(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108603227 A
(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680079832.4

(22)申请日 2016.11.18

(30)优先权数据
62/256,981 2015.11.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.07.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/062813 2016.11.18

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/087823 EN 2017.05.26

(71)申请人 卡利姆·U·米尔
地址 美国马萨诸塞州剑桥榆木大街

(72)发明人 卡利姆·U·米尔

(74)专利代理机构 北京京万通知识产权代理有限公司 11440
代理人 魏振华 万学堂

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6869(2018.01)

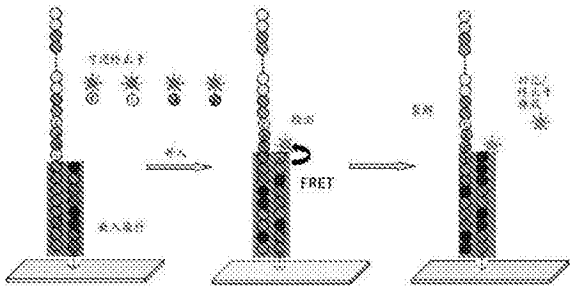
权利要求书2页 说明书63页 附图24页

(54)发明名称

超分辨率测序

(57)摘要

一种用于靶多核苷酸阵列的模板导向的边合成边测序的方法可以包括:(a)在流体容器中提供靶多核苷酸阵列;(b)使所述多核苷酸阵列与包含(i)聚合复合物和(ii)可逆终止且不同标记的A、C、G和T/U核苷酸的溶液接触;(c)使用所述聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述多核苷酸阵列中的至少一个核苷酸互补的链中;(d)使成像标签与步骤(c)的所述不同标记的核苷酸结合;(e)成像并存储步骤(d)的所述成像标签的属性和位置;(f)使终止(b)-(e)逆转;(g)重复步骤(b)-(e)并且由存储的所述成像标签的属性和位置组装所述靶多核苷酸阵列中的每一个多核苷酸的序列,任选地以均相或一锅反应的形式。本文描述了对靶多核苷酸测序的额外方法。



CN 108603227 A

1.一种用于靶多核苷酸阵列的模板导向的边合成边测序的方法,所述方法包括:

(a)在流体容器中提供靶多核苷酸阵列;

(b)使所述多核苷酸阵列与包含(i)聚合复合物和(ii)可逆终止且不同标记的A、C、G和T/U核苷酸的溶液接触;

(c)使用所述聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述多核苷酸阵列中的至少一个核苷酸互补的链中;

(d)使成像标签与步骤(c)的所述不同标记的核苷酸结合;

(e)成像并存储步骤(d)的所述成像标签的属性和位置;

(f)使终止(b)-(e)逆转;

(g)重复步骤(b)-(e)并且由存储的所述成像标签的属性和位置组装所述靶多核苷酸阵列中的每一个多核苷酸的序列,任选地以均相或一锅反应的方式。

2.根据权利要求1所述的方法,其中使所述标签结合包括多个、随机结合/去结合事件。

3.根据权利要求2所述的方法,其中为所述标签成像包括单分子定位和/或随机光学重建。

4.一种对靶多核苷酸测序的方法,所述方法包括:

(a)将所述靶多核苷酸置于焦平面中;

(b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)不同标记的A、C、G和T/U核苷酸,以及(iii)四种不同DNA PAINT成像链的溶液接触,其中每种不同标记的核苷酸包含结构N-X-LBP,其中N是核苷酸,X是可光裂解的接头,而LBP是包含DNA PAINT成像剂的对接位点的标记结合伴侣,并且其中LBP充当终止子(T):N-X-LBP(T)或单独的终止子通过可光裂解的接头与N连接:T-X-N-X-LBP;

(c)使用所述聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中;

(d)用第一波长的电磁辐射照射所述靶多核苷酸,检测对应于所述不同标记的核苷酸的属性的所得信号,并存储所述所得信号;

(e)任选地通过用第二波长的电磁辐射照射所述靶多核苷酸,去除步骤(b)的LBP和T;以及

(f)重复步骤(b)-(e)并由所述存储信号组装所述靶多核苷酸的序列,任选地以均相或一锅反应的形式。

5.一种对靶多核苷酸测序的方法,包括:

(a)将所述靶多核苷酸置于流体容器内;

(b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液接触,

其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构:

N-c-L(T)或T-c-N-c-L,

其中N是核苷酸,T是与N化学连接的终止子基团,而L是与N化学连接的标记,L(T)是充当终止子的标记,其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解接头;

(c)使用所述聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中;

(d)使用纳米级形貌成像聚点(PAINT)来鉴定所述不同标记的核苷酸;

(e)裂解所述可裂解接头,从而去除所述终止子基团和所述标记;以及

(f)重复步骤(b)-(e)并由所述存储信号组装所述靶多核苷酸的序列,任选地以均相或一锅反应的形式。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述靶多核苷酸置于表面上。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述靶多核苷酸被拉伸和/或伸长。

8.根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括在所述拉伸和/或伸长的靶多核苷酸上的多个位置处催发所述并入。

9.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述并入包括从切口延伸、从寡核苷酸延伸、使用不需要引物的DNA聚合酶、或从启动子转录。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中提供嵌入染料或荧光/发光实体作为RET供体,并且所述核苷酸上的所述标记为RET受体。

11.根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括同时对两个或更多个多核苷酸测序。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述标记核苷酸包含荧光有机染料或荧光纳米粒子。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述标记核苷酸包含猝灭剂。

14.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述标记包含结合对的第一伴侣。

15.根据权利要求14所述的方法,其中所述第二伴侣包含荧光标记的瞬时结合寡核苷酸。

16.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述标记是超分辨的。

17.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述成像或照射步骤还包括经由渐逝波提供电磁辐射。

18.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述成像或照射步骤还包括通过与金属的邻近相关效应来增强所述荧光。

19.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述成像或照射步骤还包括使用电场控制所述标记核苷酸的吸引和排斥。

20.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中组装所述序列包括单分子定位、随机光学重建显微术(STORM)、纳米级形貌成像聚点(PAINT)或受激发射损耗(STED)。

超分辨率测序

技术领域

[0001] 在各个方面和实施方案中，本发明涉及对靶多核苷酸测序的方法。

背景技术

[0002] 最初有两种成功的DNA序列测定方法：双脱氧链终止法(Sanger等人，Proc.Natl.Acad.Sci.,74:5463-5467(1977))和化学降解法(Maxam等人，Proc.Natl.Acad.Sci.,74:560-564(1977))。这些为核苷酸测序的方法既耗时又昂贵。对个体人类基因组、其他生物和病原体基因组的大规模测序的需求需要开发更低成本且更快速的替代方案。

[0003] 这导致了边合成边测序(SbS)的出现，这种测序已经成为占主导的下一代测序(NGS)技术(例如US5302509)，并且涉及在通过聚合酶模板导向并入延伸的DNA链期间或之后鉴定每个核苷酸。在一种SbS方法即焦磷酸测序(Ronaghi等人Science第281卷第5375期(1998))中，检测是基于焦磷酸(PPi)释放、其向ATP的转化以及萤火虫荧光素酶产生可见光的生物发光检测。Thermo Fisher的Ion Torrent平台以相同的方式进行测序，但检测质子而非tPPi的释放。这些SbS方法一次仅添加四种核苷酸ACGT中的一种，并且在靶标中存在均聚物运行时难以确定碱基的数量。还因为信号是可扩散的，所以此类方法在其通量上是有限的。当在一系列其他下一代测序方法中分析表面固定化反应时，可以实现高度平行分析。此外，同时添加四种核苷酸并通过用不同染料标记那些核苷酸中的一种或多种来对其进行区分是优选的，并且是由Illumina Inc.和Pacific Biosciences Inc.开发的方法的一部分。在Illumina测序中，链延伸是使用可逆终止子一个核苷酸一个核苷酸控制的。US5302509和Metzker等人(1994)公开了SbS策略，该策略涉及重复性碱基添加循环并且使用可逆终止子来防止一次添加多于一个碱基。对Illumina的核苷酸进行双重修饰(Bentley等人，Nature 456,53-59(2008))，使得在3'末端的碱基(是可裂解的)和封端基团或终止子上存在标记，这防止添加更多的核苷酸。一旦鉴定了所并入的核苷酸，就去除终止子以允许并入下一个核苷酸。Mir等人(Nucl.Acids Res.(2009)37(1):e5.)描述了基于连接的边合成边测序方法，并且这种方法被用于Applied Biosystem的SOLID测序技术中。Illumina的SbS是在克隆扩增子集群上进行的并且因为难以使得反应完成，所以该群体中不同分子的进展状态可能变得不同相。在任何给定的循环中，群体中的一个分子可添加与其他分子相比不同的碱基，导致来自每个集群的信号退化。随着合成的进行，群体中失去同步(例如错过添加/去除)的分子的数量将增加，并且非常快速地，不同步的分子的数量将超出保持同步的分子的数量。由于这种异步噪声(例如来自不同碱基的混合信号)，序列信号被遮蔽，并且无法在没有高误差的情况下继续获得。然而，为单个分子而不是分子全体测序时避免了这个问题，如Ely Michael Rabani在1996(WO1996027025A1)中所述，先前由Helicos Bio.开发。对单个分子的这种测序使样品制备更简单(Helicos)并且使得能够获得更长的读段长度(read length)(Pacific Biosciences)。

[0004] Illumina对可逆终止子方法的实现方式的问题在于：需要对固定在流动池中的靶

多核苷酸集群进行几个试剂交换步骤。在测序循环的每个步骤使用注射泵将驻留在流动池外部的试剂输送到流动池内，并且在测序循环的功能步骤之间需要几个洗涤步骤。这意味着在测序运行中要消耗大量的试剂，测序仪必须足够大以适应这种情况。因为提供的试剂过量，所以在测序运行中浪费了大量昂贵的试剂。相比之下，Pacific Biosciences不使用可逆终止子方法。通过将标记附连到末端磷酸(并入反应的天然离去基团)上，近实时地观察单个靶分子上的链延伸。这样的好处是可以在反应开始时装载测序所需的试剂，无需进一步的试剂交换。然而，这样的代价是无法停止反应以明确确定已经并入的碱基，因此误差率高。由于反应必须持续照射，因此对复合物也存在光致损伤，并且因为使用单个检测器一次只能对一个视野进行测序，所以该方法的通量低；增加检测器数量所产生的成本是令人望而却步的。Genia(被Roche收购)测序旨在使用类PacBio化学与纳米孔检测器，但通量和误差问题可能仍然存在(Kumar，Fuller等人)。一种雄心勃勃的不使用SbS的方法是由Oxford Nanopore Technology引入的纳米孔测序。但是，到目前为止，纳米孔检测的覆盖范围太大而无法达到所需的单碱基分辨率；误差率高且通量低。

[0005] 在分子测定领域，那些为均相一锅法的测定具有优势，因为不需要流体交换或洗涤步骤。在成像中，2014年诺贝尔化学奖授予超分辨率方法，其使得成像方法超出了光衍射极限。这两种方法构成了本发明中描述的发明的基石。

发明内容

[0006] 本发明提供了克服现有技术中公开的方法的缺点的测序方法。本发明涉及SbS，其包括模板衍生化链延伸，其中测序循环包括确定增长链中的单个核苷酸。每个测序循环包括多个步骤，并且进行多个测序循环对模板进行测序，其优点是可以在同一反应体积内为大量模板并行测序。通常，测序假定靶多核苷酸含有与所并入的核苷酸互补的核苷酸(测序误差是这种假设不成立的情况的实例)。

[0007] 该方法需要靶多核苷酸充当模板衍生化链延伸的模板、可检测(例如荧光)标记的或者可以变成可检测(例如荧光)标记的修饰核苷酸、和聚合复合物。在一些实施方案中，聚合复合物包含聚合剂(例如DNA聚合酶)和3'羟基末端(例如来自退火至单链靶标的引物或双链模板的一条链中的切口)。在这种情况下，核苷酸为脱氧核糖核苷酸。在一些实施方案中，聚合复合物包含聚合剂(例如RNA聚合酶)和启动子序列。在这种情况下，核苷酸为核糖核苷酸。在一些实施方案中，聚合复合物包含聚合剂(例如DNA连接酶)和3'羟基末端或5'磷酸末端。在这种情况下，核苷酸为寡核苷酸，任选地取决于链延伸的5'或3'方向而具有5'磷酸。在一些实施方案中，该方法可以应用于大批量测序以及单分子测序。

[0008] 在某些实施方案中，在单个分子水平上监测SbS。在某些实施方案中，单分子以高精度定位在2-D表面上，并且这种单分子定位使得通常太过密集而不能通过衍射限光装置分辨的分子“超分辨”。因此，与现有NGS方法相比，可以为密度高得多的可单独分辨的分子平行测序。分子以高密度排成阵列的事实意味着在流动池中需要的覆盖范围小得多，并且在较小反应区内需要的试剂体积少得多。因此，需要向所述阵列装载的试剂更少，分子排成阵列的区域可以小得多，并且在通过一段密集模板之前和之后储存试剂所需的空间比非超分辨率测序方法小得多。由于流体必须移动的距离比当前流动池短，所以也会节省一些时间。由此，可能制造单个可消耗的流体设备用于测序，其中在测序开始之前所有的试剂和缓

冲液都预先装载。

[0009] 在一些实施方案中，超分辨法需要使用特定集合的相容性标记方法。在一些实施方案中，超分辨法包括受激发射损耗(Stimulated Emission and Depletion,STED)(ref)。在一些实施方案中，超分辨法包括随机光学重建显微术(Stochastic Optical Reconstruction Microscopy,STORM)M.J.Rust,M.Bates,X.Zhuang Nature Methods 3:793-795(2006)及其类似方法和变型。在一些实施方案中，超分辨法包括：成像形貌聚点(Points Accumultion in Imaging Topography,PAINT)。在一些实施方案中，PAINT包括附连于核苷酸的标签(或对接位点)和在溶液中游离的与标签结合的反标签(例如Imager)(Sharonov,A.&Hochstrasser,R.M.Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes.Proc.Natl.Acad.Sci.USA(PNAS)103,18911-18916(2006)。在一些实施方案中，PAINT包含DNA PAINT(Jungmann,R.等人Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami.Nano Lett.10,4756-4761(2010))。

[0010] 相应地，在一些实施方案中，该方法包括以下步骤：

[0011] (a)将靶多核苷酸置于流体容器内

[0012] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)一组修饰核苷酸的溶液(反应体积)接触，

[0013] (c)使用所述聚合复合物将所述修饰核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0014] (d)使用超分辨率检测，检测高于不持续接近靶多核苷酸序列的核苷酸类型的信号或与所述信号分离的持续接近靶多核苷酸序列的核苷酸类型的信号，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0015] (e)裂解可裂解接头，从而裂解标记；以及

[0016] (f)重复步骤(b)-(e)。

[0017] 在一些实施方案中，关于溶液交换，靶多核苷酸的测序在封闭系统中进行，因为在样品和试剂装载后，测序的进行无需从容器外部交换试剂，正如至今才对高误差实时测序方法如PacBio和ONT测序而言可用的那样。然而，在本发明的一些实施方案中，与实时测序相反，将每个标记核苷酸并入增长链中是受控制的，一次一个核苷酸，使得在核苷酸连续添加之间有足够时间来测定所并入的碱基的属性(identity)并保持封闭系统内的高准确度。

[0018] 在一些实施方案中，该方法包括以下步骤：

[0019] (a)将靶多核苷酸置于流体容器内

[0020] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液(反应体积)接触，

[0021] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0022] N-c-L(T)

[0023] 或

[0024] T-c-N-c-L

[0025] 其中N是核苷酸，c是可裂解接头，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记，L(T)是充当标记和终止子的结构，其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解

接头；

[0026] (c)使用聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0027] (d)检测高于不持续接近靶多核苷酸序列的核苷酸类型的信号的持续接近靶多核苷酸序列的核苷酸类型的信号，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0028] (e)裂解可裂解接头，从而裂解标记；以及

[0029] (f)重复步骤(b)-(e)

[0030] 在一些实施方案中，进行(b)-(e)，无需向容器内加入外部试剂，从而对靶多核苷酸测序。

[0031] 在几个实施方案中，该方法包括以下步骤：

[0032] (a)将靶多核苷酸置于流体容器内；

[0033] (b)使所述靶多核苷酸与包含四类不同标记的核苷酸的溶液(反应体积)接触，

[0034] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0035] N-Hc-L+T，

[0036] 其中N是核苷酸，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记并且Hc是可裂解接头，其使得裂解能够均匀地进行，而无需从容器外部交换化学试剂；提供一个或多个荧光标记，所述荧光标记附连于聚合试剂或并入靶DNA多核苷酸中；

[0037] (c)使用聚合酶试剂将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0038] (d)提供刺激以引发能量转移相互作用并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0039] (e)提供触发因子以裂解可裂解接头，从而去除可裂解的终止子基团和可裂解的标记；以及

[0040] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(b)-(e)，从而对靶多核苷酸测序(例如，假定靶多核苷酸含有与所并入的核苷酸互补的核苷酸)。

[0041] 在一些实施方案中，当并入所添加的核苷酸时进行检测。在其他实施方案中，当添加的核苷酸与聚合复合物结合而未完成并入时进行检测。在一些实施方案中，包括标记的相同修饰起到可逆终止子的作用，所以不需要单独的修饰来将终止子附连至核苷酸。在一些实施方案中，激发照射作用于靶多核苷酸附近并且在更大的反应体积中减弱。在一些实施方案中，裂解触发因子作用于靶多核苷酸附近并且在更大的反应体积中减弱。在一些实施方案中，未并入的核苷酸从出现裂解触发因子和/或激发照射的表面移开。在一些实施方案中，充分搅拌反应混合物以去除用过的试剂并将新鲜试剂带入反应位点。在一些实施方案中，一锅反应中的全部测序步骤在单个反应体积中进行。在一些实施方案中，不直接标记核苷酸。

[0042] 1.嵌入染料供体、受体和碱基上的终止子(参见图1)：

[0043] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0044] (a)将多个嵌入染料分子并入靶多核苷酸中；

[0045] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0046] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0047] B-T-L，

[0048] 其中B是嘌呤或嘧啶碱基，T是与B化学结合的可光裂解的终止子基团，而L是包含嵌入染料分子的荧光共振能量转移(FRET)伴侣的标记；

[0049] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0050] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，在嵌入染料和所并入的不同标记的核苷酸伴侣上诱导FRET，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0051] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，由此去除可光裂解的终止子基团；以及

[0052] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0053] 2.嵌入染料供体、受体和糖上的终止子(参见图1)：

[0054] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0055] (a)将多个嵌入染料分子并入靶多核苷酸中；

[0056] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0057] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0058] S-T-L，

[0059] 其中S是糖，T是与B化学结合的可光裂解的终止子基团，而L是包含嵌入染料分子的荧光共振能量转移(FRET)伴侣的标记；

[0060] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0061] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，在嵌入染料和所并入的不同标记的核苷酸伴侣上诱导FRET，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0062] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，由此去除可光裂解的终止子基团；以及

[0063] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0064] 3.嵌入染料供体、碱基上的受体和糖上的终止子(参见图1)：

[0065] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0066] (a)将多个嵌入染料分子并入靶多核苷酸中；

[0067] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0068] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0069] L-B-S-T，

[0070] 其中S是糖，T是与S化学结合的可光裂解的终止子基团，而L是附连于碱基的标记，此标记是可光裂解的(经由接头，使其可以被去除)或者是可光灭活的(例如，其荧光经由光灭活/光漂白而减弱)；

[0071] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0072] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，在嵌入染料与所并入的不同标记的核苷酸伴侣之间诱导FRET，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0073] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，从而去除可光裂解的终止子基团并

去除可光裂解的标记或灭活可光灭活的标记;以及

[0074] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e),由此对靶多核苷酸测序。

[0075] 在一些实施方案中,不使用上述实施方案中的嵌入染料,可以使用任何DNA染剂或者可以使用可以充当DNA染剂的任何实体。例如,DNA染剂可以是缀合聚合物。染剂可以是经标记的精胺聚合物。DNA染剂可以是DNA结合肽或多肽。DNA染剂可以是抗生素如放线菌素D。

[0076] 在一些实施方案中,聚合酶上可以有一个或多个供体。

[0077] 4.聚合酶供体上的标记、受体和碱基上的终止子(参见图2)

[0078] 在本发明的一些实施方案中,对靶多核苷酸测序的方法可以包括:

[0079] (a)使FRET供体(直接或间接)附连至聚合酶;

[0080] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触,

[0081] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构:

[0082] B-T-L,

[0083] 其中B是嘌呤或嘧啶碱基,T是与B化学结合的可光裂解的终止子基团,而L是包含直接或间接附连至聚合酶的FRET供体的荧光共振能量转移(FRET)伴侣的标记;

[0084] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中;

[0085] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸,在直接或间接附连至聚合酶的FRET伴侣与所并入的不同标记的核苷酸伴侣之间诱导FRET,并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型;

[0086] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸,由此去除可光裂解的终止子基团;以及

[0087] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e),由此对靶多核苷酸测序。

[0088] 5.聚合酶供体上的标记、受体和糖上的终止子(参见图2)

[0089] 在本发明的一些实施方案中,对靶多核苷酸测序的方法可以包括:

[0090] (a)使FRET供体(直接或间接)附连至聚合酶;

[0091] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触,

[0092] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构:

[0093] S-T-L,

[0094] 其中S是糖,T是与S化学结合的可光裂解的终止子基团,而L是包含直接或间接附连至聚合酶的FRET供体的荧光共振能量转移(FRET)伴侣的标记;

[0095] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中;

[0096] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸,在直接或间接附连至聚合酶的FRET伴侣与所并入的不同标记的核苷酸伴侣之间诱导FRET,并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型;

[0097] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸,由此去除可光裂解的终止子基团;以及

[0098] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e),由此对靶多核苷酸测序。

[0099] 6.聚合酶供体上的标记、碱基上的受体和糖上的终止子(参见图2)

[0100] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0101] a)使FRET供体(直接或间接)附连至聚合酶；

[0102] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0103] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0104] L-B-S-T，

[0105] 其中S是糖，T是与S化学结合的可光裂解的终止子基团，而L是附连于碱基的标记，此标记是可光裂解的(经由接头，使其可以被去除)或者是可光灭活的(例如，其荧光经由光灭活/光漂白而减弱)，其包含直接或间接附连至聚合酶的FRET供体的荧光共振能量转移(FRET)伴侣；

[0106] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0107] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，在嵌入染料和所并入的不同标记的核苷酸伴侣上诱导FRET，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0108] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，从而去除可光裂解的终止子基团并去除可光裂解的标记或灭活可光灭活的标记；以及

[0109] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0110] 在一些实施方案中，将FRET供体和受体的位置颠倒。例如，供体可以在核苷酸上而受体可以在聚合酶上或双链体中。

[0111] 在一些实施方案中，以上在实施方案1-6中描述的FRET用光活化代替。在这种情况下，FRET供体(碱基上的嵌入染料或标记)变成光活化剂而FRET受体(核苷酸上的标记)变成灭活或变暗状态的荧光剂(fluor)。当变暗的荧光剂非常靠近活化剂时，其荧光开启。

[0112] 7.聚合酶供体上的标记、猝灭剂(quencher)和核苷酸上的终止子(参见图3)

[0113] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0114] (a)使共振能量转移(RET)供体(直接或间接)附连至聚合酶；

[0115] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0116] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0117] N-T-Q，

[0118] 其中N是核苷酸，T是与N化学结合的可光裂解的终止子基团，而Q是包含直接或间接附连至聚合酶的供体的猝灭剂伴侣的标记；

[0119] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0120] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，在供体与所并入的不同标记的核苷酸伴侣之间诱导能量/电子转移，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0121] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，由此去除可光裂解的终止子基团；以及

[0122] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0123] 对于RET来说，猝灭机制可能是一种特殊情况，其中能量不会被受体以光的形式消散。

[0124] 猝灭剂和终止子均可在碱基上或均可在糖上。或者，猝灭剂可以在碱基上而终止

子在糖上。可裂解键合可以是可化学裂解的并且以化学方式进行裂解。

[0125] 8.聚合酶上的BRET供体、受体和核苷酸上的终止子(参见图4)

[0126] 本发明涉及一种对靶多核苷酸测序的方法。在各个方面和实施方案中，这些方法包括以下步骤：

[0127] (a)提供与聚合酶(或连接酶)附连或融合的生物发光生物分子；

[0128] (b)使所述靶多核苷酸与包含四类不同标记的核苷酸的溶液(反应体积)接触，

[0129] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0130] N-c-L(T)

[0131] 或

[0132] T-c-N-c-L

[0133] 其中N是核苷酸，c是可裂解接头，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记，L(T)是充当标记和终止子的结构，其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解接头

[0134] (c)使用具有附连/融合的生物发光分子的聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0135] (d)提供使生物发光反应能够发生的底物，并由此经由从生物发光分子到核苷酸上的标记的生物发光共振能量转移(BRET)且检测所产生的电磁辐射而鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0136] (e)裂解可裂解接头，从而去除可裂解终止子基团和标记；以及

[0137] (f)重复步骤(a)-(e)，从而对靶多核苷酸测序。

[0138] 在一些BRET实施方案中，接头是可光裂解的接头并且步骤(e)包括照射靶多核苷酸。受体和终止子均可在碱基上或均可在糖上。或者，受体可以在碱基上而终止子在糖上。另外，BRET受体可以是猝灭剂而不是荧光发射体。

[0139] 10.波导/等离激元结构和核苷酸上的标记/终止子

[0140] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0141] (a)将靶多核苷酸插入波导/等离激元结构中，大部分激发能量被限制在其中(和/或在其中存在增强激发的潜力)；

[0142] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0143] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0144] N-c-L(T)

[0145] 或

[0146] T-c-N-c-L

[0147] 其中N是核苷酸，c是可裂解接头，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记，L(T)是充当标记和终止子的结构，其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解接头

[0148] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0149] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0150] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，由此去除可光裂解的终止子基团；以及

[0151] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0152] 11.直接检测核苷酸上的标记

[0153] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0154] (a)使靶多核苷酸定位在检测的焦平面上；

[0155] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0156] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0157] N-c-L(T)

[0158] 或

[0159] T-c-N-c-L

[0160] 其中N是核苷酸，c是可裂解接头，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记，L(T)是充当标记和终止子的结构，其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解接头

[0161] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0162] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0163] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，由此去除可光裂解的终止子基团；以及

[0164] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0165] 在一些实施方案中，当靶多核苷酸附连至表面时，表面优选具有3D凝胶结构，使得可以将更高浓度的多核苷酸装载到表面上的某位置，而不增加其2D覆盖范围。这可以帮助获得可相对于背景检出的信号。

[0166] 12.开放-闭合复合物

[0167] 该实施方案的方法包括：

[0168] (a)将靶多核苷酸置于流体容器区域内

[0169] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液(反应体积)接触，

[0170] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0171] NP-L

[0172] 其中NP是核苷酸磷酸，L是与NP化学连接的标记并且L对A、C、G、T/U是特异性的

[0173] (c)在不存在二价阳离子的情况下在靶多核苷酸上形成聚合酶与不同标记的核苷酸之一的闭合复合物；

[0174] (d)检测高于来自不持续接近靶多核苷酸序列的核苷酸的信号的持续接近靶多核苷酸序列的核苷酸类型的信号，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0175] (e)用二价阳离子沐浴多核苷酸，从而使核苷酸并入完成，而不并入更多的核苷酸；以及

[0176] (f)重复步骤(b)-(e)，无需向容器加入外部试剂，从而对靶多核苷酸测序(例如，

基于靶多核苷酸含有与所并入的核苷酸互补的核苷酸这一假设)。

[0177] 可以采用RET机制,其中核苷酸上的标记为RET受体,而嵌入染料或与聚合剂相关联的一种或多种标记为RET供体。RET受体可以是猝灭剂。

[0178] 13.试剂包(图5)

[0179] 在本发明的一些实施方案中,对靶多核苷酸测序的方法可以包括:

[0180] (a)提供足够用于一个测序循环的试剂包,每个包均含至少两个含有测序试剂(包括核苷酸)的流体子包,

[0181] (b)使靶多核苷酸与子包中的试剂依次接触,

[0182] (c)使用聚合酶将来自一组一种或多种核苷酸A、C、G、T/U(其中标记和任选地终止子是可裂解的)的一个标记核苷酸添加到伸长/聚合复合物中;

[0183] (d)用一定波长的电磁辐射或生物或化学发光试剂刺激靶多核苷酸,检测所产生的电磁发射并由此测定所并入的不同标记的核苷酸的属性;

[0184] (e)裂解核苷酸上的标记(和终止子,若存在);

[0185] (f)开始下一个试剂子包;以及

[0186] (g)重复步骤(b)-(f),从而对靶多核苷酸测序。

[0187] 任选地,其中(e)和(f)可能需要相同的物理触发。在一些实施方案中,在产生测序读段(read)的过程中,相同的包(包含一组子包)多次通过靶多核苷酸,每个循环一次(参见图5)。

[0188] 14.多试剂包(图6)

[0189] 在一些实施方案中,对靶多核苷酸测序的方法经由伸长/聚合复合物和包含依次通过靶多核苷酸的子包的包进行。此类实施方案包括以下步骤:

[0190] (a)提供一系列流体子包(或胶囊或液滴),该系列中的每个子包均含用于测序循环的一个步骤的试剂,每个测序流体子包被包含与含有测序试剂的流体包(例如空气或油)基本上不混溶的试剂的非反应包、间隙或空间隔开

[0191] (b)使靶多核苷酸与测序包中的试剂接触,使得当靶多核苷酸与含有一种或多种标记核苷酸(和任选地终止子)的试剂子包接触时,使用聚合酶将一个标记核苷酸添加到伸长复合物中;

[0192] (c)用一定波长的电磁辐射照射靶多核苷酸(或者如果聚合酶与生物发光/化学发光供体连接,则提供生物发光/化学发光的辅因子),检测所产生的电磁发射并由此测定所并入的不同标记的核苷酸的属性;

[0193] (d)使靶多核苷酸与含有裂解试剂(或促进光化学裂解的缓冲液)的试剂子包接触,从而使核苷酸上的标记裂解;以及

[0194] (e)重复步骤(b)-(d),从而对靶多核苷酸测序。

[0195] 在一些实施方案中,对于每个循环,不同的(但在大多数情况下是相同的)包(包含一组子包)通过靶多核苷酸(参见图6)。

[0196] 15.在流体设备内的隔室之间转移试剂

[0197] 在一些实施方案中,该方法包括:

[0198] (a)将靶多核苷酸置于流体容器区域内

[0199] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶

液(反应体积)接触，

[0200] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0201] N-c-L(T)后T-c-N-c-L

[0202] 其中N是核苷酸，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记，L(T)是充当终止子的标记，其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解接头；

[0203] (c)使用聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0204] (d)将标记核苷酸移动到不含靶多核苷酸的容器区域，并且检测高于来自不持续接近靶多核苷酸的核苷酸的信号的持续接近靶多核苷酸的核苷酸类型的信号，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0205] (e)裂解可裂解接头，从而去除终止子基团和标记；

[0206] (f)将标记核苷酸移入含有靶多核苷酸的容器区域；以及

[0207] (g)重复步骤(b)-(f)，无需向容器加入外部试剂，从而对靶多核苷酸测序(例如，基于靶多核苷酸含有与所并入的核苷酸互补的核苷酸这一假设)。

[0208] 上述实施方案可以在包含至少两个隔室的流体设备中进行，一个隔室用于并入混合物而另一个用于裂解混合物。上述机制可以与本发明的其他实施方案(例如，上文和下文描述的方面)组合。

[0209] 对于13、14和15而言，任选地，四种核苷酸中的每一种在不同的子包中提供，并且任选地不彼此不同地标记(但是含核苷酸的子包的递送顺序是已知的)。在一些实施方案中，四种核苷酸不进行标记，而标记复合物的不同组分，例如聚合剂，而含核苷酸的子包的递送顺序也是已知的。检测各个多核苷酸或其克隆扩增子。

[0210] 16.将靶多核苷酸序列移入和移出流动流(图7)

[0211] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0212] (a)使靶多核苷酸附连于流体容器表面上的第一区带内；

[0213] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)四类不同标记的核苷酸的流动流接触；

[0214] (c)使用聚合复合物将来自包含一个或多个标记核苷酸A、C、G或T/U的组的一个标记核苷酸(任选地具有可逆终止子)添加到与靶多核苷酸互补的链中，约束条件是仅可以添加一个标记的修饰核苷酸；

[0215] (d)提供与流动流垂直的电场，使得多核苷酸从其在第一区带中的附连点延伸至第二区带，使得大部分分子不再处于存在(b)中所述的试剂的第一区带中

[0216] (e)检测高于来自未添加的标记核苷酸的信号的经添加的标记核苷酸，并记录所添加的不同标记的修饰核苷酸的属性；

[0217] (e)去除标记和仅允许添加一个标记的修饰核苷酸的约束条件；以及

[0218] (f)重复步骤(b)-(e)，无需向容器加入外部试剂，从而对靶多核苷酸测序(例如，基于靶多核苷酸含有与所并入的核苷酸互补的核苷酸这一假设)。

[0219] 在一些实施方案中，流动流包括层流。

[0220] 17.使用纳米级形貌成像聚点(Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography，PAINT)的超分辨率测序(参见图8)

[0221] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0222] (a)将靶多核苷酸定位到表面/焦平面中；

[0223] (b)使靶多核苷酸与包含(i)聚合酶(起始+延伸复合物)和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0224] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0225] N-X-LBP(T)

[0226] 其中N是核苷酸，X表示与LBP化学结合的可化学裂解或可光裂解的接头基团而LBP是标记结合伴侣并充当终止子(T)，或者在也经由可化学裂解、可光裂解的接头与核苷酸连接的核苷酸上提供单独的终止子部分。

[0227] T-X-N-X-LBP

[0228] 其中标记包含结合对的第一伴侣，所述结合对包含作为PAINT(例如DNA PAINT)成像剂的对接位点的寡核苷酸序列和(iii)四种不同的PAINT(例如DNA PAINT)成像剂

[0229] (c)使用聚合酶将不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中，所述不同标记的核苷酸包含结合伴侣1，四条结合伴侣2成像剂链之一能够在其上重复结合和去结合(bind on and off)；

[0230] (d)在用第一波长的电磁辐射连续照射下成像/摄影，并且在表面上的特定位置检测持续信号(使用单分子定位算法)，由此鉴定在那些位置并入的不同标记的核苷酸的属性；

[0231] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸或将靶多核苷酸暴露于化学或生物化学试剂以诱导裂解，从而去除(b)中描述的可化学或光裂解的标记/终止子基团；以及

[0232] (f)重复步骤(b)-(e)，从而对靶多核苷酸测序。

[0233] 在一些实施方案中，PAINT作为均相或一锅反应进行。

[0234] 在一些实施方案中，将PAINT技术与

[0235] 上文或本文件别处描述的其他方面组合。在一些实施方案中，模板位置处显著或持续的PAINT信号足以区分信号与背景。PAINT技术在不利用RET或其他表面信号增强方法的情况下提供背景扣除(background rejection)，仅需检测焦平面或表面上各位置的持续信号。在一些实施方案中，FRET或BRET可以与PAINT组合，使得不需要用四个单独激光器的照射。

[0236] 18.使用随机光学重建显微术(STORM)的超分辨率测序

[0237] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0238] (a)将靶多核苷酸定位到表面/焦平面中；

[0239] (b)使靶多核苷酸与包含(i)聚合酶(起始+延伸复合物)和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0240] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0241] N-X-PL(T)

[0242] 其中N是核苷酸，X表示与PL化学结合的可化学或光裂解的接头基团而PL是能够光转换或闪烁的标记并充当终止子(T)

[0243] 或

[0244] 在也经由可化学裂解或可光裂解的接头与核苷酸连接的核苷酸上提供单独的终

止子部分

[0245] T-X-N-X-PL

[0246] 其中PL是能够光转换或闪烁的标记

[0247] (c)使用聚合酶将不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0248] (d)在用第一波长的电磁辐射连续照射下成像/摄影，并且在表面上的特定位置检测持续信号(使用单分子定位算法)，由此鉴定在那些位置并入的不同标记的核苷酸的属性；

[0249] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，从而去除所述的可光裂解的标记/终止子基团或将靶多核苷酸暴露于化学或生物化学试剂以诱导裂解(b)；以及

[0250] (f)重复步骤(b)-(e)，从而对靶多核苷酸测序。

[0251] 19.通过核苷酸的瞬时结合进行的超分辨率测序

[0252] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0253] (a)将靶多核苷酸定位到表面/焦平面中；

[0254] (b)使靶多核苷酸与包含(i)聚合酶(起始+延伸复合物)和(ii)四类可逆终止子的溶液接触(在一些实施方案中可逆终止子不标记，在其他实施方案中经标记)

[0255] 其中每个可逆终止子核苷酸包含以下结构：

[0256] N-X T

[0257] 其中N是核苷酸，X表示与终止子(T)化学结合的可化学、生物化学裂解或可光裂解的基团，该终止子可以是实际的或虚拟的终止子

[0258] (c)使用聚合酶将可逆终止子核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0259] (d)添加核苷酸，此类核苷酸包含以下结构，

[0260] N-L

[0261] 其中N是核苷酸而L是标记

[0262] (e)在用一个或多个波长的电磁辐射照射下成像/摄影，并且检测来自表面上特定位置的标记核苷酸的持续信号(使用单分子定位算法)，由此鉴定在那些位置并入的不同标记的核苷酸的属性；

[0263] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸或将靶多核苷酸暴露于化学或生物化学试剂以诱导裂解，从而去除(b)中描述的可化学、生物化学或光裂解的标记/终止子基团；以及

[0264] (f)重复步骤(b)-(e)，从而对靶多核苷酸测序。

[0265] 在19的一些实施方案中，可逆终止子也被标记并提供在瞬时结合核苷酸之前的碱基的独立读段或充当瞬时结合核苷酸的RET伴侣。

[0266] 20.通过核苷酸的瞬时结合进行的超分辨率测序

[0267] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0268] (a)将靶多核苷酸定位到表面/焦平面中；

[0269] (b)使靶多核苷酸与包含(i)聚合酶(起始+延伸复合物)和(ii)四类标记的可逆终止子的溶液接触

[0270] 其中每个可逆终止子核苷酸包含以下结构：

[0271] L-N-T

[0272] 其中N是核苷酸，L表示附连至核苷酸(T)的磷酸的标记，该核苷酸(T)可以是实际的或虚拟的终止子

[0273] (c)使用聚合酶将可逆终止子核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中，使得L为离去基团的一部分；

[0274] (d)由于在增长链末端存在终止子，允许未并入的标记核苷酸瞬时结合到链中的下一个位置而没有化学并入

[0275] (d)在用一个或多个波长的电磁辐射(同时或相继使用)照射下成像/摄影，并且检测来自表面上特定位置的标记核苷酸的持续信号(优选使用单分子定位算法)，由此鉴定在那些位置瞬时结合的不同标记的核苷酸的属性；

[0276] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸或将靶多核苷酸暴露于化学或生物化学试剂以诱导裂解，从而去除(b)中描述的可化学、生物化学或光裂解的终止子基团；以及

[0277] (f)重复步骤(b)-(e)，从而对靶多核苷酸测序。

[0278] 在一些实施方案中，瞬时结合核苷酸在结合之前呈变暗状态(例如可以通过使用NaBH4使Cy5变暗)，并通过聚合复合物上的标记进行光活化，所述标记包括聚合酶上的标记、所并入的终止子上的标记或模板中的DNA染剂。在第19和20个方面的一些实施方案中，瞬时结合不用于超分辨率，而是仅用于成像(例如以便补充标记)。

[0279] 21.使用受激发射损耗(STED)的超分辨率测序

[0280] 在本发明的一些实施方案中，对靶多核苷酸测序的方法可以包括：

[0281] (a)将靶多核苷酸定位到表面/焦平面中；

[0282] (b)使靶多核苷酸与包含(i)聚合酶(起始+延伸复合物)和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0283] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0284] N-X-SL(T)

[0285] 其中N是核苷酸，X表示与SL化学结合的可化学或光裂解的接头基团而SL是作为终止子(T)与STED相容的标记

[0286] 或

[0287] 在也经由可化学裂解或可光裂解的接头与核苷酸连接的核苷酸上提供单独的终止子部分

[0288] T-X-N-X-SL

[0289] 其中SL是能够进行STED的标记

[0290] (c)使用聚合酶将不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0291] (d)用第一波长的电磁辐射作为STED光束进行扫描，并且在表面上的特定位置检测信号，从而鉴定在那些位置并入的不同标记的核苷酸的属性；

[0292] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，从而去除所述的可光裂解的标记/终止子基团或将靶多核苷酸暴露于化学或生物化学试剂以诱导裂解(b)；以及

[0293] (f)重复步骤(b)-(e)，从而对靶多核苷酸测序。

[0294] 在一些实施方案中，激发光束是激发FRET供体的单光束，并且在一些实施方案中，损耗光束是损耗FRET供体的单光束。在一些实施方案中，以视频速率或以与CCD或CMOS相机的读出同步的更高速率扫描STED光束。

[0295] 本文描述的一些超分辨机制使得能够超分辨分子，因为密集场中的标记不会在完全相同的时间发出荧光。

[0296] 在一些超分辨率PAINT方法中，碱基通过荧光波长编码。在一些超分辨率PAINT方法中，碱基通过荧光信号的强度而不是波长编码。在本发明的一些PAINT方法中，标签/反标签复合物由于诸如高浓度、高温、高压、结合的主动电或磁控制、搅拌/混合等物理条件而具有快速缔合速率，并且由于瞬时复合物的低稳定性、高温和主动或磁控制而具有快速解离速率。快速解离速率意味着存在特定位置处的反标签成像剂的分类停留时间，但需要收集足够的光子用于高精度定位。因此，使用更加明亮的成像剂，包括多标记结构和纳米粒子，例如金或银纳米粒子。

[0297] 在一些超分辨法中，不针对特殊的超分辨率特性选择核苷酸上的标记，例如不针对与STED或STORM的相容性来选择所述标记，而是通过利用每种不同的颜色单独成像并可以单独定位这一事实来实现分辨率的提高。在另一个实施方案中，以高时间分辨率对核苷酸成像，同时它们各自与模板阵列中的分子结合，并且因为这种结合是一个随机过程，所以衍射限制区域内的每个核苷酸将在略微不同的时间并入并因此可以以高精度定位。类似地，当使用末端磷酸标记核苷酸以实时方式进行测序时，如果标记的磷酸在并入后是离去基团的一部分，即使在分子密集堆积的情况下，衍射限制点内的大部分核苷酸并入事件也可以是时间分辨的并因此是超分辨的。

[0298] 在一些实施方案中，可光裂解的标记/终止子用可化学裂解的标记/终止子替代。在一些实施方案中，化学裂解是通过使用光生成或电酸生成方法生成酸而进行的。在一些实施方案中，化学裂解不是均相的，而是涉及在测序模板的阵列上的试剂交换。在一些实施方案中，裂解归因于生物化学试剂。例如，肽接头可被蛋白酶裂解，或其他种类的部分(例如二酯酶或类似于DNA损伤加合物的修饰)可通过DNA修复系统的选定组分修复，例如T4核酸内切酶IV和核酸外切酶III能够去除核苷酸3'末端的非规范部分。

[0299] 在本发明的一些实施方案中，描述了克服非特异性吸附效应的方法。这些方法包括表面钝化和通过数据堆栈对异常信号进行计算过滤。在本发明的一些实施方案中，描述了克服来自本体溶液的背景信号的影响的方法。

[0300] 在本发明的实施方案中，针对减少测序中所用的试剂量或者减少或消除均相反应或超分辨中的背景荧光问题所述的各种方法与本发明中描述的可裂解的终止子核苷酸和聚合酶组合。

[0301] 在一些实施方案中，本发明的超分辨率测序方法以均相形式进行。

[0302] 在一些实施方案中，可裂解的接头不是可光裂解的接头，而是可被一些其他物理触发因子裂解。在一些实施方案中，物理触发因子是电化学生成的(例如，通过向电极施加电压)酸，并且可裂解的接头可被酸裂解。

[0303] 在一些实施方案中，本发明描述的机制的具体优点用于其他测序情形，例如既不使用均相形式也不使用超分辨率。一种这样的情况是非均相测序反应，其中裂解是经试剂交换以化学方式进行的，但是其中DNA染剂或嵌入染料用作带有受体的四种核苷酸的荧光供体。这优于传统SbS的优点是双重的。首先，只需要单一波长的光进行激发。其次，表面上标记核苷酸的非特异性吸附可以与所并入的标记核苷酸区分开，因为只有后者将会是FRET的对象。

[0304] 本发明的方法可以在表面固定化模板或微孔或纳米孔、通道、狭缝、液滴和珠粒中所含的模板上进行。

[0305] 在一些实施方案中，对模板进行测序，所述模板比可通过衍射受限光学成像分辨但通过超分辨率成像分辨的模板更接近。

[0306] 用于多核苷酸的模板导向的边合成边测序的此类超分辨方法包括：

[0307] (a)提供四种可逆终止核苷酸，即各自经其自身的不同标记修饰的A、C、G、T/U，每个所述标记能够进行随机光学重建(闪烁、可转换、随机发生结合等)；

[0308] (b)在模板阵列上并入带有所述不同标记的可逆终止核苷酸；

[0309] (c)拍摄阵列中每个不同标记的结合位置的图像(其中拍摄影像以捕获所有随机标记)；

[0310] (d)使终止逆转并去除标记；以及

[0311] (e)重复步骤b-d直至获得所需长度的读段。

[0312] 随机光学重建方法可以与上述所有方面组合。

[0313] 在一些实施方案中，随机光学重建方法通过使用结合对和DNA PAINT进行(Jungmann等人Nano Lett.2010,10:4756)，如17中所述。每个核苷酸包含不同的寡核苷酸序列，其是不同DNA PAINT成像链的对接位点。在一些实施方案中，通过记录核苷酸或聚合酶的瞬时结合来进行随机光学重建。在一些实施方案中，通过记录分子或颗粒单发射体或点光源的闪烁或光转换来进行随机光学重建。

[0314] 而一些超分辨法仍然会受到漂白和光物理效应的影响。DNA PAINT系统不会明显受到此类效应的影响，但在进行检测之前仍然易于并入错误碱基。瞬时核苷酸结合方法对于检测正确碱基和避免光物理效应都很有效，并且具有任何测序方法的最高准确度的潜力。

[0315] 在并入步骤期间，期望在靶多核苷酸附近具有高浓度的核苷酸和聚合剂。然而，在检测步骤期间，不期望在靶多核苷酸附近具有未并入和未加载的聚合剂(如果被标记)。未并入的核苷酸尤其如此。这是因为当核苷酸被标记时，它们产生不必要的背景荧光，这使得难以检测表面上的并入核苷酸。

[0316] 在一些实施方案中，流体夹在顶部表面与底部表面之间。底部表面包含靶多核苷酸。底部表面可包括促进核苷酸进入底部表面的特征，例如核苷酸带负电荷并且可以为底部表面提供正偏压以吸引核苷酸，并且顶部表面可以提供负偏压。这在并入步骤期间完成。然后，根据是期望有核苷酸在多核苷酸靶标附近(在并入期间)还是远离多核苷酸靶标(在检测和裂解期间)，可以在顶部表面与底部表面之间转换偏压。参见图9。

[0317] 第二表面(不含正在测序的模板)上的正电位在并入之后、在裂解指向第一表面之前施加，以防止未并入的核苷酸被裂解。在这种情况下，裂解机制不会到达第二表面，并且不会裂解在那里吸引的核苷酸。表面产生的电场是控制表面核苷酸吸引和排斥的有用方法(Asanov 1998;Sosnowski 1997)。

[0318] 就DNA PAINT而言，可以以聚合酶所需的高浓度(250nM范围)提供非荧光核苷酸以驱动并入反应。然而，成像步骤需要1-10nM范围的成像剂浓度，并且在此类浓度下，当使用TIRF成像时，几乎没有背景荧光并且可以清楚地看到与表面相互作用的每个单分子/粒子发射体。如果通过增加浓度来增加结合率，则需要进一步的措施诸如成像剂与聚合复合物

组分之间的FRET或猝灭(例如成像链形成分子信标)以保持低背景荧光。类似地,当通过记录瞬时结合核苷酸进行序列检测时,在使用高浓度的瞬时结合核苷酸时,可以使用FRET机制(例如在可逆终止子上的标记与引入的瞬时结合核苷酸之间)。不需要强有力地检测这种情况下的每个FRET事件,因为在瞬时结合核苷酸反复结合和去结合时,可以捕获其他FRET事件。

[0319] 在一些实施方案中,将各个核苷酸用单一荧光剂标记。在其他实施方案中,将各个核苷酸用多种荧光剂标记。在一些实施方案中,所述多种荧光剂是相同的并且能够改善信噪比。在一些实施方案中,所述多种荧光剂可以包括两个或更多个不同的品种,并且使得编码能够实施。在一些实施方案中,将不同的核苷酸用单色标记,但核苷酸上荧光剂的数量对于每种核苷酸类型(A、C、G、T/U)而言是不同的。例如,A可以具有2种荧光剂,C具有6种荧光剂,G具有18种荧光剂,而T/U具有48种荧光剂。

[0320] 在一些实施方案中,四种核苷酸不全部同时添加并因此不需要被不同地标记。在一些此类实施方案中,四种核苷酸类型中的每一种都一次添加一个核苷酸。例如,可以一次添加一个带有终止子的荧光核苷酸,例如在添加A之后,检测表面上并入了标记的位置,然后从核苷酸上去除标记。在另一个实例中,核苷酸(来自一次添加一个核苷酸类型的组)不进行标记,并经由诸如焦磷酸测序(例如使用萤火虫荧光素酶)或如同Ion Torrent测序中的pH、或如同Genapsys测序中的热量等机制进行检测。

[0321] 在此类实施方案中,本发明包括:

[0322] (a)将靶多核苷酸置于流体容器内;

[0323] (b)使靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)核苷酸的溶液接触;

[0324] (c)使用聚合复合物将核苷酸添加到与靶多核苷酸互补的链中;

[0325] (d)在添加的位置检测添加的核苷酸;以及

[0326] (f)重复步骤(b)-(e),每次使用不同的核苷酸并且无需向容器加入外部试剂,从而对靶多核苷酸测序。

[0327] 如果使用可逆终止子,则在步骤d之后将其去除;如果未使用可逆终止子,则在靶标中存在均聚物时添加多个核苷酸。

[0328] 该实施方案可以与上述13、14和15组合。例如在13和14中,为四种核苷酸中的每一种提供单独的子包,或在15中,提供不同的隔室用于储存不同的核苷酸。反应开始后,整个反应在密闭容器中进行。

[0329] 在一些实施方案中,反应对于某些步骤而言是均相的,但对于其他步骤而言是半均相或非均相的。在一些实施方案中,将本发明中描述的均相或一锅法测序反应进行多次。例如,进行均相反应为10个核苷酸的长度测序。然后停止均相反应,并添加一组新的试剂以进行第二均相测序反应。然后进行第三均相测序反应,依此类推,直至获得所需的读段长度。

[0330] 在各个实施方案中,本发明包括一种用于靶多核苷酸阵列的模板导向的边合成边测序的方法,所述方法包括:

[0331] (a)在流体容器中提供靶多核苷酸阵列;

[0332] (b)使所述多核苷酸阵列与包含(i)聚合复合物和(ii)可逆终止且不同标记的A、C、G和T/U核苷酸的溶液接触;

[0333] (c)使用所述聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述多核苷酸阵列中的至少一个核苷酸互补的链中；

[0334] (d)使成像标签与步骤(c)的所述不同标记的核苷酸结合；

[0335] (e)成像并存储步骤(d)的所述成像标签的属性和位置；

[0336] (f)使终止(b)-(e)逆转；

[0337] (g)重复步骤(b)-(e)并且由存储的所述成像标签的属性和位置组装所述靶多核苷酸阵列中的每一个多核苷酸的序列，任选地以均相或一锅反应的方式。

[0338] 使标签结合可包括多个随机结合/去结合事件。

[0339] 使标签成像可包括单分子定位和/或随机光学重建。

[0340] 在各个实施方案中，本发明包括一种对靶多核苷酸测序的方法，所述方法包括：

[0341] (a)将所述靶多核苷酸置于焦平面中；

[0342] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)不同标记的A、C、G和T/U核苷酸，以及(iii)四种不同DNA PAINT成像链的溶液接触，其中每种不同标记的核苷酸包含结构N-X-LBP，其中N是核苷酸，X是可光裂解的接头，而LBP是包含DNA PAINT成像剂的对接位点的标记结合伴侣，并且其中LBP充当终止子

[0343] (T)：N-X-LBP(T)或单独的终止子通过可光裂解的接头与N连接：T-X-N-X-LBP；

[0344] (c)使用聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0345] (d)用第一波长的电磁辐射照射所述靶多核苷酸，检测对应于所述不同标记的核苷酸的属性的所得信号，并存储所得信号；

[0346] (e)任选地通过用

[0347] 第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，去除步骤(b)的LBP和T；以及(f)重复步骤(b)-(e)并由所述存储信号组装所述靶多核苷酸的序列，任选地以均相或一锅反应的形式。

[0348] 在各个实施方案中，本发明包括一种对靶多核苷酸测序的方法，该方法包括：

[0349] (a)将靶多核苷酸置于流体容器内；

[0350] (b)使所述靶多核苷酸与包含(i)聚合复合物和(ii)四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0351] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0352] N-c-L(T)或T-c-N-c-L，

[0353] 其中N是核苷酸，T是与N化学连接的终止子基团，而L是与N化学连接的标记，L(T)是充当终止子的标记，其中L对A、C、G、T/U是特异性的并且c是可裂解接头；

[0354] (c)使用聚合复合物将所述不同标记的核苷酸之一并入与靶多核苷酸互补的链中；

[0355] (d)使用纳米级形貌成像聚点(PAINT)来鉴定所述不同标记的核苷酸；

[0356] (e)裂解所述可裂解接头，从而去除所述终止子基团和所述标记；以及

[0357] (f)重复步骤(b)-(e)并由所述存储信号组装所述靶多核苷酸的序列，任选地以均相或一锅反应的形式。

[0358] 靶多核苷酸可以置于表面上。

[0359] 靶多核苷酸可以被拉伸和/或伸长。

[0360] 方法还可以包括在拉伸和/或伸长的靶多核苷酸上的多个位置处催发(seeding)所述并入。

[0361] 所述并入可以包括从切口处延伸,从寡核苷酸延伸,使用不需要引物的DNA聚合酶或从启动子转录。

[0362] 可以提供嵌入染料或荧光/发光实体作为RET供体,而所述核苷酸上的标记为RET受体。

[0363] 方法还可以包括同时为两个或更多个多核苷酸测序。

[0364] 标记核苷酸可以包含荧光有机染料或荧光纳米粒子。

[0365] 标记核苷酸可以包含猝灭剂。

[0366] 标记可以包含结合对的第一伴侣。第二伴侣可以包含荧光标记的瞬时结合寡核苷酸。

[0367] 方法还可以包括超分辨标记。

[0368] 成像或照射步骤还可以包括经由渐逝波提供电磁辐射。

[0369] 成像或照射步骤还可以包括通过与金属的邻近相关效应(proximity related effect)来增强荧光。

[0370] 成像或照射步骤还可以包括使用电场控制标记核苷酸的吸引和排斥。

[0371] 对序列进行组装包括单分子定位、随机光学重建显微术(STORM)、纳米级形貌成像聚点(PAINT)或受激发射损耗(STED)。

[0372] 在一些实施方案中,该方法涉及分析作为阵列成员的分子并且为许多分子并行测序。可以同时为许多靶多核苷酸或单个靶多核苷酸的许多区段测序。对于小规模和大规模操作而言,本发明都易于自动化。

具体实施方式

[0373] 系统和试剂盒

[0374] 对于小规模和大规模操作而言,本发明都易于自动化。本发明的一个方面是用于测序的试剂盒,其包含聚合剂、特殊核苷酸和任选的标记、包含抗氧化剂的防褪色剂、流动池或芯片。本发明还包括用于根据本文件中描述的方法自动执行测序的系统和设备/仪器。

[0375] 我们将从详细讨论具体测序方法开始,然后讨论测序系统的关键组成部分,这些组成部分普遍与本发明的测序方法相关。这分为以下章节:测序方法;封闭系统;核苷酸和聚合酶;陈列和模板;标记;流体系统;成像方法。

[0376] 测序方法

[0377] 根据沃森-克里克碱基配对规则,测序的处理依赖于核苷酸之间发生的形成双链多核苷酸分子的碱基配对。在核苷酸分子中的每个位置,可以并入四种核苷酸之一。并入延伸引物或RNA拷贝中的核苷酸通常是与靶多核苷酸中的碱基配对的正确碱基。可以按照所并入的碱基的沃森-克里克互补来确定模板中碱基的属性。所以如果并入T,则模板中应存在A。

[0378] 在本发明的几个实施方案中,提供了一种对靶多核苷酸测序的方法,该方法包括以下步骤:

[0379] (a)利用标记和可逆终止核苷酸进行模板衍生化核苷酸合成,其中标记和终止子

经由可裂解键合与核苷酸附连；

[0380] (b)检测合成的多核苷酸内所述标记核苷酸存在与否；

[0381] (c)从所述核苷酸裂解所述标记和终止子；以及

[0382] (d)重复步骤a-c。

[0383] 优选地，四种核苷酸可以差异标记，例如各自具有不同的荧光团。在这种情况下，引物和模板多核苷酸同时与两种或更多种标记核苷酸接触。如果需要，则去除任何游离核苷酸并检测所并入的碱基。使用四种差异性标记核苷酸可以允许连续(实时)监测合成过程或者以均相或一锅方式进行反应。所有四种核苷酸的供应也减少了错误并入。在一个替代实施方案中，测序可以仅有两个标记的碱基，并且提供另外两个碱基但未标记。在获得前两个碱基的序列信息之后，用另外两个标记的碱基重复测序。

[0384] 本发明的一些实施方案可以应用于单分子的直接测序。PacBio和ONT已经表明，单分子分析使得能够获得长测序读段。监测各个分子进行边合成边测序相比Illumina的集群测序方法的优势在于：不存在定相问题，可以容易地进行异步延伸。在本发明的一些实施方案中，进行1-3个循环以读取一至三个碱基。在一些实施方案中，进行3-30个循环以读取3-30个碱基。在其他实施方案中，进行30-300个循环以读取30-300个碱基。在其他实施方案中，进行300-3000个循环以读取300-3000个碱基。在一些实施方案中，进行3000-30,000个循环以读取3000-30,000个碱基。在一些实施方案中，进行>30,000个循环或执行实时测序以读取>30,000个碱基。

[0385] 可以使聚合酶适于并入非天然核苷酸，并且非天然核苷酸可以以使其更易于并入的方式构造，例如通过使染料经由适当的接头附连。选择接头的化学组成以使其最低限度地干扰聚合酶功能。标记保持在大于1个核苷酸、3个核苷酸、6个核苷酸、12个核苷酸的距离处，并且可以介于13-150个原子、19-140个原子、36-130个原子、54-120个原子、72-110个原子或90-100个原子之间。聚合酶也可工程化或进化以处理特定的核苷酸修饰。

[0386] 核苷酸上的荧光团可根据需要进行漂白以更容易地检测后续并入。或者，可以去除荧光团和标记(例如通过裂解)或者可以化学修饰荧光团以去除荧光。

[0387] 在另一个实施方案中，可以仅允许一次只添加单个核苷酸来进行合成，从而以分步方式完成合成。这可以通过对超过单个核苷酸的核苷酸并入提供阻断来完成。这可以通过提供可去除的阻断因子/终止子来实现。核苷酸可被任何类型的终止子阻断，例如可光裂解的基于2-硝基苄基的阻断基团。可裂解的键可以借助光而裂解(如果该键为可光裂解的)Li等人PNAS;100(2):414-9(2003)。

[0388] 在一个实施方案中，终止子是可以通过酶去除的基团。这优选地通过从3'末端去除核苷酸来完成。此类试剂包括核酸外切酶，如T4核酸内切酶IV、核酸外切酶III、磷酸二酯酶并且包括具有3'-5'核酸外切酶活性的DNA聚合酶。作为修复3'末端的替代方案，可通过3'磷酸阻断核苷酸延伸。然后这可以通过多核苷酸激酶修复成OH，从而使末端能够延伸。也可以在核苷酸的存在下用3'-5'核酸外切酶修复。

[0389] 超分辨率生物化学

[0390] 超分辨率相容化学

[0391] 在一些实施方案中，SbS可以通过任何方式进行，包括本发明中描述的那些方式，文献或专利中描述的那些方式，或者商业上可获得的那些方式，但通过使用与超分辨率成

像相容的荧光标记并且使用超分辨率检测和/或图像处理方法进行。当使用STED相容性核苷酸时，可以通过STED实现超分辨率。当使用STORM相容性核苷酸时，通过拍摄影像(多帧，例如5000-10,000帧)并使用单分子定位方法重建图像来实现超分辨率。

[0392] 超分辨率相容性结合对

[0393] 在一些实施方案中，将标记附连至核苷酸的键合包含结合对。结合对中的一个成员优选地经由可裂解键与核苷酸连接。结合对的另一个成员附连至标记，例如荧光染料或纳米粒子。结合对由两个分子组成，例如DNA或蛋白质，它们彼此特异性结合。结合对的成员可以是天然来源的，也可以是全部或部分合成产生的。分子对的一个成员在其表面上具有一个区域，该区域可以具有突起、空腔或物理化学(例如极性基团)特征的空间组织，与所述分子对另一成员的特征的特定空间组织特异性结合并因此互补。因此，该配对的成员具有相互特异性结合的特性。结合对类型的实例是抗原-抗体、生物素-亲和素、激素-激素受体、受体-配体、酶-底物。使用包含结合对成员的键合意味着：添加到引物上的核苷酸可以在被并入引物中后进行标记。核苷酸优选经由可裂解接头附连至结合对的一个成员。可检测标记附连至结合对的另一个成员。随后，因为结合对的两个成员彼此结合，所以可检测标记可间接附连至核苷酸。

[0394] 四种类型的核苷酸中的每一种都可以附连至不同的结合对成员上。结合对的其他成员可以差异性标记，例如，各自附连至不同的荧光团或纳米粒子。这允许同时添加所有核苷酸。然后，所并入的核苷酸经由结合对机制被相应的荧光团标记。例如腺嘌呤与生物素附连，而胞嘧啶与地高辛附连。指示腺嘌呤的存在性的荧光团与亲和素附连，而指示胞嘧啶的存在性的荧光团与抗地高辛抗体附连。在一些实施方案中，结合对是带有互补序列的寡核苷酸，这容易让人们用四种不同的结合对编码四种不同的核苷酸。

[0395] 因此，在一个方面，本发明提供了一种对靶多核苷酸测序的方法，该方法包括以下步骤：

[0396] (a)使用通过可去除键合附连至结合对的一个成员上的核苷酸来进行模板衍生化核苷酸合成；

[0397] (b)在使得结合对的两个成员彼此结合的条件下，使所述核苷酸与附连于结合对另一成员的标记接触；

[0398] (c)检测所述标记存在与否；

[0399] (d)通过去除结合对第一成员与核苷酸之间的所述可去除键合来去除所述标记和所述结合对；以及

[0400] (e)重复步骤a-d。

[0401] 在一些实施方案中，该方法包括多核苷酸的模板导向的SbS，其包括：

[0402] (a)提供四种可逆终止核苷酸，即各自经其自身的不同标签修饰的A、C、G、T/U，每个所述标签为结合对的伴侣1；

[0403] (b)在模板阵列上并入带有所述不同标签的可逆终止核苷酸；

[0404] (c)添加每个结合对的伴侣2，所述伴侣2带有针对每个核苷酸的不同标记；

[0405] (d)获取阵列上每个不同标记的结合位置的一个或多个图像；

[0406] (e)使终止逆转并去除结合对的伴侣1和/或伴侣2；以及

[0407] (f)重复步骤b-e直至获得所需长度的读段。

[0408] 用结合对进行的PAINT

[0409] 在一些实施方案中，在激励瞬时结合的条件下添加伴侣2。在一些实施方案中，记录多个检测事件中的瞬时结合和去结合(影像)。当伴侣2与并入的伴侣1结合时，可以检测到信号，然后当一段时间后伴侣2解离时，来自伴侣1的信号消失。虽然对于正在测序的给定多核苷酸而言不存在伴侣2的结合，但与相邻多核苷酸的伴侣1配对的伴侣2与该伴侣结合。如果伴侣2s同时与多核苷酸结合，则相邻多核苷酸可能与第一多核苷酸间隔太近而不能实现分辨。然而，因为该过程存在随机时间方面，当调谐好系统时(就结合伴侣2s的浓度、缔合和解离常数、温度等而言)，在分析来自通常5-10,000帧的影像的帧并重建图像后可以分辨衍射限制区域内的许多分子。垂直通过影像的帧堆栈，可以确定每个多核苷酸存在许多结合对相互作用。在捕获10,000帧的典型实验中，根据调谐系统的方式，可出现20种或实质上更多的结合对相互作用。在一些实施方案中，经由单分子定位/随机光学重建由多个检测事件获得超分辨率图像。

[0410] 本发明中描述的所有普通核苷酸结构可适用于寡核苷酸标记的核苷酸，这包括以下类别的核苷酸

[0411] 1)碱基上标记的寡核苷酸，充当DNA PAINT中成像剂的对接位点并且是可逆性虚拟终止子的一部分

[0412] 2)碱基上标记的寡核苷酸，充当DNA PAINT中成像剂的对接位点，在3’位置具有终止子

[0413] 3)3’位置上标记的寡核苷酸，充当终止子和DNA PAINT中成像剂的对接位点

[0414] 4)2’位置上标记的寡核苷酸，充当DNA PAINT中成像剂的对接位点并且是可逆性虚拟终止子的一部分

[0415] 使用瞬时结合核苷酸的超分辨率测序:通过多次查询碱基提高准确性

[0416] 应该记住，与单分子SbS相比，包括文库制备和克隆扩增的下一代测序方法(例如Illumina测序)包括在测序开始之前的两组聚合酶复制反应。一组是在文库制备期间而另一组是在集群/群落(polony)/rolony扩增期间。这些步骤容易在每次聚合酶产生互补链时引入误差。相比之下，在对单分子进行测序而无需扩增的本发明中，在测序期间实际并入核苷酸时，由于聚合酶错误并入导致的误差限于可能发生一次。因此，如果聚合酶的误差率低，则测序误差率也会很低，例如10,0000个中有1个;通常由于不利的染料光物理性质(通常导致缺失误差)，单分子测序也而容易出错，但DNA PAINT方法克服了这一点，因为信号受多次补充。即使如此低的误差也可以通过本发明的一些实施方案来克服，包括在并入发生之前多次测试待并入的核苷酸，如以下实施方案中所述:在一些实施方案中，该方法是并入可逆终止子(例如含有经修饰的3’末端)，然后当终止子就位时，添加荧光标记核苷酸以询问下一个碱基。与下一个碱基互补的核苷酸的并入无法完成，因为增长链被终止，但是正确碱基会比错误碱基缔合的时间更长并且可以检测到这种差异。然而，由于阻断的3’末端，不能形成共价键来完成并入;结合是瞬时的并且每个正确缔合的标记核苷酸将被另一个置换。这样，通过模板化互补性直接标记核苷酸(其中核苷酸不可裂解)的瞬时结合多次询问靶标中的碱基，从而提高碱基识别(base call)的准确性;如果结合了错误碱基，则其会比正确碱基解离得更快。而且，因为将会记录多个结合事件，所以如果检测到足够的事件(例如10-20个)，则可以获得一致，这可能非常有利于正确碱基。下一步是使终止逆转，然后添

加下一个可逆终止子，随后再是荧光核苷酸的瞬时结合。为了减少来自未并入的可检测荧光核苷酸的背景荧光，可以使用低于正常浓度的核苷酸浓度。或者，可逆终止子可带有FRET伴侣，例如供体，或聚合酶可以含有FRET伴侣或模板可以含有用作FRET伴侣的核酸染剂或嵌入染料。单波长供体可用作多个受体的FRET伴侣，所述受体用作四种荧光核苷酸中的每一种的不同标记。因为检测到归因于荧光核苷酸的多次结合/去结合的多个FRET事件，所以与碱基识别依赖于单个FRET事件时相比，归因于FRET的碱基识别是稳健的。Klenow片段催化多次结合-分离；或者可以测试其他聚合酶。正确与不正确的碱基与询问位置的结合可以通过慢速和快速解离速率来区分。或者，如果一次供给一种类型的核苷酸，则其不需要标记；相反，可以标记聚合酶并且可以分析其解离-缔合：如果瞬时结合正确碱基，则聚合酶的解离缓慢；如果瞬时结合不正确的碱基，则聚合酶的解离快。在一个实施方案中，我们应称之为边预测边测序(Sequencing by Anticipation)，最初通过瞬时结合来识别碱基，随后，所添加的可逆终止子也带有碱基特异性标记并确认碱基识别(或先添加并识别可逆终止子，再添加瞬时核苷酸)。如果可逆终止子受到光物理性质的负面影响，则仍然可以在后续瞬时结合核苷酸的基础上识别碱基。因为荧光瞬时结合核苷酸在反应中未被消耗，所以这些核苷酸可以在成像步骤期间分流到样品上，然后分流回到流动池上的储存位置并在下一个循环中重复使用。在一些实施方案中，终止通过物理触发因子逆转并且能够以均相方式进行。

[0417] 在一个替代实施方案中，使用不可并入的瞬时结合核苷酸，并且任选地，该系统中的其他核苷酸不是可逆终止子，而是正常核苷酸，其进一步延伸由于例如缺少本文描述的用于闭合复合物测序的二价阳离子而被终止。

[0418] 在标记核苷酸瞬时结合的情况下，标记不需要经由可裂解的接头连接。它可以仅仅是碱基或任何其他相容位置上的经修饰的核苷酸。在这种情况下，标记也可以在末端磷酸位置上；在这种情况下，额外的磷酸和缓冲液中锰的添加促进了结合(Terminal phosphate labeled nucleotides:synthesis,applications,and linker effect on incorporation by DNA polymerases.Kumar S,Sood A,Wegener J,Finn PJ,Nampalli S,Nelson JR,Sekher A,Mitsis P,Macklin J,Fuller CW.Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.2005;24(5-7):401-8.Terminal phosphate-labeled nucleotides with improved substrate properties for homogeneous nucleic acid assays.Sood A,Kumar S,Nampalli S,Nelson JR,Macklin J,Fuller CW.J Am Chem Soc.2005年3月2日;127(8):2394-5。

[0419] 通过提供可以将可逆终止子转化回-OH的DNA修复试剂，可以使瞬时结合反应作为连续实时反应进行。设定DNA修复酶的条件(例如浓度)，使得反应速率较低。这将使得瞬时结合试剂在终止被逆转之前多次结合和去结合。DNA修复酶只能在延伸复合物的情况下修复3'末端，溶液中游离核苷酸的可逆终止部分保持完整。该系统可用两种类型的所述核苷酸或用单一核苷酸类型操作，例如在末端磷酸上具有标记的可逆终止子以及3'末端上的终止子(或虚拟终止子)。当将核苷酸并入时，末端磷酸标记是离去基团，从而使链延伸一个核苷酸但终止。然后，其他末端磷酸标记的3'终止核苷酸能够在3'位置多次瞬时结合，但不产生共价键合。最终，3'末端被DNA修复酶修复，从而允许有效并入末端磷酸标记的可逆终止子。这种实时方法相比PacBio实时测序的优点在于：对于模板中的每个核苷酸而言存在几

个独立检测事件。由于结合-去结合而引起的信号的明显闪烁允许通过PAINT超分辨密集分子场。多次询问每个碱基的事实导致碱基识别准确性的置信度增加。作为实时DNA修复的替代方案，这种末端磷酸标记的终止子方法也可以以分步方式通过循环试剂裂解或修复终止子或通过用光或生成的酸的定时裂解来进行。

[0420] 靶碱基序列的多重询问也可以通过使用含有3'至5'核酸外切酶活性的聚合酶并调节待并入的核苷酸的浓度来完成；使得延伸进行到下一个碱基之前，当前碱基已通过核酸外切酶的裂解和标记碱基(例如用荧光团直接标记)的重新并入而测试了多次。标记碱基可以是可逆终止子，使得测序一次进行一个碱基。通过提供两种类型的核苷酸的混合物，可以防止聚合酶回切(chew back)多于一个核苷酸；为常规标记的测序核苷酸补充硫代磷酸酯(例如，用硫代磷酸酯代替三磷酸酯链的α-磷酸的三磷酸酯类似物，从而防止聚合酶的进行性3'至5'核酸外切酶活性)，使得在几个单碱基核酸外切酶切除后，将硫代磷酸酯核苷酸并入，其无法通过DNA聚合酶的核酸外切酶活性去除。几次并入和去除可能包括不正确的并入，但这些并入通常在数量上会被正确的并入超过。硫代磷酸酯核苷酸不需要带有荧光团，并且不需要去除荧光团的裂解循环。如果核苷酸不带有3'终止子，则不需要裂解。碱基上的修饰可以充当虚拟终止子。终止并不完全并且多个核苷酸得以并入时，它们也可以被回切多次。在未使用裂解机制时，这种方法也可以实时进行。标记核苷酸与未标记硫代磷酸酯核苷酸的比率决定每个并入步骤的持续时间。这些方法与本文描述的DNA PAINT机制共同具有超分辨能力，因为密集场中的标记不会在完全相同的时间发出荧光。

[0421] 封闭系统

[0422] 本发明一些实施方案的关键是去除背景荧光(直接从溶液中未反应的荧光核苷酸发出，瑞利散射(Raleigh scattering)等)。这样做的一种方式是将标记的靶多核苷酸与未反应的荧光剂分开。本发明描述了如何以多种方式实现这一点。一种是通过去除未反应的荧光剂(例如通过洗涤)而另一种是通过从含有未反应的荧光剂的位置去除标记的靶多核苷酸。另一种去除背景的方式是通过使用渐逝场(例如通过全内反射产生)来限制激发接近靶多核苷酸所位于的表面。最后，瑞利散射可以通过其时间依赖性从荧光中滤除。瑞利散射寿命短并且可以与寿命更长的荧光分开。另外，容器表面，尤其是存在靶多核苷酸的表面应该对荧光标记无粘性，并且这可以通过钝化(例如脂质钝化)来实现。

[0423] 本发明的方法可以以下述模式进行，其中在分开的阶段提供用于反应不同步骤的反应组分。该方法也可以以“均相”模式进行，其中从一开始就在反应容器中提供反应所需的所有组分。然后，例如用于裂解键合的周期性电磁调制提供用于转换序列寄存器的定时机制。

[0424] 通过分流密闭容器内的试剂进行测序(参见图5和图6)

[0425] 在当前Illumina SbS中，每个循环提供过量试剂。因为并非所有试剂都在每个循环用完，所以以高昂的成本浪费了大量的试剂。此外，因为如果要进行250次循环，则需要储存250批这些试剂的足够溶液，所以仪器上需要足够的储存空间。这需要大型仪器，不利于构造适于临床应用的仪器。

[0426] 在一些实施方案中，一锅反应中的所有测序步骤均在单个容器中进行，但该容器含有多于一个被不混溶的气体或液体囊隔开的反应体积，每个体积在反应循环的不同步骤在反应位点上穿梭。在一些实施方案中，容器包含流体网络并且不同的反应体积储存在流

体网络中的不同位置。在一些实施方案中，在测序过程开始后，没有新的试剂穿梭到容器或锅内。

[0427] 在一些实施方案中，一锅反应含有试剂包，并且该试剂包含有试剂子包，这些包(并因此而言这些子包)多次通过模板多核苷酸(即，含过量试剂的溶液被重复使用。

[0428] 在一些实施方案中，一锅反应含有储存在锅中的多个试剂包(图6)，例如如果要进行100个测序循环，则将100个试剂包容纳在流体回路中。然后相继递送每个包。用于每个循环的包包括顺序排列的包含反应试剂或不混溶分离试剂或气隙的子包：被不混溶溶液或气体(例如空气、氮气或氩气)隔开的水溶液。不混溶子包可包含气囊(air pocket)或者可包含不混溶流体如油。

[0429] 在一些实施方案中，隔室是油包水液滴，或者每个含水包由气隙或其他介质隔开，使得每个包的试剂不能混合。

[0430] 一个子包用于并入，一个子包用于成像缓冲液，一个子包用于裂解缓冲液；这些子包散布着包含洗涤缓冲液等的子包。环路可以以预充液(priming solution)或拉伸液(stretching solution)开始。

[0431] 在另一个实施方案中，所述一锅反应在其中含有储存位置，试剂从这些位置引入，然后再从反应位点(模板阵列)去除，并且这样重复以执行测序循环。在该实施方案中，试剂不一定分包储存，而是溶液的某些组分移动到容器中的不同位置，例如在流动池的一个表面上的表面结合模板上发生反应的位置，然后反应溶液的一些组分移动到不包含正在测序的模板的表面。这些组分可以是核苷酸，并且可以移动这些组分以防其终止子和或标记在将核苷酸并入之前被裂解。

[0432] 这些包可以是进入由不混溶囊中断的流体通道中的含水进料。流体通道可以在管道、毛细管中形成，或者可以是整体式流体结构如微流体设备的一部分。通道中的每个包都被气囊隔开。一个测序循环包括几种不同的测序和洗涤试剂，各它们自通过气囊与另一个分离。气囊也将一个循环与下一个循环隔开。可以将不同的试剂和气囊放入连续环路中。在一些情况下，重复试剂环路，相同的试剂组在每个循环均接触延伸复合物。在其他情况下，提供大型环路，其中一组接一组地提供多个迭代的试剂组，其中每一组包括用于一个测序循环的试剂，并且每一组仅与延伸复合物接触一次。对于来自延伸复合物的200个碱基读段，需要200个试剂组。

[0433] 在一些实施方案中，为四种碱基中的每一种提供不同的子包，这意味着不需要标记核苷酸(并且任选地标记反应的不同组分)，或者如果四种核苷酸中的每一种的递送顺序已知，则不需要不同地进行标记。在一些实施方案中，在单独子包中递送多于四个核苷酸，其中超过四个的核苷酸提供不同的功能目的(参见瞬时结合核苷酸章节)。

[0434] 应该注意的是，如果在小体积中并行地对大量分子进行测序，则聚合试剂的频繁更换是合理的。如果在微流体通道中进行反应，则试剂的量将会很小，并且如果将阀门系统并入到测序芯片上，则通常将会过量提供的试剂可以储存在芯片上的指定腔室内并重复使用。

[0435] 该系统不是完全封闭的系统并且类似于玻璃容器(Terrarium)，因为该系统可以密封或向大气敞开，并允许热和光进入，但不需要长期管理，例如不需要在每个循环都添加新的试剂。

[0436] 使用无规卷曲与直链转换的测序(参见图7)

[0437] 在对单个长多核苷酸(例如100Kbp或更长的基因组DNA)进行一个或多个测序反应,这样可以测量30um左右的晶体长度的实施方案中,容器中可以布置多核苷酸的不同区带可以用于执行反应的不同步骤。

[0438] 在一些实施方案中,DNA聚合物可以在反应区与检测区之间来回缠绕以通过合成循环执行测序步骤。反应区含有反应所需的试剂而检测区不含反应试剂;具体而言,其不含荧光标记的核苷酸。当进行并入和裂解步骤时,靶多核苷酸沐浴在富含并入和裂解试剂的溶液中。当进行检测时,靶多核苷酸沐浴在不含并入裂解试剂/介质的溶液中。

[0439] 在一些实施方案中,靶多核苷酸从其一端拴系到平坦表面上。无需流动或电泳电位,多核苷酸靠近附连位点形成如同无规卷曲的斑点(blob)。当诱导流动或电泳效应时,多核苷酸伸出并且大部分多核苷酸延伸远离附连点。在一些实施方案中,标记的长链延伸超出核苷酸流动的区域。

[0440] 在生物化学步骤期间的一个替代实施方案中,多核苷酸可以在限制更少的3D区域(例如100um尺寸的微通道)中。在检测步骤期间,多核苷酸限于检测区域中的1D或2D区域。当要检测DNA时,将其绕进检测区;并且当要进行反应步骤时,将其绕回到反应区。

[0441] 半均相测序

[0442] 在本发明的一些实施方案中,可以根据需要在某些步骤之间引入洗涤步骤,并且本发明对于某些步骤而言是均相的,然后当再次引入新鲜试剂时变为半均相的,之后,步骤可以再次变为均相的。特别是未反应的荧光核苷酸可以在检测步骤之前和在引入裂解试剂或裂解缓冲液之后被去除。在一些实施方案中,一些步骤是半均相的,因为从芯片上的不同位置引入。

[0443] 在一些情况下,将本发明中描述的均相或一锅法测序反应进行多次。例如,在用新鲜试剂开始反应之后,进行五至十个循环,之后更新试剂进行另外五至十个循环。尽管如此,不频繁的试剂交换不同于常规的边合成边测序中交换的试剂。在常规的边合成边测序中,在每个测序步骤之间交换试剂,而在本发明中,一次性交换包含均相测序混合物的整套试剂,使得测序循环的所有步骤可以用相同的反应混合物完成。

[0444] 在一些实施方案中,即使以光化学方式完成裂解时,因为为了有效,光裂解过程或酸裂解过程需要核苷酸周围的特定化学环境,所以局部产生试剂从容器中的一个位置到另一个位置的酸分流。

[0445] 无需能量转移的均相测序

[0446] 在一些实施方案中,特别是在对分子的微阵列点或克隆扩增点(集群/集落、群落、rolony等)进行测序,其中存在高密度模板时,即使在背景信号的存在下也可以检测到表面的信号。这是因为信号集中在物镜聚焦的表面上。焦点外信号(out of focus signal)与表面信号的强度相比较弱,并且来自微阵列或克隆扩增点的焦点内信号(in-focus signal)的信噪比足以检测到标记和识别碱基。因此,在一些实施方案中,由于在表面上某位置处持续或显著发生,来自反应的结合对的信号在背景上与未反应的结合对区分开。在一些实施方案中,信噪分离通过应用强度阈值而发生。

[0447] 在一些实施方案中,将模板置于信号增强的结构内。这样的结构可以是零模波导或V型槽或纳米槽,其中照射受限或其包括增强荧光的等离激元材料或结构。漂浮在溶液

中、远离信号增强结构的标记反应物的荧光和与模板缔合的反应物相比未增强并且仍然相对较暗，因此可以区分邻近所述结构的单分子信号。

[0448] 用猝灭剂编码的核苷酸

[0449] 在一些实施方案中，反应涉及包含荧光供体和猝灭剂的能量转移(ET)对。在一个这样的实施方案中，供体荧光团在聚合酶上，并且不同标记的核苷酸用不同的猝灭基团或不同数量的相同猝灭基团标记。在一个实施方案中，供体和受体或供体和猝灭剂存在于聚合酶上。供体位于聚合酶的不同残基处，因此聚合酶的手指开合作用产生不同水平的FRET信号或不同水平的猝灭。可以通过一次添加一个来检测四种不同的核苷酸，并且由于手指闭合而引起的FRET或猝灭指示所添加的核苷酸数量。在另一个实施方案中，四种核苷酸全部同时添加，并通过FRET或猝灭的程度来检测核苷酸的属性。在一些实施方案中，核苷酸未标记。在一些实施方案中，核苷酸是可逆终止子。

[0450] 在一个实施方案中，聚合酶携带荧光标记并且可逆终止子核苷酸(根据它们是A、C、G还是T/U)携带不同的猝灭剂或不同数量的相同猝灭剂(并因此具有不同的猝灭效力)。当将可逆终止子猝灭核苷酸并入时，检测到聚合酶上标记的荧光减少。水平降低的荧光在大多数情况下随时间的推移保持在平均水平，从而允许有足够的时间来获取足够的数据以便能够确定并入了哪一猝灭剂并因此确定并入了来自A、C、G、T/U的哪一核苷酸。例如，当供体荧光团以10的水平(来自软件/相机的任意荧光单位)发荧光时，A猝灭剂标记的核苷酸的接近使荧光降至8+/-0.5，C使荧光降至6+/-0.5，G使荧光降至4+/-0.5而T使荧光降至2+/-0.5。在一些实施方案中，在测量了整个阵列上荧光的此类变化后，使终止逆转，从而允许并入下一个核苷酸。在一些情况下，光物理性质导致荧光标记的光漂白状态或暗态，这意味着未检测到并入事件或在并入的碱基上存在不明确性。在一些情况下，模板阵列的不同分子可以在可能具有单独荧光特征的聚合酶上带有供体。例如，其荧光亮度可以不同或其闪烁速率可以不同。在一些实施方案中，不是荧光水平从一个绝对水平范围降低到另一个绝对水平范围，而是检测到荧光水平范围的变化。例如，A使荧光降低2x，C使荧光降低3x，G使荧光降低5x且T使荧光降低10x。

[0451] 用猝灭剂编码核苷酸的主要优点是没有由溶液中的荧光核苷酸产生的背景。同样，激发仅需单个照射波长。此外，不用担心核苷酸上的标记漂白。

[0452] 在一些情况下，通过提供包含猝灭标记和荧光标记的混合物来完成核苷酸的编码。例如，A用猝灭剂1标记，C用猝灭剂2标记，G用荧光团1标记而T用荧光团2标记。因此，为了确定并入的核苷酸，监测猝灭程度以及发射波长的位移。

[0453] 通过荧光编码的猝灭核苷酸

[0454] 核苷酸可以呈非荧光态，例如猝灭态，直至将其并入，之后它们发出荧光。这克服了来自未并入的核苷酸，特别是那些粘附于载玻片或芯片表面的核苷酸的非特异性信号的问题。这样为使用各种类型的简单载玻片表面化学开辟了道路。另外，具有低吸附荧光核苷酸与猝灭核苷酸的表面的组合可能特别有利。如本文所用，猝灭剂是减少由荧光标记发射的荧光的部分。这包括对荧光发射的完全和部分抑制。只要一去除猝灭剂就可以检测到荧光的变化，则抑制程度并不重要。猝灭剂可以与末端磷酸附连，并且核苷酸可以有一个或多个被硫代磷酸酯或氨基磷酸酯置换的磷酸。例如，核苷酸可以是NH2-核苷酸或α-S-核苷酸。核苷酸也可以在3'末端被可逆性阻断。虽然这里使用了术语猝灭，而不是猝灭剂，但可能有

附连的第二染料，并且第一和第二染料可以以FRET伴侣的形式作为供体和受体或电子转移供体和受体相互作用(在这种情况下受体也可以是核苷酸碱基，如鸟嘌呤)。

[0455] 测序循环的定时

[0456] 在本发明的均相实施方案中，使用物理触发或定时机制将检测到的并入核苷酸转移到链中的下一个核苷酸。在某些实施方案中，荧光团经由可光裂解的键例如2-硝基苄基和具有高UV光裂解效率的衍生物附连在核苷酸上。如果这附连在3'糖处，则其充当可逆终止子。同样根据结构的性质，也可以附连在核苷酸碱基或2'末端处并且起到虚拟可逆终止子的作用；Lasergen(Stupi等人)已经开发了可以与本发明的方法一起使用的有效的可光裂解的虚拟终止子。或者，连接终止子与核苷酸的键可以是酸可裂解的，例如PN键或3'ONH_2，并且使用可光生成的酸(Gao等人J.AM CHEM.SOC第120卷，1998，第12698-126991998页；Gao等人NUCLEIC ACIDS RES.第29卷，第22期，2001年11月15日，第4744-502001页)。在另一个实施方案中，可以通过施加了电压的电极在电解质溶液中产生酸(Egeland等人ANAL CHEM.第74卷，第7期，2002年4月1日，第1590-62002页))。

[0457] 在这种情形下，将核苷酸猝灭直至将其并入，或者只有一旦其接近表面或模板才可检测到其超过阈值的荧光并且一个循环只能够并入一个核苷酸。来自并入的标记核苷酸的荧光在通过光或施加于电极的电压的作用而直接或间接去除之前，在所需时间段内保持可检测(经受光漂白，其可通过提供抗氧化剂而减弱)。一旦去除终止子，就可以并入下一个核苷酸。因此，这可以作为封闭系统操作，其中在开始时提供反应所需的试剂，并且通过物理信号的作用来重复或触发测序循环/为测序循环定时。

[0458] 荧光共振能量转移(FRET)

[0459] 在荧光共振能量转移(FRET)中，供体荧光团分子吸收激发能量并通过非辐射偶极-偶极相互作用将该能量以距离依赖性方式传递给邻近的受体荧光团分子(Stryer,L.和Haugland,R.P.1967)。

[0460] 在一个示例性实施方案中，能量转移部分可以是FRET供体/受体对。FRET是激发能从第一部分(供体)到第二部分(受体)的距离依赖性无辐射传输。FRET事件期间，来自供体或受体的荧光的变化(理想地，开-关)(例如，信号的增强或减弱)可以指示供体与受体之间的距离变化，但也可能对环境(pH、离子强度、离子类型、氧饱和度和溶剂化极性及方向变化)敏感(Deuschle等人2005Protein Science 14:2304-2314；Smith等人2005Protein Science 14:64-73)。

[0461] FRET效率受供体量子产率、受体消光系数以及供体与受体之间的光谱重叠影响。已经描述了具有良好光谱重叠的高产供体和高产受体(D.W.Piston和G.J.Kremers 2007Trends Biochem.Sci.32:407)。共振能量转移可以是分子间或分子内事件。

[0462] 与FRET受体连接的核苷酸在非常接近与FRET供体连接的聚合酶时可以产生可检测信号。或者，FRET供体和受体均可附连至相同的聚合酶，并且当酶存在构象变化时，例如从手指打开构象移至手指闭合构象时，观察到FRET信号的变化(Santoso等人PNAS 2010；107(2):715-20.)。

[0463] FRET供体和/或受体可以是荧光团、发光团、化学发光团、生物发光团或猝灭剂(P.Selvin 1995Methods Enzymol 246:300-334；C.G.dos Remedios 1995J.Struct.Biol.115:175-185；P.Wu和L.Brand 1994Anal Biochem 218:1-13)。

[0464] 在一些实施方案中，能量转移部分可以不经历FRET，但可以经历其他类型的相互能量转移，包括发光共振能量转移、生物发光共振能量转移、化学发光共振能量转移以及不严格遵循福斯特理论(Forster's theory)的相似类型的能量转移，如利用非重叠受体时的非重叠能量转移(Laitala和Hemmila 2005Anal.Chem.77:1483-1487)。

[0465] 荧光共振能量转移可用于在单分子实验中切除背景荧光(Braslavsky等人PNAS 100,2003，第3960-42003页)。已经介绍了称为iFRET的用于DNA测定的FRET，其中供体染料是用于对DNA染色的DNA嵌入染料(Howell WM等人2002)。据报道，iFRET产生的荧光值是仅由嵌入染料获得的荧光值的2.5倍，并且比传统FRET的荧光值高40倍以上。已表明，该差异的原因可能是iFRET系统涉及从一系列供体染料分子(与FRET系统中的单个供体形成对比)向受体部分中传递聚集的能量，然后受体部分能够不受阻碍地重新发射能量。使用常规FRET受体，已将双链DNA特异性嵌入染料(例如SYBR Green I)用作FRET供体。

[0466] FRET机制可以用本发明中描述的SbS方法来实现。本发明的一个实施方案涉及使用两个或更多个FRET伴侣之间的FRET在单分子水平上进行检测。FRET伴侣系统包含两个或更多个伴侣，每个伴侣附连到选自核苷酸、模板、聚合剂或聚合反应中所涉及的任何其他试剂的反应组分。选择供体-受体荧光团对，使得供体的发射光谱与受体的激发光谱重叠；可以使用许多不同的可用荧光标记组合。

[0467] 在一个优选的实施方案中，FRET检测手段用于标记核苷酸在接近靶DNA分子时被检测到的方法中。在聚合期间使标记核苷酸接近靶多核苷酸时，在核苷酸上的标记与FRET伴侣之间发生FRET反应。可以检测该反应。FRET标记通过末端磷酸基团与核苷酸附连。在延伸期间添加核苷酸时，去除这些磷酸基团，所以标记的检测、延伸和未标记核苷酸置换标记核苷酸几乎同时有效地进行。当核苷酸已经并入时，其不再有标记。释放的焦磷酸自由扩散出FRET范围。优选地，核苷酸库(例如腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和胸腺嘧啶)各自以使其FRET信号能够彼此区分开的方式进行标记。

[0468] 在另一个优选实施方案中，在与DNA结合的DNA染剂(例如嵌入染料)和与另一种聚合反应组分如核苷酸或聚合试剂附连的一个或多个FRET伴侣之间发生FRET。结合的DNA染剂可以充当FRET供体或受体。易于添加在沿着模板分子的多个位置并入的DNA染剂，使其可以有助于在沿着延伸链的任何位置的FRET反应。其中一个FRET伴侣可以是荧光标记的核苷酸，其用于延伸正在合成的多核苷酸。荧光标记可以直接或间接附连于核苷酸，并且可为纳米粒子。优选地，DNA染剂不是第一个FRET供体，因为这可能导致其大规模的光漂白；但该光漂白可以通过明智地选择防褪色组合物来最大程度降低。几种DNA染剂可用于对双链DNA染色，并且其中一些也能够相对有效地对单链DNA染色，例如SYBR Gold。然而，许多染料可导致发生光介导的链断裂。SYTOX Green染料相对耐这种断裂。

[0469] 或者，或除此之外，可以将FRET伴侣附连至聚合酶，例如DNA聚合酶。FRET标记可以呈半导体纳米晶体/量子点的形式，因为这些形式抗光漂白，当需要在整个合成过程中保留相同的聚合酶时这一点很重要。

[0470] 当FRET伴侣的激发和发射光谱重叠时，可能发生多种FRET相互作用。第一FRET伴侣在一个波长下激发，并且其发射波长与第二FRET伴侣的激发波长重叠。第二FRET伴侣具有与第三FRET伴侣的激发波长重叠的发射波长。这样，当FRET伴侣处于FRET范围内且第一个供体被激发时，可以发生一系列能量转移。这可导致大的斯托克斯位移(stokes shift)，

例如激发与发射的巨大分离。这允许在远离原始激发波长的波长处读取信号，这有利于消除从激发源到检测通道的渗漏(bleed-through)。重要的是，这种方法还确保所有组分(靶多核苷酸、标记核苷酸和聚合酶)都非常接近。在一些情况下，可以利用反斯托克斯位移。Howell等人描述了嵌入染料充当供体的系统。例如，单分子系统可能涉及作为供体的SYBR green 1和作为受体的Rox标记核苷酸或作为受体的YOYO-1和Atto647N。由于量子点可以在各种波长下激发，当它们用作受体时，可以使用在各种波长下发射的供体，例如YOYO-1、DAPI或SYBR gold。或者，并入的荧光核苷酸或荧光纳米粒子可以充当供体而嵌入染料如POPO-3可以用作受体(Nakayama等人2003)。量子点可以在远离受体染料的波长下被激发。所产生的信号将归因于量子点对其局部的一些荧光染料的局部激发。在检测FRET信号后，可通过直接激发DNA染剂来获得多核苷酸聚合物的图像。

[0471] 因为向受体的能量转移来自于高度局部化来源，所以来自于超出FRET范围(约10nm)的任何物质的背景荧光都不会造成背景荧光。因此，FRET使得能够连续监测反应，无需洗去未结合的荧光染料或纳米粒子。这样使得能够实时检测到多于一个核苷酸的添加。该系统可以是均相的，因为反应所需的全部物质可以在合成开始时放入反应容器中。希望保持反应溶液某种形式的搅拌或混合以使焦磷酸能够在释放后扩散出FRET范围。

[0472] 根据上述内容，在一个方面，本发明提供了一种对靶多核苷酸测序的方法，该方法包括以下步骤：

[0473] (a)利用经FRET伴侣标记的核苷酸和经FRET伴侣标记的至少一种其他聚合反应组分进行模板衍生化多核苷酸合成；

[0474] (b)通过检测FRET相互作用来确定并入的核苷酸；以及

[0475] (c)重复步骤(a)和(b)。

[0476] 优选地，这种方法用于进行序列的实时监测。在一些实施方案中，FRET信号是超分辨的。

[0477] 可以临时驻留在聚合剂或模板分子的FRET范围内的核苷酸可以或可以不并入，这取决于它对于所讨论的位置而言是否是正确匹配的核苷酸。FRET局部的这种临时驻留物必须与实际并入的核苷酸区分开。这可以通过利用在反应之前收集的关于例如FRET信号寿命或强度的信息来完成，这取决于其是来自于临时驻留在FRET局部的核苷酸还是正确并入的核苷酸。在本发明的背景下测量结合的一种方式是用占据与核苷酸本身不同的反应组分的FRET伴侣检测猝灭/去猝灭或优选检测波长位移。例如，由模板上的FRET伴侣引起的发射可以被核苷酸的磷酸上的FRET伴侣改变。当并入核苷酸并释放焦磷酸时，FRET相互作用被消除，因此模板上FRET伴侣的荧光特性被改变，例如其在位移波长处发射荧光。该方案中的第一供体可以是附连到聚合剂的量子点，并且整个过程可以被设计为具有能够实时监测的多种FRET相互作用。

[0478] 在各个方面，本发明包括一种对靶多核苷酸测序的方法，该方法包括：

[0479] (a)将多个嵌入染料分子并入靶多核苷酸中；

[0480] (b)使靶多核苷酸与包含聚合酶和四类不同标记的核苷酸的溶液接触，

[0481] 其中每种不同标记的核苷酸包含以下结构：

[0482] B-T-L，

[0483] 其中B是嘌呤或嘧啶碱基，T是与B化学结合的可光裂解的终止子基团，而L是包含

嵌入染料分子的荧光共振能量转移(FRET)伴侣的标记；

[0484] (c)使用聚合酶将所述不同标记的核苷酸之一并入与所述靶多核苷酸互补的链中；

[0485] (d)用第一波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，在嵌入染料和所并入的不同标记的核苷酸伴侣上诱导FRET，并由此鉴定所并入的不同标记的核苷酸的类型；

[0486] (e)用第二波长的电磁辐射照射靶多核苷酸，由此去除可光裂解的终止子基团；以及

[0487] (f)作为均相或一锅反应重复步骤(a)-(e)，由此对靶多核苷酸测序。

[0488] 如至此在本发明中描述的能量转移供体为DNA染剂，其包含嵌入剂染料或其组合、小沟结合染料或其组合，或能够沿着DNA模板的长度以基本上均匀的方式结合的任何其他能量转移体。

[0489] 能量转移供体可以是荧光分子或非荧光分子。能量转移供体可以被某一波长的光激发或因化学或生物反应而激发(化学发光和生物发光)。

[0490] 在一些实施方案中，测序方案的基本特征在于：能量转移供体必须始终接近增长链的前缘，以便能量转移可以检测每个新的核苷酸并入。当预先插入DNA双链体中时(例如通过预先温育)或在溶液中可用以插入增长链的碱基对之间时，嵌入染料保持其与新并入的核苷酸的接近性。作为提供能量转移供体如DNA染剂的替代方案，也可以通过将能量转移供体作为附连于聚合酶结合剂(例如聚合酶)的标记来满足这个要求。这种试剂由于其在合成中的功能作用而保持其与新并入的核苷酸的接近性；如果第一聚合酶结合剂与增长链解离，则另一可能调停和继续使链增长的聚合酶结合剂可以恢复为能量转移供体。

[0491] 在一些实施方案中，供体是位于聚合酶上的实体。在其他实施方案中，供体附连于实体，实体附连于聚合酶。在一些实施方案中，该实体是荧光纳米粒子(例如量子点)。在一些实施方案中，该实体是荧光团、发色团或有机染料。在一些实施方案中，供体是与聚合酶融合的多肽，例如绿色荧光蛋白(GFP)或类似的荧光蛋白。

[0492] 虽然上面已经使用了术语FRET，但是在本发明的方法中，该术语可以用能量转移代替，因为该机制可能不一定涉及荧光，而是更广义地为任何能量转移机制。此类能量转移机制可以包括生物发光能量转移、化学发光能量转移和不一定有明确定义的其他能量转移方法。例如，从沿着DNA链散布的嵌入染料的能量转移涉及与FRET中的单粒子供体不同的类天线现象。同样，除能量转移外，转移还可以是电子转移，特别是当检测猝灭事件时。在本发明描述的一些情况下，均相反应在没有能量或电子转移的情况下进行。

[0493] 在一个实施方案中，两个能量转移伴侣与聚合酶附连，这两个伴侣各自可以独立地充当核苷酸上的标记的能量转移供体和/或可以在彼此之间转移能量。例如，RNA聚合酶上的一个位置可以用Cy3B标记，Cy3B受绿光激发时可以将能量转移到Atto 647N(Santoso等人PNAS 2010 107(2):715-20.)。

[0494] 在一个实施方案中，能量转移供体经由第二蛋白与聚合酶的附连而与聚合酶间接附连。在一个这样的实施方案中，将聚合酶用生物素标记。生物素可以在体外经由与上文针对荧光标记附连所述的相同化学方法与蛋白质附连。生物素也可以经由体内生物素化(例如使用AviTag、Genecopoeia)附连。例如，生物素也可以使用TNT快速偶联转录/翻译/Transcend系统(Promega)经由体外翻译来附连。

[0495] 然后可以经由链霉亲和素-生物素相互作用使二价蛋白质(链霉亲和素)与聚合酶附连。可以购买附连有标记(Atto-tec)的链霉亲和素,或者可以在与聚合酶附连之前添加标记。经标记的链霉亲和素包括荧光纳米粒子-链霉亲和素(量子点链霉亲合素、荧光团链霉亲合素;Life Technologies)、Atto488-链霉亲和素(Atto-tec)。诸如超亮Cy3b等标记可以缀合到链霉亲和素上。可以使用中性亲和素(neutravidin)或亲和素代替链霉亲和素。通常,能量转移供体可以与链霉亲和素附连。

[0496] 聚合酶上与能量转移供体附连的部分需要暴露在蛋白质表面上,并且可以容易接受化学标记。

[0497] 当聚合酶具有多个待标记的暴露部分时,可以添加多个标记,或者由于反应效率低,只有所述部分的一个子集可能得到标记,并且可能难以确定已经标记的位置。

[0498] 本发明中使用的试剂具体地讲是20nm直径和更小或40nm直径或更小的纳米粒子,因为明显更大的珠粒太大而不能有效地进行所需的分子过程。当将纳米粒子用作FRET供体时,非常重要的是确保其被良好钝化以防止将会产生假FRET信号的荧光核苷酸非特异性结合。

[0499] 在一个实施方案中,能量转移供体部分可以是附连到聚合剂的纳米粒子或荧光染料。在一些实施方案中,纳米粒子可以具有其他或另外的表面涂层,这些涂层可以改变颗粒的特性,例如增加或降低在水或其他溶剂中的溶解性。纳米粒子可以是水分散性的。纳米粒子可以是非闪烁纳米粒子。纳米粒子可以是光稳定的。纳米粒子可以被设计成不干扰聚合酶活性,包括聚合酶与靶分子的结合、聚合酶与核苷酸的结合、聚合酶催化核苷酸并入或聚合酶裂解核苷酸和/或释放裂解产物。

[0500] 在一些实施方案中,供体的发射与受体的激发光谱重叠。图1显示了嵌入剂的发射与四种潜在受体重叠的程度(每种受体只能标记四种核苷酸中的一种)。然而,由于FRET供体可以非常靠近受体,所以受体和供体的重叠程度不需要很大。可以利用能量转移盒,其中例如嵌入染料供体或聚合酶上的标记将能量转移给2种不同的受体染料。两种不同染料中的每一种是两种不同结构的一部分。不同染料的其中一种结构包含不同染料充当其能量转移中继的另一受体;另一种结构不包含另一受体。这样,不需要供体发射波长与四种不同染料的激发波长重叠,只需要两种,它们各自发光或将其转移到发光的另一受体。如本说明书别处所述,本发明的核苷酸中的染料可以经由可光裂解的键合附连。检测能量转移和识别碱基:能量转移事件可以通过检测来自受体的发射波长的增加以及来自供体的发射波长的减小来检测。供体发射的下降与其中一个受体发射的伴随增加的一致(反相关)证实发生了FRET事件。这可以通过使用基于波长分割图像的光学器件(例如Quadview,Photometrics)来完成。理想地,每个发射波长都整洁地分离成象限图像之一。然而,在大多数情况下,受体染料的发射虽然不同,但在其发射光谱的一些部分重叠。可以通过使用图像分割光学器件来产生每个发射体的签名(signature)而区分此类紧密间隔的发射波长。图1b显示了基于四个检测通道每一个中的信号幅度标记A、C、G或T的每个荧光团的不同签名。

[0501] 本领域已知的另外的FRET技术可加以修改并应用于本发明。例如,Beechem的申请(申请号:14584829;申请日期:2014年12月29日),其通过引用整体并入本文。开放-闭合复合物测序

[0502] 在另一种情况下,一些组分可以与不包含正在测序的模板的表面缔合。此类组分

可以在模板上发生某些作用后释放。这种作用可以是在完成并入并产生共价附连之前形成聚合酶与靶多核苷酸和核苷酸的闭合复合物，并且这种作用在不存在二价阳离子的情况下进行。使用本发明的方法(例如从嵌入染料到核苷酸上的标记的FRET)，在与聚合酶复合物附连的标记核苷酸的阵列上进行成像。成像后，释放二价阳离子，使得这些离子可以移动到闭合复合物处并允许完成并入，同时核苷酸从表面移开以限制每个循环添加一个以上核苷酸的情况。

[0503] 在一些实施方案中，二价阳离子和核苷酸的移动是一个主动过程。这可以通过将不同溶液从容器的一部分分流到另一部分来完成。也可以通过电学方法完成。便利的是，二价阳离子和核苷酸带有相反电荷，使得通过将电偏压从顶部表面切换到底部表面促进它们在相反方向上的移动。完成并入后，核苷酸上除了一个以外的所有磷酸都是反应的离去基团的一部分。这使得能够在未并入的磷酸上提供荧光标记或第一结合对。这可以在β或γ磷酸上，或当在核苷酸中提供另外的磷酸时，可以在另外的磷酸之一上。例如，带标记的四、五和六磷酸修饰的核苷酸更容易被聚合酶处理。随着并入的完成，然后再次去除二价阳离子，使得可以再次形成闭合复合物以对下一个碱基测序。二价阳离子和核苷酸的移动可以通过向表面施加电偏压来控制。例如，当正在测序的模板在第一表面上时，二价阳离子远离模板向第二表面(不含正在测序的模板)上的负电位移动。出于本发明的目的，电偏压可以被归类为物理触发因子。电触发因子可以是电偏压的开关，其导致某些化学部分被吸引或排斥。在一个替代实施方案中，二价阳离子在闭合复合物形成期间被光笼罩，而在检测并入的碱基之后不被光笼罩。已知螯合剂例如1-(2-硝基-4,5-二甲氧基苯基)-N,N,N',N'-四[(氧羰基)甲基]-1,2-乙二胺(DM-硝基苯)会螯合二价阳离子如Mg2+并在暴露于350nm范围内的紫外光时将其释放。Kaplan JH1,Ellis-Davies GC.Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations.Proc Natl Acad Sci U S A.1988年9月;85(17):6571-5。这使得反应能够以均相形式进行并通过光定时到下一个碱基。

[0504] 阵列引物延伸

[0505] 在一些实施方案中，测序在寡核苷酸(其游离3'的末端通过目标序列平铺)阵列上进行，仅需单个碱基延伸，另外，也在要靶向特定的已知突变时(Methods Mol Biol.2008;444:161-7.doi:10.1007/978-1-59745-066-9_12)；当需要解决野生型背景中的罕见突变时(在癌症中常常如此)，根据本发明的方法，这种阵列引物延伸的单分子实现方式具有特定的优点。这可以在循环肿瘤DNA上完成。这里，在微阵列的每个点或特征部中，人们可以以高置信度检测和计算核酸中每个靶向位置处每个等位基因变体的频率。根据微阵列特征部或点中的分子数量，可以检测例如1/10,000或1/100,000的罕见变体，这取决于点的大小和点内分子的密度；本发明的超分辨方面可应用于DNA探针相对紧密堆积的标准微阵列的情况；制备微阵列的方法在DNA Microarrays:A practical approach Ed.M Schena,OUP,1999)中有描述。

[0506] 聚合酶和核苷酸

[0507] 聚合酶必须是可以耐受经修饰核苷酸并入的聚合酶。不同的聚合酶能够耐受核苷酸上不同的标记位点。在能量转移受体和/或终止子在碱基上的本发明实施方案中，可以适当地采用Klenow和9°North及其变体。在一些实施方案中，9°North经修饰(由NEB作为Therminator出售)。在能量转移受体和/或终止子在糖的3'或2'位置上的本发明实施方案

中，可以适当地采用在特定位置具有修饰的9°North变体。来自超嗜热古菌(Thermococcus)9°N-7的合适DNA聚合酶包括以下突变体：9°N(D141A/E143A/A485L)DNA聚合酶基因；9°N(D141A/E143A/Y409V/A485L)DNA聚合酶基因；9°N(D141A/E143A/L408S/Y409A/P410V)DNA聚合酶基因。在一些实施方案中，所用的聚合酶天然地为或工程化为高度进行性的并且经过许多循环仍然附连于增长模板。在一些其他实施方案中，聚合酶天然地为或工程化为非进行性的，并且能够在添加一个或几个核苷酸后容易地解离。这样的聚合酶可以起催化作用，因为一旦其从一种增长复合物解离，就可以附连到另一引发模板上并聚合，从而实现向多条增长链添加核苷酸。

[0508] 在能量转移供体与聚合酶附连或缔合的情况下，聚合酶必须能够耐受附连。就附加上供体的链霉亲和素的附连而言，Klenow聚合酶能够耐受该附连，Phi29聚合酶和类似聚合酶也是如此。

[0509] 可以进行不同标记位置、接头类型和长度的筛选，以确定放置聚合酶上的供体的最佳方向/灵活性，使其可以最佳地与核苷酸上的受体相互作用。聚合酶上任何位点与正并入的核苷酸之间的距离通常足够近，以便检测到稳健的FRET信号。

[0510] 酶制剂常常具有除所需功能性之外的功能性。例如，酶可以具有核酸外切酶以及聚合酶活性。或者酶制剂可存在污染活性。可能需要采取措施来防止由于此类不希望的活性而产生的不利影响。据报道，可商购获得的DNA聚合酶如Therminator、Klenow、Bst、Bsu和9°Nm DNA聚合酶、Taq(例如ampliTaq)与可逆终止核苷酸作用良好。工程化聚合酶的方法已经产生了良好的结果并且多种工程化机制如“差异保守(conserved by difference)”(Chen等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 107,1948-1953)可用于使聚合酶适应需要。TOPOTAQ(Fidelity系统)耐DNA聚合酶的常见抑制剂，如DNA染剂，诸如SYBR green 1和II及SYBR gold。核苷酸可以带有终止子或不含终止子，在后一种情况下，可以通过瞬时核苷酸结合以连续方式进行测序，或者可以使用闭合复合物方法。

[0511] 聚合试剂包括DNA聚合酶、RNA聚合酶、RNA转录酶、逆转录酶或连接酶，以及使得模板导向聚合成为可能的化学试剂。有利的聚合酶包括基于9°N聚合酶(New England Biolabs)的那些。如本文所用，“聚合试剂”还包括能够根据明确定义的规则执行高保真碱基配对的分子或复合物，而不管它们是否催化单个核苷酸的添加。它们可以是天然的，例如上面列出的那些，或者人工的，例如抗体酶和核酶。聚合试剂可以包括一种或多种化学试剂。例如，模板导向连接可以通过化学反应介导(Xu等人，2001；G.von Kiedrowski，1986)。

[0512] 包含碱基、终止子和标记的差异性标记核苷酸

[0513] 在一些实施方案，例如将试剂从容器中的一个位置分流到另一个位置的那些实施方案中，核苷酸可以在3’末端含有可化学裂解的可逆终止子基团，如3’-O-叠氮基甲基可逆终止子、3’-O-烯丙基可逆终止子或3’-ONH2可逆终止子。在一些实施方案中，终止子可以带有荧光基团或结合伴侣。在其他情况下，标记或结合伴侣可位于核苷酸上的不同位置。另外，终止子可以是核苷酸上另一位置的修饰，其虽然不化学阻断延伸，但可以抑制延伸。因此，虽然保留了3’OH官能团，但是碱基上的结构在其并入后阻碍进一步延伸，此类核苷酸已由Lasergen、Genovoxx和Helicos进行了描述并且称为虚拟终止子。Helicos核苷酸可从SeqLL Inc(Woburn,MA,USA)获得，并且包含经由含二硫键的接头附连的有效单分子标记(Atto647N)和防止每个循环添加一个以上核苷酸的特征。碱基标记在核苷酸上的以下位置

上进行:dATP和dGTP的7-脱氮位置以及dCTP和dUTP的C5位置。

[0514] 在一些实施方案中,接头含有带负电荷的羧基。

[0515] 在一些实施方案中,标记是超分辨率相容的(例如,对于STED-20或STORM-17而言)。在一些实施方案中,标记不是可直接检测的标记,而是可检测的相应伴侣或反标签能够与之结合(并且与PAINT-17相容)的结合伴侣,即标签。在一些实施方案中,标签和反标签为寡核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸为非沃森-克里克碱基对。

[0516] 在一些实施方案中,标记与核苷酸直接附连,无需可裂解的接头(用于瞬时结合策略-19)。这种瞬时结合核苷酸不能形成共价键合,因为延伸链的3'被可逆终止子阻断。或者,在一些实施方案中,此类核苷酸是瞬时结合的,原因是其5'被修饰以防止其与延伸链的3'端形成共价键合。

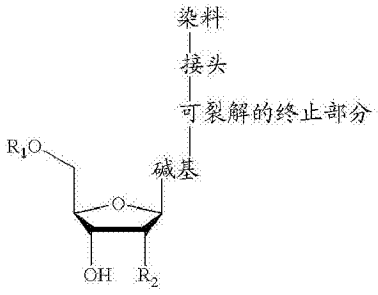
[0517] 在一些实施方案中,核苷酸可以是可光转换的(Singer M1,JäschkeAJ Am Chem Soc.2010年6月23日;132(24):8372-7.doi:10.1021/ja1024782。

[0518] 附连有多个荧光团的虚拟可逆终止子核苷酸可从Genovoxx获得,并且这些核苷酸可用于增加信噪比,并使得能够用简单照射源和低成本相机完成测序。在一些实施方案中,标记和/或虚拟终止子可以附连在2'糖位置。在标记与末端磷酸附连的实施方案中,可以将另外的磷酸添加到核苷酸末端以改善并入。在一些实施方案中,带有针对同时结合和去结合的成像链的多个结合位点的核苷酸可以产生非常明亮、持久的信号,但不具有超分辨率。成像剂结合位点可以是连续的或者可以被核苷酸序列或接头隔开。可以在成像反应之前使插入核苷酸序列成为双链的。在一些实施方案中,当目标不是进行超分辨率成像时,长寿命成像链可以在并入核苷酸之前与核苷酸结合。

[0519] 可光裂解的核苷酸的结构:

[0520] 在各个实施方案中,至少一个差异性标记核苷酸包含选自该章节(包含碱基、终止子和标记的差异性标记核苷酸)的结构/化合物。

[0521] 在一个实施方案中,提供了包含脱氧核糖或核糖及碱基的核苷酸和核苷化合物,其中所述碱基与可光裂解的终止2-硝基苄基共价连接。2-硝基苄基可以被增加DNA合成终止以及去保护速率的基团取代。另外,2-硝基苄基可以通过附连报告基团如染料或结合对来检测。染料可以通过双功能接头与2-硝基苄基连接。根据本发明的化合物可以用下式表示:

[0522] 

[0523] 其中R_1为H、单磷酸、二磷酸或三磷酸,R_2为H或OH,碱基为胞嘧啶、尿嘧啶、胸腺嘧啶、腺嘌呤或鸟嘌呤或其天然存在的衍生物,可裂解终止部分是赋予化合物聚合酶终止特性的基团,接头为双功能基团,而染料为荧光团。

[0524] 根据本发明的化合物可以被设计为可用于DNA合成测序的发荧光的、光不稳定性可逆终止子。这些化合物可以是经优化的可逆终止子,被修饰为在水溶液中具有快速有效

的去保护行为和良好的荧光特性。

[0525] 在一些实施方案中，使用本文描述的核苷酸的7-脱氮嘌呤核苷酸形式代替核苷酸的腺嘌呤和/或鸟嘌呤形式。

[0526] 包含所公开的结构的标记核苷酸的合成和用途例如在美国专利号8,889,860、8,497,360、8,361,727、8,198,029、8,148,503、7,964,352、7,897,737和7,893,227中有描述。这些专利的公开内容通过引用整体并入本文。在这些发明中描述的结构以及在文献和专利中针对SbS描述的其他结构的形式可以用本发明一些实施方案的荧光团标记(包括作为FRET伴侣)。而且，SBS核苷酸结构可以用寡核苷酸而不是荧光剂修饰。来自Lasergen的闪电终止子(lightning terminator)(如Ju及同事例如Li等人1100(2):414-9(2003)所述的那些)是对本发明的方法特别有利的核苷酸，原因是其可光裂解性将支持均相反应并且荧光标记的添加可以通过寡核苷酸的添加来取代以实现结合对和DNA PAINT相互作用。基于Nature 456,53-59(2008)中描述的双重修饰结构的核苷酸也可以在本发明的方法中用作FRET伴侣(例如用YOYO-1作为供体)或用寡核苷酸标签取代荧光剂。

[0527] 可用的核苷酸并非总是100％纯的。有时有其他碱基污染。因此，如果标记的反应产生预计是由于特定碱基而产生的特定信号，则在少数情况下，这实际上可能是由不同的碱基所产生的。这在误差模型中需要考虑到。

[0528] 经修饰的碱基即使在裂解后也在增长链中留下阻碍聚合酶进展的分子残余物或“瘢痕”；由Lasergen开发的最新的可光化学裂的解核苷酸留下的瘢痕最小。

[0529] 如本文所用的术语“核苷酸”意指任何标准的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸。核苷酸可以与标签或标记附连。或者，核苷酸包括根据定义规则(例如沃森-克里克碱基对规则)与其他碱基配对的任何经修饰核苷酸或变体。

[0530] 核苷酸通常包含合适的糖部分，例如碳环部分(Ferraro和Gotor 2000Chem.Rev.100:4319-48)、无环部分(Martinez等人，1999Nucleic Acids Research 27:1271-1274;Martinez等人，1997Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters第7卷:3013-3016)和其他合适的糖部分(Joeng等人，1993J.Med.Chem.36:2627-2638;Kim等人，1993J.Med.Chem.36:30-7;Eschenmosser 1999Science 284:2118-2124.;以及美国专利号5,558,991)。糖部分可以选自以下这些：核糖基、2'-脱氧核糖基、3'-脱氧核糖基、2',3'-二脱氧核糖基、2',3'-二脱氢二脱氧核糖基、2'-烷氧基核糖基、2'-叠氮基核糖基、2'-氨基核糖基、2'-氟代核糖基、2'-巯基核糖基、2'-烷基硫核糖基、3'-烷氧基核糖基、3'-叠氮基核糖基、3'-氨基核糖基、3'-氟代核糖基、3'-巯基核糖基、3'-烷基硫核糖基碳环、无环和其他经修饰的糖。一方面，3'-位具有羟基，以用于链伸长。另一方面，3'-位具有附连的可逆终止子和/或附连的能量转移受体。再一方面，2'-位具有附连的可逆终止子和/或附连的能量转移受体。

[0531] 核苷酸通常包含杂环碱基，该碱基包括通常存在于核酸中的经取代或未取代的含氮母体杂芳环，包括天然存在的、经取代的、经修饰的或工程化的变体。碱基能够与适当的互补碱基形成沃森-克里克和/或Hoogstein氢键。示例性碱基包括但不限于嘌呤和嘧啶，例如：2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、腺嘌呤(A)、乙烯基腺嘌呤、N6-Δ2-异戊烯基腺嘌呤(6iA)、N6-Δ2-异戊烯基-2-甲基硫代腺嘌呤(2ms6iA)、N6-甲基腺嘌呤、鸟嘌呤(G)、异鸟嘌呤、N2-二甲基鸟嘌呤(dmG)、7-甲基鸟嘌呤(7mG)、2-硫代嘧啶、6-硫鸟嘌呤(6sG)、次黄嘌呤

和O6-甲基鸟嘌呤;7-脱氮嘌呤例如7-脱氮腺嘌呤(7-脱氮-A)和7-脱氮鸟嘌呤(7-脱氮-G);嘧啶例如胞嘧啶(C)、5-丙炔基胞嘧啶、异胞嘧啶、胸腺嘧啶(T)、4-硫代胸腺嘧啶(4sT)、5,6-二氢胸腺嘧啶、O4-甲基胸腺嘧啶、尿嘧啶(U)、4-硫尿嘧啶(4sU)和5,6-二氢尿嘧啶(二氢尿嘧啶;D);吲哚例如硝基吲哚和4-甲基吲哚;吡咯例如硝基吡咯;水粉蕈素(nebularine);肌苷;羟甲基胞嘧啶;5-甲基胞嘧啶;碱基(Y);以及甲基化、糖基化和酰基化碱基部分;等等。另外的示例性碱基可以在Fasman,1989,Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,第385-394页,CRC Press,Boca Raton,Fla.及其中引用的参考文献中找到。

[0532] 有机染料可以是与发射可检测波长的光相容并且可以通过聚合酶并入的任何染料。使用单个供体需要四个碱基中的每一个上的每个不同受体作为与供体合作的能量转移受体。这用于从发射光的波长中识别碱基的属性。可能有四种对供体起反应的不同染料。例如,当供体是嵌入目标双链体中的YOYO-1或Sytox Green时,受体可以是Cy3/Cy3B、Alexa 594、Atto 647N和Cy5.5或每个波长范围内的相似染料。另一个实例是当供体是与聚合酶附连的Cy3b并且受体为Cy634、AF647、AF676和AF700时。或者,4种受体不含具有4种完全不同波长的染料。

[0533] 可裂解的键在检测标记核苷酸的存在与否后可以被裂解。标记可以以阻断另外核苷酸并入的方式附连。这样确保了仅并入一个标记核苷酸。因此,可裂解的标记可具有双重功能,即:阻断多于一个核苷酸的添加,以及报告核苷酸的属性。

[0534] 可裂解的键可以通过光裂解(如果其为可光裂解的)。Stupi等人已经描述了碱基上作为光可逆性阻断剂/标记的基于2-硝基苄基的可光裂解的接头(Angew.Chem.Int.Ed.51:1-5(2012))。如果可裂解的键为二硫桥,则可以使用温和还原剂如2-巯基乙醇、(二硫苏糖醇)二硫苏糖醇(DTT)和三(2-羧乙基)膦盐酸盐TCEP将其裂解。如果可去除的键包含二醇,则可以使用饱和NaIO4水溶液将其选择性裂解。如果可去除的键是酰胺或胺氧基(ONH_2),则可以通过温和的酸将其裂解,所述酸可以作为光生酸产生。化学处理优选是温和的。例如,所得多核苷酸内形成的氨基磷酸酯键可以用稀乙酸(例如0.1M)特异性裂解。在一些情况下,需要采取措施确保延伸引物在温和的酸处理后保持与模板复合。例如,引物可以与模板共价连接,或者引物和模板两者均可与表面连接,彼此密切接触。

[0535] 有两个类型的终止概念。第一个是不支持链延伸的糖的3'处的修饰。第二个是"虚拟"终止子概念,其中终止不是化学性的,但对于进一步的核苷酸添加是困难的,例如通过空间位阻。

[0536] Firebird提供具有3'-ONH2可逆终止子的三磷酸和携带游离氨基的二醇接头,可以将其附连到荧光剂或其他标签部分。二醇在几秒钟内被高碘酸盐水溶液裂解。可以并入具有与3'末端附连的标记的核苷酸(Hutter,D等人labelled nucleoside triphosphates with reversibly terminating aminoalkoxyl groups.Nucleos.Nucleot.Nucl.Acids 29,879-895(2010))。

[0537] 本发明的一些实施方案包括含DNA核苷酸的核苷酸组合物,所述DNA核苷酸包含三个或更多个磷酸基团、糖环、四种碱基A、C、G、T/U中的每一种、可裂解接头和经由可裂解接头附连的寡核苷酸标签。在一些实施方案中,在糖的3'末端上提供单独的终止子。在其他实施方案中,可裂解接头和寡核苷酸标签具有允许可逆终止的尺寸和结构。在一些实施方案

中，在裂解之后，所述结构有少于200个原子附连至碱基。在其他实施方案中，少于30个。

[0538] 阵列和模板

[0539] 如本文所用的“模板衍生化多核苷酸合成”意指使用靶核苷酸序列作为模板，利用特异性并入核苷酸的聚合试剂形成多核苷酸分子。聚合试剂特异性地并入符合公知的沃森克里克碱基配对规则的核苷酸，以产生模板的互补链。并入可以是核苷酸类似物、核苷酸模拟物或可以用多核苷酸为模板并且其中配对是按照明确规则的其他分子(Eckardt等人2002;Czlapinski等人，2001)。例如，已经报道了DNA碱基形状模拟物的高保真模板化，不形成沃森克里克键(Delaney等人，2003)。反之亦然，模板可以是能作为多核苷酸合成模板的任何分子。

[0540] 靶多核苷酸和合成的多核苷酸可以各自独立地为RNA或DNA链。DNA可为基因组DNA或cDNA。RNA可为mRNA、微RNA、lncRNA或基因组RNA，例如来自病毒的RNA。

[0541] 合成过程可以涉及使引物退火为模板多核苷酸。然后可以通过模板衍生化合成来延伸引物。引物由5-100个核苷酸组成，优选由10-75、15-65、20-55、25-50或30-45个核苷酸组成。可以对引物进行标记。可以制备引物，然后与靶多核苷酸杂交。引物可由核苷酸类似物或模拟物或改善其作为引物的功能的任何修饰组成。或者，可以使用例如脱氧核糖核酸酶1(DNA酶1)、切口核酸内切酶、Cas9的切口突变体或与向导RNA偶联的相关蛋白质在双链分子中产生切口。合成并因此而言测序可以在每个切口位点开始，并且非模板链逐渐被置换(就链置换聚合酶例如Phi29和Bst1而言)或切掉(就具有5’至3’核酸外切酶活性的聚合酶如Taq聚合酶而言)。通过在许多测序循环中检测到的测序信号的迁移方向揭示切口是在有义链还是反义链中催发置换合成。切口的链和局部序列背景在由仅裂解其识别位点的一条链的切口核酸内切酶产生时是已知的。在另一替代方案中，通过聚合剂本身例如整体并入本文的WO/2014/14039中所描述的TthPrimPol聚合酶产生引物。

[0542] 模板多核苷酸优选附连或拴系于溶液(例如固体表面或凝胶)。模板可以间接附连到表面或通过附连在表面上的聚合试剂附连，或者可以被捕获探针/引物捕获。捕获可以是单链靶标或双链模板的粘端或“粘性末端”。通过例如RecA介导的链交换或钝端连接，捕获也可以是双链区。

[0543] 模板DNA天然的RNA启动子可用于通过RNA聚合酶进行RNA合成。或者，可通过作为捕获探针的一部分或通过转座子导向整合到沿多核苷酸的位点中来并入特定聚合酶的外在启动子(extrinsic promoter)。T7和T3RNA聚合酶启动子是优选的外在启动子。

[0544] 本发明的方法优选在表面上进行，原因是比在溶液中自由扩散的反应更容易组织和重复监测表面上的反应。

[0545] 如本文所用的术语“阵列”涉及表面上两个或更多个(通常数千个、数百万个、数十亿个)模板分子的空间排列，可以按这些分子在特定2-D坐标中的持久定位地址从一个循环到下一个循环对其进行询问。

[0546] 阵列可以是随机阵列，其中核苷酸随机附连于表面。或者，阵列可以是空间有序的。核苷酸可以以网格图形排列，每个核苷酸之间具有规则间距。核苷酸可以与相同序列的多个其他模板一起位于“点”中。或者，阵列可以包含DNA集群。同样，阵列可由单个聚合物内的相同序列的串联拷贝组成，正如通过滚环扩增(RCA)所产生的那样(Smirnov等人)。

[0547] 多核苷酸可以直接或间接附连于表面上。例如，该过程中使用的酶(例如连接酶或

聚合酶)可以附连于固体表面上。该酶结合靶多核苷酸,从而将其锚定于固体表面。

[0548] 或者,多核苷酸可以被附连于表面的寡核苷酸捕获。捕获可以通过单链寡核苷酸与单链靶标或与双链靶标的单链区域杂交。或者,多核苷酸或表面固定的捕获探针可包含粘性末端或两者均可具有粘性末端。模板和合成的链可以通过连接反应永久连接到表面。或者,永久性固定可以通过包括与胸腺嘧啶残基相对的补骨脂素(Psoralen)部分并用紫外光交联来介导。

[0549] 阵列优选在流动池中形成。阵列可以存在于流体或微流体导管内。阵列也可以在微量滴定板的底部上或平底微量离心管上。这些装置优选具有由高光学质量材料构成的底部。

[0550] 可以通过本领域技术人员公知的许多方法(例如Fodor等人SCIENCE第251卷,1991,第767页(1991);Hegner等人(1993)或Finzi和Gelles(1995)描述的那些方法)将分子附连于固体表面。在WO02/061126和WO01/57248中描述了使用寡核苷酸核苷酸形成阵列并将多核苷酸附连到阵列的合适方法。

[0551] 表面优选为玻璃、二氧化硅或聚合物例如PMDS、环烯烃、聚苯乙烯或含氟聚合物。基底优选为载玻片、盖玻片、硅晶圆、微制作芯片或多孔板,例如平底光学级96孔板。多核苷酸可以附连至涂覆表面的材料上。例如,可以使用由Corning Inc(USA)或Asper Biotech(Estonia)提供的氨基硅烷涂覆表面。多核苷酸可以附连至可能有助于产生或调节FRET信号的珠粒、颗粒或结构,例如纳米条或纳米棒。该表面可以用例如银或金颗粒金属化以增强荧光或拉曼信号(Malicka Anal Biochem.第315卷,第2期,2003年4月15日,第160-9页,2003)。

[0552] 另外,表面或其上的颗粒可带有电荷或电偏压,或可被加热以控制测序过程(Schifferli等人,NATURE第415卷,第6868期,2002年1月10日,第152-5-S页,2002)。表面产生的电场是控制表面处核苷酸的吸引和排斥的有用方式(Asanov等人Anal Chem.70:1156-63(1998);Sosnowski PNAS.94:41119-231997(1997))。

[0553] 可以在与酶促反应相容且对荧光反应组分具有低吸收的表面上产生阵列。表面可以涂有琼脂糖、聚丙烯酰胺、溶胶-凝胶、聚合电解质多层、牛血清白蛋白/生物素/链霉亲和素涂层或各种类型的聚合物基质。可以使用水凝胶涂覆表面,例如得自Schott的Slide H或得自Surmodics的CodeLink。

[0554] 通过用BSA或Caesin对表面进行处理可以减少与表面的非特异性结合。未标记的核苷酸和各种类型的核酸如酵母tRNA和鲑鱼精DNA可用于阻断表面。有各种商用表面阻断剂可用,例如Block-Aid((ThermoFisher)。特别是对于某些纳米粒子而言,通过用CsCl或$MgCl_2$进行表面处理也可以实现阻断。

[0555] 在一些实施方案中,被检测的分子以高密度排列,并且使用超分辨法来定位和分辨比可以通过标准衍射受限光学方法分辨的信号更接近的信号。对于在600nm下发射的标记而言,衍射极限在300nm范围内;本发明的方法允许分辨相隔大约1至300nm的分子以及离得更远的分子。虽然本发明的方法优选在固体表面上进行,但是也可以使用其他用于展示多核苷酸的方法进行。这包括纳米缝(nanoslitsm)、纳米通道和纳米坑(nanopit)(Cao等人2002;Tegenfeldt等人Anal Bioanal Chem.第378卷,第7期,2004,第1678-1692页2004;Reisner等人Proc Natl Acad Sci U S A.2009年1月6日;106(1):79-84.),分子可以受限

于其中，然后不附连到表面，特别是当多核苷酸较长时。在一些实施方案中，多核苷酸可以展示在2-D晶格例如DNA折纸结构(origami structure)中。在这种情况下，从折纸伸出的柄部可以附连待测序的多核苷酸。DNA折纸和其他DNA纳米结构可能实现的纳米级间距使得能够在给定分辨率下最大限度地利用空间。例如，如果成像分辨率为20nm，则可以使用折纸网格相隔20nm精确地放置多核苷酸。

[0556] 引物

[0557] 在双链分子中或当引物退火至单链分子时，存在两个5'末端和两个3'末端。需要采取措施，使得取决于合成模式，仅在单个3'末端或单个5'末端处具有链增长的可能性。否则，从不期望的末端延伸可能使所需末端的分析复杂化。当靶标通过一个末端固定在表面上时，该末端不再参与延伸。例如，多核苷酸模板可经由其3'末端固定到表面上，因此唯一可用于延伸的3'末端是引物的3'末端。在其他情况下，模板可以被固定引物捕获，在这种情况下，需要灭活模板多核苷酸上的3'末端。这可以通过例如将经阻断的寡核苷酸连接至末端或在退火为引物之前使用ddNTP通过末端转移酶来延伸而完成。

[0558] 模板

[0559] 在一些实施方案中，模板链可以附连到合适的表面而无需对其修饰。例如，双链DNA的末端可以在pH 5.5的0.5M MES缓冲液中附连到乙烯基硅烷表面。聚RNA也能够附连在涂有oligo d(T)的表面上。在其他实施方案中，例如通过使用末端转移酶加尾来修饰的模板可用于用均聚物序列(使用dNTP)对模板多核苷酸进行加尾以利于退火为适当设计的引物(例如oligo d(T))。聚(A)聚合酶也可用于向RNA添加A。单链多核苷酸可形成可阻碍引物结合或聚合酶进展的分子内结构。有时模板也可能以使得非连续序列并列的方式折叠，这可能导致测序误差。为了避免这种情况，可以在相对较高的温度下用耐热酶进行延伸，在该温度下分子内相互作用短暂且不稳定。例如，连接或聚合酶延伸可以在65℃下完成。也可以进行热循环，这对基于连接的方法特别有用。另外，某些聚合酶与变性剂如尿素和DMSO相容。另外，可以添加单链结合蛋白例如大肠杆菌(E.coli)单链结合蛋白(SSB)和T4基因32蛋白；已经证实蛋白这些利于聚合酶作用。如果添加变性剂，则引物和模板必须通过可以经受变性步骤的键保持。例如，引物可以包含可以形成高度稳定的相互作用的LNA。或者，它们可以通过除沃森-克里克键之外的键保持在一起。例如，共价键合或链霉亲和素-生物素相互作用。然而，如果靶标基本上或完全为双链的，则可以防止出现二级结构问题。如果引物延伸从切口开始，就是这种情况。链置换合成可以通过本领域已知的方法进行(例如Paez等人2004)。

[0560] 在一些实施方案中，使本发明的多核苷酸呈基本上非球形的形式，解开、实质性伸长并且优先被完全伸长或拉伸。至少实质性伸长的多核苷酸使得能够在其上产生多个测序起始位点，方式是使用DNA酶1或切口核酸内切酶以沿着ds多核苷酸的长度产生多个3'末端。如果多核苷酸为单链的，则带有3'末端的寡核苷酸可以在沿着多核苷酸长度的多个位置结合。优选地，在平坦表面上在单个方向上比对伸长的多核苷酸，从而允许如本发明中所述，沿其长度检测来自测序反应的信号。

[0561] 多核苷酸修复

[0562] 多核苷酸在提取、储存或制备期间可能被损伤。切口和加合物可以在天然双链基因组DNA分子中形成。可以在DNA固定之前或之后引入DNA修复溶液。此类修复溶液可以包含

DNA核酸内切酶、激酶和其他DNA修饰酶。此类修复溶液可以包含聚合酶和连接酶。此类修复溶液可以是得自New England Biolabs(Ipswich,MA,USA)的pre-PCR试剂盒。

[0563] 捕获

[0564] 在一些实施方案中,靶多核苷酸可以通过其一个末端结合到特定表面。例如,pH5.5的乙烯基表面可以结合到双链DNA的末端。如果将多核苷酸修饰为例如含有生物素,则其可以结合到链霉亲和素或中性亲和素涂覆表面。这可以通过使用末端转移酶或聚(A)聚合酶为多核苷酸加尾来完成。多核苷酸也可以被附连于表面的DNA结合蛋白捕获到表面。如果将单链寡核苷酸探针的完整库或特定集合排列或铺展到表面上,则其可以用作多核苷酸的捕获探针,在后一种情况下,对于靶向分子具特异性。当靶标被序列特异性单链寡核苷酸捕获时,可以立即以靶向方式进行测序,并且这可以直接在无需预先处理的天然基因组DNA的单链或聚RNA上进行。

[0565] 本发明的方法可适用于通过计算相同属性的序列的数量来获得RNA表达数据。一旦获得了一定长度的序列信息,就可以将其用于鉴定RNA种类。因此,在一个实施方案中,靶多核苷酸包含mRNA。mRNA可以与设计成与任何mRNA分子杂交的引物杂交。例如,可以将引物设计成与所有样品mRNA种类在mRNA一级结构中的特定点杂交。这个点可以是聚腺苷酸化信号、AAUAAA、3'末端或5'末端的聚A尾、或5'末端的帽结构、或夹到5'或3'末端上的特定序列。优选地,引物附连于固体表面,并且更优选地形成阵列。该方法也可用于对其他种类的RNA,如长非编码RNA(lncRNA)和微RNA计数。在此类方法中,标签可以连接到RNA的末端或与捕获探针杂交的均聚物尾(通过酵母聚(A)聚合酶添加的)上,或者可以直接捕获RNA的末端。

[0566] 在一些实施方案中,先将RNA转化为cDNA。在一些实施方案中,测序方法也可以直接在RNA上执行,无需先转化为cDNA。本发明的核苷酸可以通过直接作用于RNA模板的聚合酶如逆转录酶和DNA聚合酶1(例如Klenow片段)并入。

[0567] 在一些实施方案中,为RNA加尾并直接附连于表面。然后使引物退火,且合成继续进行。在其他实施方案中,为RNA加尾并且尾部与附连于表面的寡核苷酸探针杂交,所述寡核苷酸也充当合成的引物。在其他实施方案中,特定RNA被序列特异性探针捕获,然后所述序列特异性探针也充当与捕获位点相邻的序列的引物。

[0568] 因此,在一个方面,本发明提供了一种对RNA测序的方法,该方法包括:

[0569] a)接触探针,该探针被设计为在RNA将与所述探针杂交的条件下与样品中的RNA分子杂交;

[0570] b)将复合物置于表面上;以及

[0571] c)使用如本文所述的方法,利用所述探针作为引物对所述RNA测序。

[0572] 标记

[0573] 标记可以是标签,例如间接检测到的寡核苷酸。标记也可以是直接检测到的染料或粒子。

[0574] 标记可以是可光学检测的标签,例如荧光标签。荧光标签可以是染料分子,例如荧光团,例如Cy染料(Cy3、Cy3b和Cy5)、ROX(羧基-x-罗丹明)、TAMRA(四甲基罗丹明)、Oregon Green®、Vistra Green™、荧光黄、PicoGreen®、BODIPY®系列和TexasRed®、Alexa染料、Atto染料、Dyo染料和EVO染料等。相关荧光团可从例如Atto-tech(Germany)、

Biotium(USA)、GE(USA)或Thermofisher(USA)商购获得。标记可以根据寿命和发射波长来区分。或者,标记可以是由于其物理化学特性(例如电子特性或电荷)而可以鉴定的标签。或者,可以检测拉曼信号,例如可以执行表面增强共振拉曼散射(SERR)(Kneipp 1999;Zander 2002)。

[0575] 标记也可以是纳米粒子或微球。纳米粒子可以是光学活性的。例如,SERS粒子、PRP(等离子体共振粒子)、量子点或具有嵌入染料的乳胶粒子,例如Fluospheres和Transfluospheres(Molecular Probes)。标记可以是报告因子和/或终止子标记。报告因子是起到报告所并入的核苷酸的属性的作用的标记。终止子或阻断剂是在去除之前防止添加多于一个核苷酸的标记。在一些情况下,荧光可以是核苷酸碱基固有的;一些碱基类似物具有增强的荧光。荧光可以通过与金属或等离激元结构的邻近相关效应增强。

[0576] 标记可以直接通过共价键或经由键合与核苷酸附连。键合优选包括可裂解的键,例如可光裂解的键,或可通过在化学试剂中流动(例如温和化学处理)而裂解的键,例如使用还原剂裂解二硫桥或使用弱酸裂解酰胺键。键合可以包含结合对。

[0577] 同样,标记和猝灭剂可以选自荧光团、猝灭剂、位移试剂、自旋标记、放射性同位素和磁共振造影剂。猝灭剂有利地是暗猝灭剂,包括黑洞猝灭剂(black hole quencher)。

[0578] 荧光标记是能够被猝灭的任何荧光标记,其包括荧光标记,例如本文件中别处提到的荧光团。猝灭的荧光也可以发自纳米粒子。荧光标记或荧光团和猝灭剂部分可以通过选自荧光共振能量转移、电子转移猝灭机制和基态复合物猝灭机制的机制相互作用。

[0579] 同样,荧光标记可以选自经任选取代的芘、蒽、萘、吖啶、芴、吲哚、苯并吲哚、噁唑、苯并噁唑、噻唑、苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑、花青、羰花青、羰苯乙烯基化物(carbostyryl)、卟啉、水杨酸盐、邻氨基苯甲酸盐、甘菊环(azulene)、二萘嵌苯(perylene)、吡啶、喹啉、香豆素、聚氮杂引达省(polyazaindacene)、氧杂蒽、噁嗪、苯并噁嗪、卡巴秦(carbazine)、次联苯甲酮(phenalenone)、苯次联苯甲酮、卡巴秦、噁嗪、4-硼杂-3a,4a-二氮杂对称引达省、荧光素、罗丹明、对甲氨基酚、5-羧基荧光素(FAM)、5-(2'-氨乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、邻氨基苯甲酰胺、铽螯合物、活性红4、德克萨斯红(Texas red)、ATTO染料、EVO染料、DYO染料、Alexa染料和BODIPY染料。

[0580] 同样,猝灭部分选自经任选取代的苯基、萘基、蒽基、苯并噻唑、苯并噁唑或苯并咪唑、芘、蒽、萘、吖啶、芴、吲哚、苯并吲哚、噁唑、苯并噁唑、噻唑、苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑、花青、羰花青、羰苯乙烯基化物、卟啉、水杨酸盐、邻氨基苯甲酸盐、甘菊环、二萘嵌苯、吡啶、喹啉、香豆素、聚氮杂引达省、氧杂蒽、噁嗪、苯并噁嗪、卡巴秦、次联苯甲酮、苯次联苯甲酮、卡巴秦、噁嗪、4-硼杂-3a,4a-二氮杂对称引达省、荧光素、罗丹明、对甲氨基酚、5-羧基荧光素(FAM)、5-(2'-氨乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、邻氨基苯甲酰胺、铽螯合物、活性红4、dabcyl、硝基酪氨酸、孔雀绿、德克萨斯红、二硝基苯、ATTO染料、EVO染料、DYO染料、Alexa染料和BODIPY染料。DABCYL、BHQ1、BHQ2、QSY7、QSY9、QSY21、QSY35、ATTO540Q、ATTO580Q、ATTO612Q、DYQ660和DYQ661、罗丹明、四甲基罗丹明、丁酸芘、曙红硝基酪氨酸、乙啡啶、荧光素、孔雀绿、德克萨斯红、二硝基苯和三硝基苯。

[0581] 标记可以是可光学检测的标签,例如荧光标签。荧光标签可以是染料分子,例如荧光团,例如Cy染料(Cy3、Cy3b和Cy5)、ROX(羧基-x-罗丹明)、TAMRA(四甲基罗丹明)、Oregon Green®、Vistra Green™、荧光素、PicoGreen®、BODIPY®系列和Texas Red®、

Alexa染料、Atto染料、Dyo染料和EVO染料等。相关荧光团可从例如Atto-tech(Germany)、Biotium(USA)、GE(USA)或Thermofisher(USA)商购获得。标记可以根据寿命和发射波长来区分。或者，标记可以是由于其物理化学特性(例如电子特性或电荷)而可以鉴定的标签。或者，可以检测拉曼信号，例如可以执行表面增强共振拉曼散射(SERR)(Kneipp 1999;Zander 2002)。

[0582] 标记也可以是纳米粒子或微球。纳米粒子可以是光学活性的。例如，SERS粒子、PRP(等离子体共振粒子)、量子点或具有嵌入染料的乳胶粒子，例如Fluospheres和Transfluospheres(Molecular Probes)。标记可以是报告因子和/或终止子标记。报告因子是起到报告所并入的核苷酸的属性的作用的标记。终止子或阻断剂是在去除之前防止添加多于一个核苷酸的标记。在一些情况下，荧光可以是核苷酸碱基固有的；一些碱基类似物具有增强的荧光。荧光可以通过与金属或等离激元结构的邻近相关效应增强。

[0583] 标记可以直接通过共价键或经由键合与核苷酸附连。键合优选包括可裂解的键，例如可光裂解的键，或可通过在化学试剂中流动(例如温和化学处理)而裂解的键，例如使用还原剂裂解二硫桥或使用弱酸裂解酰胺键。键合可以包含结合对。

[0584] 同样，标记和猝灭剂可以选自荧光团、猝灭剂、位移试剂、自旋标记、放射性同位素和磁共振造影剂。猝灭剂有利地是暗猝灭剂，包括黑洞猝灭剂(black hole quencher)。

[0585] 荧光标记是能够被猝灭的任何荧光标记，其包括荧光标记，例如本文件中别处提到的荧光团。猝灭的荧光也可以发自纳米粒子。荧光标记或荧光团和猝灭剂部分可以通过选自荧光共振能量转移、电子转移猝灭机制和基态复合物猝灭机制的机制相互作用。

[0586] 同样，荧光标记可以选自经任选取代的芘、蒽、萘、吖啶、芴、吲哚、苯并吲哚、噁唑、苯并噁唑、噻唑、苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑、花青、羰花青、羰苯乙烯基化物(carbostyryl)、卟啉、水杨酸盐、邻氨基苯甲酸盐、甘菊环(azulene)、二萘嵌苯(perylene)、吡啶、喹啉、香豆素、聚氮杂引达省(polyazaindacene)、氧杂蒽、噁嗪、苯并噁嗪、卡巴秦(carbazine)、次联苯甲酮(phenalenone)、苯次联苯甲酮、卡巴秦、噁嗪、4-硼杂-3a,4a-二氮杂对称引达省、荧光素、罗丹明、对甲氨基酚、5-羧基荧光素(FAM)、5-(2'-氨乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、邻氨基苯甲酰胺、铽螯合物、活性红4、德克萨斯红(Texas red)、ATTO染料、EVO染料、DYO染料、Alexa染料和BODIPY染料。

[0587] 同样，猝灭部分选自经任选取代的苯基、萘基、蒽基、苯并噻唑、苯并噁唑或苯并咪唑、芘、蒽、萘、吖啶、芴、吲哚、苯并吲哚、噁唑、苯并噁唑、噻唑、苯并噻唑、4-氨基-7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑、花青、羰花青、羰苯乙烯基化物、卟啉、水杨酸盐、邻氨基苯甲酸盐、甘菊环、二萘嵌苯、吡啶、喹啉、香豆素、聚氮杂引达省、氧杂蒽、噁嗪、苯并噁嗪、卡巴秦、次联苯甲酮、苯次联苯甲酮、卡巴秦、噁嗪、4-硼杂-3a,4a-二氮杂对称引达省、荧光素、罗丹明、对甲氨基酚、5-羧基荧光素(FAM)、5-(2'-氨乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、邻氨基苯甲酰胺、铽螯合物、活性红4、dabcyl、硝基酪氨酸、孔雀绿、德克萨斯红、二硝基苯、ATTO染料、EVO染料、DYO染料、Alexa染料和BODIPY染料。DABCYL、BHQ1、BHQ2、QSY7、QSY9、QSY21、QSY35、ATTO540Q、ATTO580Q、ATTO612Q、DYQ660和DYQ661、罗丹明、四甲基罗丹明、丁酸芘、曙红硝基酪氨酸、乙啡啶、荧光素、孔雀绿、德克萨斯红、二硝基苯和三硝基苯。如本文所用的术语"纳米粒子"意指在任何一个方向上的最大尺寸小于1微米的单个粒子。用于本发明的纳米粒子优选为球形，和/或优选具有20nm或更小的直径。纳米粒子可以是核/壳纳米粒子。纳米粒子

可以包括含半导体材料的核。核可以包括得自以下这些的材料(包括其二元、三元和四元混合物):元素周期表II-VI族,包括ZnS、ZnSe、ZnTe、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、MgTe;III-V族,包括GaN、GaP、GaAs、GaSb、InN、InP、InAs、InSb、AlAs、AlP、AlSb、AlS;和/或IV族,包括Ge、Si、Pb。纳米粒子可以包括至少一个包围核的壳。壳可以包括半导体材料。纳米粒子可以包括内壳和外壳。壳可以包括包含以下物质的材料(包括其二元、三元和四元混合物):ZnO、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdO、CdS、CdSe、CdTe、MgS、MgSe、GaAs、GaN、GaP、GaAs、GaSb、HgO、HgS、HgSe、HgTe、InAs、InN、InP、InSb、AlAs、AlN、AlP或AlSb。在一个实施方案中,纳米粒子包含具有CdSe的核。在另一个实施方案中,纳米粒子包含具有CdS的内壳。在另一个实施方案中,纳米粒子包含具有ZnS的外壳。核或外壳的最外层表面可以涂有不会被普通溶剂化作用去除的紧密缔合配体。在一些实施方案中,纳米粒子可以在其表面上具有一层可以进一步相互交联的配体。

[0588] 荧光纳米粒子可以是有大量荧光团嵌入其中或其表面的粒子(例如乳胶粒子)。或者,荧光发射或调制可以是粒子的固有特性,半导体纳米晶体(Quantum Dot Corp.,USA;Evident Technologies,USA)、金纳米粒子(Nanoprobes Inc.,USA)、等离子体共振粒子(PRP)(Seashell Technologies,USA)、共振光散射粒子(RLP)或TiO_2纳米粒子(Paunesku 2003)就是这样。根据其大小和/或材料组成,半导体纳米晶体在电磁波谱的不同区域发射,即使在用相同的波长激发时也是如此。应用特殊的涂覆程序将其稳定在溶液中,并使其与不同物体的缀合成为可能。纳米晶体的优点是其发射亮度高、抗光漂白稳定性高且发射光谱窄,从而有利于多重化。表面涂有链霉亲和素或生物素的各种发射波长的半导体纳米晶体可从Quantum Dot Corp.获得。可在供应商提供的温育缓冲液或其他常用缓冲液中介导链霉亲和素-生物素相互作用。

[0589] 纳米粒子也可以通过硫醇(硫氢基/巯基)基团附连至经修饰的核苷酸。硫醇基团可以附连至金属,尤其是金。或者,接头可用于将硫醇附连至核苷酸。接头可含有可光裂解的或可通过温和还原剂裂解的可裂解键。可从单个核苷酸分支出几个硫醇部分,从而增加与纳米粒子相互作用的强度。或者,核苷酸碱基可以用氨基-烯丙基基团标记。

[0590] 胺涂覆的量子点可从Quantum Dots Corp.(USA)获得,并且提供了用于将这些量子点与生物分子连接的试剂盒。

[0591] 作为通过硫醇基团将核苷酸连接至纳米粒子的替代方案,可以使用上述结合对连接系统。核苷酸可以通过可裂解接头附连到结合对的一个成员(例如生物素)上,并且纳米粒子可以涂有结合对的另一半,例如链霉亲和素。可从AmberGen商购获得可光裂解的生物素-NHS试剂,其可与核苷酸中的胺基反应。SNHS-SS-生物素可从Uptima and Pierce Biotechnology(EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin)获得,其可与DNA碱基上的胺附连并且可以被温和还原剂裂解。

[0592] 与本发明相关的纳米粒子的大小范围可以从直径只有几纳米到几百纳米。虽然是反直觉成像剂,但是成像剂上的纳米粒子标记能够以对本发明的PAINT方法有用的速率结合和去结合。另外,纳米粒子所附连的聚合酶和核苷酸能够参与多聚核苷酸模板导向的聚合。

[0593] 流体系统

[0594] 在本发明的一些实施方案中,测序生物化学在流体导管中进行或者可以适当地提

供流动池表面，可以装载试剂并任选地储存，使得可以装载样品并运输到进行测序生物化学和成像循环的地点并且任选地进行热和电控制。该设备包含用于装载样品的大型接口。该设备含有用于成像的合适透光区和用于耦合到照射源和任选的裂解源的表面。流动池可以被设计成与引入光源的物镜良好地光学匹配。该系统可以被设计成无阀门的，或者可以具有控制流体移动的阀门系统。对于本发明的DIY实现方式，可以通过将双面胶带夹在载玻片与盖玻片(通常为1.5型且适于TIRF成像)之间来构建简单的流动池。或者，可以使用得自Ibidi的粘性载玻片系统。可以手动移动试剂通过这些自制装置。或者，压力驱动流或注射泵可以连接到这些设备的入口和出口。

[0595] 成像方法

[0596] 将多核苷酸的图像投影到电荷耦合器件(CCD)或CMOS相机的阵列上，这使得能够同时对表面上二维分布的单分子群体成像(数字化并存储在存储器中)。存储在存储器中的图像然后接受图像分析算法。这些算法可以将信号与背景区分开，监测包括强度在内的信号特性的变化，并执行其他信号处理功能。存储器和信号处理可以在计算机上离线进行，或者在受微处理器控制的专用数字信号处理(DSP)电路中进行。

[0597] 通常，宽视场照射方案可涉及用灯、LED、散焦激光束或通过激光束全内反射产生的渐逝场进行照射。可以看到的视场由物镜的放大倍数、归因于C型接口(C-mount)的任何放大倍数以及CCD芯片的像素大小和数量决定。单分子成像可以用20x、40x、60X、100X或150X物镜完成，并与具有适当像素数的相机匹配。每个像素的大小越大，可以聚集的光量就越多。为了查看载玻片的大片区域，可以使用大阵列相机，例如4-16百万像素(现今，在消费类相机中可以有更大的像素数)，为了查看几cm^2必须拍摄多张图像。使用低噪声高灵敏度相机捕捉图像。有几种相机型号可以使用，包括Hamamatsu ImageEM、Andor iXon X3、通过MetaMorph(Molecular Devices)控制的Evolve(Photometrics)Cooled Micromax相机(Roper scientific)、NIS-Elements等。软件可以在带有最新处理器和对于生成的图像大小足够的RAM的Dell Precision或Lenovo D30上运行。

[0598] 特别是当采用全内反射荧光显微镜(TIRF)时，在过程中整合焦点保持或焦点锁定能力以在载玻片平移时保持聚焦是有用的。为了自动对焦的目的，可以使用软件来控制z移动。为了避免光漂白，建议使用快门(例如来自Prior Scientific)在从一个位置移动到另一个位置时阻挡照明。可以使用控制器来控制x-y载物台、滤光轮和快门(例如Prior Scientific ProScan)。

[0599] Upper Austrian Research(Linz,Austria))开发了专为基因组学设计的、使用时间延迟积分的单分子阅读器(Hess等人2004)，从而提供了信噪比和速度的显著改善。在使用时间延迟积分(TDI)成像或行扫描仪的情况下，获得连续图像条(Hesse等人Single-molecule reader for high-throughput bioanalysis.Anal Chem.2004年10月1日;76(19):5960-4.)。本发明的一个实施方案包括快速读取，以便在载物台移动使成像平移到表面上的下一个位移位置之前，在相邻像素上捕捉多个闪烁/结合-去结合事件。然后使用算法来提取关于相邻像素(假定1000个像素)的时间信息以及在下一批像素(下100个像素)中获得的空间信息。这种方法的优点是将会迅速覆盖大面积。

[0600] 全内反射荧光显微术(TIRF)

[0601] TIRF使得能够获得极高对比度、低背景图像，例如使用物镜式TIRF的现成系统(例

如Olympus、Leica、Zeiss或Nikon生产的那些)来生成指数衰减渐逝波。当样品在薄盖玻片上时,可以使用物镜式TIRF。但是,当样品在显微镜载玻片上时,会存在不相容。为此,必须使用棱镜型TIRF(AJ Lacey)或使用高NA聚光镜(Olympus,Japan)的基于聚光镜的TIRF来产生TIRF。也可以通过将激光束聚焦到载玻片或盖玻璃的边缘以及在基底中使用诸如光栅的结构来产生渐逝波。虽然上面描述了该系统在倒置显微镜上的使用,但直立显微镜也可以以适当的方式配置,例如如Braslavsky等人(2003)所述。

[0602] 多色单分子成像

[0603] 当测序策略涉及连续添加全部用单个荧光团(例如Cy3)标记的四种核苷酸中的每一种时,则在每次添加碱基后拍摄单个图像。然而,如果对每种核苷酸进行差异性标记(例如,每种核苷酸类型用不同的荧光团标记)并且同时添加,则需要区分来自每个不同荧光团的信号。这可以通过切换激发/发射滤光片获得四个单独的图像来完成。或者,可以使用诸如Dual View(Optical Insights,Santa Fe,NM)或W View(Hamamatsu,Japan)的图像(波长)分割器将两种不同波长成像到CCD芯片的不同部分上,所述分割器引导光通过两个单独的带通滤光片,它们之间的光损失很小。或者,可以将光分成四个波长并送至CCD芯片的四个象限(例如,来自Optical Insights的Quad view)。这避免了使用滤光轮切换滤光片的需要。也可以采用MetaMorph公司推出的单图像双发射或多发射分光器。图像分割可用于监测FRET。

[0604] 需要使用四种可以正确区分彼此的荧光标记。理想地,一种染料与另一种染料之间的串扰应保持在约30-40%以下,以便能够通过阈值和软件操作将其充分分离。使用的一种组合是荧光素、Cy3、德克萨斯红和Cy5。更易于分离的其他组合包括荧光素、Cy3、Cy5和Cy7,或香豆素、荧光素、Cy3和Cy5或与这些中的每一种具有相似波长的染料。由于有几种可商购获得的量子点,其波长范围从525nm到800nm(Quantum Dot Corp,Palo Alto,USA),所以有几种可以区分的组合。Chroma ScienTechnology能够定制设计可以分辨这四种颜色的滤光片组合。已经有可以分离4个波长的可用商业组合,例如具有用于DAPI/FITC/TRITC/Cy5™(Chroma Technology,Brattleboro USA)的单波段激发滤光片的8400系列Quad滤光片组。

[0605] 有利的是使用单个波长作为光源而不必使用滤光片,因为这既简化了设置,而且还因为使用滤光片时不可避免地存在一些光损失。在一些实施方案中,通过重复性杂交-去杂交动力学编码四种不同标记;使用四种具有不同缔合-解离常数的不同结合对。在一些实施方案中,核苷酸通过荧光强度编码。可以通过附连不同数量的非自灭荧光剂而对核苷酸进行荧光强度编码。单个荧光团通常需要很好地分离以避免猝灭,而刚性接头或DNA纳米结构是实现这一点的好方法。通过荧光强度编码的一个替代性实施方案是使用具有类似发射光谱的染料变体,但其量子产率或其他可测量的光学特征不同,例如Cy3B(558/572)(量子产率0.67)比Cy3(550/570)(量子产率为0.15)明显更亮,但具有相似的吸收/发射光谱。可以使用532nm激光激发两种染料。可以使用的其他染料包括Cy3.5(591/604),虽然它具有升高的激发和发射光谱,仍然会被532nm激光激发,但会发射比Cy3更弱的光,即使两者均具有相似的量子产率,Cy3.5正在用次优波长激发。Atto 532(532/553)的量子产率为0.9并且预计当532nm激光在其最佳点击中它时是最亮的。

[0606] 使用DNA PAINT与此类编码相结合是有利的,因为多次独立检测事件将使得能够

更好地测定强度。

[0607] 连续和多重化成像

[0608] 在进行实时测序时，样品相对于相机的平移可能太慢而无法检测到每个分子事件。因此，可以执行通过与检测器阵列同时拍摄图像来采集表面上的单分子数据的方法。或者，如上所述，可以通过光定时(photo-clocking)控制测序步骤。

[0609] 超出光衍射极限：超分辨和超定位

[0610] 通过常规手段，光衍射极限不允许将比发射光波长的一半更接近的分子区分为单独的点光源。诸如近场扫描光学显微镜(NSOM)等近场方法可以远远超出衍射极限，但不易实现。然而，对于亚衍射成像有几种远场方法。

[0611] 第一，在已知诸如量子点或染料等发光体的特征的情况下，可以使用染料的点扩散函数来分辨两个紧密间隔的信号。第二，有许多已经描述并且可以商购获得的硬件方法，这些方法包括扫描光学显微术、4Pi、STED和SIM。在STED的情况下，必须使用特定的相容荧光团组。第三，可以通过使信号进行光漂白(一种随机过程)来定位和分辨信号(J Biomed Opt.2012年12月;17(12):126008)。第四，如果可以鉴定从相邻发射体发出的光子，则可能克服衍射极限。这可以在两个紧密间隔的信号是不同波长的发射时进行，可以根据波长将其分开。

[0612] 还描述了许多涉及单分子定位和随机光学重建的分子方法，单分子定位和随机光学重建可以被定义为指出当来自阵列的分子的信号不同时出现时，分子在密集阵列中的位置，这些分子的光子可以单独收集，因为它们在时间上是分开的。

[0613] 基于单分子定位的超分辨成像的步骤是：(i)获得分子亚衍射极限密度，(ii)使分子子集发光，从而获得稀疏的信号阵列，使其可通过衍射极限成像光学分辨，(iii)以亚衍射极限精度确定这些荧光团的位置，并且(iv)随机地使不同荧光团子集发光，(v)由针对每个发光分子确定的位置重建亚衍射极限或纳米分辨率图像。

[0614] 一种这样的方法STORM(通过随机光学重建显微术的亚衍射极限成像(STORM)M.J.Rust,M.Bates,X.Zhuang Nature Methods 3:793-795(2006)使用单个荧光团的连续激活和定位来实现高空间分辨率。STORM及其变型(例如d-STORM)类似方法(荧光)光激活定位显微术和(F)PALM可用在本发明的某些实施方案中并且需要使用特定的相容荧光团集合，它们的性质即每个转换事件的光子数、运行/非运行循环、光稳定性和转换循环数是可以以超分辨率获得的图像质量的基础(Nat Methods.2011年12月;8(12):1027-1036)。随机光学重建可以被定义为指出当来自阵列的分子的信号不同时出现或者在时间上分开时，分子在密集阵列中的位置。除了分辨以外，此类方法也可以用于精确分配信号定位的坐标。

[0615] 另一种超分辨方法即PAINT也可用在本发明的各个实施方案中。PAINT成像似乎显示闪烁或光转换，因为荧光团(或其他标记)与核苷酸持续结合和去结合。该方法预先形成连续的单分子定位。

[0616] 这使稳健的单分子检测变得可行：因为不断补充染料，所以核苷酸的标记不会遭受单染料特有的“黑暗”三重态和光漂白。连续补充也意味着不需要大量的精力来约束照射区以防止所并入的染料的光漂白，这在使仪器成本更低方面具有明显益处。信号在模板位置的持续重复使我们能够容易地在计算上过滤掉寡核苷酸的非特异性结合。这也意味着对于每个并入事件而言存在来自相同单个分子的多个数据点，这提高了碱基识别准确性。

[0617] 在一种PAINT方法即DNA PAINT中，四种碱基中的每一种均用不同的寡核苷酸(结合伴侣1)标记，互补寡核苷酸(结合伴侣2)与该寡核苷酸(结合伴侣1)瞬时结合。四种核苷酸碱基中的每一种与不同序列补体的结合伴侣对缔合。为了区别，与四种碱基中的每一种缔合的结合伴侣2可与另一个区分开。使它们可区分的元件可以是发射不同波长的标记(例如Atto 488、Cy3B、Alexa594和Atto 655/647N)，即具有不同寿命的标记，或者可以是将不同的对设计成具有不同的结合/去结合动力学。PAINT还具有这样的优点：不必关注荧光团光漂白，因为它们总是被新鲜成像链置换。因此，选择荧光团、提供防褪色剂、氧化还原系统不那么重要，并且可以构建更简单的光学系统，例如，无需F制光圈(f-stop)来防止照射不在相机视野内的分子，因为照射仅漂白短暂进入渐逝波的标记。

[0618] 在本发明所述的DNA PAINT中，成像步骤期间的读数是作为带有不同荧光剂的结合伴侣的许多相互作用/非相互作用的聚集而获得的，所以即使一种荧光剂被光漂白或处于暗态，其他成像剂结合伴侣上落在与核苷酸连接的结合伴侣上的荧光剂可能未被光漂白或处于暗态。结合伴侣2被不同地称为成像剂、成像链、可检测标记、反标签、成像标签)。

[0619] 当靶标为单链，例如当靶标为RNA、滚环扩增子、合成DNA时或在双链DNA完全或部分变性后，DNA PAINT中的寡核苷酸标签或反标签成像链可能与单链结合，即使在存在部分匹配的情况下。这些非靶向结合情况中的许多情况可以在软件中通过它们不同的结合动力学(对于部分匹配而言，为更快的分离速率)来区分。然而，对于9mer探针，有可能基因组中会存在几个匹配。一种解决方案是明智地选择标签和反标签，例如通过使用与基因组具有最小匹配的序列。一种替代方法是使用非规范碱基对或非沃森-克里克碱基对，如由Benner等人描述的那些(Cold Spring Harb Perspect Biol.;8(11).pii:a023770(2016))。在一个实施方案中，当用嗜热酶以均相模式进行反应时，对寡核苷酸标签和反标签进行修饰以形成更稳定的碱基对。例如，标签是LNA修饰的寡核苷酸或PNA寡聚体，在升高的温度下寡核苷酸反标签仍然可以与之瞬时结合，但是与结合非靶向DNA相比，其分离速率更慢且更易检测。或者，可以通过互补DNA合成法将大部分单链靶标制成双链的以防止反标签成像剂的结合。当在65°下完成带寡核苷酸标签的核苷酸的并入时，标签寡核苷酸与模板DNA分子结合的机会很小，因为在55-72°温度下随嗜热酶一起使用的9mer的稳定性低。当双链是基因组DNA的天然形式时，对于DNA PAINT方法顺畅地运转没有挑战。使用可以与dsDNA一起作用的聚合酶、链置换聚合酶、具有5'至3'核酸外切酶活性的聚合酶进行SbS反应有多种方式。

[0620] 当适当调节溶液中荧光标记的寡核苷酸的浓度时，在任何指定时刻可检测到的分子密度是表面上分子实际密度的稀疏子集(图1)；通过拍摄影像来检测整个分子集合。因此，可以以太高而不能通过标准(衍射受限)方法分辨，但可以纳米定位和超分辨的密度排列模板。

[0621] 在一些实施方案中，PAINT技术与以上或本文件别处描述的其他方面组合。在一些实施方案中，沿靶多核苷酸的位置的显著或持续PAINT信号足以区分背景上的信号。PAINT技术在不利用BRET、FRET或其他基于接近性的信号增强方法的情况下提供背景抑制，仅需检测焦平面或表面位置的持续信号。在一些实施方案中，诸如FRET的基于信号接近性的信号增强可以与PAINT组合，使得不需要用四个单独激光器照射，并且使得来自成像剂背景的干扰减少。

[0622] 可能由振动和热效应引起漂移。在单分子成像中需要采取措施将漂移减到最少。

可以使用漂移校正。多种算法可用于执行单分子定位的漂移校正。这可涉及使用可信标志物(fiduciary marker)或未经操作。可以应用Jungmann等人在WO 2015017586A1中描述的漂移校正方法。

[0623] 高速超分辨。虽然用于典型单分子定位实验的视频成像需要几分钟到几小时,但通过调整激光功率,使用高速相机(例如Photron FASTCAM)和工程化标记例如量子点、荧光乳胶粒子(13)、共振光散射粒子(例如金)或多标记纳米级DNA Origami的特性,使得每毫秒可以收集足够的光子以使得能够在10秒内超分辨率检测所并入的核苷酸。这是对可达到的速度的保守估计;Ueno等人使用暗场全内反射显微术(14),对于金纳米粒子在表面上以仅9.1微秒(大约1秒的十万分之一)的时间分辨率达到了1-2nm的精确度。通过这样的实现方式,影像的持续时间将与当前方法中用于成像的曝光时间类似。

[0624] 定位可容易地确定发射信号的荧光团保持靠近并入位点的时间,因此必须限定连接波长发射部分(例如荧光团)与碱基的接头或桥的长度和柔韧程度,即最好是具有较短长度和僵直接头。

[0625] 图像分析和测序算法

[0626] Metamorph、ImageJ/Fiji和其他几种商业软件或免费软件提供了用于图像分析的工具。

[0627] 有两种类型的图像重建方法用于进行超分辨:提供明确的分子位置列表的定位法和重建超分辨图像而无需明确定位的去卷积法。

[0628] 现有几个软件程序用于处理定位单分子的数据,这包括ImageJ/Fiji的插件即ThunderSTORM。漂移校正对于单分子定位至关重要,所以第一步是漂移校正并将其整合到定位软件中。多种比较各种单分子定位的资源是可用的(Sage等人,2015Quantitative evaluation of software packages for single-molecule localization microscopy.Nature Methods;http://bigwww.epfl.ch/smlm/software/)。

[0629] Swift,一个用于图像处理和碱基识别以通过合成图像进行测序的开源平台(最初是为Illuina平台而开发的)可以适用于通过本发明的方法生成的数据(Whiteford N,Skelly T,Curtis C,Ritchie ME,Löhr A,Zaranek AW,Abnizova I,Brown.Bioinformatics.2009年9月1日;25(17):2194-9.)。许多汇编程序可用于由包括Velvet、All-PATHS、ABySS、SUTTA、DISCOVAR等的短读数据组装基因组。参见Simpson JT1,Pop M.Annu Rev Genomics Hum Genet.2015;16:153-72.doi:10.1146/annurev-genom-090314-050032.2015年4月22日在线发表。

[0630] 图像处理和超分辨图像重建在中央处理器(CPU)、多处理器内核、现场可编程门阵列(FPGA)、图形处理器(GPU)、集群计算和超级计算机中执行。

[0631] 迄今为止,超分辨法的使用集中在细胞结构的可视化改进上,其中需要获得高分辨率图片。为此,所采集的超分辨率数据必须相当精确并且成像装置的负担很高(例如,通常使用光学隔离台)。然而,测序的要求并不那么严格,只需要回答是或否:信号是否对应于不同特定位置存在的四种碱基之一;可以垂直通过影像中的图像堆栈来选择某些特征(例如,每个图像中仅存在四种颜色中的一种),从而确定这样的位置。因此,数据采集可以不那么精确,因为目标不是要获得精美图像,而是要了解特定信号是否可以以一定程度的置信度归因于特定位置;可以在获得测序数据时精细化这些参数;测序数据可以训练碱基识别

算法。对影像中图像堆栈的这种垂直分析也具有其他益处，例如可以允许人们过滤掉虚假信号：如果信号与该位置处一系列的信号不相关或者不遵守图像堆栈中看到的某些参数(例如，多于一种颜色，表明在纳米位置上有多于一个分子)，则可以将其过滤掉。信号处理算法也可用于从噪声图像中提取信号。

[0632] 完整系统

[0633] 用于实施本发明方法的完整系统包括：将样品分子装入其中并且所述方法的试剂进入(并且任选地穿过)其中的导管或流动池；本发明中描述的试剂，包括聚合酶、核苷酸、标记、寡核苷酸和缓冲液；包括检测/成像部件(激光器、光纤扰频器、棱镜、物镜、滤光片、反射镜等)的仪器；温控装置(例如珀耳帖装置(peltier device))；用于移动流体的泵或压力控制装置，用于控制多核苷酸或电化学的电气连接；物理信号发生器，包括例如用于光裂解的紫外光源；一个或多个计算机处理器、计算机存储器；用于仪器和过程控制、单分子定位、图像处理、碱基识别序列组装、数据显示的计算机软件，用户界面；标准操作程序。

附图说明

[0634] 图1：使用嵌入染料作为FRET伴侣进行边合成边测序。使用循环可逆终止(CRT)，以及从作为供体的嵌入染料到四种核苷酸中的每一种上的不同受体的荧光共振能量转移(FRET)进行测序。可以通过均相机制裂解。

[0635] 图2：使用聚合酶上的标记作为FRET伴侣进行边合成边测序。使用循环可逆终止(CRT)，以及从与聚合酶缔合的作为供体的标记到四种核苷酸中的每一种上的不同受体的荧光共振能量转移(FRET)进行测序。可以通过均相机制裂解。

[0636] 图3：使用猝灭剂进行边合成边测序。使用循环可逆终止(CRT)，以及通过四种核苷酸中的每一种上的不同暗猝灭剂构型对与聚合酶缔合的标记进行荧光猝灭来进行测序。可以通过均相机制裂解。

[0637] 图4：使用BRET进行边合成边测序。使用循环可逆终止(CRT)，以及在生物发光所需的辅助因子的存在下，从与聚合酶缔合的作为供体的荧光素到四种核苷酸中的每一种上的不同受体的生物发光共振能量转移(FRET)进行测序。可以通过均相机制裂解。

[0638] 图5：靶模板上测序试剂包的重复性分流。该示意图显示了试剂包(包含子包)在含有靶多核苷酸的通道上的循环；这对每个测序循环都是重复的。顶部中心显示用于引入试剂包的孔口被密封，使得所述包可以作为封闭系统循环。根据要进行的循环次数，将通道的所有部分多次暴露于所述包。每个包都多次使用。

[0639] 图6：在靶模板上分流多个测序试剂包。该示意图显示多个试剂包(包含子包，例如液滴)经过通道中所含的靶多核苷酸阵列。根据要进行的循环次数(本实例中显示循环6次)，将带有靶多核苷酸阵列的通道部分暴露于不同数量的包。每个包仅用一次。在这个实例中，每个包含8个子包，其可以包含核苷酸加上聚合剂、裂解剂(若需要)、成像试剂(若需要)和洗涤试剂(根据需要)。

[0640] 图7：拉伸靶多核苷酸远离包含标记核苷酸的流动流。(a)关闭电泳流，靶标从附连点随机卷曲并处于核苷酸的流动流中；(b)打开电泳流，并且靶标的主要部分被绕出并被拉伸远离附连点且远离核苷酸流动流。因此，由于主要限于靶多核苷酸附连点的荧光核苷酸，伸长的多核苷酸可视化，没有来自背景荧光的干扰。

[0641] 图8:使用DNA PAINT进行的超分辨率均相边合成边测序。所并入的核苷酸通过可裂解接头附连至结合伴侣1,并通过检测结合伴侣2上的标记测定核苷酸属性。在DNA PAINT中使用作为成像链的结合伴侣2的瞬时结合/去结合以超分辨紧密间隔反应中的并入。插图示意图显示了一段多核苷酸上在时间上稀疏出现的不同信号

[0642] 图9:通过转换在包含正在测序的靶多核苷酸的表面与不包含正在测序的靶多核苷酸的表面之间的极性对核苷酸进行电控制。示意图显示(a)带负电荷的核苷酸被吸引到放置靶模板的表面,(b)带负电荷的核苷酸被吸引到未放置靶模板的表面。

[0643] 图10:单嵌入染料供体、多受体。(a)YOYO-1嵌入染料的发射光谱与4种荧光受体染料的激发光谱重叠,(b)能量转移盒-YOYO-1充当核苷酸上的第一染料的供体,其将能量转移给核苷酸上的第二染料。

[0644] 图11:通过跨多个带通发射滤光片确定染料的荧光签名来鉴定所并入的核苷酸。(a)以单独染料的发射光谱为中心的滤光片;(b)签名-直方图显示了跨滤光片套件检测到的每种单独染料的强度模式。四个发射带通中的信号之间的比率强有力地揭示了染料的属性。成像剂的结合/去结合可以允许图像的超分辨率重建。

[0645] 图12:可逆终止子的一般类别。R是可逆终止子或OH基团。当R为可逆终止子时,其可以包括来自硝基苄基、二硫基、叠氮基甲基、酯类等的修饰。可裂解接头可以是包括选自以下类别的一个或多个部分的任何基团:硝基苄基、二硫基、叠氮基甲基、酯等。接头可以是可化学或光化学裂解的。标签可以是可为DNA、RNA、LNA、PNA或其组合的寡核苷酸,荧光剂或纳米粒子,例如优选与STED或STORM相容的荧光染料。在一些情况下,碱基上没有接头或标记。相反,R终止子带有标签。

[0646] 图13:炔修饰的可裂解寡核苷酸生成叠氮化物修饰的核苷酸的点击化学反应。长接头结构有助于使这种带寡核苷酸标签的核苷酸成为虚拟可逆终止子。也可以使用具有不可裂解的寡核苷酸和更靠近碱基位置的可裂解键合的形式。

[0647] 图14:4%琼脂糖凝胶显示了带寡核苷酸标签的核苷酸并入自启发夹(self-priming hairpin)中和寡核苷酸标签的裂解。显示了自启发夹的结构。

[0648] 图15:带寡核苷酸标签的核苷酸并入自启发夹中并用DNA PAINT成像(左)。没有酶的对照显示出少量信号。这表明在酶的存在下信号主要是由于并入而不是由于非特异性结合产生的。还表明DNA PAINT成像菌株不会引起显著的非特异性结合。

[0649] 图16:流动池中并入自启发夹中的带寡核苷酸标签的核苷酸上的DNA PAINT成像剂的亚衍射单分子定位。左上方显示了原始图像的像素化放大图。左下方显示了同一视野的ThunderSTORM处理图像。检测到四个不同的信号并且可以将每个信号定位到纳米精度。右上方的图表显示了线上强度的预处理图。右下方的图表显示了强度的后处理图,其显示了在几纳米范围内的定位。

[0650] 图17:用带寡核苷酸标签的核苷酸延伸并用DNA PAINT成像的两个自启发夹的超分辨。左上方显示在具有16uM像素、200Ms曝光、无增益、532nm激光、二向色长通滤光片的Hamamatsu ImageEM上拍摄的原始256x256图像;Cy3B标记的成像序列;中上方图像显示256x256图像中插入框的缩放图。中下方显示了同一区域的ThunderSTORM处理图像。右下方显示处理后的图像中的框的缩放图,其显示两个带寡核苷酸标签的核苷酸延伸型发夹的分辨。右上方的图表显示两个先前未分辨的点间隔约10nm。

[0651] 图18:用于核苷酸瞬时结合的磷酸盐标记的可逆终止子结构。提供了该结构的四种核苷酸中的每一种。当并入核苷酸时,荧光基团自然去除。这种结构的其他核苷酸可与延伸复合物瞬时结合和去结合,并且可以检测到,但由于存在可逆终止子而不能化学并入。在可能发生一定数量的瞬时结合事件之后,终止被逆转,从而允许其中一个核苷酸完全并入(任选地可以添加另外的磷酸并且任选地添加锰以促进并入),由此使增长链移动到下一个位置,以便通过瞬时结合核苷酸来询问模板中的下一个位置。不正确的瞬时结合核苷酸可以通过其与延伸复合物的不同缔合时间和通过一致性(将从正确核苷酸中检测到更多结合事件)与正确的瞬时结合核苷酸区别开。这种结构类型适用于通过PAINT进行超分辨或单分子定位。经适当修饰的Klenow、Therminator或Phi29聚合酶可用作聚合酶

[0652] 图19:用于瞬时核苷酸结合的双核苷酸系统。并入左侧的结构并终止延伸。右侧的结构瞬时结合延伸复合物以询问模板中的下一个位置。在检测到足够的结合事件后,终止被逆转并且能够并入另一个可逆终止子(左),从而允许瞬时结合核苷酸(右)询问模板中的下一个位置。

[0653] 图20:显示了经-ONH2修饰的胸腺嘧啶核苷酸(作为可从FirebirBio Inc.获得的四种此类核苷酸的一个实例),我们已在寡核苷酸合成仪上将其与经羧基修饰的寡核苷酸连接。可以在3'末端修饰寡核苷酸以防止核酸外切酶消化,正如在这种情况下用3'磷酸或C2间隔区进行的那样。

[0654] 图21呈现了伴侣1的对接序列和伴侣2的成像序列的列表。可以选择四个序列对的集合以覆盖四种核碱基。

[0655] 图22呈现了在并入经结合伴侣1标记的核苷酸之后,结合伴侣2的结合情况的PAINT图像的预处理和后处理。左:PAINT数据集中单帧的原始图像数据。右:纳米级位置处理后的相同区域(图像颜色颠倒)。

[0656] 实施例

[0657] 应该记住,以下实施例可以进一步优化,并且所用试剂的组成和浓度可以由本领域技术人员调整。如本领域中已知的并且如本文件中引用的专利和出版物中所例示的,可以添加其他组分。由于许多所需的程序是实验室手册的标准分子生物学程序,因此可以参考Sam brook和Russell,Molecular Cloning A laboratory Manual,CSL Press(www.Molecular Cloning.com)。关于DNA合成,还可参考Eckstein编辑,Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach(IRL Press,Oxford,1991)和M.J.Gait(编辑),1984,Oligonucleotide Synthesis;B.D.Hams&S.J.Higgins(编辑)。以下三本手册提供了有用的实际信息:Handbook of Fluorescent Probes(Molecular Probes,www.probes.com);Handbook of Optical Filters for Fluorescence Microscopy(www.chroma.com);Single-Molecule Techniques:A Laboratory Manual,由Paul R.Selvin编辑,University of Illinois,Urbana Champaign;Taekjip Ha,University of Illinois,Urbana-Champaign;Focus on Single Molecule Analysis,Nature Methods,2008年6月第5卷,第6期。对于标签与核苷酸和聚合剂的缀合分层,还可参见Hermanson,GT Bioconjugate Chemistry。

[0658] 需要确保所用试剂尽可能纯。本发明中使用的核苷酸和寡核苷酸尤其如此。

[0659] 下面提供的本发明的实施方案和技术细节可以由技术人员改变,并且可以在没有

过度实验或重新发明的情况下进行测试和系统性优化。如本领域技术人员可能期望的那样，可以设想，对于本发明的一个实施方案所描述的方面可以用于本发明的另一个实施方案。

[0660] 将核酸提取到流动池中

[0661] 核酸可以通过本领域技术人员已知的方法提取，包括使用市场上可获得的各种试剂盒。提取也可以在流体系统内通过下述方式完成：将细胞装载到系统中并且使细胞陷入流动池内的结构化区域中，之后添加流动裂解试剂例如蛋白酶等。提取的DNA可以在流动池中被剪切或酶消化并捕获在流动池内进行测序。

[0662] 在封闭系统中使用Illumina试剂进行测序

[0663] 各种Illumina SBS试剂盒(例如TrusSeq SBS试剂盒)可用于测序，试剂添加和成像按以下顺序进行：通用测序缓冲液；并入Mastermix；通用测序缓冲液；洗涤缓冲液；通用扫描混合物；裂解试剂混合物；裂解洗涤混合物。

[0664] 或者，在每个循环中按照以下顺序装载用于Illumina基因组分析仪II的试剂：高盐缓冲液；并入缓冲液；并入混合物(聚合酶和标记核苷酸的混合物)；并入缓冲液；扫描混合物；裂解缓冲液；裂解试剂；裂解缓冲液。

[0665] 根据是使用图5还是图6中描述的方案，将试剂一种一次装载到流体回路中，或根据要进行的循环次数(例如150次)按需要装载多次。

[0666] 将这些试剂装载到流体回路中。这里，将Cavro旋转阀(Tecan)编程为汲取每种试剂的体积，但是每次试剂汲取穿插汲取空气。这样，将试剂装载到由气穴或与测序试剂(例如油)不混溶的液体隔开的流体回路中。

[0667] Illumina试剂盒的详细信息可从网站上下载：

[0668] https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/myill umina/6936f0c7-b8cb-4a62-bcc5-207a05850b1f/truseq_sbsv5_ga_reagentprepgu ide_15013595_d.pdf.

[0669] 通过对核苷酸上四种染料中的两种使用532nm激光而对另两种染料使用660nm激光进行成像。通过使用特定发射滤光片和设计用于确定每种染料的签名的算法来区别由每种激光激发的两种染料中的每一种。

[0670] 可以使用多种不同Illumina测序仪器中的一种，包括基因组分析仪IIx。可以使用具有与Illumina流动池支架兼容的基底表面及入口和出口的Illumina流动池或定制流动池(例如，从Dolomite,Cambridge UK定制)。或者，一种自制系统包括倒置显微镜、高数值孔径物镜、激光器、CCD相机、荧光团选择性滤光片和基于注射泵或压力驱动的试剂交换系统和加热载物台。自制系统可以适用于除Illumina所提供的以外的其他核苷酸/染料组合。

[0671] 当使用Illumina流动池时，在制备Illumina库之前添加Illumina适配体。将样品DNA装载到容纳于Illlumina集群生成工作站中的流动池内。在一些实施方案中，进行集群扩增。然而在其他实施方案中，在捕获和变性之后，不进行集群扩增，并且将对固定化的单分子进行测序。在一些实施方案中，将自启发夹模板装载到流动池中，所述流动池涂有链霉亲和素，并用一个或多个生物素基团修饰模板。

[0672] 然后通过使用图5和图6中描述的任一种方案来进行测序，并且该测序涉及按上述顺序流过表面上的固定单分子的流体包。当扫描混合物在流动池中流动时成像。任选地，

Illumina GAII中的Photometrix CoolSnap相机可以用Hammamatsu ImageEM替换，并且用Illumina荧光核苷酸延伸的单个分子可以很容易地成像。

[0673] 我们使用Illumina试剂确认了在我们的流动池内自启发夹模板的延伸(参见下面的章节“使用DNA PAINT进行测序”)。

[0674] 在一些实施方案中，将嵌入染料如YOYO-1置于测序缓冲液中，并通过475nm或488nm激光照射，且检测到向Illumina染料的FRET。

[0675] 用作为FRET供体的嵌入染料和可光化学裂解的可逆终止子受体进行测序

[0676] 在反应混合物中将YOYO-1嵌入染料与ThermoPol 1反应缓冲液、Therminator聚合酶和四种可光裂解的核苷酸(例如来自Lasergen的闪电终止子或等效核苷酸)一起在65°下提供5至30分钟。可定制合成基于闪电终止子的核苷酸，并用可区别染料(例如Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5或Cy3B、tto 595、tto 6555、Cy7)标记每个核苷酸。可以将流动池在平板式PCR仪(G-STORM)中温育或在显微镜上使用加热载物台。反应后，使用TIRF照射，通过Nikon Ti-E显微镜上的高NA物镜(1.45NA Nikon)，使用完美对焦系统(PFS)检测表面结合模板中的核苷酸并入。用512x512ImageEM相机(Hamamatsu)拍摄图像。Melles Griot 488nM激光器光纤耦合到显微镜的TIRF附件中。488nm激光清除滤光片连同长通二向色镜和Nikon滤光片立方体中的发射滤光片一起使用。得自Photometrics的QuadView用于在CCD相机上按波长将发射光分为四个象限。检测后，使用紫外线曝光裂解荧光标记和终止子5-10分钟。这允许下一个循环开始。

[0677] 用聚合酶上作为FRET供体的标记和可光化学裂解的可逆终止子受体进行测序

[0678] 在存在或不存在嵌入染料的情况下使用聚合酶进行新的反应，所述聚合酶直接用荧光供体标记或者附连于经荧光基团标记的蛋白质(例如链霉亲和素)。在该实施方案中，聚合酶需要在并入碱基后保持与靶多核苷酸附连。可以工程化蛋白质以对此进行优化。

[0679] 聚合剂的标记

[0680] 含胺氨基酸如赖氨酸残基可经NHS化学标记。细胞因子残基可经马来酰胺化学标记。这种化学反应的实例是本领域普通技术人员公知的，并且可以例如使用商业试剂盒实施(例如，可从thermofisher Scientific获得并在The MolecularProbes®Handbook A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES第11版(2010)中进行了讨论。例如，硫醇与马来酰亚胺的反应是广泛用于包括蛋白质和肽在内的生物分子的生物缀合和标记的过程。

[0681] 马来酰亚胺是对硫醇显示出高选择性的亲电子化合物。虽然马来酰亚胺几乎不存在于自然界中，但硫醇非常丰富。它们在蛋白质和肽中以半胱氨酸残基的形式遇到。虽然天然DNA不含硫醇，但可以很容易地制备具有硫醇基团的合成寡核苷酸。

[0682] 硫醇易于随着二硫键的形成进行氧化二聚化。因此，细胞因子残基形成使蛋白质三级结构稳定化的半胱氨酸桥。二硫化物不与马来酰亚胺反应。因此，必须在缀合之前还原二硫化物，并将氧从反应中排除。

[0683] 缀合方案取决于起始组分的溶解性。对于水溶性低的化合物，如大多数荧光剂马来酰亚胺，使用有机共溶剂如DMSO或DMF是必不可少的。

[0684] Lumiprobe染料马来酰亚胺与蛋白质、肽和其他硫醇化生物分子缀合的一个示例方案如下：

[0685] i.将待标记的蛋白质或含硫醇的其他分子溶解在塑料小瓶中pH 7-7.5的脱气缓冲液中(尽管也可以使用其他不含硫醇的缓冲液,但PBS、Tris、HEPES是很好的)。缓冲液可以通过对其施加真空几分钟或通过在惰性气体(氮气、氩气或氦气)中鼓泡来脱气。对于蛋白质,良好的浓度介于1-10mg/mL之间。

[0686] ii.添加过量的TCEP(三羧乙基膦)试剂以还原二硫键,用惰性气体冲洗并关闭。100x摩尔过量的TCEP很好。将混合物保持在室温下20分钟。

[0687] iii.将马来酰亚胺溶于DMSO或新鲜DMF中(1-10mg于100uL中)。

[0688] iv.将染料溶液添加到硫醇溶液中(20x过量的染料),用惰性气体冲洗小瓶,然后密闭。

[0689] v.彻底混合,并保持在室温或4摄氏度下过夜。

[0690] vi.通过凝胶过滤、HPLC、FPLC或电泳进行纯化。

[0691] 对于水溶性差的马来酰亚胺,如大多数染料马来酰亚胺,可以使用共溶剂(例如DMF或DMSO)。水溶性好的马来酰亚胺(如sulfo-Cy马来酰亚胺)可溶于水。如果发生沉淀,则增加混合物中有机共溶剂的含量以实现更好的标记。

[0692] 在一个实例中,将含有单个天然半胱氨酸(C907)的DNA聚合酶1(Klenow片段)突变体在50mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.0)、120μM三(2-羧乙基)膦中,用5至10倍摩尔过量的Cy5马来酰亚胺(GE healthcare)在室温下温育1小时。使用10mM二硫苏糖醇(DTT)终止反应。在聚丙烯酰胺Bio-Gel P6离心柱上将Cy5标记的酶与游离染料分离。这些严格的反应条件产生~70%KF与Cy5缀合并且使双标记种类减到最少。在其他实例中,根据是否用于FRET中及FRET伴侣的性质,用Cy3B或Atto 488或Alexa 488置换Cy5。

[0693] 聚合酶也可与含发色团的结构域例如绿色荧光蛋白或其变体融合。此类结构域的发射波长和亮度可以通过多肽中各个残基处的突变而优化。

[0694] 用Cy3B标记链霉亲和素

[0695] 根据生产商的说明用Cy3或Cy3B单马来酰亚胺(Amersham Biosciences)标记链霉亲和素或中性亲和素。为了将标记蛋白与游离染料分离,在Superdex200HR柱(GE Healthcare)上纯化反应产物。

[0696] 用荧光素酶-聚合酶融合物上作为BRET供体的标记和可光化学裂解的可逆终止子受体进行测序

[0697] 用与荧光素酶融合的聚合酶进行上述反应。在该实施方案中,将Therminator(9°N变体)与荧光素酶融合。这在DNA水平上完成,以产生可以表达融合基因的质粒,不管是在可以产生融合蛋白的宿主中,还是通过使用Transcend偶联转录/翻译试剂盒(Promega)。为了进行荧光素酶的生物发光反应,将其辅助因子添加到混合物中。这些辅助因子包括:荧光素、O2、ATP。

[0698] Nanoluc蛋白融合载体可用于制备融合蛋白。NanoLuc®荧光素酶(Nluc)的小尺寸(19.1kDa)和极高亮度(比萤火虫[Photinus pyralis]或海肾(Renilla reniformis)亮约100倍)使其成为有用的蛋白融合伴侣。

[0699] 使多核苷酸与多核苷酸结合试剂结合

[0700] 嵌入染料、大沟结合剂、经标记的非特异性DNA结合蛋白阳离子缀合聚合物可以与DNA结合。嵌入染料可以以不同的核碱基与染料比率使用。以大约1:5-10的染料与碱基对比

率使用多种嵌入染料供体导致DNA被染料分子(例如Sybr Green 1、Sytox Green、YOYO-1)标记,所述染料分子足以用作沿着增长的DNA链添加核苷酸的供体。一些DNA结合试剂能够基本上覆盖多核苷酸。

[0701] 构建修饰核苷酸

[0702] 本领域技术人员可以根据来自本领域的许多出版物和专利的指导来合成带有标记或标签和可逆终止子的修饰核苷酸。用于制备本发明必需的修饰核苷酸的前体是广泛可用的(例如得自Trilink、Jena Biosciences、FirebirdBio、Berry associates、Ambergen)。尤其是碱基上具有氨基、炔丙基氨基、氨基烯丙基修饰的大量核苷酸是可用的,并且在2'、3'或末端磷酸处的几种相关修饰也是可用的。这些可以使用市场上可用的各种试剂盒(包括那些用于NHS酯化学的试剂盒)与羧基修饰的标签(染料、标记)连接。标记/标签也可以经马来酰胺化学附连到核苷酸上。可用的几种接头是可裂解的,如二硫基和2-硝基苄基。尤其是可用于点击化学的几个核苷酸区域。使用寡核苷酸标签的一个重要方面是可以利用大量可用并且可以容易地从寡核苷酸供应商如Gene-Link和IDT订购的寡核苷酸修饰。我们利用了这样一个事实:即寡核苷酸中可以包括可裂解位置,例如可被光裂解的可光裂解位置,可被还原剂裂解的二硫基位置,可被碱或RNA酶裂解的一个或多个RNA核苷酸。肽也可以包括在寡核苷酸与核苷酸之间并且可以被蛋白酶裂解。下面我们给出了二硫基修饰的寡核苷酸与核苷酸的点击化学反应的一个实例。

[0703] 光不稳定性接头的裂解

[0704] 3'末端的可光裂解的2-硝基苄基接头可用作阻断剂和/或标记的光可逆接头。通常可以通过用300-360nm光照射5-15分钟并在所选的缓冲液中轻轻混合来裂解光不稳定性接头。在一些实施方案中,所用缓冲液是适于通过所用聚合酶并入核苷酸,并且与不需要试剂交换的均相测序反应相容的缓冲液。在一些实施方案中,所选的缓冲液含有与磷酸盐缓冲盐水类似的盐浓度。在缓冲液中添加DTT具有有益效果(Stupi等人Angew Chem 1724-1727)并且可以加速反应。

[0705] 为了功效更佳,可以使用特定方案。在一种方案中,以1.5W/cm2、50mJ/脉冲用355nm的紫外光实现光裂解。一个脉冲持续7ns并且重复,总共持续10秒。

[0706] Metzker和Lasergen公司的同事开发的发光终止子是非常有利的可光裂解的核苷酸。这些核苷酸具有附连到羟基甲基化的碱基上的2-硝基苄基基团,并通过具有快速动力学的Therminator并入,从而使并入反应时间变短,例如缩短到一分钟。

[0707] 搅拌/混合

[0708] 在各个实施方案中,提供有效的混合或搅动,使得试剂翻转靠近表面并与靶多核苷酸及其上的延伸复合物接触。这种混合可以通过减少层流效应而发生,其中除了扩散之外在附连于表面的样品周围几乎没有发生混合。这可以通过诱导湍流来完成,诱导湍流有多种方式。反应混合物中可以包括形状粗糙的粒子,流动池至少一个壁上的粗糙或人字形或其他图案可以促进有效的混合和湍流。可以通过外部搅动使溶液来回移动,外部搅动可以通过对流动池的物理操作(这在反应溶液中包含气泡时起作用)和/或通过提供声波而进行。

[0709] 使用STED进行超分辨率合成测序

[0710] 超分辨率显微镜如Leica TCS SP8STED 3X可以耦合到任选的加热机构和用于试

剂交换的压力驱动的流动系统，以进行本发明的测序。核苷酸用STED相容性染料(http://nanobiophotonics.mpibpc.mpg.de/old/dyes/和可从http://www.abberior.com获得的那些染料)标记。染料可以与可从供应商例如GeneLink(White Plains New York)的FirebirdBio处获得的核苷酸缀合。Leica TCS SP8STED 3X可以达到30nm以下的分辨率。这可以使用4种颜色或少于4种颜色来实行。在STED中可以通过使用不同的激光线组合，或相同的激光线，但使用可以根据其寿命区分的荧光团来分辨颜色。

[0711] 用量子点标记的核苷酸进行的超分辨SbS，和随机光学重建

[0712] 将链霉亲和素量子点在4℃下在量子点缓冲液中与ss-生物素dNTPS(Perkin Elmer)缀合数天，接着在Beckman Optima上以100,000rpm进行3X超速离心并去除上清液。用nanodrop分光光度计(Nanodrop corp,USA)量化量子点-dNTP。或者，可以在45℃下温育1小时。

[0713] 在量子点链霉亲和素核苷酸缀合物(565C和655G,Quantum Dot Corporation,USA)的存在下进行延伸反应。当使用ss键合时，可以使用以下聚合酶反应缓冲液：(20mM Tris-HCl(pH 8.8)、10mM MgCl2、50mM KCl、0.5mg/ml BSA、0.01％Triton X-100)。

[0714] 在TIRF显微镜下在载玻片与盖玻片之间的量子点缓冲液(Molecular Probes,Eugene,OR,USA)中进行检测并拍摄影像以记录量子点的闪烁行为。然后使用本领域已知的方法，用影像重建超分辨率图像。

[0715] 在10-50mM TCEP/250mM Tris(pH 7.6)/100mM NaCl或Illumina裂解缓冲液中进行还原反应5-10分钟，并在量子点缓冲液或50mM TCEP/250mM Tris(pH 7.6)/100mM NaCl中洗涤。

[0716] 裂解后，将裂解的核苷酸用50mM碘乙酰胺/100mM Tris(pH 9.0)/100mM NaCl封端5分钟，接着在量子点缓冲液或SSC/HEPES/SDS和HEPES/NaCl中洗涤。之后，进行进一步的显微镜检查以检测量子点的去除。这样重复以获得测序读段。

[0717] 用ss-生物素核苷酸(结合伴侣1)进行的SbS和用链霉亲和素包被的量子点(结合伴侣2)进行标记

[0718] 引物延伸后，如上所述，但使用尚未连接的ss-生物素dNTP。然后在45℃下将量子点与阵列在量子点缓冲液中以4nM至20nM的浓度温育。拍摄影像以记录量子点的闪烁行为，接着使用TCEP(或Illumina裂解缓冲液)裂解并用碘乙酰胺封端。闪烁行为提供了进行超分辨率重建的机会。这样重复以获得测序读段。

[0719] 以上以及直接用量子点标记的寡核苷酸(例如使用可从Perkin Elmer获得的经由SS桥与生物素连接的核苷酸，其可独立地偶联至不同波长发射的量子点)可以成像。超分辨光学波动成像(SOFI)是由记录的图像时间序列计算超分辨率图像的后处理方法，该方法基于独立波动或闪烁量子点的时间相关性(相同的方法可应用于在某些介质中具有闪烁倾向的荧光剂)。

[0720] FRET和光活化成像

[0721] 为了获得FRET多色图像，将TIRF成像与供体的激光激发相结合，并且在一个或多个相机上使用图像分割器(双视图、四视图、W视图、光分割或定制光学装置)，将发射波长分割为四个发射波长和供体的发射波长，FRET期间供体的发射强度与来自受体的发射反相关。本领域技术人员可以选择适当的激光器和滤光片组。已将488nm激光(Coherent

Sapphire200mW)用于激发作为FRET供体的嵌入染料。在连续照射下,已将532nM激光(激光量子400mW)用作光活化剂并将640nM激光用作成像激光,通过可从Andor和Nikon获得的光纤合并和发射系统耦合。

[0722] 光转换

[0723] 使用单分子光转换(用于STORM)的测序,必须使用含有氧清除体系的适当成像缓冲液:用于将光漂白减到最低限度的葡萄糖、葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶,以及用于促进光转换的硫醇(特别是在使用花青染料时)。使用752nm激光时与Alexa 750一起起作用的两种缓冲液的具体组成如下。BME成像缓冲液:Tris(50mM,pH8.0);氯化钠(10mM);葡萄糖(10%w/v);β-巯基乙醇(143mM,Sigma,M3148);酶促氧清除体系(1%v/v)

[0724] MEA成像缓冲液:Tris(50mM,pH8.0):氯化钠(10mM):葡萄糖(10%w/v):β-巯基乙胺,pH8.5(10mM,Sigma,30070):酶促氧清除体系(1%v/v)

[0725] 在测序之前立即将酶促氧清除体系添加到缓冲液中,并且通过将葡萄糖氧化酶粉末(10mg,Sigma,G2133)与过氧化氢酶(50μL,20mg L-1,Roche Applied Science,106810)混合在PBS(200μL)中并以13 000rpm将混合物离心1分钟来制备储备溶液。

[0726] 可信标志物如荧光珠粒(Invitrogen,F8810)可用于颜色之间和循环之间的数据集对齐。珠粒位置在实验过程中基于其在原始数据中的图像以高精度定位。这使得紧密定位的定位集群与样品上固定的珠粒相对应。可以使用多项式卷绕变换来变换收集的一组定位以解释放大倍数、旋转、剪切等的差异,然后基于图像中的珠粒位置使用刚性平移来对齐图像。这样产生了5.6±2.5nm的图像配准精度。

[0727] Vutara 352超分辨系统(Bruker,Germany)使用高功率激光器和高达20uMx20Um视场的CMOS检测,并且可用于制作STORM图像。

[0728] 用DNA PAINT进行测序

[0729] 核苷酸用作为结合对的第1部分的寡核苷酸序列标记,四种不同的DNA序列用于四种核苷酸中的每一种,其各自与不同标记的DNA PAINT成像序列互补。结合伴侣1序列包含结合伴侣序列2的补体。表1中提供了结合对序列的列表。

[0730] 作为带有不同的可区分荧光标记的不同DNA成像链的替代。不同的成像链,虽然带有相同的荧光标记,但因具有由于寡核苷酸的序列而产生的不同结合/去结合速率或提供不同倍数的共同序列而可以加以区别;所以A由单个序列单元,C由两个序列单元,G由三个序列单元,T由四个序列单元(或引入结合频率差异的任何其他倍数集合)编码。因此它们的结合的时间签名可用于对其加以区别。同样,不同的成像链可以带有相同的荧光团,但成像剂相继添加,在两者之间进行成像。除了带有荧光团的成像链之外,也可以将它们设计为携带更明亮的标记,例如光学活性纳米粒子如半导体纳米晶体(2-35nm直径)和金粒子(例如~70-120nm直径))并且可定制成像反应的条件以促进快速结合动力学(例如更高的温度和/或更高的浓度)和快速去结合速率(例如更短的寡核苷酸和/或更高的温度)。DNA PAINT概念可以扩展到其他结合对,只要它们能够在反应条件下瞬时结合即可。

[0731] 生物素化寡核苷酸(Integrated DNA Technologies)可通过链霉亲和素-生物素相互作用与核苷酸或荧光标记连接。羧基封端的寡核苷酸(Integrated DNA Technologies)可以通过氨基烯丙基核苷酸N-羟基琥珀酰亚胺反应与胺修饰的(或在3'末端经-ONH2修饰的)核苷酸或与荧光标记连接。可以使用点击化学使炔标记寡核苷酸与叠氮

化物标记核苷酸(可从Jena Biosciences,Germany获得)连接。可以使用点击化学使叠氮化物标记寡核苷酸与DBCO标记核苷酸(可从Jena Biosciences,Germany获得)的炔连接。其他点击化学组合也是可能的。

[0732] 经荧光修饰的DNA寡核苷酸购自Biosynthesis、IBA-GO、Trilink或Gene-Link。链霉亲和素购自Invitrogen(目录号:S-888)。牛血清白蛋白(BSA)和BSA-生物素得自Sigma Aldrich(目录号:A8549)。载玻片和盖玻片购自VWR。

[0733] 我们获得了含有含5'己炔基接头、二硫化物、3'磷酸的伴侣2序列的(5'[5己炔基][SS-C5]TTATACATCTA[磷酸]3')的定制合成寡核苷酸(Genelink),并使用寡核苷酸点击试剂盒根据试剂盒方案(BaseClick,Germany)将其点击至含有叠氮基的核苷酸,即叠氮化物-PEG4-氨基烯丙基-dUTP(Jena Biosciences)以制备带寡核苷酸标签的核苷酸。点击的带寡核苷酸标签的核苷酸缀合物可以在G-25微离心柱或Amicon Ultra 3K上纯化。可能必需进行两轮纯化。该缀合物可以在不纯化的情况下使用,其缺点是~50%的延伸产物具有未缀合的核苷酸(不适于实际测序反应)。

[0734] 通过(IDT,USA)定制合成生物素化自启发夹模板(参见附图)。在一些情况下,使用Therminator(New England Biolabs)在溶液中进行初始延伸反应,在其他情况下在65℃下(也可以使用72℃),使用Pol475(Firebird Bio Inc;Taq突变体E520G、K540I、L616A)并且在4%e-gel上检查产物。带寡核苷酸标签的核苷酸在调整好的反应条件下是有效的终止子。这些条件分别包括0.5ul或1ul(2个单位)的Pol475或Therminator:1xThermopol缓冲液(NEB)、1mM带寡核苷酸标签的核苷酸、100uM自启发夹模板。如果发现有益,则可以测试0.2-2mM氯化锰并测定其对测序的影响。

[0735] 我们获得了成功并入的证据(与仅有模板和没有酶的对照相比带上移)。然后,我们在65℃下使用Illumina裂解混合物(已知为还原剂,TCEP)测试裂解10分钟或30分钟,这通过凝胶分析证明是成功的。

[0736] 或者,PEG键合可被氧化裂解或被细菌酶裂解(Schramm和Schink Biodegradation,2:71-79(1991))。可以更靠近碱基添加可裂解位置以提高持续性并获得延伸读段。

[0737] 在表面上演示所述方法之前,我们首先建立了发夹和流动池装置与SbS的相容性,SbS用Illumina并入混合物进行延伸并用532nm和660nm激光成像。这表明延伸与所述装置相容并且帮助我们将发夹浓度滴定至适合SbS初始测试的水平。然后,我们使用带寡核苷酸标签的核苷酸进行DNA PAINT在表面上演示SbS。

[0738] 用经由链霉亲和素-生物素相互作用固定在表面上的5'位置生物素化的自启发夹制备流动池。为了制备样品,用两条双面胶带将盖玻片(1.5号,18×18mm2,~0.17mm厚)和载玻片(3×1平方英寸,1mm厚)夹在一起以形成内体积为~20μL的流动室。首先,使20μL生物素标记的牛白蛋白(1mg/ml,溶于缓冲液A)流入腔室内并温育2分钟。然后使用40μL缓冲液A洗涤腔室。然后使20μL链霉亲和素(0.5mg/ml,溶于缓冲液A)流过该腔室并允许其结合2分钟。用40μL缓冲液A洗涤,随后用40μL缓冲液B洗涤后,使缓冲液B中20μL生物素标记的自启模板(~300pM单体浓度)最终流入腔室内并温育5分钟。使用40μL缓冲液B洗涤该腔室。然后这允许我们使用带寡核苷酸标签的核苷酸进行SbS,根据上文针对溶液实验描述的反应方案,我们在两个使用和不使用酶的实验中对其进行了测试。我们用链霉亲和素涂层新制

备流动池，固定生物素化发夹，进行延伸前洗涤并使用Therminator在65℃下进行带寡核苷酸标签的核苷酸向表面附连的自启发夹的并入。然后，我们在添加Cy3B标记的DNA PAINT链之前进行并入后洗涤，并使用TIRF成像拍摄影像。未立即处理的成像结果表明，在+酶相对于-酶对照的情况下，更多的成像链与表面结合(参见附图)。使用Fiji ThunderSTORM在带有Xeon处理器和32Gb RAM的Lenovo D30计算机上处理影像。在这个实验中，我们依赖于使用ThunderSTORM中可用的可信标志物自由漂移校正算法。我们能够获得延伸的多核苷酸的单分子定位(参见附图)。

[0739] 在一些情况下，可以在添加对仅需要单碱基延伸的方法有用的一个碱基后停止序列获取。当意图在一个碱基后停止时，核苷酸不需要带有可裂解接头，并且也已成功地测试本实施例的核苷酸，即叠氮化物-PEG4-氨基烯丙基-dUTP与不包括可裂解位置的寡核苷酸缀合。

[0740] 对于SbS中的下一个步骤，在65℃下使用Illumina裂解溶液裂解并入的带寡核苷酸标签的核苷酸中的ss键。然后我们使用碘乙酰胺封端裂解的核苷酸，进行洗涤，然后进行后续测序循环，这些测序循环涉及如上所述的并入、成像和裂解过程。

[0741] 三种缓冲液用于样品制备和成像：缓冲液A(10mM Tris-HCl、100mM NaCl、0.05％Tween-20，pH7.5)、缓冲液B(5mM Tris-HCl、10mM MgCl2、1mM EDTA、0.05％Tween-20，pH8)和缓冲液C(1×PBS，500mM NaCl，pH8)。

[0742] 在具有完美对焦系统的倒置Nikon Eclipse Ti显微镜(Nikon Instruments)上，使用带有油浸物镜(CFI Apo TIRF 100×，NA1.49，Oil)的Nikon TIRF照明器，应用物镜式TIRF构造进行荧光成像。使用另外的1.5倍放大倍数以获得～150x对应于107nm像素大小的最终放大倍数。对于测序实验，使单根532nm激光光纤通过光纤扰频器(Point Source Inc)，以在光学耦合到Nikon Ti TIRF附件后获得良好的均匀照明。通过475/532/660多色滤光片和532nm长通滤光片和(Chroma)完成激发和发射，并用具有200ms曝光和无EM增益的Hamamatsu ImageEM相机拍摄图像。

[0743] 在其他实验中，具有不同标签和相应成像标签的四种核苷酸全部与Atto488、Cy3B、Atto 647N和Cy7一起用于SbS。为此，使用三个激光器进行激发：488Nm(200mW，Coherent Sapphire)、561nm(200mW，Coherent Sapphire)和647nm(300mW，MBP Communications)。激光束通过清除滤光片(ZT488/10、ZET561/10和ZET640/20，Chroma Technology)，并使用多波段分束器(ZT488rdc/ZT561rdc/ZT640rdc，Chroma Technology)耦合到显微镜物镜中。用发射滤光片(ET525/50m、ET600/50m和ET700/75m，Chroma Technology；可以使用Cy7特定的附加滤光片立方体)对荧光进行光谱过滤，并在EMCCD相机(iXon X3DU-897，Andor Technologies)上成像。

[0744] 在其他实验中，使1x ThermoPol反应缓冲液流入腔室内。之后，流入Therminator聚合酶(NEB)，并使Therminator缓冲液中的具有可光裂解的接头的带寡核苷酸标签的核苷酸与固定的靶多核苷酸反应。当并入核苷酸时，其属性可以通过成像链的持续结合来测定，并且由于成像链的结合/去结合，可以对不同靶多核苷酸上的反应进行超分辨。成像后，通过可裂解接头的光化学裂解来使终止逆转，并触发下一个循环。可以提高缓冲液盐浓度以确保有效的DNA PAINT结合，但这可能以核苷酸并入为代价。然而，耐盐聚合酶是已知的，包括Phi29、TopoTaq和WO 2012173905中公开的那些聚合酶。因此0.65M的单价盐浓度可用于

在均相反应中进行DNA PAINT和聚合酶介导的核苷酸并入。

[0745] 成像包括在室温下在缓冲液B的范围内的盐浓度下，A核苷酸的对接链的1.5nM Cy3b标记的成像链，C核苷酸的对接链的Atto 488标记的成像链，G核苷酸的对接链的Atto 655标记的成像链，以及T核苷酸的对接链的cy7标记的成像链；使用不同的温度和寡核苷酸序列可能需要在缓冲液中使用不同的盐浓度。理想地，选择温度和寡核苷酸序列以便可以实现适于并入的盐浓度。CCD读出带宽在16位和5.1前置放大增益下设为1MHz。在561nm下使用294W/cm2的激发强度进行TIR照射来成像。

[0746] DNA paint可以通过FRET供体例如嵌入染料，或结合伴侣1上的染料激发，嵌入染料在结合对之间形成双链体时嵌入。可能获得几纳米的分辨率(Chemphyschem.2014;15(12):2431-5)。

[0747] 更快速的CMOS相机正变得可用，这将使得更快速成像成为可能，例如Andor Zyla Plus仅以USB 3.0连接便可在512×1024上实现高达398fps，并且在感兴趣区(ROI)或CameraLink连接上将更快。因此，用更短的对接链/成像链或更高的温度或更低的盐浓度进行操作，可能在短时间内针对所需分辨率收集足够的信息；为此，激光功率优选地较高，例如500mW；相机量子产率优选地较高，例如～80％，且染料亮度优选地较高。这样，所需采集时间可以缩短到几秒钟。但是，这可以比衍射极限方法实现>10倍的分辨率增益。

[0748] 在本发明的一个实施方案中，使用时间延迟积分与CCD或CMOS相机实现一种新成像方法，其中样品台与相机读出同步平移，使得时间分辨率遍布于许多像素。这加快了图像采集，因为从表面上的一个位置移动到另一个位置没有延迟。其结果是成像条带，即一列中的前1000个像素代表一个位置10秒的成像，而下1000个像素代表下一个位置10秒的成像。Appl Opt.54:8632-6(2015)中描述的方法也可以适用。

[0749] 用于对成像链结合进行超分辨率成像的DNA PAINT方法的优点是：每个位置随时备用，光漂白或暗态几乎没有影响，并且复杂场停止或不需要鲍威尔棱镜(Powell lens)来限制照射。

[0750] 当使用光散射纳米粒子(例如金纳米粒子)或半导体纳米晶体时，由于这些粒子更明亮、接近非穷尽的光学响应，所以存在明显进一步的速度提升。同样，需要定制相机帧率和成像剂结合/去结合速率以在使用此类纳米粒子标记时获得最大速度提高。为此，可以在暗场模式下进行TIRF成像以捕获光散射而不是来自粒子的荧光。可以调整来自CytoViva Inc的暗场装置或者可以使用基于Ueno等人(Biophysical Journal第98卷，2010年5月2014-2023)的装置。该装置使用用于暗场照明的穿孔镜，和超快速相机(FASTCAM-1024PCI；Photron)。粒子的大小、组成和形状可以允许产生不同的强度和颜色(参见US 6,180,415)。

[0751] 当模板排列成密集集群时，分子间隔范围仅从一纳米开始，需要在设置和成像中采取特殊措施。可以采用在Nature Nanotechnology 11,798-807(2016)中的Optical imaging of individual biomolecules in densely packed clusters中描述的方法。

[0752] 可以制备2-D晶格例如具有模板对接位点的DNA折纸，作为以设定距离组织多核苷酸的方式。对接位点可以是伸出的钉，并且可以是例如长度为10-70个核苷酸的寡聚dT链，用于捕获聚A RNA或加尾RNA或DNA。可以使用链霉亲和素-生物素相互作用将晶格固定到表面。

[0753] 使用瞬时结合核苷酸进行PAINT测序

[0754] 本领域技术人员可以在上文针对DNA PAINT所述的相同系统中进行图18和图19中描述的用瞬时结合核苷酸结构进行的测序。所有四个碱基的可逆终止子(可从FirebirdBio、Trilink或Jena获得或定制)用于第一碱基并入和终止。然后添加可从多个供应商处获得的碱基标记的荧光核苷酸,对于四种碱基中的每一种而言不同地标记,并进行PAINT成像。使用单分子定位(例如ThunderSTORM)和适用的Swift软件完成分析和碱基识别。在瞬时核苷酸结合方法的第二种实现方式中,使用在末端磷酸处经荧光标记的单一类型的可逆终止子,并且这种终止子可由Jena Biosciences或Trilink定制。在一些实现方式中,将可逆终止子用FRET供体或光活化剂进行荧光标记,瞬时结合核苷酸上的标记是FRET受体和/或在其瞬时结合延伸复合物之前呈变暗状态。在针对每个波长收集大约10,000帧之后,可以使终止逆转,并在模板阵列上循环到下一个碱基添加。

[0755] 制备多核苷酸群体

[0756] 在本发明的所有测序方法中,通常意在提供代表样品的多核苷酸阵列。就RNA样品而言,这将包括许多种类,并且可能存在每个种类的多个拷贝。在基因组DNA的情况下,如果来自人类,则将会有来自二倍体基因组的多个片段;并且如果检查单个细胞,则会有两个基因组拷贝。

[0757] 可以使用末端转移酶,使用单核苷酸和末端转移酶,用A核苷酸为基因组DNA加尾。然后可以根据所需密度,通过按10至300pM排列的生物素化寡聚dT来捕获片段群体。类似地,寡聚dT能够捕获聚A RNA或加尾RNA。

[0758] 成像溶液

[0759] 在非均相反应和均相反应中进行成像期间,除氧剂可用于减少光漂白和暗态。本领域的技术人员知道许多配方。这些配方通常包含除氧剂,并且可以根据正在实施的测序生物化学方法的性质而改变。例如,当所用的染料为Cy5时,可以使用以下溶液:

[0760] 30%乙腈和清除缓冲液(100mM HEPES、67mM NaCl、25mM MES、12mM Trolox、5mM DABCO、80mM葡萄糖、5mM NaI和0.1U/μL葡萄糖氧化酶(USB),pH 7.0)。在一些情况下,可以添加还原剂如2-巯基乙醇和维生素C。可以根据测序方法将特殊配方与量子点一起用于促进闪烁或抑制闪烁。

[0761] 成像和图像处理

[0762] 无需相对于相机移动样品台(保持流动池)即可完成成像。这可以在实时、连续测序期间或任选地在获取超分辨数据时完成。可以使用本发明别处描述的相机。或者,为覆盖大面积,当测序涉及暂停或终止步骤时,将样品台相对于相机平移。这允许覆盖更大的分子阵列。具有线性编码器的平移台能够实现从循环到循环的精确对齐,并且例如可信标志物的漂移校正可以用于辅助图像对齐。在一些实施方案中,使用行扫描仪或TDI成像,其涉及与相机读出同步地对样品台进行连续平移。TDI传感器可从Hamamatsu和其他供应商获得。

[0763] 图像处理可以使用经调整的SWIFT(Whiteford等人)来完成,并且可以使用Fiji中的工具,包括诸如ThunderSTORM等插件。任选地,可以将DNA折纸漂移标志物(~100pM)添加到实验中。作为折纸的替代,100nm金纳米粒子(Sigma Aldrich;10nM于缓冲液C中,在成像之前添加)可以用作漂移和对齐标志物。漂移校正涉及在每个影像持续期间跟踪每个标志物的位置,平均检测到的所有标志物的轨迹以全局校正图像中的漂移。同样,Fiji/ThunderSTORM以及MattLab具有固有的漂移校正算法,这些算法相当有效且不需要可信标

志物，而是通过自相关来校正漂移。

[0764] 编译序列读段形成单分子数据

[0765] 一旦完成了所需循环次数，就对齐图像堆栈数据或单分子定位堆栈数据(即，原始信号的位置或在整个阵列或每种颜色上运行单分子定位算法之后产生的那些信号位置)以产生单独的序列读段。

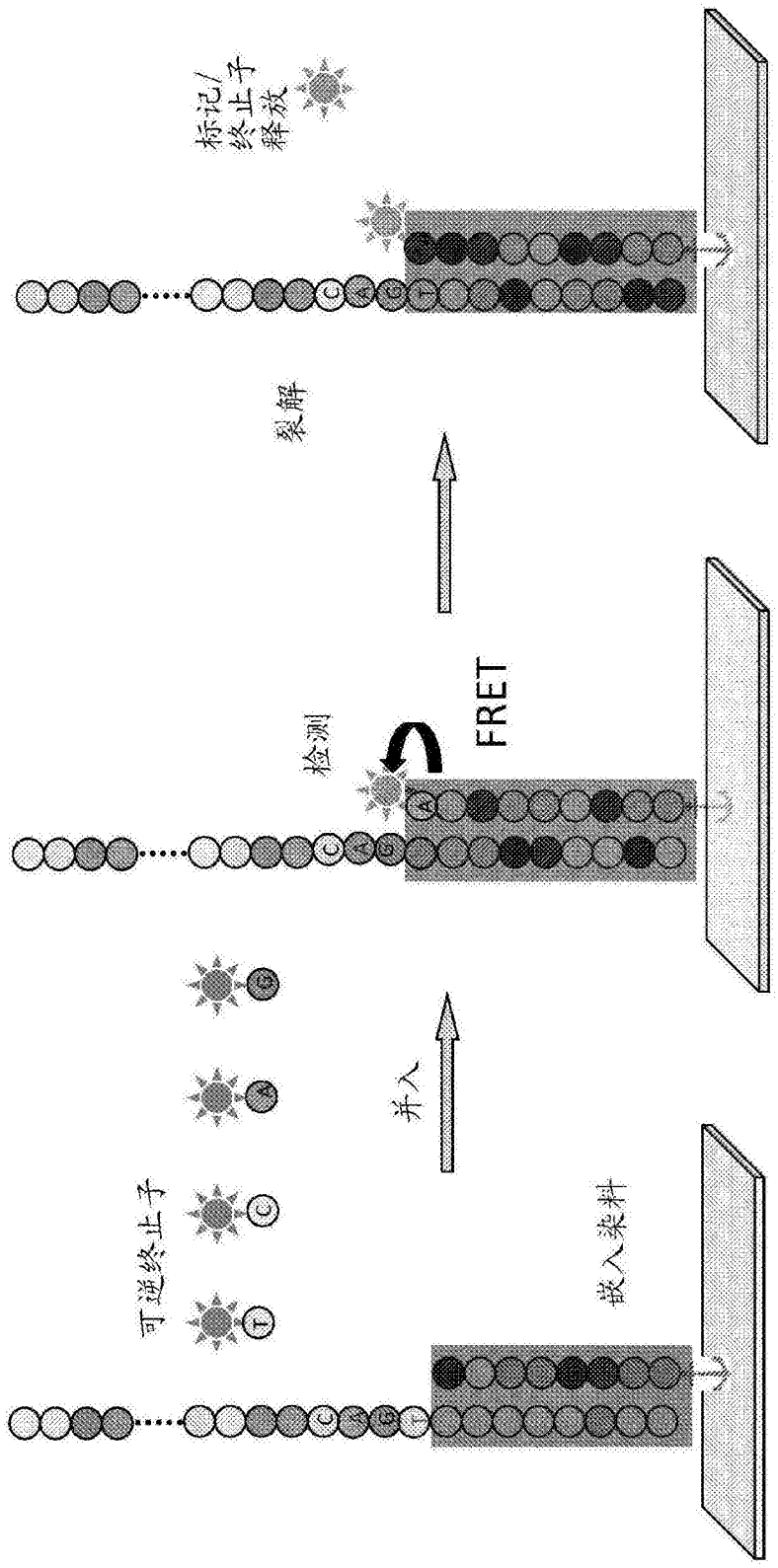


图1

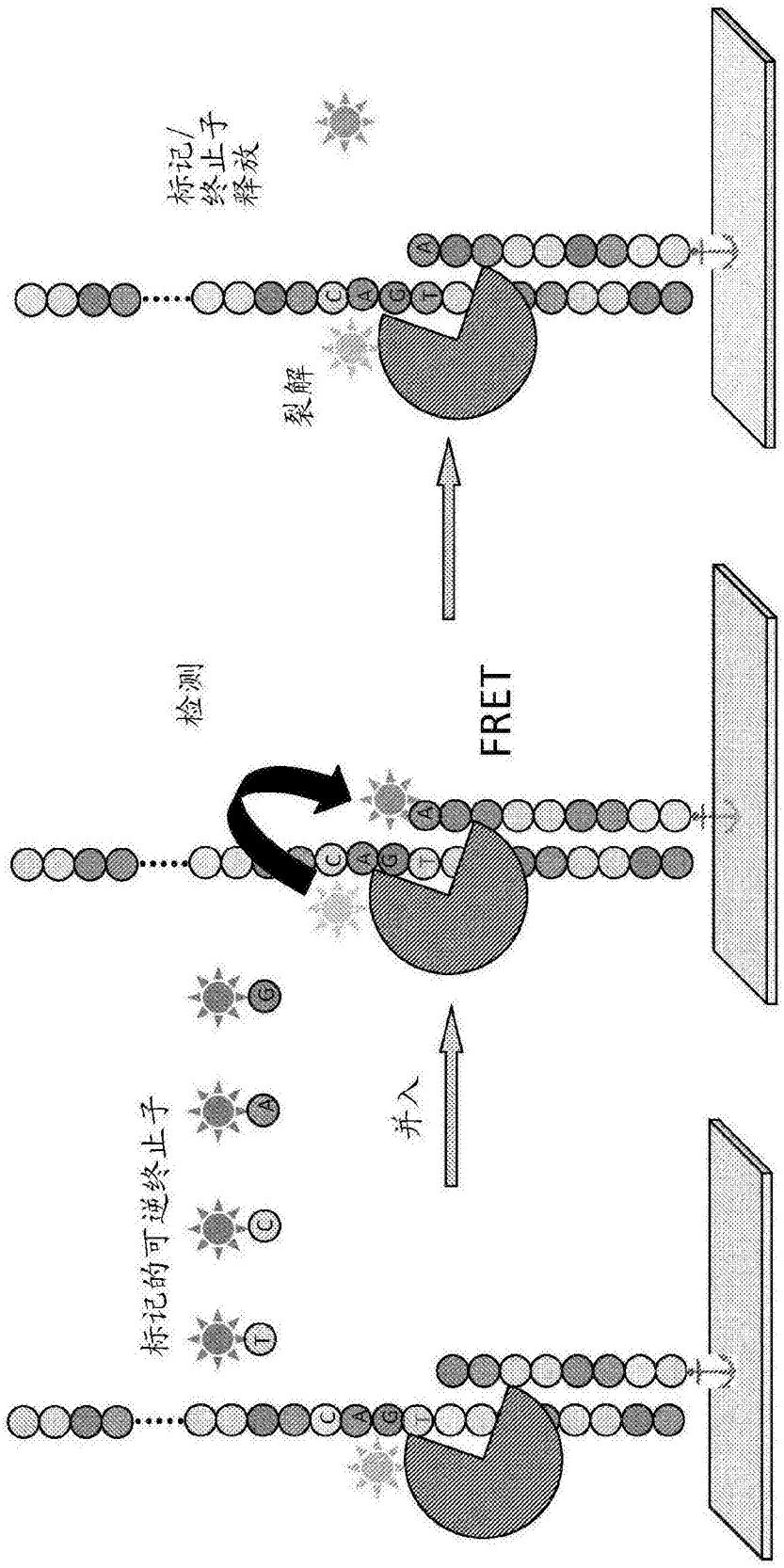


图2

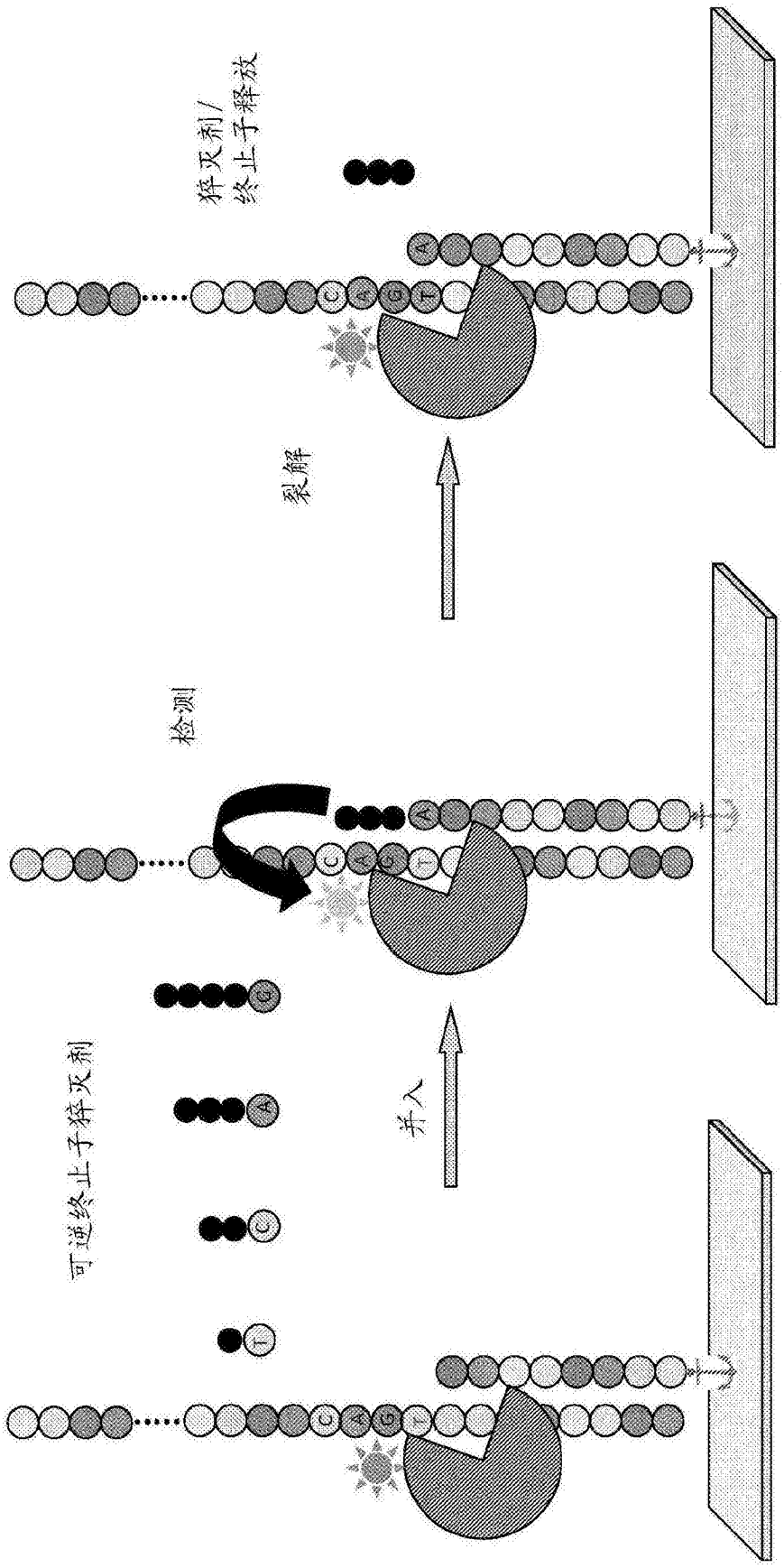


图3

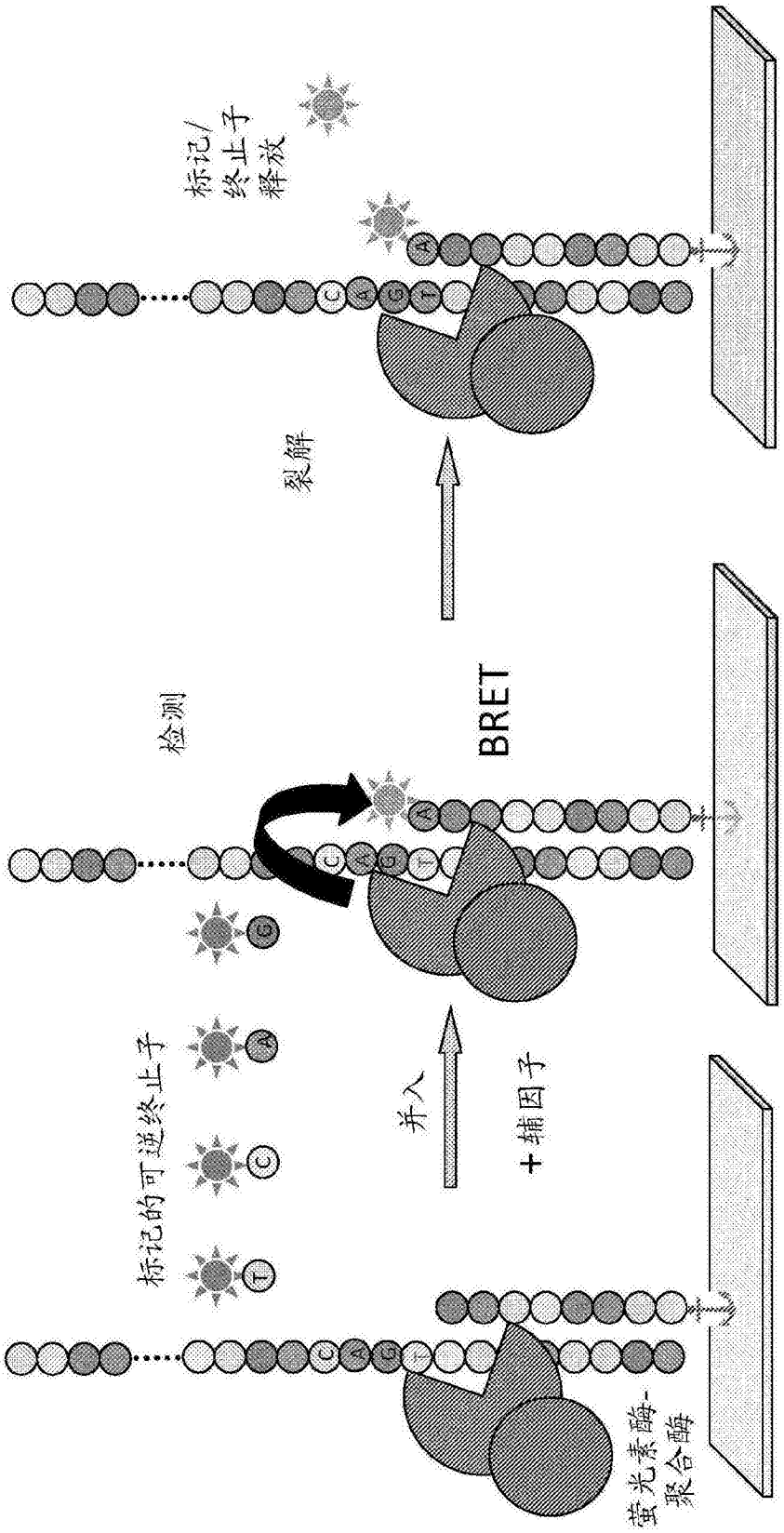


图4

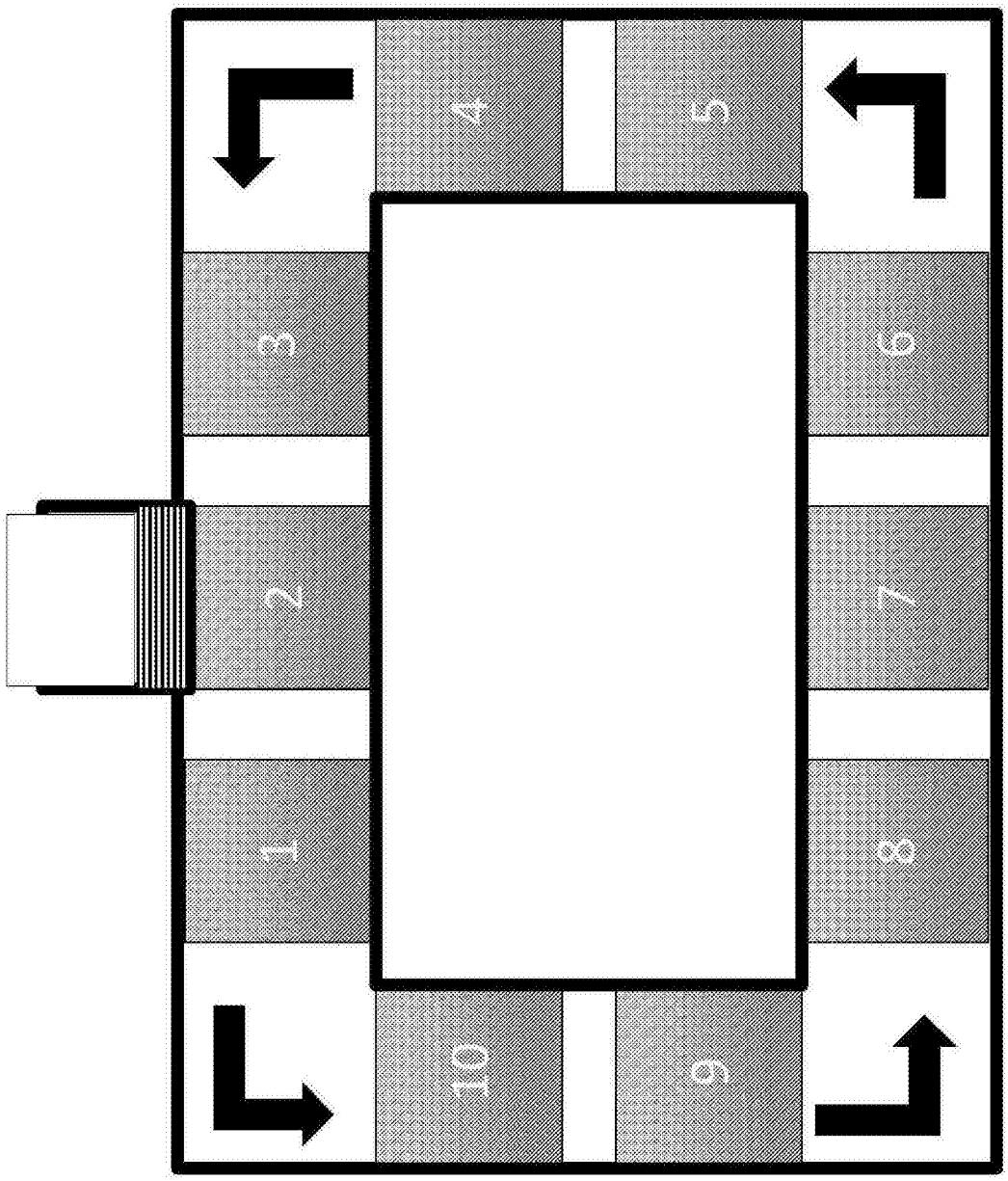


图5

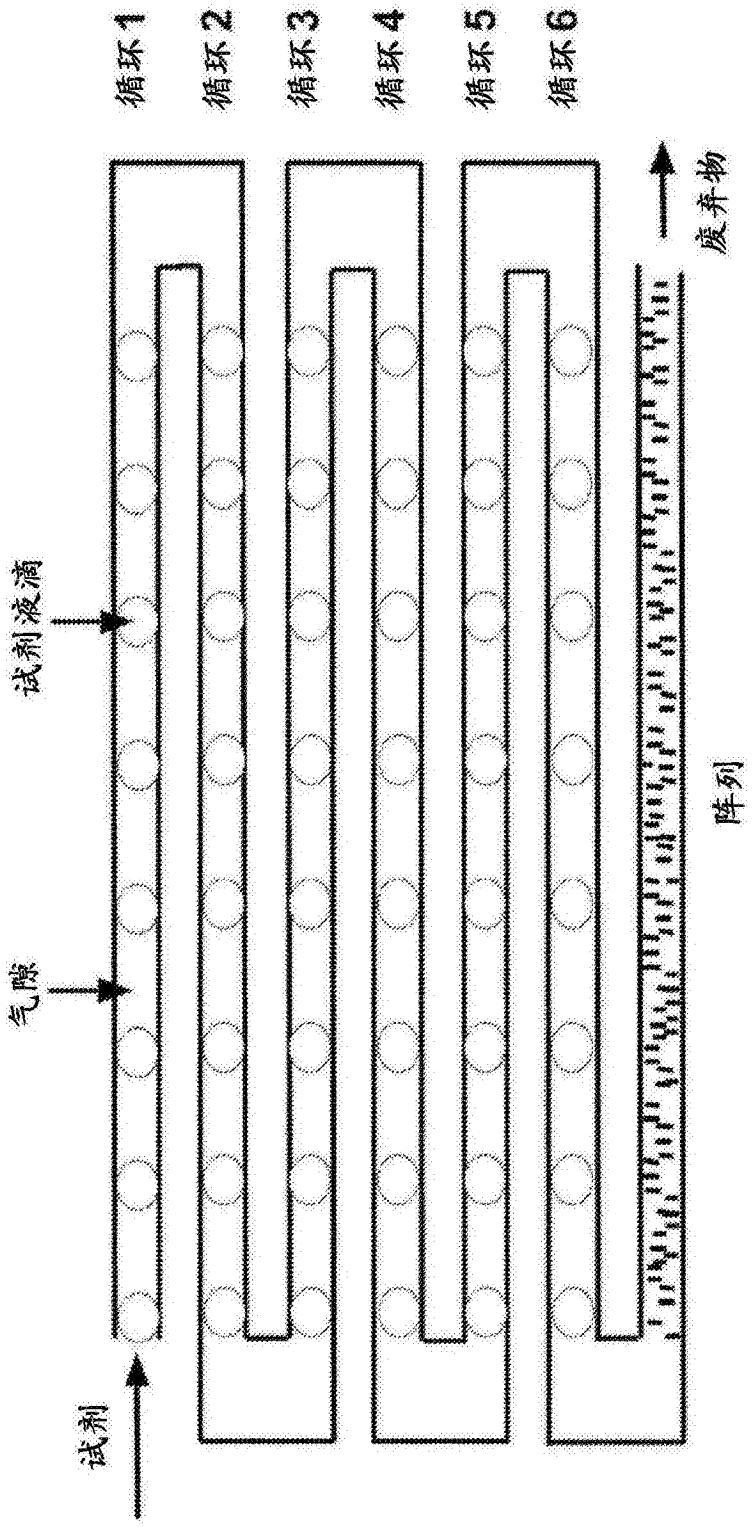


图6

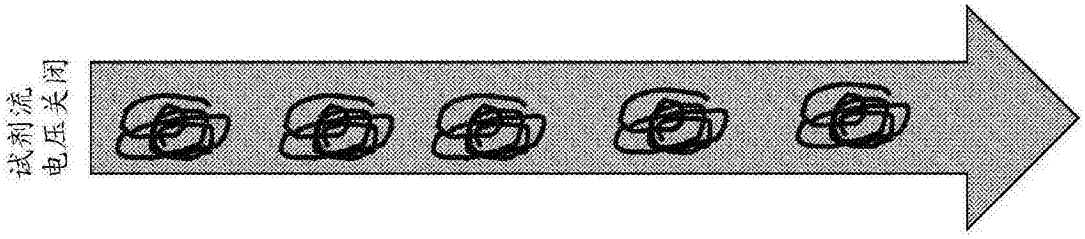


图7A

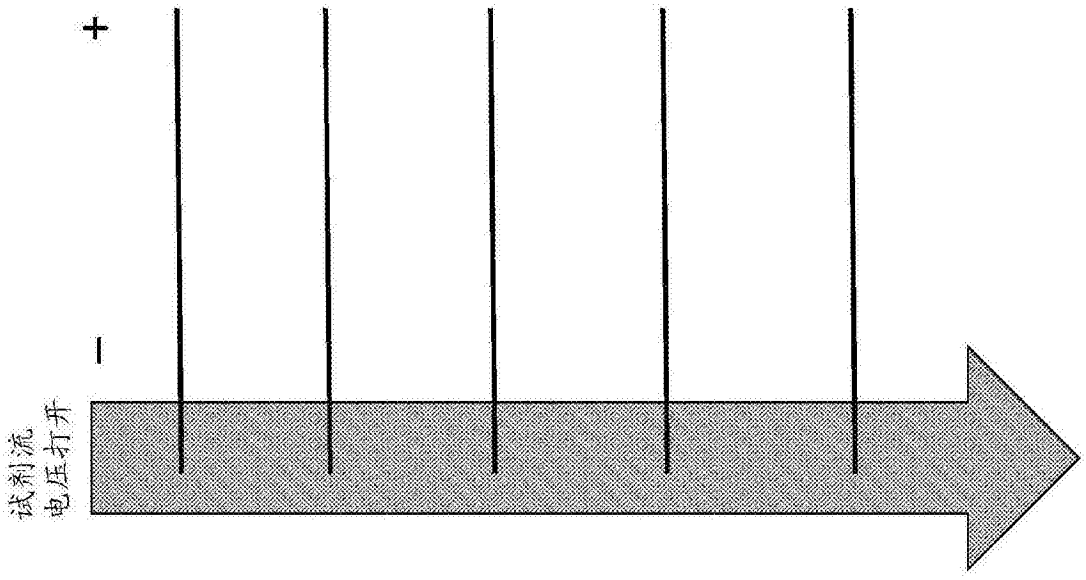


图7B

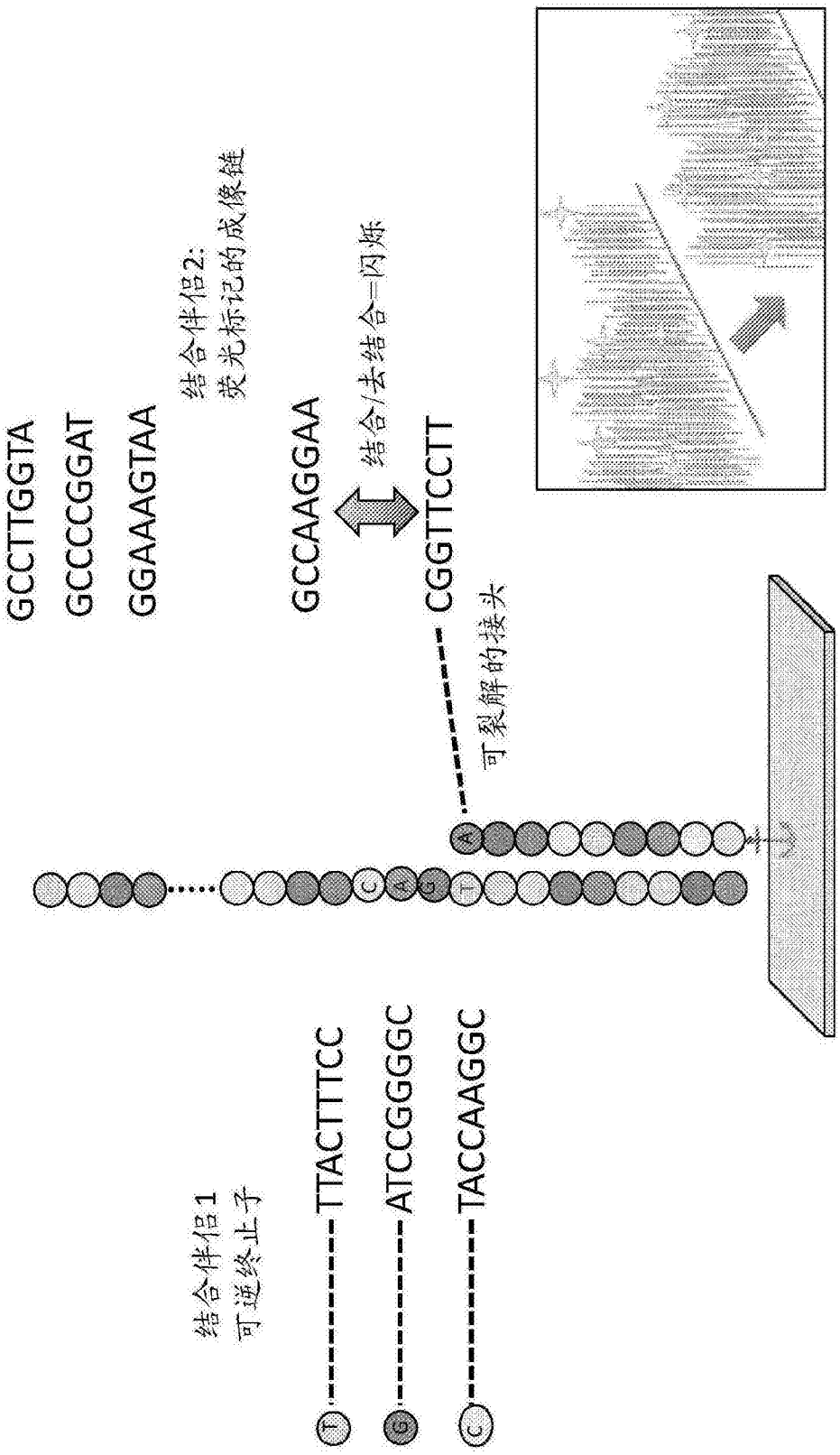

GCCTTGGTA
GCCCCGGAT
GGAAAGTAA
结合伴侣2:
荧光标记的成像链
GCCAAGGAA
结合/去结合=闪烁
CGGTTCCTT
可裂解的接头
结合伴侣1
可逆终止子
TTACTTTCC
ATCCGGGGC
TACCAAGGC

图8

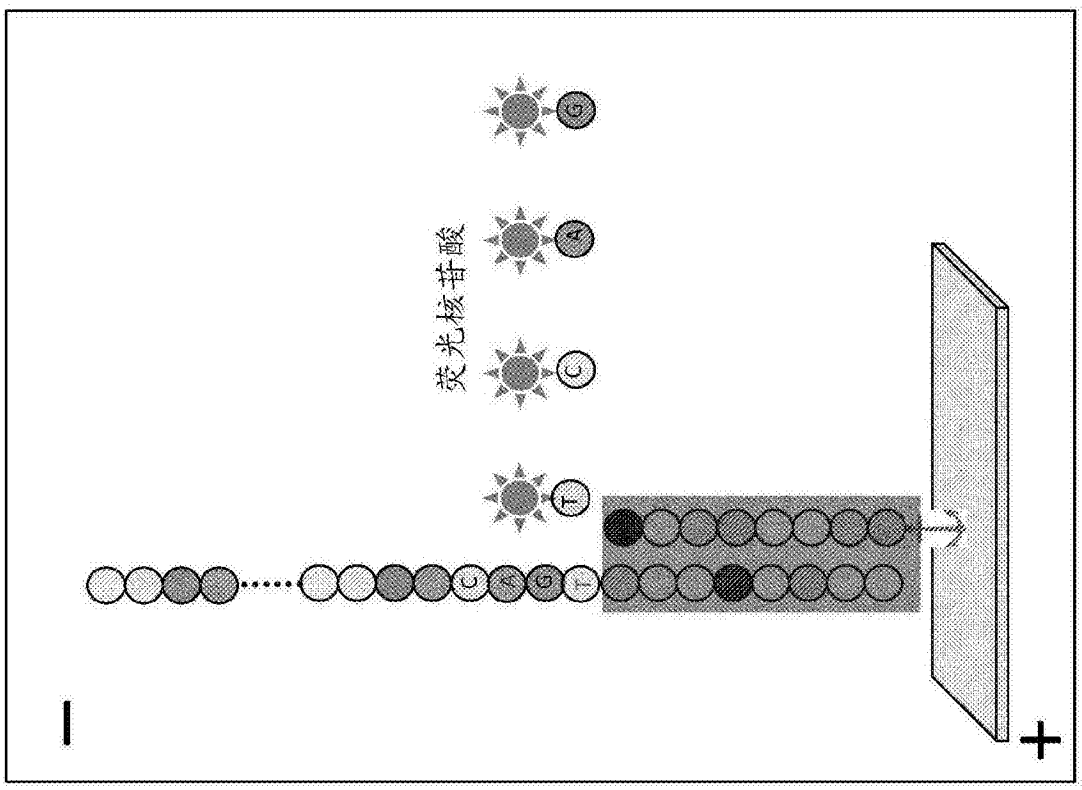


图9A

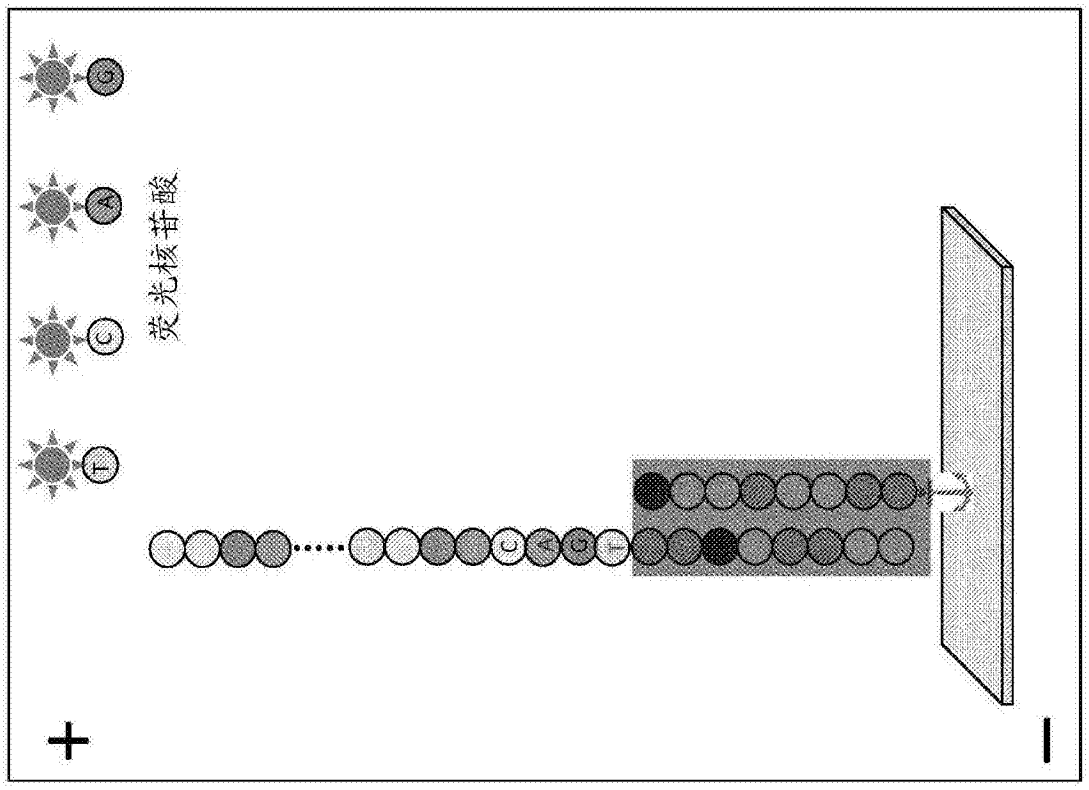


图9B

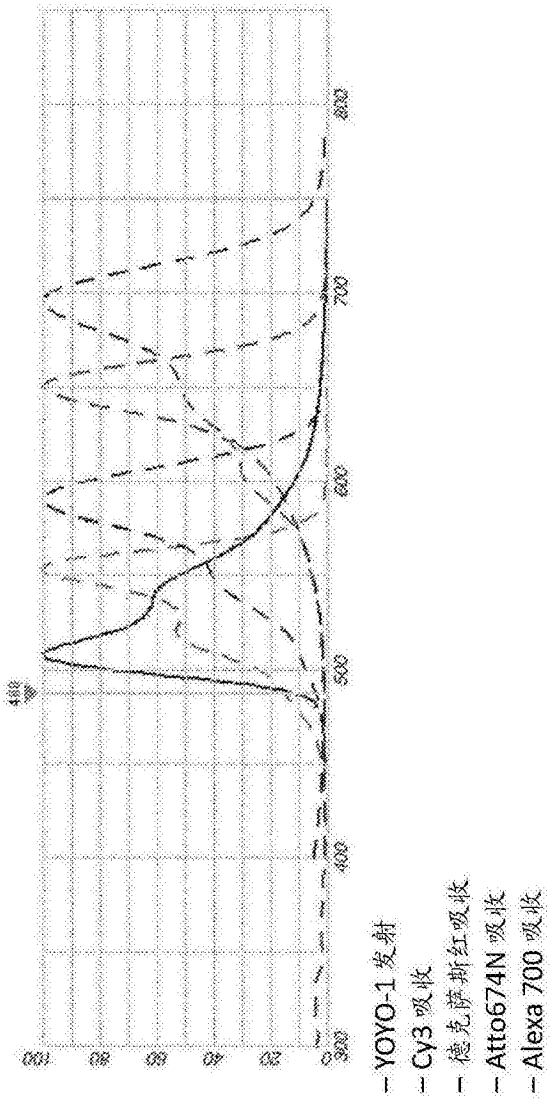


图10A

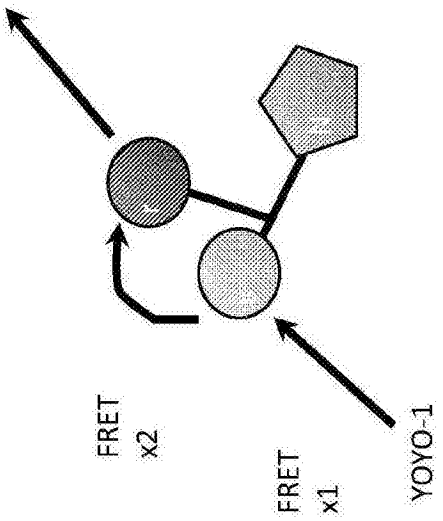


图10B

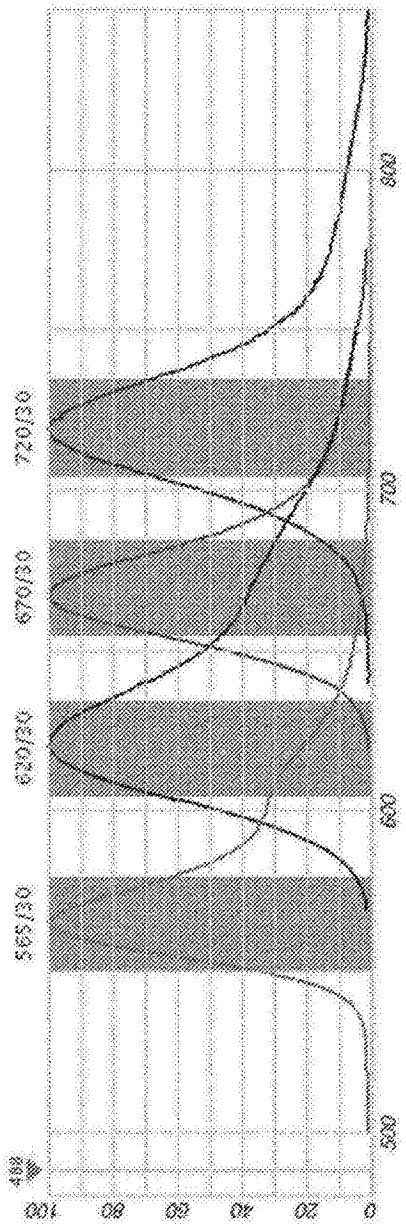


图11A

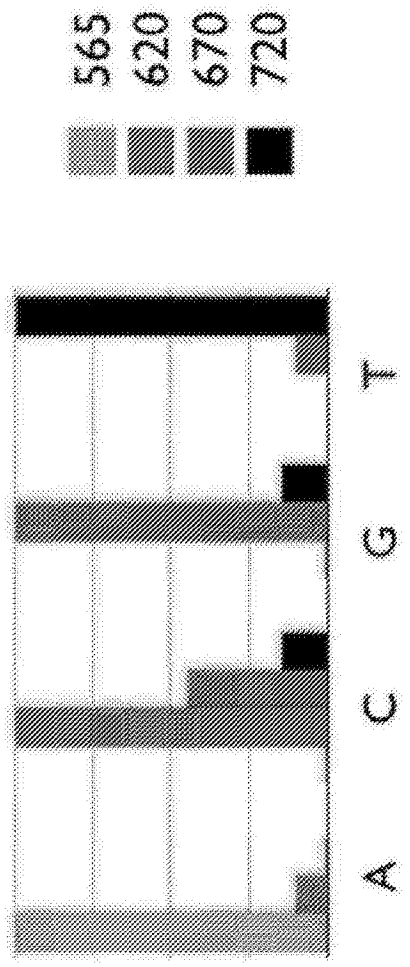


图11B

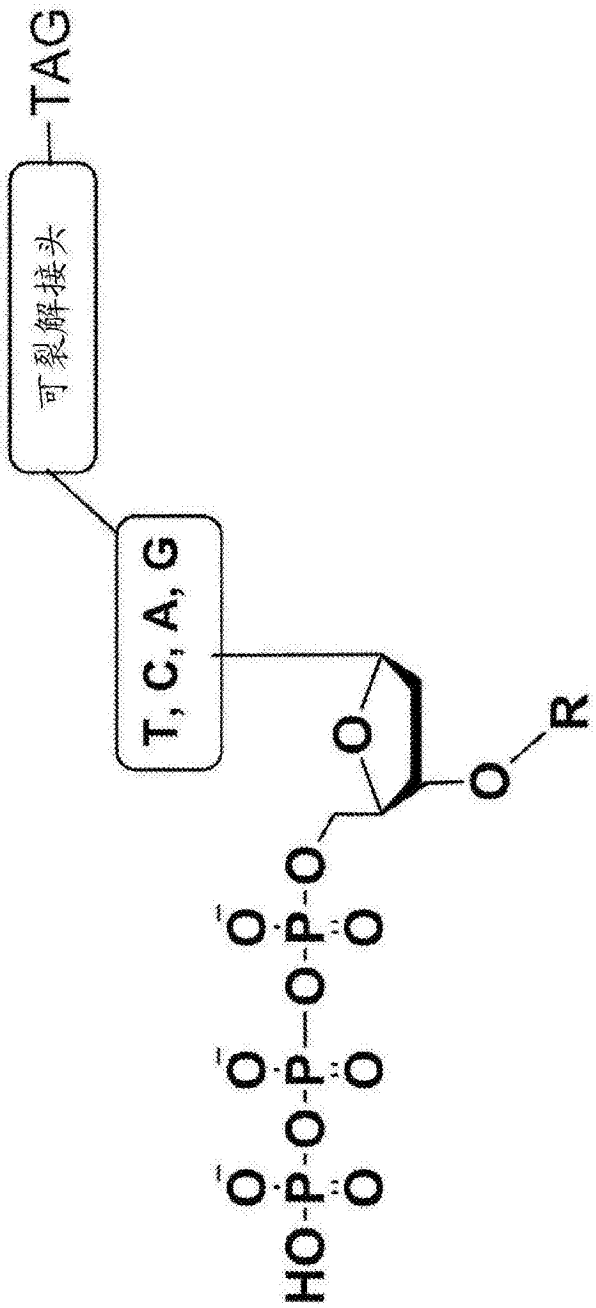


图12

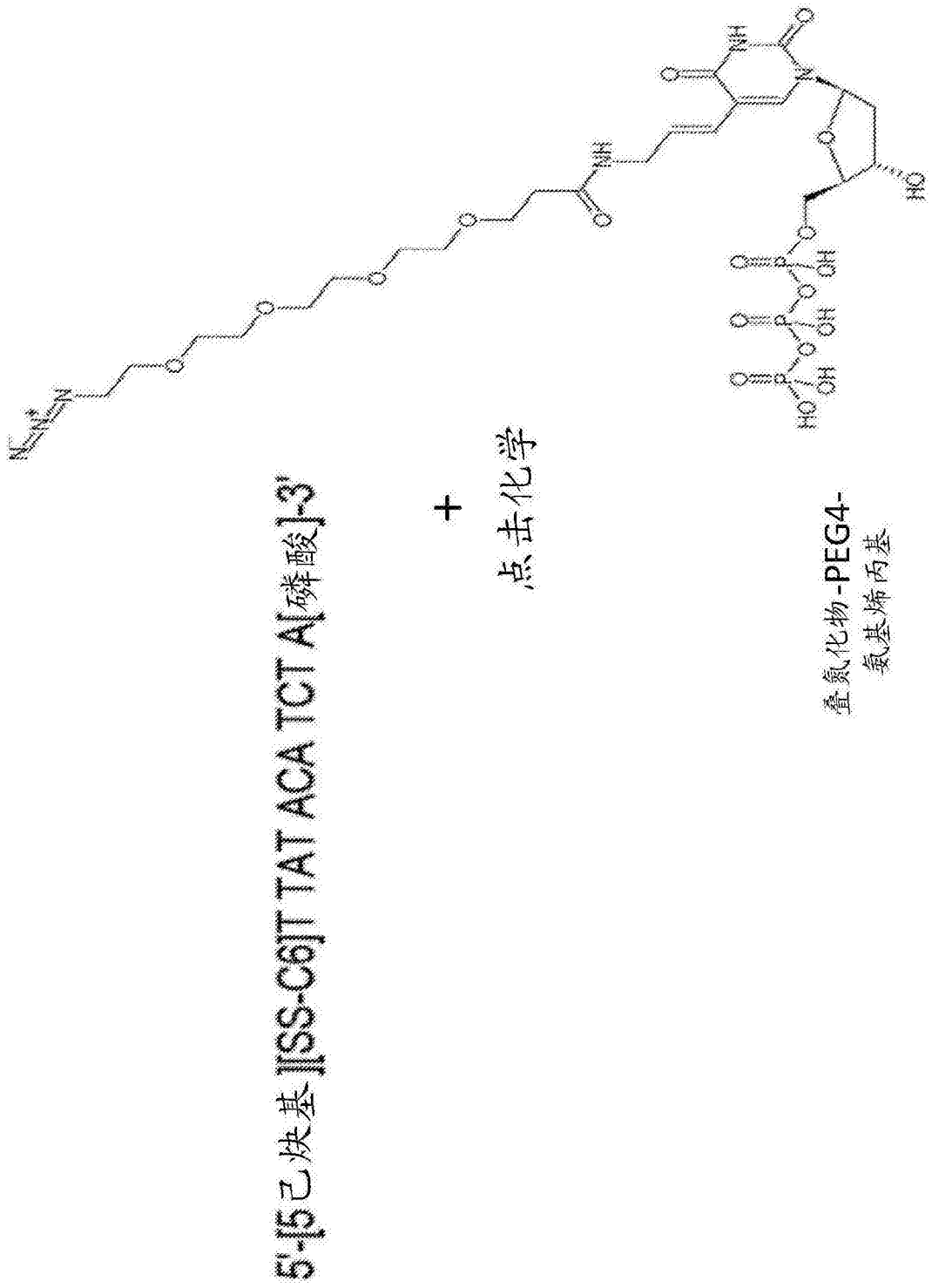


图13

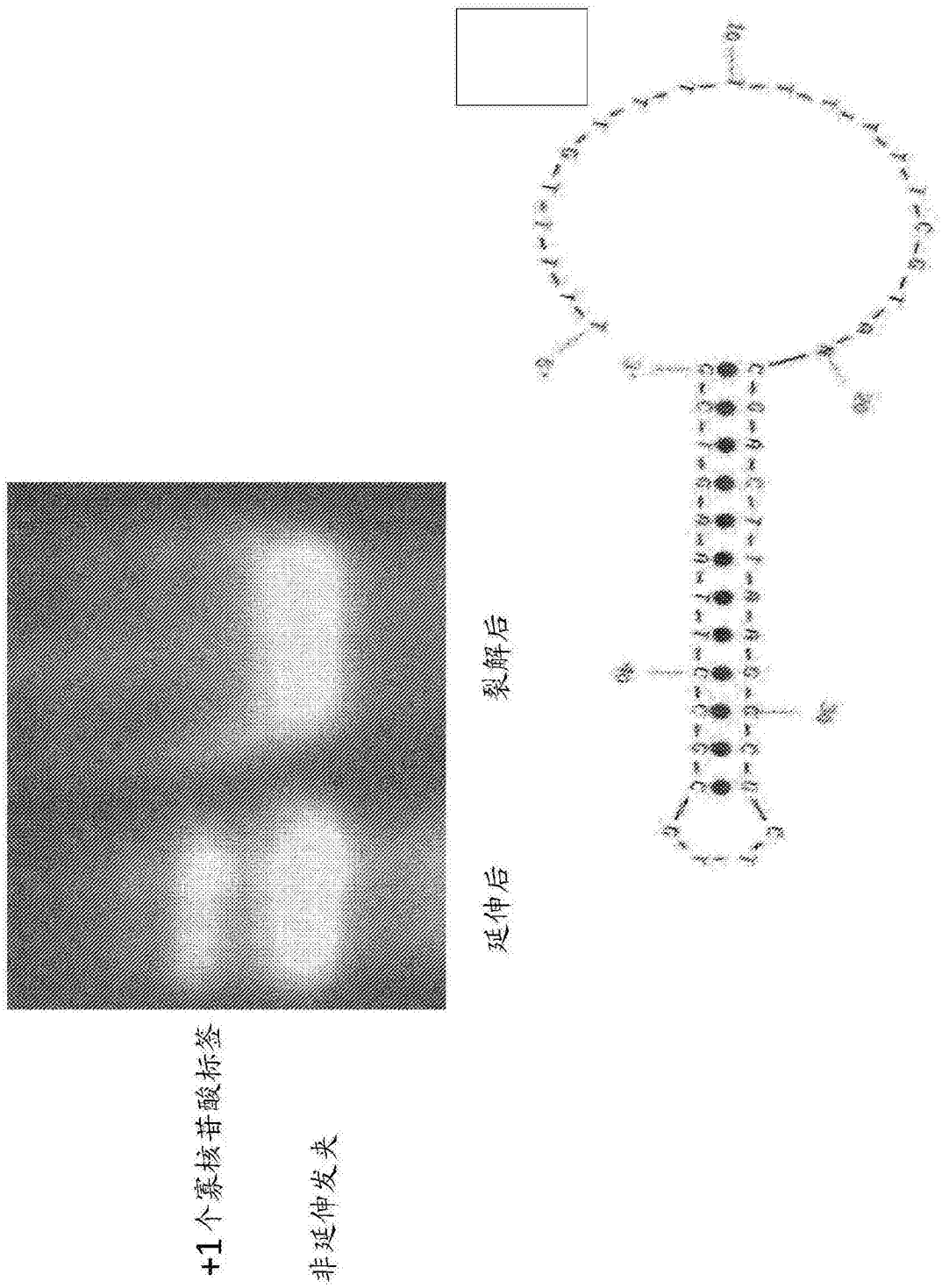


图14

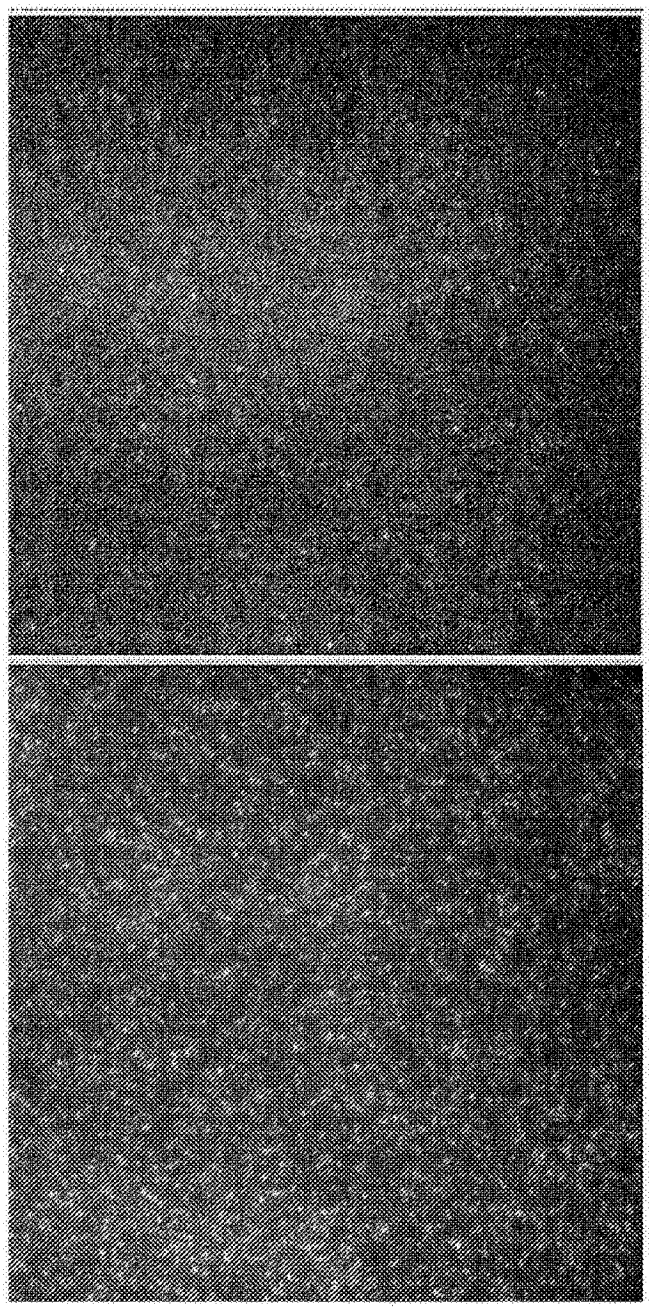


图15

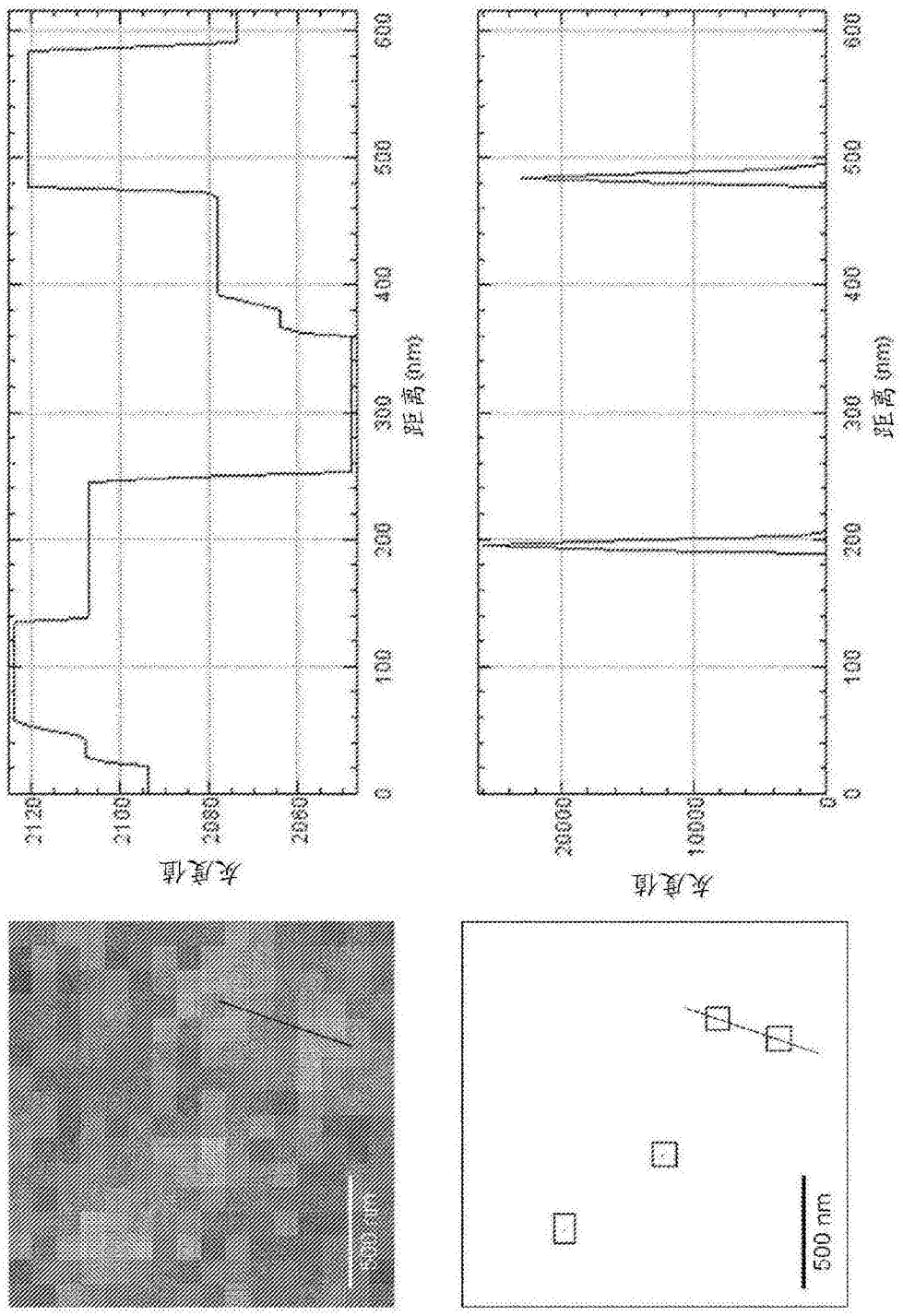

0
100
200
300
400
500
600
距离(nm)
30000
10000
灰度值
2120
2100
2080
2060
灰度值
500 nm

图16

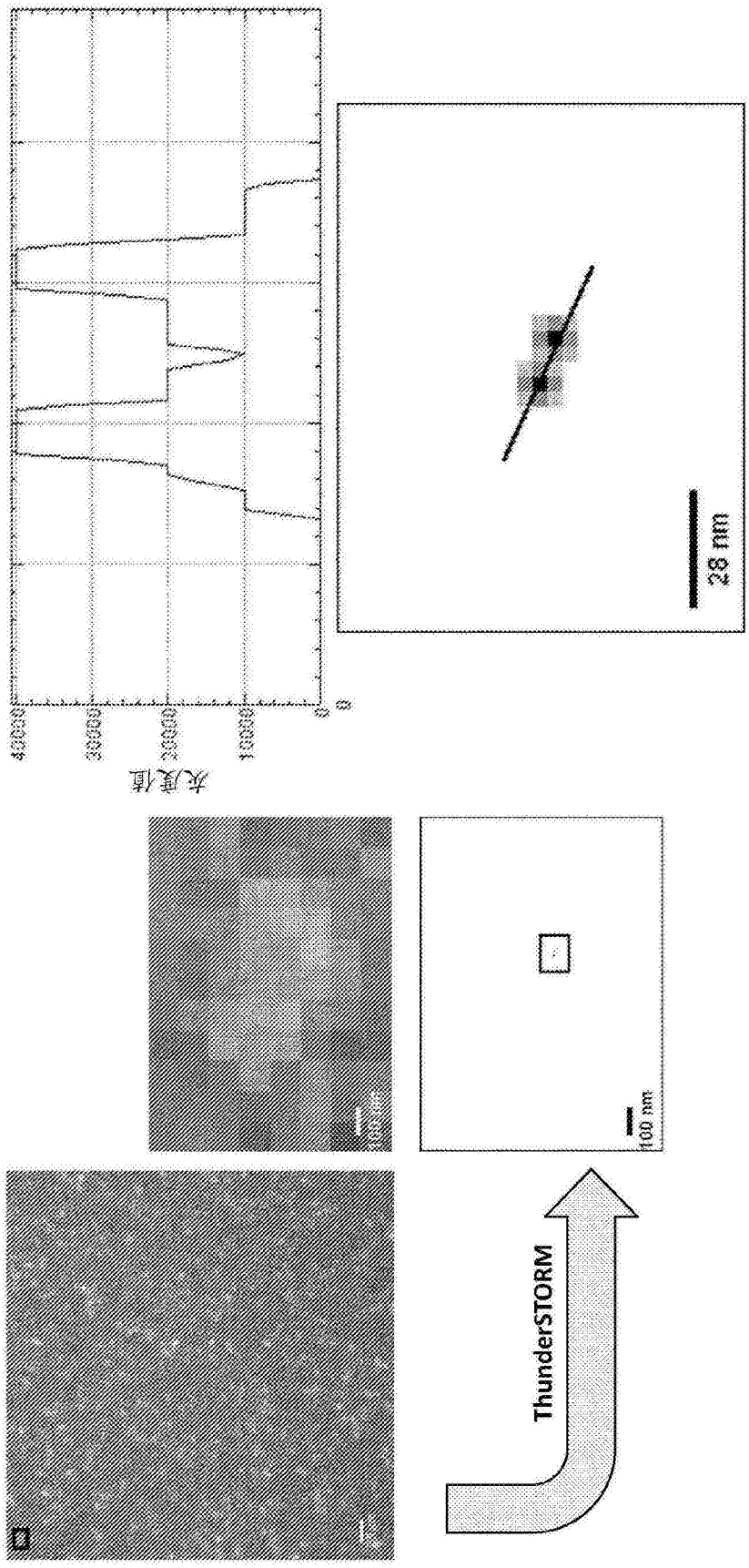
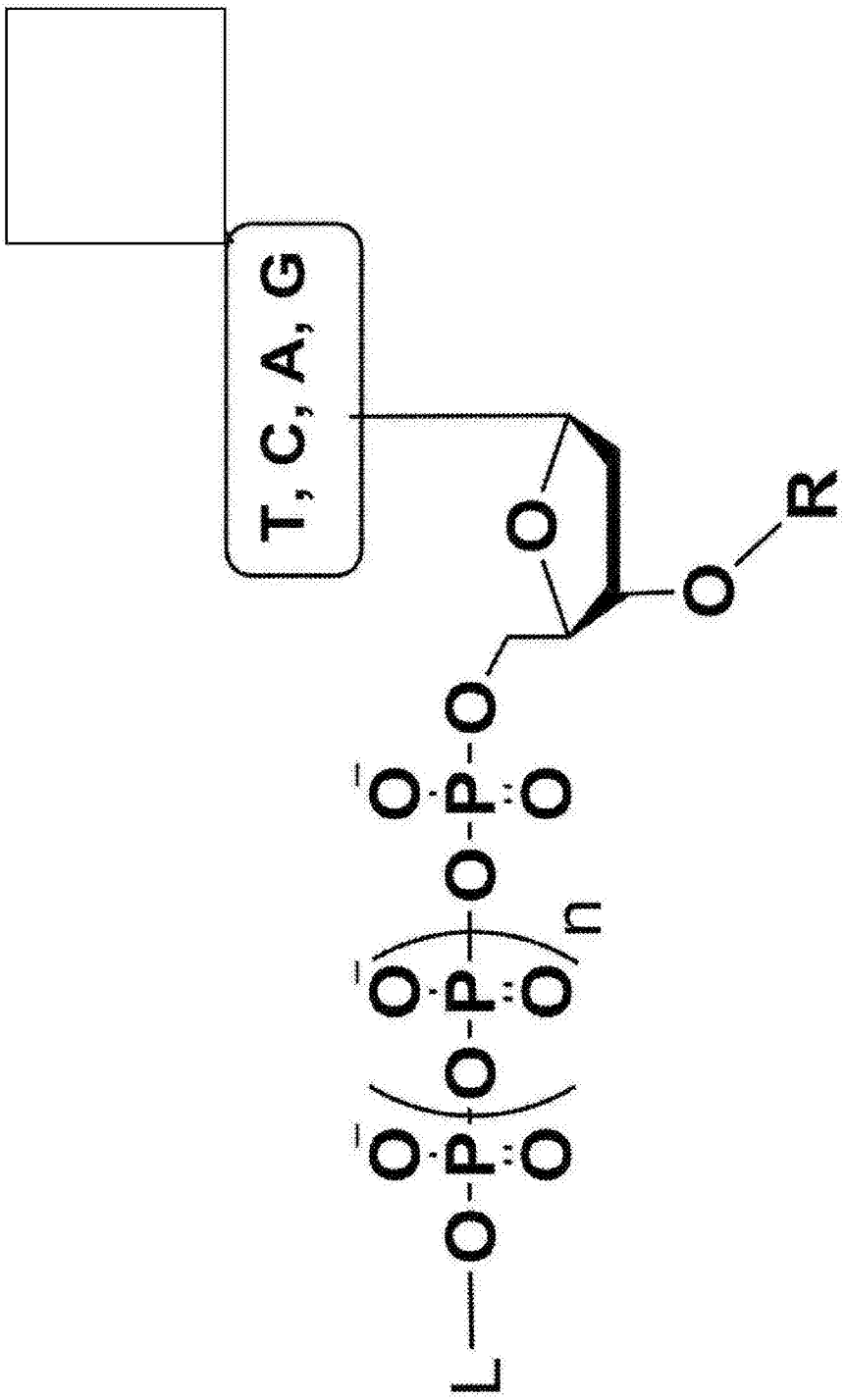


图17


T, C, A, G
O
R
O
O
O

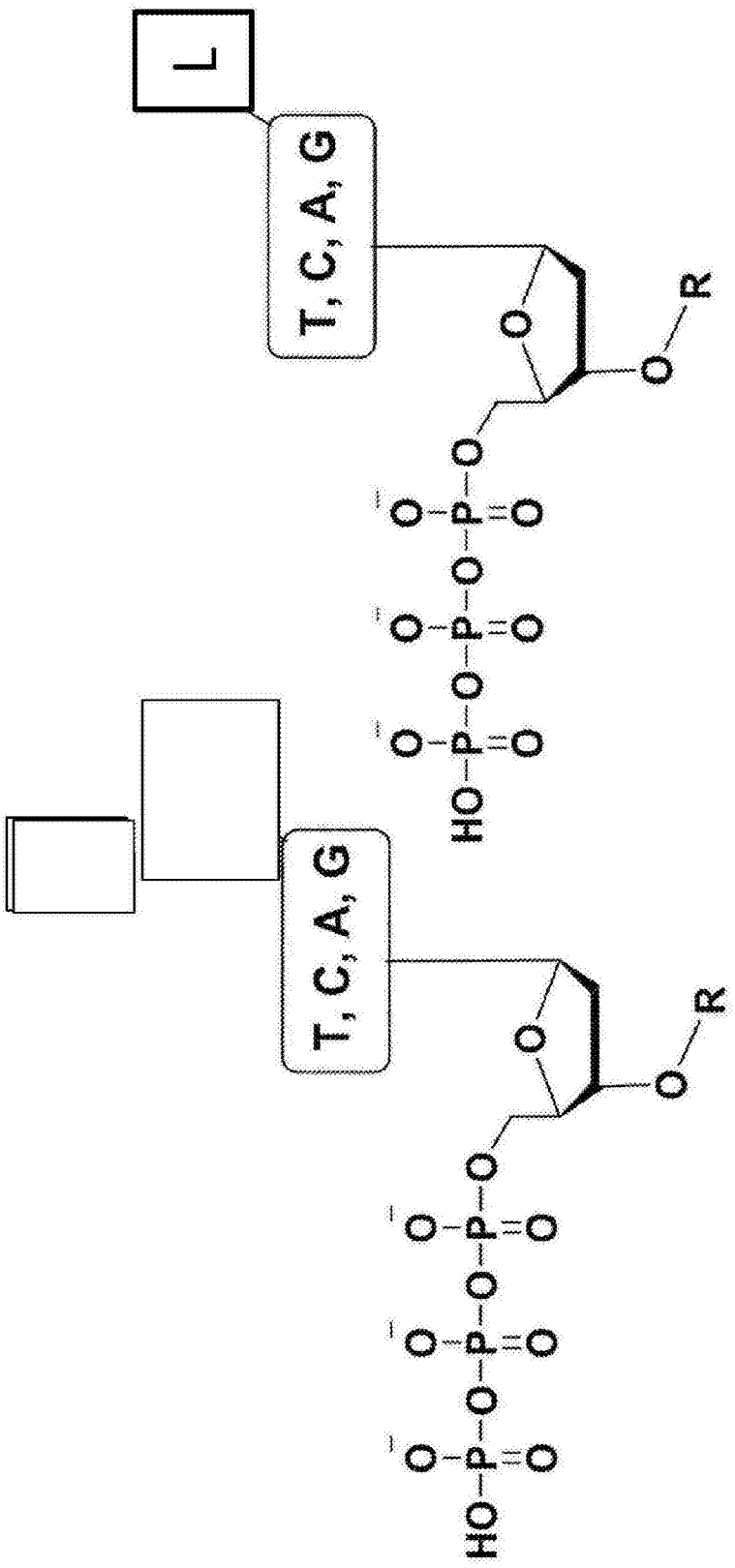

L
T, C, A, G
R
O
HO
R为H或非荧光终止子
L为碱基特异性标记
T, C, A, G
R
R为非荧光或荧光可逆终止子或RET伴侣

图19

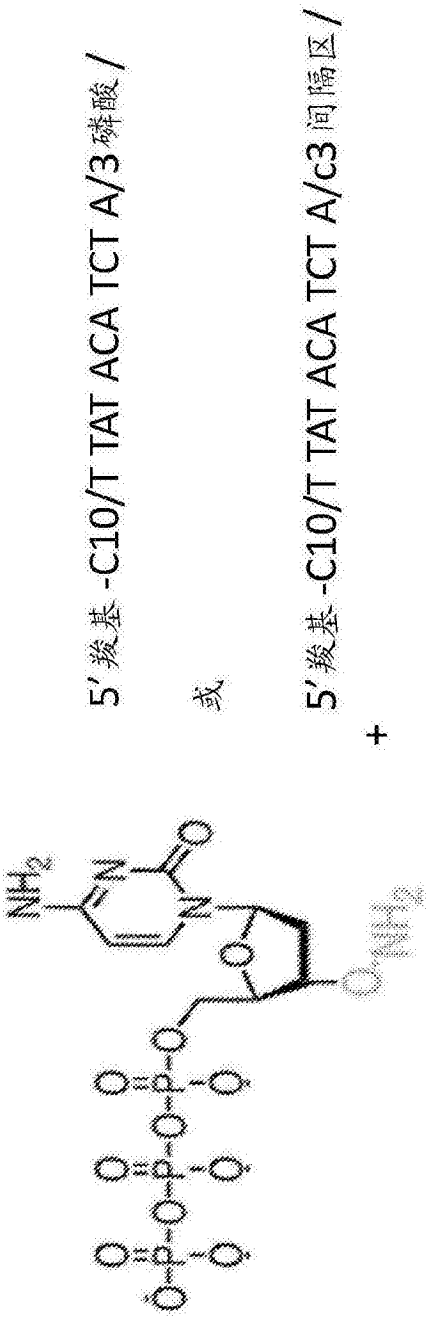


图20

对接位点		成像剂	
伴侣 1a	Nuc–TTATACATCTA–3′	伴侣 2a	5′–CTAGATGTAT– 染料
伴侣 1b	Nuc–TTATCTACATA–3′	伴侣 2b	5′–TATGTAGATC– 染料
伴侣 1c	Nuc–TTTCTTCATTA–3′	伴侣 2c	5′–GTAATGAAGA– 染料
伴侣 1d	Nuc-TTATGAATCTA-3′	伴侣 2d	5′–GTAGATTCAT– 染料
伴侣 1e	Nuc-TTTTAGGTAAA-3′	伴侣 2e	5′–CTTTACCTAA– 染料
伴侣 1f	Nuc-TTAATTGAGTA-3′	伴侣 2f	5′–GTACTCAATT– 染料
伴侣 1g	Nuc-TTAATTAGGAT-3′	伴侣 2g	5′–CATCCTAATT– 染料
伴侣 1h	Nuc-TTATAATGGAT-3′	伴侣 2h	5′–GATCCATTAT– 染料
伴侣 1i	Nuc-TTTAATAAGGT-3′	伴侣 2i	5′–CACCTTATTA– 染料
伴侣 1j	Nuc-TTATAGAGAAG-3′	伴侣 2j	5′–CCTTCTCTAT– 染料
伴侣 1k	Nuc-TTTTGATGATA-3′	伴侣 2k	5′–GTATCATCAA– 染料
伴侣 1l	Nuc-TTATAGTGATT-3′	伴侣 2l	5′–GAATCACTAT– 染料

图21

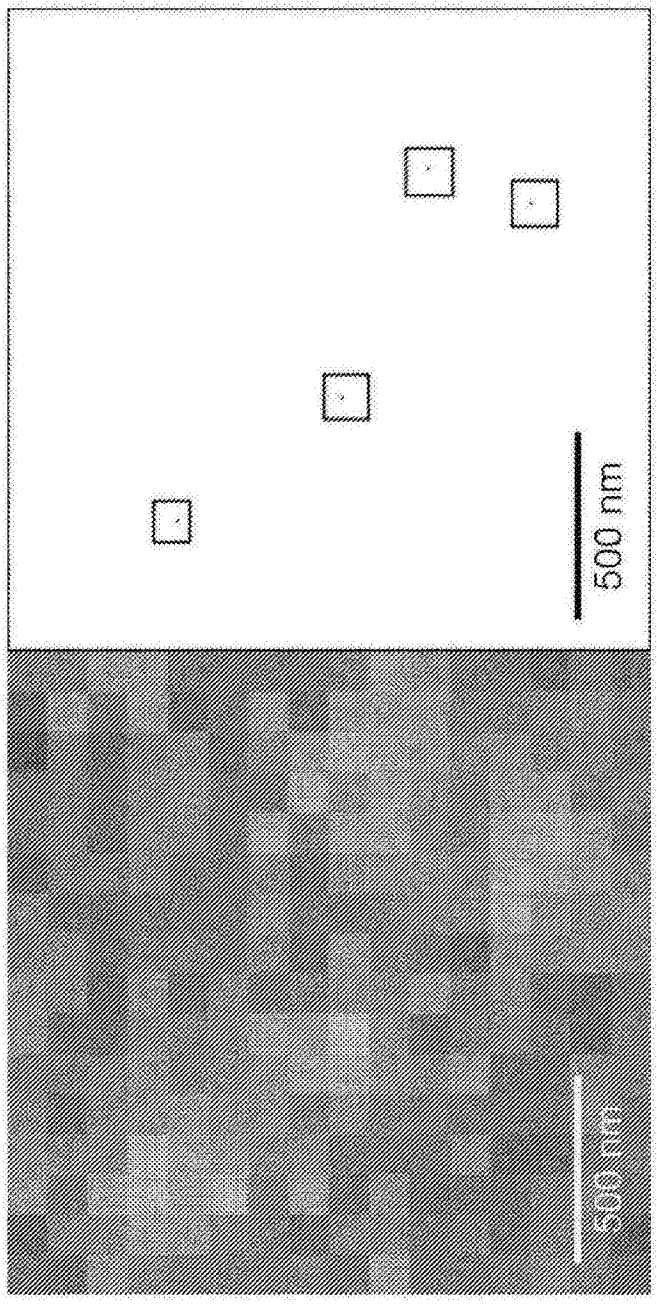


图22