



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：200936765

(43) 公開日：中華民國98(2009)年9月1日

(21) 申請案號：097140610

(22) 申請日：中華民國97(2008)年10月23日

(51) Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01)

G01N33/533 (2006.01)

(30) 優先權主張：	2007/10/25	美國	60/996,016
	2008/03/14	美國	61/036,652
	2008/10/21	美國	12/255,044

(71) 申請人：財團法人工業技術研究院 INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE  
新竹縣竹東鎮中興路4段195號

(72) 發明人：姚斌誠 YAO, BIN CHENG；張上嘉 CHANG, SHANG CHIA；潘詔智 PAN, CHAO CHI；邱創汎 CHIOU, CHUNG FAN；黎育騰 LI, YU TANG；朱正煒 CHU, CHENG WEI

(72) 代理人：洪澄文；顏錦順

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：69 項 圖式數：9 共 66 頁

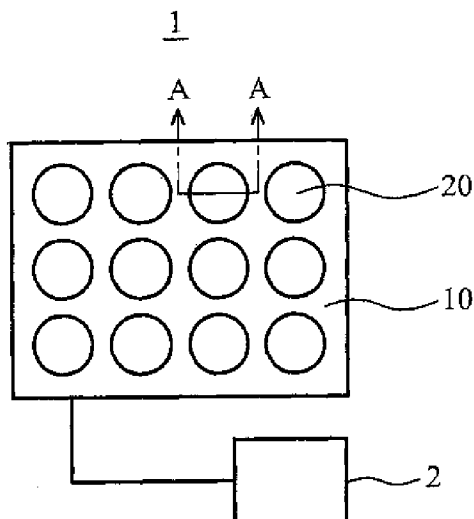
(54) 名稱

含光學偵測裝置之生物檢測系統、及偵測生物分子之方法

BIOASSAY SYSTEM INCLUDING OPTICAL DETECTION APPARATUSES, AND METHOD FOR DETECTING BIOMOLECULES

(57) 摘要

本發明揭露一種生物檢測系統，包括複數個光學偵測器，該光學偵測器各包括一具有光偵測器的基材，以及於該光偵測器上形成一鍵結位置，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於上述鍵結位置。上述鍵結位置位於上述光偵測器附近，與上述光偵測器的間隔為小於或等於100μm。上述光偵測器收集上述生物分子在接收訊號角度為0.8 SI球面度(steridian)或以上發射的光。上述光學偵測器可更包括一激發光源，形成於上述基材上，提供一光源激發附著於上述生物分子的螢光分子。



- 1：生物檢測系統
- 2：偵測與記錄系統
- 10：基材
- 20：光學偵測器



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：200936765

(43) 公開日：中華民國98(2009)年9月1日

(21) 申請案號：097140610

(22) 申請日：中華民國97(2008)年10月23日

(51) Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01)

G01N33/533 (2006.01)

(30) 優先權主張：	2007/10/25	美國	60/996,016
	2008/03/14	美國	61/036,652
	2008/10/21	美國	12/255,044

(71) 申請人：財團法人工業技術研究院 INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE  
新竹縣竹東鎮中興路4段195號

(72) 發明人：姚斌誠 YAO, BIN CHENG；張上嘉 CHANG, SHANG CHIA；潘詔智 PAN, CHAO CHI；邱創汎 CHIOU, CHUNG FAN；黎育騰 LI, YU TANG；朱正煒 CHU, CHENG WEI

(72) 代理人：洪澄文；顏錦順

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：69 項 圖式數：9 共 66 頁

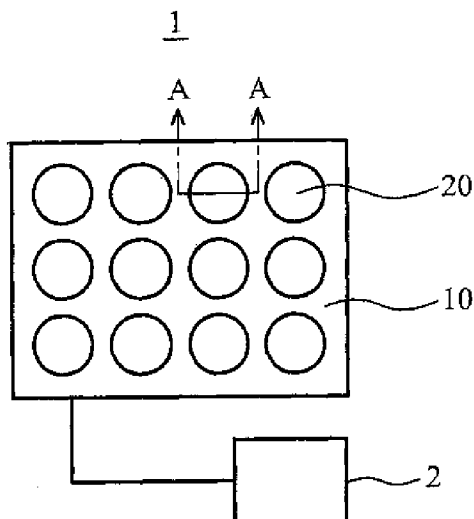
(54) 名稱

含光學偵測裝置之生物檢測系統、及偵測生物分子之方法

BIOASSAY SYSTEM INCLUDING OPTICAL DETECTION APPARATUSES, AND METHOD FOR DETECTING BIOMOLECULES

(57) 摘要

本發明揭露一種生物檢測系統，包括複數個光學偵測器，該光學偵測器各包括一具有光偵測器的基材，以及於該光偵測器上形成一鍵結位置，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於上述鍵結位置。上述鍵結位置位於上述光偵測器附近，與上述光偵測器的間隔為小於或等於100μm。上述光偵測器收集上述生物分子在接收訊號角度為0.8 SI球面度(steridian)或以上發射的光。上述光學偵測器可更包括一激發光源，形成於上述基材上，提供一光源激發附著於上述生物分子的螢光分子。



- 1：生物檢測系統
- 2：偵測與記錄系統
- 10：基材
- 20：光學偵測器

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種生物偵測系統，包括複數個光學偵測器，以及該生物偵測系統的使用於偵測及分析生物分子，例如核酸。本發明更關於一種生物偵測系統，包括至少 10,000 個光學偵測器，並行監測大量的螢光分子 (fluorophore) 及偵測及分析該生物分子。

### 【先前技術】

人類基因體計畫(HGP)刺激定序大量增加，導致定序成本相對降低。相較於人類基因體計畫耗費 13 年接近三十億美元的支出；最近完成的兩個個人基因體定序，每一基因體(genome)的定序成本明顯減少(McGuire et al., Science 317:1687(2007))。未來在個人化醫療的治療上，個人基因體定序代表一種新思維轉換。根據大量完成的基因資訊，藥物基因體學(pharmacogenomics)的發展，將使個人化的藥物設計開發更有效率。並藉由管理疾病的基因危險因子，照顧者可更輕易實施預防醫學並提供個人專屬的治療。

為使個人專屬醫療普及化，美國國家衛生研究院(NIH)的國家人類基因體研究機構(NHGRI)，訂定完成一個人類基因體定序成本降低的目標，由目前約百萬美元降至一千美元。傳統高輸出的毛細管電泳以及自動化的基因體定序技術不能滿足的個體基因體定序持續加增的需求。現行的定序方法使用的影像取得及分析步驟較為複雜且易發生錯誤(error-prone)。例如，許多現行技術需要移動陣列或偵測系統，以捕捉多重影像。得到的影像必須再被堆砌、排列

及分析。影像的獲得、加工及分析步驟皆可能產生錯誤並需要昂貴裝備且耗費較長的時間。相反地，現行的系統不涉及可移動的光學裝置，通常限制在中度的偵測通量。而且，現行裝置不將被偵測分子放置於對應的偵測單位的附近，實質上限制訊號偵測的靈敏度。

因此，為了達到“1000 元美金基因體”定序的目標，需要一種降低核酸定序成本的裝置。該裝置可並行定序多個分子，並具有簡化的設計及製程，以及避免現行裝置與方法的複雜及錯誤傾向的掃描與影像分析過程。而且，該裝置應可定序單一分子，簡化群集分子定序方法中核酸序列複製放大的步驟，及避免群集分子定序時，不同分子反應不同步導致的長序列讀序困難。

#### 【發明內容】

本發明提供一種生物檢測系統，包括複數個光學偵測器，以及提供一種使用該生物檢測系統偵測核酸的方法，例如核酸定序。本發明之生物檢測系統可大量平行定序反應，亦即同時對大量的不同核酸模版進行定序。每一定序反應使用單一分子作為模版(即單一分子定序)。本發明之裝置亦提供具有簡化設計，排除現行裝置所需的複雜、昂貴、及錯誤傾向的掃描與偵測步驟。本發明系統的簡化設計及功能一部分基於直接反應偵測鍵結位置上連接的被偵測核酸(直接連接或如經由聚合酶分子連接)，同時可偵測一個或一個以上的偵測單位(如光偵測器)，一部份基於鍵結位置與偵測單位間的短距離。本發明之一些實施例中，核酸與該偵測單位間的短距離，以偵測的大的接收訊號角

度(solid angle)方式表現。

本發明一方面提供一種生物檢測系統，在一偵測單位上辨識單一生物分子。此生物檢測系統包括複數個光學偵測器，該光學偵測器各包括一具有光偵測器的基材，以及於該光偵測器上形成一鍵結位置，該鍵結位置經處理後使該生物分子固定於該鍵結位置，其中該鍵結位置鄰近於上述光偵測器上。本發明之實施例中，上述鍵結位置與上述光偵測器的間隔距離為小於或等於  $100\ \mu\text{m}$ ，上述光偵測器收集上述生物分子在接收訊號角度為  $0.8\ \text{SI}$  球面度(steridian)或以上發射的光。上述光學偵測器可更包括一激發光源，形成於上述基材上，提供一光源激發附著於上述生物分子上的螢光分子(fluorophore)。

本發明另一發明方面提供一種核酸的偵測方法，藉由於本發明之光學偵測器的上述鍵結位置上連接至少一個核酸(直接連接，或連接於一核酸聚合酶，該核酸聚合酶連接於上述鍵結位置)，偵測在對應的光偵測器上的核酸。本發明之實施例中，偵測上述核酸之雜交作用，例如雜交至具有標記的探針。本發明之實施例中，上述核酸以在上述光學偵測器上進行核酸定序而偵測。本發明之實施例中，該核酸定序方法選自鹼基延伸定序、端部磷酸標記的定序、及搖擺定序(wobble sequencing)。本發明特定實施例中，上述定序反應為鹼基延伸反應。本發明之特定實施例中，上述鹼基延伸定序反應更包括在上述光學偵測器中加入具有阻斷基與標記的核苷酸的步驟。本發明之特定實施例中，上述核苷酸以螢光分子(fluorophore)標記。

另一方面，本發明亦提供一種偵測一樣本分子的方法。本發明之實施例中，此方法包括將一標記的樣本分子固定於本發明之光學偵測器上的鍵結位置，在對應的光偵測器上偵測該樣本分子。本發明之實施例中，上述樣本分子以連結分子固定至鍵結位置。本發明之實施例中，上述連接分子包括：(1)一捕捉分子，適合連接上述樣本分子，及(2)一核酸標籤。本發明之特定實施例中，將上述樣本分子塗鋪於本發明之光學偵測器，其中該光學偵測器上的鍵結位置上已固定有連接分子。其他實施例中，樣本分子可與一連接分子結合，形成結合複合物，然後將此結合複合物塗鋪於上述光學偵測器，使其固定在鍵結位置。本發明之特定實施例中，上述樣本分子為生物分子，例如一多胜肽、核酸、脂質、多醣、或代謝物。

本發明之具體實施詳細說明如下，然而以下的實施例僅用於進一步揭露本發明之技術內容，不應藉以限制本案的發明範疇。

## 【實施方式】

### 1. 生物檢測系統

本發明之生物檢測系統可用於並行監測大數目(例如實施例中 10,000 個以上)的單一生物分子。本發明之生物檢測系統可包括複數個光學偵測器。每一個光學偵測器，藉由偵測該螢光分子(fluorophore)發射的光子，可感測該單一分子上的螢光分子(fluorophore)存在。經由並行操作上述光學偵測器，本發明之生物檢測系統可以高通量(high throughput)辨識組織樣本中的基因體序列或表現基因的型

態。

如第 1 圖顯示本發明之生物檢測系統 1。生物檢測系統 1 包括一生物檢測基材 10 及複數個光學偵測器 20 形成於基材 10 上。每一個光學偵測器 20 可獨立運作，偵測及辨識其固定的單一生物分子。例如單股 DNA 序列的辨識，可經由逐步進行鹼基延伸及以光學偵測器 20 偵測與該延伸的鹼基偶聯的螢光分子(fluorophore)所發出的光。藉由在基材 10 上整合大數量的光學偵測器 20，可並行偵測及辨識大數量的單一生物分子。生物檢測系統 1 可根據選擇的設計，可包括至少 10,000 個、250,000 個、2,000,000 個、10,000,000 個或以上的光學偵測器 20 形成於基材 10 上。

生物檢測系統 1 可更包括一偵測與記錄系統 2，與基材 10 連接，用以控制光學偵測器 20 的運作，及記錄光學偵測器 20 所得的數據。而且，生物檢測系統 1 可更包括一激發光源(圖未顯示)。此激發光源可產生激發光，誘導螢光分子(fluorophore)發射出螢光。本發明之一實施例中，該激發光源可單獨設置，不在光學偵測器 20 或生物檢測基材 10 上。在另一實施例中，該激發光源可設置於光學偵測器 20 或生物檢測基材 10 上。

在本發明之特定實施例中，如第 1 圖所示，光學偵測器 20 由上向下視可為圓形。光學偵測器 20 可具有其他幾何圖形，例如矩形、多角形、卵形、或其他類似形狀。而且，第 1 圖顯示複數個光學偵測器 20 排列成矩形晶格圖案。光學偵測器 20 亦可排列成其他圖案，例如三角晶格圖案、蜂巢晶格圖案、或其他類似圖案。

由於生物檢測系統 1 的複數個光學偵測器 20 獨立運作，以下僅以一個光學偵測器 20 說明本發明之其他實施例。雖然僅描述一個光學偵測器 20，但可以了解生物檢測系統 1 中的不同光學偵測器 20 不需相同。可根據本發明不同實施例的需要設計，建構不同型態的光學偵測器 20。

第 2 圖顯示本發明之一實施例中，沿第 1 圖中 AA 線所示的光學偵測器 20 剖面圖。如第 2 圖所示，光學偵測器 20 包括一光偵測器 210，形成於基材 10 上，及一鍵結位置 220，形成於光偵測器 210 上。而且，光學偵測器 20 可更包括一控制回路 215，形成於基材 10 上，用以控制光偵測器 210 的運作。控制回路 215 可連接於偵測與記錄系統 2，以接收來自偵測與記錄系統 2 的控制指示，並傳送偵測訊號至偵測與記錄系統 2。在本發明之實施例中，基材 10 可為玻璃基材、半導體基材(如矽)、或塑膠基材。本發明之實施例中，每一光偵測器 210 可對應一個或以上的控制回路 215。

本發明之實施例中，光偵測器 210 可包括單一光導光子偵測器(photoconductive photon detector)或一群的光導光子偵測器。在另外的實施例中，光偵測器 210 可包括單一光電光子偵測器(photovoltaic photon detector)或一群的光電光子偵測器。在另外的實施例中，光偵測器 210 可包括單一光二極體 (photodiodes)或一群的光二極體。在另外的實施例中，光偵測器 210 可包括單一崩光二極體(avalanche photodiodes)或一群的崩光二極體。在另外的實施例中，光偵測器 210 可包括單一光電晶體(phototransistor)

或一群的光電晶體。

本發明之實施例中，光學偵測器 20 可更包括一遮光片 230 於光偵測器 210 上。遮光片 230 可包括一小孔 235。在本發明之實施例中，小孔 235 可為圓形，具有直徑  $D1$  小於或等於 1,000、500、300、200、150、或 100nm。小孔 235 可具有其他形狀，例如卵形、矩形、或其他類似形狀。本發明之實施例中，遮光片 230 可包括一不透明材料，以阻擋不想要的光到達光偵測器 210。因此經由小孔 235 使所希望的光到達光偵測器 210。

鍵結位置 220 可形成於小孔 235 附近。在第 2 圖所示之實施例中，鍵結位置 220 形成於小孔 235 內。在本發明實施例中，鍵結位置 220 形成於小孔 235 附近，與光偵測器 210 的距離  $H1$  為小於或等於  $100\ \mu\text{m}$  的距離。在另外的實施例中，距離  $H1$  可為小於或等於 75、50、25、15、10、5、 $3\ \mu\text{m}$  的距離。

光學偵測器 20 可更包括一濾光層 240(選擇性)及一微透鏡 250(選擇性)，於光偵測器 210 及遮光片 230 間。雖然第 2 圖顯示濾光層 240 形成於微透鏡 250 之上，但可了解濾光層 240 也可形成於微透鏡 250 之下。在本發明之實施例中，濾光層 240 可包括單一透明層，或複數個具有不同反射係數的透明次層。當濾光層 240 包括複數個次層時，可經由逐步在基材 10 上沈積該次層，形成濾光層 240。在本發明之實施例中，具有較高反射係數的次層可由兩個具有較低反射係數的次層以三明治形式沈積。在另外的實施例中，具有較低反射係數的次層可由兩個具有較高反射係

數的次層以三明治形式沈積。在本發明之實施例中，濾光層 240 可包括一具有單一區域的層，或複數個於不同波長範圍具有不同透明度的次區域。

如第 2 圖所示，鍵結位置 220 可經處理後使單一生物分子 30 固定於其上。在實施例中，生物分子 30 可包括一單股 DNA 分子 32 及連接於 DNA 分子 32 的端引子 34。生物分子 30 可經由端引子 34 固定於鍵結位置 220。而且，DNA 分子 32 可以螢光分子 (fluorophore) 36 標記。當以第一波長  $\lambda_1$  激發光被激發時，螢光分子 36 可發射出第二波長  $\lambda_2$  的螢光。在本發明之實施例中，第一波長  $\lambda_1$  較第二波長  $\lambda_2$  短。在另外的實施例中，第一波長  $\lambda_1$  較第二波長  $\lambda_2$  長，例如在多光子激發。然後光偵測器 210 偵測自螢光分子 36 發出的螢光，辨識螢光分子 36 所附著的鹼基，因而逐步辨識 DNA 分子 32 的序列。

第 3 圖顯示本發明實施例的光學偵測器 20 的剖面圖。如第 3 圖所示，遮光片 230 形成於光偵測器 210 之上，與光偵測器 210 的垂直間隔距離  $H_1$ 。具有一厚度  $T$  的遮光片 230，包括半徑  $R_1$  (直徑  $D_1$  的一半) 的小孔 235。在此實施例中，鍵結位置 220 可形成於小孔 235 中，與生物分子連接 (圖未顯示)。

當在鍵結位置 220 上的第一位置 36A 發現螢光分子 36 且第一位置 36A 與鍵結位置 220 距離  $H_2$  時，半徑  $R_2$  的光偵測器 210 可收集螢光分子 36 在第一接收訊號角度 (solid angle)  $\theta_1$  發射的光。當在第二位置 36B 發現螢光分子 36 且螢光分子 36 幾乎接觸到鍵結位置 220 (即距離  $H_2$  接近 0 或

小於  $1\mu\text{m}$ )時，然後光偵測器 210 收集螢光分子 36 在第二接收訊號角度  $\theta_2$  發射的光。第二接收訊號角度  $\theta_2$  大於第一接收訊號角度  $\theta_1$ ，提供實質上較強的訊號。

為了使光偵測器 210 暴露在由螢光分子 36 經小孔 235 發出的螢光，光偵測器 210 的半徑  $R_2$  必須大於或等於第二接收訊號角度  $\theta_2$  投射在光偵測器 210 的上表面的半徑。藉由使遮光層 230(或鍵結位置 220)更接近光偵測器 210(即減少距離  $H_1$ )，然後光偵測器 210 收集在接收訊號角度內較集中的光(即較強的光訊號)。在實施例中，遮光片 230(或鍵結位置 220)及光偵測器 210 具有一小距離  $H_1$ ，因此第二接收訊號角度  $\theta_2$  具有至少 0.8 SI 球面度(steradian)。

第 4 圖顯示本發明之實施例，沿第 1 圖中 AA 線所示的光學偵測器 20 剖面圖。此實施例中，激發光源 40 位於光學偵測器 20 上。如第 4 圖所示，激發光源 40 形成於光學偵測器 20 的遮光片 230 上。本發明實施例中，激發光源 40 可包括一 p 型及 n 型半導體層(410 及 430)，發光層 420 位於層 410 與層 430 的接面區。層 410 與層 430 可與電源連接。根據層 410、420、及 430 使用的材料及/或材料的物理與原子結構，激發光源 40 可為發光二極體(LED)、發光雷射二極體(LD)、有機發光二極體(OLED)、或聚合物發光二極體(PLED)。無機材料，例如砷化鎵、磷化銦、銻化鎵、及氮化鎵；有機材料，例如與聚(對苯乙炔)骨架共軛的聚合物，皆為可用於製造發光的接面二極體的半導體材料。

另外的實施例中，激發光源 40 可形成遮光片 230 或形成於遮光片 230 內。在本發明之實施例中，激發光源 40 位

於光學偵測器 20 中，發出一波長帶的光或複數個波長帶的光。激發光源 40 可在一時間發出一波長帶的光或數種波長帶的光。

如第 4 圖所示，激發光源 40 可在其中心部位包括一孔穴 450，使小孔 235 暴露出來。在此實施例中，鍵結位置 220 不形成於小孔 235 內。而且，鍵結位置 220 可形成於孔穴 450 內，並接近小孔 235。此實施例中，激發光源 40 形成遮光片 230 或形成於遮光片 230 之內時，孔穴 450 形成小孔 235 或形成於小孔 235 之內。本發明之實施例中，小孔 235 可使用適當方法，藉由例如蝕刻遮光片 230 及層 410，形成於層 410 與遮光片 230 的中心部位。

而且，經由金屬接點 415 形成於較低層 410 上以及金屬接點 435 形成於較上層 430 上，激發光源 40 可與電源 440 連接。電源 440 可單獨存在，由偵測與記錄系統 2 控制，或整合於偵測與記錄系統 2 中。

激發光源 40 的發光層 420 可發出激發光，如第 4 圖的發光層的箭頭方向，沿水平方向發光至孔穴 450。此實施例中，激發光沿著實質平行於遮光片 230 的上表面發出。因此，激發光不會干擾螢光到達光偵測器 210。本發明之光學偵測器 20 因此較傳統裝置更正確地辨識生物分子。

## 2. 核酸的偵測

本發明之生物檢測系統(包括例如單一或複數個的光學偵測器)可作為分子偵測系統的一部份或用於分子偵測的方法或步驟中，例如核酸定序。本發明之生物檢測系統及使用之方法或步驟，有效作為分析及診斷應用。這些應

用可為私人、公眾、商業、或產業用途。

本發明之實施例中，本生物檢測系統適合於大規模並行的核酸定序。由於該生物檢測系統的鍵結位置及光偵測器間的直接對應關係，及/或鍵結位置與光偵測器非常接近(實施例中，顯示接收訊號角度大)，本發明之生物檢測系統可用於定序核酸，而無需昂貴、複雜、及錯誤傾向的掃描與分析系統，例如可移動的掃描透鏡或可移動的裝置平台及之後的影像分析，因此可減少錯誤與成本。本生物檢測系統可藉由大幅增強的訊號強度而偵測光訊號，使單一分子得以被分析。

本發明之生物檢測系統可用於多樣的定序模式，且適合定序單一分子。而且，相較於現行的生物晶片裝置，本發明之光學偵測器具有簡化設計、組合、及生產。例如被定序的核酸可隨機固定於陣列上的鍵結位置位置，避免使用費時且昂貴的機械在預定位置上進行放置或合成核酸。

本發明之生物檢測系統可作為生物分子偵測方法及步驟中的系統之一部分，包括核酸雜交或定序，例如對全基因體定序、轉錄圖譜(transcriptional profiling)、比較轉錄圖譜(comparative transcriptional profiling)、或基因鑑定。生物分子的偵測也可包括連接作用的偵測及/或測量，例如蛋白質/蛋白質、抗體/抗原、受體/配位子、及核酸/蛋白質。這些應用可作為分析或診斷的步驟及方法。

適合於本發明系統偵測的核酸，在實施例中，可為連接分子(linking molecule)的一部份，固定適合分析連接作用(binding interaction)的分子在本發明提供之裝置的鍵結位

置，該分析的連接作用之分子例如蛋白質、其他核酸、碳氫化合物分子部份、或小分子。本發明實施例中，上述之連接分子更包括一捕捉分子，與被分析連接作用的分子連接。在連接分子中的核酸經由例如直接定序或雜交，作為該連接分子中捕捉分子的鑑定標籤。

本發明之方法通常包括將欲偵測分子固定於本發明提供之裝置的地址陣列。本發明之實施例中，上述地址陣列包括一具有複數個小孔 235 的遮光片 230，及一鍵結位置 220，形成於小孔 235 中或周圍。如第 1、2 圖之實施例所示。因此，本發明之生物檢測系統可同時讀取百萬個核酸片段。假設每一片段為 1000 個鹼基長度，裝置可獲得十億個片段資訊，使例如全基因體定序及再定序成為可能。

## 2.1 偵測的分子

適合本發明方法偵測的核酸可包括任何核酸，包括例如 DNA、RNA、PNA(胛肽核苷酸)，且可包括任何已知及未知的序列，包括天然發生的序列或人造序列。該核酸可為天然衍生的、重組產生的、或化學合成的。該核酸可包括天然發生的核苷酸、自然界不存在的核苷酸類似物、或修飾核苷酸。偵測的核苷酸長度根據實際的應用而異。在本發明之實施例中，核酸包括至少 10、20、50、100、200、500、1,000、2,000、5,000、10,000、20,000 個鹼基或以上。本發明之實施例中，核酸可為 10-20、10-50、10-100、50-100、50-500、50-1000、50-5000、500-2,000、500-5,000、或 1,000-5,000 個鹼基。

偵測的核酸可為單股。單股核酸模版可由已知方法行

生自雙股分子，例如加熱、鹼處理或其他化學處理。單股核酸模版也可由如化學合成或試管內合成而製造。

本發明之實施例中，偵測的核酸以其 5'端或 3'端連接至鍵結位置。本發明實施例中，該核酸更包括一個或以上的端連接引子，偶聯至該核酸的 5'端、3'端、或 5'端及 3'端。在特定實施例中，該端連接引子固定於該核酸的 3'端。端連接引子可用於固定欲偵測的核酸至裝置上的鍵結位置，提供一個或一個以上偵測引子的互補序列，該偵測引子例如定序引子。

### 2.1.1 端連接引子

端連接引子為短核酸分子，通常由少於 100 個核苷酸所組成。本發明之實施例中，該端連接引子為至少 5、10、15、20、25、30、50、75、90 個核苷酸或以上的長度。在特定的實施例中，端連接引子為 8-25、10-20、10-30、或 10-50 個核苷酸長度。在本發明之實施例中，該端連接引子為不具有分支，然而在其他實施例中，該端連接引子為具有分支。

該端連接引子可用於使欲偵測核酸附著至地址陣列上的鍵結位置。本發明實施例中，該端連接引子可將該核酸直接連接至陣列表面，例如藉由共價連接(如酯或硫鍵結)或非共價鍵結，例如抗原/抗體或生物素(biotin)/卵白素(avidin)連接，如第 6、7 圖所述。本發明之實施例中，該端連接引子將核酸間接連接至陣列表面，例如藉由連接一中間分子，如聚合酶，如第 8 圖所示。因此，該端連接引子可包括修飾核苷酸或其他修飾以加速連接至鍵結位置，

以習知之方法，例如雙硫、硫脂、醯胺、磷二酯、或酯鍵結；或藉由抗原/抗體或生物素(biotin)/卵白素(avidin)連接，例如該端連接引子包含一核苷酸，該核苷酸包括一抗原部份或生物素化核苷酸。在特定的實施例中，修飾核苷酸位於端連接引子的 3'端。在本發明之實施例中，端連接引子的 5'端包括一修飾核苷酸。

該端連接引子也可作為用於偵測該核酸的一個或以上的引子之補體，例如定序引子。本發明之實施例中，該引子用於以雜交偵測該核酸，例如該引子包含一可偵測標記，例如螢光或放射性同位素標記。本發明之實施例中，該端連接引子的 5'端包括一互補於定序引子的序列。本發明之實施例中，將互補於該定序引子的端連接引子序列定位，因此該定序引子的 3'端立即相鄰於被定序的核酸中第一個核苷酸。

如第 6 圖顯示一實施例中被定序的核酸固定於本發明之光學偵測器 20 的表示圖。單股核酸 32、端連接引子 34、及黏合的定序引子 346，被固定於經處理具有反應官能基的鍵結位置 220，使修飾的核苷酸 344 連接於端連接引子 34。本發明之實施例中，核酸 32 藉由其 5'端連接至鍵結位置 220，端連接引子 34 連接於核酸 32 的 3'端，作為定序引子 346 的補體。

本發明之實施例中，以連接酶(ligase)使端連接引子添加於欲偵測的核酸上，該連接酶例如 DNA 連接酶。在本發明之實施例中，在連接(ligation)前，端連接引子及欲偵測的核酸皆為單股。在另外的實施例中，兩者皆為單股。在

其他的實施例中，一為單股、另一為雙股。連接(ligation)為此技術領域中習知的方法。例如，在聚合酶群落定序方法(polony sequencing method)中，薛杜爾等人使用新英格蘭生物試驗(NEB)快速連接套組，使 T30 端連接引子(32pb)連接至樣本 DNA 片段(Shendure et al., 2005, Science, 309:1728-1732)。此述的連接反應溶液包括在 1X 快速連接緩衝液中含有 DNA 0.26pMole、T30 端連接引子 0.8pMole、T4 DNA 連接酶 4.0  $\mu$ l。混合後，將此反應液在室溫下培養約 10 分鐘，然後放在冰上。此連接反應以加熱樣本至 65°C、10 分鐘終止。

在其他實施例中，端連接引子合成於欲偵測的核酸上。例如，該端連接引子可為均質聚合物，以例如端轉移酶加入。例如哈利斯等人將多聚 A 尾(poly A tail)加到 DNA 模版上，作為病毒基因體的單一分子定序中多 T 定序引子的補體(Harris et al., 2008, Science 320:106-109)。

### 2.1.2 定序引子

定序引子為單股寡核苷酸，互補於偵測的核酸片段或其相關的端連接引子。本發明之實施例中，定序引子為至少 8、10、15、20、25、30、35、40、45、50 個核苷酸，或以上的長度。在特定實施例中，定序引子可為 8-25、10-20、10-30、或 10-50 個核苷酸長度。定序引子可由任何型態核苷酸組成，包括天然發生的核苷酸、自然界不存在的核苷酸類似物、或修飾核苷酸。在特定實施例中，在以偵測的核酸雜交定序引子後，可修飾定序引子的 5'端，以加速連接至地址陣列上的鍵結位置，包括一個或以上的端

連接分子。

本發明之實施例中，定序引子包含修飾的核苷酸，例如鎖住的核酸(LNAs、修飾的核糖核苷酸、或在多核酸中提供促進的鹼基堆疊交互作用者)。例如使用 LNA 的說明，拉芬等人顯示含有 LNA 的引子，相較於未鎖住的引子，具有改良的特異性及呈現較強的連接(Levin et al., 2006, Nucleic Acid Research 34(20):142)。包含 3 個 LNA 核苷酸(在 cap 處)於不同位置的 MCP1 引子(5'-cttaaattttcttgaat-3')的三種變異體為：MCP1-LNA-3'(5'-cttaaattttCtTgaAt-3')；MCP1-LNA-5'(5'-CtTaAattttcttgaat-3')；及 MCP1-LNA-even(5'-ctTaaatTttctTgaat-3')。所有 LNA-取代的引子具有升高的  $T_m$ ，然而，MCP1-LNA-5'引子展現獨特的促進定序正確性(Phred Q30 counts)。因此，在特定的實施例中，定序引子可包括在 5'區域中至少一種鎖住核苷酸，即在定序引子的 5'的一半、三分之一、或四分之一。

定序引子及單股樣本核酸(即欲偵測的核酸包括至少一個端連接引子)在應用於本發明之光學偵測器前可被雜交。經由混合樣本核酸與過量莫耳的定序引子在含鹽溶液中，例如 5X SSC(或 5X SSPE)、0.1% Tween 20(或 0.1%SDS)、及 0.1%BSA 緩衝液，使莫耳定序引子與樣本核酸雜交。此混合物可加熱至 65°C 至少 5 分鐘，緩慢冷卻至室溫，使引子/模版黏合。殘餘的引子可由適當方法去除，例如分子篩。

包括端連接引子及定序引子，引子可以適當方法設計，包括序列的可視調查或電腦輔助的引子設計。多種軟

體包裝皆可用於輔助引子設計，包括 DNASTar™(DNASTar, Inc., Madison, WI)、OIGO 4.0(National Biosciences, Inc.)、Vector NTI®(Invitrogen)、Primer Premier 5(Premierbiosoft)、及 Primer 3 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA)。設計引子應考慮如定序的分子、特異性、長度、所需要的熔點溫度、次級結構、引子二元體、GC 含量、緩衝液的 pH 及離子強度、及使用的酵素(即聚合酶或連接酶)(Joseph Sambrook and David Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3<sup>rd</sup> ed. (2001))。

### 2.1.3 連接至陣列表面

在黏合定序引子及欲偵測的核酸(包括一個或以上的端連接引子)之後，此複合物存於適當緩衝液中，塗鋪於地址陣列的表面，使其連接。本發明之實施例中，樣本核酸(欲偵測的核酸及一個或以上的端連接引子)固定於鍵結位置，之後塗鋪定序或偵測的引子。另外的實施例中，在塗鋪於該裝置之前使該複合物雜交。已知只有一個樣本核酸連接的鍵結位置為有效的地址。在特定的實施例中，將該複合物塗鋪到上述的光學偵測器，且該樣本核酸固定至該地址陣列上的任意的鍵結位置。另外的實施例中，可以適當方法將樣本核酸塗鋪至該地址陣列上的預定的鍵結位置，適當的方法例如經由機械或液體處理裝置。

使核酸固定至固體支持物上的適當方法為習知。本發明之實施例中，樣本核酸直接以共價鍵結固定在鍵結位置，例如以雙硫鍵、硫酯鍵、醯胺鍵、磷酸二酯鍵、或酯

鍵結；或以非共價鍵結固定，例如抗體/抗原或生物素/卵白素連接。本發明之實施例中，以插入分子(intervening molecule)使樣本核酸固定至鍵結位置。本發明之實施例中，該插入分子可為聚合酶，例如 DNA 聚合酶。

關於核酸的直接共價連接，阿迪西等人改良引子的 5' 端，包括 SH 官能基(Adeesi et al., 2000, Nucleic Acid Research, 28:87)。根據阿迪西等人的方法，核酸以 50 $\mu$ M 磷酸緩衝鹽溶液(PBS)(NaPi:0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH 6.5、0.1M NaCl)製備。然後約 1-5 $\mu$ l 引子溶液塗鋪於矽烷化(silanised)玻璃玻片表面，在室溫下溼度控制箱中培養約 5 小時，使該引子連接至晶片表面。在連接反應完成後，將該 PBS 溶液在室溫下震動清洗兩次，每次 5 分鐘，移除未連接的 DNA。清洗後，將 10mM $\beta$ -巰基乙醇加入該 PBS 溶液中，在室溫下潤濕該地址陣列表面，使未連接的 DNA 的硫基去活化。其次，清洗該陣列表面，例如一次以 5X SSC 0.1% Tween 及一次以 5X SSC 緩衝液清洗。因此，本發明之實施例中，使用阿迪西等人的方法，使樣本核酸固定至鍵結位置，例如，經由定序引子或樣本核酸的 5' 端。

本發明之另外實施例中，該樣本核酸可包含例如生物素化核酸，連接至在該鍵結位置表面的卵白素。另一實施例中，該樣本核酸可包括一抗原部份，例如 BrdU 或毛地黃(digoxigenin)，以抗體(或抗體片段)連接於該鍵結位置。”抗體”已知包括免疫球蛋白分子片段，包括例如一個或以上的 CDR 區域；或可變異的重鏈或可變異的輕鏈。抗體發生、重組或合成。抗體也可包括例如多株抗體及單株抗體

的變異體。本發明之實施例中，抗體連接其抗原的結合常數為至少  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ M 或以上。抗體的結構、功能及製造為習知技術(Gary Howard and Matthew Kasser, Making and Using Antibodies: A Practical Handbook CRC Press; 1<sup>st</sup> ed. (2006))。

另外的實施例中，樣本核酸可由聚合酶固定至鍵結位置，例如 DNA 聚合酶。熟知此技術的人了解應考慮保留酵素功能的可獲取資訊，例如酵素的初級、次級、及三級結構。例如習知的 Taq 及 Phi29 聚合酶的結構(Kim et al., Nature, 376:612-616(1995) and Kamtekar et al., Mol. Cell, 16:609-618(2004))。聚合酶固定於表面的方法，如美國專利申請案 2008/0199932 及 Korlach 等人 (PNAS 105:1176-1181(2008))所記載的保留活性。第 8 圖顯示本發明之實施例的表示圖，該樣本核酸(即欲定序的核酸 32、端連接引子 34、及定序引子 346)經由以工具 384 已經連接於鍵結位置 220 的聚合酶 38，連接至鍵結位置 220，該工具 384 例如直接非共價吸收、抗體、生物素、或化學鍵結，如醯胺鍵。

本發明之實施例中，鍵結位置的醛修飾表面以含醛的矽烷試劑處理。醛容易與蛋白質表面的一級胺形成希夫(Schiff)醯鍵結。由於許多蛋白質表面呈現賴胺酸，而且通常在  $\text{NH}_2$ -端有較反應性的  $\alpha$ -胺，這些蛋白質可以各種定位連接至玻片，使該蛋白質的不同面與溶液中的其他蛋白或小分子作用。另一實施例中，以 UV 光活化作用使 photoNHS(N-羥基琥珀醯亞胺羧酸分子連接至具有碳鏈連

接物的疊氮硝基苯(azidobenzene)分子)連接至該裝置上的胺修飾表面。這些實施例中，UV 光激發疊氮硝基苯(azidobenzene)的部份，去除氮後，產生高反應性的氮烯(nitrene)。氮烯(nitrene)容易與上述裝置表面的  $\text{NH}_2$  作用，形成聯胺(hydrazine)鍵。此連接物的其他端為 NHS 羧酸酯，與聚合酶表面的賴胺酸，形成醯胺共價鍵。另一實施例中，該 NHS 羧酸酯與上述裝置表面的一級胺在緩衝環境中反應。UV 光用於活化疊氮硝基苯(azidobenzene)的部份，形成高反應性氮烯(nitrene)作為電子缺少組，容易與聚合酶上的賴胺酸殘基的一級胺反應。此方法將詳細描述於以下的實施例 4。

## 2.2 定序形式

本發明之生物檢測系統可以習知方法用於偵測及定序核酸(如美國專利案 6,946,249 及 Shendure et al., Nat. Rev. Genet. 5:335-44(2004))。本發明之實施例中，定序方法根據 DNA 聚合酶或 DNA 連接酶的特異性決定，包括例如鹼基延伸定序(單一鹼基依序延伸)、合成的多鹼基定序(包括如端標記的核苷酸的定序)、及搖擺(wobble)定序，基於連接作用而決定。這些方法通常需要單股樣本核酸，包括至少一個端連接引子(直接或間接)固定於鍵結位置上。然後以定序引子(連接酶為主的定序通常為錨引子(anchor primer)，與定序引子為相似目的)開始定序。

關於所有定序形式，本發明提供可再定序單一分子的優點。例如，在完成定序讀取後，定序引子及延伸的核苷酸可自樣本核酸去除，清洗上述裝置，重複定序。在多個

實施例中，再定序可以相同或不同方法進行。關於再定序相同分子，預期定序錯誤降低為定序讀取數量的平方。例如當單一讀取的每一鹼基錯誤率為  $10^{-3}$ ，則兩次讀取後，會降低至  $(10^{-3})^2$ ，即  $10^{-6}$ 。這對單一分子定序有特別的優點，因為定序用的修飾核苷酸可失去其標記或保護基 (blocking group) 而導致如偽缺失。

### 2.2.1 鹼基延伸定序: 逐步延伸

在實施例中，本發明之光偵測裝置可用於進行鹼基延伸定序(美國專利案 5,302,509)。本發明之實施例中，鹼基延伸定序開始於使包括欲定序的單股核酸 32、連接於欲定序的單股核酸 32 的 3'端之端連接引子 34、及被黏合的定序引子 346 之部份雙股樣本核酸，連接至鍵結位置 220，如第 6 圖所示。在實施例中，然後將聚合酶 38 與修飾的核苷酸在適當緩衝液中塗鋪於上述的光偵測裝置上。在實施例中，上述樣本核酸複合物以鍵結位置上的聚合酶被固定於鍵結位置。在實施例中，上述核苷酸包括共價鍵結的可偵測標記，例如螢光標記，及保護基以避免任何次級延伸。因此，在定序引子 346 的 3'端加上單核苷酸後停止定序。

第 7 圖顯示一實施例中鹼基延伸定序反應的第一步驟。將帶有螢光保護基 364 的核苷酸 362 以 DNA 聚合酶 38 加入至定序引子 346 的 3'端。在一些實施例中，螢光標記作用如保護基。在另外的實施例中，螢光標記為分離部份。一單核苷酸附於定序引子 346 的 3'端，根據對應的光偵測器 210 辨識其標記。然後移除該螢光標記及保護基，例如使用化學或酵素胞溶，允許額外增加的鹼基延伸循

環。在特定實施例中，該標籤與保護基可同時、之後、或以任何順序移除。經由編輯加入的鹼基順序，樣本核酸的序列以 3' 向 5' 的方向追溯，一次一個鹼基。第 9 圖顯示各樣本核酸並行進行延伸、偵測、及去保護/去標記的一次循環。

通常，有兩種方法辨認在逐步延伸時加入的核苷酸。一種情形為，四種核苷酸皆有相同可偵測標記，但是以預定的順序，一次加入一種。根據延伸反應中核苷酸加入的順序，辨識延伸的核苷酸。另一種情形為在延伸時辨認加入的鹼基，將四種核苷酸同時加入，每一種連接不同、可區分的標記。在不同的實施例中，標記的激發或發光的光譜及/或強度可能不同。加入延伸反應中的核苷酸由偵測標記的強度及/或波長(即激發或發光光譜)辨識。這兩種方法的實施例於以下實施例 5 中說明。

### 2.2.2 以合成方法定序：多步驟延伸

在一些實施例中，合成方法定序以多步驟無中斷的延伸反應進行，例如不使用保護基。這些實施例中，以偵測核苷酸三磷酸水解後的磷酸釋放，例如  $\beta$  及  $\gamma$  磷酸複合物的釋放，監測聚合反應。這些複合物可直接被偵測，例如藉由該複合物上的螢光部份，或間接被偵測，例如使焦磷酸連接至化學或生物螢光偵測系統。

一些實施例中，上述樣本核酸必須連續以端-磷酸標記的核苷酸定序。端磷酸標記的核苷酸及其使用方法的例子，例如美國專利案 7,361,466 及美國專利公開案 2007/0141598。簡單地說，使用於本發明裝置的核苷酸，

當在聚合反應時水解，則標記的焦磷酸可被對應的光偵測器偵測。一些實施例中，四種核苷酸皆包括一種標記，且可同時加入。一些實施例中，核苷酸包括不能辨別，例如相同的標記，並以預定順序依序加入。帶有無法辨別的標記的核苷酸，依序、循環的添加，仍然可進行多步驟、無中斷的聚合步驟，例如以均質聚合物的順序。

### 2.2.3 連接酶為主的定序

其他實施例中，樣本核酸以本發明的光學偵測器經連接酶為主的定序方法定序。連接酶為主的定序方法例如如美國專利案 5,750,341 及薛杜爾等人(Shendure et al., 2005, Science, 309:1728-1732)所揭露。在薛杜爾等人的方法中，兩個端連接引子位於未知的單股 DNA 樣本的兩側，並固定於固體支持物上。未知序列上的特定位置(例如接近特定的端連接引子的第 n 個鹼基)，以所謂錨引子(類似定序引子)黏合於端連接引子之一來檢查，然後在此混合物中加入 4 個衰退的九元體(degenerate nonamer)。此四個九元體皆具有獨特的螢光標記，並在所有位置皆會衰退，除了有疑問的位置，每個九元體檢視不同的鹼基—A、C、G、或 T。清洗樣本、螢光掃描，辨識有疑問的鹼基。然後去除樣本核酸中的錨引子及連接的九元體，清洗該裝置，並重複步驟、尋找其他有疑問的位置。此方法的優點在於無累進性，即鹼基不需依順序尋找。因此，錯誤不會累積。而且，此方法可尋找從 5' 或 3' 方向有疑問的位置，即不需如傳統標準以 5' 向 3' 方向的 DNA 合成。所有約 13 個鹼基的樣本核酸通常可用此方法定序。

## 2.3 應用

本發明之生物檢測系統可同時偵測百萬個核酸片段。如果每一片段例如為 1000 個鹼基長度，一裝置可依此進行十億個以上的鹼基序列。以下討論為上述裝置的額外應用及其方法。

### 2.3.1 整段基因組定序

本發明之生物檢測系統可用於進行例如細菌、真菌、真核生物、或脊椎動物，例如哺乳類，例如人類的整段或部份基因體定序。

基因體 DNA 可切成至少 20、50、100、200、300、500、800、1200、1500 個核苷酸長度或以上的片段，進行定序。一些實施例中，切斷的基因體 DNA 可為 20-50、20-100、20-500、20-1000、500-1200 或 500-1500 個核苷酸長度。在一些實施例中，預定序的核酸沿著相關端連接引子製成單股，黏合至定序引子，並塗鋪於本發明之裝置，進行如上述的定序。

### 2.3.2 基因表現型態

在其他實施例中，本發明之生物檢測系統可用於定序 cDNA 以了解基因表現型態。例如，mRNA 的量可由測量裝置上偵測的特定序列的相對率而定量。數百萬個 cDNA 分子可在本發明之裝置上並行定序。假如一細胞包含平均 350,000 個 mRNA 分子，在每個細胞中平均一複製本所呈現的轉錄本，預期在一百萬定序反應中需進行約 3 次的定序。因此，本發明之裝置適合具有單一複製數量敏度的單一分子定序。

cDNA 合成為習知，通常包括具有選擇性富有 mRNA 的完整 RNA。由 mRNA 形成 cDNA 的步驟包括，例如在第一股合成時的反轉錄作用；RNA 酶處理移除剩餘的 RNA；自由六元體(random hexamer)引發該第一股，及 DNA 聚合酶合成第二股。所得的 cDNA 適合在本發明之裝置上定序。分離及製備 DNA 及 RNA 的方法為習知 (Joseph Sambrook and David Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3<sup>rd</sup> ed. (2001))。

一些實施例中，cDNA 的定序如美國專利案 6,812,005 及 7,361,488 所揭露。簡單地說，cDNA 以適應物多核酸連接，該適應物經特殊化限制酶加工，最後該加工過的核酸連接至固定於本發明裝置的鍵結位置的互補的寡核苷酸。特定的實施例中，該適應物分子為端連接引子。

本發明之實施例中，mRNA 的聚 A 尾可作為適當的端連接引子，其互補於聚 A 定序引子。

### 2.3.3 偵測及/或測量連接作用

其他實施例中，上述生物檢測系統可用於偵測多種連接作用，包括例如 DNA/DNA、RNA/RNA、或 DNA/RNA 鹼基配對、核酸/蛋白質作用、抗原/抗體、受體/配位體連接、及酵素/受質連接。樣本分子通常固定於包含一辨識核酸標籤(ID)的連接分子。一些實施例中，該連接分子更包括連接樣本分子的捕捉分子。連接分子也包括連接至鍵結位置的方法，例如加速共價化學連接的部份，例如雙硫鍵、硫酯、醯胺、磷酸二酯、或酯連接；或非共價連接，例如

抗體/抗原或生物素/卵白素連接。在一些實施例中，連接分子以 ID 標籤固定於上述陣列中。

樣本分子塗鋪於本發明之裝置上，並藉由其連接分子固定至一自由鍵結位置，例如藉由連接位於該連接分子上的捕捉分子。一些實施例中，混合樣本分子及連接分子，使其連接，然後塗鋪至本發明之裝置。一些實施例中，該連接分子首先塗鋪至該裝置，使其固定於鍵結位置，然後在塗鋪該樣本分子。然後，以本發明方法(如藉由雜交或定序)偵測 ID，辨識相關的樣本分子。複數個樣本分子種類可固定於相同陣列，由其標籤區分，而使用其連接的捕捉分子的獨特 ID 作為其連接作用的特徵。因此，一些實施例中，偵測標籤樣本分子的方法，包括使用包括核酸標籤(ID)的連接分子，使樣本分子連接至本發明之裝置的鍵結位置，進行該 ID 的核酸定序，並偵測標記的樣本分子。特定的實施例中，該核酸定序為鹼基延伸定序，或末端磷酸標記的核苷酸定序。

使用核苷酸”小段”，可在本發明之生物檢測系統上固定及辨識最多至  $4^n$  可區別的捕捉分子，其中  $n$  為代表 ID 定序的長度的整數。例如，5 個核苷酸可提供千個以上獨特的 ID，而 12 個核苷酸提供 1 千 6 百萬以上的組合。例如，連接分子固定於本發明之裝置，以偵測其對應 ID 標籤確定其位置。該連接分子然後可作為探針，例如調查與一個或以上標記的樣本分子的連接作用。即固定一個或以上連接分子的裝置可作為探針陣列。

特定的實施例中，標記的樣本分子為螢光標記。當連

接於連接分子的捕捉分子時，標記的樣本分子由對應該鍵結位置的光偵測器偵測，該連接分子固定於該鍵結位置。因此，一些實施例中，本發明之方法更包括將標記樣本分子塗鋪於本發明之裝置上，並偵測該標記的樣本分子。特定實施例中，該裝置具有包括核酸標籤(ID)的連接分子，固定於其鍵結位置上。多種標記的樣本分子可同時塗鋪於探針陣列，並藉由例如其螢光標記的強度及/或波長，由其標記分化。樣本分子與標記的詢問分子間的連接作用的分離數，根據在標記的詢問分子的固定濃度下，動能(如進入/移出比例)及統計(如任何固定時間內樣本分子在連接或未連接狀態的分配)，受到干擾。

一些實施例中，連接分子的 ID 至少為 5、10、15、20、25、30、40、50、75、90、100、150、200 個或以上的核苷酸長度。在一些實施例中，該 ID 為 5-10、20、40、80、或 160；或為 10-20 或 50；或為 20-35 個核苷酸長度。該 ID 包括一獨特的核酸序列，即欲偵測的核酸。特定的實施例中，該獨特的核酸序列可為至少 1、2、4、6、8、10、12、14、16、20、24、30 個或以上的核苷酸長度。一些實施例中，該獨特的核酸序列為 4-10、12、15、或 20 個核苷酸長度；或 10-20 個核苷酸長度。該 ID 包括至少一個端連接引子，即該 ID 包括一互補於定序引子的序列，一些實施例中，該 ID 經修飾連接於鍵結位置，如藉由包括一生物素化的核苷酸。在一些實施例中，該 ID 的端連接引子部份為 3'端至該獨特核酸序列。一些實施例中，該 ID 的端連接引子部份為 5'端至該獨特核酸序列。其他的實施例中，端連

接引子表現在該獨特核酸序列的 3'端及 5'端。

在特定實施例中，樣本分子與捕捉分子包括一部份選自碳水化合物、脂質、蛋白質、胜肽、抗原、核酸、激素、小有機分子(如醫藥)、或維生素部份；或其組合。這些部份可為天然發生(如生化上純化的)或合成的(如化學合成或重組產生的)。而且，這些基質可包含無組成物、一些組成物、或皆非原始的組成物(如非天然的胺基酸、保護基或保護基等)。在特定的實施例中，樣本分子或捕捉分子為蛋白質，例如生長因子、胜肽抗原、抗體、或受體。

使核酸連接至連接分子或鍵結位置的多種方法為習知(美國專利公開案 2004/0038331)。美國專利公開案 2004/0038331 揭露形成連接於固相支持物上的蛋白寡核苷酸的方法。美國專利案第 4,748,111 提供一例，使蛋白質連接至核酸的 3'端。其中，首先使用端轉移酶在該分子的 3'部份加上核糖殘基。然後進行過碘酸氧化反應，在該核酸上產生 3'醛基，然後與蛋白質的醯胺基形成一共價鍵。當蛋白質連接至該 ID 的 3'端時，該 ID 的 5'端連接至鍵結位置。

一些實施例中，捕捉分子例如蛋白質，連接至該 ID 的 5'端。這些實施例中，該 ID 的 3'端或定序引子的 5'端作為將捕捉分子固定至鍵結位置。例如美國專利案 6,013434 揭露寡核苷酸聚醯胺的連接，該連接是經由該寡核苷酸的 5'端。美國專利案 6,197,513 揭露 PNA 與 DNA 皆藉由該核酸的 5'端，連接於帶有羧酸部份的分子，例如蛋白質。該 PNA 與 DNA 分子包括芳基胺或胺基氧基乙醯基部份。美國專利

案 6,153,737 揭露包括至少一 2'官能化核苷酸的寡核苷酸，適合連接各種分子。

#### 2.3.4 額外的偵測方法

##### 2.3.4.1 FRET

一些實施例中，本發明之光學偵測器以福斯特共振能量轉移(Föster resonance energy transfer; FRET)偵測分子，亦稱為螢光共振能量轉移(fluorescence resonance energy transfer)。如此技術領域中所周知，FRET 出現在當激發的提供者分子非放射性轉移能量至接受者分子時，此轉移會發出能量，通常是光的形式。FRET 可協助減輕背景訊號，藉由例如在對欲偵測分子進行有效激發與發出波長間，提供較大的光譜分離。FRET 通常用於偵測相近的分子作用，因為其有效地衰敗成為位於提供者與接受者分子距離間的第六力。例如曾等人以 FRET 偵測的核酸雜交(Zhang et al., Nature Materials 4:826-31(2005))。其中，將生物素化的核酸目標連接至卵白素包覆的量子點提供者，然後，激發 Cy5-連接的 DNA 探針。本發明之實施例中，標記的捕捉分子與標記的樣本分子可形成提供者/接受者(反之亦然)對以 FRET 偵測。

本發明之核酸定序的實施例中，螢光標記的核苷酸作用如接受者螢光分子(chromophore)，對連接於聚合酶或連接酶的提供者螢光分子(chromophore)。因此，在這些實施例中，位於聚合酶或連接酶的提供者螢光分子，激發該樣本分子上聚合的或連接的核苷酸上的接受者螢光分子。不接近於聚合酶的核苷酸不被激發，因為 FRET 效能快速下

降的原因。本發明之實施例中，提供者分子為例如另一螢光分子(fluorophore)，例如量子點。量子點，例如半導體量子點為此技術領域中所習知(WO03/00015)。耦合量子點的工具，例如習知的生物分子(Mednitz et al., Nature Materials 4:235-46(2005); USP 2006/0068506、2008/0087843)。在一些實施例中，量子點連接至 DNA 聚合酶分子，進一步描述於以下的實施例 3。如上述已討論的使酵素連接至鍵結位置，熟知此項技術者無疑地可了解當連接螢光分子至例如 DNA 聚合酶或連接酶時，須注意保留酵素功能，藉由減輕螢光分子連接於初級、次級、三級結構酵素的任何影響。

#### 2.3.4.2 多光子激發

本發明之實施例中，螢光分子被兩種或以上的光子激發。例如，在本發明之實施例中，FRET 的提供者或接受者螢光分子的激發，是經過兩種或以上的光子。兩光子及多光子的激發進一步討論於美國專利案 6,344,653 及 5,034,613。

#### 2.3.4.3 時間分辨的偵測(Time Resolved Detection)

本發明之實施例中，本發明之裝置中的光源與光偵測器，可調整具有獨特的相移動(phase shift)。例如揭露於美國專利公開案 2008/0037008 的習知方法，由本發明之裝置上偵測到的分子發出的光，可由對應的光偵測器測量，而無來自激發光源的干擾。

### 3. 使用本生物檢測系統的生物分子分析服務

本發明亦提供一種生物分子分析服務，根據本發明之實施例使用該生物檢測系統。本發明之實施例中，此方法

包括從服務需求者提供樣本包括欲分析的生物分子，給服務提供者，及服務需求者從服務提供者收到分析結果，其中，該結果來自本發明之裝置。本發明之實施例中，此方法可考慮報酬，例如無服務費或契約服務同意。而且，該樣本可直接由服務需求者運送至服務提供者，或者中間經由一賣家。在一些實施例中，服務提供者或賣家可位於美國領土以外的地區，例如其他國家。

關於此所引述的所有專利案、專利申請案、或其他參考文獻，應可了解其診體作為本發明內容參考的目的及引用的陳述。任何介於參考文獻與本發明內容的衝突，以本發明內容為主。

由本說明書內引述的參考資料的教示，可最充分了解本說明書。本說明書中的實施例提供本發明之具體實施的說明，不應作為構成本發明範圍的限制。熟知此技術領域之人可容易了解本發明包含多種其他的實施方式。此所引用的所有公開物及專利案全文作為參考。關於參考文獻所使用之材料或與本說明書中不一致之處，本發明可置換任何該等材料。此引述的任何參考文獻並不意指為本案之先前技術。

除非有特別說明，所有整數、反應條件等使用於本說明書(包括申請專利範圍)中的代表量化的數字，皆可被修飾為“約”。因此，除非有特別說明為相反者，數字參數為大約數值，且可根據本發明欲獲得的所需性質而改變。為了不限制本案申請專利範圍的均等範圍，每一數字參數應由明顯數字及習知方法所使用的數字所構成。

除非有特別說明，“至少”一詞在多個元件前，可了解其依序意指每一元件。熟知此技術的人士可辨認或確認慣例試驗中所使用者為本發明之特定實施例中的均等物。以下的申請專利範圍亦包含該述之均等物。

## 實施例

### 實施例 1 高輸出生物檢測系統的製造

生物檢測系統 1 的製造方法將於以下併第 1-4 圖詳細說明。首先，在該矽基材 10 上表面具有複數個光偵測器 210，以商業可購得的  $0.25\mu\text{m}$  半導體製程，形成一般具邏輯的光學裝置。光偵測器 210 為光二極體光子偵測器，每一光偵測器具有直徑  $24\mu\text{m}$ ，曝光區域  $452\mu\text{m}^2$ 。每一光偵測器彼此相鄰排列，因此光偵測器 210 的 512 欄與 512 列陣列形成於基材 10 上。

複數個控制線圈 215 形成於沒有光偵測器 210 的基材 10 的上表面。此實施例中，一控制線圈 215 對應至一光偵測器 210，並控制對應的光偵測器 210 及控制光偵測器 210 及偵測與記錄系統 2 間的聯繫。

此實施例中，濾光層 240 形成於光偵測器 210 與控制線圈 215 的上表面。在形成濾光層 240 前，對光偵測器 210 及控制線圈 215 的上表面進行全面平坦化製程。濾光層 240 包括複數個次層。此實施例中，濾光層 240 的形成，首先由具有較高反射係數的次層沈積於上述光偵測器 210 及控制線圈 215 的平坦化的上表面。然後，具有較低反射係數的次層沈積於已形成的具有較高反射係數的次層上。藉由連續沈積較高反射係數及較低反射係數的次層，直到大量

如上述的次層沈積後，形成濾光層 240。此實施例中，濾光層 240 包括 101 個次層。

第 5 圖為一總結濾光層 240 建構的實施例的表。第 5 圖中，較小編號的次層表示較接近濾光層 240 底面的次層，較大編號的次層表示較接近濾光層 240 上表面的次層。如第 5 圖所示，在此特定的實施例中，濾光層 240 的奇數號的次層由例如氧化鈮( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ )構成，具有較高的反射係數。偶數號的次層由例如氧化矽( $\text{SiO}_2$ )構成，具有較低的反射係數。這些次層可使用濺鍍系統形成，例如使用自由基輔助濺鍍系列 RAS1100 型 (Shincron Co., Ltd; Shinagawa-ku, Tokyo, JAPAN)。此實施例的每一次層厚度亦顯示於第 5 圖。所獲得的濾光層 240，對於螢光分子 Cy5 的螢光，濾光層 240 具有高透光性，對於自氬-氬雷射以約 633nm 波長發出的光，濾光層 240 具有低透光性，該氬-氬雷射可作為一外在光源激發螢光分子 Cy5。

關於第 2 及 4 圖，具有小孔 235 的遮光片 230 形成於濾光層 240 上。於濾光層 240 或基材 10 上形成具有小孔 235 的遮光片 230 的製造方法，將詳述於下。

首先，藉由例如在濾光層 240 上旋轉塗佈光阻材料，當濾光層 240 選擇性形成於光偵測器 210 及控制線路 215 的上表面時，在該濾光層 240 上形成一光阻層，或者當該濾光層未形成時，在光偵測器 210 及控制線路 215 的平坦化上表面上形成一光阻層。之後，使該光阻層顯影，在小孔區域形成一光阻圖案。該光阻圖案係使用光罩覆蓋該小孔區域而形成，並曝光該光阻層，因此只有光罩覆蓋的區

域保留在濾光層 240 或光偵測器 210 及控制線路 215 的平坦化上表面。

然後，將一金屬層沈積於濾光層 240 上形成光阻圖案處。此實施例中，該金屬層包含鉻(Cr)，藉由磁控濺鍍步驟，沈積於濾光層 240 或光偵測器 210 及控制線路 215 的平坦化上表面。

之後，移除在該小孔區域的部分金屬層及光阻圖案，形成具有小孔 235 的遮光片 230。

另一實施例中，遮光片 230 的形成由首先沈積一金屬層(如 Cr)於濾光層 240 上，然後在該金屬層上形成一罩幕，使該金屬層的部分上表面曝光。然後蝕刻該曝光的金屬層部分，直到露出濾光層 240，在該金屬層上形成小孔。然後，自該金屬層移除罩幕，在濾光層 240 上形成具有小孔 235 的遮光片 230。

如第 2 及 4 圖所示，此實施例中，鍵結位置 220 的形成係藉由將支持材料填充至小孔 235 或孔穴 450。該支持材料可為聚合物或無機材料，對於螢光分子 36 發出的螢光具有透光性。

雖然第 1 圖僅顯示 12 個光學偵測器 20，但是可了解至少 10,000 個光學偵測器 20 可形成於基材 10 上。此實施例中，例如每個光學偵測器 20 為具有半徑約  $5\mu\text{m}$  或以下的圓形，面積約  $100\mu\text{m}^2$ 。對於面積 1 平方英吋(即  $2.54 \times 2.54\text{cm}^2$ )的基材 10，可建構六百萬個以上的光學偵測器 20 於基材 10 上。由於同時操作六百萬個光學偵測器 20，可高輸出地偵測生物分子。

實施例 2 高輸出生物檢測系統中生物分子的附著及偵測

使用螢光染色 Cy5 標記的核酸，測試上述偵測系統。Cy5 及生物素分別固定於 60 元體(60-mer)寡核苷酸的 3'及 5'端。該標記與生物素化的 DNA 溶於 TrisMg (10mM Tris, 10 mM NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH8.0)緩衝液，沈積於該地址陣列上，於潮濕環境(wet chamber)中培養。約 30 分鐘後，以 Tris 緩衝液洗去未連接的 DNA。

激發光形成於遮光片上，由 635nm 發光二極體提供。為了讀取每一畫素的訊號，激發光存在約 1-5 秒，記錄每一畫素的訊號，重複此循環 100 回。然後計算每一畫素的代表平均訊號及標準差。比較 DNA 樣本沈積前後的訊號，具有平均訊號差大於 3 倍標準差的總合的畫素，視為正畫素，即(沈積後的平均值-沈積前的平均值) $>3 \times$ (沈積後的標準差+沈積前的標準差)。

### 實施例 3 聚合酶的連接量子點

以下為官能化量子點連接至聚合酶分子上的一級胺的兩種方法。第一種方法使用胺活化點，第二種方法使用羧基活化點。

#### 3.1 胺 EVITAG™ 對 DNA 聚合酶的共軛

胺 EVITAG™ (如 Evident Technologies, cat# E2-C11-AM2-0620; EVITAG™ 合適的 QD 產物亦以商標 eFluor™ 由 eBioscience, Inc., San Diego, CA 販賣)官能化的量子點(QD)，由 BS3(雙-(磺基琥珀醯亞胺基)辛二酸)、同質雙官能化的水溶性交聯劑活化，胺 EVITAG™ 官能化

的量子點(QD)在 8 碳的間隔臂(spacer arm)的每一端包括一胺反應性 N-羥基磺基琥珀醯亞胺(NHS)酯。NHS 酯與 QD 表面的一級胺在 pH7-9 反應，形成穩定的醯胺鍵，並釋放出 N-羥基磺基琥珀醯亞胺離去基。Taq DNA 聚合酶或 Phi29 DNA 聚合酶具有數個一級胺(例如賴胺酸(K)殘基與每一多胜肽的 N 端)為 NHS 酯交聯的目標。

### 3.1.1. 量子點的表面活性

以 25  $\mu$ L 10mM BS3(雙-(磺基琥珀醯亞胺基)辛二酸；Pierce, Part#21580)及 25  $\mu$ L 10x PBS(磷酸緩衝鹽溶液，pH7.4)，添加去離子水使終體積為 250  $\mu$ L，活化 2.0mmol 的 EVITAG<sup>TM</sup>。培養 30 分鐘後，使用 PD-10 柱(Amersham Biosciences, 產品編號 17-0851-01)使此溶液脫鹽，以 1x PBS 洗提。染色部分包含活化的 QD。

### 3.1.2. DNA 聚合酶的偶聯

於上述混合物中加入於 0.1M 碳酸鈉緩衝液的 100  $\mu$ g 的 DNA 聚合酶，pH9.2，使聚合酶偶聯。充分混合後，該樣本培養於 4°C 傾斜旋轉 2 小時。

### 3.1.3. QD-共軛的聚合酶的純化

將此連接物以 30K 微旋轉過濾器(Pall Corporation, Part#OD100C33) 6000rpm 離心 5-10 分鐘，濃縮至總體積 ~200  $\mu$ l。在 30K 微旋轉過濾器上以去離子水清洗該連接物兩次。

接著，以 Superdex 30/75 樹脂(GE Healthcare, part#17-0905-10 或 17-1044-10 對小蛋白及胜肽)體積排除，純化上述連接物。該柱先以去離子水進行預先平衡，

再添加濃縮的上述連接混合物，使其進入柱床。該樣本在黑光激發下以去離子水洗提，收集螢光部分。集合該螢光部分，並以 100K 微旋轉過濾器以 6,000rpm 離心 5-10 分鐘，濃縮至總體積為  $\sim 100 \mu\text{l}$ 。此純化及濃縮的連接物儲存於  $4^\circ\text{C}$ 。

### 3.2 羧基 EVITAG<sup>TM</sup> 對 DNA 聚合酶的共軛

羧基 EVITAG<sup>TM</sup> (如 Evident Technologies, cat# E2-C11-CB2-0620) 官能化的量子點(QD)，經由 EDC-媒介的磺基-NHS 酯連接反應活化。該胺反應的磺基-NHS 酯與例如 Taq DNA 聚合酶或 Phi29 DNA 聚合酶上的一級胺的側鏈賴胺酸(K)殘基反應。

#### 3.2.1. 量子點的表面活性

將 2.0nmol 的 EVITAG<sup>TM</sup> 稀釋於 25mM MES pH5.0 緩衝液中。使用前，將 EDC(1-乙基-3-[3-二甲基胺基丙基]碳化二亞胺鹽酸鹽；Pierce, part#22980) 溶於冷的 25mM MES pH5.0，使濃度為 50mg/ml。另外，同樣準備於 25mM MES pH5.0 中的磺基-NHS 酯(Pierce, part#24525) 溶液 50mg/ml。

接著，再將  $50 \mu\text{l}$  的 EDC 溶液及  $50 \mu\text{l}$  的磺基-NHS 溶液加入該 EVITAG<sup>TM</sup> 溶液中。將此混合物均勻混合，以慢傾斜旋轉室溫下培養 30 分鐘。然後使用 PD-10 柱 (Amersham Biosciences, 產品編號 17-0851-01) 去除該混合物的鹽，以 pH9.2 的 0.1M 碳酸鈉緩衝液洗提。收集含有活化 QD 的顏色部分。

#### 3.2.2. DNA 聚合酶偶聯

將 pH9.2 的 0.1M 碳酸鈉緩衝液中的  $100 \mu\text{g}$  的 DNA 聚

合酶加入上述混合物中。充分混合後，將此樣本以傾斜旋轉培養於 4°C 2 小時。

### 3.2.3. QD-結合的聚合酶之純化

以 30K 微旋轉過濾器 (Pall Corporation, part#OD100C33) 6,000rpm 離心 5-10 分鐘濃縮此連接物至 ~200  $\mu$ l 的總體積。在 30K 微旋轉過濾器上以去離子水清洗兩次。接著，使用 Superdex 30/75 樹脂體積排除，純化此連接物。

此柱以去離子水預先平衡。然後將濃縮的偶聯混合物加入該柱中，使其進入柱床。此柱在黑光激發下以去離子水洗提，收集螢光部分。集合螢光部分，以 100 K 微旋轉過濾器 6,000rpm 離心 5-10 分鐘濃縮至 ~100  $\mu$ l 的總體積。此純化及濃縮的結合物儲存於 4°C。

### 實施例 4：連接聚合酶至該裝置

以下說明使用 photoNHS(N-羥基琥珀醯亞胺羧酸酯分子連接至帶有碳鏈連接物的疊氮硝基苯 (azidonitrobenzene) 分子) 附加於一酵素 (例如聚合酶) 以連接至一裝置的兩種方法。

#### 4.1 UV 表面活化

使用一 photoNHS 附加於一聚合酶以連接於該裝置的胺修飾表面，經 UV 光活化。UV 光激發該疊氮硝基苯 (azidonitrobenzene) 部分，藉由去除氮分子，形成一高度反應的氮烯 (nitrene) 基。氮烯 (nitrene) 與該裝置的表面  $\text{NH}_2$  作用，形成聯胺鍵。該連接物的另一端為 NHS 羧酸酯，與該聚合酶上的賴胺酸殘基形成醯胺共價鍵。

#### 4.1.1. 表面製造

將 1mM 的 photoNHS(Sigma, Art No. A3407, 分子量 390.35)溶液準備於 95%乙醇中。胺修飾表面先以碳酸緩衝液(pH9.3)、然後 95%乙醇清洗。接著，將此 photoNHS 溶液塗鋪於該胺修飾表面。以 254-365nm UV 光照射該表面 3 分鐘，再以 95%乙醇潤濕三次。

#### 4.1.2. 胺的終止加蓋(end-cap)

準備 10mM N-乙醯氧基琥珀醯亞胺溶液於碳酸緩衝液(pH9.3)，並塗鋪於該表面，使任何未反應的胺終止加蓋(end-cap)。將此裝置以溫和搖晃培養於室溫 2 小時。接著以碳酸緩衝液及蒸餾去離子水清洗該表面 3 次。

#### 4.1.3. DNA 聚合酶的偶聯

接著，將碳酸緩衝液(pH9.3)中的 1mM DNA 聚合酶溶液塗鋪於上述表面，在持續溫和搖晃下室溫培養 2 小時。然後以碳酸緩衝液及 pH7.4 的 PBS(磷酸緩衝鹽溶液)清洗上述表面 3 次。此聚合酶鍵連的表面儲存於 4°C。

### 4.2 緩衝表面的活化

在另外的實施例中，photoNHS 可在緩衝環境下活化並結合至上述表面。然後在聚合酶存在下，使用 UV 光活化疊氮硝基苯(azidinitrobenzene)部分。同樣，在 UV 光下形成高反應性氮烯(nitrene)為電子缺少基，容易與聚合酶表面的一級胺作用，形成一共價鍵連接於上述表面。

#### 4.2.1. 表面的準備

1mM 的 photoNHS(Sigma, Art No. A3407, 分子量 390.35)溶液準備於碳酸緩衝液(pH9.3)中。以碳酸緩衝液(pH9.3)潤濕胺修飾表面。將此 photoNHS 溶液塗於該胺修

飾表面，在持續溫和搖晃下培養 2 小時。然後以碳酸緩衝液潤濕該表面 3 次。

#### 4.2.2. 胺的終止加蓋(end-cap)

準備 10mM N-乙醯氧基琥珀醯亞胺溶液於碳酸緩衝液(pH9.3)，並塗鋪於該表面，使任何未反應的胺基終止加蓋(end-cap)。將此裝置以溫和搖晃培養於室溫 2 小時。接著以 PBS 緩衝液(pH7.4)潤濕 3 次。

#### 4.2.3. DNA 聚合酶的偶聯

接著，將 PBS 緩衝液(pH7.4)中的 1mM DNA 聚合酶溶液塗鋪於上述終止加蓋(end-cap)表面。以 254-365nm UV 光照射該表面 3 分鐘，然後以 PBS(pH7.4)清洗上述表面 3 次。此聚合酶鍵連的表面儲存於 4°C。

#### 實施例 5：鹼基延伸定序模式

如上說明，有兩種通用方法辨識在逐步延伸中加入的核苷酸：逐次加入四種相同標記的核苷酸；或者同時加入四種不同標記的核苷酸。每一種模式皆說明如下。

#### 5.1 逐次加入四種具有相同標記的核苷酸

##### 5.1.1 腺嘌呤(A)分子的延伸

將保護與標記的腺苷與適當的聚合酶加入定序的反應緩衝液溶液中(例如 40mM Tris-HCl pH9、1mM MgCl<sub>2</sub>)。只有當欲偵測的核酸中相鄰於端連接引子 5'端的核苷酸為胸腺嘧啶(T)時，腺嘌呤加在定序引子的 3'端上。如果最接近引子 3'端的核苷酸為鳥糞嘌呤(G)、胞嘧啶(C)、或腺嘌呤(A)時，則將不會再進行延伸。

##### 5.1.2. 延伸反應清除步驟

在延伸反應完成後，以 5X SSC 及 0.1% SDS 清洗陣列晶片一次，5X SSC 清洗一次，移除腺嘌呤及未反應溶液。

### 5.1.3. 螢光偵測及記錄

讀取鍵結位置的螢光訊號，確認腺嘌呤是否進行延伸，腺嘌呤延伸表示偵測的核酸中有對應的胸腺嘧啶。

### 5.1.4. 移除保護基及螢光基

偵測後，以化學或酵素切斷，移除保護基及螢光基。

### 5.1.5. 清除步驟

以 5X SSC 及 0.1% SDS 清洗陣列晶片一次，5X SSC 清洗一次，移除切斷的保護基及標記基。

### 5.1.6. 校讀及記錄

確定該保護及螢光基自先前的延伸步驟中成功清除。如果有殘留的保護及螢光基，該偵測及記錄系統 2 中的偵測及分析軟體將記錄其位置。該定序反應的記錄只有在之後的清除步驟中辨識保護及螢光基已移除後進行。

5.1.7. 重複 5.1.1-5.1.6，但是使用鳥糞嘌呤進行延伸反應。

5.1.8. 重複 5.1.1-5.1.6，但是使用胞嘧啶進行延伸反應。

5.1.9. 重複 5.1.1-5.1.6，但是使用胸腺嘧啶進行延伸反應。

5.1.10. 使用 A、G、C、T 為一循環進行一回四次的延伸反應。藉由重複此反應，逐次辨識核酸的序列。

## 5.2 同時加入四種不同標記的核苷酸

### 5.2.1. 鹼基延伸反應

將四種阻斷的且可區別的標記 DNA 核苷酸(A、G、C、T)及核酸聚合酶加到陣列的定序緩衝液中。此延伸反應可只在定序引子的 3'端進行。互補於定序的核酸上核苷酸的核苷酸最接近連接引子 5'端，被加到定序引子的 3'端，如第 6 圖所示。

#### 5.2.2. 延伸反應清除步驟

在延伸反應完成後，以 5X SSC 及 0.1% SDS 清洗陣列晶片一次，5X SSC 清洗一次，移除反應溶液中殘餘的材料。

#### 5.2.3. 螢光偵測及記錄

偵測每一鍵結位置上的每一可區分的螢光分子，辨識加入的核酸。

#### 5.2.4. 移除保護基及螢光基

偵測後，以化學或酵素切斷，移除保護及螢光基。

#### 5.2.5. 清除步驟

以 5X SSC 及 0.1% SDS 清洗陣列晶片一次，5X SSC 清洗一次，移除切斷的保護及螢光基。

#### 5.2.6. 校讀及記錄

確認該保護基及螢光基自先前的延伸步驟中成功清除。如果有殘留的保護基及螢光基，該偵測及記錄系統 2 中的偵測及分析軟體將記錄其位置。該定序反應的記錄只有在之後的清除步驟中確認保護及螢光基已移除後進行。

5.2.7. 重複 5.2.1-5.2.6。重複反應循環，確認核酸的序列。

實施例 6：已知核酸的定序

一化學合成的 60 元體(60-mer)寡核苷酸，具有已知序

列：生物素-5'-tcag tcag tcag tcag tcag tcag tcag tcag tcag tcag tcag tc ACACGGAGGTTCTA-3'，作為定序模版。將該定序模版連接於 14 元體(14mer)寡核苷酸定序引子(5'-TAGAACCTCCGTGT-3')。該模版的 5'端經修飾包含一生物素分子。該模版分子固定於含有卵白素(streptavidin)的反應物表面。此定序反應使用 DNA 聚合物在 1X 定序緩衝液及 15mM DTT 中，進行鹼基延伸反應。每一延伸反應步驟只加入一種具有次級延伸保護(阻斷)及螢光標記(例如 Cy5)的核苷酸。如果相鄰於定序引子 3'端的 DNA 模版核苷酸，互補於該加上去的核苷酸，之後再加上螢光標記的鹼基。洗去未反應的鹼基材料後，偵測該螢光訊號。如果加入的鹼基沒有互補，則不會偵測到螢光訊號。偵測後，化學移除保護的螢光基，使用含鹽溶液(例如 5X SSC；0.1% SDS)再次清洗該陣列，再偵測一次以確認螢光標記已移除。移除及清洗步驟之後，沒有偵測到螢光訊號的位置被認為是螢光標籤已移除。在之後的反應循環中所得到的螢光訊號，認為是之後延伸定序的訊號。移除清洗後，仍偵測到螢光訊號的位置，該位置以軟體記錄為具有未完全清除的反應。該位置產生的訊號可持續被記錄，直到在下一循環中確認該移除步驟。此方法為逐次加入四種反應鹼基材料，並循環地進行反應。因此，可辨識該模版的序列。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此項技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可做些許更動與潤飾，因此本發明之保護範圍當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示本發明之生物檢測系統的上視圖，包括一光學偵測器陣列。

第 2 圖顯示本發明之一實施例的一光學偵測器，為第 1 圖的 AA 線下的剖面圖。

第 3 圖顯示本發明之光學偵測器的尺寸詳細說明之剖面圖。

第 4 圖顯示本發明之一實施例的一光學偵測器，為第 1 圖的 AA 線下的剖面圖。

第 5 圖顯示本發明之一實施例的濾光層構成表。

第 6 圖顯示本發明之裝置的鍵結位置上連接核酸的情形。

第 7 圖顯示在以阻斷與標記核苷酸進行一循環的鹼基延伸後，該裝置的鍵結位置上連接核酸的情形。

第 8 圖顯示如第 7 圖的鹼基延伸定序反應之另一實施例。

第 9 圖顯示以鹼基延伸定序並行定序數個核酸的一次循環。

### 【主要元件符號說明】

1~生物檢測系統	235~小孔
2~偵測與記錄系統	240~濾光層
10~基材	250~微透鏡
20~光學偵測器	344~端引子
30~單一生物分子	346~定序引子

- 32~核酸
- 34~端連接引子
- 36~螢光分子
- 36A~第一位置
- 36B~第二位置
- 38~聚合酶
- 40~激發光源
- 210~光偵測器
- 215~控制回路
- 220~鍵結位置
- 230~遮光片
- 362~核苷酸
- 364~螢光保護基
- 384~工具
- 410~半導體層
- 415~金屬接點
- 420~發光層
- 430~半導體層
- 435~金屬接點
- 440~電源
- 450~孔穴

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97140610

C12Q 1/68

(2006.01)

※申請日：97.10.23

※IPC 分類：

G01N 33/533 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

辨識單一生物分子的裝置、其製造方法、包含其光學偵測系統、及生物分子的偵測方法 /Apparatus for identifying a single biomolecule, method for fabricating thereof, optical detection apparatus containing thereof, and method for detecting biomolecules

## 二、中文發明摘要：

本發明揭露一種生物檢測系統，包括複數個光學偵測器，該光學偵測器各包括一具有光偵測器的基材，以及於該光偵測器上形成一鍵結位置，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於上述鍵結位置。上述鍵結位置位於上述光偵測器附近，與上述光偵測器的間隔為小於或等於  $100 \mu\text{m}$ 。上述光偵測器收集上述生物分子在接收訊號角度為  $0.8 \text{ SI}$  球面度(steridian)或以上發射的光。上述光學偵測器可更包括一激發光源，形成於上述基材上，提供一光源激發附著於上述生物分子的螢光分子。

## 三、英文發明摘要：

A bioassay system is disclosed. The bioassay system may include a plurality of optical detection apparatuses, each

of which includes a substrate having a light detector, and a linker site formed over the light detector, the linker site being treated to affix the biomolecule to the linker site. The linker site is proximate to the light detector and is spaced apart from the light detector by a distance of less than or equal to 100 micrometers. The light detector collects light emitted from the biomolecule within a solid angle of greater than or equal to 0.8 SI steradian. The optical detection apparatus may further include an excitation light source formed over the substrate so as to provide a light source for exciting a fluorophore attached to the biomolecule.

七、申請專利範圍：

1. 一種辨識單一生物分子的裝置，包括：

一具有光偵測器的基材；及

一鍵結位置，形成於上述光偵測器上，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於該鍵結位置；

其中該鍵結位置位於上述光偵測器附近，且與上述光偵測器隔開，該鍵結位置與該光偵測器的距離為小於或等於  $100\ \mu\text{m}$ 。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一遮光片，形成於上述基材上，該遮光片包括一具有直徑的小孔，其中上述鍵結位置形成於該小孔附近。

3. 如申請專利範圍第 2 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述小孔之直徑為小於或等於  $1,000\text{nm}$ 。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述小孔之直徑為小於或等於  $200\text{nm}$ 。

5. 如申請專利範圍第 2 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一濾光層，形成於上述基材及上述遮光片之間。

6. 如申請專利範圍第 2 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一微透鏡，形成於上述基材及上述遮光片之間。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中該距離為小於或等於  $25\ \mu\text{m}$ 。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之辨識單一生物分子的

裝置，其中該距離為小於或等於  $6\ \mu\text{m}$ 。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中該光偵測器收集接收訊號角度(solid angle)內該生物分子發出的光，該接收訊號角度為大於或等於  $0.8\ \text{SI}$  球面度(steradian)。

10. 一種辨識單一生物分子的裝置，包括：

一具有光偵測器的基材；及

一鍵結位置，形成於上述光偵測器上，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於該鍵結位置；以及

一激發光源，形成於上述基材上；

其中該鍵結位置位於上述光偵測器附近，且與上述光偵測器隔開，該鍵結位置與該光偵測器的距離為小於或等於  $100\ \mu\text{m}$ 。

11. 如申請專利範圍第 10 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述激發光源包括一發光層，該發光層沿著平行於上述光偵測器表面的水平方向，向上述鍵結位置發出激發光。

12. 如申請專利範圍第 11 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一濾光層，形成於上述基材與上述發光層之間。

13. 如申請專利範圍第 10 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述激發光源係選自發光二極體(LED)、有機發光二極體(OLED)、聚合物發光二極體(PLED)、及雷射二極體(LD)。

14. 如申請專利範圍第 10 項所述之辨識單一生物分子

的裝置，其中上述激發光源提供第一波長範圍的激發光，上述生物分子發出第二波長範圍的光，該第一波長範圍與該第二波長範圍不重疊。

15. 如申請專利範圍第 10 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中該距離為小於或等於  $25\ \mu\text{m}$ 。

16. 如申請專利範圍第 10 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中該距離為小於或等於  $6\ \mu\text{m}$ 。

17. 如申請專利範圍第 10 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中該光偵測器收集接受訊號角度(solid angle)內該生物分子發出的光，該接受訊號角度為大於或等於 0.8 SI 球面度(steradian)。

18. 一種辨識單一生物分子的裝置，包括：

一具有光偵測器的基材；及

一鍵結位置，形成於上述光偵測器上，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於該鍵結位置；

其中該光偵測器收集接受訊號角度(solid angle)內該生物分子發出的光，該接受訊號角度為大於或等於 0.8 SI 球面度(steradian)。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一遮光片，形成於上述基材上，該遮光片包括一具有直徑的小孔，其中上述鍵結位置形成於該小孔附近。

20. 如申請專利範圍第 18 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述小孔之直徑為小於或等於  $1,000\text{nm}$ 。

21. 如申請專利範圍第 18 項所述之辨識單一生物分子

的裝置，其中上述小孔之直徑為小於或等於 200nm。

22. 如申請專利範圍第 19 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一濾光層，形成於上述基材及上述遮光片之間。

23. 如申請專利範圍第 19 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一微透鏡，形成於上述基材及上述遮光片之間。

24. 一種辨識單一生物分子的裝置，包括：

一具有光偵測器的基材；及

一鍵結位置，形成於上述光偵測器上，該鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於該鍵結位置；以及

一激發光源，形成於上述基材上；

其中該光偵測器收集接受訊號角度(solid angle)內該生物分子發出的光，該接受訊號角度為大於或等於 0.8 SI 球面度(steradian)。

25. 如申請專利範圍第 24 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述激發光源包括一發光層，形成於上述基材上，該發光層沿著平行於上述光偵測器表面的水平方向，向上述鍵結位置發出激發光。

26. 如申請專利範圍第 25 項所述之辨識單一生物分子的裝置，更包括一濾光層，形成於上述基材與上述發光層之間。

27. 如申請專利範圍第 24 項所述之辨識單一生物分子的裝置，其中上述激發光源係選自發光二極體(LED)、有機發光二極體(OLED)、聚合物發光二極體(PLED)、及雷射二

極體(LD)。

28. 一種光學偵測系統，包括：至少 10,000 個如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之辨識單一生物分子的裝置。

29. 一種光學偵測系統，包括：至少 250,000 個如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之辨識單一生物分子的裝置。

30. 一種光學偵測系統，包括：至少 2,000,000 個如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之辨識單一生物分子的裝置。

31. 一種光學偵測系統，包括：至少 10,000,000 個如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之辨識單一生物分子的裝置。

32. 一種核酸的定序方法，包括：

將一核酸分子固定於如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之裝置的鍵結位置上；以及

對上述裝置上的核酸分子進行核酸定序。

33. 如申請專利範圍第 32 項所述之核酸的定序方法，其中上述核酸藉由連接於一固定於上述鍵結位置的聚合酶，固定於上述鍵結位置。

34. 如申請專利範圍第 32 項所述之核酸的定序方法，其中上述核酸定序包括於上述裝置中加入標記的核苷酸。

35. 如申請專利範圍第 34 項所述之核酸的定序方法，其中上述核苷酸為螢光標記。

36. 如申請專利範圍第 35 項所述之核酸的定序方法，

其中上述核苷酸螢光標記在其末端磷酸上。

37. 如申請專利範圍第 32 項所述之核酸的定序方法，其中上述核酸定序為鹼基延伸定序，包括於上述裝置中加入具有保護基及標記的核苷酸之步驟。

38. 如申請專利範圍第 37 項所述之核酸的定序方法，其中上述核苷酸為螢光標記。

39. 如申請專利範圍第 38 項所述之核酸的定序方法，其中上述核苷酸具有相同的螢光標記，且逐次加入。

40. 如申請專利範圍第 38 項所述之核酸的定序方法，其中上述核苷酸具有各自不同螢光標記，且同時加入。

41. 如申請專利範圍第 32 項所述之核酸的定序方法，其中上述核酸定序為連接酶為主的定序。

42. 如申請專利範圍第 32 項所述之核酸的定序方法，其中上述核酸在核酸定序前於鍵結位置上被放大。

43. 如申請專利範圍第 32 項所述之核酸的定序方法，其中上述核酸序列係未知。

44. 一種複數個核酸分子的定序方法，包括：

使複數個核酸分子固定於如申請專利範圍第 28、29、30 或 31 項所述之光學偵測系統的鍵結位置上；以及

在上述光學偵測系統上並行進行上述核酸分子的核酸定序。

45. 一種生物分子的偵測方法，包括：

使一個或以上的生物分子固定於如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之光學偵測器的鍵結位置上；以及

在上述裝置上偵測該生物分子。

46. 如申請專利範圍第 45 項所述之生物分子的偵測方法，其中該生物分子包括一標記。

47. 如申請專利範圍第 46 項所述之生物分子的偵測方法，其中該標記為螢光。

48. 如申請專利範圍第 47 項所述之生物分子的偵測方法，其中該生物分子包括一部分選自多胜肽、抗體、脂質、維生素、低分子量有機分子、及多醣。

49. 如申請專利範圍第 48 項所述之生物分子的偵測方法，其中該生物分子藉由一連接分子固定於上述裝置的鍵結位置。

50. 如申請專利範圍第 49 項所述之生物分子的偵測方法，其中該連接分子包括一捕捉分子。

51. 如申請專利範圍第 50 項所述之生物分子的偵測方法，其中該捕捉分子為一蛋白質。

52. 如申請專利範圍第 50 項所述之生物分子的偵測方法，其中該捕捉分子為一抗體。

53. 如申請專利範圍第 50 項所述之生物分子的偵測方法，其中該連接分子包括一核酸標籤。

54. 如申請專利範圍第 53 項所述之生物分子的偵測方法，更包括一偵測在上述裝置上的連接分子之上述核酸標籤的步驟。

55. 如申請專利範圍第 54 項所述之生物分子的偵測方法，其中上述核酸標籤由核酸定序所偵測。

56. 如申請專利範圍第 54 項所述之生物分子的偵測方法，其中上述核酸標籤由雜交於核酸探針所偵測。

57. 如申請專利範圍第 56 項所述之生物分子的偵測方法，其中上述核酸探針為螢光標記。

58. 如申請專利範圍第 32-45 或 55 項中任一項所述之生物分子的偵測方法，其中上述核酸係以福斯特共振能量轉移(Föster resonance energy transfer; FRET)激發之標記偵測上述核酸。

59. 如申請專利範圍第 32-45 或 55 項中任一項所述之生物分子的偵測方法，其中上述核酸係以時間分辨螢光技術(time-resolved fluorescence technology)之標記偵測上述核酸。

60. 一種複數個生物分子的偵測方法，包括：

將複數個生物分子固定於如申請專利範圍第 28、29、30、或 31 項所述之光學偵測系統的鍵結位置；以及  
並行偵測在上述光學偵測系統上的生物分子。

61. 一種辨識單一生物分子的裝置之製造方法，包括：

於一基材上形成一光偵測器及一控制線路；  
於上述基材上形成一具有小孔的遮光片；以及  
於上述光偵測器上形成一鍵結位置，且該鍵結位置接近上述小孔，

上述鍵結位置經處理後使上述生物分子固定於上述鍵結位置，

其中上述鍵結位置接近上述光偵測器，且與上述光偵測器隔開，且上述鍵結位置與上述光偵測器的間隔距離為小於或等於  $100 \mu\text{m}$ 。

62. 如申請專利範圍第 61 項所述之辨識單一生物分子

的裝置之製造方法，更包括形成一濾光層於上述基材與上述遮光片之間。

63. 如申請專利範圍第 62 項所述之辨識單一生物分子的裝置之製造方法，其中形成上述遮光片包括：

於上述濾光層上形成一不透明層；

於上述不透明層上形成一光阻層；

圖案化上述光阻層，使部分上述不透明層露出；

使用上述圖案化光阻層作為罩幕，蝕刻上述不透明層，直到上述濾光層露出；以及

移除上述光阻層。

64. 如申請專利範圍第 63 項所述之辨識單一生物分子的裝置之製造方法，其中上述不透明層包括金屬。

65. 一種提供生物分子分析服務的方法，包括：

提供一服務提供者一樣本，該樣本包含一來自服務需求者的生物分子；

上述服務需求者獲得來自上述服務提供者的分析結果，

其中，上述結果係得自如申請專利範圍第 1-27 項中任一項所述之辨識單一生物分子的裝置。

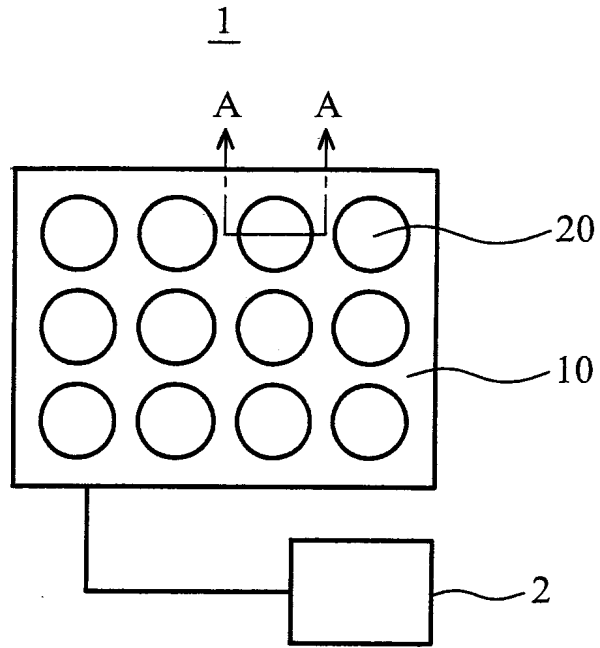
66. 如申請專利範圍第 65 項所述之提供生物分子分析服務的方法，係有報酬考量。

67. 如申請專利範圍第 66 項所述之提供生物分子分析服務的方法，其中上述服務需求者與上述服務提供者由賣主媒介。

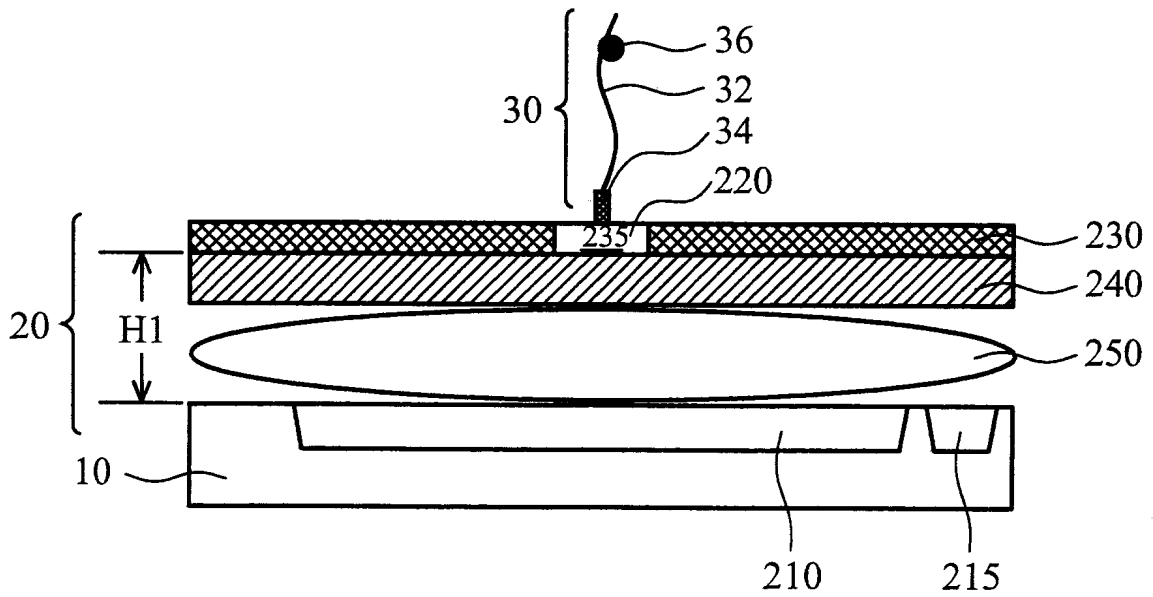
68. 如申請專利範圍第 65 項所述之提供生物分子分析

服務的方法，其中上述分析結果在其他國家產生。

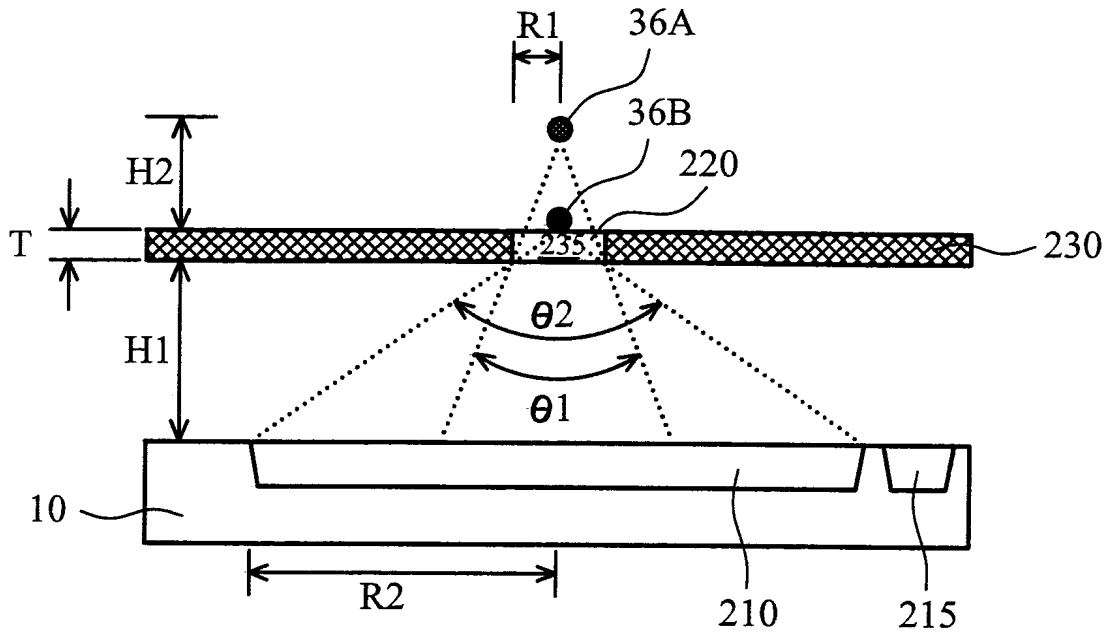
69. 如申請專利範圍第 65 項所述之提供生物分子分析服務的方法，其中上述分析結果在美國以外的其他國家產生。



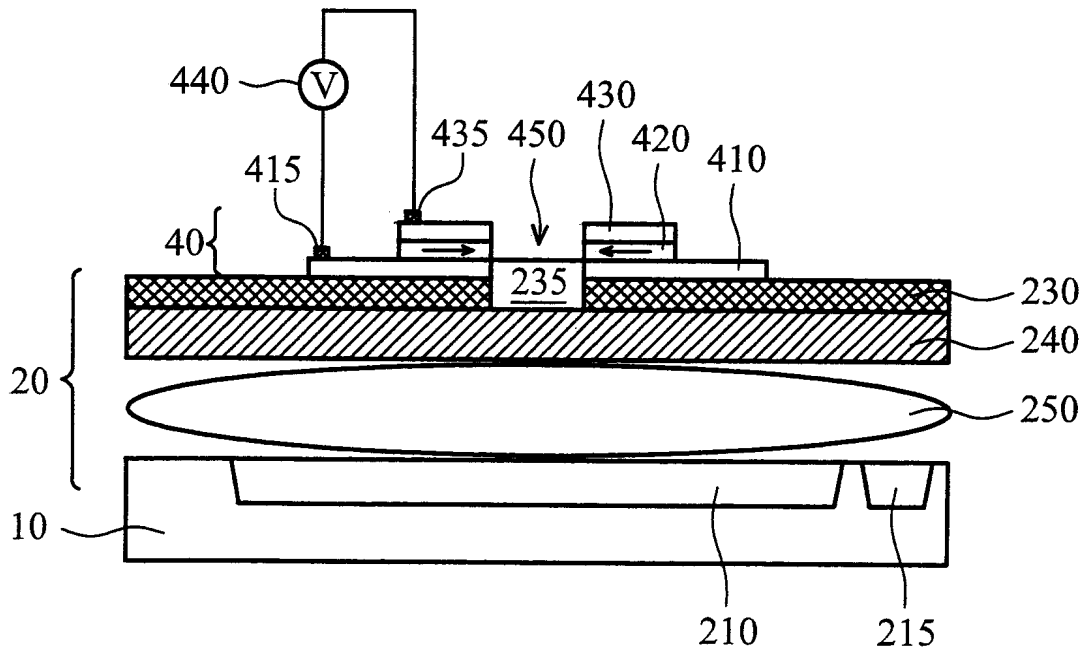
第 1 圖



第 2 圖



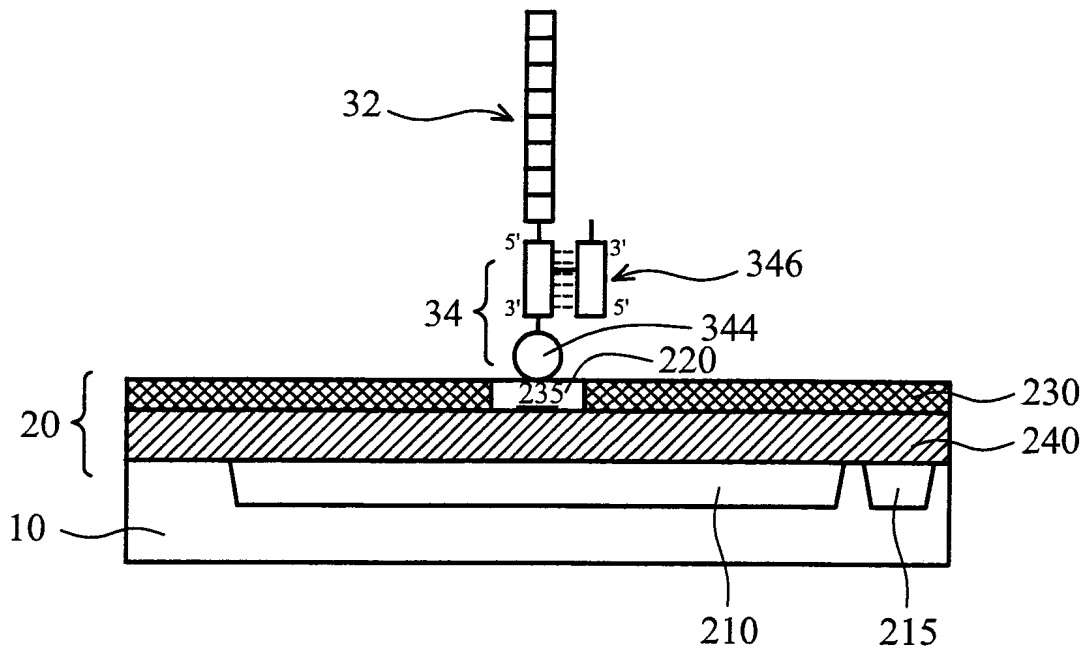
第 3 圖



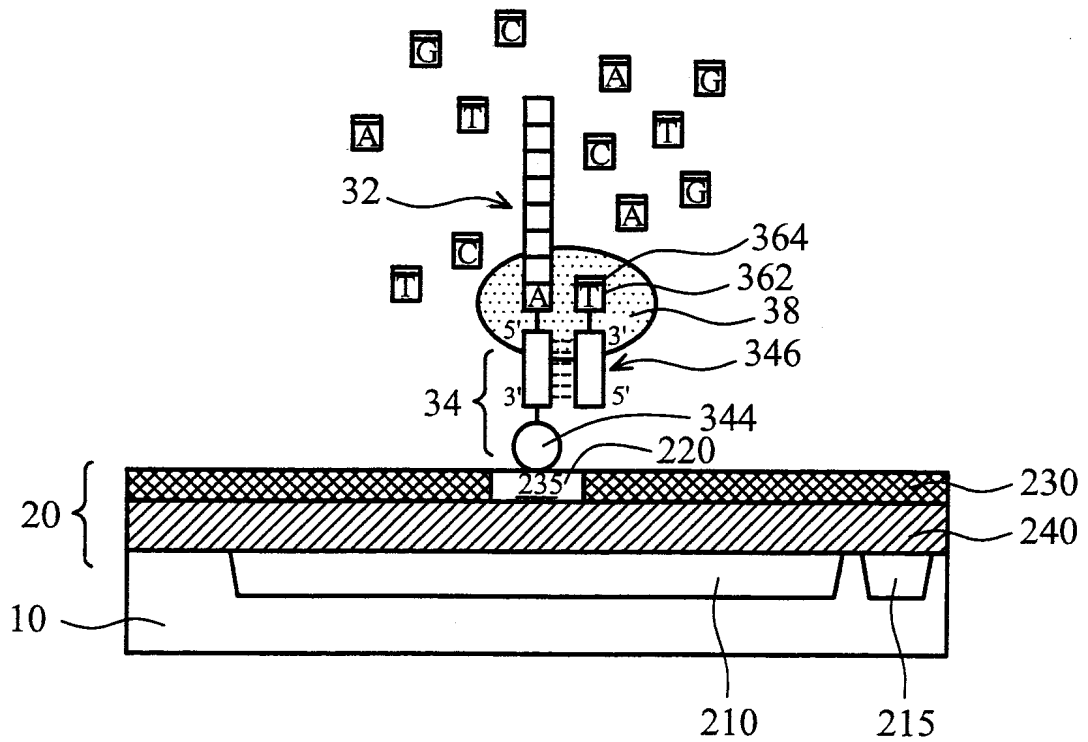
第 4 圖

層#	材料	厚度 (nm)	層#	材料	厚度 (nm)
1	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	20.56	51	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	63.08
2	SiO <sub>2</sub>	108.04	52	SiO <sub>2</sub>	93.75
3	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	48.03	53	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	63.66
4	SiO <sub>2</sub>	92.18	54	SiO <sub>2</sub>	89.79
5	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	61.85	55	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	58.99
6	SiO <sub>2</sub>	89.03	56	SiO <sub>2</sub>	93.83
7	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	61.52	57	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	58.88
8	SiO <sub>2</sub>	91.91	58	SiO <sub>2</sub>	91.3
9	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	63.12	59	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	58.66
10	SiO <sub>2</sub>	97	60	SiO <sub>2</sub>	90.59
11	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	57	61	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	58.58
12	SiO <sub>2</sub>	102.89	62	SiO <sub>2</sub>	92.95
13	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	59.97	63	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.41
14	SiO <sub>2</sub>	98.2	64	SiO <sub>2</sub>	90.76
15	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	62.48	65	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0.459
16	SiO <sub>2</sub>	87.65	66	SiO <sub>2</sub>	4.236
17	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65.9	67	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2.649
18	SiO <sub>2</sub>	101.19	68	SiO <sub>2</sub>	2.885
19	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	58.79	69	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9.579
20	SiO <sub>2</sub>	95.53	70	SiO <sub>2</sub>	5.276
21	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	64.05	71	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6.519
22	SiO <sub>2</sub>	93.45	72	SiO <sub>2</sub>	0.965
23	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	62.36	73	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9.861
24	SiO <sub>2</sub>	97.28	74	SiO <sub>2</sub>	02.27
25	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	62.53	75	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.21
26	SiO <sub>2</sub>	86.22	76	SiO <sub>2</sub>	96.68
27	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	57.06	77	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	62.96
28	SiO <sub>2</sub>	111.55	78	SiO <sub>2</sub>	94.71
29	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	41.78	79	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.58
30	SiO <sub>2</sub>	40.22	80	SiO <sub>2</sub>	95.43
31	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	109.42	81	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	64.27
32	SiO <sub>2</sub>	14.85	82	SiO <sub>2</sub>	100.1
33	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	49.18	83	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.13
34	SiO <sub>2</sub>	118.53	84	SiO <sub>2</sub>	90.33
35	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	44.43	85	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	66.04
36	SiO <sub>2</sub>	87.33	86	SiO <sub>2</sub>	97.31
37	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	61.55	87	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.99
38	SiO <sub>2</sub>	109.86	88	SiO <sub>2</sub>	90.95
39	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.33	89	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	62.41
40	SiO <sub>2</sub>	86.57	90	SiO <sub>2</sub>	100.72
41	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	62.75	91	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	65.12
42	SiO <sub>2</sub>	104.16	92	SiO <sub>2</sub>	86.45
43	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	61.44	93	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	59.12
44	SiO <sub>2</sub>	94.26	94	SiO <sub>2</sub>	99.52
45	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.92	95	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	66.74
46	SiO <sub>2</sub>	95.65	96	SiO <sub>2</sub>	86.2
47	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	61.81	97	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	53.98
48	SiO <sub>2</sub>	98.2	98	SiO <sub>2</sub>	96.6
49	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60.24	99	NB <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	67.27
50	SiO <sub>2</sub>	92.2	100	SiO <sub>2</sub>	107.09
			101		20.2

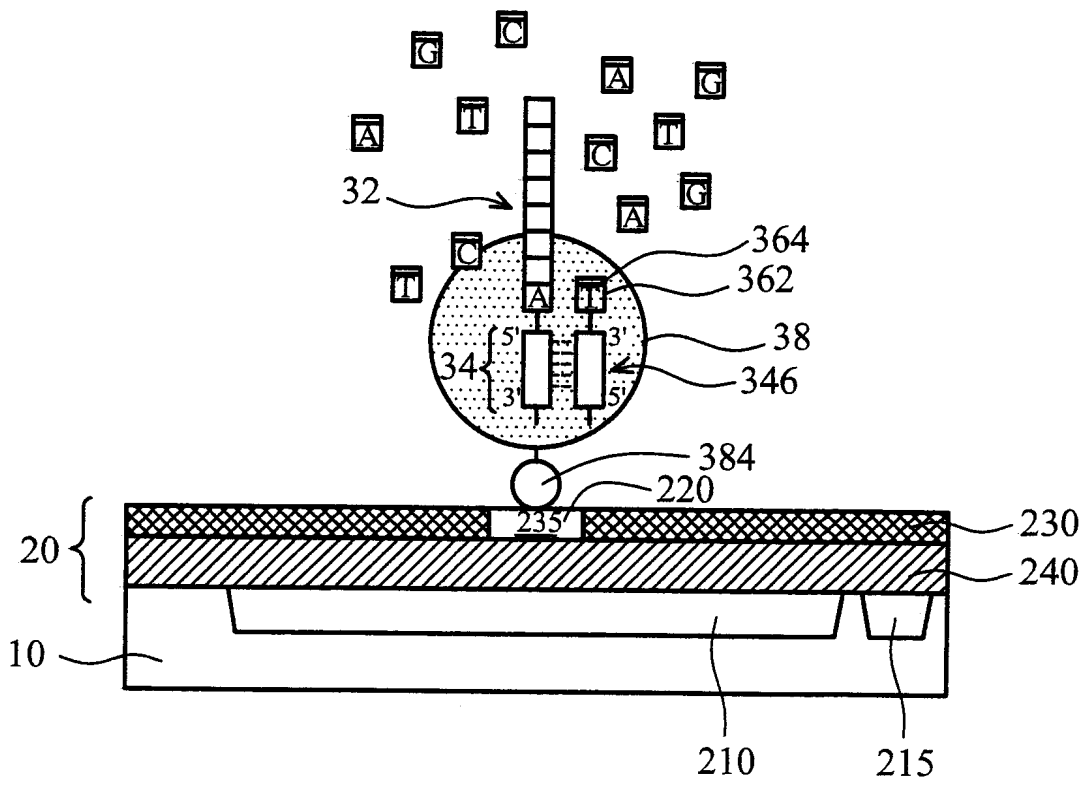
第 5 圖



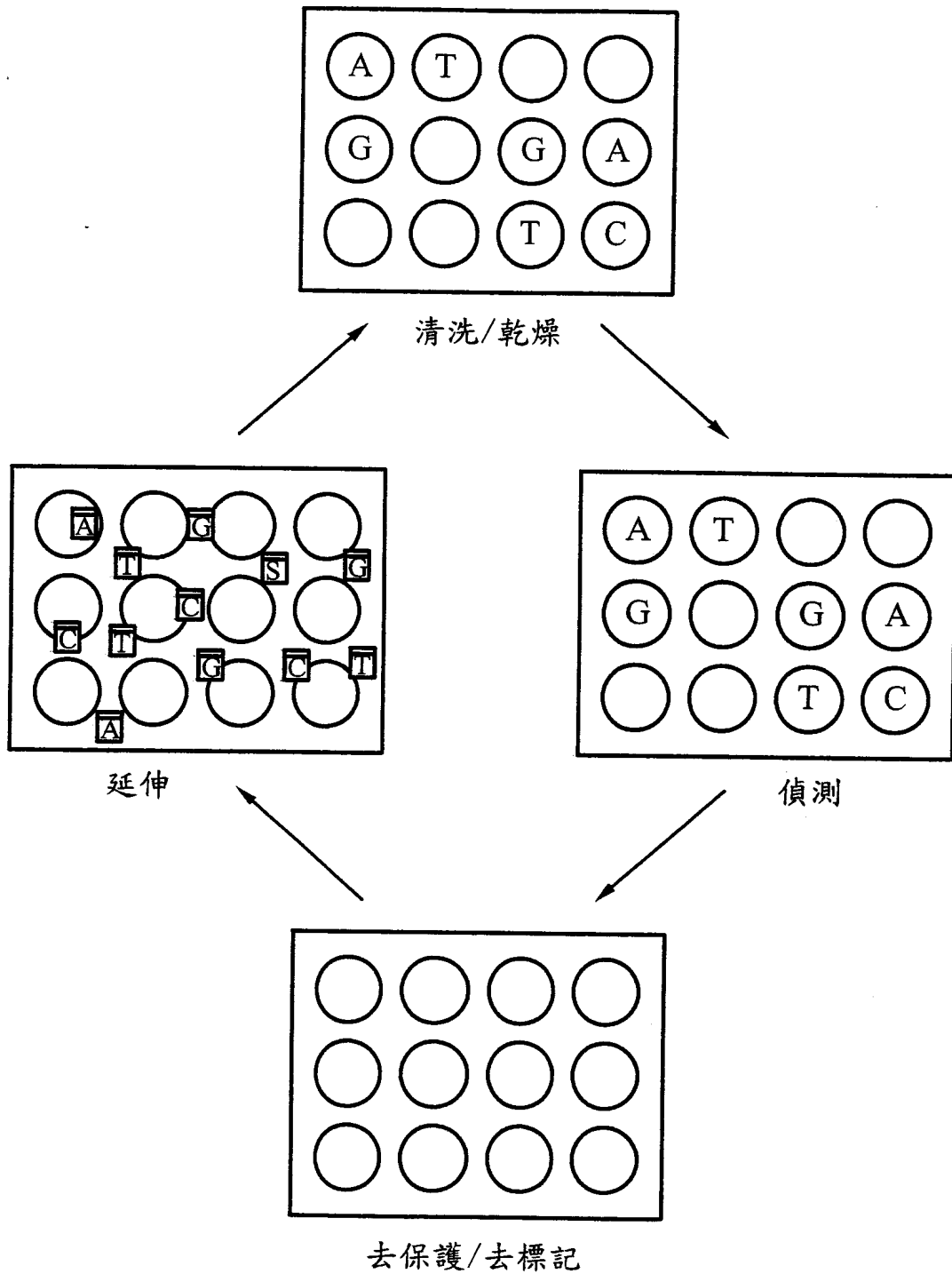
第 6 圖



第 7 圖



第 8 圖



第 9 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

1~生物檢測系統

2~偵測與記錄系統

10~基材

20~光學偵測器

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。