



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104053498 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 17

(21) 申请号 201380005450. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 01. 09

B01J 19/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/68 (2006. 01)

61/586, 260 2012. 01. 13 US

G01N 21/64 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/050168 2013. 01. 09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/105025 EN 2013. 07. 18

(71) 申请人 皇家飞利浦有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

(72) 发明人 R · 温贝格尔 - 弗里德尔 J · 鲁布

P · J · 范德扎格

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 王健

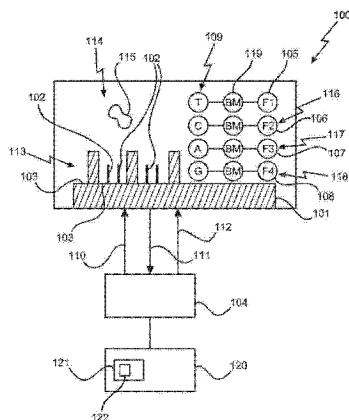
权利要求书3页 说明书14页 附图10页

(54) 发明名称

使用在线栅上再循环的试剂的DNA测序

(57) 摘要

本发明涉及使用在线栅上循环的试剂的DNA测序。该测序方法提示其允许使用单一液体而无需洗涤步骤。基于激发光和切割光的强光学约束，测序反应可以无需洗涤表面而读出。逐步测序通过使用具有光可切割的阻断部分的核苷酸来实现。在读出后，内置核苷酸通过穿过相同基材的切割光去阻断。这确保仅结合的核苷酸将被解除阻断。



1. 一种用于光控制核酸测序,特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的装置 (100),所述装置包括

- 基材 (101),用于将至少一种分子 (102) 结合在所述基材的第一表面 (103) 上,
- 光学组件 (104),

其中所述光学组件配置为将具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光 (110) 导向所述基材,以激发掺入至所述基材的第一表面上结合的分子 (102) 内的第一核苷酸 (109、116、117、118) 的荧光标记 (105、106、107、108),

其中所述光学组件配置为接收且检测由掺入至结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记发出的荧光 (111),

其中所述光学组件配置为将切割波长为 λ_{Cl} 的切割光 (112),优选UV光导向所述基材,以光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应,以从第一掺入核苷酸处切掉阻断部分和荧光标记,

其中所述基材配置为约束激发光,并且配置为在所述基材的第一表面处提供激发光的隐失波,和

其中所述基材配置为约束切割光,优选UV光,并且配置为在所述基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

2. 根据权利要求 1 的装置,所述装置进一步包括

- 与基材 (101) 的第一表面 (103) 结合的分子 (102),
- 具有多种核苷酸 (109、116、117、118) 和酶 (115) 的溶液 (114),

其中所述核苷酸各自包含阻断部分 (119),

其中所述阻断部分配置为当各个核苷酸 (109、116、117、118) 掺入至与第一表面结合的分子 (102) 内时,阻断酶 (115) 的合成活性。

3. 根据权利要求 2 的装置,

其中阻断部分 (119) 是光可切割的 3'-解除阻断的可逆终止剂。

4. 根据权利要求 2 的装置,

其中阻断部分选自以下一组,所述的组包含硝基苯基乙基衍生物、5-甲基-(2-(2-硝基苯基)丙基)碳酸酯-dUTP 类似物、5-甲基(2-氧代-1,2-二硝基乙基)碳酸酯-dUTP 类似物及其任何组合。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的装置,

其中所述基材配置为用于激发光 (110) 和切割光 (112) 的线栅 (113)。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项的装置,

其中切割反应花费时间 $t_{\text{切割}}$,

其中切割反应时间 $t_{\text{切割}}$ 取决于照射切割光的强度,

其中第二核苷酸掺入至结合的分子内花费时间 $t_{\text{掺入}}$,和

其中所述光学组件配置为提供具有这样的强度的照射切割光,使得 $t_{\text{切割}} < t_{\text{掺入}}$ 。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项的装置,

其中所述基材包括沿第一方向 (213) 的几个邻近的结合位置 (209、210、211、212),用于使分子与第一表面结合,

其中所述装置配置为通过沿第一方向 (213、407) 相对于彼此移动所述基材和所述光

学组件进行光学扫描,和

其中所述装置配置为这样进行光学扫描,使得在沿第一方向的移动中每个结合位置首先用具有至少第一波长 λ_{ex1} 的激发光进行照射,并且随后且其次用切割波长为 λ_{cl} 的切割光进行照射。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项的装置,

其中所述装置配置为逐步且光学诱导核苷酸的顺序掺入,所述顺序与结合的分子的核苷酸序列互补,

其中所述装置配置为逐步且光学读出并测定在结合的分子内掺入核苷酸的序列,和

其中所述装置配置为基于接收且检测的由各个掺入核苷酸的荧光标记发出的各个荧光来测定掺入核苷酸的序列。

9. 用于光控制核酸测序,特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的方法,所述方法包括下述步骤:

- 提供具有在基材的第一表面上结合的分子的基材 (S1),

- 通过光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{ex1} 的激发光照射所述基材,并且由此光学激发掺入至所述基材上结合的分子中的第一核苷酸的荧光标记 (S2),

- 通过所述基材约束激发光,由此通过所述基材在所述基材的第一表面处提供切割光的隐失波 (S3),

- 通过所述光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光 (S4),

- 通过所述光学组件用切割波长为 λ_{cl} 的切割光,优选 UV 光照射所述基材,并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应 (S5),和

- 通过所述基材约束切割波长为 λ_{cl} 的切割光,由此通过所述基材在所述基材的第一表面处提供切割光的隐失波 (S6)。

10. 根据权利要求 9 的方法,所述方法进一步包括下述步骤:

- 提供具有多种核苷酸和酶的溶液,

其中所述核苷酸各自包括阻断部分,所述阻断部分包含荧光标记,当各个核苷酸掺入与第一表面结合的分子内时,通过所述阻断部分阻断酶的合成活性,和

其中进行引起光化学切割反应的步骤,使得包含荧光标记的阻断部分从掺入核苷酸处被切掉。

11. 根据权利要求 9 或 10 的方法,所述方法进一步包括下述步骤:

其中所述阻断部分选自以下一组,所述的组包含硝基苯基乙基衍生物、5- 甲基 -(2-(2- 硝基苯基) 丙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物、5- 甲基 (2- 氧代 -1, 2- 二硝基乙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物及其任何组合。

12. 根据权利要求 9-11 中任一项的方法,

其中所述基材包括沿第一方向的几个邻近的分子结合位置,在所述位置上分子各自与第一表面结合,

- 所述方法进一步包括下述步骤:

通过沿第一方向相对于彼此移动所述基材和所述光学组件进行光学扫描,和

- 这样进行所述光学扫描,使得在沿第一方向的移动中每种结合的分子首先用具有至少第一激发波长 λ_{ex1} 的激发光进行照射,并且随后且其次用切割波长为 λ_{cl} 的切割光进行

照射。

13. 根据权利要求 9-12 中任一项的方法，

其中切割反应花费时间 $t_{\text{切割}}$ ，

其中切割反应时间 $t_{\text{切割}}$ 取决于照射切割光的强度，所述方法进一步包括下述步骤：

- 将第二核苷酸掺入至结合的 DNA 分子内，

其中掺入花费时间 $t_{\text{掺入}}$ ，和

- 这样选择在所述光学组件处的照射切割光的强度，使得 $t_{\text{切割}} < t_{\text{掺入}}$ 。

14. 一种程序元件 (122)，用于光控制 DNA 测序，特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列，当通过处理器执行时，所述程序元件适合于进行：

- 通过光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光照射基材，并且由此光学激发掺入与所述基材的第一表面结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记，

- 通过所述基材约束激发光，由此通过所述基材在所述基材的第一表面处提供激发光的隐失波，

- 通过所述光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光，

- 通过所述光学组件用切割波长为 λ_{CL} 的切割光，优选 UV 光照射所述基材，并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应，和

- 通过所述基材约束切割波长为 λ_{CL} 的切割光，由此通过所述基材在所述基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

15. 一种计算机可读介质 (121)，在其上存储计算机程序，所述计算机程序用于光控制 DNA 测序，特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列，当通过处理器执行时，所述计算机程序适合于进行：

- 通过光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光照射基材，并且由此光学激发掺入与所述基材的第一表面结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记，

- 通过所述基材约束激发光，由此通过所述基材在所述基材的第一表面处提供激发光的隐失波，

- 通过所述光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光，

- 通过所述光学组件用切割波长为 λ_{CL} 的切割光，优选 UV 光照射所述基材，并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应，和

- 通过所述基材约束切割波长为 λ_{CL} 的切割光，由此通过所述基材在所述基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

16. 部分作为 DNA 测序中的阻断部分的用途，

其中所述部分选自以下一组，所述的组包含硝基苯基乙基衍生物、5- 甲基 - (2- (2- 硝基苯基) 丙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物、5- 甲基 (2- 氧代 -1, 2- 二硝基乙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物及其任何组合。

使用在线栅上再循环的试剂的 DNA 测序

技术领域

[0001] 本发明涉及核酸序列的测定。特别地，本发明涉及用于光控制迭代逐步反应 (iterative stepwise reaction) 以测定核酸序列的装置、用于光控制迭代逐步反应以测定核酸序列的方法、程序元件、在其上贮存程序元件的计算机可读介质和作为 DNA 测序中的阻断部分的部分 (moiety) 的用途。

背景技术

[0002] DNA 测序是快速发展中的领域，其中关键参与者是例如 Illumina (使用 Solexa 技术)、Life (使用 Solid 技术) 和 Roche Diagnostics (使用 454 技术)。这些公司使用的测序方法的缺点是序列信息通过包含更换试剂和洗涤的几个步骤的重复来获得。这是麻烦和耗时的，并且浪费许多昂贵试剂。重复次数等于待测的核苷酸数目即阅读长度 (read length)。由于增加阅读长度的期望，这个问题将在未来变得更严重。目前，这通过在大阵列上的高度平行测序得以补偿。然而临床应用并不希望如此。相反人们希望具有快速应答和较低的多重化 (multiplexing)。同时每碱基对的成本必须显著下降。因为在每一个步骤即在核苷酸掺入后，整个表面需要进行洗涤，所有试剂最终浪费。总试剂消耗与阅读长度和当时测序的主要成本因素成比例。

[0003] 对特定靶例如 DNA 测序的过程变得更复杂，因为掺入反应需要随后为活化反应，并且在两者之间需要小心的洗涤步骤。

[0004] 可替代方法如 Pacific Biosciences 的方法更有效，因为它们对于每一个分子单独地实时跟踪核苷酸的掺入。这种方式不需要洗涤。另一方面，此类系统的光学需求是非常严重的，因为实时需要对于 4 种不同颜色的单个荧光团灵敏度。这仅可以对于有限区域实现，因为具有高放大率的物镜场对于实际系统和强激光源是有限的。对于有限区域，仅可以测序一小部分样品，并且由于漏读发生错误的风险很高。来自通过聚合酶内置的标记核苷酸的荧光信号需要与碰巧在相同位置处的相同种类分子的荧光信号区分开。这通过分析荧光信号的脉冲长度来完成。

发明内容

[0005] 可能存在提供改善的核酸序列测定的需要。本发明满足这个需要。

[0006] 本发明的目的可以视为提供改善的核酸序列测定。

[0007] 本发明的目的通过独立权利要求的主题解决。本发明的进一步实施方案和优点整合入从属权利要求中。

[0008] 应当指出本文描述的实施方案类似地属于光控制迭代逐步反应以测定核酸序列的方法、用于光控制迭代逐步反应以测定核酸序列的装置、计算机程序元件、计算机可读介质和作为 DNA 测序中的阻断部分的部分的用途。协同效应可以来自实施方案的不同组合，尽管它们可能未详细描述。

[0009] 进一步地，应当指出本发明关于方法的所有实施方案可以按所述的步骤次序进

行,然而,这不一定是该方法步骤的唯一和必需次序。随同描述了方法步骤的所有不同次序和组合。

[0010] 在本发明的上下文中,术语“阻断部分”应理解为阻断酶的合成活性的部分,所述阻断部分掺入所述酶对其进行合成过程的分子内。阻断部分可以是例如阻断分子。

[0011] 在本发明的上下文中,术语“可切割的”应理解为允许通过吸收波长为 λ_{cl} 的切割光而被切掉。

[0012] 在本发明的上下文中,应当理解本文公开的光学组件 (optical arrangement) 的每一个实施方案可以配置为发出偏振激发光和偏振切割光。因此,可以使用偏振器或已经偏振的光源。细节将在以后描述。

[0013] 此外,在本发明的上下文中,术语“激发光”分别应用于波长 λ_{Ex1} 、 λ_{Ex2} 、 λ_{Ex3} 和 λ_{Ex4} 。

[0014] 根据本发明的示例性实施方案,公开了用于光控制 DNA 序列的装置。特别地,该装置配置为光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列。可替代地,代替通过合成的测序,通过连接的合成也应理解为在本发明的范围内。所述装置包括基材,用于将至少一种分子结合在基材的第一表面上。该装置进一步包括光学组件,其配置为将具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光导向基材以激发第一核苷酸的荧光标记,所述第一核苷酸掺入至基材的第一表面上结合的分子内。光学组件进一步配置为接收且检测由掺入至结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记发出的荧光。此外,光学组件配置为将切割波长为 λ_{cl} 的切割光,优选 UV 光导向基材,以光诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应,以从第一掺入核苷酸处切掉阻断部分和荧光标记。此外,该基材配置为约束 (confine) 激发光,并且配置为因此在基材的第一表面处提供激发光的隐失波 (evanescent wave)。此外,该基材配置为约束切割光,优选 UV 光,并且进一步配置为在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

[0015] 此处提出了能够组合已知测序装置的优点的装置。该装置使得总体上易于读出,但不需要洗涤步骤或需要次数减少的洗涤步骤,意指用单一试剂满足所有读数。

[0016] 换言之,本发明公开了测序装置,其允许在单一液体中进行测序,并且其中不需要洗涤步骤或需要次数减少的洗涤步骤。所需试剂体积即成本以等于阅读长度 (50–100) 的因素减少。基于在基材即纳米光子表面结构如线栅上的激发光的强约束,测序反应可以无需洗涤表面而读出。还可以使用全内反射,以便提供隐失波。

[0017] 逐步测序通过使用具有光可切割的阻断基团的核苷酸来实现。在读出后,内置核苷酸通过穿过相同纳米光子基材的切割光例如 UV 辐射解除阻断。这确保仅结合的核苷酸将被解除阻断。DNA 测序的成本和速度与试剂消耗强烈相关。测序工作站、仪器和测试盒的速度和复杂性在很大程度上由用于重复反应和洗涤步骤的液体处理的必要性决定。两个方面均通过本发明得到改善,导致测序的引人注目的例证和成本减少。

[0018] 如下文将详细说明的,光学组件也可以配置为将具有第一和第二以及第三和第四激发波长 λ_{Ex1} 、 λ_{Ex2} 、 λ_{Ex3} 和 λ_{Ex4} 的激发光导向基材,以激发掺入至基材的第一表面上结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记。由此,可以确保当各个核苷酸使用特异性和区别性荧光标记时,可以区分例如四种不同核苷酸,例如腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胸腺嘧啶 (T) 和胞嘧啶 (C)。然而,需要时,上文描述的四种激发波长 λ_{Ex1} 、 λ_{Ex2} 、 λ_{Ex3} 和 λ_{Ex4} 中仅一种或两种或三种可以通过装置导向基材以激发分子,即掺入至结合的分子中的核苷酸的荧光标

记。关于四种颜色系统的细节将在下文根据下述图 1 和 2 更详细地说明，所述四种颜色系统中使用对于上述核苷酸 A、G、C 和 T 的四种不同荧光标记。结合的分子可以是 DNA 片段，并且可以理解为其核苷酸序列由本发明测定的核酸。

[0019] 此外，测序或 DNA 测序领域的技术人员知道波长 λ_{Ex1} 、 λ_{Ex2} 、 λ_{Ex3} 和 λ_{Ex4} 与用于例如核苷酸 A、G、C 和 T 的四种荧光标记组合选择的事实。换言之，这样选择波长，使得使用的荧光标记可以通过相关激发光光学激发。此外，这样选择波长 λ_{cl} ，使得所使用核苷酸的所需切割反应可以通过照射所述切割光而光学引起。

[0020] 作为示例性实施方案，可以使用下述波长，尽管本领域技术人员可以分开明确公开的波长。激发波长可以基于下述进行选择：激发波长在可见光谱上的最佳间距，且与最常用染料例如 FAM、HEX、Cy3Cy5、Alexa Fluor700 或 Atto700 或相似染料的吸收光谱一致。激发波长也可以经调整以适应光源的可用性，所述光源如具有例如 405、532、633 和 780nm 的固态激光光源。然而，本发明并不限于所述激发波长。可以这样选择各个染料的发射峰，使得不发生与邻近激发波长的重叠。此外，切割光，优选 UV 光可以在 250 – 400nm、优选 300 – 370nm 的范围内。然而，本发明并不限于所述激发波长。

[0021] 应当指出在基材的第一表面处结合的分子可以例如是 DNA 片段、DNA、RNA、mRNA 或别的核酸。另外本文随后将描述的酶也可以与基材的第一表面结合。在本发明的上下文中，术语“结合”应理解为元件固定至基材的第一表面的状态。

[0022] 另外，该基材提供了可以由相同分子的克隆覆盖的斑点，以便增加通过检测荧光接收的光信号。因此，基材可以作为具有各自不同克隆的此类斑点的阵列提供，使得测序的通量增加。

[0023] 换言之，上文所述的本发明装置允许不含洗涤步骤的基于组装 (assembly-based) 的光测序过程，使得通过合成测定核酸序列的全部过程可以在基材上的单一溶液中进行。过程步骤可以进行光控制。对掺入核苷酸的解除阻断（本发明应理解为活化）的过程可以通过切割光的表面选择性隐失辐射的照射来进行。优选地，此类照射用 UV 光进行。该过程描述为将切割波长为 λ_{cl} 的切割光导向基材，以光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应。因此，所述的装置配置为通过用切割光的隐失波照射基材，仅从第一掺入核苷酸处切掉荧光标记。因此，由于切割光的隐失场的定位，仅掺入的核苷酸将被解除阻断、活化或切割。所述的装置使用相同隐失场照明，用于针对溶液中的荧光标记背景读取掺入的碱基或核苷酸的荧光。对包含具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光的光场的定位通过所述激发光的隐失场实现。

[0024] 例如，通过提供线栅，所述的装置的基材可以生成切割光的隐失波和激发光的隐失波。这可以允许使用高强度的聚焦光束，使得光子光学反应在非常接近于表面的非常有限的区域以高速率发生。光学组件可以包含在单个光学组件单元中的用于荧光激发和检测即读出的各个光学元件，和用于解除阻断即活化的各个光学元件，或还可以包含在物理上区别的元件中。

[0025] 此外，光学组件可以包含各个激发光源。此外，光学组件可以包含用于发出切割光的光源。用于切割（即解除阻断）以及读出（即荧光的激发和检测）的照明可以任选通过相同透镜发生。然而，需要时，还可以提供用于解除阻断和读出的两种不同的光学设置。

[0026] 在本发明中使用的隐失波场随着与第一表面的距离成指数衰变，其中衰变长度

(decay length) 取决于在金属线间的孔径小于在相关波长处的光学分辨率的条件下, 线栅材料例如金属和线间介质的复折射率 (complex refractive index)。例如, 孔径可以是 70nm, 其远低于另外对于 UV 光的限制。衰变长度估计为 16.8nm(参见下文), 这意指场在与金属线和基材界面的该距离处已减少至照射强度的 1/e。由于线之间的第一表面蚀刻不足 (underetching), 其可能与第一表面略微不同。

[0027] 换言之, 所述的装置提供了表面选择性切割光照射和激发光照射的表面。该基材可以配置为纳米光子表面结构, 使得生成上述激发光和切割光的光约束 (optical confinement) 以及另外的切割光和激发光的隐失波。尤其是激发光即读出光学和切割光的组合允许迭代逐步反应通过合成测定核酸序列。这具有可以省略洗涤步骤的益处。随后, 用所述的装置进行的上述步骤和循环可以重复多次, 以允许一种或多种另外的核苷酸逐步掺入至结合的分子内, 并且其后读出, 无论所述核苷酸是否已如上所述掺入。

[0028] 该装置可以进一步配置为获得描述基于由该装置光控制的光学逐步反应而掺入至结合的分子内的核酸差异的数据。

[0029] 此外, 该基材可以出于聚合物例如聚 (环) 烯烃、聚碳酸酯、聚酯或 PMMA。还可以使用金属和半导体。

[0030] 根据本发明的另一个示例性实施方案, 该装置进一步包括与基材的第一表面结合的分子。该装置进一步包括具有多种核苷酸和酶的溶液。其中, 核苷酸各自包含阻断部分。阻断部分配置为当各个部分掺入与装置的第一表面结合的分子内时, 阻断酶的合成活性。

[0031] 需要时, 阻断部分包含荧光标记。然而, 阻断部分和荧光标记可以掺入或置于第一核苷酸的不同位置处。它们可以在一个单个切割过程或不同切割过程中被切掉。这适用于本发明的每一个实施方案。

[0032] 本文所述的实施方案提供了掺入反应由于包含的阻断部分而自身停止的优点。例如, 阻断部分可用立体阻碍阻断酶的合成活性。这允许对在许多斑点上同时发生的反应进行局部读出。在现有技术中, 在装置中的样品中使用的酶的作用不能同步。然而, 本发明允许核苷酸的掺入可以一步一步地进行, 并在每一个步骤后便利地完成读出。该优点通过使用上述阻断部分来实现, 所述阻断部分可以是阻断核苷酸, 其在核苷酸掺入后阻断酶的活性。需要主动解除阻断以继续下一个核苷酸的掺入, 本发明通过光学组件允许这点, 所述光学组件配置为指导切割光以切掉阻断部分。阻断部分可以包含荧光标记。

[0033] 作为示例性实施方案, 阻断部分可以体现为如 “Sequencing technologies, the next generation” by Michael L. Metzker, Nature Review Genetics 11 (2010) 31–46 中所述和限定的 3' - 阻断可逆终止剂 (terminator) 或 3' - 解除阻断的可逆终止剂。其中, 也称为 “解除阻断”, 所述阻断部分 3' - 解除阻断可逆终止剂可以用于阻断酶的活性。可逆终止剂可以理解为附着至核苷酸 / 核糖单元的配体, 其阻止在掺入后任何后续核苷酸的掺入。它们在通过化学或光化学方法切割后是可逆的, 这个过程可以恢复原状并且聚合酶可以内置下一个核苷酸。此外, Metzker 等人的 3' - 阻断可逆终止剂可以例如进行化学修改, 以使其成为光可切割的。随后, 用切割光的光切割可以借助于本发明进行。另外, 其他复合物可以与随后将描述的各个酶组合用作阻断部分。技术人员知道哪些酶和阻断部分的组合导致阻断酶的合成活性的所需效应。

[0034] 本文使用的关于所述阻断部分的术语与所述论文的公开内容一致且适合于所述

论文的公开内容。所述第二类部分具有另外的优点，如核糖单元的 3' - 位置被解除阻断的情况下，下一个核苷酸的掺入被大体积基团 (bulky group) 阻止，所述大体积基团也含有附着至在核糖单元的 5' - 位置处的碱基配对部分的荧光标记。这还可以由下述图 6 及其描述得知。只要这个基团附着，核苷酸寡聚物的延伸就被阻止。然而，在该大体积基团去除后下一个核苷酸的掺入成为可能。本发明提供了通过诱导光化学切割反应的此类去除。更有利地，由于生成切割光的隐失波，本发明仅在非常接近于分子所结合的表面处使用此类切割反应。

[0035] 除下述描述之外，应考虑到关于图 6、8 和 10 的细节，其中公开了包含荧光标记的阻断部分。

[0036] 根据本发明的另一个示例性实施方案，阻断部分是光可切割的 3' - 解除阻断的可逆终止剂。

[0037] 根据另一个示例性实施方案，阻断部分选自以下一组，所述的组包含硝基苯基乙基衍生物、5- 甲基 -(2-(2- 硝基苯基) 丙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物、5- 甲基 (2- 氧代 -1, 2- 二硝基乙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物及其任何组合。

[0038] 根据另一个示例性实施方案，该基材配置为用于激发光和切割光的线栅。

[0039] 该线栅可以包括在例如玻璃基材上的金属线模式。线间的间距充当金属包覆平板波导器，其中主要贡献来自两种基础模式。例如，对于在本发明基材的线上入射的 TE 偏振的激发光，所得的在线间的模式是隐失模式，对于 $\lambda = 630$ 纳米具有 16.8 纳米的示例性衰变长度。其中假定基材的线充满具有水的折射率 ($n = 1.33$) 的介质。对于 TM 偏振光，所得的线栅模式被称为传播模式，在这个例子中具有 $1.2 \mu m$ 的衰变长度。例如，线高在例子中可以是 60 纳米。其中 TM 偏振模式伴随 10% 或更少级别的光丧失进行传输，而 TE 偏振模式隐失衰变。

[0040] 理解线栅的不同方式是将例如铝线视为反射激发光的金属，伴随与线平行的偏振 (TE 偏振)，并且传输与线垂直的偏振 (TM 偏振)。TM 偏振光的最大传输可以高于 95%。在入射 TE 激发光的情况下的隐失场在图 3a 和 3b 中描述。通过本发明的光学组件照射的激发光和切割光可以在本发明的这个以及每一个其他实施方案中具有此类偏振。

[0041] 本领域技术人员由上文所述的描述明确得出使用的线栅的几何参数应适合于由光学组件照射的激发光和切割光。例如，线栅的线间孔径应小于相关波长的光学分辨率的条件，即孔径 \ll 光学分辨率 $\sim \lambda / 2NA$ 。在下述附图的背景下，孔径被称为隙状开口。

[0042] 所述的装置的线栅基材的使用提供了极端光学约束。与快速光化学切割组合实现所示优点，所述快速光化学切割用于解偶联在核苷酸上的所谓的阻断部分，以阻止下一个核苷酸的继续掺入。线栅的使用具有在很大程度上不依赖于入射角的额外优点。因此，它可以与聚焦光束组合使用，以实现局部的高强度，同时使剩余部分保持在黑暗中。换言之，线栅允许激发这样的分子且仅对这样的分子敏感，所述分子例如 DNA 片段，其非常接近于隐失场中的表面，并且因此不引起对在隐失场外的任何标记核苷酸的检测或作用。例如，隐失场可以从基材的第一表面延长约 20 纳米。激发光和切割光两者均可如此。

[0043] 线栅基材包括相对第一表面的第二表面，并且光学组件配置为用激发光和切割光照射基材的第二表面。换言之，光学组件中的基材相对于彼此放置，使得切割光和激发光直接朝向基材的第二表面。这可以视为基材的向后辐射。在前表面上，第一表面上，规则线结构

由线栅呈现。在规则金属线之间，即在线栅间的间隔中，结合或固定分子例如 DNA 片段。

[0044] 在本发明的上下文中，术语“激发光”分别适用于波长 λ_{Ex1} 、 λ_{Ex2} 、 λ_{Ex3} 和 λ_{Ex4} 。随后，对于所有四种激发波长，基材确保产生各个光的约束和形成各个光的隐失波。需要时，可以使用或多或少的光源和 / 或荧光标记，而不背离本发明。

[0045] 根据本发明的另一个示例性实施方案，切割反应花费时间 $t_{\text{切割}}$ ，其取决于照射切割光的强度。此外，第二核苷酸掺入至结合的分子内花费时间 $t_{\text{掺入}}$ 。本文所述的装置包括光学组件，其配置且调整为提供具有这样的强度的照射切割光，使得 $t_{\text{切割}} < t_{\text{掺入}}$ 。

[0046] 光切割应仅在已经掺入且与表面结合的分子中发生。批量的反应将产生解除阻断的试剂，其可能不知不觉地内置并以这种方式在测序结果中引入错误。因此，与通过酶掺入核苷酸的速率相比，仅局部短时照射以使得切割反应快速是有价值的。酶和阻断部分的工作原理已经在上文描述。该公开内容适用于本文描述的示例性实施方案内。所述的实施方案允许同步掺入下一个核苷酸且确保检测的荧光信号是高度可靠的。

[0047] 切割光相对于基材处于隐失模式的事实提供了下述优点：反复暴露不会导致溶液中的荧光标记被漂白且丧失其功能。换言之，所述的实施方案避免了荧光标记在溶液中的此类漂白和功能丧失。

[0048] 为了在几种结合的分子处改善性的同步掺入几种核苷酸，用切割光的解除阻断步骤应尽可能快速地进行，即使用可能的最高切割光强度。这可以通过用透镜使切割光，优选 UV 光聚焦并且通过移动透镜或基材扫描表面来实现。解除阻断步骤可以在阅读测序步骤后进行。这个阅读可以通过扫描聚焦光束或利用场照明的步进扫描 (step and scan) 进行。还可以将切割光体现为例如 UV 光对于总表面的单次闪烁。考虑到用于测序反应的碱基掺入的反应速率，局部切割光照明时间应例如低于 1 分钟。

[0049] 根据另一个示例性实施方案，该基材包括沿第一方向的几个邻近的结合位置，用于使分子与第一表面结合。该装置进一步配置为通过沿第一方向相对于彼此移动基材和光学组件进行光学扫描。此外，该装置配置为这样进行光学扫描，使得在沿第一方向的移动中每个结合位置首先用具有至少第一波长 λ_{Ex1} 的激发光进行照射，并且随后且其次用切割波长为 λ_{cl} 的切割光进行照射。

[0050] 换言之，存在切割光和激发光的偶联，其提供了同时读出荧光信号和使用切割反应的额外益处，使得可以掺入另外的核苷酸。这以扫描模式完成，所述扫描模式可以提供高局部强度的所用电磁辐射，而无需高功率光源。在这种装置中，切割光和激发光的聚焦光束是有用的。其中可以在阅读测序步骤后进行解除阻断步骤。在一个优选实施方案中，阅读扫描可以通过在单个致动器中集成两个光束与解除阻断扫描偶联。此外，需要时，甚至单个透镜可以用于对齐两个光束。可替代的两个透镜可以在单个阶段中集成，或两个分开阶段可以同步操作。这还可以在步进扫描阅读方法中实现，其中切割步骤也通过照射与激发光源相同的区域在步进扫描模式中进行。

[0051] 需要时，所述的装置配置为在沿基材的一个连续移动中形成此类光学扫描。其中允许重复连续扫描。因此，该装置配置为首先读出第一核苷酸是否掺入分子例如 DNA 片段内，并且其次配置为在先前读出核苷酸掺入分子内的情况下，引起该处的光化学切割反应。

[0052] 根据本发明的另一个示例性实施方案，公开了用于 DNA 测序的光控制，特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的方法。该方法包括下述步骤：提供具有

在基材的第一表面上结合的分子的基材，通过光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光照射基材，并且由此光学激发掺入至基材上的结合的分子中的第一核苷酸的荧光标记。该方法进一步包括通过基材约束激发光的步骤，由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。作为进一步步骤，该方法限定通过光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光。此外，进一步包括通过光学组件用切割波长为 λ_{CL} 的切割光，优选 UV 光照射基材，并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应。方法进一步限定通过基材约束切割波长为 λ_{CL} 的切割光的步骤，由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

[0053] 例如在阻断部分包含荧光标记的情况下，阻断部分和荧光标记可以同时被切掉，或可以在不同步骤中被切掉。

[0054] 换言之，所述的方法提供了激发光的表面选择性照射和切割光的表面选择性照射的方法。因此，所述的方法确保仅掺入核苷酸的荧光标记被光学激发而发出荧光信号，所述核苷酸掺入与基材的第一表面结合的分子中。随后通过光学组件检测仅接近第一表面的荧光标记的此类荧光信号。这提高了被接收并检测的荧光信号的质量。另外，所述的方法确保仅荧光标记从核苷酸处被切掉，所述核苷酸掺入与基材的第一表面结合的分子中。在本文中可以避免装置包含的溶液或其中包含的部分的降解。换言之，可以用于合成过程的核苷酸的有效浓度不会在无意中降低。

[0055] 因此，所述的方法避免溶液中的荧光标记被漂白并丧失其功能。这可以进一步减少测定核酸序列的过程例如 DNA 测序的成本。

[0056] 根据本发明的另一个示例性实施方案，公开了用于光控制 DNA 测序，特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的程序元件，当通过处理器执行时，所述程序元件适合于进行以下步骤：通过光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光照射基材，并且由此光学激发掺入与基材的第一表面结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记，通过基材约束激发光，由此通过基材在基材的第一表面处提供激发光的隐失波，通过光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光，通过光学组件用切割波长为 λ_{CL} 的切割光，优选 UV 光照射基材，并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应，并通过基材约束切割波长为 λ_{CL} 的切割光，由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

[0057] 根据本发明的另一个示例性实施方案，公开了计算机可读介质，在其上存储用于光控制 DNA 测序，特别是用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的计算机程序，当通过处理器执行时，所述计算机程序适合于进行以下步骤：通过光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光照射基材，并且由此光学激发掺入与基材的第一表面结合的分子内的第一核苷酸的荧光标记，通过基材约束激发光，由此通过基材在基材的第一表面处提供激发光的隐失波，通过光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光，通过光学组件用切割波长为 λ_{CL} 的切割光，优选 UV 光照射基材，并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应，并通过基材约束切割波长为 λ_{CL} 的切割光，由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

[0058] 计算机程序元件可以是计算机程序的部分，但它还可以单独作为整个程序。例如，计算机程序元件可以用于更新已经存在的计算机程序以达到本发明。计算机可读介质可以

视为存储介质,例如 USB 棒、CD、DVD、蓝光、数据存储装置、硬盘或任何其他如上所述的程序元件可以存储于其上的介质。

[0059] 本发明的要旨可以视为提供用于测定核酸序列的新方法。因此,测序可以在单一液体中进行并且不需要洗涤步骤。基于因相应配置的基材如线栅对第一激发光和第二切割光的强约束,测序反应可以无需洗涤表面而读出。逐步测序通过使用具有光可切割的阻断部分的核苷酸来实现,所述光可切割的阻断部分附着至溶液中的核苷酸,所述核苷酸掺入与基材的表面结合的分子中。在由使用荧光的激发光读出后,内置或掺入的核苷酸通过穿过相同基材照射切割光而解除阻断。这确保仅结合的核苷酸被解除阻断。换言之,本发明的方法和装置配置为逐步且光学诱导核苷酸的顺序掺入,所述顺序对应于结合的分子的核苷酸序列。此外,该方法和装置配置为逐步且光学读出并测定在结合的分子中掺入的核苷酸序列。此外,本发明的方法和装置配置为基于接收且检测的由各个掺入核苷酸的荧光标记发出的各个荧光来测定掺入核苷酸的序列。

[0060] 根据另一个示例性实施方案,公开了作为 DNA 测序中的阻断部分的部分的用途,其中该部分选自以下一组,所述的组包含硝基苯基乙基衍生物、5- 甲基 (2-(2- 硝基苯基) 丙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物、5- 甲基 (2- 氧代 -1, 2- 二硝基乙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物及其任何组合。

[0061] 在 DNA 测序装置中使用阻断部分 5- 甲基 (2-(2- 硝基苯基) 丙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物具有两个优点。首先,它在光化学切割后产生确定的较少的反应残留部分,导致更纯净的过程。其次,它具有高反应速率。与其他光可切割的分子相比较,新分子是硝基苯基乙基部分的衍生物,导致硝基苯衍生的光产物,其比通过硝基苯基甲基衍生的分子的光化学生成的硝基化合物稳定得多。此外,CO₂ 的生成是有效增加光化学反应速度的驱动力和清洁方式。在 DNA 测序中使用所述阻断部分的另一个优点被反应用以极低切割光强度完成的事实加以证实。这意指在 DNA 测序装置中每个斑点需要的能量可以减少。众多例子随后将在图 7 和图 9 的背景下给出。

[0062] 本发明的这些及其他特点参考下文描述的实施方案将变得显而易见并且得到阐明。

附图说明

- [0063] 本发明的示例性实施方案将在下述附图中描述。
- [0064] 图 1 示意性显示了根据本发明的示例性实施方案的装置。
- [0065] 图 2 示意性显示了根据本发明的示例性实施方案的装置。
- [0066] 图 3a 和 3b 示意性显示了在本发明的示例性实施方案中使用的结合的分子区域中产生隐失波的基材。
- [0067] 图 4 示意性显示了根据本发明的示例性实施方案的装置。
- [0068] 图 5 显示了根据本发明的示例性实施方案的方法的流程图。
- [0069] 图 6 示意性显示了两个阻断部分。
- [0070] 图 7 示意性显示了光化学切割速率的时间过程曲线图。
- [0071] 图 8 示意性显示了光化学切割过程。
- [0072] 图 9 示意性显示了光子转化图。

[0073] 图 10 显示了在本发明的示例性实施方案中使用的 5- 甲基 (2- 氧代 -1, 2- 二硝基乙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物的光化学切割过程。

[0074] 原则上, 相同或相似的部分在图中具有相同的参考符号。

具体实施方式

[0075] 图 1 描述了用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的装置 100。该装置包括基材 101, 用于将至少一种分子 102 结合在基材的第一表面 103 上。在基材 101 的第一表面或前表面 103 上结合的分子 102 可以例如是 DNA 片段。此外, 光学组件 104 显示于图 1 中。图 1 示意性显示了光学组件配置为将具有例如第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光 110 导向基材。此外, 示意性显示了四种不同的核苷酸, 并且用参考标号 109、116、117 和 118 描述。例如, 第一核苷酸 109 显示为胸腺嘧啶, T。核苷酸 109 包含阻断部分 119。此外, 阻断部分 119 包含第一荧光标记 105。以类似方式, 在图 1 中示意性描述了第二核苷酸 116, 由图 1 可以得知其也包含阻断部分 119 和第二荧光标记 106。第三核苷酸 117 也包含阻断部分和第三荧光标记 107。另外, 示意性描述了第四核苷酸 118, 其也包含阻断部分和第四荧光标记 108。然而, 样品 114 可以包含多得多的此类核苷酸, 并且核苷酸 109、116、117 和 118 在此仅作为象征性描述显示。此外, 图 1 显示了溶液 114, 其中包含核苷酸和酶 115。在所示四种核苷酸之一掺入至结合的分子 102 中的情况下, 所述的装置 100 提供了下述优点。光学组件配置为接收且检测由掺入至结合的分子 102 内的第一核苷酸的荧光标记发出的荧光。

[0076] 由图 1 可以进一步得知, 光学组件配置为将切割波长为 λ_{Cl} 的切割光 112 导向基材。这允许光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应, 以从第一掺入核苷酸处切掉各自的荧光波。此外, 基材 101 配置为约束激发光从而产生在基材的第一表面处的激发光的隐失波。此外, 基材还配置为约束切割光从而产生在基材的第一表面处的切割光的隐失波。这还可以见于 3a 和 3b 中。在图 1 的实施方案中, 该基材配置为用于激发光 110 和切割光 112 的线栅 113。因此, 线栅 113 包括规则模式, 例如规则金属线结构。由图 1 可以得知, 在规则模式之间提供了隙状开口, 在所述开口中, 结合的分子 102 固定在基材 101 的第一表面 103 处。此外, 图 1 描述了包含计算机可读介质 121 的处理单元 120, 在所述计算机可读介质 121 上存储了计算机程序元件 122。所述程序元件 122 适合于指导处理单元 120, 以进一步指导装置 100 进行上下文描述的方法, 用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列。图 1 的装置 100 配置为逐步且光学诱导核苷酸 109、116、117、119 的顺序掺入, 所述顺序与结合的分子 102 的核苷酸序列互补。在分子 102 是 DNA 片段的情况下, 由样品 114 包含的核苷酸以对应于分子 102 的核苷酸序列的顺序掺入至分子 102 内。

[0077] 该装置进一步配置为基于接收且检测的由各个掺入核苷酸的荧光标记发出的应答荧光来测定掺入核苷酸的序列。因此, 图 1 所述的装置 100 首先确保仅这样的核苷酸由激发光 110 读出, 所述核苷酸通过使用激发光的隐失波掺入至结合的分子 102 内。其次, 图 1 的装置 100 确保仅结合的核苷酸将通过切割光而解除阻断, 这避免对尚未由分子 102 包含即掺入的核苷酸的解除阻断。因此, 检测的荧光信号 100 可以视为光 111, 其对于核酸序列的测定是高度可靠的。

[0078] 因此, 用图 1 的装置 100 进行的 DNA 测序的成本和速度均得到改善。需要较少的

液体,因为不需要洗涤步骤。图 1 的装置显示测序的简化和成本减少。图 1 所述的装置 100 通过允许不含任何洗涤步骤的基于组装的容易读出,提供新过程组合,意指用单一试剂满足所有阅读。在示例性核苷酸 109、116、117、118 内使用的阻断部分可以例如是光可切割的 3'-解除阻断的可逆终止剂。然而,还可以使用其他阻断部分(使用例如立体阻碍),以达到所需和上述效应。

[0079] 此外,如图 1 中所示的光学组件 104 可以配置为提供具有这样的强度的照射切割光,使得切割反应时间 $t_{\text{切割}}$ 小于第二核苷酸掺入分子 102 内花费的时间。由于切割反应时间 $t_{\text{切割}}$ 取决于照射切割光的强度,图 1 可以提供具有特异性阻断部分的核苷酸和关于切割光强度的光学组件的配置的所选组合。换言之,图 1 的装置的切割光强度这样进行调整,使得对于使用的核苷酸和阻断部分的组合,切割反应时间 $t_{\text{切割}}$ 小于 $t_{\text{掺入}}$ 。

[0080] 需要时,另外或可替代地,装置 100 的下述设置可以提供给用户。停留可以视为在未掺入核苷酸的切割光的斑点中的平均停留时间。光学组件可以进一步配置为提供具有这样的强度的照射切割光,使得 $t_{\text{切割}}$ 小于 $t_{\text{停留}}$ 。因此,不发生由于不希望有的切割反应的游离和未结合核苷酸的降解。因此,通过这样配置装置使得 $t_{\text{切割}}$ 小于 $t_{\text{停留}}$,未掺入的核苷酸受切割影响的概率得到减少或消除。换言之,为了避免批量的切割反应,分子在线栅的隐失场中的平均停留时间应比在相关强度时切割所需的反应时间更少或少得多。对于 25nm 或更少级别的隐失场的深度和 $1e-10m^2/s$ 级别的核苷酸的扩散系数,分子扩散进出隐失场所花费的时间可以估计为 $(5e-8m)^2/1e-10 = 25$ 微秒。基于使结合的分子解除阻断所需的照明时间,可以得出损害的概率。假定照明时间为 0.1 秒,损害的概率将是 1:4000,照明时间为 10 微秒,损害的概率将是 1:400 等等。

[0081] 同样地,总损害与在试剂溶液的总体积中的隐失场的体积分数(volume fraction)成比例。对于 $100 \mu m$ 的室高度,比率为 1:4000。这意指在损害隐失场中的所有分子的最糟的情况下,仅 0.025% 的分子将被损害。对于阅读长度 100,最终溶液中 2.5% 的分子将被损害(最糟的情况),其从测序观点来看仍是可接受的。

[0082] 在下文中,提供了关于使用图 1 的装置以及图 2 的装置 100 的信息。为了改善同步性,解除阻断步骤应尽可能快速进行,即使用可能的最高强度。这可以通过用透镜使 UV 光聚焦并且通过移动透镜或基材扫描表面来实现。解除阻断步骤在阅读测序步骤后进行。这个阅读可以通过扫描聚焦光束或利用场照明的步进扫描进行。在一个优选实施方案中,通过在单个致动器中集成两个光束,甚至可能在单个透镜中通过对齐光束,可以使阅读扫描与解除阻断扫描偶联。可替代地,两个透镜可以在单个阶段中集成,或两个分开阶段可以同步操作。这还可以在步进扫描阅读方法中实现,其中 UV 步骤也通过照明与阅读器相同的场在步进扫描模式中进行。优选实施方案将取决于可用的 UV 光源及其功率。如果有足够的功率可用和 / 或测序表面的面积有限,则还可以设想 UV 对于总表面的单次闪烁。考虑到用于测序反应的碱基掺入的反应速率,局部 UV 照明时间应远低于 1 分钟。

[0083] 图 2 显示了配置为光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的装置 100。类似于图 1,显示了在其上固定即结合多种分子 102 的线栅基材 113。由图 2 可见,规则模式 214 提供了隙状开口 215,其中分子 202 结合在第一表面 203 上。该基材包括沿第一方向 213 的几个邻近的结合位置 209、210、211 和 212,用于使分子与第一表面结合。所述结合位置可以视为可以由相同分子的克隆覆盖的斑点,使得可以增加生成的光信号。基材 101 继

而提供了具有各自不同克隆的此类斑点即此类结合位置的阵列。这可以提高通量。图 1 和 2 的装置 100 均允许仅使用一种液体的 DNA 测序,由此避免提供改变溶液液体的洗涤步骤的需要。此外,光学组件 104 包括五种不同的光源 201 至 205。光源 201 至 204 可以视为激发光源,用于提供如先前描述的四种不同的激发波长 λ_{Ex1} 至 λ_{Ex4} 。光源 205 提供了具有波长 λ_{CL} 的切割光。例如,光源 205 可以发出 UV 光。参考数字 206 象征性描述了转换装置,其允许光学组件 104 在五种波长 λ_{Ex1} 至 λ_{Ex4} 和 λ_{CL} 之间转换。此外,由所述光源 201 至 205 中的至少一种发出的光导向偏振滤光片 200。此外,显示了分色镜 207,其朝向基材 101 传播光源 201 至 205 发出的光。在荧光标记已通过激发光(波长 λ_{Ex1} 至 λ_{Ex4} 中的至少一种)的隐失波激发后,由一种或多种荧光标记发出的荧光光子被导向分色镜 207,并导向荧光检测器 208。由图 2 可见,光学组件 104 可以沿方向 213 进行扫描。因此,图 2 的装置 100 配置为通过沿第一方向 213 相对于彼此移动基材 101 和光学组件 104 进行光学扫描。因此,该装置允许这样进行光学扫描,使得每个结合位置首先用激发光进行照射,并且随后且其次在沿第一方向 213 的移动中用具有切割波长的切割光进行照射。使用切割光的解除阻断步骤因此可在阅读激发的掺入核苷酸的荧光后进行。

[0084] 图 3a 和 3b 显示了体现为线栅 113 的基材 101。可以体现为规则金属线的规则模式 214 提供了四个隙状开口 215,在其中固定分子 112。如箭头所示,激发光 110 和切割光 112 导向朝着基材的第二表面的基材。第二表面相对于结合了分子的第一表面 103。因此,线栅从背部进行照明。此外,图 3a 和 3b 显示几个未结合的核苷酸 109 存在于溶液中,其随后可以掺入至第一表面上结合的分子 102 内。图 3a 和 3b 描述了在金属结构之间的隐失波 300,所述金属结构的尺度小于光束的波长的光学分辨率。隐失波在图 3b 中以对应于场强等级的亮度等级进行描述。图 3b 显示了用 TE 偏振光照明的线栅的电磁场强度。高亮度表示高强度,低亮度表示低强度。本文所述的基材可以示例性用于图 1 和 2 的装置以及图 4 的装置中。然而,应当指出通过隐失波的表面约束可以以本领域技术人员已知的其他方式实现。

[0085] 还可以使用全内反射,以便在本发明的这个或任何其他实施方案中提供隐失波。

[0086] 图 4 显示了用于连续扫描基材 101 的装置 100。装置 100 提供了具有用于发出激发光的光源 400 的光学组件 104。借助于可以旋转的彩色滤光片 401,可以提供不同的激发波长。另外,提供切割光源 402。存在光引导部件 403、404,以便将光导向各自的光学元件 405、406。可以看出,分开的透镜和光学通道用于激发光和切割光。然而,需要时,它还可以与两种光源的光路组合。图 4 中所示的光学组件 104 允许基材 101 和光学组件 104 之间沿着方向 407 相对移动。

[0087] 图 4 还可以包括分色镜,其配置为传播激发光且配置为反射由使用的荧光标记发出的荧光。此外,该基材可以配置为仅传播第一偏振光,并配置为反射与第一偏振垂直偏振的第二偏振光。偏振滤光片配置为仅传播第一偏振光。图 4 的装置配置为生成描述核酸序列的数据,所述核酸基于由装置光控制的光学逐步反应掺入至结合的分子内。

[0088] 图 5 显示了用于光控制迭代逐步反应以通过合成测定核酸序列的方法的流程图。该方法包括在步骤 S1 中提供基材的步骤,所述基材具有在基材的第一表面上结合的分子。步骤 S2 显示了通过经由光学组件用具有至少第一激发波长 λ_{Ex1} 的激发光照射基材,并且由此光学激发掺入至基材上的结合的分子中的第一核苷酸的荧光标记。此外,步骤 S3 描述

了通过基材约束激发光的步骤,由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。步骤 S4 公开了通过光学组件接收且检测第一掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光。步骤 S5 描述了通过光学组件用切割波长为 λ_{cl} 的切割光,优选 UV 光照射基材,并且由此光学诱导在第一掺入核苷酸处的光化学切割反应。此外,在步骤 S6 中,提供了通过基材约束切割波长为 λ_{cl} 的切割光,由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

[0089] 通过重复所述的方法步骤 S1 至 S6,用户能够测定已掺入至与基材的第一表面结合的分子内的核酸序列。因此,在步骤 S1 至 S6 后,需要时,用户可以进行下述步骤。将第二核苷酸掺入至基材的第一表面处结合的分子内,随后在其掺入分子后第二核苷酸阻断酶的活性。同样可以进行通过光学组件用激发光照射基材,并且由此光学激发第二掺入核苷酸的荧光标记。通过基材约束激发光,由此通过基材在基材的第一表面处提供激发光的隐失波是这个第二循环的进一步步骤。随后可以进行接收且检测第二掺入核苷酸的激发荧光标记的荧光的步骤。同样可以进行通过光学组件用切割光,优选 UV 光照射基材,并且由此光学使用在第二掺入核苷酸处的光化学切割反应。另一个步骤用于通过基材约束切割光,由此通过基材在基材的第一表面处提供切割光的隐失波。

[0090] 图 6 显示了“Sequencing technologies, the next generation”, by Michael L. Metzker, Nature Genetics 11(2010) 31 的阻断部分。首先使用 3’- 阻断可逆终止剂,并且其次使用 3’- 解除阻断的可逆终止剂。第二类是非常有利的,因为在这种情况下,核糖单元的 3’ 位置是解除阻断的,并且下一个核苷酸的掺入被大体积基团阻止,所述大体积基团还含有附着至在核糖单元的 5’- 位置处的碱基配对部分的荧光标记,如图 6 所示。

[0091] 本发明可以使用线栅技术,并且解除阻断步骤用例如 365nm 的偏振 UV 光完成。因此,在这个解除阻断步骤后,使用偏振光内置下一个标记核苷酸并且通过扫描线栅进行检测,使得仅检测在表面处的 DNA 片段处的标记核苷酸。在这完成后,再次通过提供使用 UV 光的解除阻断步骤,可以内置并检测下一个标记核苷酸等等。为了该过程正常运行,可能需要 :1. 光可切割的 3’- 解除阻断的可逆终止剂,与 3’ 阻断变体一样,3’- 阻断基团 (-N3 或 -CH2) 的去除必须同相完成。2. 光切割反应应快于通过聚合酶的新核苷酸掺入。与我们随后所述的阻断部分 (参见图 8 至 10) 相比较,由 Metzker 等人发明的所谓的 3’-OH 解除阻断的终止剂,即 2- 硝基苄基烷基化 HOMedU 三磷酸盐,对于这个目的可能比较慢。

[0092] 图 7 显示了使用终止剂聚合酶掺入 BODIPY-FL 标记的引物 -1/ 寡核苷酸模板 -4 复合物内的 dU. I-dU. V 的光化学切割速率的时间过程曲线图。图 7 得自 V. A. Litosh, W. Wu, B. P. Stupi, J. Wang, S. E. Morris, M. N. Hersh 和 M. L. Metzker, “Improved nucleotide selectivity and termination of 3’-OH unblocked terminators by molecular tuning of 2-nitrobenzyl alkylated HOMedU triphosphates”, Nucl. Acids Res, 第 36 卷, 第 6 期, 2011, E39。由该图 7 明确可见,光切割效应发生的时间尺度为 10 秒的数量级。或如这些作者所推断:“所有 5-(2- 硝基苄氧基) 甲基 -dUTP 类似物在叠氮化物溶液中暴露于具有约 0.7W/cm² 强度的 365nm UV 光 60 秒内,均实现了 100% 效率的光化学切割”。重要的是,这些作者还发现即使在暴露于具有高达 1W/cm² 强度的 365nm UV 光 150 分钟后,终止剂聚合酶也继续显示良好活性。

[0093] 然而,这个光切割化学反应慢于我们使用不同阻断部分发现的光切割化学反应。我们的方法可以改善我们提出的非循环反应。注意 Metzker 等人的化学反应中所需的光强

度为 $1\text{W}/\text{cm}^2$, 其换算为 $10\text{nW}/(\mu\text{m})^2$ 。我们已使用用部分作为 DNA 测序中的阻断部分的化学反应, 其中该部分是硝基苯基乙基的衍生物。例如, 5- 甲基 (2-(2- 硝基苯基) 丙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物具有两个优点。首先, 它在光化学切割后产生确定的较少的反应残留部分, 导致更纯净的过程。其次, 如我们独立测定的, 它具有更高的反应速率 (参见图 9)。

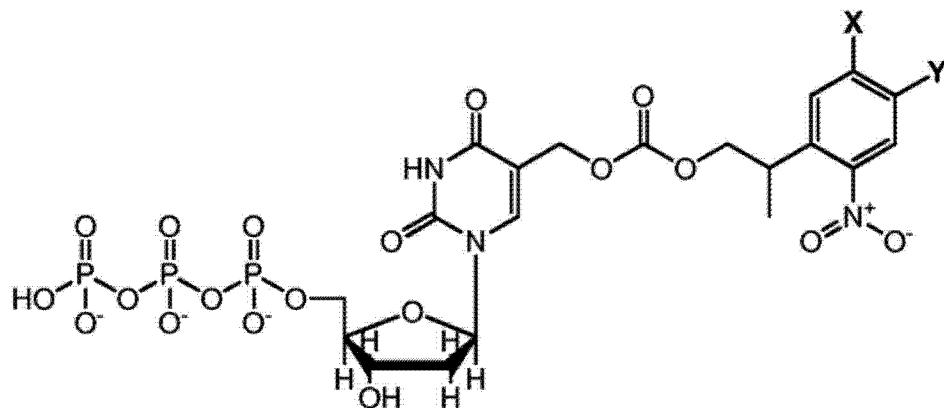
[0094] 与由 Metzger 描述的光可切割的分子相比较, 新分子是硝基苯基乙基部分的衍生物, 导致硝基苯衍生的光产物, 其比通过 Metzger 的硝基苯基甲基衍生的分子的光化学生成的硝基化合物更稳定。此外, CO_2 的生成是有效增加光化学反应速度的驱动力和清洁方式。我们的化学反应的另一个优点通过下述事实加以证实: 从光化学观点看来非常类似于图 8 的分子的化合物 101 的光化学切割反应使用在 10cm 处产生 $4\text{mW}/\text{cm}^2$ 的 PL10 灯在 30 分钟内完成。化合物 101 在图 9 中的底部处描述。关于数据还参见图 9。因此, 反应比上文引用的参考文献的化合物的例子更慢完成, 但强度低 250 倍。这意指每个斑点需要的能量低 50 倍。

[0095] 图 9 显示了化合物 101 在 365nm 光下的光转化效率 (我们的数据)。注意在 UV 吸收 1 小时后, 光谱从蓝色变为粉红色光谱。B) 根据在 365nm 处的激发, 通过在 319nm 处出现的光谱峰的光化学反应的进化图。注意在乙醇中的这个数据显示通过用在 10cm 处的 PL10 灯激发, 进化在 30 分钟后完成 (并且在 20 分钟后 80% 完成), 所述 PL10 灯相当于 $4\text{mW}/\text{cm}^2$ 的能量。

[0096] 硝基化合物的可能替代物是图 10 中所示的“5- 甲基 (2- 氧代 -1, 2- 二硝基乙基) 碳酸酯 -dUTP 类似物”, 其还显示出有效的光化学切割。需要时, 它们还可以用作本发明的任何实施方案中的阻断部分。

[0097] 此外, 下述化合物可以用作根据本发明的阻断部分:

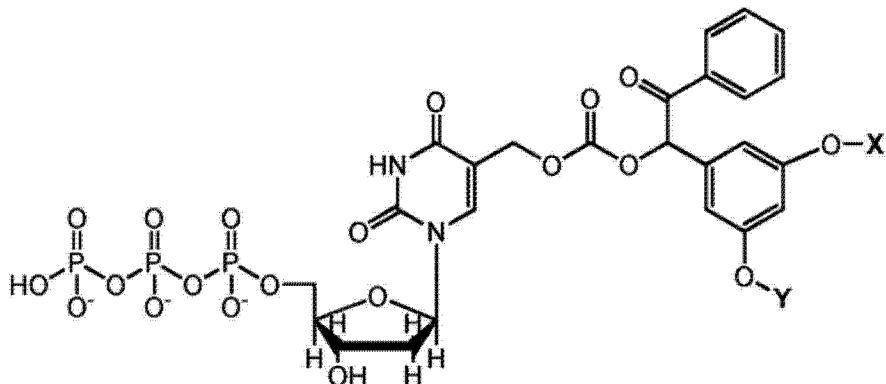
[0098]



[0099] 下述变体也可以用作根据本发明的阻断部分: 具有下式的化合物 1: $X = O(\text{CH}_2)_nZ$, 其中 n 是 1 至 18 的整数, 或 $X = O(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{CH}_2Z$, 其中 n 是 1 至 20 的整数, $Z = \text{H}$ 或连接至荧光部分的接头, 和 $Y = (\text{CH}_2)_nA$, 其中 n 是 0 至 18 的整数, 或 $Y = O(\text{CH}_2)_nA$, 其中 n 是 1 至 18 的整数, 或 $O(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{CH}_2A$, 其中 n 是 1 至 20 的整数, $A = \text{H}$ 或连接至荧光部分的接头, 在这样的组合中, 基团 A 或 Z 中的至少一种具有连接至荧光部分的接头。

[0100] 此外, 下述化合物可以用作根据本发明的阻断部分:

[0101]



[0102] 其中 X 和 Y 独立地是 $(\text{CH}_2)_n\text{Z}$, 其中 n 是 1 至 18 的整数, 或 $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{CH}_2\text{Z}$, 其中 n 是 1 至 20 的整数, Z = H 或连接至荧光部分的接头, 在这样的组合中, 基团 X 或 Y 中的至少一种具有基团 Z, 所述基团 Z 具有连接至荧光部分的接头。

[0103] 根据附图、公开内容和所附权利要求的研究, 公开实施方案的其他变化可被实践本发明的技术人员理解且实现。在权利要求中, 单词“包括”不排除其他元件或步骤, 并且不定冠词“一个”或“一种”不排除复数。单个处理器或其他单元可以完成在权利要求中所述的几个项目或步骤的功能。某些测量在相互不同的从属权利要求中叙述的这一事实不表明这些测量的组合不能被有利地使用。计算机程序可以在合适介质上存储 / 分布, 所述合适介质例如连同其他硬件一起供应或作为其他硬件的部分供应的光存储介质或固态介质, 但也可以以其他形式分布, 例如经由因特网或者其他有线或无线远程通信系统。权利要求中的任何附图标记不应解释为限制权利要求的范围。

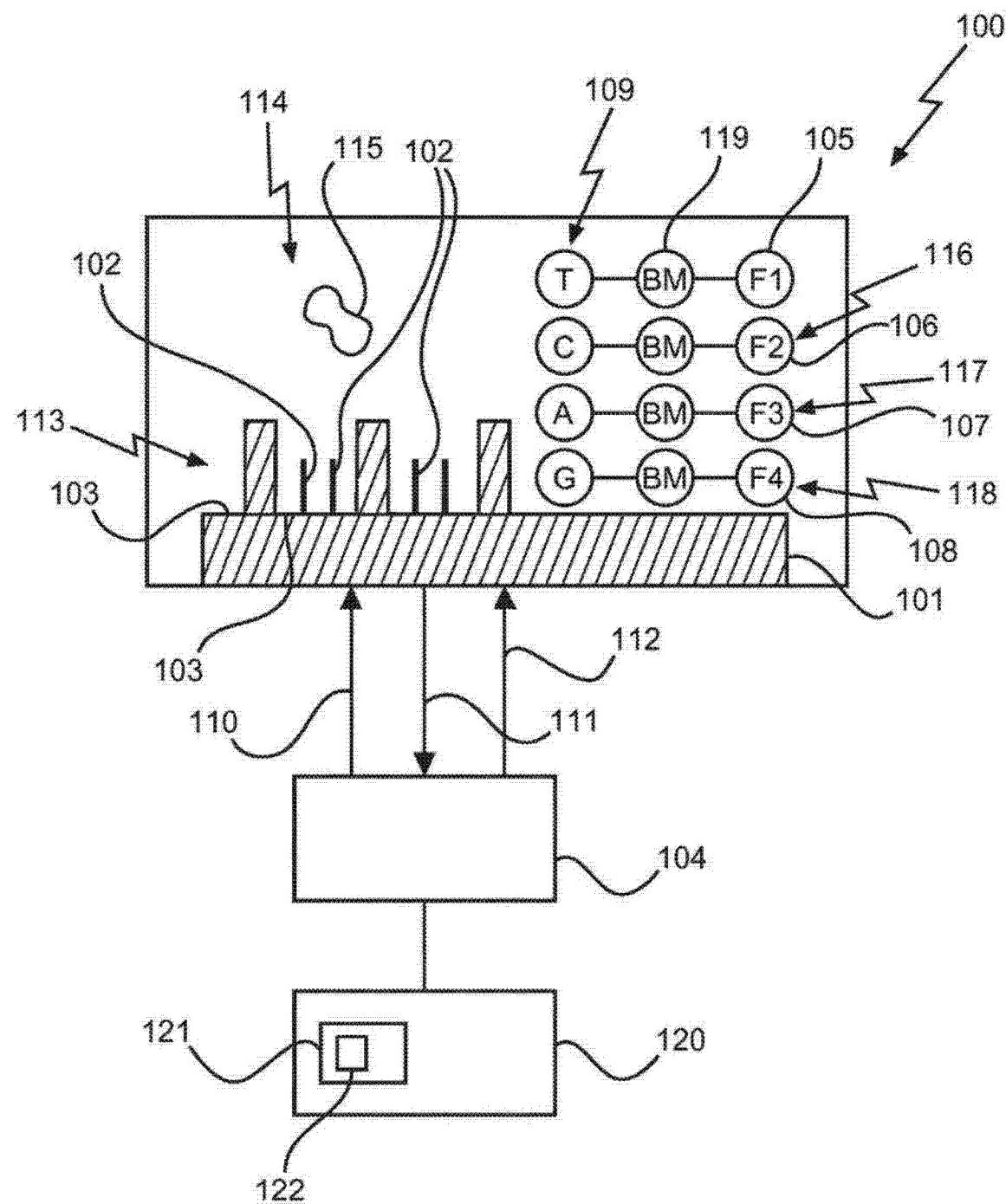


图 1

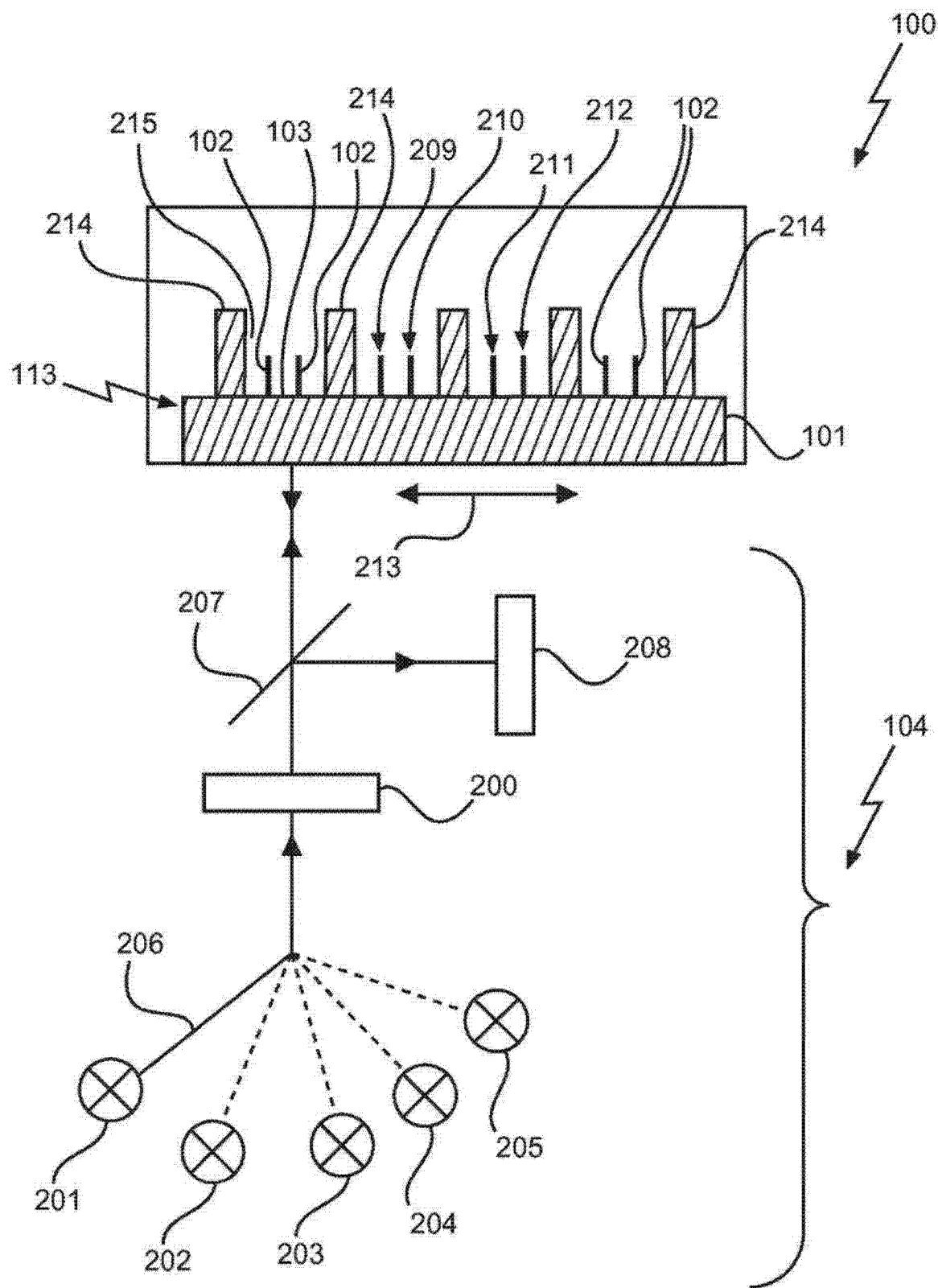


图 2

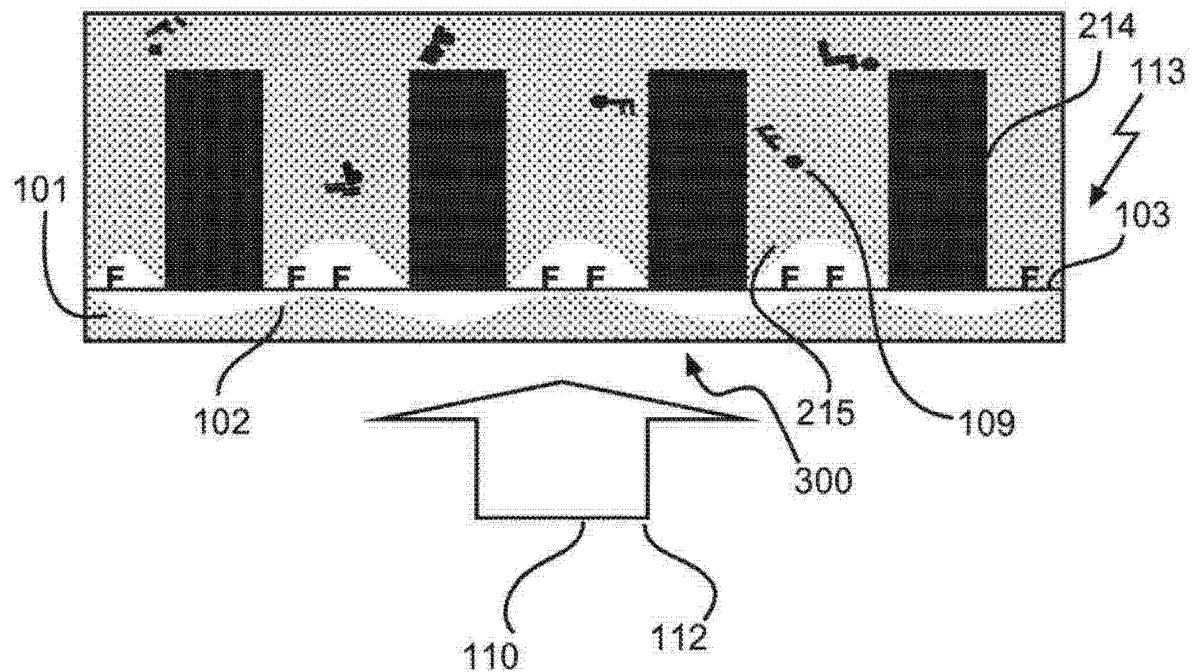


图 3a

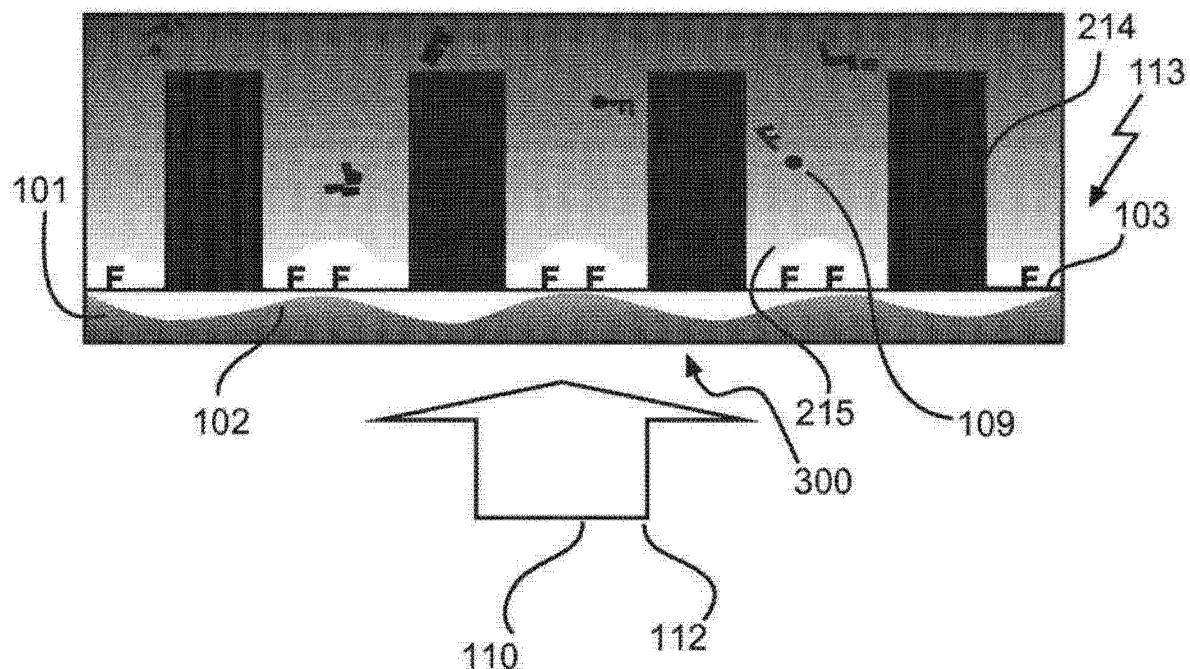


图 3b

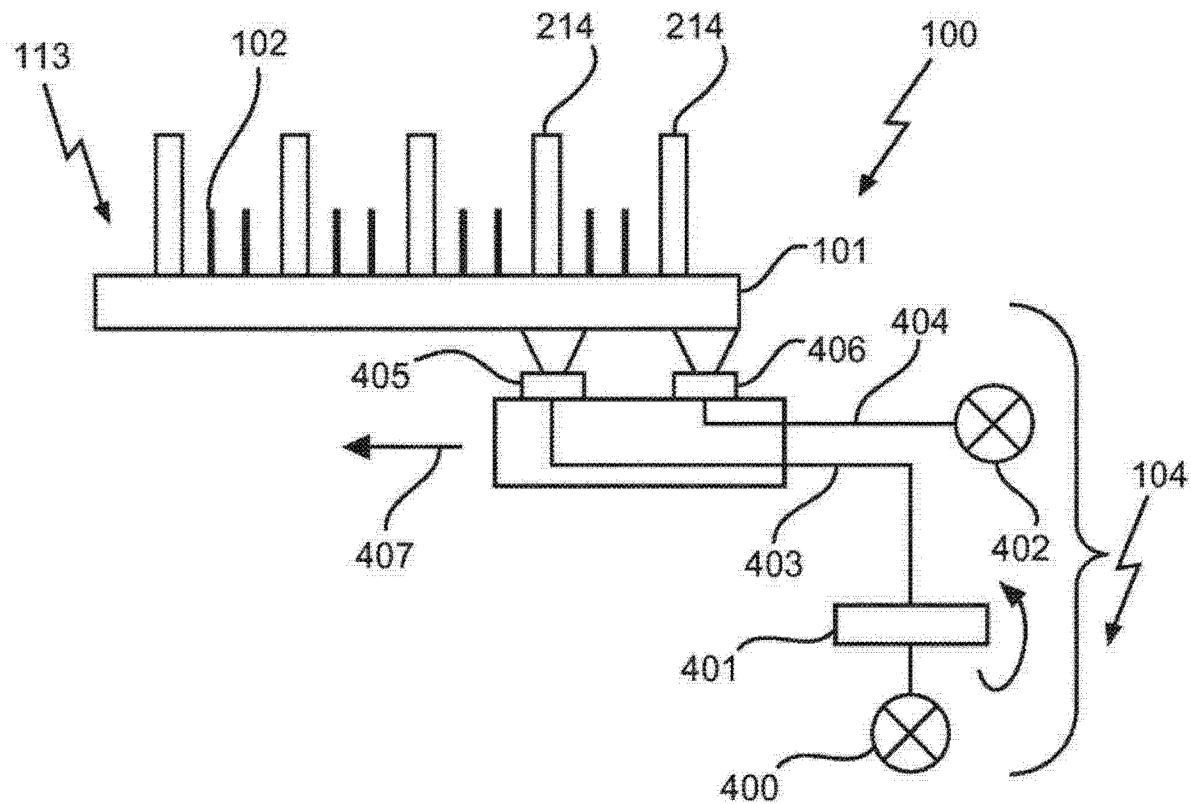


图 4

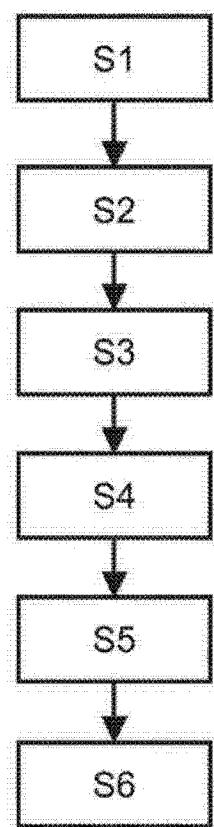


图 5

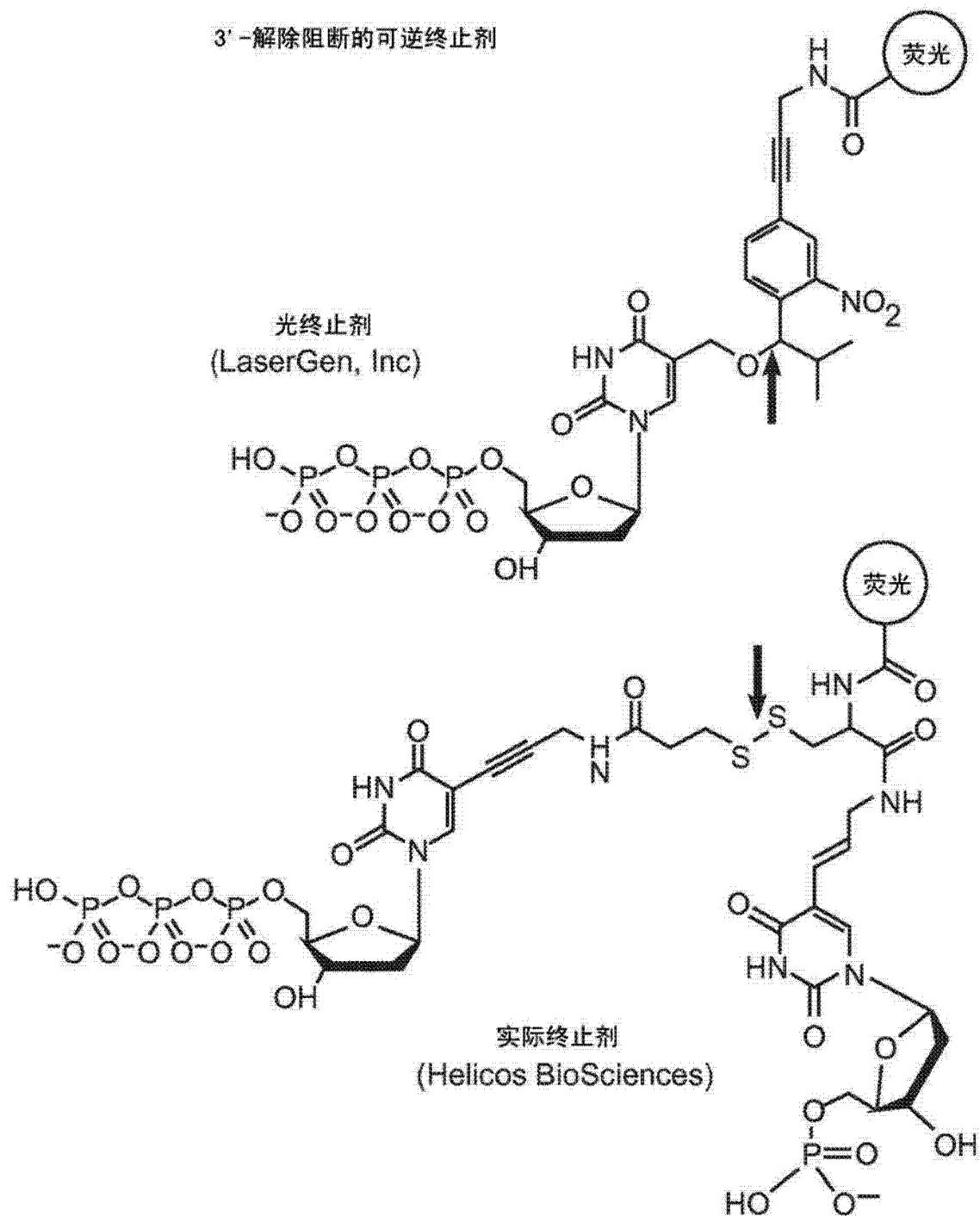


图 6

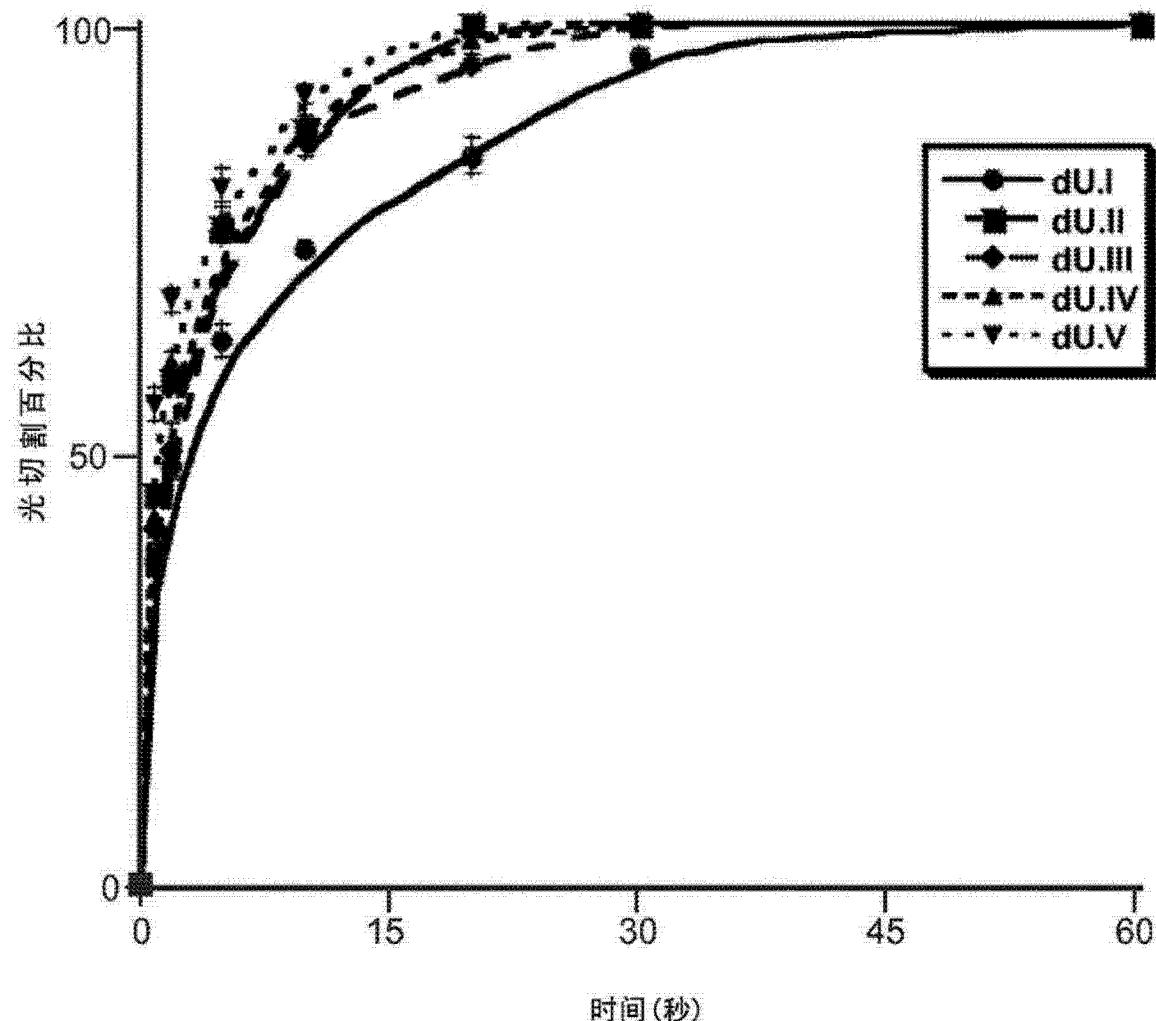


图 7

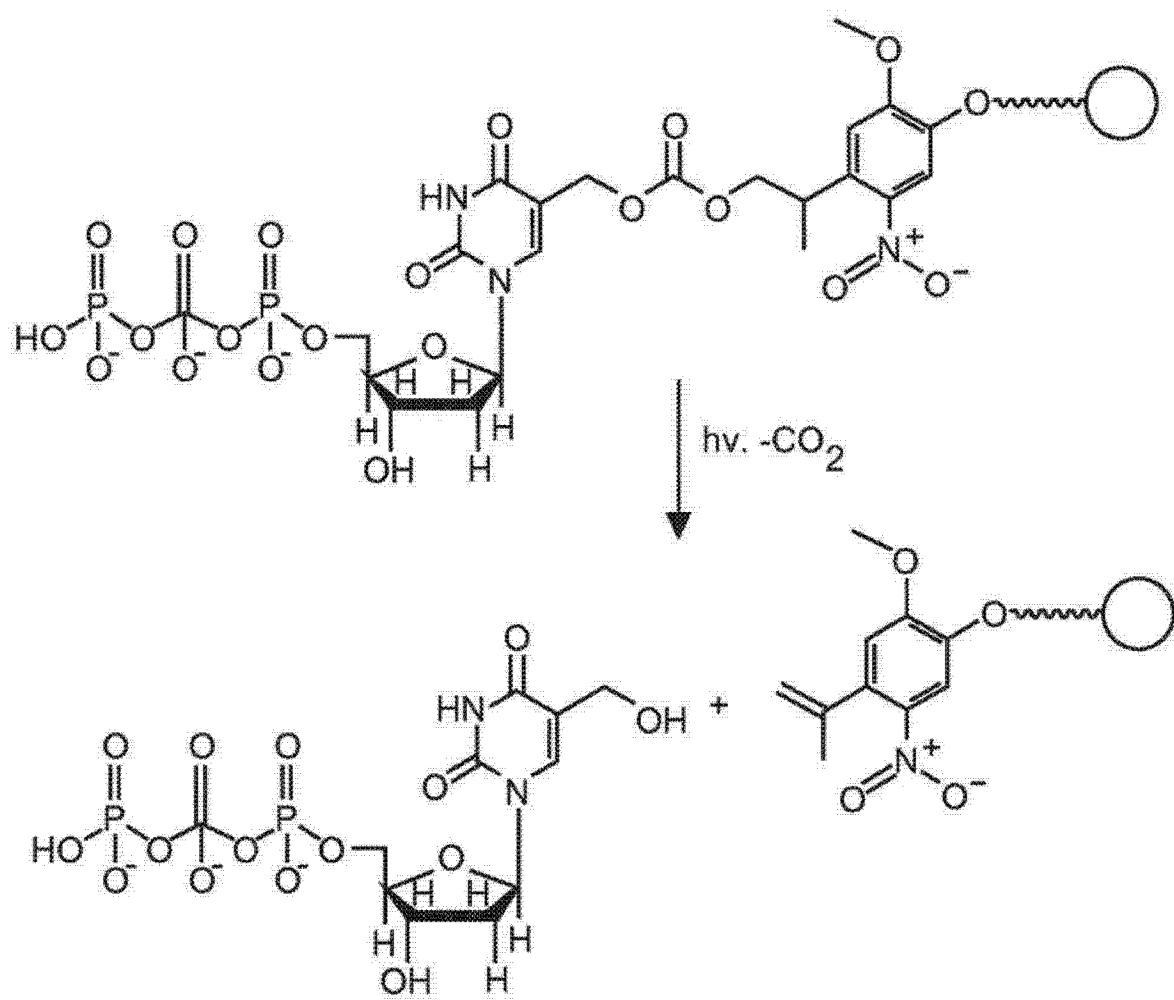


图 8

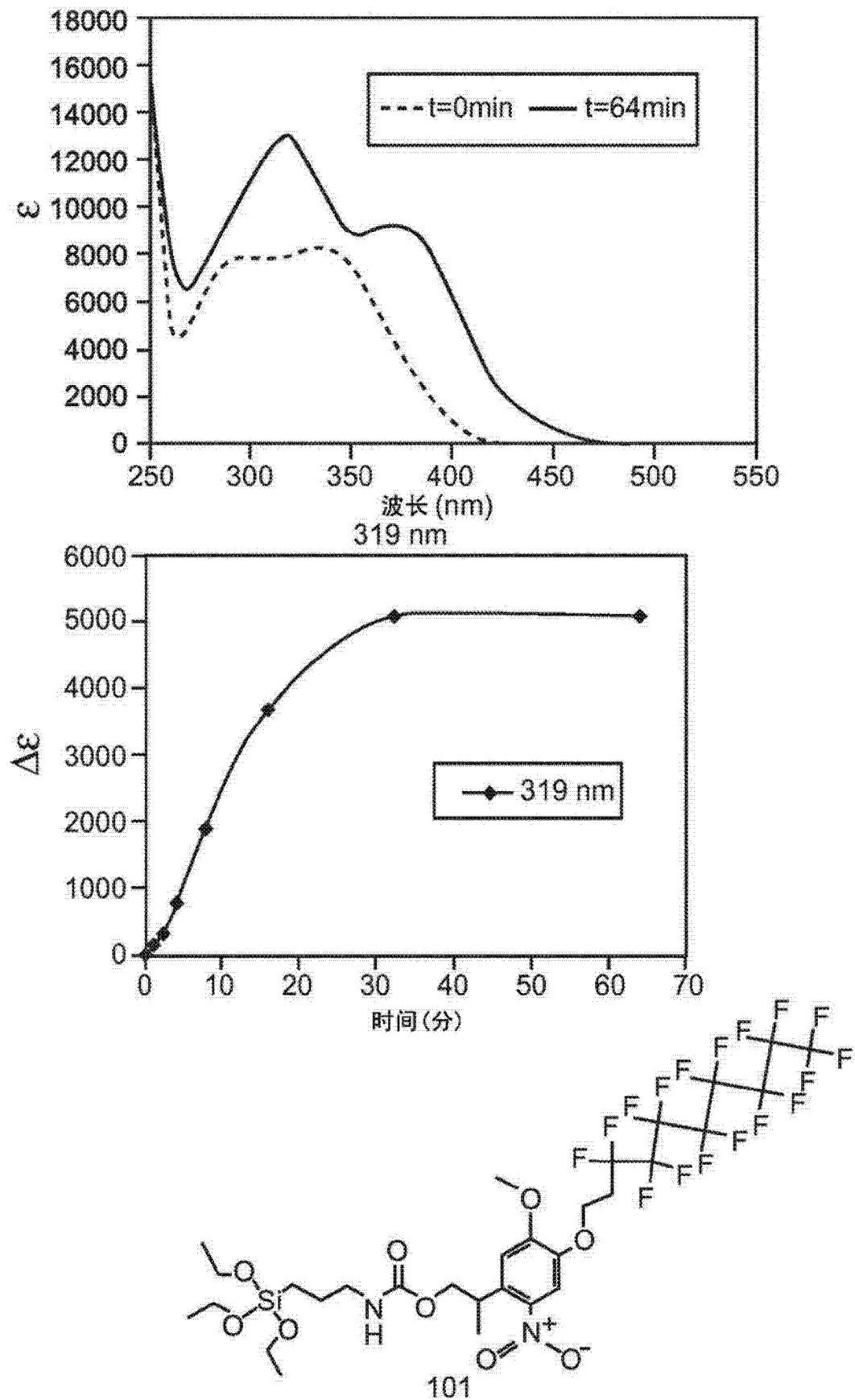


图 9

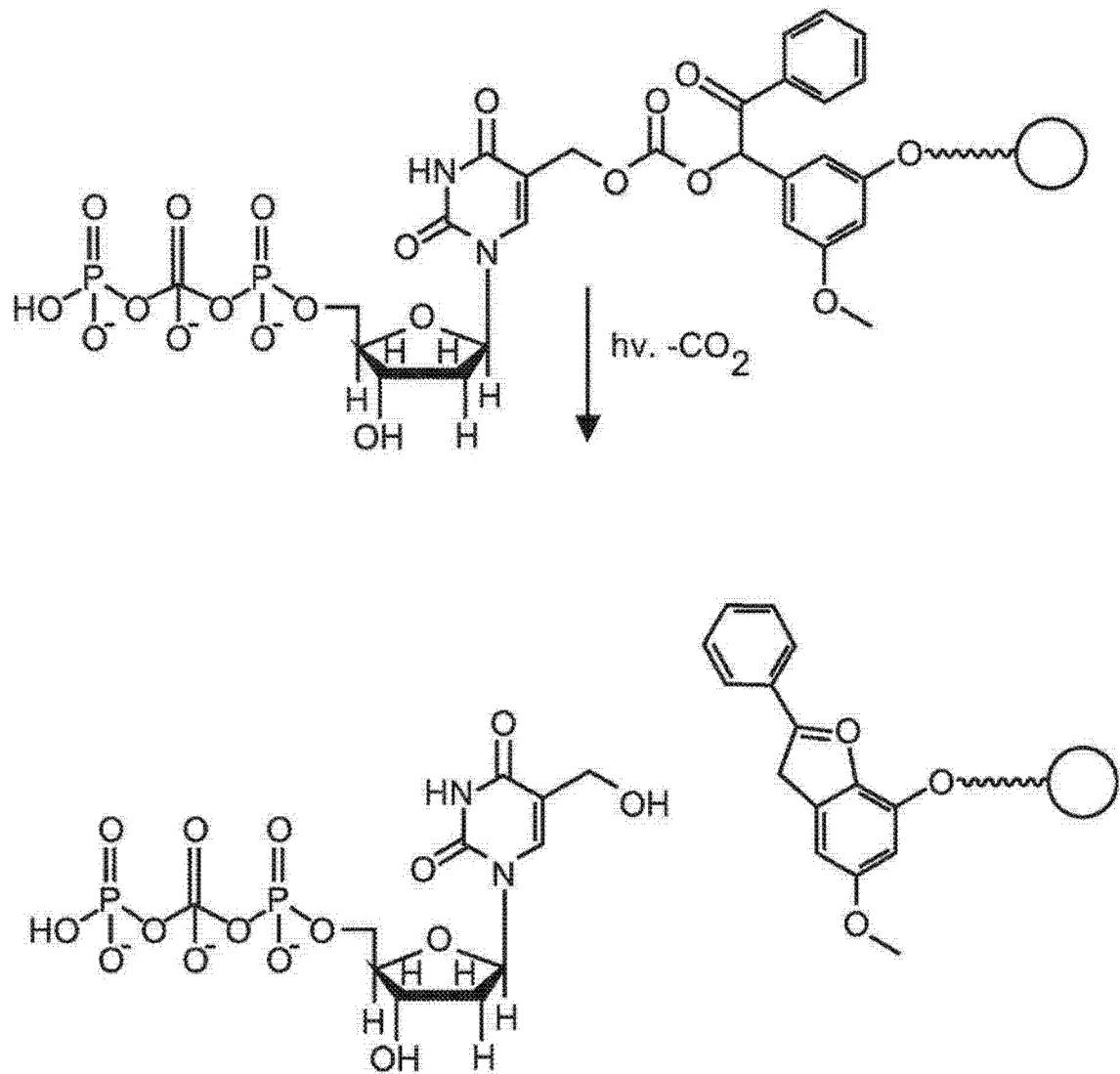


图 10