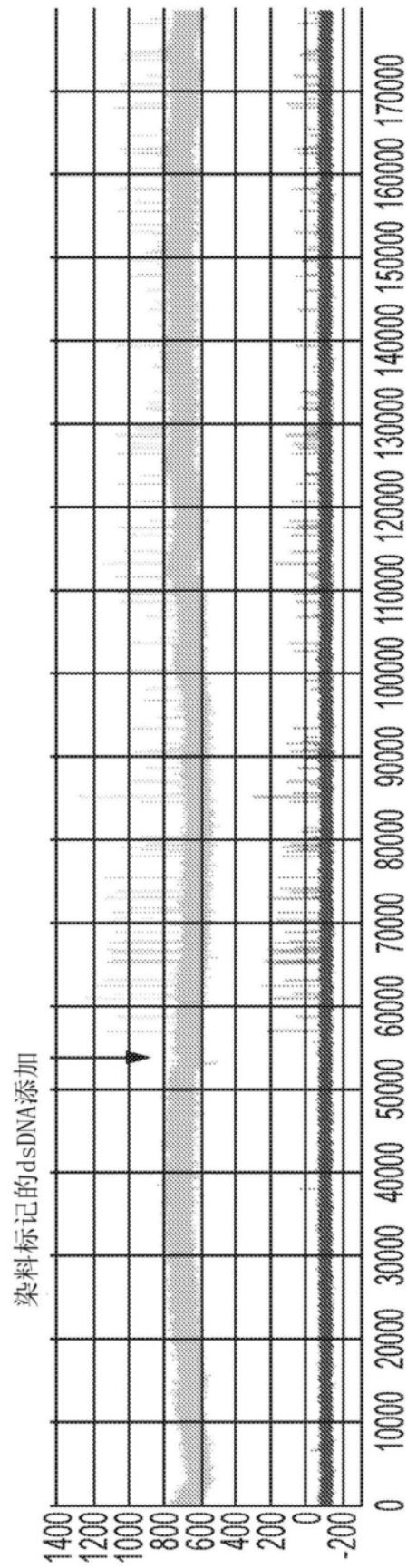


图13

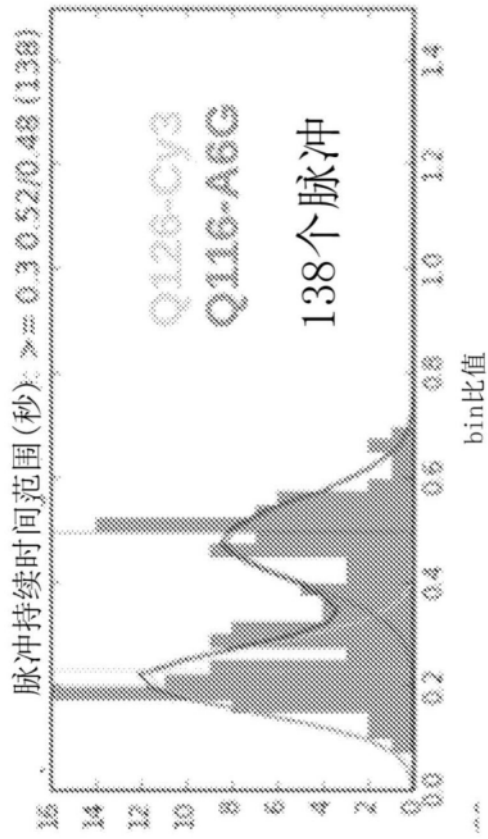


图14

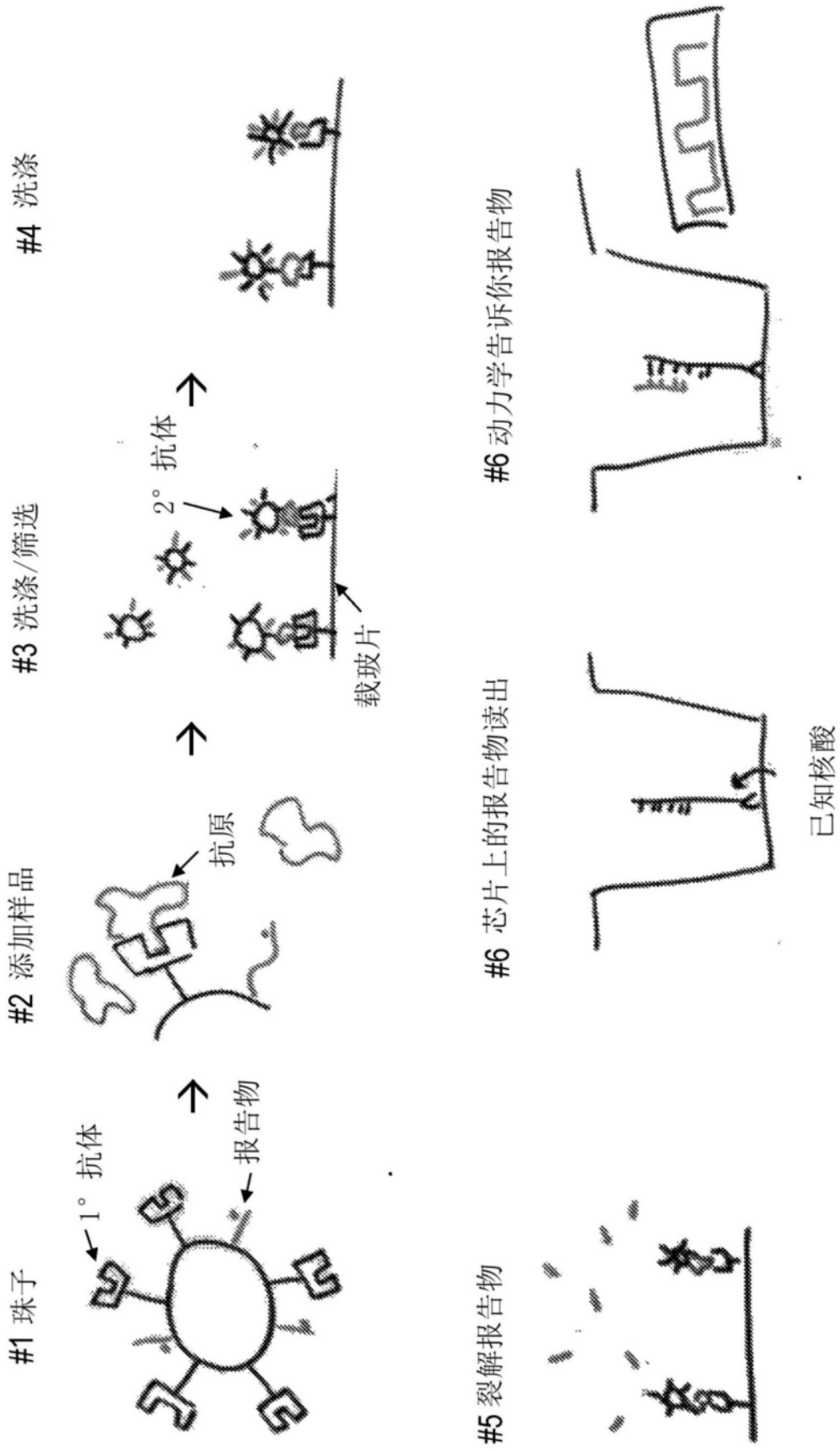


图15A

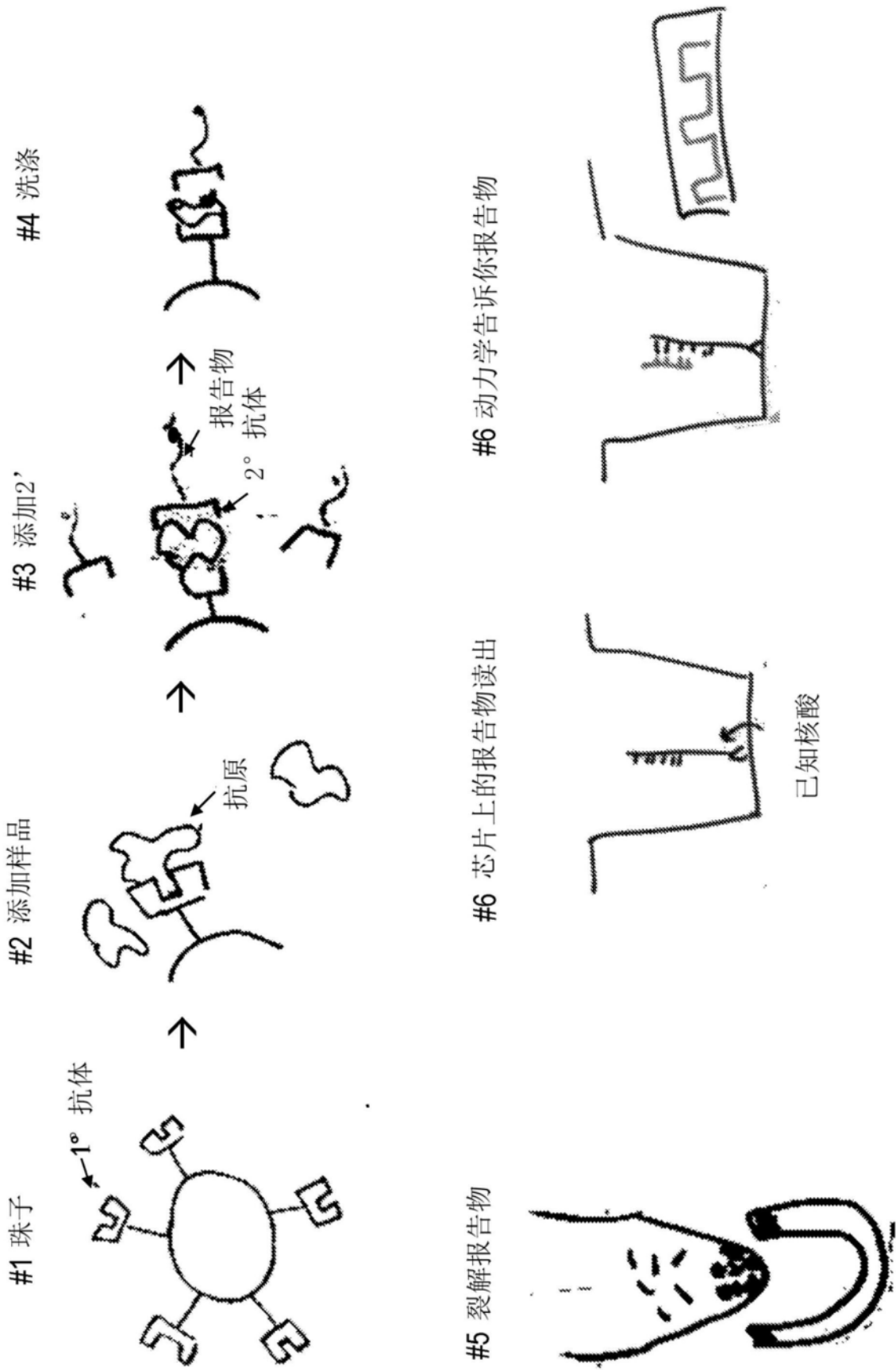


图15B