



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104379762 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 24

(21) 申请号 201280072351. 2

(22) 申请日 2012. 02. 03

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2014. 10. 08

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/AU2012/000089 2012. 02. 03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02013/113054 EN 2013. 08. 08

(73) 专利权人 皮罗比特私人有限公司
地址 新加坡新加坡市

(72) 发明人 约翰·科比特 老约翰·科比特

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 樊戎

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2011011823 A1, 2011. 02. 03,

WO 2011011823 A1, 2011. 02. 03,

WO 2004046719 A1, 2004. 06. 03,

WO 2004046719 A1, 2004. 06. 03,

审查员 吴希哲

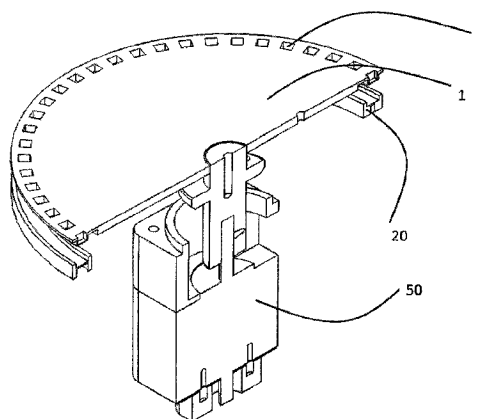
权利要求书2页 说明书19页 附图12页

(54) 发明名称

用于核酸测序的可旋转平台

(57) 摘要

本发明涉及用于进行核酸测序的方法和装置。该方法包括：提供一平台，该平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的凹槽；在每个凹槽中提供至少一个支持表面，其中，支持表面适用于固定第一结合配偶体或选择性地结合第二结合配偶体。该方法还包括：将第一或第二结合配偶体结合或固定在支持表面上，并从平台外的位置向每个凹槽中注入试剂，在注入步骤之后，平台被充分旋转，使得任何残留的或未反应的试剂基本上从每个凹槽和/或每个支持表面上被离心去除，在旋转过程中，每个支持表面保留在各个凹槽中。本发明还涉及进行核酸测序的试剂盒和试剂盒的用途。特别地，本发明主要开发用于通过焦磷酸测序进行核酸测序，然而本发明不限于该领域。



1. 一种多核苷酸分子的焦磷酸测序方法,所述方法包括以下步骤:

提供一可旋转平台,所述可旋转平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的开口槽,所述开口槽被成形为或设计为使得沉积其中的试剂能够通过所述平台的充分旋转而被从所述开口槽中以离心方式甩下所述平台;

在每个所述开口槽中提供至少一个所述支持表面,所述支持表面为磁粒的形式,其中,所述支持表面适用于固定多核苷酸分子或已有多核苷酸分子固定其上;

可选地,将多核苷酸分子固定在所述磁粒上;

将寡核苷酸引物退火为所述多核苷酸分子的单链;

从所述平台外的位置向每个所述开口槽中依次注入一系列焦磷酸测序试剂,其中,在一个或多个所述注入步骤之后,所述平台被充分转动,使得任何残留的或未反应的所述试剂从每个所述开口槽中被离心甩下所述平台,其中,在旋转过程中,每个所述磁粒被通过磁力吸引保留在各个所述开口槽中;

在各个所述开口槽中鉴定焦磷酸盐的存在;和

重复所述注入和鉴定步骤,从而对所述多核苷酸分子测序。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括以下步骤:将磁体设于距所述平台足够近,以在所述平台的旋转过程中将所述磁粒通过磁力吸引保持在所述开口槽中。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述磁体为磁板或磁环的形式。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述磁板或磁环还适用于加热所述凹槽至150℃,进而加热所述磁粒。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括步骤:在所述平台的旋转过程中采用电磁铁将所述磁粒通过磁力吸引保留在所述凹槽中。

6. 根据前述权利要求任一项所述的方法,其特征在于,所述平台为圆形,且2-500个开口槽分布在所述圆形的平台的圆周上。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述平台的直径为50-500mm,所述平台的厚度为1-6mm。

8. 根据前述权利要求6所述的方法,其特征在于,所述开口槽的容积在0.5-100μL之间,或者所述开口槽的深度为0.5-5mm,或者所述开口槽被设计为容纳1-50个磁粒。

9. 根据前述权利要求任一项所述的方法,其特征在于,所述平台由塑料材料制成,所述塑料材料选自聚碳酸酯、聚苯乙烯、耐冲性聚苯乙烯、聚乙烯和聚丙烯,或者,所述平台由玻璃或石英制成。

10. 根据前述权利要求任一项所述的方法,其特征在于,所述多核苷酸分子化学吸附在各个所述磁粒上,或者共价地、或离子地或成氢键地连接在所述磁粒上,或者范德瓦尔斯力将所述多核苷酸分子固定在所述磁粒上。

11. 根据前述权利要求任一项所述的方法,其特征在于,所述焦磷酸测序试剂选自一种或多种酶,底物,A、T、G和/或C核苷酸或相应的合适核苷酸类似物,洗涤试剂,以及冲洗试剂。

12. 根据前述权利要求任一项所述的方法,其特征在于,所述旋转所述可旋转平台的步骤按照以下方式执行:以400-1000转/分钟的速度转动所述可旋转平台,从而以离心方式从所述凹槽去除所述试剂,所述方法还包括:注入所述试剂时以10至200转/分钟的速度转动

所述可旋转平台。

13. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 还包括步骤: 振动所述平台, 从而将所述试剂和所述磁粒充分混合在一起。

14. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 所述多核苷酸分子为DNA或RNA及其修饰形式。

15. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 所述多核苷酸分子是生物素化的, 且所述磁粒包括抗生物素蛋白或链霉亲和素或用于结合所述生物素化的多核苷酸分子的类似物。

16. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 所述注入一系列焦磷酸测序试剂包括两种方式中的一种:

- a.) 将每种核苷酸或其类似物以任何合乎需要或预定的顺序单独并且依次地添加,
- b.) 将A+T+G+C核苷酸或这些核苷酸的任何预定或合乎需要的亚组作为混合物添加, 并且可选地重复添加一次或多次。

17. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 所述在各个所述开口槽中鉴定焦磷酸盐的存在, 包括检测每个所述开口槽中的光信号。

18. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 所述多核苷酸分子为双链多核苷酸分子, 所述方法还包括在所述退火之前变性所述双链多核苷酸分子。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其特征在于, 所述变性包括加热所述双链多核苷酸分子以实现变性, 或使所述双链多核苷酸分子暴露于升高的pH。

20. 根据前述权利要求任一项所述的方法, 其特征在于, 还包括步骤: 采用洗涤试剂和可选的酶处理洗涤所述开口槽。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其特征在于, 所述洗涤步骤在一个或多个注入步骤之后进行。

22. 根据权利要求11所述的方法, 其特征在于, 所述酶包括DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶和腺苷三磷酸双磷酸酶中的一种或多种。

23. 根据权利要求11所述的方法, 其特征在于, 所述底物包括腺苷5'磷酸硫酸盐(APS)和/或荧光素。

用于核酸测序的可旋转平台

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于进行实验的方法和装置。本发明尤其涉及一种能够用来进行实验,特别是多步骤实验的可旋转平台。本发明主要被设计用来在采用焦磷酸测序(pyrosequencing)对核酸测序时使用,并且将在本申请的下文中进行描述,但是本发明并不局限于该特定的应用领域。

背景技术

[0002] 下面关于现有技术的讨论用于将本发明置于一个合适的技术环境中,并使其优点能够更全面地被理解。但是,应当知道的是,说明书中任何现有技术的描述都不应当被理解为明示或暗示的承认该现有技术是广泛已知的或者组成本领域的公知常识的一部分。

[0003] 在最近时期,确定DNA核苷酸序列的能力越来越重要。以前,两种最主要的用来DNA测序的方法是酶链终止法(enzymatic chain-termination method)和化学裂解法(chemical cleavage technique),这两种方法都依赖于凝胶电泳将一个较大的DNA片段分解为DNA碎片(按照其大小)。电泳步骤和分离的DNA碎片的检测是非常繁琐的过程。然而,虽说自动电泳装置可以商业获得,但是电泳并不是很适合需要高通量的相对划算的装置的大规模基因工程或者临床测序。因此,非常需要非电泳测序方法。

[0004] 基于检测聚合酶反应中产生的无机焦磷酸盐的概念的测序方法已被公开(见公开号为W0 93/23564和W0 89/09283的国际专利申请)并且通常被称为焦磷酸测序。聚合酶反应过程中,当每个核酸被添加到增长的核酸链上时,会释放焦磷酸盐分子。人们已经发现,在这些环境下释放的焦磷酸盐能够采用酶检测,例如,通过荧光素-荧光素酶反应中产生的光检测。这些方法使得靶位的碱基被标记并使得DNA被简单快速地测序,同时不需要电泳和使用有害的放射性同位素标记。

[0005] 早期用于进行测序的方法使用0.2mL的微量离心管(或类似物),试剂被顺序添加到离心管中,以检测离心管中的DNA的顺序。虽然该方法相对简单,但是该方法的缺点是读长短,这是因为反应被每次添加核苷酸试剂稀释和/或反应副产物积聚,反应条件达到反应不再进行的地步。例如,采用该方法通常只能对约80个碱基进行可靠地测序。

[0006] 使用焦磷酸测序的商业设备同样被研发出来。这些系统使用流动池(flow cells)对目标DNA/RNA分子进行杂交。通常通过固定一个双链DNA并使互补链变性而将单链DNA固定在设于流动池中的静止的珠子上。试剂,包括核苷酸(A、G、C、或T)流过该珠子,如果掺有核苷酸将会检测到光。光信号的强度与单一反应中掺入的核苷酸的数量成比例。在两次将珠子暴露于不同的核苷酸之间会进行洗涤步骤,然后重复该过程以检测下一核苷酸的掺入。

[0007] 还已知有其他合成测序方法,例如采用荧光标记核苷酸测序。在该方法中,DNA样本先分裂,DNA双螺旋线化为单链。单DNA分子在流动池中的表面被捕获,并作为合成测序方法的模板。荧光标记核苷酸一次一个添加并通过DNA聚合酶掺入增长的互补链中。未利用的核苷酸被洗掉。当采用激光照射时,可以检测到掺入的核苷酸发出的光。荧光标记在下一个

核苷酸被添加继续循环之前被去除。跟踪核苷酸掺入确定每个单独的DNA分子的准确顺序。

[0008] 已知的还有连接法测序(sequencing by ligation)。该DNA测序方法采用DNA连接酶来识别DNA序列的给定位置的核苷酸。DNA连接酶的错配灵敏度被用来确定目标DNA分子的潜在顺序。参见例如美国专利US5,750,341和US 4,883,750。

[0009] 需要这样一种进行实验和分析的装置,该装置能够在多种化学和检测方法中使用,特别是进行包含多步骤反应和洗涤步骤的实验中,例如核酸测序中使用。此外,所需要的是能够用来简单替换需要流通环境的实验,或者替换固定的反应锅实验的装置,在这些实验中,在核酸测序时产生的副产品限制了最大测序读长。

[0010] 本发明的目的在于克服或改善前述现有技术的至少一个缺点或者提供一种有用的替代方案。

发明内容

[0011] 本发明涉及一种方法,该方法使用具有至少一个用于容纳支持表面的凹槽的可旋转平台并在每个所述凹槽中装载至少一个所述支持表面。所述支持表面适用于结合或固定第一和第二结合配偶体对中的第一或第二结合配偶体。所述第一和第二结合配偶体对是实验的组成部分,该实验优选为核酸测序,更优选为焦磷酸测序。用于实验的试剂从所述平台外的位置注入所述凹槽中,并与所述支持表面接触。所使用的试剂能够通过所述平台的旋转以离心方式被去除,而所述支持表面在离心过程中保留在所述凹槽中。任何用于保留所述支持表面的方法都落入本发明的范围内,仅通过示例的方式,所述支持表面优选为磁珠,并且,磁铁被用来在离心过程中将磁珠保留在所述凹槽内。在焦磷酸测序的环境下,优选地,所述单链DNA(ssDNA)通过离心洗涤步骤分离。在每次新添加试剂之后或者多次添加之后,可以将试剂去除。离心洗涤步骤干燥了所述支持表面并使其为后续试剂做好准备,还从实验中去除了不想要的副产物。本发明还涉及用于旋转所述平台并将所述支持保留在各个凹槽中的装置,以及包括平台和支持表面的试剂盒。

[0012] 根据第一方面,本发明提供了一种用于进行核酸测序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0013] 提供一平台,所述平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的凹槽;

[0014] 在每个所述凹槽中提供至少一个所述支持表面,其中,所述支持表面适用于固定第一结合配偶体;

[0015] 将所述第一结合配偶体结合或固定在所述支持表面上;以及

[0016] 从所述平台外的位置向每个所述凹槽中注入试剂,其中,在所述注入步骤之后,所述平台被充分旋转,使得任何残留的或未反应的所述试剂基本上从每个所述凹槽和/或每个所述支持表面上被离心去除,其中,在旋转过程中,每个所述支持表面保留在每个所述凹槽中。

[0017] 优选地,所述核酸测序为焦磷酸测序。

[0018] 所述支持表面为磁粒的形式,且所述磁粒通过这样的方式磁力吸引保留在所述凹槽中:通过将磁铁设于距所述平台足够近,从而在所述平台的旋转过程中将所述磁粒通过磁力吸引保持在所述凹槽中。优选地,所述磁铁为磁板或磁环的形式,设于所述平台下方。在优选的实施例中,所述磁板或磁环还适用于加热所述凹槽至约150℃,进而加热所述支持

表面。但是,在可选的实施例中,在所述平台的旋转过程中采用电磁铁将所述磁粒通过磁力吸引保留在所述凹槽中。

[0019] 在一些优选实施例中,所述平台基本上为圆形的,且所述凹槽绕所述圆形的平台的圆周分布。优选地,约2-500个凹槽绕所述平台的圆周分布,所述平台的直径为约50-500mm,所述平台的厚度为约1-6mm。优选地,所述凹槽的容积为约0.5-100 μ L或所述凹槽的槽深为0.5-5mm。优选地,所述凹槽被制作为能够容纳约1-50个分立的支持表面。

[0020] 在一个可选的实施例中,所述凹槽包括用于在所述平台的旋转过程中容纳所述支持表面的凹口,其中,所述凹口包括过滤器,所述过滤器适用于在所述平台的旋转过程中保留所述支持表面而让所述试剂通过,使得任何残留的或未反应的所述试剂基本上从每个所述凹槽和/或每个所述支持表面上离心去除。

[0021] 优选地,所述平台由塑料材料制成,所述塑料材料选自聚碳酸酯、聚苯乙烯、耐冲击性聚苯乙烯、聚乙烯和聚丙烯,或者所述平台由玻璃或石英制成。优选地,所述平台的圆周上设有用于容纳所述平台在旋转过程中抛出或离心出的废液的水槽。优选地,所述平台的圆周上还设有用于接收废液的槽,所述废液在所述平台的转动过程中从所述平台甩离或离心下来。

[0022] 优选地,所述第一结合配偶体化学吸附在所述支持表面上,或者共价地、或离子地或成氢键地连接在所述支持表面上,或者范德瓦尔斯(*van der Waals*)力将所述第一结合配偶体固定在所述支持表面上。

[0023] 优选地,一系列试剂被注入所述凹槽中,所述一系列试剂中的第一个包括针对第一结合配偶体的第二结合配偶体,并且后续的试剂选自洗涤和/或冲洗试剂、和用于产生可检测的信号试剂。优选地,本发明的方法还包括在每个所述注入步骤中和/或之后分析所述核酸测序的步骤。

[0024] 优选地,本发明的方法还包括步骤:以约10至200转/分钟的速度转动所述可转动平台,同时注入所述试剂,以大于400转/分钟的速度转动所述可转动平台,从而基本上以离心方式从所述凹槽去除所述试剂。优选地,所述平台以足够低的速度旋转,使得在所述注入步骤中没有试剂从所述凹槽中离心去除,所述平台以足够高的速度旋转使得试剂在所述清洗或干燥步骤中,从所述凹槽中离心去除。优选地,所述足够高的速度大于400rpm,可以为1000、2000、3000、4000rpm或更高。

[0025] 在一些优选实施例中,所述平台充分振动,从而将所述试剂和所述支持表面充分混合在一起。

[0026] 根据第二方面,本发明提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:一平台,所述平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的凹槽;和至少一个所述支持表面,其中,所述支持表面适用于固定第一结合配偶体。优选地,所述支持表面包含在所述凹槽内,其中,可拆装的一次性板附着在所述平台的表面,从而将所述支持表面保留在所述凹槽中。优选地,所述试剂盒包括一种或多种用于进行核酸测序的试剂,特别是焦磷酸测序的试剂。

[0027] 根据第三方面,本发明提供了一种用于进行核酸测序的装置,所述装置包括:

[0028] 用于以预定的可控的用户可选择的转动速度转动可旋转平台的装置;

[0029] 用于将磁铁与所述可旋转平台结合,以将磁粒保留在所述平台的凹槽中的装置;

[0030] 可选地,用于将第一结合配偶体注入所述凹槽中以将所述第一结合配偶体固定到

所述磁粒上的装置；

[0031] 用于将试剂注入所述凹槽的装置；以及

[0032] 可选地，用于注入洗涤试剂的装置。

[0033] 根据第四方面，本发明提供了一种用于进行核酸测序的方法，所述方法包括以下步骤：

[0034] 提供一平台，所述平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的凹槽；

[0035] 在每个所述凹槽中提供至少一个所述支持表面，其中，所述支持表面适用于固定第二结合配偶体；

[0036] 选择性地所述第二结合配偶体结合或固定在所述支持表面上；以及

[0037] 从所述平台外的位置向每个所述凹槽中注入试剂，其中，在所述注入步骤之后，所述平台被充分旋转，使得任何残留的或未反应的所述试剂基本上从每个所述凹槽和/或每个所述支持表面上被离心去除，其中，在旋转过程中，每个所述支持表面保留在每个所述凹槽中。

[0038] 优选地，第一结合配偶体化学吸附在所述支持表面上，或者共价地、或离子地或成氢键地连接在所述支持表面上，或者范德瓦尔斯力将所述第一结合配偶体固定在所述支持表面上。而所述第二结合配偶体与已经连接在所述支持表面上的所述第一结合配偶体是可结合的或可反应的。

[0039] 优选地，一系列试剂被注入所述凹槽中，所述一系列试剂中的第一个包括针对第一结合配偶体的第二结合配偶体，并且后续的试剂选自洗涤和/或冲洗试剂。

[0040] 根据第五方面，本发明提供了一种试剂盒，所述试剂盒包括：一平台，所述平台具有至少一个用于容纳一个或多个支持表面的凹槽；和至少一个所述支持表面，其中，所述支持表面适用于选择性地结合或固定第二结合配偶体。

[0041] 根据第六方面，本发明提供了一种用于进行核酸测序，例如焦磷酸测序的装置，所述装置包括：

[0042] 用于以预定的可控的用户可选择的转动速度转动可旋转平台的装置；

[0043] 用于将磁铁与所述可旋转平台结合，以将磁粒保留在所述平台的凹槽中的装置；

[0044] 可选地，用于将所述第二结合配偶体注入所述凹槽中以选择性地所述第二结合配偶体固定到所述磁粒上的装置；

[0045] 用于将试剂注入所述凹槽的装置；以及

[0046] 可选地，用于注入洗涤试剂的装置。

[0047] 根据第七方面，本发明提供了一种用于进行核酸链测序的方法，所述方法包括以下步骤：

[0048] 提供一平台，所述平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的凹槽；

[0049] 在每个所述凹槽中提供至少一个所述支持表面，其中，所述支持表面适用于固定核酸链结合配偶体；

[0050] 将所述核酸链结合配偶体结合或固定在所述支持表面上，然后选择性地所述核酸链结合或固定到所述支持表面；

[0051] 可选地，变形并去除任何互补核酸链，在所述支持表面上退火测序引物；以及

[0052] 从所述平台外的位置向每个所述凹槽中依次注入一系列试剂，所述一系列试剂包

括A、T、G和/或C核苷酸或者相应的合适核苷酸类似物,其中,在每个或任何的所述接触步骤之后充分转动所述平台,使得任何残留的或未反应的所述试剂基本上从每个所述凹槽和/或每个所述支持表面上被离心去除,

[0053] 其中,在旋转过程中,每个所述支持表面保留在每个所述凹槽中。

[0054] 优选地,所述核酸链为DNA或RNA及其修饰形式。优选地,所述核酸链测序为焦磷酸测序。

[0055] 优选地,所述核酸链是生物素化的,且所述核酸链结合配偶体包括抗生物素蛋白或链霉亲和素或用于结合所述生物素化的核酸链的类似物。

[0056] 优选地,每个所述支持表面依次地与包含A、T、G和/或C核苷酸的一系列试剂接触。

[0057] 优选地,所述依次接触步骤或者包括:

[0058] a.)将每种核苷酸或其类似物以任何合乎需要或预定的顺序单独并且依次地添加,

[0059] b.)将A+T+G+C核苷酸或这些核苷酸的任何预定或合乎需要的亚组作为混合物添加,并且再次添加所述混合物及其他。

[0060] 优选地,所述方法还包括在每个所述注入步骤中和/或之后分析所述核酸链的步骤。优选地,所述分析包括通过使光输出与已经同所述核酸链结合的核苷酸的数目相关联而检测所述核酸链中的下一个碱基对。

[0061] 优选地,所述变性步骤包括加热所述核酸链以实现变性,或使所述核酸链暴露于升高的pH。

[0062] 优选地,所述方法包括以下步骤:在所述核酸链变性后,用冲洗试剂通过冲洗步骤去除互补链。

[0063] 优选地,通过以下方式将每个所述支持表面为每种所述后续试剂做好准备:通过转动所述平台以离心方式去除任何残余试剂而基本上干燥所述支持表面,使得基本上不存在所述凹槽被试剂污染的情况。

[0064] 根据第八方面,本发明提供了一种进行核酸链测序的试剂盒,所述试剂盒包括:一可旋转平台,所述平台具有至少一个用于容纳一个或多个支持表面的凹槽;和至少一个支持表面,其中,所述支持表面适用于固定核酸链结合配偶体。

[0065] 根据第九方面,本发明提供了第八方面提供的用于进行核酸链测序的试剂盒的用途。优选地,所述测序为焦磷酸测序。

[0066] 根据第十方面,本发明提供了一种用于进行核酸链测序的装置,所述装置包括:

[0067] 用于以预定的可控的用户可选择的转动速度转动可旋转平台的装置;

[0068] 用于将磁铁与所述可旋转平台结合,以将磁粒保留在所述平台的凹槽中的装置;

[0069] 可选地,用于将核酸链结合配偶体注入所述凹槽中以将所述核酸链结合配偶体固定到所述磁粒上的装置;

[0070] 可选地,用于将核酸链注入所述凹槽,以选择性地将所述核酸链固定到所述磁粒上的装置;

[0071] 可选地,用于变性和可选地用于去除任何互补核酸链的装置;

[0072] 用于将A、T、G和/或C核苷酸或它们各自的类似物或它们的结合注入所述凹槽的装置;

[0073] 用于注入洗涤试剂的装置;以及

[0074] 可选地,用于注入一种或多种酶溶液的装置。

[0075] 根据第十一方面,本发明提供了一种用于进行核酸链测序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0076] 提供一平台,所述平台具有至少一个用于容纳至少一个支持表面的凹槽;

[0077] 在每个所述凹槽中提供至少一个所述支持表面,其中,所述支持表面适用于选择性地固定核酸链;

[0078] 将核酸链选择性地结合或固定到所述支持表面;

[0079] 可选地,变性并去除任何互补核酸链,在所述支持表面上退火测序引物;以及

[0080] 从所述平台外的位置向每个所述凹槽中依次注入一系列试剂,所述一系列试剂包括A、T、G和/或C核苷酸或者相应的合适核苷酸类似物,其中,在每个或任何的所述接触步骤之后充分转动所述平台,使得任何残留的或未反应的所述试剂基本上从每个所述凹槽和/或每个所述支持表面上被离心去除,

[0081] 其中,在旋转过程中,每个所述支持表面保留在每个所述凹槽中。

[0082] 优选地,所述支持表面上已固定有核酸链结合配偶体,所述核酸链选择性地与所述核酸链结合配偶体结合。优选地,所述核酸链是DNA或RNA或它们的修饰形式。优选地,所述核酸链是生物素化的,且所述第一结合配偶体包括抗生物素蛋白或链霉亲和素或用于结合所述生物素化的核酸链的类似物。

[0083] 根据第十二方面,本发明提供了一种试剂盒,包括:一可旋转平台,具有至少一个用于容纳一个或多个支持表面的凹槽;和至少一个支持表面,其中,所述支持表面适用于选择性地固定核酸链。

[0084] 根据第十三方面,本发明提供了第十二方面提供的试剂盒用于进行核酸链测序的用途。

[0085] 根据第十四方面,本发明提供了一种进行核酸链测序的装置,所述装置包括:

[0086] 用于以预定的可控的用户可选择的转动速度转动可旋转平台的装置;

[0087] 用于将磁铁与所述可旋转平台结合,以将磁粒保留在所述平台的凹槽中的装置;

[0088] 可选地,用于将核酸链注入所述凹槽中以将所述核酸链固定到所述支持表面上的装置;

[0089] 可选地,用于变性和可选地用于去除任何互补核酸链的装置;

[0090] 用于将A、T、G和/或C核苷酸或它们各自的类似物或它们的结合注入与所述支持表面接触的装置;

[0091] 用于注入洗涤试剂的装置;以及

[0092] 可选地,用于注入一种或多种酶溶液的装置。

[0093] 在一些实施例中,所述可旋转平台包括复数个较浅的槽,所述槽的容积为约0.5-100 μ L,或者槽深为约0.5-5mm。在另一些实施例中,所述凹槽相对较深,为约5-8mm,以容纳其自身适用于固定第一结合配偶体或适用于选择性地固定第二结合配偶体的磁珠。在该例子中,磁珠可以被理解为分离的区域,一个或多个磁珠可以容纳在各个凹槽中。

[0094] 所述第一或第二结合配偶体优选可结合到珠子上,优选为磁珠。可以理解,如果采用磁珠,凹槽具有足够的深度和容积,以容纳磁珠,使得不会在圆盘/平台的旋转过程中离

心移走。在优选的实施例中，系统具有通过将磁性环状圆盘提升至所述样品圆盘/平台的下方，或者激活电磁铁而将磁珠捕获在各个凹槽中的能力。在该例子中，磁珠可以被包含在所述凹槽中，足够的离心力可以通过旋转平台施加，从而基本上将珠子从周围的试剂中干燥。还可以理解的是，所述平台可以包括复数个同轴设置的环形凹槽阵列。在一些实施例中，所述第一结合配偶体化学吸附在珠子或粒子的表面。在另一些实施例中，所述第一结合配偶体共价地、或离子地或成氢键地连接在珠子或粒子的表面上。在又一些实施例中，范德瓦尔斯力将所述第一结合配偶体固定在珠子或粒子的表面上。可以理解，第二结合配偶体与已经连接在珠子或粒子的表面上的所述第一结合配偶体是可结合的或可反应的。

[0095] 本发明尤其涉及方法和实验，比如核苷酸测序方法，例如焦磷酸测序。例如，所述第一和第二结合配偶体为结合配偶体对(可选地，其中一个可以是可检测的被标记)，它们优选选自抗生物素蛋白或链霉亲和素或用于结合所述生物素化的核酸链的类似物。

[0096] 然而，如下文进一步描述的，本发明的优点是提供较快速和较简单的洗涤步骤，并且洗涤溶液和试剂的浪费量小。

[0097] 本发明现在将在焦磷酸测序的背景下解释，然而可以理解本发明不限于这种实验。

[0098] 可以理解在第一实施例中，保留在所述凹槽中的支持表面适用于固定第一结合配偶体，所述第一结合配偶体可以是例如抗生物素蛋白或链霉亲和素或链霉抗生物素蛋白变体(streptactin)或类似物，并且随后，所述抗生物素蛋白或链霉亲和素或链霉抗生物素蛋白变体(streptactin)或类似物可以在后续处理步骤中依次与生物素化的DNA反应。可以进一步理解的是，在第二实施例中，该支持表面已经包含第一结合配偶体，并且该支持表面适用于选择性固定第二结合配偶体。因此，可以进一步理解，第一实施例的支持表面可以认为是‘非官能化的’，而第二实施例的支持表面可以认为是‘官能化的’或‘预官能化的’。

[0099] 优选地，所述一系列试剂的第一个包含针对第一结合配偶体的第二或互补结合配偶体，并且后续的试剂选自洗涤或冲洗试剂，并且如下文进一步讨论。

[0100] 优选地，本发明的方法还包括在每个所述接触或注入步骤中和/或之后分析所述核酸测序的步骤。在优选的实施例中，在后续的试剂接触所述支持表面之前，每个所述支持表面会经过采用洗涤试剂的洗涤或冲洗步骤。洗涤试剂可以是任何能够基本上洗掉前面的接触步骤中的任何残留溶液或者减少任何残留溶液的量并且成分存在于所述溶液中的试剂(活性剂，例如，三磷酸腺苷双磷酸酶或其他合适的可以降解副产物或减少副产物的浓度的酶)。

[0101] 尽管该洗涤试剂可以任何试剂，所述试剂可以基本上洗去来自先前接触步骤的任何残余溶液或减少任何残余溶液及下述组分的量，其中所述组分存在于所述溶液中并且可以是活性物质，如腺苷三磷酸双磷酸酶，然而在其他实施方式中，用于除去过多核苷酸的洗涤步骤优选地不含腺苷三磷酸双磷酸酶，如Mashayekhi F.和Ronaghi M., Analysis of read-length limiting factors in pyrosequencing chemistry(焦磷酸测序化学中读出长度限制性因素的分析), Anal. Biochem. (分析生物化学)(2007), 363(2):275-287中详述，所述文献通过引用的方式完整并入本文。如Mashayekhi等人中详述，已经显示用腺苷三磷酸双磷酸酶洗涤步骤替换所述洗涤步骤改善了焦磷酸测序法的读出长度。

[0102] 优选地，当注入核苷酸试剂和酶时，所述可旋转平台1低速旋转，例如以约10-

200rpm之间的速度旋转,从而不会将添加到靶位点的试剂去除,而在加入洗涤试剂的同时,所述可旋转平台1高速旋转,例如以约400-4000rpm之间的速度旋转。但是,可以理解,也可以采用其他旋转速度。

[0103] 在优选地实施例中,通过以下方式将每个所述支持表面为每种所述后续试剂做好准备:通过转动所述平台以离心方式去除任何残余试剂而基本上干燥所述支持表面,使得基本上减少优选不存在所述凹槽被在先的试剂污染的情况。

[0104] 根据本发明的另一方面,本发明提供了平台和支持表面的组合用于进行实验的用途。根据本发明的又一方面,本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包括如前所述的平台以及一个或多个支持表面,还可选地包括一种或多种用于所述实验的试剂。

[0105] 优选地,所述用于旋转所述平台的装置为电机,所述预定的转动速度为用户可选的且为约10-5000rpm。所述装置还优选配置有真空抽取系统,用于抽取从所述可旋转平台甩出的废剂。

[0106] 本发明将以焦磷酸测序的环境下进行解释,但是,可以理解的是,本发明并不限于这种实验。

[0107] 焦磷酸测序

[0108] 优选地,所使用的所述核酸测序方法为焦磷酸测序。但是,可以理解的是,也可以采用其他核苷酸链测序方法,将在下文中进一步描述。

[0109] 优选地,所述核苷酸链为DNA或RNA及其修饰形式,例如经由亚硫酸氢盐处理或涵盖天然存在的核酸中不存在的另外的碱基。可以理解,核酸链的副本停留在一个或多个分立区域的每个区域上。

[0110] 优选地,所述可旋转平台基本上呈圆形,且直径为约50-500mm。优选地,所述可旋转平台包括约2-500个凹槽,这些凹槽从所述可旋转平台的中心等间隔布置。可以理解的是,该直径可以是任意直径,并且可以选择该直径以容纳凹槽的数目,所述数目可以在数字上是1或更大。在优选的实施方式中,所述凹槽基本上均匀地分布或位于可旋转平台的周界周围以形成基本上环形的阵列。

[0111] 优选地,所述凹槽包含支持表面,可以为珠子的形式,优选为磁珠,磁珠适用于选择性结合、捕获或固定核酸链(例如,测序模板或测序引物)。例如在一些优选的实施方式中,所述核酸链是生物素化的,并且所述分立区域包含抗生物素蛋白,并优选地包含链霉亲和素或类似物,用于固定生物素化的核酸链。备选地,所述支持表面或珠子适用于结合、捕获或固定抗生物素蛋白和优选地链霉亲和素,并且在后续步骤中,将生物素化的核酸链选择性固定至与所述支持表面结合的抗生物素蛋白/链霉亲和素。然而,可以理解,其他化学可用于固定核酸链至分立区域。本发明不限于可以用来固定核酸链至分立区域的化学。在其他实施例中,模板结合剂可以为例如配体结合、通用引物/探针或抗体。

[0112] 在一个实施例中,凹槽可以为浅槽,浅槽的容积可以在约0.5-100 μ L之间。可以理解,浅槽可以是任意形状的,也可以具有任意体积。在一些实施例中,凹槽的直径为约1-5mm。但是,容易知道,凹槽可以具有任意直径或形状。

[0113] 优选地,所述可旋转平台便利地由塑料材料制成,然而,技术人员会理解其他材料是可能的,如玻璃或石英。优选地,塑料材料选自聚碳酸酯、聚苯乙烯或聚丙烯。还构思该可转动平台还可能是层压结构。无论制成可转动平台的材料是什么,该平台必须能够耐受转

动而不变形,并且潜在地耐受用于使核酸变性的热效应,如下文进一步讨论。

[0114] 在一些优选的实施方式中,所述可转动平台(其可以是基本上圆形的盘),还包含布置在所述平台圆周处的用于接收废液的槽,所述废液从所述可转动平台的表面在其转动期间甩离或离心下来。可以理解一旦焦磷酸测序反应的每个步骤或众多步骤完成,应当移去凹槽中的未使用或废弃试剂以实现长的读出长度。通过转动可转动平台产生离心力引起废液从该平台甩离,并且为了改善废液处置,提供槽。可选地,废弃试剂可以每隔比如说20、30、40或50轮核苷酸添加或恰好在试剂变得充分稀薄从而抑制反应之前从该平台甩离。

[0115] 在这个实施方式中,可以理解随着额外的焦磷酸测序试剂添加至凹槽中并且随即在每个焦磷酸测序反应结束后从平台甩离,可转动平台的总质量会增加。因此,在备选实施方式,可能合乎需要的是,可转动平台不包括槽并且可转动平台位于其内部的壳应当设置成具有邻近该平台周边布置的槽,从而在所述‘静止的’槽中接住在所述转动平台转动过程中从其表面甩离的废液。

[0116] 熟悉焦磷酸测序背后的技术和化学的技术人员会理解固定至支持表面的核酸链可能需要变性以移走互补性核酸链。变性可以通过任何方法实现,然而,优选的实例包括加热凹槽和支持表面或甚至整个可转动平台至足以变性的温度,例如94至99℃,或通过使支持表面暴露于加热至超过94℃的溶剂如缓冲液。可选地,支持表面可以暴露于变性组合物(例如,包含NaOH的组合物)。其他方法包括通过红外辐射或等效辐射加热。可以理解可旋转平台应当由能够耐受此类变性条件的材料制成。

[0117] 也可能使可旋转平台能够加热和冷却,从而使DNA与捕获的核酸靶或与捕获的测序引物杂交或熔融。在焦磷酸测序的情况下,一旦已经捕获dsDNA靶并使其变性,则添加测序引物以与ssDNA杂交或备选地,该ssDNA与捕获的测序引物杂交。在这种情况下,可以将可旋转平台加热以除去ssDNA中的任何立体结构并且随后冷却以使测序引物与固定的靶杂交。

[0118] 可以理解由于使用相对小体积的试剂时,该室通过合适的手段密封,故加热该室可能多少增加装置的复杂性。备选地,可以使用油覆层以减少加热期期间的蒸发。其他合适的手段是技术人员熟知的。备选地,可以添加变性试剂至捕获的ssDNA和测序引物,随后添加pH较低的缓冲液以降低pH并且使测序引物与DNA靶复性。一旦复性,可以甩离pH缓冲液以废弃。

[0119] 技术人员会理解本发明在多种实施方式中能够提供的许多优点。例如,与现有技术的仪器和方法相比,本发明能够增加碱基读出长度。为了解释,现有技术方法在0.2mL微量离心管(或相似物)中实施焦磷酸测序,并且依次添加试剂至该管以检测该管中存在的DNA的序列。将核苷酸依次添加至含有反应缓冲液中的DNA、全部酶和底物的反应。该反应在96或24孔平板中进行。将平板加热(28℃)并且在反应期间振摇。因而,添加核苷酸的体积或多或少等于蒸发的体积,其中所述的蒸发不导致反应混合物稀释但是导致副产物积累。现有技术方法存在以下缺点:读出长度比较短,这最可能地归因于(例如由腺苷三磷酸双磷酸酶活性产生的)降解产物的积累。本发明不产生现有技术已知的缺点,原因在于固定的核酸链与核苷酸接触,剩余的核苷酸以及全部反应产物和副产物依次从如上文所述的凹槽基本上去除,所述支持表面在与后续核苷酸试剂接触之前还可选地被洗涤。可以预期,超过300或400个碱基的碱基读出长度是可能的,并且化学改善的情况下可能超过1000个碱基。

[0120] 另外,技术人员会显而易见诸多优点,然而为清晰性目的,本发明提供比现有技术的流通池相对简单的装置。甚至其他优点涉及比现有技术的方法和仪器可能相对更快的测序法,并且涉及与现有技术相比可能更低体积的所需试剂。现有技术方法并且尤其实施焦磷酸测序的方法的又一项限制是一个反应循环即添加一种核苷酸所需要的时间很长。一个反应循环所需要的时间正常是约60秒或甚至更长,这取决于降解先前反应循环的全部剩余核苷酸所需要的时间。仅在完全降解先前反应循环的基本上全部剩余核苷酸后才添加下一种核苷酸。可以理解如本文所述的装置能够以高得多的速度(即,通过离心步骤、洗涤步骤)除去剩余核苷酸。这导致掺入一种碱基的循环时间短得多,最可能是大约15秒,从而产生减少大约至少4倍的运行时间。然而,可以想到的是,循环时间可以进一步减小。

[0121] 与一些现有的仪器相比,本发明还能够使流体操作有所改善。还可能的是,与现有技术仪器相比,本发明可以提供增加的灵敏度,条件是可以使用高速光电倍增器替代CCD阵列。

[0122] 焦磷酸测序是基于‘合成测序’原理的DNA测序方法,该方法依赖于检测核苷酸掺入时的焦磷酸盐释放,而非采用双脱氧核苷酸的链终止过程。‘合成测序’涉及取得待测序的DNA单链并且随后酶促地合成其互补链。‘合成测序’方法基于通过检测DNA聚合酶(DNA合成酶)的核苷酸加成反应($\text{DNA} + x\text{dNTP} \rightarrow \text{DNA} + 1 + \text{PPi}$ 或取决于x的不同副产物。x也可以是ATP)的反应副产物来检测该DNA聚合酶的活性。在焦磷酸测序反应中,使用产生光的酶级联对PPi定量。

[0123] 1. 硫酸化酶 $\text{APS} + \text{PPi} \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4$

[0124] 2. 萤光素酶 $\text{萤光素} + \text{ATP} \rightarrow \text{氧代萤光素} + \text{PPi} + \text{光}$

[0125] 3. 腺苷三磷酸双磷酸酶:降解剩余dNTP和ATP

[0126] 另外,存在本领域已知的几种反应,其可以用来量化副产物,例如,使用转变 $\text{PPi} + \text{PEP} + \text{AMP} \rightarrow \text{丙酮酸} + \text{ATP} + \text{Pi}$ 的PPDK(烯醇丙酮酸双激酶)。另外,可以通过例如pH变化或其他检测参数变化检测到所述副产物。‘合成测序’方法可以备选地基于检测DNA连接酶的活性,其中所述DNA连接酶检测该DNA连接酶的引物加成反应的反应副产物。合适的方法是本领域技术人员熟知的。

[0127] 实质上,该方法允许通过沿DNA单链以一次一个碱基对方式合成互补链并且检测在每个步骤实际上添加哪种碱基而将该DNA单链测序。将模板DNA或测序引物固定,并且依次添加A、C、G和/或T核苷酸的溶液并在反应后除去。仅添加的核苷酸互补于第一未配对碱基或模板的碱基时才产生光。产生可检测信号(例如化学发光信号)的所添加核苷酸的序列允许确定模板的序列。ssDNA模板与测序引物杂交或反之亦然,并且与DNA聚合酶和任选地与ATP硫酸化酶、萤光素酶和/或腺苷三磷酸双磷酸酶孵育,并例如与底物腺苷5'磷酸硫酸盐(APS)及萤光素。提供可检测信号的其他反应级联是技术人员熟知的。

[0128] 就广义看来,焦磷酸测序法遵循以下一般步骤:

[0129] 1. 添加4种脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)之一或其合适的衍生物至核酸链模板。

[0130] DNA聚合酶掺入正确的互补性dNTP或其衍生物到该模板上,这以化学计量方式释放焦磷酸(PPi)。

[0131] 2. ATP硫酸化酶定量地将PPi转化成ATP。这种ATP触发萤光素酶介导萤光素至氧代萤光素的转化,所述的转化以与ATP量成正比的量产生可见光。检测并分析萤光素酶反应中

产生的光。

[0132] 3.未掺入的核苷酸和ATP随后由腺苷三磷酸双磷酸酶或其他合适的酶降解。

[0133] 经典焦磷酸测序方案的几种改良是本领域熟知的并且充分适合在本发明的装置上进行。由于每个单核苷酸掺入步骤中产生的光与所掺入核苷酸的量成正比,故合适的软件允许以特定核苷酸序列图样转换产生的光信息。在经典焦磷酸测序法中,将光图样称作‘热解图’。另外,所述软件优选地允许量化混合群体在特定位置处的掺入率。

[0134] 本发明构思了测序方法,所述的测序方法包括固定待测序的核酸模板或靶、或测序引物和逐步添加核苷酸的循环。尽管本发明已经就焦磷酸测序方面例举,然而可以理解,本发明也用于其他核酸测序化学,并且尤其用于从流通环境和固相中得益的此类化学。本发明也可以避免上文所提及的某些步骤,或至少使其更便利。焦磷酸测序要求存在ssDNA模板。任选地,可旋转平台还发挥作用以捕获dsDNA并使所述dsDNA变性以将例如ssDNA交给为焦磷酸测序做好准备的退火的测序引物,因而消除对独立分离步骤的需求。

[0135] 具体而言,本领域技术人员会理解,术语“流通DNA测序法”包括例如下述方法:固定核酸模板或测序引物,使该引物与该模板杂交或反之亦然,并且在核苷酸存在的情况下下以逐步方式进行引物介导的合成,其中所述核苷酸包括例如任选地链延伸终止部分(如双脱氧部分)和可选地可检测标记物(例如Sanger测序法)。又一种核酸测序法实施方式包括以下步骤:掺入标记的核苷酸至正在延伸的引物链中;鉴定掺入的核苷酸;并且移除链延伸终止部分和标记物,从而正在延伸的链为掺入下一个核苷酸做好准备。

[0136] 本领域技术人员还会理解术语“流通DNA测序法”包括例如核酸连接测序法。显而易见,术语“核酸连接测序法”包括固定核酸模板或测序引物,使该引物与模板杂交或反之亦然,随后是连续轮次的DNA连接,例如标记核苷酸或标记短探针的DNA连接。

[0137] 本领域技术人员还会清楚,本发明构思了包括核酸固定和核苷酸逐步添加及检测的步骤的任何DNA测序方法。

[0138] 本发明的方法还可以包括可选的洗涤步骤或酶处理可以改善残余或未反应试剂的去除。

[0139] 在一个实施方式中,依次接触或注入步骤包括:

[0140] a.)A,随后是T,随后是G,并且随后是C核苷酸,随后再是A等;或

[0141] b.)A+T+G+C核苷酸作为混合物添加,并且再次添加该混合物等。

[0142] 在另一个实施方式中,每个所述支持表面依次地与包含A、T、G和/或C核苷酸的一系列试剂接触。依次接触步骤可以包括以下之一:

[0143] a.)将每种核苷酸或其类似物以任何合乎需要或预定的顺序单独并且依次地添加,

[0144] b.)将A+T+G+C核苷酸或这些核苷酸的任何预定或合乎需要的亚组作为混合物添加,并且再次添加所述混合物等。

[0145] 依次接触步骤a.)对焦磷酸测序法特别有用,并且如果使用标记的核苷酸,如其中每种核苷酸用不同染料标记的荧光标记核苷酸,则依次接触步骤b.)是特别有用的。

[0146] 可以理解整个方法是迭代的,在于可以按任何预定义的秩序和/或任何预定义的组合添加核苷酸的顺序并且该顺序如所需要那样重复足够次数以将核酸模板测序。例如,A、T、G和C可以仅在已知的突变位点添加。该实施方式的优点在于该过程加快检测已知突变

的速度,原因是需要更少的碱基添加。

[0147] 优选地,本发明的方法还包括在每个所述接触步骤期间和/或之后分析核酸链的步骤。该分析可以是任何分析,然而可以理解,在焦磷酸测序法的背景下,分析步骤包括在所述分析的每个步骤中通过使光输出与已经掺入所述核酸链的核苷酸的数目相关联而鉴定所述核酸链中的下一个碱基对。技术人员可以采取检测核苷酸掺入的全部适宜和合适的技术措施。例如,用于检测由该反应产生的光的合适检测器是光电倍增器。可以理解随着可旋转平台转动,样品通过该检测器,优选地,全部样品均通过该检测器。

[0148] 在优选的实施方式中,在分立区域与后续试剂接触之前,每个所述支持表面经受采用洗涤试剂的洗涤或冲洗步骤。该洗涤试剂可以是适于洗去来自先前接触步骤的残余溶液,优选地适于洗去来自先前接触步骤的基本上全部残余溶液的任何试剂。然而,在优选的实施方式中,洗涤试剂是在其中进行以下反应步骤的缓冲液。该洗涤试剂也可以含有洗涤增强物,例如,腺苷三磷酸双磷酸酶、磷酸酶等。合适的洗涤试剂是技术人员熟知的。

[0149] 如上文讨论,变性步骤可以包括加热所述核酸链以实现变性,或使所述核酸链暴露于升高的pH,或使所述核酸链暴露于合适的酶或酶混合物。

[0150] 在优选的实施方式中,本发明的方法包括其中在所述核酸链变性后,用冲洗试剂(rinsing reagent)通过冲洗步骤去除互补链的步骤。

[0151] 用于注入所述核酸链、用于注入A、T、G和/或C核苷酸和用于注入洗涤试剂(washing reagent)的装置可以是任何装置,然而优选地,该装置与压电激励或空气脉冲驱动的喷墨型技术相似。该装置还优选地配有真空抽取系统以抽取从所述可旋转平台甩离的废试剂。该装置还配有合适的检测手段/装置以检测由焦磷酸测序反应产生的光。合适的检测器会是技术人员已知的,例如可以安装在可转动平台下方或上方的光电倍增器。

[0152] 用于变性和任选地去除任何互补性核酸链的装置可以包括用于加热该平台至约94℃的装置,或还包括注射加热过的试剂或其他变性化学品的注射器或蠕动分配器。

[0153] 在可选的检测技术中,一个或多个固态pH计安装在所述平台的每个凹槽下方。由于磁珠能够被用来结合DNA以测序,并且凹槽可以在两此测序循环之间洗涤,所述平台可以重复使用。一旦测序完成,可以通过从平台下方一开磁铁释放磁珠,平台可以被彻底洗涤,然后加入新的用来分析的样本。申请人设想,平台还可以是一次性的,如果定制平台,由于离子敏场效晶体管(即半导体芯片)的成本足够低,使得在使用后丢弃ISFET感应平台是可以实现的。

[0154] 本领域技术人员容易知道,当聚合酶添加核苷酸,会释放H⁺离子,从而改变局部pH,例如可以被固相pH计检测到。通过举例,我们参照DNA Electronics Ltd的US2010/0151479,在这里通过引用结合到本文中,它公开了包括ISFET的感应装置,ISFET被设置用来产生响应于在或者靠近晶体管表面的离子电荷的局部波动的光输出信号。在该例子中,离子电荷的波动被测量而不是绝对值。该方法简化了化学过程,这是因为天然核苷酸可以依次添加,当pH变化被检测到,磁珠被捕获,凹槽被洗涤,然后添加新一轮的核苷酸。

[0155] 优选地,当在可重复使用的平台上使用ISFET检测系统时,磁珠将被用来捕获ssDNA。当使用一次性ISFET检测平台时,ISFET的栅极表面将被覆盖,以捕获ssDNA,或者也可以使用磁珠。

[0156] 根据另一方面,本发明提供了ISFET检测器与本发明的可旋转平台一起使用,并且

在各个凹槽中,采用分立的可拆的支持表面。优选地,所述ISFET检测元件形成每个凹槽的底部。

[0157] 技术人员会理解本发明包括本文中公开的实施方案和特征以及所公开实施方案和特征的全部组合和/或渗透(permeation)。

附图说明

[0158] 下面将结合附图,以示例的方式对本发明的优选实施例进行描述,图中:

[0159] 图1A为本发明的可旋转平台的俯视图;

[0160] 图1B为图1A所示的可旋转平台的侧视图;

[0161] 图1C为沿图1B中的线1C-1C的截面图;

[0162] 图2A和图2B分别为图1所示可旋转平台的实施例的立体示意图和剖视立体示意图;

[0163] 图3为安装有图1A所示的可旋转平台的装置的截面图;

[0164] 图4显示了利用聚焦光学系统监测反应的光学检测装置;

[0165] 图5显示了利用直接成像监测反应的光学检测装置;

[0166] 图6A-C分别显示了A)链霉亲和素Mag Sepharose磁珠、B)链霉亲和素磁珠MyOne Streptavidin C1和C)中性链亲和素Sera-Mag磁性微珠的焦磷酸测序峰高;

[0167] 图7显示了使用较高频率混合的链酶亲和素Mag Sepharose磁珠达到的焦磷酸测序峰值;

[0168] 图8添加酶和底物混合物到PCR扩增子后的峰高,该PCR扩增子固定在以离心速度为1500rpm清洗的中性链亲和素Sera-Mag磁性微珠上;

[0169] 图9显示了在采用将DNA目标固定在戴诺磁珠MyOne Streptavidin C1上的焦磷酸测序的过程中的相移和变宽的峰值信号;

[0170] 图10为实际生产的平台的照片,显示了装载在凹槽1-3中的磁珠;

[0171] 图11和12为本发明的平台与用于旋转所述平台的电机啮合的立体图,并显示了在第一位置的环形的圆周磁环(20),在该第一位置,较少或没有磁力施加在所述平台上;

[0172] 图13和14分别显示了磁环(20)在第一和第二位置的侧视截面图;和

[0173] 图15为本发明的另一实施例,显示了一具有凹槽的平台,该平台被配置和布置使得在旋转时,磁珠被旋转到一空腔中而废液在离心力的作用下通过过滤器板(a frit)或相似的过滤器(60)。

[0174] 定义

[0175] 在描述和限定本发明时,下面的术语将按照下文中的定义来使用。可以理解的是,文中使用的术语仅被用来描述本发明的特定实施例而并非作为限制。除非另行规定,文中所使用的所有技术术语和科学术语的含义均与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义相同。

[0176] 除非上下文中明确地另行规定,否则在说明书和权利要求书中,“包括”、“包含”及其类似的词将被解释包含的含义,而不是排他或穷举的含义,也就是说,是“包含但不限于”的含义。

[0177] 在下文中,或另有说明,“%”的意思是“重量%”,“比”的意思是“重量比”,而“份”

的意思是“重量份”。

[0178] 尽管阐明本发明的广泛的范围的数值范围和参数为近似值,但是特定实施例中列举的数值尽可能精确描述。任何数值必然固有地含有一定的误差,该误差是由它们各自的试验测量中存在的标准偏差引起的。

[0179] 为了使描述更简明,文中的数量表达中有一些没有用“约”来限制。可以理解的是,无论是否直接采用了“约”,文中限定的每个数量意在指实际的给定值,还意在指能够基于本领域现有技术合理推断的该给定值的近似值,包括由于该给定值的实验和/或测量环境产生的近似值。

[0180] 除非另行规定,文中所使用的“主要地”和“基本上”一词将表示在重量上包括超过50%。

[0181] 采用端点的数值范围的描述包括包含在该范围内的所有数字(例如1-5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0182] “优选的”和“优选地”这些词是指可以在某种情况下能够产生一定的效果的本发明的实施例。然而,在相同的或其他情况下,其他实施例也可以是优选的。此外,一个或多个优选实施例的描述并没有暗示其他实施例是没有用的,也并不打算将其他实施例排除在本发明的范围之外。

[0183] 词的列表并不暗示任何或所有词是相互排斥的。词的列表并不暗示任何或所有的词是任何东西的穷举,除非另行明确规定。词的列表不暗示按照它们被列举的顺序而以任何方式被排序。

[0184] 文中,“结合配偶体”一词被理解为表示结合配偶体对中的一个,结合配偶体对可以是配体/受体对。结合配偶体对中的一个被称为第一结合配偶体,而结合配偶体对中的另一个被称为第二结合配偶体。例如,结合配偶体对可以是链霉亲和素/抗生物素蛋白和生物素。结合配偶体对可以包括例如链霉亲和素和生物素化的核酸。

[0185] 如文中所使用的,“可旋转”一词意在表示适用于被旋转。还可以被理解的是,“珠子”、“粒”和“固相支持体(solid support)”可以互换,“平台”和“圆盘”同样可以互换。

具体实施方式

[0186] 本申请中描述了多个实施例,这多个实施例都仅用于示例性展示。所描述的实施例均不作为对本发明的限制。本发明广泛应用于多个实施例,如容易从说明书中获得的。这些实施例充分描述,使得本领域技术人员能够实现本发明。可以理解的是,也可以采用其他实施例,并且在不超出本发明的范围的情况下,也可以对其进行其他变化。因此,本领域技术人员可以认识到,本发明可以在各种修改或变更的情况下实现。下面将结合附图进行描述,图中相同的标号表示相同的部件。

[0187] 下面结合焦磷酸测序对本发明的一个优选实施例进行描述。关于焦磷酸测序的优选实施例的描述不应当被理解为将本发明限制为焦磷酸测序实验。

[0188] 参见图1,可旋转平台(或圆盘)为聚碳酸酯圆盘1形式,包括两个或多个适用于容纳至少一个磁珠形式的支持表面的凹槽2,所述磁珠用于选择性地保留用于进行核酸测序的核酸链。这些凹槽2的直径优选为约2-3mm,并且绕圆盘1的圆周等间隔布置。例如,直径为120mm的圆盘1的周长为377mm,通过在距圆盘1的中心55mm处形成直径为3mm、间隔6mm(离散

区域的中心/靶位点2之间)的离散区域,形成绕圆盘1的圆周的约57个凹槽。但是,通过使用更大的圆盘1或更小的离散区域(例如直径0.5mm、间隔比如说1mm)或者它们的组合使得凹槽的数量更小或更大。优选地,所述凹槽2为浅槽,容积为约0.5-100 μ L。

[0189] 另一实施例可以从图2中看到,其中,相同的特征采用了相同的标号。在该实施例中,可旋转平台的直径为120mm,具有等间隔布置在其圆周上的50个凹槽。所述凹槽的直径约3mm,可以采用包括聚碳酸酯、透明聚苯乙烯(clear polystyrene)和白色的高抗冲聚苯乙烯(white high impact polystyrene,HIPS)的材料制成。平台的厚度可以为1mm-5mm,凹槽的深度为约4mm。

[0190] 优选使用的测序方法为焦磷酸测序。但是,可以知道的是,也可以使用其他核酸链测序方法,如前所述。优选地,所述凹槽2包含支持表面,该支持表面用于选择性地固定核酸链。例如,所述核酸链可以是生物素化的,所述支持表面包括用于将生物素化的核酸链结合其上的链霉亲和素。然而,可以知道的是,其他化学过程也可以用于将核酸链固定到支持表面上。

[0191] 根据本发明的用于进行核酸链测序的方法,提供了一可旋转平台,核酸链被固定在容纳在凹槽2中的支持表面上。然后,任何互补核酸链被变性并去除,例如通过加热平台1进而加热所述支持表面至约/近似94 $^{\circ}$ C。然后,通过将合适的试剂加入凹槽2中,使得支持表面与核苷酸A、T、G和C顺序接触,在每个接触步骤之间,平台1被旋转,使得任何残留或未反应的核苷酸基本上从凹槽2中离心去除。

[0192] 本发明的方法还包括在每个所述接触步骤中和/或在每个所述接触步骤之后,分析所述核酸链的步骤。该分析步骤包括通过将核苷酸的掺入产生的光的输出与已结合到核酸链上的核苷酸的数量相互关联,来检测核酸链中的下一碱基对。合适的用于检测反应产生的光的检测器为光电倍增管。容易知道的是,当可旋转平台1旋转时,所有样本都通过检测器。如果没有核苷酸掺入,则不会产生光信号,反应混合物在离心作用下被甩掉(比如说,每个循环或每10-50个循环,但是小于第80个循环),另一轮从下一核苷酸开始。

[0193] 在优选实施例中,在后续的核苷酸接触凹槽2之前,每个支持表面2会采用洗涤试剂进行清洗或冲洗步骤。洗涤试剂可以是任何能够基本上洗掉前面的接触步骤中的任何残留溶液的试剂,优选为PCR缓冲液。

[0194] 优选地,当注入核苷酸试剂和酶时,所述可旋转平台1低速旋转,例如以约10-200rpm之间的速度旋转,而在加入洗涤试剂的同时,所述可旋转平台1高速旋转,例如以约400-4000rpm之间的速度旋转。

[0195] 参见图3,本发明还提供了与所述可旋转平台1一起使用的用于核酸链测序的装置。所述装置包括用于以预定的可控的用户可选择的旋转速度旋转所述平台1的马达50,比如能够产生约10-4000rpm之间的选择速度的马达。还提供了将核酸链加入凹槽2中以将核酸链固定在所述支持表面的装置。该装置可以采用喷墨式技术或合适的分配器7(比如注射泵)的形式。还提供了将A、T、G和C核苷酸加入与所述支持表面接触和用于加入洗涤试剂的装置。同样,该装置可以采用喷墨式技术的形式。还提供了用于变形和去除任何互补核酸链的装置,该装置可以采用设于壳体4内的加热线圈(图未示)。

[0196] 合适的检测器8被用来检测焦磷酸测序反应产生的光。合适的检测器为本领域技术人员所知道,例如,光电倍增管,该光电倍增管可以安装在可旋转平台1上方。特别参见图

4和图5,图4和图5显示了本发明使用的光电倍增管检测器的不同实施例。一个光学配置使用聚焦光学系统(图4),而第二个使用直接成像(图5)。图4详细展示了聚焦透镜10、孔11、光敏表面12、光电倍增管13和检测电子仪器14。图5详细展示了孔15、光敏表面16、光电倍增管检测器17和检测电子仪器18。

[0197] 可旋转平台1可以低速(例如200rpm或更小)旋转,注入酶和核苷酸混合物,此时的离心作用很小,不足以从凹槽2中移出混合物,使得反应可以进行并完成光学检测。洗涤试剂可以在高速转动(例如400+rpm)时添加,使得清洗时能够将所有试剂从凹槽2中去除,并且基本上不污染凹槽2之间。

[0198] 例子

[0199] 使用磁珠的焦磷酸测序

[0200] 使用焦磷酸测序确定DNA目标的核苷酸顺序需要将DNA目标固定在固相支持体上。下面对焦磷酸测序的原则简单描述:

[0201] 1)将生物素化的双链DNA固定到固相支持体上;

[0202] 2)通过化学变性分离非生物素化的链;

[0203] 3)通过清洗去除非生物素化的链;

[0204] 4)使寡核苷酸引物退火,以便于测序过程的开始;

[0205] 5)添加酶和底物的混合物以进行焦磷酸测序;

[0206] 6)注入第一脱氧核糖核苷酸(dNTP),第一脱氧核糖核苷酸通过DNA聚合酶(确保两个核苷酸互补)掺入目标DNA;

[0207] 7)当掺入互补碱基时,释放出焦磷酸盐分子,通过一系列酶反应,焦磷酸盐分子转化为光信号,信号的强度被用来确定一个或多个核苷酸是否排成一列;

[0208] 8)过量的未掺入的dNTP降解,以确保它们不在测序反应的下一部分掺入,这确保了所有目标模板之间顺序保持同步;

[0209] 9)通过添加下一互补碱基,继续测序反应。

[0210] 焦磷酸测序反应中使用的生物素化的DNA的固定可以采用覆盖有链霉亲和素或中性链亲和素(neutravidin)的磁珠粒55实现。磁性粒55提供了较大的表面面积并能够在反应溶液中移动,这增加了结合能力和定位生物素化的DNA目标的可能。

[0211] 在该例子中,DNA模板的固定通过将磁珠粒55和加入平台/圆盘1的凹槽2中的生物素化的DNA目标和结合缓冲液混合预定时间(例如10分钟)实现。在固定时间之后,未结合的模板和包含各种其他试剂的浮在上层的液体(焦磷酸测序反应中所不期望的)通过离心法去除。在离心之前,磁环20上升与平台接触,将磁性粒固定在凹槽的底部。磁环下降至平台表面下放小于1mm处,提供充足的磁场将磁珠粒保留在凹槽中,而允许平台旋转并将上层液体在大于2000rpm的速度下离心甩出。使用包含洗涤剂的缓冲液的洗涤步骤被用来确保上层液体的充分去除。相同的离心步骤被用来去除清洗缓冲液。

[0212] 未生物素化的DNA链的变性采用变性剂氢氧化钠实现,该变性剂的使用不超过20秒。变性剂采用离心去除,并且清洗缓冲液被用来最大化去除。磁环再次被用来在离心浮在上层的液体的同时将磁珠保留在凹槽中。

[0213] 为了便于焦磷酸测序反应,测序引物被添加并通过加热样本至80℃以上并冷却至30℃以下的退火过程使其与DNA目标杂交。

[0214] 退火过程完成时,焦磷酸测序酶混合物与底物混合物(包含APS和荧光素)一起被注入凹槽中.磁珠粒在反应溶液中振动,以去报反应随机进行.为了说明,平台被充分振动,这样,磁珠被搅动,从而溶液和磁珠粒充分混合在一起。

[0215] 最后,向反应混合物中注入少量dNTP,如果互补碱基存在于序列中的该点则测量光信号,从而确定出序列.1分钟的周期用来确保过量的未结合的dNTP被三磷酸腺苷双磷酸酶降解.序列的确定通过注入dNTP的任一种确定.在反应过程中,平台不仅被旋转,同时也被振动,以确保磁珠保持不断的运动,并防止它们聚集在一起。

[0216] 各种类型的磁珠粒进行了性能评估。

[0217] • 戴诺磁珠MyOne Streptavidin Cl(Invitrogen):直径1 μ m的具有单层链霉亲和素共价覆盖在亲水的磁珠表面的超顺磁珠;

[0218] • Sera-Mag磁性微珠(Thermo Scientific):1 μ m的磁性羧酸盐改性碱基粒,采用核壳工艺制备,采用中性链亲和素共价覆盖;

[0219] • 链霉亲和素Mag Sepharose磁珠(通用电气生命科学部(GE Life Sciences)):结合到磁铁矿上的链霉亲和素-包含琼脂糖珠。

[0220] 磁珠粒在以下方面被评估:

[0221] 1)固定生物素化的DNA目标的能力;

[0222] 2)在离心过程中保留在凹槽中;

[0223] 3)在焦磷酸反应过程中避免蛋白的非特异性结合。

[0224] 结论

[0225] 固定

[0226] 可以发现,三种磁珠都能够固定生物素化的DNA.观察到的最高的焦磷酸测序峰信号高为中性链亲和素Sera-Mag磁性微珠,其次为戴诺磁珠MyOne Streptavidin Cl,最后是链霉亲和素Mag Sepharose磁珠(见图6A-C)。链霉亲和素Mag Sepharose磁珠的信号显著低于其他两种磁珠.发现了两个原因,第一,由于磁珠的尺寸和重量,它们不能在标准振动条件下充分混合;第二,磁珠的颜色很深,由于吸光度而减弱了光信号.解决第一个问题的办法是以更大的频率振动.确实,较高的振动频率能够更好地混合,进而获得更好的信号峰值高度(见图7)。

[0227] 离心

[0228] 已经确定,为了实现不希望的反应分子从固定的DNA中最佳去除,离心旋转速度需要在2000rpm以上.采用从聚合酶链反应分离的DNA在1500rpm的离心速度洗涤的结果证实了添加酶和底物混合物时的高峰(见图8)。产生的测序峰显著减小.在添加酶和底物后的高峰的产生可以被解释为,由于DNA固定在磁珠粒上之后的洗涤步骤中PCR组分去除效果较差.PCR中残留的dNTP将在添加酶和底物混合物时全部掺入,同步完成序列,进而产生信号高峰,而剩下的测序反应由于剩下没掺入的模板很少而随后减弱.该数据证实了需要旋转速度大于2000rpm来实现上层液体的完全去除。

[0229] 采用大于2000rpm的离心速度使得除链霉亲和素mag sepharose磁珠以外的所有磁珠被移出所述凹槽.由于他们的尺寸较大,这些磁珠在速度大于2000rpm时仍然保留在所述凹槽中。

[0230] 非特异性结合

[0231] 由于一些磁珠的外壳的成分,焦磷酸测序反应中使用的酶的非特异性结合可能对产生的峰和序列有不利影响。该现象的一个特征是峰变宽。这归咎于降解过量未结合的核苷酸的酶三磷酸腺苷双磷酸酶的减少。三磷酸腺苷双磷酸酶的减少将导致过量的核苷酸非同步掺入,造成序列移相。因此产生的序列变得难以理解,不希望产生任何信号的核苷酸注入也观察到峰。

[0232] 对于戴诺磁珠MyOne Streptavidin C1观察到这些问题(见图9)。确实,峰宽和非特定峰高与其他两种磁珠相比是最大的。最不受影响的磁珠为链霉亲和素MagSephacrose磁珠。在不希望受理论限制的情况下,可以认为琼脂糖壳是惰性的,因此避免了非特异性结合。相反地,戴诺磁珠MyOne Streptavidin C1的磁珠表面包含电荷,电荷吸引电性相反的二磷酸腺苷双磷酸酶,进而结合到磁珠上。结合的二磷酸腺苷双磷酸酶不再被用来降解过量的核苷酸,导致序列的相移。

[0233] 结论

[0234] 基于不同类型磁珠的观察,可以得出,使用的最优磁珠是链霉亲和素MagSephacrose磁珠,但是可以理解,其他磁珠仍然可以用于本发明的方法。磁粒能够在进行一定速度的洗涤离心时固定DNA目标,以保证干净的模板用于测序。不活泼的外壳还表示焦磷酸测序酶的非特异性结合并不会由于dNTP的非同步掺入而影响测序效果。

[0235] 图6A-C分别显示了A)链霉亲和素Mag Sepharose磁珠、B)链霉亲和素磁珠MyOne Streptavidin C1和C)中性链亲和素Sera-Mag磁性微珠的焦磷酸测序峰高。一皮摩尔DNA模板被添加到10 μ L结合缓冲液中,培养10分钟。固定后的磁珠在缓冲液中被洗涤,然后跟着采用NaOH变性。添加浓度为400 nM的测序引物,并通过加热至80 $^{\circ}$ C,保持60秒,然后冷却至30 $^{\circ}$ C,完成退火。添加酶和底物,焦磷酸测序反应使用15个循环的dATP、dCTP、dGTP和dTTP重新进行。可以观察到中性链亲和素Sera-Mag磁性微珠具有最高峰。

[0236] 图7显示了链霉亲和素Mag Sepharose磁珠在较高频率混合下实现的焦磷酸测序峰。信号峰从平均单峰高度为5增大到40个单位以上。然而,由于信号因磁珠粒的深色吸收而减弱,峰高没有超过其他两种磁珠观察到的峰高。

[0237] 图8显示了添加酶和底物混合物到PCR扩增子后的峰高,该PCR扩增子固定在以离心速度为1500rpm清洗的中性链亲和素Sera-Mag磁性微珠上。添加酶和底物混合物后的后续测序反应峰明显变小。相同的磁珠在2000rpm以上离心后没有保留在所述凹槽中。

[0238] 图9显示了在采用将DNA目标固定在戴诺磁珠MyOne Streptavidin C1上的焦磷酸测序的过程中的相移和变宽的峰值信号。图25为实际生产的平台的照片,显示了装载在凹槽1-3中的磁珠。图26和27为本发明的平台与用于旋转所述平台的电机啮合的立体图,显示了在第一位置的环形的圆周磁环,在该第一位置,较少或没有磁力施加在所述平台上。图28和29为侧视图,分别显示了磁环在第一和第二位置。在所述第二位置,磁环充分靠近所述平台,以施加磁力在所述凹槽内的任何磁珠上。

[0239] 图15为本发明的另一实施例,显示了一具有凹槽的平台,该平台被配置和布置使得在旋转时,磁珠被旋转到一空腔中而废液在离心力的作用下通过过滤器板(a frit)或相似的过滤器。

[0240] 如上文讨论,可以通过使用焦磷酸测序实现DNA序列的测定(见AgahA.,

[0241] Aghajan M.,Mashayekhi F.,Amini S.,Davis R.,Plummer J.D.,Ronaghi M.,

Griffin P.B., A multi-enzyme model for pyrosequencing(用于焦磷酸测序法的多重酶模式), *Nucleic Acids Res*(核苷酸研究)., 2004;32:e166)。通过检测互补性3'-脱氧核糖核苷酸5'-三磷酸(dNTP)由DNA聚合酶掺入单链模板后焦磷酸的释放,实现测序。最初,焦磷酸盐必须由硫酸化酶转化成腺苷三磷酸(ATP)。正是ATP与荧光素借助荧光素酶发生反应才产生指示核苷酸掺入和因而指示模板链序列的光信号。为允许掺入并且检测下一个核苷酸而不受源自先前所添加核苷酸的干扰,使用腺苷三磷酸双磷酸酶。腺苷三磷酸双磷酸酶会在添加下一个核苷酸之前降解过多的核苷酸。

[0242] 在焦磷酸测序过程期间存在副产物(如硫酸盐和二磷酸核苷酸)的积累。这些副产物抑制了酶,导致长时测序运行期间信号质量的降低。例如,腺苷三磷酸双磷酸酶的抑制引起未掺入的核苷酸的移除减少,这种减少导致碱基的不同步掺入并且因而导致不良的信号检测。因而,使用焦磷酸测序法的测序长度目前局限于不超过60个核苷酸(见Mashayekhi F., Ronaghi M., Analysis of read-length limiting factors in pyrosequencing chemistry(焦磷酸测序化学中读出长度限制因素的分析), *Anal. Biochem*(分析生物化学)., 2007;363:275-287)。

[0243] 因此,为了降低副产物抑制作用的影响并且增加读出长度,本发明能够在众多核苷酸暴露后洗去反应组分,从而允许添加新鲜试剂以继续该工序的下一段,同时确保模板仍与支持物结合。

[0244] 尽管参考当前设想的在实践中实施本发明的最佳实施例来展示和描述本发明,然而应当理解,可以做出多种变化以使本发明适应于不同实施方式而不脱离本文中公开并由下述权利要求书所包括的更广泛发明构思。

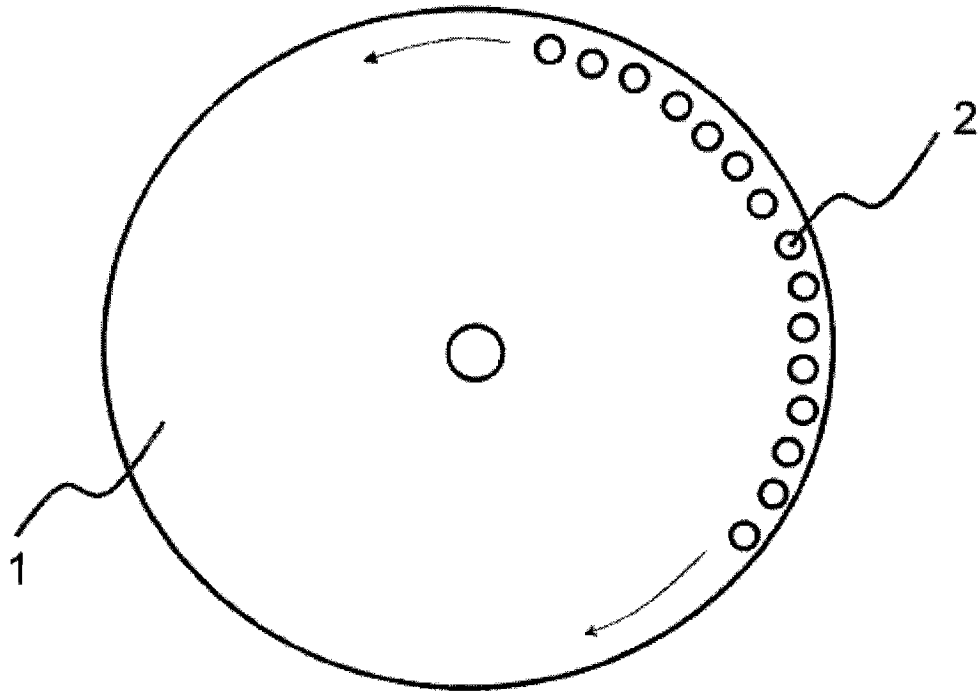


图1A

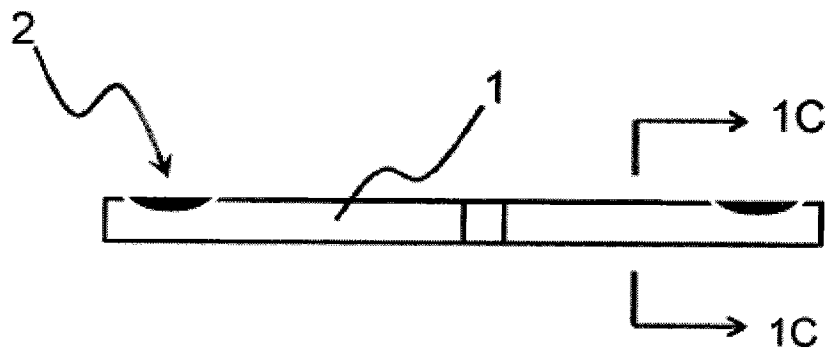


图1B

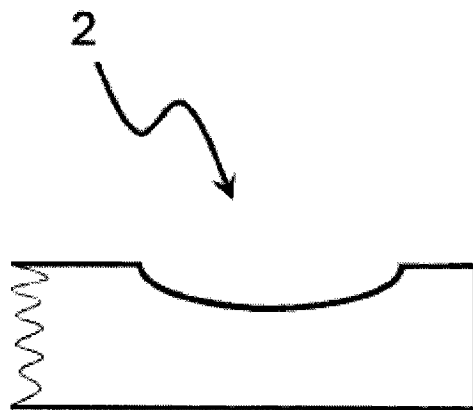


图1C

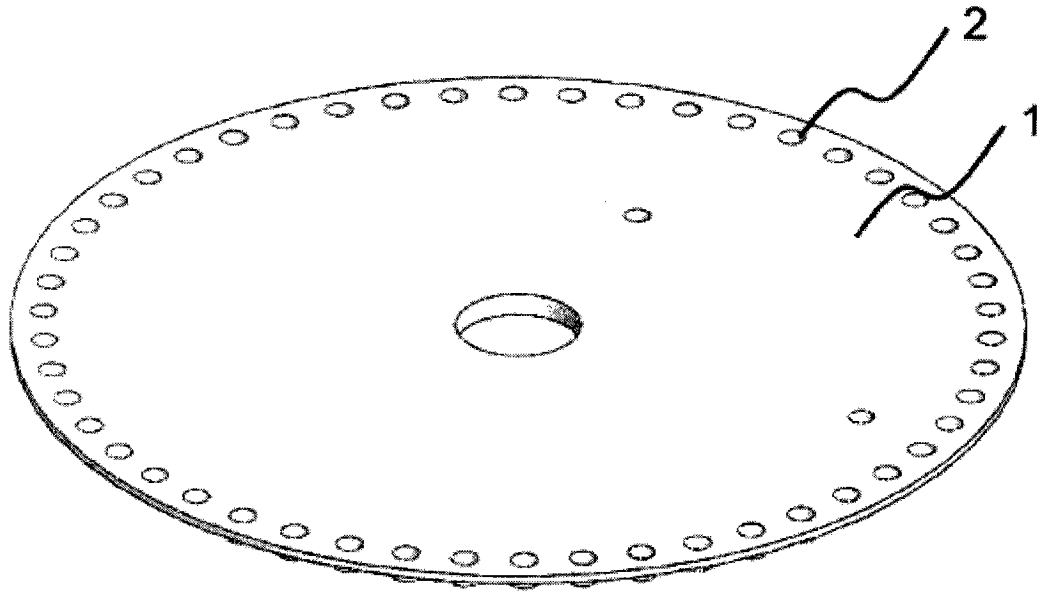


图2A

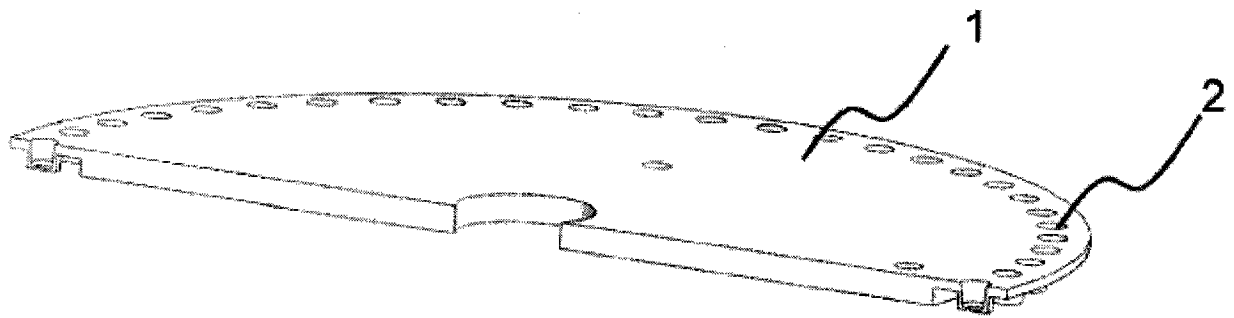


图2B

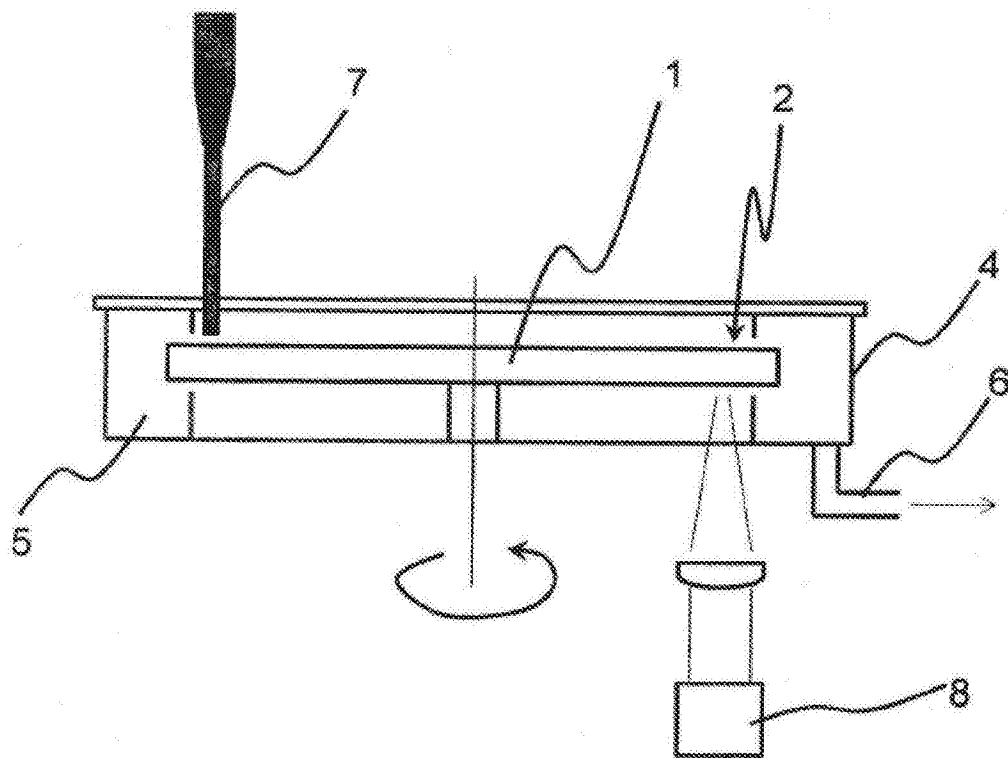


图3

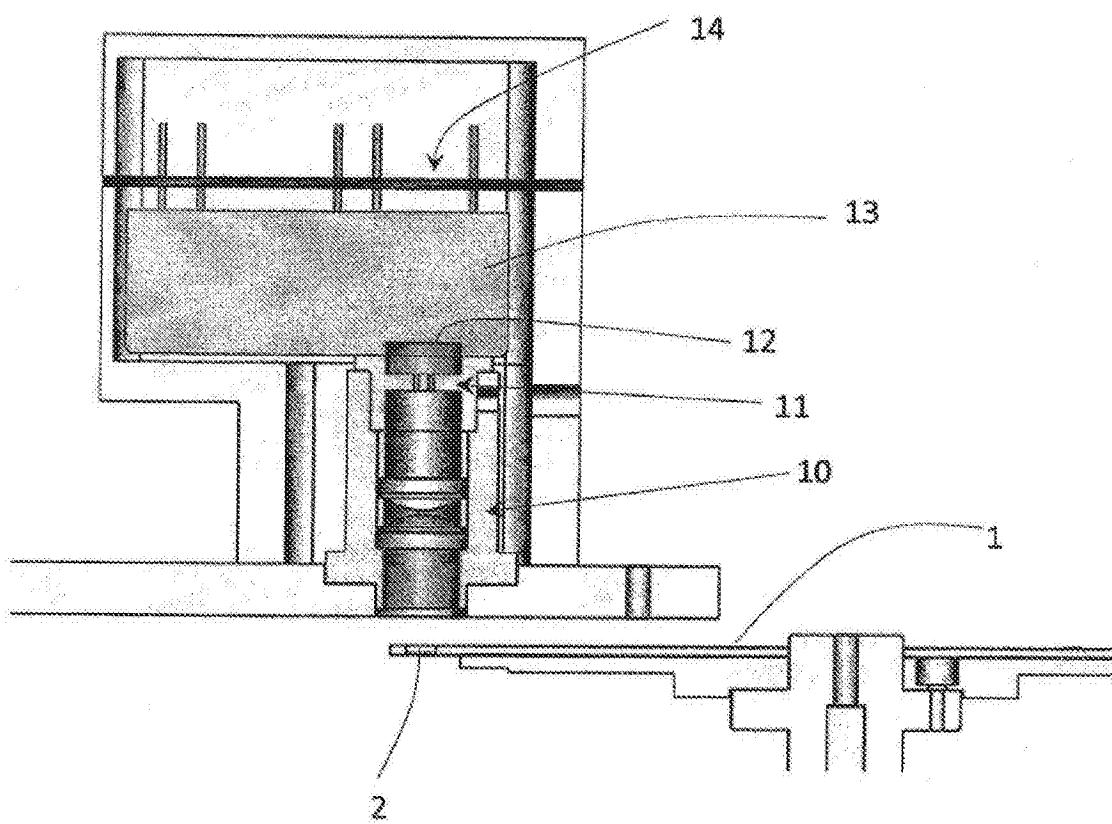


图4

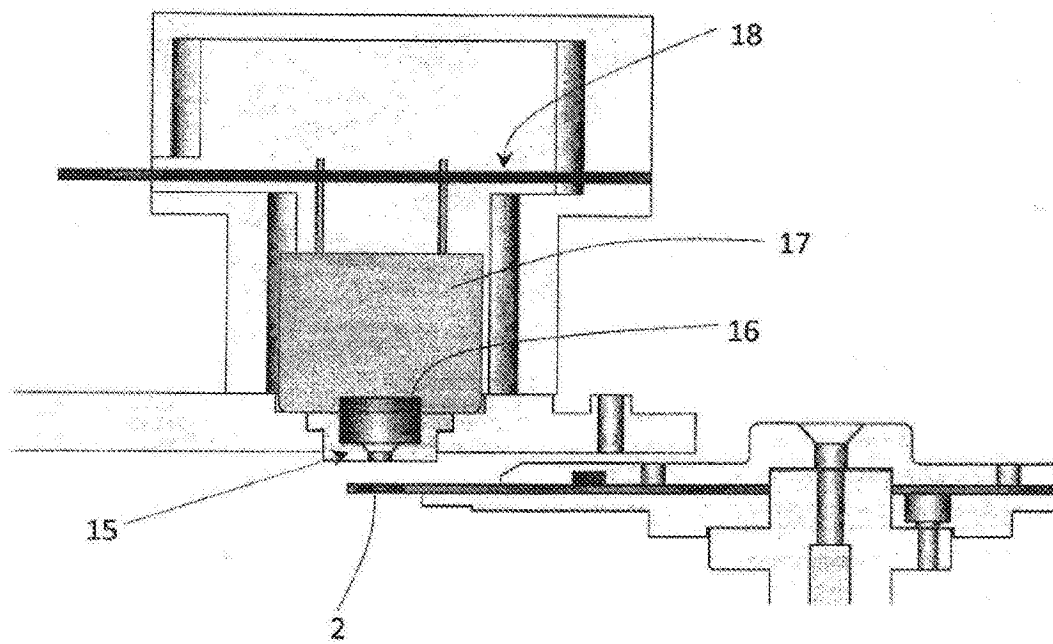


图5

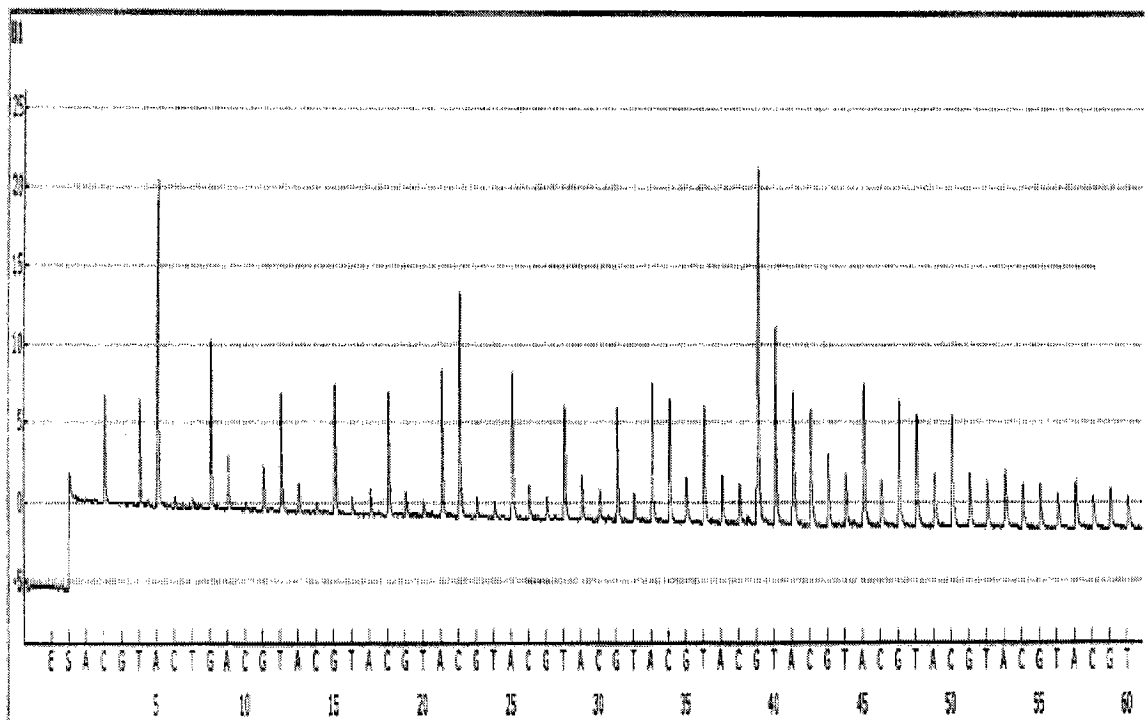


图6A

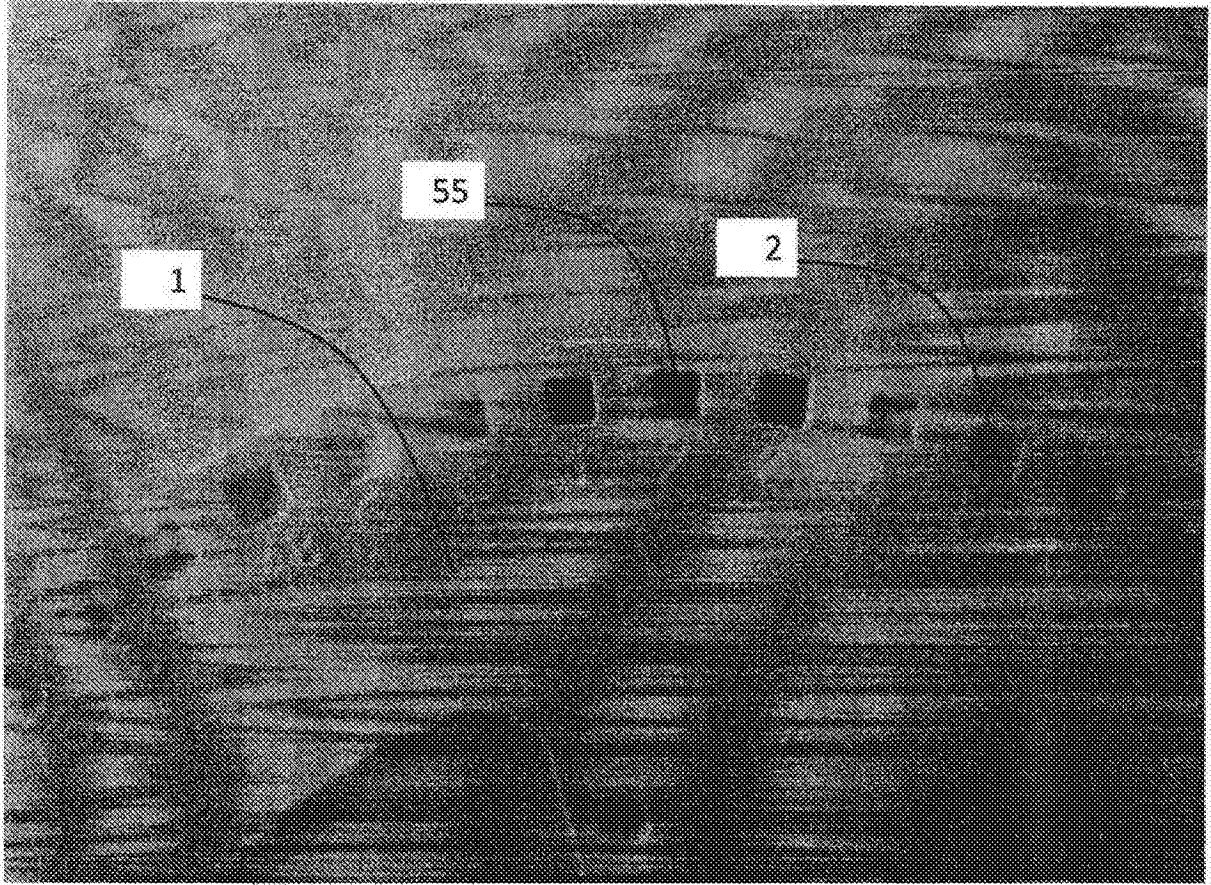


图10

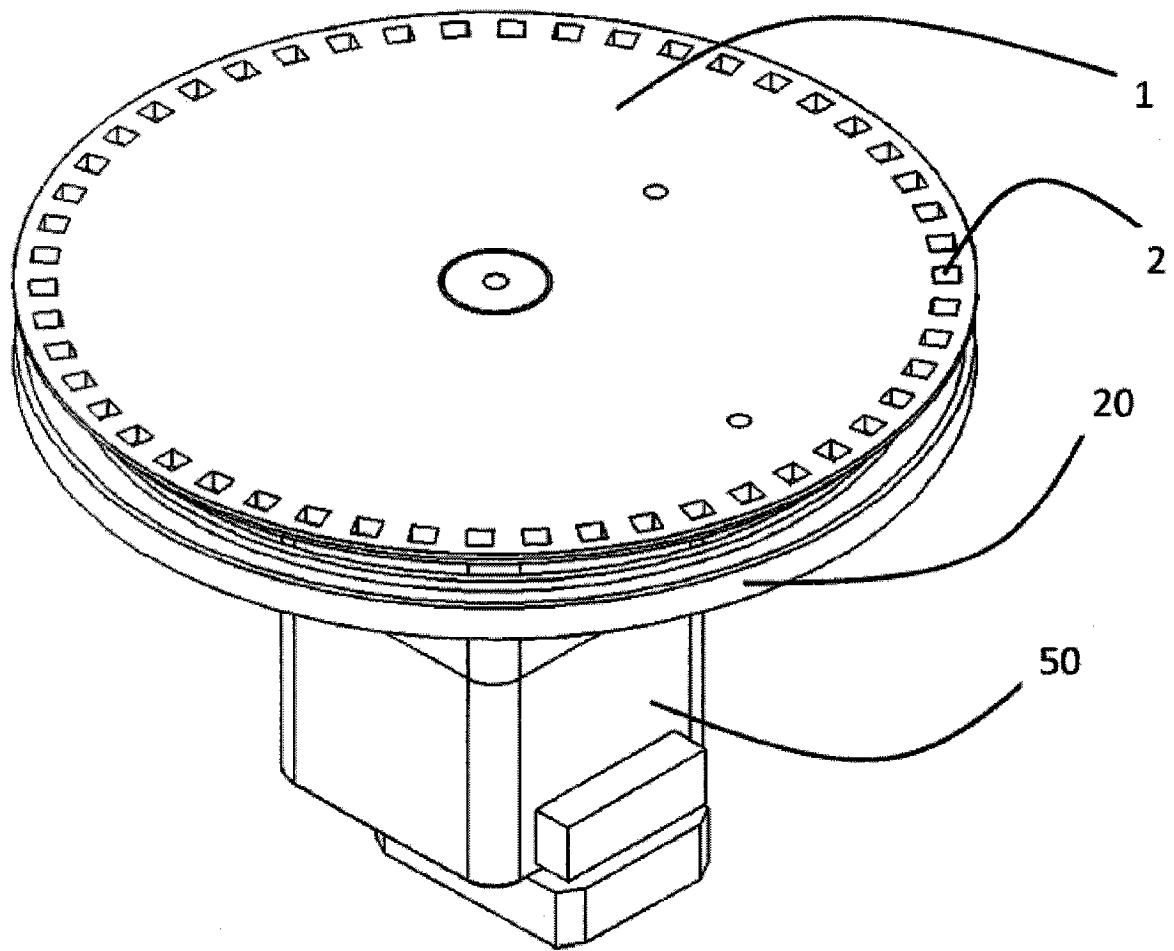


图11

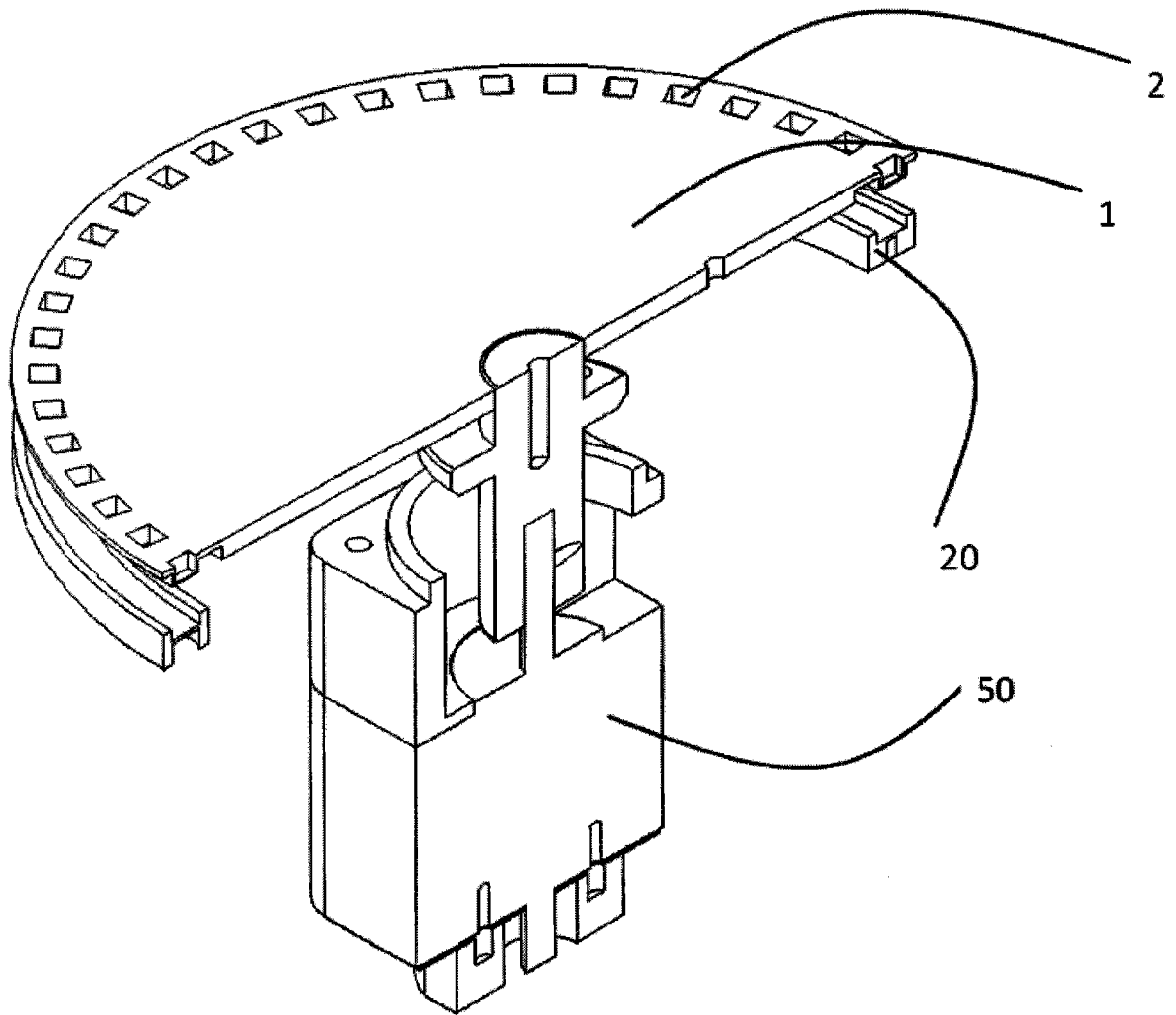


图12

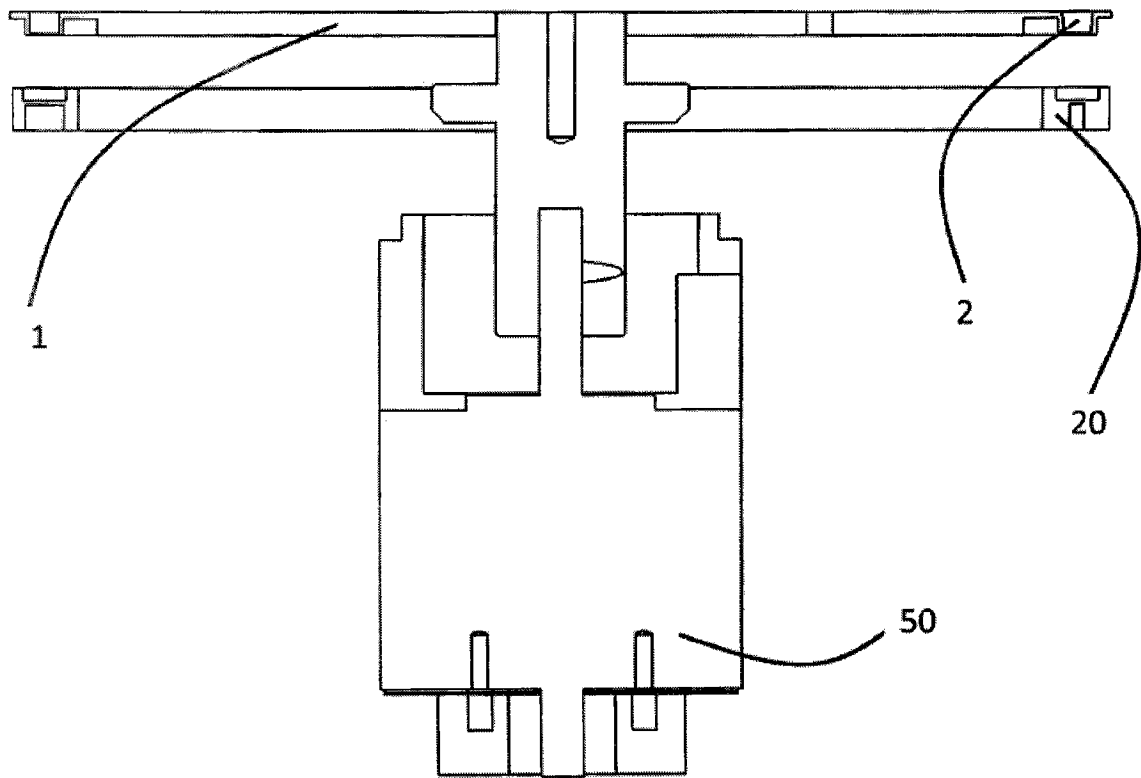


图13

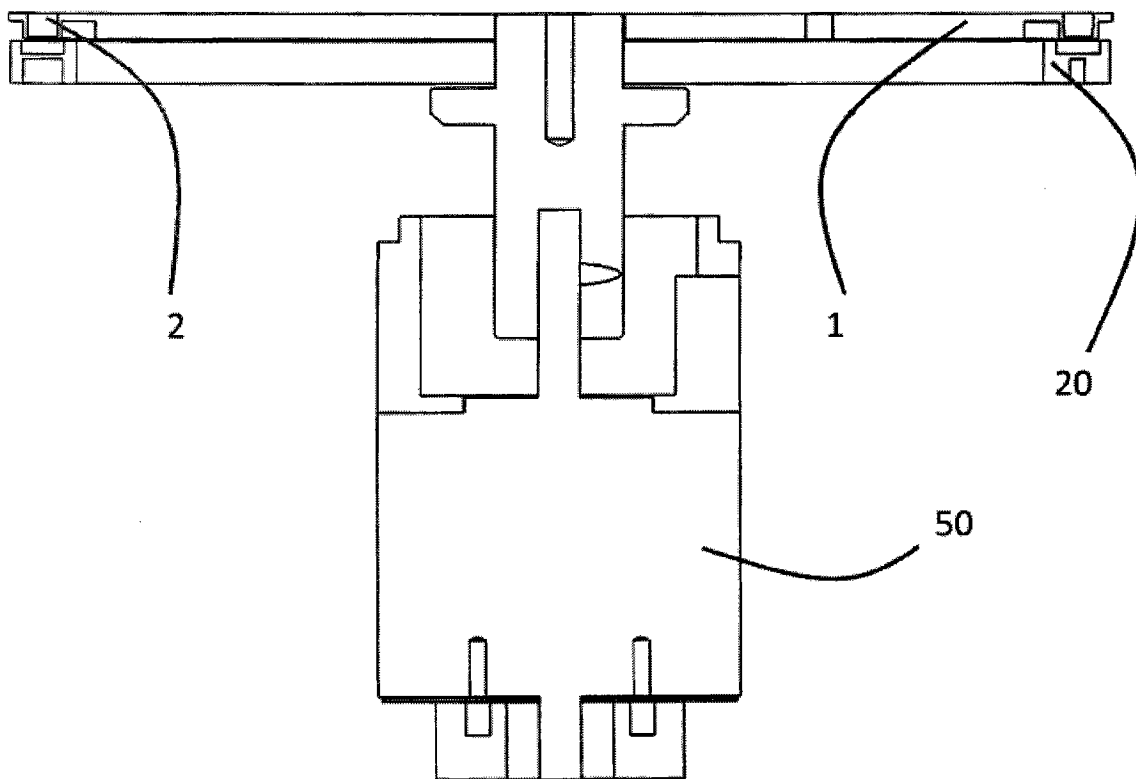


图14

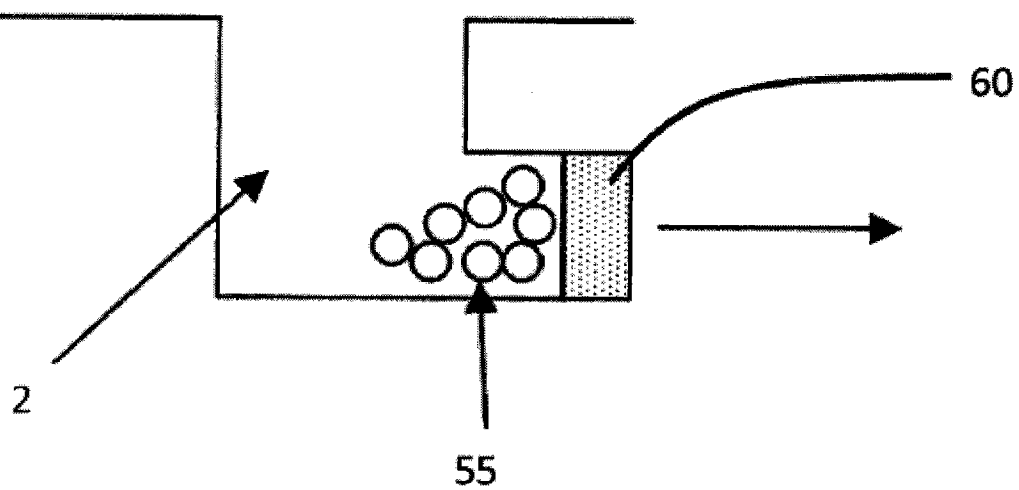


图15