



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102712950 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201080042696. 4

G01N 33/543(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 29

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

2009903546 2009. 07. 29 AU

CN 101389956 A, 2009. 03. 18,

WO 2005093388 A1, 2005. 10. 06,

EP 1324042 A2, 2003. 07. 02,

US 2004234970 A1, 2004. 11. 25,

US 6258533 B1, 2001. 07. 10,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2010/000953 2010. 07. 29

审查员 张艳青

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/011823 EN 2011. 02. 03

(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 约翰·思恩·科比特

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

公司 11243

代理人 金鲜英 冯云

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

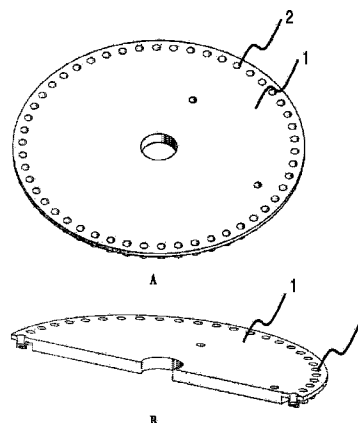
权利要求书2页 说明书19页 附图14页

(54) 发明名称

用于实施测定法的方法和装置

(57) 摘要

本发明涉及用于实施测定法的方法和装置。尤其,本发明涉及可以用于实施测定法、尤其多步骤测定法的可转动平台。本发明提供一种可转动平台,其适应于在所述平台的表面上的一个或多个分立区域内固定第一结合配偶体,或适应于在所述平台的表面上的一个或多个分立区域内选择性固定第二结合配偶体。本发明也涉及用于实施测定法的方法、装置、试剂盒和可转动平台用途。尤其,已经主要开发本发明用于通过焦磷酸测序法对核酸测序,然而本发明不限于该领域。



1. 一种对多核苷酸分子进行焦磷酸测序的方法,所述方法包括以下步骤:

提供可转动平台,所述可转动平台适应于在所述可转动平台的表面上一个或多个分立区域内固定多核苷酸分子;

将所述多核苷酸分子固定至所述可转动平台的所述表面上一个或多个所述分立区域;以及

使寡核苷酸引物与所述多核苷酸分子的单链退火,并且将一系列焦磷酸测序试剂从所述平台外部的点依次分配到每个所述分立区域,其中,在一个或多个或全部所述分配步骤后,充分地转动所述平台,从而基本上以离心方式从每个所述分立区域移去任何残余或未反应的所述试剂并且使所述任何残余或未反应的所述试剂脱离所述平台;

分析焦磷酸基团的存在;以及

重复所述分配和分析步骤,从而对所述多核苷酸分子进行测序。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述可转动平台是基本上圆形的并且其中2至500个分立区域分布在所述平台的周界周围。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述可转动平台的直径是在50至500mm之间并且所述平台的厚度是1至4mm,并且其中所述分立区域是基本上平的或基本上是浅孔,所述浅孔包含在0.5至100 μ L之间的体积或0.5至3mm的孔深度。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述可转动平台由选自聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯和聚丙烯的塑料材料形成或者由玻璃或石英形成。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述可转动平台由高抗冲聚苯乙烯形成。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述一个或多个分立区域是所述可转动平台上的涂层,其中,所述涂层适应于固定所述多核苷酸分子。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述多核苷酸分子化学地吸附到或者共价地或离子地或成氢键地结合到所述平台的每个所述分立区域上,或者范德华力将所述多核苷酸分子固定至所述平台的每个所述分立区域。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述可转动平台还包括布置在所述可转动平台周界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。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述焦磷酸测序试剂选自由如下所组成的组:一种或多种酶,底物,A、T、G和/或C核苷酸,洗涤试剂和淋洗试剂。

10. 根据权利要求1所述的方法,其中转动所述可转动平台的步骤以400至1000转/分钟的速度进行,从而基本上以离心方式将所述残余的试剂或所述未反应的试剂从所述平台移走,并且进一步包括以10至200转/分钟的速度转动所述可转动平台,同时分配所述试剂的步骤。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多核苷酸分子是DNA或者RNA或者它们的修饰形式。

12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多核苷酸分子是生物素酰化的并且所述分立区域包括用于结合生物素酰化的多核苷酸分子的抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白变体。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一系列焦磷酸测序试剂的分配包括:

- a) 将每种核苷酸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,并且任选地重复添加一次或多次。
14. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述分析焦磷酸基团的存在包括检测光信号。
15. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述多聚核酸分子是双链多聚核酸分子并且所述方法进一步包括在所述退火步骤之前使所述双链多核酸分子变性并且在变性之后离心去除未结合的链。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中所述变性包括加热所述双链多核酸分子以实现变性,或使所述双链多核酸分子暴露于升高的 pH。
17. 根据权利要求 1 所述的方法,进一步包括用洗涤试剂洗涤所述分立区域和任选的酶处理的步骤。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述洗涤步骤存在于一个或多个分配步骤之后。
19. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述酶包括 DNA 聚合酶、ATP 硫酸化酶、萤光素酶和腺苷三磷酸双磷酸酶。
20. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述底物包括腺苷 5' 磷酸硫酸盐 (APS) 和 / 或 荧光素。

用于实施测定法的方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及用于实施测定法的方法和装置尤其,本发明涉及可以用于实施测定法、尤其多步骤测定法的可转动平台。尽管已经主要开发本发明用于通过焦磷酸测序法对核酸测序,并且下文将参考这种应用描述本发明,然而将理解,本发明不限于这种具体使用领域。

背景技术

[0002] 提供以下的现有技术讨论以将本发明置于适宜的技术背景下并且能使本发明的优点更充分地理解。然而,应当理解在本说明书通篇范围内对现有技术的任何讨论不应当视为表示或暗示承认这种现有技术是广泛已知的或形成本领域公知常识的部分。

[0003] 测定 DNA 核苷酸序列的能力在最近时间变得日益重要。以往,两种最常使用的 DNA 测序方法是酶促链终止方法和化学切割技术,二者均依赖于凝胶电泳以根据大小解析从更大 DNA 区段产生的 DNA 片段。电泳步骤和检测分离的 DNA 片段是繁琐的过程。然而,尽管自动化电泳装置是市售的,电泳法不充分适合大规模基因组计划或临床测序,在这些情况下需要在高通量情况下相对有成本效益的装置。因而,对非电泳测序方法的需求是明显的。

[0004] 能够快速检测单一 DNA 碱基变化的技术也是遗传分析的重要工具。先前描述了基于固相原理的最小测序方案,其中测量放射标记的核苷酸的掺入并且将其用于分析人载脂蛋白 E 基因的三种等位多态性。然而,放射性方法不充分适合例行临床应用,并且因而,开发用于快速 DNA 序列分析的简单、非放射性方法还具有意义。

[0005] 先前已经描述了基于检测聚合酶反应期间释放的无机焦磷酸盐 (PPi) 的构思的测序方法 (见国际 PCT 公开号 W093/23564 和 W089/09283) 并且所述方法通常称作焦磷酸测序法。随着聚合酶反应期间每个核苷酸添加至正在生长的核酸链时,释放焦磷酸分子。已经发现可以例如通过萤光素酶-萤光素反应中光的产生酶促地检测在这些条件下释放的焦磷酸。此类方法能够鉴定靶位置内的碱基并且能够对 DNA 简单和快速地测序,同时不需要电泳和使用有害的放射标记物。

[0006] 用于实施焦磷酸测序法的早期现有技术方法使用 0.2mL 微量离心管 (或相似物) 同时依次添加试剂至该管以检测该管中存在的 DNA 的序列。尽管这种方法是相对简单的,但是该方法遭遇以下缺点:读出长度短,原因是该反应因每次添加核苷酸试剂而稀释和/或反应副产物积累并且反应条件达到该反应不再继续进行的程度。例如,通常仅可以用这种方法可靠地测得约 80 个碱基。

[0007] 也已经开发了利用焦磷酸测序法的商业设备。这些系统使用流动小室来进行靶 DNA/RNA 分子的杂交。旨在解释,通常通过固定双链 DNA 并且使互补链变性,将单链 DNA 固定在位于流动小室中的静止珠上。使包含核苷酸 (A、G、C 或 T) 的试剂流经该珠,并且如果掺入核苷酸,则检测到光。光的信号强度与单个反应中掺入的核苷酸的数目成正比。在该珠暴露于不同核苷酸之间,还进行洗涤步骤,并且重复该过程以检测下一个核苷酸的掺入。

[0008] 还已知借助合成的其他测序方法,例如通过使用荧光标记的核苷酸。在这种方法

中,首先将 DNA 样品片段化并且将 DNA 双螺旋解链成单链。在流动小室内部的表面上捕获单链 DNA 分子并且所述单链 DNA 分子充当合成测序方法的模板。将荧光标记的核苷酸一次添加一种并且由 DNA 聚合酶掺入正在生长的互补链中。洗去未使用的核苷酸。一旦用激光照亮,则掺入的核苷酸发射可检测到的光。在添加下一个核苷酸以继续该循环之前,除去荧光标记物。对核苷酸掺入的追踪确定每个单独 DNA 分子的精确顺序。

[0009] 借助连接的测序法也是已知的。这种 DNA 测序方法使用 DNA 连接酶来鉴定 DNA 序列中给定位置处存在的核苷酸。DNA 连接酶的错配敏感性用来确定靶 DNA 分子的潜藏序列。例如见美国专利号 5,750,341 和 US4,883,750。

[0010] 需要用于实施测定法和分析的装置,所述装置可以随多种化学和检测方法一起使用,和尤其用于实施包括多重反应和洗涤步骤(如核酸测序中所用的多重反应和洗涤步骤)的测定法的装置。另外,需要这样的装置,所述装置可以用作要求流通环境的测定法的便利替代物或用来替换其中在核酸测序情况下稀释效应限制最大测序读出长度的固定反应容器测定法。

[0011] 本发明的目的是克服或改进上述现有技术的缺点中至少一者或是提供有用的替代物。

发明内容

[0012] 根据第一方面,本发明提供一种用于实施测定法的可转动平台,所述平台适应于在所述平台的表面上的一个或多个分立区域内固定第一结合配偶体。

[0013] 根据第二方面,本发明提供一种用于实施测定法的可转动平台,所述平台适应于在所述平台的表面上的一个或多个分立区域内选择性固定第二结合配偶体。

[0014] 在一个实施方式中,该平台的整个上表面适应于固定第一结合配偶体或选择性固定第二结合配偶体。然而,在其他实施方式中,在该平台的表面或备选地第二表面上提供多个分立区域或预定义的部位或靶部位,其中所述的第二表面相对容易地与该平台(例如,珠)的表面结合以固定第一结合配偶体或选择性固定第二结合配偶体。在另一个实例中,所述分立区域是可转动平台上的涂层,其中该涂层适应于固定第一结合配偶体。

[0015] 在一些实施方式中,第一结合配偶体化学地吸附在该平台的表面上。在其他实施方式中,第一结合配偶体与该平台的表面共价地或离子地或成氢键地结合,并且在其他实施方式中,范德华力将第一结合配偶体固定至该平台的表面。可以理解第二结合配偶体是与已经与该平台的表面结合的第一结合配偶体可结合或可反应的。

[0016] 本发明特别涉及诸如核酸测序法(例如焦磷酸测序法)的方法和测定法。例如,单一和第二结合配偶体是结合配偶体对(任选地,其中之一可以是可检测标记的),它们优选地选自抗生物素蛋白或链霉亲和素或链霉抗生物素蛋白变体(streptactin)或类似物以及生物素或类似物。

[0017] 然而并且如下文进一步讨论,本发明的优点会提供相对快速且相对简单的洗涤步骤,和相关的低废弃体积的洗涤液及试剂。

[0018] 本发明现在将在焦磷酸测序法的背景下解释,然而可以理解本发明不限于这种测定法。

[0019] 可以理解在第一方面,该平台适应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酰化 DNA 反应。可以进一步理解在第二方面, 该平台已经包含第一结合配偶体, 并且该平台适应于选择性固定第二结合配偶体。因此, 可以进一步理解, 根据第一方面的平台可以认为是 ‘非官能化的’, 并且根据第二方面的平台可以认为是 ‘官能化的’ 或 ‘预官能化的’。

[0020] 根据第三方面, 本发明提供一种用于实施测定法的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0021] 提供根据第一方面的平台;

[0022] 将第一结合配偶体结合或固定至所述平台的所述表面上或嵌于所述平台 (例如, 珠) 的所述表面内的表面上的一个或多个分立区域; 并且

[0023] 使每个所述分立区域依次地与一系列试剂接触, 其中在一个或多个或全部的所述接触步骤之间如此转动所述平台, 从而基本上以离心方式从每个所述分立区域移去任何残余或未反应的所述试剂。

[0024] 优选地, 所述系列试剂的第一者包含针对第一结合配偶体的第二或互补性结合配偶体, 并且后续的试剂选自洗涤或淋洗试剂, 并且如下文进一步讨论。

[0025] 根据第四方面, 本发明提供一种用于实施测定法的方法, 所述方法包括以下步骤:

[0026] 提供根据第二方面的平台;

[0027] 将第二结合配偶体选择性结合或固定至所述平台的所述表面上或嵌于所述平台中的表面上的一个或多个分立区域; 并且

[0028] 使每个所述靶部位依次地与一系列试剂接触, 其中在一个或多个或全部的所述接触步骤之间如此转动所述平台, 从而基本上以离心方式从每个所述靶部位移去任何残余或未反应的所述试剂。

[0029] 优选地, 本发明的方法还包括在每个所述接触步骤期间和 / 或之后分析所述测定法的步骤。在优选的实施方式中, 在分立区域与后续试剂接触之前, 每个所述分立区域经受采用洗涤试剂的洗涤或淋洗步骤。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所述溶液中存在的组分 (活性物质, 例如, 降解副产物或降低副产物浓度的腺苷三磷酸双磷酸酶或其他合适酶) 的量。

[0030] 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。

[0031] 优选地, 在分配试剂时, 可转动平台以低速度转动, 例如以约 10 至 200 转 / 分钟转动, 从而不移走添加至靶部位的试剂; 并且在分配试剂时, 该平台以低速度转动, 例如以约

400 至 1000 转 / 分钟转动。然而,可以理解其他转动速度是可能的。

[0032] 在优选的实施方式中,通过以下方式将每个所述分立区域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移走任何残余试剂而基本上‘干燥’所述分立区域,从而所述分立区域被来自先前步骤的试剂污染的情况大为减少,优选地基本上不存在。

[0033] 根据第五方面,本发明提供根据第一或第二方面的平台用于实施测定法的用途。

[0034] 根据第六方面,本发明提供试剂盒,所述试剂盒包括根据第一或第二方面的平台和用于实施所述测定法的一种或多种试剂。

[0035] 根据第七方面,本发明提供用于实施测定法的装置,所述装置包括:

[0036] 用于以预定的可控的用户可选性转动速度转动根据第一或第二方面的平台的装置;

[0037] 任选地,用于分配所述第一结合配偶体到所述平台的所述表面上的所述一个或多个分立区域上,以固定所述第一结合配偶体至所述分立区域的装置;或用于分配所述第二结合配偶体到所述平台的所述表面上的所述一个或多个分立区域,以选择性固定所述第二结合配偶体至所述分立区域的装置;

[0038] 用于分配试剂与所述分立区域接触的装置;以及

[0039] 任选地,用于分配洗涤试剂的装置。

[0040] 优选地,用于转动该平台的装置是马达,并且预定的转动速度是用户可选的并且在约 10 至 1000 转 / 分钟之间。该装置还优选地配有真空抽取系统以抽取从所述可转动平台甩离的废试剂。

[0041] 在可选性设计中,可转动平台并不一定需要本身是盘;它可能由多个分立的反应孔组成,其中将所述反应孔载入以转动模式容纳每个分立反应孔的挂篮中。例如,改良的 0.2mL 离心管可以在可转动挂篮形式的平台上以 45 度安装。在这种布局中,离心管的盖是打开的并且位于水平面上(该盖的内侧面朝上)。该盖经过修改,从而可能将以低每分钟转速分配至该盖中 / 上的试剂以高每分钟转速离心至该管中。离心管的塑料铰合部也优选地经修改以充当引导废试剂离开盖至管的通道。此盖充当接受并固定第一结合配偶体或者接受并选择性固定第二结合配偶体并且随后接受后续试剂的分立区域,并且管本身将充当废物槽 / 容器。优点是操作员可以通过插入所需要数目的管至挂篮中装载一份样品许多样品。

[0042] 根据第八方面,本发明提供用于实施测定法的装置,所述装置包括:

[0043] 包含分立区域的平板,其中所述分立区域适应于固定第一结合配偶体或选择性固定第二结合配偶体;和

[0044] 通过凸缘与所述平板连接的容器,其中所述凸缘包含用于流体从所述平板通达所述容器的通道。

[0045] 优选地,该容器包含开顶(open top)并且该平板包含适应于选择性啮合该容器开顶并且提供流体密封的凸缘。优选地,该平板是此容器的盖。

[0046] 优选地,该容器包含放射状向外扩展的用于在支架(如转盘(carousel))中支撑该容器的环状凸缘。优选地,容器是基本上圆柱形的。优选地,该容器是一次性的,并且由塑料材料制成。

[0047] 优选地,根据第七方面的用于实施测定法的装置是改良的微量离心机 / 微量离心

管,如改良艾本德(Eppendorf®)。

[0048] 根据第九方面,本发明提供可转动挂篮,所述挂篮适应于接受2块或多块平板,每块平板包含适应于固定第一结合配偶体或适应于选择性固定第二结合配偶体的分立区域。优选地,可转动挂篮还适应于接受两个或更多个容器,每个容器通过凸缘与相应平板连接,其中所述凸缘包含用于流体从所述平板通达所述容器的通道。优选地,所述平板是改良微量离心管的盖并且所述容器是微量离心管本身。优选地,第九方面利用根据第八方面的装置。

[0049] 根据第十方面,本发明提供一种用于实施测定法的方法,所述方法包括以下步骤:

[0050] 提供根据第九方面的可转动挂篮和根据第八方面的装置;

[0051] 使至少一块平板啮合至所述平台;

[0052] 将第一结合配偶体结合或固定至所述分立区域,或将第二结合配偶体选择性结合或固定至所述分立区域;以及

[0053] 使每个所述分立区域依次地与一系列试剂接触,其中在每个或任何的所述接触步骤之间如此转动可转动挂篮(cradle),从而基本上以离心方式从所述分立区域移去任何残余或未反应的所述试剂。

[0054] 根据第十一方面,本发明提供根据第九方面的可转动挂篮用于实施测定法的用途,或根据第八方面的装置用于实施测定法的用途。

[0055] 根据第十二方面,本发明提供试剂盒,所述试剂盒包括根据第八方面的装置和用于实施所述测定法的一种或多种试剂。

[0056] 根据第十三方面,本发明提供试剂盒,所述试剂盒包括根据第九方面的可转动挂篮和用于实施所述测定法的一种或多种试剂。

[0057] 根据第十四方面,本发明提供用于实施测定法的装置,所述装置包括:

[0058] 用于以预定的可控的用户可选性转动速度转动根据第九方面的可转动挂篮的装置;

[0059] 任选地,用于分配第一结合配偶体或第二结合配偶体到所述分立区域上的装置;以及

[0060] 用于分配一种或多种试剂与所述分立区域接触的装置。

[0061] 本发明的其他方面涉及平行地实施测定法。例如,根据第十五方面,本发明提供用于实施测定法的可转动圆柱体,所述圆柱体具有至少一条在周围伸展的通道,每条通道包含一个或多个适应于固定第一结合配偶体或适应于选择性固定第二结合配偶体的分立区域。可以理解在这个方面,本发明提供用于实施测定法的圆柱体,其中所述圆柱体适应于或设置成是可转动的。技术人员会理解,这种实施方式能够使许多样品同时或平行地运转。

[0062] 可以理解,可转动圆柱体可以装在具有纵向伸展的缝隙的容器中,其中所述的缝隙能够使结合配偶体和试剂等分配到分立区域上。当然,可以理解当圆柱体以高速度转动时,检测单元会处于废液的切线路径中。因此,可以使用在离心期间关闭纵向伸展的缝隙的开闭器避免这种情况。

[0063] 根据第十六方面,本发明提供一种用于实施测定法的方法,所述方法包括以下步骤:

[0064] 提供根据第十五方面的可转动圆柱体；

[0065] 将所述第一结合配偶体结合或固定至一个或多个分立区域，或将第二结合配偶体选择性结合或固定至一个或多个分立区域；和

[0066] 使每个所述分立区域依次地与一系列试剂接触，其中在每个或任何的所述接触步骤之间如此转动可转动圆柱体，从而基本上以离心方式从所述分立区域移去任何残余或未反应的所述试剂。

[0067] 根据第十七方面，本发明提供根据第十五方面的可转动圆柱体用于所述测定法的用途。

[0068] 根据第十八方面，本发明提供试剂盒，所述试剂盒包括根据第十五方面的可转动圆柱体和用于实施所述测定法的一种或多种试剂。

[0069] 根据第十九方面，本发明提供用于实施测定法的装置，所述装置包括：

[0070] 用于以预定的可控的用户可选性转动速度转动根据所述第十五方面的可转动圆柱体的装置；

[0071] 任选地，用于分配所述第一或第二结合配偶体到一个或多个分立区域上，以固定或选择性分别固定所述结合配偶体至所述分立区域的装置；和

[0072] 用于分配试剂与所述分立区域接触的装置。

[0073] 本发明现在将在焦磷酸测序法的背景下解释，然而可以理解本发明不限于这种测定法。

[0074] 焦磷酸测序法

[0075] 在第二十方面，所述测定法是焦磷酸测序法，并且本发明提供一种用于实施核酸链测序的可转动平台，所述平台适应于在所述平台的表面上或在嵌于所述表面内的珠子的一个或多个分立区域内固定核酸链结合配偶体。

[0076] 在第二十一方面，所述测定法是焦磷酸测序法，并且本发明提供一种用于实施核酸链测序的可转动平台，所述平台适应于在所述平台的表面上或在嵌于所述表面内的珠子上的一个或多个分立区域内选择性固定核酸链。

[0077] 优选地，使用的测序方法是焦磷酸测序法。然而，可以理解可以利用对核酸链测序的其他方法，如下文进一步讨论。

[0078] 优选地，所述核酸链是 DNA 或 RNA 或它们的修饰形式，例如亚硫酸氢盐处理后，或涵盖天然存在核酸中不存在的额外碱基。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。

[0079] 优选地，可转动平台是基本上圆形的，并且具有约 50 至 500mm 之间的直径。优选地，可转动平台包括约 2 至 500 个之间的分立区域，所述分立区域与可转动平台的中心等距地间隔。可以理解该直径可以是任意直径，并且可以选择该直径以容纳分立区域的数量，所述数量可以在数字上是 2 或更大。在优选的实施方式中，所述分立区域基本上均匀地分布或位于可转动平台的周界周围以形成基本上圆形的阵列。

[0080] 优选地，所述分立区域适应于选择性结合、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酰化的，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，用于固定生物素酰化的核酸链。备选地，所述分立区域或珠适应于结合、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,将生物素酰化的核酸链选择性固定至与所述分立区域结合的抗生物素蛋白。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。

[0081] 技术人员会理解,也可能需要处理可转动平台上的分立区域以允许链霉亲和素(或等同的化学,如上文讨论)选择性地与其结合或黏附。例如,如果制成可转动平台的材料是聚碳酸酯,则链霉亲和素抗拒与这种聚合物的结合或不与之结合。因此,所述分立区域可能需要与链霉亲和素结合的材料(如聚苯乙烯)的涂层。当然,技术人员会理解,可以使用除聚苯乙烯之外的材料来产生用于与链霉亲和素结合的分立区域,并且因此最终能够使生物素酰化的核酸链固定至所述分立区域。优选地,所述分立区域包括适应于能够使核酸与之选择性固定的处理。

[0082] 在一个实施方式中,本发明的平台是一次性物品,然而在备选实施方式中,就核酸而言,该平台适于被‘清洁’并且在其他测定法中重复使用。例如,该平台可以由陶瓷或玻璃制成。

[0083] 在一个实施方式中,所述分立区域单纯地是可转动平台的表面上的区带或区域,其适应于接受并且选择性保留核酸链或抗生物素蛋白/链霉亲和素。所述分立区域可以是基本上平的,或具有与可转动平台相同的面貌。然而在其他优选的实施方式中,所述分立区域可以是浅孔,所述浅孔可以包括约 0.5 至 100 μL 之间的体积。可以理解浅孔可以是任何形状,并且所述的孔可以具有任何体积。然而,就常见焦磷酸测序分析/测定法中所用试剂的相对小的量,所述孔适应于仅含有低体积,如约 0.5 至 10 μL 之间。在其他实施方式中,构思了与可转动平台的表面相比,所述分立区域甚至可能是相对升高的部分。

[0084] 在优选的实施方式中,所述分立区域具有约 1 至 5mm 的直径。然而,可以理解在平面图中观察时,所述分立区域可能具有任何直径或形状。

[0085] 优选地,该可转动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。

[0086] 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周界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,应当移去与分立区域接触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。

[0087] 备选地,废弃试剂可以每隔 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。

[0088] 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分立区域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界布置的槽,从而在所述‘静止的’槽中接住在所述转动平台转动期间从其表面甩离的废液。

[0089] 熟悉焦磷酸测序法背后的技术和化学的技术人员会理解固定至分立区域的核酸

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分立区域或甚至整个可转动平台至足以变性的温度,例如 94 至 99℃,或通过使分立区域暴露于加热至超过 94℃的溶剂如缓冲液。备选地,分立区域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。可以理解可转动平台应当由能够耐受此类变性条件的材料制成。

[0090] 也可能使可转动平台能够加热和冷却,从而使 DNA 与杂交或捕获的核酸靶或与捕获的测序引物熔融。在焦磷酸测序法的情况下,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,可以将可转动平台加热以除去 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。

[0091] 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靶部位范围内的 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。

[0092] 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。现有技术方法遭遇以下缺点: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。本发明不产生从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分立区域基本上移走,所述分立区域在与后续核苷酸试剂接触之前还任选地被洗涤。构思了超过 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。

[0093] 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。

[0094] 与一些现有技术仪器相比,本发明还能够使流体操作改善。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。

[0095] 焦磷酸测序法是基于‘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($\text{DNA} + x\text{dNTP}^- \rightarrow \text{DNA}_{n+1} + \text{PPi}$ 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。

[0096] 1. 硫酸化酶 $\text{APS} + \text{PPi}^- \rightarrow \text{ATP} + \text{SO}_4$

[0097] 2. 萤光素酶 $\text{萤光素} + \text{ATP}^- \rightarrow \text{氧代萤光素} + \text{PPi} + \text{光}$

[0098] 3. 腺苷三磷酸双磷酸酶:降解剩余 dNTP 和 ATP

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 就广义看来,焦磷酸测序法遵循以下一般步骤:

[0102] 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。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)。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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测序引物的步骤和逐步添加核苷酸的循环。尽管本发明已经就焦磷酸测序法方面例举,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。焦磷酸测序法要求存在 ssDNA 模板。任选地,可转动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复性测序引物,因而消除对独立分离步骤的需求。在本

发明的一个实施方式中,可转动平台可以用来通过例如添加实现优先降解 dsDNA 链中一条链的酶或酶混合物产生 ssDNA。

[0107] 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)和任选地可检测标记物(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。

[0108] 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。

[0109] 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。

[0110] 本领域技术人员还会理解,术语“流通 DNA 测序法”包括上文所提及技术的全部。另外,在又一个实施方式中,如本文所述的“流通 DNA 测序”法可以包括酶的使用,其中所述酶固定在平台表面上和/或在结合至或固定于该平台表面上的其他表面上,例如固定在以如此方式被修饰从而可以结合所述酶的珠上。

[0111] 根据第二十二方面,本发明提供一种用于实施核酸链测序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0112] 提供根据第二十方面的平台;

[0113] 将核酸链结合配偶体结合或固定至所述分立区域并且随后将核酸链选择性结合或固定至所述分立区域;

[0114] 任选地变性并移走任何互补性核酸链,使测序引物与所述分立区域复性;以及

[0115] 使每个所述分立区域依次地与包含 A、T、G 和/或 C 核苷酸或相应的合适核苷酸类似物的一系列试剂接触,其中在每个或任何的所述接触步骤之间如此转动所述平台,从而基本上以离心方式从所述分立区域移去基本上任何残余或未反应的试剂。

[0116] 任选的洗涤步骤或酶处理可以改善残余或未反应试剂的移去。

[0117] 根据第二十三方面,本发明提供一种用于实施核酸链测序的方法,所述方法包括以下步骤:

[0118] 提供根据第二十一方面的平台;

[0119] 将核酸链选择性结合或固定至所述分立区域;

[0120] 任选地变性并移走任何互补性核酸链,使测序引物与所述分立区域复性;并且

[0121] 使每个所述分立区域依次地与包含 A、T、G 和/或 C 核苷酸或相应的合适核苷酸类似物的一系列试剂接触,其中在每个或任何的所述接触步骤之间如此转动所述平台,从而基本上以离心方式从所述分立区域移去任何残余或未反应的所述试剂。

[0122] 在这个方面,可以理解所述分立区域已经使核酸链结合配偶体与其固定,并且所述核酸链正是与所述核酸链结合配偶体选择性结合。

[0123] 任选的洗涤步骤或酶处理可以改善残余或未反应试剂的移去。

[0124] 在一个实施方式中,依次接触步骤包括:

[0125] 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

[0126] b.) 作为混合物的 A+T+G+C 核苷酸, 并且再次添加该混合物等。

[0127] 在另一个实施方式中, 使每个所述分立区域依次地与包含 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:

[0128] 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,

[0129] 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。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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。可以理解随着可转动平台转动, 样品通过该检测器, 优选地, 全部样品均通过该检测器。

[0133] 在优选的实施方式中, 在分立区域与后续试剂接触之前, 每个所述分立区域经受采用洗涤试剂的洗涤或淋洗步骤。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。

[0134] 优选地, 在分配试剂和所述酶时, 可转动平台以低速度转动, 例如以约 10 至 200 转 / 分钟转动, 从而不移走添加至分立区域的试剂; 并且在分配洗涤试剂时, 该平台以低速度转动, 例如以约 400 至 1000 转 / 分钟转动。然而, 可以理解其他转动速度是可能的。

[0135] 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。

[0136] 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, 用淋洗试剂 (rinsing reagent) 通过淋洗步骤移去互补链的步骤。

[0137] 优选地, 通过以下方式将每个所述分立区域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移走任何残余试剂而基本上干燥所述分立区域, 从而所述分立区域被试剂污染的情况大为减少, 优选地基本上不存在所述分立区域被试剂污染的情况。

[0138] 根据第二十四方面, 本发明提供根据第二十或第二十一方面的平台用于实施核酸链测序的用途。

[0139] 根据第二十五方面, 本发明提供试剂盒, 所述试剂盒包括根据第二十或第二十一方面的平台和用于实施核酸链测序的一种或多种试剂。

- [0140] 根据第二十六方面,本发明提供用于核酸链测序的装置,所述装置包括:
- [0141] 用于以预定的可控的用户可选性转动速度转动根据第二十方面的平台的装置;
- [0142] 任选地,用于分配核酸链结合配偶体到所述分立区域上以使所述核酸链结合配偶体固定至所述分立区域的装置;
- [0143] 任选地,用于分配核酸链到所述分立区域上以选择性地使所述核酸链固定至所述分立区域的装置;
- [0144] 任选地,用于变性并且任选移走任何互补性核酸链的装置;
- [0145] 用于分配 A、T、G 和 / 或 C 核苷酸或其相应类似物或其组合与所述分立区域接触的装置;
- [0146] 用于分配洗涤试剂的装置;和
- [0147] 任选地,用于分配一种或多种酶溶液的装置。
- [0148] 根据第二十七方面,本发明提供用于核酸链测序的装置,所述装置包括:
- [0149] 用于以预定的可控的用户可选性转动速度转动根据第二十一方面的平台的装置;
- [0150] 任选地,用于分配核酸链到所述分立区域上以选择性地使所述核酸链固定至所述分立区域的装置;
- [0151] 任选地,用于变性并且任选移走任何互补性核酸链的装置;
- [0152] 用于分配 A、T、G 和 / 或 C 核苷酸或其相应类似物或其组合与所述分立区域接触的装置;
- [0153] 用于分配洗涤试剂的装置;以及
- [0154] 任选地,用于分配一种或多种酶溶液的装置。
- [0155] 优选地,用于转动该平台的装置是马达,并且预定的转动速度是用户可选的并且在约 10 至 1000 转 / 分钟之间。用于分配所述核酸链、用于分配 A、T、G 和 / 或 C 核苷酸和用分配洗涤试剂 (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转动平台甩离的废试剂。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。
- [0156] 用于变性和任选地移走任何互补性核酸链的装置可以包括用于加热该平台至 94℃ 的装置,或还包括分配加热过的试剂或其他变性化学品的注射器或蠕动分配器。
- [0157] 在备选性设计中,可转动平台并不一定需要本身是盘;它可能由多个分立的反应孔组成,其中将所述反应孔载入以转动模式容纳每个分立反应孔的挂篮中。例如,改良的 0.2mL 离心管可以在可转动挂篮形式的平台上以 45 度安装。在这种布局中,该盖是打开的并且处于水平面上(该盖的内侧面朝上)。该盖经过修改,从而可能将以低每分钟转速分配至该盖中的试剂以高每分钟转速离心至该管中。离心管的塑料铰合部也经修改以充当引导废试剂离开盖至管的通道。此盖会充当执行测序反应的分立区域,并且管本身将充当废物槽。优点是操作员可以通过插入所需要数目的管至挂篮中装载一份样品许多样品。
- [0158] 本发明的其他方面涉及平行地实施核酸链测序,即,多重测序。例如,本发明提供用于实施核酸链测序的可转动圆柱体,所述圆柱体具有至少一条在周围伸展的通道,每条

通道包含一个或多个适应于固定第一结合配偶体或适应于选择性固定第二结合配偶体的分立区域。技术人员会理解,这种实施方式能够使许多样品同时或平行地运转。

[0159] 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 / 或扩散 (permeation)。

附图说明

[0160] 例如仅参考附图,现在描述本发明的优选实施方式,在所述附图中:

[0161] 图 1A 是本发明可转动平台的平面图;

[0162] 图 1B 是图 1A 中所示的可转动平台的侧视图;

[0163] 图 1C 是沿图 1B 的线 1C-1C 上取得的截面图;

[0164] 图 2A 是透视图,并且图 2B 是图 1 中所示可转动平台的实施方式的剖面透视图;

[0165] 图 3A 是透视图,并且图 3B 是图 1 中所示可转动平台的实施方式的剖面透视图;

[0166] 图 4A 和 4B 分别是图 1 中所示并且具有周沿槽的可转动平台的备选实施方式的平面图及侧视图;

[0167] 图 5 是图 1A 中所示可转动平台安装于其中的装置的截面图;

[0168] 图 6 显示了使用用于监测反应的聚焦光学器件的光学检测装置;

[0169] 图 7 显示了使用用于监测反应的直接成像法的光学检测装置;

[0170] 图 8 显示用于加热该平台上分立区域的加热环;

[0171] 图 9 显示并入图 8 中所示加热环的装置;

[0172] 图 10A 是挂篮形式的可转动平台的平面图,所述挂篮适应于接受用于实施核酸测序的至少一个微量离心管;

[0173] 图 10B 是图 4A 中所示的可转动挂篮的侧视图;

[0174] 图 10C 是沿图 10B 的线 10C-10C 上取得的截面图;

[0175] 图 10D 是随本发明可转动平台一起使用的改良离心管的透视图,所述的可转动平台是可转动挂篮形式;

[0176] 图 11 是在 EDC 存在下用链霉亲和素包被的聚苯乙烯孔的热解图结果;

[0177] 图 12 是链霉亲和素阴性对照孔的热解图,该热解图显示仅与链霉亲和素结合的模板可能已经产生信号;

[0178] 图 13 是 EDC 阴性对照孔的热解图,该热解图显示测序期间无信号;并且

[0179] 图 14 是使用测序 - 洗涤 - 测序策略时, SEQ-OLIGO-30BP 合成性寡核苷酸序列的热解图。

[0180] 定义

[0181] 在描述并要求保护本发明时,将根据下文所述定义使用以下术语。也应当理解,本文所用术语的目的仅在于描述本发明的具体实施方式并且不意图是限制性的。除非另外定义,本文所用的全部技术及科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常所理解那样相同的意思。

[0182] 除非上下文清晰地要求,否则在本说明书和权利要求书通篇范围内,与排他性或详尽性意思相反,词‘包含’、‘包含着’等应当以包容性意思,也就是说,以‘包含,但不限于’的意思解释。

[0183] 在下文或另外指出的情况下, ‘%’ 将意指 ‘重量%’, ‘比率’ 将意指 ‘重量比’ 并且 ‘份’ 将意指 ‘重量份’。

[0184] 尽管描述本发明广阔范围的数字范围和参数是近似值, 但是尽可能精确地报道具体实例中所述的数值。然而, 任何数值内在地含有因它们相应的检验量值中存在的标准偏差而必然产生的某些误差。

[0185] 为提供更精确的描述, 本文中给出的一些定量性表述不用术语 ‘约’ 限制。应理解无论是否明确地使用术语 ‘约’, 本文中给出的每个量意指实际给出的值, 并且还意指这种给出值的将基于本领域技术人员合理推断的近似值, 包括因这种给出值的实验条件和 / 或测量条件所致的近似值。

[0186] 如本文所用的术语 ‘主导地’ 和 ‘基本上’ 应当意指包含以重量计多于 50%, 除非另外说明。

[0187] 对使用端点的数字范围的描述包括隶属该范围的全部数字 (例如, 1 至 5 包括 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5 等)。

[0188] 术语 ‘优选的’ 和 ‘优选地’ 指可以在某些环境下提供某些益处的本发明实施方式。然而, 在相同或其他环境下, 其他实施方式可以也是优选的。另外, 对一个或多个优选实施方式的描述不暗示其他实施方式不是有用的, 并且不意图从本发明的范围中排除其他实施方式。

[0189] 术语 ‘一 (a)’、‘一 (an)’ 和 ‘该 (the)’ 意指 ‘一个或多个’, 除非另外明确地说明。术语 ‘一个实施方式’、‘实施方式’、‘诸实施方式’、‘该实施方式’、‘这些实施方式’、‘一个实施方式’、‘一些实施方式’、‘一个示例实施方式’、‘至少一个实施方式’、‘一个或多个实施方式’ 和 ‘一个实施方式’ 意指 ‘本发明的一个或多个 (但是并不必定全部) 实施方式’, 除非另外明确地说明。

[0190] 列举的细目名单不暗示任何或全部的细目是相互排斥的。列举的细目名单不暗示任何或全部的细目总体上穷尽任何事物, 除非另外明确地说明。列举的细目名单不暗示诸细目根据列举它们的次序以任何方式排序。

[0191] 本专利申请中提供的各部分的标题并且该专利申请的标题仅出于方便目的, 并且不应以任何方式理解为限制本公开。

[0192] 如本文所用, 术语 ‘结合配偶体’ 理解为意指结合配偶体对的一个成员, 所述结合配偶体对可以是任何配体 / 受体对。该结合配偶体对的一个成员称作 “第一结合配偶体” 并且该结合配偶体对的另一个成员称作 “第二结合配偶体”。例如, 该结合配偶体对可以是链霉亲和素 / 抗生物素蛋白和生物素。该结合配偶体对可以包括例如链霉亲和素和生物素酰化的核酸。

[0193] 如本文所用, 术语 ‘可转动的’ 意图指适应于被转动。

具体实施方式

[0194] 本专利申请中描述了众多实施方式, 并且仅出于说明目的提出它们。所描述的实施方式无论如何不意图是限制性的。本发明广泛适用于众多实施方式, 如从本文公开内容轻易可见。将这些实施方式充分详细地描述以使本领域技术人员能够实施本发明, 并且应当理解, 可以使用其他实施方式并且可以做出其他变化而不脱离本发明的范围。因此, 本领

域技术人员会认识到,可以在多种修改和改变的情况下实施本发明。现在将参考附图,其中相似的附图标记在通篇范围表示相似的部分。

[0195] 现在将参考焦磷酸测序法描述本发明的优选实施方式。参考焦磷酸测序法情况对优选实施方式的描述不应当理解为将本发明限于焦磷酸测序法。

[0196] 参考图 1,提供了聚碳酸酯盘 1 形式的可转动平台,所述的聚碳酸酯盘 1 包括适应于选择性留住用于实施核酸测序的核酸链的两个或多个分立区域 2。分立区域 2 优选地具有约 2-3mm 的直径,用链霉亲和素包被,并且以相等间隔的间距环绕盘 1 的周长存在。例如,具有 120mm 直径的盘 1 具有 377mm 的周长,并且通过以距离盘 1 中心的半径 55mm 形成(分立区域/靶部位 2 的各中心之间)间隔为 6mm 的直径 3mm 分立区域 2,在盘 1 的周界周围产生大致 57 个分立区域。然而,通过使用更大的盘 1 或更小分立区域,例如,0.5mm 直径间距 1mm 或任何其组合,分立区域的数目可以是更小或更大数字。优选地,分立区域 2 是包括约 0.5 至 100 μ L 之间体积的浅孔。

[0197] 可以在图 2 和图 3 中见到其他实施方式,其中相似特征已经给予相似附图标记。在这些实例中,可转动平台具有 120mm 直径,伴有在周界周围相等间隔的 50 个孔。所述孔具有约 3mm 直径,并且可以由包括聚碳酸酯、透明聚苯乙烯和白色高抗冲聚苯乙烯(HIPS)的材料制成。平台厚度通常是 1mm 至 3mm,并且孔深度是 0.8mm 至 2.8mm。

[0198] 在一些优选的实施方式中,如图 4 中最佳所示,可转动平台 1 还包含布置在所述平台周界处的用于接收废液的槽 3,所述废液从可转动平台 1 的表面在其转动期间甩离或离心下来。优选地,槽 3 是平台 1 的模制单元。可以理解,伴随测序反应中的每个步骤,废试剂从该平台甩离,并且为了改善废液处置,提供槽 3。然而,在备选实施方式,可转动平台 1 位于其内部的壳 4 可以设置成具有邻近该平台周界布置的槽 5 以接收在转动平台 1 转动期间从其表面甩离的废液。槽 5 中的流体可以经导管 6 抽离平台 1 以使污染最小化。优选地,使用真空系统(未显示)。

[0199] 优选使用的测序方法是焦磷酸测序法。然而,可以理解可以利用对核酸链测序的其他方法,如前文讨论。

[0200] 优选地,分立区域 2 适应于选择性地固定该核酸链。例如,该核酸链可以是生物素酰化的,并且分立区域 2 包含用于与生物素酰化核酸链固定的链霉亲和素。然而,可以理解,其他化学是可用于固定核酸链至分立区域 2。

[0201] 根据用于实施核酸链测序的本发明方法,提供可转动平台 1 并且将核酸链固定至分立区域 2。随后将任何互补性核酸链变性并且移去,例如通过加热平台 1 至约 94 $^{\circ}$ C。分立区域 2 随后依次与 A、T、G 和 C 核苷酸接触,其中在每个接触步骤之间如此转动平台 1,从而基本上以离心方式从分立区域 2 移走任何残余或未反应的核苷酸。

[0202] 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。该分析步骤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而检测该核酸链中的下一个碱基对,其中所述的光因核苷酸的掺入而产生。用于检测由该反应产生的光的合适检测器是光电倍增器。可以理解随着可转动平台 1 转动,全部样品均通过该检测器。如果没有核苷酸掺入,则没有光信号,并使用离心力甩离反应混合物(每个循环或每隔第 10-50 第循环(即)但是小于第 80 个循环),并且另一轮随下一个核苷酸开始。

[0203] 在优选的实施方式中,在分立区域 2 与后续核苷酸接触之前,每个靶部位 2 经受采

用洗涤试剂的洗涤或淋洗步骤。该洗涤试剂可以是任何试剂,其中所述的任何试剂可以基本上洗去来自先前接触步骤的任何残余溶液,并且优选地是 PCR 缓冲液。

[0204] 优选地,在分配核苷酸试剂和酶时,可转动平台 1 以低速度转动,例如以约 10 至 200 转 / 分钟转动,并且在分配洗涤试剂时,平台 1 以低速度转动,例如以约 400 至 1000 转 / 分钟转动。

[0205] 本发明提供可转动平台 1 用于核酸链测序的用途,和试剂盒,所述试剂盒包括可转动平台 1 和用于所述核酸链测序的一种或多种试剂。

[0206] 参考图 5,本发明还提供随用于核酸链测序的可转动平台 1 一起使用的装置。该装置包含用于以预定的可控的用户可选转动速度转动平台 1 的马达,如能够传送约 10 至 1000 转 / 分钟之间的转动速度的马达。还提供用于分配核酸链到分立区域 2 以固定所述核酸链至分立区域 2 的装置。这种装置可以采取喷墨型技术或合适的分配器 7(如注射器泵)的形式。还提供用于分配 A、T、G 和 C 核苷酸与分立区域 2 接触和用于分配洗涤试剂的装置。再次地,这种装置可以采取喷墨型技术的形式。还提供用于变性并移走任何互补性核酸链的装置,并且这种装置可以采取布置在壳 4 内部的加热盘管(未在该图中显示)的形式。

[0207] 还提供合适的检测装置 8 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 1。现在具体参考图 6 和图 7,所述图显示用于本发明中的光电倍增检测器的多种实施方式。一种光学构造使用聚焦光学器件(图 6)并且第二种光学布局使用直接成像法(图 7)。图 6 详述了聚焦透镜 10、缝隙 11、光敏表面 12、光电倍增器 13 和检测电子部件 14。图 7 详述了缝隙 15、光敏表面 16、光电倍增器 17 和检测电子部件 18。

[0208] 现在参考图 8,显示加热盘管或加热环 20。加热环 20 由与加热器 PCB(印刷电路板)结合的铝环组成。加热器 PCB 并入温度敏感元件(未显示)以允许闭环控制加热器温度。取决于可转动平台 1 上孔 / 分立区域的设计,加热环 20 可以在表面上具有或可以没有凸出部 21。设计凸出部 21 以确保仅可转动平台中的孔的底部与加热环 20 接触。将加热环 20 优选地设计成向上移动以接触可转动平台 1 并且向下移动以允许可转动平台 1 自由转动并允许快速移走来自反应孔的热。使用螺线管 22 以使加热环 20 向上滑动并且向下引导杆 23,可以实现这一点。

[0209] 可以将可转动平台 1 以分配酶和核苷酸混合物的低速度(即 200 转 / 分钟或更小)转动,其中离心力低到不足以从分立区域 2 移走混合物并且足以允许反应继续进行和光学检测完成。可以将洗涤试剂以高转子速度添加(即 400 转 / 分钟),从而所述洗液从靶部位 2 移走全部试剂并且在分立区域 2 之间基本上不造成污染。

[0210] 现在转至图 10A 至 10C,在备选性设计中,可转动平台 1 并不一定需要本身是盘;它可能由多个分立的反应孔 30 组成,其中将所述反应孔 30 载入以转动模式容纳每个分立反应孔 31 的挂篮中。例如,分立反应孔 30 可以是改良 0.2mL 离心管的形式,所述的离心管可以在可转动挂篮 31 形式的平台 1 上以 45 度安装。在这种布局中,盖 32 是打开的并且处于水平面上(该盖的内侧面朝上)。该盖 32 经过修改,从而可能将以低每分钟转速分配至该盖中的试剂以高每分钟转速离心至管 33 中(见虚线箭头)。盖 32 充当执行测序反应的靶部位 2,并且管 33 本身充当废物槽 3。铰合部 34 可以经修改以充当将离心的废试剂运输至管 33 的通道。

[0211] 实施例

[0212] 如上文讨论,可以通过使用焦磷酸测序法实现 DNA 序列的测定(见 AgahA., 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 与萤光素借助萤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。

[0213] 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)。

[0214] 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。

[0215] 测序靶

[0216] 使用带有自我引发环(以下划线突出显示)的 5' - 生物素标记的合成性寡核苷酸以在本发明的平台上实现直到 30 个碱基对的测序。合成性寡核苷酸 (SEQ-OLIGO-30BP) 的完整碱基对序列是:

[0217] 5' - 生物素 -A G T G T G C A GG A C G A G T CCCC A CC A C A CCCAGGAAAC AGCTATGACCATGCTTGCATGGTCATAGCTGTTTCC-3'

[0218] 由于自我引发环序列折叠于其互补性序列上,故自我引发环序列允许焦磷酸测序反应从合成性寡核苷酸的 3' 端开始。因此,由该反应待识别的第一核苷酸是以粗体突出显示腺苷 (A) 碱基。作为结果,该反应顺序中使用的第一核苷酸是互补性核苷酸,胸苷 (dTTP)。因而,用于 SEQ-OLIGO-30BP 反应的完整序列是:T GGG T G T GG T GGGG A C T C G T CC T G C A C A C T。由于焦磷酸测序法反应可以识别杂聚物核苷酸(多段的相同核苷酸),故测序用核苷酸的实际分配次序缩短至:T G T G T G T G A C T C G T C T G C A C A CT。SEQ-OLIGO-30BP 寡核苷酸被稀释降至 0.2 微摩尔浓度。

[0219] 链霉亲和素包被的盘

[0220] 使用化学品盐酸 1- 乙基 -3-(3- 二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC), 高抗冲聚苯乙烯盘用链霉亲和素借助该蛋白质与聚合物之间的共价键包被。通过添加浓度 10 毫克 / 毫升的 2.5 微升 EDC 和浓度 5 毫克 / 毫升的 2.5 微升链霉亲和素,随后在室温在减少反应体系蒸发的湿盒中孵育 4 小时,准备好多个孔。孵育后,将孔用磷酸盐缓冲盐水并且随后用水洗涤。允许孔晾干 1 小时,并且随后将孔在 4℃ 贮藏于含有干燥剂的密封袋中。

[0221] 通过使用 QIAGEN GmbH 提供的对照寡核苷酸进行众多对照实验展示链霉亲和素与聚苯乙烯平台共价结合的能力。在无洗涤步骤的情况下如下文所述实现对照寡核苷酸的测序。对照寡核苷酸的序列是 T A(C 或 T)G G T T TG C, 核苷酸分配的次序是 T A C T G T G C。对照孔缺少 EDC 或链霉亲和素。阳性盘的焦磷酸测序显示出优良的强信号(图 11)。对链霉亲和素阴性对照或 EDC 阴性对照(图 12 和图 13)未观察到真实信号。

[0222] 图 11 中显示在 EDC 存在下用链霉亲和素包被的聚苯乙烯孔的热解图结果。该结果表明,模板已经通过允许鉴定序列的生物素-链霉亲和素键与容器结合。

[0223] 图 12 中所示链霉亲和素阴性对照的热解图结果表明,仅与链霉亲和素结合的模板可能已经产生信号。因此,在图 11 的结果中,洗涤后的残余模板没有提供信号。

[0224] 图 13 中显示 EDC 阴性对照的热解图结果,该结果显示测序期间无信号。该结果表明,链霉亲和素仅在 EDC 存在下与聚苯乙烯孔结合。因此,使用共价键合作用实现与该平台的结合。

[0225] 测定法设置

[0226] 将 5 微升寡核苷酸分配至共价结合性链霉亲和素包被的聚苯乙烯盘/平台的孔中以提供 1 皮摩尔靶用于测序。模板在室温孵育 10 分钟以允许生物素-链霉亲和素结合发生。孵育后,吸掉任何未结合的模板并且将孔用 5 微升去离子水洗涤 2 次以确保除去任何残余的未结合模板。

[0227] 测序-洗涤-测序

[0228] 将盘 1 置入仪器中。手工建立运行以允许微量注射 2 微升水、1 微升包含 DNA 聚合酶、硫酸化酶、萤光素酶和腺苷三磷酸双磷酸酶的酶混合物和 1 微升由萤光素酶和缓冲液组成的底物。在允许基线稳定的 10 秒时间后,在添加酶和底物后,以 100 纳升微量注射阴性对照核苷酸 dGTP 以确保运行期间无随机信号产生。由于鸟苷不是该序列中的第一碱基,故它不应当在添加时产生信号峰。使用以下分配次序以 30 秒间距以 100 纳升加载下一组核苷酸: TGTGTGT。每种核苷酸的正确添加产生一个光信号峰。峰值取决于队列中相同核苷酸的数目。这些峰的所得图称作热解图。

[0229] 在添加这八种核苷酸后,将反应内容物通过 1000 转/分钟转动该盘 5 秒甩离。在高速转动结束时,降低转子速度返回至 60 转/分钟并且通过添加相同体积的水、酶和底物重启测序循环。依次地,随后加载下一组核苷酸并且测量信号峰。使用的第二和第三组核苷酸是: G A C T C G T C 和 T G T C A C A T, 加下划线的核苷酸用作又一种阴性对照以监测反应的非特异性。在 2 组序列之间施加洗涤步骤。完整序列数据可以在图 14 中见到。

[0230] 图 14 显示使用测序-洗涤-测序策略时, SEQ-OLIGO-30BP 合成性寡核苷酸序列的热解图。将具有自我引发环序列的 5' - 生物素标记的 SEQ-OLIGO-30BP 模板载入的链霉亲和素包被的高抗冲聚苯乙烯盘的孔以允许捕获该靶至此孔的生物素-链霉亲和素结合。洗去任何未结合的模板并且伴随酶和底物的添加启动测序反应。首先加载阴性对照核苷酸(dGTP)以监测该反应中的非特异性。将已知序列的 7 种第一核苷酸以 100 纳升体积以 30 秒间距微量注射。产生了序列中每个相应碱基的峰。峰值根据相同核苷酸在该序列内部的分布变动。在添加第一组的全部核苷酸时,将转子速度增加至 1000 转/分钟以移去孔的液体内容物,从而使模板留在原位与链霉亲和素包被的盘结合。在 5 秒后,降低该速度返回至 60 转/分钟并且通过添加新酶和底物及下一组核苷酸重启测序过程。结果显示了测序-洗

涤－测序在本发明的链霉亲和素包被盘上的能力。

[0231] 尽管参考下述实施方式说明和描述本发明,其中将所述实施方式目前构思为最佳模式或在实际实施时开展本发明的模式,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。

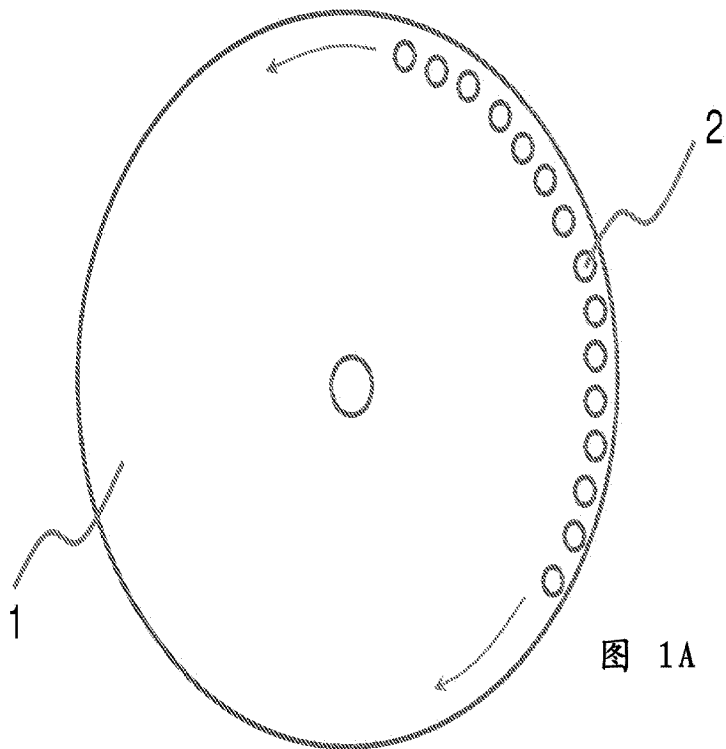


图 1A

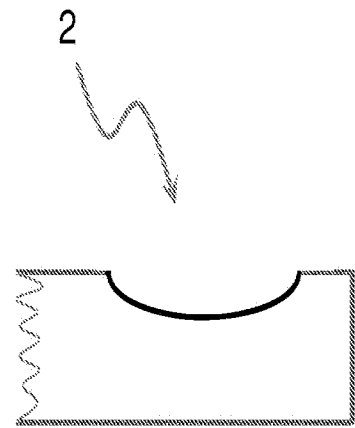


图 1C

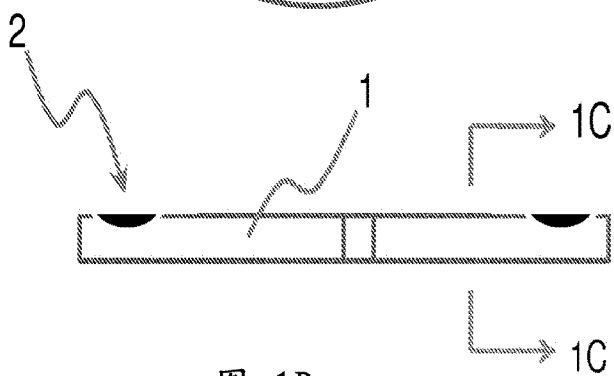


图 1B

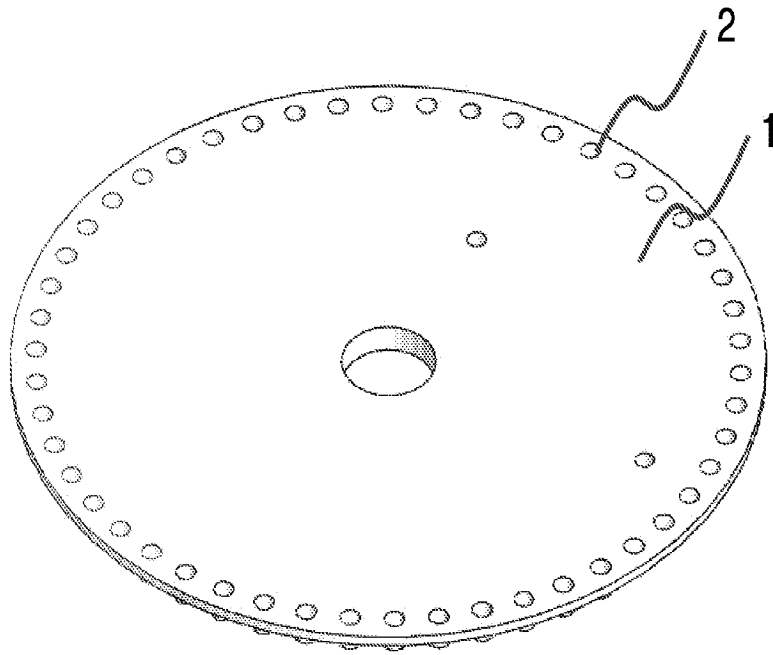


图 2A

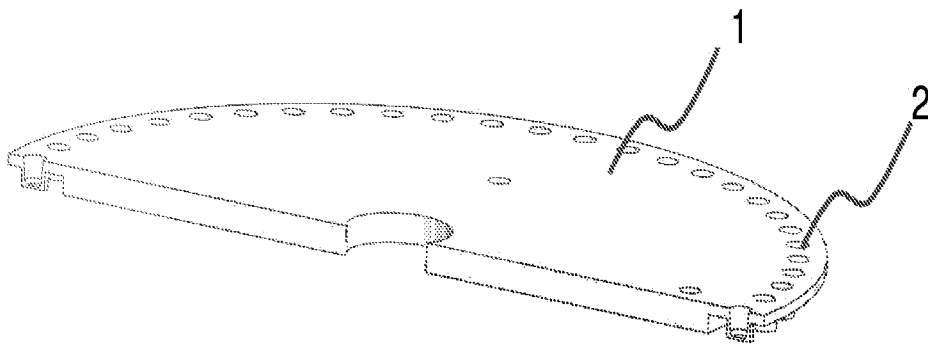


图 2B

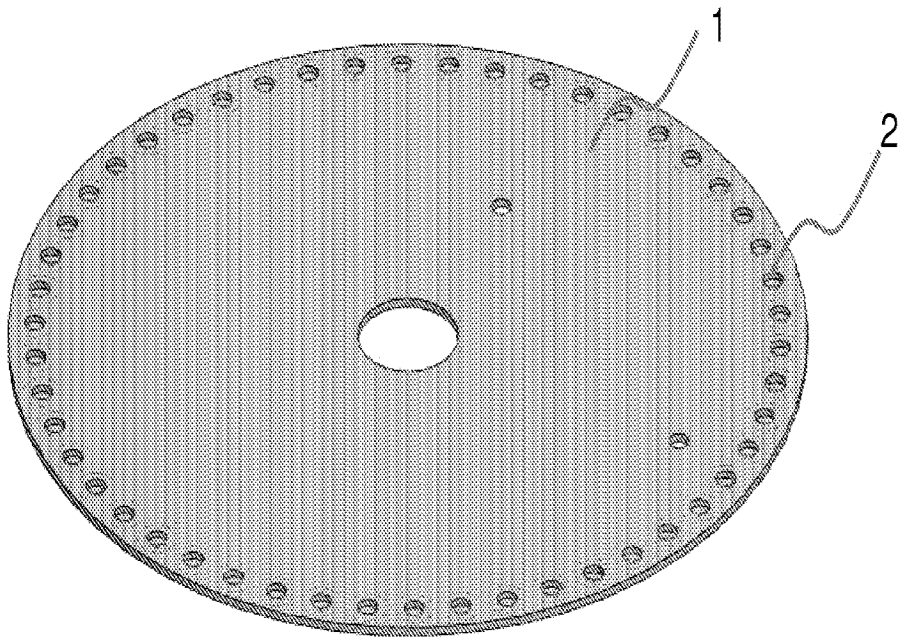


图 3A

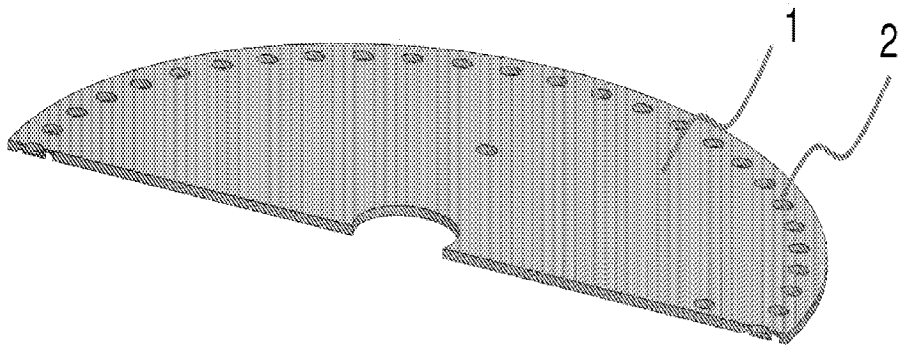


图 3B

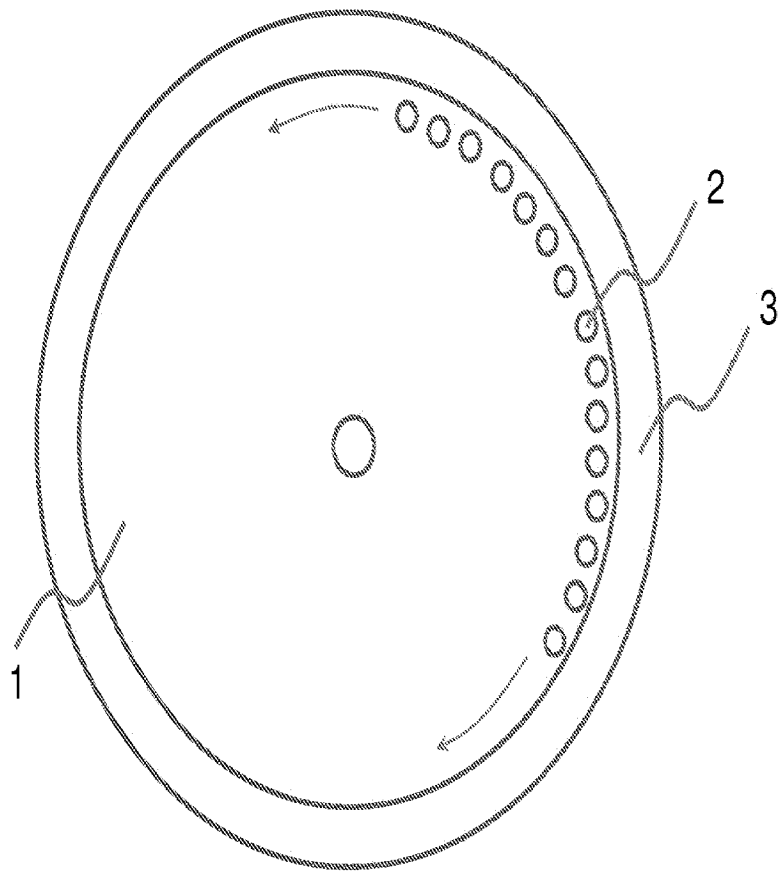


图 4A

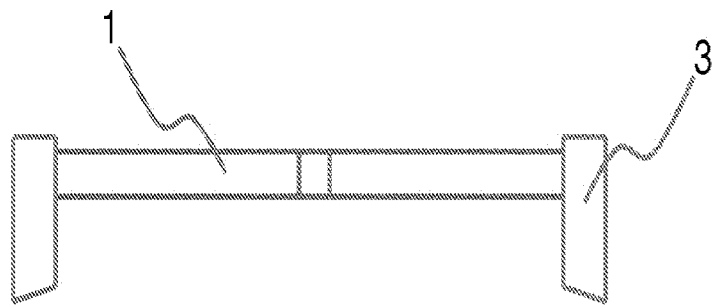


图 4B

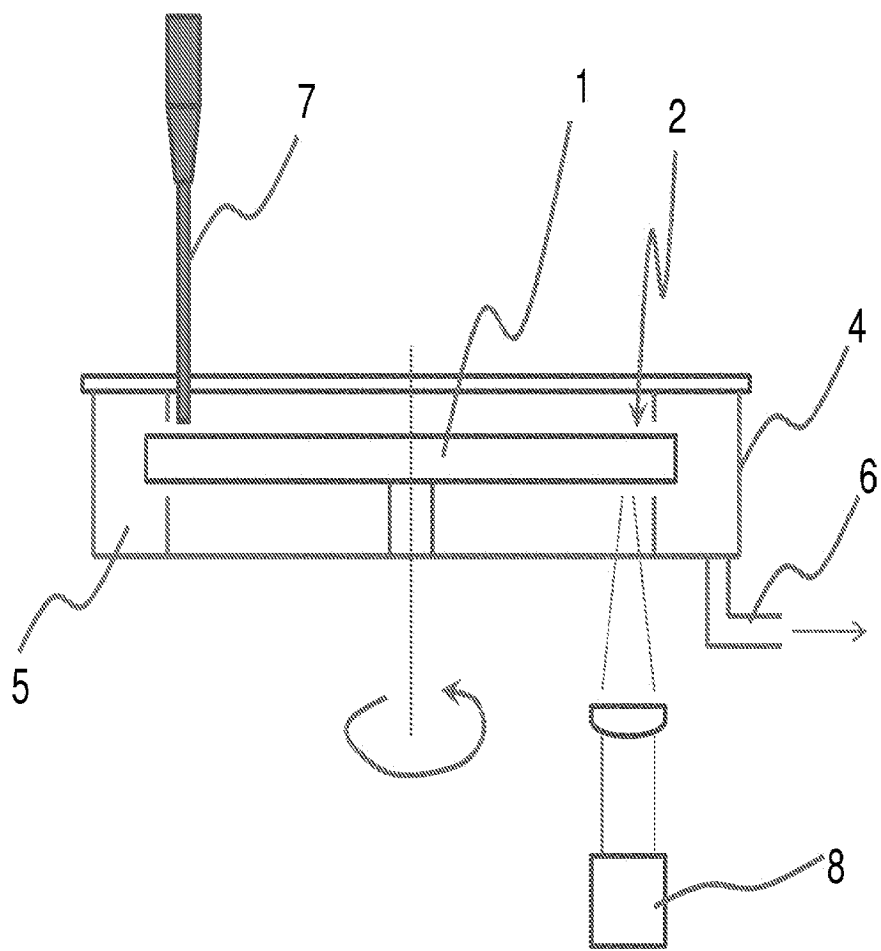


图 5

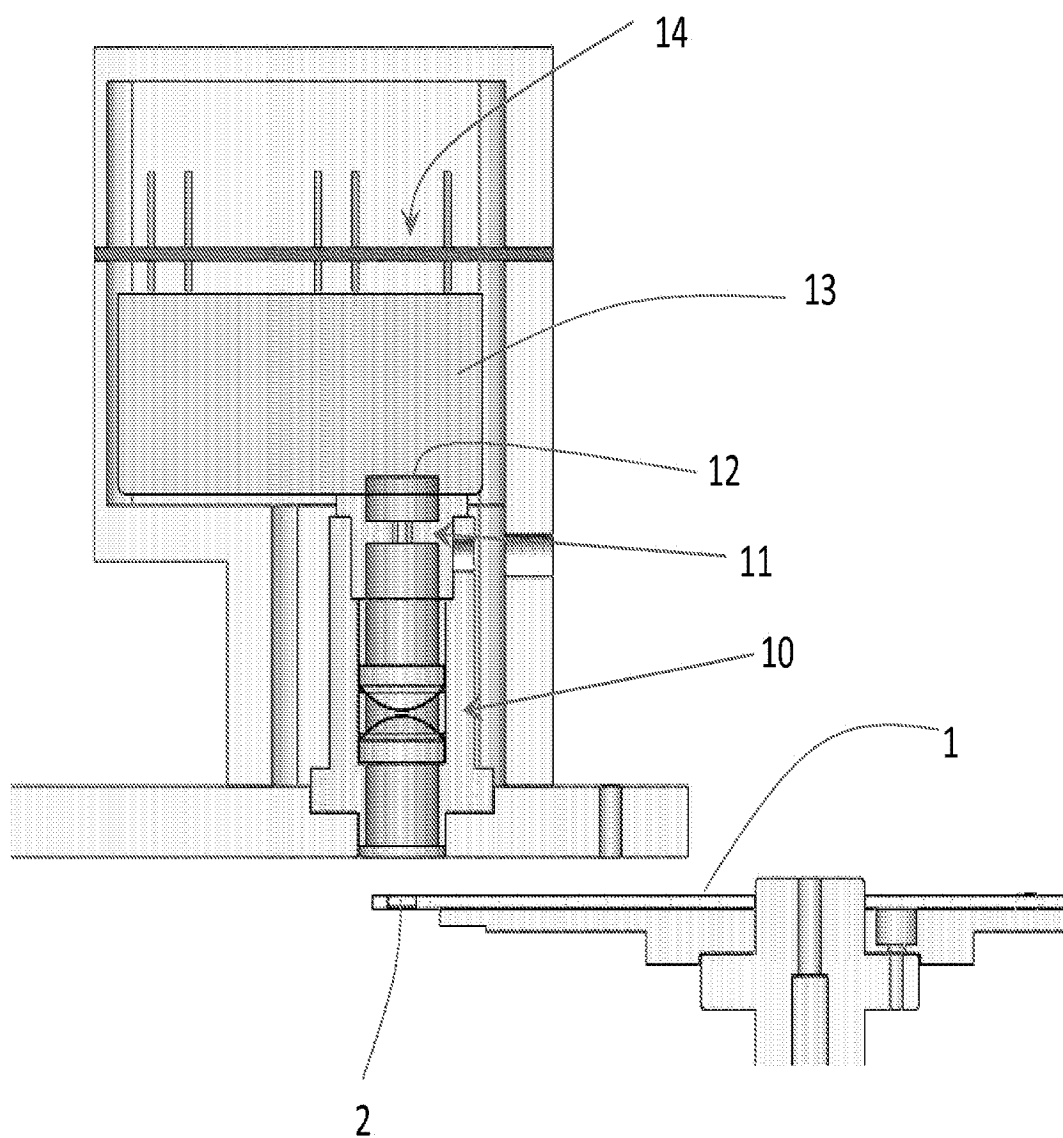


图 6

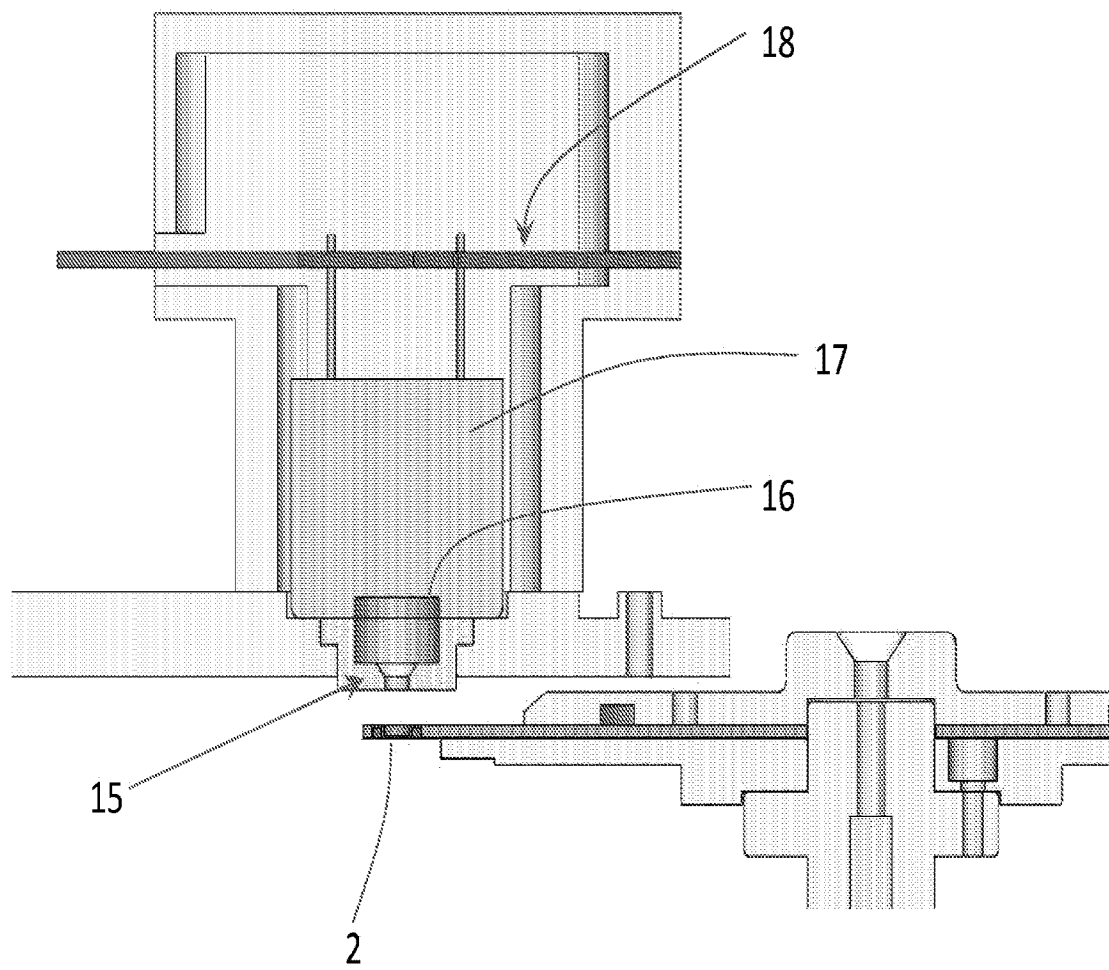


图 7

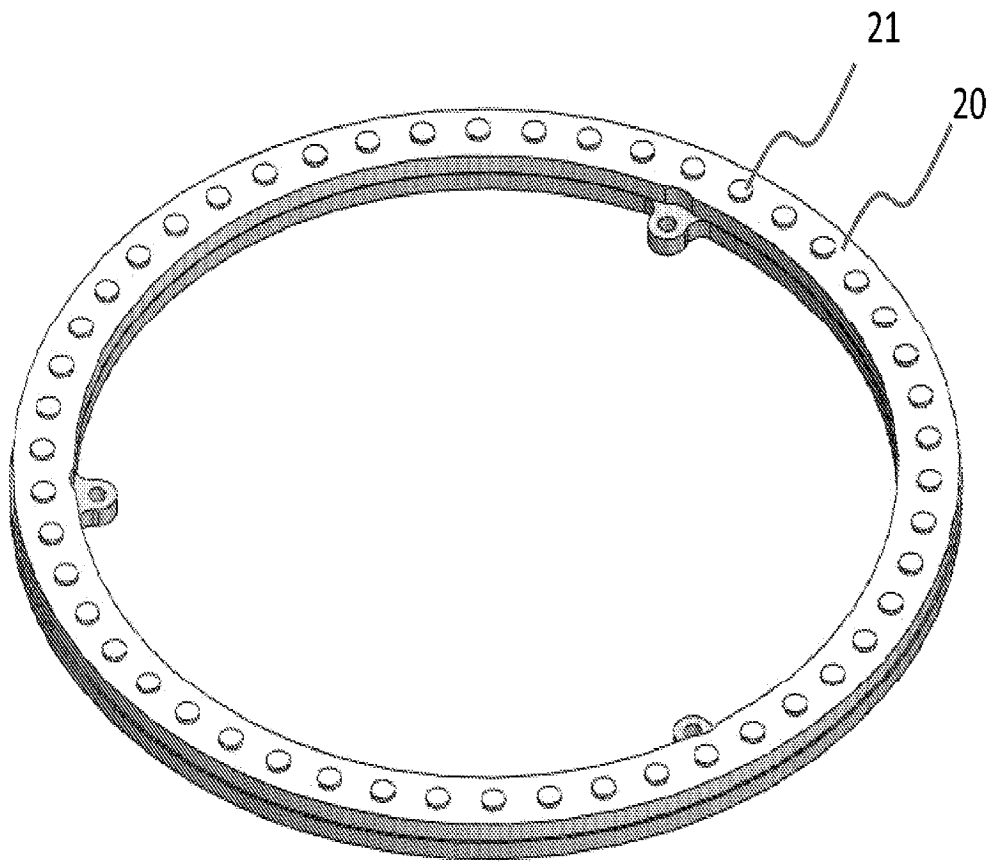


图 8

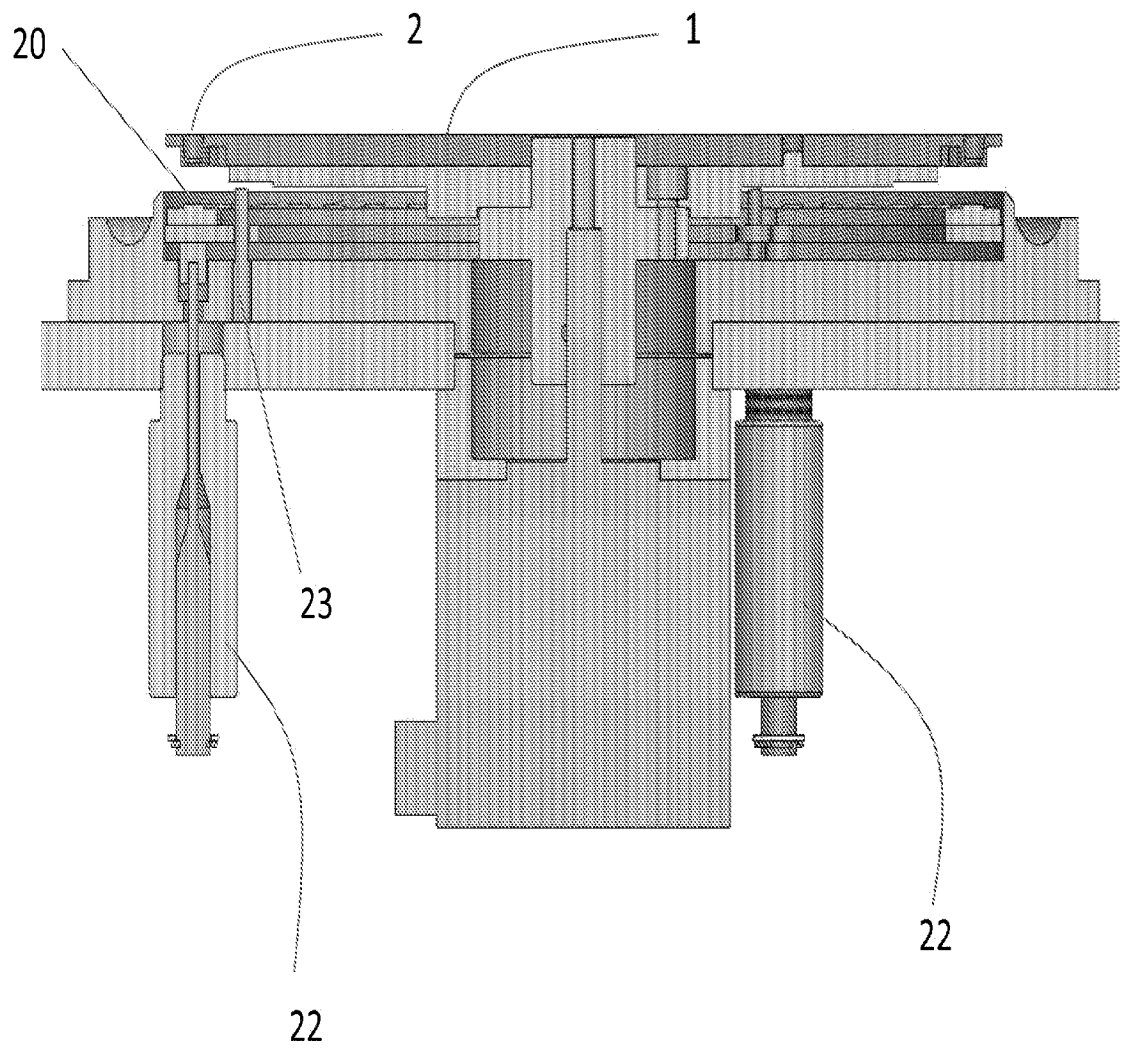


图 9

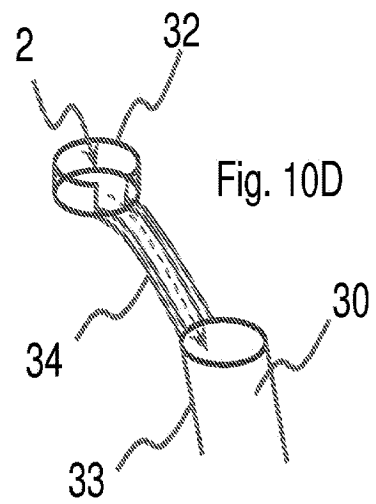
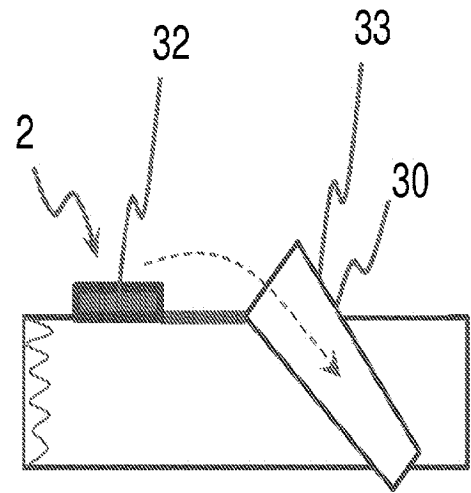
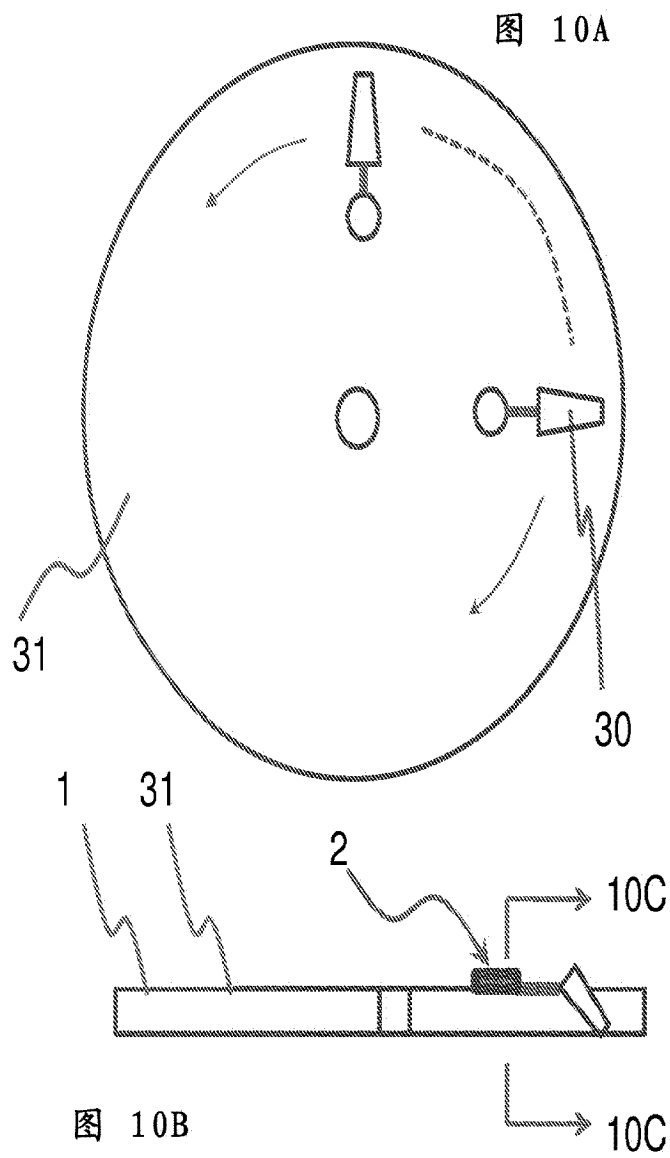


图 10C

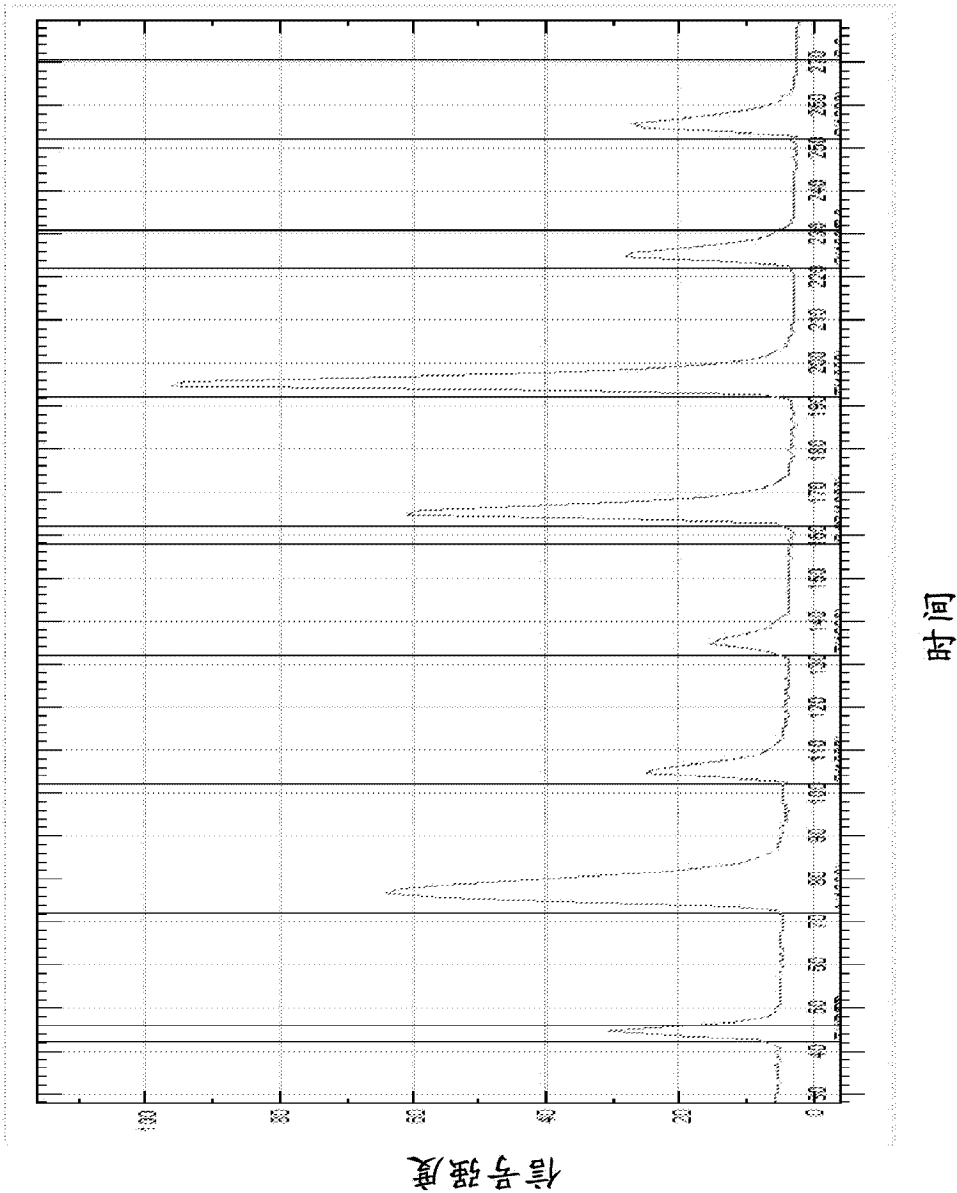


图 11

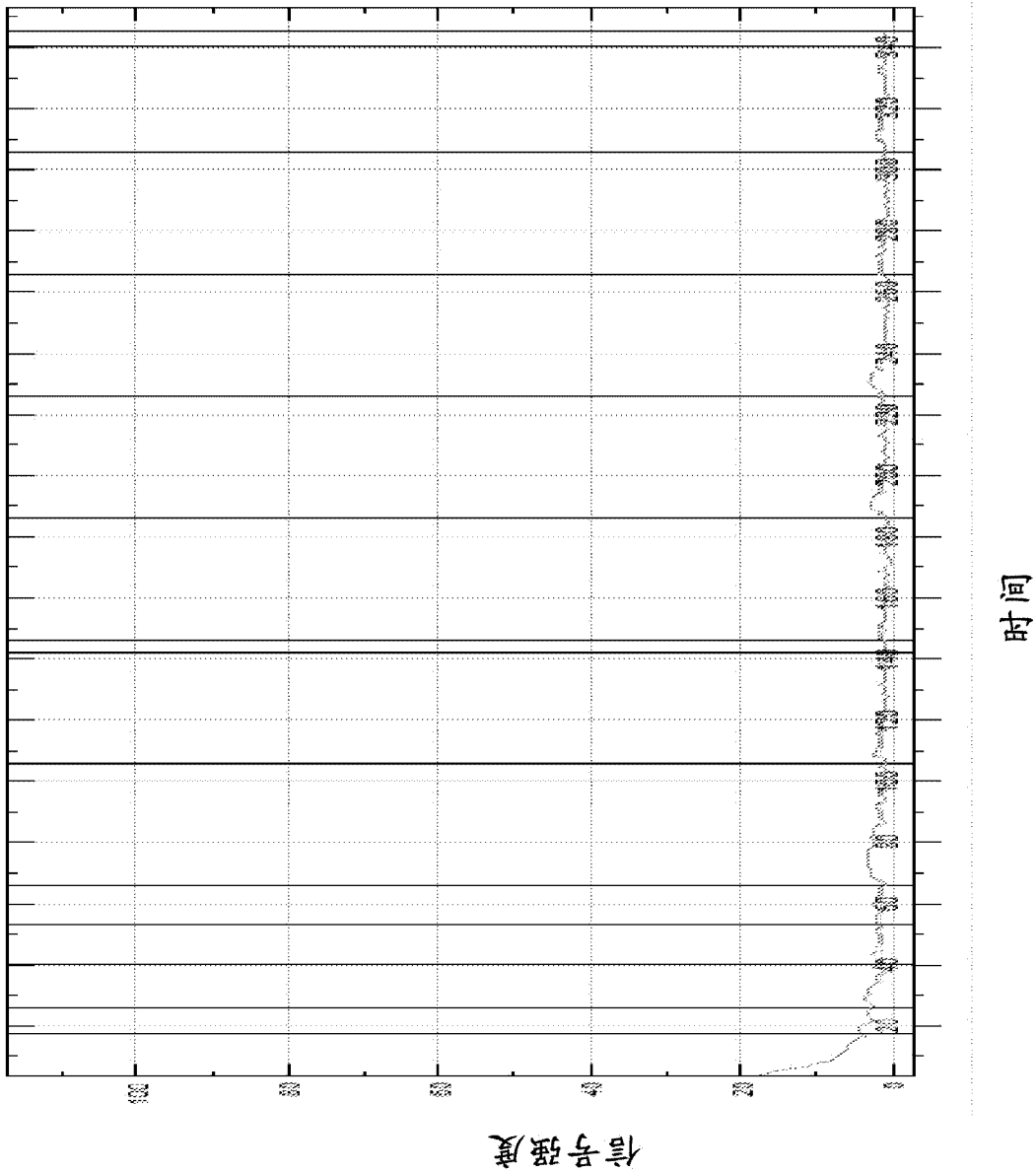


图 12

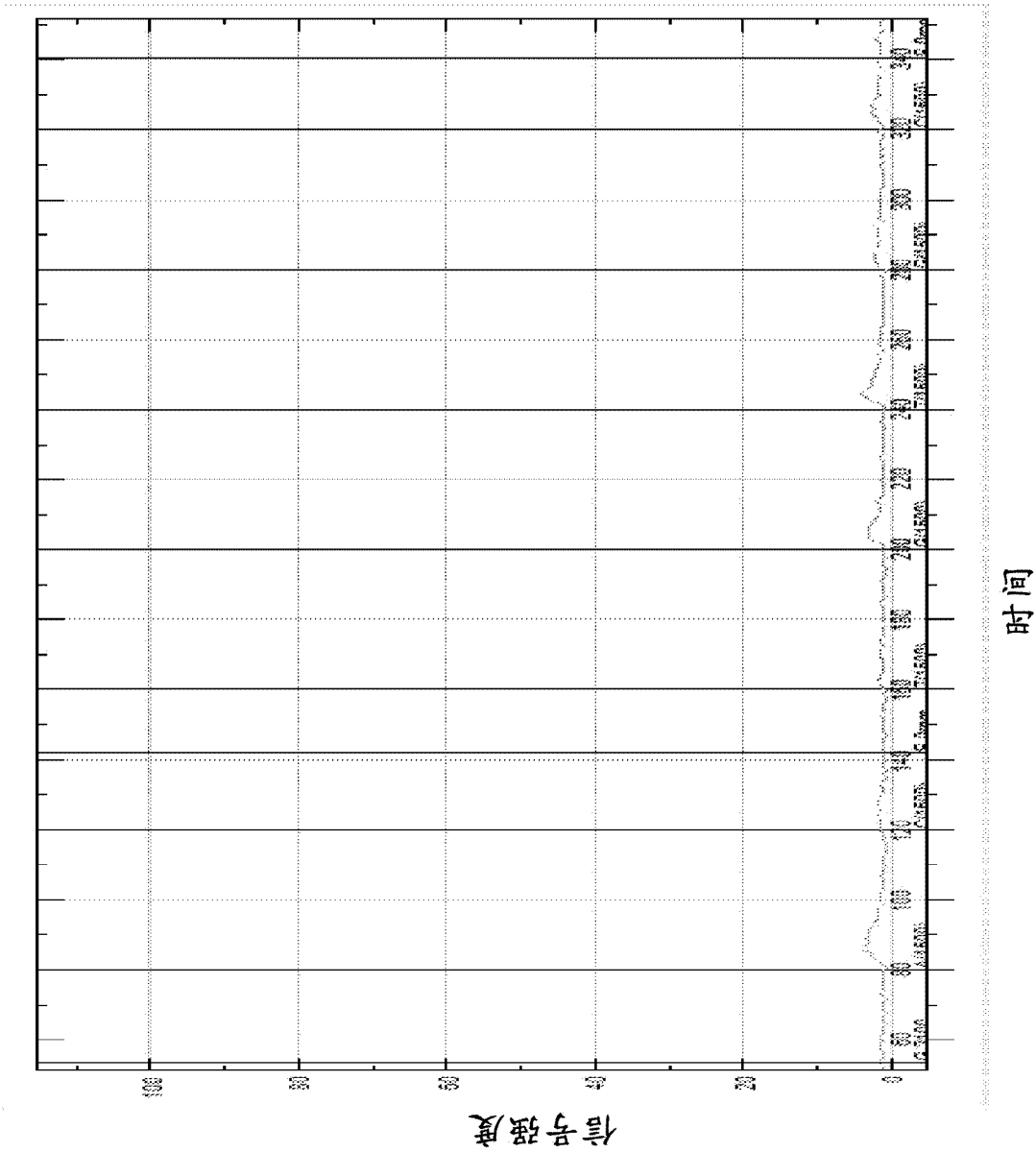


图 13

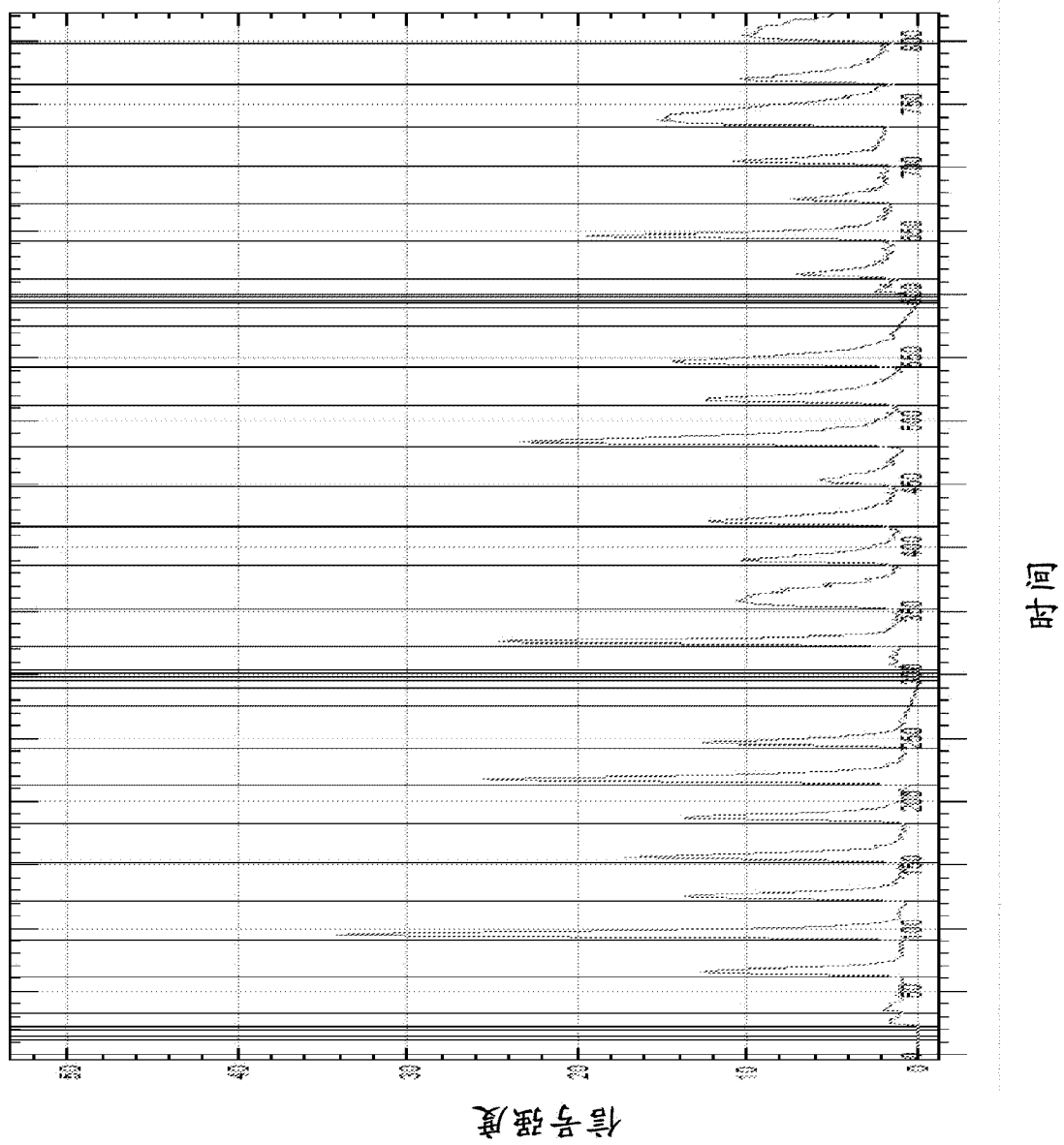


图 14