



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112892622 B

(45) 授权公告日 2022.08.30

(21) 申请号 202011576866.9

(22) 申请日 2017.03.28

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112892622 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(30) 优先权数据  
62/313,982 2016.03.28 US

(62) 分案原申请数据  
201780006200.X 2017.03.28

(73) 专利权人 亿明达股份有限公司  
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M.S. 鲍恩 M. 格瑞奇 S.S. 洪  
J.A. 穆恩 M. 萧

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

专利代理师 王冉

(51) Int.Cl.  
B01L 3/00 (2006.01)

审查员 赵婕宇

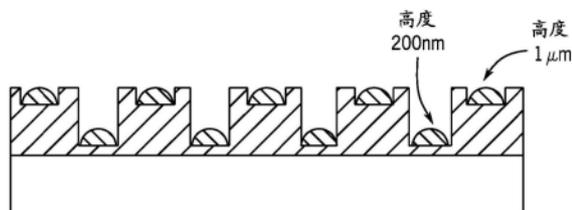
权利要求书2页 说明书20页 附图3页

(54) 发明名称

多平面微阵列

(57) 摘要

一种阵列,包括固体载体,所述固体载体具有沿着其外表面的多个轮廓。轮廓的第一子集沿着固体载体的外表面定位以形成第一特征图案,并且轮廓的第二子集沿着外表面定位以形成第二特征图案。第一子集的轮廓与第二子集的轮廓沿着外表面并置,由此第一图案和第二图案沿着外表面形成交错图案。第一图案的特征出现在第一高度 $z_1$ 处,第二图案的特征出现在第二高度 $z_2$ 处。第一图案的特征被配置为将分析物附接在相对于附接到第二图案的特征的分析物的不同高度处。



1. 一种阵列, 包括:

固体载体;

沿着固体载体的外表面定位的第一特征图案;

沿着固体载体的外表面定位并与第一特征图案交错的第二特征图案;

其中, 第一特征图案包括柱, 第二特征图案包括井;

其中, 第一特征图案的柱在第一高度 $z_1$ 处具有顶部, 第二特征图案的井在不同于 $z_1$ 的第二高度 $z_2$ 处具有底部,

其中, 第一特征图案的柱和第二特征图案的井各自包括用于分析物的附接点, 第一特征图案的柱被配置为将分析物附接在相对于附接到第二特征图案的井的分析物的不同高度处,

其中, 第二特征图案的最近邻井与第一特征图案的每个柱在交错图案中, 第二特征图案的每个最近邻井与第一特征图案的对应最近邻柱的间距小于500nm, 并且

其中, 第一特征图案中的最近邻柱具有大于500nm的间距。

2. 根据权利要求1所述的阵列, 其中, 第一特征图案包括柱的重复的特征图案, 并且其中, 第二特征图案包括井的重复的特征图案。

3. 根据权利要求1所述的阵列, 其中, 每个井占据小于 $1\mu\text{m}^2$ 的面积。

4. 根据权利要求1所述的阵列, 其中,  $z_1$ 和 $z_2$ 相隔至少 $2\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的阵列, 其中, 能够附接到分析物的材料存在于每个井处。

6. 根据权利要求1所述的阵列, 其中, 第一特征图案的柱与第二特征图案的井间隔开。

7. 根据权利要求1所述的阵列, 其中, 第一特征图案的柱与第二特征图案的井相邻。

8. 一种阵列, 包括:

固体载体;

沿着固体载体的外表面定位的第一特征图案;

沿着固体载体的外表面定位并与第一特征图案交错的第二特征图案;

其中, 第一特征图案包括第一柱且第二特征图案包括第二柱;

其中, 第一特征图案的柱在第一高度 $z_1$ 处具有顶部, 第二特征图案的第二柱在不同于 $z_1$ 的第二高度 $z_2$ 处具有顶部,

其中, 第一特征图案的第一柱和第二特征图案的第二柱各自包括用于分析物的附接点, 第一特征图案的第一柱被配置为将分析物附接在相对于附接到第二特征图案的第二柱的分析物的不同高度处,

其中, 第二特征图案的最近邻第二柱与第一特征图案的每个第一柱的最近邻第二柱在交错图案中, 第二特征图案的每个最近邻第二柱与第一特征图案的对应最近邻第一柱的间距小于500nm, 并且

其中, 第一特征图案中的最近邻第一柱具有大于500nm的间距。

9. 根据权利要求8所述的阵列, 其中, 第一特征图案包括第一柱的重复的特征图案, 并且其中, 第二特征图案包括第二柱的重复的特征图案。

10. 根据权利要求8所述的阵列, 其中, 每个柱占据小于 $1\mu\text{m}^2$ 的面积。

11. 根据权利要求8所述的阵列, 其中,  $z_1$ 和 $z_2$ 相隔至少 $2\mu\text{m}$ 。

12. 根据权利要求8所述的阵列, 其中, 能够附接到分析物的材料存在于每个第一柱处。

13. 根据权利要求8所述的阵列, 其中, 第一特征图案的第一柱与第二特征图案的第二柱间隔开。

## 多平面微阵列

[0001] 本申请是申请号为201780006200.X、申请日为2017年3月28日、发明名称为“多平面微阵列”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2016年3月28日提交的题为“MULTI-PLANE MICROARRAYS”的美国临时申请No.62/313,982的优先权和权益,其全部内容通过引用并入本文。

### 背景技术

[0004] 生物学或化学研究中的各种规程涉及在固体载体表面上或在预定的反应室内进行大量受控反应。然后可以观察或检测所期望的反应,且随后的分析可以帮助识别或揭示反应中涉及的化学物质的性质。例如,在一些多重测定中,具有可识别标记(例如荧光标记)的未知分析物可在受控条件下暴露于数千种已知探针。每个已知的探针可以放置到表面上的对应位置中。观察在表面上发生的已知探针和未知分析物之间的特定化学反应可有助于识别或揭示分析物的性质。此类协议的示例包括已知的DNA测序方法,诸如合成测序(SBS)或已知的核酸微阵列规程,诸如RNA表达分析或基因分型分析。

[0005] 在一些传统的荧光检测规程中,光学系统用于将激发光引导到荧光标记的分析物上,并且还检测可能从分析物发射的荧光信号。标准成像技术的分辨率受到检测装置中可用的像素数量等的限制。因此,当检测具有大量分析物的表面时,这些光学系统可能相对昂贵并且需要相对大的台式占地面积。例如,用于基因分型、表达或测序分析的核酸阵列可能需要检测阵列上每平方厘米的数百万个不同位点。分辨率的限制增加成本并降低这些分析的准确性。

[0006] 因此,需要更高分辨率的设备和方法,例如,用于检测核酸阵列。本公开解决了这种需要并且还提供了其他优点。

### 发明内容

[0007] 本公开的一些实施例涉及生物或化学分析,并且更具体地涉及使用用于生物或化学分析的检测装置的系统和方法。

[0008] 本公开提供了一种阵列,其包括固体载体,所述固体载体包括沿着固体载体的外表面的多个轮廓。轮廓的第一子集沿着固体载体的外表面定位以形成第一特征图案,并且轮廓的第二子集沿着固体载体的外表面定位以形成第二特征图案。第一子集的轮廓与第二子集的轮廓沿着外表面并置,由此第一图案和第二图案沿着外表面形成交错图案。第一图案的特征出现在第一高度 $z_1$ 处,第二图案的特征出现在第二高度 $z_2$ 处。所述特征包括用于分析物的附接点,由此第一图案的特征被配置为将分析物附接在相对于附接到第二图案的特征的分析物的不同高度处。

[0009] 本公开还提供了一种阵列,所述阵列包括固体载体、沿着固体载体的外表面定位的第一特征图案、以及沿着固体载体的外表面定位并与第一特征图案交错的第二特征图案。第一图案的特征出现在第一高度 $z_1$ 处,第二图案的特征出现在第二高度 $z_2$ 处。第一图案

和第二图案的特征包括用于分析物的附接点,第一图案的特征被配置为将分析物附接在相对于附接到第二图案的特征的分析物的不同高度处。

[0010] 本公开还提供了一种检测多种分析物的方法,包括提供包括固体载体的阵列,所述固体载体包括沿着所述固体载体的外表面的第一分析物特征图案和第二分析物特征图案,其中,第一图案的分析物特征出现在第一高度 $z_1$ 处,第二图案的分析物特征出现在第二高度 $z_2$ 处,并且其中,第一图案和第二图案沿着外表面形成交错图案。在第一高度 $z_1$ 处检测信号,由此第一图案的各个分析物特征彼此区分。还在第二高度 $z_2$ 处检测信号,由此第二图案的各个分析物特征彼此区分,其中,通过选择性地检测与第二高度 $z_2$ 处的特征相比较的第一高度 $z_1$ 处的特征,将第一图案中的分析物特征与第二图案中的最近邻分析物特征区分开。

### 附图说明

[0011] 图1A示出了示例特征阵列的平面图,其中所有特征处于约200nm的共同高度。

[0012] 图1B示出了两个示例特征阵列的平面图,其包括具有在约200nm的高度处的特征的第一阵列和具有在约1000nm的高度处的特征的第二阵列。两个示例阵列具有相同的网格图案和间距,但在x和y维度上偏移。

[0013] 图2示出了图1B中的两个示例阵列的横截面,其中特征是具有不同深度的井。

[0014] 图3示出了图1B中的两个示例阵列的横截面,其中特征是具有不同高度的柱。

[0015] 图4示出了图1B中的两个示例阵列的横截面,其中特征的第一子集是柱,并且特征的第二子集是井。

[0016] 图5示出了使用落射照射(epi-illumination)以激发井的第一阵列和第二阵列中的发光体、以及使用波导以选择性地激发井阵列中的一个中的发光体的示例。

### 具体实施方式

[0017] 本公开提供了可用于分析化学和生物学的固体载体。在特定实施例中,固体载体将具有带有两个或更多个特征阵列的表面,每个特征呈现用于检测的分析物。第一阵列的特征将出现在第一高度处,并且第二阵列的特征将出现在与第一高度可区分的不同高度处(例如,通过改变焦点深度)。与阵列的组合在表面上处于相同的高度情况下可分辨的分析物的群集(packing)相比,则该高度偏移提供表面上的分析物特征的更加密集的群集。

[0018] 由图1A和图1B说明由本公开的示例阵列提供的群集密度的增加。前图示出了具有约500nm间距的阵列。阵列的特征位于共同的z平面(即深度或高度)处,并且使用商业上可获得的光学器件在xy维度上可分辨。图1A的阵列中的特征的较高群集将挑战大多数光学检测器将一个特征与另一个特征区分开的能力。然而,在许多分析应用中,诸如核酸测序或其他核酸检测技术,考虑到流体处理分析阵列所需的时间期望增加阵列中分析物的数量以最大化分析的通量、且考虑到用于处理分析阵列的试剂的成本以最小化成本。

[0019] 图1B的阵列的配置可以提供针对阵列流体操作增加通量和降低成本的优点,同时避免困扰对增加阵列密度的其他尝试的检测限制。具体地,如图1B所示,两个阵列的特征可以位于不同的z平面(例如,约200nm的深度相对于约1000nm的深度)处,使得否则将彼此相邻的特征(即,如果定位在相同的z平面中)可以通过改变检测深度进行区分。更具体地,通

过在该示例中通过将光学检测器聚焦在约200nm的深度处获取第一图像并且然后在该示例中通过将光学检测器聚焦到约1微米的深度获取第二图像,可以区分组合阵列中被分开约350nm(在xy方向上)、并且如果一起检测将难以彼此分辨的特征。

[0020] 可以在不同z平面处出现的特征包括例如具有不同深度的井,如图2中示出的示例阵列的横截面视图中所示。例如,分析物(由半圆表示)可以位于井的底部或井内的不同深度。在图2的示例配置中,分析物在约200nm的高度附接到井的第一子集的底部处,并且井的第二子集将分析物定位在约1微米的高度处。

[0021] 替代配置可以利用具有不同高度的柱,如图3的示例横截面视图中所示。分析物(再次,由半圆表示)可以位于柱的顶部处或沿着柱的长度位于不同的高度处。在图3的示例配置中,分析物在约200nm的高度处附接到柱的第一子集的顶部,并且柱的第二子集将分析物定位在约1微米的高度处。阵列也可以具有柱和井的组合,例如,如图4中所示。可以注意到,在图3的实施例中,特征彼此间隔开,而在图4的实施例中,特征是相邻的。虽然在这两个实施例中都可以认为这些特征是“并置的”,但是在图4的实施例中,特征通过它们的在其之间不带有空间的相邻放置被更为密集地群集。

[0022] 在一些实施例中,在不同z平面中具有两个或更多个阵列的固体载体可允许使用较低分辨率的光学器件。例如,z平面中的每一个中的特征可以比上面讨论的更大(和/或相距更远)。可以使用多种技术中的任何一种来实现本公开的阵列,包括但不限于光刻、纳米压印光刻或3D打印。

[0023] 对于利用光学检测(诸如发光)的实施例,可以经由z平面检测聚焦和差分z平面激发来实现特征的分辨。例如,落射激发可以与全内反射(TIR)激发相结合。类似地,落射激发可以与通过其他波导实现的激发相结合。如图5中的图所示,波导可以接触第一阵列的较深的井,但不接触第二阵列的较浅的井。经由波导的照射将选择性地激发较深的井,并且可以仅从深井收集发射。来自浅井的发射可以通过减成法获得。具体地,所有井可以通过落射照射激发,并且可以通过减去从较深井的波导照射获得的发射来识别来自浅井的发射。

[0024] 除非另有说明,否则这里使用的术语将被理解为具有相关领域中的普通含义。本文使用的几个术语及其含义如下所述。

[0025] 如本文所用,术语“扩增子”,当用于指核酸时,是指复制核酸的产物,其中产物具有与核酸的核苷酸序列的至少一部分相同或互补的核苷酸序列。扩增子可以通过使用核酸或其扩增子作为模板的多种扩增方法中的任一种产生,包括例如聚合酶延伸、聚合酶链反应(PCR)、滚环扩增(RCA)、多重置换扩增(MDA)、连接延伸或连接链反应。扩增子可以是具有特定核苷酸序列的单复制(例如PCR产物)或核苷酸序列的多重复制(例如RCA的多联产物)的核酸分子。靶核酸的第一扩增子可以是互补复制。随后的扩增子是在产生第一扩增子后,从靶核酸或扩增子产生的复制。随后的扩增子可以具有与靶核酸基本上互补或与靶核酸基本上相同的序列。

[0026] 如本文所用,术语“分析物”旨在包括待被检测、表征、改性、合成等的各种分析物中的任何一种。示例分析物包括但不限于核酸(例如DNA、RNA或其类似物)、蛋白质、多糖、细胞、抗体、表位、受体、配体、酶(例如激酶、磷酸酶或聚合酶)、小分子候选药物等。阵列可包括来自分析物库的多个不同种类。例如,种类可以是来自抗体库的不同抗体,来自核酸库的具有不同序列的核酸,来自蛋白质库的具有不同结构和/或功能的蛋白质,来自小分子组合

库的候选药物等。

[0027] 如本文所用,术语“附接”是指两个事物彼此连结、紧固、粘附、连接或结合的状态。例如,分析物(诸如核酸)可通过共价键或非共价键附接到诸如凝胶或固体载体的材料。共价键的特征在于原子之间共享电子对。非共价键是不涉及共享电子对的化学键,并且可包括例如氢键、离子键、范德华力、亲水相互作用和疏水相互作用。

[0028] 如本文所用,术语“附接点”意图表示附接于分析物的固体载体或凝胶上的位置,其能够附接于分析物或意图附接于分析物。该位置可容纳单个分析物或一群分析物。该位置可以具有用于阵列的特征或轮廓的如本文所述的区域或尺寸。

[0029] 如本文所用,术语“轮廓”意图表示表面形状的局部变化。示例轮廓包括但不限于井、凹坑、通道、柱、柱状物和脊。轮廓可以作为表面中的各种凹陷或表面上的突起中的任何一种出现。全部或部分轮廓可用作阵列中的特征。例如,在固体载体的特定平面中出现的轮廓的一部分可以用作该特定平面中的特征。

[0030] 如本文所用,术语“不同”,当用于指核酸时,意指核酸具有彼此不同的核苷酸序列。两个或更多个核酸可具有沿其整个长度不同的核苷酸序列。替代地,两个或更多个核酸可具有沿其长度的大部分不同的核苷酸序列。例如,两个或更多个核酸可以具有对于两个或更多个分子不同的靶核苷酸序列部分,同时还具有在两个或更多个分子上相同的通用序列部分。该术语可以类似地应用于基于氨基酸序列差异可区分为彼此不同的蛋白质。

[0031] 如本文所使用的,术语“每个”在用于指代物品集合时,意图识别集合中的单个物品,但不一定指代集合中的每个物品。如果明确的公开或上下文另有明确规定,则可能出现例外情况。

[0032] 如本文所用,术语“高度”,当用于指代固体载体的特征或轮廓时,是指特征或轮廓相对于参考点或参考水平的高度。参考点或参考水平可以位于固体载体之中或之上,或者位于远离固体载体的位置,诸如光学部件(例如镜片)所在的位置。可以使用坐标系确定高度。例如,沿固体载体的外表面延伸的平面可以被认为是笛卡尔坐标系中的xy平面,并且可以沿z轴测量高度。在另一个示例中,物镜的焦平面可以被认为是xy平面,并且可以沿着透镜的轴测量高度。

[0033] 如本文所用,术语“外表面”意图表示固体载体或凝胶材料的外部部分或外部层。表面可以与另一种材料接触,诸如气体、液体、凝胶、聚合物、有机聚合物、具有类似或不同材料的第二表面、金属或涂层。表面或其区域可以是平坦的(例如,作为跨延伸表面区域的平均)。表面可以具有诸如井、凹坑、通道、脊、凸起区域、桩、柱等的表面轮廓。

[0034] 如本文所用,术语“特征”是指阵列中的被配置为附接特定分析物的位置。可以在x、y或z维度中的一个或多个中标识位置。例如,特征可以是在表面上的、存在于特定的z平面中并且处于沿着表面的特定xy坐标处的轮廓的全部或部分。特征可以仅包含单个分析物,或者它可以包含多个分析物的群体,可选地,所述多个分析物可以是相同的种类。在一些实施例中,特征在附接分析物之前存在于固体载体上。在其他实施例中,通过将分析物附接到固体载体来产生特征。

[0035] 如本文所用,术语“流动池”意图表示具有腔室(在该腔室处可进行反应)、用于将试剂输送到腔室的入口和用于从腔室移除试剂的出口的容器。在一些实施例中,腔室被配置用于检测腔室中(例如,在与腔室流体接触的表面上)发生的反应。例如,腔室可包括一个

或多个透明表面,其允许光学检测腔室中的阵列、光学标记分子等。示例流动池包括但不限于核酸测序设备中使用的那些,诸如由Illumina, Inc. (San Diego, CA) 商业化的Genome Analyzer<sup>®</sup>, MiSeq<sup>®</sup>, NextSeq<sup>®</sup>, HiSeq<sup>®</sup>, 或NovaSeq<sup>™</sup>平台的流通池;或者由Life Technollog (Carlsbad, CA) 商业化的SOLiD<sup>™</sup>或Ion Torrent<sup>™</sup>测序平台。例如,在W02014/142841A1;美国专利No.8,241,673和美国专利No.8,951,781中描述了示例流通池及其制造和使用方法,每一个专利通过引用以其整体并入本文。

[0036] 如本文所用,术语“交错的”当用于指代两个特征图案时,意图表示当从特定视角观察时,一个图案的特征与另一个图案的特征互相散置,反之亦然。例如,当两个xy平面从特定视角显而易见时,第一xy平面中的第一特征图案和第二xy平面中的第二图案互相散置。在一些实施例中,第一图案的特征可以在单个xy平面中与第二图案的特征互相散置。类似地,第一表面轮廓图案中的轮廓可以与表面上的第二轮廓图案的轮廓交错,例如,当轮廓的部分在特定的xy平面中互相散置时。

[0037] 如本文所用,术语“内腔”在用于指代流动池时,意图表示流动池内的腔。腔可以填充有气体、液体、凝胶或其组合。

[0038] 如本文所用,术语“发光”意指发射冷体辐射。该术语意图与白炽度区别,白炽度是由于热而从材料发射的辐射。当能量源将原子的电子从其最低能量基态置换为更高能量激发态;然后电子以辐射的形式返回能量使其能够回落到基态时,产生发光。特别有用的类型的发光物品是当通过激发辐射提供能量时发射冷体辐射的物品。这些物品被称为“荧光”或“光致发光”。荧光或光致发光可被感知为物品在一波长处的辐射发射,其为在另一波长处照射物品的结果。

[0039] 如本文所使用的,术语“光学联接”意图表示两件事物,这两件事物被对准或关联以在这两件事物之间功能性地传输光。这两件事物可以处于物理接触,但不需要处于物理接触。例如,通过诸如空气或流体的介质将光传输到物体的透镜被认为光学联接到物体。在一些实施例中,光可以通过光学联接的一个或两个事物来改性,例如通过滤波、分裂、偏振等。

[0040] 如本文所用,术语“光学可检测的”意图包括例如产生荧光、发光、散射或吸收信号的能力。可以在紫外(UV)范围(约200至约390nm),可见(VIS)范围(约391至约770nm),红外(IR)范围(约0.771至约25微米)或电磁波谱的其他范围内检测光学信号。可以以排除这些范围中的一个或多个的全部或部分的方式检测光学信号。

[0041] 如本文所用,术语“间距”在用于指代阵列的特征时,意图表示相邻特征的中心到中心间隔。该术语是指xy维度中的间隔。特征图案可以用平均间距来表征。可以对图案进行排序以使得围绕平均间距的变化系数小,或者图案可以是随机的,在这种情况下,变化系数可以相对较大。在任何一种情况下,平均间距可以是例如至少约10nm,约0.1 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约100 $\mu\text{m}$ 或更多。替代地或另外地,平均间距可以是例如至多约100 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ ,约0.1 $\mu\text{m}$ 或更小。当然,特定特征图案的平均间距可以在选自上述范围的较低值之一和较高值之一之间。

[0042] 如本文所使用的,当用于指代特征时,术语“重复图案”意图表示物体的一个区域中的特征子集的相对位置与物体的至少一个其他区域中的特征子集的相对位置相同。重复发生在x和y维度中。所述一个区域可以与图案中的那个其他区域相邻。重复图案的一个区

域中的特征的相对位置可从重复图案的另一区域中的特征的相对位置预测。用于测量的子集可以包括至少2个特征,但是可以包括至少3个、4个、5个、6个、10个或更多个特征。替代地或另外地,用于测量的子集可以包括不超过2个、3个、4个、5个、6个或10个特征。示例重复图案包括正方形格子、矩形格子、菱形格子、六边形格子和倾斜格子。重复图案可以包括子图案的多个重复。

[0043] 如本文所使用的,对相比于第二事物“选择性地”操作第一事物(或第一事物的“选择性”操作)的指代意图表示操作相比于对第二事物的影响对第一事物具有更大的影响。操作不需要对第二事物具有任何影响。操作可以对第一事物具有比对第二事物的影响大至少约1%、约10%、约50%、约90%或约99%的影响。该操作可以对第一事物具有比对第二事物的影响高至少约2倍、约5倍、约10倍、约100倍、约 $1 \times 10^3$ 倍、约 $1 \times 10^4$ 倍或约 $1 \times 10^6$ 倍的影响。操作可以包括例如检测、激发、改性、接触、处理、改变、裂解(例如化学键)、光化学裂解(例如化学键)、形成(例如化学键)、光化学形成(例如化学键)、共价改性、非共价改性、破坏、光消融、去除、合成、聚合、光聚合、扩增(例如核酸)、复制(例如核酸)、延伸(例如核酸)、连接(例如核酸)、或本文所述的或本领域已知的其他操作。

[0044] 如本文所用,术语“固体载体”是指不溶于水性液体的刚性基材。基材可以是无孔的或多孔的。基材可以可选地能够吸收液体(例如由于孔隙率),但是可以具有足够的刚性,使得基材在吸收液体时不会显着膨胀,并且当通过干燥除去液体时基材不会显着收缩。无孔固体载体可以是液体或气体不可渗透的。示例固体载体包括但不限于玻璃和改性或官能化玻璃,塑料(例如丙烯酸类,聚苯乙烯和苯乙烯与其他材料的共聚物,聚丙烯,聚乙烯,聚丁烯,聚氨酯,Teflon<sup>TM</sup>,环烯烃,聚酰亚胺等),尼龙,陶瓷,树脂,Zeonor,二氧化硅或包括硅和改性硅的二氧化硅基材料,碳,金属,无机玻璃,光纤束和聚合物。对于一些实施例,特别有用的固体载体是流动池的部件或位于流动池设备内的部件。本文进一步详细阐述了示例流动池。

[0045] 如本文所用,术语“波导”意图表示限制电磁辐射传播到特定位置的结构或材料。例如,波导可以将光引导到阵列中的第一特征子集,同时防止光传播到阵列中的第二特征子集。可用于将激发辐射联接到阵列的特征的示例波导在美国专利申请公开No.2006/0057729A1或2015/0293021A1或美国专利No.8,241,573中阐述,其每一个通过引用以其整体并入本文。

[0046] 如本文所用,术语“窗口”当用于指流动池时,意指流动池的壁或屏障,流体或气体不能通过该壁或屏障,但特定波长的辐射可通过该壁或屏障传输。

[0047] 如本文所用,术语“xy坐标”是指指定沿着固体载体表面的点、线或区域的位置的信息。xy坐标可以涉及基本平行于表面和/或与z维度正交的平面,当观察表面时检测器沿着该平面聚焦。该术语可以指定例如笛卡尔系统中的数值坐标。可以相对于x和y轴中的一个或两个提供坐标,或者可以相对于xy平面中的另一个位置提供坐标。例如,物体的特征的坐标可以指定特征相对于对象的另一特征的位置的位置。

[0048] 如本文所用,术语“xy平面”意图表示由轴x和y限定的2维区域。轴中的一个或两个可以是直的或弯曲的。例如,“平坦平面”是由直线轴x和y限定的2维区域。当用于指代检测器和检测器观察的物体时,平坦平面可以进一步指定为与检测器和被检测物体之间的观察方向正交。如本文所用,术语“弯曲平面”意图表示由于x或y轴中的一个或两个中的弧而偏

离平坦平面的平面。当用于指代检测器和由检测器观察的物体时，可以进一步将弯曲平面指定为具有与检测器和被检测物体之间的观察方向正交的切线。

[0049] 如这里所使用的，术语“z坐标”意图表示指定沿着与xy平面正交的轴的点、线或区域的位置的信息。在特定实施例中，z轴与由检测器观察的物体的区域正交。例如，可以沿z轴指定光学系统的聚焦方向。

[0050] 考虑到以上定义，可以理解下面阐述的和权利要求中记载的实施例。

[0051] 本公开提供了一种阵列，其包括固体载体，该固体载体具有沿着固体载体的外表面的多个轮廓，其中轮廓的第一子集沿着固体载体的外表面定位以形成第一特征图案，并且沿着固体载体的外表面定位轮廓的第二子集以形成第二特征图案，其中第一子集的轮廓沿着外表面与第二子集的轮廓并置，由此第一图案和第二图案沿着外表面形成交错图案，其中第一图案的特征出现在第一高度 $z_1$ 处，第二图案的特征出现在第二高度 $z_2$ 处，并且其中特征包括用于分析物的附接点，由此第一重复图案的特征被配置为将分析物附接在相对于附接到第二重复图案的特征的分析物不同的高度处。在一些实施例中，特征图案是特征的重复图案。

[0052] 可用于本公开的设备或方法的固体载体可以是二维或三维的，并且可以是平坦表面（例如，芯片或载玻片）或可以具有弯曲表面（例如圆柱或鼓）。有用的材料包括玻璃，石英，塑料（诸如聚苯乙烯（低交联和高交联聚苯乙烯），聚碳酸酯，聚丙烯或聚（甲基丙烯酸甲酯）），丙烯酸共聚物，聚酰胺，硅，金属（如烷硫醇衍生的金），纤维素，尼龙，乳胶，葡聚糖，凝胶基质（如硅胶），聚丙烯醛或复合材料。

[0053] 如下面进一步详细阐述的，固体载体可以配置成附接到一种或多种关注的分析物。可通过直接或间接键合到固体载体来实现附接。键合可以通过共价键链接实现。参见Joos等(1997) *Analytical Biochemistry*, 247:96-101; Oroskar等(1996) *Clin. Chem.* 42: 1547-1555; 和Khandjian (1986) *Mol. Bio. Rep.* 11:107-11, 其每一个通过引用以其整体并入本文。核酸分析物（但不限于核酸）的优选附接是直接胺键，其在核酸的情况下可以在核酸的末端核苷酸与整合在表面上的环氧化物之间发生。键合也可以通过非共价键链接实现。例如，生物素-链霉抗生物素蛋白 (Taylor等(1991) *J Phys D: Appl. Phys.* 24:1443, 其通过引用以其整体并入本文) 和洋地黄毒苷与抗洋地黄毒苷 (Smith等, *Science*, 253:1122 (1992), 其通过引用以其整体并入本文) 是用于将核酸锚定到表面的常用工具。

[0054] 分析物（诸如核酸）到表面的附接可以经由中间结构，诸如珠子、颗粒或凝胶（例如水凝胶）。经由水凝胶将核酸附接到阵列的示例是可自Illumina Inc. (San Diego, CA) 商购的或在美国专利No. 8,241,573和8,951,781和8,759,037中描述的流动池，每一个专利通过引用以其整体并入本文。可用于本文所述方法和设备的示例凝胶包括但不限于具有胶体结构的凝胶，诸如琼脂糖；聚合物网状结构，诸如明胶；或交联聚合物结构，诸如聚丙烯酰胺，SFA（参见，例如，美国专利申请公开No. 211/0059865A1, 其通过引用以其整体并入本文）或PAZAM（参见，例如，美国专利No. 9,012,022, 其全部内容通过引用并入本文）。经由珠子将核酸附接到阵列的示例是从Illumina Inc. 商购的BeadChip™阵列或美国专利No. 6,266,459; 6,355,431; 6,770,441; 6,859,570; 和7,622,294中所述的基于珠子的阵列，其每一个通过引用以其整体并入本文。这种中间结构可存在于井中、柱上或本文所述的其他表面轮廓处。

[0055] 固体载体可包括各种轮廓中的任何一种。示例轮廓包括但不限于凹陷、井、通道、凸起、脊或柱。这种轮廓可以形成一个或多个阵列的特征。这里阐述了各种特征的特性。应当理解,轮廓可以包括或赋予这些特性,无论轮廓是否作为阵列中的特征起作用。此外,轮廓可以支撑多个特征,使得轮廓可以具有多个特性。

[0056] 阵列的特征可以具有各种形状。例如,当在二维平面中观察时,诸如在阵列的表面上,特征可以呈现圆化、圆形、椭圆形、矩形、正方形、对称、不对称、三角形、多边形等。这些特征可以以规则的重复图案布置,包括例如正方形格子、矩形格子、菱形格子、六边形格子或倾斜格子。在一些实施例中也可以使用随机或非重复图案。可以选择图案以达到所需的群集水平。例如,圆化特征最佳地群集为六边形布置。当然,其他群集布置也可用于圆化特征,反之亦然。

[0057] 重复图案可以根据形成图案的最小重复单元的子集中存在的特征的数量来表征。该子集可以包括例如至少约2个、3个、4个、5个、6个、10个或更多个特征。取决于特征的尺寸和密度,单元可占据小于约 $1\text{mm}^2$ ,约 $500\mu\text{m}^2$ ,约 $100\mu\text{m}^2$ ,约 $50\mu\text{m}^2$ ,约 $10\mu\text{m}^2$ ,约 $1\mu\text{m}^2$ ,约 $500\text{nm}^2$ ,约 $100\text{nm}^2$ ,约 $50\text{nm}^2$ ,约 $10\text{nm}^2$ 或更小的面积。替代地或另外地,该单元可占据大于约 $10\text{nm}^2$ ,约 $50\text{nm}^2$ ,约 $100\text{nm}^2$ ,约 $500\text{nm}^2$ ,约 $1\mu\text{m}^2$ ,约 $10\mu\text{m}^2$ ,约 $50\mu\text{m}^2$ ,约 $100\mu\text{m}^2$ ,约 $500\mu\text{m}^2$ ,约 $1\text{mm}^2$ 或更多的面积。单元中的特征的特性,诸如形状、尺寸、间距等,可以从关于阵列或图案中的特征更多地在本文中阐述的特征中选择。

[0058] 可以选择阵列(或本文的方法或系统中使用的其他物体)上的特征的尺寸以适合特定应用。例如,在一些实施例中,阵列的特征可具有仅容纳单个核酸分子的尺寸。具有该尺寸范围内的多个特征的表面可用于构建用于以单分子分辨率检测的分子阵列。该尺寸范围中的特征也可用于具有各自含有核酸分子集落的特征的阵列中。因此,阵列的特征每个可以具有的面积不大于约 $1\text{mm}^2$ ,不大于约 $500\mu\text{m}^2$ ,不大于约 $100\mu\text{m}^2$ ,不大于约 $10\mu\text{m}^2$ ,不大于约 $1\mu\text{m}^2$ ,不大于约 $500\text{nm}^2$ ,或不大于约 $100\text{nm}^2$ ,不大于约 $10\text{nm}^2$ ,不大于约 $5\text{nm}^2$ ,或不大于约 $1\text{nm}^2$ 的面积。替代地或另外地,阵列的特征将不小于约 $1\text{mm}^2$ ,不小于约 $500\mu\text{m}^2$ ,不小于约 $100\mu\text{m}^2$ ,不小于约 $10\mu\text{m}^2$ ,不小于约 $1\mu\text{m}^2$ ,不小于约 $500\text{nm}^2$ ,不小于约 $100\text{nm}^2$ ,不小于约 $10\text{nm}^2$ ,不小于约 $5\text{nm}^2$ ,或不小于约 $1\text{nm}^2$ 。实际上,特征的尺寸可以在从上面例举的那些中选择的上限和下限之间的范围内。尽管关于核酸和核酸的大小已经例示了表面的特征的几个尺寸范围,但是应当理解,这些尺寸范围中的特征可以用于不包括核酸的应用。还应理解,特征的尺寸不一定限于用于核酸应用的大小。

[0059] 对于存在于特定 $z$ 平面中的特征阵列,特征可以是离散的,彼此之间以间隔分隔开。例如,特定 $z$ 平面中的最近邻特征可以通过边缘到边缘距离分隔开,所述边缘到边缘距离最多为 $100\mu\text{m}$ ,约 $50\mu\text{m}$ ,约 $10\mu\text{m}$ ,约 $5\mu\text{m}$ ,约 $1\mu\text{m}$ ,约 $0.5\mu\text{m}$ ,约 $0.4\mu\text{m}$ ,约 $0.3\mu\text{m}$ ,约 $0.2\mu\text{m}$ ,约 $0.1\mu\text{m}$ 或更小。替代地或另外地,特定 $z$ 平面中的最近邻特征可以被边缘到边缘距离分隔开,所述边缘到边缘距离至少为约 $0.1\mu\text{m}$ ,约 $0.2\mu\text{m}$ ,约 $0.3\mu\text{m}$ ,约 $0.4\mu\text{m}$ ,约 $0.5\mu\text{m}$ ,约 $1\mu\text{m}$ ,约 $5\mu\text{m}$ ,约 $10\mu\text{m}$ ,约 $50\mu\text{m}$ ,约 $100\mu\text{m}$ 或更多。这些范围也适用于不同 $z$ 平面中的特征的平均边缘到边缘间隔。

[0060] 阵列也可以关于间距被表征。例如,特征的尺寸和/或特征的间距可以变化,使得阵列可以具有期望的密度。例如,特定 $z$ 平面中的平均特征间距可以是至多约 $100\mu\text{m}$ ,约 $50\mu\text{m}$ ,约 $10\mu\text{m}$ ,约 $5\mu\text{m}$ ,约 $1\mu\text{m}$ ,约 $0.5\mu\text{m}$ ,约 $0.4\mu\text{m}$ ,约 $0.3\mu\text{m}$ ,约 $0.2\mu\text{m}$ ,约 $0.1\mu\text{m}$ 或更小。替代地或另

外地,特定z平面中的平均特征间距可以是至少约0.1 $\mu\text{m}$ ,约0.2 $\mu\text{m}$ ,约0.3 $\mu\text{m}$ ,约0.4 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约50 $\mu\text{m}$ ,约100 $\mu\text{m}$ 或更多。类似地,特定z平面的最大特征间距可以是至多约100 $\mu\text{m}$ ,约50 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ 约0.4 $\mu\text{m}$ ,约0.3 $\mu\text{m}$ ,约0.2 $\mu\text{m}$ ,约0.1 $\mu\text{m}$ 或更小;和/或特定z平面中的最小特征间距可以是至少约0.1 $\mu\text{m}$ ,约0.2 $\mu\text{m}$ ,约0.3 $\mu\text{m}$ ,约0.4 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约50 $\mu\text{m}$ ,约100 $\mu\text{m}$ 或更多。上述范围可以应用于处于两个或更多个z平面中的特征之间的平均、最大或最小间距(例如,跨z-堆叠中的多个图像)。

[0061] 也可以根据每单位面积存在的特征数量理解阵列中特征的密度。例如,阵列的特征的平均密度可以是至少约 $1 \times 10^3$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^4$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^5$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^6$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^7$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^8$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,或约 $1 \times 10^9$ 个特征/ $\text{mm}^2$ 或更高。替代地或另外地,阵列的特征的平均密度可以是至多约 $1 \times 10^9$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^8$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^7$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^6$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^5$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,约 $1 \times 10^4$ 个特征/ $\text{mm}^2$ ,或约 $1 \times 10^3$ 个特征/ $\text{mm}^2$ 或更小。上述范围可以应用于单个z平面或多个z平面中的特征的密度(例如,跨z-堆叠中的多个图像)。

[0062] 具有规则特征图案的阵列可以关于特征的相对位置排序,但是关于每个特征的一个或多个其他特性是随机的。例如,在核酸阵列的情况下,核酸特征可以关于它们的相对位置排序,但是关于任何特定特征处存在的核酸种类的序列的知识是随机的。作为更具体的示例,通过用模板核酸播种特征的重复图案并在每个特征处扩增模板以在特征处形成模板的复制(例如,经由簇扩增或桥扩增)形成的核酸阵列将具有核酸特征的规则图案,如由形成特征的轮廓的位置确定,但关于核酸序列跨阵列的分布是随机的。因此,检测阵列上核酸材料的存在可以产生重复的特征图案,而序列特异性检测可以产生跨阵列的信号的非重复分布。

[0063] 应当理解,本文对图案、顺序、随机性等的描述不仅涉及物体上的特征,诸如阵列上的特征,还涉及图像中的特征。这样,图案、顺序、随机性等可以以用于存储、操作或传送图像数据的各种格式中的任何一种存在,包括但不限于计算机可读介质或诸如图形用户界面或其他输出装置的计算机部件。

[0064] 在一些实施例中,分析物可以分布在特征上,使得分析物可以单独地分辨。例如,在该实施例中,在每个特征处可以存在不多于每种分析物的单个分子。替代地,分析物可以作为集落或群存在,使得不必分辨单个分子或细胞。就仅含有单种分析物(尽管多重复制)而言,集落或群可以是同源的。以核酸为例,阵列中的每个特征可包括核酸的集落或群,并且集落或群中的每个核酸可具有相同的核苷酸序列(单链或双链)。核酸集落也可称为“核酸簇”。核酸集落可可选地通过簇扩增或桥扩增技术产生,如本文其他地方进一步详述。靶序列的多次重复可以存在于单个核酸分子中,诸如使用滚环扩增程序产生的多联体。因此,特征可以包含单个种类的分析物的多个复制。替代地,特征处的分析物集落或群可包括两种或更多种不同的种类。例如,垫阵列中的一个或多个特征可各自包含具有两种或更多种不同核酸种类(即具有不同序列的核酸分子的混合集落)。混合集落中的两种或更多种核酸种类可以以不可忽略的量存在,例如,从而允许在混合集落中检测到多于一种核酸。

[0065] 在阵列的每个特征处可以存在不同的分析物种类。因此,不同的分析物可以存在于固体载体上的第一阵列的不同特征处,并且不同的分析物可以存在于固体载体上的第二阵列的不同特征处。每个阵列可包括至少约100,约 $1 \times 10^3$ ,约 $1 \times 10^4$ ,约 $1 \times 10^5$ ,约 $1 \times 10^6$ ,

约 $1 \times 10^9$ 或更多种不同分析物种类。因此,在具有两个不同阵列的固体载体上可以存在至少两倍的不同分析物,在具有三个不同阵列的固体载体上可以存在至少三倍的不同分析物,等等。

[0066] 多种分析物中的任何一种均可用于本文所述的方法或设备中。例如,阵列可包括细胞、病毒、核酸、蛋白质、抗体、碳水化合物、小分子(诸如候选药物)、生物活性分子或其他关注的分析物的附接的集合。

[0067] 有用的应用可包括利用具有生物分子的特征的应用,生物分子诸如核酸和多肽。这种微阵列可包括脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)探针。这些专用于存在于人和其他有机体中存在的核苷酸序列。在某些应用中,例如,单个DNA或RNA探针可以附接在阵列的各个特征处。可以将测试样品(诸如来自已知的人或有机体)暴露于阵列,使得靶核酸(例如基因片段,mRNA或其扩增子)与阵列中相应特征处的互补探针混合。可以在靶特定过程中标记探针(例如,由于靶核酸上存在的标记或由于特征处以混合形式存在的靶或探针的酶标记)。然后通过扫描特征上的特定光频率来检查阵列,以识别样品中存在哪些靶核酸。

[0068] 在一些实施例中,生物微阵列可用于基因测序和类似应用。通常,基因测序包括确定一长度的靶核酸中的核苷酸的顺序,诸如DNA或RNA的片段。可以在每个特征处对相对短的序列进行测序,并且所得到的序列信息可以用于各种生物信息学方法中以将序列片段逻辑地配合在一起,以便可靠地确定从其得到片段的更广泛长度的遗传物质的序列。已经开发了用于特征片段的基于计算机的自动算法,并且最近已经在基因组作图、基因及其功能的识别等中使用了这些算法。微阵列特别用于表征基因组内容,因为存在大量变体,并且这取代了对单个探针和靶进行许多实验的替代方案。微阵列是以实用性方式进行这种研究的理想形式。

[0069] 用于制备分析物阵列(也称为“微阵列”)或用于阵列的已知组合物的各种已知方法中的任何一种都可以适用于本文所述的方法或设备。阵列可以包含特征,每个特征具有单独的探针或探针群。在后一种情况下,每个特征处的探针群可以是具有单一种类探针的同质物。例如,在核酸阵列的情况下,每个特征可以具有多个核酸分子,每个核酸分子具有共同序列。然而,在一些实施例中,阵列的每个特征处的群可以是异质的。类似地,蛋白质阵列可以具有带有单个蛋白质或蛋白质群的特征,诸如具有相同的氨基酸序列。探针可以附接于阵列的表面,例如,经由探针与表面的共价键连接或经由探针与表面的(一个或多个)非共价键相互作用。在一些实施例中,探针(诸如核酸分子)可以经由凝胶层附接于表面,如例如美国专利No.9,012,022和美国专利申请公开No.2011/0059865A1中所述,其每一个通过引用以其整体并入本文。

[0070] 示例阵列包括但不限于可从Illumina,Inc.(San Diego,CA)获得的BeadChip<sup>®</sup>阵列或其他,诸如其中探针附接于存在于表面上的珠子(例如,表面上的井中的珠子)的那些阵列,诸如在美国专利No.6,266,459;6,355,431;6,770,441;6,859,570;和7,622,294中描述的那些,其每一个通过引用以其整体并入本文。市售微阵列的其他示例包括,例如,Affymetrix<sup>®</sup> GeneChip<sup>®</sup>微阵列或根据有时称为VLSIPS<sup>™</sup>(Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis(超大规模固定化聚合物合成))技术的技术合成的其他微阵列。斑点微阵列也可以用于根据本公开的一些实施例的方法或设备中。斑点微阵列的

示例是可从Amersham Biosciences获得的CodeLink™阵列。另一种有用的微阵列是使用喷墨印刷方法制造的微阵列,例如可从Agilent Technologies获得的SurePrint™技术。

[0071] 其他有用的阵列组合物和制造方法包括用于核酸测序应用的那些。例如,具有基因组片段扩增子的阵列(通常称为簇)是特别有用的,诸如Bentley et al., Nature 456:53-59 (2008); WO 91/06678; WO 07/123744; 美国专利No. 7,329,492; 7,211,414; 7,315,019; 7,405,281; 或7,057,026; 8,343,746和No. 9,574,226中描述的那些,每一篇均通过引用以其整体并入本文。可用于核酸测序的另一种阵列是由乳液PCR技术产生的颗粒阵列。在Dressman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8817-8822 (2003), WO 05/010145, 美国专利No. 7,323,305和7,622,280描述了示例,其每一个通过引用以其整体并入本文。

[0072] 图案化阵列可以用于核酸测序或其他分析应用,并且可以被修改以用于本公开的设备和方法中。示例图案化阵列,其制造方法及其使用方法在美国专利NO. 8,778,848; 8,778,849; 8,895,249; 9,012,022; 和9,512,422中有所描述,其每一个的全部内容通过引用并入本文。这种图案化阵列的特征可用于捕获单个核酸模板分子以播种同源集落的随后形成,例如经由桥扩增。这种图案化阵列特别适用于核酸测序应用。

[0073] 当制作和使用具有多个z平面处的特征的阵列时,可以采用上述制作和检测阵列的技术。

[0074] 可以在特征中存在多种标记或基团中的任何一种。示例标记和基团包括但不限于发光体、荧光团、发色团、化学发光物质、电化学发光物质、荧光猝灭剂、用于荧光共振能量转移(FRET)的供体和/或受体、纳米晶体等。可能有用的荧光团例如包括荧光镧系元素络合物(包括铈和铽的那些), 荧光素, 罗丹明, 四甲基罗丹明, 曙红, 赤藓红, 香豆素, 甲基香豆素, 苝, 亚麻酸绿, Cy3, Cy5, 苝, 荧光黄, Cascade Blue, Texas Red, Alexa染料, 藻红蛋白和本领域已知的其他物质, 诸如Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, OR) 6th Edition; The SyntheGencatalog (Houston, TX), Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Plenum Press New York (1999), 或WO 98/59066中描述的那些, 其每一个通过引用以其整体并入本文。示例猝灭剂包括但不限于DACYL (4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸), Black Hole Quenchers (Biosearch Technologies, Novato, CA), Qx1猝灭剂 (Anaspec, Fremont, CA), 爱荷华黑淬灭剂, DABCYL, BHQ1, BHQ2, QSY7, QSY9, QSY21, QSY35, BHQ0, BHQ1, BHQ2, QXL680, ATT0540Q, ATT0580Q, ATT0612Q, DYQ660, DYQ661和IR染料QC-1猝灭剂。化学发光物质包括例如苯巴比妥, 用于在焦磷酸测序中检测的试剂, 水母发光蛋白和本领域已知的其他物质。示例电化学发光物质包括但不限于Ru (bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, Bodipy染料, 苯巴比妥衍生物, 吡啶酯和本领域已知的其他物质。

[0075] 可以选择标签或基团以适合本文所述的设备或方法的特定应用。例如, 标记或基团可以与存在于特征处的靶分析物相关联, 并使用本文所述的技术检测。

[0076] 在特定实施例中, 靶分析物包括发光基团, 并且检测器与阵列光学联接以检测来自发光基团的发射。包括荧光基团的设备可以进一步包括如本文所述或以其他方式被本领域已知的激发组件。当使用荧光猝灭剂、用于荧光共振能量转移(FRET)的供体和/或受体或纳米晶体时, 具有激发组件的设备也是有用的。

[0077] 当在xy维度中观察时, 在固体载体上的两个阵列可以明显地彼此交错, 而与z维度中的阵列的特征的高度差异无关。因此, 固体载体上的第一轮廓子集的轮廓可以干涉固体

载体上的第二轮廓子集的最近邻轮廓。此外,第二子集的轮廓可以干涉第一子集的最近邻轮廓。以这种方式,第一图案和第二图案沿着固体载体的外表面形成交错图案。

[0078] 在特定实施例中,固体载体上的轮廓的第一重复图案将具有与固体载体上的轮廓的第二重复图案相同的网格图案,并且第一重复图案沿着固体载体的外表面从第二重复图案偏移。无论格子图案是否相同,第一重复图案的每个轮廓的面积(例如,形成特征的面积)可以与第二重复图案的每个轮廓的面积相同。当然,轮廓或特征的面积可以在特定阵列内或在固体载体上的不同阵列之间不同。还应理解,第一重复图案可以可选地具有与第二重复图案相同的间距。

[0079] 固体载体上的第一轮廓子集可包括在高度 $z_1$ 处具有底部的井或通道,并且固体载体上的第二轮廓子集可包括在高度 $z_2$ 处具有底部的井或通道。类似地,固体载体上的第一轮廓子集可以包括在高度 $z_1$ 处具有顶部的柱或脊,并且固体载体上的第二轮廓子集可以包括在高度 $z_2$ 处具有顶部的柱或脊。如这些示例所示,固体载体上的轮廓子集可以是相同的形状或形态。替代地,不同的轮廓子集可以具有不同的形状或形态。因此,第一子集的轮廓可包括在高度 $z_1$ 处具有底部的井或通道,并且第二子集的轮廓可包括在高度 $z_2$ 处具有顶部的柱或脊。示例配置在图2至4中示出。

[0080] 两个不同子集(例如,在 $z_1$ 和 $z_2$ 中)的轮廓的高程差异可以以适于或期望实现由轮廓形成的两个不同阵列之间的分辨率的任意量不同。在一些情况下,最近邻特征将由所使用的检测系统的光学分辨率体积元分开。例如, $z_1$ 和 $z_2$ (或 $z$ 中最近邻特征之间的距离)可以是至少约 $0.2\mu\text{m}$ ,约 $0.5\mu\text{m}$ ,约 $1\mu\text{m}$ ,约 $2\mu\text{m}$ ,约 $5\mu\text{m}$ ,约 $10\mu\text{m}$ ,约 $25\mu\text{m}$ 或更远地分开。替代地或另外地,该距离可以是至多约 $25\mu\text{m}$ ,约 $10\mu\text{m}$ ,约 $5\mu\text{m}$ ,约 $2\mu\text{m}$ ,约 $1\mu\text{m}$ ,约 $0.5\mu\text{m}$ ,约 $0.1\mu\text{m}$ 或更小。

[0081] 在一些实施例中,第一特征图案将沿着固体载体位于第一平面中,而固体载体上的第二特征图案将位于平行于第一平面的第二平面中。由特征形成的平面不需要是平坦的。例如,第一特征图案可以形成第一弯曲平面(例如,沿着圆柱或鼓的外部),并且第二特征图案可以出现在第二弯曲平面中。两个弯曲平面可以可选地相对于彼此基本上同心。

[0082] 可以使本公开的阵列与流体样品接触。可以发生大量接触,由此沿着固体载体的第一图案和第二图案的特征与流体同时流体连通。由此,对于固体载体的表面上的两个阵列同时发生流体处理。流动池特别地可用于用流体试剂处理阵列。因此,本发明提供了一种流动池,其容纳本文所述的阵列,使得固体载体的外表面与流动池的内腔接触。由此,阵列的特征可以与流动池的内腔接触,而与它们在 $z$ 维度中的高度差异无关。在特定实施例中,两个或更多个特征图案虽然存在于不同的高度,但将存在于流动池的内腔的同一侧上。因此,流动池的单个窗口可以具有带有两个或更多个特征图案的阵列,其中特征处于不同的高度。

[0083] 流动池可以可选地包括(一个或多个)流体入口或(一个或多个)流体出口以允许引入或移除各种流体,例如,含有在用于沉积、合成、标记或检测分析物的方法中使用的试剂的流体。各种示例方法在本文其他地方进一步详述,诸如核酸扩增、检测和测序。流动池还可包括用于检测阵列特征处的分析物的窗口。在一些实施例中,包含轮廓的固体载体对于用于在轮廓处的分析物的光学检测的特定波长的光可以是透明的。流动池可包括一个或多个检测窗口。例如,流动池的第一窗口和流动池的第二窗口可以彼此平行,第一窗口通过流动池的内腔与第二窗口分隔开。

[0084] 流动池的一个或两个窗口可以用作固体载体,在其上形成本公开的阵列。阵列可以存在于窗口的与流动池的内腔接触表面上。因此,本公开提供了一种阵列,其包括固体载体,该固体载体具有沿着固体载体的外表面的多个轮廓,其中轮廓的第一子集沿着固体载体的外表面定位以形成第一特征图案,并且轮廓的第二子集沿着固体载体的外表面定位以形成第二特征图案,其中第一子集的轮廓与第二子集的轮廓沿着外表面并置,由此第一图案和第二图案沿外表面形成交错图案,其中第一图案的特征出现在第一高度 $z_1$ 处,第二图案的特征出现在第二高度 $z_2$ 处,并且其中特征包括用于分析物的附接点,由此第一图案的特征被配置成将分析物附接在相对于附接到第二图案的特征的分析物不同的高度处,其中固体载体用作流动池的第一窗口,并且流动池包括与第一窗口平行的第二窗口,第一窗口通过流动池的内腔与第二窗口分隔开,其中第二窗口用作第二外表面,该第二外表面包括沿第二外表面定位以形成第三特征图案的第三轮廓子集和沿第二外表面定位以形成第四特征图案的第四轮廓子集,其中第三子集的轮廓沿第二外表面与第四子集的轮廓并置,由此第三图案和第四图案沿第二外表面形成第二交错图案,并且其中第三图案的特征出现在第三高度 $z_3$ 处,第四图案的特征出现在第四高度 $z_4$ 处。制造和检测位于流动池的多个窗口上的阵列的方法在本领域中是已知的,例如,如美国专利No.8,039,817(其通过引用一起整体并入本文)中所述,并且可以容易地修改以供与本文所述的方法和设备一起使用。

[0085] 本公开还提供了一种检测多个分析物的方法,包括以下步骤:(a)提供包括固体载体的阵列,所述固体载体具有沿着所述固体载体的外表面的第一分析物特征图案和第二分析物特征图案,其中第一图案的分析物特征出现在第一高度 $z_1$ 处,第二图案的分析物特征出现在第二高度 $z_2$ 处,并且其中第一图案和第二图案沿着外表面形成交错图案,(b)检测第一高度 $z_1$ 处的光学信号,从而将第一图案的各个分析物特征彼此区分开;(c)检测第二高度 $z_2$ 处的光学信号,由此将第二图案的各个分析物特征彼此区分开,其中通过选择性地检测与第二高度 $z_2$ 处的特征相比较的第一高度 $z_1$ 的特征,将第一图案中的分析物特征与第二图案中的最近邻分析物特征区分开。可选地,第一分析物特征图案和/或第二分析物特征图案可以是分析物特征的重复图案。

[0086] 本公开的方法可以包括检测来自阵列的光学信号的步骤,例如,通过获得图像。能够对表面进行高分辨率成像的检测设备是特别有用的。在特定实施例中,检测设备将具有足够的分辨率以区分处于本文所述的密度、间距和/或特征尺寸的特征。特别有用的是能够从表面获得图像或图像数据的检测设备。示例检测器是被配置为在获得区域图像的同时将物体和检测器保持在静态关系中的检测器。也可以使用扫描设备。

[0087] 本文描述的实施例可以利用步进-拍摄过程,其中阵列的不同部分(在 $xy$ 平面中)被单独地检测或在检测器和样本的相对移动之间(或之后)成像。例如,阵列的每个区域可以用激光或其他适当的辐射源激发,并且可以检测发射。可以根据本公开修改的步进-拍摄光学部件的示例在美国专利No.8,951,781中提出,其通过引用以其整体并入本文。本文描述的实施例可以利用扫描过程,其中在特征和光学部件之间的移动期间检测阵列的不同部分或对阵列的不同部分成像(在 $xy$ 平面中)。在一些实施例中,成像组件包括扫描时间延迟积分(TDI)系统。此外,成像会话(session)可以包括线扫描,使得跨垫阵列扫描光的线性聚焦区域(在 $xy$ 平面中)。可以根据本公开修改的一些线扫描方法描述于例如美国专利No.7,329,860和8,039,817中,其每一个通过引用以其整体并入本文。扫描还可以包括跨特征阵

列移动在光栅图案中的光的焦点区域。无论是使用步进-拍摄、扫描、静态图像采集还是其他配置,实施例可以被配置用于落射荧光成像或全内反射-荧光(TIRF)成像。在这方面可以修改的示例光学部件和布置在美国专利No.7,329,860;8,241,573;8,951,781;和9,193,996中描述,其每一个通过引用以其整体并入本文。

[0088] 某些实施例包括具有高数值孔径(NA)值的物镜。实施例可能特别有用的示例高NA范围包括至少约0.6的NA值。例如,NA可以是至少约0.65,约0.7,约0.75,约0.8,约0.85,约0.9,约0.95或更高。本领域技术人员将理解,取决于透镜在其中工作的介质的折射率,NA可以更高,包括例如对于空气高达约1.0,对于纯水约1.33,或对于其他介质(诸如油)更高。然而,其他实施例可具有比上面列出的示例更低的NA值。通过光学组件获得的图像数据可具有约0.1至约50微米之间的分辨率,或更特别地,约0.1至约10微米之间的分辨率。光学组件可具有足以单独地分辨以小于约15 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约2 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ ,约0.2 $\mu\text{m}$ 或更小的距离分开的特征或位点的分辨率。

[0089] 使用本公开的阵列(其中交错阵列的轮廓在不同高度处陈列特征)的优点在于可以分辨特征,即使相比于全部特征具有相同高度可以分辨的情况下,特征所附接的轮廓在外观上的xy维度上更加接近。因此,彼此区分的交错图案中的最近邻轮廓可具有小于约500nm,约250nm,约100nm,约50nm或更小的间距。替代地或另外地,交错图案的最近邻轮廓的间距可以具有大于约50nm,约100nm,约250nm,约500nm或更大的间距。

[0090] 使用本文的方法或设备检测和分辨的特征可以各自在xy平面中具有小于约100 $\mu\text{m}^2$ ,约10 $\mu\text{m}^2$ ,约1 $\mu\text{m}^2$ ,约0.1 $\mu\text{m}^2$ 或更小的面积。替代地或另外地,每个特征可以在xy平面中具有至少约0.1 $\mu\text{m}^2$ ,约1 $\mu\text{m}^2$ ,约10 $\mu\text{m}^2$ ,约100 $\mu\text{m}^2$ 或更大的面积。

[0091] 通常,物镜的NA值是物镜可以接收光的角度宽度的量度。对于给定的固定放大率,NA值越高,物镜可以收集的光越多。这是因为收集效率和分辨率增加。结果,当使用具有较高NA值的物镜时,可以更容易地区分多个特征。因此,通常,物镜的较高NA值可能有利于成像。

[0092] 在本文所述的方法中使用的检测器可以被配置为选择性地检测沿着固体载体的一个z平面与其他z平面中的固体载体上的特征。例如,检测器可以被配置用于共焦检测或其他检测模式,其收集特定z位置中的信号,同时拒绝在被检测位置上方和下方的z位置处的信号。在美国专利申请公开No.2016/019693中描述了一种特别有用的检测设备,该检测设备可用于在限定的z平面中进行线扫描,并且可选地使用时间延迟积分格式,该专利申请的全部内容通过引用并入本文。

[0093] 在一些实施例中,可以通过去卷积来区分在不同z平面中出现的特征。例如,可以将图像的z-堆叠彼此进行比较以确定每个特征所在的(一个或多个)z平面或者消除离焦特征。示例图像去卷积技术在Sibarita JB,Deconvolution microscopy.Adv Biochem Eng Biotechnol.95(2005)201-43,或McNally JG et al.,Three-dimensional imaging by deconvolution microscopy Methods 19:3(1999)373-85中描述,其每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0094] z中的检测区域的宽度可以被配置用于选择性地检测具有本文所述的高度差异的特征。例如,z中的聚焦区域的宽度(例如,z中对于焦平面的厚度,在xy区域检测器的情况下)可以小于约25 $\mu\text{m}$ ,约10 $\mu\text{m}$ ,约5 $\mu\text{m}$ ,约2 $\mu\text{m}$ ,约1 $\mu\text{m}$ ,约0.5 $\mu\text{m}$ 或约0.1 $\mu\text{m}$ 。替代地或另外地,z

中的宽度可以是至少约 $0.1\mu\text{m}$ ,约 $0.5\mu\text{m}$ ,约 $1\mu\text{m}$ ,约 $2\mu\text{m}$ ,约 $10\mu\text{m}$ ,约 $25\mu\text{m}$ 或更多。

[0095] 可能期望使用具有 $z$ 厚度的焦平面的检测器, $z$ 厚度小于 $z_1$ 和 $z_2$ 之间的距离,其中 $z_1$ 是固体载体上的第一阵列的特征的高度,并且 $z_2$ 是固体载体上的第二阵列的特征的高度。因此,通过选择性地将光学检测器聚焦到与第二高度 $z_2$ 相比的第一高度 $z_1$ ,将第一阵列中的分析物特征与第二阵列中的最近邻分析物特征区分开。类似地,通过选择性地将光学检测器聚焦到与第一高度 $z_1$ 相比的第二高度 $z_2$ ,将第二阵列中的分析物特征与第一阵列中的最近邻分析物特征区分开。

[0096] 可以经由选择性信号采集来实现在不同高度处区分特征,例如,使用检测器聚焦、共聚焦或上述其他技术。替代地或另外地,通过选择性激发与第二高度处的发光体相比的第一高度处的发光体可以实现 $z$ 中的分辨率。例如,通过选择性地激发与第二高度 $z_2$ 相比的第一高度 $z_1$ 处的发光体,可以将第一阵列中的分析物特征与第二阵列中的最近邻分析物特征区分开。这种选择性激发可以使用波导来实现,波导选择性地联接到与第二高度 $z_2$ 处的特征相比的第一高度 $z_1$ 处的特征。类似地,通过选择性地激发与第一高度 $z_1$ 相比的第二高度 $z_2$ 处的发光体,可以将第二阵列中的分析物特征与第一阵列中的最近邻分析物特征区分开。

[0097] 如图5所例示的,阵列的差分激发可以通过交替施加波导照射和落射照射来实现。在所示的示例中,落射照射用于激发并的第一阵列和第二阵列中的发光体。波导用于选择性地激发并的第二阵列中的发光体(第一阵列的特征不光学联接到波导)。因此,通过经由波导的选择性激发将第二阵列中的特征与第一阵列的特征区分开,并且可以通过图像处理以减去第二阵列的特征(其位置从波导激发图像中识别出来)来选择性地检测第一阵列中的特征。

[0098] 本公开的方法还可以包括将来自靶图像的数据提供给计算机的步骤。可以使用计算机来执行本文所述方法的各种过程和步骤。计算机可以包括处理器,该处理器是检测装置的一部分,与用于获得由计算机处理的数据的检测装置联网,或与检测装置分离。在一些实施例中,信息(例如,图像数据)可以直接或经由计算机网络在本文公开的系统的部件之间传输。局域网(LAN)或广域网(WAN)可以是公司计算网络,包括对因特网的访问,计算机和包括该系统的计算装置连接到该网络。在一个实施例中,LAN符合传输控制协议/因特网协议(TCP/IP)行业标准。在某些情况下,信息(例如,图像数据)经由输入装置(例如磁盘驱动器,压缩盘播放器,USB端口等)输入到本文公开的系统。在某些情况下,通过例如从诸如盘或闪存驱动器的存储装置加载信息来接收信息。

[0099] 用于运行本文所述的算法或其他过程的处理器可包括微处理器。微处理器可以是任何常规的通用单芯片或多芯片微处理器,诸如Intel公司制造的Pentium™处理器。特别有用的计算机可以使用Intel Ivybridge双12核处理器,LSI raid控制器,具有128GB的RAM和2TB的固态硬盘驱动器。此外,处理器可以包括任何常规的专用处理器,诸如数字信号处理器或图形处理器。处理器可以具有常规的地址线、常规的数据线和一个或多个常规的控制线。

[0100] 本文公开的实施例可以使用标准编程或工程技术实现为方法、设备、系统或制品,以产生软件、固件、硬件或其任何组合。在此上下文中,术语“制品”是指以硬件或计算机可读介质(诸如光学存储装置,和易失性或非易失性存储器装置)实现的代码或逻辑。这样的

硬件可以包括但不限于现场可编程门阵列 (FPGA), 专用集成电路 (ASIC), 复杂可编程逻辑器件 (CPLD), 可编程逻辑阵列 (PLA), 微处理器或其他类似的处理装置。在特定实施例中, 本文阐述的信息或算法存在于非瞬态存储介质中。

[0101] 在特定实施例中, 本文阐述的计算机实现的方法可以在获得物体的多个图像的同时实时发生。这种实时分析对于核酸测序应用特别有用, 其中核酸阵列经历流体和检测步骤的重复循环。对测序数据的分析通常可以是计算密集的, 使得在其他数据采集或分析算法正在进行的同时实时或在后台执行本文所述的方法可能是有益的。可以与本方法一起使用的示例实时分析方法是用于可从 Illumina, Inc. (San Diego, CA) 商购的和/或在美国专利 No. 8,965,076 中描述的 MiSeq 和 HiSeq 测序装置的实时分析方法, 该专利的全部内容通过引用并入本文。

[0102] 本公开的方法可以包括捕获分析物 (诸如核酸) 以在固体载体表面上形成分析物特征的步骤。在一些实施例中, 核酸 (或其他分析物) 处于与固体载体接触的流体中。从流体捕获核酸, 使得它们随机地终止于表面上的特定特征。因此, 片段附接的特征关于任意的特定核酸种类将附接在什么地方 (即, 在特定位置将存在什么核酸序列) 的可预测性或知识可以是随机的, 无论特征的空间图案是否是随机的。

[0103] 在流体中的分析物可以经由被动扩散或主动传输随机输送到表面上的特征。可用于这种输送的示例条件和技术是本领域已知的或本文在将改性的核酸输送至表面的上下文中举例说明的。

[0104] 本公开的方法可以进一步包括在特征处扩增核酸以产生扩增子的步骤。例如, 可以经由如下所述的核酸测序技术检测扩增子。在特定的实施例中, 可以使用附接于表面的至少一个引物扩增核酸。用于扩增的引物可以至少在一些配置中与核酸上的引发位点混合。可以延伸引物以产生附接于表面的扩增子。可以使用固相延伸方法, 如下面进一步详述。

[0105] 本公开的方法可包括扩增靶核酸、经改性的核酸部分的或其片段的步骤。可以使用本领域已知的任何合适的扩增方法。在一些实施例中, 核酸在存在于固体载体上的特征上扩增。例如, 在一些实施例中, 使用桥扩增方法扩增核酸, 如美国专利 No. 5,641,658; 7,115,400; 7,741,463; 7,790,418; 美国专利公开 No. 2002/0055100; 2004/0002090; 和 2008/0009420 的公开内容中所举例说明的, 其每一个通过引用以其整体并入本文。桥扩增方法允许扩增产物固定在固体载体上, 以形成由固定化核酸分子的簇 (或“集落”) 组成的阵列。这种阵列上的每个簇或集落由多个相同的固定化多核苷酸链和多个相同的固定化互补多核苷酸链形成。如此形成的阵列在本文中可称为“成簇阵列”。当由固定化多核苷酸链和固定化互补链的退火的对形成时, 固相扩增反应的产物是所谓的“桥接”结构, 两条链在 5' 末端处优选地经由共价键附接而固定在固体载体上。桥扩增方法是其中固定化核酸模板用于产生固定化扩增子的方法的示例。其他合适的方法也可用于从根据本文提供的方法产生的固定化核酸产生固定化扩增子。例如, 可以经由固相聚合酶链式反应 (PCR)、固相多重置换扩增 (MDA)、固相滚环扩增 (RCA) 等形成一个或多个簇或集落, 而不论每对扩增引物的一个或两个引物是否被固定化。

[0106] 在一些实施例中, 靶核酸、经改性的核酸或其片段在溶液中扩增。例如, 在一些实施例中, 扩增引物与溶液中插入物的引发位点混合。在其他实施例中, 当经改性的核酸或其

片段附接到固体载体时,扩增引物被混合到插入物。在附接到特征之前,可以在溶液中扩增核酸。可以使用本文所述的固相扩增方法可选地第二次扩增附接的扩增子。

[0107] 应当理解,本文所述或本领域已知的任何扩增方法可与通用或靶特异性引物一起使用以扩增固定化的DNA片段。合适的扩增方法包括但不限于聚合酶链式反应(PCR),链置换扩增(SDA),转录介导的扩增(TMA)和基于核酸序列的扩增(NASBA),例如,如美国专利No.8,003,354所述的,其全部内容通过引用并入本文。上述扩增方法可用于扩增一种或多种关注的核酸。例如,PCR,多重PCR,SDA,TMA,NASBA等可用于扩增固定化的核酸片段。在一些实施例中,特异性针对关注核酸的引物包括在扩增反应中。

[0108] 用于扩增核酸的其他合适方法可包括寡核苷酸延伸和连接,滚环扩增(RCA)(Lizardi等,Nat.Genet.19:225-232(1998),其通过引用以其整体并入本文)和寡核苷酸连接测定(OLA)(参见美国专利No.7,582,420;5,185,243;5,679,524和5,573,907;和EP 0 320 308 B1;EP 0 336 731 B1;EP 0 439 182 B1;WO 90/01069;WO 89/12696;和WO 89/09835,其每一个通过引用以其整体并入本文)。应当理解,可以设计这些扩增方法以扩增固定化的核酸。例如,在一些实施例中,扩增方法可包括连接探针扩增或寡核苷酸连接测定(OLA)反应,其含有特异性针对关注核酸的引物。在一些实施例中,扩增方法可包括引物延伸-连接反应,其含有特异性针对关注核酸的引物。作为可以特异性设计以用于扩增关注核酸的引物延伸和连接引物的非限制性示例,扩增可以包括用于GoldenGate<sup>®</sup>测定的引物(Illumina,Inc.,San Diego,CA),如美国专利No.7,582,420和7,611,869中举例说明的,其各自通过引用以其整体并入本文。

[0109] 等温扩增技术可用于本公开的方法中。示例等温扩增方法包括但不限于:多位移扩增(MDA),例如,Deanet al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:5261-66(2002)所举例说明的;或等温链置换核酸扩增,例如美国专利No.6,214,587所举例说明的,其每一篇通过引用以其整体并入本文。可以在本公开中使用的其他非基于PCR的方法包括例如:链置换扩增(SDA),其描述于例如Walker et al.,Molecular Methods for Virus Detection,Academic Press,Inc.,1995;美国专利No.5,455,166和5,130,238以及Walker et al.,Nucl.Acids Res.20:1691-96(1992);或超支化链置换扩增,其描述于例如Lage et al.,Genome Research 13:294-307(2003)中,其每一篇通过引用以其整体并入本文。扩增反应、条件和组分的另外描述在美国专利No.7,670,810中提出,其通过引用以其整体并入本文。其他有用的等温扩增技术包括重组酶促扩增技术,诸如由TwistDx(Cambridge,UK)以TwistAmp<sup>™</sup>试剂盒商售的那些技术。重组酶促进扩增试剂和反应条件的有用组分在美国专利NO.5,223,414和7,399,590中阐述,其每一篇均以引用的方式以其整体并入本文。还可以使用解旋酶依赖性扩增,例如,如Xuet al.EMBO Rep 5:795-800(2004)中所述,其通过引用以其整体并入本文。

[0110] 本文描述的方法可包括对阵列上的核酸进行测序的步骤。一个示例是合成测序(SBS)。在SBS中,监测沿核酸模板的核酸引物的延伸以确定模板中核苷酸的序列。如上所述,引物可以与存在于插入物中的引发位点混合。基础化学过程可以是聚合(例如,由聚合酶催化)。在特定的基于聚合酶的SBS实施例中,将荧光标记的核苷酸以模板依赖性方式添加至引物(从而延伸引物),使得对添加至引物的核苷酸的顺序和类型的检测可用于确定模板序列。使用本文所述步骤附接在阵列的不同位置处的多个不同核酸片段可以在这样的条

件下经受SBS技术,在这些条件下,针对不同模板发生的事件由于它们在阵列中的位置可以被区分开。

[0111] 流动池提供了用于容纳通过本公开的方法产生的、并且经受SBS或涉及循环中的重复试剂递送的其他检测技术的核酸阵列的方便格式。例如,为了启动第一个SBS循环,可以使一个或多个标记的核苷酸、DNA聚合酶等流入/通过容纳核酸阵列的流动池。可以检测其中引物延伸(例如经由引物与位于附接到核酸的插入物上的引发位点的混合)引起标记的核苷酸被并入的阵列的那些特征。可选地,核苷酸可以进一步包括可逆的终止特性,一旦核苷酸被添加到引物,其终止进一步的引物延伸。例如,可以将具有可逆终止子基团的核苷酸类似物添加到引物,使得直到递送解封闭剂以除去该基团而不会发生随后的延伸。因此,对于使用可逆终止的实施例,可以将解封闭试剂递送至流动池(在检测发生之前或之后)。可以在各种递送步骤之间进行洗涤。然后将该循环重复n次以使引物延伸n个核苷酸,从而检测长度为n的序列。可以容易地适用通过本公开的方法产生的阵列的示例性SBS程序、流体系统和检测平台,例如在Bentley et al.,*Nature* 456:53-59 (2008),美国专利NO.7,057,026;7,329,492;7,211,414;7,315,019;7,405,281;8,343,746中;和在WO 04/018497;WO 91/06678;WO 07/123744中描述,其每一篇都通过引用以其整体并入本文。

[0112] 使用循环反应的其他测序程序可以被使用,诸如焦磷酸测序。焦磷酸测序检测随着特定核苷酸并入新生核酸链中的无机焦磷酸(PPi)的释放(Ronaghi et al.,*Analytical Biochemistry* 242(1),84-9(1996);Ronaghi,*Genome Res.*11(1),3-11(2001);Ronaghi et al.,*Science* 281(5375),363(1998);美国专利No.6,210,891;6,258,568;和6,274,320,其每一篇通过引用以其整体并入本文。在焦磷酸测序中,释放的PPi可以通过经由ATP硫酸化酶转化为三磷酸腺苷(ATP)被检测,并且可以经由荧光素酶产生的光子检测产生的ATP水平。因此,可以经由发光检测系统监测测序反应。用于基于荧光的检测系统的激发辐射源对于焦磷酸测序程序不是必需的。可用于将焦磷酸测序应用于本公开的方法的有用的流体系统、检测器和程序描述于例如美国专利No.7,244,559;7,595,883;9,096,899,和美国专利公开No.2005/0191698A1中,其每一篇通过引用以其整体并入本文。

[0113] 连接测序反应也是有用的,包括例如Shendure et al.*Science* 309:1728-1732 (2005)和美国专利No.5,599,675和5,750,341描述的那些,其每一篇都通过引用以其整体并入本文。一些实施例可以包括混合测序过程,例如Bains et al.,*Journal of Theoretical Biology* 135(3),303-7(1988);Drmanac et al.,*Nature Biotechnology* 16,54-58(1998);Fodor et al.,*Science* 251(4995),767-773(1995);和WO 1989/10977,其各自通过引用以其整体并入本文。在连接测序和混合测序过程中,存在于阵列特征处的靶核酸(或其扩增子)经受寡核苷酸递送和检测的重复循环。本文阐述或本文引用的参考文献中所述的用于SBS方法的流体系统可以容易地适用于递送用于连接测序或混合测序过程的试剂。寡核苷酸可以是荧光标记的,并且可以使用荧光检测器检测,所述荧光检测器类似于本文或本文引用的参考文献中关于SBS过程所述的那些。

[0114] 一些实施例可以利用涉及DNA聚合酶活性的实时监测的方法。例如,可以通过携带荧光团的聚合酶和 $\gamma$ -磷酸标记的核苷酸之间的荧光共振能量转移(FRET)相互作用来检测核苷酸并入。用于基于FRET的测序的技术和试剂描述于例如Levene et al.,*Science* 299,682-686(2003);Lundquist et al.,*Opt.Lett.*33,1026-1028(2008);和Korlach et

al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105,1176-1181 (2008),其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0115] 分析物可包含光学可检测的基团。每个特征处的多个分析物可以包含核酸模板的扩增子。此外,分析物可选自核酸、蛋白质、细胞、细胞核、碳水化合物、候选药物和小分子文库的成员组成的组。

[0116] 关于图案,第一特征图案可以在第一平坦平面中,第二特征图案在与第一平面平行的第二平面中。第一特征图案可以在第一弯曲平面中,第二特征图案在第二弯曲平面中。此外,第一图案的每个特征的面积可以与第二图案的每个特征的面积相同。第一图案具有与第二图案相同的间距。在一些实施例中,图案可具有选自包括正方形格子、矩形格子、菱形格子、六边形格子和倾斜格子的组的构造。第一图案和第二图案的特征可以与流体同时流体连通。第一图案的特征可以光学联接到波导,而第二图案的特征基本上不光学联接到波导。在这种情况下,在第一高度 $z_1$ 处检测光学信号可以包括经由波导光学地激发第一图案的分析物特征。第二图案的分析物特征可以基本上不光学联接到波导。

[0117] 此外,如上所述,特征和载体可以在流动池中提供或者可以是流动池的一部分。固体载体的外表面可以与流动池的内腔接触。固体载体可包括流动池的第一窗口,并且流动池可包括平行于第一窗口的第二窗口,第一窗口通过流动池的内腔与第二窗口分离。第二窗口可包括第二外表面,该第二外表面包括沿第二外表面定位的第三轮廓子集以形成第三特征图案和沿第二外表面的第四轮廓子集以形成第四特征图案。在这样的实施例中,第三子集的轮廓可以沿着第二外表面与第四子集的轮廓并置,由此第三图案和第四图案沿着第二外表面形成第二交错图案,并且第三图案的特征出现在第三高度 $z_3$ 处,第四图案的特征出现在第四高度 $z_4$ 处。

[0118] 关于信号以及信号和分析物的检测,检测技术可以是光学的,并且可以包括共焦检测。通过选择性地使光学检测器聚焦到与第一高度 $z_1$ 相比的第二高度 $z_2$ ,可以将第二图案中的分析物特征与第一图案中的最近邻分析物特征区分开。此外,通过选择性地激发与第二高度 $z_2$ 相比的第一高度 $z_1$ 处的发光体,可以将第一图案中的分析物特征与第二图案中的最近邻分析物特征区分开。通过选择性地激发与第一高度 $z_1$ 相比的第二高度 $z_2$ 处的发光体,可以将第二图案中的分析物特征与第一图案中的最近邻分析物特征区分开。同样,分析物特征可包括凹陷、井、通道、凸起、脊或柱。分析物特征还可以或替代地包括井,并且光学信号的检测包括检测井中的分析物。在第一高度 $z_2$ 处检测光学信号可以包括检测在高度 $z_2$ 处具有底部的井中的分析物,并且在第一高度 $z_2$ 处检测光学信号可以包括检测在高度 $z_2$ 处具有底部的井中的分析物。同样,分析物特征可以包括柱,并且光学信号的检测可以包括检测柱顶部上的分析物。在这种情况下,在第一高度 $z_1$ 处检测光学信号可以包括检测在高度 $z_1$ 处具有顶部的柱上的分析物,并且在第一高度 $z_1$ 处检测光学信号可以包括检测在高度 $z_2$ 处具有顶部的柱上的分析物。检测光信号可以包括区分在 $xy$ 平面中具有的面积小于约 $1\mu\text{m}^2$ 的特征。高度 $z_1$ 和 $z_2$ 可以相隔至少约 $2\mu\text{m}$ 。检测可以使用具有的厚度小于约 $2\mu\text{m}$ 的焦平面。在一些实施例中,检测使用焦平面,该焦平面的厚度小于 $z_1$ 和 $z_2$ 之间的距离。

[0119] 而且,对于检测,诸如光学信号的信号的检测可以包括在点扫描、线扫描或步进和拍摄成像的过程中的阵列和光学检测器之间的相对移动。相对移动可以在 $xy$ 维度中。用于检测第一高度 $z_1$ 处的光学信号的相对移动可以与用于检测第二高度 $z_2$ 处的光学信号的相

对移动平行。在固体载体的外表面弯曲的情况下,相对移动可以沿着弯曲平面。用于在第一高度 $z_1$ 处检测光学信号的相对移动可以与用于在第二高度 $z_2$ 处检测光学信号的相对移动同心。

[0120] 如上所述,该技术还可包括使阵列与包含将分析物特征改性的试剂的流体接触,其中第一图案和第二图案的特征与流体同时流体连通。在这种情况下,分析物特征可包括核酸,并且试剂可包括用于核酸测序反应中的试剂。分析物特征可以包括核酸,并且试剂可以包括与核酸混合的互补核酸。

[0121] 应当理解,前述概念的所有组合(假设这些概念不相互矛盾)被认为是本文公开的发明主题的一部分。特别地,出现在本公开结尾处的所要求保护的主题的所有组合被认为是本文公开的发明主题的一部分。

[0122] 在本公开(包括权利要求)中使用的术语“基本上”和“约”用于描述和解释小的波动,诸如由于处理的变化。例如,它们可以指小于或等于 $\pm 5\%$ ,例如小于或等于 $\pm 2\%$ ,例如小于或等于 $\pm 1\%$ ,例如小于或等于 $\pm 0.5\%$ ,例如小于或等于 $\pm 0.2\%$ ,例如小于或等于 $\pm 0.1\%$ ,例如小于或等于 $\pm 0.05\%$ 。

[0123] 在整个申请中,已经引用了各种出版物、专利和专利申请。这些出版物的全部公开内容在此通过引入并入本申请。

[0124] 术语“包括”在本文中旨在是开放式的,不仅包括所列举的元素,还包括任何其他元素。

[0125] 已经描述了许多实施例。然而,应该理解,可以进行各种修改。因此,其他实施例在以下权利要求的范围内。

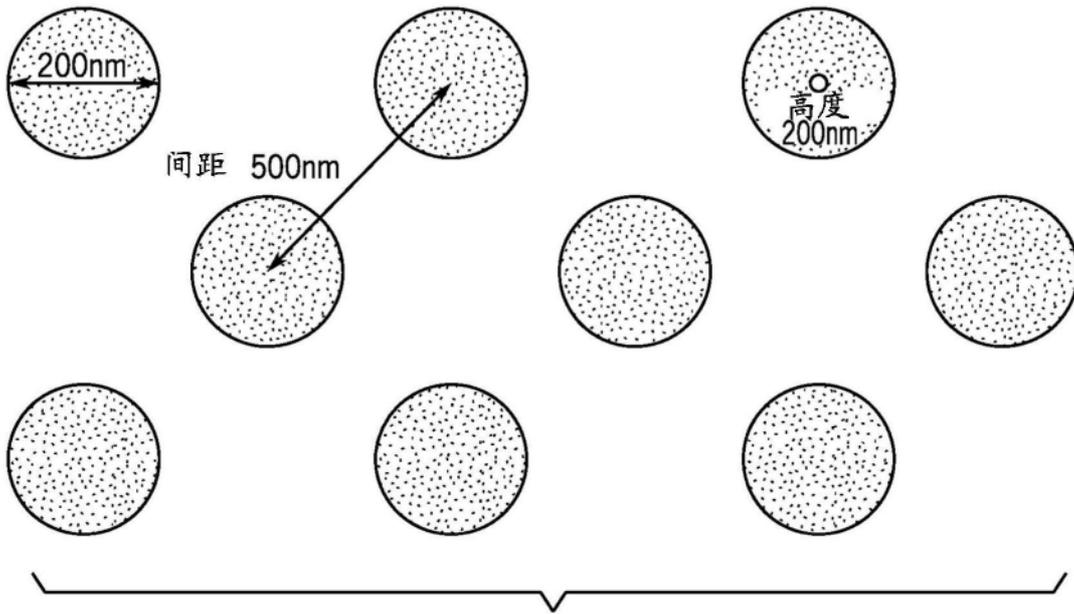


图 1A

图1A

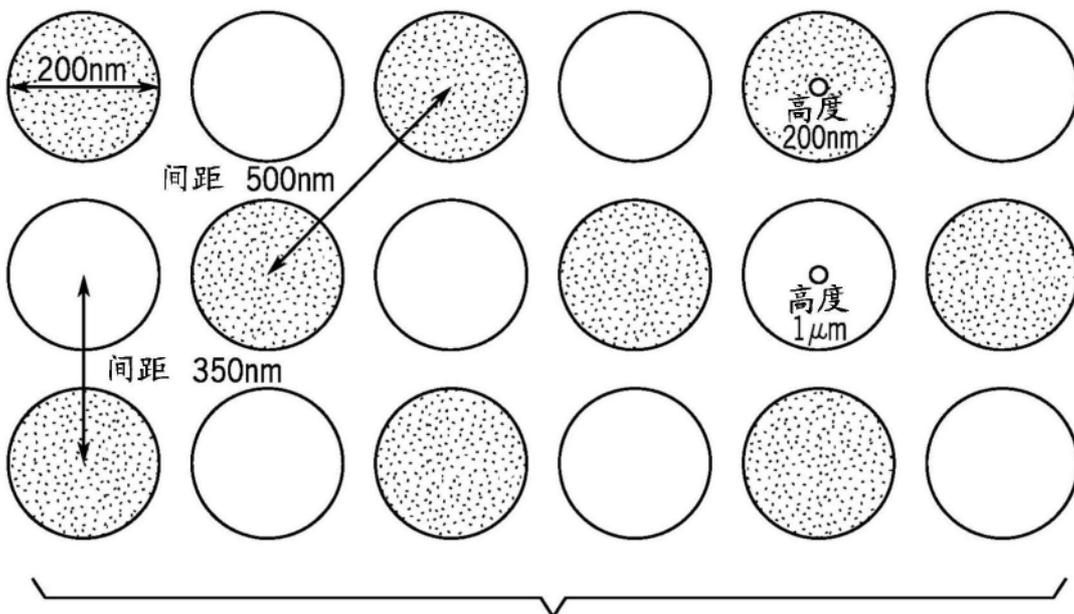


图 1B

图1B

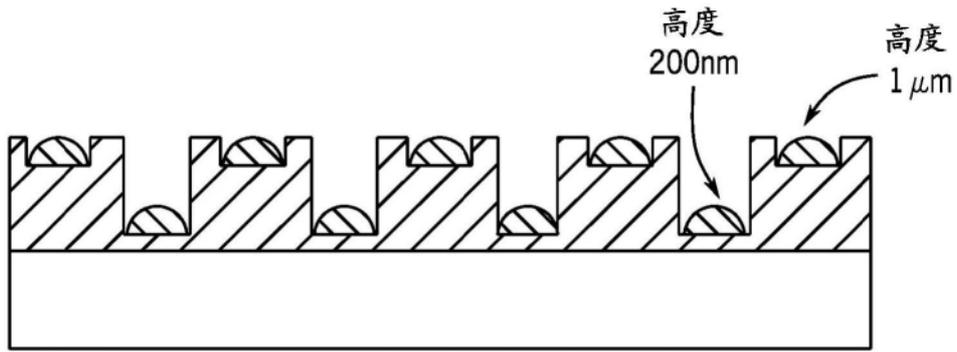


图2

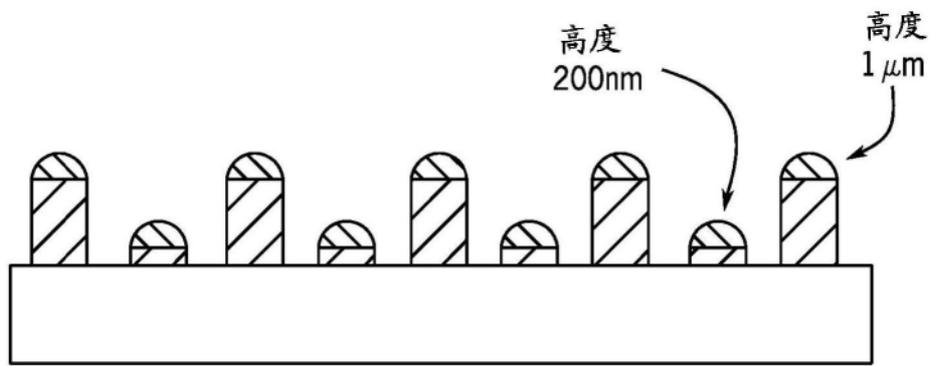


图3

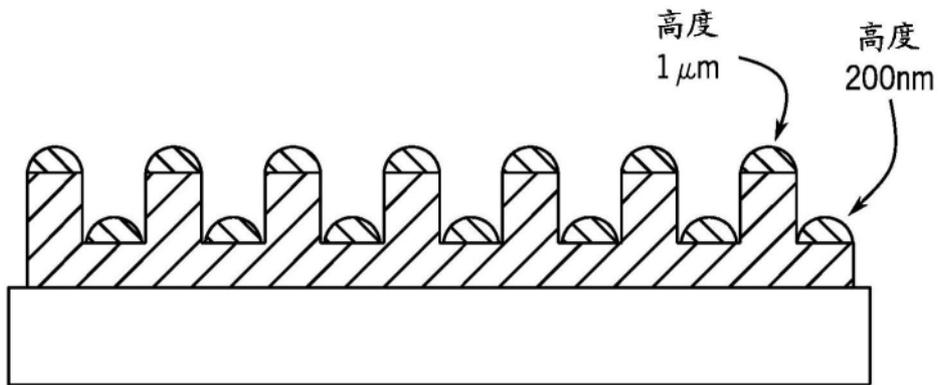


图4

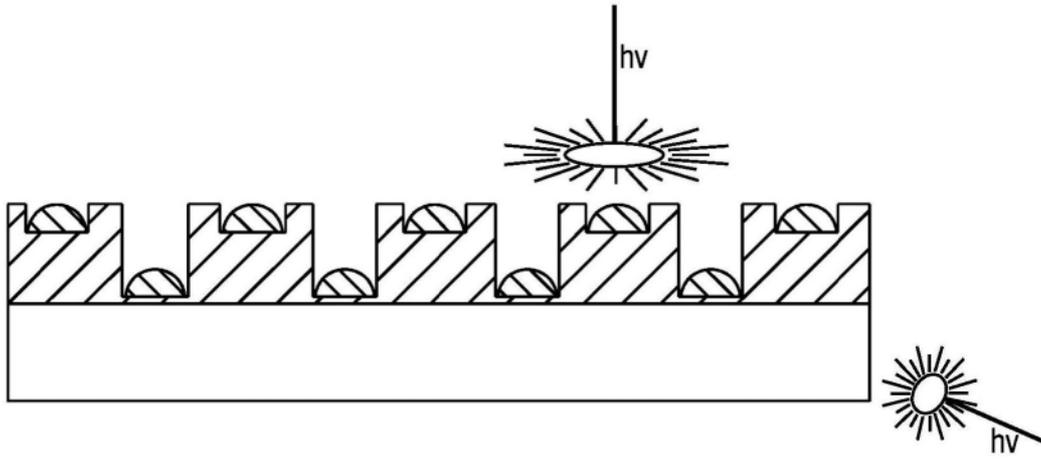


图5