



(51) МПК  
*C12Q 1/6874* (2018.01)  
*G01N 33/543* (2006.01)  
*G01R 33/09* (2006.01)  
*G01R 33/12* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C12Q 1/6874* (2019.08); *G01N 33/543* (2019.08); *G01N 27/3276* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2018101293, 12.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
12.08.2016

Дата регистрации:  
23.12.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
14.08.2015 US 62/205,336

(43) Дата публикации заявки: 16.09.2019 Бюл. № 26

(45) Опубликовано: 23.12.2019 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 14.03.2018

(86) Заявка РСТ:  
US 2016/046888 (12.08.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2017/030999 (23.02.2017)

Адрес для переписки:  
197101, Санкт-Петербург, А/я 128, "АРС-  
ПАТЕНТ", С. В. Новоселовой

(72) Автор(ы):

МЭНДЕЛЛ Джеффри Дж. (US),  
КВОК Лиза (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИЛЛЮМИНА, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US 2009/0208957 A1, 20.08.2009. US  
2010/0152424 A1, 17.06.2010. SMITH C.H. et al.,  
High-resolution giant magnetoresistance on-chip  
arrays for magnetic imaging // Journal of applied  
physics, vol.93, No.10, Parts 2 & 3, 15.05.2003, стр.  
6864-6866. SHEN W. et al., Detection of DNA  
labeled with magnetic nanoparticles using MgO-  
based magnetic tunnel (см. прод.)

(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ МАГНИТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ДАТЧИКОВ ДЛЯ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ

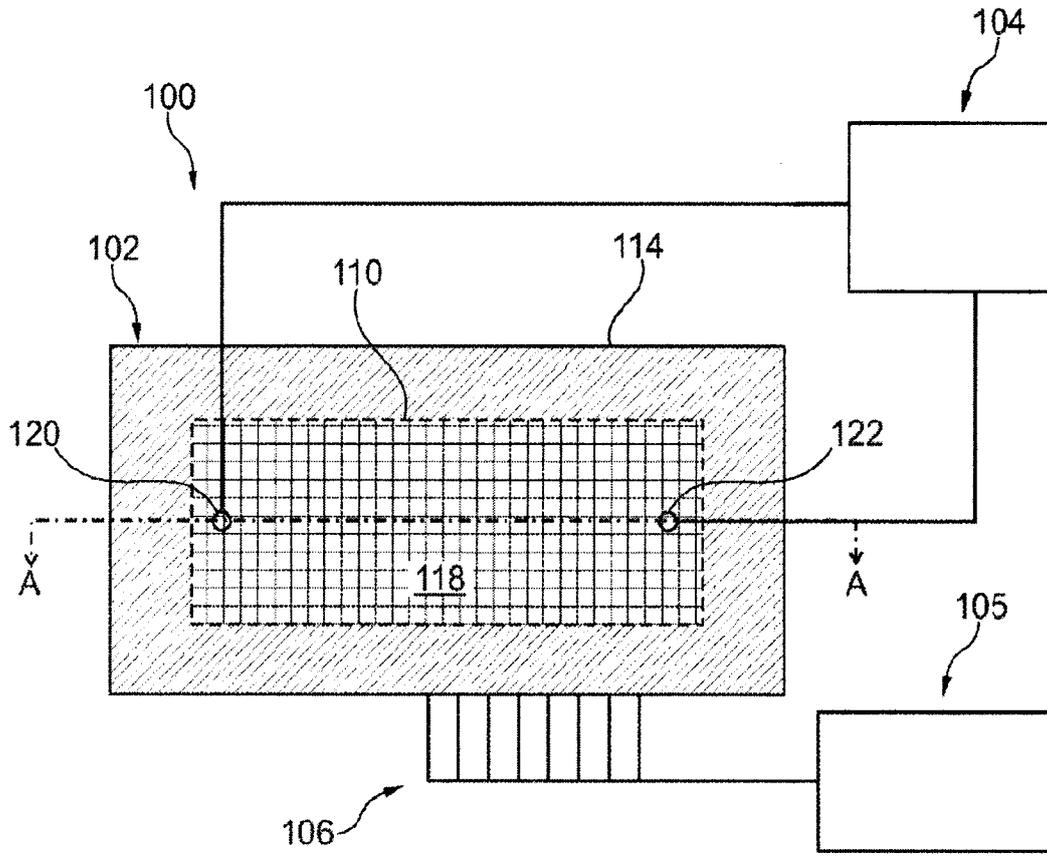
(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Предложены система и способ секвенирования синтезом (SBS). Система включает установку для обнаружения с расположенным в камере массивов магниточувствительных датчиков для обнаружения магнитных частиц в заданных участках, множество нанолунок, считывающую схему для передачи сигналов после осуществления каждого события встраивания и систему струйного контроля для пропускания реагентов через камеру для выполнения протокола SBS, где

реагенты включают совокупность типов нуклеотидов. Способ включает выращивание комплементарной цепочки посредством встраивания нуклеотидов, где нуклеотиды присоединены к соответствующим магнитным частицам, определение изменений электрического сопротивления в области датчиков и определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления. Причем изменения вызваны магнитными свойствами магнитных частиц в результате добавления

нуклеотидов к комплементарной цепочке, где нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, каждый из которых имеет разное количество магнитных частиц. Группа изобретений обеспечивает отсутствие

создаваемых биологическими образцами фоновых магнитных сигналов, негативного воздействия на механизм магнитной передачи и загрязнений. 2 н. и 15 з.п. ф-лы, 26 ил., 1 табл.



ФИГ. 1А

(56) (продолжение):

junction sensors, Journal of applied physics, vol.103, 2008, стр. 7A306-01 - 7A306-03. RU 2539038 C1, 10.01.2015.

RU 2709986 C2

RU 2709986 C2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12Q 1/6874* (2018.01)  
*G01N 33/543* (2006.01)  
*G01R 33/09* (2006.01)  
*G01R 33/12* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12Q 1/6874 (2019.08); G01N 33/543 (2019.08); G01N 27/3276 (2019.08)*(21)(22) Application: **2018101293, 12.08.2016**(24) Effective date for property rights:  
**12.08.2016**Registration date:  
**23.12.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**14.08.2015 US 62/205,336**(43) Application published: **16.09.2019 Bull. № 26**(45) Date of publication: **23.12.2019 Bull. № 36**(85) Commencement of national phase: **14.03.2018**(86) PCT application:  
**US 2016/046888 (12.08.2016)**(87) PCT publication:  
**WO 2017/030999 (23.02.2017)**

Mail address:

**197101, Sankt-Peterburg, A/ya 128, "ARS-  
PATENT", S. V. Novoselovoj**

(72) Inventor(s):

**MENDELL Dzheffri Dzh. (US),  
KVOK Liza (US)**

(73) Proprietor(s):

**ILLUMINA, INC. (US)**(54) **SYSTEMS AND METHODS OF USING MAGNETOSENSITIVE SENSORS FOR DETERMINING GENETIC CHARACTERISTICS**

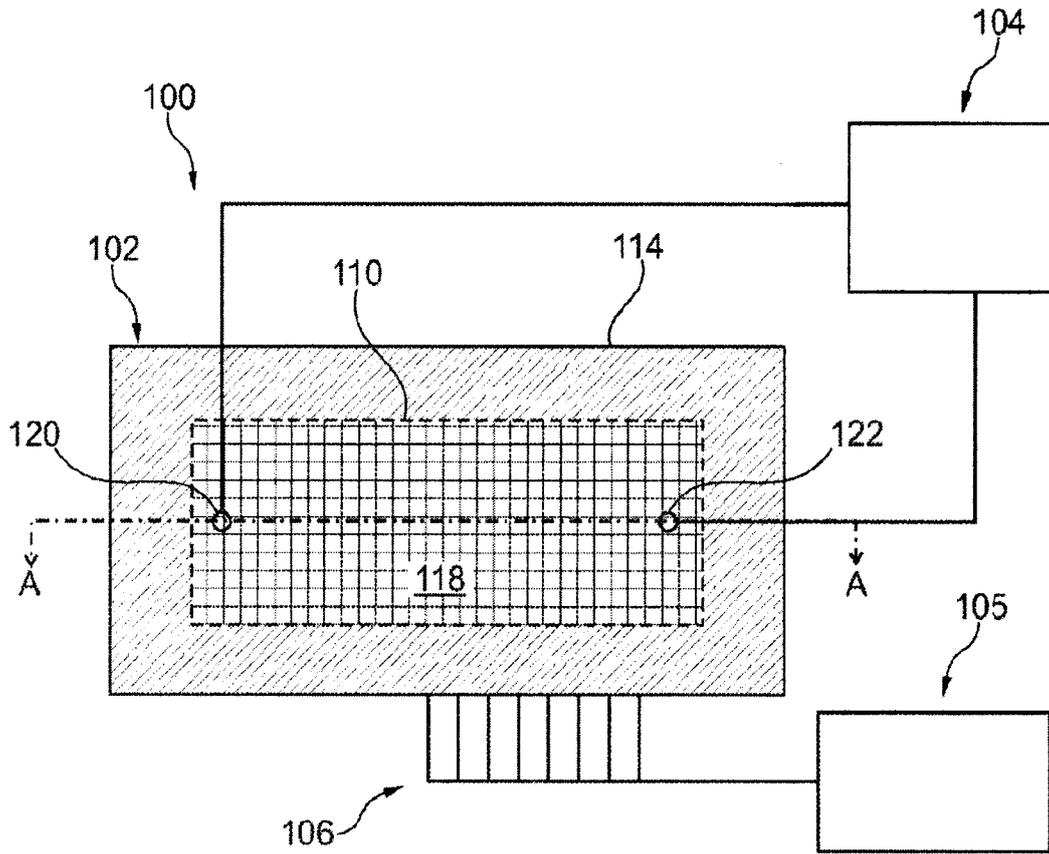
(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology. System and method for synthesis sequencing (SBS) are proposed. System includes installation for detection with located in chamber of arrays of magnetically sensitive sensors for detection of magnetic particles in specified sections, multiple nanopores, a reading circuit for transmitting signals after each embedding event and a jet control system for passing reagents through the chamber to perform the SBS protocol, where the reagents include a set of types of nucleotides. Method includes growth of a complementary chain by nucleotide incorporation,

where nucleotides are attached to corresponding magnetic particles, determination of electrical resistance variations in the area of sensors and determination of genetic characteristics of complementary chains based on detected changes in electrical resistance. Changes are caused by magnetic properties of magnetic particles as a result of addition of nucleotides to a complementary chain, where nucleotides include a set of types of nucleotides, each of which has different number of magnetic particles.

EFFECT: group of inventions ensures absence of background magnetic signals generated by biological samples, negative effect on magnetic transmission



ФИГ. 1А

RU 2709986 C2

RU 2709986 C2

## ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка претендует на полезный эффект Предварительной патентной заявки US 62/205336, поданной 14 августа 2015 года и имеющей приведенное выше название, содержание которой полностью включено в настоящую работу посредством

5 ссылки.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Существующие в настоящее время системы секвенирования нового поколения (англ. next generation sequencing, сокращенно NGS), основанные на секвенировании синтезом (англ. sequencing-by-synthesis, сокращенно SBS), отличаются сложностью, высокой

10 стоимостью и крупными габаритами. Таким образом, в области применения устройств для SBS необходимы новые подходы к обнаружению.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS), который включает предоставление установки для обнаружения, которая включает

15 массив (группу) магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек (нитей) матрицы нуклеиновой кислоты, которые расположены в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает осуществление

20 совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки посредством встраивания нуклеотидов вдоль каждой матричной цепочки. По меньшей мере некоторые из нуклеотидов присоединены к соответствующим магнитным частицам, имеющим соответствующие магнитные свойства. Каждое из совокупности событий SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области

25 магниточувствительных датчиков, которые вызваны соответствующими магнитными свойствами магнитных частиц. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает

30 предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах

35 соответствующих заданных участков. Способ также включает доставку совокупности реагентов к заданным участкам. Реагенты включают нуклеотиды и полимеразу, причем к по меньшей мере одному из нуклеотидов или к полимеразе присоединены магнитные частицы. Способ также включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков во время осуществления совокупности

40 событий SBS, где каждое событие SBS включает рост комплементарной цепочки посредством встраивания одного из нуклеотидов в комплементарную цепочку. Изменения электрического сопротивления происходят при попадании магнитных частиц в соответствующие заданные участки при осуществлении совокупности событий SBS. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных

45 цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков

расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным участкам и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам; (b) доставку магнитных частиц к заданным участкам, где магнитные частицы захватываются нуклеотидами; (с) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения обусловлены магнитными свойствами магнитных частиц; и (d) удаление магнитных частиц из заданных участков. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным участкам и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам.

Нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды. Первые, вторые и третьи нуклеотиды содержат различающиеся основания. Каждый цикл SBS также включает (b) доставку магнитных частиц к заданным участкам, причем магнитные частицы захвачены первыми нуклеотидами и вторыми нуклеотидами, и (с) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Каждый цикл SBS также включает (d) удаление магнитных частиц из первых нуклеотидов; (e) доставку магнитных частиц к заданным участкам, причем магнитные частицы захвачены третьими нуклеотидами; и (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек. Первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, и к первым и ко вторым нуклеотидам присоединены магнитные частицы. Каждый цикл SBS также включает (b) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем магнитные частицы, захваченные первыми нуклеотидами, вызывают

изменение электрического сопротивления, отличающееся от изменения электрического сопротивления, вызываемого магнитными частицами, захваченными вторыми нуклеотидами. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического

5

Один из примеров осуществления относится к способу SBS. Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек. Первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, причем к первым и вторым нуклеотидам присоединены первые и вторые одномолекулярные магниты (англ. single-molecule magnet, сокращенно SMM), соответственно. Каждый из первых и вторых SMM имеет отличающиеся магнитные состояния, которые чувствительны к различным частотам светового излучения. Каждый цикл SBS также включает (b) изменение магнитного состояния первых SMM под воздействием светового излучения первой частоты и (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем эти изменения вызваны магнитным состоянием первых SMM. Каждый цикл SBS включает (d) изменение магнитного состояния первых SMM под воздействием светового излучения второй частоты; (e) изменение магнитного состояния вторых SMM под воздействием светового излучения третьей частоты; и (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем эти изменения вызваны магнитным состоянием вторых SMM. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

10

15

20

25

30

Один из примеров осуществления относится к способу SBS. Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек. Первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, причем к первым и вторым нуклеотидам присоединены одномолекулярные магниты (SMM). Количество SMM, присоединенных к первым нуклеотидам, отличается от количества SMM, присоединенных ко вторым нуклеотидам. SMM имеют магнитные состояния, которые чувствительны к различным частотам светового излучения. Каждый цикл SBS также включает (b) изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под воздействием светового излучения первой частоты; (c) определение изменений

35

40

45

электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков; и (d) изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под воздействием светового излучения второй частоты. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений

5 электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS. Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения

10 магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки посредством добавления нуклеотидов вдоль каждой матричной цепочки с помощью

15 полимеразы. К полимеразе присоединены соответствующие магнитные частицы, которые имеют соответствующие магнитные свойства, и каждое событие SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Обнаруживаемые изменения вызваны присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления нуклеотидов под действием полимеразы. Способ

20 также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS. Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков

25 расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной

30 цепочки. Каждый из совокупности циклов SBS включает (a) доставку первого нуклеотида и полимеразы к заданным участкам. К полимеразе присоединены магнитные частицы. Каждый цикл SBS также включает (b) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Изменения электрического сопротивления вызваны присутствием на заданных участках магнитных частиц во

35 время добавления полимеразой первого нуклеотида к комплементарной цепочке. Каждый цикл SBS включает (c) доставку второго нуклеотида и полимеразы к заданным участкам. К полимеразе присоединены магнитные частицы. Каждый цикл SBS также включает (d) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Изменения электрического сопротивления вызваны

40 присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления соответствующей полимеразой второго нуклеотида к комплементарной цепочке. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS. Способ включает

45 предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка. Установка для обнаружения также включает

совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждое из совокупности событий SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов и полимераз к заданным участкам. Первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания. К полимеразе присоединены магнитные частицы. Каждое событие SBS также включает (б) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Изменения электрического сопротивления вызваны присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления полимеразой первого нуклеотида или второго нуклеотида к комплементарной цепочке. Скорости встраивания первых и вторых нуклеотидов различны. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к системе для SBS, которая включает установку для обнаружения, включающую массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков включает по меньшей мере два ферромагнитных слоя и немагнитный слой, который разделяет два ферромагнитных слоя. Каждый из магниточувствительных датчиков образует по меньшей мере один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (англ. giant magnetoresistance, сокращенно GMR; датчик также может быть назван спин-вентильным магниторезистивным датчиком) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (англ. tunnel magnetoresistance, сокращенно TMR). Магниточувствительные датчики расположены в камере вблизи соответствующих заданных участков и выполнены с возможностью обнаружения магнитных частиц, относящихся к соответствующим заданным участкам. Система также включает считывающую схему, которая соединена с возможностью связи с магниточувствительными датчиками. Считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов, которые соответствуют величинам электрического сопротивления магниточувствительных датчиков. Установка для обнаружения также включает систему струйного контроля, которая выполнена с возможностью пропускания потоков реагентов через камеру для выполнения протокола SBS. Реагенты включают совокупность типов нуклеотидов, и считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов после осуществления каждого события встраивания.

Один из примеров осуществления относится к установке для обнаружения, включающей массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков включает по меньшей мере два ферромагнитных слоя и немагнитный слой, который разделяет два ферромагнитных слоя. Каждый из магниточувствительных датчиков образует один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR). Магниточувствительные датчики расположены в камере вблизи соответствующих заданных участков и выполнены с возможностью обнаружения магнитных частиц, относящихся к соответствующим заданным участкам. Установка для обнаружения может включать считывающую схему, которая соединена с возможностью связи с магниточувствительными датчиками.

В одном из примеров осуществления система для SBS включает считывающую головку, включающую кронштейн, и магниточувствительный датчик, присоединенный к кронштейну. Магниточувствительный датчик включает один из следующих датчиков:

датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR). Магниточувствительный датчик выполнен с возможностью обнаружения магнитных частиц. Система также включает подложку для образца, имеющую поверхность подложки. Конфигурация поверхности подложки 5 позволяет располагать совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты на заданных участках поверхности подложки, и по меньшей мере один элемент из считывающей головки и подложки для образца выполнен с возможностью перемещения относительно другого с целью расположения магниточувствительного датчика вблизи заданных участков при нахождении в рабочем режиме. Система также включает 10 считывающую схему, которая соединена с возможностью связи с магниточувствительным датчиком. Считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов, которые соответствуют электрическому сопротивлению магниточувствительного датчика при его расположении на одном из заданных участков.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает 15 обеспечение наличия считывающей головки, имеющей кронштейн и магниточувствительный датчик, присоединенный к кронштейну. Магниточувствительный датчик включает один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR). Магниточувствительный датчик выполнен с 20 возможностью обнаружения магнитных частиц. Способ включает обеспечение наличия подложки для образца, имеющей совокупность матричных цепочек, расположенных на заданных участках на поверхности подложки. Способ также включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарных цепочек посредством встраивания нуклеотидов вдоль каждой из матричных цепочек. По меньшей мере 25 некоторые из нуклеотидов помечены соответствующими магнитными частицами, которые проявляют соответствующие магнитные свойства. В каждом из циклов SBS способ включает расположение магниточувствительного датчика вблизи заданных участков вдоль поверхности подложки и определение электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Способ также включает определение 30 генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив 35 магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области для определения магнитного свойства этой области. Установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы позволяет ей захватывать соответствующую матричную цепочку. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной 40 цепочки посредством встраивания нуклеотидов вдоль соответствующей матричной цепочки. Нуклеотиды присоединены к соответствующим магнитным частицам, имеющим соответствующие магнитные свойства. Каждое из совокупности событий SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, которые вызываются соответствующими магнитными свойствами магнитных 45 частиц в результате добавления нуклеотидов к комплементарной цепочке. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает

предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области для определения магнитного свойства этой области. Установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным областям и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам. Каждое событие SBS также включает (b) доставку магнитных частиц к заданным областям. Магнитные частицы захватываются нуклеотидами. Магнитные частицы обеспечивают создание соответствующего внешнего магнитного поля. Каждое событие SBS также включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков и (d) удаление магнитных частиц из заданных областей. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу SBS, который включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области для определения магнитного свойства этой области. Установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным областям и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам. Нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды. Первые, вторые и третьи нуклеотиды содержат различающиеся основания. Каждое событие SBS также включает (b) доставку магнитных частиц к заданным областям, причем магнитные частицы захвачены первыми нуклеотидами и вторыми нуклеотидами. Каждое событие SBS также включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков; (d) удаление магнитных частиц из первых нуклеотидов; (e) доставку магнитных частиц к заданным областям, причем магнитные частицы принадлежат третьим нуклеотидам; и (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки посредством встраивания нуклеотидов вдоль каждой матричной цепочки, где по меньшей

мере некоторые из нуклеотидов присоединены к соответствующим магнитным частицам, имеющим соответствующие магнитные свойства, и где каждое из совокупности событий SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, которые вызваны соответствующими магнитными свойствами магнитных частиц. Способ также включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают магниторезистивный датчик.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с гигантским магнитосопротивлением (GMR), и изменения электрического сопротивления обусловлены изменениями потока электрического тока, протекающего через проводящие слои датчиков GMR.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с туннельным магнитосопротивлением (TMR), и изменения электрического сопротивления обусловлены изменениями тока, создаваемого туннелирующими электронами, который протекает через изолирующие слои датчиков TMR.

В одном из примеров осуществления каждый из магниточувствительных датчиков включает первый и второй ферромагнитные слои и немагнитный слой, который разделяет первый и второй ферромагнитные слои.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, где последовательности комплементарных цепочек определены на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, зарегистрированных для каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, происходят ли изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение величин изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, и количество магнитных частиц, присоединенных к каждому типу нуклеотида, отличается от количества магнитных частиц, присоединенных к другим типам нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM).

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, и к каждому типу нуклеотида присоединен такой тип магнитных частиц, который отличается от типов магнитных частиц, присоединенных к другим типам нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы создают различные величины напряженности магнитного поля.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают материалы,

которые обладают парамагнитными, диамагнитными, ферромагнитными или антиферромагнитными свойствами.

5 В одном из примеров осуществления обнаруженные изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков обусловлены величинами собственного спина электронов, находящихся в материале магнитных частиц.

В одном из примеров осуществления проведение совокупности циклов SBS включает проведение совокупности циклов SBS, где каждый из совокупности циклов SBS включает доставку совокупности типов нуклеотидов, причем доставку каждого типа нуклеотида производят в отличный от других момент времени.

10 В одном из примеров осуществления проведение совокупности циклов SBS включает проведение совокупности циклов SBS, где каждый из совокупности циклов SBS включает одновременную доставку совокупности типов нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления проведение совокупности циклов SBS включает проведение совокупности циклов SBS, где каждый из совокупности циклов SBS включает доставку магнитных частиц к соответствующим нуклеотидам после добавления соответствующих нуклеотидов к комплементарной цепочке.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы имеют обратимый связующий элемент.

20 В одном из примеров осуществления обратимый связующий элемент включает биотин, дестиобиотин, авидин, нейтравидин, стрептавидин, альдегид, гидразид, комплементарный олигонуклеотид или аналог нуклеиновой кислоты.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают необратимый связующий элемент.

25 В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают фотоотщепляемые связующие элементы.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают фотообратимые связующие элементы.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают фотоактивируемые связующие элементы.

30 В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают отщепляемый (расщепляемый) связующий элемент.

В одном из примеров осуществления конфигурация магнитных частиц обеспечивает их временное связывание с соответствующим нуклеотидом.

35 В одном из примеров осуществления одна или более магнитных частиц связаны с гамма-фосфатом нуклеотида, и магнитная частица высвобождается при присоединении нуклеотида к комплементарной цепочке под действием полимеразы.

В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает кластер матричных цепочек, которые иммобилизованы на поверхности подложки установки для обнаружения.

40 В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает единственную матричную цепочку, которая иммобилизована на поверхности подложки установки для обнаружения.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды имеют биотиновые метки.

45 В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой имеющие покрытие из стрептавидина магнитные наночастицы, нуклеотиды и магнитные частицы, образующие комплекс магнитных наночастиц с биотином/стрептавидином (англ. biotin/streptavidin magnetic nanoparticle complex, сокращенно BSMN).

В одном из примеров осуществления установка для обнаружения включает

проточную ячейку, которая ограничивает камеру, имеющую заданные участки, причем доставку нуклеотидов и магнитных частиц к заданным участкам осуществляют пропусканием потока нуклеотидов и магнитных частиц через камеру проточной ячейки.

5 В одном из примеров осуществления в установке для обнаружения имеется камера, которая включает заданные участки, и при этом установка для обнаружения имеет электроды, которые расположены вдоль камеры, причем доставка нуклеотидов и доставка магнитных частиц включает выполнение операций с каплями, в которых применяют электроды.

10 В одном из примеров осуществления совокупность событий SBS осуществляют посредством реакций, проводимых в одной емкости.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы вызывают постоянное изменение намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков, в результате чего состояния намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков сохраняются после удаления магнитных частиц, причем способ включает 15 изменение величины намагничивания по меньшей мере некоторых магниточувствительных датчиков после считывания показаний этих магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления считывание показаний магниточувствительных датчиков производят после удаления магнитных частиц.

20 Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает 25 совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает доставку совокупности реагентов к заданным участкам, причем реагенты включают нуклеотиды и полимеразу, и к по меньшей мере одному из нуклеотидов или к полимеразе присоединены магнитные частицы. Способ включает определение изменений электрического сопротивления в 30 области магниточувствительных датчиков во время осуществления совокупности событий SBS, где каждое событие SBS включает рост комплементарной цепочки посредством встраивания одного из нуклеотидов в комплементарную цепочку, причем изменения электрического сопротивления происходят при попадании магнитных частиц в соответствующие заданные участки в процессе осуществления совокупности событий 35 SBS. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают магниторезистивный датчик.

40 В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с гигантским магнитосопротивлением (GMR), и изменения электрического сопротивления обусловлены изменениями потока электрического тока, протекающего через проводящие слои датчиков GMR.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с туннельным магнитосопротивлением (TMR), и изменения электрического 45 сопротивления обусловлены изменениями тока, создаваемого туннелирующими электронами, который протекает через изолирующие слои датчиков TMR.

В одном из примеров осуществления каждый из магниточувствительных датчиков включает первый и второй ферромагнитные слои и немагнитный слой, который

разделяет первый и второй ферромагнитные слои.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании  
5 обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области  
10 магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, и количество магнитных частиц, присоединенных к каждому типу нуклеотида, отличается от количества магнитных частиц, присоединенных к другим  
15 типам нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM).

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, и к каждому типу нуклеотида присоединен такой тип магнитных частиц,  
20 который отличается от типов магнитных частиц, присоединенных к другим типам нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы создают различные величины напряженности магнитного поля.

В одном из примеров осуществления магнитные свойства включают по меньшей мере одно из следующих свойств: магнитное поле, направление вектора магнитного поля или магнитный момент.  
25

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают материалы, которые обладают парамагнитными, диамагнитными, ферромагнитными или антиферромагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления обнаруженные изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков обусловлены величинами собственного спина электронов, находящихся в материале магнитных частиц.  
30

В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает кластер матричных цепочек, которые иммобилизованы на поверхности подложки установки  
35 для обнаружения.

В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает единственную матричную цепочку, которая иммобилизована на поверхности подложки установки для обнаружения.

В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает единственную молекулу полимеразы, иммобилизованную на поверхности подложки  
40 установки для обнаружения.

В одном из примеров осуществления установка для обнаружения включает проточную ячейку, которая ограничивает камеру, имеющую заданные участки, где доставку реагентов к заданным участкам осуществляют одновременным пропусканием  
45 потоков реагентов через камеру проточной ячейки.

В одном из примеров осуществления в установке для обнаружения имеется камера, которая включает заданные участки, причем установка для обнаружения имеет электроды, которые расположены вдоль камеры, и доставка реагентов включает

выполнение операций с каплями при помощи электродов.

В одном из примеров осуществления каждый нуклеотид содержит одну или более магнитных частиц, связанных с гамма-фосфатом нуклеотида, и при присоединении нуклеотида к комплементарной цепочке под действием полимеразы происходит  
5 высвобождение магнитной частицы.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы присоединяются к полимеразе, и обнаруживаемые изменения обусловлены присутствием на заданных участках магнитных частиц, вносимых при добавлении нуклеотидов под действием  
10 полимеразы.

В одном из примеров осуществления каждый тип нуклеотида имеет соответствующую скорость встраивания, которая отличается от скорости встраивания других типов нуклеотидов.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает  
15 массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах  
20 соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным участкам и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам. Каждый цикл SBS включает (b) доставку магнитных частиц к заданным участкам, где магнитные частицы захватываются нуклеотидами. Каждый цикл SBS включает (с) определение  
25 изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем изменения обусловлены магнитными свойствами магнитных частиц. Каждый цикл SBS включает (d) удаление магнитных частиц из заданных участков. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления этапы (а)-(d) повторяют при обработке  
30 совокупности типов нуклеотидов, причем доставку каждого типа нуклеотида к заданным участкам производят по отдельности.

В одном из примеров осуществления доставка нуклеотидов включает одновременную доставку совокупности типов нуклеотидов, и доставка магнитных частиц включает  
35 одновременную доставку совокупности типов магнитных частиц, где каждый тип магнитных частиц создает соответствующую напряженность магнитного поля, которая отличается от напряженностей магнитного поля, создаваемых другими типами магнитных частиц.

В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает кластер  
40 матричных цепочек, которые иммобилизованы на поверхности подложки установки для обнаружения.

В одном из примеров осуществления каждый заданный участок включает единственную матричную цепочку, которая иммобилизована на поверхности подложки  
установки для обнаружения.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды содержат биотиновые метки.  
45

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой магнитные наночастицы, имеющие покрытие из стрептавидина, и нуклеотиды и магнитные частицы образуют комплекс магнитных наночастиц с биотином/

стрептавидином (BSMN), и при этом способ дополнительно включает удаление комплекса BSMN.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой функционализированные магнитные наночастицы.

5 В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой магнитные наночастицы, имеющие покрытие из стрептавидаина.

В одном из примеров осуществления заданные участки расположены в камере проточной ячейки, и доставка нуклеотидов и доставка магнитных частиц включает пропускание потоков нуклеотидов и пропускание потоков магнитных частиц,  
10 соответственно, через камеру.

В одном из примеров осуществления в установке для обнаружения имеется камера, которая включает заданные участки, причем установка для обнаружения имеет электроды, которые расположены вдоль камеры, и доставка нуклеотидов и доставка магнитных частиц включает выполнение операций с каплями при помощи электродов.

15 В одном из примеров осуществления каждый из совокупности циклов SBS дополнительно включает определение фонового уровня электрического сопротивления после выполнения этапа (d).

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после выполнения  
20 этапа (c).

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают магниторезистивный датчик.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с гигантским магнитосопротивлением (GMR), и изменения электрического  
25 сопротивления обусловлены изменениями потока электрического тока, протекающего через проводящие слои датчиков GMR.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с туннельным магнитосопротивлением (TMR), и изменения электрического  
30 сопротивления обусловлены изменениями тока, создаваемого туннелирующими электронами, который протекает через изолирующие слои датчиков TMR.

В одном из примеров осуществления каждый из магниточувствительных датчиков включает первый и второй ферромагнитные слои и немагнитный слой, который разделяет первый и второй ферромагнитные слои.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики  
35 комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик  
40 включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при выполнении каждого из совокупности циклов SBS.

В одном из примеров осуществления магнитные свойства включают по меньшей  
45 мере одно из следующих свойств: магнитное поле, направление вектора магнитного поля или магнитный момент.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают материалы, которые обладают парамагнитными, диамагнитными, ферромагнитными или

антиферромагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления обнаруженные изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков обусловлены величинами собственного спина электронов, находящихся в материале магнитных частиц.

5 В одном из примеров осуществления магнитные частицы вызывают постоянное изменение намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков, в результате чего состояния намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков сохраняются после удаления магнитных частиц, и циклы SBS включают изменение состояния намагничивания по меньшей мере некоторых  
10 магниточувствительных датчиков после считывания показаний этих магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления считывание показаний магниточувствительных датчиков производят после удаления магнитных частиц.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом  
15 (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает  
20 совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным участкам и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам, где нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды, и первые,  
25 вторые и третьи нуклеотиды содержат различающиеся основания. Каждый цикл SBS включает (b) доставку магнитных частиц к заданным участкам, где магнитные частицы захватываются первыми нуклеотидами и вторыми нуклеотидами. Каждый цикл SBS включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Каждый цикл SBS включает (d) удаление магнитных  
30 частиц из первых нуклеотидов. Каждый цикл SBS включает (e) доставку магнитных частиц к заданным участкам, где магнитные частицы захватываются третьими нуклеотидами. Каждый цикл SBS включает (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании  
35 обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления первый нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления обнаружено при выполнении этапа (с), но не обнаружено при выполнении этапа (f); второй нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении  
40 этапа (а), если изменение электрического сопротивления обнаружено при выполнении этапа (с) и обнаружено при выполнении этапа (f); и третий нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления не было обнаружено при выполнении этапа (с), но было обнаружено при выполнении этапа (f).

45 В одном из примеров осуществления этап (а) включает доставку четвертых нуклеотидов, причем четвертый нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления не было обнаружено при выполнении этапа (с) и не было обнаружено при выполнении этапа

(f).

В одном из примеров осуществления каждый из совокупности циклов SBS дополнительно включает: (g) удаление магнитных частиц из вторых и третьих нуклеотидов.

5 В одном из примеров осуществления этапы (d) и (e) выполняют параллельно (одновременно).

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании  
10 обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области  
15 магниточувствительных датчиков при выполнении каждого из совокупности циклов SBS.

В одном из примеров осуществления магнитные свойства включают по меньшей мере одно из следующих свойств: магнитное поле, направление вектора магнитного поля или магнитный момент.

20 В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают материалы, которые обладают парамагнитными, диамагнитными, ферромагнитными или антиферромагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления обнаруженные изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков обусловлены величинами  
25 собственного спина электронов, находящихся в материале магнитных частиц.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после выполнения этапа (c).

В одном из примеров осуществления магнитные частицы вызывают постоянное  
30 изменение намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков, в результате чего состояния намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков сохраняются после удаления магнитных частиц после выполнения этапа (f), и циклы SBS включают изменение состояния намагничивания по меньшей мере некоторых магниточувствительных датчиков после считывания показаний этих  
35 магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления считывание показаний магниточувствительных датчиков производят после удаления магнитных частиц.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает  
40 массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности  
45 циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (a) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, и к первым и ко вторым

нуклеотидам присоединены магнитные частицы. Каждый цикл SBS включает (b) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем магнитные частицы, захваченные первыми нуклеотидами, вызывают изменение электрического сопротивления, отличающееся от изменения электрического сопротивления, вызываемого магнитными частицами, захваченными вторыми нуклеотидами. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при выполнении каждого из совокупности циклов SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное равенство величин обнаруженных изменений в области магниточувствительных датчиков первой величине или их приблизительное равенство второй величине.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, превышают ли обнаруженные в области магниточувствительных датчиков изменения пороговое значение.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли обнаруженные изменения в области магниточувствительных датчиков в пределах заданного диапазона величин.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает сравнение изменений, обнаруженных в области каждого из магниточувствительных датчиков, на протяжении совокупности циклов SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает проводимое при выполнении каждого из циклов SBS сравнение обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления первые и вторые нуклеотиды захватывают различные количества магнитных частиц, и различные количества магнитных частиц предназначены для создания различных величин изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM).

В одном из примеров осуществления первые нуклеотиды захватывают первый тип магнитных частиц, и вторые нуклеотиды захватывают второй тип магнитных частиц, причем первый и второй типы магнитных частиц предназначены для создания различных величин изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления первый и второй типы магнитных частиц

содержат различающиеся парамагнитные материалы.

В одном из примеров осуществления доставка первых и вторых нуклеотидов при выполнении этапа (а) включает доставку первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек и последующую доставку магнитных частиц к заданным участкам, в результате чего магнитные частицы присоединяются к первым и вторым нуклеотидам.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после каждого из событий SBS.

В одном из примеров осуществления каждый из первых и вторых нуклеотидов содержит одну или более магнитных частиц, связанных с гамма-фосфатом нуклеотида, во время добавления полимеразой первого нуклеотида или второго нуклеотида к комплементарной цепочке происходит высвобождение магнитной частицы.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, причем к первым и вторым нуклеотидам присоединены первые и вторые одномолекулярные магниты (SMM), соответственно, и каждый из первых и вторых SMM имеет отличающееся от другого магнитное состояние, которое чувствительно к различающимся частотам светового излучения. Каждый цикл SBS включает (b) изменение магнитного состояния первых SMM под воздействием светового излучения первой частоты. Каждый цикл SBS включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения вызваны магнитным состоянием первых SMM. Каждый цикл SBS включает (d) изменение магнитного состояния первых SMM под воздействием светового излучения второй частоты. Каждый цикл SBS включает (e) изменение магнитного состояния вторых SMM под воздействием светового излучения третьей частоты. Каждый цикл SBS включает (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения вызваны магнитным состоянием вторых SMM. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления каждый из циклов SBS дополнительно включает изменение магнитного состояния вторых SMM под воздействием светового излучения с четвертой частотой.

В одном из примеров осуществления SMM включают металлоорганические соединения, которые обладают суперпарамагнитными (также называемыми сверхпарамагнитными) свойствами.

В одном из примеров осуществления по меньшей мере один из этапов (b)-(d) или (e)-(f) повторяют множество раз при выполнении по меньшей мере некоторых циклов SBS.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

5 В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий  
10 SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное равенство величин обнаруженных изменений в области магниточувствительных датчиков первой величине или их приблизительное равенство второй величине.

15 В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, превышают ли обнаруженные в области магниточувствительных датчиков изменения пороговое значение.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли обнаруженные  
20 изменения в области магниточувствительных датчиков в пределах заданного диапазона величин.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает сравнение изменений, обнаруженных в области каждого из магниточувствительных датчиков, на протяжении совокупности циклов  
25 SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает проводимое при выполнении каждого из циклов SBS сравнение обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью магниточувствительных датчиков.

30 В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после каждого из событий SBS.

В одном из примеров осуществления каждый из первых и вторых нуклеотидов содержит одну или более магнитных частиц, связанных с гамма-фосфатом нуклеотида,  
35 и во время добавления полимеразой первого нуклеотида или второго нуклеотида к комплементарной цепочке происходит высвобождение магнитной частицы.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных  
40 датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной  
45 цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, причем к первым и вторым нуклеотидам присоединены одномолекулярные магниты (SMM), и к первым и вторым

нуклеотидам присоединены разные количества одномолекулярных магнитов (SMM),  
Причем SMM имеют магнитные состояния, чувствительные к отличающимся частотам  
светового излучения. Каждый цикл SBS включает (b) изменение магнитного состояния  
одномолекулярных магнитов (SMM) под воздействием светового излучения первой  
5 частоты. Каждый цикл SBS включает (c) определение изменений электрического  
сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Каждый цикл SBS включает  
(d) изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под  
воздействием светового излучения второй частоты. Способ включает определение  
генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных  
10 изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления SMM включают металлоорганические соединения,  
которые обладают суперпарамагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления этапы (b)-(d) повторяют множество раз при  
выполнении по меньшей мере некоторых циклов SBS.

15 В одном из примеров осуществления по меньшей мере первые и вторые нуклеотиды  
включают первые, вторые и третьи нуклеотиды, к каждому из которых присоединены  
SMM, причем к первым, вторым и третьим нуклеотидам присоединены разные  
количества одномолекулярных магнитов (SMM).

В одном из примеров осуществления SMM включают металлоорганические соединения,  
20 которые обладают суперпарамагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики  
комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического  
сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании  
обнаруженных изменений, заданную картину.

25 В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик  
включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем  
последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных  
изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области  
магниточувствительных датчиков при выполнении каждого из совокупности циклов  
30 SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей  
комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное  
равенство величин обнаруженных изменений первой величине или их приблизительное  
равенство второй величине.

35 В одном из примеров осуществления определение последовательностей  
комплементарных цепочек включает определение того, превышают ли величины  
изменений, обнаруженных в области магниточувствительных датчиков, пороговое  
значение.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей  
40 комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли величины  
изменений, обнаруженных в области магниточувствительных датчиков, в пределах  
заданного диапазона величин.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей  
комплементарных цепочек включает сравнение величин изменений, обнаруженных в  
45 области каждого из магниточувствительных датчиков, на протяжении совокупности  
циклов SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей  
комплементарных цепочек включает проводимое при выполнении каждого из циклов

SBS сравнение величин обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп по завершении каждого цикла.

В одном из примеров осуществления каждый из первых и вторых нуклеотидов содержит одну или более магнитных частиц, связанных с гамма-фосфатом нуклеотида, и во время добавления полимеразой первого нуклеотида или второго нуклеотида к комплементарной цепочке происходит высвобождение магнитной частицы.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки посредством добавления нуклеотидов вдоль каждой матричной цепочки под действием полимеразы, причем к полимеразе присоединены соответствующие магнитные частицы, которые проявляют соответствующие магнитные свойства, и каждое событие SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем обнаруживаемые изменения обусловлены присутствием на заданных участках магнитных частиц, привносимых при добавлении нуклеотидов под действием полимеразы. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM), и способ дополнительно включает изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под действием одной или более частот светового излучения.

В одном из примеров осуществления изобретения осуществление совокупности событий SBS включает: (а) доставку первого типа нуклеотидов к заданным участкам и обнаружение изменений электрического сопротивления, связанных с присутствием первого типа нуклеотидов, и (b) доставку второго типа нуклеотидов к заданным участкам и обнаружение изменений электрического сопротивления, связанных с присутствием второго типа нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления изобретения осуществление совокупности событий SBS включает одновременную доставку совокупности типов нуклеотидов к заданным участкам и обнаружение изменений электрического сопротивления, причем каждый тип нуклеотида имеет соответствующую скорость встраивания, которая отличается от скорости встраивания других типов нуклеотидов, и последовательности комплементарных цепочек определены на основании продолжительности существования обнаруженных изменений.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное равенство продолжительности существования обнаруженных изменений одной из некоторого количества величин, где количество величин равно количеству типов нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли продолжительности существования обнаруженных изменений в пределах соответствующего количества возможных диапазонов величин, где количество возможных диапазонов величин равно количеству типов нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает сравнение продолжительности существования обнаруженных изменений в области каждого магниточувствительного датчика в рамках осуществления совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает проводимое при осуществлении каждого события SBS сравнение продолжительности существования обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления изобретения осуществление совокупности событий SBS включает одновременную доставку совокупности реагентов к заданным участкам, причем реагенты включают нуклеотиды и полимеразу, и события SBS осуществляют посредством реакций, проводимых в одной емкости.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый из совокупности циклов SBS включает (а) доставку первого нуклеотида и полимеразы к заданным участкам, причем к полимеразе присоединены магнитные частицы. Каждый из совокупности циклов SBS включает (б) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения электрического сопротивления обусловлены присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления полимеразой первого нуклеотида к комплементарной цепочке. Каждый из совокупности циклов SBS включает (с) доставку второго нуклеотида и полимеразы к заданным участкам, причем к полимеразе присоединены магнитные частицы. Каждый из циклов SBS включает (д) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения электрического сопротивления обусловлены присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления соответствующей полимеразой второго нуклеотида к комплементарной цепочке. Способ включает определение генетических

характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM), и способ дополнительно включает изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под действием одной или более частот светового излучения.

В одном из примеров осуществления каждый из совокупности циклов SBS дополнительно включают (e) доставку к заданным участкам третьего нуклеотида и полимеразы, причем к полимеразе присоединены магнитные частицы; и (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения электрического сопротивления обусловлены присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления полимеразой третьего нуклеотида к комплементарной цепочке.

В одном из примеров осуществления каждый из совокупности циклов SBS дополнительно включает доставку к заданным участкам четвертого нуклеотида и полимеразы.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп по завершении каждого цикла.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждое из совокупности событий SBS включает (a) доставку к заданным участкам по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов и полимеразы, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, и к полимеразе присоединены магнитные частицы. Каждое из совокупности событий SBS включает (b) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, и изменения электрического сопротивления обусловлены присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления полимеразой первого нуклеотида или второго нуклеотида к комплементарной цепочке, и при этом скорости встраивания первых и вторых нуклеотидов различны. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой

одномолекулярные магниты (SMM).

В одном из примеров осуществления доставка по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов включает доставку первых, вторых и третьих нуклеотидов, каждый из которых имеет отличающееся от других основание и отличающуюся от других скорость встраивания.

В одном из примеров осуществления доставка по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов включает доставку первых, вторых, третьих и четвертых нуклеотидов, каждый из которых имеет отличающееся от других основание и отличающуюся от других скорость встраивания.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп по завершении каждого цикла.

В одном из примеров осуществления изобретения осуществление совокупности событий SBS включает одновременную доставку совокупности реагентов к заданным участкам, причем реагенты включают первые и вторые нуклеотиды и полимеразу, и события SBS осуществляют посредством реакций, проводимых в одной емкости.

Один из примеров осуществления относится к системе для секвенирования синтезом (SBS). Система включает установку для обнаружения, включающую массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков включает по меньшей мере два ферромагнитных слоя и немагнитный слой, который разделяет два ферромагнитных слоя, и каждый из магниточувствительных датчиков образует один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR), причем магниточувствительные датчики расположены в камере вблизи соответствующих заданных участков и выполнены с возможностью обнаружения магнитных частиц, относящихся к соответствующим заданным участкам. Система включает считывающую схему, соединенную с возможностью связи с магниточувствительными датчиками, где считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов, которые соответствуют величинам электрического сопротивления магниточувствительных датчиков. Система включает систему струйного контроля, конструкция которой позволяет пропускать через камеру потоки реагентов для выполнения протокола SBS, причем реагенты включают совокупность типов нуклеотидов, и считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов после осуществления каждого события встраивания.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики GMR, выполненные с возможностью осуществления перехода между первым и вторым состояниями таким образом, что в первом состоянии два ферромагнитных слоя соединены антиферромагнитным соединением, в результате чего немагнитный слой имеет первое электрическое сопротивление, и во втором состоянии внешнее

магнитное поле препятствует образованию антиферромагнитного соединения, в результате чего немагнитный слой имеет второе электрическое сопротивление.

5 В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики TMR, выполненные с возможностью осуществления перехода между первым и вторым состояниями таким образом, что в первом состоянии два ферромагнитных  
10 слоя имеют противоположные направления намагничивания, в результате чего немагнитный слой имеет первое электрическое сопротивление, и во втором состоянии два ферромагнитных слоя имеют одинаковое направление намагничивания, в результате чего немагнитный слой имеет первое электрическое сопротивление.

10 В одном из примеров осуществления система струйного контроля выполнена с возможностью (а) подвода потоков нуклеотидов к заданным участкам для добавления нуклеотидов к комплементарным цепочкам; и (b) подвода потоков магнитных частиц к заданным участкам, что приводит к присоединению магнитных частиц к нуклеотидам, при этом магнитные частицы проявляют соответствующее подходящее для обнаружения  
15 магнитное свойство; и (d) удаления магнитных частиц из заданных участков; при этом считывающая схема выполнена с возможностью определения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков после выполнения этапа (b).

20 В одном из примеров осуществления система струйного контроля выполнена с возможностью: (а) доставки нуклеотидов к заданным участкам для добавления нуклеотидов к комплементарным цепочкам, где нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды, и первые, вторые и третьи нуклеотиды содержат различающиеся основания; (b) доставки магнитных частиц к заданным участкам для присоединения магнитных частиц к первым нуклеотидам и вторым  
25 нуклеотидам; (c) удаления магнитных частиц из первых нуклеотидов; (d) доставки магнитных частиц к заданным участкам, для присоединения магнитных частиц к третьим нуклеотидам; при этом считывающая схема выполнена с возможностью определения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков после выполнения этапа (b) и после выполнения этапа (d).

30 В одном из примеров осуществления система струйного контроля выполнена с возможностью доставки по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным участкам для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, и к первым и ко вторым нуклеотидам присоединены магнитные частицы; при этом считывающая схема выполнена с  
35 возможностью определения изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, и магнитные частицы, присоединенные к первым нуклеотидам, вызывают изменение электрического сопротивления, которое отличается от изменения электрического сопротивления, вызываемого магнитными частицами, присоединенными ко вторым нуклеотидам.

40 Один из примеров осуществления относится к системе для секвенирования синтезом (SBS). Система включает считывающую головку, включающую кронштейн, и магниточувствительный датчик, присоединенный к кронштейну, где магниточувствительный датчик включает один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным  
45 магнитосопротивлением (TMR), и магниточувствительный датчик выполнен с возможностью обнаружения магнитных частиц. Система включает подложку для образца, имеющую поверхность подложки, выполненную с возможностью нахождения на поверхности совокупности цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных

в заданных участках вдоль поверхности подложки; при этом по меньшей мере один из следующих элементов: считывающая головка и подложка для образца выполнен с возможностью перемещения относительно другого с целью расположения магниточувствительного датчика вблизи заданных участков при нахождении в рабочем режиме. Система включает считывающую схему, соединенную с возможностью связи с магниточувствительным датчиком, где считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов, которые соответствуют электрическому сопротивлению магниточувствительного датчика при его расположении на одном из заданных участков.

В одном из примеров осуществления подложка для образца способна поворачиваться вокруг оси.

В одном из примеров осуществления подложка для образца имеет форму диска.

В одном из примеров осуществления считывающая головка включает совокупность магниточувствительных датчиков, присоединенных к кронштейну, причем считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов от по меньшей мере совокупности магниточувствительных датчиков к по меньшей мере некоторым при нахождении в рабочем режиме.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает обеспечение наличия считывающей головки, включающей кронштейн, и магниточувствительного датчика, присоединенного к кронштейну, где магниточувствительный датчик включает один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR), и магниточувствительный датчик выполнен с возможностью обнаружения магнитных частиц. Способ включает обеспечение наличия подложки для образца, содержащей совокупность матричных цепочек, расположенных на заданных участках вдоль поверхности подложки. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарных цепочек посредством встраивания нуклеотидов вдоль каждой из матричных цепочек, где по меньшей мере некоторые из нуклеотидов имеют метки в виде соответствующих магнитных частиц, которые проявляют соответствующее магнитное свойство; при этом при выполнении каждого из циклов SBS способ включает расположение магниточувствительного датчика вблизи заданных участков вдоль поверхности подложки и определение электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления подложка для образца способна поворачиваться вокруг оси, и расположение магниточувствительного датчика включает вращение подложки для образца вокруг оси.

В одном из примеров осуществления подложка для образца имеет форму диска.

В одном из примеров осуществления считывающая головка включает совокупность магниточувствительных датчиков, присоединенных к кронштейну.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области с целью определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях, причем конфигурация полимеразы позволяет ей захватывать соответствующую матричную цепочку. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания

комплементарной цепочки посредством встраивания нуклеотидов вдоль соответствующей матричной цепочки, где нуклеотиды присоединены к соответствующим магнитным частицам, имеющим соответствующие магнитные свойства, и каждое из совокупности событий SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения вызваны соответствующими магнитными свойствами магнитных частиц в результате добавления нуклеотидов к комплементарной цепочке. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

10 В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают магниторезистивный датчик.

В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с гигантским магнитосопротивлением (GMR), и изменения электрического сопротивления обусловлены изменениями потока электрического тока, протекающего через проводящие слои датчиков GMR.

15 В одном из примеров осуществления магниточувствительные датчики включают датчики с туннельным магнитосопротивлением (TMR), и изменения электрического сопротивления обусловлены изменениями тока, создаваемого туннелирующими электронами, который протекает через изолирующие слои датчиков TMR.

20 В одном из примеров осуществления каждый из магниточувствительных датчиков включает первый и второй ферромагнитные слои и немагнитный слой, который разделяет первый и второй ферромагнитные слои.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

25 В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

30 В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, происходят ли изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение величин изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков.

40 В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, и количество магнитных частиц, присоединенных к каждому типу нуклеотида, отличается от количества магнитных частиц, присоединенных к другим типам нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM).

45 В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, и к каждому типу нуклеотида присоединен такой тип магнитных частиц, который отличается от типов магнитных частиц, присоединенных к другим типам нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы создают различные величины напряженности магнитного поля.

В одном из примеров осуществления магнитные свойства включают по меньшей мере одно из следующих свойств: магнитное поле, направление вектора магнитного поля или магнитный момент.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают материалы, которые обладают парамагнитными, диамагнитными, ферромагнитными или антиферромагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления обнаруженные изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков обусловлены величинами собственного спина электронов, находящихся в материале магнитных частиц.

В одном из примеров осуществления каждое из совокупности событий SBS включает доставку совокупности типов нуклеотидов, причем доставку каждого типа нуклеотида производят в отличный от других момент времени.

В одном из примеров осуществления каждое из совокупности событий SBS включает одновременную доставку совокупности типов нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления каждое из совокупности событий SBS включает доставку магнитных частиц к соответствующим нуклеотидам после добавления соответствующих нуклеотидов к комплементарной цепочке.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы имеют обратимый связующий элемент.

В одном из примеров осуществления каждая заданная область включает единственную матричную цепочку, которая захвачена полимеразой.

В одном из примеров осуществления установка для обнаружения включает проточную ячейку, которая ограничивает камеру, включающую заданные области, и нуклеотиды и магнитные частицы доставляются в заданные области пропусканием потока нуклеотидов и магнитных частиц через камеру проточной ячейки.

В одном из примеров осуществления в установке для обнаружения имеется камера, которая включает заданные области, а также установка для обнаружения имеет электроды, которые расположены вдоль камеры, и доставка нуклеотидов и доставка магнитных частиц включает выполнение операций с каплями при помощи электродов.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области с целью определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным областям и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам. Каждое событие SBS включает (b) доставку магнитных частиц к заданным областям, где магнитные частицы захватываются нуклеотидами, причем магнитные частицы создают соответствующее внешнее магнитное поле. Каждое событие SBS включает (с) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Каждое событие SBS включает (d) удаление магнитных частиц из заданных областей. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании

обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления этапы (a)-(d) повторяют для совокупности типов нуклеотидов, и каждый тип нуклеотида по отдельности доставляют к заданным областям.

5 В одном из примеров осуществления доставка нуклеотидов включает одновременную доставку совокупности типов нуклеотидов, и доставка магнитных частиц включает одновременную доставку совокупности типов магнитных частиц, причем каждый тип магнитных частиц имеет соответствующее свойство создаваемого магнитного поля, которое отличается от свойства магнитного поля, создаваемого другими типами  
10 магнитных частиц.

В одном из примеров осуществления каждая заданная область включает единственную матричную цепочку, которая иммобилизована на поверхности подложки установки для обнаружения.

В одном из примеров осуществления заданные области расположены в камере  
15 проточной ячейки, и доставка нуклеотидов, а также доставка магнитных частиц включает пропускание потоков нуклеотидов и пропускание потоков магнитных частиц, соответственно, через камеру.

В одном из примеров осуществления в установке для обнаружения имеется камера, которая включает заданные области, причем установка для обнаружения имеет  
20 электроды, которые расположены вдоль камеры, и доставка нуклеотидов и доставка магнитных частиц включает выполнение операций с каплями при помощи электродов.

В одном из примеров осуществления каждое из совокупности событий SBS дополнительно включает определение фонового уровня электрического сопротивления после выполнения этапа (d).

25 В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после осуществления каждого из событий SBS.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает  
30 массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области с целью определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ  
35 включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (a) доставку нуклеотидов к заданным областям и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам, где нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды, и первые, вторые и третьи нуклеотиды  
40 содержат различающиеся основания. Каждое событие SBS включает (b) доставку магнитных частиц к заданным областям, причем магнитные частицы захвачены первыми нуклеотидами и вторыми нуклеотидами. Каждое событие SBS включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Каждое событие SBS включает (d) удаление магнитных частиц из первых нуклеотидов.  
45 Каждое событие SBS включает (e) доставку магнитных частиц к заданным областям, причем магнитные частицы принадлежат третьим нуклеотидам. Каждое событие SBS включает (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Способ включает определение генетических

характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления первый нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления обнаружено при выполнении этапа (с), но не обнаружено при выполнении этапа (f); второй нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления обнаружено при выполнении этапа (с) и обнаружено при выполнении этапа (f); и третий нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления не было обнаружено при выполнении этапа (с), но было обнаружено при выполнении этапа (f).

В одном из примеров осуществления этап (а) включает доставку четвертых нуклеотидов, и в этом случае четвертый нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления не было обнаружено при выполнении этапа (с) и не было обнаружено при выполнении этапа (f).

В одном из примеров осуществления каждое из совокупности событий SBS дополнительно включает: (g) удаление магнитных частиц из вторых и третьих нуклеотидов.

В одном из примеров осуществления этапы (d) и (e) выполняют параллельно.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления магнитные свойства включают по меньшей мере одно из следующих свойств: магнитное поле, направление вектора магнитного поля или магнитный момент.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы включают материалы, которые обладают парамагнитными, диамагнитными, ферромагнитными или антиферромагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления обнаруженные изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков обусловлены величинами собственного спина электронов, находящихся в материале магнитных частиц.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после каждого из событий SBS.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области с целью определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы

позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным областям для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, и к первым и ко вторым нуклеотидам присоединены магнитные частицы. Каждое событие SBS включает (b) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, причем магнитные частицы, принадлежащие первым нуклеотидам, вызывают изменение электрического сопротивления, отличающееся от изменения электрического сопротивления, вызываемого магнитными частицами, принадлежащими вторым нуклеотидам. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное равенство величин обнаруженных изменений в области магниточувствительных датчиков первой величине или их приблизительное равенство второй величине.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, превышают ли обнаруженные в области магниточувствительных датчиков изменения пороговое значение.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли обнаруженные изменения в области магниточувствительных датчиков в пределах заданного диапазона величин.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает сравнение изменений, обнаруженных в области каждого из магниточувствительных датчиков, в рамках осуществления совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает проводимое при осуществлении каждого события SBS сравнение обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления первые и вторые нуклеотиды захватывают различные количества магнитных частиц, и различные количества магнитных частиц выполнены с возможностью создания различных величин изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления магнитные частицы представляют собой

одномолекулярные магниты (SMM).

В одном из примеров осуществления первые нуклеотиды захватывают первый тип магнитных частиц, и вторые нуклеотиды захватывают второй тип магнитных частиц, причем первый и второй типы магнитных частиц выполнены с возможностью создания различных величин изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления первый и второй типы магнитных частиц содержат различающиеся парамагнитные материалы.

В одном из примеров осуществления доставка первых и вторых нуклеотидов при выполнении этапа (а) включает доставку первых и вторых нуклеотидов к заданным областям для достройки комплементарных цепочек и последующую доставку магнитных частиц к заданным областям, в результате чего магнитные частицы присоединяются к первым и вторым нуклеотидам.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после каждого из событий SBS.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области с целью определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным областям для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат различающиеся основания, и к первым и вторым нуклеотидам присоединены первые и вторые одномолекулярные магниты (SMM), соответственно, причем каждый из первых и вторых SMM имеет отличающееся от другого магнитное состояние, которое чувствительно к различающимся частотам светового излучения. Каждое событие SBS включает (b) изменение магнитного состояния первых SMM под воздействием светового излучения первой частоты. Каждое событие SBS включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения вызваны магнитным состоянием первых SMM. Каждое событие SBS включает (d) изменение магнитного состояния первых SMM под воздействием светового излучения второй частоты. Каждое событие SBS включает (e) изменение магнитного состояния вторых SMM под воздействием светового излучения третьей частоты. Каждое событие SBS включает (f) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения вызваны магнитным состоянием вторых SMM. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления каждое из событий SBS дополнительно включает изменение магнитного состояния вторых SMM под воздействием светового излучения с четвертой частотой.

В одном из примеров осуществления SMM включают металлоорганические соединения, которые обладают суперпарамагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления по меньшей мере один из этапов (b)-(d) или (e)

-(f) повторяют множество раз для по меньшей мере некоторых событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании

5 обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области

10 магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное равенство величин обнаруженных изменений в области магниточувствительных датчиков

15 первой величине или их приблизительное равенство второй величине.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, превышают ли обнаруженные в области магниточувствительных датчиков изменения пороговое значение.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли обнаруженные изменения в области магниточувствительных датчиков в пределах заданного диапазона величин.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает сравнение изменений, обнаруженных в области

25 каждого из магниточувствительных датчиков, в рамках осуществления совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает проводимое при осуществлении каждого события SBS сравнение обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью

30 магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп после каждого из событий SBS.

Один из примеров осуществления относится к способу секвенирования синтезом

35 (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области с целью определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу, иммобилизованную на заданных областях. Конфигурация полимеразы

40 позволяет ей присоединяться к соответствующим матричным цепочкам. Способ включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарных цепочек вдоль матричных цепочек. Каждое событие SBS включает (а) доставку по меньшей мере первых и вторых нуклеотидов к заданным областям для достройки комплементарных цепочек, где первые и вторые нуклеотиды содержат

45 различающиеся основания, и к первым и вторым нуклеотидам присоединены одномолекулярные магниты (SMM), причем к первым и вторым нуклеотидам присоединены разные количества одномолекулярных магнитов (SMM), и SMM имеют магнитные состояния, чувствительные к отличающимся частотам светового излучения.

Каждое событие SBS включает (b) изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под воздействием светового излучения первой частоты. Каждое событие SBS включает (c) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Каждое событие SBS включает (d) изменение магнитного состояния одномолекулярных магнитов (SMM) под воздействием светового излучения второй частоты. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления SMM включают металлоорганические соединения, которые обладают суперпарамагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления этапы (b)-(d) повторяют множество раз для по меньшей мере некоторых событий SBS.

В одном из примеров осуществления по меньшей мере первые и вторые нуклеотиды включают первые, вторые и третьи нуклеотиды, к каждому из которых присоединены SMM, причем к первым, вторым и третьим нуклеотидам присоединены разные количества одномолекулярных магнитов (SMM).

В одном из примеров осуществления SMM включают металлоорганические соединения, которые обладают суперпарамагнитными свойствами.

В одном из примеров осуществления определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

В одном из примеров осуществления определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, наблюдается ли приблизительное равенство величин обнаруженных изменений первой величине или их приблизительное равенство второй величине.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, превышают ли величины изменений, обнаруженных в области магниточувствительных датчиков, пороговое значение.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение того, находятся ли величины изменений, обнаруженных в области магниточувствительных датчиков, в пределах заданного диапазона величин.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает сравнение величин обнаруженных изменений в области каждого магниточувствительного датчика в рамках осуществления совокупности событий SBS.

В одном из примеров осуществления определение последовательностей комплементарных цепочек включает проводимое при осуществлении каждого события SBS сравнение величин обнаруженных изменений, регистрируемых совокупностью магниточувствительных датчиков.

В одном из примеров осуществления нуклеотиды включают блокирующие группы, и способ дополнительно включает удаление блокирующих групп по завершении каждого события.

Один из примеров осуществления изобретения относится к способу секвенирования синтезом (SBS). Способ включает предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью определения магнитного свойства заданного участка, и установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ включает проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки вдоль каждой матричной цепочки. Каждый цикл SBS включает (а) доставку нуклеотидов к заданным участкам и самопроизвольное добавление нуклеотидов к комплементарным цепочкам, где нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды, и первые, вторые и третьи нуклеотиды содержат различающиеся основания, причем первые и вторые нуклеотиды включают магнитные частицы, а третьи нуклеотиды не включают магнитных частиц. Каждый цикл SBS включает (b) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, обусловленных магнитными частицами, принадлежащими первым и вторым нуклеотидам. Каждый цикл SBS включает (c) удаление магнитных частиц из первых нуклеотидов. Каждый цикл SBS включает (d) доставку магнитных частиц к заданным участкам, где магнитные частицы захватываются третьими нуклеотидами. Каждый цикл SBS включает (e) определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, обусловленных магнитными частицами, принадлежащими вторым и третьим нуклеотидам. Способ включает определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления.

В одном из примеров осуществления первый нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления обнаружено при выполнении этапа (b), но не обнаружено при выполнении этапа (e); второй нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления обнаружено при выполнении этапа (b) и обнаружено при выполнении этапа (e); и третий нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления не было обнаружено при выполнении этапа (b), но было обнаружено при выполнении этапа (e).

В одном из примеров осуществления этап (а) включает доставку четвертых нуклеотидов, причем четвертый нуклеотид достраивает комплементарную цепочку при выполнении этапа (а), если изменение электрического сопротивления не было обнаружено при выполнении этапа (b) и не было обнаружено при выполнении этапа (e).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А представлен вид сверху системы, которая включает массив магнитных датчиков для поддержки, например, магнитную биосенсорную схему для SBS; на Фиг. 1В представлен вид поперечного сечения системы, показанной на Фиг. 1А; на Фиг. 2А показан пример устройства с GMR (с гигантским магнитосопротивлением); на Фиг. 2В показан пример устройства с TMR (с туннельным магнитосопротивлением);

на Фиг. 3 показан пример графика чувствительности биочипа с GMR, в котором применена единственная магнитная наночастица;

на Фиг. 4 представлен вид поперечного сечения части установки для обнаружения, показанной на Фиг. 1А и 1В, и более подробно показан массив магнитных датчиков;

5 на Фиг. 5 показана часть установки для обнаружения, представленной на Фиг. 1А, 1В и 4, а также показан пример магнитной биосенсорной схемы для SBS, в которой для захвата магнитной наночастицы с покрытием из стрептавидина и генерации подходящего для обнаружения сигнала применяют встроенный биотинилированный нуклеотид;

на Фиг. 6А представлена часть структурной формулы биотинилированного нуклеотида, показанного на Фиг. 5;

на Фиг. 6В представлена часть структурной формулы нуклеотида, содержащего магнитную частицу, соединенную с гамма-фосфатом нуклеотида;

на Фиг. 7 представлена блок-схема примера способа определения основания в магнитной биосенсорной схеме для SBS, в которой применяют, например, проточную ячейку, показанную на Фиг. 1А, 1В и 4;

на Фиг. 8 представлена блок-схема примера способа установления различности оснований (распознавания оснований) в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с двумя метками", в которой применяют, например, проточную ячейку, показанную на Фиг. 1А, 1В и 4;

на Фиг. 9 схематично представлена диаграмма, в которой наглядно показаны этапы способа, представленного на Фиг. 8;

на Фиг. 10 представлена блок-схема примера способа установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с четырьмя метками", в которой применяют, например, проточную ячейку, показанную на Фиг. 1А, 1В и 4;

на Фиг. 11 представлена блок-схема примера способа установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с четырьмя метками", в которой применяют нуклеотиды, меченные SMM;

на Фиг. 12 представлена блок-схема примера способа установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с четырьмя метками", в которой для установления различности оснований применяют нуклеотиды, меченные SMM с различающимися магнитными величинами;

на Фиг. 13 представлена блок-схема примера способа установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS, в которой применяют ДНК-полимеразу, меченную SMM, и нуклеотиды с различающимися скоростями встраивания;

на Фиг. 14А представлен вид сверху массива магнитных датчиков в комбинации с примером полугидрофобной области, находящейся в проточной ячейке или капельном манипуляторе (манипуляторе для работы с каплями);

на Фиг. 14В представлен вид поперечного сечения массива магнитных датчиков, показанного на Фиг. 14А;

на Фиг. 15А представлен вид сверху массива магнитных датчиков в комбинации с другим примером полугидрофобной области, находящейся в проточной ячейке или капельном манипуляторе;

на Фиг. 15В представлен вид поперечного сечения массива магнитных датчиков, показанного на Фиг. 15А;

на Фиг. 16А представлен вид сверху части капельного манипулятора, который включает массив магнитных датчиков для поддержки, например, магнитной биосенсорной схемы для SBS;

на Фиг. 16В представлен вид поперечного сечения капельного манипулятора,

показанного на Фиг. 16В;

на Фиг. 17 представлен вид сверху вращающегося устройства на основе диска, в котором имеется один подвижный магнитный датчик для поддержки, например, магнитной биосенсорной схемы для SBS;

5 на Фиг. 18А представлен вид сверху массива магнитных датчиков в комбинации с примером осуществления, в котором полимеразы иммобилизованы на заданных областях;

на Фиг. 18В представлен вид сверху и вид поперечного сечения, соответственно, массива магнитных датчиков, показанного на Фиг. 18А; и

10 на Фиг. 19 представлен магниточувствительный датчик согласно одному из примеров осуществления.

## СВЕДЕНИЯ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ ВОЗМОЖНОСТЬ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способы, рассмотренные в настоящей работе, могут быть применены в комбинации с множеством различных методик биологического или химического анализа, которые  
15 включают методики секвенирования нуклеиновых кислот. Для определения генетической характеристики образца на основании изменений электрического сопротивления, происходящих по мере роста цепочки нуклеиновой кислоты, могут быть применены примеры осуществления настоящего изобретения. Особенно подходящими методиками являются способы, в которых биологические или химические образцы локализованы  
20 в определенных положениях, в результате чего их относительные положения во время анализа не изменяются. Например, при выполнении заданного протокола, согласно которому производят многократное сканирование массива, нуклеиновые кислоты могут быть присоединены к фиксированным участкам на поверхности подложки. Особенно подходящими являются примеры осуществления, в которых импринты  
25 получают по различным каналам, например, совпадением с различными метками, применяемыми для того, чтобы отличить один тип нуклеотидного основания от другого. В некоторых примерах осуществления способ определения нуклеотидной последовательности целевой нуклеиновой кислоты может быть автоматизированным. Предпочтительные примеры осуществления включают методики секвенирования  
30 синтезом ("SBS").

Как указано в настоящей работе, примеры осуществления изобретения могут быть применены для определения генетической характеристики образца. Генетическая характеристика может быть определена путем анализа изменений электрического сопротивления, которые происходят в области магниточувствительных датчиков.  
35 Например, магнитные частицы, ассоциированные с нуклеотидами или полимеразой, могут вызывать изменения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков по мере добавления нуклеотидов к нуклеиновой кислоте. Сигналы, исходящие от магниточувствительных датчиков на основе электрического сопротивления, представляют собой данные, которые могут быть  
40 проанализированы и применены для определения генетической характеристики. Используемый в настоящем описании термин "генетическая характеристика" включает последовательность нуклеиновой кислоты или любую характеристику, относящуюся к последовательности нуклеиновой кислоты, независимо от того, определена или нет точная последовательность. Например, в примерах осуществления может быть  
45 выращена комплементарная цепочка нуклеиновой кислоты, в которой каждый нуклеотид, добавляемый к цепочке, ассоциирован с одной или более магнитными частицами. В некоторых примерах осуществления нуклеотид может быть идентифицирован при каждом событии встраивания (например, в режиме реального

времени). В других примерах осуществления нуклеотид может быть идентифицирован только после осуществления совокупности событий встраивания или вторичным анализом после завершения прогона секвенирования.

В других примерах осуществления генетическая характеристика может быть  
5 определена без проведения индивидуальной идентификации нуклеотидов, после которой последовательность становится известна. Например, данные, образуемые сигналами после протекания одного или более событий встраивания, могут быть проанализированы для того, чтобы отличить одну последовательность от одной или более других последовательностей. В одном из конкретных примеров может быть проведено  
10 сравнение данных, полученных от двух (или более) нуклеиновых кислот, которые включают однонуклеотидный (или точечный нуклеотидный) полиморфизм (англ. single nucleotide polymorphism, сокращенно SNP). Даже если последовательности нуклеиновых кислот неизвестны, в примерах осуществления могут быть проанализированы картины сигналов, получаемых от магниточувствительных датчиков. Например, каждый  
15 нуклеотид может содержать магнитную частицу с магнитным свойством, отличающимся от магнитных свойств других частиц. Обнаруженные изменения электрического сопротивления, вызываемые серией нуклеотидов, могут образовывать картину. Сигналы, которые образуют первую картину, могут относиться к одному генотипу, а сигналы, которые образуют вторую картину, могут относиться ко второму генотипу.  
20 Соответственно, от нуклеиновых кислот, от которых получена первая картина, могут быть получены отклики, соответствующие определенной генетической характеристике, в то время как от нуклеиновых кислот, от которых получена вторая картина, могут быть получены отклики, соответствующие другой генетической характеристике. При этом указанные выводы могут быть сделаны даже при неизвестных последовательностях  
25 нуклеиновых кислот.

Следует понимать, что "определение генетической характеристики" не обязательно включает идентификацию или специфическую идентификацию того, какую генетическую характеристику может иметь образец. Например, при исследовании определенного генотипа, основанного на предположительно имеющемся SNP, в примерах  
30 осуществления может быть лишь установлено, что один или более образцов дают определенную картину, в то время как другие образцы этой картины не дают. В любом случае генетическая характеристика образца определена. Аналогично, "определение генетической характеристики" может включать определение того, что образец не содержит предположительно имеющийся патоген, или определение того, что  
35 генетический вариант не содержит SNP или короткий tandemный повтор (англ. short tandem repeat, сокращенно STR).

В другом примере может быть проанализирован образец, полученный из организма индивидуума, предположительно имеющего определенное состояние. Это состояние может быть вызвано, например, генетическим нарушением, раковым заболеванием  
40 или патогеном (например, Эбола). Анализ может включать определение изменений электрического сопротивления по мере роста нуклеиновых кислот. В этом случае, также при неизвестной точной последовательности нуклеиновых кислот, в примерах осуществления путем анализа сигналов с целью идентификации одной или более картин может быть установлено имеет ли индивидуум указанное состояние.

"Методики секвенирования синтезом" ("SBS") обычно включают ферментативное удлинение (достройку) растущей цепочки нуклеиновой кислоты посредством итерационного добавления нуклеотидов в соответствии с матричной цепочкой. В традиционных способах SBS при каждой доставке к целевому нуклеотиду в присутствии

полимеразы может быть доставлен один нуклеотидный мономер. Однако в способах, рассмотренных в настоящей работе, при каждой доставке к целевой нуклеиновой кислоте в присутствии полимеразы может быть доставлено более одного типа нуклеотидного мономера.

5 В способах SBS могут быть применены нуклеотидные мономеры, которые содержат терминирующий фрагмент, или мономеры, в которых отсутствуют любые терминирующие фрагменты. Способы, в которых применяют нуклеотидные мономеры, не имеющие терминаторов, включают, например, пиросеквенирование и секвенирование с использованием нуклеотидов, меченных  $\gamma$ -фосфатами, более подробно рассмотренные  
10 ниже. В способах с применением нуклеотидных мономеров, не имеющих терминаторов, количество нуклеотидов, добавляемых в каждом цикле, обычно варьируемо и зависит от матричной последовательности и способа доставки нуклеотида. Для методик SBS, в которых применяют нуклеотидные мономеры, содержащие терминирующий фрагмент, терминатор может быть абсолютно необратимым в применяемых условиях  
15 секвенирования, как в случае традиционного секвенирования по Сэнгеру (Sanger), в котором применяют дидезоксинуклеотиды, или терминатор может быть обратим, как в случае способов секвенирования, разработанных Solexa (в настоящее время Illumina, Inc.).

В методиках SBS могут быть применены нуклеотидные мономеры, которые имеют  
20 маркерную группу (метку), или нуклеотидные мономеры, которые не имеют маркерной группы. Соответственно, события встраивания могут быть обнаружены с помощью характеристики метки, например, флуоресценции метки; характеристик нуклеотидного мономера, таких как масса или заряд молекулы; побочного продукта встраивания нуклеотида, такого как высвобождаемый пирофосфат; или подобных факторов. В тех  
25 примерах осуществления, в которых в реагенте секвенирования присутствуют два или более различных нуклеотида, различные нуклеотиды могут отличаться друг от друга, или в альтернативном варианте две или более различные метки могут быть неразличимы в условиях применяемых методик обнаружения. Например, различные нуклеотиды, присутствующие в реагенте секвенирования, могут иметь различные метки, и их можно  
30 различить с помощью подходящих оптических устройств, примеры которых имеются в описании способов секвенирования, разработанных Solexa (в настоящее время Illumina, Inc.).

При пиросеквенировании обнаруживают высвобождение неорганического пирофосфата (PPi) по мере встраивания конкретных нуклеотидов в растущую цепочку  
35 (Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., Nyren, P. (1996) "Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release (Секвенирование ДНК в режиме реального времени с использованием обнаружения высвобождаемого пирофосфата)", Analytical Biochemistry 242(1), 84-9; Ronaghi, M. (2001) "Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing (Пиросеквенирование проливает свет на секвенирование ДНК)", Genome  
40 Res. 11(1), 3-11; Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P. (1998) "A sequencing method based on real-time pyrophosphate (Способ секвенирования с применением пирофосфата в режиме реального времени)", Science 281(5375), 363; патент US 6210891, патент US 6258568 и патент US 6274320, содержания которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). При пиросеквенировании высвобождаемый PPi может быть  
45 обнаружен посредством немедленного превращения в аденозинтрифосфат (АТФ) под действием АТФ-сульфуриказы, и концентрация получаемого АТФ может быть обнаружена посредством обнаружения фотонов, генерируемых люциферазой. Секвенируемые нуклеиновые кислоты могут быть присоединены к элементам массива,

и может быть получено изображение массива для улавливания хемилюминесцентных сигналов, генерируемых при закреплении нуклеотидов на элементах массива.

Изображение может быть получено после обработки массива конкретным типом нуклеотида (например, А, Т, С или G). Изображения, получаемые после добавления

5 каждого типа нуклеотида, будут различаться в зависимости от того, какой элемент массива исследуют. Эти различия в изображениях отражают различное содержимое последовательностей, находящихся на элементах массива. Однако относительное

расположение каждого элемента на изображениях будет оставаться неизменным. Изображения можно хранить, обрабатывать и анализировать способами,

10 рассмотренными в настоящей работе. Например, с изображениями, полученными после обработки массива каждым из различных типов нуклеотидов, можно работать так же, как рассмотрено ниже для изображений, полученных по различным каналам обнаружения в способах секвенирования с обратимыми терминаторами.

В другом иллюстративном виде SBS циклическое секвенирование выполняют

15 поэтапным добавлением нуклеотидов, включающих обратимый терминатор, содержащих, например, отщепляемую или фотообесцвечиваемую метку-краситель, как описано, например, в международной патентной заявке WO 04/018497 и в патенте US 7057026, содержания которых включены в настоящее описание посредством ссылки.

Этот подход, который в настоящее время вводит в коммерческое обращение Solexa

20 (ныне Illumina Inc.), также рассмотрен в международной патентной заявке WO 91/06678 и международной патентной заявке WO 07/123744, каждая из которых включена в настоящее описание посредством ссылки. Доступность флуоресцентно меченых терминаторов, в которых может быть обращена терминация и отщеплена флуоресцентная метка, упрощает проведение эффективного секвенирования с

25 циклической обратимой терминацией (англ. cyclic reversible termination, сокращенно CRT). Кроме того, из таких модифицированных нуклеотидов могут быть совместно сконструированы полимеразы, выполненные с возможностью проведения эффективного встраивания и достройки.

Предпочтительно, в примерах осуществления секвенирования с обратимыми

30 терминаторами метки по существу не ингибируют удлинение в условиях проведения реакций SBS. Однако, метки для обнаружения могут быть удаляемыми, например, посредством отщепления или разложения. Изображения могут быть зарегистрированы после встраивания меток в элементы с нуклеиновыми кислотами, находящиеся в массиве.

В конкретных примерах осуществления каждый цикл включает одновременную доставку

35 к массиву четырех различных типов нуклеотидов, и каждый тип нуклеотида имеет специальную отличающуюся от других метку. Затем могут быть получены четыре изображения, каждое с помощью канала обнаружения, селективного для одной из четырех различных меток. В альтернативном варианте различные типы нуклеотидов

могут быть добавлены последовательно, и в каждом промежутке между этапами

40 добавления может быть получено изображение массива. В таких примерах осуществления на каждом изображении будут показаны элементы с нуклеиновыми кислотами, которые захватили нуклеотиды определенного типа. На различных изображениях, благодаря различному содержимому последовательности каждого элемента, будут присутствовать или отсутствовать различные элементы. Однако

45 относительные положения элементов на изображениях останутся неизменными.

Изображения, полученные такими способами SBS с использованием обратимых терминаторов, можно хранить, обрабатывать и анализировать так, как рассмотрено в настоящей работе. После проведения этапа регистрации изображения метки могут

быть удалены, и обратимые терминирующие фрагменты могут быть удалены для проведения последующих циклов добавления и определения нуклеотида. Преимуществом удаления меток после их обнаружения в определенном цикле и перед проведением последующего цикла может быть подавление фонового сигнала и перекрестных взаимодействий между циклами. Примеры подходящих меток и способов их удаления приведены ниже.

В конкретных примерах осуществления некоторые или все нуклеотидные мономеры могут включать обратимые терминаторы. В таких примерах осуществления обратимые терминаторы/отщепляемые атомы фтора могут включать атом фтора, связанный с фрагментом рибозы через 3'-сложноэфирный связующий элемент (Metzker, *Genome Res.* 15:1767-1776 (2005); содержание этой публикации включено в настоящее описание посредством ссылки). В других подходах химические реакции терминаторов проводят отдельно от отщепления флуоресцентной метки (Ruparel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5932-7 (2005); содержание публикации полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). В публикации Ruparel et al. рассмотрено создание обратимых терминаторов, в которых имеется небольшая 3'-аллильная группа, блокирующая удлинение, но подвергаемая деблокированию в результате кратковременной обработки на палладиевом катализаторе. Флуорофор был присоединен к основанию через фотоотщепляемый линкер, который может быть отщеплен в результате 30-секундного воздействия длинноволнового УФ излучения. Для отщепления линкеров может быть применено, например, либо восстановление дисульфидом, либо фотоотщепление. Другой подход к обратимой терминации представляет собой применение природной терминации, которая происходит после размещения объемного красителя на дНТФ (дезоксирибонуклеозидтрифосфате). Присутствие заряженного объемного красителя на дНТФ может служить эффективным терминатором за счет стерических и/или электростатических затруднений. Наличие одного события встраивания предотвращает дополнительное встраивание, если краситель не был удален. Отщепление красителя приводит к удалению атома фтора и эффективному обращению терминации. Примеры модифицированных нуклеотидов также рассмотрены в патенте US 7427673 и патенте US 7057026, содержания которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительные примеры систем и способов SBS, которые могут быть применены в способах и системах, рассмотренных в настоящей работе, рассмотрены в патенте US 7541444, патенте US 7566537, патенте US 7057026, патенте US 8460910, патенте US 8623628, международной патентной заявке WO 05/065814, патенте US 7985565, международной патентной заявке WO 06/064199, международной патентной заявке WO 07/010251, патентной публикации US 20120270305 и патентной публикации US 20130260372, содержания которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых примерах осуществления обнаружение четырех различных нуклеотидов может быть проведено с помощью менее чем четырех различных меток. Например, SBS может быть выполнено с помощью способов и систем, рассмотренных в цитируемых материалах опубликованного патентного документа US 20130079232. В первом примере пара типов нуклеотидов может быть определена при одной и той же длине волны, но распознана на основании отличающейся интенсивности сигнала одного из членов пары по сравнению с сигналом другого, или на основании изменения одного из членов пары (например, посредством химической модификации, фотохимической модификации или физической модификации), которое приводит к появлению или исчезновению явного

сигнала по сравнению с сигналом, создаваемым другим членом пары. Во втором примере три из четырех различных типов нуклеотидов могут быть обнаружены в определенных условиях, в то время как четвертый тип нуклеотида не имеет метки, подходящей для обнаружения в этих условиях, или отличается минимальным обнаружением в этих условиях (например, минимальным обнаружением из-за фоновой флуоресценции и т.д.). Встраивание первых трех типов нуклеотидов в нуклеиновую кислоту может быть установлено по присутствию их соответствующих сигналов, а встраивание четвертого типа нуклеотида в нуклеиновую кислоту может быть установлено по отсутствию или минимальному наличию любого сигнала. В третьем примере один тип нуклеотида может включать метку (метки), которые обнаруживают по двум различным каналам, в то время как обнаружение других типов нуклеотидов производят не более чем по одному из каналов. Вышеуказанные три иллюстративные конфигурации не считаются взаимоисключающими и могут быть применены в различных комбинациях. Иллюстративный пример осуществления, в котором скомбинированы все три вышеуказанных примера, представляет собой способ SBS с флуоресцентным анализом, в котором обнаружение первого типа нуклеотида производят через первый канал (например, дАТФ, имеющего метку, которую обнаруживают через первый канал при возбуждении излучением с первой длиной волны возбуждения), обнаружение второго типа нуклеотида производят через второй канал (например, дЦТФ (дезоксицитидина трифосфат), имеющего метку, которую обнаруживают через второй канал при возбуждении излучением со второй длиной волны возбуждения), обнаружение третьего типа нуклеотида производят как через первый, так и через второй канал (например, дТТФ (дезокситимидина трифосфат), который имеет по меньшей мере одну метку, которую обнаруживают через оба канала при возбуждении излучением первой и/или второй длин волн возбуждения), и четвертый тип нуклеотида, который не имеет метки, не обнаруживается или минимально обнаруживается через любой из каналов (например, дГТФ (дезоксигуанозина трифосфат) не имеющий метки).

Дополнительно, как указано в цитируемых материалах опубликованного патентного документа US 20130079232, данные секвенирования могут быть получены при помощи единственного канала. В этих так называемых подходах секвенирования с одним красителем первый тип нуклеотида подвергают мечению, но метку удаляют после получения первого изображения, а второй тип нуклеотида подвергают мечению только после получения первого изображения. Третий тип нуклеотида сохраняет метку на первом и втором изображении, а четвертый тип нуклеотида остается немеченым на обоих изображениях.

В некоторых примерах осуществления могут быть применены методики секвенирования лигированием. В таких методиках для встраивания олигонуклеотидов и идентификации встраивания таких олигонуклеотидов применяют ДНК-лигазу. Обычно олигонуклеотиды имеют различные метки, которые коррелируют с идентификационными данными конкретного нуклеотида в последовательности, с которой олигонуклеотиды гибридизуются. Как и в других способах SBS, изображения могут быть получены после обработки массива элементов, содержащих нуклеиновые кислоты, мечеными реагентами секвенирования. На каждом изображении будут показаны элементы, содержащие нуклеиновые кислоты, которые включили в себя метки конкретного типа. Благодаря различному содержанию последовательности каждого элемента, на различных изображениях различные элементы будут присутствовать или отсутствовать, но относительные положения элементов на изображениях будут оставаться неизменными. Изображения, получаемые способами секвенирования с применением лигирования,

можно хранить, обрабатывать и анализировать так, как рассмотрено в настоящей работе. Иллюстративные системы и способы SBS, которые могут быть применены в способах и системах, рассмотренных в настоящей работе, рассмотрены в патенте US 6969488, патенте US 6172218 и патенте US 6306597, содержания которых полностью

5 включены в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых примерах осуществления может быть применено секвенирование на нанопорах (Deamer, D.W., Akeson, M. "Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing (Нанопоры и нуклеиновые кислоты: перспективы сверхбыстрого секвенирования)", Trends Biotechnol. 18, 147-151 (2000); Deamer, D., D. Branton,

10 "Characterization of nucleic acids by nanopore analysis (Характеристика нуклеиновых кислот с помощью анализа на нанопорах)", Acc. Chem. Res. 35:817-825 (2002); Li, J., M. Gershow, D. Stein, E. Brandin, J. A. Golovchenko, "DNA molecules and configurations in a solid-state nanopore microscope (Молекулы ДНК и конфигурации в твердотельном нанопоровом микроскопе)", Nat. Mater. 2:611-615 (2003); содержания всех публикаций полностью

15 включены в настоящее описание посредством ссылки). В таких примерах осуществления целевая нуклеиновая кислота проходит через нанопору, несмотря на то, что в некоторых примерах осуществления наряду с применением нанопор могут быть применены способы, включающие отслеживание встраивания нуклеотида под действием ДНК-полимеразы в режиме реального времени. Нанопора может представлять собой

20 синтетическую пору или биологический мембранный белок, такой как  $\alpha$ -гемолизин. В одном из иллюстративных примеров осуществления по мере прохождения целевой нуклеиновой кислоты через нанопору каждое основание может быть идентифицировано посредством определения флуктуации электрической проводимости поры (Патент US 7001792; Soni, G.V., Meller, "A. Progress toward ultrafast DNA sequencing using solid-state

25 nanopores (Прогресс в сверхбыстром секвенировании ДНК с помощью твердотельных нанопор)", Clin. Chem. 53, 1996-2001 (2007); Healy, K. "Nanopore-based single-molecule DNA analysis (Одномолекулярный анализ ДНК с помощью нанопор)", Nanomed. 2, 459-481 (2007); Cockroft, S.L., Chu, J., Amorin, M., Ghadiri, M.R. "A single-molecule nanopore device detects DNA polymerase activity with single-nucleotide resolution (Устройство,

30 включающее нанопору, пропускающую единичные молекулы, обнаруживает активность ДНК-полимеразы с разрешением порядка одного нуклеотида)", J. Am. Chem. Soc. 130, 818-820 (2008); содержания публикаций полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). Данные, полученные секвенированием на нанопорах, можно хранить, обрабатывать и анализировать так, как рассмотрено в настоящей работе. В

35 частности, данные могут быть обработаны как изображения в соответствии с примерами обработки оптических изображений и других изображений, рассмотренными в настоящей работе.

В некоторых примерах осуществления могут быть применены способы, включающие отслеживание активности ДНК-полимеразы в режиме реального времени. Встраивание

40 нуклеотидов может быть обнаружено посредством отслеживания взаимодействий резонансного переноса энергии флуоресценции (англ. fluorescence resonance energy transfer, сокращенно FRET) между содержащей флуорофор полимеразой и мечеными  $\gamma$ -фосфатом нуклеотидами, которое рассмотрено, например, в патенте US 7329492 и патенте US 7211414 (каждый из которых включен в настоящее описание посредством

45 ссылки), или встраивание нуклеотидов может быть обнаружено с помощью волноводов с нулевой модой, как рассмотрено, например, в патенте US 7315019 (который включен в настоящее описание посредством ссылки), и с помощью флуоресцентных аналогов нуклеотидов и сконструированных полимераз, как рассмотрено, например, в патенте

US 7405281 и патенте US 8343746 (каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки). Освещение может быть ограничено объемом порядка зептолитра вокруг полимеразы, прикрепленной к поверхности, так чтобы встраивание нуклеотидов с флуоресцентными метками можно было наблюдать при низком фоновом сигнале (Levene, M.J. et al. "Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations (Волноводы с нулевой модой для одномолекулярного анализа при высоких концентрациях)", Science 299, 682-686 (2003); Lundquist, P.M. et al. "Parallel confocal detection of single molecules in real time (Параллельное конфокальное обнаружение единичных молекул в режиме реального времени)", Opt. Lett. 33, 1026-1028 (2008); Korlach, J. et al. "Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nano structures (Селективное пассивирование алюминия для целевой иммобилизации единичных молекул ДНК-полимеразы в наноструктурах волноводов с нулевой модой)", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 1176-1181 (2008); содержания публикаций полностью включены в настоящее описание посредством ссылки). Изображения, получаемые такими способами, можно хранить, обрабатывать и анализировать так, как рассмотрено в настоящей работе.

В конкретных примерах осуществления полимеразы иммобилизована или прикреплена к заданной области на поверхности, расположенной вблизи магниточувствительного датчика. В таких примерах осуществления может повышаться вероятность того, что различные магнитные частицы, которые обнаруживаются магниточувствительными датчиками по мере роста комплементарной цепочки, могут находиться на относительно равных расстояниях от магниточувствительного датчика.

Примеры осуществления, рассмотренные в настоящей работе, также мог включать меченные  $\gamma$ -фосфатом нуклеотиды, в которых метка, присоединенная к  $\gamma$  фосфату, включает магнитную частицу, которая изменяет электрическое сопротивление магниточувствительных датчиков.

Некоторые примеры осуществления SBS включают обнаружение протона, высвобождаемого при встраивании нуклеотида в продукт достройки. Например, в секвенировании, основанном на обнаружении высвобождаемых протонов, может быть применен электрический детектор и соответствующие методики, которые на коммерческой основе предоставляет Ion Torrent (Guilford, CT, дочернее предприятие Life Technologies), или способы и системы секвенирования, рассмотренные в патенте US 8262900, патенте US 7948015, опубликованном патентном документе US 20100137143; или патенте US 8349167, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Рассмотренные в настоящей работе способы амплификации целевых нуклеиновых кислот с применением кинетического исключения могут быть с успехом применены для подложек, используемых для обнаружения протонов. В частности, способы, рассмотренные в настоящей работе, могут быть применены для создания клональных популяций ампликонов, которые используют для обнаружения протонов.

Раскрытые выше способы SBS могут быть с успехом выполнены в мультиплексных форматах, в которых производят одновременные операции с совокупностью различных целевых нуклеиновых кислот. В конкретных примерах осуществления может быть произведена обработка различных целевых нуклеиновых кислот в общей реакционной емкости или на поверхности определенной подложки. Это облегчает доставку реагентов секвенирования, удаление непрореагировавших реагентов и обнаружение события встраивания в мультиплексном формате. В тех примерах осуществления, в которых применяют закрепленные на поверхности целевые нуклеиновые кислоты, целевые нуклеиновые кислоты могут находиться в формате массива. В формате массива целевые

нуклеиновые кислоты обычно могут быть присоединены к поверхности пространственно распознаваемым образом. Целевые нуклеиновые кислоты могут быть присоединены за счет непосредственного ковалентного присоединения, присоединения к грануле или другой частице или связана с полимеразой или другой молекулой, которая присоединена к поверхности. Массив может включать одну копию целевой нуклеиновой кислоты на каждом сайте (также называемом элементом), или на каждом сайте или элементе может находиться совокупность копий, имеющих одинаковые последовательности. Совокупность копий может быть получено способами амплификации, мостиковой амплификацией или полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в эмульсии, которые более подробно рассмотрены ниже.

В способах, рассмотренных в настоящей работе, могут быть применены массивы, содержащие элементы, расположенные с любой из совокупности различных плотностей, примеры которых включают по меньшей мере приблизительно 10 элементов/см<sup>2</sup>, 100 элементов/см<sup>2</sup>, 500 элементов/см<sup>2</sup>, 1000 элементов/см<sup>2</sup>, 5000 элементов/см<sup>2</sup>, 10000 элементов/см<sup>2</sup>, 50000 элементов/см<sup>2</sup>, 100000 элементов/см<sup>2</sup>, 1000000 элементов/см<sup>2</sup>, 5000000 элементов/см<sup>2</sup> или более.

Преимущество способов, рассмотренных в настоящей работе, состоит в быстром и эффективном параллельном обнаружении совокупности целевых нуклеиновых кислот. Соответственно, настоящее изобретение относится к интегрированным системам, которые могут подготавливать и обнаруживать нуклеиновые кислоты с помощью методик, известных в данной области техники, таких как методики, примеры которых приведены выше. Таким образом, интегрированная система согласно настоящему изобретению может включать компоненты для работы с текучими средами (текучими компонентами), которые позволяют доставлять реагенты, необходимые для амплификации, и/или реагенты, необходимые для секвенирования, к одному или более иммобилизованным фрагментам ДНК, и система также включает такие компоненты, как насосы, клапаны, резервуары, трубки для подачи текучих сред и подобные элементы. Проточная ячейка может быть предназначена и/или может быть включена в интегрированную систему для обнаружения целевых нуклеиновых кислот. Примеры проточных ячеек рассмотрены, например, в патенте US 8241573 и опубликованном патентном документе US 20120270305, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. Как показано в примерах проточных ячеек, один или более компонентов для работы с текучими средами, находящихся в интегрированной системе, может быть применен для проведения амплификации и для обнаружения. Если рассматривать в качестве примера пример осуществления секвенирования нуклеиновой кислоты, то один или более компонентов для работы с текучими средами, находящихся в интегрированной системе, может быть применен для осуществления способа амплификации, рассмотренного в настоящей работе, и для доставки реагентов секвенирования в способ секвенирования, например, такой, как способ, раскрытый выше. В альтернативном варианте интегрированная система может включать отдельные системы для работы с текучими средами, выполненные с возможностью осуществления способов амплификации и выполнения обнаружения. Примеры интегрированных систем секвенирования, в которых могут быть получены амплифицированные нуклеиновые кислоты, а также определены последовательности нуклеиновых кислот, включают, не ограничиваясь ими, платформу MiSeq™ (Illumina, Inc., San Diego, CA) и устройства, рассмотренные в опубликованной патентной заявке US 20120270305, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Используемые в настоящем описании нижеследующие термины имеют указанные значения. "Капля" означает объем жидкости, находящийся в капельном манипуляторе (манипуляторе для работы с каплями, англ. droplet actuator). Обычно капля по меньшей мере частично ограничена заполняющей текучей средой (англ. filler fluid). Например, капля может быть полностью окружена заполняющей текучей средой, или она может быть ограничена заполняющей текучей средой и одной или более поверхностью капельного манипулятора. В другом примере капля может быть ограничена заполняющей текучей средой, одной или более поверхностями капельного манипулятора и/или атмосферой. В другом примере капля может быть ограничена заполняющей текучей средой и атмосферой. Капли могут состоять, например, из воды или неводной среды или могут представлять собой смеси или эмульсии, включающие водные и неводные компоненты. Капли могут иметь огромную совокупность различных форм, неограничивающие примеры которых обычно включают следующие формы: диска, пули, усеченной сферы, эллипсоида, сферы, частично сжатой сферы, полусферы, овоида, цилиндра, комбинации таких форм и различные формы, образующиеся в результате операций с каплями, таким как слияние или расщепление, или образующиеся в результате контакта таких форм с одной или более поверхностями капельного манипулятора. Примеры текучих сред, образующих капли, которые могут быть подвергнуты операциям с каплями в соответствии с принципами настоящего изобретения, имеются в международной патентной заявке WO/2007/120241 Eckhardt et al., озаглавленной "Droplet-Based Biochemistry (Биохимия на основе капель)", опубликованной 25 октября 2007 г, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

В различных примерах осуществления капля может включать биологический образец, такой как цельная кровь, лимфатическая жидкость, сыворотка крови, плазма крови, пот, слезная жидкость, слюна, мокрота, спинномозговая жидкость, околоплодная жидкость, семенная жидкость, вагинальные выделения, серозная жидкость, синовиальная жидкость, перикардальная жидкость, жидкость брюшной полости, плевральная жидкость, трансудаты, экссудаты, содержимое кисты, желчь, моча, желудочная жидкость, кишечная жидкость, образцы кала, жидкости, содержащие одну или совокупность клеток, жидкости, содержащие органеллы, флюидизированные ткани, флюидизированные организмы, жидкости, содержащие многоклеточные организмы, биологические мазки и биологические смывы. Кроме того, капля может включать реагент, такой как вода, деионизированная вода, солевые растворы, кислотные растворы, щелочные (основные) растворы, растворы моющих средств и/или буферные растворы. Капля может включать нуклеиновые кислоты, такие как ДНК, геномная ДНК, РНК, мРНК или их аналоги; нуклеотиды, такие как дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды или их аналоги, такие как аналоги, содержащие терминирующие фрагменты, такие как фрагменты, рассмотренные в следующих публикациях: Bentley et al., Nature 456:53-59 (2008); в международной патентной заявке WO/2013/131962 Gormley et al., озаглавленной "Improved Methods of Nucleic Acid Sequencing (Улучшенные способы секвенирования нуклеиновых кислот)", опубликованной 12 сентября 2013 г.; в патенте US No. 7057026, Barnes et al., озаглавленном "Labelled Nucleotides (Меченые нуклеотиды)", выпущенном 6 июня 2006 г.; в международной патентной заявке WO/2008/042067, Kozlov et al., озаглавленной "Compositions and Methods for Nucleotide Sequencing (Композиции и способы секвенирования нуклеотидов)", опубликованной 10 апреля 2008 г.; в международной патентной заявке WO/2013/117595, Rigatti et al., озаглавленной "Targeted Enrichment and Amplification of Nucleic Acids on a Support (Целевое обогащение и амплификация нуклеиновых кислот на подложке)", опубликованной 15 августа 2013

г.; в патенте US 7329492, Hardin et al., озаглавленном "Methods for Real-Time Single Molecule Sequence Determination" (Способы определения последовательности одиночной молекулы в реальном времени), выпущенном 12 февраля 2008 г.; в патенте US 7211414, Hardin et al., озаглавленном "Enzymatic Nucleic Acid Synthesis: Compositions and Methods for Altering Monomer Incorporation Fidelity (Ферментативный синтез нуклеиновых кислот: композиции и способы изменения точности встраивания мономеров)", выпущенном 1 мая 2007 г.; в патенте US 7315019, Turner et al., озаглавленном "Arrays of Optical Confinements and Uses Thereof (Массивы оптических волноводных эффектов и их применение)", выпущенном 1 января 2008 г.; в патенте US 7405281, Xu et al., озаглавленном "Fluorescent Nucleotide Analogs and Uses Therefor (Флуоресцентные аналоги нуклеотидов и их применение)", выпущенном 29 июля 2008 г.; и в опубликованном патентном документе US 20080108082, Rank et al., озаглавленном "Polymerase Enzymes and Reagents for Enhanced Nucleic Acid Sequencing (Полимеразные ферменты и реагенты для улучшения секвенирования нуклеиновых кислот)", опубликованном 8 мая 2008 г.; где содержания цитируемых документов полностью включены в настоящее описание посредством ссылки; ферменты, такие как полимеразы, лигазы, рекомбиназы или транспозазы; партнеры по связыванию, такие как антитела, эпитопы, стрептавидин, авидин, биотин, лектины или углеводы; или другие биохимически активные молекулы. Другие примеры содержимого капель включают реагенты, такие как реагент для биохимического протокола, такого как протокол амплификации нуклеиновой кислоты, протокол анализа аффинного связывания, протокол ферментативного анализа, протокол секвенирования, и/или протокол анализа биологических жидкостей. Капля может включать одну или более гранул.

"Капельный манипулятор" означает устройство для манипуляций с каплями. Примеры капельных манипуляторов рассмотрены, например, в следующих публикациях: Pamula et al., патент US 6911132, озаглавленный "Apparatus for Manipulating Droplets by Electrowetting-Based Techniques (Устройство для манипуляций с каплями на основе методик электросмачивания)", выданный 28 июня 2005 г.; Pamula et al., опубликованная патентная заявка US 20060194331, озаглавленная "Apparatuses and Methods for Manipulating Droplets on a Printed Circuit Board (Устройства и способы манипуляций с каплями на печатной плате)", опубликованная 31 августа 2006 г.; Pollack et al., Международная патентная заявка WO/2007120241, озаглавленная "Droplet-Based Biochemistry (Биохимия на основе капель)", опубликованная 25 октября 2007 г.; Shenderov, патент US 6773566, озаглавленный "Electrostatic Actuators for Microfluidics and Methods for Using Same (Электростатические манипуляторы для микроструйных устройств и способы их применения)", выданный 10 августа 2004 г.; Shenderov, патент US 6565727, озаглавленный "Actuators for Microfluidics Without Moving Part (Манипуляторы для микроструйных устройств, не имеющие движущихся деталей)", выданный 20 мая 2003 г.; Kim et al., опубликованная патентная заявка US 20030205632, озаглавленная "Electrowetting-driven Micropumping (Микроперекачивание, приводимое в движение электросмачиванием)", опубликованная 6 ноября 2003 г.; Kim et al., опубликованная патентная заявка US 20060164490, озаглавленная "Method and Apparatus for Promoting the Complete Transfer of Liquid Drops from a Nozzle (Способ и устройство для улучшения полного переноса капель жидкости из сопла)", опубликованная 27 июля 2006 г.; Kim et al., опубликованная патентная заявка US 20070023292, озаглавленная "Small Object Moving on Printed Circuit Board (Перемещение мелких объектов по печатной плате)", опубликованная 1 февраля 2007 г.; Shah et al., опубликованная патентная заявка US 20090283407, озаглавленная "Method for Using Magnetic Particles in Droplet Microfluidics (Способ применения магнитных

частиц в капельном микроструйном устройстве)", опубликованная 19 ноября 2009 г.; Kim et al., опубликованная патентная заявка US 20100096266, озаглавленная "Method and Apparatus for Real-time Feedback Control of Electrical Manipulation of Droplets on Chip (Способ и устройство для контроля отклика в режиме реального времени при электрических манипуляциях с каплями на чипе)", опубликованная 22 апреля 2010 г.; Velev, патент US 7547380, озаглавленный "Droplet Transportation Devices and Methods Having a Fluid Surface (Устройства и способы для транспортировки капель, имеющие текучую поверхность)", выданный 16 июня 2009 г.; Sterling et al., патент US 7163612, озаглавленный "Method, Apparatus and Article for Microfluidic Control via Electrowetting, for Chemical, Biochemical and Biological Assays and the Like (Способ, устройство и изделие для управления микроструйным устройством посредством электросмачивания, для проведения химических, биохимических, биологических и подобных анализов)", выданный 16 января 2007 г.; Becker et al., патент US 7641779, озаглавленный "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing (Способ и устройство для программируемой струйной обработки)", выданный 5 января 2010 г.; Becker et al., патент US 6977033, озаглавленный "Method and Apparatus for Programmable Fluidic Processing (Способ и устройство для программируемой струйной обработки)", выданный 20 декабря 2005 г.; Decre et al., патент US 7328979, озаглавленный "System for Manipulation of a Body of Fluid (Система для манипуляции объемом текучей среды)", выданный 12 февраля 2008 г.; Yamakawa et al., опубликованная патентная заявка US 20060039823, озаглавленная "Chemical Analysis Apparatus (Устройство для химического анализа)", опубликованная 23 февраля 2006 г.; Wu, опубликованная патентная заявка US 20110048951, озаглавленная "Digital Microfluidics Based Apparatus for Heat-exchanging Chemical Processes (Устройства на основе микроструйной методики для теплообменных химических способов)", опубликованная 3 марта 2011 г.; Fouillet et al., опубликованная патентная заявка US 20090192044, озаглавленная "Electrode Addressing Method (Способ адресации электрода)", опубликованная 30 июля 2009 г.; Fouillet et al., патент US 7052244, озаглавленный "Device for Displacement of Small Liquid Volumes Along a Micro-catenary Line by Electrostatic Forces (Устройство для вытеснения небольших объемов жидкости вдоль микроцепной линии под действием электростатических сил)", выданный 30 мая 2006 г.; Marchand et al., опубликованная патентная заявка US 20080124252, озаглавленная "Droplet Microreactor (Капельный микрореактор)", опубликованная 29 мая 2008 г.; Adachi et al., опубликованная патентная заявка US 20090321262, озаглавленная "Liquid Transfer Device (Устройство для переноса жидкости)", опубликованная 31 декабря 2009 г.; Roux et al., опубликованная патентная заявка US 20050179746, озаглавленная "Device for Controlling the Displacement of a Drop Between Two or Several Solid Substrates (Устройство для управления вытеснения капли между двумя или несколькими твердыми подложками)", опубликованная 18 августа 2005 г.; и Dhindsa et al., "Virtual Electrowetting Channels: Electronic Liquid Transport with Continuous Channel Functionality (Виртуальные каналы электросмачивания: Электронный транспорт жидкости с непрерывной функциональностью каналов)", Lab Chip, 10:832-836 (2010), где содержание каждого из цитируемых документов полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Некоторые капельные манипуляторы могут включать одну или более подложек, между которыми расположен зазор для операций с каплями, и электроды, связанные (например, нанесенные в виде слоя, прикрепленные к и/или погруженные в) с одной или более подложкам и установленные для проведения одной или более операций с каплями. Например, некоторые капельные манипуляторы включают основную (или нижнюю) подложку, электроды для операций с каплями, соединенные с подложкой,

один или более диэлектрических слоев поверх подложки и/или электродов и необязательно один или более гидрофобных слоев поверх подложки; при этом диэлектрические слои и/или электроды образуют поверхность для операций с каплями. Также может быть установлена верхняя подложка, которая отделяется от поверхности для операций с каплями зазором, обычно называемым зазором для операций с каплями. Различные варианты размещения электродов на верхней и/или нижней подложках рассмотрены в цитируемых выше патентах и патентных заявках, и некоторые новые варианты размещения электродов рассмотрены в настоящем описании. При проведении операций с каплями предпочтительно, чтобы капли оставались в постоянном контакте или находились в частом контакте с электродом заземления или электродом сравнения. В зазоре электрод заземления или сравнения может быть соединен с верхней подложкой, обращенной к зазору, нижней подложкой, обращенной к зазору. В тех случаях, когда электроды устанавливаются на обеих подложках, электрические контакты для соединения электродов с капельным манипулятором для управления или мониторинга электродов, могут быть соединены с одной или обеими пластинами. В некоторых случаях электроды на одной подложке соединены электрическим соединением с другой подложкой таким образом, что только одна подложка находится в контакте с капельным манипулятором. В одном из примеров осуществления проводящий материал (например, эпоксид, такой как MASTER BOND™ Polymer System EP79, поставляемый Master Bond, Inc., Hackensack, NJ) обеспечивает электрическое соединение между электродами, находящимися на одной подложке, и электрическими путями (цепями), находящимися на других подложках; например, электрод заземления, находящийся на верхней подложке, может быть соединен с электрической цепью, находящейся на нижней подложке таким проводящим материалом. В тех случаях, когда применяют совокупность подложек, между подложками может быть установлен разделитель, определяющий высоту зазора между подложками и ограничивающий имеющиеся на манипуляторе дозирующие резервуары (англ. dispensing reservoirs). Высота разделителя может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5 мкм, 100 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 275 мкм или более. В альтернативном варианте или дополнительно максимальная высота разделителя может составлять приблизительно 600 мкм, 400 мкм, 350 мкм, 300 мкм или менее. Разделитель может быть, например, образован слоем выступов, выступающих за пределы верхней или нижней подложки, и/или материалом, введенным между верхней и нижней подложками. В одной или более подложках могут быть образованы одно или более отверстий для создания канала для текучей среды, через который жидкость может быть направлена в зазор для операций с каплями. В некоторых случаях одно или более отверстий могут быть состыкованы для взаимодействия с одним или более электродами, например, состыкованы таким образом, чтобы жидкость, протекающая через отверстие, протекала достаточно близко к одному или более электродам для операций с каплями, что позволяет электродам для операций с каплями эффективно выполнять операции с каплями жидкости. В некоторых случаях основная (или нижняя) и верхняя подложки могут быть сформованы в виде одного целостного компонента. На основной (или нижней) и/или верхней подложках и/или в зазоре могут быть установлены один или более электродов сравнения. Примеры установки электродов сравнения приведены в цитируемых выше патентах и патентных заявках. В различных примерах осуществления манипуляции с каплями в капельном манипуляторе могут быть произведены при помощи электрода, например, за счет электросмачивания или диэлектрофореза или Кулоновских сил. Примеры других методик управления операциями с каплями, которые могут быть применены в капельных манипуляторах

согласно изобретению, включают применение устройств, создающих гидродинамическое давление текучей среды, таких, как устройства, в основе действия которых лежат механические принципы (например, внешние шприцевые насосы, пневматические мембранные насосы, вибрационные мембранные насосы, вакуумные устройства, устройства с применением центробежных сил, пьезоэлектрические/ультразвуковые насосы и устройства с применением акустических воздействий); электрические или магнитные принципы (например, электроосмотическое течение, электрокинетические насосы, пробки из магнитной жидкости, электрогидродинамические насосы, применение магнитных сил притяжения или отталкивания и магнитогидродинамические насосы); термодинамические принципы (например, образование газовых пузырей/увеличение объема за счет фазового изменения); другие принципы поверхностного смачивания (например, электросмачивание и оптоэлектросмачивание, а также градиенты поверхностного натяжения, вызываемые химическим, температурным, структурным и радиоактивным взаимодействием); сила тяжести; поверхностное натяжение (например, капиллярное действие); электростатические силы (например, электроосмотическое течение); центробежное течение (подложка расположена на компакт-диске, который вращается); магнитные силы (например, течение, вызываемое осцилляцией ионов); магнитогидродинамические силы; и вакуум или разность давлений. В определенных примерах осуществления для проведения операции с каплей в капельном манипуляторе согласно настоящему изобретению могут быть применены комбинации двух или более указанных выше методик. Аналогично, одна или более указанных выше методик может быть применена для доставки жидкости в зазор для операций с каплями, например, из резервуара, находящегося в другом устройстве, или из внешнего резервуара капельного манипулятора (например, резервуара, связанного с подложкой капельного манипулятора и каналом течения из резервуара в зазор для операций с каплями). В некоторых капельных манипуляторах согласно настоящему изобретению поверхности для операций с каплями могут быть изготовлены из гидрофобных материалов, или на них могут быть нанесены покрытия, или они могут быть обработаны для придания им гидрофобности. Например, в некоторых случаях некоторая часть поверхностей или все поверхности для операций с каплями могут быть функционализированы материалами или химическими веществами с низкой поверхностной энергией, например, осаждением или синтезом *in situ* с использованием таких соединений, как поли- или перфорированные соединения в растворе или полимеризуемые мономеры. Примеры включают TEFLON® AF (поставляемый DuPont, Wilmington, DE), члены класса материалов Cytop, покрытия класса FLUOROPEL® гидрофобных и супергидрофобных покрытий (поставляемые Cytonix Corporation, Beltsville, MD), силановые покрытия, фторсилановые покрытия, гидрофобные производные фосфонатов (например, поставляемые Aculon, Inc) и электронные покрытия NOVEC™ (поставляемые 3M Company, St. Paul, MN), другие фторированные мономеры для плазмохимического осаждения из газовой фазы (англ. plasma enhanced chemical vapor deposition, сокращенно PECVD) и органосилоксан (например, SiOC) для PECVD. В некоторых случаях поверхность для операций с каплями может включать гидрофобное покрытие, толщина которого составляет от приблизительно 10 нм до приблизительно 1000 нм. Кроме того, в некоторых примерах осуществления верхняя подложка капельного манипулятора включает электропроводящий органический полимер, на который затем наносят гидрофобное покрытие или обрабатывают иным способом для придания гидрофобности поверхности для операций с каплями. Например, электропроводящий органический полимер, осаждаемый на полимерную подложку, может представлять собой поли-3,4-

этилендиокситиофен/полистиролсульфонат (англ. poly(3,4-ethylenedioxythiophene) poly (styrenesulfonate), сокращенно PEDOT:PSS). Другие примеры электропроводящих органических полимеров и альтернативных проводящих слоев рассмотрены в публикации Pollack et al., Международная патентная заявка WO/2011/002957, озаглавленная "Droplet Actuator Devices and Methods (Капельные манипуляторы и способы)", опубликованной 6 января 2011 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Одна или обе подложки могут быть изготовлены с использованием в качестве подложки печатной платы (англ. printed circuit board, сокращенно PCB), стекла, стекла с покрытием из оксида индия-олова (англ. indium tin oxide, сокращенно ИТО) и/или полупроводниковых материалов. Если подложка представляет собой стекло с покрытием из ИТО, то предпочтительно толщина покрытия из ИТО составляет по меньшей мере приблизительно 20 нм, 50 нм, 75 нм, 100 нм или более. В альтернативном варианте или дополнительно его толщина может составлять не более приблизительно 200 нм, 150 нм, 125 нм или менее. В некоторых случаях верхняя и/или нижняя подложка включает подложку из PCB, имеющую покрытие из диэлектрического материала, такого как полиимидный диэлектрический материал, который в некоторых случаях также может иметь покрытие или быть обработан иным способом для придания гидрофобности поверхности для операций с каплями. Если подложка включает PCB, то примерами подходящих материалов являются следующие материалы: MITSUI™ BN-300 (поставляемый MITSUI Chemicals America, Inc., San Jose CA); ARLON™ 11N (поставляемый Arlon, Inc, Santa Ana, CA).; NELCO® N4000-6 и N5000-30/32 (поставляемые Park Electrochemical Corp., Melville, NY); ISOLA™ FR406 (поставляемый Isola Group, Chandler, AZ), в частности, IS620; класс фторполимеров (подходящих для флуоресцентного определения, поскольку они имеют низкий фоновый уровень флуоресценции); класс полиимидов; сложный полиэфир; полиэтиленнафталат; поликарбонат; простой полиэфирэфиркетон; жидкокристаллический полимер; циклоолефиновый сополимер (англ. cyclo-olefin copolymer, сокращенно СОС); циклоолефиновый полимер (англ. cyclo-olefin polymer, сокращенно СОР); арамид; нетканый арамидный армированный материал THERMOUNT® (поставляемый DuPont, Wilmington, DE); волокно марки NOMEX® (поставляемое DuPont, Wilmington, DE); и бумага. В качестве диэлектрического компонента подложки также подходят различные материалы. Их примеры включают: диэлектрики, нанесенные осаждением из газовой фазы, такие как PARYLENE™ С (в особенности, на стекло), PARYLENE™ N и PARYLENE™ HT (для высокой температуры, ~300°C) (поставляемые Parylene Coating Services, Inc., Katy, TX); покрытия из TEFLON® AF; Cytop; паяльные маски, такие как жидкие фотопроявляемые паяльные маски (например, на PCB), такие как материалы серий TAIYO™ PSR4000, TAIYO™ PSR и AUS (поставляемые Taiyo America, Inc. Carson City, NV) (хорошие термические характеристики для вариантов применения, включающих обеспечение температурного контроля), и PROBIMER™ 8165 (хорошие термические характеристики для вариантов применения, включающих обеспечение температурного контроля) (поставляемый Huntsman Advanced Materials Americas Inc., Los Angeles, CA); паяльная маска на основе сухой пленки, такая как паяльные маски на основе сухой пленки линии VACREL® (поставляемые DuPont, Wilmington, DE); пленочные диэлектрические материалы, такие как полиимидная пленка (например, полиимидная пленка KAPTON®, поставляемая DuPont, Wilmington, DE), полиэтилен и фторполимеры (например, фторэтиленовый полимер, англ. fluorethylene propylene, сокращенно FEP), политетрафторэтилен; сложный полиэфир; полиэтиленнафталат; циклоолефиновый сополимер (СОС); циклоолефиновый полимер (СОР); любые другие материалы подложек

PCB, перечисленные выше; полимеры для черненных матриц; полипропилен; и черные материалы для гибких цепей, такие как DuPont™ Pyralux® НХС и DuPont™ Kapton® МВС (поставляемые DuPont, Wilmington, DE). Напряжение и частота, применяемые для транспортировки капель, могут быть выбраны для обеспечения работы с реагентами, применяемыми в конкретных протоколах анализа. Конструкционные параметры могут быть различными, например: количество и местоположения размещаемых на манипуляторе резервуаров, количество независимых соединений электродов, размер (объем) различных резервуаров, местоположение зон промывки магнитов/гранул, размер электродов, межэлектродное пространство и высота зазора (между верхней и нижней подложками) могут варьироваться в зависимости от применения конкретных реагентов, протоколов, объемов капель и т.д. В некоторых случаях подложка согласно настоящему изобретению может быть функционализирована материалами или химическими веществами с низкой поверхностной энергией, например, посредством осаждения или синтеза *in situ* с использованием поли- или перфорированных соединений в растворе или полимеризуемых мономеров. Примеры включают покрытия из TEFLON® AF и покрытия из FLUOROPEL®, подходящие для нанесения покрытия погружением или распылением, другие фторированные мономеры для плазмохимического осаждения из газовой фазы (PECVD) и органосилоксан (например, SiOC) для PECVD.

Дополнительно, в некоторых случаях на некоторую часть поверхности или всю поверхность для операций с каплями может быть нанесено покрытие из вещества, которое снижает фоновые сигналы, такие как фоновая флуоресценция от подложки PCB. Например, покрытие, снижающее шумы, может включать полимеры для черненных матриц, такие как полимеры для черненных матриц, поставляемых Toray industries, Inc., Japan. Электродами капельного манипулятора обычно управляет контроллер или процессор, который сам представляет собой часть системы, которая может иметь функции обработки, а также может хранить данные и программное обеспечение и принимать и выводить данные. Реагенты могут быть доставлены в капельный манипулятор, в зазор для операций с каплями или в резервуар, соединенный соединением для текучей среды с зазором для операций с каплями. Реагенты могут находиться в жидком виде, например, в виде капель, или они могут быть доставлены в зазор для операций с каплями или в резервуар, соединенный соединением для текучей среды с зазором для операций с каплями, в восстанавливаемой форме. Для восстановления восстанавливаемые реагенты обычно объединяют с жидкостями. Один из примеров восстанавливаемых реагентов, подходящих для применения в способах и устройстве, рассмотренных в настоящем описании, включает реагенты, рассмотренные в патенте US 7727466, Meathrel et al., озаглавленном "Disintegratable Films for Diagnostic Devices (Разрушаемые пленки для диагностических устройств)", выданном 1 июня 2010 г., содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

"Операция с каплей" означает любую манипуляцию с каплей, произведенную на капельном манипуляторе. Операция с каплей может, например, включать: помещение капли в капельный манипулятор; дозирование одной или более капель из источника капель; расщепление, разделение или разъединение капли с образованием двух или более капель; транспортировку капли с одного участка на другой в любом направлении; слияние или объединение двух или более капель в одну каплю; разбавление капли; перемешивание капли; взбалтывание капли; деформацию капли; сохранение исходного положения капли; инкубацию капли; нагревание капли; испарение капли; охлаждение капли; отбрасывание капли; транспортировку капли из капельного манипулятора; другие операции с каплями, рассмотренные в настоящем описании; и/или любую

комбинацию перечисленных выше операций. Термины "сливаться", "слияние", "объединяться", "объединение" и подобные им термины используют для описания создания одной капли из двух или более капель. Следует понимать, что при употреблении этого термина в отношении двух или более капель может быть применена любая комбинация операций с каплями, которая достаточна для объединения двух или более капель в одну каплю. Например, осуществление "слияния капли А с каплей В" может включать транспортировку капли А до контакта со стационарной каплей В, транспортировку капли В до контакта со стационарной каплей А или транспортировку капель А и В до контакта друг с другом. Термины "расщепление", "разъединение" и "разделение" не предполагают какого-либо конкретного изменения объема полученных капель (т.е. объем полученных капель может быть исходным или иным) или количества полученных капель (количество полученных капель может составлять 2, 3, 4, 5 или более). Термин "перемешивание" означает операции с каплями, которые приводят к более гомогенному распределению одного или более компонентов внутри капли.

Примеры "загрузочных" операций с каплями включают загрузку с помощью микродиализа, загрузку с приложением давления, роботизированную загрузку, пассивную загрузку и загрузку с помощью пипетки. Операции с каплями могут быть осуществлены под действием электродов. В некоторых случаях операции с каплями дополнительно облегчаются за счет использования гидрофильных и/или гидрофобных участков на поверхностях и/или физических препятствий. Примеры операций с каплями рассмотрены в патентах и патентных заявках, цитируемых выше при раскрытии определения "капельный манипулятор". Для определения или подтверждения результата операции с каплей в некоторых случаях могут быть применены методики обнаружения или визуализации полного сопротивления или электрической емкости. Примеры таких методик рассмотрены в опубликованной патентной заявке US 20100194408, Sturmer et al., озаглавленной "Capacitance Detection in a Droplet Actuator (Определение электрической емкости в капельном манипуляторе)", опубликованной 5 августа 2010 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Вообще говоря, методики обнаружения или визуализации могут быть применены для подтверждения присутствия или отсутствия капли на определенном электроде.

Например, присутствие отмеренной капли на электроде назначения после проведения операции отмеривания капли подтверждает, что операция отмеривания капли прошла эффективно. Аналогично, присутствие капли на участке определения на соответствующем этапе протокола анализа может подтверждать, что в результате серии предыдущих операций с каплями была успешно создана капля для проведения определений. Транспортировка капли может быть достаточно быстрой. Например, в различных примерах осуществления продолжительность транспортировки капли от одного электрода до другого может превышать приблизительно 1 секунду или приблизительно 0,1 секунды, или приблизительно 0,01 секунды или приблизительно 0,001 секунды. В одном из примеров осуществления электрод работает на переменном токе, но его переключают на постоянный ток для получения изображения. Удобно, если при проведении операций с каплями площадь, занимаемая каплей, приблизительно равна площади электросмачивания; другими словами, 1х-, 2х- и 3х-капли успешно контролируют, применяя 1, 2 и 3 электрода, соответственно. Если площадь, занимаемая каплей, превышает количество электродов, доступных для проведения операции с каплей в течение заданного времени, то разность между размером капли и количеством электродов обычно не должна превышать 1; другими словами, 2х-каплю успешно контролируют, применяя 1 электрод, и 3х-каплю успешно контролируют, применяя 2

электрода. Если капли включают гранулы, то удобно чтобы размер капли был равен количеству электродов, которые контролируют каплю, например, транспортируют каплю.

"Заполняющая текучая среда" означает текучую среду, связанную с подложкой капельного манипулятора, на которой проводят операции с каплями; эта текучая среда по существу не смешивается с капельной фазой, что позволяет производить над капельной фазой операции с каплями, выполняемые с помощью электродов. Например, зазор капельного манипулятора, выполненный с возможностью операций с каплями, обычно заполнен заполняющей текучей средой. Заполняющая текучая среда может, например, представлять собой или включать масло с низкой вязкостью, такое как кремнийорганическое масло, или представлять собой заполняющую текучую среду на основе гексадекана. Заполняющая текучая среда может представлять собой или включать галогенированное масло, такое как фторированное или перфорированное масло. Заполняющая текучая среда может полностью заполнять зазор капельного манипулятора или может покрывать одну или более поверхностей капельного манипулятора. Заполняющие текучие среды могут быть электропроводными или неэлектропроводными. Заполняющие текучие среды могут быть выбраны с целью улучшения проведения операций с каплями и/или снижения утечки реагента или целевых веществ из капель, улучшения образования микрокапель, уменьшения перекрестного загрязнения капель, уменьшения загрязнения поверхностей капельного манипулятора, замедления разрушения материалов капельного манипулятора и т.д. Например, заполняющие текучие среды могут быть выбраны с целью обеспечения совместимости с материалами капельного манипулятора. Например, с фторированными поверхностными покрытиями могут быть подходящим образом применены фторированные заполняющие текучие среды. Фторированные заполняющие текучие среды подходят для снижения потерь липофильных соединений, таких как подложки из умбеллиферона (7-оксикумарина), такие как подложки из 6-гексадеканоиламидо-4-метилумбеллиферона (которые используют, например, в анализах Краббе (Krabbe), Ниманна-Пика (Niemann-Pick) или других анализах); другие подложки из умбеллиферона рассмотрены в опубликованном патентном документе US 20110118132, Winger et al., озаглавленном "Enzymatic Assays Using Umbelliferone Substrates with Cyclodextrins in Droplets of Oil (Ферментативные анализы с использованием подложек из умбеллиферона с циклодекстринами в каплях масла)", опубликованном 19 мая 2011 г., содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Примеры подходящих фторированных масел включают масла линии Galden, такие как Galden HT170 (т.кип. = 170°C, вязкость = 1,8 сантиСтокс, плотность = 1,77), Galden HT200 (т.кип. = 200°C, вязкость = 2,4 сантиСтокс, d = 1,79), Galden HT230 (т.кип. = 230°C, вязкость = 4,4 сантиСтокс, d = 1,82) (все поставляются Solvay Solexis); масла линии Novac, такие как Novac 7500 (т.кип. = 128°C, вязкость = 0,8 сантиСтокс, d = 1,61), Fluorinert FC-40 (т.кип. = 155°C, вязкость = 1,8 сантиСтокс, d = 1,85), Fluorinert FC-43 (т.кип. = 174°C, вязкость = 2,5 сантиСтокс, d = 1,86) (оба поставляются 3M). В целом, выбор перфорированных заполняющих текучих сред зависит от кинематической вязкости (предпочтительно, но не обязательно < 7 сантиСтокс) и от температуры кипения (предпочтительно, но не обязательно > 150°C при операциях с ДНК/РНК (ПЦР, и т.д.)). В заполняющие текучие среды могут быть добавлены, например, поверхностно-активные вещества или другие добавки. Например, могут быть выбраны добавки для улучшения проведения операций с каплями и/или снижения утечки реагента или целевых веществ из капель, улучшения образования микрокапель, уменьшения перекрестного загрязнения

капель, уменьшения загрязнения поверхностей капельного манипулятора, замедления разрушения материалов капельного манипулятора и т.д. Может быть выбран такой состав заполняющей текучей среды, включающей добавку поверхностно-активного вещества, который позволяет работать с реагентами, применяемыми в специфичных протоколах анализа и эффективно взаимодействовать или не взаимодействовать с материалами, из которых состоит капельный манипулятор. Примеры заполняющих текучих сред и композиции заполняющих текучих сред, подходящих для применения в способах и установке согласно настоящему изобретению, представлены в международной патентной заявке WO 2010/027894, Srinivasan et al., озаглавленной "Droplet Actuators, Modified Fluids and Methods (Капельные манипуляторы, модифицированные текучие среды и способы их применения)", опубликованной 3 июня 2010 г.; в международной патентной заявке WO 2009/021173, Srinivasan et al., озаглавленной "Use of Additives for Enhancing Droplet Operations (Применение добавок для улучшения операций с каплями)", опубликованной 12 февраля 2009 г.; в международной патентной заявке WO/2008/098236, Sista et al., озаглавленной "Droplet Actuator Devices and Methods Employing Magnetic Beads (Капельные манипуляторы и способы, в которых применяют магнитные гранулы)", опубликованной 15 января 2009 г.; и в опубликованном патентном документе US 20080283414, Monroe et al., озаглавленном "Electrowetting Devices (Устройства с электросмачиванием)", опубликованном 20 ноября 2008 г., где содержания перечисленных документов полностью включены в настоящее описание посредством ссылки, а также в других цитируемых в настоящем описании патентах и патентных документах. В некоторых случаях во фторированные масла могут быть добавлены фторированные поверхностно-активные вещества, например, Zonyl FSO-100 (Sigma-Aldrich) и/или другие. Заполняющая текучая среда обычно представляет собой жидкость. В некоторых примерах осуществления вместо жидкости может быть применен заполняющий газ.

"Резервуар" означает замкнутый объем или частично замкнутый объем, выполненный с возможностью удержания, хранения или подачи жидкости. Система капельного манипулятора согласно настоящему изобретению может включать резервуары, находящиеся на картридже, и/или резервуары, находящиеся вне картриджа. Резервуары, находящиеся на картридже, могут представлять собой (1) резервуары, находящиеся на манипуляторе, которые представляют собой резервуары, находящиеся в зазоре для операций с каплями или на поверхности для операций с каплями; (2) резервуары, находящиеся вне манипулятора, которые представляют собой резервуары, находящиеся на картридже капельного манипулятора, но снаружи зазора для операций с каплями и не контактирующие с поверхностью для операций с каплями; или (3) гибридные резервуары, которые включают области, расположенные на манипуляторе, и области, расположенные вне манипулятора. Примером резервуара, находящегося вне манипулятора, является резервуар в верхней подложке. Резервуар, находящийся вне манипулятора, обычно соединен соединением для текучей среды с отверстием или проточным каналом, выполненным с возможностью подачи потока жидкости из резервуара, находящегося вне манипулятора, в зазор для операций с каплями, такой как резервуар, находящийся на манипуляторе. Резервуар, находящийся вне картриджа, может представлять собой резервуар, который вовсе не является частью картриджа капельного манипулятора, но из которого жидкость подают в некоторую часть картриджа капельного манипулятора. Например, резервуар, находящийся вне картриджа, может представлять собой часть системы или загрузочной станцией, к которой картридж капельного манипулятора присоединен во время функционирования.

Аналогично, резервуар, находящийся вне картриджа, может представлять собой контейнер для хранения реагентов или шприц, который применяют для выпуска текучей среды в резервуар, находящийся на картридже, или в зазор для операций с каплями. Система, в которой имеется резервуар, находящийся вне картриджа, обычно включает средства транспортировки текучей среды, по которым жидкость может быть подана из резервуара, находящегося вне картриджа, в резервуар, находящийся на картридже, или в зазор для операций с каплями.

Употребляемые в настоящем описании термины "верх (верхний)", "низ (нижний)", "над", "под" и "на" применяют для обозначения относительных положений компонентов проточной ячейки и/или капельного манипулятора, таких как относительные положения верхней и нижней подложек проточной ячейки и/или капельного манипулятора. Следует понимать, что проточная ячейка и/или капельный манипулятор функционируют независимо от их ориентации в пространстве.

Если указано, что жидкость, находящаяся в любой форме (например, в виде капли или непрерывного объема, как движущегося, так и стационарного), находится "на", "у", или "поверх" электрода, массива, матрицы или поверхности, то такая жидкость может быть либо в непосредственном контакте с электродом/массивом/матрицей/поверхностью, либо она может быть в контакте с одним или более слоями или пленками, которые расположены между жидкостью и электродом/массивом/матрицей/поверхностью. В одном из примеров заполняющая текучая среда может рассматриваться как пленка, находящаяся между жидкостью и электродом/массивом/матрицей/поверхностью.

Если указано, что капля находится "на" или "загружена на" капельный манипулятор, следует понимать, что капля расположена на капельном манипуляторе таким образом, при котором с помощью капельного манипулятора каплю можно подвергать одной или более операций с каплями, и при этом капля расположена на капельном манипуляторе таким образом, который позволяет определять свойство капли или получать сигнал от капли, и/или каплю подвергают операции с каплями, выполняемой капельным манипулятором.

Примеры осуществления, рассмотренные в настоящей работе, могут включать способы, системы, устройства и установки для проведения биологического или химического анализа с помощью схемы магнитного обнаружения. Например, магнитное обнаружение может быть применено в примерах осуществления для базового обнаружения и установления различий при выполнении протокола секвенирования синтезом (SBS). Различные примеры осуществления могут относиться к способам SBS на основе магнитного биосенсорного обнаружения с помощью интегрированной с КМОП (комплементарным металлооксидным полупроводником, англ. complementary metal-oxide semiconductor, сокращенно CMOS) проточной ячейки и/или капельного манипулятора. В некоторых примерах осуществления проточная ячейка может включать один или более каналов, ограниченных поверхностями, на которых могут быть иммобилизованы матричные цепочки. Через каналы в соответствии с заданной временной схемой могут быть направлены различные растворы для доставки реагентов для секвенирования SBS. В других примерах осуществления реагенты могут быть доставлены каплями, движением которых управляет капельный манипулятор.

В некоторых примерах осуществления SBS секвенирование может быть проведено посредством реакции, проводимой в одной емкости (также называемой синтезом в одной емкости). Например, праймеры могут быть поданы одновременно с полимеразой, обратимо заблокированными аналогами нуклеотидов и деблокирующим агентом.

Нуклеиновые кислоты, полимеразы, обратимо блокированные аналоги нуклеотидов и деблокирующий агент могут присутствовать в реакционной емкости одновременно. Полимераза способна катализировать присоединение одного обратимо блокированного аналога нуклеотида к праймеру с образованием достроенного праймера (продукта достройки праймера), имеющего блокированный 3'-конец. Деблокирующий агент может снимать блок с 3'-конца достроенного праймера, чтобы к достроенному праймеру можно было добавлять следующие аналоги нуклеотидов. В другом примере осуществления нуклеотиды могут не иметь 3'-блока, и деблокирующий агент не добавляют. Изменения сопротивления могут отслеживаться в режиме реального времени по мере встраивания последующих нуклеотидов под действием полимеразы. Такие примеры осуществления могут быть особенно подходящими для анализа единичных молекул. Поскольку реагенты одновременно находятся в реакционной среде, в результате реакции, проводимой в одной емкости, праймер может быть последовательно достроен так, чтобы он включал несколько аналогов нуклеотидов. По меньшей мере одним преимуществом реакции, проводимой в одной емкости, является то, что реагенты не нужно ни добавлять в реакцию, ни удалять из реакции, что позволяет снижать потери реагентов, обусловленные многократным переносом текучих сред, и позволяет увеличивать продолжительность времени реакции, затрачиваемого на рабочие циклы, за счет уменьшения продолжительности этапов переноса текучих сред. SBS секвенирование посредством реакций, проводимых в одной емкости, рассмотрено в патентной заявке US 2013/0085073, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

При проведении реакций в одной емкости магниточувствительные датчики эффективно отслеживают состояние комплементарной цепочки и обнаруживают добавление нуклеотида к цепочке. В таких примерах осуществления либо к нуклеотиду, либо к полимеразе может быть присоединена магнитная частица. Например, каждый тип нуклеотида может содержать магнитную частицу (или частицы), придающую ему уникальное магнитное свойство, позволяющее отличать этот нуклеотид от других типов нуклеотидов. В других примерах осуществления магнитные частицы могут быть присоединены к полимеразе. Как рассмотрено в настоящей работе, различные типы нуклеотидов могут иметь различные скорости встраивания, по которым в примерах осуществления может быть идентифицирован тип добавленного нуклеотида.

Как указано в настоящей работе, в некоторых примерах осуществления матричные цепочки могут быть иммобилизованы, например, на поверхности проточной ячейки. Однако в других примерах осуществления на поверхности проточной ячейки может быть иммобилизована полимеразы. Полимераза может быть иммобилизована внутри небольшой реакционной камеры или лунки. Например, полимеразы могут быть локализованы в небольшом объеме (например, порядка зептолитра) таким образом, чтобы свободно диффундирующие магнитные частицы можно было легко отличить от частиц, устойчиво связанных с полимеразой, на основании времени существования сигнала. Каждый объем может быть соотношен с одним или более магниточувствительным датчиком.

Полимераза может быть иммобилизована на поверхности с помощью известных линкеров. Примеры таких линкеров включают: сложные NHS-эфиры, изоцианаты и конъюгаты изотиоцианатных линкеров с аминами, малеимидами с цистеинами, применение реактивов клик-химии, содержащих азиды, с алкинами, применение маркеров сплавления, таких как Halotag, Spycatcher-Spytag, и другие аналогичные способы биоконъюгации белок-белок. Дополнительная информация о примерах линкеров,

которые могут быть применены, может быть найдена в приведенных ниже публикациях, содержания которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки: Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2-ое изд., Elsevier, 2008; Zakeri et al. "Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin (Пептидный маркер, быстро образующий ковалентную связь с белком, посредством конструирования бактериального адгезина)", *PNAS* 109: E691-E697 (2012); и Liu et al. "Specific Enzyme Immobilization Approaches and Their Application with Nanomaterials (Специфичные подходы к иммобилизации ферментов и их применение в комбинации с наноматериалами)", *Topics in Catalysis* 55(16-18): 1146-1156 (2012).

В одном из иллюстративных примеров осуществления восстановленная тиольная (-SH) группа (также называемая сульфгидрильной группой) цистеинового остатка может быть введена в реакцию со связующей структурой, имеющей группу, способную реагировать с тиолом. Примеры таких групп включают малеимид и йодоацетамид. Первичные способные реагировать с тиолом реагенты, включающие йодоацетамиды, малеимиды, бензилгалогениды и бромметилкетоны, могут быть использованы для S-алкилирования тиолов с образованием стабильных простых тиоэфиров, арилирующие реагенты, такие как галогениды 7-нитробенз-2,1,3-оксадиазола (англ. 7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazole, сокращенно NBD) могут реагировать с тиолами или аминами, аналогично замещая ароматический галогенид нуклеофилом, и, поскольку тиолятный анион является более сильным нуклеофилом, чем нейтральный тиол, цистеин более реакционноспособен выше своей pKa. Кроме того, химические группы, способные реагировать с сульфгидрильными группами, включают галогеноацетилы, малеимиды, азиридины, акрилоилы, арилирующие агенты, винилсульфоны, пиридилдисульфиды, тиолы TNB (сокращение от 2-nitro-5-thiobenzoic acid, т.е. 2-нитро-5-тиобензойной кислоты) и дисульфидные восстановители; такие группы могут образовывать конъюгаты с сульфгидрилами посредством алкилирования (например, посредством образования простых тиоэфирных связей) или обмена дисульфидом (например, образования дисульфидной связи). Также могут быть применены подходящие реакции обмена сульфгидрила.

В альтернативном варианте целью могут быть амины (-NH<sub>2</sub>). Например, относительно реакционноспособными являются первичный амин остатка лизина и N-концевая группа полипептида. На аминные остатки могут воздействовать сложные N-гидроксисукцинимидные эфиры (NHS сложные эфиры), которые могут образовывать стабильную амидную связь, или сшивающие агенты на основе сложных имидоэфиров, которые могут реагировать с первичными аминами с образованием амидиновых связей. Существует совокупность других соединений, способных реагировать с аминами. Например, синтетические химические группы, которые могут образовывать химические связи с первичными аминами, включают изотиоцианаты, изоцианаты, ацилазиды, сложные NHS-эфиры, сульфонилхлориды, альдегиды, глиоксали, эпоксиды, оксираны, карбонаты, арилгалогениды, сложные имидоэфиры, карбодиимиды, ангидриды и сложные эфиры фторфенила; такие группы могут образовывать конъюгаты с аминами, например, посредством ацилирования или алкилирования. В других примерах осуществления, для введения новой функциональной группы, такой как азид или алкин, который применяют в клик-химии, может быть использован модифицированный аминокислотный остаток. Например, группы, реакционноспособные по отношению к тиольным или аминокислотным группам, рассмотренные выше, могут быть применены в сочетании с линкерами, которые позволяют присоединять функциональные азидогруппы или алкинные группы для дальнейшего применения получаемых продуктов в реакциях

клик-химии.

В некоторых примерах осуществления секвенирование может быть выполнено посредством проведения заданной реакции, в результате которой происходит связывание двух фрагментов или разделение (например, расщепление) двух фрагментов. Во многих случаях заданная реакция может быть инициирована химическим или ферментативным путем. Однако в некоторых примерах осуществления заданная реакция может быть инициирована изменением температуры или электрической характеристики, которое воздействует на реагенты.

В некоторых примерах осуществления магнитные частицы имеют магнитные свойства или состояния, которые по существу постоянны или однородны. Например, магнитные свойства могут создавать постоянное или однородное магнитное поле. Однако в других примерах осуществления, магнитное свойство или состояние может быть индуцируемым или настраиваемым. Например, магнитные свойства могут переходить из одного состояния в другое состояние при воздействии электромагнитной энергии заданной частоты.

Различные примеры осуществления изобретения также относятся к системе и/или установке для обнаружения. Используемый в настоящем описании термин "установка для обнаружения" включает массив магниточувствительных датчиков и камеру, через которую текучая среда может протекать вблизи магниточувствительных датчиков. В различных примерах осуществления установка для обнаружения включает твердофазное устройство. Поток текучей среды может быть, например, непрерывным потоком жидкости, такой как жидкости, рассмотренные в патентной заявке US 2015/0079596, патенте US 8951781 и международной патентной заявке WO 2015/089092, где содержание каждого цитируемого документа полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В альтернативном варианте поток текучей среды также может быть направлен посредством операций с каплями, таких как операции электросмачивания, которые более подробно рассмотрены далее в настоящем описании.

Примеры осуществления могут включать применение магнитных биосенсорных схем для SBS, основанных на принципах магнитосопротивления и/или спинтроники (т.е. электронных схем с использованием поляризованных по спину электронов). Например, проточная ячейка или капельный манипулятор могут включать массив магнитных датчиков, размещенных с высокой плотностью, включающий устройства с гигантским магнитосопротивлением (GMR) и/или устройства с туннельным магнитосопротивлением (TMR). Устройства GMR и устройства TMR также могут быть названы датчиками GMR или датчиками TMR, соответственно. В конкретных примерах осуществления массив магнитных датчиков может быть применен для обнаружения амплифицированных клональных кластеров ДНК или единичных цепочек ДНК, которые включают метки из магнитных частиц. Магнитные частицы могут представлять собой, например, магнитные наночастицы и/или одномолекулярные магниты (SMM).

Согласно настоящему изобретению, массив магниточувствительных датчиков включает совокупность датчиков, расположенных согласно заданной схеме. Массив может включать датчики, расположенные бок о бок в виде сетки или матрицы (например, 10 рядов и 10 колонок), или массив датчиков может иметь более разреженное неоднородное расположение. В некоторых примерах осуществления магниточувствительные датчики массива могут быть расположены в непосредственной близости друг к другу, так что между ними не имеется никаких опосредующих элементов. Однако в других примерах осуществления магниточувствительные датчики массива могут быть отделены друг от друга. Между соседними магниточувствительными

датчиками необязательно могут быть расположены другие элементы (например, электроды).

В некоторых примерах осуществления перед обнаружением сигналов биологические или химические образцы могут быть селективно расположены вблизи одного или более магниточувствительных датчиков массива. Например, каждый магниточувствительный датчик может быть приписан к соответствующей площади или объему (обычно называемому заданным участком), и при этом магниточувствительный датчик выполнен с возможностью определения внешнего магнитного поля заданного участка. В одном из конкретных примеров матричные цепочки могут быть иммобилизованы на поверхности или матрице, расположенной на заданном участке. В другом примере биологический или химический образец может быть расположен в углублении (например, лунке), которое расположено над одним или более магниточувствительными датчиками.

В альтернативном варианте перед выполнением обнаружения биологические или химические образцы могут иметь неизвестные положения относительно массива магнитных датчиков. В таких примерах осуществления только после обнаружения магнитных частиц может быть определено находятся ли магнитные частицы на заданных участках магниточувствительных датчиков. В таких примерах осуществления один или более магниточувствительных датчиков могут быть неспособны проанализировать биологический или химический образец. В других примерах осуществления совокупность магниточувствительных датчиков могут быть расположены вблизи одного образца таким образом, чтобы каждый из совокупности датчиков мог обнаруживать одну и ту же магнитную частицу или мог обнаруживать различные магнитные частицы, связанные с одним образцом.

Используемые в подробном описании и формуле изобретения фразы, такие как "массив [элементов]" или "совокупность [элементов]" и подобные им выражения не обязательно включают каждый элемент, который может иметь компонент. Компонент может включать другие элементы, подобные совокупности элементов. Например, фраза "совокупность магниточувствительных датчиков [включающих названный признак]" не обязательно означает, что каждый магниточувствительный датчик установки для обнаружения имеет названный признак. Другие магниточувствительные датчики могут не иметь названного признака. Соответственно, если ясно не указано иное (например, "каждый магниточувствительный датчик [имеющий названный признак]"), примеры осуществления могут включать аналогичные элементы, которые не имеют названных признаков.

Каждый из магниточувствительных датчиков может быть применен для обнаружения изменения электрического сопротивления. Например, каждый из магниточувствительных датчиков может иметь собственное электрическое сопротивление.

Магниточувствительный датчик может определять изменения электрического сопротивления, вызванные, например, магнитным свойством материала, расположенного вблизи магниточувствительного датчика. Используемый в настоящем описании термин "магнитное свойство" может включать магнитное поле, направление вектора магнитного поля, магнитный момент. Магнитное свойство может быть вызвано материалами, имеющими парамагнитные, диамагнитные, ферромагнитные и антиферромагнитные свойства. Магнитное свойство также может быть вызвано, по меньшей мере частично, спинами электронов, имеющихся в материале. В некоторых примерах осуществления магнитное свойство может быть неизменным. Однако в других случаях магнитное свойство может быть изменяемым или индуцируемым.

Например, датчик GMR может включать проводящий слой, имеющий электрическое

сопротивление, которое может изменяться в присутствии материала, имеющего определенное магнитное свойство. Например, магнитные частицы могут создавать соответствующие магнитные поля или магнитные моменты, вызывающие изменение сопротивления. Датчик GMR может иметь первое электрическое сопротивление в  
5 отсутствие внешнего магнитного поля и второе электрическое сопротивление в присутствии внешнего магнитного поля. Аналогично, датчик TMR может содержать изолирующий слой, по которому протекает туннельный ток. Поток туннельного тока замедляется электрическим сопротивлением датчика TMR. Датчик TMR может иметь  
10 первое электрическое сопротивление в отсутствие магнитного материала и второе электрическое сопротивление в присутствии магнитного материала. Примеры осуществления изобретения позволяют определить различия в электрическом сопротивлении, что позволяет определить присутствие магнитного материала. В некоторых случаях магнитный материал может иметь различные магнитные свойства. Таким образом, примеры осуществления изобретения позволяют различать различные  
15 магнитные поля и/или различные магнитные моменты.

Электронная схема установки для обнаружения, такая как электронная схема, включаемая в считывающую схему, может передавать от каждого магниточувствительного датчика сигналы, которые коррелируют с электрическим  
сопротивлением на магниточувствительном датчике. Например, электронная схема  
20 может быть электрически соединена с одним или более слоями магниточувствительного датчика, такими как один из ферромагнитных слоев и/или один из немагнитных слоев. Сигналы, получаемые при наличии и отсутствии внешних магнитных полей, могут сравниваться с целью обнаружения изменения электрического сопротивления. По изменению электрического сопротивления можно определить присутствовали или нет  
25 магнитные частицы на момент передачи сигналов. Например, любое существенное изменение электрического сопротивления может указывать на присутствие магнитных частиц. Кроме того, в некоторых примерах осуществления величина изменения может быть проанализирована для определения типа присутствующей магнитной частицы или количества присутствующих магнитных частиц. Другими словами, примеры  
30 осуществления могут быть выполнены с возможностью (а) определения наличия магнитного поля на заданном участке или (б) определения напряженности магнитного поля на заданном участке. Из этих данных, согласно примерам осуществления, может быть выведена полезная информация о биологическом или химическом образце. Полезная информация может включать, например, идентификацию нуклеотида или  
35 последовательность нуклеиновой кислоты.

Как указано выше, в примерах осуществления могут быть получены сигналы, которые соответствуют электрическому сопротивлению при наличии магнитного свойства и при отсутствии магнитного свойства. Эти данные могут быть проанализированы для определения изменения электрического сопротивления. Следует понимать, что в  
40 примерах осуществления также могут быть получены сигналы, соответствующие нахождению магнитного свойства в первом состоянии или качестве, и сигналы, соответствующие нахождению магнитного свойства в отличном от первого втором состоянии или качестве. Эти данные также могут быть проанализированы для определения изменения электрического сопротивления. Например, магнитный материал  
45 может иметь изменяемое или индуцируемое магнитное свойство. В одном из примеров частица SMM (одномолекулярный магнит) может быть чувствительна к различным установкам "Включено/Выключено" частот светового излучения. Магнитное состояние частицы SMM может быть изменено "Включением" частоты светового излучения или

"Выключением" частоты светового излучения. Таким образом, в примерах осуществления может быть произведено сравнение сигналов, полученных после "Включения" частоты светового излучения, с сигналами полученных после "Включения" частоты светового излучения.

5 Примеры, рассмотренные ниже, включают определение изменений электрического сопротивления, вызванные только магнитными полями. Однако следует понимать, что в зависимости от примера осуществления такие изменения могут быть вызваны другим магнитным свойством (например, направлением вектора магнитного поля и/или магнитным моментом).

10 В конкретных примерах осуществления устройства и способы могут быть применены для секвенирования амплифицированных клональных кластеров ДНК или единичных цепочек ДНК.

В конкретных примерах осуществления в магнитной биосенсорной схеме для SBS для обнаружения и распознавания события встраивания нуклеотида применяют нуклеотиды, меченные гаптенем (парциальным антигеном), и функционализированные магнитные наночастицы.

15 В конкретных примерах осуществления в магнитной биосенсорной схеме для SBS для обнаружения и установления различий оснований применяют нуклеотиды, меченные SMM.

20 В конкретных примерах осуществления в магнитной биосенсорной схеме для SBS для обнаружения и установления различий оснований применяют немеченные нуклеотиды и функционализированную ДНК-полимеразу. В одном из примеров ДНК-полимераза функционализована (имеет прикрепленный маркер) магнитной частицей, такой как одномолекулярный магнит.

25 1.1. Магниторезистивные датчики для секвенирования ДНК

Примеры осуществления, рассмотренные в настоящей работе, могут включать способы, системы, устройства и установки для биологического или химического анализа с помощью схемы магнитного обнаружения. Например, примеры осуществления могут включать устройства и способы применения магнитного биосенсорного обнаружения в секвенировании ДНК, например, для поддержки магнитной биосенсорной схемы для SBS. Так, один или более примеров осуществления относится к проточной ячейке и/или капальному манипулятору, который включает магнитную биосенсорную схему для SBS, основанную на магнитосопротивлении и/или спинтронике. Магнитосопротивление представляет собой свойство материала изменять величину электрического

30 сопротивления при приложении к нему внешнего магнитного поля. Определенные материалы (и многослойные устройства) имеют гигантское магнитосопротивление (GMR), колоссальное магнитосопротивление (англ. colossal magnetoresistance, сокращенно CMR), туннельное магнитосопротивление (TMR) и чрезвычайно высокое магнитосопротивление (англ. extraordinary magnetoresistance, сокращенно EMR). Обычно

40 сопротивление может зависеть либо от величины намагничивания (определяемой прикладываемым магнитным полем), либо непосредственно от магнитного поля. Спинтроника, также называемая спин-электроникой или флюкстроникой, представляет собой зарождающуюся методику, в которой в твердофазных устройствах, наряду с использованием фундаментального заряда электрона, применяют как свойства

45 собственного спина электрона, так и связанный с ним магнитный момент. В спинтронике на спины воздействуют не только магнитными, но и электрическими полями.

В одном или более примеров осуществления может быть применен, например, массив датчиков на основе GMR и/или TMR. В то время как механизмы обнаружения в

традиционных устройствах SBS требуют применения объемных и дорогостоящих оптических систем, в датчиках на основе GMR и/или TMR для создания массивов памяти могут быть эффективно применены известные способы изготовления полупроводников, которые могут быть применены для экономичного изготовления массивов магнитных датчиков. Кроме того, с помощью известных способов изготовления полупроводников в магнитной биосенсорной схеме для SBS, применяемой, например, в проточной ячейке и/или капельном манипуляторе, может быть достигнута высокая плотность размещения магнитных датчиков в массиве.

Таким образом, согласно примерам осуществления может быть получено недорогое, портативное, неоптическое устройство секвенирования, в котором (1) даже сложные биологические образцы не создают обнаруживаемого фонового магнитного сигнала, (2) биологические образцы не оказывают негативного воздействия на механизм магнитной передачи, и (3) загрязнения в виде солей, pH, фоновая флуоресценция не мешают производить магнитное биосенсорное обнаружение. Кроме того, один или более примеров осуществления может быть пригоден для проведения диагностики (кровь, клеточный лизат, слюна, моча и т.д.). Что касается секвенирования, то эти характеристики позволяют проводить обнаружение единичной молекулы (в некоторых примерах осуществления для большей точности лучше применять кластеры) и допускают минимальную подготовку образца.

На Фиг. 1А и 1В показан вид сверху и вид поперечного сечения, соответственно, примера системы 100. В показанном примере осуществления система 100 включает установку 102 для обнаружения (или детектор), систему 104 струйного контроля (Фиг. 1А), которая соединена соединением для текучей среды с установкой 102 для обнаружения, считывающую схему 106 (Фиг. 1А) и электронную аналитическую схему 105 (Фиг. 1А). Установка 102 для обнаружения включает массив 110 магнитных датчиков для поддержки, например, магнитной биосенсорной схемы для SBS. Например, установка 102 для обнаружения включает нижнюю подложку 108, которая включает печатную монтажную плату (англ. printed circuit board, сокращенно РСВ) 112 и массив 110 магнитных датчиков, установленный на РСВ 112. Установка 102 для обнаружения также включает верхнюю подложку (или проточную ячейку) 114, которая установлена в соответствии с массивом 110 магнитных датчиков. Массив 110 магнитных датчиков расположен вдоль поверхности 109 (Фиг. 1В) нижней подложки 108. Камера или резервуар 118 ограничен поверхностью 109 подложки и верхней подложкой 114. Массив 110 магнитных датчиков может включать совокупность датчиков, находящихся в камере 118 вблизи заданных участков. Например, датчики могут иметь открытые поверхности, которые ограничивают камеру 118. В альтернативном варианте между камерой 118 и массивом 110 магнитных датчиков могут быть расположены один или более слоев (например, пассивирующий слой). Например, поверхность 109 подложки может быть ограничена пассивирующим слоем. В показанном примере осуществления верхняя подложка 114 и нижняя подложка 108 разделены разделителями 116. В других примерах осуществления в верхней подложке 114 может быть проделано углубление, которое становится камерой 118 после установки верхней подложки 114 на нижнюю подложку 108.

Верхняя подложка 114 может быть, например, подложкой из стекла или подложкой из полимера. В одном из примеров толщина верхней подложки 114 составляет приблизительно 400 мкм. В одном из примеров разделители 116 представляют собой клейкие разделители высотой приблизительно 100 мкм. В другом примере разделители 116 представляют собой выступы, интегрированные либо с верхней, либо с нижней

подложкой, высотой приблизительно 100 мкм. Камера 118 секвенирования представляет собой проточный канал, снабженный в верхней подложке 114 входным отверстием 120 и выходным отверстием 122. То есть жидкость может течь в/из камеры 118 секвенирования через входное отверстие 120 и выходное отверстие 122.

5 В одном из примеров массив 110 магнитных датчиков представляет собой массив 10×10, в котором шаг между магниточувствительными датчиками может составлять, например, от приблизительно 10 мкм до приблизительно 100 мкм. В другом примере массив 110 магнитных датчиков представляет собой массив магнитных датчиков с  
10 высокой плотностью на основе КМОП, такой как массив 8000×8000, в котором шаг между магниточувствительными датчиками составляет приблизительно 200 нм (для имеющих в настоящее время 64-Мбитных устройств), или массив 100000×100000, в котором шаг между магниточувствительными датчиками составляет приблизительно 100 нм (для имеющих в настоящее время 10-Гбитных устройств). В одном из примеров массив 110 магнитных датчиков представляет собой устройство размером 100 нм × 400  
15 нм.

Магниточувствительные датчики, образующие массив 110 магнитных датчиков, могут представлять собой, например, устройства или датчики на основе GMR или устройства или датчики на основе TMR. Устройства на основе GMR или устройства на основе TMR могут быть применены, например, для обнаружения амплифицированных  
20 клональных кластеров ДНК или единичных цепочек ДНК, меченных, например, магнитными наночастицами и/или SMM. Система 100 может быть применена для других целей, таких как диагностическое применение, в котором зонды или другие единицы, имеющие магнитные частицы, селективно присоединяются к заданным биологическим или химическим целевым частицам.

25 Как показано на Фиг. 1А, считывающая схема 106 отделена от установки 102 для обнаружения. Однако в других примерах осуществления, считывающая схема 106 может быть полностью интегрирована с установкой 102 для обнаружения. Например, установка 102 для обнаружения может включать твердофазное устройство, такое как КМОП, которое включает электронную схему, образующую по меньшей мере часть  
30 считывающей схемы 106. В некоторых примерах осуществления нижняя подложка 108 может включать устройство КМОП.

Считывающая схема 106 соединена с возможностью связи с магниточувствительными датчиками, которые образуют массив 110. Считывающая схема 106 выполнена с  
35 возможностью передачи сигналов, которые могут основываться на (или указывать на или представлять) электрическом сопротивлении магниточувствительных датчиков, в электронную аналитическую схему 105. Считывающая схема 106 включает электропроводящие ходы. В некоторых примерах осуществления считывающая схема 106 включает электронную схему, которая выполнена с возможностью модификации сигналов перед передачей сигналов в электронную аналитическую схему 105. Например,  
40 считывающая схема 106 может усиливать сигналы, оцифровывать сигналы, конвертировать сигналы в соответствии с таблицей преобразования и т.д. В альтернативном варианте считывающая схема 106 не модифицирует сигналы перед передачей сигналов в электронную аналитическую схему.

В некоторых примерах осуществления считывающая схема 106 определяет  
45 электрическое сопротивление в области магниточувствительных датчиков и передает эти данные электронной аналитической схеме 105. В других примерах осуществления считывающая схема 106 передает электронной аналитической схеме 105 необработанные данные, и электронная аналитическая схема определяет электрическое сопротивление

в области каждого магниточувствительного датчика. Электрическое сопротивление может быть вычислено в соответствии с законом Ома или по другой формуле/алгоритму, который основан, по меньшей мере частично, на законе Ома. Электрическое сопротивление может быть вычислено, например, передачей информации (например, обнаруженного тока или напряжения) в таблицу преобразования, которая преобразует информацию в сигнал или величину, которая отражает электрическое сопротивление.

Электронная аналитическая схема 105 выполнена с возможностью получения (непосредственно или опосредованно) сигналов от считывающей схемы 106 и для анализа сигналов в соответствии с одним или более заранее заданных алгоритмов/ формул для получения полезной информации. Электронная аналитическая схема 105 необязательно может быть интегрирована с установкой 102 для обнаружения. Например, электронная аналитическая схема может быть закреплена на нижней подложке 108.

Считывающая схема 106 и/или электронная аналитическая схема 105 может анализировать обнаруженное изменение электрического сопротивления у каждого из магниточувствительных датчиков. Используемая в настоящем описании фраза "анализировать обнаруженное изменение электрического сопротивления" (и подобные ей фразы) не ограничена простым математическим вычислением. В некоторых случаях единственной необходимой информацией является информация о том, удовлетворяет ли величина электрического сопротивления (или другой характеристики, указывающей на электрическое сопротивление, такой как электрический ток или напряжение) определенному условию. Например, если величина электрического сопротивления меньше заданного значения, то показания могут считаться положительным результатом (т.е. магнитная частица присутствует на заданном участке). Если величина электрического сопротивления превышает заданное значение, то показания могут считаться отрицательным результатом (т.е. магнитные частицы отсутствуют). В приведенном выше примере величина, на которую электрическое сопротивление отличается от заданного значения, не важна. Важно лишь, составляет ли величина электрического сопротивления больше или меньше заданного значения.

Однако в других примерах осуществления величина, на которую электрическое сопротивление (или другая электрическая характеристика) отличается от заданного значения, может быть полезной. Например, величина изменения электрического сопротивления может быть показателем напряженности магнитного поля. Напряженность магнитного поля, в свою очередь, может зависеть от количества магнитных частиц и/или типа магнитных частиц на заданном участке.

Соответственно, этап анализа обнаруженного изменения электрического сопротивления может включать (а) определение наличия какого-либо изменения и/или (b) определение величины изменения. Кроме того, этап анализа обнаруженного изменения электрического сопротивления может включать использование величин, определяющих другие электрические характеристики (например, тока, напряжения).

В одном из примеров обнаруженное изменение может быть проанализировано посредством нахождения разности между первой обнаруженной величиной (например, базовым электрическим сопротивлением, базовым током или базовым напряжением), которая получена в течение первого периода времени, например, после операции отщепления, и второй обнаруженной величиной, которая получена в течение последующего второго периода времени, например, после события встраивания.

В другом примере обнаруженное изменение может быть проанализировано только после получения одной обнаруженной величины. Например, каждому магниточувствительному датчику массива может быть присвоена заданная пороговая

величина или базовая величина. Показания могут быть идентифицированы как положительные или отрицательные при сравнении этой заданной величины с обнаруженным значением.

5 В других примерах осуществления обнаруженная величина может быть введена в таблицу преобразования, из которой может быть получено выходное значение. Выходное значение может служить показателем напряженности магнитного поля, которая, в свою очередь, может соответствовать количеству магнитных частиц и/или типу магнитных частиц на заданных участках.

10 В других примерах осуществления обнаруженная величина может сравниваться с совокупностью различных величин. Каждая из этих различных величин может соответствовать одному типу магнитной частицы. Например, если обнаруженная величина приблизительно равна первой величине, то на заданном участке может находиться первый тип магнитной частицы. Если обнаруженная величина приблизительно равна второй величине, то на заданном участке может находиться второй тип магнитной частицы. Аналогично, обнаруженная величина может сравниваться с совокупностью различных диапазонов величин. Если обнаруженная величина находится в пределах первого диапазона, то на заданном участке может находиться первый тип магнитной частицы. Если обнаруженная величина находится в пределах второго диапазона, то на заданном участке может находиться второй тип магнитной частицы.

Обнаруженная величина может представлять одно значение, которое получено в один момент времени. Однако в некоторых случаях обнаруженная величина может быть получена в течение заранее определенного периода времени или в течение совокупности заранее определенных периодов времени. Например, обнаруженная величина может представлять собой максимальное или минимальное значение, определяемое в течение периода времени, или она может представлять собой среднюю величину, определяемую в течение периода времени. В других примерах осуществления период времени, в течение которого существует изменение электрического сопротивления, также может представлять собой полезную информацию.

30 Электронная аналитическая схема 105 выполнена с возможностью анализа обнаруженных изменений с целью получения полезной информации о биологическом или химическом образце. Например, электронная аналитическая схема 105 может идентифицировать или назвать нуклеотид, который был добавлен при каждом событии SBS, проводимом для определения последовательности нуклеиновой кислоты. Событие SBS может включать один или более этапов, которые приводят к добавлению нуклеотида к комплементарной последовательности, и один или более этапов обнаружения такого добавления. Событие SBS может включать добавление одного нуклеотида к совокупности кластеров (например, к сотням, тысячам кластеров) или может включать добавление одного нуклеотида к одной комплементарной цепочке. В настоящей работе рассмотрены различные способы идентификации нуклеотидов. Эти способы могут включать способы, рассмотренные выше для определения изменений электрического сопротивления. Например, в некоторых примерах осуществления для идентификации нуклеотида достаточно лишь одного обнаруженного изменения. В других примерах осуществления для идентификации нуклеотида может быть произведено сравнение двух или более обнаруженных изменений.

45 В некоторых примерах осуществления нуклеотид может быть назван и/или последовательность может быть определена посредством проводимого для каждого события SBS сравнения изменений, обнаруженных совокупностью

магниточувствительных датчиков. Например, если первый магниточувствительный датчик имеет первое электрическое сопротивление, и второй магниточувствительный датчик имеет отличающееся от первого второе электрическое сопротивление, то может быть установлено, что магнитные частицы, обнаруженные первым и вторым датчиками, различны. Если третий магниточувствительный датчик имеет электрическое сопротивление, по существу равное электрическому сопротивлению четвертого магниточувствительного датчика, то может быть установлено, что магнитные частицы, обнаруженные третьим и четвертым датчиками, одинаковы.

В некоторых примерах осуществления нуклеотид может быть назван и/или последовательность может быть определена посредством сравнения различных изменений, обнаруженных каждым магниточувствительным датчиком. Например, после выполнения протокола SBS, магниточувствительным датчиком может быть зарегистрирована сотня различных показаний. Каждое показание может соответствовать одному из четырех оснований, встраиваемых в комплементарную цепочку. Предполагая, что магнитные частицы одного типа (или одинаковое их количество) создают одинаковые изменения электрического сопротивления, для каждого из показаний может быть произведено наименование нуклеотидов.

Считывающая схема 106 и/или электронная аналитическая схема 105 может включать систему аппаратного обеспечения и/или программного обеспечения, которая способна выполнять одну или более функций. Например, считывающая схема 106 и/или электронная аналитическая схема 105 может включать компьютерный процессор, контроллер или другое логическое устройство, которое выполняет операции в соответствии с инструкциями, хранящимися на вещественном и энергонезависимом машиночитаемом носителе данных, таком как компьютерная память. В альтернативном варианте считывающая схема 106 и/или электронная аналитическая схема 105 может включать подключенное к проводной сети устройство, которое выполняет операции в соответствии с жестко закодированной логикой устройства.

Считывающая схема 106 и/или электронная аналитическая схема 105 может включать или представлять собой аппаратное обеспечение и соответствующие инструкции (например, программное обеспечение, хранящееся на вещественном и энергонезависимом машиночитаемом носителе данных, таком как жесткий диск компьютера, ROM (от англ. read only memory, постоянное запоминающее устройство, ПЗУ), RAM (от англ. random access memory, оперативное запоминающее устройство, ОЗУ) или подобный носитель), с помощью которых выполняют одну или более операций, рассмотренных в настоящей работе. Аппаратное обеспечение может включать электронные цепи, которые включают и/или соединены с одним или более логическими устройствами, такими как микропроцессоры, процессоры, контроллеры или подобные устройства. Эти устройства могут представлять собой устройства серийного производства, подходящим образом запрограммированные или содержащие инструкции для выполнения операций, рассмотренных в настоящей работе, в соответствии с инструкциями, рассмотренными выше. Кроме того или в альтернативном варианте одно или более из этих устройств может быть подключено с помощью проводной сети к логическим цепям для выполнения рассмотренных операций.

Согласно настоящему изобретению, структура, ограничение или элемент, который "выполнен с возможностью" выполнения задачи или операции, имеет специальную структурную форму, конструкцию или специально адаптирован так, что он пригоден для выполнения заданной задачи или операции. Для ясности и во избежание двусмысленностей следует упомянуть, что объект, который может быть лишь

модифицирован для выполнения задачи или операции, не "выполнен с возможностью" выполнения задачи или операции согласно настоящему изобретению. Напротив, использование в настоящем описании термина "выполнен с возможностью" относится к конструкционным адаптациям или характеристикам и означает конструкционные требования к любой структуре, ограничению или элементу, о которых сказано, что они "выполнены с возможностью" выполнения задачи или операции. Например, можно заключить, что считывающая схема или электронная аналитическая схема, которая сконструирована для выполнения задачи или операции (например, имеет одну или более программ или инструкций, хранящуюся на ней или применяемую в комбинации с ней, созданную или выполненную с возможностью выполнения задачи или операции, и/или имеет набор электронных схем для обработки данных, созданный или выполненный с возможностью выполнения задачи или операции). Для ясности и во избежание двусмысленностей следует упомянуть, что компьютер общего назначения (который после подходящего программирования может стать "выполненным с возможностью" выполнения задачи или операции) не "выполнен с возможностью" выполнения задачи или операции, если и до тех пор, пока его не запрограммируют или структурно модифицируют подходящим образом для выполнения задачи или операции. Кроме того, следует отметить, что операции, выполняемые считывающей схемой 106 и/или электронной аналитической схемой 105 (например, операции, подходящие для выполнения способов согласно изобретению или его аспектам), могут быть достаточно сложными, и поэтому человек может быть неспособен выполнить такие операции в течение разумного периода времени.

Система и/или установка для обнаружения также может включать систему струйного контроля, которая выполнена с возможностью пропускания потоков реагентов в соответствии с заданной программой через камеру для выполнения заранее заданного протокола. Система струйного контроля включает сеть каналов, которые могут быть образованы трубками, проточными ячейками или другими устройствами для работы с текучими средами. Течение может контролироваться одним или более клапанами и насосами, которые селективно активируют для доставки требуемого реагента. Протокол может представлять собой протокол SBS, в котором реагенты, включающие совокупность типов нуклеотидов, ферментов (например, полимеразу) или других реакционных компонентов, доставляют к заданным участкам для достройки матричных цепочек. Система струйного контроля может быть подобной или функционировать подобно системам, рассмотренным в патентных документах US 2015/0079596 и US 2015/0045234, патентах US 8951781 и US 8173080, и в международных патентных заявках WO 2014/143010 и WO 2015/089092; содержание каждого из документов полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. После или во время каждого из событий встраивания считывающая схема может передавать сигналы электронной аналитической схеме.

В некоторых примерах осуществления система струйного контроля обеспечивает непрерывный поток реагентов. Однако в других примерах осуществления, установка 102 для обнаружения включает капельный манипулятор. Например, по меньшей мере одна подложка из верхней и нижней подложек 114, 108 может включать электроды для выполнения операций с каплями. Электроды могут быть чередующимися или распределенными по массиву 110 магнитных датчиков. В альтернативном варианте, в других примерах осуществления, массив 110 магнитных датчиков может быть расположен напротив электродов так, чтобы камера 118 располагалась между массивом

и электродами.

На Фиг. 2А и 2В представлены примеры устройства 200 GMR и устройства 205 TMR, соответственно. Как устройство 200 GMR, так и устройство 205 TMR включает пару ферромагнитных слоев, разделенных немагнитным слоем.

5 Как показано на Фиг. 2А, устройство 200 GMR включает первый ферромагнитный слой 210, немагнитный слой 212 и второй ферромагнитный слой 214. Немагнитный слой 212 расположен между ферромагнитным слоем 210 и ферромагнитным слоем 214. Ферромагнитный слой 210 и ферромагнитный слой 214 изготовлены из ферромагнитных сплавов. Немагнитный слой 212 представляет собой ультратонкий немагнитный электропроводный слой (например, слой меди).

10 На Фиг. 2А устройство 200 GMR показано в двух состояниях, причем направление намагничивания в ферромагнитном слое 214 фиксировано или "закреплено" с помощью пиннирующего слоя (не показан), расположенного поверх ферромагнитного слоя 214. Сначала, благодаря антиферромагнитной связи, магнитные моменты в ферромагнитном слое 210 и ферромагнитном слое 214 направлены в противоположных направлениях. Это состояние характеризуется высоким сопротивлением току (I). Медный немагнитный слой 212 в обычном состоянии представляет собой прекрасный проводник, но, если его толщина составляет лишь несколько атомов, рассеяние электронов приводит к значительному повышению сопротивления меди. Сопротивление этого слоя изменяется

15 в соответствии с относительной ориентацией спинов электронов, окружающих проводящий слой (т.е. немагнитный слой 212).

Затем под действием внешнего магнитного поля (H), которое разрушает антиферромагнитные связи и выравнивает магнитные моменты в ферромагнитном слое 210 и ферромагнитном слое 214, состояние устройства 200 GMR может изменяться.

25 Воздействие внешнего магнитного поля (H) изменяет (т.е. снижает) сопротивление устройства таким образом, что эта структура может быть применена для измерения внешнего поля. Для повышения чувствительности применяемые на практике устройства часто изготавливают из совокупности чередующихся магнитных и немагнитных слоев. Изменение сопротивления при действии магнитного поля на устройство 200 GMR

30 обычно может составлять от 10% до приблизительно 20%, что является существенной величиной по сравнению с максимальной чувствительностью в несколько процентов, характерной для магнитных датчиков других типов.

Как показано на Фиг. 2В, устройство 205 TMR включает ферромагнитный слой 210, немагнитный слой 212 и ферромагнитный слой 214. Однако в то время как немагнитный

35 слой 212 в устройстве 200 GMR проводит электричество, в устройстве 205 TMR немагнитный слой 212 представляет собой тонкий изолирующий слой.

Если два ферромагнитных слоя (например, ферромагнитный слой 210 и ферромагнитный слой 214) разделены тонким изолирующим слоем (например, немагнитным слоем 212), то электрическое сопротивление многослойной конструкции

40 в направлении, перпендикулярном пленке, изменяется в зависимости от ориентации вектора намагничивания ферромагнитных слоев благодаря спин-зависимому туннелированию электронов между двумя ферромагнитными слоями.

На Фиг. 2В показано устройство 205 TMR в двух состояниях, причем направление намагничивания в ферромагнитном слое 214 фиксировано или "закреплено" с помощью пиннирующего слоя (не показан), расположенного поверх ферромагнитного слоя 214. Сначала, когда направления векторов намагничивания двух ферромагнитных слоев противоположны, электроны с ориентацией спина, противоположной вектору намагничивания ферромагнитного слоя, не могут быть подвергнуты туннелированию.

Затем величина тока, создаваемого туннелирующими электронами, уменьшается (т.е. повышается сопротивление) по сравнению со случаем, в котором векторы намагничивания имеют одно и то же направление. Затем, когда направления векторов намагничивания двух ферромагнитных слоев совпадают, повышается вероятность туннелирования электронов между двумя ферромагнитными слоями через изолирующий слой, что приводит к повышению величины туннельного тока (т.е. к снижению сопротивления).

Геометрия устройства 200 GMR, показанного на Фиг. 2А, и устройства 205 TMR, показанного на Фиг. 2В, основана на параллельной анизотропии, что означает, что векторы намагничивания свободного и пиннингovanного слоев параллельны плоскости подложки. Однако массив 110 магнитных датчиков может быть образован на основании любой известной геометрии устройства GMR/TMR. В другом примере массив 110 магнитных датчиков может быть образован на основании такой геометрии устройства GMR/TMR, в которой вместо параллельной анизотропии применяют перпендикулярную анизотропию, что означает, что векторы намагничивания свободного и пиннингovanного слоев перпендикулярны плоскости подложки.

Для случая применения массива 110 магнитных датчиков на основе устройств GMR и/или устройств TMR в проточной ячейке 100 с целью обнаружения амплифицированных клональных кластеров ДНК или единичных цепочек ДНК, имеющих метки из, например, магнитных наночастиц и/или SMM, на Фиг. 3 показан пример графика 300 чувствительности биочипа с GMR, в котором применена единственная магнитная наночастица. Как видно из графика 300, экспериментальная зависимость напряженности однородного поля от предварительно амплифицированного сигнала показывает, что минимальное обнаруживаемое изменение напряженности поля составляет более 0,1 Эрстед. Единичная наночастица генерирует в области датчика однородное поле напряженностью 0,12 Эрстед (при моделировании), что указывает на возможность обнаружения биочипом с GMR единичной наночастицы (молекулы). Предполагается, что применение кластеров, включающих одну или более молекул матричной ДНК, повысит интенсивность считываемого сигнала.

На Фиг. 4 представлен вид поперечного сечения части установки 102 для обнаружения, показанной на Фиг. 1А и 1В, и более подробно показаны магниточувствительные датчики массива 110 магнитных датчиков. Как показано, установка 100 для обнаружения включает массив 110 магнитных датчиков, смонтированный на РСВ 112. На Фиг. 4 показано, что массив 110 магнитных датчиков включает совокупность магниточувствительных датчиков 130. В некоторых примерах осуществления магниточувствительные датчики 130 могут быть расположены рядами и колонками. Однако в зависимости от целевого применения могут быть выбраны другие схемы расположения датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков 130 может представлять собой, например, устройство на основе GMR (например, устройство 200 GMR, показанное на Фиг. 2А) или устройство на основе TMR (например, устройство 205 TMR, показанное на Фиг. 2В). Каждый из магниточувствительных датчиков 130 может включать немагнитный слой 212, расположенный между первым ферромагнитным слоем 210 и вторым ферромагнитным слоем 214. В этом примере первый ферромагнитный слой 210 каждого магниточувствительного датчика 130 ориентирован в направлении камеры 118. Кроме того, направление вектора намагничивания во втором ферромагнитном слое 214 фиксировано или "закреплено" с помощью пиннингующего слоя 216, расположенного вблизи второго ферромагнитного слоя 214. Несмотря на то, что на Фиг. 4 представлены только первый и второй

ферромагнитные слои 210, 214 и немагнитный слой 212, следует понимать, что другие примеры осуществления могут включать более двух ферромагнитных слоев и более одного немагнитного слоя, расположенного между соответствующими слоями.

5 Как показано, каждый из магниточувствительных датчиков 130 выполнен с возможностью обнаружения внешнего магнитного поля, локализованного или генерируемого в заданном или соответствующем пространстве 131 камеры 118. Используемый в настоящем описании термин "заданный участок" означает расположенное вблизи датчика пространство, в котором соответствующий магниточувствительный датчик может обнаруживать магнитную частицу или частицы. 10 Следует понимать, что размер и форма заданного участка может зависеть от совокупности факторов, таких как размер и сила действия магнитных частиц, конфигурация магниточувствительных датчиков (например, размер, форма и количество слоев) или чувствительность магниточувствительных датчиков. Таким образом, в зависимости от варианта применения, заданный участок может изменяться. Несмотря на то, согласно изобретению магниточувствительный датчик может обнаруживать 15 внешнее магнитное поле в пространстве, находящемся вблизи заданного участка в области датчика, такое внешнее магнитное поле может быть относительно слабым, и любые сигналы могут быть идентифицированы как шумы.

В показанном примере осуществления каждый из заданных участков представляет собой лишь небольшую часть или объем камеры 118, которая непрерывно пролегает 20 вдоль массива 110 магнитных датчиков таким образом, что соседние заданные участки не разделены физически ничем, кроме стенки. Однако в других примерах осуществления заданные участки могут быть физически отделены друг от друга. Например, каждый заданный участок может находиться в пределах лунки или углубления, ограниченного 25 одной или более стенками. Стенки могут разделять заданные участки. В тех примерах осуществления, которые включают капельные манипуляторы, после доставки реагентов в заданный участок заданный участок может быть занят каплей. В таких примерах осуществления заданные участки могут быть отделены друг от друга текучей заполняющей средой. Однако изобретение также включает пример, в котором одна 30 капля может занимать сразу совокупность заданных участков.

Кроме того, на Фиг. 4 показано, что установка 102 для обнаружения может включать слой 140, который расположен между магниточувствительными датчиками 130 и камерой 118. На Фиг. 4 также показано, что установка 102 для обнаружения может включать электропроводный слой 150, расположенный вдоль верхней подложки 114. 35 Электропроводный слой 150 на верхней подложке 114 может представлять собой, например, слой из золота или слой из оксида индия-олова (англ. indium tin oxide, сокращенно ИТО). В одном из примеров электропроводный слой 150 может быть применен в качестве базовой плоскости напряжения истока-стока, общей для всех магниточувствительных датчиков 130 массива 110 магнитных датчиков.

40 Слой 140 может быть сформован из любого гидрофильного материала, гидрофобного материала или комбинации гидрофильного и гидрофобного материала, подходящей для проведения химических взаимодействий на поверхности в камере 118. Толщина слоя 140 может составлять, например, от приблизительно 300 нм до приблизительно 400 нм. В одном из примеров слой 140 представляет собой покрытие из 45 полиакриламидного геля, такого как смесь норборнена (или норборнилена или норкамфена) и сополимера N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида с акриламидом, также называемого PAZAM. Более подробная информация о материале PAZAM имеется в патентной заявке US 13/784368, George et al., озаглавленной "Polymer Coatings

(Полимерные покрытия)", поданной 4 марта 2013 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

На Фиг. 4 показано, что в камере 118 на слое 140 иммобилизовано совокупность олигонуклеотидных праймеров 142, которые расположены в соответствии с магниточувствительными датчиками 130 массива 110 магнитных датчиков. В одном из примеров олигонуклеотидные праймеры 142 представляют собой праймеры захвата, с которыми гибридизуются одноцепочечные фрагменты ДНК, затем подвергаемые амплификации с образованием кластеров матриц клональных ДНК для SBS.

Как указано в настоящей работе, в некоторых примерах осуществления сигнал (сигналы), генерируемый во время реакции SBS, может быть получен, например, при встраивании нуклеотида (нуклеотидов), непосредственно или опосредованно меченного магнитной частицей, и обнаружен с помощью магниточувствительных датчиков 130, как более подробно рассмотрено ниже. Магнитная частица может быть, например, магнитной наночастицей или SMM.

#### 1.2. SBS с использованием магнитных наночастиц

В одном из примеров осуществления для обнаружения события встраивания нуклеотида, в магнитной биосенсорной схеме для SBS применяют функционализированные магнитные наночастицы и меченные гаптенем нуклеотиды. В одном из примеров нуклеотиды (A, G, C и T) представляют собой биотинилированные магнитные наночастицы с покрытием из стрептавидина. Например, для последовательного добавления нуклеотидов, в цикле SBS применяют единственный тип магнитной наночастицы и четыре (4) цикла операций с текучими средами / обнаружения.

На Фиг. 5-12 представлены различные способы, которые могут быть осуществлены с помощью систем и установок для обнаружения, рассмотренных в настоящей работе. Например, способ может включать предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Каждый из магниточувствительных датчиков может быть расположен вблизи соответствующего заданного участка с целью обнаружения на этом участке внешнего магнитного поля. Установка для обнаружения также включает совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Способ также включает осуществление совокупности событий SBS с целью выращивания комплементарной цепочки посредством встраивания нуклеотидов вдоль каждой матричной цепочки. По меньшей мере некоторые из нуклеотидов присоединены к соответствующим магнитным частицам, которые создают соответствующие магнитные поля. Каждое из совокупности событий SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, вызванных соответствующими магнитными полями, создаваемыми магнитными частицами. Способ также может включать определение последовательностей комплементарных цепочек. Последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

На Фиг. 5 представлена часть проточной ячейки 100, показанной на Фиг. 1A, 1B и 4, и представлен пример магнитной биосенсорной схемы 500 для SBS. Для захвата магнитной наночастицы с покрытием из стрептавидина и генерации подходящего для обнаружения сигнала, в магнитной биосенсорной схеме 500 для SBS применяют встроенный биотинилированный нуклеотид. В этом примере матричные цепочки 510 ДНК (т.е. матричные цепочки 510a и 510b ДНК), собранные в кластер в результате

амплификации, иммобилизованы на слое 140. Матричная цепочка 510a ДНК представляет собой одну из матричных цепочек первого клонального кластера, и матричная цепочка 510b ДНК представляет собой одну из матричных цепочек второго клонального кластера. С матричными цепочками 510a и 510b ДНК гибридованы, соответственно, праймеры 515a и 515b секвенирования. В реакции присоединения основания происходит встраивание биотинилированного нуклеотида 520, который достраивает праймер 515 секвенирования. Биотинилированный нуклеотид 520 более подробно рассмотрен при описании Фиг. 6. В одном из примеров биотинилированный нуклеотид 520 представляет собой дАТФ. Биотинилированный нуклеотид 520 встраивается в растущую комплементарную цепочку только на матрице 510b ДНК (т.е. дАТФ не комплементарна для добавления основания в соответствии с матрицей 510a ДНК). Раствор (не показан), содержащий совокупность магнитных наночастиц 525 с покрытием из стрептавидина, направляют в камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100. Магнитные наночастицы 525 могут представлять собой, например, суперпарамагнитные наночастицы, диаметр которых составляет от приблизительно 10 нм до приблизительно 50 нм. Магнитная наночастица 525 связывается с встроенным биотинилированным нуклеотидом 520 посредством образования комплекса связывания с биотином-стрептавидином. Несвязанные магнитные наночастицы 525 удаляют промывкой. Магнитная частица 525, связанная со встроенным нуклеотидом 520, изменяет сопротивление магнитного датчика 130b; при этом генерируются соответствующие электрические сигналы, которые измеряют. Если в области магнитного датчика 130a не имеется магнитной наночастицы 525, связанной с матричной цепочкой 510a ДНК/праймером 515a секвенирования, то сигнал, генерируемый магнитным датчиком 130a, отличается от сигнала, генерируемого магнитным датчиком 130b.

На Фиг. 6А представлена часть структурной формулы биотинилированного нуклеотида 520, показанного на Фиг. 5. Биотинилированный нуклеотид 520 включает биотиновую метку 610. Биотиновая метка 610 связана с основанием 615 нуклеотида 520 через отщепляемый линкер 620. 3'-Гидроксильная (ОН) группа нуклеотида 520 защищена блокирующей группой 625. После встраивания нуклеотида 520 в растущую цепочку комплементарной ДНК и обнаружения (магнитного биосенсорного обнаружения) события встраивания, комплекс биотина/стрептавидина и магнитной наночастицы может быть удален из нуклеотида 520 посредством отщепления отщепляемого линкера 620. После удаления комплекса биотина/стрептавидина и магнитной наночастицы, обнаруживаемый сигнал возвращается к фоновым уровням. Блокирующая группа 625 может быть удалена по реакции деблокирования, после чего возможно встраивание следующего комплементарного биотинилированного нуклеотида.

На Фиг. 6В представлена часть структурной формулы меченной магнитной частицей нуклеотида 650, который может быть применен в некоторых примерах осуществления. Нуклеотид 650 включает основание 655 и магнитную частицу 660, которая присоединена к гамма-фосфату 665 через линкер 670. Может быть применена совокупность различных линкеров и совокупность различных магнитных частиц.

На Фиг. 7 представлена блок-схема примера способа 700 определения основания в магнитной биосенсорной схеме для SBS с применением, например, проточной ячейки 100, показанной на Фиг. 1А, 1В и 4. Для определения основания в способе 700 применяют последовательное добавление биотинилированных нуклеотидов (т.е. одного нуклеотида за один раз) и одного типа магнитной наночастицы с покрытием из стрептавидина (SA). В одном из примеров в способе 700 применяют магнитную биосенсорную схему 500 для SBS, показанную на Фиг. 5, и биотинилированный нуклеотид 520, показанный на

Фиг. 6. Как показано на Фиг. 7, способ 700 включает рассмотренные ниже этапы, не ограничиваясь ими.

При выполнении этапа 710, первый биотинилированный нуклеотид 520 встраивается в растущие цепочки комплементарной ДНК в результате первой реакции присоединения основания, проводимой в цикле SBS. Первый биотинилированный нуклеотид 520 может быть доставлен к заданным участкам, содержащим матричные цепочки. Например, раствор, содержащий первый биотинилированный нуклеотид 520 (например, биотинилированный нуклеотид 520a), направляют в камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100 и через заданные участки, что позволяет первым биотинилированным нуклеотидам 520 достраивать растущие комплементарные цепочки. В другом примере капля раствора, содержащего первые биотинилированные нуклеотиды 520, может быть доставлена в каждый из заданных участков с помощью операций с каплями, рассмотренных в настоящей работе. Капля может занимать заданный участок в течение заранее определенного периода времени, позволяющего первым биотинилированным нуклеотидам 520 достраивать растущие комплементарные цепочки. В одном из примеров первый нуклеотид представляет собой биотинилированный дАТФ.

При выполнении этапа 715, магнитные наночастицы с SA (т.е. с покрытием из стрептавидина) вводят в проточную ячейку. Магнитные наночастицы с SA могут быть доставлены к заданным участкам, содержащим матричные цепочки, и может быть обнаружен первый сигнал. Например, раствор, содержащий магнитные наночастицы 525 с SA, может быть направлен в камеру 118 проточной ячейки 100. Магнитные наночастицы 525 с SA захватываются первыми биотинилированными нуклеотидами 520. Например, магнитные наночастицы 525 могут быть захвачены посредством образования на сайтах (кластерах) комплекса связывания с биотином/стрептавидином. В другом примере капля раствора может быть доставлена в каждый из заданных участков с помощью операций с каплями, рассмотренных в настоящей работе. Капля может занимать заданный участок в течение заранее заданного периода времени, которое позволяет магнитным наночастицам с SA присоединяться к меченым нуклеотидам. После присоединения магнитных частиц к меченым нуклеотидам может быть обнаружен первый сигнал. Сигнал может представлять собой изменение электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. Изменение электрического сопротивления может быть вызвано магнитной частицей (частицами), находящейся на заданном участке (участках).

При выполнении этапа 720, магнитные частицы могут быть удалены из меченых нуклеотидов. Например, комплексы магнитных наночастиц с биотином/стрептавидином могут быть удалены из встроенных нуклеотидов 520 посредством отщепления отщепляемого линкера 620. После удаления комплексов магнитных наночастиц с биотином/стрептавидином сигнал возвращается к фоновым уровням. Блокирующую группу 625 нуклеотидов 520 удаляют проведением реакции деблокирования, после чего может происходить встраивание следующего комплементарного нуклеотида.

Затем в способе секвенирования SBS выполняют последующие реакции присоединения основания. В конкретных примерах осуществления могут быть проведены вторая, третья и четвертая реакции присоединения основания. Например, раствор, содержащий второй биотинилированный нуклеотид 520 (например, биотинилированный нуклеотид 520b) направляют в камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100. В одном из примеров второй нуклеотид представляет собой биотинилированный дГТФ.

При выполнении этапа 725, в проточную ячейку вводят магнитные наночастицы с SA, и производят обнаружение второго сигнала. Например, магнитные наночастицы

525 захватываются посредством образования на сайтах (кластерах) комплекса связывания с биотином/стрептавидином и встраивания G, после чего производят обнаружение второго сигнала в области соответствующих магнитных датчиков 130.

При выполнении этапа 730, комплексы магнитных наночастиц с биотином/стрептавидином удаляют из встроенных нуклеотидов 520 посредством отщепления отщепляемого линкера 620. Блокирующую группу 625 нуклеотидов 520 удаляют проведением реакции деблокирования, что позволяет осуществлять последующее встраивание следующего комплементарного нуклеотида. Цикл SBS продолжают, выполняя третью реакцию присоединения основания. Например, раствор, содержащий третий биотинилированный нуклеотид 520 (например, биотинилированный нуклеотид 520с), направляют в камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100. В одном из примеров третий нуклеотид представляет собой биотинилированный дЦТФ.

При выполнении этапа 735, магнитные наночастицы с SA вводят в проточную ячейку, и производят обнаружение третьего сигнала. Например, магнитные наночастицы 525 захватываются посредством образования комплекса связывания с биотином/стрептавидином на всех сайтах (кластерах) и происходит встраивание C, и производят обнаружение третьего сигнала в области соответствующих магнитных датчиков 130.

При выполнении этапа 740, комплексы магнитных наночастиц с биотином/стрептавидином удаляют из встроенных нуклеотидов 520 посредством отщепления отщепляемого линкера 620. Блокирующую группу 625 нуклеотидов 520 удаляют проведением реакции деблокирования, что позволяет осуществлять последующее встраивание следующего комплементарного нуклеотида. Цикл SBS продолжают проведением четвертой реакции присоединения основания. Например, раствор, содержащий четвертый биотинилированный нуклеотид 520 (например, биотинилированный нуклеотид 520d), направляют в камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100. В одном из примеров четвертый нуклеотид представляет собой биотинилированный дТТФ.

При выполнении этапа 745, магнитные наночастицы с SA вводят в проточную ячейку, и производят обнаружение четвертого сигнала. Например, магнитные наночастицы 525 захватываются посредством образования комплекса связывания с биотином/стрептавидином на всех сайтах (кластерах) и происходит встраивание T, после чего производят обнаружение четвертого сигнала в области соответствующих магнитных датчиков 130.

При выполнении этапа принятия решения 750 определяют, требуется ли проведение еще одного цикла SBS, включающего добавление четырех оснований. Если требуется проведение еще одного цикла SBS, то способ 700 переходит к этапу 755. Если проведение еще одного цикла SBS не требуется, то способ 700 окончен.

При выполнении этапа 755, комплексы магнитных наночастиц с биотином/стрептавидином удаляют из встроенных нуклеотидов 520 посредством отщепления отщепляемого линкера 620. Блокирующую группу 625 нуклеотидов 520 удаляют проведением реакции деблокирования, что позволяет осуществлять последующее встраивание следующего комплементарного нуклеотида. В способе 700 выполняют возврат к этапу 710.

В другом примере в магнитной биосенсорной схеме для SBS с "2 метками" применяют меченные гаптенем нуклеотиды и два различных типа функционализированных магнитных наночастиц. В этом примере для установления различности оснований в цикле SBS применяют два цикла операций с текучими средами / обнаружения.

На Фиг. 8 представлена блок-схема примера способа 800 распознавания оснований

в магнитной биосенсорной схеме для SBS с "двумя метками" с использованием, например, проточной ячейки 100, показанной на Фиг. 1А, 1В и 4. На Фиг. 9 схематично представлена диаграмма, в которой наглядно показаны этапы способа 800, представленного на Фиг. 8. В одном из примеров в способе 800 для обнаружения встраивания А и С применяют биотинилированные нуклеотиды А с расщепляемой дисульфидной (SS) связью (А-LN3-SS-Биотин), биотинилированные нуклеотиды С (С-LN3-Биотин) и магнитные наночастицы с покрытием из стрептавидина (SA), и для обнаружения встраивания Т применяют меченные дигоксигенином (DIG) нуклеотиды Т (Т-LN3-DIG) и магнитные наночастицы с покрытием из антитела (или фрагмента антитела), специфичного по отношению к DIG. Нуклеотиды G не включают метки для обнаружения. Как показано на Фиг. 8, способ 800 включает рассмотренные ниже этапы, не ограничиваясь ими.

При выполнении этапа 810 в цикле SBS нуклеотиды встраиваются в растущие комплементарные цепочки. Нуклеотид может представлять собой А-LN3-SS-Биотин, С-LN3-Биотин, Т-LN3-Dig или немеченный G. Этот этап также наглядно представлен на схематичной диаграмме, показанной на Фиг. 9.

При выполнении этапа 815 производят обнаружение первого сигнала, генерируемого при встраивании нуклеотидов А или С. Например, с помощью магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100 производят обнаружение первого сигнала при встраивании нуклеотидов А или С. Раствор, содержащий магнитные наночастицы, имеющие покрытие из стрептавидина (SA), пропускают через камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100, и при встраивании А или С на сайтах (кластерах) образуются комплексы с биотином/стрептавидином. Этот этап также наглядно представлен на схематичной диаграмме, показанной на Фиг. 9.

При выполнении этапа 820 через камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100 пропускают раствор, который включает магнитные наночастицы, имеющие покрытие из анти-DIG (Anti-DIG NP), и реагент, расщепляющий дисульфидную связь (SS). Образование комплекса между встроенными нуклеотидами Т-LN3-DIG и анти-DIG NP селективно идентифицирует сайты (кластеры), на которых произошло встраивание Т. Реагент, расщепляющий SS связь, расщепляет дисульфидную связь во встроенных нуклеотидах А-LN3-SS-Биотин и эффективно удаляет комплексы с биотином/стрептавидином из нуклеотидов А, удаляя, таким образом, сигналы, которые могут генерироваться этими сайтами. Этот этап также наглядно представлен на схематичной диаграмме, показанной на Фиг. 9.

При выполнении этапа 825, производят обнаружение второго сигнала, свидетельствующего о встраивании нуклеотидов Т. Например, с помощью магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100 производят обнаружение второго сигнала, генерируемого при встраивании нуклеотидов Т. Также производят обнаружение сигнала, генерируемого при встраивании нуклеотида С. Этот этап также наглядно представлен на схематичной диаграмме, показанной на Фиг. 9.

При выполнении этапа 830 с помощью биоинформационного программного обеспечения выполняют наименование оснований. В этом примере встраивание А и С определяют по обнаружению первого сигнала. Встраивание Т и С определяют по обнаружению второго сигнала. Поскольку реагент, расщепляющий SS связь, пропускали через проточную ячейку при выполнении этапа 820, то сигнал, соответствующий встраиванию нуклеотидов А, отсутствует при обнаружении второго сигнала. Встраивание G определяют на основании отсутствия сигнала при первом и втором обнаружениях. Этот этап также наглядно представлен на схематичной диаграмме,

показанной на Фиг. 9.

При выполнении этапа принятия решения 835 определяют, требуется ли проведение еще одного цикла SBS. Если требуется проведение еще одного цикла SBS, то способ 800 переходит к этапу 840. Если проведение еще одного цикла SBS не требуется, то способ 800 окончен.

При выполнении этапа 840 проводят реакцию деблокирования и реакцию отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов блокирующей группы, чтобы она не препятствовала присоединению следующего нуклеотида в следующем цикле SBS. Реакцию отщепления применяют для удаления из встроенных нуклеотидов связанных с ними магнитных наночастиц и для возвращения сигнала к фоновым уровням. Затем в способе 800 выполняют возврат к этапу 810. Этот этап также наглядно представлен на схематичной диаграмме, показанной на Фиг. 9.

В других примерах осуществления магнитные частицы могут быть уже присоединены к одному или более нуклеотидам при добавлении нуклеотидов к комплементарной цепочке. Например, нуклеотиды, которые пропускают с потоком через камеру секвенирования для добавления к комплементарной цепочке, могут представлять собой A-LN3-SS-(Магнитная Частица), C-LN3-Биотин, T-LN3-(Магнитная Частица) и немеченый G. В таких примерах осуществления присоединение магнитных частиц к нуклеотидам A и T после добавления этих нуклеотидов к комплементарной цепочке не требуется. Напротив, может быть получен первый сигнал от встроенных нуклеотидов A и T. Например, с помощью магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100 производят обнаружение первого сигнала, генерируемого при встраивании нуклеотидов A или T.

Затем раствор, который включает реагент, расщепляющий дисульфид (SS), может быть пропущен через камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100. Реагент, расщепляющий SS связь, расщепляет дисульфидную связь во встроенных нуклеотидах A-LN3-SS-(Магнитная Частица), удаляя, таким образом, сигналы, которые могут генерироваться этими сайтами. Раствор, который включает магнитные частицы, выполненные с возможностью присоединения к C-LN3-Биотин, также может быть пропущен через камеру 118 секвенирования.

Затем может быть обнаружен второй сигнал, генерируемый при встраивании нуклеотидов T и нуклеотидов C. Например, с помощью магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100 производят обнаружение второго сигнала, генерируемого при встраивании нуклеотидов T и встраивании нуклеотидов C.

После обнаружения первого и второго сигналов с помощью биоинформационного программного обеспечения может быть выполнено наименование оснований. В этом примере встраивание A и T определяют по обнаружению первого сигнала. Встраивание T и C определяют по обнаружению второго сигнала. Поскольку через проточную ячейку пропускали реагент, расщепляющий SS связь, сигнал, получаемый при встраивании нуклеотидов A, отсутствует при обнаружении второго сигнала. Встраивание G определяют на основании отсутствия сигнала при первом и втором обнаружении.

Как указано выше, если не требуется проведение дополнительных циклов, то могут быть проведены реакция деблокирования и реакция отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов блокирующей группы, чтобы она не препятствовала присоединению следующего нуклеотида в следующем цикле SBS. Реакцию отщепления применяют для удаления из встроенных нуклеотидов связанных с ними магнитных наночастиц и для возвращения сигнала к фоновым уровням.

В другом примере для установления различности оснований в магнитной

биосенсорной схеме для SBS с "четырьмя метками" применяют модифицированные нуклеотиды и различные величины магнитных свойств. В одном из примеров различные величины магнитных свойств создаются путем захвата одной или более магнитных наночастиц на сайтах встраивания нуклеотида. Например, дАТФ подвергают модификации для обеспечения захвата одной магнитной наночастицы, дТТФ подвергают модификации для обеспечения захвата двух магнитных наночастиц, дЦТФ подвергают модификации для обеспечения захвата трех магнитных наночастиц, и дГТФ подвергают модификации для обеспечения захвата четырех магнитных наночастиц. В результате величина обнаруживаемого сигнала зависит от вида встроенного основания.

В одном из примеров для захвата одномолекулярного магнита (SMM), имеющего всего одну реакционноспособную группу (например, модифицированного малеимидом SMM), применяют модифицированный нуклеотид, включающий тиольную (SH) группу. Нуклеотид может включать одну, две, три или четыре тиольные группы и захватывать один, два, три или четыре модифицированных малеимидом SMM, соответственно.

Другим примером пары химических веществ, которая может быть применена в магнитной биосенсорной схеме для SBS с "четырьмя метками" с использованием модифицированных нуклеотидов и SMM, является пара альдегид (CHO)-аминооксигруппа (или гидразин).

В другом примере для модификации нуклеотида применяют до четырех ортогональных химических реагентов таким образом, при котором один нуклеотид может рекрутировать от 1 до 4 магниточувствительных гранул. Пример магнитной биосенсорной схемы для SBS с "четырьмя метками" более подробно рассмотрен при описании Фиг. 10.

В другом примере осуществления в магнитной биосенсорной схеме для SBS могут быть применены наночастицы, включающие различные парамагнитные материалы. Например, парамагнитные материалы выбраны таким образом, что каждый тип наночастицы имеет отличающуюся от других ответную реакцию на воздействие частоты прикладываемого внешнего магнитного поля. Некоторые парамагнитные частицы могут иметь настраиваемые резонансные частоты и не будут переходить в парамагнитное состояние или в достаточной степени следовать за прикладываемым внешним полем при неоптимальных частотах. Поскольку каждый тип наночастицы по-разному реагирует на прикладываемое внешнее поле, каждый из типов наночастиц может быть применен для установления различности оснований. Наночастицы, включающие различные парамагнитные материалы, могут быть применены, например, в магнитных биосенсорных схемах для SBS с использованием "одной метки", "двух меток" или "четырех меток".

В другом примере осуществления диаметр/объем наночастиц для каждого типа метки может быть различным. Например, при переходе от диаметра 10 нм к диаметру 50 нм происходит приблизительно 100-кратное изменение объема и приблизительно 25-кратное изменение площади поверхности (на сигнал влияют как объем, так и площадь поверхности).

На Фиг. 10 представлена блок-схема примера способа 1000 распознавания оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS с "четырьмя метками", в которой применяют, например, проточную ячейку 100, показанную на Фиг. 1А, 1В и 4. В этом примере дАТФ подвергают модификации для обеспечения захвата одной магнитной наночастицы (или SMM), дТТФ подвергают модификации для обеспечения захвата двух магнитных наночастиц (или SMM), дЦТФ подвергают модификации для обеспечения захвата трех магнитных наночастиц (или SMM), и дГТФ подвергают модификации для обеспечения

захвата четырех магнитных наночастиц (или SMM). Способ 1000 включает рассмотренные ниже этапы, не ограничиваясь ими.

При выполнении этапа 1010 цикла SBS нуклеотиды встраиваются в растущие комплементарные цепочки. Нуклеотид может представлять собой А, Т, С или G.

5 При выполнении этапа 1015 обнаруживают сигналы, соответствующие встроенным нуклеотидам. Например, сигналы, соответствующие встроенным нуклеотидам, обнаруживают с помощью магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100. Раствор, содержащий функционализированные магнитные наночастицы, пропускают через камеру 118 секвенирования проточной ячейки 100, и при встраивании А, Т, С или G на  
10 всех сайтах (кластерах) образуются комплексы нуклеотид/наночастица.

При выполнении этапа 1020 с помощью биоинформационного программного обеспечения выполняют наименование оснований в зависимости от величины магнитных свойств. В этом примере встраивание А обнаруживают по сигналу, имеющему первую величину, встраивание Т обнаруживают по сигналу, имеющему вторую величину,  
15 встраивание С обнаруживают по сигналу, имеющему третью величину, и встраивание G обнаруживают по сигналу, имеющему четвертую величину.

При выполнении этапа принятия решения 1025 определяют, требуется ли проведение еще одного цикла SBS. Если требуется проведение еще одного цикла SBS, то способ 1000 переходит к этапу 1030. Если проведение еще одного цикла SBS не требуется, то  
20 способ 1000 окончен.

При выполнении этапа 1030 проводят реакцию деблокирования и реакцию отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов блокирующей группы, чтобы она не препятствовала присоединению  
25 следующего нуклеотида в следующем цикле SBS. Реакцию отщепления применяют для удаления из встроенных нуклеотидов связанных с ними магнитных наночастиц и для возвращения сигнала к фоновым уровням. В способе 1000 выполняют возврат к этапу 1010.

В альтернативном примере осуществления, показанном на Фиг. 10, может быть выполнен способ SBS, включающий реакции, проводимые в одной емкости. В этом  
30 примере матричные цепочки могут быть иммобилизованы на поверхности, или на поверхности может быть иммобилизована полимеразы. Для выполнения реакции, проводимой в одной емкости, обратимо блокированные нуклеотиды, к которым присоединены магнитные частицы, подают одновременно с деблокирующим агентом. В тех примерах осуществления, в которых на поверхности иммобилизованы матричные  
35 цепочки, вместе с нуклеотидами и деблокирующим агентом может быть подана полимеразы.

При выполнении этапа 1010 нуклеотиды могут встраиваться в растущие комплементарные цепочки. При выполнении этапа 1015 производят обнаружение сигналов, соответствующих встраиванию нуклеотидов. В частности, при добавлении  
40 нуклеотида к комплементарной цепочке под действием полимеразы магниточувствительные датчики могут регистрировать изменение электрического сопротивления, вызванное присутствием магнитных частиц. Магнитные частицы могут создавать постоянное внешнее магнитное поле или в альтернативном варианте могут активироваться воздействием внешних факторов.

45 При выполнении этапа 1020 выполняют наименование оснований на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления. Например, встраивание А обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего первую величину, встраивание Т обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего вторую величину,

встраивание С обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего третью величину, и встраивание G обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего четвертую величину.

При выполнении этапа 1030 проводят реакцию деблокирования и реакцию отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов блокирующей группы, чтобы она не препятствовала присоединению следующего нуклеотида в следующем цикле SBS. Реакцию отщепления применяют для удаления из встроенных нуклеотидов связанных с ними магнитных наночастиц и для возвращения сигнала к фоновым уровням.

В примерах осуществления, проводимых в одной емкости, реагенты не включают 3'-блокирующие агенты или деблокирующие агенты. Для идентификации событий встраивания в режиме реального времени может отслеживаться изменение электрического сопротивления каждого магнитоочувствительного датчика. Такие примеры осуществления могут быть особенно подходящими для протоколов, подходящих для работы с единичными молекулами.

Поскольку в приведенном выше примере осуществления представлена реакция, проводимая в одной емкости, следует понимать, что этапы 1010, 1015 и 1030 могут происходить для различных матричных цепочек в различные моменты времени. В некоторых примерах осуществления один или более этапов можно регулировать. Например, этап 1030 может быть выполнен под действием внешних факторов, которыми воздействуют через систему. Кроме того, этап 1030 может быть выполнен в режиме реального времени. В альтернативном варианте этап 1030 может быть выполнен после осуществления совокупности событий встраивания или после завершения способа секвенирования SBS. В других альтернативных примерах осуществления, таких как протоколы, подходящие для работы с единичными молекулами, этап 1030 не выполняют.

### 1.3. SBS с применением одномолекулярных магнитов

В другом примере осуществления в магнитной биосенсорной схеме для SBS для установления различности оснований применяют нуклеотиды, меченные одномолекулярными магнитами (SMM). SMM относятся к классу металлоорганических соединений, проявляющих суперпарамагнитные свойства, например, они магнитны только при наличии внешнего магнитного поля. Магнитные свойства или состояния некоторых SMM могут быть изменены под воздействием внешних факторов. В одном из примеров магнитное состояние SMM может быть "переключено" под действием света. Например, световое излучение одной частоты может быть применено для переключения SMM в состояние "Вкл. (Включен)", и световое излучение другой частоты может быть применено для переключения SMM в состояние "Выкл. (Выключен)". Благодаря возможности перехода между магнитными состояниями, при многократной регистрации характеристик образца может быть повышено отношение сигнал/шум (С/Ш). Один или более SMM могут быть выбраны таким образом, чтобы размер SMM не препятствовал химическим реакциям нуклеотида. В одном из примеров размер SMM может составлять приблизительно 1,2 нм.

SMM, соответствующие магнитные свойства или состояния которых могут быть изменены при воздействии внешних факторов, рассмотрены в следующих публикациях: Feng et al., "Tristability in a Light-Actuated Single-Molecule Magnet (Тройная стабильность активируемого светом одномолекулярного магнита)", J. Am. Chem. Soc., 2013, 135 (42), стр. 15880-15884; **Mathonière** et al., "Photoinduced Single-Molecule Magnet Properties in a Four-Coordinate Iron(II) Spin Crossover Complex (Фотоиндуцируемые свойства одномолекулярного магнита в комплексе четырехкоординированного железа (II) со

спин-кроссовером)", J. Am. Chem. Soc., 2013, 135 (51), стр. 19083-19086; Christou et al. "Single-molecule magnets (Одномолекулярные магниты)", Mrs Bulletin 25.11 (2000): 66-71; "Single-molecule magnets and related phenomena (Одномолекулярные магниты и связанные с ними явления)", том 122 в "Structure and bonding Single-molecule magnets and related phenomena (Структура и связывание одномолекулярных магнитов и связанные с ними явления)", под ред. Richard Winpenny, Guillem **Aromí**, Springer (2006); Sato, "Switchable molecular magnets (Переключаемые молекулярные магниты)", Proc Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol, Sci. 11 июня 2012 г.; 88(6): 213-225; Sato (2003) "Optically switchable molecular solids: Photoinduced spin-crossover, photochromism, and photoinduced magnetization (Оптически переключаемые молекулярные твердые вещества: Фотоиндуцируемый спин-кроссовер, фотохромизм и фотоиндуцируемое намагничивание)", Acc. Chem. Res. 36, 692-700; Sato et al. (2007) "Control of magnetic properties through external stimuli (Контроль магнитных свойств с помощью внешних воздействий)", Angew. Chem. Int. Ed. 46, 2152-2187. Каждая из приведенных публикаций полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

В одном из примеров нуклеотид, меченный SMM, имеет по существу ту же структуру, что и нуклеотид 520, показанный на Фиг. 6. В этом примере биотиновая метка 610 заменена одним или более SMM.

В одном из примеров SMM применяют в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с четырьмя метками". В этом примере каждый нуклеотид (А, Г, С и Т) имеет метку из SMM, которая чувствительна к различным комбинациям Вкл./Выкл. частот светового излучения. Например, А имеет метку из первого SMM, который чувствителен к первой комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения, Г имеет метку из второго SMM, который чувствителен ко второй комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения, С имеет метку из третьего SMM, который чувствителен к третьей комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения, и Т имеет метку из четвертого SMM, который чувствителен к четвертой комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения.

На Фиг. 11 представлена блок-схема примера способа 1100 установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме "с четырьмя метками" для SBS с применением нуклеотидов, меченных SMM. В этом примере А имеет метку из первого SMM, который чувствителен к первой комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения, Г имеет метку из второго SMM, который чувствителен ко второй комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения, С имеет метку из третьего SMM, который чувствителен к третьей комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения, и Т имеет метку из четвертого SMM, который чувствителен к четвертой комбинации Вкл./Выкл. частот светового излучения.

При выполнении этапа 1110 цикла SBS нуклеотиды, меченные SMM, встраиваются в растущие комплементарные цепочки. Нуклеотид может представлять собой А, Г, С или Т.

При выполнении этапа 1115 для обнаружения встраивания первого нуклеотида, например, А, применяют первую комбинацию Вкл./Выкл. частот светового излучения. Например, для переключения метки SMM, находящейся на встроенном нуклеотиде А, применяют частоту "Вкл.", и производят обнаружение сигнала. Частоту "Выкл." светового излучения применяют для переключения SMM в состояние "Выкл." и для возвращения сигнала к фоновым уровням.

При выполнении этапа 1120 для обнаружения встраивания второго нуклеотида, например, Г, применяют вторую комбинацию Вкл./Выкл. частот светового излучения. Например, для переключения метки SMM, находящейся на встроенном нуклеотиде Г,

применяют частоту "Вкл.", и производят обнаружение сигнала. Частоту "Выкл." светового излучения применяют для переключения SMM в состояние "Выкл." и для возвращения сигнала к фоновым уровням.

5 При выполнении этапа 1125 для обнаружения встраивания третьего нуклеотида, например, С, применяют третью комбинацию Вкл./Выкл. частот светового излучения. Например, для переключения метки SMM, находящейся на встроенном нуклеотиде С, применяют частоту "Вкл.", и производят обнаружение сигнала. Частоту "Выкл." светового излучения применяют для переключения SMM в состояние "Выкл." и для

10 При выполнении этапа 1130 для обнаружения встраивания четвертого нуклеотида, например, Т, применяют четвертую комбинацию Вкл./Выкл. частот светового излучения. Например, для переключения метки SMM, находящейся на встроенном нуклеотиде Т, применяют частоту "Вкл.", и производят обнаружение сигнала. Частоту "Выкл." светового излучения применяют для переключения SMM в состояние "Выкл." и для

15 При выполнении этапа принятия решения 1135 определяют, требуется ли проведение еще одного цикла SBS. Если требуется проведение еще одного цикла SBS, то способ 1100 переходит к этапу 1140. Если проведение еще одного цикла SBS не требуется, то способ 1100 окончен.

20 При выполнении этапа 1140, проводят реакцию деблокирования и реакцию отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов блокирующей группы, чтобы она не препятствовала присоединению следующего нуклеотида в следующем цикле SBS. Реакцию отщепления применяют для

25 При выполнении этапа 1140, проводят реакцию деблокирования и реакцию отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов. В способе 1100 выполняют возврат к этапу 1110.

В другом примере нуклеотиды, меченные SMM, могут быть применены в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с четырьмя метками" с использованием различных величин магнитных свойств для установления различности оснований. В одном из примеров дАТФ имеет метку из одного SMM, дГТФ имеет метку из двух SMM, дЦТФ имеет метку

30 из трех SMM, и дТТФ имеет метку из четырех SMM. При этом величина обнаруживаемого сигнала зависит от типа встроенного основания.

На Фиг. 12 представлена блок-схема примера способа 1200 распознавания оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS "с четырьмя метками" с использованием нуклеотидов, меченных SMM с различными величинами магнитных свойств, для

35 установления различности оснований. В этом примере применяют единственный тип SMM, но каждый нуклеотид помечен различным количеством одномолекулярных магнитов (SMM). Например, дАТФ имеет метку из одного SMM, дГТФ имеет метку из двух SMM, дЦТФ имеет метку из трех SMM, и дТТФ имеет метку из четырех SMM. В способе 1200 применяют, например, проточную ячейку 100, показанную на Фиг. 1А,

40 1В и 4. Способ 1200 включает рассмотренные ниже этапы, не ограничиваясь ими.

При выполнении этапа 1210 в цикле SBS нуклеотиды, меченные SMM, встраиваются в растущие комплементарные цепочки. Нуклеотид может представлять собой А, G, С или Т.

При выполнении этапа 1215 производят обнаружение сигналов, соответствующих встраиванию нуклеотидов, с помощью, например, магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100. Первую частоту светового излучения применяют для переключения меток SMM в состояние "Вкл.", и производят обнаружение сигнала на всех сайтах (кластерах) при встраивании А, G, С или Т. Вторую частоту светового излучения применяют для

переключения меток SMM в состояние "Выкл." и для возвращения сигнала к фоновым уровням.

При выполнении этапа 1220 с помощью биоинформационного программного обеспечения выполняют наименование оснований в зависимости от величины магнитных свойств. В этом примере встраивание А обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего первую величину, встраивание G обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего вторую величину, встраивание С обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего третью величину, и встраивание Т обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего четвертую величину.

При выполнении этапа принятия решения 1225 определяют, требуется ли проведение еще одного цикла SBS. Если требуется проведение еще одного цикла SBS, то способ 1200 переходит к этапу 1230. Если проведение еще одного цикла SBS не требуется, то способ 1200 окончен.

При выполнении этапа 1230 проводят реакцию деблокирования и реакцию отщепления. Реакцию деблокирования применяют для удаления из встроенных нуклеотидов блокирующей группы, чтобы она не препятствовала присоединению следующего нуклеотида в следующем цикле SBS. Реакцию отщепления применяют для удаления меток SMM из встроенных нуклеотидов и для возвращения сигнала к фоновым уровням. В способе 1200 выполняют возврат к этапу 1210.

1.4. Функционализированная ДНК-полимераза в способах SBS с магнитным биосенсорным обнаружением

В другом примере осуществления для установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS применяют немеченые нуклеотиды и функционализированную ДНК-полимеразу. В одном из примеров к ДНК-полимеразе присоединен маркер из одномолекулярного магнита, и нуклеотиды адаптированы так, чтобы они имели различающиеся скорости встраивания при проведении SBS. Например, нуклеотид А модифицирован с целью достижения первой скорости встраивания, G модифицирован с целью достижения второй скорости встраивания, С модифицирован с целью достижения третьей скорости встраивания, и Т модифицирован с целью достижения четвертой скорости встраивания. Поскольку скорости встраивания каждого нуклеотида различаются, время пребывания ДНК-полимеразы на сайте (кластере) встраивания является функцией от типа встраиваемого основания. Примеры скоростей встраивания нуклеотидов представлены в Таблице 1.

**Таблица 1**

**Скорости встраивания нуклеотидов**

Нуклеотид	Скорость встраивания (мс)
дАТФ	10
дГТФ	100
дЦТФ	500
дТТФ	1000

В одном из примеров 3'-гидроксильная (ОН) группа сконструированных нуклеотидов не защищена блокирующей группой. В другом примере 3'-гидроксильная (ОН) группа сконструированных нуклеотидов защищена блокирующей группой.

В одном или более примерах осуществления, таких как примеры, рассмотренные

при описании Фиг. 13, протокол SBS может включать присоединение магнитных частиц к полимеразе. Магнитные частицы могут представлять собой, например, магнитные наночастицы или SMM. В частности, в одном или более примерах осуществления способ SBS может включать предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков. Установка для обнаружения может быть аналогична установкам, рассмотренным в настоящей работе. Каждый из магниточувствительных датчиков может быть расположен вблизи соответствующего заданного участка для обнаружения внешнего магнитного поля на этом участке. Установка для обнаружения также может включать совокупность цепочек матрицы нуклеиновой кислоты, расположенных в пределах соответствующих заданных участков. Матричные цепочки могут быть иммобилизованы на поверхности. В альтернативном варианте матричные цепочки могут быть заключены в пределах заданного объема, такого как лунка или гелевая матрица.

Способ также может включать проведение совокупности циклов SBS с целью выращивания комплементарной цепочки посредством добавления нуклеотидов вдоль каждой матричной цепочки под действием полимеразы. К полимеразе могут быть присоединены соответствующие магнитные частицы, генерирующие соответствующие магнитные поля. При добавлении нуклеотидов к матричным цепочкам под действием полимеразы, полимеразы может быть локализована на заданном участке. Таким образом, датчики могут обнаруживать магнитные поля, генерируемые магнитными частицами, присоединенными к полимеразе.

Каждый цикл SBS может включать определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков. В частности, обнаруженные изменения могут быть вызваны присутствием на заданных участках магнитных частиц во время добавления нуклеотидов с помощью полимеразы. Способ также может включать определение последовательностей комплементарных цепочек, рассмотренное в настоящей работе.

На Фиг. 13 представлена блок-схема примера способа 1300 установления различности оснований в магнитной биосенсорной схеме для SBS с помощью ДНК-полимеразы, меченной SMM, и нуклеотидов с различающимися скоростями встраивания. В этом примере нуклеотиды не заблокированы и имеют скорости встраивания, приведенные в Таблице 1.

При выполнении этапа 1310 в цикле SBS нуклеотиды встраиваются в растущие комплементарные цепочки. Нуклеотид может представлять собой А, G, C или T. В одном из примеров четыре нуклеотида, имеющие одинаковую продолжительность встраивания, запускают по отдельности. Затем отслеживают пребывание встраивающей полимеразы (которое, вероятно, составляет от приблизительно 30 мс до приблизительно 100 мс). В другом примере четыре нуклеотида, имеющие сильно различающиеся продолжительности встраивания, запускают одновременно.

При выполнении этапа 1315 производят обнаружение сигналов от SMM-маркера полимеразы. Например, с помощью магнитных датчиков 130 проточной ячейки 100 на каждом сайте встраивания нуклеотида обнаруживают сигнал от ДНК-полимеразы, меченной SMM. Световое излучение первой частоты применяют для переключения SMM-маркера полимеразы в положение "Вкл.", и при встраивании А, G, C или T производят обнаружение сигнала на всех сайтах (кластерах). Световое излучение второй частоты применяют для переключения SMM-маркера полимеразы в положение "Выкл." и для возвращения сигнала к фоновым уровням.

При выполнении этапа 1320 с помощью биоинформационного программного

обеспечения выполняют наименование оснований в зависимости от скорости встраивания нуклеотида. В этом примере встраивание А обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего первую продолжительность (например, приблизительно 10 мс), встраивание G обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего вторую продолжительность (например, приблизительно 100 мс), встраивание С обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего третью продолжительность (например, приблизительно 500 мс), и встраивание Т обнаруживают в результате появления сигнала, имеющего четвертую продолжительность (например, приблизительно 1000 мс).

При выполнении этапа принятия решения 1325 определяют, требуется ли проведение еще одного цикла SBS. Если требуется проведение еще одного цикла SBS, то в способе выполняют возврат к этапу 1310. Если проведение еще одного цикла SBS не требуется, то способ 1300 окончен.

Однако примеры осуществления настоящего изобретения не ограничены примерами осуществления, показанными на Фиг. 1А-13. Магнитные датчики (например, датчики на основе GMR и/или TMR) могут быть применены в комбинации с другими структурами, механизмами и/или системами, поддерживающими магнитную биосенсорную схему для SBS, примеры которой показаны и раскрыты в настоящей работе ниже со ссылками на Фиг. 14А-18.

На Фиг. 14А и 14В представлен вид сверху и вид поперечного сечения, соответственно, массива 110 магнитных датчиков в комбинации с примером полугидрофобной области, находящейся в проточной ячейке или капельном манипуляторе 1400. Проточная ячейка или капельный манипулятор 1400 включает массив 110 магнитных датчиков, расположенный на верхней по отношению к верхней подложке 114 поверхности РСВ 112, и электропроводный слой 150, рассмотренный при описании проточной ячейки 100, показанной на Фиг. 1А, 1В и 4.

Проточная ячейка или капельный манипулятор 1400 дополнительно включает полугидрофобную область 1410, расположенную поверх массива 110 магнитных датчиков. В этом примере полугидрофобная область 1410 включает подложку 1418. Подложка 1418 может, например, представлять собой стеклянную подложку или подложку КМОП. В одном из примеров подложка 1418 представляет собой подложку из диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ). Полугидрофобная область 1410 дополнительно включает совокупность нанолунок 1412, которые расположены в подложке 1418 в виде заданной схемы. Внутренние части нанолунок 1412 покрыты гидрофильным слоем 1414, образуя, таким образом, гидрофильные нанолунки 1412. На поверхность подложки 1418, находящуюся снаружи нанолунок 1412, нанесен гидрофобный слой 1416. Кроме того, внутри каждой из нанолунок 1412 имеются олигонуклеотидные праймеры 142.

Гидрофильный слой 1414 внутри нанолунок 1412 может состоять из любого гидрофильного материала, подходящего для проведения в капельном манипуляторе химических процессов, протекающих на поверхности. В одном из примеров гидрофильный слой 1414 представляет собой покрытие из полиакриламидного геля, такого как смесь норборнена (или норборнилена, или норкамфена) и сополимера N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида с акриламидом, также называемого PАЗАМ. В другом примере гидрофильный слой 1414 включает сополимер N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида с акриламидом и акрилонитрилом, также называемый PАЗАМ-РАN. В некоторых примерах осуществления PАЗАМ и/или PАЗАМ-РАN может быть модифицирован для придания ему термочувствительности, что приводит к образованию термочувствительного полиакриламидного геля. Более подробное описание материала PАЗАМ имеется в опубликованной патентной заявке

US 13/784368, George et al., озаглавленной "Polymer Coatings (Полимерные покрытия)", поданной 4 марта 2013 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Гидрофобный слой 1416 заполняет промежуточное пространство между нанолунками 1412. Гидрофобный слой 1416 может состоять из любого гидрофобного материала, подходящего для проведения в капельном манипуляторе химических процессов, протекающих на поверхности. В одном из примеров гидрофобный слой 1416 состоит из фтороктилтрихлорсилана (англ. fluoro-octyl-trichloro-silane, сокращенно FOTS), имеющего формальное наименование (тридекафтор-1,1,2,2-тетрагидрооктил) трихлорсилан. В другом примере гидрофобный слой 1416 состоит из фторированного фоторезиста (т.е. гидрофобного фторполимера), такого как фотодиэлектрик ALX2010, поставляемый Asahi Glass Co., Ltd. (Токуо, Япония), сокращенно AGC.

В проточной ячейке или капельном манипуляторе 1400 нанолунки 1412 расположены рядами и колонками и имеют положения, по существу соответствующие рядам и колонкам магнитных датчиков 130, находящихся в массиве 110 магнитных датчиков. Каждая нанолунка 1412 имеет определенную глубину и диаметр. В одном из примеров глубина нанолунок 1412 составляет приблизительно 350 нм, и диаметр составляет приблизительно 400 нм. В другом примере глубина нанолунок 1412 приблизительно 350 нм, и диаметр составляет приблизительно 500 нм.

На Фиг. 15А и 15В представлен вид сверху и вид поперечного сечения, соответственно, находящегося в проточной ячейке или капельном манипуляторе 1400 массива 110 магнитных датчиков в комбинации с другим примером полугидрофобной области 1410. В этом примере полярности гидрофильного слоя 1414 и гидрофобного слоя 1416 изменены на противоположные. Так, гидрофильный слой 1414 не находится в лунке по отношению к плоскости гидрофобного слоя 1416; гидрофильный слой 1414 находится на возвышении по отношению к плоскости гидрофобного слоя 1416. Например, нанолунки 1412 полугидрофобной области 1410, показанные на Фиг. 14А и 14В, заменены возвышениями 1420. На возвышениях 1420 имеется гидрофильный слой 1414 и олигонуклеотидные праймеры 142, в результате чего образуются гидрофильные возвышения 1420.

В этом примере проточной ячейки или капельного манипулятора 1400 гидрофильные возвышения 1420 расположены рядами и колонками и имеют положения, по существу соответствующие рядам и колонкам магнитных датчиков 130, находящихся в массиве 110 магнитных датчиков.

На Фиг. 16А и 16В представлен вид сверху и вид поперечного сечения, соответственно, части капельного манипулятора 1600, которая включает массив 110 магнитных датчиков для поддержки, например, магнитной биосенсорной схемы для SBS. Капельный манипулятор 1600 включает нижнюю подложку 1610 и верхнюю подложку 1612, которые разделены зазором 1614 для операций с каплями. Зазор 1614 для операций с каплями содержит заполняющую текучую среду 1616. Заполняющая текучая среда 1616 представляет собой, например, масло с низкой вязкостью, такое как кремнийорганическое масло или заполняющую текучую среду на основе гексадекана. Нижняя подложка 1610 включает набор 1605 электродов, который включает, например, различные линии электродов 1618 для операций с каплями (например, электродов электросмачивания), питающих различные электроды 1620 резервуара. Операции с каплями проводят на электродах 1618 для операций с каплями, на поверхности, выполненной с возможностью операций с каплями.

Как показано, массив 110 магнитных датчиков, который имеет размеры,

приблизительно совпадающие с размерами электродов 1618 для операций с каплями, может быть расположен в одной или более линий электродов 1618 для операций с каплями. В этом примере части верхней подложки 1612, находящиеся вблизи электродов 1618 для операций с каплями, могут включать пластину или электрод базового заземления (не показан), в то время как части верхней подложки 1612, находящиеся вблизи массива 110 магнитных датчиков, могут включать базовую плоскость или электрод напряжения истока-стока (не показан). Капля 1630 (например, капля образца или реагента) может быть перемещена посредством операций с каплей вдоль электродов 1618 для операций с каплями к массиву 110 магнитных датчиков, где могут быть выполнены определенные магнитные биосенсорные операции, такие как операции, рассмотренные при описании Фиг. 5-13.

В некоторых примерах осуществления один или более магниточувствительных датчиков может иметь возможность перемещаться относительно подложки для образца, на которой находится биологический или химический образец. Например, система секвенирования синтезом (SBS) может включать считывающую головку, имеющую кронштейн, и магниточувствительный датчик, присоединенный к кронштейну. Магниточувствительный датчик может включать один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR).

Система также может включать подложку для образца, имеющую поверхность подложки. Поверхность подложки выполнена с возможностью расположения совокупности цепочек матрицы нуклеиновой кислоты на заданных участках вдоль поверхности подложки. По меньшей мере одно из следующих устройств: считывающая головка и подложка для образца способны перемещаться относительно друг друга с целью расположения магниточувствительного датчика вблизи заданных участков при нахождении системы в рабочем режиме. В частности, магниточувствительный датчик расположен таким образом, который позволяет обнаруживать внешние магнитные поля, генерируемые магнитными частицами. Система также включает считывающую схему, которая соединена с возможностью связи с магниточувствительным датчиком. Считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов, которые соответствуют электрическому сопротивлению магниточувствительного датчика при его расположении на одном из заданных участков. Считывающая схема может быть аналогична считывающей схеме 106 (Фиг. 1).

На Фиг. 17 представлен вид такой системы сверху. В частности, на Фиг. 17 представлено вращающееся устройство 1700 на основе диска, в котором имеется один подвижный магнитный датчик для поддержки, например, магнитной биосенсорной схемы для SBS. Вращающееся устройство 1700 на основе диска включает дискообразную подложку 1710 (или подложку для образца), которая может представлять собой, например, подложку из полимерного компакт-диска (англ. compact disk, сокращенно CD). В поверхности дискообразной подложки 1710А имеется группа концентрических дорожек 1712 (или желобков). Вращающееся устройство 1700 на основе диска дополнительно включает магнитную считывающую головку 1714, расположенную на подвижном кронштейне 1716. Так, на одном конце подвижного кронштейна 1716 имеется шарнир (точка поворота), а на противоположном конце подвижного кронштейна 1716 находится магнитная считывающая головка 1714. Магнитная считывающая головка 1714 включает один магнитный датчик, такой как датчик на основе GMR и/или TMR, например, один из магнитных датчиков 130, рассмотренных выше и показанных на Фиг. 1А-4. Однако изобретение включает пример осуществления,

в котором магнитная считывающая головка может включать более одного магниточувствительного датчика.

Вращение дискообразной подложки 1710 во вращающемся устройстве 1700 на основе диска может быть осуществлено в соответствии со стандартной методикой CD. На концентрических дорожках 1712 может быть размещена совокупность, например, олигонуклеотидных праймеров 142 (не показаны). В этом случае олигонуклеотидные праймеры 142 также представляют собой праймеры захвата, на которых гибридизуются одноцепочечные фрагменты ДНК, которые могут быть амплифицированы с образованием кластеров клональных ДНК матриц для SBS.

В одном из примеров имеется приблизительно 10 концентрических дорожек 1712, содержащих приблизительно 100 кластеров на одной дорожке, что составляет приблизительно 1000 кластеров на диске. При вращении дискообразной подложки 1710 реагенты могут быть рассеяны и распределены по концентрическим дорожкам 1712 под действием центробежной силы. Затем с помощью одного магнитного датчика магнитной считывающей головки 1714 могут быть выполнены магнитные биосенсорные операции, например, приблизительно при 10 об./мин. Для качественного обнаружения необходимо, чтобы расстояние между магнитной считывающей головкой 1714 и магнитными частицами, встроенными или захваченными при проведении реакции встраивания нуклеотида во время SBS, было достаточно мало. Аспекты вращающегося устройства 1700 на основе диска включают недорогую подложку (например, CD подложку), снижение непроизводительных расходов на микроперекачивание текучих сред, высокую скорость работы с текучими средами, и, кроме того, датчик (датчики) может быть применен повторно, поскольку диск функционализирован специальным образом, подходящим для проведения SBS.

Несмотря на то, что в устройстве 1700 применяют вращающийся диск, изобретение включает применение других типов движения. Например, подложка для образца может включать ползунок. Для расположения магниточувствительных датчиков соответственно заданным участкам ползунок и/или считывающая головка могут быть подвижными. Например, ползунок и/или считывающая головка могут быть соединены функциональным соединением с двигателем.

По сравнению с традиционными системами оптического обнаружения, применяемыми при проведении SBS, устройства и способы для SBS согласно настоящему изобретению, в которых для поддержки магнитной биосенсорной схемы для SBS применяют массив магнитных датчиков, имеют определенные преимущества, неограничивающие примеры которых включают следующие:

(1) Небольшой размер - массив магнитных датчиков занимает намного меньше места, чем оптомеханические устройства. Например, 1-гигабитное устройство на основе массива магнитных датчиков может занимать площадь, приблизительно составляющую 13 см × 3 см × 0,1 см, в то время как оптомеханическое устройство может занимать площадь, приблизительно составляющую 5,08 см × 5,08 см × 5,08 см;

(2) Простота и низкая стоимость - для магнитной биосенсорной системы требуется только контроллер, в то время как для систем оптического обнаружения требуются столы поступательного перемещения, оптические компоненты и контроллер;

(3) Надежность - магнитная биосенсорная система не имеет хрупких движущихся деталей, в то время как системы оптического обнаружения имеют хрупкие движущиеся детали; и

(4) Скорость - магнитная биосенсорная схема может работать приблизительно в 6,5 раз быстрее прямой визуализации с применением КМОП и приблизительно в 100 раз

быстрее оптомеханических устройств XTen. Например, магнитное биосенсорное обнаружение может поддерживать скорость обработки данных, составляющую 3,2 Гбайт/сек; 1,6 миллиарда передач в секунду за Ввод/Вывод, что составляет 1,6 миллиарда кластеров в секунду.

5 На Фиг. 18А и 18В представлен вид сверху и вид поперечного сечения, соответственно, массива 110 магнитных датчиков в проточной ячейке или капельном манипуляторе 1800. Проточная ячейка или капельный манипулятор 1800 включает массив 110 магнитных датчиков, расположенный на верхней по отношению к верхней подложке 114 поверхности РСВ 112, и электропроводный слой 150, рассмотренный при описании проточной ячейки 100, показанной на Фиг. 1А, 1В и 4.

10 Проточная ячейка или капельный манипулятор 1800 дополнительно включает полугидрофобную область 1410, расположенную поверх массива 110 магнитных датчиков. В этом примере полугидрофобная область 1810 включает подложку 1818. Подложка 1818 может, например, представлять собой стеклянную подложку или подложку КМОП. В одном из примеров подложка 1818 представляет собой подложку из диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ). Полугидрофобная область 1810 дополнительно включает совокупность лунок 1812 (например, нанолунок), которые расположены в подложке 1818 в виде заданной схемы. Внутренние части нанолунок 1812 покрыты гидрофильным слоем 1814, образуя, таким образом, гидрофильные нанолунки 1812. На поверхность подложки 1818, находящуюся снаружи нанолунок 1812, нанесен гидрофобный слой 1816. Кроме того, внутри каждой из нанолунок 1812 имеются олигонуклеотидные праймеры 142.

Гидрофильный слой 1814 внутри нанолунок 1812 может состоять из любого гидрофильного материала, подходящего для проведения в капельном манипуляторе химических процессов, протекающих на поверхности. В одном из примеров гидрофильный слой 1814 представляет собой покрытие из полиакриламидного геля, такого как смесь норборнена (или норборнилен или норкамфен) и сополимера N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида с акриламидом, также называемого PZAM. В другом примере гидрофильный слой 1814 включает сополимер N-(5-азидоацетамидилпентил)акриламида с акриламидом и акрилонитрилом, также называемый PZAM-PAN. В некоторых примерах осуществления PZAM и/или PZAM-PAN может быть модифицирован для придания ему термочувствительности, что приводит к образованию термочувствительного полиакриламидного геля. Более подробное описание материала PZAM имеется в опубликованной патентной заявке US 13/784368, George et al., озаглавленной "Polymer Coatings (Полимерные покрытия)", поданной 4 марта 2013 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

40 Гидрофобный слой 1816 заполняет промежуточное пространство между нанолунками 1812. Гидрофобный слой 1816 может состоять из любого гидрофобного материала, подходящего для проведения в капельном манипуляторе химических процессов, протекающих на поверхности. В одном из примеров гидрофобный слой 1816 состоит из фтороктилтрихлорсилана (англ. fluoro-octyl-trichloro-silane, сокращенно FOTS), имеющего формальное наименование (тридекафтор-1,1,2,2-тетрагидрооктил) трихлорсилан. В другом примере гидрофобный слой 1816 состоит из фторированного фоторезиста (т.е. гидрофобного фторполимера), такого как фотодиэлектрик ALX2010, поставляемый Asahi Glass Co., Ltd. (Токио, Япония), сокращенно AGC.

В проточной ячейке или капельном манипуляторе 1800 нанолунки 1812 расположены в виде массива и имеют положения, которые по существу соответствуют массиву 110

магнитных датчиков 130. Как показано на Фиг. 18В, в каждой из нанолунок может находиться единственная полимеразы 1820, иммобилизованная в заданной области 1822 в пределах нанолунки 1812. Полимераза 1820 может быть иммобилизована в заданной области 1822 с помощью линкера, такого как линкеры, рассмотренные выше. Каждая из полимераз 1820 выполнена с возможностью захвата матричной цепочки, к которой присоединен праймер. На Фиг. 18В показан частично завершённый протокол SBS.

Если полимеразы 1820 иммобилизованы на поверхности, то в примерах осуществления могут быть выполнены различные протоколы, рассмотренные выше, в которых нуклеотиды метят магнитными частицами. Например, при наличии иммобилизованной на поверхности полимеразы могут быть выполнены способы, рассмотренные выше при описании Фиг. 7-12. Как указано в настоящей работе, по мере добавления магнитной частицы, присоединенной к нуклеотиду, к комплементарной цепочке в магниточувствительных датчиках 130 могут происходить изменения электрического сопротивления. В каждом цикле согласно примерам осуществления может быть произведена доставка одного нуклеотида за один раз, то есть должны быть выполнены четыре отдельных подцикла. В альтернативном варианте согласно примерам осуществления может быть произведена одновременная доставка двух или более нуклеотидов за один раз. Однако в других примерах осуществления протокол SBS может быть выполнен с помощью реакций, проводимых в одной емкости.

Несмотря на то, что приведенный выше пример был рассмотрен для случая полимеразы, иммобилизованной на поверхности лунки, изобретение включает возможность селективной локализации полимеразы на плоской поверхности.

На Фиг. 19 представлено устройство 1905 TMR на трех различных этапах 1951, 1952, 1953 выполнения протокола SBS. Устройство 1905 TMR может представлять собой магниточувствительный датчик, который может быть частью массива датчиков, встроенного в проточную ячейку и/или капельный манипулятор. Устройство 1905 TMR включает первый ферромагнитный слой 1910 (или слой для хранения информации), немагнитный слой 1912 и второй ферромагнитный слой 1914. Немагнитный слой 1912 включает тонкий изолирующий слой, например, из  $Al_2O_3$ . Как рассмотрено выше, если первый и второй ферромагнитные слои 1910, 1914 разделены немагнитным слоем 1912, то электрическое сопротивление такой многослойной конструкции в направлении, перпендикулярном пленке, изменяется в зависимости от ориентации вектора намагничивания ферромагнитных слоев 1910, 1914 благодаря спин-зависимому туннелированию электронов между двумя ферромагнитными слоями 1910, 1914. Как показано, устройство 1905 TMR включает разделительный слой 1916, состоящий из Ru, слой 1918, компенсирующий магнитный поток, и антиферромагнитный слой 1920. Устройство 1905 TMR соединено электрическим соединением с и расположено между линией 1922 записи (например, электропроводящей дорожкой) и линией 1924 считывания.

Как рассмотрено выше, если направления векторов намагничивания двух ферромагнитных слоев 1910, 1914 противоположны (как показано на третьем этапе 1953), электрон, имеющий ориентацию спина, противоположную направлению вектора намагничивания ферромагнитного слоя, не подвергается туннелированию. При этом ток, создаваемый туннелирующими электронами, уменьшается (т.е. повышается сопротивление) по сравнению с ситуацией, в которой направления векторов намагничивания одинаковы. Если направления векторов намагничивания двух ферромагнитных слоев 1910, 1914 одинаковые (как показано на первом и втором этапах 1951, 1952), то вероятность туннелирования электронов между двумя ферромагнитными слоями через изолирующий слой повышается, что приводит к повышению туннельного

тока (т.е. понижению сопротивления).

В примерах осуществления могут быть выполнены один или более способов, рассмотренных в настоящей работе. Например, перед проведением первого этапа 1951 матричные цепочки 1928 могут быть иммобилизованы на заданной области поверхности подложки 1926, и к ним присоединены праймеры. При проведении первого этапа 1951 нуклеотиды 1930 могут встраиваться в комплементарную цепочку, после чего могут быть добавлены магнитные частицы 1932, которые присоединяются к встроенным нуклеотидам 1930. В альтернативном варианте нуклеотиды 1930, присоединяемые к комплементарной цепочке, уже могут иметь присоединенные магнитные частицы 1932.

Магнитные частицы 1932 могут иметь магнитное свойство, которое приводит первый ферромагнитный слой 1910 к такому состоянию, в котором первый ферромагнитный слой 1910 сохраняет свое намагничивание после удаления магнитной частицы 1932, как показано на втором этапе 1952. В частности, намагничивание остается не временным, а постоянным до тех пор, пока оно не изменяется под действием линии 1922 записи.

Эта операция может быть аналогична операции запоминания энергонезависимым устройством памяти. В таких примерах осуществления устройство 1905 TMR может быть считано в заданные моменты времени и в течение заданного периода времени с помощью линии 1924 считывания. В таких примерах осуществления устройство 1905 TMR может обеспечивать более высокое отношение сигнал/шум, чем устройства TMR, которые не имеют слоев для хранения информации, сохраняющих свои магнитные состояния. После считывания устройства 1905 TMR, через линию 1922 записи может быть пропущен электрический ток, который изменяет намагничивание первого ферромагнитного слоя 1910. Затем, согласно протоколу SBS, может быть повторен другой цикл SBS.

Приведенное выше подробное описание примеров осуществления изобретения сопровождается графическими материалами, на которых представлены конкретные примеры осуществления настоящего изобретения. Другие примеры осуществления, включающие отличающиеся структуры и операции, не исключены из объема настоящего изобретения. Следует понимать, что в пределах объема настоящего изобретения могут быть внесены изменения в различные детали примеров осуществления. Кроме того, приведенное выше подробное описание предназначено для иллюстративных и неограничивающих целей.

В приведенных ниже пунктах формулы изобретения раскрыты определенные примеры осуществления настоящего изобретения. Таким образом, содержание пунктов формулы изобретения включено в подробное описание.

#### (57) Формула изобретения

##### 1. Система для секвенирования синтезом (SBS), включающая:

установку для обнаружения, включающую массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков включает по меньшей мере два ферромагнитных слоя и немагнитный слой, который разделяет два ферромагнитных слоя, и каждый из магниточувствительных датчиков образует один из следующих датчиков: датчик с гигантским магнитосопротивлением (GMR) или датчик с туннельным магнитосопротивлением (TMR), причем магниточувствительные датчики расположены в камере вблизи соответствующих заданных участков и выполнены с возможностью обнаружения магнитных частиц, относящихся к соответствующим заданным участкам;

при этом установка для обнаружения включает множество нанолунок, разделенных промежуточными пространствами, где заданные участки содержат гидрофильный слой

в пределах либо нанолунок, либо промежуточных пространств, и множество олигонуклеотидных праймеров захвата, иммобилизованных на указанном гидрофильном слое;

5 считывающую схему, соединенную с возможностью связи с магниточувствительными датчиками, где считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов, которые соответствуют величинам электрического сопротивления магниточувствительных датчиков; и

10 систему струйного контроля, которая выполнена с возможностью пропускания реагентов через камеру для выполнения протокола SBS, причем реагенты включают совокупность типов нуклеотидов, где считывающая схема выполнена с возможностью передачи сигналов после осуществления каждого события встраивания.

2. Система по п.1, в которой система струйного контроля выполнена с возможностью:

(а) первоначального подвода потоков нуклеотидов к заданным участкам для добавления нуклеотидов к комплементарным цепочкам; и

15 (б) последующего подвода потоков магнитных частиц к заданным участкам, что приводит к присоединению магнитных частиц к нуклеотидам в некоторых из заданных участков, и при этом магнитные частицы проявляют соответствующее подходящее для обнаружения магнитное свойство;

20 где считывающая схема выполнена с возможностью определения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков после выполнения этапа (б).

3. Система по п.1, в которой система струйного контроля выполнена с возможностью:

25 (а) доставки нуклеотидов к заданным участкам для добавления нуклеотидов к комплементарным цепочкам, где нуклеотиды включают по меньшей мере первые, вторые и третьи нуклеотиды, и первые, вторые и третьи нуклеотиды содержат различающиеся основания, при этом каждый из первых и вторых нуклеотидов имеет первую гаптенную метку, а третьи нуклеотиды имеют вторую гаптенную метку, которая отличается от первой гаптенной метки;

30 (б) доставки функционализированных магнитных частиц к заданным участкам для присоединения функционализированных магнитных частиц к первой гаптенной метке первых нуклеотидов и к первой гаптенной метке вторых нуклеотидов;

(с) доставки иным образом функционализированных магнитных частиц к заданным участкам для присоединения иным образом функционализированных магнитных частиц ко второй гаптенной метке третьих нуклеотидов;

35 где считывающая схема выполнена с возможностью определения электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков после выполнения этапа (б) и после выполнения этапа (с).

4. Система по п.1, где каждый заданный участок находится на гидрофильном слое, который окружен гидрофобным слоем.

40 5. Система по п.1, где каждый из нуклеотидов включает гаптенную метку и где система струйного контроля выполнена с возможностью последовательного добавления одного из нуклеотидов за один раз и функционализированных магнитных наночастиц, которые могут связываться с гаптенной меткой.

6. Способ секвенирования синтезом (SBS), включающий:

45 предоставление установки для обнаружения, которая включает массив магниточувствительных датчиков, где каждый из магниточувствительных датчиков расположен вблизи соответствующей заданной области для определения магнитного свойства этой области, и установка для обнаружения также включает полимеразу,

иммобилизованную на заданных областях, причем конфигурация полимеразы позволяет ей захватывать соответствующую матричную цепочку;

5 осуществление совокупности событий SBS для выращивания комплементарной цепочки посредством встраивания нуклеотидов вдоль соответствующей матричной цепочки, причем нуклеотиды присоединены к соответствующим магнитным частицам, имеющим соответствующие магнитные свойства, и каждое из совокупности событий SBS включает определение изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков, где изменения вызваны соответствующими магнитными свойствами магнитных частиц в результате добавления нуклеотидов к

10 комплементарной цепочке;

где нуклеотиды включают совокупность типов нуклеотидов, каждый из которых имеет разное количество магнитных частиц, присоединенных к нему, что дает варьирующую величину электрического сопротивления в течение совокупности заранее определенных периодов времени; и

15 определение генетических характеристик комплементарных цепочек на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, включая варьирующую величину электрического сопротивления в течение совокупности заранее определенных периодов времени.

7. Способ по п.6, в котором определение генетической характеристики комплементарных цепочек включает анализ обнаруженных изменений электрического сопротивления для определения того, образуют ли сигналы, полученные на основании обнаруженных изменений, заданную картину.

8. Способ по п.6, в котором определение генетических характеристик включает определение последовательностей комплементарных цепочек, причем

25 последовательности комплементарных цепочек определяют на основании обнаруженных изменений электрического сопротивления, которые наблюдаются в области магниточувствительных датчиков при протекании каждого из совокупности событий SBS.

9. Способ по п.8, в котором определение последовательностей комплементарных цепочек включает определение величин изменений электрического сопротивления в области магниточувствительных датчиков.

10. Способ по п.6, в котором совокупность типов нуклеотидов включает дАТФ, модифицированный одной магнитной наночастицей, дТТФ, модифицированный двумя магнитными наночастицами, дЦТФ, модифицированный тремя магнитными

35 наночастицами, и дГТФ, модифицированный четырьмя магнитными наночастицами.

11. Способ по п.10, в котором магнитные частицы представляют собой одномолекулярные магниты (SMM).

12. Способ по п.6, в котором каждое из совокупности событий SBS включает одновременную доставку совокупности типов нуклеотидов.

40 13. Способ по п.6, в котором каждая заданная область включает единственную матричную цепочку, которая захвачена полимеразой.

14. Способ по п.6, где магниточувствительные датчики включают магниторезистивный датчик.

15. Способ по п.6, где одна или более магнитных частиц связаны с гамма-фосфатом каждого нуклеотида, и при присоединении нуклеотида к комплементарной цепочке под действием полимеразы происходит высвобождение магнитной частицы.

16. Способ по п.6, где магнитные частицы вызывают постоянное изменение намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков, в результате чего

состояния намагничивания соответствующих магниточувствительных датчиков сохраняются после удаления магнитных частиц, причем способ включает изменение величины намагничивания по меньшей мере некоторых из магниточувствительных датчиков после считывания показаний этих магниточувствительных датчиков.

5 17. Способ по п.16, где считывание показаний магниточувствительных датчиков производят после удаления магнитных частиц.

10

15

20

25

30

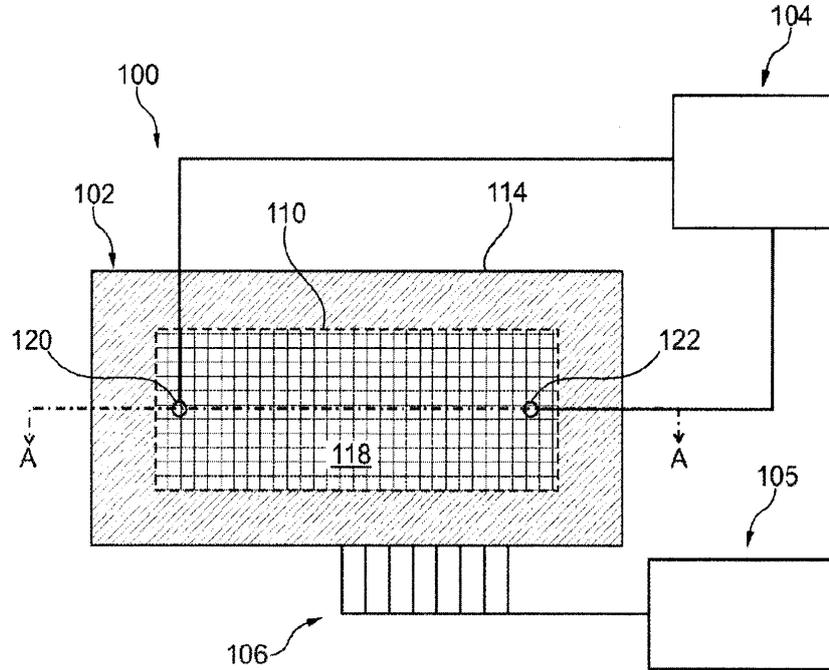
35

40

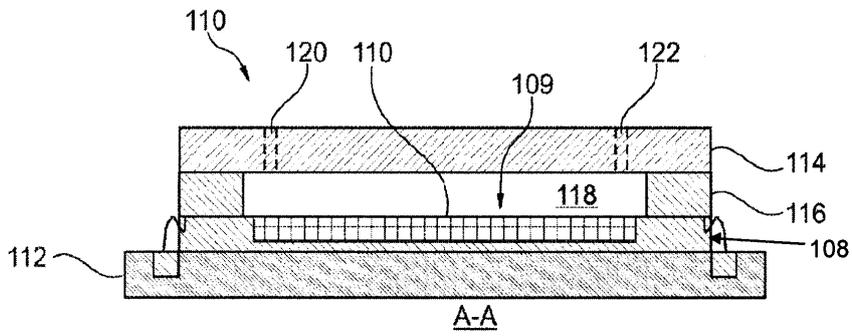
45

1

1



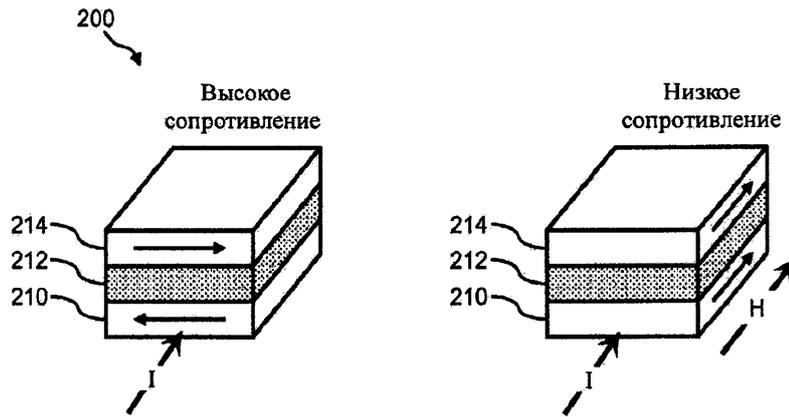
ФИГ. 1А



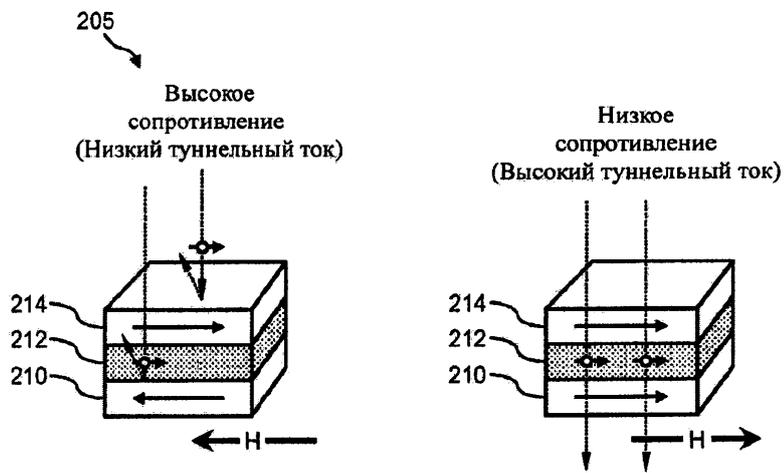
ФИГ. 1В

2

2

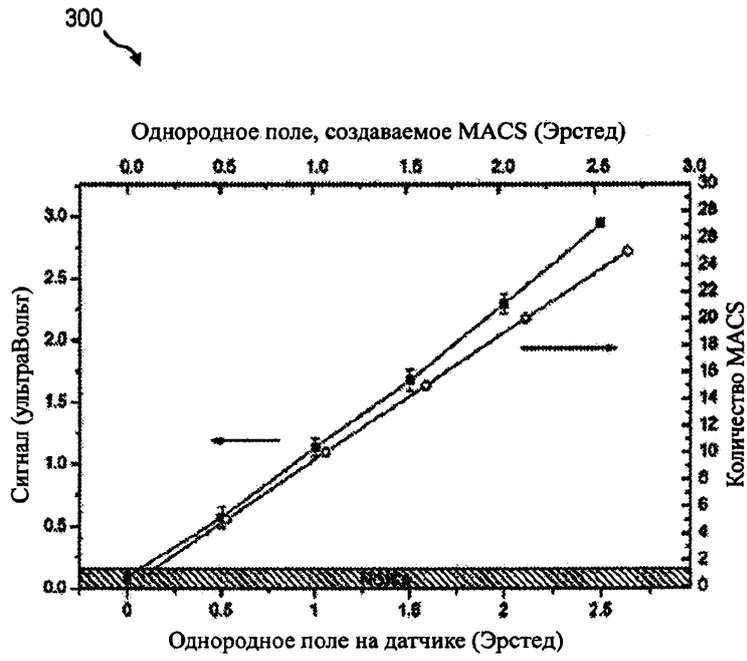


ФИГ. 2А



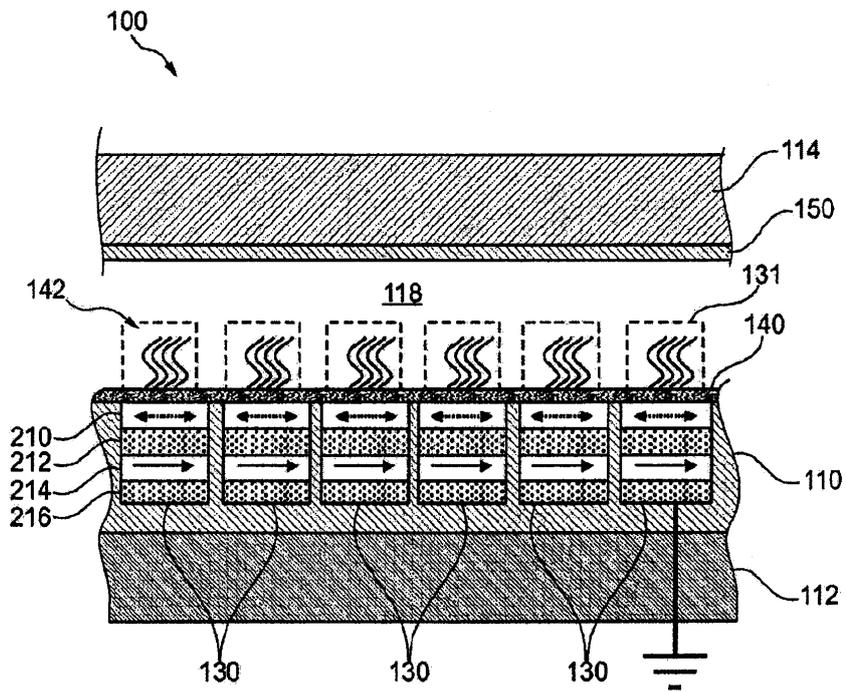
ФИГ. 2В

3



ФИГ. 3

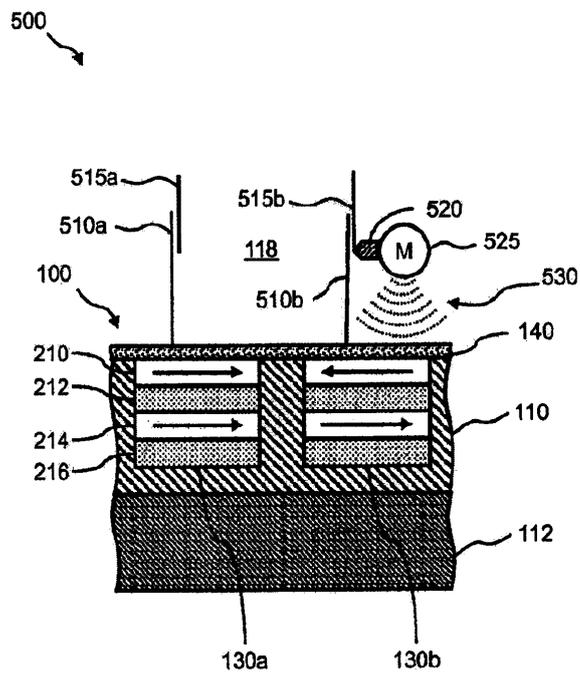
4



ФИГ. 4

5

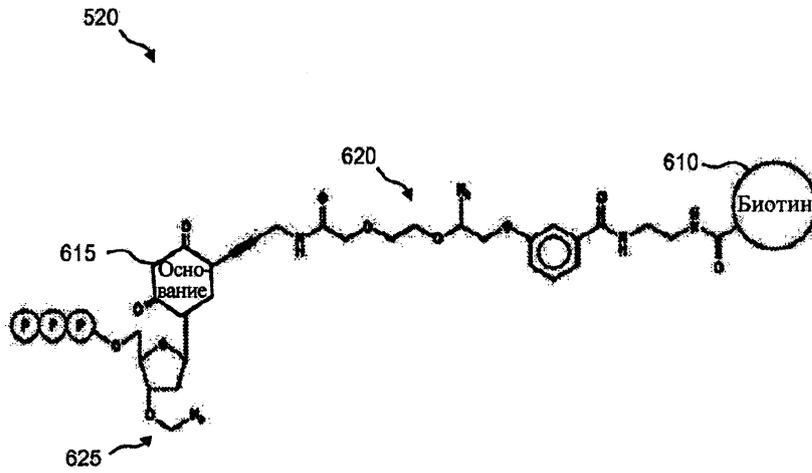
5



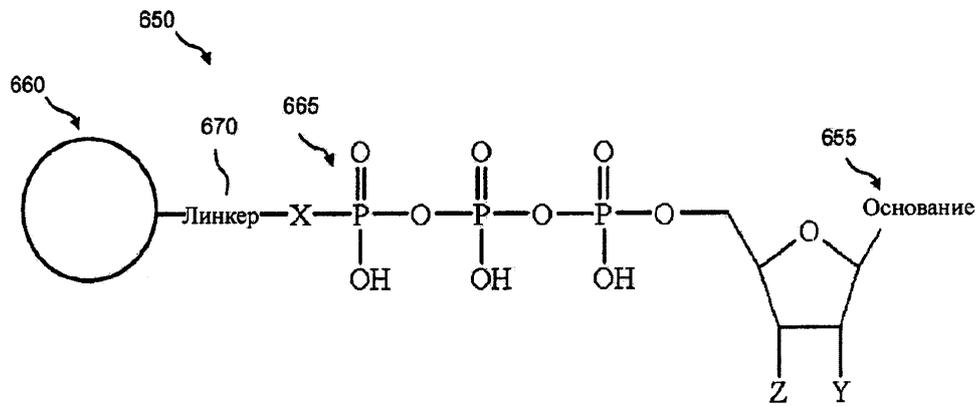
ФИГ. 5

6

6



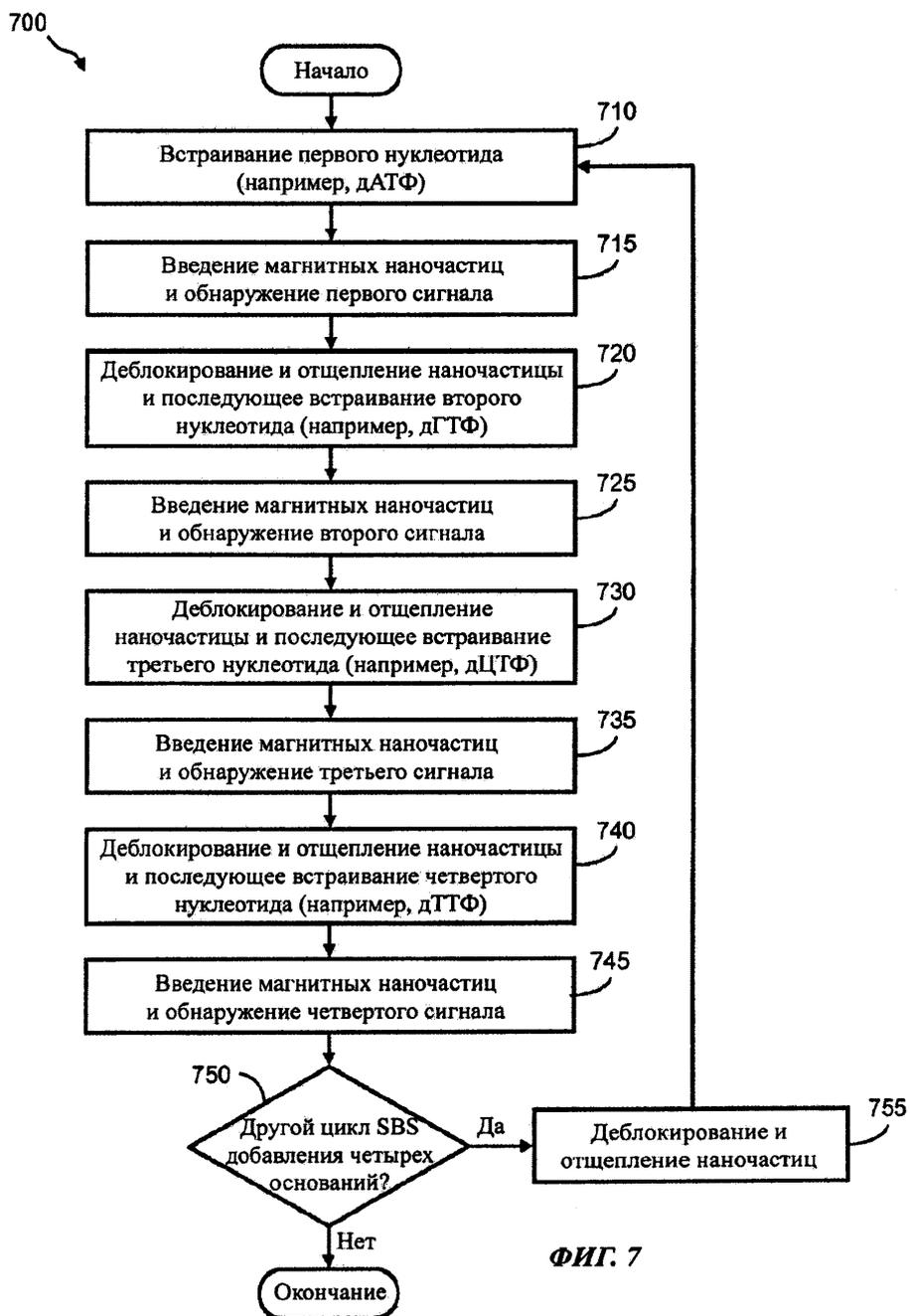
ФИГ. 6А



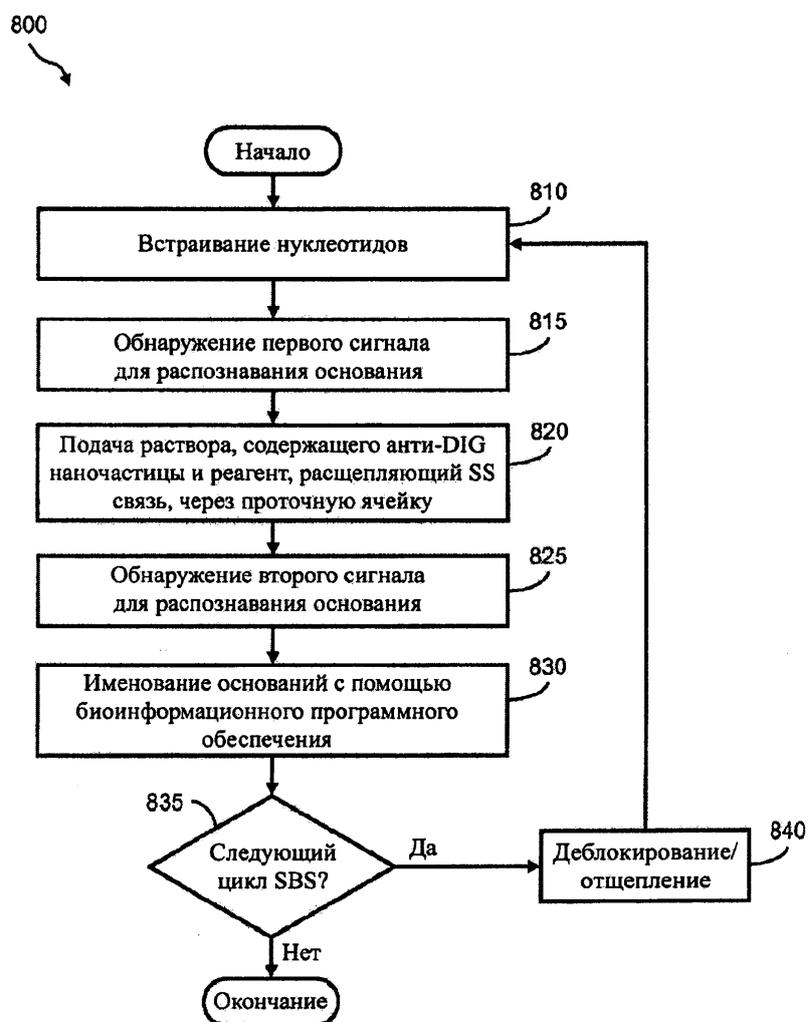
ФИГ. 6В

7

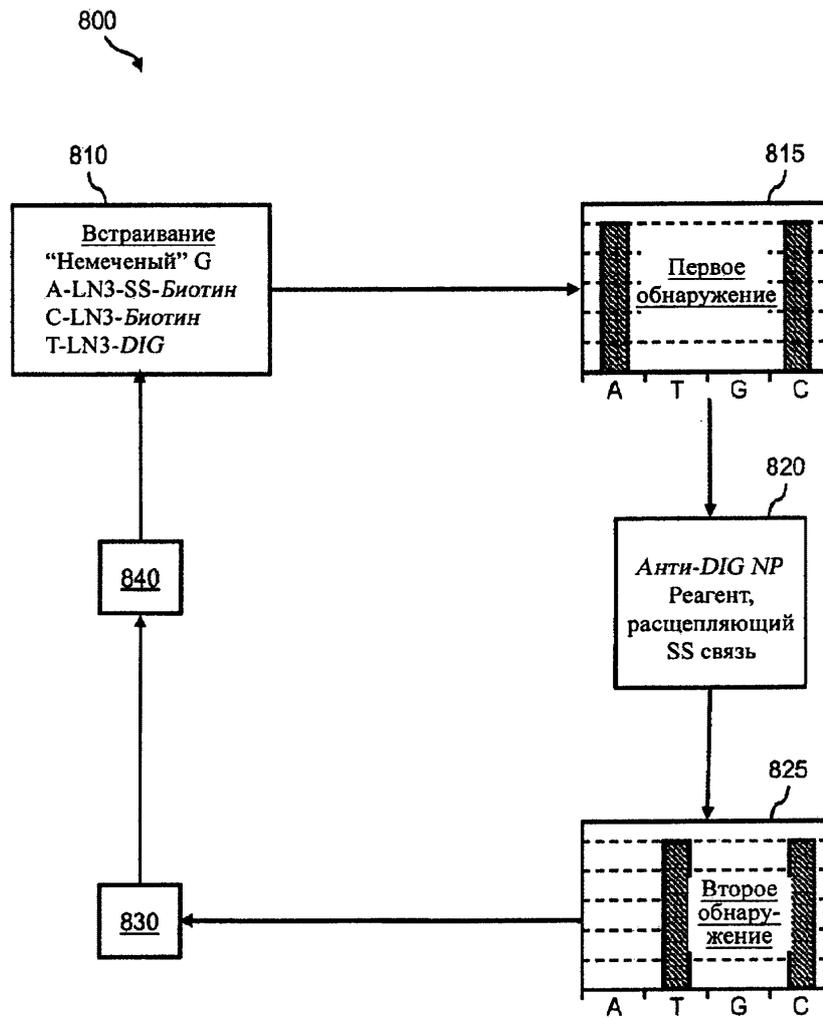
7



8

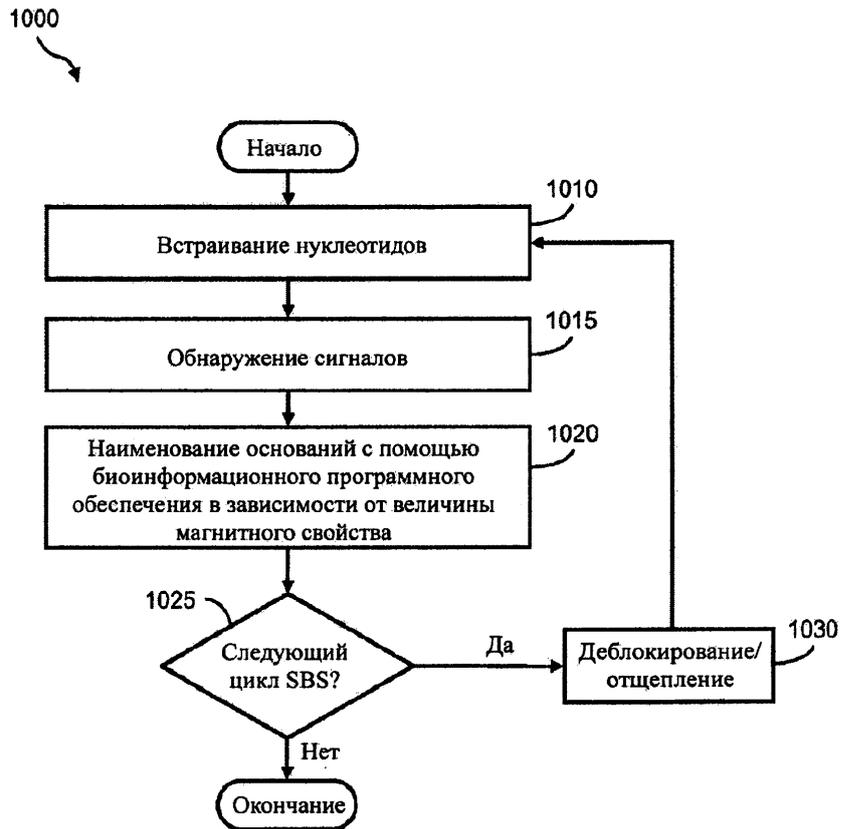


ФИГ. 8



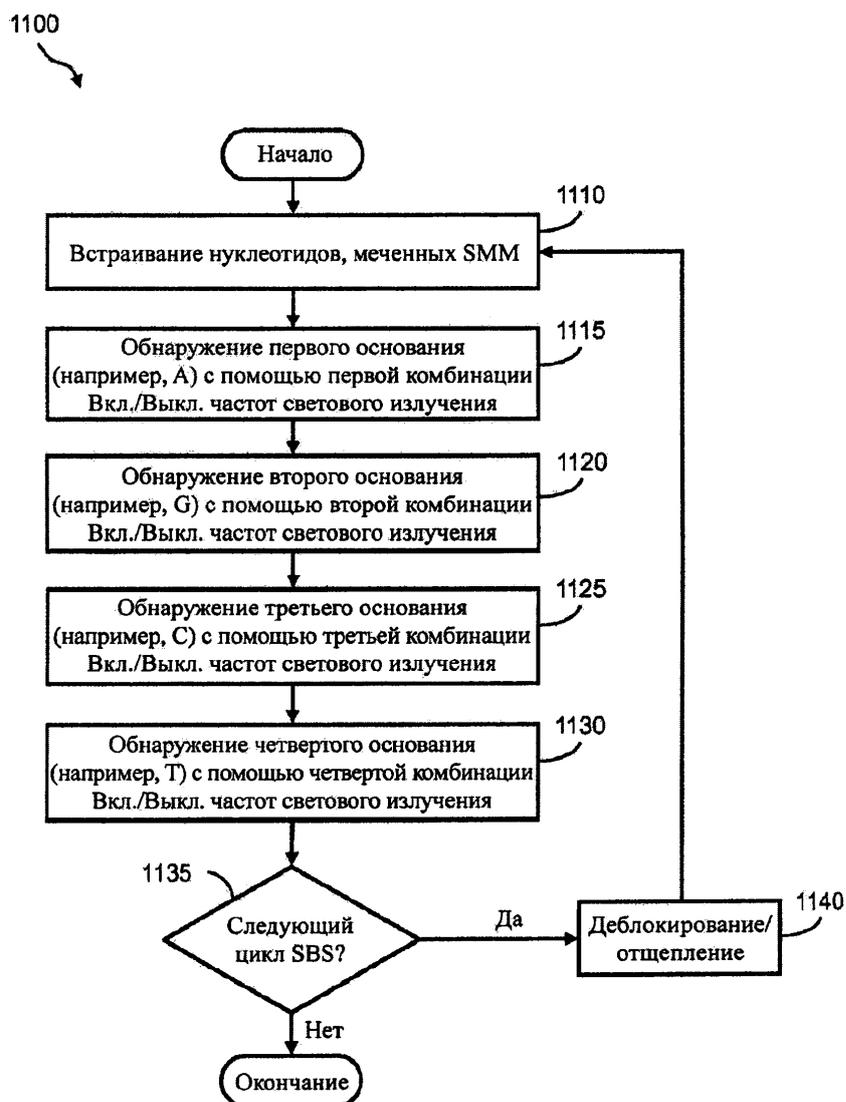
ФИГ. 9

10

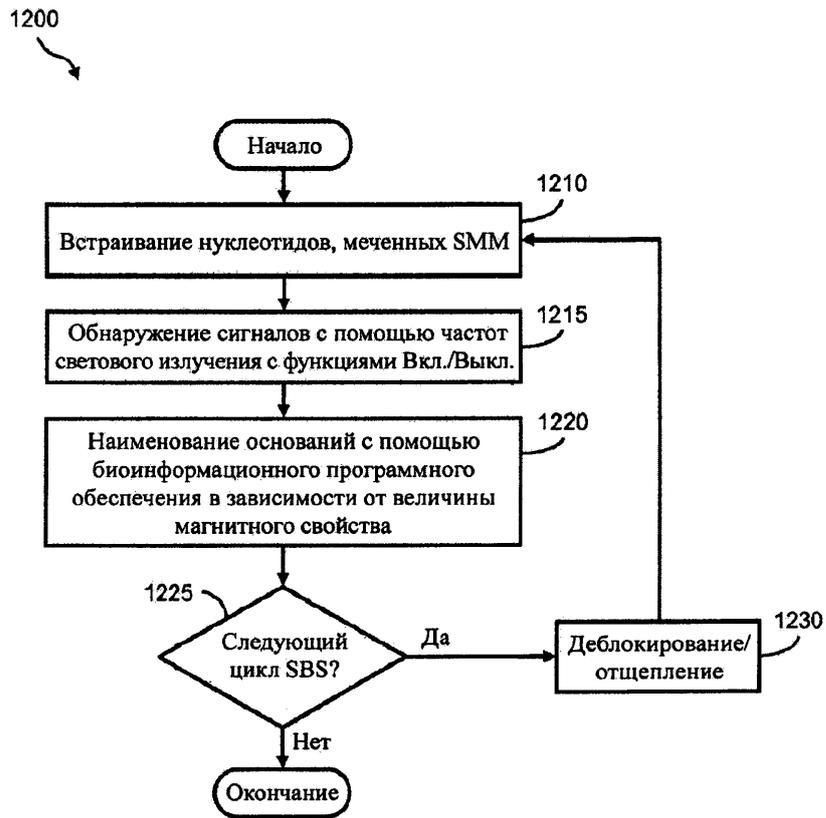


ФИГ. 10

11

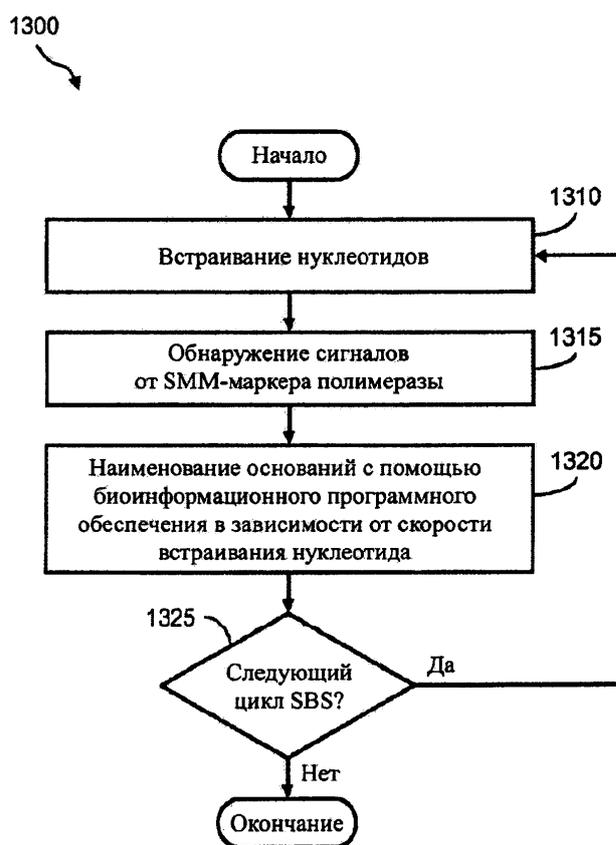


ФИГ. 11



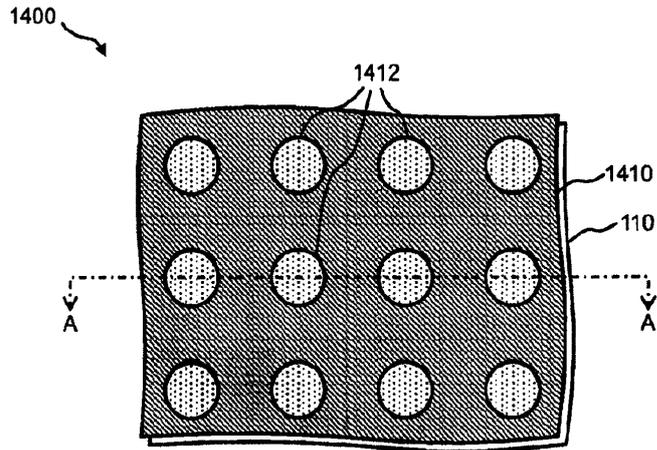
ФИГ. 12

13

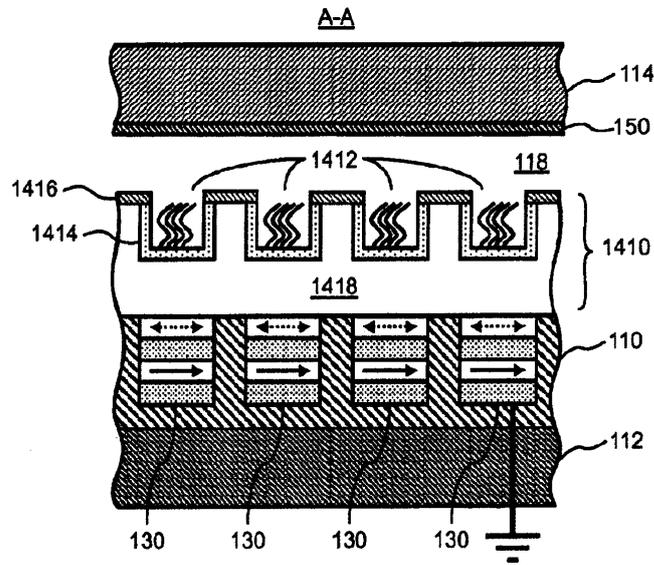


ФИГ. 13

14

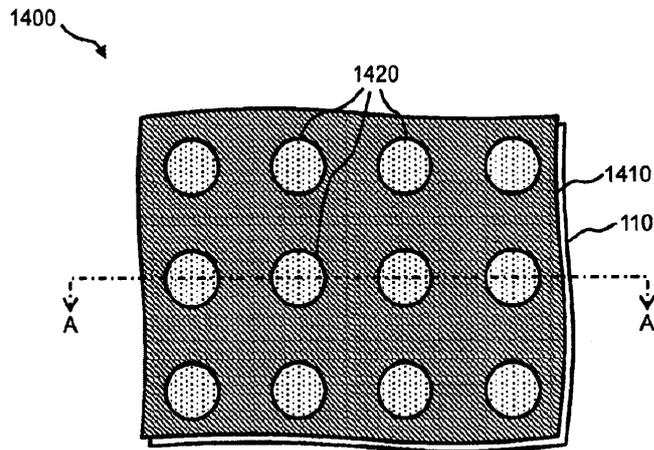


ФИГ. 14А

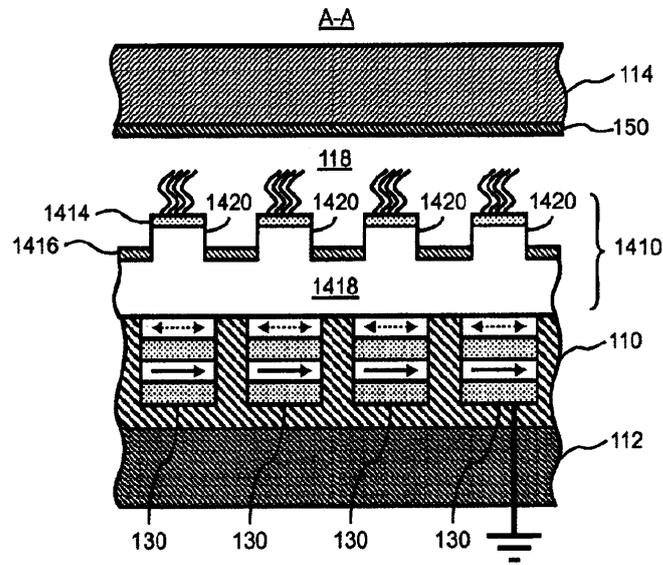


ФИГ. 14В

15

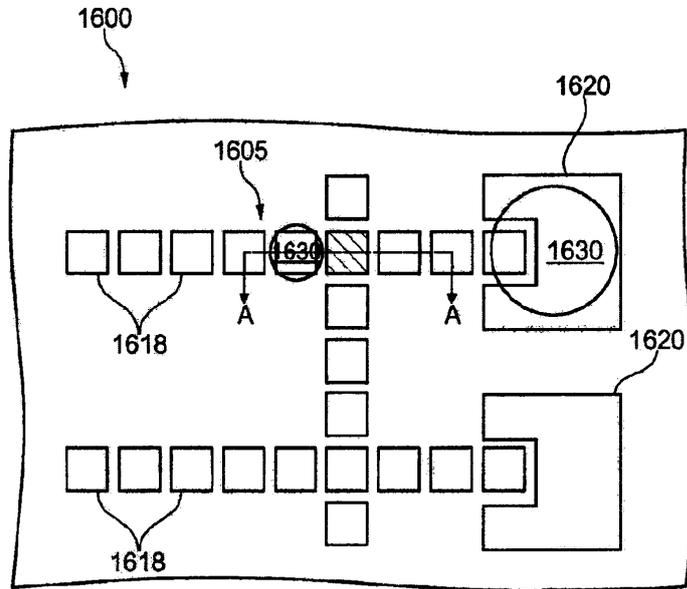


ФИГ. 15А

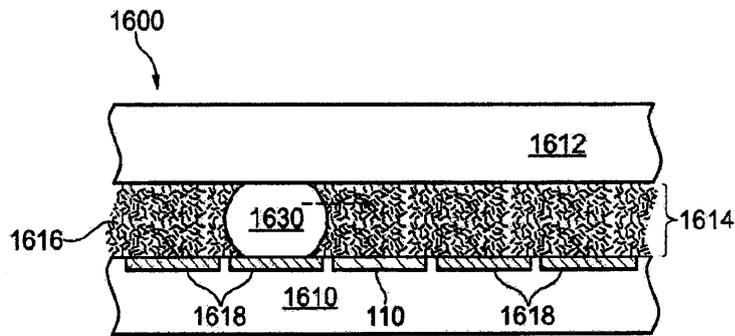


ФИГ. 15В

16

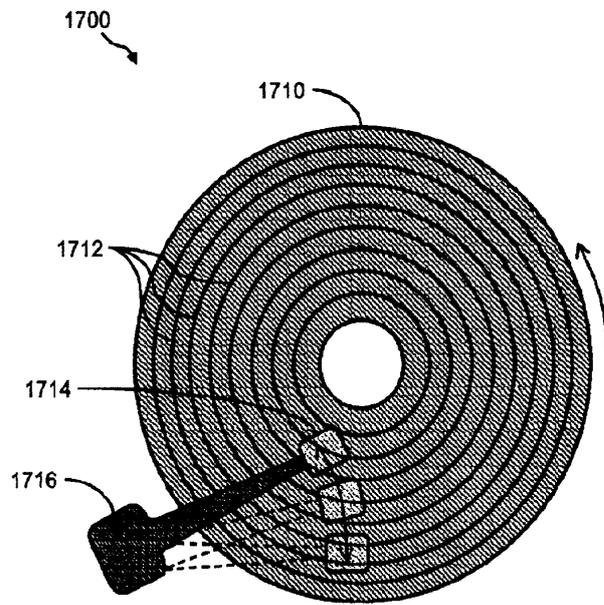


ФИГ. 16А



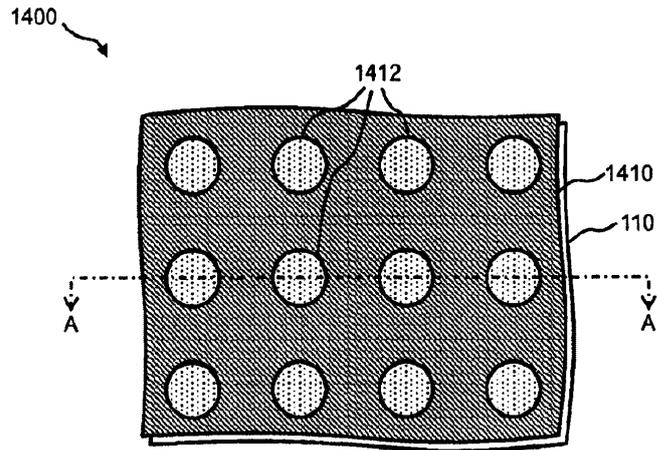
ФИГ. 16В

17

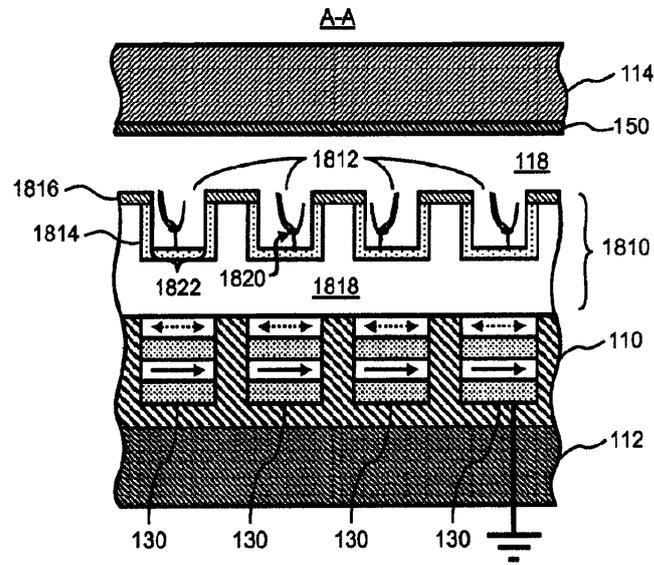


ФИГ. 17

18

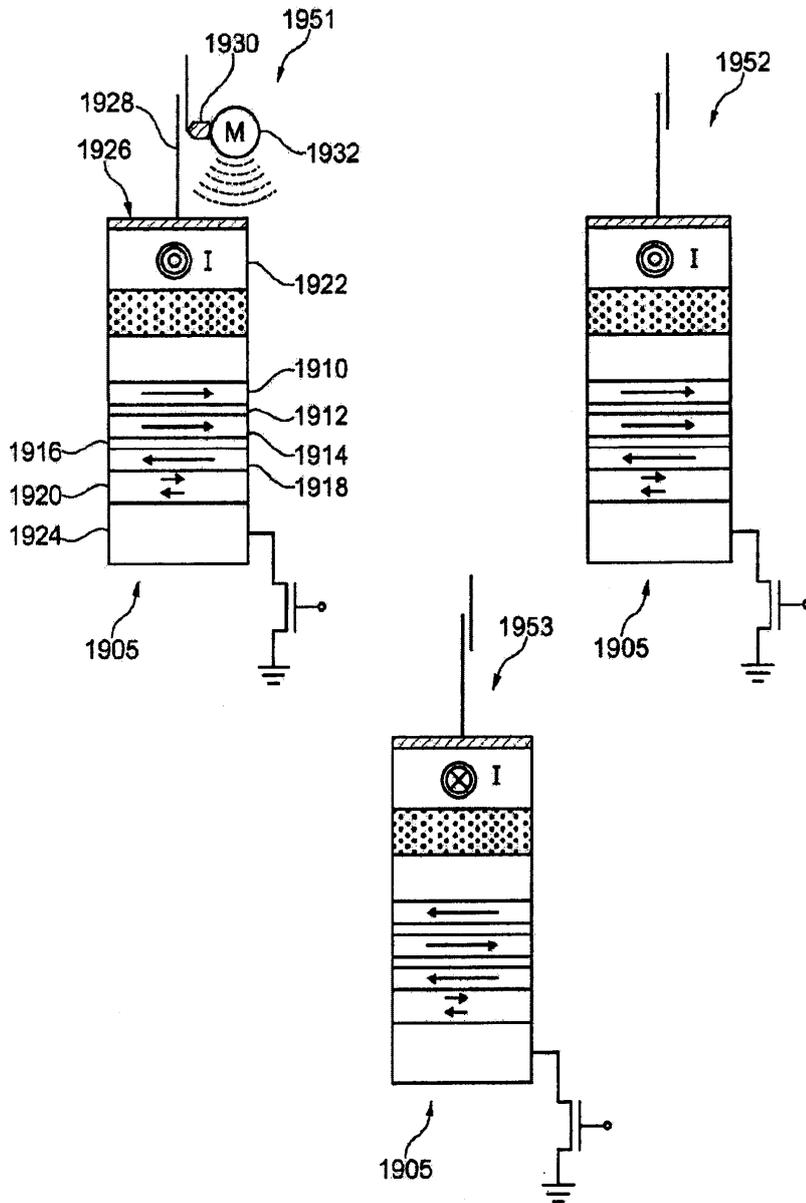


ФИГ. 18А



ФИГ. 18В

19



ФИГ. 19