

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

H04B 10/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680029426.3

[43] 公开日 2009 年 9 月 16 日

[11] 公开号 CN 101536368A

[22] 申请日 2006.8.10

[21] 申请号 200680029426.3

[30] 优先权

[32] 2005.8.11 [33] US [31] 11/201,768

[86] 国际申请 PCT/US2006/031387 2006.8.10

[87] 国际公布 WO2007/019582 英 2007.2.15

[85] 进入国家阶段日期 2008.2.13

[71] 申请人 加利福尼亚太平洋生物科学股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 P·伦奎斯特 S·特纳
D·扎卡里

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 李 玲

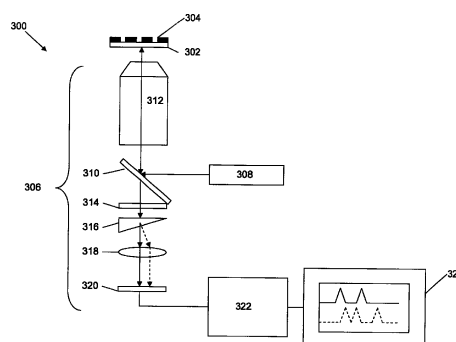
权利要求书 4 页 说明书 13 页 附图 5 页

[54] 发明名称

监测来自单个源的多个光学信号的方法和系统

[57] 摘要

适用于监测来自单个光学信号源的多个不同光学信号的方法和系统，其中，每一个这种不同的光学信号与其它信号空间分离并且被引向不同的检测器或者单个检测器上的不同位置，这种引导一般是通过使用较少数量的光学元件和/或操纵来完成的。



1. 一种检测光学信号的方法，包括：

提供至少第一和第二光学信号的源，其中第一光学信号包括不同于至少第二光学信号波长的波长；

使光学信号穿过一光学系统，该光学系统使第一和第二光学信号在岔开的路径上传输；

在一个光学检测器上的不同位置处接收第一和第二光学信号。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，受限的源包括至少第三光学信号，所述第三光学信号包括不同于至少第一和第二光学信号波长的波长。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述第三光学信号与所述第一和第二光学信号空间分离并且被引向所述一个光学检测器上不同于第一和第二位置的第三位置。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，受限的源包括至少第四光学信号，所述第四光学信号包括不同于至少第一、第二和第三光学信号波长的波长。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述第四光学信号与所述第一、第二和第三光学信号空间分离并且被引向所述一个光学检测器上不同于第一、第二和第三位置的第四位置。

6. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述第三光学信号与所述第一和第二光学信号空间分离并且被引向第二光学检测器上的第一位置。

7. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述至少第一和第二光学信号是至少部分同时发生的。

8. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述第一和第二光学信号不是同时发生的。

9. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述源包括至少第一和第二荧光成分，用于分别发射第一和第二光学信号。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述第一和第二荧光成分包括第一和第二荧光标记，它们共价偶连到至少第一和第二不同的核苷酸多磷酸或者核苷酸多磷酸类似物。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述源包括受限的零模式波导。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述源包括一个复合物，所述

复合物包括聚合酶、模板核酸以及与模板核酸的一部分互补的引物序列，并且被固定不动在零模式波导中，其中，当携带第一和第二荧光标记的第一和第二不同的核苷酸多磷酸或核苷酸多磷酸类似物分别与复合物结合时，产生第一和第二光学信号。

13. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，空间分离第一和第二光学信号包括使第一和第二光学信号穿过一光学系统，该光学系统将第一和第二光学信号引向岔开的路径。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述光学系统包括光栅，用于空间分离第一和第二光学信号。

15. 如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述光学系统包括棱镜，用于空间分离第一和第二光学信号。

16. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，还包括：基于将第一和第二光学信号引导到检测器上的位置，来描述第一和第二光学信号的特性。

17. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述源包括未知的光学信号，所述方法还包括：利用将未知光学信号引导至所述一个检测器上的位置，来描述该未知光学信号是第一光学信号还是第二光学信号。

18. 一种分析系统，包括：

受限反应区域，用于包含产生至少第一和第二光学信号的反应混合物，其中第一光学信号包括不同于至少第二光学信号波长的波长；

与所述受限反应区域进行光学通讯的光学系统，用于接受第一和第二光学信号并且空间分离第一和第二光学信号以及将它们引向光学检测器上的不同位置。

19. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述光学检测器包括光电二极管。

20. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述光学检测器包括电荷耦合器件（CCD）。

21. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述光学系统包括光栅，用于空间分离被引导着穿过其中的第一和第二光学信号。

22. 如权利要求 21 所述的分析系统，其特征在于，所述光学系统包括光栅，用于空间分离被引导着穿过其中的第一、第二和第三光学信号。

23. 如权利要求 22 所述的分析系统，其特征在于，所述光学系统包括光栅，用于空间分离被引导着穿过其中的第一、第二、第三和第四光学信号。

24. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述光学系统包括第一棱镜，用于空间分离至少第一和第二光学信号。

25. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述受限反应区域包括在多阱板中的阱。

26. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述受限反应区域包括在分子阵列上的特征。

27. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，所述受限反应区域包括零模式波导。

28. 如权利要求 24 所述的分析系统，其特征在于，所述光学系统还包括与第一棱镜串联连接着的至少第二棱镜。

29. 如权利要求 28 所述的分析系统，其特征在于，所述第一和第二棱镜中至少一个可环绕着光学系统的光轴旋转，以调整穿过其中的光学信号的色散分布。

30. 如权利要求 18 所述的分析系统，其特征在于，还包括处理器，它可操作地耦合着检测器，以便个别地或者集中地记录入射检测器上不同位置的第一和第二光学信号并且基于所述光学信号入射在检测器上的不同位置描述第一和第二光学信号的特性。

31. 一种分析系统，包括：

受限反应区域，用于包含产生至少第一和第二光学信号的反应混合物，其中所述第一光学信号包括不同于至少第二光学信号波长的波长；

光学系统，它与所述受限反应区域进行光学通讯，用于接受第一和第二光学信号并且空间分离第一和第二光学信号以及将它们引向光学检测器上的不同位置，其中所述光学系统包括可替代的模块光学元件，用于空间分离通过其中的第一和第二光学信号。

32. 如权利要求 31 所述的分析系统，其特征在于，所述可替代的模块元件包括至少第一棱镜。

33. 如权利要求 31 所述的分析系统，其特征在于，所述模块元件包括至少第一棱镜和第二棱镜。

34. 如权利要求 32 所述的分析系统，其特征在于，所述第一和第二棱镜中的至少一个可环绕着所述光学系统的光轴进行旋转。

35. 如权利要求 31 所述的分析系统，其特征在于，所述可替代的模块元件包括光栅。

36. 如权利要求 31 所述的分析系统，其特征在于，还包括多个可替代模块元件的库，其中多个模块元件中的各个元件都具有针对不同光学信号的不同色散分布。

37. 一种检测光学信号的方法，包括：

提供至少第一和第二光学信号的源，其中第一光学信号包括不同于至少第二光学信号的光学特性的光学特性；

使光学信号穿过一光学系统，该光学系统使第一和第二光学信号在岔开的路径上传输；

在一个光学检测器上不同的位置处接收第一和第二光学信号。

38. 一种检测光学信号的方法，包括：

提供至少第一和第二光学信号的源，其中第一光学信号包括不同于至少第二光学信号波长的波长；以及

将第一和第二光学信号引向一个光学检测器上的不同位置。

39. 一种检测光学信号的方法，包括：

提供多个不同光学信号的源，其中各个不同光学信号包括不同于各个其它光学信号的波长；

空间分离所述多个不同光学信号并且将它们引向一个光学检测器上多个分开的位置。

40. 一种检测光学信号的方法，包括：

提供至少第一和第二光学信号的受限的源，其中所述第一光学信号包括不同于至少第二光学信号波长的波长；以及

空间分离所述第一和第二光学信号并且将所述第一和第二光学信号引向第一光学检测器上的第一和第二不同位置。

监测来自单个源的多个光学信号的方法和系统

相关申请的交叉参考

本申请要求由 Lundquist 等人于 2005 年 8 月 11 日提交的 USSN 11/201,768、题为“METHODS AND SYSTEMS FOR MONITORING MULTIPLE OPTICAL SIGNALS FROM A SINGLE SOURCE”的优先权和权益。该在先申请引用在此作为参考。

关于联邦资助研究的声明
没有。

发明背景

在不同光学信号的收集过程中不同光学信号的单独识别、区分和/或量化在多个不同的领域中都十分重要。特别值得注意的是，诸如化学化验等等的多元分析操作的使用往往都是采用具有不同光学特性的光学信号事件，并随后从各种其它光学信号中分别进行识别和潜在地量化。这类分析化验包括医学诊断测试、食品和其它工业工艺分析以及生物研究和开发中的基本工具，同时化学现在已经有更多的光学和化学方法应用于这些信号的分析，这类系统时常包括来自于该研究方法的整体效益转移的复杂性和/或成本。本发明是针对其它系统和方法的缺点而提出的。

发明内容

本发明主要提供了一种适用于检测和监测来自单一的、最好是受限的信号源的多个不同光学信号的方法和系统。在较佳方面，这类系统和方法应用于检测流体承载的材料以及特别是感兴趣的化学、生物化学或者生物反应的反应物和/或产物的发光信号或荧光信号。

在第一方面，本发明提供了检测光学信号的方法，其中这些方法包括提供至少第一和第二光学信号的源，其中，第一光学信号所包括的光学特性不同于至少第二光学信号的光学特性。在较佳方面，光学特性是光学信号的波长。光学信号

被引至检测器的不同位置，例如，光信号穿过用于使第一和第二光信号在不同路径上传输的光学系统，然后在一个光学检测器的不同位置上被接收到。

在相关方面，检测光学信号的方法包括提供多个不同光学信号的源，其中，各个不同的光学信号包括与其它各个光学信号不同的波长，并且在空间上分离多个不同的光学信号以及将其引向一个光学检测器上的不同位置。

在另一方面，提供了一种适用于检测光学信号的方法，该方法包括提供至少第一和第二光学信号的受限的源，其中，第一光学信号包括与至少第二光学信号不同的光学特性（例如波长）。随后，这些信号被空间分离并且被引向第一光学检测器上的第一和第二不同位置。

本发明也提供了能够实现上述方法的系统。例如，在一个方面，本发明提供了一种分析系统，这种系统包括用于包含能够产生至少第一和第二光学信号的反应混合物的受限反应区域，其中，第一光学信号所包括的光学特性不同于至少第二光学信号的光学特性。这类系统还包括与受限反应区域进行光学通讯的光学系统，用于接受第一和第二光学信号以及在空间上分离第一和第二光学信号并将其引向光学检测器上的不同位置。

本发明的相关系统包括用于包含能够产生至少第一和第二光学信号的反应混合物的受限反应区域，其中，第一光学信号包括不同于至少第二光学信号的波长，与受限反应区域进行光学通讯的光学系统用于接受第一和第二光学信号以及空间分离第一和第二光学信号并将其引向光学检测器上的不同位置。在另一方面，光学系统包括可替代的模块式光学组件，用于空间分离通过其的第一和第二光学信号。通过从模块集或者模块库中选择不同的模块，能够提高整个系统的适用性。

附图简要说明

图 1A 是图示说明本发明的方法和系统的简化示意图。图 1B 是图示说明图 1A 所示系统的光学信号分离的示意图。

图 2 是图示说明在随时间检测多种不同光学信号的过程中本发明的系统和方法的操作的示意图。

图 3 是详细说明根据本发明的一个典型系统的简化示意图。

图 4 图示说明了构成适用于检测其偏振各不相同的多个光学信号的另一种系统配置的简化示意图，其中，偏振光的其它特性（比如波长）相对。

图 5A 显示了入射到单个 CCD 照相机芯片的不同位置的不同光学信号，其中，

这些信号来自单一的、组合的源，并且经受本发明的方法。图 5B 显示在经分离的信号之间的相对分离距离。

具体实施方式

I 概述

本发明主要提出了一种方便、高效和成本低廉的光学信号以及来源于这些光学信号的数据的采集的分析和/或管理的设备、系统和方法。这些设备、系统和方法最感兴趣的应用是分析所感兴趣的反应，例如，诸如核酸合成之类的化学和生物化学的反应，以及在这些反应过程中所涉及步骤的特性等。

一般来说，本发明提出了一种适用于通过将光学信号相互分离并将其引向一个单一光学检测器上的不同的检测功能或者不同的位置来测量来自一个光学信号源的两个或者多个不同光学信号的方法、系统和设备。通过分别地检测不同的光学信号，就能够存储各个信号中识别处因果时间的发生。此外，通过在几个检测器或者单一的检测器或者检测器阵列来实现，就能够减小系统及其相关控制和分析过程的复杂性和成本，同时进一步提高它们的有效性和/或灵敏性。

在本发明的整个系统和方法被众多应用所广泛采用的同时，这些系统和方法最感兴趣的应用是化学和/或生物化学的反應的分析和描述，包括在反应过程中的自然或者人工所产生的这类不同的光学信号。有多种不同的分析反应，这些分析反应会产生多种得益于本发明的光学信号。这些包括：使用不同波长的光学信号的反应，例如，荧光和/或发光的反应物或者产物，发光的反应物或者产物，有色和/或发色的反应物或者产物，等等；以及使用不同于其它特性的光学信号的反应，例如，发光的偏振或者相位调制中的偏移。一般来说，正如本文所使用的那样，参考光学信号的波长包括该信号的波长范围。特别是，光学信号，例如，所发射出的荧光、亮度或者其它等等，作为光谱中的一部分，这部分光谱的范围从 1nm 到 30nm 直至 100nm 或者在整个光谱的更多一部分。就本发明而言，不同波长的光学信号表示它的波长范围是相互不同的。于是，在不同信号的波长范围只有少许层叠或者根本不重叠是最为理想的同时，波长重叠的一些也是可以容忍的，使得该信号可以单独被识别。在光学系统中，从信号的重叠或者噪声中识别和鉴别信号的方法，例如，通过使用光学元件和/或通过严格的数据选择等方法都是业内所众所周知的。在更为较佳的方面，本发明的分析方法和系统都可以应用于核酸的分析，特别是应用于核酸的序列分析。

因为本发明的方法和系统大大减小了复杂性，并因此具有较高的灵敏度，所以特别应用于检测光学信号较弱（例如，低发光水平、少信号事件等）的应用。特别是，因为本发明采用的系统使得通过系统的光学操纵次数最小化，因此也同样减小了由于这种操纵所累加的系统整体效率损耗。例如，在光学信号通过多束分离、再聚焦、滤波等等操作时，与各级有关的损耗就会大大降低整个分析的灵敏度。因此，仅仅只检验整个信号光谱中的单独部分的光谱，例如，使用严格的带通滤光片等，就能够进一步减小在信号检测操作过程中所使用的信号数量。在本发明的方法和系统的情况下，整个信号的整个光谱都经历检测，并且各个不同信号分量的选择取决于所选择的单一检测器上的位置，例如，在检测器阵列中应该施加评估给定信号的像素，而不是在通过诸如光学截止滤波检测之前的部分信号的截取。

在许多应用开始时采用较为适合的信号强度来满足这类损耗，有些应用操作是在组合有效损耗的条件下进行的，使得有效损耗小于整个系统的有意义检测的水平或者将所感兴趣的结构变化到光学信号在系统的噪声水平的范围之内，即，即使信号如此之小但在信号的完整性中仍旧能够鉴别处随机的波动。这类小信号类型的应用实例包括：低浓度的化学分析，例如，单一或少量分子的反应，等等；在这种情况下，非常少的或者甚至于单一可检测的分子都能够在任意给定的时间内进行有效的检测。

II 方法

如上所述，在一个方面，本发明提出了一种适用于通过相互分离不同的光学信号并将其至少一部分引向一个光学检测器或者检测器阵列中的不同位置来检测来自多个不同光学信号的信号源的光学信号的方法。在单一检测器的不同位置上检测多个信号的情况下，应该理解的是，这类检测器包括或者能够构成提供入射其表面信号的信号信息，该信号信息不仅与信号的完整性和时间有关，而且还与该信号所入射的阵列位置或方位有关。这类检测器的简单实例包括阵列类型的检测器，这是在光学领域中一般常见的；以及本发明所详细讨论的一些实例。在单个检测器来检测单点信号的情况下，应该理解的是，入射信号的位置信息是由各个单独的检测器的位置来提供的（一般来说，尽管不一定需要多个单独的检测器），而不是在一个单一检测器或者检测器阵列中的位置。

尽管本发明可以应用于多种光学信号源，但是在较佳的方面，光学信号的源包括受限的源。本发明的受限源一般具有的特性是源的一个或多个分量可产生空

间受限的特殊光学信号并且在检测过程中不会流入和/或流出受限源。这类受限源与系统形成明显的差异，在系统中，信号产生分量、反应物或者其它等等都可以在导管中有效地流过检测点。尽管以上已经论述过了，但是在本发明中所采用的信号产生机理的分量可以扩散进和出受限空间，同时仍旧在本文所阐述的阐述方位之内。然而，在许多情况下，有助于信号机理的一个或者多个分量在受限空间中都是固定不变的。

在反应化学种类以及尤其是诸如水性和/或有机流体之类的流体承载的反应化学种类所引起的光学信号的情况下，源的受限属性特别有价值。特别是，在不同光学信号的流体源的情况下，源的受限属性将不允许这类流体在检测过程中受限的流入或流出的运动。流体受限的实例包括，例如，常规的多阱分析板，例如，96、384 或者 1536 的多阱板。这类流体反应物受限的其它实例包括纳米尺度的阱或孔径，例如，在美国专利申请 No.2003/0174992 A1 中所讨论的零模式波导结构，通过该专利的全文引用合并与此，以便于适用于所有目的，它即可作为物理显示又可作为光学限制，例如，限制渗入波导的光量并因此由诸如荧光信号之类的信号来有效地限制发射信号的总量。这类零模式波导在本发明的探索中特别有用，它们提供了从诸如流体承载的反应物的非常小的量中来监测不同光学信号的能力，从而允许检测在少量分子等等之间的相互作用。于是，在零模式波导可以表示受限空间的同时，受限空间的可观察部分只是这类空间中的一部分，正如由波导尺寸所部分确定的那样。这部分可观察量表示信号源的其它限制。特别感兴趣的是在单一分子相互作用中的这类限制量，例如，通过在模板独立的核酸合成中类似于核酸聚合酶的标记核苷的逐步反应的 DNA 序列识别；分子相互作用的监测，例如，DNA 的杂交、免疫测定、生化酶的反应以及其它等等。

除了结构限制之外，例如，使用阱、贮存槽以及其它等等，所附加或者所选择的限制包括能够产生一个或者多个光学信号的化学种类的化学固定，即，代替或者附加任何结构限制。这类化学限制的实例包括在化学类型和基片表面之间、使用化学相互作用所创建的结构限制的共价的、范德瓦尔斯或者其它相关的相互作用，例如，具有围绕着疏水性屏蔽的亲水性区域从而限制流体和化学种类以及其它等等的基片。在限制表示为在给定位置上的反应物的化学固定的情况下，多种不同的固定技术都可以采用，包括：在支撑或者基片表面上的共价联接，也包括典型的硅烷或者环氧化物的联接。同样，其它相关联接也都可以采用，例如，用于将反应物与基片或支撑物偶连的互补键合。这类连接包括，例如，抗体/抗原

联接、生物素/抗生物素蛋白联接以及其它等等。在化学创建结构限制的情况下，同样，各种技术都能有效地提供这类在基片上的“结构”。特别是，疏水性屏蔽可以通过在类似亲水性二氧化硅表面上提供硅烷族来创建。这类材料很容易使用常规的光刻技术、丝网印刷、喷墨打印或其它技术在基片表面上进行图形化，以便于确定疏水性屏蔽区域所环绕着的亲水性界限。

正如以上所间接指出的那样，在从反应化学种类所产生的源中所发射出的光学信号的较佳方面，这类种类的反应会产生、消除、增加、减小或者改变光学信号的特性。这类反应种类包括发色或带色的反应物，例如，使得材料的透射率发生偏移从而发出具有一种或多种波长的光，即，根据反应物来改变颜色。发光的反应物的种类，具有主动发光源的使用（荧光或者发出荧光的）或者不具有这类激发源（发光）的使用在本发明的方法中都能得到较佳的使用。此外，在本发明的内容中，这类反应种类在溶液中都获得较佳的包含并且可以作为反应混合物来提供，其中，基片、产物或者其两者的组合都会产生不同的光学信号。

在较佳方面，正如以上所注意到的那样，所要检测的不同光学信号包括不同波长的光，例如，发射出具有不同波长频谱的不同荧光，或者通过以不同波长频谱的不同发色来传输。在这种情况下，例如，通过使用一个或多个双色滤光片的组合的波束分离器，或者通过使用棱镜或者光学光栅，来实现两个或多个不同的光学信号的空间分离，以及将不同的信号引向光学检测器或者检测器阵列上的不同位置。在另一方面，不同的光学信号在其它特性方面是不同的，例如，它们的相对极性、它们的调制相位或者频率，及其它等等，从而通过例如偏振或解调滤光片的使用来提供它们的空间分离以及引向在检测器或检测器阵列上的不同位置。基于这类不同特性的生物化学化验的实例在例如美国专利 No.6,699,655 中进行了讨论，该专利披露了通过检测荧光反应物和偏振光激发时的产物（一般是偏振影响剂的组合）的相对极性来监测反应过程。

空间分离和/或将不同光学信号引向光学检测器或者检测器阵列的不同位置的方法主要是基于不同光学信号的特性，这是差分检测方法的基础。例如，在不同光学信号具有不同波长的情况下，分离和引向是通过使用光学滤光片和/或棱镜以不同的方式和/或不同的程度进行选择性的传输或者重新定向不同波长的光来实现的。例如，所采集到的具有从受限源中反射出的两个不同波长的信号可以分离成两束波束，例如，通过使用双色滤光片来去除其它信号分量，随后再通过屏蔽滤光片，从而允许整个信号中的一部分被引向光学检测器或者检测器阵列。然而，

根据本发明，采用简单的光学系统来实现分离光学信号并将其引向检测器或者检测器阵列上的不同位置，或者，在一些情况下，将其引向多个不同的检测器或者检测器阵列。特别是，V形的棱镜或者光栅可以用于获得这一结果。与较为复杂的光学系统相比较，这类棱镜或者衍射光栅的使用可直接为整个系统提供光学系统并且产生更多的传输光路。因此，与截止滤光片相比较，例如，双色滤光片，信号的整个频谱、或者至少信号的多个选择滤波部分、减小，例如，棱镜的反射损耗，都可以引向检测器或者检测器阵列。因此，就可以有较大的信号有效地用于检测、操纵和去卷积。发明的简单化在系统的灵活性方面提供了其它优点，其中，单个仪器就可以很容易地构成执行较宽方位的不同操作，例如，通过简单地采用选自不同棱镜库或集中的其它棱镜替代光学系统中可以互换棱镜部分，来进行各个利用不同范围光学信号的操作。通过比较，常规多个滤光片的光学系统的重构将需要多得多的实质性变更，例如，改变多个滤光片等等。特别是，根据本发明一些方面，空间分离光学信号的光学系统的元件可以包括标准模块，并且便于替换的元件，例如，棱镜、多个棱镜和/或光栅，能够插入在仪器中的适当接受槽中和从其中拔出。此外，指定的仪器可以由这类模块元件库中的剩余请求来提供，其中各个元件都能为不同的光学信号或者光学信号集提供不同的光学色散分布，从而允许终端用户方便地识别分离分量，以便于为用户提供最大的有效性和灵活性。本文更加具体地讨论了一些典型的光学系统。

遵循本文所讨论的光学系统的简单性，多个并行的光学信号的最终检测一般是通过使用较小数量的检测器来完成的。特别是， n 个光学信号（其中 $n>1$ ）的检测一般是通过使用最多 $n-1$ 单独检测器来完成的。在特别较佳的方面，将和2、3、4、5、6个一样多的或者更多的不同光学信号引向在1上的不同位置上，或者在3或多个信号的情况下，引向2个或者多个单独的光学检测器或者检测器阵列。根据本发明，将意识到的是，在将多于一个信号引向在一个指定检测器上的多于一个位置的情况下，这类检测器不是单一点检测器，例如，简单的光电二极管，而是以具有能够产生表示光学信号入射检测器的信号以及表示该信号入射检测器的位置的信号检测区域来替代。这类检测器的实例包括成像检测器，例如，电荷耦合器件（CCD），其中，在CCD上的各个像素元件都构成一个单一点检测器，而且整个器件构成检测器阵列，并且检测器信号表示信号入射的像素以及在该像素上的强度。同样，也可以使用较大的二极管阵列检测器，它包括较多数量的空间排列和间隔的光电二极管，以便于提供在阵列中的信号强度和信号位置信息。

尽管以上已经进行了阐述，但是根据本发明，简单的点检测器可以结合这类检测器阵列一起使用，例如，将单一的信号引向单一的检测器，以及不同的信号引向不同的或者分离的检测器，而不是在相同检测器上的区域。

尽管主要和较佳地针对将多个光学信号引向一个检测器或检测器阵列或者数量小于被检测的不同光学信号的数量检测器的方法和系统，但是在某些替代的方面，在波长不同的光学信号使用诸如光栅或者色散棱镜（例如，V形棱镜）进行空间分离时，各种不同的信号选择性地引向不同的检测器元件（例如，点检测器）。在这种情况下，就财政成本而言和就光学效率而言，简单和成本高效的分离光学的组合（例如，棱镜或者光栅）可提供优于复杂光学系统的增强效率。于是，在没有发现使用单一检测器或者检测器阵列的简单化的时候，在使用多个较低成本的点检测器或者较低分辨率的检测器阵列作为检测器元件的情况下，还存在着成本的效率问题。此外，这类系统还保持着优于复杂系统和方法的实质性成本效率。

基于空间分离和引向，光学信号在检测器或者检测器阵列上的特定位置上的入射表示两个光学信号中的一个信号是由受限源所发射或者传输的。如果在检测器或检测器阵列元件上两个或者多个位置显示一个光学信号的入射，则表示正反射两个或者多个不同的光学信号。通过监测特殊位置或者表示入射信号的元件，就能识别所发射的信号，并且基于正在进行的反应，识别所发生的反应条件，例如，指定反应物的指定产物的产生或者消耗量。

图1A是图示说明本发明方法的简化示意图。如图所示，在系统100中，至少有两个不同的光学信号102和104是由这类信号的受限源106所发射的。本文其它值得注意的地方是，这类受限源最好是定义好的包括流体承载的化学反应物的位置，例如，反应阱或区域，零模式波导等等。随后，这些信号经过适当的光学元件，例如，棱镜108、光栅或者其它等等，对不同的光学信号进行空间分离（如实线箭头102和虚线104的分支路径所示）。一旦分离之后，则通过透镜110，例如，成像透镜，来聚焦信号，使之在检测器阵列112上的两个不同的位置114和116处撞击检测器阵列。信号的分离如图1B所示。特别是，组合的光学信号进入棱镜108，成为由点150所表示的信号。一旦信号通过光学系统的空间分离元件（例如，棱镜108）之后，并且聚焦在检测器上，使之空间分离成它们各自不同的光学信号分量，如点152和154所表示。

图2图示说明了在一个时间周期内的检测操作，其中这些信号可以是同时发

生的，也可以不是同时发生的。特别是，如图所示，系统 100 还连接着记录/读取系统，如绘图 202 所示意表示。随着时间变化，如绘图 202 的水平轴所表示，受限源 106 可以不同的时间（如时间 204 和 206 所示）或者同时发生（在时间 208）发射不同的光学信号。在检测器 112 的不同位置上检测光学信号，其中各个位置在空间上连接着记录系统（例如，连接 210 和 212）。因此，来自于单一受限源的光学信号分别检测和记录，并且能在给定的时间点上呈现。

使用本发明方法的一个实例是进行核酸序列分析的处理，特别是基于单个分子的处理，这种处理通过检测被掺入正生长的合成链中的不同标记的核苷酸类似物进而监测互补核酸序列的模板依赖性合成，从而分析核酸序列。详见，例如，美国专利 No.2003/0044781 A1，并通过引用全文合并与此。

在一个这类方法中，DNA 聚合酶与模板核酸序列有关或者复合物，通过模板或者聚合酶的粘结而使其固定在基片表面上不动。这一复合物揭示了适当的聚合酶反应的条件，包括不同标记的核苷多磷酸盐，例如，核苷三磷酸（NTP）、核苷四磷酸、核苷五磷酸等等，或者类似于这些中的任何一种，或者其它核苷或核苷分子，它们都可通过聚合酶来掺入（为了简便，所有这些都称之为 NTP），其中各个不同的 NTP（例如，A、T、G 或者 C）以具有不同发射波长分布的荧光标记来标记。掺入各种不同类型的 NTP 会产生用于表示掺入事件的不同光学信号。例如，在采用包含固定不动的聚合酶/模板复合物的受限体积的方法中，给定荧光基底的掺入导致在适用于较长时间周期的检测区域中所保持的基础，而不是掺入的基础。通过检测与所掺入的基底有关的信号，就能够依次识别在模板依赖性合成中所掺入的基底。根据本发明，一般具有荧光脉冲的各个掺入信号引向光学检测器阵列上的不同位置，并且根据检测器阵列上的位置进行识别。于是，正如图 2 所示，在单一受限源中产生不同的光学信号，尽管它们是在不同时刻产生的，例如，作为各个基底被依次掺入。

在这种情况下，聚合酶反应环境是籍助于它固定在基片表面上不动来受限的，但是也一般会进一步形成结构上的限制，例如，在零模式波导中和/或在多阱模板中的反应阱中。

在另一实例中，核酸链（例如，多（聚）核苷酸）被固定不动在基片表面上并且采用具有与它们相关的不同光学标记的核酸探针来查询。通过识别诸如保存在固定不动核酸的受限区域内位置上杂交的探针，就能识别固定不动的序列的次序。同样，在固定不动的序列已知的情况下，就能识别与其杂交的探针序列的次序。

序。

在其它实例中，检测在基片和产物的荧光偏振能力中的差异的化验可以使用本发明的方法和系统来监测。参考实例，美国专利 No.6,699,655 通过全文引用合并与此并应用于所有目的，该专利讨论了全数字化验系统，该系统能够监测具有明显不同变化的反应物和产物中的反应。这类化验包括激活酶或磷酸（盐）酶的化验，其中与它们的基片相比较，磷酸化或者去磷酸化的产物具有明显不同的电荷，作为磷酸族核酸杂交的化验、蛋白酶化验及其它等等的附加或去除。简单地说，大的、带电荷分子或者其它结构基于其所不同的电荷与基片或者产物形成不同的联系，并且改变基片或者产物的旋转扩散，从而改变根据偏振激发辐射所粘结荧光标记所发射的荧光的相对偏振。结合本发明，而不是将去偏振的荧光的不同平面元件引向导各个检测器，首先空间分离两个不同的信号，并随后引向在同一检测器上的不同位置上。图 4 显示了进行不同偏振光学信号中的鉴别应用的一个系统实例。

应该意识到的是，尽管已经讨论了一些类型的化验，但是本发明的方法在多种不同分析内容中十分有用，其中，由一个单一受限源发射两个或者多个光学信号，但需要分别检测、记录和/或监测它们，包括内部控制信号的使用，等等。

III. 系统

本发明还提供了有效进行上述方法的系统和设备。图 3 图示说明了适用于进行本发明方法的一个典型系统。如图所示，整个系统 300 包括至少两个不同光学信号 302 的信号源。如图所示，源 302 包括至少一个的基片，并且较佳包括制造在其表面上的零模式波导 304 的阵列。在与源 302 的光学通讯中提供了光学系统 306，包括波导 304。如图所示，光学系统 306 包括激发辐射的源，例如，激光器 308、激光二极管、LED 或及其它等等，用于作为源 302 中的荧光或发光光学信号的元件。在所示 306 的光学系统中所包括的是双色反射镜 310，用于将激发辐射反射引向到源 302，例如，包括波导 304，但是能通过所发射的荧光。物透镜或者其它聚焦透镜 312 主要提供聚焦并还引导来自源 302 的激发辐射成为光学信号，例如，荧光。在图示说明的系统中，信号通过屏蔽或者槽口滤光片 314，进一步减小不被双色棱镜 310 所反射的任何激发辐射，并且随后通过棱镜 316 或者光栅，以便于提供空间分离所激发的辐射，例如，采用波导，以及通过透镜 312 引向在光学检测器，例如，CCD 320。有效的棱镜和/或光栅一般都是由多家商业光学提供商所提供的，包括，例如，Thorlabs 股份有限公司(New Jersey)公司, Newport 公司

(Irvine, California)公司, CVI 公司(Albuquerque, New Mexico)等等。基于 CCD 320 所检测到的信号, 包括它们的强度和位置/像素识别, 都由处理器 322 记录, 该处理器可以对这类记录信号数据进行一项或者多项数据操作(例如, 指派反应的参数, 等等), 并随后提供用户友好的读取格式, 例如, 显示于显示器 324。

尽管只显示了单个棱镜或光栅, 但可以意识到的是, 在一些情况下, 可以使用多个棱镜。特别是, 在一些情况下, 给定棱镜的色散分布所导致的不同信号的空间分离不能够获得所需要的空间分布。例如, 检测器阵列具有高密度的检测器元件的情况下, 就希望提供规则的或者线性分隔的信号元件。然而, 给定棱镜的色散分布不一定是线性的, 即, 所产生的传输信号不是等距空间分离的。然而, 在通过确保所有信号相互之间都具有相似的分离来便于检测的情况下, 例如, 使用 CCD 来检测密集的信号, 则十分有利地可以使用具有不同色散分布的棱镜为各个被检测信号提供近似线性的分离。同样, 在一些情况下, 不同信号的检测可以通过在两个或者多个信号元件之间提供比可能提供的线性分离更大的分离来进行优化。在这类情况下, 两个或者多个棱镜的可调整性允许增加系统的灵活性。除了使用其它棱镜或者光栅之外, 还应该意识到的是, 调整系统可以通过旋转棱镜或其它色散光学元件来完成, 例如, 环绕着光学系统的光轴并且还垂直于颜色分离的方向进行旋转, 以便于调整色散的程度。于是, 在系统实施例, 可以在能够方便地环绕着光轴旋转的结构有效地提供一个或者多个棱镜。

在所示系统的操作中, 不同光学信号 302 的源包括能够产生产物的反应混合物, 或者消耗能够产生至少两种不同光学信号的基片, 例如, 基片、媒介和/或保护以不同波长发光的荧光标记的产物。光源, 例如, 激光器 308, 引导激发的辐射, 例如, 将适用于源 302 所存在的荧光标记的适当激发波长的光引向双色棱镜 310。由双色棱镜 310 反射所激发的辐射, 并通过物镜 312 撞击源 302, 随后激发其中所包含的荧光标记。被激发的荧光随后由物镜 312 收集并引向通过双色棱镜 310, 由其选择性地反射具有激发辐射波长的光, 但通过发射荧光波长的光。其结果是, 从荧光中滤波掉任何发射的激发辐射。随后通过空间分离波长不同信号的棱镜 316 或者光栅来引导荧光信号, 并随后使用透镜 318(例如, 成像透镜)来重新聚焦以及将其引向光学检测器阵列上的不同位置, 例如, CCD 320、光子计数雪崩光电二极管阵列、光电倍增管(PMT)阵列或者其它等等。各种不同的检测器阵列可以用于本发明, 包括, 例如, 二极管阵列、CCD 阵列以及其它等等。CCD 一般较佳具有紧凑属性、高的精度和成本, 并一般都可用作为检测器。各种类型的 CCD 可

以用于适应给定分析的需要,包括,例如,标准 CCD、电子倍增器 CCD (EMCCD) 和/或加强 CCD (ICCD)。

正如以上所讨论的那样,本发明的改进系统可以用于监测不同于其它光学特性的信号。特别是,图 4 图示说明了一种系统,该系统可以所发射荧光的相对极性来引导相互不同的光学信号。这类监测可以用于监测产物或者反应物上所产生的物质尺寸变化的反应,并最终改变反应物或者产物发射去偏振荧光的能力(参见美国专利 No.6,699,655)。通过测量在两个正交平面中发射的光,就能根据偏振激发光来评估荧光发射的相对去偏振。如图所示,系统 400 还包括激化光源 402 并通过双色滤光片 406 和物镜 408 引向受限反应器皿或者区域 410。光源 402 可以包括偏振光源或者通过偏振滤光片 404 引导,以便于向反应器皿 410 提供偏振激发辐射。发射的荧光随后由物镜透镜 408 收集并通过波束分离器 412 引导,其中,波束分离器 412 将发射荧光分离成两个相似的波束。各个波束随后分别通过两个不同的偏振滤光片 414 和 416,使得只有在两个正交平面中的一个平面中的荧光通过透镜 418 引向导检测器阵列 420 上的各个区域 422 合 424。在检测器阵列上的各个信号位置是被检测的荧光平面的表示。随后,比较信号的强度,以便于确定反应混合物的荧光的相对去偏振(再次参见美国专利 No.6,699,655)。

IV. 实例

为了测试光学系统在分离来自受限源的多个光学信号中的效率,系统被设置成基本类似于图 3 所示的系统。如图所示,该系统包括具有一系列制造在其表面上的零模式波导的基片。该基片定位在最接近于物镜透镜和在物镜透镜的光学通讯内,以及将白光源定位在零模式波导基片上并且通过在波导基片上的窄带滤光片来引导。物镜透镜用于聚焦来自波导通过 V 形棱镜的光学信号。一旦采用 V 形棱镜分离之后,不同的光学信号随后通过在 512×512 像素的 EMCCD 摄像芯片上的成像透镜。在操作中,由物镜透镜所收集到并随后通过 V 形棱镜的宽带光(白光光谱的连续子集所形成的)被聚焦在 CCD 照相机上,作为分离信号的采集。图 5A 图示说明了 CCD 的四个不同区域所产生的图像,它对应于来自八个零模式波导的光并具有四个不同波长 405nm(A)、488nm(B)、568nm(C)和 647nm(D)。图 5B 是相对位置的图形,在距离未分离信号位置的距离(毫米),显示了在分离信号之间的相对分离距离。

进行了比较实验,与基于滤光片的波长分离相比较,验证了基于棱镜分离的增加效率。特别是,制备两个不同荧光染料(Alexa488 和 Alexa568,由 Molecular

Probes 公司 (Molecular Probes Eugene, OR) 提供) 的混合物会具有不同峰值的发射波长 (分别为 488nm 和 568nm), 并且使用适当的激发辐射来查询。混合物的发射通过物镜, 并在将分离信号聚焦在 CCD 芯片上之前, 使之经历基于滤光片的波长分离 (使用两个 Semrock 三槽口滤光片), 或者基于 V 形棱镜的分离。下列表格提供了自各个不同光学系统中的各个信号的荧光强度, 是使用 EMCCD 测量的结果。正如所看到的那样, 相比于基于滤光片的系统, 基于棱镜的分离具有相当高效率的分离信号的检测。

分离方法	检测到的荧光强度	
	Alexa488	Alexa568
基于滤光片的分离	1146	1263
棱镜分离	2845	2676

尽管为了说明的目的已经进行详细的讨论, 但应该意识到的是, 在本发明的范围内, 业内熟练技术人员可以采用多种已知或者适当的变化。除非上下文内容的清晰和明确阐述, 本文所提供的任何浓度数值就混合数值或者百分比而言都是给定的, 而与基于混合物的特定分量或者其它附加所产生的任何变化无关。对于本文还没有明确包含的内容, 用于本披露参考的所有出版的参考文献和专利文档都通过引用全文合并与此, 以用于所有目的。

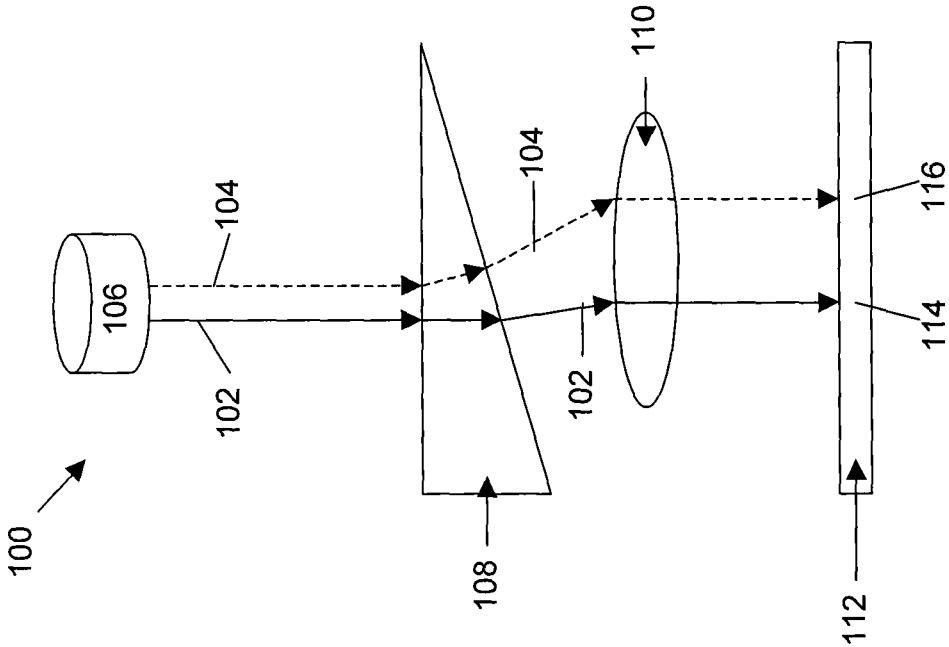


图 1A

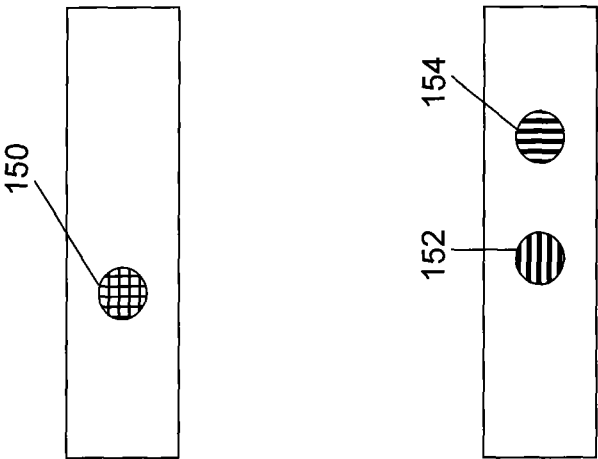


图 1B

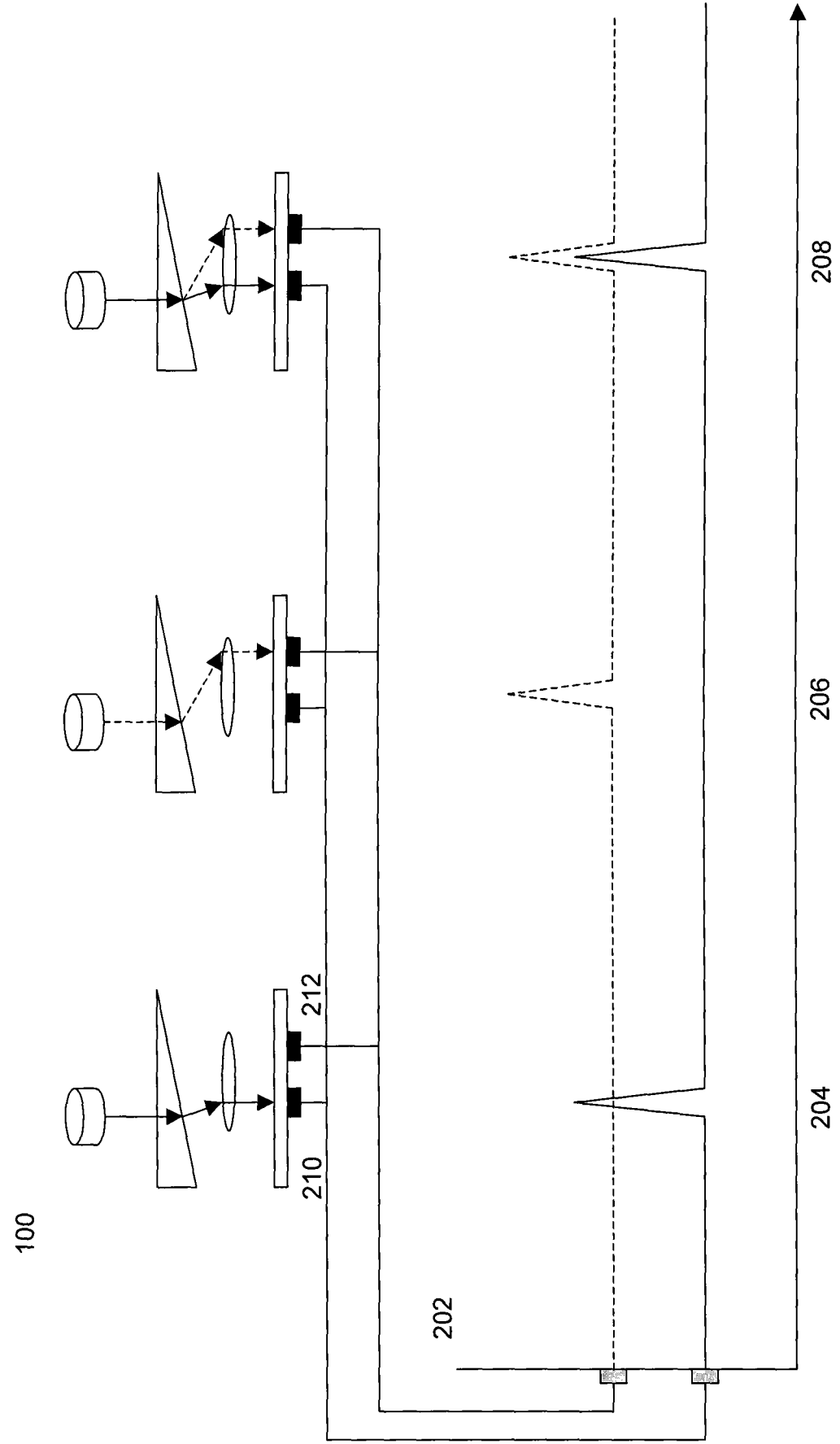


图 2

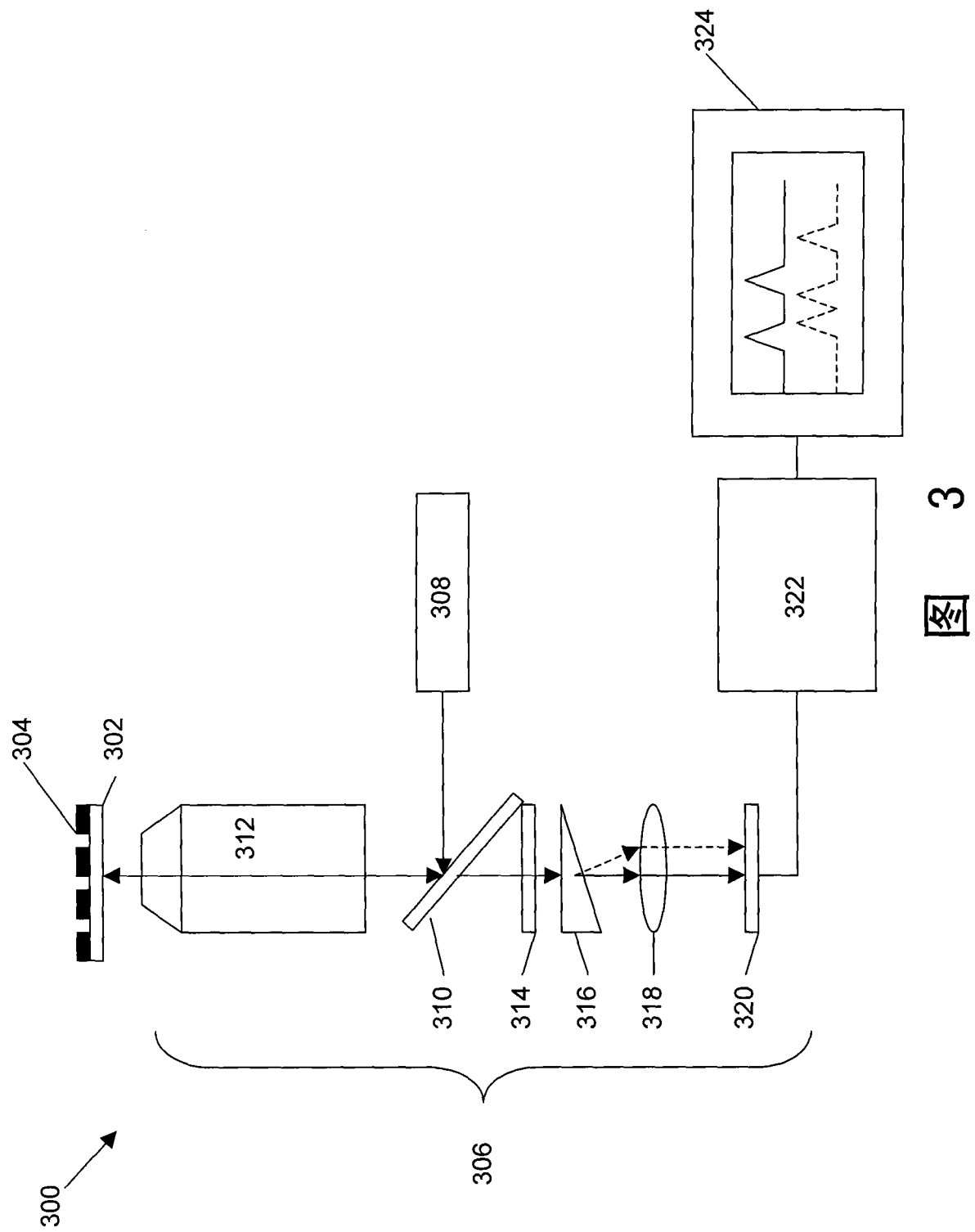


图 3

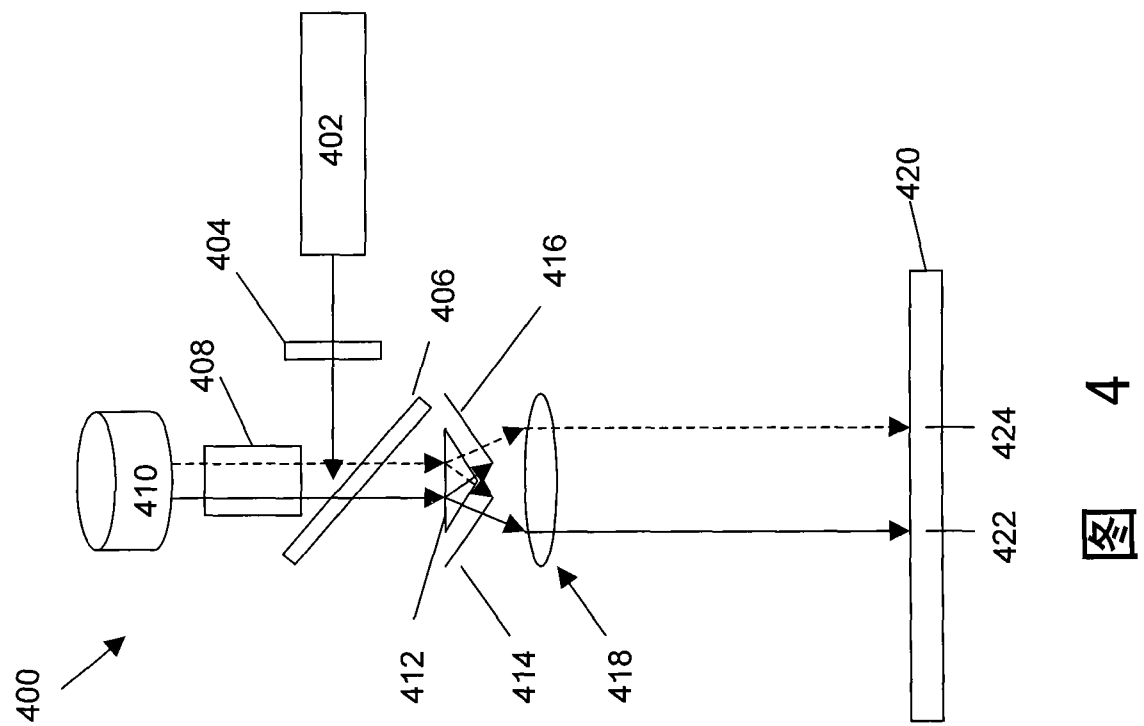


图 4

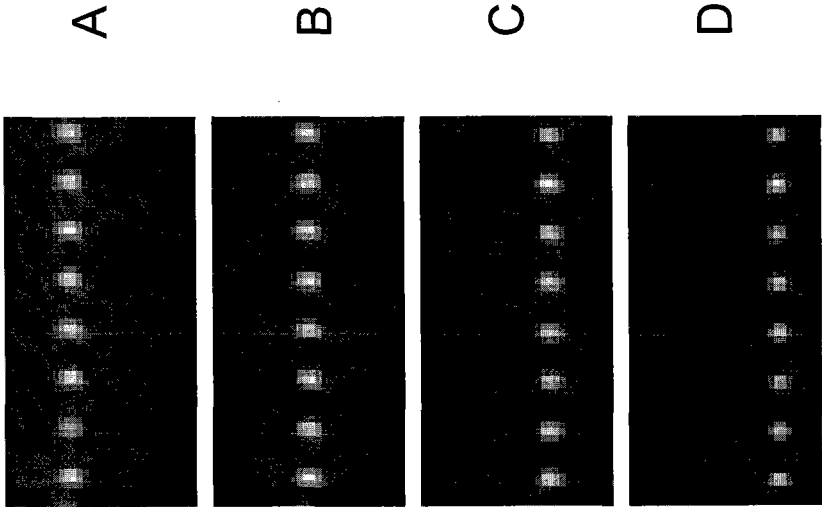


图 5A

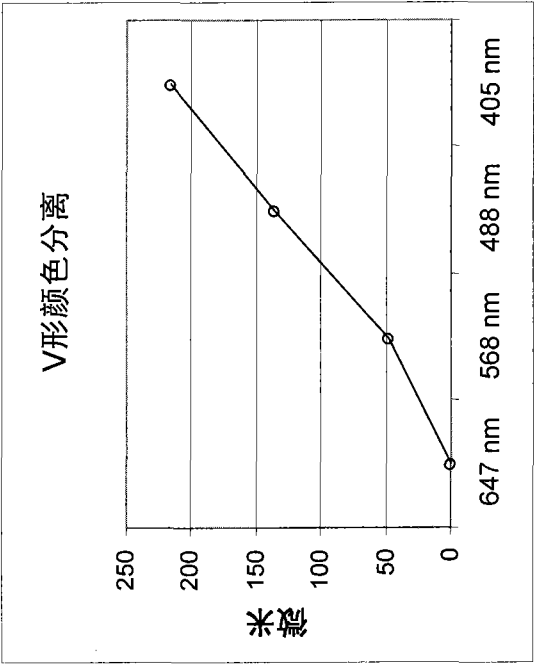


图 5B