



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I860366 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：109118502

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 06 月 02 日

(51)Int. Cl. : G01N35/10 (2006.01)

(30)優先權：2019/06/19 美國 62/863,444

(71)申請人：美商伊路米納有限公司 (美國) ILLUMINA, INC. (US)
美國(72)發明人：顏銘宏 YEN TONY (US)；史塔哇 艾利克 STAVA, ERIC (US)；潘恰佩克森 拉
賈戈柏 PANCHAPAKESAN, RAJAGOPAL (IN)

(74)代理人：閻啓泰；林景郁

(56)參考文獻：

TW 201946692A

CN 101460953A

審查人員：謝敏哲

申請專利範圍項數：26 項 圖式數：8 共 48 頁

(54)名稱

儀器中的試劑交換

(57)摘要

一種方法，包括使併入試劑流動通過儀器的試劑管理系統和流體槽。流體槽具有定位於其中的第一多核苷酸。併入試劑將第一鹼基添加到鹼基序列上。鹼基序列包括與第一多核苷酸互補的第二多核苷酸。在第一鹼基已經被添加到第二多核苷酸上之後，捕獲從第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像。使裂解試劑流動通過試劑管理系統和流體槽，以從第一鹼基去除第一終止劑，以便使鹼基序列中隨後的鹼基能夠被添加至第二多核苷酸。使緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統和流體槽。

A method includes flowing an incorporation reagent through a reagent management system and a flow cell of an instrument. The flow cell having a first polynucleotide positioned therein. The incorporation reagent adding a first base onto a sequence of bases. The sequence of bases includes a second polynucleotide complementary to the first polynucleotide. An image of an identification signal emanating from the first base is captured after the first base has been added onto the second polynucleotide. A cleavage reagent is flowed through the reagent management system and flow cell to remove a first terminator from the first base in order to enable a subsequent base in the sequence of bases to be added to the second polynucleotide. A buffer reagent is flowed through the reagent management system and flow cell in a plurality of cycles of consecutive forward and reverse flow directions.

指定代表圖：

符號簡單說明：

- 108:多核苷酸
- 200:儀器
- 202:流體槽
- 204:試劑管理系統
- 206:連接器
- 208:試劑
- 209:試劑
- 210:試劑
- 211:試劑
- 212:試劑
- 214:試劑
- 216:試劑
- 218:試劑
- 220:入口端口
- 222:出口端口
- 224:流動通道
- 226:偵測模組
- 230:盒
- 232:試劑槽
- 234:試劑流
- 236:通道
- 238:通道
- 242:旋轉閥
- 244:閥體
- 246:中心端口
- 248:可旋轉端口
- 250:旋轉通道
- 252:槽通道
- 254:槽通道端口
- 255:公共管線
- 256:出口端口
- 258:入口端口
- 260:夾管閥
- 262:夾管閥
- 264:泵
- 266:柱塞

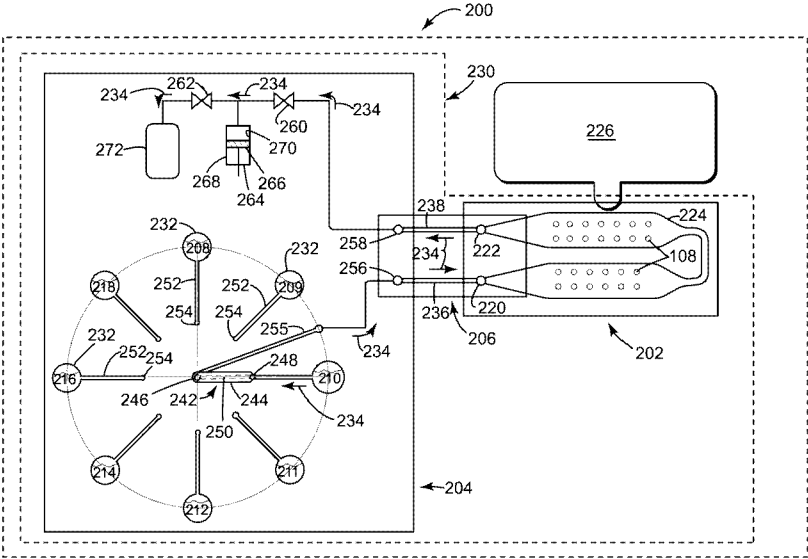


圖7

I860366

TW I860366 B

268:缸

270:缸腔

272:廢料罐



公告本

I860366

【發明摘要】

【中文發明名稱】 儀器中的試劑交換

【英文發明名稱】 REAGENT EXCHANGE IN AN INSTRUMENT

【中文】

一種方法，包括使併入試劑流動通過儀器的試劑管理系統和流體槽。流體槽具有定位於其中的第一多核苷酸。併入試劑將第一鹼基添加到鹼基序列上。鹼基序列包括與第一多核苷酸互補的第二多核苷酸。在第一鹼基已經被添加到第二多核苷酸上之後，捕獲從第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像。使裂解試劑流動通過試劑管理系統和流體槽，以從第一鹼基去除第一終止劑，以便使鹼基序列中隨後的鹼基能夠被添加至第二多核苷酸。使緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統和流體槽。

【英文】

A method includes flowing an incorporation reagent through a reagent management system and a flow cell of an instrument. The flow cell having a first polynucleotide positioned therein. The incorporation reagent adding a first base onto a sequence of bases. The sequence of bases includes a second polynucleotide complementary to the first polynucleotide. An image of an identification signal emanating from the first base is captured after the first base has been added onto the second polynucleotide. A cleavage reagent is flowed through the reagent management system and flow cell to remove a first terminator from the first base in order to enable a subsequent base in the sequence of bases to be added to the second polynucleotide. A buffer reagent is flowed through the reagent management system and flow cell in a

plurality of cycles of consecutive forward and reverse flow directions.

【指定代表圖】 圖7

【代表圖之符號簡單說明】

- 108: 多核苷酸
- 200: 儀器
- 202: 流體槽
- 204: 試劑管理系統
- 206: 連接器
- 208: 試劑
- 209: 試劑
- 210: 試劑
- 211: 試劑
- 212: 試劑
- 214: 試劑
- 216: 試劑
- 218: 試劑
- 220: 入口端口
- 222: 出口端口
- 224: 流動通道
- 226: 偵測模組
- 230: 盒
- 232: 試劑槽
- 234: 試劑流

- 236: 通道
- 238: 通道
- 242: 旋轉閥
- 244: 閥體
- 246: 中心端口
- 248: 可旋轉端口
- 250: 旋轉通道
- 252: 槽通道
- 254: 槽通道端口
- 255: 公共管線
- 256: 出口端口
- 258: 入口端口
- 260: 夾管閥
- 262: 夾管閥
- 264: 泵
- 266: 柱塞
- 268: 缸
- 270: 缸膛
- 272: 廢料罐

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 儀器中的試劑交換

【英文發明名稱】 REAGENT EXCHANGE IN AN INSTRUMENT

【技術領域】

【0001】 本案係關於確定在多核苷酸中之核苷酸順序的方法和儀器。

相關申請的交叉引用

【0002】 本專利申請案主張2019年6月19日提交的且發明名稱為Reagent Exchange In An Instrument的美國臨時專利申請第62/863,444號的優先權。前述申請的全部內容在此通過引用併入本文。

【先前技術】

【0003】 用於執行確定多核苷酸的核苷酸順序的方法的儀器可以包括與流體槽(flow cell)流體連通的試劑管理系統(reagent management system; RMS)。RMS能夠儲存複數種試劑、選擇複數種試劑和使複數種試劑相繼流動通過流體槽的流動通道。

【0004】 這樣的方法可以包括一系列(a sequence of)所選試劑的多個循環(multiple cycles)，所述所選試劑被規定路徑(route)以通過流體槽的流動通道，以便對定位於流體槽的流動通道中的經選殖的第一多核苷酸的簇(cluster)執行多種受控的化學反應。化學反應使加標籤的(tagged)核苷酸能夠與第一多核苷酸的鹼基序列形成鹼基對，一次形成一個鹼基對。在配對後，標籤被激發以發射出鑑定鹼基對的鑑定訊號。每個加標籤的多核苷酸添加到與流體槽中的第一多核苷酸形成雙股的增長的互補的第二多核苷酸股。

【0005】 因此，可以一次一個鹼基地逐步建立(build up)互補的第二多核苷酸股，以確定第一多核苷酸的簇中的鹼基序列。可以被逐步建立的互補的第二多核苷酸股中的已知核苷酸的數量越大(即，第二多核苷酸股的長度變得越長)，可以提供的關於第一多核苷酸的簇中的核苷酸順序的數據越多，並且總體分析變得越快。

【0006】 然而，如果試劑流之間的試劑交換不充分，那麼可能出現試劑之間的交叉污染。因此，對確定多核苷酸的核苷酸順序、具有改進的試劑流之間的試劑交換的儀器和方法存在需要。

【發明內容】

【0007】 根據本公開內容的一個或更多個方面，本公開內容通過提供一種可操作的以執行確定多核苷酸的核苷酸順序的方法的儀器提供了優點。該方法包括洗滌階段，其中當使緩衝試劑流動通過儀器的試劑管理系統和流體槽時，緩衝試劑的總掃過體積(sweep volume)大於緩衝試劑的總流體消耗(fluidic consumption)。此外，總掃過體積與總流體消耗的比率可以高達6、10或更高。與其中總掃過體積與總流體消耗的比率為1的其他方法相比，本方法增強了試劑交換。因此，相對於所述其他方法，階段超前(pre-phasing)被減少並且可以增長的多核苷酸的長度被增加。

【0008】 根據本公開內容的一個或更多個方面的方法包括使併入試劑(incorporation reagent)流動通過儀器的試劑管理系統和流體槽。流體槽具有定位於其中的第一多核苷酸。併入試劑將第一鹼基添加到鹼基序列上。鹼基序列包括與第一多核苷酸互補的第二多核苷酸。在第一鹼基已經被添加到第二多核苷酸上之後，捕獲從第一鹼基發出的鑑定訊號(identification signal)的圖像。使裂解試劑流動通過試劑管理系統和流體槽，以從第一鹼基去除第一終止劑

(terminator)，以便使鹼基序列中隨後的鹼基能夠被添加至第二多核苷酸。使緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統和流體槽，以從試劑管理系統和流體槽洗去裂解試劑。

【0009】 在方法的一些實例中，複數個循環包括4個或更多個循環。

【0010】 在方法的一些實例中，複數個循環包括12個或更多個循環。

【0011】 在方法的一些實例中，試劑管理系統和流體槽定位於儀器的盒(cartridge)中，該盒能夠可移除地插入到(removably insertable into)儀器中。

【0012】 在方法的一些實例中，併入試劑、裂解試劑和緩衝試劑儲存於試劑管理系統的試劑槽中，所述試劑槽被配置為儲存有限總體積的每種試劑。

【0013】 在方法的一些實例中，使緩衝試劑流動包括：

使第一正向流體積(first forward flow volume)的緩衝試劑以複數個循環的每個循環的正向流動方向流動；以及使第二反向流體積(second reverse flow volume)的緩衝試劑以複數個循環的每個循環的反向流動方向流動，所述第一正向流體積大於所述第二反向流體積。

【0014】 在方法的一些實例中，正向流體積比反向流體積大約3%或更多。

【0015】 在方法的一些實例中，使緩衝試劑流動包括：

在複數個循環的最後一個循環後持續約10秒或更長時間的培育期間，其基本上沒有緩衝試劑流動通過試劑管理系統和流體槽；以及在培育期間後，使第三正向流體積的緩衝試劑以正向流動方向流動。

【0016】 在方法的一些實例中，在使緩衝試劑流動期間，緩衝試劑的總掃過體積基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} + \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ，其中：

第一FFV是第一正向流體積，

第二RFV是第二反向流體積，

N是複數個循環的總循環數，並且

第三FFV是第三正向流體積。

【0017】 在方法的一些實例中，在使緩衝試劑流動期間，緩衝試劑的總流體消耗基本上由下式確定： $((\text{第一FFV}-\text{第二RFV}) * N)+\text{第三FFV}$ 。

【0018】 在方法的一些實例中，緩衝試劑的總掃過體積與緩衝試劑的總流體消耗的比率為等於或大於約6。

【0019】 在方法的一些實例中，對於正向流動方向和反向流動方向的複數個循環的每個循環，以正向流動方向的流動和以反向流動方向的流動相隔約1秒或更短的延遲時間。

【0020】 在方法的一些實例中，對於正向流動方向和反向流動方向的複數個循環的每個循環，以正向流動方向的流動和以反向流動方向的流動相隔約200毫秒或更短的延遲時間。

【0021】 在方法的一些實例中，正向流動方向和反向流動方向的複數個循環的每個循環相隔約200毫秒或更短的延遲時間。

【0022】 方法的任何實例可以以任何合適的組合方式來實施，以獲得本文描述的優點。

【0023】 根據本公開內容的一個或更多個方面的儀器包括試劑管理系統，所述試劑管理系統是可操作的以定位於儀器中。試劑管理系統包括複數個試劑槽。試劑槽具有至少第一試劑槽、第二試劑槽和第三試劑槽，所述第一試劑槽、第二試劑槽和第三試劑槽被配置為包含分別定位於其中的併入試劑、裂解試劑和緩衝試劑。試劑管理系統是可操作的以從複數個試劑槽中的一個試劑槽選擇試劑流。流體槽是可操作的以定位於儀器中。流體槽包括與試劑管理系統流體連通的流動通道。流動通道是可操作的以規定路徑使得試劑流經過定位於流動通道中的第一多核苷酸。儀器是可操作的以：

使併入試劑流動通過試劑管理系統和流體槽，以將第一鹼基添加到鹼基序

列上，所述鹼基序列包括與第一多核苷酸互補的第二多核苷酸；

在第一鹼基已經被添加到第二多核苷酸上之後，捕獲從第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像；

使裂解試劑流動通過試劑管理系統和流體槽，以從第一鹼基去除第一終止劑，以便使鹼基序列中隨後的鹼基能夠被添加至第二多核苷酸；以及

使緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統和流體槽，以從試劑管理系統和流體槽洗去裂解試劑。

【0024】 在一些實例中，儀器包括盒(cartridge)，所述盒是可操作的以包含試劑管理系統和流體槽，其中併入試劑、裂解試劑和緩衝試劑儲存於試劑管理系統的試劑槽中，試劑槽被配置為儲存有限總體積的每種試劑。

【0025】 在一些實例中，儀器是可操作的以使緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統和流體槽，所述複數個循環為4個或更多個循環。

【0026】 在一些實例中，儀器是可操作的以使緩衝試劑流動，使得：
第一體積的緩衝試劑以複數個循環的每個循環的正向流動方向流動；
第二體積的緩衝試劑以複數個循環的每個循環的反向流動方向流動，所述第一體積大於所述第二體積；

在複數個循環的最後一個循環後施加持續約10秒或更長時間的基本上沒有緩衝試劑流動通過試劑管理系統和流體槽的培育期間；並且

在培育期間後，第三正向流體積的緩衝試劑以正向流動方向流動。

【0027】 在一些實例中，儀器是可操作的以使緩衝試劑流動，使得：
緩衝試劑的總掃過體積基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} + \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ，其中：

第一FFV是第一正向流體積，

第二RFV是第二反向流體積，

N是複數個循環的總循環數，並且

第三FFV是第三正向流體積；

緩衝試劑的總流體消耗基本上由下式確定： $((\text{第一FFV}-\text{第二RFV}) * N)+\text{第三FFV}$ ；並且

其中緩衝試劑的總掃過體積與緩衝試劑的總流體消耗的比率為等於或大於約6。

【0028】 在一些實例中，儀器是可操作的以使緩衝試劑流動，使得對於正向流動方向和反向流動方向的複數個循環的每個循環，以正向流動方向的流動和以反向流動方向的流動相隔約200毫秒或更短的延遲時間。

【0029】 儀器的任何實例可以以任何合適的組合方式來實施，以實現本文描述的優點。

【0030】 應理解，前述方面(包括方法和儀器)和下文更詳細討論的另外的概念(條件是這樣的觀念沒有相互不一致)的所有組合被預期作為本文公開的進步性標的的一部分。

【0031】 本公開內容的這些和其他目的、特徵和優點根據以下對本公開內容的多個方面的詳細描述結合附圖將變得明顯。

【圖式簡單說明】

【0032】 本公開內容將根據以下的詳細描述結合附圖而被更充分地理解，在附圖中：

【0033】 [圖1]描繪了根據本文公開的方面的核苷酸的化學結構的簡化的實例；

【0034】 [圖2]描繪了根據本文描述的方面的第一多核苷酸和增長的互補

的第二多核苷酸的簡化的實例；

【0035】 [圖3]描繪了根據本文公開的方面的確定多核苷酸的核苷酸順序的方法的流程圖的實例；

【0036】 [圖4]描繪了根據本文公開的方面的確定多核苷酸的核苷酸順序的另一種方法的流程圖的實例；

【0037】 [圖5]描繪了表格，所述表格示出了根據本文公開的方面，在洗滌階段的工作實例期間獲得的緩衝試劑的總掃過體積與總流體消耗的多種比率；

【0038】 [圖6]描繪了根據本文公開的方面根據圖5的工作實例中獲得的數據繪製的總掃過體積與總流體消耗的比率對階段超前斜率的圖；

【0039】 [圖7]描繪了根據本文公開的方面的儀器的示意圖的實例；並且

【0040】 [圖8]描繪了根據本文公開的方面的圖7的儀器的示意性方塊圖的實例。

【實施方式】

【0041】 現在將描述某些實例以提供對本文公開的方法、系統和裝置的結構、功能、製造和使用的原理的全面理解。在附圖中圖示了一個或更多個實例。本領域技術人員將理解，在本文中具體描述並在附圖中圖示的方法、系統和裝置是非限制性實例，並且本公開內容的範圍僅由申請專利範圍限定。結合一個實例圖示或描述的特徵可以與其他實例的特徵組合。這樣的修改和變化形式預期被包括在本公開內容的範圍內。

【0042】 可以遍及本公開內容(包括申請專利範圍)中使用的術語“基本上”、“約(approximately)”、“約(about)”、“相對地”或其他這樣的類似術語用於描述和解釋諸如由於處理中的變化而引起的偏離參考或參數的小波動。這樣的小

波動也包括偏離參考或參數的零波動。例如，它們可以指小於或等於 $\pm 10\%$ ，諸如小於或等於 $\pm 5\%$ 、諸如小於或等於 $\pm 2\%$ 、諸如小於或等於 $\pm 1\%$ 、諸如小於或等於 $\pm 0.5\%$ 、諸如小於或等於 $\pm 0.2\%$ 、諸如小於或等於 $\pm 0.1\%$ 、諸如小於或等於 $\pm 0.05\%$ 。

【0043】 參考圖1，描繪了根據本文公開的方面的核苷酸100的化學結構的簡化的實例。核苷酸100包含以下三個次單元分子：含氮鹼基102 (也稱為核鹼基或鹼基)、五碳糖104 (諸如核糖或去氧核糖)和至少一個磷酸基團106。連接在一起的多個核苷酸被稱為多核苷酸。在圖2中最佳地觀察到的第一多核苷酸108和第二多核苷酸110是這樣的多核苷酸的實例。

【0044】 核苷酸100的含氮鹼基102可以是以下五種類型之一：腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)和尿嘧啶(U)。每種類型的鹼基102將與僅一種其他鹼基類型配對(即化學附接)，以形成多核苷酸的兩條互補雙股(諸如圖2中示出的互補雙股多核苷酸112)中的互補鹼基對。

【0045】 如本文使用的，互補是指第一核苷酸的第一鹼基與第二核苷酸的特定第二鹼基的配對，所述第二核苷酸的特定第二鹼基可以與第一核苷酸的第一鹼基化學附接。第二鹼基(及其相關核苷酸)在本文中被認為與第一鹼基(及其相關核苷酸)互補。例如：腺嘌呤-胸腺嘧啶(A-T)和鳥嘌呤-胞嘧啶(G-C)是可以連接去氧核糖核酸(DNA)的互補雙多核苷酸股(double polynucleotide strands)的互補鹼基對。此外，腺嘌呤-尿嘧啶(A-U)和鳥嘌呤-胞嘧啶(G-C)是可以連接核糖核酸(RNA)的互補雙多核苷酸股的互補鹼基對。

【0046】 參考圖2，描繪了根據本文描述的方面的第一多核苷酸108和增長的互補的第二多核苷酸110的簡化的實例。第一多核苷酸108和第二多核苷酸110連接在一起以形成雙股多核苷酸112。

【0047】 第一多核苷酸108被化學錨定114至流體槽202的流動通道224的

底板(floor) 116 (在圖7中最佳地觀察到)。第一多核苷酸108包括核苷酸118-1至118-N，其中N表示第一多核苷酸108中核苷酸118的總數目並且也指示第一多核苷酸108的長度。與每個核苷酸118相關的含氮鹼基的具體類型由帶圓圈的字母A、G、C或T標示，它們分別表示鹼基類型腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶。第一多核苷酸108可以是錨定至流動通道224的底板116的經選殖的相同第一多核苷酸108的許多簇中的一個。

【0048】 第二多核苷酸110包括至少核苷酸120-1至120-6。同樣地，與每個核苷酸120相關的含氮鹼基的具體類型由帶圓圈的字母A、G、C或T標示。每個核苷酸120包括化學標籤(諸如螢光標籤)，該化學標籤(諸如螢光標籤)在被激發(例如被激發光激發)時將發射出鑑定訊號(諸如螢光)，所述鑑定訊號(諸如螢光)將鑑定核苷酸120的具體鹼基。

【0049】 核苷酸120的鹼基僅可以附接至核苷酸118的互補鹼基以形成一系列互補鹼基對122-1至122-6。鹼基對122及其相關的核苷酸118、120形成雙股多核苷酸112。

【0050】 用於執行確定第一多核苷酸108的核苷酸118-1至118-N的順序的方法的儀器(諸如儀器200)可以包括與流體槽202流體連通的試劑管理系統204(在圖7中最佳地觀察到)。試劑管理系統能夠儲存複數種試劑、選擇複數種試劑並且使複數種試劑相繼流動通過流體槽202的流動通道224。試劑管理系統和/或流體槽可以位於或可以不位於儀器的能夠可移除地插入的盒(removably insertable cartridge) 230中(在圖7中最佳地觀察到)。

【0051】 如將在本文中更詳細解釋的，這樣的方法可以包括一系列所選試劑208-218的複數個循環(multiple cycles) (在圖7中最佳地觀察到)，所述所選試劑被規定路徑以通過流體槽202的流動通道224，以便對第一多核苷酸108執行多種受控的化學反應。流動通過第一多核苷酸108的至少一種試劑，也稱為併入試

劑，包含核苷酸120。併入試劑中的每個核苷酸120包含化學標籤(諸如螢光標籤)，該化學標籤(諸如螢光標籤)在被激發(例如被激發光激發)時將發射出鑑定訊號(諸如螢光)，所述鑑定訊號(諸如螢光)將鑑定核苷酸120的具體鹼基。另外，併入試劑中的每個核苷酸120的鹼基包含防止其他鹼基與其附接的可分離的終止劑。化學反應使核苷酸120能夠與第一多核苷酸108的核苷酸118的鹼基序列形成鹼基對122，一次形成一個鹼基對122。

【0052】 然而，如果試劑流之間的試劑交換不充分，那麼可能出現試劑之間的交叉污染。即，如果第一試劑沒有被去除並且與方法的連續的第二試劑流交換，那麼第一試劑可能污染第二試劑。這可引起被稱為階段超前的現象，其中在每個循環中複數個加標籤的鹼基被不經意地添加至增長的互補的第二多核苷酸股。階段超前使確定核苷酸序列的方法的準確性變差。階段超前也是累積性的，其中階段超前可以在方法的每個循環中重複出現並且隨著每個循環進一步降低準確性。階段超前還將減少在互補的第二多核苷酸中可以逐步建立的鹼基的數目(即，減少長度)，其中這些鹼基的順序可以在可接受的準確性程度內被確定。在具有不均勻的通道的流體槽的區域或具有不良流體流動條件(諸如轉角(corner))的區域中的試劑交換可以特別具有挑戰性。

【0053】 除了階段超前的增加之外，不適當的試劑交換也可促成可以降低用於確定核苷酸序列的多種方法的準確性的其他現象。例如，不適當的試劑交換可引起階段落差(phasing)的增加，其中加標籤的鹼基不被添加至增長的互補的第二核苷酸。此外，不適當的試劑交換可引起通過過濾器(filter)的簇的百分比減少，而所述百分比是來自每個簇的訊號純度的指示。

【0054】 此外，當RMS位於儀器的盒中時，試劑槽的試劑儲存容量可以受限於盒的空間約束，使得有效的試劑交換更為重要。

【0055】 在圖2中圖示的實例中，方法已經使加標籤的核苷酸120-1至

120-5能夠與核苷酸118-1至118-5依次結合，以形成互補的鹼基對122-1至122-5。核苷酸120-6是序列中的下一個核苷酸，並且將與核苷酸118-6結合(或配對)以形成互補的鹼基對122-6。

【0056】 在配對後，核苷酸120-6的化學標籤將被激發以發射出鑑定訊號，所述鑑定訊號將鑑定鹼基對122-6。在鑑定後，附接至核苷酸120-6的鹼基的終止劑被去除，使得可以附接隨後的鹼基。加標籤的核苷酸120-6添加至與第一多核苷酸108形成雙股的增長的互補的第二多核苷酸股110。

【0057】 因此，可以一次一個鹼基120地逐步建立互補的第二多核苷酸股110，以確定第一多核苷酸108的簇中的核苷酸118的鹼基序列。可以被逐步建立的互補的第二多核苷酸股110中的核苷酸120的數量越大(即，第二多核苷酸股長度變得越長)，可以提供的關於第一多核苷酸108的簇中的核苷酸順序的數據越多，並且總體分析變得越快。

【0058】 參考圖3，描繪了根據本文描述的方面的確定多核苷酸的核苷酸順序的方法130的簡化的流程圖的實例。方法130包括四個基本階段，它們是：併入階段132、成像階段134、裂解階段136和洗滌階段138。

【0059】 在併入階段132期間，使併入試劑流動通過儀器200的試劑管理系統204和流體槽202 (在圖7中最佳地觀察到)。流體槽202具有定位於其中的第一多核苷酸108 (在圖2中最佳地觀察到)。併入試劑將第一鹼基(與核苷酸120-6相關)添加到鹼基序列(與核苷酸120-1至120-5相關)上。鹼基序列(及其相關的核苷酸120-1至120-6)包括與第一多核苷酸108互補的第二多核苷酸110。

【0060】 更具體地，併入試劑流動通過先前錨定至流體槽202的流動通道224的經選殖的第一多核苷酸108的簇。併入試劑包括已知的核苷酸120，其中這些核苷酸120的鹼基與第一多核苷酸108的鹼基依次配對，以形成與第一多核苷酸108互補的增長的第二多核苷酸110。第一多核苷酸108和第二多核苷酸110形

成雙股多核苷酸112，諸如DNA片段。第一多核苷酸108和第二多核苷酸110的鹼基類型可以是腺嘌呤(A)、鳥嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)中的任一種。

【0061】 併入試劑中的核苷酸120還包括標籤(在本實例中為螢光標籤)，該標籤使得能夠用激發訊號(在本實例中用激發光)鑑定鹼基類型。核苷酸120還包括本領域已知的可裂解終止劑(或阻斷基團(blocking group))，該可裂解終止劑(或阻斷基團)阻止一次多於一個第二多核苷酸110的鹼基與第一多核苷酸108的鹼基配對。

【0062】 在成像階段134期間，在核苷酸120-6的第一鹼基已經添加到第二多核苷酸110上之後，捕獲從核苷酸120-6的第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像。

【0063】 更具體地，與第二多核苷酸110締合的核苷酸120的螢光標籤被激發光激發以發射特徵螢光。然後拍攝螢光圖像，以鑑定形成增長的第二多核苷酸110的核苷酸120-1至120-6的序列中新添加的核苷酸120-6的鹼基類型。由於第二多核苷酸110與第一多核苷酸108互補，因此可以確定第一多核苷酸的核苷酸118的順序。第二多核苷酸110可以增長得越長，第一多核苷酸108中可以被確定順序的核苷酸118越多。

【0064】 在裂解階段136期間，使裂解試劑流動通過試劑管理系統204和流體槽202，以從核苷酸120-6去除終止劑。這使核苷酸120-1至120-6的序列中隨後的核苷酸(未示出)能夠被添加至第二多核苷酸110。

【0065】 在洗滌階段138期間，緩衝試劑(或洗滌試劑)以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統204和流體槽202，以從試劑管理系統和流體槽洗去裂解試劑。緩衝試劑可以是化學物質的混合物，該混合物用於從流體槽和試劑管理系統去除非預期的化學物質。非預期的化學物質可以是，例如，從前一步驟殘留的活性試劑(諸如過量的裂解試劑)或來自前

一步驟的作為副產物產生的多種污染物。緩衝試劑可以是例如添加有硫辛酸的緩衝鹽水溶液(saline solution)。

【0066】 如本文使用的，正向流動是指從試劑管理系統204的試劑槽232至流體槽202的試劑流的方向(在圖7中最佳地觀察到)。如本文使用的，反向流動是指從流體槽202至試劑槽232的試劑流的方向。

【0067】 在圖3的實例中，複數個循環被圖示為緩衝試劑的正向流動方向140和連續的反向流動方向142的12個重複循環。然而，緩衝試劑可以以正向流動方向140並且然後以連續的反向流動方向142循環任何次數。例如，複數個循環可以是2個、4個、6個、12個或更多個循環。

【0068】 在洗滌階段138期間連續的正向流動方向140和反向流動方向142的複數個循環使得能夠比先前的使用相同有限體積的緩衝試劑的方法更徹底地去除(即試劑交換)在裂解階段136期間引入到系統中的裂解試劑。這是因為，先前的方法在洗滌階段期間僅使試劑以正向方向流動。因此，在先前的方法中，相同的緩衝試劑將僅通過試劑管理系統和流體槽一次，並且在洗滌階段期間可能未充分去除裂解試劑。在這些條件下，在隨後的併入階段期間，隨後的併入試劑可能變得被殘留的裂解試劑污染。然後，殘留的裂解試劑可能在隨後的併入階段期間過早地從核苷酸去除終止劑。這可能使得產生不期望的量的階段超前，其中一次多於一個鹼基被附接至增長的第二多核苷酸。

【0069】 如果使得階段超前隨每個新的循環累積，那麼可能發展出多核苷酸的鹼基順序的顯著不確定性。不確定性可隨著每個循環增加，這可降低隨著多核苷酸股的增長可以獲得的數據的準確性。因此，可以增長使得第二多核苷酸股的鹼基順序可以以合理的準確度被確定的第二多核苷酸股的總體長度可受到階段超前的限制。

【0070】 相比之下，本公開內容的正向流動方向140和反向流動方向142

的複數個循環使相同的緩衝試劑能夠通過試劑管理系統和流體槽若干次，以進行更徹底的洗滌。在一個實例中，使用如本文描述的連續的正向流動方向和反向流動方向的複數個循環可以提供有限體積的緩衝試劑的更有效的利用，特別是在例如由於空間和/或成本約束而不期望增加緩衝試劑的體積的情況下可以提供有限體積的緩衝試劑的更有效的利用。因此，可以需要更少的緩衝試劑來達到給定水平的試劑交換。

【0071】 如本文使用的，連續的正向流動方向140和反向流動方向142是指彼此相繼出現而無居間步驟(intervening steps)的正向流動方向和反向流動方向。無居間步驟是指試劑正向流動和反向流動之間沒有實質的無流動培育期間(或延遲時間)。

【0072】 因此，對於正向流動方向和反向流動方向的複數個循環的每個循環，以正向流動方向140的流動和以反向流動方向142的流動應當相隔約1秒或更少、約200毫秒或更少、或約100毫秒或更少的延遲時間。另外，正向流動方向和反向流動方向的複數個循環的每個循環應當相隔約1秒或更少、約200毫秒或更少、或約100毫秒或更少的延遲時間。

【0073】 在一個實例中，為了避免污染試劑管理系統204中的試劑槽232(在圖7中最佳地觀察到)，以正向方向140流動的緩衝試劑的體積應該大於以反向方向流動的緩衝試劑的體積。換言之，為了防止在洗滌階段期間污染試劑槽：

使第一正向流體積(第一FFV)的緩衝試劑以複數個循環的每個循環的正向流動方向流動；並且

使第二反向流體積(第二RFV)的緩衝試劑以複數個循環的每個循環的反向流動方向流動，其中第一正向流體積大於第二反向流體積。更具體地，第一正向流體積(第一FFV)可以比第二反向流體積(第二RFV)大約3%或更多。

【0074】 在複數個正向流動方向140和反向流動方向142已經發生後，洗滌

階段138進行到培育期間144。培育期間144是基本上沒有緩衝試劑流動通過試劑管理系統204和流體槽202的時間段。在複數個循環的140、142的最後一個循環已經發生後，培育期間144可以具有約10秒或更長的持續時間。

【0075】 在培育期間144後，洗滌階段138進行到第三正向流動146。即，在培育期間144後，使第三正向流體積(第三FFV)的緩衝試劑以正向流動方向流動。培育期間144和第三正向流動146可以有助於使裂解試劑從可能在試劑管理系統或流體槽的邊緣形成的裂隙(crack)擴散出。

【0076】 在完成洗滌階段138後，方法然後循環回148併入階段132，以開始將核苷酸序列中的下一個核苷酸120添加到第二多核苷酸110上的過程。

【0077】 在一些先前存在的方法中，因為在洗滌階段期間緩衝試劑僅以正向方向流動，在洗滌階段期間消耗的緩衝試劑的總量(總流體消耗)基本上等於在洗滌階段期間掃過試劑管理系統和流體槽的緩衝試劑體積的總量(總掃過體積)。相比之下，在本公開內容的方法中，在洗滌階段期間，總掃過體積可以是總流體消耗的許多倍。

【0078】 更具體地，在使緩衝試劑流動期間(洗滌階段)，緩衝試劑的總掃過體積基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} + \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ，其中：

第一FFV是第一正向流體積，

第二RFV是第二反向流體積，

N是複數個循環的總循環數，並且

第三FFV是第三正向流體積。

另外地，在使緩衝試劑流動期間(洗滌階段)，緩衝試劑的總流體消耗基本上由下式確定：

$((\text{第一FFV} - \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ 。

如前述類型的式中使用的，術語“基本上由...確定”用於描述和解釋在確定諸

如第一FFV、第二RFV和第三FFV的參數時可能出現的測量公差(measurement tolerance)。

【0079】 因為相同體積的緩衝試劑可以通過試劑管理系統和流體槽若干次，緩衝試劑的總掃過體積與緩衝試劑的總流體消耗的比率可以基本上大於1。更具體地，緩衝試劑的總掃過體積與緩衝試劑的總流體消耗的比率可以為等於或大於約6、約10、約12或更大。

【0080】 在基於盒的儀器系統(cartridge based instrument system)中，試劑管理系統和/或流體槽可以定位於盒中。盒可以能夠可移除地插入到儀器中，意味著盒可以被插入到儀器中和從儀器移除。

【0081】 因此，在基於盒的儀器系統中，大的總掃過體積與總流體消耗的比率(2、6、10、12或更大)可以是特別有益的。這是因為併入試劑、裂解試劑和緩衝試劑可以儲存於試劑管理系統的試劑槽中，並且試劑管理系統可以是盒的一部分。因此，試劑管理系統的試劑槽可以被配置成儲存有限總體積的每種試劑以便納入(fit into)盒中。大的總掃過體積與總流體消耗的比率使相同有限體積的試劑能夠在其被消耗之前掃過試劑管理系統和流體槽若干次，從而增強試劑交換。

【0082】 參考圖4，描繪了根據本文公開的方面的確定多核苷酸的核苷酸順序的另一種方法150的流程圖的實例。方法150包括併入階段152、成像階段154、裂解階段156和洗滌階段158。

【0083】 在併入階段152期間，使併入試劑160流動通過儀器200的試劑管理系統204和流體槽202 (在圖7中最佳地觀察到)。併入試劑可以是將螢光標記的核苷酸併入到DNA股中的化學物質的混合物。

【0084】 流體槽202具有定位於其中的第一多核苷酸108 (在圖2中最佳地觀察到)。併入試劑將第一鹼基(與核苷酸120-6相關)添加到鹼基序列(與核苷酸

120-1至120-5相關)上。鹼基序列(及其相關的核苷酸120-1至120-6)形成與第一多核苷酸108互補的第二多核苷酸110。

【0085】 併入試劑中的核苷酸120還包括標籤(在本實例中為螢光標籤)，該標籤使得能夠用激發訊號(在本實例中用激發光)鑑定鹼基類型。核苷酸120還包括本領域已知的可裂解終止劑(或阻斷基團)，該可裂解終止劑(或阻斷基團)阻止一次多於一個第二多核苷酸110的鹼基與第一多核苷酸108的鹼基配對。

【0086】 接下來，在併入階段152期間，使用洗滌試劑162去除任何過量的併入試劑160。洗滌試劑可以用於從流體槽去除活性試劑的化學物質的混合物。

【0087】 方法進行到成像階段154，在此階段中，使用掃描試劑164保護流體槽表面免受光損傷(photo damage)，然後拍攝圖像。掃描試劑164可以是在偵測過程期間使核苷酸股穩定的化學物質的混合物。

【0088】 接下來，在成像階段154期間，在核苷酸120-6的第一鹼基已經添加到第二多核苷酸110上之後，捕獲從核苷酸120-6的第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像166。

【0089】 更具體地，與第二多核苷酸110相關的核苷酸120的螢光標籤被激發光激發以發射特徵螢光。然後拍攝螢光圖像，以提供關於形成增長的第二多核苷酸110的核苷酸120-1至120-6的序列中新添加的核苷酸120-6的鹼基類型的鑑定信息。

【0090】 接下來，在成像階段154期間，使用另外的加標籤試劑168將第二標籤附接至新添加的核苷酸120-6。加標籤試劑168可以用於將螢光標籤遞送至核苷酸的化學物質的混合物。

【0091】 接下來，在成像階段154期間，使用洗滌試劑170去除過量的加標籤試劑168。洗滌試劑170可以用於從流體槽去除活性試劑的化學物質的混合

物。

【0092】 接下來，在成像階段154期間，應用第二掃描試劑172以保護流體槽表面免受光損傷，然後拍攝第二圖像。第二掃描試劑可以是在偵測過程期間使核苷酸股穩定的化學物質的混合物。

【0093】 接下來，在成像階段154期間，捕獲從核苷酸120-6的第一鹼基發出的第二鑑定訊號的第二圖像174。更具體地，與第二多核苷酸110相關的核苷酸120的第二螢光標籤被激發光激發以發射第二特徵螢光。然後拍攝第二螢光的圖像，以提供關於新添加的核苷酸120-6的鹼基類型的另外的鑑定信息。

【0094】 方法進行到裂解階段156，其中使用洗滌試劑176去除任何過量的第二掃描試劑172。洗滌試劑可以用於從流體槽去除活性試劑的化學物質的混合物。

【0095】 接下來，在裂解階段156期間，使裂解試劑178流動通過試劑管理系統204和流體槽202，以從核苷酸120-6去除終止劑。這使核苷酸120-1至120-6的序列中隨後的核苷酸(未示出)能夠被添加至第二多核苷酸110。

【0096】 方法進行到洗滌階段158，其中使第一緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過試劑管理系統204和流體槽202，以從試劑管理系統和流體槽洗去裂解試劑178。第一緩衝試劑可以是例如添加有硫辛酸的緩衝鹽水溶液。

【0097】 更具體地，使22微升(μL)的第一正向流體積(第一FFV)的第一緩衝試劑以正向流動方向180流動，以開始複數個循環的每個循環。然後，使19微升(μL)的第二反向流體積(第二RFV)的第一緩衝試劑以反向流動方向182流動，以終止複數個循環的每個循環。在圖4的這個具體實例中，存在正向流動和反向流動的總計12個循環。

【0098】 接下來，在洗滌階段158期間，對系統施加基本上沒有第一緩衝

試劑流動通過試劑管理系統204和流體槽202的培育期間184。在該具體實例中，培育期間184具有約30秒的持續時間，儘管可以使用其他培育期間。

【0099】 在培育期間184後，洗滌階段158進行到第三正向流動186。即，在培育期間184後，使12微升(μL)的第三正向流體積(第三FFV)的第一緩衝試劑以正向流動方向流動。

【0100】 在洗滌階段158中使用第一緩衝試劑，以基本上從系統去除裂解試劑178。然而，第一緩衝試劑中有效去除裂解試劑178的特定化學物質也可能干擾下一個循環的併入試劑。這樣的化學物質的一個這樣的實例可以是硫辛酸。

【0101】 因此，在洗滌階段158期間，使第二緩衝試劑188的正向流流動通過試劑管理系統和流體槽以去除第一緩衝試劑。第二緩衝試劑可以是不具有硫辛酸的鹽水溶液。第二緩衝試劑在去除裂解劑(cleave agent)方面並不重要，而是不會在下一個循環干擾併入試劑160。

【0102】 在完成洗滌階段158後，方法然後循環回191併入階段152，以開始將核苷酸序列的下一個核苷酸120添加到第二多核苷酸110上的過程。

【0103】 如本文先前說明的，在洗滌階段期間，第一緩衝試劑的總掃過體積基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} + \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ，其中：

第一FFV是第一正向流體積並等於22 μL ，

第二RFV是第二反向流體積並等於19 μL ，

N是複數個循環的總循環數並等於12，並且

第三FFV是第三正向流體積並等於12 μL 。

因此，在圖4的實例中，總掃過體積等於 $(22+19)*12+12=504$ μL 。

【0104】 另外地，在洗滌階段期間，第一緩衝試劑的總流體消耗基本上由下式確定：

$((\text{第一FFV} - \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ 。

因此，在圖4的實例中，總流體消耗等於：

$$(22-19)*12+12=48\ \mu\text{L}。$$

【0105】 另外地，在圖4的實例中，總掃過體積與總流體消耗的比率等於： $504/48=10.5$ 。比較而言，先前的系統的總掃過體積與總流體消耗的比率基本上是1。這是因為，先前的系統僅使用有效去除裂解試劑的緩衝試劑的正向流動。

【0106】 圖5和圖6示出了從非限制性工作實例獲得的結果。

【0107】 參考圖5，描繪了表格190，表格190示出了在方法150的示例洗滌階段158期間獲得的第一緩衝試劑的總掃過體積與總流體消耗的多種比率的工作實例。在190-1至190-7列中，總流體消耗保持恒定，為48 μL 。同樣在190-2至190-7列中，第一正向流體積(第一FFV)、第二反向流體積(第二RFV)、循環數(N)和第三正向流體積(第三FFV)被改變，以將總掃過體積從100 μL 增加到1200 μL ，同時總流體消耗保持恒定，為48 μL 。如可以觀察到的，總掃過體積與總流體消耗的比率從2.08 (190-2列中)至25 (190-7列中)變化。

【0108】 頂列190-1表示先前的方法的比較實例，其中不存在緩衝試劑的反向流動和正向流動的循環。相反，190-1列在洗滌階段期間僅具有正向流動，並且因此，其總掃過體積等於其總流體消耗。

【0109】 參考圖6，描繪了根據本文公開的方面由圖5的工作實例中獲得的數據繪製的總掃過體積與總流體消耗的比率對階段超前斜率(pre-phasing slope)的曲線(graph)192、194。曲線194在環境溫度(例如，在25至35攝氏度的範圍內的環境溫度)繪製。曲線192在環境溫度加8攝氏度(例如，在33至43攝氏度的範圍內的溫度)繪製。

【0110】 如曲線192和194中指示的，階段超前斜率被表示為流體槽中多核苷酸的簇中每個循環領先1個鹼基對的分子的百分比(%)。階段超前斜率是每個循環階段超前率(the rate of pre-phasing per cycle)的量度。

【0111】 在本文的方法的處理期間，階段超前值越低，給定多核苷酸長度的數據質量越佳。另外地，階段超前值越低，多核苷酸可以增長得越長。

【0112】 如從曲線192和194可以確定的，其中可以達到最低的階段超前斜率百分比的總掃過體積與總流體消耗的比率的最佳範圍為等於或大於約6。根據圖5的工作實例的經繪製的數據的曲線192、194可以確定的可選的最佳範圍同樣也是從約6至約12。

【0113】 最佳範圍與低的階段超前(pre-phase)斜率相關。在圖6的工作實例的大多數情況下，最佳範圍與低於0.2%的階段超前斜率百分比相關。從圖5和圖6的工作實例獲得的如此低的階段超前斜率百分比提供了令人驚訝的結果，即互補的第二多核苷酸110能夠在可接受的準確度內被逐步建立成比先前用有限量的試劑獲得的鹼基長度更長的鹼基長度。在圖5和圖6的工作實例中，基於盒的儀器系統能夠在高百分比的時間(high percentage of time)(例如，90%以上的時間)準確建立第二互補多核苷酸110長達200個鹼基或更長的長度。因此，第一多核苷酸108和第二多核苷酸110的鹼基對也能夠在相同的高百分比的時間被準確地逐步建立至200個鹼基對或更長的長度。

【0114】 參考圖7，描繪了根據本文描述的方面的儀器200的示意圖的實例。在該具體實例中，儀器包括接合在其中的盒230。盒230包括與試劑管理系統(RMS) 204流體連通的流體槽202。在該具體實例中，RMS 204通過中間連接器206與流體槽202流體連通。盒230可以能夠可移除地插入到儀器200中，意味著盒可以被插入到儀器中和從儀器移除。

【0115】 即使該圖7的實例圖示了具有包含在盒230中的RMS 204和流體槽202的基於盒的儀器200，其他的儀器200也可以不包括這樣的基於盒的系統。而是，在一些儀器200中，RMS 204的組件可以一體地(integrally)且剛性地(rigidly)安裝在儀器200內，並且只有流體槽202是可以從儀器200可拆卸的(detachable)。

此外，流體槽202可以是或不是可從盒230拆卸的。

【0116】 RMS包括複數個試劑槽232。每個試劑槽232是可操作的以包含定位於其中的複數種試劑208-218中的一種試劑。RMS 204是可操作的從複數種試劑208-218中的一種選擇試劑流234。

【0117】 RMS還是可操作的以以正向方向和反向方向引導試劑流234。如本文使用的，正向流動是指試劑流234從試劑槽232至流體槽202的方向。如本文使用的，反向流動是指試劑流234從流體槽202至試劑槽232的方向。

【0118】 取決於待在流體槽處進行的化學反應的類型和順序，試劑208-218可以是試劑的若干類型中的任一種或組合。例如，試劑208-218可以是以下類型：

試劑208和209可以是併入試劑的不同調配物(formulation)。

試劑210和211可以是掃描試劑的不同調配物。

試劑212可以是裂解試劑。

試劑214和216可以是緩衝試劑的不同調配物。

試劑218可以是空氣。

【0119】 連接器206包括通過RMS出口端口256與RMS 204流體連通的第一通道236。第一通道236是可操作的以規定路徑使得試劑流234通過流體槽202的入口端口220並進入流體槽202的流動通道224中。連接器206還包括通過流體槽202的出口端口222與流動通道224流體連通的第二通道238。第二通道238是可操作的以在試劑流234已經通過流動通道224後規定路徑使得試劑流234從流體槽202通過RMS入口端口258並返回到RMS 204中。

【0120】 儀器200的流體槽202包括通過入口端口220與第一通道236流體連通並且通過出口端口222與第二通道238流體連通的流動通道224。流動通道224是可操作的以進行來自複數種試劑208-218的多種試劑流234和定位於流動通

道224中的多核苷酸(諸如圖2的多核苷酸108)之間的多種化學反應。

【0121】 儘管圖7的實例圖示了具有單個入口端口220和單個出口端口222的流體槽202，但也可以使用流體槽的其他配置。例如，流體槽202可以包括用於接收來自連接器206的複數個通道的試劑流的複數個入口端口220。此外，舉例而言，流體槽可以包括用於規定路徑使得試劑流到達連接器206的複數個通道的複數個出口端口222。

【0122】 儘管圖7的實例圖示了通過中間連接器206與RMS 204流體連通的流體槽202，但是流體槽202可以可選地直接連接至RMS 204，而其間不具有連接器206。即，RMS出口端口256可以直接連接至流體槽入口端口220，並且RMS入口端口258可以直接連接至流體槽出口端口222。

【0123】 在這個實例中，RMS 204包括用於選擇試劑208-218的旋轉閥242。旋轉閥242具有內部旋轉閥體244。閥體244包括通過旋轉通道250連接的中心端口246和可旋轉端口248。閥體244圍繞中心端口246旋轉(pivot)以使可旋轉端口248移動。

【0124】 包含試劑208-218的複數個試劑槽232可以佈置圍繞在旋轉閥242的周邊或者以其他方式遠離旋轉閥242。每個試劑槽232與相應的槽通道252流體連通。每個槽通道252包括槽通道端口254，旋轉閥242的可旋轉端口248可以與槽通道端口254對準，以便接收來自任何給定試劑槽232的試劑流234。

【0125】 當可旋轉端口248與槽通道端口254中的一個對準時，試劑流234的流動路徑被建立，該流動路徑允許試劑流234從選擇的槽232流動通過槽通道252、通過旋轉閥242、通過公共管線(common line) 255並且從RMS出口端口256流出。然後，試劑流234繼續通過第一通道236進入流體槽202的入口端口220並通過流動通道224，在流動通道224中複數種試劑208-218中的所選試劑可以與多核苷酸108反應。

【0126】 未反應的試劑和/或反應的副產物可以從流體槽202的出口端口222流出並流動通過第二通道238。試劑流234然後可以通過RMS入口端口258重新進入RMS 204。

【0127】 RMS 204的RMS入口端口258與第一夾管閥(pinch valve) 260流體連通。第一夾管閥260與第二夾管閥262流體連通。第一夾管閥260和第二夾管閥262包括彈性中心部分，該彈性中心部分可以被機械或氣動地啟動以通過夾管閥260、262夾止或釋放試劑流234。另外地，儘管在本實例中圖示了夾管閥260、262，但是也可以使用其他類型的閥來執行相同的功能。例如，閥260、262可以是旋轉閥。

【0128】 板載泵(onboard pump) 264 (諸如注射泵或類似的泵)也佈置在RMS 204上。即使板載泵264可以是其他類型的泵，它在本文也將被稱為注射泵264。注射泵264以T形構造(tee formation)連接在第一夾管閥260和第二夾管閥262之間。兩個夾管閥260、262都由儀器200打開和關閉，以使注射泵264與流體槽202和/或廢料罐272接合或脫離。

【0129】 注射泵264包括佈置在缸(cylinder) 268中的往復式柱塞266，缸268具有缸膛(cylinder bore) 270。柱塞266被接納在缸膛270內以形成柱塞-缸膛密封部(seal)。柱塞266由儀器200驅動以在缸膛270內往復運動，並將試劑208-218以正向流動方向從試劑槽232泵送到廢料罐272。

【0130】 除了儀器200是可操作的以將試劑流234以正向方向從試劑槽232泵送至流體槽202並泵送至泵264之外，儀器200可以是可操作的以以反向方向泵送試劑流234。即，試劑208-218可以以反向流動方向從泵264被泵送至流體槽202並泵送至試劑槽232上。因此，根據圖3的方法130和圖4的方法150，儀器可以是可操作的以例如使緩衝試劑214、216以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過RMS 204和流體槽202。

【0131】 儀器200還包括偵測模組226，偵測模組226是可操作的以偵測光的光子，或者當由試劑208-218引起的化學反應誘導多核苷酸108影響可偵測性質時，偵測其他形式的這樣的可偵測性質。

【0132】 儘管圖7中圖示的實施方案是使用旋轉閥242的儀器200的實施方案，該旋轉閥242規定路徑使得多種試劑208-218通過公共管線255並進入流體槽202中，但其他儀器200可以不使用旋轉閥242。例如，來自每個試劑槽232的槽通道252可以直接延伸到複數個單獨的RMS出口端口256中的一個。

【0133】 在這種情況下，槽通道252可以各自包括閥(未示出)以控制來自每個試劑槽232的試劑流234。另外，第一通道236可以是複數個第一通道，其各自接收來自相應的RMS出口端口256的相應的試劑流234。此外，流體槽202的入口端口220可以是複數個入口端口220，以接收來自複數個第一通道236中的每一個的多種試劑流234。

【0134】 參考圖8，描繪了圖7的儀器200的示意性方塊圖的實例。儀器200包括接收盒230的對接站(docking station) 274。儀器200內的多種電組件和機械組件與盒230交互以在流體槽202中進行的多種化學反應的微流體分析操作期間操作盒。

【0135】 除了其他事物以外，儀器200可以包括一個或更多個處理器276，所述處理器276執行存儲於記憶體278中的程序指令，以便執行微流體分析操作。處理器與旋轉閥驅動組件280、注射泵驅動組件282、夾管閥驅動組件284、偵測模組226和溫度調節組件306進行電子通信。

【0136】 為使用者提供使用者介面286以控制和監測儀器200的操作。通信介面288可以在儀器200和遠程電腦、網絡等之間傳送數據和其他信息。

【0137】 旋轉閥驅動組件280包括驅動軸290，其機械耦合到旋轉閥介面支架(rotary valve interface bracket) 292。旋轉閥介面支架292選擇性地機械耦合到盒

230的旋轉閥242。旋轉閥驅動組件280包括旋轉馬達(motor)294，並且在一些實施方案中包括平移馬達(Translation motor)296。平移馬達296可以使驅動軸290以在與旋轉閥242的接合狀態和脫離狀態之間的平移方向移動。旋轉馬達294管理旋轉閥242的旋轉閥體244的旋轉。

【0138】 旋轉閥驅動組件280還包括監測驅動軸290的位置的位置編碼器(position encoder) 298。編碼器298向處理器276提供位置數據。

【0139】 注射泵驅動組件282包括耦合到可延伸軸302的注射泵馬達300。軸302在延伸位置和縮回位置之間由注射泵馬達300驅動，以使柱塞266在注射泵264上的缸268的缸腔270內往復運動。

【0140】 夾管閥驅動組件284包括兩個氣動驅動的夾管閥驅動馬達304的組。兩個夾管閥驅動馬達304機械耦合到第一夾管閥260和第二夾管閥262中的相應的一個夾管閥。夾管閥驅動馬達304可以使用空氣壓力來夾止或釋放第一夾管閥260和/或第二夾管閥262的彈性中心部分，以氣動地打開和關閉第一夾管閥260和/或第二夾管閥262。可選地，夾管閥驅動馬達304可以是電驅動的。

【0141】 偵測模組226可以包含適於使得能夠偵測與流體槽202中的多核苷酸108相關的發射光光子或其他形式的可偵測性質和/或是使得能夠偵測與流體槽202中的多核苷酸108相關的發射光光子或其他形式的可偵測性質所需的所有照相機和/或偵測傳感器。在儀器200內的設備電路(未示出)然後可以處理和傳輸從那些偵測到的發射得到的數據訊號。然後可以分析數據訊號以揭示多核苷酸108的性質。

【0142】 溫度調節組件306 (或其他環境控制設備)也可以被包括在儀器200中。溫度調節組件306可以用於在多種化學反應期間提供流體槽202的溫度控制。更具體地，溫度調節組件306可以提供流體槽202的加熱和冷卻兩者，從而使得能夠進行流體槽202的熱循環。除了僅僅控制或調節溫度以外，環境控制設

備可以控制或調節其他參數(例如，壓力)。

【0143】 應認識到，前述概念和在本文更詳細討論的另外的概念的所有組合被預期為本文所公開的進步性標的的一部分(條件是這樣的概念沒有相互不一致)。特別是，出現在本公開內容的申請專利範圍中的要求保護的主題的所有組合都被預期為本文公開的進步性標的的一部分。

【0144】 儘管前述公開內容已經通過參考具體實例被描述，但應理解，在所描述的創新性概念的精神和範圍內可以進行許多改變。因此，預期本公開內容不限於所描述的實例，而是它具有由所附申請專利範圍的語言限定的整個範圍。

【符號說明】

【0145】

- 100: 核苷酸
- 102: 鹼基
- 104: 五碳糖
- 106: 磷酸基團
- 108: 多核苷酸
- 110: 多核苷酸
- 112: 雙股多核苷酸
- 114: 化學錨定
- 116: 底板
- 118-1: 核苷酸
- 118-2: 核苷酸
- 118-3: 核苷酸

118-4: 核苷酸
118-5: 核苷酸
118-6: 核苷酸
118-7: 核苷酸
118-N: 核苷酸
120-1: 核苷酸
120-2: 核苷酸
120-3: 核苷酸
120-4: 核苷酸
120-5: 核苷酸
120-6: 核苷酸
122-1: 鹼基對
122-2: 鹼基對
122-3: 鹼基對
122-4: 鹼基對
122-5: 鹼基對
122-6: 鹼基對
130: 方法
132: 併入階段
134: 成像階段
136: 裂解階段
138: 洗滌階段
140: 正向流動方向
142: 反向流動方向

144: 培育期間
146: 正向流動
148: 循環回
150: 方法
152: 併入階段
154: 成像階段
156: 裂解階段
158: 洗滌階段
160: 併入試劑
162: 洗滌試劑
164: 掃描試劑
166: 圖像
168: 加標籤試劑
170: 洗滌試劑
172: 掃描試劑
174: 圖像
176: 洗滌試劑
178: 裂解試劑
180: 正向流動方向
182: 反向流動方向
184: 培育期間
186: 正向流動
188: 緩衝試劑
190: 表

- 190-1: 列
- 190-2: 列
- 190-3: 列
- 190-4: 列
- 190-5: 列
- 190-6: 列
- 190-7: 列
- 191: 循環回
- 192: 曲線
- 194: 曲線
- 200: 儀器
- 202: 流體槽
- 204: 試劑管理系統
- 206: 連接器
- 208: 試劑
- 209: 試劑
- 210: 試劑
- 211: 試劑
- 212: 試劑
- 214: 試劑
- 216: 試劑
- 218: 試劑
- 220: 入口端口
- 222: 出口端口

224: 流動通道
226: 偵測模組
230: 盒
232: 試劑槽
234: 試劑流
236: 通道
238: 通道
242: 旋轉閥
244: 閥體
246: 中心端口
248: 可旋轉端口
250: 旋轉通道
252: 槽通道
254: 槽通道端口
255: 公共管線
256: 出口端口
258: 入口端口
260: 夾管閥
262: 夾管閥
264: 泵
266: 柱塞
268: 缸
270: 缸膛
272: 廢料罐

- 274: 對接站
- 276: 處理器
- 278: 記憶體
- 280: 旋轉閥驅動組件
- 282: 注射泵驅動組件
- 284: 夾管閥驅動組件
- 286: 使用者介面
- 288: 通信介面
- 290: 驅動軸
- 292: 旋轉閥介面支架
- 294: 旋轉馬達
- 296: 平移馬達
- 298: 編碼器
- 300: 注射泵馬達
- 302: 軸
- 304: 夾管閥驅動馬達
- 306: 溫度調節組件

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種確定多核苷酸的核苷酸順序的方法，所述方法包括：

使併入試劑流動通過儀器的試劑管理系統和流體槽，所述流體槽具有定位於其中的第一多核苷酸，其中所述併入試劑將第一鹼基添加到鹼基序列上，所述鹼基序列包含與所述第一多核苷酸互補的第二多核苷酸；

在所述第一鹼基已經被添加到所述第二多核苷酸上之後，捕獲從所述第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像；

使裂解試劑流動通過所述試劑管理系統和流體槽，以從所述第一鹼基去除第一終止劑，以便使所述鹼基序列中隨後的鹼基能夠被添加至所述第二多核苷酸；以及

使緩衝試劑以複數個循環的連續正向流動方向和反向流動方向流動通過所述試劑管理系統和流體槽。

【請求項2】如請求項1所述的方法，其中所述複數個循環包括4個或更多個循環。

【請求項3】如請求項1所述的方法，其中所述複數個循環包括12個或更多個循環。

【請求項4】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中所述試劑管理系統和流體槽定位於所述儀器的盒(cartridge)中，所述盒能夠可移除地插入到所述儀器中。

【請求項5】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中所述併入試劑、所述裂解試劑和所述緩衝試劑儲存於所述試劑管理系統的試劑槽中，所述試劑槽是可操作的以儲存有限總體積的每種試劑。

【請求項6】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中使所述緩衝試劑流動包括：

使第一正向流體積的所述緩衝試劑以所述複數個循環的每個循環的正向流

動方向流動；並且

使第二反向流體積的所述緩衝試劑以所述複數個循環的每個循環的反向流動方向流動，所述第一正向流體積大於所述第二反向流體積。

【請求項7】如請求項6所述的方法，其中所述正向流體積比所述反向流體積大約3%或更多。

【請求項8】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中使所述緩衝試劑流動包括：

在所述複數個循環的最後一個循環後持續約10秒或更長時間的培育期間，其基本上沒有緩衝試劑流動通過所述試劑管理系統和流體槽；以及

在所述培育期間後，使第三正向流體積的所述緩衝試劑以所述正向流動方向流動。

【請求項9】如請求項8所述的方法，其中在使所述緩衝試劑流動期間，所述緩衝試劑的總掃過體積(total sweep volume)基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} + \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ，其中：

第一FFV是所述第一正向流體積，

第二RFV是所述第二反向流體積，

N是所述複數個循環的總循環數，並且

第三FFV是所述第三正向流體積。

【請求項10】如請求項9所述的方法，其中在使所述緩衝試劑流動期間，所述緩衝試劑的總流體消耗基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} - \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ 。

【請求項11】如請求項10所述的方法，其中所述緩衝試劑的總掃過體積與所述緩衝試劑的總流體消耗的比率為等於或大於約6。

【請求項12】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中對於正向流動方向和

反向流動方向的所述複數個循環的每個循環，以所述正向流動方向的流動和以所述反向流動方向的流動相隔約1秒或更短的延遲時間。

【請求項13】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中對於正向流動方向和反向流動方向的所述複數個循環的每個循環，以所述正向流動方向的流動和以所述反向流動方向的流動相隔約200毫秒或更短的延遲時間。

【請求項14】如請求項1-3中任一項所述的方法，其中正向流動方向和反向流動方向的所述複數個循環的每個循環相隔約200毫秒或更短的延遲時間。

【請求項15】一種確定多核苷酸的核苷酸順序的儀器，所述儀器包括：

試劑管理系統，所述試劑管理系統定位於所述儀器中，所述試劑管理系統包括複數個試劑槽，所述試劑槽具有至少第一試劑槽、第二試劑槽和第三試劑槽，所述第一試劑槽、第二試劑槽和第三試劑槽是可操作的以包含分別定位於其中的併入試劑、裂解試劑和緩衝試劑，所述試劑管理系統從所述複數個試劑槽中的一個試劑槽選擇試劑流；和

流體槽，所述流體槽定位於所述儀器中，所述流體槽包括與所述試劑管理系統流體連通的流體通道，所述流體通道規定路徑使得所述試劑流經過定位於所述流體通道中的第一多核苷酸；

其中所述儀器是可操作的以：

使所述併入試劑流動通過所述試劑管理系統和流體槽，以將第一鹼基添加到鹼基序列上，所述鹼基序列包含與所述第一多核苷酸互補的第二多核苷酸；

在所述第一鹼基已經被添加到所述第二多核苷酸上之後，捕獲從所述第一鹼基發出的鑑定訊號的圖像；

使所述裂解試劑流動通過所述試劑管理系統和流體槽，以從所述第一鹼基去除第一終止劑，以便使所述鹼基序列中隨後的鹼基能夠被添加至所述第二多核苷酸；以及

使所述緩衝試劑以複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過所述試劑管理系統和流體槽。

【請求項16】如請求項15所述的儀器，其中所述儀器是可操作的以使所述緩衝試劑以4個或更多個循環之複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過所述試劑管理系統和流體槽。

【請求項17】如請求項15所述的儀器，其中所述儀器是可操作的以使所述緩衝試劑以12個或更多個循環之複數個循環的連續的正向流動方向和反向流動方向流動通過所述試劑管理系統和流體槽。

【請求項18】根據請求項15-17中任一項所述的儀器，其中所述儀器是可操作的以使所述緩衝試劑流動，使得對於正向流動方向和反向流動方向的所述複數個循環的每個循環，正向流動方向的流動和反向流動方向的流動相隔約200毫秒或更短的延遲時間。

【請求項19】如請求項15-17中任一項所述的儀器，其中所述試劑管理系統能夠可移除地插入到所述儀器中。

【請求項20】如請求項15-17中任一項所述的儀器，其中所述流體槽能夠可移除地插入到所述儀器中。

【請求項21】如請求項15-17中任一項所述的儀器，所述儀器包括：

盒，所述盒包含所述試劑管理系統和流體槽；

其中所述併入試劑、所述裂解試劑和所述緩衝試劑儲存於所述試劑管理系統的試劑槽中，其中所述試劑槽儲存有限總體積的每種試劑。

【請求項22】如請求項21所述的儀器，其中所述盒能夠可移除地插入到所述儀器中。

【請求項23】如請求項15-17中任一項所述的儀器，其中所述儀器是可操作的以使所述緩衝試劑流動，使得：

第一體積的所述緩衝試劑以所述複數個循環的每個循環的正向流動方向流動；

第二體積的所述緩衝試劑以所述複數個循環的每個循環的反向流動方向流動，所述第一體積大於所述第二體積。

【請求項24】如請求項23所述的儀器，其中正向流體積比反向流體積大約3%或更多。

【請求項25】如請求項23所述的儀器，其中所述儀器是可操作的以使所述緩衝試劑流動，使得：

在所述複數個循環的最後一個循環後施加持續約10秒或更長時間的基本上沒有所述緩衝試劑流動通過所述試劑管理系統和流體槽的培育期間；並且

在所述培育期間後，第三正向流體積的所述緩衝試劑以所述正向流動方向流動。

【請求項26】如請求項25所述的儀器，其中所述儀器是可操作的使所述緩衝試劑流動，使得：

所述緩衝試劑的總掃過體積基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} + \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ，其中：

第一FFV是所述第一正向流體積，

第二RFV是所述第二反向流體積，

N是所述複數個循環的總循環數，並且

第三FFV是所述第三正向流體積；

所述緩衝試劑的總流體消耗基本上由下式確定： $((\text{第一FFV} - \text{第二RFV}) * N) + \text{第三FFV}$ ；並且

其中所述緩衝試劑的總掃過體積與所述緩衝試劑的總流體消耗的比率為等於或大於約6。

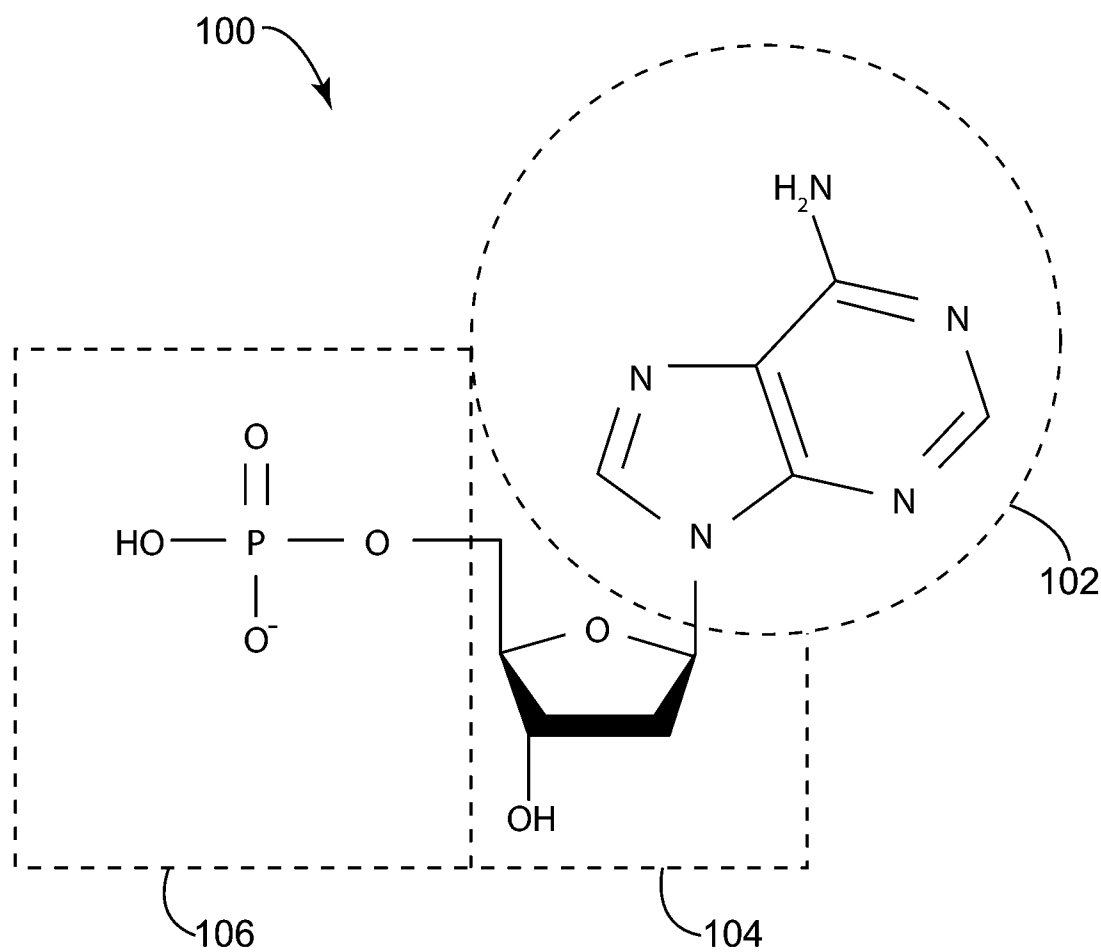


圖1

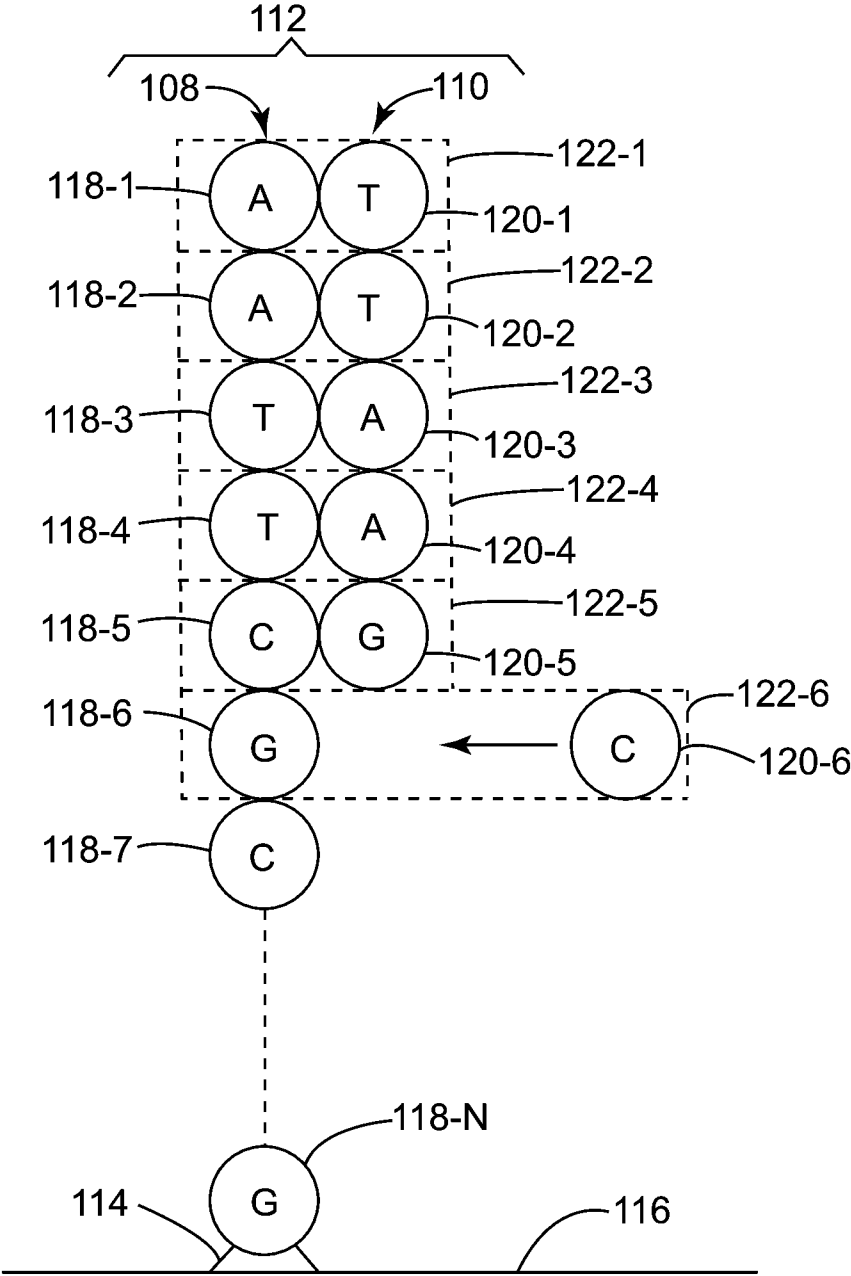


圖2

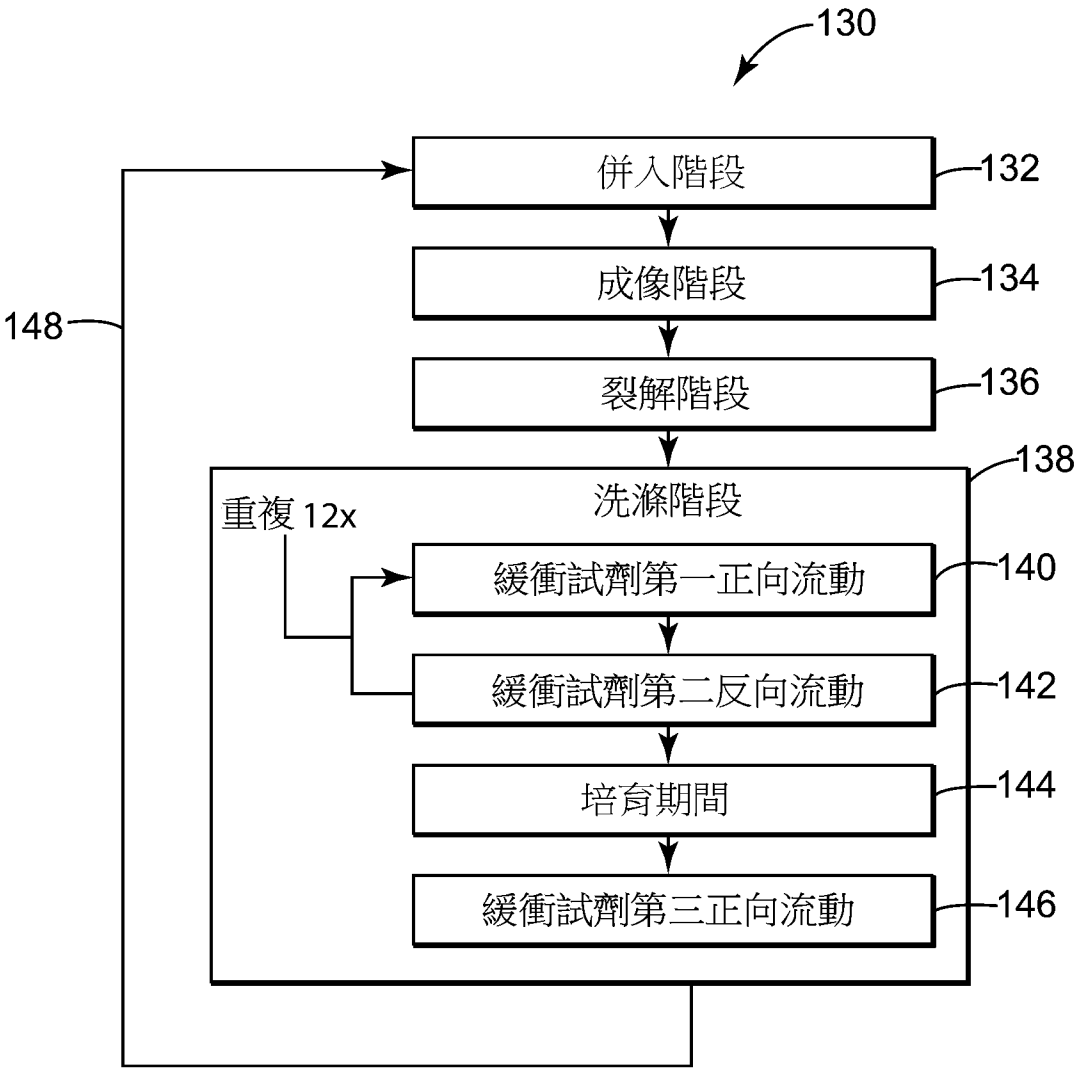


圖3

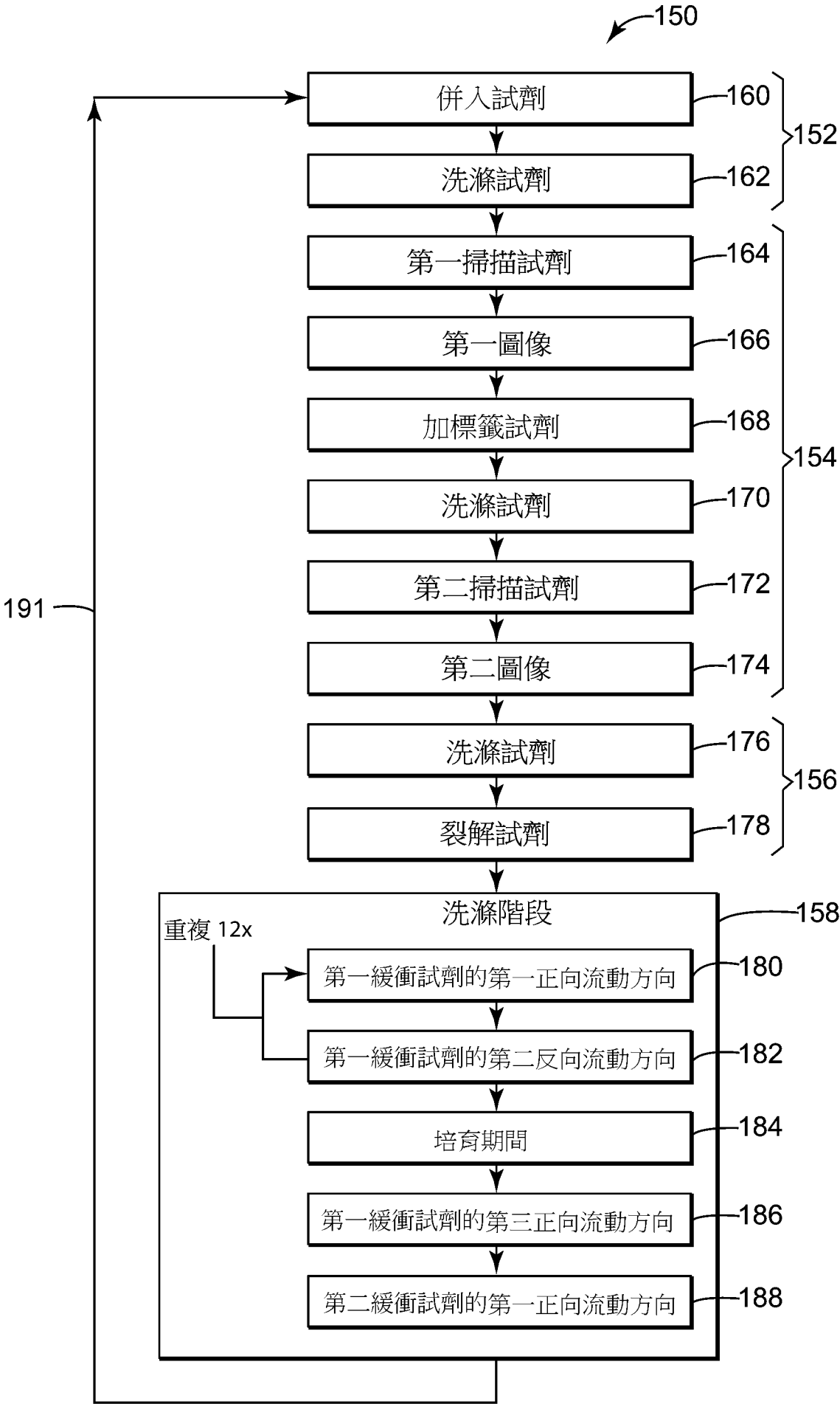


圖4

維持在48(μL)的總流體消耗
190

總掃過體積 (μL) 總流體消耗 (μL)	總掃過體積 (μL)	第一正向流體積 (μL)	第二反向流體積 (μL)	循環數	第三正向流體積 (μL)
48/48 = 1	48	0	0	0	—190-1
100/48 = 2.08	100	25	13	2	—190-2
200/48 = 4.16	200	25	19	4	—190-3
300/48 = 6.25	300	25	21	6	—190-4
444/48 = 9.25	444	25	22	9	—190-5
600/48 = 12.5	600	25	23	12	—190-6
1200/48 = 25	1200	25	24	24	—190-7

圖5

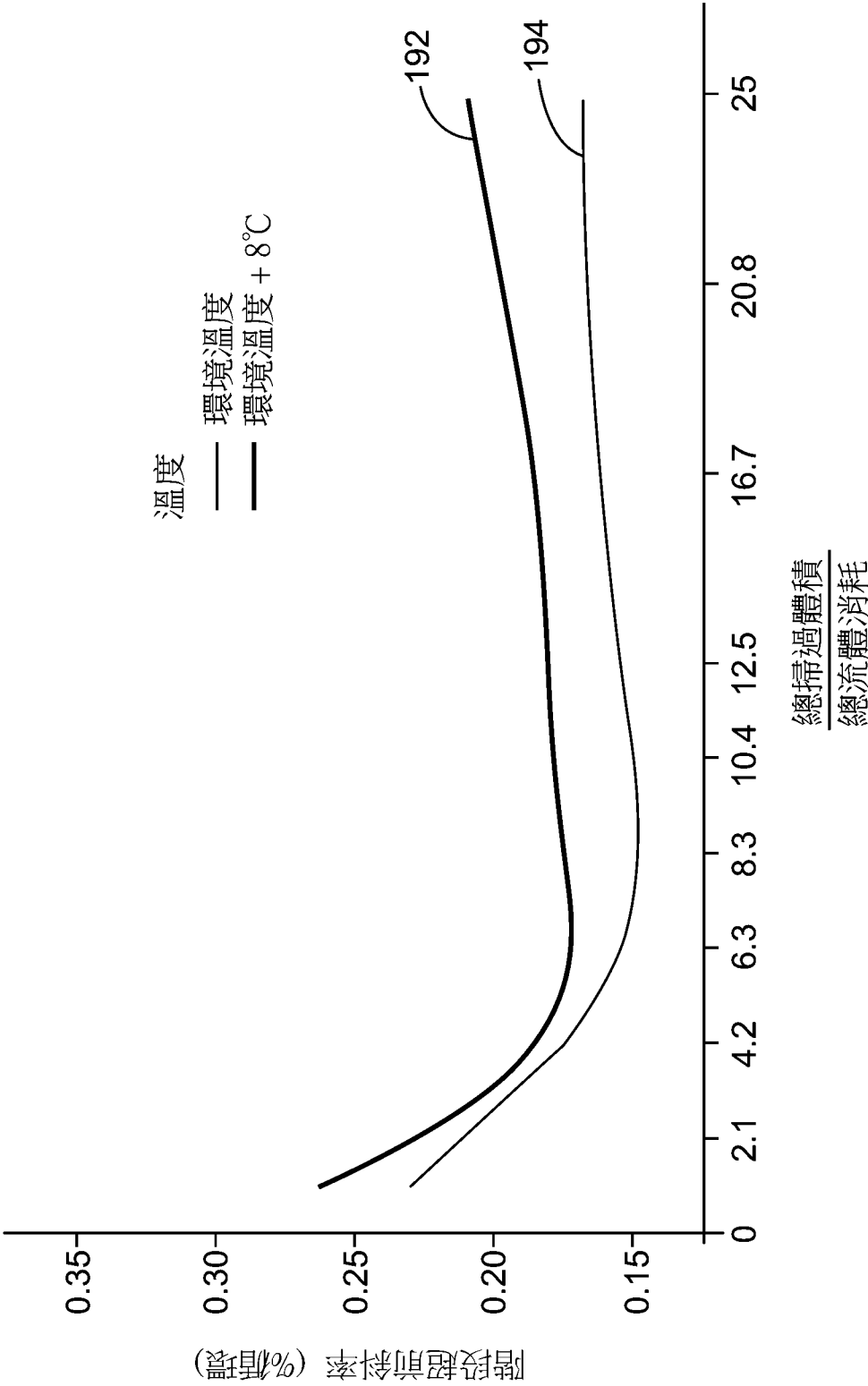
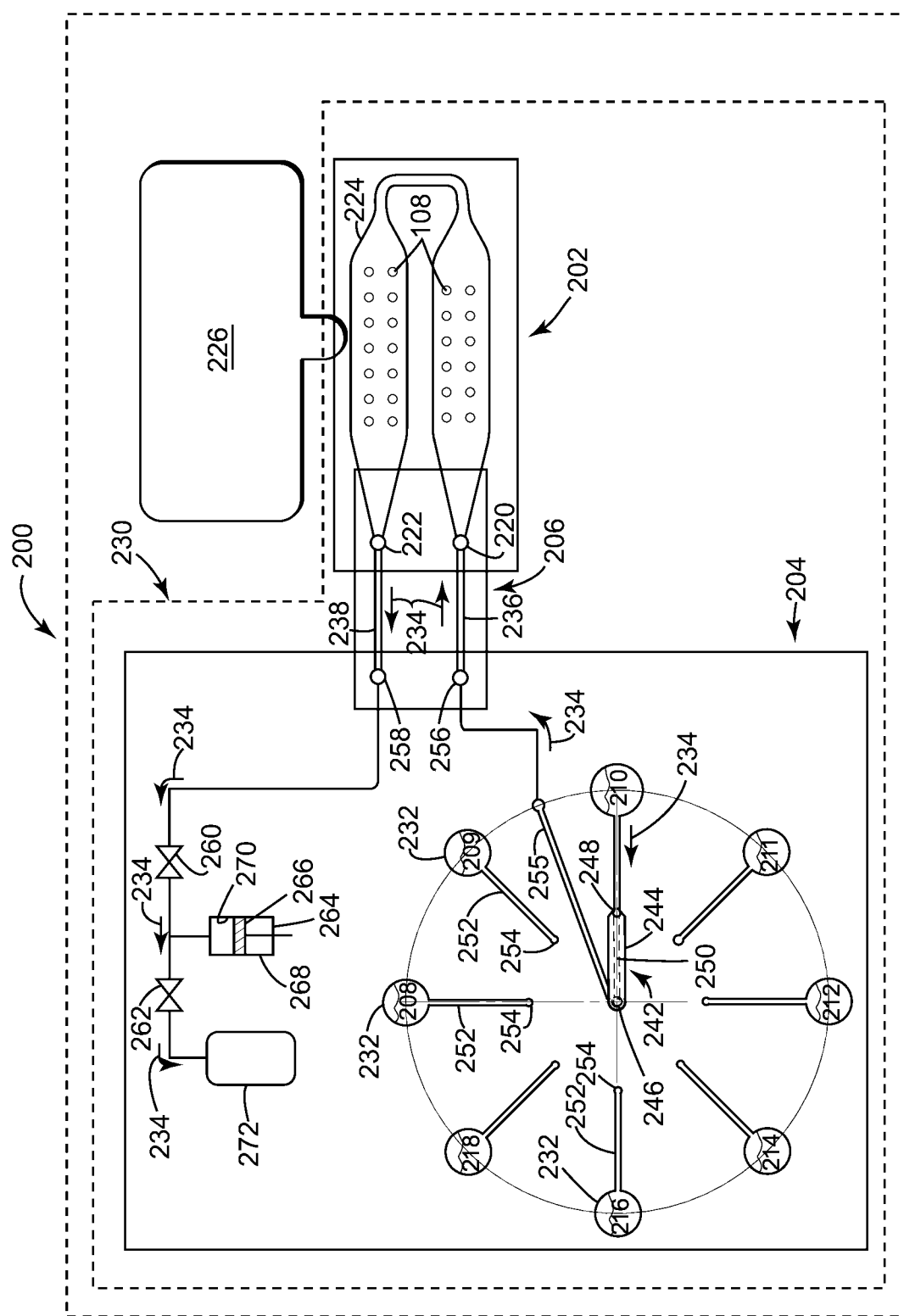


圖6


$$\frac{1}{\square}$$

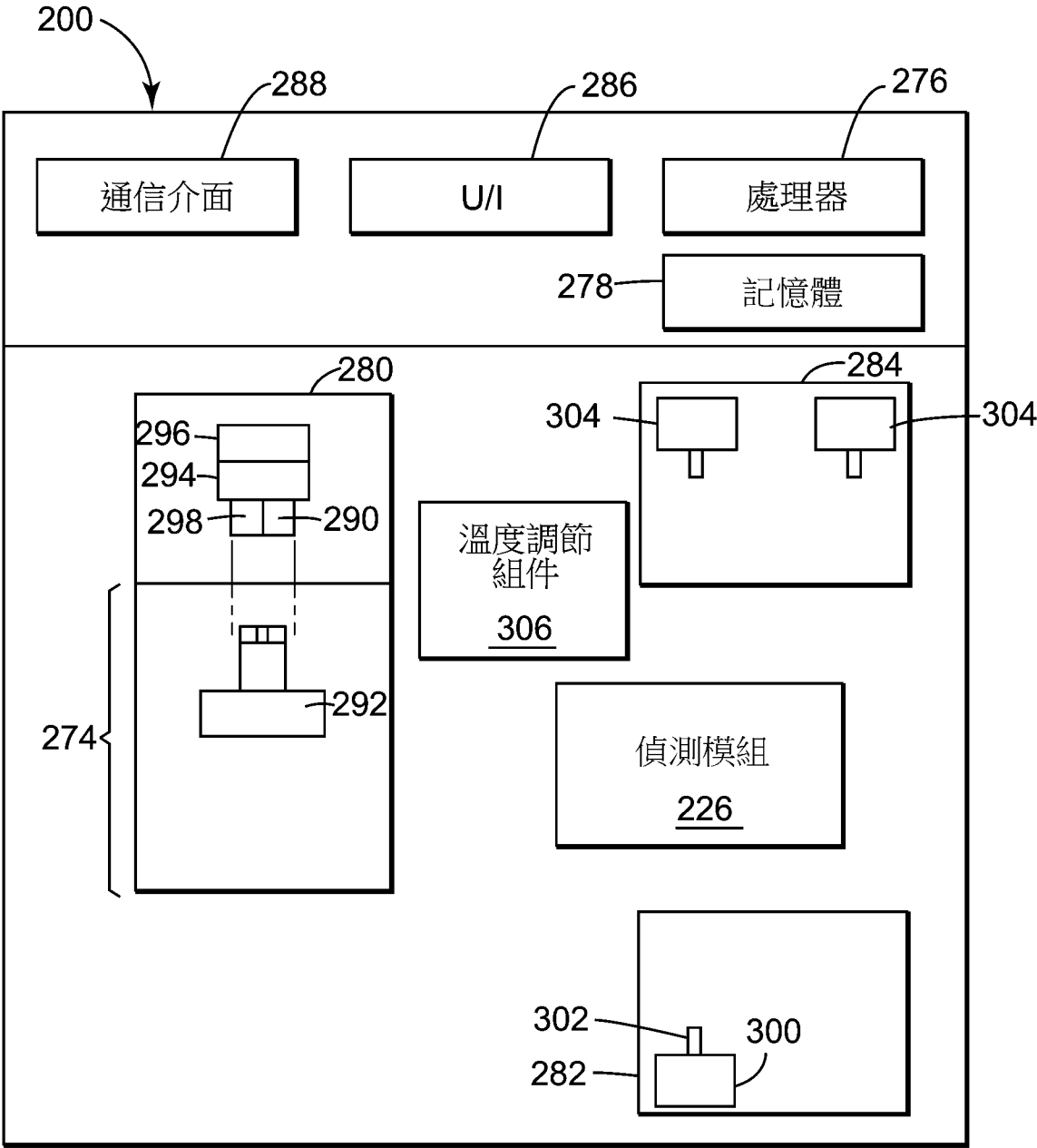


圖8