



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102753708 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201180009326. 5

(22) 申请日 2011. 01. 04

(30) 优先权数据

61/291, 964 2010. 01. 04 US

61/291, 953 2010. 01. 04 US

61/291, 950 2010. 01. 04 US

61/292, 061 2010. 01. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/020117 2011. 01. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/082419 EN 2011. 07. 07

(73) 专利权人 生命科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H·孙 E·S·诺德曼

M·F·奥尔德姆 J·R·奥尼尔

C·康奈尔 U·厄尔曼奈拉

A·N·K·劳 T·柯特瑟格罗

K·J·利瓦克

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 沈端

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

G01N 27/414 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2006/0246497 A1, 2006. 11. 02, 说明书第【0040】-【0055】段, 图 3A.

US 2007/0190543 A1, 2007. 08. 16, 说明书第 165-169, 181 段.

审查员 樊颖

权利要求书1页 说明书30页 附图27页

(54) 发明名称

DNA 测序方法以及用于实现所述方法的检测器和系统

(57) 摘要

在有些实施方案中, 提供了一种分析物检测系统, 其包括纳米通道、电极排列和设置在所述纳米通道中的多个 nanoFET 装置。可以使用多个核酸碱基检测部件, 它们包括多个纳米孔、多个纳米通道、多个杂交探针、它们的组合等。根据本发明的教导的其它实施方案, 使不同的编码的分子与靶 DNA 分子杂交, 并用于检测不同序列沿着靶分子的存在。也提供了一种试剂盒, 所述试剂盒包括编码的分子的混合物。在有些实施方案中, 包括纳米通道、纳米孔等的装置被用于操纵 DNA 分子的运动, 例如, 用于准备 DNA 测序检测。还提供了纳米孔结构和制备它们的方法, 以及使用纳米孔结构进行核酸测序的方法。提供了表面修饰的纳米孔以及制备它们的方法。在有些实施方案中, 提供了用于减慢单链 DNA (ssDNA) 穿过纳米孔的迁移的表面修饰的纳米孔, 以及构造成检测在 ssDNA 链上的多个不同碱基中的每一个的纳米孔。

1. 一种分析物检测系统,其包括:

纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、第一侧面和与所述第一侧面相对的第二侧面;

一对电泳电极,所述一对电泳电极包括在所述第一端部处的第一电泳电极和在所述第二端部处的第二电泳电极;

一对正交电极,所述一对正交电极包括在所述第一侧面处的第一正交电极和在所述第二侧面处的第二正交电极;和

设置在所述通道中的多个纳米场效应晶体管装置,即 nanoFET,其中所述多个 nanoFET 包括至少 4 个不同的 nanoFET,每个 nanoFET 被彼此不同的受体分析物官能化。

2. 根据权利要求 1 所述的分析物检测系统,其另外包括与珠子结合的靶 DNA 分子,其中所述珠子设置在所述纳米通道中。

3. 根据权利要求 1 所述的分析物检测系统,其另外包括与珠子结合的外切核酸酶,其中所述珠子设置在所述纳米通道中。

DNA 测序方法以及用于实现所述方法的检测器和系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以前提交的美国临时专利申请号 61/291,950、61/291,953、61/291,964 和 61/292,061 的优先权利益,它们都在 2010 年 1 月 4 日提交,且它们各自的内容通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本发明的教导涉及 DNA 测序和可用于 DNA 测序的检测器的领域。本发明的教导也涉及操纵 DNA 和其它带电荷的聚合物的运动以及用于实现这种运动的系统的领域。另外,本发明的教导涉及使用纳米孔(nanopore)的 DNA 检测领域。

背景技术

[0004] DNA 测序遗传分析方法已经是复杂的、昂贵的和冗长的。用于进行 DNA 测序的检测器已经是昂贵的,且需要光学部件。对核酸测序的方法已经要求对靶核酸链的多个拷贝测序。需要花费更低的、耗时更少的 DNA 测序方法,也需要花费更低的检测器,该检测器不需要标记 DNA。还需要复杂度更低的、花费更低的 DNA 操纵方法和系统,以及操纵 DNA 分子来实现 DNA 测序的方法和系统。此外,需要更快的且不要求大量扩增待分析的目标链的核酸测序方法和系统。

发明内容

[0005] 根据不同的实施方案,提供了一种分析物检测系统,其包括纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部。可以提供一对电泳电极,以使带电荷的分析物穿过所述纳米通道运动。所述电泳电极可以包括在第一端部处的第一电泳电极和在第二端部处的第二电泳电极。也可以提供一对正交电极,其包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极,或者,在一侧上的第一正交电极和在另一侧上的第二正交电极。可以前两对电极没有占用的轴线上提供另一对正交电极。另一个选择是,在相同平面中具有第二和第三电极对。在有些实施方案中,所述检测器可以包括:设置在纳米通道中的多个纳米场效应晶体管装置(nanoFET)。在有些实施方案中,所述 nanoFET 中的一个或多个可以包括垂直的 FET,例如,在锗层上、在硅柱上垂直排列的 FET 和 / 或包含 q- 尖形状(包括金-铝合金尖)的 FET。所述多个 nanoFET 可以包括至少 4 个不同的 nanoFET,每个被彼此不同的受体分析物官能化。在有些实施方案中,靶 DNA 分子可以结合在珠子上,且所述珠子可以设置在纳米通道中,以在测序方法过程中保留靶分子。在有些实施方案中,外切核酸酶可以结合在珠子上,且所述珠子可以设置在纳米通道中。

[0006] 根据不同的实施方案,提供了一种 DNA 测序系统,其包括多个核酸碱基检测部件和忆阻器网络。在有些实施方案中,所述忆阻器网络可以与所述多个检测器发生电通信,且可以包括三维网络。所述多个核酸碱基检测部件可以包括多个纳米孔、多个纳米通道、多个杂交探针、它们的组合等。在有些实施方案中,所述多个核酸碱基检测部件包括至少 4 个检

测器,且所述 4 个检测器可以包括:构造成检测腺嘌呤的第一检测器、构造成检测胞嘧啶的第二检测器、构造成检测鸟嘌呤的第三检测器和构造成检测胸腺嘧啶的第四检测器。在有些实施方案中,一个额外的检测器或所述 4 个检测器之一可以构造成检测尿嘧啶。在其它实施方案中,一个或多个额外的检测器或所述 4 个检测器之一可以构造成检测其它核苷,诸如肌苷或假尿苷。在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测任意天然的或合成的核酸类似物。在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测用作标志物或标记的蛋白、RNA、碳水化合物、其它生物分子或其它分子,其中用作标志物或标记的蛋白、碳水化合物、其它生物分子或其它分子与单链或双链核酸分子的一部分杂交、结合或缔合。在有些实施方案中,所述忆阻器网络可以包括忆阻器/晶体管混合网络。在有些实施方案中,忆阻器和/或忆阻器混合电路执行多个传感器的实时数据分析,所述传感器在 DNA 测序系统的纳米孔或纳米通道检测部位处。

[0007] 根据本发明的教导的不同实施方案,可杂交的寡核苷酸(在本文中称作经编码的分子)可以与靶 DNA 分子杂交,并用于检测不同序列沿着靶分子的存在。例如,可以使靶 ssDNA 分子接触不同的经编码的分子的混合物,并可以使用纳米孔、纳米通道、它们的组合等来检测反应产物。可以选择和/或构造可杂交的经编码的分子,以影响穿过检测器(例如,穿过纳米孔检测器中的电极对途径)的离子电流传播。每个经编码的杂交分子可以造成穿过电途径的电信号,所述信号可以检测到,并用于揭示关于靶物的信息。从检测的信号收集的信息可以用于测定靶物序列的一部分和那些部分沿着靶物长度的位置。在有些实施方案中,与每个经编码的分子有关的信号可以是独特的,这允许直接鉴别经编码的分子。在其它实施方案中,可能存在由经编码的分子产生的电信号的图谱。所述图谱可以源自:来自不同检测器的不同信号、来自相同检测器的不同信号水平、来自一个或多个检测器(其测定经编码的分子不邻近检测器或与检测器相互作用)的检测、或它们的任意组合。根据本发明的教导的不同实施方案,也提供了包含经编码的分子的混合物的试剂盒,和使用所述试剂盒进行基因分型的方法。所述试剂盒可以包括一起地或单独地包装的经编码的分子。所述试剂盒也可以含有一种或多种标准品、试剂、缓冲液、它们的组合等。

[0008] 根据不同的实施方案,本发明的教导提供了 DNA 测序和基因分型的方法,其中使用本文所述的 DNA 测序系统。

[0009] 根据本发明的教导的另一个方面,提供了操纵 DNA 分子或其它带电荷的聚合物的装置、系统和方法。在有些实施方案中,可以操纵 DNA,以相对于检测器进行定位,从而实现聚合物的 DNA 测序。在有些实施方案中,提供了用于定向 DNA 分子的装置,所述装置包括纳米孔或纳米通道。

[0010] 根据不同的实施方案,提供了一种 DNA 分子运动装置,所述装置包括纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部。还提供了一对平移电极,包括在纳米通道的第一端部处的第一平移电极和在纳米通道的第二端部处的第二平移电极。提供了至少 3 对正交电极,每对包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极。可以提供控制装置,用于单个地控制施加于每个电极对的至少一个电极上的电压。在有些实施方案中,所述纳米通道装有电泳介质,且所述平移电极对可以包括一对电泳电极。

[0011] 根据不同的实施方案,本发明的教导提供了 DNA 测序和基因分型的方法,其中使

用本文所述的 DNA 测序系统。

[0012] 根据不同的实施方案,提供了用于 DNA 测序的 DNA 分子操纵系统。所述系统可以用于控制 DNA 分子在测序方法过程中的运动和速度。在有些实施方案中,提供了一种 DNA 操纵系统,该系统包括纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部。可以提供一对电泳电极,以使带电荷的分析物穿过所述纳米通道运动。所述电泳电极可以包括在第一端部处的第一电泳电极和在第二端部处的第二电泳电极。也可以提供一对正交电极,其包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极。在有些实施方案中,所述系统可以包括:设置在纳米通道中的多个纳米场效应晶体管装置(nanoFET)。所述多个 nanoFET 可以包括至少 4 个不同的 nanoFET,每个被彼此不同的受体分析物官能化。在有些实施方案中,靶 DNA 分子可以结合在珠子上,且所述珠子可以设置在纳米通道中,以在测序方法过程中保留靶分子。在有些实施方案中,外切核酸酶可以结合在珠子上,且所述珠子可以设置在纳米通道中。

[0013] 根据本发明的教导的不同实施方案,提供了一种 DNA 分子操纵装置,其使用隧穿电流作为可检测的信号,用于测定 DNA 分子的单个核酸碱基。所述装置可以包括内部冗余部件(built in redundancy feature),使得碱基可以被读取多次。在有些实施方案中,提供了多个电极结构,且在有些实施方案中,所述 DNA 相对于同一个电极运动多次。在有些实施方案中,使用电场或其它装置使 DNA 运动,然后使用正交电场保持就位。

[0014] 根据不同的实施方案,使用键或其它机理,在 DNA 分子的一端或两端伸长 DNA 链,然后使扫描头相对于结合的 DNA 移动。在有些实施方案中, DNA 结合在 DNA 链尺度的刚性结构的表面上,例如,结合在纳米管或纳米珠子上,然后使用纳米定位台,使 DNA 与所述结构一起移动经过固定的扫描头。在有些实施方案中,排列一对或碳纳米管,并间隔大约单个碱基的长度,并使 DNA 穿过 2 个碳纳米管运动,所述纳米管用作电极。在有些实施方案中, 2 个纳米管定向成直角,使得 DNA 链被 1 个纳米管或纳米柱定位,且碱基特异性的隧穿电流被另一个纳米管读出。

[0015] 根据不同的实施方案,本发明的教导提供了 DNA 测序和基因分型的方法,其中使用本文所述的 DNA 测序系统。

[0016] 根据本发明的教导的其它不同实施方案,提供了可用于核酸测序的纳米孔,以及用于形成纳米孔结构的方法。所述方法可以包括:处理在基质中形成的纳米孔,所述基质包括至少一个硅或二氧化硅材料层。所述纳米孔可以包括具有暴露的硅烷醇基的内侧壁。在一个替代实施方案中,可以使用纳米通道。可以使暴露的硅烷醇基与含有氨基的化合物(诸如含有氨基的烷氧基硅烷)反应,以将硅烷醇基转化成含有氨基的官能团。然后,可以使氨基与 N-羟基琥珀酰亚胺的丙烯酸酯和丙烯酰胺的共聚产物反应。丙烯酸的 N-羟基琥珀酰亚胺酯会与氨基反应。在有些实施方案中,可以用五氟苯酚的丙烯酸替代 N-羟基琥珀酰亚胺的丙烯酸酯。所述反应会导致共聚产物通过酰胺化共价结合在内侧壁上。得到的表面处理聚合物可以用于影响 ssDNA 分子穿过纳米孔的迁移速率,用于在 ssDNA 穿过纳米孔时使它延长,用于赋予 ssDNA 优先朝向,用于将 ssDNA 物理地限制在纳米孔内的区域内,用于减少传感元件和 ssDNA 之间的分离,用于减少纳米孔的有效大小,从而实现更大的生产容差、更少需求的生产工艺。因而,与检测处于未伸长方向的碱基时相比,伸长的 ssDNA 的单个碱基可以被纳米孔中的检测部分更容易地检测到。

[0017] 根据不同的实施方案,本文使用的术语“纳米孔”也适用于纳米通道的概念。术语“纳米孔”不包括关于几何形状、长宽比、大小、形状、横截面剖面等的任何限制,但是表征“纳米孔”自身的几何形状的突出尺寸小于 0.1 微米。纳米孔可以是“贯通的”或“不通的”,由单一或多种材料组成,所述材料排列成例如层或其它形式,每个层由一种或多种材料制成。所述层(象单个原子一样薄)可以具有非恒定的厚度,且脱离基本上平面的几何形状。导电材料(“电极”)可以相对于局部纳米孔侧壁几何形状齐平,可以向孔的中央轴线伸出,或可以在周围方向倒凹。在有些实施方案中,所述电极层不需要覆盖整个平面,所述层的仅一部分可以暴露于纳米孔内。可以将多个单独的电极定位在同一层上,并使各个部分分别地暴露于纳米孔的表面上。

[0018] 根据不同的实施方案,提供了一种对贯穿基质的纳米孔进行表面修饰的方法,所述基质包括用作电极层的至少一个导体层,所述导体可以是碳纳米管、石墨烯层、InSnO、贵金属或贵金属合金。所述电极层例如可以与电压源发生电连接,可以使用造成所述电极起阳极作用的应用电势。纳米孔的内侧壁的至少一部分可以由至少一个暴露的表面层来限定。在有些实施方案中,所述层可以包括金。根据不同的实施方案,暴露的贵金属或其合金可以在其暴露的表面处与硫醇化的化合物(例如, α -巯基-多元醇)反应,从而形成与暴露的金属表面的硫连接。所述硫醇化的化合物也可以包括末端核酸碱基亲和部分,所述部分可以实现非共价的、物理的、暂时的且可逆的亲合力。尽管在这点上在本文中提及结合,应当理解,所述选择性的缔合是非共价的、物理的、暂时的且可逆的。在本文中,“结合”可以表示“非零的 / 正亲合力”,短语“暂时结合”或者可以表示亲合力驱动的相互作用或感知,它们的实际结合仅仅是许多可能的相互作用或感知机会之一。在与互补的核酸碱基暂时选择性地结合以后,所述结合可能影响穿过电极的电流或电压。然后可以检测和分析电流或电压的变化,以确定哪类碱基与所述结合部分暂时结合。此外,可以感知电信号(例如,DC 信号、AC 信号或二者)的变化,所述变化源自多种电传导性质(例如,电阻、电容、电感、极化矩、隧穿电流等)中的任一种的变化。

[0019] 在有些实施方案中,提供了在基质中形成的纳米孔,其中所述基质包括多个隔开的层,每个层包括贵金属或贵金属合金。在有些实施方案中,所述多个层中的至少一个可以包括暴露的表面,所述表面具有与其结合的第一种核酸碱基结合剂(亲和剂)。所述多个层中的至少一个不同的层可以包括暴露的表面,所述表面具有与其结合的、不同于第一种的第二种核酸碱基结合剂(亲和剂)。所述第一种和第二种核酸碱基结合剂(亲和剂)中的每一种可以包括,例如,包含至少一种脱氧核糖核苷酸磷酸酯的硫醇化的二醇。可以将所述纳米孔结构构造造成,当所述第一种或第二种核酸碱基结合剂(亲和剂)与穿过纳米孔的 ssDNA 分子的互补碱基暂时结合时,可以检测到穿过各个电极的电流、电压或二者的变化,并用于鉴别暂时结合的碱基。

[0020] 根据不同的实施方案,提供了一种方法,所述方法包括:贯穿基质,形成纳米孔,所述基质包括至少一个石墨烯层。所述纳米孔可以包括内侧壁,所述内侧壁的至少一部分包括暴露的石墨烯表面。所述暴露的石墨烯表面可以通过反应来修饰,所述反应使核酸碱基结合剂(亲和剂)与所述表面共价地结合。所述结合剂(亲和剂)可以包括羰基连接部分和脱氧核糖核苷酸磷酸酯。在有些实施方案中,所述磷酸酯可以包括二磷酸酯或三磷酸酯。在一个替代实施方案中,所述结合剂可以直接地连接到石墨烯上,无需连接基团。在另一个实

实施方案中,所述结合剂可以由核苷碱基组成,不含有作为常规 dNTP 的一部分的糖或磷酸酯基团。

[0021] 根据本发明的教导的其它实施方案,提供了贯穿基质形成的纳米孔。所述纳米孔可以包括内侧壁,且可以具有直径。所述内侧壁可以是表面修饰的,以具有与其表面化学结合的聚合物,所述聚合物沿半径向内(例如,向纳米孔的半径中心)延伸。所述聚合物可以向内延伸这样的距离:所述距离是直径长度的至少 25%,例如,直径长度的约 35% 或约 45%。所述直径可以是 100nm 或更小,例如,20nm 或更小或 10nm 或更小。聚合物可以包括任一种本文所述的纳米孔表面修饰聚合物。

[0022] 在本发明的教导的其它实施方案中,提供了一种贯穿基质形成的多层纳米孔。所述纳米孔可以包括内侧壁,所述内侧壁至少部分地由第一层限定。所述第一层可以包括在内侧壁处的暴露的表面。在有些实施方案中,所述暴露的表面可以限定一个电极、一个或多个对电极和一个或多个电介质,所述电介质将所述电极与所述一个或多个对电极隔开。在有些实施方案中,至少 2 个对电极被限定在纳米孔内侧壁处,且每个可以被不同的核酸碱基结合剂(亲和剂)进行表面修饰,所述结合剂共价地键合在暴露的表面处。利用这样的构型,所述 2 种不同的核酸碱基中的每一种可以被第一层电极鉴别出。具有多个不同的电极层的构型可以用于检测所有可能的核酸碱基,和 / 或提供可用于验证结果的检测冗余。参考附图将会更完整地理解本发明的教导的这些和其它方面。

附图说明

[0023] 图 1 是根据本发明的教导的不同实施方案的检测方案的一个示意图,其中使用 4 个连续排列的 nanoFET 堆进行 DNA 测序,每个堆包括 4 个分别用 G、A、T 和 C 受体分子官能化的 nanoFET。

[0024] 图 2 是根据本发明的教导的不同实施方案的检测系统的一个示意图,所述检测系统包括:电泳通道、排列在所述通道中的多个官能化的 nanoFET、电路和要在所述纳米通道中测序的 DNA 靶分子。

[0025] 图 3A-3B 示意地图解了根据本发明的教导的不同实施方案,一种制备要用于 DNA 测序使用的 nanoFET 芯片中的珠子、酶和靶 DNA 的方法。

[0026] 图 4 示意地图解了纳米孔检测系统、单链 DNA 支架形式的靶分子和与 DNA 支架的不同部分杂交从而沿着支架形成双链区段的多个不同的可杂交的经编码的分子。

[0027] 图 5A-5C 描绘了显示 3 对电极的 DNA 分子操纵纳米通道,其中电场相位和 DNA 间距是处于完美对准(图 5A)、没有对准(图 5B)和处于调谐的对准(图 5C),分别根据本发明的教导的不同实施方案。

[0028] 图 6A-6C 描绘了显示 3 对电极的 DNA 分子操纵纳米孔,其中电场相位和 DNA 间距是对准的(图 6A)、异相(图 6B)和重新对准的(图 6C),分别根据本发明的教导的不同实施方案。

[0029] 图 7 描绘了显示 3 对电极、一对平移电极和一个势垒的 DNA 分子操纵纳米孔,这是根据本发明的教导的不同实施方案。

[0030] 图 8A-8C 描绘了 DNA 分子操纵纳米孔两相装置,其显示出一个层中的 3 对(一组)电极和在另一个层中的 3 对(一组)电极,其中所述 2 个组彼此异相(图 8A)、所述 2 个组彼

此异相(图 8B) 和所述 2 个组通过场强度的变化重新对准(图 8C)。

[0031] 图 9A-9C 分别是显示出电极排列和电极间隙的 DNA 分子操纵通道的顶视图、侧视图和端视图,根据本发明的教导的不同实施方案。

[0032] 图 10A-10C 分别是显示出电极排列和隧穿电极的 DNA 分子操纵通道的顶视图、侧视图和端视图,根据本发明的教导的不同实施方案。

[0033] 图 11A-11C 分别是显示出电极排列和角电极的 DNA 分子操纵通道的顶视图、侧视图和端视图,根据本发明的教导的不同实施方案。

[0034] 图 12A-12C 分别是盘旋通道形式的 DNA 分子操纵通道的顶视图、侧视图和端视图,并显示了电极排列和隧穿电极,根据本发明的教导的不同实施方案。

[0035] 图 13A-13C 分别是 DNA 分子操纵结合槽和用于扫描所述槽而设置的原子力显微镜的顶视图、侧视图和端视图,根据本发明的教导的不同实施方案。

[0036] 图 14A-14C 分别是 DNA 分子拉长结构和电极排列的顶视图、侧视图和端视图,根据本发明的教导的不同实施方案。

[0037] 图 15 是根据本发明的教导的不同实施方案的双纳米管构型的侧视图,其中 DNA 分子穿过 2 个碳纳米管(它们起隧穿电极的功能)来拉长, DNA 的单个碱基的距离隔开所述纳米管,并使用所述管之间的隧穿电流来表征间隙中的分离的碱基。

[0038] 图 16 是根据本发明的教导的不同实施方案的双纳米管构型的侧视图,其中穿过可移动的纳米管尖部来拉长 DNA 分子,且另一个碳纳米管包括固定的柱,在固定的纳米管柱和可移动的纳米管尖部之间构造出间隙,所述纳米管尖部从侧面接近柱,且在所述管之间的隧穿电流用于表征间隙中的分离的碱基。

[0039] 图 17 是根据本发明的教导的不同实施方案的固定的柱纳米管和原子力显微镜(AFM)尖部构型的侧视图,其中绕着固定的柱纳米管和原子力显微镜(AFM)尖部构型拉长 DNA 分子,将在固定的柱纳米管和 AFM 尖部之间的间隙构造成,每次将刚好一个碱基呈现给 AFM 尖部。

[0040] 图 18 是根据本发明的教导的不同实施方案的检测方案的示意图,其中使用角结构和纳米芽(nanobud)进行 DNA 测序,且在显示的实施例中,所述纳米芽被核酸受体分子官能化。

[0041] 图 19 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔移动的 ssDNA 分子的横截面侧视图的示意图。

[0042] 图 20 是沿着图 19 的线 2-2 做出的、图 19 所示的纳米孔的顶视图,并描绘了物理孔径和有效孔径。

[0043] 图 21 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔移动的 ssDNA 分子的横截面侧视图的示意图,其中所述纳米孔包括与电极表面结合的选择性的核酸碱基结合剂(亲和剂)。

[0044] 图 22 是沿着图 21 的线 4-4 做出的、图 21 所示的纳米孔和分子的顶视图,显示了根据本发明的教导的不同实施方案的电极和对电极构型。

[0045] 图 23 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔移动的 ssDNA 分子的横截面侧视图的示意图,其中所述纳米孔包括选择性的核酸碱基结合剂(亲和剂)以结合 4 种不同的核酸碱基 A、C、G、T,其中所述碱基结合剂(亲和剂)结合 4 种不同的各自的电极。

[0046] 图 24 是沿着图 23 的线 6-6 做出的、图 23 所示的纳米孔和分子的顶视图,显示了在根据本发明的教导的不同实施方案的构型中的 2 个电极和 1 个对电极。

[0047] 图 25 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔移动的 ssDNA 分子的横截面侧视图的示意图,其中所述纳米孔包括单个单独的石墨烯层。

[0048] 图 26 是根据本发明的教导的不同实施方案可以用作电极层的石墨烯层的示意图。

[0049] 图 27 是图 26 的一部分的放大图,显示了石墨烯层中的核之间的平均距离。

[0050] 图 28 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图,所述方法可以用于制备根据本发明的教导的不同实施方案的纳米孔,其中对在二氧化硅层的暴露的内侧壁上的硅烷醇基进行氨基甲硅烷基化。

[0051] 图 29 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图,所述方法可以用于制备根据本发明的教导的不同实施方案的纳米孔,其中通过使丙烯酸的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯和 N, N- 二甲基丙烯酰胺的反应产物与暴露的表面上的氨基反应,使捕集或缠绕共聚物化学地键合在图 28 所示的纳米孔的暴露的内表面上。

[0052] 图 30 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图,所述方法可以用于制备根据本发明的教导的不同实施方案的纳米孔,其中在图 29 所示的纳米孔的内侧壁上的捕集或缠绕共聚物用氨基结束的多元醇进一步加帽,和 / 或与二氨基结束的多元醇交联。

[0053] 图 31 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图,所述方法可以用于制备根据本发明的教导的不同实施方案的纳米孔,其中通过与硫醇化的核酸碱基结合剂(亲和剂)反应,对纳米孔的金阳极层的暴露的内侧壁进行表面修饰。

[0054] 图 32A-32F 显示了根据本发明的教导的不同实施方案的 6 种各自的硫醇化的多元醇的化学结构,所述多元醇可以用于缀合在金阳极的表面上的核酸结合剂(亲和剂)。

[0055] 图 33A-33D 显示了根据本发明的教导的不同实施方案的 4 种各自的核酸结合剂(亲和剂)的化学结构,所述结合剂可以与本文所述的不同的糖 / 磷酸酯部分和硫醇化的多元醇反应,以将通过硫醇连接而结合的核酸结合剂(亲和剂)缀合到金阳极的表面上。

[0056] 图 34 显示了一种脱氧核糖核苷酸三磷酸酯,其可以包括在图 33A-33D 中所示的碱基之一,且可以用作根据本发明的教导的不同实施方案的核酸结合剂(亲和剂)。

[0057] 图 35 和 36 分别显示了 PNA 部分和 DNA 部分,所述部分可以用于形成根据本发明的教导的不同实施方案的核酸结合剂(亲和剂)。

具体实施方式

[0058] NanoFET、纳米通道和纳米孔

[0059] 根据不同的实施方案,提供了一种分析物检测系统,其包括纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部,或者,在一侧上的第一正交电极和在另一侧上的第二正交电极。提供了一对电泳电极,其包括在第一端部处的第一电泳电极和在第二端部处的第二电泳电极。也提供了一对正交电极,其包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极。可以在前两对电极没有占用的轴线中提供另一对正交电极。另一种选择是,具有在相同平面中的第二和第三电极对。在所述纳米通道中设置了多个设置于通道中的纳米场效应晶体管装置(nanoFET)。在有些实

实施方案中,一个或多个 nanoFET 可以包括垂直的 FET,例如,在锗层上、在硅柱上垂直排列的 FET 和 / 或包含 q- 尖形状(包括金 - 铝合金尖)的 FET。所述多个 nanoFET 可以包括至少 4 个不同的 nanoFET,每个被彼此不同的受体分析物官能化。在有些实施方案中,靶 DNA 分子可以结合在珠子上,且所述珠子可以设置在纳米通道中,以在测序方法过程中保留靶分子。在有些实施方案中,外切核酸酶可以结合在珠子上,且所述珠子可以设置在纳米通道中。

[0060] 根据不同的实施方案,提供了一种 DNA 测序装置,其包括 nanoFET,所述 nanoFET 已经被官能化,以检测在 nanoFET 的表面上的电荷变化。各个 nanoFET 的表面可以用分析物受体分子官能化,所述受体分子表现出的对目标分析物的亲和力高于相同的 nanoFET 在没有所述分析物受体分子的情况下所具有的亲和力。在有些实施方案中,所述受体分子可以包括核酸碱基结合部分,所述部分可以暂时结合靶核酸的碱基,例如,通过氢键合。可以使用其它结合部分。这种官能化的 nanoFET 可以以连续方式在纳米通道中排列,例如,如图 1 所示。在其它实施方案中,所述检测可以源自电场与分子的相互作用,所述分子已经与 nanoFET 暂时地结合。所述场可以是 DC 场、AC 场或 DC 和 AC 场的组合。在其它实施方案中,可以用分析物受体分子官能化紧密接近的电极,所述分析物受体分子表现出的对目标分析物的亲和力高于同一个电极在没有所述分析物受体分子的情况下所具有的亲和力。在有些实施方案中,所述受体分子可以包括核酸碱基结合部分,所述部分可以暂时结合靶核酸的碱基,例如,通过氢键合。可以使用其它结合部分。在其它实施方案中,可以官能化 nanoFET 和电极。在有些实施方案中,所述相同部分可以用于官能化 nanoFET 和电极。在其它实施方案中,不同的部分可以用于官能化 nanoFET 和电极。在有些实施方案中,与 nanoFET 接近的电极可以是在 nanoFET 的 1nm 以内。在其它实施方案中,与 nanoFET 接近的电极可以距离 nanoFET 1nm 至 10nm。在其它实施方案中,与 nanoFET 接近的电极可以距离 nanoFET 10nm 至 100nm。

[0061] 如图 1 所示,通过施加电场,并使分析物暂时结合修饰的 nanoFET 的官能化的表面,可以使分析物穿过纳米通道迁移。所述暂时结合可以引起独特的物理信号,诸如电导率。可以使用其它运输方法,并包括,例如,流体流、向心力、它们的组合等。在有些实施方案中,用 A 的受体分子官能化 nanoFET A,用 B 的受体分子官能化 nanoFET B,用 C 的受体分子官能化 nanoFET C,用 D 的受体分子官能化 nanoFET D。通过对准 A、B、C 和 D nanoFET,可以构建 A、B、C 和 D 的单个检测模块。在有些实施方案中,可以连续地连接多个检测模块,以增加检测准确度,因为可以使同一个分析物结合多个 nanoFET 多次。通过使用每种类型的多个 nanoFET,可以检测分析物多次,从而增加灵敏度和准确度。在有些实施方案中,可以使用不同数目的 nanoFET,所述 nanoFET 被不同的分子官能化。作为一个非限制性实例,如果 A 比 B、C 或 D 更难以检测,与用 B、C 或 D 官能化的 nanoFET 检测器的数目相比,可以用 A 官能化更多的 nanoFET 检测器。可以使用官能化的检测器的任意组合和任意次序。在有些实施方案中,可以使用与 nanoFET 接近的、不同地官能化的电极的任意组合和任意次序。在其它实施方案中,可以使用类似地或不同地官能化的电极和 nanoFET 的任意组合和次序,其中所述各自接近的电极和 nanoFET 中的每一个可以被官能化。在其它实施方案中,可以使用类似地或不同地官能化的电极和 nanoFET 的任意组合和次序,其中所述各自接近的电极和 nanoFET 中的一些可以被官能化。

[0062] 所述装置和方法可以用于任意分析物检测,例如,通过连接适当的不同的受体分

子。DNA 测序在本文中仅用于例证、而不是限制本发明的教导。在有些实施方案中,所述受体分子可以包括与要检测的分析物碱基互补的碱基,例如,T 对 A、A 对 T、C 对 G、G 对 C。在有些实施方案中,所述受体分子可以包括合成的受体,诸如 PNA 或其它非-DNA 受体。在有些实施方案中,一个额外的检测器或所述 4 个检测器之一可以构造成检测尿嘧啶。在其它实施方案中,一个或多个额外的检测器或所述 4 个检测器之一可以构造成检测其它核苷,诸如肌苷或假尿苷。在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测任意天然的或合成的核酸类似物。在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测用作标志物或标记的蛋白、RNA、碳水化合物、其它生物分子或其它分子,其中用作标志物或标记的蛋白、碳水化合物、其它生物分子或其它分子与单链或双链核酸分子的一部分杂交、结合或缔合。在其它实施方案中,通过使用适当的分析物受体分子,所述分析物检测系统可以用于测定蛋白的序列或部分序列。

[0063] 在有些实施方案中,使用纳米丝晶体管、碳管晶体管、石墨烯晶体管或其它更标准的基于半导体的晶体管,可以制造 nanoFET。在有些实施方案中,可以在 nanoFET 附近进行来自 nanoFET 的电流的额外放大,以使噪音最小化。在有些实施方案中,可以使用放大器,诸如电压放大器、电流放大器、积分仪、它们的组合等。在有些实施方案中,可以制作进行额外放大的放大器(其邻近 nanoFET),作为在其中制造纳米通道和 / 或 nanoFET 的相同过程集合的一部分。在有些实施方案中,可以制作进行额外放大的放大器(其邻近 nanoFET),作为与用于制造纳米通道和 / 或 nanoFET 的那些不同的过程集合的一部分,但是仍然可以是相同结构的一部分。在其它实施方案中,可以制作进行额外放大的放大器(其邻近 nanoFET),作为单独结构的一部分。所述单独的结构可以是印刷电路板、混合电路。

[0064] 根据不同的实施方案,可以用外切核酸酶顺序地消化 DNA 分子,以形成带负电荷的核苷酸单磷酸酯产物。在一个示例性的实施方案中,可以将所述产物导入纳米通道中或纳米孔中,所述纳米孔嵌有被 G、A、T、C 和 / 或其它核苷的受体分子官能化的 nanoFET。通过调节所述电泳电极产生的电场强度,或通过调节固定化在 nanoFET 上的受体分子的亲和力,可以结合持续时间。序列信息是 DNA 测序中的最重要的信息,所以所述结合可以是短暂的事件,其可以用于防止序列信息的相位误差。

[0065] 为了实现有效的检测,通过在除了流动方向以外的方向施加电场,可以使核苷酸集中于 nanoFET 上。图 2 显示了一个示例性的排列,其中将正交电极排列成,下拉带负电荷的产物分析物至纳米通道 10 的底部,并将电泳电极排列在纳米通道 10 的相对端部,以使产物穿过纳米通道移动,并经过 4 个不同的 nanoFET 12、13、14 和 15。NanoFET 12、13、14 和 15 可以如本文所述官能化,或用包含核酸碱基和连接部分(例如,硫醇化的二醇连接)的核酸碱基结合剂连接至金阳极 nanoFET 表面上。如图 2 所示,可以提供对电极 18、20、22 和 24,以分别与 nanoFET 12、13、14 和 15 形成电极对。在有些实施方案中,这如下实现:建立非常小的通道,dNTP 可以穿过所述通道移动,例如,小至 5nm x 100nm 的通道。在其它实施方案中,所述纳米通道的宽度可以大于 5nm,其中 nanoFET 或电极之一被构造在纳米通道的一个壁上,而 nanoFET 或电极中的另一个可以构造在 AFM (原子力显微镜)的尖部上。然后将 AFM 的尖部构造成放在纳米通道内。AFM 的尖部可以构造成,相对于在纳米通道的壁上的 nanoFET 或电极之一是可调节的。可以使用多个 AFM 尖部,其中许多尖部可以一起调节,例如 2、4、8 或更多个尖部可以构造成一起调节。或者,多个 AFM 尖部之一可以是可单个

地调节的。在其它实施方案中,可以用另一个电极替换 nanoFET,使得 2 个电极可以构成一对,以测量穿过样品分子的隧穿电流。隧穿电流电极之一或二者可以被与样品分子相互作用的部分官能化。在隧穿电极对中的 2 个电极可以被相同的部分官能化,或被在隧穿电极对中的每个电极上的不同的部分官能化。

[0066] 在有些实施方案中,可以垂直于 nanoFET 所位于的平面施加电场,以确保它们会与在 nanoFET 上的受体分子相互作用。在有些实施方案中,可以去除负责穿过纳米通道运输 dNTP 的场,使得存在足够相互作用和测量的时间。在有些实施方案中,可以振荡正交场,例如,与电泳场的变化同步,从而允许与 nanoFET 相连的亲分子或隧穿电极相互作用。在有些实施方案中,可以调节正交场,以改变核苷酸的结合或解离的速率。在有些实施方案中,所述正交场可以构造成处于这样的频率:所述频率与样品分子的一部分的振荡共振。在有些实施方案中,所述正交场的频率可以在一定范围内变化,使得在已经结合到电极、隧穿电极或 nanoFET 之一上的样品分子或分析物的目标部分之间可以测定出检测的隧穿电流或 nanoFET 中的电流的差异,这是由于与电极、隧穿电极或 nanoFET 和目标分析物结合的受体的亲和力高于对样品分子或分析物的其它非目标部分的亲和力。在有些实施方案中,在检测中的差异可能源自隧穿电流或穿过 nanoFET 的电流的量的变化。在其它实施方案中,所述差异可能导致隧穿电流或穿过 nanoFET 的电流的相位的变化。在其它实施方案中,检测的差异可以源自隧穿电流或穿过 nanoFET 的电流的量和相位的组合。可以控制温度、缓冲液组成等,以提供适当的结合时间。在有些实施方案中,可以循环所述温度,以提供受控的结合和解离。在有些实施方案中,可以使用第二正交对或组的电极,其中可以使用第二对正交电极来将样品分子定位在与所述电泳电极垂直的轴线上。该第二正交对电极可以用于定位样品分子。样品分子或分析物的定位,可以导致与在没有所述场存在下由第二正交对或组的电极产生的机会相比,官能化的电极、隧穿电极或 nanoFET 之间改善的结合或相互作用的机会。样品分子或分析物之间的改善的结合或相互作用可以导致来自隧穿电流或 nanoFET 中的电流的改善的检测。

[0067] 图 3A-3B 示意地图解了根据本发明的教导的不同实施方案,一种制备要用于 DNA 测序使用的 nanoFET 芯片中的珠子的方法。所述方法可以用于制备珠子,所述珠子可用于装置(诸如图 2 所示的装置)中。如图 3A-3B 所示,可以将多种外切核酸酶连接至珠子上,可以使靶 DNA 与珠子上的连接位点杂交,所述珠子可以用于将靶物保持在装置中。

[0068] 作为一个示例性的 nanoFET 芯片装置操作,外切核酸酶会从靶 DNA 每次切下 1 个 dNTP,使切下的 dNTP 穿过官能化的 nanoFET 或隧穿电极移动,在其中检测 dNTP。在有些实施方案中,通过使靶 DNA 与基质结合,防止靶 DNA 被扫入纳米通道。这可以在造成 dNTP 被扫入纳米通道的电极附近进行,或在电极和 nanoFET 之间的某处进行。根据外切核酸酶的电荷,可能必须通过具有足够长度的连接物类似地使它结合基质,所述长度使它可以与靶 DNA 相互作用。在每种靶 DNA 的附近可以存在几种酶,以便使酶反应的时间最小化。

[0069] 在有些实施方案中,可以去除或调节与将释放的 dNTP 扫入纳米通道中有关的电压,以便允许靶 DNA 和连接的外切核酸酶之间的相互作用。在有些实施方案中,可以使用改变样品分子的速度的其它方式。所述装置的该部分可以是在没有正交场的区域中,从而防止靶 DNA 和外切核酸酶之间的相互作用。在有些实施方案中,可以去除和替换靶 DNA 和外切核酸酶。通过使用 DNA PNA 的连接的引物,或使用非特异性的引物,可以实现连接。在有

些实施方案中,可以使用其它连接方法,诸如使用生物素和抗生蛋白链菌素。在有些实施方案中,所述靶 DNA 可以具有一条链被保护免于外切核酸酶活性,使得第二条链可以被加入的聚合酶合成,从而允许外切核酸酶进行重复降解,并随后进行 DNA 序列的重复检测。所述靶 DNA 可以具有连接在一端上的通用引物,随后加入补体,所述补体可以与聚合酶一起加入。或者,所述引物可以是发夹引物,从而避免对第二引物的需要。

[0070] 根据不同的实施方案,所述装置可以具有大量通道以增加处理量。可以以使单个靶物与每个通道结合的方式,使靶 DNA 连接至基质上;可以使用富集方案(诸如在 WO 2006/135782 中描述的方案),以确保比在其它情况下由泊松分布产生的效果更好的优势,这样的参考文献通过引用整体并入本文中。可以以几种不同的方式制造所述通道。在有些实施方案中,将所述晶体管制造在平面表面上,然后建立通道结构,例如,从介电材料中。可以使用聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)。在有些实施方案中,从硅中建立通道,例如,通过使用天然的晶系进行刻蚀以建立 V 槽,或使用更传统的垂直刻蚀。所述制造也可以包括金属化、在通道的侧面上形成植入物和加入碳纳米管或纳米丝检测器部件。所述通道可以被壁物理地隔开,或被空区域被动地分离,类似于在凝胶上具有泳道。

[0071] 根据不同的实施方案,所述 DNA 测序系统可以包括多个核酸碱基检测部件和忆阻器网络。在有些实施方案中,所述忆阻器网络可以与所述多个检测器发生电通信,且可以包括三维网络。在有些实施方案中,所述忆阻器网络可以包括忆阻器/晶体管混合网络。所述多个核酸碱基检测部件可以包括多个纳米孔、多个纳米通道、多个杂交探针、它们的组合等。在有些实施方案中,所述多个核酸碱基检测部件包括至少 4 个检测器,且所述 4 个检测器可以包括:构造成检测腺嘌呤的第一检测器、构造成检测胞嘧啶的第二检测器、构造成检测鸟嘌呤的第三检测器和构造成检测胸腺嘧啶的第四检测器。在有些实施方案中,一个额外的检测器或所述 4 个检测器之一可以构造成检测尿嘧啶。在其它实施方案中,一个或多个额外的检测器或所述 4 个检测器之一可以构造成检测其它核苷,诸如肌苷或假尿苷。在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测任意天然的或合成的核酸类似物。在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测用作标志物或标记的蛋白、RNA、碳水化合物、其它生物分子或其它分子,其中用作标志物或标记的蛋白、碳水化合物、其它生物分子或其它分子与单链或双链核酸分子的一部分杂交、结合或缔合。

[0072] 根据不同的实施方案,本发明的教导提供了一种用于 DNA 测序的方法,其中使用本文所述的 DNA 测序系统。

[0073] 在有些实施方案中,忆阻器和/或忆阻器混合电路执行多个传感器的实时数据分析,所述传感器在 DNA 测序系统的纳米孔或纳米通道检测部位处。在有些实施方案中,根据本发明的教导可以使用的忆阻器和使用它们的方法,包括在下述文献中描述的那些:例如,Strukov 等人,The missing memristor found, *Nature*, 第 453 卷,2008 年 5 月 1 日,Williams,How We Found the Missing Memristor, *IEEE Spectrum*, 2008 年 12 月 11 日,Johnson,3-D memristor chip debuts, *EE Times* 2008 年 11 月 26 日,和 Eid 等人,Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules, 在线公开于 *Science* DOI:10.1126/science.1162986, 2008 年 11 月 20 日。这些出版物中的每一篇通过引用整体并入本文中。

[0074] 根据不同的实施方案,使用忆阻器、忆阻器/晶体管杂合体或它们的组合来收集

和分析来自传感器的实时数据,所述传感器在多个纳米通道或纳米孔结构中的每一个中。在有些实施方案中,使用在阵列中的单个或多个传感器来进行 DNA 测序。为了本公开内容的目的,“纳米通道”和“纳米孔”可互换地使用。从这样的装置构建的电路会模仿脑的方面。用晶体管实现神经元,用在横杆中的纳米丝实现轴突,并用在交叉点处的忆阻器实现突触。在有些实施方案中,这样的电路可以构造成执行多个传感器的实时数据分析。在有些实施方案中,将忆阻器横杆记忆单元堆叠在 CMOS 逻辑芯片的顶部上。印痕光刻可以用于将忆阻器横杆添加在 CMOS 逻辑电路的顶部上。在有些实施方案中,使用集成的混合电路,其包括晶体管和忆阻器。构型比特可以位于忆阻器横杆中的 CMOS 晶体管之上。可以使用包含晶体管/忆阻器杂合体的 3-D 忆阻器芯片,其具有逻辑和密度以执行来自多个传感器(例如,在多个纳米孔、纳米通道或其它检测器中的多个传感器)的信号的有意义的实时数据分析。

[0075] 在本发明的教导范围内的一个示例性应用是,分析在纳米孔、纳米通道或其它检测部件处检测到的实时 DNA 测序数据,其中将忆阻器或 3-D 忆阻器/晶体管杂合体的性质构造成处理比常规装置远远更多的数据,且更有效。根据本发明的教导,所述数据可以以非易失方式存储在存储器中。在有些实施方案中,可以加工数据的实时分析。忆阻器或忆阻器/晶体管杂合体的以神经网络方式有效地起作用的能力,使得这样的电路能够学习和介入 DNA 测序过程,以修改 DNA 测序过程的结果,并使它更有效。

[0076] 根据不同的实施方案,忆阻器、忆阻器/晶体管杂合体、晶体管或隧穿电极的长期模仿神经网络能力,使得能够监测荧光发射和非-荧光实时 DNA 测序数据,且也可以学习。这样的网络可以为测序系统提供反馈、改变 DNA 测序参数并使得该系统更有效。例如,通过改进的忆阻器、忆阻器/晶体管杂合体、晶体管或隧穿电极反馈,可以提高读出长度,并随后在局部检测器环境中进行调节。

[0077] 根据不同的实施方案,以神经网络方式使用的忆阻器或忆阻器/晶体管杂合体的实时数据分析会提供关于一个或多个 ZMW 或其它检测器或检测器部件的运行的实时反馈,以提高性能或改变过程和结果。这样的系统可以如下提高读出长度:打开或关闭装置,在适当的时间添加化学试剂,或进行其它这样的操作。忆阻器或忆阻器/晶体管杂合体可以用于提供关于接受的数据的实时反馈,这是由于它们的形成神经网络的能力。根据本发明的教导,纳米孔、纳米通道或其它核酸碱基检测部件的网络可以与忆阻器或忆阻器/晶体管杂合体集成,以形成这样的 DNA 测序系统:所述系统实时地报告,且可以调节自身(它们被使用得更多时),以连续地改善碱基检测。所述意外的性能可以源自处理越来越多的碱基调用的网络和存储检测到的 4 种不同碱基 A、C、G 和 T 中的每一种的电信号范围的忆阻器。

[0078] 在有些实施方案中,所述系统可以使用逻辑来测定检测的电信号是否落入在第一碱基的预期信号的强度和第二碱基的预期信号的强度、持续时间或相位之间的某处,使得可靠的碱基调用可以基于这样的中间信号而做出。在具有冗余的系统中,如果在以后测得中间强度信号是来自与以前调用的碱基不同的碱基,所述系统可以记忆如何调用以后的碱基,所述碱基造成信号的类似的中间强度、持续时间或相位。使用忆阻器和忆阻器/晶体管杂合体实现的其它优点包括在通过引用并入本文中的文献中描述的那些。

[0079] 根据不同的实施方案,使用忆阻器或忆阻器/晶体管杂合体,可以实现荧光发射数据、离子电流、隧穿电流、nanoFET 电流和在纳米孔处的多个传感器所获得的其它数据或

来自其它检测装置的数据的非易失存储。该存储可以用于受管制的临床环境中,其中数据的非易失性由于法律原因是重要的。在忆阻器装置中的存储器的持久性优于大多数其它电子装置存储器。

[0080] 根据本发明的教导的不同实施方案,可杂交的寡核苷酸(在本文中称作经编码的分子)可以与靶 DNA 分子杂交,并用于检测不同序列沿着靶分子的存在。例如,可以使靶 ssDNA 分子接触不同的经编码的分子的混合物,并可以使用纳米孔、纳米通道、它们的组合等来检测由与反应产物的相互作用产生的信号。可以选择和 / 或构造可杂交的经编码的分子,以影响穿过检测器(例如,穿过纳米孔检测器中的电极对途径)的离子电流传播。每个经编码的杂交分子可以引起独特的电信号,所述电信号可以在电学上与其它信号区分开,并用于揭示关于靶物的信息。或者,隧穿电流或穿过 nanoFET 的电流可以用于建立可辨别的信号。

[0081] 从所述检测的独特信号收集的信息可以用于测定靶物序列的一部分和所述部分沿着靶物长度的位置。结果可以是单链的 DNA 链,除了经编码的分子杂交的各个长度以外。每个经编码的分子可以在与靶物部分互补的各个位置处与 DNA 链的各个延伸杂交。通过以此方式检测靶物的不同部分,可以在靶物上进行测序和 / 或基因分型。尽管使用这样的经编码的分子进行基因分型的系统可能不一定用于测序整个靶物,并且使用经编码的分子的系统可能更准确地被描述为基因分型系统,应当理解,这样的系统在本文中也称作 DNA 测序系统。

[0082] 参考图 4,将更充分地理解根据这些实施方案的一个示例性的 DNA 测序系统。图 4 示意地图解了纳米孔检测系统、单链 DNA 支架形式的靶分子和与 DNA 支架的不同部分杂交从而沿着支架形成双链区段的多个不同的可杂交的经编码的分子。如显示的,经编码的分子被装配在 DNA 支架上,成为寡核苷酸(寡物)的线性阵列。可以选择或制备不同的经编码的分子,以在穿过纳米孔移动期间对离子电流、隧穿电流或穿过 nanoFET 的电流具有不同的影响。或者,在有些实施方案中,所述检测器可以构造成检测用作标志物或标记的蛋白、RNA、碳水化合物、其它生物分子或其它分子,其中用作标志物或标记的蛋白、碳水化合物、其它生物分子或其它分子与单链或双链核酸分子的一部分或蛋白杂交、结合或缔合。

[0083] 在图 4 中,地址 1 表示特定 DNA 序列。被鉴别为地址 1 寡物的经编码的分子是,具有与地址 1 互补的序列的寡物,使得地址 1 寡物与地址 1 杂交。地址 1 寡物。通过构建地址 1 寡物,以在穿过纳米孔移动过程中表现出独特离子电流效应,可以产生独特的信号或代码。如所示的,地址 1 寡物包括带负电荷的 DNA 主链,但是应当理解,地址 1 寡物可以替代性地包括 PNA 主链、带正电荷的 PNA 主链等。如果使用一组不同的地址寡物,它们可以彼此区分开,并与未杂交的靶物的延伸区分开,这是由于穿过纳米孔检测到的离子电流的差异。带负电荷的 DNA 地址寡物会在测量的电路电流中表现出不同于中性 PNA 地址寡物的电流水平。同样地,带正电荷的 PNA 会表现出第三电流水平。DNA 的单链延伸会表现出对离子电流的另一种不同的影响,且可以用于进一步解码靶物。作为用作标志物或标记的蛋白、RNA、碳水化合物、其它生物分子或其它分子的检测结果,作为电流水平的差异的结果,可以产生另一个电流水平,其中用作标志物或标记的蛋白、碳水化合物、其它生物分子或其它分子与单链或双链核酸分子的一部分或蛋白杂交、结合或缔合。所述不同的电流水平可以类似于荧光试验中的不同的颜色。在有些实施方案中,电流水平可以源自离子电流、隧穿电流、nanoFET

中的电流,或离子电流、隧穿电流或 nanoFET 中的电流中的任一种的组合。

[0084] 在有些实施方案中,使用与 DNA 的单链延伸相对应的离子电流水平作为代码的标点。在有些实施方案中,有效代码可以继之以单链区段的特征性电流水平,例如,继之以指示双链区段的电流水平。在有些实施方案中,有效代码可以继之以单链区段的特征性电流水平,然后继之以指示单个双链区段的电流水平。检测到的偏离图谱的代码可以作为异常值抛弃。在有些实施方案中,第一组电流水平可以用于奇数地址,第二组电流水平可以用于偶数地址。这样的标点可以用于减少固定长度的支架所产生的代码的总数,且可以充当数据分析的质量控制功能。在其它实施方案中,不同类型的电流检测(诸如离子电流、隧穿电流或 nanoFET 电流或它们的任意组合)可以以类似的交替方式使用,且因而可以用于减少代码的数目,且充当数据分析的质量控制功能。

[0085] 在有些实施方案中,使用松散性作为影响穿过纳米孔的离子电流的性质,且根据本发明的教导的不同实施方案可以使用包含不同松散性的经编码的分子。此外,根据本发明的教导的不同实施方案,可以在经编码的分子中使用影响离子电流的任意化学部分或影响离子电流的化学部分集合。这样的化学部分可以是地址寡物主链的一部分、与主链相连、用于指定序列的碱基的一部分或与碱基相连。

[0086] 在有些实施方案中,地址大小可以是在下述范围内:2-50 个核苷酸,例如,4-30 个核苷酸、5-30 个核苷酸或 10-20 个核苷酸。地址寡物的长度可以影响用于获取电流水平的明确评估的时间的长度。与编码分子的长度相关联的时间的长度也可以用于提供编码分子的类型的明确测定,或可以用于增加可利用的不同代码的数目,或可以使用澄清和其它代码的组合。地址寡物或其它标记穿过纳米孔的时间长度可以取决于,例如,寡物长度和跨纳米孔的电压偏倚。更低的电压偏倚可以提供更多的时间来获得准确的电流测量,但是也会降低数据收集速率。更低的电压偏倚也意味着更低的基线电流,后者可以影响可区分不同电流水平的数目。更短的寡物和更高的电压偏倚对于生产、高数据收集速率和更大的代码空间(例如,更可区分的电流水平)而言是有利的。更长的地址寡物和更低的电压偏倚会提高电流水平数据的质量。可以经验地和/或实验地确定寡物长度和电压偏倚的最佳选择。在其它实施方案中,样品分子穿过纳米孔或纳米通道的速率可以受到所述结构的其它部件的影响。

[0087] 根据不同的实施方案,可以使用这样的地址寡物:所述地址寡物具有在支架上彼此刚好相邻的地址,使得完成的经编码的分子是完全双链的。双链的杂交靶物可以用于适当尺寸的纳米孔中,以严格地单列方式穿过纳米孔。

[0088] 根据不同的实施方案,通过将支架 DNA 分子包裹在囊泡或具有半透性壳的空心珠子中,可以生产经编码的分子。所述壳可以构造成捕集支架 DNA,但是允许一种或多种地址寡物的穿过。在示例性的实施方案中,所述支架分子可以被保留,这基于它们的长度,或由于庞大的部分或以其它方式进行限制的部分的连接。所述珠子可以足够大,以包括 100 万或更多个靶支架分子拷贝,约 1 至约 1000,000 个拷贝,或约 1 至 10,000 个拷贝。可以一起使用 1 个、数十个、数百个、数千个或数百万个珠子或更多。

[0089] 在一个示例性的实施方案中,提供了 3 类地址寡物:DNA⁻、PNA⁰ 和 PNA⁺。在第一步中,将珠子集合分成 3 个组。第一组珠子用 DNA⁺ 寡物温育,第二组用 PNA⁰ 寡物温育,第三组用 PNA⁺ 寡物温育。在实现与地址 1 寡物的杂交以后,地址寡物与支架交联。实现交联,

使得在随后的生产步骤中或当在试验中使用经编码的分子时,所述寡物不会交换。接着,可以将所有珠子混合到一起,并重新分成 3 组。每个组可以用地址 2 寡物之一温育,随后交联。可以重复该过程,直到所有地址都被占据。在结束时,每个珠子含有经编码的分子的集合,它们都具有相同的代码。为了使用经编码的分子集合,可以破碎或裂解开珠子,可以测试小量分子以测定代码,并可以将剩余的分子连接至要在试验中使用的分析物特异性的探针上。在一个示例性的实施方案中,就使用连接试验的 SNP 检测而言,可以将经编码的分子连接至等位基因特异性的寡物上,所述寡物对特定等位基因是特异性的,例如,对特定 SNP 是特异性的。

[0090] 根据不同的实施方案,可以使经编码的分子以严格地单列方式穿过纳米孔或纳米通道。可以维持经编码的寡物沿着支架的阶,且在单个电流中的各个变化可以对应着穿过纳米孔的不同寡物。在有些实施方案中,可以将修饰部分连接至靶物上,使得寡物的特定一端可以首先移动穿过通向纳米孔的开口。这样的标志物或定位部分可以用于定向要测序或基因分型的分子。在其它实施方案中,可以使用“拖溜槽”,使得样品分子更可能在一个方向进入纳米孔或纳米通道。如果维持阶信息,在具有 7 个地址的支架中引起 3 个不同的电流水平的寡物会产生 3^7 或 2187 个不同的代码。就 SNP 分析而言,每个 SNP 可以使用 2 个代码。每个等位基因特异性的寡物具有 1 个代码。因而,具有 7 个地址的 3 个电流水平能够在单个多路反应中分析约 1000 个 SNP。对于某些电压偏倚,可以使用约 300-400 微秒来检测穿过纳米孔的 10kb 双链 DNA 分子。因此,每 1-10 毫秒可以检测 1 个经编码的分子。在 1 毫秒,这对应着 1,000 个分子 / 秒或 60,000 个分子 / 分钟。对于 2,000 个不同的代码,60,000 个读数意味着,每个代码可以读出大约 30 次。该数据冗余度足以在统计上确信特定代码是否存在于样品中。因而,所述经编码的分子可以在 1-10 分钟中从 1000-SNP 反应中读出。在有些实施方案中,可以使用更高的电压偏倚,直到检测到离子电流、隧穿电流或 nanoFET 电流之一的可检测的变化,此后,要么可以改变电压偏倚以允许额外的检测时间,要么可以实现改变样品分子穿过纳米孔或纳米通道的速度的其它措施。

[0091] 根据不同的实施方案,1,000 个基因型 / 1-10 分钟可以基于使用单个检测通道。所述检测装置可以包括这样的简单的装置:所述装置包括一个室和被纳米孔隔开的 2 个电极以及能够实现电压偏倚和电流测量的相对简单的电子器件。在有些实施方案中,可以使用 10 个或更多个、或 100 个或更多个平行的通道或孔,使得可以在 100 个平行通道上分析在 1000-丛水平的反应,以产生 100,000 个基因型 / 1-10 分钟的检测处理量。在有些实施方案中,可以实现电压偏倚或改变样品分子穿过纳米孔或纳米通道的速度的其它措施,使得单个孔或通道可以具有经过调整的它们各自的样品分子的速度。

[0092] 在有些实施方案中,区分 10 个不同的电流水平。此外,可以使用 λ DNA 作为支架。在一个示例性的实施方案中,使用 20 个核苷酸地址,且对于 50kb λ DNA 分子,提供 2500 个地址。对于 10 个电流水平,可得到 10^{2500} 个可能的代码。可构建出无限数目的代码。

[0093] 根据不同的实施方案,通过电子隧穿、功能电极、原子力显微术、静电力显微术、它们的组合等,提供跨纳米孔的检测,例如,如本文所述。

[0094] 根据不同的实施方案,使用小量试剂可以合成大量经编码的珠子,这会导致与使用单个地经编码的珠子合成相比更低的生产成本。可以增加线性的经编码的分子的长度,以产生无限的代码空间。经编码的分子的检测比经编码的珠子的检测更快,且经编码的分

子能够实现均匀形式的分析物测定,从而导致改善的动力学。例如,根据不同的实施方案,与它们在珠子表面上的反应相比,连接反应在溶液中更快地进行。

[0095] 根据不同的实施方案,本发明的教导的方法提供了对小量分析物具有更高灵敏度的试验。不需要维持光学途径,因而会增加仪器设计的灵活性,并促进具有多个检测通道的设计。电流水平可以比荧光发射更离散,这会导致在辨别信号时提高的统计能力。

[0096] 根据不同的实施方案,使用本文所述的经编码的分子集合的方法会表现出非常大的代码空间、使用简单的仪器操作快速读出离散信号的时间、在实现非常灵敏的、均匀的分析物测定时有效的生产方法。在有些实施方案中,可以与数字测定格式结合地实现本发明的教导。根据不同的实施方案,本发明的教导的经编码的分子、使用它们的方法和包含它们的试剂盒可用于许多用途,包括、例如,检测 SNP、定量 mRNA、基因分型、RNA 表达测定、蛋白表达测定、小分子定量测定、在生命科学领域以外的应用、它们的组合等。

[0097] 尽管参照纳米孔进行了例证,应当理解,本发明的教导也包括使用在纳米通道检测器和在其它 DNA 序列检测器中的经编码的分子的方法。

[0098] 根据本发明的教导的不同实施方案,提供了包含经编码的分子的混合物的试剂盒,也提供了使用所述试剂盒进行测序和 / 或基因分型的方法。所述试剂盒可以包括一起或单独地包装的经编码的分子。所述试剂盒也可以含有一种或多种标准品、试剂、缓冲液、它们的组合等。

[0099] 在用于 DNA 测序的其它系统、方法和部件中或使用它们,可以实现在本发明的教导范围内的前述实施方案和它们的变体。示例性的教导(本发明的教导可以与其一起和在其中实现,且其可以与本发明的教导一起和在其中实现)包括在下述文献中描述的系统、方法和部件:例如, Li 等人, DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope, Nature Materials, 第 2 卷, 第 611-615 页 (2003 年 9 月), Golovchenko 等人的美国专利号 6, 464, 842, Branton 等人的美国专利号 6, 627, 067, Golovchenko 等人的美国专利号 6, 783, 643, 和 Golovchenko 等人的美国专利申请公开号 US 2002/0187503A1、US 2004/0229386A1, Polonsky 等人的 US 2008/0187915A1, Sun 的 US 2006/0084128, Livak 的 US 2007/0190543A1, Sun 等人的 US 2007/0238186A1, Sun 等人的 US 2008/0050752, Oldham 等人的 US 2009/0181381A1, 和 Sun 等人的 US 2009/0226927, 它们每篇通过引用整体并入本文中。

[0100] 用于 DNA 测序的 DNA 的定向

[0101] 根据不同的实施方案, DNA 分子运动装置包括纳米通道, 所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、第一侧面或顶面和与第一侧面或顶面相对的相对侧面或底面。所述装置包括一对平移电极, 所述平移电极包括在纳米通道的第一端部处的第一平移电极和在第二端部处的第二平移电极。排列至少 3 对正交电极, 每对包括在第一侧面或顶面处的第一正交电极和在相对侧面或底面处的第二正交电极。

[0102] 在有些实施方案中, 所述装置可以是系统的一部分, 所述系统另外包括控制装置, 所述控制装置用于单个地控制施加于每个电极对的至少一个电极上的电压。

[0103] 在有些实施方案中, 所述纳米通道装有电泳介质, 且所述平移电极对可以包括一对电泳电极。

[0104] 根据不同的实施方案, 提供了一种电场控制系统, 其中可以使纳米通道中的电场

的峰与 DNA 的周期性对准。这样的细调可以实现希望的 DNA 减慢和 / 或停止。可以调节电场, 以在 DNA 上提供净力, 从而减慢它和 / 或停止它。图 5A-5C 描绘了可以用于控制 DNA 的运动的电极排列和电场。在图 5A-5C 中, 电极对 91A 和 91B、93A 和 93B、95A 和 95B 沿着 DNA 分子操纵通道 97 排列, 并提供共同地图解为 99 的电场, 其具有相位。DNA 分子 101 穿过所述通道移动。显示的电场不是准确的, 但是意图传达根据不同实施方案的场调节的一般概念。

[0105] 在图 5A 中, 对准电场相位和 DNA 间距, 并实现 DNA 靶物的更好的受控运动。根据不同的实施方案, 电场控制系统可以细调电场, 以调节尺寸、环境条件、DNA 的间距等变量的变化。DNA 间距可以随着电泳场、pH 条件等而变化, 相位和 DNA 间距的变异性, 如图 5B 所示。在有些实施方案中, 通过调整在一个或多个电极对上的电压, 可以调整相位对准。在有些实施方案中, 通过直接地调节单个电极的电压, 可以调整相位对准。在这样的就位、操作前调节或细调以后, 可以对准相位和 DNA 间距, 如图 5C 所示。

[0106] 在有些实施方案中, 可以使用 DNA 的迁移速率作为测量方法, 以调节电极场至需要的间距。在有些实施方案中, 用最佳场水平使 DNA 迁移最小化。本发明的教导因而会为 DNA 分子运动控制系统提供飞行中可维持性。此外, 所述系统可以包括可反转的电泳场, 所以可以使 DNA 分子在第一个方向穿过纳米通道, 然后反转它的行程, 并在相反反向穿过纳米通道。实现的该可重复性可以提供 DNA 分析的冗余, 并确保读出的准确度。所述受控的运动可以用于, 例如, 使 DNA 分子与纳米孔或纳米通道对准, 用于在其中的进一步加工。

[0107] 根据不同的实施方案, 本发明的教导提供了一种使用本文所述的 DNA 分子操纵系统进行 DNA 操纵的方法。根据不同的实施方案, 本发明的教导的方法提供了对小量分析物具有更高灵敏度的试验。不需要维持光学途径, 因而会增加仪器设计的灵活性, 并促进具有多个检测通道的设计。电流水平可以比荧光发射更离散, 这会导致在辨别信号时提高的统计能力。

[0108] 尽管参照纳米通道进行了例证, 应当理解, 本发明的教导也包括使用纳米孔检测器和其它 DNA 碱基序列检测器的方法。根据不同的实施方案, 通过电子隧穿、功能电极、原子力显微术、静电力显微术、它们的组合等, 可以提供跨纳米孔的检测。

[0109] 根据本发明的教导的不同实施方案, 提供了对在美国公开的专利申请号 US2008/0187915 中描述的装置、系统和方法的改进。例如, 可以使用势垒替代描述的阱, 例如, 通过将负电势应用于中央电极 (相对于在侧面的那些)。在这样的装置中, 捕集能的强度不受影响, 因此装置的活力也不受影响。相反, 结果是电荷的平衡位置不连贯移位半个聚合单位间距离。在有些实施方案中, 在纳米孔内的垒可以由任意数目的电极 (包括单个电极) 来建立。

[0110] 根据不同的实施方案, 且不同于势阱, 可以补偿聚合物的柔性, 且可以使在中央电极的侧面上的电场具有正效应。由于电力指向离开中央电极, 穿过电场的 DNA 会拉长, 并保持于拉伸下。这样的拉伸预加载是有利的, 因为拉长的 DNA 更接近地类似于刚性杆模型, 且可以更稳健地再现可用于装置的最佳操作的单体间间距。此外, 拉伸预加载也会增加分子的刚度, 并从而增加它的稳定性, 减少布朗运动的有害效应。

[0111] 在有些实施方案中, 可以有益地使用 DNA 分子的弹性来补偿生产容差, 后者经常不会精确地提供准确间隔。在刚性杆的理想情况下, 尺寸失配会导致捕集能的降低或归零,

结果导致装置的性能的降低。但是,在有些实施方案中,因为 DNA 分子的弹性和通过调节电极对之间的电势差来控制牵拉力的能力,可以独立地拉长 ssDNA 分子的两侧,以匹配不同层的实际尺寸产生的要求。根据不同的实施方案,基于装置的实际几何形状,提供了调节过程,以使捕集能最大化,例如,以找到每个电极的最佳电势。在有些实施方案中,可以实现反馈过程,其中加在一个或多个电极上的电压发生改变,如图 6A-6C 所示,这基于被同一个电极感知的或被一个或多个其它电极或传感器感知的、得到的可测量的电性能的变化。

[0112] 在有些实施方案中,在纳米孔中提供势垒 U 来替代势阱。这样的垒可以与拖电极产生的电场的叠加相容,如图 7 所示。尽管可以使用电势谱的许多组合,利用本文所述的和图 7 所示的电势分布,可以使在纳米孔内的 DNA 分子的整个长度处于张力下。可以证实,锁定电场的捕集作用会克服拖场的平移作用。在几何学上和电学上对称的情况下,具体地,其中

[0113] $V_1=V_3$, 且 $g_1=g_2$

[0114] 结果是,

$$[0115] \quad \frac{|V_1 - V_2|}{|V_t - V_c|} > \frac{g}{p},$$

[0116] 其中 g 是电极之间的间隙, p 是聚合物的未拉长的单体单元之间的标称螺距。

[0117] 在有些实施方案中,可以将所述分析容易地延伸至非对称的情况,其中 p_1 和 p_2 是沿着纳米孔轴线在单体单元之间的有效距离。在不同的实施方案中,作为 DNA 分子的两侧的不同预拉伸的结果,所述有效距离可以是不同的。通过独立地调节电势分布的偏倚电压,可以控制带电荷的聚合物的半径定位(也就是说,离侧壁的距离)。

[0118] 根据不同的实施方案,且类似于具有势阱的情况,可以如下控制 DNA 分子的运动:减少或消除势垒,持续 DNA 移动希望的距离所需的时间量,然后重建所述垒。非零的拖电场允许在去掉锁定作用以后产生 DNA 运动的优先方向。在单个势阱的情况下, DNA 的定位的可控性的缺乏会造成不能确定地实现它的迁移,但是本发明的教导克服了这样的问题。

[0119] 在有些实施方案中,势垒、势阱或垒和阱的组合可以在不同的电极对之间在时间、空间上周期地转换,其中 2 个电极是在纳米孔内的电极的最小数目。结果,为 DNA 分子提供净运动,如图 6A-6C 所示。所述势垒可以在不同的电极对或集合之间逐渐变化,这在很大程度上与磁场在步进电机中逐渐转换相同。另外,类似于步进电机,电极对或集合可以是 180 度异相。

[0120] 根据本发明的教导的其它实施方案,且类似于步进电机,可以使用额外的电极对或集合,例如可以使用 5 对或集合或更多,类似于 5-相步进电机。尽管用 5 来例证,可以使用任意其它数目的电极对或集合。在这样的实施方案中,所述装置可以与锁定电势的对称的几何形状和分布相容,以及与几何学上和电学上不对称的构型相容。

[0121] 在有些实施方案中,相对于 DNA 分子的运动在轴向上处于相同位置的电极可以具有施加在它们上的相同电压。

[0122] 在其它实施方案中,相对于 DNA 分子的运动在轴向上处于相同位置的电极可以具有施加在它们上的不同电压。如图 8A-8C 所示,纳米孔可以具有多个层,且每个层可以存在 1、2、3 或更多个电极和 / 或电极对。

[0123] 尽管参照纳米孔进行例证,应当理解,这样的电极和排列可以构造为纳米通道的

一部分。

[0124] 可以在 DNA 操纵、定向和 / 或测序的其它系统、方法和部件中或与它们一起实现前述实施方案及其变体。示例性的教导(本发明的教导可以与其一起和在其中实现,且其可以与本发明的教导一起和在其中实现)包括在下述文献中描述装置、系统、方法和部件:例如, Li 等人, DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope, Nature Materials, 第 2 卷, 第 611-615 页 (2003 年 9 月), Ohshiro 等人的文章, Complementary base-pair-facilitated electron tunneling for electrically pinpointing complementary nucleobases, PNAS, 第 103 卷, 第 1 期 (2006 年 1 月 3 日), Golovchenko 等人的美国专利号 6,464,842, Branton 等人的美国专利号 6,627,067, Golovchenko 等人的美国专利申请公开号 US 2002/0187503A1、US 2004/0229386A1, Polonsky 等人的 US 2008/0187915A1, Sun 的 US 2006/0084128, Livak 的 US 2007/0190543A1, Sun 等人的 US 2007/0238186A1, Sun 等人的 US 2008/0050752, Oldham 等人的 US2009/0181381A1, 和 Sun 等人的 US 2009/0226927, 它们每篇通过引用整体并入本文中。

[0125] 用于 DNA 测序的 DNA 分子运动的速度控制

[0126] 根据本发明的教导的不同实施方案,提供了一种 DNA 分子运动装置,其包括纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部。所述装置可以另外包括至少一对平移电极,所述平移电极包括在第一端部处的第一平移电极和在第二端部处的第二平移电极。也可以提供一对正交电极,其包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极。控制装置可以单个地控制施加于每个电极的电压。在有些实施方案中,第一平移电极和第二平移电极中的每一个各自包括电泳电极,且所述纳米通道可以填充例如电泳介质。所述控制装置可以构造成反转跨平移电极对的电压,例如,反转 DNA 分子的运动的方向。在有些实施方案中,将一对隧穿电极设置在纳米通道中,并构造成检测纳米通道中的 DNA 分子的单个核酸碱基。

[0127] 根据不同的实施方案,提供了一种 DNA 分子运动装置,其可以包括:纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部;一对平移电极,其包括在第一端部处的第一平移电极和在第二端部处的第二平移电极;至少一对正交电极,每对可以包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极;和控制装置,其用于单个地控制施加于每个电极对的至少一个电极上的电压。所述控制装置可以包括反馈传感器,所述反馈传感器构造成感知与 DNA 间距有关的反馈信号,并调节施加于至少一对正交电极的至少一个电极上的电压、电流或二者。在已经建立 DNA 测序系统进行操作以后,这样的控制可以在现场(on-site)实现。

[0128] 根据不同的实施方案,提供了一种控制 DNA 分子穿过纳米通道的运动的方法。所述方法包括:提供一种 DNA 分子运动装置,所述装置可以包括:纳米通道,所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部;一对平移电极,其包括在第一端部处的第一平移电极和在第二端部处的第二平移电极;至少一对正交电极,每对可以包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极;和控制装置,其用于单个地控制施加于每个电极对的至少一个电极上的电压。所述方法可以包括:使 DNA 分子穿过纳米通道运动;检测在 DNA 分子穿过纳米通道运动过程中的 DNA 间距,以产生信

号；并基于所述信号，调节施加于一个或多个电极上的电压。所述至少一对正交电极可以提供电场相，且调节电压可以包括：调节电压以将相位与检测的 DNA 间距相联系。

[0129] 在本发明的教导的其它实施方案中，提供了一种控制 DNA 分子穿过纳米通道的运动的方法。所述方法使用一种 DNA 分子运动装置，所述装置包括：纳米通道，所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部；一对平移电极，其包括在第一端部处的第一平移电极和在第二端部处的第二平移电极；至少一对正交电极，其包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极；和控制装置，其用于单个地控制施加于每个电极对的至少一个电极上的电压。所述方法可以包括：使 DNA 分子穿过纳米通道在第一个方向运动；在 DNA 分子穿过纳米通道运动的过程中，检测 DNA 分子的核酸碱基；和反转施加于所述第一和第二平移电极上的电压，以反转 DNA 分子的运动成为在第二个方向，该方向与第一个方向相反。

[0130] 根据本发明的教导的不同实施方案，提供了如图 9A-9C 所示的装置。所述装置包括通道 130，所述通道 130 以多种方法中的任一种形成。制造方案可以取决于要在装置中使用的电极的制造方法。在图 9A-9C 所示的装置中，通道 130 可以刻蚀进玻璃中，磨入塑料中，压入塑料中，注射模塑，从硅微型机械加工，使用半导体工艺（诸如光刻工艺或纳米印痕）制造，或以类似方式制造。使用平移电极 132 和 134，造成 DNA 分子从通道 130 的一端移动至另一端。没有显示用于将缓冲液、DNA 和 / 或清洁溶液导入通道 130 中或从通道 130 中取出 DNA、缓冲液或清洁溶液的任何开口。通道 130 可以制造成规则的或不规则的 1D 或 2D 阵列（未显示），且可以具有共同的馈线（未显示），以允许将缓冲液、DNA 和 / 或清洁溶液导入通道 130 中，或从通道 130 中取出 DNA、缓冲液或清洁溶液。共同的馈线可以与通道阵列共平面，或可以制造在平行的平面中。也可以制造多层通道，从而允许非常高的检测密度。对于所有阵列、阵列的部分而言，电泳电极的电压控制可以是共同的，或者可以为每个纳米通道制造单个电极。可以使用额外的电极来在与共同的馈线有关的纳米通道的入口处浓缩样品。每个纳米通道的单个电极可以与所述电泳电极中的一个或多个组合使用。或者，可以为每个纳米通道使用一对（或更多）电极，以便在纳米通道入口处双向电泳地浓缩样品。所述双向电泳电极可以独立于所述电泳电极地使用，或可以与所述电泳电极中的一个或多个结合使用。也可能反转平移电极 132 和 134 和 / 或所述电泳电极的极性，使得可以更好准确地重读 DNA 链。可以使用其它方案替代平移电极来移动 DNA，例如，激光镊子（未显示）。可以在 2 个轴线操纵运动。2D 或 3D 阵列可以用于本文所述的任意的的方法、系统或装置，其控制诸如 DNA 等分子的运动、定向或检测。

[0131] 在碱基的读出过程中，使用保留电极 136 和 138 来固定化或减慢 DNA。也提供了隧穿电流电极 140 和 142。保留电极 136 和 138 最少可以覆盖隧穿电极 140 和 142 的区域中的大表面积。当被活化时，它们迫使 DNA 朝向隧穿电极 140 和 142 所定位的表面，从而阻止或减慢进一步平移。它们进一步减少振动运动，且倾向于定向 DNA，使得隧穿电极 140 和 142 之间的碱基旋转更一致。保留电极 136 和 138 可以直接接触含有 DNA 的缓冲溶液，如果确实如此，薄电介质可以将隧穿电极 140 和 142 与保留电极 136 和 138 隔开。或者，通过使用在保留电极 136 和 138 与缓冲液之间的薄电介质，可能建立适当的场，如果如此，可以适当地增加所述场。

[0132] 使用微型机械加工技术，可以制造隧穿电极 140 和 142，但是也可以在金属沉积和

电子束光刻以后进行刻蚀。它们显示为通道 130 的高度的一半,但是可以更短,例如,小于 100nm,或更高,例如,纳米通道的整个深度。可以提供多个隧穿电极集合,从而允许沿着 DNA 链在不同点处一次读出,从而允许更快的链读出和 / 或更好的数据,这归因于不同读数之间的平均数据。如所示的,在隧穿电流电极 140 和 142 的上面提供间隙 144。

[0133] 另一个实施方案显示在图 10A-10C 中,其中与在图 9A-9C 中使用的相同的参照数字代表相同的部件。在图 10A-10C 中所示的实施方案的不同之处在于如何制备隧穿电极 146 和 148。不是在 DNA 的每侧具有一个电极(其垂直于主链),而是制备隧穿电极 146 和 148,使得它们跨主链间隔 1 个碱基。该实施方案容易制造,且更能抗噪音,因为 2 个隧穿电极 146 和 148 紧密地联接,而不是形成相当大的环。隧穿电极 146 和 148 不一定必须在它们的整个长度上间隔单个碱基。此外,可以在与隧穿电极 146 和 148 垂直的壁上提供一个额外的操纵电极集合(未显示),且可以用于集中 DNA,其中使用来自隧穿电极 146 和 148 的反馈。在有些实施方案中,上保留电极 136 可以用一对操纵电极替代,同时保留二者的功能。在其它实施方案中,操纵电极可以用在与保留电极相同的纳米通道表面上,其中所述保留电极没有覆盖整个表面。可以一次使用多对隧穿电极,从而允许更快的链读出和 / 或更好的数据,这归因于不同读数之间的平均数据。

[0134] 在图 11A-11C 所示的实施方案中,可以不使用保留电极,且作为替代,将高频 AC 场提供在平移电极 132 和 134 上,以保持 DNA 就位。也可以使用所述场使 DNA 在上面与角隧穿电极 150 接触(随着 DNA 穿过角阻塞 152)。可以使角隧穿电极比 DNA 的响应更快地改变频率。通过使用拖溜槽或带正电荷的尾巴,可以放大该效果。在有些实施方案中,可以建立多个角电极,以允许多个隧穿电极集合,并实现由此提供的利益,以在多个点处一次检测 DNA,从而允许更快的链读出和 / 或更好的数据,这归因于不同读数之间的平均数据。角电极可以都在一侧,或可以在交替侧,造成 DNA 在不同的角电极之间拉长。在一个替代实施方案中,保留电极可以替代高频 AC 场地使用或与高频 AC 场组合地使用,以控制 DNA 的运动。

[0135] 图 12A-12C 显示的实施方案与图 11A-11C 所示的实施方案类似,但是包括螺旋通道(而不是角结构)形式的通道 160。通道 160 可以沿着它的长度具有均匀的宽度,且显示为正弦曲线,但是可以具有其它形状,例如,具有更急的拐弯。隧穿电极 162 可以提供在曲线的顶点处,或在沿着曲线的其它位置处。每条曲线可以存在一对电极,或每条曲线可以存在几对电极。

[0136] 图 13A-13C 显示了装置 165 的一个实施方案,所述装置 165 包括基质 166,所述基质 166 具有在其中形成的槽 168,其中 DNA 结合在槽中。所述 DNA 可以结合在两端,或者,结合在一端,而另一端具有施加于它的运动力,诸如电场或激光镊子。所述 DNA 可以以多种方法中的任一种进行结合,包括生物素 - 抗生蛋白链菌素和 PNA-PNA 杂交。拉长 DNA 可以用于减少振动噪音。如显示的,所述 DNA 结合在沟 168 的一端的底部,并将电场施加在沟 168 的远处相对端和该端下面,使得 DNA 被迫进入沟 168 的底部。将 AFM 尖部 170 构造成用作隧穿电极,并沿着沟 168 进行扫描。或者,通过移动两端,可以平移 DNA,同时 AFM 尖部仅在同一条轴线中移动。该方案可以使用保留电极,使得 DNA 得到保持,并防止旋转。在有些实施方案中,可以以与大规模存储装置目前使用的类似的方式使用扫描 AFM 尖部的阵列。

[0137] 图 14A-14C 显示了一个实施方案,其中在 2 个结构之间主动地拉长 DNA 分子 172,所述结构包括 DNA 结合表面 174 和 176。电极 178 提供在所述结构的两侧,其一侧用作 AFM,

以测定施加的适当量的力。然后与隧穿电极 180 一起使用第二 AFM, 用于测定隧穿电流。在有些实施方案中, 所述方法可以在真空中进行, 消除来自缓冲液离子和水的干扰, 并允许 DNA 深度冷却, 进一步减少振动噪音。在有些实施方案中, 可以以与大规模存储装置目前使用的类似的方式使用扫描 AFM 尖部的阵列。

[0138] 根据不同的实施方案, 使用扫描 AFM 方案的另一种检测装置测定短 PNA (例如, 6 聚体 PNA) 的杂交相互作用力, 其中使用大量尖部, 所述尖部代表可能的 6 聚体的适当集合。所述 AFM 可以垂直于 DNA 振荡, 以便使相互作用最大化。然后产生杂交力相对于位置相对于序列的图, 以测定统计上可能的序列。可以使用不同长度的结合部分, 包括 1、2、3、4、5、7 或更多个碱基。

[0139] 在有些实施方案中, 组合本文所述的实施方案的不同方案, 例如, 通过用扫描尖部替代本文所述的隧穿电极。

[0140] 图 15 是根据本发明的教导的不同实施方案的双纳米管构型的侧视图。DNA 分子可以穿过 2 个碳纳米管 184 和 186 进行拉长, 所述碳纳米管起隧穿电极的作用。DNA 的单个碱基的距离将纳米管 184 与纳米管 186 隔开, 以限定间隙 185。在所述管之间的隧穿电流可以用于表征在间隙 185 中分离的碱基。平移电极 188 和 190 可以实现 DNA 分子 182 穿过纳米管 184 和 186 的运动。在该方案中, 使 DNA 分子 182 穿过纳米管 184 和 186 流动。然后将纳米管 184 和 186 用作隧穿电极。可以为单链 DNA 优化每个纳米管 184 和 186 的直径。为了优化读出, 可以将旋转场施加于纳米管 184 和 186 之间的间隙, 以维持 DNA 分子 182 的旋转一致性。可以降低 DNA 分子 182 的温度, 可能在纳米管中显著低于 0°C, 同时仍然维持标称的水性条件。DNA 分子 182 的运动力包括电场, 但是也可以包括或替代性地包括进行性酶诸如聚合酶或外切核酸酶。可以使用其它纳米管, 其中 DNA 分子可以相继穿过其它纳米管移动, 从而允许更快的链读出和 / 或更好的数据, 这归因于不同读数之间的平均数据。所述纳米管可以构造成位于前述的纳米通道中; 可以使用保留电极和操纵电极来控制 DNA 在纳米管中的运动。

[0141] 图 16 是根据本发明的教导的不同实施方案的双纳米管构型的侧视图, 其中 DNA 分子 192 穿过可移动的纳米管尖部 194 进行拉长, 第二纳米管包括固定的柱 196。每个纳米管可以独立地包括碳纳米管或由不同材料制成的纳米管。在固定的纳米管柱 196 和可移动的纳米管尖部 194 之间限定出间隙 195。作为可移动的纳米管尖部 196 从侧面接近固定的纳米管柱 194, 在可移动的纳米管尖部 194 和固定的纳米管柱 196 之间提供隧穿电流。所述隧穿电流可以用于表征在间隙 195 中分离的 DNA 分子的核碱基。平移电极 188 和 190 可以实现 DNA 分子 192 穿过纳米管 194 的运动。

[0142] 如图 16 所示, 所述间隙可以构造在固定的纳米管柱 196 和可移动的纳米管尖部 194 之间, 所述尖部 194 从侧面接近固定的纳米管柱 196。DNA 分子 192 可以被与环绕滑轮的绳类似的力拉过间隙。在固定的纳米管柱 196 和可移动的纳米管尖部 194 之间的隧穿电流可以用于表征位于间隙中的分离的核酸碱基。光学镊子、操纵珠子、操纵磁珠等可以围绕固定的纳米管柱 196 牵拉 DNA 分子 192。对于 10nm 碳纳米管固定柱, 所述尺寸使得每次仅 1 个碱基暴露于可移动的纳米管尖部 194。在有些实施方案中, 所述固定的纳米管柱直径可以大于单链 DNA 中的碱基间距。在有些实施方案中, 所述尖部和柱由碳以外的材料制成。

[0143] 图 17 是根据本发明的教导的不同实施方案的装置的侧视图, 所述装置包括固定

的柱纳米管 100 和原子力显微镜 (AFM) 尖部 102 构型。绕着固定的柱纳米管 100 拉长 DNA 分子 104, 并在固定的柱纳米管 100 和 AFM 尖部 102 之间限定间隙 106。限定间隙 106 的大小, 并构造成每次仅呈现一个碱基给 AFM 尖部 102。珠子 108 可以连接至 DNA 分子 104 上, 并用于辅助操纵 DNA 分子 104 穿过间隙 106 的运动。固定的纳米管柱 100 可以是导体 110 的一部分。在有些实施方案中, 所述固定的纳米管可以附着在锐角上或沿着曲线, 如图 11A-11C 和 12A-12C 所示。在有些实施方案中, 可以使用纳米芽来进一步定位场和隧穿电流。在其它实施方案中, 可以将纳米管之一构造成起 nanoFET 的作用。所述纳米管可以进一步构造成具有纳米芽, 以便进一步定位 DNA 和 nanoFET 之间的相互作用。

[0144] 图 18 是根据本发明的教导的不同实施方案的检测方案的一个示意图, 其中使用角结构和纳米芽进行 DNA 测序。如图 18 所示, 用核酸受体分子将纳米芽官能化。随着围绕角结构操纵 ssDNA 分子, 组成 ssDNA 的单个核酸碱基暴露于纳米芽。在有些实施方案中, 可以提供具有 4 个各自的官能化的纳米芽的 4 角结构, 以感知 4 种不同的核酸碱基。

[0145] 在有些实施方案中, 除了别的以外, 双纳米管的其它用途可以包括: 观察染料分子是否与 DNA 直接结合, 或与其它分子结合。纳米管可以用于建立纳米流动池, 并造成光波浓度在间隙处更高。在有些实施方案中, 可以使用具有多个碳层的纳米管。根据最近的文章: P. Muehlschlegel 等人 Science 308, 1607 (2005) (它通过引用整体并入本文中, 并描述了使用双金属纳米杆作为触角), 在双纳米管之间的间隙可以起偶极子纳米触角的作用, 以增强单一染料光发射。

[0146] 在有些实施方案中, 通过在纳米孔的一侧产生旋转场, 所述旋转场可以停止或减慢 DNA 分子穿过纳米孔的前进, 提供对纳米孔的使用的优化。在有些实施方案中, 可以减小场强度, 使得 DNA 可以前进单个碱基, 然后再次增加场强度。在有些实施方案中, 在纳米孔的相对侧面上建立一个额外的旋转场, 这允许更高的场强度, 用于更好地控制 DNA 分子运动。在有些实施方案中, 该概念适用于上述的双纳米管概念。

[0147] 根据不同的实施方案, 提供了一种分析物检测系统, 其包括纳米通道, 所述纳米通道具有第一端部、与所述第一端部相对的第二端部、顶部和与所述顶部相对的底部。提供了一对电泳电极, 其包括在第一端部处的第一电泳电极和在第二端部处的第二电泳电极。也提供了一对正交电极, 其包括在顶部处的第一正交电极和在底部处的第二正交电极。在纳米通道中设置了多个设置于通道中的纳米场效应晶体管装置 (nanoFET)。所述多个 nanoFET 可以包括至少 4 个不同的 nanoFET, 每个被彼此不同的受体分析物官能化。在有些实施方案中, 靶 DNA 分子可以结合在珠子上, 且所述珠子可以设置在纳米通道中, 以在测序方法过程中保留靶分子。在有些实施方案中, 外切核酸酶可以结合在珠子上, 且所述珠子可以设置在纳米通道中。

[0148] 根据不同的实施方案, 提供了一种 DNA 测序装置, 其包括 nanoFET, 所述 nanoFET 已经被官能化, 以检测在 nanoFET 的表面上的电荷变化。各个 nanoFET 的表面可以用分析物受体分子官能化, 所述受体分子表现出的对目标分析物的亲和力高于相同的 nanoFET 在没有所述分析物受体分子的情况下所具有的亲和力。在有些实施方案中, 所述受体分子可以包括核酸碱基结合部分, 所述部分可以暂时结合靶核酸的碱基, 例如, 通过氢键合。这种官能化的 nanoFET 可以以连续方式在纳米通道中排列, 例如, 如图 1 所示。

[0149] 纳米孔结构和使用它们的核酸测序方法

[0150] 根据不同的实施方案,本发明的教导提供了与电极结合的功能性的核酸碱基结合剂(亲和剂),以检测沿着靶 ssDNA 链的不同的核酸碱基。这样的检测不需要使用 DNA 碱基特异性的性质(诸如隧穿电流谱等)来实现检测特异性。作为传感元件的替代,例如,聚合物、纳米丝、纳米管等可以用于本发明的教导的有些实施方案中,它们不需要这样的检测器:所述检测器依赖于对几何构象变化的大敏感性来获得可测量的分子的和/或结构的性质。相反,将功能性的化学基团连接在传感元件(诸如隧穿电极)上。所述基团对 ssDNA 靶物的不同碱基中的至少一个是特异性的。在有些实施方案中,通过移动的 ssDNA 的作用,使传感元件变形,这是由于它的官能团对至少特定碱基的亲合力。碱基特异性的可测量的信号可以从至少一个电极生成,或从 2 个或更多个电极的信号的分析 and / 或组合提取。在有些实施方案中,2 个或更多个具有不同碱基特异性的传感元件可以集成在纳米孔结构的相同层中。示例性的电极包括例如在美国专利号 7,619,290、7,595,260、7,500,213、7,385,267 和 7,301,199 中描述的那些,它们通过引用整体并入本文中。

[0151] 在有些实施方案中,所述纳米孔可以形成在基质中,所述基质包括多个隔开的电极层,每个电极层包括贵金属或其合金。在有些实施方案中,每个电极可以独立地包括金属氧化物(例如,铟-锡氧化物(ITO))作为阳极材料。其它金属氧化物表面(例如,包括 Al_2O_3 、 Ta_2O_5 、 Nb_2O_5 、 ZrO_2 、 TiO_2 或其组合或合金)也可以用于通过磷酸酯或膦酸酯基团化学地结合亲和剂。所述不同的电极层彼此可以被中间绝缘电介质或半导体层或它们的组合(包括在相同层内的不同材料的组合)隔开,例如被氮化硅层或二氧化硅层隔开。多个电极层中的至少一个可以包括暴露的表面,所述表面具有与其键合的第一种核酸碱基结合剂(亲和剂),且所述多个层的至少一个不同的电极层可以包括暴露的表面,所述表面具有与其键合的、不同于第一种的第二种核酸碱基结合剂(亲和剂)。所述第一种和第二种核酸碱基结合剂(亲和剂)中的每一种可以包括,例如,硫醇化的多元醇,所述多元醇包括至少一种脱氧核糖核苷酸磷酸酯。所述纳米孔结构可以构造成,使得所述第一种或第二种核酸碱基结合剂(亲和剂)暂时结合(即,杂交、结合和/或缔合)靶物或样品分子的一部分。所述结合可以是,例如,与穿过纳米孔的 ssDNA 分子的互补碱基的结合。可以检测穿过各个电极的电流、电压或二者的变化,并用于鉴别暂时结合的碱基。

[0152] 图 19 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔 23 移动的 ssDNA 分子 21 的横截面侧视图的示意图。如图 19 所示,纳米孔 23 包括内侧壁 25,所述内侧壁 25 具有与其结合的捕集或缠绕聚合物 26,所述聚合物 26 邻近纳米孔 23 的开口 28。所述捕集聚合物会减小纳米孔 23 的有效孔径,并用于梳理、拉长和/或拉伸 ssDNA 21(随着它穿过纳米孔 23 移动)。捕集聚合物 26 可以选择性地固定化在二氧化硅层 32 的内侧壁上。层 32 可以在面向纳米孔 23 的暴露的表面上包括二氧化硅或含有二氧化硅的硅(就像在由硅的天然氧化产生的二氧化硅中)。层 32 可以通过 CVD 沉积的无定形硅。所述捕集聚合物可以限定和拉伸 ssDNA 21,可以增加空间感知分辨率,这至少通过减小 ssDNA 在穿过纳米孔 23 移动时的屈曲,且可以减小纳米孔 23 的有效孔径。捕集聚合物 26 可以包括,例如,本文所述的树枝状聚合物、支化聚合物或共聚物。

[0153] 纳米孔 23 形成在基质 30 中,所述基质 30 包括:第一二氧化硅层 32、第一氮化硅层 34、第一电极层 36、第二氮化硅层 38、第二电极层 40、第三氮化硅层 42、第三电极层 44 和第二二氧化硅层 46。尽管描绘了 3 个电极层 36、40 和 44,根据本发明的教导的不同实

实施方案可以使用更多或更少的电极层。在有些实施方案中,所述结构不具有氮化硅层 34。在有些实施方案中,在电极层 44 和二氧化硅层 46 之间不存在氮化硅层。在有些实施方案中,所述氮化硅可以被其它聚合物电介质替换,例如,聚酰亚胺或氟化的聚(亚芳基醚)。参考下述文章,可以更充分地理解关于氟化的聚(亚芳基醚)的使用的其它细节:Aldrich N. K. Lau 等人,“Self-Crosslinkable Poly(arylene ether)s Containing Pendent Phenylentriazine Groups,” J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem., 1994, 32, 1507-1521, 它通过引用整体并入本文中。

[0154] 在有些实施方案中,纳米孔 23 形成在基质 30 中,所述基质 30 包括:第一电学绝缘层 32 (例如二氧化硅)、第二绝缘层 34 (例如氮化硅)、第一电极层 36、第三绝缘层 38 (例如氮化硅)、第二电极层 40、第四绝缘层 42 (例如氮化硅)、第三电极层 44 和最后的绝缘层 46 (例如,氮化硅)。尽管描绘了 3 个电极层 36、40 和 44,根据本发明的教导的不同实施方案可以使用更多或更少的电极层。

[0155] 可以看出,每个电极层已经进行表面修饰,以具有与其相连的感知聚合物 48 (例如导电的)。所述相同的或不同的聚合物可以连接至 3 个不同的电极层的内侧壁表面上。由于聚合物 26 引起的聚合物 48、48a 和 48 拉长所产生的限制和聚合物 48、48a 和 48b 的刷子的空间排列,会减少电极和 ssDNA 分子之间的有效分离,因而引起更强的信号和更好的分辨率。应当理解,感知聚合物 48、48a 和 48b 会提供有效方案来传递各个电极和 ssDNA 分子之间的电信号,所述电极否则会被存在于纳米孔表面上的电传播层屏蔽。此外,聚合物 48、48a 和 48b 会通过阻碍侧向运动和减缓它的布朗运动而主动地促进控制 ssDNA 的定位,从而减少有关的感知噪音。另外,它们允许单个碱基的一致定向,具有进一步减少与碱基的随机分布和运动有关的电噪音的额外净效应。

[0156] 可以看出,每个电极层已经经过表面修饰,以具有与其相连的核酸碱基结合剂(亲和剂) 48。相同的或不同的碱基结合剂(亲和剂)可以连接在 3 个不同的电极层的内侧壁表面上。如在层 36 和 44 处所示,ssDNA 分子 21 的某些碱基暂时结合(例如,缔合)连接在电极层 36 和 44 上的核酸碱基结合剂(亲和剂)。通过电流或电压(例如,穿过电极)的变化,可以检测所述暂时结合(缔合)。在有些实施方案中,在 ssDNA 上的不同碱基与不同的碱基结合剂(亲和剂)反应,以生成电流的不同变化,所述变化可以用于检测在各个电极处暂时结合的碱基的类型。

[0157] 在有些实施方案中,作为在孔的表面上发生或进行的化学和/或物理过程的结果,每个层的暴露的部分可以具有与基础材料不同的化学组成。例如,可以使用的处理包括:自发的或非自发的氧化,诸如对硅的天然氧化,孔形成后的化学和/或物理处理,诸如给定材料薄层的沉积或等离子体的表面活化等。通过上述的相同化学-物理处理,或通过电化学处理,可以用不同的金属选择性地钝化或包被一个或多个传导层(例如,电极层)的暴露的表面、侵蚀、它们的组合等。电化学处理可以包括电沉积、氧化等。如果给定的电极要用于电容性感知,可以使用钝化。如果需要多种感知方法,可以使用钝化的和未钝化的电极的组合。电镀和电侵蚀是在纳米孔内生长电极以减小中央间隙或物理孔径和控制它们的形状或间隙大小的方法,不仅向内,而且向外。在有些实施方案中,可以制备倒凹电极。

[0158] 图 20 是图 19 所示的纳米孔 23 的顶视图,并描绘了由形成在纳米孔 23 的内侧壁 25 上的捕集聚合物 26 产生的物理孔径 50 和有效孔径 52。在有些实施方案中,储存颗粒可

以用于至少部分地填充纳米孔,以减小分子穿过纳米孔的迁移速率。在有些实施方案中,可以形成熔化的和拉伸的聚合物,并用于减小纳米孔的有效孔径。可以将熔化的和拉伸的聚合物包被在基质(穿过所述基质形成纳米孔)的上面,且可以部分地堵塞纳米孔,例如,在它的开口处。根据不同的实施方案,聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯等聚合物可以用于这样的目的。图 20 描绘了在电极 44 的水平物理孔径 50,和由形成在纳米孔 23 的内侧壁 25 上的感知聚合物 48b 产生的有效孔径 52。

[0159] 图 21 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔 60 移动的 ssDNA 分子 58 的横截面侧视图的示意图。纳米孔 60 包括与电极 63 的内侧壁表面结合的第一种核酸碱基结合剂(亲和剂)62 以及与不同电极 65 的内侧壁结合的第二种不同的核酸碱基结合剂(亲和剂)64。在有些实施方案中,可以重复示例性的多层化结构 66,以提供许多被不同的核酸碱基结合剂(亲和剂)修饰的电极表面层。可以提供至少一个电极层,以检测 4 种不同的核酸碱基 A、C、G 和 T 中的每一种。电极层的数目可以由需要的测序冗余度和每个单个电极的碱基-分辨率(例如,分辨 4 种碱基所需的最少电极数目)决定。

[0160] 图 22 是图 21 所示的纳米孔 60 的顶视图,并显示了被电介质隔离物 70 和 71 隔开的电极 68 和对电极 69。可以看出,电极 68 可以具有比对电极 69 远远更大的暴露的内侧壁,例如,大 50% 至大 400%、大 100% 至大 300%、或大 200% 至大 250%。在不同的实施方案中,所述对电极可以位于不同的层上,或可以使用不同的层的电极之一作为对电极,或甚至电极没有嵌入纳米孔中。另外,也可以颠倒电极和对电极的功能。如该图所示,对电极可以是裸露的(即没有固定化的聚合物),但是它也可以具有固定化在它的表面上的聚合物。总之,层可以含有一个或多个电极和一个或多个对电极,它们具有或没有固定化的聚合物,且它们的功能可以颠倒,以及它们的配对可以在运行中重新排列。同样地,在不同的层上的电极和对电极(具有或没有固定化的聚合物)之间的配对也是可能的,以及它们在运行时的功能颠倒或配对重排。

[0161] 图 23 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔 80 移动的 ssDNA 分子 78 的横截面侧视图的示意图。纳米孔 80 包括 4 种不同的选择性的核酸碱基结合剂(亲和剂)82、84、86、88,它们构造成结合 4 种不同的核酸碱基 A、C、G、T。碱基结合剂(亲和剂)82、84、86 和 88 结合 4 种不同的各自的电极 92、94、96 和 98。图 24 是沿着图 23 的线 6-6 做出的、图 23 所示的纳米孔和分子的顶视图,并显示了电极 92 和 94 的排列。提供了单个对电极 101。电极 92 和 94 和对电极 101 彼此被电介质隔离物 103、105 和 107 隔开。所述电介质隔离物可以由聚合物电材料(例如,聚酰亚胺或氟化的聚(亚芳基醚))制成。

[0162] 图 25 是根据本发明的教导的不同实施方案穿过纳米孔 112 移动的 ssDNA 111 分子的横截面侧视图的示意图。纳米孔 112 包括结合在二维碳电极层 114、116 和 118 的表面上的选择性的核酸碱基结合剂(亲和剂)(未显示)。如所示的,电极层 114、116 和 118 彼此被电介质层隔开,所述电介质层包括氮化硅或电介质聚合物。电极 114、116 和 118 是石墨烯,因为它的单层厚度和它的电性质,它会提供优良的分辨率和电转导。纳米孔 112 也可以包括结合在石墨烯层 114、116 和 118 的暴露原子上的选择性的核酸碱基感知剂(未显示)。

[0163] 根据不同的实施方案,可以在纳米孔中提供几何形状,所述几何形状使得纳米孔不对称。可以在纳米孔中提供不对称,其造成分子(例如,ssDNA 分子)在穿过纳米孔移动时扭曲。可以测量为了穿过孔移动而施加于分子的转矩的量。随着 ssDNA 分子的每个碱基经

过不对称,可以施加和测量不同的转矩,因而可以对分子测序。在有些实施方案中,可以将磁珠连接在分子的 2 个相对端上,可拉伸分开所述两端,并可以测量由每个核酸移动经过或穿过不对称所产生的旋转和 / 或转矩,并测定该转矩的特有碱基。

[0164] 根据不同的实施方案,提供了一种方法,所述方法包括:穿过包括至少一个石墨烯层的基质,提供和 / 或形成纳米孔。所述纳米孔可以包括内侧壁,所述内侧壁的至少一部分包括暴露的石墨烯表面。通过向其共价地结合核酸碱基结合剂(亲和剂)的反应,可以修饰所述暴露的石墨烯表面。所述结合剂(亲和剂)可以包括羰基连接部分和脱氧核糖核苷酸磷酸酯。在有些实施方案中,所述磷酸酯可以包括二磷酸酯或三磷酸酯。

[0165] 图 26 是根据本发明的教导的不同实施方案可以用作二维碳电极层的石墨烯层的示意图。图 27 是图 26 的一部分的放大图,显示了石墨烯层中相邻碳原子的核之间的平均距离。使用石墨烯可以提供原子薄的电极。使电极厚度最小化,可以提高分辨率,且可以与本文所述的许多官能化的核酸碱基结合剂(亲和剂)一起使用。石墨烯可以用于感知分子的和处理信号的电子器件的在芯片上(on-chip)集成。参考下述文章,可以更充分地理解关于石墨烯的使用的其它细节:Yu-Ming 等人,Operation of Graphene Transistors at Gigahertz Frequencies, IBM T. J. Watson Research Center 出版, Yorktown Heights, New York (2008 年 12 月 19 日),它通过引用整体并入本文中。

[0166] 根据不同的实施方案,提供了一种形成纳米孔结构的方法。图 28 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图,所述方法可以用于制备根据本发明的教导的不同实施方案的纳米孔。所述方法可以包括:处理穿过基质 122 形成的纳米孔 120,所述基质 122 包括至少一个二氧化硅材料层 124。纳米孔 120 可以包括内侧壁 126,所述内侧壁 126 具有暴露的硅烷醇基。所述暴露的硅烷醇基可以与含有氨基的烷氧基硅烷反应,以将硅烷醇基转化成氨基。图 28 描绘了这样的反应。如显示的,对在二氧化硅层的暴露的内侧壁上的硅烷醇基进行氨基甲硅烷基化。

[0167] 如此形成的氨基可以与 N-羟基琥珀酰亚胺的丙烯酸酯和 N,N-二甲基丙烯酰胺的共聚产物反应。图 29 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图,其中通过使 N-羟基琥珀酰亚胺的丙烯酸酯和 N,N-二甲基丙烯酰胺的反应产物与暴露的内侧壁 126 上的氨基(通过图 28 描述的方法步骤形成)反应,使捕集或缠绕共聚物键合在纳米孔 120 的暴露的内表面上。所述反应产生共价地键合在暴露的内侧壁 126 上的共聚物。

[0168] 可以使用不同的分子量来细调可以提供的捕集或缠绕的量。可以使用在 0.1-10MDa、0.75-5MDa 或 1MDa-2MDa 范围内的分子量。例如,具有约 1.0MDa 的分子量的捕集共聚物可以用于减小 10nm 纳米孔的有效孔径。在有些实施方案中,可以将捕集共聚物旋转铸造在纳米孔中。

[0169] 在有些实施方案中,可以如下交联共聚物:通过使 N-羟基琥珀酰亚胺的残余丙烯酸酯与 α, ω -二氨基多元醇(PEG)反应,形成交联产物,所述交联产物进一步增加捕集或缠绕,以减慢或拉伸 ssDNA 在纳米孔中的迁移。

[0170] 图 30 是纳米孔 120 在随后的表面修饰以后的横截面侧视图,其中进一步修饰在暴露的内侧壁 126 上的捕集或缠绕共聚物中的 N-羟基琥珀酰亚胺的残余丙烯酸酯(如图 29 所示)。如图 30 所示,进一步,氨基结束的聚乙二醇可以用于与 N-羟基琥珀酰亚胺的未反应的丙烯酸酯反应,以进一步增加聚合物缠绕。也可以组合地或单独地使用 α, ω -二氨基

多元醇(PEG), 以与 N- 羟基琥珀酰亚胺的未反应的丙烯酸酯反应, 产生交联的 3-D 网络, 以提高捕集特征。

[0171] 得到的表面处理聚合物可以用于减慢 ssDNA 分子穿过纳米孔的迁移, 并用于拉长 ssDNA (随着它穿过纳米孔)。因而, 与未拉长的构象中的碱基的检测相比, 纳米孔中的检测部分可以更容易地检测拉长的 ssDNA 的单个碱基。

[0172] 酯化的丙烯酸可以包括丙烯酸的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯、甲基丙烯酸的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯等。所述丙烯酰胺可以包括甲基丙烯酰胺、N, N- 二甲基丙烯酰胺等。

[0173] 在有些实施方案中, 可以使用水溶性的帽化剂和交联剂。在有些实施方案中, 功能性的帽化剂不仅可以用于提供捕集, 而且可以用于提供选择性的核酸碱基灵敏度。在有些实施方案中, 可以使用 N- 异丙基丙烯酰胺替代 N, N- 二甲基丙烯酰胺或作为 N, N- 二甲基丙烯酰胺的附加, 以提供 LCST 特征。

[0174] 根据不同的实施方案, 提供了一种对穿过基质的纳米孔进行表面修饰的方法, 所述基质包括至少一个贵金属层或贵金属合金层作为电极层。所述电极层可以例如与电压源电连接, 且可以使用赋予电极阳极的应用电势。纳米孔的内侧壁的至少一部分可以由所述至少一层的暴露的表面限定。在有些实施方案中, 所述电极可以包括金。根据不同的实施方案, 暴露的贵金属或其合金可以在其暴露的表面处与硫醇化的化合物反应, 从而形成与暴露的表面的硫连接。所述硫醇化的化合物可以包括脱氧核糖核苷酸三磷酸酯部分等。在有些实施方案中, 所述方法可以另外包括: 使硫醇化的化合物与脱氧核糖核苷酸三磷酸酯反应, 然后使硫醇化的化合物与暴露的表面反应, 且在其它实施方案中, 在使硫醇化的化合物与暴露的表面反应以后, 可以造成这样的反应。

[0175] 在使用中, 可以将电势施加于暴露的表面上, 以建立阳极。在一个示例性的实施方案中, 所述贵金属或贵金属合金包括金, 例如, 纯金或具有大于 95 重量 % 的纯度的金。对于与暴露的金表面的反应, 硫醇化的化合物可以包括硫醇化的聚乙二醇。例如, 硫醇化的化合物可以包括: 通过聚(环氧乙烷)连接物与巯基相连的氨基。在有些实施方案中, 所述方法从形成纳米孔开始, 然后处理所述纳米孔。形成可以通过化学刻蚀、等离子体刻蚀、离子刻蚀、激光打孔、微型机械加工等。

[0176] 图 31 是纳米孔表面修饰方法的横截面侧视图, 所述方法可以用于制备根据本发明的教导的不同实施方案的纳米孔。通过与硫醇化的核酸碱基结合剂反应, 对纳米孔 230 的金阳极层 234 的暴露的内侧壁 232 进行表面修饰。可以使一种或多种不同的核酸结合剂(亲和剂)结合在金阳极 234 的暴露的内侧壁 232 上。在图 31 所示的化学式中, m、n 和 p 可以各自独立地是 0、1-100、1-50、1-20、1-10 或 1-5。图 32A-32F 显示了根据不同实施方案的 6 种各自的硫醇化的多元醇的化学结构, 所述多元醇可以用于在图 31 所示的金阳极 234 的内侧壁表面 232 上形成核酸结合剂。

[0177] 图 33A-33D 显示了 4 种各自的核酸结合剂(亲和剂)的化学结构, 所述结合剂可以与本文所述的不同的糖 / 磷酸酯部分和硫醇化的多元醇反应, 以形成核酸结合剂(亲和剂), 所述结合剂通过硫醇连接而结合到图 31 所示的金阳极 234 的内侧壁表面 232 上。在图 34 中, 显示了一种这样的糖磷酸酯部分, 所述部分具有图 33A-33D 所示的碱基。在有些实施方案中, 每种碱基结合剂(亲和剂)可以包括图 33A-33D 所示的部分之一, 所述部分通过通过 9-N 原子(与 Ade 和 Gua 一样)或通过 1-N 原子(与 Thy 和 Cyt 一样)结合到结合剂的剩余部

分上。在有些实施方案中,官能团可以利用糖基、磷酸酯基团或通过聚腺苷酸、聚胞苷酸、聚鸟苷酸和聚胸苷酸(聚尿苷酸)部分结合到碱基结合剂的剩余部分上。在其它实施方案中,通过 9-N 原子(与 Ade 和 Gua 一样)或通过 1-N 原子(与 Thy 和 Cyt 一样)与结合剂的剩余部分结合的、图 33A-33D 所示的部分之一可以没有连接物地直接结合到碳石墨烯层上。

[0178] 图 34 显示了一种脱氧核糖核苷酸三磷酸酯,其可以在指定的位置包括在图 33A-33D 中所示的碱基之一,以形成根据不同实施方案的核酸结合剂。随着目标链穿过图 31 所示的纳米孔 230 移动,所述结合剂可以暂时地结合靶 ssDNA 链的互补碱基。所述暂时结合可以包括,例如,氢键的形成、范德华力、它们的组合等,导致电流的变化,所述变化可以被检测到,并用于鉴别被碱基结合剂(亲和剂)暂时结合的碱基。

[0179] 图 35 和 36 分别显示了 PNA 部分和 DNA 部分,所述部分可以用于形成根据本发明的教导的其它不同实施方案的核酸碱基结合剂(亲和剂)。

[0180] 使用电化学固定化,可以将核酸碱基结合剂(亲和剂)以可控的方式放在各个电极上。在有些实施方案中,通过电荷吸引力/排斥力,可以移动结合剂(亲和剂),并共价地键合就位。

[0181] 根据本发明的教导的其它实施方案,提供了穿过基质形成的纳米孔。所述纳米孔可以包括内侧壁,且可以具有直径。所述内侧壁可以经过表面修饰,以具有与其表面结合的聚合物,所述聚合物沿半径向内(例如,朝向纳米孔的半径中心)延伸。所述聚合物可以向内延伸这样的距离:所述距离是直径长度的至少 25%,例如,直径长度的约 35%、约 45% 或约 55%。所述内侧壁可以经过表面修饰,以具有与其表面的一侧结合的聚合物,所述聚合物跨直径长度将其自身延伸至孔的相对侧面。所述内侧壁也可以经过表面修饰,以具有聚合物与其表面的多个连接点,所述聚合物延伸以在不同的水平覆盖孔开口。所述直径可以是 100nm 或更小,例如,20nm 或更小,或 10nm 或更小。所述聚合物可以包括本文所述的任一种纳米孔表面修饰聚合物,例如,所述聚合物可以包括酯化的丙烯酸和丙烯酰胺的反应产物、包含脱氧核糖核苷酸磷酸酯部分的硫醇化的化合物的反应产物、包含脱氧核糖核苷酸磷酸酯部分的羧酸的反应产物等。

[0182] 在本发明的教导的其它实施方案中,提供了一种多层纳米孔,其形成在基质中。所述纳米孔可以包括至少部分地由第一层限定的内侧壁。所述第一层可以包括在内侧壁上的暴露的表面。在有些实施方案中,所述暴露的表面可以限定一个电极、一个或多个对电极和一个或多个电介质,所述电介质将所述电极与所述一个或多个对电极隔开。在有些实施方案中,至少 2 个对电极被限定在纳米孔内侧壁处,且每个可以被不同的核酸碱基结合剂(亲和剂)进行表面修饰,所述结合剂共价地键合在暴露的表面处。利用这样的构型,至少 2 种不同的核酸碱基中的任一种可以被第一层电极鉴别出。具有多个不同的电极层的构型可以用于检测所有可能的核酸碱基,和/或提供可用于验证结果的检测冗余。

[0183] 在使用中,可以穿过纳米孔施加电动力诸如电泳场,例如,使用电极对,所述电极对包括在纳米孔上面的电极和在纳米孔下面的对电极。可以排列所述场,并具有这样的强度,使得 ssDNA 分子会穿过纳米孔从一侧移动至另一侧。可以构造可反转的场,所以可以在第一个方向牵拉 ssDNA 穿过纳米孔,然后在相反反向穿过纳米孔。这样的构型可以实现在任一个和两个方向的测序检测。来回方案可以用于提供碱基调用信号的冗余,例如,在正向和反向的双重检查或碱基调用。信号加工可以用于抛弃坏信号、解卷积信号、累加信号、产

生碱基调用、执行这些过程的组合等。

[0184] 根据不同的实施方案,可以使用非水性溶剂作为在其中移动靶核酸的介质。有利地,当使用非水性溶剂时,不会发生水解,且存在更宽的操作电压窗。非水性溶剂也可以提供更低的背景噪音、更清楚的电信号和更好的信噪比(S/N)。非水性溶剂不一定必须是良好的 DNA 溶剂,因为电泳拉长可以补偿靶分子的天然松弛。此外,可以使用这样的非水性溶剂:其具有就 DNA 迁移而言最佳的粘度。所述非水性溶剂可以是,例如,乙腈、DMF、DMSO、或内酰胺。

[0185] 通过向要测序的核酸中加入相对大的分子或大分子,可以促进改善核酸链穿过纳米孔的定向运动的方法。这样的大分子可以例如连接在 ssDNA 片段的一端上,在与电驱动力的方向相反的方向产生流体动力学阻力。所述大分子可以包括聚合物,且可以是中性的或带电荷的,它的分子量不要求是单分散的,即, M_w/M_n 不是必须等于 1。可以用于该目的的示例性的大分子包括在下述文献中描述的那些:例如,Meagher 等人的美国专利申请公开号 US 2008/0241950A1 和 Meagher 等人的 US 2008/0227211A1,它们二者通过引用整体并入本文中。

[0186] 具有可以与本发明的教导一起并作为其部分实现的装置、系统、方法和化学试剂的其它参考文献,包括:Polonsky 等人的美国公开的专利申请号 US 2008/0187915A1, Polonsky 等人的公开 WO 2008/092760A1, Morpurgo 等人的文章, Controlled fabrication of metal electrodes with atomic separation, American Institute of Physics, 第 74 卷, 第 14 期, 第 2084-2086 页(1999), 和 Polonsky 等人的 IBM 研究报告, DNA Transistor, IBM Research Division, RC24242, W0704-094 (2007 年 4 月 18 日),它们通过引用整体并入本文中。

[0187] 本领域技术人员在考虑本说明书和本文公开的本发明的教导的实践以后,会明白本发明的教导的其它实施方案。本说明书和实施示意图仅视作示例性的。

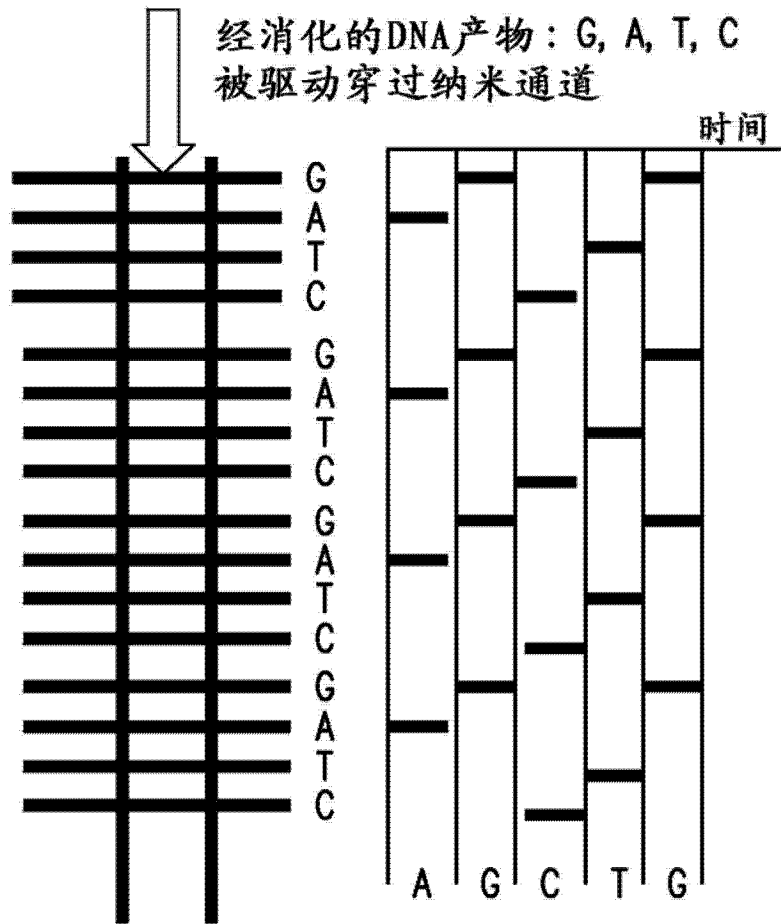


图 1

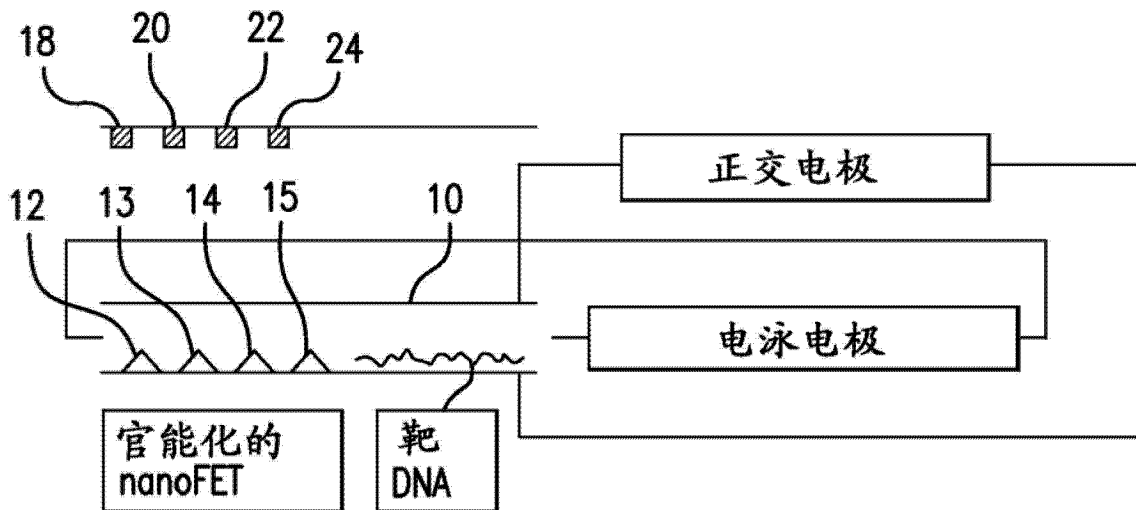
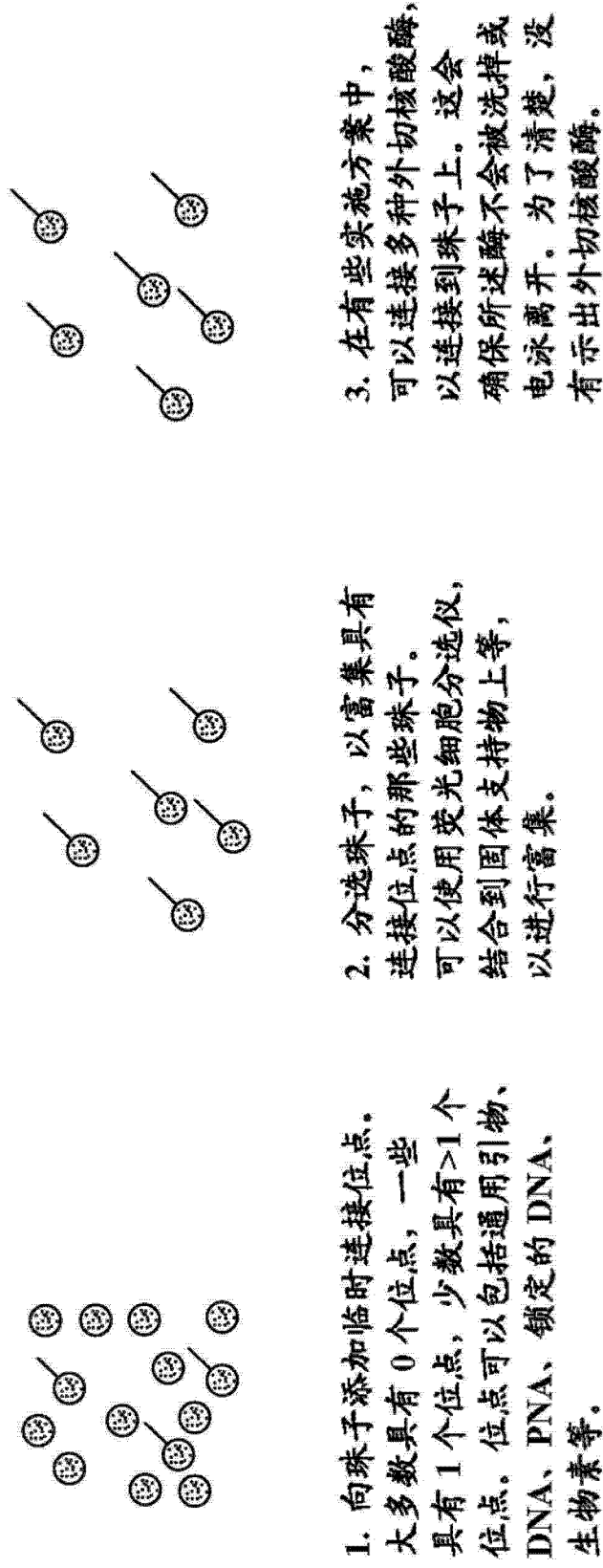


图 2

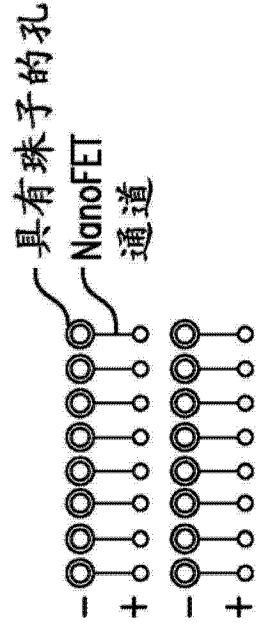


1. 向珠子添加临时连接位点，大多数具有 0 个位点，一些具有 1 个位点，少数具有 >1 个位点。位点可以包括通用引物、DNA、PNA、锁定的 DNA、生物素等。

2. 分选珠子，以富集具有连接位点的那些珠子。可以使用荧光细胞分选仪，结合到固体支持物上，可以进行富集。

3. 在有些实施方案中，可以连接多种外切核酸酶，以连接到珠子上。这会确保所述酶不会被洗掉或电泳离开。为了清楚，没有示出外切核酸酶。

图 3A



4. 使靶DNA与珠子杂交。
抑制外切核酸酶活性直到
希望的时间，例如，使用
温度、缓冲液等。

在该图中夸大了DNA和
连接大小。

5. 将珠子加入 nanoFET
芯片中。使腔的尺寸形成
为容纳具有模板的单个珠
子。

这里示出了电极。

6. 激活外切核酸酶，
并读出序列。

7. 一旦模板被耗尽，
可以排出珠子，并可
以加入新珠子。

图 3B

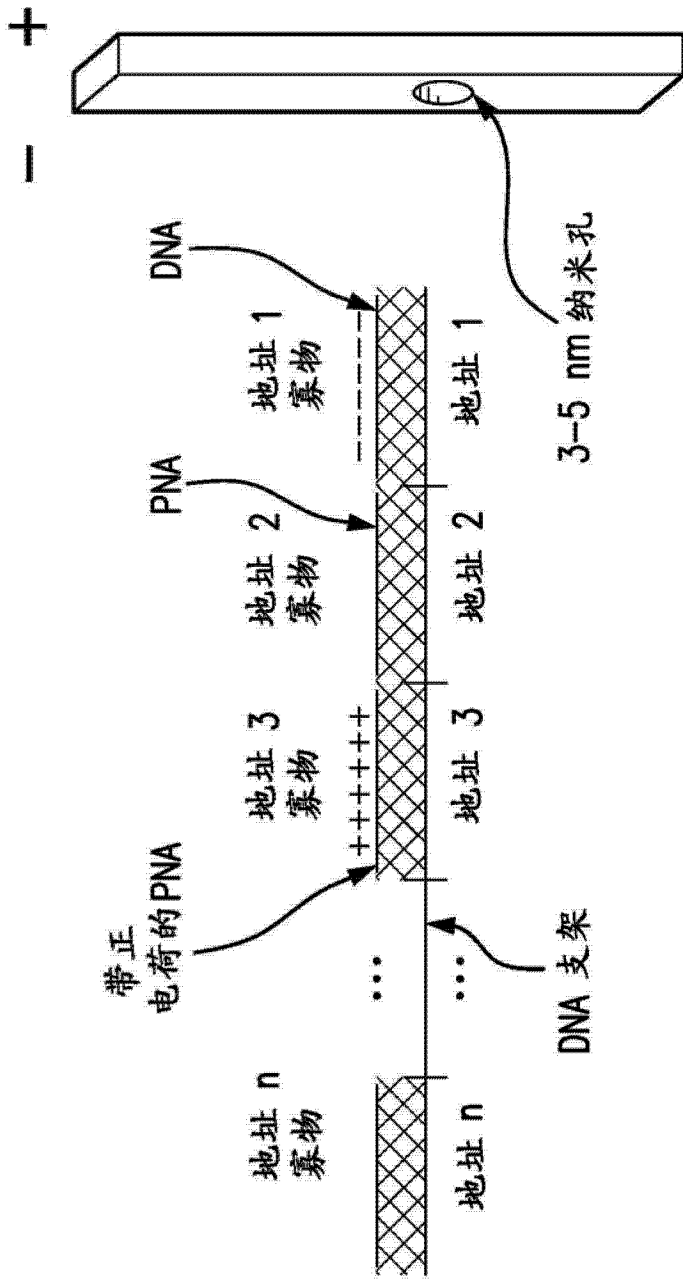


图 4

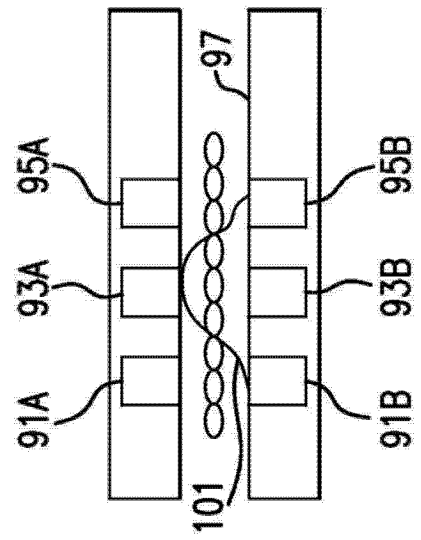


图 5A

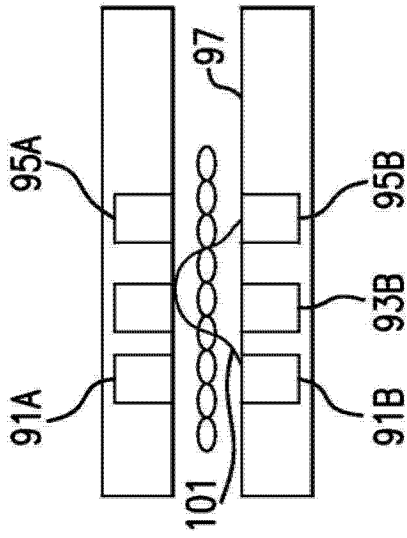


图 5B

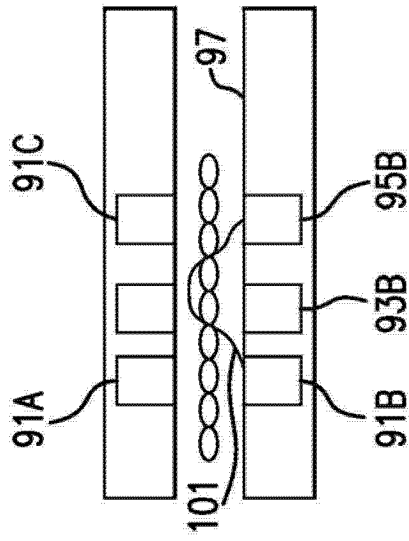


图 5C

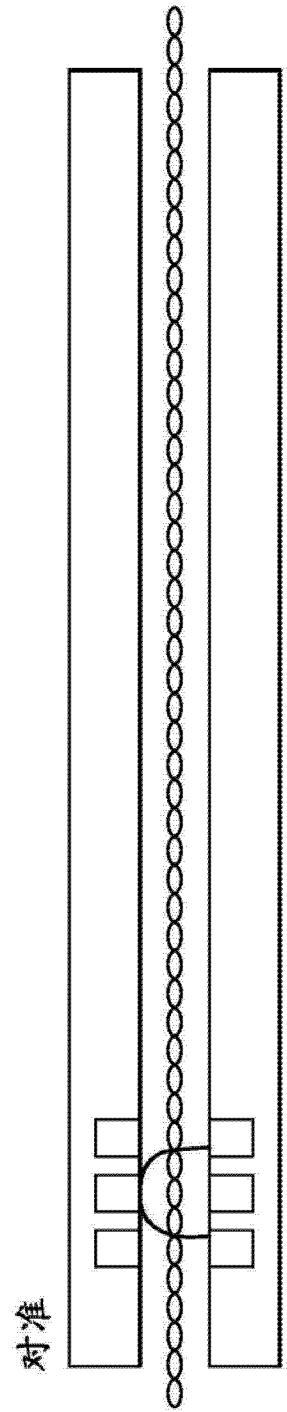


图 6A

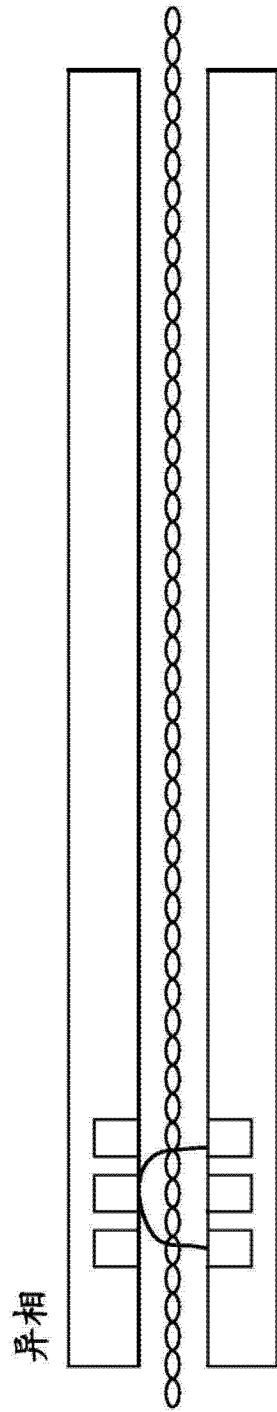


图 6B

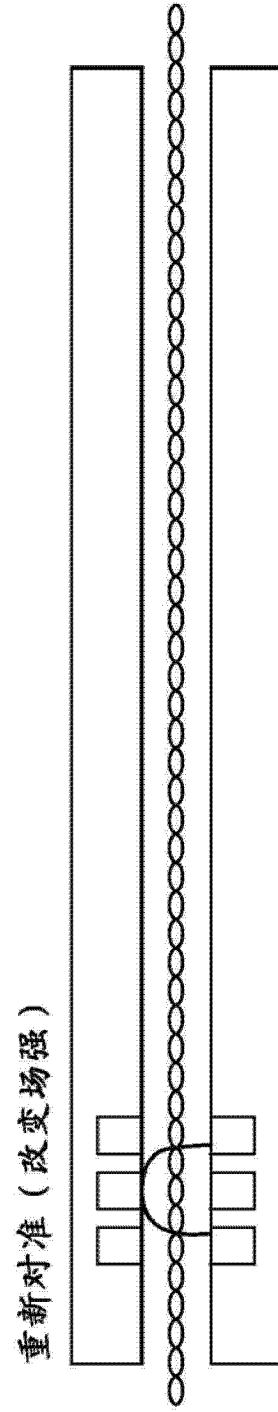


图 6C

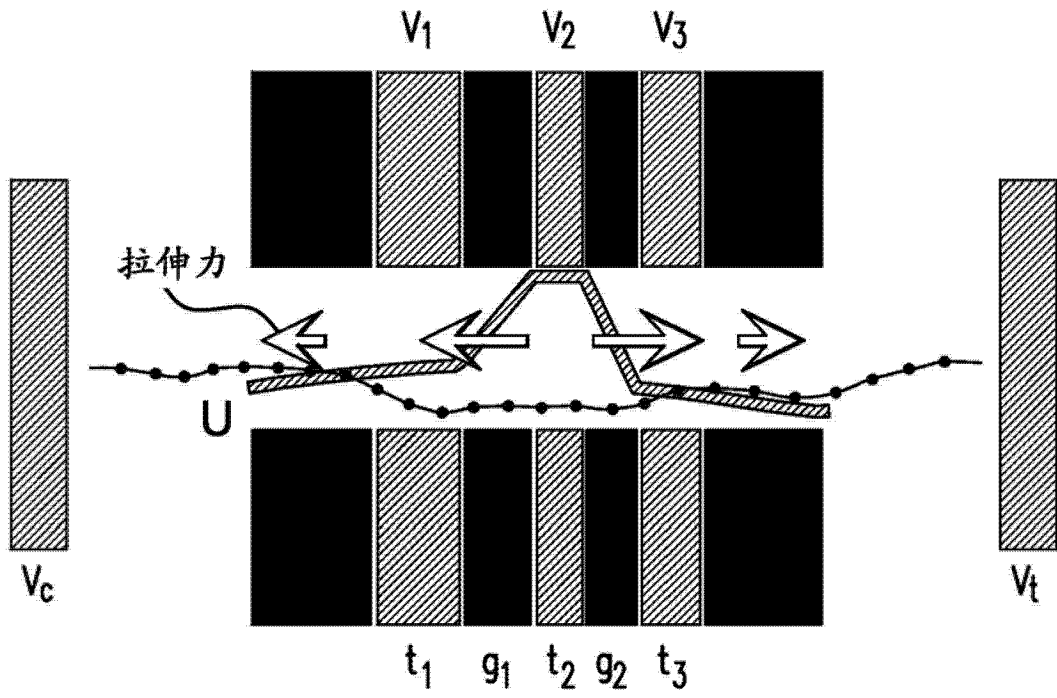


图 7

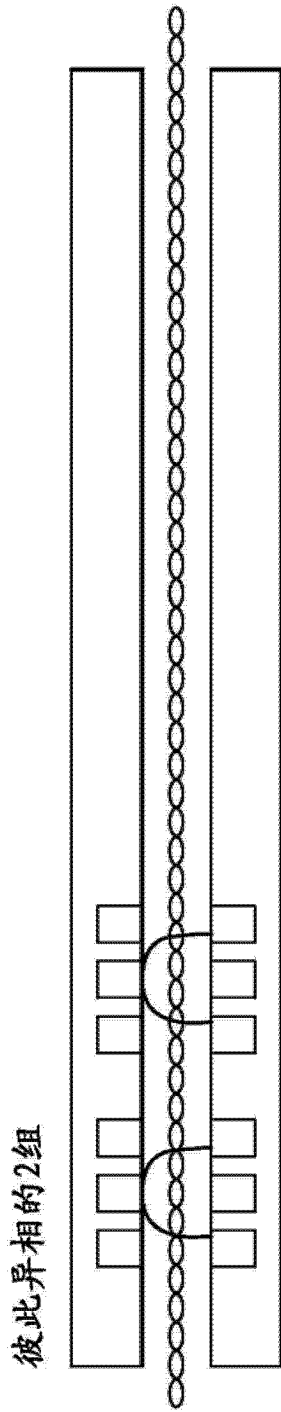


图 8A

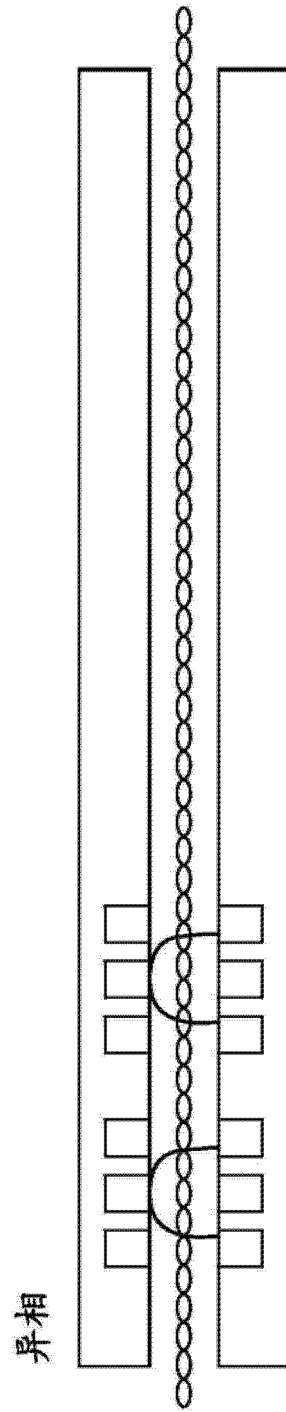


图 8B

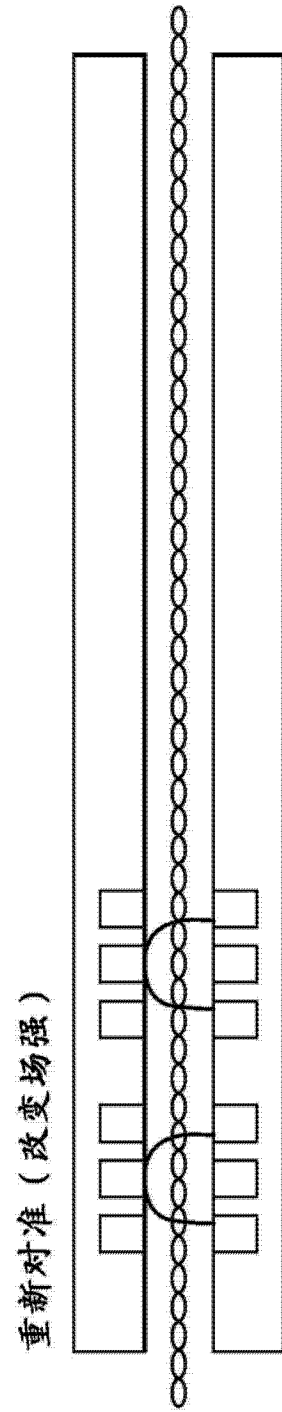


图 8C

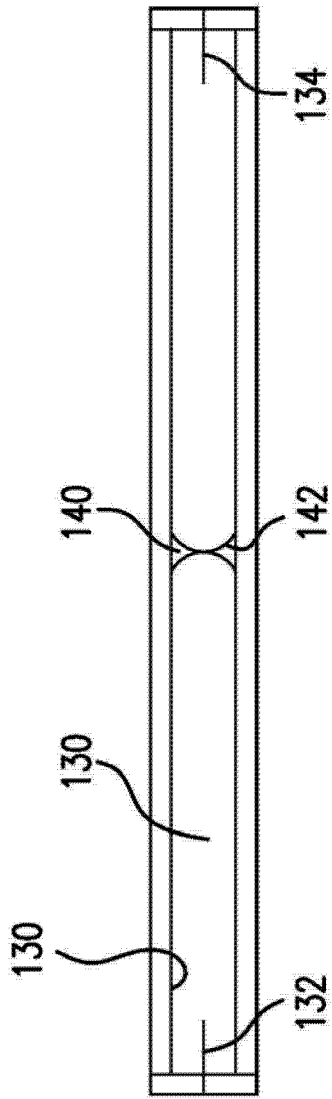


图 9A

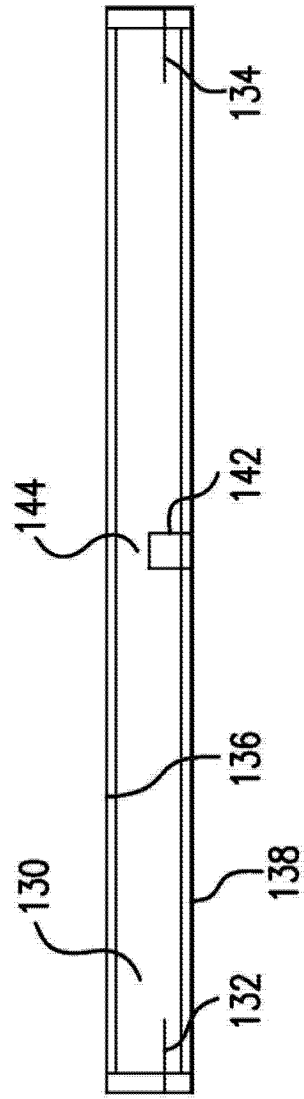


图 9B

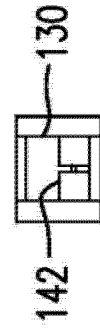


图 9C

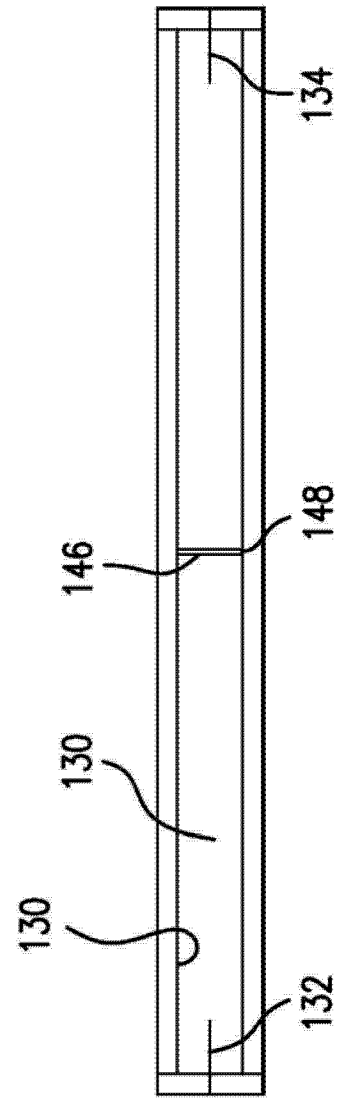


图 10A

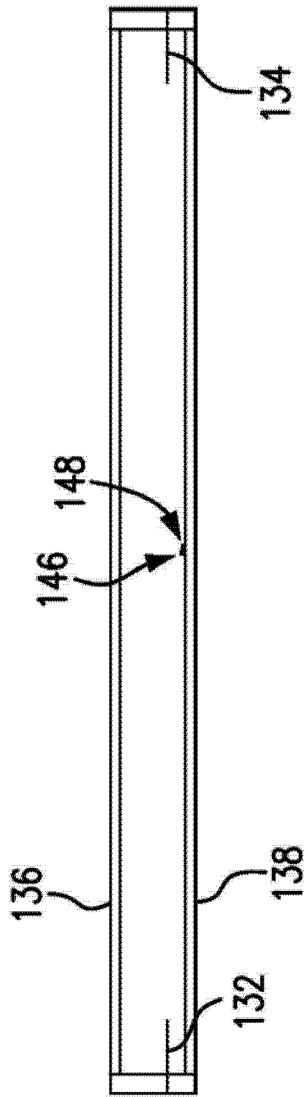


图 10B

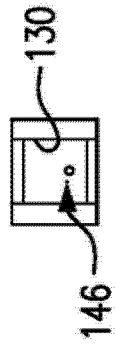


图 10C

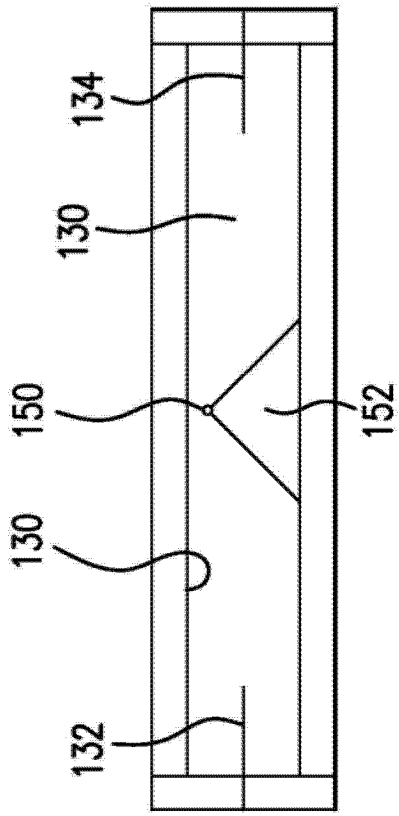


图 11A

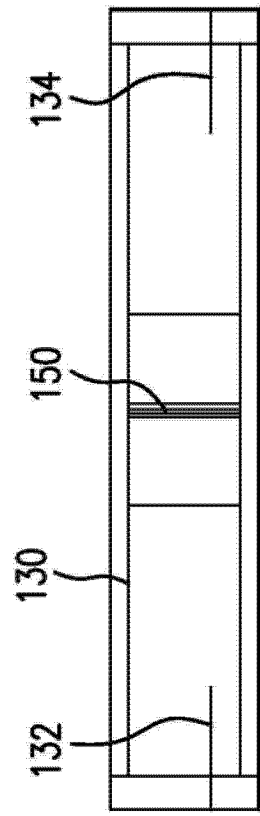


图 11B

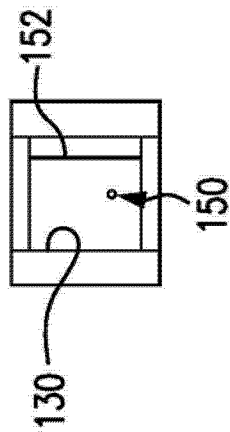


图 11C

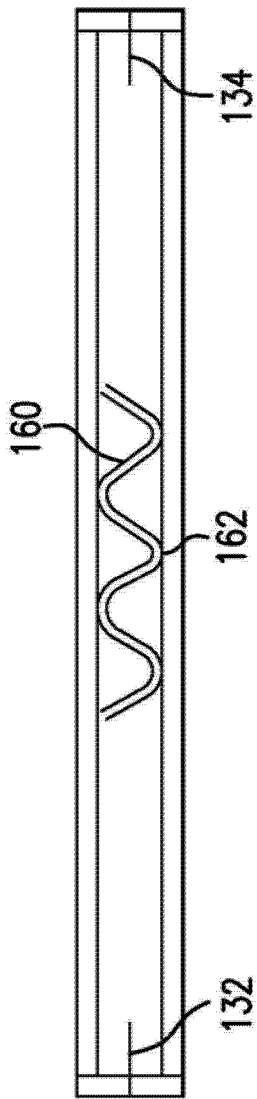


图 12A

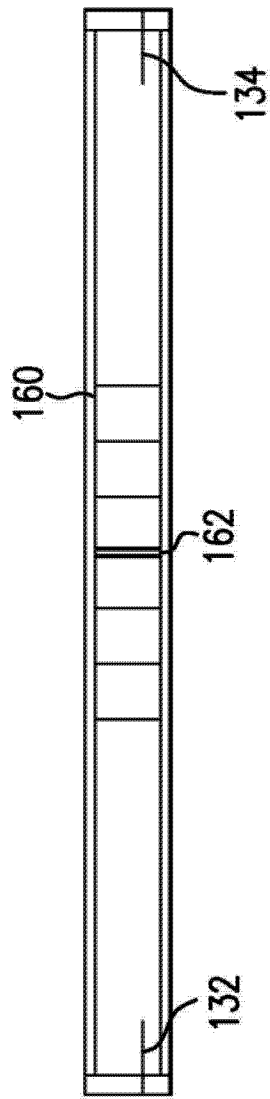


图 12B

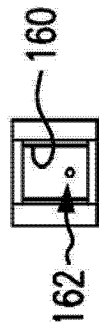


图 12C

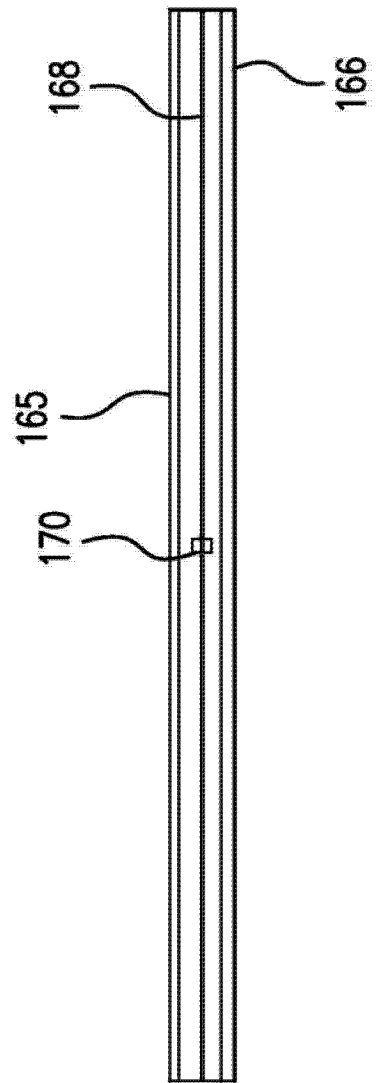


图 13A

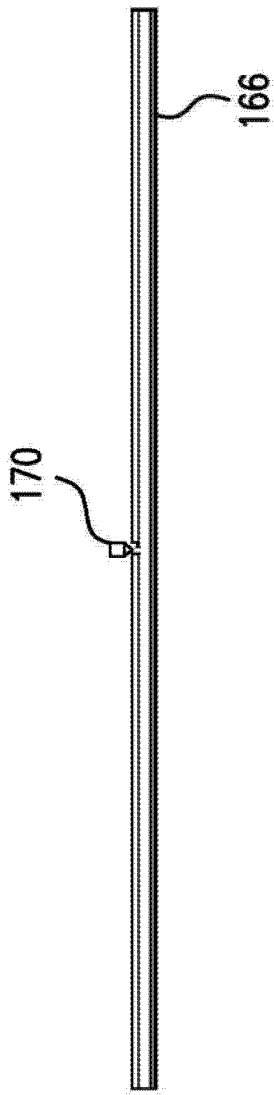


图 13B

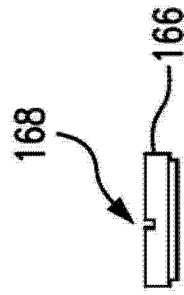


图 13C

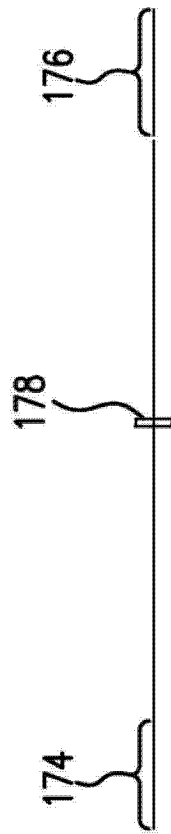


图 14A

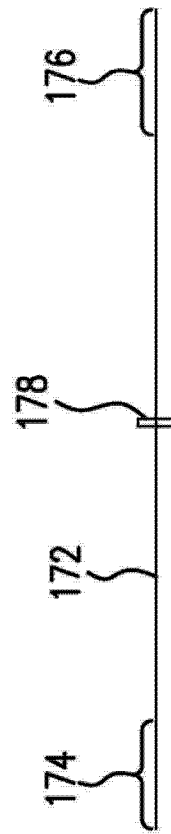


图 14B

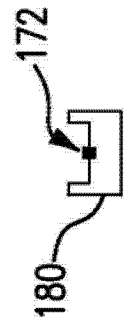


图 14C

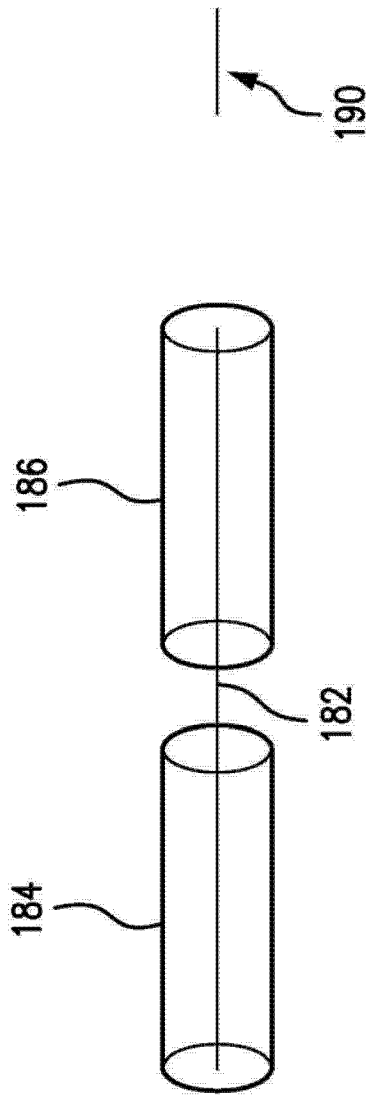


图 15

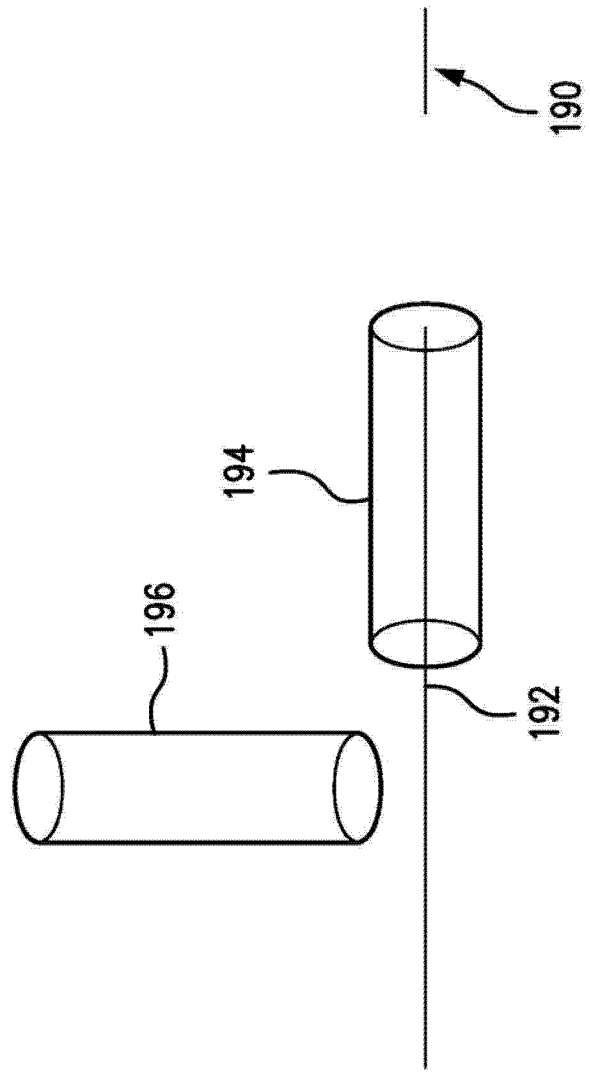


图 16

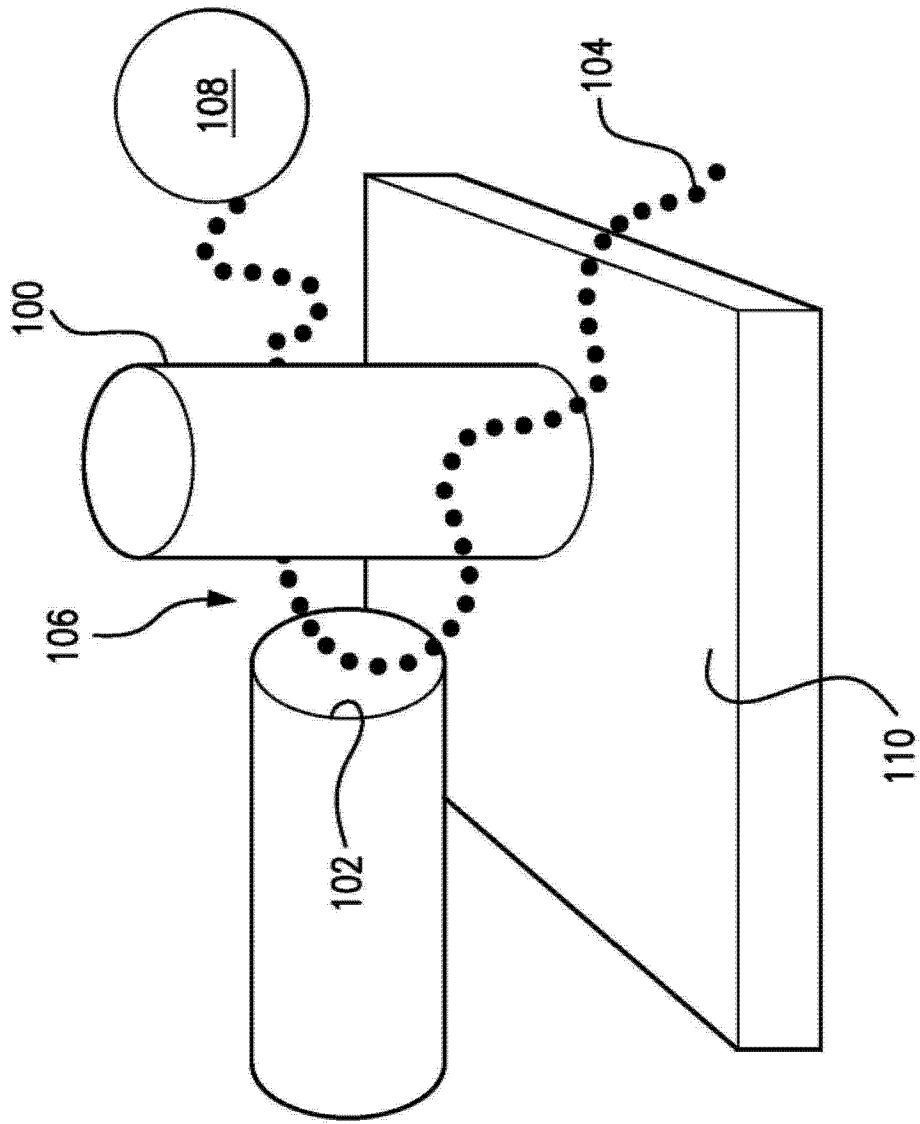


图 17

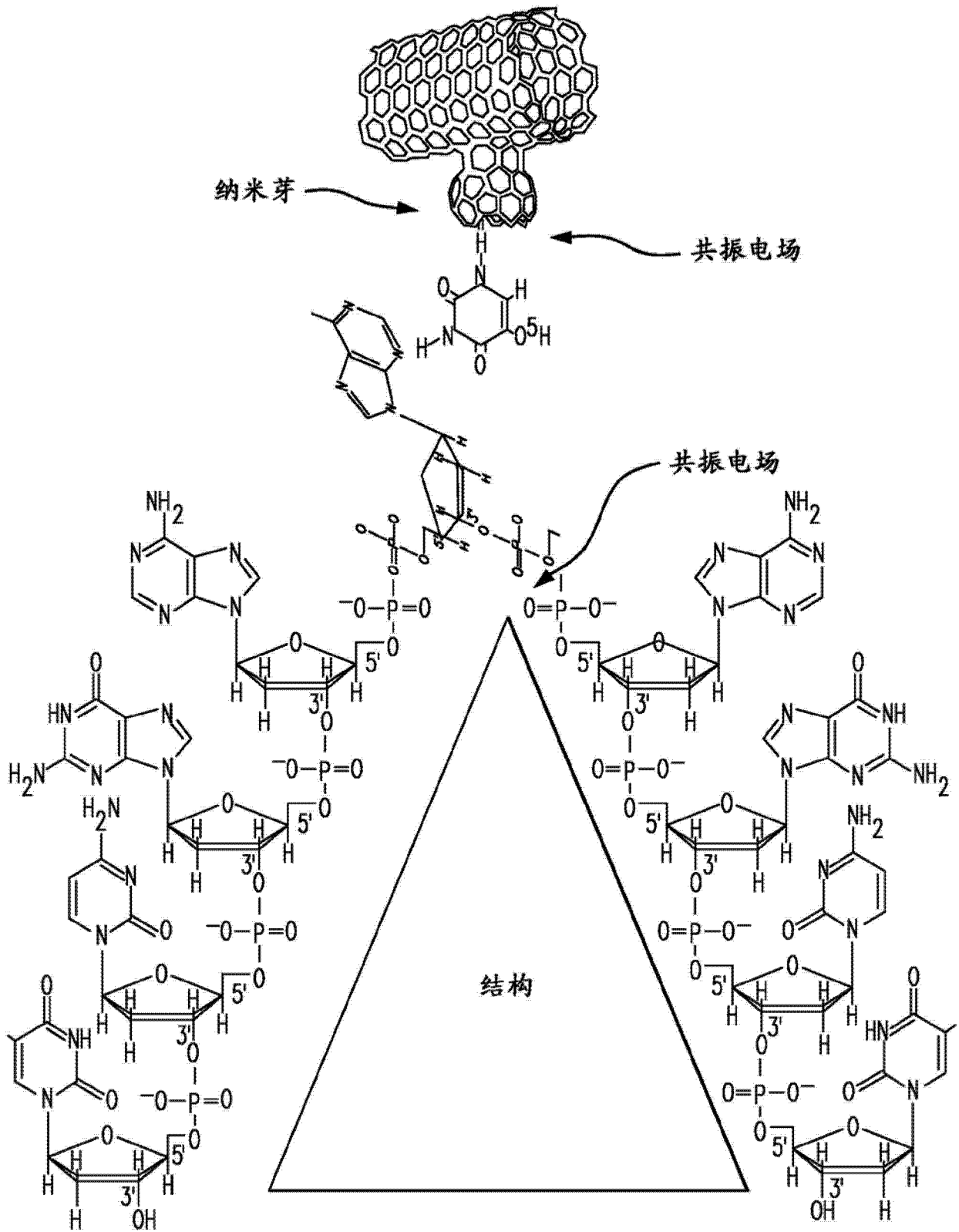


图 18

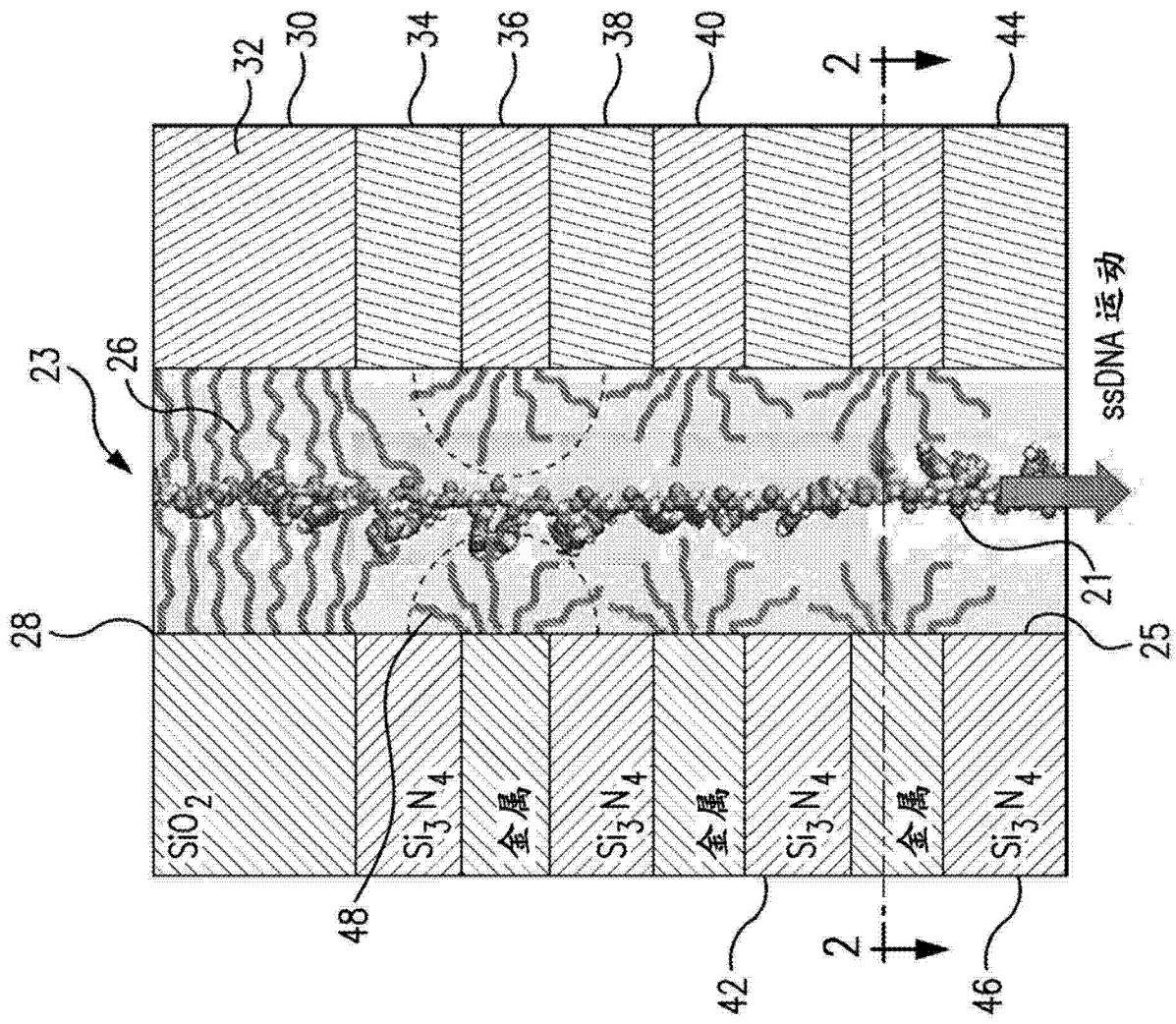


图 19

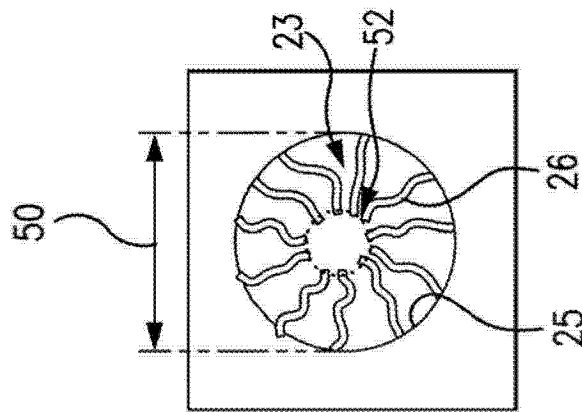


图 20

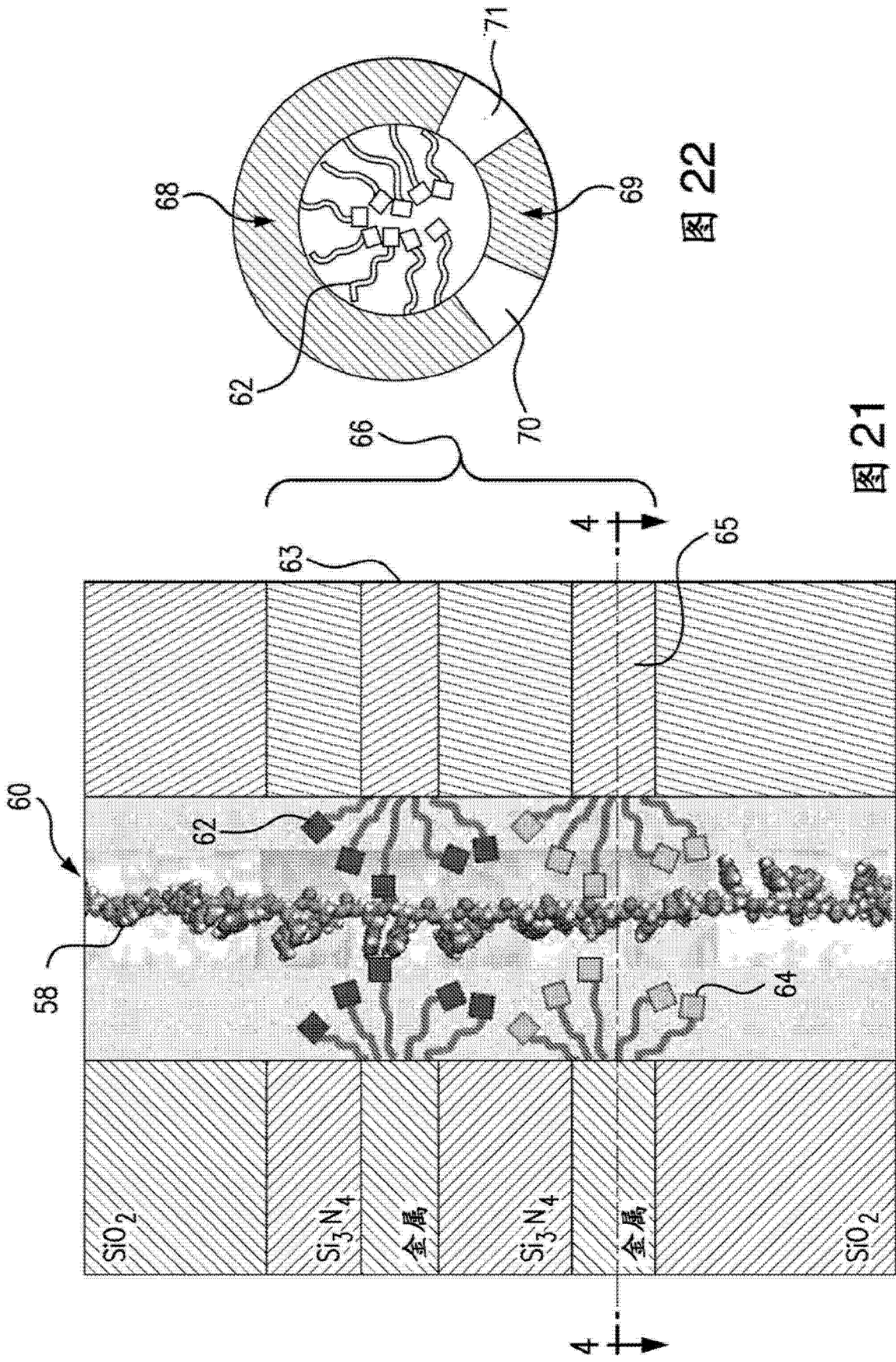


图 21

图 22

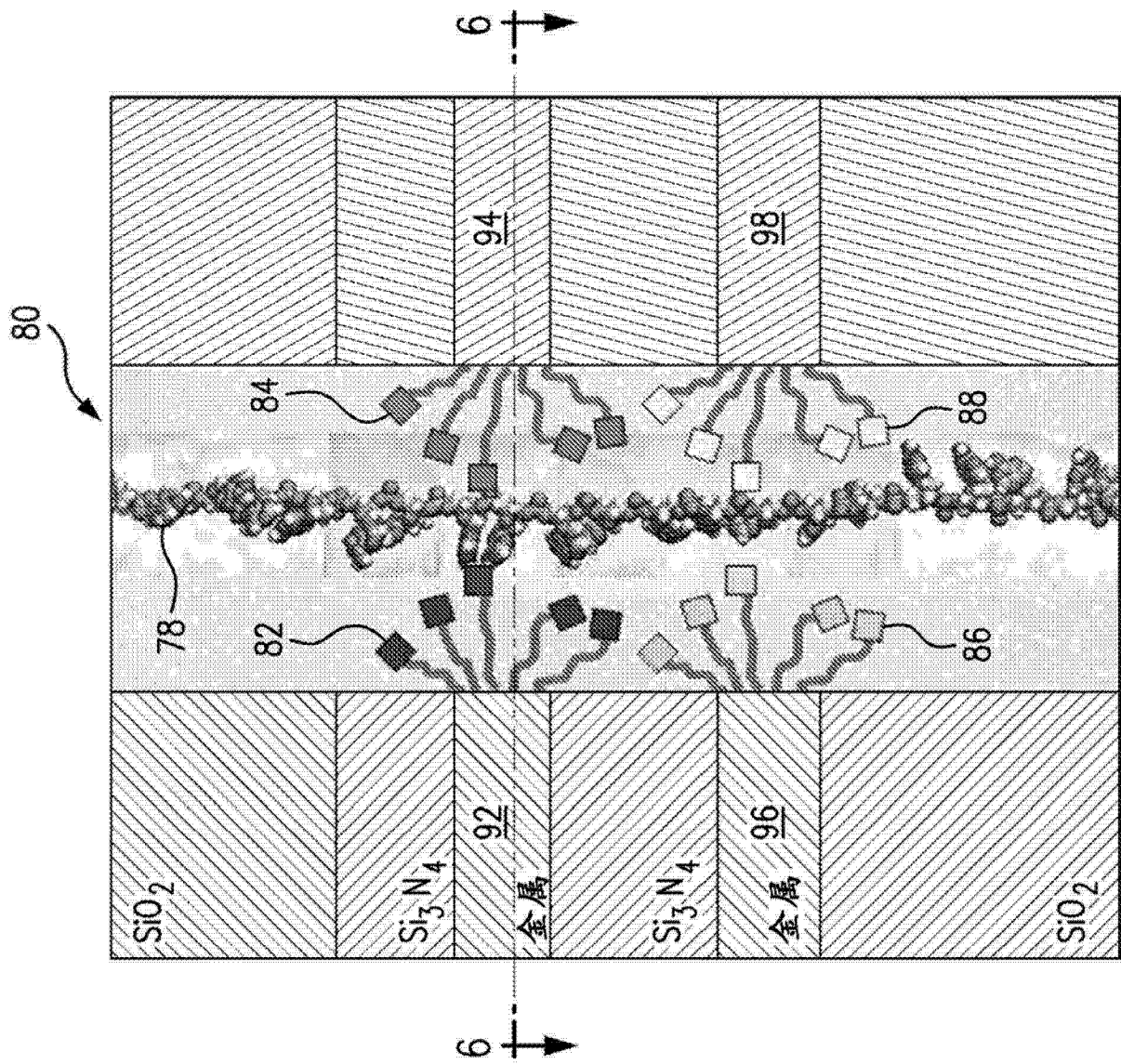


图 23

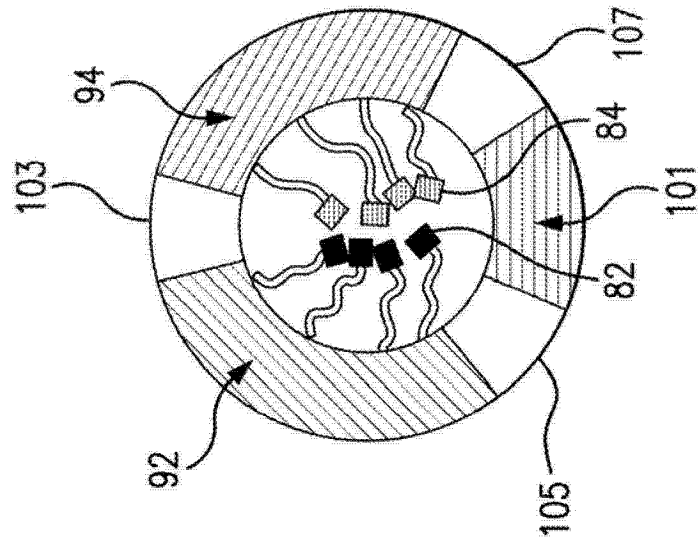


图 24

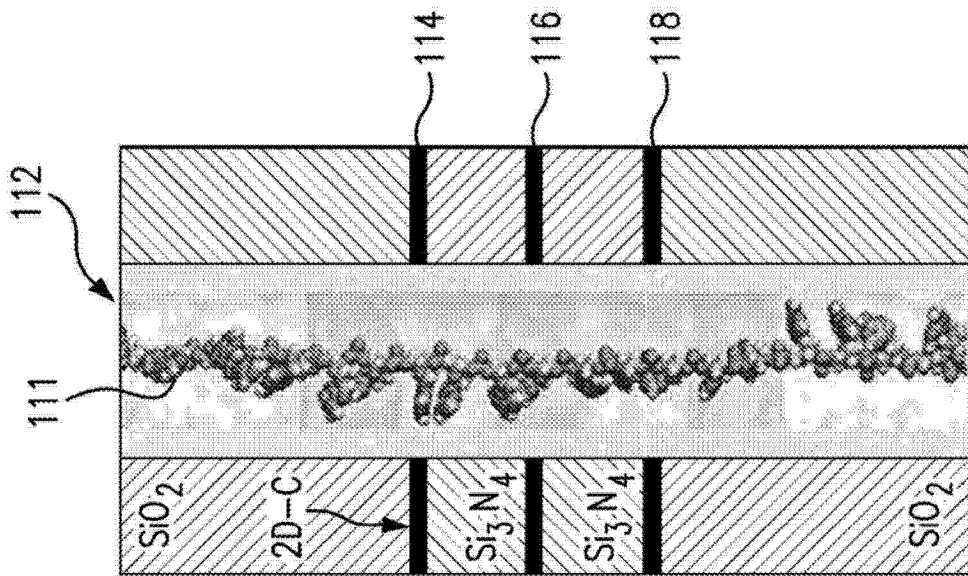


图 25

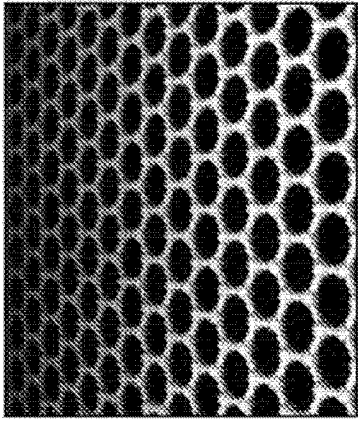


图 26

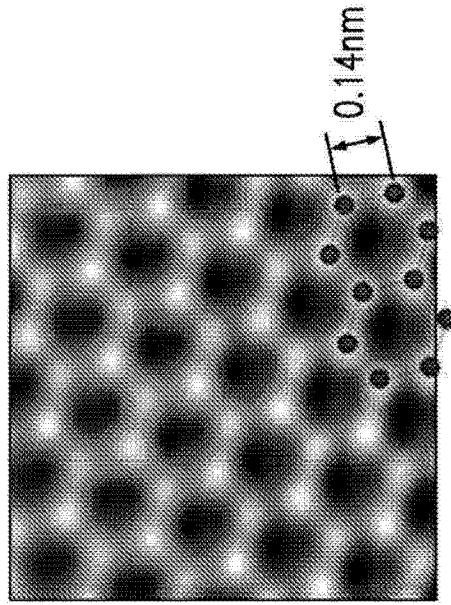


图 27

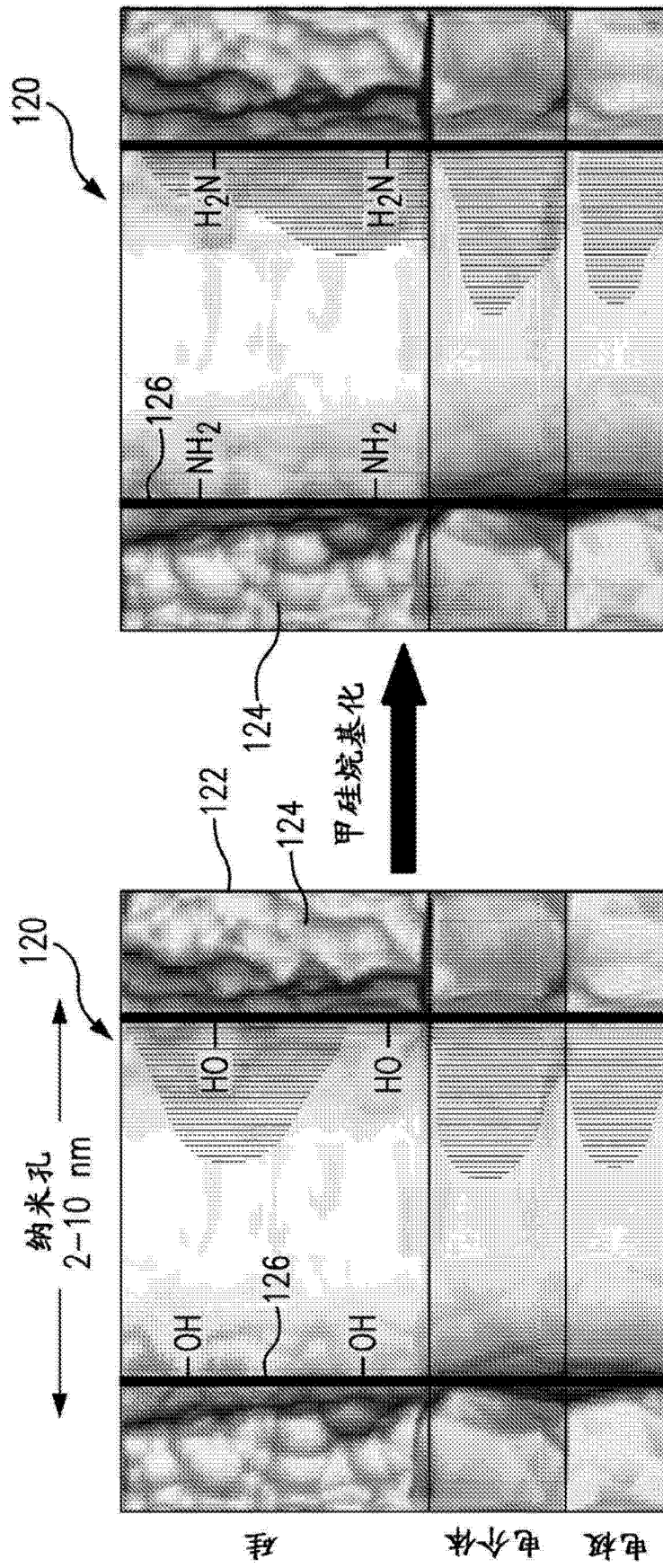


图 28

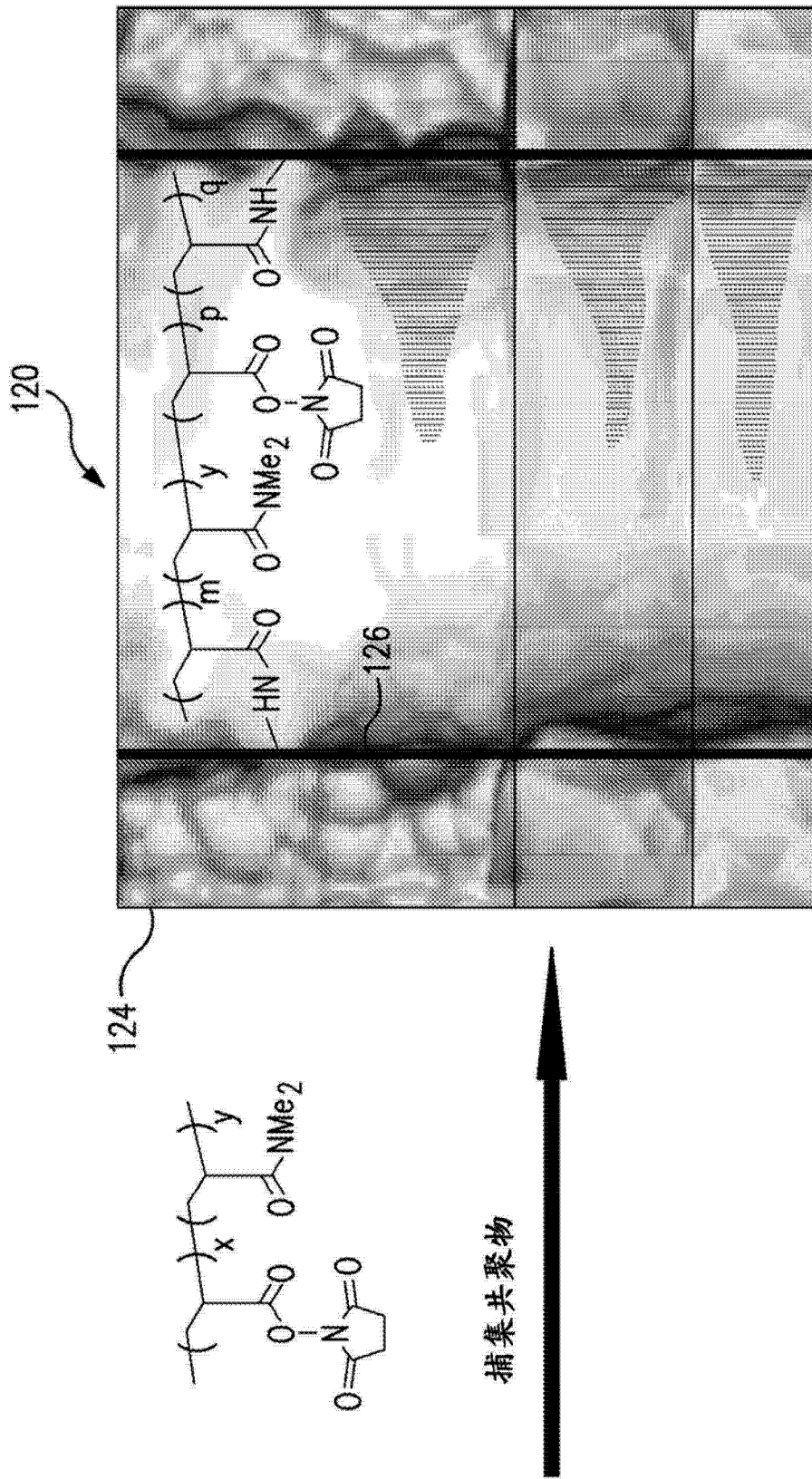


图 29

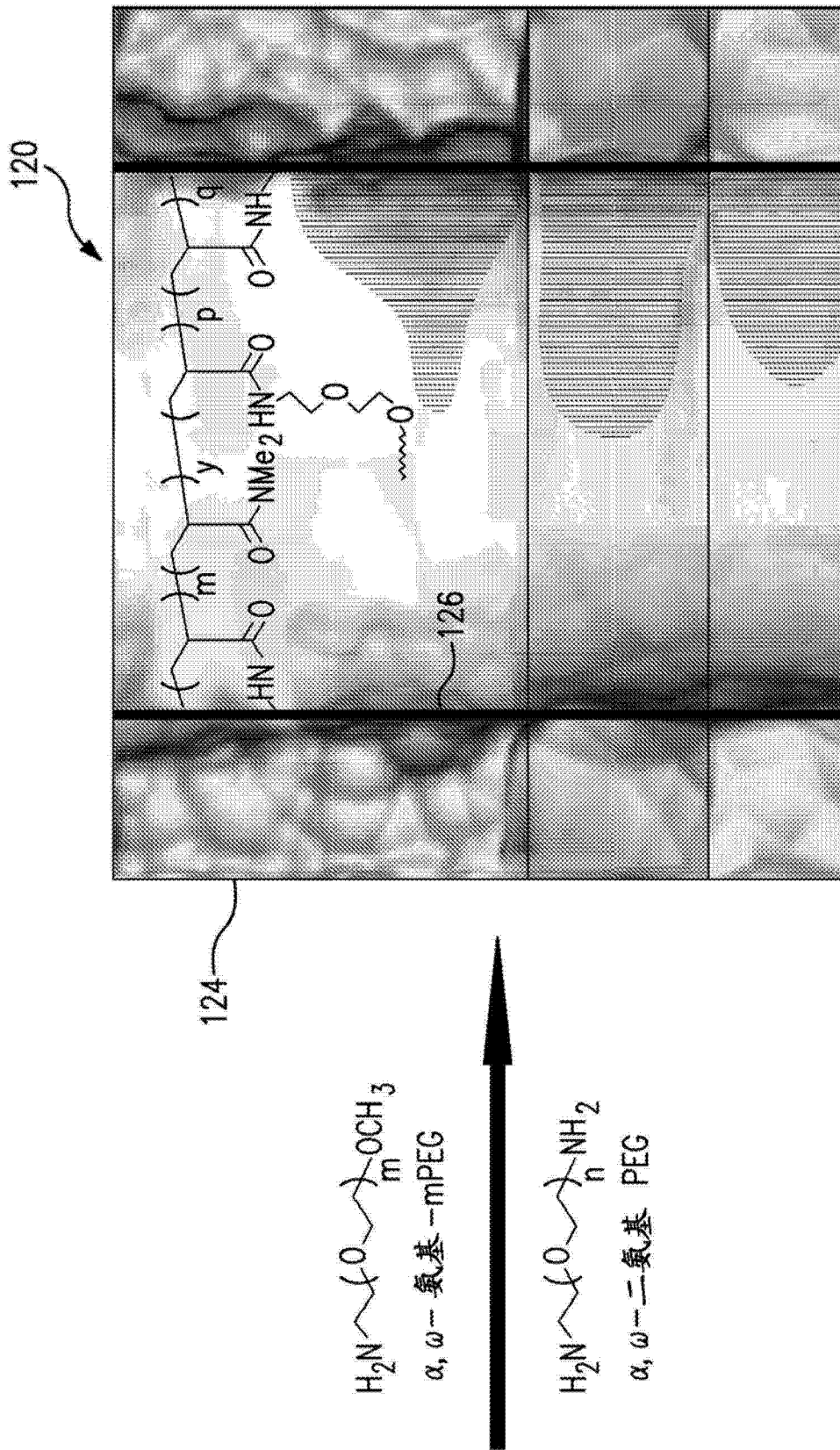
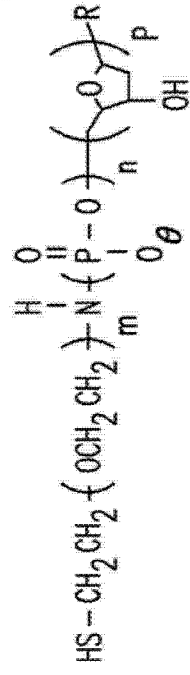
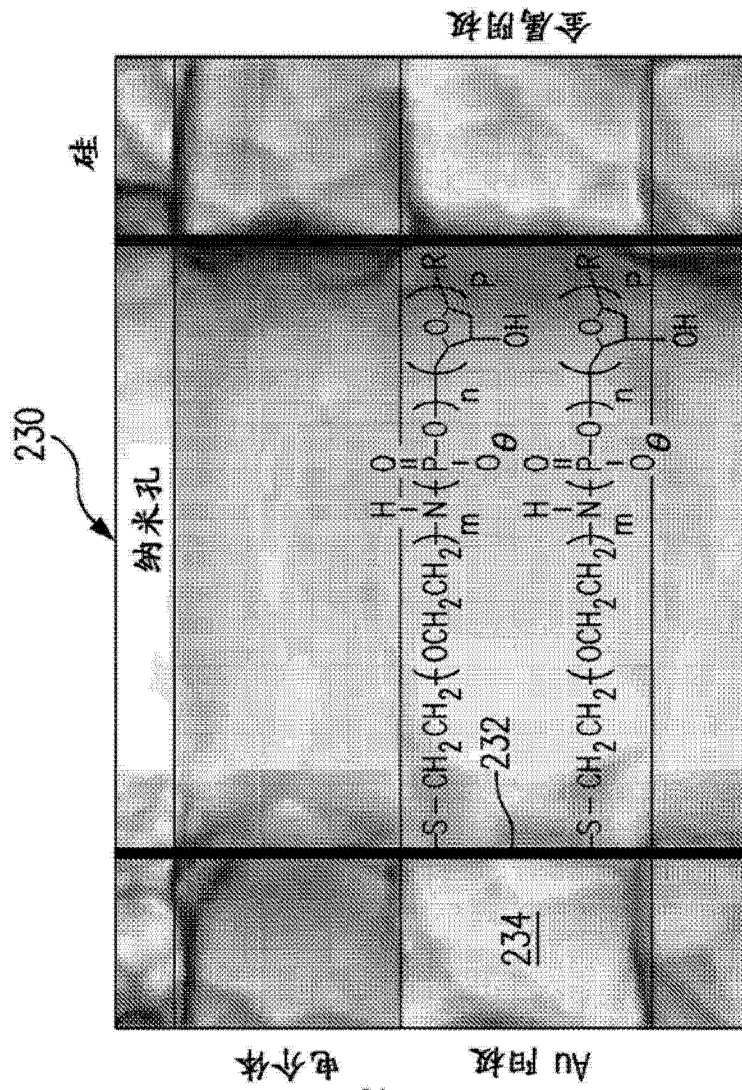


图 30



R 可以是 A, T, C, G, 和其它亲和分子;
n 和 ρ 可以独立地是 0

图 31

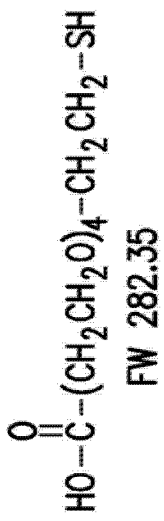


图 32A

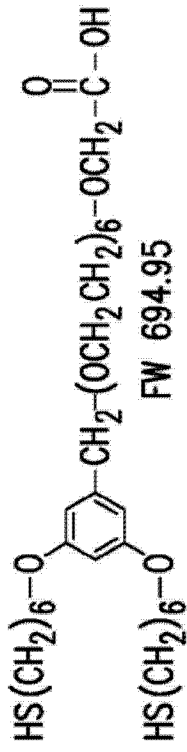


图 32D

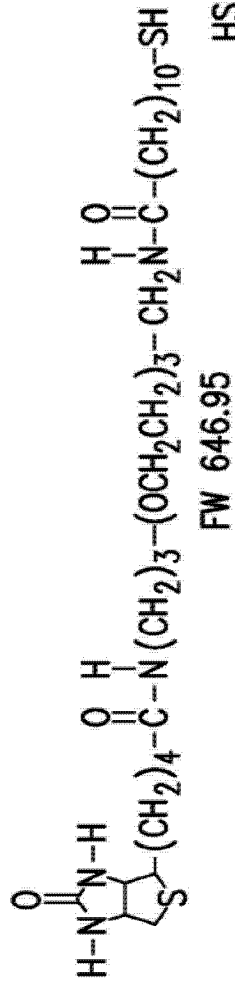


图 32B

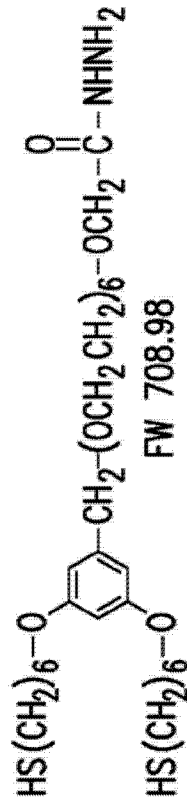


图 32E

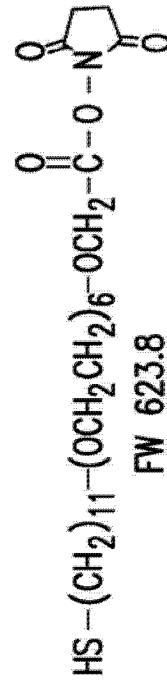


图 32C

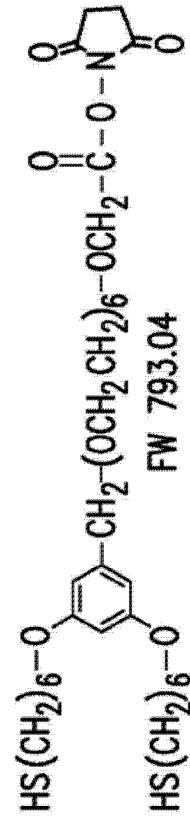


图 32F

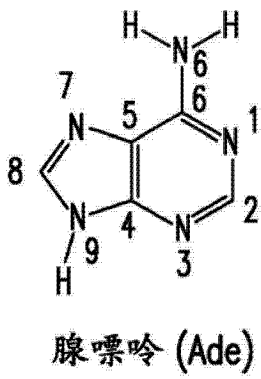


图 33A

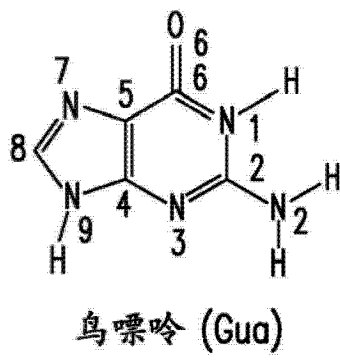


图 33B

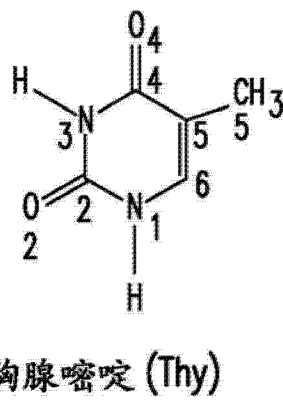


图 33C

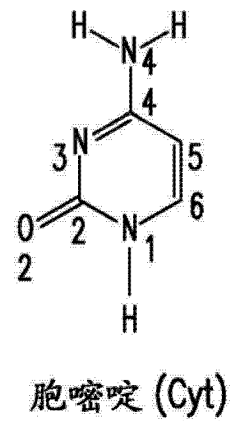


图 33D

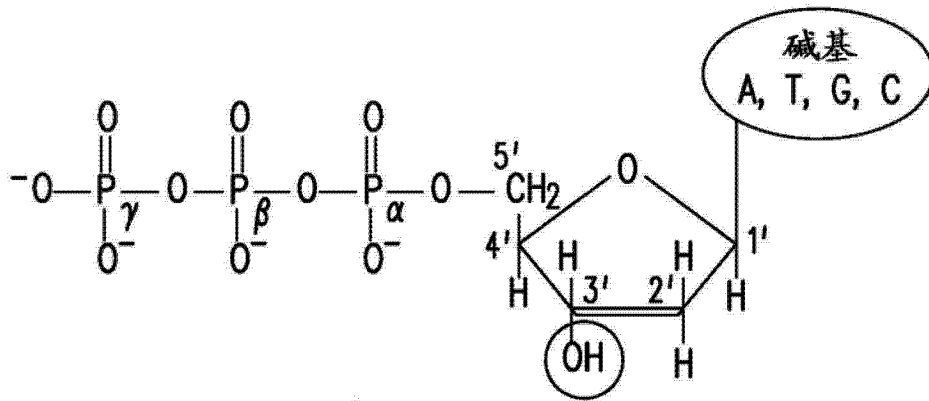


图 34

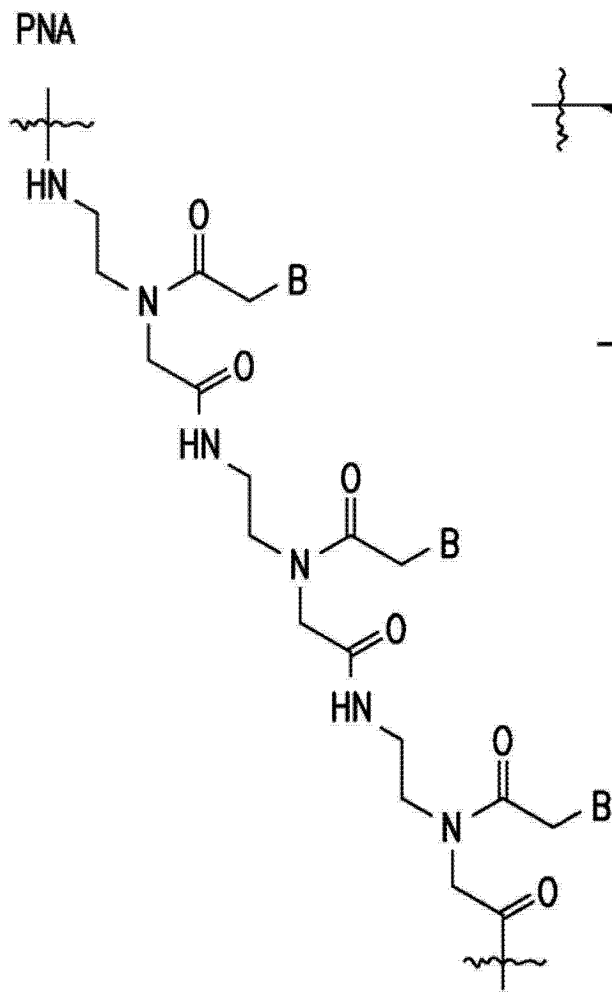


图 35

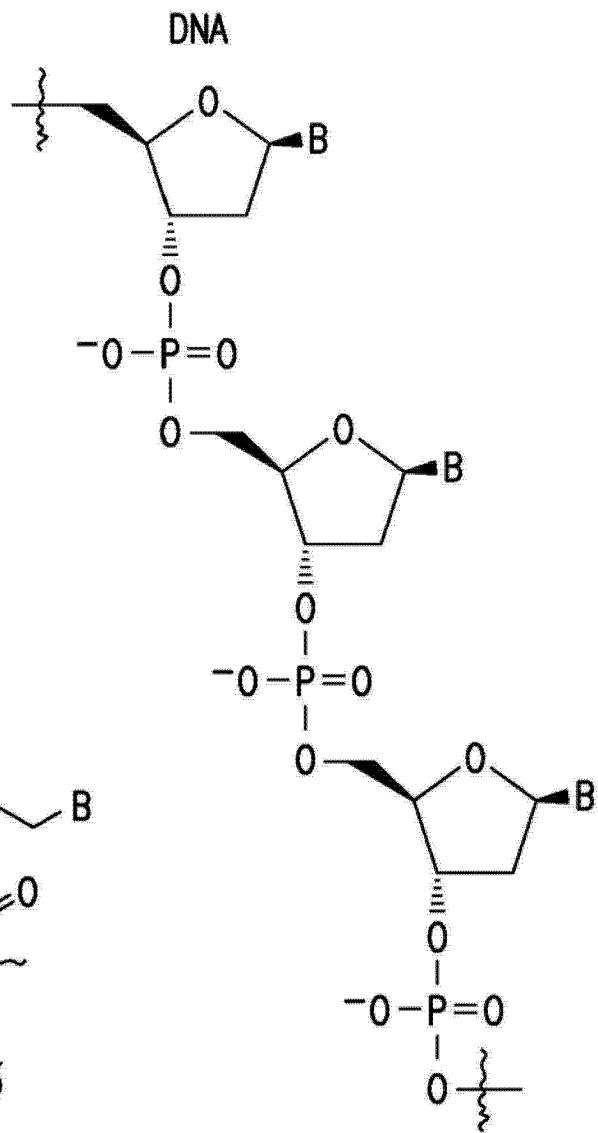


图 36