

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290421** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.20

(22) Дата подачи заявки
2020.07.29

(51) Int. Cl. *A61K 35/76* (2015.01)
C12M 1/34 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/554 (2006.01)

(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЫ-МИШЕНИ

(31) **62/881,254**

(32) **2019.07.31**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/044089**

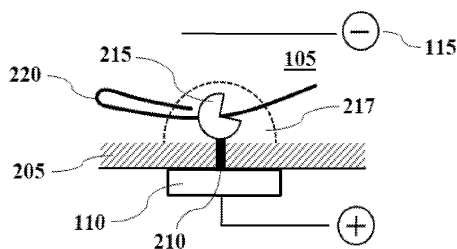
(87) **WO 2021/021944 2021.02.04**

(71) Заявитель:
ЭКСБАЙО ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Иванов Игорь Константинович, Тянь Хуэй (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем раскрытии представлены системы и способы анализа или идентификации молекулы-мишени. Например, система по настоящему раскрытию может содержать (i) сенсорный электрод, (ii) связывающее звено, соединенное с сенсорным электродом и выполненное с возможностью связывания по меньшей мере части молекулы-мишени, и (iii) диэлектрический материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий по меньшей мере часть поверхности сенсорного электрода. Датчик может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим звеном. Один или более сигналов применимы для анализа или идентификации молекулы-мишени.



A1

202290421

202290421

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573192EA/071

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ОЦЕНКИ МОЛЕКУЛЫ-МИШЕНИ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/881254, поданной 31 июля 2019 года, которая полностью включена в данный документ по ссылке.

Предпосылки изобретения

[0002] Секвенирование нуклеиновых кислот можно использовать для предоставления информации о последовательности в образце нуклеиновой кислоты. Такая информация о последовательности может быть полезна для диагностики или лечения состояния (например, заболевания) субъекта (например, индивидуума, особи, пациента и так далее). Например, информацию о последовательности нуклеиновой кислоты субъекта можно использовать для идентификации, диагностики или разработки лечения одного или более генетических заболеваний. В другом примере информация о последовательности нуклеиновой кислоты одного или более патогенов может привести к лечению одного или более инфекционных заболеваний.

[0003] Обнаружение одного или более редких вариантов последовательности (например, мутаций) может быть ценным для здравоохранения. Обнаружение редких вариантов последовательности может быть важным для раннего обнаружения одной или более патологических мутаций. Обнаружение одной или более связанных с раком мутаций (например, точечных мутаций) в клинических образцах может улучшить идентификацию одного или более минимальных остаточных заболеваний во время химиотерапии или обнаружение опухолевых клеток у пациентов с рецидивом. Кроме того, такое обнаружение мутации(й) может быть важным для оценки воздействия мутагенов окружающей среды, мониторинга репарации эндогенной ДНК или изучения накопления одной или более соматических мутаций у стареющих людей. Обнаружение редкого варианта(ов) последовательностей может улучшить пренатальную диагностику и обеспечить возможность определения характеристик фетальных клеток, присутствующих в материнской крови.

[0004] Альтернативно или дополнительно, обнаружение малых молекул и/или полипептидов (например, факторов роста, ферментов и так далее) в биологическом образце (например, крови, моче, биопсии ткани и так далее) можно использовать для идентификации или мониторинга одного или более состояний здоровья, таких как рак.

Сущность изобретения

[0005] В одном аспекте настоящего раскрытия представлена система для анализа или идентификации молекулы-мишени, содержащая: датчик, содержащий (i) сенсорный электрод, (ii) связывающее звено, соединенное с сенсорным электродом и выполненное с возможностью связывания по меньшей мере части молекулы-мишени, и (iii) диэлектрический материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий по

меньшей мере часть поверхности сенсорного электрода, причем датчик выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим звеном, причем упомянутые один или более сигналов применимы для анализа или идентификации молекулы-мишени.

[0006] В некоторых вариантах осуществления один или более сигналов указывают на один или более элементов, включая: (i) электрическое сопротивление или его изменение в датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в датчике, и (iii) электрическую индуктивность или ее изменение в датчике.

[0007] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем один или более сигналов представляют собой ток или напряжение. В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем один или более сигналов не являются туннельным током.

[0008] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем средний размер сечения сенсорного электрода не более чем в 20 раз превышает средний размер молекулы-мишени. В некоторых вариантах осуществления средний размер сечения сенсорного электрода не более чем в 2 раза превышает средний размер молекулы-мишени.

[0009] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем средний размер сечения сенсорного электрода меньше среднего размера молекулы-мишени.

[0010] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем связывающее звено соединено с сенсорным электродом через проводящий материал.

[0011] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем диэлектрический материал представляет собой самособирающийся монослой.

[0012] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем молекула-мишень содержит метку, и эта метка выполнена с возможностью вызывать изменение одного или более сигналов.

[0013] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем датчик дополнительно содержит электрод сравнения, электрически связанный с сенсорным электродом, причем один или более сигналов указывают на импеданс или изменение импеданса между сенсорным электродом и электродом сравнения. В некоторых вариантах осуществления сенсорный электрод и электрод сравнения выполнены с возможностью обеспечения первого электрического поля вдоль первого направления, и система дополнительно содержит дополнительный генератор электрического поля, выполненный с возможностью приложения второго электрического поля вдоль второго направления, которое отличается от первого направления. В некоторых вариантах осуществления второе направление практически перпендикулярно первому направлению.

[0014] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем

датчик дополнительно выполнен с возможностью определения времени нахождения по меньшей мере части молекулы-мишени на связывающем звене.

[0015] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем связывающее звено содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, фермента, антитела, его функционального фрагмента и его функционального варианта.

[0016] В некоторых вариантах осуществления любой из рассматриваемых систем молекула-мишень содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида и их варианта.

[0017] В другом аспекте настоящего раскрытия представлен набор для анализа или идентификации молекулы-мишени, содержащий: (i) любую из рассматриваемых систем, содержащих датчик, и (ii) инструкции для обеспечения образца, подлежащего анализу датчиком, причем образец содержит или предположительно имеет молекулу-мишень.

[0018] В еще одном аспекте настоящего раскрытия представлен способ анализа или идентификации молекулы-мишени, включающий: (a) обеспечение датчика, содержащего (i) сенсорный электрод, (ii) связывающее звено, соединенное с сенсорным электродом и выполненное с возможностью связывания по меньшей мере части молекулы-мишени, и (iii) диэлектрический материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий по меньшей мере часть поверхности сенсорного электрода; (b) детектирование одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда упомянутая по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим звеном; и (c) использование одного или более сигналов для анализа или идентификации молекулы-мишени.

[0019] В некоторых вариантах осуществления один или более сигналов указывают на один или более элементов, включая: (i) электрическое сопротивление или его изменение в датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в датчике, и (iii) электрическую индуктивность или ее изменение в датчике.

[0020] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов один или более сигналов представляют собой ток или напряжение. В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов один или более сигналов не являются туннельным током.

[0021] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов средний размер сечения сенсорного электрода не более чем в 20 раз превышает средний размер молекулы-мишени. В некоторых вариантах осуществления средний размер сечения сенсорного электрода не более чем в 2 раза превышает средний размер молекулы-мишени.

[0022] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов средний размер сечения сенсорного электрода меньше среднего размера молекулы-мишени.

[0023] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов связывающее звено соединено с сенсорным электродом через проводящий материал.

[0024] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов диэлектрический материал представляет собой самособирающийся монослой.

[0025] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов молекула-мишень содержит метку, причем метка выполнена с возможностью вызывать изменение одного или более сигналов.

[0026] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов датчик дополнительно содержит электрод сравнения, электрически связанный с сенсорным электродом, и один или более сигналов указывают на импеданс или изменение импеданса между сенсорным электродом и электродом сравнения. В некоторых вариантах осуществления сенсорный электрод и электрод сравнения обеспечивают первое электрическое поле вдоль первого направления, и способ дополнительно включает использование дополнительного генератора электрического поля для приложения второго электрического поля вдоль второго направления, которое отличается от первого направления. В некоторых вариантах осуществления второе направление практически перпендикулярно первому направлению.

[0027] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов способ дополнительно включает определение времени нахождения по меньшей мере части молекулы-мишени на связывающем звене.

[0028] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов связывающее звено содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, фермента, антитела, его функционального фрагмента и его функционального варианта.

[0029] В некоторых вариантах осуществления любого из рассматриваемых способов молекула-мишень содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида и их варианта.

[0030] Дополнительные аспекты и преимущества настоящего раскрытия станут легко понятны специалистам в данной области техники из следующего подробного описания, в котором показаны и описаны только иллюстративные варианты осуществления настоящего раскрытия. Как будет понятно, настоящее раскрытие допускает другие и разные варианты осуществления, и некоторые его детали допускают модификации в различных очевидных аспектах, все без отклонения от раскрытия. Соответственно, чертежи и описание следует рассматривать как иллюстративные по своему характеру, а не как ограничительные.

Включение по ссылке

[0031] Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в этом описании, включены в данный документ по ссылке в той же степени, как если бы каждая отдельная

публикация, патент или заявка на патент были специально и отдельно указаны включенными по ссылке. В тех случаях, когда включенные по ссылке публикации и патенты или заявки на патенты противоречат раскрытию, содержащемуся в этом описании, описание предназначено превалировать над и/или иметь преимущество перед любым таким противоречащим материалом.

Краткое описание чертежей

[0032] Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Более хорошее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к следующему подробному описанию, излагающему иллюстративные варианты осуществления, в которых использованы принципы изобретения, и прилагаемым чертежам (также «фигура» и «фиг.» здесь), на которых:

[0033] фиг. 1A-1E схематично показывают пример датчика для анализа или идентификации молекулы-мишени;

[0034] фиг. 2A-2E схематично показывают другой пример датчика для анализа или идентификации молекулы-мишени;

[0035] фиг. 3 схематично показывает пример датчика с изменяемой высотой канала;

[0036] фиг. 4A и 4B схематично показывают пример датчика с дополнительным генератором электрического поля;

[0037] фиг. 5A и 5B схематично показывают пример датчика, выполненного с возможностью детектирования окислительно-восстановительного потенциала молекулы-мишени;

[0038] фиг. 6 показывает компьютерную систему, которая запрограммирована или иным образом выполнена с возможностью реализации представленных здесь способов; и

[0039] фиг. 7 показывает примерный процесс анализа или идентификации молекулы-мишени.

Подробное описание

[0040] Хотя здесь показаны и описаны различные варианты осуществления изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в данной области техники могут прийти в голову многочисленные вариации, изменения и замены без отклонения от изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы описанным здесь вариантам осуществления изобретения.

[0041] Используемые в описании и формуле изобретения формы единственного числа могут включать множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, термин «трансмембранный рецептор» может включать в себя множество трансмембранных рецепторов.

[0042] Используемый здесь термин «примерно» или «приблизительно» может относиться к допустимому для конкретного значения диапазону погрешности,

определяемому специалистом в данной области техники, который будет частично зависеть от того, как измеряют или определяют это значение, т.е. от ограничений системы измерения. Например, «примерно» может означать стандартное отклонение в пределах 1 или более чем 1, согласно практике в данной области техники. Альтернативно, «примерно» может означать диапазон до 20%, до 10%, до 5% или до 1% от данного значения. Альтернативно, особенно в отношении биологических систем или процессов, этот термин может означать в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратного, а более предпочтительно – в пределах 2-кратного значения. В тех случаях, когда в заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, следует исходить из того, что термин «примерно» означает в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретного значения.

[0043] Используемый здесь термин «диэлектрический материал» относится к электроизоляционному материалу, который может быть поляризован под действием приложенного электрического поля. Когда диэлектрический материал помещают в электрическое поле, электрические заряды не могут проходить через диэлектрический материал. В некоторых случаях в таком электрическом поле диэлектрический материал может демонстрировать диэлектрическую поляризацию, при которой положительные заряды могут смещаться по электрическому полю, а отрицательные заряды могут сдвигаться в противоположном направлении, создавая тем самым внутри диэлектрического материала внутреннее электрическое поле, которое может частично компенсировать внешнее электрическое поле. Примеры диэлектрического материала могут включать, но не ограничиваясь ими, сложный полиэфир, полиэтилен, полипропилен, ткань (такую как нейлон), бумагу, ламинат, стекло, самособирающийся монослой (ССМ) и так далее.

[0044] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «самособирающийся монослой» и «ССМ» относятся к упорядоченной или относительно упорядоченной сборке (например, одному или более слоям) молекул, адсорбированных на поверхности (например, на поверхности электрода). Множество молекул в ССМ могут быть ориентированы приблизительно параллельно друг другу. Множество молекул в ССМ могут располагаться приблизительно перпендикулярно поверхности. Каждая из молекул может содержать функциональную группу, выполненную с возможностью прилипания к поверхности, и часть, выполненную с возможностью взаимодействия с одной или более соседними молекулами (например, посредством гидрофобных взаимодействий) в ССМ с образованием относительно упорядоченного массива. Функциональная группа может быть выполнена с возможностью ковалентного или нековалентного связывания с поверхностью. В одном примере функциональной группой может быть тиол, который ковалентно связывается с поверхностью металла, такой как поверхность золота. В некоторых случаях ССМ может состоять из одной популяции молекул или смешанной популяции молекул. Смешанная популяция молекул может предоставлять (открывать) множество дополнительных функциональных возможностей (например, биологических

функциональных возможностей, связывающих фрагментов и так далее). В некоторых вариантах осуществления ССМ можно использовать в датчике (например, биосенсоре, химическом датчике и так далее) для обнаружения молекул (например, малых молекул, биологических молекул и так далее) в образце, таком как биологический образец. Примеры ССМ могут включать, но не ограничиваясь ими, 3-меркаптопропилтриметоксисилан (ЗМРТ), 3-аминопропилтриметоксисилан (APTES), п-аминофенилтриметоксисилан (APTS) и 4-[2-(триэтоксисилил)этил]пиридин. В некоторых случаях один или более проводящих материалов могут быть смешаны в ССМ и в контакте с поверхностью.

[0045] Используемый здесь термин «проводящий материал» может относиться к любому материалу, который способен проводить электрический ток, металлам (например, вольфрам, титан, тантал, алюминий, медь) и неметаллам (например, проводящие малые молекулы или проводящие полимеры). Примеры проводящих полимеров могут включать полианилин, полипиррол, политиофен (например, поли(3,4-этилендиокситиофен)), полифуран, полифенилен (например, поли(п-фениленвинилен)), их функциональные варианты и их комбинации. В некоторых случаях степень полимеризации проводящего полимера может находиться в диапазоне от 10 до 100000 мономерных звеньев.

[0046] Используемый здесь термин «связывающее звено» в общем относится к молекуле, способной взаимодействовать (например, связывать) одну или более молекулами-мишеней. Такое связывание может быть ковалентным и/или нековалентным (например, водородное связывание, гидрофобные взаимодействия и так далее). Взаимодействие между связывающим звеном и молекулой-мишенью (молекулами-мишенями) может быть обратимым или необратимым. Альтернативно или дополнительно, связывающее звено может быть выполнено с возможностью связывания метки (или зонда), который соединен с молекулой-мишенью. Молекулой-мишенью может быть биомолекула. Молекулой-мишенью может быть клетка или один или более компонентов или производных клетки.

[0047] Используемый здесь термин «биомолекула» может относиться к любой молекуле, встречающейся в биологической системе, ее производному или ее функциональному варианту. Биомолекула может быть естественного происхождения или быть результатом внешнего нарушения системы (например, заболевания, отравления, генетических манипуляций и так далее), а также ее синтетическими аналогами и производными. Неограничивающие примеры биомолекул могут включать аминокислоты (существующие в природе или синтетические), пептиды, полипептиды, гликозилированные и негликозилированные белки (например, поликлональные и моноклональные антитела, рецепторы, интерфероны, ферменты и так далее), нуклеозиды, нуклеотиды, олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды ДНК, РНК, ПНК), полинуклеотиды (например, ДНК, кДНК, РНК и так далее), углеводы, гормоны, гаптены, стероиды, токсины и так далее. Биомолекулы могут быть выделены из естественных источников, или они могут быть синтетическими.

[0048] Используемый здесь термин «клетка» в общем относится к биологической

клетке или производному клетки. Клетка может быть основной структурной, функциональной и/или биологической единицей живого организма. Клетка может происходить из любого организма, имеющего одну или более клеток. Некоторые неограничивающие примеры включают: прокариотические клетки, эукариотические клетки, бактериальные клетки, клетки архей, клетки одноклеточных эукариотических организмов, клетки простейших, клетки растений (например, клетки сельскохозяйственных культур, фруктов, овощей, зерновых, соевых бобов, кукурузы, маиса, пшеницы, семян, помидоров, риса, маниока, сахарного тростника, тыквы, сена, картофеля, хлопка, каннабиса, табака, цветковых растений, хвойных деревьев, голосеменных растений, папоротников, плаунов, роголистников, печеночников, мхов), клетки водорослей (например, *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Annochloropsis gaditana*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Sargassum patens* C. Agardh и тому подобное), морских водорослей (например, ламинарии), клетки грибов (например, дрожжевые клетки, клетки из гриба), клетки животных, клетки беспозвоночных животных (например, дрозофил, кишечнополостных, иглокожих, нематод и так далее), клетки позвоночных животных (например, рыб, амфибий, рептилий, птиц, млекопитающих), клетки из млекопитающего (например, свиньи, коровы, козы, овцы, грызуна, крысы, мыши, нечеловекообразного примата, человека и так далее) и так далее. Иногда клетка не происходит из природного организма (например, клетка может быть получена синтетически, иногда ее называют искусственной клеткой).

[0049] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «нуклеотид», «азотистое основание» и «основание» в общем относятся к комбинации основание-сахар-фосфат. Нуклеотид может включать в себя синтетический нуклеотид. Нуклеотид может включать в себя аналог синтетического нуклеотида. Нуклеотиды могут представлять собой мономерные звенья последовательности нуклеиновой кислоты (например, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК)). Термин нуклеотид может включать рибонуклеозидтрифосфаты, аденозинтрифосфат (АТФ), уридинтрифосфат (УТФ), цитозинтрифосфат (СТФ), гуанозинтрифосфат (ГТФ), уридинтрифосфат (УТФ) и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, такие как dATP, dCTP, dGTP, dTTP или их производные. Такие производные могут включать, например, [α S]dATP, 7-деаза-dGTP и 7-деаза-dATP, и производные нуклеотидов, придающие нуклеазную устойчивость содержащей их молекуле нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «нуклеотид» в общем относится к дидеоксирибонуклеозидтрифосфатам (ddNTP) и их производным. Иллюстративные примеры дидеоксирибонуклеозидтрифосфатов могут включать, но не ограничиваясь ими, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP и ddTTP. Нуклеотид может быть немеченым или детектируемо меченым (меченым детектируемыми метками). Мечение также можно проводить квантовыми точками. Детектируемые метки могут включать, например, радиоактивные изотопы, флуоресцентные метки, хемилюминесцентные метки, биолюминесцентные метки и ферментные метки. Флуоресцентные метки нуклеотидов

могут включать, но не ограничиваясь ими, флуоресцеин, 5-карбоксифлуоресцеин (FAM), 2'7'-диметокси-4'5'-дихлор-6-карбоксифлуоресцеин (JOE), родамин, 6-карбоксиродамин (R6G), N,N,N',N'-тетраметил-6-карбоксиродамин (TAMRA), 6-карбокси-X-родамин (ROX), 4-(4'-диметиламинофенилазо)бензойную кислоту (DABCYL), Cascade Blue, Oregon Green, Texas Red, цианин и 5-(2'-аминоэтил)аминонафталин-1-сульфо кислоту (EDANS). Конкретные примеры флуоресцентно меченых нуклеотидов могут включать [R6G]dUTP, [TAMRA]dUTP, [R110]dCTP, [R6G]dCTP, [TAMRA]dCTP, [JOE]ddATP, [R6G]ddATP, [FAM]ddCTP, [R110]ddCTP, [TAMRA]ddGTP, [ROX]ddTTP, [dR6G]ddATP, [dR110]ddCTP, [dTAMRA]ddGTP и [dROX]ddTTP, доступные от Perkin Elmer, Foster City, Calif; дезоксинуклеотиды FluoroLink, FluoroLink Cy3-dCTP, FluoroLink Cy5-dCTP, FluoroLink Fluor X-dCTP, FluoroLink Cy3-dUTP и FluoroLink Cy5-dUTP, доступные от Amersham, Arlington Heights, IL; Флуоресцеин-15-dATP, флуоресцеин-12-dUTP, тетраметилродамин-6-dUTP, IR770-9-dATP, флуоресцеин-12-ddUTP, флуоресцеин-12-UTP и флуоресцеин-15-2'-dATP, доступные от Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.; и меченные хромосомами нуклеотиды, BODIPY-FL-14-UTP, BODIPY-FL-4-UTP, BODIPY-TMR-14-UTP, BODIPY-TMR-14-dUTP, BODIPY-TR-14-UTP, BODIPY-TR-14-dUTP, Cascade Blue-7-UTP, Cascade Blue-7-dUTP, флуоресцеин-12-UTP, флуоресцеин-12-dUTP, орегонский зеленый 488-5-dUTP, родамин зеленый-5-UTP, родамин зеленый-5-dUTP, тетраметилродамин-6-UTP, тетраметилродамин-6-dUTP, Texas Red-5-UTP, Texas Red-5-dUTP и Texas Red-12-dUTP, доступные от Molecular Probes, Eugene, Oreg. Нуклеотиды также могут быть мечены или маркированы путем химической модификации. Химически модифицированный одиночный нуклеотид может представлять собой биотин-dNTP. Некоторые неограничивающие примеры биотинилированных dNTP могут включать биотин-dATP (например, био-N6-ddATP, биотин-14-dATP), биотин-dCTP (например, биотин-11-dCTP, биотин-14-dCTP) и биотин-dUTP (например, биотин-11-dUTP, биотин-16-dUTP, биотин-20-dUTP).

[0050] Существующие в природе нуклеотиды гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил могут соответственно обозначаться буквами G, C, A, T и U (Г, Ц, А, Т и У). Нуклеотид может содержать любую субъединицу, которая может быть включена в растущую цепь нуклеиновой кислоты. Такой субъединицей может быть А, С, G, Т или U, или любая другая субъединица, специфичная к одному или более комплементарным А, С, G, Т или U, или комплементарная пурины (т.е. А или G или их варианту) или пиримидину (т.е. С, Т или U или их варианту). Субъединица может обеспечивать разделение отдельных оснований нуклеиновых кислот или групп оснований (например, AA, ТА, АТ, GC, CG, СТ, ТС, GT, TG, AC, CA или их урациловых аналогов).

[0051] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «олигомер» и «нуклеиновая кислота» в общем относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов, в одно-, двух- или многоцепочечной форме. Полинуклеотид может быть экзогенным или эндогенным по отношению к клетке. Полинуклеотид может существовать

в бесклеточной среде. Полинуклеотид может представлять собой ген или его фрагмент. Полинуклеотид может представлять собой ДНК. Полинуклеотид может представлять собой РНК. Полинуклеотид может иметь любую трехмерную структуру и может выполнять любую функцию. Полинуклеотид может содержать один или более аналогов (например, измененный остов, сахар или азотистое основание). Модификации структуры нуклеотидов, если они присутствуют, могут быть внесены до или после сборки полимера. Некоторые неограничивающие примеры аналогов включают: 5-бромоурацил, пептидную нуклеиновую кислоту, ксенонуклеиновую кислоту, морфолино, закрытые нуклеиновые кислоты, гликолевые нуклеиновые кислоты, треозонуклеиновые кислоты, дидеоксинуклеотиды, кордицепин, 7-деаза-GTP, флуорофоры (например, родамин или флуоресцеин, связанный с сахаром), тиолсодержащие нуклеотиды, связанные с биотином нуклеотиды, флуоресцентные аналоги оснований, CpG-островки, метил-7-гуанозин, метилированные нуклеотиды, инозин, тиюридин, псевдоурдин, дигидроуридин, квеуозин и виозин. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определенные с помощью анализа сцепления, экзоны, интроны, матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), рибосомную РНК (рРНК), короткую интерферирующую РНК (киРНК), короткошпилечную РНК (кшРНК), микроРНК (миРНК), рибозимы, комплементарную ДНК (кДНК, такую как двухцепочечная кДНК (дц-кДНК) или одноцепочечная кДНК (оц-кДНК), циркулирующую опухолевую ДНК (цоДНК), поврежденную ДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, бесклеточные полинуклеотиды, включая внеклеточную ДНК (cfDNA или вкДНК) и внеклеточную РНК (cfRNA или вкРНК), зонды на основе нуклеиновой кислоты (например, зонды флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH)) и праймеры. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может содержать один или более модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов. Модификации структуры нуклеотидов, если они присутствуют, могут быть внесены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом.

[0052] Используемый здесь термин «ген» в общем относится к нуклеиновой кислоте (например, ДНК, такой как геномная ДНК и кДНК) и ее соответствующей нуклеотидной последовательности, которая вовлечена в кодирование транскрипта РНК. Используемый здесь термин «ген» со ссылкой на геномную ДНК может включать промежуточные, не кодирующие области, а также регуляторные области, и может включать 5'- и 3'-концы. В некоторых вариантах применения этот термин включает в себя транскрибируемые последовательности, включая 5'- и 3'-нетранслируемые области (5'-UTR и 3'-UTR), экзоны и интроны. В некоторых генах транскрибируемая область будет

содержать «открытые рамки считывания», кодирующие полипептиды. В некоторых вариантах применения этого термина «ген» включает только кодирующие последовательности (например, «открытую рамку считывания» или «кодирующую область»), необходимые для кодирования полипептида. Гены могут не кодировать полипептид, например, гены рибосомной РНК (рРНК) и гены транспортной РНК (тРНК). Термин «ген» может включать не только транскрибируемые последовательности, но и нетранскрибируемые области, в том числе до и после регуляторных областей, энхансеры и промоторы. Ген может быть «эндогенным геном» или нативным геном в его естественном расположении в геноме организма. Ген может быть «экзогенным геном» или ненативным геном. Ненативным геном может быть ген, обычно не встречающийся в организме-хозяине, но который вводят в организм-хозяин путем переноса генов (например, трансген). Ненативный ген может иметь последовательность нуклеиновой кислоты естественного происхождения или полипептидную последовательность, которая содержит мутации, вставки и/или делеции (например, ненативную последовательность).

[0053] Используемый здесь термин «мутация» в общем относится к изменению последовательности нуклеотидов обычно консервативной последовательности нуклеиновой кислоты, приводящему к образованию мутанта, отличающегося от нормальной (неизменной) последовательности или последовательности дикого типа. Перед секвенированием положение (например, относительно гена или полинуклеотида образца) и последовательность мутации могут быть неопределенными. Альтернативно, перед секвенированием положение (например, относительно гена или полинуклеотида образца) и последовательность мутации могут быть определенными, и в этом случае секвенирование может выполняться для обнаружения наличия или отсутствия мутации в полинуклеотиде образца. Мутация может содержать замену пары оснований (например, замену одного нуклеотида) и мутацию со сдвигом рамки. Мутация со сдвигом рамки может потребовать вставки или делеции от одной до нескольких пар нуклеотидов.

[0054] Используемый здесь термин «зонд» в общем относится к нуклеотиду или полинуклеотиду, который помечен маркером (например, флуоресцентным маркером), пригодным для обнаружения или идентификации соответствующего ему нуклеотида- или полинуклеотида-мишени в реакции гибридизации путем гибридизации с соответствующей последовательностью-мишенью. Используемые здесь взаимозаменяемо термины «нуклеотидный зонд», «нуклеотидная метка» и «меченый нуклеотид» в общем относятся к зонду, имеющему один единственный нуклеотид. Используемые здесь взаимозаменяемо термины «полинуклеотидный зонд», «полинуклеотидная метка» и «меченый полинуклеотид» в общем относятся к зонду, имеющему полинуклеотид. Полинуклеотидный зонд может быть помечен по меньшей мере одним маркером (например, одним маркером на каждый нуклеотид полинуклеотидного зонда). Зонд может быть гибридизируемым с одним или более нуклеотидами- или полинуклеотидами-мишенями. Полинуклеотидный зонд может быть полностью комплементарным одному или более полинуклеотидам-мишеням в образце или может содержать один или более

нуклеотидов, которые не являются комплементарными (то есть не совпадают) с одним или более нуклеотидами упомянутых одного или более полинуклеотидов-мишеней в образце.

[0055] В некоторых вариантах осуществления маркер может представлять собой окислительно-восстановительное вещество. Используемый здесь термин «окислительно-восстановительное вещество» в общем относится к молекуле или соединению или ее/его части (например, молекулярному или функциональному фрагменту молекулы или соединения), которые могут окисляться и/или восстанавливаться (то есть «окисляться-восстанавливаться») во время или после электрической стимуляции (например, во время или при приложении электрического потенциала) или могут подвергаться реакции Фарадея. В одном примере окислительно-восстановительное вещество может содержать один или более молекулярных фрагментов, которые принимают и/или отдают один или более электронов в зависимости от их состояния окисления-восстановления. В некоторых случаях окислительно-восстановительное вещество может образовать часть (например, молекулярный фрагмент) малой молекулы, соединения, полимерной молекулы или может существовать в виде отдельной молекулы или соединения. Примеры окислительно-восстановительного вещества могут включать имидазолий, пирролидиний, тетраалкиламмоний, [OTf]-, [FAP]-, [PF₆]-, [BF₄]-, [DCA]-, [NTf₂]-, [FSI]-, [B(CN)₄]-, ферроцен (Fc), их производные, их функциональные варианты и их комбинации. Примеры производных Fc могут включать метилферроцен, диметилферроцен, этилферроцен, пропилферроцен, н-бутилферроцен, трет-бутилферроцен и 1,1-дикарбоксилатферроцен.

[0056] Идентичные нуклеотиды могут быть мечены одинаковым маркером. Альтернативно, идентичные нуклеотиды могут быть мечены разными маркерами. Например, первый нуклеотид А может быть мечены первым маркером, а второй нуклеотид А – вторым маркером, причем первый маркер и второй маркер разные. В случаях, когда датчик может обнаруживать и различать первый маркер и второй маркер отдельно друг от друга, использование множества маркеров для одного и того же нуклеотида может помочь выявить последовательность идентичных нуклеотидов, которые представлены последовательным образом.

[0057] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «комплемент», «комплементы», «комплементарный» и «комплементарность» в общем относятся к последовательности, полностью комплементарной к и гибридизируемой с данной последовательностью. Последовательность, гибридизованная с данной нуклеиновой кислотой, называется «комплементом» или «обратным комплементом» данной молекулы, если ее последовательность оснований в данной области техники способна комплементарно связывать последовательности ее партнера по связыванию так, чтобы образовать, например, пары оснований А-Т, А-У, G-С и G-У. Обычно первая последовательность, гибридизируемая со второй последовательностью, специфически или избирательно гибридизируется со второй последовательностью, так что гибридизация со второй последовательностью или набором вторых последовательностей предпочтительна

(например, термодинамически более стабильна при данном наборе условий, таких как жесткие условия, обычно используемые в данной области техники) по отношению к гибридизации с нецелевыми последовательностями во время реакции гибридизации. Обычно, гибридизируемые последовательности имеют общую степень комплементарности последовательностей по всей или части их соответствующих длин, например, комплементарность 25%-100%, включая комплементарность последовательностей по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%. Соответствующие длины могут содержать область из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов. Идентичность последовательностей, например, с целью оценки комплементарности в процентах, может быть измерена с помощью любого подходящего алгоритма выравнивания, включая, но не ограничиваясь ими, алгоритм Нидлмана-Вунша (см., например, выравниватель игл EMBOSS, доступный на сайте www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html, опционально с настройками по умолчанию), алгоритм BLAST (см., например, инструмент выравнивания BLAST, доступный по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, опционально с настройками по умолчанию) или алгоритм Смита-Уотермана (см., например, выравниватель EMBOSS Water, доступный на сайте www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html, опционально с настройками по умолчанию). Оптимальное выравнивание можно оценить, используя любые подходящие параметры выбранного алгоритма, включая параметры по умолчанию.

[0058] Комплементарность может быть совершенной или существенной/достаточной. Совершенная комплементарность между двумя нуклеиновыми кислотами может означать, что две нуклеиновые кислоты могут образовать дуплекс, причем каждое основание в дуплексе связано с комплементарным основанием посредством спаривания Уотсона-Крика. Существенная или достаточная комплементарность может означать, что последовательность в одной цепи не является полностью и/или совершенно комплементарной последовательности в противоположной цепи, но что между основаниями в двух цепях происходит достаточное связывание с образованием стабильного гибридного комплекса при наборе условий гибридизации (например, температуре и концентрации соли). Такие условия можно предсказать, используя последовательности и стандартные математические расчеты для прогнозирования T_m гибридизированных цепей или путем эмпирического определения T_m с использованием обычных методов.

[0059] Используемый здесь термин «гибридизация» в общем относится к реакции, в которой один или более полинуклеотидов реагируют с образованием комплекса, стабилизированного посредством водородного связывания между основаниями нуклеотидных остатков. Водородное связывание может происходить за счет спаривания оснований по Уотсону-Крику, связывания Хугштейна или любым другим специфическим

к последовательности способом в соответствии с комплементарностью оснований. Комплекс может содержать две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепи, образующие многоцепочечный комплекс, одну самогибридирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может представлять собой стадию более обширного процесса, такого как инициация ПЦР или ферментативное расщепление полинуклеотида эндонуклеазой. Вторая последовательность, комплементарная первой последовательности, может называться «комплементом» первой последовательности. Термин «гибридируемый» применительно к полинуклеотиду обычно относится к способности полинуклеотида образовывать комплекс, который стабилизируется за счет образования водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков в реакции гибридизации.

[0060] Используемый здесь термин «полинуклеотид-мишень» в общем относится к молекуле нуклеиновой кислоты или полинуклеотиду в популяции молекул нуклеиновой кислоты с последовательностью-мишенью, в которой желательно определить наличие, количество и/или нуклеотидную последовательность, или изменения в одном или более из них. Термин «последовательность-мишень» в общем относится к последовательности нуклеиновой кислоты на одной цепи нуклеиновой кислоты. Последовательность-мишень может быть частью гена, регуляторной последовательности, геномной ДНК, кДНК, цоДНК, РНК, включая мРНК, миРНК, рРНК или другие. Последовательность-мишень может быть последовательностью-мишенью из образца или вторичной мишенью, такой как продукт реакции амплификации. Полинуклеотид-мишень может быть частью гена (или его фрагмента), который содержит одну или более мутаций.

[0061] Используемый здесь термин «сайт-мишень» в общем относится к полинуклеотидной последовательности, которая содержит полинуклеотид-мишень (или нуклеотид-мишень). Полинуклеотид-мишень (или нуклеотид-мишень) сайта-мишени может быть одним или более вариантов последовательности. Примеры одного или более вариантов последовательности могут включать в себя вариацию одного нуклеотида, вставку или делецию одного или более нуклеотидов (например, последовательных или непоследовательных нуклеотидов), вариацию числа копий (CNV), содержащую один или более повторов одного или более нуклеотидов (например, CNV со средним размером по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 или более тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.); CNV со средним размером самое большее 200, 150, 100, 50, 10, 5, 1 или менее т.п.н.) и микросателлитную нестабильность (MSI). Сайт-мишень может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000 или более нуклеотидов. Сайт-мишень может содержать самое большее 500000, 100000, 50000, 10000, 5000, 1000, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотид. Сайт-мишень может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000 или более нуклеотидов, чем полинуклеотид-мишень. Сайт-мишень может содержать самое большее 500000, 100000, 50000, 10000, 5000, 1000,

500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотид, чем полинуклеотид-мишень. В некоторых примерах сайтом-мишенью может быть полинуклеотид-мишень.

[0062] Используемый здесь термин «жесткое условие» в общем относится к одному или более условиям гибридизации, при которых нуклеиновая кислота, обладающая комплементарностью к последовательности-мишени, преимущественно гибридизируется с последовательностью-мишенью и практически не гибридизируется с нецелевыми последовательностями. Жесткие условия могут зависеть от последовательности и могут меняться в зависимости от ряда факторов. В некоторых случаях, чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой последовательность может специфически гибридизоваться со своей последовательностью-мишенью.

[0063] Используемый здесь термин «фрагмент узнавания» в общем относится к молекуле (например, малой молекуле, полинуклеотиду, белку, их вариантам или их комбинации), которая способна взаимодействовать с последовательностью нуклеиновой кислоты, то есть с «последовательностью узнавания» или «сайтом узнавания» («сайтом распознавания»), таким как желаемая (или целевая) последовательность нуклеиновой кислоты. Фрагмент узнавания может содержать домен (например, компонент, содержащий домен), способный связываться (например, гибридизоваться) с последовательностью узнавания. Такой домен может содержать одну или более аминокислот, один или более нуклеотидов, их варианты или их комбинации. Альтернативно или дополнительно, фрагмент узнавания может ассоциироваться (например, связываться) со вторичной молекулой, содержащей такой домен. В некоторых примерах фрагмент узнавания может содержать молекулу нуклеиновой кислоты, способную гибридизоваться с последовательностью узнавания. В некоторых примерах фрагмент узнавания может содержать компонент, который проявляет конкретную биологическую активность, включая, но не ограничиваясь ими, одну или более активностей нуклеазы (например, двухцепочечной нуклеазы), никазы, активатора транскрипции, репрессора транскрипции, фермента метилирования нуклеиновой кислоты, фермента деметилирования нуклеиновой кислоты и рекомбиназы. Последовательность узнавания может содержать по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов. Последовательность узнавания может содержать самое большее 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или менее нуклеотидов.

[0064] Фрагмент узнавания можно использовать для выделения желаемой молекулы, содержащей желаемую последовательность нуклеиновой кислоты, из множества молекул (например, множества молекул нуклеиновых кислот). Фрагмент узнавания можно использовать для обогащения желаемой молекулы, содержащей желаемую нуклеиновую кислоту, в композиции или реакционной смеси. В некоторых примерах фрагмент узнавания может быть захвачен системой захвата (например, магнитными шариками) посредством одного или более взаимодействий (например,

связывания авидина-биотина, магнитного связывания и так далее). В одном примере фрагмент узнавания может содержать биотин, который может образовывать комплекс со стрептавидиновым магнитным шариком для выделения или обогащения.

[0065] Примеры фрагмента узнавания могут включать CRISPR-ассоциированные (Cas) системы (например, белки Cas, включая каталитически активные или неактивные полипептиды Cas); нуклеазы «цинковых пальцев» (ZFN); эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN); мегануклеазы; РНК-связывающие белки (RBP); РНК-связывающие белки Cas; рекомбиназы; флиппазы; транспозазы; белки Argonaute (Ago) (например, прокариотический Argonaute (pAgo), архейный Argonaute (aAgo) и эукариотический Argonaute (eAgo)); их варианты; и их комбинации. Фрагмент узнавания может содержать полинуклеотид (например, последовательность длиной по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеотидов), который может быть захвачен системой захвата посредством одного или более взаимодействий, таким как, например, полинуклеотидная последовательность, меченная биотином, которая может быть захвачена одним или более функционализированными авидином магнитными шариками. По меньшей мере часть такого полинуклеотида может иметь комплементарность с последовательностью узнавания целевой молекулы нуклеиновой кислоты.

[0066] Используемый здесь термин «никаза» в общем относится к молекуле (например, ферменту), которая расщепляет одну цепь двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты (т.е. «разрывает» двухцепочечную молекулу или, иначе говоря, образует ник – одноцепочечный разрыв). Никаза может быть нуклеазой, которая расщепляет только одну цепь ДНК, либо из-за ее естественной функции, либо потому что она была сконструирована (например, модифицирована путем мутации и/или делеции одного или более нуклеотидов) для расщепления только одной цепи ДНК. Никаза может представлять собой никирующий фермент (например, рестрикционную эндонуклеазу, никирующую эндонуклеазу и так далее). Никаза может связываться с сайтом образования ника двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, создавая ник (или разрыв) в одной цепи двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты. Ник может быть создан внутри сайта образования ника. Альтернативно, ник может быть создан рядом с сайтом образования ника. В некоторых случаях никаза может связываться с сайтом связывания никазы, который находится рядом с сайтом образования ника. Ник может иметь длину по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеотидов. Ник может иметь длину самое большее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотид. Примеры никазы могут включать системы Cas (например, никазу Cas, такую как Cas9n), N.Alw I, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, Nb.BsmI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nb.BsrDI, Nt.BstNBI, Nb.BstCI, Nt.CviPII, Nb.Bpu I OI, Nt.Bpu I OI и Nt. Bst9I, их варианты и их комбинации. В некоторых примерах молекула нуклеиновой кислоты (например, двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты или одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, являющаяся самокомплементарной) может содержать по меньшей мере один сайт образования ника, который уже содержит по

меньшей мере один ник.

[0067] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «CRISPR-ассоциированная система», «система Cas» и «комплекс Cas» в общем относятся к двухкомпонентному рибонуклеопротеиновому комплексу с гидовой РНК (гРНК) и полипептидом или белком Cas (например, эндонуклеазой Cas, ее каталитическим или некаталитическим производным и так далее) или другим белком, обладающим эндонуклеазной активностью. Термин «CRISPR» относится к коротким палиндромным повторам, регулярно расположенным группами, и родственной им системе. По меньшей мере часть гРНК может обладать комплементарностью к по меньшей мере части области-мишени. Область-мишень может содержать «протоспейсер» и «примыкающий к протоспейсеру мотив» (РАМ), и оба домена могут быть необходимы для нуклеазной активности (например, расщепления) полипептида Cas. Протоспейсер можно назвать сайтом-мишенью (или геномным сайтом-мишенью). Упомянутая гРНК может спариваться (или гибридизироваться) с противоположной цепью протоспейсера (сайтом связывания), чтобы направить полипептид Cas к области-мишени. Сайт РАМ обычно относится к короткой последовательности, распознаваемой полипептидом Cas, и в некоторых случаях может потребоваться для нуклеазной (или никазной) активности. Последовательность и число нуклеотидов для сайта РАМ могут различаться в зависимости от типа фермента Cas.

[0068] Полипептид Cas может обладать нуклеазной (или никазной) активностью, а гРНК может взаимодействовать с полипептидом Cas для направления нуклеазной (или никазной) активности полипептида Cas на желаемую область-мишень. Альтернативно, полипептид Cas может быть некаталитическим и может не обладать нуклеазной активностью. Некаталитический полипептид Cas можно назвать «мертвым» или неактивным Cas (dCas).

[0069] Белок Cas может содержать белок из или происходящий из CRISPR-ассоциированной системы типа I, типа II или типа III, который может обладать направляемой РНК полинуклеотид-связывающей или нуклеазной активностью. Примеры подходящих белков Cas включают Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (или CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9 (то есть Csn1 и Csx12), Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (или CasA), Cse2 (или CasB), Cse3 (или CasE), Cse4 (или CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, Cul966, их гомологи и их модифицированные варианты (например, каталитические или некаталитические). В некоторых случаях белок Cas может содержать белок из или происходящий из CRISPR-ассоциированной системы типа V или типа VI, такой как Cpf1 (или Cas12a), C2c1 (или Cas12b), C2c2, их гомологи и их модифицированные варианты (например, каталитические или некаталитические).

[0070] Хотя некоторые примеры в данном документе относятся к белку Cas, можно использовать другие белки с эндонуклеазной активностью. Такие другие белки могут не быть белком Cas, но могут быть сконфигурированы для использования, например, с гРНК.

[0071] Полипептид или белок Cas можно сконструировать для модификации нуклеазной активности до никазной активности. Например, замена аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvC I у Cas9 из *S. pyogenes* может преобразовать Cas9 из нуклеазы, расщепляющей обе цепи, в никазу Cas9n, расщепляющую только одну цепь. Мутанты никазы Cas9n могут вводить гРНК-нацеленные одноцепочечные разрывы в ДНК вместо двухцепочечных разрывов, создаваемых полипептидами Cas дикого типа. Другие примеры мутаций, которые превращают Cas9 в никазу, могут включать N840A, N854A и N863A.

[0072] Используемый здесь термин «гидовая РНК (гРНК)» в общем относится к молекуле РНК, которая может связываться с полипептидом Cas и способствовать нацеливанию полипептида Cas на конкретное место в целевой области нуклеиновой кислоты (например, ДНК или гена). Степень комплементарности между гРНК и конкретным местом в целевой области нуклеиновой кислоты может составлять по меньшей мере 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Гидовая РНК может содержать сегмент CRISPR РНК (крРНК) и сегмент транскрибирующей крРНК (тракрРНК). Используемые здесь взаимозаменяемо термины «крРНК» и «сегмент крРНК» в общем относятся к молекуле РНК или ее части, которая содержит направляющую полинуклеотид гидовую последовательность, стволую последовательность и, необязательно, последовательность с 5'-выступом. Используемые здесь взаимозаменяемо термины «тракрРНК» и «сегмент тракрРНК» в общем относятся к молекуле РНК или ее части, которая содержит белок-связывающий сегмент (например, белок-связывающий сегмент, способный взаимодействовать с CRISPR-ассоциированным белком, таким как Cas9). В некоторых случаях гидовая РНК может представлять собой единую направляющую РНК (егРНК или sgRNA), где сегмент крРНК и сегмент тракрРНК расположены в одной и той же молекуле РНК. гРНК может содержать одну или более пептидных нуклеиновых кислот.

[0073] крРНК может содержать по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 или более оснований РНК. крРНК может содержать самое большее 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или менее оснований РНК. Последовательность-мишень нуклеиновой кислоты гРНК системы Cas может содержать по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 или более оснований ДНК. Последовательность-мишень нуклеиновой кислоты гРНК системы Cas может содержать самое большее 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 или менее оснований ДНК. Последовательность крРНК можно выбрать для нацеливания на любую последовательность-мишень. Последовательность-мишень может быть последовательностью в геноме клетки. Последовательность-мишень может включать в себя те последовательности, которые уникальны в целевом геноме.

[0074] Используемый здесь термин «полимераза» в общем относится к ферменту (например, натуральному или синтетическому), способному катализировать реакцию полимеризации. Примеры полимераз могут включать в себя полимеразу нуклеиновых

кислот (например, ДНК-полимеразу или РНК-полимеразу), транскриптазу и лигазу. Полимераза может представлять собой фермент полимеризации. Термин «ДНК-полимераза» в общем относится к ферменту, способному катализировать реакцию полимеризации ДНК.

[0075] Используемый здесь термин «связанная полимераза» в общем относится к полимеразе, такой как ДНК-полимераза, которая соединена (например, слита) с линкером. Линкер может быть способен соединяться (например, связываться или конъюгировать) с другим объектом (например, нанопорой, такой как белковая нанопора или твердотельная нанопора).

[0076] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «вариант последовательности» и «вариант секвенирования» в общем относятся к любому изменению в последовательности относительно одной или более эталонных последовательностей. Обычно, вариант последовательности встречается с более низкой частотой, чем эталонная последовательность, для данной популяции особей, у которых представлена эталонная последовательность. Например, конкретный род бактерий может иметь консенсусную эталонную последовательность для гена 16S рРНК, но отдельные виды внутри этого рода могут иметь один или более вариантов последовательности в пределах гена или части гена, которые пригодны для идентификации этого вида в популяции бактерий. В качестве еще одного примера, последовательности для множественных особей одного и того же вида или множественных считываний секвенирования для одной и той же особи могут давать консенсусную последовательность при оптимальном выравнивании, и варианты последовательности относительно этого консенсуса можно использовать для идентификации мутантов в популяции, указывающих на опасную контаминацию. В общем, «консенсусная последовательность» относится к нуклеотидной последовательности, которая отражает наиболее распространенный выбор основания в каждом положении в этой последовательности, когда ряд родственных нуклеиновых кислот был подвергнут интенсивному математическому анализу и/или анализу последовательности, такому как оптимальное выравнивание последовательностей в соответствии с любым из множества алгоритмов выравнивания последовательностей. Эталонная последовательность может представлять собой единственную эталонную последовательность, такую как заранее определенная геномная последовательность одной особи. Эталонная последовательность может представлять собой консенсусную последовательность, образованную путем выравнивания множественных последовательностей, таких как предварительно определенные геномные последовательности множественных особей, выступающих в качестве эталонной популяции, или множественные чтения секвенирования полинуклеотидов одной и той же особи. Эталонная последовательность может быть консенсусной последовательностью, образованной путем оптимального выравнивания последовательностей из анализируемого образца, так что вариант последовательности представляет собой изменение относительно соответствующих последовательностей в одном и том же образце. Вариант

последовательности может встречаться в популяции с низкой частотой (также называется «редким» вариантом последовательности). Например, вариант последовательности может встречаться с частотой 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,001% или ниже. Вариант последовательности может встречаться с частотой 0,1% или менее.

[0077] Вариант последовательности может быть любой вариацией по отношению к эталонной последовательности. Изменение последовательности может состоять из изменения, вставки или делеции одного нуклеотида или множества нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеотидов. Если вариант последовательности содержит два или более различия в нуклеотидах, отличающиеся нуклеотиды могут быть смежными или не смежными друг с другом. Примеры типов вариантов последовательностей включают однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), полиморфизмы делеций/вставок (DIP), варианты числа копий (CNV), короткие tandemные повторы (STR), повторы простых последовательностей (SSR), переменное число tandemных повторов (VNTR), полиморфизмы длин амплифицированных фрагментов (AFLP), инсерционные полиморфизмы на основе ретротранспозонов, специфичный к последовательности амплифицированный полиморфизм и различия в эпигенетических метках, которые могут быть обнаружены как варианты последовательностей (например, различия в метилировании).

[0078] Используемый здесь термин «секвенирование» в общем относится к процедуре определения порядка, в котором нуклеотиды встречаются в нуклеотидной последовательности-мишени. Методы секвенирования могут включать высокопроизводительное секвенирование, такое как, например, секвенирование следующего поколения (NGS). Секвенирование может быть полногеномным секвенированием или целевым секвенированием. Секвенирование может быть секвенированием отдельной молекулы или массовым параллельным секвенированием. Методы секвенирования следующего поколения могут быть пригодны для получения миллионов последовательностей за один прогон. В одном примере, секвенирование может быть выполнено с использованием одного или более методов нанопорового секвенирования, например, секвенирования посредством синтеза, секвенирования посредством лигирования или секвенирования посредством расщепления.

[0079] Используемый здесь термин «нанопора» в общем относится к поре, каналу или проходу, образованным или иным образом предусмотренным в мембране. Мембрана может быть органической мембраной, такой как липидный бислой, или синтетической мембраной, такой как образованная из полимерного материала мембрана, такая как белковая нанопора. Мембрана может быть твердотельной мембраной (например, кремниевой подложкой). Нанопора может быть расположена смежно с или в окрестности сенсорной цепи или электрода, соединенного с сенсорной цепью, такой как, например, схема на комплементарных структурах металл-оксид-полупроводник (КМОП или CMOS) или на полевых транзисторах (FET). Нанопора может быть частью сенсорной цепи.

Нанопора может иметь характерные ширину или диаметр, например, порядка примерно от 0,1 нанометра (нм) до 1000 нм. Нанопорой может быть биологическая нанопора, твердотельная нанопора, гибридная биологическая-твердотельная нанопора, их разновидность или их комбинация. Примеры биологической нанопоры включают, но не ограничиваясь ими, OmpG из *E. coli* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp. и *Pseudomonas* sp. и альфа-гемолизин (α -гемолизин) из *S. aureus* sp., MspA из *M. smegmatis* sp., их функциональные варианты или их комбинации. Секвенирование может включать прямое секвенирование и/или обратное секвенирование. Примеры твердотельной нанопоры включают, но не ограничиваясь ими, нитрид кремния, оксид кремния, графен, сульфид молибдена, их функциональные варианты или их комбинации. Твердотельные нанопоры могут быть изготовлены с помощью высокоэнергетического луча, импринтинга (например, наноимпринтинга), лазерной абляции, химического травления, плазменного травления (например, травления кислородной плазмой) и так далее.

[0080] Используемый здесь термин «комплекс для нанопорового секвенирования» в общем относится к нанопоре, связанной или соединенной с ферментом, например, полимеразой, который(ая), в свою очередь, связана с полимером, например, с полинуклеотидной матрицей. Комплекс для нанопорового секвенирования может быть расположен в мембране, например, в липидном бислое, где он функционирует для идентификации компонентов полимера, например, нуклеотидов или аминокислот.

[0081] Используемые здесь взаимозаменяемо термины «нанопоровое секвенирование» и «секвенирование на основе нанопор» в общем относятся к способу, который определяет последовательность полинуклеотида с помощью нанопоры. В некоторых случаях последовательность полинуклеотида быть определена зависимым от матрицы образом. В некоторых случаях раскрытые здесь способы, системы или композиции могут не ограничиваться каким-либо конкретным методом, системой или устройством нанопорового секвенирования.

[0082] Используемый здесь термин «штрихкод» в общем относится к заданной последовательности нуклеиновой кислоты, которая обеспечивает определенный признак подлежащего идентификации полинуклеотида, с которым связан штрихкод (например, полинуклеотид, содержащий по меньшей мере часть штрихкода, или полинуклеотид, обладающий комплементарностью к по меньшей мере части штрихкода). В некоторых примерах признаком подлежащего идентификации полинуклеотида может быть тот образец, из которого получен этот полинуклеотид. Штрихкод может иметь длину по меньшей мере примерно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. Штрихкод может иметь длину самое большее 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотида. Штрихкод, связанный с полинуклеотидами из первого образца, может отличаться (например, разные последовательности и/или разные длины) от штрихкода, связанного с полинуклеотидами из второго образца, который отличается от первого образца. В таком случае идентификация штрихкода в соответствующих полинуклеотидах может помочь идентифицировать источник образца

одного или более полинуклеотидов. Таким образом, разные образцы с разными штрихкодами можно анализировать (например, секвенировать) вместе (например, в партии) и разделять во время анализа по меньшей мере частично на основе штрихкода. В некоторых примерах штрихкод можно точно идентифицировать даже после мутации, вставки или делеции одного или более нуклеотидов в последовательности штрихкода (например, мутации, вставки или делеции по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более нуклеотидов). Множество полинуклеотидов из одного и того же образца могут иметь одинаковый штрихкод. Альтернативно, множество полинуклеотидов из одного и того же образца могут иметь разные штрихкоды. Первый штрихкод может отличаться от второго штрихкода по меньшей мере тремя положениями нуклеотидов, например, по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениями нуклеотидов. В пуле образцов может быть представлено множество штрихкодов, причем каждый образец содержит полинуклеотиды, содержащие один или более штрихкодов, которые отличаются от штрихкодов, содержащихся в полинуклеотидах, полученных из других образцов в пуле. Образцы полинуклеотидов, содержащих один или более штрихкодов, могут быть объединены на основе последовательностей штрихкодов, к которым они присоединены, так что все четыре нуклеотидных основания А, G, C и T приблизительно равномерно представлены в одном или более положениях вдоль каждого штрихкода в пуле (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более положениях, или во всех положениях штрихкода). В некоторых примерах способы по настоящему раскрытию могут включать идентификацию образца, из которого получен полинуклеотид-мишень, на основе последовательности штрихкода, к которой присоединен полинуклеотид-мишень. Штрихкод может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, которая при присоединении к полинуклеотиду-мишени может служить идентификатором образца, из которого был получен полинуклеотид-мишень. В одном примере олигонуклеотидный праймер (например, праймер для амплификации) может содержать один или более штрихкодов. В другом примере молекула нуклеиновой кислоты может быть связана с (например, лигирована) адаптерной нуклеиновой кислотой (например, для закольцовывания), и эта адаптерная нуклеиновая кислота может содержать один или более штрихкодов.

[0083] Используемый здесь термин «образец» в общем относится к любому образцу, который может содержать одну или более составляющих (например, молекул нуклеиновой кислоты) для обработки или анализа. Образцом может быть биологический образец. Образец может быть клеточным или тканевым образцом. Образец может быть бесклеточным образцом, таким как кровь (например, цельная кровь), плазма, сыворотка, пот, слюна или моча. Образец может быть получен *in vivo* или культивирован *in vitro*.

[0084] Используемый здесь термин «субъект» в общем относится к индивидууму или объекту, от которого получен образец, такому как, например, позвоночное (например, млекопитающее, такое как человек) или беспозвоночное. Млекопитающим может быть мышь, обезьяна, человек, сельскохозяйственное животное (например, корова, коза, свинья или курица) или домашнее животное (например, кошка или собака). Субъектом может

быть растение. Субъектом может быть пациент. У субъекта может не быть симптомов в отношении заболевания (например, рака). Альтернативно, у субъекта могут быть симптомы в отношении заболевания.

[0085] Всякий раз, когда термин «по меньшей мере», «более чем» или «больше или равно» предшествует первому числовому значению в серии из двух или более числовых значений, термин «по меньшей мере», «более чем» или «больше или равно» применяется к каждому числовому значению в этой серии числовых значений. Например, больше или равно 1, 2 или 3 эквивалентно больше или равно 1, больше или равно 2 или больше или равно 3.

[0086] Всякий раз, когда термин «не более», «менее» или «меньше или равно» предшествует первому числовому значению в серии из двух или более числовых значений, термин «не более», «менее» или «меньше или равно» применяется к каждому числовому значению в этой серии числовых значений. Например, меньше или равно 3, 2 или 1 эквивалентно меньше или равно 3, меньше или равно 2 или меньше или равно 1.

[0087] I. Системы и способы анализа и обнаружения молекулы-мишени

[0088] В одном аспекте настоящего раскрытия представлена система для анализа или идентификации молекулы-мишени. Система может содержать датчик, выполненный с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана по меньшей мере частью датчика или в окрестности по меньшей мере части датчика. Один или более сигналов применимы для анализа или идентификации молекулы-мишени.

[0089] Система может содержать по меньшей мере один раскрытый здесь датчик. Система может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более датчиков. Система может содержать самое большее 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или менее датчика(ов).

[0090] Детектированный сигнал, указывающий на импеданс или изменение импеданса в датчике, вызываемые молекулой-мишенью, может представлять собой одно измерение. Альтернативно, детектированный сигнал может представлять собой медианное значение или среднее значение множества измерений.

[0091] При детектировании одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, по меньшей мере часть молекулы-мишени может быть связана со связывающим фрагментом датчика. Связывающий фрагмент может быть выполнен с возможностью связывания по меньшей мере части молекулы-мишени (например, нуклеотида, аминокислоты, малой молекулы, иона и так далее). Раскрытый здесь датчик может содержать по меньшей мере один связывающий фрагмент. Датчик может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или более связывающих фрагментов. Датчик может содержать самое большее 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или менее связывающих фрагментов.

[0092] На фиг. 1A-1E схематично показаны примеры системы, содержащей датчик по настоящему раскрытию, к примеру, для оценки (например, анализа, идентификации, количественного определения, ранжирования и так далее) одной или более молекул-мишеней. Обращаясь к фиг. 1A, датчик может быть погружен в жидкость 105 (например, воду или буфер, такой как солевой раствор, буфер с высоким содержанием электролита, буфер с низким содержанием электролита и так далее). Датчик может содержать сенсорный электрод 110, который электрически связан с электродом 115 сравнения. Датчик может быть выполнен с возможностью детектирования или измерения одного или более свойств LCR (индуктивности (L), емкости (C) и сопротивления (R)) объема 112 жидкости 105, причем объем 112 находится вблизи или смежно с сенсорным электродом 110. Молекулы-мишени (обозначенные как 102-1, 120-2 и 120-3) могут присутствовать или плавать в жидкости. Молекула-мишень может быть связана или не связана с подтверждением (например, флуоресцентной меткой или окислительно-восстановительным веществом). Обращаясь к фиг. 1B, когда по меньшей мере часть любой из молекул-мишеней (например, молекулы-мишени 120-1) находится рядом с или внутри объема 112 жидкости 105, датчик может детектировать один или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в объеме 112.

[0093] В некоторых случаях импеданс или изменение импеданса может быть детектирован(о) путем приложения постоянного напряжения (например, синусоидального возмущения напряжения) при измерении тока (например, изменения тока). Значение импеданса (Z) можно определить, разделив значение приложенного напряжения (V) на значение измеренного тока (I).

[0094] Детектированный импеданс или детектированное изменение импеданса, например, между сенсорным электродом 110 и электродом 115 сравнения, может составлять по меньшей мере примерно 1 микроом, 2 микроома, 3 микроома, 4 микроома, 5 микроом, 6 микроом, 7 микроом, 8 микроом, 9 микроом, 10 микроом, 20 микроом, 30 микроом, 40 микроом, 50 микроом, 60 микроом, 70 микроом, 80 микроом, 90 микроом, 100 микроом, 200 микроом, 300 микроом, 400 микроом, 500 микроом, 600 микроом, 700 микроом, 800 микроом, 900 микроом, 1 миллиом, 2 миллиома, 3 миллиома, 4 миллиома, 5 миллиом, 6 миллиом, 7 миллиом, 8 миллиом, 9 миллиом, 10 миллиом, 20 миллиом, 30 миллиом, 40 миллиом, 50 миллиом, 60 миллиом, 70 миллиом, 80 миллиом, 90 миллиом, 100 миллиом, 200 миллиом, 300 миллиом, 400 миллиом, 500 миллиом, 600 миллиом, 700 миллиом, 800 миллиом, 900 миллиом, 1 Ом, 2 Ом, 3 Ом, 4 Ом, 5 Ом, 6 Ом, 7 Ом, 8 Ом, 9 Ом, 10 Ом, 20 Ом, 30 Ом, 40 Ом, 50 Ом, 60 Ом, 70 Ом, 80 Ом, 90 Ом, 100 Ом, 200 Ом, 300 Ом, 400 Ом, 500 Ом, 600 Ом, 700 Ом, 800 Ом, 900 Ом, 1 килоом, 2 килоома, 3 килоома, 4 килоома, 5 килоом, 6 килоом, 7 килоом, 8 килоом, 9 килоом, 10 килоом, 20 килоом, 30 килоом, 40 килоом, 50 килоом, 60 килоом, 70 килоом, 80 килоом, 90 килоом, 100 килоом, 200 килоом, 300 килоом, 400 килоом, 500 килоом, 600 килоом, 700 килоом, 800 килоом, 900 килоом, 1000 килоом или более. Детектированный импеданс или детектированное изменение импеданса, например, между сенсорным электродом 110 и электродом 115

сравнения, может составлять самое большее примерно 1000 килоом, 900 килоом, 800 килоом, 700 килоом, 600 килоом, 500 килоом, 400 килоом, 300 килоом, 200 килоом, 100 килоом, 90 килоом, 80 килоом, 70 килоом, 60 килоом, 50 килоом, 40 килоом, 30 килоом, 20 килоом, 10 килоом, 9 килоом, 8 килоом, 7 килоом, 6 килоом, 5 килоом, 4 килоом, 3 килоом, 2 килоом, 1 килоома, 900 Ом, 800 Ом, 700 Ом, 600 Ом, 500 Ом, 400 Ом, 300 Ом, 200 Ом, 100 Ом, 90 Ом, 80 Ом, 70 Ом, 60 Ом, 50 Ом, 40 Ом, 30 Ом, 20 Ом, 10 Ом, 9 Ом, 8 Ом, 7 Ом, 6 Ом, 5 Ом, 4 Ом, 3 Ом, 2 Ом, 1 Ом, 900 миллиом, 800 миллиом, 700 миллиом, 600 миллиом, 500 миллиом, 400 миллиом, 300 миллиом, 200 миллиом, 100 миллиом, 90 миллиом, 80 миллиом, 70 миллиом, 60 миллиом, 50 миллиом, 40 миллиом, 30 миллиом, 20 миллиом, 10 миллиом, 9 миллиом, 8 миллиом, 7 миллиом, 6 миллиом, 5 миллиом, 4 миллиом, 3 миллиом, 2 миллиом, 1 миллиома, 900 микроом, 800 микроом, 700 микроом, 600 микроом, 500 микроом, 400 микроом, 300 микроом, 200 микроом, 100 микроом, 90 микроом, 80 микроом, 70 микроом, 60 микроом, 50 микроом, 40 микроом, 30 микроом, 20 микроом, 10 микроом, 9 микроом, 8 микроом, 7 микроом, 6 микроом, 5 микроом, 4 микроом, 3 микроом, 2 микроом, 1 микроома или менее.

[0095] Детектированный импеданс или детектированное изменение импеданса, например, между сенсорным электродом 110 и электродом 115 сравнения, может представлять собой измерение (например, одно единственное измерение, множество измерений для получения среднего значения множества измерений), снятое за период по меньшей мере примерно 1 наносекунда, 2 наносекунды, 3 наносекунды, 4 наносекунды, 5 наносекунд, 6 наносекунд, 7 наносекунд, 8 наносекунд, 9 наносекунд, 10 наносекунд, 20 наносекунд, 30 наносекунд, 40 наносекунд, 50 наносекунд, 60 наносекунд, 70 наносекунд, 80 наносекунд, 90 наносекунд, 100 наносекунд, 200 наносекунд, 300 наносекунд, 400 наносекунд, 500 наносекунд, 600 наносекунд, 700 наносекунд, 800 наносекунд, 900 наносекунд, 1 микросекунда, 2 микросекунды, 3 микросекунды, 4 микросекунды, 5 микросекунд, 6 микросекунд, 7 микросекунд, 8 микросекунд, 9 микросекунд, 10 микросекунд, 20 микросекунд, 30 микросекунд, 40 микросекунд, 50 микросекунд, 60 микросекунд, 70 микросекунд, 80 микросекунд, 90 микросекунд, 100 микросекунд, 200 микросекунд, 300 микросекунд, 400 микросекунд, 500 микросекунд, 600 микросекунд, 700 микросекунд, 800 микросекунд, 900 микросекунд, 1 миллисекунда, 2 миллисекунды, 3 миллисекунды, 4 миллисекунды, 5 миллисекунд, 6 миллисекунд, 7 миллисекунд, 8 миллисекунд, 9 миллисекунд, 10 миллисекунд, 20 миллисекунд, 30 миллисекунд, 40 миллисекунд, 50 миллисекунд, 60 миллисекунд, 70 миллисекунд, 80 миллисекунд, 90 миллисекунд, 100 миллисекунд, 200 миллисекунд, 300 миллисекунд, 400 миллисекунд, 500 миллисекунд, 600 миллисекунд, 700 миллисекунд, 800 миллисекунд, 900 миллисекунд, 1 секунда, 2 секунды, 3 секунды, 4 секунды, 5 секунд, 6 секунд, 7 секунд, 8 секунд, 9 секунд, 10 секунд или более. Детектированный импеданс или детектированное изменение импеданса, например, между сенсорным электродом 110 и электродом 115 сравнения, может представлять собой измерение (например, одно единственное измерение, множество измерений для получения среднего значения множества

измерений), снятое за период самое большее примерно 10 секунд, 9 секунд, 8 секунд, 7 секунд, 6 секунд, 5 секунд, 4 секунд, 3 секунд, 2 секунд, 1 секунды, 900 миллисекунд, 800 миллисекунд, 700 миллисекунд, 600 миллисекунд, 500 миллисекунд, 400 миллисекунд, 300 миллисекунд, 200 миллисекунд, 100 миллисекунд, 90 миллисекунд, 80 миллисекунд, 70 миллисекунд, 60 миллисекунд, 50 миллисекунд, 40 миллисекунд, 30 миллисекунд, 20 миллисекунд, 10 миллисекунд, 9 миллисекунд, 8 миллисекунд, 7 миллисекунд, 6 миллисекунд, 5 миллисекунд, 4 миллисекунд, 3 миллисекунд, 2 миллисекунд, 1 миллисекунды, 900 микросекунд, 800 микросекунд, 700 микросекунд, 600 микросекунд, 500 микросекунд, 400 микросекунд, 300 микросекунд, 200 микросекунд, 100 микросекунд, 90 микросекунд, 80 микросекунд, 70 микросекунд, 60 микросекунд, 50 микросекунд, 40 микросекунд, 30 микросекунд, 20 микросекунд, 10 микросекунд, 9 микросекунд, 8 микросекунд, 7 микросекунд, 6 микросекунд, 5 микросекунд, 4 микросекунд, 3 микросекунд, 2 микросекунд, 1 микросекунды, 900 наносекунд, 800 наносекунд, 700 наносекунд, 600 наносекунд, 500 наносекунд, 400 наносекунд, 300 наносекунд, 200 наносекунд, 100 наносекунд, 90 наносекунд, 80 наносекунд, 70 наносекунд, 60 наносекунд, 50 наносекунд, 40 наносекунд, 30 наносекунд, 20 наносекунд, 10 наносекунд, 9 наносекунд, 8 наносекунд, 7 наносекунд, 6 наносекунд, 5 наносекунд, 4 наносекунд, 3 наносекунд, 2 наносекунд, 1 наносекунда или менее.

[0096] Обращаясь к фиг. 1A и 1B, между сенсорным электродом и электродом сравнения может быть приложено электрическое поле. В некоторых случаях с датчиком может быть функционально соединен функциональный генератор для того, чтобы подавать напряжение (например, синусоидальное напряжение малой амплитуды), вызывая ток в цепи датчика. После этого можно измерить ток, а также амплитуду и фазу (компоненты переменного тока (а.с.)). Такое значение может быть преобразовано в один или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике. Это измерение можно повторить при серии разных напряжений (или частот), таким образом строя импедансный спектр датчика. В некоторых случаях с датчиком может быть функционально соединен измеритель LCR для измерения одного или более LCR-сигналов или сигнатур датчика, когда молекула-мишень находится в контакте с (например, непосредственно или опосредованно) или поблизости от сенсорного электрода.

[0097] Обращаясь к фиг. 1C, сенсорный электрод 110 датчика может быть расположен смежным с почти плоской или плоской поверхностью 130. Обращаясь к фиг. 1D, сенсорный электрод 110 датчика может быть расположен в углублении 135, например, в нижней части (на дне) углубления 135. Углубление 135 может быть углублением с закрытым дном. В некоторых случаях по меньшей мере часть поверхности углубления (например, та часть поверхности углубления, которая не закрыта сенсорным электродом) может быть покрыта диэлектрическим материалом (например, изоляционным материалом). Альтернативно, поверхность углубления может быть не покрыта диэлектрическим материалом. Углубление может помочь локализовать или захватить молекулу-мишень внутри углубления на более длительный промежуток времени и/или с

более высокой аффинностью связывания для повышения точности и чувствительности датчика. В некоторых случаях (i) первая молекула-мишень может быть захвачена углублением для измерения первого сигнала, указывающего на импеданс или изменение импеданса в датчике, и (ii) последующая молекула-мишень может быть захвачена углублением для измерения дополнительного сигнала, указывающего на импеданс или изменение импеданса в датчике. Во время (ii) первая молекула-мишень может оставаться захваченной в углублении. Например, молекула-мишень может быть связана с субстратом, расположенным в углублении. Альтернативно, первая молекула-мишень может не быть захваченной в углублении во время (ii). Например, первая молекула-мишень может выйти из углубления перед (ii). Обращаясь к фиг. 1Е, сенсорный электрод 110 датчика может быть расположен под нанопорой (например, белковой нанопорой или твердотельной нанопорой). В этом примере сенсорный электрод 110 может быть расположен под белковой нанопорой 140, которая внедрена в липидный бислой 145. Этот липидный бислой 145 может иметь или не иметь емкость. Нанопора 140 может быть выполнена с возможностью функционировать в качестве зарядового и/или размерного фильтра, тем самым контролируя то, что проходит через нанопору 140 в углубление 135, вызывая изменение свойств LCR датчика. Размер нанопоры 145 может быть регулируемым. Общий заряд нанопоры 145 может быть регулируемым. В одном примере подача положительного электрического сигнала на нанопору 145 может помочь отфильтровать положительно заряженные молекулы и обеспечить поступление только отрицательно заряженных молекул и их взаимодействие с сенсорным электродом 110. В некоторых случаях датчик, показанный на фиг. 1Е, может детектировать один или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса внутри датчика после (i) проникновения молекулы-мишени (или метки, первоначально присоединенной к молекуле-мишени) через нанопору 140 и (ii) связывания (например, прямого или непрямого) проникшей молекулы-мишени (или метки) с сенсорным электродом 110. Такие один или более сигналов могут не детектироваться, когда молекула-мишень (или метка) находится внутри нанопоры 140. В одном примере по меньшей мере часть молекулы-мишени (или метки) может присоединяться к сенсорному электроду (например, через линкер, такой как проводящий материал) для детектирования одного или более сигналов. В другом примере по меньшей мере часть молекулы-мишени (или метки) может находиться в окрестности проводящего материала для детектирования одного или более сигналов.

[0098] В другом аспекте настоящего раскрытия представлена система для анализа или идентификации молекулы-мишени. Система может содержать датчик, содержащий сенсорный электрод и электрод сравнения, электрически связанные друг с другом. Датчик может содержать диэлектрический материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий первую часть поверхности сенсорного электрода. Датчик может содержать проводящий материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий вторую часть поверхности сенсорного электрода. Датчик может содержать связывающее звено,

соединенное с проводящим материалом, причем связывающее звено выполнено с возможностью связывания молекулы-мишени. Датчик может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим звеном. Один или более сигналов применимы для анализа или идентификации молекулы-мишени. Проводящий материал может обеспечивать связь (например, химическую связь) или может содержать связующее звено (например, наностержень, пептид, малую молекулу и так далее) с любым желаемым размером (например, длиной, диаметром или площадью сечения, объемом и так далее). В альтернативном аспекте связывающее звено может быть непосредственно соединено с сенсорным электродом. В еще одном аспекте связывающее звено может быть соединено с по меньшей мере частью диэлектрического материала, который соединен с сенсорным электродом.

[0099] Один или более сигналов могут указывать на (i) электрическое сопротивление или его изменение в датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в датчике, или (ii) электрическую индуктивность или ее изменение в датчике. Один или более сигналов могут указывать на по меньшей мере два из: (i) электрического сопротивления или его изменения в датчике, (ii) электрической емкости или ее изменения в датчике и (ii) электрической индуктивности или ее изменения в датчике. Один или более сигналов могут указывать на (i) электрическое сопротивление или его изменение в датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в датчике или (ii) электрическую индуктивность и ее изменение в датчике.

[0100] Одним или более сигналами может быть ток или напряжение. Одним или более сигналами может не быть туннельный ток.

[0101] Первая часть сенсорного электрода, покрытая диэлектрическим материалом, может составлять по меньшей мере 50 процентов (%) поверхности сенсорного электрода. В некоторых случаях первая часть сенсорного электрода может составлять по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или более поверхности сенсорного электрода. В некоторых случаях первая часть сенсорного электрода может составлять самое большее 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50% или менее поверхности сенсорного электрода.

[0102] Вторая часть сенсорного электрода может составлять самое большее 50% поверхности сенсорного электрода. В некоторых случаях вторая часть сенсорного электрода может составлять самое большее 50%, 45%, 0%, 35%, 0%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее поверхности сенсорного электрода. В некоторых случаях вторая часть сенсорного электрода может составлять по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% или более поверхности сенсорного электрода.

[0103] Средний размер сечения (или площадь поверхности, которая соединена с диэлектрическим материалом и проводящим материалом) сенсорного электрода может

быть не более чем в 100 раз больше среднего размера молекулы-мишени. В некоторых случаях средний размер сечения сенсорного электрода может быть самое большее в 100 раз, 90 раз, 80 раз, 70 раз, 60 раз, 50 раз, 40 раз, 30 раз, 25 раз, 20 раз, 15 раз, 10 раз, 9 раз, 8 раз, 7 раз, 6 раз, 5 раз, 4 раз, 3 раз, 2 раз, 1 раз, 0,5 раза или 0,1 раза больше среднего размера молекулы-мишени. В некоторых случаях средний размер сечения сенсорного электрода может быть по меньшей мере в 0,1 раза, 0,5 раза, 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или в 100 раз больше среднего размера молекулы-мишени. В некоторых случаях средний размер сечения сенсорного электрода может быть не более чем по меньшей мере 0,1 нанометра (нм), 0,5 нм, 1 нм, 2 нм, 3 нм, 4 нм, 5 нм, 10 нм, 50 нм, 100 нм, 500 нм, 1000 нм, 5000 нм, 10000 нм или больше среднего размера молекулы-мишени. В некоторых случаях средний размер сечения сенсорного электрода может быть самое большее 10000 нм, 5000 нм, 1000 нм, 500 нм, 100 нм, 50 нм, 10 нм, 5 нм, 4 нм, 3 нм, 2 нм, 1 нм, 0,5 нм, 0,1 нм или меньше среднего размера молекулы-мишени.

[0104] Альтернативно, средний размер сечения сенсорного электрода может быть меньшим, чем средний размер молекулы-мишени. В некоторых случаях средний размер сечения сенсорного электрода может быть по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40% или 50% меньше среднего размера молекулы-мишени. В некоторых случаях средний размер сечения сенсорного электрода может быть самое большее на 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% меньше среднего размера молекулы-мишени.

[0105] Площадь второй части поверхности сенсорного электрода может быть не более 500 квадратных ангстрем ($\text{\AA}^2$), $100 \text{\AA}^2$, $50 \text{\AA}^2$, $10 \text{\AA}^2$, $9 \text{\AA}^2$, $8 \text{\AA}^2$, $7 \text{\AA}^2$, $6 \text{\AA}^2$, $5 \text{\AA}^2$, $4 \text{\AA}^2$, $3 \text{\AA}^2$, $2 \text{\AA}^2$, $1 \text{\AA}^2$ или менее. В некоторых случаях размер сечения или диаметр второй части поверхности сенсорного электрода может быть приблизительно равен диаметру (например, удвоенному радиусу Ван-дер-Ваальса) атома проводящего материала.

[0106] Диэлектрический материал может представлять собой твердый слой (например, твердый металлический или полупроводящий материал) или самособирающийся монослой (ССМ).

[0107] Проводящий материал может представлять собой одну единственную молекулу (например, единственную проводящую полимерную цепь). В некоторых случаях один или более признаков атомно-силовой микроскопии (АСМ) (например, пьезоэлектрический консольный зонд АСМ) для связывания единственной молекулы с конкретным (или случайным) положением в пределах поверхности чувствительного электрода. Альтернативно, проводящий материал может представлять собой множество молекул (например, множество идентичных и/или разных проводящих полимерных цепей). Проводящий материал может быть составлен из по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000 или более молекул. Проводящий материал может быть составлен из самое большее 100000, 50000, 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5 или 1 молекулы.

[0108] В некоторых случаях субстрат может быть связан со связывающим звеном (например, нуклеазой или ее вариантом) датчика по настоящему раскрытию, и связывающее звено или дополнительный элемент (например, дополнительный фермент) может быть выполнен(о) с возможностью расщепления по меньшей мере части субстрата. Датчик может быть выполнен с возможностью (i) детектировать различие одного или более сигналов, указывающих на изменение импеданса в датчике после такого расщепления, и (ii) идентифицировать то, что было расщеплено, на основе анализа одного или более сигналов.

[0109] Связывающим звеном может быть фермент, антитело, аптамер, небиологический материал (например, синтетический полимер), их функциональные фрагменты, их функциональные варианты или их комбинации. Фермент может быть выбран из группы, состоящей из полимеразы, нуклеазы (например, двухцепочечной нуклеазы), никазы, активатора транскрипции, репрессора транскрипции, фермента метилирования нуклеиновой кислоты, фермента деметилирования нуклеиновой кислоты и рекомбиназы. Антитело может представлять собой целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как фрагмент scFv, Fab, домен V_HH или домен V_H антитела, содержащего только тяжелую цепь. Антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим (например, биспецифическим, триспецифическим и так далее). Антитело может быть моновалентным или мультивалентным (например, бивалентным, тривалентным и так далее).

[0110] Связывающее звено может быть непосредственно соединенным с проводящим материалом, например, ковалентно или нековалентно присоединенным к проводящему материалу. Альтернативно, связывающее звено может быть опосредованно соединено с сенсорным электродом, например, через линкер, который связывает проводящий материал, с одной стороны, и связывающее звено, с другой стороны. В таких случаях линкер также может представлять собой проводящий линкер с тем, чтобы минимизировать мешающее влияние сенсорных возможностей датчика. Альтернативно, линкер может быть непроводящим.

[0111] Молекула-мишень может быть выбрана из группы, состоящей из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида, их варианта и их комбинации.

[0112] Молекула-мишень может содержать одну или более меток. Молекула-мишень может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или более меток. Молекула-мишень может содержать самое большее 5, 4, 3, 2 или 1 метку. Метка может быть выполнена с возможностью вызывать (индуцировать) изменение одного или более сигналов датчика. В некоторых случаях можно использовать множество типов меток для множества молекул-мишеней, и один или более сигналов каждой из молекул-мишеней с их соответствующей меткой могут быть приблизительно отличимы от других. В некоторых случаях один или более признаков или одна или более характеристик молекулы-мишени (например, размер, форма, заряд, вибрация, движение в текучей среде

и так далее) могут дополнительно влиять на один или более сигналов датчиков, тем самым дополнительно делая упомянутые один или более сигналов каждой из молекул-мишеней с их соответствующей меткой более отличимыми от других. В некоторых случаях меткой по настоящему раскрытию может быть импедансная метка. Импедансная метка может быть выполнена с возможностью выявления изменения детектированного импеданса в датчике, например, между сенсорным электродом и электродом сравнения. Примеры импедансной метки могут включать, но не ограничиваясь ими, органические соединения, металлоорганические соединения, наночастицы, металлы, их функциональные варианты и их комбинации.

[0113] Альтернативно, молекула-мишень может не содержать никакой метки. В таких случаях один или более признаков или одна или более характеристик молекулы-мишени (например, размер, форма, заряд, вибрация, движение в текучей среде и так далее) могут дополнительно влиять на один или более сигналов датчиков, тем самым дополнительно делая упомянутые один или более сигналов каждой из молекул-мишеней с их соответствующей меткой более отличимыми от других. В одном примере связывающим звеном может быть белок в биологическом образце, таком как кровь, плазма или моча. Связывающим звеном может быть фермент (например, полимеразы, предназначенная для выполнения амплификации по типу катящегося кольца (RCA)), который связывается с кольцевой нуклеиновой кислотой для RCA. Фрагмент-мишень может представлять собой азотистое основание без какой-либо метки флуоресцентного или окислительно-восстановительного вещества, но чувствительность датчика по настоящему раскрытию может позволять проводить анализ одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда нуклеотид связан с кольцевой нуклеиновой кислотой с помощью полимеразы.

[0114] Размер, форма и/или разрешающая способность одного или более компонентов датчика по настоящему раскрытию могут определяться или ограничиваться разрешающими способностями таких методов, как фотолинтография, травление, наноимпринтинг, размером бионанопор и так далее.

[0115] На фиг. 2А-2Е схематично показаны примеры системы, содержащей датчик по настоящему раскрытию, к примеру, для оценки (например, анализа, идентификации, количественного определения, ранжирования и так далее) одной или более молекул-мишеней. Обращаясь к фиг. 2А, датчик может быть погружен в жидкость 105 (например, воду или буфер, такой как солевой раствор, буфер с высоким содержанием электролита, буфер с низким содержанием электролита и так далее). Датчик может содержать сенсорный электрод 110, который электрически связан с электродом 115 сравнения. Датчик может содержать диэлектрический материал (например, ССМ) 205, соединенный с по меньшей мере верхней поверхностью сенсорного электрода 110. ССМ 205 может покрывать большую часть верхней поверхности сенсорного электрода 110. Кроме того, проводящий материал 210 (например, одна или более проводящих полимерных цепей) может быть соединен с верхней поверхностью сенсорного электрода 110. Проводящий

материал 210 может быть внедрен в «море» ССМ 205. Также с проводящим материалом 210 может быть соединен связывающий фрагмент 215 на противоположной(ом) сенсорному электроду 110 стороне (или конце). Датчик может быть выполнен с возможностью детектирования или измерения одного или более свойств LCR или их изменения в пределах объема 217 жидкости 105, причем объем 217 находится рядом с или примыкает к связывающему звену 215. В этом примере связывающим звеном 215 может быть фермент (например, полимеразы), и фермент может быть выполнен с возможностью добавления одного или более нуклеотидов к полинуклеотидному субстрату 220.

[0116] Толщина диэлектрического материала (например, ССМ 205, как показано на фиг. 2А), который соединен с по меньшей мере частью поверхности сенсорного электрода, может составлять примерно по меньшей мере 0,1 нм, 0,5 нм, 1 нм, 2 нм, 3 нм, 4 нм, 5 нм, 6 нм, 7 нм, 8 нм, 9 нм, 10 нм, 20 нм, 30 нм, 40 нм, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 200 нм, 300 нм, 400 нм, 500 нм, 600 нм, 700 нм, 800 нм, 900 нм, 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 200 мкм, 300 мкм, 400 мкм, 500 мкм, 600 мкм, 700 мкм, 800 мкм, 900 мкм, 1000 мкм или более. Толщина диэлектрического материала, который соединен с по меньшей мере частью поверхности сенсорного электрода, может составлять самое большее примерно 1000 мкм, 900 мкм, 800 мкм, 700 мкм, 600 мкм, 500 мкм, 400 мкм, 300 мкм, 200 мкм, 100 мкм, 90 мкм, 80 мкм, 70 мкм, 60 мкм, 50 мкм, 40 мкм, 30 мкм, 20 мкм, 10 мкм, 9 мкм, 8 мкм, 7 мкм, 6 мкм, 5 мкм, 4 мкм, 3 мкм, 2 мкм, 1 мкм, 900 нм, 800 нм, 700 нм, 600 нм, 500 нм, 400 нм, 300 нм, 200 нм, 100 нм, 90 нм, 80 нм, 70 нм, 60 нм, 50 нм, 40 нм, 30 нм, 20 нм, 10 нм, 9 нм, 8 нм, 7 нм, 6 нм, 5 нм, 4 нм, 3 нм, 2 нм, 1 нм, 0,5 нм, 0,1 нм или менее.

[0117] Обращаясь к фиг. 2В, молекулы-мишени 230 могут представлять собой три нуклеотидных зонда (обозначенных как 1, 2 и 3), плавающих в жидкости 105. Обращаясь к фиг. 2С, связывающее звено 215 (например, полимеразы), которое(ая) соединено(а) с сенсорным электродом 110 и внедрено(а) в ССМ (не показано), может взаимодействовать с целевым нуклеотидным зондом 230-1 и связывать этот целевой нуклеотидный зонд с нуклеотидным субстратом 220. Датчик может измерять один или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда (i) содержащий метку нуклеотидный зонд 230-1 связывается со связывающим звеном 215, и/или (ii) связывающее звено 215 или дополнительный фермент, функционально соединенный со связывающим звеном 215, отщепляет метку от нуклеотидного зонда 230-1. В некоторых случаях измеряемыми импедансом или изменением импеданса может быть объемный импеданс или изменение объемного импеданса. В некоторых примерах детектированные импеданс или изменение импеданса не находятся в пределах дебаевского (или двойного) слоя электрода, например, сенсорного электрода 110, как показано на фиг. 2С. В одном примере детектированные импеданс или изменение импеданса могут быть за пределами дебаевского слоя электрода. В некоторых примерах детектированные импеданс или изменение импеданса не находятся в пределах дебаевского (или двойного) слоя

диэлектрического материала (например, ССМ 205, как показано на фиг. 2А), который соединен с сенсорным электродом. В одном примере детектированные импеданс или изменение импеданса могут быть за пределами дебаевского слоя диэлектрического материала.

[0118] Обращаясь к фиг. 2D, молекулы-мишени 230 могут представлять собой четыре нуклеотидных зонда (обозначенных как 240-1, 240-2, 240-3 и 240-4), плавающих в жидкости 105. В данном случае нуклеотидные зонды имеют идентичное нуклеотидное основание (например, аденин, или А), но с разными метками, нарисованными в виде меток разной формы. В данном положении по длине нуклеотидного субстрата 220 (т.е. $t=N$) связывающее звено 215 (например, полимераза), которое(ая) соединено(а) с сенсорным электродом 110 и внедрено(а) в ССМ (не показано), может взаимодействовать с целевым нуклеотидным зондом 240-4 (например, путем случайного выбора на основе свободного движения нуклеотидных зондов в жидкости 105) и связывать этот целевой нуклеотидный зонд 240-4 с нуклеотидным субстратом 220. После этого датчик может детектировать один или более сигналов (например, график зависимости емкости от сопротивления), указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике из-за присоединения нуклеотидного зонда 240-4 к субстрату 220. Аналогичным образом, когда субстрат снова «подзывает» то же самое азотистое основание, что и ранее, для следующего положения нуклеотидного субстрата 220 (то есть $t=N+1$), связывающее звено 215 может взаимодействовать с другим целевым нуклеотидным зондом 240-1 (например, путем случайного выбора) и связывать этот целевой нуклеотидный зонд 240-1 с нуклеотидным субстратом 220. После этого датчик может детектировать один или более сигналов (например, график зависимости емкости от сопротивления), указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике из-за присоединения нуклеотидного зонда 240-1 к субстрату 220.

[0119] В некоторых случаях датчик может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса, например, между сенсорным электродом 110 и электродом 115 сравнения, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени (и/или метки, соединенной с молекулой-мишенью) связана (например, непосредственно или опосредованно через связывающее звено 215 и проводящий материал 210) с по меньшей мере частью датчика, например, сенсорного электрода 110. Альтернативно, датчик может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса, например, между сенсорным электродом 110 и электродом 115 сравнения, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени (и/или метки, соединенной с молекулой-мишенью), не связана, но находится в окрестности по меньшей мере части датчика, например, сенсорного электрода 110.

[0120] Датчик по настоящему раскрытию может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса, например, между сенсорным электродом и электродом сравнения, когда

расстояние между (i) по меньшей мере частью молекулы-мишени (и/или меткой, соединенной с молекулой-мишенью) и (ii) сенсорным электродом составляет по меньшей мере примерно 0,1 нм, 0,5 нм, 1 нм, 2 нм, 3 нм, 4 нм, 5 нм, 6 нм, 7 нм, 8 нм, 9 нм, 10 нм, 20 нм, 30 нм, 40 нм, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 200 нм, 300 нм, 400 нм, 500 нм, 600 нм, 700 нм, 800 нм, 900 нм, 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 200 мкм, 300 мкм, 400 мкм, 500 мкм, 600 мкм, 700 мкм, 800 мкм, 900 мкм, 1000 мкм или более. Датчик, раскрытый в данном документе, может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса, например, между сенсорным электродом и электродом сравнения, когда расстояние между (i) по меньшей мере частью молекулы-мишени (и/или меткой, соединенной с молекулой-мишенью) и (ii) сенсорным электродом составляет самое большее примерно 1000 мкм, 900 мкм, 800 мкм, 700 мкм, 600 мкм, 500 мкм, 400 мкм, 300 мкм, 200 мкм, 100 мкм, 90 мкм, 80 мкм, 70 мкм, 60 мкм, 50 мкм, 40 мкм, 30 мкм, 20 мкм, 10 мкм, 9 мкм, 8 мкм, 7 мкм, 6 мкм, 5 мкм, 4 мкм, 3 мкм, 2 мкм, 1 мкм, 900 нм, 800 нм, 700 нм, 600 нм, 500 нм, 400 нм, 300 нм, 200 нм, 100 нм, 90 нм, 80 нм, 70 нм, 60 нм, 50 нм, 40 нм, 30 нм, 20 нм, 10 нм, 9 нм, 8 нм, 7 нм, 6 нм, 5 нм, 4 нм, 3 нм, 2 нм, 1 нм, 0,5 нм, 0,1 нм или менее.

[0121] Датчик по настоящему раскрытию может быть выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса, например, между сенсорным электродом и электродом сравнения, когда молекула-мишень (и/или метка, связанная с молекулой-мишенью), находится внутри заданного пространства (например, заданного объема 217, как показано, например, на фиг. 2А), находящегося рядом или смежно с сенсорным электродом. Заданное пространство может характеризоваться объемом по меньшей мере примерно 0,1 нм², 0,5 нм², 1 нм², 2 нм², 3 нм², 4 нм², 5 нм², 6 нм², 7 нм², 8 нм², 9 нм², 10 нм², 20 нм², 30 нм², 40 нм², 50 нм², 60 нм², 70 нм², 80 нм², 90 нм², 100 нм², 200 нм², 300 нм², 400 нм², 500 нм², 600 нм², 700 нм², 800 нм², 900 нм², 1 мкм², 2 мкм², 3 мкм², 4 мкм², 5 мкм², 6 мкм², 7 мкм², 8 мкм², 9 мкм², 10 мкм², 20 мкм², 30 мкм², 40 мкм², 50 мкм², 60 мкм², 70 мкм², 80 мкм², 90 мкм², 100 мкм², 200 мкм², 300 мкм², 400 мкм², 500 мкм², 600 мкм², 700 мкм², 800 мкм², 900 мкм², 1000 мкм² или более. Заданное пространство может характеризоваться объемом самое большее примерно 1000 мкм², 900 мкм², 800 мкм², 700 мкм², 600 мкм², 500 мкм², 400 мкм², 300 мкм², 200 мкм², 100 мкм², 90 мкм², 80 мкм², 70 мкм², 60 мкм², 50 мкм², 40 мкм², 30 мкм², 20 мкм², 10 мкм², 9 мкм², 8 мкм², 7 мкм², 6 мкм², 5 мкм², 4 мкм², 3 мкм², 2 мкм², 1 мкм², 900 нм², 800 нм², 700 нм², 600 нм², 500 нм², 400 нм², 300 нм², 200 нм², 100 нм², 90 нм², 80 нм², 70 нм², 60 нм², 50 нм², 40 нм², 30 нм², 20 нм², 10 нм², 9 нм², 8 нм², 7 нм², 6 нм², 5 нм², 4 нм², 3 нм², 2 нм², 1 нм², 0,5 нм², 0,1 нм² или менее.

[0122] Датчик по настоящему раскрытию может не требовать, чтобы по меньшей мере часть молекулы-мишени (и/или метка, связанная с молекулой-мишенью) входила в и/или проходила через пору (например, нанопору, такую как белковая нанопора или

твердотельная нанопора) для детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса. Например, датчик может не содержать нанопоры или не быть функционально соединен с нанопорой, как показано, например, на фиг. 2A-2D. Альтернативно, по меньшей мере часть молекулы-мишени (и/или метка, связанная с молекулой-мишенью) может входить в и/или проходить через пору датчика (например, нанопору, такую как белковая нанопора или твердотельная нанопора) для детектирования датчиком одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса. Например, датчик может содержать нанопору, как показано на фиг. 1E.

[0123] На фиг. 2E показаны примеры графика зависимости емкости от сопротивления, полученного с помощью датчика после того, как каждый из нуклеотидных зондов 240-4 и 240-1 присоединен к субстрату 220 связывающим звеном 215. Измерение сигнала импеданса жидкости 105 может быть показано как фон или контроль. Как показано на графиках на фиг. 2E, несмотря на соединение с одинаковым нуклеотидным основанием (например, аденином), разные метки могут давать разные характеристики зависимости емкости от сопротивления, тем самым позволяя сенсору различать последовательное добавление двух или более одинаковых азотистых оснований к субстрату 220. В одном примере датчик по настоящему раскрытию может быть способен определять различие между (i) первым временем (t), указывающим на добавление N-го аденина (например, 20-го аденина), и (ii) вторым временем, указывающим на последующее добавление (N+1)-го аденина (например, 21-го аденина).

[0124] В некоторых вариантах осуществления, как показано на фиг. 3, высота 310 канала 305, удерживающего текучую среду 105, может быть рассчитана для подавления подвижности (или способности к диффузии) молекулы-мишени вдоль оси, параллельной высоте 310 канала 305. Когда эффективная рабочая зона датчика (например, размер связывающего звена, проводящего материала или сенсорного электрода) ограничена, всякая подвижность молекулы-мишени вдоль оси, перпендикулярной эффективной рабочей зоне датчика (например, оси, параллельной высоте 310), может отрицательно влиять на измерения одного или более сигналов. Таким образом, уменьшение высоты 310 канала 305 может сделать систему фактически двумерной, тем самым ограничивая какой-либо эффект от перпендикулярного движения молекулы-мишени относительно сенсорного электрода 110. Высота 310 канала может составлять самое большее 300 микromетров (мкм), 250 мкм, 200 мкм, 150 мкм, 100 мкм, 90 мкм, 80 мкм, 70 мкм, 60 мкм, 50 мкм, 40 мкм, 30 мкм, 25 мкм, 20 мкм, 15 мкм, 10 мкм, 9 мкм, 8 мкм, 7 мкм, 6 мкм, 5 мкм, 4 мкм, 3 мкм, 2 мкм, 1 мкм или менее. Высота 310 канала может составлять по меньшей мере 1 мкм, 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 25 мкм, 30 мкм, 40 мкм, 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкм, 90 мкм, 100 мкм, 150 мкм, 200 мкм, 250 мкм, 300 мкм или более.

[0125] Обращаясь к фиг. 3, в некоторых случаях высота 310 канала 305 может быть задана (например, во время изготовления датчика). Альтернативно, высота 310 канала 305 может быть регулируемой. В некоторых случаях, в зависимости от размера молекулы-

мишени или среднего размера популяции молекул-мишеней, может быть желательным регулирование высота 310 канала 305. В таких случаях один или более переключателей (например, механических переключателей, микрожидкостных переключателей) можно расположить на или смежно с по меньшей мере частью датчика для изменения высоты 310 в реальном времени. Примеры переключателей могут включать, но не ограничиваясь ими, исполнительные механизмы с тепловым или пьезоэлектрическим приводом, исполнительные механизмы с электроприводом и так далее.

[0126] В некоторых вариантах осуществления сенсорный электрод и электрод сравнения могут обеспечивать первое электрическое поле вдоль первого направления. В дополнение, система может дополнительно содержать дополнительный генератор электрического поля (например, дополнительные наборы электродов в другой цепи), выполненный с возможностью приложения второго электрического поля во втором направлении, отличающемся (например, практически перпендикулярном) по отношению к первому направлению первого электрического поля. Разница между первым направлением и вторым направлением может составлять по меньшей мере примерно 1 градус, 2 градуса, 3 градуса, 4 градуса, 5 градусов, 6 градусов, 7 градусов, 8 градусов, 9 градусов, 10 градусов, 15 градусов, 20 градусов, 30 градусов, 40 градусов, 50 градусов, 60 градусов, 70 градусов, 80 градусов, 90 градусов, 100 градусов, 110 градусов, 120 градусов, 130 градусов, 140 градусов, 150 градусов, 160 градусов, 170 градусов или более. Разница между первым направлением и вторым направлением могут составлять самое большее примерно 180 градусов, 170 градусов, 160 градусов, 150 градусов, 140 градусов, 130 градусов, 120 градусов, 110 градусов, 100 градусов, 90 градусов, 80 градусов, 70 градусов, 60 градусов, 50 градусов, 40 градусов, 30 градусов, 20 градусов, 15 градусов, 10 градусов, 9 градусов, 8 градусов, 7 градусов, 6 градусов, 5 градусов, 4 градуса, 3 градуса, 2 градуса, 1 градус или менее. В одном примере разница между первым направлением и вторым направлением может составлять примерно 90 градусов (то есть первое направление и второе направление могут быть практически перпендикулярны друг другу). На фиг. 4А схематично представлена система, содержащая датчик, к примеру, для оценки (например, анализа, идентификации, количественного определения, ранжирования и так далее) одной или более молекул-мишеней, причем датчик не содержит какого-либо дополнительного генератора электрического поля. Когда полинуклеотидный субстрат 220 большой и свернутый при связывании со связывающим звеном 215, складывание полинуклеотидного субстрата 220 может сделать одно или более положений субстрата 220 недоступным связывающему звену (например, ферменту полимеразы) для добавления целевого нуклеотида и, таким образом, отрицательно повлиять на чувствительность и/или точность датчика. Напротив, на фиг. 4В схематично представлена другая система, содержащая датчик и дополнительный генератор электрического поля, выполненный с возможностью приложения дополнительного электрического поля 405 между дополнительным набором электродов 410 и 415, к примеру, для оценки (например, анализа, идентификации, количественного определения, ранжирования и так далее) одной или более молекул-

мишеней. Как показано, направление электрического поля 405 может быть практически перпендикулярно поверхности сенсорного электрода 110. Приложенное электрическое поле 405 может разворачивать и/или натягивать субстрат 220 вдоль направления электрического поля 405, тем самым уменьшая складывание и наложение на субстрат 220 связывающего звена 215, проводящего материала (не показан) и/или поверхности сенсорного электрода 110.

[0127] Система может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5 или более дополнительных генераторов электрического поля. Система может содержать самое большее 5, 4, 3, 2 или 1 дополнительный генератор электрического поля. Когда имеется множество дополнительных генераторов электрического поля, множество дополнительных генераторов электрического поля могут прикладывать множество электрических полей, которые проходят вдоль одного и того же или разных направлений. Альтернативно, система может не содержать какого-либо дополнительного генератора электрического поля.

[0128] В некоторых вариантах осуществления молекулы-мишени могут содержать один или более окислительно-восстановительных фрагментов (например, меток), а датчик по настоящему раскрытию может быть выполнен с возможностью измерения окислительно-восстановительного потенциала (например, потенциала окисления или потенциала восстановления) окислительно-восстановительных фрагментов. В одном примере датчик может быть выполнен с возможностью измерения потенциала окисления окисляемой функциональной группы молекулы-мишени. Буферный раствор может отрицательно влиять на активность связывающего звена (например, ферментативную активность связывающего звена) и, таким образом, для какое-либо связывающего звена может быть желательно уменьшить концентрацию соли в растворе. Однако в некоторых случаях пониженная концентрация соли в буфере может увеличивать сопротивление системы и тем самым уменьшать чувствительность или точность датчика. В таких случаях использование метки с одним или более окислительно-восстановительными фрагментами и измерение окислительно-восстановительного потенциала молекулы-мишени, содержащей такую метку, может быть выгодным и улучшать точность.

[0129] На фиг. 5А схематично представлен пример системы, содержащей датчик, который измеряет потенциалы окисления одной или более молекул-мишеней, к примеру, для оценки (например, анализа, идентификации, количественного определения, ранжирования и так далее) одной или более молекул-мишеней. Датчик может содержать один или более компонентов системы, проиллюстрированной на фиг. 2А, например, сенсорный электрод 110, электрод 115 сравнения, жидкость 105 (например, солевой раствор), связывающее звено 215 (например, полимеразу) и полинуклеотидный субстрат 220. В данном случае молекулы-мишени, которые нужно присоединить к субстрату 220 с помощью связывающего звена 215, представляют собой синтетические нуклеотиды А, Т, С и G, обозначенные номерами 510-1, 510-2, 510-3 и 510-4. Окислительно-восстановительные фрагменты молекул-мишеней могут представлять собой ферроцен (Fc)

или ряд производных Fc, то есть Fc-x, Fc-y и Fc-dm. Fc и его производные могут иметь разные потенциалы окисления, а значит, при присоединении связывающим звеном 215 к субстрату 220 каждой молекулы-мишени, содержащей свою соответствующую окислительно-восстановительную метку, приложение разных напряжений (например, изменяемых на несколько милливольт) может быть способно выявить, какая молекула-мишень была добавлена к субстрату 220, например, путем обнаружения переноса электрона(ов) между (i) окислительно-восстановительным фрагментом молекулы-мишени и (ii) сенсорным электродом, когда добавляемая к субстрату 220 молекула-мишень, связанная с окислительно-восстановительным фрагментом, связывается связывающим звеном.

[0130] На фиг. 5B схематично представлен график зависимости тока (I, ось y) от времени (t, ось x) при различных напряжениях (обозначенных как V_0 , V_1 , V_2 , V_3 и V_4 вдоль оси y), и график тока (обозначенный квадратными пиками), полученный от датчика по фиг. 5A. На фиг. 5B друг на друга наложено множество графиков зависимости тока от времени при различных напряжениях, чтобы продемонстрировать разные сигнатуры тока, возникающие от разных комплексов молекула-мишень – окислительно-восстановительная метка, как предусмотрено здесь. Окислительно-восстановительные метки четырех молекул-мишеней 510-1, 510-2, 510-3 и 510-4 могут реагировать на разные напряжения, и, таким образом, соответствующие измеренные сигнатуры тока можно использовать для определения последовательности 520 интересующей области субстрата-мишени 220.

[0131] В некоторых вариантах осуществления датчик может быть выполнен с возможностью определения времени нахождения молекулы-мишени на связывающем звене. В некоторых случаях разные молекулы-мишени или разные метки, связанные с молекулами-мишенями, могут проявлять разные времена нахождения на связывающем звене датчика, и время нахождения может быть уникальной или дополнительной сигнатурой для анализа или идентификации молекул-мишеней.

[0132] Датчик по настоящему раскрытию может представлять собой электрическую цепь (например, схему CMOS или FET). Электрическая цепь может быть соединена с источником напряжения. К электрической цепи может быть приложено постоянное (неизменное) напряжение, и можно измерять изменение тока. Альтернативно, можно измерять изменение напряжения, необходимого для поддержания установившегося тока. Датчик может находиться в электролитическом растворе (например, 0,5 М ацетата калия и 10 мМ KCl). Альтернативно, датчик может не находиться в электролитическом растворе. В некоторых примерах датчик может находиться в водном растворе или газе.

[0133] Одним или более сигналами может быть ток или напряжение, измеренный(ое) в сенсорной цепи. Одним или более сигналами могут быть ток и напряжение, измеренные в сенсорной цепи. Сигналом может быть туннельный ток. Альтернативно, сигналом может не быть туннельный ток. Током может быть ток Фарадея. Альтернативно, током может не быть ток Фарадея. Ток может составлять по меньшей мере 1 пикоампер (пА), 10 пА, 100 пА, 1 наноампер (нА), 10 нА, 100 нА, 1 микроампер

(мА), 10 мА, 100 мА или более. Ток может составлять самое большее 100 мА, 10 мА, 1 мА, 100 нА, 10 нА, 1 нА, 100 пА, 10 пА, 1 пА или менее. Ток может быть по меньшей мере в диапазоне пикоампер (пА), в диапазоне десятков пА, в диапазоне сотен пА, в диапазоне наноампер (нА), в диапазоне десятков нА, в диапазоне сотен нА, в диапазоне микроампер (мА), в диапазоне десятков мА или выше. Ток может находиться самое большее в диапазоне десятков мА, в диапазоне мА, в диапазоне сотен нА, в диапазоне десятков нА, в диапазоне нА, в диапазоне сотен пА, в диапазоне десятков пА, в диапазоне пА или ниже. Напряжение может составлять по меньшей мере 0,1 милливольт (мВ), 0,5 мВ, 1 мВ, 5 мВ, 10 мВ, 50 мВ, 100 мВ, 500 мВ или более. Напряжение может составлять самое большее 500 мВ, 100 мВ, 50 мВ, 10 мВ, 5 мВ, 1 мВ, 0,5 мВ, 0,1 мВ или менее. Напряжение может быть по меньшей мере в диапазоне милливольт (мВ), в диапазоне десятков мВ, в диапазоне сотен мВ или выше. Напряжение может быть самое большее в диапазоне сотен мВ, в диапазоне десятков мВ, в диапазоне мВ или ниже.

[0134] В некоторых вариантах осуществления датчик по настоящему раскрытию может быть представлен в виде массивов, таких как массивы, находящиеся на чипе или биочипе. Массив датчиков может иметь любое подходящее число любых датчиков по настоящему раскрытию. Массив может содержать примерно 10, примерно 20, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 400, примерно 600, примерно 800, примерно 1000, примерно 1500, примерно 2000, примерно 3000, примерно 4000, примерно 5000, примерно 10000, примерно 15000, примерно 20000, примерно 40000, примерно 60000, примерно 80000, примерно 100000, примерно 200000, примерно 400000, примерно 600000, примерно 800000, примерно 1000000 или более датчиков.

[0135] В другом аспекте настоящего раскрытия представлен способ анализа или идентификации молекулы-мишени. Способ может включать использование датчика для детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана по меньшей мере частью датчика. Способ может дополнительно включать использование упомянутых одного или более сигналов для анализа или идентификации молекулы-мишени. В способе может использоваться любая из рассматриваемых систем по настоящему раскрытию, показанных на фиг. 1-5.

[0136] В другом аспекте настоящего раскрытия представлен способ анализа или идентификации молекулы-мишени. Способ может включать обеспечение датчика, содержащего сенсорный электрод и электрод сравнения, электрически связанные друг с другом. Датчик может дополнительно содержать диэлектрический материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий первую часть поверхности сенсорного электрода. Датчик может дополнительно содержать проводящий материал, соединенный с сенсорным электродом и покрывающий вторую часть поверхности сенсорного электрода. Датчик может дополнительно содержать связывающее звено, соединенное с проводящим материалом, причем связывающее звено выполнено с возможностью связывания молекулы-мишени. Способ может дополнительно включать детектирование одного или

более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим фрагментом. Способ может дополнительно включать использование упомянутых одного или более сигналов для анализа или идентификации молекулы-мишени. В способе может использоваться любая из рассматриваемых систем по настоящему раскрытию, показанных на фиг. 1-5.

[0137] На фиг. 7 показан примерный процесс 701 осуществления способа анализа или идентификации молекулы-мишени. Способ может включать обеспечение датчика (процесс 710). Датчик может содержать связывающее звено. Способ может включать обеспечение молекулы-мишени в датчике (процесс 720). Способ может включать детектирование одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим звеном (процесс 730). Способ может включать использование упомянутых одного или более сигналов для анализа или идентификации молекулы-мишени.

[0138] Один или более сигналов могут указывать на (i) электрическое сопротивление или его изменение в датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в датчике, или (ii) электрическую индуктивность или ее изменение в датчике. Один или более сигналов могут указывать на по меньшей мере два из (i) электрического сопротивления или его изменения в датчике, (ii) электрической емкости или ее изменения в датчике, или (iii) электрической индуктивности или ее изменения в датчике. Один или более сигналов могут указывать на (i) электрическое сопротивление или его изменение в датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в датчике, и (iii) электрическую индуктивность или ее изменение в датчике.

[0139] Одним или более сигналами могут быть ток или напряжение. Одним или более сигналами может не быть туннельный ток.

[0140] В некоторых вариантах осуществления сенсорный электрод и электрод сравнения могут обеспечивать первое электрическое поле. Кроме того, способ может дополнительно включать обеспечение дополнительного генератора электрического поля. Способ может дополнительно включать использование дополнительного генератора электрического поля для приложения второго электрического поля во втором направлении, которое приблизительно перпендикулярно первому направлению первого электрического поля.

[0141] В некоторых вариантах осуществления способ может дополнительно включать определение времени нахождения молекулы-мишени на связывающем звене. Способ может дополнительно включать использование времени нахождения вместо и/или в дополнение к упомянутым одному или более сигналам для анализа или идентификации молекулы-мишени.

[0142] II. Образец

[0143] Образцы для анализа могут содержать множество полинуклеотидов. Полинуклеотид может представлять собой одноцепочечную ДНК, двухцепочечную ДНК или их комбинацию. Полинуклеотиды могут содержать геномную ДНК, геномную кДНК,

внеклеточную ДНК, внеклеточную кДНК или комбинацию любых из вышеперечисленных.

[0144] Полинуклеотид может содержать внеклеточную ДНК, циркулирующую опухолевую ДНК, геномную ДНК и ДНК из погруженных в формалин и заключенных в парафин (FFPE) образцов. В некоторых примерах выделенная ДНК из FFPE образца может быть повреждена, и такая поврежденная ДНК может быть восстановлена (репарирована) с помощью доступного набора для восстановления ДНК FFPE. Образец может включать в себя любой подходящий образец ДНК и/или кДНК, такой как, например, моча, кал, кровь, слюна, ткань, биопсия, физиологическая жидкость или опухолевые клетки.

[0145] Множество полинуклеотидов могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

[0146] Образец полинуклеотидов может происходить из любого подходящего источника. Например, образец может быть получен от пациента, от животного, от растения или из окружающей среды, такой как, например, встречающаяся в природе или искусственная атмосфера, система водоснабжения, почва, система сбора атмосферных патогенов, подземные отложения, грунтовые воды или очистные сооружения.

[0147] Полинуклеотиды из образца могут включать один или более разных полинуклеотидов, таких как, например, ДНК, РНК, рибосомная РНК (рРНК), транспортная РНК (тРНК), микроРНК (миРНК), матричная РНК (мРНК), фрагменты любого из вышеперечисленных или комбинации любых из вышеперечисленных. Образец может содержать ДНК. Образец может содержать геномную ДНК. Образец может содержать митохондриальную ДНК, хлоропластную ДНК, плазмидную ДНК, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, олигонуклеотидные метки или комбинацию любых из вышеперечисленных.

[0148] Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными, двухцепочечными или их комбинацией. Полинуклеотид может представлять собой одноцепочечный полинуклеотид, который может быть или не быть в присутствии двухцепочечных полинуклеотидов.

[0149] Начальное количество полинуклеотидов в образце может составлять, например, менее 50 нг, например, менее 45 нг, 40 нг, 35 нг, 30 нг, 25 нг, 20 нг, 15 нг, 10 нг, 5 нг, 4 нг, 3 нг, 2 нг, 1 нг, 0,5 нг, 0,1 нг или менее. Начальное количество полинуклеотидов в образце может составлять, например, более 0,1 нг, например, более 0,5 нг, 1 нг, 2 нг, 3 нг, 4 нг, 5 нг, 10 нг, 15 нг, 20 нг, 25 нг, 30 нг, 35 нг, 40 нг, 45 нг, 50 нг или более. Количество начальных полинуклеотидов может составлять, например, от 0,1 нг до 100 нг, от 1 нг до 75 нг, от 5 нг до 50 нг или от 10 нг до 20 нг.

[0150] Полинуклеотиды в образце могут быть одноцепочечными, либо в том виде, в каком они были получены, либо в результате обработки (например, денатурации). Дополнительные примеры подходящих полинуклеотидов описаны в настоящем документе, например, в отношении любого из различных аспектов раскрытия.

Полинуклеотиды можно подвергать последующим стадиям (например, закольцовывания и амплификации) без стадии экстракции и/или без стадии очистки. Например, образец текучей среды может быть обработан для удаления клеток без стадии экстракции для получения очищенного образца жидкости и образца клеток с последующим выделением полинуклеотидов из очищенного образца жидкости. Доступны различные процедуры выделения полинуклеотидов, такие как преципитация или неспецифическое связывание с субстратом, с последующей промывкой субстрата для высвобождения связанных полинуклеотидов. Когда полинуклеотиды выделяют из образца без стадии клеточной экстракции, полинуклеотиды в основном будут внеклеточными или «бесклеточными» полинуклеотидами, которые могут соответствовать мертвым или поврежденным клеткам. Идентичность таких клеток может быть использована для характеристики клеток или популяции клеток, из которых они получены, например, в микробном сообществе.

[0151] Образец может быть получен у субъекта. Субъектом может быть любой подходящий организм, включая, например, растения, животных, грибы, протистов, монер, вирусы, митохондрии и хлоропласты. Полинуклеотиды образца могут быть выделены у субъекта, например, образец клетки, образец ткани, образец физиологической жидкости или образец органа, или клеточные культуры, полученные из любого из них, включая, например, культивированные клеточные линии, биопсию, образец крови, мазок со щеки или образец текучей среды, содержащий клетку, такой как слюна. Субъектом может быть животное, такое как корова, свинья, мышь, крыса, курица, кошка, собака, или млекопитающее, такое как человек. Образец может содержать опухолевые клетки, например, в образце опухолевой ткани от/из субъекта.

[0152] Образец может не содержать интактных клеток, может быть обработан для удаления клеток, или полинуклеотиды выделяют без этапа клеточной экстракции, такого как для выделения внеклеточных полинуклеотидов, таких как внеклеточная ДНК.

[0153] Другие примеры источников образцов включают образцы из крови, мочи, фекалий, ноздрей, легких, кишечника, других физиологических жидкостей или выделений, их производные или их комбинации.

[0154] Образец от одного индивидуума может быть разделен на множественные отдельные образцы, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более отдельных образцов, которые независимо подвергают способам по раскрытию, таким как анализ в двух повторах, в трех повторах, в четырех повторах или более. Если образец получен у субъекта, у этого субъекта может быть также получена эталонная последовательность, такая как, например, консенсусная последовательность из анализируемого образца или последовательность полинуклеотидов из другого образца или другой ткани того же субъекта. Например, образец крови может быть проанализирован на наличие мутаций цодНК, а клеточная ДНК из другого образца от субъекта, такого как буккальный образец или образец кожи, может быть проанализирована для определения эталонной последовательности.

[0155] Полинуклеотиды могут быть выделены из образца, с экстракцией из клеток

в образце согласно любому подходящему способу или без нее.

[0156] Множество полинуклеотидов может содержать внеклеточные полинуклеотиды, такие как внеклеточная ДНК (вкДНК) или циркулирующая опухолевая ДНК (цоДНК). Внеклеточная ДНК циркулирует как у здоровых, так и у больных индивидуумов. вкДНК из опухолей (цоДНК) не ограничена каким-либо конкретным типом рака, но, по-видимому, является обычным явлением при различных злокачественных новообразованиях. Концентрация свободно циркулирующей ДНК в плазме может быть ниже у контрольных субъектов по сравнению с концентрацией у пациентов с наличием или подозрением на наличие какого-то состояния. Например, концентрация свободно циркулирующей ДНК в плазме может составлять, например, от 14 нг/мл до 18 нг/мл у контрольных субъектов и от 18 нг/мл до 318 нг/мл у пациентов с неоплазией.

[0157] Апоптотическая и некротическая гибель клеток может способствовать внеклеточной циркуляции ДНК в физиологических жидкостях. Например, значительно повышенные уровни циркулирующей ДНК могут наблюдаться в плазме больных раком предстательной железы и другими заболеваниями предстательной железы, такими как доброкачественная гиперплазия предстательной железы и простатит. Кроме того, циркулирующая опухолевая ДНК может присутствовать в текучих средах, происходящих из тех органов, где возникает первичная опухоль. В одном примере, обнаружение рака молочной железы может быть достигнуто при промывании протоков; обнаружение колоректального рака - в стуле; обнаружение рака легких - в мокроте; и обнаружение рака предстательной железы - в моче или эякуляте. Внеклеточная ДНК может быть получена из множества различных источников. Примером источника могут быть образцы крови субъекта. Однако вкДНК или другая фрагментированная ДНК может быть получена из множества других источников, включая, например, образцы мочи и кала, которые могут быть источником вкДНК, включая цоДНК.

[0158] В некоторых вариантах осуществления молекула-мишень может указывать на состояние здоровья или заболевание. В некоторых случаях заболеванием может быть опухоль или рак. Неограничивающие примеры антигенов, которые могут быть связаны связывающим звеном рассматриваемой системы, могут включать, но не ограничиваясь ими, 1-40-β-амилоид, 4-1BB, 5AC, 5T4, 707-AP, киназный якорный белок 4 (AKAP-4), активинный рецептор тип-2B (ACVR2B), активин-рецептороподобную киназу 1 (ALK1), антиген аденокарциномы, адипофилин, адренорецептор β 3 (ADRB3), AGS-22M6, рецептор фолиевой кислоты α, α-фетопротеин (AFP), AIM-2, киназу анапластической лимфомы (ALK), рецептор андрогенов, ангиопоэтин 2, ангиопоэтин 3, ангиопоэтин-связывающий рецептор 2 клеточной поверхности (Tie 2), токсин сибирской язвы, AOC3 (VAP-1), антиген созревания В-клеток (BCMA), B7-H3 (CD276), возбудитель сибирской язвы, фактор активации В-клеток (BAFF), клетка В-лимфомы, антиген 2 стромальных клеток костного мозга (BST2), транскрипционный фактор Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS), антиген C242, C5, CA-125, раковый антиген 125 (CA-125 или

MUC16), раковый/тестикулярный антиген 1 (NY-ESO-1), раковый/тестикулярный антиген 2 (LAGE-1a), карбоангидраза 9 (CA-IX), раково-эмбриональный антиген (CEA), сердечный миозин, CCCTC-связывающий фактор (CTCF), CCL11 (эотаксин-1), CCR4, CCR5, CD11, CD123, CD125, CD140a, CD147 (басигин), CD15, CD152, CD154 (CD40L), CD171, CD179a, CD18, CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23 (рецептор IgE), CD24, CD25 (α -цепь рецептора IL-2), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3 ϵ , CD30, член f подобного молекуле CD300 семейства (CD300LF), CD319 (SLAMF7), CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, лиганд CD40, CD41, CD44 v7, CD44 v8, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD80, CD97, CEA-родственный антиген, CFD, ch4D5, открытая рамка считывания 61 хромосомы X (CXORF61), клаудин 18.2 (CLDN18.2), клаудин 6 (CLDN6), *Clostridium difficile*, фактор слипания A, CLCA2, рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R), CSF2, CTLA-4, член A семейства 12 доменов лектина C-типа (CLEC12A), лектиноподобную молекулу-1 C-типа (CLL-1 или CLECL1), хемокиновый рецептор C-X-C типа 4, циклин B1, цитохром P4501B1 (CYP1B1), сур-В, цитомегаловирус, гликопротеин В цитомегаловируса, дабигатран, DLL4, DPP4, DR5, шига-токсин тип-1 *E. coli*, шига-токсин типа-2 *E. coli*, экто-ADP-рибозилтрансферазу 4 (ART4), рецептор муциноподобного гормона 2, содержащий модуль EGF (EMR2), множественный EGF-подобный домен 7 (EGFL7), мутантный фактор элонгации 2 (ELF2M), эндотоксин, эфрин A2, эфрин B2, рецептор 2 эфрина типа A, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), вариант рецептора эпидермального фактора роста III (EGFRvIII), эписиалин, молекулу адгезии эпителиальных клеток (EpcAM), эпителиальный гликопротеин 2 (EGP-2), эпителиальный гликопротеин 40 (EGP-40), ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG (трансмембранная протеаза, слитый ген ETS серина 2 (TMPRSS2)), *Escherichia coli*, вариантный ген 6 транслокации ETS, расположенный на хромосоме 12p (ETV6-AML), F-белок респираторно-синцитиального вируса, FAP, Fc-фрагмент рецептора IgA (FCAR или CD89), Fc-рецептор-подобный 5 (FCRL5), фетальный ацетилхолиновый рецептор, β -цепь фибрина II, белок α активации фибробластов (FAP), экстра домен-В фибронектина, FGF-5, Fms-подобную тирозинкиназу 3 (FLT3), фолат-связывающий белок (FBP), фолатагидролазу, рецептор фолиевой кислоты 1, рецептор фолиевой кислоты α , рецептор фолиевой кислоты β , Fos-родственный антиген 1, рецептор Frizzled, фукозил GM1, G250, рецептор 20, связанный с G-белком (GPR20), рецептор, связанный с G-белком класс C группа 5, член D (GPC5D), ганглиозид G2 (GD2), ганглиозид GD3, гликопротеин 100 (gp100), глипикан-3 (GPC3), α -цепь рецептора GMCSF, GPNMB, GnT-V, фактор дифференцировки роста 8, GUCY2C, мутантный белок теплового шока 70-2 (mut hsp70-2), гемагглютинин, клеточный рецептор 1 вируса гепатита A (HAVCR1), поверхностный антиген гепатита B, вирус гепатита B, HER1, HER2/neu, HER3, гексасахаридную часть гликоцерамида globoH (GloboH), HGF, HNGFR, высокомолекулярный антиген, ассоциированный с меланомой (HMW-MAA), гистоновый комплекс, ВИЧ-1, HLA-DR, HNGF, Hsp90, HST-2 (FGF6), вирус папилломы человека E6 (HPV E6), вирус папилломы человека E7 (HPV E7), киназу рецептора рассеивающего

фактора человека, обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), TNF человека, ICAM-1 (CD54), iCE, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IgE, область Fc IgE, IGF-1, рецептор IGF-1, IGHE, IL-12, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-1 β , IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, рецептор IL-6, IL-9, иммуноглобулин лямбда-подобный полипептид 1 (IGLL1), гемагглютинин гриппа А, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-I рецептор), инсулиноподобный фактор роста 2 (ILGF2), интегрин $\alpha 4\beta 7$, интегрин $\beta 2$, интегрин $\alpha 2$, интегрин $\alpha 4$, интегрин $\alpha 5\beta 1$, интегрин $\alpha 7\beta 7$, интегрин $\alpha \text{IIb}\beta 3$, интегрин $\alpha \nu\beta 3$, рецептор интерферона α/β , индуцированный интерфероном γ белок, рецептор α интерлейкина 11 (IL-11R α), субъединицу α -2 рецептора интерлейкина-13 (IL-13Ra2 или CD213A2), карбоксилэстеразу кишечника, область домена киназы (KDR), KIR2D, KIT (CD117), молекулу адгезии L1-клеток (L1-CAM), легумаин, член 2 подсемейства А лейкоцитарного иммуноглобулиноподобного рецептора (LILRA2), лейкоцит-ассоциированный иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1), антиген Льюиса-Y, LFA-1 (CD11a), LINGO-1, липотейхоевую кислоту, LOXL2, L-селектин (CD62L), комплекс лимфоцитарного антигена 6, локус К 9 (LY6K), антиген лимфоцитов 75 (LY75), специфичную для лимфоцитов протеинтирозинкиназу (LCK), лимфотоксин- α (LT- α) или фактор некроза опухоли- β (TNF- β), фактор, ингибирующий миграцию макрофагов (MIF или MMIF), M-CSF, антиген дифференцировки молочной железы (NY-BR-1), MCP-1, антиген-1 меланомы яичка (MAD-CT-1), антиген-2 меланомы яичка (MAD-CT-2), ингибитор апоптоза меланомы (ML-IAP), ассоциированный с меланомой антиген 1 (MAGE-A1), мезотелин, муцин 1, ассоциированный с клеточной поверхностью (MUC1), MUC-2, муцин CanAg, миелин-ассоциированный гликопротеин, миостатин, N-ацетилглюкозаминилтрансферазу V (NA17), NCA-90 (гранулоцитарный антиген), фактор роста нервов (NGF), протеиназу 1, регулируемую апоптозом нейронов, молекула адгезии нервных клеток (NCAM), ингибитор роста нейритов (например, NOGO-A, NOGO-B, NOGO-C), нейропилин-1 (NRP1), N-гликолилнейраминую кислоту, NKG2D, рецептор Notch, о-ацетил-G ганглиозид D2 (OAcGD2), обонятельный рецептор 51E2 (OR51E2), онкофетальный антиген (h5T4), слитый белок онкогена, состоящий из кластерной области точки разрыва (BCR) и гомолог 1 вирусного онкогена мышинового лейкоза Абельсона (Abl) (bcr-abl), *Oryctolagus cuniculus*, OX-40, oxLDL, мутант p53, парный бокс-белок Pax-3 (PAX3), парный бокс-белок Pax-5 (PAX5), паннексин 3 (PANX3), фосфатно-натриевый котранспортер, фосфатидилсерин, плацентарно-специфический 1 (PLAC1), рецептор тромбоцитарного фактора роста α (PDGF-R α), рецептор тромбоцитарного фактора роста β (PDGFR- β), полисиаловую кислоту, проакрозин-связывающий белок sp32 (OY-TES1), белок 1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), пропротеинконвертазу субтилизин/кексин типа 9 (PCSK9), простазу, опухолевый антиген-1 карциномы предстательной железы (PCTA-1 или галектин 8), антиген меланомы, распознаваемый Т-клетками 1 (MelanA или MART1), P15, P53, PRAME, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), специфический мембранный антиген простаты (PSMA), кислую фосфатазу предстательной железы (PAP), клетки карциномы предстательной

железы, простатин, протеазу серин 21 (тестизин или PRSS21), субъединицу протеасомы (просома, макропаин), тип β , 9 (LMP2), *Pseudomonas aeruginosa*, гликопротеин вируса бешенства, RAGE, член С семейства гомологов Ras (RhoC), рецептор-активатор лиганда каппа-В ядерного фактора (RANKL), рецептор конечных продуктов повышенного гликозилирования (RAGE-1), рецептор тирозинкиназоподобного орфанного рецептора 1 (ROR1), renal ubiquitous 1 (RU1), renal ubiquitous 2 (RU2), респираторно-синцитиальный вирус, антиген резус-группы крови D, резус-фактор, точки разрыва транслокации саркомы, склеростин (SOST), селектин Р, сиалиловую молекулу адгезии Льюиса (sLe), белок спермы 17 (SPA17), сфингозин-1-фосфат, антиген плоскоклеточного рака, распознаваемый Т-клетками 1, 2 и 3 (SART1, SART2 и SART3), стадийспецифический эмбриональный антиген-4 (SSEA-4), *Staphylococcus aureus*, STEAP1, surviving, синдекан 1 (SDC1)+A314, SOX10, сурвивин, surviving-2B, синовиальную саркому, точку разрыва X 2 (SSX2), Т-клеточный рецептор, TCR Г Белок альтернативной рамки считывания (TARP), теломеразу, TEM1, тенасцин С, TGF- β (например, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3), рецептор тиреотропного гормона (TSHR), ингибитор пути тканевого фактора (TFPI), Тn-антиген ((Тn Ag) или (GalNAc α -Ser/Thr)), член семейства рецепторов TNF созревания В-клеток (BCMA), TNF- α , TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRG, трансклутаминазу 5 (TGS5), опухолевый антиген CTAA16.88, опухолевой эндотелиальный маркер 1 (TEM1/CD248), связанный с опухолевым эндотелиальным маркером 7 (TEM7R), опухолевой белок p53 (p53), опухолеспецифическое гликозилирование MUC1, опухолеассоциированный преобразователь сигнала кальция 2, опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG72), опухолеассоциированный гликопротеин 72 (TAG-72)+A327, рецептор TWEAK, тирозиназу, родственный тирозиназе белок 1 (TYRP1 или гликопротеин 75), родственный тирозиназе белок 2 (TYRP2), уроплакин 2 (UPK2), фактор роста эндотелия сосудов (например, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF), рецептор 1 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1), рецептор 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR2), виментин, гомолог, полученный из вирусного онкогена v-мус птичьего миелоцитоматоза нейробластомы (MYCN), фактор фон Виллебранда (VWF), опухолевый белок Вильмса (WT1), семейство антигенов Х, член 1А (XAGE1), β -амилоид и к-легкая цепь.

[0159] III. Нанопора

[0160] Система секвенирования может содержать реакционную камеру, которая включает в себя одно или более нанопоровых устройств. Нанопоровое устройство может представлять собой нанопоровое устройство с индивидуальной адресацией. Нанопора с индивидуальной адресацией может быть индивидуально считываемой. Нанопора с индивидуальной адресацией может быть индивидуально записываемой. Нанопора с индивидуальной адресацией может быть индивидуально считываемой и индивидуально записываемой. Система может содержать один или более компьютерных процессоров для способствования подготовке образцов и различным операциям по раскрытию, таким как секвенирование полинуклеотидов. Процессор может быть соединен с нанопоровым устройством.

[0161] Нанопоровое устройство может включать в себя множество сенсорных электродов с индивидуальной адресацией. Каждый сенсорный электрод может содержать смежную с электродом мембрану и одну или более нанопор в этой мембране. Нанопора может быть в мембране, такой как липидный бислой, расположенный смежно с или в обеспечивающей измерение окрестности электрода, который является частью интегральной схемы или соединен с интегральной схемой. Нанопора может быть связана с отдельным электродом и сенсорной интегральной схемой или с множеством электродов и сенсорных интегральных схем. Нанопора может представлять собой твердотельную нанопору.

[0162] Устройства и системы для применения в способах, представленных в настоящем раскрытии, могут точно обнаруживать отдельные события встраивания нуклеотидов, например, при встраивании нуклеотида в растущую цепь, комплементарную матрице. Встраивать нуклеотиды в растущую полинуклеотидную цепь может фермент, такой как ДНК-полимераза, РНК-полимераза или лигаза. Ферменты, такие как полимеразы, могут генерировать полинуклеотидные цепи.

[0163] Добавленный нуклеотид может быть комплементарен соответствующей цепи матричного полинуклеотида, которая гибридизируется с растущей цепью. Нуклеотид может содержать метку или разновидность метки, которая связана с любым положением нуклеотида, включая, но не ограничиваясь ими, фосфат, такой как γ -фосфат, сахар или фрагмент азотистого основания нуклеотида. В некоторых случаях метки обнаруживают (детектируют) в то время, когда метки связываются с полимеразой во время встраивания нуклеотидных меток. Метка может продолжать обнаруживаться до тех пор, пока метка не переместится через нанопору после встраивания нуклеотида и последующего отщепления и/или высвобождения метки. События встраивания нуклеотидов могут высвобождать метки из нуклеотидов, которые проходят через нанопоры и обнаруживаются. Метка может быть высвобождена полимеразой или отщеплена/высвобождена любым подходящим образом, включая, без ограничения, отщепление ферментом, расположенным рядом с полимеразой. Таким образом может быть идентифицировано встроенное основание (т.е. А, С, G, Т или U), поскольку из каждого типа нуклеотида (т.е. аденина, цитозина, гуанина, тимина или урацила) высвобождается уникальная метка. При событиях встраивания нуклеотидов, которые не высвобождают ее, метка, связанная со встроенным нуклеотидом, обнаруживается с помощью нанопоры. В некоторых примерах метка может проходить через нанопору или в ее окрестности и обнаруживаться с помощью нанопоры.

[0164] Способы и системы по раскрытию могут обеспечивать возможность обнаружения событий встраивания нуклеотидов, например, с разрешающей способностью по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 или 100000 полинуклеотидных оснований в течение данного периода времени. Например, нанопоровое устройство может использоваться для обнаружения отдельных событий встраивания нуклеотидов, причем каждое событие связано с отдельным основанием нуклеиновой кислоты. В других примерах нанопоровое устройство может использоваться

для обнаружения события, связанного с множеством оснований. Например, сигнал, воспринимаемый нанопоровым устройством, может быть комбинированным сигналом от по меньшей мере 2, 3, 4 или 5 оснований.

[0165] В некоторых способах секвенирования метки не проходят через нанопору. Метки могут детектироваться нанопорой и выходить из нанопоры, не проходя через нанопору, например, выходя с направления, обратного тому направлению, с которого метка вошла в нанопору. Устройство для секвенирования может быть выполнено с возможностью активного вытеснения меток из нанопоры.

[0166] В некоторых способах секвенирования метки не высвобождаются при событиях встраивания нуклеотидов. События встраивания нуклеотидов могут предоставлять метки нанопоре без высвобождения меток. Метки могут обнаруживаться нанопорой без их высвобождения. Метки могут прикрепляться к нуклеотидам линкером достаточной длины, чтобы предоставить метку нанопоре для детектирования.

[0167] События встраивания нуклеотидов могут детектироваться нанопорой в реальном времени по мере того, как они происходят. Фермент, такой как ДНК-полимераза, присоединенный(ая) к или находящийся(ая) в окрестности нанопоры, может способствовать прохождению полинуклеотида через нанопору или рядом с ней. Событие встраивания нуклеотида или встраивания множества нуклеотидов могут высвобождать или предоставлять одну или более меток, которые могут быть обнаружены нанопорой. Обнаружение может происходить по мере того, как метки проходят через нанопору или рядом с ней, пока метки находятся в нанопоре и/или пока метки предоставлены нанопоре. В некоторых случаях фермент, присоединенный к нанопоре или находящийся в ее окрестности, может способствовать детектированию меток при встраивании одного или более нуклеотидов.

[0168] Меткой может быть атом, молекула, группа атомов или группа молекул. Метка может обеспечивать оптическую, электрохимическую, магнитную или электростатическую, например, индуктивную или емкостную, сигнатуру, которая может быть обнаружена с помощью нанопоры.

[0169] Нанопора может быть сформирована в или иным образом встроена в мембрану, расположенную смежно с сенсорным электродом сенсорной цепи, такой как интегральная схема. Интегральная схема может быть специализированной интегральной схемой (ASIC). Интегральная схема может быть на полевых транзисторах или на комплементарных структурах металл-оксид-полупроводник (КМОП или CMOS). Сенсорная цепь может быть расположена в микросхеме (чипе) или другом устройстве с нанопорой, или вне микросхемы (чипа) или устройства, например, в конфигурации вне чипа.

[0170] Когда нуклеиновая кислота или метка протекает через нанопору или рядом с ней, сенсорная цепь детектирует электрический сигнал, связанный с нуклеиновой кислотой или меткой. Нуклеиновая кислота может быть субъединицей более крупной цепи. Метка может быть побочным продуктом события встраивания нуклеотида или

другого взаимодействия между меченой нуклеиновой кислотой и нанопорой или примыкающим к нанопоре веществом, таким как фермент, который отщепляет метку от нуклеиновой кислоты. Метка может оставаться прикрепленной к нуклеотиду. Детектированный сигнал может быть собран (получен) и сохранен в ячейке памяти, а затем использован для построения последовательности нуклеиновой кислоты. Полученный сигнал может быть обработан для учета любых аномалий в детектированном сигнале, таких как ошибки.

[0171] Нанопоры можно использовать для непрямого секвенирования полинуклеотидов, в некоторых случаях – с электрическим детектированием. Непрямое секвенирование может представлять собой любой метод, при котором встроенный в растущую цепь нуклеотид не проходит через нанопору. Полинуклеотид может проходить на любом подходящем расстоянии от и/или в окрестности нанопоры, в некоторых случаях в пределах такого расстояния, что метки, высвобождаемые в результате событий встраивания нуклеотидов, обнаруживаются в нанопоре.

[0172] Побочные продукты событий встраивания нуклеотидов могут быть детектированы нанопорой. События встраивания нуклеотидов относятся к встраиванию нуклеотида в растущую полинуклеотидную цепь. Побочный продукт может быть соотнесен с встраиванием нуклеотида данного конкретного типа. События встраивания нуклеотидов могут катализироваться ферментом, таким как ДНК-полимераза, и использовать взаимодействие пар оснований с молекулой-матрицей для выбора среди доступных для встраивания нуклеотидов в каждом месте.

[0173] Образец нуклеиновой кислоты может быть секвенирован с использованием меченых нуклеотидов или аналогов нуклеотидов. В некоторых примерах способ секвенирования молекулы нуклеиновой кислоты включает (а) встраивание (например, полимеризацию) меченых нуклеотидов, при этом при встраивании высвобождается метка, связанная с отдельным нуклеотидом, и (b) детектирование высвобожденной метки с помощью нанопоры. В некоторых случаях способ дополнительно включает направление метки, присоединенной к отдельному нуклеотиду или высвобожденной из него, через нанопору. Высвобожденная или присоединенная метка может быть направлена любым подходящим методом, в некоторых случаях с помощью фермента (или молекулярного мотора) и/или разности потенциалов на поре. В качестве альтернативы, высвобожденная или присоединенная метка может быть направлена через нанопору без использования фермента. Например, метка может быть направлена разностью потенциалов на нанопоре, как описано здесь.

[0174] Метка может быть детектирована с помощью нанопорового устройства, имеющего по меньшей мере одну нанопору в мембране. Метка может быть ассоциирована с отдельным меченым нуклеотидом во время встраивания отдельного меченого нуклеотида. Нанопоровое устройство может обнаруживать метку, ассоциированную с отдельным меченым нуклеотидом во время встраивания. Меченые нуклеотиды, будь то встроенные в растущую цепь нуклеиновой кислоты или невстроенные, могут быть

детектированы, определены или дифференцированы в течение данного периода времени с помощью нанопорового устройства, в некоторых случаях с помощью электрода и/или нанопоры нанопорового устройства. Период времени, в течение которого нанопоровое устройство детектирует метку, может быть короче, а в некоторых случаях значительно короче, чем тот период времени, в течение которого метка и/или связанный с меткой нуклеотид удерживается ферментом, таким как фермент, облегчающий встраивание нуклеотида в цепь нуклеиновой кислоты (например, полимераза). Метка может быть детектирована электродом множество раз в течение того периода времени, который встроенный меченый нуклеотид связан с ферментом. Например, метка может быть детектирована электродом по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 10000, 100000 или 1000000 раз в течение того периода времени, который встроенный меченый нуклеотид связан с ферментом.

[0175] Секвенирование может быть выполнено с использованием предварительно загруженных меток. Предварительная загрузка метки может включать направление по меньшей мере части метки через по меньшей мере часть нанопоры, в то время как метка может быть присоединена к нуклеотиду, который был встроен в цепь нуклеиновой кислоты (например, растущую цепь нуклеиновой кислоты), подвергается встраиванию в цепь нуклеиновой кислоты, или еще не встроен в цепь нуклеиновой кислоты, но может претерпевать встраивание в цепь нуклеиновой кислоты. Предварительная загрузка метки может включать направление по меньшей мере части метки через по меньшей мере часть нанопоры до встраивания нуклеотида в цепь нуклеиновой кислоты или в то время, как нуклеотид встраивается в цепь нуклеиновой кислоты. Предварительная загрузка метки может включать направление по меньшей мере части метки через по меньшей мере часть нанопоры после встраивания нуклеотида в цепь нуклеиновой кислоты.

[0176] Метка, ассоциированная с отдельным нуклеотидом, может быть детектирована нанопорой без высвобождения из нуклеотида при встраивании. Метки могут быть детектированы без их высвобождения из встроенных нуклеотидов во время синтеза цепи нуклеиновой кислоты, комплементарной цепи-мишени. Метки могут быть присоединены к нуклеотидам линкером так, чтобы метка была предоставлена нанопоре (например, метка свисает в или иным образом проходит через по меньшей мере часть нанопоры). Длина линкера может быть достаточно большой, чтобы позволить метке проходить в или через по меньшей мере часть нанопоры. В некоторых случаях метка предоставляется нанопоре (т.е. перемещается в нее) за счет разности потенциалов. Также могут быть подходящими и другие способы подачи метки в пору (например, использование ферментов, магнитов, электрических полей, перепада давления). В некоторых случаях к метке не прикладывают активную силу (т.е. метка диффундирует в нанопору).

[0177] Чип для секвенирования образца нуклеиновой кислоты может содержать множество нанопор с индивидуальной адресацией. Нанопора с индивидуальной адресацией упомянутого множества может содержать по меньшей мере одну нанопору,

сформированную в мембране, расположенной смежно с интегральной схемой. Каждая нанопора с индивидуальной адресацией может быть способна детектировать метку, ассоциированную с отдельным нуклеотидом. Нуклеотид может быть встроен (например, полимеризован), и метка при встраивании может не высвобождаться из нуклеотида.

[0178] Метки могут быть предоставлены нанопорам при событиях встраивания нуклеотида и высвобождаются из нуклеотида. Высвобожденные метки могут проходить через нанопору. В некоторых случаях метки не проходят через нанопору. Метка, которая высвободилась при событии встраивания нуклеотида, отличается от метки, которая может протекать через нанопору, но не высвободилась при событии встраивания нуклеотида, по меньшей мере частично временем пребывания в нанопоре. В некоторых случаях метки, которые находятся в нанопоре не менее 100 миллисекунд (мс), высвобожжены при событиях встраивания нуклеотидов, а метки, которые находятся в нанопоре менее 100 мс, не высвобожжены при событиях встраивания нуклеотидов. Метки могут быть захвачены и/или направлены через нанопору вторым ферментом или белком (например, связывающим нуклеиновую кислоту белком). Второй фермент может отщеплять метку при (например, во время или после) встраивании(я) нуклеотида. Линкер между меткой и нуклеотидом может быть отщеплен.

[0179] Метка, связанная со встроенным нуклеотидом, отличается от метки, связанной с нуклеотидом, который не был встроен в растущую комплементарную цепь, по времени пребывания метки в нанопоре или сигналу, детектированному от невстроенного нуклеотида с помощью нанопоры. Невстроенный нуклеотид может генерировать сигнал (например, разность потенциалов, ток), который можно детектировать в течение периода времени от 1 наносекунды (нс) до 100 мс или от 1 нс до 50 мс, тогда как встроенный нуклеотид может генерировать сигнал с временем жизни от 50 мс до 500 мс или от 100 мс до 200 мс. Невстроенный нуклеотид может генерировать сигнал, который можно детектировать в течение периода времени от 1 нс до 10 мс или от 1 нс до 1 мс. Невстроенная метка детектируема нанопорой в течение периода времени (в среднем) большего, чем тот период времени, в течение которого нанопорой детектируема встроенная метка.

[0180] Встроенные нуклеиновые кислоты могут быть детектированы и/или детектируемы нанопорой в течение более короткого периода времени, чем невстроенный нуклеотид. Альтернативно, встроенные нуклеиновые кислоты могут быть детектированы и/или детектируемы нанопорой в течение более длительного периода времени, чем невстроенный нуклеотид. Разницу и/или соотношение между этими периодами времени можно использовать для определения того, встроен ли обнаруженный нанопорой нуклеотид или нет, как описано здесь.

[0181] Период обнаружения может быть основан на свободном прохождении нуклеотида через нанопору; невстроенный нуклеотид может находиться в нанопоре или в ее окрестности в течение периода времени от 1 наносекунды (нс) до 100 мс или от 1 нс до 50 мс, тогда как встроенный нуклеотид может находиться в нанопоре или в ее

окрестности в течение периода времени от 50 мс до 500 мс или от 100 мс до 200 мс. Периоды времени могут меняться в зависимости от условий обработки; однако встроенный нуклеотид может иметь большее время пребывания, чем у невстроенного нуклеотида.

[0182] Метка или разновидность метки может включать детектируемые атом или молекулу или множество детектируемых атомов или молекул. Метка может содержать один или более аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил или их производные, связанные с любым положением, включая фосфатную группу, сахар или азотистое основание молекулы нуклеиновой кислоты. Метка может содержать один или более аденин, гуанин, цитозин, тимин, урацил или их производные, ковалентно связанные с фосфатной группой основания нуклеиновой кислоты.

[0183] Метка может иметь длину по меньшей мере 0,1 нанометра (нм), 1 нм, 2 нм, 3 нм, 4 нм, 5 нм, 6 нм, 7 нм, 8 нм, 9 нм, 10 нм, 20 нм, 30 нм, 40 нм, 50 нм, 60 нм, 70 нм, 80 нм, 90 нм, 100 нм, 200 нм, 300 нм, 400 нм, 500 нм или 1000 нм.

[0184] Метка может включать хвост из повторяющихся субъединиц, таких как множество из аденина, гуанина, цитозина, тимина, урацила или их производных. Например, метка может включать хвостовой участок, имеющий по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 1000, 10000 или 100000 субъединиц аденина, гуанина, цитозина, тимина, урацила или их производных. Субъединицы могут быть связаны друг с другом, а на терминальном конце связаны с фосфатной группой нуклеиновой кислоты. Другие примеры частей меток включают любой полимерный материал, такой как полиэтиленгликоль (PEG), полисульфонаты, аминокислоты или любой полностью или частично положительно заряженный, отрицательно заряженный или незаряженный полимер.

[0185] IV. Полимераза

[0186] ДНК-полимераза может быть связана с 3'-концом цепи полинуклеотида с ником в сайте образования ника. Секвенирование ДНК может быть выполнено с использованием фермента, такого как ДНК-полимераза, для амплификации и транскрипции полинуклеотида в окрестности нанопоры и меченых нуклеотидов. Методы секвенирования могут включать встраивание или полимеризацию меченых нуклеотидов с использованием полимеразы, такой как ДНК-полимераза, или транскриптазы. Полимераза может быть мутирована, чтобы позволить ей принимать меченые нуклеотиды. Полимераза также может быть мутирована, чтобы увеличить время, в течение которого метка обнаруживается нанопорой.

[0187] Ферментом секвенирования может быть, например, любой подходящий фермент, который создает полинуклеотидную цепь за счет фосфатной сцепки нуклеотидов. ДНК-полимераза может представлять собой, например, полимеразу 9°Nm™ или ее вариант, ДНК-полимеразу I E.Coli, ДНК-полимеразу T4 бактериофага, секвеназу, ДНК-полимеразу Taq, полимеразу 9°Nm™ (экзо-)A485L/Y409V, ДНК-полимеразу ф29, ДНК-полимеразу Bst или варианты, мутанты или гомологи любого из

вышеперечисленных. Гомолог может иметь любой подходящий процент гомологии, такой как, например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичность последовательности.

[0188] В некоторых примерах для нанопорового секвенирования фермент полимеризации может быть присоединен к нанопоре или расположен в ее окрестности. Подходящие способы присоединения фермента полимеризации к нанопоре включают сшивание фермента с нанопорой или в окрестности нанопоры, например, посредством образования внутримолекулярных дисульфидных связей. Нанопора и фермент также могут представлять собой слитую конструкцию, например, кодированную одной полипептидной цепью. Способы получения слитых белков могут включать слияние кодирующей последовательности фермента в рамке и рядом с кодирующей последовательностью нанопоры и экспрессию этой слитой последовательности с одного промотора. Фермент полимеризации может быть присоединен к или соединен с нанопорой с использованием молекулярных скоб или белковых пальцев. Фермент полимеризации может быть присоединен к нанопоре через промежуточную молекулу, такую как, например, биотин, конъюгированный как с ферментом, так и с нанопорой, с тетрамерами стрептавидина, связанными с обоими биотинами. Эту промежуточную молекулу можно назвать линкером.

[0189] Фермент секвенирования также может быть присоединен к нанопоре антителом. Белки, которые образуют ковалентную связь между собой, могут быть использованы для прикрепления полимеразы к нанопоре. К нанопоре также могут быть присоединены ферменты фосфатазы или фермент, отщепляющий метку от нуклеотида.

[0190] Полимераза может быть мутирована для способствования и/или повышения эффективности мутантной полимеразы по встраиванию меченых нуклеотидов в растущий полинуклеотид по сравнению с немутантной полимеразой. Полимераза может быть мутирована для улучшения проникновения аналога нуклеотида, такого как меченый нуклеотид, в область активного сайта полимеразы и/или мутирована для координации с аналогами нуклеотида в активной области.

[0191] Другие мутации, такие как аминокислотные замены, вставки, делеции и/или экзогенные признаки полимеризации, могут приводить к усиленной координации ионов металлов, сниженной экзонуклеазной активности, сниженным скоростям реакции на одном или более этапах полимеразного кинетического цикла, уменьшенной фракции ветвления, измененной селективности кофактора, повышенному выходу, повышенной термостабильности, повышенной точности, повышенной скорости, увеличенной длине считывания, повышенной солеустойчивости по сравнению с немутантной полимеразой.

[0192] Подходящая полимеразы может иметь профиль кинетической скорости, подходящий для обнаружения меток нанопорой. Профиль скорости обычно относится к общей скорости встраивания нуклеотида и/или скорости любой стадии встраивания нуклеотида, такой как добавление нуклеотида, ферментативная изомеризация, например, в

закрытое состояние или из него, связывание или высвобождение кофактора, высвобождение продукта, встраивание полинуклеотида в растущий полинуклеотид или транслокацию.

[0193] Полимераза может быть адаптирована для обнаружения событий секвенирования. Профиль скорости полимеразы может быть такой, что метка загружается в нанопору (и/или детектируется ею) в среднем за 0,1 миллисекунды (мс), 1 мс, 5 мс 10 мс, 20 мс, 30 мс, 40 мс, 50 мс, 60 мс, 80 мс, 100 мс, 120 мс, 140 мс, 160 мс, 180 мс, 200 мс, 220 мс, 240 мс, 260 мс, 280 мс, 300 мс, 400 мс, 500 мс, 600 мс, 800 мс или 1000 мс. Например, профиль скорости полимеразы может быть такой, чтобы метка загружается в нанопору и/или детектируется ею в среднем за по меньшей мере 5 мс, по меньшей мере 10 мс, по меньшей мере 20 мс, по меньшей мере 30 мс, по меньшей мере 40 мс, по меньшей мере 50 мс, по меньшей мере 60 мс, по меньшей мере 80 мс, по меньшей мере 100 мс, по меньшей мере 120 мс, по меньшей мере 140 мс, по меньшей мере 160 мс, по меньшей мере 180 мс, по меньшей мере 200 мс, по меньшей мере 220 мс, по меньшей мере 240 мс, по меньшей мере 260 мс, по меньшей мере 280 мс, по меньшей мере 300 мс, по меньшей мере 400 мс, по меньшей мере 500 мс, по меньшей мере 600 мс, по меньшей мере 800 мс или по меньшей мере 1000 мс. Метка может быть детектирована нанопорой в среднем за от 80 мс до 260 мс, от 100 мс до 200 мс или от 100 мс до 150 мс.

[0194] Комплекс нанопора/полимераза может быть выполнен с возможностью обнаружения одного или более событий, связанных с амплификацией и транскрипцией кольцевого полинуклеотида. Упомянутые одно или более событий могут быть наблюдаемыми кинетически и/или наблюдаемыми некинетически, такими как, например, миграция нуклеотида через нанопору без вступления в контакт с полимеразой.

[0195] В некоторых случаях полимеразная реакция демонстрирует две кинетические стадии, которые проходят от промежуточной стадии, на которой нуклеотид или полифосфатный продукт связан с ферментом полимеразой, и две кинетические стадии, которые проходят от промежуточной стадии, на которой нуклеотид и полифосфатный продукт не связаны с ферментом полимеразой. Эти две кинетические стадии могут включать изомеризацию фермента, встраивание нуклеотида и высвобождение продукта. В некоторых случаях этими двумя кинетическими стадиями являются транслокация матрицы и связывание нуклеотидов.

[0196] Подходящая полимеразы может демонстрировать сильное или усиленное замещение цепи.

[0197] V. Идентификация вариантов последовательности

[0198] Способы, представленные в настоящем раскрытии, можно использовать для идентификации вариантов последовательностей в образце полинуклеотида. Различие последовательностей между прочтениями секвенирования и эталонной последовательностью называется вариантом подлинной последовательности, если различие последовательностей встречается в по меньшей мере двух разных полинуклеотидах, например, в двух разных кольцевых полинуклеотидах, которые можно

различить в результате наличия разных соединений. Поскольку маловероятно, что положение и тип варианта последовательности, которые являются результатом ошибок амплификации или секвенирования, точно дублируются на двух разных полинуклеотидах, содержащих одну и ту же последовательность-мишень, включение этого параметра проверки может уменьшить фон ошибочных вариантов последовательности с одновременным повышением чувствительности и точности обнаружения фактической вариации последовательности в образце. Вариант последовательности может иметь частоту менее 5%, 4%, 3%, 2%, 1,5%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,001% или ниже, достаточно выше фона, чтобы обеспечить точную идентификацию. Вариант последовательности может встречаться с частотой менее 0,1%. Частота варианта последовательности может быть значительно выше фоновой, когда такая частота статистически значимо выше фоновой частоты ошибок, например, при значении p менее 0,05, 0,01, 0,001 или 0,0001. Частота варианта последовательности может быть значительно выше фона, когда эта частота по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 25 раз, 50 раз, 100 раз или более выше частоты фоновых ошибок. Частота фоновых ошибок для точного определения последовательности в данном положении может составлять менее 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,005%, 0,001% или 0,0005%.

[0199] Идентификация варианта последовательности может включать оптимальное выравнивание одного или более прочтений секвенирования с эталонной последовательностью для выявления различий между ними, а также для выявления соединений. Выравнивание может включать в себя размещение одной последовательности вдоль другой последовательности, итеративное введение пробелов вдоль каждой последовательности, оценку того, насколько хорошо две последовательности совпадают, и повторение для различных положений по эталону. Совпадение с наилучшей оценкой считается выравниванием и представляет собой вывод о степени взаимосвязи (сходства) между последовательностями.

[0200] Эталонная последовательность, с которой сравнивают прочтения секвенирования, представляет собой эталонный геном, такой как геном представителя того же вида, что и субъект. Эталонный геном может быть полным или неполным. Эталонный геном может состоять только из областей, содержащих полинуклеотиды-мишени, например, из эталонного генома или из консенсуса, полученного в результате прочтений секвенирования при анализе. Эталонная последовательность может содержать или может состоять из последовательностей полинуклеотидов одного или более организмов, таких как последовательности одной или более бактерий, архей, вирусов, протистов, грибов или другого организма. Эталонная последовательность может состоять только из части эталонного генома, такой как области, соответствующие одной или более анализируемым последовательностям-мишеням. Например, для обнаружения патогена эталонным геномом может быть весь геном патогена или его часть, пригодная для идентификации, например, конкретного штамма или серотипа. Прочтение секвенирования

можно выровнять с множественными различными эталонными последовательностями, например, для скрининга множественных разных организмов или штаммов.

[0201] VI. Терапевтические применения

[0202] Способы, системы и композиции, представленные здесь, могут быть направлены на одно или более терапевтических применений, таких как характеристика образца пациента и, необязательно, диагностика состояния субъекта. Терапевтические применения могут включать информирование о выборе методов терапии, к которым пациент может быть наиболее восприимчив, и/или лечение субъекта, нуждающегося в терапевтическом вмешательстве, на основе результатов способов, представленных в настоящем раскрытии.

[0203] Например, способы, представленные в настоящем раскрытии, можно использовать для диагностики наличия опухоли, прогрессирования и/или метастазирования опухолей, например, когда проанализированные полинуклеотиды содержат или состоят из вкДНК, цоДНК или фрагментированной опухолевой ДНК. У субъекта можно отслеживать эффективность лечения опухоли, например, путем мониторинга цоДНК с течением времени, снижение цоДНК можно использовать в качестве показателя эффективности лечения, а увеличение цоДНК может информировать о необходимости выбора иных видов лечения и/или иных дозировок. Другие применения включают оценку отторжения органов у реципиентов трансплантата, например, когда увеличение количества циркулирующей ДНК, соответствующей геному донора трансплантата, используют в качестве раннего индикатора отторжения трансплантата, а также генотипирование/изотипирование патогенных инфекций, таких как вирусные или бактериальные инфекции. Обнаружение вариантов последовательности в циркулирующей ДНК плода может быть использовано для диагностики состояния плода.

[0204] Способы, представленные в настоящем раскрытии, могут включать постановку диагноза субъекту на основании результата секвенирования, например, диагностирование у субъекта заболевания, связанного с обнаруженным причинным генетическим вариантом, или сообщение о вероятности того, что у пациента есть или будет развиваться такое заболевание.

[0205] Причинный генетический вариант может включать варианты последовательности, ассоциированные с конкретным типом или стадией рака, или раком, имеющим конкретную характеристику, такую как метастатический потенциал, устойчивость к лекарственным средствам и/или чувствительность к лекарственным средствам. Способы, представленные в настоящем раскрытии, могут быть использованы для информирования о терапевтических решениях, руководстве и мониторинге методов лечения рака. Например, эффективность лечения можно контролировать, сравнивая образцы цоДНК пациентов до, во время и после лечения конкретными средствами, в том числе для молекулярно-таргетной терапии, такими как моноклональные препараты, химиотерапевтические препараты, протоколы облучения и комбинации любого из вышеперечисленных. Например, можно отслеживать цоДНК, чтобы увидеть,

увеличиваются или уменьшаются определенные мутации или появляются новые мутации после лечения, что может позволить врачу изменить лечение за гораздо более короткий период времени, чем это предусмотрено методами мониторинга, которые отслеживают симптомы пациента. Способы могут включать поставку диагноза субъекту на основании результатов секвенирования полинуклеотидов, например, диагностирование у субъекта конкретной стадии или типа рака, связанного с обнаруженным вариантом последовательности, или сообщение о вероятности того, что у пациента есть или разовьется такой рак.

[0206] Например, для терапии, которая специально нацелена на пациентов на основе молекулярных маркеров, пациентов можно протестировать, чтобы выяснить, присутствуют ли определенные мутации в их опухолях, и эти мутации можно использовать для прогнозирования ответа или устойчивости к терапии и принятия решения в отношении применения такой терапии. Обнаружение и мониторинг цодНК во время курса лечения может быть полезным при выборе лечения.

[0207] Варианты последовательности, связанные с одним или более видами рака, можно использовать для диагностики, прогноза или принятия решений о лечении. Например, подходящие последовательности-мишени, имеющие онкологическое значение, включают изменения в гене TP53, гене ALK, гене KRAS, гене PIK3CA, гене BRAF, гене EGFR и гене KIT. Последовательность-мишень можно специфически амплифицировать и/или специфически проанализировать на наличие вариантов последовательности, которая может представлять собой весь ассоциированный с раком ген или его часть.

[0208] Способы, представленные в настоящем раскрытии, могут быть пригодны для выявления новых, редких мутаций, которые связаны с одним или более типами, стадиями или характеристиками рака. Например, в популяциях индивидуумов, имеющих общую анализируемую характеристику, такую как конкретное заболевание, тип рака и/или стадия рака, с использованием способов, представленных в настоящем раскрытии, могут быть идентифицированы варианты последовательности, отражающие мутации в конкретных генах или частях генов. Идентифицированным вариантам последовательностей, встречающимся со статистически значимо большей частотой среди группы индивидуумов, обладающих общей характеристикой, чем среди индивидуумов без этой характеристики, может быть присвоена степень ассоциации с этой характеристикой. Идентифицированные таким образом варианты последовательностей или типы вариантов последовательностей можно затем использовать при диагностике или лечении индивидуумов, у которых обнаружены такие варианты.

[0209] Дополнительные терапевтические применения могут включать использование в неинвазивной диагностике плода. ДНК плода можно найти в крови беременной женщины. Способы, представленные в настоящем раскрытии, можно использовать для идентификации вариантов последовательностей в циркулирующей ДНК плода и, таким образом, их можно использовать для диагностики одного или более генетических заболеваний у плода, таких как заболевания, связанные с одним или более

причинными генетическими вариантами. Примеры причинных генетических вариантов включают трисомию, кистозный фиброз, серповидноклеточную анемию и болезнь Тея-Сакса. Мать может предоставить контрольный образец и образец крови для сравнения. Контрольным образцом может быть любая подходящая ткань, которую затем можно секвенировать для получения эталонной последовательности. Последовательности вкДНК, соответствующие геномной ДНК плода, затем могут быть идентифицированы как варианты последовательности относительно эталонной материнской. Отец также может предоставить эталонный образец, чтобы помочь в идентификации последовательностей плода и вариантов последовательностей.

[0210] Различные терапевтические применения могут включать обнаружение экзогенных полинуклеотидов, в том числе из патогенов, таких как бактерии, вирусы, грибы и микробы, информация о которых может использоваться для лечения.

[0211] VII. Компьютерные системы

[0212] В настоящем раскрытии представлены компьютерные системы, которые запрограммированы для реализации одного или более способов по настоящему раскрытию. Компьютерные системы по настоящему раскрытию можно использовать для регулирования различных операций датчика, таких как детектирование одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в датчике, когда по меньшей мере часть молекулы-мишени связана связывающим фрагментом датчика.

[0213] На фиг. 6 показана компьютерная система 601, которая запрограммирована или иным образом сконфигурирована для осуществления связи с и регулирования различных аспектов секвенирования по настоящему раскрытию. Компьютерная система 601 может обмениваться данными, например, с одной или более цепями, соединенными с датчиком или содержащими его, и одним или более устройствами (например, машинами), используемыми для приготовления, обработки или хранения одной или более реакционных смесей для измерения. Компьютерная система 601 также может обмениваться данными с одним или более контроллерами или процессорами по настоящему раскрытию. Компьютерная система 601 может быть электронным устройством пользователя или компьютерной системой, расположенной удаленно по отношению к электронному устройству. Электронное устройство может быть мобильным электронным устройством.

[0214] Компьютерная система 601 содержит центральный процессор (ЦП, также называемый здесь «процессором» и «компьютерным процессором») 605, который может быть одноядерным или многоядерным процессором, или множеством процессоров для параллельной обработки. Компьютерная система 601 также содержит память или ячейку 610 памяти (например, оперативное запоминающее устройство, постоянное запоминающее устройство, флэш-память), электронный блок 615 хранения (например, жесткий диск), интерфейс 620 связи (например, сетевой адаптер) для осуществления связи с одной или более другими системами и периферийные устройства 625, такие как кэш-память, другая память, хранилище данных и/или электронные адаптеры дисплея. Память

610, блок 615 хранения, интерфейс 620 и периферийные устройства 625 связаны с ЦП 605 через шину связи (сплошные линии), такую как материнская плата. Блок 615 хранения может быть блоком хранения данных (или репозиторием данных) для хранения данных. Компьютерная система 601 может быть функционально связана с компьютерной сетью ("сетью") 630 с помощью интерфейса 620 связи. Сеть 630 может быть Интернетом, глобальной сетью и/или экстранетом, или интранетом и/или экстранетом, который находится на связи с Интернетом. Сеть 630 в некоторых случаях является телекоммуникационной сетью и/или сетью передачи данных. Сеть 630 может включать в себя один или более компьютерных серверов, которые могут обеспечивать возможность распределенных вычислений, таких как облачные вычисления. Сеть 630, в некоторых случаях с помощью компьютерной системы 601, может реализовать одноранговую сеть, которая может позволить устройствам, подключенным к компьютерной системе 601, вести себя как клиент или сервер.

[0215] ЦП 605 может выполнять последовательность машиночитаемых команд, которые могут быть реализованы в программе или программном обеспечении. Команды могут быть сохранены в ячейке памяти, такой как память 610. Команды могут быть направлены в ЦП 605, что позволяет затем программировать или иным образом конфигурировать ЦП 605 для реализации способов по настоящему раскрытию. Примеры операций, выполняемых ЦП 605, могут включать выборку, декодирование, исполнение и обратную запись.

[0216] ЦП 605 может быть частью цепи (схемы), такой как интегральная схема. В эту цепь (схему) могут быть включены один или более других компонентов системы 601. В некоторых случаях схема представляет собой специализированную интегральную схему (ASIC).

[0217] Блок 615 хранения может хранить файлы, такие как драйверы, библиотеки и сохраненные программы. Блок 615 хранения может хранить пользовательские данные, например, пользовательские настройки и пользовательские программы. Компьютерная система 601 в некоторых случаях может включать в себя один или более дополнительных блоков хранения данных, которые являются внешними по отношению к компьютерной системе 601, например, расположенными на удаленном сервере, который связан с компьютерной системой 601 через интранет или Интернет.

[0218] Компьютерная система 601 может взаимодействовать с одной или более удаленными компьютерными системами по сети 630. Например, компьютерная система 601 может взаимодействовать с удаленной компьютерной системой пользователя. Примеры удаленных компьютерных систем включают персональные компьютеры (например, портативный ПК), планшеты или планшетные ПК (например, Apple® iPad, Samsung® Galaxy Tab), телефоны, смартфоны (например, Apple® iPhone, устройства с поддержкой Android, Blackberry®) или персональные цифровые помощники. Пользователь может получить доступ к компьютерной системе 601 через сеть 630.

[0219] Способы, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы

посредством исполняемого машиной (например, компьютерным процессором) кода, хранящегося в электронном хранилище компьютерной системы 601, таком как, например, памяти 610 или электронном блоке 615 хранения. Машиноисполняемый или машиночитаемый код может быть представлен в виде программного обеспечения. Во время использования код может выполняться процессором 605. В некоторых случаях код может быть извлечен из блока 615 хранения и сохранен в памяти 610 для быстрого доступа процессором 605. В некоторых ситуациях электронный блок 615 хранения может быть исключен, а машиноисполняемые команды хранятся в памяти 610.

[0220] Код может быть предварительно скомпилирован и сконфигурирован для использования с машиной, имеющей процессор, приспособленный для выполнения кода, или может быть скомпилирован во время выполнения. Код может быть представлен на языке программирования, который может быть выбран для обеспечения возможности выполнения кода в предварительно скомпилированном или скомпилированном виде.

[0221] Аспекты систем и способов, представленных в настоящем документе, таких как компьютерная система 601, могут быть воплощены в программировании. Различные аспекты технологии можно рассматривать как «продукты» или «изделия производства», как правило, в форме исполняемого машиной (или процессором) кода и/или связанных с ним данных, которые переносятся или воплощаются в типе машиночитаемого носителя. Машинно-исполняемый код может храниться в электронном блоке хранения, таком как память (например, постоянное запоминающее устройство, оперативное запоминающее устройство, флэш-память) или жесткий диск. Носители типа «хранилище» могут включать в себя любую или всю материальную память компьютеров, процессоров или тому подобное или связанные с ними модули, такие как различные полупроводниковые запоминающие устройства, ленточные накопители, дисковые накопители и тому подобное, которые могут обеспечивать невременное хранение в любой момент времени для программирования программного обеспечения. Все программное обеспечение или его части могут время от времени передаваться через Интернет или различные другие телекоммуникационные сети. Такие связи, например, могут обеспечить загрузку программного обеспечения с одного компьютера или процессора на другой, например, с сервера управления или хост-компьютера на компьютерную платформу сервера приложений. Таким образом, другой тип носителя, который может нести программные элементы, включает в себя оптические, электрические и электромагнитные волны, например, используемые через физические интерфейсы между локальными устройствами, через проводные и оптические стационарные сети и по различным радиоканалам. Физические элементы, переносящие такие волны, такие как проводные или беспроводные каналы связи, оптические каналы связи или тому подобное, также могут рассматриваться как носители, несущие программное обеспечение. Используемые здесь термины, такие как «считываемый компьютером носитель» или «машиночитаемый носитель», если они не ограничены невременным, материальным «носителем данных», относятся к любому носителю, который участвует в предоставлении команд процессору для выполнения.

[0222] Следовательно, машиночитаемый носитель, такой как исполняемый компьютером код, может принимать множество форм, включая, но не ограничиваясь ими, материальный носитель данных, носитель несущей волны или физическую среду передачи. Энергонезависимые носители данных включают, например, оптические или магнитные диски, такие как любое из запоминающих устройств в любом компьютере(ах) и тому подобное, такие как те, что можно использовать для реализации баз данных и т.д., показанные на чертежах. Энергозависимые носители данных включают в себя динамическую память, такую как основная память такой компьютерной платформы. Материальные среды передачи включают коаксиальные кабели, медный провод и оптоволокно, включая провода, составляющие шину в компьютерной системе. Среда передачи несущей волны может принимать форму электрических или электромагнитных сигналов, акустических или световых волн, таких как те, которые генерируются во время передачи данных в радиочастотном (РЧ) и инфракрасном (ИК) диапазонах. Таким образом, распространенные формы машиночитаемых носителей включают, например: дискету, гибкий диск, жесткий диск, магнитную ленту, любой другой магнитный носитель, CD-ROM, DVD или DVD-ROM, любой другой оптический носитель, бумажную ленту для перфокарт, любой другой физический носитель данных с рисунками из отверстий, RAM, ROM, PROM и EPROM, FLASH-EPROM, любую другую микросхему памяти или картридж, несущую волну, передающую данные или команды, кабели или линии, передающие такую несущую волну, или любой другой носитель, с которого компьютер может считывать программный код и/или данные. Многие из этих форм машиночитаемых носителей можно использовать для переноса одной или более последовательностей одной или более команд в процессор для выполнения.

[0223] Компьютерная система 601 может включать в себя или иметь связь с электронным дисплеем 635, который содержит пользовательский интерфейс (UI) 640 для обеспечения, например, (i) хода реакционной смеси, (ii) хода секвенирования и (iii) информации о секвенировании, полученной в результате секвенирования. Примеры пользовательского интерфейса включают, без ограничения, графический пользовательский интерфейс (GUI) и пользовательский веб-интерфейс.

[0224] Способы и системы по настоящему раскрытию могут быть реализованы посредством одного или более алгоритмов. Алгоритм может быть реализован с помощью программного обеспечения при выполнении центральным процессором 605. Алгоритм может, например, определять считывание последовательности целевого нуклеотида, полинуклеотида, пептида, полипептида, белка и так далее.

[0225] Хотя здесь были показаны и описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены только в качестве примера. Не предполагается, что изобретение ограничено конкретными примерами, представленными в описании изобретения. Хотя изобретение было описано со ссылкой на вышеупомянутое его описание, описания и иллюстрации вариантов осуществления в данном документе не

предназначены для толкования в ограничительном смысле. Специалистам в данной области техники будут очевидны многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от изобретения. Кроме того, следует понимать, что все аспекты изобретения не ограничены конкретными изображениями, конфигурациями или относительными пропорциями, изложенными здесь, которые зависят от множества разнообразных условий и переменных. Следует понимать, что при практической реализации изобретения могут быть использованы различные альтернативы описанным здесь вариантам осуществления изобретения. Поэтому предполагается, что изобретение должно также охватывать любые такие альтернативы, модификации, варианты или эквиваленты. Предполагается, что следующая формула изобретения определяет объем изобретения и что ею охватываются способы и конструкции в пределах объема этой формулы изобретения и их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система для анализа или идентификации молекулы-мишени, содержащая:
датчик, содержащий (i) сенсорный электрод, (ii) связывающее звено, соединенное с упомянутым сенсорным электродом и выполненное с возможностью связывания по меньшей мере части упомянутой молекулы-мишени, и (iii) диэлектрический материал, соединенный с упомянутым сенсорным электродом и покрывающий по меньшей мере часть поверхности упомянутого сенсорного электрода,
причем упомянутый датчик выполнен с возможностью детектирования одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в упомянутом датчике, когда упомянутая по меньшей мере упомянутая часть упомянутой молекулы-мишени связана упомянутым связывающим звеном, причем упомянутые один или более сигналов применимы для анализа или идентификации упомянутой молекулы-мишени.
2. Система по п. 1, в которой упомянутые один или более сигналов указывают на (i) электрическое сопротивление или его изменение в упомянутом датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в упомянутом датчике или (iii) электрическую индуктивность или ее изменение в упомянутом датчике.
3. Система по п. 1, в которой упомянутые один или более сигналов представляют собой ток или напряжение.
4. Система по п. 3, в которой упомянутые один или более сигналов не являются туннельным током.
5. Система по п. 1, в которой средний размер сечения упомянутого сенсорного электрода не более чем в 20 раз превышает средний размер упомянутой молекулы-мишени.
6. Система по п. 5, в которой упомянутый средний размер сечения упомянутого сенсорного электрода не более чем в 2 раза превышает упомянутый средний размер упомянутой молекулы-мишени.
7. Система по п. 1, в которой средний размер сечения упомянутого сенсорного электрода меньше упомянутого среднего размера упомянутой молекулы-мишени.
8. Система по п. 1, в которой упомянутое связывающее звено соединено с упомянутым сенсорным электродом через проводящий материал.
9. Система по п. 1, в которой упомянутый диэлектрический материал представляет собой самособирающийся монослой.
10. Система по п. 1, в которой упомянутая молекула-мишень содержит метку, причем упомянутая метка выполнена с возможностью вызывать изменение упомянутых одного или более сигналов.
11. Система по п. 1, в которой упомянутый датчик дополнительно содержит электрод сравнения, электрически связанный с упомянутым сенсорным электродом, и при этом упомянутый один или более сигналов указывают на упомянутые импеданс или изменение импеданса между упомянутым сенсорным электродом и упомянутым электродом сравнения.

12. Система по п. 11, в которой упомянутый сенсорный электрод и упомянутый электрод сравнения выполнены с возможностью обеспечения первого электрического поля вдоль первого направления, дополнительно содержащая дополнительный генератор электрического поля, выполненный с возможностью приложения второго электрического поля вдоль второго направления, которое отличается от упомянутого первого направления.

13. Система по п. 12, в которой упомянутое второе направление практически перпендикулярно упомянутому первому направлению.

14. Система по п. 1, в которой упомянутый датчик дополнительно выполнен с возможностью определения времени нахождения упомянутой по меньшей мере упомянутой части упомянутой молекулы-мишени на упомянутом связывающем звене.

15. Система по п. 1, в которой упомянутое связывающее звено содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, фермента, антитела, его функционального фрагмента и его функционального варианта.

16. Система по п. 1, в которой упомянутая молекула-мишень содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида и их варианта.

17. Способ анализа или идентификации молекулы-мишени, включающий:

(a) обеспечение датчика, содержащего (i) сенсорный электрод, (ii) связывающее звено, соединенное с упомянутым сенсорным электродом и выполненное с возможностью связывания по меньшей мере части упомянутой молекулы-мишени, и (iii) диэлектрический материал, соединенный с упомянутым сенсорным электродом и покрывающий по меньшей мере часть поверхности упомянутого сенсорного электрода;

(b) детектирование одного или более сигналов, указывающих на импеданс или изменение импеданса в упомянутом датчике, когда упомянутая по меньшей мере упомянутая часть упомянутой молекулы-мишени связана упомянутым связывающим звеном; и

(c) использование упомянутых одного или более сигналов для анализа или идентификации упомянутой молекулы-мишени.

18. Способ по п. 17, в котором упомянутые один или более сигналов указывают на (i) электрическое сопротивление или его изменение в упомянутом датчике, (ii) электрическую емкость или ее изменение в упомянутом датчике или (iii) электрическую индуктивность или ее изменение в упомянутом датчике.

19. Способ по п. 17, в котором упомянутые один или более сигналов представляют собой ток или напряжение.

20. Способ по п. 19, в котором упомянутые один или более сигналов не являются туннельным током.

21. Способ по п. 17, в котором средний размер сечения упомянутого сенсорного электрода не более чем в 20 раз превышает средний размер упомянутой молекулы-мишени.

22. Способ по п. 21, в которой упомянутый средний размер сечения упомянутого сенсорного электрода не более чем в 2 раза превышает упомянутый средний размер упомянутой молекулы-мишени.

23. Способ по п. 17, в котором средний размер сечения упомянутого сенсорного электрода меньше упомянутого среднего размера упомянутой молекулы-мишени.

24. Способ по п. 17, в котором упомянутое связывающее звено соединено с упомянутым сенсорным электродом через проводящий материал.

25. Способ по п. 17, в котором упомянутый диэлектрический материал представляет собой самособирающийся монослой.

26. Способ по п. 17, в котором упомянутая молекула-мишень содержит метку, причем упомянутая метка выполнена с возможностью вызывать изменение упомянутого одного или более сигналов.

27. Способ по п. 17, в котором упомянутый датчик дополнительно содержит электрод сравнения, электрически связанный с упомянутым сенсорным электродом, и при этом упомянутые один или более сигналов указывают на упомянутые импеданс или изменение импеданса между упомянутым сенсорным электродом и упомянутым электродом сравнения.

28. Способ по п. 27, в котором упомянутый сенсорный электрод и упомянутый электрод сравнения обеспечивают первое электрическое поле вдоль первого направления, причем способ дополнительно включает использование дополнительного генератора электрического поля для приложения второго электрического поля вдоль второго направления, которое отличается от упомянутого первого направления.

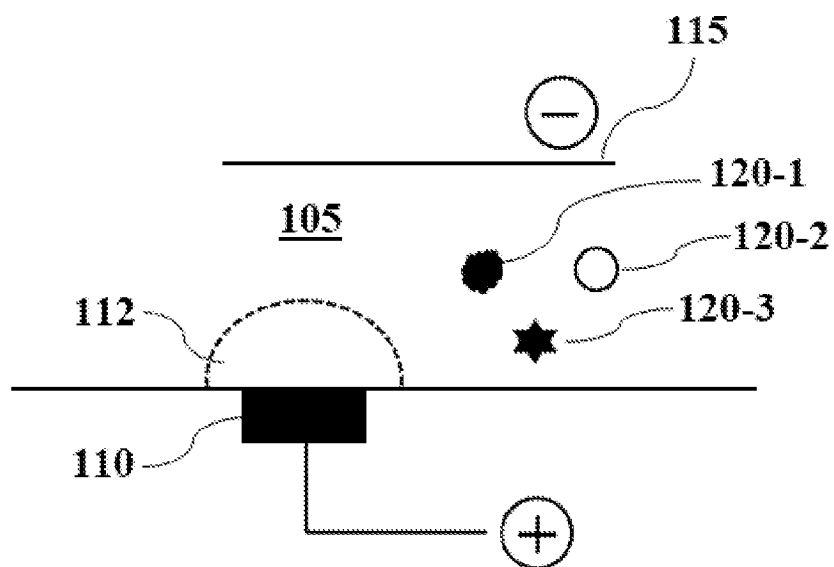
29. Способ по п. 28, в котором упомянутое второе направление практически перпендикулярно упомянутому первому направлению.

30. Способ по п. 17, дополнительно включающий определение времени нахождения упомянутой по меньшей мере упомянутой части упомянутой молекулы-мишени на упомянутом связывающем звене.

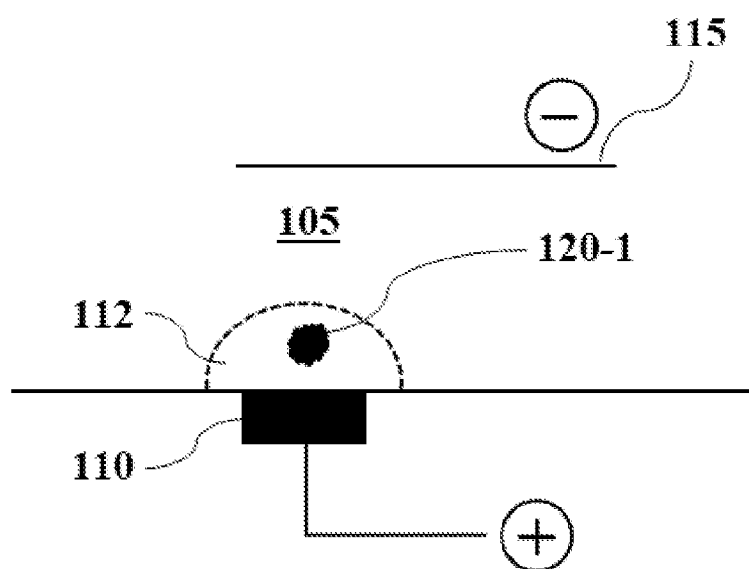
31. Способ по п. 17, в котором упомянутое связывающее звено содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, фермента, антитела, его функционального фрагмента и его функционального варианта.

32. Способ по п. 17, в котором упомянутая молекула-мишень содержит один или более элементов, выбранных из группы, состоящей из малой молекулы, нуклеотида, полинуклеотида, аминокислоты, пептида, полипептида и их варианта.

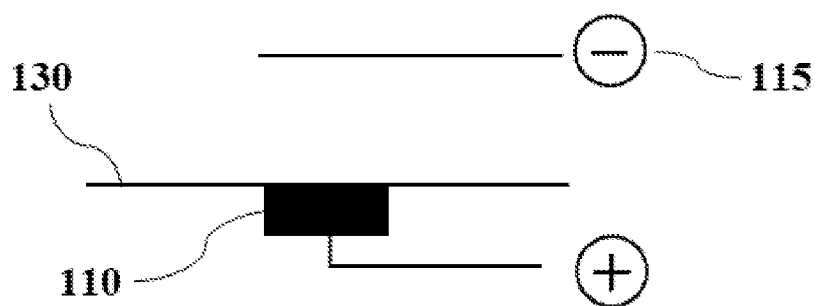
1/8



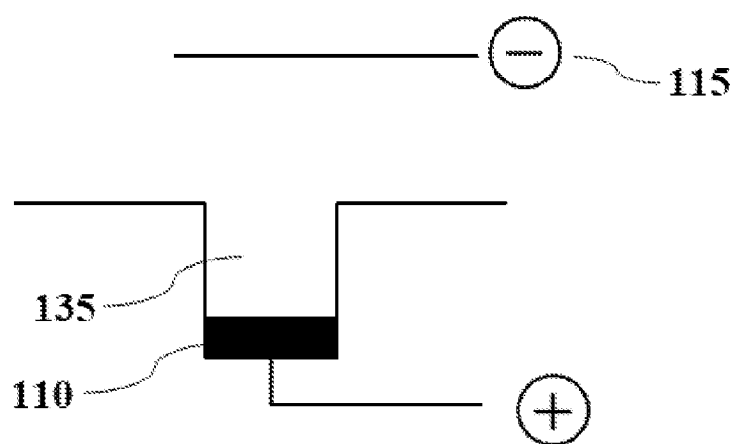
ФИГ. 1А



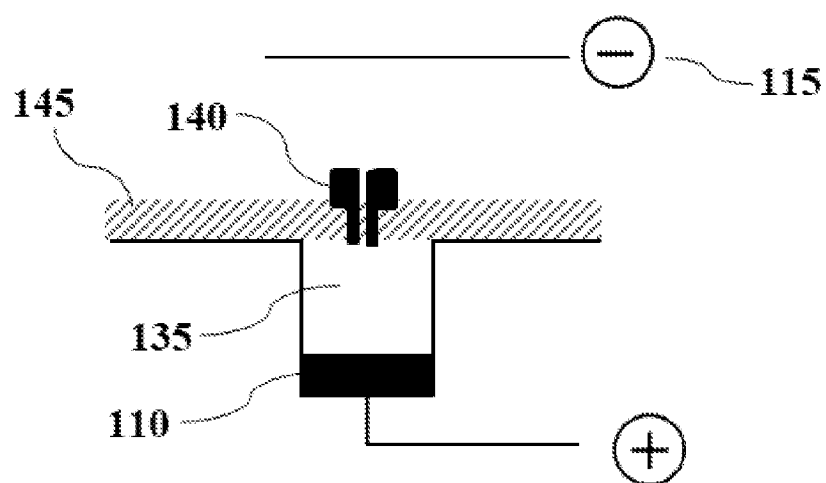
ФИГ. 1В



ФИГ. 1С

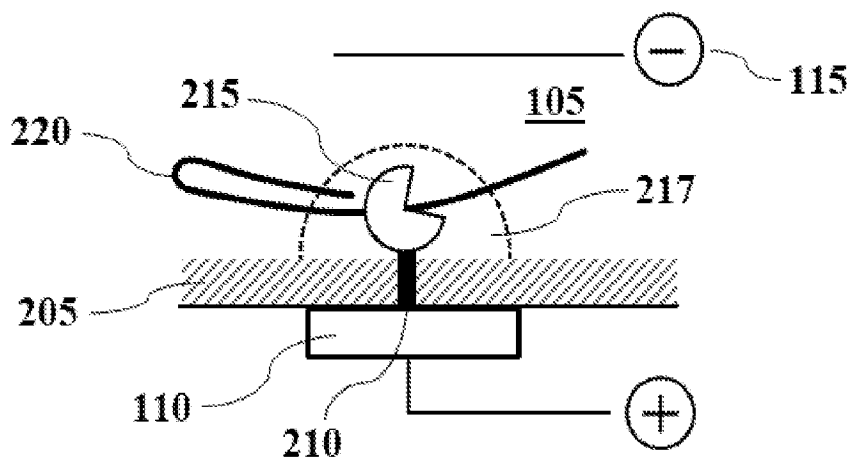


ФИГ. 1D

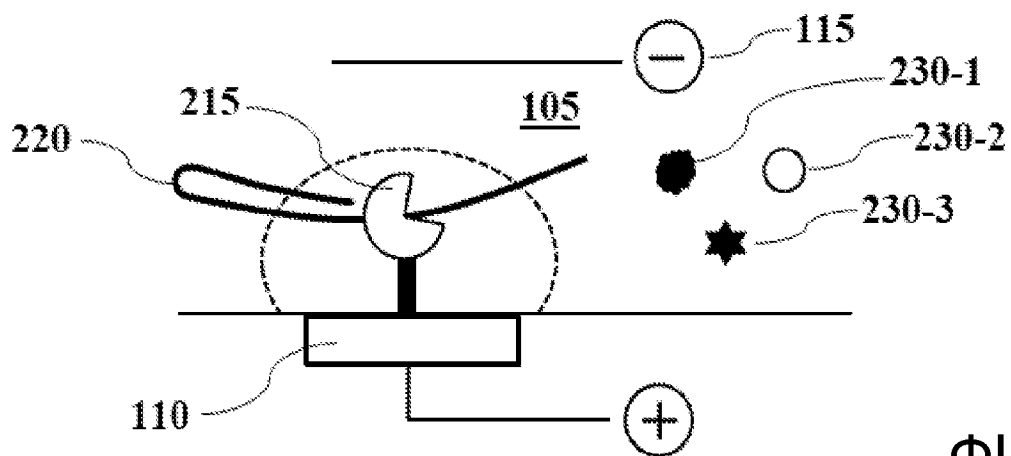


ФИГ. 1E

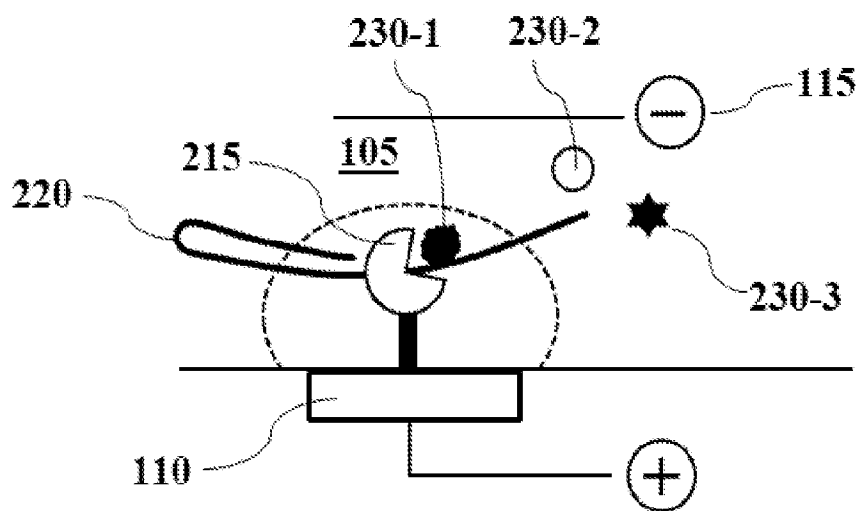
3/8



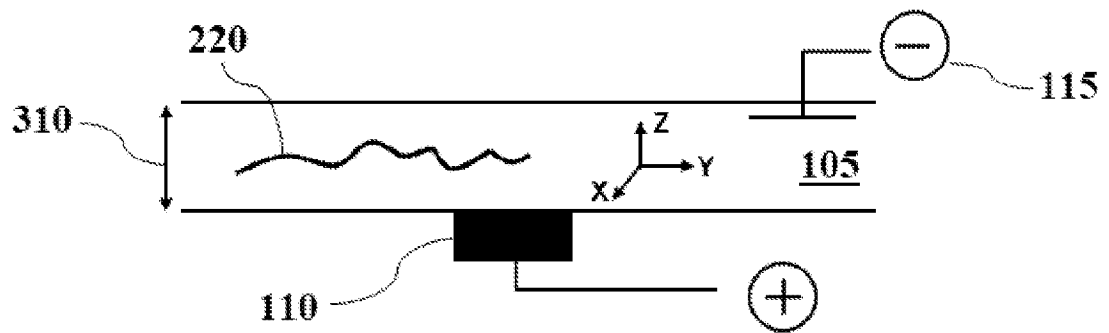
ФИГ. 2А



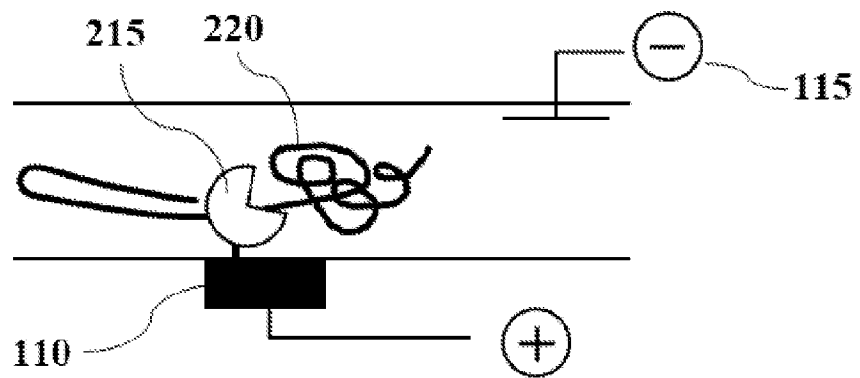
ФИГ. 2В



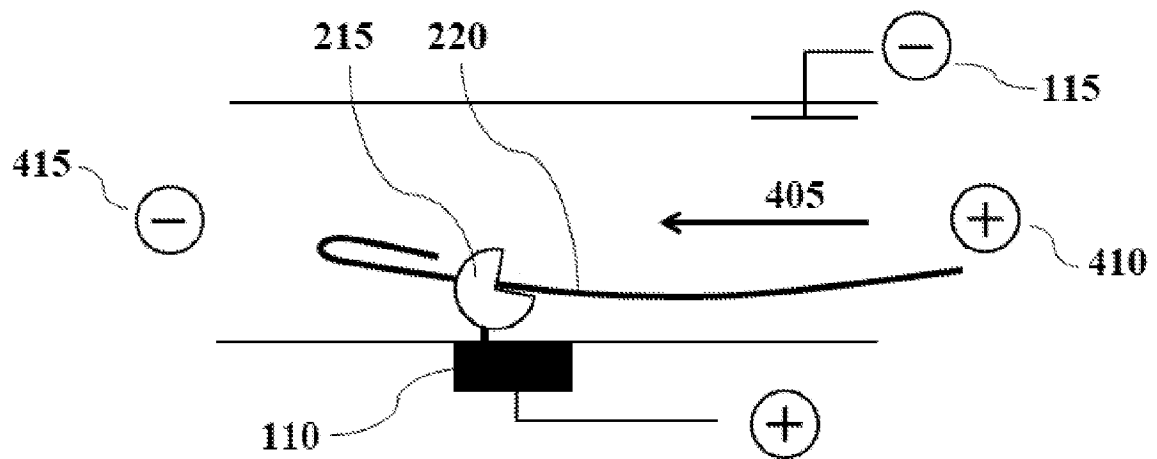
ФИГ. 2С



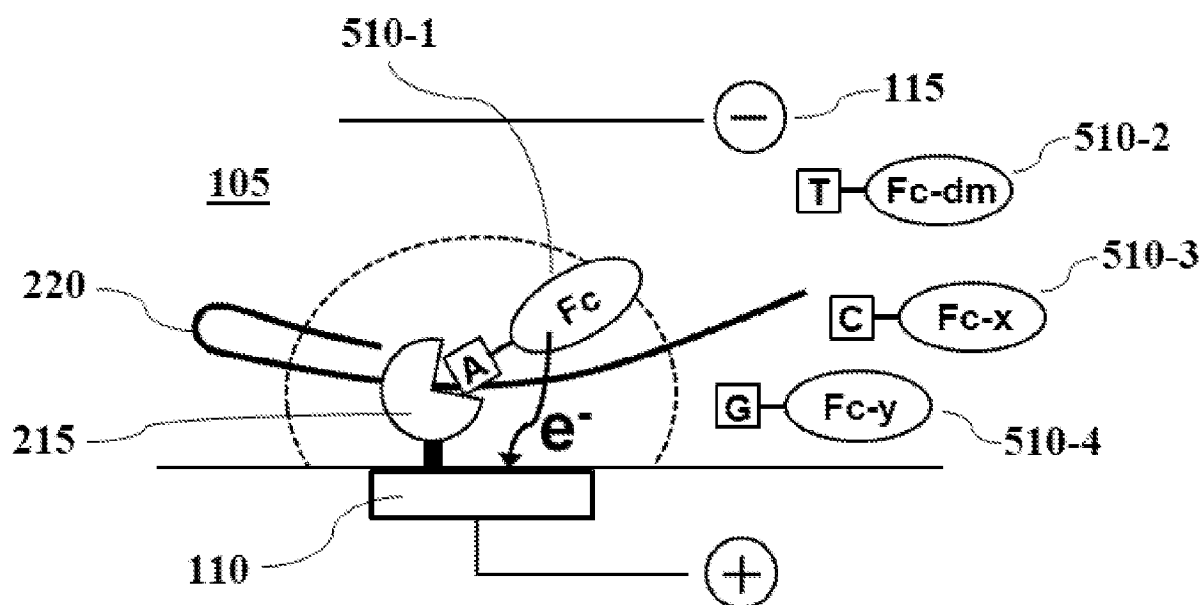
ФИГ. 3



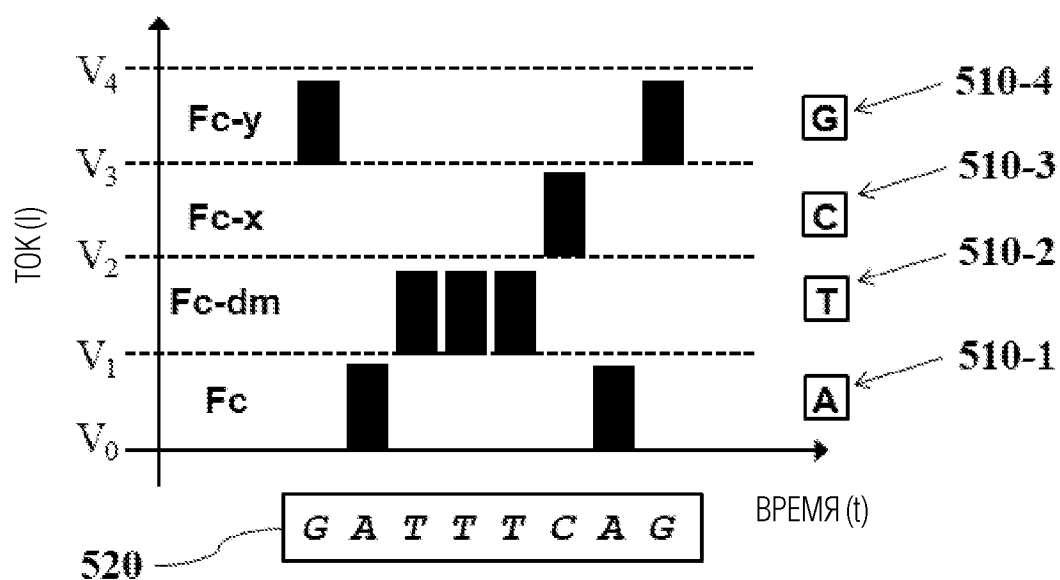
ФИГ. 4A



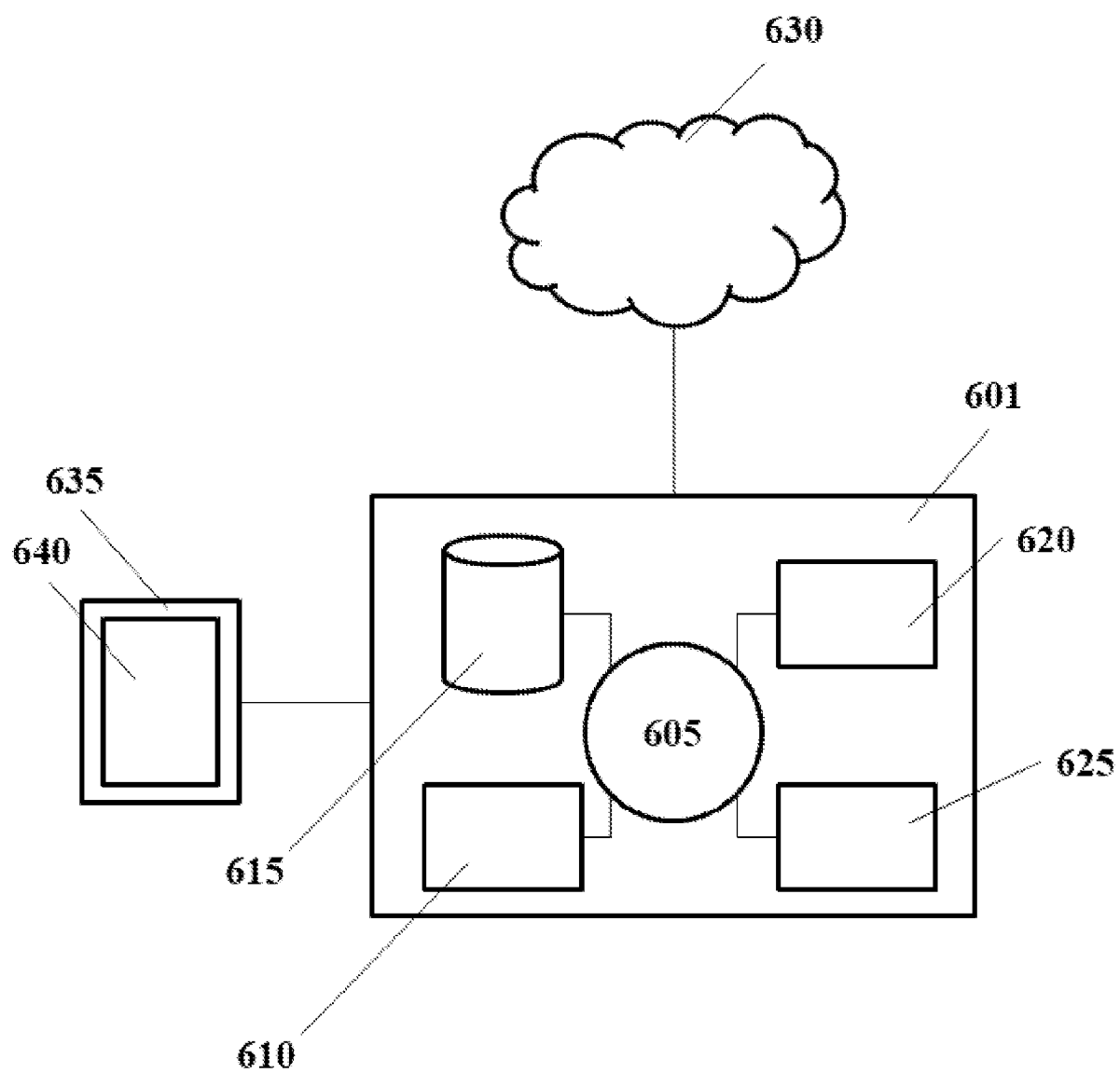
ФИГ. 4B



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 6



ФИГ. 7