



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201606285 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 02 月 16 日

(21)申請案號：103127583

(22)申請日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 12 日

(51)Int. Cl.：

G01N21/64 (2006.01)

G01N33/50 (2006.01)

(71)申請人：國立交通大學(中華民國) NATIONAL CHIAO TUNG UNIVERSITY (TW)

新竹市大學路 1001 號

(72)發明人：陳怡君 CHEN, YI CHUN (TW)

(74)代理人：林火泉

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：6 項 圖式數：7 共 24 頁

(54)名稱

生化反應之即時量測方法

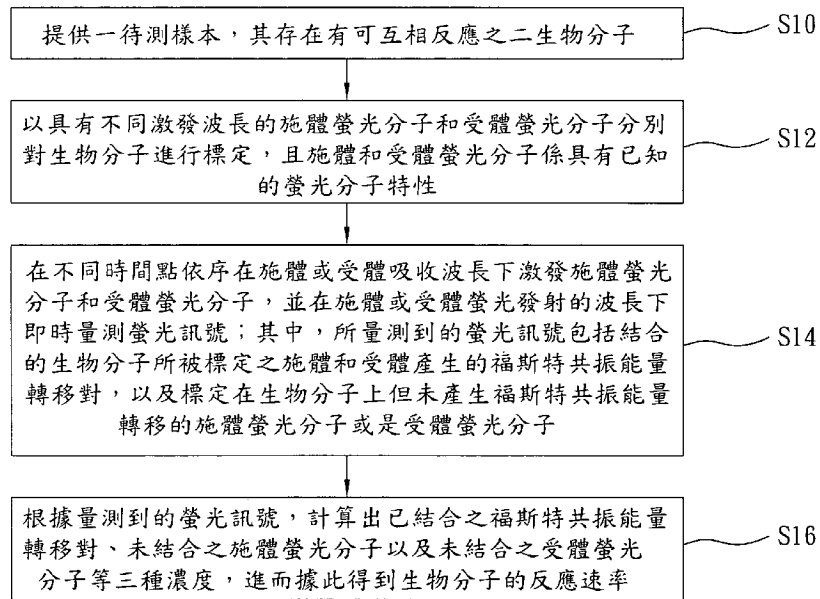
METHOD FOR MEASURING REAL-TIME KINETICS OF CHEMICAL REACTIONS

(57)摘要

本發明係揭露一種生化反應之即時量測方法，其係在互相吸引的生物分子間利用福斯特共振能量轉移對(FRET pair)的施體螢光分子與受體螢光分子來分別進行標定，當生物分子間互相產生反應時，此標定的施體螢光分子與受體螢光分子會產生福斯特共振能量轉移(FRET)訊號。這些量測到的 FRET 訊號以及非 FRET 訊號之螢光強度係用來計算已結合 FRET 對、未結合施體螢光分子及未結合受體螢光分子等的濃度，然後自這些濃度的計算結果獲得化學反應速率。本發明可以應用於任何量測螢光的設備上，且不受限於樣本態樣，並可達到快速、即時且連續性的量測。

The present invention discloses a method for measuring real-time kinetics of chemical reactions. The biomolecules of interest should be labeled by the donor and acceptor fluorophores of a Förster resonance energy transfer (FRET) pair. When the biomolecules interact with each other, the donor and acceptor would give FRET signals. The fluorescence intensity signals of FRET and non-FRET are measured to calculate the concentrations of bounded FRET pair, dissociated donor alone molecule, and dissociated acceptor alone molecule. Then, chemical equilibrium constant can be achieved from calculated results of the concentrations. The present invention can be integrated into any instrument setup that can detect fluorescence intensity, and applied for both in vitro and in vivo samples to achieve fast, real-time and continuous measurements.

指定代表圖：



第 2 圖

## 發明摘要

※ 申請案號： 103127583

G01N 21/64 (2006.01)

※ 申請日： 103. 8. 12

※IPC 分類：

G01N 33/50 (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

生化反應之即時量測方法/Method for Measuring Real-Time Kinetics of Chemical Reactions

## 【中文】

本發明係揭露一種生化反應之即時量測方法，其係在互相吸引的生物分子間利用福斯特共振能量轉移對（FRET pair）的施體螢光分子與受體螢光分子來分別進行標定，當生物分子間互相產生反應時，此標定的施體螢光分子與受體螢光分子會產生福斯特共振能量轉移（FRET）訊號。這些量測到的FRET訊號以及非FRET訊號之螢光強度係用來計算已結合FRET對、未結合施體螢光分子及未結合受體螢光分子等的濃度，然後自這些濃度的計算結果獲得化學反應速率。本發明可以應用於任何量測螢光的設備上，且不受限於樣本態樣，並可達到快速、即時且連續性的量測。

## 【英文】

The present invention discloses a method for measuring real-time kinetics of chemical reactions. The biomolecules of interest should be labeled by the donor and acceptor fluorophores of a Förster resonance energy transfer (FRET) pair. When the biomolecules interact with each other, the donor and acceptor would give FRET signals. The fluorescence intensity signals of FRET and

non-FRET are measured to calculate the concentrations of bounded FRET pair, dissociated donor alone molecule, and dissociated acceptor alone molecule. Then, chemical equilibrium constant can be achieved from calculated results of the concentrations. The present invention can be integrated into any instrument setup that can detect fluorescence intensity, and applied for both in vitro and in vivo samples to achieve fast, real-time and continuous measurements.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**第（ 2 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**

無

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**

# 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】(中文/英文)

生化反應之即時量測方法 / Method for Measuring Real-Time Kinetics of Chemical Reactions

## 【技術領域】

【0001】 本發明係有關一種量測分子間交互作用的技術，特別是關於一種生化反應之即時量測方法，以即時定量量測在活體 (in vivo) 樣本或是化學溶液樣本中分子間的交互作用。

## 【先前技術】

【0002】 一般在量測分子與分子之間的結合效率的方式，常見者係使用表面電漿子共振 (surface plasmon resonance) 系統，其在量測過程中，必須預先知道所量測的分子濃度，並且改變其中一個分子的濃度，反應進行多次量測，才能定量量測分子之間的結合效率。然而，爲了重複多次不同濃度的量測，必須使用足夠數量的生物樣本，對於稀少之樣本來說難以準確定量。再者，表面電漿子共振系統的架構係無法進行活體內的量測，此乃因活體內的分子濃度難以控制或改變；且此系統架構亦無法觀察在活體中，生物分子持續作用的情況下，結合效率隨時間的改變狀況。

【0003】 除了使用上述之表面共漿子共振系統量測分子間之結合效率之外，亦可採用福斯特共振能量轉移 (Förster resonance energy transfer, FRET) 相關技術來進行之。

【0004】 如美國專利US 7,456,954 B2以及其相關論文 (Biophysical

Journal, Vol.88, April 2005, 2939-2953) 中所載，其係使用福斯特共振能量轉移的螢光分子，標定待量測的分子，此種量測方式係分別激發福斯特共振能量轉移的螢光分子對之螢光強度，並記錄不同激發波長下，在不同螢光波段所量測到的訊號；此種方式可以判斷出分離或結合等不同狀態時的分子數量。然而，此種量測方式僅限用於單分子的量測，亦即只能使用全反射螢光顯微系統，量測固定在玻片表面的單分子。換言之，對於溶液或是活體之中的樣本，並無法量測到分子之間的交互作用，亦無法進行即時的或是連續性的量測。

**【0005】** 又如美國專利 US 2013/0052656A1 和歐洲專利 EP 2196794A1 所揭示，其係在流式細胞儀的架構下進行福斯特共振能量轉移之量測。此專利前案係在量測螢光分子的螢光半衰期，並以螢光半衰期的數值辨別福斯特共振能量轉移的變化，故，同樣以福斯特共振能量轉移的螢光訊號，判斷所標定分子間的交互作用。然而，由於只觀察螢光半衰期的相對變化，無法定量出絕對的數值，因此仍須進行多次量測，並量測時要改變分子的濃度，再以不同濃度的數據，計算出化學反應的結合常數和分離常數。此種技術係與前述之表面電漿子共振系統十分類似，就是必須有多個不同濃度的量測，因此並無法應用在活體中的量測，亦無法進行即時動態量測。

**【0006】** 有鑑於此，本發明遂提出一種生化反應之即時量測方法，以解決存在於先前技術中之該等缺失。

### **【發明內容】**

**【0007】** 本發明之主要目的係在提供一種生化反應之即時量測方

法，其係利用福斯特共振能量轉移的螢光強度之定量，以獲得二生物分子在分離及結合狀態時，各自的分子濃度，進而得到生物反應之反應速率，故本發明確實可在活體樣本中，即時定量量測生化反應的反應速率，以研究活體中分子之間的交互作用及結合效率，實為一種十分便利實用的生化反應定量檢測技術。

**【0008】** 本發明之另一目的係在提供一種生化反應之即時量測方法，其係不限於樣本的型態，活體樣本或是溶液樣本，皆可應用此量測方法，以進行即時且連續性的量測，並可以觀察動態或是受激發的化學反應過程。

**【0009】** 為達上述之目的，本發明提出之生化反應之即時量測方法，包括之步驟有：先提供一待測樣本，其內存在有發生結合反應的生物分子；以具有不同激發波長的施體螢光分子和受體螢光分子分別對生物分子進行標定，且施體和受體螢光分子係具有已知的螢光分子特性；標定完成之後，即可在不同時間點依序在施體或受體吸收波長下激發施體和受體螢光分子，並在施體或受體發射波長條件下即時量測到螢光訊號，螢光訊號來自標定在生物分子的施體或是受體未產生福斯特共振能量轉移時的自身螢光訊號，以及當生物分子結合時，施體和受體螢光分子所產生的福斯特共振能量轉移訊號並形成複數福斯特共振能量轉移對；取得這些螢光訊號之後，據此計算出已結合之福斯特共振能量轉移對、未產生福斯特共振能量轉移之施體螢光分子以及未產生福斯特共振能量轉移的之受體螢光分子等三種濃度，進而根據這三種濃度來得到生物分子間的反應速率。

**【0010】** 其中，這些螢光訊號係在三個量測條件下進行量測：一是激

發在施體吸收波長，並在施體發射波長進行量測；另一是激發在施體吸收波長，並在受體發射波長進行量測；以及激發在受體吸收波長，並在受體發射波長進行量測，以藉此量測到螢光訊號，來取得前述三種濃度。

【0011】 以下藉由具體實施例配合所附的圖式詳加說明，當更容易瞭解本發明之目的、技術內容、特點及其所達成之功效。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0012】

第1圖係為本發明使用之一實施例的量測架構示意圖。

第2圖係為本發明即時量測生化反應之流程示意圖。

第3圖係為本發明使用之量測條件的照射波長與生物分子示意圖，其中(A)圖為本發明使用之照射方法的時間序列示意圖，(B)～(D)圖為在發射波長下偵測螢光訊號，以及(E)～(G)圖為生物分子反應示意圖。

第4圖係為本發明選擇一福斯特共振能量轉移對的螢光激發和發射光譜之一實施例的示意圖。

第5圖係為本發明使用之已標定螢光分子的生物分子X與Y於分離狀態的示意圖。

第6圖係為本發明使用之已標定螢光分子的生物分子X與Y於結合狀態的示意圖。

第7圖係為本發明在福斯特共振能量轉移對施體D與受體A間之能量傳遞過程中不同反應之反應效率示意圖。

### 【實施方式】

【0013】 在生物分子反應中，互相吸引的生物分子間可以利用福斯特共振能量轉移（Förster resonance energy transfer，FRET）對（pair）的施體螢光分子與受體螢光分子來分別進行標定，當分子間互相產生給合反應時，此標定的施體螢光分子與受體螢光分子會產生FRET訊號，此FRET訊號的螢光強度即可顯示已互相結合之生物分子的濃度（數量），同時，單獨施體與單獨受體之訊號的螢光強度則與分離狀態時的生物分子的濃度有關。在本發明之方法中，量測到的FRET訊號以及非FRET訊號之螢光強度係用來計算一化學反應之反應物與產物的濃度。然後，化學反應速率可以從這些濃度的計算結果來獲得，且在使用本發明之方法之前，應取得此FRET對的幾個基本螢光特性，包含有施體與受體二者的消光係數（extinction coefficient）與螢光量子產量（fluorescence quantum yield）以及在施體與受體間的FRET效率。

【0014】 本發明可應用於任何可用來量測FRET螢光訊號的儀器設備，例如螢光顯微鏡、流式細胞儀或是微量分析盤等。第1圖係為本發明使用之一實施例的量測架構示意圖，其係用來取得FRET，如圖所示，此設備包括有至少二不同激發波長的施體螢光分子與受體螢光分子，根據本實施例，二發光二極體LED1、LED2係用來照射樣本10，LED1在施體吸收波長 $D_{EX}$ 激發施體螢光分子，LED2在受體吸收波長 $A_{EX}$ 激發受體螢光分子。在樣本10中，發生結合反應的生物分子係利用施體螢光分子和受體螢光分子進行標定，且此樣本可以為活體細胞或是化學溶液。然後，利用光電倍增管（photomultiplier tubes，PMTs）PMT1、PMT2來檢測施體與受體螢光分子的螢光訊號，PMT1檢測在施體發射波長 $D_{EM}$ 的螢光訊號，且PMT2檢測在受

體發射波長 $\lambda_{EM}$ 處的螢光訊號。如第1圖所示之二向色濾光片(dichroic filter) DM1~DM4則用來反射和透射所選定的光波長。其中，發光二極體LED1和LED2在不同時間點輪流啟動，使施體螢光分子和受體螢光分子係激發於不同時間點，因此，光電倍增管PMT1、PMT2檢測紀錄源自於不同時間點之FRET對在不同狀態的訊號，此照射與偵測方法係設計用來區分已結合螢光分子與分離螢光分子的螢光強度訊號。

【0015】 在說明完本發明使用之量測架構之後，接續說明本發明之方法，其係使用FRET來取得化學反應濃度和反應速率，對於互相吸引的分子交互反應而言，爲了根據本發明所量測到的分子濃度來計算反應速率，必須先取得該反應之反應速率的形式。請同時參閱第1圖之架構示意圖以及第2圖所示之流程圖，首先，如步驟S10所示，先提供一待測樣本，且其內係存在有可發生結合反應之至少二生物分子，例如蛋白質、DNA、RNA、胜肽(peptides)、蛋白質片段等。然後如步驟S12所示，以具有不同激發波長的一FRET對進行標定，此FRET對係包括施體螢光分子及受體螢光分子，以生物分子數目對於螢光分子數目是1:1的比例，分別對此二生物分子進行標定，因此施體螢光分子與受體螢光分子的螢光訊號強度，可用以代表其標定之生物分子濃度。且此施體螢光分子及受體螢光分子係具有已知的螢光分子特性，這些特性包括施體螢光分子與受體螢光分子的消光係數、施體螢光分子與受體螢光分子的螢光量子產量以及施體與受體之間的FRET效率。然後，如步驟S14所示，利用發光二極體LED1及LED2照射樣本10，以便於不同時間點依序在施體或受體吸收波長下激發施體螢光分子和受體螢光分子，並在施體或受體發射波長條件下即時量測到不同的螢光訊號。

所量測到的螢光訊號包括結合的生物分子所被標定之施體和受體產生的福斯特共振能量轉移訊號並形成複數福斯特共振能量轉移對，以及標定在生物分子上但沒有產生福斯特共振能量轉移的施體螢光分子或是受體螢光分子所產生的螢光訊號。其中，量測到的這些螢光訊號其係三個量測條件下進行的，一是激發在施體吸收波長，並在施體發射波長進行量測；另一是激發在施體吸收波長，並在受體發射波長進行量測；最後一個是激發在受體吸收波長，並在受體發射波長進行量測。藉由這三組量測條件，即可對應得到三組螢光訊號。最後如步驟S16所示，根據這些螢光訊號，可以計算出已結合FRET對之濃度、未結合（分離）之施體螢光分子的濃度以及未結合（分離）之受體螢光分子的濃度等三種濃度，並由已預先取得之結合反應之反應式形式，進而得到此生物分子間互相反應的反應速率。

【0016】 第3圖係為本發明使用之量測條件的照射波長與生物分子示意圖，如圖所示，量測到上述之三組螢光訊號，以爲了解決三個未知濃度：已結合FRET對、未結合（分離）之施體螢光分子的濃度、以及未結合（分離）之受體螢光分子。第3(A)圖顯示本發明使用之照射方法的時間序列示意圖，設定在不同時間點來激發 $D_{EX}$ 和 $A_{EX}$ 波長。第3(B)圖及第3(E)圖顯示，當在施體吸收波長 $D_{EX}$ 激發樣本，則在施體發射波長 $D_{EM}$ 偵測到的訊號包括二種情況：在結合分子XY中標定的施體D沒有以福斯特共振能量轉移的方式轉移到受體A所剩下的螢光能量，以及標定在分離狀態時的分子X上之施體D被激發後發射出的螢光訊號。第3(C)圖及第3(F)圖顯示，激發在施體吸收波長 $D_{EX}$ ，並在受體發射波長 $A_{EM}$ 偵測螢光訊號，訊號來源包括三種：來自結合分子XY的受體A被FRET作用激發所發射之螢光，標定在結合狀態的分

子Y及未結合狀態（分離）的分子Y上的受體A，因為在施體吸收波長 $D_{EX}$ 受到直接激發，並產生螢光訊號。在第3(D)圖及第3(G)圖中，在受體吸收波長 $A_{EX}$ 激發樣本，且在受體發射波長 $A_{EM}$ 進行檢測，因此，不管在結合狀態或是分離狀態，皆可激發受體A，並發射出螢光訊號。在本發明中，僅需要這三組螢光訊號，即可計算化學濃度與化學反應的反應速率。在第3圖中，連續輪流激發架構係設計用來量測施體與受體的動態變化或濃度改變，因此使用第3圖並搭配第1圖所示之量測架構，確實可以實現快速且即時的觀察反應。

【0017】 在詳細說明完本發明之主要技術特徵之後，接續說明本發明所使用之技術原理以及演算方法。

【0018】 如第4圖所示，其係為本發明選擇一FRET對的螢光激發和螢光光譜之一實施例的示意圖，其中包含有施體激發光譜D1、施體發射光譜D2、受體激發光譜A1和受體發射光譜A2，且在施體發射光譜D2和受體激發光譜A1間的光譜重疊區域對發生FRET是相當必要的。當施體螢光分子在波長 $D_{EX}$ 被激發，施體螢光分子發射可以在波段 $D_{EM}$ 之間被偵測到，而受體螢光分子的激發波長和發射光譜係分別標示為 $A_{EX}$ 和 $A_{EM}$ 。 $D_{EM}$ 和 $A_{EM}$ 的螢光偵測可以使用光譜儀進行分辨，或是量測在 $D_{EM}$ 、 $A_{EM}$ 波段內的所有螢光訊號總合，二種偵測方式皆可使用。選擇 $D_{EX}$ 和 $A_{EX}$ 的適當數值，使其只可用來激發施體或受體，並避免激發其他螢光分子，至於 $D_{EM}$ 和 $A_{EM}$ ，光譜頻段也應該避免自其他螢光分子量測到螢光訊號。

【0019】 將生物分子X和Y分別以施體螢光分子D和受體螢光分子A進行標定，他們之間交互作用時的結合反應速率與化學動力學可以利用本

發明之FRET方法進行量測。如第5圖所示，當生物分子X和Y分離，施體D和受體A係遠離彼此，所以在施體D與受體A之間無任何福斯特共振能量轉移，因此，所量測的螢光訊號源自於單獨的施體螢光分子和受體螢光分子。如第6圖所示，當生物分子X和Y結合，施體D和受體A會彼此互相靠近，此時即可偵測到FRET訊號。因為生物分子以及螢光分子係以1：1比例進行標定，所以已結合之生物分子X和Y的濃度即等於具有FRET之施體D和受體A的濃度，其係以[DA]表示；單獨的生物分子X的濃度係等於施體D的濃度[D]，以及單獨的生物分子Y的濃度係等於受體A的濃度[A]。

【0020】 生物分子間之反應即如式(1)所示，並利用此FRET量測到的螢光訊號，在式(1)中的化學反應速率可以表示如式(2)，此反應速率的形式可以在量測及計算前先設定。如前面所述，生物分子X和生物分子Y的濃度分別等於對應施體和受體螢光分子的濃度，藉由FRET對、分離狀態時的施體D和受體A的濃度量化，可以計算出化學反應速率 $K_a$ 。



$$K_a = \frac{[XY]^a}{[X]^b[Y]^c} = \frac{[DA]^a}{[D]^b[A]^c} \quad (2)$$

【0021】 第7圖顯示本發明在FRET對施體D與受體A間之螢光發射過程的示意圖，施體的激發態和基態係分別標示為D\*和D，且受體的激發態和基態則分別標示為A\*和A，FRET的反應動力常數為 $k_{et}$ ，施體和受體螢光發射的反應動力常數分別為 $k_f^D$ 和 $k_f^A$ ，且非輻射衰減過程的施體反應動力常數 $k_{nr}^D$ 和受體反應動力常數 $k_{nr}^A$ 。當D和A之間沒有發生FRET ( $k_{et} = 0$ )，此受體和施體的螢光反應函數 $I_D(t)$ 和 $I_A(t)$ 可以分別表示為下列式(3)和式(4)：

$$I_D(t) = k_f^D \cdot e^{-(k_f^D + k_{nr}^D)t} \quad (3)$$

$$I_A(t) = k_f^A \cdot e^{-(k_f^A + k_{nr}^A)t} \quad (4)$$

【0022】 當D和A之間發生FRET ( $k_{et} \neq 0$ )，具有FRET之受體和施體的螢光反應函數 $I_D'(t)$ 和 $I_A'(t)$ 可以分別表示為下列式(5)和式(6)：

$$I_D'(t) = k_f^D \cdot e^{-(k_f^D + k_{nr}^D + k_{et})t} \quad (5)$$

$$I_A'(t) = \frac{k_f^A \cdot k_{et}}{(k_f^D + k_{nr}^D + k_{et}) - (k_f^A + k_{nr}^A)} \cdot [e^{-(k_f^A + k_{nr}^A)t} - e^{-(k_f^D + k_{nr}^D + k_{et})t}] \quad (6)$$

【0023】 施體與受體螢光分子的螢光強度係決定於分離和結合的FRET對的分子濃度，由前述式(3)~式(6)所示，量測自施體發射光譜的螢光強度為 $D_{EM}$ ，且量測自受體發射光譜的螢光強度為 $A_{EM}$ ，二者分別表示如式(7)及式(8)所示：

$$D_{EM} = Q_f^D \cdot (1 - E) \cdot \epsilon^D \cdot [DA] + Q_f^D \cdot \epsilon^D \cdot [D] \quad (7)$$

$$A_{EM} = Q_f^A \cdot \epsilon^A \cdot \{[DA] + [A]\} + Q_f^A \cdot E \cdot \epsilon^D \cdot [DA] \quad (8)$$

【0024】 在此，從施體轉移到受體之能量的量子產量 (quantum yield)，亦可稱之為FRET效率，係定義為 $E = \frac{k_{et}}{k_f^D + k_{nr}^D + k_{et}}$ 。施體和受體的螢光量子產量則分別為 $Q_f^D = \frac{k_f^D}{k_f^D + k_{nr}^D}$ 和 $Q_f^A = \frac{k_f^A}{k_f^A + k_{nr}^A}$ ，其皆為螢光發射波長的函數。施體和受體的消光係數分別為 $\epsilon^D$ 和 $\epsilon^A$ ，其亦為吸收波長的函數。在本發明之方法中，首先必須取得FRET對的螢光量子產量、消光係數和FRET效率，以便計算從螢光量測中獲得的化學反應速率，要計算出此化學反應速率應該要取得三種螢光訊號：1、激發在施體吸收波長 $\lambda_{DEX}$ ，並於受體發射波長 $\lambda_{AEM}$ 量測，其係可以表示為 $Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{DEX}) \cdot \{[DA] + [A]\} + Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot E \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot [DA]$ ；2、激發在施體吸收波長 $\lambda_{DEX}$ ，並於施體發射波長 $\lambda_{DEM}$ 進行偵測，其係可以表示為 $Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot$

$(1 - E) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot [DA] + Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot [D]$ ; 3、激發在受體吸收波長 $\lambda_{AEX}$ ，且在受體發射波長 $\lambda_{AEM}$ 進行偵測，其係可表示為 $Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot \{[DA] + [A]\}$ ，此即為 $A'_{EM}$ 。

【0025】 前述步驟的計算係用來區分訊號1至訊號3，不同激發波長的受體訊號比率（ $R_A$ ）如式(9)所示：

$$R_A = \frac{Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{DEX}) \cdot \{[DA] + [A]\} + Q_f^D(\lambda_{AEM}) \cdot E \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot [DA]}{Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot \{[DA] + [A]\}} = \frac{\epsilon^A(\lambda_{DEX}) + E \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot \frac{[DA]}{[DA] + [A]}}{\epsilon^A(\lambda_{AEX})} \quad (9)$$

由式(9)可知，由量測到的這些螢光訊號（ $R_A$ ）與消光係數 $\epsilon^A(\lambda_{AEX})$ 和 $\epsilon^D(\lambda_{DEX})$ ，可以計算出此分子濃度比率 $d_+$ 和 $\alpha$ ，如下列式(10)和式(11)所示：

$$d_+ = \frac{[DA]}{[DA] + [A]} = \frac{R_A \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) - \epsilon^A(\lambda_{DEX})}{E \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX})} \quad (10)$$

$$\frac{[A]}{[DA]} = \left( \frac{1}{d_+} - 1 \right) = \alpha \quad (11)$$

【0026】 然後，可計算出已結合FRET對的濃度 $[DA]$ 和未結合受體濃度 $[A]$ 。根據式(11)，即可得到式(12)、式(13)及式(14)：

$$A'_{EM} = Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot \{[DA] + [A]\} = Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot (1 + \alpha) \cdot [DA] \quad (12)$$

$$[DA] = \frac{A'_{EM}}{Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot (1 + \alpha)} \quad (13)$$

$$[A] = \frac{A'_{EM} \cdot \alpha}{Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot (1 + \alpha)} \quad (14)$$

【0027】 同樣地，定義為訊號2除以訊號3為施體訊號比率( $R_D$ )，如式(15)所示：

$$R_D = \frac{Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot (1 - E) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot [DA] + Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot [D]}{Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) \cdot \{[DA] + [A]\}} = \frac{Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot (1 - E) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot d_+ + Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot d_+ \cdot \frac{[D]}{[DA]}}{Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX})} \quad (15)$$

【0028】 未結合施體對上已結合FRET對的濃度比率 $\beta$ 係如式(16)所示：

$$\frac{[D]}{[DA]} = \frac{R_D \cdot Q_f^A(\lambda_{AEM}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{AEX}) - Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot (1 - E) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot d_+}{Q_f^D(\lambda_{DEM}) \cdot \epsilon^D(\lambda_{DEX}) \cdot d_+} = \beta \quad (16)$$

並根據式(13)以及式(16)，可以計算出未結合之施體螢光分子濃度[D]，如式(17)所示：

$$[D] = \frac{A_{EM} \cdot \beta}{Q_f^A(\lambda_{A_{EM}}) \cdot \epsilon^A(\lambda_{A_{EX}}) \cdot (1+u)} \quad (17)$$

【0029】 承上，根據前述式(13)、式(14)和式(17)之結果，可以獲得 [DA]、[A]和[D]，進而獲得反應速率 ( $K_a = \frac{|DA|^a}{[D]^b[A]^c}$ )。

【0030】 因此，本發明可以辨別生物分子在分離或結合狀態時的螢光訊號，並可計算出螢光訊號強度對應的分子濃度。再者，本發明可以應用在任何可以量測螢光的設備架構上，且不限於樣本的型態，例如活體樣本或是溶液樣本，皆可應用此量測方法。

【0031】 本發明只需量測前面所述之三種螢光訊號，並經由式（9）至式（17）之計算，即可取得量測時間點的瞬間生物分子濃度以及生化反應速率，並不需要重覆多次不同樣品濃度之量測。因此本發明確實可以進行快速且即時的量測，並且，藉由第3圖所示之連續性量測方法，更可以觀察動態或是受激發而改變的化學反應過程，應用相當廣泛。

【0032】 以上所述之實施例僅係爲說明本發明之技術思想及特點，其的在使熟習此項技藝之人士能夠瞭解本發明之內容並據以實施，當不能以之限定本發明之專利範圍，即大凡依本發明所揭示之精神所作之均等變化或修飾，仍應涵蓋在本發明之專利範圍內。

### 【符號說明】

【0033】

10 樣本

LED1、LED2 發光二極體

|           |        |
|-----------|--------|
| PMT1、PMT2 | 光電倍增管  |
| DM1～DM4   | 二向色濾光片 |
| D         | 施體螢光分子 |
| A         | 受體螢光分子 |
| X、Y       | 生物分子   |

## 申請專利範圍

1. 一種生化反應之即時量測方法，包括下列步驟：

提供一待測樣本，其內存在有可互相反應之至少二生物分子；

以具有不同激發波長的施體螢光分子和受體螢光分子分別對該二生物分子進行標定，且該施體螢光分子和該受體螢光分子係具有已知的螢光分子特性；

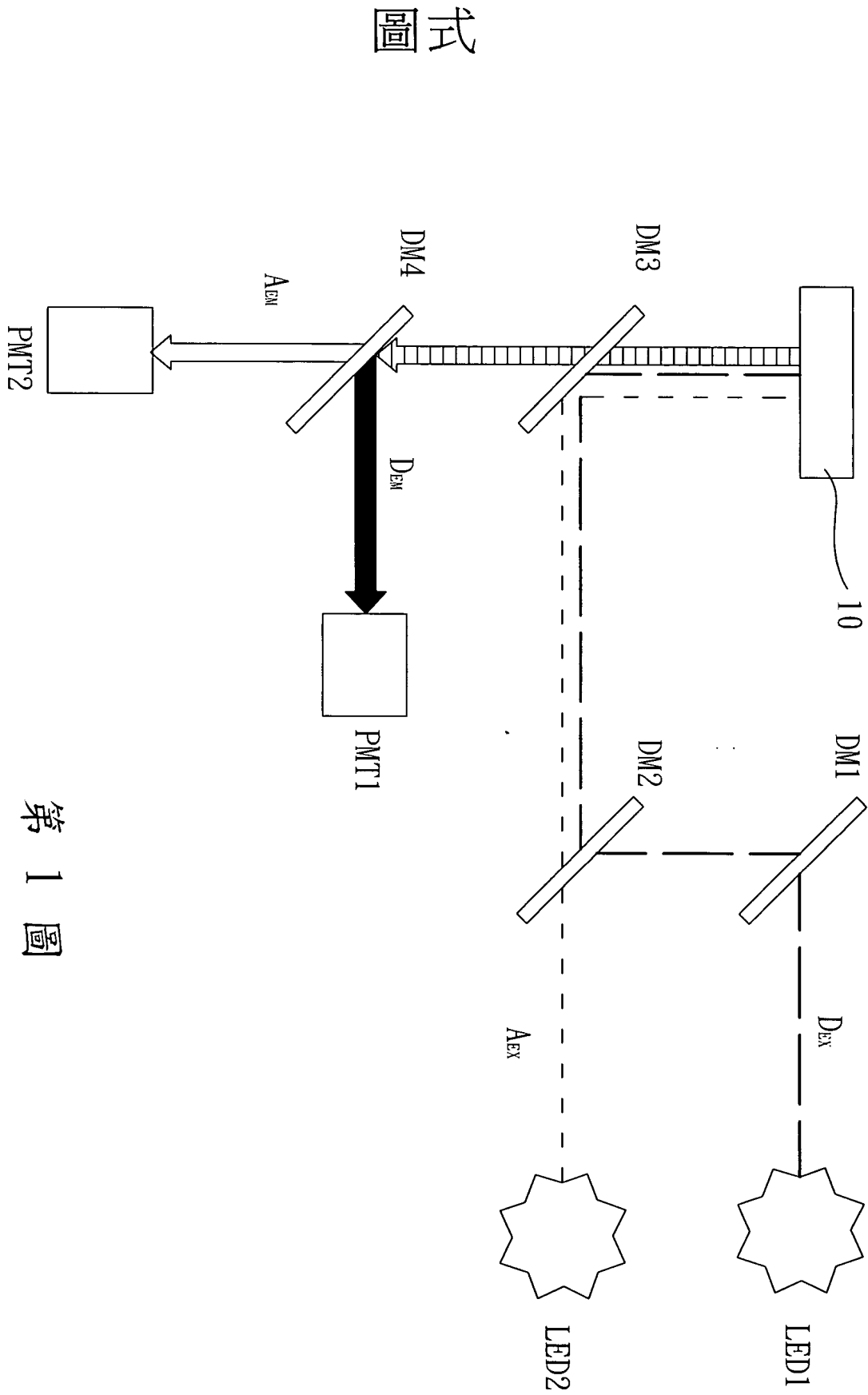
在不同時間點依序在施體或受體吸收波長下激發該施體螢光分子和該受體螢光分子，以產生以下三種螢光訊號：標定在結合狀態的生物分子之施體與受體螢光分子產生的福斯特共振能量轉移對，以及標定在生物分子但未產生福斯特共振能量轉移的該施體螢光分子或受體螢光分子所產生螢光訊號；以及

根據該等螢光訊號，計算出已結合之該福斯特共振能量轉移對以及未產生福斯特共振能量轉移的之該施體螢光分子與該受體螢光分子等三種濃度，進而得到該二生物分子的反應速率。

2. 如請求項1所述之生化反應之即時量測方法，其中該待測樣本係可為活體細胞或是化學溶液。
3. 如請求項1所述之生化反應之即時量測方法，其中該螢光分子特性包含有該施體螢光分子與受體螢光分子的消光係數、螢光量子產量以及該福斯特共振能量轉移效率。
4. 如請求項1所述之生化反應之即時量測方法，其中該等螢光訊號係在下列三個量測條件下進行：激發在該施體吸收波長，並在施體發射波長進行量測；激發在該施體吸收波長，並在受體發射波長進行量測；以及激

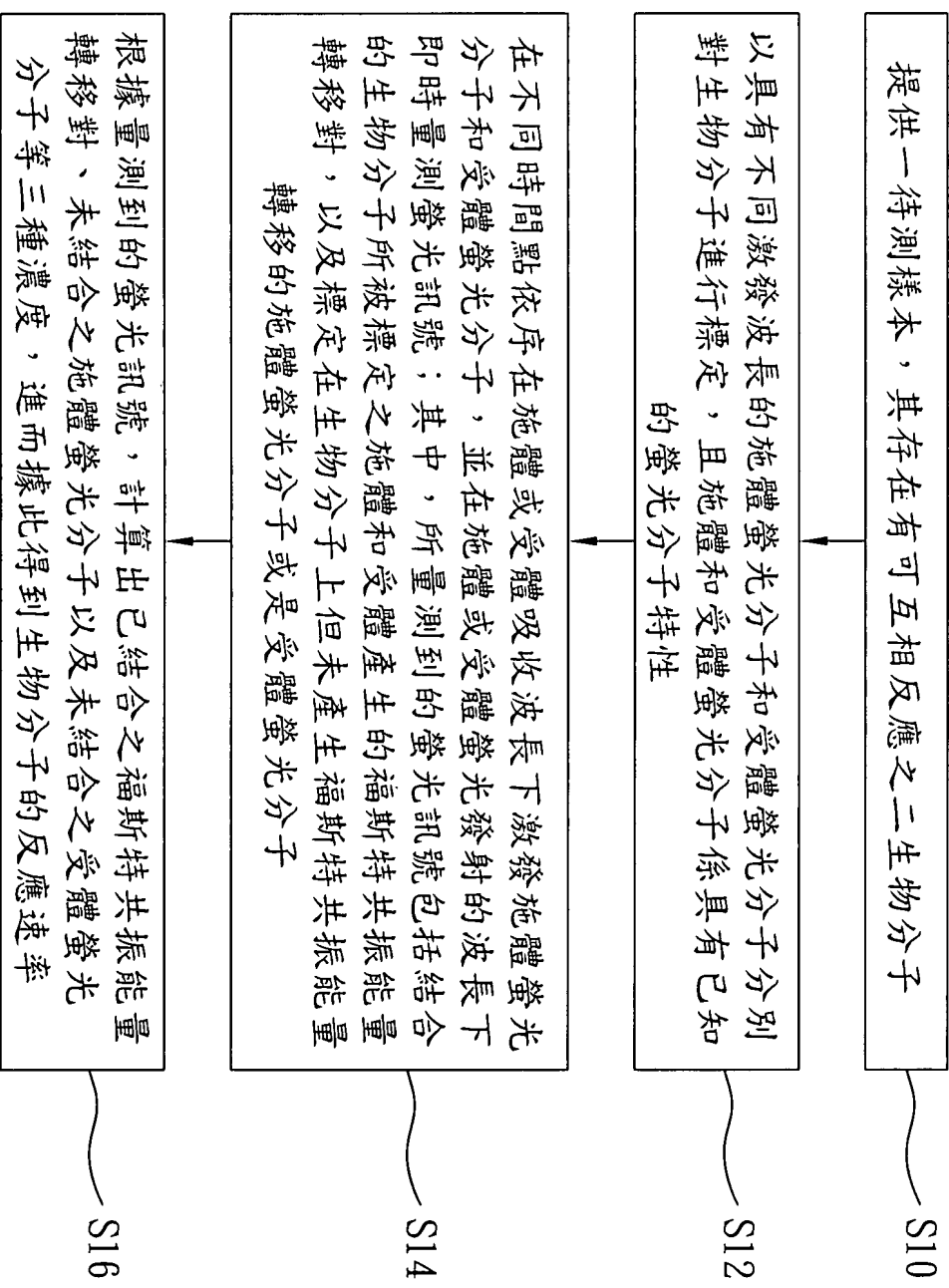
發在該受體吸收波長，並在受體發射波長進行量測。

5. 如請求項1所述之生化反應之即時量測方法，其中該施體螢光分子及該受體螢光分子係以1：1的比例分別對該生物分子進行標定。
6. 如請求項1所述之生化反應之即時量測方法，其中該生物分子係可為蛋白質、DNA、RNA、胜肽（peptides）或蛋白質片段。

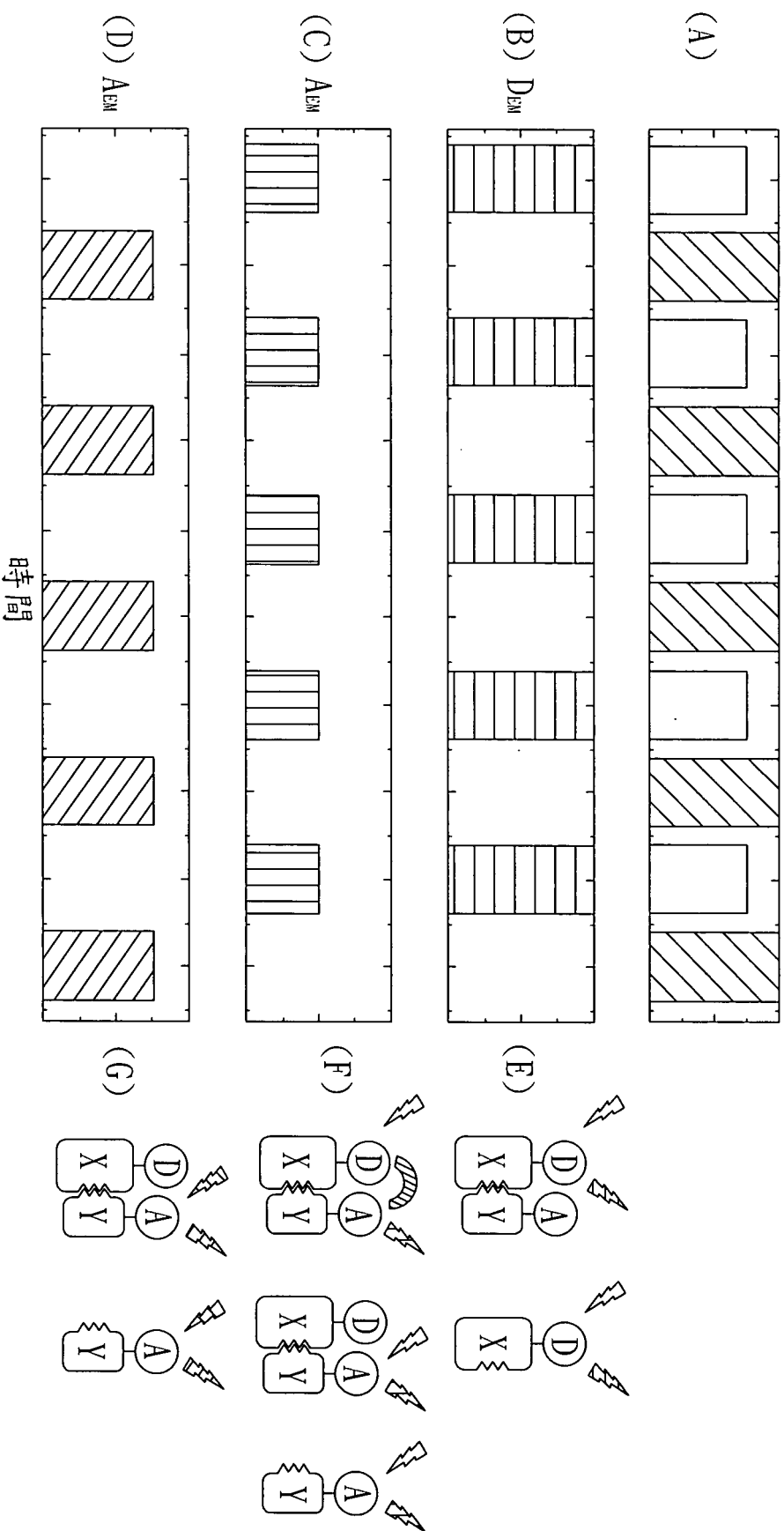
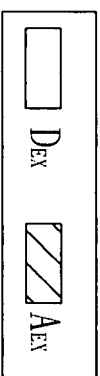


圖式

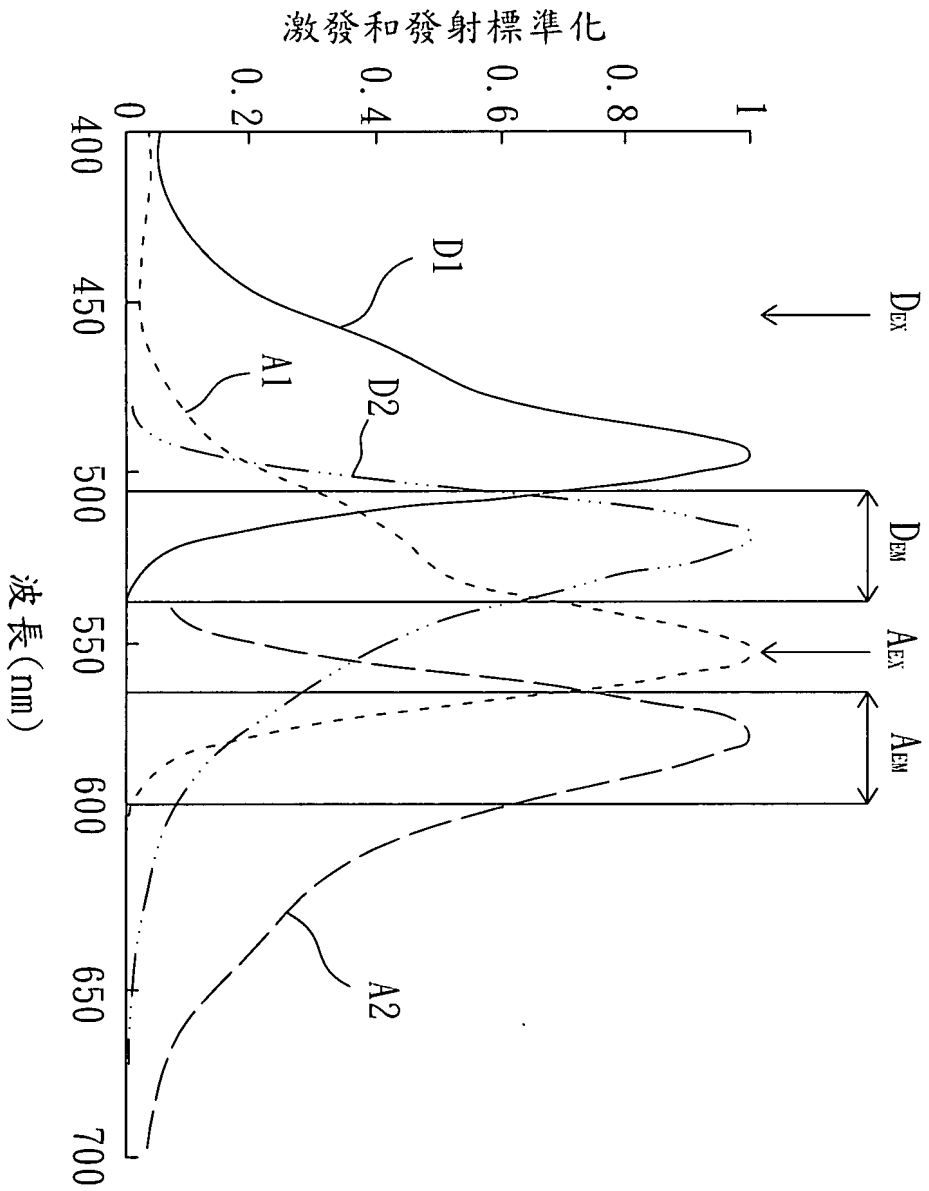
第 1 圖



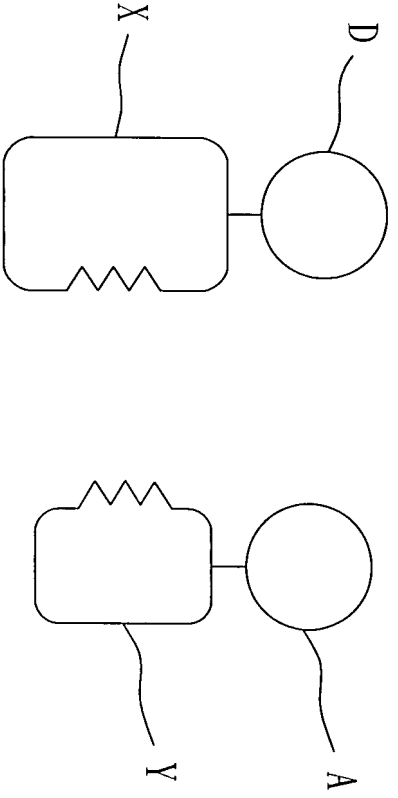
第 2 圖



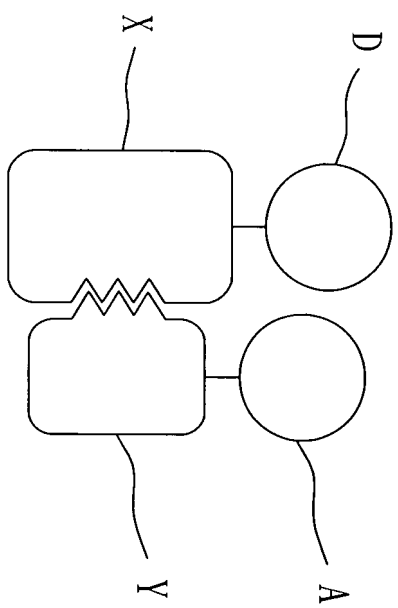
第 3 圖



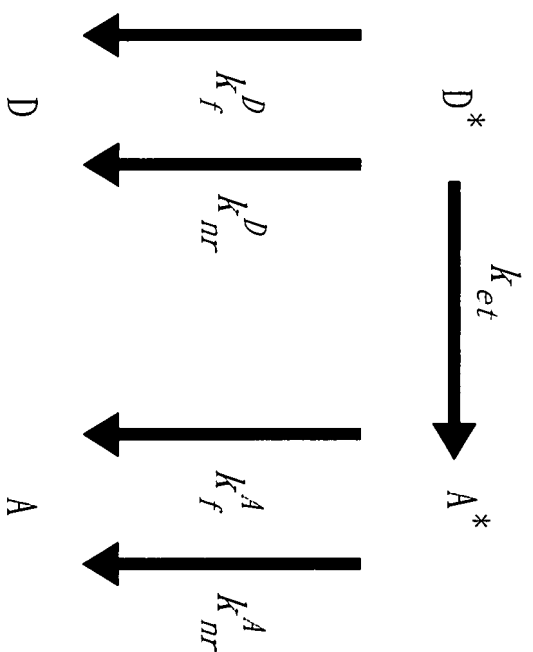
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖