



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101914620 B

(45) 授权公告日 2014.02.12

(21) 申请号 201010248517.4

(22) 申请日 2005.09.16

(30) 优先权数据

10/944,106 2004.09.17 US

60/649,009 2005.01.31 US

60/651,846 2005.02.09 US

(62) 分案原申请数据

200580031483.0 2005.09.16

(73) 专利权人 加利福尼亚太平洋生命科学公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 S·特纳 J·科尔拉赫

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1328604 A, 2001.12.26,

WO 2002/004680 A2, 2002.01.17,

Paez J G, et al..Genome coverage and sequence fidelity of  $\phi$ 29 polymerase-based

multiple strand displacement whole genome amplification. 《Nucleic Acids Research》.2004, 第32卷(第9期), 第e71页.  
Nelson J R, et al..TempliPhi,  $\phi$ 29 DNA Polymerase Based Rolling Circle Amplification of Templates for DNA Sequencing. 《BioTechniques》.2002, 第32卷第44-47页.

审查员 幸颖

权利要求书2页 说明书36页 附图13页

(54) 发明名称

核酸测序的方法

(57) 摘要

本发明涉及光约束,其制备方法,和使用光约束来分析分子和/或监控化学反应的方法。本发明包括的装置和方法在高通量和低成本单分子分析中特别有用。

1. 一种核酸测序的方法,包括:

使靶核酸分子进行模板引导的聚合反应,在多种类型的核苷酸或核苷酸类似物和显示链置换活性的聚合酶的存在下,产生与靶核酸分子互补的新生核酸链,其中所述模板引导的聚合反应多次处理靶核酸分子中相同的核苷酸序列,以生成所述核苷酸序列的丰余序列信息;

记录核苷酸或核苷酸类似物掺入新生核酸链中的时序;以及

测定靶序列中的核苷酸序列,所述测定包括分析所述丰余序列信息。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶核酸分子是一种环状核酸。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述靶核酸分子是一种环状 DNA。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶核酸分子包括在靶核酸分子内多次存在的核苷酸序列。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶核酸包括环状核酸的依赖于模板复制的产物。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其中利用聚合酶对所述靶核酸分子测序一次以上。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其中利用聚合酶对所述靶核酸分子测序两次以上。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述核苷酸或核苷酸类似物还包括一个标记。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述标记在核苷酸或核苷酸类似物的碱基、糖部分、 $\alpha$  磷酸或  $\beta$  磷酸处连接到所述核苷酸或核苷酸类似物上。

10. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述标记在末端磷酸处连接到核苷酸或核苷酸类似物上。

11. 如权利要求 8 所述的方法,其中所述标记在核苷酸或核苷酸类似物的末端磷酸上,包括选自一磷酸、二磷酸、三磷酸、四磷酸、五磷酸和六磷酸的磷酸部分。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中各类核苷酸或核苷酸类似物都有在所述记录步骤过程中区分彼此的标记。

13. 如权利要求 8 或 12 所述的方法,其中所述标记是荧光共振能量转移供体或受体。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶核酸分子附着到载体上。

15. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述靶核酸分子与附着到载体上的引物杂交。

16. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述聚合酶附着到载体上。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述记录是在模板引导的聚合反应发生时进行的。

18. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述记录步骤包括鉴定在所述多种类型的核苷酸或核苷酸类似物中提供的核苷酸或核苷酸类似物。

19. 如权利要求 1 所述的方法,其中模板引导的聚合反应在一个光约束中发生。

20. 如权利要求 1 所述的方法,其中模板引导的聚合反应在一个光约束阵列中发生。

21. 如权利要求 1 所述的方法,其中模板引导的聚合反应在一个零模波导中发生。

22. 如权利要求 1 所述的方法,其中靶核酸分子和聚合酶形成了在一个光约束中固定化的单个复合物。

23. 如权利要求 20 所述的方法,其中光约束阵列的填充分数大于 0.0001。

24. 如权利要求 20 所述的方法,其中光约束阵列在基板上的密度超过  $4 \times 10^4$  约束 / 平方毫米。

25. 如权利要求 20 所述的方法,其中光约束阵列在基板上的密度超过  $10^5$  约束 / 平方毫米。

26. 如权利要求 1 所述的方法,还包括对所述冗余序列信息进行统计学数据分析以测定靶序列中对应于所述相同核苷酸序列的核苷酸序列。

## 核酸测序的方法

[0001] 本申请是申请号为 200580031483.0 (名称为《分子分析的装置和方法》、国际申请日为 2005 年 9 月 16 日) 的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参照

[0003] 本申请是于 2004 年 9 月 17 日提交的未决的美国实用专利申请 10/944, 106 的部分继续申请, 此处完整引用作为参考。本申请也对分别于 2005 年 1 月 31 日和 2005 年 2 月 9 日提交的美国临时申请号 60/649, 009 和 60/651, 846 要求优先权, 这两份申请在此处引用作为参考。

[0004] 发明背景

[0005] 自从荧光相关光谱学 (FCS) 的应用以来, 照射和信号检测的约束一直公认为分子诊断学的一个重要工具。FCS 包括对含有荧光标记分子的样品体积照射, 以及检测由于分子扩散进出有效观测体积而产生的荧光信号波动。如果观测体积内仅包含少量的荧光分子, 并且背景信号较低, 将最好地分析分子荧光强度的波动。这可以通过结合使用严格限制的检测体积和低样品浓度来实现。传统 FCS 的检测体积大约为 0.5 飞升 (或  $0.5 \times 10^{-15}$  升), 并通过使用高数值光圈的显微镜物镜来紧密聚焦一个激光束而实现。在这个检测体积中, 在浓度最高约为 1 纳摩尔的溶液中可以观察到单分子 (single molecules)。对于大部分的生化反应来说, 这个浓度范围低得不可接受, 典型的反应常数应该是在微摩尔或高于微摩尔范围。在较低浓度时, 这些反应进行得不够快, 并且其表现方式与在大多数分析中可用的方式在性质上不同。为了在更高更相关的浓度下观测单分子, 一般需要将观测体积降至更小。

[0006] 最近几年来, 由于纳米制造技术的进展, 使得可以生产整合了电子、光学、化学和 / 或机械元件的纳米尺寸的装置。

[0007] 然而, 为了提供在生物学或诊断上更相关的条件下观测单分子反应的能力, 仍然非常需要更快速、更便宜、更精确的生物化学分析。同时还需要批量生产的小的一次性装置, 其通过提供适合在高浓度条件下进行单分子分析的光约束能够达到这些目的。本发明能满足这些需求并还有相关的优点。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明的一个主要方面是用于表征分子和 / 或监测化学反应的光学装置和方法的设计。本发明的装置和方法特别适用于单分子 (single-molecule) 分析。

[0010] 因此, 本发明提供了一种表面密度超过  $4 \times 10^4$  个约束每平方毫米, 甚至超过  $10^5$  个约束每平方毫米的光约束 (optical confinement) 阵列。在一个方面, 阵列中单个约束提供了小于 1 纳升 ( $\times 10^{-9}$  升)、小于 1 皮升、或小于 1 飞升甚至仄升数量级的有效观测体积。在其它一些方面, 每个单个约束提供小于 1000 仄升、100 仄升、80 仄升、或小于 50 仄升甚至小于 10 仄升的有效观测体积。

[0011] 在其它一些方面, 每个单独约束产生一个有效观测体积, 这个有效观测体积允许对浓度高于 1 纳摩尔, 或高于 100 纳摩尔, 甚至达到微摩尔数量级的单分子 (individual molecules) 进行分辨。在特定优选方案中, 每个单约束产生的有效观测体积允许分析以生

理学相关的浓度,例如,高于约 1 微摩尔或者高于 50 微摩尔甚至高于 100 微摩尔的浓度存在的单分子。这种阵列可以包含一个零模波导 (zero-mode waveguide) 或其它纳米级光学结构。这种光约束阵列还可以包含另外一个约束阵列,这另外一个阵列不产生上述的有效观测体积或者不能分辨单分子。例如,这种光约束阵列可结合或整合到微量滴定板,在多孔反应板上的每个不同孔中可以设置了一个独立的光约束阵列。这种光约束阵列可包含至少约  $2 \times 10^5$  个光约束,或至少约  $10^6$  或至少约  $10^7$  个光约束。

[0012] 在另外一个实施方案中,本发明提供了产生具有上述特征的多个光约束的方法。该方法包括以下步骤:(a) 提供基板 (substrate);和 (b) 形成表面密度超过每平方毫米  $4 \times 10^4$  个约束的光约束阵列,其中 在每个单独的约束中包含一个零模波导,该零模波导包含一个围绕芯 (core) 的包层 (cladding),其中设置所述包层用于阻止波长大于截止波长的电磁能纵向穿过零模波导的芯传播,和 (c) 用频率小于截止频率的电磁辐射照射该阵列,由此产生了多个光约束。

[0013] 在另外一个实施方案中,本发明提供了一种产生可分辨单分子的光学观测体积的方法。该方法包括提供一个零模波导,这个零模波导包括围绕芯的包层,其中设置所述包层是为了阻止频率低于截止频率的电磁能纵向穿过零模波导的芯传播,其中在用频率低于截止频率的电磁辐射照射零模波导时,零模波导就产生了可分辨单分子的有效观测体积。在某些方面,这个有效观测体积小于 1 纳升 ( $10^{-9}$  升),小于 1 皮升,或小于 1 飞升,优选为仄升的数量级。使用本发明的零模波导,一般可以获得小于 100 仄升 ( $100 \times 10^{-21}$  升),或小于 50 仄升,甚至小于 10 仄升的有效观测体积。在其它方面,该方法产生的有效观测体积允许分辨浓度高于 1 纳摩尔,通常高于 100 纳摩尔,优选为微摩尔数量级的单分子。在优选实施方案中,以高于约 5 微摩尔,高于 7.5 微摩尔,甚至高于 50 微摩尔范围的浓度存在的单分子能使用本发明的方法分辨。

[0014] 本发明还提供了一种检测多分子间相互作用的方法。该方法包括以下步骤:(a) 将多分子紧密接近地置于零模波导阵列上,其中阵列中各个波导相距一个合适的距离,该距离足以在用入射波长照射该阵列时产生多种衍射级别的可检测的衍射散射强度;(b) 以入射波长照射零模波导阵列;和 (c) 检测多种衍射级别的入射波长衍射散射强度的变化,从而检测多分子间的相互作用。

[0015] 本发明还提供了一种在用入射波长照射光约束阵列时减少衍射散射的方法,其中此阵列至少包括一个第一光约束和一个第二光约束,所述方法包括:形成光约束阵列,其中光约束与第二光约束相距一段距离,使得在入射波长照射下,在给定角度下由第一光约束产生的衍射散射强度要小于在没有该光约束的情况下用相同入射波长照射第一光约束产生的强度。在优选方案中,上述光约束是零模波导。

[0016] 本发明还包括一种使用光约束阵列检测生物分析物的方法,该光约束阵列在基板上的密度超过每平方毫米  $4 \times 10^4$  个约束或本文提到的任何其它密度或其等同密度。该方法一般包括用一入射光束照射阵列中至少一个怀疑包含分析物的光约束。本发明还提供了一种使用光约束阵列来进行多个化学反应的方法,该光约束阵列在基板上的密度超过每平方毫米  $4 \times 10^4$  个约束或本文提到的任何其它密度或其等同密度。该方法包括以下几个步骤,将含有标记的反应物的多个反应样品放入阵列中的光约束内,其中不同的反应样品放入阵列中的一个不同的约束内;将阵列置于适合化学反应形成产物的条件下;并用上述光学系

统检测产物的形成。

[0017] 此外,本发明还提供了一种对多种靶核酸分子进行测序的方法。该方法一般包括以下步骤:(a) 提供一种在基板上的密度超过每平方毫米  $4 \times 10^4$  个约束或本文提到的任何其它密度或其等同密度的光约束阵列,其中所述光约束提供能观测单分子的有效观测体积;和与该光约束可操作连接的光学系统,其检测来自所述约束的有效观测体积的信号;(b) 在光约束中混合多种靶核酸分子、互补于靶核酸分子的引物、聚合酶和一种以上类型的将要掺入新生核苷酸链中的核苷酸或核苷酸类似物,每条链与各自的靶核酸分子互补;(c) 使步骤(b)中的混合物在适宜通过模板引导的核苷酸或核苷酸类似物聚合形成新生核苷酸链的条件下进行聚合反应;(d) 用入射光束照射该光约束;和(e) 鉴定掺入每个新生核苷酸链中的核苷酸或核苷酸类似物。

[0018] 本发明还提供了一种装置,其包括在填充分数(fill fraction)大于约0.0001的固体载体(support)上的波导阵列,其中所述波导适合容纳生物试剂,并且其中所述波导提供可观测所述生物试剂中存在的单分子的有效观测体积;和一个光学系统,其检测所述波导中的所述单分子,如通过检测来自有效观测体积的信号。在一个方面,该阵列的填充分数大于约0.001。在另一方面,该阵列的填充分数大于约0.01,在有些情况下大于0.1,或处于约0.001到约0.1的范围内。

[0019] 本发明也提供了多种使用这样的高填充分数阵列的方法。在一个实施方案中,本发明提供了一种检测生物分析物的方法。该方法包括任选地捕获光约束中的分析物,该光约束是如下产生的:(a) 提供填充分数高于约0.0001的波导阵列;和(b) 使用入射光束照射阵列中的至少一个怀疑包含分析物的波导,从而检测分析物。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种使用所述高填充分数阵列进行涉及多种反应样品的多个化学反应的方法。该方法包括(a) 提供一个所述的高填充分数阵列;(b) 将含有标记反应物的多种反应样品置于阵列中的波导内,其中一个独立的反应样品置于阵列中一个不同的波导内;(c) 将该阵列置于适合化学反应形成产物的条件下;和(d) 利用光学系统检测产物的形成。该检测步骤包括用入射光束照射不同的波导和检测从反应样品中发出的光信号。适用的化学反应包括蛋白质-蛋白质相互作用、核酸-蛋白质相互作用和核酸-核酸相互作用。特别地,本发明提供了一种使用大于约0.0001的填充分数对多个靶核酸分子进行测序的方法。

[0021] 本发明进一步提供了使用具有高填充分数的阵列对核酸进行测序的方法。该方法一般包括:(a) 提供一个填充分数大于约0.0001或0.001或0.01或甚至0.1的波导阵列;(b) 在波导中混合多个靶核酸分子、互补于靶核酸分子的引物、聚合酶和一种以上类型的将要掺入到多个新生核苷酸链中的核苷酸或核苷酸类似物,每个链与各自的靶核酸分子互补;(c) 使步骤(b)中的混合物在适合通过模板引导的核苷酸或核苷酸类似物聚合形成新生核苷酸链的条件下发生聚合反应;(d) 使用入射光束照射波导;和(e) 鉴定掺入每个新生核苷酸链中的核苷酸或核苷酸类似物。

[0022] 本发明也包括一种丰余测序方法。该方法包括:(a) 使靶核酸分子在多种类型的核苷酸或核苷酸类似物和显示出链置换活性的聚合酶的存在下发生模板引导的聚合反应,产生与靶核酸分子互补的新生核酸链;以及(b) 记录核苷酸或核苷酸类似物掺入到新生核苷酸链中的时序。在该实施方案的一个方面,靶核酸分子是一种环形核酸,或者是由环形

核酸序列合成的线形或环形模板链,从而使合成的链包括原环形链的多个重复拷贝,然后进行本发明的测序操作。在该实施方案的另一方面,用聚合酶对靶核酸分子多次测序,例如一次以上,或者两次以上。在该实施方案的又另一方面,该聚合酶是 DNA 聚合酶,例如修饰的或未修饰的  $\Phi 29$  聚合酶。

[0023] 本发明还包括一种具有表面的固体载体,其中所述表面上附着有聚合酶阵列,其中阵列中的成员包括具有链置换活性的能单独光学分辨的聚合酶。

[0024] 本发明还包括一种零模波导,它包括固定在其中的第一分子复合物,所述分子复合物包括与靶核酸复合的聚合酶,其中所述聚合酶通过模板依赖的靶核苷酸复制多次处理靶核酸中的核苷酸序列。

[0025] 本发明进一步提供了一种制作显示最小的入射波长衍射散射强度的光约束阵列的方法。该方法包括提供一个基板;在该基板上形成光约束阵列,使该阵列中的每个单独的光约束彼此相距的距离小于波长的一半。

[0026] 最后,本发明还包括一种制作光约束的方法,该光约束包括围绕芯的包层,所述方法包括:(a) 提供涂覆有光致抗蚀剂层的基板;(b) 使所述光致抗蚀剂层形成图案,以限定所述芯的边界;(c) 去除围绕所述限定的边界的所述光致抗蚀剂层,使得还有足够量的光致抗蚀剂占据所述芯;(d) 将一层包层材料沉积到所述保留的光致抗蚀剂和所述基板上;(e) 去除至少一部分沉积在所述保留的光致抗蚀剂上的所述包层材料;和 (f) 去除 (e) 步骤的所述光致抗蚀剂,从而形成所述光约束的由所述包层围绕的所述芯。在一个方面,所述光致抗蚀剂为负性图案 (negative),并且所述图案形成步骤使用正性图案。在另一方面,所述光致抗蚀剂为正性图案 (positive pattern),并且所述图案形成步骤使用负性图案。所述去除步骤可以采用选自蚀刻、机械抛光、离子研磨和溶剂溶解的技术来实现。包层材料层可以使用热蒸发法或蒸汽沉积法来沉积。

[0027] 附图简述

[0028] 图 1 显示的是一种示例性光约束阵列的顶视图,其中零模波导排列成正方形格式。

[0029] 图 2 显示的是一种示例性光约束阵列的顶视图,其中零模波导排列为非正方形格式。

[0030] 图 3 显示的是一种示例性二维阵列的顶视图,有一个示例性的角和两个不同的单位向量长度。

[0031] 图 4 显示的是一种示例性 ZMW 规则排列的顶视图。

[0032] 图 5 显示的是多个阵列组成的阵列,其中子阵列 71 是超级阵列 72 的一部分。

[0033] 图 6 显示的是负性制造的工艺。

[0034] 图 7 显示与光学系统光学连接的 ZMW 阵列。

[0035] 图 8 显示通过正性抗蚀剂 (左边) 或负性抗蚀剂 (右边) 制作的 ZMW 结构的扫描电子显微照片。这种多晶膜的颗粒结构在图像上可见为斑点,ZMW 为暗的圆形结构。

[0036] 图 9 显示使用人工预形成的复制叉,ZMW 中的单分子 DNA 序列模式识别。

[0037] 图 10 显示的是与基板 105 结合的涂覆的 ZMW 101。ZMW 包括侧壁 102、上表面上的包膜 103 和金属膜 104。

[0038] 图 11 显示的是一个校准 (alignment) 策略和光学设置。

[0039] 图 12 显示一个在基板 93 上由多孔膜 91 构成的备选光约束, 92 表示膜上的小孔。

[0040] 图 13A 和 13B 显示的是一个校准检测系统及相关的部件。

[0041] 图 14 显示的是几个示例性的光致切割阻断剂和用于切割阻断基团的合适的波长。

[0042] 图 15 显示的是一种示例性的可逆延伸终止子, 其中光致切割阻断剂与可检测标记 (如荧光标记) 结合。

[0043] 图 16 显示的是使用该光约束得到的荧光爆发谱, 其对应于在单分子测序反应中掺入两种类型的标记核苷酸或核苷酸类似物的时序。

[0044] 发明详述

[0045] 除非另外说明, 本发明的实施将使用集成电路 (IC) 加工、生物化学、化学、分子生物学、基因组学和重组 DNA 的常规技术, 这些技术是本领域的技能。参见, 如, Stanley Wolf 等, SILICON PROCESSING FOR THE VLSI ERA, Vols 1-4 (Lattice Press); Michael Quirk 等, SEMICONDUCTOR MANUFACTURING TECHNOLOGY; Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第二版 (1989); METHODS IN ENZYMOLOGY 系列 (Academic Press, Inc.); PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), 以上所有在此引用作为参考。

[0046] 定义:

[0047] 在说明书和权利要求中使用的单数形式“一种”和“一个”包括复数形式, 除非上下文中有明确的说明。

[0048] “发光 (Luminescence)”指的是除自身温度上升以外其它任何原因导致物质发出光。一般来说, 原子或分子当它们从激发态转移到较低能态 (一般是基态) 时发出电磁能的光子 (如: 光); 这个过程一般称为“衰变”。存在多种激发原因, 如果激发原因是光子, 这个发光过程就被称为“光致发光”。如果这个激发原因是电子, 这个发光过程就被称为“电致发光”。更具体而言, 电致发光是由于直接注入和失去电子而形成电子空穴对, 随后电子空穴对重组发出光子而引起的。由于化学反应而引起的发光一般被称为“化学发光”。由活生物体产生的发光一般被称为“生物发光”。如果光致发光是由于自旋容许跃迁造成的 (如单态 (singlet) - 单态跃迁, 三重态 (triplet) - 三重态跃迁), 这种光致发光过程一般被称为“荧光”。典型地, 荧光发射在激发原因消失后就不再持续了, 这是由于通过这种自旋容许跃迁可能快速衰减的短暂的激发态而造成的。如果光致发光是由于自旋禁戒跃迁 (如三重态 - 单态跃迁), 这种光致发光过程一般被称为“磷光”。典型地, 磷光发射在激发原因消失后仍然持续很长时间, 这是由于仅通过自旋禁戒跃迁才会衰减的长久激发态而造成的。“发光标记物”或“发光信号”可能具有上述任一种特性。

[0049] 术语“电磁辐射”指的是带有能量的电磁波, 包括, 例如, 按照频率升序排列 (或按照波长降序排列), 红外辐射、可见光、紫外 (UV) 光、X-射线和  $\gamma$  射线。

[0050] 在文中使用的“有效观测体积”一般指的是通过用于特定用途的检测手段可以观测的体积。例如, 关于基于荧光的检测, 所述体积暴露于激发辐射, 和 / 或其发射的辐射被相邻的光学系统 / 检测器采集。例如, 关于用于某些用途的零模波导, 激发辐射传播到波导芯内确定了有效观测体积, 特别是, 所述体积暴露的光强至少为进入波导芯的原激发辐射强度的 1%, 优选至少 10%。这样的强度和体积可根据所述应用的特定条件容易地计算,



包括激发辐射的波长和波导芯的尺寸（见，例如：美国专利 No. 6, 917, 726, 此处引用作为参考）。

[0051] “引物”是一种短的多核苷酸，一般具有游离的 3' -OH 基，它通过与靶核酸杂交结合到靶样品中可能存在的靶核酸（或模板）上，随后促进与靶标互补的多核苷酸的聚合。

[0052] 术语“可操作地连接于”或“可操作地偶联于”这两个词在这里可以交互使用。它们指的是一种并置关系，其中所述组件的关系使得它们能够以预期的方式执行功能。

[0053] 术语“核苷酸”通常指的是包含碱基、糖和一个或更多的阴离子基团，优选磷酸基团的分子。该分子可以包括一个、两个、三个、四个、五个或更多的磷酸基团和 / 或其它基团如硫酸基团。该术语还包括核苷酸类似物，核苷酸类似物在结构上和天然核苷酸类似，并且能够基本像核苷酸一样起作用，例如显示出与 DNA 或 RNA 中存在的一个或多个碱基的碱基互补性，和 / 或能够在聚合酶的作用下碱基互补地掺入到正在合成的核苷酸链中。

[0054] “核苷酸类型”指的是拥有将要检测的共同特性的一组核苷酸。例如，核苷酸类型可以分为四类：DNA 为 A、T、C 和 G，或者 RNA 为 A、U、C 和 G，在一些实施方案中，反应中使用的每一类核苷酸用一个独特的标记物标记以和其它的区分开来。

[0055] 术语“多核苷酸”指的是任意长度的“核苷酸”的聚合形式。

[0056] 术语“光约束”指的是用于预期反应的反应物被限制在该约束内并通过光学手段分析的区域。

[0057] “多核苷酸探针”指的是用于通过杂交反应检测或鉴定其相应的靶多核苷酸的多核苷酸。

[0058] 术语“杂交”在用于多核苷酸时指的是多核苷酸在杂交反应中形成复合物的能力，该复合物通过核苷酸残基的碱基之间的氢键键合而稳定化。氢键键合可以通过 Watson-Crick 碱基配对、Hoogsteen 结合作用或其它任何序列特异性的方式发生。这种复合物可以包括形成双链结构的两条链，形成多链复合物的三条或更多条链，自杂交的单条链，或这些结构的任意组合。杂交反应可以构成更广泛的过程中的一步，如 PCR 反应的起始，或使用核酶对多核苷酸的酶切。

[0059] 杂交反应能在不同“严格性”的条件下进行。相关条件包括温度、离子强度、温育时间、反应混合液中是否存在诸如甲酰胺这样的其他溶质和洗涤步骤。较高严格条件是这样的条件，例如较高的温度和较低的钠离子浓度，这种条件下需要杂交成分之间具有较高的最低互补性才能形成稳定的杂交复合物。一般来说，低严格杂交反应在大约 40°C 在 10×SSC 中，或在相等离子强度的溶液 / 温度下进行。中等严格的杂交一般是在 6×SSC 中在约 50°C 下进行的，严格杂交一般是在 1x×SSC 中在大约 60°C 下进行的。

[0060] 当在两条单链多核苷酸之间以反向平行结构发生杂交时，这种反应被称为“退火”，那些多核苷酸被描述为“互补的”。如果杂交能发生在第一多核苷酸和第二多核苷酸链中的一条之间，则该双链多核苷酸与另一条多核苷酸可以是“互补的”或“同源的”。“互补性”或“同源性”（一个多核苷酸与另一个多核苷酸互补的程度）可以根据公认的碱基配对原则，根据相对链中预期相互形成氢键的碱基比例来确定。

[0061] 本发明的光约束的结构

[0062] 本发明的一方面是用于表征分子和 / 或监测化学反应的光学装置和方法的设计。本发明的光学装置允许在生理学相关条件下多路分析 (multiplexing) 大量单分子。

[0063] 在一种实施方案中,本发明提供了一种高密度光约束阵列,其表面密度超过每平方毫米  $4 \times 10^4$  个约束,优选超过  $10^5$  个,其中阵列中的单个约束提供仄升级别的有效观测体积。阵列中可包括至少约  $2 \times 10^5$ 、至少约  $10^6$ 、或至少约  $10^7$  个光约束。优选地,阵列中单个约束提供小于约 1000 仄升、更优选小于约 900 仄升、更优选小于约 80 仄升、甚至更优选小于约 10 仄升的有效观测体积。需要时,能提供小于 1 仄升的有效观测体积。在一个优选方面,单个约束产生可分辨以生理学浓度存在的单分子的有效观测体积。对大多数生化反应而言,生理学相关的浓度是在微摩尔到毫摩尔之间,因为绝大多数酶的米氏常数就处在这个范围。相应的,优选的光约束阵列具有能检测浓度高于约 1 微摩尔 ( $\mu\text{M}$ ),或更优选高于  $50 \mu\text{M}$ 、或者甚至高于  $100 \mu\text{M}$  的单分子的有效观测体积。

[0064] 为了达到在生理相关条件下进行单分子分析所需要的观测体积,阵列需包括零模波导或可替代的纳米级的光学结构。这种可替代结构包括但不限于具有反射率介质 (reflective index media) 的多孔膜,和使用与反射率相匹配的固体的约束。

[0065] 如同这里所用的,“零模波导”指的是其中大部分入射辐射都衰减了的光波导,优选超过 80%,更优选超过 90%,甚至更优选超过 99% 的入射辐射都衰减了。由于如此高水平的衰减,波导内不存在明显的电磁辐射传播模式。结果在进入该波导时入射电磁辐射的快速衰减产生了可有效地检测单分子的极小的观测体积,甚至当它们以高达微摩尔级的浓度存在时依然如此。

[0066] 本发明的零模波导一般包括一个围绕芯的包层 (即部分的或全部的),其中设置包层是为了阻止波长高于截止波长的电磁能纵向穿过零模波导的芯进行传播。这种包层一般使用能防止电磁辐射产生的电磁场显著穿透的材料制成。适合制造包层的材料包括但不限于合金、金属、半导体材料及其任意组合。合金包括具有金属性质,但是包含两种或多种成分,其中至少有一种成分是金属的任意物质。合金在各种成分 - 无论金属还是非金属的 - 的含量或量上可能不同。优选的合金与纯成分的材料相比一般改善了某些所需的特性。可以通过使用材料的混合物来改善的特性包括,耐化学性、导热性、导电性、反射性、粒度、热膨胀系数、脆性、耐高温性、传导性和 / 或降低包层的粒径。

[0067] 一般来说,适用于本发明的合金可包括其中一种成分的比例低至 0.0001% 的混合物。在其它例子中,可能需要高比例的一种以上成分的合金。ZMW 的一个实施方案是使用铝来作为 ZMW 结构的包层。作为说明合金是如何有益于 ZMW 结构的一个例子,这有益于考虑不同的铝合金是怎样影响 ZMW 的。在冶金工艺中,很多材料和铝做成合金。适合和铝形成合金的材料非限制性例子有铈、砷、铍、铋、硼、镉、钙、碳、铈、铬、钴、铜、镓、氢、铟、铁、铅、锂、镁、锰、汞、钼、镍、铌、磷、硅、钒、锌等。作为说明引入其它成分是如何有利地影响 ZMW 性能的一个例子,众所周知,在铝中加入硼能提高铝的导电性。金属膜导电性的增加能通过减少穿透深度而降低观测体积从而提高性能。优选的实施方案包括含有超过 0.0001% 掺杂剂的铝合金。更优选的实施方案包括含有超过 0.005% 掺杂剂的铝合金。再更优选的实施方案包括含有超过 0.1% 掺杂剂的铝合金。

[0068] 与之相反,有些材料预计降低 ZMW 结构的性能,在这些情况中,需要采取措施去除某些杂质。例如,在某些应用中出于装置毒性的考虑可能需要降低铅或砷的含量。该装置的一个优选的实施方案包括含砷量小于 1% 的金属膜。该装置的一个更优选的实施方案包括含砷量小于 0.1% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含砷量小于 0.001% 的金属膜。

一个更优选的实施方案包括含砷量小于 0.00001% 的金属膜。另外一个优选的实施方案包括含铅量小于 1% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含铅量小于 0.1% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含铅量小于 0.01% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含铅量小于 0.001% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含铅量小于 0.00001% 的膜。在光约束的性能非常重要的其它应用当中, 杂质往往会降低其导电性, 从而使约束变差, 这是不希望的。例如钒在冶金工艺中被认为是降低铝导电性的。一个优选的实施方案包括含钒量小于 0.1% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含钒量小于 0.01% 的金属膜。一个更优选的实施方案包括含钒量小于 0.001% 的膜。

[0069] 适合制造包层的半导体材料通常是不透明的, 包括硅、硅酸盐、氮化硅、磷化镓、砷化镓或其任意组合。

[0070] 可以在零模波导包层上涂覆材料以提高其表面特性。例如, 涂覆能加强包层材料的耐用性。此外, 如果芯内包含的反应物易与包层材料反应或附着, 特别需要涂覆。在该领域内有多种多样的适用的涂覆材料。有一些材料能共价结合到表面, 其它的则可通过非共价相互作用结合到表面上。涂覆材料的非限制性例子包括氧化铝膜, 例如二甲基氯硅烷、二甲基二氯硅烷、六甲基二硅氮烷或三甲基氯硅烷的硅烷化剂, 聚马来酰亚胺, 以及诸如氧化硅、Aquasil™ 和 Surfasil™ 的渗硅剂。一个示例的涂覆的 ZMW(101) 如图 10 所示。ZMW(101) 结合到基板 (105)。ZMW 包括侧壁 (102)、上表面上的涂覆材料 (103) 和金属膜 (104)。

[0071] 在某些实施方案中, 使用超过一种金属的异质金属组合物制造约束可能会是有益的。例如, 对于某些应用来说, 一种混合物包含一层以上, 每层具有每种不同组成, 或每层中的组成不同可能是有益的。这可以有利地影响约束的几个方面的性能, 包括但不限于光约束的性质、结构强度和装置的性能、装置的表面化学性质等。在一个实施方案中, 约束包含有两层, 其中一层是用于加强第二层和基板的粘着力。在另一个实施方案中, 包层膜的组成随着相对于约束的轴向位置而不同, 从而提供与一层均一组合物不同的光学性能。在这个实施方案的一个特别形式中, 该膜包含一种紧靠基板表面的具有较高趋肤深度值 (value of skin depth) 的组合物, 并且包含另一种远离基板表面的具有较低趋肤深度值的组合物, 使得这种约束的特性是在接近表面处形状更一致, 随着远离基板而很快逐渐减少。在另一个实施方案中, 选择包含约束包层的两种不同层的厚度, 从而在装置的基板上获得特定的光学条件, 例如, 相长干涉和相消干涉。

[0072] 只要能有效阻止电磁辐射的传播模式, 包层围绕的内腔 (即芯) 可以采用适宜的大小、形状或体积。通常芯具有小于截止波长 ( $\lambda_c$ ) 的侧向尺寸。对于直径为  $d$ 、拥有良好导体包层的圆形波导,  $\lambda_c$  大概为  $1.7\lambda d$ 。芯的横断面可以是环形、椭圆形、卵形、圆锥形、矩形、三角形、多面体或其它任何形状。各种形状可能特别适用于特定的应用。例如, 延长的横断面可用于更好地接近具有机械持续性或刚性的分子, 例如 DNA。从各种纵横比的拉长的狭缝到卵形的范围中的横断面显著提高持续性分子对于结构的检测区的可达性, 且辐射的轴向衰减没有过度的损失。尽管优选均一的横断面积, 但是需要时横断面积在波导的任意特定深度可以不同。优选的平均横断面积是  $100\text{nm}^2$  到  $10,000\text{nm}^2$ 。

[0073] 在一个优选实施方案中, 芯是非圆柱形的。在该实施方案的一个方面中, 非圆柱形芯在上表面上包括一个开口, 在完全被包层包裹的下表面上有一个基底, 其中该开口的侧向尺寸较基底窄。这种构造显著限制了反应物的扩散, 由此增加了在观测体积中的平均滞

留时间。该构造特别可用于测量化学反应的结合速率常数 (on-rate)。在另一方案中,芯包括一个侧向尺寸较基底宽的开口。该构造允许较容易地接近大分子,如果零模波导的开口端与由于光学性能原因所需的基底一样小,那么大分子在进入该构造时将产生空间或熵阻碍。例子包括长链多电解质,如 DNA 分子的可达性,其承受与进入小开口相反的熵力。

[0074] 本发明包括的零模波导具有较高的填充分数比,通常大于 0.0001,优选大于 0.001,更优选大于 0.01,再更优选大于 0.1。在此处所用的图案的“填充分数”是指该图案前景 (foreground) 所占面积与图案所占总面积 (前景和背景 (background) 之和) 之比。术语“填充分数比”和“填充分数”两者可以互换使用。对于零模波导而言,认为前景是零模波导的芯所占据的区域,背景是零模波导之间的区域 (例如,某些设计中形成包层的铝膜)。具有高填充分数比的零模波导对于进行同质分析尤其有用。可以通过将阵列中所有零模波导的总面积加起来,并且除以总有效面积,包括零模波导以及它们之间的区域,从而计算填充分数。例如,如果一个零模波导的直径为 50nm,那么该零模波导的面积是  $7,850\text{nm}^2$  的四分之一,或者说是  $1962.5\text{nm}^2$ 。如果这些零模波导位于正方形的阵列中,相距 100nm,那么每个零模波导的总有效面积是 10,000 平方纳米。因此,该阵列的填充分数为 78% 的四分之一或是 19.6%,与填充分数为 0.01% 级别的零模波导相比,这种零模波导在表面结合测定中提供高近 4 个数量级的信号强度。

[0075] 在生物测定,例如 ELISA 和其它的分子结合生物测定中,一种限制是不能同质地进行操作,或者其中可以将溶液加入混合物中但不去除任何物质的模式。这使得高度多路的测定变得复杂,因为从大量孔中加入和去除物质比仅仅添加物质显然更加复杂。至于 ELISA 试验,去除物质是必须的,因为在试验结束时仍游离在溶液中的荧光 (或其它) 标记物会干扰对反应表面结合的标记物的检测能力。为了克服这一缺点,设计了利用某些放射性同位素的窄谱放射性发射的技术,但是这些技术在人员安全和废物处理方面有其固有的困难。已经设计出了其它将测定的灵敏性限制在表面的技术,如全内反射限制 (TIR) 和共焦检测。与这些技术中的任一种相比,零模波导光子结构允许较简单的、较便宜的光学系统配置,并且在灵敏性限制于表面的方面大大优于这两种技术。

[0076] 在生物测定中填充分数很重要,因为有效探针面积局限于检测区域中零模波导底部的表面积。这种测定中能检测的信号量与有效区面积成正比,零模波导占据较大比例的有效表面将增加该种测定的信号强度。高填充分数结构通常可以用于任何表面灵敏性用途,并不局限于 ELISA 方法。

[0077] 截止波长是这样一种波长,高于它的波长在使用的照射几何图形下基本不能沿波导传播电磁能。如果给出芯的几何图形、包层材料的性质以及入射电磁辐射的波长,本领域技术人员通过解麦克斯韦方程可以容易地推导出截止波长 (参见,如, John D. Jackson, CLASSICAL ELECTRODYNAMICS (经典电动力学), 第二版, John Willey and Sons)。入射波长的选择取决于使用阵列的特定用途。在有些方案中,入射波长可以选自大约 10nm 到大约 1mm 的范围。检测荧光信号时,入射波长一般选自大约 380nm 到大约 800nm 的范围。为了产生所需的观测体积,通常采用极化 (线性,或优选圆极化) 和非极化的入射辐射来照射阵列。

[0078] 在一项单独的实施方案中,本发明提供一种称为外反射约束 (ERC) 的可替代的光约束。与传统的全内反射约束 (IRC) 不同,低指数介质是电磁辐射的载体,高指数 (且不透

明的) 介质是反射器。因此其折射率的作用与 IRC 是相反的。通常 ERC 需要一定种类的在不透明相中提供分析物(即待测分子)的方法。

[0079] IRC 依赖于入射的电磁辐射在高指数折射与低指数折射之间界面上的反射。如果光的入射角高于全内反射的临界角(本领域公知),所有入射电磁辐射都被反射,不能传播到低指数相。迅衰辐射的窄区建立在接近低指数侧的界面处。这种辐射场典型地是指数式衰减场,衰减长度的范围为大约 100nm 到大约 200nm,取决于入射角和两相的折射率。如果低指数相为含有分析物的溶液,则可以应用迅衰辐射检测溶液中的分析物,其具有高度的表面敏感性。

[0080] 在 ERC 中,电磁辐射的传播载体是透明的低指数膜,而承载分析物的介质是不透明的高指数金属膜。在该情况下,大部分辐射被反射,而与入射角无关,没有反射的光根据金属的趋肤深度快速衰减。通常会采取一些手段转移金属相中的分析物。这些手段可以利用在金属层内形成的纳米毛细管的形式。当足够小的时候,这种纳米毛细管的存在对能量在两种介质中的分配影响较小,但是可以大到足以用于传送活性分子。为了足够小,金属膜的任何缺陷都要小于照射波长。这一点可以达到,因为可见光波长与目的生物分子的典型大小之间的比例较大。可见光的波长通常在 400nm 到 750nm 之间,目的生物分子的直径通常在 1-30nm 左右。可以利用界面处辐射的衰减将辐射限制在分析物的极小区域内。在高指数基板上指数匹配(与水)的膜上的小孔可以产生侧向约束,这超过了在 TIR 中使用衍射限制的光学所可能产生的。原则上,这样可以产生 100 仄升的约束。在该方法中,使用全内反射约束形式,其中将与分析物溶液指数匹配的固体材料加到基板表面上,随后穿刺出纳米级小孔。当用于 TIR 模式时,该结构将提供比单独应用 TIR 更多的约束。

[0081] 其它可替代的约束包括指数匹配的固体。作为一个说明性的例子,这种光约束的制作开始于一个透明的高指数基板,如蓝宝石,PMMA(聚甲基丙烯酸甲酯)抗性树脂的 200nm 旋涂膜。通过暴露于电子束光刻可以使分离的斑点依照所用图案成为可溶的。显影以后,该装置在 PMMA 层有纳米级小孔,由于其与含有分析物的溶液的折射率相似,轴向约束不受 PMMA 层的影响,但是倘若侧向限制的程度是由小孔的直径决定的,则溶液在物理上被阻止接近除小孔所处区域之外的表面。

[0082] 可以通过能够在单分子水平上检测和 / 或监测反应物之间相互作用的光学系统提供光约束。该光学系统通过如下步骤完成这些功能:首先产生入射波长并将其传送到约束中所含的反应物;随后收集、分析反应物发出的光信号。通常这种系统采用光具组(optical train),将来自约束阵列的信号引导到基于阵列的检测器的不同位置上,同时检测来自多个不同约束的多个不同的光信号。特别地,光具组通常包括光栅和楔形棱镜,将来自阵列中的每个约束的光谱特征不同的信号同时引导和分离到基于阵列的检测器上的不同位置,如 CCD。通过将来自各个约束的信号分别引导到检测器上的不同位置,此外将来自每个约束的分量信号分离到不同的位置,可以同时监测多个约束,以及来自每个约束的多种信号。

[0083] 适用于本发明的光学系统至少包括两个组件,也就是一个激发源 和一个光子探测器。激发源产生并传送对光约束中的反应物进行光学激发的入射光。根据应用目的,入射光的光源可以是激光、激光二极管、发光二极管(LED)、紫外线灯泡和 / 或白光源。如果需要,可以同时使用一个以上的光源。在采用具有不同激发光谱的多种不同化合物的应用

中,尤其需要采用多个光源,可以同时检测一种以上荧光信号,追踪一个以上或一种类型的分子的相互作用。在该领域有大量不同的光子探测器。代表性的检测器包括但不限于:光阅读器、高效光子探测系统、光敏二极管(例如,雪崩光敏二极管(APD))、照相机、电荷耦合器件(CCD)、电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)、增强型电荷耦合器件(ICCD)和配备有前面任一探测器的共焦显微镜。如果需要,光约束阵列可以包括各种校准辅助装置或标记,以便于光约束和激发源、光子探测器或下面所述的光传输组件的适当空间放置。

[0084] 本发明光系统可能还包括具有多种功能的光传输组件。首先,它收集和/或引导入射波长进入含有反应物的光约束中。第二,它将光约束中反应物发出的光信号传送和/或引导到光子探测器中。第三,它可以选择和/或改变入射波长或反应物发出的波长的光学特性。该种组件的说明性例子包括衍射光栅、阵列波导光栅(AWG)、光学纤维、光开关、平面镜、透镜(包括微透镜和纳米透镜)、准直器(collimators)。其它的例子包括光学衰减器、偏振滤光片(例如,二向色滤光片)、波长滤波器(低通、通带、高通)、波片、延迟线(delay line)。在一些实施方案中,光传输组件可以是与光约束阵列光连接的平面波导。例如,平面波导可以与零模波导阵列可操作地连接,将入射波长直接引导到零模波导的各个芯,以使波能的损失降到最低。可以包括平面通道作为位于阵列基板底部的可拆单元,或可与基板结合作为阵列的一个组成部分。

[0085] 适合用于本发明的光传输组件包括将光以改变或未改变的状态从一个位置引导到另一个位置的多种光学装置。该种光传输装置的非限制性例子包括光导纤维、衍射光栅、阵列波导光栅(AWG)、光开关、平面镜(包括二向色镜)、透镜(包括微透镜和纳米透镜)、准直器、滤波器、棱镜以及其它任何利用适当的折射率和几何形状引导光线传播的装置。

[0086] 在一个优选实施方案中,本发明的光约束与光子探测器可操作地连接。例如,光约束阵列与相应的、单独的光子检测器可操作地连接。光约束与相应的探测器可以空间对齐(例如1:1对应),从而便于采集来自波导的光信号。一个特别优选的设置包括零模波导阵列,其中每个波导可以与相应的微透镜或纳米透镜可操作地连接,优选对齐以优化信号收集效率。或者,在光具组中可以使用物镜、滤波器组、分辨不同波长的信号的棱镜、和成像透镜的组合,将不同光约束中发出的光信号引导到阵列检测器,例如CCD,并且同时将每个不同约束发出的信号分离为对应于每个约束中发生的不同反应的多种组成信号单元。

[0087] 图7示出了一个示例性的光学设置,其中ZMW阵列与一个光学系统可操作地连接。该系统包括ZMW阵列膜(81)、盖玻片(82),光线可以通过盖玻片(82)传播,并且通过集成透镜组(83)聚焦,该透镜是由具有与玻璃不同于的折射率的材料制成的。具体地,84代表ZMW结构,85代表经集成透镜如包埋式微透镜聚焦到ZMW上的光线。

[0088] 图11示出了一种校准策略和光学系统。该系统包括一个光电探测器131,一个任选的用于收集光线的透镜132,具有与基板135连接的金属膜134的ZMW 133,和一个与入射光束137对准的物镜136。图13显示一种示例性的校准检测系统及其相关组件。示例性的系统13A包括一个光约束,例如具有与基板114连接的金属膜113的零模波导111。零模波导111通常含有信号发生分子112,与相关组件光学连接,这些组件包括物镜115、光束分离器/二向色棱镜117、任选的长焦透镜120(用于无限远校正系统)、光电探测器122(例如四象限光电探测器)。116代表通过系统传播的光线。118代表入射照射线。119代表射向探测器112的反射光线。图13B示出了四象限光电二极管的前视图。图中央示出了在

四象限探测器中心上未正确对准的光束。可以通过处理四个象限产生的四种电压,确定光束和光约束,如 ZMW,未正确对准的程度和方向。

[0089] 本发明阵列在基板表面可以有单行或是多行光约束,其中具有多条路径,例如通常至少两条,更加常见 10 条以上,或是更加常见 100 条以上。光约束阵列可以沿基板的 X 轴或 Y 轴水平或对角线对齐。各个光约束可以在穿过基板表面或在基板表面上以任意形式排列,例如成行或是成列排列,从而形成网格,或形成环形、椭圆形、卵形、圆锥形、矩形、三角形或是多面体形。为使相邻光约束之间的最近间距最小,优选六边形阵列。

[0090] 可以将光约束阵列结合到便于分析、具有高通量或其它优点的一种结构中,例如微量滴定板等。这种设置在此也被称为“阵列的阵列”。例如,可以将本发明阵列组合到另一个阵列中,如微量滴定板或多孔板,其中该板的每个微孔中含有一个本发明光约束阵列。通常,这种多孔板包括多个反应槽或孔,例如,48 孔、96 孔、384 孔或 1536 孔的形式。在这种情况下,这些孔通常分别排列在 18mm、9mm、4.5mm 或 2.25mm 中心上。

[0091] 图 5 示出了一种阵列的阵列的例子,其中子阵列 71 是超级阵列 72 的一部分。阵列还可以以点阵排列。例如,图 4 显示的是一个说明性的 ZMW 规则排列的顶视图。在此构造中有一个由参数  $d_1$ 、 $d_2$  和角  $\theta$  限定的点阵。除了每个阵点处有一个 ZMW 外,还有一个排列中包括多个 ZMW 的复合晶胞,这种排列由一系列角和间距限定,晶胞内的每个组分具有一个角和一个间距。具体来说,52 代表第一点阵间距,53 代表点阵角,54 代表第二点阵间距,55 代表晶胞的第一间距,56 代表晶胞的第一角。该图显示了包括两个组分的晶胞的阵列,但是晶胞可以有任意多个组分。

[0092] 如上所述,本发明阵列包括多个光约束。在一些实施案例中,阵列至少有大约  $20 \times 10^4$  个不同的光约束,优选至少约  $20 \times 10^6$  个不同的约束,更优选至少约  $20 \times 10^8$  个约束。在某些实施方案中,固体表面上点的密度至少为约  $4 \times 10^4$  个约束 / $\text{mm}^2$ ,通常至少约  $8 \times 10^4$ ,至少约  $1.2 \times 10^5$ ,或至少约  $4 \times 10^6$  个约束 / $\text{mm}^2$ ,但不超过  $4 \times 10^{12}$  个约束 / $\text{mm}^2$ ,通常不超过约  $4 \times 10^{10}$  个约束 / $\text{mm}^2$ 。阵列的总体尺寸通常是,厚度为几纳米到几毫米,宽或长为几毫米到 50 厘米。优选的阵列具有厚度大概为几百微米的总体尺寸,根据所需光约束的数量可以具有任意的宽度或长度。

[0093] 在图 1 所示的一个例子中,光约束例如零模波导阵列为正方形排列。该阵列包括代表性的零模波导 21,它与毗邻的波导相隔距离“d”(22 代表两个零模波导之间的距离)。在图 2 所示的另一个例子中,光约束例如零模波导阵列以非正方形的格式排列。该阵列包括一个单独性的零模波导 31,它与毗邻的波导的距离为“d”(32 代表两个零模波导之间的距离)。图 3 显示另一个示例性的二维阵列的俯视图。其中一个维度上相邻光约束之间的距离为“ $d_1$ ”,另一个维度上距离为“ $d_2$ ”,单位向量角为  $\theta$ 。

[0094] 可以根据使用本发明阵列的特定用途调整各个光约束之间的距离。例如,如果目标用途需要暗视野照射阵列,没有或者具有低水平的来自光约束的入射光衍射散射,那么通常相对于入射波长,使各个约束彼此靠近。

[0095] 因此,一方面,本发明提供了一种零模波导阵列,其包括至少一个第一和至少一个第二零模波导,其中第一零模波导与第二零模波导之间有一段距离,使得在用入射波长照射时,以特定角度观察到的第一零模波导的衍射强度低于在没有第二零模波导时用相同入射波长照射第一零模波导时的衍射强度。如果阵列包括以规则间隔的点阵排列的零模波

导,其中零模波导与最近的零模波导之间的距离小于入射波长的一半,则衍射散射可以减小或明显消除。在这种方案中,结构表现为零级光栅。这些光栅不能散射入射光,尽管其含有本身能非常有效地散射的大量组件。这种排列非常适用于某些照明方法,如暗视野照明,其中表面散射将导致可被物镜采集到的激发辐射,从而增加背景噪音。用于照射的波长范围为 250nm 到 8 微米,也就是说间距小于 4000nm 的零模波导阵列仍可以按此方式应用。在此方面,间距小于 2000nm 时更优选,间距小于 1000nm 更优选。如果不对称地使用照射,或是将收集锥度定在 90 度以下,一些间距大于波长一半的构造可能具有相同的优点。除了减少衍射散射的优点以外,各个约束之间的较小间距还减小了照射面积,从而降低了功率需量。

[0096] 相对于入射波长而言光约束之间距离较远的阵列也有合乎需要的特性。尽管角相关的散射增强了背景信号,不利于某些应用,但它提供了一种非常适合于表征描述光约束的尺寸和形状的方法。此外还适用于对分子相互作用进行总体的、大量的测定,尤其是涉及未标记的分子。适于此用途的阵列通常包括多个光约束,各个光约束之间的距离大于一倍入射波波长,通常为入射波波长的 1.5 倍,但通常不超过入射波波长的 150 倍。

[0097] 试剂盒:

[0098] 本发明也包括含有本发明的光约束阵列的试剂盒。本发明包括的试剂盒包括可以表征分子和 / 或在单分子水平上监测化学反应的那些。每个试剂盒通常包括使这种表征和 / 或监测程序成为可能的装置和试剂。根据试剂盒的预期用途,试剂盒的内容物和包装各不相同。如果用于 DNA 测序,试剂盒通常包括:(a) 光约束阵列,优选本发明的零模波导,其可以分辨单分子或单分子反应,例如浓度大于约 1 微摩尔的那些分子;(b) 测序试剂,通常包括聚合酶、含水缓冲液、盐、引物、核苷酸或核苷酸类似物。需要时,还可以包括一种已知序列的“控制”核酸,用于监测反应的准确性或进程。

[0099] 试剂可以以固体形式、固定化形式提供,和 / 或溶解 / 悬浮在适于贮存及以后在进行试验时置换或是添加到反应介质中的缓冲液中。通常提供适当的各种包装。试剂盒任选地可以提供在该程序中有用的其他组分。这些任选的组分包括但不限于:缓冲液、捕获剂、显影剂、标记物、反应表面、对照样品、说明书和说明信息。使用该发明试剂盒的诊断或预测程序可由临床实验室、实验性实验室、医生或个人进行。

[0100] 光约束的制备:

[0101] 本发明阵列可以用本发明提供的纳米加工技术制造,此外还可以采用在集成电路(IC)和微电子机械系统(MEMS)领域已知的技术制作。制造过程通常包括,选择阵列基板,然后用合适的 IC 加工方法和 / 或 MEMS 显微机械加工技术构建和集成光约束和其它有关元件。

[0102] 阵列基板:

[0103] 在一些实施方案中,光约束阵列位于刚性基板上。在例如涉及具有折射率介质的多孔膜的另一一些实施方案中,可以采用柔性材料。通常,刚性载体不易弯曲。本发明所用的不是刚性载体的固体材料的例子包括膜、柔性金属或塑料膜等等。这样,在使用阵列的试验条件下,特别是在高通量处理条件下,本发明阵列的刚性基板足以为位于其上或是其内部的光约束提供物理支持和结构。

[0104] 其上排布有本发明阵列图案的基板根据阵列的预期用途可以采用从简单到复杂的多种构造。因此,基板可以具有全部为片状或是板状的构造,如矩形或圆盘形构造,如在



标准微量滴定板和显微镜载玻片中所见的总体为矩形的构造是优选的。通常,刚性基板的厚度至少为约 0.01mm,也可以为 1cm 或是更厚,但通常不超过约 5cm.。刚性基板的长度和宽度根据将要在其上或内部制作的光约束阵列的大小而不同。

[0105] 很多种材料可以用来制作本发明阵列的基板。制作基板的材料优选地可以透过可见光和紫外光。合适的材料包括玻璃、半导体(例如,硅酸盐、硅、硅酸盐类、氮化硅、二氧化硅、石英、熔融石英和砷化镓)、塑料和其它有机聚材料。在优选的方案中,使用基于硅基基板如玻璃、石英和熔融石英作为下面的透明基板材料。

[0106] 本发明阵列的基板至少包括一个表面,上面安置光约束图案,该表面可以是光滑的,或是基本平面的,或是不规则的,例如具有凹陷或隆起。可以用一个或多个不同的化合物层对表面进行修饰,用理想的方式调节表面性质。目标修饰层包括:有机和无机层,例如金属、金属氧化物、聚合物、有机小分子、功能部分如抗生物素蛋白/生物素等等。选择涂覆涂层材料的方法取决于所使用的涂覆材料的种类。通常通过直接将材料涂覆在零模波导表面,随后从表面上洗去基质多余的未结合的涂覆涂料,进行涂覆。此外,还可以用传统的技术沉积涂覆涂料,如化学蒸汽淀积(CVD)、溅射、旋涂、原位合成等等。某些涂覆材料可以通过加热、辐射和/或化学反应交联到表面上。在优选的方案中,通过共价反应或通过离子或疏水/亲水相互作用将合适的涂覆材料结合到基质表面。对于硅基基板,例如,甲硅烷化学方法特别适合将涂覆材料共价连接到表面上,例如偶联基团、特异性结合部分等等。这些化学方法是本领域技术人员公知的,而且不需要过多的实验即可实施。

[0107] 制作程序:

[0108] 本发明阵列基板的制作可以根据下述方法或 IC-加工和/或 MEMS 显微机械加工的其它标准技术进行。本领域已知的标准技术包括但不限于电子束曝光技术、光刻技术、化学蒸气或物理蒸气沉积、干法或湿法蚀刻、离子注入、等离子体蚀刻、压焊和电镀术。其它制作方法在美国专利申请公布 No. 2003/0174992 中有详细记述,其内容在此引用作为参考。

[0109] 在一个优选实施方案中,本发明提供一种负性制作工艺(negative tone fabrication process),相比可能产生不同尺寸的光约束的传统正性制作工艺,该负性制作工艺可以产生尺寸更均一并且更一致的光约束。下面的表 1 中列出了这两种制作工艺的比较。

[0110] 表 1 制作零模波导的正性和负性加工步骤

[0111]

步骤	正性制作工艺	负性制作工艺
1	在加热的过氧化氢和氢氧化铵溶液中清洗熔融石英基板	同左
2	用去离子水对基板进行连续冲洗	同左
3	用氧等离子体清洗剂清洗基板	同左
4	用溅射或热蒸发技术在基板上涂覆金属膜	在基板上旋涂电子束抗蚀剂
5	将基板在金属层上旋涂电子束抗蚀剂	烘烤膜外面的浇铸溶剂
6	烘烤膜外面的浇铸溶剂	用电子束光刻技术使抗蚀剂曝光
7	用电子束光刻技术使抗蚀剂曝光	在化学浴中使抗蚀剂显影, 以显示在抗蚀剂中具有大的空隙的小柱阵列
8	在化学浴中使抗蚀剂显影, 以显示小孔	洗去显影剂, 将芯片干燥
9	洗去显影剂, 将芯片干燥	用热蒸发或溅射技术将芯片上涂覆金属膜
10	用活性离子蚀刻技术将抗蚀剂图案转移给金属膜	用 Microposit 1165 剥离剂溶解下面的负性抗蚀剂
11	用氧等离子体去除抗蚀剂	同左

[0112] 在负性工艺中, 将负性抗蚀剂涂覆到基板上。如果通过施加某些因素会使一种抗蚀剂可溶, 则该抗蚀剂是负性的, 对于光致抗蚀剂或  $e^-$  束抗蚀剂来说, 相应的因素分别是光能或是电子束能。此外, 正性抗蚀剂可以与负性图案一起使用。负性图案的特征是, 在除了光约束例如零模波导的位置以外的所有区域施加因素, 而不同于仅向光约束区域施加因素的正性图像。在每一种情况中, 在抗蚀剂显影之后, 抗蚀剂仅存在于光约束预期所处的位置。在许多情况中, 使用工具获得这些残留抗蚀剂特征的下切侧壁剖面 (undercut

sidewall profile) 是有用的。本领域有很多技术可以获得下切侧壁,例如,电子束光刻。例如,当应用负性抗蚀剂时,一种方法是将电子束抗蚀剂层连续涂覆在表面上,上层膜对电子束传递给它的能量具有较高的敏感性。因为电子束有扩散的趋势,因此上层膜与下层膜相比有较大的面积不溶,如期望的在上层下方形成一个悬垂部分。

[0113] 通过本领域中公知的显影和适当的清洗过程,例如等离子体清洗过程之后,包含光约束的金属膜可以通过几种方法之一进行涂覆,包括金属蒸发、分子束外延技术等等。如果抗蚀剂剖面如上所述下切,那么沉积在抗蚀剂仍然占据的区域中的金属将留在抗蚀剂顶部而不是留在装置表面。随后通过任一种技术将抗蚀剂层去除,包括采用或不采用超声处理或其它机械搅拌的溶剂溶解技术,活性等离子体蚀刻技术、蒸发等。当抗蚀剂被去除时残留在抗蚀剂上的金属被去除(“浮脱”),同时直接存留在基板上的抗蚀剂仍然形成光约束的壁。

[0114] 该工艺的优点是光约束的尺寸由抗蚀剂特征决定,并不是取决于活性离子蚀刻图案传递机制的精确度,该机制对于金属膜,特别是铝,是高度可变的,铝是用于这些装置的一种理想的金属。正性工艺具有抗蚀剂特征尺寸的固有的变化以及图案转移引起的变化,而负性工艺仅具有第一种可变性而没有第二种。金属薄膜技术有更少的侧向变化,因此总体精确度较好。该方法也不依赖于适当蚀刻对所述金属的有效性,因此该工艺可应用的金属比正性工艺有更广的选择。

[0115] 图 6 是制作零模波导的一种示例性负性工艺的示意图。在此工艺中,首先在基板 11 上涂覆一层负性抗蚀剂 12。任选地,可以在基板上涂覆第二抗蚀剂层 13。将抗蚀剂暴露于与正性工艺中使用的相同图案的电子束光刻工具,产生与原来观察到的相反的图案,即残留抗蚀剂小柱以及小柱之间的空隙 15 的循环阵列之一。通过在该图案上涂覆金属薄层,如铝层 17,随后溶解负性抗蚀剂柱 18,产生最终的零模波导结构。因为该工艺不依赖于铝层的厚度或金属膜的晶体结构或形态,因此产生非常一致的构造,并且在临界特征尺寸上提供更精细的控制。图 8 示出了用正性抗蚀剂(左图)或负性抗蚀剂(右图)制作的 ZMW 结构的扫描电子显微照片。多晶膜的颗粒结构在图像上可见为斑点,ZMW 为暗的圆形结构。

[0116] 一种负性工艺变型被称为纳米浇铸。除了不用双层抗蚀剂以外,纳米浇铸的制作步骤相似。该工艺首先是在基板表面沉积抗蚀剂(该例子中用的是单层抗蚀剂)。随后是电子束曝光和显影,曝光图案上的每一个点形成一个圆柱体。该工艺中,理想的是使金属沉积技术既可以将材料涂覆在抗蚀剂结构的顶面,又可以涂覆在抗蚀剂结构的侧壁。该工艺是三维的,因为三维抗蚀剂结构外表面的复制阴模(negative replica)在构成光约束壁的金属膜的内表面再现。在这种情况下,下切(undercut)抗蚀剂剖面和其各种产生方法都不是必要的,因为在负性工艺中,它们特别用来防止沉积的膜与抗蚀剂结构的侧面接触。在纳米浇铸方法中,沉积的膜准确地再现抗蚀剂的外表面,所以只在需要非圆柱状约束时使用下切图形。

[0117] 在纳米浇铸的操作中,一般要小心地把金属从纳米浇铸“母版”(抗蚀剂结构)上除去,这种抗蚀剂结构在一些实例中可能完全埋藏而无法除去。然而,这可以用许多方法补救。

[0118] 当沉积技术在沉积中具有高度的各向异性时(例如金属蒸发),侧壁在靠近抗蚀

剂结构的顶端将会非常薄,在一些实例中可能是圆柱形柱。这个弱点能够导致金属直接破裂,从而使金属从抗蚀剂结构上因而从 ZMW 位置上去除。可以利用一种溶液相或等离子体的各向同性蚀刻使膜进一步变薄直到这个弱点被分离,达到相同的效果。如果金属沉积步骤有着程度较低的各向异性(例如溅射或者电镀),则可以通过化学机械抛光或者离子研磨使抗蚀剂材料暴露。

[0119] 在除去抗蚀剂结构上的金属帽的同时或是之后,通过溶剂溶解或活性离子蚀刻除去抗蚀剂材料。如果应用适当的图案并正确选择其他参数,就能完成制造步骤。

[0120] 本发明光约束和其他装置的使用:

[0121] 本发明装置,包括光约束和联合的光学系统,为分析分子和实时监测化学反应提供了一种有效的方法。本发明装置和检测/监测方法可以应用于多个方面,包括用于诊断和研究应用的生物化学反应和生物反应分析。在特别优选的方面,本发明适用于说明关于研究应用的核酸序列,尤其是作为预防医学一部分的人类个体基因组测序,基因型-表型相关性的快速假设检验,多细胞生物发育各个阶段的体外和原位基因表达模式分析,确定个体克隆的广泛突变组和多种疾病或疾病状态。其他应用包括测定酶动力学,鉴别靶分子与靶分子的候补调切剂之间的特异性相互作用。更进一步的应用包括描述细胞受体多样性,鉴别已知的和新的病原体,为农业、环境和治疗目的的研究多样性。

[0122] 在某些实施方案中,本发明装置和方法允许进行高通量单分子分析。单分子分析为研究生物学事件提供了几个令人注目的优于传统方法的优点。首先,这种分析提供单分子的信息,而该分子的特性隐藏在那些通过普通总体测量技术记录的统计学平均信息中。另外,由于这种分析可以多路进行,它有助于高通量的完成,只需要少量试剂,利用高带宽的光学系统如现代雪崩光敏二极管进行快速数据收集。此外,由于单分子计数自动产生一定程度的抗照射性和光收集波动,因此单分子分析在测量物质量上比本体荧光或者光散射技术具有更高的准确度。这样,单分子分析大大地提高了基因分型、基因表达模式分析、DNA 测序、核苷酸多态性检测、病原体检测、蛋白质表达模式分析和药物筛选的效率和准确度。

[0123] 单分子测序

[0124] 本发明装置,包括不同形式的光约束和联合的光学系统,尤其适合多路单分子测序。因此,本发明提供了一种对多种靶核酸同时测序的方法。该方法一般包括(a)提供本发明光约束的阵列;(b)在约束中混合多种靶核酸分子、与靶核酸分子互补的引物、聚合酶和超过一种类型的将要掺入到多条与相应靶核酸分子互补的新生核苷酸链内的核苷酸或核苷酸类似物;(c)使混合物在适合通过模板引导的聚合作用形成新生核苷酸链的条件下发生聚合反应;(d)用入射光束照射波导;和(e)鉴别掺入到每条新生核苷酸链内的核苷酸或者核苷酸类似物。

[0125] 本发明测序方法可用于测定任何核酸分子的核酸,包括双链或单链的、线性的或环状的核酸(如:环状 DNA)、单链 DNA 发夹结构、DNA/RNA 杂合体、具有聚合酶识别位点的 RNA 或 RNA 发夹结构。本发明的方法适用于复杂核酸结构的测序,如 5' 或 3' 非翻译序列、串联重复片段、外显子或内含子、染色体片段、整个染色体或者基因组。

[0126] 一方面,对核酸单分子确定在聚合反应期间加入碱基的时间顺序。这个确定步骤发生时在光约束中发生模板引导的引物延长或者聚合反应。在一个优选的实施方案中,单分子测序在均相测定中进行,不需要在每个碱基添加事件后转移、分离或洗去任何反应物

或副产物（如从核苷酸上切下的荧光团）。在均相测定法的某些方面，单分子测序的进行无需在读取下一个碱基序列之前向混合物中加入反应物。在这个测定中，逐步加入核苷酸或者在每个碱基添加事件后除去副产物都不是必需的，因为光约束上大量试剂的反应物的扩散不会干扰掺入的检测。序列信息随着聚合酶不断将合适的核苷酸或者核苷酸类似物加入到新生 DNA 链中而不断地产生。关于这种单分子测序的详细论述参见如公开的美国专利申请第 2003/0044781 号，此处引用全部作为参考，M. J. Levene, J. Korlach, SW. Turner, M. Foquet, H. G. Craighead, W. W. Webb, SCIENCE 299 :682-686, 2003. 1, Zero-Mode Waveguides for Single-Molecule Analysis at High Concentrations (用于高浓度单分子分析的零模波导)。没有同步化损耗，因为个单分子被分别观测。该方法也能使直接来自生物样品的靶核酸分子得到利用，使能够进行测序之前对靶核酸的克隆、亚克隆或扩增的需要最小化。

[0127] 在一个优选的实施方案中，将聚合酶锚定在光约束内的有效观测体积内。在观测该体积的同时，利用例如用于脱保护等的，能够无中断地连续掺入生长链内的标记核苷酸类似物，进行依赖模板的互补链合成。在优选的方面，在该方法中使用如下的核苷酸类似物，其在非掺入的磷酸基或衍生物如核苷酸多聚磷酸的  $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  等上带有标记，该标记在掺入过程中从该类似物上切下。这种核苷酸类似物的优点在于能够连续掺入到生成生长核酸链中，并且在掺入过程中除去它们的标记基团，从而不增大合成过程中的信号噪音，而如果这些标记物仍然与合成链结合，则将会导致这种增大的信号噪音。另外，由于掺入事件导致观测体积内标记类似物的存在延长（与观测体积内非掺入的类似物的随机扩散相比），与掺入有关的信号是很容易识别的。在特别优选的方面，单分子核酸测序应用使用一种模板核酸，从而对特定目标序列段的串联重复序列进行多次或反复的读取/合成。特别地，本发明系统一般用多种方法提供丰余性，以校正用聚合酶在模板依赖的合成中可能产生的任何错误。例如，由于本发明方法集中在单分子上，采用丰余过程确保由聚合酶引起的错掺事件在数据分析时被校正。

[0128] 第一方面，这种丰余性通过利用多种不同的应用于特定目标序列的约束阵列来提供，如多孔板的一个孔中。除了这种丰余性之外，本发明也提供在一个约束中对特定序列段（或者它的拷贝）多次反复测序。在第一优选方面，这样的反复测序可能通过以环状模板形式提供目标序列段来完成，因此聚合酶在环形模板周围多次处理（允许说明这种模板的序列）。核苷酸片段环化方法是本领域技术人员公知的，依据本发明能够容易地应用于模板序列。

[0129] 另一方面，通过利用具有目标序列段的模板依赖的环状模板获得类似的结果。尤其是这种合成产物一般包括一条线性链、环状模板的多个拷贝，并且，提供目标序列段的反复测序。更进一步地说，丰余性是通过环化这种线性、多拷贝模板并对多拷贝多次反复测序而完成的。

[0130] 另一方面，通过连环化以单分子扩增策略产生的扩增子获得类似的结果，其中一些策略是本领域技术人员公知的。这些策略可以利用稀释达到单分子水平，或者在扩增过程中在双相乳液中从小微囊中分离出分子。连环化的链随后作为单个模板被测序，以这种方式从单分子产生丰余信息。

[0131] 在另一方面，通过利用一个长的在沿着它的多个位置处有切口和/或缺口的双链

模板获得类似的结果。这个分子然后能在沿着链的几个位点处开始单分子测序,每个位点包含一个能独立对链测序的约束。因为有几个约束作用于相同的链,结果就是相同的模板被测序若干次从而得到来自一个单分子的冗余信息。

[0132] 示例性的实验装置:

[0133] 在实施本发明的测序方法中,将包含靶核酸、与靶核酸互补的引物、聚合酶和一种以上类型的核苷酸或者核苷酸类似物的反应混合物加到光约束阵列上。优选地每个光约束只接收一个待测序的靶核酸分子。它可以通过在大量包含测序过程需要的其他反应物的溶液中稀释微量靶核酸来完成。可替代的,其开口的侧向尺寸比底部窄的非圆柱形波导可以用于限制多种靶核酸的进入。

[0134] 靶核酸或聚合酶在光约束上的固定:

[0135] 可以通过许多方法把靶核酸固定在光约束的内面。例如,通过附着(1)引物或(2)单链靶核酸或(3)双链或者部分双链靶核酸分子,可以将靶核酸固定在光约束上。此后,或是(1)靶核酸分子与附着的寡核苷酸引物杂交,(2)寡核苷酸引物与固定化的靶核酸分子杂交形成引物靶核酸分子复合物,或者(3)在双链或部分双链靶核酸上产生聚合酶识别位点(例如,通过诸如引发酶的辅助蛋白的相互作用)。引物靶核酸分子复合物上的核酸聚合酶在适合沿着靶核酸分子移动并且在聚合位点处使寡核苷酸引物延长的位置上提供。

[0136] 在优选的方面,如先前所描述的那样,聚合酶首先附着到本光约束的表面上该约束的有效观测体积内,在适合靶核酸分子复合物相对于聚合酶移动的位置处。

[0137] 本领域技术人员知道有许多方法可以使核酸和酶固定在光约束上,不论是共价的还是非共价的,通过连接部分或者将它们限定到一个固定的部分。这些方法是固相合成和微阵列领域众所周知的(Beier等,Nucleic Acids Res. 27:1970-1-977(1999))。用于将核酸或聚合酶连接到固体载体上的结合部分的非限制性例子包括链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白/生物素连接、氨基甲酸酯键、酯键、酰胺、硫脂、(N)-官能化的硫脲、官能化的顺丁烯二酰亚胺、氨基、二硫化物、酰胺、腙键等等。特异性结合靶核酸或聚合酶的抗体也可以作为结合部分。另外,利用本领域公知的方法甲硅烷基部分可以使核酸直接连接到诸如玻璃的基板上。

[0138] 我们所期望的是,聚合酶可以经过修饰包含一个或多个表位如Myc、HA(来自流感病毒血凝素)、多组氨酸和/或FLAG,它们的特异性抗体可以在商业上获得。另外,聚合酶经修饰可包含异源结构域如谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖结合蛋白(MBP)、特异性结合肽区(参见例如,美国专利5,723,584,5,874,239和5,932,433)或者免疫球蛋白的Fc部分。上述区域各自的结合剂即谷胱甘肽、麦芽糖和抗免疫球蛋白Fc部分的抗体是可以获得的,并且可以用于涂覆本发明的光约束的表面。

[0139] 采用本领域众所周知的常规化学技术可以将它们固定的聚合酶或核酸的结合部分或试剂加至载体上。一般来说,这些操作包括载体的标准化学表面修饰,载体在不同温度水平及在包含结合部分或试剂的不同介质中的温育,以及随后可能的洗涤和清洁步骤。

[0140] 反应混合物:标记的核苷酸、聚合酶和引物:

[0141] 根据单分子测序法利用的各种类型的核苷酸与可检测标记物偶联,以便于光子探测器能够检测和辨别它们在本发明光约束中的存在。优选的标记物是发光标记物,尤其是荧光标记物或生色标记物。

[0142] 在本领域中已经开发了许多种在核苷酸中作为可检测标记物使用的官能团。表 1 列举了很多这种官能团的例子。其余的例子参见美国专利第 6,399,335 号、公布的美国专利申请第 2003/0124576 号,以及名为“荧光探针和标记技术 (A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies),第十版”(2005)的手册(可从 Invitrogen, Inc.,/Molecular Probes 获得),均在此处引用作为参考。

[0143] 表 1

[0144] 可检测标记官能团示例:

- |        |         |             |
|--------|---------|-------------|
| [0145] | 4-氨基苯酚  | 6-氨基萘酚      |
| [0146] | 4-硝基苯酚  | 6-硝基萘酚      |
| [0147] | 4-甲基酚   | 6-氯萘酚       |
| [0148] | 4-甲氧基酚  | 6-溴萘酚       |
| [0149] | 4-氯苯酚   | 6-碘萘酚       |
| [0150] | 4-溴苯酚   | 4,4'-二羟基联苯基 |
| [0151] | 4-碘苯酚   | 8-羟基喹啉      |
| [0152] | 4-硝基萘酚  | 3-羟基吡啶      |
| [0153] | 4-氨基萘酚  | 7-羟基香豆素     |
| [0154] | 4-甲基萘酚  | 9-羟基异吩噻唑    |
| [0155] | 4-甲氧基萘酚 | 8-羟基茈       |
| [0156] | 4-氯萘酚   | 9-羟基葱       |
| [0157] | 4-溴萘酚   | 6-硝基-9-羟基葱  |
| [0158] | 4-碘萘酚   | 3-羟基黄酮      |
| [0159] | 6-甲基萘酚  | 荧光素         |
| [0160] | 6-甲氧基萘酚 | 3-羟基苯并黄酮    |

[0161] 利用这些或者其他本领域公知的合适的官能团,可以产生适合本测序方法的多种荧光团。它们包括但不限于 4-乙酰胺基-4'-异硫氰酸芪-2,2'-二磺酸、吖啶及其衍生物如吖啶和吖啶异硫氰酸酯、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、4-氨基-氮-[3-乙炔基/苯基]萘酰亚胺-3,5-二磺酸脂(荧光黄 VS)、N-(4-苯胺基-1-萘基)顺丁烯二酰亚胺、邻氨基苯甲酸、亮黄、香豆素及其衍生物如香豆素、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC, 香豆素 120)、7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆满 151);焰红染料(cyanosine);4',6-二脒基-2-苯基吖啶(DAPI);5',5"-二溴邻苯三酚-磺酞(溴邻苯三酚红);7-二乙氨基-3-(4'-异硫氰酸苯基)-4-甲基香豆素;二亚乙基三胺五乙酸;4,4'-二异硫氰酸二氢-芪-2,2'-二磺酸;4,4'-二异硫氰酸芪-2,2'-二磺酸;5-[二甲氨基]萘-1-磺酞氯(DNS,丹酞氯);4-(4'-二甲氨基苯偶氮基)苯甲酸(DABCYL);4-二甲氨基苯偶氮基苯基-4'-异硫氰酸酯(DABITC);曙红及其衍生物如曙红异硫氰酸酯;赤藓红及其衍生物如赤藓红 B 及赤藓红异硫氰酸酯;乙吡啶;荧光素及其衍生物如 5-羧基荧光素(FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素(DTAF)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)和 QFITC(XRITC);荧光胺;IR144;IR1446;异硫氰酸孔雀绿;4-甲基伞形酮;邻甲酚酞;硝基酪氨酸;碱性副品红;酚红;B-藻红蛋白;邻苯二醛;茈及其衍生物如茈、茈丁酸酯及琥珀酰亚氨基-1-茈丁酸酯;活性红 4(Cibacron. RTM.

亮红 3B-A) ;罗丹明及其衍生物如 6- 羧基-X- 罗丹明 (ROX)、6- 羧基罗丹明 (R6G)、丽丝胺罗丹明 B、磺酰氯罗丹明 (Rhod)、罗丹明 B、罗丹明 123、罗丹明 X 异硫氰酸酯、磺酰罗丹明 B、磺酰罗丹明 101 和磺酰罗丹明 101 的磺酰氯衍生物 ( 德克萨斯红 ) ;N, N, N', N' - 四甲基-6- 羧基罗丹明 (TAMRA) ;四甲基罗丹明 ;四甲基罗丹明异硫氰酸酯 (TRITC) ;核黄素 ;玫红酸和铽螯合衍生物。其他能应用于本发明测序方法的荧光团在美国专利第 5, 866, 366 号和 WO 01/16375 中公开,这两项在此处引用作为参考。

[0162] 标记物可以连接到磷酸主链的碱基、核糖单位或其组合上。优选的标记物是基本上不会妨碍在测序反应中连续添加核苷酸的那些。这样的标记物包括与  $\alpha$  磷酸、 $\beta$  磷酸、末端磷酸、或者在四、五或六磷酸核苷酸中的  $\delta$  或更远端磷酸、或者核苷酸的碱基单位连接的那些。

[0163] 包含标记末端磷酸 ( 如 dNTP 中的  $\gamma$  磷酸 ) 的核苷酸是特别优选的,因为在测序过程中不需要其他的方法来除去标记物。在核酸聚合过程中,核苷酸的  $\alpha$  和  $\beta$  磷酸之间发生键断裂,导致  $\beta$  和末端磷酸 ( 如 dNTP 的  $\gamma$  磷酸 ) 从聚合位点释放出来。这样,核苷酸一旦掺入,连接到末端磷酸上的标记物就从新生链上分离出来。一般而言,末端磷酸连接的核苷酸可能包含三个或者更多磷酸,一般是大约 3 到 6 个磷酸,优选大约 3 到大约 5 个磷酸。表 1 列举了许多带有标记末端磷酸的核苷酸的例子。已经开发了其他许多末端磷酸连接的核苷酸,并且在美国专利申请第 2003/0124576 号中有详述,此处引用作为参考。

[0164] 表 2

[0165] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0166] 鸟苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0167] 胞苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0168] 胸苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0169] 尿嘧啶 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0170] 3' - 叠氮基 -3' - 脱氧胸苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0171] 3' - 叠氮基 -2', 3' - 二脱氧胸苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0172] 2', 3' - 二脱氢 -2', 3' - 二脱氧胸苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基苯基 ) 三磷酸

[0173] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 氨基苯基 ) 三磷酸

[0174] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 甲基苯基 ) 三磷酸

[0175] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 甲氧基苯基 ) 三磷酸

[0176] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 氯苯基 ) 三磷酸

[0177] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 溴苯基 ) 三磷酸

[0178] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 碘苯基 ) 三磷酸

[0179] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 硝基萘基 ) 三磷酸

[0180] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 氨基萘基 ) 三磷酸

[0181] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 甲基萘基 ) 三磷酸

[0182] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 甲氧基萘基 ) 三磷酸

[0183] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 氯萘基 ) 三磷酸

[0184] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 溴萘基 ) 三磷酸

[0185] 腺苷 -5' -(  $\gamma$  -4- 碘萘基 ) 三磷酸



- [0186] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-甲基萘基)三磷酸
- [0187] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-甲氧基萘基)三磷酸
- [0188] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-氨基萘基)三磷酸
- [0189] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-硝基萘基)三磷酸
- [0190] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-氯萘基)三磷酸
- [0191] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-溴萘基)三磷酸
- [0192] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-碘萘基)三磷酸
- [0193] 腺苷-5'-( $\gamma$ -4'-羟基联苯基)三磷酸
- [0194] 腺苷-5'-( $\gamma$ -8-喹啉基)三磷酸
- [0195] 腺苷-5'-( $\gamma$ -3-吡啶基)三磷酸
- [0196] 腺苷-5'-( $\gamma$ -伞形酮)三磷酸
- [0197] 腺苷-5'-( $\gamma$ -试卤灵)三磷酸
- [0198] 腺苷-5'-( $\gamma$ -芘)三磷酸
- [0199] 腺苷-5'-( $\gamma$ -蒽)三磷酸
- [0200] 腺苷-5'-( $\gamma$ -6-硝基蒽)三磷酸
- [0201] 腺苷-5'-( $\gamma$ -黄酮基)三磷酸
- [0202] 腺苷-5'-( $\gamma$ -荧光素)三磷酸
- [0203] 腺苷-5'-( $\gamma$ -苯并黄酮)三磷酸
- [0204] 腺苷-5'-( $\gamma$ -(4-硝基苯基)- $\gamma$ -(4-氨基苯基)三磷酸
- [0205] 腺苷-5'-( $\gamma$ -(4-硝基苯基)- $\gamma$ -(4-硝基萘基)三磷酸
- [0206] 也可以使用包含修饰的磷酸主链的核苷酸。例如,修饰成分可以磷酰二胺、甲基膦酸酯、烷基磷酸三酯、甲酰缩醛(formacetal)、二硫代磷酸酯、一硫代磷酸酯、硫代磷酰胺、氨基磷酸酯或它们的类似物。
- [0207] 在一些实施方案中,用于本发明的核苷酸或核苷酸类似物是包含可逆阻断基的可逆延伸终止子。在一些实施方案中,可逆延伸终止子上的可逆阻断基与可检测标记物相连接。在其他实施方案中,阻断基和可检测标记物位于核苷酸上的不同位点。还有一些实施方案中,阻断基本身也是标记物。
- [0208] 一个用作说明的可逆延伸终止子包含3'端的标记核糖单位。在核糖单位上的每一个标记物一般充当可逆阻断基,在聚合反应时下一个核苷酸加入事件发生前必须被除去。优选的3'-核糖标记物包含暴露在适当波长的光束下能够被脱保护的光致除去的官能团。
- [0209] 在另外一个实例中,可逆阻断基位于核苷酸核糖单位的2'或4'位置处。然而在另外一些实施方案中,可逆阻断基是与核苷酸的碱基(腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、鸟嘌呤或尿嘧啶)相连接或结合的。可逆阻断基,尤其是光致切割阻断基的非限制性例子包括但不限于那些图14和图15所示的及序列号为60/649,009的未决的申请中描述的分子,该申请在此处引用作为参考。
- [0210] 用于切割光致切割阻断基的波长依赖于阻断基的选择。波长可能在大约320nm到大约800nm之间。在一些实施方案中,用于切割阻断基的波长与用来检测标记物的波长差不多相同。在另一些实施方案中,用于切割阻断基的波长与用来检测标记物的波长是不同

的。

[0211] 在一些实施方案中,使用基本上不含未标记核苷酸的标记核苷酸混合物是有利的。这种混合物及其在测序中的应用在序列号为 60/651,846 的未决的申请中有详述,该申请在此处引用作为参考。简要地说,这种混合物的制备是通过用特异性修饰未标记或错误标记的核苷酸或核苷酸类似物的试剂处理包含标记和未标记的核苷酸或核苷酸类似物的混合物,来降低它们用于杂交和测序分析中的能力。优选地,使用的试剂特异性地修饰未标记或错误标记的核苷酸类似物,使这些核苷酸类似物不能用于杂交或测序分析。例如,核苷酸可以被修饰,使其不再含有在杂交或模板引导的测序试验中 Watson Crick 碱基配对通常所需要的结构。在一些实施方案中,核苷酸或核苷酸类似物的磷酸基尤其是末端磷酸基被修饰,生成在模板引导的聚合反应过程中较低程度地掺入新生核酸链内的分子。在更优选的实施方案中,核苷酸或核苷酸类似物的末端磷酸基被修饰,生成在模板引导的聚合反应过程中不能或是基本上不能掺入新生核酸链内的分子。

[0212] 试剂可以包括一种或多种酶。本领域公知的许多种酶适合用于修饰核苷酸或核苷酸类似物,如通过切割或改变糖、碱基或磷酸基的构型来破坏特定的 Watson Crick 碱基配对。可作为示例的试剂包括但是不限于鸟嘌呤或腺嘌呤 P-核糖基转移酶、嘌呤核苷磷酸化酶、AMP 核苷酶、嘌呤的核苷脱氧核糖基转移酶、乳清酸 P-核糖基转移酶、胸苷磷酸化酶、胸苷或尿苷核苷酶、尿苷磷酸化酶、嘧啶核苷磷酸化酶、核苷脱氧核糖基转移酶。

[0213] 适用于修饰核苷酸或核苷酸类似物的末端磷酸基的酶包括多种磷酸酶。这种酶的一个例子是能够除去脱氧核苷三磷酸(dNTP)的 $\gamma$ 和 $\beta$ 磷酸的虾碱性磷酸酶(SAP)。这种酶可以将特异性未标记的 dNTP 转化成一般在模板引导的测序反应中不能被聚合酶利用的一磷酸核苷 dNMP。据显示这种磷酸酶能够选择性地修饰未被标记的核苷酸,如在末端磷酸处。因此,在末端磷酸标记和未标记的核苷酸混合物中,SAP 将优先作用于未标记的核苷酸,留下大部分的标记核苷酸用于在测序反应中掺入。

[0214] 其他可用的适合的磷酸酶包括但是不限于小牛小肠碱性磷酸酶和/或其他哺乳动物、甲壳类动物和其他动物的磷酸酶。对实施本发明有用的磷酸酶的例子在 US 20040203097、US 20040157306、US20040132155 和 US 20040110180 中可以找到。

[0215] 任何其他的天然发生或合成的磷酸酶或是通过重组 DNA 技术制备的磷酸酶,只要它们特异性地或优先地使未标记的核苷酸或类似物(与标记的核苷酸相比而言)转化成基本上不能被聚合酶利用的分子,也都是可以使用的。定向分子进化也可用于提高和扩大相关酶的活性,以产生上述期望的性质。许多种芯片(in silicon)和原位诱变技术都可用于本领域。产生这种酶的诱变和筛选实验的一个例子包括用未标记的核苷酸废除系统内聚合反应的第一项试验,和检查在标记核苷酸存在下聚合活性的保留的第二项筛选。这两种筛选可以在高度多路传送平行测定中进行。显示出某些有益特异性的酶可以保留,用一些方法突变,然后再次筛选。诸如这些的方法已经在特异性和表现上产生了相当大的改善。

[0216] 也可以使用能够选择性或优先修饰一部分未标记的核苷酸的酶。例如,肌酸激酶能够特异性切除三磷酸腺苷上的磷酸,但是不作用于其他碱基。其他的选择性或优先作用于一种或多种类型的未标记核苷酸的酶同样可以使用。

[0217] 上述核苷酸修饰酶可用于预处理核苷酸或核苷酸类似物,或用在杂交和/或测序反应混合物中,例如,同其他杂交或测序试剂一起。

[0218] 核苷酸修饰发生的反应条件随着修饰酶的选择而不同。一方面,条件可按照下列参数设定:pH值介于4.0和12.0之间,更优选pH6.0~10.0、更优选7.0~9.0、更优选小于8、更优选7~8,最优选pH7.5~8.5,优选缓冲液控制。缓冲液可以是基于Tris的,优选pH7.5至pH8.5。其他可用的缓冲液如下但不仅限于:有机缓冲液如MOPS、HEPES、TRICINE等,或者无机缓冲剂如磷酸盐或醋酸盐。可以添加缓冲液或其他试剂控制溶液的pH值从而提高酶的稳定性。期望时,可以加入还原剂例如但是不限于二硫苏糖醇(DTT)或2-巯基乙醇来限制可能不利地影响酶稳定性的酶的氧化。特定反应条件包括各种缓冲液和pH条件的选择属于本领域技术人员的技能,因此在此处不再详细说明。

[0219] 在预处理完成后,可以通过使反应温度升高到至少约65°C,优选约65°C-约80°C来对酶进行热灭活。可供选择地,可以通过采用如透过具有小于酶大小的分子量截止值的滤器(如Millipore)离心,而从反应混合物中除去酶。

[0220] 处理之后,混合物一般含有低于约30%,优选低于约20%,更优选低于约10%、更优选低于约5%、更优选低于约1%、更优选低于约0.5%或者更优选低于约0.1%,甚至更优选低于约0.01%的未标记的核苷酸或未标记的核苷酸类似物。这种富集的标记核苷酸或核苷酸类似物的混合物对在单分子测序反应中标记核苷酸的高分辨率检测特别有用。

[0221] 重要的是,前述处理的结果是一种用于核酸合成的方法,优选为了基本只利用核苷酸来说明模板序列,例如用核苷酸类似物特别是标记的类似物基本上完全取代天然核苷酸。这种在测序操作中基本只存 在核苷酸类似物尤其是标记的类似物,也被称为基本完全取代的模板依赖性合成,与以前描述的测序方法有很大不同,以前的方法是将一个核苷酸置换为其余三个天然核苷酸中的一个标记的链终止核苷酸,或者每次只用一个类似物探询聚合酶模板合成物,以确定这种类似物是否掺入。

[0222] 用于本发明测序方法的另一种类型的适宜核苷酸允许通过荧光共振能量传递(FRET)检测。在FRET中,受激发的荧光团(供体)以依赖于距离的方式把它激发态的能量传递给光吸收分子(受体)。限制能量可以传递的距离能够使人看出标记分子和紧密靠近的物质的相互作用。这种类型的核苷酸可能包含连接在碱基、核糖或优选磷酸主链(例如,连接在末端磷酸上)上的供体荧光团,和连接在碱基、核糖或磷酸主链上所述供体不会连接之处的受体荧光团。在一个优选的实施方案中,供体荧光团连接在末端磷酸上,受体荧光团连接到核苷酸的碱基或核糖单位上。一旦这种类型的核苷酸掺入新生链中,即可以检测到荧光信号,这可能由不再被猝灭的多聚磷酸的释放而引起。通过测定在聚合反应过程中掺入互补核苷酸后释放的荧光多聚磷酸的顺序,人们可以推断出靶核酸的碱基序列。这种类型的核苷酸的其他例子在美国申请20030194740中公开,此处引用作为参考。

[0223] 在另一种实施方案中,供体荧光团可以存在于核苷酸中,而受体存在于聚合酶中,或反之亦然。需要时,荧光团可由绿色荧光蛋白(GFP)或其突变体提供,该突变体具有与野生型绿色荧光蛋白不同的发射和/或吸收光谱。例如:在399nm处激发并在511nm处发射的GFP突变体H9-40(Tsien等人,Ann. Rev. Biochem. 67:509(1998))可作为荧光团供体与BODIPY、荧光素、罗丹明绿和俄勒冈绿合用。此外,四甲基罗丹明、丽丝胺™、德克萨斯红和萘荧光素可作为该GFP突变体的受体荧光团。

[0224] 其它能够进行荧光团能量转移的代表性供体和受体包括但不限于:4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸苄-2,2'-二磺酸;吡啶及其衍生物:吡啶、吡啶异硫氰酸酯;5-(2'-氨

乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS);4-氨基-N-[3-乙炔基磺酰)苯基]萘亚胺-3,5-二磺酸;N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺;邻氨基苯甲酰胺;BODIPY;亮黄;香豆素及其衍生物:香豆素、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC,香豆素120)、7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆满151);花青染料;焰红染料;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI);5',5"-二溴邻苯三酚-磺酰(溴邻苯三酚红);7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸苯基)4-甲基香豆素;二亚乙基三胺五乙酸;4,4'-二异硫氰酸二氢-芪-2,-2'-二磺酸;4,4'-二异硫氰酸芪-2-2'-二磺酸;5-[二甲基氨基]萘-1-磺酰氯(DNS,丹酰氯);4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯(DABITC);曙红及其衍生物:曙红、曙红异硫氰酸酯;赤藓红及其衍生物:赤藓红B、赤藓红异硫氰酸酯;乙吡啶;荧光素及其衍生物:5-羧基荧光素(FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基-荧光素(DTAF)、2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、荧光素、异硫氰酸荧光素、OFITC、(XRITC);荧光胺;IR144;IR1446;孔雀绿异硫氰酸酯;4-甲基伞形酮;邻甲酚酞;硝基酪氨酸;碱性副品红;酚红;B-藻红蛋白;邻苯二醛;芪及其衍生物:芪、芪丁酸酯、琥珀酰亚氨基-1-芪丁酸酯;丁酸酯量子点;活性红4(Cibacron. TM. 亮红3B-A);罗丹明及其衍生物:6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基罗丹明(R6G)、丽丝胺罗丹明B、磺酰氯罗丹明(Rhod)、罗丹明B、罗丹明123、罗丹明X异硫氰酸酯、磺酰罗丹明B、磺酰罗丹明101、磺酰罗丹明101的磺酰氯衍生物(德克萨斯红);N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA);四甲基罗丹明;四甲基罗丹明异硫氰酸酯(TRITC);核黄素;玫红酸;钽螯合衍化物;Cy 3;Cy 5;Cy 5.5;Cy 7;IRD 700;IRD 800;拉霍亚蓝(La Jolla Blue);酞菁;萘酞菁。

[0225] 在替代构型中,每一核苷酸类似物上都存在供体和受体荧光团,其中供体发出基本均一的激发光谱,但是给予受体能量,受体发出对于每一类型的类似物如A、T、G或C而言不同的发射光谱。这种构型能将单一激发源用于多种不同的发射谱,降低所用系统的能量输入需求。

[0226] 此外,咕吨染料,包括荧光素和罗丹明染料,可作为供体和受体对。这些染料中有许多在苯基部分上含有修饰的取代基,可用作同核苷酸的末端磷酸或碱基键合的位点。需要时,可以使用充当猝灭剂能够猝灭多种波长的荧光的受体。这些猝灭剂的代表性的例子包括4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮基)-苯甲酸(DABCYL)、二硝基苯(DNP)和三硝基苯(TNP)。

[0227] 适用于本发明的聚合酶可以是任何能够以合理的合成保真度催化模板引导的聚合的核酸聚合酶。聚合酶可以是DNA聚合酶或RNA聚合酶,野生型或修饰型热稳定聚合酶或热降解聚合酶。适用的热稳定聚合酶包括来自水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)、*Thermus caldophilus*、丝状栖热菌(*Thermus filiformis*)、热竖芽孢杆菌(*Bacillus caldotenax*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、嗜热芽孢杆菌(*Thermus thermophilus*)、沃氏火球菌(*Pyrococcus woesei*)、激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)、*Thermococcus litoralis*和海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的聚合酶。适用的热降解聚合酶包括大肠杆菌DNA聚合酶,大肠杆菌DNA聚合酶Klenow片段,T4DNA聚合酶,T7DNA聚合酶。

[0228] 能用于测定核苷酸序列分子序列的其它聚合酶的例子包括:大肠杆菌T7,T3,SP6RNA聚合酶和AMV,M-MLV和HIV逆转录酶。聚合酶能够结合引物单链核酸处的引物靶

核酸序列,复制起点,双链核酸中的切口或缺口,单链核酸中的二级结构,辅助蛋白生成的结合位点,或引物单链核酸。

[0229] 在一个优选的实施方案中,在添加非常规或修饰后的核苷酸例如同荧光团连接的核苷酸方面,聚合酶显示出比野生型酶更高的效率。重组 DNA 技术可用于修饰野生型酶。此类技术一般包括表达载体或表达载体库的构建,在发生表达的条件下培养被转化的宿主细胞。通过使用任一常规测序方法以及此处公开的测序方法能够选择能够添加非常规或修饰后的核苷酸的聚合酶。

[0230] 在另一优选的实施方案中,用表现出高度持续合成能力的聚合酶进行测序,该能力即通过保持稳定的核酸/酶复合物合成长核酸段的能力。加工聚合酶一般可以合成一条大约 10000 碱基对的新链。在辅助酶(例如:解旋酶/引发酶)的帮助下,一些加工聚合酶甚至可以合成超过 50,000 的碱基对。例如,与解旋酶/引发酶复合的 T7DNA 聚合酶可以合成几百个 kb 的核苷酸,同时还保持了与靶核酸的稳定的复合物(Kelman 等人,“Processivity of DNA Polymerases:Two Mechanisms,One Goal(DNA 聚合酶的持续合成能力:两种机制,同一目标)”Structure 6:121-125(1998))。

[0231] 在另一优选实施方案中,测序用能够滚环复制的聚合酶进行,即:能够复制环状 DNA 模板,包括但不限于质粒和噬菌体 DNA。优选的滚环聚合酶表现出键置换活性,而且优选具有降低的或基本上没有 5' 至 3' 外切核酸酶活性。键置换引起环状 DNA 模板的串联拷贝的合成,从而可以对同一 DNA 模板进行再测序一次以上。对同一 DNA 模板的再测序大大增加了聚合酶所产生的任何错误的检出机会,因为聚合酶不太可能重复发生同一个错误,而且在聚合酶链反应中,同一个错误肯定不会指数扩增。

[0232] 适用于本发明的滚环聚合酶的非限制性实例包括但不限于,T5DNA 聚合酶(Chatterjee 等人,Gene 97:13-19(1991)),T4DNA 聚合酶全酶(Kaboord 和 Benkovic,Curr. Biol. 5:149-157(1995)),噬菌体 M2DNA 聚合酶(Matsumoto 等人,Gene 84:247(1989)),噬菌体 PRD1 DNA 聚合酶(Jung 等人,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8287(1987)),和 Zhu 和 Ito,Biochim. Biophys. Acta. 1219:267-276(1994)),DNA 聚合酶 I Klenow 片段(Jacobsen 等人,Eur. J. Biochem. 45:623-627(1974))。

[0233] 优选的一类滚环聚合酶利用蛋白质引发作为开始复制的途径。该类别中示例性的聚合酶是经修饰和未经修饰的 DNA 聚合酶,选自或来源于噬菌体  $\Phi$ 29、PRD1、Cp-1、Cp-5、Cp-7、 $\Phi$ 15、 $\Phi$ 1、 $\Phi$ 21、 $\Phi$ 25、BS 32 L17、PZE、PZA、Nf、M2Y(或 M2)、PR4、PR5、PR722、B 103、SF5、GA-1,及短尾病毒科中的有关成员。特别的是,野生型噬菌体  $\Phi$ 29 基因组由 19,285 个碱基对的线形双链 DNA(ds-DNA)组成,其末端蛋白(TP)同每一 5' 端共价连接。为了开始复制,组蛋白样病毒蛋白质同复制起点形成核蛋白复合物,这样可能促成 DNA 两末端的双螺旋解螺旋(Serrano 等人,EMBO Journal 16(9):2519-2527(1997))。DNA 聚合酶催化第一 dAMP 向 TP 提供的羟基上的添加。此蛋白质引发的事件的发生同模板中的第二 3' 核苷酸相反,并且起始产物(TP-dAMP)滑回 DNA 中的某一位置以恢复末端核苷酸。起始后,同一 DNA 聚合酶复制 DNA 链中的一条,而同时置换另一条。 $\Phi$ 29DNA 聚合酶的高持续合成能力和链置换能力使其有可能在没有解旋酶或辅助持续性因子的情况下完成含有  $\Phi$ 29TP 的基因组(TP-DNA)的复制(综述见 Serrano 等人,EMBO Journal 16(9):2519-2527(1997))。

[0234] 5' 至 3' 外切核酸酶活性降低的修饰的  $\Phi$ 29DNA 聚合酶也已经描述(美国专利

5, 198, 543 和 5, 001, 050, 此处引入)。这些聚合酶作为 5' 至 3' 外切核酸酶用于测序是特别理想的, 如果过量存在, 可以降解正在合成的新生链。

[0235] 利用多种辅助蛋白质可以加强链置换。辅助蛋白质包括但不限于解旋酶 (Siegel 等人, *J. Biol. Chem.* 267 :13629-13635(1992))、单纯疱疹病毒蛋白质 ICP8 (Skaliter 和 Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(22) :10665-10669(1994))、单链 DNA 结合蛋白 (Rigler 和 Romano, *J. Biol. Chem.* 270 :8910-8919(1995))、腺病毒 DNA 结合蛋白 (Zijderveld 和 van der Vliet, *J. Virology* 68(2) :1158-1164(1994)) 和 BMRF1 聚合酶辅助亚基 (Tsurumi 等人, *J. Virology* 67(12) :7648-7653(1993))。

[0236] 在一优选的实施方法中, 测序反应涉及链置换聚合酶和环状靶 DNA 的单一复合物, 其固定于光约束上。混合标记的核苷酸或核苷酸类似物和引物之后, 链置换聚合酶引导新链的合成, 并记录各种类型的标记核苷酸或核苷酸类似物掺入新链的时序。需要时, 链置换聚合酶可以合成靶 DNA 的多个串联重复, 从而实现同一环状 DNA 靶标的多次重测序。优选地记录核苷酸或核苷酸类似物掺入靶 DNA 分子的至少两个串联重复, 更优选至少大约 3 个至大约 10 个或至少大约 3 个至大约 100 个串联重复, 优选不超过大约 100 万个串联重复的时序。这种多轮的或丰余的测序可在等温条件和 / 或室温下进行。

[0237] 使用本发明的方法, 可以以每秒至少一个碱基的速度进行测序, 优选至少每秒 10 个碱基, 更优选至少每秒 100 个碱基。据报道, 聚合酶在体内每秒能够聚合 1,000 个碱基, 在体外每秒能够聚合 750 个碱基 (见, 例如: Kelman 等人, “Processivity of DNA Polymerases: Two Mechanisms, One Goal (DNA 聚合酶持续合成能力: 两种机制, 同一目标)” *Structure* 6 :121-125(1998); Carter 等人, “The Role of Exonuclease and Beta Protein of Phage Lambda in Genetic Recombination. II. Substrate Specificity and the Mode of Action of Lambda Exonuclease (遗传重组中外切核酸酶和噬菌体  $\lambda$  的  $\beta$  蛋白的作用. II.  $\lambda$  核酸外切酶的底物特异性和作用方式)” *J. Biol. Chem.* 246 :2502-2512(1971); Tabor 等人, “Escherichia coli Thioredoxin Confers Processivity on the DNA Polymerase Activity of the Gene 5 Protein of Bacteriophage T7 (大肠杆菌硫氧还蛋白使噬菌体 T7 基因 5 蛋白的 DNA 聚合酶活性具有持续合成能力)” *J. Biol. Chem.* 262 :16212-16223(1987); 和 Kovall 等人, “Toroidal Structure of Lambda-Exonuclease ( $\lambda$  核酸外切酶的环型结构)” *Science* 277 :1824-1827(1997), 在此引入作为参考)。

[0238] 反应条件:

[0239] 本发明的测序过程可在利用聚合酶能够进行模板引导的聚合的任何条件下进行。一方面, 将聚合酶的底物, 即测序反应中存在的不同类型的核苷酸, 调整至生理学相关浓度。例如, 测序反应中使用的核苷酸以大约为聚合酶米氏常数的浓度存在。这一浓度一般从大约 1 微摩尔到大约 50 微摩尔或大约 100 微摩尔。

[0240] 测序过程同样可以通过使用少于 4 个的标记物来实现。使用 3 个标记物, 序列可通过核酸链测序推断, (1) 如果可以检测第 4 种碱基, 则作为其他标记物信号之间的恒定暗时间延迟 (dark time delay), 或者 (2) 明确地通过对两条核酸链测序, 因为此种情况下, 可以从每一碱基对获取正荧光信号。使用两种标记物的另外一种可能的方案是将一种碱基用一种荧光团标记, 将另外三种碱基有另外一种荧光团标记。此种情况下, 其它的三种碱基无

法给出序列,而仅仅给出在用该另外一种荧光团标识的特定碱基之间产生的大量碱基。通过在不同的测序反应中通过不同碱基循环这种标识荧光团,可由连续的测序过程推断出整个序列。充分利用这个仅使用 2 种标记物的方案,通过每一测序过程仅使用两种标记的碱基,甚至有可能获得完整的序列。

[0241] 测序过程可在等温条件下、在室温或循环变温加热条件下进行。缓冲液、pH 等的选择属于本领域技术人员的技能,因此此处不加以详述。

#### [0242] 检测

[0243] 本发明的测序法需要限制在光约束中的单(独)分子的成像。使用当某一特定类型的核苷酸掺入新链中时发出可辨别的光信号的荧光团标记聚合酶和/或核苷酸。随着核苷酸持续加到光约束内的新链中,检测可辨别信号的顺序。在一个优选实施方案中,在每一个核苷酸加入事件后无需转运、分离或洗脱任何反应物或副产物(例如:从核苷酸上切下的荧光团),即可进行这种检测。在该优选实施方案的一个方面,在读取下一个即将掺入的碱基序列核苷酸之前无需向混合物中添加反应物即可实现序列的测定。

[0244] 通过光学系统的协助进行限制在本发明的光约束内的单分子的成像。此系统一般包括至少两个单元,即激发源和光子探测器。众多有关这些单元的例子在上面已有表述。

[0245] 在一个优选的实施方案中,激发源是激光,优选偏振激光。激光的选择取决于连接到不同类型核苷酸和/或聚合酶上的荧光团。对于大多数荧光化合物而言,其所需的激发光范围为大约 300nm 至大约 700nm 之间。对于蛋白质性质的荧光团而言,如绿色荧光蛋白及其突变体,激发波长的范围可以是大约 488nm 至大约 404nm 之间。本领域技术人员通过常规实验应当知道或者能够确定激发特定荧光团的适当的激发波长(参见,例如: *The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 第十版(2005)(可从 Invitrogen, Inc./Molecular Probes 获得),此处引用作为参考)。

[0246] 选择激发源的另一个考虑是选择荧光的单光子激发还是多光子激发。多光子激发同检测配合使用,也被称为多光子显微术("MPM"),能够提供较高的灵敏度和空间分辨率。MPM 是激光扫描显微镜的一种形式,它利用局部非线性激发来激发薄光栅扫描平面内的荧光。同传统的激光扫描共聚焦显微术一样,在 MPM 中,激光被聚焦,并且穿过样品光栅扫描。影像由荧光强度测量矩阵组成,这种测量是在激光来回扫描样品时通过将检测器信号数字化而进行的。双光子激发的概率是非常小的,而且聚焦增加了在焦点处的局部强度。虽然双光子激发的荧光通常是 MPM 中的主要信号源,但三光子或更多光子激发的荧光和二次或三次谐波振荡也可用于成像。参见,例如:多光子显微术的综述,Webb 等人. *Nature Biotechnology* (2003) 21 : (11) 1251-1409。一种优选的 MPM 设置包括 MPM 激光扫描显微镜和二次谐波成像,配备工作波长为约 700nm-1000nm 的飞秒锁模(mode-lock)钛蓝宝石激光。此设置在常规成像多光子显微镜中能捕捉超过约 100 个光子/像素。

[0247] 可辨别信号的顺序也可以通过其它的光学系统进行检测,这些系统包括诸如光阅读器、高效光子探测系统、光倍增管、闸敏(gate-sensitive)FET、纳米管 FET、光敏二极管(例如:雪崩光敏二极管(APD))、照相机、电荷耦合器件(CCD)、电子倍增电荷耦合器件(EMCCD)、增强型电荷耦合器件(ICCD)和共焦显微镜等部件。

[0248] 一个优选的实施方案包括宽场 CCD 或 ICCD 及具有数字图像处理能力的增强型电视成像显微镜,以及荧光光脱色恢复技术(FPR)和荧光相关光谱学(FCS),同时具备共焦多

光子能力和连续数据采集和控制。此设置还可包括用于准弹性光散射、激光 DIC 干涉测量、相关光谱学仪器操作、光学力显微镜检查和时间相关单光子计数 (TCSPC) 的模块装置。

[0249] 这些光学系统也可包括光传输组件,如衍射栅、阵列波导光栅 (AWG)、光学纤维、光开关、平面镜、透镜(包括微透镜和纳米透镜)、准直器。其它的一些实例包括光学衰减器、偏振滤光片(例如:二向色滤光片)、波长滤波器(低通、带通或高通)、波片及延迟线。在一些实施方案中,光传输组件可以是与光约束阵列光学连通的平面波导。

[0250] 本领域中已知的上述及其它的光学组件可以以多种方式组合和装配,从而实现由测序反应所发出的可辨别信号的检测。优选的装置允许利用具有大量光约束的阵列进行平行数据收集,其中发生同时的和独立的核苷酸测序。一方面,优选的系统能够收集和来处理来自超过  $10^4$ 、超过  $2 \times 10^4$ 、或超过  $10^5$ 、或超过  $2 \times 10^5$ 、或优选超过  $10^6$ 、或优选超过  $2 \times 10^6$ 、更优选超过  $10^7$  或  $2 \times 10^7$  个光约束的信号。另一方面,优选的设置可以每秒约 1 个碱基的速度实时监测同时且独立的核酸测序,优选以每秒约 10 个碱基的速度,更优选以每秒约 100 个碱基的速度,更优选以每秒 1000 个碱基的速度。这样,与快速测序反应结合的群并行性可以提供超过 100,000 碱基/秒的总测序输出。总测序输出可扩大至至少 1 兆碱基/秒,优选 10 兆碱基/秒或更高。进一步通过从多种不同序列片段中获取数据,例如从 2 个或 2 个以上不同反应体积中获取数据,人们可以获得独立的序列,例如从基因组 DNA 的连续片段获得,使其具有可直接应用于基因组测序的高通量。

[0251] 其它的单分子应用:

[0252] 本发明的光约束和光约束阵列可应用于期望进行单分子分析的其他许多化学和生物应用中。一般来说,本发明的光约束适用于与任何试剂有关的任何单分子分析,该试剂可以附着在表面上,并且其底物可以被标记,包括酶、核酸、抗体、抗原等等。这些应用包括鉴别与诸如蛋白质、糖蛋白、核酸、类脂以及无机化学物质或其任意组合的生物分子有关的相互作用。这些相互作用可能发生在核酸分子之间,核酸和蛋白质之间,蛋白质和小分子之间。

[0253] 长时间以来人们已经认可与生物分子有关的相互作用的异常可解释大量的疾病,包括多种形式的癌症、血管疾病、神经元疾病和内分泌疾病。现已知异常的相互作用,例如信号复合物的组成型激活和过早失活的形式,导致疾病细胞的异常行为。对于癌症,两种信号转导分子,如生长因子受体及其相应的配体之间异常的相互作用可能导致细胞过程的功能障碍,将最终导致生长失调、缺乏锚定抑制作用、基因组不稳定性和/或细胞转移倾向。

[0254] 生物学分子或化学分子之间特定的相互作用一般涉及一个正在研究的靶分子和能够与该靶分子特异性相互作用的探针。在实施本发明的方法时,将靶分子和探针置于光约束中。靶分子-探针复合物可以是蛋白质-蛋白质复合物、糖蛋白-蛋白质复合物(例如:受体和配体复合物)、蛋白质-核酸复合物(例如:转录因子和核酸复合物)、蛋白质-脂质复合物以及有机或无机小分子的复合物。

[0255] 优选地,每个光约束仅含有一个研究中的靶分子。这可以如下实现:通过在大量溶液中稀释少量的靶分子,使得在约束阵列上的沉积导致初级分布,或者大多数约束将排列有单个靶分子。或者,可以使用非圆柱形波导,其中波导芯的开口其横向尺寸要比底部窄,来限制多个标记蛋白的进入,同时允许大量较小的探针进入。

[0256] 利用任何适用于使上述聚合酶固定和沉积的方法可以将靶标或探针固定在光约



束的内面上。这些方法包括使用通过多种结合部分实现的共价和非共价连接。结合部分的选择取决于靶标和 / 或探针的性质。例如：结合部分可通过合成与蛋白质靶标或探针相连接，或者通过重组方法制备为融合基序或标签。固定靶蛋白或蛋白质探针的一种优选方法包括使用链霉抗生物素蛋白或抗生物素蛋白 / 生物素结合对，以及上面提到的其它任何结合部分或结合因子。

[0257] 反应条件取决于研究中的特定相互作用。可以改变反应温度、反应持续时间、缓冲液强度和靶标浓度或探针浓度。例如，为了测定探针同靶蛋白的结合亲和力，可以改变探针浓度。为了确定靶标 - 探针复合物的热稳定性，可以改变反应温度。还可以通过改变 pH 或缓冲盐浓度决定靶标 - 探针复合物的稳定性。希望时，可以在生理学相关温度和缓冲液条件下研究相互作用。生理学相关温度的范围从大约室温到大约 37℃。一种生理学缓冲液含有生理浓度的盐，为中性 pH，范围为约 6.5 至约 7.8，优选约 7.0 至约 7.5。为了鉴别特定靶标和探针之间的特定体外相互作用而调整反应条件是本领域技术人员的技能，在此不再详述。

[0258] 靶标和 / 或探针一般用可检测的标记物进行标记，使光子探测器可以探测到指示相互作用的信号。合适的标记物包括在“单分子测序”部分提到的所有那些标记物。优选的标记物是发光标记物，特别是荧光或发色标记物。

[0259] 在一个实施方案中，用荧光团标记靶标，在荧光团同相应的结合有适当猝灭剂的探针发生相互作用时，荧光团的信号会猝灭。上述部分描述了多种合适的荧光团 - 猝灭剂对，因此不再详述。这一实施方案的一种变化是用供体和受体荧光团标记靶标和探针（或反之亦然），当两个分子彼此结合时发出可辨别的信号。范围较宽的适用的供体和受体荧光团在上面已有描述。本领域技术人员应当知道多种多样的可检测标记物以及他们的组合，用来产生指示生物学分子和 / 或化合物之间的特定相互作用的可辨别信号。

[0260] 在本文所述光学系统的帮助下完成对指示特定相互作用的可辨别信号的检测。任何适用于单分子测序的系统同样适用于检测其它生物学分子和 / 或化合物之间的相互作用。一个优选的系统允许利用具有大量光约束的阵列实现平行数据收集，在此系统中，可以发生同时且独立的靶标 - 探针相互作用。一方面，优选的系统可以从超过  $10^4$  个光约束、超过  $2 \times 10^4$  个光约束、超过  $10^5$  个光约束、超过  $2 \times 10^5$  个光约束、优选超过  $10^6$ 、或者优选超过  $2 \times 10^6$  个光约束、甚至更优选超过  $10^7$  或  $2 \times 10^7$  个光约束中收集和处理的信号。

[0261] 上面提到的方法在检测特定蛋白质 - 蛋白质相互作用中的应用是特别有意义的。这一应用一般利用置于光约束中的蛋白质探针和靶蛋白。在该实施方案的一方面，特定蛋白质 - 蛋白质相互作用发生在细胞表面受体和它相应的配体之间。细胞表面受体是锚定在或插入到细胞质膜中的分子。他们组成了蛋白质、糖蛋白、多糖和脂质的一个大家族，他们不但是作为质膜的结构组成成分，还是控制多种生物学功能的调控元件。另一方面，特定蛋白质 - 蛋白质相互作用涉及细胞表面受体和免疫脂质体或免疫毒素。又另一方面，特定蛋白质 - 蛋白质相互作用能够涉及胞质蛋白质、核蛋白质，伴侣蛋白质或锚定在其它细胞内膜结构上的蛋白质。又另一方面，特定蛋白质 - 蛋白质相互作用发生在靶蛋白质（例如：抗原）和该抗原的特异性抗体之间。

[0262] 抗原和抗体之间的特异性相互作用已在免疫测定法中利用。本领域中有多种免疫测定法，但没有一种可以进行单分子检测。例如，常规放射免疫测定法检测免疫印迹上一组

抗原和一组放射性标记的抗体之间的相互作用。另一种常规免疫测定法被称为 ELISA (酶联免疫吸附测定法), 它利用抗原-特异性抗体以及与该特异性抗体结合的酶联属抗体。在加入连接的酶的底物后, 显示抗原和抗体之间的特异性相互作用。对免疫印迹再进行这种测定, 为所有接受检测的相互作用提供一个总体的测量。

[0263] 本发明的光约束为进行单分子免疫测定法提供了有效的工具。与常规免疫测定法不同, 可以在单分子水平上分析抗原和抗体之间的特异性相互作用。尽管本发明中包括的所有光约束都适用于进行单分子免疫测定, 但是一个特别理想的系统包括具有较高填充分数比的光约束阵列。例如, 一个优选系统包括填充分数大于 0.0001, 更优选大于约 0.001, 更优选大于约 0.01, 再更优选大于 0.1 的波导阵列。

[0264] 在实施本发明的免疫测定的过程中, 可用合适的标记物标记抗体, 该标记物选自放射性标记物、荧光标记物、化学发光标记物、酶标签, 如洋地黄毒苷、 $\beta$ -牛乳糖苷酶、脲酶、碱性磷酸酶或过氧化物酶、亲和素/生物素复合物以及在此公开的任何可检测标记物。

[0265] 本发明的免疫测定法可用于表征生物实体、筛选抗体治疗剂和确定靶抗原的结构构象。例如, 已经常规使用涉及生物实体特异性抗体或该生物实体所产生的副产物的特异性抗体的免疫测定法通过形成抗体-实体复合物鉴定该实体。免疫测定法还可用于筛选具有治疗潜能的能够激活或下调靶抗原生物活性的抗体。通过利用能够区分折叠为不同构象的靶蛋白的抗独特型抗体, 免疫测定法也可用于确定结构构象。

[0266] 前面提到的单分子分析的另外一个重要的应用是研究酶动力学, 包括确定酶的转化循环, 动态行为, 折叠和展开的中间体以及结合亲和力。所研究的酶可以固定在光约束内或者存在于在本发明的光约束内限制的溶液中。

[0267] 本发明中包括的所有光约束可用于研究酶动力学。对特定光约束的选择取决于所研究的具体特性。例如, 测量酶促反应的结合速率常数 (on-rate) 优选一种光约束, 其包含非圆柱形芯, 该芯在其上表面有一个开口, 该开口要比在光约束的底部窄。这种结构显著地限制了反应物或底物的扩散, 因此增加了在观测体积内的平均滞留时间。另一方面, 包含一个有开口的芯, 而该开口的横向尺寸比底部宽的光约束施加了进入结构的立体或熵阻碍, 因此对测定大酶或酶复合物的可达性是很有用的。

[0268] 本发明光约束在总体测量中的应用

[0269] 本发明的光约束尤其可以用于进行单分子分析, 该本发明光约束也适用于高通量的总体大量测量。因此, 本发明提供了一种检测多种分子之间相互作用的方法, 包括: 将所述的紧密靠近的多种分子加入到零模波导阵列上, 其中所述阵列中的每个波导都相隔一定的间距, 该间距足以在应用入射波长的光束照射所述阵列时产生可探测到的强度的多衍射级的衍射散射; 应用所述的入射波长照射所述的零模波导阵列; 检测所述多衍射级的所述入射波长的衍射散射的强度变化, 由此检测所述的多种分子之间的相互作用。

[0270] 用于该方法的阵列一般包括相对于入射波长而言远距离间隔的光约束。这种相对于照射辐射 (例如, 半个波长的照射辐射) 而言远距离的光约束间隔对远离镜反射角的特定角度的入射光的衍射散射产生较大影响。在该实施方案的一方面, 该阵列包括相隔一个以上入射辐射波长的各个约束, 通常是入射波长的 1.5 倍以上, 但通常不超过入射波长的 150 倍。

[0271] 具有相对于入射波长而言远距离间隔的光约束的阵列也有预期的性质。尽管依

赖于角度的散射可能提高不利于某些特定用途的本底信号,但是它提供了一种尤其适用于表征光约束的大小和形状的方法。它也能够方便地进行分子相互作用的总体大量测量,尤其涉及未标记的分子。适用于该用途的阵列一般包括相隔一个以上入射辐射波长的各个约束,通常是入射波长的 1.5 倍以上,但通常不超过入射波长的 150 倍。

[0272] 一般借助于本文所述的光学系统进行总体大量测量。适用于单分子测序的任何方案同样也适用于该分析。

[0273] 下面的实施例部分提供了关于制作本发明的光约束的进一步说明以及其在测序中的应用。这些实施例为本领域普通技术人员提供了指南,并不意味着限制。

## 实施例

[0274] 实施例 1

[0275] 下面提供了一种示例性的制作零模波导的方法。在此描述的参数旨在举例说明,而不是进行限制。

[0276] 1. 基板:基板进行两次抛光,60/40 划痕/刺孔 (scratch/dig) 的表面质量,熔融氧化硅晶片,切至直径为 100 毫米 (+/-0.2 毫米),并且厚度为 175 微米 (+/-25 微米),总厚度的偏差小于 25 微米。

[0277] 2. 清洗:5 份去离子水、1 份 30% v/v 的过氧化氢水溶液、1 份 30% v/v 的氢氧化铵水溶液的混合溶液在一个热板上加热至 75°C。利用特氟纶容器或其他抗化学腐蚀的容器,将上述晶片浸入该混合溶液中 15 分钟。

[0278] 3. 冲洗:将载有晶片的容器从 RCA 清洗浴中取出,浸入去离子水浴中。晶片放置在该第二浴中 2 分钟。将仍然载有该晶片的容器从去该浴中取出,并用去离子水喷洒直至冲洗阶段完成。

[0279] 4. 干燥:在最后冲洗步骤的 1 分钟内,仍然在该容器内,使用干燥清洁的氮气流进行干燥。

[0280] 5. 氧等离子体处理:将晶片装入 Glenn 1000p 等离子灰化机中,使用等离子体蚀刻模式(晶片放在一个动力板 (powered shelf) 上,另一个动力板下)、140m 托的压强、400 瓦特的正向功率,40 千赫的频率。等离子体保持 10 分钟。使用 18sccm 的分子氧流。

[0281] 6. 蒸气涂覆:在氧等离子体处理后的 3 分钟内,将晶片放到 Yield Engineering Systems 蒸气涂覆炉中,涂覆一层六甲基二硅氮烷 (HMDS) 粘合增进剂。

[0282] 7. 电子束抗蚀剂涂覆:在蒸气涂覆后的 15 分钟内,应用 NEB-31 电子束抗蚀剂 (Sumitomo Chemical America) 在手动旋转单元中涂覆晶片。大约有 3 毫升涂覆在晶片上,然后以 4500 转/分的速率旋转 60 秒。初始加速和减速均设定为 3 秒。

[0283] 8. 抗蚀剂烘烤:将晶片放在 115°C 的 CEE 热板上烘烤 2 分钟。该热板配有真空机构,可以使晶片和热板表面有良好的热接触。

[0284] 9. 金蒸发:然后将一层 10nm 的金热蒸发到晶片上抗蚀剂涂覆的那一面。蒸发前,压强必须达到低于  $2 \times 10^{-6}$  托。蒸发以大约 2.5 埃/秒的速率进行,并使用 Inficon 控制仪进行监控。

[0285] 10. 电子束曝光:使用诸如 Leica VB6-HR 的高分辨率电子束光刻工具将由零模波导组成的图案在晶片上曝光。零模波导形成单个 exel 特征的图案。在标称 1 纳安的电

流、可变分辨单位为 1、以及 5 纳米的 exel 设置,剂量范围可以是 10000 微库伦 / 平方厘米 -300000 微库伦 / 平方厘米。

[0286] 11. 曝光后烘烤 :将晶片放置在同样配备有真空机构的 95℃的热板上,进行 2 分钟的曝光后烘烤。

[0287] 12. 金蚀刻 : 移开电子束系统后,用金蚀刻剂 TFA(GE 8148, Transene Corporation) 在室温下保持 10 秒钟除去 10 纳米的金层。将晶片放在与步骤 2 中使用的相似的特氟纶容器中。

[0288] 13. 冲洗 :从金蚀刻剂浴中取出装有晶片的容器,将其浸入去离子水浴中。晶片在该第二浴中放置 2 分钟或更短的时间并轻轻手工搅拌。从去离子水浴中取出含有晶片的容器,并用去离子水喷洒直至彻底地完成冲洗过程。或者也可以将装有晶片的容器放入一个新的装有新鲜去离子水的容器中。

[0289] 14. 干燥 :在最后冲洗步骤的 1 分钟内,使用干燥清洁的氮气流在该容器内进行晶片干燥。

[0290] 15. 曝光后烘烤 :将晶片放置在同样配备有真空机构的 95℃的热板上,进行 2 分钟的曝光后烘烤。

[0291] 16. 显影 :在室温下,将仍然在抗化学腐蚀的容器中的晶片浸入显影液 MF-321(Shipley Chemicals, Rohm-Haas) 中,放置 30 秒。

[0292] 17. 冲洗 :从显影蚀刻剂浴中取出装有晶片的容器,并浸入去离子水浴中。晶片在该第二浴中放置 2 分钟并轻轻地搅拌。从去离子水浴取出含有晶片的容器,并用去离子水喷洒直至彻底地完成冲洗过程。

[0293] 18. 干燥 :在最后冲洗步骤的 1 分钟内,使用干燥清洁的氮气流在该容器内进行晶片干燥。

[0294] 19. 表面清除 :将晶片装入以灰化模式运行的 Glenn 1000p 等离子体灰化机中(晶片放在一个底板(grounded plate)上,动力板下),并以 140 毫托的压强、400 瓦特的正向功率在 40 千赫下进行 30 秒的氧等离子体表面清除。使用 18sccm 的分子氧流。

[0295] 20. 铝蒸发 :在表面清除后的 5 分钟内将该晶片放入金属蒸发器中。将一层 100nm 的热蒸发的铝沉积在该晶片上。蒸发在不小于  $2 \times 10^{-6}$  托的压强下以 25 埃 / 秒的速率进行,并使用 Inficon 控制器进行监控。

[0296] 21. 铝厚度测量 :应用 P-10 表面光度仪(Tencor) 测量铝的厚度。

[0297] 22. 零模波导剥离(decasting) :通过将特氟纶容器或其他抗化学 腐蚀的容器中的零模波导浸入 1165 剥离剂(Shipley Chemicals, Rohm-Haas) 浴中或 AZ-300T 剥离剂(Shipley Chemicals, Rohm-Haas) 浴中,将其从包覆的铝膜上剥离。通过将装有剥离剂和晶片的容器放入超声波仪中,对其进行超声处理。晶片在剥离浴中放置 30 分钟或更长至大约 45 分钟,并轻轻地搅拌。

[0298] 23. 冲洗 :将剥离浴从超声波仪中移开。从剥离浴中取出晶片,并浸入去离子水浴中。晶片在该第二浴中放置 2 分钟并轻轻地手动搅拌。从去该浴中取出晶片,并用去离子水喷洒直至彻底地完成冲洗过程。

[0299] 24. 干燥 :在最后冲洗的 1 分钟内,使用干燥清洁的氮气流在该容器内进行晶片干燥。

[0300] 25. 光致抗蚀剂涂覆 :以 1500 转 / 分的速度用 Shipley 1827 光致抗蚀剂旋转涂覆晶片。涂覆约 5 毫升的抗蚀剂。加速和减速设定为 5 秒。

[0301] 26. 抗蚀剂烘烤 :将晶片放在 115°C 的 CEE 热板上烘烤 15 分钟。该热板配有真空机构,可以使晶片和热板表面有良好的热接触。

[0302] 27. 切割 :使用 K & S-7100 切割机 (Kulicke & Soffa) 使用树脂 / 金刚石刀片 (ADT 00777-1030-010-QIP 600) 对晶片进行切割。晶片在切割之前要放置到低粘性胶带上。

[0303] 28. 模具去除 :用手从胶带上取下模具并储存。

[0304] 29. 抗蚀剂去除 :通过将模具首先浸入丙酮浴中 1 分钟,然后浸入 2-丙醇浴中 2 分钟并轻轻地手动搅拌,除去 1827 光致抗蚀剂层。

[0305] 30. 模具干燥 :从 2-丙醇浴中取出模具后,用干燥的清洁空气进行干燥。

[0306] 31. 等离子体清洁 :将晶片放入 Drytek 100 等离子体蚀刻机中,并在 140 毫托的压力、85sccm 氧的分子氧流和 500 瓦特正向功率的射频功率下以 13 兆赫进行 1 分钟的氧等离子体处理。或者,也可以在 2 托的压力、10.5 瓦特的功率下用 Harrick 等离子体清洁机 PDC-32G 进行 5 分钟的干燥清洁空气等离子体处理。

[0307] 实施例 2

[0308] 单个 DNA 聚合酶分子酶促合成 DNA 链的实时监测

[0309] 该实验可以利用如下详述的光学系统和反应混合物进行。但是,提到任何具体的光学系统和参数、缓冲液、试剂、浓度、pH、温度等并不是限制性的。其作为实施本发明的方法的一个示例性的实施例。

[0310] 使用荧光标记的核苷酸实时跟踪单个 DNA 聚合酶分子酶促合成 DNA 链。应用稀释的酶溶液,通过非特异性结合,将单个的 Phi29N62DDNA 聚合酶 (Amersham Biosciences, Piscataway,NJ) 固定在零模波导 (ZMWs) 中。固定化后,清洗 ZMW 结构除去未结合的酶,然后暴露于含有反应试剂的溶液。并于 DNA 模板,使用一种 70bp 的预引发的环状 DNA 序列,其以特征性的不对称间距包含两个鸟嘌呤碱基 (图 9A)。链置换聚合酶如 Phi29 DNA 聚合酶将继续环绕该环状模板并因此产生一个长的、高度重复的互补 DNA 链。

[0311] R110-dCTP (Amersham Biosciences,Piscataway,NJ) 被用作荧光标记的核苷酸类似物,其中荧光团通过一个与  $\gamma$  磷酸连接的连接体连接到核苷酸上。与更为常用的碱基标记的核苷酸类似物相反,随着连接的核苷酸掺入到不断增长的 DNA 链内, $\gamma$  磷酸连接的类似物可以通过 DNA 聚合酶的酶活性切割,然后该标记自由地扩散到 DNA 聚合酶周围的有效观察体积之外。荧光团的有效去除确保持续较低的本底水平,并防止明显干扰 DNA 聚合酶的活性。 $\gamma$  磷酸连接的荧光团的这些特征可优选用于该用途,因为他们能够用荧光团标记的类似物替换所有四种碱基。核苷酸的结合及其后续向核酸内的掺入与错配事件不同,因为这两个过程的速率常数明显不同,并且核苷酸掺入包括几个阻止零延迟事件的后续步骤。

[0312] 所有其他的核苷酸都不进行标记。我们已经建立了一个非常有效的方法去除核苷酸类似物制剂中剩余的痕量的天然 dNTP,通过在聚合试验前使用碱性磷酸酶进行酶纯化,以确保不会由于掺入未标记的 dNTP 而引入这些错误。

[0313] 为了研究这些条件下 Phi29<sup>N62D</sup> DNA 聚合酶的速率和持续合成能力,在溶液中并

且使用固定在玻璃表面的酶,在反应混合物中使用 R110-dCTP 完全替代 dCTP 测量掺入特征。结果发现该酶能够有效地利用这种类似物,合成几千个碱基对长度的互补 DNA,而在滚环合成方案中没有中断,使用两个小的预形成的复制叉(图 9A)和较大的环状 DNA 如 M13 DNA。只有两个不对称间隔的 R110-dCTP 被整合入该模板内。相似的实验表明 DNA 聚合酶可以被固定在 ZMW 底部,而不丢失其催化活性。

[0314] 通过记录单个 ZMW 中发出的荧光爆发,跟踪滚环 DNA 合成期间荧光标记的 dCTP 核苷酸的掺入。观察多个波导中的 DNA 聚合酶活性,其为持续几分钟的不同的荧光爆发。荧光时间轨迹显示特征性的双爆发模式(图 9B),每个爆发对应于一个 R110-dCTP 类似物向 DNA 链内的掺入事件和随后荧光团的切割。在由全时轨迹得到的爆发间隔直方图中,可见两个峰,它们与沿短(14 个碱基,约 1 秒)和长(54 个碱基,约 4 秒)DNA 模板片段的 DNA 合成相对应,这与这些条件下在本体溶液中测量的总平均速度一致,即每秒约 10 个碱基对。

[0315] 值得注意的是,在  $10 \mu\text{m}$  的荧光团浓度时,单分子活性较易观察到。在常规产生的激发体积内,荧光团的数量很大以至于不能观察到 DNA 聚合酶的各个酶转化。这些实验通过证实以下几点证实了基于 ZMW 的单分子 DNA 测序方法的有效性:(a) ZMW 中 DNA 聚合酶的固定化不影响其酶活性;(b) 荧光  $\gamma$  磷酸连接的核苷酸类似物不抑制 DNA 聚合酶的活性;(c) ZMW 提供了一个适当的约束来检测在试剂的生理学浓度下单分子 DNA 聚合酶的活性。一般来说,这些结果证明了 ZMW 允许进行酶动力学的单分子分析,尤其涉及任何能附着在表面上并且其底物可以被荧光标记的酶。

### [0316] 实施例 3

#### [0317] 应用多种不同标记的核苷酸的实时测序

[0318] 使用两种不同的标记核苷酸类似物进行与以上实施例 2 所述相似的实验。该实验可以利用如下详述的光学装置或系统以及反应混合物进行。但是,提到任何具体的光学装置和参数、缓冲液、试剂、浓度、pH、温度等并非限制性的。其作为实施本发明的方法的一个示例性的实施例。

[0319] 制备反应样品:在一个测序反应中使用大约  $10 \mu\text{l}$  的反应混合物。该反应混合物通常含有 0.5-1mM 的  $\text{MnCl}_2$ 、0.1-1  $\mu\text{M}$  的 DNA 模板、10  $\mu\text{M}$  的 dATP、10  $\mu\text{M}$  的 dAGP、10  $\mu\text{M}$  的 SAP 处理过的 Alexa488-dC4P、10  $\mu\text{M}$  的 SAP 处理过的 Alexa 568-dT4P 以及 DNA 聚合酶。标记的 dC4P 和 dT4P 也可以用标记的 dA4P 和 dG4P 代替。

[0320] 制备零模波导:在聚合反应之前,零模波导一般要在等离子体清洗机中再生。将覆盖 ZMW 的 PDMS 垫圈放置在波导上方,盖住每个光约束。添加一份不含 DNA 聚合酶的上述反应混合物而不接触波导表面。检测扩散背景。如果背景(即 ZMW 发出的荧光爆发)较低并且可以接受,就可将 DNA 聚合酶加至 ZMW,并将其固定在上面。固定混合物一般含有 0.5 至 1mM 的  $\text{MnCl}_2$ 、0.1-1  $\mu\text{M}$  的模板、15nM 的 DNA 聚合酶,在 25mM Tris-HCL, pH 7.5 以及 10mM  $\beta$ -巯基乙醇的缓冲液中。在约  $0^\circ\text{C}$  温育约 15 分钟后,可以将聚合酶吸附于 ZMW 表面。然后去除固定反应混合物,替换成上述反应混合物。

[0321] 使用一种配备有适宜激光例如 Ar/Kr 激光的显微镜系统,其包括用于同时收集和检测来自多个不同波导的信号以及用于分辨存在的 A488 和 568 荧光团的光学装置。该系统包括一个物镜和一系列用于从反射的激发光中分离发出的荧光的二向色/缺口关闭的(notch-off)滤光器。发出的信号经过一个楔形滤光片,将每一种荧光团的信号组分在空间

上分开,并将每个信号在 EMCCD 照相机上成像。

[0322] 聚合酶活性检测:将 ZMW 放置于显微镜下。开启透射照明光后,使用照像机在需要的时间内,例如 2 分钟或更长的时间,监测聚合反应。数据被自动传输到计算机上,该计算机存储并跟踪 ZMW 中每个反应的荧光爆发。

[0323] 一种环状 DNA 根据上述的操作过程进行测序,该 DNA 有一段重复的 A 碱基之后是一段 G 碱基,或者具有一系列重复的 A-G 碱基。图 16 显示了一个代表性的荧光爆发谱,其对应于标记核苷酸的每个掺入事件,表明用一种以上类型的标记核苷酸已经实现了实时单分子测序。来自多个不同重复和多个不同波导的脉冲数据的统计学分析建立了对标记碱基掺入的依赖于序列的实时检测。

[0324] 尽管为了举例说明而进行了详细描述,但是应当指出,本领域技术人员已知或了解的许多变化可以在本发明的范围内实施。本文中提到的所有公开的参考文献和专利文件都完整引入作为参考。

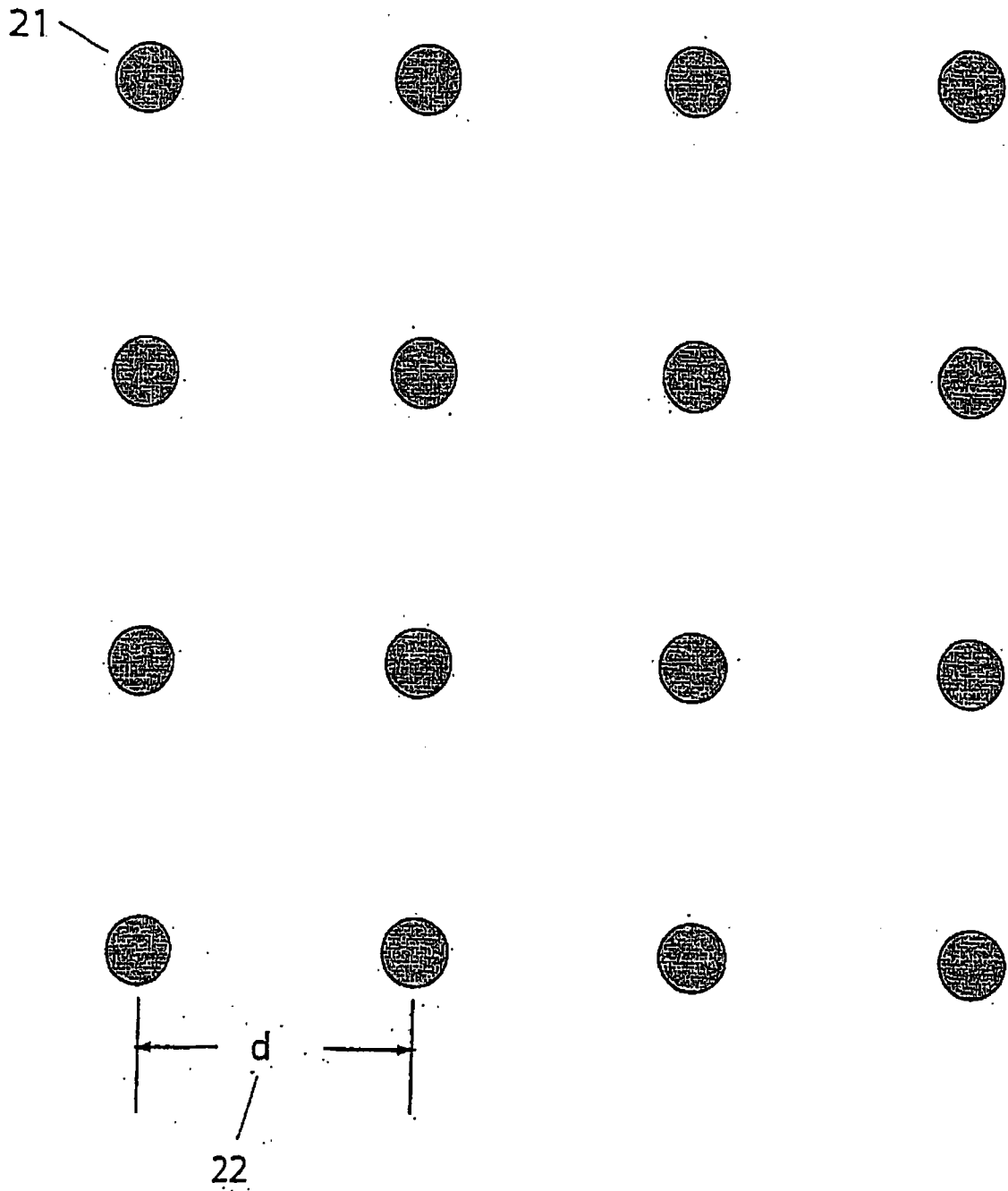


图 1



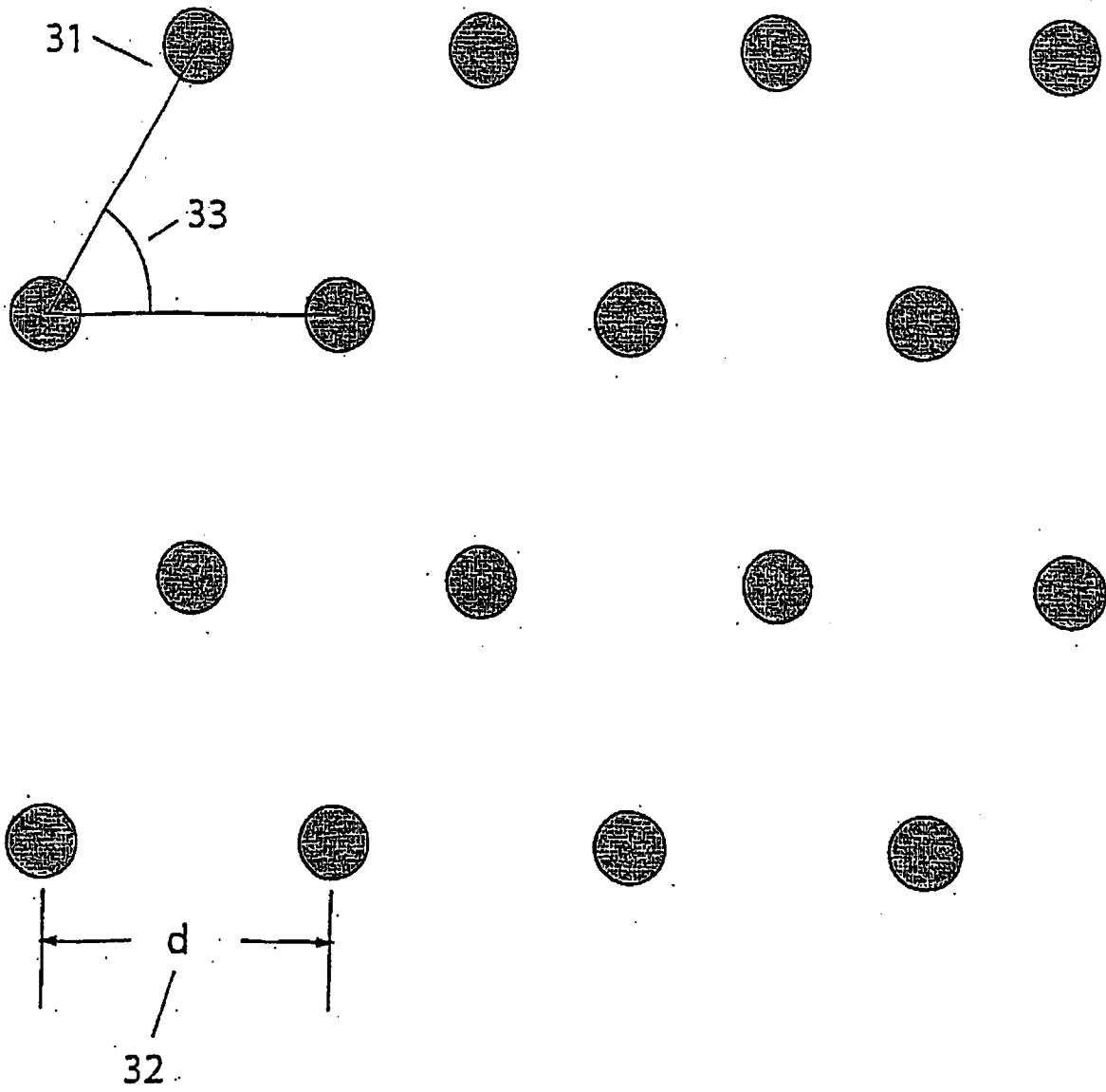


图 2

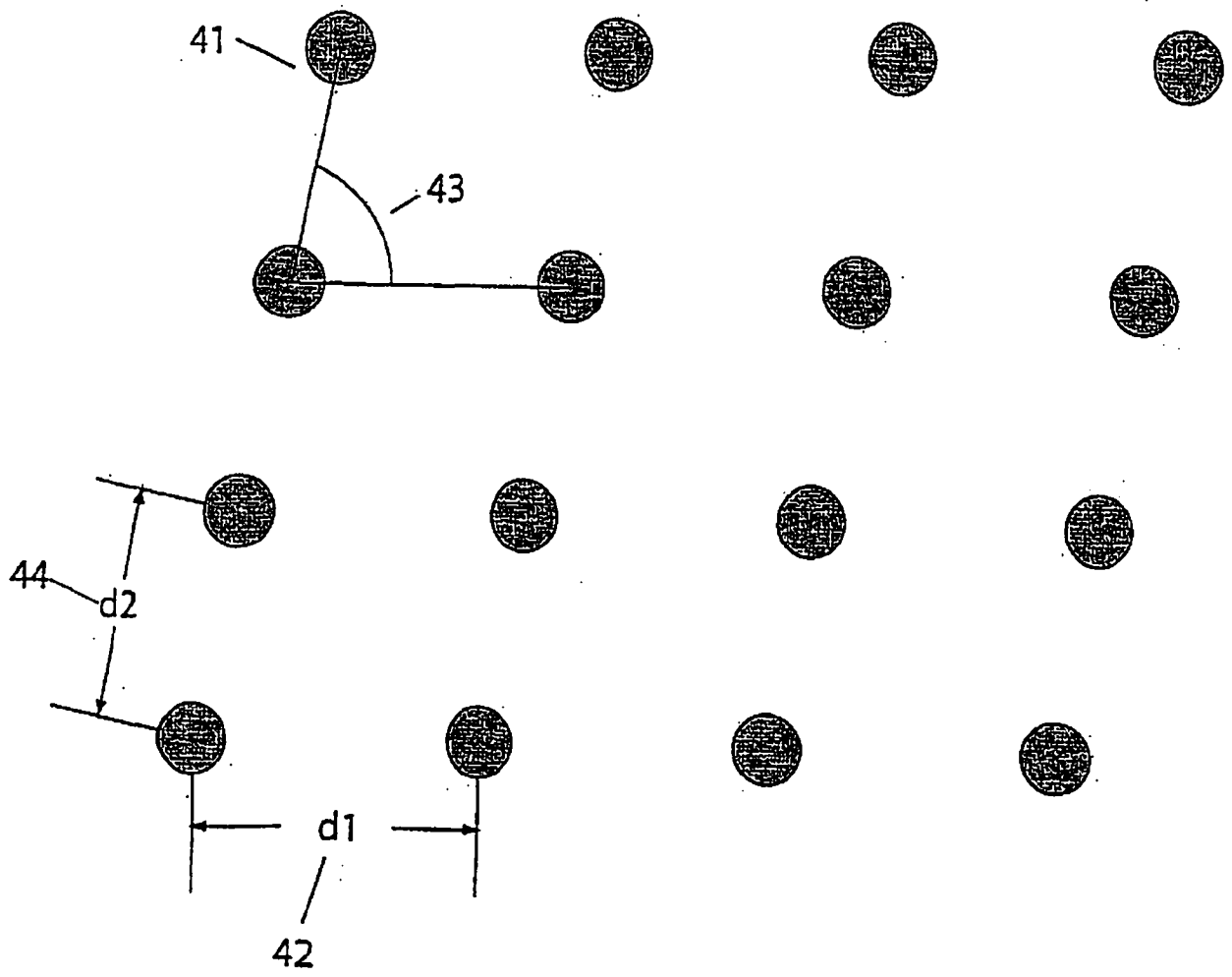


图 3

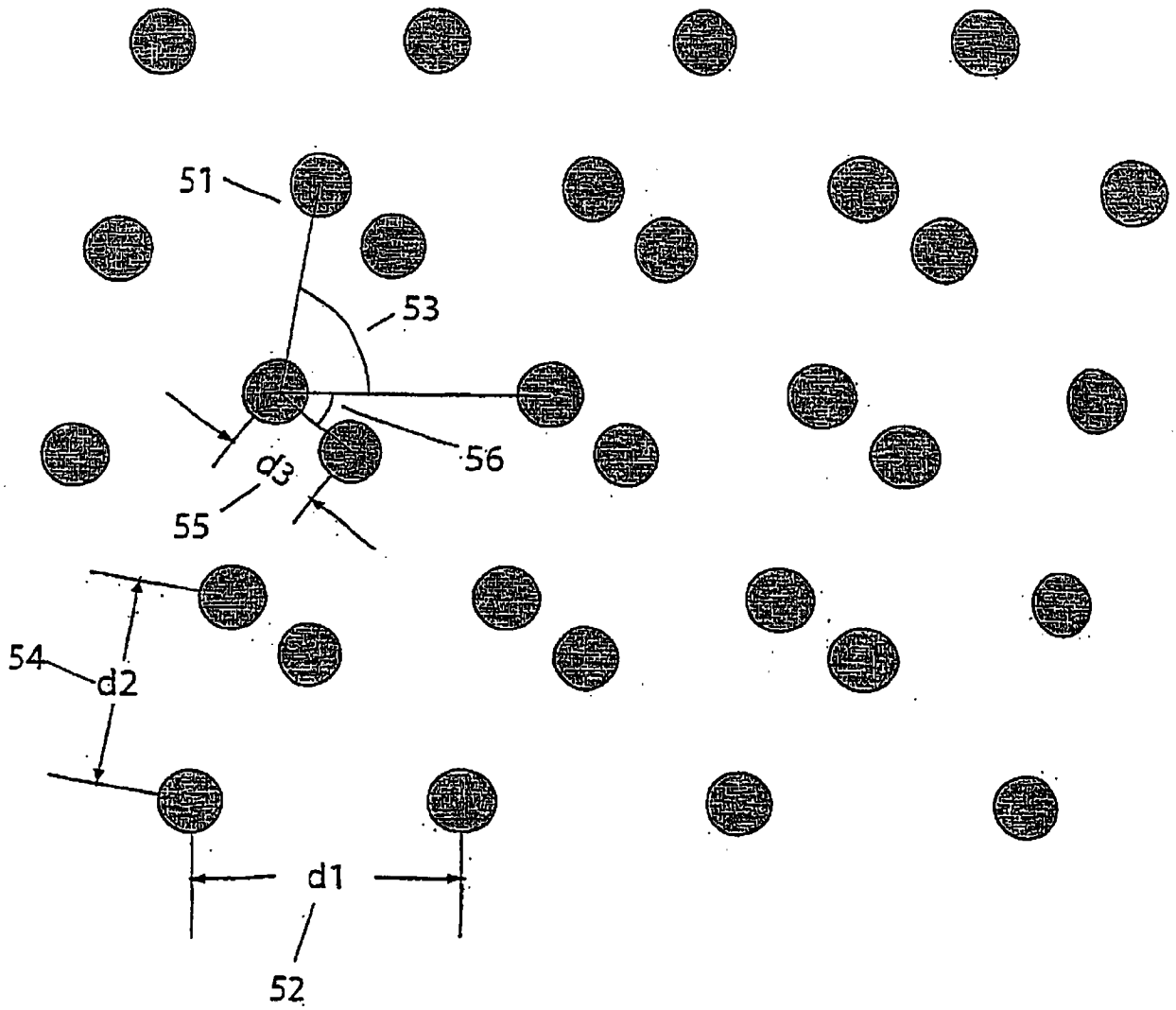


图 4

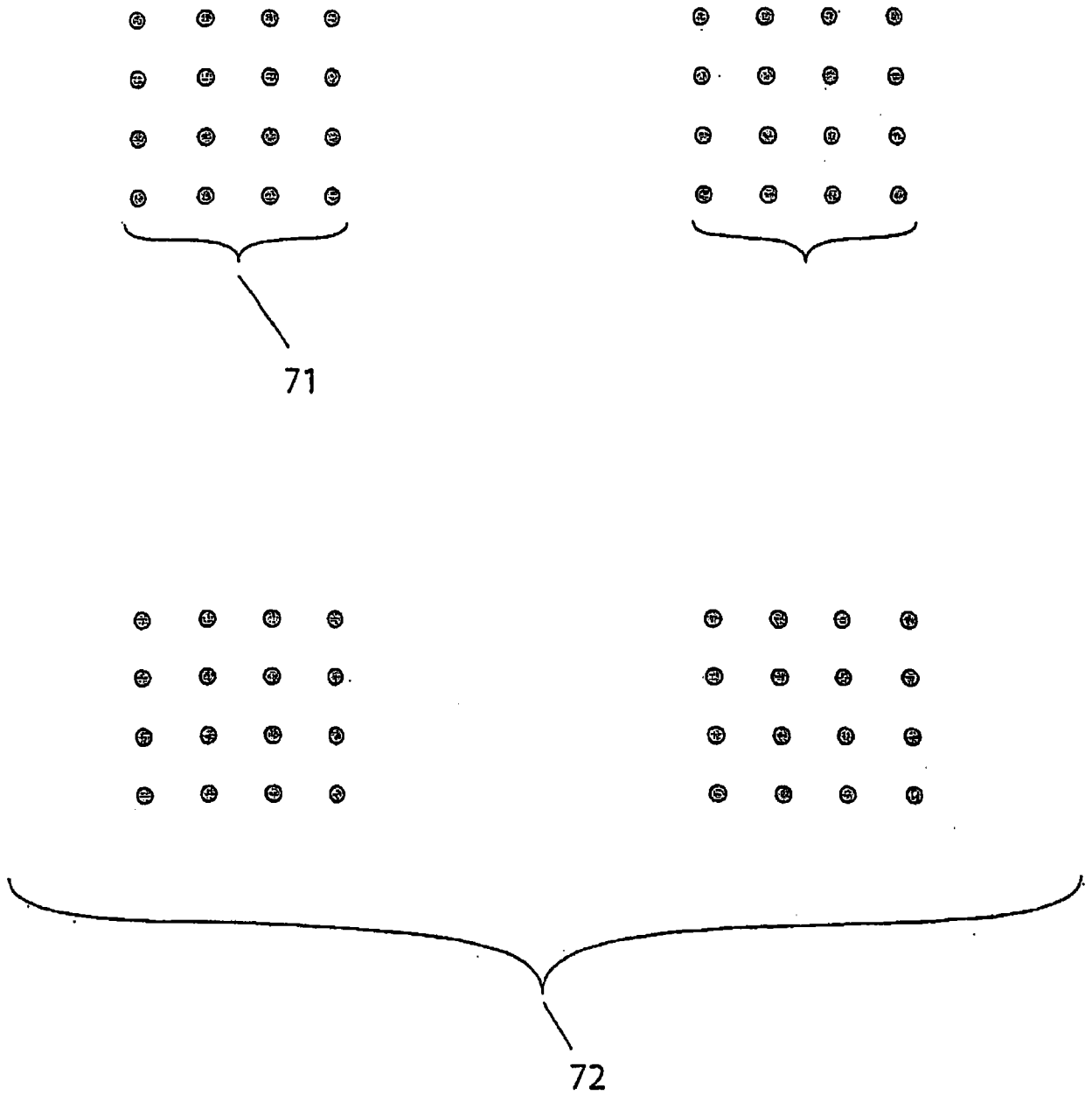


图 5

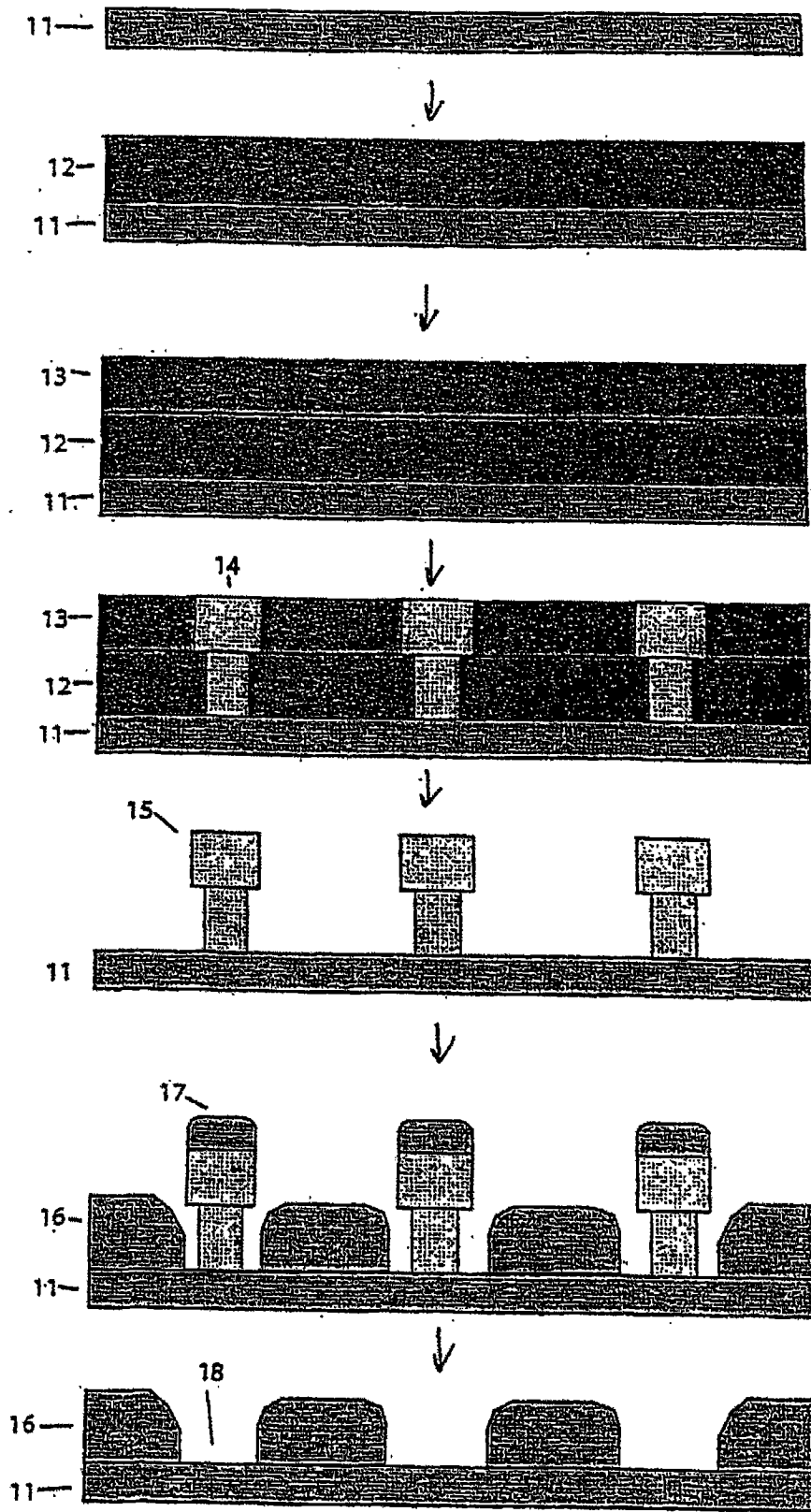


图 6

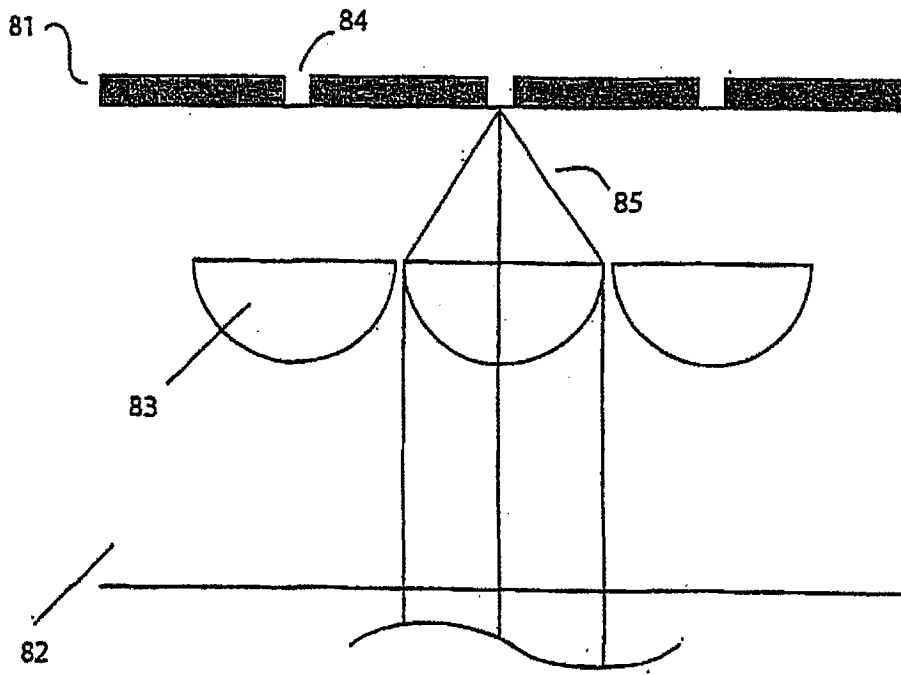


图 7

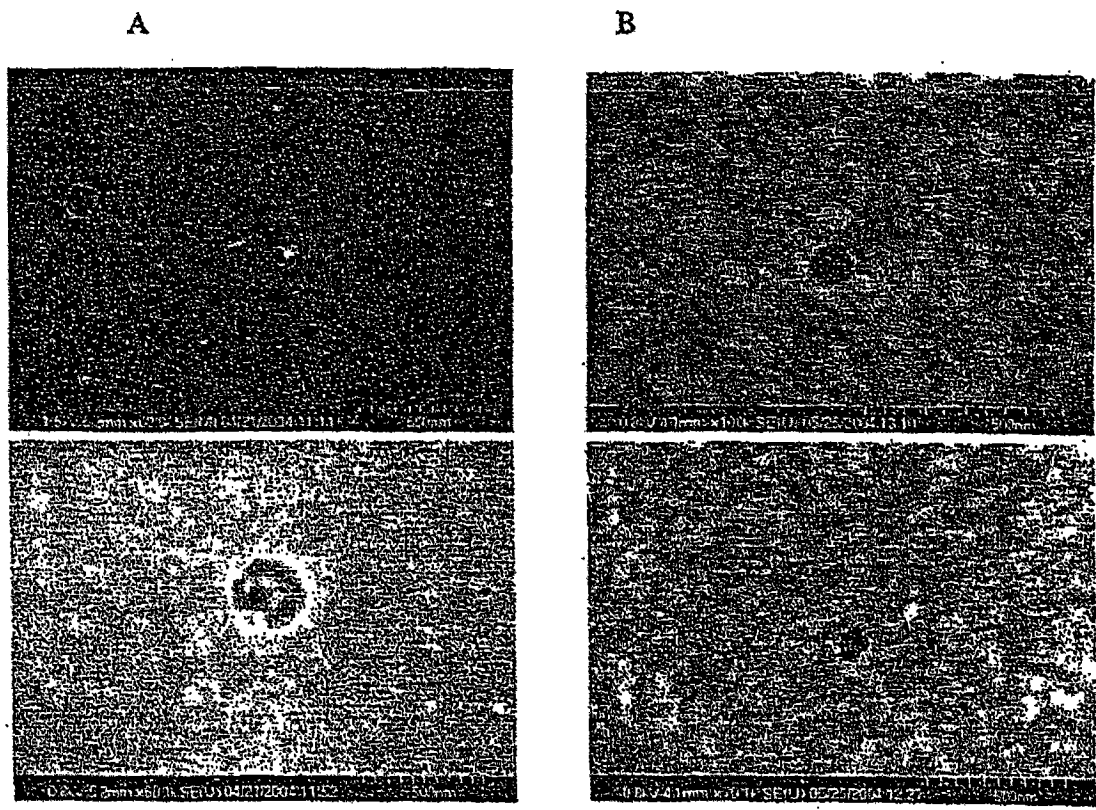


图 8

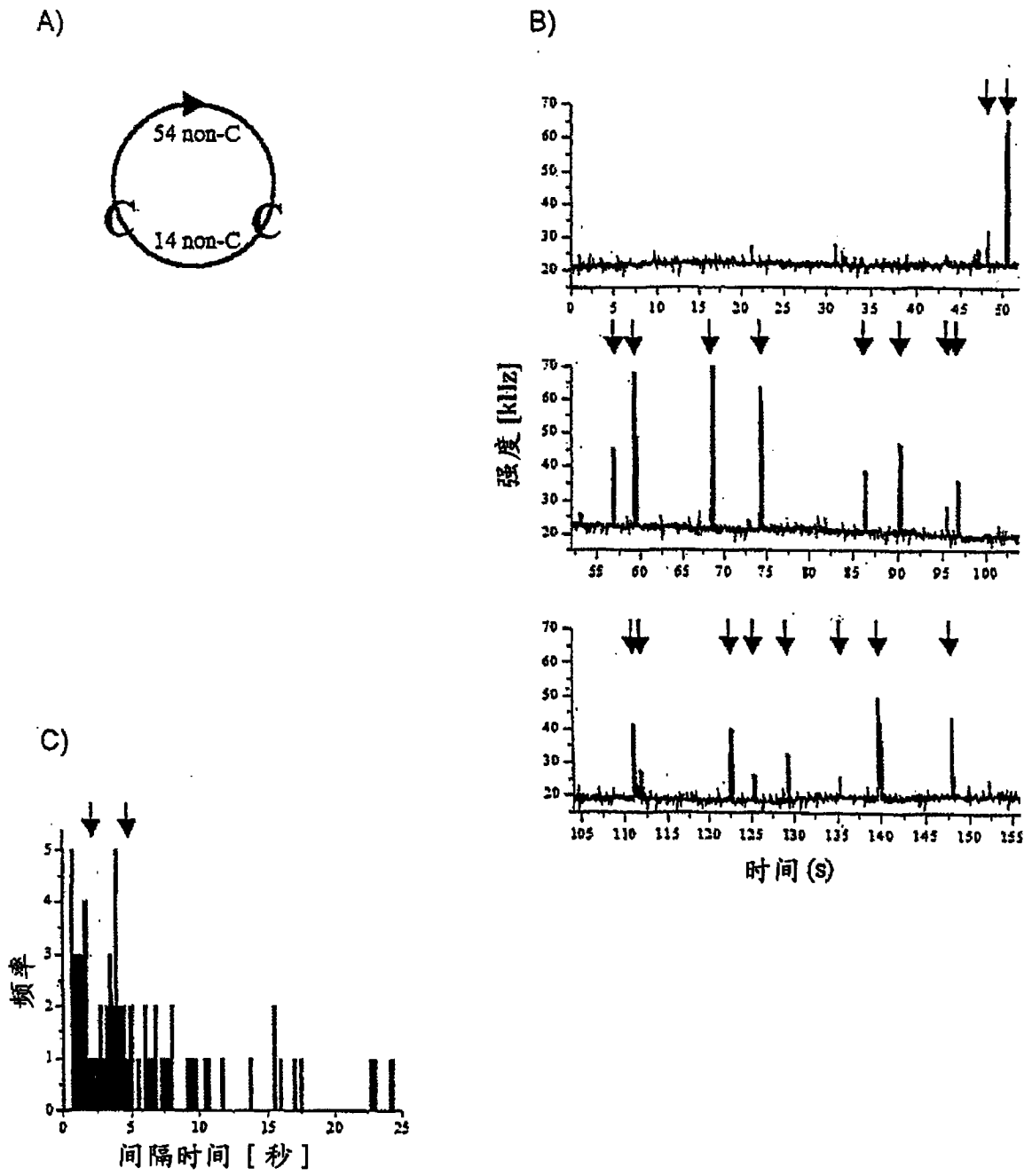


图 9

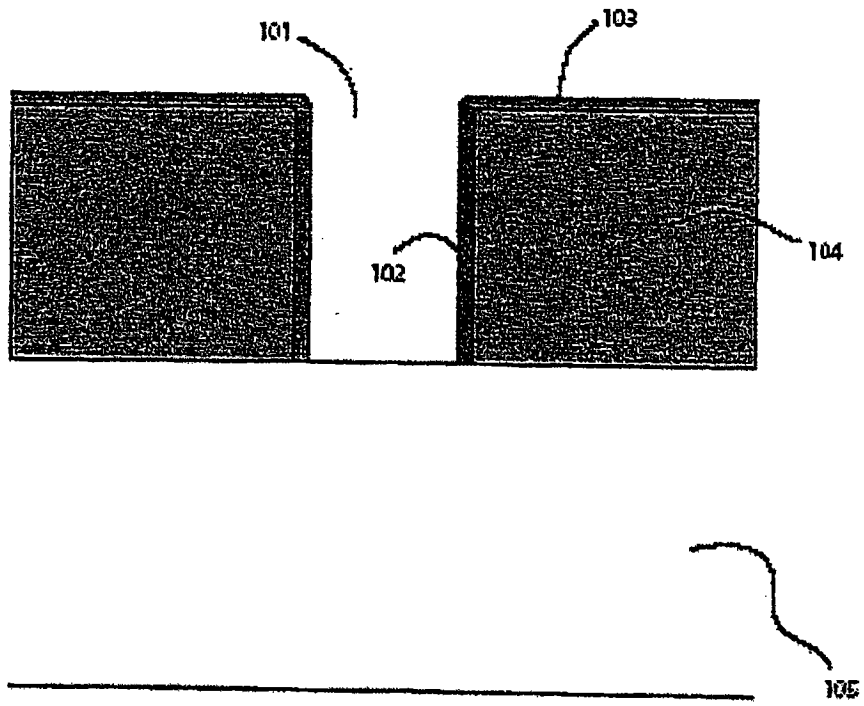


图 10

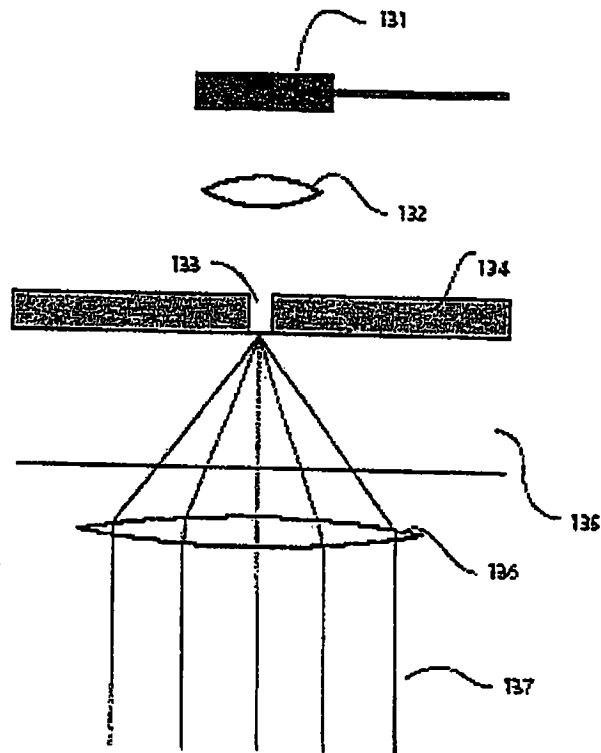


图 11



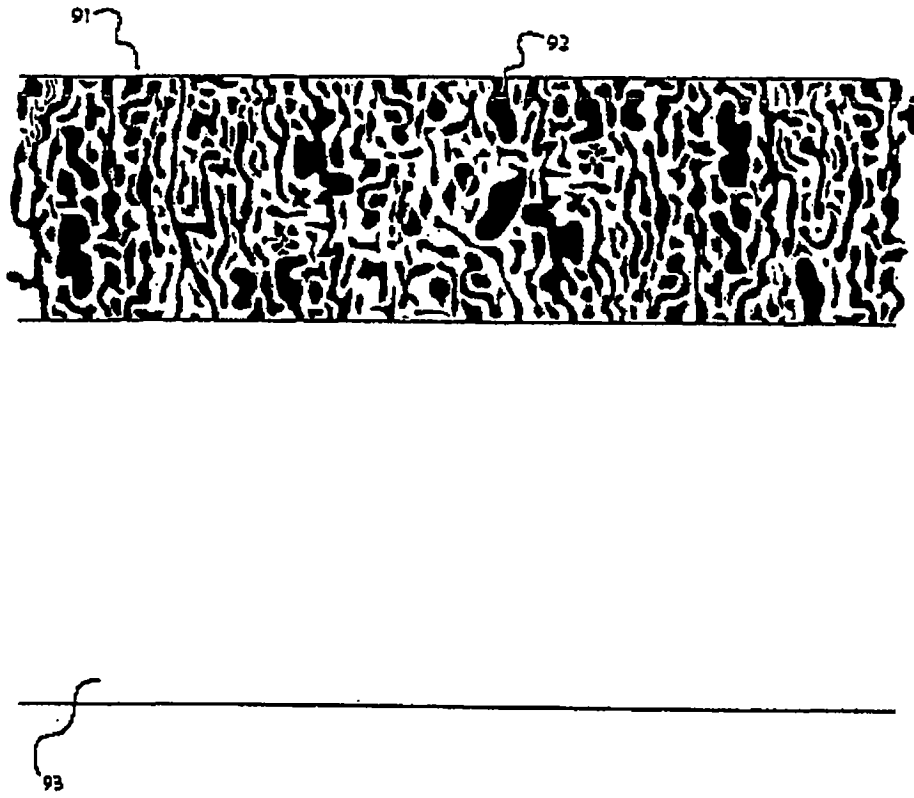


图 12

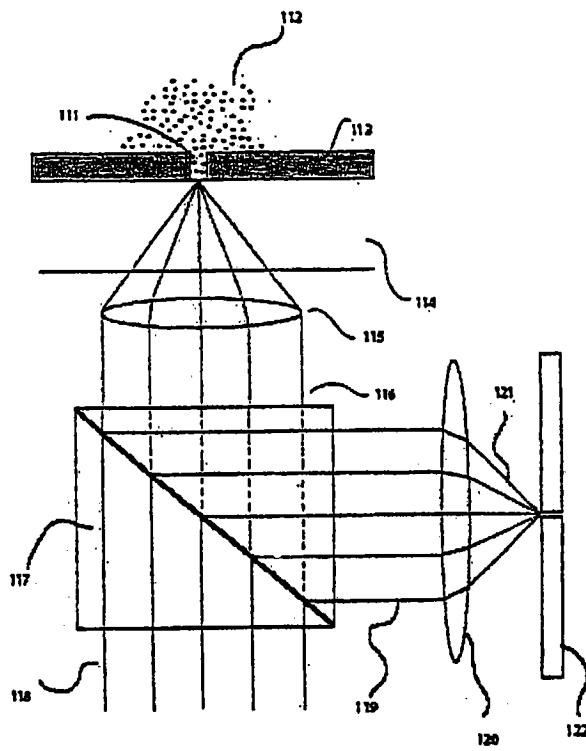


图 13A

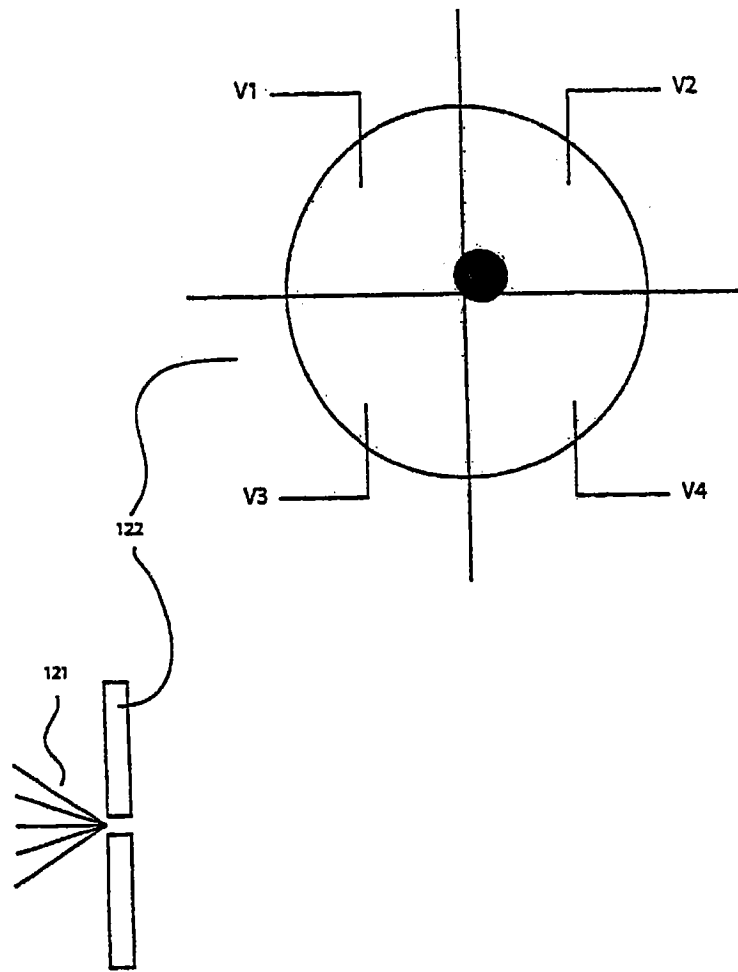
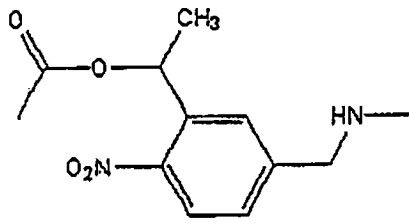


图 13B

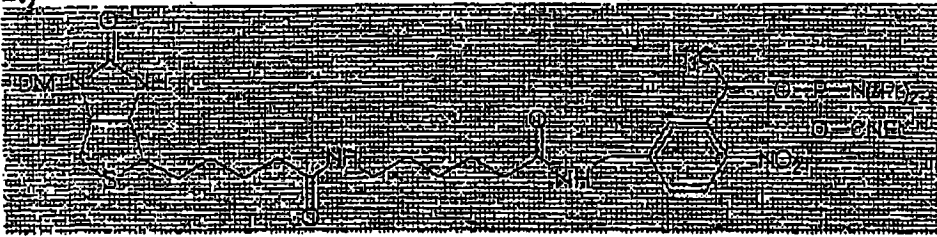
a.) 光致切割阻断剂的例子

1-(氨基甲基-2-硝基苯基)乙基碳酸酯



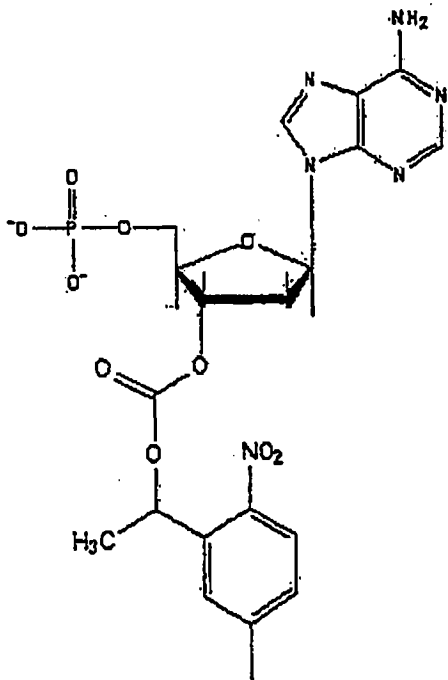
在 340nm 附近发生切割

b.)



切割波长 350nm

c.)



d.)

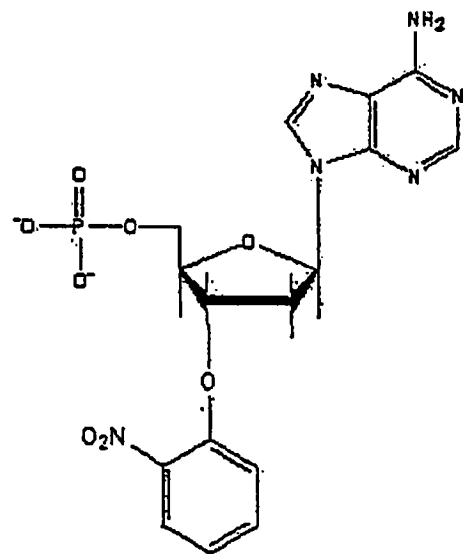


图 14

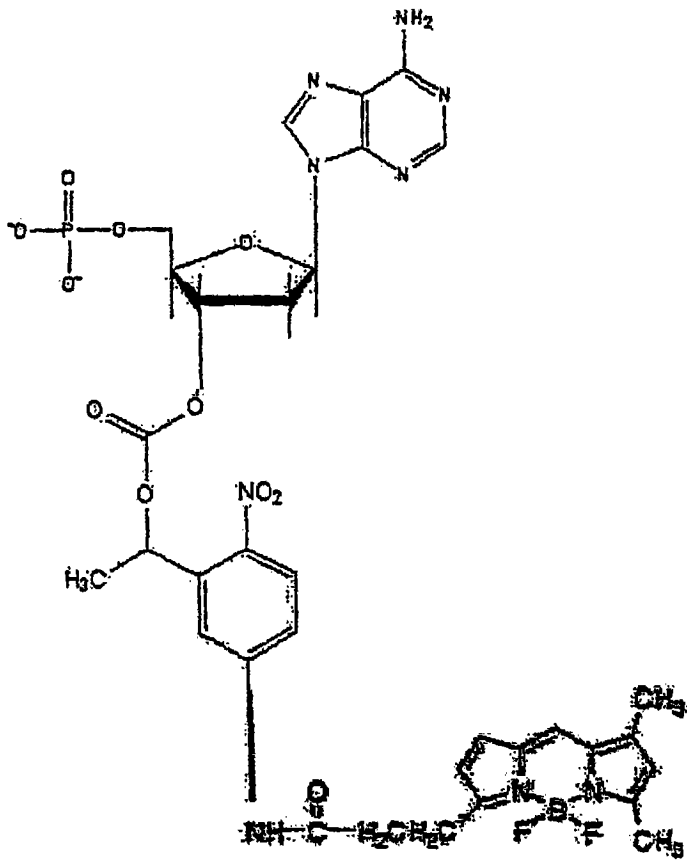


图 15

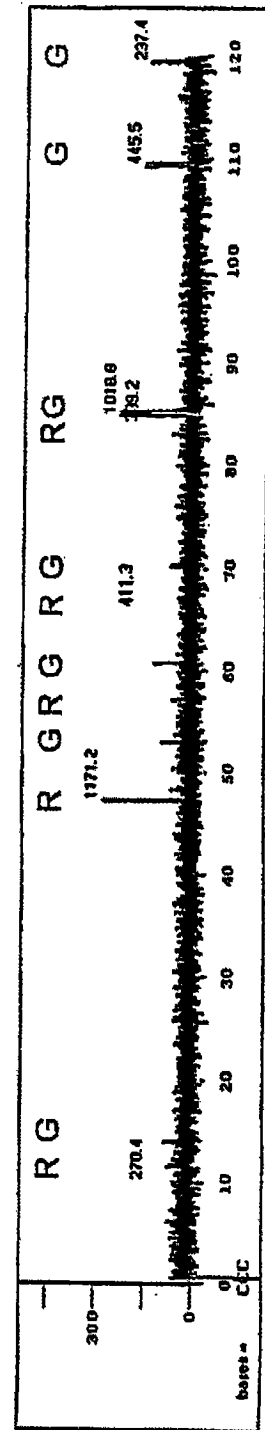


图 16