

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12M 1/34

C12Q 1/68

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98803852.8

[43]公开日 2000年4月26日

[11]公开号 CN 1251609A

[22]申请日 1998.2.11 [21]申请号 98803852.8

[30]优先权

[32]1997.2.12 [33]US [31]60/037,921

[32]1997.11.5 [33]US [31]60/064,687

[86]国际申请 PCT/US98/03024 1998.2.11

[87]国际公布 WO98/35012 英 1998.8.13

[85]进入国家阶段日期 1999.9.29

[71]申请人 尤金·Y·查恩

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 尤金·Y·查恩

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

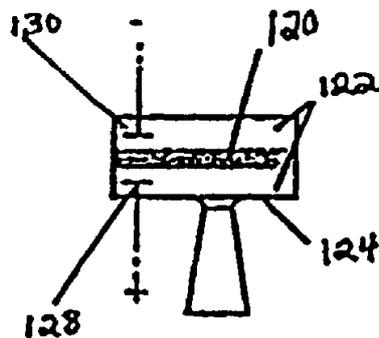
代理人 程伟

权利要求书 31 页 说明书 173 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 分析聚合物的方法和产品

[57]摘要

本发明提供分析聚合物的方法和产品。该方法包括聚合物的各种结构特性的确定方法。



ISSN 1008-4274

# 权利要求书

---

1. 一种分析链接单元聚合物的方法，包括：

将大量的聚合物个体单元暴露在选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂中；个体单元与所述试剂相互作用，产生可检测的信号；以及

依次检测来源于所述相互作用的信号，以便分析该聚合物。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述信号是电磁辐射。

3. 根据权利要求 2 的方法，其中所述试剂是电磁辐射。

4. 根据权利要求 3 的方法，其中在大量的聚合物个体单元中有一部分是带荧光团标记的。

5. 根据权利要求 3 的方法，其中：

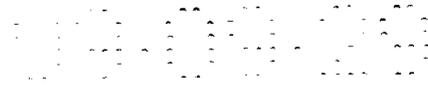
将大量的聚合物个体单元依次暴露在电磁辐射下，其方法是使大量的个体单元极接近光发射化合物并将光发射化合物暴露在电磁辐射下；以及

大量的聚合物个体单元对光发射化合物发射的电磁辐射具有可检测的影响。

6. 根据权利要求 3 的方法，其中：

将大量的聚合物个体单元依次暴露在电磁辐射下，以及

该电磁辐射可检测地影响大量的聚合物个体单元发射的电磁辐射，以产生可检测的信号。



7. 根据权利要求 5 的方法，其中对光发射化合物发射的电磁辐射具有可检测的影响的个体单元是带荧光团标记的。
8. 根据权利要求 5 的方法，其中光发射化合物附着在固体材料上。
9. 根据权利要求 3 的方法，其中大量的聚合物个体单元依次暴露在试剂下，其方法是使聚合物通过壁材料中的纳通道并且使大量的聚合物个体单元在该纳通道旁的相互作用测站暴露在试剂下。
10. 根据权利要求 9 的方法，其中所述聚合物通过壁材料中的纳通道，毗邻该纳通道有光发射化合物镶嵌在所述壁材料中，借此使大量的个体单元在聚合物通过该纳通道时与光发射化合物相互作用。
11. 根据权利要求 9 的方法，其中所述壁材料包括大量的纳通道和在该纳通道处的相互作用测站，并且该方法进一步包括使大量的聚合物通过所述纳通道而且在任何给定时刻每个纳通道都只有一种聚合物，以及同时检测由于聚合物个体单元在所述相互作用测站与试剂相互作用而产生的信号。
12. 根据权利要求 1 的方法进一步包括将所述的受检信号储存在数据库中。
13. 根据权利要求 2 的方法进一步包括将受检信号与来自另一种聚合物的签字进行比较，以确定两种聚合物的亲缘关系。

14. 根据权利要求 2 的方法进一步包括将受检信号与代表已知聚合物特征的已知的签字进行比较, 以确定被分析的聚合物与已知聚合物的亲缘关系。
15. 根据权利要求 2 的方法, 其中大量的个体单元是两种单元, 第一单元在聚合物第一端, 第二单元在聚合物第二端。
16. 根据权利要求 15 的方法进一步包括测量在检测来自第一单元的第一信号与检测来自第二单元的第二信号之间所间隔的时间长度。
17. 根据权利要求 2 的方法进一步包括测量依次检测各个信号的时间间隔。
18. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述个体单元中第一单元与试剂相互作用产生第一可检测信号, 所述个体单元中第二单元与试剂相互作用产生不同于第一可检测信号的第二可检测信号。
19. 根据权利要求 1-18 的方法, 其中聚合物是核酸。
20. 根据权利要求 1-18 的方法, 其中只有一部分聚合物单元是带标记的。
21. 根据权利要求 1-18 的方法, 其中只有一部分聚合物单元是带标记的而且是随机加标记的。
22. 根据权利要求 1-18 的方法, 其中所述聚合物至少有两种单元被加上不同标记, 以便产生两种不同的可检测信号。

23. 根据权利要求 1 的方法，其中将大量的聚合物个体单元暴露在至少两种试剂之下，而且聚合物单元与至少两种试剂之间的相互作用将产生至少两种信号。
24. 根据权利要求 23 的方法，其中至少两种试剂定位在聚合物所经通道的不同的区域中。
25. 根据权利要求 23 的方法，其中所述至少两种信号是不同的信号。
26. 根据权利要求 23 的方法，其中所述至少两种信号是相同的信号。
27. 根据权利要求 9 的方法，其中纳通道固定在壁中。
28. 根据权利要求 1 的方法，其中所述单元在测站中暴露在试剂下，而且所述测站是非配位体材料。
29. 一种分析链接单元聚合物的方法，包括：

使大量的链接单元聚合物的个体单元相对测站移动；以及

依次检测由于个体单元通过所述测站时在所述聚合物或所述测站中所发生的可检测的物理变化而产生的信号。
30. 根据权利要求 29 的方法，其中所述测站是相互作用测站，而且在所述相互作用测站将个体单元暴露在与它相互作用的试剂下，产生所述的相互作用的特征性的可检测电磁辐射信号。

31. 根据权利要求 29 的方法，其中所述测站是信号发生测站而且所产生的特征信号是随聚合物变化的脉冲。

32. 一种分析链接单元聚合物的方法，包括：

将大量的聚合物个体单元暴露在测站中，以便产生由于所述聚合物单元暴露在该测站中所导致的非离子传导信号，其中所述测站附着在壁材料上，该材料具有定义通道的表面。

33. 一种识别聚合物个体单元的方法，包括：

将聚合物的个体单元短暂地暴露在选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂下，其中个体单元的身份是未知的，以便与代表所述个体单元特征的可检测电磁辐射信号产生相互作用；

检测所述信号；以及

将所述信号作为所述个体单元的身份的指示与聚合物中产生信号的毗邻单元所产生的信号区分开。

34. 根据权利要求 33 的方法，其中试剂是一种或多种荧光团，通过将个体单元定位在该试剂的能量转移距离内使该个体单元短暂地暴露在试剂下，并通过检测该试剂与该个体单元之间的荧光能量转移来检测所述信号。

35. 根据权利要求 34 的方法，其中所述试剂至少包括三种荧光团。

36. 根据权利要求 33-34 的方法，其中聚合物的个体单元暴露在试剂下，其方法是将该个体单元定位在包括壁材料中的纳通道的相互作用测站。
37. 根据权利要求 36 的方法，其中所述壁材料包括两层，一层是传导的，另一层是非传导的，而纳通道横穿这两层。
38. 一种识别聚合物个体单元的方法，包括：
- 让聚合物的个体单元瞬时地相对某个站移动，该个体单元的身份是未知的；
- 检测由于在该单元或该测站中发生的可检测的物理变化所产生的信号；以及
- 将所述信号作为该个体单元的身份的指示与由于聚合物中产生信号的毗邻单元暴露在该测站中所产生的信号区分开。
39. 根据权利要求 38 的方法，其中所述测站是相互作用测站，而个体单元在该相互作用测站暴露在与该个体单元相互作用的试剂下，以产生代表所述相互作用特征的可检测电磁辐射信号。
40. 根据权利要求 38 的方法，其中所述测站是信号发生测站，而且所产生的信号是随聚合物变化的脉冲。

41. 一种确定链接单元聚合物的两种个体单元接近程度的方法，包括：

相对某个测站移动该聚合物；

将个体单元暴露在所述测站中，以产生由于在该单元或该测站中发生的可检测的物理变化而产生的特征信号；

检测所产生的特征信号；以及

测量在检测这些特征信号之间的时间间隔，该时间间隔的长短反映出两种个体单元之间的接近程度。

42. 根据权利要求 41 的方法，其中所述测站是相互作用测站，而且个体单元在该相互作用测站暴露在与该个体单元相互作用的试剂下，以产生代表所述相互作用特征的可检测电磁辐射信号。

43. 根据权利要求 42 的方法，其中所述试剂选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源。

44. 根据权利要求 41 的方法，其中所述测站是信号发生测站，而且所产生的信号是随聚合物变化的脉冲。

45. 根据权利要求 41-44 的方法，其中所述聚合物是核酸。

46. 根据权利要求 41-43 的方法，其中所述聚合物个体单元是带荧光团标记的。

47. 根据权利要求 41-46 的方法，其中两种个体单元是被随机地加上标记的聚合物个体单元。

48. 根据权利要求 42-43 的方法，其中所述相互作用测站包括在壁材料中的纳通道。
49. 一种确定链接单元聚合物的两种个体单元的次序的方法，包括：
- 使该聚合物相对某个测站作直线运动；
  - 使个体单元之一暴露在所述测站中，以产生由于在该单元或该测站中发生的可检测的物理变化而出现的信号；
  - 使另外的个体单元暴露在所述测站中，以产生由于在该单元或该测站中发生的可检测的物理变化而出现的不同于第一信号的第二可检测的信号；以及
  - 确定这些信号的次序作为两种个体单元的次序指数。
50. 根据权利要求 49 的方法，其中所述测站是相互作用测站，而所述个体单元之一在该相互作用测站暴露在与一种个体单元相互作用的试剂下以产生第一可检测的电磁辐射信号；接下来让另一种个体单元在该相互作用测站暴露在与另一种个体单元相互作用的试剂下以产生第二可检测的电磁辐射信号。
51. 根据权利要求 50 的方法，其中所述试剂选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源。
52. 根据权利要求 49 的方法，其中所述测站是信号发生测站而且所产生的信号是随聚合物变化的脉冲。
53. 根据权利要求 49-52 的方法，其中聚合物是核酸。

54. 根据权利要求 49-51 的方法，其中聚合物的个体单元是带荧光团标记的。
55. 根据权利要求 49-52 的方法，其中聚合物的个体单元是被随机地加上标记的聚合物个体单元。
56. 根据权利要求 50-51 的方法，其中相互作用测站包括在壁材料中的纳通道。
57. 一种确定链接单元聚合物中两种个体单元的距离的方法，包括：
- (1) 相对某个测站直线输送该聚合物；
  - (2) 检测每种个体单元在所述测站旁通过时所产生的特征信号；
  - (3) 测量被测信号之间的时间间隔；
  - (4) 对大量的同类聚合物重复步骤 1、2 和 3 以产生一组数据；以及
  - (5) 依据从所述大量的同类聚合物获得的信息通过分析该组数据确定两种个体单元之间的距离。
58. 根据权利要求 57 的方法，其中所述测站是信号发生测站。
59. 根据权利要求 58 的方法，其中所述特征信号是随聚合物变化的脉冲。
60. 根据权利要求 57 的方法，其中步骤(2)包括测量所产生的电磁辐射信号。

61. 根据权利要求 57 的方法，其中大量的同类聚合物是同源的群体。
62. 根据权利要求 57 的方法，其中大量的同类聚合物是异源的群体。
63. 根据权利要求 57 的方法，其中大量的类似聚合物被随机地加上标记。
64. 根据权利要求 57-63 的方法，其中所述聚合物是核酸。
65. 根据权利要求 58 的方法，其中两种链接单元是在信号发生测站通过测量该测站的光辐射进行检测的。
66. 根据权利要求 57 的方法，其中步骤(1)-(4)本质上是同时执行的。
67. 根据权利要求 57 的方法，其中所述测站是相互作用测站，而且该相互作用测站是纳通道。
68. 一种制品，包括：
  - 壁材料，该材料具有定义通道的表面；
  - 试剂，该试剂选自附着在壁材料上与所述通道毗邻的电磁辐射源、猝灭源、发光膜层和荧光激发源，而且该试剂离所述通道非常近且有足够的剂量，足以与通过所述通道的配偶化合物发生可检测的相互作用，其中所述配偶化合物选自光发射化合物、光接收化合物、辐射化合物和猝灭剂。
69. 根据权利要求 68 的制品，其中所述试剂是电磁辐射源，而且该电磁辐射源是光发射化合物。

70. 根据权利要求 69 的制品，其中所述通道是微通道。
71. 根据权利要求 69 的制品，其中所述通道是纳通道。
72. 根据权利要求 69 的制品，其中定义微通道的壁材料表面是没有光发射化合物的。
73. 根据权利要求 69 的制品，其中所述光发射化合物附着在所述壁材料的外表面上。
74. 根据权利要求 73 的制品，其中所述光发射化合物附着在链接物上，该链接物附着在所述壁材料外表面上。
75. 根据权利要求 73 的制品，其中所述光发射化合物集中在壁材料外表面的某个区域，该区域在一部分通道的周围。
76. 根据权利要求 73 的制品进一步包括有开口的掩膜层，该掩膜层只允许局部区域的光发射化合物露出。
77. 根据权利要求 69 的制品进一步包括不同于附着在壁材料上毗邻所述通道的第一光发射化合物的第二光发射化合物，其中所述光发射化合物非常接近所述通道而且其剂量足以与通过所述通道的配偶光发射化合物发生相互作用。
78. 根据权利要求 73-76 的制品，其中毗邻所述光发射化合物的壁材料外表面是传导层。
79. 根据权利要求 78 的制品，其中所述壁材料包括两层，传导层和非传导层。

80. 根据权利要求 73-76 的制品，其中所述壁材料至少包括两层，第一层阻止信号发生而第二层允许信号发生。
81. 根据权利要求 73-76 的制品，其中毗邻所述光发射化合物的壁材料外表面是不透光层。
82. 根据权利要求 80 的制品，其中所述壁材料包括两层，不透光层和透光的支撑层。
83. 根据权利要求 69 的制品，其中所述光发射化合物镶嵌在所述壁材料中。
84. 根据权利要求 83 的制品，其中所述光发射化合物集中在所述壁材料的某个区域，该区域在一部分通道的周围。
85. 根据权利要求 84 的制品，其中所述光发射化合物在一部分通道周围的所述壁材料中形成同心环。
86. 根据权利要求 83 的制品进一步包括不同于附着在壁材料上毗邻该通道的第一光发射化合物的第二光发射化合物，其中所述光发射化合物离该通道足够近且有足够的剂量，足以与通过该通道的配偶光发射化合物发生可检测的相互作用。
87. 根据权利要求 86 的制品，其中第二光发射化合物镶嵌在壁材料中。
88. 根据权利要求 83-87 的制品，其中所述壁材料包括毗邻光发射化合物第一侧的第一传导层。



89. 根据权利要求 88 的制品，其中所述壁材料包括毗邻光发射化合物第二侧的第二传导层，第一和第二层将光发射化合物夹在当中。
90. 根据权利要求 83-87 的制品，其中所述壁材料包括非传导材料，而光发射化合物镶嵌在所述非传导材料中。
91. 根据权利要求 83-87 的制品，其中所述壁材料包括在光发射化合物的第一侧的第一不透光层。
92. 根据权利要求 91 的制品，其中所述壁材料包括在光发射化合物的第二侧上的第二不透光层，第一和第二层将光发射化合物夹在当中。
93. 根据权利要求 83-87 的制品，其中壁材料是透光材料。
94. 根据权利要求 93 的制品，其中光发射化合物镶嵌在该透光材料中。
95. 根据权利要求 69-86 的制品，其中光发射化合物镶嵌在透光材料层中。
96. 根据权利要求 89 的制品，其中光发射化合物镶嵌在透光材料层中。
97. 根据权利要求 68 的制品，其中所述光发射化合物是荧光化合物。
98. 根据权利要求 69 的制品，其中纳通道的长度介于 500 埃至 1 毫米之间。

99. 根据权利要求 68 的制品，其中通道宽度介于 1 至 500 埃之间。
100. 根据权利要求 68 的制品，其中所述壁材料是由两层构成的，彼此附着的第一不透光层和发光膜层，并且其中所述通道穿过这两层延伸并且是由这两层的表面定义的。
101. 根据权利要求 100 的制品，其中所述通道是纳通道。
102. 根据权利要求 101 的制品进一步包括第二不透光层，发光膜层夹在第一和第二不透光层之间。
103. 根据权利要求 101-102 的制品，其中定义通道的表面包括没有发光膜层材料的不透光层表面。
104. 根据权利要求 100-103 的制品，其中通道长度介于 500 埃至 1 毫米之间。
105. 根据权利要求 68 的制品，其中试剂是荧光激发源，而且该荧光激发源是闪烁层。
106. 根据权利要求 105 的制品，其中闪烁层选自 NaI(Tl)、ZnS(Ag)、蒽、苝和塑料磷光体。
107. 根据权利要求 105 的制品，其中闪烁层镶嵌在壁材料中，夹在两个不透辐射层之间。

**108.**一种制品，包括：

壁材料，该材料具有定义大量通道的表面；

测站，所述测站附着在壁材料的离散区域中并且至少毗邻一个所述通道，其中所述站离所述通道足够近且有足够的数量，足以使信号在聚合物暴露在所述测站中时出现，这是由于在通过该通道的链接单元聚合物中或在所述测站中发生了可检测的物理变化。

**109.**根据权利要求 108 的制品，其中所述测站是相互作用测站，而且该相互作用测站是电磁辐射源。

**110.**根据权利要求 108 的制品，其中壁材料是由两层构成的，彼此附着的第一不透光层和发光膜层，而所述通道穿过这两层延伸并且是由这两层的表面定义的。

**111.**根据权利要求 108 的制品，其中所述测站是信号发生测站，而且该信号发生测站产生随聚合物变化的脉冲。

**112.**根据权利要求 108 的制品，其中所述测站是电磁辐射源，而且该电磁辐射源是闪烁膜。

**113.**根据权利要求 112 的制品，其中闪烁膜镶嵌在壁材料中，夹在两个不透辐射的膜层之间。

**114.**根据权利要求 109-113 的制品，其中所述通道是微通道。

**115.**根据权利要求 109-113 的制品，其中所述通道是纳通道。

116. 一种制品，包括：

壁材料，该材料具有定义通道的表面；

大量的测站，每个测站都附着在壁材料的离散区域中并且毗邻该通道，其中所述测站离该通道足够近并且有足够的数量，足以使在聚合物暴露于该测站中时出现信号，这是由于在通过该通道的链接单元聚合物中或在该测站中发生了可检测的物理变化。

117. 根据权利要求 116 的制品，其中所述测站是相互作用测站。

118. 根据权利要求 116 的制品，其中所述测站是信号发生测站。

119. 根据权利要求 116 的制品，其中所述测站是电磁辐射源，而且该电磁辐射源是闪烁膜。

120. 根据权利要求 117-119 的制品，其中所述通道是微通道。

121. 根据权利要求 117-119 的制品，其中所述通道是纳通道。

122. 一种分析链接单元聚合物的方法，包括：

(1) 提供带标记的链接单元聚合物；

(2) 依次检测来自小于所有链接单元的单元特殊标记物的信号；以及

(3) 储存所述受检信号的签字，以便分析该聚合物。

123. 根据权利要求 122 的方法，其中所述信号是沿直线检测的。

124. 根据权利要求 122 的方法，其中信号的签字是至少 10 个信号。

125. 根据权利要求 122 的方法，其中信号的签字定义单元特异性标记物的次序。
126. 根据权利要求 122 的方法，其中信号的签字定义单元特异性标记物之间的距离。
127. 根据权利要求 122 的方法，其中信号的签字定义单元特异性标记物的数量。
128. 根据权利要求 122 的方法，其中所有单元特异性标记物都被检测。
129. 根据权利要求 122 的方法，其中只有一部分单元特异性标记物被检测。
130. 根据权利要求 122 的方法，其中用单元特异性标记物随机地给部分所述聚合物加上标记。
131. 根据权利要求 129 的方法，其中用单元特异性标记物给所有聚合物单元加上标记。
132. 根据权利要求 122 的方法，其中带标记物的链接单元聚合物暴露在选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂下，而且所述信号是由所述聚合物的单元特殊标记物与试剂之间的相互作用产生的。
133. 根据权利要求 122 的方法，其中带标记物的链接单元聚合物相对某个测站移动，并且在所述聚合物的单元特异性标记物暴露在该测站中时产生信号。

134. 根据权利要求 122 的方法，其中该方法是识别聚合物的单元特异性标记物的方法，单元特异性标记物的身份至少代表一种聚合物单元的身份，而且将单元特殊标记物瞬间暴露在某个测站中，以产生代表所述单元的特异性标记物特征的信号，并且进一步包括一个区分步骤，该步骤将所述信号作为该单元特异性标记物的身份的指示与聚合物中产生信号的毗邻的单元特异性标记物所产生的信号区分开。
135. 根据权利要求 134 的方法，其中所述测站是选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂，而所述信号是可检测的电磁辐射信号。
136. 根据权利要求 122 的方法，其中所述方法是确定聚合物中两种单元特异性标记物接近程度的方法，其中两种单元特异性标记物的接近程度是所述信号的签字，每种单元特异性标记物的身份反映出至少一种聚合物单元的身份，其中带标记的聚合物相对某个测站移动，使两种单元特异性标记物暴露在所述的测站中，以便产生由于在单元特异性标记物或所述测站中发生的可检测的物理变化而出现的特征信号；并且进一步包括测量时间间隔的步骤，该步骤测量在检测每个特征信号之间的时间间隔的长短，该时间间隔的长短反映出两种单元特异性标记物的接近程度。

137. 根据权利要求 122 的方法，其中所述方法是确定聚合物的两种单元特异性标记物的次序的方法，每种单元特异性标记物的身份反映至少一种聚合物单元的身份，其中两种单元特异性标记物的次序是所述信号的签字，其中带标记的聚合物相对某个测站作直线运动，使单元特异性标记物之一暴露在所述测站中以产生作为信号的签字的信号，然后使另一种单元特异性标记物暴露在所述测站中以产生作为所述信号签字的不同于第一信号的第二可检信号；并且该方法进一步包括一个确定次序的步骤，该步骤确定这些信号的次序作为两种单元特异性标记物的次序指数。
138. 根据权利要求 122 的方法，其中所述方法是确定聚合物的两种单元特异性标记物之间的距离的方法，每种单元特异性标记物的身份反映至少一种聚合物单元的身份，其中两种单元特异性标记物的距离是所述信号的签字，其中带标记的聚合物相对某个测站作直线运动，以便在每种单元特异性标记物在所述测站旁经过时产生特征信号；并且进一步包括一个确定距离的步骤，该步骤确定这些信号之间的距离作为两种单元特异性标记物之间的距离指数。
139. 一种制备壁材料的方法，包括将光发射化合物或猝灭剂通过共价键键合到壁材料的众多离散位置上，在所述壁材料上每个所述离散位置都非常接近各自的相互作用测站，借此当能够与所述光发射化合物或猝灭剂发生相互作用产生信号的聚合物个体单元定位于所述相互作用测站时该光发射化合物或猝灭剂与该个体单元相互作用产生所述信号。

140. 根据权利要求 139 的方法，其中光发射化合物或猝灭剂在所述壁材料中通过共价键键合到接近通道的离散位置上，所述通道定义相互作用测站。
141. 根据权利要求 140 的方法，其中所述通道是纳通道。
142. 根据权利要求 140 的方法，其中所述通道是微通道。
143. 根据权利要求 140 的方法，其中光发射化合物或猝灭剂通过共价键以某种方式键合到壁材料上，借此使定义通道的壁材料表面没有光发射化合物和猝灭剂。
144. 根据权利要求 141 的方法，其中光发射化合物或猝灭剂通过共价键以某种方式键合到壁材料上，借此使定义通道的壁材料表面没有光发射化合物和猝灭剂。
145. 根据权利要求 141-144 的方法进一步包括将传导材料层施于所述壁材料。
146. 一种使化学基材附着到穿过不透明的壁材料的通道边缘上的方法，包括：  
提供带光保护的化学基团的壁材料，其中带光保护的化学基团有选择地附着在穿过该壁材料的通道边缘上；  
将光线施于带光保护的化学基团，以去除对该化学基团的光保护；以及  
将化学基材施加到去除了保护的化学基团上。
147. 根据权利要求 146 的方法，其中只将光线施加在定义通道边缘的壁材料表面的选定区域。

148. 根据权利要求 146 的方法，其中所述通道具有第一端和第二端，所述边缘在第一端，而光线施加在第二端上，光线穿越通道与在所述第一端的带光保护的化学基团接触。
149. 根据权利要求 146-148 的方法，其中所述通道是微通道。
150. 根据权利要求 146-148 的方法，其中所述通道是纳通道。
151. 一种制备壁材料的方法，其中所述壁材料具有在壁材料表面上定域的光发射区，该方法包括：
- 提供具有表面的壁材料；以及
  - 将光发射化合物施加到该表面上，以便在该表面上产生定域的光发射区，其中所述定位区定义检测光发射的靶区，而且该靶区是穿越该壁材料的通道的边缘。
152. 根据权利要求 151 的方法进一步包括下述步骤：
- 将带光保护的化学基团附着到壁材料表面上；
  - 将光线施加给带光保护的化学基团以便在附着光发射化合物之前去除对该化学基团的保护；以及
  - 使光发射化合物附着到去除了光保护的化学基团上。
153. 根据权利要求 152 的方法，其中光线只施加给定义通道边缘的壁材料表面的选定区域。
154. 根据权利要求 152 的方法，其中带光保护的化学基团只附着在定义通道边缘的壁材料表面的选定区域。

155. 根据权利要求 152 的方法，其中所述通道具有第一端和第二端，所述边缘在第一端，而光线施加在第二端上，光线穿过通道与在所述第一端的带光保护的化学基团接触。

156. 根据权利要求 152-155 的方法，其中所述通道是微通道。

157. 根据权利要求 152-155 的方法，其中所述通道是纳通道。

158. 根据权利要求 151 的方法进一步包括将具有开口的掩膜定位在壁材料表面上的步骤，以致只有定域的光发射区通过掩膜的开口露出。

159. 根据权利要求 158 的方法，其中所述光发射化合物附着在一部分壁材料表面上。

160. 一种检测两种相互影响的配偶化合物之间所能发生的能量共振转移或猝灭的方法，该方法包括：

将这两种配偶化合物带到足够接近的距离，为发生这种转移或猝灭创造条件；

将试剂施加给所述配偶之一，该试剂选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源；

用某种材料防护使荧光能量共振转移和猝灭的发生不受电磁辐射发射和所述配偶之间的相互作用的影响；以及

检测发射的电磁辐射。



**161.**一种检测信号的装置，包括：

带缓冲舱的壳体；

定义缓冲舱部分并具有许多用于矫直聚合物的开口的壁；

相对所述壳体固定的敏感元件，该敏感元件将每个开口发射的信号与其它开口发射的信号区分开，以产生随开口变化的敏感元件信号；以及

收集和储存所述信号的存储器。

**162.**根据权利要求 161 的装置，其中所述敏感元件是光敏元件并且该光敏元件感受许多开口发射的电磁辐射信号。

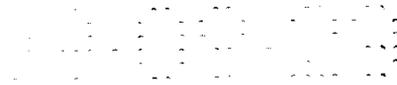
**163.**根据权利要求 161 的装置进一步包括微处理器。

**164.**根据权利要求 161 的装置，其中所述开口是由壁上的微通道定义的。

**165.**根据权利要求 161 的装置，其中所述开口是由壁上的纳通道定义的。

**166.**根据权利要求 161-165 的装置，其中所述的“许多”至少是 50。

**167.**根据权利要求 161-165 的装置，其中所述装置进一步包括借助所述壁与所述第一缓冲舱分开的第二缓冲舱，而且借助所述开口使两个缓冲舱彼此之间呈流体连通状态。



168. 根据权利要求 166 的装置，其中所述装置进一步包括借助所述壁与所述第一缓冲舱分开的第二缓冲舱，而且借助所述开口使两个缓冲舱彼此之间呈流体连通状态。
169. 根据权利要求 167 的装置进一步包括一对紧固在壳体上的电极，所述电极之一定位在第一缓冲舱中，另一个电极定位在第二缓冲舱中。
170. 一种检测信号的装置，包括：
- 定义第一缓冲舱和第二缓冲舱的壳体；
  - 由壳体支撑并将第一和第二缓冲舱分开的壁；
  - 由所述壁定义并在第一和第二缓冲舱之间提供流体交换的许多开口；以及
  - 区分和收集随通道变化的信号的敏感元件。
171. 根据权利要求 170 的装置，其中所述通道是纳通道。
172. 根据权利要求 170 的装置，其中所述通道是微通道。
173. 根据权利要求 170 的装置，其中所述试剂选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源。
174. 根据权利要求 173 的装置，其中所述试剂是电磁辐射，而且所述电磁辐射是光发射化合物。
175. 根据权利要求 174 的装置，其中所述光发射化合物集中在壁上的通道处。

176.根据权利要求 170-175 的装置进一步包括使生物实体通过所述通道的装置。

177.一种描述试验聚合物特征的方法，包括：

针对大量的聚合物获取随聚合物变化的脉冲；

对从大量的聚合物获取的随聚合物变化的脉冲进行比较；

基于这些聚合物的随聚合物变化的脉冲之间的相似性确定这些聚合物的亲缘关系；以及

基于相关聚合物的随聚合物变化的脉冲描述试验聚合物的特征。

178.根据权利要求 177 的方法，其中大量的聚合物是同源的群体。

179.根据权利要求 177 的方法，其中大量的聚合物是异源的群体。

180.根据权利要求 177 的方法，其中所述聚合物被随机地加上标记。

181.根据权利要求 177 的方法，其中所述聚合物是至少有两种不同的链接单元的聚合物，而且所述的至少两种不同的链接单元都是带标记的，以便产生不同的信号。

182.根据权利要求 177-181 的方法，其中所述聚合物是核酸。

183.根据权利要求 182 的方法，其中所获得的随聚合物变化的脉冲包括随聚合物变化的脉冲次序。

184. 根据权利要求 182 的方法，其中所获得的随聚合物变化的脉冲包括特殊信号之间的时间间隔。

185. 根据权利要求 182 的方法，其中获取随聚合物变化的脉冲的方法是让大量的聚合物作直线运动使它们经过信号发生测站。

186. 根据权利要求 182 的方法，其中所获得的随聚合物变化的脉冲包括随聚合物变化的脉冲数。

187. 一种为链接单元聚合物测序的方法，包括：

从大量的重叠聚合物获取随聚合物变化的脉冲，每种聚合物至少有一部分具有与其余的聚合物相同的链接单元序列；以及

比较这些随聚合物变化的脉冲，以获得在大量的聚合物中相同的链接单元序列。

188. 根据权利要求 187 的方法，其中随聚合物变化的脉冲是可以光学方法检测的。

189. 根据权利要求 187 的方法，其中大量的聚合物是同源的群体。

190. 根据权利要求 187 的方法，其中大量的聚合物是异源的群体。

191. 根据权利要求 187 的方法，其中大量的聚合物被随机地加上标记。

192. 根据权利要求 187-191 的方法，其中所述聚合物是核酸。

193. 根据权利要求 193 的方法，其中用选自电磁辐射源、猝灭源和荧光激发源的试剂给所述核酸加上标记。

194. 一种给核酸加标记的方法，包括：

使正在分裂的细胞与核苷酸类似物接触；

分离已与核苷酸类似物合并的细胞核酸；以及

通过给并入的核苷酸类似物加标记来修改与核苷酸类似物合并的核酸。

195. 根据权利要求 194 的方法，其中核苷酸类似物是溴化的类似物。

196. 根据权利要求 194 的方法，其中使分裂细胞与核苷酸类似物接触的方法是：

在细胞分裂周期中阻止细胞生长；

完成接触步骤；以及

允许细胞再次进入细胞分裂周期。

197. 根据权利要求 194 的方法，其中在细胞已经再次进入并完成细胞分裂周期之后和完成下一个细胞分裂周期之前分离所述核酸。

198. 根据权利要求 194-197 的方法，其中被并入的核苷酸类似物是用选自电磁辐射源、猝灭源、荧光激发源和辐射源的试剂加标记的。

199. 一种确定链接单元聚合物的单元次序的方法，包括：

- (1) 让聚合物相对某个测站作直线运动；
- (2) 测量每个个体单元在经过所述测站的旁边时所产生的随聚合物变化的脉冲，即两种个体单元各产生一种特征信号；
- (3) 针对大量的同类聚合物重复步骤(1)和(2)；
- (4) 依据从所述大量的同类聚合物获得的信息确定至少两种个体单元的次序。

200. 根据权利要求 199 的方法，其中所述测站是信号发生测站。

201. 根据权利要求 199 的方法，其中所述测站是相互作用测站。

202. 根据权利要求 199 的方法，其中步骤(2)包括测量所产生的电磁辐射信号。

203. 根据权利要求 199 的方法，其中大量的同类聚合物是同源的群体。

204. 根据权利要求 199 的方法，其中大量的同类聚合物是异源的群体。

205. 根据权利要求 199 的方法，其中所述聚合物是核酸。

206. 一种分析一组聚合物的方法，所述组中的每种聚合物都是独立的链接单元聚合物，该方法包括：

使这组聚合物彼此平行地取向，以及  
检测所述聚合物特有的聚合物特征。

207. 根据权利要求 206 的方法，其中所述聚合物是通过施加电场取向的。
208. 根据权利要求 206 的方法，其中所述特有的聚合物特征是在聚合物中链接单元的次序。
209. 根据权利要求 206 的方法，其中检测步骤是针对所述聚合物同时完成的。
210. 根据权利要求 206 的方法，其中检测步骤包括测量电磁辐射信号。
211. 根据权利要求 206 的方法，其中检测步骤包括使所述聚合物相对大量的信号发生测站作直线运动以及检测和区分在所述聚合物通过所述相互作用测站时所产生的信号。
212. 根据权利要求 206-211 的方法，其中所述聚合物是同源的群体。
213. 根据权利要求 206-211 的方法，其中所述聚合物是异源的群体。
214. 根据权利要求 206-211 的方法，其中所述聚合物被随机地加上标记。
215. 根据权利要求 206-211 的方法，其中取向步骤是在无凝胶的溶液中进行。

216. 一种分析一组聚合物的方法，该组中每种聚合物都是独立的链接单元聚合物，该方法包括：

使这组聚合物在电场中取向；

使这组聚合物同时移动，通过各自的通道；以及

在这些聚合物通过通道时检测特有的聚合物特征。

217. 根据权利要求 216 的方法，其中所述通道是纳通道。

218. 根据权利要求 216 的方法，其中所述特有的聚合物特征是在聚合物中链接单元的次序。

219. 根据权利要求 216 的方法，其中检测步骤是针对所述聚合物同时完成的。

220. 根据权利要求 216 的方法，其中检测步骤包括测量电磁辐射信号。

221. 根据权利要求 216 的方法，其中检测步骤包括使所述聚合物相对大量的信号发生测站作直线运动以及检测和区分在所述聚合物通过所述信号发生测站时所产生的随聚合物变化的脉冲。

222. 根据权利要求 216-221 的方法，其中所述聚合物是同源的群体。

223. 根据权利要求 216-221 的方法，其中所述聚合物是异源的群体。

224. 根据权利要求 216-221 的方法，其中所述聚合物被随机地加上标记。

225. 根据权利要求 216-221 的方法，其中取向步骤是在无凝胶的溶液中进行。

226. 一种用光学方法检测大量信号的装置，该装置包括：

带缓冲舱的壳体；

定义缓冲舱部分的壁材料，该壁包括聚合物相互作用测站；以及

紧固在壳体上的光敏元件，该光敏元件的结构和安排是为检测在相互作用测站发射的电磁辐射信号而设计的。

227. 一种可以利用大量的链接单元聚合物的特征信息应答有关请求的计算机系统，包括：

存储器，该存储器以利用聚合物独占的标志字访问每种聚合物的方式储存大量的聚合物的纪录，该纪录包括反映由于在大量的聚合物个体单元或聚合物暴露于其中的测站中发生可检测的物理变化而产生的依次受检信号的信息；以及

处理器，该处理器按照选定聚合物所独占的标志访问储存在所述存储器中的一种选定聚合物的纪录。

228. 根据权利要求 227 的系统，其中依次受检的信号是暴露在选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂下的大量的聚合物个体单元相互作用的结果。

229. 根据权利要求 227 的系统进一步包括：

比较设备，该设备将选定聚合物的依次受检信号与代表已知聚合物特征的签字进行比较，以确定选定的聚合物与已知聚合物的亲缘关系。

# 说明书

## 分析聚合物的方法和产品

### 本发明的背景技术

对分子和细胞生物学的研究正集中在细胞的宏观结构上。我们现在已经知道的是，细胞具有复杂的微观结构，它们决定着细胞的功能。与细胞结构和功能相关的众多的多样性都取决于该细胞将各种结构单元组装成各种化合物的能力。细胞正是通过将有限的称为单体的结构单元组装成聚合物而完成这一使命的。聚合物功能的多样化的关键基于聚合物内的单体的一级序列，而且对理解细胞功能的基础是不可或缺的，例如，为什么细胞在某一行为上有所不同，或者细胞将如何对某一药物治疗产生应答。

通过确定聚合物单体的序列而确定其结构的能力对于理解每种活性成分以及该成分在细胞中所扮演的角色都是不可缺少的。确定了聚合物的序列，就可以画出其表达图谱，确定其所表达的蛋白质，并理解为什么某些突变会引发疾病，以及确定在某一个单体缺失了或发生突变会使多糖具有更好的功能或丧失了功能。

表达图谱涉及对 mRNA 表达形式的确定。对于理解遗传编程，包括时序性和空间性的遗传编程，都十分需要对不同表达的 mRNA 予以鉴定。在有机体生命成长的不同时序过程中，不同的基因有时被启动或被关闭，包括胚胎期、成长期、以及老年期。除了这些成长期的变化之外，还有对各种刺激的应答性的短暂性变化，例如，受伤、药物、外源物、以及压力等。如果能够对某

种细胞应答刺激或在生长中的表达上的变化的及时地作出图来，则就可以产生所谓的暂时性表达图谱。另一方面，还有所谓的本体表达图谱，其包括不同组织和细胞类型的基因表达的区别性知识。表达图谱不仅在个体之间和物种之间有所不同，而且在患病和健康之间也有所不同。对区别性基因表达的检查可以得到对各种基因关键性的发现，例如，信号传导 (Smith et al., 1990)、昼夜节律 (Loros et al., 1989)、果实成熟 (Wilinson et al., 1995)、饥饿 (Qu et al., 1996)、细胞周期控制 (el-Deiry et al., 1993)、以及局部缺血损伤 (Wang et al., 1995) 等等。由于制作表达图谱涉及对 cDNA 或 mRNA 的测序和鉴定，所以，更快的测序就意味着更快地绘制众多基因表达图谱。

当前，只有约 1% 的人体基因组被测序，而对其它的基因组所已经进行的测序就更少了。此外，仅仅有一份不完全的利用表达序列标记而绘制出来的人体表达图谱 (Adams et al., 1995)。当前的基因组测序的方法是缓慢的，而且涉及众多的实验室工作，例如，克隆、建立基因组文库、选择菌落、以及测序等等。建立一个部分性的基因组文库所花费的时间都在几个月的数量级上。甚至，在建立了基因组文库后，还需要花费时间来制备用于测序的 DNA，以及进行实际测序的各个步骤。由于这些不利因素的不断增加的效果，很明显的是，对一个基因组进行测序也需要投入大量的金钱、时间、以及人力。

总的来说，现在对 DNA 的测序都采用两种方法中的一种。第一种方法比较普及，即由 Sanger 等人在 1977 年所描述的双脱氧链终止法。该方法涉及酶学方法合成终止于双脱氧核苷酸的 DNA 分子。使用 ddNTP，可以合成终止于靶标 DNA 的每个位置的 DNA 分子群体。随后进行的分析可以获得 DNA 分子长度和分子终止的碱基 (即 A、C、G 或 T) 的有关信息。根据这些信

息，可以确定 DNA 的序列。第二种方法是 Maxam-Gilbert 测序方法 (Maxam and Gilbert, 1977)，其利用化学降解来产生在靶标 DNA 的某些位置降解的分子。由于知道化学反应的特异性切割以及片段的长度，就可以产生 DNA 的序列。这两种方法都依赖于聚丙烯酰胺凝胶电泳和照相识别放射性的 DNA 片段。每种方法都需要 1-3 天时间。Sanger 测序反应每次仅能产生 300-800 个碱基。

已经提出了对采用 Sanger 方法的测序信息的结果进行改善的各种方法。这些以 Sanger 法为基础的方法包括多重测序、毛细管凝胶电泳、以及自动化凝胶电泳等等。最近，更多的兴趣在于开发独立于 Sanger 法的各种方法。这些独立于 Sanger 法的各种方法采用了完全不同的机制来获得碱基的信息。这类方法中包括着最新的技术，即包括扫描电子显微术 (SEM)、质谱法、酶荧光无机焦磷酸盐检测分析测序 (Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay, ELIDA)、外源核酸酶测序、以及杂交测序等。对这些方法的简要总结见本文后面的有关部分。

当前，自动化凝胶电泳是最为广泛采用的进行大规模测序的方法。该自动化方法需要对荧光标记的 Sanger 片段采用电荷耦合装置 (charge coupled device, CCD) 检测器来进行实时读取。对四种不同的双脱氧链终止反应采用不同的标记引物来进行。反应混合物被合并，并且在聚丙烯酰胺板上一起进行电泳。在凝胶的终端采用激光激发，可以获得分开的 DNA 片段，用计算机可以获得序列的信息。现在有很多商业化的自动化测序仪，它们各自都采用不同的检测方法和标记。其中最为有效的是实用生物系统型号 377XI (Applied Biosystems Model 377XI)，它每天可以处理的最大实际量为 115,200 碱基。

在毛细管凝胶电泳方法中，反应样品被直径很小的且充满了凝胶的毛细管所分析。直径很小的毛细管（50  $\mu\text{m}$ ）可以让电泳过程中的热量有效地散去。这样，就可以采用很高的场强而又没有过量的焦耳热（400 V/m），使每次反应的分离时间被降低到约 20 分钟。它们不仅更快速地分开了碱基，而且还比常规的凝胶电泳的分辨率高。进而，很多的毛细管被平行分析（Wooley and Mathies, 1995），就可以使产生的碱基信息强化（实际效率等于 200,000 碱基/天）。其最大的缺点是不能够连续地加载毛细管，因为新被填充的毛细管必须在每个反应进行的时候才准备出来。毛细管凝胶电泳仪已经在最近被商业化了。

多重测序是一种更为有效地利用电泳凝胶的方法（Church and Kieffer-Higgins, 1988）。首先将 Sanger 反应的样品用独特的寡聚体标记，随后在每条电泳的泳道上处理可以多达 20 个不同的样品。然后将样品印迹到膜上。再用相应于 Sanger 反应样品上的标记物的寡聚体按顺序地探察该印迹膜。随后对该印迹膜进行反复清洗和探察，直到所有 20 个样品的序列都被确定为止。虽然进行凝胶运行的次数被明显地降低了，但是，所需要进行的清洗和杂交的步骤也同进行凝胶电泳一样费力。其实际的测序速率与自动化凝胶电泳相近。

在八十年代的后期首次介绍了质谱仪的测序方法。该领域的最近的发展可以进行更好的序列测定（Crain, 1990; Little et al., 1994; Keough et al., 1993; Smirnov et al., 1996）。质谱仪测序首先需要创造一些相互之间在长度上仅仅相差一个碱基的嵌套 DNA。在一个示例中，用外源核酸酶部分地酶解了一个 33 聚体（Smirnov, 1996）。然后产生了一群具有相似的 5'端但不同的 3'终止点的分子。随后对该反应混合物进行分析。质谱仪的敏感度

足以区分各个片段之间的质量上的差异，从而获得有关的序列的信息。

相比于常规的方法，质谱仪测序是高度精确、廉价、以及迅速的方法。然而，其主要的限制是所读取的碱基的长度是在 10 的数量级上。即便是最好的方法，如矩阵辅助的激光解吸离子化时程（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight, MALDITOF）质谱仪，也只能最多读取 80-90 碱基对的长度。对更长的 DNA 的读取实际是不可能的，因为在分析步骤中那些更长的 DNA 在胍的地方断裂。因此，质谱仪测序仅限于很短的引物序列，而对大规模的测序没有实际应用价值。

扫描隧道电子显微术（STM）测序（Ferrell, 1997）方法是在 STM 被商业化的时候开发出来的。最初认为其可以用电子显微直接读取碱基对的信息，但是，这一点已经不再是可能的了。因为，必须将 DNA 分子放在导体上，一般是用高级别热解的石墨（HOPG）或金子上。但是，这些材料缺乏抵抗在隧道端所产生的电子力和物理力而将 DNA 牢固地保留的结合位点。可以用静电力将 DNA 分子吸附在有关的表面上，但是其难度很大。即便成功地将 DNA 固定下来，也很难于区分碱基的信息，因为所需的分辨率十分的高。根据目前的技术，可以将嘌呤与嘧啶分开，但是，无法确定具体的嘌呤以及嘧啶。要达到这个成果，就需要电子显微镜能够区别嘌呤上面的醛基和胺基团，以及嘧啶上面是否具有甲基。

酶荧光无机焦磷酸盐检测分析（ELIDA）测序所采用的是检测从 DNA 聚合反应中释放的焦磷酸盐来确定所添加的连续的碱基。由 DNA 聚合反应所释放的焦磷酸盐被 ATP 硫酸化酶转换为 ATP，并且对 ATP 的产生用萤火虫荧光素酶连续监测。为了确

定碱基的特异性，该方法采用了连续的用 ATP、CTP、GTP、以及 TTP 洗涤。如果对 ATP 的洗涤产生了焦磷酸盐，则有 1 个或更多个腺嘌呤核苷被加入。所加入的碱基的数量直接与产生的焦磷酸盐成比例。可以同时平行地对很多个 ELISA 的反应进行分析来提高所产生的序列的信息。

主要的缺陷是读取的长度很短。Ronaghi 等人 (Ronaghi et al., 1996) 仅仅成功地读取了 15 个碱基的长度，因为需要多次的洗涤。因为每读取一个碱基都要洗涤 4 次，这就意味着每读取 100 个碱基就需要洗涤 400 次。如果每次洗涤损失原料的 1%，则 400 次洗涤后，则就只有 1.85 的原料被保留，这是不足以进行检测的。

外源核酸酶测序涉及用荧光物标记的单链 DNA 分子，其被悬浮在流体中并被外源性核酸酶顺序切割。单个的荧光碱基被释放并通过单一的分子检测系统。被标记的核苷酸的检测的顺序相应于 DNA 的序列 (Ambrose et al., 1993; Davis et al., 1992; Jett et al., 1989)。采用持续性外源核酸酶，理论上可以达到每秒钟 10 个碱基对的速率对 10,000 bp 的大片段进行测序。

实际上，外源性核酸酶测序在每个步骤上都遇到了很多的问题。标记步骤需要 DNA 中的所有 4 种碱基都被不同的荧光物所标记。在立体结构上讲，这是非常不利的。Ambrose 等人在 1993 年对 M13 DNA 的 7 kb 链上的两种碱基获得了完全的标记。进而，将 DNA 悬浮在流体中也需要很艰难的光学捕获。该步骤费时而且要求很高的专业技术。再有，还需要对单个的荧光物分子进行高效的检测。此时的 1% 误差都是显著的。已经获得的检测效率从 65% 被提高到 95%。这种效率上的提高已经达到了极限，很难获得进一步的改进了。

在用杂交进行测序的方法中，靶标 DNA 被用包括所有可能的寡聚体序列按顺序探索。根据所掌握的寡聚体与靶标之间的杂交形式来得到靶标 DNA 的序列（Bains, 1991; Cantor et al., 1992; Drmanac et al., 1994）。对靶标 DNA 的探索有两种可能的方法。一种是所谓的“上行探索”（"Probe Up"）方法，即将靶标 DNA 固定在底物上，用一系列的寡聚体进行探索。而另一种是所谓的“下行探索”（"Probe Down"）方法，其要求将一系列的寡聚体被固定在底物上，然后与靶标 DNA 杂交。随着“DNA 芯片”的到来，即把微芯片合成技术用于 DNA 探针，使数以千计的不同 DNA 探针在 1 平方厘米的面积上排成阵列，就使得下行探索方法更为实际。上行探索方法需要 8 聚体，65,536 连续的探针和洗涤，这需要大量的时间。而另一方面，下行探索杂交则在几秒钟内产生数据。在杂交良好的情况下，65,536 个的 8 聚体将确定最多为 170 个碱基。采用 65,536 个“混合”的 11 聚体，可以对 700 碱基对进行测序。

在实际中，上行探索方法已经被用来对约 100 个碱基对的序列进行测序。由于杂交的非完好性，很难产生准确的序列。在杂交中的偏差被放大了很多倍。1% 的误差率就使可被测序的最大长度降低至少 10%。因此，如果 65,536 个寡核苷酸中的 1% 在与一个 200 聚体的 DNA 靶标杂交中产生错误的阳性杂交信号，则所得到的“杂交”中的 75% 就是假的（Bains, 1997）。在这种情况下，就无法进行序列测定。结论是，杂交必须极为有效才能产生合理的数据。进而，用杂交进行测序的方法在比探针少一个碱基的序列中存在着重复时，会有问题出现。当存在着这样的序列时，对杂交数据就有多重可能的序列。

对这些方法的最为常见的限制是读取的长度很短。实际上，短的读取长度意味着在对靶标 DNA 的线性顺序被确定之前，还

需要获得额外的遗传序列的信息。短的片段要与另外的重叠序列桥联。理论上讲，对于读取长度为 500 个碱基而言，最少需要  $9 \times 10^9$  个碱基先被测序，然后才可以对人体基因组的全部  $3 \times 10^9$  个碱基进行正确的排序。在现实中，产生一个可信的基因组所需要测序的碱基大约为  $2 \times 10^{10}$  个碱基。比较各种现有的技术，只有那个不现实的外源性核酸酶方法具有理论上的长链的读取能力。其它的方法只具有短链的理论读取能力，并且在实际中的读取能力更短。为了减少需要测序的碱基的数量，很明确的是要改善读取的长度。

蛋白质测序一般涉及化学诱导的顺序的去除和对终端氨基酸残基的确定，例如，Edman 降解方法[参见，Stryer, L., Biochemistry, W.H. Freeman and Co., San Francisco (1981) pp. 24-27]。Edman 降解方法需要多肽具有能够与异氰酸酯反应的游离的氨基。异氰酸酯一般是异氰酸苯酯。这种分子内的加成物与聚合物主链上的最近的氨基反应，形成五元环。这种加成造成了重新排列，并且终端氨基酸残基被随后用强酸所切割。氨基酸的被释放的乙内酰苯硫脲 (PTH) 被确定，并且被缩短了的聚合物可以进行重复的降解和分析的循环。

进而言之，已经开发了一些新的方法对多肽的羧基终端进行测序[参见，Inglis, A.S., Anal. Biochem. 195:183-196 (1991)]。羧基终端测序法模仿了 Edman 降解，但是，所涉及的是从聚合物的另一端按顺序进行降解[参见，Inglis, A.S., Anal. Biochem. 195:183-196 (1991)]。如同 Edman 降解，羧基终端测序方法涉及化学诱导的按顺序的去除，以及对终端氨基酸残基的确定。

更为近来所描述的是多肽测序方法，其中制备了聚合物片段的一套嵌套（定义序列的一套），然后进行了质谱分析[参见，

Chait, B.T. et al., Science 257:1885-94 (1992)]. 比较被测片段质谱结果和已知的氨基酸残基的质谱数据之间的差异来确测序列。虽然该 DNA 测序需要形成聚合物片段的一套嵌套（定义序列），该方法与常规的包括按顺序去除和确定每个残基的蛋白质测序方法还是有着本质上的差别。虽然该方法有实践的潜力，但它已经遇到了一些问题，并且还没有被证实为有效的方法。

这些已知的对聚合物测序的方法都各自带有自己的缺陷。例如，大多数的方法都比较慢，而且耗费人力。以凝胶为基础的 DNA 测序方法需要约 1-3 天来确定一个 300-800 个单元的聚合物的序列。而质谱显微方法和 ELISA 方法则只可能对很短的聚合物测序。

对于从头至尾的确定聚合物序列的方法一直就有着众多原因的需要。测序的速率限制着产生多重个体的能力和暂时性表达图谱，这些图谱毫无疑问地有助于快速确定复杂的遗传功能。还需要的是改善聚合物的分析方法，使其速度被加快到可以用于对疾病的诊断中和对新药的制备中。

## 本发明的概述

本发明涉及对聚合物进行分析的新方法和产品，特别涉及的是确定聚合物序列的新方法和产品。在聚合物测序方面，本发明令人惊奇地比现有技术拥有更多的优点。在本发明之前，没有任何的方法或合并应用的方法可以接近本发明所获得的测序速率。利用本发明的方法，对整个个体基因组的测序速度可以比用常规方法提高几个数量级。除了对整个基因组进行测序之外，本发明的方法和产品还可以用于对疾病过程和其发展建立详尽和多重的表达图谱。对某一个体基因组的测序和产生多重的表达图

谱的能力将极大地提高对任何疾病的过程和表象的异常基础进行确定的能力。

根据本发明的分析聚合物的方法是建立在对聚合物的每个单元进行单独分析的基础之上的。单独检查每个单元，就可以确定该单元的类型以及其在聚合物主链上的位置。这一点可以通过将一个单元放置在测站上，并且检查该单元在接近该测站时所发生的变化而实现。这些变化可以是该单元与测站或其配体之间所发生的相互作用的结果，并且对那个特定单元是特异性的。例如，如果所述的聚合物是核酸分子，在 T 处于靠近测站的位置时，则就有对 T 为特异性的变化发生。而另一方面，如果是 G 处于靠近测站位置时，则就会有对 G 为特异性的变化发生。所发生的特异性变化取决于所使用的测站以及所分析的聚合物的种类。例如，所述的变化可能是作为相互作用的结果的电磁信号的变化。

本发明的方法从广义上讲包括两类通过确定聚合物内的单元（或有时为一组单元）来分析聚合物的方法。第一类方法涉及对至少一个单一聚合物的分析。单一聚合物的个体单元在一方面引起与试剂的相互反应，产生变化，例如能量的转移或猝灭，并产生信号。该信号是该单元身份的指示性信号。在另一个方面，单个的单元到达测站，产生对该单元或测站为可检测的物理变化。这个在单元中或测站中的变化产生可被检测的对那个单元来说是特征性的信号。第二类方法涉及对众多聚合物的分析。每一个聚合物的一个单元被放置在测站上可以发生相互作用的位置。该相互作用产生依赖聚合物的脉冲并特异性地代表着该单元。所述的依赖聚合物的脉冲可以产生于如能量转移、猝灭、导电性的变化、机械性变化、电阻的变化、或其它的物理变化等。

本发明的分析聚合物的方法对于确定 DNA 分子内的序列单元特别有用，并且可以消除建立基因组文库、克隆、以及菌落挑取的需要，而这些都是基因组级别的测序方法中的主要限制因素。本文中所描述的方法提供了比现有技术所能达到的更长的序列的读取，以及百万级别的更快的序列读取。所提供的读取长度是在几十万个核苷酸的级别上的。这就意味着显著地降低了重叠和多余序列的需要，而且降低了在能建立基因组之前需要测序的 DNA 的实际数量。

本发明还涉及对用于分析的聚合物的制备方法。讲长的读取长度与新的制备方法结合起来，就得到更为合理化及有效的方法。再者，对给定的聚合物的单元的实际读取时间比现有技术的速度快几百万倍，因为本发明的新的装置提供了非常大量的平行放大，该装置被称为纳通道板（nanochannel plate）或微通道板（microchannel plate）。将这些成分结合起来，就导致这样一种包括测序的聚合物的分析方法，其将为分子生物学和细胞生物学领域带来巨大的改进。

本发明所描述的方法的对聚合物如基因组 DNA 的测序能力将对生物医学带来巨大的影响。以这种快速的速率获取遗传信息将加快人体基因组计划的完成。本发明的方法和产品将能够对每一个体建立多重表达图谱，从而理解完整的人体遗传程序。在同一时间比较一群个体的遗传数据将是首次能够不仅容易地发现单一的基因疾病，而且还可以在 DNA 被测序了的时候快速地发现复合性多基因疾病。

本发明的一个方面涉及对链接的单元的分析方法。该方法涉及将聚合物众多单个的单元与试剂相接触，这些试剂包括电磁辐射、猝灭源、以及荧光激发源等，单个的单元与试剂相互作用产

生可检测的信号，按顺序检测来自所述的相互作用的信号，从而对聚合物进行分析。在一个实施方案中，所述的信号是电磁辐射。在另一个实施方案中，试剂是电磁辐射。根据本发明的另一个实施方案，聚合物的单个的单元是被荧光物所标记的。

聚合物的众多的单元可以按顺序地暴露于电磁辐射，将这些众多的单个的单元放到靠近发射光的化合物的位置，并且用电磁辐射照射该发射光的化合物，其中，聚合物的众多的单个的单元对发射光的化合物的电磁辐射产生可检测的影响。在另一个实施方案中，聚合物的众多的单个的单元被暴露于电磁辐射，其中，电磁辐射对聚合物的众多的单个的单元的电磁辐射产生可检测的信号。

根据本发明的另一个实施方案，本发明的方法涉及将聚合物移动通过壁材料（Wall Material）中的纳通道以捕获可检测的信号。聚合物的众多的单个的单元按顺序地暴露于试剂，这是把聚合物移动通过在壁材料中的纳通道，让聚合物的众多的单个的单元在纳通道的相互作用的测站处暴露于试剂。试剂可以附着在（包埋在、共价结合在、或表面涂布在）壁材料上。在一个实施方案中，壁材料包括众多的纳通道，每一个纳通道有一个相互作用测站，多个聚合物被移动通过所述的纳通道，在任一给定的时间只有一个聚合物通过相互作用测站（如果没有重叠，则可以在一个纳通道内存在一个以上的聚合物），同时检测聚合物的单个的单元与试剂在相互作用测站的相互作用所产生的信号。优选将纳通道固定在壁材料中。

所检测到的信号可以存储在数据库中用于进一步分析。在一个分析方法中，这些信号可以同另一个聚合物的信号进行比较来确定这两个聚合物的相关性。另外，被检测的信号还可以与已知

的聚合物的已知的信号特性相比较来确定被检测的聚合物与已知的聚合物之间的相关性。在分析中还可以涉及测量从来自第一个单元的第一个信号的检测到来自第二个单元的第二个信号的检测之间的时间间隔。在一个实施方案中，众多的单个的单元是两个单元，第一个单元在聚合物的一端，第二个单元在聚合物的另外一端。这时的顺序的检测信号之间的时间间隔就可以指出两个单元之间的距离或聚合物的长度。

聚合物可以是本领域内所知道的任何类型的聚合物。在优选的实施方案中，聚合物选自包括核酸和蛋白质的一组中。在更优选的的实施方案中，聚合物是核酸。

与试剂相互作用产生信号的聚合物的单元被标记。这些单元可以被内部标记或外部标记。在一个实施方案中，只有聚合物的一部分单元被标记。在另一个实施方案中，所有的单元都被标记。在又一个实施方案中，聚合物的至少两个单元被不同地标记以产生两个不同的可检测的信号。对聚合物的单元可以这样标记，使每个单元或某一特定部分的单元被标记，也可以随机地标记。

在另一个实施方案中，聚合物的众多的单个的单元暴露于纳通道的不同区域至少两个测站，其中，在聚合物的这些单元与至少两个测站之间的相互作用产生至少两个信号。

在一个实施方案中，聚合物的单个的单元被辐射标记，并且信号是以荧光形式表现的电磁辐射。

在另一个实施方案中，这些单元在测站暴露于试剂。优选的测站是非液体材料。

在另一个实施方案中，聚合物的众多的单个的单元暴露于至少两种试剂，并且聚合物的这些单元与至少两种的试剂产生至少两个信号。该至少两种试剂可以位于聚合物所通过的纳通道的不同区域。在一个实施方案中，所述的至少两个信号是不同的信号。在另一个实施方案中，该至少两个信号是相同的信号。

根据本发明的另外一个方面，还提供了链接的单元的聚合物的分析方法。该方法包括步骤有，将链接的单元的聚合物的众多的单个的单元相对于测站进行移动，并在单个的单元通过测站时测定聚合物或测站的可检测物理变化所产生的顺序的信号，从而分析该聚合物。本发明的这个方面也容纳着以上所述的各个实施方案。

在另一个实施方案中，测站是相互作用测站，单个的单元在相互作用测站暴露于与单个的单元相互作用的试剂，产生可检测的作为该相互作用的特征性的电磁辐射信号。在另一个实施方案中，测站是产生信号的测站，所产生的特征性信号是依赖于聚合物的脉冲。优选的测站是非液体材料。

在本发明的另一个实施方案中，涉及的是链接的单元的聚合物的分析方法，将聚合物的众多的单个的单元暴露于测站来产生由该聚合物的单元暴露于测站而导致的非离子性传导信号，其中的测站附着于具有定义通道的表面的壁材料上。本发明的这个方面还容纳以上所述的各个实施方案。

根据本发明的另外一个方面，还提供了对聚合物的单个的单元进行鉴定的方法。该方法涉及的步骤有，将聚合物的单个的单元暂时地暴露于选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源所组成的一组中的试剂，该单个的单元的是未知的，产生上述的单个的单元的

特征性可检测的电磁辐射信号，检测该信号，区分所述的信号与来自聚合物的相邻的信号产生单元所产生的信号，作为该单个的单元的身份的指示。

上述的试剂可以是一个或更多个荧光团，并且优选至少三个荧光团。当把单个的单元处于试剂的能量转移区域内而使其暂时地暴露于一个或更多个荧光团（试剂）时，荧光能量的转移就发生在试剂与该单个的单元之间。对荧光能量的测定可以检测出该信号。

在一个实施方案中，把该单个的单元处于包括在壁材料中有纳通道的相互作用测站而使聚合物的单个的单元暴露于试剂。优选的壁材料包括至少两层，一层可以产生信号，另一层防止信号的产生，并且纳通道贯穿这两层。

根据本发明的另一个方面，提供了对聚合物的单个的单元进行鉴定的方法。该方法包括的步骤有，将聚合物的单个的单元暂时地相对测站进行移动，该单个的单元的是未知的，检测产生于该单元或测站中的可检测的物理变化的信号，区分所述的信号与来自聚合物的相邻的信号产生单元相对测站所产生的信号，作为该单个的单元的身份的指示。本发明的这个方面容纳着以上所述的每一个实施方案。

在一个实施方案中，测站是相互作用测站，单个的单元在该相互作用测站暴露于与该单个的单元相互作用并产生该相互作用的特征性的可检测的电磁辐射信号。在另一个实施方案中，测站是信号产生测站，并且所产生的特征性信号是依赖于聚合物的脉冲。

本发明的另一个方面是对链接的单元的聚合物的两个单个的单元的接近程度进行测定的方法。该方法包括的步骤有，相对于测站来移动聚合物，将单个的单元暴露于测站来产生由该单元或测站的可检测的物理变化所导致的特征性信号，检测所产生的特征性信号，测量各特征性信号的检测点之间的时间间隔，该时间间隔的量是这两个单个的单元的接近程度的指示。

在另一个实施方案中，测站是相互作用测站。在又一个实施方案中，相互作用测站包括试剂，并且该试剂选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源所组成的一组中，并且特征性信号是可检测的电磁辐射信号。在另一个实施方案中，相互作用测站是在壁材料中的纳通道。

在某些其它的实施方案中，测站指的是信号产生测站。在另一个实施方案中，该信号产生测站包括物理脉冲源，其与聚合物相互作用，产生物理脉冲的特征性信号。在一个实施方案中，物理脉冲产生于物理量的变化，例如将物理脉冲源暴露于聚合物的单元而导致的电阻或传导性的变化。在一个实施方案中，物理脉冲产生于由该聚合物的单元在位于其附近的微电极或纳电极之间的运动所造成的电容或电阻的变化。这些作为该单元通过电极的结果而发生的电阻或导电性的变化对于该单元是特异性的。在另一个实施方案中，物理脉冲产生于该单元释放出来的放射性信号。在另一个实施方案中，它们则产生于压电片、直接的物理接触、以及 NMR-核旋转信号。

聚合物可以是本领域中所知道的任何类型。在优选的实施方案中，聚合物选自于核酸和蛋白质。在更优选的实施方案中，聚合物是核酸。聚合物可以被随机性或非随机性地标记。可以对不

同的单元采用不同的标示物来产生不同的信号。在一个实施方案中，聚合物的单个的单元是被荧光团标记的。

本发明的另一个方面提供了对链接的单元的聚合物的两个单个的单元的次序进行确定的方法。该方法涉及的步骤有，将聚合物相对测站线性移动，让一个单个的单元暴露于测站来产生由于该单元或测站的可检测的物理变化而得到的信号，将另一个单个的单元暴露于测站来产生由于该单元或测站的可检测的物理变化而得到的不同于第一个信号的第二个可检测的信号，确定这些信号的次序来作为这两个单个的单元的次序的指示。

在一个实施方案中，测站是相互作用测站。在另一个实施方案中，相互作用测站包括试剂，这些试剂选自电磁辐射、猝灭源、以及荧光激发源的一组，并且所产生的特征性的信号是电磁辐射信号。在另一个实施方案中，相互作用测站是处在壁材料中的纳通道。

在一些其它的实施方案中，所述的测站是信号产生测站。在另一个实施方案中，信号产生测站包括物理脉冲源，其与聚合物相互作用产生特征性的信号，即物理脉冲。在一个实施方案中，将该物理脉冲源暴露于聚合物的单元导致了物理量如电阻和电容的变化，从而产生了物理脉冲。在一个实施方案中，物理脉冲产生于聚合物的单元在位于其附近的微电极或纳电极之间的运动所造成的电容或电阻的变化。例如，信号产生测站可以包括在相对于聚合物单元的一端安置的微电极或纳电极。作为聚合物的单元通过电极的运动所导致的电阻和电容的变化将是对那个单元为特异性的。在另一个实施方案中，物理脉冲产生于该单元释放的放射性信号。在另一个实施方案中，其产生于压电垫、直接的物理接触、以及 NMR-核旋转信号。

聚合物可以是本领域中所知道的任何类型。在优选的实施方案中，聚合物选自于核酸和蛋白质。在更优选的实施方案中，聚合物是核酸。聚合物可以被随机性或非随机性地标记。可以对不同的单元采用不同的标示物来产生不同的信号。在一个实施方案中，聚合物的单个的单元是被荧光团标记的。在另一个实施方案中，聚合物的单个的单元是被放射性标记的。

根据本发明的另一个方面，提供了对链接的单元的聚合物的两个单个的单元之间的距离进行确定的方法。该方法包括的步骤有，让聚合物相对于测站线性地通过测站，在这两个单元各自通过测站时检测所产生的特征性信号，测定所获信号之间的时间间隔，对众多的类似聚合物重复所述的步骤 1、2 和 3 来产生一套数据，对这一套数据进行分析，根据从众多的类似聚合物所获得的信息来确定这两个单个的单元之间的距离。

在一个实施方案中，测站是相互作用测站。在另一个实施方案中，相互作用测站包括试剂，这些试剂选自电磁辐射、猝灭源、以及荧光激发源的一组，并且所产生的特征性的信号是电磁辐射信号。在另一个实施方案中，相互作用测站是处在壁材料中的纳通道。

在一些其它的实施方案中，所述的测站是信号产生测站。在另一个实施方案中，信号产生测站包括物理脉冲源，其与聚合物相互作用产生特征性的信号，即物理脉冲。在一个实施方案中，将该物理脉冲源暴露于聚合物的单元导致了物理量如电阻和电容的变化，从而产生了物理脉冲。在一个实施方案中，物理脉冲产生于聚合物的单元在位于其附近的微电极或纳电极之间的运动所造成的电容或电阻的变化。例如，信号产生测站可以包括在相对于聚合物单元的一端安置的微电极或纳电极。作为聚合物的

单元通过电极的运动所导致的电阻和电容的变化将是对那个单元为特异性的。在另一个实施方案中，物理脉冲产生于该单元释放的放射性信号。在另一个实施方案中，其产生于压电垫、直接的物理接触、以及 NMR-核旋转信号。

聚合物可以是本领域中所知道的任何类型。在优选的实施方案中，聚合物选自于核酸和蛋白质。在更优选的实施方案中，聚合物是核酸。聚合物可以被随机性或非随机性地标记。可以对不同的单元采用不同的标示物来产生不同的信号。在一个实施方案中，聚合物的单个的单元是被荧光团标记的。

根据本发明的另一个实施方案，众多的类似聚合物是同源的群体。在另一个实施方案中，众多的类似聚合物是异源的群体。

在另一个实施方案中，所述的步骤 1-4 是几乎同时进行的。

根据本发明的另一个方面，揭示了对两个可以发生共振能量转移或猝灭的相互作用的配体进行共振能量转移和猝灭测定的方法。该方法包括的步骤有，将两个配体放在互相足够靠近到可以发生所述的共振能量转移和猝灭的地方，给配体中的一个施加试剂，试剂选自于包括电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的一组，用屏蔽材料来对电磁辐射发射和所述的配体之间的相互作用中所发生的荧光共振能量转移和猝灭，检测所发射的电磁辐射。在一个优选的实施方案中，所述的屏蔽材料是导电性屏蔽材料。

在本发明的另一个方面，是链接的单元的聚合物的分析方法。该方法包括的步骤有，提供标记的链接的单元的聚合物，对来自少于全体单元的单元特异性标示物的信号进行检测，将检测到的所述的信号的签字存储起来对聚合物进行分析。在一个实施方案中，所有的单元特异性标示物都被检测。在另一个实施方案

中，聚合物是部分地和随机地被单元特异性标示物所标记。在另一个实施方案中，只有一部分的单元特异性标示物被检测。在另一个实施方案中，聚合物的所有单元都被单元特异性标示物所标记。

在一个实施方案中，被标记的链接的单元的聚合物被暴露于试剂，试剂选自于包括电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的一组，聚合物的单元特异性标示物与试剂之间的相互作用产生信号。

在一个实施方案中，信号是被线性检测的。在另一个实施方案中，信号的签字包括至少 10 个信号，优选 20 个信号。信号的签字包括关于聚合物的任何信息。优选的是，信号的签字包括关于次序、距离和单元特异性标示物的信息。

在另一个实施方案中，链接的单元的聚合物被标记后，相对于测站运动，在测站产生由于聚合物的单元特异性标示物暴露于测站而导致的信号。该测站可以是相互作用测站。

在一些实施方案中的方法，是对聚合物的单元特异性标示物的鉴定方法，该对单元特异性标示物的鉴定是对聚合物的至少一个单元的身份的指示。该单元特异性标示物短暂地暴露于测站，产生所述的单元特异性标示物的特征信号，该信号区别于相邻的聚合物的信号产生单元特异性标示物所产生的信号，并作为该单元特异性标示物的身份的指示。测站可以是相互作用测站，其包括选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的一组，并且其中的信号是可检测的电磁辐射信号。

在另一些实施方案中的方法，是对聚合物的两个单元特异性标示物的接近度进行鉴定的方法，其中，这两个单元特异性标示物的接近度是所述的信号的签字每个单元特异性标示物的身份

是对聚合物的至少一个单元的身份的指示。被标记的聚合物相对于测站运动，将这两个单元特异性标示物暴露于测站，产生由于在单元特异性标示物或测站中的可检测的物理变化而导致的特征性信号，测量每一个特征性信号之间的时间间隔，该时间间隔是这两个单元特异性标示物的接近度的指示。

所述的方法还可以是对聚合物的两个单元特异性标示物的次序的鉴定方法，每个单元特异性标示物的身份是聚合物的至少一个单元的身份的指示，其中这两个单元特异性标示物的次序是所述的信号的签字。被标记的聚合物相对于测站线性地运动，将一个单元特异性标示物暴露于测站，产生单元特异性标示物的信号，将另一个单元特异性标示物暴露于测站，产生不同于第一个信号的可被检测的单元特异性标示物的信号。对这些信号的次序的确定，是这两个单元特异性标示物的次序的指示。

在一个实施方案中的方法是对聚合物的两个单元特异性标示物之间的距离进行确定的方法，每一个单元特异性标示物的身份是聚合物的至少一个单元的身份的指示，其中这两个单元特异性标示物之间的距离是所述的信号的签字。被标记的聚合物相对于测站线性地运动，在这两个单元特异性标示物中的每一个通过测站时，产生特征性信号，两个信号之间的距离被确定为对这两个单元特异性标示物之间的距离的指示。

本发明的另一个实施方案中的方法，是对测试的标记的聚合物进行特征化的方法，其中，多个被标记的聚合物暴露于测站，得到每个被标记的聚合物的信号的签字。该方法涉及的步骤有，比较这些聚合物的信号的签字，根据聚合物的信号的签字来确定这些聚合物之间的相关程度，并且根据相关的聚合物的信号的签字来对测试的聚合物进行特征化。

根据本发明的另一个实施方案，提供了对链接的单元的聚合物进行测序的方法。从多个重叠的聚合物中获得它们每一个的信号，每个聚合物至少有一部分所具有的链接的单元的序列与其它的聚合物相同，比较信号的签字，得到在所有的这些聚合物中都相同的链接的单元的序列。

在另一个实施方案中的方法，是对一套聚合物进行分析的方法，所述的聚合物中的每一个都是单独的由链接的单元所组成的聚合物，其中这一套聚合物被相互平行排列，检测所述的这些聚合物的特异性特征。

上述的方法的基础是，聚合物与测站之间的相互作用，在一些实施方案中涉及单元与试剂之间的能量转移和猝灭，从而导致信号的产生，在另一些实施方案中，则是在单元或测站中的物理变化，导致信号的产生。每一个方法都可以同时对很多的聚合物进行，也可以有时每次只对一个聚合物来进行。

还可以进行以相互作用为基础的对多个聚合物一次进行分析的方法，其中涉及在单元与测站之间的依赖于聚合物的脉冲。这些方法将在下面讨论，都基于单元与信号产生单元之间的相互作用，产生可被检测的任何种类的依赖于聚合物的脉冲。依赖于聚合物的脉冲产生于将聚合物的单元暴露于信号产生测站，但是不要求在聚合物单元中或测站中发生物理变化。例如，依赖于聚合物的脉冲可以产生于能量转移、猝灭、导电性的变化、机械性变化、电阻的改变，或其它的物理变化。

本发明的另一个方面是对测试聚合物进行特征化的方法。在进行对测试聚合物的特征化的方法时，要对多个聚合物获得它们每一个的依赖于聚合物的脉冲，比较这些多个聚合物的依赖于聚

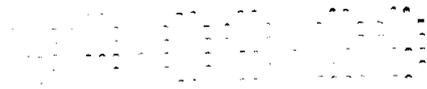
合物的脉冲，根据这些依赖于聚合物的脉冲的相似性来确定聚合物的相关性，根据相关的聚合物的依赖于聚合物的脉冲来对测试的聚合物进行特征化。

所述的多个聚合物可以是任何类型的聚合物，但是优选核酸。在一个实施方案中，多个聚合物是同源性的群体。在另一个实施方案中，多个聚合物是异源性群体。聚合物可以被随机地或非随机地标记。对不同的链接的单元可以采用不同的标记，来产生不同的依赖于聚合物的脉冲。

依赖于聚合物的脉冲提供了关于聚合物的很多不同类型的结构信息。例如，所获得的依赖于聚合物的脉冲可以包括依赖于聚合物的脉冲的次序，或者，所获得的依赖于聚合物的脉冲可以包括特异性信号之间的时间间隔，或特异性依赖于聚合物的脉冲的数目。

在一个重要的实施方案中，依赖于聚合物的脉冲是由多个聚合物通过信号产生测站而获得的。

根据本发明的另一个方面，提供了对链接的单元的聚合物中的两个单个的单元之间的距离进行确定的方法。该方法包括的步骤有，（1）让聚合物线性地通过测站，（2）在这两个单个的单元各自通过测站时检测所产生的依赖于聚合物的脉冲，（3）测量所检测的依赖于聚合物的脉冲之间的时间间隔，（4）对多个类似的聚合物重复上述步骤（1）、（2）和（3）来产生一套数据，以及（5）分析这一套数据，根据从所述的多个类似的聚合物中所获得的信息来确定这两个单个的单元之间的距离。在一个实施方案中，步骤（1）至（4）是基本上同时进行的。

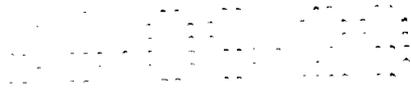


多个聚合物可以是任何种类的，但是，优选核酸。在一个实施方案中，多个聚合物是同源性的群体。在另一个实施方案中，多个聚合物是异源性群体。聚合物可以被随机地或非随机地标记。对不同的链接的单元可以采用不同的标记，来产生不同的依赖于聚合物的脉冲。

在一个实施方案中，所测量的依赖于聚合物的脉冲是所产生的电磁辐射信号。在另一个实施方案中，两个链接的单元是在信号产生测站处测定其光发射而被检测的。信号产生测站可以是纳通道。

根据本发明的另一个方面，提供了链接的单元的聚合物的两个单个的单元的次序的确定方法。该方法包括的步骤有，（1）让聚合物线性地通过信号产生测站，（2）让一个单个的单元暴露于测站来产生依赖于聚合物的脉冲，（3）让另一个单个的单元暴露于测站来产生第二个依赖于聚合物的脉冲，（4）对多个类似的聚合物重复上述步骤（1）、（2）和（3）来产生一套数据，以及（5）分析这一套数据，根据从所述的多个类似的聚合物中所获得的信息来确定这两个单个的单元之间的距离。在一个实施方案中，步骤（1）至（4）是基本上同时进行的。在一个实施方案中，所测量的信号是电磁辐射信号。

多个聚合物可以是任何种类的，但是，优选核酸。在一个实施方案中，多个聚合物是同源性的群体。在另一个实施方案中，多个聚合物是异源性群体。聚合物可以被随机地或非随机地标记。对不同的链接的单元可以采用不同的标记，来产生不同的依赖于聚合物的脉冲。



在一个实施方案中，所测量的依赖于聚合物的脉冲是所产生的电磁辐射信号。在另一个实施方案中，两个链接的单元是在信号产生测站处测定其光发射而被检测的。信号产生测站可以是纳通道。

本发明的另一个方面提供了对链接的单元的聚合物进行测序的方法。该方法涉及的步骤有，从多个重叠的聚合物获得依赖于聚合物的脉冲，这些聚合物的至少一部分具有相同于其它的聚合物的链接的单元的序列，比较依赖于聚合物的脉冲，获得在这些多个聚合物中都相同的链接的单元的序列。

在一个实施方案中，依赖于聚合物的脉冲是可被光学测定的。在另一个实施方案中，对核酸用试剂标记，试剂选自包括电磁辐射源、猝灭源、荧光激发源、以及辐射源的一组。

多个聚合物可以是任何种类的，但是，优选核酸。在一个实施方案中，多个聚合物是同源性的群体。在另一个实施方案中，多个聚合物是异源性群体。聚合物可以被随机地或非随机地标记。对不同的链接的单元可以采用不同的标记，来产生不同的依赖于聚合物的脉冲。

本发明还提供了对核酸进行标记的方法。该方法包括的步骤有，让分生细胞与核苷酸类似物相接触，从细胞核酸中分离出带有被导入的核苷酸类似物的核酸，通过对导入的核苷酸类似物进行标记来带有导入的核苷酸类似物的核酸。在一个实施方案中，核苷酸类似物是溴化了的类似物。

对于处在细胞切割周期中的细胞，可以通过发育停滞来让分生细胞与或不与核苷酸类似物接触，完成接触步骤后，可以让细胞重新进入细胞切割周期。然后，在细胞重新进入并完成了细胞

切割周期后，但又在完成第二个细胞切割周期之前，将核酸分离出来。

在另一个实施方案中，被引入的核苷酸类似物用选自包括电磁辐射源、猝灭源、荧光激发源的一组的试剂所标记。

根据本发明的另一个实施方案，提供了对一套聚合物进行分析的方法，这一套中的聚合物都分别是链接的单元的聚合物。该方法包括的步骤有，让这一套聚合物相互平行排列，检测每个聚合物的特异性特征。在一个实施方案中，排列步骤是在没有凝胶的溶液中进行的。可以用任何的方法来排列聚合物。优选的排列聚合物的方法是给聚合物施加电场。

多个聚合物可以是任何种类的，但是，优选核酸。在一个实施方案中，多个聚合物是同源性的群体。在另一个实施方案中，多个聚合物是异源性群体。聚合物可以被随机地或非随机地标记。对不同的链接的单元可以采用不同的标记，来产生不同的依赖于聚合物的脉冲。

聚合物特异性特征是关于聚合物的结构特点的信息。聚合物的特异性特点可以是在聚合物中各链接单元的次序。

在一个实施方案中，对所述各聚合物的检测步骤是同时进行的。在另一个实施方案中，检测步骤包括测量电磁辐射信号。根据优选的实施方案，检测步骤包括，让聚合物相对于多个信号产生测站线性地通过它们，在所述的聚合物通过信号发生测站时检测依赖于聚合物的脉冲并区分这些信号。

在本发明的另一个实施方案中，提供了分析一套聚合物的方法，这一套聚合物中的每一个都分别是链接的单元的聚合物。该

方法包括的步骤有，在电场中排列这一套聚合物，同时让这些聚合物通过各自的通道，在这些聚合物通过其通道的时候，检测聚合物特异性特点。在一个实施方案中，排列步骤是在没有凝胶的溶液中进行。优选的通道是纳通道。

多个聚合物可以是任何种类的，但是，优选核酸。在一个实施方案中，多个聚合物是同源性的群体。在另一个实施方案中，多个聚合物是异源性群体。聚合物可以被随机地或非随机地标记。对不同的链接的单元可以采用不同的标记，来产生不同的依赖于聚合物的脉冲。

聚合物特异性特征是关于聚合物的结构特点的信息。聚合物的特异性特点可以是在聚合物中各链接单元的次序。

在一个实施方案中，对所述各聚合物的检测步骤是同时进行的。在另一个实施方案中，检测步骤包括测量电磁辐射信号。根据优选的实施方案，检测步骤包括，让聚合物相对于多个信号产生测站线性地通过它们，在所述的聚合物通过信号发生测站时检测依赖于聚合物的脉冲并区分这些信号。

根据本发明的另一个方面，提供了一种制品。这种制品包括，壁材料，其具有定义通道的表面，试剂，这些试剂选自包括电磁辐射源、猝灭源、发光薄膜和荧光激发源，并且它们是链接在相邻于通道的壁材料上的，其中的试剂与通道足够地靠近，并且其数量足以与其配体化合物可检测地相互作用，这些配体化合物选自包括光发射化合物、接受光的化合物、放射性化合物、以及通过通道的猝灭物。优选的通道是聚合物的支持物。

在一个实施方案中，试剂是电磁辐射源，并且电磁辐射源是光发射化合物。在另一个实施方案中，通道选自包括微通道和纳通道的一组之中。

根据本发明的另一个实施方案，壁材料的定义通道的表面是不含有光发射化合物的。在另一个实施方案中，光发射化合物链接在壁材料的外表面上。在又一个实施方案中，光发射化合物链接到链接子上，链接子则链接在壁材料的外表面上。在另外一个实施方案中，光发射化合物是包埋在壁材料中，或在壁材料的一层中，或在壁材料上。在另一个实施方案中，光发射化合物在壁材料的围绕通道的那一部分外表面区域中可以是比较集中的。在围绕通道的壁材料中，光发射化合物可以形成同心环。该制品还可以具有掩饰层，其上有开孔，仅仅将光发射化合物的局部暴露出来。

在邻接通道的壁材料上还可以链接不同于第一种光发射化合物的第二种光发射化合物，其中，该光发射化合物于通道足够的靠近，并且其数量足以同通过通道的配体光发射化合物产生可检测的相互作用。

壁材料可以由不同的层所构成。在一个实施方案中，临近光发射化合物的壁材料的外表面是导电层。在另一个实施方案中，壁材料包括两层，即导电层和非导电层。壁材料还可以包括至少两层，第一层防止信号的产生，第二层允许信号产生。此外，临近光发射化合物的壁材料可以是不透光层。在另一个实施方案中，壁材料包括两层，不透光层和支持性透光层。壁材料可以是在光发射化合物的第二面的第二种不透光层，所述的第一和第二层把光发射化合物夹在中间。在优选的实施方案中，光发射化合物是荧光化合物。

通道可以具有各种形状和尺寸。优选的通道是纳通道，其介于 1 埃和 1 毫米之间。在优选的实施方案中，通道的宽度是在 1-500 埃之间。优选的壁材料包括多个通道。优选的壁材料包括至少两个或更多个通道，优选至少 50 个通道。

在一个实施方案中，壁材料包括两层，第一层不透光层与发光膜层彼此链接，其中，通道贯穿这两层，并且由这两层的表面所定义。优选的通道是纳通道。在某些实施方案中，该制品包括第二不透光层，发光膜层位于第一和第二不透光层之间。在优选的实施方案中，定义通道的表面包括不透光层的表面，并且其不含有发光膜层材料。

在另一个实施方案中，试剂是荧光激发源，并且其中的荧光激发源是闪烁层。该闪烁层可以选自包括 NaI(Tl)、ZnS(Ag)、葱、芪、以及塑料磷光体。优选的闪烁层是被包埋在壁材料中的，介于两个不透过放射的层之间，例如在铅和聚甲基丙烯酸甲酯之间。

本发明的另一方面是一种制品，其是一种壁材料，具有定义多个通道的表面，并且，在至少临近于一个通道的壁材料的离散的区域链接着测站，其中，测站与通道足够的靠近，并且其数量足以使信号产生于正在通过通道的链接的单元的聚合物的可检测的物理变化，或当聚合物暴露于测站时产生于测站之中。

根据本发明的另一个方面，提供了一种制品。该制品是具有定义通道的表面的壁材料，以及多个测站，这些测站分别链接在临近通道的壁材料的离散的区域，其中，测站与通道足够地靠近，并且其数量足以引起信号产生于正在通过通道的链接的单元

的聚合物的可检测的物理变化，或当聚合物暴露于测站时产生于测站之中。

本发明的另一个方面是壁材料的制备方法。该方法包括的步骤有，将光发射化合物或猝灭化合物与壁材料的多个离散的区域相共价链接，每个所述的离散的区域都与各自在所述的壁材料上的测站足够地靠近，从而，当聚合物的单个的单元（该单元可以与所述的光发射化合物或猝灭化合物相互作用来产生信号）被放在所述的相互作用测站时，则光发射化合物或猝灭化合物就与该单个的单元相互作用来产生信号。在一个实施方案中，该方法包括将导电层材料施加到壁材料上的步骤。

在另一个实施方案中，发光化合物或猝灭化合物是被共价链接在所述的壁材料中靠近通道的离散的地方，所述的通道定义相互作用测站。通道优选为微通道。在更优选的实施方案中，通道是纳通道。发光化合物或猝灭化合物可以共价链接到壁材料上，其链接的方式要使壁材料的表面定义着通道并且使该通道不含有发光化合物和猝灭化合物。

本发明还包括将化学物质选择性地链接在不透明的壁材料中的通道的环形的位置上的方法。该方法包括的步骤有，向通过壁材料的通道的环形上链接光保护化学基团，向该光保护化学基团施加以光来去除对化学基团的光保护，将化学物质链接到被去掉了保护的化学基团上。

在一个实施方案中，仅仅向壁材料的定义通道的环形的表面的某些区域选择性地施加以光。在另一个实施方案中，通道具有第一端和第二端，环形位于第一端，而光则施加在第二端，光通

过通道并在所述第一端的环形处接触光保护的化学基团。通道优选微通道。在更优选的实施方案中，通道是纳通道。

根据本发明的另一方面，提供了一种制备在壁材料的局部表面具有光发射区域的壁材料的方法。该方法包括的步骤有，提供具有表面的壁材料，将光发射化合物施加在该表面上来在其上产生至少局部光发射区域，其中的局部区域定义检测光发射的靶标区域，并且其中的靶标区域是通过壁材料的通道的环形区域。在一个实施方案中，该方法进一步包括的步骤有，向壁材料的表面上链接光保护化学基团，在链接光发射化合物之前将光施加在光保护化学基团上来去掉对化学基团的光保护，将光发射化合物链接在去掉了光保护的化学基团上。

在一个实施方案中，光只被施加在定义通道的环形的壁材料上的选择性的表面区域。在优选的实施方案中，光保护化学基团只链接在定义通道的环形的壁材料上的选择性的表面区域。在另一个实施方案中，通道具有第一端和第二端，环形位于第一端，而光被施加在第二端，光通过通道并在所述第一端的环形处接触光保护的化学基团。通道优选微通道。在更优选的实施方案中，通道是纳通道

该方法还可以进一步包括的步骤有，将具有开孔的掩饰物放在壁材料的表面上，使只有在开孔处的局部光发射区域可以通过掩饰物的开孔。在一个实施方案中，光发射化合物是被链接在壁材料表面的一部分上的。

根据本发明的另一个方面，提供了信号的检测设备。该设备具有外壳，带有缓冲舱，定义一部分缓冲舱的壁，具有多个开孔来与聚合物对直，相对于外壳固定的传感器，该传感器区分每一

个开孔所发射的信号与另外的开孔所产生的依赖于传感器的信号，以及收集和储藏所述的传感器信号的存储器。在优选的实施方案中，传感器是光学传感器。

在一个实施方案中，光学传感器检测众多的开孔中发射的电磁辐射信号。在另一个实施方案中，该设备包括微处理器。

在一个实施方案中，开孔被壁材料中的通道所定义。优选的是，开孔被壁材料中的微通道所定义。更优选的是，开孔被壁材料中的纳通道所定义。在一个实施方案中，所述的众多开孔是至少两个开孔。在优选的实施方案中，所述的众多为至少 50 个开孔。

在一个实施方案中，该设备包括由所述的壁而与第一个缓冲舱相分开的第二缓冲舱，并且其中的这些缓冲舱彼此通过开孔具有流体相通性。在另一个实施方案中，该设备包括固定在外壳上的一对电极，其中的一个电极位于第一缓冲舱中，另一个电极位于第二缓冲舱中。

根据本发明的另一个方面，提供了信号的检测设备。该设备包括外壳，其定义第一缓冲舱和第二缓冲舱，由外壳所包围的壁，其将第一和第二缓冲舱分开，由该壁所定义的多个通道并提供第一与第二缓冲舱之间的流体相通，用于区别和收集依赖于通道的信号的传感器。优选的通道是微通道。更优选的通道是纳通道。在一个实施方案中，众多的通道是至少两个通道。在优选的实施方案中，众多通道是至少 50 个。优选的信号是光学信号。

在一个实施方案中，包围着通道的壁材料包括着链接在壁材料上的试剂，这些试剂选自包括电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的一组。优选的试剂是电磁辐射，而且电磁辐射是光发射化合

物。在一个实施方案中，光发射化合物集中在壁材料中的通道上。

根据另一个实施方案，该设备包括将生物学对象移动通过通道的装置。

根据本发明的另一个方面，提供了一种设备，其包括带有缓冲舱的外壳，定义缓冲舱的一部分的壁材料，该壁包括聚合物相互作用测站，固定在外壳上的光学传感器，该光学传感器被构造和安排来检测在相互作用测站发射的电磁辐射信号。

本发明的另一个方面是一种计算机系统，其向接收到的请求来作出关于众多聚合物的特征信息的应答。该系统包括存储器，用于对众多的聚合物根据独特的聚合物鉴定特征以可提取的方式来存储，一套记录，其包括对检测的信号顺序指示性信息，这些信号产生于聚合物所暴露于的测站或众多聚合物的单个的单元的物理变化，微处理器，用于提取在存储器中所保存的记录，这种提取是根据与所选择的聚合物的独特的鉴定特征而从众多的聚合物中选取带有该特征的聚合物。

在一个实施方案中，信号产生于众多的聚合物的单个的单元对试剂的暴露，这些试剂选自包括电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的一组。在另一个实施方案中，该计算机系统还包括将所选的聚合物的顺序的检测信号与已知的聚合物的已知的信号特征形式进行比较的装置，来确定所选的聚合物同已知的聚合物之间的相关程度。

本发明的各个限定都包括各种本发明的实施方案。因此，应该理解的是，本发明的各个限定都涉及每个方法和每个设备中的任何元素或元素的结合。

## 附图的简要说明

图 1: 随机性标记方法的示意图。

图 2: 原始数据, 显示能量发射形式的变化, 来通过事件率方法确定距离信息。能量形式的变化产生于顺序的可检测信号, 根据其作图, 得到的曲线从左至右表示能量强度的降低, 随后是两次能量强度的提高。其中的事件率为  $6.8\text{A/s}$ , 并且  $t_1$  是在第一和第二标记进入时间的的时间间隔。

图 3: 显示对带有  $5'\text{ACGTACGTACGTACGT}'3$  序列的 16 聚体的随机性 A-标记片段的代表性群体, 并且还显示了如何利用距离信息来确定接纳标记核苷酸之间的碱基间隔。

图 4: 各种可能的纳通道板的构造示意图。

图 5: 用于分析放射性聚合物的纳通道板的示意图。

图 6: 带有供体荧光团的同心环的纳通道横截面示意图, 以及供体发射和相应的纳通道能量转移的示意图。

图 7: 显示具有多个纳通道的纳通道板的模型, 其带有在板中的供体荧光团层。图 7B 显示显示单个的纳通道的放大视图, 其在导电层的临近位置有单个的接纳体。

图 8A 和 8B: 图示了当接纳标记通过纳通道时的信号的产生。图 8A 显示一个纳通道的放大视图。图 8B 图示了在接纳标记从 A 位置移动到 C 位置时供体强度的显著改变。

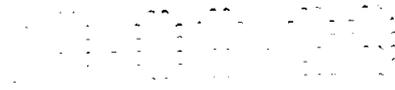


图 9: 示意和图解了两个碱基被标记的 DNA 链通过纳通道的情况, 其具有适宜的供体荧光团的厚度和半径, 并被夹在导电材料中间。

图 10: 体积图, 显示在具有一个和两个接纳体时的供体发射强度的变化。图 10A 显示了体积的变化量。图 10B 显示对一个接纳体的改变。

图 11: 显示了 DNA 可以通过所制造的纳通道的实验结果。

图 12: 显示了保持着纳通道 (或微通道) 板的装置的构造, 其可以产生电场。

图 13: 示意了纳通道的装置, 其包括两个融合的 Pyrex 细胞, 并保持着纳通道板, 上和下缓冲区域, 电极, 浸入的对象和电源。

图 14: 示意了体外碱基特异性 (IBSA) 标记。

图 15: 显示了从 IBSA 标记识别 DNA 序列的总体方案。

## 本发明的详细描述

本发明包括了对聚合物或聚合物的单元的分析 and 鉴定方法, 它们在该单元通过测站时, 对在聚合物的至少一个单元与测站之间或与试剂之间的相互作用所产生的、或在该单元或测站中的物理变化所产生的依赖于聚合物的脉冲的可检测信号的检测而实现的。所谓的对聚合物的“分析”, 指的是获取聚合物的某些结构信息, 例如, 其尺寸、单元的次序、与其它的聚合物的相关程度、各单元的身份、以及是否存在等等。因为生物分子的结构和功

能是互相依赖的，所以这些结构信息可以揭示关于聚合物的功能的重要的信息。

根据本发明的一个方法是对链接的单元的聚合物的分析方法，即将聚合物的众多个单元暴露于选自于包括电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的一组的试剂，这样，每一个单个的单元都与试剂相互作用来产生可检测的信号。这些相互作用产生的信号被按顺序检测。

在本文中，聚合物的单元“暴露于”试剂或测站指的是将该单元和试剂或测站放在或呈现在彼此足够相互作用的靠近的位置，从而在该单元或试剂或测站之间可以发生能量转移或猝灭或物理变化来产生可检测的信号。术语足够相互作用的靠近指的是足够的靠近使相互作用或变化可以产生可检测的信号。

在一个实施方案中，聚合物的单元被按顺序暴露于试剂。术语“按顺序暴露于”指的是相互之间有时间上的间隔。在优选的实施方案中，让聚合物和试剂以线性的方式彼此相对运动，使聚合物的每一个单元都通过在测站的试剂的相互作用的靠近的区域。当聚合物的每一个单元与试剂或测站相互作用时，就产生可检测的信号。可以用检测装置捕获（按检测顺序）和记录这些可检测的信号。对于每一个单元所产生的可检测的信号可以是对该单元的类型为指示性的。在本文中，信号被按顺序检测指的是来自同一聚合物的不同的单元的信号在在有时间间隔的情况下所检测。不是所有的单元都需要被检测或需要产生被按顺序检测的信号。

当单元被按顺序地暴露于试剂或测站，则单元和试剂或测站相互发生相对移动。在本文中，术语“单元和试剂或测站相互发

生相对移动”指的是，在单元和试剂或测站之间发生相互作用的期间内，单元和试剂或测站都移动或只有其中的一个移动而另一个保持静止。单元和试剂或测站可以用任何机制来相对移动。例如，试剂或测站可以保持静止，而让电流来将聚合物通过试剂或测站。其它的移动聚合物的方法包括但不限于由磁场、机械力、流动的液体介质、压力系统、重力、以及分子马达如在聚合物是DNA时的DNA聚合酶或解旋酶、或当聚合物是多肽如肌动蛋白时的肌球蛋白。聚合物的移动可以通过采用通道、槽沟或环等指导聚合物来给以辅助。此外，试剂或测站可以被移动而聚合物则保持静止。例如，可以让扫描尖端持有试剂或测站，沿着聚合物的全长移动。

在另一个实施方案中，信号是被同时检测的。在本文中，术语“同时被检测”指的是，让聚合物的多个被标记的单元同时暴露于试剂或测站。可以采用多个相互作用位点来让多个的单元同时暴露于试剂或测站。可以同时在这每一个的位点检测信号。例如，可以将试剂或测站相应于聚合物单元的相互间隔的聚体位置。当聚合物被带到对多个试剂或测站的足够相互作用的靠近的位置时，就同时产生信号。这是可以实施的，例如，将试剂或测站线性地间隔排成阵列，其间隔基本上相等并等于各个单元之间的间隔。对于聚合物的位置，则可以让其相对于试剂或测站处于与试剂或测站足够相互作用地靠近来同时产生信号。

当信号被按顺序检测时，也可以同时对多个聚合物进行分析。同时对多个聚合物的分析是，容多于一个的聚合物在同一时间相对于试剂或测站运动。聚合物可以是相似的或不同的。如果聚合物是相似的，就可以同时检测相同的或不同的单元。优选的是，同时至少对两个聚合物进行分析。在更优选的实施方案中，

同时对至少 50 个聚合物进行分析，在另一个优选的实施方案中，同时对至少 100 个聚合物进行检测。

在本文中，术语“聚合物”指的是具有线性主链的化合物，由单个的单元通过链接而构成该主链。在有些情况下，聚合物的主链可以带有分支。优选的主链没有分支。术语“主链”指的是聚合物化学领域中常规的含义。聚合物可以在主链上为异源性的，从而含有任何可能的聚合物单元链接在一起的组合，例如，肽-核酸（其中氨基酸被与核酸链接并具有提高了的稳定性）的链接。在优选的实施方案中，聚合物的主链是同源性的组成，例如，核酸、多肽、多糖、碳水化合物、聚氨基甲酸乙酯、聚碳水化合物、聚脲类、聚乙烯亚胺、聚亚芳基硫化物、聚硅氧烷、聚酰亚胺、聚乙酸乙酯、聚酰胺、聚酯、或聚硫酯等。在最优选的实施方案中，聚合物是核酸或多肽。在本文中，术语“核酸”指的是生物聚合物，其包括核苷酸，例如，脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）。在本文中，多肽指的是包括链接的氨基酸的生物聚合物。

在本文中涉及聚合物的链接的单元时，“链接的”或“链接”指的是两个个体被任何的物理化学的方式相互链接起来，包括任何本领域所熟知的链接，如共价链接或非共价链接。这些链接对本领域的技术人员来说都是熟知的。天然的链接，即本领域的技术人员在自然中发现的将某一个聚合物的单元链接在一起的链接是最常见的。天然链接包括，例如，酰胺、酯、和硫酯链接。然而，被本发明的方法所分析的聚合物的单个的单元可以通过合成性或被修饰的链接所连在一起。由共价键将各单元链接在一起的聚合物将是最常见的，但是，还可以包括氢键等形式。

聚合物由多个单个的单元所构成。在本文中，术语“单个的单元”指的是这样的构件或单体，它们可以被与其它的构件或单体直接地或间接地连在一起组成聚合物。聚合物优选为由至少两个不同的链接的单元而组成的聚合物。这些至少两个不同的链接的单元可以产生或被标记而产生不同的信号，详细的讨论在下面给出。每个单元的具体类型将依赖于聚合物的类型。例如，对DNA而言，其包括脱氧核糖磷酸主链，主链所包括的单元由嘌呤核嘧啶，例如，腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、2-氨基嘌呤、2-氨基-6-氯代嘌呤、2, 6-二氨基嘌呤、次黄嘌呤、以及其它天然或非天然的核碱基，被芳香基团取代或不取代。RNA是包括核糖磷酸主链的生物聚合物，其主链包括嘌呤和嘧啶单元，如上面对DNA所描述的那些，但是，其中由尿嘧啶代替了胸腺嘧啶。DNA的单元可以通过其5'或3'羟基与聚合物的其它的单元链接而形成酯键。RNA的单元可以通过其5'、3'或2'羟基与聚合物的其它的单元链接而形成酯键。此外，具有5'、3'或2'羟基的DNA或RNA单元可以通过氨基基团与聚合物的其它的单元链接而形成酰胺链接。多肽的单个的单元是氨基酸，包括20中天然氨基酸和被修饰的氨基酸。氨基酸可以是酰胺或游离酸的形式存在，并且可以通过其 $\alpha$ -氨基基团与聚合物主链的其它的单元链接而形成与聚合物的酰胺链接。

术语“众多的单个的单元”指的是至少两个单元互相链接在一起。

在用序列的字母代表核酸的时候，应该理解的是，核苷酸从左至右为5'至3'方向，字母“A”代表腺苷、“C”代表胞苷、“G”代表鸟苷、“T”代表胸苷、“U”代表尿苷，除非另有注释。

聚合物可以是天然的聚合物，它们在自然界发生，或可以是非天然发生的聚合物，其不存在于自然界。一般聚合物包括至少天然聚合物的至少一部分。聚合物可以是被分离的或被从头至尾合成的。例如，聚合物可以从天然来源中分离出来，如提纯，酶解和凝胶分离，或是合成性的，例如(i)在体外扩增，如利用聚合酶链反应(PCR)；(ii)合成，如化学合成；(iii)重组的，如克隆重组等。

聚合物或其至少一个单元处于这样的形式，即其能够与试剂或测站相互作用来产生该相互作用的特征性信号。能够进行这样的相互作用的聚合物的单元被称为标记了的。如果聚合物的单元可以进行相互作用来产生特征性信号，那么，该聚合物就被称为内部标记了的。这时就不需要给该聚合物加上外部标记。然而，如果必须将非天然的分子链接到聚合物的单个的单元来产生相互作用并发生特征性信号的话，则该聚合物就被称为需要外部标记的。术语“标记”可以是例如，光发射、能量的接纳、荧光、放射性、或猝灭等。

很多天然发生的聚合物的单元是光发射化合物或猝灭物。例如，天然核酸的核苷酸具有独特的吸收谱，例如，A、G、T、C、和U具有的最大吸收分别在259nm、252nm、267nm、271nm、以及258nm。在聚合物中还可以加入包括内部标记的被修饰的单元。例如，核酸分子可以包括任何的下述的被修饰了的核苷酸单元，其具有光发射化合物或猝灭物的特征性能量发射形式：2,4-二硫尿嘧啶、2,4-二硒尿嘧啶、次黄嘌呤、巯基嘌呤、2-氨基嘌呤、以及硒嘌呤等。

如果一个单元在不用加上外部标记的时候，就可以通过其自身的除光发射、猝灭或放射性以外的性质提供关于该单元身份的

信息的话，则这样的单元就可以被认为是内部标记了的。例如，单元的带电性和形状提供了关于该单元的信息，它们可以是特异性的特征信号，例如，由该单元封闭了导电的通道后引起的导电性的变化。

如果在根据本发明的方法中选用了外部标记，则所选择的外部标记将取决于各种因素，包括所进行的分析的性质、试剂的类型和聚合物的类型。外部标记化合物包括但不限于光发射化合物、猝灭化合物、放射性化合物、旋转标记、以及重金属化合物等。对于被分析的聚合物的单元而言，标记要能够在空间上和化学上相容。

在本文中，术语“光发射化合物”指的是在用特定波长的光照射时会产生发光应答的化合物。这些化合物是能够通过磷光、化学发光、冷光、极化荧光、闪烁剂、或更优选的荧光来吸收和发射光。所选择的具体的光发射化合物将取决于各种在下面详细讨论的因素。各种文献中对光发射化合物已经给予了大量的描述。例如，可参见 Haugland 的著作《荧光探针和研究化学品手册》第六版（分子探针公司，1996年）[Haugland, R.P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6<sup>th</sup> edition, Molecular Probes, Inc., 1996]，该著作的内容通过在此引述而合并于本文，作为对光发射化合物的描述。

放射性化合物是发射 $\alpha$ 、 $\beta$ 、或 $\gamma$ 核辐射的化合物。 $\alpha$ 射线是4号质量的正电粒子，并且被电场核磁场轻微地反射。 $\beta$ 射线是负电的电子，并且被电场和磁场强烈地反射。 $\gamma$ 射线是负电电子，但是不被电场和磁场反射，具有的波长为 $10^{-8}$ 至 $10^{-9}$ cm的数量级。

通常，荧光染料是具有一链几个共轭的双键的碳氢分子。染料的发射和吸收波长是基本上与共轭链上的碳原子数目成比例的。优选的荧光化合物是“Cy-3”，参见“生物探测系统”（匹兹堡，PA）（Biological Detection Systems,

Pittsburgh, PA)。可以用于本发明的其它的优选荧光化合物包括但不限于荧光异硫氰酸盐 (“FITC”)、德克萨斯红、四甲基罗丹明异硫氰酸盐 (“TRITC”)、4,4-二氟代-4-硼-3a、以及 4a-叠氮-s-阴丹司 [4a-diaza-s-indacene, (“BODIPY”)]。

化学发光化合物是由于化学反应而发光的化合物。磷光化合物是由于吸收辐射而延迟发光化合物。冷光化合物是在收到激发发出非热性电磁辐射的物质。这些化合物都是本领域所熟知的，而且有众多的供应来源。

在本发明的一个实施方案中，光发射化合物是供体荧光团或接纳荧光团。在本文中，荧光团是能够在在一个波长吸收光并且在另一个波长上发射光的分子。供体荧光团是能够将其荧光能量转移给其附近的接纳分子的荧光团。接纳荧光团是能够接收其附近的供体荧光团的能量的荧光团（对于供体荧光团来讲，接纳体可以不是荧光团，可以是非荧光的）。荧光团可经光照射被光化学提升到激发态，或更高能量级上。激发波长一般在光谱的紫外区、蓝区、或绿区。荧光团仅在激发态保留很短的时间，然后就释放能量并回到原来的状态。那些将其能量作为光而散发出去的荧光团是供体荧光团。散发出去的光子的波长分布形成了其发射谱，其峰值在比激发谱更长的波长处（能量更低），但是，对一种具体的荧光团来讲，则具有相等的特征。

在本发明的另一个实施方案中，聚合物的单元被放射性化合物标记。该放射性化合物在通过试剂或测站时发射核辐射。当试剂是闪烁层时，该核辐射与闪烁层相互作用并造成荧光激发。然后就可以检测到被放射性标记的单元的指示性荧光信号。

用本领域所熟知的众多方法都可以将外部标记加入到聚合物中。例如，标记可以直接连到聚合物上，或链接到与聚合物相连的连接子上。例如，已经用化学方法将荧光团直接引入到核酸中了，而且荧光团还被通过活性氨基或巯基而引入到核酸中了。Mirabekov 在其《核酸研究》中已经有大量的论述[Mirabekov, *Nucleic Acids Research*, 24:4535-4532 (1996)]。还可以将那些易于被化学衍生或包含连接子的被修饰的单元引入到聚合物中来加强这个过程。在聚合物、链接在和/或外部标记上能够为了制备生物共轭体而进行的修饰方法，可以大量见于 Hermanson 的《生物共轭技术》一书[Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Inc., San Diego, 1996]，在此通过引述而将其内容合并于本文。

对 DNA 进行直接化学标记的方法有几种是已知的 (Hermanson, 1996; Roget et al., 1989; Proudnikov and Mirzzbekov, 1996)。这些方法中的一种是以对 DNA 部分地脱嘌呤而引入醛基为基础的。带有胍的荧光标记被有效地与醛基结合，并且胍键被钠还原所稳定，标记效率为约 60%。在有过量的胺荧光团存在时，胞嘧啶与亚硫酸氢盐之间的反应导致在 N<sub>4</sub> 位的转氨基化 (Hermanson, 1996)。各种反应条件，如 pH 值、胺荧光团的浓度、接触时间和温度等，都影响所形成的产物的产率。在高浓度的胺荧光团 (3M) 存在时，转氨基化可以接近 100% (Draper and Gold, 1980)。

光发射化合物可以被本领域所熟知的任何方法链接到聚合物上或其它的材料上。例如，能够与各种光发射化合物反应的功能基团包括但不限于 (功能基团:光发射化合物的反应基团)，活化酯:胺或苯胺；酰基叠氮:胺或苯胺；酰基卤:胺、苯胺、醇、或酚；酰基腈:醇或酚；醛:胺或苯胺；烷基卤:胺、苯胺、醇、酚、或硫

羧；烷基磺酸盐：硫羧、醇或酚；酞：醇、酚、胺或苯胺；酰基卤：硫羧；氮丙啶：硫羧或硫酯；羧酸：胺、苯胺、醇或烷基卤；重氮烷：羧酸；环氧化物：硫羧；卤代乙酰胺：硫羧；卤代三嗪：胺、苯胺或酚；肼：醛或酮；羧胺：醛或酮；亚氨酸酯：胺或苯胺；异氰酸酯：胺或苯胺；以及异硫氰酸酯：胺或苯胺。

与聚合物的单元相互作用的试剂选自包括电磁辐射、猝灭源、和荧光激发源的一组。“电磁辐射”在本文中是由电磁波产生的能量。电磁辐射的形式可以是直接的光源，也可以是由光发射化合物如供体荧光团所发射。“光”在本文中包括任何波长的电磁能量，如可见光、红外线和紫外光。

在本文中，猝灭源是那些改变或能够改变光发射源的性质的物体。被改变的性质包括荧光强度、寿命、光谱、荧光性、和磷光。

在本文中，荧光激发源是那些能够发出荧光或提高到光子发射态的物质（即，电磁辐射、直接的电场、温度、荧光、辐射、闪烁、物理接触、和机械破裂等）。例如，当单元被放射性化合物标记后，放射活性的发出引起闪烁层的试剂的分子被激发而导致荧光。

当聚合物的单元被暴露于试剂时，就在它们之间产生信号。这些信号提供关于该聚合物的信息。例如，如果蛋白质聚合物的全体某种特定的单元如全体的丙氨酸都被用某种光发射化合物所标记（内部标记或外部标记），则在与试剂的相互作用中检测到了该光发射化合物的特征性信号的话，这些信号就表示丙氨酸残基存在于聚合物的某个具体的位置。如果每一种单元，例如每一种氨基酸，都被具有独特的光发射形式的不同的光发射化合物所

标记，那么，每个氨基酸就会与试剂相互作用来产生独特的信号。根据对每个信号所代表的是聚合物的那一个单元的确定，则就可以确定这些单元的序列。

这些单元与试剂之间的相互作用可以具有多种形式，但不一定要求这些单元与试剂之间发生物理性接触。这些相互作用的举例如下。第一种相互作用中，试剂是电磁辐射，聚合物的单元是光发射化合物（被光发射化合物内部标记或外部标记）。当光发射单元被电磁辐射（例如，具有适宜的波长的激光束，或从供体荧光团发射的电磁辐射）所接触，则电磁辐射造成光发射化合物发出特定波长的电磁辐射。然后可以检测到信号。该信号表现了光发射的特征形式，因而表明聚合物存在着被特定标记的单元。在这种情况下，聚合物的单元就被称为“可检测地影响从光发射化合物所发出的电磁辐射”。

第二种相互作用的形式中，试剂是荧光激发源，聚合物的单元是光发射化合物或放射性化合物。当光发射单元被荧光激发源接触时，该荧光激发源造成光发射化合物发出特定波长的电磁辐射。当放射性的单元被荧光激发源接触时，则该单元发出的核辐射造成荧光激发源发出特定波长的电磁辐射。这时，就可以检测到有关信号。

这些相互作用形式的变型中，会有相互作用中的第三种成分存在，即涉及产生信号的邻近化合物。例如，单元可以被供体荧光团形式的光发射化合物所标记，近似化合物可以是接纳荧光团。如果让光发射化合物处在激发态并被送到邻近接纳荧光团的位置，那么，在供体与接纳体之间会发生能量转移，产生出信号，该信号可以作为存在着光发射单元的检测尺度。让光发射化合物

暴露于光（例如，激光束）或暴露于荧光激发源，就可以让其处于“激发态”。

另一种相互作用涉及的邻近化合物是猝灭源。在这种情况下，光发射单元被暴露于光而引起发出电磁辐射。如果光发射化合物被放在邻近猝灭源的位置，那么，从光发射单元发出的信号就被改变。

还可以创造出与上述的相互作用平行的一系列相互作用形式，然而，其中的光发射化合物是邻近化合物，单元是猝灭源或接纳体来源。在这些情况下，试剂是由邻近化合物发出的电磁辐射，将单元放在与邻近化合物处于相互作用地靠近的位置就产生信号，即在单元与这样的辐射之间的相互作用的特征。

这些相互作用产生可检测的信号的作用机制都是本领域所熟知的。为了举例说明的目的，下面给出的机制是根据本发明的供体与接纳体荧光团相互作用，产生可检测的信号，包括这种相互作用的有关的实际限制，以及对这些限制的降低和消除的方法。

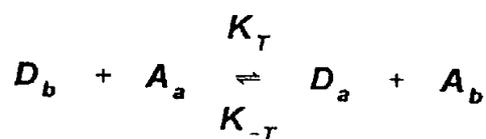
在优选的实施方案中，单元与试剂之间的相互作用所产生的信号来源于荧光团之间的荧光能量共振转移（FRET）。无论是单元还是贴近的化合物/试剂都可以用供体或受体荧光团来加标记。FRET 是荧光团之间的光子能量转移。FRET 作为一种描述分子细节的手段是有前途的，因为它有能力测量分开 10 至 100 埃的两个点。FRET 的“埃”级分辨率已经被用于许多分子动力学和生物物理现象的研究（参照 Clegg, 1995; Clegg, 1992; Selven, 1995; Wu 和 Brand, 1994）。由供体和受体荧光团之间的能量转移所引起的 FRET 的分辨力上升将取决于探头之间的距离的负 6

次幂。实际上，这种分辨率比分辨率最高的电子显微镜法要高出大约一个数量级。

为了进行 FRET，供体的发射谱应与受体的激发谱重合。具体地说，聚合物单元被受体荧光团特异性标记。试剂是供体荧光团。将激光调谐到供体荧光团的激发波长。在聚合物通过通道移动时，供体荧光团发射其特征波长。当受体荧光团进入与供体荧光团相互作用的距离时，受体荧光团被来自供体荧光团的能量激活。这种相互作用的结果是供体荧光团的发射猝灭而受体荧光团的发射得到增强。

为了产生供检测使用的高效率的最佳 FRET 信号，应当满足两个条件。第一个条件是在受体缺席时，供体提供高效率的发射。第二个条件是在 FRET 期间，无论是供体还是受体的发射都发生有效的变化。

在模型系统中，供体荧光团和受体荧光团两者都能无限地引起光子发射。在这种情况下，在能量转移期间供体发射的减弱等于受体发射的增强。换言之，就供体和受体两者而言发射的变化是相同的。之所以如此是因为每发生一件供体发射猝灭事件就相应地有一个等同的受体发射事件发生。*Cantor* 和 *Schimmel* (1980) 提出这种模型系统的直观轮廓。考虑的是两种荧光团(一种供体和一种受体)的系统。在 Forster 距离范围内，出现非常弱的耦合。供体和受体之间的相互作用被概括成：



其中  $D_a$  和  $A_a$  是基础单重态，而  $D_b$  和  $A_b$  是一级激发单重态， $k_T$  和  $k_{-T}$  是正向和逆向的能量转移率。上述反应说明，就给定的一级激发态供体而言，它将通过内转换迅速地失去能量，最终达到其基态  $D_a$ 。由于受体的吸收能谱与供体的发射能谱重合，所以有非常弱的耦合出现，从而允许发生能量共振转移。

作为能量共振转移的结果，供体 ( $D_b$ ) 和受体 ( $A_b$ ) 两者都处于受激振动状态。振动的松弛迅速地将这些带到它们各自的基础振动级。振动的松弛非常有效，而且受激振动状态的平均寿命只有  $10^{-15}$  秒 (Skoog 等人, 1992)。另一方面，荧光团分子的内转换大约是  $10^{-9}$  秒。这种速率上的差异意味着即使  $k_T$  是非常有效的，逆反应 ( $k_{-T}$ ) 也未必发生。因此，在这个理想系统中有受激供体和受体种群的相对错位。

上述分析陈述了使用单一受体和单一供体的系统。相同类型的相互作用可以在利用许多受体和许多供体的系统上实现。无论什么时候受体都处于其基础单重态  $A_a$ ，所以能够发生能量转移。这意味着对于寿命为 1 ns (纳秒) 的受体，可以每秒激发  $1 \times 10^9$  次，与标准照明条件下的供体荧光团 (大约每秒激发 25,000 次) 相比这是非常高的速率。由于受体能够经受的最高激发次数比单个供体荧光团的高得多，所以多个供体可以将它们的能量转移给一个受体。

虽然受体激发到较高的能级 ( $A_b$ ) 和供体同时去活事件可以被看成是在采用多个供体和一个受体的系统中导致干扰所产生的信号的潜在问题，但是下面的分析证明情况不是那样。激发到较高的能级和供体同时去活事件将不可能干扰信号的发生。

将受体激发到较高的能级意味着在理论上可能有进一步的激发，将受体从第一单重态 ( $A_b$ ) 激活到更高的单重态 ( $A_x$ )。如果这确实可能，那么在给定时间内激发事件的最高次数将由于有效寿命较短而增加。因为受体已不必为了经历能量转移去活所以出现较短的有效寿命。如果受体吸收的转移能量与供体发射的能量一致（对于大多数分子通常不是这种情况），这种能量转移才能在受体中出现。因此，在供体和受体之间的能量转移只有在受体处于其基础单重态时才可能发生。

在供体同时去活的情况下，只有一种供体能够将能量转移给该受体。这意味着其它供体不猝灭并发射辐射。如果同时事件频繁发生，那么上述多个供体猝灭的情况将不象能够发射光子的供体份额那样精确。下述的概率计算证明这种事件在统计学上并不频繁从而支持多供体猝灭的运用。

在 1 ns 内发生 k 个供体同时发射的概率  $n = P_{n,k} = (P_k)({}_n C_k)$ ，其中 n 是荧光团数。

不能经历能量转移缩短供体发射数 =

$$(2-1)P_{n,2}t = (3-1)P_{n,3}t + \dots + (n-1)P_{n,n}t = \sum_{k=2}^{n-1} (k-1)P_{n,k}t$$

这些计算的目的是算出在给定的持续时间内供体同时去活事件的数量。这个数字是重要的，因为交叠事件数 (the number of overlapping events) 越大，供体能量转移的百分数就越小。例如，有可能确定对于 4 个荧光团 ( $n=4$ ) 在 1 纳秒中发生两个供体同时发射 ( $k=2$ ) 的概率 ( $P_{n,k} = P_{4,2}$ )。在这个实例中，每次发射持续 1 纳秒而且在光栅中被表示成蓝色圆点。此外，每个荧光团平均每秒钟随机地发射 25,000 个光子。这些变量被定义为  $n =$  荧光团数； $k =$  供体同时发射的次数； $P =$  概率； $C =$  组合；以

及  $t =$  时间。对于  $n$  个荧光团在 1 纳秒内发生  $k$  个同时事件的概率 ( $P_{n,k}$ ) 等于  $k$  次同时事件的概率 ( $P_k$ ) 乘以对于  $n$  个荧光团可能发生  $k$  次同时事件的组合数 ( ${}_nC_k$ )。同时事件的总数作为同时事件的所有可能情况的概率之和给出。这样以 (事件数/纳秒) 为单元给出概率。因此, 经历同时发射的荧光团总数是针对 1 纳秒计算的概率乘以给定的时间 ( $t$ )。考虑在给定时间 ( $t$ ) 内发生更多个供体同时发射的概率 ( $P_{4,3}$  和  $P_{4,4}$ ) 也是必要的。依据这些信息, 可以推算出由于同时去活不能经历能量转移的供体荧光团的数量。

在 1 纳秒时间内 4 荧光团中有两个供体同时发射的概率由下式给出:

$$P_{n,k}=P_{4,2}=(P_k)({}_nC_k)=P_k \frac{n!}{k!(n-k)!} = \left( \frac{25000}{10^9} \right)^2 \left( \frac{4!}{2!2!} \right) = 3.75 \times 10^{-9}$$

1 纳秒包含 1 次发射的概率是  $25,000/10^9$ 。在同一纳秒内发生两次发生的概率是上述概率的平方  $(25,000/10^9)^2$ 。由于有 4 个不同的荧光团, 所以有 6 种可能产生同时发射的不同组合 ( $4!/2!2!$ )。这些数值相乘得到  $3.75 \times 10^{-9}$  事件/纳秒。这个值乘以  $10^9$  纳秒得到 3.75 事件/秒。在这种情况下, 有每个事件中的两次发射 ( $k=2$ ) 和这些 ( $k-1$ ) 之一不能经历能量转移, 所以不经历 FRET 的供体发射总数是 3.75 事件/秒。

上述的简单计算可以应用于具有更多数量荧光团的系统。在这种情况下, 可以考虑 1000 个荧光团 ( $n=1000$ )。以类似的方式计算出  $P_{1000,2}$  是  $3.122 \times 10^{-4}$  事件/纳秒。不能经历能量转移的供体发射次数是  $3.122 \times 10^5$ 。在某些情况下, 可能发生三个供体同时发射。这些事件的概率 ( $P_{1000,3}$ ) 被算出, 它等于:

$$= \left( \frac{25000}{10^9} \right)^3 \left( \frac{1000!}{3!997!} \right) = 2.596 \times 10^{-6}$$

不能发生的供体发射数是 $(3-1)(10^9)(2.596 \times 10^{-6})$ ，即  $5.192 \times 10^3$ 。在类似的方式中，四重或更多重同时发射的计算需要包括在不能经历能量转移的供体荧光团的实际数量之内。这个数字被表示成下式：

$$= (2-1)P_{n,2}t = (3-1)P_{n,3}t + \dots + (n-1)P_{n,n}t = \sum_{k=2}^{k=n} (k-1)P_{n,k}t$$

对上式求解得到不经历能量转移的供体发射数为  $3.174 \times 10^5$ 。供体发射是以下述数值计算的：25000 光子/秒/荧光团，1000 个荧光团和 1 秒时间间隔。这意味着每秒钟将发射  $2.5 \times 10^7$  个光子。结论是 98.7% 的供体事件能经历能量转移。

从上面对多供体/单受体系统的讨论得出的结论是一个受体可以与多个供体一起经历能量转移。考虑到的限制是将受体激发到较高的能级，供体同时去活的限制也被考虑在内。在供体发射同时发生时，只有一个去活的供体能够与该受体一起经历能量转移，如果这种情况经常发生，那么该受体将不能与供体发射事件一起经历能量转移。概率计算表明对于在标准照明条件下的 1000 个供体/1 个受体的系统有 98.7% 的供体发射事件能够与受体一起经历能量转移。从这些详细分析得到的总结论是多供体/单受体系统确实可以存在，而且单一受体能够与大量的供体分子一起经历能量转移。

下面介绍对于多供体/单受体系统的供体和受体荧光团如何选择优化条件。为了优化该系统，应当考虑这个系统在实际运行时可能出现的两个问题。这些问题是光漂白作用和溶解猝灭作用（Rost, 1990; Menter 等人, 1978; Giloh 和 Sedat, 1982; Vaughan 和 Weber, 1970; Guilbault, 1973; Udenfriend, 1962; Pringsheim, 1963）。这些作用可能限制荧光团所能经历的激发循环的数量。与在理想系统中荧光团能够经历无限次激发的情况相反，实际上所能经历的激发循环的次数是有限的，取决于溶剂条件和激发光线的强度。但是，在多供体/单受体系统中所产生的信号可以在某些实验条件下得到优化。

优化和产生有效信号的理论如下。基本原理是只要模型条件得到尽可能接近地模拟，信号就能产生。回想一下理想的荧光团能够经历无限次激发循环的情况。如果实际的荧光团具有类似的行为方式，那么只要光子发射的时间累积是充分的任何数量的荧光团都能被检测到。实现接近理想条件的方法之一是使荧光团固定在固体介质中。将荧光团镶嵌在固体介质中可以消除光漂白作用和猝灭作用（Haughland, 1996; Garland 和 Moore, 1979; Rost, 1991），而且某些类型的荧光团是特别稳定的（例如在植物细胞壁中的阿魏酸、铀酰玻璃和吡啶黄素）（Rost, 1991）。这将显著地增加可能的激发次数。尽管镶嵌在固体介质中，供体荧光团可以持续数小时产生荧光信号（Rost, 1991）而且仍然能与受体一起经历 FRET（Stryer, 1978; Cantor 和 Schimmel, 1980），反之亦然。此外，众所周知，受体能够在溶剂条件下持续数小时与供体一起经历能量共振转移（Wittwer, 1997; Lee 等人, 1994; Uchiyama 等人, 1996; Livak 等人, 1997）。受体猝灭提供稳定信号的供体的能力转译成产生非常有效的信号的能力。

业已证明受体在溶剂条件下可以在延长的时间周期内与供体一起经历能量转移 (Witter, 1997; Lee 等人, 1994; Uchiyama 等人, 1996; Livak 等人, 1997)。证据来自基于蛋白质和核酸切割检验的实验。在这些检验中, 特定底物在其带一端被供体或受体荧光团所标记。由于底物的长度在供体-受体对的 Forster 距离范围内, 所以该供体的荧光被猝灭。监视供体的荧光允许进行基于光线的切割检验。在这种方法中, 供体荧光增强与特定的酶的切割活性成正比。这种类型的分析化验 (通常被称为荧光切割检验) 业已用于多种系统的研究, 包括 HIV 蛋白酶 (Matayoshi 等人, 1990; Toth 和 Marshall, 1990)、中性蛋白酶 (Ng 等人, 1989)、EcoRV 限制核酸内切酶 (Erskine 和 Halford, 1994)、PaeR7 核酸内切酶 (Ghosh 等人, 1994)、DNA 聚合酶 I 5'-3' 核酸外切酶的活性 (Wittwer 等人, 1997; Livak, 1997)、嗜热菌蛋白酶 (Yang 和 Van Wart, 1994) 和木瓜酶 (Garcia-Echeverria 和 Rich, 1992)。这些实验的确切性是重要的, 因为它们包含受体在延长的时间周期内能够猝灭供体的证据。在荧光切割检验中, 对照组包括在实验持续期间监视未切割的底物 (在没有切割酶时)。对于特别漫长的实验, 需要在延长的时间周期内监视这些对照组。在这些对照组中供体荧光没有增强直接证明受体在相当长的时间内能够猝灭供体。

因为受体的能态保持不变, 受体在延长的时间周期内保持其转移能量的能力。在受体吸收的能量与供体发射的能量一致时, 发生能量转移。能量转移的结果是基础单重态 ( $A_a$ ) 向受激单重态 ( $A_b$ ) 的转变。受体通过内转换 (荧光内转换或非辐射的内转换) 失去能量。前面引证的研究工作证明, 尽管是非理想实验条件, 受体仍保持它们的相对能级并因此保持它们经历能量转移的能力。

荧光团通常在溶液中经历的激发周期数大致为 35,00 个周期 (Rost, 1991)。但是, 荧光团在溶液中的激发周期数受前面讨论过的溶剂作用 (如氧猝灭、碰撞猝灭和受激态反应) 的限制。可以通过调整溶剂条件使激发周期数得到优化 (Haughland, 1996)。为了优化检测受体荧光的条件, 可以采用各种各样的化学方法。业已发现, 叠氮化钠 ( $\text{NaN}_3$ )、碘化钠 ( $\text{NaI}$ )、二硫苏糖醇 (DTT)、二硫赤藓糖醇 (DTE)、连二亚硫酸钠、倍倍酸丙酯和聚乙烯醇 (PVA) 对各种荧光团都是有效的 (Bock 等人, 1985; Johnson 等人, 1982; Picciolo 和 Kaplan, 1984; Gill, 1979; Giloh 和 Sedat, 1982; Valnes 和 Brandtzaeg, 1985)。人们还发现  $\beta$ -巯基乙醇、硝普酸钠以及将电子供体与带 SH 基团的分子合并也是有效的 (Franklin 和 Fillion, 1985; Spatz 和 Grabig, 1983; Hamada 和 Fujita, 1983)。此外, 用于减少荧光团溶液褪色的工业反应剂也是可以利用的。*SlowFade* (Molecular Probe, OR) 组合物将二氢荧光素的褪色率减小到几乎等于零。因为它使来自二氢荧光素的发射强度几乎保持不变, 所以 *SlowFade* 试剂对使用共焦激光扫描显微镜法的定量测量和应用是特别有用的, 在这些测量和应用中激发强度可能是极度的和长时间的。对于在推荐的优化条件下运行的系统, 最初的供体发射和有受体存在时供体发射的变化两者都具有接近理想条件下的效率。

在本文中术语“可检测的信号”是能用常规技术检测的任何类型信号。所产生的信号取决于试剂、测站、单元和邻近化合物 (如果存在的话) 的类型。在一个实施方案中, 信号是由带 (内源或外源) 标记的聚合物单元或邻近化合物的光发射产生的电磁辐射。在另一个实施方案中, 信号是放射性辐射与闪烁层相互作用产生的荧光。受检信号可以储存在数据库中以供分析。分析储存信号的方法之一是将储存的信号与来自另一种聚合物的签字进行比较, 以便确定两种聚合物之间的亲缘关系。另一种分析储

存信号的方法是将受检信号与代表已知聚合物特征的已知的签字进行比较，以确定被分析的聚合物与已知聚合物的亲缘关系。下面将详细地讨论信号的比较。

可以检测一个以上可检测的信号。例如，第一个体单元可以与试剂或测站相互作用以产生第一可检测信号，而第二个体单元可以与试剂或测站相互作用以产生不同于第一可检测信号的第二可检测信号。这样可以检测在一种聚合物上的多种单元。

可检测信号是在测站中产生的。本文中的术语“测站”是某个区域，在这个区域一部分待检测的聚合物（即单元）被检测，即被暴露，以便产生信号或随聚合物变化的脉冲。所述测站可以由任何材料组成，包括气体。优选的测站是非液体材料的。“非液体”具有它在技术上的常规含义。液体是以其成分分子在其自身中自由运动且没有分离倾向为特征的非固体、非气体物质。在另一个优选实施方案中，所述测站是固体材料。在一个实施方案中，当单元与试剂相互作用时，所述测站是相互作用测站。所述测站还可以是信号发生测站，下面将对它进行详细讨论。文中所使用的“相互作用测站或位点”是一个区域，在这个区域中可以使聚合物单元和试剂彼此的相对位置足够接近，借此它们可以相互作用。例如，适合荧光团的相互作用测站是它们足够接近以致它们可以发生能量相互作用产生信号的区域。

在优选的实施方案中相互作用测站是纳通道的一个区域，定域在这里的试剂（如受体荧光团）附着在形成该通道的壁面上并且能够与通过该通道的聚合物相互作用。聚合物通过试剂定位区的那个点就是相互作用测站。当聚合物中每种带标记的单元在试剂旁通过时，就产生可被检测的信号。试剂可以以各种方式定位在通道区内。例如，试剂可以镶嵌在形成通道壁的材料中，或者

试剂附着在壁材料的表面。另外，试剂可以是光源，该光源离开所述通道一段距离但能够通过波导管直接将光线传输到通道区。还可以使用这样的装置，在该装置中可以通过多重通道输送多种聚合物。下面将更详细地讨论这些和其它与本发明有关的实施方案。可以通过使用沟槽或环引导聚合物来帮助聚合物移动。

本发明还包括建立相互作用测站的其它安排。例如，聚合物可以通过系留在壁表面或镶嵌在壁中的分子马达，借此将聚合物单元依次带到特定位置，优选的是带到贴近试剂的相互作用距离内，借此定义相互作用测站。分子马达是一种化合物，如聚合酶、螺旋酶（*helicase*）或肌动蛋白，该化合物与聚合物相互作用并且沿着聚合物长度经过每个单元输送过去。同样，聚合物可以保持不动，而读数器沿着聚合物运动，该读数器已经附着有试剂。例如，试剂可以被保持在沿着聚合物长度扫描的扫描尖内。当试剂被移动到进入与每个聚合物单元发生相互作用的距离时就建起了相互作用测站。

一旦产生信号，就可以检测它。检测装置的具体类型将取决于所产生的信号类型，当然，所述信号类型将取决于在单元与试剂之间发生的相互作用类型。在本发明的方法中涉及到的许多相互作用将产生电磁辐射信号。适合检测电磁辐射信号的许多方法在技术上已知的，包括二维或三维成象系统。

最近已有报道介绍使生物系统中的荧光成象的三维成象系统。Dickson 等人已经介绍过单分子在凝胶微孔中的三维成象（Dickson 等人，*Science*, 274: 966-969, 1996）。Dickson 等人研究了界定的环境对单一的荧光分子的布朗运动的影响。用聚丙烯酰胺（PAA）凝胶捕获游离荧光染料单分子和与蛋白质键合的荧光染料单分子。尼罗红被并入有微孔的聚丙烯酰胺凝

胶，其中微孔尺寸大约为 2 纳米。荧光团凝胶被通过全内反射（TIR）所产生的损耗波激发，并检测在凝胶的微孔内单分子的运动或活动抑制。TIR 法利用激发强度的指数型下降产生与微孔中的分子有关的三维信息，以确定荧光团离开界面的距离。通过两种情况研究观测到的运动和理论上的布朗运动之间的差异。对于游离荧光团的情况，布朗运动减少  $10^4$  倍。带标记的蛋白质在空间上完全保持静止。通过直接模拟，纳通道的空间在纳通道 FRET 猝灭时应当限制或消除带标记的 DNA 的布朗运动。这将为预期的 DNA 稳定地通过纳通道创造条件。

按照本发明的方法使用的显微系统的实例是在 Ishijima 等人在 Cell, 92: 161-171 (1998) 中提供的系统。

二维成象系统是重要的，因为它们在参数方面具有噪声低、量子效率高、象素与图象的相关关系适当和节约处理时间等优点。用于检测信号的设备实例是检测荧光波段电磁辐射的二维荧光成象系统。

基于测量荧光信号的荧光成象系统有三个领域，包括测量强度、寿命和光谱。可以采用各种方法来捕捉强度信号，包括电荷耦合器件（CCD）摄像机、条纹摄像机和硅二极管阵列。由于 CCD 摄像机广泛地用于工业应用中，所以它是这些方法中最通用的。条纹摄像机提供飞秒（ $10^{-15}$  秒）以下的优异的瞬时清晰度。硅二极管阵列具有优异的动态范围、信噪比和瞬时清晰度（通常帧频为 1000/s.），但是象元比较大（ $25 \mu\text{M} \times 500 \mu\text{M}$ ，而电荷耦合器件 CCD 只有  $20 \mu\text{M} \times 20 \mu\text{M}$ ）。每种设备都可以与本发明的方法一起使用，但 CCD 摄像机是优选的。

寿命和光谱成象是由仪器组合完成的，其中包括选通图象增强器、脉冲激光器和 CCD 摄像机。时间选通法（一种与寿命相关的技术）涉及按时间识别从背景到自身荧光的荧光信号。Periasamy 等人提供一份综述，介绍用于临床的时间选通荧光显微镜法，在此通过引证将其并入本文 [Periasamy 等人，*Microscopy and Analysis*, 33-35, (1995)]。寿命成象采用时间选通或相位调制技术，以确定荧光的寿命。光谱成象确定每个象素处的发射光谱。时间选通和寿命成象技术提供许多优于简单的 CCD 成象的优点，例如有较好的信噪比和更大的染料特性，因此也是用于本发明检测方法的优选设备。

第一种类型的成象技术，即强度成象，通常涉及使用 CDD 摄像机或 ICCD 摄像机独立地捕捉强度信号。这是符合本发明要求的检测信号的方法，因为它具有简单性。CCD 和 ICCD 摄像机很容易从供应商（即 Photometric, Hamamatsu, Princeton, Instruments）那里买到。

CCD 是二维的硅材料，它有许多被称为象素的光敏元件，这些光敏元件能够保存光子相互作用所产生的电荷。CCD 暴露在荧光光子发射下将在各个象素中引起电荷累积。在曝光完成后，将整行的累积电荷朝串行的 CCD 寄存器输送。在这个串行寄存器中，各个象素的累积电荷被输送到读出放大器，该放大器产生与电荷量成正比的信号。以相同的方式读 CCD 的每一行，直至该图象被成功地转换成信号的二维顺序为止。在 CCD 与 CCD 串行寄存器之间的电荷转移是极为有效的（99.9999%有效）。输出放大器对所测量的模拟信号产生线性响应，并且在 8 位和 16 位之间将该图象数字化。

在读出该图象时，有两个选择，CCD 摄像机通常用它们来修改图象。这两个选择是读出子阵列和重新分级（即电荷编组）子阵列。经过编程的 CCD 摄像机能够有选择地处理在感性趣的指定区域中的象素。指定感性趣的区域的优点是允许更快地形成读出图象。由于每个象素的处理和数字化时间是固定的，所以允许所需的较小区域有较高的帧频。从子阵列读出较小的区域是可能的。例如，可以以 1MHz 的象素读出频率从  $1024 \times 1024$  象素的 CCD 中以 100 帧/秒的帧频读出  $100 \times 100$  象素。另一方面，重新分级是将若干较小的象素合并成一个较大的象素以便缩短读出时间，它允许将来自几个象素的电荷合并。在重新分级期间 CCD 在低分辨率下工作，以便增大动态范围和提供较高的帧频。动态范围是 CCD 能够线性检测的最大信号与读出基础噪声之比。例如， $1024 \times 1024$  象素 CCD 经  $4 \times 4$  重新分级得到  $256 \times 256$  的图象，该图象具有比未经重新分级的版本大 16 倍的象素。但可以以 16 倍的速度读出该图象。CCD 的特殊操作模式是由该摄像机的零部件和主计算机限定的。

为了理解 CCD 的控制，有三种典型的 CCD 零部件是需要讨论的，包括摄像机控制器、电子电路单元和摄像头。在主计算机和摄像机之间控制器起输入和输出的中间处理器的作用。控制器包含使摄像机执行某些主机命令的逻辑电路。此外，它还将数字化的象素数据转发给计算机。该控制器内部有一些适合确定 CCD 相的坐标和给模拟信号处理单元定时的必要的顺序。电子电路单元将数字化的命令变换成有效的时钟信号和顺序。此外，该单元包含 A/D 转换器。通常使用 8 位到 16 位的数字转换器。摄像头包含 CCD 和冷却装置。液氮或珀尔帖冷却是通用的。

在基本理解 CCD 摄像机的操作的情况下，考虑摄像机的性能是最重要的。具体地说，这些参数是噪声、线性度、量子效率

和瞬时清晰度。有四种重要的噪声分量。它们是暗电流、读数噪声、起伏噪声和灯光噪声。暗电流是在 CCD 内的微弱电流。由于即使在黑暗中也有电荷累积，所以有这项。CCD 的温度越低，暗电流就越小。热电制冷器或液氮能够降低 CCD 的温度，从而降低暗电流。 $-120^{\circ}\text{C}$  的温度可以将暗电流降低几个数量级。多路定相(MPP) (Multi-pin phasing) 是新 CCD 技术，它能将暗电流降低 100 倍或更多。读数噪声是由输出前置放大器引起的在较高的帧频下产生的随机电荷。随着收集率增大，读数噪声也增大。在温度低于 $-60^{\circ}\text{C}$  时读数噪声可以显著降低。通常也称为光子噪声的起伏噪声起因于光的量子特性。它是光子信号的平方根。在低亮度级，相对的起伏噪声高并往往掩盖所需的信号。灯光噪声是由照明光源的亮度波动引起的并且可以通过使用稳压电源得到控制。在 CCD 摄像机的定量应用中，灯光噪声往往是非常被忽略。

在用荧光显微镜法进行定量分析期间，光度计的线性变成特别重要的。就在本发明的方法中的用途而言，线性度的概念不是太重要的，因为一般地说线性的操作器将不应用于 CCD 数据。由于 CCD 的电荷生成机理本来就是线性的，所以输出信号精确地与电荷成正比。在 CCD 与数字转换器之间的电子电路提供漂移的余地。高科技的 CCD 通常呈现小于 0.1% 漂移的线性度。在大多数情况下，这样的线性度是难以测量的，因为它的线性度高于检验它所用的技术。

量子效率是在到达 CCD 的光子中通过相互作用在 CCD 中产生电子-空穴对的份额。量子效率的范围从 10% (低级的 CCD) 到高达 80% (背面照明的高科技 CCD)。还有量子效率的谱漂移，而且峰值通常出现在可见光波长。背面照明的 CCD 在所有的谱线位置都具有高得多的量子效率。

在讨论摄像机可能达到的帧频时, CCD 摄像机的瞬时清晰度是重要的。曝光时间因给定的应用而变化, 而曝光时间可以借助所用荧光团的数量和激发光强度来进行调节。在给定的摄像机中, 瞬时清晰度的限度是模数转换器工作频率和图象尺寸的函数。例如, A/D 转换器在 1MHz 下工作则可以用 1 秒钟读 100 帧  $100 \times 100$  的图象。此外, 所需动态范围越大, 读数频率就越低。例如, 目前以每象素 14 位进行数字化的 CCD 摄像机在 1MHz 以上运行是困难的。使用并联的串行寄存器器件可以突破由一个 A/D 转换器所强加的种种瞬时限度。用这样的器件速度增加与可利用的信道数量成正比。在 1MHz 下工作的带 4 个输出寄存器的 CCD 摄像机可以以每秒 400 帧的速度获得 14 位的  $100 \times 100$  象素图象。不能突破的速度最大限度是由象素读出时间决定的, 该读出时间在  $20 \mu\text{s}$  至  $500 \text{ns}$  之间变化。对于  $100 \times 100$  象素的图象, 甚至最慢的象素读出时间也能达到 500 帧/秒。因此, 与其说读出时间制约帧频, 不如说正是 A/D 转换器限制帧频。作为这种观点的证据, 采用  $128 \times 128$  阵列已经能够获得 2000 帧/秒的帧频 (Ichikawa 等人, 1992)。

在本发明的方法中特别有用的 CCD 摄像机是象素大、噪声低和扫描时间短的摄像机。大象素尺寸具有较大的井容量 (well capacity) 并允许收集更多的光子, 并因此得到更高的信噪比最大值。鉴别强度变化的基础是高信噪比 (下面将简短地讨论)。因此, 低噪声有助于改善信噪比 (SNR)。井容量比较小且动态范围比较窄的 MPP 型 CCD 器件是不大适合的。由于扫描收集短, 所以瞬时清晰度高, 从而允许高容量的数据流, 该数据流应当能够实时地储存在计算机的 RAM 或硬盘中。量子效率应当是适当的。CCD 的线性度不是关键, 但假定它是高科技级的 (0,1%)。因为构成图象的供体荧光团具有大致相同的强度, 动态范围也不是关键。

增强型 CCD (ICCD) 摄像机除了 CCD 摄像机之外还包括光 (电) 阴极、微通道板 (MCP) 和荧光屏。荧光照射在光电阴极上, 将光电子释放给 MCP。该 MCP 是二次电子倍增器, 它包括数百万个玻璃毛细管 (通道) 融合成薄盘形的阵列。当光电子入射在这些通道上时产生二次电子。这些电子通过那些通道产生一直接受控的放大倍数作为仪器的增益。MCP 中每个通道对应一个象元。MCP 的输出聚焦在荧光屏上, 在那里电子由于 MCP 放电而跑出来。光学图象在荧光屏上重现并被 CCD 摄像机捕获。

在某些实例中, 优选的是采用 ICCD。附加图象增强器提供高速选通和高增益。选通可能是 ICCD 最重要的方面。它是通过控制供给图象增强器的输入电压所产生的电子快门作用。现在, 时间分解成象法完全可能具有纳秒和低于纳秒的选通时间 (Thomas 等人, 1992)。因为背景信号的瞬时鉴别, 选通将允许更多的信号检测。在时间选通的荧光显微镜法和荧光寿命成象显微镜法的脉冲法中可以看到瞬时鉴别和信噪比的提高。图象增强器的增益被用于提高摄像机的灵敏度并在荧光寿命成象显微镜法的相位调制法中充当工具。电子增益可以高达 10,000:1。这允许将微弱的光学信号放大到高于读数噪声。

单一光子事件可以用 ICCD 检测。例如, Sase 等人在 1995 年利用 CCD 摄像机、图象增强器和表荧光显微镜法 (epifluorescence microscopy) 已经实现了单荧光团成象。在 Sase 等人的论文“用荧光显微镜法在运动肌动蛋白上的单荧光团实时成像” [Real Time Imaging of Single Fluorophores on Moving Actin with an Epifluorescence microscopy] 中论述了单荧光团能够以高检测效率实时成象。其它已经实现分辨单分子灵敏度的方法包括荧光关联能谱法 (Eigen 和 Rigler, 1994; Kinjo 和 Rigler, 1995)、远场共焦显微镜法 (Nie 等人, 1994)、低温荧光显微镜法 (Karthan 等人, 1995)、单分子的光子猝发计数 (Haab 和

Mathies1995; Castro 和 Shera, 1995; Goodwin 等人, 1995; Peck 等人, 1989; Nguyen 和 Keller, 1987; Lee 等人, 1994; Chen 和 Dovichi, 1996; Shera 等人, 1990; Soper 等人, 1992)、二光子受激的荧光 (Mertz, 1995) 和电化学检测 (Fan 和 Bard, 1995)。

SNR 的数值可以基于对 CCD 摄像机的各项要求进行计算。例如, 满足前面陈述的判据的 CCD 是 EEV 05-20CCD (Princeton Instruments, Princeton, NJ), 它具有表 1 中陈述的技术指标:

CCD 格式	1152 × 770	动态范围, 位	14 至 17
象素尺寸, μs	22.5 × 22.5	非线性度, %	<1(16 位)
全井容量, ke'	500	在 -120°C 下暗电荷, 电子/帧-小时	<1
读数噪声, e'	4-6, 50Hz; 22, 500Hz	量子效率, %峰值	40

为了计算 SNR, 需要考虑各种噪声值的方程。在任何检测系统中总有基础噪声, 该噪声可能妨碍微弱的间断信号的检测。从直觉上说, 所需信号越强, 基础噪声就变得越不重要。通过增加荧光团的数量或激发强度可以获得较强的信号和较高的信噪比。计算 SNR 的公式是:

$$SNR = \frac{PE}{\sqrt{(N_{shot}^2 + N_{dark}^2 + N_{read}^2 + N_{lamp}^2)}}$$

$$PE = \frac{I\xi\rho tENG}{hv}$$

PE 代表从检测器发射的光电子数并且与检测器系统的效率 (E) 有关。效率越高, 就给定的光子数而言, 所发射的光电子数就越大。PE 还与荧光团数 (N)、前置放大器的增益 (G)、求和时间 (t)、光线强度 (I)、荧光团的摩尔消光系数 ( $\epsilon$ ) 和选定的荧光团所特有的荧光常数 ( $\rho$ ) 有关。 $N_{\text{shot}}$  代表由荧光团发射的随机起伏引起的噪声并且与所产生的信号幅度有关。信号越强, 起伏噪声也越大。 $N_{\text{dark}}$  和  $N_{\text{read}}$  是暗噪声和读数噪声。 $N_{\text{lamp}}$  是照明光源所产生的噪声。请注意, 重要的是在 SNR 中  $N_{\text{lamp}}$  可能具有相当大的影响。强度起伏为 1% 的照明光源可能只有 100:1 这样高的 SNR。在这种情况下, 灯光噪声通过采用稳压电源得以最小化。例如, 电源经过改进的市售的 (Uniphase) 氦氖激光器具有小于总强度的 0.002% 的强度起伏。此外, 钨丝灯可以配备稳压电源, 以使该灯泡的输出起伏小于 0.001%。表 2 列出各种变量并提供选择这些具体数值的理由。

表 2

变量	数值	理由
I	$30\text{W}/\text{cm}^2$	2W 激光器的强度是由 $P/A$ 给出的。A 是波束面积。激光器的强度为 $64\text{W}/\text{cm}^2$
$\epsilon$	$91,000 \text{ l}/\text{M cm}$	荧光素的摩尔消光系数
$\rho$	$3.8 \times 10^{-21} \text{ M cm}^3$	荧光素的荧光发射常数
t	0.010 s	以 100 帧/秒工作的 CCD 的求和时间
E	0.025	包括滤波器、物镜和 CCD 的量子效率的系统的收集效率
N	1000	合理的供体荧光团数/象素
G	60	典型的前置放大器的增益; ICCD 的增益可高达 10,000:1
h	$6.6261 \times 10^{-34} \text{ J s}$	普朗克常数
$\nu$	$6.1224 \times 10^{14} \text{ s}^{-1}$	$c = \nu\lambda$ ; $\lambda = 490\text{nm}$ (荧光素的激发波长)
$N_{\text{shut}}$	$632 e^{-1}$	$N_{\text{shut}} = PE$
$N_{\text{lamp}}$	$8 e^{-1}$	0.002% 强度起伏
$N_{\text{read}}$	$40 e^{-1}$	在高读出速度下对 EEV05-20CCD 的估算结果
$N_{\text{dark}}$	$\sim 0$	EEV05-20CCD 在 $-120^\circ\text{C}$ 下的值
SNR	631:1	来自上述方程

631:1 的 SNR 是高的。高 SNR 保证强度和强度变化两者的有效检测, 换言之, 在没有和有受体存在的情况下都保证了供体的发射。例如, 631:1 的 SNR 意味着说检测到 0.158% ( $1/632 \times 100$ ) 信号变化的置信度为 66%。说检测到 0.316% 的变化, 其置信度为 95%; 说检测到 0.475% 的变化, 其置信度为 99%。强度变化越大, 检测的变化也越大。在没有任何强度变化时较高的基准 SNR 考虑到为给定的强度变化百分比提供较大的置信区间。为了使检测信号变化的置信度达到最大值, 重要的是在有受体存在时产生大百分比的变化。

产生大百分比变化的方法之一是使多个供体荧光团群集在相互作用测站周围，例如在聚合物能通过的同心环中，以保证所有的供体荧光团都将与该受体一起经历能量转移。供体荧光团的这种同心环的适当的宽度是由供体的发射率和供体-受体对的 Forster 距离决定的。在受体通过时典型的强度变化分布 30%至 50%范围内，它毫不含糊地对应于 100%的置信度。

在 CCD 摄像机能够处理信号之前，所产生的每个信号都必须被检测器系统的象素捕获。每个象素都应当能够捕获来自单一相互作用测站的信号并且应当具有检测信号瞬时变化的能力。被一个象素检测的相互作用测站（如在纳通道上的试剂定位区）的面积是由检测器上的象素尺寸、图象的放大倍数和带测波长的衍射极限决定的。测量面积、检测器象素尺寸和放大倍数之间的关系由下式给出：

$$a = 2d/M$$

待测区域的大小是由  $a^2$  给出的，其中  $a$  是边长。检测器象素的边长由  $d$  给出。放大倍数由  $M$  给出。采用这些变量的常规值： $d = 15 \mu\text{s}$  和  $M = 60\times$ ，推算出测量区域的边长为 500 nm，恰好在波长为 500 nm 的信号的解释能力的范围内。在表面照明条件下适合显微镜样品的解象能力是由下式给出的（Matsumoto, 1993）：

$$R_f = 0.61\lambda / NA$$

$R_f$  是被解象的两个明亮点之间的最小距离。 $\lambda$  是供体发射的荧光的波长。NA 是显微镜物镜的数值孔径。因为 NA 与解象能力之间是反比关系，所以需要最高的数值孔径。NA 是由适合透镜选择的下述经典判据给出的（Taylor 和 Salmon, 1989）：

$$NA = n \sin\Theta$$

$n$  是浸渍介质的折射指数。使用折射指数较高的介质（如油）往往是符合要求的。 $\Theta$  是光轴与进入该透镜的最大边光之间的角度。就高质量高倍率的显微镜物镜而言，数值孔径可以高达 1.4。从上述的两个方程，就 500 nm 发射信号和 NA 为 1.4 的透镜而言，解象能力为 218 nm。

由上述计算得出的结论是在检测器单元上两个毗邻的象素每个都可以检测来自它们各自的相互作用测站的信号而不会混淆信号来源。通过仔细计算放大倍数和象素尺寸可以避免象素之间的交调干扰。例如，如果采用最小的象素尺寸（ $d = 6 \mu\text{m}$ ）和最大的放大倍数（ $M = 100\times$ ），那么受检区域的边长则为 120 nm。由于该系统的解象能力保持恒定在 218 nm，信号干扰将存在。在确定实验条件之前进行这些计算就可以避免这种情况。因此，通过调整放大倍数和检测系统上的象素尺寸可以获得测量区域与衍射极限相匹配的最佳数值。这个最佳数值可以通过设定边长等于或大于检测系统的解象能力从上述两个公式的联立方程求出：

$$2d/M \geq 0.61\lambda / NA$$

相互作用测站的密度可以变化，以致相互作用测站与检测系统的象素一一对应。例如，如果采用  $4 \times 10^6$  个纳通道/平方厘米的板，采用  $60\times$  的放大倍数和  $15 \mu\text{m}$  的象素尺寸，那么将发现每个象素占 0.01 个纳通道（相互作用测站）。相互作用测站的密度可以调整得更低，例如， $48 \mu\text{m}$  的微孔间最小平均距离也在适当的范围内。

除了强度成象之外，时间选通荧光显微镜法和荧光寿命成象两者都可以用于按照本发明的方法检测信号。时间选通荧光显微镜法和荧光寿命成象两者都是更复杂的方法，它们有一些优点，诸如荧光信号的瞬时鉴别和优于强度成象的信噪比。

如果有充分的背景散射或自身荧光，时间选通是符合要求的。在散射波长等于所需荧光团的发射波长时背景光散射就是一个问题。通过使用 Stokes 漂移大的荧光团致使散射波长比受检波长短可以避免散射的影响。在这种情况下，可以通过使用滤波器将散射光消除。另一方面，自身荧光是影响所有使用荧光显微术的研究的共有的问题。自身荧光可能是由溶剂、溶质和显微镜系统的光学零件引起的。自身荧光降低检测的信噪比。即使对检测器系统的各种零部件做了许多改进也还是这种情况（Periasamy 和 Hermen, 1994）。

时间选通荧光显微术（TGFM）利用不同的荧光寿命在自身荧光与荧光之间制造差别。可以选择寿命比自身荧光长的荧光染料。寿命短的自身荧光在少于  $1\ \mu\text{s}$  的时间内衰变到零，而寿命长的荧光可以显示从  $1\ \mu\text{s}$  到  $10\ \text{ms}$  的寿命（例如镧的螯合物、镧系元素的螯合物）。样品的激发可以用比自身荧光或荧光寿命短的短暂的强度脉冲来进行。接下来是指数型衰减。如果仅仅在荧光信号衰减后进行测量，寿命比较长的信号将以比较高的灵敏度得到测量。

适合 TGFM 的成象装置的实例是在 Periasama 的论文(1995)中提供的。在该参考文献中展示有表面照明能力和连续波（CW）激光器（Coherent or Spectra-Physics）的荧光显微镜，在所需的激发波长下发射。用带斩光控制的斩光器斩断激光器的激发光，以形成有规定的脉宽的激光脉冲。利用可变的中灰滤光片

(Omega Optics) 控制光线强度。为了使测量时间延迟, 延迟脉冲发生器被用于产生信号以控制高频选通图象增强器 (Hamamatsu) 或发射光路中的斩光器。CCD 摄像机 (Princeton Instruments or Photometrics) 用于收集信号。

荧光寿命表示分子在返回其基态之前保持在受激状态的平均时间长度。有两种测量荧光寿命的方法。这些是脉冲法和脉冲调制法 (Lakowicz, 1986; McGown, 1989; Gratton 和 Limkema, 1983)。在脉冲法中, 用短暂的光脉冲激发样品, 然后测量随时间变化的荧光衰减。在脉冲调制法中, 样品是用正弦调制的光线激发的。相移和解调被用于计算寿命。直到最近, 寿命测量才与小杯样品 (cuvette samples) 起使用。在过去的 5 年中, 已经研制了一些方法将显微镜的二维分辨力与高分辨的寿命测量结合起来 (Rodgers 和 Firey, 1985; Wang 等人, 1990; Morgan 等人, 1990; Clegg 等人, 1991; Lakowicz 和 Berndt, 1991; Buurman 等人, 1992; van de Ven 和 Gratton, 1992; Oida 等人, 1993)。荧光寿命成像显微术 (FLIM) 的发展已允许详细研究荧光标记在细胞和其它微观样品中的位置和环境。下面将讨论 FLIM 的优点、理论和应用。

各种荧光寿命测量由于种种原因已经被使用 (Wang 等人, 1996), 这些原因包括特异性、敏感性、定量估计和高瞬时清晰度。寿命测量提供高特异性, 因为荧光分子具有迥然不同寿命。通过对吸收与发射进行比较, 寿命提供更大的分子辨别力。寿命测量还可以在少量的分子中进行, 从而导致类似于强度测量的灵敏度。通过寿命进行分子的定量估计提供真实的测量结果, 因为荧光寿命直接涉及荧光团的荧光量子产额。最后, 寿命可以用于检测按生命分子过程的时标 (通常介于皮秒和微秒之间) 发生的瞬时效件。

有两种确定生命的方法。首先介绍脉冲法 (Lakowicz, 1986)。考虑用短暂的光脉冲激发众多荧光团。受激分子的荧光信号随时间以一阶方式衰减, 作为下述的指数函数给出:

$$I(t)=Ae^{(-t/\tau)}$$

其中  $a$  是任意的常数,  $t$  是时间,  $\tau$  是荧光寿命。从上式可以看出, 荧光寿命是强度衰减到原值的  $1/e$  (即衰减 63%) 所需要的时间。实测寿命的方法之一是使用脉冲采样法 (Herman 等人, 1996)。在相邻帧上收集  $D_1$  和  $D_2$ 。用寿命方程分析各帧, 由此产生图 2 和 2-D 阵列。每次激发事件后, 将附着在 CCD 摄像机上的多通道板选通图象增强器 (MCP-GII) 在激发脉冲后的某个时间间隔 ( $t_1$ ) 接通非常短暂的时间 (即 4 ns)。在连续接通的 CCD 上获取发射信号。多次重复相同的过程, 以便在一帧 CCD 上捕获充分的信号。在生成对应于  $t_1$  的充分信号之后, 读 CCD 并将选通窗相对激发脉冲 ( $t_2$ ) 偏置, 然后重复整个过程。通过逐个象素分析整理这两帧的数据, 给出每个点的图象寿命。

Wang 等人在 1996 年介绍一种用于脉冲 FLIM 的装置, 该装置包括 5 个主要部分: (1) 脉冲光源; (2) 图象检测系统 (选通图象增强器和 CCD 摄像机); (3) 定时控制单元; (4) 荧光显微镜。该系统与针对上述的时间选通荧光显微术 (TGFM) 所介绍的装置是一样的, 所不同的是脉冲光源是荧光皮秒脉冲光源 (Coherent), 该光源包括模式锁定的 YAG 激光器、带第三谐波发生器的染料激光器和谐振腔卸载器 (cavity dumper)。皮秒脉冲具有可调谐的紫外或红外波长。所产生的速率从单脉冲直至到 76 Mhz。

第二种确定荧光寿命的方法是借助相位调制法。该方法使用强度经过正弦调制的光线，而不是使用脉冲激发光源。所以，样品的发射仿效相同的正弦变化。经过调制的发射信号由于荧光分子的激发持续时间不同而发生相位延迟。相位偏置的大小 ( $\varphi$ ) 直接涉及荧光团的寿命。此外，有发射信号的解调。换言之，最终的发射幅度小于激发光的幅度。测量相位角 ( $\varphi$ ) 和解调因子 ( $m = BA/ba$ ) 并将它们用于计算相位寿命 ( $\tau_p$ ) 和调制寿命 ( $\tau_m$ ) (lakowicz, 1986)。

$$\tau_p = \frac{\tan \Phi}{\omega}$$

$$\tau_m = \frac{\sqrt{(1/m^2) - 1}}{\omega}$$

在单一的指数衰减中， $\tau_p = \tau_m = \tau$ ，实际的荧光寿命。

在相位调制寿命测定后面的基础理论可以应用于二维成像系统。下面的介绍将基于 Gadella 等人 (1993) 和 Lakowicz 和 Szmackinski (1996) 的报告，在此通过引证将它们并入本文。该方法使用增益调制图象增强器，该图象增强器产生强度与发射信号的相移相关的图象。可以通过几帧用不同的电子延迟器或相移收集的相敏图象计算目标的寿命图象。为了进一步理解，有必要给出描述来自某个点  $r$  的时间平均相敏强度的方程：

$$I(r, \theta - D) = I_0(r)[1 + 1/2m_D m(r) \cos(\theta(r) - \theta_D)]$$

其中  $r$  表示象素位置， $\theta_D$  是增益调制信号的相位角， $\theta(r)$  是发射信号的相位， $m_D$  是检测器的增益调制， $m(r)$  是经过调制的发射信号的幅度， $I_0(r)$  是象素的原强度 (它取决于浓度)。这个方程将

给定象素的强度描述成两个控制参数 ( $\theta_D$  和  $m_D$ ) 和三个未知参数 ( $I_0(r)$ 、 $\theta(r)$ 、 $m(r)$ ) 的函数。回忆一下, 如果  $\theta(r)$  或  $m(r)$  是已知的, 那么寿命 ( $\tau$ ) 就可以确定。由于有三个未知参数, 所以为了确定样品的寿命至少需要三幅不同的图象。通过控制增益调制信号的相位角 ( $\theta_D$ ), 将产生一系列相敏图象, 因此也可以确定寿命。

Lakowicz 和 Szmackinski (1996) 曾介绍过用于调相 FLIM 的装置。激发是由谐振腔卸载激光器的输出提供的, 该输出由模式锁定的 Nd:YAG 激光器同步泵送。激发光由激光波束扩展器扩展。选通图象增强器位于靶和 CCD 摄像机之间。图象增强器的增益利用频率合成器的输出进行调制。CCD 摄像机捕获相敏图象。带 FLIM 软件的计算机处理该输出以产生寿命图象。

在该方法中涉及的其它相互作用将产生核辐射信号。在聚合物上的放射性标记通过限定的检测区 (如测站) 时, 发射核辐射, 一部分核辐射将通过限定的辐射检测区。核辐射检测器紧贴辐射检测区放置, 以捕获发射的辐射信号。许多测量核辐射的方法在技术上是已知的, 包括泡雾室设备、恒流离子舱、脉冲计数器、气体计数器 (即 Geiger-Muller 计数器)、固态检测器 (表面势垒检测器、锂漂移检测器、本征锗检测器)、闪烁检测器、Cerenkov 检测器等。

所产生的其它类型的信号在技术上是众所周知的, 并且有许多熟悉这项技术的人已知的检测方法。其中包括对置的电极、磁效应和压电扫描头 (piezoelectric scanning tips)。对置的纳电极能够通过测量电容变化发挥作用。两个对置的电极建起一蓄能区, 该蓄能区实际上是在这两个电极之间。众所周知, 在电极之间放入不同的物质时, 两个对置电极的电容将发生变化。这个值

被称为介电常数。介电常数的变化可以作为这两个电极之间的电压变化来测量。在本实例中，不同的核苷酸基即聚合物单元可以导致不同的介电常数。电容按方程  $C = KC_0$  随聚合物单元的介电常数变化，其中  $K$  是介电常数，而是没有任何基时的电容。然后，将纳电极的电压反射输出到测量设备，纪录信号随时间的变化。

纳级的 NMR 检测设备是为检测带特有的自旋标记的聚合物单元通过而建造的。该纳级 NMR 检测设备包括能被扫描的磁体和用频率恒定的电磁能量照射聚合物的装置（这与保持磁场不变扫描电磁频率是相同的）。当磁场达到正确的强度时，核吸收能量并发生共振。这种吸收引起极微弱的电流在样品周围的天线线圈中流动。该信号被放大并输出到纪录设备。对于带已知标记的化合物，检测时间比当前的 NMR 检测设备短得多，后者需要上述化合物的全谱。带已知标记的聚合物单元在特定区域中有已知的化学位移，借此取消完成全谱扫描的需要，从而将每个基的检测时间降低到微秒或毫秒。

纳级的压电扫描头可以在不同的聚合物单元与该扫描头实际接触的基础上用于读出不同的聚合物单元。依据聚合物单元的尺寸和形状，产生不同的压电信号，从而形成一系列取决于单元的变化。单元上的标记实际上不同于原单元并且能够形成借助压电扫描头检测的待用装置。在聚合物单元与该扫描头接触时压电晶体发生变化并产生电流输出到检测设备。聚合物单元与该扫描头的相互作用所引起的电流的幅度和持续时间反映该聚合物单元的特征。

可检测的光学信号生成后，经过检测储存在数据库中，并且可以通过分析该信号获取有关该聚合物的结构信息。计算机可以

是那台收集聚合物数据的计算机，也可以是单独的数据分析专用计算机。适合实现本发明的计算机系统通常包括向用户显示信息的输出设备、与输出设备相连的主机以及接收来自用户的输入的输入设备。主机通常包括借助互连机构与存储器系统相连的处理器。输入设备和输出设备也借助互连机构与该处理器和存储器系统相连。

纳通道可以用化学沉积法制备，该方法顺着聚碳酸酯样板膜片的整个宽度形成金属纤丝。还可以这样生产该膜片，使该膜片的两个表面被金属薄膜覆盖，以形成纳盘电极群，金属薄膜之一可以被除去，以露出膜片表面。金属薄膜可以被除去，以露出膜片表面。这些电极可以在其基底与普通的集电装置链接。这个组件对于研究聚物流过时电流的变化是有用的，因为电导的变化是能够测量的。在 Martin, C.P.R.的报告中介绍这种板的制备 [Science, 266: 1961-1965(1994)]。

用于受检信号数据分析的计算机程序很容易从 CCD 制造商那里买到。这些程序可以在下面介绍的通用计算机上执行。就本发明的方法而言，只需要完成有关单一象素的操作存在（点操作）。点操作的复杂程度取决于所用的成象方法。基于强度的成象由于对各个象素只完成一次运算完成所以提供最快的数据处理。不管成象技术（强度、TGFM、或 FLIM），在每种方法中对每个象素完成的算法与某些更复杂的成象条件下需要完成的球形的整帧操作相比都被看作是低水平的。

应当理解，可以将一种或多种输出设备接到计算机系统上。输出设备的实例包括阴极射线管（CRT）显示器、液晶显示器（LCD）、打印机、通信设备（如调制解调器）和声频输出。还应当理解，可以将一种或多种输入设备接到计算机系统上。输出

设备的实例包括键盘、辅助键盘、跟踪球、鼠标、光笔和书写板、通信设备、以及数据输入设备（如敏感元件）。应当理解，本发明不受与计算机系统结合使用的具体的输入输出设备（即文中介绍的那些）的限制。

计算机系统可以是通用的计算机系统，该系统可以利用高级计算机编程语言（如 AC@）编程。计算机系统还可以是有专用程序的专用硬件。在通用计算机系统中，处理器通常是市售的处理器，其实例包括购自 Inter 公司的 x86 系列处理器、购自 AMD 和 Cyrix 公司的类似的器件、购自 Motorola 的 680X0 系列微处理器、购自 IBM 的 PowerPC 微处理器和购自 Digital Equipment Coporation 的 Alpha 系列处理器。许多其它的处理器也可以使用。这些微处理器执行被称为操作系统的程序，其中操作系统的实例包括 WindowsNT、UNIX、DOS、VMS 和 OS8，该操作系统控制其它计算机程序的执行并且提供调度、调试、输入/输出控制、记帐、编译、存储分配、数据管理和存储器管理、以及通信控制和相关的服务。处理器是操作系统定义一计算机平台，应用程序是用高级编程语言为这个平台编写的。

存储器系统通常包括计算机可读可携带非易失性纪录媒体，其实例包括磁盘、快速存储器和磁带。磁盘可以是被称为软盘的可更换的磁盘，或被称为硬磁盘机的永久性磁盘。磁盘具有许多通常按二进制格式（即被解释成 0 和 1 顺序的格式）储存信号的磁道。这些信号可以定义准备由微处理器执行的应用程序或储存在磁盘上准备由该应用程序处理的信息。在操作时，处理器通常从非易失性纪录媒体上读取数据，输入集成电路存储器单元，该单元通常是易失性的随机存取存储器，如动态随机存取存储器（DRAM）或静态存储器（SRAM）。该集成电路存储器单元考虑到使处理器以比在磁盘上存取更快的速度存取信息。处理

器通常处理集成电路存储器内的数据，在完成处理后，再将数据拷贝到磁盘上。各种用于管理数据在磁盘与集成电路存储器单元之间流动的机构是已知的，而本发明不受这类机构的限制。还应当理解，本发明也不受具体的存储器系统的限制。

应当理解，本发明不受具体的计算机平台、具体的处理器、或具体的高级编程语言的限制。因此，该计算机系统可以是多处理器的计算机系统，也可以包括接在计算机网络上的多台计算机。

在计算机的存储器系统中，有关聚合物的数据可以储存在数据库中，即数据文件中。每种聚合物的数据都可以储存在该存储器系统中，以致处理器可以独立地存取其它聚合物的数据，例如借助将独特的标识符赋予每种聚合物。

包含在数据中的信息以及如何分析它们将取决于与试剂发生相互作用产生信号的带标记的单元的数量和类型。例如，如果单一聚合物的每个单元都带标记，而且每种类型的单元（例如核酸中所有的 A 单元）都具有特殊的类型标记，那么通过分析单一聚合物确定在该聚合物中每个单元的次序是可能的。但是，如果聚合物（如核酸）中四种类型的单元只有一种单元是带标记的，那么要确定该核酸的完整的顺序将需要更多的数据。下面将介绍几种加标记的方案和用计算机分析借助那些方案所产生的数据的方法。为了便于讨论，加标记战略是针对核酸介绍的。但是，每种战略都适用于给所有的聚合物加标记。

可能有几种不同的加标记战略，它们涉及不同类型的带标记的核苷酸的排列、带标记核苷酸的不同百分比、以及单链或双链加标记和诸如与聚合物结合并具有特殊顺序的化合物之类的

多样性标记，（下面将结合具体的实施方案更详细地讨论多样性标记）。最简单的加标记方案涉及给四种核苷酸加上不同的标记。采用三种、两种、甚至一种标记的加标记方案也是可能的。

给四种核苷酸加标记的方案是能够成立的，其中用不同的标记物给目标 DNA 的 A、C、G 和 T 加标记。这种分子在途经相互作用测站时将产生与目标 DNA 上线性的核苷酸顺序相对应的线性的信号次序。采用四种核苷酸战略的优点是容易解释数据和可以通过带标记的单一聚合物确定完整的单元顺序。但是，给所有的四种碱基都加外在标记可能带来位阻问题。为了减少这类问题，可以利用一些或全部核苷酸的内在特性给核苷酸加标记。正象前面讨论的那样，核苷酸原本是带标记的，因为每种嘌呤和嘧啶都有截然不同的吸收光谱性质。在文中介绍的每种加标记方案中，核苷酸是既可以加外在标记也可以利用内在标记，但优选的是在采用给四种核苷酸都加标记的方法时至少让一些核苷酸利用内在标记。在给四种核苷酸都加标记的方案中采用外在标记时使用荷电量小或呈中性的标记以减少位阻也是优选的。

给三种核苷酸加标记的方案（其中四种核苷酸中有三种是加标记的）也可以完成。在四种核苷酸中只有三种带标记时，分析按本发明的方法产生的数据要比四种核苷酸都加标记时复杂。因为第四种未加标记的核苷酸的数量和位置必须单独确定，所以该数据更复杂。一种确定第四种核苷酸的数量和位置的方法是利用不同的两组带标记的核酸分子的分析结果。例如，一组核酸分子可以用 A、C 和 G 加标记，而另一组用 C、G 和 T 加标记。从这两组数据分析带标记的核苷酸的线性次序得到顺序数据。只要这两组都包含四种带标记的核苷酸，为每组选定的三种核苷酸就可能有许多种不同的可能性。例如，ACG 组就可能与带标记的 CST、ACT 或 AGT 组之一配对。

包括第四种核苷酸的顺序还可以只使用带一种标记的聚合物而不是使用一组至少带两种不同标记的聚合物通过识别该聚合物上的第四种核苷酸的位置来确定。这可以借助确定核酸分子上带标记的核苷酸之间的距离来完成。例如，A、C 和 G 是带标记的而且所产生的可检测信号表明该核酸分子具有 AGGCAAACG 的顺序。如果核酸分子中每个核苷酸之间的距离除了 G 和 G 之间的距离是正常的核苷酸间距离的两倍之外是与适合特定的核苷酸组合的已知的核苷酸间距离等价的，那么 T 将定位在两个 G 之间并且完整的分子具有 AGTGCAAACG 的顺序。核苷酸之间的距离可以由几种方法确定。首先，聚合物和试剂彼此之间可以按线性方式以恒定的速率相对移动，以致核酸分子的单个的单元将以单一的时间间隔通过该试剂。如果在可检测信号之间逝去两个时间间隔，那么在那个位置内存在不能产生可检测信号的未带标记的核苷酸。这种确定碱基间距离的方法将在下文中参照随机地给一个碱基加标记更详细地讨论。另外，聚合物与试剂可能彼此之间发生相互作用，以致每种带标记的单元同时与试剂发生相互作用，同时产生可检测信号。所产生的每个可检测信号都沿着该聚合物发生在该单元的定位点上。可以通过直接计算可检测信号之间的距离来确定未带标记的单元是否沿着核酸分子定位在某个地方。

还可以按照给两种核苷酸加标记的方案给核酸分子加标记。为了鉴别数据和解释核苷酸的顺序可以使用 6 组给两种核苷酸加标记的核酸分子。Ambrose 等人 (1993) 和 Harding 与 Keller (1992) 已经论述过大荧光 DNA 分子的合成，其中两种核苷酸全被加上外在标记。该分子的平均尺寸是 7 kb。给两种核苷酸加标记可能有 6 种不同的组合：

$$({}_n C_k) \frac{n!}{k!(n-k)!} = \frac{4}{2!2!} = 6$$

其中  $n$  中核苷酸一次取  $k$  种。可能的组合是 AC、AG、AT、CG、CT 和 GT。对每种组合中标记的线性次序的认识将允许对该核酸序列的重建。利用 4 聚体 (5'ACGT3') 作为模型顺序, 可以验证该理论。第一组 AC 给出 C 必须在 A 的后面的信息。这既没有给出有关插入 A 和 C 的核苷酸的数量信息, 也没有给出任何有关在 A 前面的 G 或 T 的信息。第二组 AG 表明还有 G 在 A 的后面。组 AT 表明 T 在 A 的后面。从这三组可以知道目标 DNA 是 4 聚体, 并且在 A 的后面有一个 C、一个 G 和一个 T。后面的几组给出有关 A 后面的这三种核苷酸的排序信息。组 CG 表示 G 在 C 后面。组 CT 表示 T 在 C 后面。组 GT 结束排列, 给出 5'ACGT3' 的最终译码顺序。除了使用 6 组带标记的核酸分子的方法之外, 通过理顺有关产生上述可检测信号的带标记的核苷酸之间的距离的信息和从少于 6 组给两种核苷酸加标记的核酸分子获得的信息可以建立该顺序。

还可以使用第四种加标记方案, 即随机地给一种核苷酸加标记的方案。在这种方法中, 借助种群分析和/或 DNA 运动的瞬时速度获得的距离信息被用于确定将两个带标记的核苷酸分开的核苷酸的数量。分析 4 种带不同标记的目标分子得到完整的顺序。

一种带这些加标记方法的分析方法包括使用互补的碱基信息。图 1 说明这种加标记战略, 其中需要两种加不同标记的 DNA 样品。第一种样品用相同的荧光团给其中两种不互补的碱基随机地加上标记。不互补的碱基对是 AC、AG、TC 和 TG。第二种样

品有一种碱基被随机地加上标记。在第二种样品中被选中的碱基可以是四种碱基中的任意一种。在给出的实例中，被选中的两种不互补的碱基是 A 和 C。因此，准备了两种样品，一种有带标记的 A 和 C，另一种有带标记的 A。DNA 经过按基因组分类、加上末端标记和纯化后借助纳通道 FRET 测序进行分析。由每个碎片产生的顺序特异的 FRET 信息按两组互补的链之一分类。分类的作用是便于进行种群分析，以确定所有需要的碱基的位置。这张图说明从分类数据产生顺序信息的过程。从第一组被分析的信息得到在一条链上所有的 A 和 C 的位置。从第二组被分析的信息得到对一条链上所有的 A 和 C 的认识。将同样的方法应用于补链。对补链上的 A 和 C 的认识与对其它链上的 T 和 G 的认识是一致的。结果是顺序重建。为了交叉验证该顺序，可以对其它不互补的碱基对（如 TG、TC 和 AG）重复该过程。

有两种确定碱基间距离的方法。一种需要确定 DNA 运动的瞬时速率，该速率很容易从能量转移的持续时间或特殊标记的猝灭计算出来。另一种涉及分析目标 DNA 分子的种群和与其对应的高斯距离分布。

瞬时速率法涉及基于已知的 DNA 运动瞬时速率 ( $v$ ) 乘以信号之间的时间间隔 ( $t$ ) 确定分开的距离。通过测量带标记的核苷酸在相互作用测站旁通过所花费的时间可以求出瞬时速率。由于试剂浓缩区的长度 ( $d$ ) 是已知的（通过试剂定位区的标定和实际测量，如供体荧光团浓缩区的厚度），所以该速率为  $v = d/t$ 。如图 2 所示，分析表明能量发射图变化的原始数据产生一条曲线，该曲线从左到右表示两次能量强度下降，随后是两次能量强度上升，其中所述能量发射图是依据可依次检测的信号通过绘图得到的。从第一次能量强度下降开始的曲线平稳段（用  $t_1$  表示）是第二平稳段（ $t_2$ ）的两倍。相互作用测站的长度给定为 51 埃。

从这个给定的信息，可以知道带标记的核苷酸的数量。此外，通过使 DNA 的运动速率与供体强度曲线平稳段的时间相关，可以确定两者分开的距离。

核苷酸的数量简单地用强度下降次数来表示。在图 2 中，有两次强度下降。因此，在该 DNA 上必然有两个可检测的标记。为了确定碱基分开的距离有必要了解 DNA 运动的瞬时速率，通过了解一个带标记的核苷酸跨过试剂定位区所花费的时间和该试剂定位区的长度可以求出该速率。该试剂定位区的长度给定为 51 埃。一个带标记的核苷酸跨过该试剂定位区所花费的时间是受第一次强度下降和第一次强度上升制约的（被表示成灰色阴影区，7.5 秒）。DNA 运动的速率为 6.8 埃/秒。从带标记的核苷酸被分开的时间（ $t_1 = 5\text{s.}$ ）乘以该速率（6.8 埃）推演出碱基间距，该间距等于 10 个碱基对。作为一种交叉检验的方法， $51 \text{ 埃} - t_1 v$  得到该碱基间距。

在种群法中，考虑带标记核苷酸的整个种群。不必象速率法那样需要了解试剂定位区的长度和瞬时速率。采用种群分析靠统计消除对个体核苷酸分子进行精确测量的需要。

下面介绍一个种群分析的实例，该实例使用 5 种途经纳通道的核苷酸分子。准备 5 种代表相同的 DNA 碎片的分子。在恒定的电场中，在第一和第二带标记的核苷酸之间的检测时间应当对所有的 DNA 分子都是一样的。在实验条件下，这些时间略有不同，从而导致时间的高斯分布。该高斯分布的峰值代表两个带标记的核苷酸之间的间距（ $d$ ）。

补充实例进一步说明种群分析和确定距离信息的概念，该实例使用一种核苷酸被随机地加上标记的核酸分子种群（该种群用

6 种分子表示)。为了提供参照点,核酸是带末端标记的。在有足够的核酸分子的情况下,可以确定任意两个 A 之间的距离。在将两种分子看作是子种群时,这两种分子传达末端标记和第二个 A 之间以及第二和第三个 A 之间的碱基间距。分开的次数用于建立一些分布,这些分布是碱基间距的表达。在相同的两种分子中,建立 4 种和 6 种碱基间距的分布。将同样的逻辑扩展到该种群的其余部分,就可以确定 DNA 上所有的 A 的位置。对其它三种碱基 (C、G 和 T) 重复该过程将产生完整的顺序。

除了给一种类型的单元全部加上标记之外,还可能采用给一种核苷酸加标记的方案,在该方案中并非同一类型的每个核苷酸都被加上标记。这种方法的概貌示于图 3,该图表示一个给 A 随机地加上标记的顺序为 5'ACGTACGTACGTACGT's3 的 16 聚体碎片的有代表性的种群。每个单独加标记的 DNA 分子除了 5'和 3'末端标记之外还有一半的 A 被加上标记。对于大量的随机加标记的碎片,可以求出在目标 DNA 上相继的两个 A 之间的距离。末端标记的作用是识别 DNA 的末端与第一个 A 之间的距离。对其他的核苷酸重复同样的分析将产生该所 6 聚体的顺序。使用这种方法的优点包括没有空间效应且容易加标记。这种加标记的类型被称为随机加标记。被“随机加标记”的聚合物是并非所有指定类型的单元全加上标记的聚合物。在被随机加标记的聚合物中哪些指定类型的单元被加上标记是未知的。

正象前面简要陈述的那样,这些加标记方案的各种组合可以一起使用。在前面列出的所有的方法中,无论是来自信号的有序的线性信息还是核苷酸之间的距离信息都被考虑到了。这两方面可以结合起来以给出一些依赖于有序的线性信息和距离信息两者的方法。例如,随机地给一种核苷酸加标记的战略扩展成随机地给 4 种核苷酸加标记的战略。随机地给 4 种核苷酸加标记是给



所有的 4 种核苷酸的一部分加上标记。分子种群中这 4 种核苷酸都有一部分被加上标记。这 4 种核苷酸中每一种都有独特的标记。分析随机加标记的种群导致产生顺序数据。

采用双链 DNA 允许有种种变化。在 DNA 的一条链上的两种核苷酸全被带标记的核苷酸取代时能够完成给单链双核苷酸加标记的方案。为了减少由两种外加标记的核苷酸强加的空间限制，在提出支撑双核苷酸加标记的理论时可能给每条补链上的一种核苷酸全加上标记以获得同样的末端。这种方法涉及使用双链 DNA，其中每条链有不同的标记。6 组带不同标记的双螺旋 DNA 将产生一个数据组，该数据组适合提供顺序信息。DNA 的每条补链应当有一种带标记的核苷酸。在每组双螺旋 DNA 中，两种不同的核苷酸的等价物（可能的组合是 AC、AG、AT、CG、CT 和 GT）被加上标记。在两条补链具有带标记的腺嘌呤时，这是组合 AT 的等价物。在给双螺旋双核苷酸加标记时，优点是在每条链上只有一种核苷酸被加上标记，从而与在单链 DNA 上给双核苷酸加标记相比允许合成较长的带标记的链。实际上，业已有人证明用一种全带标记的核苷酸合成 DNA 碎片可以获得比 10kb 长得多的长度（Ambrose 等人，1993；Harding 和 Keller，1992）。

本发明的方法的一种用途是确定在聚合物内单元的顺序。识别聚合物（如核酸）中单元的顺序在理解该聚合物的功能和确定该聚合物在生理环境（如细胞或组织）中的作用时是一个重要步骤。当前使用的测序方法是缓慢而繁琐的。本发明的方法要快得多而且能够在非常短的时间周期里产生足够多的顺序数据。

聚合物的测序可以包括给完整的聚合物测序或给聚合物的一部分测序，甚至包括识别聚合物上的个体单元。聚合物个体单元的认识方法之一涉及下述步骤：将身份不明的聚合物个体单元

暂时暴露在选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂之下以便与代表该个体单元特征的可检测信号产生相互作用；以及检测该信号并将该信号从产生毗邻信号的聚合物单元所产生的信号中区分出来作为该个体单元身份的指示。

个体单元被“暂时暴露”在试剂下，以便产生代表该个体单元特征的可检测信号。文中用语“暂时暴露”意味着该单元定位在该试剂的相互作用距离内并持续足够的时间以产生信号，然后离开该相互作用距离。产生信号所需要的时间长度将取决于该个体单元和所涉及的试剂，但该时间量通常介于 1 纳秒至 1 秒之间。

将代表个体单元特征的信号与产生毗邻信号的聚合物单元所产生的信号区分开。“产生毗邻信号的单元”是暴露在试剂下能产生可检测信号的离该个体单元最近的单元。它不必是直接链接在该个体单元上的单元，除非直接链接的单元带（内在或外在）标记并产生可检测信号。

在试剂是一种或多种荧光团的情况下，在试剂与该单元之间的相互作用距离是能量转移距离，而所产生的信号是荧光能量共振转移。文中用语“能量转移距离”是该单元与荧光团之间的距离，如果两个互补源之一与另一个源的吸收光谱重叠，那么该距离允许在这两个互补源之间发生相互作用。文中用语“荧光能量共振转移”是在发射光谱与吸收光谱重叠的情况下荧光团之间的光子能量转移。

识别聚合物个体单元的另一种方法涉及下述步骤：使身份不明的聚合物个体单元相对某个测站作瞬时运动；检测由于在该单元或该站中发生可检测的物理变化而产生的信号；以及将所述信

号作为该个体单元身份的指示与由于产生毗邻信号的聚合物单元暴露在该测站下而产生的信号区分开。

因此，在一方面，本发明的方法能用于识别一个、一些或所有的聚合物单元。这可以借助确定在聚合物主链上的特定位置检测到的信号是否是有带标记的特定单元存在的特征，通过识别个体单元的类型及其在该聚合物主链上的位置来实现。

本发明的方法对于识别聚合物的其它结构性质也是有用的。按照本发明的方法分析聚合物所获得的结构信息可以包括识别聚合物的特征性质，例如识别聚合物是否存在于样品中或确定聚合物的亲缘关系；识别聚合物的尺寸；识别聚合物中两个或多个个体单元之间的接近程度或距离；识别在聚合物内两个或多个个体单元的次序；和/或识别聚合物单元的总组成。这些特征可用于各种各样的目的，如确定指定的聚合物是否在样品中出现。例如，当聚合物是核酸时，本发明的方法可以用于确定指定的基因顺序是否在细胞或组织中被表达。通过确定样品内的聚合物是否表示仅仅在感兴趣的聚合物中才能找到的个体单元的特征图案（即通过将受检信号与代表已知聚合物特征的已知的签字进行比较，确定被分析的聚合物与已知聚合物的亲缘关系）可以确定指定的顺序是否存在。为了确定感兴趣的聚合物在样品中是否存在，无需确定该聚合物的完整的顺序。类似地，这些方法可以用于将来自一种聚合物的受检信号与来自另一种聚合物的签字进行比较，以确定两种聚合物的亲缘关系。

两个聚合物个体单元之间的接近程度或距离也可以按照本发明的方法确定下来。重要的是能够确定两个单元之间的接近程度或距离。沿着主链每个聚合物单元都有其特定的位置。单元的顺序作为已知聚合物的蓝图。在未知聚合物上两个或多个单元之

间的距离可以与已知聚合物的蓝图进行比较，以确定它们是否有关。因此，确定两个单元之间的距离的能力对于确定两个感兴趣的单元之间有多少单元（如果有）是至关重要的。

为了确定链接单元聚合物的两个个体单元的接近程度，让该聚合物相对某个测站运动，在所述测站中每个个体单元都暴露在该测站下，产生由于在该单元或测站中发生可检测的物理变化而出现的特征信号。然后，检测所生成的每个特征信号并且测量在检测每个特征信号之间逝去的时间长短。逝去的时间长短反映两个个体单元的接近程度。所述测站可以是相互作用测站，而所述单元可以暴露在试剂下以便产生电磁信号。

文中用语“代表相互作用特征的信号”是来源于所述测站与带特殊标记的单元之间相互作用的期望信号。所产生的特殊信号将取决于测站的类型以及带标记的单元的类型。例如，如果所述测站是试剂（它是电磁辐射），而带标记的单元是荧光团，那么两者之间的相互作用将导致该荧光团以其已知的发射波长发射电磁辐射。如果所述测站是试剂（它是闪烁层），而带标记的单元是放射性的，那么两者之间的相互作用将导致以荧光的形式发射电磁辐射。

利用本发明的方法确定聚合物单元的次序是可能的。在本发明的一方面，聚合物的两个个体单元的次序可以用下述方法确定：使聚合物相对某个测站作直线运动并将两个个体单元暴露在所述测站中，以产生由于在所述测站或所述单元中发生可检测的物理变化而产生的第一和第二可检测信号。信号的次序是两个个体单元的次序的指示。

聚合物单元的总组成也可以借助本发明的方法得以确定。例如，如果该聚合物是核酸，那么本发明的方法可以提供有关该核酸中嘌呤对嘧啶的百分比或 A、C、T 和 G 的百分比的信息。

有关样品大小的定量信息也可以借助本发明的方法得以确定。例如，通过确定构成聚合物的个体单元的数量可以确定该聚合物的尺寸。构成该聚合物的单元的数量可以通过测量完整的聚合物以直线方式经过在相互作用部位的试剂所需要的时间并除以那种特殊类型的聚合物的个体单元完全通过所述部位的平均时间长度得以确定。

除了关于特异单元的信息之外，为了提供关于聚合物的信息本发明的方法可以同时识别多个单元。一方面，该方法可以通过下述步骤完成：即提供带标记的链接单元聚合物、检测来自数量比链接单元全体少的标记单元特异标志的信号、以及储存受检信号的签字，以便分析该聚合物。在本发明的这方面，可以用单元特异标志给带标记的聚合物的每个单元加上标记，也可以用单元特异标志给一部分单元加上标记。

对于同时分析聚合物的多个单元这种方法是特别有用的。这是通过使用按特殊顺序与不止一个单元相互作用的单元特异标志来加标记实现的。文中用语“单元特异标志”是一种化合物，该化合物以特殊的方式与一个或多个聚合物单元相互作用并且能够区分那些单元。例如，用于核酸分子的单元特异标志可以是结合成特殊的碱基顺序（如 TG、AG、ATC 等）的带标记的二聚体、三聚体等。通过识别带标记的标志的存在位置，关于该聚合物的结构信息可以推演出来。例如，在聚合物上重现该标志可以揭示该聚合物的身份。这样就能够确定在聚合物溶液或混合物中某种聚合物是否存在。标志在聚合物上的次序、距离、数量等

可以提供关于聚合物的顺序或组成的信息。其他的单元特异标志包括但不限于顺序特异的大小沟粘合剂和夹杂物、顺序特异的DNA和肽键链接的蛋白质、顺序特异的肽-核酸等。有许多这样的单元特异标志存在并且对于熟悉这项技术的人是众所周知的。

这种类型的分析可以在一个识别DNA碎片的实施方案中使用，其方法是分析多重探测剂对聚合物各个碎片的杂交图。当前用于DNA杂交分析的前沿方法依赖于DNA芯片。由于许多理由本发明的方法是优越的。它可以确定键合在多重探测剂之间的未知DNA碎片的数量、类型、次序和距离。这种信息可以用于确切地识别以不同方式表达的基因数量。当前的杂交研究只能确定与给定碎片键合的探测剂类型。此外，本发明的方法能够精确地定量分析特殊表达的基因的实际数量。当前的方法依赖于荧光强度的定量分析，由于检测系统的非线性这种分析往往产生错误。本发明的方法不需要选择被表达的基因或未知的核酸进行分析，就可以给出大量的信息。这与要求用不同的DNA芯片分析不同的基因、被表达的基因组和不同的有机体是截然不同的。本发明的方法能够通过计算机分析所产生的杂交图识别被表达的未知基因。然后将通过DNA探测剂的线性分析获得的数据与数据库中的信息匹配，以确定目标DNA的身份。因此，这些方法能够分析来自杂交反应的信息，然后将它们应用于诊断和确定基因表达图。

文中用语“签字”是由带标记的聚合物产生的顺序特异的信号。签字包括有关聚合物结构的信息。例如，聚合物的签字可以用一系列邻接单元或数个彼此隔开特定距离的特异单元来定义。聚合物的签字与聚合物是视为同一的。签字对于通过沿着DNA链的长度识别在某个位置的碱基来确切地识别碎片是有用

的。了解任何一个位置的概率是  $1/4$ 。毫不含糊的碎片识别与大致 20 个被识别的位置一起产生  $[(1/4)^{20} = 9.1 \times 10^{-13}]$ 。就带 20 个受检标记的碎片和 10% 检测/加标记而言，只需要该碎片的尺寸是 200 个碱基对。建议的读数长度在千碱基的数量级上，这应当毫不含糊地识别任何碎片。碎片识别考虑到按类似的顺序编组，从而有可能通过种群分析进行顺序重建。

本发明优选的分析方法涉及使用带放射性标记的聚合物。放射性辐射的类型影响所用的检测设备的类型。一般地说，有三种核辐射类型，包括  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  辐射。 $\alpha$  辐射在物质中引起大范围的离子化并允许借助离子化舱和正比计数器进行个体计数，但是令人更感性趣的是， $\alpha$  辐射与物质发生相互作用还可能引起能够产生荧光的分子激发。该荧光被称为闪烁现象。比  $\alpha$  衰减弱的  $\beta$  衰减可以经过放大产生适当的信号。 $\gamma$  辐射是由激发能量的内转换引起的。 $\gamma$  射线的闪烁计数是有效的并能产生强信号。碘化钠晶体在入射的  $\gamma$  辐射作用下发出荧光。

文中用语“闪烁”层或材料是任何能够通过核辐射激发产生荧光或发射光线的材料。闪烁材料在技术上是已知的。具有共振结构的芳香族碳氢化合物是极好的闪烁材料。蒽和苝属于这类化合物的范畴。能发出荧光的无机晶体也是已知的。为了使这些化合物发光，无机晶体必须有少量的杂质，在价带和导带之间形成数个能级。这样才可能发生激活和去激活。在许多情况下，通过磷光光子发射可以发生去激活，从而导致长检测寿命。允许通用的闪烁材料包括 NaI(Tl)、ZnS(Ag)、蒽、苝和塑料磷光体。

许多测量核辐射的方法在技术上是已知的，其中包括诸如泡雾室设备、恒流离子舱、脉冲计数器、气体计数器（即 Geiger-Muller 计数器）、固态检测器（表面势垒检测器、锂漂

移检测器、本征锗检测器)、闪烁检测器、Cerenkov 检测器之类的装置。

带放射性标记的聚合物的分析方法与其它产生随聚合物变化的脉冲的方法是一样的。例如,带放射性标记 A 的聚合物样品可以借助测定样品 DNA 上 A 的相对间隔的系统进行分析。检测各个辐射信号之间的时间代表被分析的聚合物的特征。分析 4 个标记 DNA 种群 (A、C、G、T) 能够得到被分析的聚合物的顺序。DNA 的顺序也可以用更复杂的方案进行分析,包括分析带双标记的 DNA 和带单标记的 DNA 的化合(作用)。分析 A 和 C 带标记的碎片之后分析 A 带标记的变种将了解 A 和 C 的位置。如果对补链重复该程序,就可以知道顺序。该系统可以进一步用于聚合物(多肽、RNA、糖类等)、大小、浓度、类型、身份、出现、顺序和数量的分析。

为了确定关于聚合物的结构信息可以在一种聚合物或多种聚合物上完成上述的各种方法。本发明还包括上述方法在许多聚合物上的实践。下面详细介绍这些方法和同时在许多聚合物上实现本发明的方法的装置。

在上述的方法中有一些是以能够产生可检测信号的涉及能量转移和猝灭的相互作用为基础的。在本发明的这些实施方案中将按两种限制之一介绍能量转移或猝灭所牵连的事物。第一种限制是在相互作用中涉及到的试剂选自电磁辐射、猝灭源或荧光激发源。第二种限制是可检测信号是电磁辐射信号。对于熟悉这项技术的人显而易见的是每种方法都可能包含第二种限制而不是所介绍的第一种限制而且仍然包含涉及能量转移或猝灭的相互作用概念。例如,除了包含通过使聚合物单元暴露在选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂下产生可检测信号来分析聚合物

的方法之外，在这些实施方案中本发明还包括通过使聚合物单元暴露在试剂下产生可检测的电磁信号来分析聚合物的方法。

除了涉及能量转移、猝灭或电磁辐射信号的方法之外，前面介绍的本发明的方法可以通过检测由于在聚合物单元中或测站中发生可检测的物理变化而产生的信号。文中所指在聚合物单元中或测站中发生的“可检测的物理变化”是由于聚合物单元暴露在站中而在该单元中或站中出现的任何类型的变化。一旦单元暴露在测站中，可检测信号就会形成。例如，测站可以是相互作用测站或信号发生测站，下面将逐一讨论。在测站中或单元中发生的且能产生可检测信号的变化类型取决于测站的类型和单元的类型。为了举例说明的目的，文中讨论了几种经历变化以致产生可检测信号的测站-单元组合的实例。熟悉这项技术的人将能够引申出落在本发明的范围内的其它测站-单元组合。

在测站与聚合物单元之间的相互作用是以能量转移为基础时，单元、测站、或两者都可能发生物理变化，以致产生可检测信号。在一个实施方案中，所述测站可以将能量转移给所述单元，使该单元发射一个能量单元的特异信号。在该单元中发生的物理变化来源于能态的变化。在另一个实施方案中，所述单元可以将能量转移给所述测站，使该测站由于这种特殊的能量转移发射一个单元的特异信号。在第三个实施方案中，配偶化合物可以引起产生信号的物理变化。在放射性单元与测站之间发生相互作用时，该单元通过释放能量发生物理变化。

本发明的另一方面包括分析众多聚合物的方法。其中每种聚合物都是通过依次检测大量的聚合物单元在信号发生测站的相互作用来进行分析的。这些方法包括但不限于用于表现试验聚合物特征的方法、用于给聚合物测序的方法、用于确定聚合物单元

次序的方法、用于确定聚合物单元之间距离的方法、和分析一组聚合物。这些方法包括但不限于来源于能量转移或猝灭的相互作用。

描述聚合物特征的方法是这样完成的：针对众多聚合物中的每种聚合物确定其随聚合物变化的脉冲、比较众多聚合物的随聚合物变化的脉冲、在这些聚合物的随聚合物变化的脉冲的相似性的基础上确定这些聚合物的亲缘关系、然后以相关聚合物的随聚合物变化的脉冲为基础描述试验聚合物的特征。

文中用语“随聚合物变化的脉冲”是一个可检测的物理量，该物理量发出或传递有关聚合物的一个个体单元的结构特征的信息。例如，该物理量可以是电磁辐射、化学传导性、电导等。随聚合物变化的脉冲可以由能量转移、猝灭、传导性的变化、机械变化、阻抗变化、或任何其它的物理变化引起。虽然随聚合物变化的脉冲对于特定的单元是特殊的，但是由于聚合物有不只一个带特定标记的单元，因此该聚合物将具有不只一个相同的随聚合物变化的脉冲。因此，如果每个特殊类型的单元具有不同的标记，它们可以产生不同的随聚合物变化的脉冲。

用于检测随聚合物变化的脉冲的方法取决于所产生的物理量的类型。例如，如果该物理量是电磁辐射，那么随聚合物变化的脉冲可以用光学方法检测。文中用语“可用光学方法检测的”随聚合物变化的脉冲是电磁辐射形式的光信号，它能用光敏成象系统进行检测。在该物理量是化学传导性时，随聚合物变化的脉冲是用化学方法检测的。文中用语“用化学方法检测的”随聚合物变化的脉冲是呈化学浓度变化或诸如离子电导之类的变化形式的信号，它可以用测量化学传导性的标准方法进行检测。如果

该物理量是电信号，那么随聚合物变化的脉冲呈电阻或电容变化的形式。

文中用语“聚合物的亲缘关系”可以通过识别那种聚合物独特的聚合物特征图来确定。例如，如果该聚合物是核酸，那么在聚合物内 10 个邻接的核苷酸的任何顺序实际上都将是那种核酸分子独特的特征。

“众多聚合物”是至少两种聚合物。优选的是，众多聚合物是至少 50 种聚合物，更优选的是至少 100 种聚合物。随聚合物变化的脉冲可以提供有关聚合物的任何类型的结构信息。例如，这些信号可以提供完整的或部分的聚合物顺序、随聚合物变化的脉冲的次序、或作为单元之间距离的指示的随聚合物变化的脉冲之间的时间间隔。

随聚合物变化的脉冲是借助在聚合物单元与信号发生测站的环境之间发生的相互作用获得的。文中用语“信号发生测站”是一个区域，在这个区域中单元与环境发生相互作用产生随聚合物变化的脉冲。在本发明的一些方面，随聚合物变化的脉冲来源于在指定区域中与试剂接触，该试剂选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源并能与单元发生相互作用产生可检测信号。在另一些方面，随聚合物变化的脉冲来源于在指定区域中与化学环境接触，该环境能够在与分子发生相互作用时作出反应经历传导性的特殊变化。当具有特殊结构的分子与该化学环境发生相互作用时，传导性将发生变化。具体结构的特殊变化可以是瞬时变化，如可以反映涉及特殊结构或物理变化的相互作用的传导性变化所需要的时间长度。例如，相互作用的强度的变化可以反映与特殊结构的相互作用。在其它方面，随聚合物变化的脉冲来源于电容或电阻的变化，该变化是由聚合物单元在毗邻该单元的微电极或纳

电极之间运动引起的。例如，信号发生测站可以包括定位在聚合物单元两侧的微电极或纳电极。由于聚合物单元运动通过电极引起的电阻或传导性的变化对于特定单元将是特有的。

确定两个个体单元之间的距离的方法也被本发明包括在内。为了确定链接单元聚合物的两个个体单元之间的距离，让该聚合物相对信号发生测站作直线运动，并且测量每个个体单元在信号发生测站旁通过时所产生的随聚合物变化的脉冲。当聚合物的每个单元依次在所述信号发生测站旁通过时，我们说该聚合物相对信号发生测站是按直线传送的。

对众多类似聚合物重复每个步骤是为了产生一个数据组。然后可以基于从众多类似聚合物获得的信息通过分析该数据组确定两个个体单元之间的距离。

该方法包括识别包括标记的聚合物的量。例如，确定在样品中有特异的单元或单元组合的聚合物的数量是可能的。例如，在 mRNA 的样品中能够确定在该样品中存在的特殊的 mRNA 的数量。这是通过识别代表所需的 mRNA 分子的特征的图案即签字完成的。然后，可以按照本发明的方法分析 RNA 样品并确定具有特异图案即签字的 mRNA 分子的数量。

文中用语“类似聚合物”是具有至少一个重叠区的聚合物。类似聚合物可以是聚合物的同源群体，也可以是聚合物的异源群体。文中使用的聚合物的“同源群体”是一组一致的聚合物。类似聚合物的“异源群体”是一组类似的聚合物，它们不是一致的但包括至少一个单元一致的重叠区。重叠区通常包括至少 10 个邻接的核苷酸。某些情况下，重叠区包括至少 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 或 22 个邻接的核苷酸。



“众多类似聚合物”是两种或更多种聚合物。优选的是，众多类似聚合物是 50 或更多种类似聚合物。更优选的是，众多类似聚合物是 100 或更多种类似聚合物。

文中用语“数据组”是一组定义类似聚合物产生的随聚合物变化的脉冲的信息。象前面讨论的那样分析这个数据组，而且所用的分析方法取决于用于产生标记聚合物的加标记方案的类型。核酸测序是本发明的方法中特别优选的实施方案。

当前。不足 5% 的人体基因组已经测序。这就是说在人体测序知识（即所有个体的顺序）方面只有一小部分是理想的。例如，就人体总体而言，有  $1.4 \times 10^{19}$ （50 亿人  $\times 3 \times 10^9$  碱基/人）。到目前为止，只有  $2 \times 10^{-10}$  % 的人体基因信息是已知的。通过全世界的共同努力，人体基因组的测序速度大约为  $3 \times 10^9$ /15 年，即 550,000 碱基/天，其成本  $> 1$  美元/碱基。借助在此介绍的本发明的方法测序将在测序速度方面取得飞跃性的突破。用一台机器完成一个人体基因组预期的时间是大约 15 小时。几个平行的动态阵列能够用不足 1 小时的时间完成一个人体基因组的测序。

链接单元聚合物的测序方法也被本发明包括在内。完成该方法的途经是从众多重叠聚合物中的每种聚合物获取随聚合物变化的脉冲，每种聚合物至少有一部分具有与其它聚合物一致的链接单元顺序，然后将这些随聚合物变化的脉冲拿来进行比较，以获取在众多聚合物中一致的链接单元顺序。

众多重叠聚合物是一组聚合物，其中每种聚合物至少有一段链接单元的顺序与其它聚合物是一致的。这个顺序段被称为重叠区并且包括至少 10 个邻接单元。



在本发明的另一方面，链接单元聚合物的单元次序可以通过下述步骤确定：让聚合物相对信号发生测站作直线运动并在每种个体单元（有两种，每种产生一种随聚合物变化的特征脉冲）在信号发生测站旁通过时测量所产生的随聚合物变化的脉冲。针对众多类似聚合物重复这些步骤，并且基于从众多类似聚合物获得的信息确定至少两种个体单元的次序。

本发明包括分析一组聚合物的方法，其中这组聚合物中每种聚合物都是独立的链接单元聚合物。该方法涉及使这组聚合物彼此平行地取向和检测这些聚合物的聚合物特异特征。

这组聚合物彼此平行地取向。借助任何能够使这些聚合物彼此平行地定位的装置可以使这些聚合物取向。例如，可以将电场施加给这些聚合物，使它们平行地取向。优选的是取向步骤是在无凝胶的溶液中进行。

文中用语“聚合物特异特征”是聚合物的任何与顺序有关的结构特征。例如，聚合物特异特征包括但不限于聚合物的长度、链接单元在聚合物中的次序、聚合物单元之间的距离、聚合物单元之间的接近程度、一种、一些或全部聚合物单元的顺序、以及该聚合物存在与否等有关聚合物的信息。

检测聚合物特异特征的步骤可以针对所有的聚合物同时完成。这个步骤包括依次检测所有聚合物的每个单元。这可以通过下述途径完成：相对众多信号发生测站沿直线输送每种聚合物，并且在所述聚合物通过所述信号发生测站时检测和识别所产生的随聚合物变化的脉冲。

本发明还包括分析一组聚合物的方法，这组聚合物中每种聚合物都是独立的链接单元聚合物。该方法是这样完成的：使这组

聚合物在电场中取向；使这组聚合物同时通过各自的指定通道；以及在聚合物通过所述通道时检测聚合物特异特征。使这组聚合物同时通过它们各自的通道的步骤是这样完成的：使每条通道有一种聚合物流动以使每个单元单独地通过该测站。如果这些聚合物串列式定位同时只有一个单元与一个测站相互作用，那么在该通道中就可以同时有不止一种聚合物。

文中用语“各自的指定通道”是这样的通道，其结构是在聚合物进入该通道之前确定的，以致聚合物在通过该通道时将遵循指定的路径。象在凝胶矩阵中发现的那些通道不是各自的指定通道。

本发明的方法还可以用于检测能够发生能量共振转移或猝灭的两种相互作用的配偶之间的能量共振转移或猝灭。文中用语“能量共振转移（RET）”是在两种具有重叠的发射与吸收光谱的化合物之间的光子能量转移。荧光能量共振转移（FRET）是荧光团之间的光子能量转移。两种相互作用的配偶是任何能够能量转移或猝灭的化合物，即发光化合物或猝灭剂。

该方法是这样完成的：将这对配偶引入足够近的距离以允许发生这种转移或猝灭；将选自电磁辐射、猝灭源和荧光激发源的试剂施加给所述配偶之一；用屏蔽材料屏蔽由于配偶之间发射电磁辐射和相互作用而出现的荧光能量转移和猝灭；以及检测发射的电磁辐射。

文中用语“屏蔽材料”是任何阻止或限制能量转移或猝灭的材料。这类材料包括但不限于传导材料、高折射指数材料和不透光材料。在优选的实施方案中，屏蔽材料是传导的屏蔽材料。文

中用语“传导的屏蔽材料”是其传导性足以阻止供体源和受体源之间发生能量转移的材料。

本发明的每种方法至少在聚合物测序的各个方面是有用的。而且，这些方法都可以与结合聚合物的分析方法介绍的各种加标记方案一起使用。

本发明的方法可以使用对聚合物的个体单元产生特殊的可检测信号的任何设备来完成。一种能完成这种分析的设备是有利于聚合物直线转移通过相互作用测站或信号发生测站的设备。按照本发明的一个方面，提供一种制品，该制品对实现本发明的方法是有用的。这种制品包括壁材料，它具有定义通道的表面；试剂，该试剂选自电磁辐射源、猝灭源、发光膜层和荧光激发源而且附着在壁材料上毗邻所述通道；其中所述试剂距通道足够近并且其剂量足以在选自发光化合物或猝灭剂的配偶化合物通过所述通道时与它发生可检测的相互作用。

文中用语“壁材料”是任何尺寸的固体或半固体的壁垒，它能够支撑至少一条通道。半固体材料是自支撑材料，例如，它可以是凝胶，如聚丙烯酰胺凝胶。例如，壁材料可以由单一的支撑材料组成，它可以是传导的或非传导的、透光的或不透光的、透明的或不透明的。在某些实例中，试剂镶嵌在该壁材料内。在这些实例中，壁材料可以完全或部分地由非传导层、透光层或透明层构成，以便让试剂暴露在该壁材料中形成的通道中为信号发生创造条件。在壁材料仅仅是部分地由这些材料构成时，壁材料的其余部分可以由传导的、不透光的或不透明的膜层构成，这些膜层阻止信号发生。在一些情况下，壁材料是由不同材料的膜层构成的。例如，壁材料可以由一层传导层和一层非传导层构成。另

外，壁材料可以由被两层传导层包围的一层非传导层构成。本发明的壁材料包括多层材料和各种材料组合。

文中用语“发光膜层”是天然发光的或借助某些激发或照明设备发光的薄膜，例如电光薄膜和借助内反射照明的高折射指数薄膜。

文中用语“传导材料”是其传导性至少足以阻止供体和受体之间发生能量转移的材料。

文中用语“非传导材料”是其传导量小到允许在供体与受体之间发生能量转移的材料。

文中用语“透光材料”是能够透射由在用的特殊的电磁辐射、猝灭源或荧光激发源所产生的波长的光线的材料。

文中用语“不透光材料”是不能够透射由在用的特殊的电磁辐射、猝灭源或荧光激发源所产生的波长的光线的材料。

文中用语“通道”是聚合物能够通过的通道。只要聚合物能够通过，该通道的尺寸是任意的。例如，该通道可以是无分支的笔直的圆筒形通道，它也可以是互连蜿蜒通道的分支网络。优选的是笔直的纳通道或微通道。文中用语“纳通道”是尺寸在纳米数量级上的通道。纳通道的平均直径介于 1 nm 至 999 nm 之间。文中用语“微通道”是尺寸在微米数量级上的通道。微通道的平均直径介于 1  $\mu\text{m}$  至 1 mm 之间。下面将详细介绍按照本发明优选的通道尺寸和规范。在优选的实施方案中，所述通道固定在壁中。

试剂以这样的方式附着在壁材料上，以致它将与通过壁材料上的通道传送的发光配偶化合物一起经历能量转移或猝灭并借此与该配偶化合物发生相互作用。为了与该配偶化合物发生相互作用，该试剂可以定位在距该通道非常近的距离内。例如，该试剂可以附着在该通道的侧面、附着在壁材料的外表面、附着在该通道边缘周围的壁材料外表面的浓缩区、镶嵌在壁材料内、或者以同心环的形式镶嵌在该通道周围的壁材料中。非必选的是该试剂覆盖整个壁材料表面或镶嵌在壁材料中遍及每个角落。当试剂不定域时，为了改进信号发生，可以用掩膜覆盖壁材料的某些区域，以致只有试剂定位区被露出。文中用语“掩膜”是具有任何尺寸和形状的开口的物体。可以将一种以上试剂附着在壁材料上以便在这些试剂暴露在配偶试剂下时产生不同的信号。

试剂可以通过任何技术上已知的完成附着的方法附着到壁材料上。在 Hermanson, G.T. 的著作“Bioconjugate Techniques (生物共轭技术)” (Academic Press, Inc., San Diego, 1996) 中提出生物材料偶配方法的实例，在此通过引证将其并入本文。

当试剂附着在壁材料的表面上时，它可以直接附着在壁材料上，也可以借助键合剂附着。关于试剂附着的文中用语“键合剂”是将光发射化合物或猝灭剂束缚到壁材料上的分子。键合剂在技术上是已知的。通用的键合剂包括不同长度的烷烃。

试剂以足以与配偶光发射化合物发生可检测的相互作用的剂量附着在壁材料上。文中用语“配偶光发射化合物”是前面定义的光发射化合物，但是当它的位置非常接近试剂时它将以特殊的方式与该试剂发生相互作用并经历能量转移或猝灭。配偶光发射化合物的量和所需的试剂的量将取决于所用的试剂和光发射化合物的类型。

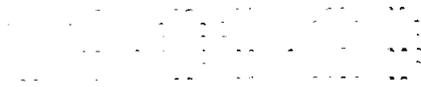
本发明的制品的另一实例是一种壁材料，该壁材料具有定义众多通道的表面和附着在该壁材料的离散区上并至少毗邻诸通道之一的测站，其中所述测站距该通道足够近而且以足够量存在，其剂量足以在聚合物暴露在该测站中时引起由于在通过该通道的链接单元聚合物中或在该测站中发生可检测的物理变化而产生的信号。至少毗邻诸通道之一的壁材料的“离散区”是被没有测站的壁材料包围的局部区域。离散区周围的区域不与该单元相互作用，不产生由于该单元与该测站相互作用所产生的同样的特征信号。离散区的位置在通道中或在通道附近，以致在离散区的测站在单元通过该通道时暴露在该单元下。

本发明的另外的制品是一种壁材料，该壁材料具有定义通道的表面和众多测站的表面，每个测站附着在该壁材料的离散区上且毗邻该通道，其中所述测站距该通道足够近而且以足够的量存在，其剂量足以在聚合物暴露在该测站中时引起由于在通过该通道的链接单元聚合物中或在该测站中发生可检测的物理变化而产生的信号。

文中用语“众多测站”是至少两个测站。优选的是众多测站是至少三个测站。在另一个优选的实施方案中，众多测站是至少5个测站。

在优选的实施方案中，该制品是纳通道板。下面介绍的有荧光团镶嵌其中的纳通道板的优化设计仅仅是为说明的目的而提供的。该介绍决不是对权利要求书所述制品的限制。

纳通道板的几个实例在图4中给出。图4A说明纳通道板(60)有传导材料层(62)和非传导材料层(64)。通道(70)的直径足以容许带标记的双链DNA以直线方式通过。在这个实



例中，供体荧光团（68）以围绕每条通道的同心环形式镶嵌在透明的非传导材料中。该纳通道板的其余部分是用不透光材料（66）制成的。

图 4B、C、D、E 和 K 说明在通道（70）形成的开口周围有荧光团（68）附着在壁材料表面上的纳通道板。如图 4B 和 4D 所示，这些荧光团可以覆盖整个壁材料表面。这些荧光团也可以集中在图 4C、E 和 K 所示的通道开口周围而不是覆盖整个表面。此外，支撑荧光团的壁材料可以如图 4D 和 4C 所示是传导层（62），壁材料可以如图 4K 所示是不透光层（78），或者壁材料如图 4B 和 4C 所示是支撑层（72）。支撑层可以是任何类型的壁材料，包括但不限于传导材料、非传导材料、透明材料、透光材料和不透光材料。

图 4F、G、H、I 和 L 说明在通道（70）周围有荧光团（68）镶嵌在壁材料中的纳通道板。这些荧光团可以散布在壁材料表面（如图 4F 所示），或者如图 4G、H 和 I 所示的集中在通道周围。在图 4F、G、H、I 和 L 所示的实施方案中，荧光团镶嵌在传导材料层（62）或透明材料层（74）或透光材料层（79）中。有荧光团镶嵌其中的膜层可以如图 4F 和 4G 所示形成壁材料表面，或者夹在其它膜层之间。例如，图 4H 和 4I 中的非传导层（64）夹在两个传导层（62）之间。图 4L 的透光层（79）夹在两个不透光层（78）之间。在某些情况下，所示膜层形成完整的壁材料。在另一些情况下，这些膜层或许毗邻支撑层或被支撑层夹在中间，如图 4I 所示。

图 4J 说明在通道（70）所形成开口周围有荧光团（68）附着在壁材料表面的纳通道板。在壁材料的全部暴露表面（包括通道内的表面）周围的材料都是传导材料。

图 4M 和 4N 说明在至少一部分通道 (70) 周围有发光薄膜 (76) 定位在壁材料内的纳通道板。该发光薄膜既可以如图 4M 所示形成壁材料表面并与不透光层 (78) 毗邻, 也可以如图 4N 所示夹在两个不透光层 (78) 中间。

图 4O 和 4P 说明有两层荧光团 (68) 镶嵌在壁材料中或附着在壁材料表面的纳通道板。在图 4O 中, 荧光团层 (68) 附着在传导材料 (62) 的表面, 在壁材料的两侧并围绕着通道形成的开口。在图 4P 中, 荧光团层 (68) 镶嵌在两个透光层 (79) 中, 这两个透光层夹着一个不透光层 (78)。

本发明优选的方法涉及正象前面讨论的那样的对带放射性标记的聚合物的分析。制备带放射性标记的聚合物, 如带  $^{32}\text{P}$  或  $^3\text{H}$  的 DNA, 在技术上是已知的。下面的介绍代表按照本发明的方法分析带放射性标记的聚合物的许多可能的实施方案之一(图 4Q 和 4R)。带放射性标记的核酸分子 (160) 用专门制造的多层纳通道 (162) 进行分析。该纳通道是标记核酸分子的直径并且是为得到指定的检测区而构造的。图 4Q 和 4R 所示的示范纳通道板是由两个不透辐射的膜层 (如铅膜或 Lucite 膜) (164、166) 和一个低密度材料膜 (或闪烁层) (168) (即常规聚合物、有机玻璃、Teflon 等) 组成的非均质多层结构。在图 4Q 中, 铅膜夹着低密度材料层并且其厚度足以阻止辐射通过。低密度材料允许辐射通过, 借此建立指定的辐射检测区。当 DNA 上的辐射标记通过该指定的检测区时, 发射核辐射, 其中一部分将通过该指定的辐射检测区。图 4R 说明在通道所形成的开口周围有低密度材料 (168)。围绕着壁材料的全部暴露表面 (包括通道内的表面) 的材料是不透辐射层 (165)。

在分析带辐射标记的核苷酸的相关实施方案（图 5）中，给出基于闪烁计数和多纳通道的检测系统。制作如图 5 所示的纳通道阵列（170）。有多重多层通道（172）是为了数据输出的并行放大。每个个体通道由屏蔽核辐射的核辐射屏蔽层（174）和暴露在核辐射下被激发的荧光闪烁层（176）组成。用核辐射屏蔽材料将这些个体通道彼此分开。通过用光学性能的 Lucite（或任何能阻止核辐射通过的透明材料）覆盖阻止核辐射抵达荧光检测系统。这样只允许荧光信号抵达检测系统。

上面介绍的每种纳通道都仅仅是一实例。所以，应当理解，就这些涉及任何一种元件或元件组合的实施方案所介绍的每种限制都可能包括在每种纳通道中。制备具有多层不同材料的薄膜的技术已有介绍，如美国专利第 5,462,467 号和 Ferreira 等人，*Thin solid Films* 224: 806809 (1990)。

在所提供的实例中，供体荧光团集中在每条通道周围的同心环中，以便优化供体强度。从直觉上说，同心环是优选的，因为能量转移的范围部分地受 Forster 距离的限制。详细地研究一条通道将说明在同心环结构中可能发生的供体强度的显著变化。图 6 展示有同心环结构的通道（82）。最外面的同心环（86）表示通道周围的供体荧光团的边缘。中间的同心区（84）表示从供体到受体的能量转移速率大于供体荧光团发射速率的区域。

供体荧光团镶嵌在固体介质中的基本理由最好通过研究光致漂白和猝灭的机理来理解。可以减弱荧光信号的因素包括：光致漂白、温度猝灭、能量转移猝灭、碰撞猝灭、激发态反应和溶剂效应。这些机理是类似的，即它们不是由于碰撞事件就是由于双分子事件造成的。固体介质是阻止这些不希望的分子过程的物理壁垒并且是隔离供体荧光团的手段。例如，光致漂白机理是由

于被激发的荧光团与氧反应形成无荧光的产物 (Menter 等人, 1978; Menter 等人, 1979; Giloh 和 Sedat, 1982)。固体介质、特别是在无氧环境中制造的固体介质阻止氧接触镶嵌其中的荧光团, 从而消除了可能发生的氧化反应 (Garland 和 Moore, 1979; Rost, 1990)。为了进一步理解固体介质的作用, 扼要地介绍其它猝灭效应。温度猝灭是随着温度升高荧光减弱。温度影响程度取决于该化合物; 它通常是每摄氏度大约 1% 猝灭变化 (Guilbault, 1973)。人们认为这种作用是由于分子运动增强和碰撞频率增大导致在发生荧光前向基态跃迁的概率增大。碰撞猝灭是由许多种涉及荧光团与另一个分子直接接触的机理组成的宽广范畴 (Lakowicz, 1983)。激发态反应涉及激发态的活性荧光团与附近的溶剂分子反应, 并构成碰撞猝灭的一个子集 (Porter, 1967; Zweig, 1973)。溶剂效应涉及溶剂-荧光团碰撞和包括氢键、酸-碱化学和电荷转移的相互作用 (Lakowicz, 1983)。能量转移猝灭是荧光团上的杂质借助不希望的 FRET 所造成的效应。通过简要地列举光致漂白和猝灭的机理, 显而易见分子与荧光团的相互作用是荧光团发射减弱的主要原因。因此, 固体介质通过隔离荧光团和建立阻止不需要的猝灭分子进入的物理壁垒消除了这些不希望的分子相互作用、碰撞和反应。

为了确定固体介质对能量转移的影响应当研究定义能量转移的方程。需要考虑描述 Forster 距离的方程 [Selvin, 1995; Cantor and Schimmel, 1980; Wu and Brand, 1994; Clegg et al., 1995; Fairclough and Cantor, 1978]:

$$R_0 = \frac{\sqrt{8.79 \times 10^{-5} J \Phi_D k^2}}{n^4}$$

其中  $J$  是供体发射与受体吸收的规范化的光谱重叠,  $\phi_D$  是在没有受体时供体发射的量子效率 (即离子得率) ( $\phi_D$  等于发射的光子数除以被吸收的光子数),  $n$  是折射指数,  $\kappa^2$  是与两个偶极子的相对角度有关的几何因子。将供体荧光团镶嵌在固体介质中使折射指数  $n$  增大。在溶剂系统中,  $n$  取值为 1.35 左右 (Selvin; 1995) 略高于水的值 1.33。一些固体介质的典型数值是熔融石英 1.46、无铅玻璃 1.52、重火石玻璃 1.66。固体介质和溶剂系统的  $R_0$ 's 之比值可以用于确定改变折射指数的影响幅度:

$$\frac{R_0'}{R_0} = \left( \frac{n'}{n} \right)^{2.3}$$

其中带 “'” 号的值是固体介质的值; 不带 “'” 号的值是溶剂系统的值。假设  $n' = 1.5$ , 比值变成 0.93。因此, Forster 距离只变化 7%, 一个通过采用原始  $R_0$  较高的供体-受体对容易修正的值。

再次参照图 6, 不提这些方程, 从概念上说, 能量转移率 ( $k_{\text{transfer}}$ ) 从该通道的中心随着离开该中心的距离的增加而下降 (图 6)。大家还知道供体发射率 ( $k_{\text{emit}}$ ) 在没有受体时在供体荧光团的整个区域上是均匀一致的 (图 6)。最接近通道 (因此也最接近受体) 的区域完全猝灭。在所有小于  $R_{\text{equal}}$  的区域, 因为  $k_{\text{transfer}}$  大于  $k_{\text{emit}}$  所以供体荧光团完全猝灭。在所有大于  $R_{\text{equal}}$  的区域, 供体发射率大于能量转移率, 所以猝灭不完全。

如果供体荧光团的同心环的半径等于  $R_{\text{equal}}$ , 那么就供体荧光团而言将发生 100% 的强度变化。这意味着在带受体标记的核苷酸经过该通道离去时受体以理想的效率得到检测。回想一下, 置信区间与该系统的 SNR 相关, 就这种变化而言, 产生 99.9%

置信区间所需最小信噪比经过计算，其结果是 6:1。就推荐的检测系统而言 SNRs 大于 600:1。

在这个时候提出定量的说明以便计算  $R_{\text{equal}}$ 。给出供体发射率和能量转移率的方程。供体发射率为：

$$k_{\text{emit}} = \frac{I \xi \rho N}{h \nu}$$

其中  $I$  是入射到供体荧光团上的光线强度， $\xi$  是供体荧光团的摩尔消光系数， $\rho$  是荧光发射常数 ( $3.8 \times 10^{-21} \text{ mol cm}^3/\text{L}$ )， $N$  是供体荧光团数， $h$  是普朗克常数 ( $6.6261 \times 10^{-34} \text{ J s}$ )， $\nu$  是激发光的频率。

多个供体对一个受体的能量转移率 ( $k_{\text{transfer}}$ ) 是从原来用于一个供体和一个受体的 Forster 的能量转移率方程 (Forster, 1965) 推演出来的。原来的方程为：

$$K = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

其中  $k$  是一个供体对一个受体的能量转移率， $R_0$  是 Forster 距离， $\tau$  是供体的荧光寿命， $r$  是从供体到受体的距离。多供体系统的推导是从前面对多供体系统的讨论的引伸。

对于多供体系统，在被转移的能量方面有两条限制。第一，有受体寿命强加的饱和极限。受体只有在它处于单基态 (the ground singlet state) 时才能被激发。就寿命为 1ns 的受体而言，

上限是  $1 \times 10^9$  次激发事件/秒。这个高饱和水平很难给出与单个荧光团的低速激发（25,000 次激发事件/秒）的关系。第二个限制是供体荧光团同时去激发的概率。在前面的计算中，只有少量的同时去激发事件可以发生。由于来源于能量转移的激发事件未使受体饱和以及供体同时去激发概率低，所以多供体系统分能量转移率正比于供体荧光团数（N）：

$$K_{transfer} = \frac{N}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

用这个方程，通过令两个速率方程相等并求解 r 可以求出令  $k_{transfer}$  等于  $k_{emit}$  的半径（ $R_{equal}$ ）。

$$k_{emit} = K_{transfer} \Rightarrow \frac{I \xi \rho N}{h\nu} = \frac{N}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

求解 r。

$$r = R_{equal} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\tau_D I \xi \rho / h\nu}}$$

的数值可以计算出来。表 3 列出各个变量的数值和选择这些具体数值的理由。

表 3

变量	数值	理由
$R_0$	60 埃	Forster 转移距离为 20 埃至 100 埃
$\tau_D$	$1 \times 10^{-9}$ 秒/光子	荧光寿命范围从 1 ns 到 20 ns
$h$	6.6261 J s	普朗克常数
$\nu$	$6.1224 \times 10^{14} \times s^{-1}$	$c = \nu\lambda$ ; $\lambda = 490\text{nm}$ (激发荧光素)
$I$	$30 \text{ W/cm}^2$	2W 激光强度是由 $P/A$ 给出的; $A$ 是波束面积 ( $r = 2\text{mm}$ ); 激光强度是 $64 \text{ W/cm}^2$
$\epsilon$	91,000 1/M cm	荧光素的摩尔消光系数
$\rho$	$3.8 \times 10^{-21} \text{ M cm}^3$	荧光素的荧光发射常数
$R_{\text{equal}}$	350 埃	来自上述方程

$R_{\text{equal}}$  的计算结果是 350 埃, 在 Forster 距离的数量级之内。这意味着在通道周围半径为 350 埃的荧光团同心环在受体标记通过时将产生 100% 的信号强度。实际上, 从信号检测和分辨毗邻碱基的需要这两个角度看, 具有这样大的供体强度是多余的。例如, 只要 0.5% 的强度变化就能产生 99.9% 的置信区间。在供体层中有两个受体而不是一个受体时看一下供体发射的进一步减小就有可能分辨毗邻的碱基。如果一个受体已经将供体发射减小到零, 那么由于供体发射不可能进一步减小补充受体将不被检测。下面将详细讨论这个方面。下面还将提供利用光致不稳定的保护基和光衍射作用在每条通道周围构成供体荧光团同心环的方法的实例。

通道直径至少为 1nm 的纳通道可以按聚碳酸酯滤膜形式从 Poretics 公司购买, 并且可以向 Corning Separations 公司订购。有几种方法可以用于制作所需直径的纳通道。

一种制作纳通道板的方法是借助径迹蚀刻法在膜片材料中产生直径均匀一致的圆孔。孔径在 10 nm 数量级上且孔密度接近每平方厘米 10 个孔的微孔或纳孔聚合物膜片可以借助径迹蚀刻

法制备[R. L. Fleischer, P. B. Price, R. M. Walker, *Nuclear Tracks in Solids* Univ. of California Press, Berkeley, CA (1975)]。借助径迹蚀刻法制作微孔是两步法。第一步, 将聚碳酸酯(或其它聚合物材料)薄膜在核子反应器中暴露在经准直的带电粒子下。当这些粒子通过聚碳酸酯材料上时它们留下敏化了的径迹。该径迹的密度是通过改变薄膜在反应器中的时间来控制的。第二步, 粒子留下的径迹被优先蚀刻(或溶解)成均匀的圆筒形通道。穿孔直径可以由蚀刻剂在该薄膜上的停留时间控制。形成径迹蚀刻膜片的方法在技术上已有许多先例, 例如欧洲专利申请第83305268.1号, 公开号0109147, 授权给 Varian Associates, Inc., 美国专利第3,303,085号; 3,662,178号; 3,713,921号; 3,802,972号; 3,852,134号; 4,956,219号; 5,462,467号; 5,564,959号和5,449,917号, 在此通过引证将它们全部并入本文。市售的膜片通常是由聚碳酸酯或聚酯制备的, 但是许多其它材料是可以径迹蚀刻法处理的(Id)。例如, 其它聚合物材料包括但不限于聚苯乙烯; 芳香族聚酯; 聚烯烃, 包括聚乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚丙烯; 乙烯基塑料, 诸如聚二氟乙烯(PVDF)和纤维素酯, 诸如硝酸纤维素、丁酸纤维素和乙酸纤维素。如果本发明的纳通道板是用径迹蚀刻技术制备的, 那么它可以由任何能用径迹蚀刻形成径迹蚀刻膜片的材料制成。

在研究和工业领域用高能粒子轰击材料的设备是已知的。用于形成径迹的粒子可以借助带电粒子加速器, 如静电加速器(如 Van de Graaff 加速器或 Tandem 加速器); 直线加速器或环形加速器, 如回旋加速器; 或者任何技术上已知的设备来产生。

一旦在薄膜上形成损坏径迹, 就可以用气体或液体有选择地蚀刻该薄膜, 借此形成通道即微孔。蚀刻剂的停留时间决定该通道的尺寸。被径迹蚀刻的薄膜在蚀刻剂下暴露足够的时间以产生

尺寸适合所需应用的通道，时间变化将取决于被分析的聚合物的类型和分析的类型。通道直径可以按照 M. Mulder 在“Basic Principles of Membrane Technology (膜技术基本原理)” (Klumer Academic, 1991) 中揭示的方法采用扫描电子显微镜 (SEM) 进行测量。

形成定义直径的纳通道的第二种方法是将径迹蚀刻与表面涂敷结合使用。直径大于所需纳通道设备的聚碳酸酯膜片涂上一层规定厚度的薄膜材料。所得到的结构是涂到所需直径的聚碳酸酯膜片。加在纳通道板上的第一层薄膜是传导层。传导层有助于分辨毗邻的碱基 (下面将详细讨论)

通过溶剂沉积将传导聚合物的薄膜层加到聚碳酸酯膜片上。传导聚合物的溶剂沉积法已有介绍 (Cheung 等人, 1994; Ferreira 等人, 1994; Ferreira 和 Ruber, 1995; Fou 和 Ruber, 1995)。下面是从 Fou 和 Ruber, 1995 中摘录的一段:

*我们介绍利用逐层处理技术所需要的溶液化学和方法论... 以便巧妙地将诸如聚吡咯和聚苯胺之类的传导聚合物处理成多层薄膜并对薄膜厚度和薄膜构造两者实施埃级控制。具有 300S/cm 以上传导性的超薄薄膜可以制作。该方法涉及将单层导电聚合物从稀释溶液中自发吸收到基材上。随后用可溶性聚阴离子通过交替沉积形成多层薄膜。薄膜的厚度可以精确控制到埃级并且可以分布在 5 埃至 1000 埃以上。所用的传导聚合物是聚吡咯和聚苯胺，因为可以使它们极富超薄层 (~50 埃) 传导性 (300S/cm)。*

采用溶剂沉积法形成所需纳通道的优点是双重的。第一，任何规定直径的纳通道都可以精确地形成。第二，由于第一层纳通

道板是传导层，所以增加它是很方便的。另一个优点（虽然不明显）是增加传导材料层的厚度可以降低聚碳酸酯表面的峰-谷距离，形成更均匀的表面。

制备本发明的纳通道器件的另一种方法是生产碳纳管阵列。Iijima 证明生产六角形键合碳原子的多重同心筒形壳可以起催化表面作用，将物质限制在一维空间中 [Iijima, *Nature*, 354: 56 (1991), 也见美国专利第 4,424,054 号]。

Li. W. Z. 等人也报告了一种生产大面积的高度有序隔离的长纳管的方法。这种方法以蒸汽化学沉积为基础，它利用包含微孔中镶嵌铁纳颗粒而不是碳黑和石墨的中孔硅石或用过渡金属纳颗粒覆盖的硅石。下面的方法是 Li, W. Z. 等人揭示的：

包含铁纳颗粒的中孔硅石是用溶胶-凝胶法通过四乙氧基硅 (TEOS) 在硝酸铁水溶液中水解制备的。分析纯的 TEOS (10ml) 与 10.4 ml 分析纯的乙醇和 0.1 M 硝酸铁水溶液 (11.4ml) 混合，磁力搅拌大约 30 分钟。然后，添加几滴浓缩的氟化氢 (0.2 ml)，再将该混合物搅拌 15 分钟。在该混合物形成凝胶之后，将该凝胶在 60 °C 下干燥 1 周，以除去多余的水和其它溶剂。然后，在 450 °C、 $10^{-2}$  毫米汞柱压力下焙烧该凝胶。获得具有比较均匀的微孔的硅石网，氧化铁纳颗粒镶嵌在这些微孔中。然后，在 550 °C 下在 180 毫米汞柱的 9%  $H_2/N_2$  气流 ( $110\text{ cm}^3/\text{min}$ ) 中使氧化铁纳颗粒还原 5 小时，以获得催化活性高的铁纳颗粒。随后，将包含 9% 乙炔的氮气混合物以  $110\text{ cm}^3/\text{min}$  的流速引入该舱室，再借助在 700 °C 下乙炔分解获得的碳原子的沉积在基材上形成碳纳管。在碳沉积之前和之后用扫描电子显微镜 (S-4200, Hitachi) 考核该样品，并且借助附着在 SEM 上的 SiLi 检测

器纪录能量分散 X 射线光谱 (EDX)。为了制备透射电子显微镜 (TEM) 样品, 将该样品用研钵研磨并悬浮在乙醇中, 然后将一滴滴在多孔的碳紫铜栅格上, 用 JEM 200-cx 显微镜考核以确定碳纳管的特征。

此外, 纳通道可以从多孔的阳极氧化铝制备, 它是有直径通常在 4 至 200nm 范围内尺寸均匀的筒形中心孔的六角形柱状晶胞的填充阵列。这种类型的膜片是由金属铝用电化学方法制备的 [A. Despic 和 V. P. Parkhutik, in *Morden Aspects of Electrochemistry*, J. O. Bockris, R.E. White, B. E. Conway 编辑 (Plenum, New York, 1994), vol. 20, chap. 6]。已经实现高达每平方厘米  $10^{11}$  个孔的微孔密度 [D. AlMawiawi, N. Coombs, M. Moskovits, *J. Appl. Phys.*, 70, 4421(1991)]。采用这种方法已经制备出微孔直径小到 5nm 的膜片 [有人认为甚至可以制备出更小的微孔, Martin, C. R., *Science*, 266: 1961(1994)]。

Matsuda 和 Fukuda 已经介绍过多孔氧化铝膜片的改进。这些膜片 (它们是贵金属 (铂和金) 纳孔阵列) 是通过采用两步法复制多孔的阳极氧化铝的蜂窝结构来制备的。在制备出多孔氧化铝的多孔负结构之后用金属制备正结构, 这将导致其几何结构与多孔阳极氧化铝的结构完全一致。所以, 该方法允许用需要的材料而不是氧化铝制备多孔阳极氧化铝的孔阵列 [Matsuda 和 Fukuda, *Science*, 268: 1466(1995)]。下面简要地介绍 Matsuda 和 Fukuda 的方法。

阳极氧化铝是利用基材上的氧化铝在 40 V 长期阳极化来生产的, 这导致最少的缺陷和错位, 接下来用饱和的  $\text{HgCl}_2$  除去铝基材和多孔层的底面部分。然后, 将该材料用 5% (按重量计) 的磷酸溶液浸渍, 以调整孔径。借助真空沉积在多孔阳极氧化

铝的底部上沉积薄金属层,以便形成催化剂或电极供随后的镀金属工艺使用。一般地说,用于蒸发的金属与用于形成“脚手架”的金属是相同的。在真空条件下将包含引发剂(如5%(按重量计)过氧化苯甲酰)的金属异丁烯酸酯单体注入这些微孔并借助紫外辐射使之聚合。然后,用NaOH除去氧化铝层,以产生聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)的多孔氧化铝型负结构。正结构是由PMMA模具通过化学沉积铂形成的。将负型的PMMA浸渍在化学镀溶液中,使金属从筒形结构的底面部分开始沉积并逐渐填充PMMA的空腔,直至金属填充到PMMA的负型顶面。另一种办法是在不变的条件下用电化学方法将Au沉积到PMMA的微型空腔中,借此来制备金(Au)孔阵列。

在现有技术中介绍过的其它纳米级的多孔材料包括微孔密度高达每平方厘米 $3 \times 10^{10}$ 个微孔的纳通道阵列玻璃[R. J. Tonucci, B. L. Justus, A.J. Campillo, C.E. Ford, *Science* 258: 783(1992)和 Pearson 与 Tonucci, *Science* 270: 68(1995)]。Douglas 等人已经证明在来源于杆菌属的蛋白质中的纳米孔(nanosopic pore)可以用于将这些微孔的图象转移到下层基材上[Douglas 等人, *Science* 257: 642(1992)]。最后, Ozin 已经讨论过各种各样的可用作模板材料的纳米级多孔固体[Ozin, G. *Adv. Mater.* 4: 612 (1992)]。Nishizawa 等人描述了半径小到 0.8 纳米的金属纳管膜片的生产[Nishizawa 等人, *Science* 268: 700(1995)], 所介绍的纳管成形方法是在市售的聚碳酸酯滤膜中的微孔壁上镀金, 该滤膜包含贯通膜片厚度(6  $\mu\text{m}$ )半径(25 nm)一致的筒形微孔(每平方厘米 $6 \times 10^8$ 个微孔)。“沉积在微孔壁上的金层厚度可以通过改变镀金时间予以控制。因此, 金纳管的内径也可以改变[通过测量穿越包含纳管的膜片的气体(He)通量予以确定]。” Berggren 等人已经论证过采用单层自动组装和中性的惰性气体束的纳米

级平印术 (nanolithography) 技术[Berggren 等人, *Science* 269: 1255- 1257(1995)]。

La Silva 等人介绍一种隧道效应扫描显微镜 (STM) 制作尺寸介于 10 至 100 纳米且部分地与其环境隔离的简单金属结构的技术。这种方法是将非常薄的金属膜沉积在绝缘基材上并在需要横向电绝缘的地方用利器尖机加出穿透该薄膜的开口 [Journal of Vacuum Science & Technology B, (1993) 11: 1992 – 1999] 。

壁材料可以以最有利于分辨聚合物毗邻单元的方式构成。由于壁材料的作用是提供传导信号的环境, 所以用于制备壁材料的材料可以选择以便有助于这个过程。例如, 如果试剂镶嵌在壁材料中, 那么在试剂周围的壁材料优选传导材料或透光材料。为了分辨毗邻的带标记碱基, 在有荧光团镶嵌在通道周围的壁中的装置中优化壁材料至少有两种其它的机理, 包括使用薄传导层和控制每条通道周围的供体荧光团的半径。

传导层通过电屏蔽阻止 Forster 能量转移。图 6 说明与包含供体荧光团非传导层有关的传导层构型。该传导“三明治”形成能够发生能量转移的定义区, 这有助于优化碱基的分辨。Forster 能量转移是由供体与受体之间电偶极子相互作用引起的。在所发生的信号取决于 FRET 时使用传导层的基本理由是 FRET 是随电场变化的, 因此在供体和受体之间设置电屏障将阻止能量转移。全面理解能量转移的基础是必要的。入射激发光在供体中诱导电子跃迁或致使供体中的电子发生碰撞, 所以它将在供体中建立电场 (Selvin, 1995)。这将在供体中产生感生的电偶极矩, 于是该供体也产生它自己的电场。当受体处于该供体的电场中时发生能量转移。因此, 在该受体中有受激跃迁, 该跃迁产生感生偶极距。该偶极距的大小与供体电场的大小有关:  $p_A = \alpha_A E_D$ , 其中  $\alpha_A$  是

受体的极化度。受体吸收的能量是  $p_A E_D = \alpha_A E_D^2$ ，它转换成能量转移率随  $1/R^6$  变化的关系式。

电屏蔽理论在大多数物理学入门书籍中可以找到。Purcell, 1985 提供清楚的解释。匣内的势函数  $\psi(x, y, z)$  必须满足拉普拉斯方程  $\nabla^2 \psi = 0$ 。给定传导体的已知条件，超导体的边界是等势的，这意味着  $\psi = \psi_0$ ，即在超导体的表面上处处是常值函数。拉普拉斯方程的显解是  $\psi = \psi_0$  贯穿该体积。按照唯一性定理，只有一个解，这意味着  $\psi = \text{常数}$ 。由于  $E = -\text{grad } \psi$ ，所以势函数不变的电场是零。因此，在匣内电场处处是零。

带有开孔的空心匣模型可以应用于纳通道板，因为纳通道板基本上是有许多“孔”的传导匣。参照图 7A 和 7B，图 7A 展示有纳通道的完整的纳通道板 (90)。供体荧光团层 (88) 被传导“匣”封闭着。在这种情况下，由于电屏蔽 (90) 对于供体荧光团不可能有来自匣外的能量转移。回忆一下，能量转移的基础是电场。纳通道的边界条件是纳通道板的外表面  $\psi = \psi_0$ ，即一个等势表面。拉普拉斯方程的逻辑解是在边界内处处都有  $\psi = \text{常数}$ 。依据唯一性定理，这是唯一可能的答案，因此在纳通道的传导“匣”内部处处都因  $E = -\text{grad } \psi$ ，所以  $E = 0$ 。结论是受体荧光团不能经历来自该匣外部的能量转移。在受体分子不与供体荧光团同在任何位置，能量转移量都将受到限制。在图 7B 中，不经历能量转移的供体荧光团被角度  $\theta$  包围，该角度在所有场合都是非常大，受体荧光团处在供体荧光团的位置除外，这是所需要的构型。

传导层的影响是在带标记的核苷酸通过该纳通道时形成敏锐的信号。图 8A 和图 8B 说明在受体标记通过纳通道时信号的生成。图 8A 展示一条纳通道 (98) 的放大图。只有一部分传导

层 (94) 被展示出来。不透光的聚碳酸酯膜层未被展示。DNA 链上的受体标记 (100) 从下向上通过纳通道运动, 从位置 A 开始移向位置 C。FRET 只能在位置 B 发生, 因为在位置 A 和位置 B 传导层屏蔽供体荧光团 (96) 与受体的任何相互作用。图 8B 中的曲线说明随着受体标记从位置 A 向位置 C 移动供体强度的陡峭变化。曲线中段表示供体荧光团的能级。曲线的外侧段表示传导层的能级。在传导层和供体荧光团层的界面, 由于电屏蔽作用供体强度有显著变化。

显然, 用传导层能够解决毗邻碱基之间的分辨问题。通过形成传导“三明治”, 其中供体荧光团的厚度小于 B-DNA 的螺距 (3.4 埃), 所需的分辨力就能实现。用等离子体沉积法、溶液沉积法、化学气相沉积法或离子束沉积法可以很容易地构成这种厚度的薄膜 (Spohr, 1990; Valiev, 1992; Konuma, 1992; Pauleau, 1995; Dash, 1975; Stuart, 1983; Morosanu, 1990)。但是, 使用厚度小于 3.4 埃的供体荧光团薄膜是不符合要求的, 在下一个标题下将予以解释。简言之, 镶嵌在较厚膜层中的供体荧光团允许测量 DNA 移动的瞬时速度。通过测量带标记的核苷酸在厚膜层中花费的时间和了解该膜层的尺寸, 就可以知道 DNA 的移动速度, 该速度对于确定带标记的核苷酸之间的距离是至关重要的。

精确分辨毗邻的带标记碱基的方法的另一个实例是控制每个纳通道周围的供体荧光团半径。有供体荧光团的同心环存在时, 转移给两个受体标记的能量比转移给一个受体的能量大。检测转移给一个和两个受体的能量差允许分辨毗邻的碱基。为了使供体荧光团能够与一个以上受体相互作用, 供体荧光团的厚度不得不 DNA 的螺距。此外, 供体荧光团的半径必须大于适合一个受体的  $R_{\text{equal}}$  (见图 6)。在有一个以上受体存在时, 半径大于适合一个受体的  $R_{\text{equal}}$  允许进一步降低供体强度。半径等于意味着



在一个受体通过时供体强度下降 100%。在这种情况下，两个受体通过得到与一个受体相同的检测信号。

图 9 图解说明两个碱基带标记的 DNA 链通过纳通道(104)，其中夹在传导材料(106)之间的荧光团(108)有适当的厚度和半径。用“A”至“D”标记的位置对应于在该图右边的图上的标记。开始，DNA 上的受体标记在位置 A。在这个位置不可能发生能量转移，所以供体强度保持在最大值。DNA 进一步移动允许一个受体与供体荧光团一起经历能量转移(B)并且供体强度发生急剧下降。在位置 C，两个荧光团能够经历能量转移，供体强度进一步下降。最后，两个受体标记离开供体荧光团区，能量转移不再可能，于是供体强度返回最大值(D)。

在有一个和两个受体存在时供体发射的变化不用数学定量就能形象地说明。图 10A 用体积说明变化量。该插图将能量转移的程度表示成实心体积(110)。原始的供体强度被表示成盘形体积(112)。图 10B 由一个受体引起的变化。右图是两个受体的情况。衰减曲线代表能量转移率相对 Forster 方程给出的径向距离的变化。适合两个受体的衰减曲线大致是一个受体的衰减曲线的两倍。供体发射率和能量转移率以单元  $1/s \text{ nm}^2$  表示。供体发射下降率在能量转移表面上积分得到供体发射的净下降。这被表示成每条衰减曲线下的阴影面积在  $2\pi$  范围内积分。已知原始的供体发射(矩形阴影面积在  $2\pi$  范围内积分)，供体发射的下降百分比可以求出。

在数学上，这些变化很容易计算。在两种情况下，该变化都等于带状面积(图 10)在  $2\pi$  范围内积分。为了计算，供体发射率和能量转移率用适当的单元  $1/s \text{ nm}^2$  表示。为此，供体荧光团



的密度  $N/A$  将被用于速率方程，其中  $N_D$  是荧光团数， $A$  是供体荧光团占据的面积。因此，发射率由下式给出：

$$k_{emit} = \frac{I\xi\rho N_D}{h\nu A}$$

能量转移率变成：

$$k_{transfer} = \frac{N_D N_A}{\tau_{DA}} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

其中  $N_A$  是能够与供体一起经历能量转移的受体数。适合计算带状面积在  $2\pi$  范围内积分的一般方程如下：

$$\pi(R_{equal}^2 - R_{channel}^2)K_{emit} + \int_0^{2\pi R_{donor}} \int_{R_{equal}} K_{transfer} r dr d\theta$$

就现在的计算而言， $R_{donor} = 55 \text{ nm}$ ， $N_D = 1000$ 。供体荧光团的密度 ( $N_D/A$ ) 变成 0.11 个荧光团/平方纳米。这个值是不合理的，因为可能的最大荧光团的面积是  $1 \text{ nm}^2$ 。这意味着该密度至少在比可能的最高荧光团密度低的数量级。

为了求解该一般方程，回忆一下，令  $k_{emit} = k_{transfer}$ ，可以求出  $R_{equal}$ ，从而得出下式：

$$R_{equal} = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\tau_{DA} I \xi \rho / N_A h \nu}}$$

重要的是知道原始的供体发射 ( $E_0$ )，它由下式给出：

$$E_0 = K_{emit} \pi (R_{donor}^2 - R_{channel}^2)$$

采用上述数值和来自表 3 的数值，有可能针对处在经历能量转移位置的受体数量将供体发射值列成表格 (表 4)。  $N_A = 1-5, 11-12$  的数值是作为实例被计算出来。我们希望第一供体发射下降的值最大。随后的下降逐渐减小。当接近时，希望实际变化 (不是百分数) 趋于零。之所以这样是因为供体分子几乎完全猝灭。

决定检测能力的是变化率和信噪比，而不是供体发射的绝对值的变化。正象希望的那样，SNR 随着受体数增加而减小，因为有更多的供体猝灭。换言之，供体发射变得更小。从  $N_A = 5$  到  $N_A = 12$ , SNR 的这种下降通过变化率的增加得到补偿。利用 SNR 和变化率计算出置信度。例如，对于检测从一个受体到两个受体的变化的置信度使用一个受体时的 SNR 和一个受体到两个受体的变化率进行计算。在这种情况下，对检测 0.483% 的变化，有 95% 的置信度。由于变化率高 (29.1%)，所以将以 100% 的置信度检测从一个受体到两个受体的信号变化。上述计算结果表明多重毗邻的受体可以得到高效率的检测。

表 4

$N_A$	供体发射(个光子/秒)	相对前一个的变化率(%)	SNR(在 $E_0$ 80%全井容量, $N_A=0$ )	置信度
0	$2.5572 \times 10^7$	—	632 : 1	~100
1	$1.0943 \times 10^6$	57.2%	413 : 1	“”
2	$7.7510 \times 10^6$	29.1%	348 : 1	“”
3	$5.7650 \times 10^6$	25.6%	300 : 1	“”
4	$4.3560 \times 10^6$	24.4%	261 : 1	“”
5	$3.2440 \times 10^6$	25.5%	225 : 1	“”
”	”	”	”	”
11	$3.8200 \times 10^5$	—	77 : 1	“”
12	$2.1200 \times 10^5$	44.5%	58 : 1	“”

在上述计算中所做的假设是在一个荧光团通过供体荧光团层期间供体发射保持不变。回忆一下，供体荧光团层可以由镶嵌在不传导的透明材料中的单层荧光团组成。对于接近纳通道出口的受体能量转移的距离小于最初进入该通道时的距离。这种变化事实上是重要的，就象下面通过数学方法展示的那样。对更多的受体将该变化考虑在内将得到较高的信噪比和较大的供体强度变化。这意味着表 4 中的数值虽然已经表明非常有效的信号生成/检测，但实际上甚至还要略高一些。

在受体通过供体荧光团层时供体发射的变化是按下述公式计算确定的。我们希望在受体通过供体层时由于能量转移的有效距离较小能量转移的程度也随之减小。这种减小的后果是供体发射大于前面的计算中所使用的。较高的供体发射意味着较高的 SNR。假设受体已经进入供体层一个小距离。短暂的时间之后，另一个受体进入该供体层。额外的受体存在使供体发射下降。百分率变化是大的。事实上，它比以前的计算结果大。较高的 SNR 和较大的百分率变化相结合意味着检测效率比以前的估计高。采

用这种系统能够识别复杂的加标记方案，如给各个核苷酸加标记。

当受体与供体荧光团处在同一平面上时，供体发射方程由下式给出：

$$k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [K_{emit} \pi(R_{equal}^2 - R_{channel}^2) + \int_0^{R_{donor}} 2\pi r \int_{R_{equal}}^{R_0} K_{transfer} r dr d\lambda]$$

回忆一下  $k_{emit}$  和  $k_{transfer}$  的方程：

$$k_{emit} = \frac{I \xi \rho N_D}{h \nu A} \quad k_{transfer} = \frac{N_D N_A}{\tau_{DA}} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6$$

为了用径向距离 ( $x$ ) 和受体距供体层的距离 ( $d$ ) 表达原始的供体发射函数的函数，将下式代入：

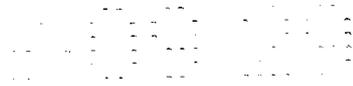
$$dr = \frac{x}{\sqrt{x^2 + d^2}} dx$$

将求解  $k_{transfer}$  的方程代入，得到最终的方程：

$$k_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [K_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + 2\pi \frac{N_D R_0^6}{\tau_{DA} A} \int_{x_{equal}}^{R_{donor}} \frac{x}{(x^2 + d^2)} d\lambda]$$

令  $u = x^2 + d^2$ ，于是  $dx = du/2x$ ，

$$K_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [K_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + 2\pi \frac{N_D \pi R_0^6}{\tau_{DA} A} \int_{U=x_{equal}^2+d^2}^{U=R_{donor}^2+d^2} \frac{1}{2U^3} du]$$



$$K_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [K_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_0}^6}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4(x_{equal}^2 + d^2)^2} - \frac{1}{4(R_{donor}^2 + d^2)^2})]$$

将  $x_{equal} = \sqrt{(R_{equal}^2 - d^2)}$  代入，最终的发射函数变成：

$$E(d) = K_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [K_{emit} \pi(R_{equal}^2 - d^2 - R_{channel}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_0}^6}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4R_{equal}^4} - \frac{1}{4(R_{donor}^2 + d^2)^2})]$$

最终的供体发射函数可以对距离作图。

距离 (埃)	供体发射 (个光子/秒)	相对原始值的变化率
0	$1.09425 \times 10^7$	—
20	$1.09740 \times 10^7$	0.023%
40	$1.0692 \times 10^7$	1.158%
60	$1.12278 \times 10^7$	2.607%
80	$1.14501 \times 10^7$	4.638%
100	$1.17365 \times 10^7$	7.256%

$$E_2(d) = K_{emit} \pi(R_{donor}^2 - R_{channel}^2) - [K_{emit} \pi(x_{equal}^2 - R_{channel}^2) + (2\pi \frac{N_{DR_0}^6}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4(R_{equal}^2 + d^2)^2} - \frac{1}{4(R_{donor}^2 + d^2)^2}) + (2\pi \frac{N_{DR_0}^6}{\tau_{DA}}) (\frac{1}{4R_{equal}^4} - \frac{1}{4R_{donor}^4})]$$

为了求出上述方程的解，需要通过令  $k_{emit}$  等于两个受体的能量转移之和求出  $R_{equal}$ 。按下面的等式求解  $R_{equal}$  是用计算机完成的：

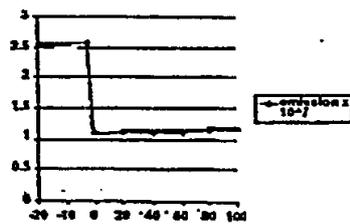
$$K_{emit} = K_{transfer(1)} + K_{transfer(2)} \Rightarrow \frac{I \xi \rho N_D}{h\nu} = \frac{N_D}{\tau_D} (\frac{R_0}{R_{equal}})^6 + \frac{N_D}{\tau_D} \frac{R_0^6}{(R_{equal}^2 + d^2)^3}$$

受体从一个变成两个，供体发射的变化率被列成表格。

距离(d)	$R_{\text{equal}}$ 2 受体	$E_2(d)$	$E_1(d)$	变化率	SNR
0 埃	39.28	$7.7510 \times 10^8$	$1.0943 \times 10^7$	29.10%	348.0 : 1
20 埃	39.21	$7.7661 \times 10^8$	$1.0974 \times 10^7$	29.24%	348.3 : 1
40 埃	39.11	$7.8012 \times 10^8$	$1.1069 \times 10^7$	29.44%	349.3 : 1
60 埃	39.01	$7.8815 \times 10^8$	$1.1228 \times 10^7$	29.80%	350.9 : 1
80 埃	38.82	$7.9790 \times 10^8$	$1.1450 \times 10^7$	30.31%	353.1 : 1
100 埃	38.610	$8.0962 \times 10^8$	$1.1737 \times 10^7$	31.01%	355.7 : 1

$$\text{变化率} = \frac{E_1(d) - E_2(d)}{E_1(d)} \times 100$$

所以，一直到各个碱基的碱基分辨是能实现的。对碱基分辨自变量的推论是在供体层中各受体花费的时间可以被确定。这转换成关于 DNA 移动的瞬时速度的信息。



为了实现最佳的聚合物线形穿越通道 (optimal linear crossing of a polymer across a channel)，重要的是考虑通道直径以及用于引导聚合物线形穿越的方法 (如电场)。通道直径应当很好地与带标记聚合物的直径相对应。线形穿越的理论是通道直径很好地与聚合物直径相对应。例如，DNA 聚合酶的环状滑动夹具有与

双链 DNA 对应的内径并成功地实现 DNA 分子的线形穿越(inear crossing)。DNA 的成千上万个碱基能够通过该滑动夹。几份参考文献也已经证明在通道直径很好地与 DNA 的直径相对应时 DNA 线形穿越通道发生。(Bustamante, 1991; Gurrieri 等人, 1990; Matsumoto 等人, 1981)。

在实验中实验的单链 DNA 具有 1.6 nm 的直径。内径大约 1.7-3 nm 的通道就足以允许单链 DNA 分子线形穿越。通道直径与 DNA 直径不需要精确匹配, 但优选的是它们是同样的。对于具有 3.4nm 直径的双链 DNA, 通道尺寸在 3.5 nm 和 4.5 nm 之间就足以允许线形穿越。

象前面讨论的那样, 许多方法可用于使聚合物穿越通道并经过相互作用测站或信号发生测站。按照本发明优选的方法是利用电场。电场可以用于推动聚合物通过该通道, 因为聚合物在施加的电场方向上被绷紧和准直, 这在几项研究中已得到证实 (Bustamante, 1991; Gurrieri 等人, 1990; Matsumoto 等人, 1981)。与聚合物线形穿越通道关系最密切的实验起因于用电场推动聚合物分子通过蛋白质通道的实验, 这些实验是 Kasianowicz 等人 (1996) 和 Bezrukov 等人 (1994) 介绍的, 在此通过引证将它们并入本文。下面简要地介绍这些实验, 以便说明一种使聚合物能够线形穿越的方法。

在题为“在使用膜片通道时, 聚核苷酸分子的个体特性描述” [Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel] 的研究中 Kasianowicz 等人 (1996) 证明 DNA 分子在电场作用下线形穿越双分子脂膜中的蛋白质通道 (在 PCT 公开的专利申请 WO96/29593 中也有介绍)。摘录如下:

我们证明电场能够驱动单链的 RNA 和 DNA 分子通过双分子脂膜膜中的 2.6 nm 直径的离子通道。因为该通道直径只能适应 RNA 和 DNA 的单链，所以每种聚合物作为局部阻断该通道的伸直链横穿该膜片。

该分析方法是利用金黄色酿脓葡萄球菌溶血素作为膜通道完成的。它具有 2.6 nm 的直径并且能够在伸直期间保持畅通，允许连续的离子电流流过双分子脂膜。该假设是当 DNA 分子横穿通道时离子电流应当有阻断。采用单通道录声将阻断时间纪录下来。阻断时间的程度与发生线形穿越时通过该通道的单链 DNA 分子的长度相对应。起初在膜片上施加 -120mv 电位，引发离子电流。当添加单链 DNA 时，相继发生两次传导阻断，分别为 30  $\mu$ s 和 1300  $\mu$ s。

这个数据支持两种假设：(1) 阻断时间的长度（用“寿命”表示）直接与 DNA 的长度成正比；(2) 对于给定长度的 DNA 施加较高的电压缩短阻断时间，表明确实发生了线形穿越。作为对照物。业已证明双链 DNA 不能穿越该蛋白质膜。

Bezrukov 等人（1994）已经用丙甲菌素微孔作过类似的研究，其报告题为“运动通过单离子通道的聚合物计数” [Counting Polymers Moving Through a Single Ion Channel]。丙甲菌素微孔具有 2 nm 的内径。传导阻断的持续时间与被推过该微孔的聚合物长度成正比，从而支持线形穿越假设。来自 Kasianowicz 等人（1996）和 Bezrukov（1994）的结果证明电场能够驱动 DNA 以纵向模式穿越蛋白质微孔。

一个证明 DNA 能够通过按照本发明制造的通道的实验已经完成。该实验的结果示于图 11。DNA 以各种形式暴露在纳通道下，以确定它是否能够通过。只有 50 kb 的双链线形 DNA 能够

通过 4 nm 纳通道的阵列。借助同样尺寸的圆质体塑造的叠合 DNA 不能通过该阵列。线 1 和 2 是对照物。正象希望的那样，与线形 DNA 相比圆形 DNA 迁移更缓慢。线 3 和 4 证明只有线形 DNA 才能通过该纳通道阵列。由于溶合直径大约 5 nm 的叠合 DNA 不能通过该阵列，所以线形 DNA 通过该板的唯一方法是线形模式。

采用 Kasianowicz 等人介绍的上述系统可以分析随机标记的聚合物，如 DNA，其方法是使聚合物通过该通道并进行单元特异性测量。通道可以象 Kasianowicz 等人和在 PCT 的专利申请公开文本 WO/96/29593 中介绍的那样用脂膜制备成蛋白质微孔。简言之，将金黄色酿脓葡萄球菌蛋白质 $\alpha$ -溶血素添加到双分子脂膜的 cys 侧。例如，双分子脂膜可以由二植烷醇基磷脂酰胆碱构成，其方法是在 Teflon 膜片上使该溶液在 0.2 mm 孔上成层，将两个包含缓冲溶液的间格分开。添加溶血素后，可以跨双分子脂膜施加电压并且从 0 mV 变化到 140 mV。将随机标记的 DNA 添加到在蛋白质的 cys 一侧的缓冲溶液中。施加电压，使带标记的 DNA 从该通道的 cys 侧横渡到带正电荷 trans 侧。在每个单元通过该通道时由于该通道被阻塞传导性发生变化。传导性的变化取决于通过该通道的单元的大小、形状和电荷。如果该单元是带标记的，传导性的变化将反映该标记的性质。以这样的方式可以识别带标记的单元。这种方法可以用于识别特定的单元、或单元的特异次序、或单元之间的距离、或简单地确定带标记单元的数量。

由于纳通道内外摩擦系数的差异，DNA 的逆向移动是不大可能的。预计在溶剂化的标记 DNA 和纳通道内部之间发生的 van der Waals 相互作用将对纳通道内的那部分 DNA 产生高于自由溶液中的摩擦阻力。这通过有纳通道板存在时 DNA 迁移变得更缓

慢得以证实（比较图 6 中的线 1 和 3）。摩擦阻力不同可能在所需的 DNA 移动方向上形成棘爪机理。

使聚合物按直线移动通过相互作用测站或信号发生测站的另一种方法涉及使用分子马达。分子马达是一种器件它与聚合物相互作用并推动该聚合物通过该站。分子马达包括但不限于 DNA 聚合酶和螺旋酶。业已证明 DNA 聚合酶能有效地起分子马达的作用。优选的是夹在 DNA 上的聚合酶段的内径类似于双链 DNA 的内径。此外，大量的 DNA 可以是能够以线形方式穿过该滑动夹。

DNA 聚合酶 III 全酶的 $\beta$ -子单元的总结构直径为 80 埃，内径大约为 35 埃。相比之下，B-形双螺旋 DNA 的一个完整的螺旋（a full turn）才大约为 34 埃。 $\beta$ -子单元按所谓的滑动夹机理贴合在 DNA 周围，以便在 DNA 复制期间传递全酶的突进运动（processive motion）。大家都理解 $\beta$ -子单元在复制期间环绕着 DNA，以限制向全酶突进(processivity)（Bloom 等人，1996；Fu 等人，1996；Griep，1995；Herendeen 和 Kelly，1996；Naktinis 等人，1996；Paz-Elizur 等人，1996；Skaliter 等人，1996）。因为滑动夹是全酶的突进机构，所以它必然意味着有大量的 DNA 呈线形穿过该滑动夹。一时间有数千个碱基穿过该滑动夹（Kornberg 和 Baker，1991）。

制备本发明的壁材料也被包括在本发明之内。按照本发明，一种制备壁材料的方法包括将试剂通过共价键键合到壁材料的众多离散位置。在壁材料上该试剂被键合在足以接近相互作用测站的离散位置，以致在能与该试剂发生相互作用产生信号的聚合物个体单元定位在该相互作用测站时，该试剂与该个体单元相互

作用产生信号。这些离散位置可以在壁材料表面上，也可以在壁材料内，以致试剂镶嵌在壁材料中。

另一种方法是使化学物质通过不透明的壁材料有选择地附着在通道的边缘。文中用语“不透明的”材料是选定波长的光线不能透过的材料。

壁材料是与附着在穿越该壁材料的通道边缘上的光保护化学基团一起提供的。然后，用光线照射该光保护化学基团，以去除对该化学基团的保护，并将化学物质附着到该去除了光保护的化学基团上。

文中用语“光保护化学基团”是一种光敏化合物，该化合物在暴露在光线下时能够变成有化学活性的。当光线照射到该光保护化学基团时，该基团被去除光保护并且对于与诸如发光化合物和猝灭化合物之类的化学物质相互作用是敏感的。

即使光保护化学基团覆盖着整个壁表面，仍然能够制备试剂定位区。光线可以有选择地照射壁面的某些需要有试剂定位的区域。例如，光线可以只照射在通道开口周围的壁面区域，以致只有这些区域被去除光保护。在添加试剂时，它将只围绕通道开口周围的那些区域附着到壁面上。

此外，还提供了一种制备壁材料的方法，在该壁材料表面上有光发射定位区。将光发射化合物施加到壁材料表面上，以便在该表面上产生至少数个光发射定位区。光发射化合物可以直接施加在壁材料表面上，也可以间接地通过已经附着在该表面上并且已经去除了光保护的光保护化学基团施加到该表面上。

文中用语“光发射定位区”是在壁材料表面上光发射化合物集中的区域，它是在穿越壁材料的通道周围为检测光发射定义的一个靶区。该定位区可以通过几种方式产生。第一，可以将光发射化合物直接附着到壁材料表面上，只附着在通道边缘周围。第二，可以将光发射化合物附着到已经有选择地附着在通道边缘周围的定位区上的光保护化学基团上。另外，可以将光保护化学基团加在壁材料的整个表面或随机地加在壁材料表面的某些区域，而只有选定的区域才用光线去除光保护以形成一些能够附着光发射化合物的定位区。在采用掩膜形成光发射定位区时，光保护化学基团和光发射化合物两者都可以加到壁材料的整个表面或随机地加到壁材料表面的某些区域。有开口的掩膜可以定位在壁表面上，以致掩膜上的开口将壁表面（特别是通道开口周围）的定位区露出。

在壁材料表面上有光发射定位区的壁材料还可以通过先将光发射化合物施于壁表面以便在该表面上产生至少数个光发射定位区，然后在壁材料上建立通道使该通道的边缘在光发射定位区内形成靶区。

每条通道周围都有供体荧光团同心环的制品的制作方法的非限定性实例是为证明本发明的优选方法提供的。该方法是通过使用光致不稳定的保护基和光衍射来实现的。在不透光的聚碳酸酯多孔介质的一侧涂上共价键合剂的稠密层。该键合剂受光致不稳定保护基的保护。光线从不透光的聚碳酸酯的背面透射过来。由于去保护光源的波长（400 - 500 nm）比通道尺寸（5 nm）大得多，所以每个通道作为一个点光源发挥作用。越接近该通道透射光的强度也越大。因此，只有接近该通道的那些基团才被去掉保护。在随后的化学反应中，去掉保护的基团可以自由地与供体荧光团发生反应，以产生同心环。

去保护作用的同心环的半径是受控的，这可以从光的衍射性去理解。波长长的光线和尺寸小的通道构成一个衍射非常强的环境，在该环境中衍射角大于  $90^\circ$ 。光线不能透过不透光的聚碳酸酯表面，而是被迫通过这些通道衍射。按照 Huygen 原理，每条通道作为一个二次点光源，形成球面辐射。Huygen 原理指出波前上所有的点都可以看成一个点光源，产生二次球面波。在时间  $t$  之后，新的波前位置将是这些二次波的公切面。Huygen 原理的直接结果是在每条通道的出口端形成一个点光源。进一步的结果是随着距每条通道中心的距离的增加激发光的强度减小。

离开通道的光强和最终的光强度球面分布都可以计算。离开通道的光强是作为通道的横截面面积与入射光强度 ( $I_0$ ) 的乘积给出的：

$$P = I_0 \pi R_{channel}^2$$

在离开通道时，光线变成球面辐射的点光源。在这种特殊情况下，限制光源发射半球形辐射（表面积为  $4\pi r^2$ ）。新辐射强度  $I(r)$  作为离开通道中心的径向距离的函数等于该通道的出射光强除以在给定距离  $r$  的辐射表面积：

$$I = \frac{P}{A} = \frac{I_0 R_{channel}^2}{2r}$$

对于距离不透光的聚碳酸酯 1 cm 的 60W 光源，在距该通道中心 35 nm 距离 ( $R_{channel}$ ) 处光强从  $4.77 \text{ W/cm}^2$  降低到  $0.43 \text{ W/cm}^2$ ，相当于 91% 的强度变化。从上述方程，通过控制光源的强度可以精确控制每条通道周围的光线半径。

已经有人特别详细地介绍过光敏保护基 (Pillai, 1980)。可利用的光敏保护基取决于相应的共价键合剂的类型 (氨基、羟基、羧基、酮基、巯基等)。例如,用硝基萘氧基羰基(NVOC)、2-硝基苄氧基羰基和 $\alpha$ -取代的 2-硝基苄氧基羰基基团可以保护氨基基团。后两种也可以用于保护羧酸和羟基基团。2-硝基苄氧基羰基衍生物的光解解封是直接的,只需要 350 nm 的灯和乙醇。去保护的时间是受控的,从 1 小时到 24 小时。

本发明还包括检测信号的装置。该装置对用于检测在聚合物途经相互作用测站时发生的相互作用所产生的信号的制品和敏感元件提供支持。该装置包括带缓冲舱的外壳、作为缓冲舱的一部分并且有众多开口适合聚合物准直的壁、以及相对外壳固定的敏感元件,该敏感元件将每个开口发出的信号与其它开口发出的信号区分开以产生随开口变化的敏感元件信号。

文中用语“随开口变化的敏感元件信号”是由于聚合物与站之间的相互作用在壁材料的开口位置产生的信号。

在外壳内的壁定义至少一个、优选两个缓冲舱。文中用语“缓冲舱”是能够容纳液体介质的区域。这两个缓冲舱可以处于彼此流体连通的状态。

壁上有众多由该壁内的通道所形成的开口。壁内的“众多开口”意味着至少包括由两条通道的两个开口。优选的众多开口至少是 50 个开口。

文中用语“敏感元件”是对物理刺激作出反应并以信号形式发出相应的脉冲的器件。敏感元件包括但不限于光学传感器、温度传感器、压力传感器、声传感器、磁传感器、电传感器、机械传感器、放射性传感器和运动传感器。优选的敏感元件是光学传

感器。文中用语“光学传感器”是能够检测输入的电磁辐射信号并将它转换成脉冲的器件。该脉冲是可以测量的并可以作为数据储存。各种光学传感器在技术上是众所周知的并且包括显微镜。该敏感元件相对外壳是固定的，以致该敏感元件能够检测在相互作用测站产生的信号。不必将该敏感元件直接固定或附着在外壳上。

文中用语“微处理器”是收集并储存敏感元件信号的器件。一般地说，该微处理器是包含若干电子元件（如 ROM、RAM、寄存器和 I/O 控制）的器件。在电子学领域中常规的微处理器是众所周知。

图 12 给出一种结构适合安装能产生电场的纳通道（或微通道）板（120）的装置实例。由电极（128、130）建立的电场用于驱动 DNA 通过纳通道。该示范纳通道板浸没在略微粘稠的缓冲溶液中，该缓冲溶液有助于减缓聚合物穿越纳通道的速度，以便为每个碱基提供较长的信号收集时间。此外，在板的两侧是浸没在该缓冲溶液中的电极（128、130）。纳通道板、缓冲层（122）和电极的组合包含在一个适合图象分析并能毗邻  $60 \times 1.4 \text{ NA}$  的浸油物镜定位的光学玻璃舱中。

正象前面讨论的那样，优选的是用电场驱使聚合物线形穿越通道。使用电场是适当的，因为在电场中聚合物被绷直呈线形取向，这有利于线形穿越纳通道。此外，聚合物的移动速度可以通过电压予以控制。最后，电场对 FRET 不产生负面影响。

光学显微术（Bustamante, 1991; Gurrieri 等人, 1990; Matzsmoto 等人, 1981; Rampino 和 Chrambach, 1990; Schwartz 和 Koval, 1989; Smith 等人, 1989）、线性分光特性(LD)(Åkerman

等人, 1990; Åkerman 等人, 1985; Moore 等人, 1989)、荧光检测 LD (Holzwarth 等人, 1987) 和线性双折射 (Sturm 和 Weill, 1989; Chu 等人, 1990) 都可以用于研究 DNA 分子在电泳中的瞬时形状变化。在这些研究中, DNA 呈现强烈的取向性和绷直。

Gurrieri 等人已经证明 DNA 分子在电场中呈线形的绷紧形态。在每种情况下, DNA 分子都准确地与施加的电场方向在一条直线上。用于观察 DNA 分子的方法是将 DNA 荧光标记与视频图象识别摄像机系统一起使用 (Bustamante, 1991; Houseal 等人, 1989; Morikawa 和 Yanagida, 1981; Matsumoto 等人, 1989; Yanagida 等人, 1983)。所展示的 DNA 分子是 164 kbp 长的 T2 分子。

已经用线性分光特性和电分光特性对 DNA 在电场中的取向作过认真的研究 (Ding 等人, 1972; Yamaoka 和 Matsuda, 1981; Wu 等人, 1981)。事实上, 用这两项技术已经完成对 DNA 取向的第一批研究。首先在溶液中研究 DNA, 然后在电泳凝胶中进行研究。在溶液和凝胶中所做的两项研究得到类似的结构, 即 DNA 分子确实按电场方向取向。

由于核苷酸碱基优选接近乎垂直于电场取向, 天然 DNA 呈现负的 UV 线性分光特性。DNA 取向已被归因为有永久的或引导的偶极距存在的结果。例如, Ding 等人介绍了在乙醇稀释的三卡可酸盐缓冲液 (80% v/v 乙醇) 中对 DNA 的观察结果。

LD 数据来自 9V/cm 的单电脉冲。脉冲持续时间是用水平条指示的。在稳定态, LD 的读数平台接近 -1.5, 这意味着 DNA 按电场方向取向 (Åkerman 等人, 1990)。

Åkerman 等人 (1990) 已经完成了关于脉冲电场凝胶电泳的 LD 研究并获得类似于溶液中的结果。Åkerman 提供一条 LD' 随时间变化的曲线。LD' 代表按电场取向。数值 -1.5 意味着 DNA 分子在电场中取向。在 x 轴上的水平条表示电脉冲的持续时间。DNA 处于 1% 的琼脂糖中。脉冲开始后, LD' 曲线平台立即接近 -1.5, 这意味着在脉冲开始后 DNA 立即取向。关掉脉冲时, DNA 不再在电场中取向, LD' 曲线也不再保持在 -1.5。

DNA 在电场中取向的基础是在 DNA 中有永久的或诱导的偶极距。回忆一下, 偶极子本身对准电场方向以使偶极距最小。Hogen 等人 (1978) 已经提出在与各相异性的离子流有关的 DNA 中诱导偶极距的基本原理:

*为了解释分光特性对电场、介质的离子化程度和大分子长度的依赖性, 我们提出一个新模型, 在该模型中各相异性的离子流在聚电解质周围产生不对称的离子雾, 从而导致取向力矩。*

从对 DNA 在电场中准直的讨论中得出的结论是 DNA 分子或其它聚合物本身无论是在电泳凝胶中还是在溶液中都按电场方向取向。溶液研究是在电泳研究之前完成的。DNA 在电场中定向进而支持可以驱使 DNA 分子和其它聚合物线形穿越纳通道。DNA 的展开取向在 DNA 分子的线形穿越中也是重要的。如上所述, 可以用电场驱使 DNA 和其它聚合物线形穿越蛋白质通道。文中介绍的数据合理地说明这种前景并为说明 DNA 的行为为何能够如此提供理论基础。既然业已证明 DNA 能线形穿越蛋白质微孔而且 DNA 分子本身能按电场方向定向, 那么 DNA 线形穿越纳通道就能实现。

聚合物的移动速度也是重要的，因为能量转移的持续时间是重要的。受体在供体荧光团层中持续时间越长，所产生的信号就越强。毫秒级的持续时间允许提供精确的信号检测。由于供体荧光团层大约是 40 埃，所需要的聚合物移动速度近似为 40 埃/10 毫秒，即 4000 埃/秒。在纳通道 FRET 猝灭时，建议的速度是靠控制施加电场的电压或聚合物分子的分数系数实现的。

DNA 的移动速度可以通过给出描述 DNA 链在电场中移动的方程来确定：（Tinoco 等人，1995）

$$u = \frac{ZeE}{f}$$

其中 Z 是（无因次的）电荷数， $e = 1.6022 \times 10^{-19}$  库仑，E 是电场强度（以库仑/米表示），f 是分数系数，以公斤/秒表示。移动速度取决于电场强度 E 的大小、该分子的净电荷和用该分子的分数系数 f 表征的分子的大小和形状。分子上的净电荷是由 Ze 赋值的。分数系数可以由下式确定：（Tinoco 等人，1995）

$$f = kf_0 = k(6\pi\eta r)$$

其中  $\eta$  是粘度系数，r 是与 DNA 具有相同体积的球的半径，k 是形状因子（对于 DNA 链大约是 1.7）， $f_0$  是与 DNA 具有相同体积的球的分数系数。

从理论上说，大家可以看到无论是分数系数还是电场强度都能用于控制聚合物的移动速度。在给定系统中，不同的电压就有不同的聚合物迁移速度。类似地，分子越大或分子所在的介质越

粘稠，分子的迁移率就越低。例如，在凝胶电泳中，计算电场强度、聚合物的大小和分数系数的影响是可能的。重要的是理解粘稠的介质与凝胶一样能够对分数系数产生所需的影响。由于分数系数与电泳速度成反比，所以粘度加倍使电泳速度减半。

已有许多小组完成了在粘稠溶剂中的电泳（Chang 和 Yeung, 1995; Bello 等人, 1994; Jumpanen 和 Riekkola, 1994; Klenchin 等人, 1991; Harris 和 Kell, 1985; Korchemnaya 等人, 1978）。Sahota 和 Khaledi (1994) 用实验说明在甲醛胺中电泳，其中所用甲醛胺在 25℃ 下具有 3.3 cP 的粘度并加两倍水（0.89 cP, 25℃）。在甲醛胺中电泳比在水中电泳更有利，因为甲醛胺具有比水高的介电常数并且可以增溶溶解多种支持电解质。在电泳缓冲液中，它通常与水一起用在混合物中。也已有使用甘油溶液、N-甲基-2-吡咯烷酮、乙酸和 N-甲基甲醛胺的混合溶液（Korchemnaya 等人, 1978）。粘度有可能分布在相当大的范围内，从 1 cP 到高达 25 cP（Bellow 等人, 1994）。所需溶液的实际粘度取决于聚合物分子在纳通道中的分数系数。因此，实际的分数系数取决于粘度和纳通道对聚合物的摩擦作用。由于纳通道的小孔，在纳通道壁和标记聚合物之间有来自溶剂截留的摩擦作用。这些溶剂截留作用的幅度类似于凝胶电泳所产生的那些。因此，只有略为粘稠的溶液可以提高所需的聚合物移动速度。

就给定的电场而言，尺寸不同的聚合物的电泳迁移率可以依据分子量和迁移距离的已知关系予以确定，该关系如下：

$$\log M = a - bx$$

其中 M 是核酸的分子量，x 是迁移距离（正比与迁移率）。a 和 b 是相应于给定电场的常数。

总之，在电场中聚合物的移动速度可以受电场、摩擦系数和分子大小的控制。符合需要的聚合物移动速度的数值已经可以确定。

电场对 FRET 没有负面效应。由于能量转移与近距离的电偶极相互作用有关，所以存在外电场对供体-受体对经历 FRET 的能力可能产生不利的影晌。正象从用 FRET 引物完成的最新研究和基于凝胶的 DNA 自动测序中所看到的那样，外电场的存在对 FRET 没有负作用（Glazer 和 Mathies, 1997; Hung 等人, 1996; Ju 等人, 1996a; Ju 等人, 1996b; Marra 等人, 1996; Wang 等人, 1996; Wang 等人 1995）。FRET 引物用于给测序反应产物加标记，因为有 Stoke's 位移并因此产生较大的荧光团差异。在这些实验中，FRET 标记 DNA 碎片仍然是凝胶，同时在有电场存在的情况下用 CCD 摄像机和激光检测这些碎片。既可以使用四色毛细管电泳系统也可以使用 Applied Biosystems 373A 测序仪。这些实验表明在有强电场存在时发生能量转移。

纳通道装置的示范设计示于图 13，该装置包括安装纳通道板（140）的两个熔融 Pyrex 玻璃舱（132、134）。上下缓冲液区（136、138）分别被包含在较小的 Pyrex 舱（134）和较大的 Pyrex 舱（132）中。这两个缓冲液区用盖玻璃密封，该盖玻璃已经用铟锡氧化物（ITO）作过改进。铟锡氧化物是透明的导体，在这个系统中它的功能是作为电极（142）。这对电极与调压电源（152）相连，该调压电源包括负载电阻  $R_L$ （为了接近恒流系统该电阻大约几个 G）和变阻器（该变阻器控制来自电源的电压）。电压表并联在电路中。涂油（144）的浸油物镜（150）在盖玻璃下面，用于检测荧光信号（148）。



将聚合物加到上缓冲液区中并用电场驱动该聚合物向舱室移动。该缓冲液具有符合要求的粘度和电解性能。通过同一浸油物镜（60×、1.4 NA）完成表面照明和信号采集是可能的。该装置的尺寸类似于常规显微镜的载玻片尺寸（75 mm × 25 mm），以便于安装。在纳通道板和盖玻璃之间的间隙是 0.4 mm。厚度 0.1 mm 的薄盖玻璃被展示。这些尺寸是优选的，因为有长工作距离的物镜可以利用。例如，来自 Nikon 的 CFI<sub>60</sub> 系统具有 60×、1.4 NA 的物镜，该物镜可以研究厚度超过 0.6 mm 的样品。

温度控制块用于防止焦耳加热和温度波动。该控制块是空心的以便于为纳通道装置提供均匀的温度控制。在该装置两侧有入口和/或出口，以允许冷却剂通过该空心舱循环。

几个小组已经将专用装置用于荧光显微术观察电泳（Rampino 和 Chrambach, 1991; Matsumoto 等人, 1981; Smith 等人, 1989; Bustamante, 1991; Gurrieri 等人, 1990; Schwartz 和 Koval, 1989; Smith 等人, 1990）。Smith 等人（1990）用于观察经历脉冲电场凝胶电泳的 DNA 分子如下：

将 20  $\mu$ l 的一滴熔融琼脂糖置于两片显微镜盖玻璃（24mm × 24mm）之间并冷却 10 分钟。将这个夹心组合放在标准的显微镜载玻片的顶部并在四角用指甲油密封。该载玻片事先已做好制备，四个角形电极用环氧粘接剂固定在该载玻片上。然后将这个装置在大约 5 °C 下冷藏 30 分钟。将熔融的琼脂糖滴在电极上以完成电链接，并且间或添加 TBE 缓冲液(0.5×) 以保持其润湿。

Rampino 和 Chrambach(1991)介绍一种更复杂的装置，该装置有较大的缓冲液区、条状铂电极和冷却剂流动区。整个装置可

以安装在显微镜的载物台上。实际上，凝胶本身夹在两块盖玻璃之间并被置于该装置的中心，与两侧的缓冲液块接触。该设计考虑到均匀的电场和温度控制。与上述装置相比，Rampino 和 Chrambach 的装置是为标准的无脉冲电场的凝胶电泳设计的。

下面简要地介绍本发明的装置（示于图 13）是怎样与聚合物发生关系的。借助本发明的方法或技术上已知的方法给聚合物（如 DNA）是带上（外在的或内在的）标记。将带标记的 DNA 置于缓冲溶液中，该缓冲溶液优选略微粘稠的。将该缓冲液添加到上缓冲液舱（136）。利用电极建立电场，使 DNA 呈线形进入纳通道板（140）上的纳通道。当带标记的聚合物从纳通道板的另一侧露出时引起该标记与试剂即通道周围的环境发生相互作用，产生信号即随聚合物变化的脉冲，借助检测装置检测该脉冲信号。受检信号即随聚合物变化的脉冲被储存和处理，以便揭示有关该聚合物的结构信息。

本发明的最后一个方面包括制备供本发明的方法使用的以及供任何希望利用随机标记的核酸其它场合使用的核酸的方法。该方法包括下述步骤：使正在切割的细胞与核苷酸类似物接触；将已经与该核苷酸类似物合并的细胞核酸分离出来；通过给并入的核苷酸类似物加标记来诱发已与该核苷酸类似物合并的核酸发生变异。文中用语“核苷酸类似物”是能代替 A、T、G 或 C 且具有改进结构的分子。例如，核苷酸类似物包括但不限于溴化类似物、2,4-二硫代尿嘧啶、2,4-硒基尿嘧啶、次黄嘌呤、巯基嘌呤、2-氨基嘌呤和硒基嘌呤。并入的核苷酸类似物可以用选自光发射化合物、猝灭源或荧光激发源的试剂加标记。

正在切割的细胞是通过任何技术上已知的将核苷酸并入活细胞的手段与核苷酸类似物“接触”的。例如，可以将核苷酸类

似物添加到细胞培养介质中，由细胞自然摄取。为了优化核苷酸类似物的摄取，可以在添加核苷酸类似物之前采用常规的手段抑制正在切割的细胞的生长，一旦将核苷酸类似物添加到该介质中就去抑制让细胞重新进入细胞切割周期。然后，在这些细胞已经重新进入细胞切割周期并至少完成一个切割周期之后将已与核苷酸类似物合并的核酸分离出来。

在 Bick 和 Davidson 在《美国国家科学研究学报》[*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71: 2082-2086 (1974)]中提供一个用于将核苷酸类似物并入 DNA 的方法实例。Bick 和 Davidson 让依赖 BrdU 的细胞系列 B<sub>4</sub> 在经 Dulbecco's 改良的 Eagle 介质的基本生长介质中生长，在该基本介质中补充包含 0.1 mM BrdU 的 10% 胎牛血清 (E 介质)。用 100 mm Falcon 塑料的组织培养皿将 10<sup>6</sup> 个 B<sub>4</sub> 细胞接种在包含 0.1 mM 次黄嘌呤、0.4 μM 氨基嘌呤和 10 μM BrdU 的 E 介质 (E-HAB 介质) 中，并且用整整 6 周时间让细胞以高密度 (每个 100 mm 培养皿 5×10<sup>5</sup> 个细胞) 在 E-HAB 介质中通过 3 次。然后，将细胞以低密度 (每个 6 mm 皿 1000 个细胞) 置于 E-HAB 介质中，并且在 3 周后在每个培养皿中观察大约 10 个大菌落。来自一个培养皿的细胞被采集起来并作为命名为 HAB 的新细胞系列保留起来。因为包含 BrdU 的细胞具有希望的光敏特性，所以 HAB 细胞在任何时候都要避免环境光线的照射。在 E-HAB 介质中完成 10 次细胞生成之后，将 HAB 细胞的等分试样转移回 E 介质。将命名为 HAB-E 的新细胞子系列 (the new subline of cells) 分离出来并保留在 E 介质中。

Bick 和 Davidson 让该细胞在添加了 H<sub>3</sub><sup>32</sup>PO<sub>4</sub> (新英格兰核公司, New England Nuclear Corp.) 的上述介质中在 2 μCi/ml 放射性下生长。在 2 至 3 个种群加倍后，象 Davidson 和 Bick 在《美国国家科学研究学报》[*Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70: 138- 142(1973)]

中介绍的那样收获细胞并将 DNA 分离出来，不同的是在第一次苯酚提取之后将 DNA 提取物用 50  $\mu\text{g/ml}$  浓度的核糖核酸酶 A 在 37 $^{\circ}\text{C}$  下进行 60 分钟例行处理。在第二次苯酚提取之后，DNA 逆着 10 mM Tris-HCl, 10 mM pH7.6, 1 mM EDTA 进行粗放的透析，然后逆着 10 mM Tris-HCl pH7.6, 1 mM EDTA 进行最后的透析。另一种分离 DNA 的方法在技术上是已知的。（例如，参阅 Sambrook 等人，“分子克隆——实验室手册”，1989 年第 2 版，Cold Spring Harbor 实验室出版 [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]）。

本发明制备核酸的方法在下文中作为在体外给碱基加特异标记的方法（IBSA）是优选的。IBSA 涉及在有核苷酸类似物存在的条件下培养来源于受验者的细胞。核苷酸类似物或者能够随后发生化学变性、在供体发射波长中具有高摩尔消光系数，或者具有适合附着受体标记的键合剂。最重要的类似物是包含在 DNA 复制期间不与碱基对发生相互作用的官能团的类似物。8-取代嘌呤、5-取代嘧啶和 6-取代嘧啶满足这个判据。

下面详细地陈述一个 IBSA 计划的非限定性实例。该方法的要点示于图 14 并且包括从最初的分离 DNA、到给基因组加标记、到最后的测序分析的各个步骤。细胞与受验者分离，然后进行培养。在有足够的细胞提供适当的遗传物质时在细胞周期中捕获细胞。捕获可以发生在该周期中的任何时刻，只要它不中断 S 相即可。容易化学衍生的核苷酸类似物（如 8-溴-2'-脱氧嘌呤和 5-溴-2-脱氧嘧啶）被添加到生长介质中。然后，让细胞生长一个周期并将来自该细胞的基因组 DNA 分离出来。最终获得的 DNA 是带标记的和未带标记的 DNA 的嵌合体，一种半保留复制的产物。其中有的 DNA 只标记一条链的优点是这样将致使产物双螺旋 DNA 可以用在本发明的测序方法中。

将基因组 DNA 断裂成大约 100 kb 长。在这个时刻，这种基因组 DNA 是带化学标记和末端标记的。在溴化类似物中培养细胞的优点是致使一种诱发变异激活碱基进一步诱发变异，将受体标记加到碱基上。就人体基因组而言，有大约 3 万种碎片。借助本发明的测序方法可以同时分析这些碎片。尺寸和潜在顺序类似的碎片被编成一组并完成种群分析，以产生 DNA 顺序信息。基因组的测序可以用大约 6 小时完成。从分离受验者的细胞到测序结束所需时间大约是 1 周。下面的段落将详细介绍每个独立步骤。

第一步是细胞培养和细胞周期停滞。细胞周期停滞的目的是产生同步的细胞种群，该细胞种群能够同时经历 DNA 复制，以保证所有的产物 DNA 将是有标记的和无标记的 DNA 的嵌合体。有许多使细胞同步的方法，包括使细胞停滞在 M 或 S 相的方法。只有在 M 相中断才能产生需要的基因组嵌合体。介稳相抑制剂的实例包括加压的氧化亚氮、长春花碱 (Marcus & Robbins, 1963) 和脱羧秋水仙碱。脱羧秋水仙碱能在介稳相使细胞停滞，但是通过刷新可能逆转 (Mitchison, 1971; Kato & Yoshida, 1970; Stubblefield, 1968)。细胞在脱羧秋水仙碱中生长几小时，导致同步培养 (Wunderlich & Peyk, 1969)。加压的氧化亚氮是优越的，即它容易去除 (Rao, 1968)。去除阻断和添加需要的溴化碱基类似物考虑到同步进入 S 相。

能够使用的核苷酸类似物包括但不限于 8-溴-2'-脱氧腺苷、8-溴-2'-脱氧鸟苷、5-溴-2'-脱氧胞苷和 5-溴-2'-脱氧尿苷。这些溴化核苷酸类似物被激活，以便耦合到亲核试剂上 (Traincard 等人, 1983; Sakamoto 等人, 1987; Keller 等人, 1988; Hermanson, 1996)。将含胺的受体标记和荧光团耦合到碱基类似物上是在环

境温度 (35°C) 下进行的。受体标记的最后位置致使标记碎片的碱基配对不受影响。

溴化的核苷酸类似物可以从市场上购买 (Sigma 公司、Fluka 有限公司、Fisher Scientific 有限公司), 或者借助与溴化试剂反应来制备。Hermanson (1996) 提出一个利用 N-溴琥珀酰亚胺 (NBS) 在胸苷、胞苷和鸟苷处溴化 DNA 的备忘录。腺嘌呤是由不需要 NBS 的其它方法制备的。例如, 8-溴-2'-脱氧腺苷和 8-溴-2'-脱氧鸟苷可以借助天然碱基与溴水反应来合成 (Ikehara 等人, 1969a; Ueda 等人, 1974; Faerber & Scheit, 1971; Kochetkov 等人, 1968)。在嘌呤第 8 位溴化也可以借助核苷酸酰吗啉来实现 (Lang 等人, 1968; Ikehara 等人, 1969b)。溴化的溶剂条件是特别重要的。在 0°C 的二甲基甲酰胺中不发生 2'-脱氧腺苷的溴化, 但是在 50-60°C 的冰醋酸中该反应则能进行, 比较容易形成 8-溴-2'-脱氧腺苷 (Gueron et al., 1967; Rahn et al., 1965)。

业已证明, 溴化的以及其它的碱基类似物在细胞培养期间被有效地并入基因组 DNA (Balzarini 等人, 1984)。一个特例是将 5-溴-2'-脱氧尿苷并入细胞以用于流动血细胞计数。5-溴-2'-脱氧尿苷在腺苷位置并入新合成的 DNA (Crissman 等人, 1990; Poot & Hoehn, 1990; Bohmer, 1990; Gaines 等人, 1996; Nicolas 等人, 1990)。碱基类似物的取代百分数可以非常高, 就象 Bick 和 Davidson 在他们的报告“在与溴化脱氧尿苷有关的 DNA 电解槽系列中, 用溴化脱氧尿苷完全代替胸苷” [Total Substitution of Bromodeoxyuridine for Thymidine in the DNA of Bromodeoxyuridine- Dependent Cell Line] (1974) 所揭示的那样。下面一段摘自这份报告:

为了获得完全取代, 将依赖 BrdU 的细胞在没有外加腺苷... 时暴露在包含氨基喋呤、腺苷生物合成的强抑制剂和 BrdU

的培养介质中。我们在此报告一种细胞系列的分离，在该细胞系列中核 DNA 中的腺苷至少有 99.8% 已被 BrdU 取代。

在目前建议的随机地给碱基加标记的计划中，高达 99.8% 的取代百分比是不必要的，但是这个数据使我们深入了解细胞与碱基类似物合并的可能性。其它溴化的碱基类似物也可以比较容易地并入哺乳动物细胞（Stewart 等人，1968）。已以这种方式合并的无溴碱基类似物的几个实例包括 2-氨基嘌呤（Glickman, 1985）、5-丙炔氧基-2'-脱氧尿苷和 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷（Balzarini 等人，1984）。

在通过细胞培养产生适当溴化的 DNA 嵌合体之后，通过完成若干个步骤准备用于分析的嵌合基因组 DNA，其中包括一个非必选的染色体分类步骤。从流动分类的染色体的局部酶解可以产生 100kb 的 DNA 碎片。非必选的流动分类步骤在许多手册和教科书（de Jong 等人，1989；Fawcett 等人，1994）中已经作过详细介绍，在此不再详细讨论。简要地说，通过添加脱羧秋水仙碱使细胞停滞在介稳相。数百万培养细胞被慢慢地溶解，将中期染色体释放到悬浮缓冲液中，在该缓冲液用一种或多种荧光染料给它们着色。然后，在一束激光的系统中利用一种荧光团或者在两束激光的检测系统中利用两种荧光团借助靶染色体的荧光发射图来识别它们。然后，按照 Glover 和 Hames 的建议（见 DNA Cloning 3, 1995）制备经过分类的染色体并完成局部酶解。从而获得大约 100 kb 的尺寸。

用荧光团给溴化的 DNA 加标记可以在酶解之前或之后进行。碱基溴化将激活碱基亲核移位。有许多带氨基/胍基的荧光团可以使用，包括流行染料、荧光素、香豆素、四溴荧光素、若丹明和德克萨斯红（分子探针，OR）。这些都吸收和发射可见

光。在这些荧光团中氨基与嘌呤的第 8 位和嘧啶的第 5 位起化学反应。对排代反应的实验建议是由 Hemanson 于 1969 年提出的。其中介绍的加标记计划的改进方案如下：

对给溴化 DNA 加标记的建议：

1. 将与胍或胺耦合的荧光团溶解在水中，浓度为 80 mM 至 100 mM；
2. 将 25  $\mu$ l 荧光团溶液添加到溴被激活的 DNA 溶液中；
3. 在 50 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时；
4. 借助乙醇沉淀完成纯化，添加 20  $\mu$ l 的 4M LiCl 和 500  $\mu$ l 乙醇（冷却到 -20 $^{\circ}$ C），混合均匀。
5. 在 -20 $^{\circ}$ C 下储存 30 分钟，然后借助 12,000g 的离心作用将沉淀的 DNA 分离出来；
6. 去除悬浮剂，并用 70% 和 100% 的乙醇洗涤该该丸片，每次洗涤后都离心。

将带标记的 DNA 丸片重新用水溶解并在 -20 $^{\circ}$ C 下储存。

从基因组局部酶解可以形成大约 3 万个 100 kb 的碎片。这些碎片或者借助末端转移酶或者通过络合作用都被带上末端标记，以便将这些带标记的聚核苷酸分类。通过末端加标记并入的荧光标记可以借助不同的光谱吸收系数或特殊的标记顺序（采用络合计划时）进行唯一的识别。在末端加标记后，所制备的 DNA 经历上述的纳通道 FRET 测序。数据按碎片大小和潜在顺序进行分类。通过种群分析产生 DNA 顺序。

图 15 给出依据 IBSA 标记解释 DNA 顺序的一般计划。基因组 DNA 的样品有两种碱基是带标记的（在这种情况下是 A 和

C)。末端和中间带标记的 DNA 碎片通过 FRET 测序进行分析。所获得的数据按碎片大小和潜在顺序进行分类。潜在顺序被定义为针对具体的 DNA 碎片所产生的顺序特殊的 FRET 签字。潜在顺序不给出测序信息，而是允许对 DNA 分子进行唯一的识别。为了确定 A 和 C 在每个碎片上的位置进行种群分析。给补链配对。只针对一种碱基 (A) 重复确定碱基位置的方法。比较针对一种带标记碱基和两种带标记碱基所获得的数据以产生 DNA 顺序。

为了测序并非总是需要成百上千个碱基的碎片。表达图和单个基因的测序需要短得多的标记碎片。生成比较短的标记碎片可以靠切口译码、引物延伸 (primer extension) 和聚合酶链反应 (PCR) 实现。此外，较小的碎片还可以通过 Sanger 反应的修饰和使用末端转移酶来进行分析。采用酶法，大核苷酸类似物往往能被并入 (Hemanson, 1990)。

在引物延伸中，经修饰的三磷酸核苷被添加到所需引物量符合规定的 DNA 样板上。所用聚合酶的形式是 Klenow 碎片，该碎片缺少完整的大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 5'-3'核酸外切酶活性 (Kessler 等人, 1990; Feinberg 和 Vogelstein, 1983, 1984)。等价的酶是测序酶 (Sequenase) 2.0 和 T7 聚合酶。这种方法是制备带内在标记的靶 DNA 的简单方法。采用该方法合成长度大于 10kb 的带内在标记的大 DNA 碎片已经用一种被修饰碱基取代过的核苷酸合成出来。该建议的摘要涉及使用测序酶 2.0 (Amersham)。退火反应由 1 $\mu$ l 引物 (0.5 pmol/ $\mu$ l)、2  $\mu$ l 测序酶缓冲液 (5 $\times$ )、5  $\mu$ g 质粒 DNA 和 10  $\mu$ l 无菌蒸馏水组成。在 65 $^{\circ}$ C 水浴中保温 2 分钟之后，允许在 30 $^{\circ}$ C 发生 30 分钟退火。实际的反应混合物由 10  $\mu$ l 的退火反应 (引物-样板)、1  $\mu$ l 二硫苏糖醇 (0.1M)、每种 dNTP 各 1  $\mu$ M、0.1  $\mu$ M 荧光团 dNTP 和

0.025 U/ $\mu$ l 的测序酶。混合后，允许该反应在室温下进行 15 分钟。

Ambrose 等人 (1993) 和 Harding & Keller (1992) 已用实验说明利用引物延伸合成大荧光 DNA 分子。在他们的实验中，在比 7 kb 长的 DNA 上实现了用荧光团类似物对一个嘧啶的完全取代。这些作者已报告过长度介于 5-7 kb 的荧光 DNA，其中有两个嘧啶被完全地加上标记。采用其它不寻常的碱基类似物（如 7-(2-氧代乙基)鸟嘌呤、2'-氨基-2'-脱氧胞苷、8-氧代嘌呤和 N-4-氨基胞苷）也完成了大碎片的合成（Barbin 等人，1985；Purmal 等人，1994；Aurup 等人，1994；Negishi 等人，1988）。

切口译码吸取了大肠杆菌 DNA 聚合酶能够在 [通过胰脱氧核糖核酸酶(Dnase)I 生成的] 切口的 3'-羟基端依次添加核苷酸残基与从毗邻的 5'-磷酸基端去除核苷酸合并的优点（Meinkoth & Wahl, 1987; Rigby 等人, 1977; Langer 等人, 1981; Holtke 等人, 1990）。通过切口译码已将许多经修饰的碱基并入（Meffert & Dose, 1988; Gebeyehu 等人, 1987; Gillam & Tener, 1986）。DNA 聚合酶 I 为了被填充象形成它们那样迅速地引起断裂，从而将需要的核苷酸并入原链。由于在反应期间有一定数量的标记三磷酸核苷存在，所以标记被并入，使母体链得到修饰。切口译码涉及双链 DNA 靶、1  $\mu$ l 浓度为 2 ng/ml 的 DNase、三种类型未加标记的三磷酸脱氧核苷每种 1  $\mu$ l（dNTPs 浓度 100  $\mu$ M）、1  $\mu$ l 标记 dNTP（300  $\mu$ M）、32  $\mu$ l 水和 1  $\mu$ l 包含 5 至 10 单元放射性的 DNA 聚合酶的混合物。反应在 15 $^{\circ}$ C 下进行 1 小时。用 4  $\mu$ l 的 0.25M DETA、2  $\mu$ l 的 10 mg/ml tRNA 和 150  $\mu$ l 的 10 mM Tris (pH 7.5) 使反应猝灭。通过乙醇沉淀纯化带标记的 DNA (Bethesda 研究实验室，新英格兰核公司，以及 Amersham 公司 [Bethesda Research Laboratories, New England Nuclear, and Amersham])。

直接用 PCR 加标记不仅将所需不仅并入靶 DNA，而且扩大标记 DNA 的量 (Saiki 等人, 1985, 1988)。PCR 使用热稳定型 DNA 聚合酶，最常见的是来自 *Thermus aquaticus* 的 Taq 聚合酶。Taq 聚合酶具有在每个 PCR 周期中将标记并入正在生长的 DNA 拷贝的能力。采用这种方式可以给长达 3 kb 的 DNA 碎片加标记。Wiemann 等人 (1995) 介绍了用荧光素-15-dATP 给 PCR 产物加内在标记的方法，一项能够应用于其它荧光团的建议。用于荧光团的 PCR 合并的反应混合物包括每种引物各 1  $\mu$ M、每种 dNTP 各 1  $\mu$ M、10  $\mu$ M 的荧光团-dNTP 和 0.025 U/ $\mu$ l 的 Taq 聚合酶 (Perkin -Elmer, Norwalk, CT)。反应缓冲液包括 10 mM Tris-HCl (pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 和 0.01%(wt/vol) 明胶。用 30 个周期完成 PCR。

借助 Sanger 法产生的测序反应也可以借助酶加标记进行分析。每个链端碎片都带着 3'和 5'荧光团标记。5'荧光团是作为引物的一部分被并入的，而 3'末端标记是借助末端转移酶添加上去的。末端转移酶加标记原本是利用带放射性标记的三磷酸核苷引伸出来的 (Roychoudhury 等人, 1979; Tu & Cohen, 1988)。该技术后来被用于非放射性的核苷酸类似物 (Kumer 等人, 1988)。这项技术涉及将靶 DNA 添加到(a) 20  $\mu$ l 0.5 M 的卡可酸钾、5 mM 的 CoCl<sub>2</sub>、1 mM DTT(pH 7); (b) 100 mM 经修饰的三磷酸脱氧核苷、4  $\mu$ l 5 mM dCTP 和 100  $\mu$ l 水中。末端转移酶在反应混合物中被添加到 50 单元的最终浓度并且在 37°C 下反应 45 分钟 (Hermanson, 1996)。

二次加标记的程序也可以使用。在这种方法中，带适合与荧光团键合的链接臂的碱基类似物最初利用上述方法并入 DNA。利用诸如 Waggoner(1995)介绍的那些共价键链接技术，后续的荧光团与链接臂的键合是可能的。Jett 等人已经用实验说明 M13

DNA (7250 kb) 的全长度合成, 其中包括 5-(3-氯丙炔基)-dCTP、5-(3-氨基烯丙基)-dCTP 或 5-(3-氨基烯丙基)-dUTP 之一的完全并入。共价键荧光团键合到链接剂上也得到证明。这项技术的优点是该标记不需要由个体荧光分子组成, 而可以是带较多染料的比较大的分子。这样的实例包括藻胆蛋白质、填充染料的微球、标记蛋白质或荧光标记链。

通过在此引证将上述的每份专利、专利申请和参考文献以其全部内容并入本文。至此已经依据本发明介绍了目前优选的实施方案, 我们相信熟悉这项技术的人依据上述的教导将提出其它改进方案、变型或变化。所以, 应当理解所有这些变型、改进方案和变化都被认为落在权利要求书定义的本发明的范围内。

## 参考文献

1. 阿科曼 B. 等人 1990 年在《大 DNA 分子电泳》上发表的“用线性分光光谱分析在凝胶电泳期间的 DNA 结构力学” [Akerman, B., Jonsson, M., Moore, D., and Schellman, J. 1990. Conformational dynamics of DNA during gel electrophoresis studied by linear dichroism spectroscopy. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E., and Birren, B. W., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.]
2. 阿科曼 B. 等人 1985 年发表的“用线性分光光谱探测到的 DNA 电泳定向” [Akerman, B., Jonsson, M., and Nordén. 1985. Electrophoretic orientation of DNA detected by linear dichroism spectroscopy. *J. Chem. Soc. D. Chem. Commun.* 422.]
3. 艾坎斯 R. 1992 年发表的“在生物活性荧光探测器中的低照度-慢扫描探测装置的性能” [Aikens, R. 1992. Properties of low-light level slow-scan detectors in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Mason, W. T. (Ed.) Harcourt Brace & Company, Cambridge, England.]
4. 艾伦 M. J. 等人 1991 年发表的“扫描显微镜” [Allen, M. J., Balooch, M., Subbrah, S., Tench, R. J., Sickhaus, W., and Balhorn, R. 1991. *Scanning Microsc.* 5:625.]
5. 安布鲁斯 W. P. 等人 1993 年发表的“用单个分子对 DNA 排序和测定的应用” [Ambrose, W. P., Goodwin, P. M., Jett, J. H., Johnson, M.E., Martin, J. C., Marrone, B.L., Schecker, J. A., Wilkerson, C. W., and Keller, R. A. 1993. Application of single molecule detection to DNA sequencing and sizing. *Ber. Bunsenges. Phys: Chem.* 97: 1535-1542.]
6. 安德森-恩格斯, S. 等人 1990 年发表的“用于组织诊断的多色荧光成象系统” [Andersson-Engels, S., Johansson, J., and Svanberg, S. 1990. Multicolor fluorescence imaging systems for tissue diagnostics. *Proc. SPIE-Bioimag. Two-Dimens. Spectrosc.* 1205: 179-89.]
7. 欧普 H. 等人 1994 年发表在《核酸研究》第 22 期上的文献 [Aurup, H., Tuschl, T., Benseler, F., Ludwig, J., and Eckstein, F. 1994. Oligonucleotide duplexes containing 2'-amino-2'-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity. *Nucleic Acids Res.* 22:20-4.]
8. 阿兹 E. 等人 1993 年发表在第 217 期“欧洲生化杂志”的文献 [Arts, E., Kuiken, J., Jager, S., and Hoekstra, D. 1993. Fusion of artificial membranes with mammalian spermatozoa. Specific involvement of the equatorial segment after acrosome reaction. *Eur. J. Biochem.* 217: 1001-9.]
9. 拜恩斯 W. 1991 年发表在第 11 期“基因组”杂志上的“用于 DNA 排序的杂化方法” [Bains, W. 1991. Hybridization methods for DNA sequencing. *Genomics*, 11:294-301.]

10. 拜恩斯 W. 1991 年发表的“用于 DNA 排序的杂化” [Bains, W. 1997. Hybridization for sequencing of DNA. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Ed. VCH Publishers, New York.]
11. 博萨雷尼 J. 等人 1984 年发表在第 217 期“生化杂志”上的文献[Balzarini, J., De Clercq, E., Ayusawa, D., and Seon, T. 1984. Thymidylate synthetase-deficient mouse FM3A mammary carcinoma cell line as a tool for studying the thymidine salvage pathway and the incorporation of thymidine analogues into host cell DNA. *Biochem. J.* 217:245-52.]
12. 巴兵, A. 等人 1985 年发表在“癌症研究”的文献[Barbin, A., Laib, R. J., and Bartsch, H. 1985. Lack of miscoding properties of 7-(2-oxoethyl) guanine, the major vinyl chloride-DNA adduct. *Cancer Res.* 45:2440-4.]
13. 贝罗等人在《电泳》第 15 期发表的文献[Bello, M. S., de Besi, R., Rezzonico, R., Righetti, P. G., and Casiraghi, E. 1994. Electroosmosis of polymer solutions in fused silica capillaries. *Electrophoresis* 15:623-6.]
14. 贝斯洛克夫等人在《自然》第 370 期发表的文献[Bezrukov, S. M., Vodyanoy, I., and Parsegian, V. A. 1994. Counting polymers moving through a single ion channel. *Nature.* 370:279.]
15. 毕克等人在 1974 年发表在《自然科学研究》上发表的文献[Bick, M. D., and Davidson, R. L. 1974. Total substitution of bromodeoxyuridine for thymidine in the DNA of a bromodeoxyuridine-dependent cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71:2082-2086.]
16. 比格诺尔德 1987 年发表在第 105 期《免疫学方法》的文献[Bignold, L. P. 1987. A novel polycarbonate (Nuclepore) membrane demonstrates chemotaxis, unaffected by chemokinesis, of polymorphonuclear leukocytes in the Boyden chamber. *J. of Immunological Methods.* 105:275-280.]
17. 布鲁莫等人 1996 年发表在第 271 期《生物化学杂志》上的文献[Bloom, L. B., Turner, J., Kelman, Z., Beechem, J. M., O'Donnell, M., and Goodman, M. F. 1996. Dynamics of loading the beta sliding clamp of DNA polymerase III onto DNA. *J. Biol. Chem.* 271:30699-708.]
18. 伯克等人 1985 年发表在第 33 期《组织生化和细胞生化杂志》上的文献[Böck, G., Hilchenbach, M., Schauenstein, K. and Wick, G. 1985. Photometric analysis of antifading reagents for immunofluorescence with laser and conventional illumination sources. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 33:699-705.]
19. 伯尔莫 R 于 1990 年发表在《细胞生物学方法》第 18 期的文献[Böhmer, R. 1990. Cell division analysis using bromodeoxyuridine-induced suppression of Hoechst 33258 fluorescence. *Methods in Cell Biology* 18: 173-84.]



20. 布鲁诺等人 1995 年发表的〈无定型硅材料的沉积〉[Bruno, G., Capezzuto, P., and Madan, A. 1995. Plasma deposition of amorphous siliconbased materials. Academic Press, Boston.]
21. 巴斯泰曼特于 1991 年发表在〈生物物理化学〉第 20 期的文献[Bustamante, C. 1991. Direct observation and manipulation of single DNA molecules using fluorescence microscopy. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 20:415-46.]
22. 伯尔曼等人 1992 年发表在〈扫描〉第 14 期的文献[Buurman, E. P., Sanders, R., Draaijer, A. Van Veen; J. J. F., Houpt, P. M., and Levine, Y. K. 1992. Fluorescence lifetime imaging using a confocal laser scanning microscope. Scanning 14:155-59.]
23. 坎特等人 1992 年发表在〈基因组〉第 13 期的文献[Cantor, C. R., Mirzabekov, A., and Southern, E. 1992. Report on the sequencing by hybridization workshop. Genomics, 13:1378-1383.]
24. 喀斯特罗等人 1995 年发表在第 67 期〈分析化学〉的文献[Castro, A. and Shera, E. B. 1995. Single-molecule electrophoresis. Anal. Chem. 67:3181-3186.]
25. 张等人 1995 年发表在第 16 期〈电泳〉的文献[Chang, H. T. and Yeung, E. S. 1995. Dynamic control to improve the separation performance in capillary electrophoresis. Electrophoresis. 16:2069-73.]
26. 陈等人 1996 年发表在〈分析化学〉第 68 期的文献[Chen, D. and Dovichi, N. J. 1996. Single-molecule detection in capillary electrophoresis : molecular shot noise as a fundamental limit to chemical analysis. Anal. Chem. 68: 690-696.]
27. 楚等人 1986 年发表在第 234 期〈科学〉的文献[Chu, G. Vollrath, D., and Davis, R. W. 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. Science 234: 1582.]
28. 丘吉尔等人 1988 年发表在〈科学〉第 240 期的文献[Church, G. M. and Kieffer-Higgins, S. 1988. Multiplex DNA sequencing. Science 240: 185-88.]
29. 克拉克等人 1993 年发表在〈分析生化〉第 210 期的文献[Clark, I., MacManus, J. P., Banville, D., and Szabo, A. G. 1993. A study of sensitized lanthanide luminescence in an engineered calcium-binding protein. Anal. Biochem. 210: 1-6.]
30. 克莱克等人 1991 年发表在第 1640 期〈英国国际光学学社杂志〉的文献[Clegg, R. M., Feddersen, B., Gratton, E., and Jovin, T. M. 1991. Time-resolved imaging microscopy. Proc. SPIE—Int. Soc. Opt. Eng. 1640: 448-460.]
31. 克莱克等人 1992 年发表在第 211 期〈酶学方法〉的文献[Clegg, R. M. 1992. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. Methods in Enzymology. 211: 353-379.]



32. 克莱克等人 1993 年发表在第 90 期〈美国国家科学研究院学报〉上的文献[Clegg, R. M., Murchie, A. I. H., Zechel, A., and Lilley, D. M. J. 1993. Observing the helical geometry of double-stranded DNA in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2994-98.]
33. 克莱克于 1995 年发表在第 6 期〈当代生物技术观点〉上的文献[Clegg, R. M. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 103-110.]
34. 库尔森等人 1974 年发表在第 340 期〈生物化学和生物物理〉上的文献[Colson, P., Houssier, C. and Fredericq, E. 1974. *Biochim. Biophys. Acta* 340: 244-61.]
35. 克莱因 1990 年发表在第 9 期〈质谱学回顾〉的文献[Crain, P. F. 1990. *Mass Spectrom. Rev.* 9: 505-54.]
36. 克里斯曼等人 1990 年发表在第 33 期〈细胞生物学方法〉的文献[Crissman, H. A. and Steinkamp, J. A. 1990. Detection of bromodeoxyuridine-labeled cells by differential fluorescence analysis of DNA fluorochromes. *Methods in Cell Biology* 33: 199-206.]
37. 库达尔等人 1983 年发表的〈生化和生物学中的荧光显微术〉[Cundall, R. B. and Date, R. E. (1983). *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy in Biochemistry and Biology.* Plenum, New York.]
38. 代诗 1975 年发表的“固体表面的膜：物理吸收的物理学和化学” [Dash, J. G. 1975. *Films on solid surfaces: the physics and chemistry of physical adsorption.* Academic Press, New York.]
39. 戴维斯等人 1992 年发表在第 20 期〈洛斯阿拉莫斯科学〉的文献[Davis, L., Fairfield, F., Hammond, M., Harger, C., Jett, J., and Keller, R. 1992. Rapid DNA sequencing based on single-molecule detection. *Los Alamos Science.* 20: 280-6.]
40. 戴维斯等人 1991 年发表在第 8 期〈实用遗传学分析技术〉[Davis, L. M., Fairfield, F. R., Harger, C. A., Jett, J. H., Keller, R. A., Hahn, J. H., Krakowski, L. A., Marrone, B. L., Martin, J. C., Nutter, H. L., Ratliff, R. L., Shera, E. B., Simpson, D. J. and Soper, S. A. 1991. *Genet. Anal. Tech. Appl.* 8: 1-7.]
41. 德戎等人 1989 年发表在〈细胞遗传学〉第 51 期的文献[De Jong, P. J., Yokobata, K., Chen, C., Lohman, F., Pederson, L., McNinch, J. et al. 1989. *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 985.]
42. 丁等人 1972 年发表在第 11 期〈生物聚合物〉上的文献[Ding, D. W., Rill, R. and Van Holde, K. E. 1972. *Biopolymers* 11:2109-2124.]
43. 度斯尔 1988 年发表在第 924 期〈遥控感应〉的文献[Dozier, J. 1988 HIRIS-The high resolution imaging spectrometer. *Proc. SPIE-Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process. Remote Sens.* 924: 10-22.]

44. 德尔马克等人 1989 年发表在第 4 期〈基因组〉上的文献[Drmanac, R., Labat, I., Brukner, I., and Crkvenjakov, R. 1989. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* 4: 114-128.]
45. 德尔马克等人 1994 年发表的“DNA 序列的自动化测序和分析技术” [Drmanac, R., Drmanac, S., Jarvis, J., and Labat, I. 1994. Sequencing by hybridization. In *Automated DNA Sequencing and Analysis Techniques*, J. Craig Ventor, Ed. Academic Press, London.]
46. 埃良等人 1994 年发表在第 91 期〈美国国家科学研究学报〉上的文献[Eigen, M. and Rigler, R. 1994. Sorting single molecules: applications to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:5740-7.]
47. 爱尔德瑞等人 1993 年发表在第 75 期〈细胞〉上的文献[EI-Deiry, W. S., et al., 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.]
48. 法尔伯等人第 104 期〈化学〉上的文献[Faerber, P. and Scheit, K. H. 1971. *Chem. Ber.* 104:456-460.]
49. 法尔克劳夫等人 1978 年发表的“酶学方法” [Fairclough, R. H., and Cantor, C. R. 1978. The use of singlet-singlet energy transfer to study macromolecular assemblies. *Methods in Enzym.* 347-79.]
50. 范等人 1995 年发表在第 267 期〈科学〉的文献[Fan, F. F. and Bard, A. J. 1995. Electrochemical detection of single molecules. *Science* 267:871-4.]
51. 法谢特等人 1994 年发表在第 42 期〈细胞生物学方法〉的文献[Fawcett, J. J., Longmire, J. L., Martin, J. C., Deaven, L. L., and Cram, L. S. 1994. Large-scale chromosome sorting. *Methods in Cell Biology* 42:319-331.]
52. 费因伯格等人 1983 年发表在第 132 期〈分析生物化学〉上的文献[Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13.]
53. 费因伯格等人 1984 年发表在第 137 期〈分析生物化学〉上的文献[Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. (Addendum). *Anal. Biochem.* 137:266-7.]
54. 费雷拉等人 1985 年发表在第 28 期“ACS”上的文献[Ferreira, M. and Rubner, M. F. 1985. Molecular-level processing of conjugated polymers. 1. Layer-by-layer manipulation of conjugated polymers. *ACS* 28:7107-7114.]

55. 费雷拉等人 1997 年发表的“分子生物学和生物学技术” [在 Ferreira, T., Allison, D., Thundat, T., and Warmack, R. 1997. Scanning tunneling microscopy in sequencing of DNA. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Ed. VCH Publishers, New York.]
56. 弗斯特 1965 年发表的〈当代量子化学〉第 III 卷 [Forster, T. 1965. In *Modern Quantum Chemistry*, Vol. III (Sinanoglu, O., Ed.), pp. 93-137, Academic Press, New York.]
57. 弗等人 1995 年发表在“ACS”第 28 期上的文献 [Fou, A. C. and Rubner, M. F. 1995. Molecular-level processing of conjugated polymers. 2. Layer-by-layer manipulation of in-situ polymerized p-type doped conducting polymers. *ACS* 28:7115-7120.]
58. 弗兰克林等人 1985 年发表在第 60 期〈染色技术〉上的文献 [Franklin, A. L. and Fillion, W. G. 1985. A new technique for retarding fading of fluorescence: DPX-BME. *Stain Technology* 60:125-35.]
59. 弗雷等人 1995 年发表的文献 [“Frey, M. W., Sowers, L. C., Millar, D. P., and Benkovic, S. J. 1995. The nucleotide analog 2-aminopurine as a spectroscopic probe of nucleotide incorporation by the Klenow fragment of *Escherichia coli* polymerase I and bacteriophage T4 DNA polymerase.]
60. 付等人 1996 年发表在第 15 期〈胚胎学杂志〉上的文献 [Fu, T. J., Sanders, G. M., O'Donnell, M., and Geiduschek, E. P. 1996. Dynamics of DNA-tracking by two sliding-clamp proteins. *EMBOJ*. 15:4414-22.]
61. 盖德拉等人 1993 年发表在第 48 期〈生物物理化学〉的文献 [Gadella, T. W. J., Jovin, T. M., and Clegg, R. M. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale. *Biophysical Chemistry*. 48:221-239.]
62. 盖因斯等人 1996 年发表在第 195 期〈免疫学方法杂志〉上的文献 [Gains, H., Andersson, L., and Biberfeld, G. 1996. A new method for measuring lymphocyte proliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J. of Immunological Meth.* 195:63-72.]
63. 盖里尼等人 1996 年发表的“荧光成相” [Garini, Y., Katzir, N., Cabib, D., and Buckwaid, R. A. 1996. Spectral bio-imaging. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X. – F. and Herman, B., Eds.), John Wiley & Sons, New York.]
64. 盖兰德等人 1979 年发表在第 183 期〈生化杂志〉上的文献 [Garland, P. B. and Moore, C. H. 1979. Phosphorescence of protein-bound eosin and erythrosin: a possible probe for measurements of slow rotational motion. *Biochem. J.* 183, 561-572.]
65. 盖里齐等人 1993 年发表在第 32 期〈生化〉上的文献 [Gawrisch, K., Han, K. H., Yang, J. S., Bergelson, L. D., and Ferretti, J. A. 1993. Interaction of peptide fragment 828-848 of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 with lipid bilayers. *Biochemistry* 32:3112-18.]

66. 格比叶胡等人 1987 年发表在第 15 期〈核酸研究〉上的文献[Gebeyehu, G. Rao, P. Y., SooChan, P., Simms, D. A., and Klevan, L. 1987. Novel biotinylated nucleotide—analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15:4513-34.]
67. 吉布森等人 1987 年发表在第 53 期〈基因〉上的文献[Gibson, T. J., Coulson, A. R., Sulston, J. E., and Little, R. F. R. 1987a. *Gene.* 53:275.]
68. 吉布森等人 1987 年发表在第 283 页的文献[Gibson, T. J., Rosenthal, A., and Waterson, R. H. 1987b. *Gene* 53:283.]
69. 吉尔于 1979 年发表在第 35 期“Experientia”上的文献[Gill, D. 1979. Inhibition of fading in fluorescence in microcopy of fixed cells. *Experientia* 35:400-1.]
70. 吉尔曼等人 1986 年发表在第 157 期〈分析生化〉上的文献[Gillam, I. C. and Tener, G. M. 1986. N4-(6-aminoethyl) cytidine and -deoxycytidine nucleotides can be used to label DNA. *Anal Biochem.* 157:199-207.]
71. 吉罗等人 1982 年发表在第 217 期〈科学〉上的文献[Giloh, H. and Sedat, J. W. 1982. Fluorescence microscopy; reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science* 217:1252-1255.]
72. 格雷策等人 1997 年发表在第 8 期〈当代生物技术观点〉的文献[Glazer, A. N. and Mathies, R. A. 1997. Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Current Opinion in Biotechnology* 8:94-102.]
73. 格里克曼 1985 年发表在第 31 期〈基础生命科学〉上的文献[Glickman, B. W. 1985. *Basic Life Sciences.* 31:353-79.]
74. 格拉夫等人 1995 年发表的“DNA 克隆 3”[Glover, D. M. and Hames, B. D. 1995. *DNA Cloning* 3. IPL Press, New York.]
75. 古德温 1995 年发表在第 21 期“细胞生物学”上的文献[Goodwin, P. M. Ambrose, W. P., Martin, J. C., and Keller, R. A. 1995. Spatial dependence of the optical collection efficiency in flow cytometry. *Cytometry.* 21:133-144.]
76. 格兰顿等人 1983 年发表在第 44 期〈生物物理杂志〉上的文献[Gratton, E. and Limkema, M. 1983. A continuously variable frequency cross-correlation phase fluorometer with picosecond resolution. *Biophys. J.* 44:315-325.]
77. 格雷普 1995 年发表在第 232 期〈分析生物化学〉上的文献[Griep, M. A. 1995. Fluorescence recovery assay: a continuous assay for processive DNA polymerases applied specifically to DNA polymerase III holoenzyme. *Anal. Biochem.* 232:180-9.]



78. 古朗等人 1967 年发表在第 47 期《化学物理杂志》上的文献[Guéron, M., Eisinger, J., and Shulman, R. G. 1967. *J. Chem. Phys.* 47:4077.]
79. 桂尔鲍德 1973 年发表的文献[Guilbault, G. G. 1973. (ed.) *Practical fluorescence: theory, methods and techniques.* Marcel Dekker, New York.]
80. 桂雷里等人 1990 年发表在第 29 期《生化》上的文献[Gurrieri, S. Rizzarelli, E. Beach, D. and Bustamante, C. 1990. Imaging of kinked configurations of DNA molecules undergoing orthogonal field alternation gel electrophoresis by fluorescence microscopy. *Biochemistry* 29:3396-3401.]
81. 哈伯等人 1995 年发表在《分析化学》第 67 期上的文献[Haab, B. and Mathies, R. 1995. Single molecule fluorescence burst detection of DNA fragments separated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 67:3253-60.]
82. 哈马塔等人 1983 年发表在第 79 期《组织生化》上的文献[Hamada, S. and Fujita, S. 1983. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 79:219-26.]
83. 哈丁等人 1992 年发表在第 10 期《生物技术趋势》上的文献[Harding, J. D. and Keller, R. A. 1992. Single molecule detection as an approach to rapid DNA sequencing. *Trends Biotechnol.*10:55-57.]
84. 哈里斯等人 1985 年发表在第 13 期《欧洲生物物理杂志》上的文献[Harris, C. M. and Kell, D. B. 1985. On the dielectrically observable consequences of the diffusional motions of lipids and proteins in membranes. 2. Experiments with microbial cells, protoplasts and membrane vesicles. *Eur. Biophysics. J.* 13:11-24.]
85. 豪兰德 1996 年发表的“分子探针”上的文献[Haughland, R. P. 1996. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Molecular Probes, Eugene.]
86. 贺仁定等人 1996 年发表在第 84 期《细胞》上的文献[Herendeen, D. R and Kelly, T. J. 1996. DNA polymerase III: running rings around the fork. *Cell.* 84:5-8.]
87. 贺尔曼等人发表的文献[Herman, B., Wang, X. F., Periasamy, A., Kwon, S., Gordon, G., and Wodnicki, P. Fluorescence lifetime imaging in cell biology. *Proceedings of Optical Diagnostics of Living Cells and Biofluids* 2678:88-97.]
88. 霍甘等人 1978 年发表在第 75 期《美国国家科学研究学报》的文献[Hogan, M., Dattagupta, N. and Crothers, D. M. 1978. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:195-199.]
89. 霍尔托克等人 1990 年发表在第 371 期《分子遗传学》上的文献[Holtke, H. J., Seibl, R., Burg, J., Muhlegger, K., and Kessler, C. 1990. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids: II. Optimization of the digoxigenin system. *Mol. Gen. Hoppe-Seyler* 371:929-938.]

90. 霍尔法斯 1995 年发表在第 246 期《酶学方法》上的文献{Holzwarth, A. R. 1995. Time-resolved fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology*. 246:335-361.}
91. 霍尔法斯等人 1990 年发表的文献[Holzwarth, G., Whitcomb, R. W., Platt, K. J., Crater, G. D., and Mckee, C. B. 1990. Velocity of linear DNA during pulsed-field gel electrophoresis. In *Electrophoresis of Large DNA Molecules* (Lai, E. and Birren, B. W., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.]
92. 霍尔法斯等人 1987 年发表在第 28 期《生物聚合物》上的文献[Holzwarth, G., McKee, C. B., Steiger, S., and Crater, G. 1987. Transient orientation of linear DNA molecules during pulsed-field gel electrophoresis. *Biopolymers* 28:1043.]
93. 侯斯拉等人 1989 年发表在第 56 期《生物物理杂志》上的文献[Housel, T. W., Bustamante, C., Stump, R. F., and Maestre, M. F. 1989. *Biophys. J.* 56:507.]
94. 胡弗等人 1982 年发表在第 78 期《皮肤学研究》上的文献[Huff, J. C., Weston, W. L. and Wanda, K. D. 1982. Enhancement of specific immunofluorescent findings with use of para-phenylenediamine mounting buffer. *J. of Investigative Dermatology* 78:449-50.]
95. 黄等人 1996 年发表在第 243 期《分析生化》上的文献[Hung, S. C., Ju, J., Mathies, R. A., and Glazer, A. N. 1996. Cyanine dyes with high absorption cross section as donor chromophores in energy transfer primers. *Anal. Biochem.* 243:15-27.]
96. Ickhikawa 等人 1993 年发表的文献[Ickhikawa, M., Iijima, T., and Matsumoto, G. 1993. Simultaneous 16, 384-site optical recording of neural activities in the brain. In *Brain Mechanisms of Perception and Memory: From Neuron to Behavior*. T. Ono, L. R. Squire, M. E. Raichle, D. I. Perrett & M. Fukuda (eds). Oxford University Press, NY.]
97. Ikehara 等人 1969 年发表在第 17 期《化学药物公报》上的文献[Ikehara, M., Tazawa, I., and Fukui, T. 1969a. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 17:1019-1024.]
98. Ikehara 等人 1969 年发表在第 8 期《生化》上的文献[Ikehara, M., Tazawa, I., and Fukui, T. 1969b. *Biochemistry* 8:736-43.]
99. Iijima 等人 1989 年发表在第 15 期《神经科学》上的文献[Iijima, T., Ichikawa, M., & Matsumoto, G. 1989 *Abstr. Soc. Neurosci.* 15:398.]
100. 简尼斯克发表的文献[Janesick, J. (1980-91) *Informal Notes*, Jet Propulsion Laboratory, California institute of Technology, Pasadena, California.]

101. 杰特等人 1989 年发表在第 7 期〈结构和动力学杂志〉上的文献[Jett, J., Keller, R., Marrone, B., Moyzis, R., Ratliff, R., Seitzinger, N., Shera, E., and Stewart, C. 1989. High-speed DNA sequencing: an approach based upon fluorescence detection of single molecules. *J. of Bio. Structure & Dynamics* 7:301-9.]
102. 杰特等人 1995 年的美国专利第 54057445 号[Jett et al. 1995. US Patent No. 54057447.]
103. 约翰森等人 1982 年发表在第 55 期〈免疫学方法〉上的文献[Johnson, G. D., Davidson, R. S., McNamee, K. C., Russell, G., Goodwin, D. & Holborow, E. J. 1982. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomenon and its remedy. *J. of Immunological Methods* 55:231-242.]
104. 约翰森等人 1981 年发表在第 43 期〈免疫学方法〉上的文献[Johnson, G. D. and Nogueira Araujo, G. M. de C. 1981. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. of Immunological Methods* 43:349-50]
105. 车等人 1996 年发表在第 24 期〈核酸研究〉上的文献[Ju, J., Glazer, A. N., and Mathies, R. A. 1996a. Cassette labeling for facile construction of energy transfer fluorescent primers. *Nucleic Acids Res.* 24:1144-8.]
106. 车等人 1996 年发表在第 2 期〈天然药物〉上的文献[Ju, J., Glazer, A. N., and Mathies, R. A. 1996b. Energy transfer primers: a new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis. *Nature Medicine.* 2:246-9.]
107. 姜番恩等人 1995 年发表在第 16 期〈电泳〉上的文献[Jumppanen, J. H. and Riekkola, M. L. 1995. Influence of electrolyte composition on the effective electric field strength in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis.* 16: 1441-4.]
108. Kasianowicz 等人 1996 年发表在第 93 期〈美国国家科学研究学报〉上的文献[Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., and Deamer, D. W. 1996. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:13770-3.]
109. Kato 等人 1970 年发表在第 60 期〈细胞研究〉上的文献[Kato, H. and Yoshida, T. H. 1970. Nondisjunction of chromosomes in a synchronized cell population initiated by reversal of colcemid inhibition. *Expl. Cell Res.* 60:459-64.]
110. 寇弗等人 1993 年发表在第 7 期〈快速通讯质谱〉上的文献[Keough, T., Baker, T. R., Dobson, R. L. M., Lacey, M. P., Riley, T., Hasselfield, J., and Hesselberth, P. E. 1993. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:195-200.]
111. 金侯等人发表在第 23 期〈核酸研究〉上的文献[Kinjo, M. and Rigler, R. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy. *Nucleic Acids Research.* 23:1795-1799.]

112. 科克等人 1993 年发表在第 97 期〈物理化学〉上的文献[Kirk, W. R., Wessels, W. S., and Prendergast, F. G. 1993. Lanthanide-dependent perturbations of luminescence in indolythylenediaminetetraacetic acid-lanthanide chelate. *J. Phys. Chem.* 97:10326-10340.]
113. 克兰琴等人 1991 年发表在第 60 期〈生物物理杂志〉上的文献[Klenchin, V. A., Sukharev, S. I., Serov, S. M., Chernomordik, L. V., and Chizmadzhev, YuA. 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophysical J.* 60:804-11.]
114. 克切特阔夫等人发表在第 1 期〈核酸化学〉上的文献[Kochetkov, N. K., Budowsky, and Shibaev, V. N. *Proc. Nucl. Acid Chem.*, 1:500-2.]
115. 阔奴曼等人 1992 年发表的文献[Konuma, M. 1992. *Film Deposition by plasma techniques.* Springer-Verlag, New York.]
116. 阔车那亚等人 1978 年的文献[Korchemnaya, E. K., Ermakov, A. N., Bochkova, L. P. 1978. *J. Anal Chem USSR (Eng. Transl.)* 33:625.]
117. 阔伯格等人 1991 年发表的文献[Kornberg, A., and Baker, T. A. 1991. *DNA Replication* W. H. Freeman, New York.]
118. 拉阔维斯等人 1996 年发表的文献[Lakowicz, J. R. and Szmazinski, H. 1996. *Imaging applications of time-resolved fluorescence spectroscopy.* In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X. F. and Herman, B. Eds). John Wiley & Sons, New York.]
119. 拉阔维斯等人 1991 年发表在第 62 期〈科学仪器回顾〉上的文献[Lakowicz, J. R. and Berndt, K. W. 1991. Lifetime-selective fluorescence imaging using an RF phase-sensitive camera. *Rev. Sci. Instru.* 62:3653.]
120. 朗等人 1968 年发表的文献[Lang, R. A., Robins, R. K., and Townsend, L. B. 1968. *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry.* 1:228. Ed, Zorbach, W. W. and Tipson, R. S. John Wiley & Sons. New York.]
121. 朗尔等人 1981 年发表的文献[Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C. 1981. Enzymatic synthesis of biotinlabeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78-6633-6637.]
122. 李等人 1995 年发表在第 230 期〈分析化学〉上的文献[Lee, K. B., Matsuoka, K, Nishimura, S, and Lee, Y. C. 1995. A new approach to assay endo-type carbohydrases: bifluorescent-labeled substrates for glycoamidases and ceramide glycanases. *Anal. Biochem.* 230:31-6.]
123. 李等人发表在第 20 期〈核酸研究〉上的文献[Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., and Wilson, R. K. *Nucleic Acids Res.* 20:2471-2483.]

124. 李等人 1994 年发表在第 220 期〈分析生化〉上的文献[Lee, S. P., Porter, D., Chirikjian, J. G., Knutson, J. R., and Han, M. K. 1994. A fluorometric assay for DNA cleavage reactions characterized with BamHI restriction endonuclease. *Anal. Biochem.* 220:377-383.]
125. 李等人 1995 年发表在第 227 期〈分析化学〉上的文献[Lee, S. P., Censullo, M. L., Kim, H. G., Knutson, J. R., and Han, M. K. 1995. Characterization of endonucleolytic activity of HIV-1 integrase using a fluorogenic substrate. *Anal. Biochem.* 227:295-301.]
126. 李等人 1994 年发表在第 66 期〈分析化学〉上的文献[Lee, Y-H, Maus, R. G., Smith, B. W. and Winefordner, J. D. 1994. Laser-induced fluorescence detection of a single molecule in a capillary. *Anal. Chem.* 66:4142-9.]
127. 乐沃斯吉 1994 年的文章[Lewotsky, K. 1994. Hyperspectral Imaging: evolution of imaging spectrometry. *SPIE OE/Rep.*, November:1-3.]
128. 李特尔等人 1994 年发表在第 116 期〈美国化学学会杂志〉上的文献[Little, D. P., Chorush, R. A., Speir, J. P., Senko, M. W., Kelleher, N. L., and McLafferty, F. W. 1994. *J. Am. Chem. Soc.* 116:4893-4897.]
129. 李瓦克 1997 年的文献[Livak, K. J. 1997. Quantitation of DNA/RNA using real-time PCR detection. PE Applied Biosystems, Foster City, CA.]
130. 洛克哈德等人 1996 年发表在第 14 期〈自然生物技术〉上的文献[Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T. et al., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechn.* 14:1675-1680.]
131. 罗鲁斯等人 1989 年发表在〈科学〉上的文献[Loros, J. J., Denome, S. A., and Dunlap, J. C. 1989. Molecular cloning of genes under control of the circadian clock in *Neurospora*. *Science* 243:385-388.]
132. 马库司等人 1963 年发表在〈美国国家科学研究学报〉第 50 期上的文献[Marcus, P. I. and Robbins, E. 1963. Viral inhibition in the metaphase-arrest cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:1156-64.]
133. 马尔拉等人 1996 年发表在第 6 期〈基因组研究〉上的文献[Marra, M., Weinstock, L. A., and Mardis, E. R. 1996. End sequence determination from large insert clones using energy transfer fluorescent primers. *Genome Research* 6:1118-22.]
134. 马丁等人 1994 年发表在第 68 期〈病毒学杂志〉上的文献[Martin, I, Dubois, M-C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., and Ruysschaert, J-M. 1994. Correlation between fusogenicity of synthetic modified peptides corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: an infrared spectroscopy study. *J. Virol.* 68:1139-48.]



135. 梅森 1992 年发表的文献[Mason, W. T. 1992. *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Harcourt Brace & Company, Cambridge, UK.]
136. Matayoshi 等人 1990 年发表在第 247 期(科学)上的文献[Matayoshi, E. D., Wang, G. T., Krafft, G. A., and Erickson, J. 1990. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. *Science*. 247:954.]
137. Matsumoto 等人 1993 年发表在第 38 期(细胞生物学方法)上的文献[Matsumoto, B. 1993. Cell biological applications of confocal microscopy. *Methods in Cell Biology*. 38:86.]
138. Matsumoto 等人 1981 年发表在第 152 期(分子生物学)上的文献[Matsumoto, S., Morikawa, K., and Yangida, M. 1981. Light microscopic structure of DNA in solution studied by the 4', 6-diamidino-2-phenylindole staining method. *J. Mol. Biol.* 152:501-516.]
139. 毛利司等人 1986 年发表在第 25 期(生化)上的文献[Maurizi, M. R., Kasprzyk, P. G., and Ginsberg, A. 1986. Distances between active site probes in glutamine synthetase from *Escherichia coli* fluorescence energy transfer in free and in stacked dodecamers. *Biochem.* 25: 141-151.]
140. 毛特那尔 1956 年发表在第 78 期(美国化学学会杂志)上的文献[Mautner, H. G. 1956. *J. Am. Chem. Soc.* 78:5293.]
141. 马克西姆等人 1977 年发表在第 74 期(美国国家科学研究学报)上的文献[Maxam, A. M. and Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:560-4.]
142. 梅蒙等人 1988 年发表的文献[Maymon, W., and Neeck, S. P. 1988. Optical system design alternatives for the Moderate-Resolution Imaging Spectrometer Tilt (MODIS-T) for the Earth Observing System (EoS). *Proc. SPIE-Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process Remote Sens.* 924:10-22.]
143. 麦克刚等人 1989 年发表在第 61 期(分析化学)上的文献[McGown, L. B. 1989. Fluorescence lifetime filtering. *Anal. Chem.* 61:839A-847A.]
144. 梅弗特等人 1988 年发表在第 239 期(FEBS Lets)上的文献[Meffert, R. and Dose, K. 1988. Uv-induced cross-linking of proteins to plasmid Pbr322 containing 8-azidoadenine 2'-deoxyribonucleotides. *FEBS Lets.* 239:190-4.]
145. 梅尔慈等人 1995 年发表在第 20 期(光学通讯)上的文献[Meertz, J., Xu, C. and Webb, W. W. 1995. Single-molecule detection by two-photon-excited fluorescence. *Optics Letters* 20:2532-34.]
146. 梅因阔司等人 1987 年发表在第 152 期(酶学方法)上的文献[Meinkoth, J. and Wahl, G. M. 1987. Nick translation. *Methods in Enzymology* 152:91-94.]

147. 蒙特等人 1979 年发表在第 27 期〈光化学〉上的文献[Menter, J. M., Hurst, R. E. and West, S. S. 1979. Photochemistry of heparin-acridine orange complexes in solution. *Photochemistry and Photobiology*. 27:629-33.]
148. 蒙特等人 1978 年发表在第 27 期〈光化学〉上的文献[Menter, J. M., Golden, J. F. & West, S. S. 1978. Kinetics of fluorescence fading of acridine orange-heparin complexes in solution. *Photochemistry and Photobiology* 27:629-633.]
149. 米奇等人 1992 年发表在第 13 期〈肌肉研究杂志〉上的文献[Miki, M., O'Donoghue, S. I., and Dos Remedios, C. G. 1992. Structure of actin observed by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 13:132.]
150. 米奇等人 1993 年发表在第 268 期〈生化杂志〉上的文献[Miki, M. and Iio, T. 1993. Kinetics of structural changes of reconstituted skeletal muscle thin filaments observed by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 268:7101-7106.]
151. 米特齐森等人 1971 年发表的文献[Mitchinson, J. M. 1971. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge University Press, London.]
152. 摩尔等人 1986 年发表在第 49 期〈生物物理杂志〉上的文献[Moore, D. P., Schellman, J. A., and Baase, W. A. 1986. The orientation, relaxation and reptation of DNA in orthogonal field, alternately-pulsed field gel electrophoresis: a linear dichroism study. *Biophys. J.* 49:130a.]
153. Morikawa 等人 1981 年发表在第 89 期〈生化杂志〉上的文献[Morikawa, K., and Yangida, M. 1981. *J. Biochem.* 89:693.]
154. 莫罗萨怒等人 1990 年发表的文献[Morosanu, C. E. 1990. *Thin films by chemical vapour deposition*. Elsevier, New York.]
155. 摩根等人 1990 年的文献{Morgan, C. G., Mitchell, A. C., and Murray, J. G. 1990. Nanosecond time-resolved fluorescence microscopy: principle and practice. *Trans. R. Microsc. Soc. (Micro'90)* 463-466.}
156. Nakashima 等人 1992 年发表的文献[Nakashima, M., Yamada, S., Shiono, S., and Maeda, M. 1992. *IEEE Trans. Biomed. Engng.* 39:26-36.]
157. Naktinis 等人 1996 年发表在第 84 期〈细胞〉上的文献[Naktinis, V., Turner, J., O'Donnell, M. 1996. A molecular switch in a replication machine defined by an internal competition for protein rings. *Cell*. 84:127-45.]
158. Negishi 等人 1988 年发表在第 19 期〈核酸研讨会汇编〉上的文献[Negishi, K., Matsumoto, K., Bessho, T., Tada, F., and Hayatsu, H. 1988. In vitro mutagenesis by incorporation of N4-aminodeoxycytidine 5'-triphosphate. *Nucleic Acids Symposium Series*. 19:33-6.]

159. 纽曼等人 1977 年发表在第 110 期〈分子生物学〉上的文献[Newman, J., Swiney, J. L., Day, L. A. 1977. *J. Mol. Biol.* 110:119-46.]
160. 尼古拉斯等人 1990 年发表在第 8 期〈骨骼和矿物质〉上的文献[Nicolas, V., Nefussi, J. R., Collin, P., and Forest, N. 1990. Effects of acidic fibroblast growth factor and epidermal growth factor on subconfluent fetal rat calvaria cell cultures: DNA synthesis and alkaline phosphatase activity. *Bone and Mineral.* 8:145-56.]
161. 纽因等人的文献[Nguyen, D. C. and Keller, R. A. Detection of single molecules of phycoerythrin in hydrodynamically focused flows by laser-induced fluorescence. *Anal. Chem.* 59:2185-2161.]
162. 聂等人 1994 年发表在〈科学〉第 266 期上的文献[Nie, S., Chiu, D. T., and Zare, R. N. 1994. Probing individual molecules with confocal fluorescence microscopy. *Science.* 266:1018-21.]
163. Oida 等人 1993 年发表在第 64 期〈生物物理〉上的文献[Oida, T., Sato, Y., and Kusumi, A. 1993. Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy): methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys. J.* 64:676-685.]
164. 昂鲁斯特等人 1993 年发表在第 268 期〈生物化学杂志〉上的文献[Onrust, R., and O'Donnell, M. 1993. *J. Biol. Chem.* 268:11766-72.]
165. 派普等人 1993 年发表在第 32 期〈生化〉上的文献[Pap, E. H. W., Bastiaens, P., Borst, J. W., van den Berg, P., van Hoek, A., Snoek, G., Wirtz, K, and Visser, A. 1993. Quantitation of the interaction of protein kinase C with diacylglycerol and phosphoinositides by time-resolved detection of resonance energy transfer. *Biochemistry* 32:13310-17.]
166. 保尔的文献[Paul, W. Professor of Physics, Harvard University.]
167. 保立奥 1995 年的文献[Pauleau, Y. 1995. Materials and processes for surface and interface engineering. Kluwer Academic Publishers, Boston.]
168. 帕慈-爱立祖等人 1996 年发表在第 271 期〈生物化学杂志〉上的文献[Paz-Elizur, T., Skaliter, R., Blumenstein, S., and Livneh, Z. 1996. Beta, a UV-inducible smaller form of the beta subunit sliding clamp of DNA polymerases III of *Escherichia coli*. I. Gene expression and regulation. *J. Biol. Chem.* 271:2482-90.]
169. 派克等人 1989 年发表在第 86 期〈美国国家科学研究学报〉上的文献[Peck, K., Stryer, L., Glazer, A. N. and Mathies, R. A. 1989. Single-molecule fluorescence detection: autocorrelation criterion and experimental realization with phycoerythrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4087-4091.]
170. 派瑞萨米等人的文献[Periasamy, A., Siadat-Pajouh, M., Wodnick, P., Wang, X-F., and Herman, B. Time-gated fluorescence microscopy for clinical imaging. *Microscopy and analysis.* 3:33-4.]

171. 派瑞萨米等人 1994 年发表在第 6 期〈计算机辅助的显微镜〉上的文献[Periasamy, A., & Herman, B. 1994. Computerized fluorescence microscopic vision in the biomedical science, *J. of Computer-Assisted Microscopy* 6:1-26.]
172. 皮斯奥罗等人 1984 年发表在第 30 期〈实用显微镜的进展〉上的文献[Picciolo, G. L. and Kaplan, D. S. 1984. Reduction of fading of fluorescent reaction product for microphotometric quantitation. *Advances in Applied Microbiology* 30:197-234.]
173. 皮腊依 1980 年的文献[Pillai, V. N. 1980. Photoremovable protecting groups in organic synthesis. *Synthesis*. 1980:1.]
174. 普拉特等人 1983 年发表在第 31 期〈组织化学和细胞化学杂志〉上的文献[Platt, J. L. and Michael, A. F. 1983. Retardation of fading and enhancement of intensity of immunofluorescence by p-phenylenediamine. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 31:840-42.]
175. 普特等人 1990 年发表在第 33 期〈细胞生物学方法〉上的文献[Poot, M. and Hoehn, H. 1990. Cell cycle analysis using continuous bromodeoxyuridine labeling and Hoeschst 33258-ethidium bromide bivariate flow cytometry. *Methods in Cell Biology* 33:185-98.]
176. 伯特 1967 年的文献[Porter, G. (Ed.) 1967. Reactivity of the photoexcited organic molecule. Interscience, New York.]
177. 普林舍姆 1963 年的文献[Pringsheim, P. 1963. Fluorescence and phosphorescence. John Wiley, New York.]
178. 普立奥雷等人 1979 年发表在第 18 期〈生物聚合物〉上的文献[Priore, D. R. C. and Allen, F. S. 1979. *Biopolymers* 18:1809-1820.]
179. 普尔矛等人 1994 年发表在第 22 期〈核酸研究〉上的文献[Purmal, A. A., Kow, Y. W., and Wallace, S. S. 1994. 5-Hydroxyprimidine deoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acids Res.* 22:3930-5.]
180. 普塞尔 1985 年的文献[Purcell, E. M. 1985. Electricity and Magnetism, Vol. 2 McGraw-Hill, New York.]
181. 曲等人 1996 年发表在第 380 期〈自然〉上的文献[Qu, D., et al., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380:243-247.]
182. 来恩等人 1965 年的文献[Rahn, R. O., Schulman, R. G., and Longworth, J. W. 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53:893.]

183. 莱姆皮诺等人 1990 年发表在第 194 期〈分析生物化学〉上的文献[Rampino, N. J. and Chrambach, A. 1990. Apparatus for gel electrophoresis with continuous monitoring of individual DNA molecules by video epifluorescence microscopy. *Anal. Biochem.* 194:278-283.]
184. 拉奥等人 1968 年发表在第 160 期〈科学〉上的文献[Rao, P. N. 1968. Mitotic synchrony in mammalian cells treated with nitrous oxide at high pressures. *Science* 160:774-6.]
185. 里格伯等人 1977 年发表在第 113 期〈分子生物学杂志〉上的文献[Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237-51.]
186. 雷迪克等人 1989 年的文献[Reddick, R. C., Warmack, R. J., and Ferrell, T. L. 1989. *Phys. Rev. B* 39:767-770.]
187. 罗杰斯等人 1985 年的文献[Rodgers, M. A. J. and Firey, P. A. 1985. *Photochem. Photobiol.* 42:613.]
188. 罗那吉等人 1996 年的文献[Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhln, M., and Nyren, P. 1996. Realtime DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242:84-89.]
189. 罗斯等人 1964 年发表在第 2 期〈生物聚合物〉上的文献[Ross, P. D. and Scruggs, L. 1964. *Biopolymers.* 2:231-6.]
190. 罗斯特 1991 年的文献[Rost, F. W. D. 1991. *Quantitative Fluorescence Microscopy.* Cambridge University Press, Cambridge.]
191. 罗伊等人 1979 年的文献[Roychoudhury, R., Tu, C.-P.-D., and Wu, R. 1979. Influence of nucleotide sequence adjacent to duplex DNA termini on 3'-terminal labeling by terminal transferase. *Nucleic Acids Res.* 6:1323-1333.]
192. 萨哈等人 1993 年的文献[Saha, A. K., Kross, K., Kloszewski, E. D., Upson, D. A., Toner, J. L., Snow, R. A., Black, C. D. V., and Desai, V. C. 1993. Time-resolved fluorescence of a new europium chelate complex: demonstration of highly sensitive detection of protein and DNA samples. *J. Am. Chem. Soc.* 115:11032-33.]
193. 萨霍塔等人 1994 年的文献[Sahota, R. S. and Khaledi, M. G. 1994. Nonaqueous capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 66:1141-6.]
194. 塞奇等人 1985 年发表在第 230 期〈科学〉上的文献[Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.]

195. 塞奇等人 1988 年发表在第 239 期《科学》上的文献[Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.]
196. 桑尔等人 1977 年的文献[Sanger, F., Nicklen, A., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-7.]
197. 萨斯等人 1995 年的文献[Sase, I., Miyata, H., Corrie, J., Craik, J., and Kinoshita, Jr., K. K. 1995. Real time imaging of single fluorophores on moving actin with and epifluorescence microscope. *Biophys. J.* 69:323-8.]
198. 斯掣特等人 1980 年的文献[Scheit, K. H. 1980. *Nucleotide Analogs: Synthesis and Biological Function.* John Wiley & Sons, New York.]
199. 斯车尔曼等人 1987 年的文献[Schellman, J. A., and Jensen, H. P. 1987. Optical spectroscopy of oriented molecules. *Chem. Rev.* 87:1359.]
200. 斯楚特 1989 年的文献[Schott, J. R. 1989. Remote sensing of the Earth: A synoptic view. *Phys Today* September: 72-79.]
201. 施瓦兹等人 1989 年发表在第 338 期《自然》上的文献[Schwartz, D. C. and Koval, M. 1989. Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis. *Nature* 338:520-522.]
202. 塞尔文等人 1994 年的文献[Selvin, P. R., Rana, T. M., and Hearst, J. E. 1994. Luminescence resonance energy transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 116:6029-30.]
203. 塞尔文等人 1995 年的文献[Selvin, P. R. 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Methods in Enzymology.* 246:300-334.]
204. 舍拉等人 1990 年发表在第 174 期《化学物理学》上的文献[Shera, E. B., Seitzinger, N. K., Davis, L. M., Keller, R. A., and Soper, S. A. 1990. Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Letts.* 174:553-57.]
205. 史克姆斯等人 1986 年发表在第 5 期《DNA》上的文献[Shikmus, M. L., Guaglianone, P., and Herman, T. M. 1986. Synthesis and characterization of biotin-labeled nucleotide analogs. *DNA.* 5:247-55.]
206. 斯卡里特等人 1996 年发表在第 271 期《生物化学杂志》上的文献[Skaliter, R., Bergstein, M., and Livneh, Z. 1996. Beta, a UV-inducible shorter form of the beta subunit of DNA polymerase III of *Escherichia coli*. II. Overproduction, purification, and activity as a polymerase processivity clamp. *J. Biol. Chem.* 271:2491-6.]

207. 斯库格等人 1992 年发表的文献[Skoog, D. A., West, D. M., and Holler, F. J. 1992. *Analytical Chemistry*. Saunders College Publishing, New York.]
208. 斯米尔诺夫等人的文献[Smirnov, I. P., Roskey, M. T., Juhasz, P., Takach, E. J., Martin, S. A., and Haff, L. A. 1996. Sequencing oligonucleotides by exonuclease digestion and delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 238:19-25.]
209. 史密斯等人 1990 年发表在第 87 期《美国国家科学学报》上的文献[Smith, D. P., Shieh, B. H., and Zuker, C. S. 1990. Isolation and structure of an arrestin gene from *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1003-1007.]
210. 史密斯等人 1990 年的文献[Smith, S. B., Burrieri, S., and Bustamante, C. 1990. Fluorescence microscopy and computer simulations of DNA molecules in conventional and pulsed-field gelelectrophoresis. In *Electrophoresis of large DNA Molecules* (Lai, E. and Birren, B. W., Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.]
211. 史密斯等人 1989 年发表在第 243 期《科学》上的文献[Smith, S. B., Aldridge, P. K., and Callis, J. B. 1989. Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis. *Science* 243:203-206.]
212. 史密斯等人 1986 年的文献[Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B., and Hood, L. E. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 321:674-9.]
213. 索伯尔 1970 年的文献[Sober, H. A. Ed. 1970. *Handbook of Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed. The Chemical Rubber Co., Cleveland.]
214. 索伯尔 1992 年的文献[Soper, S. A., Davis, L. M., and Shera, E. B. 1992. Single molecule spectroscopy in solution. *Los Alamos Science* 20:286-98.]
215. 斯帕慈等人 1983 年的文献[Spatz, W. B. and Grabig, S. 1983. Reduced fading of fast blue fluorescence in the brain of the guinea-pig by treatment with sodium-nitroprusside. *Neuroscience Letters* 38:1-4.]
216. 斯泊霍尔 1990 年的文献[Spohr, R. 1990. *Lon tracks and microtechnology: principles and applications* Vieweg, Braunschweig.]
217. 斯坦伯格 1971 年的文献[Steinberg, I. Z. 1971. *Annu. Rev. Biochem.* 40:83.]
218. 斯坦尔等人 1971 年的文献[Steiner, R. F. and Weinryb, I. 1971. *Excited States of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum Press, New York.]

219. 斯图瓦特等人 1968 年的文献[Stewart, J. E., Hahn, G. M., Parker, V., and Bagshaw, M. A. 1968. Chinese hamster cell monolayer cell cultures. *Exp. Cell Res.* 49:293-299.]
220. 斯图瓦特 1983 年的文献[Stuart, R. V. 1983. Vacuum technology, thin films, and sputtering: and introduction. Academic Press, New York.]
221. 斯特里尔 1978 年的文献[Stryer, L. 1978. *Annual Review of Biochem.* 47:819.]
222. 斯图布莱费尔的 1968 年的文献[Stubblefield, E. 1968. Synchronization methods for mammalian cell cultures. In *Methods in Cell Physiology*. Ed. by D. M. Prescott. 3:25-43. Academic Press, New York.]
223. 斯特姆等人 1989 年的文献[Sturm, J. and Weill, G. 1989. Direct observation of DNA chain orientation and relaxation by electric birefringence: implication for the mechanism of separation during pulsed-field gel electrophoresis. *Phys. Rev. Lett.* 62:1484.]
224. 塔里阿尼等人 1996 年发表在第 240 期〈分析生物化学〉上的文献{Taliani, M., Bianchi, E., Narjes, F., Fossatelli, M., Urbani, A., Steinkuler, C., De Francesco, R., and Pessi, A. 1996. A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer dipeptide substrates. *Anal. Biochem.* 240:60-7.}
225. 泰勒等人 1989 年发表在第 29 期〈细胞生物学方法〉上的文献[Taylor, D. L. and Salmon, E. D. 1989. *Methods in Cell Biol.* 29:207-37.]
226. 泰勒等人 1981 年的文献[Taylor, D. L., Reidler, J., Spudich, J. A., and Stryer, L. 1981. Detection of actin assembly by fluorescence energy transfer. *J. Cell Biol.* 89:363.]
227. 特尔比斯特等人 1993 年的文献[Ter Beest, M. and Hoekstra, D. 1993. Interaction of myelin basic protein with artificial membranes. Parameters governing binding, aggregation and dissociation. *Eur. J. Biochem.* 211:689-96.]
228. 塞尔等人 1997 年的文献[Theil, E. 1997. Automation in genome research. In *Molecular Biology and Biotechnology*, R. A. Meyers, Ed. VCH Publishers, New York.]
229. 托马斯等人 1992 年的文献[Thomas, R. S., Shimkunas, A. R., and Manger, P. E. 1992. Sub-nanosecond intensifier gating using heavy and mesh cathode underlays. *Proc. Int. Congr. High Speed Photo. Photon 19<sup>th</sup>.* 1984.]
230. 田等人 1991 年的文献[Tian, R. and Rodgers, M. A. J. (1991). Time-resolved fluorescence microscopy. In *New Techniques in Optical Microscopy and Spectrophotometry* (R. J. Cherry, Ed.), pp. 312-351. CRC Press, Boca Raton, FL.]

231. 提诺库等人 1995 年的文献[Tinoco, I., Sauer, K., and Wang, J. C. 1995. *Physical Chemistry* Prentice Hall, Englewood Cliffs.]
232. 图等人 1980 年的文献[Tu, C.-P.-D., and Cohen, S. 1980 3'-End labeling of DNA with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] cordycepin-5'-triphosphate. *Gene* 10:177-83.]
233. Uchiyama 等人 1996 年的文献[Uchiyama, H., Hirano, K., Kashiwasake-Jibu, M., and Taira, K. 1996. Detection of undegraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 271:380-84.]
234. 吴登弗兰德 1962 年的文献[Udenfriend, S. 1962. *Fluorescence assay in biology and medicine.* Academic Press, New York and London.]
235. 乌叶答等人 1974 年的文献[Ueda, T., Miura, K., Imazawa, K., and Odajima, K. 1974. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 22:2377-2382.]
236. 瓦里叶夫 1992 年的文献[Valiev, K. A. 1992. *The physics of submicron lithography.* Plenum Press, New York.]
237. 瓦尔尼斯等人 1985 年的文献[Valnes, K. and Brandtzaeg, P. 1985. Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *J. of Histochemistry and Cytochemistry* 33:755-761.]
238. 范霍尔斯特等人 1993 年的文献[Van Hulst, N. F., Moers, M. H. P., Noordman, O. F. J., Tack, R. G., Segerink, F. B., and Bolger, B. 1993. *Appl. Phys. Lett.* 62:461.]
239. 范德闻等人 1992 年德文献[Van de Ven, M., and Gratton, E. 1992. Time-resolved fluorescence lifetime imaging. In *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications* (B. Herman, and J. J. Lemaster, Eds.), 373-402. Academic Press, San Diego.]
240. 瓦韩等人 1970 年的文献[Vauhan, W. M. and Weber, G. 1970. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water. A dynamic probe of the microenvironment. *Biochemistry* 9:464-473.]
241. 瓦格那尔 1995 年的文献[Waggoner, A. 1995. Covalent labeling of proteins and nucleic acids with fluorophores. *Methods in Enzymology* 246:362-373.]
242. 王等人 1995 年的文献[Wang et al., 1995. Discovery of adrenomedullin in rat ischemic cortex and evidence for its role in exacerbating focal brain ischemic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1003-1007.]
243. 王等人 1976 年的文献[Wang, S. Y. 1976. *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids.* Academic Press, New York.]

244. 王等人 1996 年的文献[Wang, X. F., Periasamy, A., Wodnicki, P., Gordon, G. W., and Herman, B. 1996. Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy: instrumentation and biomedical applications. In *Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy* (Wang, X. F. and Herman, B. Ed). John Wiley & Sons, Inc., New York.]
245. 王等人 1996 年的文献[Wang, X. F., Periasamy, A., Wodnicki, P., Gordon, G. W., and Herman, B. 1996. Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy: instrumentation and biomedical applications. *Chemical Analysis* 137: 313-350.]
246. 王等人 1990 年的文献[Wang, X. F., Kitajima, S., Uchida, T., Coleman, D. M., and Minami, S. 1990. Time-resolved fluorescence microscopy using multichannel photon counting. *Appl. Spectrosc.* 44:25.]
247. 王等人 1996 年的文献[Wang, Y., Wallin, J. M., Ju, J., Sensabaugh, G. F., and Mathies, R. A. 1996. High-resolution capillary array electrophoretic sizing of multiplexed short tandem repeat loci using energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis.* 17:1485-90.]
248. 王等人 1995 年的文献[Wang, Y., Ju, J., Carpenter, B. A., Atherton, J. M., Sensabaugh, G. F., and Mathies, R. A. 1995. Rapid sizing of short tandem repeat alleles using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Anal. Chem.* 67:1197-203.]
249. 沃德等人 1969 年的文献[Ward, D. C. and Reich, E. 1969. Fluorescence studies of nucleotides and polynucleotides. 244:1228-1237.]
250. 魏曼等人 1995 年的文献[Weimann, S., Rupp, T., Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., and Ansorge, W. 1995. Primer design for automated DNA sequencing utilizing T7 DNA polymerase and internal labeling with fluorescein-15-Datp. *BioTechniques* 18:688-97.]
251. 魏尔金森等人 1995 年的文献[Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Conner, T. W., and Klee, H. J. 1995. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display. *Plant Mol. Biol.* 27:1097-1108.]
252. 魏特尔等人 1997 年的文献[Wittwer, C. T., Herman, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques.* 22:130-1, 134-8.]
253. 乌里等人 1995 年的文献[Wooley, A. T. and Mathies, R. A. 1995. Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Anal. Chem.* 67:3676-3680.]
254. 沃伦尼司等人 1994 年的文献[Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V., and Winoto, A. 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281.]

255. 吴等人 1981 年的文献[Wu, H. M., Dattagupta, N. and Crothers, D. M. 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6808-6811.]
256. 吴等人 1994 年的文献[Wu, P. G. and Brand, L. 1994. Resonance energy transfer: methods and applications. Anal. Biochem. 218: 1-13.]
257. 文德里奇等人 1969 年的文献[Wunderlich, F. and Peyk, D. 1969. Antimitotic agents and macronuclear division of ciliates. II Endogeneous recovery from colchicine and colcemid-a new method of synchronization in Tetrahymena pyriformis GL. Expl. Cell Res. 57:142-4.]
258. Yanagida 等人 1983 年的文献[Yanagida, M., Hiraoka, Y., and Katsura, I. 1983. Cold Spring Harbor Symp. Biol. 47:177-87.]
259. Yamaoka 等人 1981 年的文献[Yamaoka, K. and Matsuda, K. 1981. Macromolecules 14:595-601.]
260. Yamaoka 等人 1973 年的文献[Yamaoka, K. and Charney, E. 1973. Macromolecules 6:66-76.]
261. 瓦尼等人 1988 年的文献[Vane, G., Chrien, T. G., Reimer, J. H., Green, R. O., and Conel, J. E. 1988. Comparison of laboratory calibrations of the Airborne Visible/Infrared Imaging Spectrometer (AVIRIS) at the beginning and end of the first flight season. Proc. SPIE-Recent Adv. Sensors, Radiometry Data Process. Remote Sens. 924:168178.]
262. 斯魏格 1973 年的文献[Zweig, A. 1973. Photochemical generation of stable fluorescent compounds (photofluorescence). Pure and Applied Chemistry 33:389-410.]

# 说明书附图

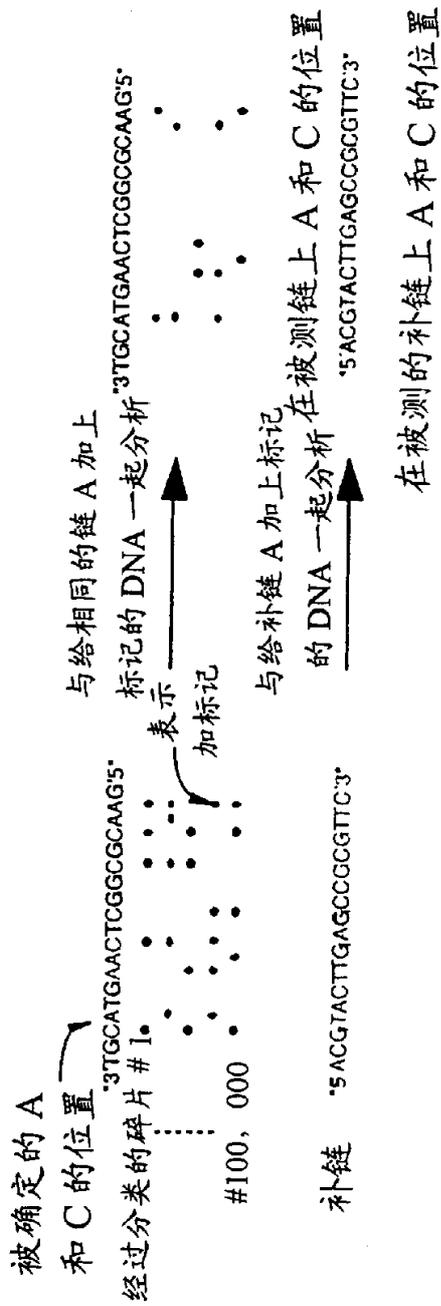


图 1

.....

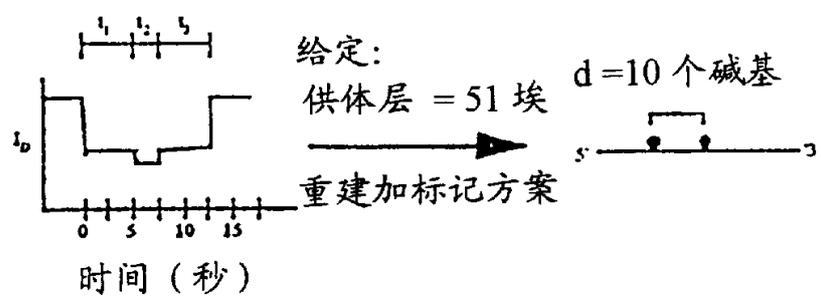


图 2



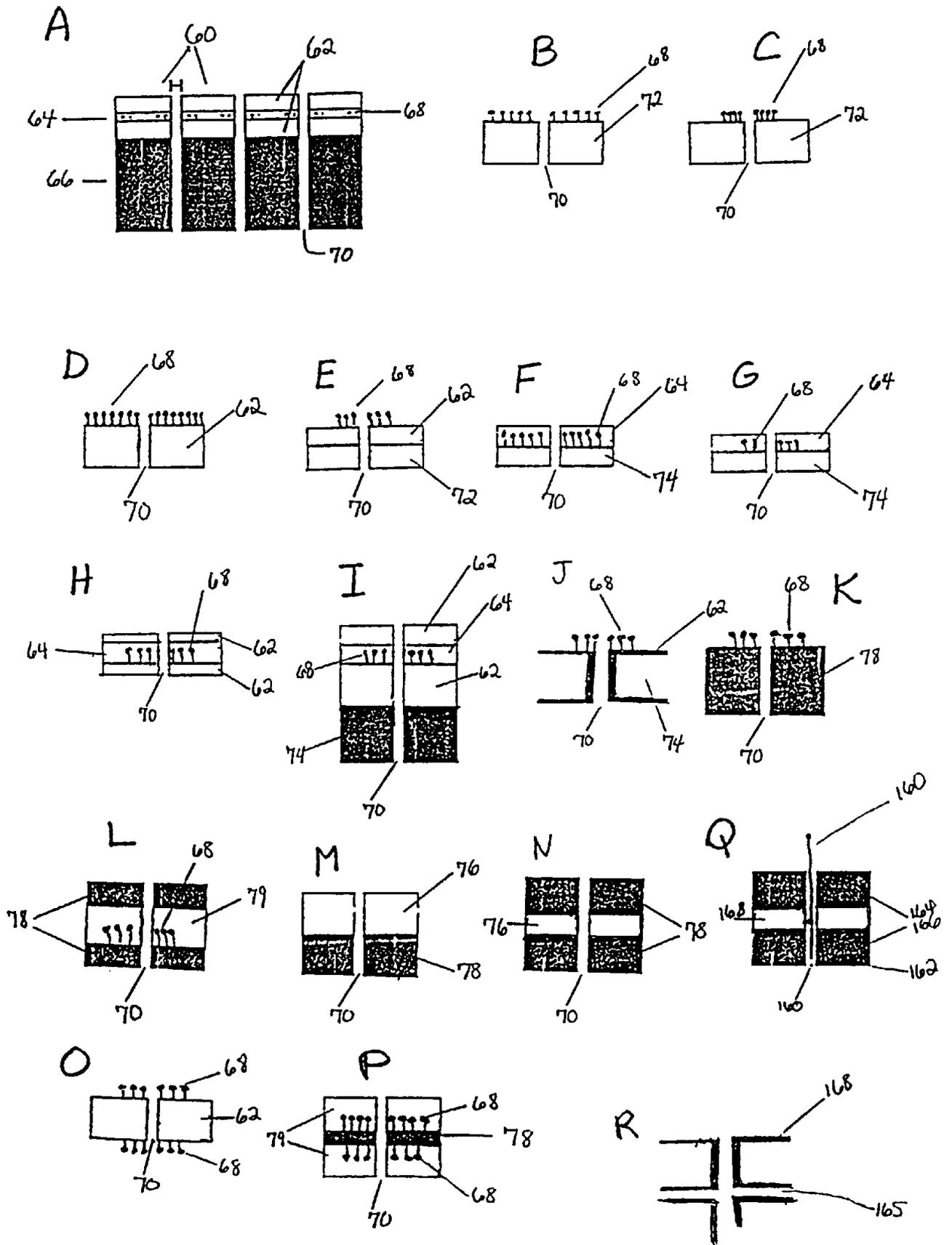


图 4

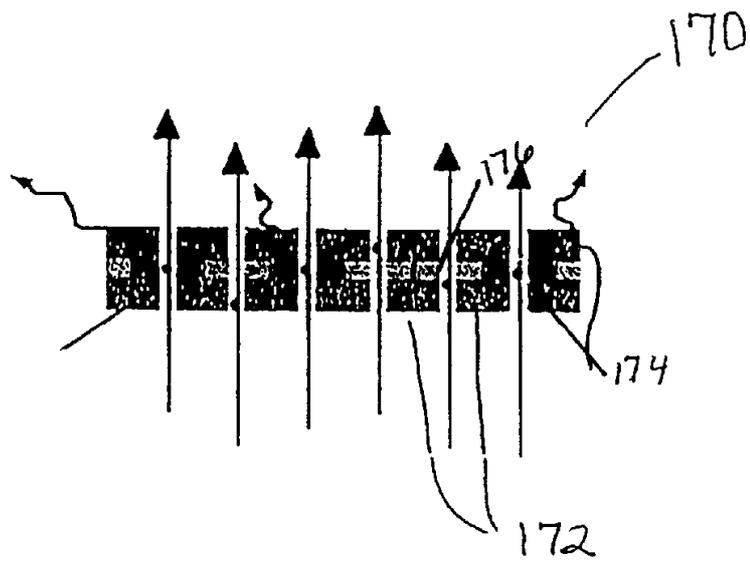


图 5

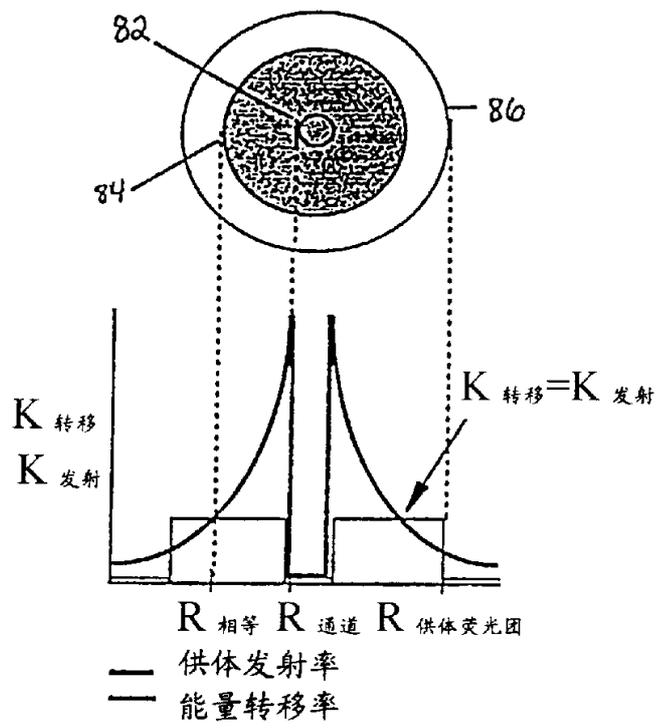


图 6

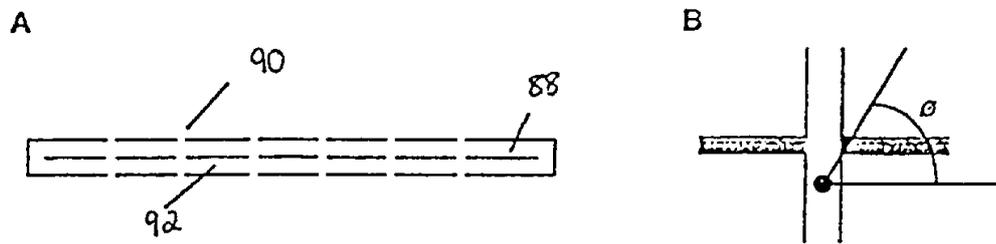


图 7

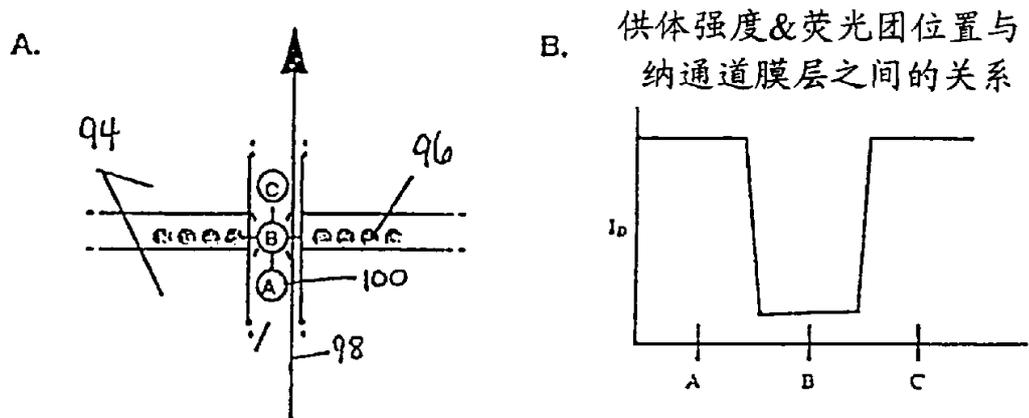


图 8

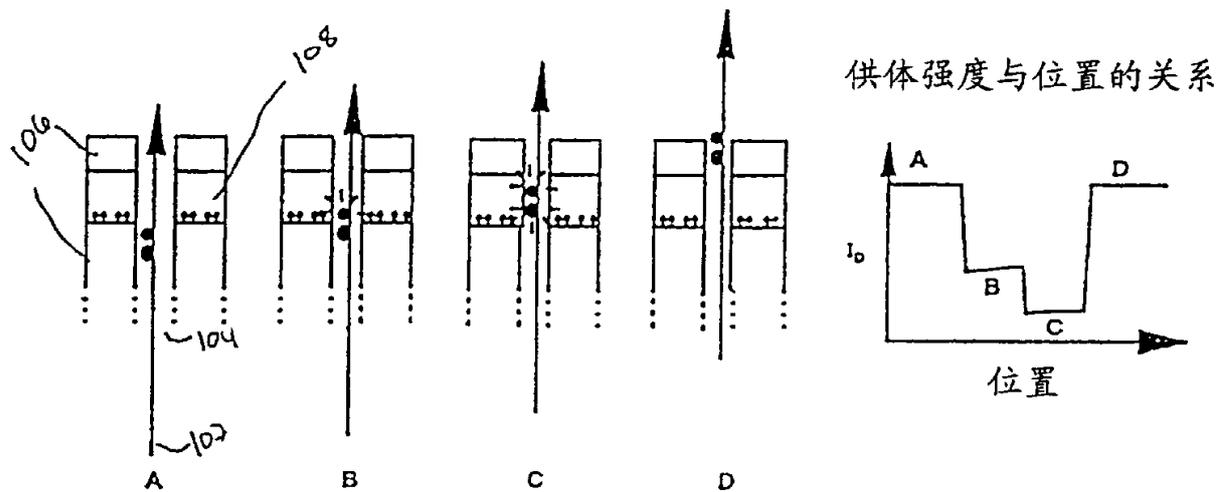


图 9

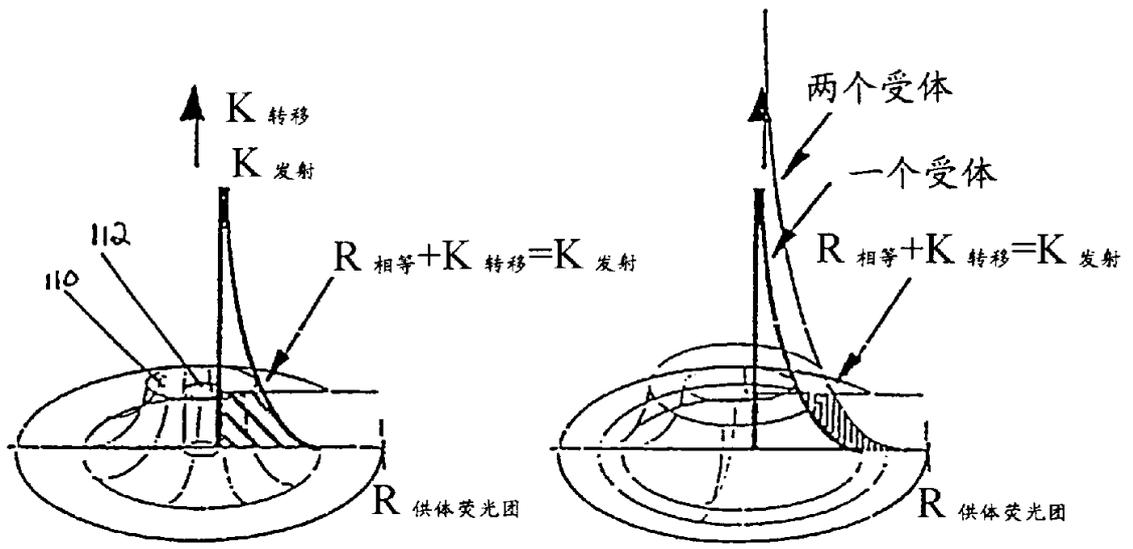


图 10

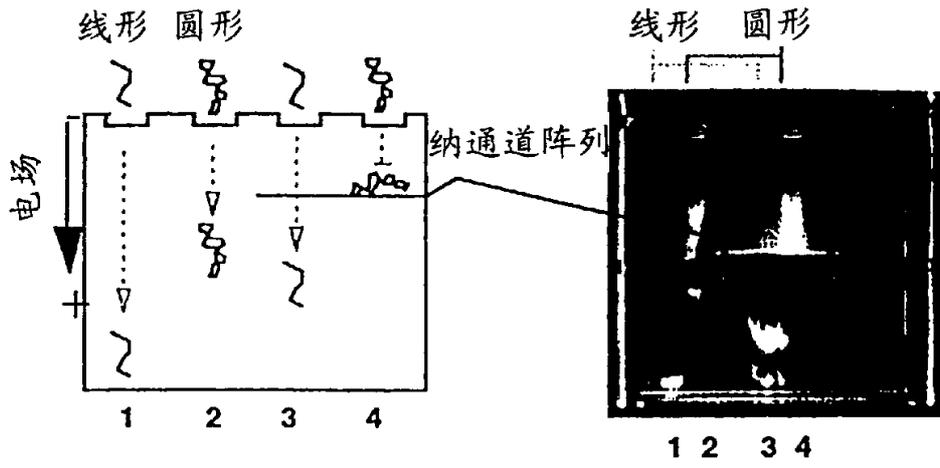


图 11

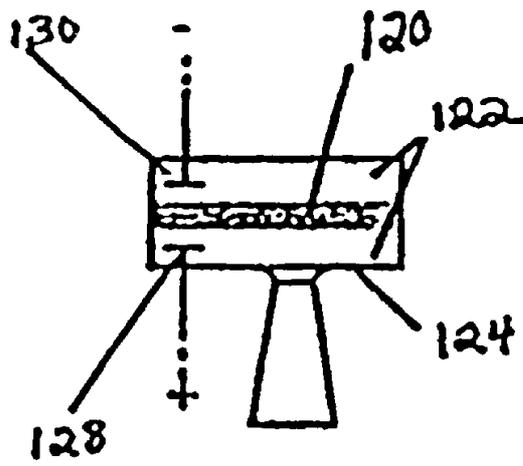


图 12

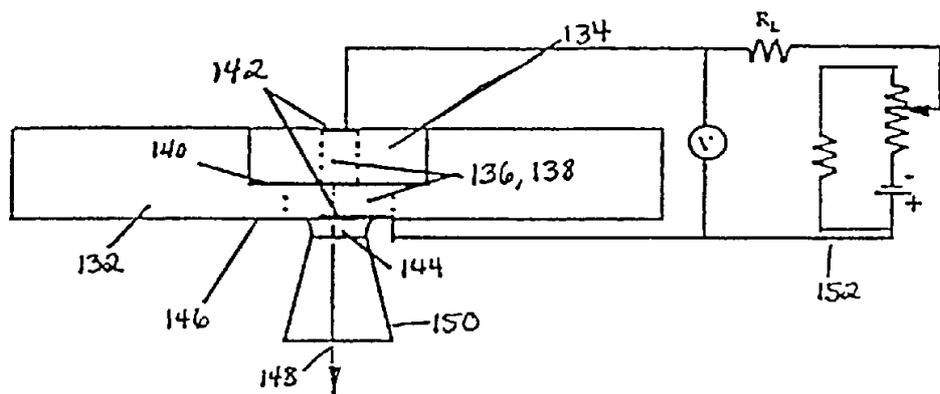


图 13

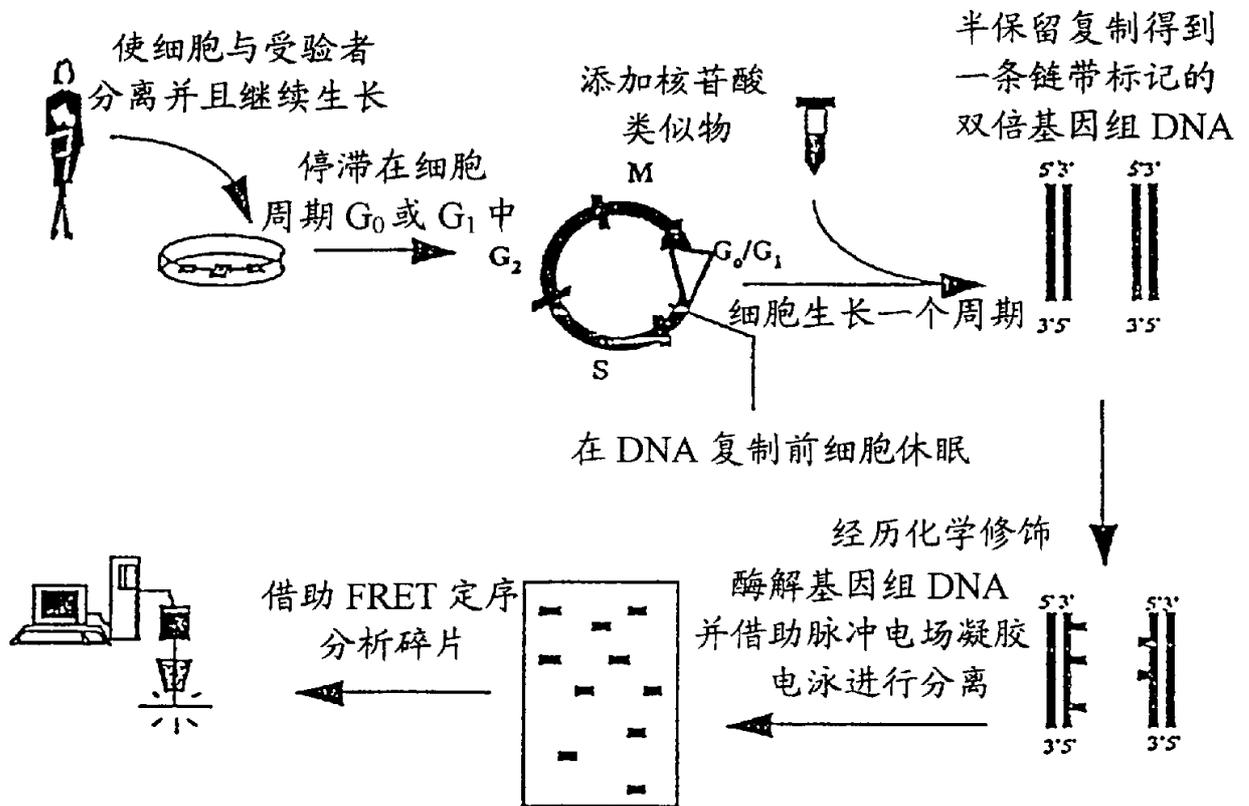


图 14

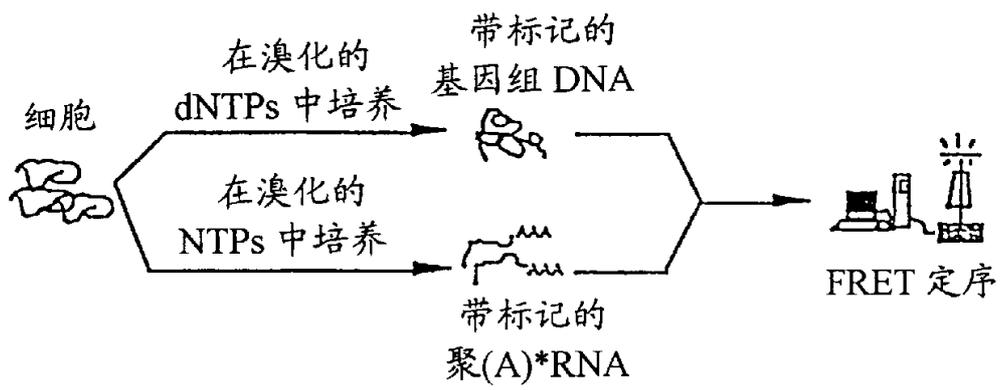


图 15