



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111148987 B

(45) 授权公告日 2023. 04. 14

(21) 申请号 201880047719.7

(22) 申请日 2018.06.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111148987 A

(43) 申请公布日 2020.05.12

(30) 优先权数据
62/521,192 2017.06.16 US
62/527,451 2017.06.30 US
62/551,616 2017.08.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.01.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/037076 2018.06.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/231805 EN 2018.12.20

(73) 专利权人 杜克大学
地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 A·R·勒贝克 C·德威尔
C·拉博达

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
专利代理师 康健 王思琪

(51) Int.Cl.
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
G07H 21/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106029904 A, 2016.10.12
CN 1961206 A, 2007.05.09
US 7796262 B1, 2010.09.14

审查员 李步骞

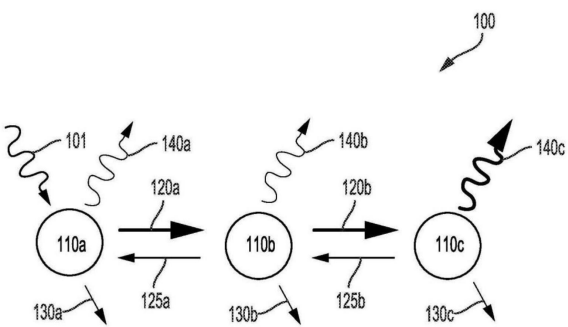
权利要求书6页 说明书28页 附图16页

(54) 发明名称

用于改善标记检测、计算、分析物感应和可
调随机数生成的谐振器网络

(57) 摘要

本发明提供了适用于多种应用的谐振器网络。所述网络包括通过主干(例如,由DNA组成的主干)保持在相对于彼此的位置中的荧光团、量子点、染料、等离子纳米棒或其它光学谐振器。所述网络可以根据指定的时间衰减曲线呈现光学吸收和再发射,例如,以提供用于成像或流式细胞术的时间复用标记。所述网络可以包括呈现暗态的谐振器,使得可以通过在一个或多个谐振器中引起暗态来修改网络的行为。这样的网络可以被配置为逻辑门或其他逻辑元件,例如,以通过单个网络提供对分析物的多路复用检测,以允许调整网络的时间衰减曲线(例如,使用所述网络作为可控随机数发生器),或者提供其他益处。



1. 标记, 包括:

两个或更多个输入谐振器, 其中所述输入谐振器包括荧光团、量子点或染料中的至少一种, 并且所有所述输入谐振器包括在单一波长处被激发的相同的荧光团、量子点或染料;

输出谐振器, 其中所述输出谐振器包括荧光团、量子点或染料中的至少一种;

受体, 其中所述受体是抗体, 适体或蛋白质; 以及

有机主干,

其中所述受体与感兴趣的分析物选择性地相互作用, 以允许检测样品中所述感兴趣的分析物的存在、量或位置,

其中所述两个或更多个输入谐振器、所述输出谐振器和所述受体连接到所述主干, 并且

其中所述主干保持所述输入谐振器和所述输出谐振器的相对位置, 使得能量能够从所述输入谐振器中的每一个传输到所述输出谐振器。

2. 根据权利要求1所述的标记, 其中所述两个或更多个输入谐振器包括第一输入谐振器和第二输入谐振器, 并且其中所述主干保持所述输入谐振器和所述输出谐振器的相对位置, 使得能量能够从所述第二输入谐振器经由所述第一输入谐振器传输到所述输出谐振器。

3. 根据权利要求2所述的标记, 其中能量可以从所述第一输入谐振器传递到所述第二输入谐振器。

4. 根据权利要求2所述的标记, 其中所有所述输入谐振器包括所述相同的荧光团。

5. 根据权利要求3所述的标记, 其中每一个所述的输入谐振器经由相应的接头连接到所述主干,

其中所述接头具有特征性接头长度,

其中所述输入谐振器的特征在于Förster半径, 并且其中所述接头在相应的连接位置处连接到所述主干,

其中所述连接位置彼此分离小于所述Förster半径且大于所述特征性接头长度的两倍。

6. 根据权利要求1所述的标记, 其中所述两个或更多个输入谐振器包括多于四个输入谐振器。

7. 根据权利要求1所述的标记, 其中所述两个或更多个输入谐振器包括超过30个输入谐振器。

8. 根据权利要求1所述的标记, 其中所述输出谐振器是第一输出谐振器, 其中所述标记还包括:

第二输出谐振器; 和

两个或更多个另外的输入谐振器,

其中所述两个或更多个另外的输入谐振器和所述第二输出谐振器连接到主干, 并且

其中所述主干保持所述另外的输入谐振器和所述第二输出谐振器的相对位置, 使得能量可以从每个另外的输入谐振器传输到所述第二输出谐振器。

9. 根据权利要求8所述的标记, 其中所述主干保持所述另外的输入谐振器和所述第一

输出谐振器的相对位置,使得能量可以从至少一个所述另外的输入谐振器传输到所述第一输出谐振器。

10. 根据权利要求1所述的标记,还包括:

一或多个介质谐振器,其中所述一或多个介质谐振器连接到主干,其中所述主干保持至少一个所述一或多个介质谐振器的相对位置,使得该输出谐振器可以从至少一个所述一或多个介质谐振器接收能量,并且其中所述主干保持所述输入谐振器和所述输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述输入谐振器传输到所述输出谐振器,包括所述主干保持所述输入谐振器、所述输出谐振器和所述一或多个介质谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述输出谐振器。

11. 根据权利要求10所述的标记,其中所述输入谐振器吸收在激发波长的光,其中所述输出谐振器发射在发射波长的光,其中所述发射波长不同于所述激发波长,其中所述一或多个介质谐振器的特征在于各自的发射波长,并且其中所述一或多个介质谐振器的发射波长介于所述输入谐振器的激发波长和所述输出谐振器的发射波长之间。

12. 根据权利要求10所述的标记,其中所述一或多个介质谐振器作为所述输入谐振器与所述输出谐振器之间的谐振器导线设置在所述标记内。

13. 根据权利要求10所述的标记,其中所有所述介质谐振器包括相同的荧光团。

14. 根据权利要求10所述的标记,还包括连接到所述主干的辅助谐振器,其中所述主干保持所述输入谐振器、所述输出谐振器、所述一或多个介质谐振器以及所述辅助谐振器的相对位置,使得处于暗态的所述辅助谐振器有助于将能量从所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述输出谐振器。

15. 根据权利要求10所述的标记,还包括连接到所述主干的抑制谐振器,其中所述主干保持所述输入谐振器、所述输出谐振器、所述一或多个介质谐振器以及所述抑制谐振器的相对位置,使得处于暗态的所述抑制谐振器抑制能量从所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述输出谐振器。

16. 如权利要求1所述的标记,其中所述感兴趣的分析物选自自由表面蛋白、分子表位、激素、细胞和细胞表面受体或其他细胞表面元件组成的组。

17. 权利要求1所述的标记,其中所述主干包含至少部分互补的两条DNA链。

18. 一种标记,包括:

输入谐振器,其中所述输入谐振器包括在单一波长处被激发的荧光团、量子点或染料中的至少一种;

一或多个介质谐振器,其中所述一或多个介质谐振器中的第一个靠近所述输入谐振器设置,使得所述一或多个介质谐振器中的第一个可以从所述输入谐振器接收能量;

输出谐振器,其中至少一个所述一或多个介质谐振器邻近所述输出谐振器设置在所述标记内,使得所述输出谐振器可以从至少一个所述一或多个介质谐振器接收能量;

受体,其中所述受体是抗体,适体或蛋白质,并且其中所述受体与感兴趣的分析物选择性地相互作用,以允许检测样品中所述感兴趣的分析物的存在、量或位置;以及

主干,其中所述输入谐振器、所述输出谐振器、所述受体和所述一或多个介质谐振器连接到主干,并且其中所述主干保持所述输入谐振器、所述输出谐振器和所述一或多个介质谐振器的相对位置,使得能量可以从所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到

所述输出谐振器。

19. 根据权利要求18所述的标记,其中所述主干包含至少部分互补的两条DNA链。

20. 根据权利要求18所述的标记,其中所述介质谐振器、所述输入谐振器或所述输出谐振器中的至少一个包括荧光团。

21. 根据权利要求18所述的标记,其中所述一或多个介质谐振器作为所述输入谐振器与所述输出谐振器之间的谐振器导线设置在所述标记内。

22. 根据权利要求18所述的标记,其中所有介质谐振器包括相同的荧光团。

23. 根据权利要求18所述的标记,其中所述输入谐振器是第一输入谐振器,其中所述标记还包括第二输入谐振器,并且其中至少一个所述一或多个介质谐振器邻近所述第二输入谐振器设置,使得至少一个所述一或多个介质谐振器可以从所述第二输入谐振器接收能量。

24. 根据权利要求23所述的标记,其中所述第一输入谐振器的特征在于第一激发波长,并且其中所述第二输入谐振器的特征在于与所述第一激发波长不同的第二激发波长。

25. 根据权利要求18所述的标记,其中所述输出谐振器是第一输出谐振器,其中所述标记还包括第二输出谐振器,其中至少一个所述一或多个介质谐振器邻近所述第二输出谐振器设置在所述标记内,使得所述第二输出谐振器可以从至少一个所述一或多个介质谐振器接收能量。

26. 根据权利要求25所述的标记,其中所述第二输出谐振器的特征在于与所述第一输出谐振器的发射波长不同的第二发射波长。

27. 根据权利要求18项所述的标记,其中所述输入谐振器吸收在激发波长的光,其中所述输出谐振器发射在发射波长的光,并且其中所述发射波长与所述激发波长不同。

28. 根据权利要求27所述的标记,其中所述一或多个介质谐振器的特征在于各自的发射波长,并且其中所述一或多个介质谐振器的发射波长介于所述输入谐振器的激发波长和所述输出谐振器的发射波长之间。

29. 根据权利要求18所述的标记,还包括连接到所述主干的辅助谐振器,其中所述主干保持所述输入谐振器、所述输出谐振器、所述一或多个介质谐振器以及所述辅助谐振器的相对位置,使得处于暗态的所述辅助谐振器有助于将能量从所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述输出谐振器。

30. 根据权利要求18所述的标记,还包括连接到所述主干的抑制谐振器,其中所述主干保持所述输入谐振器、所述输出谐振器、所述一或多个介质谐振器以及所述抑制谐振器的相对位置,使得处于暗态的所述抑制谐振器抑制能量从所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述输出谐振器。

31. 根据权利要求18所述的标记,其中所述感兴趣的分析物选自由表面蛋白、分子表位、激素、细胞和细胞表面受体或其他细胞表面元件组成的组。

32. 一种标记,包括:

多个输入谐振器,其中所述输入谐振器包括荧光团、量子点或染料中的至少一种,并且所有所述输入谐振器包括在单一波长处被激发的相同的荧光团、量子点或染料,其中所述多个输入谐振器中的输入谐振器邻近彼此设置在所述标记内,使得所述输入谐振器能够在彼此之间传输能量;

受体,其中所述受体是抗体、适体或蛋白质,并且其中所述受体与感兴趣的分析物选择性地相互作用,以允许检测样品中所述感兴趣的分析物的存在、量或位置;以及

主干,其中所述输入谐振器和所述受体连接到所述主干,并且其中所述主干保持所述输入谐振器的相对位置,使得能量能够在所述输入谐振器之间传输。

33. 根据权利要求32所述的标记,其中所述主干包含至少部分互补的两条DNA链。

34. 根据权利要求32所述的标记,其中所述多个输入谐振器的所有输入谐振器包括相同的荧光团。

35. 根据权利要求32所述的标记,其进一步包括多个输出谐振器,其中所述多个输出谐振器中的输出谐振器连接到所述主干,并且其中所述主干保持所述输入谐振器和所述输出谐振器的相对位置,使得能量能够从所述多个输入谐振器中的各个输入谐振器传输到每个所述输出谐振器。

36. 根据权利要求35所述的标记,其中所述输入谐振器吸收在激发波长的光,其中所述输出谐振器发射在发射波长的光,并且其中所述发射波长不同于所述激发波长。

37. 根据权利要求32所述的标记,其中所述感兴趣的分析物选自自由表面蛋白、分子表位、激素、细胞和细胞表面受体或其他细胞表面元件组成的组。

38. 根据权利要求32所述的标记,其中所述多个输入谐振器包括多于四个输入谐振器。

39. 根据权利要求32所述的标记,其中所述多个输入谐振器包括多于三十个输入谐振器。

40. 一种系统,包括:

样品容器;

光源;

光检测器;和

控制器,其中该控制器被编程为执行以下操作,包括:

使用所述光源照射所述样品容器;

使用所述光检测器,检测来自所述样品容器的多个光子发射的波长和强度中的至少之一;和

基于检测到的多个光子的发射的波长或强度,确定标记的标识,其中确定所述标记的标识包括从一组已知标记中选择所述标识,其中所述一组已知标记包括第一标记和第二标记,其中所述第一标记包括:

第一受体,其中所述第一受体与感兴趣的第一分析物选择性地相互作用,并且其中所述第一受体是抗体、适体或蛋白质;

至少两个第一输入谐振器;

至少一个第一输出谐振器,其中所述第一标记中的第一输入谐振器的数量与所述第一标记中的第一输出谐振器的数量之比为第一值;和

第一主干,其中所述第一受体、所述至少两个第一输入谐振器和所述至少一个第一输出谐振器连接到所述第一主干,并且其中该第一主干保持所述至少两个第一输入谐振器和所述至少一个第一输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述第一输入谐振器传输到所述至少一个第一输出谐振器;以及

其中所述第二标记包括:

第二受体,其中所述第二受体与感兴趣的第二分析物选择性地相互作用,并且其中所述第二受体是抗体、适体或蛋白质;

至少两个第二输入谐振器;

至少一个第二输出谐振器,其中所述第二标记中的第二输入谐振器的数量与所述第二标记中的第二输出谐振器的数量之比具有第二值;和

第二主干,其中所述第二受体、所述至少两个第二输入谐振器和所述至少一个第二输出谐振器连接到所述第二主干,并且其中该第二主干保持所述至少两个第二输入谐振器和所述至少一个第二输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述第二输入谐振器传输到所述至少一个所述第二输出谐振器。

41. 根据权利要求40所述的系统,其中所述第一值和所述第二值不同。

42. 根据权利要求40所述的系统,其中所述操作还包括:

根据所确定的标记的标识,将样品容器中的内容物分选到一或多个位置。

43. 一种造影剂,其包括:

第一标记,包括:

第一受体,其中所述第一受体与感兴趣的第一分析物选择性地相互作用,并且其中所述第一受体是抗体、适体或蛋白质;

至少两个第一输入谐振器;

至少一个第一输出谐振器,其中所述第一标记中的第一输入谐振器的数量与所述第一标记中的第一输出谐振器的数量之比为第一值;和

第一主干,其中所述第一受体、所述至少两个第一输入谐振器和所述至少一个第一输出谐振器连接到所述第一主干,并且其中该第一主干保持所述至少两个第一输入谐振器和所述至少一个第一输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述第一输入谐振器传输到至少一个第一输出谐振器;和

第二标记,包括:

第二受体,其中所述第二受体与感兴趣的第二分析物选择性地相互作用,并且其中所述第二受体是抗体、适体或蛋白质;

至少两个第二输入谐振器;

至少一个第二输出谐振器,其中所述第二标记中的第二输入谐振器的数量与所述第二标记中的第二输出谐振器的数量之比具有第二值;和

第二主干,其中所述第二受体、所述至少两个第二输入谐振器和所述至少一个第二输出谐振器连接到所述第二主干,并且其中该第二主干保持所述至少两个第二输入谐振器和所述至少一个第二输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述第二输入谐振器传输到至少一个第二输出谐振器。

44. 根据权利要求43所述的造影剂,其中所述第一值和所述第二值不同。

45. 根据权利要求43所述的造影剂,其中所述第一输入谐振器和所述第二输入谐振器的吸收波长不同。

46. 根据权利要求43所述的造影剂,其中所述第一输出谐振器和所述第二输出谐振器的发射波长不同。

47. 根据权利要求43所述的造影剂,其中所述第一标记还包括:

一或多个介质谐振器,其中所述一或多个介质谐振器中的第一个靠近所述至少两个第一输入谐振器布置在第一标记内,使得所述一或多个介质谐振器中的第一个可以从所述至少两个第一输入谐振器中的每个接收能量,其中至少一个所述一或多个介质谐振器邻近至少一个第一输出谐振器设置在第一标记内,以使该至少一个第一输出谐振器可以从至少一个所述一或多个介质谐振器接收能量,并且其中所述第一主干保持所述至少两个第一输入谐振器和所述至少一个输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述第一输入谐振器传输到至少一个第一输出谐振器,包括所述主干保持所述第一输入谐振器、所述至少一个第一输出谐振器和所述一或多个介质谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述第一输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述至少一个第一输出谐振器。

用于改善标记检测、计算、分析物感应和可调随机数生成的谐振器网络

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年6月16日提交的美国临时专利申请第 62/521,192号,于2017年6月30日提交的美国临时专利申请第62/527,451 号和于2017年8月29日提交的美国临时专利申请第62/551,616号的优先权,所述临时申请的内容以援引加入的方式并入本文。

背景技术

[0003] 可以将各种荧光团,量子点,拉曼染料和其他光学活性物质掺入标记中。此类标记可用于确定样品中所述标记和/或配置为与所述标记结合的分析物的存在、位置、量或其他性质。这可以包括以一或多种光波长照射样品,以及检测被所述标记响应地反射的光、被所述标记吸收和荧光再发射的光或从所述标记发射的光。响应于对样品的光照而从样品中检测到的光的时间、光谱含量、强度、偏振度或一些其他性质可以用于检测所述样品中所述标记的标识。例如,可以将激发光谱、发射光谱、对光漂白的敏感性或某些其他光学性质方面有所不同的标记文库应用于样品,以检测样品中相应的多种分析物的存在、位置或其他性质。

[0004] 在一些示例中,标记可以包括足够接近的多个荧光团,以使能量可以从该标记的吸收供体荧光团传递到该标记的发射受体荧光团。在这样的示例中,与靶分析物结合的状态或这种标记物的某些其他状态可以与供体和受体之间的距离相关。即,结合到分析物实例的标记可能导致标记构象的变化,使得供体和受体之间的距离增加(或减少)到能量从供体转移到受体的可能性降低(或增加)的程度。在这样的示例中,可以检测标记的整体荧光程度或标记的某些其他光学性质,并将其用于确定样品中所述分析物的存在、位置、量、同种型或某些其他性质。

发明内容

[0005] 本公开的一个方面提供了一种标记,其包括:(i)两个或更多个输入谐振器,每个输入谐振器包括荧光团、量子点或染料中的至少一种;(ii)输出谐振器,其包括荧光团或量子点中的至少一种;(iii)有机主干(organic backbone)。所述两个或更多输入谐振器和所述输出谐振器连接于所述主干,并且所述主干保持输入谐振器和输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个输入谐振器传输到输出谐振器。

[0006] 本公开的另一方面提供了一种标记,包括:(i)输入谐振器;(ii)一或多个介质谐振器,其中所述一或多个介质谐振器中的第一个靠近输入谐振器布置,使得所述第一介质谐振器可以从输入谐振器接收能量;(iii)输出谐振器,其中至少一个所述一或多个介质谐振器靠近所述输出谐振器设置在所述标记内,使得所述输出谐振器可以从至少一个所述一或多个介质谐振器接收能量;(iv)主干。所述输入谐振器、输出谐振器和一或多个介质谐振器连接于主干,并且所述主干使得所述输入谐振器、输出谐振器和一或多个介质谐振器的相对位置得以保持,使得能量可以从所述输入谐振器经由一或多个介质谐振器传输到所述

输出谐振器。

[0007] 本公开的另一方面提供一种系统,该系统包括:(i)样品容器;(ii)光源;(iii)光检测器;(iv)控制器。对控制器进行编程以执行以下操作:(a)使用光源照射所述样品容器;(b)使用所述光检测器,在检测波长范围内检测相对于该样品容器的光照从该样品容器发射多个光子的时间;和(c)基于检测到的多个光子发射的时间,确定标记的标识。确定标记的标识包括从一组已知标记中选择所述标记的标识。所述的标记包括:(1)输入谐振器;(2)输出谐振器,其中输出谐振器的特征在于发射波长并且检测波长的范围包括输出谐振器的发射波长;和(3)一或多个介质谐振器的网络,其中所述的输入谐振器、输出谐振器以及一或多个介质谐振器在标记内的相对位置使得响应于被光照激发,能量可以从所述输入谐振器经由所述一或多个介质谐振器传输到所述输出谐振器。

[0008] 本公开的另一方面提供了一种非暂时性计算机可读介质,其上存储有可由至少一个处理器执行指令以执行下述功能的指令:(i)光照包含标记的样品;(ii)在检测波长的范围内检测相对于样品的光照从所述样品发射多个光子的时间,其中所述检测波长的范围包括所述标记的输出谐振器的发射波长;(iii)基于检测到的多个光子的发射时间,确定所述标记的标识。所述标记包括:(a)输入谐振器;(b)输出谐振器,其中该输出谐振器的特征在于发射波长;(c)一或多个介质谐振器的网络,其中所述输入谐振器、输出谐振器以及一或多个介质谐振器在标记内的相对位置使得响应于输入谐振器被光照激发,能量可以从该输入谐振器通过一或多个介质谐振器的网络传输到该输出谐振器。确定标记的标识包括从一组已知标记中选择所述标记的标识。

[0009] 本公开的另一方面提供了一种造影剂,其包括:(i)第一标记;(ii)第二标记。所述第一标记包括:(a)与感兴趣的第一分析物选择性相互作用的第一受体;(b)至少两个第一输入谐振器;(c)至少一个第一输出谐振器,其中所述第一标记中的第一输入谐振器的数量与该第一标记中的第一输出谐振器的数量之比具有第一值;(d)第一主干,其中所述第一受体、至少两个第一输入谐振器和至少一个第一输出谐振器连接到该第一主干,并且该第一主干保持所述至少两个第一输入谐振器和至少一个第一输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述的第一输入谐振器传输到所述至少一个第一输出谐振器。所述第二标记包括:(a)第二受体,其与感兴趣的第二分析物选择性地相互作用;(b)至少两个第二输入谐振器;(c)至少一个第二输出谐振器,其中该第二标记中的第二输入谐振器的数量与该第二标记中的第二输出谐振器的数量之比具有第二值;(d)第二主干,其中所述第二受体、至少两个第二输入谐振器和至少一个第二输出谐振器连接到所述第二主干,并且该第二主干保持所述至少两个第二输入谐振器和所述至少一个第二输出谐振器的相对位置,使得能量可以从每个所述的第二输入谐振器传输到所述至少一个第二输出谐振器。此外,所述的第一值和所述的第二值不同。

[0010] 本公开的另一方面提供了一种方法,包括:(i)光照包含标记的样品;(ii)相对于对样品的光照,在检测波长范围内检测从样品发射多个光子的时间,其中所述的检测波长范围包括所述标记的输出谐振器的发射波长;和(iii)基于检测到的多个光子的发射时间,确定所述标记的标识。所述标记包括:(a)输入谐振器;(b)以发射波长为特征的输出谐振器;和(c)一或多个介质谐振器的网络,其中所述输入谐振器、输出谐振器以及一或多个介质谐振器在所述标记内的相对位置使得响应于输入谐振器被光照激发,能量可以从该输入

谐振器经由一或多个介质谐振器的网络传输到该输出谐振器。确定标记的标识包括从一组已知标记中选择该标记的标识。

[0011] 本公开的另一方面提供一种系统,该系统包括:(i)样品容器;(ii)光源;(iii)光检测器;和(iv)控制器。对所述控制器进行编程以执行以下操作:(a)使用所述光源照射所述样品容器;(b)使用所述光检测器在检测波长范围内检测相对于样品容器的光照从样品容器发射多个光子的时间;(c)基于检测到的多个光子的发射时间,确定所述标记的标识。确定标记的标识包括从一组已知标记中选择所述标记的标识。所述标记包括:以发射波长为特征的输入谐振器,其中检测波长的范围包括所述输入谐振器的发射波长;以及(b)调制谐振器,其中所述输入谐振器和调制谐振器在标记内的相对位置使得能量可以响应于所述输入谐振器被光照激发而在输入谐振器和调制谐振器之间传输。

[0012] 本公开的另一方面提供一种谐振器网络,该谐振器网络包括:(i)具有暗态的第一输入谐振器,其中该第一输入谐振器可以响应于接收到在第一输入激发波长的光照而进入暗态;(ii)读出谐振器,可以从读出波长的光照中接收能量;(iii)输出谐振器;(iv)主干。所述第一输入谐振器、读出谐振器和输出谐振器连接到主干,并且所述主干保持该第一输入谐振器、读出谐振器和输出谐振器的相对位置,使得能量可以从读出谐振器传输到输出谐振器,并且进一步使得能量从所述读出谐振器传输到输出谐振器的概率与该第一输入谐振器是否处于暗态相关。

[0013] 本公开的另一方面提供了一种用于检测分析物的方法,该方法包括:(i)在第一时间段期间,以第一输入波长的光照射谐振器网络;(ii)在第一时间段期间,以读出波长的光照射谐振器网络;(iii)在第一时间段期间,检测从所述谐振器网络的输出谐振器发射的光的强度。该谐振器网络包括:(a)具有暗态的第一输入谐振器,其中该第一输入谐振器可以响应于接收到在第一输入激发波长的光照而进入暗态;(b)读出谐振器,其可以从读出波长的光照中接收能量;(c)介质谐振器;(d)输出谐振器;(e)包括优先结合分析物的受体的传感器;(f)主干。所述的第一输入谐振器,读出谐振器、传感器和输出谐振器连接到主干,并且所述主干保持所述的第一输入谐振器、读出谐振器、介质谐振器、传感器和输出谐振器的相对位置,使得能量可以经由所述介质谐振器从所述读出谐振器传输到所述输出谐振器,并且进一步使得当所述第一输入谐振器处于暗态时,能量从读出谐振器传输到输出谐振器的概率与所述受体是否与分析物的实例结合相关。

[0014] 本公开的另一方面提供了一种方法,包括:(i)在第一时间段期间,以第一输入波长的光照射多个谐振器网络;(ii)在第一时间段期间,以读出波长的光照射多个谐振器网络;(iii)相对于谐振器网络的光照,检测从多个谐振器网络的输出谐振器发射多个光子的时间。所述的多个谐振器网络中的每个谐振器网络包括:(a)第一输入谐振器,该第一输入谐振器具有暗态并且响应于接收到在第一输入激发波长的照射而可以进入暗态;(b)读出谐振器,其可以从读出波长的照射中接收能量;(c)两个或更多的介质谐振器;(d)输出谐振器;(e)主干。所述的第一输入谐振器、读出谐振器、两个或更多介质谐振器和输出谐振器连接到主干,并且所述主干保持所述的第一输入谐振器、读出谐振器、两个或更多介质谐振器以及输出谐振器的相对位置,使得能量可以经由所述介质谐振器从所述读出谐振器传输到所述输出谐振器,并且进一步使得根据时间相关的概率密度函数,所述谐振器网络响应于所述读出谐振器接收到读出波长的光照而从所述输出谐振器发射光子。所述时间依赖概率

密度函数的可检测属性与所述第一输入谐振器是否处于暗态相关。

[0015] 本领域普通技术人员通过阅读以下详细描述并在适当的情况下参考附图将理解上述这些以及其他方面、优点以及替代方案都包含在本发明的范围内。

[0016] 附图简述

[0017] 图1A示出了标记中的谐振器的示意图。

[0018] 图1B示出了图1A中示意性示出的标记的状态转换图。

[0019] 图2A示出了随着时间发生标记的各种终端状态的累积概率。

[0020] 图2B示出了在标记被激发之后,所述标记发射光子的概率为时间的函数。

[0021] 图3A示出了标记中的谐振器的示意图。

[0022] 图3B示出了标记中的谐振器的示意图。

[0023] 图3C示出了标记中的谐振器的示意图。

[0024] 图3D示出了标记中的谐振器的示意图。

[0025] 图3E示出了标记中的谐振器的示意图。

[0026] 图3F示出了标记中的谐振器的示意图。

[0027] 图4A示出了各种不同的标记将发射光子的概率为上述标记被激发之后的时间的函数。

[0028] 图4B示出了从两种不同标记的样品中接收到光子的计数为所述标记被激发后时间的函数。

[0029] 图5示出了示例标记的示意图。

[0030] 图6A示出了标记中的谐振器的示意图。

[0031] 图6B示出了标记中的谐振器的示意图。

[0032] 图6C示出了标记中的谐振器的示意图。

[0033] 图6D示出了标记中的谐振器的示意图。

[0034] 图6E示出了标记中的谐振器的示意图。

[0035] 图6F示出了标记中的谐振器的示意图。

[0036] 图6G示出了标记中的谐振器的示意图。

[0037] 图6H示出了标记中的谐振器的示意图。

[0038] 图7A示出了网络中的谐振器的示意图。

[0039] 图7B示出了网络中的谐振器的示意图。

[0040] 图7C示出了网络中的谐振器的示意图。

[0041] 图7D示出了网络中的谐振器的示意图。

[0042] 图8A示出了网络中的谐振器的示意图。

[0043] 图8B示出了网络中的谐振器的示意图。

[0044] 图8C示出了网络中的谐振器的示意图。

[0045] 图8D示出了网络中的谐振器的示意图。

[0046] 图8E示出了网络中的谐振器的示意图。

[0047] 图8F示出了网络中的谐振器的示意图。

[0048] 图9A示出了网络中的谐振器的示意图。

[0049] 图9B示出了网络中的谐振器的示意图。

[0050] 图10A示出了网络中的谐振器的示意图。

[0051] 图10B示出了网络中的谐振器的示意图。

[0052] 图11示出了示例方法的流程图。

[0053] 图12示出了示例方法的流程图。图13示出了示例方法的流程图。

[0054] 发明详述

[0055] 在以下详细描述中,参考作为其一部分的附图。在附图中,类似的符号通常标识类似的组成部分,除非上下文另有规定。在详细描述,附图和权利要求中描述的说明性实施方案并非意为限制性的。在不偏离本文呈现主题的范围的情况下,可以利用其他实施方案,并且可以做出其他改变。应当理解在附图中示出的本公开的各方面可以以各种不同配置来布置、替换、组合、分离和设计,所有这些都明确地包含在本发明的范围内。

[0056] I. 概述

[0057] DNA自组装和其他新兴的纳米级制造技术允许以纳米级的精度制造指定结构的许多实例。这样的精度可以允许荧光团,量子点,染料分子,等离激元纳米棒或其他光学谐振器相对于彼此定位在精确的位置和/或方向上,以便创建各种光学谐振器网络。可以指定这样的谐振器网络以促进各种不同的应用。在一些示例中,谐振器网络可以被设计为使得它们在光激发(例如,通过光照脉冲)和再发射之间展现出预先指定的时间关系;因此,这可能实现可以使用单一激发波长和单一检测波长检测到的时间复用标记和标签。另外或任选,可以利用相对于激发这些谐振器网络的光再发射时间的概率性质来生成随机变量的样本。这些谐振器网络可以包括一或多个表现出暗态的“输入谐振器”;包括这样的输入谐振器的谐振器网络可以被配置为实现逻辑门或其他结构以控制激子或其他能量通过谐振器网络的流动。然后这样的结构可用于,例如允许通过单一谐振器网络检测多种不同的分析物,控制使用谐振器网络生成的随机变量的分布,进一步多路复用用于显影生物样品的一组标记,或辅助一些其他应用。

[0058] 这些谐振器网络包括荧光团、量子点、染料、拉曼染料、导电纳米棒、发色团或其他光学谐振器结构的网络。该网络还可以包括抗体,适体,脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)链,或其他受体,其配置为允许选择性结合感兴趣的分析物(例如,表面蛋白,分子表位,特征核苷酸序列,或感兴趣分析物的其他特征)。所述标记可用于观察样品,鉴别样品的内含物(例如,鉴别样品中的细胞,蛋白质或其他颗粒或物质),基于其标识对这些内含物进行分选(例如,根据所识别的细胞类型或其他属性在流式细胞仪中对细胞进行分选),或辅助其他一些应用。

[0059] 在示例应用中,可以应用这样的谐振器网络(例如,通过将谐振器网络与抗体,适体或其他分析物特异性受体相连接)来检测生物或材料样品或其他感兴趣环境中大量不同标记的存在、区分或观察所述标记。这样的标记可以允许检测样品中一种或多种感兴趣分析物的存在,量或位置(例如,在流式细胞仪的通道中)。利用大的可区分标记文库可以同时检测大量不同的分析物。另外或任选,通过使用多个标记物与相同的分析物结合(例如,结合到不同的表位,表面蛋白或分析物的其他特征),利用可区分标记物的大型文库可以允许更准确地检测具体的分析物(例如,感兴趣的细胞类型或亚型)。更进一步,利用所述大型标记文库可以允许根据感兴趣的相应分析物的可能密度或数量来选择标记,例如,以确保对应于样品中具有不同浓度分析物的不同标记的有效亮度在光学询问这样的样品时是大约

相同的。

[0060] 这样的标记物可以通过在以下方面的不同而区分：激发光谱、发射光谱、荧光寿命、荧光强度、对光漂白的敏感性、对与分析物的结合或某些其他环境因素的荧光依赖性、再发射光的偏振或其他一些光学属性。然而，由于对可用荧光团或其他光学可区分物质的限制以及对感兴趣的常见样品材料的波长透明度/相容性的限制，在依赖于发射或激发光谱的差异时，可能难以生成可区分标记的大型文库。

[0061] 本公开提供了用于指定、制造、检测和识别在时间衰减曲线和/或激发和发射光谱方面不同的光学标记的方法。另外或任选，所提供的标记相对于现有标记（例如，基于荧光团的标记）可以具有增强的亮度，并且可以具有可配置的亮度以促进面板设计或允许不同标记的相对亮度以便于其他考虑。诸如此类的标记在标记激发之后（例如，通过超快激光脉冲）在该标记的光再发射的时间依赖概率方面可以不同。另外或任选，诸如此类的标记可以包括谐振器网络，以增加所述标记的激发波长和所述标记的发射波长之间的差异（例如，通过在输入谐振器和输出谐振器之间插入多个介质谐振器以允许激子在所述输入谐振器和所述输出谐振器之间传输，直接在所述输入谐振器和所述输出谐振器之间的能量传输是不利的）。更进一步，诸如此类的标记可以包括逻辑门或其他光可控结构，以在检测和识别标记时允许进一步多路复用。

[0062] 由于这样的标记在时间衰减曲线方面可能不同，因此可以通过用单一波长的光照照射样品和/或通过在波长的窄带内检测来自样品的响应性发射光来在样品中检测和识别它们。所述检测范例可以简化用于询问包含此类标记的样品的设备和/或可有利于对具有严格光学要求（例如，表现出明显的自发荧光，对光漂白或其他有害光学效应特别敏感，具有窄的透明带）的样品介质进行高标记计数的询问。

[0063] 每个标记（或本文所述的其他谐振器网络）包括至少一个能够接收光能以激发所述网络的输入谐振器（例如，来自询问激光脉冲的能量）和至少一种能够响应于经由谐振器网络接收到来自所述输入谐振器的能量（例如，作为通过福斯特(Förster)谐振能量传递(FRET)和/或某种其他机制传输的激子)而发射光子的输出谐振器。所述输入谐振器、输出谐振器和一或多种另外的介体谐振器的相对位置允许激子、电场、表面等离子体激元或其他能量从谐振器到谐振器的传递，使得当所述网络中的特定谐振器（例如输入谐振器）被激发，其可能将所述激发能量转移到一个或多个其他谐振器（例如，输出谐振器）。可以指定在这样的标记的每个实例中存在的谐振器的数量和布置（例如，标记的每个实例的输入谐振器的数量）以设置标记的亮度（例如，以标准化可能与样品中存在的分析物发生结合的不同标记从样品中发射的光的强度）。

[0064] 因此，特定标记的时间衰减曲线可以与谐振器网络的属性相关，例如，与谐振器的标识和属性（例如，非辐射衰减的概率、谐振能量转移到另一个谐振器的概率、或辐射发射的概率）以及谐振器在网络中的相对位置和方向相关。例如，可以在输入谐振器和输出谐振器之间顺序地布置多个介质谐振器以形成谐振器导线。所述谐振器网络的时间衰减曲线可能与导线的长度相关，例如，更长的导线可以表现出具有在时间上较晚的较宽峰值的衰减曲线。可以通过改变每个标记的谐振网络属性来创建可区分标记的文库，以使得可以区分标记的相应衰减曲线。因此，可以通过照射样品并检测相对于光照从样品发射光子的时间来检测样品中所述标记的存在、标识或其他特征。

[0065] 另外或任选,可以利用从所述谐振器网络激发和再发射光之间的时间差的概率性质来生成随机变量的样本。所述谐振器网络的时间衰减曲线可以是静态的(即,由网络的结构设置并且不容易修改或控制);在这样的示例中,从上述网络(或从上述网络的群)发出的光子再发射的时间可以用于生成与网络的静态时间衰减曲线相关的单个随机变量的样本。任选,上述网络可以包括一或多种输入谐振器,当受到适当光刺激时,上述输入谐振器表现出暗态(即,就其向网络中的其他谐振器发送能量和/或从网络中的其他谐振器接收能量的能力而言,可以被禁用)。这样的输入谐振器可以用于调整网络随时间的衰减曲线,例如,以允许使用上述谐振器网络来生成与所述网络的各种不同的、光学可控的时间衰减曲线相关的各种不同随机变量的样本。

[0066] 可以将这种表现出暗态的谐振器并入网络中,使得其处于暗态的情况抑制和/或促进能量在网络的不同部分之间(例如,在输入和输出之间)的传输。例如,这样的输入谐振器可以位于两个另外的谐振器之间,使得当输入谐振器处于暗态时,阻碍了另外两个谐振器之间经由输入谐振器的能量传输。在另一示例中,可以将输入谐振器放置在网络内,使得当输入谐振器不处于暗态时,该输入谐振器优先从网络中的一个或多个其他谐振器接收能量。因此,将输入谐振器置于暗态可起到防止输入谐振器“沉没(sinking)”来自所述网络的能量的作用。

[0067] 因此,可以将这种表现出暗态的谐振器合并到谐振器网络中,以便在网络内提供逻辑函数。例如,所述的谐振器网络可以被配置为执行逻辑计算,其中通过诱导相关的输入谐振器进入其暗态(例如,通过以输入谐振器的激发波长的光照照射它们),将输入“编程”到网络中。然后通过光学激发网络的另外的谐振器(“读出谐振器”)并检测从网络的输出谐振器响应地发出的光子来“读出”逻辑计算。

[0068] 这样的谐振器网络还可用于感测样品或其它感兴趣的环境的属性,例如,以检测生物样品中一种或多种感兴趣的分析物的存在或数量。所述网络的一或多个谐振器可能对感兴趣的变量本质上敏感(例如,当环境pH在特定范围内时,谐振器可能会被淬灭)。另外或任选,该网络可以包括传感器,该传感器被配置为改变谐振器网络的一个或多个可检测属性(例如,响应于激发而再发射的概率,激发和在发射的时间衰减曲线)。例如,所述网络可以包括下述的受体(例如,抗体,适体,互补DNA或RNA链):当与分析物发生结合时淬灭网络的谐振器;当不与分析物发生结合时淬灭网络的谐振器;当与分析物发生结合时改变网络中一个或多个谐振器的相对位置,或者根据是否与分析物的实例结合改变所述谐振器网络的配置和/或行为。所述谐振器网络可以包括逻辑元件(例如,一或多种表现出暗态的谐振器),使得可以使用单个谐振器网络来检测多种不同的分析物(例如,通过控制暗态输入谐振器以“寻址”所述网络的多种不同的受体的具体一种)。

[0069] 所述标记的谐振器网络可以通过多种技术来创建。在一些示例中,DNA自组装可用于确保标记内的谐振器的相对位置对应于根据期望的时间衰减曲线而指定的位置。例如,所述网络的每个谐振器可以结合到相应的指定DNA链。每条DNA链可包括一或多个部分,所述一或多个部分与一或多个其他DNA链的部分互补,使得DNA链自组装成纳米结构,该纳米结构将谐振器维持在指定的相对位置。

[0070] II. 使用指定的谐振器网络进行时间多路复用的标记

[0071] 可以创建如本文所述的标记,其在响应于照射的时间衰减曲线的方面明显不同。

这可以通过指定标记谐振器网络的标识,数量,相对位置和/或方向,拓扑或其他属性来实现。可以规定谐振器的这些属性,使得所得的时间衰减曲线对应于期望的时间衰减曲线。例如,可以指定标记的谐振器网络,使得标记的时间衰减曲线包括一个或多个具有各自指定宽度、归一化幅度、平均延迟时间或其他属性或特征的峰,以使得所述标记的时间衰减曲线可与一种或多种其他标记和/或与感兴趣的样品或环境中存在的背景材料(例如细胞或其他生物样品的荧光蛋白)区分开。

[0072] 通常,所述标记的谐振器网络包括至少一种输入谐振器,一或多个介质谐振器以及至少一种输出谐振器。所述谐振器可以是荧光团、拉曼染料、量子点、染料、颜料、导电纳米棒或其他纳米结构、发色团或其他物质,其可以以激子、电场、表面等离子体激元的形式或以一些可以统一方式从一个谐振器传递到另一谐振器的其他形式的能量的形式从所述网络中的一或多种其它谐振器接收能量和/或将能量传输到该一或多种其它谐振器中。

[0073] 所述网络的至少一种输入谐振器可以将所述标记被照射(例如,通过具有与输入谐振器的激发波长相对应的波长的激光脉冲)产生的能量接收到所述网络中。所述网络的至少一种输出谐振器可以以光子的形式从网络传输能量,可以检测和使用相对于标记被照射的光子发射时间以及从样本中检测到的多个另外的光子(例如,来自所述样品中该标记的其他实例,或来自标记的特定实例并作为由于样品重复照射导致的结果)以识别所述标记。设置输入谐振器,输出谐振器和一或多个介质谐振器以形成谐振器网络,以便将经由输入谐振器接收到所述网络中的能量(例如激子)可以通过所述网络传输到输出谐振器。

[0074] 值得注意的是,将网络中的任何特定谐振器标记为“输入”,“介质”或“输出”是非限制性的。网络的特定谐振器可以充当一个或多个其他谐振器的介质谐振器,并且还可以充当该网络的输入谐振器和/或输出谐振器。此外,本文所述的标记可以仅包括两种谐振器(例如,“输入”谐振器和“调制”谐振器),并且可以如本文所述通过将标记暴露于至少能够激发输入谐振器的光照并相对于所述光照检测从输入谐振器或调制谐振器中的至少一个响应地发射的多个光子的发射的时间来进行查询。所述输入谐振器(例如,荧光团,导电纳米棒或其他纳米粒子,量子点)可以设置在标记内,从而能量(例如,激子,电场)可以从输入谐振器转移到调制谐振器(例如,荧光团,导电纳米棒或其他纳米颗粒,量子点,非荧光光学吸收分子或物质)和/或从调制谐振器返回到输入谐振器。

[0075] 然后,所述两种谐振器标记的标识或者本发明所述一些其他标记的标识可以基于检测到的多个光子发射的相对时间来确定,后者可从用于接收来自光照的能量的同一个谐振器发射光。例如,所述标记可以通过将检测到的时间与一组已知时间衰减曲线进行比较来识别,其中该标记对应于所述的一组已知时间衰减曲线中的一个时间衰减曲线。在这样的示例中,可以通过指定谐振器的标识并通过精确地控制所述谐振器的相对位置和/或方向(例如,使用DNA自组装)来调节标记的时间衰减曲线。

[0076] 所述谐振器和整个谐振器网络的具体配置导致相对于标记的照射从输出谐振器(或从输入谐振器、介质谐振器、调制谐振器或所述标记的某些其他谐振器)发出光子的时间,显示特征性的时间延迟曲线。因此,可以检测相对于样品的光照(在一个或多个光照周期期间)从样品发射多个光子的时间,并将其用于基于样本中所述标记的特征性时间衰减曲线识别样品中的标记,或识别样品中的一个或多个其他标记。

[0077] 图1A示出了如本文所述的示例性标记100的谐振器的示意图,以及往返于那些谐

振器的势能。示例标记100包括输入谐振器110a,介质谐振器110b和输出谐振器110c。输入谐振器110a可以通过从标记100的环境接收光照101而被激发。一旦被激发,输入谐振器110a可以辐射发射光子140a,非辐射衰减130a,使得能量损失(例如,作为热量)到环境,或将能量120a转移到介质谐振器110b(例如,通过Förster共振能量转移过程)。响应于被激发,所述介质谐振器110b可以辐射发射光子140b,非辐射衰减130b,将能量120b转移到输出谐振器110c,或者将能量125a 转移到输入谐振器110a。响应于被激发,输出谐振器110c可以辐射地发射光子140c,非辐射衰减130c,或者将能量125b转移到介质谐振器110b。

[0078] 举例来说,在图1A中,通过其代表箭头的相对线宽来指示不同能量跃迁/转移的相对概率。因此,对于示例性标记100,最有可能的是:输入谐振器110a将能量传递到介质谐振器110b,介质谐振器110b将能量传递给输出谐振器110c,并且输出谐振器110c辐射地发射光子140c。

[0079] 来自具体谐振器的每个转变的时间依赖性可以由具有随时间特定分布的随机变量表示。例如,传递能量(例如,传递激子)到输出谐振器110c 的介质谐振器110b可以根据时域中的指数分布的随机变量出现。这些随机变量以及标记100的谐振器网络的结构和其他特征可用于例如使用连续时间马尔可夫链来对标记100的行为建模。然后可以使用这种模型来预测标记100从光照101对输入谐振器110a的激发到输出谐振器110c发射光子140c的整体时间衰减曲线。

[0080] 图1B示出了状态图,该状态图可用于根据谐振器的激发状态来对标记100的电势状态进行建模。该模型假定标记100中仅一个谐振器可以被激发,因为从光照101经由输入谐振器110a接收仅单个能量单位(例如,单个激子)。然后,该能量单位可以在谐振器之间转移和/或可以离开谐振器网络(例如,通过光子的发射或通过非辐射衰减过程)。该模型包括用于激发输入谐振器110a(“输入激发”),介质谐振器110b(“介质激发”)和输出谐振器110c(“激发输出”)的状态。该模型还包括每个谐振器的非辐射衰减吸收状态(“输入衰减”,“介质衰减”和“输出衰减”)以及每个谐振器的辐射光子发射(“输入发射”,“介质发射”和“输出发射”)。

[0081] 还显示了每个跃迁的跃迁概率。这些跃迁概率可能与谐振器的标识(例如,它们的固有荧光寿命,Förster半径)、它们的相对位置、距离和/或方向(例如,相对于谐振器对的弗斯特半径的距离)或标记100的某些其他属性相关。因此,可以指定谐振器网络内谐振器的相对位置和标识,以控制模型的跃迁概率和拓扑,从而控制标记100的预测时间衰减曲线。

[0082] 在示例中,标记包括Alexa Fluor 448染料作为输入谐振器和Alexa Fluor 594染料作为输出谐振器,其中输入谐振器和输出谐振器彼此靠近放置,从而输入谐振器可以响应于输入谐振器被光照(例如,超短激光脉冲)激发将能量作为激子传输给输出谐振器。图2A显示了随时间推移以下的概率:输入谐振器(“AF448荧光”)发射光子,输入谐振器发生衰减(“AF448非辐射衰减”),输出谐振器(“AF594荧光”)发射光子,并且输出谐振器发生衰减(“AF594非辐射衰减”)。图2A还说明了随时间推移这些过程中至少一个发生的概率(“激子弛豫”)。

[0083] 从这些概率,我们可以确定所述标记的时间衰减曲线。这在图2B中显示为“AF594荧光”。因此,如果样品中存在标记的多个实例和/或如果多次光照包含单个标签实例的样

品,则从输出谐振器发射光子的时间(例如,在Alexa Fluor 594染料的发射波长处)相对于样品的光照将显示出随时间的分布,对应于所示的时间衰减曲线。相反,从输入谐振器发射光子的时间(例如,在Alexa Fluor 488染料的发射波长处)相对于样品的光照将呈现出随时间的分布,对应于图2B中所示的其他时间衰减曲线(“AF488 荧光”)。

[0084] 具体标记在特定波长(例如,所述标记的输出谐振器的发射波长)的时间衰减曲线可以通过指定谐振器网络的拓扑、结构、谐振器类型或所述标记的其他属性来控制。因此,不同的可区分标记的文库可以通过指定它们各自的谐振器网络以使其时间衰减曲线可相互区分(例如,通过具有特定时间分辨率的特定检测设备从包含此类标记的样品中检测光子)和/或与样品或其他感兴趣环境中的背景过程(例如,荧光)区分。这可以包括指定时间衰减曲线,以最大化或增加时间衰减曲线之间的统计差异的度量(例如,Kullback-Leibler差异,Jensen-Shannon差异,Bregman差异或Fisher 信息度量)。另外或任选,所述时间衰减曲线可以被指定为相对于就时间衰减曲线中存在的一或多个峰的时间、宽度、形状、数量或其他标识而言是不同的。

[0085] 可以使用多种方法确定谐振器网络以提供期望的时间衰减曲线。例如,启发法可以用于改变网络的谐振器导线中的一些谐振器,网络的输入和输出之间的网络中的一些并联谐振器导线,网络的谐振器的标识(例如,相对于谐振器的激发和/或发射光谱),或网络的其他属性,以便提供时间衰减曲线中峰值的数量,宽度或延迟的相关变化,时间衰减曲线的平均延迟或时间衰减曲线的其他属性。另外或任选,可以使用诸如遗传算法,机器学习或其他技术的自动化方法来指定一个或多个谐振器网络的配置,使得它们的时间衰减曲线是可区分的或提供某些其他益处。然后可以通过实验验证这种标记的时间衰减曲线,并且可以将实验确定的时间衰减曲线用于识别样品或其他感兴趣环境中存在的标记。

[0086] 图3A是示意图,示出了本文所述的示例性标记300a的谐振器,以及往返于那些谐振器的势能转移。示例标记300a包括输入谐振器(“IN”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”)以及输出谐振器(“OUT”)。通过接收来自标记300a的环境的光照(例如,在输入谐振器的激发波长的光照),可以激发该输入谐振器。两个介质谐振器被布置为输入谐振器和输出谐振器之间的谐振器导线。即,两个介质谐振器被布置成使得导线中的每个谐振器可以从两个相邻的谐振器接收能量和/或将能量传输到两个相邻的谐振器。可以指定这种谐振器导线内的谐振器的数量,以便调整标记300a 的时间衰减曲线,例如,调整衰减曲线中峰的延迟或宽度,以增加衰减曲线的平均衰减,或调整时间衰减曲线的其他一些属性。

[0087] 举例来说,谐振器之间不同能量转移的相对概率在图3A中由其代表箭头的相对线宽指示。因此,对于示例性标记300a,输入谐振器更有可能将能量传递到第一介质谐振器(M1)而非相反过程。第二介质谐振器(M2) 也更有可能将能量传递到输出谐振器。第一介质谐振器将能量传输至第二介质谐振器的可能性与第二介质谐振器将能量传输至第一介质谐振器的可能性是相同的。因此,能量通常从输入谐振器单向传播到介质谐振器,并且从介质谐振器单向传播到输出谐振器。相反,能量可以在从输出谐振器(或从介质谐振器之一)中以光子形式发射或通过非辐射过程损失之前在介质谐振器之间双向传播。

[0088] 图3A的标记300a示出了结合有二元件谐振器导线的标记,其中能量可以在导线中的相邻谐振器之间双向传递。可以通过选择导线中的谐振器来实现这种双向能量转移,以使第一介质谐振器的发射光谱与第二介质谐振器的激发光谱明显重叠,反之亦然。这可以

通过为导线中的两个介质谐振器选择相同的荧光团(例如Alexa Fluor 594)来实现。

[0089] 任选,可以指定谐振器网络中的一对或多对介质谐振器(例如,谐振器导线中的相邻谐振器),使得能量通常在成对的谐振器之间单向传播。图3B示出了包括这种谐振器对的示例性标记300b的示意图。示例标记 300b包括输入谐振器(“IN”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”)以及输出谐振器(“OUT”)。谐振器之间不同能量转移的相对概率在图3B中用其代表箭头的相对线宽表示。因此,对于示例性标记300b,输入谐振器更有可能将能量传递到第一介质谐振器(M1)而非相反过程。第一介质谐振器(M1)将能量传输至第二介质谐振器(M2)的可能性更大而非相反过程,第二介质谐振器(M2)将能量传输至第二谐振器的可能性更大而非相反过程。因此,能量通常从输入谐振器通过介质谐振器单向传播到输出谐振器。相对于第一示例性标记300a的时间衰减曲线,这样的标记300b 的时间衰减曲线可以表现出更窄和/或延迟更少的峰和/或可以表现出总体上平均延迟减少。

[0090] 如本文所述的标记可包括具有任意长度和/或组成的多条谐振器导线(例如,连接在公共输入和输出谐振器之间的具有相似或不同组成的多条谐振器导线)。例如,图3C示出了示例标记300c的示意图,该示例标记300c包括任意长度的谐振器导线(即,包括“n”个谐振器)。示例标记300c 包括输入谐振器(“IN”),“n”个介质谐振器(“M1”,“M2”,“M3”,“M4,……”和“Mn”)和输出谐振器(“OUT”)。如图3C中的代表性箭头的相对线宽所指示的,谐振器导线中相邻的介质谐振器之间的能量传递是双向的。然而,这种谐振器导线的谐振器对之间的一个或多个跃迁可以是单向的。

[0091] 如本文所述的标记的谐振器网络可以代表不同的拓扑,例如,分支拓扑。这样的分支拓扑可以包括多个不同的谐振器导线,其末端连接到输入谐振器,输出谐振器,介质谐振器(例如,一或多个其他谐振器导线的端部谐振器),或者以某种其他方式连接以提供展示所需的时间衰减曲线。

[0092] 图3D示出了示例标记300d的示意图,该示例标记300d包括两条路径,能量可以通过两条路径传播通过谐振器网络以被输出谐振器发射。示例标记300d包括输入谐振器(“IN”),其可以从输入谐振器接收能量并且可以将能量传输到输出谐振器的第一介质谐振器(“M1”)以及三个另外的谐振器(“M2”,“M3”和“M4”),其布置为可以将能量从输入谐振器传输到输出谐振器的谐振器导线。如代表箭头的相对线宽所指示的,谐振器导线中相邻的介质谐振器之间的能量传递是双向的。这样的谐振器网络可以表现出时间衰减曲线,该时间衰减曲线是其他时间衰减曲线的混合,例如,是仅包括输入、输出和第一谐振器的标记的第一时间衰减曲线与仅包括输入、输出和谐振器导线(即,介质谐振器“M2”,“M3”和“M4”)的第二时间衰减的混合。谐振器网络可以包括介质谐振器,输入谐振器和/或输出谐振器的二维或三维场。这样的任意谐振器网络可以通过遗传算法或其他自动化过程来确定,以提供期望的时间衰减曲线或满足一些其他标准。

[0093] 如本文所述的标记的谐振器网络可以包括多个输入谐振器和/或多个输出谐振器。可以提供这样的多个输入和/或输出谐振器以提供各种益处,例如,调整标记的有效时间衰减曲线,以增加标记响应于光照而被激发的可能性和/或增加标记的有效亮度,以便为标记的激发和/或检测提供波长相关的多路复用(例如,通过使标记表现出不同的时间衰减曲线,具体取决于多个光谱不同的输入谐振器中的哪个被激发),或提供其他一些益处。多个输入谐振器可以是相同的(也就是说,每个都可以包含相同的荧光团,量子点或其他光学

元件),也可以是不同的(例如,可以是不同的荧光团,以使得不同的输入荧光团被各自不同的光波长激发)。多个输出谐振器可以是相同的(即,每个可以包括相同的荧光团,量子点或其他光学元件)或可以不同(例如可以是不同的荧光团,使得不同的输出荧光团以各自不同的波长发光)。另外或任选,标记的单个实例可以包括多个不同的或相互连接的谐振器网络(例如,同一谐振器网络的多个副本),以便增加和/或控制标记的有效亮度,以减少识别标记所需的时间和/或光脉冲数,或提供其他益处。

[0094] 图3E示出了示例标记300e的示意图,该示例标记300e包括输入谐振器(“IN”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”)以及第一输出谐振器(“OUT1”)。标记还可选地包括第二(“OUT2”)和第三(“OUT3”)输出谐振器。可以提供另外的的输出谐振器以调节标记300e的时间衰减曲线。例如,第二输出谐振器可以与第一输出谐振器相同(例如,可以具有相同的发射光谱),并且可以被添加到标记300e以增加标记300e在第二介质谐振器被激发(例如,通过将来自第二介质谐振器的能量转移到第一或第二输出谐振器中的一个的概率加倍,使得输出谐振器中的一个随后可以将接收到的能量作为光子发射)之后发射能量的可能性。

[0095] 另外或任选,附加的输出谐振器可以具有不同的发射波长或发射光谱,并且可以被提供以有利于在对应于不同的输出谐振器的不同波长处的时间衰减曲线的光谱多路复用检测。例如,第三输出谐振器可以不同于第一输出谐振器(例如,可以具有不同的发射光谱),并且可以被添加到标记300e,使得标记300e可以从一个或另一个输出谐振器发射光子。可以分别检测在波长方面不同的所述的光子,并将其用于确定标记300e(或包含标记的样品)的两个不同的时间衰减曲线,并且可以使用所述多个检测到的时间衰减曲线来识别标记300e。

[0096] 图3F示出了示例标记300f的示意图,该示例标记300f包括第一输入谐振器(“IN1”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”)以及输出谐振器(“OUT”)。标记还可选地包括第二(“IN2”)和第三(“IN3”)输入谐振器。可以提供另外的的输入谐振器以调整标记300f的时间衰减曲线或增加标记300f通过暴露于光照而被激发的可能性。例如,第二输入谐振器可以与第一输入谐振器相同(例如,可以具有相同的激发谱),并且可以被添加到标记300f以增加标记300f响应于光照而接收能量的可能性(例如,通过使光照的光子被第一或第二输入谐振器中的至少一个吸收的概率加倍)。

[0097] 另外或任选,另外的输入谐振器可以相对于激发波长或激发光谱而不同,并且可以被提供来促进标记300f的光谱多路复用激发,并因此促进在对应于不同输入谐振器的不同波长处的时间衰减曲线的光谱多路复用的检测。例如,第三输入谐振器可以不同于第一输入谐振器(例如,可以具有不同的激发光谱),并且可以被添加到标记300f,使得可以在第一和第二时间段内通过第一和第二光照来激发标记300f,所述第一和第二光照在波长上不同并且分别在第一和第二时间段内提供。与激发标记300f的输入谐振器不同,标记300f的这种激发可以通过各自不同的时间衰减曲线来表征并因此在分开的时间段内被检测,并用于确定标记300f(或来自包含标记的样品)的两个不同的时间衰减曲线,并且可以使用所述多个检测到的时间衰减曲线来识别标记300f。

[0098] 注意,本文描述的标记的谐振器网络也可以被用来生成随机变量的样本。随机变量的样本可以基于谐振器网络/标记的激发与检测到响应地从谐振器网络/标记发射的一个或多个光子的时间之间的时间差来生成。随机变量的特定分布可以与谐振器网络/标记

的时间衰减曲线相关。例如,所生成的样本的值可以是所检测的谐振器网络的光照的时间与检测到从谐振器网络响应地发射的一个或多个光子的时间之间的时间差的函数。所生成的随机变量的分布可以与谐振器网络的时间衰减曲线以及所应用的函数相关联,且该函数用于根据检测到的时间差来生成随机变量的样本。可以指定谐振器网络的结构(例如,以表现出特定的时间衰减曲线或其他时间依赖概率密度函数),使得从检测到的时间差生成样本的函数在计算上易于处理和/或有效计算。

[0099] III用于识别样品中标记的示例系统和方法

[0100] 在各种应用中询问样本(例如,生物样本或流式细胞仪中的细胞流)或其他感兴趣的环境以检测可能存在于样品或其他感兴趣环境中的本发明所述标记的存在、标识、绝对量或相对量、或其他性质。这种询问可以促进样品的成像,例如,以确定关于样品中存在的一种或多种分析物的位置、浓度或其他信息以及一种或多种不同标记被配置成与哪种分析物结合。这种询问可以有助于鉴定样品的细胞,蛋白质,RNA链或其他内含物,以便对这些内含物进行分选或提供其他益处。例如,流式细胞仪可以包括细胞(或其他感兴趣的颗粒)流过的流道。可以如本文所述地询问这种流动通道,以便识别通道中的一个或多个标记和/或识别细胞的类型或亚型,确定细胞的性质或基于识别的标记确定一些其他信息。然后可以例如根据细胞类型将这种信息用于对细胞进行分选。

[0101] 用于在所关注的环境中检测和/或识别标记的此类方法可以包括向感兴趣的环境提供光照(例如,以一个或多个超短脉冲光照的形式)以及检测响应于光照(例如,所述光子的波长或光谱,所述光子相对于光照的时间(例如光照的一个或多个脉冲)的发射时间)从所述环境发射的光子的一或多种性质。这可以包括提供单个光照脉冲并检测从环境中一或多种标记的多个实例响应地发射的光子。另外或任选,所述一或多种标记的一个或多个实例可以通过多个光照脉冲被多次光照,并且可以检测相对于光照脉冲响应地发射光子的时间。然后,可以将有关响应性发射光子的时间的信息用于识别环境中存在的一种或多种标记,确定此类标记的结合状态或其他属性,确定环境中标记的绝对量或相对量,或确定环境中存在的与本文所述一或多种标记有关的一些其他信息。

[0102] 光照可以作为一个或多个光照脉冲提供给环境。所提供的光照可以具有指定的波长,例如一个或多个标记的输入谐振器的激发波长。这样的激发波长在感兴趣的环境中存在的一些或所有标记之间可能是共有的,例如,由于某些或所有标记包括与它们的输入谐振器相同的荧光团,量子点,染料或其他光学物质或结构。另外或任选,可以提供多个不同波长的光以激发例如多个不同标记的多个不同输入谐振器。在一些示例中,可以在不同的时间点(例如,作为不同的光照脉冲的一部分)提供这样的不同波长的光,以促进多个不同标记和/或多个不同标记集的光谱多路复用检测。在一些示例中,单个标记可以包括多个不同的输入谐振器,并且不同的输入谐振器可以被各自不同波长的光激发,例如作为各自不同光照脉冲的一部分。

[0103] 为了改善环境中标记的识别,用于询问环境的光照脉冲可以是超短脉冲(例如,持续时间在阿秒至纳秒量级的脉冲)。这种超短脉冲可以作为锁模振荡器发射的宽带脉冲提供。在标记包括具有长寿命状态(例如,镧系元素原子或其他镧系元素化合物或络合物)的谐振器的示例中,光照脉冲可以具有更长的持续时间,例如,微秒级。

[0104] 相对于这种光照脉冲,响应于光照脉冲而从环境发射光子的时间可以以各种方式

来检测。在一些示例中,可以例如使用一个或多个单光子雪崩二极管,光电倍增器或其他单光子检测器来检测单个光子的时间。作为时间相关的单光子计数器的一部分,可以使用此类检测器的输出来确定在向环境提供光照脉冲之后根据时间确定的光子计数。这种检测到光子的时间可以用于确定概率密度函数,该概率密度函数用于确定响应于样品的照射而从样品发射光子的时间。

[0105] 另外或任选,检测来自环境的光子的发射时间可以包括检测发射的光子的速率或强度中一个或多个峰值的时间,或者检测发射光子的时间的一些其他综合性质(例如,确定可以与已知的时间衰减曲线的相应峰值的延迟匹配的光子发射速率的峰值的延迟时间)。这样的检测可以包括将峰值检测器,微分器,匹配滤波器或一些其他模拟或数字信号处理技术应用于单光子雪崩二极管或其他光电检测器元件的输出,该单光子雪崩二极管或其他光电检测器元件被配置为接收从感兴趣的环境中发射的光子。

[0106] 一或多个已知标记可以存在于感兴趣的环境中,并且确定这样的标记的标识和/或确定环境中关于标记的一些其他信息可能是有益的。如上所述,可以根据它们的时间衰减曲线来区分这些标记;即,每个已知的标记可以通过各自不同的时间衰减曲线来表征。因此,可以通过将检测到的来自环境的光子发射时间与时间衰减曲线字典进行比较来确定环境中存在的一个或多个标记的标识,其中字典中的每个时间衰减曲线对应于可能存在于环境中的各已知标记。

[0107] 图4A示出了六种不同的时间衰减曲线,每种对应于六个已知标记之一。每个已知标记都具有相同的输入谐振器(例如Alexa Fluor 430)和输出谐振器(例如Alexa Fluor 750),它们与一个或多个相同的介质谐振器(例如Alexa Fluor 594)结合形成谐振器导线。已知的标记在介质谐振器的数量方面有所不同。可以将关于从环境接收的光子的时间的信息与时间衰减曲线进行比较,并用于确定环境中存在哪些已知标记(如果有的话)。这可以包括将来自环境的光子发射的峰值速率的延迟与每个已知的时间衰减曲线中的峰值的延迟进行比较。

[0108] 另外或任选,检测到的光子发射时间可用于确定响应于样品的光照而从样品发射光子的时间的概率密度函数。然后将这种确定的概率密度函数与已知标记的时间衰减曲线进行比较,并用于识别环境中存在的一个或多个标记。图4B示出了相对于样品的光照(在时间0)在多个离散的时间范围内随时间从两个不同样品中检测到的光子计数。从包含图4A中已知标记“6”的第一样本中接收第一计数(由黑色矩形表示),并从包含来自图4A中已知标记“1”的第二样本中接收第二计数(由白色矩形表示)。计数可用于确定第一和第二样本各自的第一和第二概率密度函数,并且可将第一和第二概率密度函数与六种已知的时间衰减曲线进行比较,以识别存在哪些已知标记在每个样本中。这样的比较可以包括确认确定的概率密度函数和每种已知时间衰减曲线之间的统计差异的量度(例如, Kullback-Leibler差异, Jensen-Shannon差异, Bregman差异或 Fisher 信息度量)。然后可以例如通过选择对应于统计差异的确定最小度量的已知标记来确定样品中存在的标记。

[0109] 相似或不同的方法可用于确定样品中是否存在多个标记,并且如果存在,则用于识别此类多个标记。在一些示例中,环境(例如,流式细胞仪的流道)中的细胞或其他内容的标识可由此基于所述环境中标记的标识来确定,例如基于所有已知标记的子集同时存在于流动通道或其他感兴趣的环境中的确定。

[0110] 为了确定环境中存在多少已知标记的组,并识别这些存在的标记,可以使用多种方法。例如,期望最大化算法可以与统计混合模型一起用于基于确定的概率密度函数来确定环境中最可能存在的标记,该概率密度函数为响应于环境的光照而从环境发射光子的时间的概率密度函数。这样的混合模型可以基于与已知标记的组相对应的时间衰减函数组。这样的期望最大化算法和混合模型也可以用于确定样品中所述多个标记的相对量。

[0111] 询问环境可以包括检测在多个不同波长范围内的光子的发射时间。可以这样做以检测来自标记的两个不同输出谐振器的光子发射时序。另外或任选,可以这样做以检测来自标记的输出谐振器,一或多个介质谐振器和/或输入谐振器的光子发射的时间。

[0112] 此外,所述环境中存在的一或多个标记可包括表现出暗态的谐振器,使得该标记的时间衰减曲线取决于表现出暗态的谐振器是否处于其各自的暗态。例如,标记可以包括第一显暗态谐振器,并且当第一显暗态谐振器处于暗态时,该标记可以显示第一时间衰减曲线,并且当该第一显暗态谐振器不处于暗态时,该标记可显示第二时间衰减曲线。在这样的示例中,所述标记的检测和/或识别可以包括在显暗态谐振器不处于其暗态的时间段以及在不同的时间段检测光学激发和再发射的时间,在一段时间内诱导一或多个显暗态谐振器进入暗态(例如,通过提供在一或多个显暗态谐振器的激发波长的光照),并再次检测所述标记的光激发的时间以及再发射的时间。

[0113] IV. 示例性谐振器网络

[0114] 如本文所述的谐振器网络(例如,作为标记的一部分包括在内的谐振器网络)可以以各种方式制造,使得一或多个输入和/或读出谐振器,输出谐振器,显暗态“逻辑输入”谐振器,和/或介质谐振器根据指定的谐振器网络布置,并且进一步使得该网络的时间衰减曲线、网络的亮度、激发光谱、发射光谱、斯托克斯位移或网络的其他一些光学标识或网络的其他一些可检测的感兴趣属性(例如,与感兴趣分析物的结合状态)对应于其规格(例如,指定的时间衰减曲线,响应光照的发射概率)。这种布置可以包括确保谐振器之间的相对位置、距离、取向或其他关系(例如,成对的谐振器之间)对应于谐振器之间的指定位置、距离、取向、或其他关系。

[0115] 这可以包括使用DNA自组装来制造一或多个谐振器网络的多个实例。例如,可以将许多不同的DNA链偶联(例如,通过胸苷上的伯氨基修饰基团以连接N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯修饰的染料分子)到谐振器网络的相应谐振器(例如,输入谐振器、输出谐振器和/或介质谐振器)。成对的DNA链可以具有至少部分互补的部分,使得当DNA链混合并暴露于规定的条件(例如,规定的pH或规定的温度曲线)时,DNA链的互补部分会对齐并结合在一起以形成半刚性纳米结构,该半刚性纳米结构保持谐振器网络的谐振器的相对位置和/或取向。

[0116] 图5示出了这种谐振器网络的示意图。输入谐振器(“SOURCE ATTO 488”),输出谐振器(“EMITTER ATTO 610”)和两个介质谐振器(“MEDIATOR 1ATTO 565”和“MEDIATOR 2ATTO 565”)分别连接到DNA链。然后,连接的DNA链与其他DNA链一起自组装成所示的纳米结构,以使输入谐振器,介质谐振器和输出谐振器形成谐振器导线。在一些示例中,可以经由此类方法或其他技术形成多个单独的相同或不同的网络,作为谐振器网络的单个实例的一部分(例如,以增加谐振器网络的亮度)。

[0117] 所述谐振器网络的谐振器之间的距离可以被指定为使得该谐振器网络表现出一

或多种期望的行为(例如,被特定激发波长的光激发并且响应于根据指定的时间衰减曲线)。这可以包括指定相邻谐振器之间的距离,以使得它们能够在彼此之间(例如,双向或单向)传输能量,并且进一步使得谐振器不会彼此淬灭或以其他方式干扰彼此的光学标识。在其中谐振器通过接头与主干结合的实例中(例如,通过N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯分子产生的酰胺键或其他接头结构与DNA主干结合),所述接头可以偶联到考虑到这些因素以及链接器的长度而在背景中指定的位置。例如,连接位置可以以大于链接器长度两倍的距离分开(例如,以防止谐振器彼此接触,从而彼此淬灭或以其他方式干扰彼此的光学标识)。另外或任选,连接位置可以以小于谐振器可以在彼此之间传输能量的最大距离的距离来分隔。例如,谐振器可以是荧光团或其他一些光学谐振器,其特征在于当通过Förster谐振能量传递传输能量时具有Förster半径,并且连接位置之间的距离可以小于Förster半径。

[0118] V. 使用指定的谐振器网络来改善亮度和/或光谱多路复用的标记

[0119] 当设计或指定一组谐振器网络和/或标记用于流式细胞术,分子成像,光学计算,生物传感,分析物测定,光学随机数生成或某些其他应用时(例如,通过面板设计流程),能够任意选择一或多个谐振器网络的激发光谱/波长,发射光谱/波长,消光系数,亮度或其他光学标识可能是有益的。然后可以将这样的包含谐振器网络的标记物的组合(例如,包括两个或更多个这样的标记物的造影剂)施加到样品上,以便检测、识别、成像或以其他方式观察样品中感兴趣的分析物(例如,通过将多标记造影剂与样品混合或将其以其他方式施加到样品上)。通过选择施加到样品上的不同标记的各自的激发波长、发射波长、亮度、消光系数、吸收截面或其他光学性质,可以提高检测、区分或观察样品中所述标记的能力。如本文所述,可以创建这样的标记,它们在激发光谱,它们的发射光谱,它们的亮度或其他光学标识方面不同。这可以通过指定标记谐振器网络的标识、数量、相对位置和/或方向、拓扑或其他属性来实现。

[0120] 例如,选择和/或配置不同的标记从而使得激发波长、发射波长、斯托克斯位移或其他光谱标识不同以便于识别所述标记是有利的。所述识别可以基于检测到的从所述标记发射的光的波长和/或基于从所述标记发射的光的检测或确定的亮度,所述亮度是用于激发所述标记的光的波长的函数。但是,当使用单谐振器标记(例如,单荧光团标记)时,所述光学属性的选择可能受到市售或以其他方式可得谐振器的有限文库的约束。使用两个谐振器的标记(例如,两个荧光团标记配置为使一个荧光团充当Förster谐振能量转移的供体,另一个荧光团作为Förster谐振能量转移的受体)可能会增加可能的标记的空间和/或其可能的光学性质范围。然而,这样的标记仍可能受到也能参与彼此之间的能量传递(例如,由于具有充分重叠的发射光谱和激发光谱)的具有所期望光学属性的谐振器的可得性的限制(例如,就标记的有效斯托克斯位移的幅度或其他属性而言)。

[0121] 为了提供更大的自由度来指定标记和/或谐振器网络的这种光学属性,所述的谐振器网络可以包括一或多个介质谐振器,其被配置为允许能量从输入谐振器经由一或多个介质谐振器转移到输出谐振器。在这样的谐振器网络中,可以选择输入谐振器和输出谐振器(例如,根据激发光谱/波长,发射光谱/波长,亮度,与环境条件的相容性,光漂白趋势),而不需要所述的输出谐振器能够从输入谐振器直接接收能量(例如,通过谐振能量传递)。然后可以相对于所述输入和输出谐振器选择一或多个介质谐振器并定位在谐振器网络内,从而可以将由于谐振器网络被照射而接收到该网络中的能量通过所述介质谐振器传输到

所述的输出谐振器。。

[0122] 图6A示出了如本文所述的示例性谐振器网络600a的示意图。示例性谐振器网络600a包括输入谐振器(“IN”),介质谐振器(“M1”)和输出谐振器(“OUT”)。通过接收来自谐振器网络600a的环境的光照(例如,在输入谐振器的激发波长处的光照),可以激发输入谐振器。输入谐振器,输出谐振器和介质谐振器被布置成使得介质谐振器可以从输入谐振器接收能量并且输出谐振器可以从该介质谐振器接收能量。可以选择介质谐振器(例如,从一组可商购的荧光团中),使得它能够从输入谐振器接收能量并将能量提供给输出谐振器。这可以包括选择介质谐振器,使得输入谐振器的发射光谱与介质谐振器的激发光谱重叠和/或使得介质谐振器的发射光谱与输出谐振器的激发光谱重叠。

[0123] 为了允许这种谐振器网络的输入谐振器的激发光谱/波长与输出谐振器的发射光谱/波长之间更大的差异,该谐振器网络可以包括另外的的介质谐振器(例如,布置为所述标记内的谐振器导线)。图6B示出了如本文所述的示例性谐振器网络600b的示意图。示例性谐振器网络600b包括输入谐振器(“IN”),n个介质谐振器(“M1”至“M4”和“Mn”)以及输出谐振器(“OUT”)。通过接收来自谐振器网络600b的环境的光照(例如,在输入谐振器的激发波长处的光照),可以激发输入谐振器。介质谐振器被布置为在输入谐振器和输出谐振器之间的任意长度的谐振器导线。即,n个介质谐振器被布置成使得所述导线中的每个谐振器可以从一个相邻的谐振器接收能量并且将能量传输到另一相邻的谐振器。可以规定这种谐振器导线内的谐振器的数量和标识,以便调节输入谐振器的激发光谱和输出谐振器的发射光谱之间的差,例如,调节谐振器导线的激发波长之间的差。输入谐振器和输出谐振器的发射波长。在这样的示例中,设置在输入和输出谐振器之间的每个介质谐振器可以具有介于输入的激发波长和输出谐振器的发射波长之间的发射波长,例如,使得从每个介质谐振器接收和/或发射的能量允许从输入谐振器到输出谐振器的能量的激子(或其他量子)的波长和/或幅度的受控减小。

[0124] 此外,如本文所述增加或以其他方式指定标记和/或谐振器网络的亮度以利于检测或识别这种谐振器网络可能是有益的。例如,样品中感兴趣的的不同分析物可以以不同浓度或量存在于样品中。在这样的示例中,样品(例如,包含可通过流式细胞仪检测检测、鉴定和/或分选的细胞的样品)中存在的蛋白质,受体,小分子,RNA片段,DNA片段或其他感兴趣的分析物的数量或浓度)可能相差很大量(例如,多个数量级)。在这样的示例中,将包括具有大约相同亮度的两个标记的造影剂施加到样品上,可能导致被配置为与更普遍的分析物结合的第一标记的亮度远高于被配置为与较少见的分析物(因此以较低浓度存在所述样品中)结合的第二标记的亮度。样品中第一标记的较大亮度可能会阻止或降低样品中第二标记的检测。在这样的示例中,将第二标记配置为具有比第一标记更高的亮度可能是有益的。但是,对该标记的亮度的控制可能会受到市售或其他方式可得谐振器(例如,荧光团)的有限文库的限制。

[0125] 另外,如本文所述,增加谐振器网络的亮度通常是有利的,以便于稀有分析物的检测,降低这种检测所必需的光照强度(例如,减少标记的光漂白和/或防止由于这种光照而对样品造成损坏),或减小谐振器网络的某些其他应用所需的光照强度(例如,光学逻辑功能的执行,随机变量的样本的产生)。

[0126] 为了增加或以其他方式指定所述谐振器网络的亮度(例如,相对于造影剂中存在

的其他标记),可以如本文所述将谐振器网络配置为具有多个输入谐振器,输出谐振器和/或谐振器网络。对所述谐振器网络或多个不同谐振器网络(例如,用于流式细胞术,分子成像或某些其他应用的造影剂中存在的两个或多个标记的各不同谐振器网络)的亮度的控制能力可以利于用于流式细胞术的面板选择(例如,通过允许规定相对于对应更普遍的分析物的标记而言对应样品中较低丰度分析物的标记具有更高的亮度)。

[0127] 为了控制谐振器网络的亮度,可以使用DNA自组装或其他技术来提供具有单个谐振器或多个谐振器的许多实例的谐振器网络,以使所述谐振器网络总体亮度增加的量与谐振器实例数量相关。这可以包括提供如本文所述的谐振器网络的许多副本(例如100、300a-f,600a-b),以便增加这种标记的有效亮度,以减少从其检测到的光子的数量和/或识别此类标记所需的时间(例如,光照脉冲数),或提供其他一些益处。这样的多个谐振器和/或多个谐振器网络可以在标记内以足够远的相互距离定位,使得在谐振器和/或谐振器网络之间基本上不发生能量传递(例如,谐振能量传递)。另外或任选,所述谐振器和/或谐振器网络可以参与能量传递(例如,通过能量池或某种其他机制来增加谐振器网络的亮度,或者提供某种其他益处)。

[0128] 另外或任选,可以指定标记和/或标记的谐振器网络的输入荧光团和/或输出荧光团的绝对或相对数量,以控制谐振器网络的整体亮度。这可以包括指定谐振器网络,以使得一个输出谐振器可以从多个输入谐振器接收能量(例如,激子)和/或使得单个输入谐振器可以向多个输出谐振器提供能量(例如,激子)。例如,图6C示出了示例性谐振器网络600c的示意图,该示例性谐振器网络600c包括六个输入谐振器(“IN1”至“IN6”)和输出谐振器(“OUT”)。如代表箭头所示,能量可从每个输入谐振器直接传递到输出谐振器。这样的谐振器网络可以通过增加谐振器网络的吸收截面,通过提供可以被光照或经由某种其他机制或过程激发的另外部位来提供增加的亮度。

[0129] 在另一示例中,图6D示出了示例谐振器网络600d的示意图,该示例性谐振器网络600d包括六个输出谐振器(“OUT1”至“OUT6”)和输入谐振器(“IN”)。如代表箭头所示,能量可能直接从输入谐振器传递到每个输出谐振器。在能量不可能从输入谐振器传输到输出谐振器的示例中所述的谐振器网络可以提供增加的亮度,其中输出谐振器发射光的时间(例如,荧光寿命)较长,或者通过某种其他机制或过程。

[0130] 值得注意,本文所述的谐振器网络可以既包括可以向多个输出谐振器提供能量的输入谐振器,也可以包括可以从多个输入谐振器接收能量的输出谐振器。例如,图6E示出了示例性谐振器网络600e的示意图,该谐振器网络600e包括十个输入谐振器(“IN1”至“IN10”)和两个输出谐振器(“OUT1”和“OUT2”)。如代表箭头所示,能量可能从“IN1”和“IN2”直接转移到任一输出谐振器。能量转移也可能直接发生,从“IN3”到“IN6”到“OUT1”,从“IN7”到“IN10”到“OUT2”。

[0131] 在一些示例中,谐振器网络可以包括一或多个介质谐振器(例如,以增大输入谐振器的激发波长与输出谐振器的发射波长之间的差异,以调节谐振器的时间衰减曲线网络)将能量从多个输入谐振器传输到输出谐振器和/或将能量从输入谐振器传输到多个输出谐振器。图6F示出了如本文所述的示例性谐振器网络600f的示意图。示例性谐振器网络600f包括五个输入谐振器(“IN1”至“IN5”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”)以及输出谐振器(“OUT”)。可以通过接收来自谐振器网络600f的环境的光照(例如,在输入谐振器的激发波

长的光照)来激发输入谐振器。

[0132] 两个介质谐振器被布置为输入谐振器和输出谐振器之间的谐振器导线。即,两个介质谐振器被布置为使得第一介质谐振器可以从每个输入谐振器接收能量,第二介质谐振器可以从第一输入谐振器接收能量,并且输出谐振器可以从第二介质谐振器接收能量。可以指定这种谐振器导线内的谐振器的数量,以便调整谐振器网络600f的时间衰减曲线(例如,调整衰减曲线中峰值的延迟或宽度,以增加衰减曲线的平均衰减,或调整时间衰减曲线的某些其他属性),以增加输入谐振器的激发波长与输出谐振器的发射波长之间的差异,或提供其他益处。

[0133] 如本文所述的谐振器网络的谐振器网络可以代表不同的拓扑,例如分支拓扑。这样的分支拓扑可以包括多个不同的谐振器导线,其端部连接到输入谐振器,输出谐振器,介质谐振器(例如,一个或多个其他谐振器导线的端部谐振器),或者以某种其他方式连接以提供展示所需的时间衰减曲线的谐振器网络。

[0134] 在一些示例中,标记和/或谐振器网络可以包括以某种方式互连以提供本文所述的一些或全部益处的多个输入谐振器,介质谐振器和/或输出谐振器。例如,图6G示出了示例性谐振器网络600g的示意图,该示例性谐振器网络600g包括输出谐振器(“OUT”)和输入谐振器(“IN”)的场。如代表箭头所指示的,能量传递可以直接从多个输入谐振器发生至每个输出谐振器并且从每个输入谐振器到一或多个输出谐振器。

[0135] 这种谐振器网络或本文所述的其他谐振器网络(例如600c,600d,600e,600f)的亮度可以通过控制网络中输入谐振器的数量与输出数量的比率来调节网络中的谐振器。例如,对于某些输入谐振器,输出谐振器和环境条件,可以通过增加输入谐振器的数量与输出谐振器的数量之间的比率(即,相对于输出谐振器的数量增加输入谐振器的数量)来增加谐振器网络的亮度。因此,可以通过调节两个标记的输入和输出谐振器之间的比率(例如,使得第一标记的输入谐振器与输出谐振器之间的第一比率与第二标记的输入谐振器与输出谐振器之间的第二比率相差规定的数量)来调节包含造影剂(例如,用于对细胞样品进行染色以进行流式细胞术的造影剂)的两个标记的相对亮度。

[0136] 标记和/或谐振器网络的亮度也可以通过提供输入谐振器的网络来增加,其中,由网络的输入谐振器接收的能量(例如,来自环境光照的能量)经由一或多个其他输入谐振器转移到网络的输出谐振器。这种输入谐振器的场可以通过有效地吸收与由输入谐振器的场限定的平面形状和/或三维体积相交的大部分光子来起到增加谐振器网络的吸收截面的作用。此外,输入谐振器可以表现出双向能量传递(例如,成对的相邻输入谐振器可以任意方向在它们之间传递能量),从而允许谐振器的场表现出吸收的能量的汇集。这样的汇集可以增加与场相交的光子被吸收的可能性和/或增加被场吸收的能量经由整个谐振器网络成功地转移到输出谐振器的可能性。这样的谐振器网络可以包括多个输入谐振器/每个输出谐振器,例如,超过四个输入谐振器/每个输出谐振器,或者超过三十个输入谐振器/每个输出谐振器。在输入谐振器的所述场中的输入谐振器都可以是相同类型的输入谐振器(例如,相同类型的荧光团,具有重叠的激发和发射光谱,使得不同的荧光团实例可以在彼此之间传输能量)或不同类型的谐振器(例如,允许在多个不同的激发波长处吸收光子或提供其他一些益处)。

[0137] 例如,图6H示出了示例性谐振器网络600h的示意图,该示例性谐振器网络600h包

括输出谐振器(“OUT”)和输入谐振器的场(“IN”)。如代表箭头所示,在相邻的输入谐振器之间可能双向发生能量转移。另外,能量传递可能直接从多个相邻的输入谐振器发生到输出谐振器。因此,输出谐振器可以经由经由中间输入谐振器的能量传输而间接地从不相邻的输入谐振器接收能量。

[0138] VI. 示例性逻辑谐振器网络

[0139] 如本文所述的谐振器网络(例如,作为标记的一部分,被重新用于生成随机数生成器)可以被配置为表现出可光学调制或以其他方式可控的行为。在一些示例中,网络行为可以是光学可控的,从而允许网络执行逻辑操作或提供一些其他益处。可以由网络的一个或多个具有光可诱导的“暗态”的谐振器来提供这样的光学控制,其中当谐振器处于暗态时,该谐振器不能或发送和/或接收能量(例如,激子)的能力较弱。另外或任选,谐振器网络的行为可以与网络环境的性质(例如,与pH水平,与感兴趣的分析物与网络的结合)相关,从而允许使用谐振器网络以光学方式检测网络环境的属性。在某些示例中,单个谐振器网络可以同时包含传感器行为和光学可控行为,从而可以对单个谐振器网络进行光学控制以检测多种不同的分析物或其他环境变量(例如,通过将网络的光学逻辑元件操作为“寻址(address)”特定感测到的感兴趣变量)。

[0140] 可以通过多种方法来提供对谐振器网络行为的光学控制。在一些示例中,可以光学地调节各个谐振器的状态。这可以不可逆地执行,例如,通过在一个或多个谐振器的激发波长处以高于阈值水平的强度照射光照来对一个或多个谐振器进行光漂白。备选地,可以例如通过光学地使一个或多个谐振器进入“暗态”来可逆地调节各个谐振器的状态。

[0141] “暗态”是其中谐振器(例如,本文所述的荧光团,量子点或一些其他光学活性分子或原子)变得不能或者变得较不能够向谐振器环境发送和/或从谐振器环境(例如从谐振器网络的其他谐振器)接收能量(例如光子,激子)的状态。通过用特定波长的光照射,可以将谐振器光学地置于暗态。这种光照可能会导致谐振器进入暗态,例如,通过使电子转变为另一种能量状态,从而阻止谐振器吸收另外的的能量,从而导致谐振器获得/丢失电荷(例如从环境接收电子和/或向环境贡献电子),或通过使谐振器进行其他处理而进入暗态。因此,包括一或多个这样的谐振器(即,可以被光学控制以进入暗态的谐振器)的谐振器网络可以具有时间衰减曲线,在光照之后光子再发射的概率或其他一些标识,其可通过提供足以使谐振器进入暗态的光照来进行光学控制。

[0142] 可以将这种暗态谐振器作为谐振器网络的一部分来提供,以便允许对通过网络的能量(例如,激子)的流动进行光学控制。这样的谐振器网络可以被配置为使得当处于暗态时,暗态谐振器起促进能量流过谐振器网络的作用(例如,从网络的一部分流向另一部分,和/或从网络的输入端)。到网络的输出)。另外或任选,谐振器网络可以被配置成使得暗态谐振器在处于暗态时起到抑制能量流过谐振器网络的作用(例如,从网络的一部分流向另一部分,和/或从网络的输入流向到网络的输出)。这样的光学可控的抑制和/或激发可以用于提供逻辑门,谐振器网络内的能量流控制或各种其他行为和/或应用。

[0143] 表现出这种光学可诱导的暗态的谐振器可以以多种方式应用于谐振器网络中,以便在处于暗态时抑制能量流过谐振器网络。例如,可以将这种抑制谐振器设置为谐振器网络内能量流动路径的一部分。因此,当抑制谐振器处于暗态时(例如,由于用适当波长的光照射谐振器网络),将完全或部分阻止沿路径的能量流,从而完全或部分抑制沿路径的能量

流。

[0144] 这在图7A和7B中以示例的方式示出,它们示出了在各个不同的时间点的示例性谐振器网络700a。谐振器网络700a包括读出谐振器 (“CLK”),输入谐振器 (“IN”)和输出谐振器 (“OUT”)。当输入谐振器不处于暗态时(如图7A所示),可以从读出谐振器传输能量(例如激子)(例如,响应于读出谐振器被光710a以该读出谐振器的激发波长照射)到输入谐振器,以及从输入谐振器到输出谐振器。因此,当输入谐振器不处于暗态时,被谐振器网络(由读出谐振器)吸收的光照710a可以通过谐振器网络700a传输到输出谐振器,然后从输出谐振器作为光子720a发射。

[0145] 相反,当输入谐振器处于暗态时(图7B中通过用虚线画出“IN”谐振器来显示),能量(例如激子)无法从读出谐振器传输到输入谐振器,以及从输入谐振器到输出谐振器。因此,当输入谐振器处于暗态时,由谐振器网络(由读出谐振器)吸收的光照710a不通过谐振器网络700a传输至输出谐振器,因此输出谐振器不会响应性发射光子。

[0146] 另外地或任选,表现出这种光可诱导暗态的谐振器可以以多种方式应用于谐振器网络中,以便在处于暗态时促进能量流过该谐振器网络。例如,可以提供这种促进谐振器作为谐振器网络内能量流的替代性、耗散和/或非辐射路径的一部分。非暗态的所述促进谐振器可以起到吸收或以其他方式优先接收能量(例如激子)的作用,从而防止能量传播到输出谐振器或谐振器网络的其他部分。因此,当促进谐振器处于暗态时(例如,由于以适当波长的光照射谐振器网络),能量将不会流向促进谐振器,因此可能沿着不同的路径流动通过网络(例如,到输出谐振器)。

[0147] 这在图7C和7D中以示例的方式示出,其在各个不同的时间点示出了示例性谐振器网络700b。谐振器网络700b包括读出谐振器 (“CLK”),输入谐振器 (“IN”),中间谐振器 (“M”)和输出谐振器 (“OUT”)。当输入谐振器不处于暗态时(如图7C所示),能量(例如激子)可以从读出谐振器传输(例如,响应于读出谐振器被光710a以其激发波长照射)到介质谐振器,并从介质谐振器到输入谐振器或输出谐振器中的任何一个。如果传输到输入谐振器,则能量很可能被耗散(例如,作为热量从网络中丢失,或以输入谐振器的发射波长作为光子发射),而如果将能量传输到输出谐振器有可能从所述输出谐振器以所述输出谐振器的发射波长作为光子发射。

[0148] 在图7C和7D中,谐振器之间不同能量转移的相对概率由其代表箭头的相对线宽指示。因此,对于示例网络700b,当输入谐振器不处于暗态时,介质谐振器更有可能将能量传递到输入谐振器而不是输出谐振器。因此,当输入谐振器不处于暗态时,由谐振器网络(由读出谐振器)吸收的光照710b被输入谐振器吸收然后消散的可能性高于其被输出谐振器接收并作为光子从网络700b传输出去的可能性。

[0149] 相反,当输入谐振器处于暗态时(在图7D中,通过用虚线画出“IN”谐振器来显示),能量(例如激子)无法从介质谐振器传输到输入谐振器,并因此传输到输出谐振器。因此,当输入谐振器处于暗态时,被谐振器网络(由读出谐振器)吸收的光照710b可以通过谐振器网络700b传输到输出谐振器,然后从输出谐振器作为光子720a发射。

[0150] 可以采用这种行为来实现本文所述的谐振器网络中的逻辑门或其他计算或门控功能。例如,图7A和7B所示的谐振器网络700a可以被用作“非(NOT)”门,其中通过读出谐振器的激发来触发对门的“评估”。可以通过检测输出谐振器是否响应所述“评估”而发出光子

来实现对门输出的检测。通过提供(或不提供)输入波长的光照来施加门输入,以使输入谐振器进入暗态。因此,“高”输入(足以使输入进入暗态的光照)将导致“低”输出(响应于读出谐振器的激发,所述网络不从输出谐振器发射光子)。相反,“低”输入将导致“高”输出,从而提供非(NOT)门的行为。

[0151] 谐振器结构可以被设计为提供任意逻辑门函数或其他计算或门功能(gating functionality)。这可以包括提供多个“输入”谐振器,可以通过以适当的波长向输入谐振器提供光照来使其进入暗态。这些另外的的输入谐振器可能在诱发暗态所需的光波长方面有所不同。这些另外的的谐振器在促进能量流过所述网络还是抑制能量流过所述网络方面也可能有所不同。因此,以这些不同的波长提供(或未以这些不同的波长提供)的光可以代表向谐振器网络的各个不同的逻辑输入。波长可以相差超过指定量(例如,相差超过10纳米,或相差超过50纳米),以便允许沿着各个不同逻辑输入的可靠且独立的信号。

[0152] 在图8A中示出了配置为逻辑与(AND)门的这种谐振器网络的示例。谐振器网络800a包括读出谐振器(“CLK”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”),两个输入谐振器(“IN1”和“IN2”)以及输出谐振器(“OUT”)。在谐振器之间不同能量转移的相对概率在图8A中通过其代表性箭头的相对线宽来指示。因此,为了使能量以高概率从读出谐振器传输到输出谐振器,两个输入谐振器必须处于它们的暗态(例如,响应于被提供有处于其各自输入波长的光照)。

[0153] 这种谐振器网络的另一示例,被配置为逻辑或(OR)门,如图8B所示。谐振器网络800b包括读出谐振器(“CLK”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”),两个输入谐振器(“IN1”和“IN2”)以及输出谐振器(“OUT”)。谐振器之间不同能量转移的相对概率在图8B中用其代表箭头的相对线宽表示。因此,为了使能量以高概率从读出谐振器传输到输出谐振器,至少一个输入谐振器必须处于其暗态(例如,响应于以其各自的输入波长中的一种或两种波长提供的光照)。

[0154] 这种谐振器网络的另一示例,被配置为逻辑与非(NAND)门,如图8C所示。谐振器网络800c包括读出谐振器(“CLK”),两个输入谐振器(“IN1”和“IN2”)和输出谐振器(“OUT”)。在谐振器之间不同能量转移的相对概率在图8C中通过其代表性箭头的相对线宽来指示。因此,为了使能量以高概率从读出谐振器传输到输出谐振器,不超过一个输入谐振器可以处于其暗态(例如,响应于以它们各自的输入波长的一种波长或另一种波长或不是这两种波长之一的波长提供光照)。

[0155] 这种谐振器网络的另一示例,被配置为逻辑或非(NOR)门,如图8D所示。谐振器网络800d包括读出谐振器(“CLK”),两个输入谐振器(“IN1”和“IN2”)和输出谐振器(“OUT”)。谐振器之间不同能量转移的相对概率在图8D中用其代表箭头的相对线宽表示。因此,为了使能量以较高的可能性从读出谐振器传输到输出谐振器,两个输入谐振器都不会处于暗态(例如,响应于以不是其各自输入波长中任一种的波长的光照)。

[0156] 可以在单个谐振器网络中提供响应于接收相同波长的光照而进入其暗态的多个输入谐振器,以便实现指定的逻辑功能或行为。在图8E中示出了配置为逻辑XOR门的这种谐振器网络的示例。谐振器网络800e包括读出谐振器(“CLK”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”),四个输入谐振器(“IN1a”,“IN1b”,“IN2a”和“IN2b”)和输出谐振器(“OUT”)。谐振器之间不同能量转移的相对概率在图8E中用其代表箭头的相对线宽表示。因此,为了使能量

以高概率从读出谐振器传输到输出谐振器,所述输入谐振器中的一个和仅一个必须处于其暗态(例如,响应于提供在仅限于其各自输入波长中的一种或另一种的光照)。

[0157] 这种谐振器网络的另一个示例,被配置为逻辑XNOR门,如图8F所示。谐振器网络800f包括读出谐振器(“CLK”),两个介质谐振器(“M1”和“M2”),四个输入谐振器(“IN1a”,“IN1b”,“IN2a”和“IN2b”)和输出谐振器(“OUT”)。在谐振器之间不同能量转移的相对概率在图8F中通过其代表性箭头的相对线宽来指示。因此,为了使能量以高概率从读出谐振器传输到输出谐振器,两个输入谐振器都必须处于其暗态或都必须不处于其暗态(例如,响应于以两者各自的输入波长提供的光照或响应于以不是两者各自输入波长中任一波长提供的光照)。

[0158] 谐振器网络可以包括如本文所述的输入谐振器(例如,可以通过光诱导和/或以其他方式光学控制其暗态的暗态展示谐振器)来控制通过谐振器网络的能量流(例如,谐振器网络的不同部分)。可以控制这样的输入以便选择性地激活或失活(deactivate)谐振器网络的部分。这在图9A中以示例方式进行了说明,该图显示了谐振器网络900a,该网络包括一个读出谐振器(“CLK”),三个输入谐振器(“IN1”,“IN2”和“IN3”)和三个输出谐振器(“OUT1”,“OUT2”和“OUT3”)。谐振器之间不同能量传递的相对概率在图9A中用其代表箭头的相对线宽表示。因此,为了使能量从读出谐振器传输到具体的一个输出谐振器,相应的输入谐振器必须不处于其暗态。因此,可以通过以输入谐振器的各个输入波长提供(或不以上述波长提供)光照来选择响应于读出谐振器的激发而可以发射光子的输出谐振器。例如,为了选择“OUT1”输出谐振器,可以以第二(“IN2”)和第三(“IN3”)输入谐振器的暗态诱导波长提供光。

[0159] 光学可控的谐振器网络(例如,通过在网络的一个或多个谐振器中通过光学诱导暗态)可被应用以提供多种益处。例如,本文所述的包含谐振器网络的标记可以包括这种暗态谐振器,以便提供用于标记检测和识别的进一步的多路复用。这可以包括当标记的输入谐振器处于暗态时,标记相对于响应于光照的光子发射的相对时间表现出第一时间衰减曲线或其他时间依赖概率密度函数。当输入谐振器不处于暗态时,标记可以显示第二时间衰减曲线或其他随时间变化的概率密度函数。因此,可以在第一和第二时间段期间对标记进行光学询问,其中输入谐振器在第一时间段期间不处于暗态,而在第二时间段期间(例如,由于在输入谐振器的激发波长处的光照)处于暗态。在第一时间段和第二时间段期间,响应于光照检测到的来自标记的光的相对发射时间可以一起用于识别所述标记。

[0160] 在另一个示例中,本文所述的谐振器网络可以包括所述的暗态谐振器,以便相对于响应于光照而从一或多个谐振器网络发射光子的时序提供可控的时间相关概率密度函数。所检测到的相对时间可以用来生成随机变量的样本,该随机变量的概率分布与由所述谐振器网络展现的时间依赖概率密度函数相关。处于暗态的这种谐振器网络的一个或多个输入谐振器可以修改谐振器网络呈现的时间依赖概率密度函数。因此,可以通过控制所述输入谐振器是否处于暗态来控制由此产生的随机变量样本的概率分布。

[0161] 在一些示例中,这可以包括在谐振器网络内应用暗态输入谐振器以控制谐振器网络的各部分是否可用于将能量从网络的读出谐振器传输至网络的输出谐振器。网络的每种此类配置,仅包括由输入谐振器的暗态“启用”的网络部分,可以对应于各自不同的时间依赖概率密度函数,因此可用于生成各不同的随机变量的样本。

[0162] 这在图9B中以示例的方式示出,其示出了谐振器网络900b,其包括读出谐振器(“CLK”),三个输入谐振器(“IN1”,“IN2”和“IN3”),其中十二个谐振器(“M1”至“M12”)和输出谐振器(“OUT”)。谐振器之间不同能量转移的相对概率在图9B中用其代表箭头的相对线宽表示。因此,为了使能量从读出谐振器传输到输出谐振器,输入谐振器中的至少一个必须不处于其暗态。关于响应于读出谐振器的激发而从输出谐振器发出光子的发射时间,谐振器网络900b表现出的总体时间依赖概率密度函数与每个输入谐振器是否存在其暗态中相关。因此,例如,如果“IN2”和“IN3”输入谐振器处于暗态,而“IN1”不处于暗态,则谐振器网络900b将表现出与由“IN1”、“M1”、“M2”、“M3”和“M4”组成的谐振器导线相关的时间依赖概率密度函数。在另一个示例中,如果“IN3”输入谐振器处于暗态,而“IN1”和“IN2”谐振器不在其暗态时,谐振器网络900b将表现出这样的时间依赖概率密度函数,所述时间依赖概率密度函数与由“IN1”、“M1”、“M2”、“M3”和“M4”组成的谐振器导线的时间依赖概率密度函数以及与由“IN2”、“M5”和“M6”组成的谐振器导线相关的另外的时间依赖概率密度函数的组合相关。

[0163] 在又一个示例中,本文所述的谐振器网络可以包括用于检测谐振器网络的环境的属性的传感器,例如,谐振器网络所暴露的溶液的pH或结合于谐振器网络的受体的分析物的存在或量。这样的谐振器网络可以包括各种传感器元件或其他组件(例如,网络本身的谐振器),它们能够将网络环境的属性转换为谐振器网络中的光学可检测变化(例如,响应于光照的总体强度或光发射概率的变化,响应于光照的来自网络的光发射的时间衰减函数和/或时间依赖概率密度函数的变化)。例如,谐振器网络的一个或多个谐振器可以具有与以下相关的光学属性(例如,被淬灭或进入暗态的属性):所述谐振器所暴露的溶液的pH或其他属性,所述谐振器是否已结合于目标分析物,或所述谐振器网络环境中某些其他感兴趣的属性。

[0164] 在另一个例子中,这样的传感器可以包含优先结合感兴趣的分析物(例如,蛋白质、激素、细胞、细胞表面受体或其他细胞表面元件、互补的DNA或RNA链、小分子、金属离子)的受体(例如,抗体、适配体、一或多种蛋白质、DNA或RNA链)。然后可以以多种方式将这种受体与感兴趣的分析物结合的状态与谐振器网络的一种或多种可检测的光学性质相关。例如,分析物与受体的结合可导致谐振器网络内一个或多个谐振器的相对位置发生变化,从而改变谐振器网络的光学可检测属性(例如,总体强度或响应于光照的发光概率,响应于光照来自网络的光发射的时间衰减函数和/或时间依赖概率密度函数的变化)。这样的变化可能是由于受体的构象变化,谐振器网络的主干的一个或多个元件的构象变化,或者是由于连接到受体的谐振器或主干元件的位置发生了变化。另外或任选,受体可以与网络的谐振器和/或其一部分(例如,包括荧光部分的蛋白质的一部分)连接,使得未与分析物实例结合的受体导致谐振器被淬灭或光学上失效。任选,与分析物的实例结合的受体可能导致谐振器被淬灭或以其他方式在光学上失效。

[0165] 这在图10A和10B中以示例的方式示出,其示出了示例性谐振器网络1000。谐振器网络1000包括读出谐振器(“CLK”),优先结合感兴趣的分析物735的受体730,当分析物735的实例结合到受体730时被淬灭的介质谐振器(“IN”),和输出谐振器(“OUT”)。因此,当受体730未与分析物的实例结合时,谐振器网络1000可以响应于在读出谐振器(图10A中所示)的激发波长处接收到光710a而发射光720a。相反,当受体730与分析物735结合时,谐振器

网络1000不能响应于在读出谐振器的激发波长处的接收光710a而发光,因为介质谐振器已经被淬灭并因此不能将接收到的能量从读出谐振器传输到输出谐振器(如图10B所示)。

[0166] 如上所述,被配置用于光学感测谐振器网络的环境的一或多个属性的谐振器网络可以包括一或多个呈现输入谐振器的暗态。这样的输入谐振器可以允许谐振器网络的复用,以便使用该网络来检测多个不同的环境属性。例如,谐振器可以包括多个不同的受体,其与相应的不同分析物选择性地相互作用,并且当结合到相应分析物的实例时,淬灭网络的相应谐振器或以其他方式引起谐振器网络相应部分的光学性质的变化。可以在这种谐振器网络中提供一个或多个输入谐振器,以允许使用该谐振器网络对分析物的检测进行光控多路复用。这可以包括使用输入谐振器来实现逻辑门或其他用于寻址传感器的方式,以使谐振器网络对读出谐振器被激发的响应(例如,从谐振器网络的输出谐振器发出的光的强度或时间)与光学选择的受体之一是否结合到相应分析物的实例相关。通过实现光学控制和/或选择彼此隔开小于成像波长的距离的谐振器网络的不同部分,这种光控多路复用还可以允许亚波长成像和/或分析物测定。

[0167] VII示例方法

[0168] 图11是用于询问样本以检测和识别可以包含在样本内的一或多种标记的方法1100的流程图,如本文所述。为了说明的目的,在方法1100 中识别的标记包括:(i) 输入谐振器;(ii) 以发射波长为特征的输出谐振器;(iii) 一或多个介质谐振器的网络。输入谐振器、输出谐振器以及一或多个介质谐振器在标记内的相对位置使得能量可以响应于被光照(例如,通过输入谐振器的激发波长的激光脉冲)激发的输入谐振器经由一或多个介质谐振器的网络传输到输出谐振器。

[0169] 方法1100包括照射包含标记的样品(1110)。这可能包括用一个或多个光照脉冲照射样品。这样的光照脉冲可以是超短脉冲,其脉冲宽度在阿秒和纳秒之间。光照脉冲可以具有不同的光谱和/或包括不同的光波长。例如,光照的第一脉冲可以包括在该标记的输入谐振器的激发波长的光,光照的第二脉冲可以包括在不同标记的输入谐振器的激发波长的光。在另一个示例中,光照的第一脉冲可以包括在该标记的输入谐振器的激发波长的光,且光照的第二脉冲可以包括在该标记的另一输入谐振器的激发波长的光。

[0170] 方法1100还包括相对于样品的光照在检测波长范围内(1120)检测从样品发射多个光子的时间。检测波长的范围包括标记的输出谐振器的发射波长。检测来自样品的多个光子的发射时间可以包括例如使用单个光子雪崩二极管,光电倍增管或一些其他检测器元件来检测单个光子的接收时间。另外或任选,检测从样品发射多个光子的时间可以包括检测从样品发射光子的强度、速率或其他标识随时间变化的峰值或其他特征的时间。

[0171] 方法1100还包括基于检测到的多个光子的发射时间来确定标记的标识(1130)。确定标记的标识包括从一组已知标记中选择标记的标识。确定标记的标识可以包括将检测到的多个光子的发射时间与对应于已知标记的一组时间衰减曲线进行比较。例如,检测到的多个光子的发射时间可以用于确定响应于样品的照射而从样品发射光子的时间的概率密度函数。然后,可以将这样确定的概率密度函数与每个已知的时间衰减曲线进行比较。这样的比较可以包括确定概率密度函数与已知时间衰减曲线之间的统计偏差的度量,例如,Kullback-Leibler偏差,Jensen-Shannon偏差,Bregman 偏差或Fisher信息度量。

[0172] 方法1100可以包括如本文其他地方所述的另外的步骤或替代的步骤。例如,方法

1100可以包括基于所确定的样品中一个或多个标记的标识来识别样品的细胞或其他内容。方法1100可以包括基于所确定的标记的标识来对样品中的细胞或其他颗粒进行分选(例如,样品可以被包含在流式细胞仪的流道内,并且所述流通道中的细胞可以根据流通道中一个或多个标记的确定标识分选)。方法1100可以包括以谐振器波长的暗态展示谐振器的激发波长发射光,从而调整标记的时间衰减曲线或其他光学可检测的属性,并且识别标记可以包括确定检测到的时间对应于光学可检测标识的调整状态。图11所示的示例性方法1100意在作为说明性的非限制性示例。如本领域技术人员将显而易见的,可预期该方法的另外的或替代组成部分。

[0173] 图12是用于询问如本文所述的谐振器网络以检测分析物的方法1200 的流程图。为了说明的目的,方法1200的谐振器网络包括:(i) 第一输入谐振器,该第一输入谐振器具有暗态并且响应于在第一输入激发波长处接收到的光照而可以进入暗态;(ii) 读出谐振器,它可以从读出波长的光照中接收能量;(iii) 介质谐振器;(iv) 输出谐振器;(v) 包括优先结合分析物的受体的传感器;(vi) 主干。第一输入谐振器,读出谐振器,传感器和输出谐振器连接到主干。主干保持第一输入谐振器,读出谐振器,介质谐振器,传感器和输出谐振器的相对位置,使得能量可以经由介质谐振器从读出谐振器传输到输出谐振器,并且进一步使得当第一输入谐振器处于暗态时,能量从读出谐振器传输到输出谐振器的概率与受体是否结合到分析物的实例相关。

[0174] 方法1200包括在第一时间段期间用第一输入波长的光照射谐振器网络(1210)。这可以包括利用一或多个光照脉冲照射样品。可指定所述脉冲的持续时间和/或数量以保证所述第一输入谐振器可能已经进入暗态,例如提供的在第一输入波长的光可被提供超过阈值持续时间的次数。

[0175] 方法1200包括在第一时间段期间用读出波长的光照射谐振器网络(1220)。这可以包括用一个或多个光照脉冲光照射样品。这样的光照脉冲可以是超短脉冲,其脉冲宽度在阿秒和纳秒之间。光照脉冲可以具有不同的光谱和/或包括不同的光波长。例如,光照的第一脉冲可以包括在所述标记的输入谐振器的激发波长的光,且光照的第二脉冲可以包括在不同标记的输入谐振器的激发波长的光。在另一个示例中,光照的第一脉冲可以包括在所述标记的输入谐振器的激发波长的光,且光照的第二脉冲可以包括在所述标记的另一输入谐振器的激发波长的光。可以在提供在第一输入波长的光之后提供在读出波长的光。

[0176] 方法1200还包括在第一时间段期间检测从谐振器网络的输出谐振器发射的光的强度(1230)。这可以包括相对于以读出波长提供的一个或多个光脉冲的时间来检测所述光的发射时间。检测从谐振器网络发出的光的强度可以包括检测从一组谐振器网络中发出多个光子的时间,例如,使用单个光子雪崩二极管,光电倍增管,或其他一些探测器元件来检测单个光子的接收时间。另外或任选,检测从样品发射多个光子的时间可以包括检测从样品发射的光子的强度、速率或其他标识随时间变化的峰值或其他特征的时间。检测从谐振器网络发射的光的强度可以包括例如通过整合与检测到的光的强度相关的信号来检测从输出谐振器发射的光的总量。

[0177] 方法1200可以包括如本文其他地方所述的附加或替代步骤。方法1200可以包括基于检测到的发射光的强度来确定分析物的存在、量、计数或其他性质。在一些示例中,谐振器网络可以被配置为允许例如通过光学复用和/或寻址谐振器网络的多个不同传感器的

过程来检测多种分析物。例如,谐振器网络可以包括对第二分析物敏感的第二传感器和与谐振器网络的其余部分连接在一起的第二输入谐振器,使得当第二谐振器处于暗态而第一输入谐振器不处于暗态时,能量从读出谐振器传输到输出谐振器的概率与第二受体是否结合到第二分析物的实例相关。在这样的示例中,方法1200可以包括:在第二时间段期间,以第二输入谐振器的激发波长的光照射所述谐振器网络;用读出波长的光照射所述谐振器网络;在第二时间段期间检测从所述谐振器网络发射的光的强度。然后可以将第二时间段内检测到的强度用于确定有关第二分析物的浓度、存在、计数或一些其他信息。图12中示出的示例性方法1200意在作为说明性的非限制性示例。如本领域技术人员将显而易见的,可预期该方法的另外或替代组成部分。

[0178] 图13是用于使用如本文所述的多个谐振器网络来生成随机变量的样本的方法1300的流程图。为了说明的目的,在方法1300中标识的谐振器网络包括:(i) 第一输入谐振器,该第一输入谐振器具有暗态并且响应于接收到第一输入波长的光照而可以进入暗态;(ii) 读出谐振器,它可以从读出波长的光照接收能量;(iii) 两个或多个介质谐振器;(iv) 输出谐振器;(v) 主干。所述第一输入谐振器,读出谐振器,两个或更多个介质谐振器和输出谐振器连接到主干。所述主干保持第一输入谐振器,读出谐振器,两个或更多个介质谐振器和输出谐振器的相对位置,使得能量可以经由介质谐振器从读出谐振器传输到输出谐振器,并且进一步使得谐振器响应于读出谐振器接收到读出波长处的光照根据时间依赖概率密度函数从输出谐振器发射光子,并且其中时间依赖概率密度函数的可检测属性与第一输入谐振器是否处于暗态相关。

[0179] 方法1300包括在第一时间段期间用第一输入波长的光照射多个谐振器网络(1310)。这可能包括用一个或多个光照脉冲照射样品。可以规定所述光照的所述脉冲的持续时间和/或数量,以确保每个谐振器网络和/或谐振器网络的指定部分的第一输入谐振器可能已经进入了暗态,例如,在第一输入波长处提供的光可以被提供超过阈值持续时间。

[0180] 方法1300包括在第一时间段期间,以读出波长的光照射多个谐振器网络(1320)。这可能包括用一个或多个光照脉冲照射样品。这样的光照脉冲可以是超短脉冲,其脉冲宽度在阿秒和纳秒之间。

[0181] 方法1300还包括检测相对于谐振器网络的光照从多个谐振器网络的输出谐振器发射多个光子的时间(1330)。检测来自谐振器网络的多个光子的发射时间可以包括例如使用单个光子雪崩二极管,光电倍增管或一些其他检测器元件来检测单个光子的接收时间。另外或任选,检测从样品发射多个光子的时间可以包括检测从样品发射的光子的强度、速率或其他标识随时间变化的峰值或其他特征的时间。

[0182] 方法1300可以包括如本文其他地方所述的附加或替代步骤。例如,方法1300可以包括基于检测到的时间来生成随机变量的样本,例如,通过将函数应用于检测到的时间。方法1300可以包括通过照射谐振器网络并检测响应地从谐振器网络发射光子的发射时间来产生随机变量的附加样本。谐振器网络可以包括一个或多个另外的输入谐振器,并且方法1300可以包括在另外的时间段内,通过光学控制谐振器网络的输入谐振器来生成附加的随机变量的样本,使得谐振器网络表现出与其他随机变量相对应的时间依赖概率密度函数。可以通过检测响应于光照从谐振器网络发射光的时间来生成随机变量的样本。图13中示出的示例性方法1300旨在作为说明性的非限制性示例。如本领域技术人员将显而易见

的,可预期该方法的另外的或替代组成部分。

[0183] VIII结论

[0184] “Fluorescent taggants with temporally coded signatures”(Wang,S., Vyas,R.,Dwyer,C,“Fluorescent taggants with temporally coded signatures,” Optics Express,第24卷,第14期,2016年7月11日)通过引用并入本文。本文引用的所有参考文献通过引用并入。另外,本发明不旨在限于本发明的公开实施例。应当理解,前述公开内容强调了本发明的某些特定实施例,并且等同于其的所有修改或替代都在所附权利要求书中所阐述的本发明的精神和范围内。

[0185] 附图中所示的具体布置不应视为限制性的。应当理解,其他实施例可以包括给定图中所示的每个组成部分的更多或更少。此外,一些示出的组成部分可以被组合或省略。更进一步,示例性实施例可以包括图中未示出的组成部分。

[0186] 另外,尽管本文已经公开了各个方面和实施例,但是其他方面和实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。本文所公开的各个方面和实施方案是出于说明的目的,而不是旨在进行限制,其真实范围由所附权利要求指示。在不脱离本文提出的主题的精神或范围的情况下,可以利用其他实施方案,并且可以进行其他改变。容易理解的是,可以以各种不同的配置来布置、替换、组合、分离和设计如本文一般地描述的以及在附图中示出的本公开的各方面,所有这些都涵盖在本发明范围中。

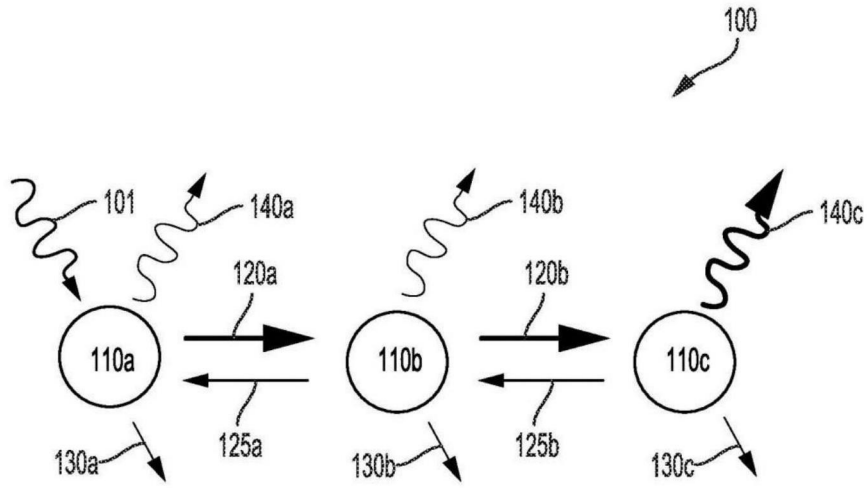


图1A

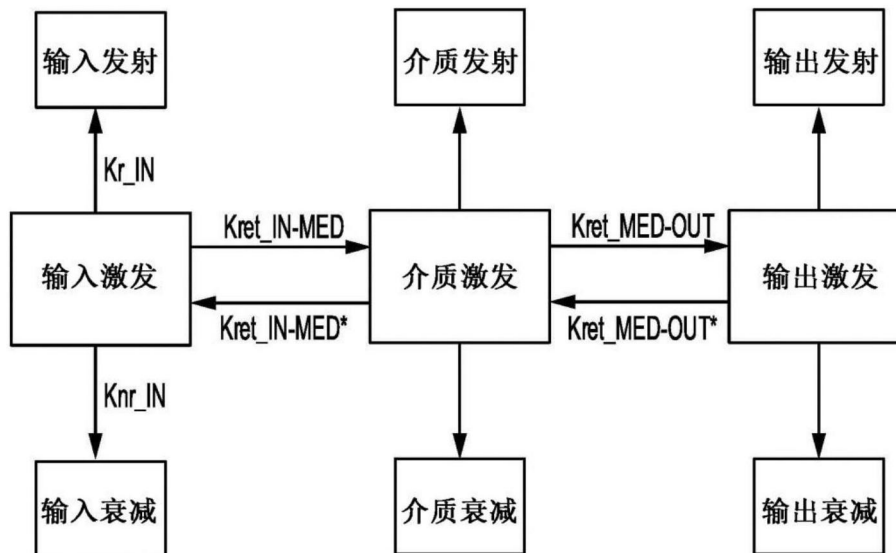


图1B

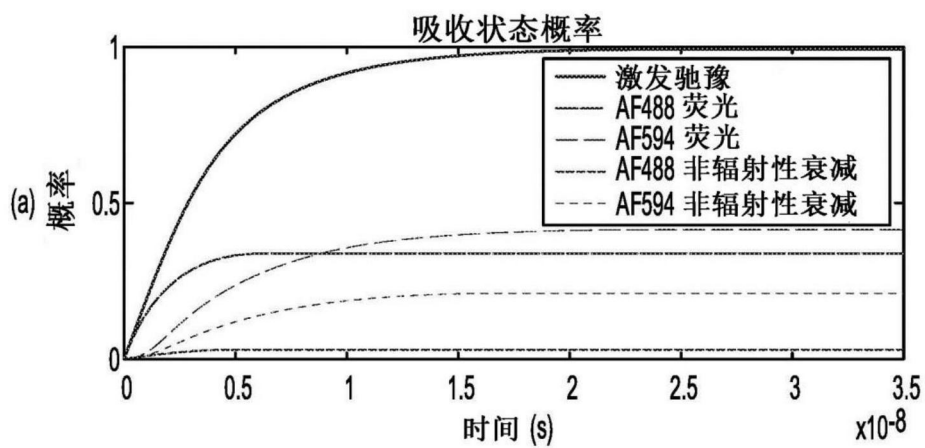


图2A

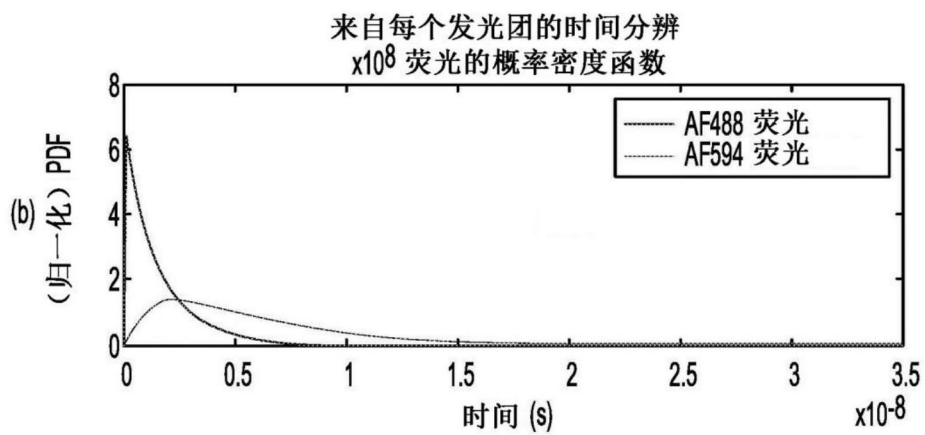


图2B

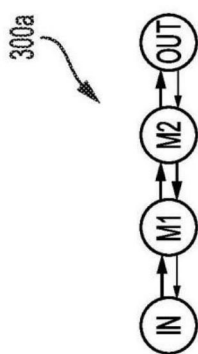


图3A

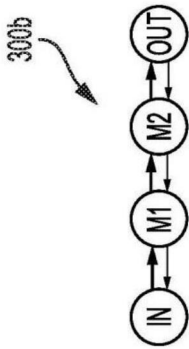


图3B

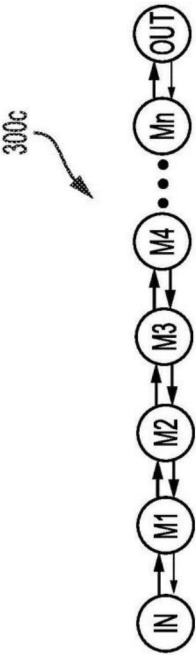


图3C

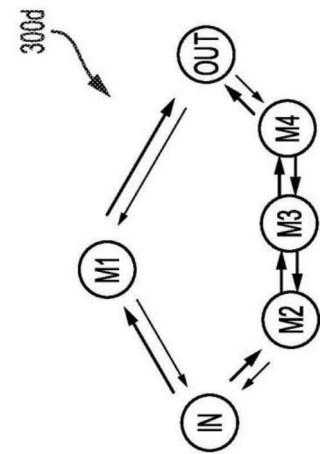


图3D

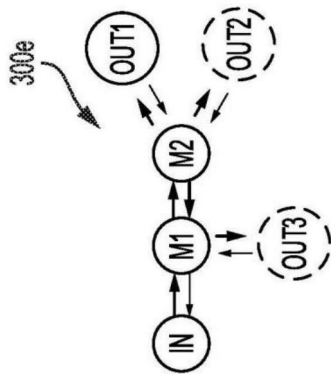


图3E

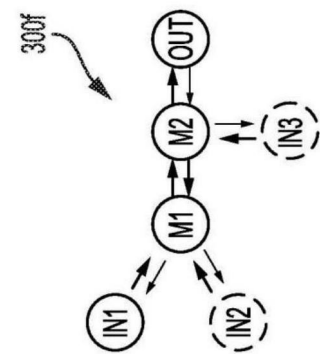


图3F

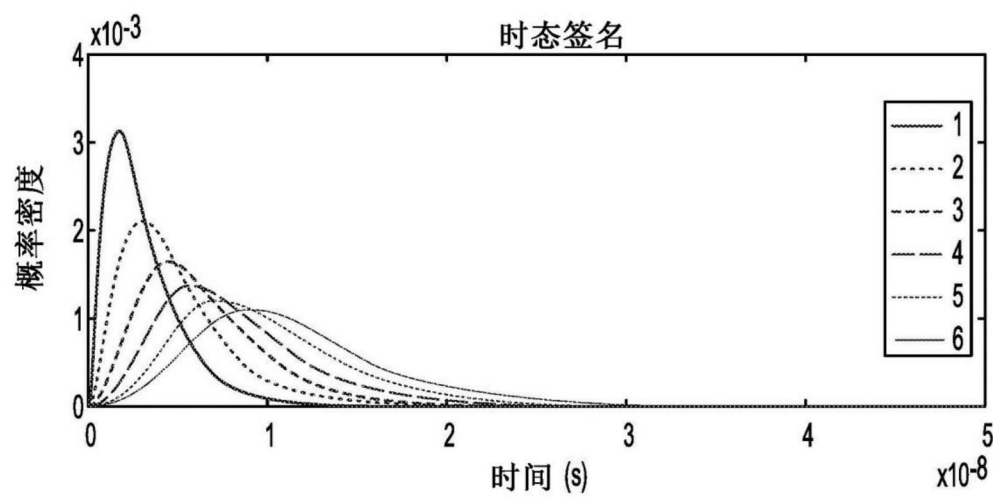


图4A

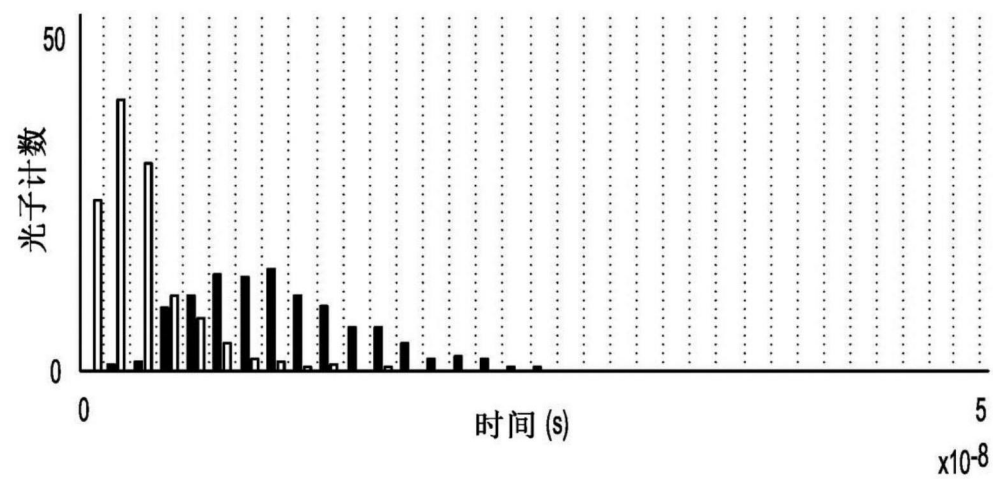


图4B

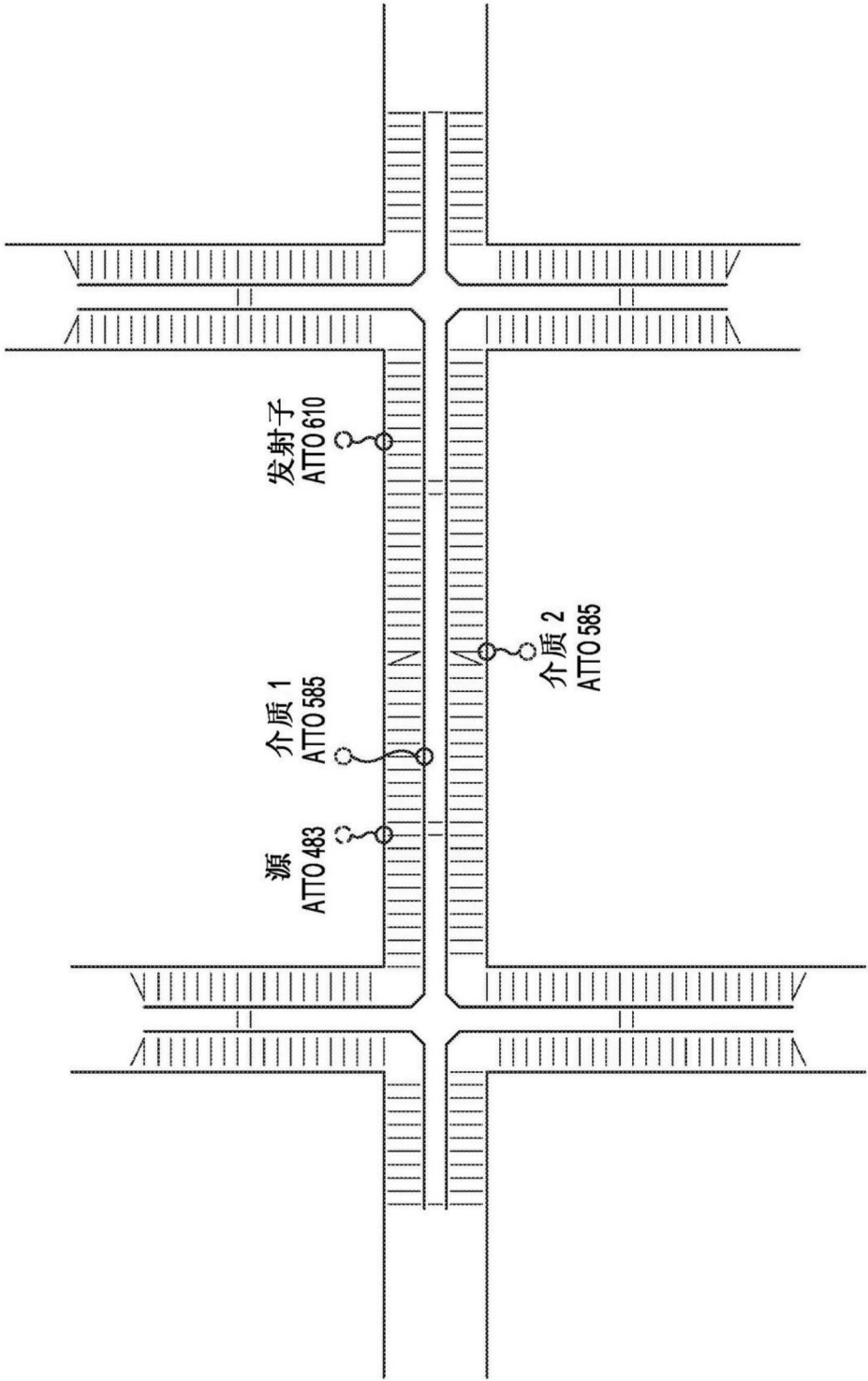


图5

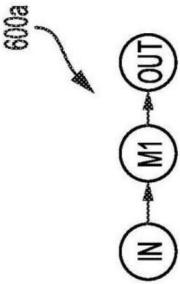


图6A

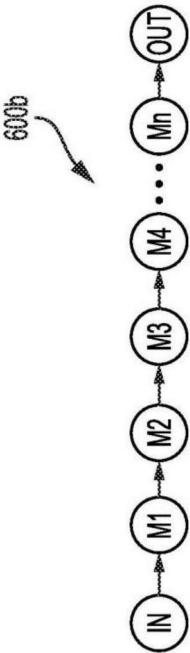


图6B

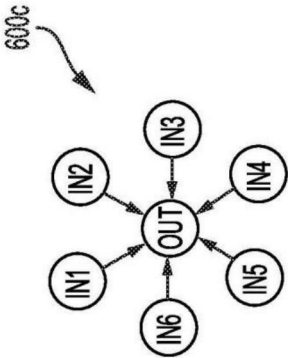


图6C

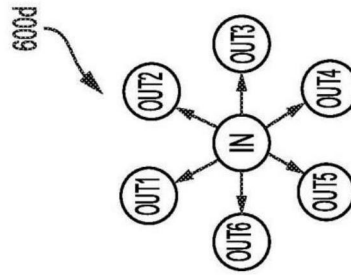


图6D

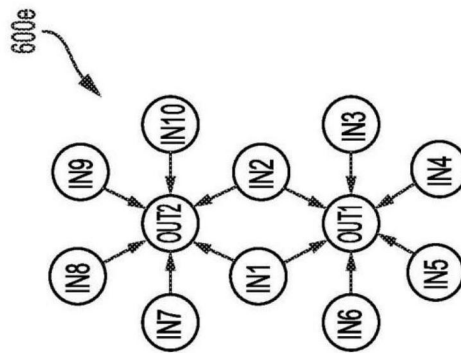


图6E

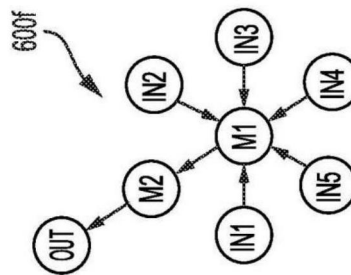


图6F

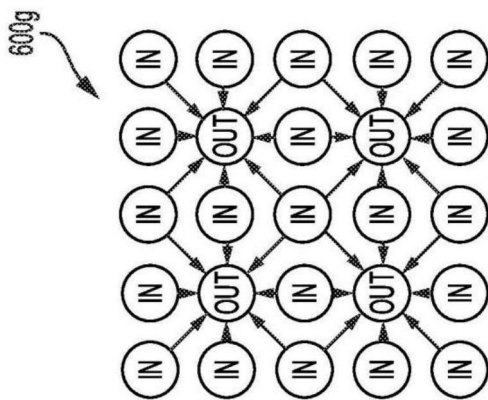


图6G

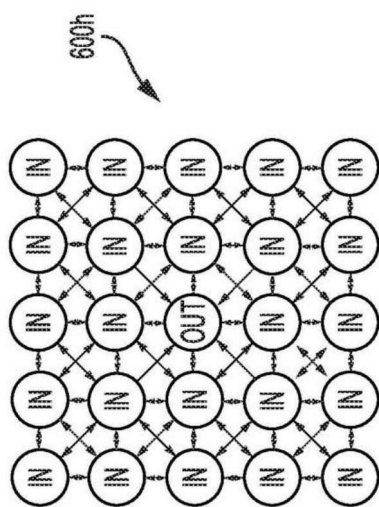


图6H

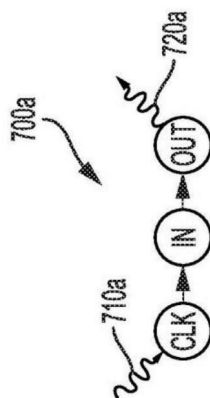


图7A

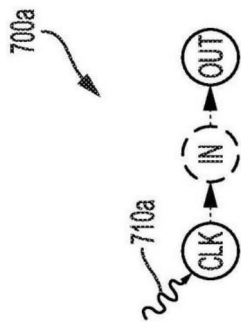


图7B

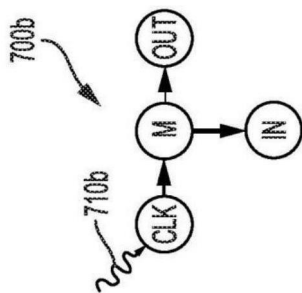


图7C

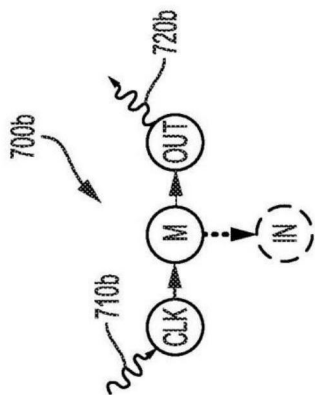


图7D

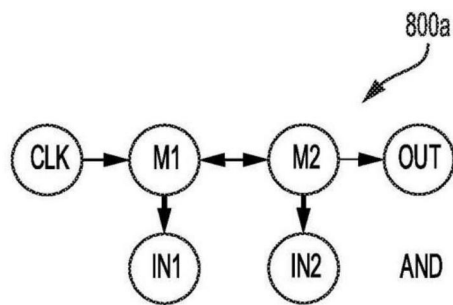


图8A

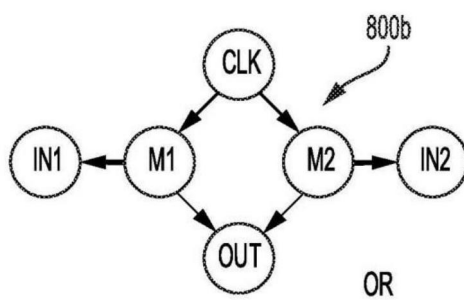


图8B

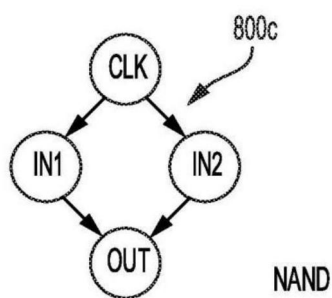


图8C

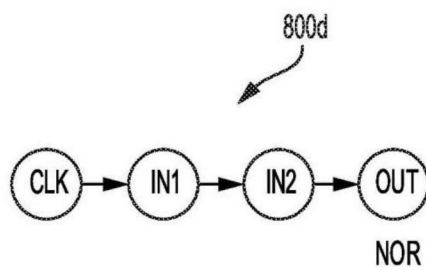


图8D

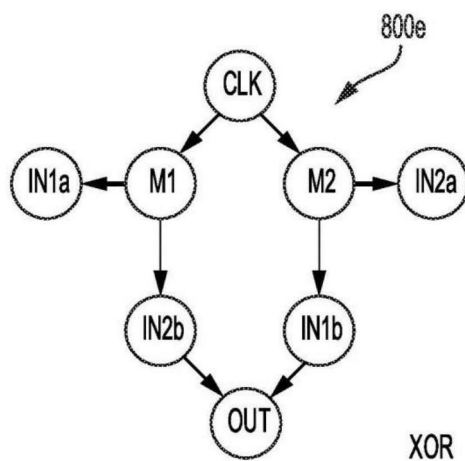


图8E

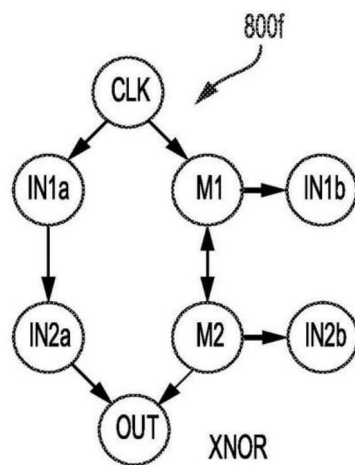


图8F

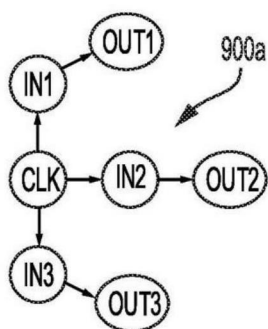


图9A

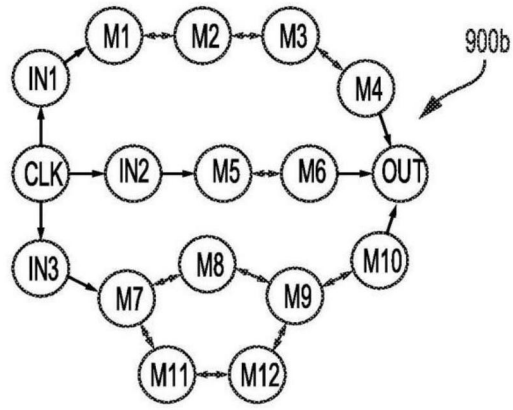


图9B

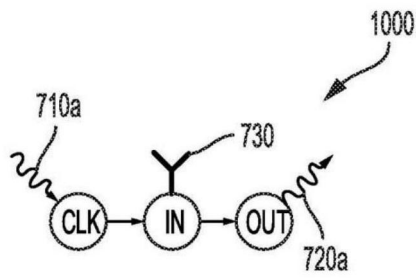


图10A

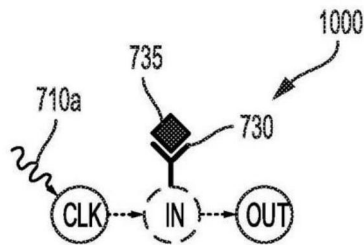


图10B

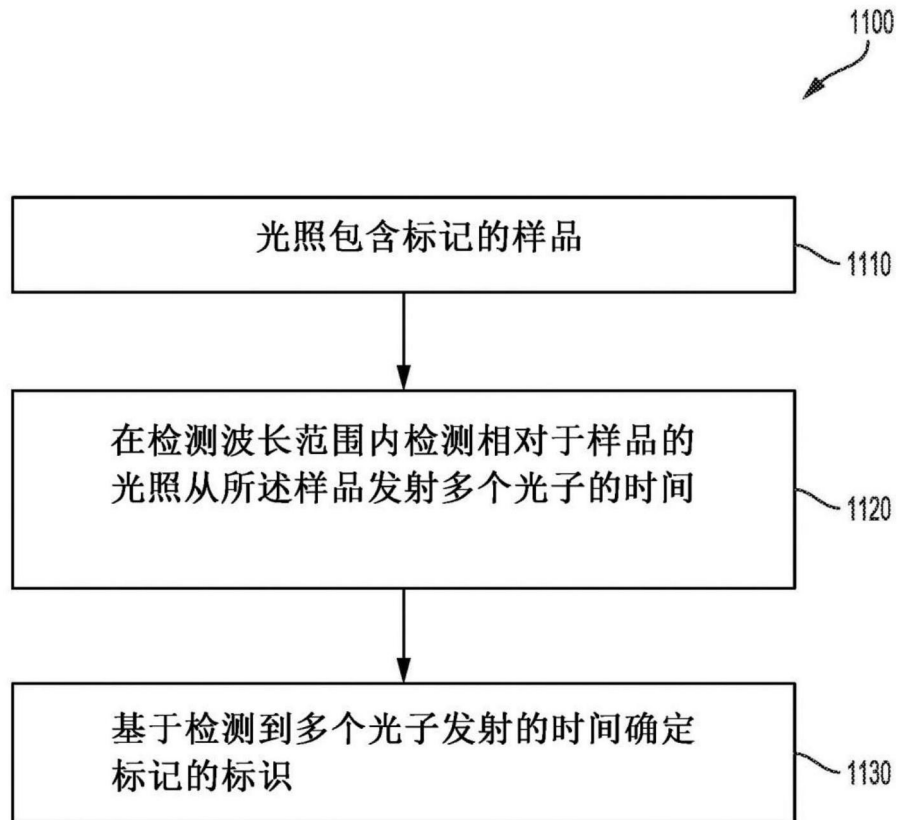


图11

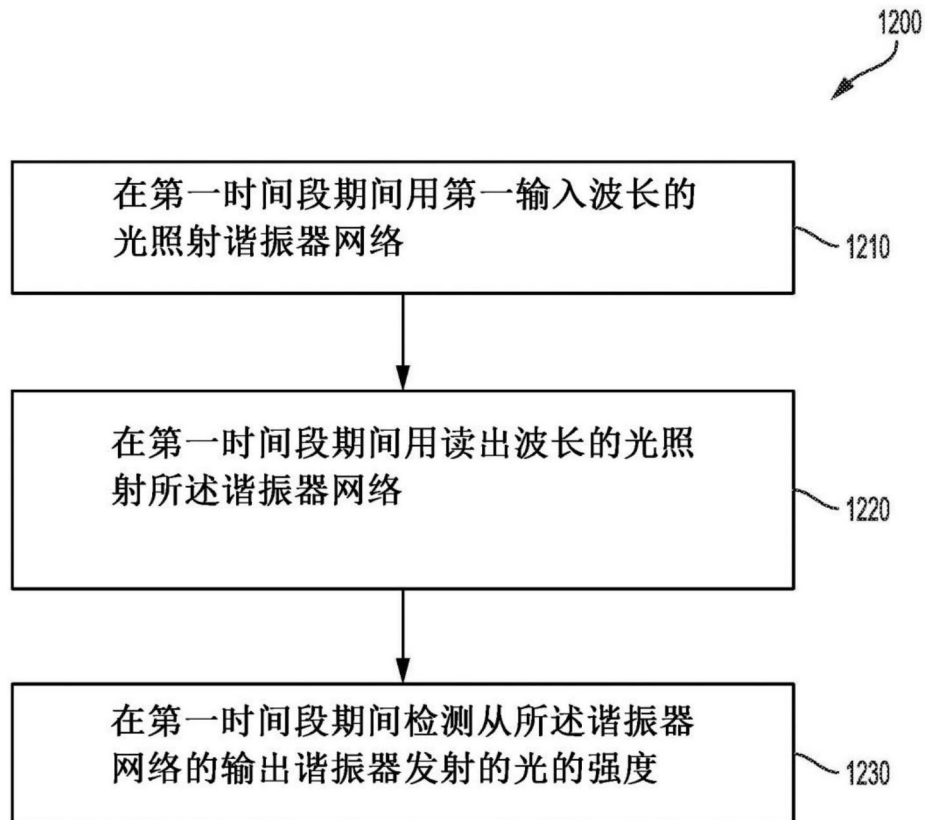


图12

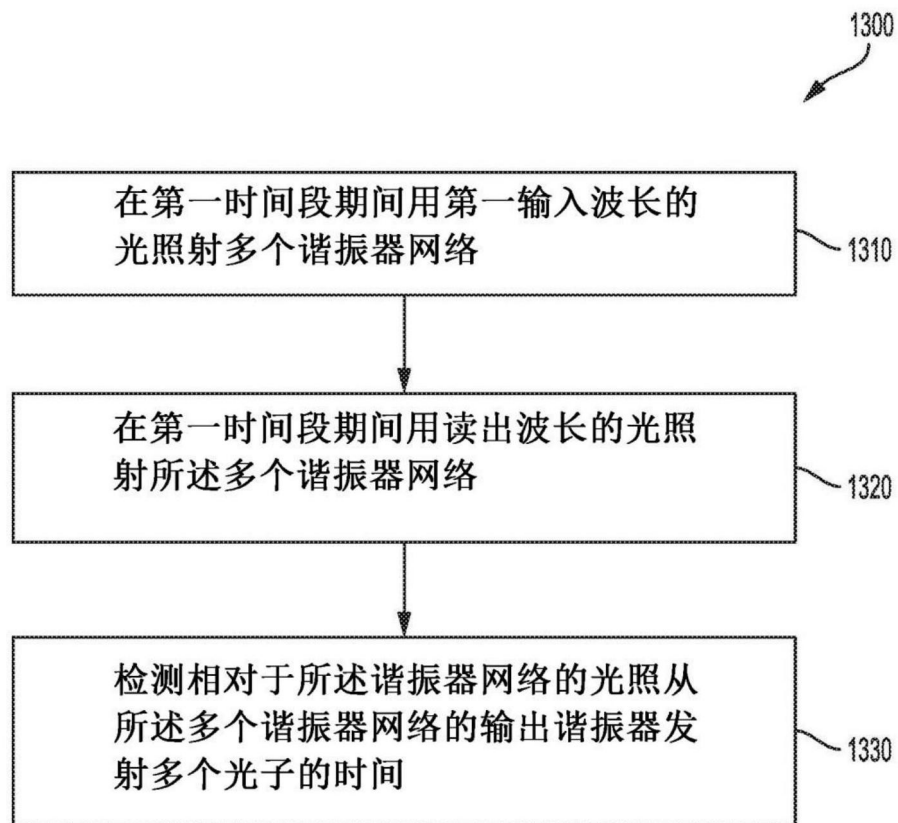


图13