I704229

(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 I704229 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 09 月 11 日

(21)申請案號：105115925　(22)申請日： 中華民國 105 (2016) 年 05 月 20 日

(51)Int. Cl.：　*C12Q1/68　(2018.01)*　*G01N21/62　(2006.01)*

(30)優先權：2015/05/20　美國　62/164,464

2015/05/20　美國　62/164,482

2015/05/20　美國　62/164,485

2015/05/20　美國　62/164,506

2015/08/07　美國　14/821,688

(71)申請人：美商寬騰矽公司 (美國) QUANTUM-SI INCORPORATED　(US)
美國

(72)發明人：羅斯伯格　強納森M ROTHBERG, JONATHAN M. (US)；雷克伊　傑瑞米 LACKEY, JEREMY (CA)；瑞德　布萊恩 REED, BRIAN (US)；施興華 SHI XINGHUA (CN)；黃海冬 HUANG, HAIDONG (CN)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US　20030092005A1　US　20110300534A1

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：18 項　圖式數：37　共 199 頁

(54)名稱

核酸定序方法

(57)摘要

本發明提供基於發光壽命及/或強度之分子定序方法。在一些態樣中，核酸定序方法涉及測定在核酸定序反應期間納入之一系列經發光標記之核苷酸之發光壽命及視情況發光強度。

Methods of sequencing molecules based on luminescence lifetimes and/or intensities are provided. In some aspects, methods of sequencing nucleic acids involve determining the luminescence lifetimes, and optionally luminescence intensities, of a series of luminescently labeled nucleotides incorporated during a nucleic acid sequencing reaction.

指定代表圖：

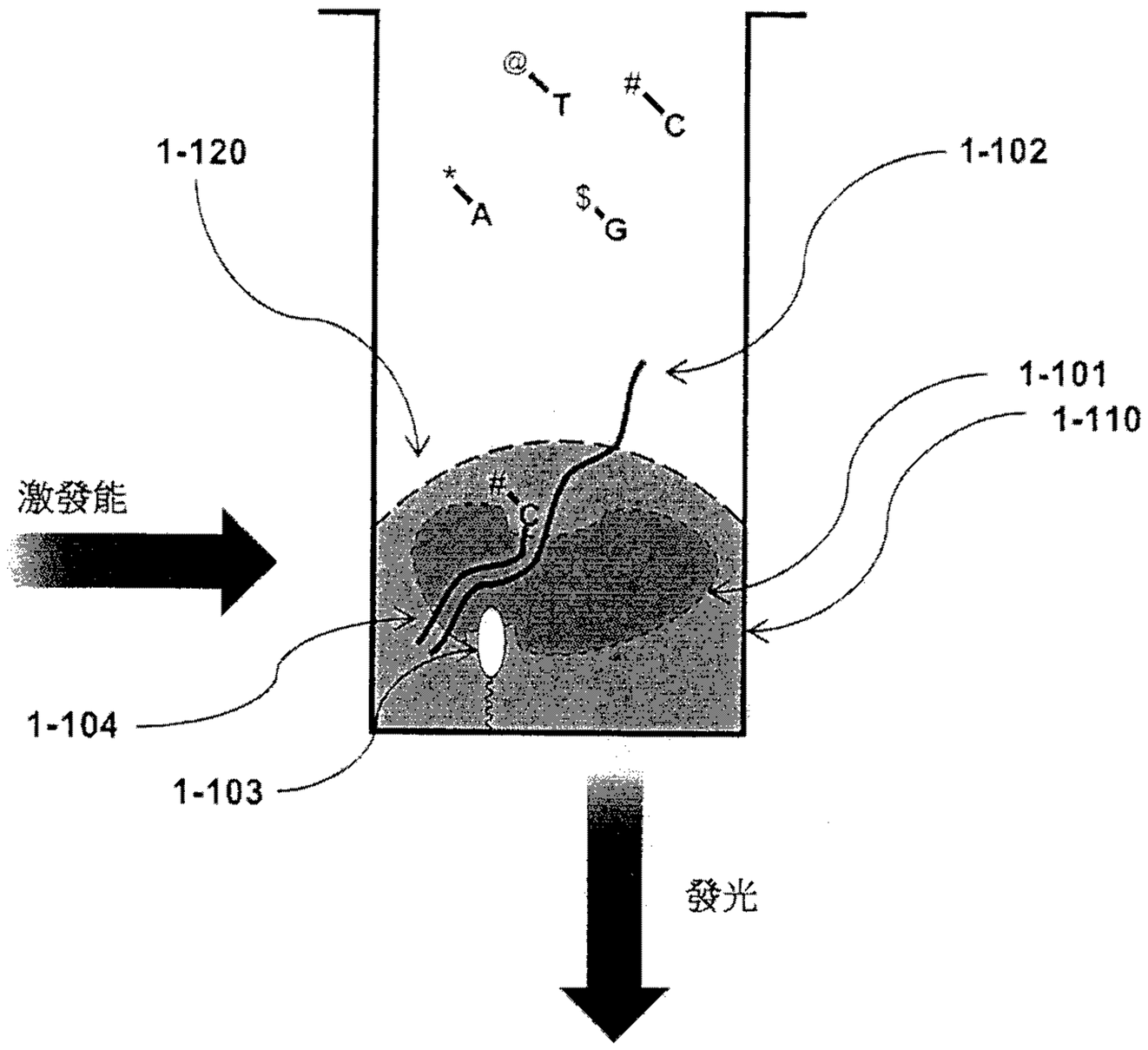


圖 1

符號簡單說明：

1-101・・・核酸聚合酶

1-102・・・靶核酸

1-103・・・連接體

1-104・・・引子

1-110・・・試樣孔

1-120・・・靶容積

I704229

發明摘要

令告本

※ 申請案號：105115985

※ 申請日：105.5.20

※IPC 分類：C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/62 (2006.01)

【發明名稱】

核酸定序方法

METHODS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING

【中文】

本發明提供基於發光壽命及/或強度之分子定序方法。在一些態樣中，核酸定序方法涉及測定在核酸定序反應期間納入之一系列經發光標記之核苷酸之發光壽命及視情況發光強度。

【英文】

Methods of sequencing molecules based on luminescence lifetimes and/or intensities are provided. In some aspects, methods of sequencing nucleic acids involve determining the luminescence lifetimes, and optionally luminescence intensities, of a series of luminescently labeled nucleotides incorporated during a nucleic acid sequencing reaction.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

1-101　核酸聚合酶

1-102　靶核酸

1-103　連接體

1-104　引子

1-110　試樣孔

1-120　靶容積

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

109年02月27日 修正替換頁

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

核酸定序方法

METHODS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING

相關申請案

本申請案主張以下案件在35 U.S.C. § 119(e)下之優先權：標題為「METHODS FOR NUCLEIC ACID SEQUENCING」且在2015年5月20日提出申請之美國臨時專利申請案第62/164,482號、標題為「INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS」且在2015年5月20日提出申請之美國臨時專利申請案第62/164,506號、標題為「INTEGRATED DEVICE WITH EXTERNAL LIGHT SOURCE FOR PROBING, DETECTING, AND ANALYZING MOLECULES」且在2015年5月20日提出申請之美國臨時專利申請案第62/164,464號及標題為「PULSED LASER」且在2015年5月20日提出申請之美國臨時專利申請案第62/164,485號，每一者之全部內容以引用方式併入本文中。

本申請案主張標題為「INTEGRATED DEVICE WITH EXTERNAL LIGHT SOURCE FOR PROBING, DETECTING, AND ANALYZING分子」且在2015年8月7日提出申請之美國專利申請案第14/821,688號在35 U.S.C. §120下之優先權，該申請案之全部內容以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本申請案概言之係關於用於實施生物及/或化學試樣之快速、大規模平行、定量分析之方法、組合物及器件及製作該等器件之方法。

【先前技術】

可使用「生物分析(biological assay、bioassay)」實施生物試樣之檢測及分析。生物分析通常涉及大型昂貴實驗室設備，其需要訓練研究科學家以操作設備且實施生物分析。此外，生物分析通常大規模實施，從而需要大量特定類型之試樣來進行檢測及定量。

藉由使用發射特定波長光之發光標記物對試樣加標籤來實施一些生物分析。使用光源照射標記物以引起發光，且使用光檢測器檢測發光以量化由標記物發射之發光量。使用發光標記物之生物分析通常涉及使用昂貴雷射光源來照射試樣且使用複雜發光檢測光學裝置及電子裝置來收集來自經照射試樣之發光。

【發明內容】

根據本申請案之一態樣，可基於在分子曝光於複數個單獨光脈衝時自其發射之一系列光子之一或多種性質來鑑別單一分子(例如與反應試樣中之其他可能分子進行區分)。在一些實施例中，可使用所發射光子基於不同發光壽命來鑑別/區分分子。在一些實施例中，可計算發光壽命。在一些實施例中，無需計算實際壽命。舉例而言，可使用一或多種暗示發光壽命之性質(例如局部發射時間、所檢測發射之時間分佈)。在一些實施例中，可使用所發射光子來測定分子之發光強度，且可使用發光強度來鑑別分子。在一些實施例中，可使用所發射光子來測定分子之發光壽命及發光強度，且可使用發光壽命或發光強度來鑑別分子。在一些實施例中，分子身份可基於發光壽命及發光強度之組合。

在一些實施例中，可使用發光標記來標記分子。在一些實施例中，發光標記係螢光團。在一些實施例中，可基於發光標記之性質來鑑別或區分發光標記。發光標記(例如螢光團)之性質包含(但不限於)發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率及發光強度。在一些

實施例中，基於發光壽命來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光強度來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於觀察發射光子所需之遞送激發能之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發射光子之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光壽命及觀察發射光子所需之遞送激發能之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光強度及觀察發射光子所需之遞送激發能之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光壽命、發光強度及觀察發射光子所需之遞送激發能之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光壽命及發射光子之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光強度及發射光子之波長來鑑別或區分發光標記。在一些實施例中，基於發光壽命、發光強度及發射光子之波長來鑑別或區分發光標記。

在某些實施例中，使用不同發光標記物標記反應混合物或實驗中之不同類型分子。在一些實施例中，不同標記物具有可區分之不同發光性質。在一些實施例中，不同標記物之區別在於具有不同發光壽命、不同發光強度、不同之發射光亞波長或其組合。存在複數個類型具有不同發光標記物之分子可容許監測複雜反應之不同步驟，或容許鑑別複雜反應產物之不同組份。在一些實施例中，可測定不同類型分子發生反應或相互作用之順序。

在一些實施例中，可使用不同數量之相同發光分子(例如一或多種相同螢光染料)來發光標記不同核苷酸。在一些實施例中，改變發光標記中之發光分子之數量可容許基於不同強度來區分不同核苷酸。在一些實施例中，可各自使用不同類型之發光分子及/或不同數量之每一發光分子來標記不同核苷酸。在一些實施例中，不同類型之發光分子容許基於不同強度及/或不同壽命來區分不同核苷酸。

在某些實施例中，使用複數個類型具有不同發光標記物之分子

之發光性質來鑑別生物分子(例如核酸或蛋白質)之序列。在一些實施例中，在合成生物分子期間納入時，使用複數個類型具有不同發光標記物之分子之發光性質來鑑別單一分子。在一些實施例中，在定序反應期間納入時，使用複數個類型具有不同發光標記物之核苷酸之發光性質來鑑別單一核苷酸。此可容許測定核酸模板之序列。在一些實施例中，將經發光標記之核苷酸納入與核酸模板互補之核酸股中。在一些實施例中，互補股包括引子。

在某些實施例中，複數個類型具有不同發光標記物之核苷酸包括4類經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，4種經發光標記之核苷酸吸收及/或發射在一個光譜範圍內之光子。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸在第一光譜範圍內發射，且第四經發光標記之核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍內之光子。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸在第一光譜範圍內發射，且第三及第四經發光標記之核苷酸在第二光譜範圍內發光。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸在第一光譜範圍內發射，第三核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍內之光子，且第四核苷酸吸收及/或發射第三光譜範圍內之光子。在一些實施例中，4種經發光標記之核苷酸中之每一者吸收及/或發射不同光譜範圍內之光子。在一些實施例中，每一類型吸收及/或發射相同光譜範圍內之光子之經發光標記之核苷酸具有不同發光壽命或發光強度或二者。

在一些實施例中，反應混合物中之4種不同類型之核苷酸(例如腺嘌呤、鳥嘌呤、胞嘧啶、胸腺嘧啶/尿嘧啶)可各自經一或多個發光分子標記。在一些實施例中，每一類型之核苷酸可連結至一個以上之相同發光分子(例如兩個或更多個相同螢光染料連結至一種核苷酸)。在一些實施例中，每一發光分子可連結至一個以上核苷酸(例如兩個或更多個相同核苷酸)。在一些實施例中，一個以上核苷酸可連結至一

個以上發光分子。在一些實施例中，保護分子用作用於附接一或多個核苷酸(例如相同類型)及一或多個發光分子(例如相同類型)之錨。在一些實施例中，所有4核苷酸皆經在相同光譜範圍內(例如520-570 nm)吸收及發射之發光分子標記。

在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記可選自包括芳香族或雜芳香族化合物之染料且可為芘、蒽、萘、吖啶、二苯乙烯、吲哚、苯并吲哚、噁唑、呫唑、噻唑、苯并噻唑、啡啶、吩噁嗪、卟啉、喹啉、乙錠、苯甲醯胺、青色素、羰花青素、水楊酸鹽、鄰胺基苯甲酸酯、香豆素、螢光素、玫瑰紅或其他類似化合物。實例性染料包含吖哚染料(例如螢光黃或玫瑰紅染料)、萘染料、香豆素染料、吖啶染料、青色素染料、苯并噁唑染料、二苯乙烯染料、芘染料、酞青素染料、藻膽蛋白染料、方酸染料及諸如此類。

在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Alexa Fluor®® 546、Cy3B™、Alexa Fluor® 555及Alexa Fluor® 555及FRET對Alexa Fluor® 555及Cy3.5®。在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Alexa Fluor® 555、Cy3.5®、Alexa Fluor® 546及DyLight™ 554-R1。在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Alexa Fluor® 555、Cy3.5®、ATTO Rho6G及DyLight™ 554-R1。在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Alexa Fluor® 555、Cy3B™、ATTO Rho6G及DyLight™ 554-R1。在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Alexa Fluor® 555、Cy3B™、ATTO 542及DyLight™ 554-R1。在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Alexa Fluor® 555、Cy3B™、ATTO 542及Alexa Fluor® 546。在一些實施例中，屬4種核苷酸之組內之發光標記包括Cy3.5®、Cy3B™、ATTO Rho6G及DyLight™ 554-R1。

在某些實施例中，至少一類、至少兩類、至少三類或至少四類

經發光標記之核苷酸包括選自由以下組成之群之發光染料：6-TAMRA、5/6-羧基玫瑰紅6G、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、Alexa Fluor® 568、Alexa Fluor® 610、Alexa Fluor® 647、Aberrior Star 635、ATTO 425、ATTO 465、ATTO 488、ATTO 495、ATTO 514、ATTO 520、ATTO Rho6G、ATTO 542、ATTO 647N、ATTO Rho14、Chromis 630、Chromis 654A、Chromeo™ 642、CF™514、CF™532、CF™543、CF™546、CF™546、CF™555、CF™568、CF™633、CF™640R、CF™660C、CF™660R、CF™680R、Cy3、Cy3B™、Cy3.5®、Cy5、Cy5.5、Dyomics-530、Dyomics-547P1、Dyomics-549P1、Dyomics-550、Dyomics-554、Dyomics-555、Dyomics-556、Dyomics-560、Dyomics-650、Dyomics-680、DyLight™ 554-R1、DyLight™ 530-R2、DyLight™ 594、DyLight™ 635-B2、DyLight™ 650、DyLight™ 655-B4、DyLight™ 675-B2、DyLight™ 675-B4、DyLight™ 680、HiLyte™ Fluor 532、HiLyte™ Fluor 555、HiLyte™ Fluor 594、LightCycler® 640R、Seta™ 555、Seta™ 670、Seta™700、Seta™u 647及Seta™u 665，或具有式(染料101)、(染料102)、(染料103)、(染料104)、(染料105)或(染料106)，如本文中所闡述。

在一些實施例中，至少一類、至少兩類、至少三類或至少四類經發光標記之核苷酸各自包括選自由以下組成之群之發光染料：Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、Cy3B™、Cy3.5®、DyLight™ 554-R1、Alexa Fluor® 546、Atto Rho6G、ATTO 425、ATTO 465、ATTO 488、ATTO 495、ATTO 514、ATTO 520、ATTO Rho6G及ATTO 542。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 546，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3B™，第三類經發光標記之

核苷酸包括兩種Alexa Fluor® 555，且第四類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 555及Cy3.5®。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 555，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3.5®，第三類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 546，且第四類經發光標記之核苷酸包括DyLight™ 554-R1。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 555，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3.5®，第三類經發光標記之核苷酸包括ATTO Rho6G，且第四類經發光標記之核苷酸包括DyLight™ 554-R1。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 555，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3B™，第三類經發光標記之核苷酸包括ATTO Rho6G，且第四類經發光標記之核苷酸包括DyLight™ 554-R1。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 555，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3B™，第三類經發光標記之核苷酸包括ATTO 542，且第四類經發光標記之核苷酸包括DyLight™ 554-R1。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 555，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3B™，第三類經發光標記之核苷酸包括ATTO 542，且第四類經發光標記之核苷酸包括Alexa Fluor® 546。

在一些實施例中，第一類經發光標記之核苷酸包括Cy3.5®，第二類經發光標記之核苷酸包括Cy3B™，第三類經發光標記之核苷酸包括ATTO Rho6G，且第四類經發光標記之核苷酸包括DyLight™ 554-R1。

在一些實施例中，至少一類、至少兩類、至少三類或至少四類經發光標記之核苷酸包括選自由以下組成之群之發光染料：Alexa Fluor® 532、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、Alexa Fluor® 594、Alexa Fluor® 610、CF™532、CF™543、CF™555、CF™594、Cy3、DyLight™ 530-R2、DyLight™ 554-R1、DyLight™ 590-R2、DyLight™ 594、DyLight™ 610-B1，或具有式(染料101)、(染料102)、(染料103)、(染料104)、(染料105)或(染料106)。

在一些實施例中，第一及第二類經發光標記之核苷酸包括選自由以下組成之群之發光染料：Alexa Fluor® 532、Alexa Fluor® 546、Alexa Fluor® 555、CF™532、CF™543、CF™555、Cy3、DyLight™ 530-R2、DyLight™ 554-R1，且第三及第四類經發光標記之核苷酸包括選自由以下組成之群之發光染料：Alexa Fluor® 594、Alexa Fluor® 610、CF™594、DyLight™ 590-R2、DyLight™ 594、DyLight™ 610-B1，或具有式(染料101)、(染料102)、(染料103)、(染料104)、(染料105)或(染料106)。

在某些實施例中，至少一類、至少兩類、至少三類或至少四類經發光標記之核苷酸分子包括選自由以下組成之群之發光蛋白：TagBFP、mTagBFP2、Azurite、EBFP2、mKalama1、Sirius、Sapphire、T-Sapphire、ECFP、Cerulean、SCFP3A、mTurquoise、mTurquoise2、單體Midoriishi-Cyan、TagCFP、mTFP1、EGFP、Emerald、Superfolder GFP、單體Azami Green、TagGFP2、mUKG、mWasabi、Clover、mNeonGreen、EYFP、Citrine、Venus、SYFP2、TagYFP、單體Kusabira-Orange、mKOK、mKO2、mOrange、mOrange2、mRaspberry、mCherry、mStrawberry、mTangerine、tdTomato、TagRFP、TagRFP-T、mApple、mRuby、mRuby2、mPlum、HcRed-Tandem、mKate2、mNeptune、NirFP、TagRFP657、

IFP1.4、iRFP、mKeima Red、LSS-mKate1、LSS-mKate2、mBeRFP、PA-GFP、PAmCherry1、PATagRFP、Kaede (綠色)、Kaede (紅色)、KikGR1 (綠色)、KikGR1 (紅色)、PS-CFP2、mEos2 (綠色)、mEos2 (紅色)、PSmOrange或Dronpa。本申請案之態樣提供將激發能遞送至逆鑑別分子且檢測激發後之發射光子之方法及可用於該等方法之系統及器件。在某些實施例中，檢測包括記錄每一檢測發光之發光與激發能之先前脈衝之間的持續時間。在某些實施例中，檢測包括記錄複數種檢測發光中之每一者之發光與激發能之先前脈衝之間的持續時間。在某些實施例中，遞送複數個激發能脈衝。擬鑑別分子之發光標記物可由每一脈衝或一部分脈衝激發。在某些實施例中，藉由一或多個感測器檢測複數種發光。擬鑑別分子之發光標記物可在每一激發或一部分激發之後發光。產生發光之激發事件之分數係基於標記物之發光量子產率。在一些實施例中，增加包括發光標記物之發光分子之數量可增加量子產率(例如增加發光發射之數量)。另外，並非所有由標記物發射之發光皆可檢測到，舉例而言，一些發光將遠離感測器。在某些實施例中，基於發光標記物之發光性質(包含吸收光譜及標記物在給定光譜範圍中激發之後發射光子之波長)來選擇一或多種激發能。

在某些實施例中，基於擬檢測經發光標記之分子之發光性質(例如發光壽命)來選擇脈衝激發能之頻率。在一些實施例中，脈衝之間之間隙長於所激發一或多種經發光標記之分子的發光壽命。在一些實施例中，間隙長於所激發一或多種經發光標記之分子之發光壽命約兩倍至約10倍、約10倍至約100倍或約100倍至約1000倍。在一些實施例中，間隙長於所激發一或多種經發光標記之分子之發光壽命約10倍。

在某些實施例中，基於所監測化學製程來選擇脈衝激發能之頻率。對於定序反應而言，在納入經發光標記之核苷酸時遞送至靶容積之脈衝數將部分地決定所檢測發射光子之數量。在一些實施例中，選

擇頻率以容許在納入經發光標記之核苷酸期間檢測到足夠數量之光子，其中足夠數量係自複數類經發光標記之核苷酸區分經發光標記之核苷酸所需之光子數。在一些實施例中，基於發射光子之波長來區分經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發光發射壽命(例如脈衝激發與發射檢測之間之時間)來區分經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發射光子之波長及發光發射壽命來區分經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發射信號之發光強度(例如基於發射頻率或一定時間段內之發射事件總數)來區分經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發射信號之發光強度及發光壽命來區分經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發光強度及波長來區分經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發光強度、波長及發光壽命來區分經發光標記之核苷酸。

根據本申請案之一態樣，提供包括激發源模組及集成器件之系統。激發源模組包括經構形以發射具有第一持續時間之激發能脈衝之激發源。集成器件包含：靶容積，其經構形以接收在耦合至激發能脈衝時會發光之分子；第一能量路徑，沿該路徑激發能脈衝自能量源耦合組件移動至靶容積；感測器，其檢測第二持續時間中之發光，其中第二持續時間大於第一持續時間；第二能量路徑，沿該路徑發光自靶容積移動至感測器；及第三能量路徑，沿該路徑激發能脈衝自激發源移動至能量源耦合組件。

根據本申請案之另一態樣，提供包括靶容積及感測器之集成器件。靶容積經構形以接收經複數種發光標記物中之一者標記之試樣，複數種發光標記物中之每一者具有不同壽命值。感測器經構形以檢測在複數個持續時間中來自複數種發光標記物中之一者之發光。選擇複數個持續時間以區別複數種發光標記物。

根據本申請案之另一態樣，提供包括靶容積及複數個感測器之

集成器件。靶容積經構形以接收經複數種發光標記物中之一者標記之試樣。複數種發光標記物中之每一者在複數個光譜範圍中之一者內發光且複數種發光標記物中在複數個光譜範圍中之一者中發光之一部分各自具有不同發光壽命。複數個感測器之每一感測器經構形以在複數個持續時間中檢測複數個光譜範圍中之一者且選擇複數個持續時間以區別複數種發光標記物之一部分。

根據本申請案之另一態樣，提供包括複數個激發源及集成器件之系統。複數個激發源發射複數種激發能。複數個激發源中之每一者發射複數種激發能中之一者之脈衝。集成器件包含：靶容積，其經構形以接收經複數種發光標記物中之一者標記之試樣；及感測器，其經構形以檢測在複數種激發能中之一者之脈衝之後於複數個持續時間中來自複數種發光標記物中之一者的發光。複數種在由複數種激發能中之一者照射之後發光之發光標記物之一部分各自具有不同壽命值。複數個計時脈衝事件與發光發射之間之持續時間之數據的累積結果可區別複數種發光標記物。

根據本申請案之另一態樣，提供靶核酸之定序方法。在一些實施例中，靶核酸之定序方法包括以下步驟：(i)提供包括以下部分之混合物：(a)該靶核酸、(b)與該靶核酸互補之引子、(c)核酸聚合酶及(d)納入與該靶核酸互補之生長核酸股中之核苷酸，其中該等核苷酸包含不同類型之經發光標記之核苷酸，其中該等經發光標記之核苷酸在依序納入該生長核酸股期間產生可檢測信號，該等不同類型經發光標記之核苷酸之該等可檢測信號在一定時域中彼此區別(例如藉由測定可檢測信號之時序及/或頻率)；(ii)在足以藉由延伸該引子來產生該生長核酸股之條件下對(i)之該混合物實施聚合反應；(iii)在依序納入該生長核酸股期間量測來自該等經發光標記之核苷酸之該等可檢測信號；及(iv)在依序納入該生長核酸股中後測定來自該等經發光標記之核苷

酸之該等所量測可檢測信號之時序及/或頻率以鑑別該等經發光標記之核苷酸納入該生長核酸股中的時間序列，由此測定該靶核酸之序列。

在一些實施例中，靶核酸或核酸聚合酶附接至載體。在一些實施例中，在對(i)之混合物實施聚合反應後鑑別納入時間序列。在一些實施例中，可檢測信號係光學信號。在一些實施例中，光學信號係發光信號。在一些實施例中，測定所量測可檢測信號之時序及/或頻率包括：(i)在一或多個感測器處接收該等可檢測信號；及(ii)將因應於接收於該一或多個感測器處之該等可檢測信號所產生複數個電荷載子中之電荷載子基於產生該等電荷載子之時間選擇性引導至至少一個電荷載子儲存區中。

在一些實施例中，該等所量測可檢測信號之時序及/或頻率包括衰減壽命之量測。在一些實施例中，所量測可檢測信號之時序及/或頻率包括可檢測信號在一或多個檢測可檢測信號之感測器處之到達時間的量測。在一些實施例中，該方法進一步包括基於可檢測信號之到達時間將可檢測信號產生之電荷載子分離至與一或多個感測器連接之倉中。在一些實施例中，所量測可檢測信號之時序及/或頻率係非光譜量測。

【圖式簡單說明】

熟習此項技術者將理解，本文所闡述之圖僅用於圖解說明目的。應理解，在一些情況下，本發明之各個態樣可放大或擴大展示以促進本發明之理解。在各圖式中，類似參考特性通常在各個圖中係指類似特徵、功能類似及/或結構類似元件。該等圖式未必按比例繪製，而通常著重圖解說明教示內容之原理。該等圖式並非意欲以任何方式限制本發明範圍。

在結合圖式時，依據下文所陳述之詳細說明將較更佳明瞭本發

明之特徵及優點。

在參照圖式闡述實施例時，可使用方向參考(「上方」、「下方」、「頂部」、「底部」、「左」、「右」、「水平」、「垂直」等)。該等參考僅意欲幫助讀者以正常定向觀看圖式。該等方向參考並不意欲闡述所體現器件之較佳或唯一定向。器件可體現於其他定向中。

如自詳細說明所明瞭，圖(例如圖1-37)中所繪示且進一步出於闡釋目的闡述於整個申請案中之實例闡述非限制性實施例，且在一些情形下可出於更清晰闡釋之目的簡化某些製程或刪除某些特徵或步驟。

圖1展示含有用於核酸定序之各種組份之試樣孔(例如試樣孔)之非限制性示意圖。

圖2展示以下4階段之核酸定序之非限制性、實例性實驗：(A)在納入經發光標記之核苷酸之前；(B)第一納入事件；(C)在第一納入事件與第二納入事件之間之時段；及(D)第二納入事件；且展示在階段(A)-(D)期間原始數據及經處理數據之相應實例。

圖3-1及3-2繪示具有不同發光壽命之4種發光分子之非限制性信號與發射時間及衰減機率之正規化累積分佈函數。

圖4-1及4-2展示實例性經發光標記之核苷酸之發光壽命之非限制性圖表及發光強度圖表。

圖5-1至5-3繪示使用4種經發光標記之核苷酸之非限制性定序實驗：(A)來自綠色脈衝及紅色脈衝之所檢測發光之跡線；(B)基於每一核苷酸納入之發光壽命及強度之來自綠色脈衝之數據的減小；及(C)實驗測定序列與模板序列之比對。

圖6-1至6-3繪示使用4種經發光標記之核苷酸之非限制性定序實驗：(A)來自綠色脈衝之所檢測發光之跡線；(B)基於每一核苷酸納入之發光壽命及強度之來自綠色脈衝之數據的減小；及(C)實驗測定序

列與模板序列之比對。

圖7展示用於表面製備之非限制性、實例性製程，其包含以下步驟：(a)沈積、(b)鈍化、(c)矽烷化、(d)複合加載及(e)定序反應引發。

圖8-1及8-2展示鈍化具有膦酸酯-PEG基團之金屬氧化物表面之兩種非限制性方法。

圖9展示使用矽烷-PEG-生物素及矽烷-PEG混合物對玻璃實施官能化之兩種非限制性方法。

圖10-1至10-4繪示經由保護分子連結之一或多個發光分子及一或多個核苷酸之非限制性實例。

圖11-1至11-4繪示涉及經由分裂連接體附接至保護分子之一或多個核苷酸及一或多個發光分子之構形之非限制性實例。

圖12-1至12-7繪示可用於定序反應及實例性定序實驗中之經發光標記之核苷酸分子之構形的非限制性實施例，其中使用經發光標記之核苷酸之發光性質來鑑別納入定序反應中之鹼基。

圖13-1至13-3繪示將非功能結合位點改造至保護分子中以在所選位點處附接發光分子及核苷酸之非限制性實例。

圖14繪示經由保護分子連結發光分子及核苷酸之非限制性實例，其中將發光分子及核苷酸附接至保護分子之連接體包括寡核苷酸。

圖15-1及15-2繪示經由複性互補寡核苷酸將發光分子附接至保護分子之非限制性實例，其中每一寡核苷酸股含有一個與保護分子上之結合位點相容之非共價結合配體。

圖16-1至16-3繪示利用基因編碼之標籤在保護分子之獨立位點處附接發光分子及核苷酸之非限制性實例。

圖17-1及17-2繪示利用蛋白質末端基團處之反應性基團在保護分子之獨立位點處附接發光分子及核苷酸之非限制性實例。

圖18-1至18-3繪示利用非天然胺基酸在保護分子之獨立位點處附接發光分子及核苷酸之非限制性實例。

圖19A及圖19B繪示由非蛋白質保護分子隔離之發光分子及核苷酸之非限制性實例。

圖20繪示包括蛋白質-蛋白質結合對之保護分子之非限制性實施例。

圖21-1至21-3繪示連接體構形之非限制性實例。

圖22-1至22-3繪示用於核苷酸連接體合成及實例性結構之非限制性反應圖。

圖23A係根據一些實施例可用於生物及化學樣品之快速、移動分析之裝置之方塊圖表示。

圖23B係根據一些實施例之集成器件及儀器之方塊圖。

圖24A繪示根據一些實施例之集成器件之像素列。

圖24B繪示根據一些實施例耦合至像素列中之試樣孔之激發能及自每一試樣孔引導至感測器之發射能。

圖25繪示根據一些實施例之集成器件及激發源。

圖26繪示根據一些實施例之集成器件及激發源。

圖27A繪示根據一實施例形成於集成器件之像素區中之試樣孔。

圖27B繪示根據一些實施例入射於試樣孔上之激發能。

圖27C繪示包含凹槽之試樣孔，該凹槽在一些實施例中增加了與試樣孔連接之激發區處之激發能。

圖28繪示根據一些實施例之試樣孔及凹槽。

圖29A及29B繪示根據一些實施例之具有時間倉之感測器。

圖30A繪示根據一些實施例用於提供光脈衝之實例性系統。

圖30B繪示光強度隨時間而變化之繪圖。

圖31A繪示根據一些實施例用於實施量測之示意圖。

圖31B繪示根據一些實施例之光信號隨時間而變化之繪圖。

圖31C繪示根據一些實施例之時間倉中之標記物之信號特徵。

圖32A繪示根據一些實施例之光信號隨時間而變化之繪圖。

圖32B繪示根據一些實施例之時間倉中之標記物之信號特徵。

圖33A繪示根據一些實施例用於實施量測之示意圖。

圖33B繪示根據一些實施例之壽命隨發射波長而變化之繪圖。

圖34A繪示根據一些實施例之光信號隨波長而變化之繪圖。

圖34B繪示根據一些實施例之光信號隨時間而變化之繪圖。

圖35A繪示根據一些實施例之用於多個感測器之時間倉中之標記物之信號特徵。

圖35B繪示根據一些實施例之光信號隨時間而變化之繪圖。

圖35C繪示根據一些實施例之用於多個感測器之時間倉中之標記物之信號特徵。

圖36A繪示根據一些實施例用於實施量測之示意圖。

圖36B繪示根據一些實施例之光信號隨波長而變化之繪圖。

圖37A繪示根據一些實施例之光信號隨時間而變化之繪圖。

圖37B繪示根據一些實施例之用於多個感測器之時間倉中之標記物之信號特徵。

【實施方式】

發明者已研發用於基於分子之一或多種發光性質來鑑別單一分子之新方法、組合物及器件。在一些實施例中，基於發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率、發光強度或其兩者或更多者之組合來鑑別分子。鑑別可意指分配分子之確切分子身份，或可意指自可能分子組區分或區別特定分子。在一些實施例中，可基於不同之發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率、發光強度或其兩者或更多者之組合來彼此區分複數個單一分子。在一些實施例中，藉由將單一

分子曝光於一系列單獨光脈衝且評估自分子發射之每一光子之時序或其他性質來鑑別該分子(例如與其他分子區分)。在一些實施例中，綜合依序自單一分子發射之複數個光子之資訊且評估以鑑別分子。在一些實施例中，自依序自分子發射之複數個光子來測定分子之發光壽命，且可使用發光壽命來鑑別分子。在一些實施例中，自依序自分子發射之複數個光子來測定分子之發光強度，且可使用發光強度來鑑別分子。在一些實施例中，自依序自分子發射之複數個光子來測定分子之發光壽命及發光強度，且可使用發光壽命及發光強度來鑑別分子。

本申請案之態樣可用於檢測及/或鑑別一或多種生物或化學分子。在一些實施例中，可藉由測定一或多種試劑或產物在一或多個時間點處之存在或不存在來評估化學或生物反應。

本申請案之態樣藉由將分子曝光於光且測定自分子發射之一或多種光子之一或多種性質來訊問分子。在某些實施例中，藉由將分子曝光於光脈衝且測定自分子發射之光子之一或多種性質來訊問分子。在一些實施例中，將分子曝光於複數個單獨光脈衝事件且測定在單獨光脈衝事件之後發射之單獨光子之一或多種性質。在一些實施例中，分子並不因應於每一光脈衝發射光子。然而，可藉由將分子曝光於一系列單獨光脈衝且評估在光脈衝事件子組之後發射之單獨光子(例如在約10%之脈衝事件之後發射之光子，或在約1%之脈衝事件之後發射之光子)來評估複數個發射光子。

本申請案之態樣可用於藉由測定一或多種試劑、中間體及/或反應產物在一或多個時間點處之存在或不存在來監測化學或生物反應。在一些實施例中，可藉由將反應試樣曝光於一系列單獨光脈衝且分析在每一光脈衝之後檢測之任一發射光子來分析反應隨時間變化之進展。

因此，在本申請案之一些態樣中，將反應試樣曝光於複數個單

獨光脈衝且檢測並分析一系列發射光子。在一些實施例中，發射光子系列提供關於存在且並不在反應試樣中隨實驗時間變化改變之單一分子之資訊。然而，在一些實施例中，發射光子系列提供關於一系列在不同時間存在於反應試樣中(例如隨反應或製程進展)之不同分子之資訊。

在一些實施例中，可使用本申請案之態樣分析生物試樣以(例如)測定試樣中一或多種核酸或多肽之序列及/或測定試樣中一或多種核酸或多肽變體(例如所關注基因中之一或多種突變)之存在或不存在。在一些實施例中，可對患者試樣(例如人類患者試樣)實施測試以提供核酸序列資訊或測定一或多種所關注核酸之存在或不存在以用於診斷、預後及/或治療目的。在一些實例中，診斷測試可包含(例如)藉由對個體生物試樣中之無細胞去氧核糖核酸(DNA)分子及/或表現產物(例如核糖核酸(RNA))實施定序來對個體生物試樣中之核酸分子實施定序。

在一些實施例中，使用發光壽命及/或強度分析(例如訊問及/或鑑別)之一或多種分子可為經標記分子(例如已經一或多種發光標記物標記之分子)。在一些實施例中，可使用標記物鑑別生物分子之個別亞單位。在一些實例中，使用發光標記物鑑別生物分子之個別亞單位。一些實施例使用發光標記物(在本文中亦稱為「標記物」)，其可為外源性或內源性標記物。外源性標記物可為用作用於發光標記之報導基因及/或標籤之外部發光標記物。外源性標記物之實例可包含(但不限於)、螢光分子、螢光團、螢光染料、螢光染劑、有機染料、螢光蛋白、參與螢光共振能量轉移(FRET)之物質、酶及/或量子點。其他外源性標記物為業內已知。該等外源性標記物可偶聯至特異性結合特定靶或組份之探針或官能基(例如分子、離子及/或配體)。將外源性標籤或報導基因附接至探針使得可經由檢測外源性標籤或報導基因之存在

來鑑別靶。探針之實例可包含蛋白質、核酸(例如DNA、RNA)分子、脂質及抗體之探針。外源性標記物及官能基之組合可形成任一用於檢測之適宜探針、標籤及/或標記，包含分子探針、經標記探針、雜交探針、抗體探針、蛋白質探針(例如生物素結合探針)、酶標記、螢光探針、螢光標籤及/或酶報導基因。

儘管本發明參照發光標記物，但可針對本文所提供之器件、系統及方法使用其他類型之標記物。該等標記物可為質量標籤、靜電標籤、電化學標記或其任一組合。

儘管可向試樣中添加外源性標記物，但內源性標記物可為試樣之已有部分。內源性標記物可包含所存在可在激發能存在下發光或「自發螢光」之任一發光標記物。內源性螢光團之自發螢光可提供無標記及非侵襲性標記且無需引入外源性螢光團。該等內源性螢光團之實例可包含(舉例而言且並不加以限制)血紅素、氧基血紅素、脂質、膠原及彈性蛋白交聯物、還原型菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、經氧化黃素(FAD及FMN)、脂褐素、角蛋白及/或卟啉。

鑒於已認識到需要用於實施單一分子檢測及/或核酸定序之簡單、較不複雜裝置，發明者設想用於使用發光標籤組(例如發光標記物、發光標記)標記不同分子以檢測單一分子之技術。該等單一分子可為具有標籤之核苷酸或胺基酸。可在結合至單一分子時、在自單一分子釋放時或在結合至單一分子且自其釋放時檢測標籤。在一些實例中，標籤係發光標籤。所選組中之每一發光標籤與各別分子締合。舉例而言，可使用4標籤組「標記」存在於DNA中之核鹼基–該組之每一標籤與不同核鹼基締合，舉例而言，第一標籤與腺嘌呤(A)締合，第二標籤與胞嘧啶(C)締合，第三標籤與鳥嘌呤(G)締合，且第四標籤與胸腺嘧啶(T)締合。此外，標籤組中之每一發光標籤具有可用於區分該組之第一標籤與該組中之其他標籤的不同性質。以此方式，可使用

該等區分特性中之一或多者來獨特地鑑別每一標籤。舉例而言且並不加以限制，可用於區分一種標籤與另一標籤之標籤特性可包含因應於激發能由標籤發射之光之發射能及/或波長、由特定標籤吸收以將標籤置於激發態中之激發光之波長及/或標籤之發射壽命。

定序

本申請案之一些態樣可用於對生物聚合物(例如核酸及蛋白質)實施定序。在一些實施例中，本申請案中所闡述之方法、組合物及器件可用於鑑別一系列納入核酸或蛋白質中之核苷酸或胺基酸單體(例如藉由檢測納入一系列經標記核苷酸或胺基酸單體之時程)。在一些實施例中，本申請案中所闡述之方法、組合物及器件可用於鑑別一系列納入由聚合酶合成之模板依賴性核酸定序反應產物中之核苷酸。

在某些實施例中，藉由天然核酸聚合酶實施模板依賴性核酸定序產物。在一些實施例中，聚合酶係天然聚合酶之突變體或經修飾變體。在一些實施例中，模板依賴性核酸序列產物包括一或多個與模板核酸股互補之核苷酸區段。在一態樣中，本申請案提供藉由測定互補核酸股之序列來測定模板(或靶)核酸股之序列之方法。

在另一態樣中，本申請案提供藉由對複數個核酸片段實施定序來對靶核酸實施定序之方法，其中靶核酸包括片段。在某些實施例中，該方法包括組合複數個片段序列以提供母體靶核酸之序列或部分序列。在一些實施例中，藉由電腦硬體及軟體來實施組合步驟。本文所闡述之方法可使得對相關靶核酸之組(例如整個染色體或基因體)實施定序。

在定序期間，聚合酶可偶合(例如附接)至靶核酸分子之引發位置。引發位置可為與靶核酸分子之一部分互補之引子。作為一替代方式，引發位置係提供於靶核酸分子之雙股區段內之間隙或切口。間隙或切口之長度可為0至至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30

或40個核苷酸。切口可斷裂雙股序列之一條股，此可提供用於聚合酶(例如股置換聚合酶)之引發位置。

在一些情形下，可將定序引子複性至可或可不固定至固體載體上之靶核酸分子。固體載體可包括(例如)用於核酸定序之晶片上之試樣孔(例如奈米孔口、反應室)。在一些實施例中，可將定序引子固定至固體載體上且靶核酸分子之雜交亦將靶核酸分子固定至固體載體上。在一些實施例中，將聚合酶固定至固體載體上且可溶性引子及靶核酸接觸聚合酶。然而，在一些實施例中，在溶液中形成包括聚合酶、靶核酸及引子之複合物且將複合物固定至固體載體上(例如經由聚合酶、引子及/或靶核酸之固定)。在一些實施例中，試樣孔(例如奈米孔口、反應室)中之任一組份皆不固定至固體載體上。舉例而言，在一些實施例中，在溶液中形成包括聚合酶、靶核酸及引子之複合物且並不將複合物固定至固體載體上。

在適當條件下，接觸複性引子/靶核酸之聚合酶可在引子上添加或納入一或多種核苷酸，且核苷酸可以5'至3'模板依賴性方式添加至引子中。核苷酸在引子上之該納入(例如經由聚合酶作用)通常可稱為引子延伸反應。每一核苷酸可與可檢測標籤締合，該可檢測標籤可在核酸延伸反應期間檢測及鑑別(例如基於其發光壽命及/或其他特性)且用於測定納入延伸引子中之每一核苷酸，且由此用於測定新近合成之核酸分子之序列。經由新近合成之核酸分子之序列互補性，亦可測定靶核酸分子之序列。在一些情形下，可在類似反應條件(例如相同或類似反應溫度)下或在反應條件(例如不同反應溫度)下將定序引子複性至靶核酸分子且將核苷酸納入定序引子中。在一些實施例中，藉由合成方法實施定序可包含存在靶核酸分子群體(例如靶核酸之拷貝)及/或擴增靶核酸以達成靶核酸群體之步驟。然而，在一些實施例中，使用藉由合成實施之定序來測定所評估每一反應中單一分子之序列(且無

需核酸擴增來製備用於定序之靶模板)。在一些實施例中，根據本申請案之態樣平行(例如在單一晶片上)實施複數個單一分子定序反應。舉例而言，在一些實施例中，複數個單一分子定序反應各自在單獨反應室(例如奈米孔口、試樣孔)在於單一晶片上實施。

實施例能夠以高準確度及長讀取長度對單一核酸分子實施定序，例如準確度為至少約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%或99.9999%，及/或讀取長度大於或等於約10個鹼基對(bp)、50 bp、100 bp、200 bp、300 bp、400 bp、500 bp、1000 bp、10,000 bp、20,000 bp、30,000 bp、40,000 bp、50,000 bp或100,000 bp。在一些實施例中，單一分子定序中所使用之靶核酸分子係單股靶核酸(例如去氧核糖核酸(DNA)、DNA衍生物、核糖核酸(RNA)、RNA衍生物)模板，其添加或固定至含有定序反應之至少一種其他組份(例如聚合酶(例如DNA聚合酶)、定序引子，其固定或附接至固體載體(例如試樣孔之底部壁或側壁)上)之試樣孔(例如奈米孔口)中。靶核酸分子或聚合酶可直接或經由連接體附接至試樣壁(例如在試樣孔之底部壁或側壁處)。試樣孔(例如奈米孔口)亦可含有經由引子延伸反應進行核酸合成且包含發光標籤(例如螢光團)之任一其他試劑，例如適宜緩衝劑、輔因子、酶(例如聚合酶)及多磷酸去氧核糖核苷(例如三磷酸去氧核糖核苷、包含三磷酸去氧腺苷(dATP)、三磷酸去氧胞苷(dCTP)、三磷酸去氧鳥苷(dGTP)、三磷酸去氧尿苷(dUTP)及三磷酸去氧胸苷(dTTP)dNTP)。在一些實施例中，每一種類之dNTP (例如含有腺嘌呤之dNTP (例如dATP)、含有胞嘧啶之dNTP (例如dCTP)、含有鳥嘌呤之dNTP (例如dGTP)、含有尿嘧啶之dNTP (例如dUTP)及含有胸腺嘧啶之dNTP (例如dTTP))偶聯至不同發光標籤，從而自標籤所發射光之檢測指示納入新近合成之核酸中之dNTP的身份。可經由任一適宜器件及/或方

法(包含在本文其他處所闡述之用於檢測之該等器件及方法)檢測來自發光標籤之發射光且歸因於其適當發光標籤(及由此相關dNTP)。發光標籤可在任一位置處偶聯至dNTP，從而發光標籤之存在並不抑制dNTP在新近合成之核酸股中之納入或並不抑制聚合酶活性。在一些實施例中，發光標籤偶聯至dNTP之末端磷酸酯(例如γ磷酸酯)。

在一些實施例中，可使單股靶核酸模板與定序引子、dNTP、聚合酶及核酸合成所需之其他試劑接觸。在一些實施例中，可使所有適當dNTP與單股靶核酸模板同時(舉例而言，同時存在所有dNTP)接觸，從而可連續納入dNTP。在其他實施例中，可使dNTP與單股靶核酸模板依序接觸，其中使單股靶核酸模板與每一適當dNTP單獨接觸，其中在單股靶核酸模板與不同dNTP接觸之間進行洗滌步驟。可針對擬鑑別單股靶核酸模板之每一連續鹼基位置重複進行使單股靶核酸模板與每一dNTP單獨接觸、隨後洗滌之此一循環。

在一些實施例中，定序引子複性至單股靶核酸模板且聚合酶基於單股靶核酸模板將dNTP (或其他多磷酸去氧核糖核苷)連續納入引子中。可在將dNTP納入引子中期間或之後使用適當激發光激發與每一所納入dNTP締合之獨特發光標籤且可隨後使用任一適宜器件及/或方法(包含本文其他處所闡述用於檢測之器件及方法)檢測其發射。光之特定發射(例如具有特定發射壽命、強度、光譜及/或其組合)之檢測可歸因於所納入之特定dNTP。然後可使用自所檢測發光標籤之集合獲得之序列經由序列互補性來測定單股靶核酸模板之序列。

儘管本發明提及dNTP，但本文所提供之器件、系統及方法中與各種類型之核苷酸(例如核糖核苷酸及去氧核糖核苷酸(例酯具有至少4、5、6、7、8、9或10個磷酸酯基團之多磷酸去氧核糖核苷))一起使用。該等核糖核苷酸及去氧核糖核苷酸可包含各種類型之標籤(或標記物)及連接體。

核酸定序之實例

下列實例意欲闡釋本文所闡述之一些方法、組合物及器件。實例之所有態樣係非限制性。圖1示意性圖解說明單一分子核酸定序方法之設置。1-110係經構形以含有包括核酸聚合酶1-101、擬定序靶核酸1-102及引子1-104之單一複合物之試樣孔(例如奈米孔口、反應室)。在此實例中，將試樣孔1-110之底部區繪示為靶容積(例如激發區) 1-120。

如本文中其他處所闡述，靶容積係激發能所引向之容積。在一些實施例中，該容積係試樣孔容積及激發能耦合至試樣孔之性質。靶容積可經構形以限制限定於靶容積中之分子或複合物之數量。在一些實施例中，靶容積經構形以限定單一分子或複合物。在一些實施例中，靶容積經構形以限定單一聚合酶複合物。在圖1中，包括聚合酶1-101之複合物限定於靶容積1-120中。可視情況藉由附接至試樣孔之表面上來固定複合物。用於試樣孔表面製備及官能化之實例性製程繪示於本申請案其他處進一步論述之圖7-9中。在此實例中，藉由包括一或多種適於將連接體附接至聚合酶1-101之生物分子(例如生物素)之連接體1-103來固定複合物。

孔口容積亦含有具有適宜溶劑、緩衝劑及聚合酶複合物合成核酸股所需之其他添加劑之反應混合物。反應混合物亦含有複數類經發光標記之核苷酸。每一類型之核苷酸由符號*-A、@-T、$-G、#-C代表，其中A、T、G及C代表核苷酸鹼基，且符號*、@、$及#代表經由連接體-附接至每一核苷酸之獨特發光標記。在圖1中，#-C核苷酸正納入互補股1-102中。所納入核苷酸位於靶容積1-120內。

圖1亦使用箭頭指示遞送至靶容積附近之激發能及朝向檢測器發射之發光之概念。箭頭係示意圖，且並不意欲指示激發能遞送或發光之特定定向。在一些實施例中，激發能係來自光源之光脈衝。激發能

可在光源與靶容積附近之間經過一或多個器件組件(例如波導或濾光片)。發射能亦可在發光分子與檢測器之間經過一或多個器件組件(例如波導或濾光片)。一些發光可發射於並不引導至檢測器之載體上(例如朝向試樣孔側壁)且不可檢測。

圖2示意性圖解說明單一試樣孔(例如奈米孔口)中之隨時間變化之定序製程。階段A至D繪示如圖1中之具有聚合酶複合物之試樣孔。階段A繪示在向引子中添加任一核苷酸之前之初始狀態。階段B繪示經發光標記之核苷酸(#-C)之納入事件。階段C繪示納入事件之間之時段。在此實例中，向引子中添加核苷酸C，且先前附接至經發光標記之核苷酸(#-C)之標記及連接體已發生裂解。階段D繪示經發光標記之核苷酸(*-A)之第二納入事件。在階段D之後之互補股由引子、C核苷酸及A核苷酸組成。

階段A及C皆繪示納入事件之前或之間之時段，其在此實例中指示持續約10毫秒。在階段A及C中，因並未納入核苷酸，故在靶容積(未繪製於圖2中)並無經發光標記之核苷酸，但可檢測到背景發光或來自未納入之經發光標記之核苷酸之假性發光。階段B及D展示不同核苷酸(分別為#-C及*-A)之納入事件。在此實例中，該等事件亦指示持續約10毫秒。

標記為「原始倉數據」之列繪示在每一階段期間生成之數據。在整個實例實驗中，將複數個光脈衝遞送至靶容積附近。對於每一脈衝而言，檢測器經構形以記錄由檢測器接收之任一發射光子。在發射光子由檢測器接收時，將其分離成複數個時間倉(在此實例中存在3個)中之一者。在一些實施例中，檢測器經構形以具有介於2與16個時間倉。「原始倉數據」記錄值1 (最短條)、2 (中等條)或3 (最長條)，其分別對應於最短、中等及最長倉。每一條指示發射光子之檢測。

因在階段A或C之靶容積中並不存在經發光標記之核苷酸，故並

未檢測到光子。對於階段B及D中之每一者而言，在納入事件期間檢測到複數個光子發射事件(如本文所用之發光事件或「發光」)。發光標記#之發光壽命短於發光標記*。階段B數據由此繪示為其所記錄平均倉值低於倉值較高之階段D。

標記為「經處理數據」之列繪示經處理以指示在相對於每一脈衝之時間下發射光子之數量(計數)的原始數據。因每一條對應於特定時間倉之光子計數，故繪示經處理數據之實例性曲線對應於包括多於圖中所闡述三個時間倉之時間倉之原始倉數據。在此實例中，僅處理數據以測定發光壽命，但亦可針對其他發光性質(例如所吸收或發射光子之發光強度或波長)來評估數據。實例性經處理數據可估計靶容積中之發光標記之發光壽命之指數式衰減曲線特性。因發光標記#之發光壽命短於發光標記*，故階段B之經處理數據在較長持續時間中具有較少計數，而階段D之經處理數據在較長持續時間中具有相對較多計數。

圖2之實例實驗將添加至互補股中之前兩種核苷酸鑑別為CA。對於DNA而言，在該區複性至引子之後即刻之靶股序列由此鑑別為GT。在此實例中，可僅基於發光壽命在複數個C、G、T及A中區分核苷酸C及A。在一些實施例中，可能需要其他性質(例如所吸收或發射光子之發光強度或波長)來區分一或多種特定核苷酸。

在納入核苷酸後發射之信號可儲存於記憶體中且在稍後時間點加以處理以測定靶核酸模板之序列。此可包含比較該等信號與參考信號以測定所納入核苷酸隨時間而變化之身份。或者或另外，可收集在納入核苷酸後發射之信號且即時(例如在納入核苷酸時)處理以即時測定靶核酸模板之序列。

本文所用之術語「核酸」通常係指包括一或多個核酸亞單位之分子。核酸可包含一或多個選自腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鳥嘌呤

(G)、胸腺嘧啶(T)及尿嘧啶(U)或其變體之亞單位。在一些實例中，核酸係去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)或其衍生物。核酸可為單股或雙股。核酸可為圓形。

本文所用之術語「核苷酸」通常係指核酸亞單位，其可包含A、C、G、T或U或其變體或類似物。核苷酸可包含任一可納入生長核酸股中之亞單位。該亞單位可為A、C、G、T或U或任一對一或多個互補A、C、G、T或U具有特異性或與嘌呤(例如A或G或其變體或類似物)或嘧啶(例如C、T或U或其變體或類似物)互補之其他亞單位。亞單位可使得能夠解析個別核酸鹼基或鹼基組(例如AA、TA、AT、GC、CG、CT、TC、GT、TG、AC、CA或尿嘧啶-其對應體)。

核苷酸通常包含核苷及至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個磷酸酯(PO_3)基團。核苷酸可包含核鹼基、5碳糖(核糖或去氧核糖)及一或多個磷酸酯基團。核糖核苷酸係糖為核糖之核苷酸。去氧核糖核苷酸係糖為去氧核糖之核苷酸。核苷酸可為單磷酸核苷或多磷酸核苷。核苷酸可為包含可檢測標籤(例如發光標籤或標記物(例如螢光團))之多磷酸去氧核糖核苷，例如三磷酸去氧核糖核苷，其可選自三磷酸去氧腺苷(dATP)、三磷酸去氧胞苷(dCTP)、三磷酸去氧鳥苷(dGTP)、三磷酸去氧尿苷(dUTP)及三磷酸去氧胸苷(dTTP) dNTP。

多磷酸核苷可具有「n」個磷酸酯基團，其中「n」係大於或等於2、3、4、5、6、7、8、9或10之數值。多磷酸核苷之實例包含二磷酸核苷及三磷酸核苷。核苷酸可為末端磷酸酯標記之核苷，例如末端磷酸酯標記之多磷酸核苷。該標記可為發光(例如螢光或化學發光)標記、螢光標記、著色標記、色素原標記、質量標籤、靜電標記或電化學標記。標記(或標記物)可經由連接體偶合至末端磷酸酯。連接體可包含(例如)至少一個或複數個羥基、硫氫基、胺基或鹵代烷基，其可適於在天然或經修飾核苷酸之末端磷酸酯處形成(例如)磷酸酯、硫

酯、胺基磷酸酯或烷基膦酸酯鏈接。連接體可(例如)藉助聚合酶發生裂解以使標記與末端磷酸酯分離。核苷酸及連接體之實例提供於美國專利第7,041,812號中，該專利之全部內容以引用方式併入本文中。

核苷酸(例如多磷酸核苷酸)可包括甲基化核鹼基。舉例而言，甲基化核苷酸可為包括一或多個附接至核鹼基上(例如直接附接至核鹼基環、附接至核鹼基環之取代基)之甲基之核苷酸。實例性甲基化核鹼基包含1-甲基胸腺嘧啶、1-甲基尿嘧啶、3-甲基尿嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、1-甲基腺嘌呤、2-甲基腺嘌呤、7-甲基腺嘌呤、N6-甲基腺嘌呤、N6,N6-二甲基腺嘌呤、1-甲基鳥嘌呤、7-甲基鳥嘌呤、N2-甲基鳥嘌呤及N2,N2-二甲基鳥嘌呤。

發光性質

如本文中所闡述，發光分子係吸收一或多個光子且可隨後在一或多個持續時間之後發射一或多個光子之分子。分子之發光由若干參數闡述，包含(但不限於)發光壽命、吸收光譜、發射光譜、發光量子產率及發光強度。術語吸收及激發可在整個本申請案中互換使用。典型發光分子可吸收多個波長下之光或經受該光之激發。在某些波長下或某些光譜範圍內之激發可由發光發射事件鬆弛，而在某些其他波長或光譜範圍下之激發可能並不由發光發射事件鬆弛。在一些實施例中，發光分子僅經適宜激發以用於在單一波長下或單一光譜範圍內之發光。在一些實施例中，發光分子經適宜激發以用於在兩個或更多個波長下或兩個或更多個光譜範圍內之發光。在一些實施例中，藉由量測激發光子之波長或吸收光譜來鑑別分子。

來自發光發射事件之發射光子將在可能波長之光譜範圍內之波長下發射。通常，發射光子之波長長於(例如具有較小能量或紅移)激發光子之波長。在某些實施例中，藉由量測發射光子之波長來鑑別分子。在某些實施例中，藉由量測複數個發射光子之波長來鑑別分子。

在某些實施例中，藉由量測發射光譜來鑑別分子。

發光壽命係指激發事件與發射事件之間之持續時間。在一些實施例中，將發光壽命表示為指數式衰減方程式中之常數。在存在一或多個遞送激發能之脈衝事件之一些實施例中，持續時間係脈衝與後續發射事件之間之時間。

可使用任一適宜方法(例如藉由使用適宜技術量測壽命或藉由測定發射之時間依賴性特性)來實施分子之「發光壽命測定」。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包括測定相對於一或多種分子(例如定序反應中之經發光標記之不同核苷酸)之壽命。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包括測定相對於參考之壽命。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包括量測壽命(例如螢光壽命)。在一些實施例中，測定分子之發光壽命包括測定一或多種指示壽命之時間特性。在一些實施例中，可基於複數個發生於一或多個時間門控窗口中之發射事件(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多個發射事件)相對於激發脈衝之分佈來測定分子之發光壽命。舉例而言，可基於相對於激發脈衝量測之光子到達時間之分佈自複數個具有不同發光壽命之分子區分單一分子的發光壽命。

應瞭解，單一分子之發光壽命可指示在單一分子達到激發態之後所發射光子之時序且可藉由指示光子時序之資訊來區分單一分子。一些實施例可包含基於分子之發光壽命藉由量測與由分子所發射光子有關之時間自複數個分子區分某一分子。時間分佈可指示可自分佈測定之發光壽命。在一些實施例中，可基於時間分佈(例如)藉由比較時間分佈與對應於已知分子之參考分佈自複數個分子區分單一分子。在一些實施例中，自時間分佈測定發光壽命之值。

發光量子產率係指在給定波長下或在給定光譜範圍內引起發射

事件之激發事件之分數，且通常小於1。在一些實施例中，本文所闡述分子之發光量子產率介於0與約0.001之間、介於約0.001與約0.01之間、介於約0.01與約0.1之間、介於約0.1與約0.5之間、介於約0.5與0.9之間或介於約0.9與1之間。在一些實施例中，藉由測定或估計發光量子產率來鑑別分子。

如本文中針對單一分子所使用，發光強度係指每單位時間由藉由遞送脈衝激發能激發之分子發射之發射光子數。在一些實施例中，發光強度係指每單位時間由藉由遞送脈衝激發能激發之分子發射之發射光子檢測數，且藉由特定感測器或感測器組來檢測。

給定分子之發光壽命、發光量子產率及發光強度可各自在不同條件下有所變化。在一些實施例中，單一分子與分子系綜具有不同之觀察之發光壽命、發光量子產率或發光強度。在一些實施例中，限定於試樣孔(例如奈米孔口)中之分子與並不限定於試樣孔中之分子具有不同之觀察之發光壽命、發光量子產率或發光強度。在一些實施例中，附接至另一分子之發光標記或發光分子與並不附接至另一分子之發光標記或發光分子具有不同之發光壽命、發光量子產率或發光強度。在一些實施例中，與巨分子複合物(例如蛋白質複合物(例如核酸聚合酶))相互作用之分子與並不與巨分子複合物相互作用之分子具有不同之發光壽命、發光量子產率或發光強度。

在某些實施例中，本申請案中所闡述之發光分子吸收一個光子且在持續時間之後發射一個光子。在一些實施例中，可藉由量測持續時間來測定或估計分子之發光壽命。在一些實施例中，可藉由量測多個脈衝事件及發射事件之複數個持續時間來測定或估計分子之發光壽命。在一些實施例中，可藉由量測持續時間自複數類分子之發光壽命來區別分子之發光壽命。在一些實施例中，可藉由量測多個脈衝事件及發射事件之複數個持續時間自複數類分子之發光壽命來區別分子之

發光壽命。在某些實施例中，藉由測定或估計分子之發光壽命在複數類分子中鑑別或區別分子。在某些實施例中，藉由在複數類分子之複數個發光壽命中區別分子之發光壽命來在複數類分子中鑑別或區別分子。

在某些實施例中，發光發射事件係螢光。在某些實施例中，發光發射事件係磷光。如本文中所使用，術語發光涵蓋所有發光事件，包含螢光及磷光。

在一態樣中，本申請案提供測定單一發光分子之發光壽命之方法，其包括：在靶容積中提供發光分子；將複數個激發能脈衝遞送至靶容積附近；及檢測來自發光分子之複數個發光。在一些實施例中，該方法進一步包括評估複數個在每一對脈衝與發光之間之持續時間之分佈。在一些實施例中，該方法進一步包括將單一發光分子固定於靶容積中。

在另一態樣中，本申請案提供測定複數個分子之發光壽命之方法，其包括：在靶容積中提供複數個發光分子；將複數個激發能脈衝遞送至靶容積附近；及檢測來自發光分子之複數個發光。在一些實施例中，該方法進一步包括評估複數個在每一對脈衝與發光之間之持續時間之分佈。在一些實施例中，該方法進一步包括將發光分子固定於靶容積中。在一些實施例中，複數個包括2至約10個分子、約10至約100個分子或約100至約1000個分子。在一些實施例中，複數個包括約1000至約10^6個分子、約10^6至約10^9個分子、約10^9至約10^{12}個分子、約10^{12}至約10^{15}個分子或約10^{15}至約10^{18}個分子。在一些實施例中，所有複數個分子皆係相同類型之分子。

圖3展示具有不同發光壽命之4種發光分子(最長至最短，頂部至底部)之實例性衰減特徵3-1。幅值可係指來自包括許多分子之試樣之發光強度，其基於發光壽命在初始激發之後隨時間變化指數式降低。

或者，幅值可係指在複數個激發能脈衝之後且在持續時間之後(例如)針對單一分子所檢測之發射的數量或計數。具有不同發光壽命之4種發光分子(最短至最長，頂部至底部)之正規化累積分佈函數3-2對應於3-1。CDF可代表基於發光壽命在初始激發之後隨時間變化達到零之發光幅值之正規化機率(例如所有已發光之激發分子之累積機率)。或者，CDF可代表在單一激發能脈衝之後或在複數個激發能脈衝中之每一者之後在某一持續時間下發光之單一分子的正規化機率。

在一態樣中，本申請案提供測定單一發光分子之發光強度之方法，其包括：在靶容積中提供發光分子；將複數個激發能脈衝遞送至靶容積附近；及檢測來自發光分子之複數個發光。在一些實施例中，該方法進一步包括測定每單位時間之複數個所檢測發光之數量。在一些實施例中，該方法進一步包括將單一發光分子固定於靶容積中。

在另一態樣中，本申請案提供測定複數個分子之發光強度之方法，其包括：在靶容積中提供複數個發光分子；將複數個激發能脈衝遞送至靶容積附近；及檢測來自發光分子之複數個發光。在一些實施例中，該方法進一步包括測定每單位時間之複數個所檢測發光之數量。在一些實施例中，該方法進一步包括將發光分子固定於靶容積中。在一些實施例中，複數個包括2至約10個分子、約10至約100個分子或約100至約1000個分子。在一些實施例中，複數個包括約1000至約10^6個分子、約10^6至約10^9個分子、約10^9至約10^{12}個分子、約10^{12}至約10^{15}個分子或約10^{15}至約10^{18}個分子。在一些實施例中，所有複數個分子皆係相同類型之分子。

激發能

在本文所闡述方法之一態樣中，使用一或多種激發能來激發擬鑑別或區分之分子之發光標記。在一些實施例中，激發能係位於可見光譜中。在一些實施例中，激發能係位於紫外光譜中。在一些實施例

中，激發能係位於紅外光譜中。在一些實施例中，使用一種激發能來激發經發光標記之分子。在一些實施例中，使用兩種激發能來激發經發光標記之分子。在一些實施例中，使用三種或更多種激發能來激發經發光標記之分子。在一些實施例中，藉由所遞送激發能中之僅一者來激發每一經發光標記之分子。在一些實施例中，藉由所遞送激發能中之兩者或更多者來激發經發光標記之分子。在某些實施例中，激發能可為單色或限定於一定光譜範圍中。在一些實施例中，光譜範圍之範圍介於約0.1 nm與約1 nm之間、介於約1 nm及約2 nm之間或介於約2 nm與約5 nm之間。在一些實施例中，光譜範圍之範圍介於約5 nm與約10 nm之間、介於約10 nm與約50 nm之間或介於約50 nm與約100 nm之間。

在某些實施例中，以光脈衝形式遞送激發能。在某些實施例中，以複數個光脈衝之形式遞送激發能。在某些實施例中，使用兩種或更多種激發能來激發經發光標記之分子。在一些實施例中，同時遞送每一激發能(例如在每一脈衝中)。在一些實施例中，在不同時間遞送每一激發能(例如在每一能量之單獨脈衝中)。可以任一足以容許檢測來自靶分子之發光之模式來遞送不同激發能。在一些實施例中，在每一脈衝中遞送兩種激發能。在一些實施例中，以交替脈衝遞送第一激發能及第二激發能。在一些實施例中，以一系列連續脈衝遞送第一激發能，且以後續一系列連續脈衝遞送第二激發能，或以交替模式遞送該等系列。

在某些實施例中，基於經發光標記之分子之發光性質來選擇光脈衝之頻率。在某些實施例中，基於複數種經發光標記之核苷酸之發光性質來選擇光脈衝之頻率。在某些實施例中，基於複數種經發光標記之核苷酸之發光壽命來選擇光脈衝之頻率。在一些實施例中，頻率經選擇以便脈衝之間之間隙長於一或多種經發光標記之核苷酸之發光

壽命。在一些實施例中，基於複數種經發光標記之核苷酸之最長發光壽命來選擇頻率。舉例而言，若4種經發光標記之核苷酸之發光壽命為0.25 ns、0.5 ns、1.0 ns及1.5 ns，則光脈衝之頻率可經選擇以便脈衝之間之間隙超過1.5 ns。在一些實施例中，間隙長於一或多種所激發經發光標記之分子之發光壽命約兩倍至約10倍、約10倍至約100倍或約100倍至約1000倍。在一些實施例中，間隙長於一或多種所激發經發光標記之分子之發光壽命約10倍。在一些實施例中，間隙介於約0.01 ns與約0.1 ns之間、介於約1 ns與約5 ns之間、介於約5 ns與約15 ns之間、介於約15 ns與約25 ns之間或介於約25 ns與約50 ns之間。在一些實施例中，間隙經選擇以便存在50%、75%、90%、95%或99%之機率由脈衝激發之分子將以發光方式衰減或激發態藉由另一機制鬆弛。

在存在多種激發能之某些實施例中，每一激發能之脈衝頻率相同。在存在多種激發能之某些實施例中，每一激發能之脈衝頻率不同。舉例而言，若使用紅色雷射來激發壽命為0.2 ns至0.5 ns之發光分子，且使用綠色雷射來激發壽命為5 ns與7 ns之發光分子，則在每一紅色雷射脈衝之後之間隙可短於(例如5 ns)在每一綠色雷射脈衝之後之間隙(例如20 ns)。

在某些實施例中，基於所監測化學製程來選擇脈衝激發能之頻率。對於定序反應而言，頻率可經選擇以便遞送足夠容許檢測足夠數量之擬檢測發射光子之諸多脈衝。在檢測光子之背景中，足夠數量係指自複數種經發光標記之核苷酸鑑別或區分經發光標記之核苷酸所需之光子數。舉例而言，DNA聚合酶可平均每20毫秒一次納入額外核苷酸。經發光標記之核苷酸與複合物相互作用之時間可約為10毫秒，且發光標記物裂解時與下一經發光標記之核苷酸開始相互作用時之間之時間可約為10毫秒。然後可選擇脈衝激發能之頻率以經10毫秒遞送足

夠脈衝，從而在納入經發光標記之核苷酸時在10毫秒期間檢測到足夠數量之發射光子。舉例而言，在100 MHz頻率下，在10毫秒中具有100萬個脈衝(納入事件之近似長度)。若該等脈衝之0.1%產生檢測光子，則存在1,000個發光數據點可經分析以測定所納入經發光標記之核苷酸之身份。任一上述值皆係非限制性。在一些實施例中，納入事件可耗費1 ms至20 ms、20 ms至100 ms或100 ms至500 ms。在以單獨計時脈衝遞送多種激發能之一些實施例中，經發光標記之核苷酸可僅由一部分脈衝激發。在一些實施例中，選擇多種激發能脈衝之頻率及模式，從而該脈衝數量足以激發複數種經發光標記之核苷酸中之任一者以容許檢測足夠數量之發射光子。

在一些實施例中，脈衝頻率介於約1 MHz與約10 MHz之間。在一些實施例中，脈衝頻率介於約10 MHz與約100 MHz之間。在一些實施例中，脈衝頻率介於約100 MHz與約1 GHz之間。在一些實施例中，脈衝頻率介於約50 MHz與約200 MHz之間。在一些實施例中，脈衝頻率約為100 MHz。在一些實施例中，頻率係隨機的。

在某些實施例中，激發能介於約500 nm與約700 nm之間。在一些實施例中，激發能介於約500 nm與約600 nm或約600 nm與約700 nm之間。在一些實施例中，激發能介於約500 nm與約550 nm之間、介於約550 nm與約600 nm之間、介於約600 nm與約650 nm之間或介於約650 nm與約700 nm之間。

在某些實施例中，本文所闡述之方法包括遞送兩種激發能。在一些實施例中，兩種激發能相隔約5 nm至約20 nm、約20 nm至約40 nm、約40 nm至約60 nm、約60 nm至約80 nm、約80 nm至約100 nm、約100 nm至約150 nm、約150 nm至約200 nm、約200 nm至約400 nm或至少約400 nm。在一些實施例中，兩種激發能相隔約20 nm至約80 nm或約80 nm至約160 nm。

在激發能稱為位於特定範圍中時，激發能可包括單一波長，從而波長位於該範圍之間或位於其端點處，或激發能可包括具有最大強度之波長光譜，從而最大強度位於該範圍之間或位於其端點處。

在某些實施例中，第一激發能在450 nm至500 nm範圍內且第二激發能在500 nm至550 nm、550 nm至600 nm、600 nm至650 nm或650 nm至700 nm之範圍內。在某些實施例中，第一激發能在500 nm至550 nm範圍內且第二激發能在450 nm至500 nm、550 nm至600 nm、600 nm至650 nm或650 nm至700 nm之範圍內。在某些實施例中，第一激發能在550 nm至600 nm範圍內且第二激發能在450 nm至500 nm、500 nm至550 nm、600 nm至650 nm或650 nm至700 nm之範圍內。在某些實施例中，第一激發能在600 nm至650 nm範圍內且第二激發能在450 nm至500 nm、500 nm至550 nm、550 nm至600 nm或650 nm至700 nm之範圍內。在某些實施例中，第一激發能在650 nm至700 nm範圍內且第二激發能在450 nm至500 nm、500 nm至550 nm、550 nm至600 nm或600 nm至650 nm之範圍內。

在某些實施例中，第一激發能在450 nm至500 nm範圍內且第二激發能在500 nm至550 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在450 nm至500 nm範圍內且第二激發能在550 nm至600 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在450 nm至500 nm範圍內且第二激發能在600 nm至670 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在500 nm至550 nm範圍內且第二激發能在550 nm至600 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在500 nm至550 nm範圍內且第二激發能在600 nm至670 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在550 nm至600 nm範圍內且第二激發能在600 nm至670 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在470 nm至510 nm範圍內且第二激發能在510 nm至550 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在470 nm至510 nm範圍內且第二激

發能在550 nm至580 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在470 nm至510 nm範圍內且第二激發能在580 nm至620 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在470 nm至510 nm範圍內且第二激發能在620 nm至670 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在510 nm至550 nm範圍內且第二激發能在550 nm至580 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在510 nm至550 nm範圍內且第二激發能在580 nm至620 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在510 nm至550 nm範圍內且第二激發能在620 nm至670 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在550 nm至580 nm範圍內且第二激發能在580 nm至620 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在550 nm至580 nm範圍內且第二激發能在620 nm至670 nm範圍內。在某些實施例中，第一激發能在580 nm至620 nm範圍內且第二激發能在620 nm至670 nm範圍內。

用於將激發能脈衝遞送至靶容積中之激發能來源及器件之某些實施例闡述於本文其他處。

經發光標記之核苷酸

在一態樣中，本文所闡述之方法及組合物包括一或多種經發光標記之核苷酸。在某些實施例中，一或多種核苷酸包括去氧核糖核苷。在一些實施例中，所有核苷酸皆包括去氧核糖核苷。在某些實施例中，一或多種核苷酸包括核糖核苷。在一些實施例中，所有核苷酸皆包括核糖核苷。在一些實施例中，一或多種核苷酸包括經修飾核糖或核糖類似物(例如鎖核酸)。在一些實施例中，一或多種核苷酸包括天然鹼基(例如胞嘧啶、鳥嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶)。在一些實施例中，一或多種核苷酸包括胞嘧啶、鳥嘌呤、腺嘌呤、胸腺嘧啶或尿嘧啶之衍生物或類似物。

在某些實施例中，該方法包括將聚合酶複合物暴露於複數種經發光標記之核苷酸之步驟。在某些實施例中，組合物或器件包括含有

複數種經發光標記之核苷酸之反應混合物。在一些實施例中，複數種核苷酸包括4類核苷酸。在一些實施例中，4類核苷酸各自包括胞嘧啶、鳥嘌呤、腺嘌呤及胸腺嘧啶中之一者。在一些實施例中，4類核苷酸各自包括胞嘧啶、鳥嘌呤、腺嘌呤及尿嘧啶中之一者。

在某些實施例中，每一類經發光標記之核苷酸在反應混合物中之濃度介於約50 nM與約200 nM、約200 nM與約500 nM、約500 nM與約1 μM、約1μM與約50 μM或約50 μM與250 μM之間。在一些實施例中，每一類經發光標記之核苷酸在反應混合物中之濃度介於約250 nM與約2 μM之間。在一些實施例中，每一類經發光標記之核苷酸在反應混合物中之濃度約為1 μM。

在某些實施例中，反應混合物含有用於定序反應之其他試劑。在一些實施例中，反應混合物包括緩衝劑。在一些實施例中，緩衝劑包括3-(*N*-嗎啉基)丙烷磺酸(MOPS)。在一些實施例中，緩衝劑係以介於約1 mM與約100 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，MOPS濃度約為50 mM。在一些實施例中，反應混合物包括一或多種鹽。在一些實施例中，鹽包括乙酸鉀。在一些實施例中，乙酸鉀之濃度約為140 mM。在一些實施例中，鹽係以介於約1 mM與約200 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，反應混合物包括鎂鹽(例如乙酸鎂)。在一些實施例中，乙酸鎂之濃度約為20 mM。在一些實施例中，鎂鹽係以介於約1 mM與約50 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，反應混合物包括還原劑。在一些實施例中，還原劑係二硫蘇糖醇(DTT)。在一些實施例中，還原劑係以介於約1 mM與約50 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，DTT之濃度約為5 mM。在一些實施例中，反應混合物包括一或多種光穩定劑。在一些實施例中，反應混合物包括抗氧化劑、除氧劑或三重態淬滅劑。在一些實施例中，光穩定劑包括原兒茶酸(PCA)。在一些實施例中，光穩定劑包括4-硝基苄醇

(NBA)。在一些實施例中，光穩定劑係以介於約0.1 mM與約20 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，PCA之濃度約額3 mM。在一些實施例中，NBA之濃度約為3 mM。含有光穩定劑(例如PCA)之混合物亦可包括酶以再生光穩定劑(例如原兒茶酸二氧酶(PCD))。在一些實施例中，PCD之濃度約為0.3 mM。

本申請案涵蓋區別複數種核苷酸中之核苷酸之不同方法。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命。在某些實施例中，兩種或更多種經發光標記之核苷酸具有相同發光壽命或實質上相同之發光壽命(例如不能藉由該方法或器件區分之壽命)。

在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之每一者吸收不同光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之兩者吸收相同光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之三者吸收相同光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之四者或更多者吸收相同光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之兩者吸收不同光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之三者吸收不同光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之四者或更多者吸收不同光譜範圍中之激發能。

在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之每一者發射不同光譜範圍中之光子。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之兩者發射相同光譜範圍中之光子。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之三者發射相同光譜範圍中之光子。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之四者或更多者發射相同光譜範圍中之光子。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之兩者發射不同光譜範圍中之光子。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之三者發射不同光譜範圍中之光子。在某些實施例中，經發光標記之核苷酸中之四者或更多者發射不

同光譜範圍中之光子。

在某些實施例中，4種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命。在某些實施例中，兩種或更多種經發光標記之核苷酸具有不同發光壽命且吸收及/或發射第一光譜範圍中之光子，且一或多種經發光標記之核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍中之光子。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命且在第一光譜範圍中發光，且第四經發光標記之核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍中之光子。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命且在第一光譜範圍中發光，且第三及第四經發光標記之核苷酸各自具有不同發光壽命並在第二光譜範圍中發光。

在某些實施例中，4種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光強度。在某些實施例中，兩種或更多種經發光標記之核苷酸具有不同發光強度且在第一光譜範圍中發光，且一或多種經發光標記之核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍中之光子。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光強度且在第一光譜範圍中發光，且第四經發光標記之核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍中之光子。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光強度且在第一光譜範圍中發光，且第三及第四經發光標記之核苷酸各自具有不同發光強度並在第二光譜範圍中發光。

在某些實施例中，4種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命或發光強度。在某些實施例中，兩種或更多種經發光標記之核苷酸具有不同發光壽命或發光強度且在第一光譜範圍中發光，且一或多種經發光標記之核苷酸吸收及/或發射第二光譜範圍中之光子。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命或發光強度且在第一光譜範圍中發光，且第四經發光標記之核苷

酸吸收及/或發射第二光譜範圍中之光子。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命或發光強度且在第一光譜範圍中發光，且第三及第四經發光標記之核苷酸各自具有不同發光壽命或發光強度並在第二光譜範圍中發光。

在某些實施例中，兩種或更多種經發光標記之核苷酸具有不同發光壽命且吸收第一光譜範圍中之激發能，且一或多種經發光標記之核苷酸吸收第二光譜範圍中之激發能。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命且吸收第一光譜範圍中之激發能，且第四經發光標記之核苷酸吸收第二光譜範圍中之激發能。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命且吸收第一光譜範圍中之激發能，且第三及第四經發光標記之核苷酸各自具有不同發光壽命並吸收第二光譜範圍中之激發能。

在某些實施例中，兩種或更多種經發光標記之核苷酸具有不同發光壽命或發光強度且吸收第一光譜範圍中之激發能，且一或多種經發光標記之核苷酸吸收第二光譜範圍中之激發能。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命或發光強度且吸收第一光譜範圍中之激發能，且第四經發光標記之核苷酸吸收第二光譜範圍中之激發能。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸中之每一者具有不同發光壽命或發光強度且吸收第一光譜範圍中之激發能，且第三及第四經發光標記之核苷酸各自具有不同發光壽命或發光強度並吸收第二光譜範圍中之激發能。

在定序期間，鑑別核苷酸之方法可在序列中之各種鹼基對之間有所變化。在某些實施例中，可標記兩類核苷酸以吸收第一激發能，且基於不同發光強度來區分該兩類核苷酸(例如A、G)，而可標記兩種其他類型之核苷酸(例如C、T)以吸收第二激發能，且基於不同發光壽命來區分該兩種其他類型之核苷酸。對於此一實施例而言，在定序期

間，可僅基於發光強度來測定序列之某些區段(例如僅納入A及G之區段)，而可僅基於發光壽命來測定序列之其他區段(例如僅納入C及T之區段)。在一些實施例中，基於發光壽命來區別2至4種經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發光強度來區別2至4種經發光標記之核苷酸。在一些實施例中，基於發光壽命及發光強度來區別2至4種經發光標記之核苷酸。

圖4展示實例性經發光標記之核苷酸之發光壽命4-1及相同實例性核苷酸之發光強度4-2。舉例而言，第四列展示連接至螢光團Alexa Fluor® 555 (AF555)之六磷酸去氧胸苷(dT6P)核苷酸之數據。此經發光標記之核苷酸具有大約0.25 ns之壽命且顯示大約20000個計數/s之發光強度。任一經發光標記之核苷酸之所觀察發光壽命及發光強度可通常針對核苷酸在納入條件(例如在單一分子複合物中、在奈米孔口中)與其他較典型條件(例如彼等針對4-1及4-2者)有所不同。

發光檢測

在本文所闡述方法之一態樣中，藉由一或多個感測器檢測發射光子(發光)或複數個發射光子。對於複數種經發光標記之分子或核苷酸而言，每一分子可發射單一光譜範圍中之光子，或一部分分子可發射第一光譜範圍中之光子且另一部分分子可發射第二光譜範圍中之光子。在某些實施例中，藉由單一感測器檢測發射光子。在某些實施例中，藉由多個感測器檢測發射光子。在一些實施例中，藉由第一感測器檢測在第一光譜範圍中發射之光子，且藉由第二感測器檢測在第二光譜範圍中發射之光子。在一些實施例中，藉由不同感測器檢測在複數個光譜範圍中之每一者中發射之光子。

在某些實施例中，每一感測器經構形以基於激發能與發射光子之間之持續時間來向發射光子分配時間倉。在一些實施例中，在較短持續時間之後發射之光子將分配較早時間倉，且在較長持續時間之後

發射之光子將分配稍後時間倉。

在一些實施例中，將複數個激發能脈衝遞送至靶容積附近且檢測到複數個光子(其可包含光子發射事件)。在一些實施例中，複數個發光(例如光子發射事件)對應於將經發光標記之核苷酸納入核酸產物中。在一些實施例中，經發光標記之核苷酸之納入持續約1 ms至約5 ms、約5 ms至約20 ms、約20 ms至約100 ms或約100 ms至約500 ms。在一些實施例中，約10至約100、在納入經發光標記之核苷酸期間檢測到約100至約1000、約1000至約10000或約10000至約100000個發光。

在某些實施例中，若並未納入經發光標記之核苷酸，則檢測不到發光。在一些實施例中，存在發光背景。在一些實施例中，在並未納入經發光標記之核苷酸時，檢測到假性發光。該等假性發光可出現於在激發能脈衝期間於靶容積中存在一或多種經發光標記之核苷酸但並未藉由定序反應納入(例如擴散至靶容積中，或與聚合酶相互作用但並未納入)時。在一些實施例中，自靶容積中並未納入之經發光標記之核苷酸所檢測到之複數個發光小於(例如10、100倍、1000倍、10000倍)來自經發光標記之核苷酸的複數個發光。

在一些實施例中，對於每一複數個對應於經發光標記之核苷酸之納入之所檢測發光而言，基於脈衝與發射光子之間之持續時間來向發光分配時間倉。關於納入事件之該複數個在本文中稱為「突發」。在一些實施例中，突發係指高於基線(例如雜訊臨限值)之一系列信號(例如量測)，其中該等信號對應於出現於經發光標記之核苷酸處於激發區內時之複數個發射事件。在一些實施例中，突發與先前及/或後續突發相隔代表基線之信號之時間間隔。在一些實施例中，藉由基於複數個持續時間測定發光壽命來分析突發。在一些實施例中，藉由基於每單位時間之檢測發光數測定發光強度來分析突發。在一些實施例

中，藉由測定所檢測發光之光譜範圍來分析突發。在一些實施例中，分析突發數據使得可分配所納入經發光標記之核苷酸之身份，或使得可自複數種經發光標記之核苷酸區別一或多種經發光標記之核苷酸。分配或區別可依賴於發射光子之發光壽命、發光強度、光譜範圍中之任一者或其任一組合。

圖5繪示實例性模板核酸之定序。使用以下4種經發光標記之核苷酸來運行定序實驗：連接至Alexa Fluor® 647 (A-AF647)之去氧腺苷、連接至Alex Fluor 555 (T-AF555)之去氧胸苷、連接至DyLight™ 554-R1 (G-D554R1)之去氧胍及連接至DyLight™ 530-R2 (C-D530R2)之去氧胞苷。藉由紅色光譜範圍中之激發能激發核苷酸A-AF647，且藉由綠色光譜範圍中之激發能激發T、G及C核苷酸。在200 s定序反應中檢測之光子數展示於強度跡線5-1中。每一尖峰對應於所檢測發光之突發且使用圓點進行標記。每一突發可對應於經發光標記之核苷酸之納入，且包括數千個所檢測發光。可利用不同顏色之跡線來表示不同激發脈衝。舉例而言，紫色跡線可用於綠色激發脈衝，且藍色跡線可用於紅色激發脈衝。來自藍色跡線之突發可分配為納入核苷酸A-AF647 (此實例中具有紅色發光分子之唯一核苷酸)。

圖5展示使用強度對壽命繪圖5-2還原原始數據以區別相同顏色之突發(例如T、G及C之間之紫色跡線中之突發)之一種方式。每一圓代表來自紫色跡線之突發。分析每一突發以基於每一檢測光子之脈衝與發射之間之持續時間來測定經發光標記之核苷酸的發光壽命。另外，分析每一突發以基於每秒之檢測光子數來測定經發光標記之核苷酸之發光強度。納入事件群集於對應於三種經發光標記之核苷酸中之每一者之三組中。將繪圖下部中之暗簇(虛線下方之繪圖區域)分配為C-D530R2，其具有最長發光壽命及最低發光強度。將繪圖下部中之亮簇(虛線下方之繪圖區域)分配為G-D554R1，其具有中間壽命及強度。

且將繪圖上部中之光簇(虛線上方之繪圖區域)分配為T-AF555，其具有最短壽命及最高強度。圖5展示自數據測得之序列與模板核酸之已知序列之間之比對5-3。垂直條指示以實驗方式測得之鹼基與靶序列之間之匹配。破折號指示模板序列中並不在所測定序列中分配核苷酸之位置，或指示所測定序列中並不對應於模板序列中之任一位置之額外位置。

圖6繪示對模板核酸實施定序之第二實例。使用以下4種經發光標記之核苷酸來運行定序實驗：連接至Alexa Fluor® 647 (A-AF647)之去氧腺苷、連接至Alex Fluor 555 (T-AF555)之去氧胸苷、連接至Alexa Fluor® 647 (G-AF647)之去氧胍及連接至Alexa Fluor® 546 (C-AF546)之去氧胞苷。藉由紅色光譜範圍中之激發能激發核苷酸A-AF647及G-AF647，且藉由綠色光譜範圍中之激發能激發T及C核苷酸。在此實驗中，A及G具有相同發光標記物，且並不辨別。圖6在強度跡線6-1中展示在約300 s定序反應中檢測之光子數。每一尖峰對應於所檢測發光之突發且使用圓點進行標記。每一突發可對應於經發光標記之核苷酸之納入，且包括數千個所檢測發光。該跡線展示綠色激發脈衝之所檢測發光(對應於鹼基T及C)。

圖6展示使用強度對壽命繪圖6-2還原原始數據以區別T及C之一種方式。每一圓代表來自強度跡線6-1之突發。分析每一突發以基於每一檢測光子之脈衝及發射之間之持續時間來測定經發光標記之核苷酸的發光壽命。另外，分析每一突發以基於每秒之檢測光子數來測定經發光標記之核苷酸之發光強度。納入事件群集於對應於兩種經發光標記之核苷酸中之每一者之兩組中。將繪圖右側部分中之暗簇(虛線右側之繪圖區域)分配至C-AF546，其具有最長發光壽命及最低發光強度。將繪圖右側部分中之光簇(虛線右側之繪圖區域)分配為T-AF555，其具有最短壽命及最高強度。圖6展示自數據測得之序列與

模板核酸之已知序列之間之比對6-3。垂直條指示以實驗方式測得之鹼基與靶序列之間之匹配。破折號指示模板序列中並不在所測定序列中分配核苷酸之位置，或指示所測定序列中並不對應於模板序列中之任一位置之額外位置。

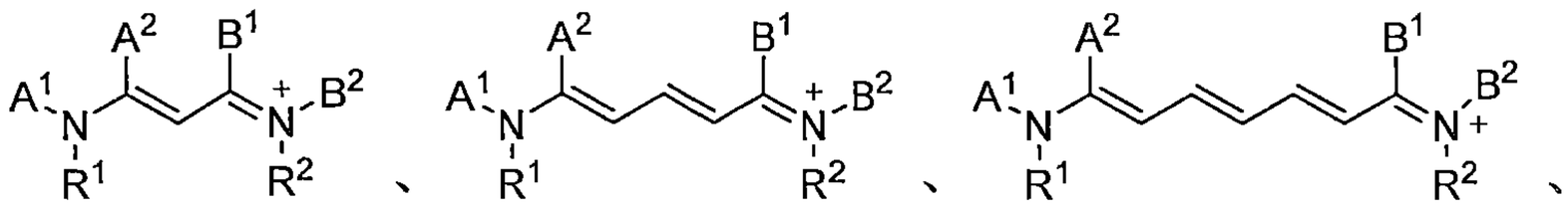
在一些實施例中，可製備定序反應之一或多種組份且用於試樣孔(如展示於圖7-9中之非限制性實施例中所繪示)中以(例如)用於分析定序反應背景中之發光標記。

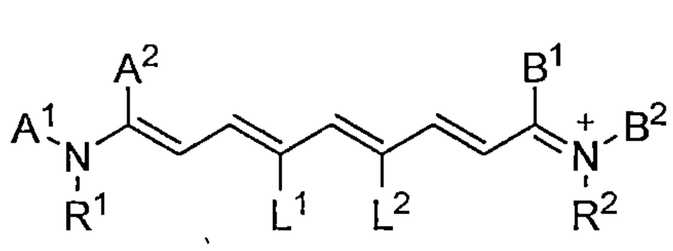
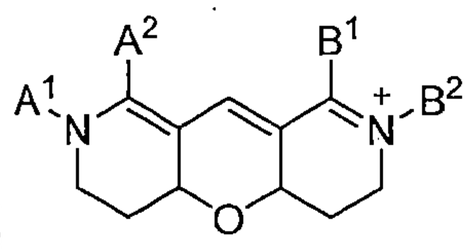
發光標記

術語發光標籤、發光標記及發光標記物可通篇互換使用，且係關於包括一或多個發光分子之分子。在某些實施例中，所納入分子係(例如)並不附接不同發光標記之發光分子。典型核苷酸及胺基酸並不發光，或並不在激發能及發射能之適宜範圍內發光。在某些實施例中，所納入分子包括發光標記。在某些實施例中，所納入分子係經發光標記之核苷酸。在某些實施例中，所納入分子係經發光標記之胺基酸或經發光標記之tRNA。在一些實施例中，經發光標記之核苷酸包括核苷酸及發光標記。在一些實施例中，經發光標記之核苷酸包括核苷酸、發光標記及連接體。在一些實施例中，發光標記係螢光團。

在某些實施例中，發光標記及視情況連接體保持附接至所納入分子。在某些實施例中，發光標記及視情況連接體在納入過程期間或之後自分子裂解。

在某些實施例中，發光標記係青色素染料或其類似物。在一些實施例中，青色素染料具有下式：




或


或其鹽、立體異構體或互變異構體，其中：

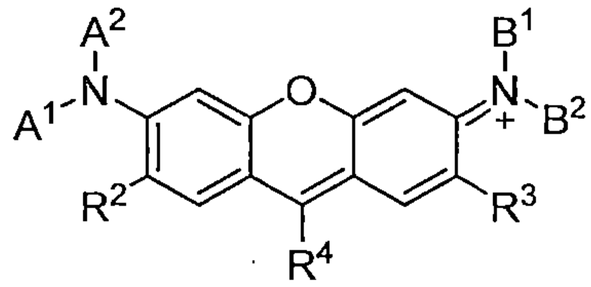
A^1及A^2連接形成視情況經取代之芳香族或非芳香族、單環或多環雜環；

B^1及B^2連接形成視情況經取代之芳香族或非芳香族、單環或多環雜環；

R^1及R^2中之每一者獨立地係氫、視情況經取代之烷基；且

L^1及L^2中之每一者獨立地係氫、視情況經取代之烷基，或L^1及L^2連接形成視情況經取代之芳香族或非芳香族、單環或多環碳環。

在某些實施例中，發光標記係玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，玫瑰紅染料具有下式：


，

或其鹽、立體異構體或互變異構體，其中：

A^1及A^2中之每一者獨立地係氫、視情況經取代之烷基、視情況經取代之芳香族或非芳香族雜環基、視情況經取代之芳香族或非芳香族碳環基或視情況經取代之羰基，或A^1及A^2連接形成視情況經取代之芳香族或非芳香族、單環或多環雜環；

B^1及B^2中之每一者獨立地係氫、視情況經取代之烷基、視情況經取代之芳香族或非芳香族雜環基、視情況經取代之芳香族或非芳香族碳環基或視情況經取代之羰基，或B^1及B^2連接形成視情況經取代之芳香族或非芳香族、單環或多環雜環；

R^2及R^3中之每一者獨立地係氫、視情況經取代之烷基、視情況經

取代之芳基或視情況經取代之醯基；且

R^4係氫、視情況經取代之烷基、視情況經取代之芳基、視情況經取代之芳香族或非芳香族雜環基、視情況經取代之芳香族或非芳香族碳環基或視情況經取代之羰基。

在一些實施例中，R^4係視情況經取代之苯基。在一些實施例中，R^4係視情況經取代之苯基，其中至少一種取代基係視情況經取代之羰基。在一些實施例中，R^4係視情況經取代之苯基，其中至少一種取代基係視情況經取代之磺醯基。

通常，發光標記包括芳香族或雜芳香族化合物且可為芘、蒽、萘、吖啶、二苯乙烯、吲哚、苯并吲哚、噁唑、咔唑、噻唑、苯并噻唑、啡啶、吩噁嗪、吓啉、喹啉、乙錠、苯甲醯胺、青色素、羰花青素、水楊酸鹽、鄰胺基苯甲酸酯、香豆素、螢光素、玫瑰紅或其他類似化合物。實例性染料包含吡喔染料，例如螢光黃或玫瑰紅染料，包含5-羧基螢光黃(FAM)、2'7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基螢光黃(JOE)、四氯螢光黃(TET)、6-羧基玫瑰紅(R6G)、N,N,N',N'-四甲基-6-羧基玫瑰紅(TAMRA)、6-羧基-X-玫瑰紅(ROX)。實例性染料亦包含在α或β位置中具有胺基之萘胺染料。舉例而言，萘基胺基化合物包含1-二甲基胺基萘基-5-磺酸酯、1-苯胺基-8-萘磺酸酯及2-對-甲苯胺基-6-萘磺酸酯、5-(2'-胺基乙基)胺基萘-1-磺酸(EDANS)。其他實例性染料包含香豆素，例如3-苯基-7-異氰酸基香豆素；吖啶，例如9-異硫氰基吖啶及吖啶橙；N-(對-(2-苯并噁唑基)苯基)馬來醯亞胺；青色素，例如吲哚二羰花青素3 (Cy3)、(2Z)-2-[(E)-3-[3-(5-羧基戊基)-1,1-二甲基-6,8-二磺基苯并[e]吲哚-3-鎓-2-基]丙-2-亞烯基]-3-乙基-1,1-二甲基-8-(三氧烷基硫基)苯并[e]吲哚-6-磺酸酯(Cy3.5®)、2-{2-[(2,5-二側氧基吡咯啶-1-基)氧基]-2-側氧基乙基}-16,16,18,18-四甲基-6,7,7a,8a,9,10,16,18-八氫苯并[2'',3'']吲嗪并[8'',7'':5',6']吡喃并

[3',2':3,4]吡啶并[1,2-a]吲哚-5-鎓-14-磺酸酯(Cy3B™)、吲哚二羰花青素5 (Cy5)、吲哚二羰花青素5.5 (Cy5.5)、3-(-羧基-戊基)-3'-乙基-5,5'-二甲基氧雜羰花青素(CyA)；1H,5H,11H,15H-吖喔并[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']二喹啉-18-鎓、9-[2(或4)-[[[6-[2,5-二側氧基-1-吡咯啶基)氧基]-6-側氧基己基]胺基]磺醯基]-4(或2)-磺基苯基]-2,3,6,7,12,13,16,17-八氫-內鹽(TR或Texas Red®)；BODIPY®™染料；苯并噁唑；二苯乙烯；芘；及諸如此類。

對於核苷酸定序而言，經發光標記之核苷酸之某些組合可較佳。在一些實施例中，經發光標記之核苷酸中之至少一者包括青色素染料或其類似物。在一些實施例中，至少一種經發光標記之核苷酸包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸各自包括青色素染料或其類似物。在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸各自包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，至少三種經發光標記之核苷酸各自包括青色素染料或其類似物。在一些實施例中，至少三種經發光標記之核苷酸各自包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，至少4種經發光標記之核苷酸各自包括青色素染料或其類似物。在一些實施例中，至少4種經發光標記之核苷酸各自包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸包括青色素染料或其類似物，且第四經發光標記之核苷酸包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，兩種經發光標記之核苷酸包括青色素染料或其類似物，且第三及視情況第四經發光標記之核苷酸包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，三種經發光標記之核苷酸包括玫瑰紅染料或其類似物，且第三及視情況第四經發光標記之核苷酸包括青色素染料或其類似物。

在一些實施例中，至少一種經標記核苷酸連接至兩種或更多種染料(例如兩個或更多個拷貝之相同染料及/或兩種或更多種不同染

料)。

在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸吸收第一激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者包括青色素染料或其類似物，且經發光標記之核苷酸中之至少一者包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸吸收第二激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者包括青色素染料或其類似物，且經發光標記之核苷酸中之至少一者包括玫瑰紅染料或其類似物。在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸吸收第一激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者包括青色素染料或其類似物，且經發光標記之核苷酸中之至少一者包括玫瑰紅染料或其類似物，且至少兩種額外經發光標記之核苷酸吸收第二激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者包括青色素染料或其類似物，且經發光標記之核苷酸中之至少一者包括玫瑰紅染料或其類似物。

在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸吸收第一激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者具有小於約1 ns之發光壽命，且經發光標記之核苷酸中之至少一者具有大於1 ns之發光壽命。在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸吸收第二激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者具有小於約1 ns之發光壽命，且經發光標記之核苷酸中之至少一者具有大於1 ns之發光壽命。在一些實施例中，至少兩種經發光標記之核苷酸吸收第一激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者具有小於約1 ns之發光壽命，且經發光標記之核苷酸中之至少一者具有大於1 ns之發光壽命，且至少兩種其他經發光標記之核苷酸吸收第二激發能，其中經發光標記之核苷酸中之至少一者具有小於約1 ns之發光壽命，且經發光標記之核苷酸中之至少一者具有大於1 ns之發光壽命。

在某些實施例中，發光標記係選自表1之染料。表1中所列示之

染料係非限制性，且本申請案之發光標記可包含未列示於表1中之染料。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表1。在某些實施例中，4種或更多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表1。

表1.實例性螢光團

螢光團		
5/6-羧基玫瑰紅6G	Chromis 678C	DyLight™ 655-B1
5-羧基玫瑰紅6G	Chromis 678Z	DyLight™ 655-B2
6-羧基玫瑰紅6G	Chromis 770A	DyLight™ 655-B3
6-TAMRA	Chromis 770C	DyLight™ 655-B4
Alexa Fluor® 350	Chromis 800A	DyLight™ 662Q
Alexa Fluor® 405	Chromis 800C	DyLight™ 675-B1
Alexa Fluor® 430	Chromis 830A	DyLight™ 675-B2
Alexa Fluor® 480	Chromis 830C	DyLight™ 675-B3
Alexa Fluor® 488	Cy3	DyLight™ 675-B4
Alexa Fluor® 514	Cy3.5®	DyLight™ 679-C5
Alexa Fluor® 532	Cy3B™	DyLight™ 680
Alexa Fluor® 546	Cy5	DyLight™ 683Q
Alexa Fluor® 555	Dyomics-350	DyLight™ 690-B1
Alexa Fluor® 568	Dyomics-350XL	DyLight™ 690-B2
Alexa Fluor® 594	Dyomics-360XL	DyLight™ 696Q
Alexa Fluor® 610-X	Dyomics-370XL	DyLight™ 700-B1
Alexa Fluor® 633	Dyomics-375XL	DyLight™ 700-B1
Alexa Fluor® 647	Dyomics-380XL	DyLight™ 730-B1
Alexa Fluor® 660	Dyomics-390XL	DyLight™ 730-B2
Alexa Fluor® 680	Dyomics-405	DyLight™ 730-B3
Alexa Fluor® 700	Dyomics-415	DyLight™ 730-B4
Alexa Fluor® 750	Dyomics-430	DyLight™ 747
Alexa Fluor® 790	Dyomics-431	DyLight™ 747-B1
AMCA	Dyomics-478	DyLight™ 747-B2

螢光團		
ATTO 390	Dyomics-480XL	DyLight™ 747-B3
ATTO 425	Dyomics-481XL	DyLight™ 747-B4
ATTO 465	Dyomics-485XL	DyLight™ 755
ATTO 488	Dyomics-490	DyLight™ 766Q
ATTO 495	Dyomics-495	DyLight™ 775-B2
ATTO 514	Dyomics-505	DyLight™ 775-B3
ATTO 520	Dyomics-510XL	DyLight™ 775-B4
ATTO 532	Dyomics-511XL	DyLight™ 780-B1
ATTO 542	Dyomics-520XL	DyLight™ 780-B2
ATTO 550	Dyomics-521XL	DyLight™ 780-B3
ATTO 565	Dyomics-530	DyLight™ 800
ATTO 590	Dyomics-547	DyLight™ 830-B2
ATTO 610	Dyomics-547P1	eFluor® 450
ATTO 620	Dyomics-548	Eosin
ATTO 633	Dyomics-549	FITC
ATTO 647	Dyomics-549P1	螢光黃
ATTO 647N	Dyomics-550	HiLyte™ Fluor 405
ATTO 655	Dyomics-554	HiLyte™ Fluor 488
ATTO 665	Dyomics-555	HiLyte™ Fluor 532
ATTO 680	Dyomics-556	HiLyte™ Fluor 555
ATTO 700	Dyomics-560	HiLyte™ Fluor 594
ATTO 725	Dyomics-590	HiLyte™ Fluor 647
ATTO 740	Dyomics-591	HiLyte™ Fluor 680
ATTO Oxa12	Dyomics-594	HiLyte™ Fluor 750
ATTO Rho101	Dyomics-601XL	IRDye® 680LT
ATTO Rho11	Dyomics-605	IRDye® 750
ATTO Rho12	Dyomics-610	IRDye® 800CW
ATTO Rho13	Dyomics-615	JOE
ATTO Rho14	Dyomics-630	LightCycler® 640R

螢光團		
ATTO Rho3B	Dyomics-631	LightCycler® Red 610
ATTO Rho6G	Dyomics-632	LightCycler® Red 640
ATTO Thio12	Dyomics-633	LightCycler® Red 670
BD Horizon™ V450	Dyomics-634	LightCycler® Red 705
BODIPY® 493/501	Dyomics-635	麗絲胺玫瑰紅B
BODIPY® 530/550	Dyomics-636	萘并螢光黃
BODIPY® 558/568	Dyomics-647	Oregon Green® 488
BODIPY® 564/570	Dyomics-647P1	Oregon Green ® 514
BODIPY® 576/589	Dyomics-648	Pacific Blue™
BODIPY® 581/591	Dyomics-648P1	Pacific Green ™
BODIPY® 630/650	Dyomics-649	Pacific Orange™
BODIPY® 650/665	Dyomics-649P1	PET
BODIPY® FL	Dyomics-650	PF350
BODIPY® FL-X	Dyomics-651	PF405
BODIPY® R6G	Dyomics-652	PF415
BODIPY® TMR	Dyomics-654	PF488
BODIPY® TR	Dyomics-675	PF505
C5.5	Dyomics-676	PF532
C7	Dyomics-677	PF546
CAL Fluor® Gold 540	Dyomics-678	PF555P
CAL Fluor® Green 510	Dyomics-679P1	PF568
CAL Fluor® Orange 560	Dyomics-680	PF594
CAL Fluor® Red 590	Dyomics-681	PF610
CAL Fluor® Red 610	Dyomics-682	PF633P
CAL Fluor® Red 615	Dyomics-700	PF647P
CAL Fluor® Red 635	Dyomics-701	Quasar® 570
Cascade® Blue	Dyomics-703	Quasar® 670
CF™350	Dyomics-704	Quasar® 705
CF™405M	Dyomics-730	玫瑰紅123

螢光團		
CF™405S	Dyomics-731	玫瑰紅6G
CF™488A	Dyomics-732	玫瑰紅B
CF™514	Dyomics-734	玫瑰紅綠色
CF™532	Dyomics-749	玫瑰紅綠色-X
CF™543	Dyomics-749P1	玫瑰紅紅色
CF™546	Dyomics-750	ROX
CF™555	Dyomics-751	ROX
CF™568	Dyomics-752	Seta™ 375
CF™594	Dyomics-754	Seta™ 470
CF™620R	Dyomics-776	Seta™ 555
CF™633	Dyomics-777	Seta™ 632
CF™633-V1	Dyomics-778	Seta™ 633
CF™640R	Dyomics-780	Seta™ 650
CF™640R-V1	Dyomics-781	Seta™ 660
CF™640R-V2	Dyomics-782	Seta™ 670
CF™660C	Dyomics-800	Seta™ 680
CF™660R	Dyomics-831	Seta™ 700
CF™680	DyLight™ 350	Seta™ 750
CF™680R	DyLight™ 405	Seta™ 780
CF™680R-V1	DyLight™ 415-Co1	Seta™ APC-780
CF™750	DyLight™ 425Q	Seta™ PerCP-680
CF™770	DyLight™ 485-LS	Seta™ R-PE-670
CF™790	DyLight™ 488	Seta™646
Chromeo™ 642	DyLight™ 504Q	Seta™u 380
Chromis 425N	DyLight™ 510-LS	Seta™u 425
Chromis 500N	DyLight™ 515-LS	Seta™u 647
Chromis 515N	DyLight™ 521-LS	Seta™u 405
Chromis 530N	DyLight™ 530-R2	磺醯羅丹明101
Chromis 550A	DyLight™ 543Q	TAMRA

螢光團		
Chromis 550C	DyLight™ 550	TET
Chromis 550Z	DyLight™ 554-R0	Texas Red®
Chromis 560N	DyLight™ 554-R1	TMR
Chromis 570N	DyLight™ 590-R2	TRITC
Chromis 577N	DyLight™ 594	Yakima Yellow™
Chromis 600N	DyLight™ 610-B1	Zenon®
Chromis 630N	DyLight™ 615-B2	Zy3
Chromis 645A	DyLight™ 633	Zy5
Chromis 645C	DyLight™ 633-B1	Zy5.5
Chromis 645Z	DyLight™ 633-B2	Zy7
Chromis 678A	DyLight™ 650	Abberior®® Star 635
Square 635	Square 650	Square 660
Square 672	Square 680	Abberior® Star 440SXP
Abberior® Star 470SXP	Abberior® Star 488	Abberior® Star 512
Abberior® Star 520SXP	Abberior® Star 580	Abberior® Star 600
Abberior® Star 635	Abberior® Star 635P	Abberior® Star RED

亦可基於最大吸光度或所發射發光之波長來對染料進行分類。表2提供根據最大吸光度之近似波長分組成行之實例性螢光團。表2中所列示之染料係非限制性，且本申請案之發光標記可包含未列示於表2中之染料。確切最大吸光度或發射波長可能並不比對應於所指示光譜範圍。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表2中所列示之「紅色」組。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表2中所列示之「綠色」組。在某些實施例中，一或多種經發光標記之核苷酸之發光標記係選自表2中所列示之「黃色/橙色」組。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而其皆選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」或「綠色」組中之一者。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從

而三種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第一組，且第四種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第二組。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而兩種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第一組，且第三種及第四種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第二組。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而兩種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第一組，且第三種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第二組，且第四種係選自表2中所列示之「紅色」、「黃色/橙色」及「綠色」組之第三組。

表2.根據光譜範圍分組之實例性螢光團。

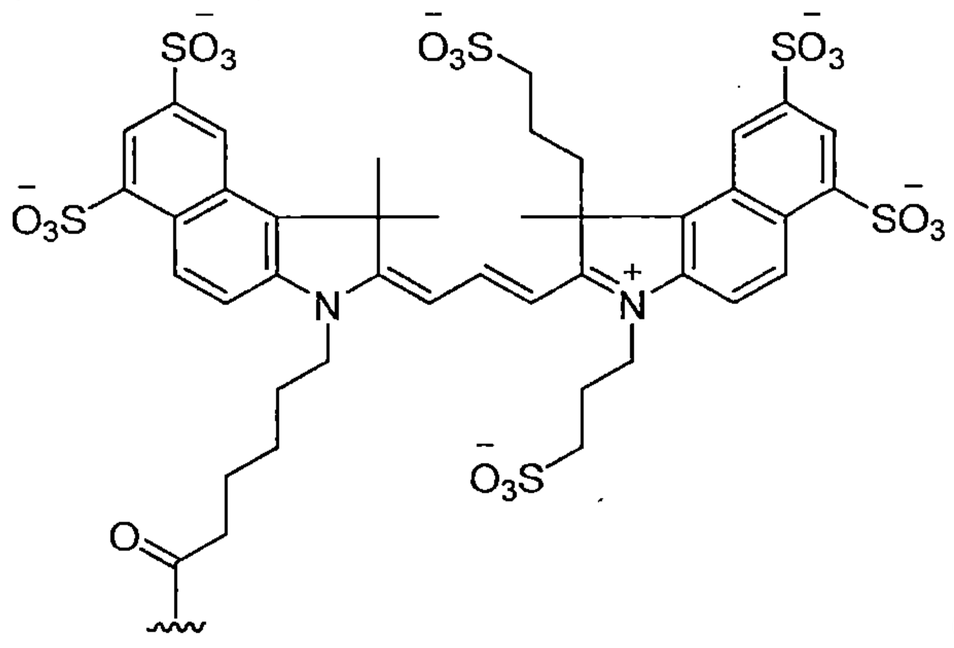
「綠色」 520-570 nm	**「黃色/橙色」 570-620 nm**	**「紅色」 620-670 nm**
5/6-羧基玫瑰紅6G	Alexa Fluor® 594	Alexa Fluor® 633
6-TAMRA	Alexa Fluor® 610-X	Alexa Fluor® 647
Alexa Fluor® 532	ATTO 590	Alexa Fluor® 660
Alexa Fluor® 546	ATTO 610	ATTO 633
Alexa Fluor® 555	ATTO 620	ATTO 647
Alexa Fluor® 568	BODIPY® 576/589	ATTO 647N
ATTO 520	BODIPY® 581/591	ATTO 655
ATTO 532	CF™594	ATTO 665
ATTO 542	CF™620R	ATTO 680
ATTO 550	Chromis 570N	ATTO Rho14
ATTO 565	Chromis 577N	BODIPY® 630/650
BODIPY® 530/550	Chromis 600N	BODIPY® 650/665
BODIPY® 558/568	Dyomics-590	CAL Fluor® Red 635
BODIPY® 564/570	Dyomics-591	CF™ 633-V1
CF™514	Dyomics-594	CF™ 640R-V1
CF™532	Dyomics-601XL	CF™633

「綠色」 520-570 nm	「黃色/橙色」 570-620 nm	「紅色」 620-670 nm
CF™543	Dyomics-605	CF™640R
CF™546	Dyomics-610	CF™640R-V2
CF™555	Dyomics-615	CF™660C
CF™568	DyLight™ 590-R2	CF™660R
Chromis 530N	DyLight™ 594	CF™680
Chromis 550A	DyLight™ 610-B1	CF™680R
Chromis 550C	DyLight™ 615-B2	CF™680R-V1
Chromis 550Z	HiLyte™ Fluor 594	Chromeo™ 642
Chromis 560N	LightCycler®® Red 610	Chromis 630N
Cy3	PF594	Chromis 645A
Cy3.5®	PF594	Chromis 645A
Cy3B™	PF610	Chromis 645C
Dyomics-530	Quasar® 570	Chromis 645Z
Dyomics-547	Abberior® Star 580	Cy5
Dyomics-547P1	Abberior® Star 600	Cy5.5
Dyomics-548		Dyomics-630
Dyomics-549P1		Dyomics-631
Dyomics-550		Dyomics-632
Dyomics-554		Dyomics-633
Dyomics-555		Dyomics-634
Dyomics-556		Dyomics-635
Dyomics-560		Dyomics-636
DyLight™ 521-LS		Dyomics-647
DyLight™ 530-R2		Dyomics-647P1
DyLight™ 543Q		Dyomics-648
DyLight™ 550		Dyomics-648P1
DyLight™ 554-R0		Dyomics-649
DyLight™ 554-R1		Dyomics-649P1
HiLyte™ Fluor 532		Dyomics-650

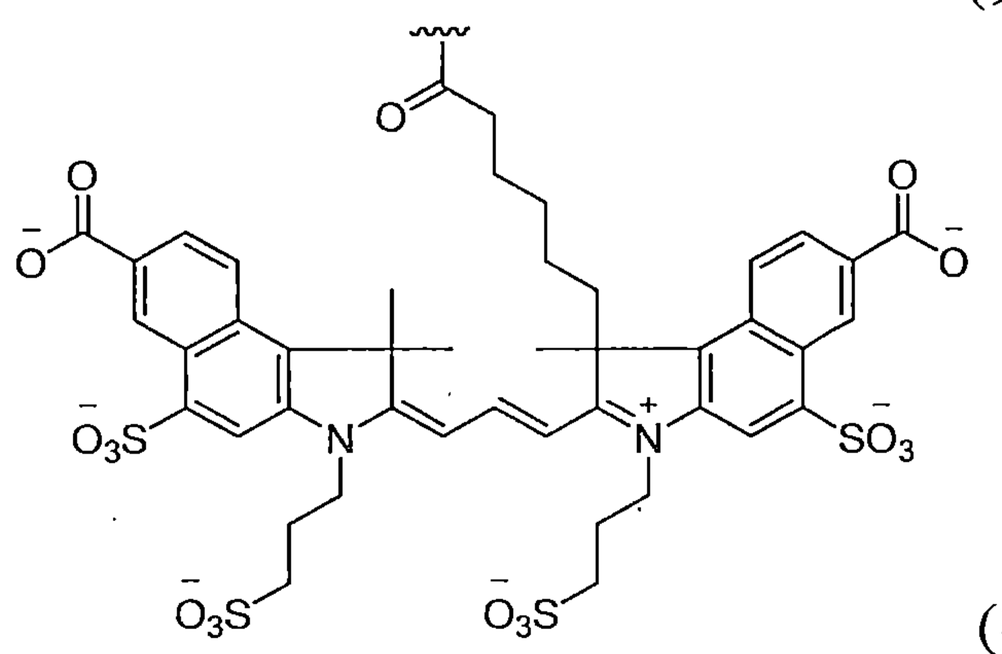
「綠色」 520-570 nm	「黃色/橙色」 570-620 nm	「紅色」 620-670 nm
HiLyte™ Fluor 555		Dyomics-651
PF532		Dyomics-652
PF546		Dyomics-654
PF555P		DyLight™ 633
PF568		DyLight™ 633-B1
Seta™ 555		DyLight™ 633-B2
Abberior® Star 520SXP		DyLight™ 650
		DyLight™ 655-B1
		DyLight™ 655-B2
		DyLight™ 655-B3
		DyLight™ 655-B4
		DyLight™ 662Q
		DyLight™ 680
		DyLight™ 683Q
		HiLyte™ Fluor 647
		HiLyte™ Fluor 680
		LightCycler®® 640R
		LightCycler® Red 640
		LightCycler® Red 670
		PF633P
		PF647P
		Quasar® 670
		Seta™ 632
		Seta™ 633
		Seta™ 650
		Seta™ 660
		Seta™ 670
		Seta™Tau 647
		Square 635

「綠色」 520-570 nm	「黃色/橙色」 570-620 nm	「紅色」 620-670 nm
		Square 650
		Square 660
		Abberior® Star 635
		Abberior® Star 635P
		Abberior® Star RED

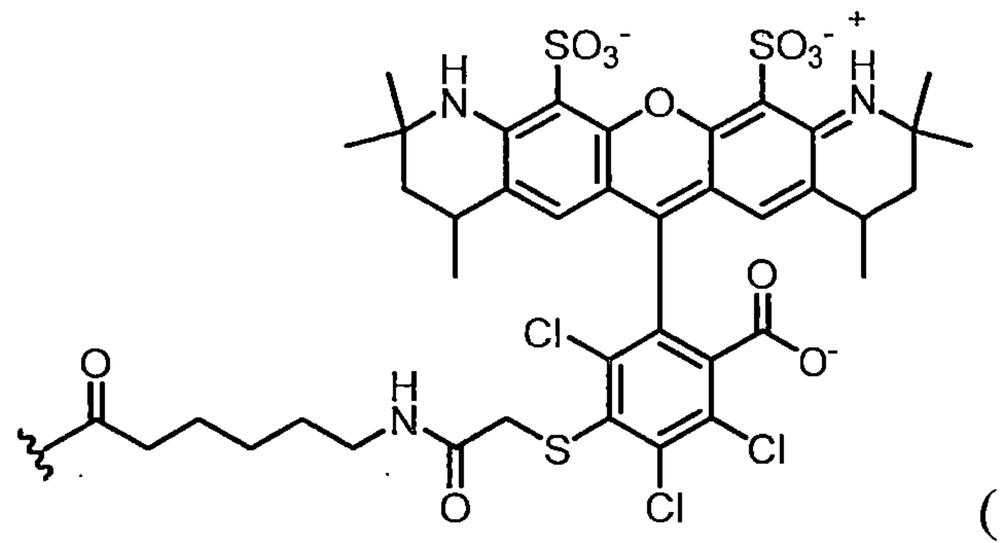
在某些實施例中，發光標記可為下式之(染料101)、(染料102)、(染料103)、(染料104)、(染料105)或(染料106) (呈NHS酯形式)：



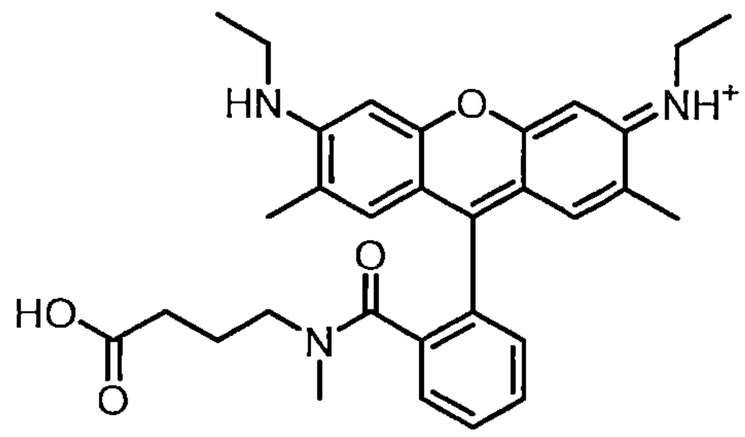
(染料101)，



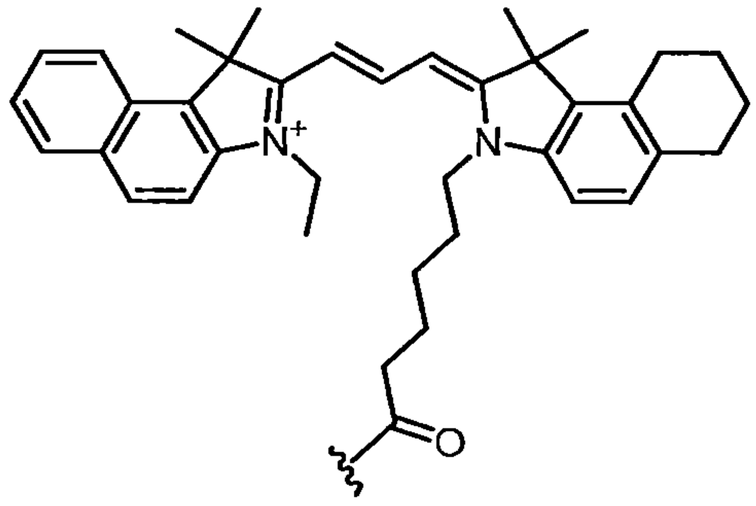
(染料102)，



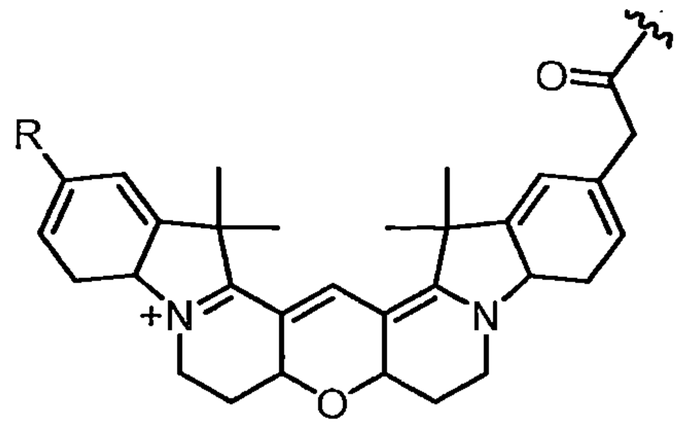
(染料103)，



(染料104)，



(染料105)，



(染料106)，

或其類似物。在一些實施例中，每一磺酸酯或羧酸酯獨立地係視情況經質子化。在一些實施例中，上述染料藉由在指示附接點處形成醯胺鍵來附接至連接體或核苷酸。

在某些實施例中，發光標記可包括第一發色團及第二發色團。在一些實施例中，第一發色團之激發態能夠經由至第二發色團之能量轉移來鬆弛。在一些實施例中，能量轉移係福斯特共振能量轉移(Förster resonance energy transfer，FRET)。此一FRET對可用於提供具有使得標記較易於自複數個發光標記區別開來之性質之發光標記。在某些實施例中，FRET對可吸收第一光譜範圍中之激發能且在第二光譜範圍中發光。

對於經發光標記之分子(例如經發光標記之核苷酸)之組而言，經發光標記之 FRET對之性質可容許選擇複數個可區分分子(例如核苷酸)。在一些實施例中，FRET對之第二發色團具有不同於複數個其他

經發光標記之分子之發光壽命。在一些實施例中，FRET對之第二發色團具有不同於複數個其他經發光標記之分子之發光強度。在一些實施例中，FRET對之第二發色團具有不同於複數個其他經發光標記之分子之發光壽命及發光強度。在一些實施例中，FRET對之第二發色團發射不同於複數個其他經發光標記之分子之光譜範圍中的光子。在一些實施例中，FRET對之第一發色團具有不同於複數個經發光標記之分子之發光壽命。在某些實施例中，FRET對可吸收不同於複數個其他經發光標記之分子之光譜範圍中之激發能。在某些實施例中，FRET對可吸收與複數個其他經發光標記之分子中之一或多者相同之光譜範圍中之激發能。

在一些實施例中，兩種或更多種核苷酸可連結至發光標記，其中該等核苷酸連結至發光標記上之不同位置。一非限制性實例可包含含有兩個與核苷酸類似物上之反應性部分相容之獨立反應性化學部分(例如疊氮基、乙炔基團、羧基、胺基)之發光分子。在此一實施例中，發光標記可經由獨立鏈接連結至兩個核苷酸分子。在一些實施例中，發光標記可包括兩個或更多個至兩種或更多種核苷酸之獨立連結。

在一些實施例中，兩種或更多種核苷酸可經由連接體(例如具支鏈連接體或兩個或更多個可附接核苷酸及/或染料之反應性位點之連接體)連結至發光染料。因此，在一些實施例中，兩種或更多種核苷酸(例如相同類型)可連接至兩種或更多種染料(例如相同類型)。

在一些實施例中，發光標記可包括具有發光性質之量子點。在一些實施例中，一或多種核苷酸連結至量子點。在一些實施例中，一或多種核苷酸經由與蛋白質不同位點之連結連結至量子點。在一些實施例中，使用核苷酸分子塗覆量子點之表面。在某些實施例中，量子點以共價方式連結至一或多種核苷酸(例如經由每一組份上之反應性

部分)。在某些實施例中，量子點以非共價方式連結至一或多種核苷酸(例如經由每一組份上之相容非共價結合配偶體)。在一些實施例中，量子點之表面包括一或多個以非共價方式結合至一或多種生物素化核苷酸之鏈黴抗生物素蛋白分子。

在一些實施例中，發光標記可包括具有發光性質之蛋白質。在一些實施例中，一或多種核苷酸連結至發光蛋白。在一些實施例中，一或多種核苷酸經由至蛋白質不同位點之連結連結至發光蛋白。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而一種核苷酸經螢光蛋白標記，而剩餘三種核苷酸經螢光染料(例如表1及2中之非限制性實例)標記。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而兩種核苷酸經螢光蛋白標記，而剩餘兩種核苷酸經螢光染料(例如表1及2中之非限制性實例)標記。在某些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而三種核苷酸經螢光蛋白標記，而剩餘核苷酸經螢光染料(例如表1及2中之非限制性實例)標記。在一些實施例中，選擇4種核苷酸之發光標記，從而所有4種核苷酸皆經螢光蛋白標記。

根據本申請案之一些態樣，發光標記(例如染料，例如螢光團)可損害定序反應中曝光於激發光之聚合酶。在一些態樣中，此損害發生於納入經發光標記之核苷酸期間，此時發光分子與聚合酶保持緊密靠近。損害反應之非限制性實例包含在聚合酶與發光分子之間形成共價鍵及自發光分子向酶發射輻射或非輻射衰減。此可縮短聚合酶之有效性且減小定序運行之長度。

在一些實施例中，核苷酸及發光標記由相對較長之連接體或連接體構形連結以保持發光標記在納入經標記核苷酸期間遠離聚合酶。術語「連接體構形」在本文中用於係指連結發光分子與核苷酸之整個結構且並不涵蓋發光分子或核苷酸。

在一些實施例中，單一連接體連結發光分子與核苷酸。在一些

實施例中，連接體含有一或多個分歧點，從而兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)核苷酸連結至每一發光分子，兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)發光分子連結至每一核苷酸，或兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)核苷酸連結至兩個或更多個(例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多個)發光分子。

在一些實施例中，連接體構形決定了發光標記與核苷酸之間之距離。在一些實施例中，該距離為約1 nm或2 nm至約20 nm。舉例而言，大於2 nm、大於5 nm、5-10 nm、大於10 nm、10-15 nm、大於15 nm、15-20 nm、大於20 nm。然而，發光標記與核苷酸之間之距離不能過長，此乃因發光標記需要位於照射容積內以在核苷酸保持於酶之活性位點內時得以激發。因此，在一些實施例中，整體連接體長度為小於30 nm、小於25 nm、約20 nm或小於20 nm。

在一些實施例中，在連接體構形內包含保護分子。保護分子可為蛋白質、蛋白質同二聚體、蛋白質異二聚體、蛋白質寡聚物、聚合物或可防止聚合酶損害可發生於酶與發光標記之間之反應之其他分子。保護分子之非限制性實例包含蛋白質(例如抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、特拉普唯丁(Traptavidin)、奈特拉唯丁(NeutrAvidin)、泛蛋白)、蛋白質複合物(例如胰蛋白酶:BPTI、芽孢桿菌rna酶:芽胞桿菌、大腸菌素E9核酸酶:Im9免疫蛋白)、核酸(例如去氧核糖核酸、核糖核酸)、多糖、脂質及碳奈米管。

在一些實施例中，保護分子係寡核苷酸(例如DNA寡核苷酸、RNA寡核苷酸或其變體)。在一些實施例中，寡核苷酸係單股。在一些實施例中，發光標記直接或間接附接至單股寡核苷酸之一端(例如5'端或3'端)且一或多種核苷酸直接或間接附接至單股寡核苷酸之另一端(例如3'端或5'端)。舉例而言，單股寡核苷酸可包括附接至寡核苷

酸之5'端之發光標記及一或多種附接至寡核苷酸之3'端之核苷酸。在一些實施例中，寡核苷酸係雙股(舉例而言，寡核苷酸包括兩條複性、互補寡核苷酸股)。在一些實施例中，發光標記直接或間接附接至雙股寡核苷酸之一端且一或多種核苷酸直接或間接附接至雙股核苷酸之另一端。在一些實施例中，發光標記直接或間接附接至雙股寡核苷酸之一條股且一或多種核苷酸直接或間接附接至雙股核苷酸之另一條股。舉例而言，雙股寡核苷酸可包括附接至寡核苷酸一條股之5'端之發光標記及一或多種附接至另一條股之5'端之核苷酸。

在一些實施例中，保護分子連結至一或多個發光分子及一或多個核苷酸分子。在一些實施例中，發光分子並不毗鄰核苷酸。舉例而言，一或多個發光分子可連結於保護分子之第一側上且一或多種核苷酸可連結至保護分子之第二側，其中保護分子之第一側及第二側彼此遠離。在一些實施例中，其大致位於保護分子之相對側上。

保護分子與發光標記之連結點與保護分子與核苷酸之連結點間之距離可為空間中之線性量測值或保護分子表面上的非線性量測值。可藉由對保護分子之三維結構進行建模來量測保護分子上之發光標記及核苷酸連結點之間的距離。在一些實施例中，此距離可為2、4、6、8、10、12、14、16、18、20 nm或更大。或者，可藉由將保護分子之結構處理為二次表面(例如橢球面、橢圓柱面)來闡述保護分子上之發光標記及核苷酸之相對位置。在一些實施例中，發光標記及核苷酸之間隔距離至少為代表保護分子之橢圓形形狀之周長之八分之一。在一些實施例中，發光標記及核苷酸之間隔距離至少為代表保護分子之橢圓形形狀之周長之四分之一。在一些實施例中，發光標記及核苷酸之間隔距離至少為代表保護分子之橢圓形形狀之周長之三分之一。在一些實施例中，發光標記及核苷酸之間隔距離為代表保護分子之橢圓形形狀之周長之一半。

圖10闡釋發光分子(200)與核苷酸(250)由保護分子(100)分隔之非限制性實例10-1。發光分子(200)經由連接體(300)連結至保護分子(100)，其中連接體(300)附接至保護分子(100)。核苷酸(250)經由連接體(350)連結至保護分子(100)，其中連接體(350)附接至保護分子(100)。保護分子可用於提供防止發光標記靠近聚合酶之空間障壁。保護分子可用於吸收由發光分子發射之輻射及非輻射衰減，或使聚合酶免於該輻射及非輻射衰減。保護分子可用於在發光標記與聚合酶之間提供空間障壁及衰減障壁。

保護分子之大小應使得在核苷酸保持於酶之活性位點內時發光標記不能或不可能直接接觸聚合酶。保護分子之大小亦應使得在核苷酸保持於酶之活性位點內時所附接發光標記位於擬激發之照射容積內。應考慮經選擇以連結發光標記與保護分子之連接體及經選擇以連結核苷酸與保護分子之連接體來選擇保護分子之大小。保護分子及用於連結發光標記及核苷酸(例如多磷酸核苷)之連接體包括連接體構形，其中連接體構形之大小應使得在核苷酸保持於酶之活性位點內時發光標記不能直接接觸聚合酶。

保護分子(及/或包括保護分子之連接體構形)較佳為水溶性。在一些實施例中，較佳地，保護分子(及/或包括保護分子之連接體構形)具有淨負電荷。

在一些實施例中，因一或多個連結標記與核苷酸之非共價鏈接，標記(例如發光分子)並不以共價方式連接至核苷酸。在一些實施例中，一或多個連接體以非共價方式附接至保護分子及/或發光分子。在一些實施例中，一或多個連接體以非共價方式附接至保護分子及/或核苷酸。在一些實施例中，發光標記以共價方式附接至連接體，其中連接體以非共價方式附接至 保護分子(例如經由一或多個結合配偶體)。在一些實施例中，核苷酸以共價方式附接至連接體，其

中連接體以非共價方式附接至保護分子(例如經由一或多個結合配偶體)。

圖10-15圖解說明經由保護分子連結之一或多個發光分子及一或多個核苷酸之非限制性實例，其中一或多個發光分子及一或多個核苷酸以非共價方式附接至保護分子。

圖10圖解說明包括10-1之要素之非限制性實例10-2，其中連接體包括以非共價方式將發光分子附接至保護分子(陰影形狀)之非共價結合位點(110)之非共價結合配體(400)，且第二連接體包括以非共價方式將核苷酸附接至保護分子之第二非共價結合位點(120)之非共價結合配體(450)。

圖10圖解說明包括10-2之要素之非限制性實例10-3，其中保護分子(陰影形狀)包括4個獨立非共價結合位點。第二獨立發光分子可經由非共價結合配體(401)以非共價方式附接至保護分子之非共價結合位點(111)。第二獨立核苷酸分子可經由非共價結合配體(451)以非共價方式附接至保護分子之非共價結合位點(121)。在繪示兩個獨立發光分子及兩個獨立核苷酸以非共價方式結合於保護分子之4個獨立非共價結合位點處之此實施例中，任意選擇發光分子及核苷酸之數量。在一些實施例中，保護分子之4個獨立非共價結合位點在一個位點處包括一個發光分子且在剩餘三個位點中之每一者處包括一個核苷酸。在一些實施例中，保護分子之4個獨立非共價結合位點在一個位點處包括一個核苷酸且在剩餘三個位點中之每一者處包括一個發光分子。

圖10圖解說明包括10-3之要素之非限制性實例10-4，其中連接體(301)包括兩個經由保護分子(陰影形狀)之兩個獨立非共價結合位點以非共價方式附接單一發光分子之獨立非共價結合配體(400、401)，且連接體(351)包括兩個經由保護分子之剩餘兩個獨立非共價結合位點以非共價方式附接單一核苷酸之獨立非共價結合配體(450、451)。

圖11圖解說明包括10-4之要素之非限制性實例11-1，其中連接體(301)包括允許附接兩個發光分子之分歧點(302)。

圖11圖解說明包括11-1之要素之非限制性實例11-2，其中連接體(351)包括允許附接兩個核苷酸之分歧點(352)。

圖11圖解說明包括11-2之要素之非限制性實例11-3，其中連接體(302)包括兩個允許附接4個發光分子之額外分歧點(304)且連接體(352)包括兩個允許附接4個核苷酸之額外分歧點(354)。

圖11圖解說明包括11-3之要素之非限制性實例11-4，其中(304)中所繪示之每一分歧點包括允許附接總共6個發光分子之額外發光分子之額外附接部分(306)，且(354)中所繪示之每一分歧點包括允許附接總共6個核苷酸之額外核苷酸之額外附接部分(356)。

圖12圖解說明可用於定序反應中之以下經標記核苷酸分子組之非限制性實例：胸腺嘧啶12-1、腺嘌呤12-2、胞嘧啶12-3及鳥嘌呤12-4。在此實施例中，使用包括4個非共價結合位點之保護分子來將6個相同類型核苷酸連結至一或多個發光分子。在此實施例中，3個相同類型核苷酸經由兩個單獨連接體附接至保護分子，每一連接體包括以共價方式連接至三個相同類型核苷酸之獨立非共價結合配體。如由12-1、12-2及12-3所繪示，單一發光分子經由包括兩個以非共價方式附接至保護分子之兩個獨立結合位點之獨立非共價結合配體之連接體以非共價方式附接至保護分子。如12-4中所繪示，發光連接體中之分歧點允許添加第二發光分子。

在包括4種實例性核苷酸之定序實驗中，12-1、12-2及12-3之發光標記可包括三種獨特發光分子(例如三種不同螢光團)。因該等實例性分子各自僅含有單一螢光團，故若不使用獨特螢光團，則用於區分胸腺嘧啶、腺嘌呤或胞嘧啶納入之性質(例如發光壽命、發光強度、發射波長)將高度類似或不可區分。鳥嘌呤12-4連結至兩個發光分

子。在一些實施例中，12-4之發光標記可包括兩種相同發光分子，其中所選分子不同於12-1、12-2及12-3中所使用之螢光團。在包括連結至4種獨特螢光團之4種獨特核苷酸之定序反應中，每一螢光團應具有一或多種容許每一者自複數種區分之獨特發光性質(例如發光壽命、強度、發射波長或其兩者或更多者之組合)。在一些實施例中，12-4之兩種螢光團可包括兩種相同螢光團，其中所選螢光團與12-1、12-2及12-3之螢光團中之一者相同。在包括連結至不同編號之相同發光分子之獨特核苷酸之定序反應中，不同編號之螢光團應賦予容許自複數種核苷酸區分一種核苷酸之獨特性質(例如增加之發光強度)。或者，12-4之兩種螢光團可包括FRET對。

圖12另外圖解說明定序實驗及可使用何種獨特發光性質區分複數種經發光標記之核苷酸12-5之非限制性實例。連結至每一鹼基(胸腺嘧啶、腺嘌呤、胞嘧啶、鳥嘌呤)之經發光標記具有容許每一經標記核苷酸自複數種經標記核苷酸區分之發光性質(例如發光壽命、發光強度及/或發射波長)。包含相同類型之多個核苷酸可用於加速定序反應中之納入速率。

利用經發光標記之核苷酸12-5之定序實驗可實施於實例性反應器皿12-6中。該反應發生於波導上方之室中，波導用作用於激發能之導管，從而藉由來自波導之衰逝波將激發能遞送至反應室底部之試樣中。孔口阻斷自波導輻射至本體試樣之光及來自感測器之環境及/或雜散光，且提供用於反應室之製作路徑。反應室係經蝕刻結構，試樣係置於底部且置於來自波導之衰逝波之高激發區內。使用選擇性表面化學來提供反應室之具有不同組成之底部及側壁，從而可將試樣選擇性局部化至反應室之底部。用於表面製備之實例性工作流程展示於圖7中，其繪示尤其包括與達成選擇性表面化學相關之製程的製程。舉例而言，表面鈍化(例如如圖8中所展示之非限制性實施例中所繪示)

可提供可用於表面官能化(例如如圖9中所展示之非限制性實施例中所繪示)期間之選擇性表面基材。

可在定序反應期間根據實例性工作流程12-7自4種經發光標記之核苷酸來區分所納入之特定核苷酸。在整個實驗過程中，存在兩個不同時段：脈衝時段及檢測時段。在持續20皮秒之脈衝時段期間，並未收集到發射光。在脈衝時段後係持續10奈秒之檢測時段，其中4個時間倉捕獲發生於檢測時段中之發射事件(*i*)。脈衝時段及檢測時段構成一個循環。將發射事件連續分倉且累積於100萬個循環之過程中(*ii*)。各時間倉中之發射事件之整體分佈代表發光壽命且可用於匹配特定數據組與已知壽命分佈(*iii*)。在一些實施例中，發射事件之分佈(例如發光壽命)並不區分一種經發光標記之鹼基與複數種其他經標記分子。除發射事件之分佈外，可使用發射事件之量(例如發光強度)來鑑別單一分子與複數種其他分子。

圖13圖解說明包括10-4之要素之非限制性實例13-1，其中保護分子之非共價結合位點經改造以作為非功能結合位點(461)。在一些實施例中，13-1之保護分子可包括鏈黴抗生物素蛋白。在一些實施例中，結合位點係非功能性，此乃因其不能以非共價方式結合生物素分子。非限制性實施例13-1繪示經由兩種獨立非共價結合相互作用附接至保護分子之單一發光分子及經由單一非共價結合相互作用附接至保護分子之6個核苷酸。在一些實施例中，具有三個功能非共價結合位點之保護分子可包括一或多個經由單一非共價相互作用附接之發光分子及一或多個經由兩種獨立非共價相互作用附接之核苷酸。在一些實施例中，具有三個功能非共價結合位點之保護分子可包括一或多個經由兩種獨立非共價相互作用附接之發光分子及一或多個經由單一非共價相互作用附接之核苷酸。

圖13圖解說明包括10-3之要素之非限制性實例13-2，其中保護分

子之兩個非共價結合位點經改造以作為非功能結合位點(411、461)。在一些實施例中，13-2之保護分子可包括鏈黴抗生物素蛋白。在一些實施例中，結合位點係非功能性，此乃因其不能以非共價方式結合生物素分子。非限制性實施例13-2繪示經由單一獨立非共價結合相互作用附接至保護分子之單一發光分子及經由單一非共價結合相互作用附接至保護分子之6個核苷酸。在一些實施例中，具有兩個功能非共價結合位點之保護分子可包括一或多個經由單一非共價相互作用附接之發光分子及一或多個經由單一非共價相互作用附接之核苷酸。在一些實施例中，兩個非功能非共價結合位點係順式結合位點或反式結合位點，其中「順式結合位點」定義為較「反式結合位點」更緊密地靠近。圖13進一步繪示生成具有兩個非功能反式結合位點之鏈黴抗生物素蛋白分子之非限制性實例13-3。

在一些實施例中，連接體可包括核苷酸。圖14圖解說明發光分子及核苷酸經由保護分子連結之非限制性實例性反應圖，其中將發光分子及核苷酸附接至保護分子之連接體包括經由二價連接體附接之寡核苷酸(例如包括DNA、RNA、PNA或其修飾形式之寡核苷酸)。包括寡核苷酸之二價連接體(360)以非共價方式結合至保護分子之兩個獨立非共價結合位點(a)。引入融合至與與連接體(360)互補之寡核苷酸之發光分子(201)以生成經發光標記之保護分子(b)。引入包括寡核苷酸之第二二價連接體(361)以形成(c)。引入融合至與連接體(361)互補之寡核苷酸之核苷酸(251)以生成最終產物(d)。

圖15圖解說明發光分子經由複性互補寡核苷酸附接至保護分子之非限制性實例性反應圖，其中每一寡核苷酸股含有一個與保護分子上之結合位點相容之非共價結合配體。使融合至發光分子及非共價結合配體之第一寡核苷酸(362)複性(*i*)至融合至非共價結合配體之互補寡核苷酸(363)。使複性產物(364)結合至保護分子(*ii*)且純化。使用本

文所揭示之任一技術或構形使經發光標記之純化保護分子與核苷酸結合(*iii*)。圖15亦繪示使用經Cy3染料標記(使用類似於反應圖中之非限制性實例之雙股體DNA連接體)之核苷酸實施之實例性定序實驗。

在一些實施例中，一或多個連接體以共價方式附接至保護分子及/或發光分子。在一些實施例中，一或多個連接體以共價方式附接至保護分子及/或核苷酸。

圖16-20闡釋經由保護分子連結之發光分子及核苷酸之非限制性實例，其中發光分子及核苷酸以共價方式附接至保護分子。

圖16繪示用於生成一般保護分子(陰影形狀)之反應圖16-1，其中保護分子包括兩個基因編碼標籤。基因編碼標籤(325)經設計以與融合至發光分子之特定反應性基團形成共價附接(*i*)且單獨基因編碼標籤(375)經設計以與融合至核苷酸之特定反應性基團形成共價附接(*ii*)，從而形成最終產物(c)。圖16進一步繪示用於經由基因編碼標籤(曲線)共價附接包括生物正交官能基(例如疊氮化物、醛或炔烴)之一般受質(星形)之反應圖16-2之非限制性實施例，且繪示基因編碼標籤及動力學速率常數之非限制性實例16-3。

圖17繪示用於生成一般保護分子(陰影形狀)之反應圖17-1之非限制性實例，其中保護分子係包括N-末端處之反應性基團及C-末端處之反應性基團之蛋白質。蛋白質第一末端處之第一反應性基團(326)經設計以融合至發光分子之特定反應性基團與形成共價附接。蛋白質之剩餘末端處之第二反應性基團(376)經設計以與融合至核苷酸之特定反應性基團形成共價附接。進一步繪示反應性N-末端基團及C-末端基團及相應反應性基團之非限制性實例17-2。

圖18繪示用於生成一般保護分子(陰影形狀)之反應圖18-1之非限制性實例，其中保護分子係在蛋白質之一部分處包括反應性非天然胺基酸且在蛋白質之另一部分處包括反應性非天然胺基酸之蛋白質。蛋

白質之第一部分處之第一反應性非天然胺基酸(327)經設計以與融合至發光分子之特定反應性基團形成共價附接。蛋白質之第二部分之第二反應性非天然胺基酸(377)經設計以與融合至核苷酸之特定反應性基團形成共價附接。圖18進一步繪示用於靶蛋白之化學標記之一般及非限制性反應圖18-2。在此實例中，將具有獨特生物正交官能基之非天然胺基酸(例如選自非限制性實例18-3之非天然胺基酸)經由基因代碼擴增位點特異性地引入蛋白質中且然後化學選擇性地使用外部添加之探針進行標記。

圖19A係由非蛋白質保護分子(101)分隔之發光分子及核苷酸之非限制性實例。非蛋白質保護分子之非限制性實例可包含核酸分子(去氧核糖核酸、核糖核酸)、脂質及碳奈米管。如所展示，發光分子及核苷酸直接附接至非蛋白質保護分子(例如以共價方式附接)。在一些實施例中，發光分子及核苷酸直接附接至非蛋白質保護分子之鄰接部分。舉例而言，在一些實施例中，非蛋白質保護分子係核酸分子，且發光分子及/或核苷酸直接結合至核酸分子之核苷酸。在一些實施例中，發光分子及/或核苷酸經由並非非蛋白質保護分子之鄰接部分之連接體附接至非蛋白質保護分子。舉例而言，在一些實施例中，非蛋白質保護分子係核酸分子，且發光分子及/或核苷酸經由連接體附接至核酸。

在一些實施例中，發光分子及核苷酸可經由反應性部分附接至非蛋白質保護分子，如圖19B中所繪示。在此實例中，發光分子之反應性部分(550)經由非蛋白質保護分子上之相應反應性部分(500)以共價方式附接至非蛋白質保護分子。核苷酸上之反應性部分(551)經由非蛋白質保護分子上之相應反應性部分(501)以共價方式附接至非蛋白質保護分子(101)。在一些實施例中，反應性部分500及/或反應性部分501直接附接至非蛋白質保護分子之鄰接部分。在一些實施例中，

反應性部分500及/或反應性部分501經由並非非蛋白質保護分子之鄰接部分之連接體附接至非蛋白質保護分子。

在一些實施例中，保護分子包括蛋白質-蛋白質對。蛋白質-蛋白質對可包括任一組多肽結合配偶體(例如蛋白質-受體、酶-抑制劑、抗體-抗原)。圖20繪示包括蛋白質-蛋白質結合對之保護分子之非限制性實施例。在此非限制性實例中，結合對之一種多肽(102)以正交方式經發光分子標記且第二多肽(103)以正交方式連接至核苷酸。蛋白質-蛋白質結合對之非限制性實例包含胰蛋白酶-BPTI、芽孢桿菌rna酶:芽胞桿菌及大腸菌素E9核酸酶-Im9免疫蛋白。

圖21繪示包括一或多個附接至非共價結合配體之發光分子之連接體構形之非限制性實例。在實施例21-1中，包括非共價結合配體(410)、間隔體連接體(310)及反應性部分(510)之第一連接體層附接至包括相容反應性部分(211)之發光分子(210)。可使用第一連接體層之反應性部分經由相容反應性部分直接附接至發光分子或核苷酸。可使用第一連接體層之反應性部分經由相容反應性部分附接第二連接體層。在實施例21-2中，兩個發光分子經由第二連接體層附接至第一連接體層，其中第二連接體層包括與第一層之反應性部分相容之反應性部分(512)、包括分歧點之間隔體連接體(312)及與發光分子之反應性部分相容之兩個反應性部分(522)。可使用第二連接體層之兩個反應性部分直接附接至發光分子或核苷酸分子。可使用第二連接體層之兩個反應性部分附接第三連接體層以進一步增加構成連接體構形之發光分子或核苷酸之數量。在實施例21-3中，6個發光分子經由結合於每一反應性部分(522)處之第三連接體層附接至第二連接體層，其中每一第三連接體層包括相容反應性部分(513)、三官能化間隔體連接體(313)及與發光分子之反應性部分相容之三個反應性部分(523)。

因此，發光標記可直接(例如藉由鍵)附接至分子，或可經由連接

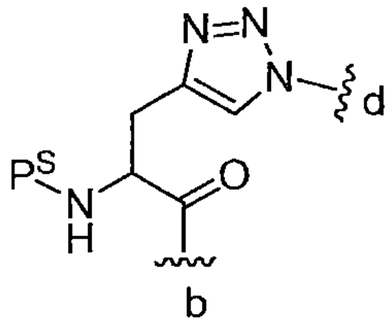
體或連接體構形附接。在某些實施例中，連接體包括一或多種磷酸酯。在一些實施例中，核苷酸藉由包括一或多種磷酸酯之連接體連結至發光標記。闡述為具有一或多種磷酸酯之連接體係指包括一或多種存在於連接體結構內(並不直接附接至核苷酸之一或多種磷酸酯)之磷酸酯之連接體。在一些實施例中，核苷酸藉由包括三種或更多種磷酸酯之連接體連結至發光標記。在一些實施例中，核苷酸藉由包括4種或更多種磷酸酯之連接體連結至發光標記。

在某些實施例中，連接體包括脂肪族鏈。在一些實施例中，連接體包括-$(CH_2)_n$-，其中n係1至20之整數(包含此二者)。在一些實施例中，n係1至10之整數(包含此二者)。在某些實施例中，連接體包括雜脂肪族鏈。在一些實施例中，連接體包括聚乙二醇部分。在一些實施例中， 連接體包括聚丙二醇部分。在一些實施例中，連接體包括-$(CH_2CH_2O)_n$-，其中n係1至20之整數(包含此二者)。在一些實施例中，連接體包括-$(CH_2CH_2O)_n$-，其中n係1至10之整數(包含此二者)。在某些實施例中，連接體包括-$(CH_2CH_2O)_4$-。在某些實施例中，連接體包括一或多個伸芳基。在一些實施例中，連接體包括一或多個伸苯基(例如對-取代伸苯基)。在某些實施例中，連接體包括對掌性中心。在一些實施例中，連接體包括脯胺酸或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括脯胺酸六聚體或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括香豆素或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括萘或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括蒽或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括聚苯基醯胺或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括吡唑酮或其衍生物。在一些實施例中，連接體包括4-胺基炔丙基-L-苯丙胺酸或其衍生物。在某些實施例中，連接體包括多肽。

在一些實施例中，連接體包括寡核苷酸。在一些實施例中，連接體包括兩個複性寡核苷酸。在一些實施例中，一或多種寡核苷酸包

括去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或鎖核糖核苷酸。

在某些實施例中，連接體包括光穩定劑。在一些實施例中，連接體具有下式：

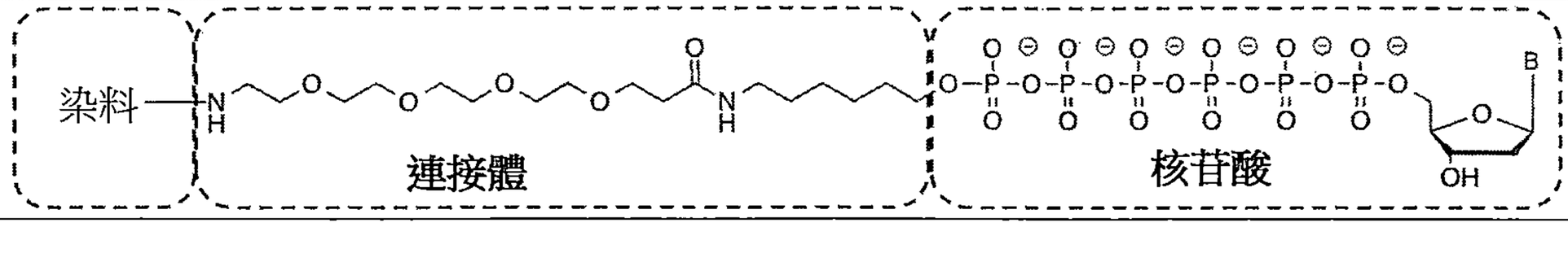


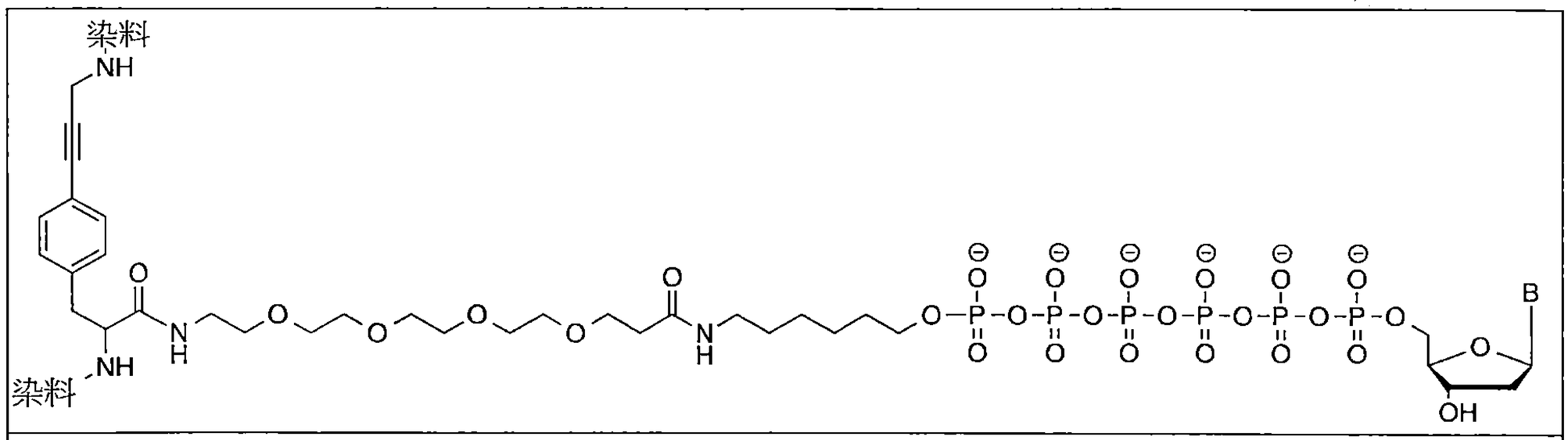
，

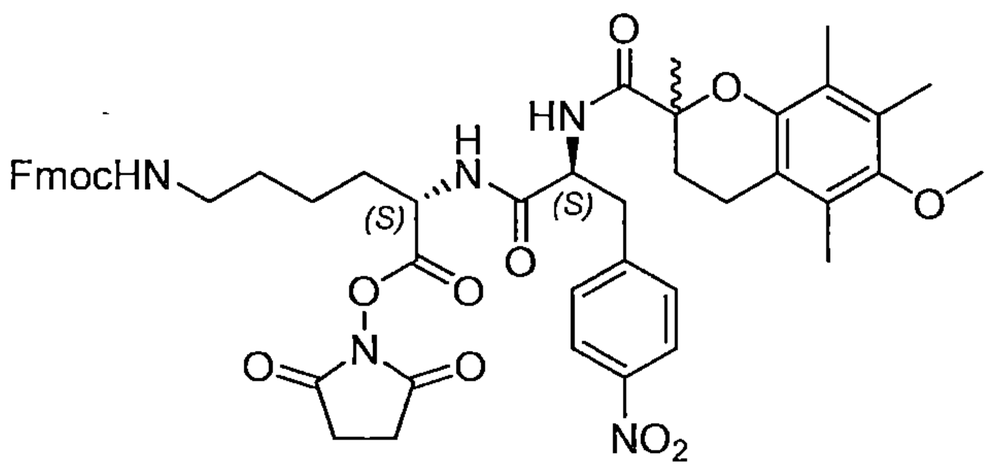
其中P^S係光穩定劑，標記為d之位置附接至發光標記，且標記為b之位置附接至核苷酸。在一些實施例中，標記為d之位置藉由如本文所闡述之連接體附接至發光標記。在一些實施例中，標記為b之位置藉由如本文所闡述之連接體附接至核苷酸。

在某些實施例中，連接體包括一或多種磷酸酯、脂肪族鏈、雜脂肪族鏈及一或多種醯胺(例如-C(=O)NH-)。在某些實施例中，可經由圖22中所繪示之實例性反應圖22-1來合成包括一或多種磷酸酯及脂肪族鏈之連接體。實例性連接體結構進一步繪示於22-2及22-3中。在某些實施例中，連接體係選自表3中所繪示之連接體。表3中之某些實例性連接體結構展示為連接至核苷酸(例如六磷酸核苷)及/或染料。

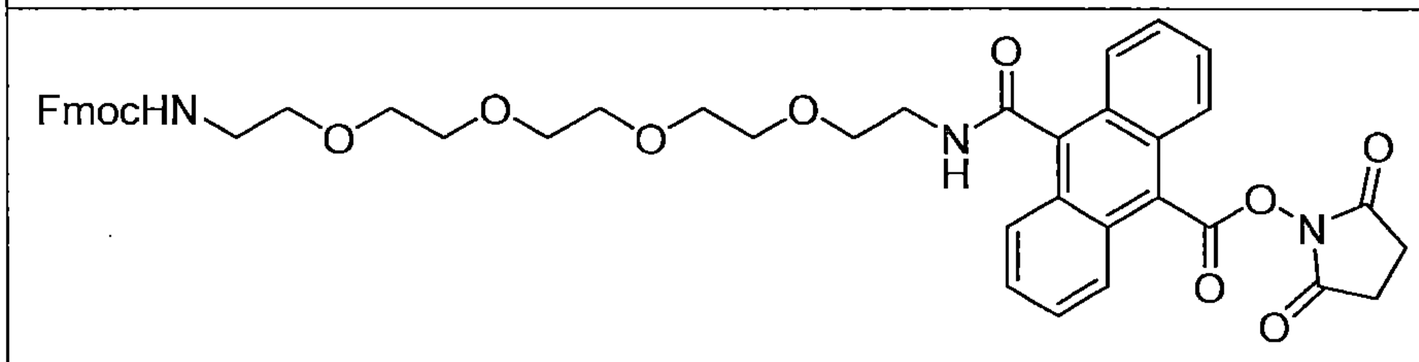
表3.實例性連接體或連接體/染料組合。

連接體


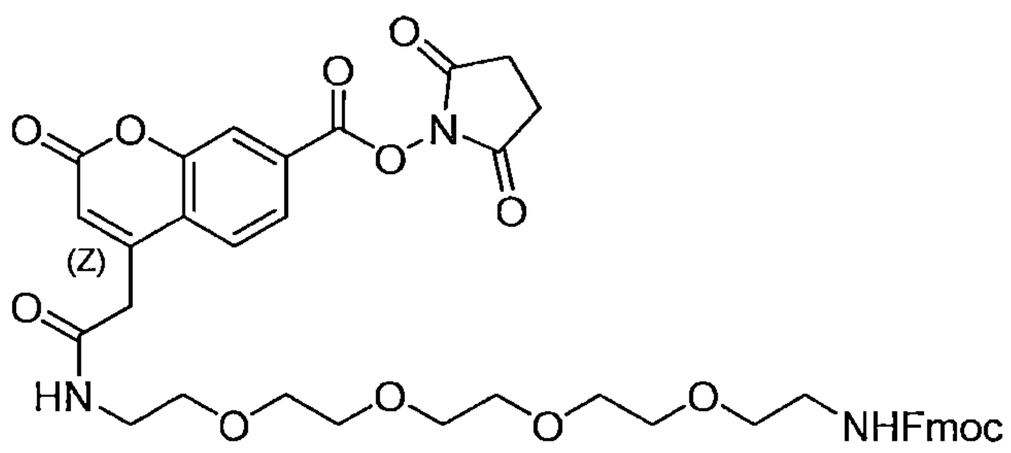




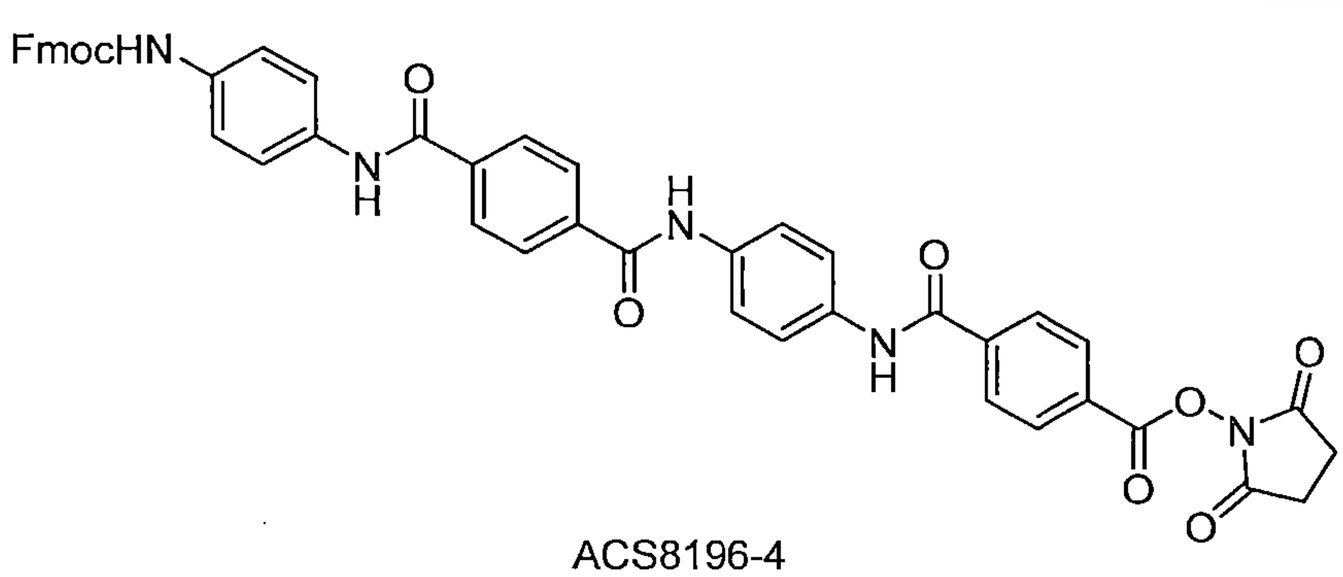
ACS8196-1



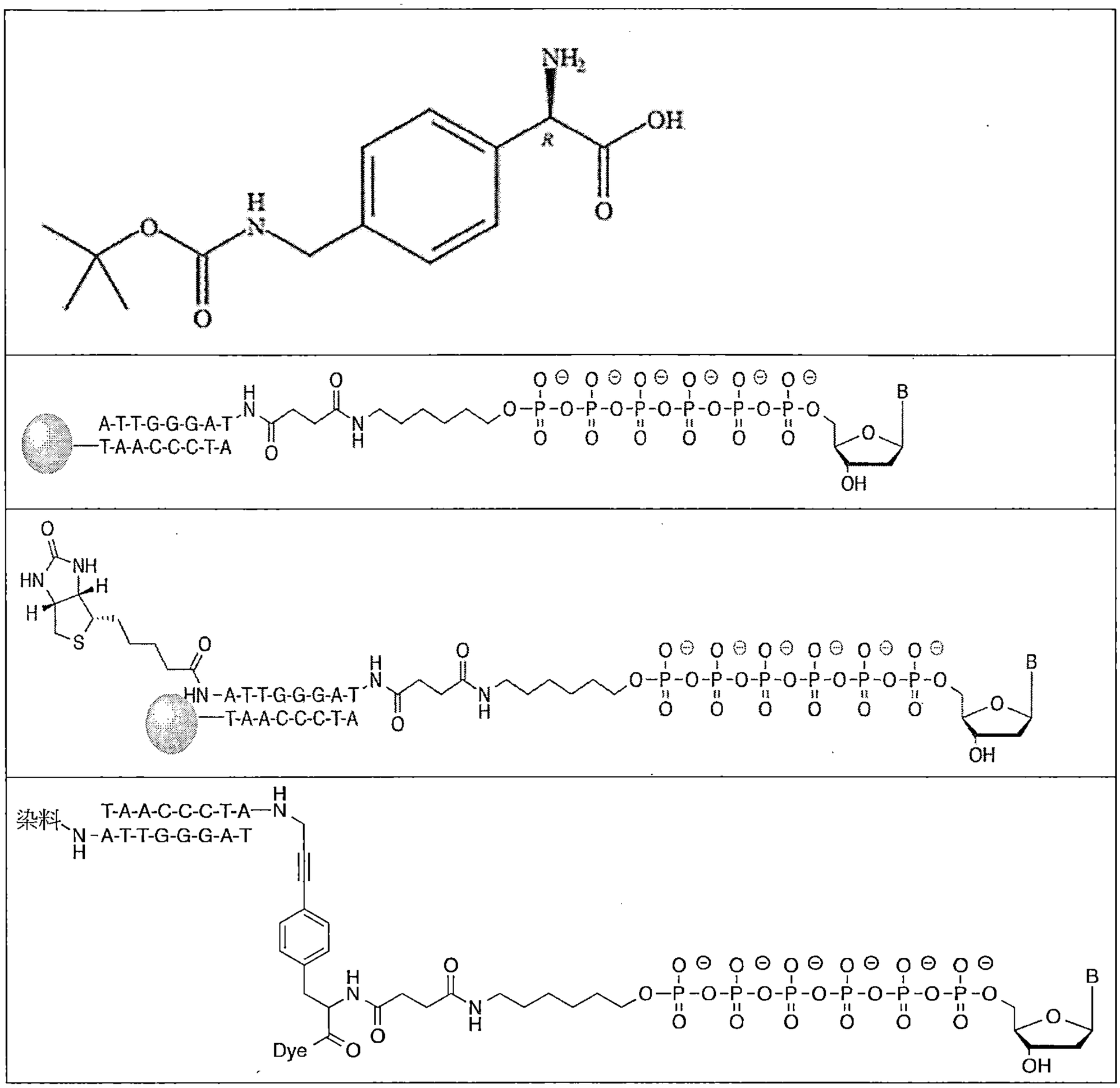
ACS8196-3

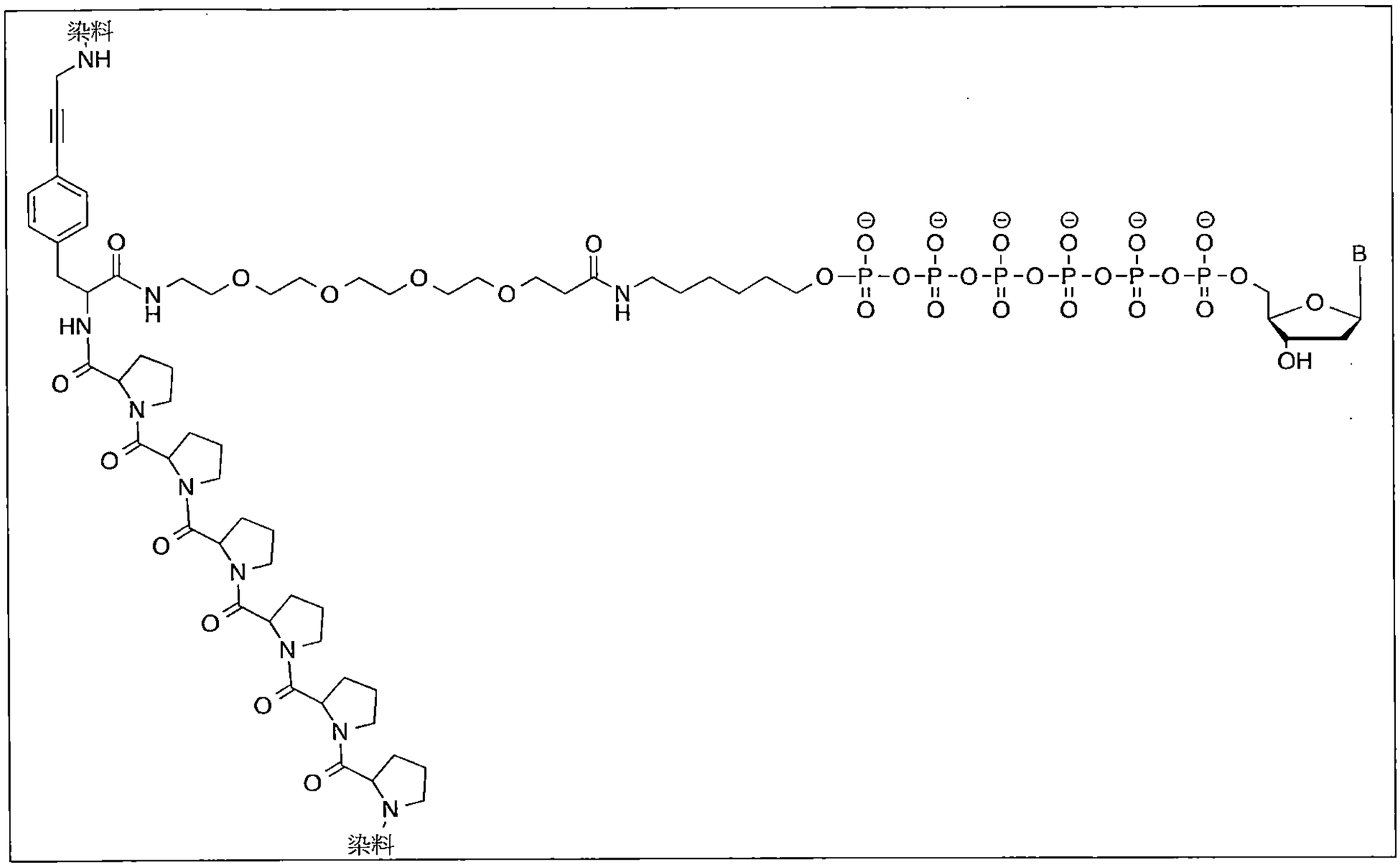


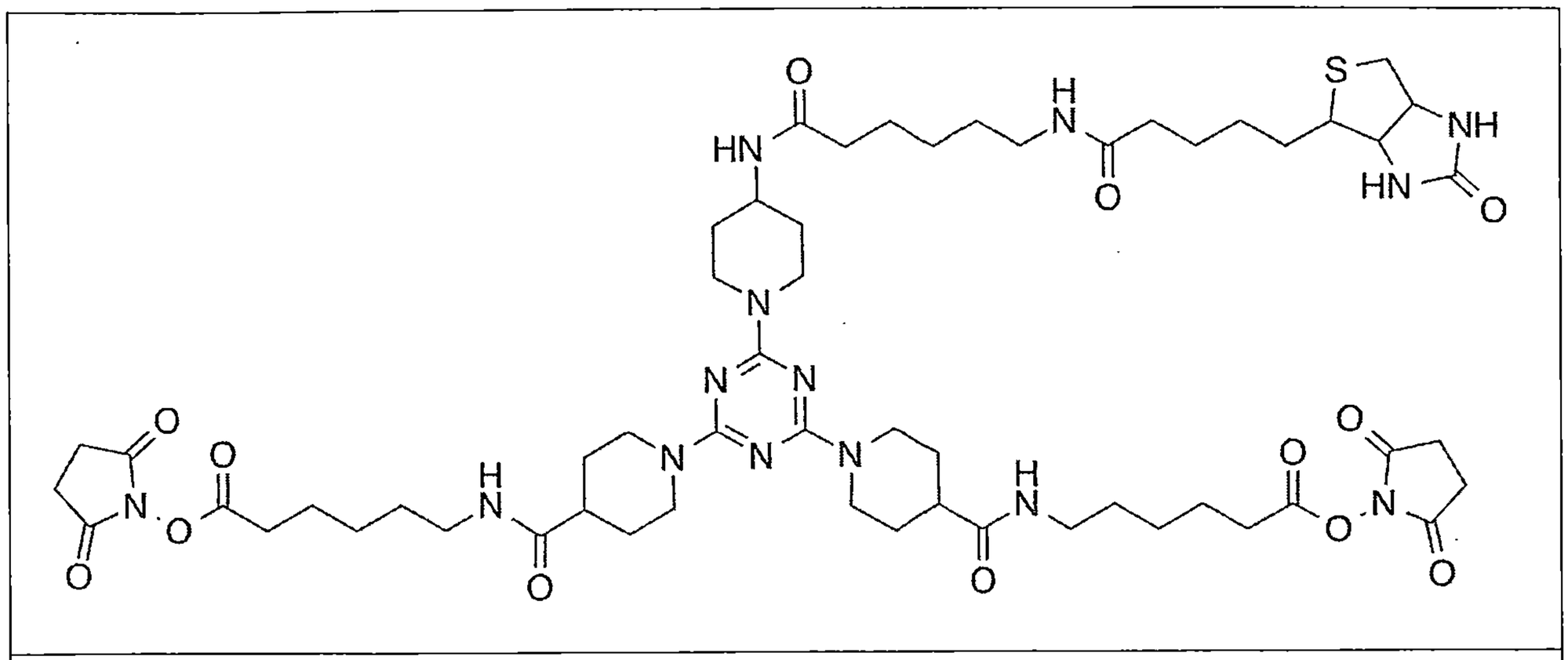
ACS8196-2

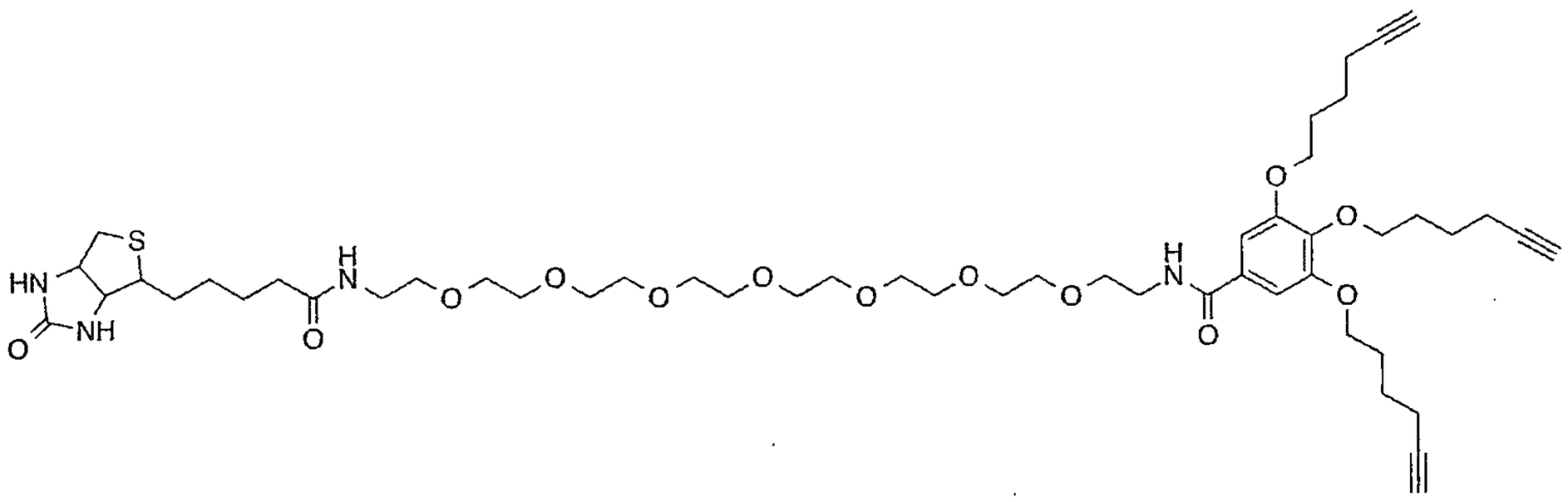


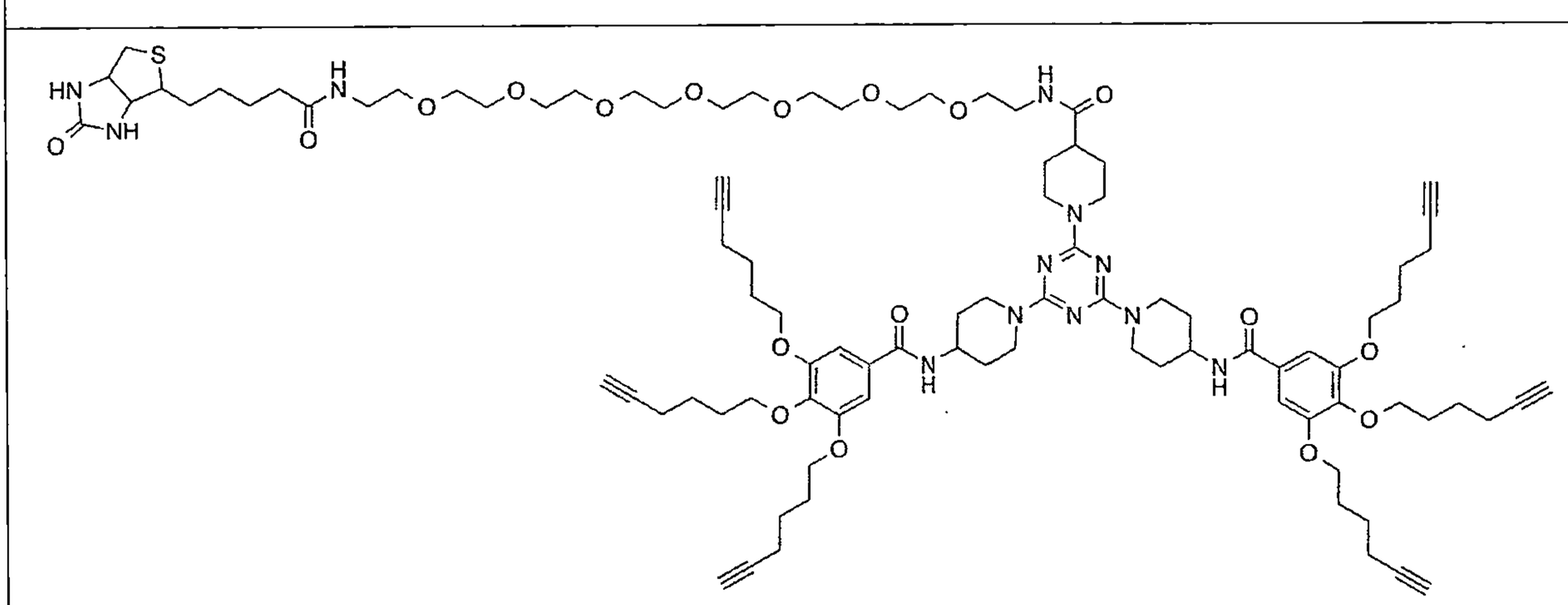
ACS8196-4

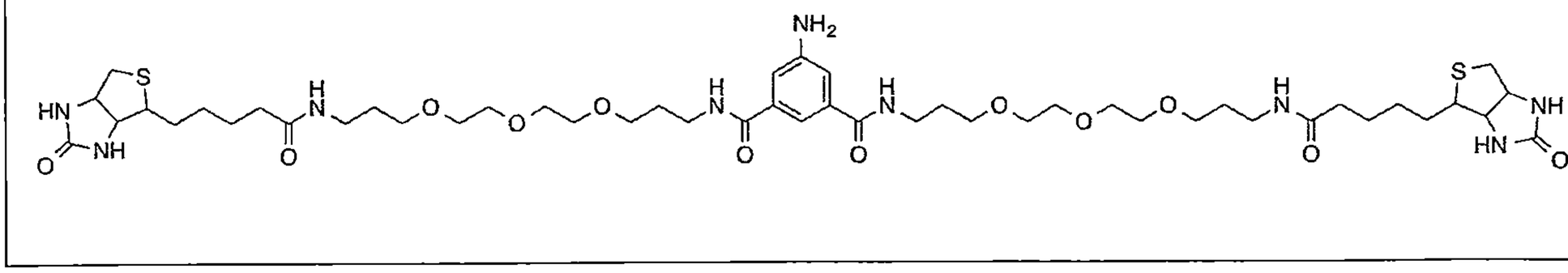

NH2
OH
R
O
H
N
O
O
A-T-T-G-G-G-A-T
T-A-A-C-C-C-T-A
B
OH
HN
NH
S
染料
Dye

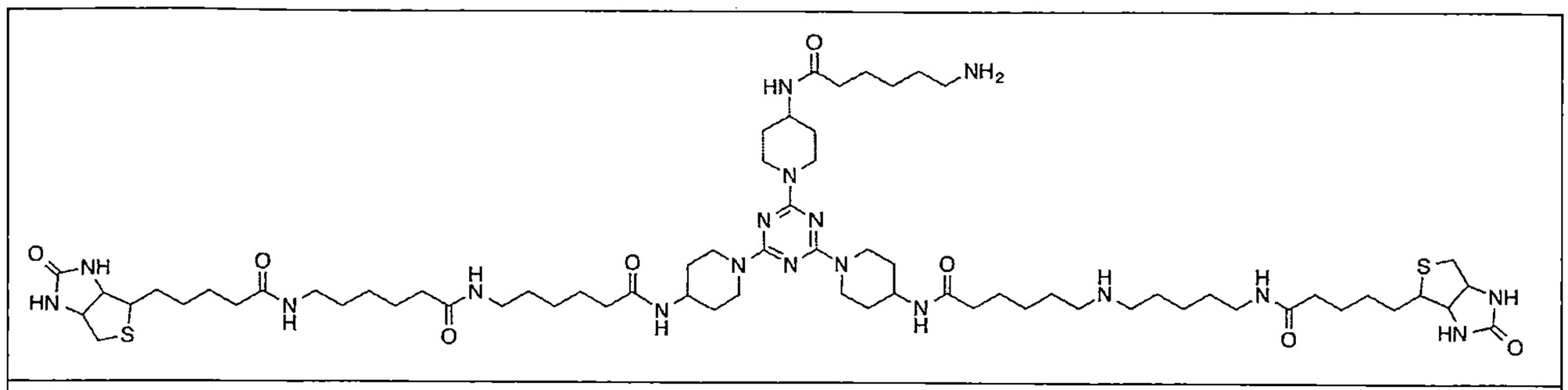

染料
NH
O
N
H
HN
O
N
O
N
O
N
O
N
O
N
染料
O
O
O

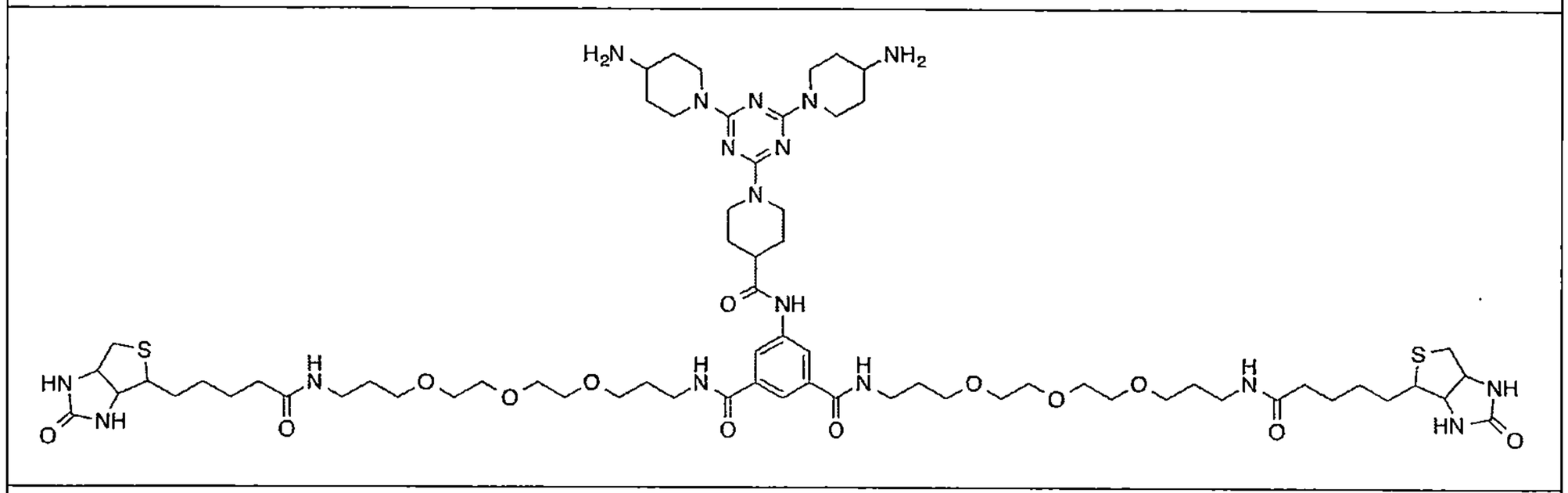


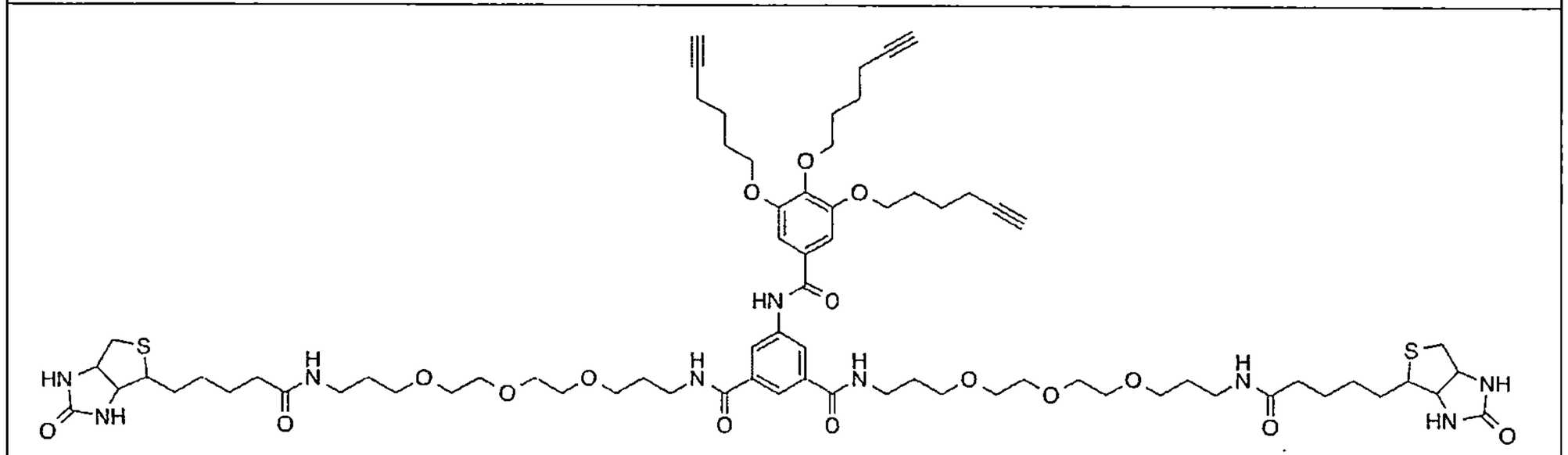


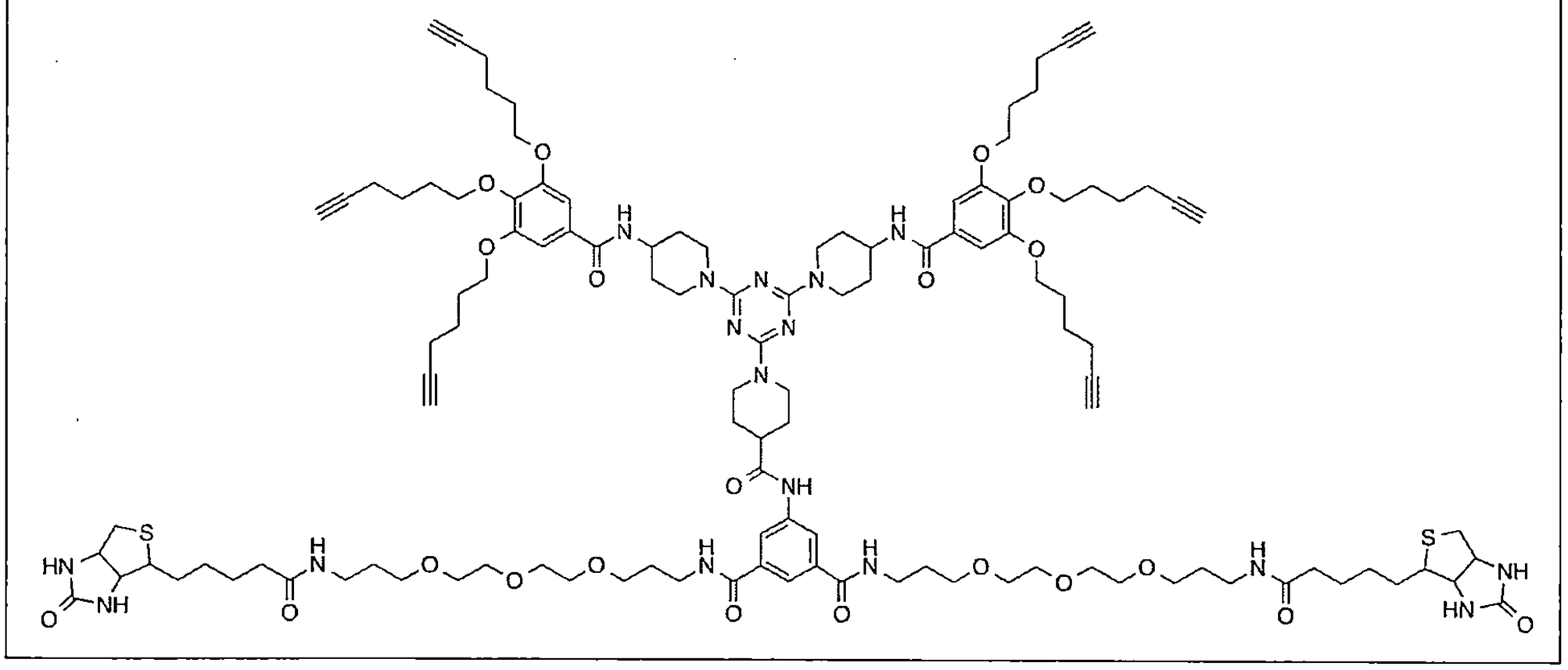


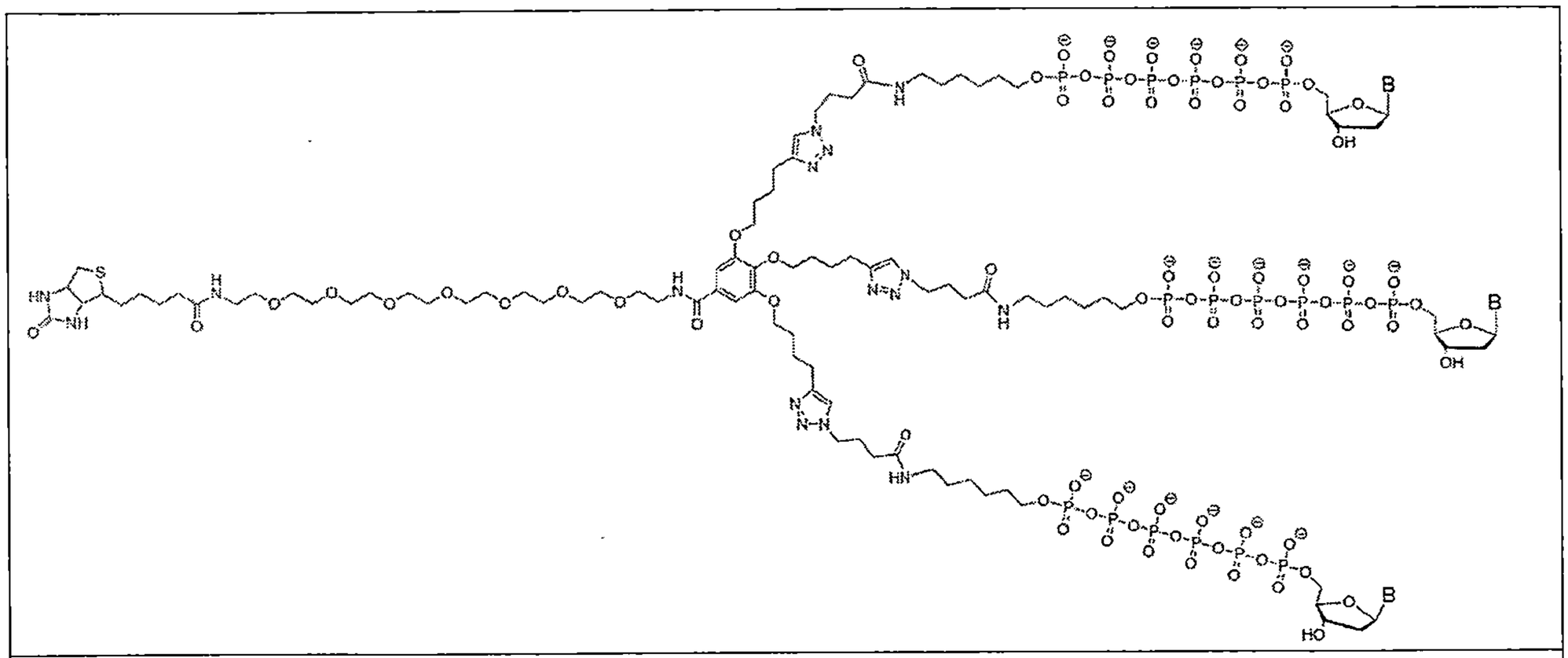


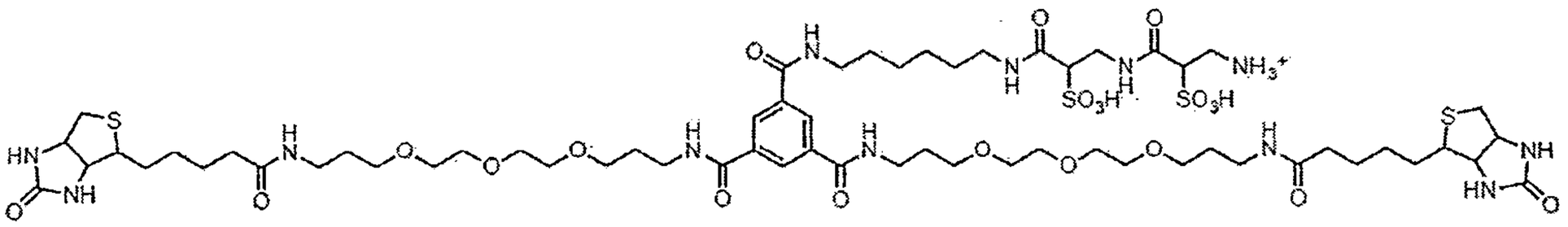


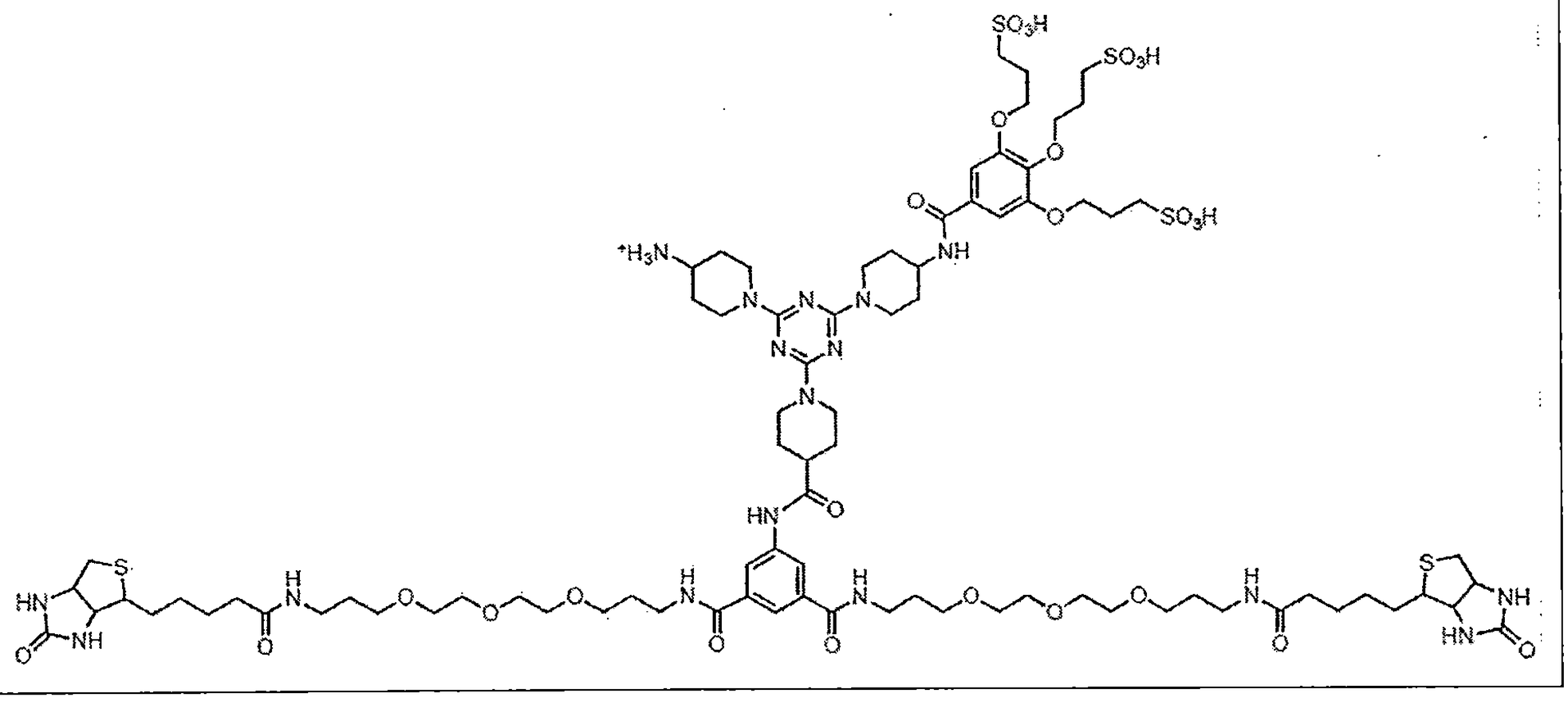






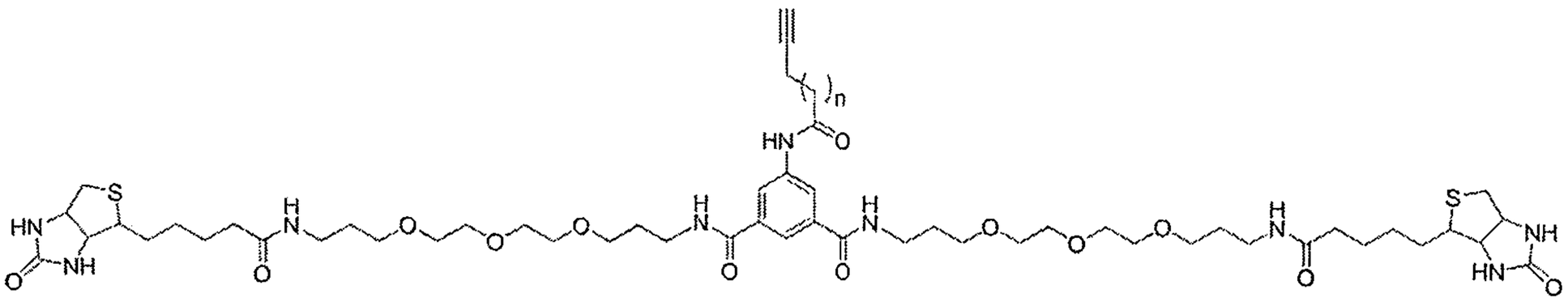
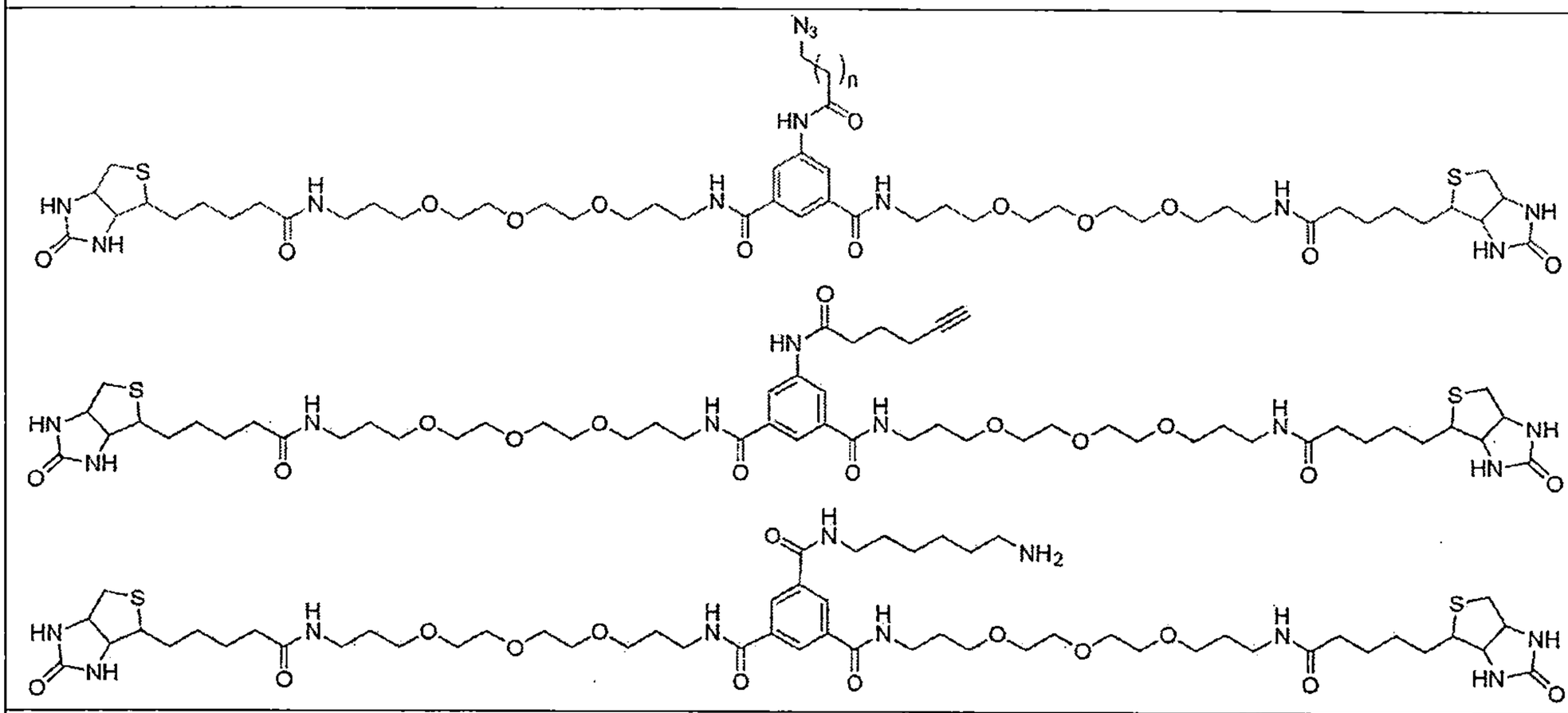
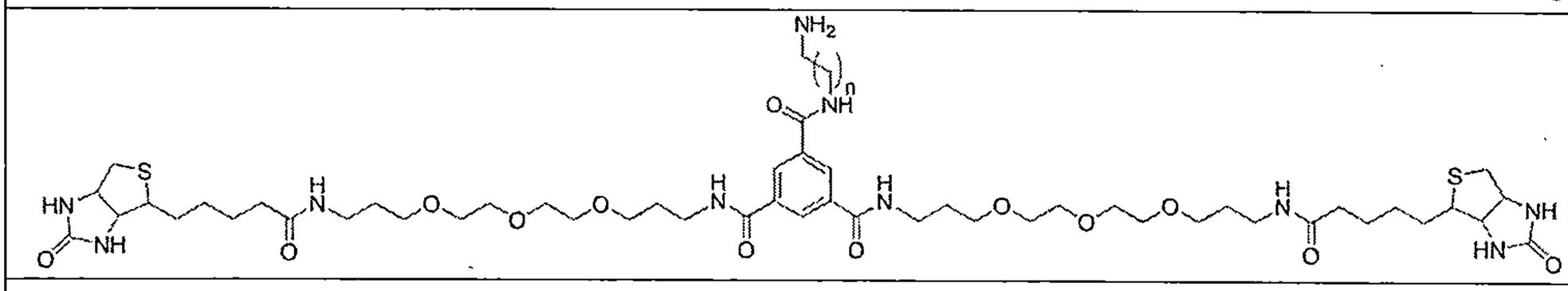
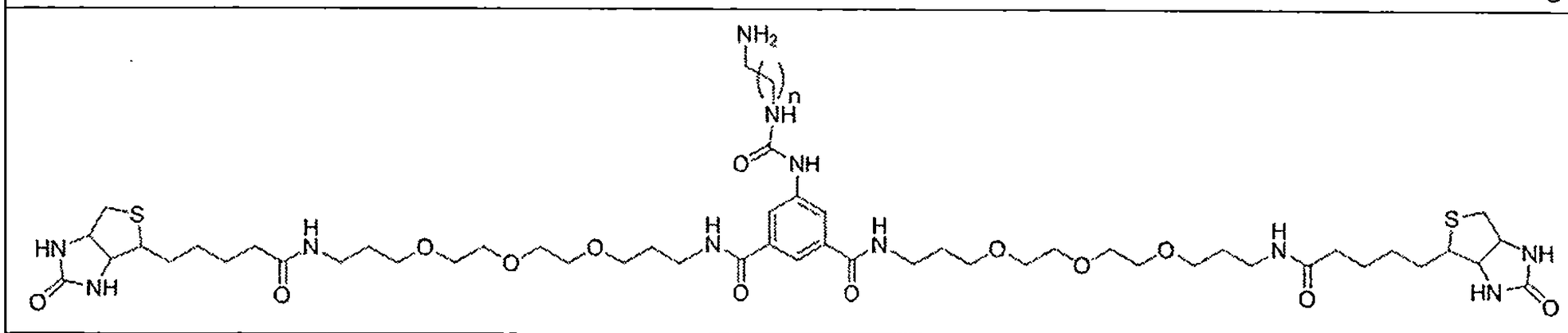
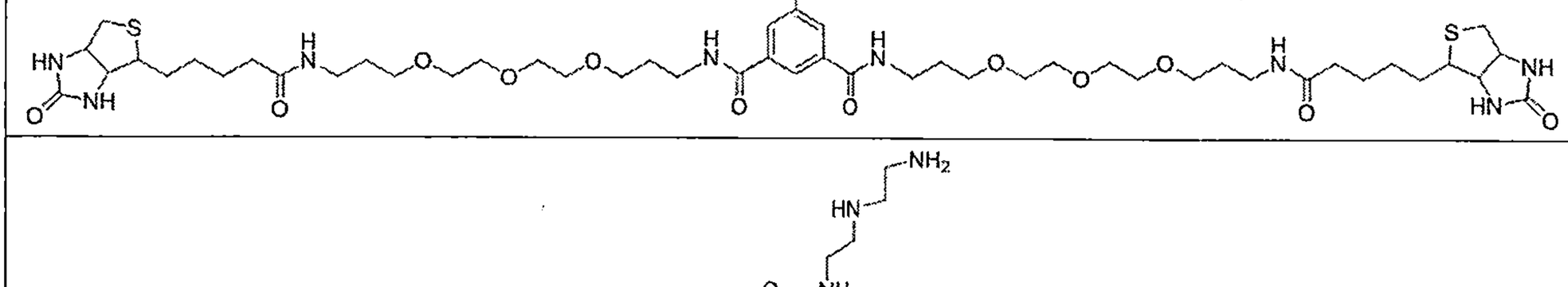
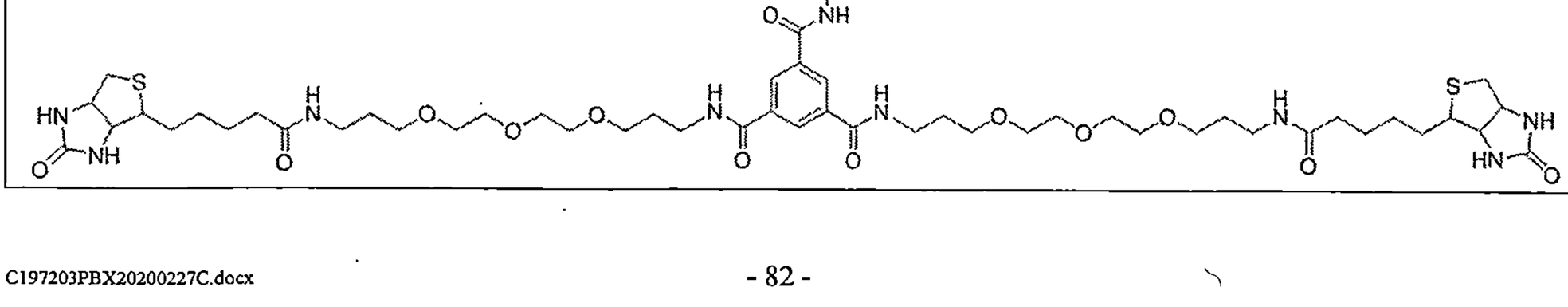


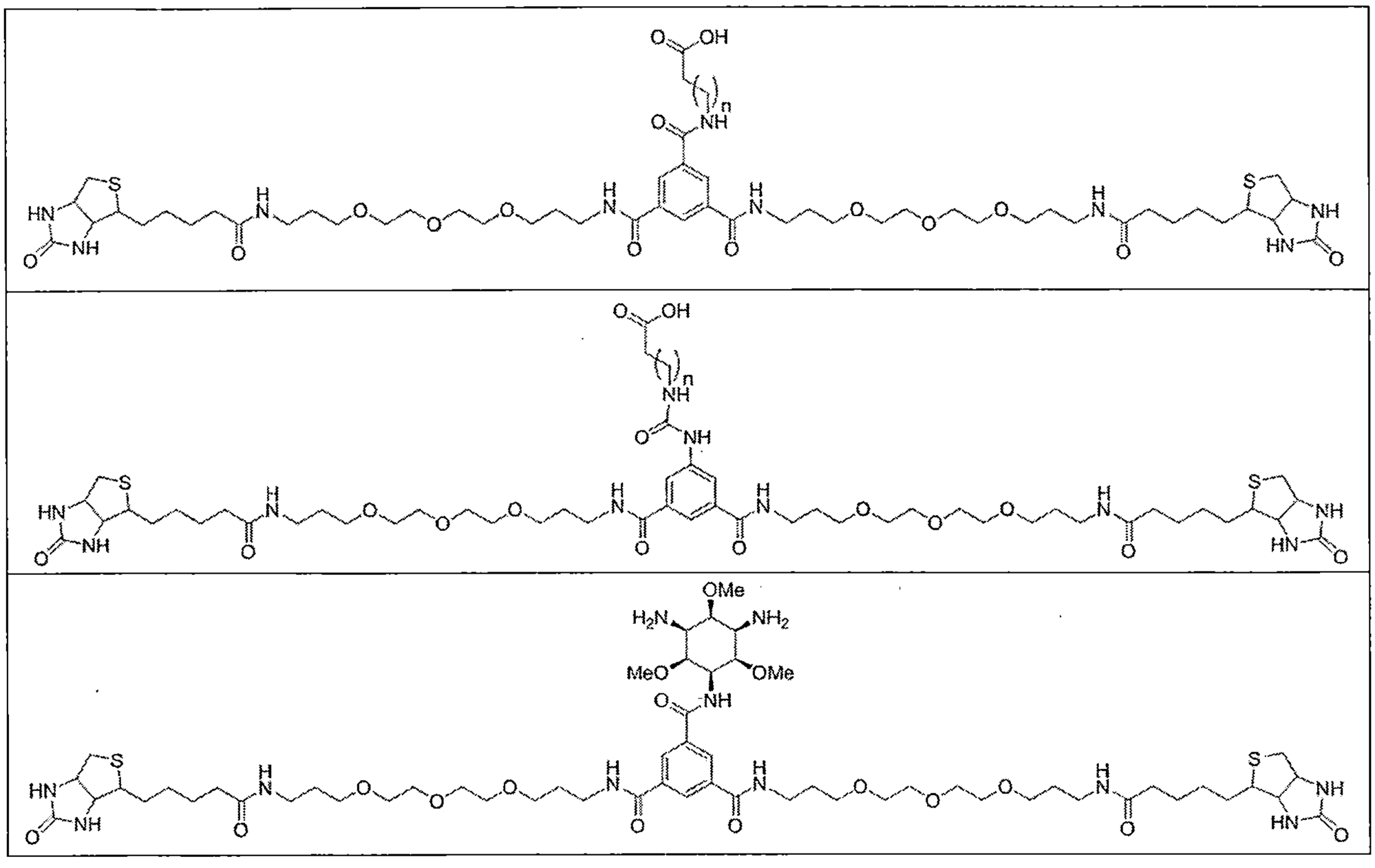




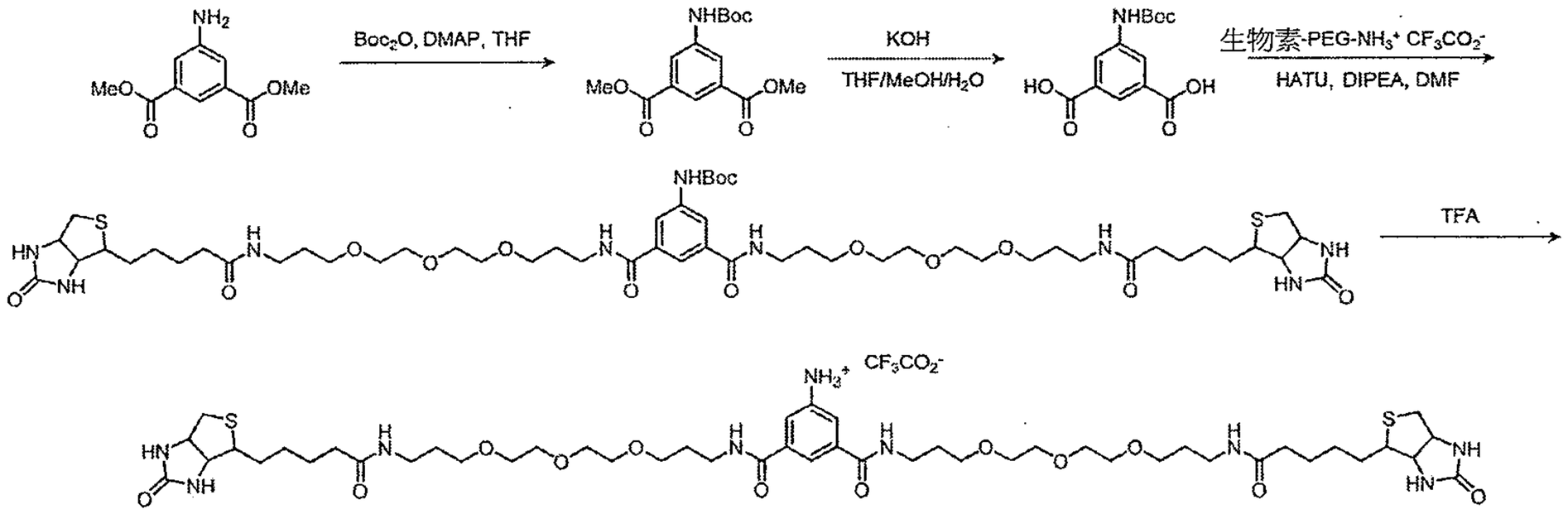
在一些實施例中，連接體係自包括第一層及視情況第二層及/或第三層之前體合成。在一些實施例中，「第一層」含有一或多種生物素部分。在某些實施例中，連接體之第一層含有單一生物素部分。在某些實施例中，連接體之第一層含有兩種生物素部分。在一些實施例中，第一層含有一或多種反應性部分(例如疊氮基、乙炔基團、羧基、胺基)。在一些實施例中，連接體之第一層係選自表5中所繪示之結構。

表5.實例性第一連接體層。

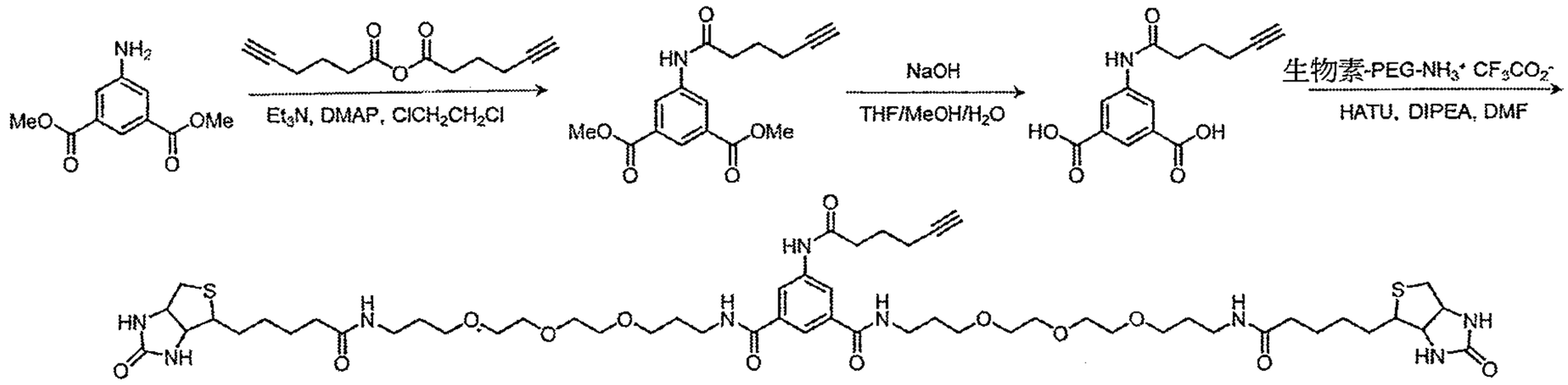
第一層







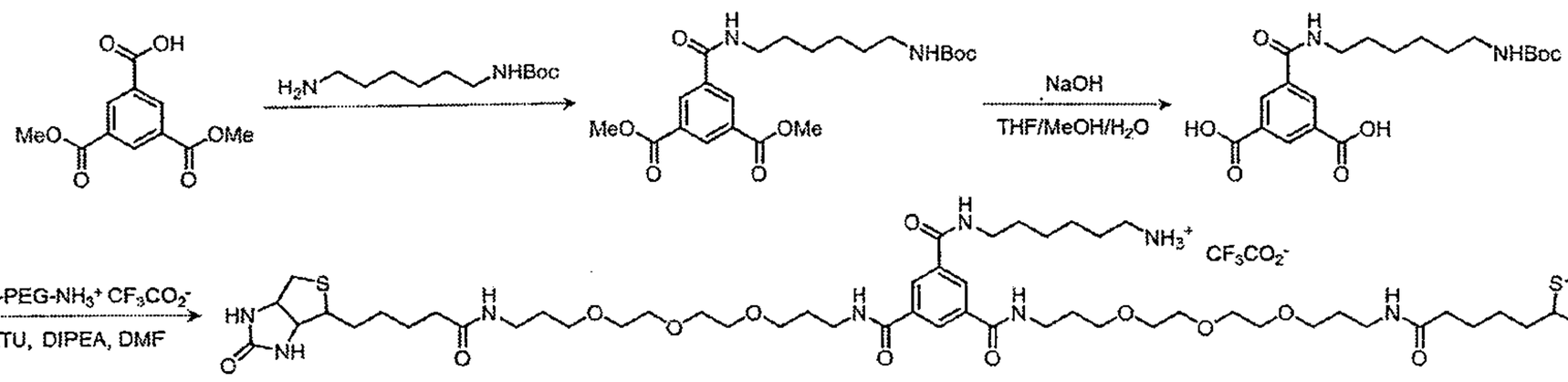
在一些實施例中，可根據下列實例性反應圖來合成連接體之第一層：



在其他實施例中，可根據下列實例性反應圖來合成連接體之第一層：

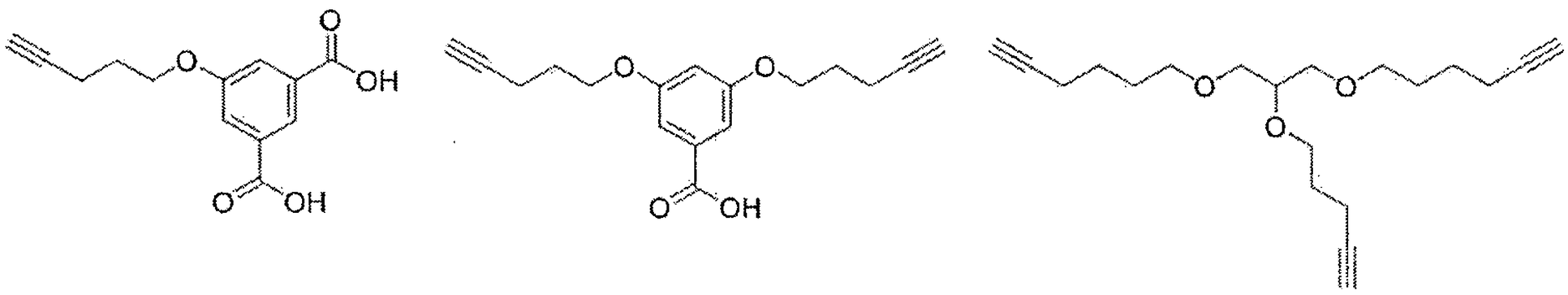


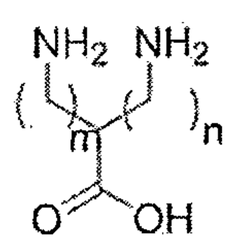
在其他實施例中，可根據下列實例性反應圖來合成連接體之第一層：

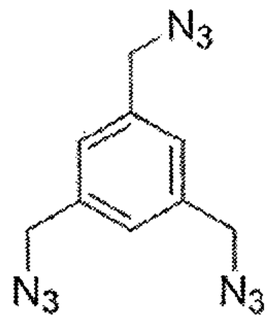


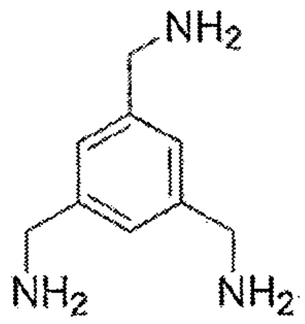
在一些實施例中，「第二層」含有一或多種反應性部分(例如疊氮基、乙炔基團、羧基、胺基)。在一些實施例中，第二層以共價方式附接至連接體之第一層。在一些實施例中，第二層以共價方式連結第一層與第三層。在一些實施例中，「第三層」含有一或多種反應性部分(例如疊氮基、乙炔基團、羧基、胺基)。在一些實施例中，第三層以共價方式附接至連接體之第一層。在一些實施例中，第三層經由第二層以共價方式連結至第一層。在一些實施例中，連接體包括第一層及第二層。在一些實施例中，連接體包括第一層及第三層。在一些實施例中，連接體包括第一層、第二層及第三層。在某些實施例中，第二及/或第三連接體層係選自表6中所繪示之結構。

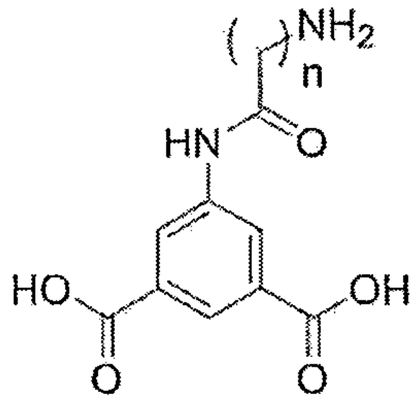
表6.實例性第二及第三連接體層。

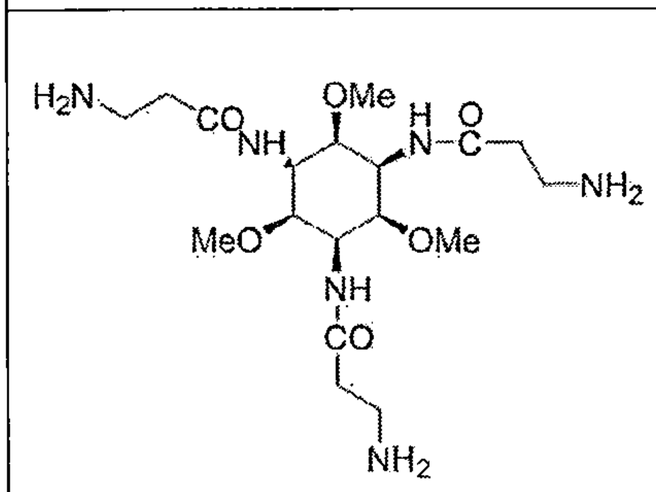
第二及第三層


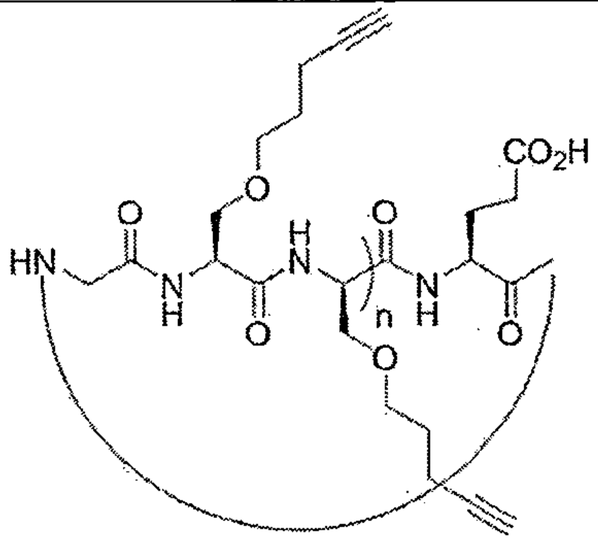


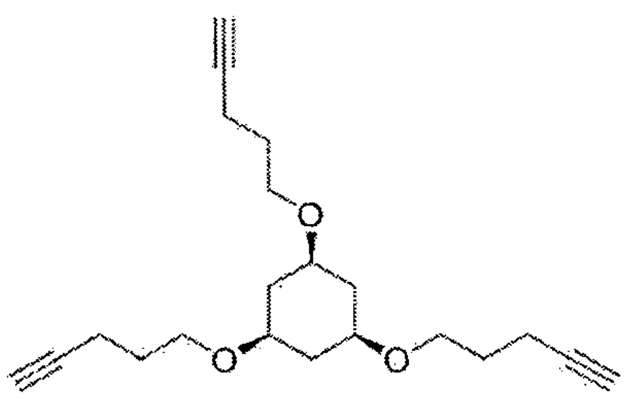




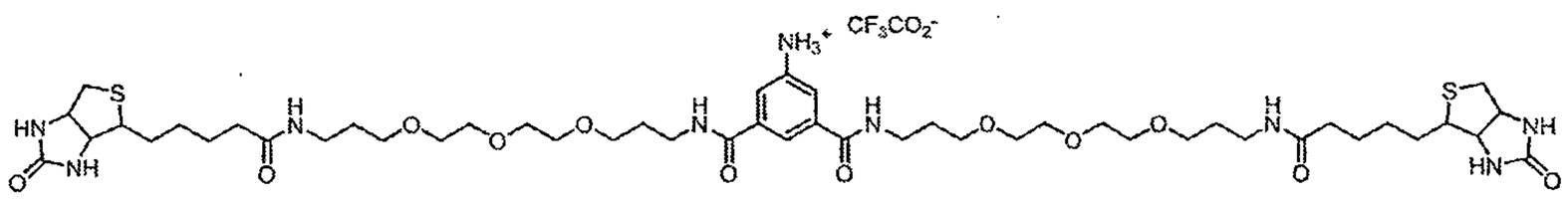


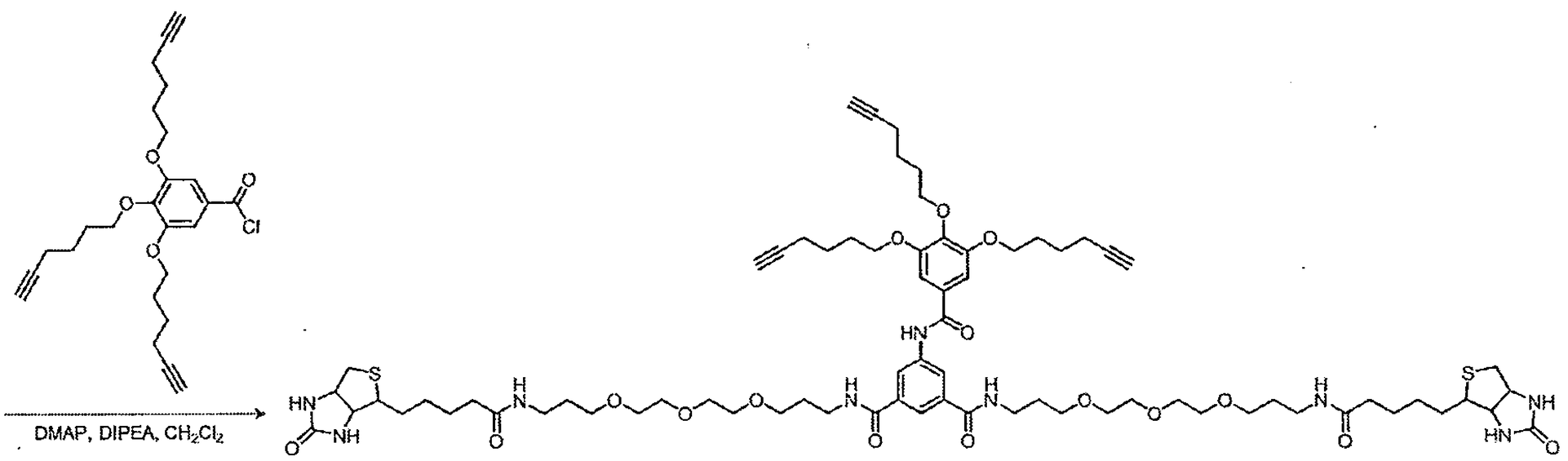




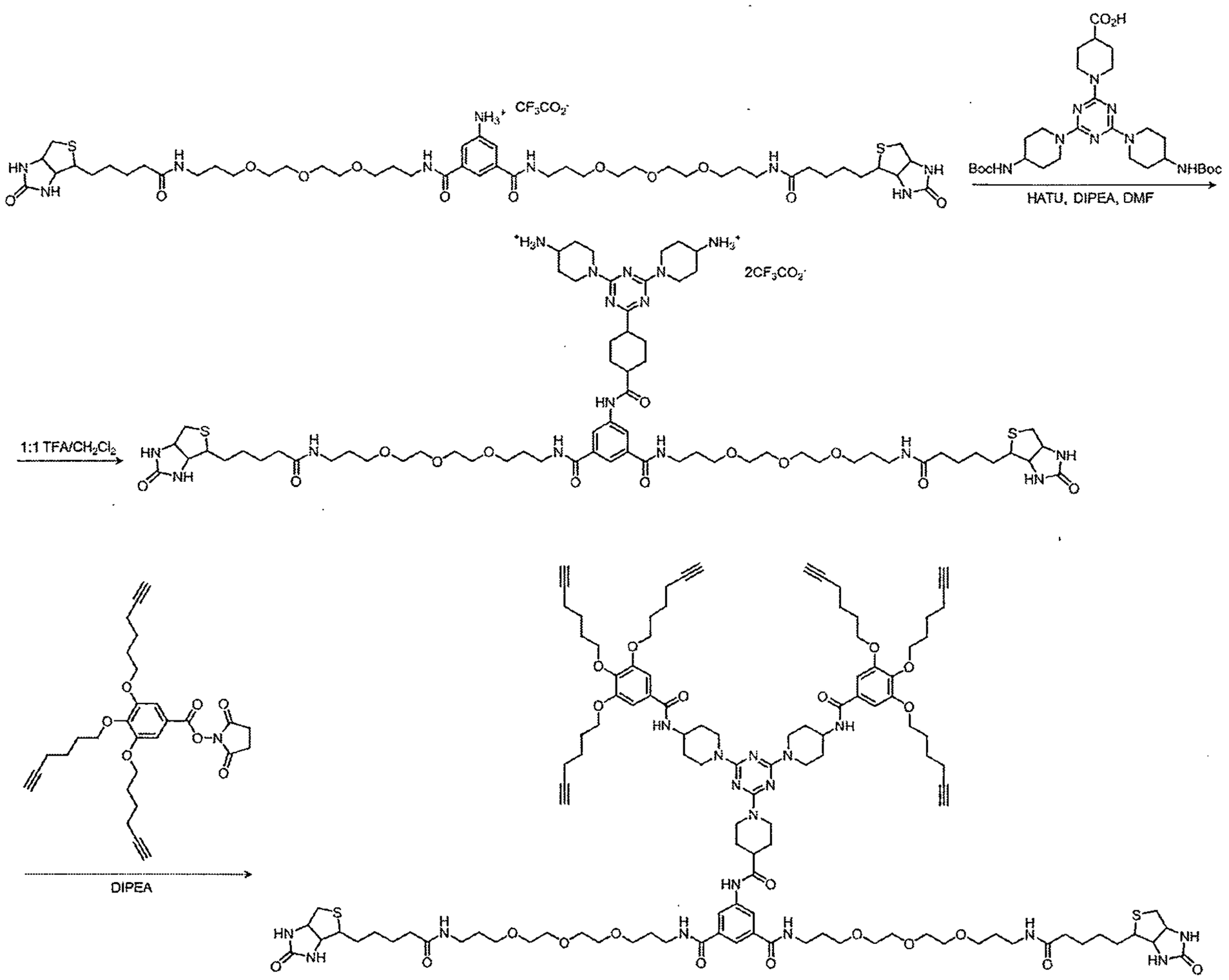


在一些實施例中，可根據下列實例性反應圖來合成包括超出第一層之層(例如第二層及/或第三層)之連接體：



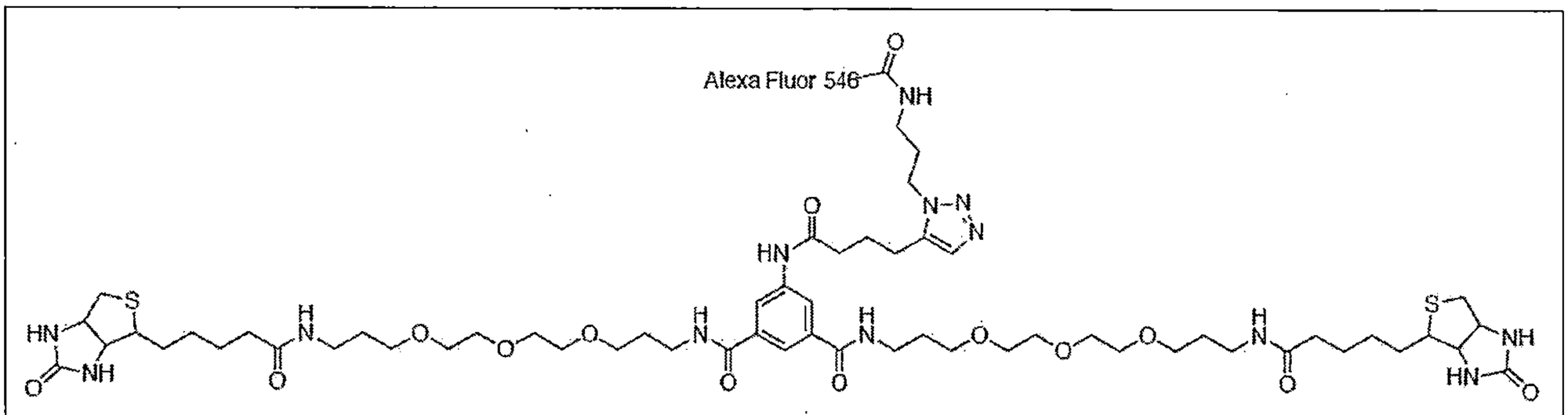
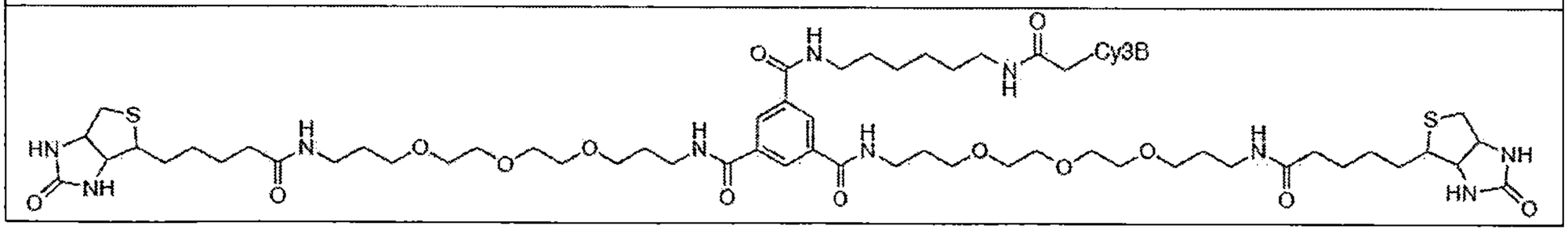


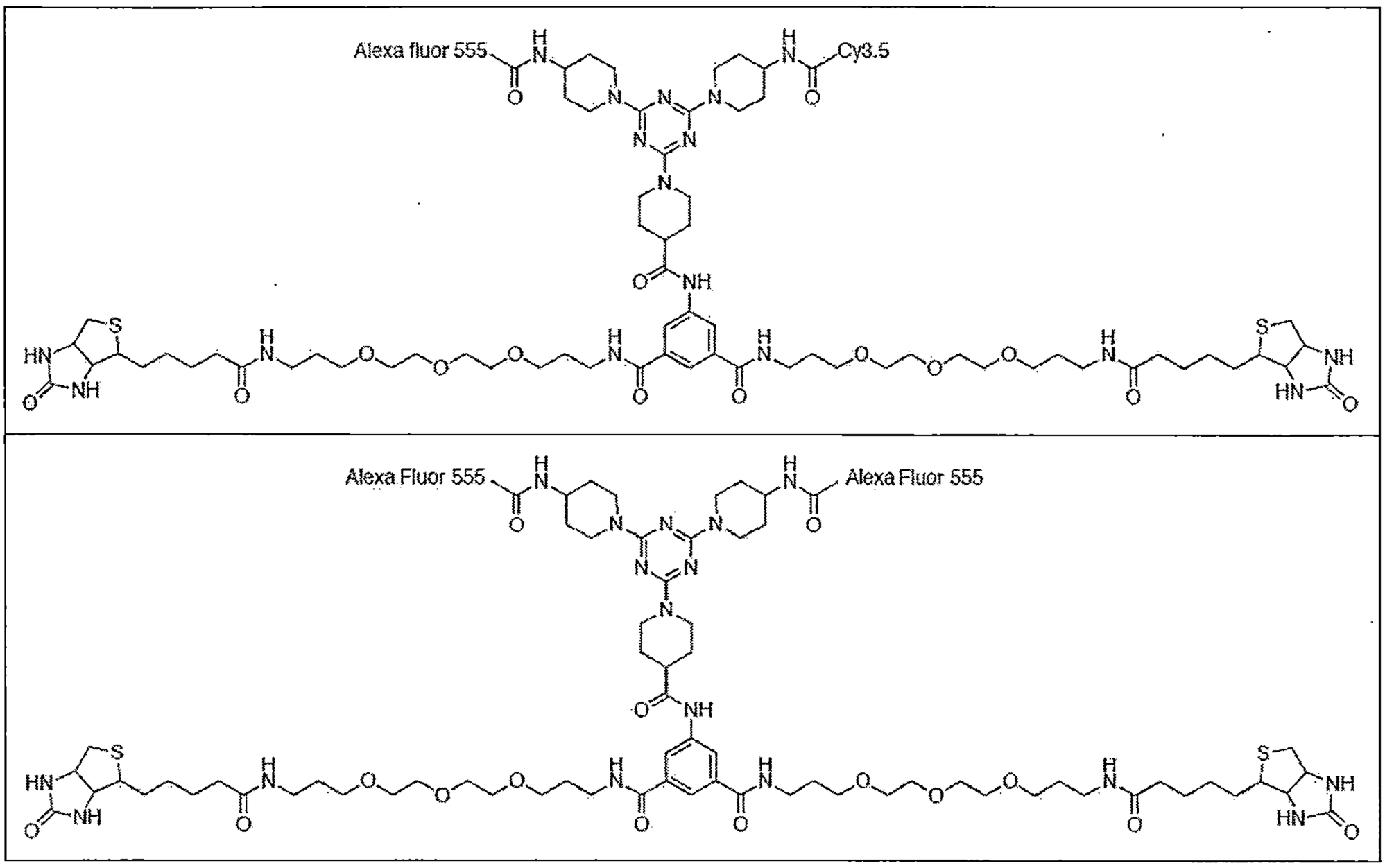
在一些實施例中，可根據下列實例性反應圖來合成至少包括第二層及第三層之連接體：



具有生物素化連接體之實例性發光標記展示於表7中。應瞭解，不同發光標記可代替表7中所繪示之染料。

表7.具有生物素化連接體之實例性發光標記。



試樣孔(例如奈米孔口)表面製備

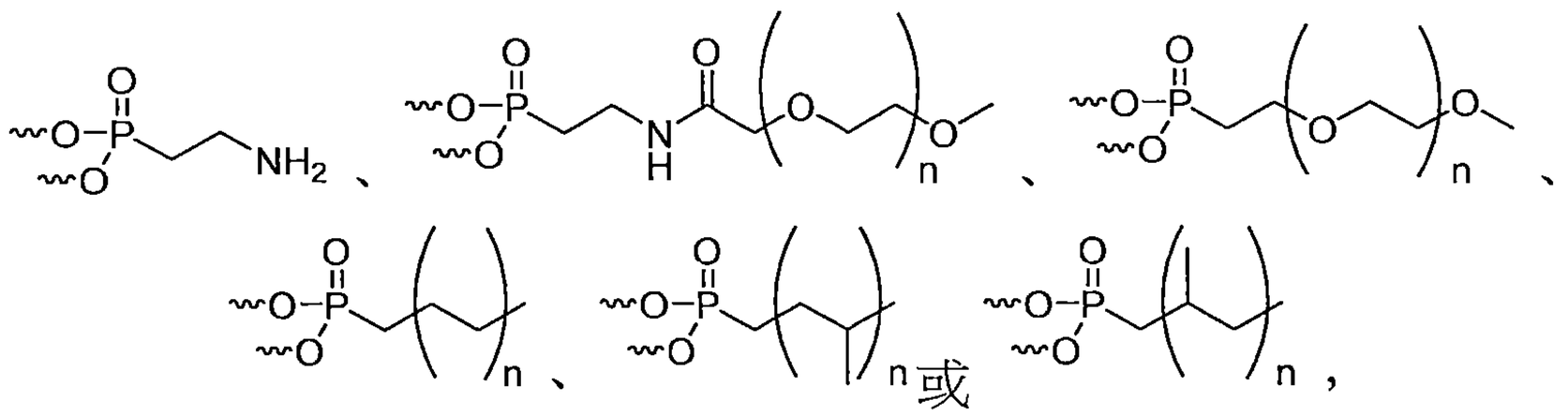
在某些實施例中，使用限定於靶容積(例如反應容積)中之分子來實施檢測一或多種經發光標記之分子之方法。在一些實施例中，靶容積係位於試樣孔(例如奈米孔口)內之區域。試樣孔(例如奈米孔口)及試樣孔(例如奈米孔口)之製作之實例闡述於本文其他處。在某些實施例中，試樣孔(例如奈米孔口)包括含有第一材料之底部表面及由複數個金屬或金屬氧化物層形成之側壁。在一些實施例中，第一材料係透明材料或玻璃。在一些實施例中，底部表面較為平坦。在一些實施例中，底部表面係彎曲孔。在一些實施例中，底部表面包含側壁中位於由複數個金屬或金屬氧化物層形成之側壁下方之一部分。在一些實施例中，第一材料係熔融矽石或二氧化矽。在一些實施例中，複數個層各自包括金屬(例如Al、Ti)或金屬氧化物(例如Al_2O_3、TiO_2、TiN)。

鈍化

在一或多種分子或複合物固定於底部表面上之實施例中，可期

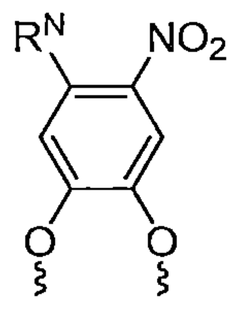
望鈍化側壁以防止側壁表面上之固定。在一些實施例中，藉由以下步驟來鈍化側壁：將金屬或金屬氧化物障壁層沈積於側壁表面上；且向障壁層上施加塗層。在一些實施例中，金屬氧化物障壁層包括氧化鋁。在一些實施例中，沈積步驟包括將金屬或金屬氧化物障壁層沈積於側壁表面及底部表面上。在一些實施例中，沈積步驟進一步包括自底部表面蝕刻掉金屬或金屬氧化物障壁層。

在一些實施例中，障壁層塗層包括膦酸酯基團。在一些實施例中，障壁層塗層包括具有烷基鏈之膦酸酯基團。在一些實施例中，烷基鏈包括具有1至20個碳原子之直鏈飽和烴基團。在一些實施例中，障壁層塗層包括己基膦酸(HPA)。在一些實施例中，障壁層塗層包括聚合膦酸酯。在一些實施例中，障壁層塗層包括聚乙烯基膦酸(PVPA)。在一些實施例中，障壁層塗層包括具有經取代烷基鏈之膦酸酯基團。在一些實施例中，烷基鏈包括一或多種醯胺。在一些實施例中，烷基鏈包括一或多個聚(乙二醇)鏈。在一些實施例中，塗層包括具有下式之膦酸酯基團：



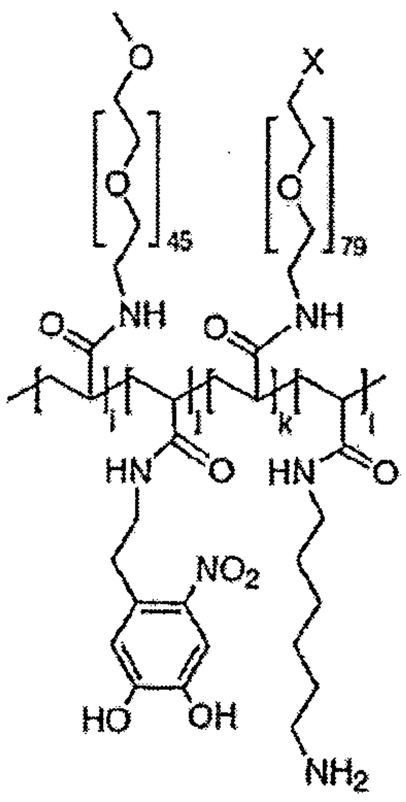
其中n係介於0與100之間之整數(包含此二者)，且〰係氫至表面之附接點。在一些實施例中，n係介於3與20之間之整數(包含此二者)。在一些實施例中，障壁層塗層包括不同類型之膦酸酯基團之混合物。在一些實施例中，障壁層塗層包括具有不同PEG重量之聚(乙二醇)鏈之膦酸酯基團之混合物。

在某些實施例中，障壁層包括硝基dopa基團。在某些實施例中，障壁層塗層包括下式之基團：



，

其中R^N係視情況經取代之烷基鏈且〰係氫或至表面之附接點。在一些實施例中，R^N包括聚合物。在一些實施例中，R^N包括聚(離胺酸)或聚(乙二醇)。在一些實施例中，障壁層包括含有離胺酸單體之聚(離胺酸)之共聚物，其中離胺酸單體獨立地包括PEG、硝基dopa基團、膦酸酯基團或一級胺。在某些實施例中，障壁層包括式(**P**)之聚合物：



(P)。

在一些實施例中，X係-OMe、生物素基團、膦酸酯或矽烷。在一些實施例中，i、j、k及l中之每一者獨立地係介於0與100之間之整數(包含此二者)。

圖8繪示鈍化金屬氧化物表面之兩種方法。在8-1中，使用(2-胺基乙基)膦酸處理金屬氧化物表面，從而提供經(2-胺基乙基)膦酸酯基團塗覆之表面。在第二鈍化步驟中，使用聚(乙二醇) NHS酯處理表面。NHS酯與表面膦酸酯基團之胺基團形成醯胺鍵以形成經PEG官能化膦酸酯基團塗覆之表面。在8-2中，使用PEG官能化膦酸處理金屬氧化物表面以在一個步驟中提供經PEG官能化膦酸酯基團塗覆之表面。實例性實施例8-2進一步繪示添加第二PEG官能化膦酸以提供經

兩類PEG官能化膦酸酯基團塗覆之表面。在此實例中，第一PEG膦酸具有550之平均分子量，且第二PEG膦酸具有180之平均分子量。如所繪示，較短PEG鏈膦酸可幫助填充表面塗層中在使用具有較長PEG鏈之初始PEG膦酸處理之後保留之間隙。

聚合酶固定

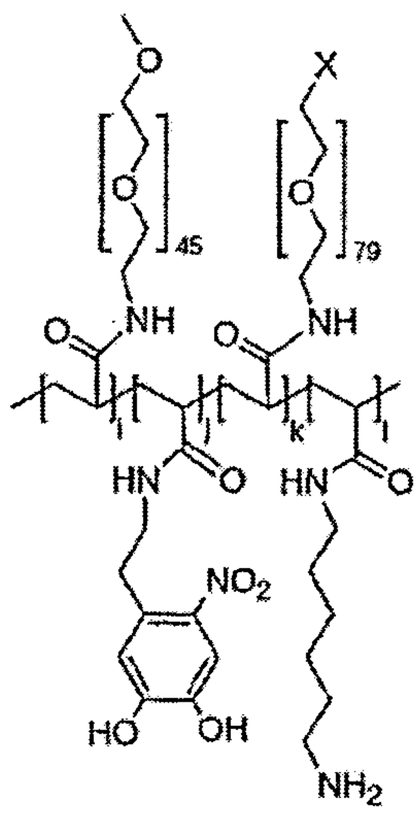
在一或多種分子或複合物固定於底部表面上之實施例中，可期望對底部表面實施官能化以容許附接一或多種分子或複合物。在某些實施例中，底部表面包括透明玻璃。在某些實施例中，底部表面包括熔融矽石或二氧化矽。在一些實施例中，底部表面經矽烷官能化。在一些實施例中，底部表面經離子帶電聚合物官能化。在一些實施例中，離子帶電聚合物包括聚(離胺酸)。在一些實施例中，底部表面經聚(離胺酸)-接枝-聚(乙二醇)官能化。在一些實施例中，底部表面經生物素化牛血清白蛋白(BSA)官能化。

在某些實施例中，底部表面經包括硝基dopa基團之塗層官能化。在某些實施例中，塗層包括下式之基團：



，

其中R^N係視情況經取代之烷基鏈且〰係氫或至表面之附接點。在一些實施例中，R^N包括聚合物。在一些實施例中，R^N包括聚(離胺酸)或聚(乙二醇)。在一些實施例中，R^N包括生物素化聚(乙二醇)。在一些實施例中，塗層包括具有離胺酸單體之聚(離胺酸)之共聚物，其中離胺酸單體獨立地包括PEG、生物素化PEG、硝基dopa基團、膦酸酯基團或矽烷。在某些實施例中，塗層包括具有式(**P**)之聚合物：



(P)。

在一些實施例中，X係-OMe、生物素基團、膦酸酯或矽烷。在一些實施例中，i、j、k及l中之每一者獨立地係介於0與100之間之整數(包含此二者)。

在一些實施例中，底部表面經包括烷基鏈之矽烷官能化。在一些實施例中，底部表面經包括視情況經取代之烷基鏈之矽烷官能化。在一些實施例中，底部表面經包括聚(乙二醇)鏈之矽烷官能化。在一些實施例中，底部表面經包括偶合基團之矽烷官能化。舉例而言，偶合基團可包括化學部分，例如胺基團、羧基、羥基、硫氫基、金屬、螯合劑及諸如此類。或者，其可包含特異性結合要素，例如生物素、抗生物素蛋白、鏈黴抗生物素蛋白、奈特拉唯丁、凝集素、SNAP-tags™或其受質、締合或結合肽或蛋白質、抗體或抗體片段、核酸或核酸類似物或諸如此類。另外或或者，偶合基團可用於偶合用於偶合或結合所關注分子之額外基團，所關注分子可在一些情形下包含化學官能基及特異性結合要素。舉例而言，可將偶合基團(例如生物素)沈積於受質表面上且在給定區域中選擇性活化。然後可使中間體結合劑(例如鏈黴抗生物素蛋白)偶合至第一偶合基團。所關注分子(其在此特定實例中經生物素化)然後偶合至鏈黴抗生物素蛋白。

在一些實施例中，底部表面經包括生物素或其類似物之矽烷官

能化。在一些實施例中，底部表面經包括聚(乙)二醇鏈之矽烷官能化，其中聚(乙二醇)鏈包括生物素。在某些實施例中，底部表面經矽烷混合物官能化，其中至少一類矽烷包括生物素且至少一類矽烷並不包括生物素。在一些實施例中，混合物包括比並不包括生物素之矽烷小約10倍、小約25倍、小約50倍、小約100倍、小約250倍、小約500倍或小約1000倍之生物素化矽烷。

圖9繪示生成官能化玻璃底部表面之兩種實例性途徑。在上方之途徑中，將玻璃表面暴露於PEG-矽烷及生物素化-PEG-矽烷之250:1比率之混合物中。在下方之途徑中，將玻璃表面首先暴露於異氰酸基-丙基-三乙氧基矽烷(IPTES)。異氰酸酯基團與PEG-胺及生物素化-PEG-胺之混合物之反應形成尿素鍵且得到PEG及生物素化-PEG鏈經由矽烷基團附接至表面之表面。

圖7繪示自所製作晶片製備試樣孔表面以引發定序反應之非限制性實例性製程。試樣孔繪示為具有底部表面(非陰影矩形)及側壁(陰影垂直矩形)。側壁可包括多個層(例如Al、Al_2O_3、Ti、TiO_2、TiN)。在步驟(a)中，使用Al_2O_3障壁層沈積側壁。然後在步驟(b)中(例如)藉由使用一或多種PEG-膦酸處理表面來使用PEG膦酸酯基團塗覆Al_2O_3障壁層。在步驟(c)中，使用(例如)PEG-矽烷及生物素化-PEG-矽烷之混合物對底部表面實施官能化。卵形代表可提供用於附接單一分子或複合物(例如聚合酶複合物)之位點之個別生物素基團。在步驟(d)中，將聚合酶複合物附接至底部表面上之生物素基團上。聚合酶可藉助結合劑(例如鏈黴抗生物素蛋白)及聚合酶複合物上之生物素標籤進行附接。聚合酶複合物可進一步包括模板核酸及引子(未展示)。步驟(e)繪示藉由將經固定聚合酶複合物暴露於經發光標記之核苷酸來引發定序反應。

可藉由將聚合酶複合物暴露於結合混合物中之官能化表面上來

將複合物固定於表面上。在一些實施例中，結合混合物包括一或多種鹽。在一些實施例中，鹽包括乙酸鉀。在一些實施例中，鹽包括氯化鈣。在一些實施例中，鹽係以介於約1 mM與約10 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，鹽係以介於約10 mM與約50 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，鹽係以介於約50 mM與約100 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，鹽係以介於約100 mM與約250 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，乙酸鉀之濃度約為75 mM。在一些實施例中，氯化鈣之濃度約為10 mM。在一些實施例中，結合混合物包括還原劑。在一些實施例中，還原劑包括二硫蘇糖醇(DTT)。在一些實施例中，還原劑係以介於約1 mM與約20 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，二硫蘇糖醇之濃度約為5 mM。在一些實施例中，結合混合物包括緩衝劑。在一些實施例中，緩衝劑包括MOPS。在一些實施例中，緩衝劑係以介於約10 mM與約100 mM之間之濃度存在。在一些實施例中，MOPS之濃度約為50 mM。在一些實施例中，緩衝劑係以介於約5.5與約6.5之間之pH存在。在一些實施例中，緩衝劑係以介於約6.5與約7.5之間之pH存在。在一些實施例中，緩衝劑係以介於約7.5與約8.5之間之pH存在。在一些實施例中，結合混合物包括三磷酸去氧核苷酸(dNTP)。在一些實施例中，三磷酸去氧核苷酸係以介於250 nM與10 μM之間之濃度存在。在一些實施例中，dNTP之濃度約為2 μM。在一些實施例中，結合混合物包括表面活性劑。在一些實施例中，表面活性劑係Tween表面活性劑(例如Tween 20)。在一些實施例中，表面活性劑係以介於約0.01%與約0.1%之間之容積百分比存在。在一些實施例中，Tween之容積百分比約為0.03%。

聚合酶

本文所用之術語「聚合酶」通常係指任一能夠催化聚合反應之酶(或聚合酶)。聚合酶之實例包含(但不限於)核酸聚合酶、轉錄酶或

連接酶。聚合酶可為聚合酶。

關於單一分子核酸延伸(例如關於核酸定序)之實施例可使用任一能夠合成與靶核酸分子互補之核酸之聚合酶。在一些實施例中，聚合酶可為DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆轉錄酶及/或其一或多者之突變體或改變形式。

聚合酶之實例包含(但不限於) DNA聚合酶、RNA聚合酶、熱穩定聚合酶、野生型聚合酶、經修飾聚合酶、大腸桿菌(E. coli) DNA聚合酶I、T7 DNA聚合酶、噬菌體T4 DNA聚合酶φ29 (φ29) DNA聚合酶、Taq聚合酶、Tth聚合酶、Tli聚合酶、Pfu聚合酶、Pwo聚合酶、VENT聚合酶、DEEPVENT聚合酶、EX-Taq聚合酶、LA-Taq聚合酶、Sso聚合酶、Poc聚合酶、Pab聚合酶、Mth聚合酶、ES4聚合酶、Tru聚合酶、Tac聚合酶、Tne聚合酶、Tma聚合酶、Tca聚合酶、Tih聚合酶、Tfi聚合酶、鉑Taq聚合酶、Tbr聚合酶、Tfl聚合酶、Tth聚合酶、Pfutubo聚合酶、Pyrobest聚合酶、Pwo聚合酶、KOD聚合酶、Bst聚合酶、Sac聚合酶、Klenow片段、具有3’ - 5’外核酸酶活性之聚合酶及其變體、修飾產物及衍生物。在一些實施例中，聚合酶係單一亞單位聚合酶。DNA聚合酶及其性質之非限制性實例尤其詳細闡述於DNA Replication第2版，Kornberg及Baker, W. H. Freeman, New York, N.Y. (1991)。

在靶核酸之核鹼基與互補dNTP之間發生鹼基配對後，聚合酶藉由在新近合成股之3’羥基端與dNTP之α磷酸酯之間形成磷酸二酯鍵來將dNTP納入新近合成之核酸股中。在偶聯至dNTP之發光標籤係螢光團之實例中，藉由激發來針對其存在產生信號且在納入步驟期間或之後檢測發射脈衝。為檢測偶聯至dNTP之末端(γ)磷酸酯之標記，將dNTP納入新近合成股中會釋放β及γ磷酸酯及檢測標記，檢測標記自由擴散至試樣孔中，從而使得自螢光團檢測之發射有所降低。

在一些實施例中，聚合酶係具有高持續力之聚合酶。然而，在一些實施例中，聚合酶係具有減小之持續力之聚合酶。聚合酶持續力通常係指聚合酶連續將dNTP納入核酸模板中而不釋放核酸模板之能力。

在一些實施例中，聚合酶係具有低5'-3'外核酸酶活性及/或3'-5'外核酸酶活性之聚合酶。在一些實施例中，對聚合酶進行修飾(例如藉由胺基酸取代)以相對於相應野生型聚合酶具有減小之5'-3'外核酸酶活性及/或3'-5'活性。DNA聚合酶之其他非限制性實例包含9°Nm™ DNA聚合酶(New England Biolabs)及Klenow外-聚合酶之P680G突變體(Tuske等人(2000) JBC 275(31):23759-23768)。在一些實施例中，具有減小之持續力之聚合酶會增加對含有一或多個核苷酸片段(例如相同類型之兩個或更多個連續鹼基)之模板進行定序的準確度。

在一些實施例中，聚合酶係較非標記核酸對經標記核苷酸具有較高親和力之聚合酶。

關於單一分子RNA延伸(例如關於RNA定序)之實施例可使用任一能夠自RNA模板合成互補DNA (cDNA)之逆轉錄酶。在該等實施例中，逆轉錄酶可以類似於聚合酶之方式發揮作用，其中可經由將dNTP納入複性至RNA模板之逆轉錄引子中自RNA模板來合成cDNA。cDNA然後可參與定序反應且如上文及本文其他處所闡述來測定其序列。然後可使用cDNA之所測定序列經由序列互補性來測定原始RNA模板之序列。逆轉錄酶之實例包含莫洛尼鼠類白血病病毒逆轉錄酶(Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase，M-MLV)、禽類成髓細胞瘤病毒(AMV)逆轉錄酶、人類免疫缺失病毒逆轉錄酶(HIV-1)及端粒酶逆轉錄酶。

熟習此項技術者可藉由突變或相對於相應野生型聚合酶之其他修飾來增加或降低不同類型核酸之持續力、外核酸酶活性、相對親和

力或核酸聚合酶之其他性質。

模板

本發明提供用於檢測生物分子或其亞單位(例如核酸分子)之器件、系統及方法。該檢測可包含定序。可自獲得自個體(例如人類或其他個體)之生物試樣提取生物分子。在一些實施例中，個體可為患者。在一些實施例中，可檢測靶核酸及/或定序以用於診斷、預後及/或治療目的。在一些實施例中，關於定序分析之資訊可用於輔助疾病或病狀之診斷、預後及/或治療。在一些實施例中，個體可懷疑患有健康病狀，例如疾病(例如癌症)。在一些實施例中，個體可經歷疾病治療。

在一些實施例中，可自個體之體液或組織(例如呼吸、唾液、尿液、血液(例如全血或血漿)、糞便或其他體液或生檢試樣)來提取生物試樣。在一些實例中，自個體之體液或組織提取一或多種核酸分子。可自獲得自個體(例如個體組織之一部分)或獲得自個體之無細胞體液(例如全血)之一或多種細胞來提取一或多種核酸。

可在製備中處理生物試樣以用於檢測(例如定序)。該處理可包含自生物試樣分離生物分子(例如核酸分子)及/或純化且生成生物分子之更多拷貝。在一些實例中，自個體之體液或組織分離一或多種核酸分子且純化，且經由核酸擴增(例如聚合酶鏈式反應(PCR))進行擴增。然後，可(例如)經由定序來鑑別一或多種核酸分子或其亞單位。然而，在一些實施例中，可如本申請案中所闡述無需擴增即評估(例如定序)核酸試樣。

如本申請案中所闡述，定序可包含藉由以下方式來測定模板生物分子(例如核酸分子)之個別亞單位：合成與模板互補或類似之另一生物分子(例如藉由合成與模板核酸分子互補之核酸分子)且鑑別隨時間變化之核苷酸納入(例如藉由合成進行定序)。或者，定序可包含直

接鑑別生物分子之個別亞單位。

在定序期間，可將指示生物分子之個別亞單位之信號收集於記憶體中且即時或在稍後時間點處理以測定生物分子之序列。該處理可包含對比該等信號與參考信號以使得能夠鑑別個別亞單位，此在一些情形下將產生讀段。讀段可為具有足夠長度(例如至少約30、50、100個鹼基對(bp)或更多)之序列，其可用於鑑別較大序列或區域，例如可比對至染色體或基因體區域或基因上之位置。

可使用序列讀段來重構個體基因體之較長區域(例如藉由比對)。可使用讀段來重構染色體區、全染色體或全基因體。可使用序列讀段或自該等讀段生成之較大序列來分析個體基因體(例如鑑別變體或多型性)。變體之實例包含(但不限於)單核苷酸多型性(SNP) (包含串聯SNP)、小規模多鹼基缺失或插入(亦稱為indel或缺失插入多型性(DIP))、多核苷酸多型性(MNP)、短串聯重複(STR)、缺失(包含微缺失)、插入(包含微插入)、結構變化形式(包含複製、倒轉、易位、倍增、複合多位點變體、拷貝數變化形式(CNV))。基因體序列可包括變體組合。舉例而言，基因體序列可涵蓋一或多種SNP及一或多種CNV之組合。

術語「基因體」通常係指生物體之遺傳性資訊之整體。基因體可編碼於DNA或RNA中。基因體可包括編碼蛋白質之編碼區以及非編碼區。基因體可包含所有染色體一起在生物體中之序列。舉例而言，人類基因體具有總共46條染色體。所有該等染色體之序列一起構成人類基因體。在一些實施例中，測定整個基因體之序列。然而，在一些實施例中，用於基因體子組(例如一種或數種染色體或其區域)或用於一種或數種基因(或其片段)之序列資訊足以用於診斷、預後及/或治療應用。

可完成複數個單股靶核酸模板之核酸定序，其中可使用多個試

樣孔(例如奈米孔口)，如本文其他處所闡述器件中之情形。每一試樣孔可提供有單股靶核酸模板且可在每一試樣孔中完成定序反應。可使每一試樣孔在引子延伸反應期間與核酸合成所需之適當試劑(例如dNTP、定序引子、聚合酶、輔因子、適當緩衝劑等)接觸且可在每一試樣孔中進行定序反應。在一些實施例中，使多個試樣孔同時與所有適當dNTP接觸。在其他實施例中，使多個試樣孔與每一適當dNTP單獨接觸且在與不同dNTP接觸之間各自進行洗滌。可在每一試樣孔中檢測所納入dNTP且如本文其他處所闡述測定每一試樣孔中之單股靶核酸之序列。

儘管一些實施例可涉及藉由檢測樣品中之單一分子進行診斷測試，但發明者亦已認識到，可使用本發明之單一分子檢測能力來實施(例如)基因之一或多種核酸區段之多肽(例如蛋白質)定序或核酸(例如DNA、RNA)定序。

裝置之概述

發明者已進一步認識到且瞭解，用於檢測及定量單一分子或顆粒之小型高速裝置可減小實施生物及/或化學試樣之複合定量量測之成本且快速推進生物化學技術發現之速率。此外，可易於運輸之成本有效性器件不僅可轉變在已開發國家實施生物分析之方式，且亦在開發中國家首次達成可明顯改良人們之健康及幸福之基本診斷測試。舉例而言，本文所闡述之實施例可用於血液、尿液及/或唾液之診斷測試中，該等診斷測試可在開發中國家由個體在其家中使用，或由醫生在遠程診療所中使用。

具有大量像素(例如數百、數千、數百萬或更多)之像素化感測器器件使得可平行檢測複數種個別分子或顆粒。該等分子可為(舉例而言且並不加以限制)蛋白質及/或DNA。此外，可以大於100個訊框/秒獲取數據之高速器件使得可檢測且分析隨時間變化發生於所分析試樣

內之動態過程或變化。

發明者已認識到且瞭解，妨礙生物分析設備變得更為小型之一個阻礙係需要過濾激發光以防止在感測器處引起不期望檢測事件。用於透射期望信號光(發光)且足以阻斷激發光之光學濾光片可較厚、巨大、昂貴且不能承受光入射角度之變化，從而妨礙了小型化。然而，發明者認識到且瞭解，使用脈衝激發源可減小該濾光需要或在一些情形下完全去除該等濾光片之需要。藉由使用能夠測定相對於激發光脈衝檢測到光子之時間之感測器，可基於接收光子之時間而非所接收光之光譜來分離信號光與激發光。因此，對於巨大光學濾光片之需要在一些實施例中有所減小及/或得以去除。

發明者已認識到且瞭解，亦可使用發光壽命量測來鑑別存在於試樣中之分子。能夠在檢測到光子時進行檢測之光學感測器能夠使用自許多事件搜集統計學量測由激發光激發之分子之發光壽命。在一些實施例中，可除進行發光之光譜量測外亦進行發光壽命量測。或者，可在鑑別試樣分子時完全省略發光之光譜量測。可使用脈衝激發源進行發光壽命量測。另外，可使用包含感測器之集成器件或光源位於與集成器件分開之系統中之器件進行發光壽命量測。

發明者亦認識到且瞭解，將試樣孔(例如奈米孔口)及感測器集成於能夠量測自生物試樣發射之發光之單一集成器件中會減小產生此一器件之成本，從而可形成拋棄式生物分析晶片。與基礎儀器介接之拋棄式、一次性集成器件可用於世界上之任何地方，且並無需要用於試樣分析之高成本生物實驗室之限制。因此，可為先前不能實施生物試樣之定量分析之地區帶來自動化生物分析。舉例而言，可藉由以下方式來實施用於嬰兒之血樣測試：將血樣置於拋棄式集成器件上，將拋棄式集成器件置於較小可攜式基礎儀器中用於分析，且藉由電腦處理結果以用於藉由使用者進行直接審核。亦可經由數據網路將數據傳輸

至遠程位置以進行分析，及/或歸檔以用於後續臨床分析。

發明者亦認識到且瞭解，可藉由在晶片上不包含光源來使拋棄式、一次性器件更加簡單且成本更低。而是，光源可為納入與拋棄式晶片介接以分析試樣之系統中之可再用組件。

發明者亦認識到且瞭解，在使用複數種不同類型發光標記物對試樣加注標籤時，可使用發光標記物之任一適宜特性來鑑別存在於晶片之特定像素中之標記物的類型。舉例而言，可使用由標記物發射之發光之特徵及/或激發吸收之特徵來鑑別標記物。在一些實施例中，可使用發光之發射能(其與光波長直接相關)來區分標記物之第一類型與標記物之第二類型。另外或或者，亦可使用發光壽命量測來鑑別存在於特定像素處之標記物之類型。在一些實施例中，可利用脈衝激發源使用能夠以足夠解析度區分檢測光子時之時間之感測器進行發光壽命量測以獲得壽命資訊。另外或或者，可使用由不同類型標記物吸收之激發光之能量來鑑別存在於特定像素處之標記物的類型。舉例而言，第一標記物可吸收第一波長之光，但並不等效吸收第二波長之光，而第二標記物可吸收第二波長之光，但並不等效吸收第一波長之光。以此方式，在可使用一種以上激發光源(各自具有不同激發能)以交錯方式照射試樣時，可使用標記物之吸收能量鑑別存在於試樣中之標記物類型。不同標記物亦可具有不同發光強度。因此，亦可使用所檢測發光強度來鑑別存在於特定像素下之標記物之類型。

I. 系統之概述

該系統包含集成器件及經構形以與集成器件介接之儀器。集成器件包含像素陣列，其中像素包含試樣孔及至少一個感測器。集成器件之表面具有複數個試樣孔，其中試樣孔經構形以自置於集成器件表面上之樣品接收試樣。樣品可含有多種試樣且在一些實施例中含有不同類型之試樣。複數個試樣孔可具有適宜大小及形狀，從而至少一部

分試樣孔接收來自樣品之一種試樣。在一些實施例中，試樣孔內之諸多試樣可分佈於試樣孔中，從而一些試樣孔含有一種試樣且其他試樣孔含有零種、兩種或更多種試樣。

在一些實施例中，樣品可含有多個單股DNA模板，且集成器件之表面上之個別試樣孔可經定大小及定形狀以接收單股DNA模板。單股DNA模板可分佈於集成器件之試樣孔中，從而集成器件之至少一部分試樣孔含有單股DNA模板。樣品亦可含有加注標籤之dNTP，其然後進入試樣孔中且可容許在將核苷酸納入與試樣孔中之單股DNA模板互補之DNA股中時鑑別核苷酸。在此一實例中，「試樣」可係指單股DNA及通常藉由聚合酶納入之加注標籤之dNTP。在一些實施例中，樣品可含有單股DNA模板且可隨後隨著將核苷酸納入試樣孔內之DNA互補股中來將加注標籤之dNTP引入試樣孔中。以此方式，可藉由將加注標籤之dNTP引入集成器件之試樣孔中之時間來控制納入核苷酸的時序。

自與集成器件之像素陣列分隔之激發源來提供激發能。至少部分地藉由集成器件之元件將激發能引向一或多個像素中以照射試樣孔內之照射區。在位於照射區內時且因應於由激發能照射，標記物或標籤然後可發射發射能。在一些實施例中，一或多個激發源係系統儀器之一部分，其中儀器組件及集成器件經構形以將激發能引向一或多個像素。

然後可藉由集成器件之像素內之一或多個感測器來檢測由試樣發射之發射能。所檢測發射能之特性可提供用於鑑別與發射能有關之標記物之指示。該等特性可包含任一適宜類型之特性，包含由感測器檢測之光子之到達時間、隨時間變化由感測器累積之光子量及/或光子在兩個或更多個感測器中之分佈。在一些實施例中，感測器可具有容許檢測一或多種與試樣發射能有關之時序特徵(例如螢光壽命)之構

形。感測器可檢測在激發能脈衝傳播穿過集成器件之後光子到達時間之分佈，且到達時間之分佈可指示試樣發射能之時序特性(例如螢光壽命之代替者)。在一些實施例中，一或多個感測器會指示由標記物或標籤發射之發射能之機率(例如螢光強度)。在一些實施例中，複數個感測器可經定大小及配置以捕獲發射能之空間分佈。然後可使用來自一或多個感測器之輸出信號自複數種標記物區分某一標記物，其中可使用複數種標記物來鑑別樣品內之試樣。在一些實施例中，試樣可由多種激發能激發，且發射能及/或因應於多種激發能由試樣發射之發射能之時序特性可自複數種標記物區分某一標記物。

系統23-100之示意圖概略圖圖解說明於圖23A及23B中。該系統包括與儀器23-104介接之集成器件23-102。在一些實施例中，儀器23-104可包含一或多個集成為儀器23-104之一部分之激發源23-106。在一些實施例中，激發源可位於儀器23-104及集成器件23-102外部，且儀器23-104可經構形以接收來自激發源之激發能且將其引導至集成器件中。集成器件可使用任一適宜插孔與儀器介接，該插孔用於接收集成器件且保持其與激發源精確光學對準。激發源23-106可經構形以向集成器件23-102提供激發能。如圖23B中所示意性圖解說明，集成器件23-102具有多個像素，其中至少一部分像素23-112可實施試樣之獨立分析。該等像素23-112可稱為「被動式源像素」，此乃因像素自與像素分隔之源23-106接收激發能，其中該源激發複數個像素。像素23-112具有試樣孔23-108 (其經構形以接收試樣)及感測器23-110 (其用於檢測因應於使用由激發源23-106提供之激發能照射試樣由試樣發射之發射能)。試樣孔23-108可使試樣保持靠近集成器件23-102之表面以便於將激發能遞送至試樣且檢測來自試樣之發射能。

用於將激發能引導且耦合至試樣孔23-108之光學元件位於集成器件23-102及儀器23-104上。該等源-至-孔元件可包括一或多個位於集

成器件23-102上之光柵耦合器(用於將激發能耦合至集成器件)及波導(用於將來自儀器23-104之激發能遞送至像素23-112中之試樣孔)。在一些實施例中，位於集成器件上之元件可用於將來自試樣孔之發射能引向感測器。試樣孔23-108、激發源-至-孔光學裝置之一部分及試樣孔-至-感測器光學裝置位於集成器件23-102上。激發源23-106及源-至-孔組件之一部分位於儀器23-104中。在一些實施例中，單一組件可用於將激發能耦合至試樣孔23-108且將來自試樣孔23-108之發射能遞送至感測器23-110。包含於集成器件中之用於將激發能耦合至試樣孔及/或將發射能引導至感測器之適宜組件之實例闡述於標題為「INTEGRATED DEVICE FOR PROBING, DETECTING AND ANALYZING MOLECULES」之美國專利申請案14/821,688及標題為「INTEGRATED DEVICE WITH EXTERNAL LIGHT SOURCE FOR PROBING, DETECTING, AND ANALYZING MOLECULES」之美國專利申請案14/543,865中，該等專利申請案之全部內容皆以引用方式併入本文中。

如圖23B中所圖解說明，集成器件包括複數個像素，其中像素23-112與其自身個別試樣孔23-108及至少一個感測器23-110相關。複數個像素可配置成陣列，且可在陣列中存在任一適宜數量之像素。集成器件23-102中之像素數可在大約10,000個像素至1,000,000個像素範圍內或為該範圍內之任一值或值範圍。在一些實施例中，像素可配置成512個像素×512個像素之陣列。集成器件23-102及儀器23-104可包含用於處置與大像素陣列(例如大於10,000個像素)有關之數據之多通道、高速通信連接。

儀器23-104與經由集成器件界面23-114集成器件23-102介接。集成器件界面23-114可包含用以將集成器件23-102定位及/或對準至儀器23-104以改良來自激發源23-106之激發能至集成器件23-102之耦合之

組件。激發源23-106可為任一經配置以將激發能遞送至至少一個試樣孔之適宜光源。適宜激發源之實例闡述於標題為「INTEGRATED DEVICE FOR PROBING, DETECTING AND ANALYZING MOLECULES」之美國專利申請案14/821688中，該專利申請案之全部內容以引用方式併入本文中。在一些實施例中，激發源23-106包含多個經組合以將激發能遞送至集成器件23-102之激發源。多個激發源可經構形以產生多種激發能或波長。集成器件界面23-114可接收來自位於集成器件上之像素中之感測器之讀出信號。集成器件界面23-114可經設計以便藉由將集成器件固定至集成器件界面23-114上來將集成器件附接至儀器上。

儀器23-104包含用於控制儀器23-104之操作之使用者界面23-116。使用者界面23-116經構形以容許使用者將資訊輸入儀器中(例如用於控制儀器之運作之命令及/或設置)。在一些實施例中，使用者界面23-116可包含按鈕、開關、撥號盤及用於語音命令之麥克風。另外，使用者界面23-116可容許使用者接收關於儀器及/或集成器件之性能之反饋(例如合理對準及/或藉由來自集成器件上之感測器之讀出信號獲得之資訊)。在一些實施例中， the使用者界面23-116可使用揚聲器提供反饋以提供聽覺反饋，且使用指示燈及/或顯示螢幕來提供視覺反饋。在一些實施例中，儀器23-104包含用於與計算器件23-120連結之電腦界面23-118。可使用任一適宜電腦界面23-118及計算器件23-120。舉例而言，電腦界面23-118可為USB界面或FireWire界面。計算器件23-120可為任一通用電腦，例如膝上型電腦或桌上型電腦。電腦界面23-118促進了資訊在儀器23-104與計算器件23-120之間之通信。可經由連結至儀器之電腦界面23-118之計算器件23-120來提供用於控制及/或構形儀器23-104之輸入資訊。可藉由計算器件23-120經由電腦界面23-118接收輸出資訊。該輸出資訊可包含關於儀器23-104及/

或集成器件23-112之性能之反饋及來自感測器23-110之讀出信號之資訊。儀器23-104亦可包含用於分析自感測器23-110接收之數據及/或將控制信號發送至激發源23-106之處理器件23-122。在一些實施例中，處理器件23-122可包括通用處理器、專用處理器(例如中央處理單元(CPU) (例如一或多個微處理器或微控制器核心)、現場可程式化閘陣列(FPGA)、特定應用積體電路(ASIC)、定製積體電路、數位信號處理器(DSP)或其組合)。在一些實施例中，可藉由處理器件23-122及外部計算器件23-120來處理來自感測器23-110之數據。在其他實施例中，可省略計算器件23-120且可僅藉由處理器件23-122來處理來自感測器23-110之數據。

圖解說明像素列之集成器件24-102之橫截面示意圖展示於圖24A中。每一像素24-112包含試樣孔24-108及感測器24-110。可使感測器24-110與試樣孔24-108對準且加以定位，從而感測器24-110接收由試樣孔24-108內之試樣發射之發射能。適宜感測器之實例闡述於標題為「INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS」之美國專利申請案14/821,656中，該專利申請案之全部內容以引用方式併入本文中。

耦合至集成器件之激發源可向集成器件24-102之一或多個像素提供激發能。圖24B係圖解說明使激發源24-106耦合至集成器件24-102以向集成器件24-102提供激發能24-130 (以虛線展示)之示意圖。圖24B圖解說明激發能自激發能來源24-106至像素24-112中之試樣孔24-108之路徑。可使用位於集成器件之外之組件來定位激發源24-106且對準至集成器件。該等組件可包含光學組件，包含透鏡、鏡子、稜鏡、孔口、衰減器及/或光學纖維。可在儀器中包含其他機械組件以容許控制一或多個對準組件。該等機械組件可包含致動器、步進電動機及/或旋鈕。

集成器件包含將激發能24-130引向集成器件中之像素之組件。在每一像素24-112內，激發能耦合至與像素有關之試樣孔24-108。儘管圖24B圖解說明激發能耦合至像素列中之每一試樣孔，但在一些實施例中，激發能可能並不耦合至列中之所有像素。在一些實施例中，激發能可耦合至集成器件之像素列中之一部分像素或試樣孔。激發能可照射位於試樣孔內之試樣。試樣可因應於激發能照射而達到激發態。在試樣處於激發態時，試樣可發射發射能且發射能可由感測器檢測。圖24B示意性圖解說明自試樣孔24-108至像素24-112之感測器24-110之發射能24-140路徑(展示為實線)。像素24-112中之感測器24-110可經構形及定位以檢測來自試樣孔24-108之發射能。在一些實施例中，感測器24-110可包含多個子感測器。

可將擬分析試樣引入像素24-112之試樣孔24-108中。試樣可為生物試樣或任一其他適宜試樣(例如化學試樣)。試樣可包含多種分子且試樣孔可經構形以分離單一分子。在一些情況下，試樣孔之尺寸可用於將單一分子限定於試樣孔內，從而容許對單一分子實施量測。激發源24-106可經構形以將激發能遞送至試樣孔24-108中以激發試樣或至少一種附接至試樣或以其他方式與試樣締合之發光標記物(在其位於試樣孔24-108內之照射區內時)。

在激發源將激發能遞送至試樣孔時，孔內之至少一種試樣可發光，且可藉由感測器檢測所得發射。如本文中所使用，片語「試樣可發光」或「試樣可發射輻射」或「來自試樣之發射」意指，發光標籤、標記物或報導基因、試樣本身或與試樣有關之反應產物可產生發射之輻射。

集成器件之一或多個組件可將發射能引向感測器。一或多種發射能可由感測器檢測且轉化成至少一種電信號。電信號可沿經由集成器件界面(例如圖23B中所展示之儀器23-104之集成器件界面23-114)連

結至儀器之集成器件之電路中之導線傳輸。可隨後處理及/或分析電信號。電信號之處理或分析可發生於位於儀器23-104上或儀器外之適宜計算器件(例如圖23B中所展示之計算器件23-120)上。

在操作中，藉由使用激發源激發孔內之試樣且使用感測器檢測來自試樣發射之信號來平行分析試樣孔內之試樣。可藉由相應感測器檢測來自試樣之發射能且轉化成至少一種電信號。在一些實施例中，可在集成器件上處理所得信號或信號，或傳輸至儀器中用於藉由處理器件及/或計算器件進行處理。可獨立地於與其他像素有關之信號來接收來自試樣孔之信號並加以處理。

在一些實施例中，可使用一或多種標記物標記試樣，且可藉由儀器分辨與標記物有關之發射。舉例而言，感測器可經構形以將來自發射能之光子轉化成電子以形成電信號，可使用該電信號來分辨取決於來自特定標記物之發射能之壽命。藉由使用具有不同壽命之標記物標記試樣，可基於藉由感測器檢測之所得電信號來鑑別特定試樣。

試樣可含有多個類型之分子且不同發光標記物可獨特地與某一類型分子進行締合。在激發期間或之後，發光標記物可發射發射能。可使用發射能之一或多種性質來鑑別試樣中之一或多個類型之分子。用於區分分子類型之發射能性質可包含螢光壽命值、強度及/或發射波長。感測器可檢測光子(包含發射能之光子)，且提供指示該等性質中之一或多者之電信號。在一些實施例中，來自感測器之電信號可提供關於在一或多個時間間隔中之光子到達時間分佈之資訊。光子到達時間分佈可對應於在藉由激發源發射激發能脈衝之後檢測到光子之時間。時間間隔值可對應於在該時間間隔期間檢測之光子數。多個時間間隔中之相對值可指示發射能之時間特性(例如壽命)。試樣分析可包含藉由比較分佈內兩個或更多個不同時間間隔之值來區分標記物。在一些實施例中，可藉由測定分佈中所有時間倉中之光子數來提供強度

指示。

II. 集成器件

集成器件可經構形以接收來自外部激發能來源之激發能。在一些實施例中，可使用器件之某一區域耦合至位於集成器件之外之激發能來源。集成器件之組件可將激發能自激發源耦合區引導至至少一個像素中。在一些實施例中，至少一個波導可經構形以將激發能遞送至至少一個具有試樣孔之像素。位於試樣孔內之試樣可因應於激發能照射而發射發射能。位於像素內之一或多個感測器經構形以接收發射能。

根據一些實施例展示於圖25中之集成器件25-200之組件及/或層包含集成至一個器件中之試樣孔25-203、波導25-220及感測器25-275。試樣孔25-203可形成於集成器件25-200之試樣孔層25-201中。在一些實施例中，試樣孔層25-201可為金屬。試樣孔25-203可具有尺寸D_{tv}，其可指示試樣孔之橫截面尺寸。試樣孔25-203可用作奈米孔口且具有一或多個產生場增強效應之亞波長尺寸，該場增強效應增加了試樣孔25-203中之試樣之激發強度。波導25-220經構形以將來自激發源25-230 (位於器件25-200之外)之激發能遞送至試樣孔25-203。波導25-220可形成於試樣孔層25-201與感測器25-275之間之層中。集成器件25-200之設計使得感測器25-275可收集自試樣孔25-203中之試樣發射之發光。至少有時，試樣吸收激發能且發射具有小於激發能之能量(稱為發射能或發光)之光子。

使試樣孔25-203及感測器25-275位於集成器件25-200上可減小光自試樣孔25-203行進至感測器25-215之光學距離。集成器件25-200或器件內組件之尺寸可針對某些光學距離進行構形。器件中組件及/或一或多個層之材料之光學性質可決定試樣孔與感測器之間之光學距離。在一些實施例中，一或多個層之厚度可決定像素中試樣孔與感測

器之間之光學距離。另外或或者，形成集成器件25-200之一或多個層之材料之折射率可決定像素在試樣孔25-203與感測器25-275之間的光學距離。像素中試樣孔與感測器之間之此一光學距離可小於1 mm、小於100微米、小於25微米及/或小於10微米。可在試樣孔層25-201與波導層25-220之間存在一或多個層以改良來自波導25-220之激發能至試樣孔25-203之耦合。儘管圖25中所展示之集成器件25-200僅圖解說明單一層25-210，但可在試樣孔25-203與波導25-220之間形成多個層。可形成具有光學性質之層25-210以改良來自波導25-220之激發能至試樣孔25-203之耦合。層25-210可經構形以減小激發能之散射及/或吸收及/或增加來自試樣孔25-203中之試樣之發光。根據一些實施例，層25-210可光學透明，從而光可在較小衰減下在試樣孔25-203中來回行進。在一些實施例中，可使用介電材料形成層25-210。在一些實施例中，可在層25-210內及/或在層25-210與試樣孔層25-201之間之界面處提供激發能耦合組件以改良來自波導25-220之激發能至試樣孔25-203之耦合。作為一實例，形成於試樣孔層25-201與層25-210之間之界面處之能量收集組件25-215可經構形以改良來自波導25-220之激發能至試樣孔25-203之耦合。能量收集組件25-215係可選的，且在一些實施例中，波導25-220及試樣孔25-203之構形可使得在不存在激發能收集組件25-215下獲得適當耦合激發能。

自試樣孔25-203中之試樣發射之發光或能量可以各種方式傳輸至感測器25-275中，一些實例詳細闡述於下文中。一些實施例可使用光學組件來增加將特定波長光引導至感測器25-275中專用於檢測特定波長光之區域或部分中之可能性。感測器25-275可包含多個用於同時檢測可對應於來自不同發光標記物之發射之不同波長光之部分。

可存在於試樣孔25-203與感測器25-275之間之一或多個層可經構形以改良自試樣孔25-203至感測器25-275發光之收集。發光引導組件

可位於試樣孔層25-201與層25-210之間之界面處。能量收集組件25-215可將發射能朝向感測器25-275聚集，且可另外或替代地在空間上分離具有不同特徵能量或波長之發射能。該等能量收集組件25-215可包含用於將發光引向感測器25-275之光柵結構。在一些實施例中，光柵結構可為一系列同心環或「紅心」光柵結構構形。同心圓形光柵可自試樣孔層25-201之底部表面突出。圓形光柵可用作可用於降低信號光傳播且將信號光引向有關感測器25-275之電漿元件。此一紅心光柵可將發光更有效地引向感測器25-275。

層25-225可毗鄰波導形成。可選擇層25-225之光學性質以改良自試樣孔至感測器25-275之發光收集。在一些實施例中，層25-225可為介電材料。可在試樣孔層25-201與感測器25-275之間形成擋板。擋板25-240可經構形以便感測器25-275接收對應於試樣孔25-203之發光且減少發光，並反射/散射來自其他試樣孔之激發。可定位及構形濾光元件25-260以減少到達感測器25-275之激發能。在一些實施例中，濾光元件25-260可包含選擇性透射一或多種用於標記試樣之標記物之發射能之濾光片 。在具有試樣孔陣列及感測器陣列(其中每一試樣孔具有相應感測器)之實施例中，可形成對應於每一試樣孔之擋板以減少來自其他試樣孔之發光且反射及/或散射由對應於試樣孔之感測器收集之激發光。

可在波導25-220與感測器25-275之間形成一或多個層以減小激發能至感測器之透射。在一些實施例中，可在波導25-220與感測器25-275之間形成濾光元件。該等濾光元件可經構形以減小激發能至感測器25-275之透射，同時使得來自試樣孔之發光由感測器25-275收集。

可藉由感測器25-275檢測一或多種發射能且轉化成至少一種電信號。可將一或多種電信號沿一或多列或行導線(未展示)傳輸至基板25-200上之集成電子電路中以用於後續信號處理。

圖25之上述闡述係一些實施例之裝置之一些組件的概述。在一些實施例中，圖25之一或多個元件可不存在或位於不同位置。集成器件25-200及激發源25-230之組件更詳細闡述於下文中。

A. **激發源耦合區**

集成器件可具有激發源耦合區，其經構形以與外部激發能來源耦合且將激發導向集成器件之像素區中之至少一個像素中。激發源耦合區可包含一或多個經構形以將光耦合至至少一個波導中之結構。可使用用於將激發能耦合至波導中之任一適宜機制。

集成器件之激發源耦合區可包含經構形以與外部激發源耦合之結構組件。集成器件可包含光柵耦合器，其經構形以與鄰近集成器件表面定位之外部激發源耦合且將光引向集成器件之至少一個波導中。可形成光柵耦合器之特徵(例如大小、形狀及/或光柵構形)以改良來自激發源之激發能至波導之耦合。光柵耦合器可包含一或多個結構組件，其中該等結構組件之間之間隔可用於傳播光。光柵耦合器之一或多個尺寸可提供具有某一特徵波長之光之期望耦合。

集成器件亦可包含在波導一端具有錐形區之波導。波導之垂直於波導中之光傳播方向之一或多個尺寸可在波導一端較大，從而形成波導之錐形區。在一些實施例中，波導錐之形區具有可如下尺寸：其垂直於光傳播且平行於集成器件表面，在波導一端較大且沿波導之長度變得較小。在包含光柵耦合器之實施例中，錐形區可鄰近光柵耦合器定位，從而錐形區之較大端位於最靠近光柵耦合器處。可對錐形區進行定大小及定型以藉由將一或多個波導尺寸擴展至容許改良波導與光柵耦合器之重疊模式來改良光在光柵耦合器與波導之間之耦合。以此方式，鄰近集成器件之表面定位之激發源可經由光柵耦合器將光耦合至波導中。光柵耦合器及波導錐形體之此一組合可容許激發源針對集成器件之對準及定位具有較大容差。

光柵耦合器可定位於集成器件中位於集成器件之像素外部之區域中。在集成器件之表面上，像素之試樣孔可佔據與激發源耦合區分隔之表面區域。鄰近激發源耦合區之表面定位之激發源可與光柵耦合器耦合。試樣孔可與激發源耦合區分隔定位以減小來自激發源之光對性像素能之干擾。集成器件之光柵耦合器可形成於集成器件中包含波導之一或多個層內。以此方式，集成器件之激發源耦合區可包含與波導位於集成器件之同一平面內之光柵耦合器。可針對特定組之光束參數(包含光束寬度、入射角及/或入射激發能之偏振)對進行光柵耦合器構形。

集成器件26-200之剖面圖展示於圖26中。集成器件26-200包含至少一個形成於集成器件26-200之層26-223中之試樣孔26-222。集成器件26-200包含實質上形成於集成器件26-200之同一平面中之光柵耦合器26-216及波導26-220。在一些實施例中，光柵耦合器26-216及波導26-220形成自集成器件26-200之同一層且可包含相同材料。集成器件26-200之激發源耦合區26-201包含光柵耦合器26-216。如圖26中所展示，試樣孔26-222定位於集成器件26-200中位於激發源耦合區26-201外部之表面上。相對於集成器件26-200定位之激發源26-214可提供入射於集成器件26-200中位於激發源耦合區26-201內之表面26-215上之激發能。藉由將光柵耦合器26-216定位於激發源耦合區26-201內，光柵耦合器26-216可與來自激發源26-214之激發能耦合使激發能耦合至波導26-220。波導26-220經構形以將激發能傳播至一或多個試樣孔26-222附近。

可自一或多種材料形成光柵耦合器。在一些實施例中，光柵耦合器可沿平行於波導中之光傳播之方向包含不同材料之交替區。如圖26中所展示，光柵耦合器26-216包含由材料26-224環繞之結構。形成光柵耦合器之一或多種材料可具有一或多種適於耦合及傳播光之折射

率。在一些實施例中，光柵耦合器可包含自由具有較大折射率之材料環繞之一種材料形成之結構。作為一實例，光柵耦合器可包含由氮化矽形成且由二氧化矽環繞之結構。

可使用任一適宜尺寸及/或光柵間間隔來形成光柵耦合器。光柵耦合器26-216垂直於穿過波導之光傳播(例如沿如圖26中所展示之y-方向)之尺寸可為大約50 nm、大約100 nm、大約150 nm或大約200 nm。光柵耦合器中沿平行於波導中光傳播之方向(例如沿如圖26中所展示之z-方向)之結構之間的間隔可具有任一適宜距離。間隔間光柵可為大約300 nm、大約350 nm、大約400 nm、大約420 nm、大約450 nm或大約500 nm。在一些實施例中，光柵間間隔可在光柵耦合器內有所變化。光柵耦合器26-216可具有一或多個實質上平行於集成器件26-200之表面26-215且提供用於與外部激發源26-214耦合之適宜區域之尺寸。光柵耦合器26-216之該區域可與來自激發源26-214之光束之一或多個尺寸一致，從而光束與光柵耦合器26-215重疊。光柵耦合器可具有構形以用於大約10微米、大約20微米、大約30微米或大約40微米之光束直徑之區域。

集成器件可包含形成於光柵耦合器中與激發源相反之一側且經構形以反射光之層。該層可反射朝向光柵耦合器且通過光柵耦合器之激發能。藉由在集成器件中包含該層，激發能至波導之耦合效率可得以改良。反射層之一實例係圖26中所展示之集成器件26-200之層26-218。層26-218定位於集成器件26-200之激發源耦合區26-201內且經構形以反射朝向光柵耦合器26-216之光。層26-218係鄰近光柵耦合器26-216中與來自激發源26-214之入射激發能相反之一側形成。將層26-218定位於集成器件26-200之像素外部可減小層26-218對像素之性能能力之干擾。層可26-218可包含任一適宜材料。層26-218可實質上反射一或多種激發能。在一些實施例中，此層可包含Al、AlCu及/或

TiN。

B. 波導

集成器件可包含一或多個經配置以將期望量之激發能遞送至集成器件之一或多個試樣孔中之波導。將波導定位於一或多個試樣孔附近，從而隨著激發能沿波導進行傳播，一部分激發能耦合至一或多個試樣孔。波導可使激發能耦合至複數個像素且用作匯流排波導。舉例而言，單一波導可將激發能遞送至集成器件之像素列或行中。在一些實施例中，波導可經構形以傳播具有複數個特徵波長之激發能。集成器件之像素可包含經構形以將激發能自波導引向試樣孔附近之其他結構(例如微腔)。在一些實施例中，波導可攜載具有經構形以延伸至試樣孔及/或試樣孔附近區域中之漸逝尾部之光學模式。位於試樣孔附近之其他能量耦合結構可使來自漸逝尾部之能量耦合至試樣孔中。

集成器件之波導之一或多個尺寸可提供激發能沿波導及/或至一或多個試樣孔中之期望傳播。波導可具有垂直於光傳播且平行於波導平面之尺寸，其可視為橫截面寬度。波導之橫截面寬度可為大約0.4微米、大約0.5微米、大約0.6微米、大約0.65微米、大約0.8微米、大約1微米或大約1.2微米。波導可具有垂直於光傳播且垂直於波導平面之尺寸，其可視為橫截面高度。波導之橫截面高度可為大約0.05微米、大約0.1微米、大約0.15微米、大約0.16微米、大約0.17微米、大約0.2微米或大約0.3微米。在一些實施例中，波導之橫截面寬度大於橫截面高度。波導可定位於距離集成器件內之一或多個試樣孔某一距離處，例如圖26中所展示介於試樣孔26-222與波導26-220之間之距離D，其為大約0.3微米、0.5微米或大約0.7微米。

在一實例性實施例中，波導可具有大約0.5 μm之橫截面寬度及大約0.1 μm之橫截面高度，且定位於試樣孔層下方大約0.5 μm。在另一實例性實施例中，波導可具有大約1 μm之橫截面寬度及0.18 μm之橫

截面高度，且定位於試樣孔層下方0.3 μm。

波導可經定尺寸以支持單一橫向輻射模式或可經定尺寸以支持多橫向輻射模式。在一些實施例中，波導之一或多個尺寸可用於使得波導僅支持單一橫向模式且可選擇性傳播TE或TM偏振模式。在一些實施方案中，波導可具有形成於其末端之高度反射區段，從而其支持波導內之縱向駐波模式。藉由支持一種模式，波導可具有減小之來自具有不同傳播常數之模式之交叉耦合的模態干擾效應。在一些實施例中，高度反射區段包括單一、高度反射表面。在其他實施例中，高度反射區段包括多個整體產生高反射率之反射結構。波導可經構形以使用波導光束分裂器來分裂來自具有較高輸出強度之單一激發源之激發能以自單一激發源產生複數個激發能光束。該等光束分裂器可包含漸逝耦合機制。另外或或者，可將光子晶體用於波導結構中以改良激發能之傳播及/或用於環繞波導之材料中以減小激發能之散射。

波導相對於集成器件之像素中之其他組件之位置及配置可經構形以改良激發能朝向試樣孔之耦合，改良感測器對於發射能之收集，及/或減小由激發能引入之信號雜訊。可相對於試樣孔對波導進行定大小及/或定位以減小在波導中傳播之激發能對自試樣孔發射之發射能之干擾。波導在集成器件中之定位及配置可取決於波導及環繞波導之材料之折射率。舉例而言，可增加波導中垂直於沿波導之光傳播方向且在波導平面內之尺寸，從而在激發能傳播至像素之感測器時實質量之來自試樣孔之發射能通過波導。在一些實施方案中，可選擇試樣孔與波導之間之距離及/或波導厚度以減少自波導與環繞材料之間之一或多個界面的反射。根據一些實施例，波導對發射能之反射可減小至在一些實施例中小於約5%、在一些實施例中小於約2%及在一些實施例中小於約1%。

波導傳播激發能之能力可取決於用於波導之材料及環繞波導之

材料。以此方式，波導結構可包含核心材料(例如波導26-220)及包覆材料(例如如圖26中所圖解說明之區域26-224)。用於波導及環繞材料之材料可容許具有特徵波長之激發能傳播穿過波導。可針對特定折射率或折射率組合來選擇用於波導或環繞材料之材料。波導材料可具有低於波導環繞材料之折射率。實例性波導材料包含氮化矽(Si_xN_y)、氧氮化矽、碳化矽、氧化鉭(TaO_2)、二氧化鋁。實例性波導環繞材料包含二氧化矽(SiO_2)及氧化矽。波導及/或環繞材料可包含一或多種材料。在一些情況下，可藉由形成包含一種以上材料之波導及/或環繞材料來獲得用於波導及/或環繞材料之期望折射率。在一些實施例中，波導包括氮化矽且環繞材料包括二氧化矽。

將來自單一波導之波導分裂成多個波導可容許激發能到達集成器件之試樣孔之多個列或行。可使激發源耦合至輸入波導且可將輸入波導分裂成多個輸出波導，其中每一輸出波導將激發能遞送至試樣孔之列或行。可使用用於分裂及/或組合波導之任一適宜技術。該等波導分裂及/或組合技術可包含星形分裂器或耦合器、Y分裂器及/或漸逝耦合器。另外或或者，可使用多模式干擾分裂器(MMI)來分裂及/或組合波導。可使用該等波導分裂及/或組合技術中之一或多者將激發能引導至試樣孔中。

C. **試樣孔**

根據一些實施例，試樣孔27-210可形成於集成器件之一或多個像素處。試樣孔可包括形成於基板27-105之表面處之較小容積或區且經配置以便試樣27-101可自沈積於基板表面上之樣品擴散進入及離開試樣孔，如圖27A及圖27B中所繪示，該等圖圖解說明集成器件之單一像素27-100。在各個實施例中，試樣孔27-210可經配置以接收來自波導27-240之激發能。擴散至試樣孔中之試樣27-101可由黏著劑27-211暫時或永久保留於試樣孔之激發區27-215內。在激發區中，試樣可由

激發能(例如激發輻射27-247)激發，且隨後發射可觀察且評估以描述試樣之輻射。

進一步詳述操作，可將至少一種擬分析試樣27-101 (例如)自含有試樣之流體懸浮液之樣品(未展示)引入試樣孔27-210中。來自波導27-240之激發能可激發試樣或至少一種附接至試樣或包含於與試樣締合之標籤中之標記物(在其處於試樣孔內之激發區27-215內時)。根據一些實施例，標記物可為a發光分子(例如螢光團)或量子點。在一些實施方案中，可存在一種以上用於分析試樣之標記物(例如用於單分子基因定序之不同標記物及標籤，如「Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules」， J. Eid等人，*Science* 323，第133頁(2009)中所闡述，該文獻之全部內容以引用方式併入本文中)。在激發期間及/或之後，試樣或標記物可發射發射能。在使用多種標記物時，其可以不同特徵能量發射及/或以不同時間特性(包含不同壽命)發射。來自試樣孔之發射能可輻射或以其他方式行進至感測器27-260，其中檢測發射能且轉化成可用於描述試樣之電信號。

根據一些實施例，試樣孔27-210可為部分包封結構，如圖27B中所繪示。在一些實施方案中，試樣孔27-210包括形成於材料27-230之至少一個層中之亞微米大小孔或孔口(藉由至少一個橫向尺寸D_{sw}進行描述)。在一些情形下，孔可稱為「奈米孔口」。根據一些實施例，試樣孔之橫向尺寸可介於大約20奈米與大約1微米之間，但可在一些實施方案中使用較大及較小大小。在一些實施方案中，試樣孔27-210之容積可介於約10^{-21}公升與約10^{-15}公升之間。試樣孔可形成為可或可不支持傳播模式之波導。試樣孔可形成為可或可不支持傳播模式之波導。在一些實施例中，試樣孔可形成為具有擁有直徑(或最大橫向尺寸) D_{sw}之圓柱形形狀(或類似形狀)之零模式波導(ZMW)。ZMW可以並不支持穿過孔之傳播光學模式之奈米級孔形式形成於單一金屬層中。

因試樣孔27-210具有較小容積，但可檢測每一像素下之單試樣事件(例如單分子事件)，即使試樣可以類似於彼等發現於天然環境中之濃度的濃度濃縮於檢驗樣品中。舉例而言，微莫耳濃度之試樣可存在於經放置與集成器件接觸之樣品中，但在像素層面下，僅約一種試樣(或單分子事件)可在任一給定時間下位於試樣孔內。在統計學上，一些試樣孔可不含試樣且一些可含有一種以上試樣。然而，可觀數量之試樣孔可含有單一試樣(例如在一些實施例中至少30%)，從而可針對大量像素平行實施單分子分析。因可在每一像素下分析單分子或單試樣事件，故集成器件使得可檢測可原本在總體均值中注意不到之稀有事件。

試樣孔之橫向尺寸D_{sw}可在一些實施例中介於約500奈米(nm)與約一微米之間，在一些實施例中介於約250 nm與約500 nm之間，在一些實施例中介於約100 nm與約250 nm之間，且在一些實施例中介於約20 nm與約100 nm之間。根據一些實施方案，試樣孔之橫向尺寸介於大約80 nm與大約180 nm之間，或大約為激發波長或發射波長之八分之一至四分之一。根據其他實施方案，試樣孔之橫向尺寸介於大約120 nm與大約170 nm之間。在一些實施例中，試樣孔27-210之深度或高度可介於約50 nm與約500 nm之間。在一些實施方案中，試樣孔27-210之深度或高度可介於約80 nm與約250 nm之間。

具有亞波長橫向尺寸之試樣孔27-210可以至少兩種方式改良集成器件之像素27-100之操作。舉例而言，自樣品之相反側入射於試樣孔上之激發能可以指數式降低之功率耦合至激發區27-215中，且並不傳播穿過試樣孔達到樣品。因此，激發能在其激發所關注試樣之激發區中有所增加，且在激發有助於背景雜訊之其他試樣之樣品中有所減小。同樣，將來自保留於孔基底處(例如較靠近感測器27-260)之試樣之發射較佳地引向感測器，此乃因向上傳播穿過試樣孔之發射得以高

度阻抑。該等效應皆可改良像素下之信號雜訊比。發明者已識別可經改良以進一步增強像素下之信號雜訊比之試樣孔之若干態樣。該等態樣係關於試樣孔形狀及結構，且亦係關於有助於使激發能耦合至試樣孔及來自試樣孔之所發射輻射之毗鄰光學及電漿結構(闡述於下文中)。

根據一些實施例，試樣孔27-210可形成為經構形以並不支持用於所關注特定波長之傳播模式之奈米孔口。在一些情況下，對奈米孔口實施構形，其中所有模式皆低於臨限波長且孔口可為亞截止奈米孔口(SCN)。舉例而言，試樣孔27-210可在導電層中包括圓柱形孔或鏜孔。試樣孔之橫截面無需為圓形，且在一些實施例中可為橢圓形、正方形、矩形或聚多邊形。激發能27-247 (例如可見或近紅外輻射)可經由入口孔口27-212進入試樣孔中，入口孔口可由試樣孔之壁27-214界定於孔之第一端處，如圖27B中所繪示。在形成為SCN時，激發能可沿奈米孔口之長度(例如在樣品方向上)以指數方式衰減。在一些實施方案中，波導可包括用於來自試樣之發射輻射之SCN，但可不為用於激發能之SCN。舉例而言，藉由試樣孔形成之孔口及波導可足夠大以支持用於激發能之傳播模式，此乃因其波長可短於發射輻射。較長波長下之發射可超過用於波導中之傳播模式之截止波長。根據一些實施例，試樣孔27-210可包括用於激發能之SCN，從而將最大強度之激發能局部化至試樣孔27-210之入口處之試樣孔之激發區27-215中(例如局部化至層27-235與層27-230之間之界面附近，如該圖中所繪示)。激發能之該局部化可改良來自試樣之發射能之局部化，且限制來自單一試樣(例如單一分子)之發射之所觀察發射。

根據一些實施例，像素27-100可包含其他結構。舉例而言，像素27-100可包含一或多個激發耦合結構27-220，其會影響激發能至試樣孔內之試樣之耦合。像素亦可包含發射引導結構27-250，其用於將來

自試樣孔內之試樣之發射能引導至感測器27-260中。

為改良局部化於試樣孔處之激發能之強度，發明者研發且研究其他試樣孔結構。圖27C繪示在試樣孔之激發端包含空腔或凹槽27-216之試樣孔之實施例。根據一些實施例，向試樣孔中增加凹槽27-216會容許試樣移動至具有較高激發強度之區域中。在一些實施方案中，凹槽之形狀及結構改變了局部激發場(例如因層27-235與試樣孔中之流體之間之折射率差)，且可進一步增加凹槽中之激發能強度。凹槽27-216可形成於層27-235內，從而一部分佔據試樣孔27-214及凹槽27-216之試樣容積由形成層27-216之材料環繞。

凹槽可具有任一適宜形狀。凹槽可具有實質上等效於試樣孔之橫向形狀之橫向形狀，例如圓形、橢圓形、正方形、矩形、多邊形等。在一些實施例中，凹槽之側壁可實質上平直且垂直(如同試樣孔之壁)。在一些實施方案中，凹槽側壁可傾斜及/或彎曲，如圖中所繪示。凹槽之橫向尺寸在一些實施例中可與試樣孔之橫向尺寸大致具有相同大小，在一些實施例中可小於試樣孔之橫向尺寸，或在一些實施例中可大於試樣孔之橫向尺寸。凹槽27-216可延伸至超出試樣孔層27-230大約10 nm至大約200 nm。在一些實施方案中，凹槽可延伸至超出試樣孔層27-230大約50 nm至大約150 nm。在一些實施例中，凹槽可延伸至超出試樣孔層27-230大約150 nm至大約250 nm。藉由形成凹槽，激發區27-215可延伸至試樣孔外側，如圖27C中所繪示。

一些實施例係關於具有擁有鄰近波導定位之凹槽之試樣孔之集成器件。圖28展示具有形成於層28-630及層28-636中之試樣孔28-632之集成器件。層28-630可為金屬層且包含一或多種金屬(例如Al)。層28-636可用作介電層且包含一或多種介電材料(例如二氧化矽)。試樣孔28-632可在平行於層28-630及/或層28-636之方向上具有可變尺寸。試樣孔28-632可至少在集成器件之層28-630內沿z-方向具有尺寸D2，

且在一些實施例中，尺寸D2可視為試樣孔28-632之直徑。試樣孔28-632之尺寸D2可為大約700 nm、大約800 nm、大約900 nm、大約1微米或大約1.1微米。試樣孔28-632可在集成器件之層28-636內沿z-方向具有尺寸D1且在一些實施例中可視為試樣孔28-632之表面處之直徑。尺寸D1可為大約100 nm、大約150 nm、大約200 nm或大約250 nm。試樣孔28-632之具有尺寸D1之表面定位於沿x-方向距波導28-634為尺寸d1處。鄰近波導28-634以距離d1來定位試樣孔28-632可容許改良來自波導28-634之激發能至試樣孔28-632之耦合。尺寸d1可為大約50 nm、大約100 nm、大約150 nm、大約200 nm或大約250 nm。

D. **激發能至試樣孔之耦合**

可經由一或多種技術使激發能耦合至集成器件之一或多個試樣孔。如先前所論述，在一些實施例中，波導經定位以與激發源一起耦合至一或多個試樣孔。隨著激發能沿波導傳播，一部分激發能可經由各種光耦合技術耦合至一或多個試樣孔。舉例而言，波導可實質上在一個方向上引導激發能，且衰逝波或尾部可垂直於此一方向形成且在一些情況下位於波導結構外側。此一漸逝尾部可將一部分激發能引向一或多個試樣孔中。在一些實施例中，試樣孔層可經設計及經構形以將激發能引導至試樣孔之局部區域內。試樣孔可經構形以將試樣保留於試樣孔之局部區域內，從而將激發能引向試樣。

另外，一或多個組件可形成於集成器件中以改良或增強激發能至試樣孔之耦合。該等其他組件可形成於像素中且提供來自波導之激發能至像素及朝向試樣孔之耦合。位於像素中之一或多個組件可用於將一部分來自波導之激發能汲取至像素中。該等組件可包含光學結構，例如光柵結構散、射結構、微腔及/或奈米天線。可選擇該等組件中之一或多者之特徵或構形以將某一量之激發能耦合至試樣孔之列或行內的每一試樣孔。經構形以向像素列提供激發能之波導可耦合至

每一像素區中之組件以將一部分激發能提供至像素列中之每一像素。在波導經構形以將來自激發源之激發能引向一或多個像素時，波導可稱為匯流排波導。

毗鄰試樣孔定位之組件可改良來自波導之激發能至試樣孔之耦合。該等組件可稱為分接頭及/或微腔。微腔可使一部分來自波導之激發能偏轉，從而激發能到達試樣孔。可使用一或多個微腔使激發能耦合至試樣孔。一或多個微腔可減小來自波導之激發能之損失，包含金屬損失。一或多個微腔可用作將激發能聚焦至試樣孔之透鏡。在一些實施例中，一或多個微腔可改良來自試樣孔中標記物之發光朝向感測器之引導。微腔可具有圓柱形、凸狀、凹狀、矩形、球形或橢圓形構形或任一其他適宜形狀。可自任一適宜材料形成微腔。在一些實施例中，微腔可包含氮化矽。

在自存在試樣孔之集成器件之頂部觀看時，一或多個微腔可與至少一部分波導重疊以將激發能引向試樣孔。波導厚度可經構形以減小激發能之損失且改良激發能至一或多個微腔之耦合。在一些實施例中，沿試樣孔列之微腔可改變波導與每一試樣孔之間之耦合強度。微腔可增加沿激發能傳播方向之耦合以在引導激發能離開波導到達每一試樣孔時適應波導中減小之功率。在一些實施例中，一或多個微腔毗鄰試樣孔。可在試樣孔之中心位置與微腔中心之間存在偏移距離。在其他實施例中，一個微腔位於試樣孔下方，從而在自存在試樣孔之集成器件之頂部觀看時，至少一部分試樣孔與一部分微腔重疊。

集成器件之波導之一或多個尺寸可沿波導長度在光傳播穿過波導之方向上有所變化。沿波導改變一或多個尺寸可改良耦合效率及由波導提供至複數個試樣孔之激發能之量之實質性均勻性。在一些實施例中，波導之橫截面寬度可沿像素之列或行有所變化。波導可包含錐形體，從而波導之橫截面寬度沿激發能傳播穿過波導之方向有所降

低。在一些實施例中，錐形波導可經構形以針對像素列達成類似耦合效率，其中列中之像素包含微腔及試樣孔。組合改變錐形波導及/或微腔之一或多個尺寸可適應在激發能耦合至列中之每一試樣孔激發能沿波導長度之功率減小。

在一些實施例中，波導可藉由漸逝場耦合至試樣孔。在一些實施例中，具有鄰近試樣孔定位之同心光柵環之紅心光柵結構可改良來自波導之激發能至試樣孔之耦合。在一些實施例中，波導可在試樣孔附近包含具有減小之橫截面寬度之區域，從而來自在波導中傳播之激發能之漸逝場耦合至試樣孔。對於像素列而言，波導可沿波導長度包含多個具有減小之橫截面寬度之區域以改良列中試樣孔中之耦合均勻性及效率。以此方式，波導可視為在沿波導之某些位置處具有狹縮區段。

集成器件中具有一或多個試樣孔之層可干擾光穿過波導之傳播。在一些實施例中，試樣孔層係由金屬(例如鋁)形成。可期望將試樣孔層定位於距波導某一距離處以減小損失且改良器件性能。該等技術可使得藉由以下方式來達成期望性能：將試樣孔層定位於距波導某一距離處，同時容許該層中之試樣孔接收足夠量之激發能。

E. 發射能至感測器之引導

集成器件可包含一或多個定位於像素之試樣孔與感測器之間之組件，從而改良感測器對於來自試樣孔中之試樣之發光之收集。該等組件可改良發光信號對背景信號之信號雜訊比以改良發光標記物之檢測。一些組件可將來自試樣孔之發光引導至像素中之相應感測器中。在一些實施例中，組件可提供激發能至試樣孔之適宜耦合及離開試樣孔之發光之耦合。其他組件(例如濾光片)可減小激發能及其他並不與試樣及/或標記物有關之造成由感測器獲取之信號之光。

紅心光柵可自試樣孔周圍之同心光柵環形成。紅心光柵可與試

樣孔耦合以改良離開試樣孔之發光之傳播。紅心光柵結構可將發光引向具有試樣孔之像素中之感測器。在一些實施例中，由紅心光柵引導之發光之有效直徑大約為5微米。

在一些實施例中，一或多個經提供用於耦合波導及試樣孔以容許激發能傳播至試樣孔之微腔亦可將來自試樣孔之發光引導至感測器。

具有定中心於感測器上之開口之擋板可形成於試樣孔與感測器之間。如圖26中所展示，擋板層26-226定位於試樣孔26-22與感測器層26-230之間。像素之擋板可經設計以阻抑除像素發光外之能量之收集。與試樣孔及感測器有關之擋板可容許來自試樣孔之發光到達感測器，同時減少來自相鄰像素之發光、激發能及其他並不與來自與感測器有關之試樣孔之發光有關之能量。擋板開口之尺寸可經構形以容許發光由同一像素上之紅心引導。如圖26中所展示，擋板26-226沿z-方向具有開口以容許發光通過定位於層26-230中之感測器。可選擇擋板材料以達成某些光學性質，例如減少某些光波長或能量在某些入射角下之透射。在一些實施例中，可藉由多個具有不同折射率之材料層形成擋板。擋板可包含矽、氮化矽(Si3N4)、矽、氮化鈦(TiN)及鋁(Al)之一或多個層。經構形以形成擋板之層可具有大約20 nm、大約20 nm、大約50 nm、大約60 nm、大約70 nm、大約80 nm或大約90 nm之橫截面高度。

濾光組件可形成於波導與感測器之間以減少感測器對激發能之收集。可提供用於過濾激發能之任一適宜方式。用於過濾激發能之技術可包含基於一或多種光特性進行過濾。該等特性可包含波長及/或偏振。濾光組件可選擇性阻抑散射激發能，同時容許發光通過感測器。圖26中所展示之層26-228可包含本文所闡述之一或多種過濾組件。

集成器件可包含經構形以反射一或多個特徵波長之光且容許透射具有不同特徵波長之光之波長濾光片。在一些實施例中，由波長濾光片反射之光之特徵波長可短於由波長濾光片透射之光。此一波長濾光片可反射激發能且容許透射發光，此乃因用於激發標記物之激發能之特徵波長通常短於用於藉由激發能達到激發態由標記物發射之發光。

F. **感測器**

任一能夠獲取時間倉資訊之適宜感測器皆可用於量測以檢測發光標記物之壽命。舉例而言，標題為「INTEGRATED DEVICE FOR TEMPORAL BINNING OF RECEIVED PHOTONS」之美國專利申請案14/821,656闡述能夠測定光子之到達時間之感測器，且其全部內容以引用方式併入本文中。將感測器對準，從而每一試樣孔具有至少一個感測器區域以檢測來自試樣孔之發光。在一些實施例中，集成器件可包含蓋革(Geiger)模式崩潰光二極體陣列及/或單光子崩潰二極體陣列(SPAD)。

本文闡述一種集成光檢測器，其可精確量測或「時間分倉」入射光子之到達時序且可用於各種應用(例如核酸定序(例如DNA定序)中)。在一些實施例中，集成光檢測器可以奈秒或皮秒解析度來量測光子之到達，此可促進入射光子之到達之時域分析。

一些實施例係關於具有光檢測器之積體電路，其因應於入射光子產生電荷載子且能夠辨別藉由入射光子之到達生成之電荷載子相對於參考時間(例如觸發事件)之時序。在一些實施例中，電荷載子分離結構分離在不同時間生成之電荷載子且將電荷載子引導至一或多個電荷載子儲存區(稱為「倉」，其聚集在不同時間段內產生之電荷載子)中。每一倉儲存在所選時間間隔內產生之電荷載子。讀出儲存於每一倉中之電荷可提供關於在每一時間間隔內到達之光子數之資訊。此一

積體電路可用於各種應用中之任一者中，例如本文所闡述之彼等。

闡述具有光檢測區及電荷載子分離結構之積體電路之一實例。在一些實施例中，積體電路可包含像素陣列，且每一像素可包含一或多個光檢測區及一或多個電荷載子分離結構，如下文所論述。

圖29A展示一些實施例之像素29-900之圖。像素29-900包含光子吸收/載子生成區29-902 (亦稱為光檢測區)、載子行進/捕獲區29-906、具有一或多個電荷載子儲存區之載子儲存區29-908 (在本文中亦稱為「電荷載子儲存倉」或簡稱為「倉」)及用於讀出來自電荷載子儲存倉之信號之讀出電路29-910。

光子吸收/載子生成區29-902可為半導體材料(例如矽)之區域，其可將入射光子轉化成光生成電荷載子。光子吸收/載子生成區29-902可曝光於光，且可接收入射光子。在光子由光子吸收/載子生成區29-902吸收時，其可生成光生成電荷載子(例如電子/電洞對)。光生成電荷載子在本文中亦簡稱為「電荷載子」。

可在光子吸收/載子生成區29-902中確立電場。在一些實施例中，電場可為「靜態」，如與載子行進/捕獲區29-906中之變化電場相區分。光子吸收/載子中之電場生成區29-902可包含側向分量、垂直分量或側向分量及垂直分量。電場之側向分量可位於圖29A之向下方向上，如由箭頭所指示，其對光生成電荷載子誘導驅使其朝向載子行進/捕獲區106之力。電場可以各種方式形成。

在一些實施例中，可在光子吸收/載子生成區29-902中形成一或多個電極。可向電極施加電壓以在光子吸收/載子生成區29-902中確立電場。電極可稱為「光閘極」。在一些實施例中，光子吸收/載子生成區29-902可為完全空乏電荷載子之矽區域。

在一些實施例中，可藉由接面(例如PN接面)確立光子吸收/載子生成區29-902中之電場。可摻雜光子吸收/載子生成區29-902之半導體

材料以形成具有產生電場之定向及/或形狀之PN接面，該電場對光生成電荷載子誘導驅使其朝向載子行進/捕獲區29-906之力。在一些實施例中，PN接面二極體之P末端可連結至設定其電壓之末端。此一二極體可稱為「釘紮」光二極體。釘紮光二極體因設定其電壓且吸引載子之末端而可促進表面處之載子重組，此可減小暗電流。期望捕獲之光生成電荷載子可通過表面之重組區下方。在一些實施例中，可使用半導體材料中之遞級摻雜濃度來確立側向電場。

如圖29A中所圖解說明，可捕獲光子且可在時間t1處產生電荷載子29-901A (例如電子)。在一些實施例中，可沿光子吸收/載子生成區29-902及載子行進/捕獲區29-906確立電勢梯度，其使得電荷載子29-901A在圖29A之向下方向(如由圖29A中所展示之箭頭所圖解說明)上行進。因應於電勢梯度，電荷載子29-901A可自時間t1下之其位置移動至時間t2下之第二位置、時間t3下之第三位置、時間t4下之第四位置及時間t5下之第五位置。電荷載子29-901A由此因應於電勢梯度移動至載子行進/捕獲區29-906中。

載子行進/捕獲區29-906可為半導體區。在一些實施例中，載子行進/捕獲區29-906可為與光子吸收/載子生成區29-902具有相同材料(例如矽)之半導體區，只是載子行進/捕獲區29-906可與入射光隔開(例如藉由上覆不透明材料，例如金屬層)。

在一些實施例中，且如下文進一步所論述，可在光子吸收/載子生成區29-902及載子行進/捕獲區29-906中藉由定位於該等區域上方之電極來確立電勢梯度。然而，本文所闡述之技術並不限於用於產生電勢梯度之電極之特定位置。本文所闡述之技術亦並不限於使用電極來確立電勢梯度。在一些實施例中，可使用空間遞級摻雜特徵確立電勢梯度。可使用任一適宜技術確立使得電荷載子沿光子吸收/載子生成區29-902及載子行進/捕獲區29-906行進之電勢梯度。

可在像素中形成電荷載子分離結構以使得能夠分離在不同時間下產生之電荷載子。在一些實施例中，至少一部分電荷載子分離結構可形成於載子行進/捕獲區29-906上方。如下文所闡述，電荷載子分離結構可包含一或多個形成於載子行進/捕獲區29-906上方之電極，可藉由控制電路控制其電壓以改變載子行進/捕獲區29-906中之電勢。

可改變載子行進/捕獲區29-906中之電勢以使得能夠捕獲電荷載子。可藉由改變上覆於載子行進/捕獲區29-906上之一或多個電極上之電壓來改變電勢梯度以產生可將載子限定於預定空間區內之電勢障壁。舉例而言，可在時間t5下改變上覆於圖29A中載子行進/捕獲區29-906中之虛線上之電極上之電壓以升高沿圖29A中載子行進/捕獲區29-906中之虛線的電勢障壁，由此捕獲電荷載子29-901A。如圖29A中所展示，可將在時間t5下捕獲之載子轉移至載子儲存區29-908之倉「倉0」中。可藉由改變載子行進/捕獲區29-906及/或載子儲存區29-908中之電勢(例如藉由改變上覆於該等區域上之電極之電壓)以使得載子行進至電荷載子儲存倉中來將載子轉移至電荷載子儲存倉中。

在載子行進/捕獲區29-906之預定空間區內改變某一時間點之電勢可使得能夠陷獲藉由發生於特定時間間隔內之光子吸收生成之載子。藉由陷獲不同時間及/或位置下之光生成電荷載子，可辨別藉由光子吸收生成電荷載子之時間。在此意義上，可藉由在發生觸發事件之後陷獲某一時間點及/或空間點之電荷載子來將電荷載子「時間分倉」。將電荷載子時間分倉於特定倉內提供關於藉由吸收入射光子生成光生成電荷載子之時間的資訊，且由此亦相對於觸發事件將產生光生成電荷載子之入射光子之到達「時間分倉」。

圖29B圖解說明在不同時間及空間點下捕獲電荷載子。如圖29B中所展示，可在時間t9下改變上覆於載子行進/捕獲區29-906中之虛線

上之電極上之電壓以升高沿圖29B中載子行進/捕獲區106中之虛線的電勢障壁，由此捕獲載子29-901B。如圖29B中所展示，可將在時間t9下捕獲之載子轉移至載子儲存區29-908之倉「倉1」中。因電荷載子29-901B係陷獲於時間t9下，故其代表發生不同於載子29-901A (其捕獲於時間t5下)之光子吸收事件(亦即在t1下)之時間(亦即時間t6)下之光子吸收事件。

基於捕獲電荷載子之時間來實施多個量測且將電荷載子聚集於載子儲存區29-908之電荷載子儲存倉中可提供關於在光子吸收/載子生成區29-902中捕獲光子之時間的資訊。該資訊可用於各種應用中，如上文所論述。

在一些實施例中，在激發脈衝之後每一時間倉捕獲之持續時間可有所變化。舉例而言，可使用較短時間倉檢測在激發脈衝之後即刻之發光，而較長時間倉可用於較遠離激發脈衝之時間下。藉由改變時間倉間隔，可改良給定感測器中與每一時間倉有關之電信號量測之信號雜訊比。因光子發射事件之機率在激發脈衝之後即刻較高，故在此時間內之時間倉可具有較短時間間隔以補償檢測較多光子之可能。在較長時間下，光子發射之機率可較小且在此時間內檢測之時間倉可較長以補償較少光子數之可能。在一些實施例中，可使用具有顯著較長持續時間之時間倉來區分多個壽命。舉例而言，大部分時間倉可捕獲在大約0.1-0.5 ns範圍內之時間間隔，而某一時間倉可捕獲在大約2-5 ns範圍內之時間間隔。時間倉數及/或每一倉之時間間隔可取決於用於檢測自試樣物體發射之光子之感測器。測定每一倉之時間間隔可包含鑑別由感測器提供之時間倉數所需之時間間隔以區分用於分析試樣的發光標記物。可在類似條件及時間倉下對所記錄直方圖之分佈與已知標記物直方圖進行比較以鑑別試樣孔中之標記物類型。本申請案之不同實施例可量測標記物之壽命，但用於激發標記物之激發能、每一

像素中之感測器區數及/或藉由感測器檢測之波長有所變化。

III. 激發源

根據一些實施例，一或多個激發源可位於集成器件外部，且可經配置以將光脈衝遞送至具有試樣孔之集成器件中。舉例而言，標題為「PULSED LASER」且在2015年5月20日提出申請之美國臨時專利申請案62/164,485及標題為「PULSED LASER」且在2016年3月18日提出申請之美國臨時專利申請案62/310,398闡述可用作激發源之脈衝雷射源的實例，該等臨時專利申請案中之每一者之全部內容以引用方式併入本文中。舉例而言，光脈衝可耦合至複數個試樣孔且用於激發該等孔內之一或多種標記物。根據一些實施方案，一或多個激發源可遞送一或多個特徵波長下之光脈衝。在一些情形下，激發源可包裝為安裝於基礎儀器(其中可載有集成器件)中或耦合至基礎儀器之可替換模組。可將來自激發源之能量以輻射方式或非輻射方式遞送至至少一個試樣孔或至少一個試樣孔中之至少一種試樣中。在一些實施方案中，具有可控強度之激發源可經配置以將激發能遞送至集成器件之複數個像素中。像素可配置成線性陣列(例如列或行)或2D陣列(例如像素陣列之子區域或完整像素陣列)。

任一適宜光源皆可用於激發源。一些實施例可使用非相干光源且其他實施例可使用相干光源。藉助非限制性實例，根據一些實施例，非相干光源可包含不同類型之發光二極體(LED)，例如有機LED(OLED)、量子點(QLED)、奈米線LED及(無機)有機半導體LED。藉助非限制性實例，根據一些實施例，相干光源可包含不同類型之雷射，例如半導體雷射(例如垂直腔表面發射雷射(VCSEL)、邊緣發射雷射及分佈-反饋(DFB)雷射二極體)。另外或或者，可使用板條式耦合光學波導雷射(SCOWL)或其他不對稱單一模型波導結構。在一些實施方案中，相干光源可包括有機雷射、量子點雷射及固態雷射(例如由雷

射二極體或閃光燈激發之Nd:YAG或ND:玻璃雷射)。在一些實施例中，可使用雷射-二極體激發式纖維雷射。可將相干光源無源鎖模以產生超短脈衝。可存在一種以上類型之用於集成器件上之像素陣列之激發源。在一些實施例中，可組合不同類型之激發源。可根據用於製作所選類型之激發源之習用技術來製作激發源。

以介紹方式且並不限制本發明，相干光源之實例性配置繪示於圖30A中。該圖圖解說明可包含超短脈衝雷射激發源30-110作為激發源之分析型儀器30-100。超短脈衝雷射30-110可包括增益介質30-105(其在一些實施例中可為固態材料)、用於激發增益介質之幫浦源(未展示)及至少兩個空腔反射鏡30-102、30-104 (其界定光學雷射空腔之末端)。在一些實施例中，可在雷射空腔中存在一或多個其他光學元件以用於光束成型、波長選擇及/或脈衝形成。在操作時，脈衝雷射激發源30-110可產生超短光學脈衝30-120，其在空腔末端反射鏡30-102、30-104之間之雷射空腔中來回循環且穿過增益介質30-105。空腔反射鏡30-104中之一者可部分地透射一部分循環脈衝,，從而一系列光學脈衝30-122自脈衝雷射30-110發射至後續組件30-160 (例如光學組件及集成器件)。所發射脈衝可掃過特徵在於光束腰w之光束(由虛線指示)。

發射脈衝30-122之所量測時間強度特徵可表現為如圖30B中所繪示。在一些實施例中，發射脈衝之峰強度值可大致相等，且該等特徵可具有高斯型時間特徵(Gaussian temporal profile)，但可能為其他特徵(例如雙曲正割特徵)。在一些情形下，脈衝可並不具有對稱時間特徵且可具有其他時間形狀。在一些實施例中，增益及/或損失動力學可產生具有不對稱特徵之脈衝。可藉由半高全寬(FWHM)值來表徵每一脈衝之持續時間，如圖30B中所指示。超短光學脈衝可具有小於100皮秒之FWHM值。

自雷射激發源發射之脈衝可相隔規則間隔*T*。在一些實施例中，可藉由雷射中之有源增益及/或損失調節速率來測定*T*。對於鎖模雷射而言，可藉由空腔末端反射鏡30-102、30-104之間之來回行進時間來測定*T*。根據一些實施例，脈衝間隔時間*T*可介於約1 ns與約100 ns之間。在一些情形下，脈衝間隔時間*T*可介於約0.1 ns與約1 ns之間。在一些實施方案中，脈衝間隔時間*T*可介於約100 ns與約2 μs之間。

在一些實施例中，光學系統30-140可針對來自雷射激發源30-110之脈衝30-122之光束進行操作。舉例而言，光學系統可包含一或多個透鏡以重新整形光束及/或改變光束之發散。重新整形光束可包含增加或降低光束腰值及/或改變光束之橫截面形狀(例如自橢圓形至圓形、自圓形至橢圓形等)。改變光束之發散可包括彙聚或發散光束通量。在一些實施方案中，光學系統30-140可包含衰減器或放大器以改變光束能量之量。在一些情形下，光學系統可包含波長過濾元件。在一些實施方案中，光學系統可包含脈衝成型元件，例如脈衝延伸器及/或脈衝壓縮器。在一些實施例中，光學系統可包含一或多個非線性光學元件，例如用於減小脈衝長度之可飽和吸收器。根據一些實施例，光學系統30-140可包含一或多個改變來自雷射激發源30-110之脈衝之偏振之元件。

在一些實施方案中，光學系統30-140可包含非線性晶體，其用於經由頻率加倍將來自激發源30-110之輸出波長轉化成較短波長或經由參數放大轉化成較長波長。舉例而言，雷射輸出可在非線性晶體(例如在週期極化鈮酸鋰(PPLN))或其他非極化非線性晶體中頻率加倍。此一頻率加倍過程可使得獲得更有效雷射以生成更適於激發所選螢光團之波長。

片語「特徵波長」或「波長」可係指由激發源產生之輻射之受限帶寬內之中心或主要波長。在一些情形下，其可係指由激發源產生

之輻射之帶寬內之峰波長。舉例而言，可基於生物分析器件中所使用發光標記物或探針之選擇來選擇激發源之特徵波長。在一些實施方案中，選擇激發能來源之特徵波長以直接激發(例如單光子激發)所選螢光團。在一些實施方案中，選擇激發源之特徵波長以用於間接激發(例如多光子激發或諧波轉化成提供直接激發之波長)。在一些實施例中，可藉由經構形以生成在應用於試樣孔之特定波長下之激發能之光源來生成激發輻射。在一些實施例中，激發源之特徵波長可小於來自試樣之相應發射之特徵波長。舉例而言，激發源可發射特徵波長介於500 nm與700 nm之間(例如515 nm、532 nm、563 nm、594 nm、612 nm、632 nm、647 nm)之輻射。在一些實施例中，激發源可提供定中心於兩個不同波長(例如532 nm及593 nm)下之激發能。

在一些實施例中，可使用脈衝激發源激發發光標記物以量測發光標記物之發射壽命。此可用於基於發射壽命而非發射顏色或波長來區分發光標記物。作為一實例，脈衝激發源可週期性激發發光標記物以生成及檢測用於測定標記物之壽命之後續光子發射事件。在來自激發源之激發脈衝經小於發光標記物之壽命之持續時間自峰脈衝功率或強度轉變至較低(例如接近消失)功率或強度時，可量測發光標記物之壽命。可有益地使激發脈衝迅速終止,從而其並不在評估發光標記物之壽命時於激發後期期間再激發發光標記物。舉例而言且並不加以限制，脈衝功率可在250皮秒之後降至小於峰功率大約20 dB、大約40 dB、大約80 dB或大約120 dB。在一些實施方案中，脈衝功率可在100皮秒之後降至小於峰功率大約20 dB、大約40 dB、大約80 dB或大約120 dB。

使用超短激發脈衝激發發光標記物之另一優點在於減小了標記物之光漂白。向標記物施加連續激發能可隨時間變化漂白及/或損害發光標記物。儘管激發源之峰脈衝功率可遠高於在連續暴露下快速損

害標記物之值，但使用超短脈衝可增加在標記物由激發能損害之前有用量測之時間及數量量。

在使用脈衝激發源分辨發光標記物之壽命時，激發能脈衝之間之時間可與標記物之最長壽命一樣長或更長以觀察及評估每一激發脈衝之後的發射事件。舉例而言，激發脈衝之間之時間間隔T (參見圖30B)可長於所檢驗螢光團之任一發射壽命。在此情形中，在來自先前脈衝之經激發螢光團具有適當量之時間發螢光之前，後續脈衝可能並未到達。在一些實施例中，間隔T需要足夠長以測定激發螢光團之激發脈衝與在終止激發脈衝後且在下一激發脈衝前由螢光團發射之後續光子之間的時間。

儘管激發脈衝之間之間隔T應足夠長以觀察螢光團之衰減性質，但亦期望T足夠短以容許在短時間段中進行許多量測。舉例而言且並不加以限制，一些應用中所使用螢光團之發射壽命可在約100皮秒至約10奈秒範圍內。因此，用於檢測及/或分辨該等壽命之激發脈衝可具有介於約25皮秒至約2奈秒之間之持續時間(FWHM)，且可提供於介於約20 MHz與約1 GHz之間之脈衝脈衝速率下。

進一步詳細而言，可使用用於調節激發能以產生用於壽命量測之脈衝激發源之任一適宜技術。激發源(例如雷射)之直接調節可涉及調節激發源之電驅動信號，從而發射功率呈脈衝形式。可調節光源輸入功率(包含光學抽吸功率)及一部分增益區中之激發態載子注入及/或載子去除以影響增益介質之增益，從而使得經由動態增益成型來形成激發能脈衝。另外，可藉由各種方式調節光學共振器之品質(Q)因子以使用Q切換技術形成脈衝。該Q切換技術可為主動式及/或被動式。可將雷射之共振空腔之縱向模式鎖模以經由鎖模產生一系列發射光脈衝。該等鎖模技術可為主動式及/或被動式。雷射空腔可包含單獨吸收部分以容許調節載子密度且控制該部分之吸收損失，由此提供用於

使激發脈衝成型之其他機制。在一些實施例中，可使用光學調節器將連續波(CW)之光束光調節成激發能脈衝形式。在其他實施例中，可使用發送至耦合至激發源之聲光調節器(AOM)之信號以改變輸出光之偏轉、強度、頻率、相及/或偏振以產生脈衝激發能。AOM亦可用於連續波光束掃描、Q切換及/或鎖模。儘管闡述用於產生脈衝激發源之上述技術，但可使用產生脈衝激發源之任一適宜方式來量測發光標記物之壽命。

在一些實施例中，用於形成適用於壽命量測之脈衝激發源之技術可包含調節驅動光子發射之輸入電信號。一些激發源(例如二極體雷射及LED)將電信號(例如輸入電流)轉化成光信號。光信號之特性可取決於電信號之特性。在產生脈衝光信號時，電信號可隨時間有所變化以產生可變光信號。調節電信號以具有特定波形可產生具有特定波形之光學信號。電信號可為具有某一頻率之正弦曲線波形且所得光脈衝可出現於與頻率相關之時間間隔內。舉例而言，具有500 MHz頻率之電信號可產生每2奈秒具有脈衝之光信號。由不同脈衝激發源(不論彼此類似抑或不同)產生之組合光束可具有低於1 mm之相對路徑差。

在一些激發源(例如雷射二極體)中，電信號改變載子密度且經由重組電子及電洞對來產生光子。載子密度與光信號相關，從而在載子密度高於臨限值時，經由受激發射生成大量相干光子。供應至雷射二極體之電流可將電子或載子注入器件中，且由此增加載子密度。在載子密度高於臨限值時，可以快於供應載子之電流之速率生成光子，且由此載子密度可降低至低於臨限值且光子生成有所減小。隨著光子生成之減小，因連續電流注入及光子吸收，載子密度再次開始增加，且最終增加至高於臨限值。此循環使得載子密度圍繞光子生成之臨限值發生振盪，從而使得光信號產生振盪。該等動力學(稱為鬆弛振盪)可因載子密度振盪而在光信號中產生假像。在最初將電流供應至雷射

時，可在光信號達到穩定功率之前因載子密度振盪而產生振盪。在形成脈衝激發源時，載子密度振盪可在脈衝光信號中引入假像。來自該等鬆弛振盪之假像可增寬脈衝光信號及/或在光信號中產生尾部，從而限制了可藉由此一脈衝光源檢測之壽命，此乃因激發信號可與藉由發光標記物發射之光子重疊。

在一些實施例中，可使用用於縮短激發脈衝之持續時間之技術以減小檢測發光標記物所需之激發能且由此減少或延遲漂白及其他對於發光標記物之損害。可使用縮短激發脈衝之持續時間之技術來減小在激發脈衝之最大值或峰之後激發能的功率及/或強度，從而容許檢測較短壽命。該等技術可電驅動激發源以減小在峰功率之後之激發功率。可調整電驅動信號以儘可能迅速地驅動激發能脈衝之強度在峰脈衝之後達到零。此一技術可涉及在產生峰功率之後逆轉電驅動信號之符號。可調整電信號以在光學信號之第一鬆弛振盪或第一振盪之後迅速減小載子密度。藉由減小在第一振盪之後之載子密度，可僅生成第一振盪之光脈衝。電信號可經構形以生成藉由減小在信號峰之後發射之光子數來迅速關斷光信號之短脈衝。根據一些實施例，可設計皮秒雷射二極體系統以發射光脈衝。在一些實施例中，可使用可飽和吸收器(包含半導體可飽和吸收器(SESAM))來阻抑光學尾部。在該等實施例中，使用可飽和吸收器可將光學尾部阻抑3-5 dB或在一些情況下阻抑大於5 dB。減小激發脈衝中之尾部之效應可減小及/或消除對於激發能之額外過濾的任何需要，增加可量測之壽命範圍，及/或使得能夠獲得較快脈衝速率。增加激發脈衝速率可使得能夠在給定時間中實施較多實驗，此可降低獲取足夠統計學數據以鑑別標記試樣物體之標記物之壽命所需之時間。

另外，可一起使用該等技術中之兩者或更多者來生成脈衝激發能。舉例而言，可使用光學調節技術進一步修飾自直接調節源發射之

脈衝激發能。可以任一適宜方式組合用於調節激發脈衝及調整電脈衝驅動信號之技術以最佳化用於實施壽命量測之脈衝激發能。可將經調整電驅動信號施加至來自直接調節源之脈衝激發能。

在一些實施例中，可使用具有某一數量之線接合件之雷射二極體作為脈衝激發源。具有較多線接合件之雷射二極體可減小激發源之電感。具有較低電感之雷射二極體可使得雷射中之電流能夠以較高頻率進行操作。選擇包裝方法以最小化電感可改良以較高頻率供應至激發源之功率，使得能夠獲得較短激發脈衝，更快減小峰後光學功率，及/或增加用於檢測發光標記物之脈衝重複速率。

在一些實施例中，可使用傳輸線與激發源之組合來生成光脈衝。傳輸線可與雷射二極體之阻抗匹配以改良光脈衝之性能及/或品質。在一些實施例中，傳輸線阻抗可為50歐姆。在一些情況下，終端電阻可類似於線電阻以避免反射。或者或另外，終端阻抗可類似於線阻抗以避免反射。終端阻抗可小於線阻抗以反射負脈衝。在其他實施例中，終端阻抗可具有電容性或電感性組件以控制負反射脈衝之形狀。在其他實施例中，傳輸線可容許較高脈衝頻率。使用傳輸線可產生頻率在40 MHz至500 MHz範圍內之電脈衝。可組合使用傳輸線與上述經調整電信號以產生光脈衝具有某一持續時間及特定時間間隔之脈衝光源。

用於調整電信號以改良光脈衝產生之技術可包含將激發源連結至具有負偏壓能力之電路。在一些實施例中，可在光脈衝發射之後將負偏壓提供至激發源以減少光脈衝中之尾部發射。實例性電路可包含電流源、二極體雷射、電阻器、電容器及開關，其可用於減少光脈衝中之尾部之存在。此一電路可產生在關閉開關時繞過二極體雷射之恆定電流，或呈導電狀態。在打開開關時，開關可具有高電阻且電流可流經二極體雷射。可藉由打開及關閉開關以向二極體雷射提供間歇電

流來生成光脈衝。在一些情況下，電阻可足夠高且電容足夠小，使得在打開開關時在電容器兩側存在電壓且二極體雷射發射光。在關閉開關時，電容器兩側之電壓將反向偏置二極體雷射。此一反向偏置可減小或消除光脈衝中之尾部之存在。在該等情況下，開關可經構形以在光脈衝峰之後關閉以在峰光脈衝之後立即減小雷射功率。可選擇電路中之電阻值，從而電容器上之電荷在隨後打開開關及/或藉由雷射二極體生成後續光脈衝之前發生放電。

可提供其他電路組件以調整雷射二極體之電信號，從而產生光脈衝。在一些實施例中，多個電容器、電阻器及電壓可連結為網絡電路以控制供應至雷射二極體之電信號之波形。可藉由切換具有相應信號S1、S2、.....、SN之諸多電壓V1、V2、.....、VN (在存在N個電容器子電路時)來產生受控波形。

在一些實施例中，用於生成光脈衝之電信號可使用具有離散組件(包含射頻(RF)及/或微波組件)之電路。可包含於此一電路中之離散組件係DC阻斷器、適配器、邏輯閘、終接器、移相器、延遲器、衰減器、組合器及/或RF放大器。可使用該等組件產生具有某一幅值之正電信號，隨後產生具有另一幅值之負電信號。可正電信號與負電信號之間存在延遲。在其他實施例中，電路可產生多個組合形成經構形以驅動激發源之電脈衝信號之電信號。此一電路可產生可用於增加光脈衝功率之差分輸出。藉由調節電路之離散組件，可調節電輸出信號以產生適用於壽命量測之光脈衝。

在一些實施例中，可組合激發源以生成用於壽命量測之光脈衝。同步脈衝源可經某一距離耦合至電路或負載。在一些實施例中，激發源可平行耦合至電路。激發源可來自相同來源或來自多個來源。在具有多個來源之一些實施例中，多個來源可在激發源類型上有所變化。在組合來源時，可能較為重要的是，考慮電路阻抗及激發源以使

足夠功率供應至激發源。可藉由使用一或多種用於產生脈衝激發源之上述技術來組合來源。

激發源可包含電池組或任一經配置以向激發源提供動力之其他電源。舉例而言，激發源可位於基礎儀器中且可經由與其耦合之集成生物分析器件(例如經由導電引線)來接收其操作功率。激發源可獨立控制或聯合集成生物分析器件之控制一起控制。僅作為一實例，可以無線方式或經由有線互連(例如USB互連)使用個人電腦及/或集成生物分析器件來將激發源之控制信號提供至激發源。

在一些實施方案中，激發源可以時間門控方式及/或以與集成器件之一或多個感測器同步之方式來進行操作。舉例而言，可打開激發源以激發發光標記物，且然後關斷。在打開激發源的同時可關斷感測器，且然後可在關斷激發源之後打開保持採樣間隔。在一些實施例中，可打開感測器保持採樣間隔，同時打開激發源。

IV. 使用集成器件及激發源之實例性量測

可使用本申請案中所闡述集成器件或集成器件及激發源之任一組合來獲得用於檢測、分析及/或探測試樣中之分子之量測。激發源可為脈衝激發源或在一些情況下為連續波源。加注標籤至特定試樣之發光標記物可指示試樣之存在。可藉由激發能、發光發射波長及/或由標記物發射之發射能之壽命來區分發光標記物。可藉由測定每一標記物之壽命來鑑別具有類似發光發射波長之標記物。另外，可藉由每一標記物之發光發射波長來鑑別具有類似壽命之標記物。藉由使用標記物(其中藉由所發射發光之時間及/或光譜性質之組合來鑑別標記物)，可實施標記物及有關試樣之定量分析及/或鑑別。

可使用壽命量測來測定存在於試樣孔中之標記物。可藉由實施多個實驗來鑑別發光標記物之壽命，其中將發光標記物激發至激發態且然後量測發射光子時之時間。使激發源形成脈衝以產生激發能脈衝

且引導至標記物處。量測激發脈衝與來自發光標記物之後續光子發射事件之間之時間。藉由使用複數個激發脈衝重複該等實驗，可測定在特定時間間隔內光子發射之情況數。該等結果可填充代表發生於一系列離散時間間隔或時間倉內之光子發射事件數量之直方圖。可調節時間倉數及/或每一倉之時間間隔以鑑別特定組之壽命及/或標記物。

隨後在一些實施例中闡述可進行以鑑別發光標記物之實例性量測。具體而言，論述使用僅發光壽命量測、聯合光譜及發光壽命量測及僅發光壽命量測但使用兩種不同激發能來區分發光標記物之實例。實施例並不限於下文所詳述之實例。舉例而言，一些實施例可僅使用光譜量測來鑑別發光標記物。

可使用任一適宜發光標記物。在一些實施例中，可使用市售螢光團。舉例而言且並不加以限制，可使用下列螢光團：Atto Rho14（「ATRho14」）、DyLight™ 650（「D650」）、Seta™Tau 647（「ST647」）、CF™ 633（「C633」）、CF™ 647（「C647」）、Alexa Fluor® 647（「AF647」）、BODIPY® 630/650（「B630」）、CF™ 640R（「C640R」）及/或Atto 647N（「AT647N」）。

另外及/或視情況，可以任一適宜方式修飾發光標記物以增加試樣分析製程之速度及準確度。舉例而言，可使光穩定劑偶聯至發光標記物。光穩定劑之實例包含但不限於除氧劑或三重態淬滅劑。使光穩定劑偶聯至發光標記物可增加光子發射速率且亦可減少「閃爍」效應(其中發光標記物並不發射光子)。在一些實施例中，在生物事件以毫秒等級發生時，增加光子發射速率可增加檢測到生物事件之機率。增加光子事件之速率可隨後增加發光信號之信號雜訊比且增加進行壽命量測之速率，從而使得試樣分析更為迅速且更我精確。

此外，可視需要調節集成器件之試樣孔中之環境以改變標記物之壽命。此可藉由認識到藉由標記物狀態之密度(此可使用環境進行

調節)來實現標記物之壽命來達成。舉例而言，標記物距試樣孔之底部金屬層愈遠，則壽命愈長。因此，為增加標記物之壽命，試樣孔(例如凹槽)之底部表面之深度可自金屬層延伸某一距離。同樣，用於形成試樣孔之材料可影響標記物之壽命。儘管不同標記物通常在相同方向(例如較長或較短)上具有壽命位移，但對不同標記物之影響程度可有所不同。因此，可改造不能經由壽命量測在自由空間中區分之兩種標記物以可藉由製作試樣孔環境以調節各種標記物之壽命來予以區分。

A. **壽命量測**

可使用一種激發能波長激發試樣孔中之標記物來實施壽命量測。選擇具有不同壽命之標記物之組合以基於壽命量測來區分個別標記物。另外，在藉由所用激發源照射時，標記物組合能夠達到激發態。經構形以使用一種激發進行壽命量測之集成器件可包含多個沿列定位之像素，其中每一試樣孔經構形以與同一波導耦合。像素包含試樣孔及感測器。可使用一或多個微腔或紅心光柵將波導耦合至每一像素之試樣孔。

脈衝激發源可為使用上述技術之脈衝激發源中之一者。在一些情況下，脈衝激發源可為經構形以經由雷射二極體之直接調節電抽吸發射脈衝之半導體雷射二極體。脈衝功率在峰之後大約250皮秒小於脈衝峰功率20 dB。每一激發脈衝之時間間隔在20-200皮秒範圍內。每一激發脈衝之間之持續時間在1-50奈秒範圍內。可實施實例性量測之方式之示意圖展示於圖31A中。因使用一種激發能，故可在集成器件中形成適於減小激發能至感測器之透射之激發濾光片，例如上述波長激發濾光片。

用於每一像素之感測器在每一像素中具有至少一個光敏感區。在光子到達感測器時之時間間隔內檢測光子。增加時間倉之數量可改

良在一系列時間倉中所收集光子之所記錄直方圖之解析度且改良不同發光標記物之區別。在感測器經構形以檢測特定波長時，4種發光標記物可發射類似於特定波長之發光。或者，4種發光標記物可在不同波長下發光。

可基於壽命量測區分之4種發光標記物之實例性組係ATRho14、Cy5、AT647N及CF™633，如由圖31B中之繪圖所展示。該4種標記物具有不同壽命且在使用至少4個時間倉時產生區分直方圖。圖31C概述該等標記物中之每一者在16個時間倉中之信號特徵。針對每一標記物將信號特徵正規化。時間倉在時間間隔中有所變化以提供每一標記物之獨特信號特徵。圖32A及32B分別圖解說明另一實例性組標記物ATTO Rho14、D650、ST647及CF™633之連續及離散信號特徵，該等標記物可基於壽命量測進行區分。標記物之其他組包含ATTO Rho14、C647、ST647、CF™633；Alexa Fluor®647、B630、C640R、CF™633；及ATTO Rho14、ATTO 647N、AlexaFluor647、CF™633。

B. 光譜壽命量測

壽命量測可與一或多種發光標記物之光譜量測進行組合。光譜量測可取決於個別標記物之發光波長且在每一像素中使用至少兩個感測器區捕獲。集成器件之實例性結構包含各自具有擁有兩個不同區域之感測器之像素，每一區域經構形以檢測不同波長。可使用多波長濾光片來將不同波長之光選擇性透射至每一感測器區。舉例而言，一個感測器區及濾光片組合可經構形以檢測紅光，而另一感測器區及濾光片組合可經構形以檢測綠光。

可使用一種激發能波長激發試樣孔中之標記物來組合壽命量測與光譜量測。選擇具有至少兩種不同發光波長之標記物組合，其中選擇以一定波長下發射且具有不同壽命之標記物來基於壽命及光譜量測區分個別標記物。另外，選擇標記物組合以能夠在藉由所用激發源照

射時達到激發態。

激發源係脈衝激發源，且可為使用上述技術之激發源中之一者。在一些情況下，脈衝激發源可為經構形以經由雷射二極體之直接調節電抽吸發射脈衝之半導體雷射二極體。脈衝功率在峰之後250皮秒小於峰功率20 dB。每一激發脈衝之持續時間在20-200皮秒範圍內。每一激發脈衝之間之時間間隔在1-50奈秒範圍內。可實施實例性量測之方式之示意圖展示於圖33A中。因使用一種激發能，故可使用適於減小激發能至感測器之透射之激發濾光片。

用於每一像素之感測器在每一像素中具有至少兩個光敏感區。在一些實施例中，在每一像素中存在兩個光敏感區。在其他實施例中，在每一像素中存在四個光敏感區。每一光敏感區經構形以檢測不同波長或波長範圍。在光子到達感測器時之時間間隔內檢測光子。增加時間倉之數量可改良在一系列時間倉中所收集光子之所記錄直方圖之解析度且改良不同發光標記物之區別(根據其個別壽命)。在一些實施例中，在感測器之每一區域中存在兩個時間倉。在其他實施例中，在感測器之每一區域中存在四個時間倉。

可基於壽命量測區分之4種發光標記物之實例性組係ATTO Rho14、AS635、Alexa Fluor®647及ATTO 647N。該4種標記物中之兩種以一個類似波長及另一類似波長發射。在類似波長下發射之每一對標記物內，標記物對具有不同壽命且在使用至少4個時間倉時產生區分直方圖。在此實例中，ATTO Rho14及AS635發射類似發光波長且具有不同壽命。Alexa Fluor® 647及ATTO 647N發射不同於由ATTO Rho 14及AS635發射之波長之類似發光波長，且具有不同壽命。圖33B展示此組標記物之壽命隨發射波長而變化之繪圖，其用以圖解說明可如何基於壽命及發射波長之組合來區分該等標記物中之每一者。圖34A展示ATT Rho14、Alexa Fluor® 647及ATT 647N之功率隨波長

而變化之繪圖。圖34B展示在存在於直徑為135 nmin之試樣孔中時該等標記物中之一者之螢光信號隨時間變化的繪圖。圖35A圖解說明該等標記物在4個光敏感區中之信號特徵且每一區捕獲4個時間倉。將信號特徵正規化且用於根據對於4個時間倉中之每一者由光敏感區所捕獲光子之相對數量來區分不同標記物。用於該等光譜-壽命量測之4種螢光團之其他組係ATRho14、D650、ST647、CF™633；ATTO Rho14、C647、ST647、CF™633；Alexa Fluor® 647、B630、C640R、CF™633；及ATTO Rho 14、ATTO 647N、Alexa Fluor® 647、CF™633。圖35B展示ATRho14、D650、ST647及C633之強度信號特徵隨時間變化之繪圖。圖35C圖解說明ATRho14之信號特徵。

C. **壽命-激發能量測**

可使用利用至少兩種激發能波長組合之壽命量測來區分多個標記物。在使用一種激發波長且並不使用另一種時，一些標記物可激發。針對每一激發波長選擇具有不同壽命之標記物之組合以基於壽命量測來區分個別標記物。在此實施例中，集成器件可經構形以使得每一像素具有擁有一個區域之感測器，且外部激發源可經構形以提供兩種激發能波長，該兩個波長可以是具有時間交錯之電調節脈衝二極體雷射。

激發源係至少兩種激發能之組合。激發源係脈衝激發源且可為使用上述技術之激發源中之一或多者。在一些情況下，脈衝激發源可為經構形以經由雷射二極體之直接調節電抽吸發射脈衝之兩個半導體雷射二極體。脈衝功率在峰之後250皮秒小於脈衝峰功率20 dB。每一激發脈衝之時間間隔在20-200皮秒範圍內 。每一激發脈衝之間之時間間隔在1-50奈秒範圍內。每一脈衝發射一種激發波長，且藉由已知激發波長，具有不同壽命之標記物之子組得以獨特鑑別。在一些實施例中，激發脈衝在不同波長中交替。舉例而言，在使用兩種激發波長

時，後續脈衝在一種波長與另一其他波長之間交替。可實施實例性量測之方式之示意圖展示於圖36A中。可使用用於組合多個激發源及具有不同波長之交錯脈衝之任一適宜技術。用於將一種以上激發波長之脈衝遞送至一列試樣孔之一些技術之實例闡釋且闡述於本文中。在一些實施例中，在每列試樣孔中存在單一波導且存在兩個，該等激發源經組合以便激發能脈衝在兩種激發波長之間交替。在一些實施例中，在每列試樣孔中存在兩個波導且每一波導經構形以攜載兩種激發波長中之一者。在其他實施例中，在每列像素中存在單一波導且一種波長耦合至波導之一端且另一波長耦合至另一端。

用於每一像素之感測器在每一像素中具有至少一個光敏感區。光敏感區可具有5微米×5微米之尺寸。在光子到達感測器時之時間間隔內檢測光子。增加時間倉之數量可改良在一系列時間倉中所收集光子之所記錄直方圖之解析度且改良不同發光標記物之區別。感測器具有至少兩個時間倉。

可基於壽命量測區分之4種發光標記物之實例性組係Alexa Fluor® 546、Cy3B™、Alexa Fluor® 647及ATTO 647N。如圖36B中所展示，Alexa Fluor® 546及Cy3B™在一種波長(例如532 nm)下激發，且具有不同壽命。Alexa Fluor® 647及ATTO 647N在另一波長(640 nm)下激發，且具有不同壽命，如圖37A中所展示。ATTO647N及CF™633 (其皆係在640 nm下激發)在16個時間倉中之可區分正規化信號特徵展示於圖37B中。藉由檢測在已知激發波長之後之光子，可基於先前激發波長來測定該等兩對標記物中之一對且基於壽命量測來鑑別每一對中之每一標記物。

等效內容及範圍

本申請案之各個態樣可單獨使用，組合使用，或以並未特定論述於前文所闡述實施例中之各種配置來使用，且由此並不將其應用限

於先前說明中所陳述或圖式中所圖解說明之組件之細節及配置。舉例而言，一實施例中所闡述之態樣可以任一方式與其他實施例中所闡述之態樣進行組合。

同樣，本發明可體現為提供至少一種實例之方法。實施為方法部分之動作可以任一適宜方式定序。因此，可構築以不同於所闡釋順序之順序實施動作之實施例，此可包含同時實施一些動作(儘管在闡釋性實施例中展示為依序動作)。

在申請專利範圍中使用諸如「第一」、「第二」、「第三」等序數詞術語來修飾申請專利範圍要素本身並不暗示一個申請專利範圍要素比申請專利範圍要素具有任何優先級、居先或次序靠前或實施方法之動作的時間次序，而是僅用作用以區分具有某一名稱的一個申請專利範圍要素與具有同一名稱(但使用序數詞術語)的另一要素以區分申請專利範圍要素。

同樣，本文中所使用之措辭及術語係出於說明目的且不應視為具有限制性。本文使用「包含」、「包括」或「具有」、「含有」、「涉及」及其變化形式意欲涵蓋其後所列示之項目及其等效物以及額外項目。

【符號說明】

1-101　核酸聚合酶

1-102　靶核酸

1-103　連接體

1-104　引子

1-110　試樣孔

1-120　靶容積

23-100　系統

23-102　集成器件

23-104 儀器

23-106 激發源

23-108 試樣孔

23-110 感測器

23-112 像素

23-114 集成器件界面

23-116 使用者界面

23-118 電腦界面

23-120 計算器件

23-122 處理器件

24-102 集成器件

24-106 激發源

24-108 試樣孔

24-110 感測器

24-112 像素

24-130 激發能

24-140 發射能

25-200 集成器件/基板

25-201 試樣孔層

25-203 試樣孔

25-210 層

25-215 感測器/能量收集組件/激發能收集組件

25-220 波導/波導層

25-225 層

25-230 激發源

25-240 擋板

25-260 濾光元件

25-275 感測器

26-200 集成器件

26-201 激發源耦合區

26-214 激發源

26-215 表面

26-216 光柵耦合器

26-218 層

26-220 波導

26-222 試樣孔

26-223 層

26-224 材料

26-226 擋板

26-228 層

26-230 層

27-100 像素

27-101 試樣

27-105 基板

27-210 試樣孔

27-211 黏著劑

27-212 進入孔口

27-214 壁

27-215 激發區

27-216 空腔或凹槽

27-220 激發耦合結構

27-230 材料/層

27-235 層

27-240 波導

27-247 激發輻射/激發能

27-250 發射引導結構

27-260 感測器

28-630 層

28-632 試樣孔

28-634 波導

28-636 層

29-900 像素

29-901A 電荷載子

29-901B 電荷載子

29-902 光子吸收/載子生成區

29-906 載子行進/捕獲區

29-908 載子儲存區

29-910 讀出電路

30-100 分析型儀器

30-102 空腔末端反射鏡

30-104 空腔末端反射鏡

30-105 增益介質

30-110 超短脈衝雷射激發源

30-120 超短光學脈衝

30-122 光學脈衝/發射脈衝

30-140 光學系統

30-160 組件

100 保護分子

101 非蛋白質保護分子

102 多肽

103 第二多肽

110 非共價結合位點

111 非共價結合位點

120 第二非共價結合位點

121 非共價結合位點

200 發光分子

201 發光分子

210 發光分子

211 相容反應性部分

250 核苷酸

251 核苷酸

300 連接體

301 連接體

302 分歧點/連接體

304 分歧點

310 間隔體連接體

312 間隔體連接體

313 三官能化間隔體連接體

325 基因編碼標籤

326 第一反應性基團

327 第一反應性非天然胺基酸

350 連接體

351 連接體

352 分歧點/連接體

354	分歧點
360	連接體
361	連接體
362	第一寡核苷酸
363	互補寡核苷酸
364	複性產物
375	基因編碼標籤
376	第二反應性基團
377	第二反應性非天然胺基酸
400	非共價結合配體
401	非共價結合配體
410	非共價結合配體
411	非功能結合位點
450	非共價結合配體
451	非共價結合配體
461	非功能結合位點
500	反應性部分
501	反應性部分
510	反應性部分
513	相容反應性部分
522	反應性部分
523	反應性部分
550	反應性部分
551	反應性部分
D1	尺寸
D2	尺寸

d1	尺寸/距離
D	距離
D_{tv}	橫截面尺寸
D_{sw}	橫向尺寸/直徑
w	光束腰

108年05月31日 修正替換頁

申請專利範圍

1. 一種於包含2個或更多類型之標記分子的試樣中鑑別單一分子之方法，該方法包括：

測定該試樣中該單一分子之發光壽命及發光強度；以及

基於該單一分子之發光壽命及發光強度二者之組合鑑別該單一分子為該2個或更多類型之標記分子之一。

2. 如請求項1之方法，其進一步包括將一或多種激發能之一系列脈衝遞送至該試樣。

3. 如請求項1之方法，其進一步包括檢測來自該試樣之複數個發射光子。

4. 如請求項1之方法，其進一步包括針對複數個來自該試樣之發射光子中之每一者記錄檢測到該發射光子與先前所遞送激發能之間的持續時間。

5. 如請求項1之方法，其中該2個或更多類型之標記分子包括4個分子類型。

6. 如請求項5之方法，其中該4個分子類型包括4類經發光標記之核苷酸。

7. 如請求項6之方法，其中該4類經發光標記之核苷酸包括含有腺嘌呤之第一核苷酸、含有鳥嘌呤之第二核苷酸、含有胞嘧啶之第三核苷酸及含有胸腺嘧啶或尿嘧啶之第四核苷酸。

8. 如請求項1之方法，其中該單一分子係納入核酸中之經發光標記之核苷酸。

9. 如請求項1之方法，其中重複該方法以鑑別一系列單一分子。

10. 如請求項9之方法，其中該系列單一分子係一系列依序納入包括引子之核酸中之經發光標記之核苷酸。

11. 如請求項10之方法，其進一步包括藉由分析依序納入包括該引子之該核酸中之經發光標記之核苷酸之序列來測定模板核酸的序列。

12. 如請求項3之方法，其中該複數個脈衝中之每一者包括單一激發能。

13. 如請求項3之方法，其中該複數個脈衝之第一部分包括第一激發能且該複數個脈衝之第二部分包括第二激發能。

14. 如請求項3之方法，其中以介於約10 MHz與約100 MHz之間或介於約100 MHz與約1 GHz之間之平均頻率遞送該系列脈衝。

15. 如請求項3之方法，其中該頻率介於約50 MHz與約200 MHz之間。

16. 如請求項4之方法，其中對於所鑑別之每一單一分子，所檢測發射光子數介於約10與約100之間或介於約100與約1,000之間。

17. 如請求項1之方法，其中將所鑑別每一單一分子固定於固體載體上。

18. 如請求項17之方法，其中該固體載體包括試樣孔之底部表面。

圖式

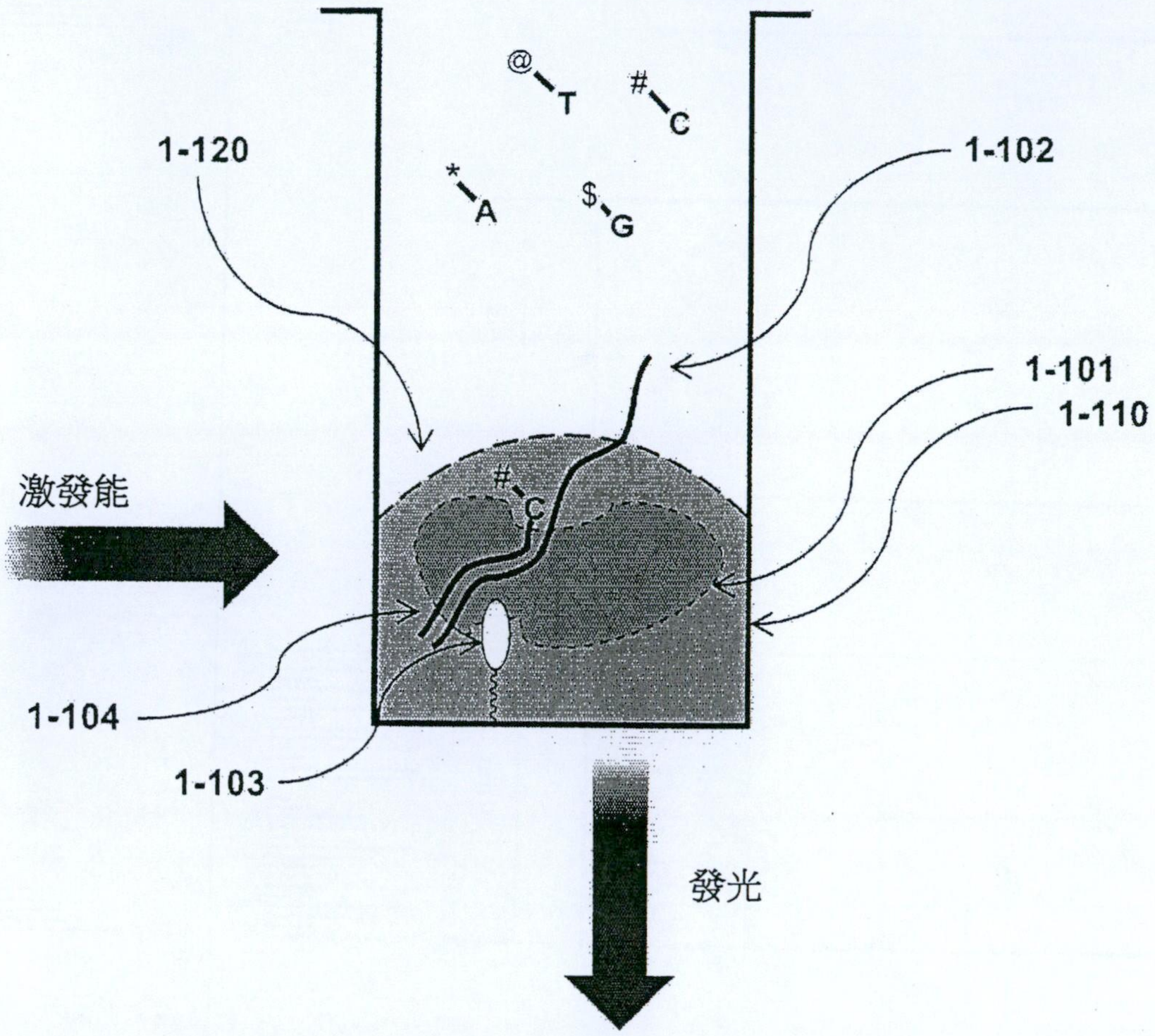


圖 1

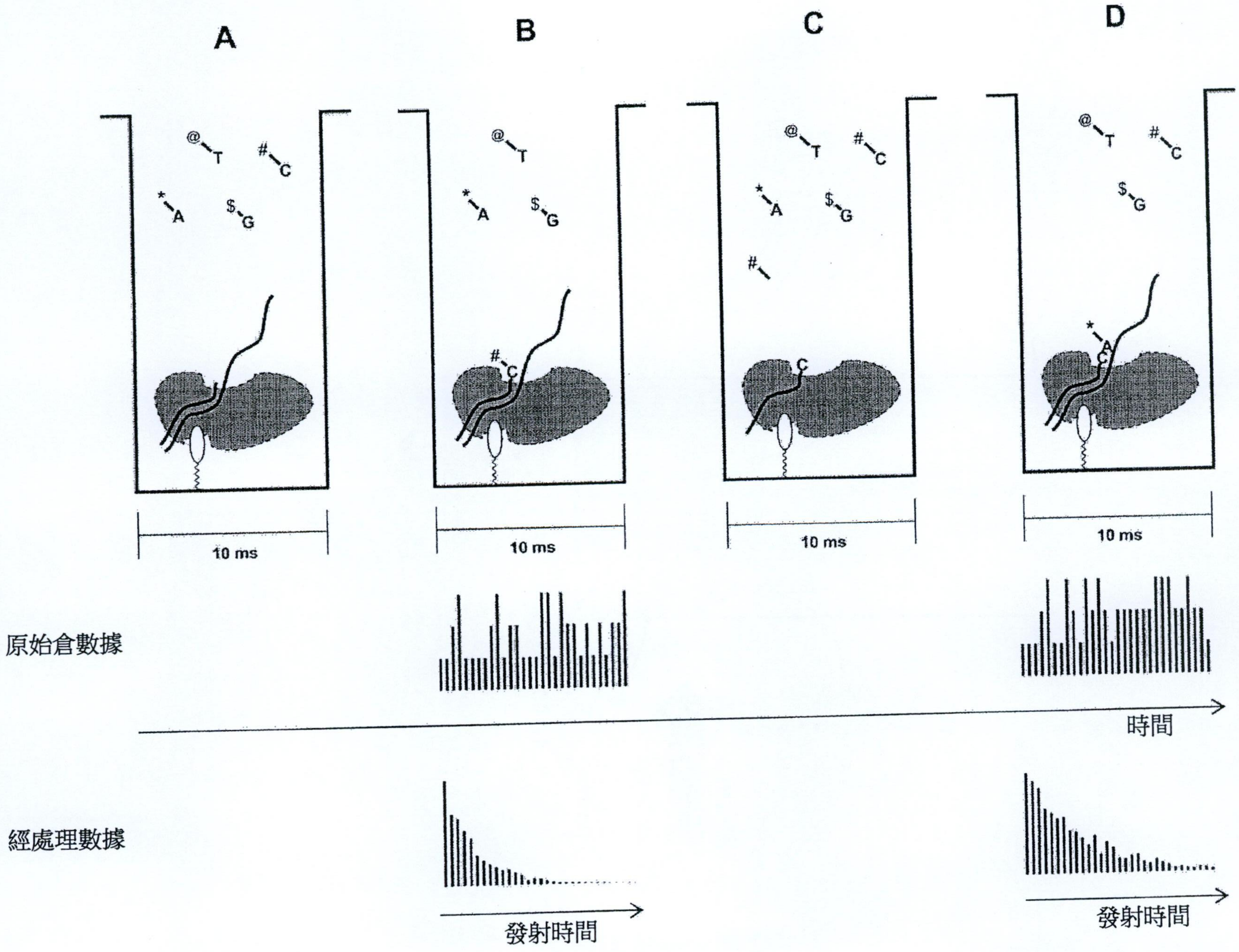
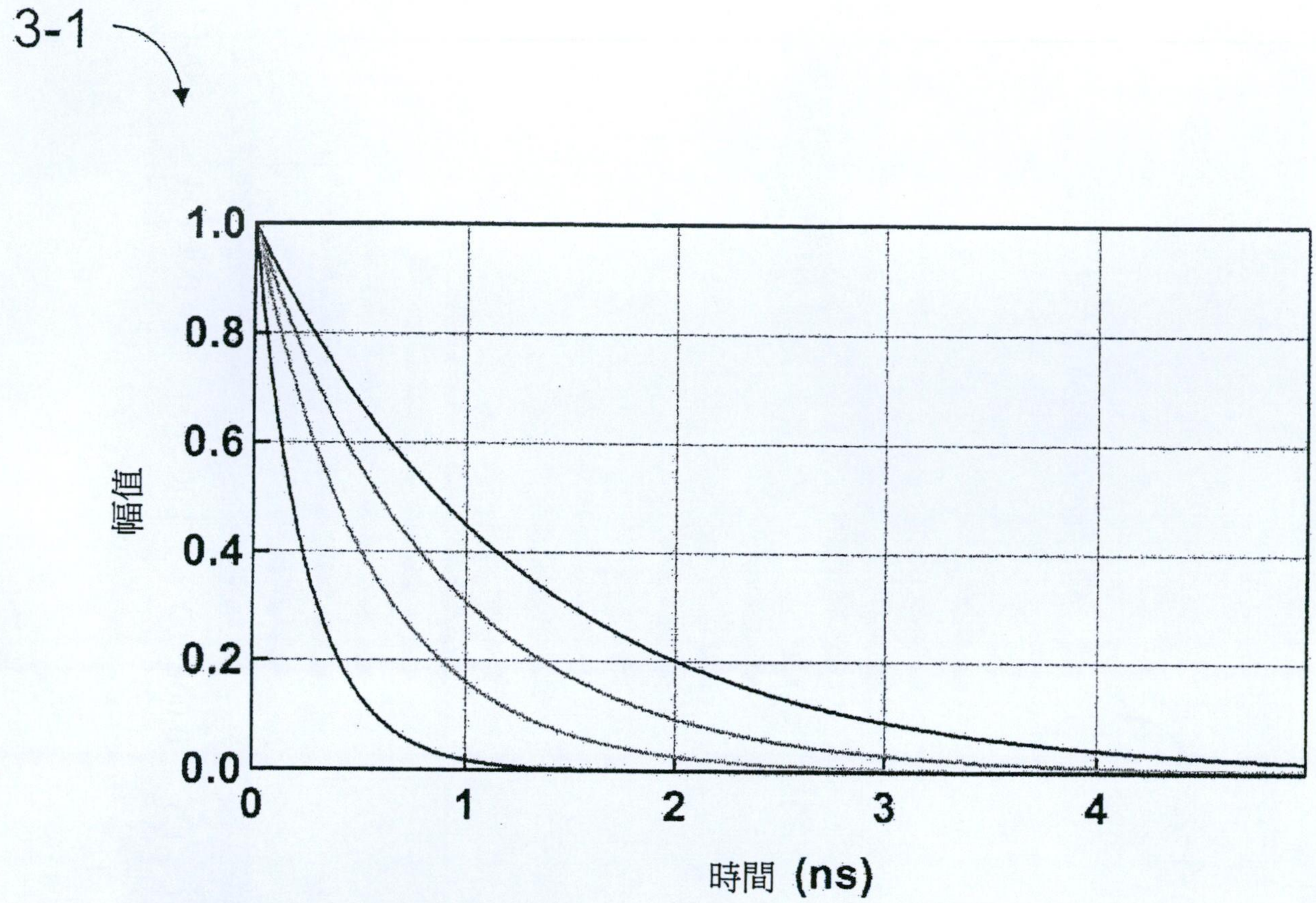


圖 2



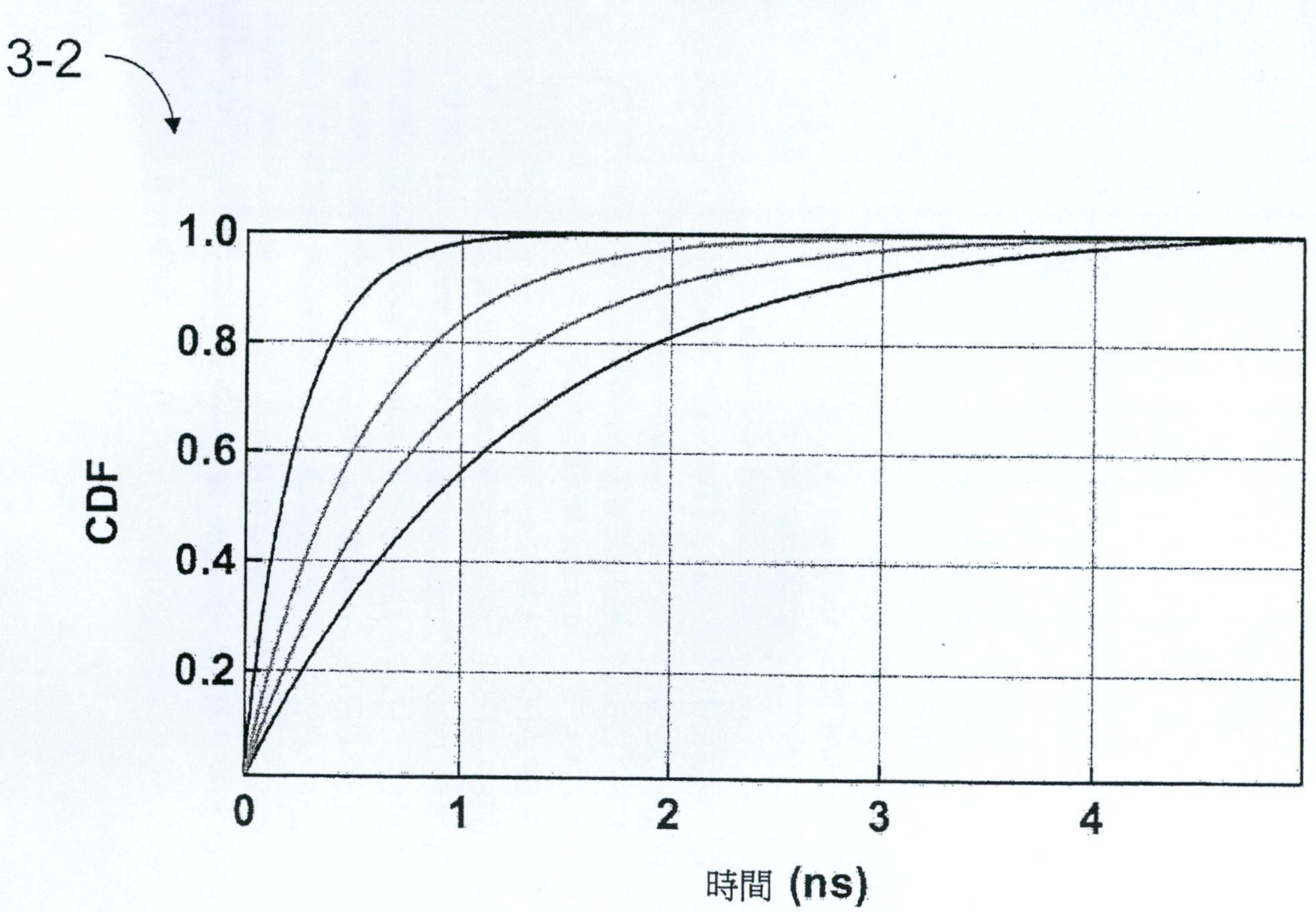


圖 3

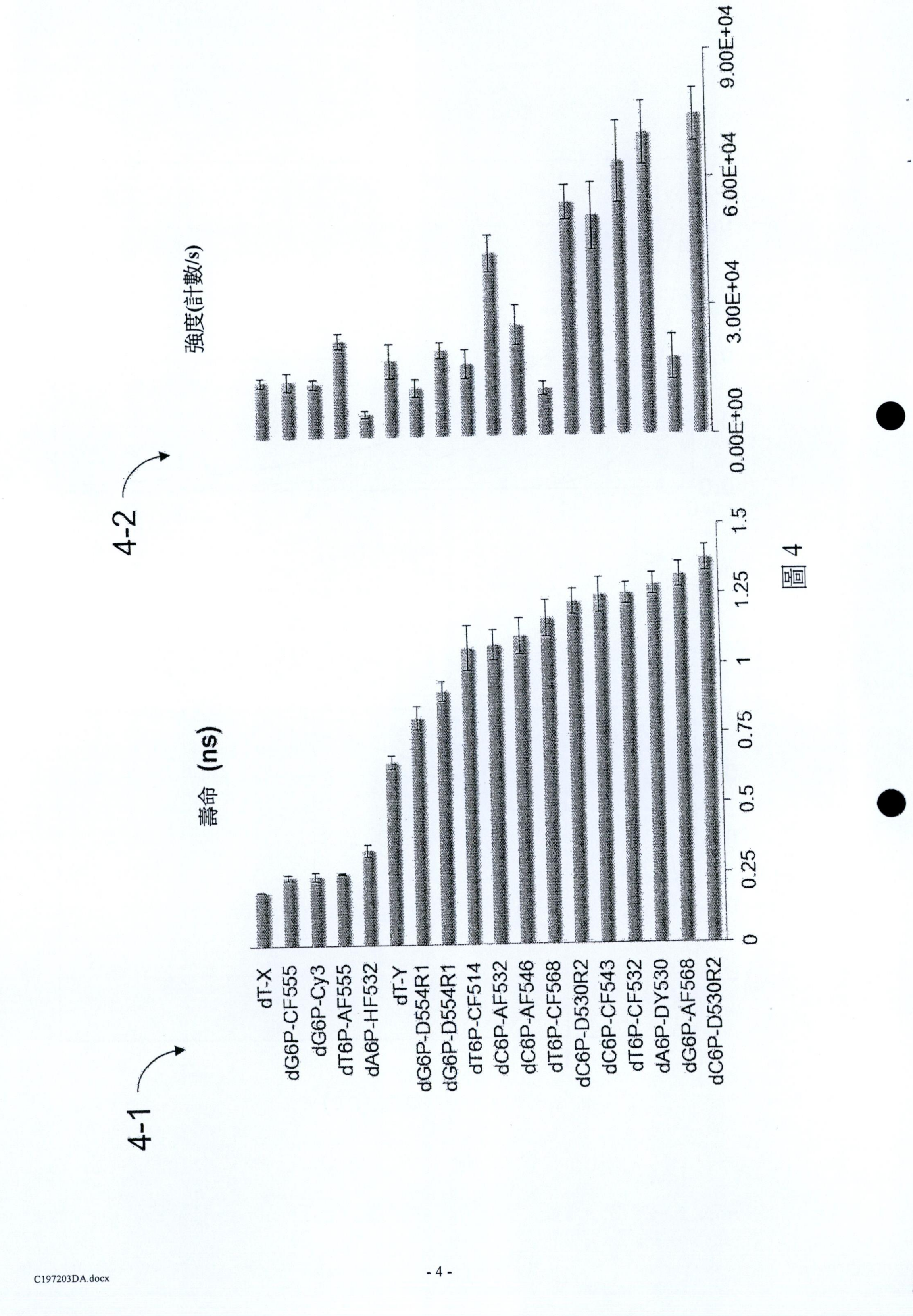
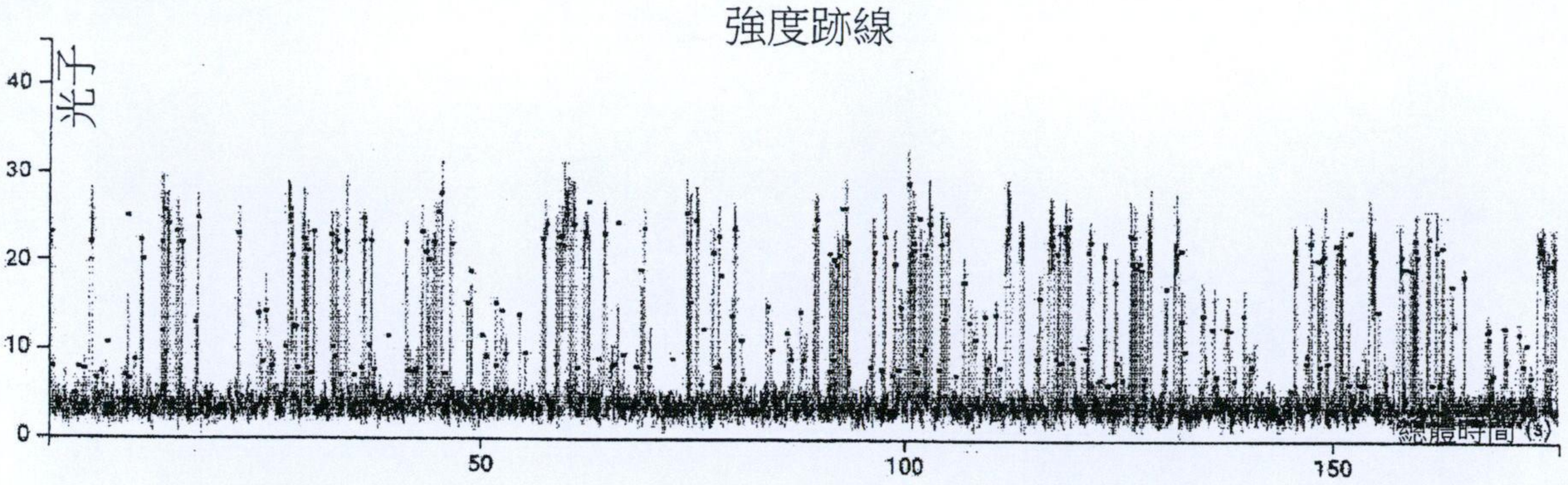
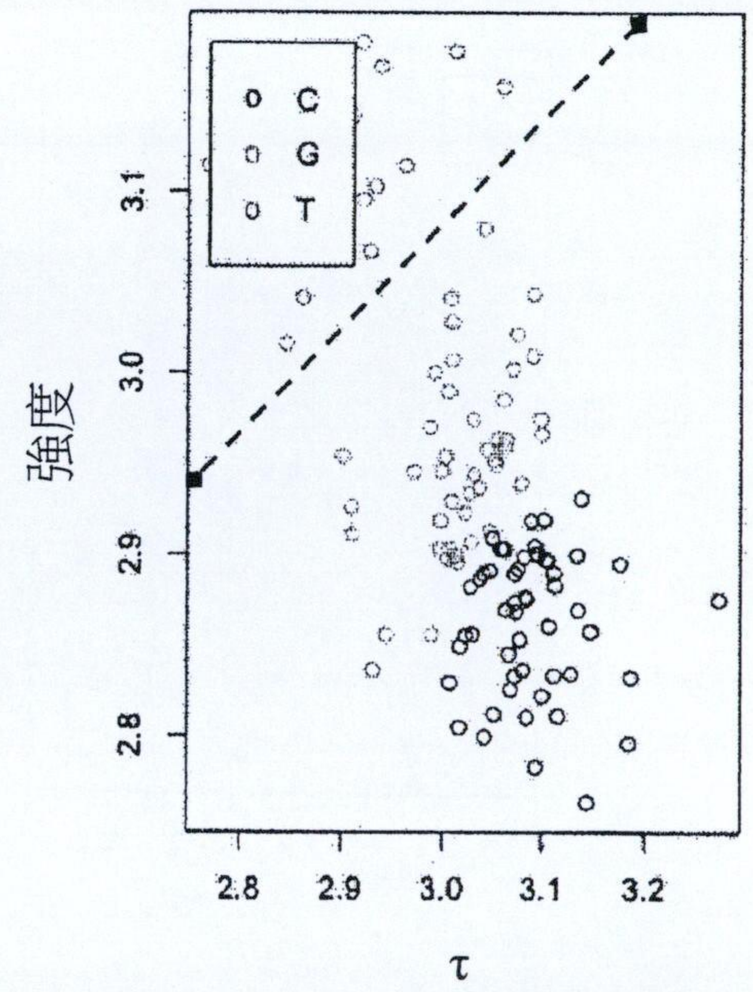

4-1
dT-X
dG6P-CF555
dG6P-Cy3
dT6P-AF555
dA6P-HF532
dT-Y
dG6P-D554R1
dG6P-D554R1
dT6P-CF514
dC6P-AF532
dC6P-AF546
dT6P-CF568
dC6P-D530R2
dC6P-CF543
dT6P-CF532
dA6P-DY530
dG6P-AF568
dC6P-D530R2
壽命 (ns)
0
0.25
0.5
0.75
1
1.25
1.5
4-2
強度(計數/s)
0.00E+00
3.00E+04
6.00E+04
9.00E+04

圖 4

5-1



5-2



5-3

```
P1      1 AACCCACC-CC-CCAAA-CACA-ACATAATCTCTAATCA-CAACAACCAACACCAACACCACCAAA-CA-A-ACATATCT  72
          ||||||||  ||  |||||  ||||  |||||  |||||   |||  |||||||  |||  |||  ||||||||||  ||  |  ||||||||
S1    110 AACCCACCACCACCAAAACACACACATA-TCTCTC-TCAACAACAAC-AAC-CCACCACCACCAAAACACACACATATCT  185

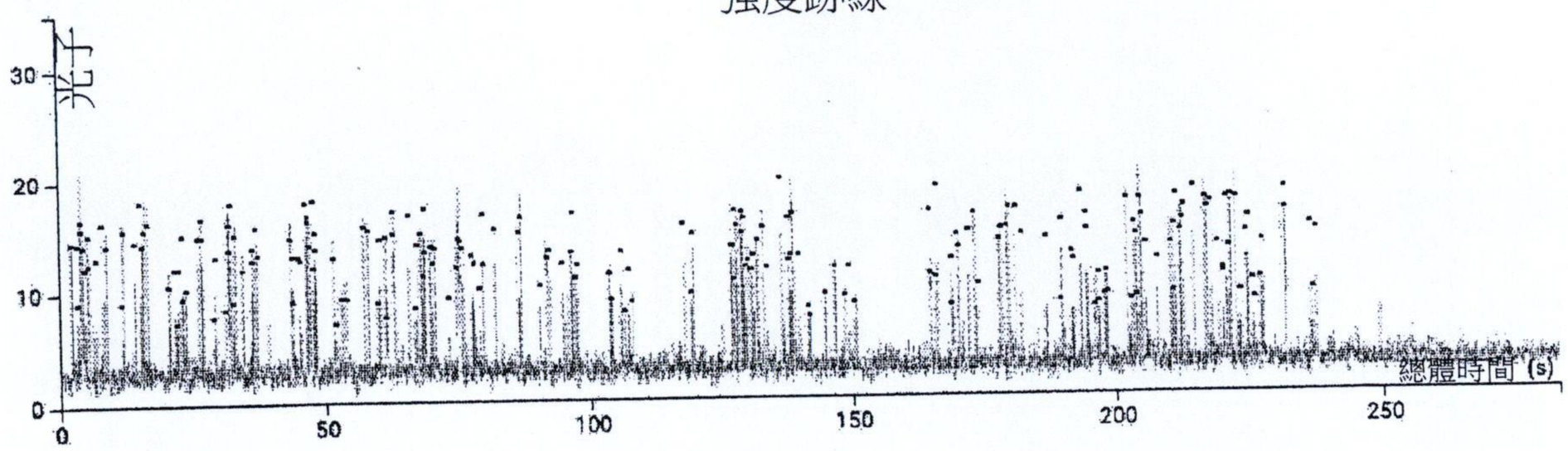
P1     73 CTCTCAACAA--ACA--CAACCACC-CCAACACAAACACATACCTCTC-CAACAACAACAAACCAC-AC-ACTAAAACAC  144
          ||||||||||  |||  |  ||||||  ||||  |||  |||||||  |||||  ||||||||||||  ||||  ||  ||  |||||||
S1    186 CTCTCAACAACAACAACCCACCACCACCAAAACACACACATATCTCTCTCAACAACAACAACCCACCACCACCAAAACAC  265

P1    145 ACACATACATCTCTCAACAACAACAACCCCAACACCACCAAAAAACACA-ATATCTCTTCTCA-CAACAACAAACCCCAAT  222
          |||||||  ||||||||||||||||||||||||  ||||||||||  |||||  ||||||||  ||||  |||||||||  ||  |  |
S1    266 ACACATATCTCTCTCAACAACAACAACCCACCACCACCAAAACACACACATATCTCT-CTCAACAACAACAACCCACCAC  344

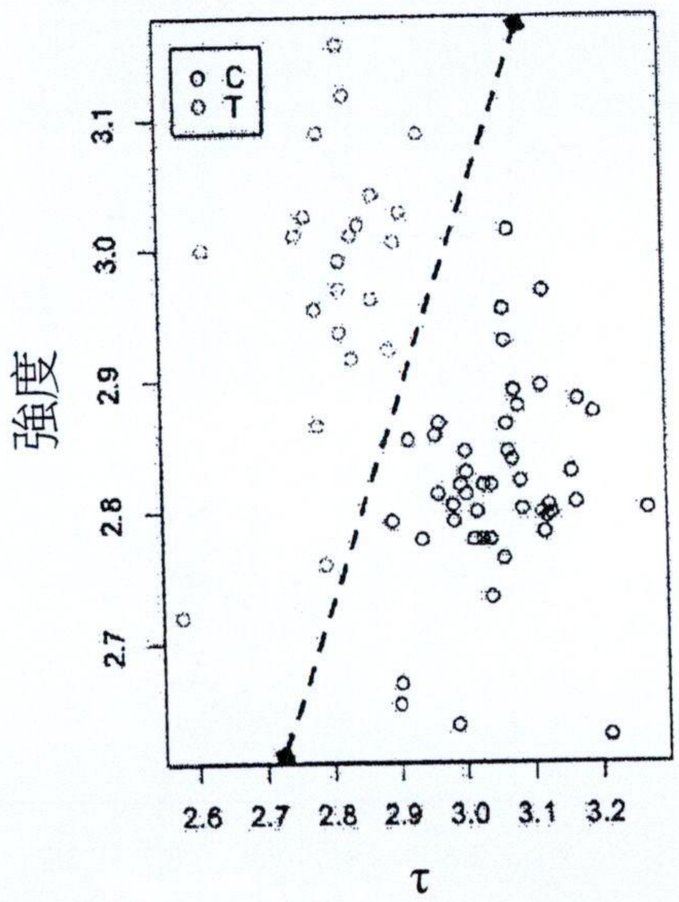
P1    223 CA-AAAAAAACACACATATTCTCTCTCAACAA  253
          ||  ||||  ||||||||||  ||||||||||||
S1    345 CACCAAAACACACACATAT-CTCTCTCAACAA  375
```

圖 5

6-1



6-2



6-3

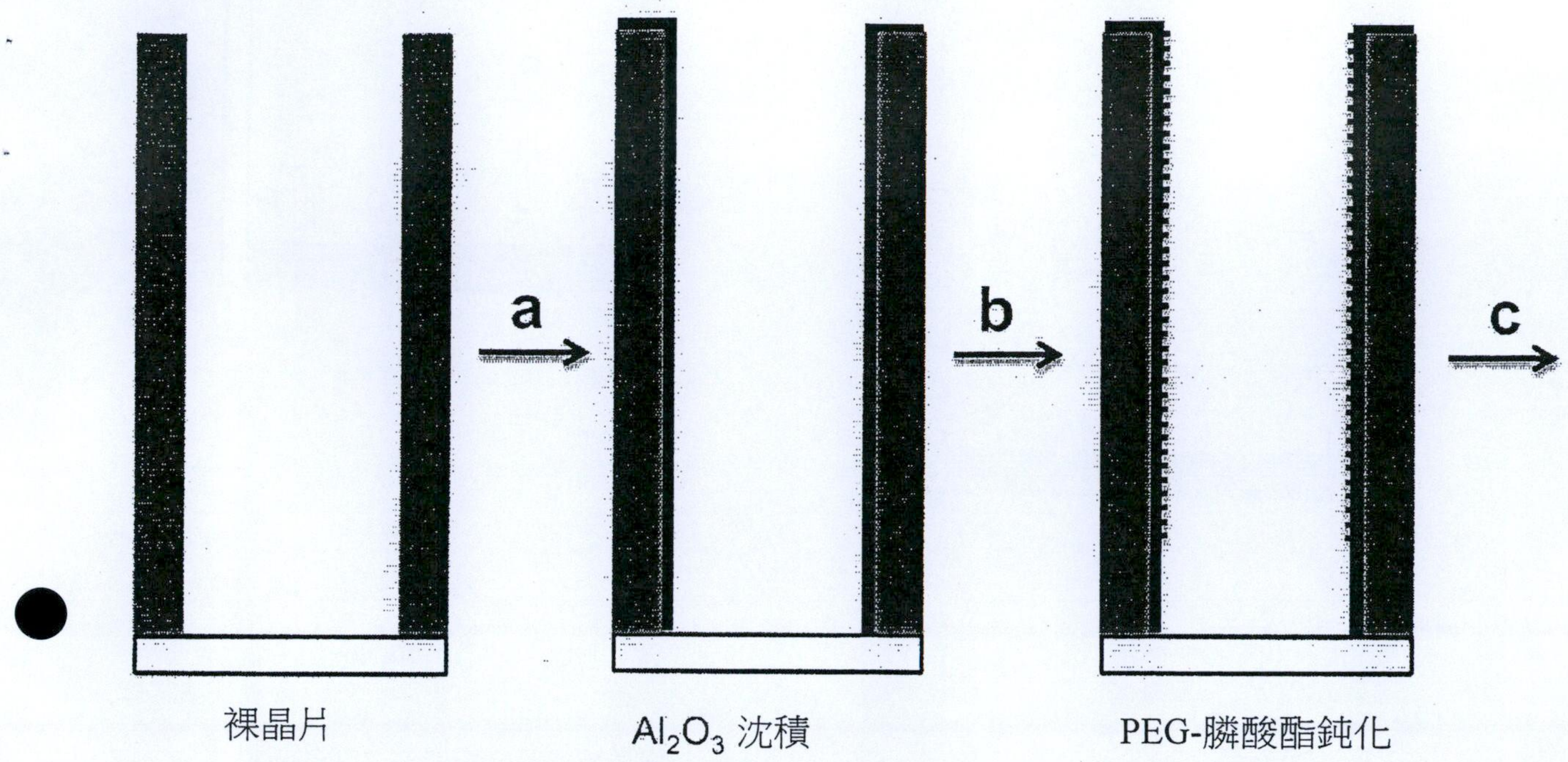
```
P1    1 ACACCAACAATAAAAAAAAAAA-ACCTCTC-CAA--AC-ACAACACAAA------AAAAAAAAAAAATA-CTC-C-CAAC   66
S1   69 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAAC  148

P1   67 AACAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCA-CAACAACAAC--------AAAAAAAAAAAAAAATA  137
S1  149 AACAA-CAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATA  227

P1  138 TCCCTCTCAACA-CA-CAACAATAAAAAAAAAAAA----------TCTC-CTCA-CAACAA-AACAAAAAAAAAAAAAAA  202
S1  228 TCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCTCTCTCAACAACAACAACAAAAAAAAAAAAAA  307

P1  203 AAA----AT-T-TCTCTAAACA-C  219
S1  308 AAAAAAAATATCTCTCTCAACAAC  331
```

圖 6



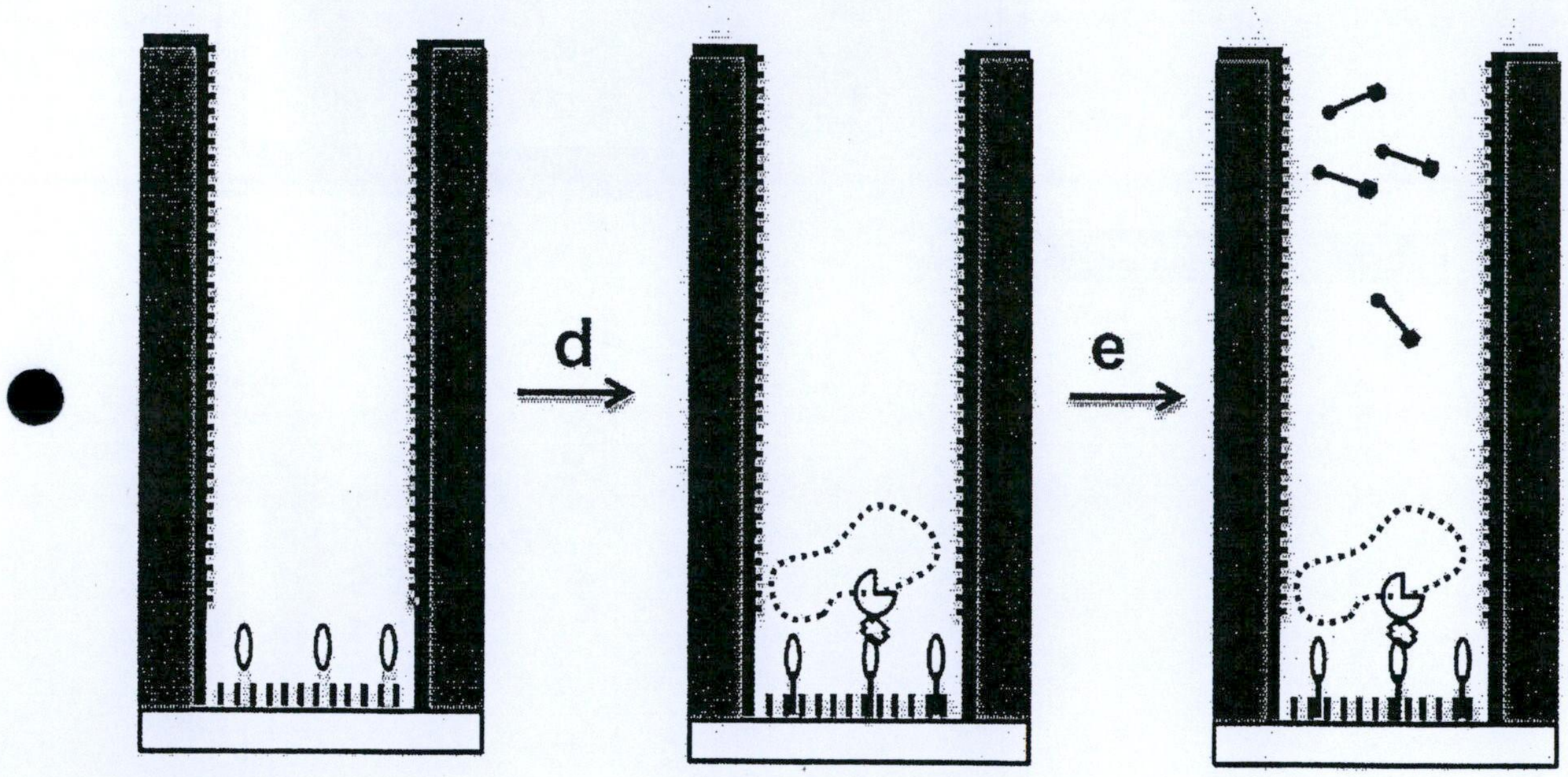
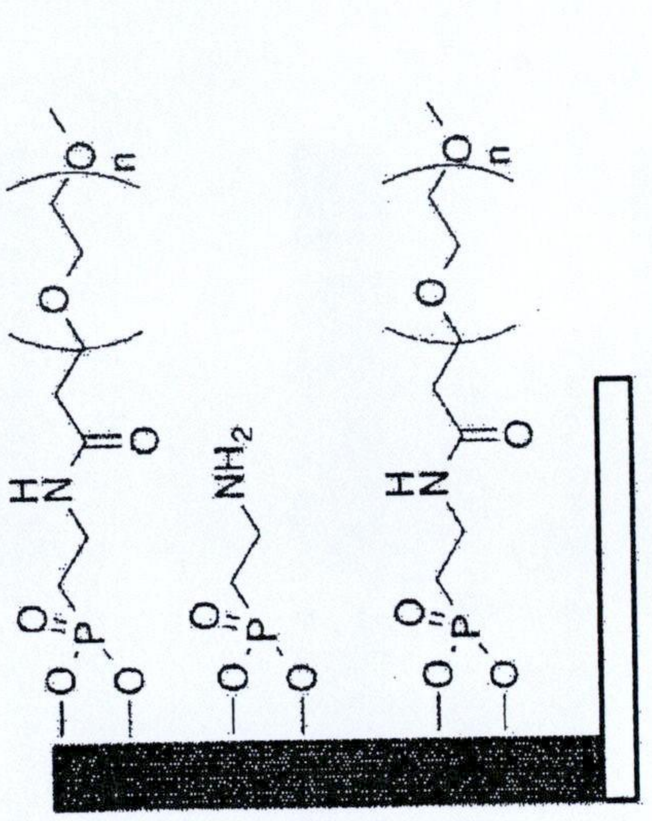
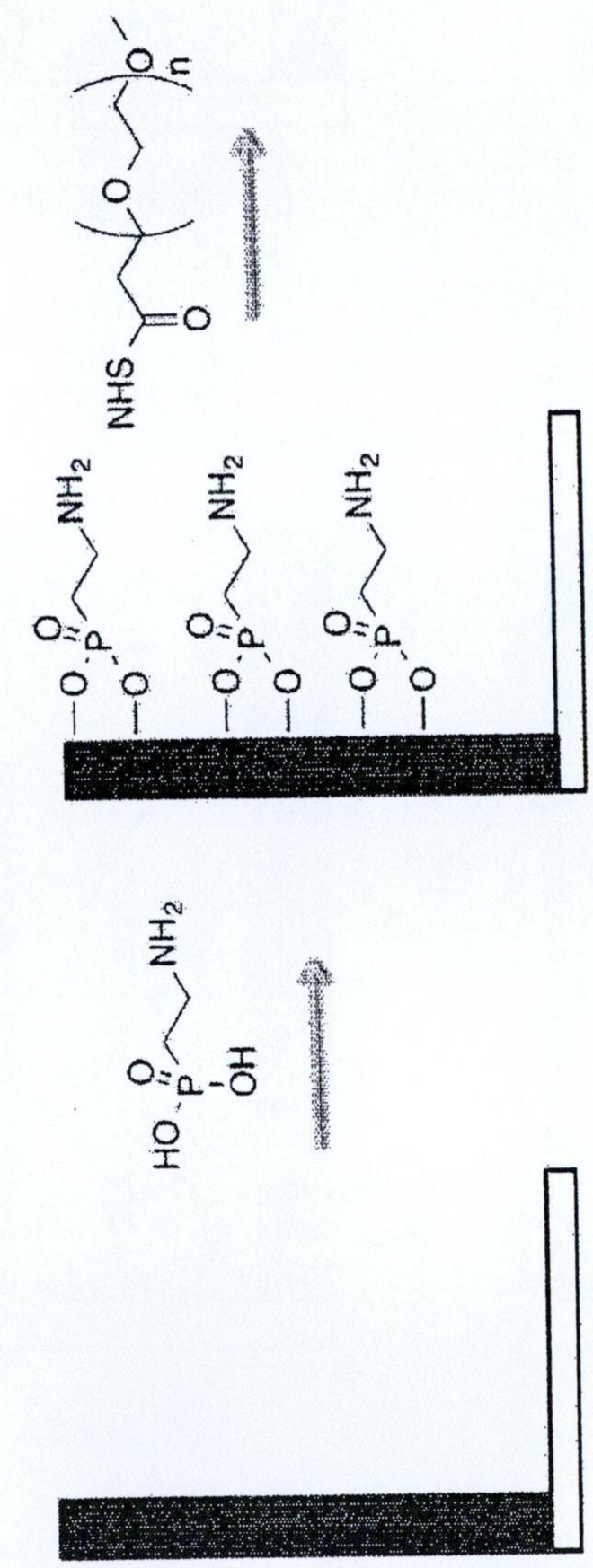


圖 7


NH2
HN
O
n
O=P
O
OH
HO
mPEG膦酸
MW 180

8-1


NHS
NH2
HN
O
n
O=P
O
OH
HO
mPEG膦酸
MW 550

8-2

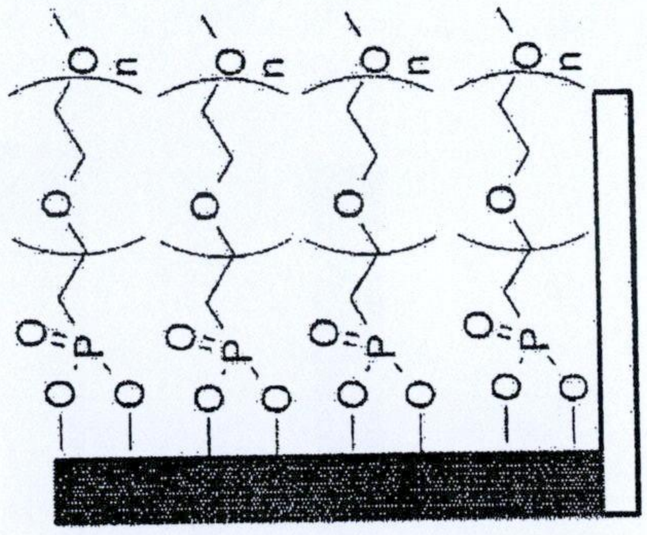


圖 8

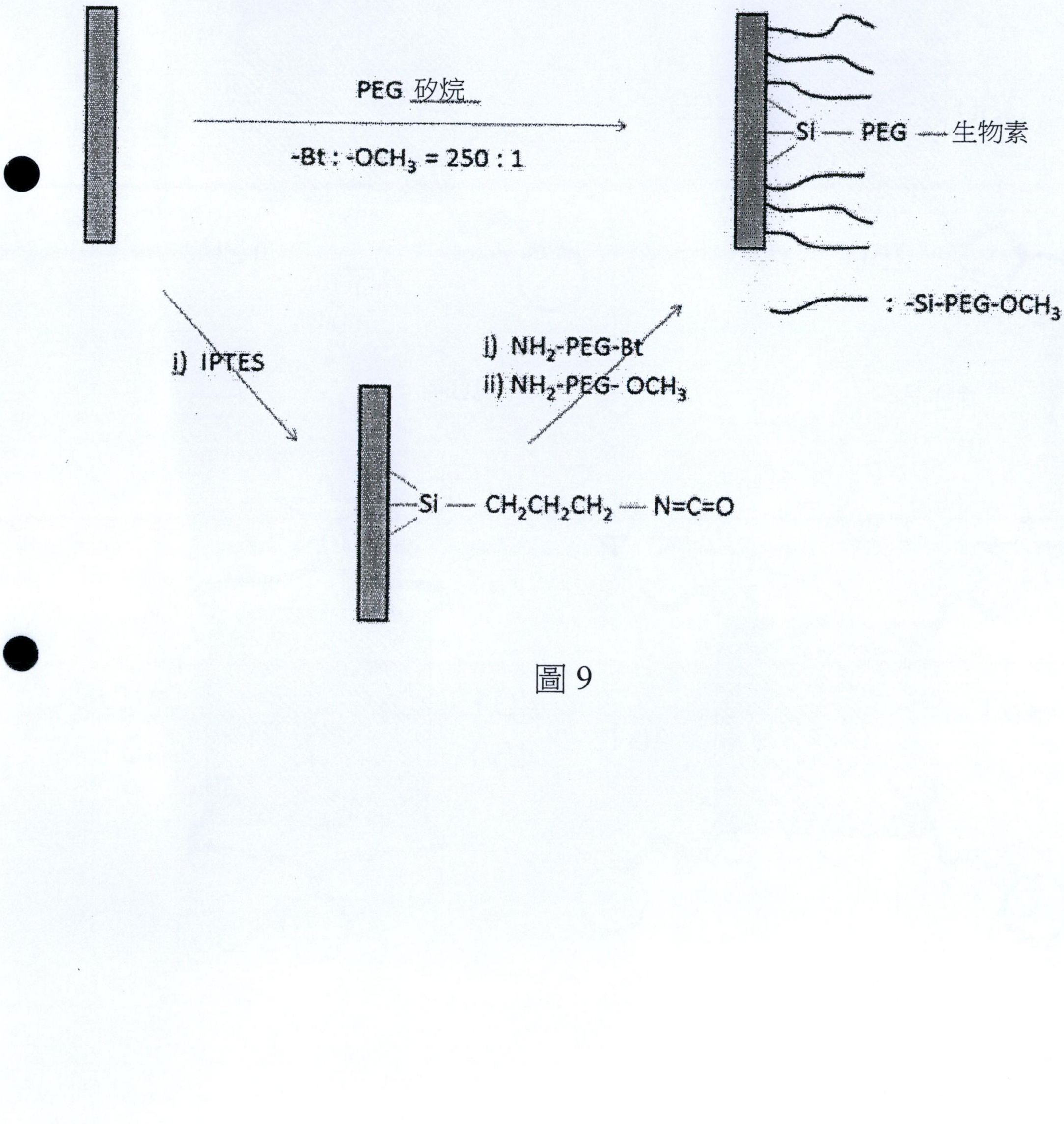
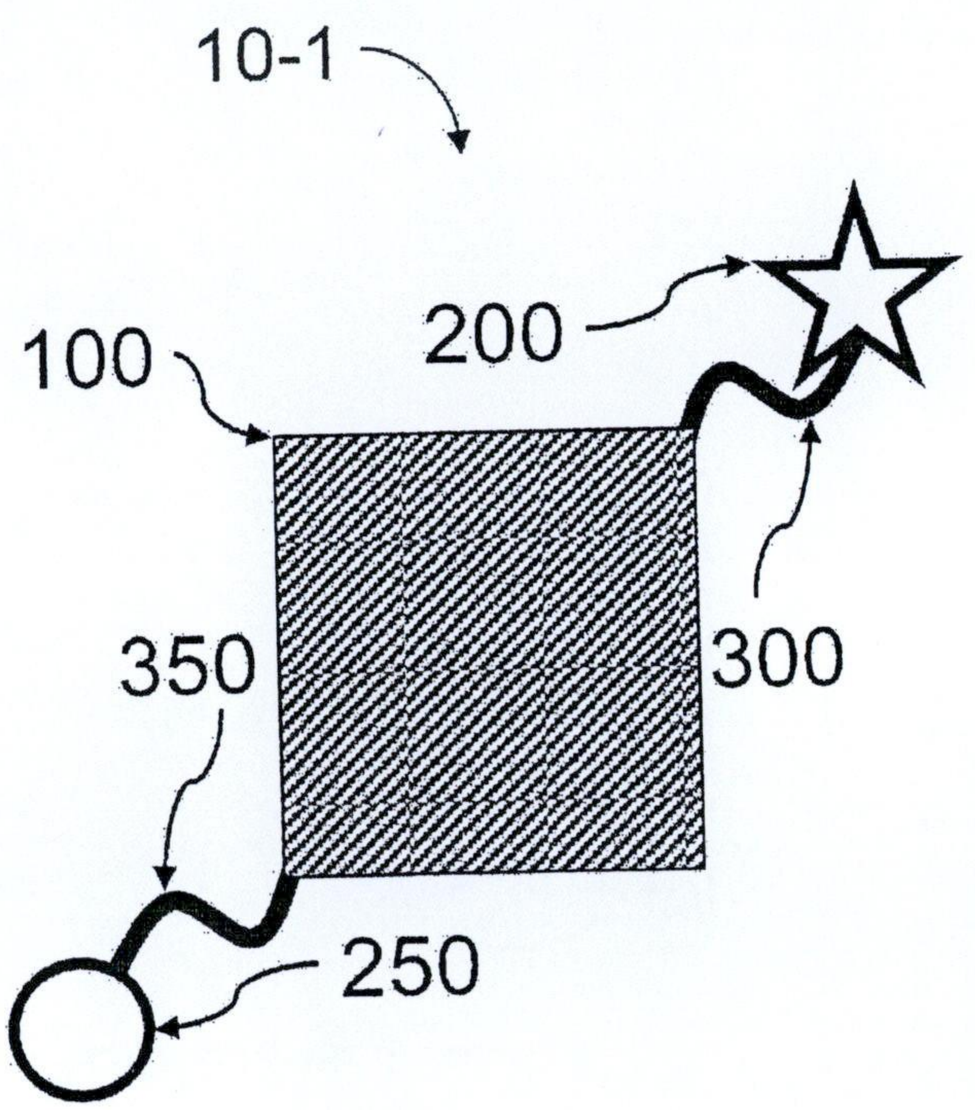
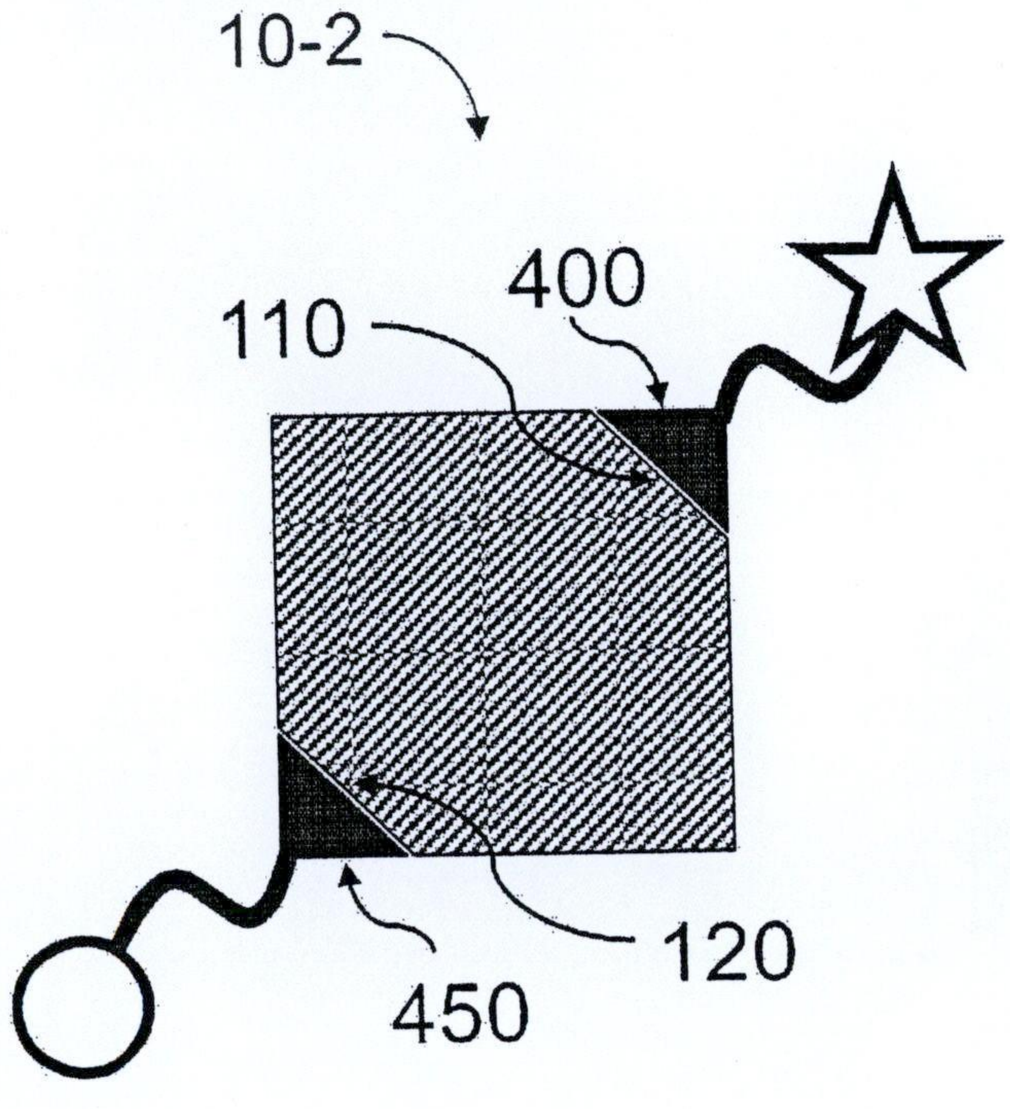
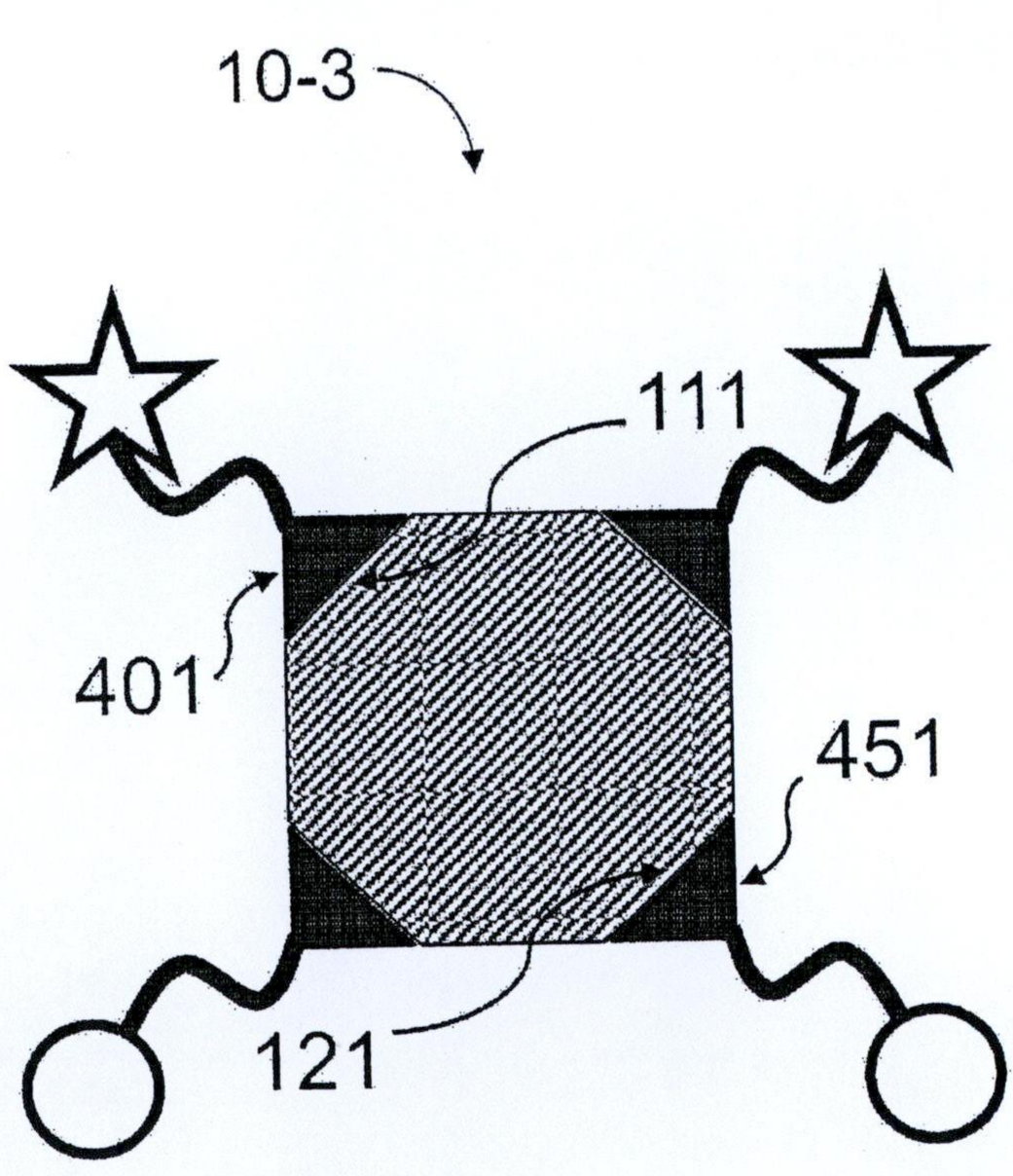

PEG 矽烷
-Bt : -OCH3 = 250 : 1
Si — PEG — 生物素
: -Si-PEG-OCH3
i) IPTES
i) NH2-PEG-Bt
ii) NH2-PEG- OCH3
Si — CH2CH2CH2 — N=C=O

圖 9


10-1
200
100
350
300
250


10-2
400
110
120
450


10-3
111
401
451
121

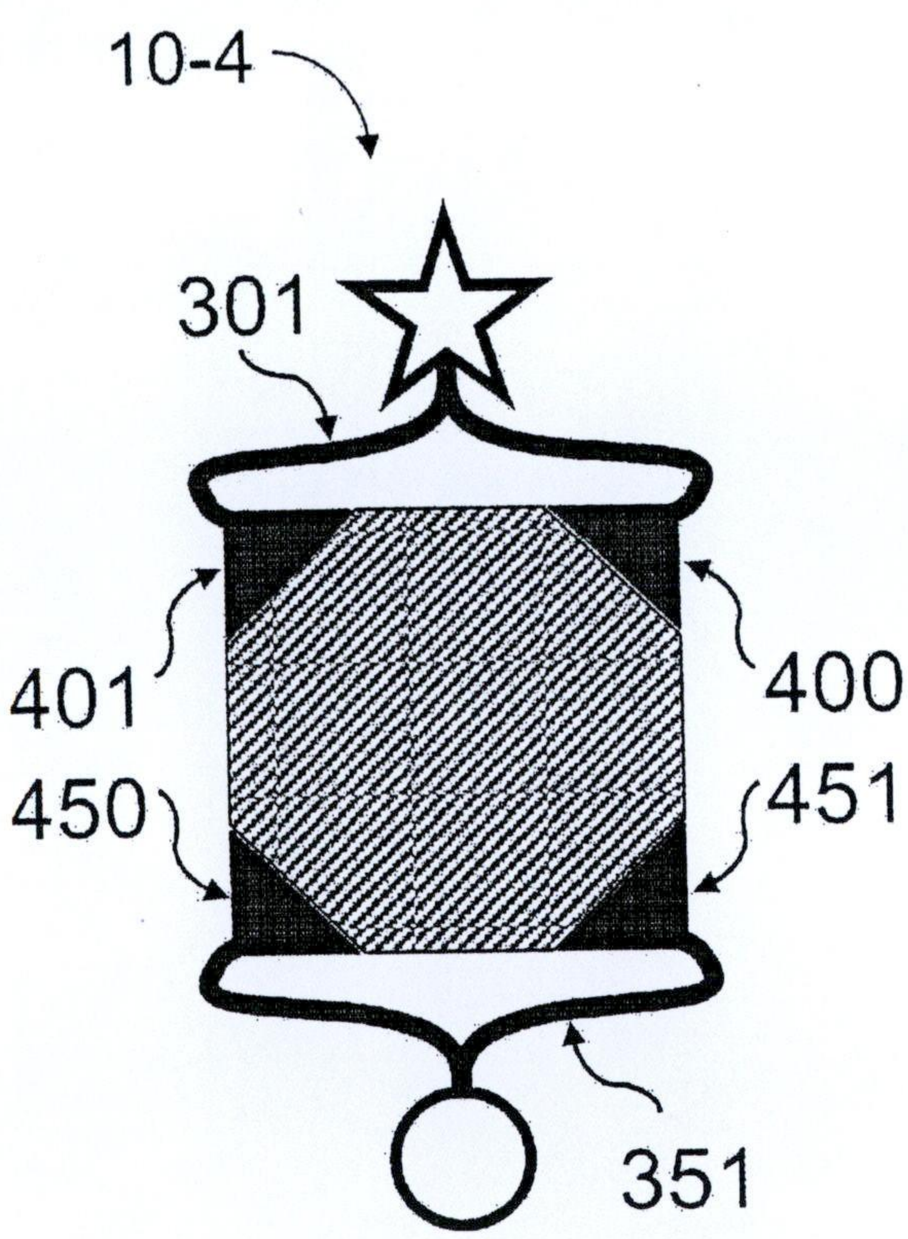

10-4
301
401
450
400
451
351

圖 10

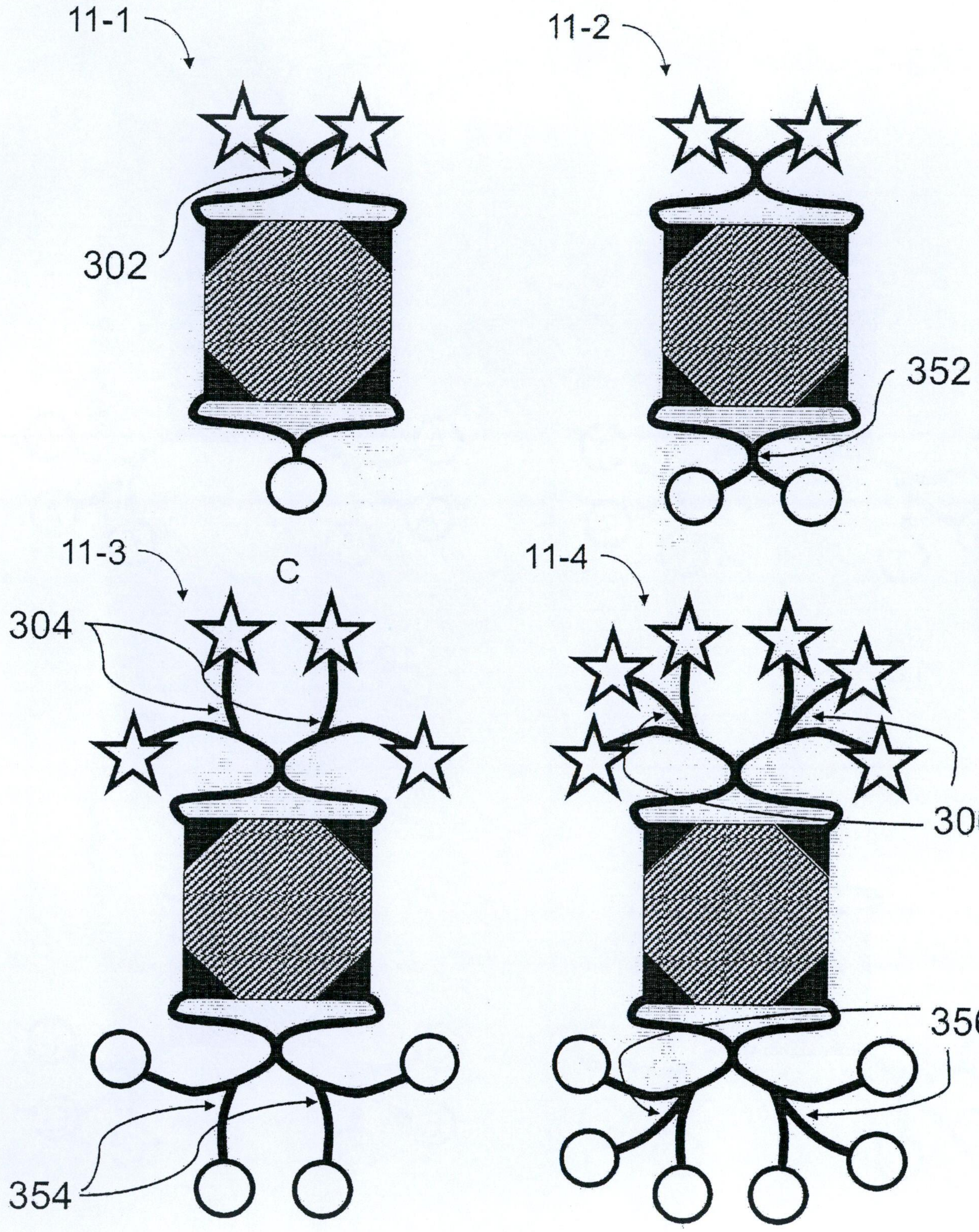
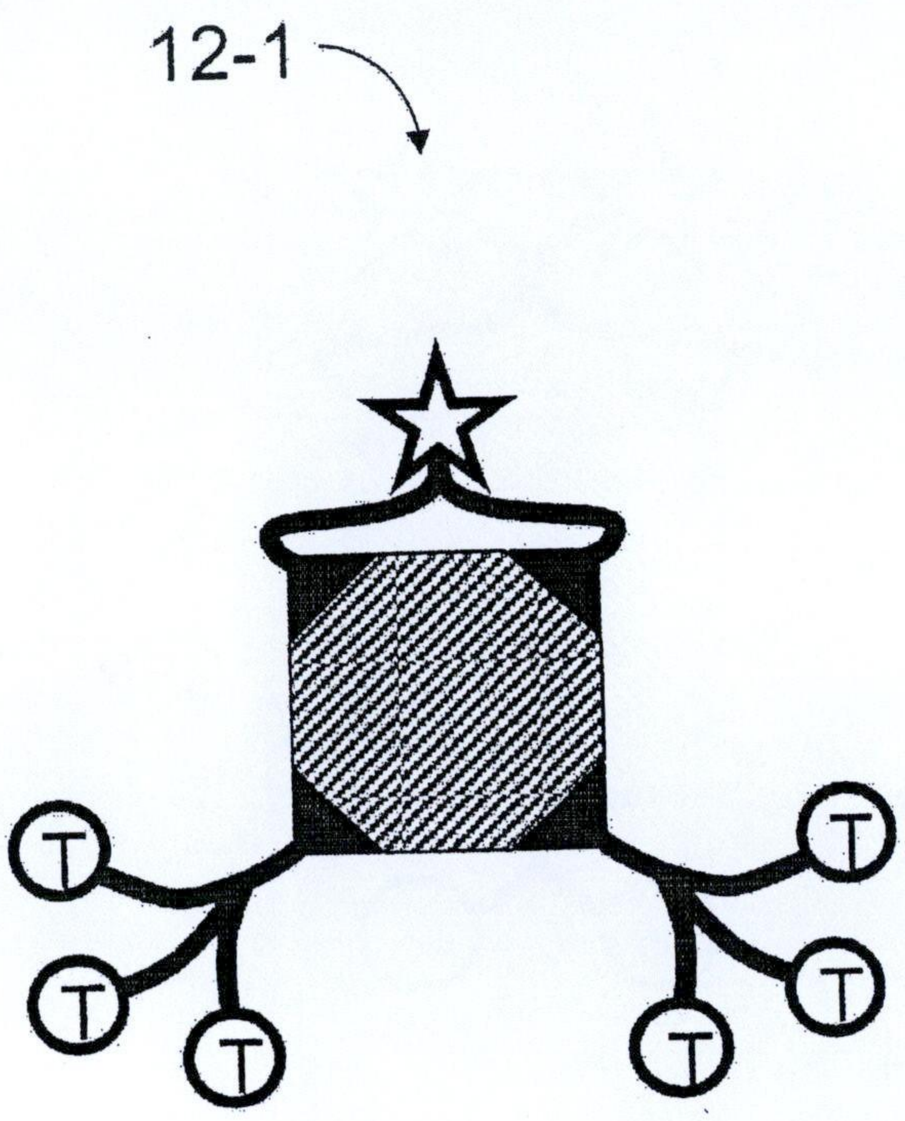
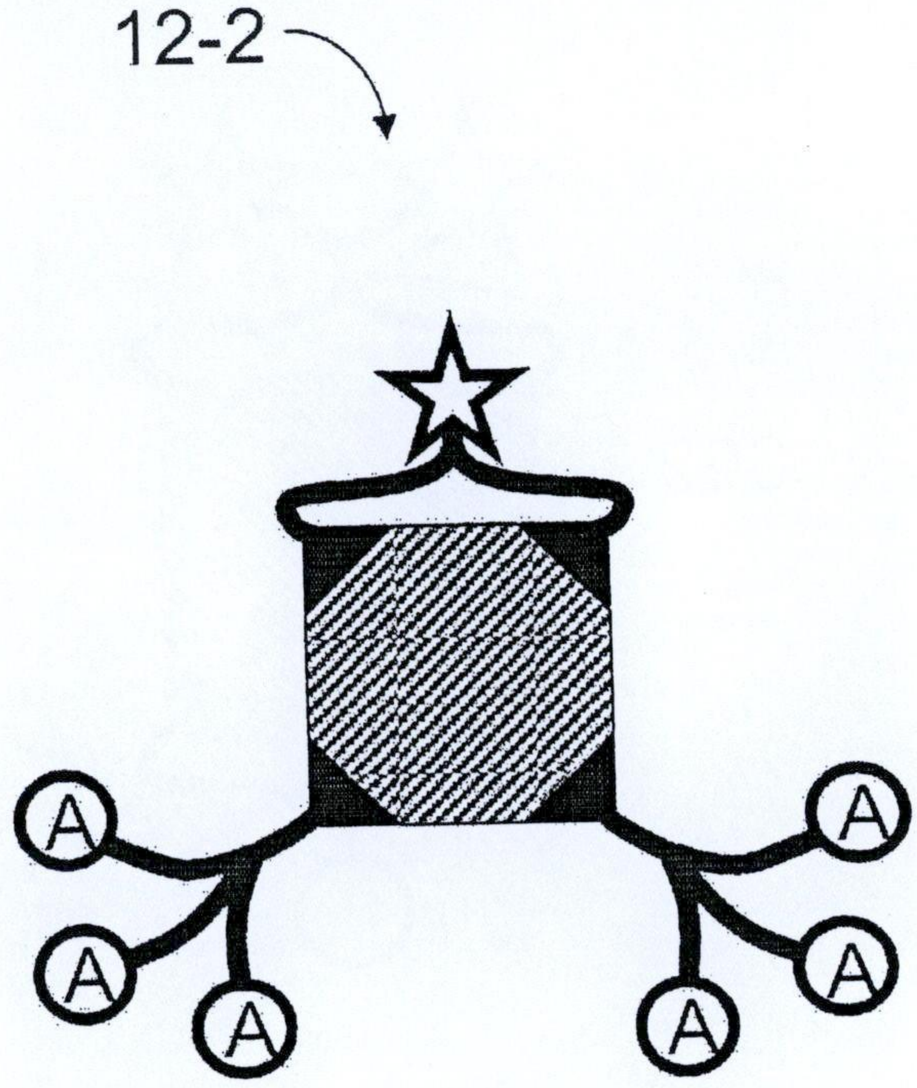
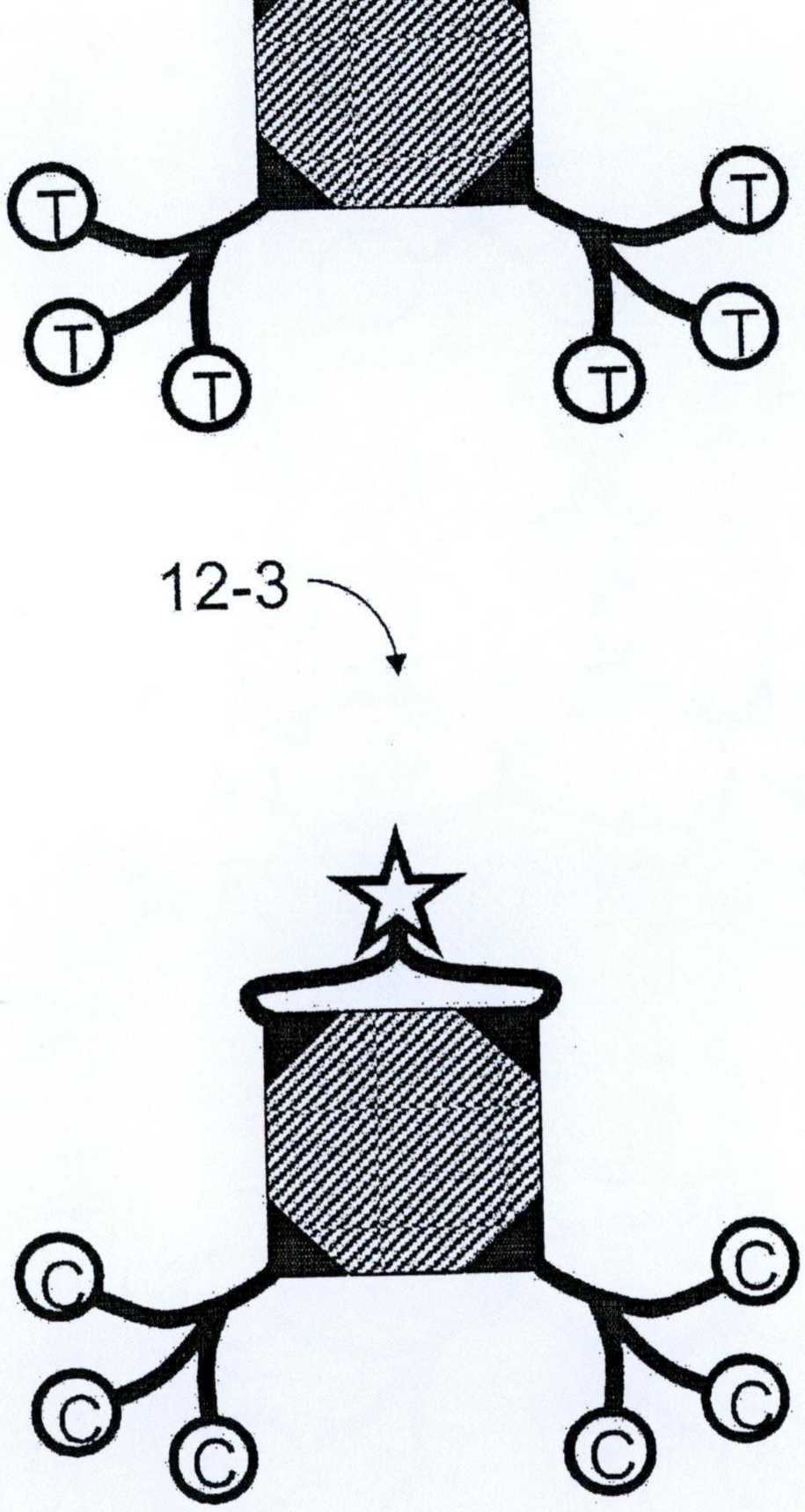


圖 11







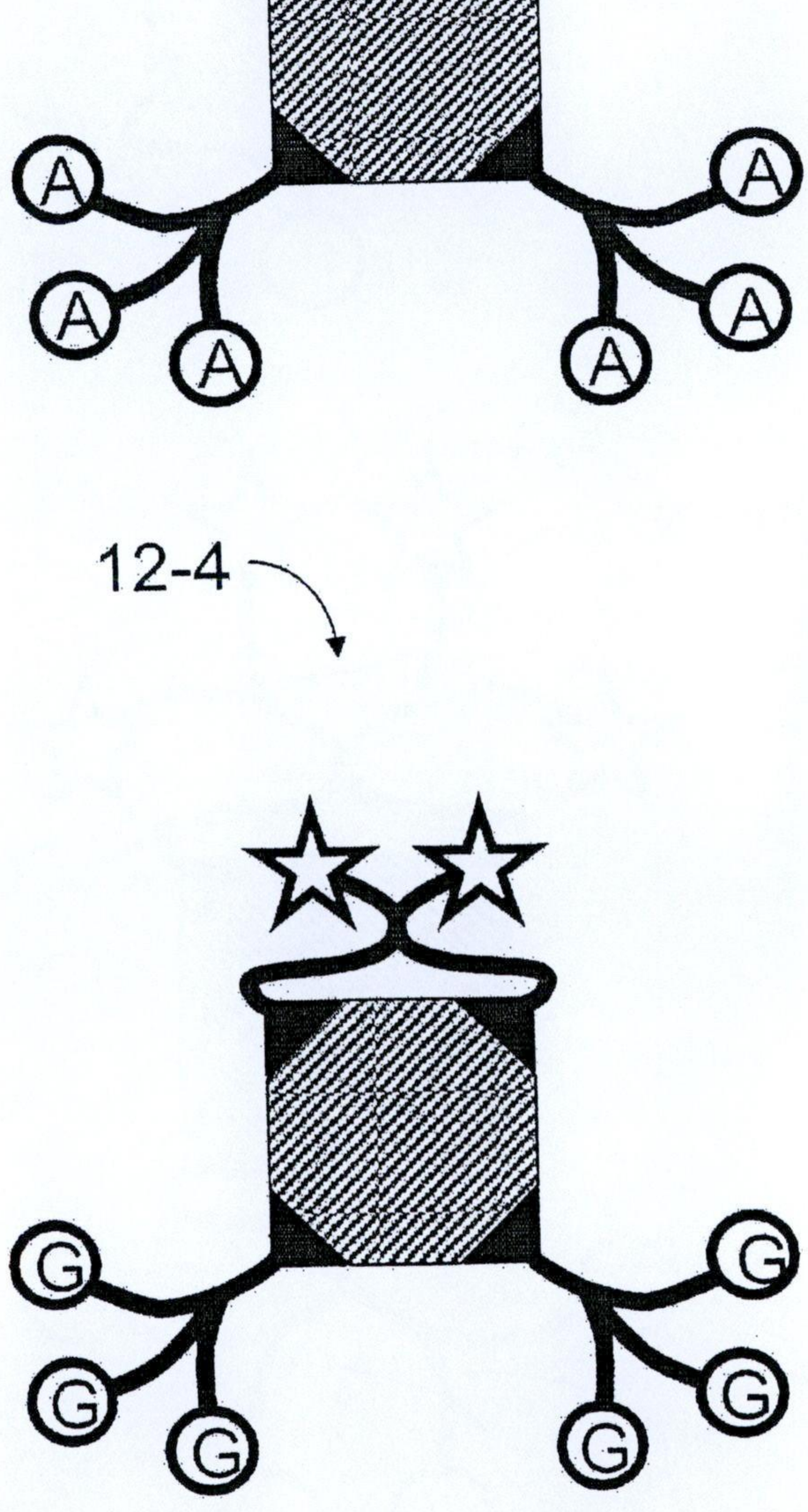
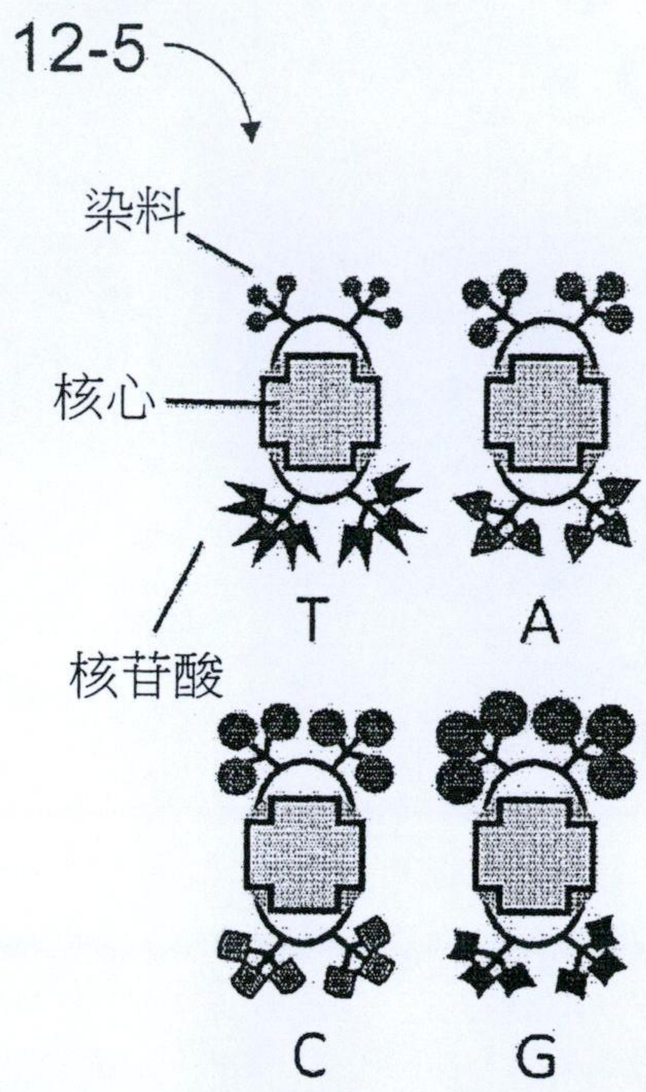
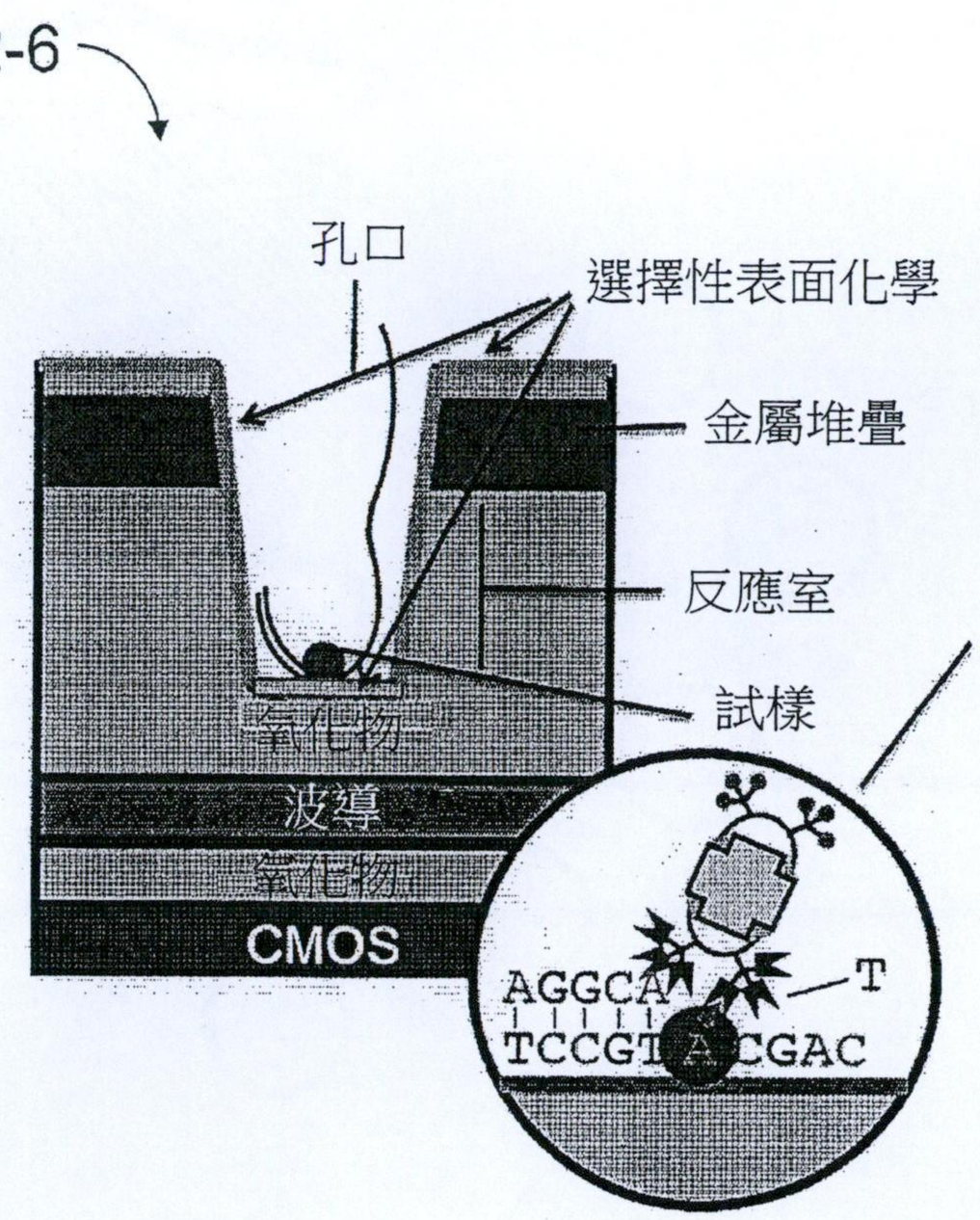


圖 12


12-5
染料
核心
核苷酸
T
A
C
G


12-6
孔口
選擇性表面化學
金屬堆疊
反應室
試樣
氧化物
波導
氧化物
CMOS
AGGCA
T
TCCGT
CGAC

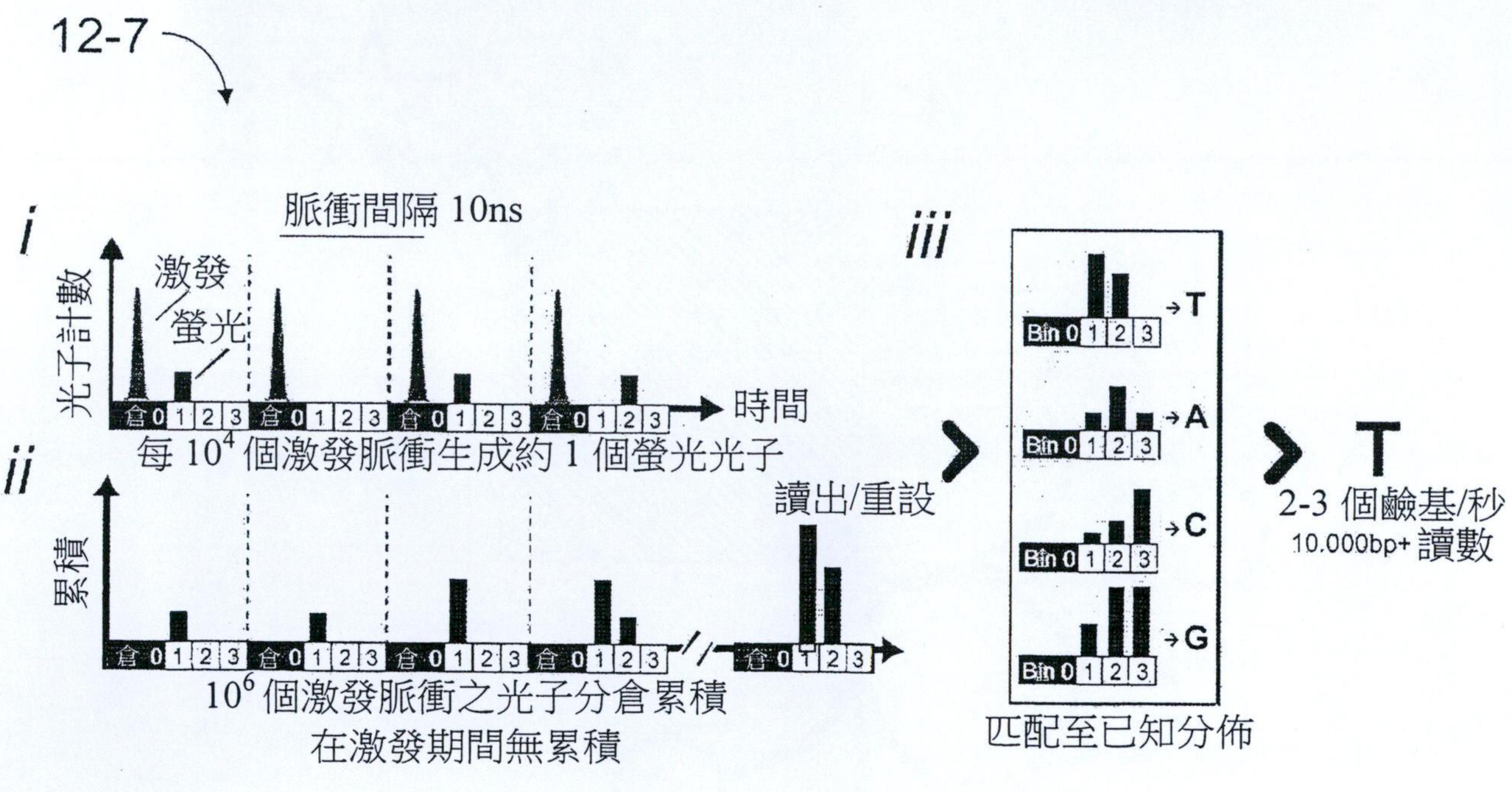

12-7
i
脈衝間隔 10ns
激發
螢光
光子計數
倉 0 1 2 3
時間
每 10^4 個激發脈衝生成約 1 個螢光光子
ii
累積
讀出/重設
10^6 個激發脈衝之光子分倉累積
在激發期間無累積
iii
Bin 0 1 2 3
→T
→A
→C
→G
匹配至已知分佈
T
2-3 個鹼基/秒
10.000bp+ 讀數

圖 12（續）

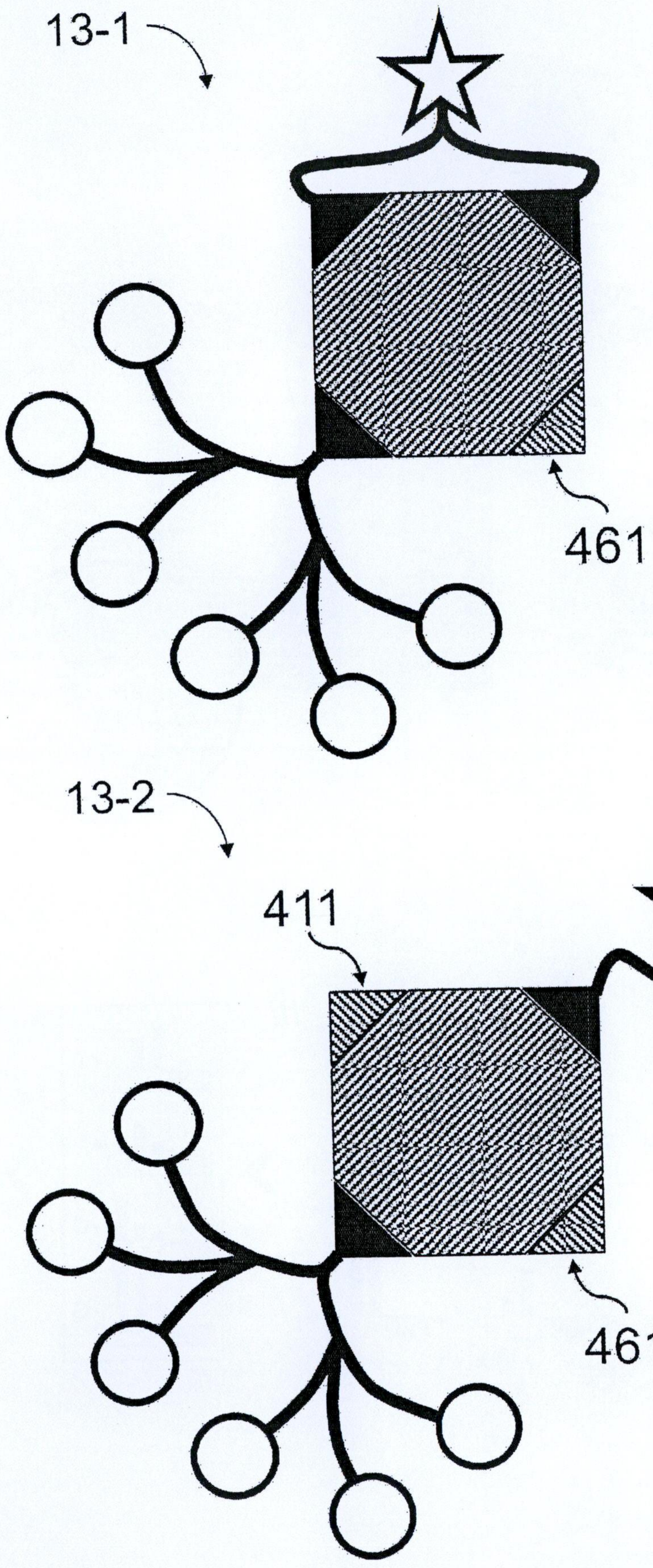
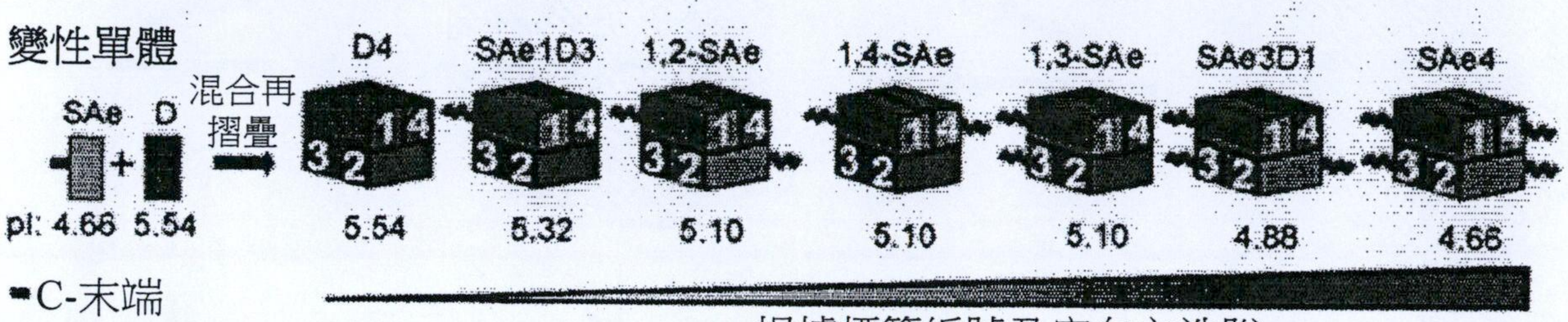
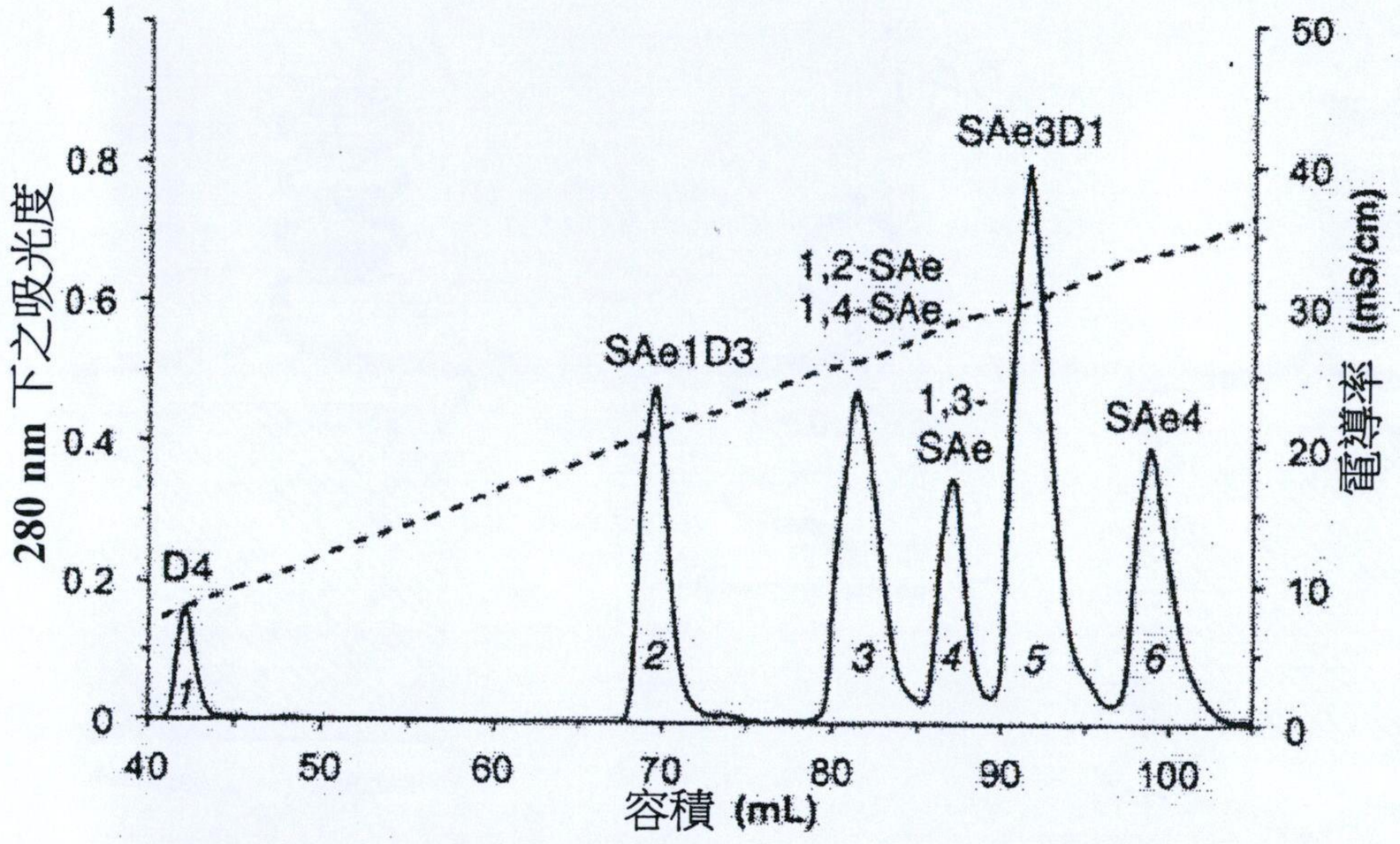


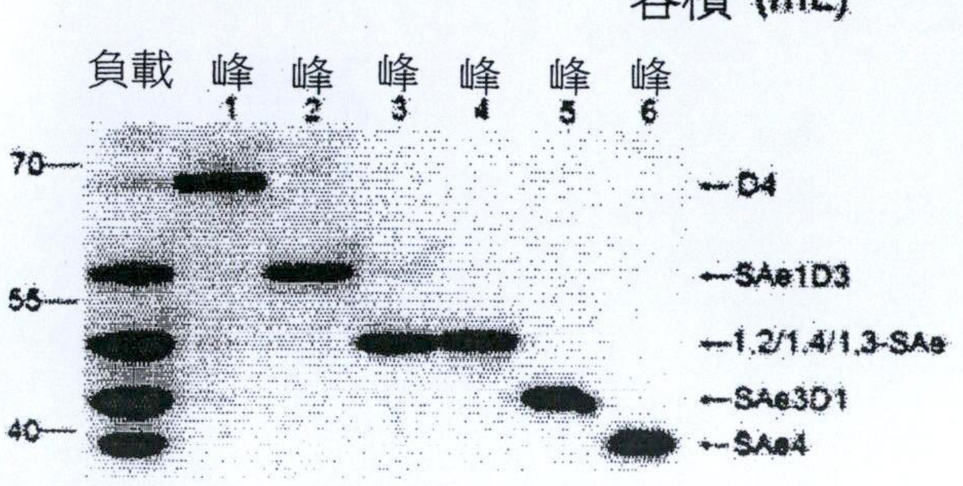
圖 13

13-3

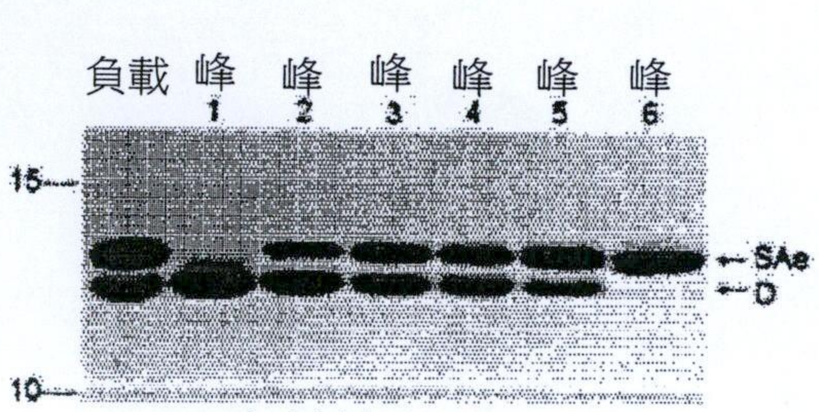
>鏈黴抗生物素蛋白-E6(SAe)
MAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK
NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASEEEEEE
>死亡(D)
MAEAGITGTWYAQLGDTFIVTAGADGALTGTYEAAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWK
NNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS





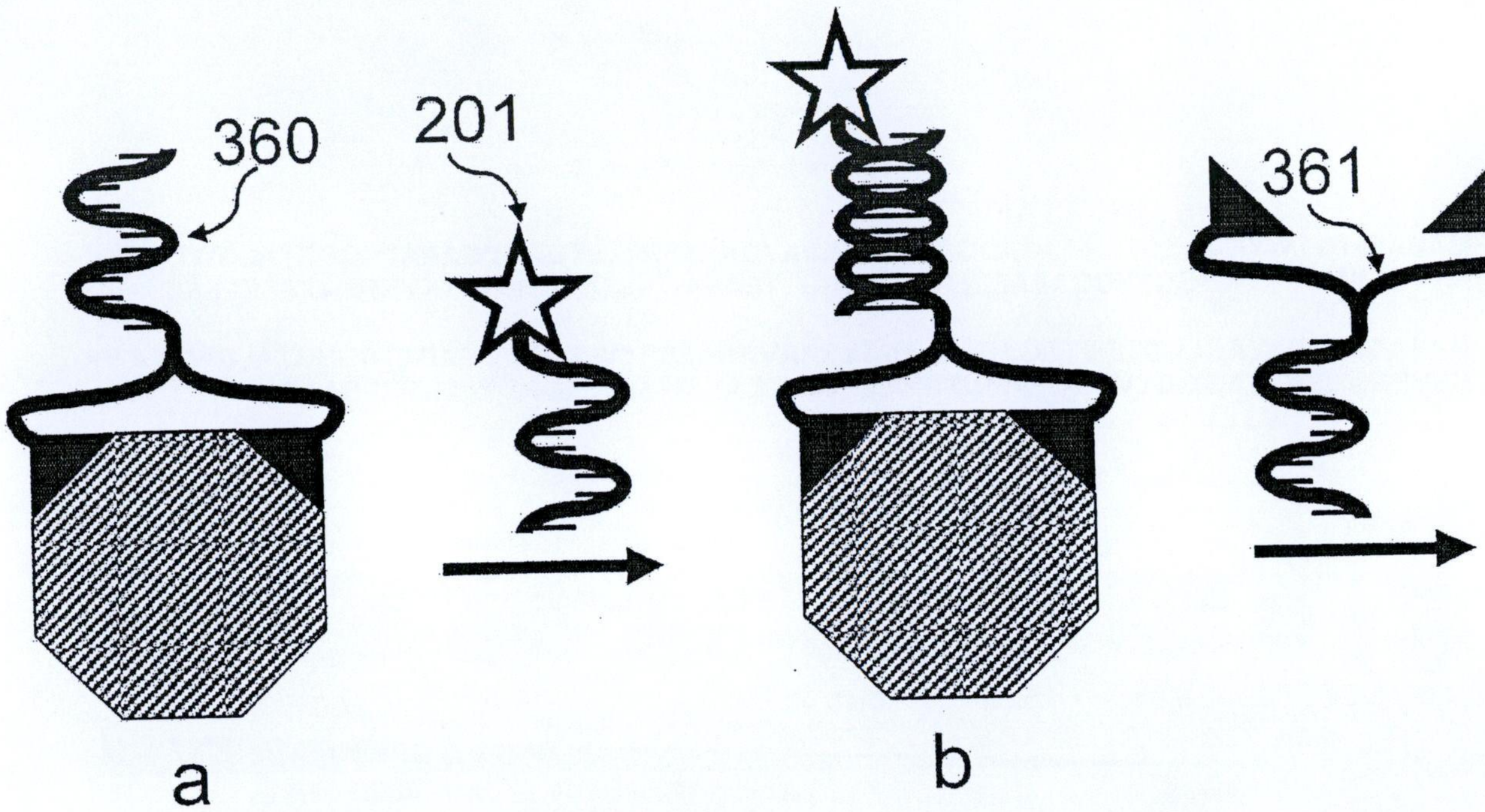


非布林線(unbolled)



布林線(bolled)

圖 13（續）



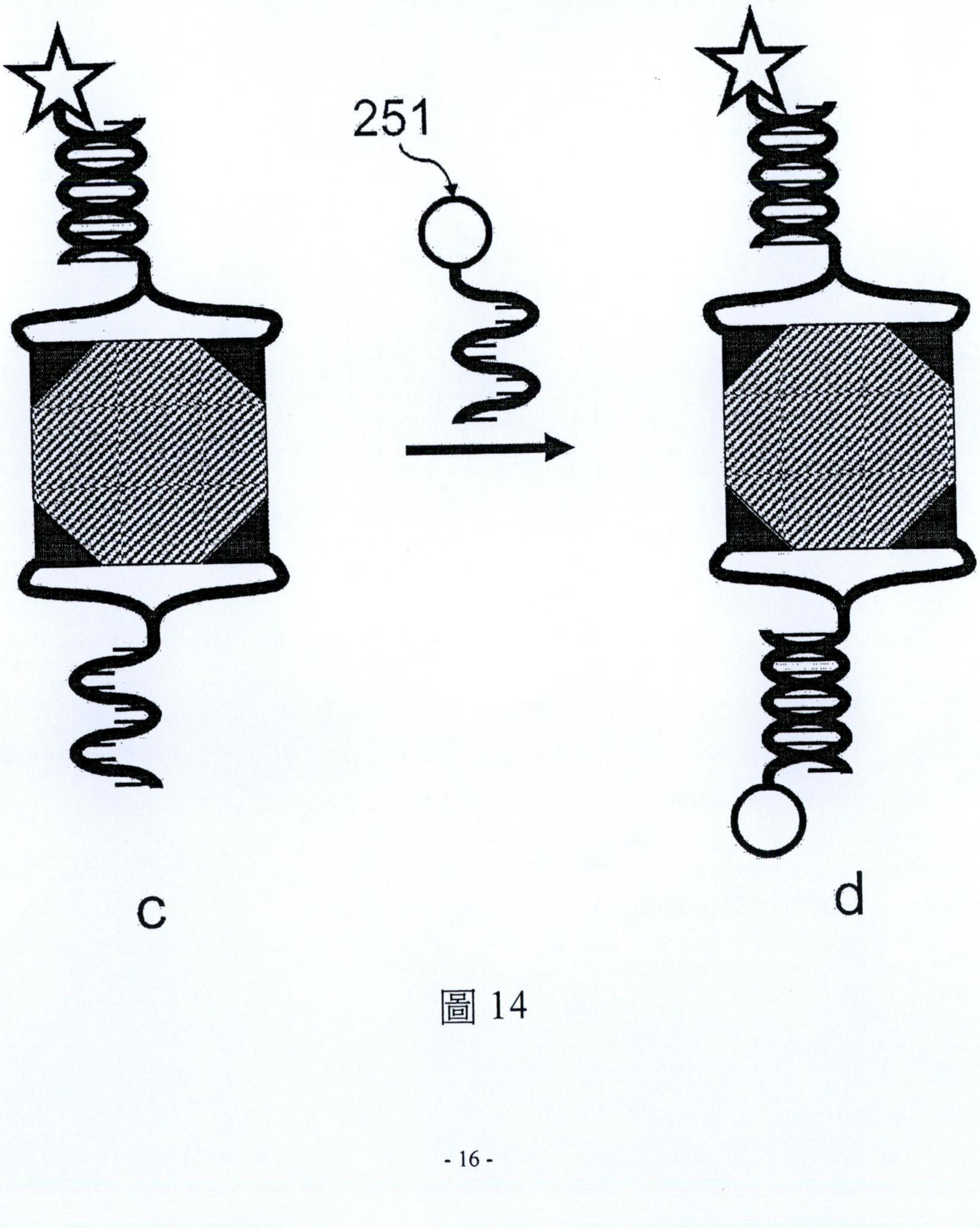


圖 14

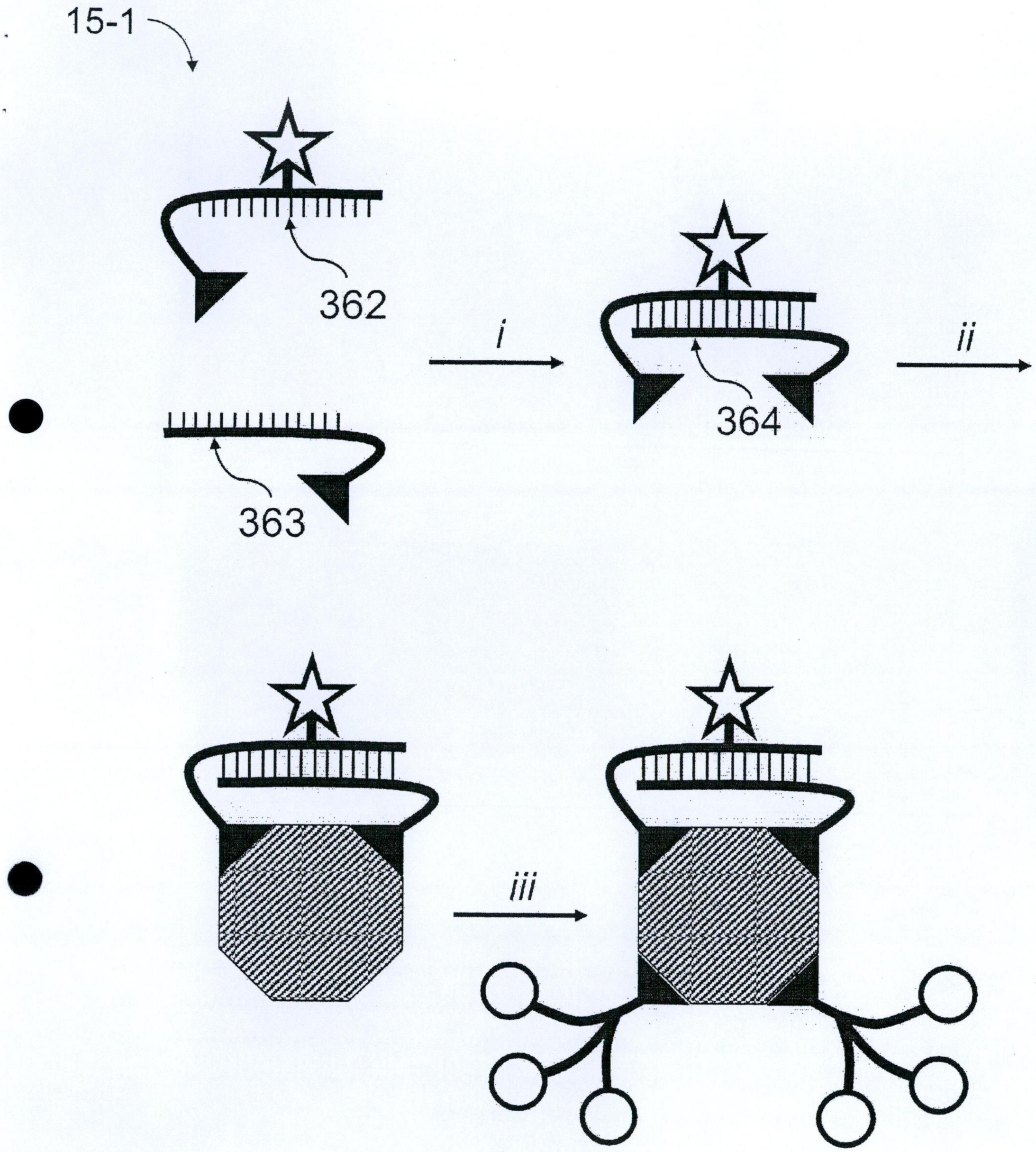
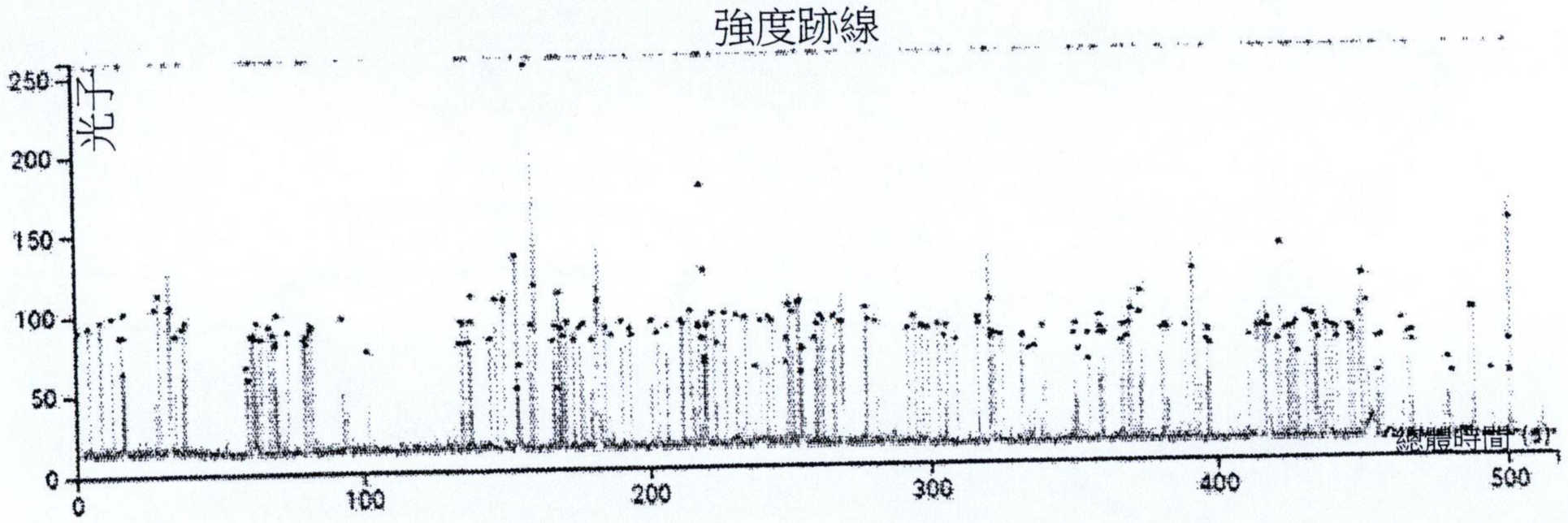
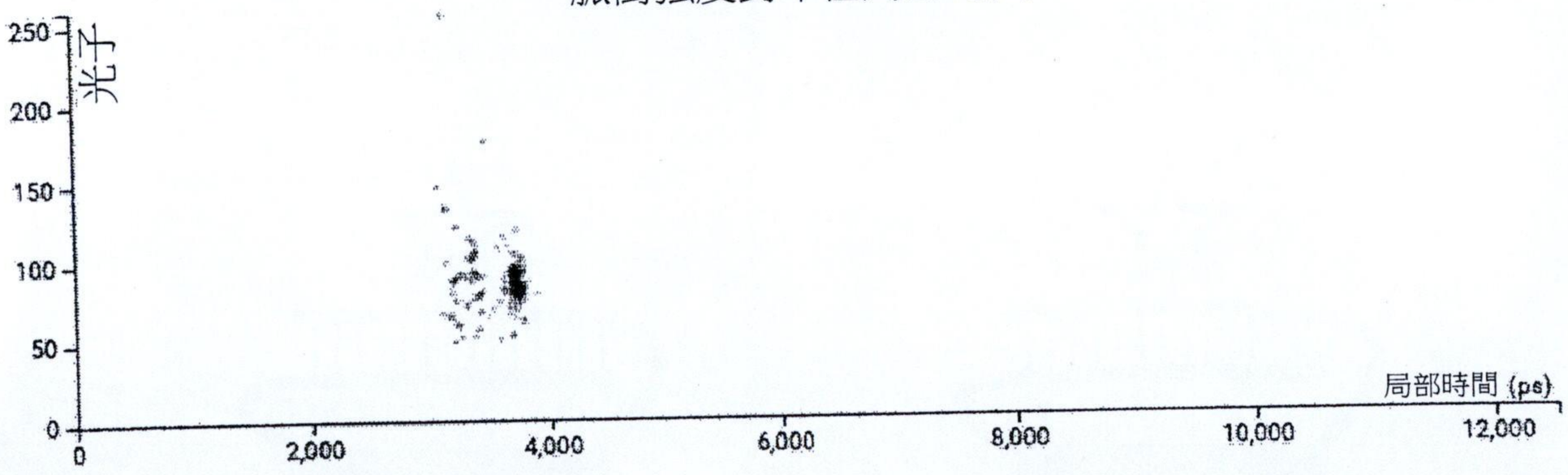


圖 15

15-2



脈衝強度對中值局部時間



鹼基識別模板

鹼基識別模板

鹼基識別模板

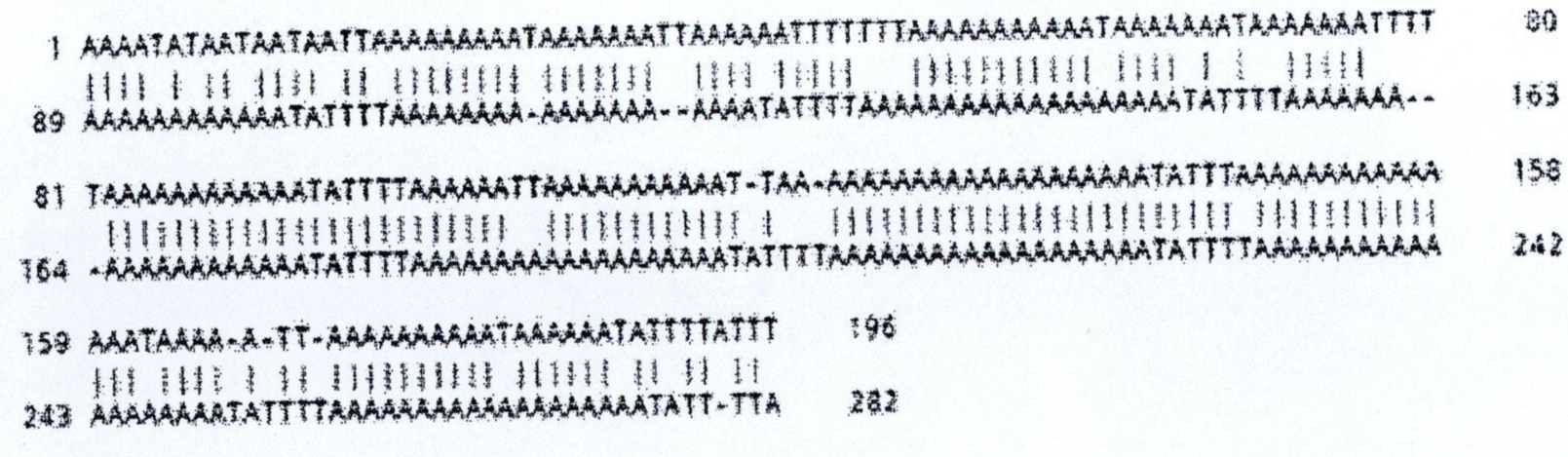
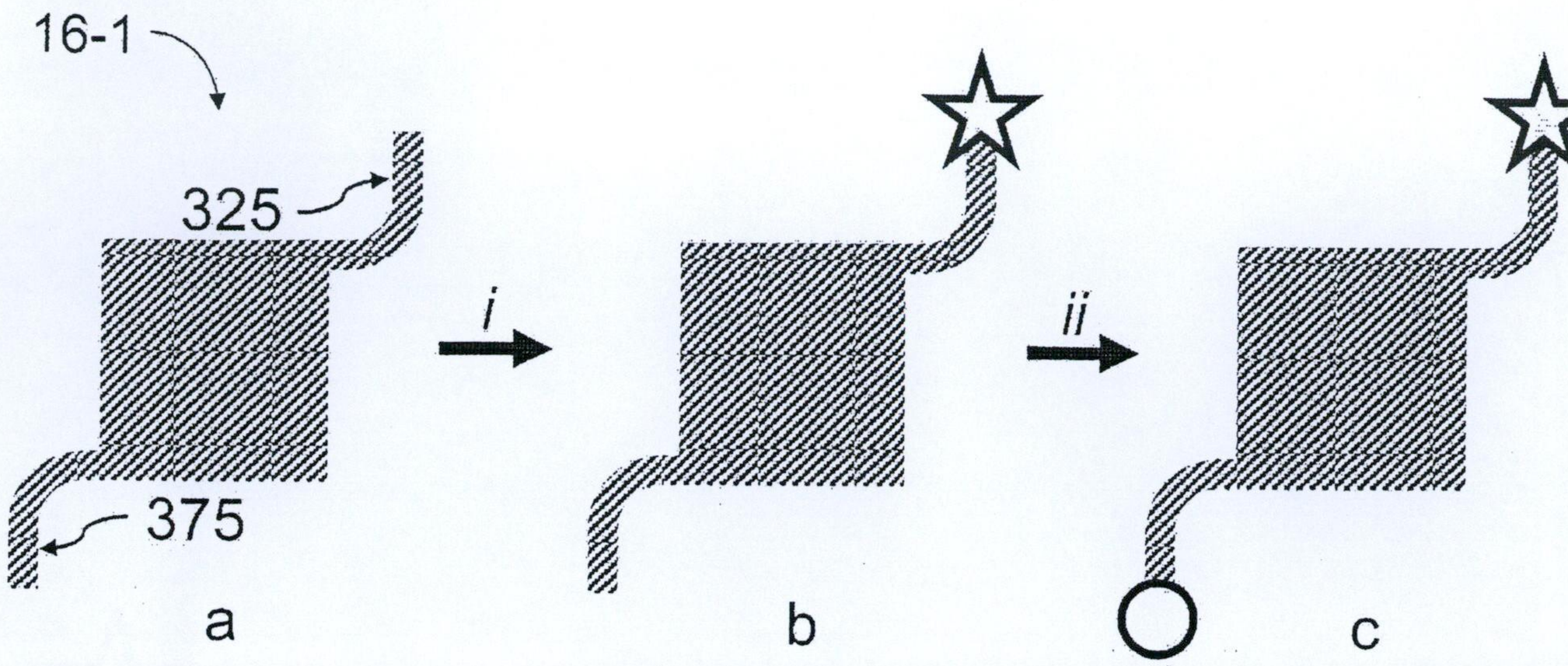
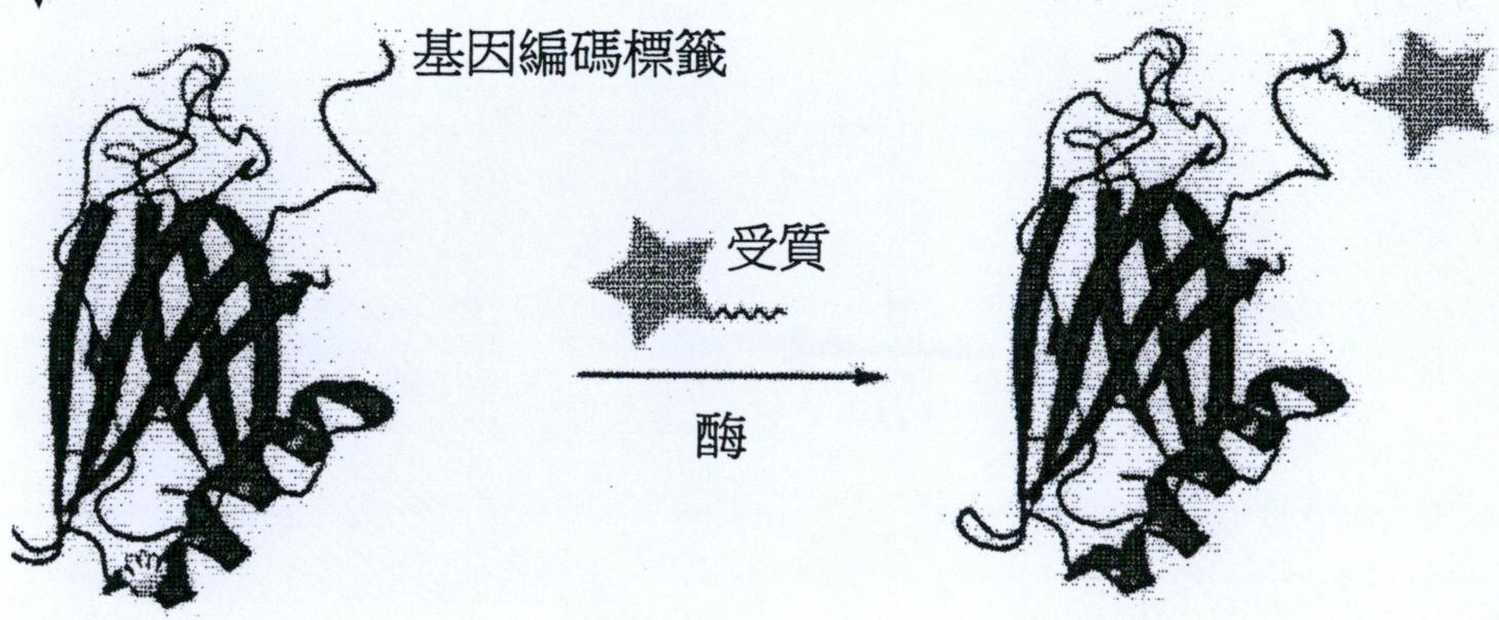


圖 15（續）





16-3

酶	經編碼標籤肽	k_{cat} min^{-1}	K_M μM	k_{cat}/K_M min^{-1} μM^{-1}	肽中之位點
甲醯甘胺酸生成酶	CXPXR 或 13 聚體 LCTPSRGSLFTGR	-	-	-	C 或 N 末端
磷酸泛醯巯基乙胺基轉移酶	ACP, PCP 或 ybbR 標籤(11 聚體；DSLEFIASKLA; 13 聚體：VLDSLEFIASKLA; 17 聚體：GSQDVLDSLEFIASKLA)	(對於 500 μM ybbR 13 聚體及生物素-CoA)			C 或 N 末端或撓性環
轉肽酶	LPXTG	14.7	60.8	0.242	任一部分
轉麩醯胺酸酶	XXQXX	16.2	5,500	0.003	任一部分
法尼基轉移酶	CaaX	45	7	6	C 末端
		(對於 yPFTase 及 2.4 μM CVIA)，對於 FPP			
		31.2	1.71	18.2	
		對於 FPP-醛			
生物素連接酶	GLNDIFEAQKIEWHE	7.8	1.87	4.17	C 或 N 末端
		(對於大腸桿菌生物素連接酶及生物素)			
硫辛酸連接酶	GFEIDKVWYDLDA	9.6	4.2	2.3	C 或 N 末端或撓性環
		2.88	-	-	

圖 16

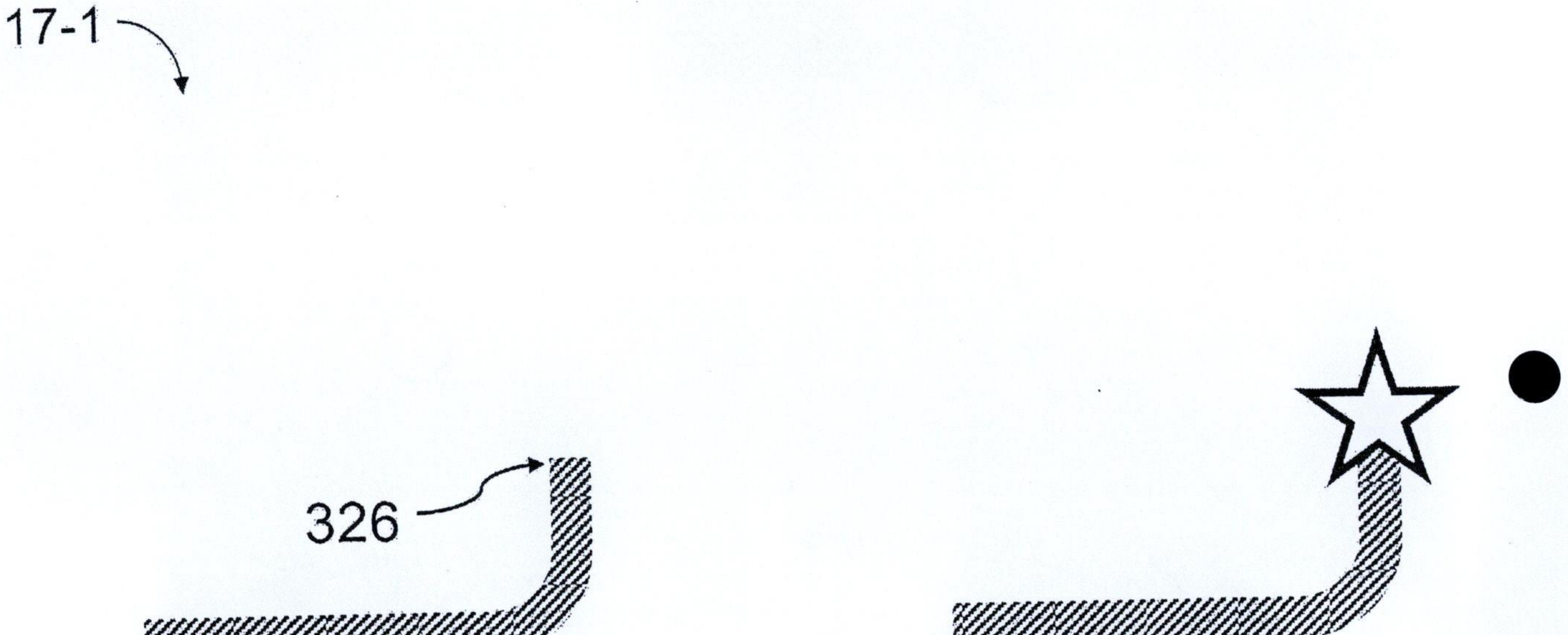
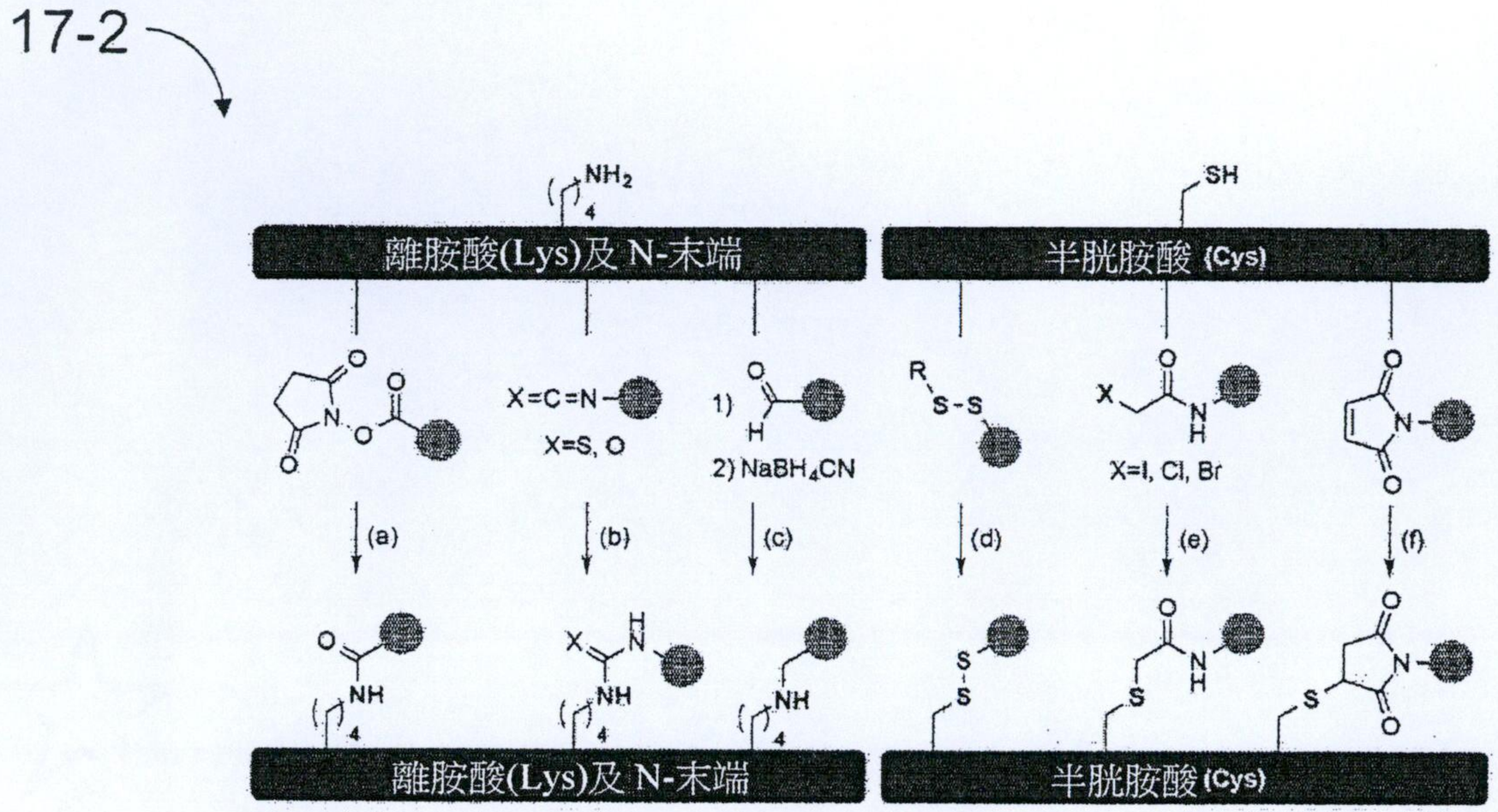
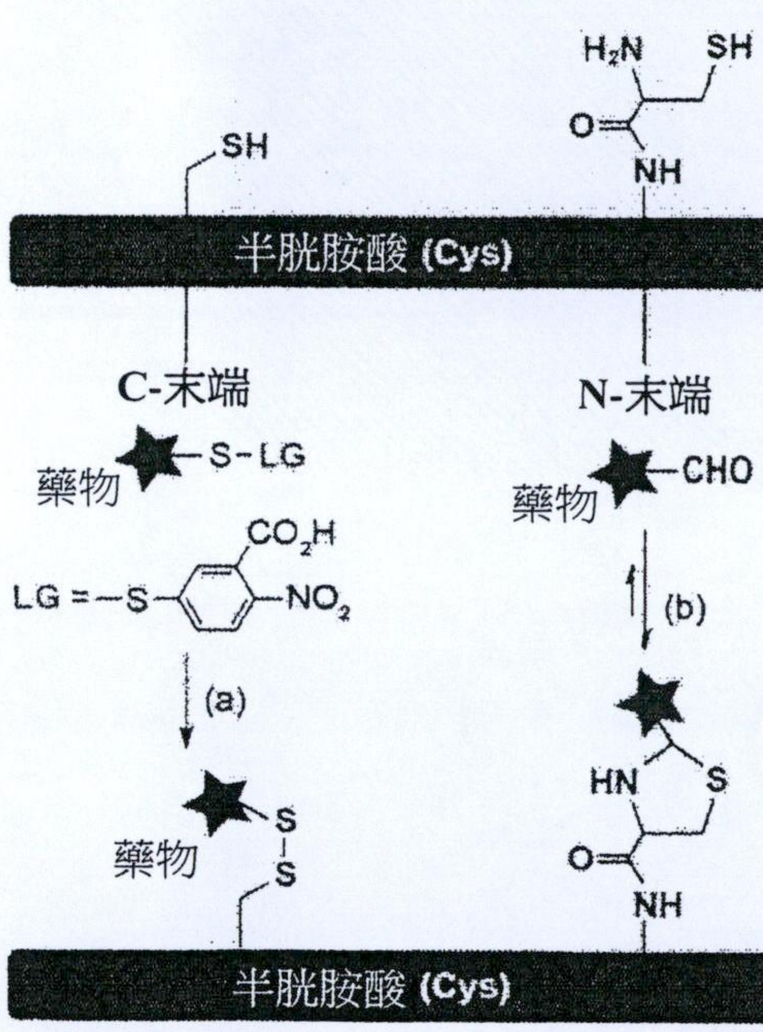


圖 17


17-2
NH2
4
離胺酸(Lys)及 N-末端
SH
半胱胺酸 (Cys)
X=C=N
X=S, O
1)
2) NaBH4CN
R
S-S
X
X=I, Cl, Br
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
NH
離胺酸(Lys)及 N-末端
半胱胺酸 (Cys)


H2N
SH
O
NH
SH
半胱胺酸 (Cys)
C-末端
N-末端
藥物
S-LG
CHO
CO2H
LG =
S
NO2
(a)
(b)
HN
S
藥物
S
S
半胱胺酸 (Cys)

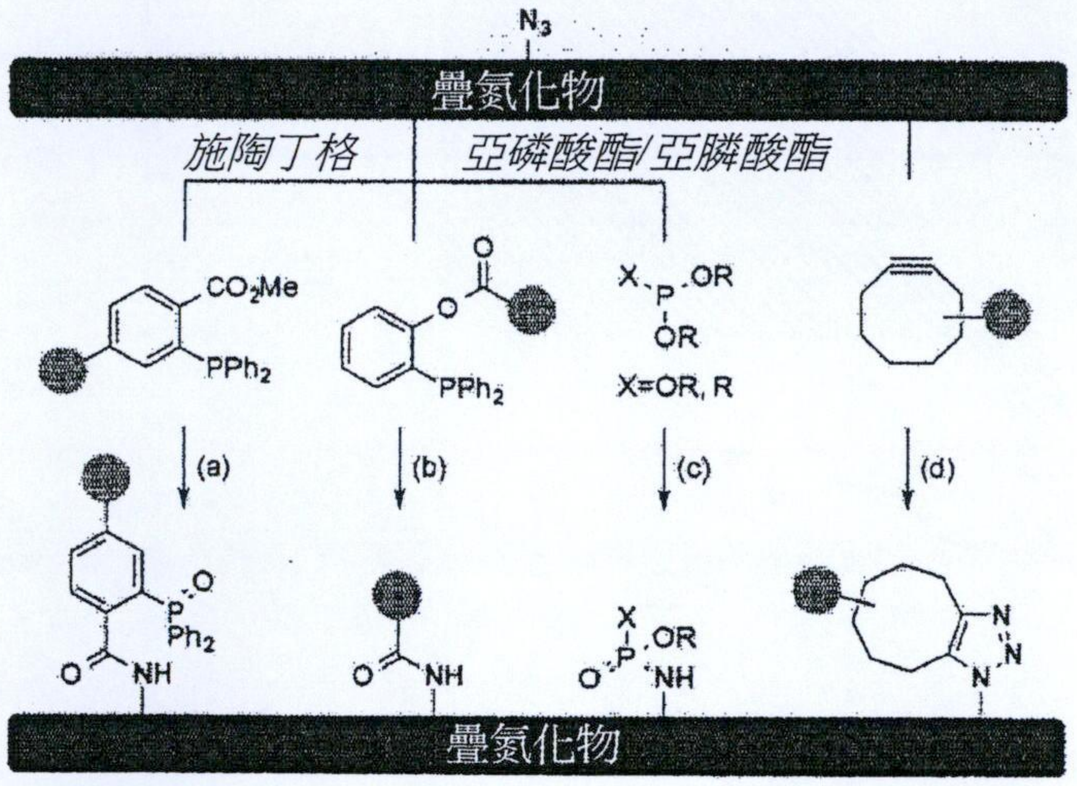

N3
疊氮化物
施陶丁格
亞磷酸酯/亞膦酸酯
CO2Me
PPh2
X
P
OR
X=OR, R
(a)
(b)
(c)
(d)
O
P
Ph2
NH
X
OR
N
N
疊氮化物

圖 17（續）

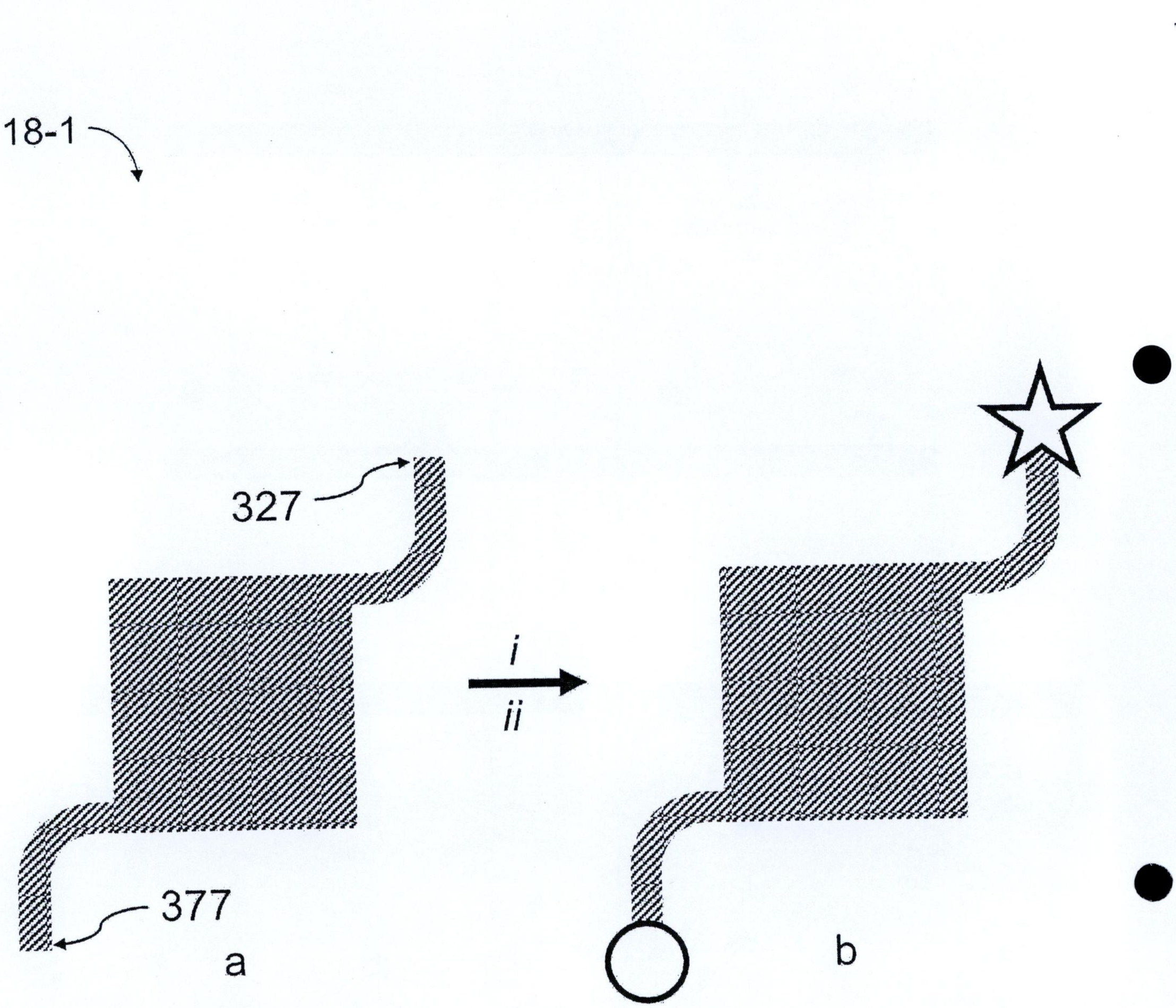
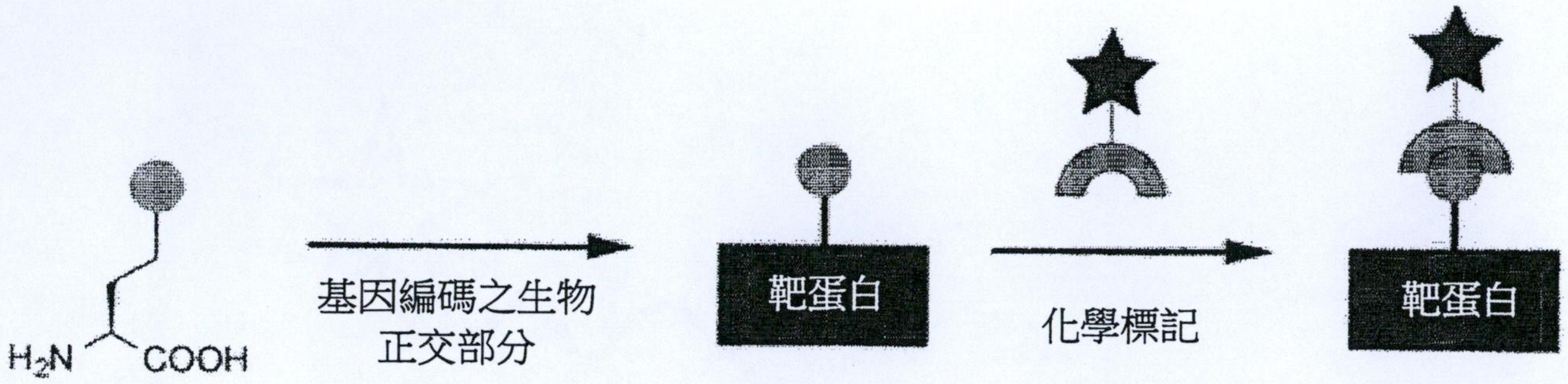


圖 18

18-2


H_2N
COOH
基因編碼之生物
正交部分
靶蛋白
化學標記
靶蛋白

18-3

「酮」
p-AcF
m-AcF
p-BzF
diF
Aon
「疊氮化物」
p-AzF
p-AzbK
AzK
AcPK
「末端炔烴」
PrgF
EtcK
AlkK
AlkK2
「張力炔烴」
CoK1
CoK2
BCNK
「1,2-胺基硫醇」
ThiPK
DCysK
LCysK
「苯胺」
p-AmF
「碘化物」
pIF
p-IpK
「酮酸酯」
p-BorF
「四唑」
p-TzF
「烯烴」
O-AllY
AcrK
O-AllK
「張力烯烴」
CpK
NorK
TCOK
「四嗪」
TetF

圖 18（續）

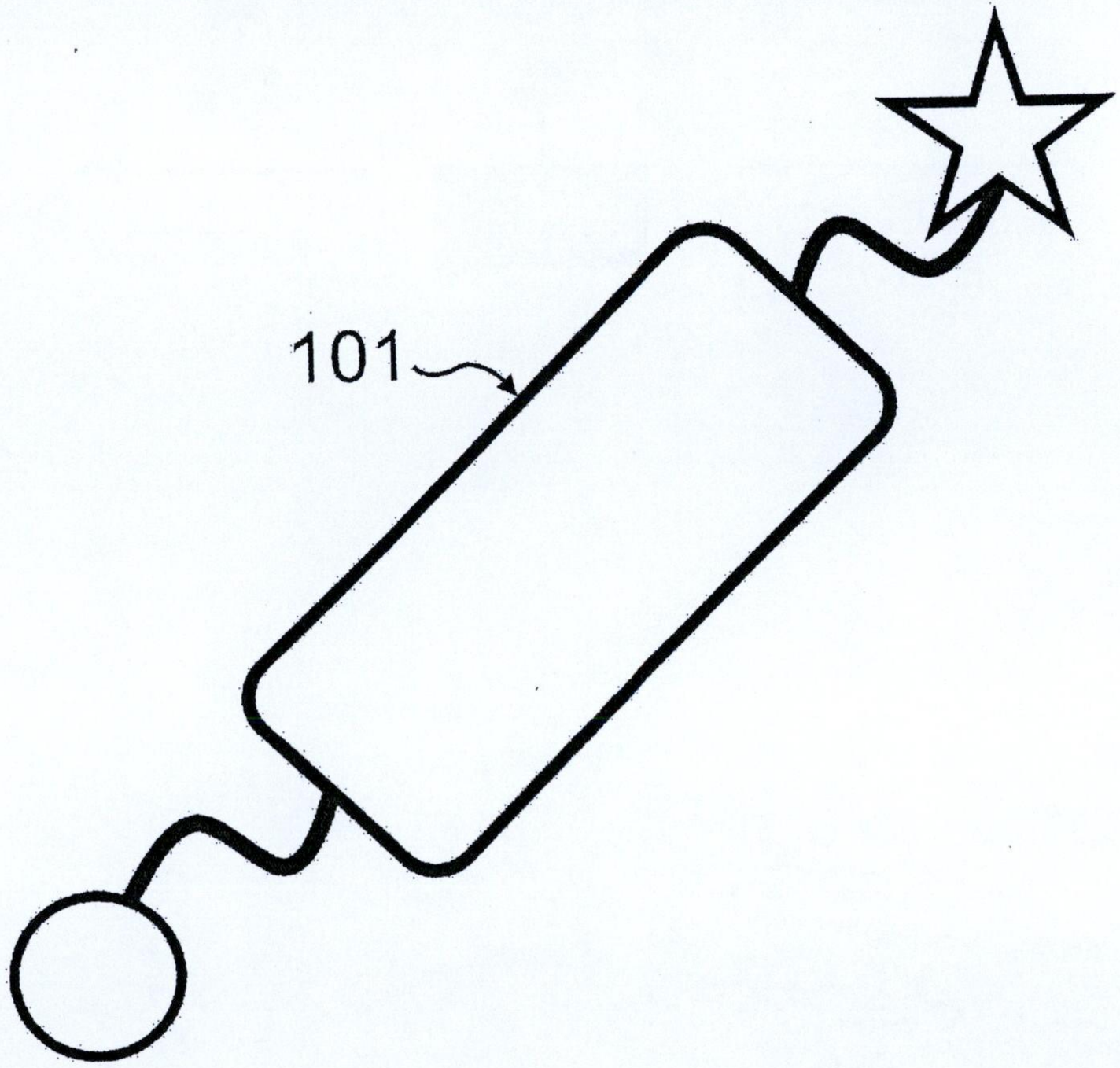


圖 19A

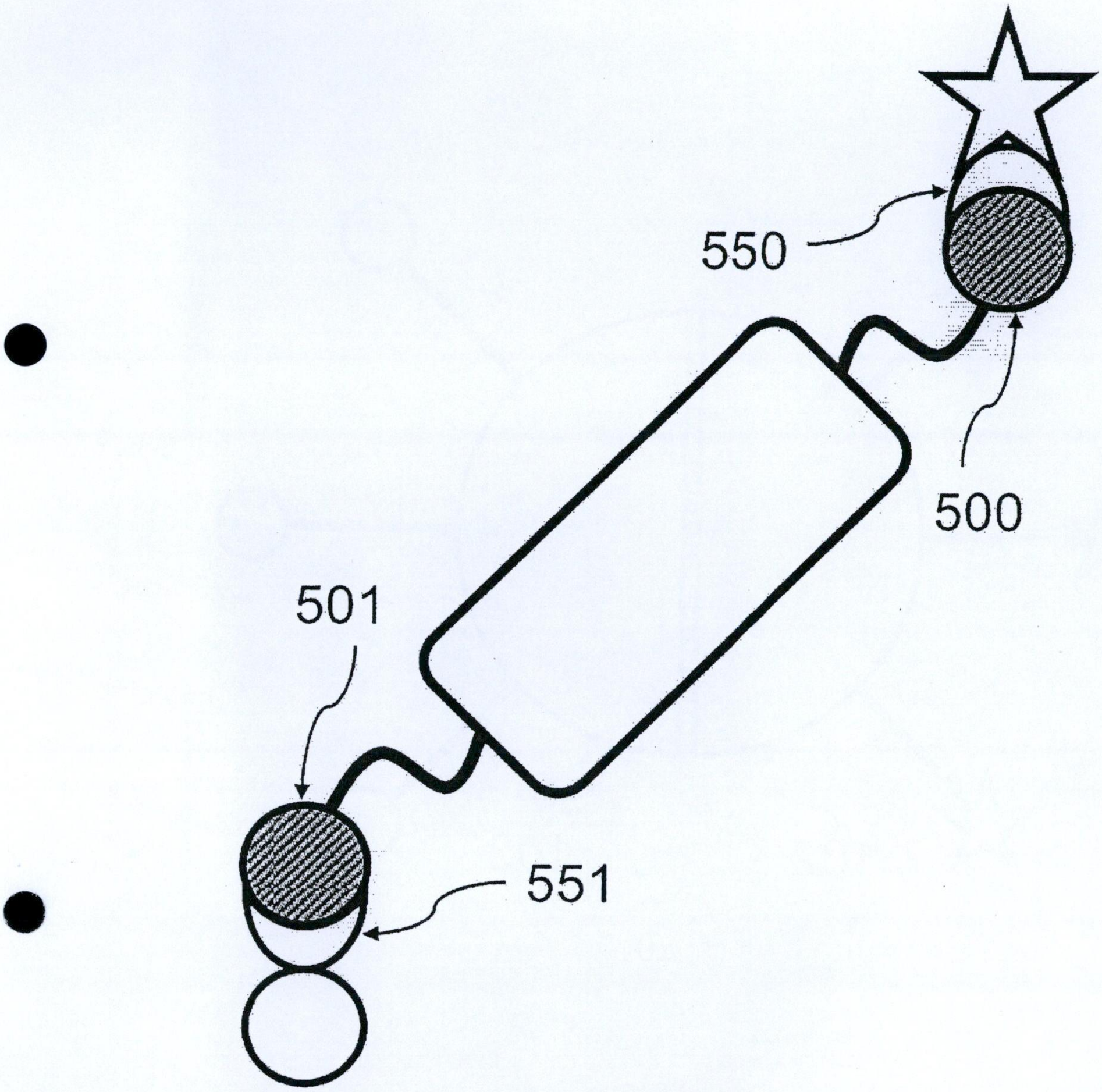


圖 19B

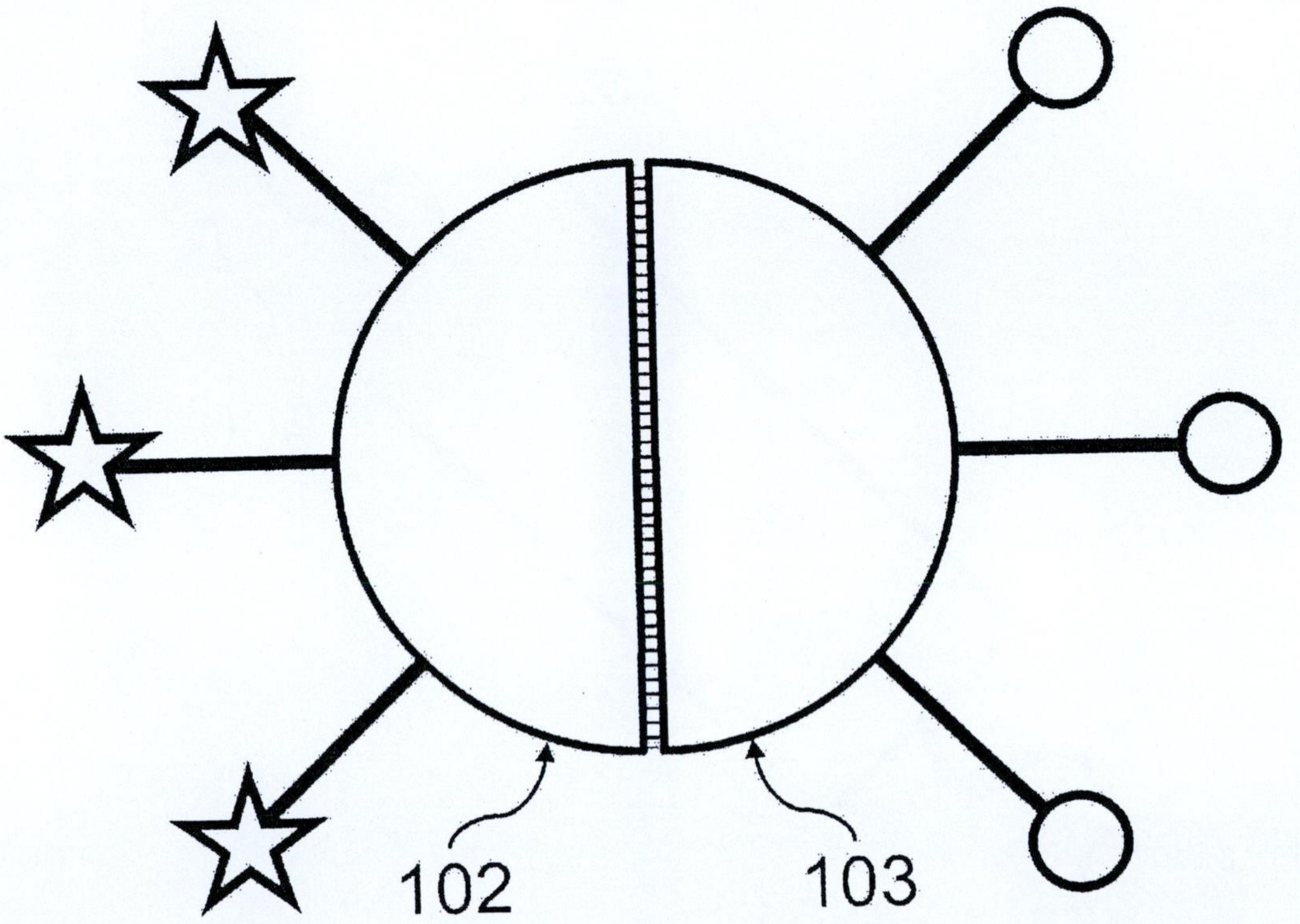


圖 20

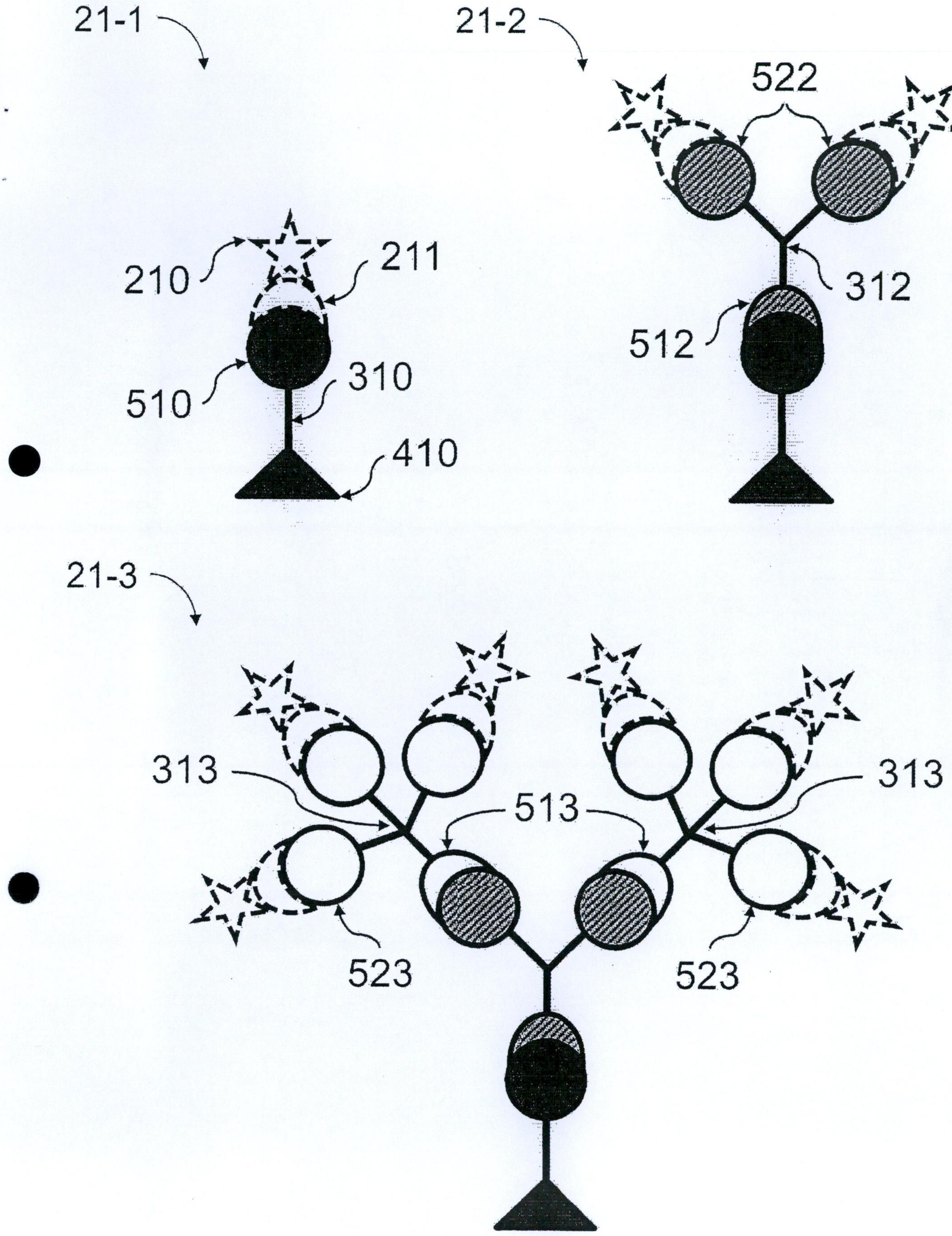
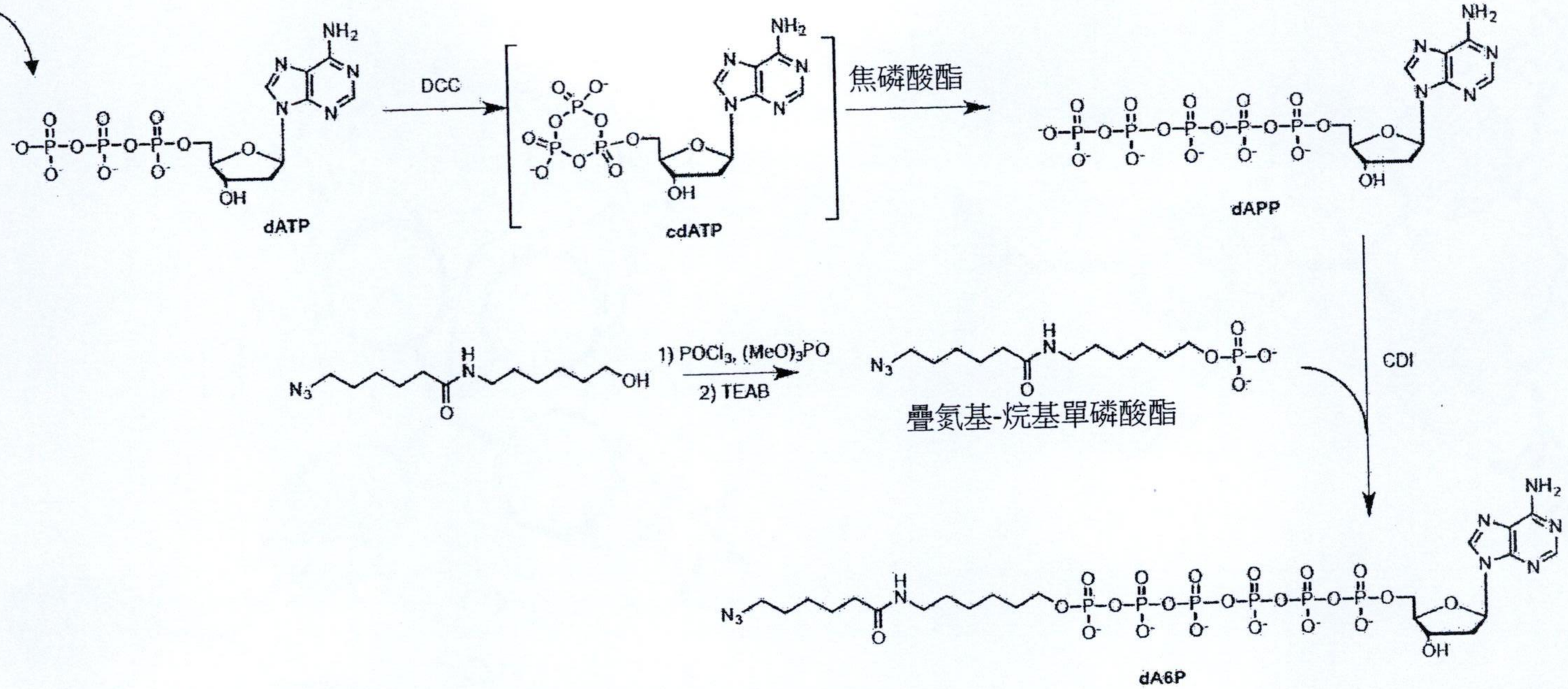
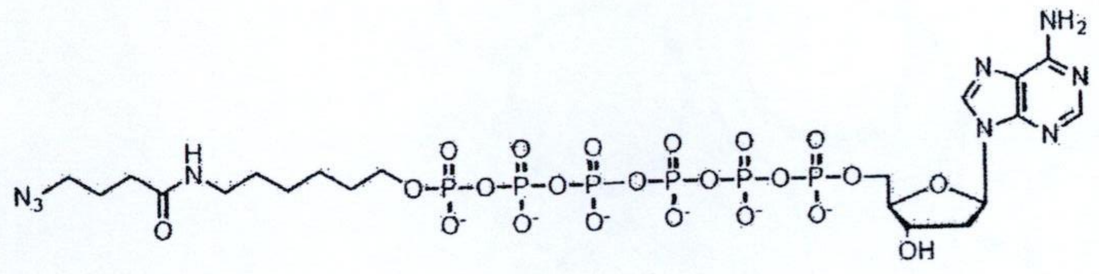


圖 21

22-1



22-2



22-3

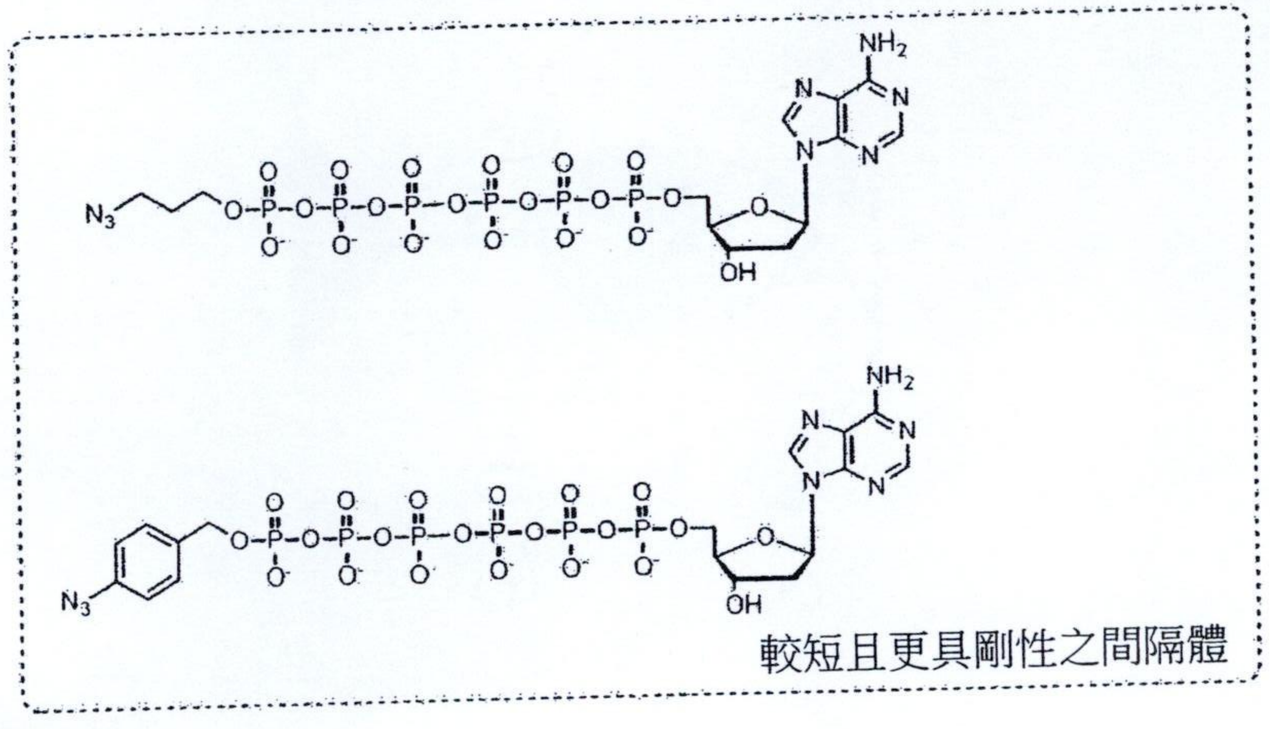


圖 22

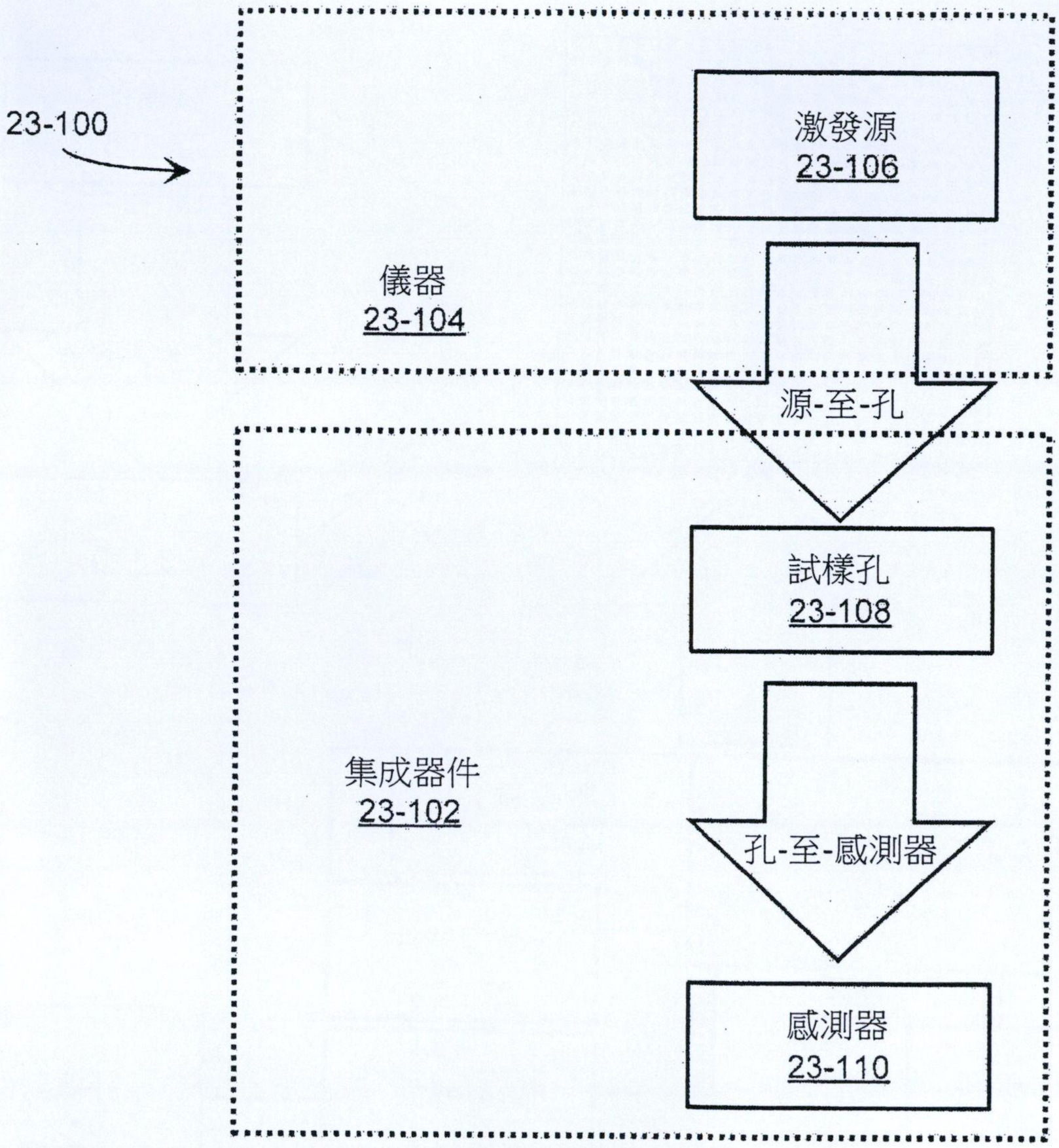

23-100
激發源
23-106
儀器
23-104
源-至-孔
試樣孔
23-108
集成器件
23-102
孔-至-感測器
感測器
23-110

圖 23A

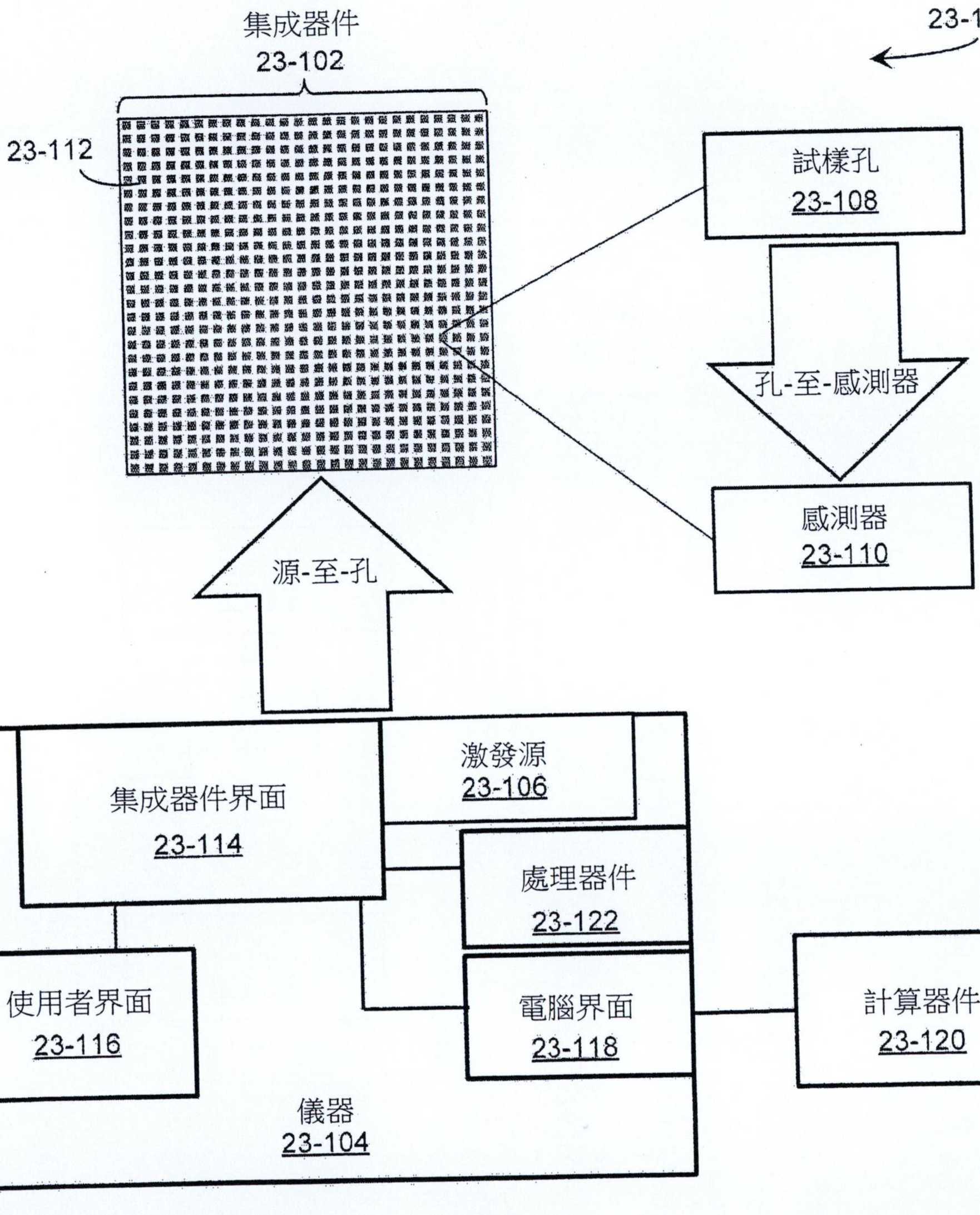

集成器件
23-102
23-100
23-112
試樣孔
23-108
孔-至-感測器
感測器
23-110
源-至-孔
激發源
23-106
集成器件界面
23-114
處理器件
23-122
使用者界面
23-116
電腦界面
23-118
計算器件
23-120
儀器
23-104

圖 23B

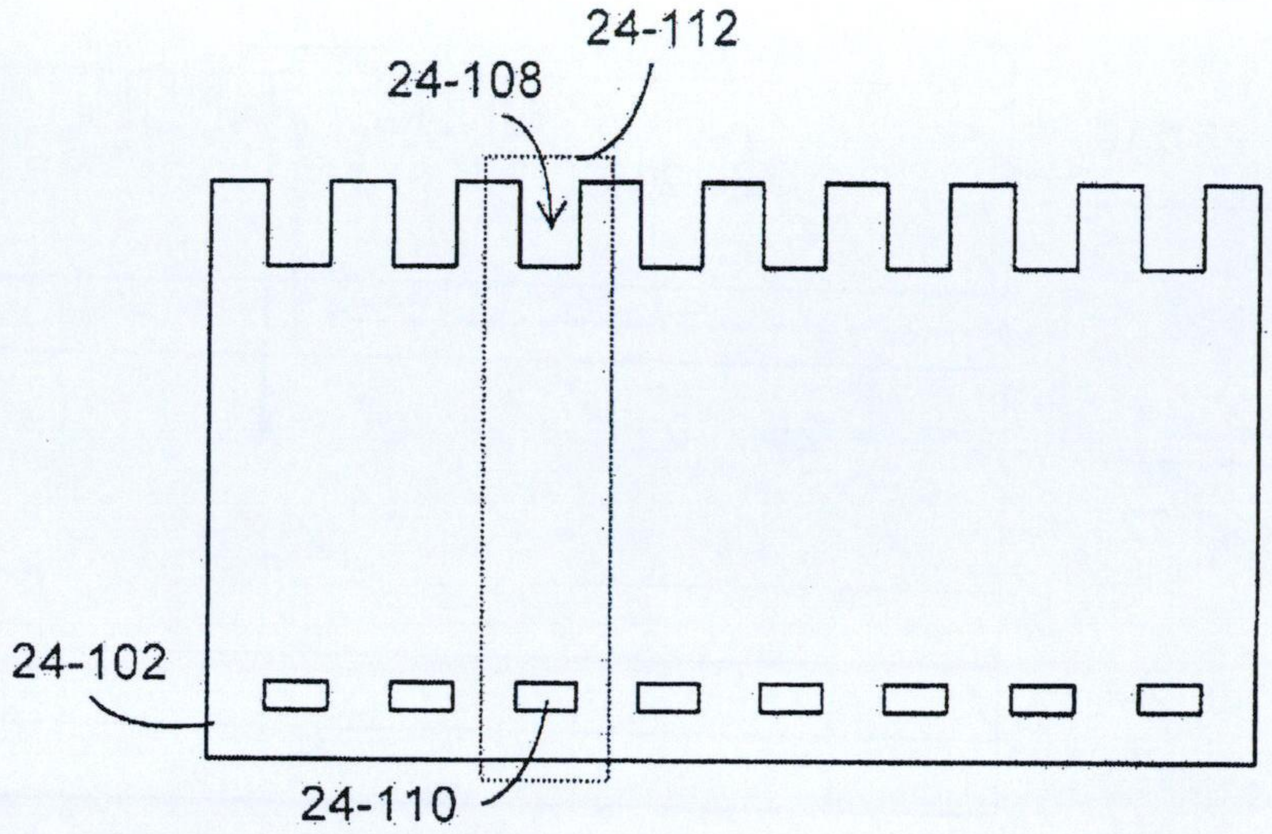

24-112
24-108
24-102
24-110

圖 24A

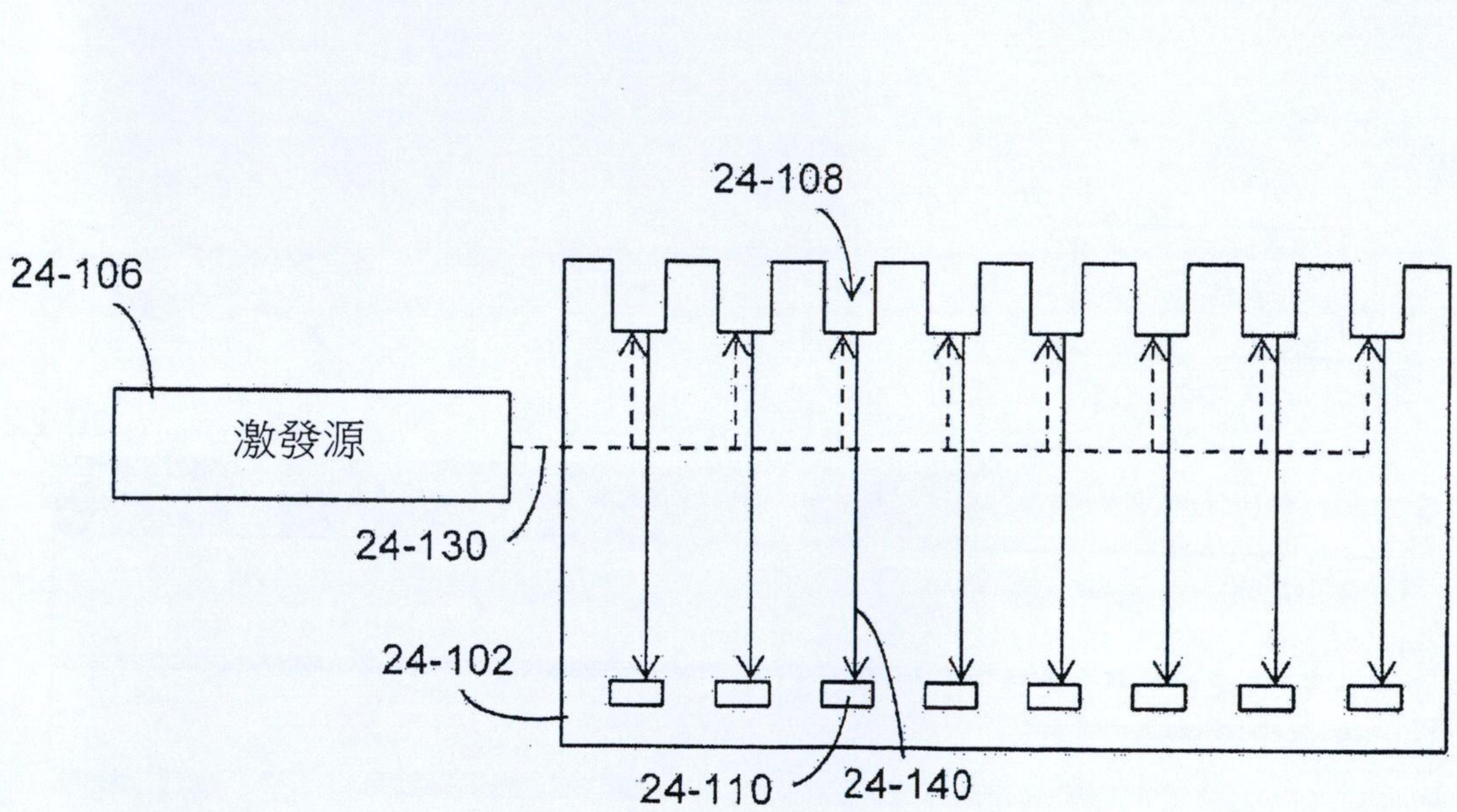

24-108
24-106
激發源
24-130
24-102
24-110
24-140

圖 24B

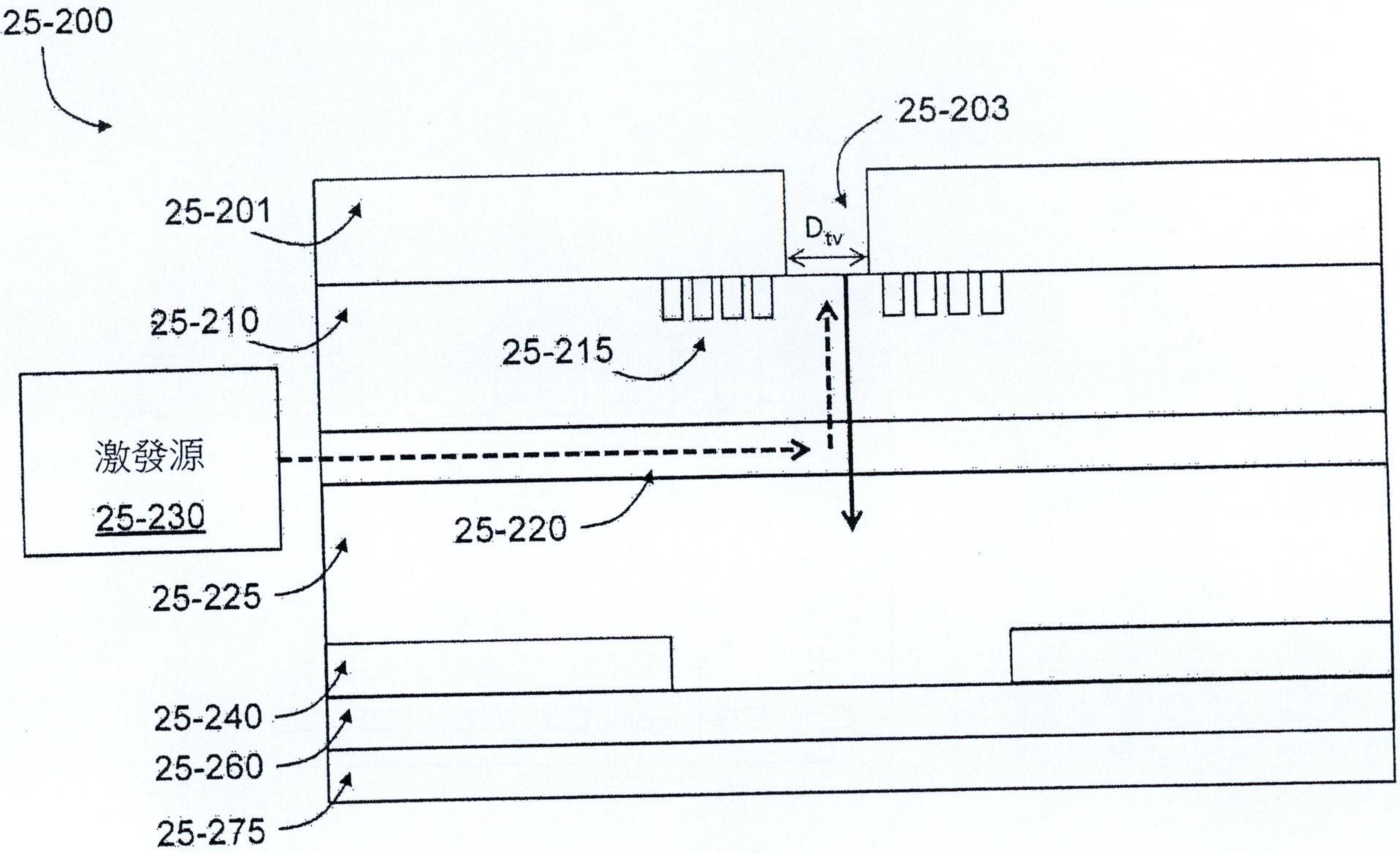

25-200
25-203
25-201
D_{tv}
25-210
25-215
激發源
25-230
25-220
25-225
25-240
25-260
25-275

圖 25

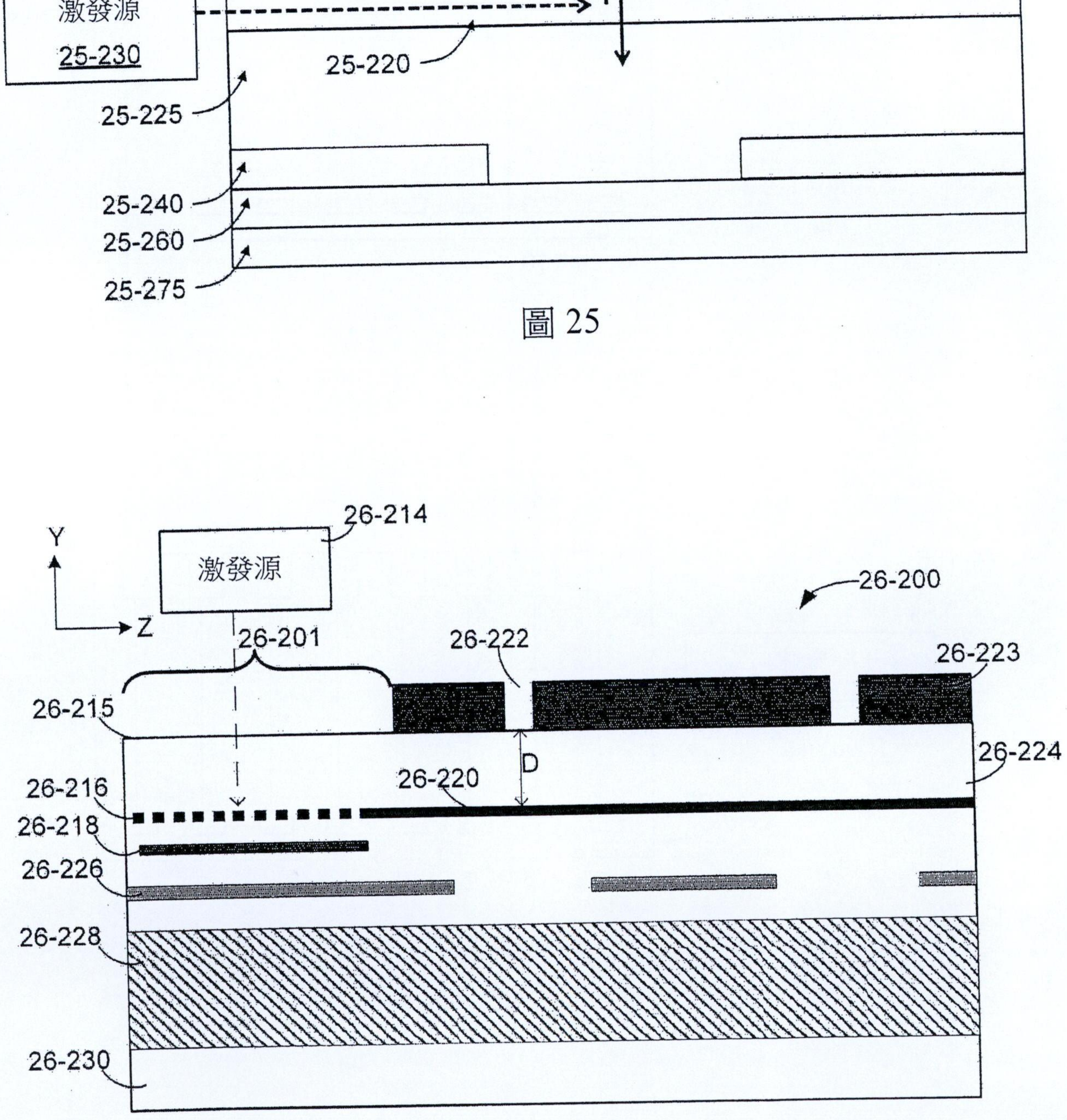

26-214
Y
Z
激發源
26-200
26-201
26-222
26-223
26-215
D
26-224
26-220
26-216
26-218
26-226
26-228
26-230

圖 26

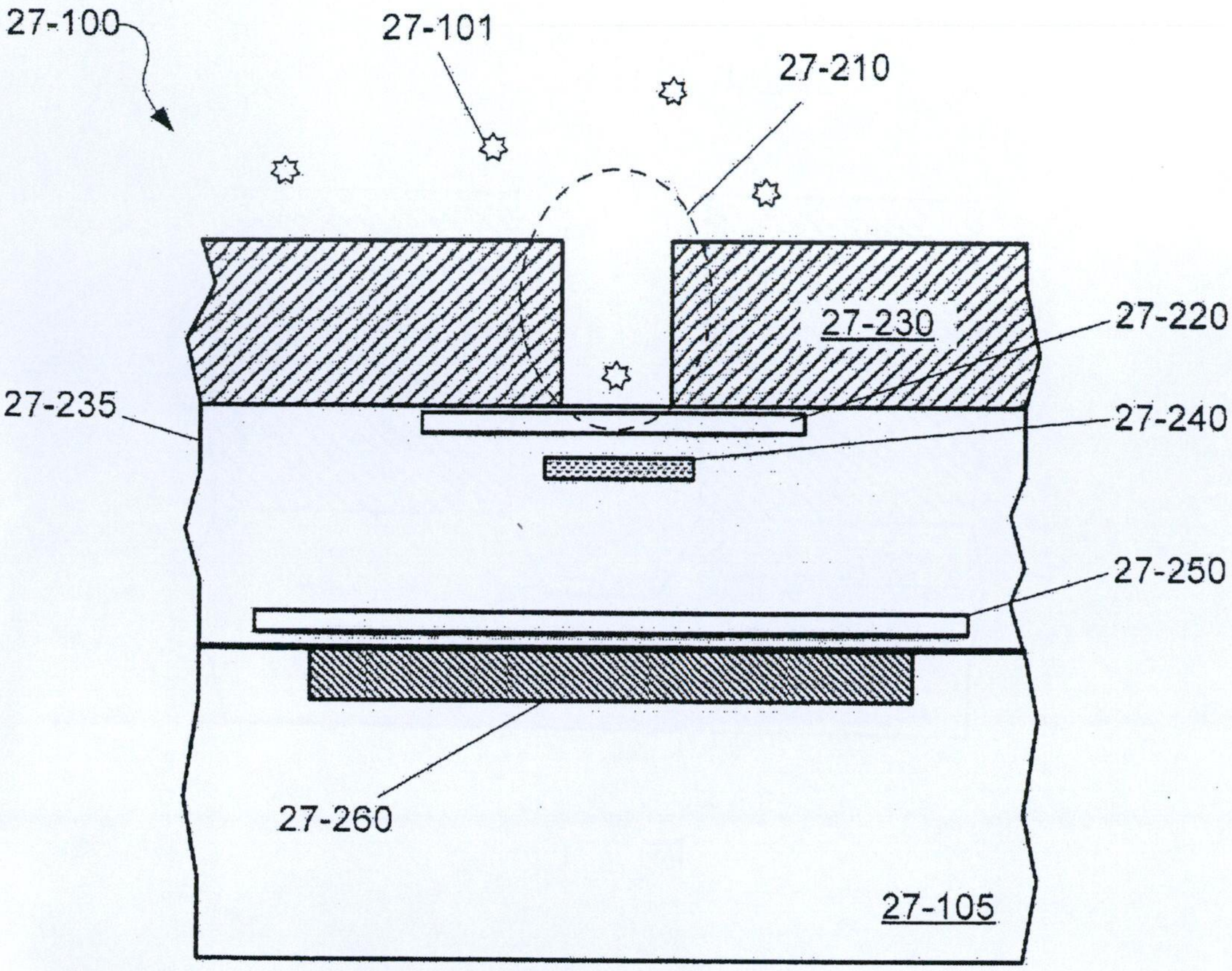

27-100
27-101
27-210
27-230
27-220
27-235
27-240
27-250
27-260
27-105

圖 27A

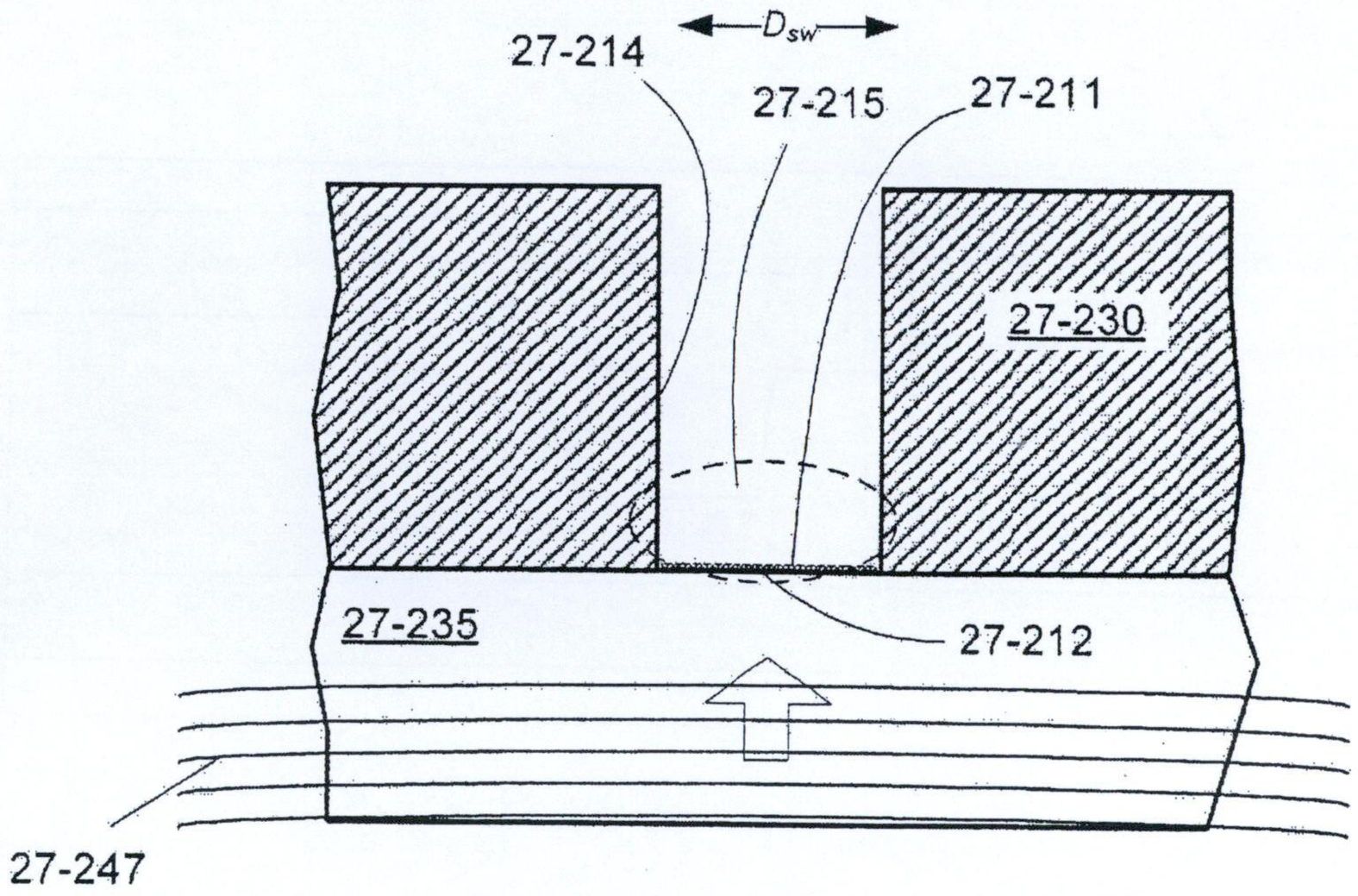

D_{sw}
27-214
27-215
27-211
27-230
27-235
27-212
27-247

圖 27B

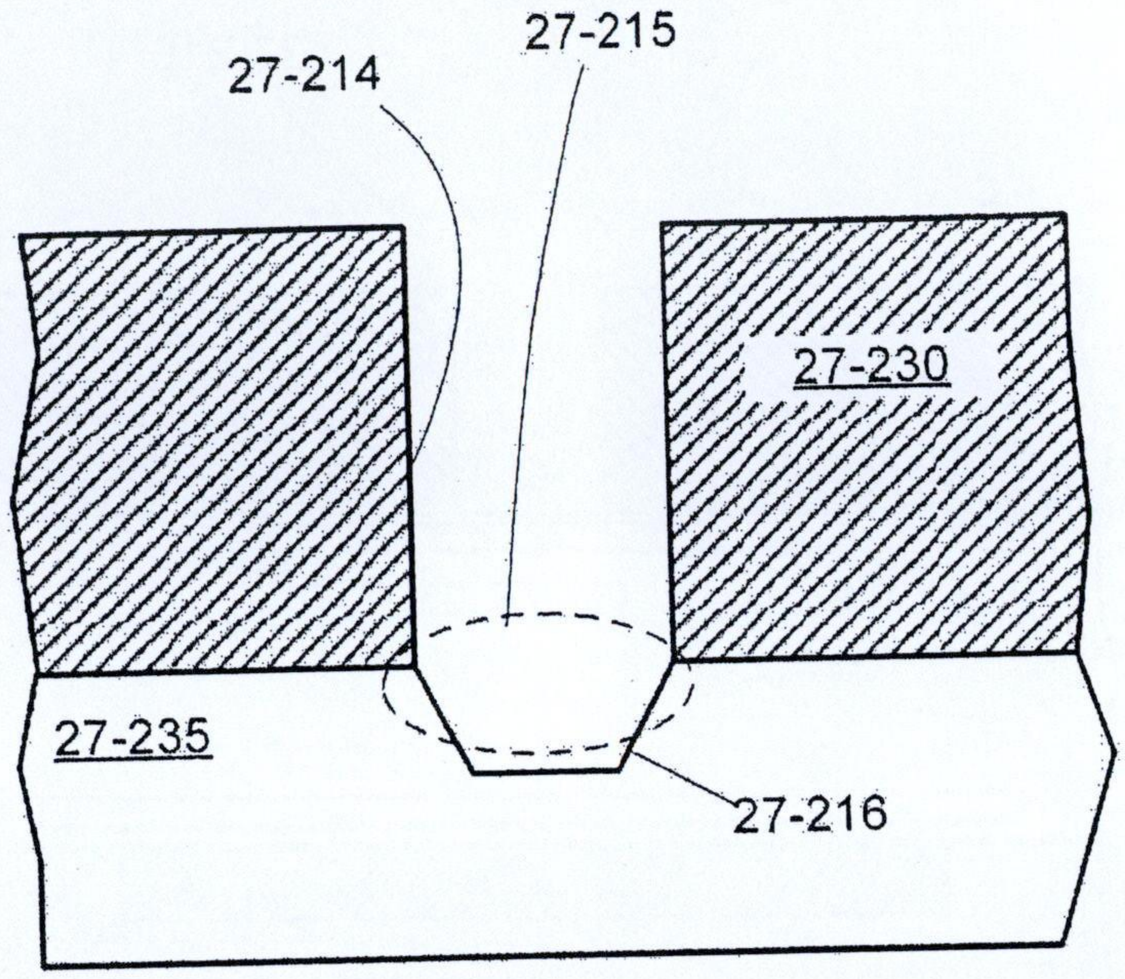

27-214
27-215
27-230
27-235
27-216

圖 27C

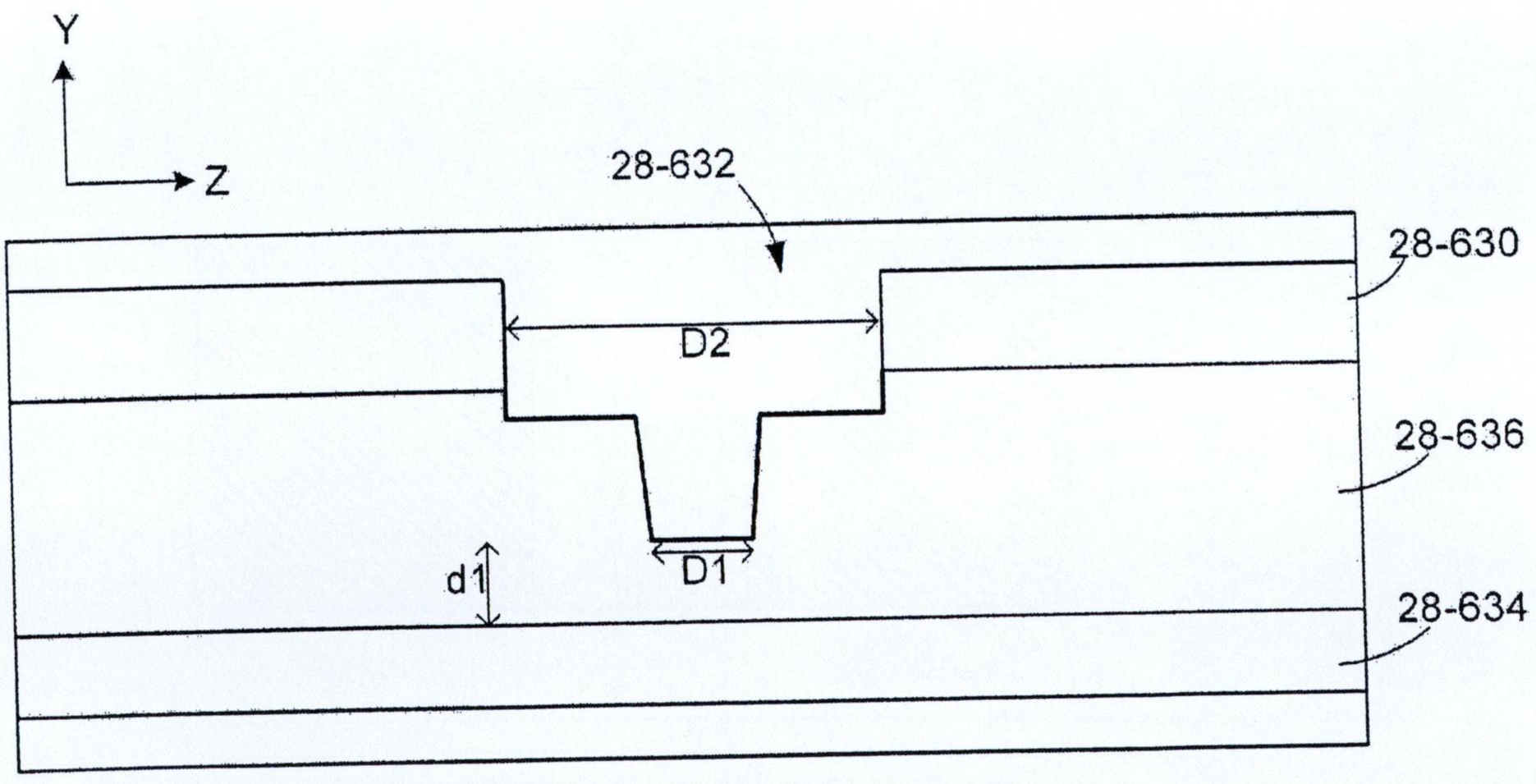

Y
Z
28-632
28-630
D2
28-636
d1
D1
28-634

圖 28

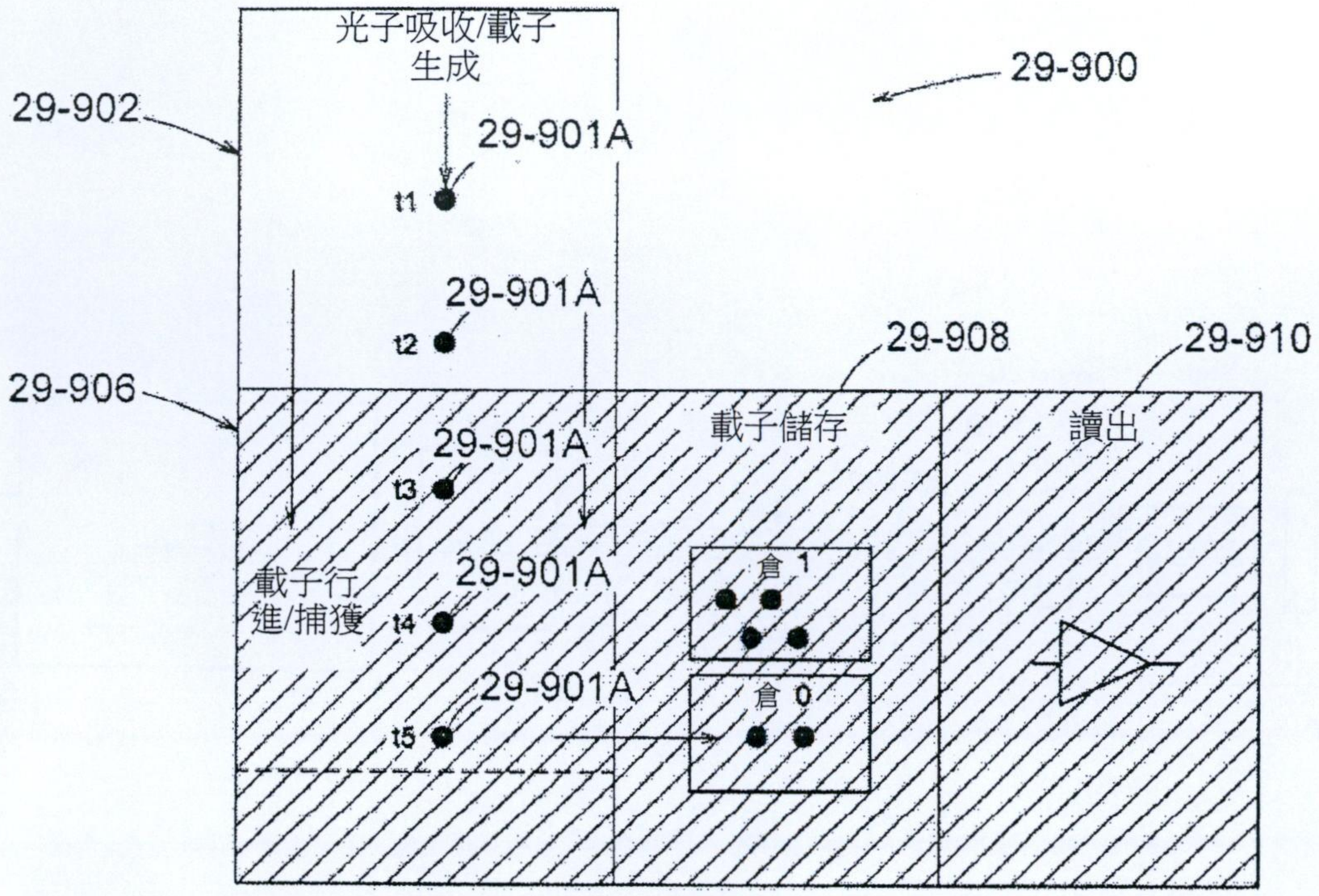

光子吸收/載子
生成
29-900
29-902
29-901A
t1
29-901A
t2
29-908
29-910
29-906
載子儲存
讀出
29-901A
t3
29-901A
載子行
進/捕獲
t4
倉 1
29-901A
t5
倉 0

圖 29A

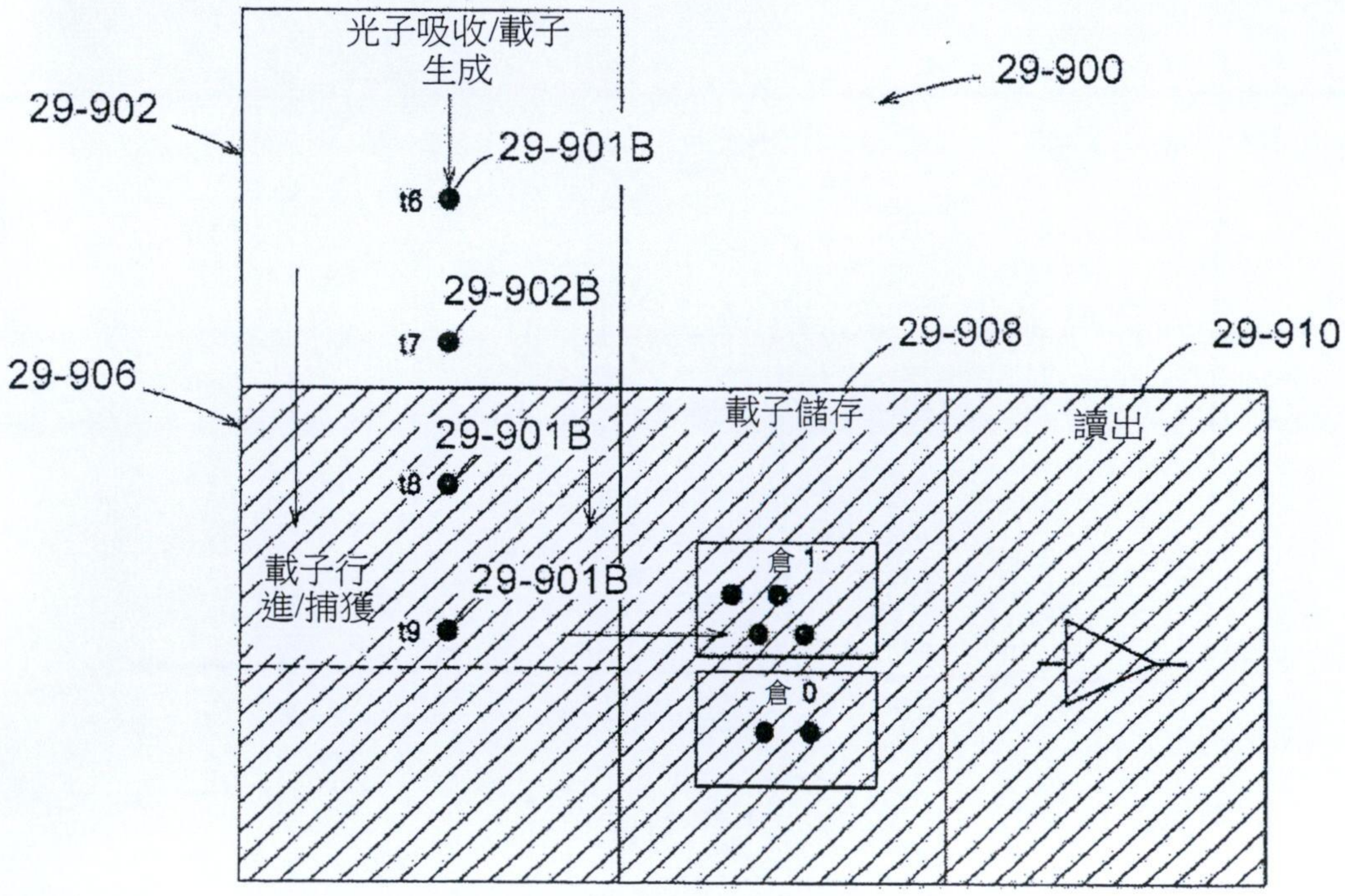

光子吸收/載子
生成
29-900
29-902
29-901B
t6
29-902B
t7
29-908
29-910
29-906
載子儲存
讀出
29-901B
t8
載子行
進/捕獲
29-901B
t9
倉 1
倉 0

圖 29B

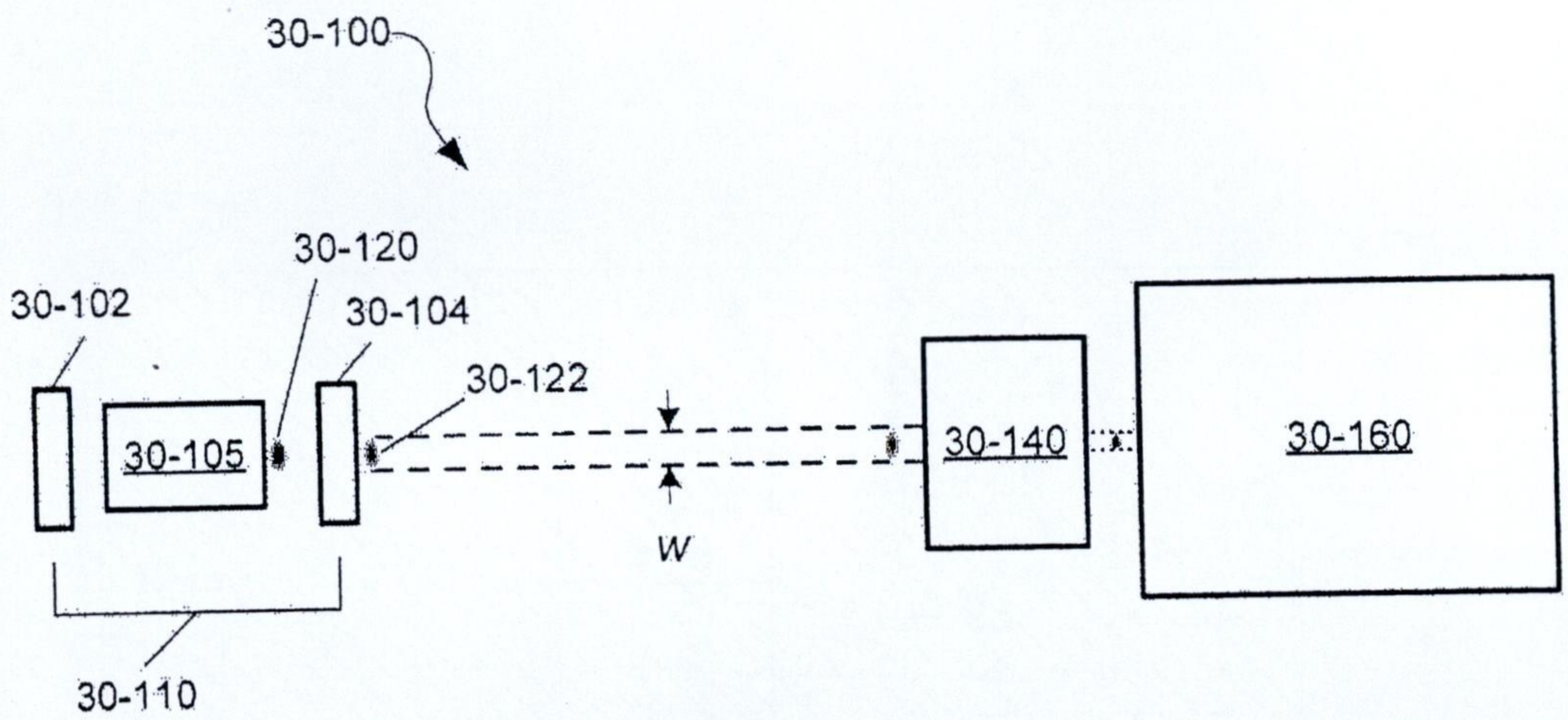

30-100
30-120
30-102
30-104
30-122
30-105
30-140
30-160
w
30-110

圖 30A

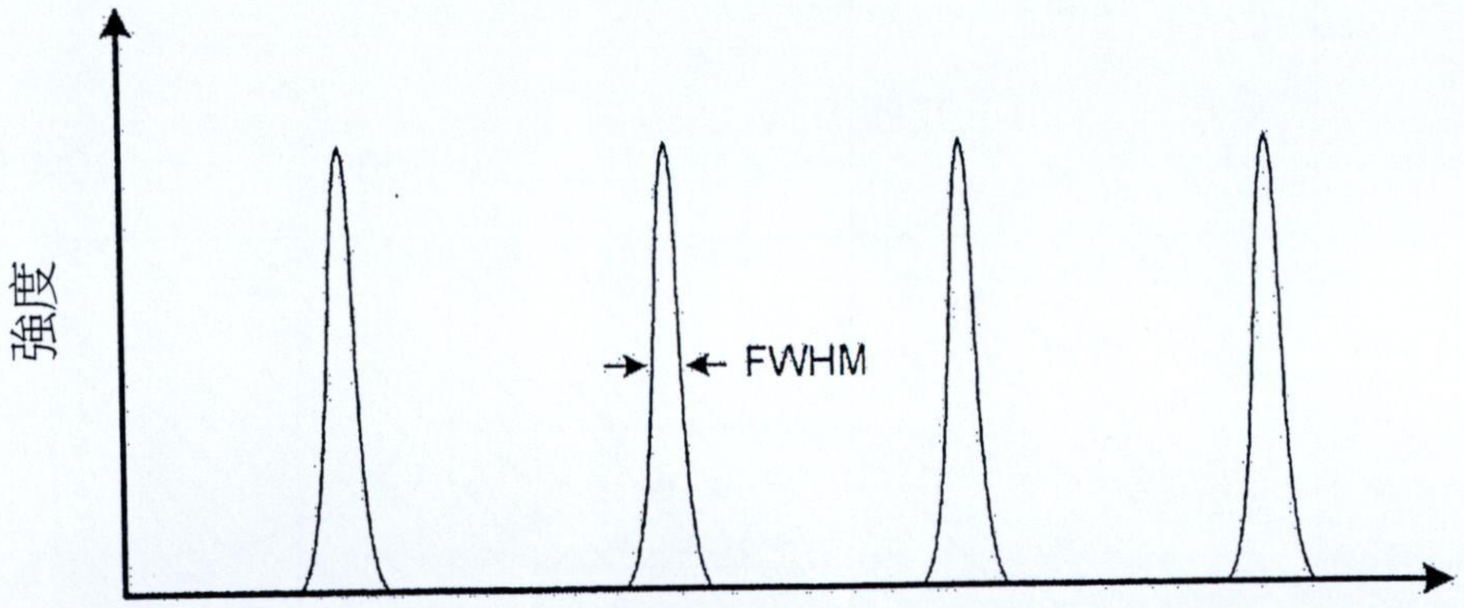

強度
FWHM
時間
T

圖 30B

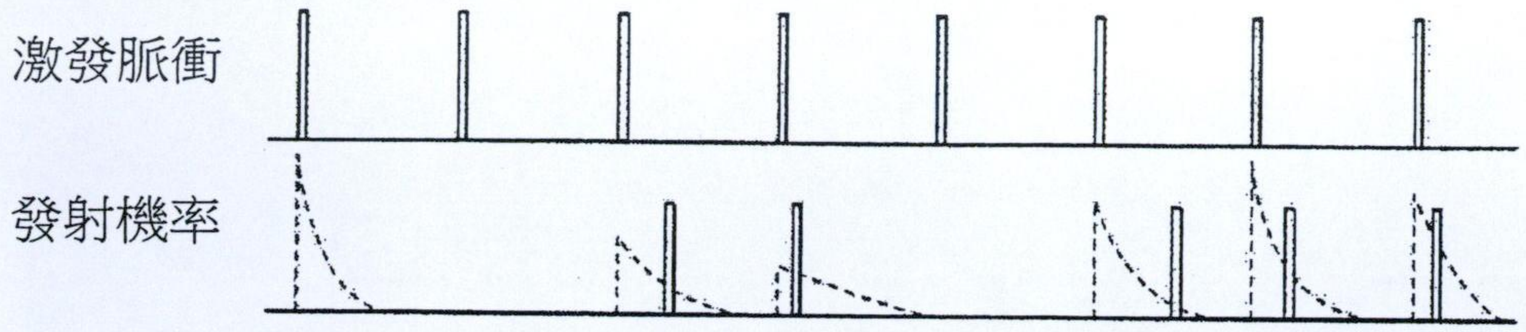


圖 31A

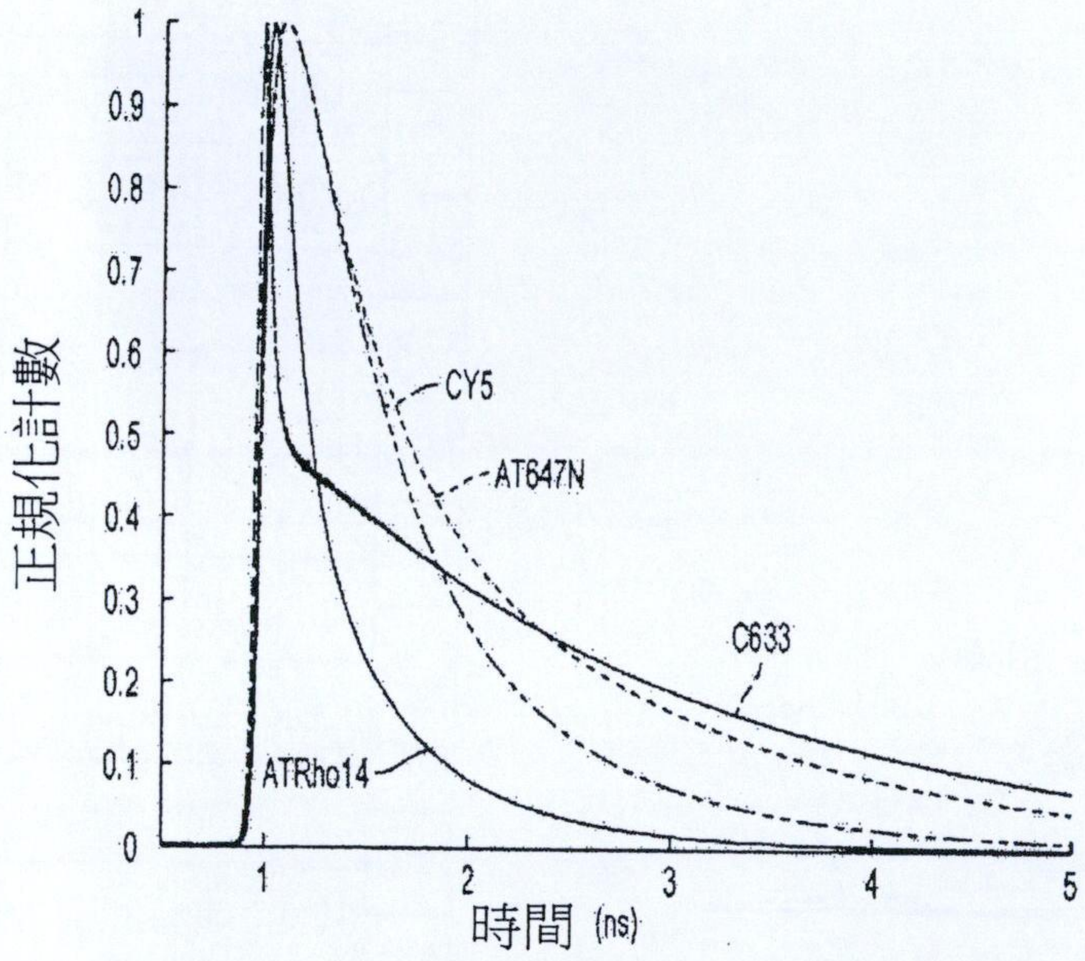


圖 31B

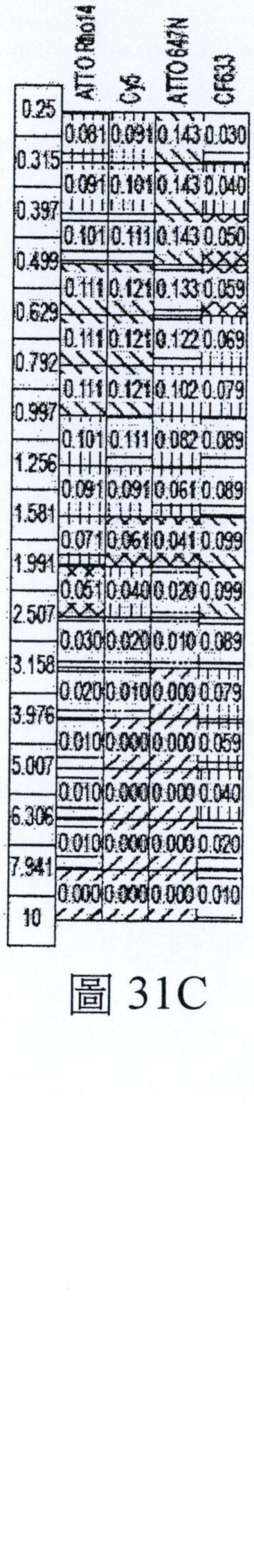


圖 31C

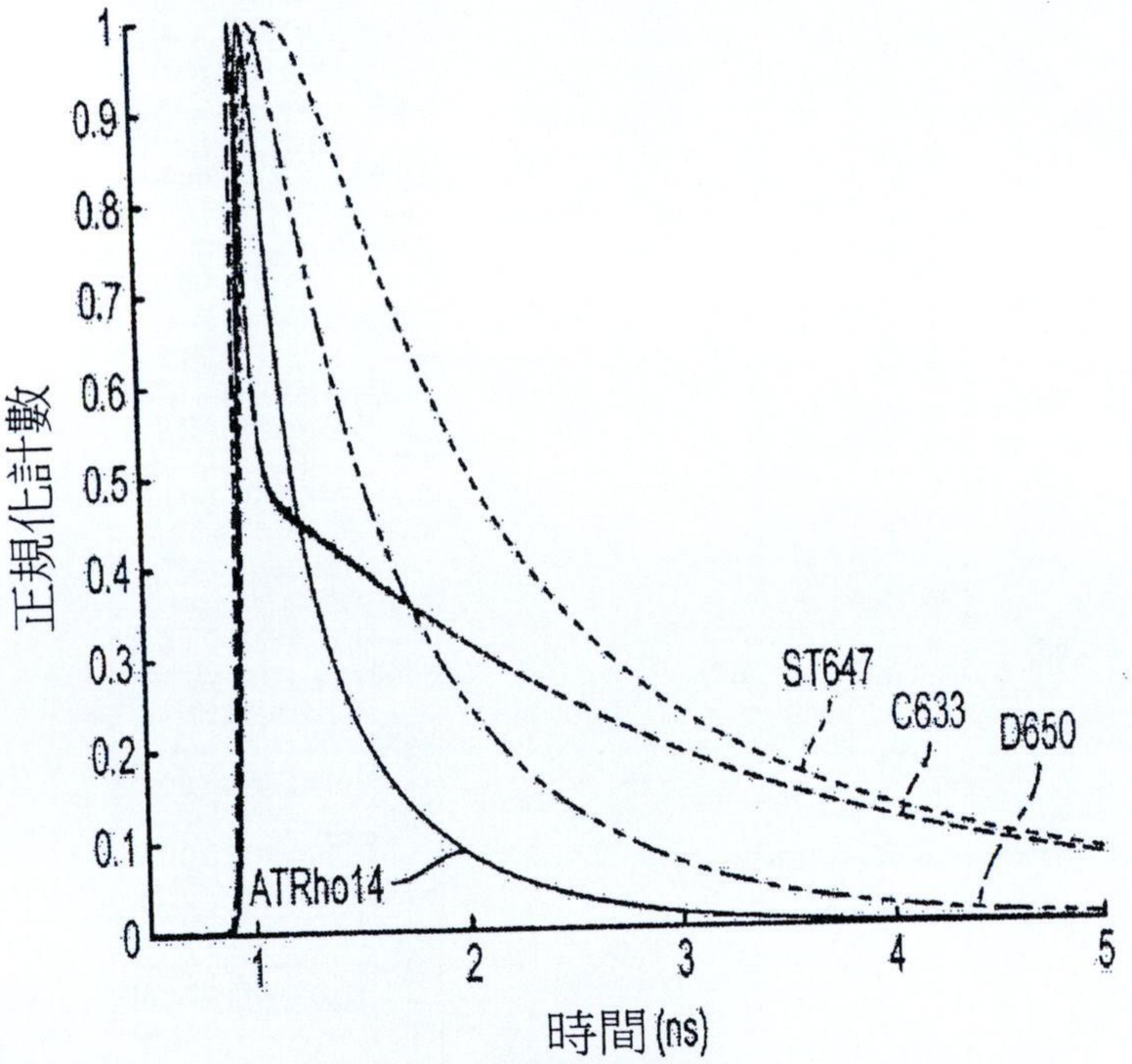

正規化計數
時間(ns)
ATRho14
ST647
C633
D650
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1
2
3
4
5

圖 32A

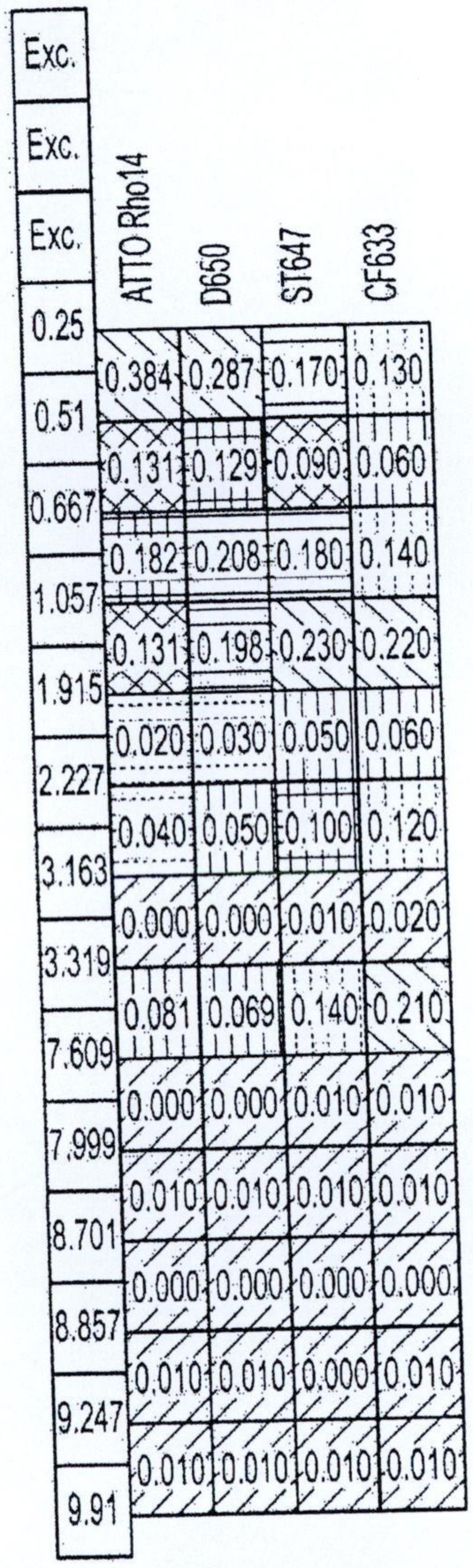

Exc.
Exc.
Exc.
0.25
0.51
0.667
1.057
1.915
2.227
3.163
3.319
7.609
7.999
8.701
8.857
9.247
9.91
ATTO Rho14
D650
ST647
CF633
0.384 0.287 0.170 0.130
0.131 0.129 0.090 0.060
0.182 0.208 0.180 0.140
0.131 0.198 0.230 0.220
0.020 0.030 0.050 0.060
0.040 0.050 0.100 0.120
0.000 0.000 0.010 0.020
0.081 0.069 0.140 0.210
0.000 0.000 0.010 0.010
0.010 0.010 0.010 0.010
0.000 0.000 0.000 0.000
0.010 0.010 0.000 0.010
0.010 0.010 0.010 0.010

圖 32B

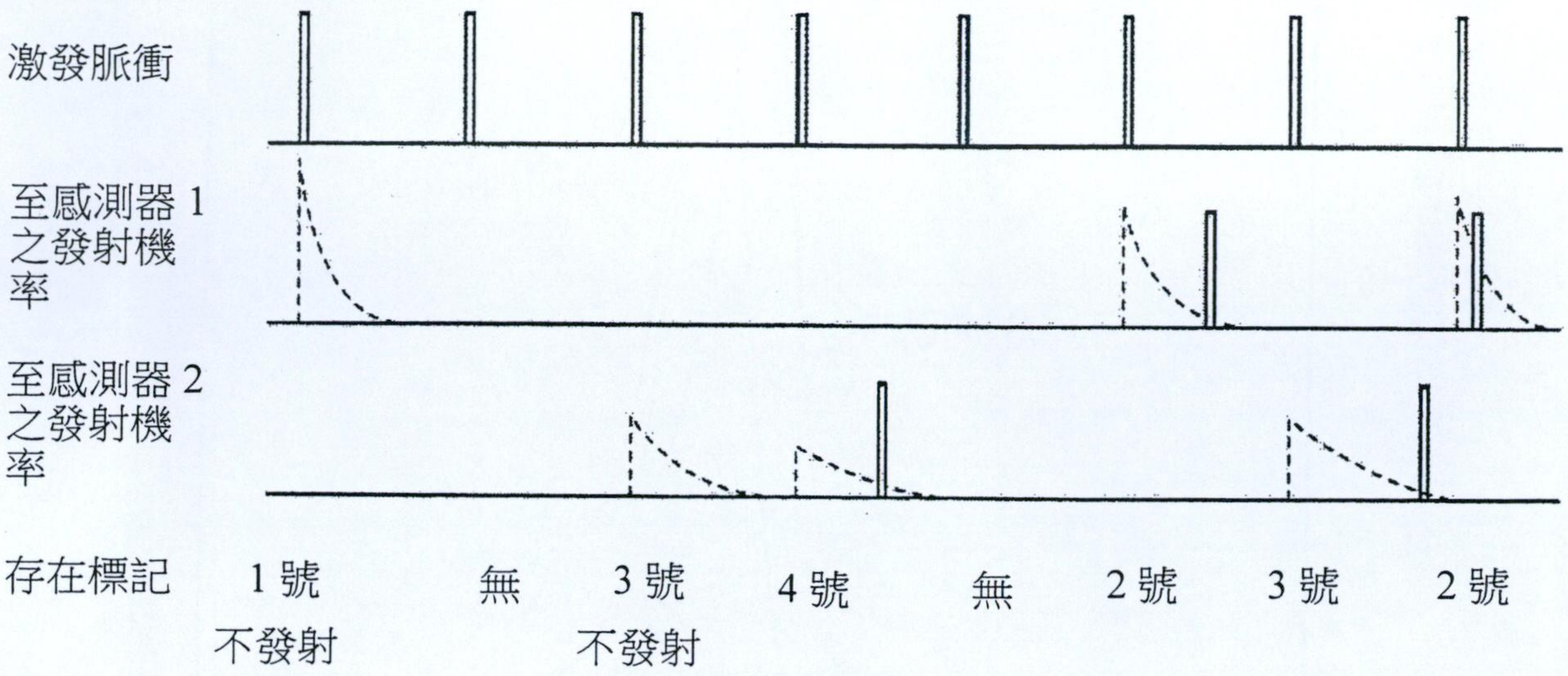

激發脈衝
至感測器 1 之發射機率
至感測器 2 之發射機率
存在標記
1 號
無
3 號
4 號
無
2 號
3 號
2 號
不發射
不發射

圖 33A

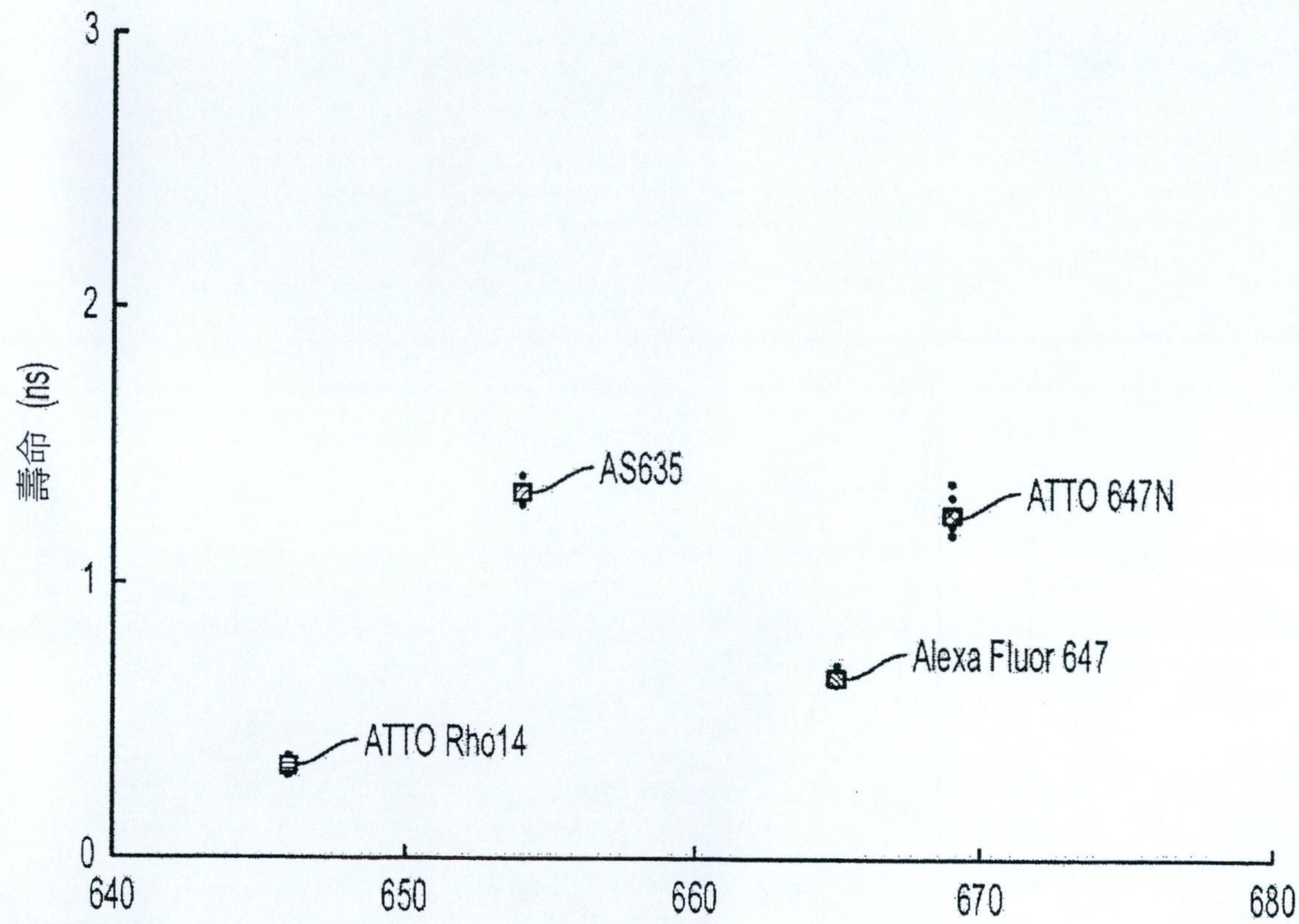

3
2
1
0
壽命 (ns)
AS635
ATTO 647N
Alexa Fluor 647
ATTO Rho14
640
650
660
670
680
發射波長 (nm)

圖 33B

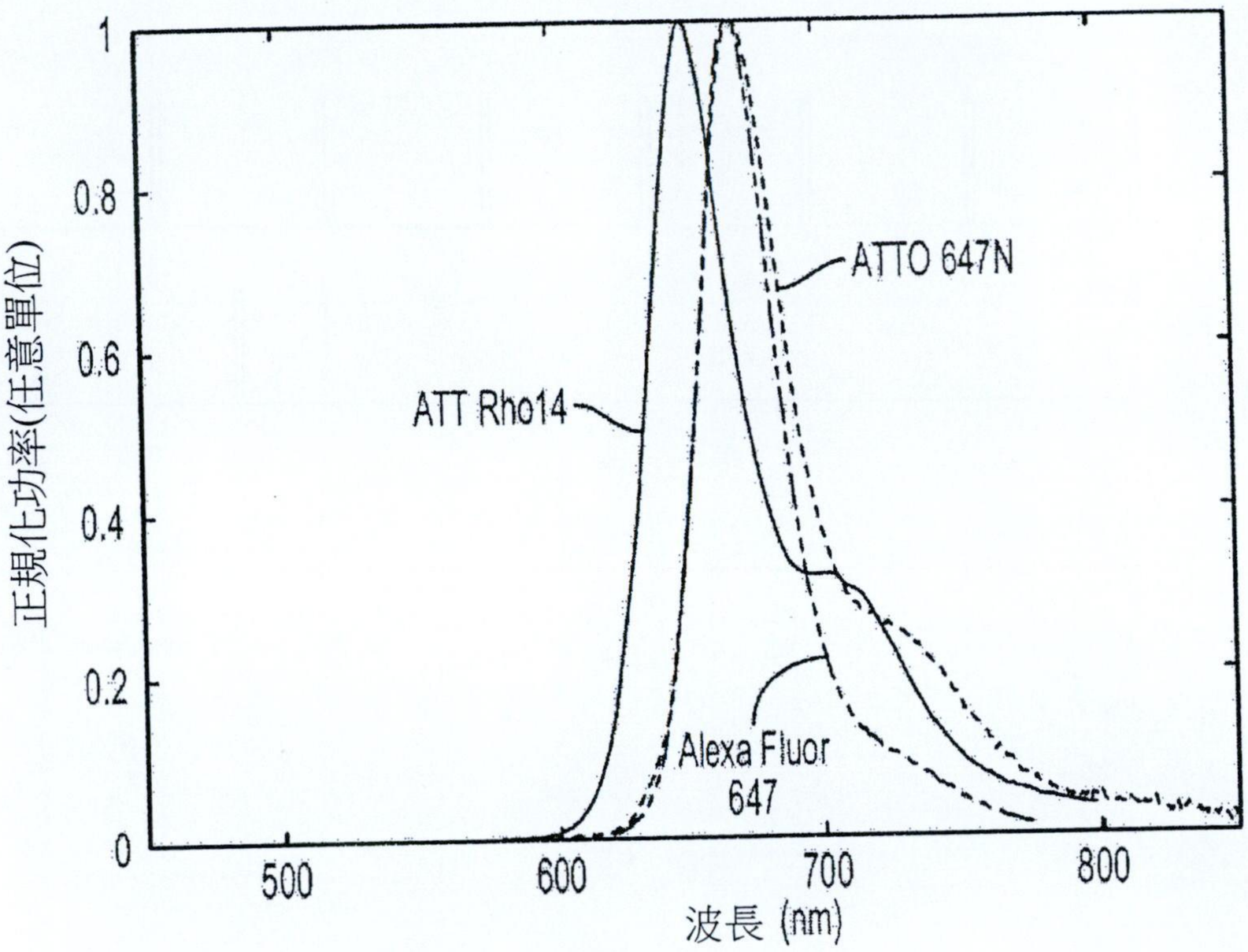

1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
正規化功率(任意單位)
ATT Rho14
ATTO 647N
Alexa Fluor
647
500
600
700
800
波長 (nm)

圖 34A

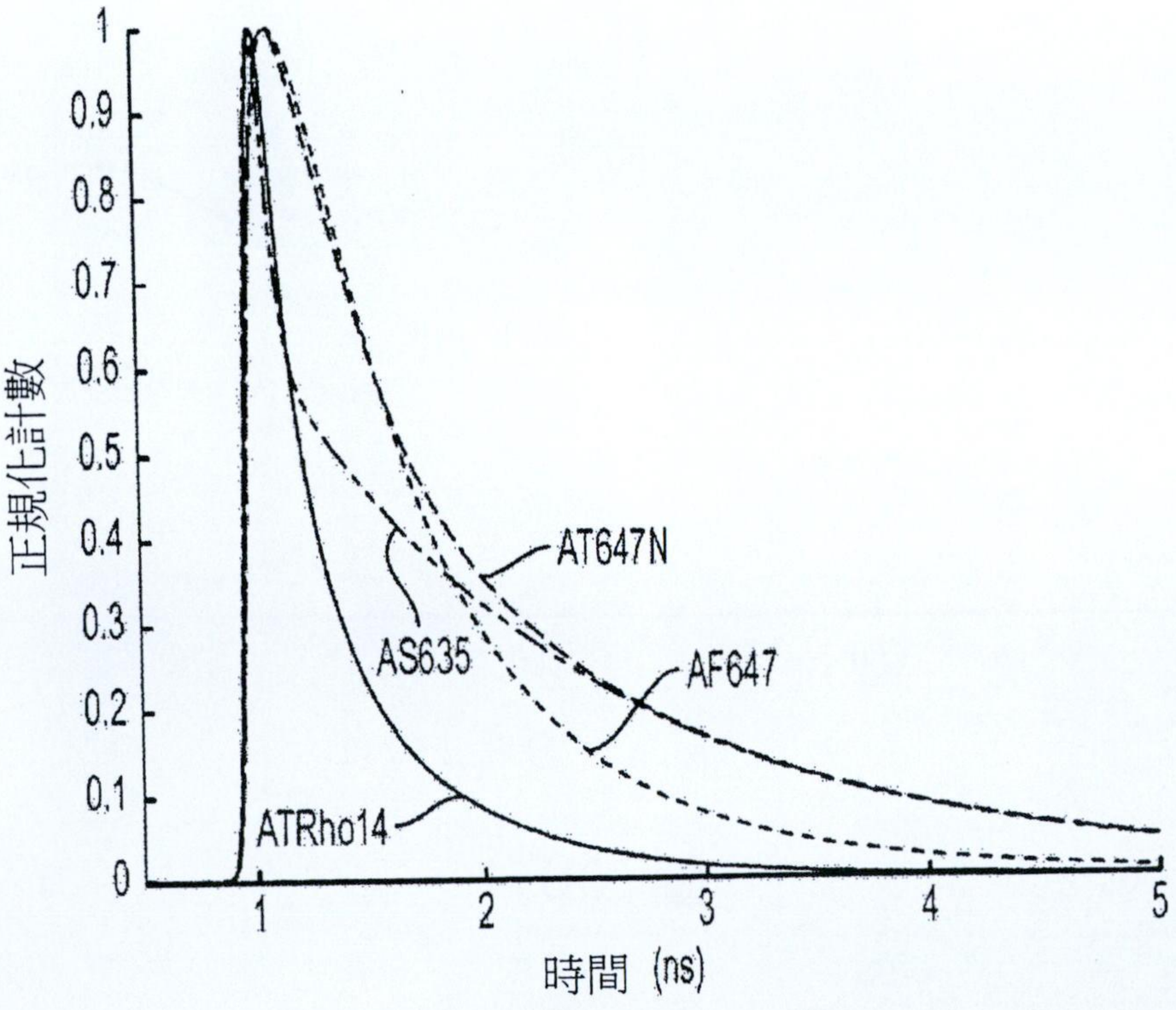

1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
正規化計數
AT647N
AS635
AF647
ATRho14
1
2
3
4
5
時間 (ns)

圖 34B

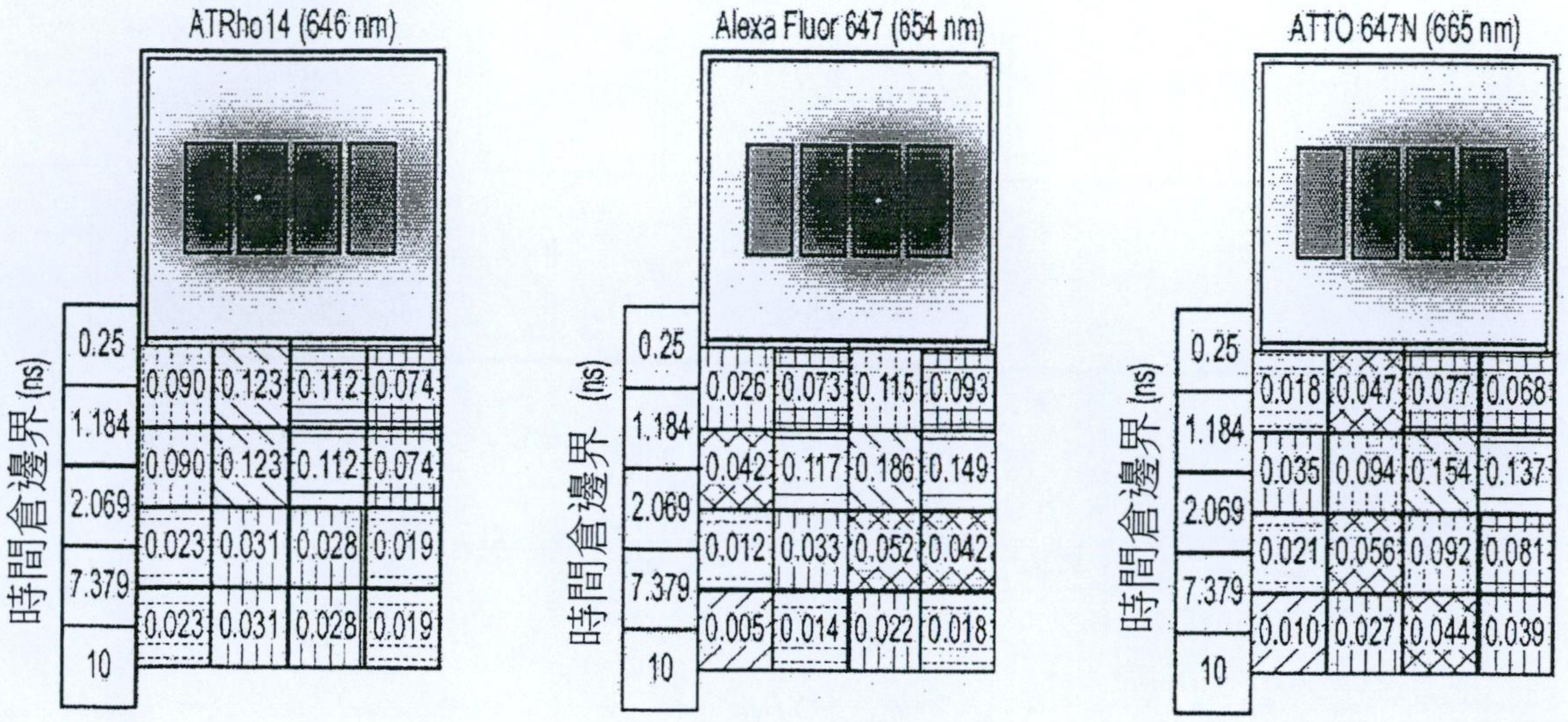


圖 35A

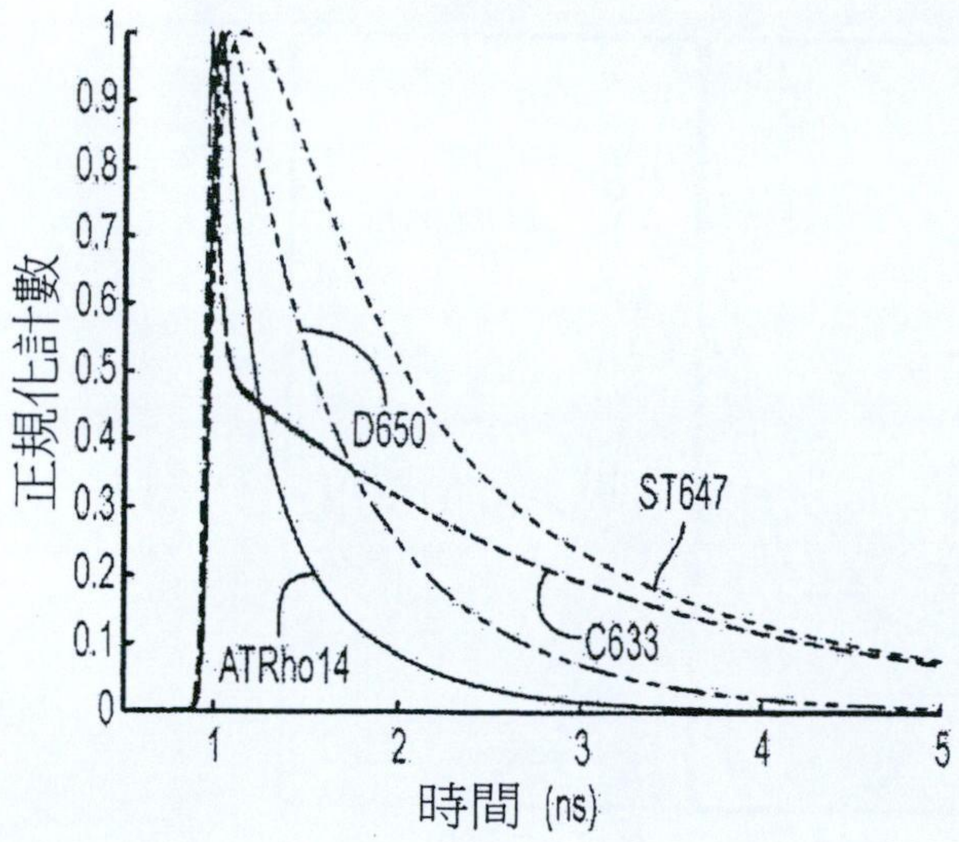


圖 35B

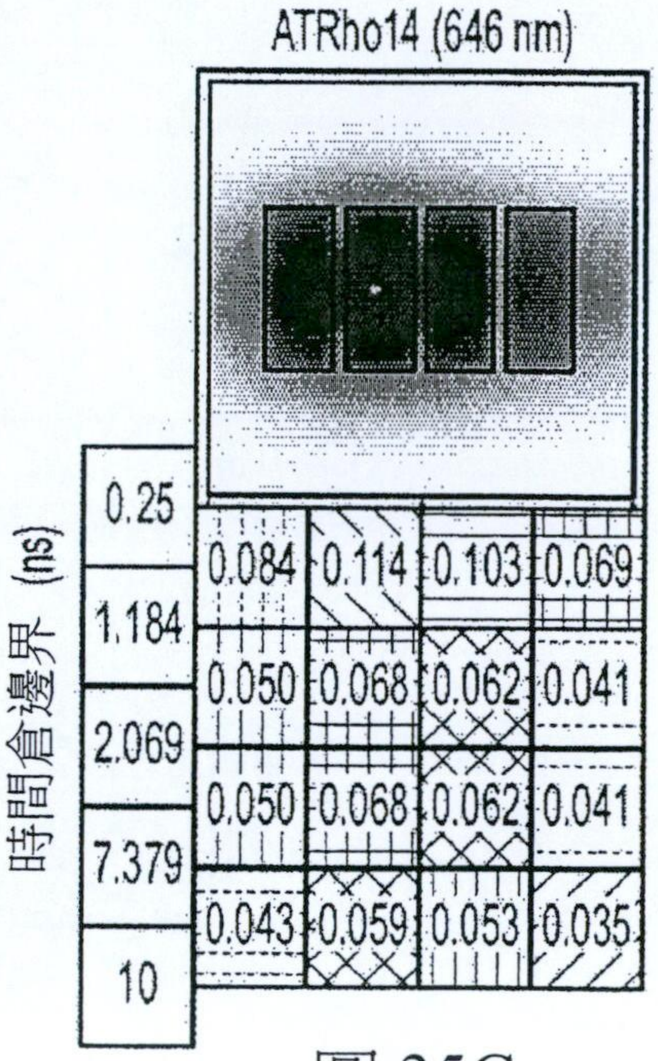


圖 35C

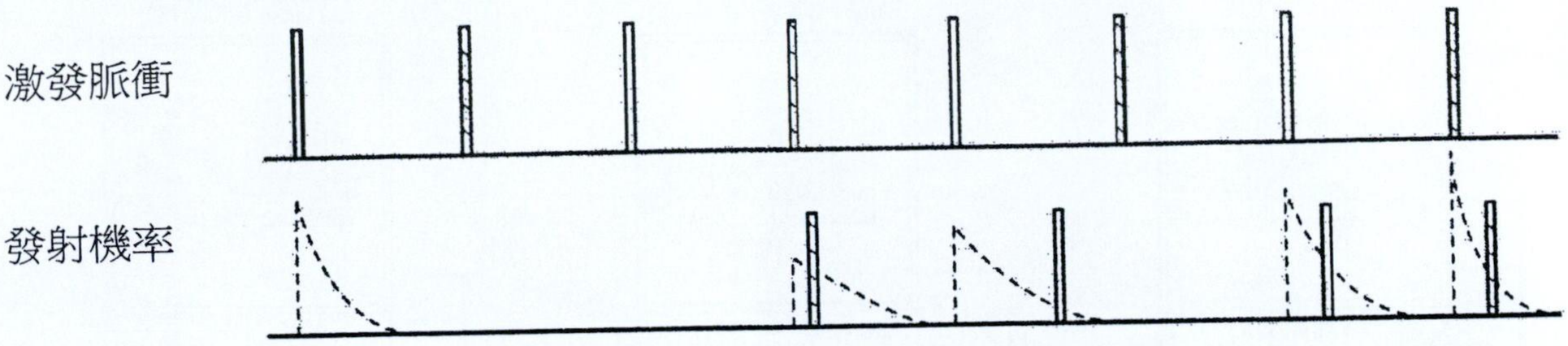

激發脈衝
發射機率
存在標記
1 號
無
4 號
2 號
3 號
1 號
1 號
4 號
不發射
錯誤激發
錯誤激發

圖 36A

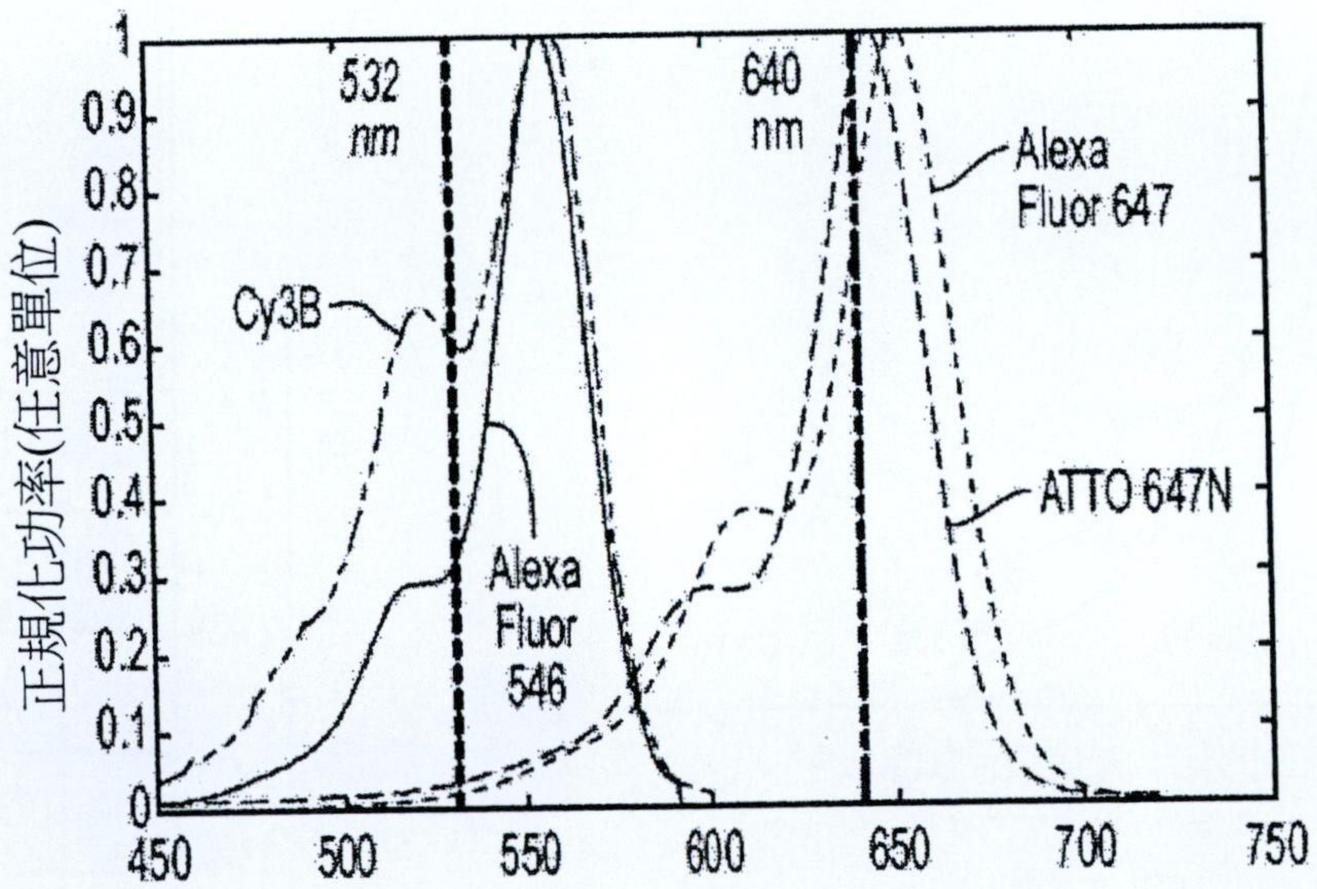

532 nm
640 nm
Cy3B
Alexa Fluor 546
Alexa Fluor 647
ATTO 647N
正規化功率(任意單位)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
450
500
550
600
650
700
750
波長 (nm)

圖 36B

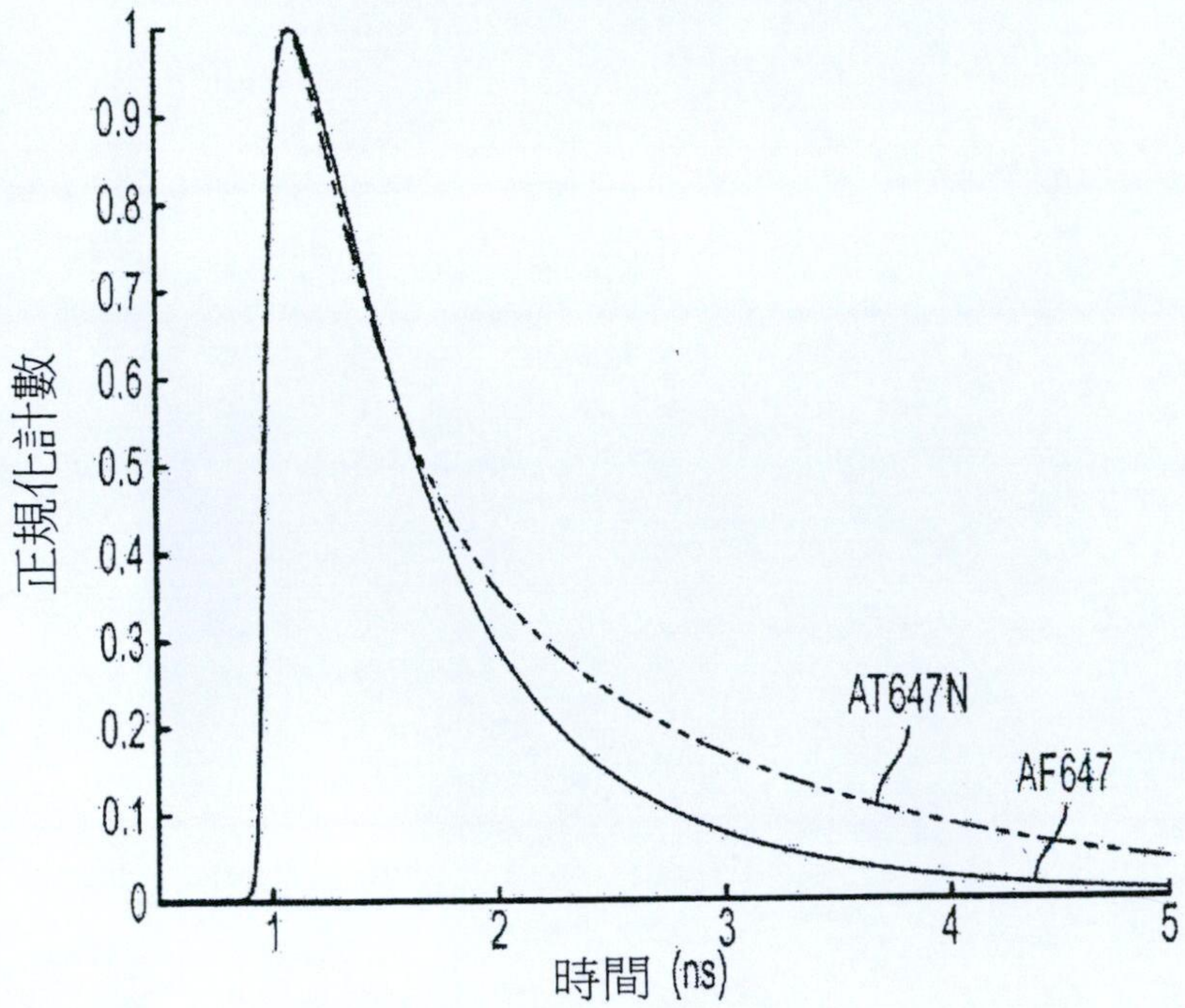

正規化計數
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1
2
3
4
5
時間 (ns)
AT647N
AF647

圖 37A

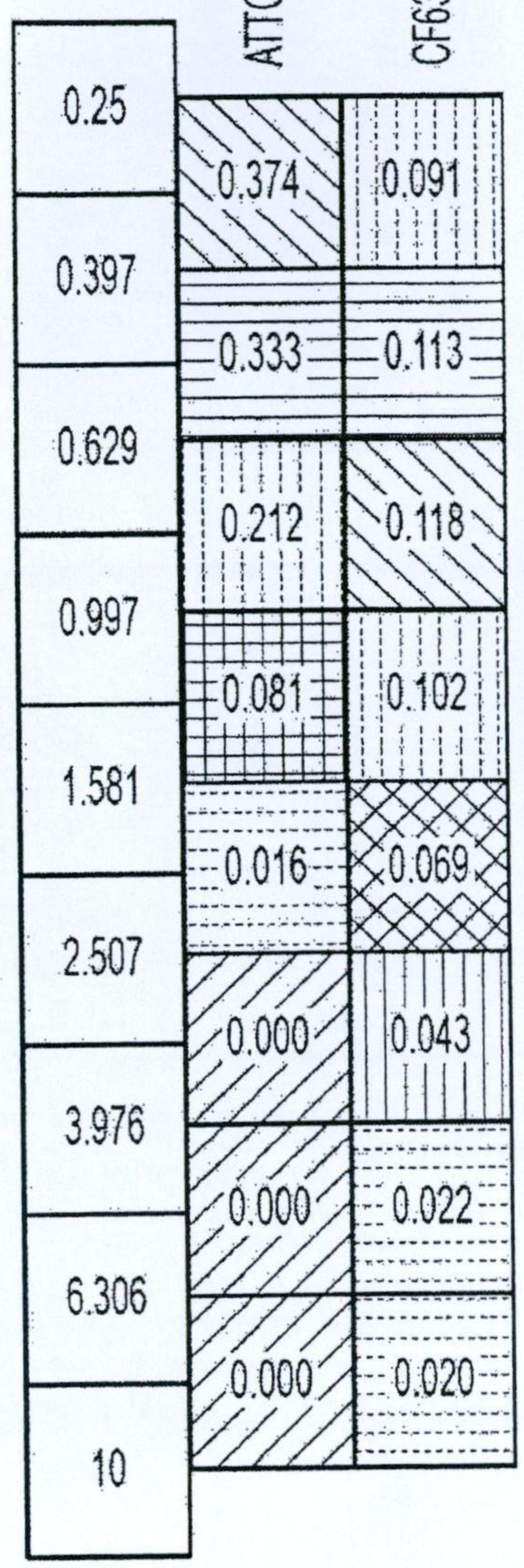

ATTO647N
CF633
0.25
0.374
0.091
0.397
0.333
0.113
0.629
0.212
0.118
0.997
0.081
0.102
1.581
0.016
0.069
2.507
0.000
0.043
3.976
0.000
0.022
6.306
0.000
0.020
10

圖 37B