



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101946010 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200880127116. 4

代理人 顾晋伟 彭鲲鹏

(22) 申请日 2008. 12. 19

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C12Q 1/68(2006. 01)

61/008, 862 2007. 12. 21 US

61/098, 710 2008. 09. 19 US

(56) 对比文件

WO 2007081385 A2, 2007. 07. 19, 权利要求 1-6、28 - 29, 实施例 8, 图 12.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 08. 19

孙凯等. 《液相芯片技术研究进展》. 《中华实验外科杂志》. 2005, 第 22 卷 (第 5 期), 639-640.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/013912 2008. 12. 19

审查员 袁实

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/085215 EN 2009. 07. 09

(73) 专利权人 哈佛大学

地址 美国马塞诸塞州

(72) 发明人 大卫·A·韦茨

杰里米·阿格雷斯蒂

迈克尔·P·韦纳 亚当·R·阿巴特

托尼·洪

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

权利要求书4页 说明书33页

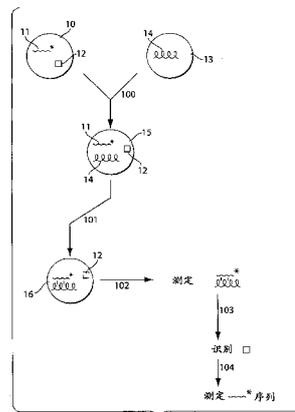
序列表5页 附图40页

(54) 发明名称

用于核酸测序的系统和方法

(57) 摘要

本发明涉及用于核酸测序的系统和方法, 包括在流体液滴中对核酸测序。在一组实施方案中, 所述方法利用杂交测序, 其中使用液滴例如微流体液滴。在一些实施方案中, 形成包含靶核酸、核酸探针和至少一种标识成分 (例如荧光颗粒) 的液滴。在一些情况下, 通过测定所述至少一种标识成分来确定与靶核酸杂交的核酸探针。与靶核酸杂交的核酸探针可用于确定靶核酸的序列。在某些情况中, 微流体液滴具有修饰核酸探针的试剂。在一些情况下, 液滴 (例如所述液滴) 发生变形使得液滴中的成分分别通过靶区域。



1. 一种测定标识成分的方法,其包括:  
提供含有核酸探针和至少三种可区分标识成分的第一微流体液滴;  
提供包含靶核酸的第二微流体液滴;和  
将所述第一流体液滴与所述第二流体液滴合并,从而形成合并液滴;  
测定所述合并液滴中的所述至少三种标识成分。
2. 根据权利要求1的方法,其还包括测定所述合并液滴内包含的靶核酸。
3. 根据权利要求2的方法,其包括测定所述靶核酸至少一部分的序列。
4. 根据权利要求2的方法,其包括测定所述靶核酸而不使该靶核酸与表面相接触。
5. 根据权利要求2的方法,其还包括通过测定所述合并液滴中包含的所述至少三种标识成分来测定所述靶核酸的至少一部分。
6. 根据权利要求1的方法,其中所述液滴含有至少四种可区分的标识成分。
7. 根据权利要求1的方法,其还包括测定所述至少三种标识成分。
8. 根据权利要求7的方法,其包括使用荧光测定至少三种标识成分。
9. 根据权利要求1的方法,其中至少一种标识成分是颗粒。
10. 根据权利要求9的方法,其中至少一种标识成分是发荧光的。
11. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针含有至少四个残基。
12. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针含有至少五个残基。
13. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针含有至少六个残基。
14. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针含有至少一个锁核酸残基。
15. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针含有至少一个通用残基。
16. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针包含信号实体。
17. 根据权利要求1的方法,其还包括测定所述靶核酸与所述核酸探针的结合。
18. 根据权利要求1的方法,其还包括测定所述靶核酸与所述至少三种标识成分的结合。
19. 根据权利要求17的方法,其中测定核酸探针与靶核酸的结合包括测定所述信号实体的改变。
20. 根据权利要求17的方法,其中测定核酸探针与靶核酸的结合包括测定所述核酸探针中至少一部分的荧光改变。
21. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针包含猝灭剂。
22. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针包含增强剂。
23. 根据权利要求1的方法,其还包括向所述合并液滴提供聚合酶。
24. 根据权利要求1的方法,其中所述第一和第二流体液滴中至少之一还包含聚合酶。
25. 根据权利要求24的方法,其中所述聚合酶是 Taq 聚合酶。
26. 根据权利要求24的方法,其中在核酸探针与靶核酸结合后,所述聚合酶导致猝灭剂与核酸探针解离。
27. 根据权利要求1的方法,其中所述核酸探针相对于至少一种标识成分是固定的。
28. 根据权利要求27的方法,其中所述核酸探针包含核酸序列,所述至少一种标识成分包含寡核苷酸,并且其中将所述核酸序列与该寡核苷酸相连接。
29. 根据权利要求1的方法,其中至少一种标识成分含有至少一种与其相对固定的寡

核苷酸。

30. 根据权利要求 1 的方法,其中所述液滴含有四种可区分标识成分,每种可区分标识成分具有至少一种与其相对固定的寡核苷酸。

31. 根据权利要求 30 的方法,其中相对于所述四种可区分标识成分中每一种进行固定的每种所述寡核苷酸具有仅在一个位置上与其他寡核苷酸存在差异的序列。

32. 根据权利要求 31 的方法,其中每种所述寡核苷酸含有多个通用残基。

33. 根据权利要求 32 的方法,其中每种所述寡核苷酸除了一个位置之外在每个位置都由通用残基组成。

34. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第一微流体液滴至少含有第一核酸探针和第二核酸探针。

35. 根据权利要求 34 的方法,其中通过将包含第一核酸探针的微流体液滴与包含第二核酸探针的微流体液滴合并来形成所述第一微流体液滴。

36. 根据权利要求 34 的方法,其还包括向合并的液滴提供连接酶。

37. 根据权利要求 34 的方法,其中将所述第一核酸探针与第二核酸探针相连接。

38. 根据权利要求 34 的方法,其还包括测定所述第一核酸探针和第二核酸探针的序列。

39. 一种测定标识成分的方法,其包括:

提供包含至少三种可区分标识成分的微流体液滴;

使所述微流体液滴经过靶区域,使得所述至少三种标识成分中每一个单独通过靶区域;和

测定经过靶区域的所述至少三种标识成分中每一个。

40. 根据权利要求 39 的方法,其中所述微流体液滴还含有核酸和核酸探针。

41. 根据权利要求 40 的方法,其中通过测定所述至少三种标识成分来测定所述核酸。

42. 根据权利要求 39 的方法,其中所述至少三种标识成分中的至少一些是颗粒。

43. 根据权利要求 39 的方法,其中所述至少三种标识成分中的至少一些是纳米颗粒。

44. 根据权利要求 39 的方法,其中所述至少三种标识成分中的至少一些是发荧光的。

45. 一种测定标识成分的方法,其包括:

通过以下步骤测定含有核酸探针的液滴的至少一部分:向所述液滴中加入第一标识成分、与第一标识成分可区分的第二标识成分以及与第一和第二标识成分可区分的第三标识成分。

46. 根据权利要求 45 的方法,其还包括向所述液滴中加入与所述第一、第二和第三标识成分可区分的第四标识成分。

47. 根据权利要求 45 的方法,其还包括测定所述液滴内包含的核酸。

48. 根据权利要求 47 的方法,其还包括测定所述核酸与所述核酸探针的结合。

49. 根据权利要求 45 的方法,其中所述第一、第二和第三标识成分各自均为颗粒。

50. 根据权利要求 45 的方法,其中所述液滴含有第一核酸探针和第二核酸探针。

51. 根据权利要求 50 的方法,其还包括测定所述第一和第二核酸探针与液滴内所包含靶核酸的结合。

52. 一种测定标识成分的方法,其包括:

定义至少六种可区分标识成分,将所述标识成分安排为至少三组,每组具有至少两种所述成分;

将至少八种可区分物质中的每一种与选自所述至少三组中每一组的至少一种标识成分相结合,使得所述至少八种可区分物质没有两种与同一标识成分组合相结合;和

制备至少八个可区分液滴,每个液滴含有所述至少八种不同物质之一以及所结合的来自所述至少三组中每一组的成分。

53. 根据权利要求 52 的方法,其包括定义至少约 10 种可区分标识成分。

54. 根据权利要求 53 的方法,其包括定义至少约 40 种可区分标识成分。

55. 根据权利要求 54 的方法,其包括定义至少约 100 种可区分标识成分。

56. 根据权利要求 52 的方法,其包括将所述成分安排为至少四组。

57. 根据权利要求 52 的方法,其中每个组具有至少约 5 种成分。

58. 根据权利要求 52 的方法,其中每个组具有至少约 10 种成分。

59. 根据权利要求 52 的方法,其包括结合至少约 10 种可区分物质中的每一种。

60. 根据权利要求 52 的方法,其包括结合至少约 30 种可区分物质中的每一种。

61. 根据权利要求 52 的方法,其包括结合至少约 100 种可区分物质中的每一种。

62. 根据权利要求 52 的方法,其包括结合至少约 300 种可区分物质中的每一种。

63. 根据权利要求 52 的方法,其包括结合至少约 1000 种可区分物质中的每一种。

64. 根据权利要求 52 的方法,其包括结合至少约 4000 种可区分物质中的每一种。

65. 根据权利要求 52 的方法,其中所述物质是核酸探针。

66. 根据权利要求 52 的方法,其包括制备至少约 100 个可区分液滴。

67. 根据权利要求 52 的方法,其包括制备至少约 1000 个可区分液滴。

68. 根据权利要求 52 的方法,其还包括向所述至少八种可区分液滴的每一种中加入靶核酸。

69. 根据权利要求 52 的方法,其中所述液滴的至少一些是微流体液滴。

70. 一种测定标识成分的方法,其包括:

提供多种可区分核酸探针和多种可区分标识成分;

从所述多种核酸探针中选择一种核酸探针,并从所述多种可区分标识成分中选择至少三种可区分标识成分;

形成含有所选的一种核酸探针和至少三种可区分标识成分的流体液滴;和

重复所述选择和形成步骤,以形成流体液滴群,其包括至少十种可区分流体液滴,每种含有一种核酸探针和至少三种可区分标识成分。

71. 根据权利要求 70 的方法,其包括从所述多种可区分标识成分中选择至少四种可区分标识成分。

72. 根据权利要求 70 的方法,其包括提供至少约 10 种可区分标识成分。

73. 根据权利要求 72 的方法,其包括提供至少约 20 种可区分标识成分。

74. 根据权利要求 73 的方法,其包括提供至少约 40 种可区分标识成分。

75. 根据权利要求 70 的方法,其包括提供至少约 10 种可区分核酸探针。

76. 根据权利要求 70 的方法,其包括提供至少约 100 种可区分核酸探针。

77. 根据权利要求 70 的方法,其包括提供至少约 1000 种可区分核酸探针。

78. 根据权利要求 70 的方法,其包括重复所述选择和形成步骤,以形成包含至少约 100 种可区分流体液滴的流体液滴群。

79. 根据权利要求 70 的方法,其包括重复所述选择和形成步骤,以形成包含至少约 1,000 种可区分流体液滴的流体液滴群。

80. 根据权利要求 70 的方法,其中选择一种核酸探针和至少三种可区分标识成分的步骤包括:

将所述多种可区分标识成分安排成至少三组;和  
从所述至少三组的每一组中各选择一种标识成分。

81. 根据权利要求 70 的方法,其包括完成针对第一组可区分核酸探针和第一组可区分标识成分的提供、选择、形成和重复步骤,以形成第一流体液滴群,以及完成针对第二组可区分核酸探针和第二组可区分标识成分的提供、选择、形成和重复步骤以形成第二流体液滴群。

82. 根据权利要求 81 的方法,其中所述第一组核酸探针与所述第二组核酸探针基本相似。

83. 根据权利要求 82 的方法,其中所述第一组核酸探针与所述第二组核酸探针不同。

84. 根据权利要求 81 的方法,其中所述第一组标识成分与所述第二组标识成分基本相似。

85. 根据权利要求 82 的方法,其中所述第一组标识成分与所述第二组标识成分不同。

86. 根据权利要求 81 的方法,其中所述核酸探针中的至少一些包含至少三个核酸残基。

87. 根据权利要求 81 的方法,其中所述核酸探针中的至少一些还包含至少一个通用残基。

88. 根据权利要求 81 的方法,其中至少一组核酸探针包括含有三个残基的全部可能序列中的至少一部分。

89. 根据权利要求 81 的方法,其中至少一组核酸探针包括含有四个残基的全部可能序列中的至少一部分。

90. 根据权利要求 81 的方法,将来自第一群的至少一个流体液滴与来自第二群的至少一个流体液滴合并成第三流体液滴。

91. 根据权利要求 90 的方法,其包括对来自第一群的基本全部液滴与来自第二群的基本全部液滴重复所述合并步骤,以形成第三液滴群。

92. 试剂盒,其包含:

至少 10 种可区分的多种第一流体液滴,每个液滴含有核酸探针;和

至少 10 种可区分的多种第二流体液滴,每个液滴含有至少三种可区分标识成分。

## 用于核酸测序的系统和方法

[0001] 政府经费

[0002] 本发明是在国立卫生研究院的 DMR-0602684 的政府资助下进行的。政府拥有本发明的某些权利。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求 Weitz 等人于 2007 年 12 月 21 号提交的名为“用于核酸测序的系统和方法”的美国临时专利申请序列号 No. 61/008,862 以及 Weitz 等人于 2008 年 9 月 19 号提交的名为“用于核酸测序的系统和方法”的美国临时专利申请序列号 61/098,710 的权益，它们均通过引用并入本文。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及用于对核酸进行测序的系统和方法，其包括在流体液滴中对核酸进行测序。

[0006] 发明背景

[0007] 确定核酸序列的能力对于例如了解基因的功能和调控的应用来说或者对于应用许多分子生物学的基本技术来说十分重要。杂交测序 (Sequencing by hybridization (SBH)) 是最近开发出的 DNA 测序方法。在杂交测序中，一大组单链片段或探针附着在衬底上。使带标记的单链靶 DNA 片段溶液与所述衬底接触。这些片段与所述衬底上的互补片段杂交，根据所选的标记，可使用检测器或荧光 / 磷光染料鉴定杂交的片段。然后，根据片段与芯片的杂交模式对靶 DNA 测序。但是，目前的 SBH 技术存在一些限制其应用的问题，例如需要相对大量的试剂，或者具有相对小的通量。

### 发明内容

[0008] 本发明涉及对核酸进行测序的系统和方法，包括在流体液滴中对核酸进行测序。在一些情况下，本发明的主题涉及相关联的产品、特定问题的替代解决方案和 / 或一种或多种系统和 / 或物品的多种不同用途。

[0009] 在一个方面中，本发明涉及方法。根据一组实施方案，所述方法包括：提供含有核酸探针和至少一种标识成分的第一微流体液滴，提供包含靶核酸的第二微流体液滴，以及将所述第一流体液滴与第二流体液滴合并，从而形成合并液滴。在另一组实施方案中，所述方法包括：提供包含多种标识成分的微流体液滴，使得所述液滴变形并使所述液滴经过靶区域，使得所述多个标识成分中的每一个单个经过靶区域，以及确定经过靶区域的多个标识成分中的每一个。

[0010] 根据另一组实施方案，所述方法包括：通过向含有核酸探针的液滴中加入第一标识成分、可与第一标识成分区分的第二标识成分，以及可与第一和第二标识成分区分的第三标识成分，来测定所述液滴的至少一部分。

[0011] 在一组实施方案中，所述方法包括：定义至少六种可区分的标识成分，其中所述标识成分布置为至少三个组，每一组具有至少两种所述成分，将至少 8 种可区分物质中的每

一种与选自所述至少三个组中每一组的至少一种标识成分相关联,使得所述至少 8 种可区分物质中没有两种与相同的标识成分组相关联,以及制备至少 8 种可区分的液滴,其中每个液滴含有所述至少 8 种不同物质之一以及来自所述至少三组中每一组的所述关联成分。

[0012] 在另一组实施方案中,所述方法包括:提供多种可区分的核酸探针以及多种可区分的标识成分,从所述多种核酸探针中选择一种核酸探针并从所述多种可区分的标识成分中选择至少三种可区分的标识成分,形成含有所选一种核酸探针和所述至少三种可区分标识成分的流体液滴,以及重复选择和形成步骤以形成流体液滴群,包含至少 10 种可区分的流体液滴。在一些情况下,每个液滴含有一个核酸探针和所述至少三种可区分的标识成分。

[0013] 另一个方面中,本发明涉及试剂盒。在一些情况下,所述试剂盒包含至少 10 种可区分流体液滴中的第一组,其中每个液滴含有核酸探针,以及至少 10 种可区分流体液滴中的第二组,其中每个液滴含有至少三种可区分标识成分。

[0014] 与附图一起考虑下述多个本发明非限制性实施方案的详细说明后,本发明的其它优点和新特征将是很明显的。在本说明书和通过引用并入的文献包含冲突和/或不一致的内容时,应以本说明书为准。如果通过引用并入的两个或更多个文献彼此包含冲突和/或不一致的内容,则以有效日期靠后的文献为准。

#### 附图说明

[0015] 本发明的非限制性实施方案参考附图以举例方式描述,所述附图是示意图,且未按比例描绘。在附图中,每个相同或几乎相同的组分通常以单个数字表示。为清楚起见,在对于本领域技术人员理解本发明来说图解不是必需的时,没有标出每幅图中的每个组分,也未显示本发明每个实施方案中的每个组分。在所述附图中:

[0016] 图 1 显示了本发明一个实施方案中对靶核酸进行测序的方法。

[0017] 图 2A-2F 显示了核酸探针的非限制性实例。

[0018] 图 3 显示了本发明另一个实施方案中对靶核酸进行测序的方法。

[0019] 图 4 显示了本发明另一个实施方案中对靶核酸进行测序的另一种方法。

[0020] 图 5 显示了制备液滴库的实例。

[0021] 图 6A-6D、7A-7C 和 8A-8G 显示对靶核酸进行测序的方法的非限制性实例。

[0022] 图 9A-9C 显示了有关本发明一些实施方案中荧光偏振 (FP) 检测的信息。

[0023] 图 10 显示了本发明一个实施方案中实验设置的非限制性实例。

[0024] 图 11 显示了本发明另一个实施方案中实验设置的非限制性实例。

[0025] 图 12A-12B 显示了利用液体标记作为标识成分的实例。

[0026] 图 13A-13B 显示了某些实施方案中可独立地控制荧光强度和荧光偏振。

[0027] 图 14 显示了在本发明的一个实施方案中液滴内发生的 DNA 连接的实例。

[0028] 图 15 显示了根据另一个实施方案的使用带标记核酸探针进行的连接测定的结果。

[0029] 图 16A-16E 显示了在本发明的一个实施方案中连接第一和第二核酸探针的方法。

[0030] 图 17A 显示了根据一些实施方案,可用于一种本发明方法的第一核酸探针组和第二核酸探针组。

[0031] 图 17B 显示了根据一个实施方案的多个液滴,其可通过如图 17A 所示将来自第一

核酸探针组的第一核酸探针与来自第二核酸探针组的第二核酸探针合并而形成。

[0032] 图 18A 显示在单个微流体通道中一次一个对液滴中的信号实体和 / 或标识成分进行测定。

[0033] 图 18B 和 18C 分别显示了在多个通道中或者在限定的区域中一次对多个液滴中的信号实体和 / 或标识成分进行测定。

[0034] 图 19 展示了根据一个实施方案的形成多个液滴的包含多种靶核酸的溶液。

[0035] 图 20A 和 20B 显示了第一和第二微流体液滴流入通道使得它们合并的图像。

[0036] 图 21 显示在本发明的一个实施方案中用于合并液滴的方法的示意图。

[0037] 图 22 显示在延时线中孵育多个合并的液滴。

[0038] 图 23 显示根据一个实施方案, 合并的液滴相对于沿孵育通道位置的速度的图。

[0039] 图 24 显示根据一个实施方案, 用于确定杂交的系统的照片。

[0040] 图 25A 显示了与图 24 中所述相似的系统的示意图。

[0041] 图 25B 显示在使用例如图 25A 中所示系统测定液滴时可观察到的荧光偏振。

[0042] 图 26 显示根据一个实施方案的系统的照片, 其中液滴在测定过程中变形。

[0043] 图 27A-27D 显示根据一个实施方案, 基于检测多种强度对液滴进行检测。

[0044] 图 28 显示根据一个实施方案, 使用本发明方法制备和测定的包含绿色和 / 或红色染料的多个液滴的图。

[0045] 图 29 显示根据本发明的一些实施方案, 3 $\mu$ M 模板的结合测定的结果, 其中 i) 不存在靶核酸, ii) 存在错配靶核酸, 和 iii) 存在匹配靶核酸。

[0046] 图 30 显示了根据一个实施方案, 包含选自第一组核酸探针的第一核酸探针与选自第二组核酸探针的第二核酸探针的文库示意图。

[0047] 图 31A 显示根据一个实施方案, 可用于产生包含不同浓度的不同染料的四组液滴的微流体装置的示意图。

[0048] 图 31B 显示了展示多个液滴产生的影片的第一帧图像, 所述液滴使用图 31A 所示装置形成。

[0049] 图 32 显示了根据一个实施方案, 通过混合多种类型液滴而形成的液滴乳液的示意图。

[0050] 图 33A 和 33B 显示了根据本发明的一些实施方案, 包含第一核酸探针、第二核酸探针和靶核酸的多个液滴的形成。

[0051] 图 34 显示了根据一个实施方案, 光通过微流体液滴折射的示意图, 以及在液滴图像中显示的所得的液滴眩光。

[0052] 图 35 显示了根据一个实施方案, 可用于产生液滴眩光的实验设置实例。

[0053] 图 36A 显示了根据一个实施方案, 两个 3 聚物 (3-mer) 核酸探针与靶核酸的杂交。

[0054] 图 36B 显示了图 36A 所示的两个 3 聚物核酸探针的连接。

[0055] 图 37 显示了根据一个实施方案, 在绿色波长滤光片下用 CCD 照相机对包含液滴眩光的多个微流体液滴进行视频捕获的静止画面。

[0056] 图 38 显示了根据一个实施方案, 包含液滴眩光的多个液滴的 CCD 摄像机静止图像强度阈值。

[0057] 图 39A 和 39B 分别显示了包含液滴眩光的多个液滴的荧光强度读数分别产生的掩

码 (mask) 和掩码叠加 (mask overlay)。

[0058] 图 40 和 41 分别显示了根据一个实施方案, 来自绿色滤光片照相机和红色滤光片照相机的多个液滴的图像。

[0059] 图 42 显示了分别包含图 40 和 41 的绿色和红色照相机数据之叠加的合成图象, 显示两个不同的液滴群。

[0060] 图 43 显示了根据一个实施方案, 例如图 42 所示的, 来自图像的以秒计取样的之上数据点强度计数的直方图, 其具有显示双峰分布的 (A) 绿色通道和 (B) 红色通道。

[0061] 图 44 显示具有两个离散荧光强度群的两个微流体液滴的荧光强度的来自 CCD 照相机的静止图像捕获。

[0062] 图 45 显示包含液滴眩光的具有两个离散荧光强度群的两个液滴的来自 CCD 照相机的静止图像捕获。

[0063] 序列说明

[0064] SEQ ID NO :1 为 ACTTCG, 合成 DNA 序列 ;

[0065] SEQ ID NO :2 为 \*GATCC, 合成 DNA 序列, 其中 \* 为信号实体 ;

[0066] SEQ ID NO :3 为 GATCTGNNNN, 合成 DNA 序列, 其中 N 为通用碱基 ;

[0067] SEQ ID NO :4 为 CATATC, 合成 DNA 序列 ;

[0068] SEQ ID NO :5 为 GATCTNGNNN, 合成 DNA 序列, 其中 N 为通用碱基 ;

[0069] SEQ ID NO :6 为 CXACATC, 合成 DNA 序列, 其中 X 为 A、C、G 或 T 之一 ;

[0070] SEQ ID NO :7 为 GACTCTGTCCCTCCCTGTGTACCCTGTGCGTCCCTACTCTACC, 合成 DNA 序列 ;

[0071] SEQ ID NO :8 为生物素 -CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCCCTATCCCCTGTTGCGTGTCTCAG, 合成 DNA 序列 ;

[0072] SEQ ID NO :9 为 CTAAGTTA, 合成 DNA 序列 ;

[0073] SEQ ID NO :10 为 CTNAGNTA, 合成 DNA 序列, 其中 N 为通用碱基 ;

[0074] SEQ ID NO :11 为 CTANNTTA, 合成 DNA 序列, 其中 N 为通用碱基 ; 和

[0075] SEQ ID NO :12 为 CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATCCGTAA TCATGGCCAT, 合成 DNA 序列。

[0076] 发明详述

[0077] 本发明涉及用于核酸测序的系统和方法, 包括在流体微滴中对核酸测序。在一组实施方案中, 所述方法利用杂交测序, 其中使用液滴, 例如微流体液滴。在一些实施方案中, 形成包含靶核酸、核酸探针和至少一种标识成分 (例如荧光颗粒) 的液滴。在一些情况下, 通过测定所述至少一种标识成分来确定与靶核酸杂交的核酸探针。与靶核酸杂交的核酸探针可用于确定靶核酸的序列。在某些情况中, 微流体液滴具有修饰核酸探针的试剂。在一些情况下, 液滴 (例如如上所述的液滴) 发生变形, 使得液滴的组分逐个经过靶区域。

[0078] 一方面, 本发明涉及用于测序靶核酸的系统和方法。在多个实施方案中, 靶核酸可被复制并包含在多个流体液滴中, 所述流体液滴还可含有核酸探针、标识成分等。如下文详细讨论地, 通过确定流体液滴内的核酸探针, 可确定靶核酸的序列。在一个实施方案中, 本发明涉及这样的方法: 提供含有核酸探针和至少一种标识成分的微流体液滴, 提供包含靶核酸的第二微流体液滴, 以及将第一流体液滴与第二流体液滴合并, 以形成合并液滴。在一

些情况下,所述方法还包括确定核酸探针是否与靶核酸结合,例如使得所述核酸探针与所述靶核酸在溶液中保持在一起,并形成相对稳定的双链体(例如通过非共价相互作用,如氢键键合、碱基配对等),并且在溶液中不易于分离。在一些情况下,所述核酸探针可与靶核酸杂交。另外,在一些情况下,可确定所述至少一种标识成分的身份。

[0079] 作为非限制性的实例,图 1 中显示第一实施方案。在该图中,提供第一流体液滴 10,其含有核酸探针 11 和至少一种标识成分 12。另外,在本实例中,提供第二流体液滴 13,其含有靶核酸 14。所述第一流体液滴与第二流体液滴合并,形成合并流体液滴 15,如箭头 100 所示。在某些情况下,核酸探针 11 可与靶核酸 14 相结合,如箭头 101 所示,可测定所述靶核酸与所述核酸探针的结合,如箭头 102 所示。例如,所述核酸探针和所述靶核酸可由于互补或基本上互补的序列而结合 16。在一些情况下,可确定所述核酸探针的序列,以通过确定至少一种标识成分 12(如箭头 103 和 104 所示)而确定靶核酸的至少一部分序列,如下文详细所述。

[0080] 在一些情况下,使用液滴库,其中液滴可含有可区分的核酸探针和 / 或标识成分。通过确定所述靶核酸与可区分核酸探针的结合,例如通过使用所述标识成分,可确定所述靶核酸的序列。通常,不是每个流体液滴中所含的所有靶核酸都会与所有核酸探针相结合,通过确定哪些核酸探针能够与靶核酸相结合,可确定靶核酸的序列。下文更详细讨论制备液滴库的方法。

[0081] 如所述,本发明的多个实施方案涉及在流体液滴中含有核酸和 / 或其它物质。如本文所使用的,“流体”是常规含义,即易于流动并且采取其容器外形的物质。通常,流体是不能承受静剪切应力的材料,在施加剪切应力时,流体发生持续且永久的变形。因此,在有些情况下,流体可具有任何适当的粘度,其允许至少一定程度的流体流动。流体的非限制性实例包括液体和气体,但还可包括自由流动的固体颗粒、粘弹性流体等。

[0082] 本文使用的“液滴”是第一流体的分离的部分,其完全由第二流体所围绕。应当注意,液滴不一定是球形的,而是可采取其它形状,例如取决于外界环境。在一个实施方案中,液滴具有最小的横截面尺寸,其基本等于液滴位于其中的通道的垂直于流体流动的最大尺寸。在非球形液滴中,液滴的直径为与非球形液滴具有相同体积的理想数学球体的直径。

[0083] 所述流体液滴可使用任何合适方法形成。例如,所述液滴可如下形成:摇动或搅拌液体以形成独立液滴,产生含有独立液滴的悬液或乳液,或者通过移液器技术、针等形成液滴。产生液滴的其它非限制性实例公开于 Stone 等人于 2004 年 12 月 28 日提交的名为“流体分散的方法和装置”的美国专利申请序列号 No. 11/024, 228, 2005 年 8 月 11 日作为美国专利申请公开号 No. 2005/0172476 公开;Link 等人于 2005 年 10 月 7 日提交的名为“流体物质的形成和控制”的美国专利申请序列号 No. 11/246, 911, 2006 年 7 月 27 日作为美国专利申请公开号 No. 2006/0163385 公开;或者 Link 等人于 2006 年 2 月 23 日提交的名为“流体物质的电控制”的美国专利申请序列号 No. 11/360, 845, 2007 年 1 月 4 日作为美国专利申请公开号 No. 2007/0003442 公开;2008 年 6 月 26 日提交的名为“用于操纵流体物质的方法和装置”的国际专利申请 No. PCT/US2008/007941, 其均通过引用并入本文。

[0084] 本发明的多个实施方案使用多种或成系列的流体液滴。所述流体液滴可以是多分散的(例如具有不同尺寸范围),或者在一些情况下,所述流体液滴可以是单分散的或者基本单分散的,例如具有均一的直径分布,例如,使得不超过约 10%、约 5%、约 3%、约 1%、约

0.03%或者约0.01%的液滴具有比平均直径大约10%、约5%、约3%、约1%、约0.03%或者约0.01%的平均直径。本文使用的液滴群的“平均直径”是液滴直径的算术平均值。本领域技术人员能够确定液滴群的平均直径,例如,使用激光散射或其它已知的方法。作为非限制性实施例,液滴平均直径可小于约1mm,小于约500微米,小于约200微米,小于约100微米,小于约75微米,小于约50微米,小于约25微米,小于约10微米,或者小于约5微米。所述液滴的平均直径还可为至少约1微米,至少约2微米,至少约3微米,至少约5微米,至少约10微米,至少约15微米,或者在某些情况下至少约20微米。

[0085] 流体液滴可含有待测序的靶核酸,并且所述靶核酸可以是任何适当的核酸。例如,靶核酸可以是编码生物学实体(比如蛋白质、酶、抗体、受体、核酸酶、核糖体等和/或其部分)的核酸。作为另一个实例,靶核酸可以是调节序列或者非编码序列,例如,小干扰RNA、微RNA、小发夹RNA等。所述靶核酸的长度可以为任何数目的核苷酸,例如约25、约50、约60、约64、约70、约80、约90、约100、约200、约400、约800、约1600、约3200、约6400的量级或者甚至更多核苷酸的长度。靶核酸(以及其它类型核酸,如本文所述)的非限制性实例包括核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)或其混合物或共聚物,其可以分离自天然来源、重组产生、人工合成等。所述核酸可含有例如腺苷或“A”、胸苷或“T”、鸟苷或“G”、胞苷或“C”或者尿苷或“U”或者其它残基,例如下文详细讨论的通用残基。所述核酸可以双链的,或是单链的以便于杂交。此外,所述核酸可以获得自基本上任何来源。例如,所述核酸可以分离自细胞或病毒,使用传统化学合成来合成,使用聚合酶链式反应(PCR)技术合成,等等。

[0086] 包含在液滴内的靶核酸可暴露于核酸探针和/或一种或多种标识成分。例如,如上所述,含有靶核酸的流体液滴可与含有核酸探针和至少一种标识成分的第二流体液滴合并。合并液滴的多种技术在下文中更详细地讨论。

[0087] 在某些实施方案中,一般使用核酸探针来确定靶核酸中的某些序列。通常,靶核酸中的短部分可与核酸探针相结合,例如,小于约20个残基、小于约15个残基、小于约10个残基、小于约9个残基、小于约8个残基、小于约7个残基、小于约6个残基、小于约5个残基、小于约4个残基的序列等。所述残基通常在靶核酸探针内是连续的,尽管在下文所讨论的一些情况中,靶核酸内的一些残基不一定是连续的。在一些实施方案中,核酸探针可含有能识别靶核酸的至少一部分的相对短的核酸残基序列,常常具有与靶核酸中被识别的部分相似的长度。例如,所述核酸探针可具有小于约20个核苷酸或者小于约10个核苷酸的长度,或者例如上文所述的长度。在一种情况下,核酸探针序列的长度可以是四个残基(例如图2A)。在另一种情况下,核酸探针序列的长度可以是五个残基(例如图2B)。在另一个情况下,核酸探针序列的长度可以是六个残基(例如图2C)。核酸探针内的核酸探针序列可以是连续的,或者所述序列可以是不连续的。例如,可以有通用残基或者缺口存在。在有些情况下,所述核酸探针可以以一些形式进行标记,比如使用信号实体,例如放射性同位素或荧光标签(例如图2D)。多种信号实体以及其它核酸探针的实例在下文中更详细地讨论。

[0088] 所述核酸探针可选择成使得至少一些探针含有与靶核酸序列互补或基本互补的序列。例如,在一个实施方案中,所述核酸探针序列选择成使得某一大小或数量(或者大小或数量的范围)的每种核酸残基排列都被代表,从而确保这些核酸探针序列中的至少一种与靶核酸基本互补。本文使用的与第二序列“基本互补”的第一序列是这样的序列,其中第一和第二序列中至少约75%互补(例如通过沃森-克里克互补配对,或者任选地还包括

G:U 摆动) 和 / 或所述序列具有最多 1 或 2 个碱基错配。在一些实施方案中,两个序列可以至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、至少约 97%、至少约 98%、至少约 99% 或者至少约 100% 互补。

[0089] 在一些实施方案中,使用多种可区分或不同的核酸探针,例如在核酸探针所含残基序列中存在一处或多处差异的核酸探针。例如,可使用多种流体液滴,所述流体液滴各个可含有特定的核酸探针序列。可制备所述流体液滴,使得每个流体液滴仅含有一种核酸探针序列(尽管可存在核酸探针的多个拷贝)。另外,在一些情况下,不同的流体液滴可独立地含有相同或不同的核酸探针序列(例如使得具有一定冗余度,从而给定液滴群或液滴库中并非每个流体液滴都必然是惟一的)。

[0090] 在一些情况下,所述核酸探针可以是带标记的,例如使用信号实体标记。所述信号实体可使用检测方法以一定方式来测定,例如下文所讨论的。所述信号实体可以包含在核酸探针中的任何适当的位置,例如在核酸探针的核酸序列的 5' 端位点,3' 端位点,或者在核酸探针的内部位点。在一些情况下,所述信号实体可以选择成使得其在核酸探针与靶核酸相结合时产生与核酸探针不结合靶核酸时不同的信号(或者不产生信号)。所述信号实体可包括但不限于,荧光染料、化学发光实体、放射性标记、同位素比如非放射性同位素或可通过质谱检测的同位素(例如带电团质量标记(electrophore mass label,EML))、可用作标记抗体的特异性结合伴侣的配体、酶、可用作标记配体的特异性结合伴侣的抗体、抗原、具有特异性反应性的基团,和 / 或电化学可检测部分。荧光信号实体的非限制性实例包括萤光素、罗丹明或六氯荧光素;本领域技术人员了解易于购得的其它荧光实体。信号实体的其它实例在本文中有详细讨论。

[0091] 例如,在一个实施方案中,核酸探针可包含核酸残基序列、信号实体、以及猝灭剂或增强剂(例如如图 2E 所示,信号探针标记为 S,猝灭剂标记为 Q)。所述信号实体可以是例如荧光实体,并且可位于核酸探针中的任何位置,例如,共价连接到核酸序列的 5' 端。在多个实施方案中可适用于核酸探针的荧光实体的非限制性实例包括 6- 羧基荧光素和四氯荧光素。所述猝灭剂或增强剂可以是能够以一定方式影响信号实体的任何实体,例如分别通过抑制或利于信号实体的测定。例如,在核酸探针内荧光信号实体和猝灭剂的接近可使得猝灭剂能够部分或完全地抑制信号实体的荧光,而在增强剂位于信号实体附近时,增强剂可以能够增强荧光信号实体的荧光。所述猝灭剂或增强剂也可位于核酸探针中的任何位置,例如,连接到核酸序列的 3' 端。猝灭剂的非限制性实例包括四甲基罗丹明和二氢环吡咯并吲哚(dihydrocyclopyrroloindole) 三肽。

[0092] 作为非限制性实例,猝灭剂(或类似地,增强剂)可如下所述用于核酸探针的信号实体内。与靶核酸相结合的核酸探针可以通过某些酶或其它物质例如聚合酶如 Taq 聚合酶的作用而从靶核酸上除去或解离。例如,在一些情况下,聚合酶可导致核酸探针内的核酸序列发生降解,其可造成信号实体和 / 或猝灭剂或增强剂释放,这样,猝灭剂或增强剂可能不再接近信号实体或者至少不对其产生显著影响。于是,可通过测定信号实体的变化来测定核酸探针的降解。相反,在核酸探针未与靶核酸充分结合的系统(例如如果不存在充分互补的序列),不会在聚合酶或其它物质的作用下发生核酸探针降解(例如靶核酸和核酸探针之间存在的任何结合时间太短或长度太短,以至于不出现酶促作用),这样,无法测定到信号实体信号的显著变化。因此,在一个实施方案中,可为包含核酸探针和靶核酸的流体

液滴提供聚合酶比如 Taq 聚合酶。如本文所讨论的,可使用任何合适的技术将所述聚合酶提供给流体液滴。

[0093] 在一些情况下,核酸探针可包含至少一种锁核酸(LNA)残基(参见,例如图 2F)。锁核酸残基是核酸的类似物,其具有与天然核酸残基相似的化学形状(例如能够与互补残基形成 2 或 3 个氢键),但是不能在像天然核酸残基那样多的维度上自由旋转。例如,在一些情况下,锁核酸残基可含有 2' -O、4' -C 亚甲基桥,其中亚甲基桥将核糖“锁闭”成常见于某些 DNA 或 RNA 形式中的 3' - 内结构构象。锁闭的核糖构象可增加残基堆叠和 / 或主链的预组织。在一些情况下,这可显著增加核酸序列的热稳定性(例如解链温度)。如下文所讨论的,含有一个或多个锁核酸残基的核酸探针可用于某些实施方案中,因为锁核酸残基可显示出与靶核酸结合的亲和性增加,例如,由于其内部旋转能力的限制。

[0094] 在某些实施方案中,核酸探针可含有通用残基,其可以能够与多于一种天然核苷酸(在一些情况下,与所有天然核苷酸)建立残基配对关系。示例性通用残基包括 5- 硝基吡啶和 3- 硝基吡咯,但本领域技术人员了解可用于本文所述系统和方法的其它通用残基。如下文所讨论的,含有一个或多个通用碱基的核酸探针可用于某些实施方案。所述核酸探针可使用任何合适的技术合成,例如固相亚磷酸胺三酯法。在一些情况下,合成多种核酸探针,形成这些探针的文库。所述文库可包含多种序列,例如,组织在多个流体液滴中。在一些(但不是全部)实施方案中,所述文库可含有具有大致相同残基数的序列,例如约 4 个残基、约 5 个残基、约 6 个残基、约 7 个残基等。核酸探针文库可使用任何合适的技术制备,并且可使用人工技术或自动化产生,例如使用机器人装置。

[0095] 在一个实施方案中,所述核酸探针可并行产生。例如,微流体装置可用于并行产生核酸探针文库。例如,微流体液滴制备器可在单个芯片上复制许多次,每个液滴制备器可用于制备不同的核酸探针。产生被液体围绕的流体液滴的方法的非限制性实例描述于 2004 年 12 月 28 日提交的名为“流体分散的方法和装置”的美国专利申请序列号 11/024, 228, 2005 年 8 月 11 日作为美国专利申请公开号 2005/0172476 公开;2006 年 2 月 23 日提交的名为“流体物质的电控制”的美国专利申请序列号 No. 11/360, 845, 2007 年 1 月 4 日作为美国专利申请公开号 2007/0003442 公开的;或者 2006 年 3 月 3 日提交的名为“形成颗粒的系统和方法”的美国专利申请序列号 No. 11/368, 263, 2007 年 3 月 8 日作为美国专利申请公开号 2007/0054119 公开的,以上均通过引用并入本文。例如,在一些实施方案中,可在液体围绕的流体上产生电荷,这可导致流体分散成液体中的独立液滴。

[0096] 在一个实施方案中,所述文库可包含某一长度或某些长度的核酸序列组中的每种可能序列。在另一个实施方案中,所述文库可包含具有某一长度或某些长度的所有可能序列中的至少约 30%、至少约 50%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95% 或者至少约 100%。下文讨论了制备文库的一些方法。

[0097] 在许多实施方案中,存在至少一种标识成分。本文使用的“标识成分”是包含可以一定方式进行测定之组分的物质,例如,标识成分可在包含于液滴中进行标识。标识成分可以是在液滴内不溶的(例如悬浮)或者可溶的。非限制性实例包括可通过荧光、化学发光、放射性等进行检测的标识成分。具体实例包括但不限于含有染料的颗粒、量子点或者荧光颗粒,其在一些实施方式中还可具有与其连接的其它物质,例如寡核苷酸,如本文所述的那些。在一些情况下,任何给定液滴中可存在多于一个的相同标识成分。

[0098] 在某些实施方案中,可在例如液滴内使用多于一种的不同标识成分。例如,液滴可含有至少两种可区分的标识成分,至少三种可区分的标识成分,至少四种可区分标识成分,至少五种可区分标识成分,等。标识成分可使用任何适用方法进行区分,例如颜色、荧光、吸收、强度、大小、电荷、放射性、质量等。

[0099] 在一组实施方案中,颗粒或微粒(例如珠子)可用作标识成分。颗粒可具有任何尺寸,可以是球形的或非球形的。例如,在一些情况下颗粒可具有约 100nm 至约 100um 直径的平均直径。在某些实施方案中,所述颗粒可具有小于约 1 微米、小于约 300nm、小于约 100nm、小于约 30nm 或者小于约 10nm 的平均直径。本文使用的“平均直径”是液滴中所含颗粒直径的算术平均值。本文使用的非球形颗粒的直径是与所述颗粒具有相同体积的理想数学球形的直径。

[0100] 在一些实施方式中,可选择多种标识成分来标识液滴,使得存在至少 3 种可区分标识成分、至少 4 种可区分标识成分、至少 6 种可区分标识成分、至少 8 种可区分标识成分、至少 9 种可区分标识成分、至少约 10 种可区分标识成分、至少约 20 种可区分标识成分、至少约 30 种可区分标识成分、至少约 40 种可区分标识成分、至少约 50 种可区分标识成分、至少约 60 种可区分标识成分、至少约 70 种可区分标识成分、至少约 80 种可区分标识成分、至少约 90 种可区分标识成分、至少约 100 种可区分标识成分等。多种可区分标识成分的一个非限制性实例为 Luminex FlexMAP 微球珠,其可购自 Luminex Corp.。根据一个实施方案,珠或颗粒(比如这些)可通过使用在每个珠或颗粒内独立变化的两种或更多种染料或其它化合物而区分。因此,根据某些实施方案,多个可区分珠可用作多种标识成分。作为另一个具体非限制性实例,包含聚苯乙烯以及一种或多种染料的颗粒可用作标识成分。所述颗粒中使用的染料可包括,例如,基于方酸的分子或其它发出荧光(例如扩展到近红外和/或红外区)的荧光分子。在一些情况下,每个颗粒中可使用可独立控制浓度的两种或更多种染料。

[0101] 在一个方面中,靶核酸可暴露于核酸探针和至少一种标识成分。例如,核酸探针和所述至少一种标识成分可包含在第一流体液滴中,所述靶核酸可包含在第二流体液滴中,它们随后合并(例如如下文所述),从而使得靶核酸暴露于核酸探针。通过测定靶核酸探针与核酸探针的结合,可确定靶核酸探针的至少一部分序列。在一些情况下,通过使用多种不同核酸探针对此进行重复,可确定整个靶核酸探针的序列。

[0102] 对靶核酸进行测序的一组实施方案一般如下所述。提供包含核酸探针和至少一种标识成分的第一流体液滴。在此实例中,核酸探针包含与信号实体和猝灭剂或增强剂相连的核酸残基序列。例如,核酸探针可含有 4、5、6、7、8 或 9 个残基。信号实体、猝灭剂和增强剂在上文有述。还提供包含靶核酸的第二流体液滴。可根据任何合适方法合并第一流体液滴和第二流体液滴,所述方法包括本文所述的那些。合并的流体液滴还可包含聚合酶。可通过在合并液滴之前将聚合酶提供给第一流体液滴或第二流体液滴,或者在第一和第二液滴合并之后直接提供给第三流体液滴,从而将聚合酶引入合并的流体液滴。在某些情况下,例如在核酸探针和靶核酸的相应序列互补或基本互补时,在第一和第二液滴合并之后核酸探针可与靶核酸杂交或以其他方式结合。在这些情况下,如上所述,在使用包含信号实体和猝灭剂或增强剂的核酸探针时,聚合酶可导致核酸探针在核酸探针与靶核酸杂交或结合后发生降解。然后,信号实体和/或猝灭剂或增强剂可由于聚合酶的作用而从核酸探针中释

放出来,这样,猝灭剂或增强剂可基本上不再影响可测定的信号实体。但是,如果核酸探针不与靶核酸杂交或以其他方式结合,例如,由于不充分互补,则第一和第二液滴合并之后可测得信号实体没有变化。因此,对信号实体变化的测定可用于确定核酸探针是否与靶核酸杂交或结合。所述至少一种标识成分也可进行测定和 / 或用于测定核酸探针的序列。

[0103] 图 3 显示一个非限制性实例。在该图中,第一流体液滴 20 显示含有核酸探针 21 和至少一种标识成分 22。但是,在其它一些实施方案中,可在液滴中使用两种、三种或四种或更多种标识成分。在该图中,核酸探针 21 包含核酸序列 23,其与信号实体 24 和猝灭剂 (“Q”)25(尽管在另一些实施方案中,可使用增强剂代替猝灭剂)相连。还提供了含有靶核酸 27 的第二微流体液滴 26。在该实例中,第一流体液滴 20 与第二流体液滴 26 合并,形成合并流体液滴 28,如箭头 200 所示。在合并流体液滴中存在聚合酶 29(例如,存在于第一和 / 或第二流体液滴中)。如果核酸探针 21 与靶核酸 27 结合,如箭头 201 所示,则信号实体 24 与核酸 23 和猝灭剂 25 分开,如箭头 202 所示。在某些情况下,核酸探针 21 和靶核酸 27 可结合(例如如果核酸探针与靶核酸互补或基本互补),可通过确定信号实体 24 的变化来检测它们的结合,如箭头 203 所示。在一些情况下,然后可通过测定标识成分 22 来确定核酸 23 的序列(如箭头 204 和 205 所示)。

[0104] 对靶核酸进行测序的另一组实施方案使用连接酶从而在靶核酸存在下将核酸探针连接在一起。实例如下。可提供至少包含第一和第二核酸探针的第一流体液滴,所述第一和第二核酸探针分别选自第一组和第二组核酸探针。但是,在一些情况下,可提供两种流体液滴,各包含分别选自第一组或第二组核酸探针的第一或第二核酸探针。所述核酸探针各包含与信号实体、猝灭剂和 / 或增强剂相连的核酸残基序列,如本文所述。还提供包含靶核酸的第二流体液滴。然后,第一流体液滴(或两种不同的流体液滴)和第二流体液滴可使用任何适当方法合并,如本文所述。

[0105] 另外,可将连接酶引入合并的流体液滴中。可通过在合并液滴之前将连接酶提供给第一流体液滴或第二流体液滴,或者在第一和第二液滴合并之后直接提供给所述合并液滴,而将连接酶引入合并的流体液滴中。

[0106] 在一些实施方案中,第一和第二核酸探针可以与靶核酸相结合,例如如果靶核酸和核酸探针基本互补的话。在这些情况下,核酸探针可以连接在一起(例如通过使用连接酶进行连接),其可用于(如下文所述)确定与核酸探针的结合。例如,在一些情况下,第一和第二核酸探针会在彼此相邻的位置上与靶核酸结合(例如杂交)(例如第一核酸的序列基本上与靶核酸互补,而第二核酸的序列与第一核酸探针的基本互补序列附近的靶核酸基本互补)。在这种情况下,由于连接酶的存在可发生第一和第二核酸探针的连接。但是,在第一和第二核酸探针不在靶核酸的相邻位置上结合的另一一些情况下,可以不发生连接。例如,第一和第二核酸可具有基本上与靶核酸互补的序列,但该序列不彼此相邻(例如,靶核酸探针中与第一和第二核酸探针互补的序列之间可存在一个或多个残基)。

[0107] 在一些实施方案中,使用例如上文所述的连接方法对靶核酸进行测序可能是有利的。例如,如本文所述,这些方法可允许从较小的文库形成相对大的测序文库。这可降低合成文库的时间和 / 或成本(例如试剂的成本)。另外,在一些实施方案中,与非连接方法相比,连接方法可包括增强的信号,因为连接提高了探针长度,这继而可提高结合能。在一些情况下,这些方法可提高单碱基对的特异性,从而提高测序方法的准确性。这是因为相比于

较长的核酸探针,较短的核酸探针可具有更高的单碱基对特异性。在一些情况下,可使用包含通用碱基、锁核酸、缺口或其它生物化学试剂的核酸探针来提高特异性和结合能,以改造探针结构和优化方法,如本文所述。在一些情况下,所述连接方法还可有利地将使用包含长和短核酸探针的文库的益处相结合。例如,短探针可用于形成较长的探针,其一般会更紧密地结合核酸探针。另一方面,由于探针的柔性,较长的探针一般比较短核酸探针的特异性差。因此,某些连接方法可利用较短和较长探针的一些优点(例如较短探针的特异性结合,但是一旦结合后,较短探针连接形成较长探针,因此结合更加紧密)。

[0108] 本发明连接方法的非限制性实例在图 16 中显示。如图 16A 所示,靶核酸 80 暴露于第一核酸探针 82 和第二核酸探针 84。在一些情况下,如图 16B 所示,第一和第二核酸探针可彼此相邻地与靶核酸杂交,并且如箭头 81 所示。然后,包含第一核酸探针 82 和第二核酸探针 84 的靶核酸 80 可暴露于连接酶 86,如箭头 83 所示。如图 16C 所示,第一和第二核酸探针可相连接,形成核酸寡聚物 88。但是,在一些情况下,第一和第二核酸探针不彼此相邻地与靶核酸杂交,如图 16E 所示和箭头 87 所示。在这种情况下,包含第一核酸探针 82 和第二核酸探针 84 的靶核酸 80 暴露于连接酶 86,图箭头 89 所示,不会出现显著的核酸探针连接。在一些情况下,所述核酸探针之一或之二不与靶核酸杂交(例如,序列不基本互补),在第一核酸探针和第二核酸探针之间不发生连接。例如,如图 16D 所示和箭头 85 所示,仅有第一核酸探针 82 与靶核酸 80 杂交,而第二核酸探针 84 不与靶核酸 80 杂交。

[0109] 作为另一个非限制性实例,如果两个 3 聚物核酸探针是互补的,相邻地杂交,并且为正确顺序,则它们可连接,形成新的 6 聚物,如图 36A 和 36B 中所示。图 36A 显示连续互补的 3 聚物与靶核酸的杂交。图 36B 显示使用连接酶对核酸探针进行连接。连接将两个 3 聚物探针共价键合在一起,形成更紧密结合的 6 聚物。在连接之前,探针的结合能仅为 3 聚物的结合能,其一般太小而无法在室温下检出。在连接之后,两个 3 聚物变为 6 聚物,其具有两倍于 3 聚物的结合能,因此可杂交,如图 53C 所示。因此,探针的连接依赖于高度特异性但短暂的短探针结合,产生紧密结合的组合探针。

[0110] 例如,第一与第二核酸探针的连接可通过与所述核酸探针至少之一相结合的信号实体的变化来确定。如果第一和第二核酸探针在相邻位置上与靶核酸互补或基本互补,则第一和第二核酸探针(包含信号实体)与靶核酸结合,并且参与连接反应,如上所述。因此,通过测定连接的核酸探针中的信号实体,基于核酸探针的序列,可确定部分的靶核酸序列。相反地,如果第一或第二核酸探针不能与靶核酸序列结合(例如如果序列不充分互补),则不发生连接反应,所测的信号实体会具有不同的信号。在一些情况下,来自第一组的每个核酸探针包含第一信号实体或标识成分,来自第二组的每个核酸探针包含第二信号实体或标识成分。可通过确定第一和/或第二信号实体和/或标识成分来确定第一和第二核酸探针的连接。

[0111] 在一些情况下,第一组核酸探针和/或第二组核酸探针可包含所选全长序列的至少一部分。例如,第一组核酸探针可包含具有 3 个核酸残基的全部探针中一部分的每种至少一个。第一组核酸探针和第二组核酸探针可以基本相似,也可以不是这样。在一些情况下,第一组核酸探针与第二组核酸探针包含基本相同的探针。在一些情况下,第一组和第二组核酸探针包含基本上所有可能的 3 聚物。在一些情况下,液滴可包含来自第一组的单个探针和来自第二组的单个探针。在其它一些情况下,液滴可包含来自第一组的第一类型的

多个探针和来自第二组的第二类型的多个探针。

[0112] 第一组和第二组核酸探针可以是基本上类似的,或是不同的。例如,如果第一组和第二组包含所有可能的3聚物中的至少一部分的话,则第一组和第二组核酸可以是基本上类似的,但是它们可以包含不同的信号实体,或者信号实体位于不同的位置(例如3'端和5'端)。第一组可区分标识成分和第二组可区分标识成分可以是基本上类似的,或是不同的。在一些实施方案中,第一组和/或第二组核酸探针包含可能的3聚物、4聚物、5聚物、6聚物、7聚物、8聚物、9聚物、10聚物等的至少一部分。

[0113] 除了A、G、C和T之外,在某些情况下也可存在其它的核酸残基。例如,在一些情况下,至少一些核酸探针可另外包含至少一个通用残基。例如,包含另外通用残基的3聚物可具有序列NNNXXX,其中N是通用残基,XXX中每个X独立地为A、G、C或T(例如3聚物)。

[0114] 本文使用的“通用碱基或通用残基”(例如“N”)指这样的碱基,其在以核苷碱基(例如核苷酸或PNA)的形式掺入聚合物结构时不根据具有核苷碱基的互补聚合物结构对碱基进行明显的区分。例如,通用碱基可与超过一种选自A、T、C和G的核苷酸杂交。通用残基是本领域技术人员已知的。通用残基的非限制性实例包括:脱氧肌苷、3-硝基吡咯、4-硝基吡咯、6-硝基吡咯、5-硝基吡咯、6-甲基-7-氮杂吡咯、吡咯并吡嗪(pyrrolopyridine)、咪唑并吡啶(imidizopyridine)、异喹诺酮、丙炔基-7-氮杂吡咯、丙炔基异喹诺酮、丙二烯基-7-氮杂吡咯、8-氮杂-7-脱氮-2'-脱氧鸟苷、8-氮杂-7-脱氮-2'-脱氧腺苷、2'-脱氧胞苷、2'-脱氧尿苷、2'-脱氧腺苷、2'-脱氧鸟苷、7-脱氮-2'-脱氧肌苷、2'-氮杂-2'-脱氧肌苷、3'-硝基唑、4'-硝基吡咯、5'-硝基吡咯、6'-硝基吡咯、4-硝基苯并咪唑、硝基咪唑(例如5'-硝基咪唑)、4-氨基苯并咪唑、咪唑并-4,5-碳二亚胺、3'-硝基咪唑、咪唑-4-羧酰胺、3-(4-硝基唑-1-基)-1,2-丙二醇,以及8-氮杂-7-脱氮腺苷。

[0115] 在一些情况下,第一组核酸探针可以能够连接在3'端,第二组核酸探针可以能够连接在5'端,使得第一核酸探针和第二核酸探针各自仅一端可彼此连接。因此,探针需要与靶核酸以正确顺序杂交,以发生连接。也就是说,探针必须与靶核酸杂交,以使第一探针的3'端和第二探针的5'端彼此相邻且探针能够连接。如果第一探针和第二探针与靶核酸杂交,使得第一探针的5'端和第二探针的3'端彼此相邻,则探针可能不能结合(例如,如果第一探针的5'端和第二探针的3'端包含防止在该末端杂交的实体(例如标识成分、信号实体等))。

[0116] 所述连接方法可允许首先制备相对少的液滴数。例如,如果产生包含所有可能的六聚物总数的多种液滴,则使用本文所述技术必须产生4096种液滴类型。但是,如果使用两组3聚物,利用上述连接方法研究所有可能的六聚物,则仅需产生128种液滴类型(例如第一组3聚物(64种)和第二组3聚物(64种)。第一组液滴可以与第二组液滴合并,形成液滴文库,每个液滴包含来自第一组的液滴和来自第二组的液滴。

[0117] 使用SBH(杂交测序)生物信息学,在单次运行中可测序的靶核酸长度预计可约为文库中探针数的四分之一。例如,对于具有 $64(4^3)$ 种成分的3聚物文库,可对约10-12个碱基的靶核酸进行测序。另外例如,对于具有4096种成分的6聚物文库,可对约1000个碱基的靶核酸进行测序。再例如,对于具有约1700万种探针的12聚物文库,可对约四百万个碱基的靶核酸测序。但是,这种大文库对于标准方法的合成来说大得不切实际。但是,使用

本发明的某些方法,可通过将两个 6 聚物连接在一起而形成 12 聚物,这需要合成 6 聚物文库的  $4096+4096 = 8192$  种探针。这是全部 1700 万个成员的文库中探针数目的 0.0005%。如所述,产生 12 聚物的 6 聚物本身可通过连接 3 聚物来形成,使得 12 聚物可通过连接四个 3 聚物探针来形成,需要合成总共 256 种探针。此关系由下式表示:

[0118]  $f(n) = (4^{n1}+4^{n2} \dots)/4^{(n1+n2 \dots)}$ , 其中

[0119]  $n1+n2+ \dots = R$ ,

[0120] 其中  $f(n)$  是需要合成的探针与完整文库相比的分数,  $R$  是最终连接的探针的长度,  $n1, n2 \dots$  是连接在一起的第一、第二... 探针中的碱基数。在一些情况下,可提供至少三个、至少四个、至少五个、至少六个等核酸探针组。本文所述的连接方法可扩展至掺入超过两组的核酸探针。连接形成的探针总长可以是至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个、至少 15 个、至少 16 个残基等。

[0121] 第一组与第二组核酸探针组合的非限制性实例显示于图 17。为简单起见,以下显示针对第一组核酸探针 246 和第二组核酸探针 248 的实例,其中每个探针组包含四个通用核酸残基以及一个 A、C、G 或 T 残基(例如 NNNNX 或包含四个通用残基的 1 聚物),如图 17A 所示。第一组核酸探针 246 包含四种探针(250、252、254、256),其中每个探针包含 3' 或 5' 侧的信号实体或标识成分(如所示)。与第一组核酸探针相比,第二组核酸探针 248 包含四种探针(258、260、262、264),其中每个探针分别包含 3' 或 5' 侧的信号实体或标识成分(如所示)。如图 17B 所示,形成多个液滴 266,其中每个包含来自第一组的至少一种探针和来自第二组的至少一种探针。如果来自第一组的每个探针与来自第二组的每个探针一起包含在液滴中,则在该实施例中将形成十六种液滴。但是,在一些情况下,并不是每个来自第一组的探针都与来自第二组的每个探针在液滴中合并。

[0122] 在一些情况下,第一组核酸探针中的每一个可与至少一种可区分标识成分相结合,第二组核酸探针的每一个可与至少一种可区分的标识成分相结合。例如,可形成包含第一组可区分核酸探针和第一组可区分标识成分的第一组液滴,并可形成包含第二组可区分核酸探针和第一组可区分标识成分的第二组,以形成第二流体液滴群。然后,可通过鉴定可区分标识成分来鉴定合并液滴中包含的核酸探针,如本文有关确定核酸探针所述。所述标识成分还可用于在所述液滴暴露于靶核酸后确定每个探针的序列。与第一组核酸探针相结合的可区分标识成分以及与第二组核酸探针相结合的可区分标识成分可以彼此可区分或不可区分。在一些情况下,它们将是可区分的,使得每一个(例如全部第一核酸探针和全部第二核酸探针)将可通过确定可区分标识成分来鉴定。在一些情况下,来自第一组和第二组的每个液滴可至少包含可区分标识成分,使得来自第一组和第二组的每个探针的序列与可区分标识成分相关联。

[0123] 包含第一组核酸探针和第二组核酸探针的文库可使用多种方法产生。液滴文库可使用非微流体或微流体方法产生,如本文所述。一般说来,第一和第二核酸探针的连接在它们暴露于靶核酸之后才发生。

[0124] 作为非微流体方法的非限制性实例,来自第一和第二组核酸探针的每个核酸探针可置于不同的容器中。来自第一组的每个核酸探针可与来自不同容器中的第二组的每个核酸探针合并,直至来自第一组的每个探针已经与来自第二组的每个探针合并。例如,图 30 显示文库 A 和文库 B 的示意图,各包含分别来自第一组和第二组核酸探针的包含 3 聚物的

64种探针。将来自文库A的每种探针与来自文库B的每种探针合并,形成 $64 \times 64 = 4096$ 个成员的合并文库。在一些实施方案中,这可使用阵列来实现。例如,可提供含有至少4096个空孔的大多孔板,在每个孔中,可将来自文库A和文库B的核酸探针独特组合混合在一起。例如,在第一行孔中,将探针A(1,1)与探针B(1,1)、B(1,2)....., B(2,1), B(2,2), ..., B(8,7),和B(8,8)混合。在下一行中,将探针A(1,2)与探针B(1,1),B(1,2),...,B(2,1), B(2,2),...,B(8,7)和B(8,8)混合,直至混合出探针A和探针B每个可能的组合。从这两个小的文库出发,产生总共4096个组合( $64 \times 64 = 4096$ )。可将组合的A×B文库中每个成员乳化,可将乳液合并以形成包含来自每种乳液的至少一个液滴的合并文库。合并文库可再注入微流体装置中并与靶核酸合并,如本文所述,并如图33B所示。

[0125] 在一些微流体实施方案中,来自第一组和第二组的核酸探针可以在微流体装置中合并。例如,可将来自第一组的每种核酸探针分别乳化,并将来自第一组的每种探针的乳液与第一组核酸探针(例如文库A)合并。这也可针对第二组核酸探针进行,形成文库B。可将文库A和文库B注射到微流体装置中,如图33A所示。同时,在一些实施方案中,包含靶核酸的液滴也可引入通道中,如图33A左边所示。使用本领域技术人员已知的技术,可调节包含靶核酸的液滴的流速,并调节再注入的文库以使得包含靶核酸的一个液滴与来自文库A的一个液滴以及来自文库B的一个液滴相组合。这三个液滴可使用本文所述用于合并微流体液滴的技术进行合并。

[0126] 作为另一个非限制性实例,可将包含第一核酸探针的多种液滴与包含第二核酸探针的多种液滴之一合并,从而制备包含第一核酸探针和第二核酸探针的多种液滴。也就是说,可制备各包含选自第一组核酸探针的至少一种核酸探针的第一多种液滴,可制备各包含选自第二组核酸探针的至少一种核酸探针的第二多种液滴。可将来自第一多种液滴的液滴与来自第二核酸组的液滴合并,由此形成包含选自第一核酸探针组的至少一种核酸探针和选自第二核酸探针组的至少一种核酸探针的液滴。可重复此步骤,直至形成多种合并的液滴,使得来自第一组的基本所有核酸探针与来自第二组的基本所有核酸探针一起包含在液滴中。然后,可将所形成的合并液滴文库与包含靶核酸的第三液滴合并。

[0127] 对靶核酸进行测序的另一组实施方案如下。可提供第一流体液滴,其包含核酸探针(其可含有信号实体)和至少第一标识成分、与第一标识成分可区分的第二标识成分以及与第一和第二标识成分可区分的第三标识成分。在一些情况下,还可存在与第一、第二和第三标识成分可区分的第四标识成分。在一些实施方案中,每个标识成分还可包含寡核苷酸,并且液滴中的许多标识成分经常可包含可区分寡核苷酸。在一些情况下,每一寡核苷酸含有一个或多个通用核酸残基。例如,给定液滴中的寡核苷酸可各含有多个通用核酸残基,液滴中的每一寡核苷酸可具有非通用残基的残基差异。

[0128] 作为一个具体的非限制性实例,在流体液滴中存在四种可区分标识成分时,四种可区分标识成分的寡核苷酸可以为 $A(N)_{n-1}$ 、 $C(N)_{n-1}$ 、 $G(N)_{n-1}$ 和 $T(N)_{n-1}$ ,其中N为通用核酸残基,n为寡核苷酸的长度。在该实例中,寡核苷酸均存在一个残基的差异。在一些情况下,寡核苷酸中通用核酸部分的长度是四个残基。在另一些情况下,是五个残基。在另一些情况下,是六个残基。在一些情况下,存在差异的残基位于寡核苷酸的5'端位置,例如 $5' -XN_{(n-1)}-3'$ (X是天然核酸残基)。但在另一些情况下,存在差异的残基位于寡核苷酸的5'端第二位,例如 $5' -NXN_{(n-2)}-3'$ 。在又一些情况下,存在差异的残基位于其它位置,

例如 5' -NNXN<sub>(n-3)</sub>-3' 。

[0129] 在该实例中可提供包含靶核酸的第二流体液滴。然后,可将所述流体液滴和第二流体液滴合并,形成合并流体液滴。在一些情况下,可存在能够与靶核酸结合的核酸探针,例如,它们互补或基本互补。另外,标识成分中的寡核苷酸之一也可与靶核酸结合。

[0130] 在核酸探针和标识成分中的寡核苷酸之一已经与靶核酸相结合的一些情况下,核酸探针和标识成分中的寡核苷酸可连接在一起(例如通过连接),这可用于(如下文所述)确定结合。连接通常在标识成分中的寡核苷酸与核酸探针的序列相对于靶核酸彼此相邻地定位时发生,如果寡核苷酸和核酸探针序列相对于靶核酸没有正确定位,则不发生显著连接。在一些情况下,可通过使用任何合适方法在合并的流体液滴中提供连接酶(例如 DNA 连接酶)而导致寡核苷酸与核酸探针序列的连接。例如,可如下将连接酶引入合并的流体液滴中:在合并液滴之前将聚合酶提供给第一流体液滴或第二流体液滴,或者直接提供给合并流体液滴,等等。

[0131] 例如,可通过测定标识成分与核酸探针中信号实体的结合来确定核酸探针与标识成分中寡核苷酸的连接。如果核酸探针与靶核酸互补或基本互补,则核酸探针(包含信号实体)与靶核酸结合,并且参与连接反应。如果选择可区分标识成分以使得每个结合的寡核苷酸仅在一个位置存在差异(例如如果其它残基是通用核酸残基),则仅有一种可区分标识成分能够参与连接反应。因此,基于核酸探针的序列和标识成分寡核苷酸的序列,可通过测定哪种可区分标识成分与核酸探针中的信号实体结合来确定靶核酸序列的一部分。相反地,如果核酸探针不能与靶核酸序列结合(例如,如果序列不充分互补),则不发生连接反应,并且将会发现没有标识成分与核酸探针的信号实体结合。

[0132] 上述方法的非限制性实例显示于图 4。在该实例中,提供第一流体液滴 30,其含有核酸探针 31、第一标识成分 32、与第一标识成分可区分的第二标识成分 33、与第一、第二标识成分可区分的第三标识成分 34、以及与第一、第二和第三标识成分可区分的第四标识成分 35。当然,液滴内可存在标识成分的超过一个拷贝。所述可区分标识成分可各包含结合的寡核苷酸。这些核酸寡核苷酸序列的每一种可选择成与其它标识成分所结合的其它核酸寡核苷酸存在一个残基的差异,而其它残基可以是通用核酸残基。例如,与四种可区分标识成分结合的四种寡核苷酸可以是 NANNNN、NTNNNN、NGNNNN 和 NCNNNN(或者任何其它组合,例如本文所述的那些)。在该实例中,还提供了包含靶核酸 37 的第二流体液滴 36。使用任何合适方法(例如本文所述的那些)将第一流体液滴和第二流体液滴合并形成合并流体液滴 38,如箭头 300 所示。在一些情况下,核酸探针 31 可与靶核酸 37 结合,标识成分(32、33、34 或 35)中的寡核苷酸之一也可与靶核酸 37 结合,如箭头 301 所示。将连接酶 39 提供给合并的流体液滴,如果寡核苷酸和核酸探针序列各与靶核酸 37 正确结合,则可将标识成分中的寡核苷酸与核酸探针的核酸序列相连接,如图所示。在一些情况下,如果有任何缺口或间插序列,连接酶就不会进行连接。然后,可对与核酸探针的信号实体结合的标识成分进行测定,如箭头 302 所示。用于此测定的方法如下所示。

[0133] 尽管上文讨论了本发明的几个具体实施例,应注意,还可使用上述步骤和/或其它步骤的任何组合来对靶核酸进行测序。

[0134] 可通过测定靶核酸与所述多种可区分核酸探针之一的结合(或不结合)来确定靶核酸的序列。在实验条件下通过氢键键合形成相对稳定的双链体时,靶核酸可与核酸探针

结合。相对稳定的氢键键合可由于沃森-克里克互补性（例如 A 匹配 T, 但不匹配 G 或 C, G 匹配 C, 但不匹配 A 或 T）和 / 或其它作用例如 GC 摆动而形成, 或者由于锁核酸或通用碱基导致的其它结合形成, 如本文所述。确定靶核酸序列的合适方法的非限制性实例包括为本领域技术人员所知的杂交测序技术。

[0135] 杂交测序 (SBH) 是研究靶核酸中核酸残基序列的方法, 其之前已有描述, 例如在美国专利 No. 5, 202, 231 中。一般说来, SBH 使用一组确定序列的核酸探针来检测靶核酸中更长的靶标链上的互补序列。然后, 可使用计算机算法排列与靶标杂交的确定序列, 以构建靶核酸的序列。

[0136] 因此, 在本发明的一个实施方案中, 靶核酸可与核酸探针的某些组合相结合, 产生特征性的“杂交”模式。给定样品中的每个阳性结合 (或杂交) 事件提供了有关靶核酸的一条不连续信息。在一些情况下, 可在不精确确定任何特定核酸探针与靶核酸结合的确切位置的情况下对靶核酸进行采样。已经开发出了根据杂交模式进行靶核酸重建的算法和软件, 它们是本领域技术人员已知的。但是, 在另一些情况下, 对杂交模式的分析 (例如本文所述的那些) 可提供靶核酸序列的“指纹”鉴定, 而不具体确定靶核酸序列本身。杂交的模式还可以人工分析或通过计算机分析。

[0137] 本发明的另一个方面一般涉及产生液滴库的系统和方法, 其中液滴含有可区分的核酸探针和 / 或标识成分。在一些实施方案中, 多种可区分标识成分可用于标识多种流体液滴, 在一些情况下, 可区分标识成分用于确定每个液滴中存在的核酸序列 (例如核酸探针)。例如, 在一个实施方案中, 可制备至少约 64 种、至少约 256 种、至少约 1024 种、至少约 4096 种、或者至少约 16384 种或更多种流体液滴, 其中每种含有核酸探针 (包含多拷贝的核酸探针) 以及一种或多种标识成分, 其组合在一起标识该核酸探针, 而不标识不同的核酸探针。在一组实施方案中, 本发明提供了制备这些流体液滴库的系统和方法。

[0138] 在一个实施方案中, 使用多种可区分标识成分来标识多种流体液滴或核酸探针或其它合适样品。例如, 如果使用荧光颗粒, 则首先测定可区分颗粒组合, 例如具有至少 5 种可区分颗粒、至少约 10 种可区分颗粒、至少约 20 种可区分颗粒、至少约 30 种可区分颗粒、至少约 40 种可区分颗粒、至少约 50 种可区分颗粒、至少约 75 种可区分颗粒或者至少约 100 种或更多可区分颗粒。此类组的一个非限制性实例可得自 Luminex。可区分标识成分可分为多个组 (例如 2、3、4、5、6、7 或更多个), 其中每个组含有可区分标识成分组合的至少两个成员。

[0139] 然后, 可将样品与选自每个可区分标识成分组的一个成员相关联。例如, 可通过选自第一组的第一成分、选自第二组的第一成分和选自第三组的第一成分的组合来鉴定第一样品, 这些成分的每一个彼此可区分; 可通过选自第一组的第一成分、选自第二组的第一成分和选自第三组的第二成分的组合来鉴定第二样品。在该实例中, 独特组合的数目就是每个组中成员数的乘积; 因此, 可制备标识成分的大量可区分组。因此, 例如, 通过定义至少六种标识成分 (其中标识成分安排成至少三组, 每组有至少两种标识成分), 可通过将至少 8 个不同样品的每一个与至少三种标识成分相结合来测定至少 8 个不同样品, 其中与每个样品结合的每个标识成分选择成使得存在来自所述至少三组中每一组的一种标识成分。通过增加每个组的成员数和 / 或所存在的组数, 可获得甚至更大的数目。另外, 每组的成员数可以是相同的, 或者在一些情况下是不同的。

[0140] 应注意,在另一些实施方案中,其它编码方法也是可能的。例如,可区分成分可用二进制数字表示,从而对核酸探针或其它样品任意进行编号,并且通过添加对应于所存在的可区分标识成分的二进制数字来标识。

[0141] 因此,在一些实施方案中,可通过将一个或多个以这种形式布置的标识成分引入流体液滴中来标识流体液滴。可以分别标识相对大量的流体液滴。例如,可通过向每个液滴中添加已经由此种方式确定的三种或四种标识成分来标识含有不同核酸探针的数十、数百或数千种流体液滴的库。

[0142] 在一组实施方案中,作为非限制性实施例,40种可区分标识成分的组合可用于如下编码高达约10000种可区分核酸探针。将40种可区分标识成分分为4组,每组10种。每个组的每个成员编号为1至0,四个组标记为A、B、C和D。将来自每个组的一个成员加入流体液滴(例如含有核酸探针的)中,标识成分以ABCD的顺序记录。因此,例如,如果发现流体液滴中包含来自组A的成分2、来自组B的成分1、来自组C的成分7以及来自组D的成分6,则液滴为 $A_2-B_1-C_7-D_6$ ,或者液滴编号2176。可基于该液滴编号确定液滴的身份和/或液滴内所含的物质,例如通过任意查找表,或者通过一些编码方法。例如,作为另一个非限制性实例,24种可区分标识成分的组合可用于编码6聚物(例如,包含在核酸探针内的),这如下实现:将标识成分分为6组,每组含有4种成分,使得每个成分代表不同的碱基(例如A、C、T或G),而每个组代表位置。通过在含有6聚物的流体液滴内包含来自6个组中每一组的一种成分,可通过液滴内存在的标识成分组合来标识6聚物。因此,例如,如果存在来自组1的成分A、来自组2的成分C、来自组3的成分T、来自组4的成分T、来自组5的成分C和来自组6的成分G,则液滴内所含的6聚物为 $1_A 2_C 3_T 4_T 5_C 6_G$ ,代表序列ACTTCG(SEQ ID NO:1)。

[0143] 产生液滴库的一个非限制性实例显示于图5。提供多个八种流体液滴50,其各自含有核酸探针(编号51-58)。还提供了六种可区分标识成分60,其已分为三组(1和2为组1,3和4为组2,5和6为组3)。将所述可区分标识成分和核酸探针组合在液滴61中,使得八种液滴的每一种中存在三种可区分标识成分(每组各一个),从而八种核酸探针没有两种与同一组三种可区分标识成分结合。因此,在此具体实例中,各自含有核酸探针的八种流体液滴的每一种由三种可区分标识成分的组合来标识。

[0144] 具体实施方案中标识成分和/或信号实体的测定方法将取决于流体液滴中所存在的组分。如上所述,可使用比如放射性、荧光、磷光、光散射、光吸收、荧光偏振等技术进行测定。使用这些原理运行的许多检测器是市售的。所述检测器可用于测定流体液滴中可能存在的至少一种信号实体和/或标识成分,在一些情况下,可使用超过一种检测器。

[0145] 在一些实施方案中,液滴发生变形,使得液滴中所含的信号实体和/或标识成分以单行穿过检测器。可通过使液滴通过具有狭窄处的通道使其变形,所述狭窄处的横截面积小于液滴在游离溶液中的横截面积,例如图6C所示。在一些情况下,液滴发生变形,使得基本上所有的信号实体和/或标识成分在液滴内排列成使得没有两个能够同时穿过与液滴运动方向垂直的虚拟平面。

[0146] 在一些实施方案中,检测可以是并行进行的,即,可以在一个通道内和/或多个通道内同时测定许多信号实体和/或标识成分。例如,可使用定时装置使并行途径的检测同步。并行检测的另一个非限制性实例是使用照相机或其他成像装置,其布置成能够对超过

一个通道进行拍摄,例如同时进行。照相机可以是例如行扫描照相机,2D CCD 照相机等。在一个具体实施方案中,至少一种汞弧灯可照亮选定数目的通道,可使用多个照相机(其每个可具有单独的滤光片)来捕获特定颜色的光谱。图像可以连续或同时捕获,例如使得每个液滴的位置在所有照相机图像中是相同的。

[0147] 在一些情况下,可在某时间点测定单个液滴的信号实体和/或标识成分。例如,图 18A 所示,多个液滴 272 流过微流体通道 270。检测器 274 相对于通道 270 设置成一次检测一个液滴 278(或液滴 278 的一部分)。检测器 274 可测定横截面 276 中的信号实体和/或标识成分。在另一些情况下,每次可测定来自多个液滴中的信号实体和/或标识成分。例如,图 18B 所示,多个液滴 282 流过多个微流体通道 280(在该非限制性实例中,显示四个通道)。检测器 286 相对于通道 280 设置成使得检测在微流体通道 282 的横截面 287 中经过检测器的多个液滴 284 的信号实体和/或标识成分。作为另一个非限制性的实例,如图 18C 所示,多个流体液滴 295 可通过入口 291 流入所含区域 290。检测器 294 相对于所含区域 290 设置成使得可测定横截面 296 中多个液滴 295 的信号实体和/或标识成分。在一些情况下,所含区域 290 可具有出口 292,其可包含门 293(例如阀),以控制所述多个流体液滴的流动。在一些情况下,门 293 可允许流体流动,但是不允许流体液滴流动。在一些情况下,每秒可测定至少约一百、至少约一千、至少约一万、至少约十万、至少约五十万、至少约一百万、至少约五百万、至少约一千万个液滴。

[0148] 在同时可测定多个液滴的情况下,可使用协助测定多个液滴的方法和/或系统。在一些情况下,为了同时对液滴阵列成像,检测器可能需要确定相邻液滴的分界,以对每个液滴仅测定一个信号。根据一组实施方案,在测定包含区域中收集的多个液滴时,利用光源产生液滴眩光的下列方法和/或系统可能是有利的,因为可能难以确定液滴的边界(例如边缘)以测定液滴。

[0149] 在一些情况下,可通过测定相对于参考点的位置的信号来测定液滴。也就是说,每个液滴可与参考点相关联,可相对于参考点来测定液滴的信号。例如,可用光照射液滴表面以使每个液滴产生液滴眩光,从而产生参考点。这可允许检测器确定每个液滴的相对位置,从而测定每个液滴的信号,如本文所述。

[0150] 在一些情况下,在测定多个液滴时,除了用于检测荧光的光源之外,可使用第二光源(例如灯、LED 阵列)。第二光源可以与待测液滴成角度(例如非直角)照射(例如在显微镜下可见)。由于光的取向和球形滴内的折射(如本文所述的),照相机的镜头可捕获漫射光,在每个液滴图像上产生相对集中且明亮的眩光(例如液滴眩光),这很容易看见并可与背景信号区分。因此,由于液滴内的光散射,液滴可产生基本上聚焦的眩光。例如,图 44 显示具有两个离散荧光强度群的多个微流体液滴荧光强度的来自 CCD 照相机的静止图像捕获。液滴的紧密堆积使得难于确定液滴的边界。图 45 显示如上文图 44 中类似环境的 CCD 照相机捕获的静止图像,其利用第二光源以斜角照射液滴。每个液滴可显示液滴眩光,并且在每滴上可见。

[0151] 在一些情况下,光源可被引导至表面上的多个微流体液滴,使得由于液滴内的光散射而基本上在所有所述多个液滴中产生液滴眩光。在液滴上形成的液滴眩光可用于确定液滴的位置。在一些情况下,液滴眩光可定量。在一些情况下,可使用软件来确定和/或定量与液滴相关的液滴眩光。例如,液滴眩光可位于距液滴中心大致相同的角度和距离,因此

用作每个液滴的参考点。在一些情况下,液滴眩光可偏离每个液滴的中心,因此,液滴眩光可用于识别用于采集荧光数据的同一帧中每个液滴的参考点。因此,在一些情况下,不需要打开和关闭液滴眩光(例如通过打开和关闭光源),和/或将液滴鉴定和数据获取过程分开。

[0152] 图 34 显示了该实例中描述方法的示意图,其详细显示了光通过微流体液滴的折射以及所得液滴眩光,这些将显示在液滴图像中。在该非限制性实例中,光以 55 度的角度照射(尽管其他情况中可使用几乎任何非直角角度)。物镜尺寸和相对于液滴的距离未按比例描绘。在该图中,光 500(例如斜射光)显示以 55 度角照在微流体液滴 502 上,其在显微镜载物台上成像 505。折射光线 504 顺着折射光路通过液滴,可见仅有小范围的散射光 504(其被物镜 506 聚集),还有焦平面上的折射光 507。这在通过显微镜观察的颗粒图像上产生液滴眩光。散射光 508 的许多区域不在焦平面上。

[0153] 在一些实施方案中,如果斜射光来自足够远(例如离开液滴约 1 英尺)的光源,则紧密堆积在显微镜载物台表面上的液滴阵列应见到平行光以与载物台相同的入射角到达每个液滴。这会产生每个液滴的相同折射图案;因此,在图像上每个液滴的相同位置出现液滴眩光,从而产生每个液滴的参考点,其距每个液滴的中心为大致相同的角度和距离。

[0154] 尽管可使用多种角度的斜射光产生液滴眩光,但在一些实施方案中,对产生最佳结果的角度范围可能有限制。例如,如果光以大角度存在,则所得液滴眩光可出现在液滴图像的中心附近,这可干扰来自液滴的其它光学信息例如荧光强度的收集。另一方面,在一些实施方案中,如果光以过于倾斜的角度照射,在一些情况下,物镜将收集不到折射光线,这样,液滴图像中将看不到液滴眩光。适于给定实验设置的角度可通过实验确定。

[0155] 液滴眩光的存在和/或位置可通过观察图像来确定,并可相应调节光源的角度以产生所需的液滴眩光存在和/或位置。在一些实施方案中,第二光源的角度小于约 30°、约 30° 至约 80° 之间、大于约 80°、约 40° 至约 70° 之间、约 20°、约 30°、约 40°、约 50°、约 60°、约 70°、约 80° 等。

[0156] 在一些情况下,使用第二光源的实验设置可如图 35 所示。可提供荧光显微镜,例如,包含发射滤光片 520、二向色镜 522、弧光灯 524、激发滤光片 526 和物镜 528。待测定的多个液滴可以位于显微镜载物台 530 上。可以一定角度(例如约 55 度)提供斜射光 532(例如第二光源)。可通过检测器或成像器(例如 CCD 照相机等)记录激发显微镜 534 的光。上述实验设置不以任何形式作为限制,本领域技术人员能够仅使用常规技术来确定可能的其它组分和/或其它设置。

[0157] 可通过检测器或成像器(比如 CCD 照相机)捕获多个液滴的图像。在一些实施方案中,CCD 照相机可包含滤光片,其仅允许窄光谱的光经过而到达照相机(例如红光、绿光等),使得可获得特定的荧光图像。在使用多于一个照相机时,图像的捕获可以是或不是同步的。在一个特定实施方案中,图像的捕获是同步的,使得同时捕获第一和第二波长的荧光信息。在一些实施方案中,可选择第二光源,使得仅在至少两个图像之一中观察到液滴眩光(例如,在具有绿色波长捕获的照相机获得的图像中仅可观察到来自绿色 LED 光源的光)。

[0158] 在一些实施方案中,例如如果形成的液滴眩光明显比背景更强,则可使用简单的方法完成液滴位置的软件鉴定。液滴眩光可用作参考点,因为液滴眩光一般出现在距各液滴中心一致的方向和距离上。根据斜射光的设置,液滴眩光可偏离液滴中心,允许将同一帧

图像同时用于液滴鉴定和数据获取。因此,斜射光可以打开和关闭,或者不打开和关闭,和/或图像可以需要或不需要在略微不同的时间点拍摄。

[0159] 所收集的图像可以如下进行处理。在一些情况下,可使用简单的强度阈值程序处理至少一幅图像(例如包含液滴眩光的),以确定每个液滴的液滴眩光。可用软件计算或者可人工输入,以确定液滴眩光与液滴中心之间的角度和/或距离。在一些实施方案中,液滴眩光与液滴中心之间的角度和/或距离可同时记录(例如,如果实验设置不改变的话)。可使用软件产生相对于每个液滴眩光的取样掩码(例如,以确定每个液滴相对于对应液滴眩光的位置)。所述取样掩码可以与相应时间拍摄的每幅图像叠加(例如,用第一和第二照相机拍摄的第一和第二图像)。这可允许产生每个液滴的标记系统,其定义了液滴中要获取信号(例如荧光强度读数)的边界。此方法的具体例子描述于实施例 12。

[0160] 在一些情况下,可提供可用于对表面(例如微流体通道或包含区域中)上多个微流体液滴成像的成像系统。所述成像系统可包含能够将光正交聚焦至表面上布置的多个微流体液滴的第一光源,以及以基本非正交的角度将光聚焦至表面上布置的多个微流体液滴的第二光源。例如,第一光源可以是来自显微镜的光源,第二光源可以是灯、LED 等。成像系统还可包含能够对表面上布置的多个微流体液滴产生的散射(例如液滴眩光)和非散射光(例如荧光)进行成像的成像器。非散射光可产生自第一光源,散射光可产生自第二光源。在一些情况下,成像器可能能够对产生自布置于表面上的多个微流体液滴的散射光和非散射光同时进行成像。例如,成像器可以是照相机例如 CCD 照相机。在一些情况下,成像系统可包含超过一个成像器,至少两个成像器,至少三个成像器,至少四个成像器等。本领域技术人员将能够确定可与所述成像系统一起使用的其它布置和组件(例如第三光源,滤光片)。成像系统可能能够一次对至少一千、至少五千、至少一万、至少二万、至少三万、至少四万、至少五万、至少十万等的液滴同时进行成像。

[0161] 在一些但是不是所有的实施方案中,本文所述的系统和方法的所有组分都是微流体的。本文使用的“微流体的”,表示包含至少一个横截面尺寸小于 1mm 并且长度与垂直于通道的最大横截面尺寸的比值至少为约 3 : 1 的流体通道的设备、装置或系统。本文使用的“微流体通道”是满足此标准的通道。

[0162] 可提供能够导致两个或更多个液滴合并或聚结成一个液滴的微流体系统,例如在两个或更多个液滴通常不能合并或聚结的情况下(例如由于组成、表面张力、液滴大小等的原因,如本领域技术人员已知)合并或结合。合并两个或更多个液滴的实施方案实例已在上文有述。流体液滴可使用任何合适技术合并,例如 Link 等人于 2005 年 10 月 7 日提交的名为“流体物质的形成和控制”美国专利申请序列号 No. 11/246, 911, 2006 年 7 月 27 日作为美国专利申请公开号 No. 2006/0163385 公开;或者 Link 等人于 2006 年 2 月 23 日提交的名为“流体物质的电控制”的美国专利申请序列号 No. 11/360, 845, 2007 年 1 月 4 日作为美国专利申请公开 No. 2007/0003442 公开,以上均通过引用并入本文。例如,在微流体系统中,与液滴大小相关的液滴表面张力可防止发生液滴的合并或聚结。在一个实施方案中,两个液滴可给予相反的电荷(即正负电荷,不一定同样大小),这可提高两液滴的电相互作用,使得可发生液滴的合并和聚结。可通过使用泰勒锥或任何其他适用技术将电荷(正或负)传递给液滴。例如,可将对含有液滴的反应器施加电场,液滴可经过容器,可发生化学反应导致液滴带电;使液滴流过具有相反湿润特性的区域,等等。

[0163] 垂直于流体流动方向来测量通道“横截面尺寸”。本发明组件中的大部分流体通道具有小于约 2mm 的最大横截面尺寸, 在一些情况下, 小于约 1mm。在一组实施方案中, 含有本发明实施方案的所有流体通道是微流体的, 或者具有不超过约 2mm 或约 1mm 的最大横截面尺寸。在另一个实施方案中, 流体通道可部分由单一组分形成 (例如蚀刻衬底或模制单元)。当然, 可使用更大的通道、管、腔室、储库等来存储大量流体, 并将流体递送至本发明的组件。在一组实施方案中, 含有本发明实施方案的通道的最大横截面尺寸小于约 500 微米, 小于约 200 微米、小于约 100 微米、小于约 50 微米或者小于约 25 微米。

[0164] 本文使用的“通道”表示物品 (衬底) 之上或其中的构造, 其至少部分引导流体的流动。所述通道可具有任何横截面形状 (圆形、卵形、三角形、不规则、正方形或矩形等), 并且可以是有覆盖或无覆盖的。在完全覆盖的实施方案中, 至少一部分通道可具有完全封闭的横截面, 或者除了入口和出口之外, 整个通道可以沿其整个长度上完全封闭。通道也可具有至少约 2 : 1, 更通常至少约 3 : 1、至少约 5 : 1 或者至少约 10 : 1 或以上的长径比 (长度与平均横截面尺寸的比值)。开放通道一般包括便于控制流体运输的特征, 例如结构特征 (长形凹槽) 和 / 或物理或化学特征 (疏水性和亲水性) 或者其它可对流体施加力 (例如限制力) 的特征。通道中的流体可以部分或完全填充通道。在使用开放通道的一些情况下, 流体可以保持在通道中, 例如使用表面张力 (即, 凹或凸液面)。

[0165] 通道可以为任何尺寸, 例如与液体流动垂直的最大尺寸小于约 5mm 或约 2mm, 或小于约 1mm, 或小于约 500 微米, 小于约 200 微米, 小于约 100 微米, 小于约 60 微米, 小于约 50 微米, 小于约 40 微米, 小于约 30 微米, 小于约 25 微米, 小于约 10 微米, 小于约 3 微米, 小于约 1 微米, 小于约 300nm, 小于约 100nm, 小于约 30nm, 或者小于约 10nm。在一些情况下, 通道的尺寸可选择成使流体能自由流过物品或衬底。通道的尺寸还可选择成例如允许在通道中实现特定的体积或线性流量。当然, 可通过任何本领域技术人员已知的方法改变通道数目和通道形状。在一些情况下, 可使用超过一个通道或毛细管。例如, 可使用两个或更多个通道, 其中它们设置在彼此内部, 设置成彼此邻近, 设置成彼此交叉, 等等。

[0166] 可用于本发明的微流体系统的非限制性实例公开于, 2005 年 10 月 7 日提交的名为“流体物质的形成和控制”美国专利申请序列号 No. 11/246, 911, 2006 年 7 月 27 日作为美国专利申请公开 No. 2006/0163385 公开; 2004 年 12 月 28 日提交的名为“流体分散的方法和装置”的美国专利申请序列号 No. 11/024, 228, 2005 年 8 月 11 日作为美国专利申请公开 No. 2005/0172476 公开; 2006 年 2 月 23 日提交的名为“流体物质的电控制”的美国专利申请序列号 No. 11/360, 845, 2007 年 1 月 4 日作为美国专利申请公开 No. 2007/0003442 公开; 2006 年 3 月 3 日提交的名为“形成多乳剂的方法和装置”的国际专利申请 No. PCT/US2006/007772, 2006 年 9 月 14 日作为 WO 2006/096571 公开; 2006 年 3 月 3 日提交的名为“形成颗粒的系统和方法”的美国专利申请序列号 No. 11/368, 263, 2007 年 3 月 8 日作为美国专利申请公开 No. 2007/0054119 公开; 2007 年 3 月 28 日提交的名为“多乳剂和形成的方法”的美国临时专利申请序列号 No. 60/920, 574; 以及 2006 年 1 月 20 日提交的名为“形成包裹在颗粒中例如胶体颗粒的流体的液滴的系统和方法”国际专利申请 No. PCT/US2006/001938, 2006 年 7 月 27 日作为 WO2006/078841 公开, 每篇均通过引用以整体并入本文。

[0167] 在一些实施方案中, 本发明的系统可以是非微流体装置。例如, 可使用 Couette 剪切池、摇动乳液和 / 或膜乳化对两个或更多个液滴进行合并、操纵和 / 或聚结。在一些实施

方案中,可使用电场和 / 或磁场将两个或更多个液滴合并、操纵和 / 或聚结成一个液滴,例如来自衬底所含的一个或多个场产生组件的电场和 / 或磁场。包含布置成能够与样品相互作用和 / 或操纵样品的多个电场和 / 或磁场产生组件的系统的非限制性实例公开于 Ham 等人 2005 年 4 月 13 日提交的名为“操纵和 / 或检测生物样品和其它物体的方法和装置”美国专利申请序列 No. 11/105,322,2006 年 1 月 26 日作为美国专利申请公开 No. 2006/0020371 公开,和 2008 年 6 月 26 日提交的名为“操纵液滴的方法和装置”的国际专利申请 No. PCT/US2008/007941,每篇均通过引用并入本文。

[0168] 在一些情况下,所述场产生组件可排列成阵列。通过以特定顺序开启组件,可使用一个或多个电场和 / 或磁场产生组件产生电场和 / 或磁场,从而可使得流体液滴或其它样品相对于衬底移动。例如,可给予两个液滴相反电荷(即正负电荷,不一定同样大小),这可提高这两个液滴的电相互作用,使得液滴由于相反电荷而可发生合并和聚结。例如,可使用一个或多个电场产生组件对液滴施加电场。

[0169] 在一个实施方案中,可提供含有一种或多种上述组合物的试剂盒。本文使用的“试剂盒”通常定义为包含一种或多种本发明组合物和 / 或与本发明相关联的其它组合物(例如如前所述的)的套装或套件。所述试剂盒中的每种组合物可以液体形式(例如在溶液中)、固体形式(例如干粉)等提供。在一些情况下,本发明的试剂盒可包含任何形式的说明书,其与本发明组合物一起提供,其形式使得本领域技术人员会认识到,该说明与本发明组合物相关联。例如,说明可包含对所述组合物和 / 或与试剂盒相关的其它组合物的使用、修改、混合、稀释、保存、施用、组装、存储、包装和 / 或制备的说明。所述说明可以任何本领域技术人员认可的形式以含有这些说明的载体提供,例如手写的或印刷的、语音的、可听的(例如电话)、数字化、光学的、视觉的(例如录像带、DVD 等)或者电子通信(包括互联网或基于网络的通信),以任何形式提供。

[0170] 通过引用将下列参考文献并入本文:Weitz 等人 2007 年 12 月 21 日提交的名为“核酸测序的系统和方法”的美国临时专利申请序列号 No. 61/008,862,以及 Weitz 等人 2008 年 9 月 19 日提交的名为“核酸测序的系统和方法”的美国临时专利申请序列号 No. 61/098,710,每篇均通过引用并入本文。另外,通过引用并入本文下列文献:Weitz 等人与本申请同一日提交的名为“液滴和相关物质文库的产生”的美国临时专利。

[0171] 包含以下实施例,以说明本发明的多个实施方案。根据本发明的教导,本领域技术人员会认识到,可对公开的具体实施方案进行许多改变,仍然得到类似或相似的结果,而不脱离本发明的精神和范围。因此,下列实施例旨在说明本发明的某些实施方案,而不是列举本发明的完整范围。

[0172] 实施例 1

[0173] DNA 测序方法的非限制性实例描述于下列预示性实施例中。使用五聚物对附图进行说明,仅用于说明。也可使用其它长度。另外,在一些情况下,也可使用修饰残基,例如锁核酸残基和 / 或通用残基。

[0174] 参考图 6 讨论一个示例方法。具体地,该方法是使用基于珠子的标记策略、修饰核苷酸和荧光的实例。图 6A 显示了用作标识成分的多种颜色标记的珠子,例如, Luminex Corporation 所制的珠子。此实施例中的珠子是 5  $\mu$ m 直径珠子,其可分为 100 种可区分类型(150),例如,基于两种不同染料的荧光强度来划分。将这些珠子任意编号为 1-100 号。

[0175] 所述珠子可如下用于标识。这些可区分珠子中的 40 种可分为四组珠子,每组含有 10 种成员,如图 6B 所示(珠子 41-100 不用于该实施例)。在该具体实施例中,所有液滴具有来自四组珠子中每一组的各一种可区分珠子(但可能存在每种类型珠子的超过一个相同拷贝)(图 6B)。为简单起见,在本实施例中,每个珠子代表基数(10)系统中的数量分配值(但其它实施方案中可使用其它方法)。例如,可选择珠子 1、11、21 和 31 来表示 1 的值,珠子 10、20、30 和 40 表示 0 的值。作为具体的例子,第 2176 号溶液或者标签含有珠子 6(151)、17(152)、21(153) 和 32(154)(图 6C)。

[0176] 在所示的实施例中,此液滴还含有带标记的核酸探针 5' -\*GATCT-3' (155) (SEQ ID NO :2) (其中 \* 是信号实体,例如荧光实体),在一些情况下其可被修饰,以掺入一个或多个锁核酸和 / 或通用残基。含有核酸探针和珠子的溶液可分别各自乳化并汇总,产生含有核酸探针和至少四种可区分珠子的分析液滴库 158(图 6D)。将靶核酸 156 提供给微流体装置(未显示),形成各含有靶核酸的多种液滴 157,例如通过液滴-液滴合并技术。然后,将液滴 157 与液滴 158 合并,形成多个合并液滴 159,其各含有靶核酸、核酸探针和相应的标识成分。

[0177] 在本实施例中如下述测定靶核酸与核酸探针的结合,但在其它情况下也可使用其它方法。如箭头 160 所示,将多个合并的液滴 159 通入通道 167,液滴发生变形以使液滴中的每个珠子单行通过检测器 161。在所示实施例中,如果在液滴中核酸探针与靶核酸结合,则核酸探针的荧光光谱将发生变化,这可使用检测器来测定。在液滴中的珠子和信号实体单行经过检测器 161 时对其进行测定,记录所得的荧光量。在本实施例中,如果指示靶核酸与核酸探针结合的信号实体的荧光有变化(例如由猝灭剂从核酸探针释放造成),则可通过液滴内所含的四种可区分珠子确定液滴的身份。例如,如果检测器测定的珠子被鉴定为珠子 6、17、21 和 32(对应于探针标记的核酸探针 5' -\*GATCT-3' (SEQ ID NO :2)),则可确定靶核酸上存在序列 5' -GATCT-3' (SEQ ID NO :2) 的互补序列。

#### [0178] 实施例 2

[0179] 本实施例使用基于珠子的标记策略、Taqman 探针和荧光。同实施例 1 一样,液滴具有来自四组标识成分珠子类型中每一组的各一种成员。图 7A 显示一个液滴 171 中可能成分的实例,如图 6 中所给出的。Taqman 分析将用于本实施例中的液滴。

[0180] 核酸探针 169 包含寡核苷酸 174、信号实体 172 和猝灭剂 173,其通过利用荧光能共振转移(FRET,是一种染料被另一种抑制而不发射光子)来降低(或提高)来自信号实体 172 的荧光。此具体实施例中的信号实体位于寡核苷酸的 5' 端,猝灭剂在 3' 端。

[0181] Taqman 探针与靶核酸退火,如图 7B 中 175 所示。然后,Taq 聚合酶添加核苷酸,直至到达 Taqman 探针,如 176 所示。非互补的 Taqman 探针被取代。Taq 聚合酶的 5' 至 3' 外切活性将互补的 Taqman 探针从靶核酸上降解掉。因此,如果核酸探针与靶核酸结合,如 177 中所示,则猝灭剂 173 与信号实体 172 分离,使得信号实体 172 可被测定,如 178 所示。

[0182] 如实施例 1 中一样,然后,可使用任何适用方法测定靶核酸与核酸探针的结合。在本实施例中,多种核酸探针(在该情况下,与信号实体和猝灭剂相连接)与一种或多种标识成分相结合,形成分析液滴库 179,与含有靶核酸并在本实施例中含有 Taq 聚合酶的多种液滴 180 合并,如图 7C 所示。然后,将液滴 179 与液滴 180 合并,形成多种合并液滴 181。如箭头 182 所示,将液滴 181 通入通道 167,被检测器 161 测定。如果核酸探针与靶核酸结合,

则可释放信号实体。因此,信号实体中荧光差异可用于确定核酸探针与靶核酸的结合。

### [0183] 实施例 3

[0184] 本具体实施例使用 DNA 连接、珠子标记和荧光。Luminex Corporation 提供了可分为 100 种可区分珠 210 的珠子,如图 8A 所示。每种珠子类型可包被有特定生物测定的特定试剂,以允许捕获和检测来自样品的特定分析物。激光激发了标识每种珠子颗粒的内部染料以及在测定过程中捕获的任何报告染料。

[0185] 图 8B 和 8C 说明如下:将四十种珠子分为四组,每组 10 种可区分珠子,每个珠子将附着有引物,使得第一组 10 种珠子将具有“A”类型组和多种通用残基 214(即珠子 1-10 各附着寡核苷酸探针组 5' -ANNNN-3'),第二组 10 种珠子类型(即珠子 11-20)将附着有“C”型寡核苷酸 213(即 5' -CINN-3'),第三组 10 种珠子类型(即珠子 21-30)将附着有“G”型寡核苷酸 212(即 5' -GNNNN-3'),第四组 10 种珠子类型(即珠子 31-40)将附着有“T”型寡核苷酸 211(即 5' -TNNNN-3')。

[0186] 每种珠子类型还代表基数(10)系统中的数值,类似于之前讨论的系统。例如,珠子 1、11、21 和 31 表示 1 的值,(为简单起见,珠子 10、20、30 和 40 表示 0 的值)。前 10 种珠子类型(A 类型组)表示个位数值(0 至 9 的数值)。第二位数是“C 数字”,表示十位的值。第三位数是“G 数字”,最后一位数是“T 数字”。在本特定实施例中,四位数是由四十种珠子类型以 TGCA 的顺序(图 8D)编码。例如,第 2176 液滴类型 219 含有 Luminex 珠子类型 6-A(215)、17-C(217)、21-G(216) 和 32-T(218)(图 8C 和 7D)。在该图中,作为举例,液滴 219 还含有核酸探针,例如,探针 5' -\*GATCT-3'(SEQ ID NO:2)(226)(但液滴内可存在核酸探针的多个拷贝)。

[0187] 在本实施例中如下所述测定靶核酸与核酸探针的结合,但在其它情况下可使用其它技术。含有核酸探针和珠子的溶液可分别各自乳化,然后汇总乳液,产生分析液滴库 220。所有液滴都将具有来自 4 个组中每一组的各一种珠子(但是可存在珠子的多个拷贝)。然后,可将核酸探针和珠子共同包裹在液滴中。还提供了含有靶核酸和 DNA 连接酶的多种液滴 221。将汇集的乳液文库液滴与多种 221 液滴合并(如箭头 222 所示)(图 8E),形成多种合并的液滴 223。使合并的液滴 223(如箭头 224 所示)通过检测器 225。如果珠子上的核酸探针与寡核苷酸彼此接近并且都与靶核酸互补的话,则模板引导的核酸探针连接会导致珠子与靶核酸结合。因为四种珠子在除了一个位置之外的其它所有位置含有通用核酸残基,所以四种珠子中仅有一种能够使靶核酸和核酸探针相邻,使得珠子上寡核苷酸与核酸探针发生连接,如图 8F 所示。

[0188] 然后,可使用任何适用技术测定珠子、靶核酸和核酸探针的结合。例如,如图 8F 所示,提供含有如上所述四种珠子(215、216、217 和 218)以及核酸探针 226 和靶核酸 227 的液滴。如果核酸探针的序列与靶核酸中的序列互补,则核酸探针将与靶核酸结合。四种珠子之一还包含在位置相邻时可与核酸探针序列连接的寡核苷酸,如图 8F 所示(此图中的 216);其它序列(215、217 和 218)由于序列中核苷酸不匹配额不能相邻地定位。核酸探针 216 可与珠子上与靶核酸探针结合的寡核苷酸连接,这样,珠子 216 的寡核苷酸与核酸探针 226 相邻地与靶核酸 227 结合。在所述珠子单列通过通道狭窄处时对其进行解码,对连接(即结合)在珠子上的标记核酸探针的量进行定量。如本实施例所示,例如,“G”数字珠子(珠子 21)216 与核酸探针 226 结合,这显示与靶核酸互补的序列为 5' -GATCTGNNNN-3'(SEQ ID

NO :3), 因此靶核酸含有序列 5' -CATATC-3' (SEQ ID NO :4)。

[0189] 如上所述, 在其它实施方案中, 与珠子相结合的寡核苷酸的差异残基也可位于其它位置, 例如寡核苷酸 5' 端的第二位, 例如 5' -NXN<sub>(n-2)</sub>-3'。一个这样的实例显示于图 8G 中。在该实施例中, 标识成分 229 包含珠子和具有序列 5' -NGNNN-3' 的寡核苷酸。包含于可区分珠子连接的寡核苷酸 (5' -NCNNN-3'、5' -NANNN-3'、5' -NTNNN-3') 的三种其它标识成分也存在于液滴中。在该实施例中, 标识成分 229 与核酸探针 226 的靶核酸 227 结合。类似于上文所述的实施方案, 所述标识成分可与核酸探针相连接。所述珠子按照如上所述解码, 并显示与靶核酸互补的序列为 5' -GATCTNGNNN-3' (SEQ ID NO :5), 靶核酸含有序列 5' -CXACATC (SEQ ID NO :6) (N 为通用碱基, X 是 A、C、G 或 T 任意之一)。

#### [0190] 实施例 4

[0191] 在一些但是不是所有的实施方案中, 本文所述的系统和方法的所有组分都是微流体的。用于检测的仪器设置实例在这里给出。

[0192] 本实施例中的装置包括光学组件, 其可设置为测量荧光强度和荧光偏振。图 9 显示了有关荧光偏振 (FP) 检测的信息。光学组件是光学设备中的一系列反光镜、透镜和棱镜等。在一些实施方案中, 光学组件可包括 3 个激光器、约 5 个检测器, 并且可测量 30 μm 液滴中约 1000 种或更多的荧光团。假定分子在其发光期间不显著旋转的化, 则如果用偏振光激发荧光分子, 就会发射基本上相同偏振的光。在分子发光寿命期间发生旋转时, 出现消偏振或相同偏振方向所发射光的减少。与较大分子 311 相连 (并显示较长的翻转时间 (tumbling time)) 的染料将比溶液中的游离染料更慢地使光消偏振, 因此, 光将保持是偏振光 313, 如图 9A 所示。另一方面, 与较小分子 312 连接的染料会比溶液中的游离染料更快地使光消偏振, 因此, 光 314 将不再是偏振光。图 9B 显示, 根据其荧光寿命, 不同的染料会显示出不同的偏振。FP 也受到染料所连接分子的分子量的影响。图 9C 显示了这种情况, 并显示了游离荧光素染料 315、荧光素标记的 20 聚物寡核苷酸 316 和与第二 DNA 分子 317 杂交的荧光素标记的 20 聚物寡核苷酸的 FP。在此具体情况下, 由于残基的堆积, 翻转速度可能降低。

#### [0193] 实施例 5

[0194] 本实施例说明了, 在本发明的一个实施方案中, 用于在单个液滴通过通道时分析和解码单个液滴中至少四种不同颜色珠子和染料荧光偏振 (FP) 和 / 或荧光强度 (FI) 的仪器。激光器可购自几个制造商, 包括 Power Technology, Inc. (Alexander, AR)。示例光学组件显示于图 10 中。此光学组件是模块式的, 必要时可更换滤光片和激光器。本实施例使用 5 个检测器的构造, 能够读取两种不同发射波长的 FP。该仪器将能够测量 3 个通道的 FP。对安放 PDMS 芯片的载物台进行加热。

[0195] 在该图中, 所用的激发光源是激光器, 其可包含作为平行光线发光的多个不同颜色的激光器。激发光通过二向色性激光反光镜反射, 其反射激光波长而使得所有其它波长通过。激光可通过望远透镜组合而被发散, 或者可通过柱面透镜转为激光线。然后, 通过具有高数值孔径的透镜将它们聚焦为小点。高数值孔径确保来自样品的大立体角的荧光以反方向被物镜捕获。然后, 如图所示, 并且根据所用的特定荧光团和滤光片, 荧光通过二向色镜, 多种波长反射进入检测器组件。偏振分光镜是测定荧光偏振所必需的。其反射一种偏振光 (S) 并使得另一种通过 (P)。然后, 使用独立的 PMT 测定其各自的强度。随后, 将值组合并根据式  $(S-G*P)/(S+G*P)$  计算荧光偏振, 其中 G 是 G 因子, 通常为 1。为了产生以 [mP]

单位的数,将以上计算结果乘以 1000。典型的 FP 值范围为约 20 至约 1000mP。检测器组件可以是 PMT、二极管或雪崩二极管。还使用具有 NI FPGA 卡的计算机监测信号,所述卡运行以 LabVIEW 编写的自定义代码。图 11 中的组件是相似的,但是排列在光学平台上。在该实施方案中,可能需要温度梯度来优化 FP。这可通过将 Peltier 设备置于设备平台下以控制温度来实现。在一个实施方案中,实验运行在 1kHz 频率下(1000 个液滴/秒),并以 GHz 的频率收集数据。在另一个实施方案中,可通过选择不同的 PMT、选择具有更高染料浓度的珠子和/或增加液滴中染料标记的量来提高检测的灵敏度。在一些情况下,所述装置可包含拓宽的通道和/或使用流体力学聚焦以防止珠子堵塞。在一些情况下,芯片上的狭窄处也可以是冗余的,使得如果一个被堵塞,则另一狭窄处开始发挥作用。

[0196] 图 11 中给出了显示荧光架和液滴监视器的具体仪器构造。激光器位于左上方。红色激光器 400(30mW 635nm)用于驱动 Cy5 荧光。绿色激光器 401(125mW 532nm)用于驱动 HEX 荧光。使用 562 二向色镜 402 使光束平行,所示二向色镜反射 562nm 以下的任何光线(Semrock Brightline FF562-Di02-25x36)。左下方的反光镜 403 将光束反射到右下方的光学器件 404 中。光线通过 488/532/638 激光二向色镜 405(Semrock Brightline Di01T488/532/638-25x36x5.0),其允许接近这些的波长通过,反射其它所有波长。然后,光束通过 IR 热反光镜 406(Edmund Optics NT43-955),其反射 IR 并使得其它波长通过。接着,它们进入物镜(Mitotuyo Plan APO,5x,10x,20x 或 50x)并聚焦于样品上。在一些情况下,放大倍数越大,检测就越灵敏。认为这是由于更高放大倍数的物镜具有更高的数值孔径,因此捕获样品发射的更大立体角的光。样品 407 安装在 XYZ 移动平台上,其具有 2 英寸(50.8mm)的行程(Thorlabs)。有两条方向相反的成像通路。荧光成像使用激光器作为光源。使用红外照明进行直接成像,其允许在捕获荧光数据的同时拍摄图像。IR 光源 408 是通过 15mm 透镜(Thorlabs, LA1222)聚焦的 IR 二极管(Digikey)。然后,IR 和荧光束透过物镜返回。IR 反光镜 406 将 IR 向上反射进入 CCD 照相机 409(Sony XCD-V50,右上方)。荧光通过 IR 反光镜传递到激光二向色镜,在那里它反射进入检测 PMT(Hamamatsu H5784-20,图中心)。绿色 FP PMT 410 和红色 PMT 411 都存在。IP 检测器和照相机用于显现液滴。其还可用于监测不同模板液滴的结束和开始。有 593nm 高通二向色镜 412(Semrock Brightline FF593-Di02-25x36),其反射 HEX 信号进入 FP 检测器设置。这允许 Cy5 信号(~680nm)进入 Cy5 通道 PMT。FP 检测器(图中心的 T 形物体)包含两个彼此垂直安装在 50-50 分光镜(Thorlabs CM1-BS1)中的 PMT。在分光镜前安装的是 560/25 带通滤光片(Semrock Brightline FF01-560/25-25)。在每个 PMT 前面安装的是起偏器(Meadowlark Optics DPM 100-VIS1)和  $f = 25\text{mm}$  的透镜(Thorlabs LA1951)。PMT 安装于滚筒筛平台上(Thorlabs CRM1)使得它们可以彼此 90 度旋转。

[0197] 在本具体实施例中,所述机器使用 532nm 绿色激光器来激发信号实体,使用 635nm 二极管激光器来激发来自用于对珠子进行颜色编码的染料的红色和近红外荧光。在另一个实施例中,在使用 Luminex 珠子作为标识成分并使用六氯荧光素(HEX)标记的核酸探针时,仪器可设置为读取 HEX 通道的 FP(~560nm)以确定核酸探针是否与靶核酸结合,FI 可通过 HEX 和 Cy5 两个通道(~690nm)进行读取。

[0198] PMT 数据可以数字化,通过国家仪器场可编程门控阵列(National Instrument field-programmable gate array,NI-FPGA)卡分析数字信号。可对此门阵列进行编程,以

同时和 / 或多通道以数百千赫捕获和分析数据。可对 FPGA 卡编程, 以在液滴流过激光器表现为峰值时对液滴进行测定。由于在液滴位于检测器前的整个持续时间里对液滴进行测定, 因此在一些情况下, 可监测每个颜色通道的最大强度和 / 或其时间积分。然后, 可将这些测量值相结合, 以确定与靶核酸相结合的核酸探针的标识成分和荧光偏振 (例如由于信号实体)。

[0199] 可将微流体芯片置于加热载物台, 其允许多区域加热。可使水滴中的反应物在芯片上沿着热区域 (例如 95°C) 和温区域 (例如 65-72°C) 之间蛇形排布的通道中循环, 从而在芯片上进行双温度循环 PCR。

[0200] 将 PMT 信号输入到安装在 CA-1000 连接组件中的 National Instrument 连接插头。所述连接插头将 PMT 信号输入单个电缆, 其插在 National Instrument 紧凑 FPGA 卡中。所述卡可安装在运行 Windows XP 的 PC 上。可使用 LabVIEW 程序环境中开发的软件来捕获和分析数据。

[0201] 可使用 Luminex Lab MAP 硬件和软件 (Luminex Corp., Austin, TX) 大批量测量微球荧光。可使用针对 FITC 校准颗粒的 MESF 单元的量子荧光 (Quantum Fluorescence) 试剂盒和 QuickCal 软件 (全部来自 Sigma, St. Louis, MO), 将绿色荧光测量值转换为可溶性荧光染料当量分子 (molecules of equivalent soluble fluorochrome, MESF)。从所有数据点中减去由微球本身产生的绿色荧光。在珠子荧光测量和探针附着的液滴测量中会使用如上所述的仪器。

[0202] 实施例 6

[0203] 本实施例说明了多种可区分荧光珠子的制备, 其类似于市售的 Luminex 珠子 (5.6um 直径)。FP 可不依赖于染料浓度 (例如, 1M 浓度的荧光素具有与 0.01M 相同的 FP), 并且在标记中可作为自变量处理。因此, 如果在两个维度上将单个染料变化 10 个单位, 则其可用于产生 100 种染料标记。所以, 使用 2 种染料, 可产生 10000 种标记。图 12 显示, 染料的 FP 可通过将其与更大分子相连接而改变。图 12A 显示荧光素 330、生物素 331 和生物素 + 链霉亲和素 332 的 FP。图 12B 显示, 通过改变两种不同化合物的相对浓度, 可以可控地改变总 FP 值。需要注意的是, FP 可独立于荧光团的浓度进行控制。

[0204] 图 13 显示, 可独立地控制荧光强度 (fluorescence intensity, FI) 和 FP。因此, 扩大染料浓度及液滴 FP 值的范围允许产生许多种标识成分。图 13A 显示将具有重叠发射光谱并且各自具有不同 FP 的两种染料混合的结果。以不同的比例混合两种染料, 得到不同的 FP 值, 以及不同的总染料浓度, 以产生不同的 FI。图 13B 显示, 相对宽的浓度范围指示改变总 FI 的大跨度。该图涵盖了图 13A 中所示的总染料浓度的 10 倍增加。

[0205] 实施例 7

[0206] 在一些情况下, 标识成分可以是聚苯乙烯珠子, 其尺寸范围为约 10nm 至 100um 直径, 所述珠子可以是染色的。例如, 所用染料可以为基于方酸的分子, 其显示扩展到近红外和 / 或红外区的荧光。这可允许实现可再现的方法, 其中两种或更多种独立浓度的染料均匀地吸收进每个珠子中, 得到与各自珠子中所存在染料数相关的多种荧光信号。在本实施例中, 为了制备具有不同荧光特征的珠子群, 可通过充分增加染料的比例来改变红色 : 橙色染料的比值, 使得所得群体在光学上不与之前的群体重叠。例如, 给定的珠子群中两种染料的浓度与所述群体在 X-Y 图上的位置之间可能有关联性。可以根据以线性荧光通道单位表

示的第一颜色 (FL3) 或第二颜色 (FL2) 染料强度来分配每个位置。随着珠子沿柱垂直向上移动,珠子中第一颜色和第二颜色染料的量均可增加。这可能是由于能量从一种染料转移到另一种染料。在从左至右水平移动穿过一排时,可减少一种染料以保持稳定的 FL3 值。这可能是由于一种染料的光谱重叠进另一染料区域中。使用该方法,可构建多种不重叠的珠子群体。可使用两个参数:荧光颜色以及颜色强度或亮度(以荧光通道单位表示)来对珠子进行分类。

#### [0207] 实施例 8

[0208] 本实施例说明了根据一个实施方案的模板 DNA 制备。在本实施例中,使用修改的 Aeromist 喷雾器 (Alliance Medical, Russellville, MO) 进行 DNA 片段化。可通过在 Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) 上使用 DNA 1000 LabChip 对 2ul 等分试样的雾化材料进行解析来确定雾化片段的尺寸分布。

[0209] DNA 雾化产生具有多种不同末端的片段。片段可具有平末端,并由多种酶例如 T4DNA 聚合酶、大肠杆菌 DNA 聚合酶 (Klenow 片段) (NEB, Beverly, MA) 和 T4 多核苷酸激酶 (NEB) 磷酸化。可用 Qiaquick PCR 纯化柱对精制反应物进行纯化。

[0210] 对基因组 DNA 文库进行片段化和精制之后,可将引物序列添加到 DNA 片段的每一端。44 碱基引物序列(“接头”)是双链寡核苷酸,其包含 5' 端 20 个碱基的 PCR 扩增引物,之后是 20 个碱基的测序引物。在每个反应中可使用两类接头,接头 A 和接头 B。A 和 B 接头存在以下差异:核苷酸序列,以及 B 接头上存在 5' 生物素标签。设计接头对以允许与平末端的片段化基因组 DNA 进行连接。例如,接头 A 可以是 CCATCTCATCCCTGCGTGTCCCATCTGTTCCTCCCTGTCTCAG (SEQ ID NO:7),接头 B 可以是 5' 生物素 TEG/CCTATCCCCTGTGTGCCTTGCCTATCCCTGTTGCGTGTCTCAG (SEQ IDNO:8)。对于每个接头对,PCR 引发区域含有 5' 四碱基突出端和平末端的 3' 区。接头的 3' 平末端一侧与平末端基因组 DNA 片段连接,而 5' 突出端防止与接头的 PCR 引物区域连接,从而实现定向。可使用 2% 琼脂糖 (Invitrogen, Carlsbad, CA) / TBE 平板凝胶和 4.5ul 10mg/ml 溴化乙锭储液 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 进行凝胶纯化。3' 连接处的两个缺口可通过 Bst DNA 聚合酶大片段的链置换活性来修复。保存的 M-270 链霉亲和素珠子 (Dyna1, Oslo, Norway) 可用于分离与抗体连接的片段。用来自 MinElute PCR 纯化试剂盒 (Qiagen) 单个柱对单链文库进行浓缩,所述柱在使用前加温至室温。

#### [0211] 实施例 9

[0212] 本实施例说明了本发明的一个实施方案中液滴库的制备。在本实施例中,用针对特定生物测定的特定试剂包被 Luminex 珠子,使得能够捕获和检测来自样品的特定分析物。激光激发标识每种珠子的内部染料以及测定过程中的任何信号实体。

[0213] 根据 Luminex (珠子的制造商) 的推荐,将羧基化的微球 ( $5 \times 10^6$  个, 400ul) 与核酸探针偶联。通过将偶联的微球与摩尔过量的与珠子所结合序列互补的生物素化寡核苷酸杂交来评估偶联反应的成功。有效偶联产生具有 2000-4000U 平均荧光强度 (MFI) 的微球。在一些情况下,可替换 MFI 小于 1000 的微球,使得所用的微球具有良好的强度。

[0214] 作为制备分析液滴库的示例,可将合适标记的珠子悬于 96 孔板中,使得每个孔含有四种珠子的组合,其中每种珠子与其它珠子可区分(但每个珠子可存在多个相同的拷贝)。向每个孔添加选自核酸探针文库的核酸探针。所述核酸探针可以是带标记的。可用

每个孔的内含物分别产生 30 微米液滴的乳液。每种乳液中每个所得水性液滴会含有四种可区分珠子中每一种各 3-4 个珠子以及多种浓度的带标记核酸探针,例如 10-100uM。可针对每个单独的孔进行乳化。在全部孔的集合已经乳化时,将液滴汇集在一起产生分析液滴库。所述库可以保存任何适当的时间,例如从小于一个小时至数月。

#### [0215] 实施例 10

[0216] 在本发明的一些实施方案中,可在液滴内进行 DNA 的连接。这是这种连接的一个示例性说明。在本实施例中,图 14 显示,在存在(第 3 泳道)和不存在(第 4 泳道)T4DNA 连接酶的情况下,模板 DNA+33 聚物+磷酸化 7 聚物的共同流动。将水相上样于聚丙烯酰胺凝胶。在液滴内发生 7 聚体与 33 聚体的连接,得到 40 聚体。

[0217] 为了防止在液滴合并之前连接酶的活性,可从活性酶中去除 ATP 辅因子。模板液滴中可包含用于连接反应的 ATP。T4DNA 连接酶可包含在分析液滴库中。因此,仅在 DNA 模板和分析液滴库合并时,连接酶变得有活性。

[0218] 模板(双链 PCR 产物,250-450 个碱基对长)可在 3-20ng/ml 浓度下使用。在此浓度范围中已经观察到绿色荧光信号。包含核酸寡核苷酸的标识成分可在 10nM 范围内使用,这些成分与核酸探针的比例可以为 1 : 50。包含核酸寡核苷酸的标识成分与 DNA 偶联微球之间的连接可孵育至少 30 分钟。

[0219] 为了避免从未连接的夹心复合物(ZipCode 杂交复合物)形成可能的背景荧光来源,可在没有连接酶的情况下测定背景荧光。临流动分析之前,在 45°C 下将微球悬液孵育最少 15 分钟,这使得背景荧光最小化。

[0220] 已经使用带标记的核酸探针测试了连接测定。测试了含有 0 个或 2 个简并位点的 8 碱基序列。为了使用标准连接测定反应分析单核苷酸多态性(SNP),设计了短的 8 碱基寡核苷酸(CTAAGTTA(SEQ ID NO :9))。SNP 是基因组中的单核苷酸在物种的个体之间存在差异时出现的 DNA 序列变异。对于 SNP1(A,G 多态性),使用 PCR 扩增的纯合靶 DNA(之前通过 RFLP 分析基因分型为 GG)进行连接测定。对于匹配条件,连接探针设计成与靶 DNA 的多至 25 个碱基互补,并包含待分析的单碱基。如图 15A 所示,8 碱基核酸探针(CTAAGTTA(SEQ ID NO :9))成功鉴定出 GC 纯合靶 DNA。来自 8 碱基探针的信号强度是 18 碱基探针所观察到的 65%。如图 15B 和 15C 所示,两种简并寡核苷酸(CTNAGNTA(SEQ ID NO :10)和 CTANNTTA(SEQ ID NO :11)(其中 N 为通用碱基)均正确鉴定出靶 DNA 的 SNP 基因型。每个探针包含 5'PO<sub>4</sub>和 3'荧光素。连接探针与核酸探针的比值表示在连接测定之前添加的两种探针的摩尔比。为了补偿正确的 5'-CTAAGTTA-3'(SEQ ID NO :9)核酸探针浓度的 16 倍降低,以比非简并序列高 16 倍的浓度使用简并核酸探针。

#### [0221] 实施例 11

[0222] 以下实施例描述了使用包含可区分核酸探针和可区分标识成分的液滴文库对核酸探针与靶核酸杂交进行测定。

[0223] 在第一实施例中,产生并混合四种乳液,每种乳液含有至少一种染料。本实施例用于测定来自多个液滴的信号。根据如下所述产生乳液。首先,通过用荧光染料与 DNA 分子的四种组合填充四个储库来制备四种流体。在第一储库中提供 20uM 的 Cy5 染料。在第二储库中提供 15uM 的 Cy5 染料。向第三储库中添加 10uM 的 Cy5 染料以及 2uM 未连接的核酸探针 A(羧基四甲基罗丹明(TAMRA)连接的 6 聚物)和核酸探针 B(6-羧基荧光素(FAM)连接

的 9 聚物)。向第四储库提供 2 $\mu$ M Cy5 连接的核酸探针 A (TAMRA 连接的 6 聚物) 和核酸探针 B (FAM 连接的 9 聚物)。不向第四储库提供 Cy5 染料。在本实施例中,四种浓度的 Cy5 染料用作标记,而提供相同浓度的连接和非连接核酸探针 A 和核酸探针 B 来测试液滴中 FRET 的检测能力。

[0224] 乳化来自四个储库的流体。通过将四种不同溶液注入四个不同流动聚焦液滴制备器来产生乳液。将氟碳油也注入每个液滴制备器中。所用的全部四个装置基本相同,其具有约 25 $\times$ 25 微米的流动聚焦尺寸。以大致相同的速率将全部四种流体注入装置:内相为约 500 微升/小时,外相为约 1000 微升/小时。结果,所有液滴制备器以大致相同的速率产生大致相同尺寸的液滴。

[0225] 然后,每个液滴制备器中产生的液滴通过与出口相连的管流出。有四个液滴制备器和四个出口管。所述管捆在一起并置于共同的注射器中。随着液滴从管中排出,它们汇集到注射器中。此液滴形成持续约 30 分钟,之后收集到约 1mL 的液滴。因为所有液滴同时乳化,所以将它们随机混入收集注射器中。图 32 显示通过混合多种类型液滴 342 而形成液滴乳液 340 的示意图,每种类型的液滴包含可区分核酸探针和至少一种独特的标识成分。

[0226] 图 31A 显示微流体装置的示意图,其用于并行产生四组液滴,每组液滴含有一至四种不同染料组合。上入口 600 允许为装置提供油。内入口 602 允许将四种不同染料组合注入装置中。流动聚焦接头 604 是形成四种类型液滴的地方,其中每种具有独特的染料组合。然后,液滴流经通道,并收集于收集腔室 606 中。在离开装置之前,在收集腔室中对液滴成像。图 31B 显示影片第一帧的图像以及收集腔室的放大视图,液滴在产生后、离开装置前流入其中。在该帧中,液滴尚未形成,通道内充满了荧光染色的水和氟碳油的共同流动流。

[0227] 形成包含靶核酸的多个液滴。靶核酸为 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAACGACGGCCAGTGAATCCGTAATCATGGCCAT-3' (SEQ ID NO:12)。如图 19 所示,使用微流体装置 348 将包含多种靶核酸的溶液 344 形成多个液滴 346,其各含有至少一种靶核酸。

[0228] 使用微流体技术将包含靶核酸的多个液滴以及包含靶核酸探针的液滴文库合并,例如 2004 年 4 月 9 日提交的名为“流体物质的形成和控制”的国际专利申请 No. PCT/US2004/010903,以及 2004 年 8 月 27 日提交的名为“流体物质的电控制”的国际专利申请 No. PCT/US2004/027912。如图 20A 所示,包含核酸探针的液滴流入微流体通道 352,使得包含靶核酸的液滴 354 与包含核酸探针的液滴 356 相邻。图 20B 显示使用电聚结进行的液滴合并。图 21 显示图 20A-20B 中所述方法的示意图。图 22 显示在延时线中孵育合并的液滴。在本实施例中,合并的液滴孵育约五分钟。

[0229] 图 23 显示合并的液滴相对于孵育通道上位置的速度 (um/s) 的图。更具体地说,图 23 显示液滴通过通道的速度曲线。y 轴显示使用 piv (particle image velocimetry, 颗粒图像速度测量法) 所测的速度,而 x 轴显示位置。在一些实施方案中,对于圆形截面通道中的泊肃叶流 (Poiseuille flow),由于通道壁的非滑动边界条件,可以预计,流动速度曲线是抛物线。但是,在一些情况下,乳液流进通道可导致流体以非牛顿流方式流动,流体曲线可能不是抛物线。流体曲线显示,通过通道的流速大致是恒定的,接近壁的地方除外。不受理论的限制,这可能是由于液滴以极高的体积分数产生(例如相比于油体积,水体积的百分比很高)而出现的。因此,在液滴流入通道时,液滴可保持彼此的相对位置,使得液滴以大致相同的速率流过通道。这可用于减少不同液滴之间孵育时间的差异。

[0230] 在一些情况下,作为非限制实例,液滴的必需孵育时间是其在孵育通道中度过的时间。如果液滴是稀释的,则流体可具有牛顿流体的性质并且流动是抛物线的。因此,液滴通过通道运动的速度可能取决于液滴在通道宽度中的位置(例如在通道中间的液滴可具有比通道边缘的液滴更快的速度)。因此,如果流速不基本为抛物线的话,两个液滴的孵育时间可能不同。但是,如果流动曲线是常数的话,则液滴的速度将大致相等,因此孵育时间也大致相等。在一些情况下,对于低体积份数的乳液来说,可实现非抛物线的流动曲线。例如,对于低长宽比的通道来说,流场中的空间梯度可由最短的尺寸决定。在有些情况下,如果通道长度明显小于宽度,则最短的尺寸将是高度。这可能导致流动曲线的导数非常尖,这可在壁附近产生大梯度。

[0231] 图 24 显示本实施例中所用系统的区域,其中测定了杂交结果。在该系统中,合并的液滴 380 被释放进入微流体通道 381,并一次一个地(例如液滴 382)经过光源 384(例如激光线),对杂交结果进行测定。测定之后,液滴(例如液滴 386)继续流出微流体通道。图 25A 显示了上述设置的示意图。在测定过程中,液滴也可变形,例如图 26 中所示。

[0232] 图 27A-27D 是显示速度/增益相对于时间(ms)的定量结果图((i)绿色,(ii)红色)。这些图描述了使用荧光对多种标记进行检测。更具体地说,图 27 显示了四种不同液滴类型的红色和绿色荧光信号。该实施例的实验步骤与上文所述相似。在该实施例中,使用光电倍增管(PMT)代替 CCD 检测器进行检测。四条曲线显示了所制备的四种不同类型液滴的红色和绿色 PMT 信号。信号中的每个峰对应于流经检测器的液滴。在液滴经过检测器时,红色和绿光激光器激发荧光,由物镜成像到背后的 PMT 上。

[0233] 图 28 显示基于检测红色和绿色强度进行液滴检测。测量各个液滴的红色和绿色荧光强度。曲线上的每个点代表所检测的液滴。为了产生该曲线,首先制备四种类型的液滴,每种含有红色和绿色荧光染料的不同组合(如上所述)。例如,点 610 代表包含少量绿色染料和大量红色染料的液滴,而点 616 表示包含大量绿色染料和少量红色染料的液滴。曲线每个位置上的多个点(例如 610、612、614、616)表示具有大致相同的红色/绿色染料比的多种液滴。为了测定液滴,将绿色和红光激光聚焦于液滴上。激光使液滴内所含的染料发荧光,所发射的光线被显微镜物镜捕获。此光通过二向色分光镜,其使得红光通过而绿光被反射。然后,光线通过红色和绿色滤光片进一步滤光,然后聚焦于 PMT 传感器上。红色滤光片后的 PMT 测量红光的强度,而绿色滤光片后的 PMT 测量绿光的强度(例如图 11 所示的设备)。测量同时进行,所得结果由计算机存储并处理。计算机处理测量值,以确定来自每个液滴的红色和绿色荧光的量。然后,将结果绘制在图 28 所示的图上。

[0234] 图 29 显示 3 $\mu$ M 模板结合测定的结果。曲线显示荧光偏振相对于核酸探针长度,其中 i) 不存在靶核酸(例如模板),ii) 存在错配靶核酸,以及 iii) 存在匹配靶核酸。

[0235] 在一些情况下,使用计算机来检测和/或定量所述液滴。在检测器是 PMT 检测器的情况下,使用 LabView FPGA。使用三个 PMT 监测液滴,其中每个 PMT 与不同的滤光片和/或起偏器相连。对每个 PMT 进行编号。PMT 1 监测平行偏振的绿光。PMT 2 监测垂直偏振的绿光。PMT 3 监测非偏振的红光。这三个 PMT 各自输出作为时间函数的电压,其与作为时间的函数而检测的光强度成正比。这些电压时间轨迹传送给计算机,在那里对其进行分析。

[0236] 计算机程序检索用户确定用于检测液滴的信号之一。如图 27 所示,每个液滴看起来对应于作为时间函数的电压的一个峰。在液滴运动进入激光束路径时,峰的前沿是液滴

的前沿。当其位于光束中心时，峰对应于液滴。在其运动离开激光束时，后沿是液滴的后沿。在液滴流经激光时，使用作为时间函数的电压变化顺序来确定是否检测到液滴。

[0237] 计算机对信号进行监测，以确定信号何时升高到高于用户指定的阈值水平。如果信号高于阈值水平，则计算此循环与前一个循环之间的电压差异。如果差异是正数，则信号升高，表明这是液滴的前沿。计算机继续测定液滴的信号，并存储与该液滴相关的最大电压。在信号下降至低于阈值时，观察液滴的后沿。确定液滴的最高电压，关联来自全部三个 PMT 的信号。与每个液滴相关的测量是检测到前沿的时间、峰值电压值、检测到后沿的时间、电压高于阈值的持续时间（例如，峰的宽度，其对于恒定流速来说与液滴长度成正比）以及电压高于阈值的积分信号。收集所有三个 PMT 信号的测量值，所述信号是同时收集的。然后，进一步合并测量值，以确定用户所选的至少一个值。例如，如果需要荧光偏振测量的话，则可计算绿光的平行与垂直峰值的比值或积分强度。还可将这些数字与用户的规格进行比较，从而确定液滴是否满足标准以进一步鉴定其为可用于进行测定和 / 或定量的液滴。在一些情况下，可存储液滴信息（例如测量值）和 / 或可选择所述液滴以用于分选。

[0238] 实施例 12

[0239] 下述实施例描述了用于液滴检测的系统和方法，其允许从基于乳液的微流体测定进行实时高通量数据采集。

[0240] 本实施例所述的方法用于对微流体液滴进行成像，所述微流体液滴为例如包含荧光信号的微流体液滴（例如，包含至少两种荧光染料群的微流体液滴）。制备两组微流体液滴，一组液滴包含荧光素衍生染料（在绿光波长下可见），第二组液滴包含 Cy5 染料（在红光波长下可见）。液滴在同一容器中混合在一起，无法根据尺寸或形态进行区别。使液滴以混合群的形式流入槽式通道，在荧光显微镜设置下进行观察。在本实施例中，使用绿色 LED 阵列为液滴提供斜射光，其置于大致 55 度角，距显微镜载物台约 1 英尺，产生液滴眩光。图 35 显示了所述实验设置的实例。提供了包含发射滤光片 520、二相色镜 522、弧光灯 524、激发滤光片 526 和物镜 528 的荧光显微镜。将多个液滴置于显微镜载物台 530 上。以约 55 度的角度提供斜射光 532。可通过检测器或成像器（例如 CCD 照相机等）记录激发显微镜 534 的光。

[0241] 在本实施例中，通过两个 CCD 照相机捕获图像，一个置于仅允许绿色波长窄光谱的光通过的滤光片下，而另一个照相机置于仅允许红色波长窄光谱的光通过的滤光片下。使两个照相机捕获的帧同步，以允许同时捕获绿色和红色波长的荧光信息。由于斜射光来自绿色 LED 光源，因此仅在绿色波长捕获上观察到液滴眩光。

[0242] 使用简单的强度阈值程序处理来自绿色波长捕获的图像帧，以挑出每个液滴上的液滴眩光。在这种情况下，人工向软件输入液滴眩光与液滴中心之间的角度和距离；但是，在一些情况下，这可以使用软件程序自动进行。在一些实施方案中，液滴眩光与液滴中心之间的角度和距离会需要同时记录，只要实验设置不改变的话。使用软件产生相对于每个液滴眩光的取样掩码。将取样掩码与红色和绿色波长相片帧叠加，产生每个液滴的标记系统，其限定了液滴边界内获得荧光强度读数的相同区域。计算机将绿色波长图像与对应的红色波长图像合并，形成具有来自两个照相机的信息的复合图像。使用从液滴眩光产生的掩码，从复合图像收集荧光强度信息。在本实施方案中，测量来自液滴的强度的精确度很高，并且几乎没有对相邻液滴采样的风险。

[0243] 图 37 显示来自绿色波长滤光片下 CCD 摄像机捕获的微流体液滴的静止帧。应注意,在该图像中,紧密堆积的液滴之间的边界很难辨别,而液滴眩光容易观察。在该图像中,包含荧光素的液滴显示较浅的颜色,而包含 Cy5 的液滴在图像中较暗。图 38 显示 CCD 静止图像的强度阈值。图 39A 和 39B 分别显示荧光强度读数的掩码和掩码叠加。图 40 和图 41 分别显示来自绿色滤光片照相机和红色滤光片照相机的图像。图 42 显示包含绿色和红色照相机数据的复合图象,其显示包含荧光素(暗灰色)和 Cy5(浅灰色)的两个不同液滴群。图 43 显示了以秒取样的超过 50000 个数据点的强度计数的直方图,其具有显示为预计的双峰分布的 (A) 绿色通道和 (B) 红色通道。

[0244] 本实施例所述的方法可在没有大量计算的情况下完成,并且可针对与用于数据获取相同的图像帧进行。这可消除数据在基于液滴的测定中作为瓶颈。例如,如上所述进行实验的计算机以数百帧/秒的速率获取来自 12 位  $320 \times 240$  数据流的强度数据。使用约 2000 个液滴/帧的紧密阵列,这对应于来自 200000 个液滴/秒的数据处理采集。

[0245] 在一些实施方案中,本实施例所述的方法在测定多个液滴时可能是有利的。液滴眩光可能比背景更强,使得容易鉴定液滴的位置,从而允许与不使用液滴眩光的方法相比更简单地测定液滴。在一些实施方案中,液滴眩光的软件鉴定可使用简单的方法完成。液滴眩光可用作参考点,因为液滴眩光一般在距各液滴中心一致的方向和距离上出现。另外,第二光源可以多种角度照射液滴,并可选择产生显著聚焦眩光的特定角度(例如基于目视观测)。还可选择角度以使得液滴眩光偏离于液滴的中心。偏离于液滴中心的液滴眩光可允许将同一数据帧同时用于液滴鉴定和数据采集。因此,斜射光不需要打开和关闭,和/或不必在略有不同的时间点拍摄合并的图像。

[0246] 尽管在本文中已经描述和说明了本发明的多个实施方案,但是本领域技术人员容易想到多种其它装置和/或结构来完成本文所述的功能和/或获得本文所述的结果和/或一个或多个优点,每种这样的变化或修饰都被认为在本发明的范围之内。更一般地说,本领域技术人员容易了解,本文所述的全部参数、尺寸、材料和构造意均为示例性,实际参数、尺寸、材料和构造将取决于使用本发明教导的具体应用。本领域技术人员会认识到(或者使用不超过常规的实验能够确定)本文所述的本发明具体实施方案的许多等同方案。因此,应理解,上述实施方案仅以举例形式存在,在所附权利要求及其等同方案的范围之内,可按照具体所述和/或权利要求之外的形式实施本发明。本发明涉及本文所述的各个特征、系统、材料和/或方法。另外,如果这些特征、系统、制品、材料和/或方法不彼此矛盾,则两种或更多种这些特征、系统、制品、材料和/或方法的任何组合也包含在本发明的范围内。

[0247] 本文使用的全部定义仅用于本公开内容。这些定义不一定适用于共同拥有的其它专利和/或专利申请,不论是否与本公开相关。本文使用的定义应理解为优先于字典的定义、通过引用合并的文献中的定义和/或所定义术语的常规含义。

[0248] 还应理解,除非另外明确指出,否则在本文要求保护的包含超过一个步骤的任何方法中,该方法步骤的顺序不一定限于所述方法中步骤的顺序。

[0249] 在权利要求中以及上述说明书中,所有过渡词句,例如“包含”、“包括”、“带有”、“具有”、“含有”等应理解为开放式的,即表示包含但不限于此。仅有“由……组成”和“基本由……组成”的过渡词句应分别为封闭或半封闭式的过渡词句,如美国专利局审查指南 2111.03 部分所述。

[0001]

## 序 列 表

<110> President and Fellows of Harvard College

<120> 用于核酸测序的系统和方法

<130> H0498. 70311

<150> 61/008, 862

<151> 2007-12-21

<150> 61/098, 710

<151> 2008-09-19

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 1

acttcg

6

<210> 2

<211> 5

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1).. (1)

<223> 信号实体

<400> 2

[0002]

gatcc 5

<210> 3  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成寡核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (7)..(10)  
 <223> n 为通用碱基

<400> 3  
 gatctgnnnn 10

<210> 4  
 <211> 6  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 4  
 catatc 6

<210> 5  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 合成寡核苷酸

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (6)..(6)

[0003]

<223> n 为通用碱基	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (8)..(10)	
<223> n 为通用碱基	
<400> 5	
gatctngnnn	10
<210> 6	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (2)..(2)	
<223> N 为 A、C、G 或 T 中任一种	
<400> 6	
cnacatc	7
<210> 7	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 7	
gactctgtcc ctccttgtc taccctgtgc gtcctactc tacc	44
<210> 8	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
[0004]	

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1).. (1)

<223> biotin

<400> 8

cctatcccct gtgtgccttg cctatcccct gttgcgtgtc tcag

44

<210> 9

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<400> 9

ctaagtta

8

<210> 10

<211> 8

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成寡核苷酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (3).. (3)

<223> n 为通用碱基

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6).. (6)

<223> n 为通用碱基

[0005]

<400> 10		
ctnagnta		8
<210> 11		
<211> 8		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (4)..(5)		
<223> n 为通用碱基		
<400> 11		
ctanntta		8
<210> 12		
<211> 64		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 12		
cgccagggtt ttccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaatcc gtaatcatgg		60
ccat		64

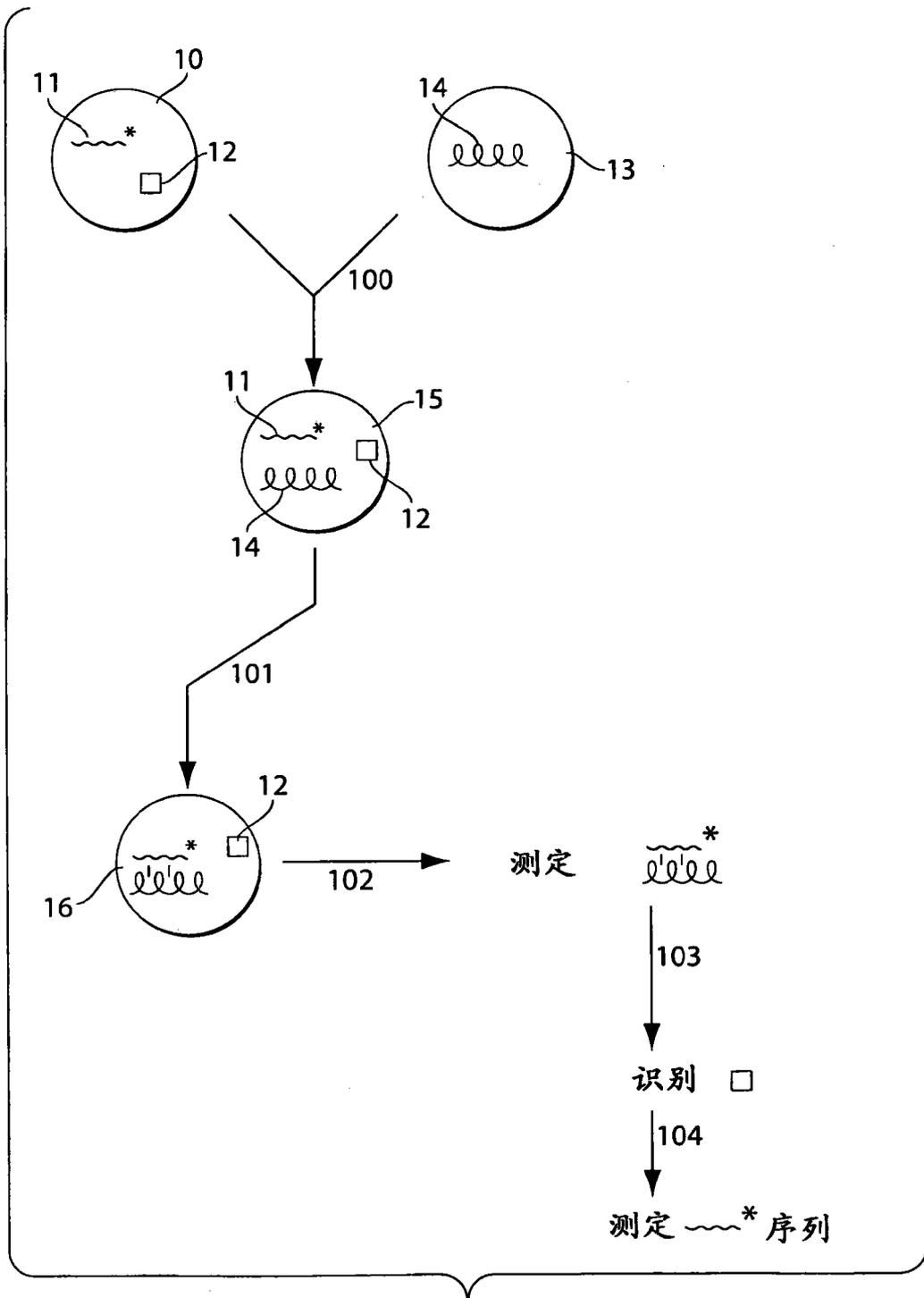


图 1



图 2A

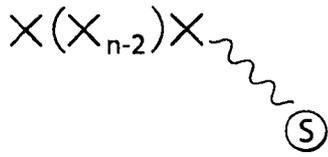


图 2D

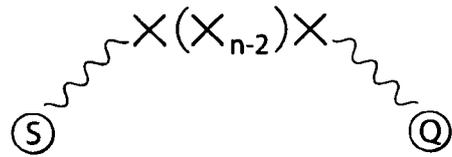


图 2E

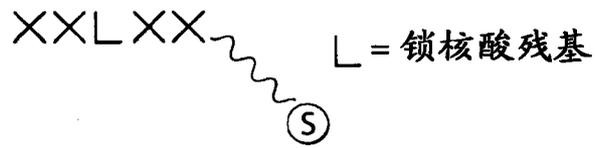


图 2F

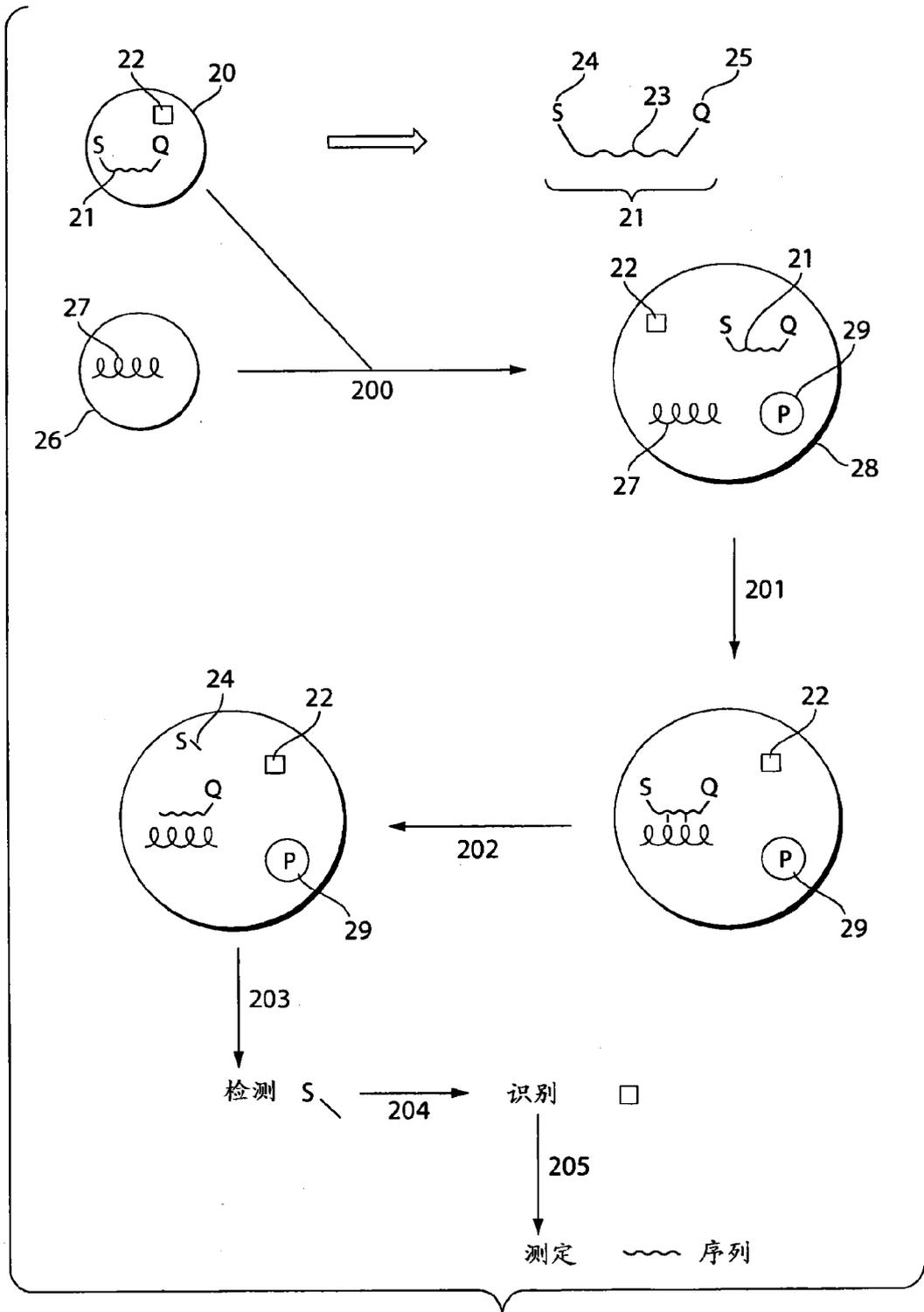


图 3

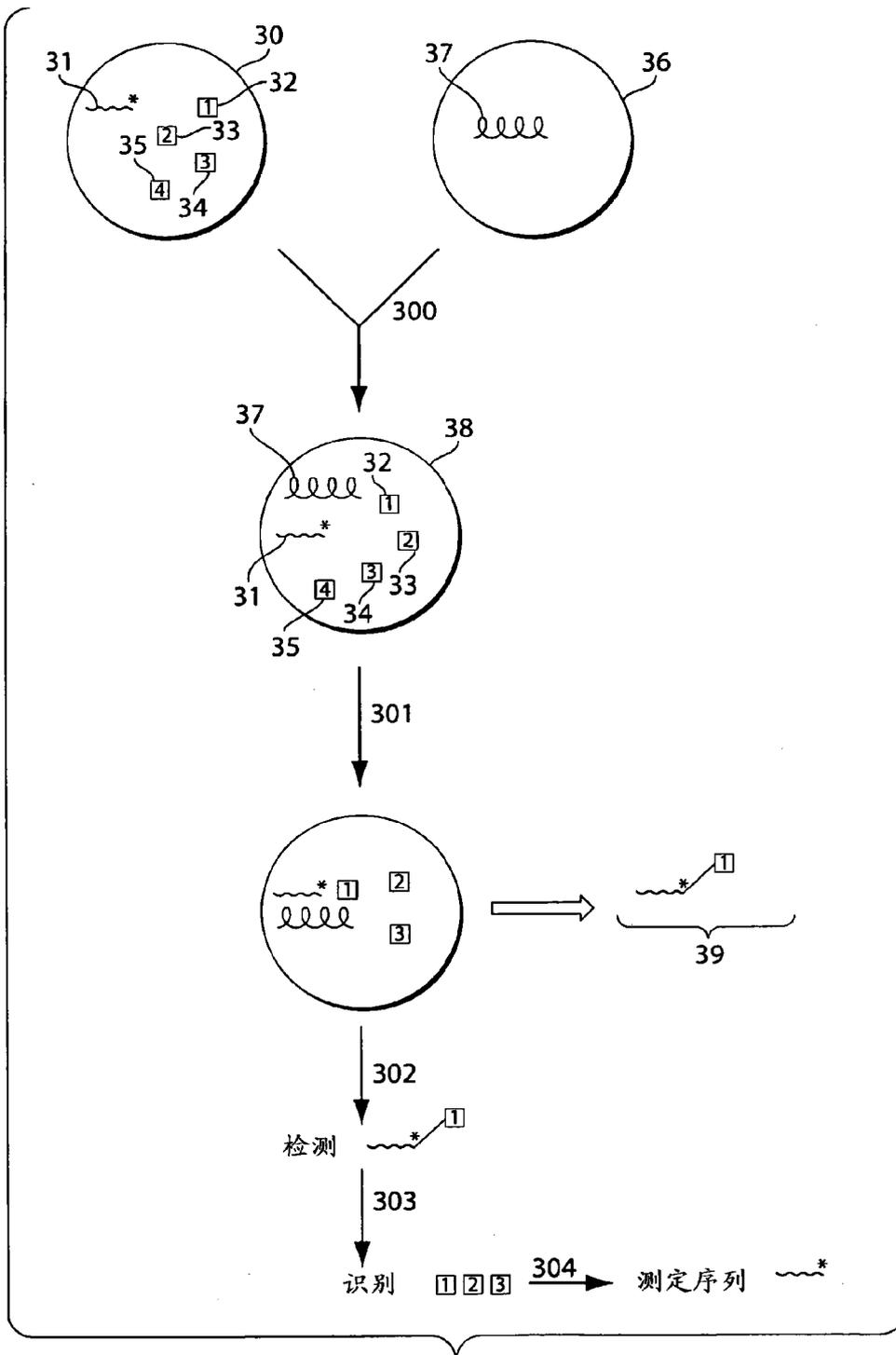


图 4

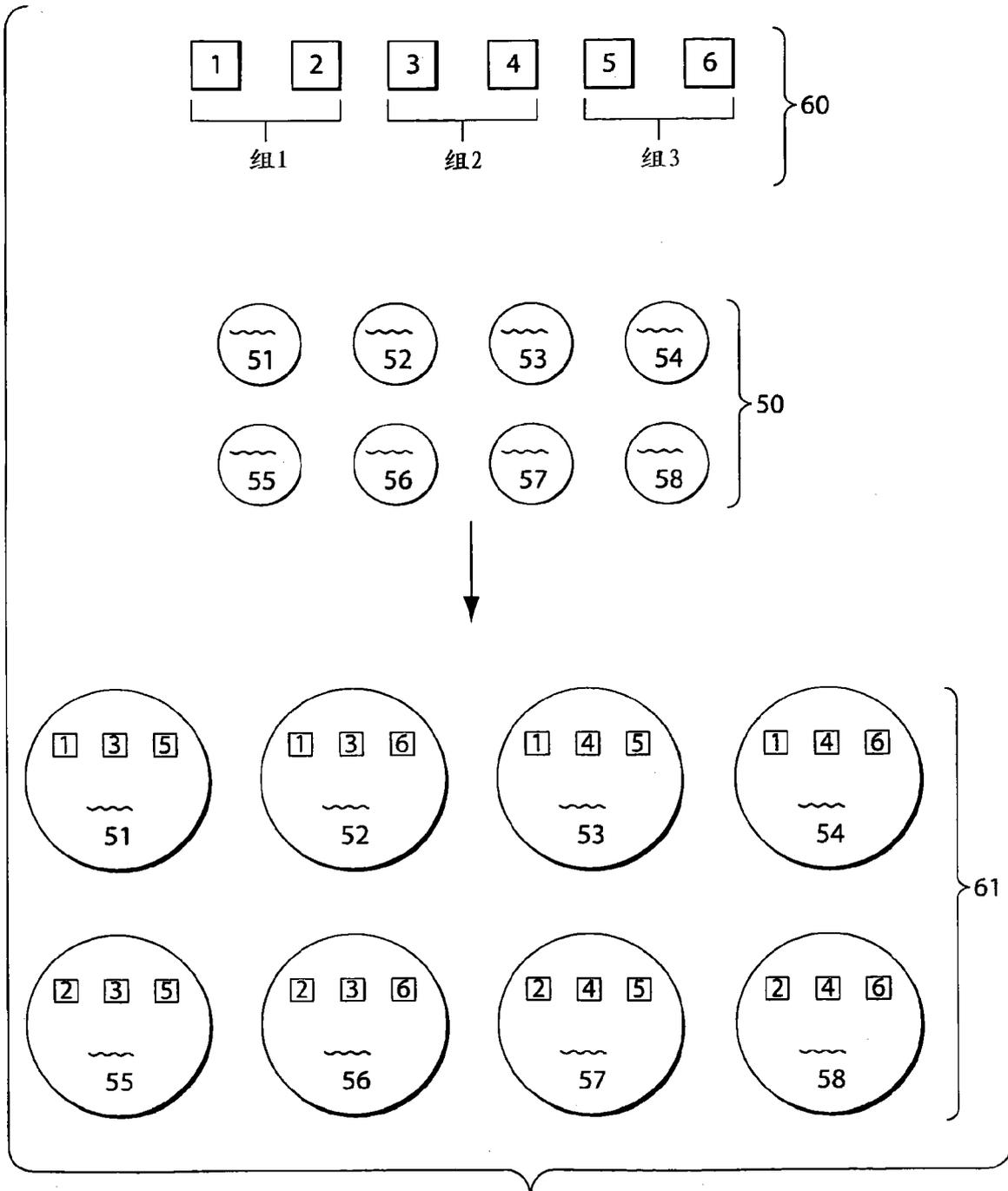


图 5

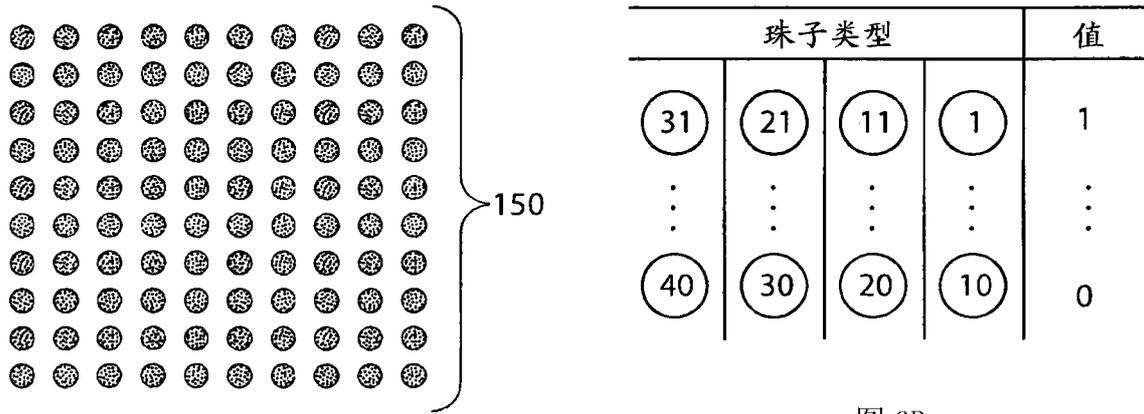


图 6B

图 6A

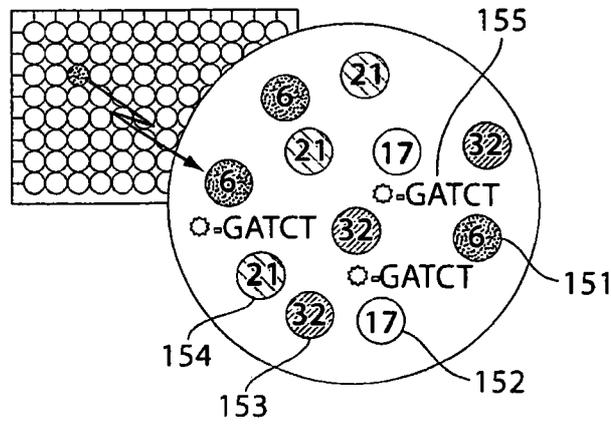


图 6C

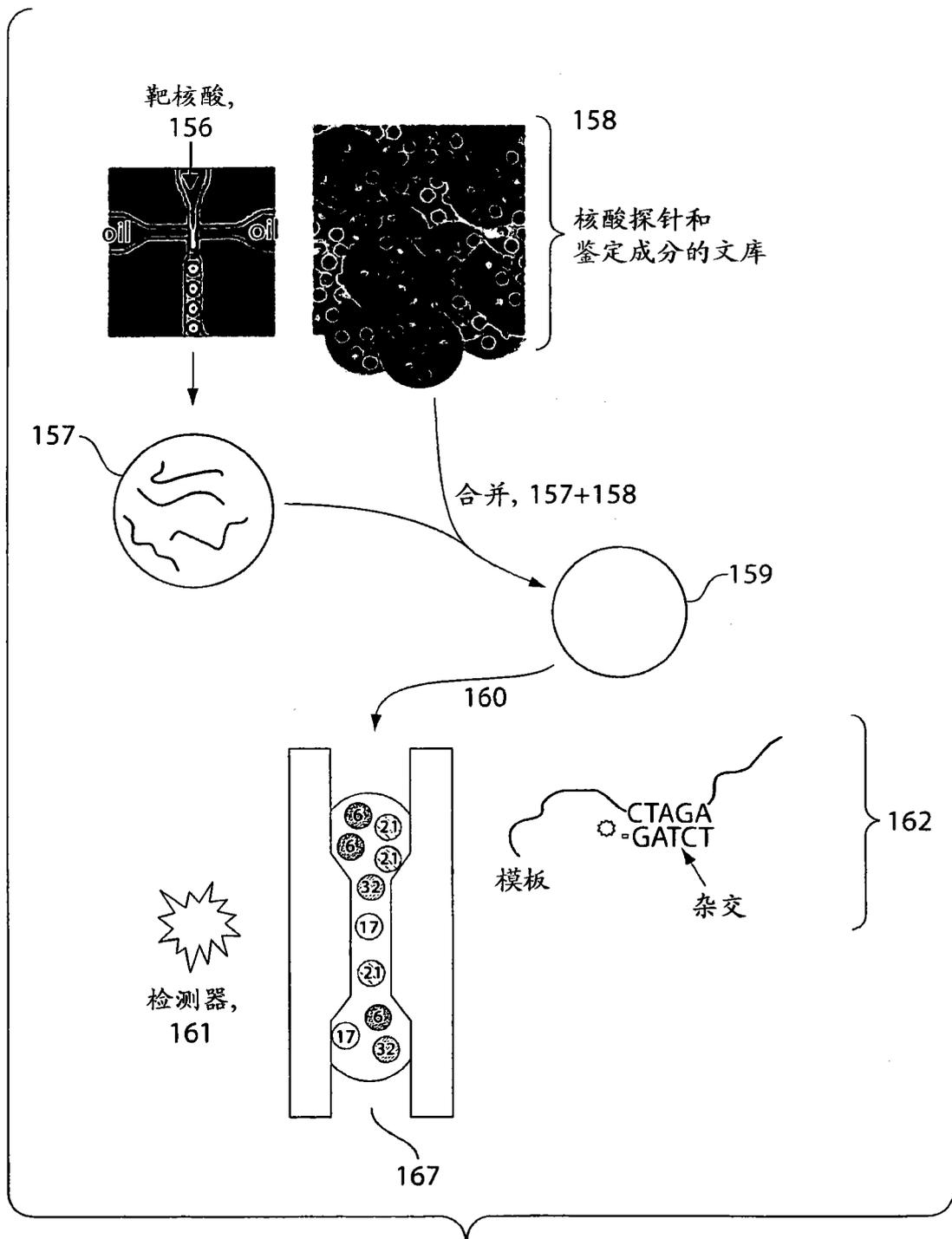


图 6D

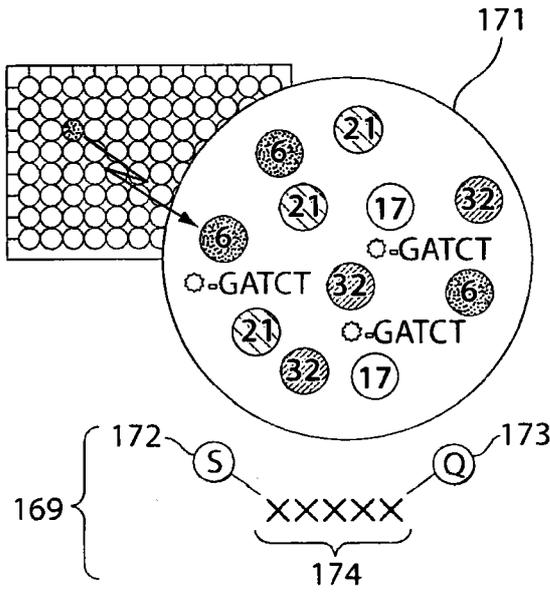


图 7A

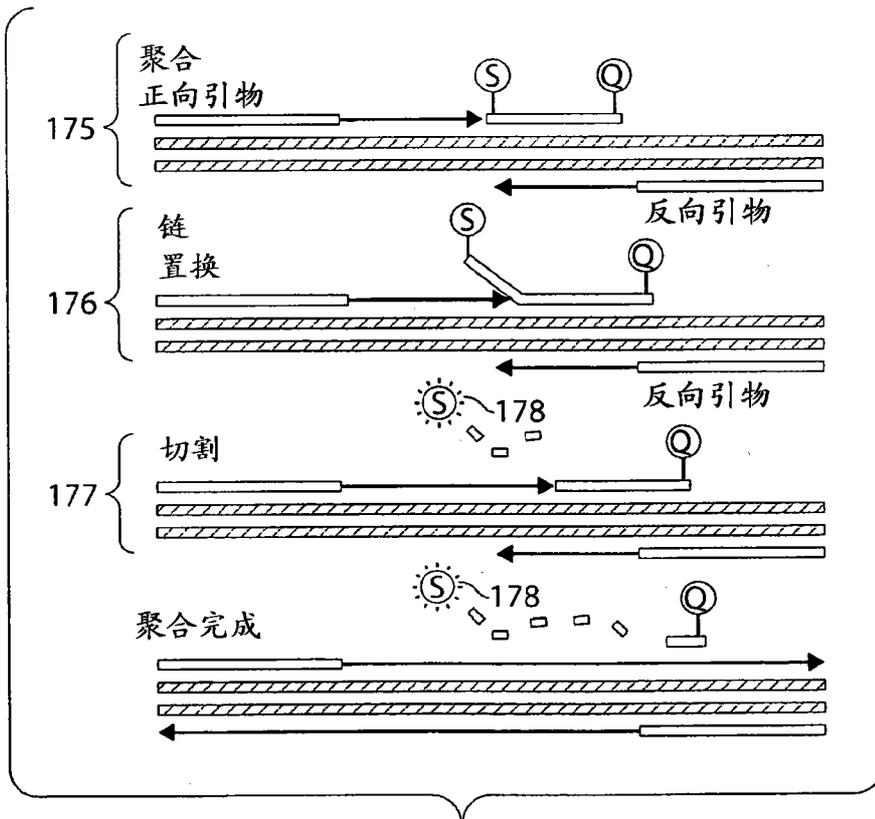


图 7B

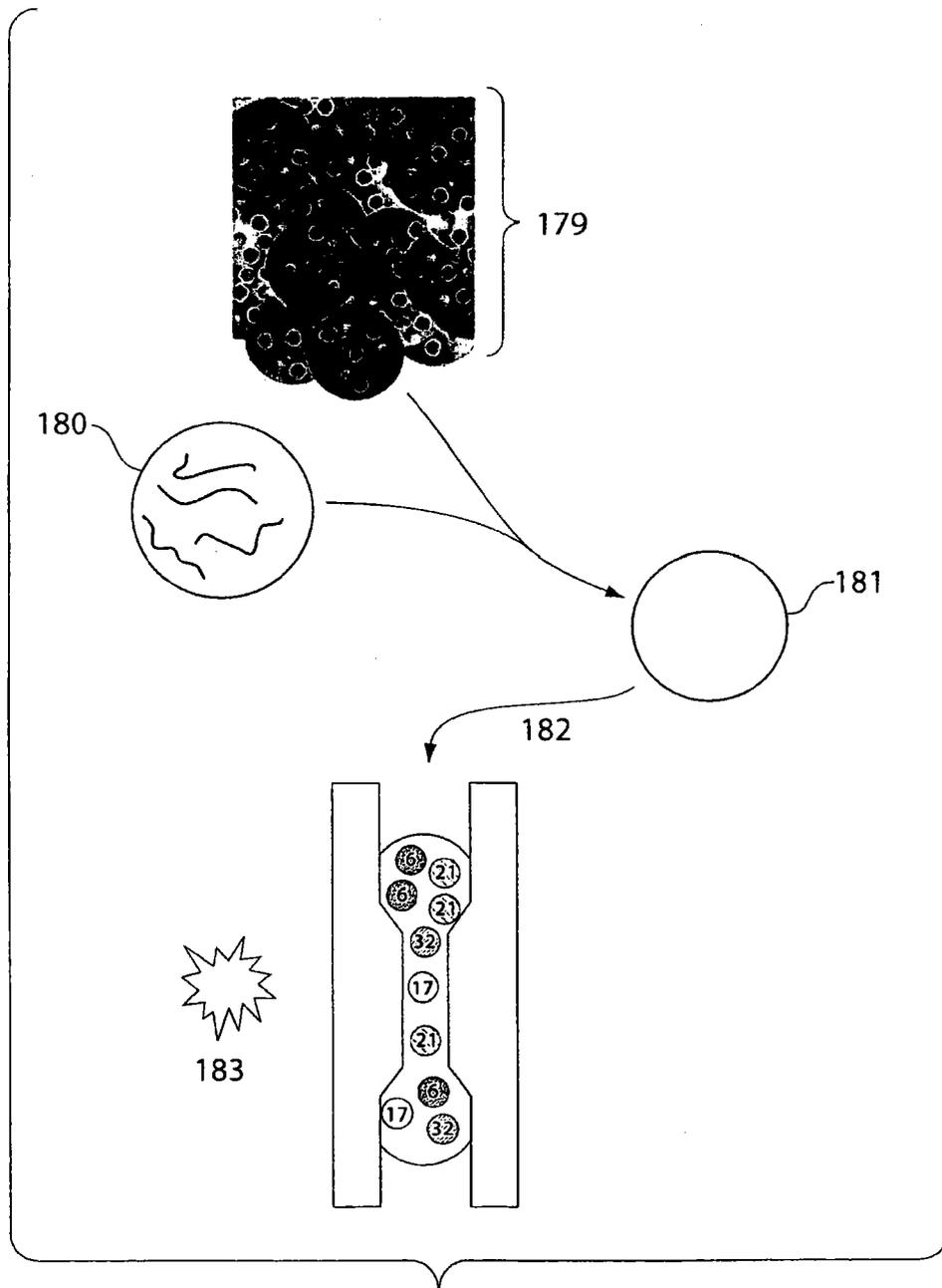


图 7C

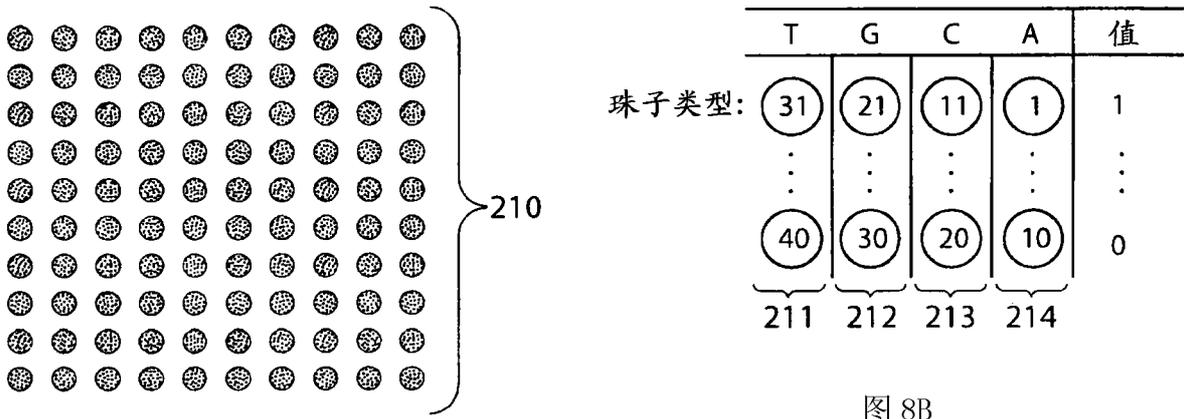


图 8B

图 8A

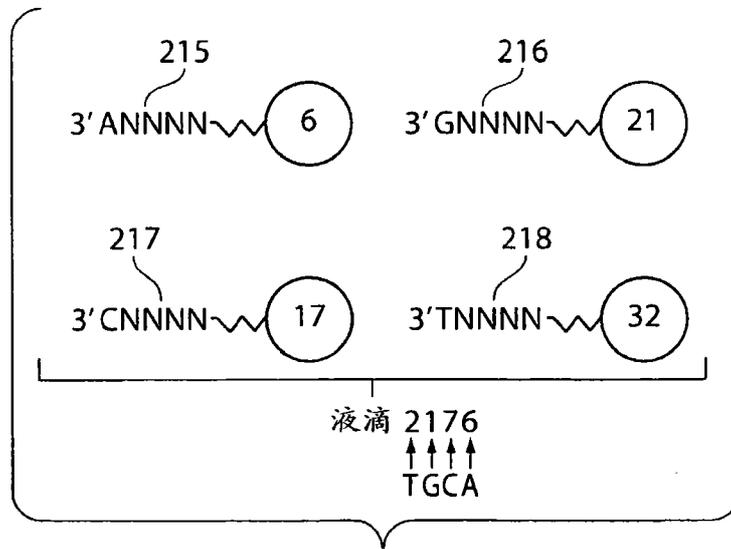


图 8C

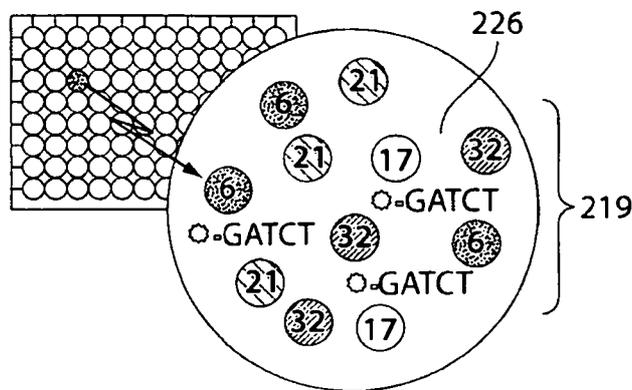


图 8D

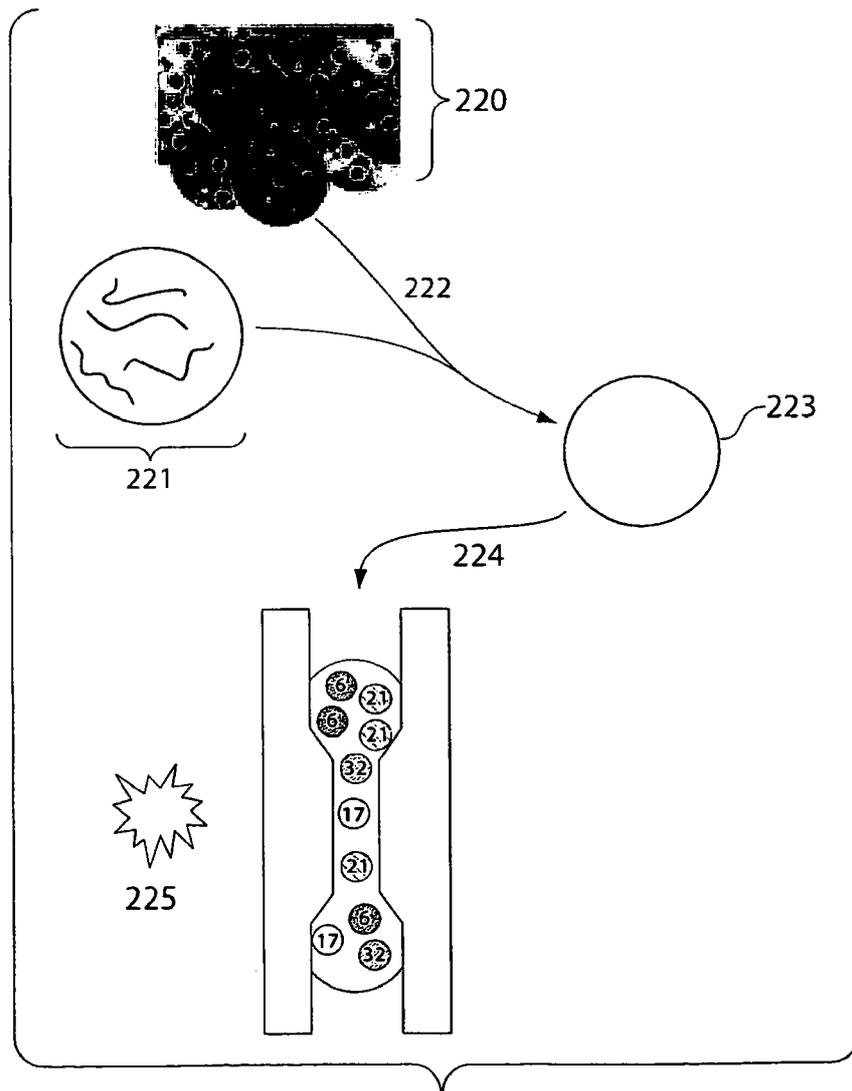


图 8E

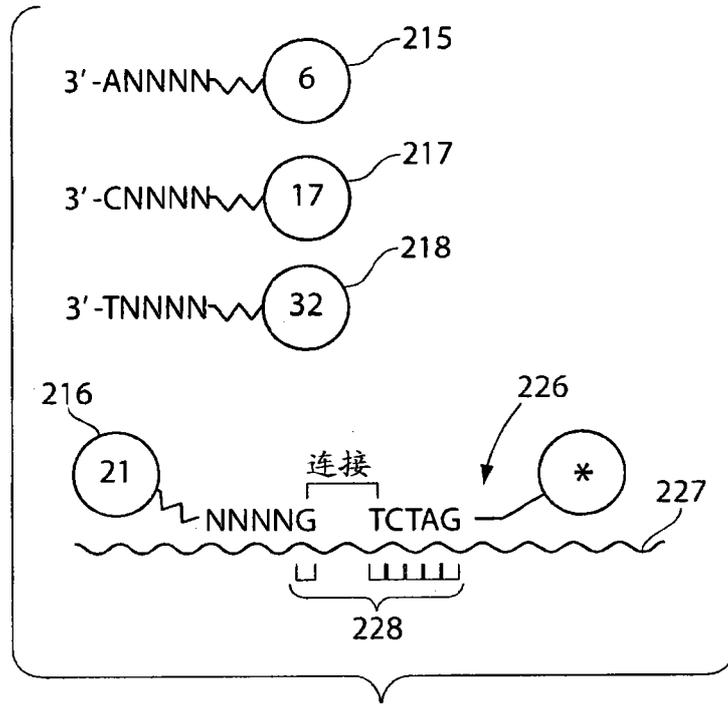


图 8F

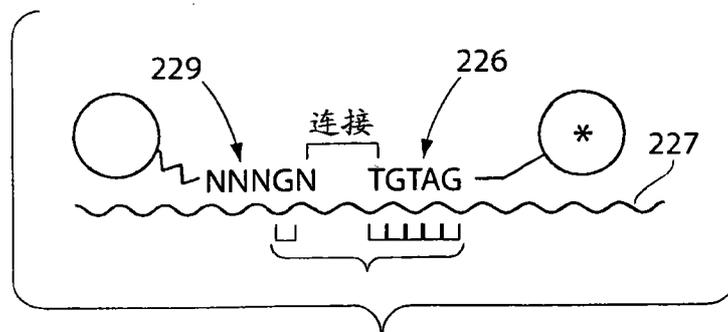


图 8G

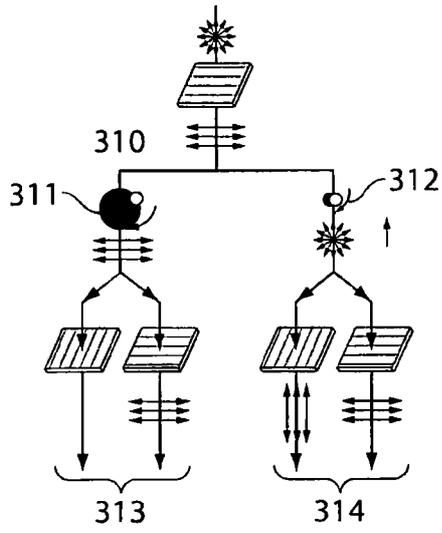


图 9A

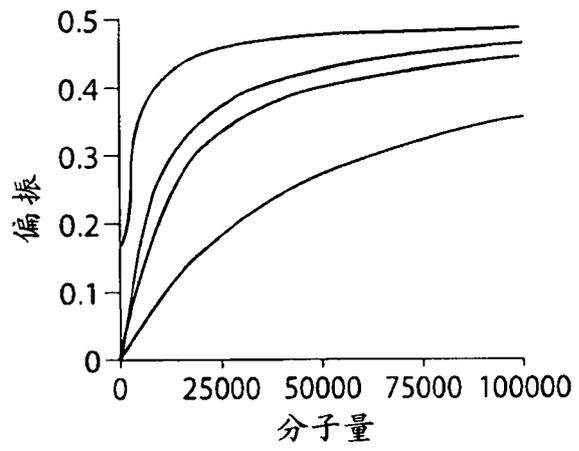


图 9B

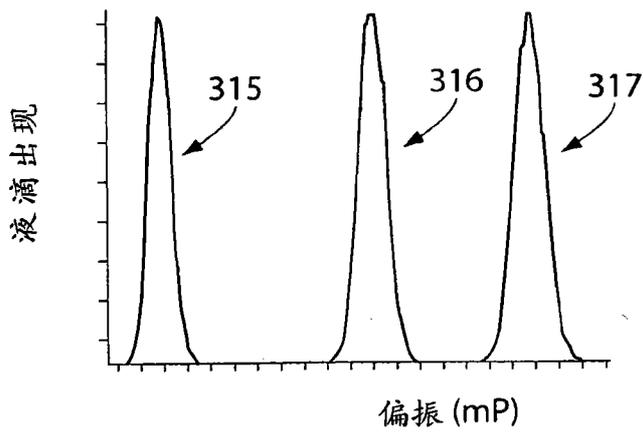


图 9C

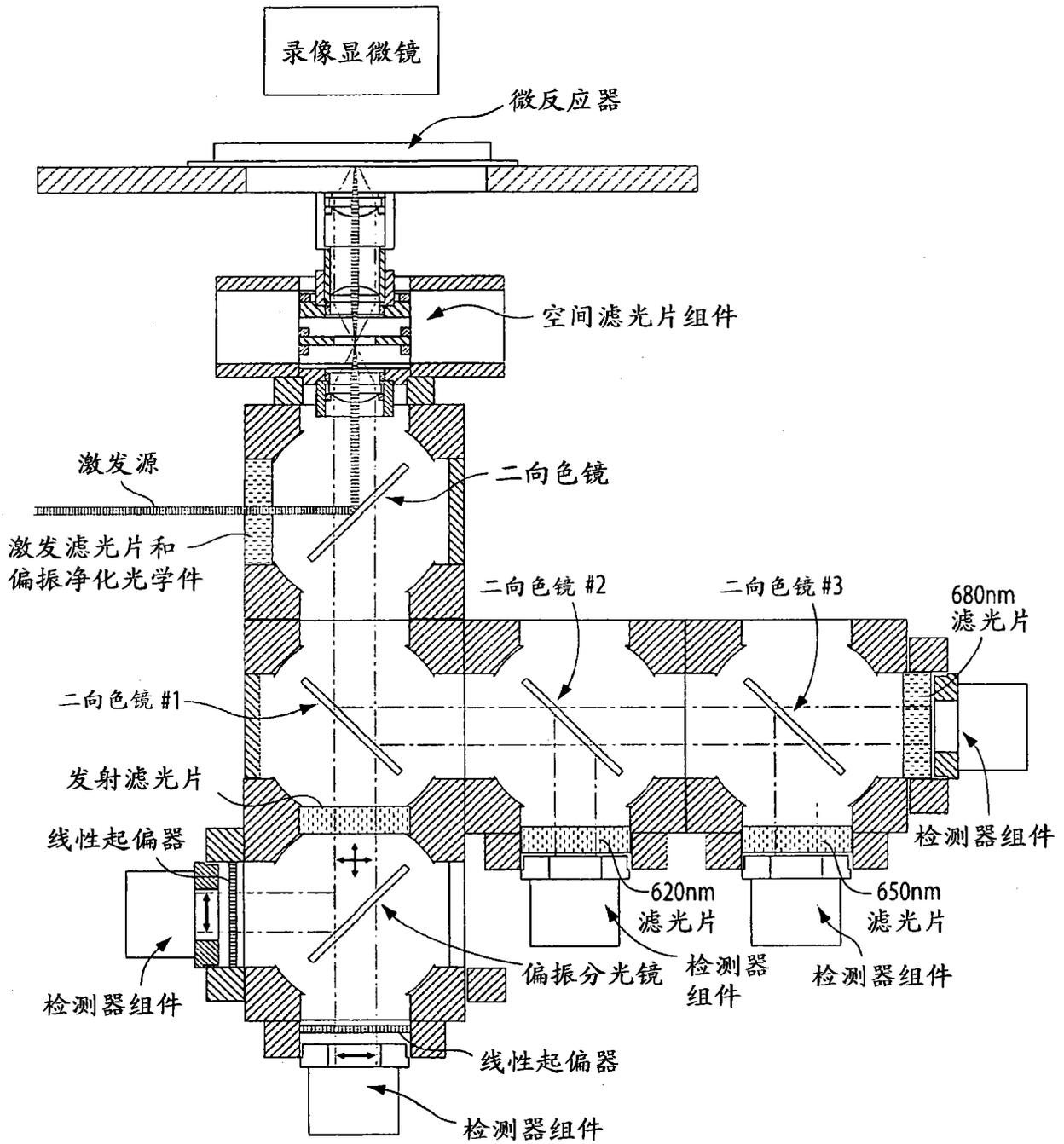


图 10

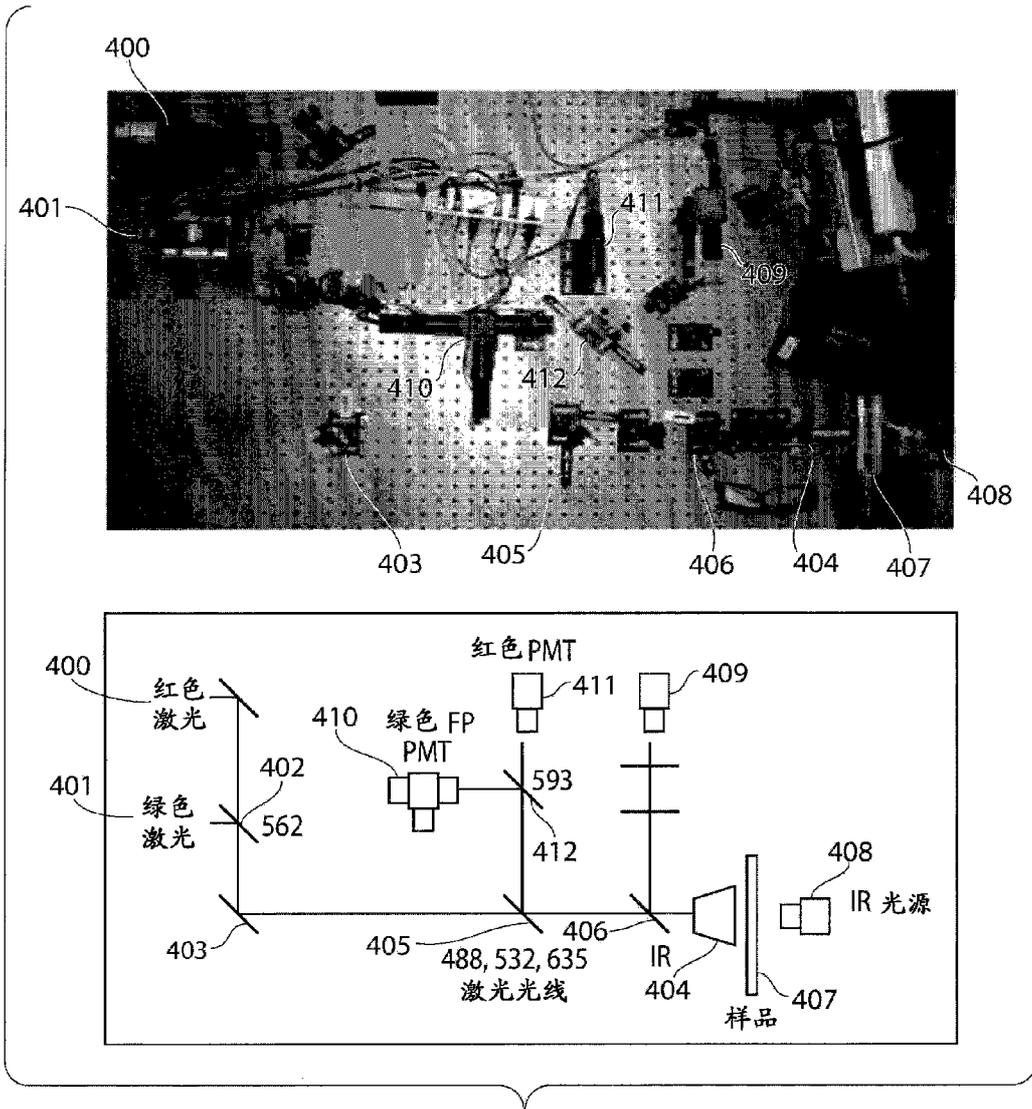


图 11

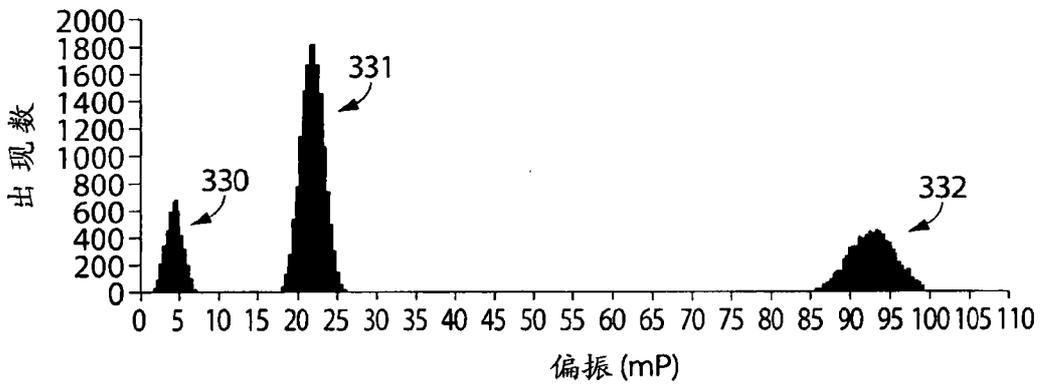


图 12A

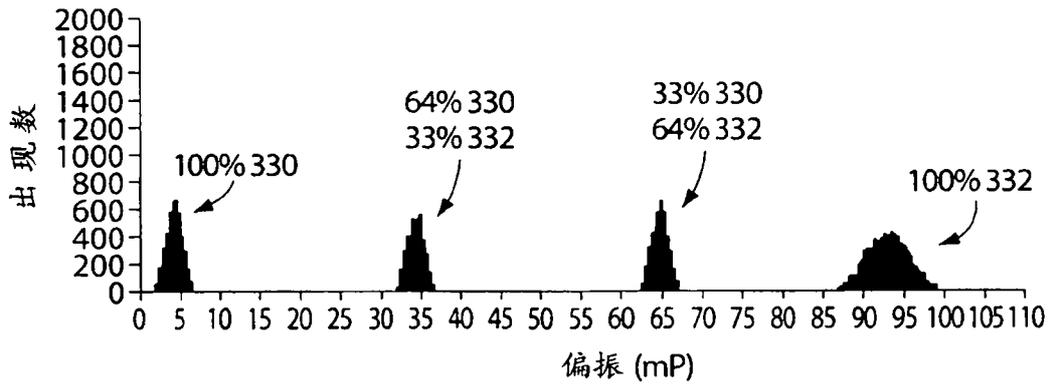


图 12B

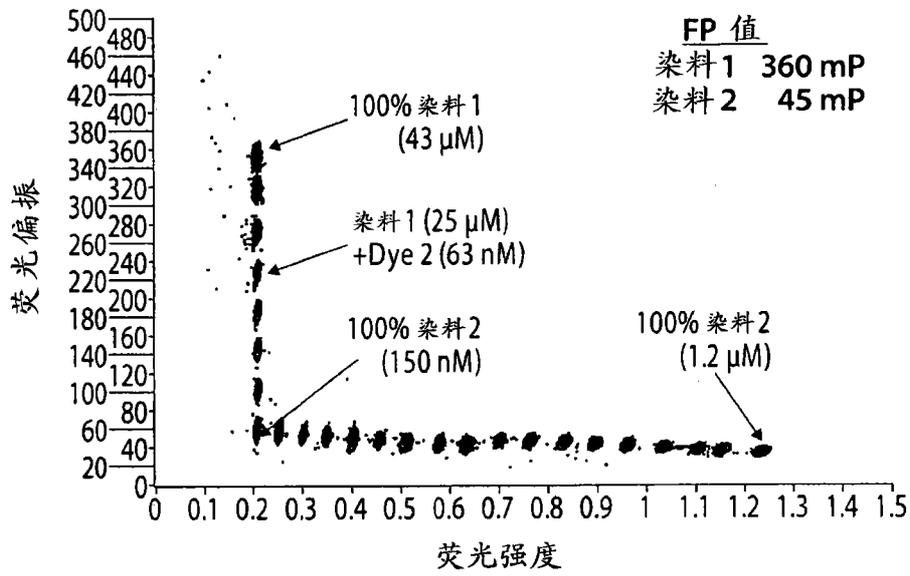


图 13A

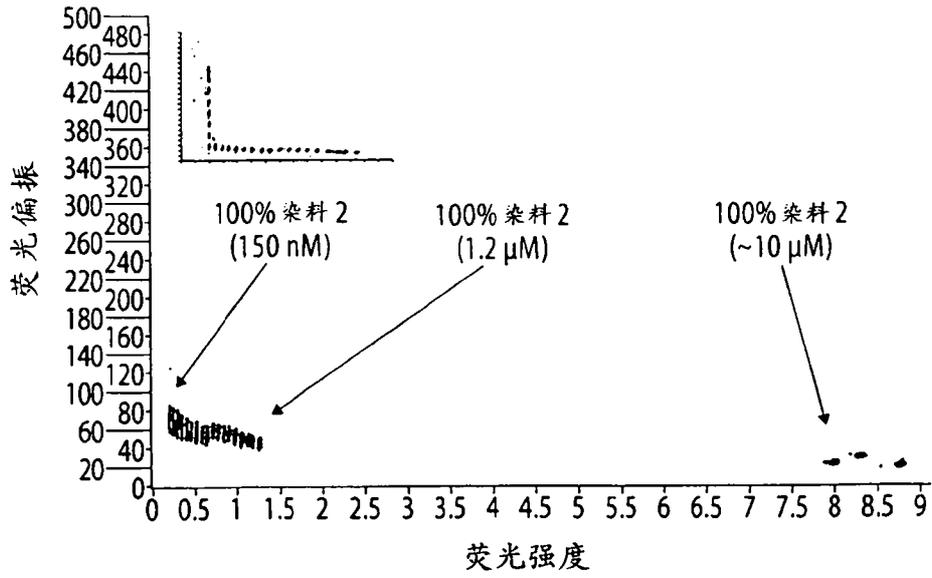


图 13B

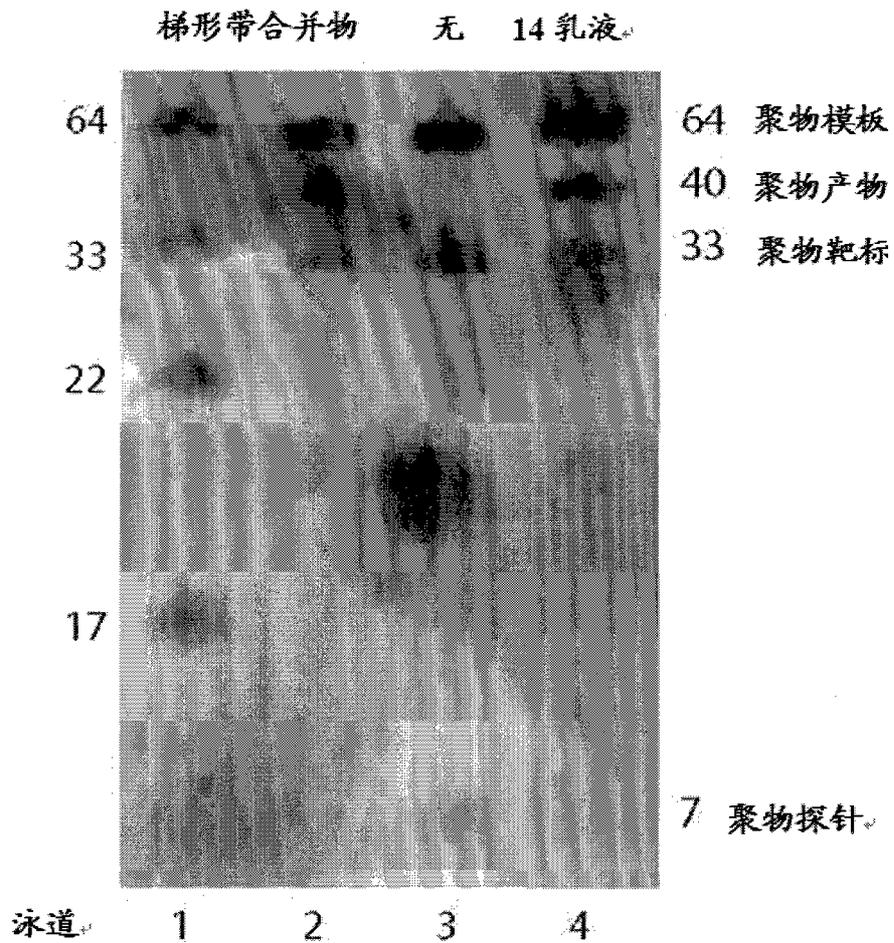


图 14

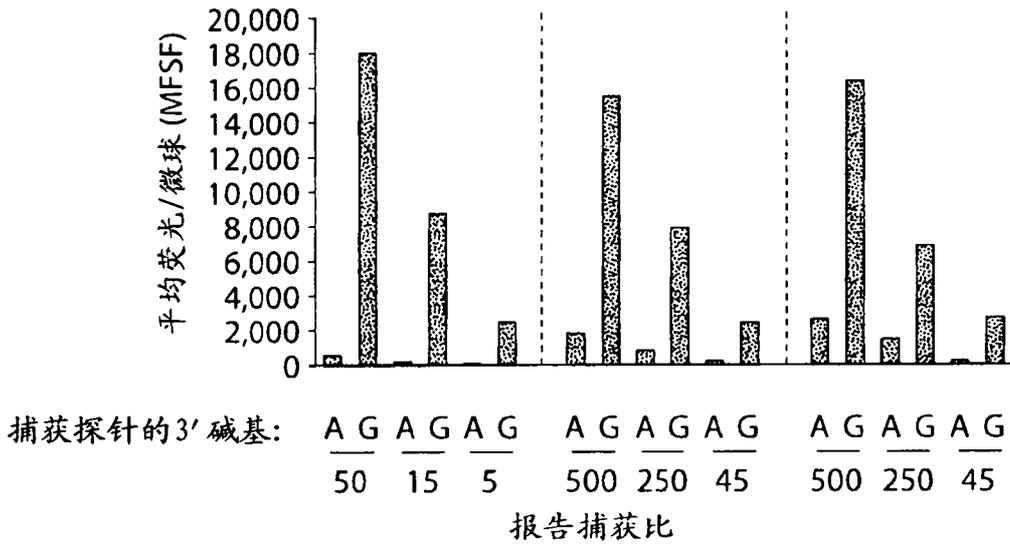


图 15

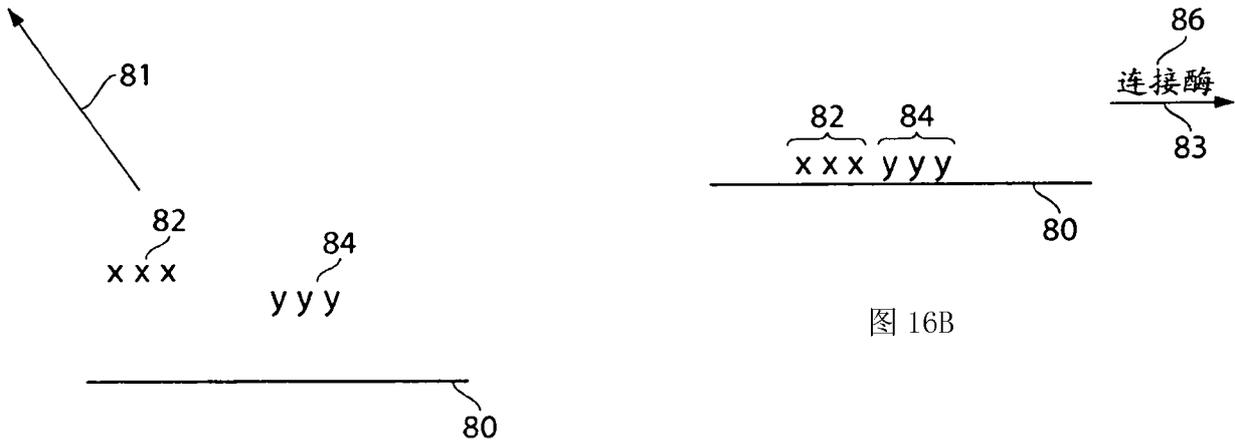


图 16B

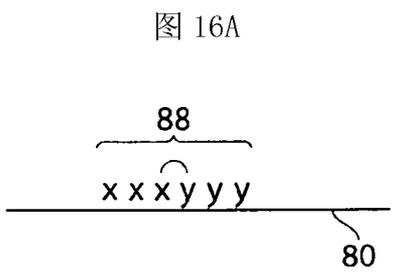


图 16A

图 16C

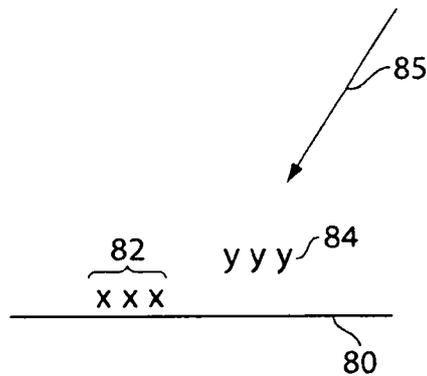


图 16D

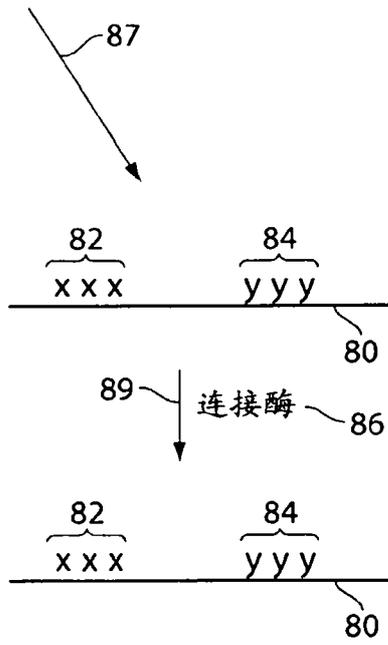


图 16E

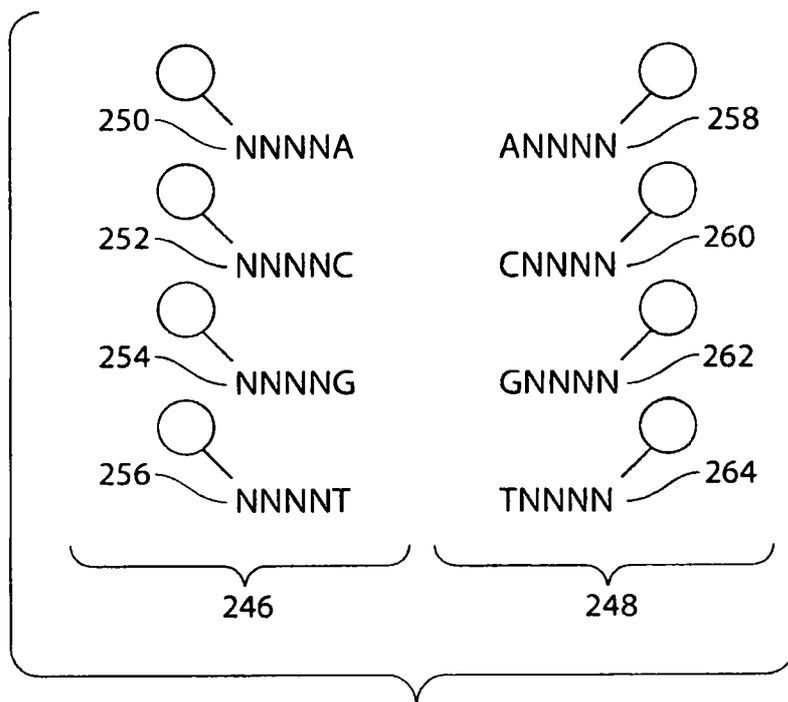


图 17A

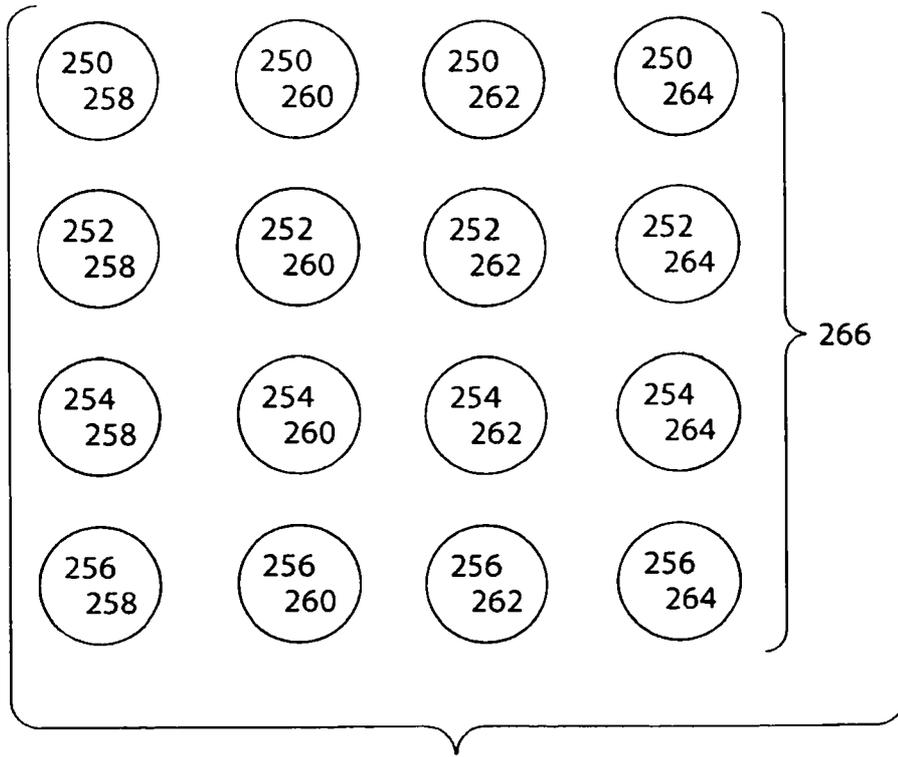


图 17B

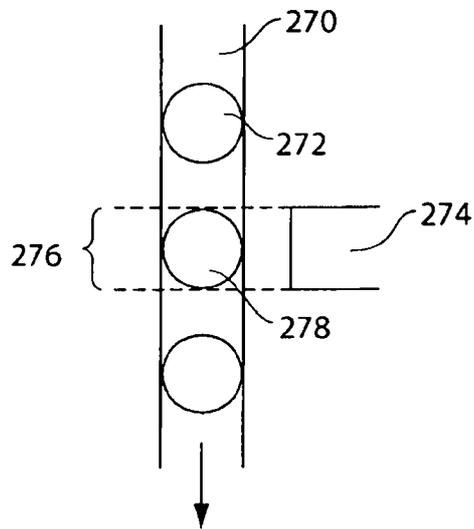


图 18A

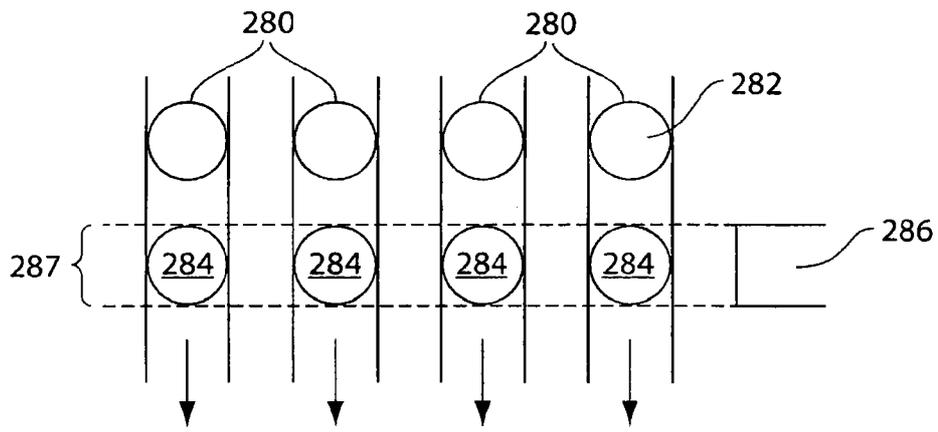


图 18B

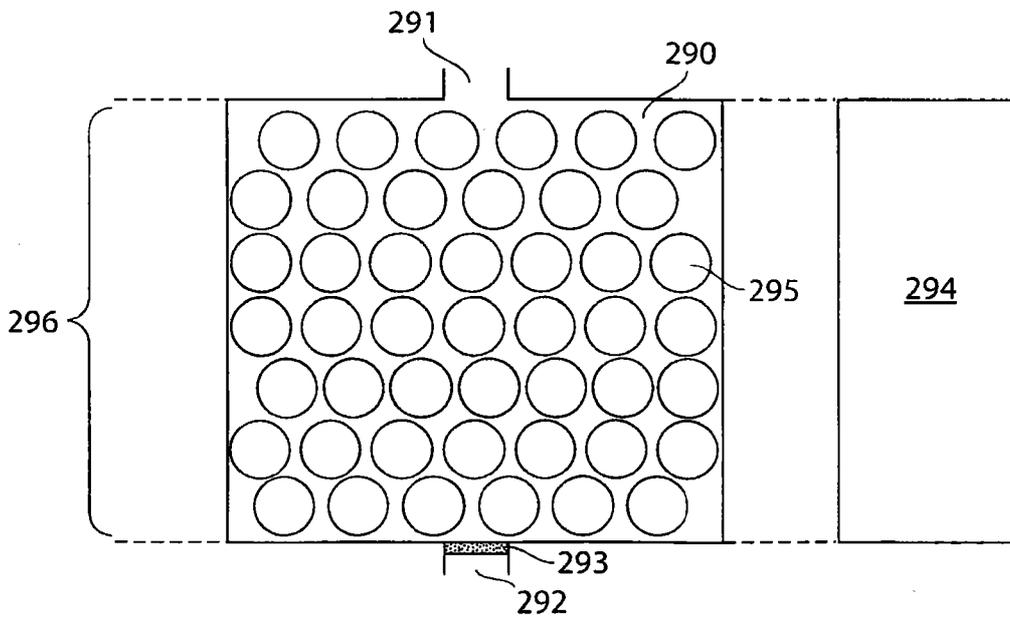


图 18C

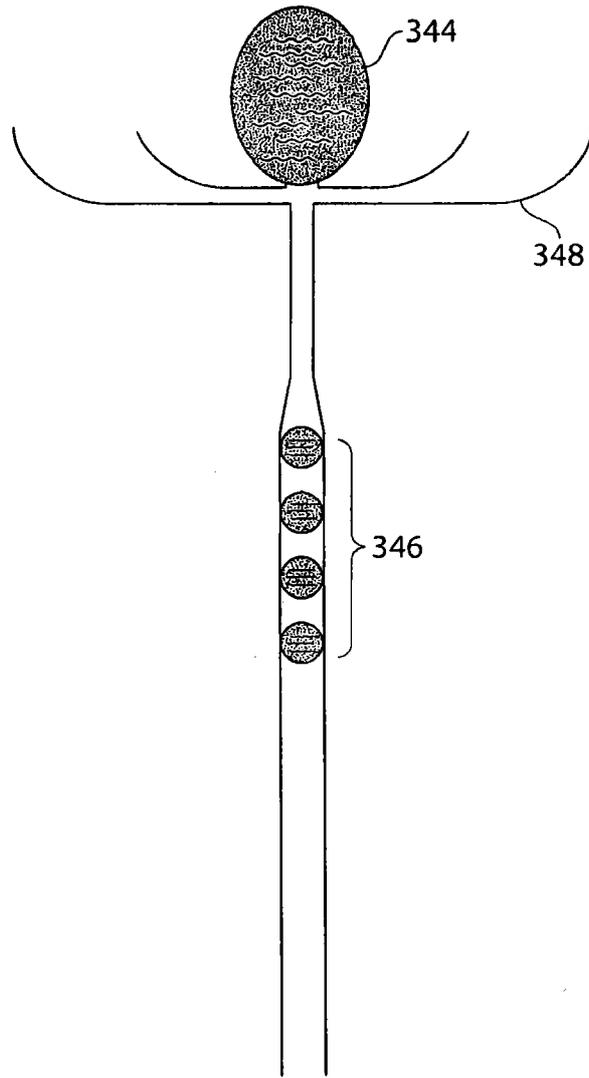


图 19

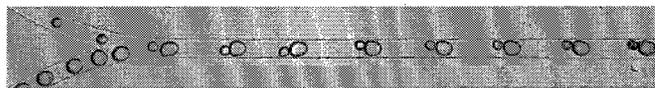


图 20A

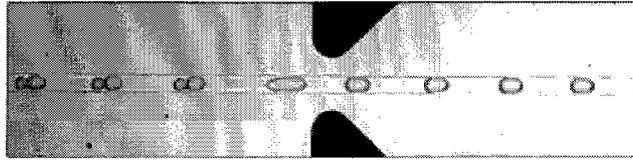


图 20B

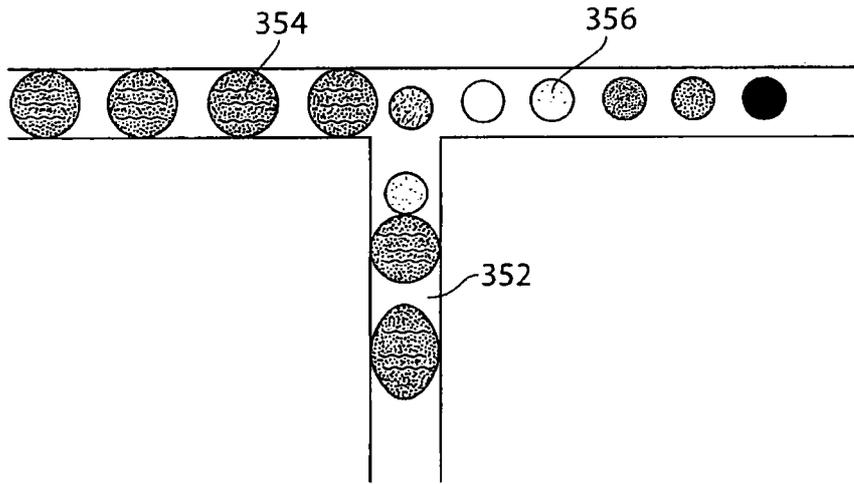


图 21

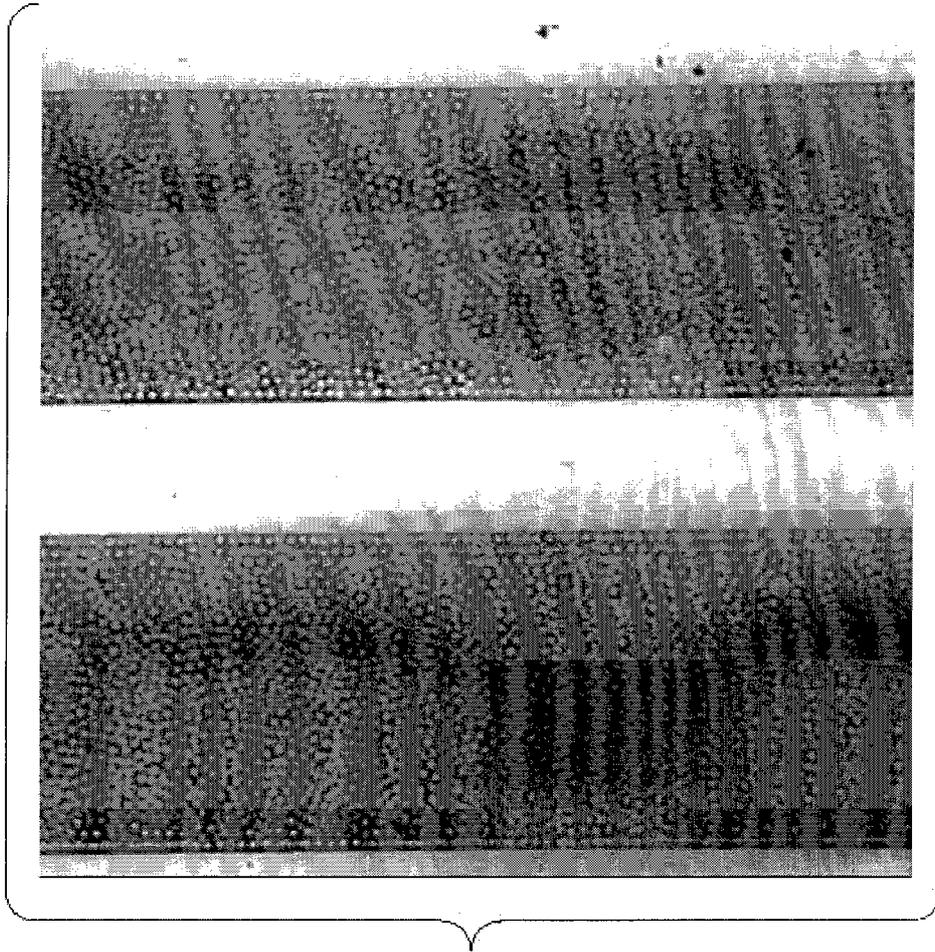


图 22

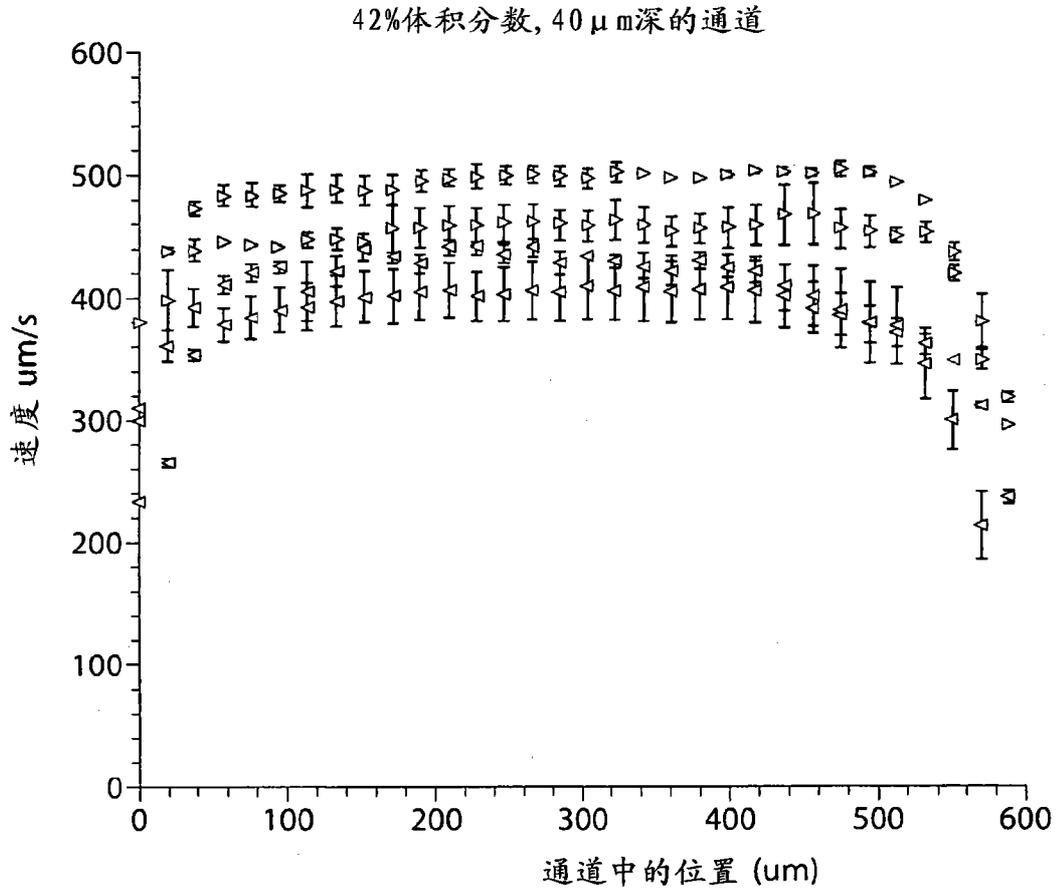


图 23

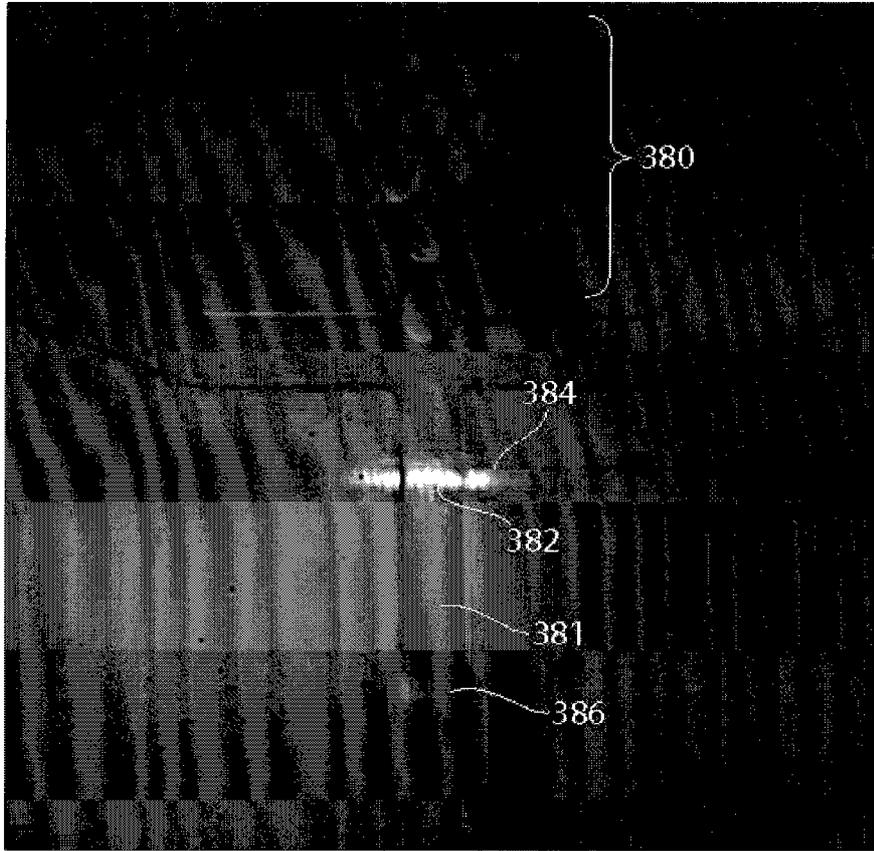


图 24

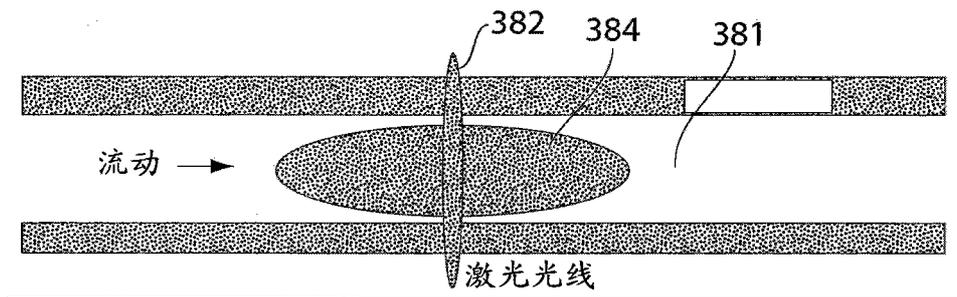


图 25A

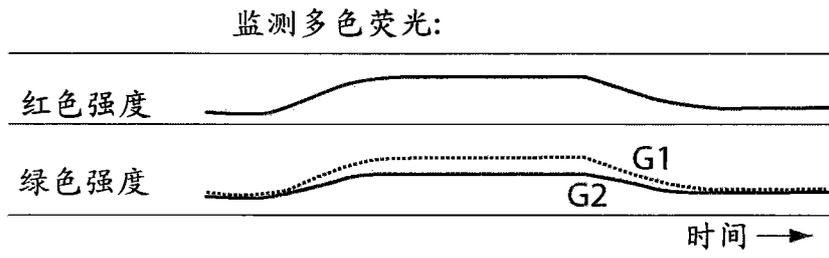


图 25B

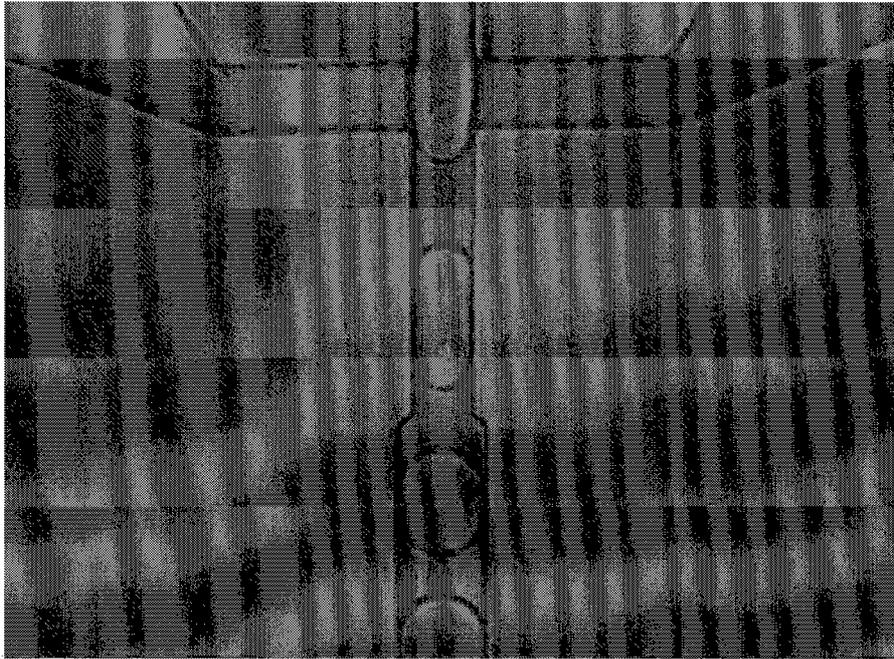


图 26

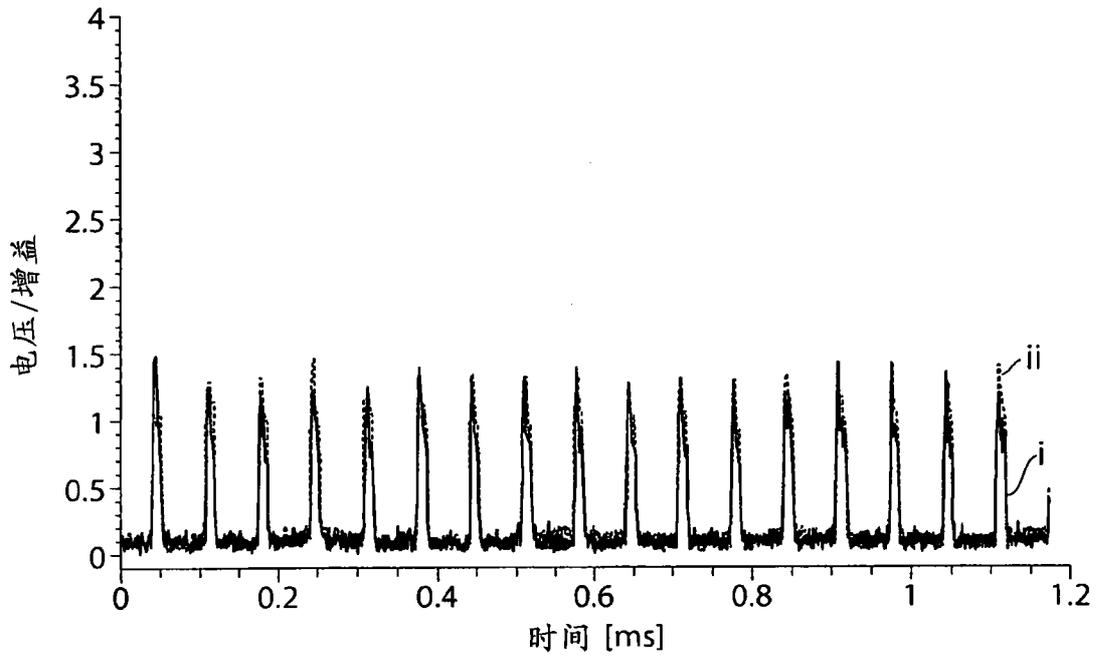


图 27A

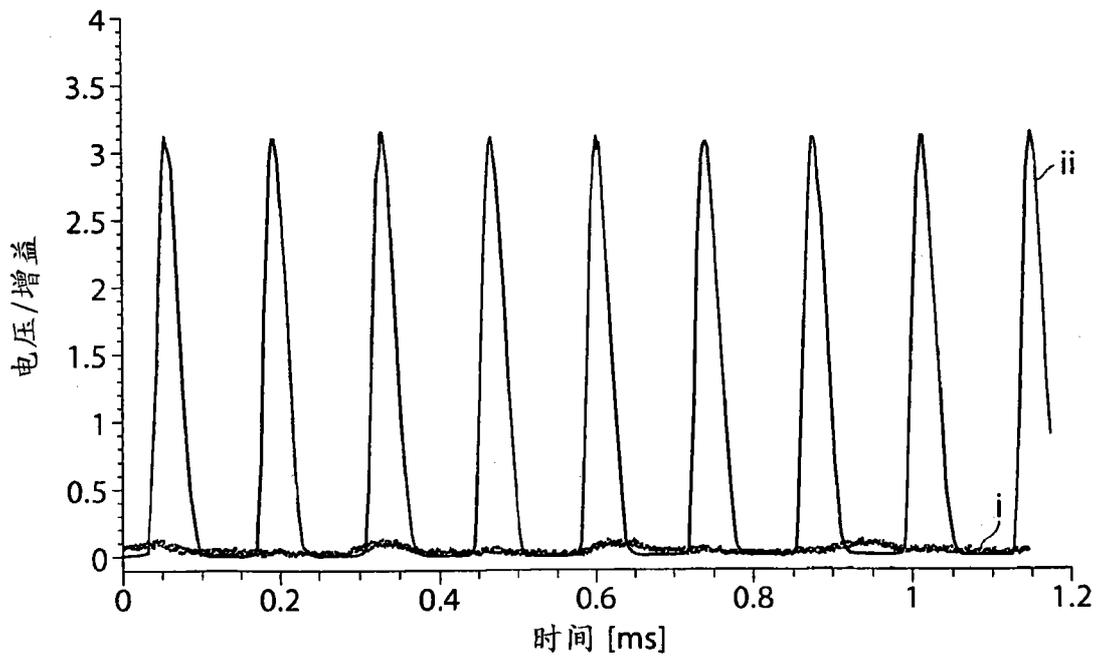


图 27B

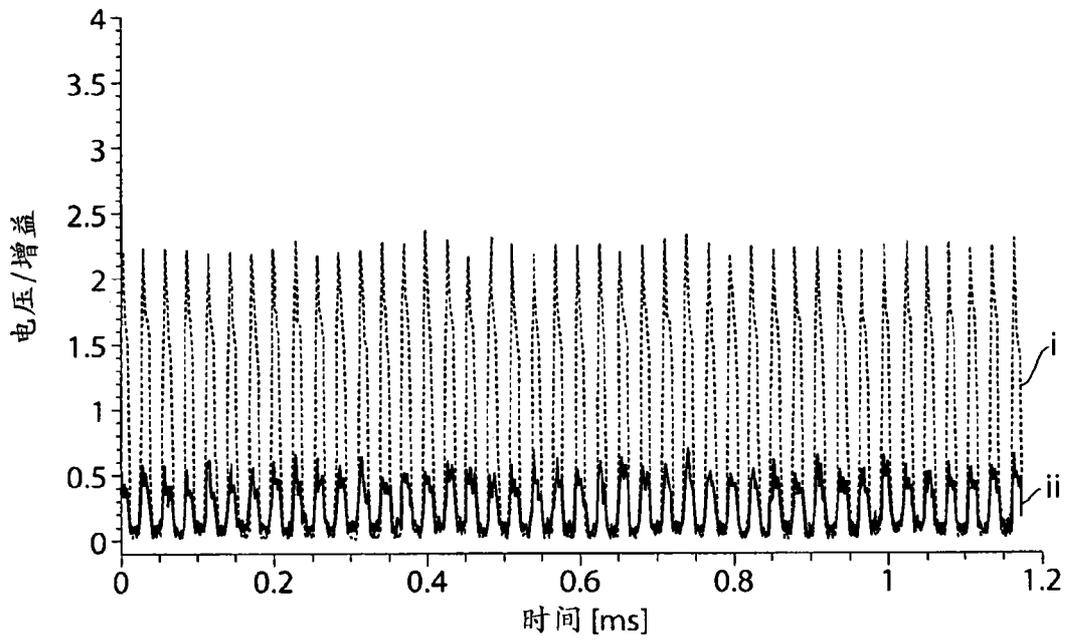


图 27C

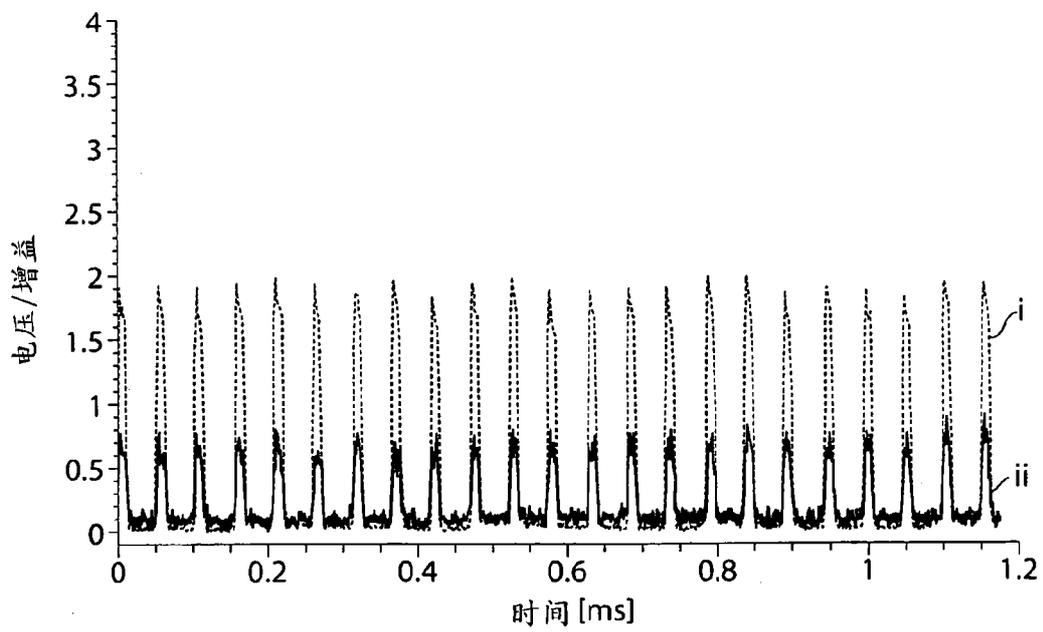


图 27D

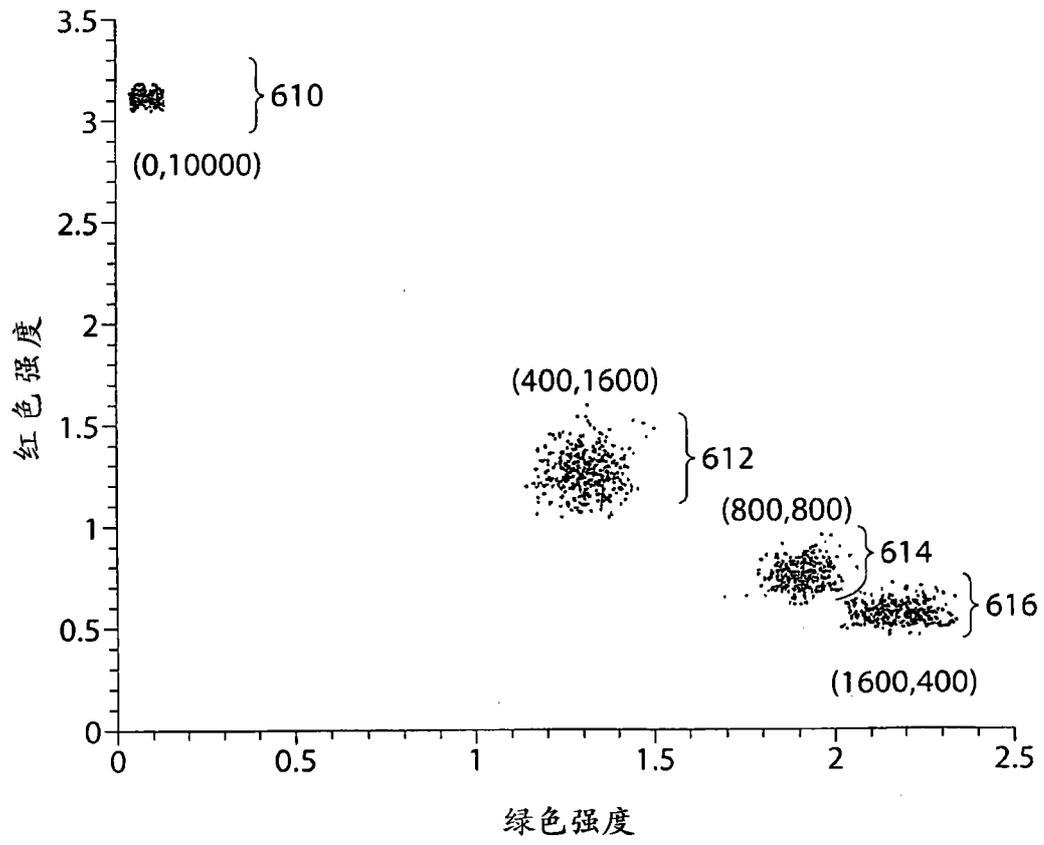


图 28

结合测定, 3  $\mu$ M模板

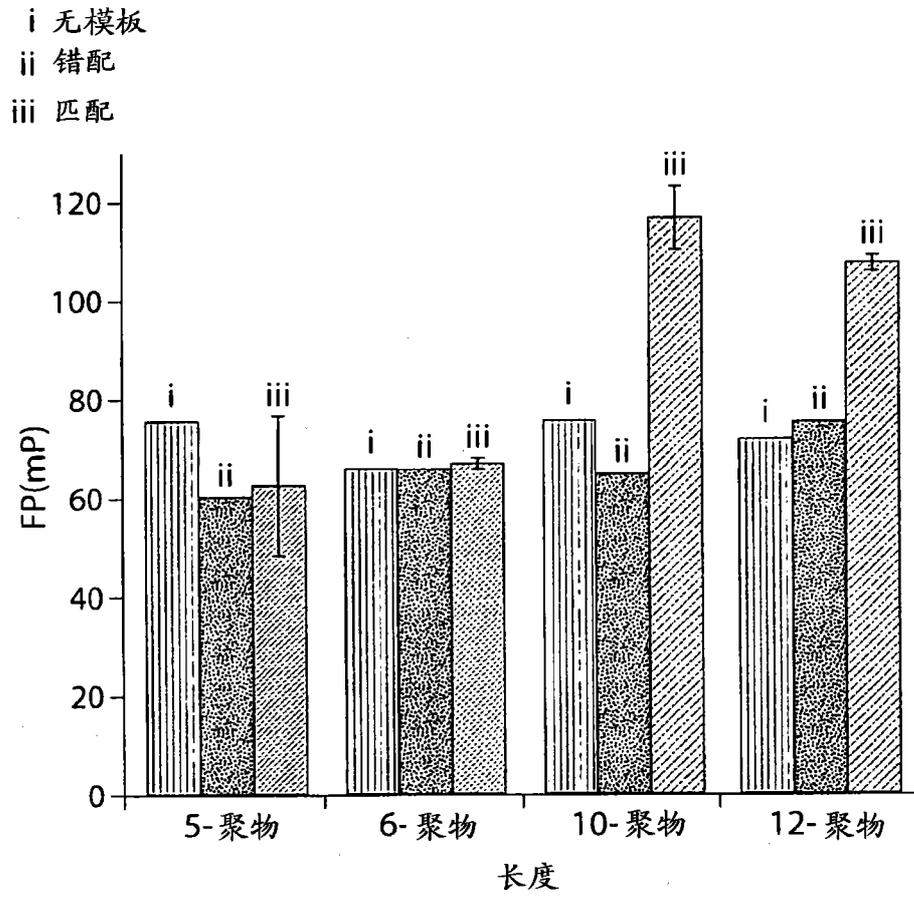


图 29

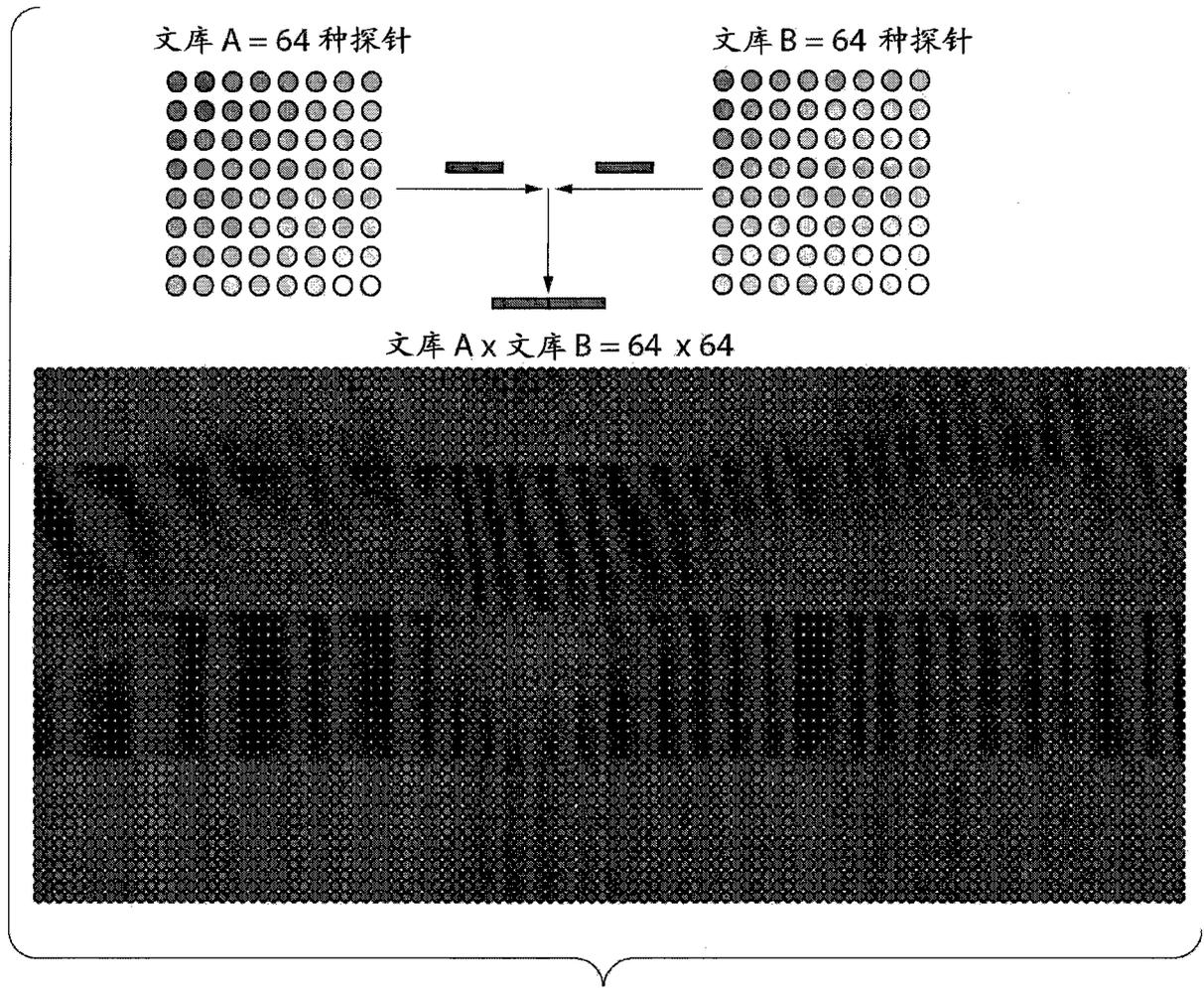


图 30

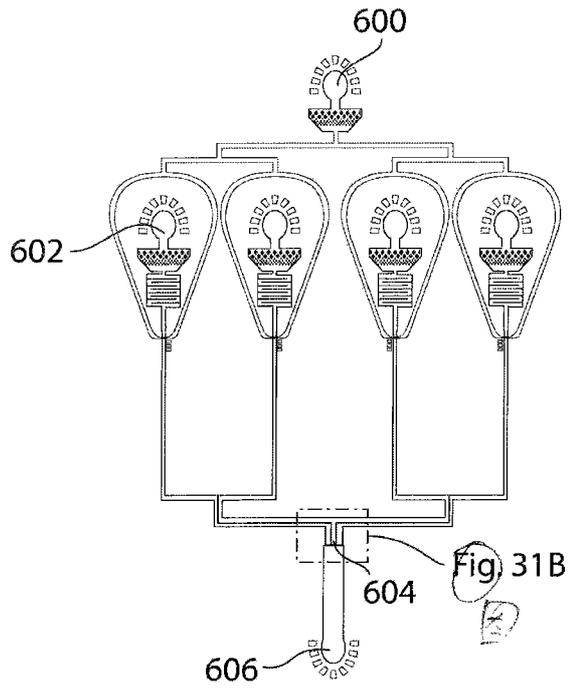


图 31A

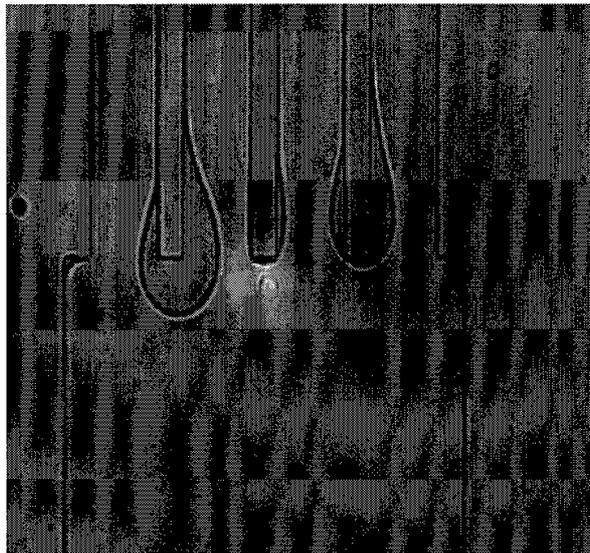


图 31B

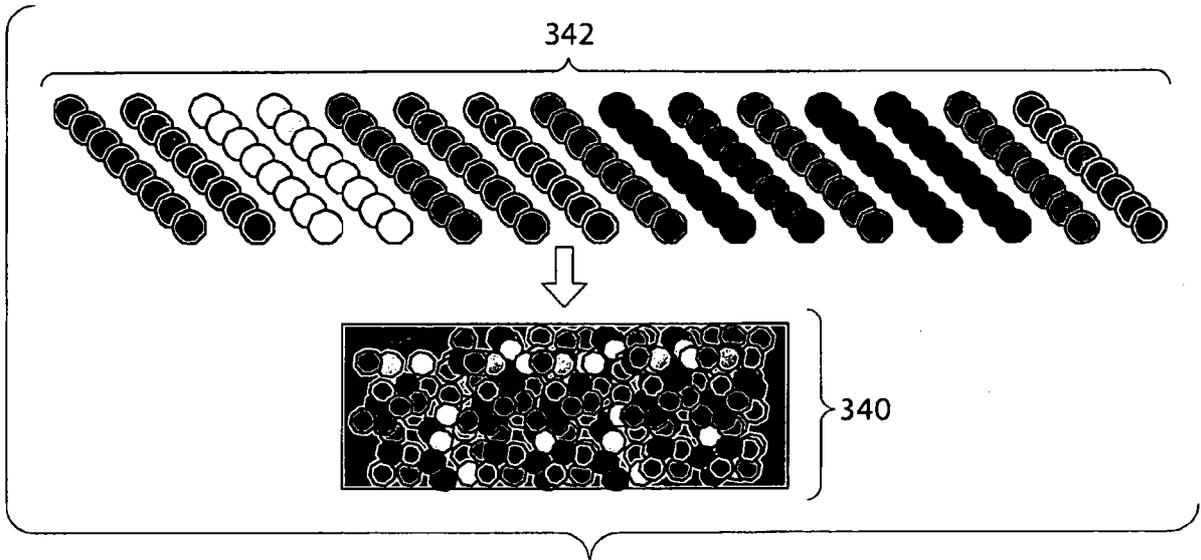


图 32

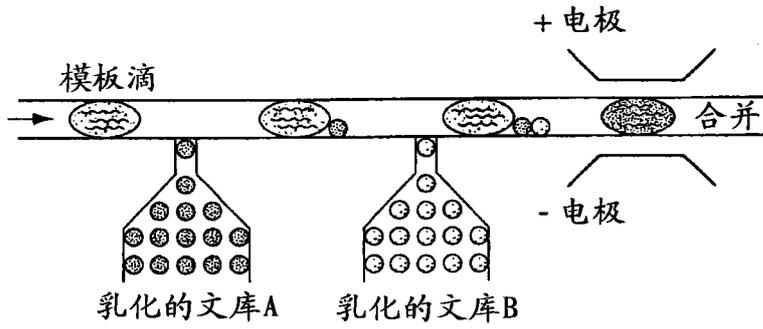


图 33A

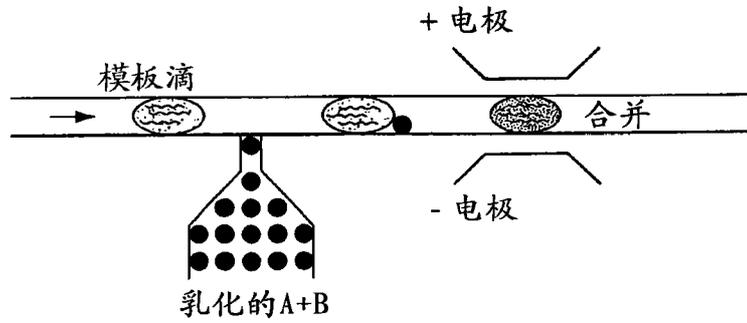


图 33B

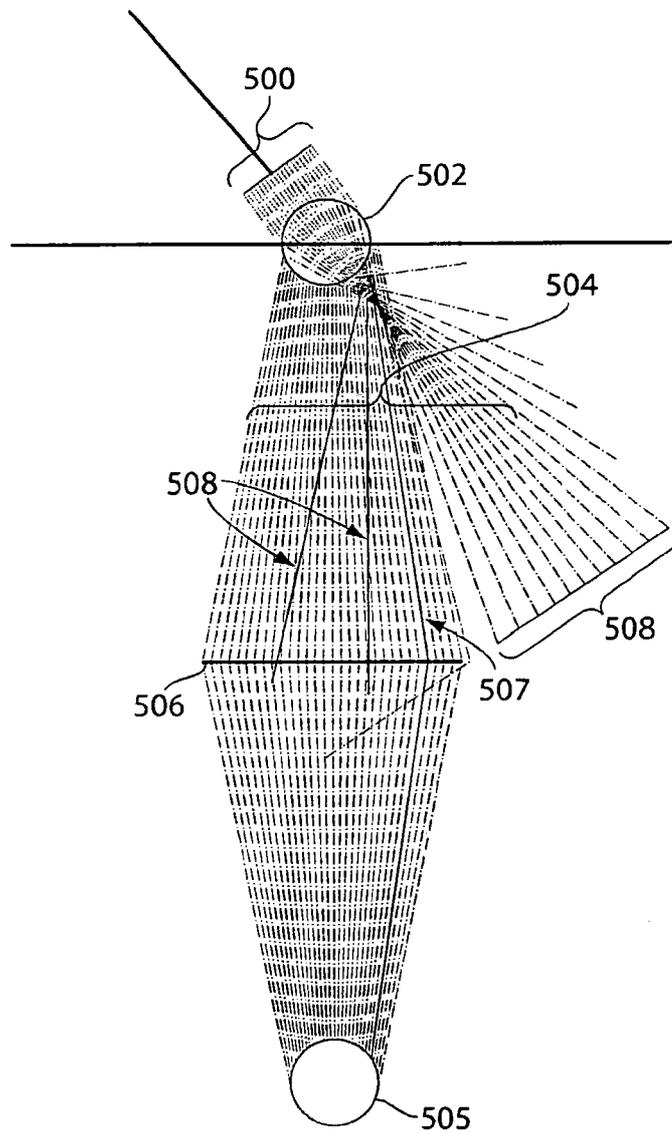


图 34

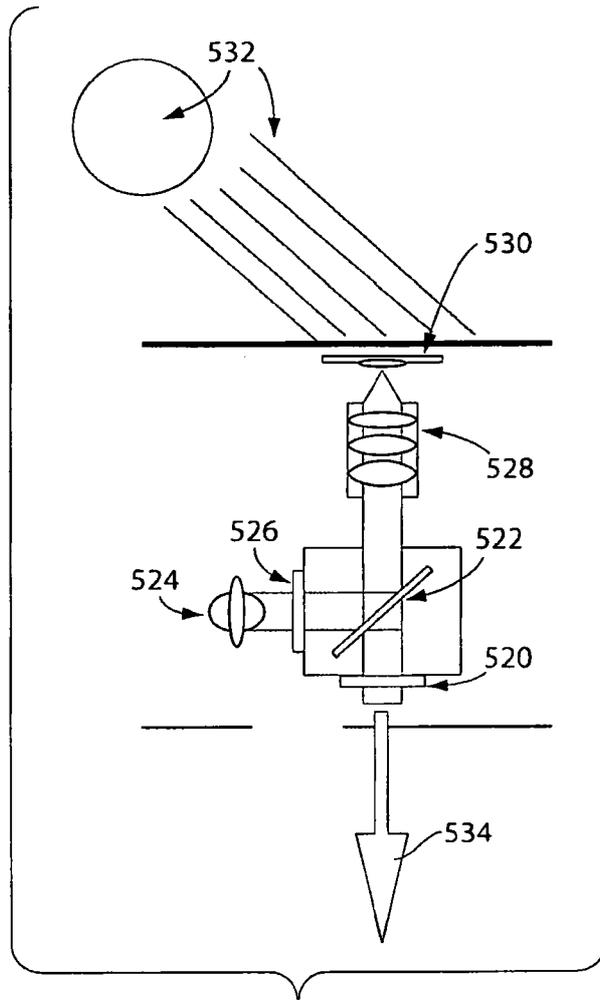


图 35

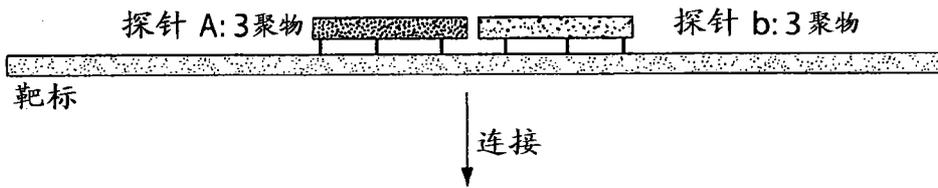


图 36A

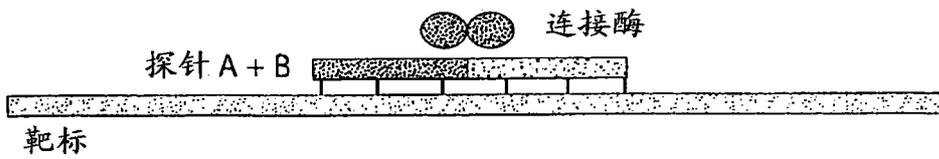


图 36B

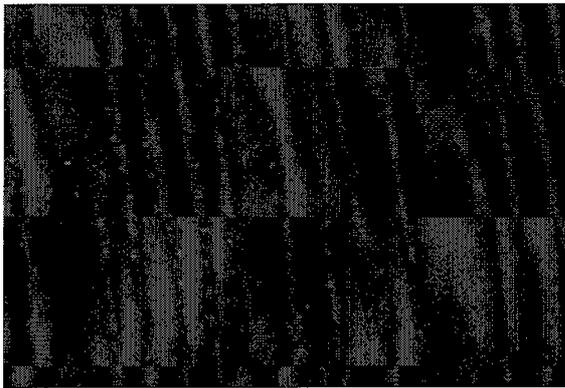


图 37

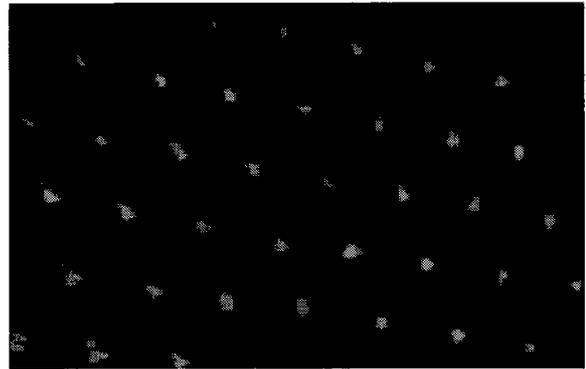


图 38

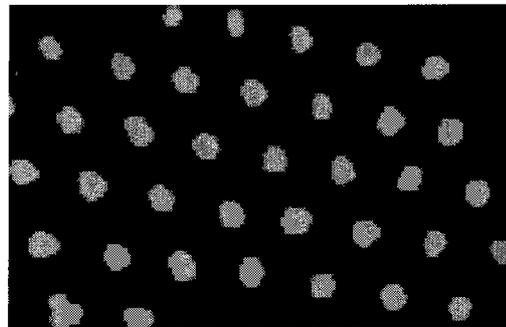


图 39A

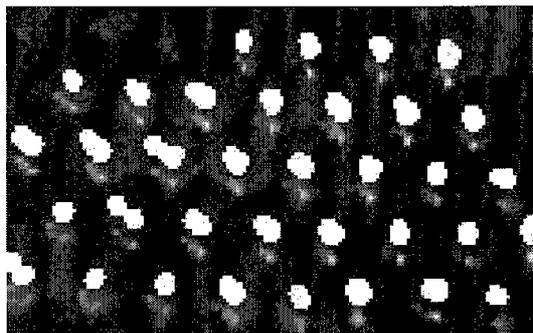


图 39B

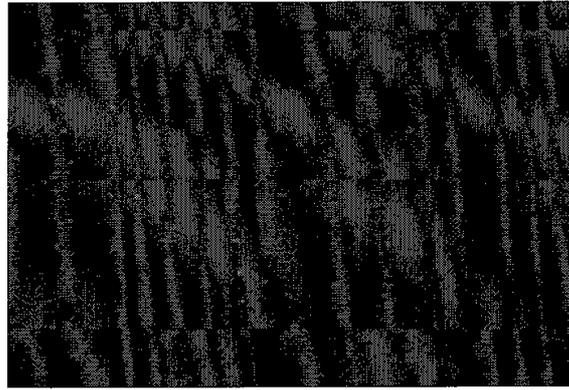


图 40

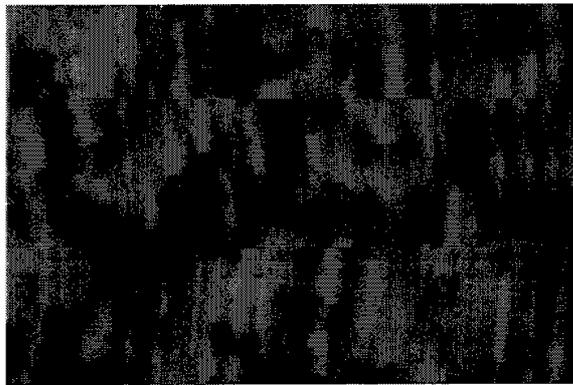


图 41

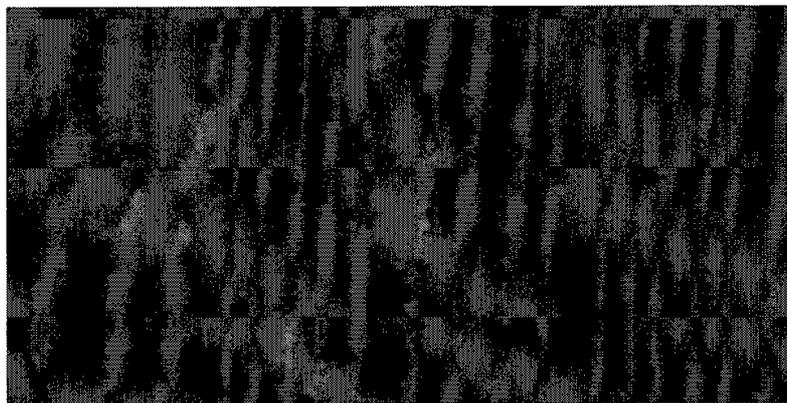


图 42

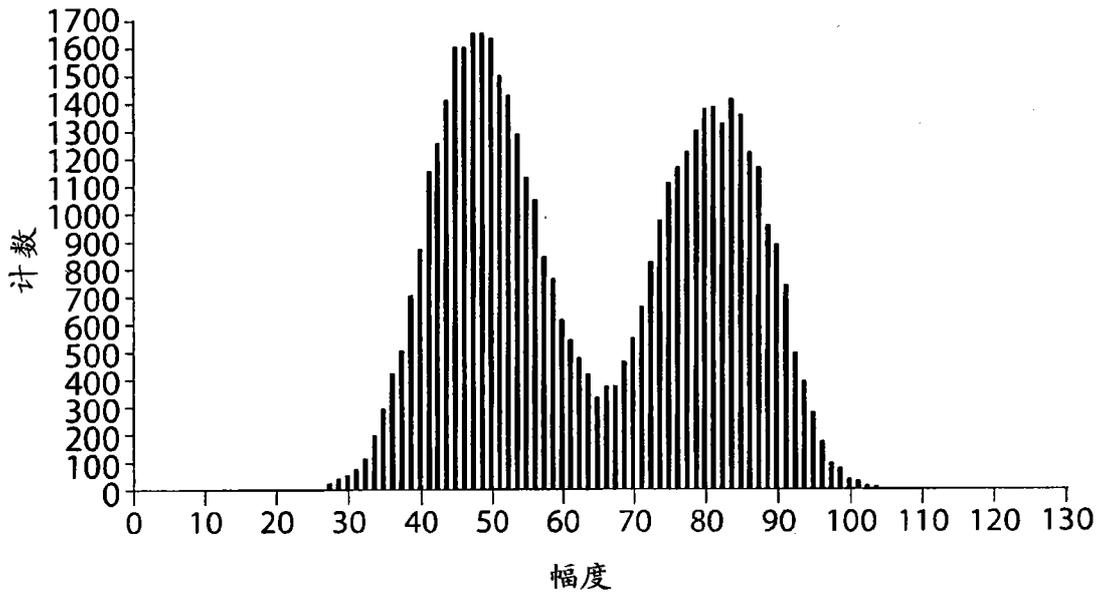


图 43A

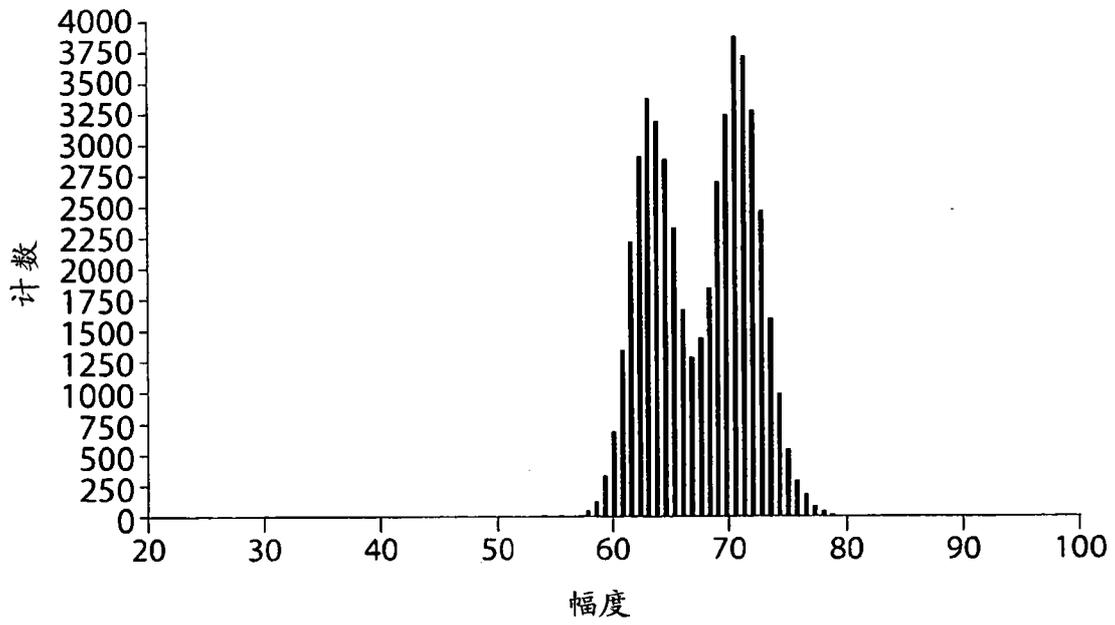


图 43B

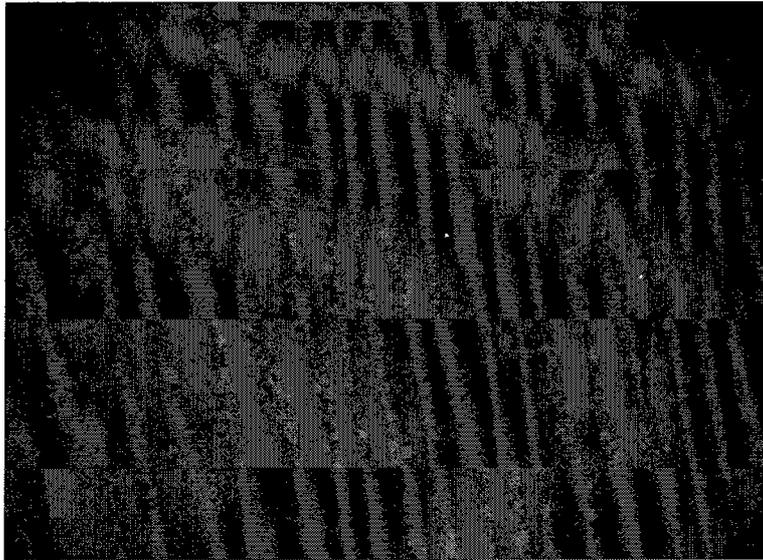


图 44

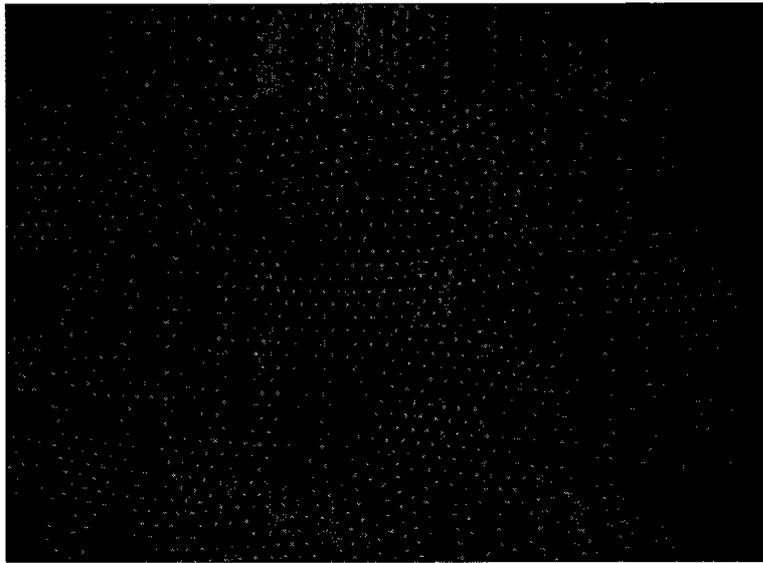


图 45