

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480040708.4

[51] Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 30/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 31 日

[11] 公开号 CN 1906295A

[22] 申请日 2004.11.18

[21] 申请号 200480040708.4

[30] 优先权

[32] 2003.12.12 [33] US [31] 10/734,717

[32] 2003.12.24 [33] US [31] 60/532,523

[32] 2004.5.24 [33] US [31] 10/852,642

[86] 国际申请 PCT/US2004/038924 2004.11.18

[87] 国际公布 WO2005/061709 英 2005.7.7

[85] 进入国家阶段日期 2006.7.20

[71] 申请人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

[72] 发明人 威廉·贝丁罕 巴里·W·罗伯莱  
拉尼贾尼·V·帕塔萨拉蒂  
卡特娅·埃里克森

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 代易宁 陆弋

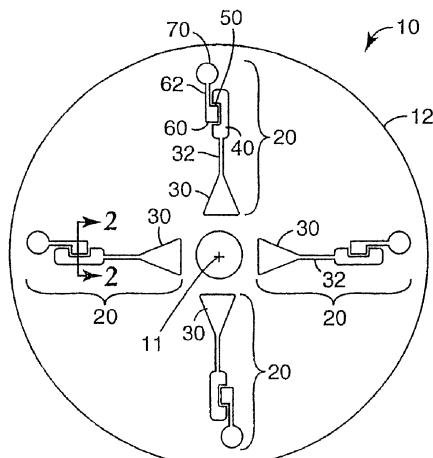
权利要求书 7 页 说明书 49 页 附图 4 页

[54] 发明名称

可变阀装置和方法

[57] 摘要

本发明涉及一种具有可变阀结构的样品处理装置以及使用该装置的方法。该阀结构允许将位于处理腔室中的样品材料的选定部分去除。将所选定的部分去除是通过在理想位置处在阀膜中形成开口而实现的。该阀膜优选足够大以允许基于处理腔室中样品材料的特性而对开口的位置进行调整。如果在形成开口之后旋转样品处理装置，则更为靠近旋转轴线的材料的选定部分通过该开口离开处理腔室。样品材料的剩余部分不能通过开口离开，因为该部分比开口更加远离旋转轴线。



1. 一种样品处理装置上的阀处理腔室，该阀处理腔室包括：

处理腔室，具有位于样品处理装置的相对的第一和第二主侧之间的处理腔室空间，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，而且该长度大于该宽度；

位于处理腔室区域内的阀腔室，该阀腔室位于处理腔室空间和样品处理装置的第二主侧之间，其中通过将阀腔室和处理腔室相分离的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离，并且处理腔室空间的一部分位于阀膜和样品处理装置的第一主侧之间；以及

位于处理腔室区域中的探测窗口，其中该探测窗口能够透射被引导进和/或出处理腔室空间的选定电磁能。

2. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中探测窗口沿着处理腔室的长度与阀膜共同延伸。

3. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中探测窗口通过样品处理装置的第一主侧形成。

4. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中探测窗口通过样品处理装置的第二主侧形成。

5. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中阀腔室和探测窗口占据处理腔室区域的互斥部分。

6. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中探测窗口通过样品处理装置的第二主侧形成，并且阀腔室和探测窗口占据处理腔室区域的互斥部分。

7. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中阀膜沿着处理腔室区域的长度在处理腔室区域最大长度的 30%或更多上延伸。

8. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中阀膜沿着处理腔室的长度延伸 1 毫米或者更长的长度。

9. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中样品处理装置在处理腔室空间和样品处理装置的第一主侧之间是不透明的。

10. 根据权利要求 1 所述的阀处理腔室，其中阀腔室的至少一部分位于延伸到处理腔室区域中的阀盖内，并且阀膜形成在阀盖中。

11. 根据权利要求 10 所述的阀处理腔室，其中阀盖仅占据处理腔室区域的一部分宽度。

12. 根据权利要求 11 所述的阀处理腔室，其中探测窗口至少占据处理腔室区域的未被阀盖所占据的一部分宽度。

13. 一种样品处理装置上的阀处理腔室，该阀处理腔室包括：处理腔室，具有位于样品处理装置的相对的第一和第二主侧之间的处理腔室空间，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，而且该长度大于该宽度；

位于处理腔室区域内的阀腔室，该阀腔室位于处理腔室空间和样品处理装置的第二主侧之间，其中通过将阀腔室和处理腔室相分离的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离，并且处理腔室空间的一部分位于阀膜和样品处理装置的第一主侧之间，而且阀腔室和探测窗口占据处理腔室区域的互斥部分，并且阀腔室的至少一部分位于延伸到处理腔室区域中的阀盖内，并且阀膜形成在阀盖中；以及

位于处理腔室区域中的探测窗口，其中该探测窗口能够透射被引

---

导进和/或出处理腔室空间的选定电磁能。

14. 一种从处理腔室选择性地去除样品材料的方法，该方法包括：

提供样品处理装置，其包括：

具有处理腔室空间的处理腔室，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，而且该长度大于该宽度；

位于处理腔室区域中的阀腔室，其中通过位于阀腔室和处理腔室之间的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离；以及

位于处理腔室区域中的探测窗口，其中该探测窗口能够透射选定的电磁能；

在处理腔室中提供样品材料；

通过探测窗口探测处理腔室中样品材料的特性；

沿着处理腔室长度在选定位置处在阀膜中形成开口，其中该选定位置与所探测到的样品材料特性相关联；以及

仅将样品材料的一部分从处理腔室通过形成于阀膜中的开口移动到阀腔室中。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中仅将样品材料的一部分从处理腔室移动到阀腔室中的步骤包括旋转该样品处理装置。

16. 根据权利要求 14 所述的方法，其中该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，而且该长度大于该宽度。

17. 根据权利要求 14 所述的方法，其中所探测的特性包括样品材料的自由表面，并且从处理腔室移动到阀腔室中的部分样品材料包括选定数量的样品材料。

18. 根据权利要求 14 所述的方法，还包括旋转该样品处理装置以将处理腔室中的样品材料成分分离。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所探测的样品材料特性包括所分离的样品材料成分之间的边界，并且从处理腔室移动到阀腔室中的部分样品材料包括样品材料的选定成分的一部分。

20. 根据权利要求 14 所述的方法，其中仅将样品材料的一部分从处理腔室移动到阀腔室中的步骤包括将选定数量的样品材料从处理腔室移动到阀腔室中。

21. 根据权利要求 14 所述的方法，其中样品材料包括血液。

22. 一种从处理腔室选择性地去除样品材料的方法，该方法包括：提供样品处理装置，其包括：

具有处理腔室空间的处理腔室，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，而且该长度大于该宽度；

位于处理腔室区域中的阀腔室，其中通过位于阀腔室和处理腔室之间的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离；以及

位于处理腔室区域中的探测窗口，其中该探测窗口能够透射选定的电磁能；

在处理腔室中提供样品材料；

通过探测窗口探测处理腔室中样品材料的特性；

在处理腔室区域中在选定位置处在阀膜中形成开口，其中该选定位置与所探测到的样品材料特性相关联；并且

通过旋转该样品处理装置而仅将样品材料的一部分从处理腔室通过形成于阀膜中的开口移动到阀腔室中。

23. 一种从全血分离核酸的方法，该方法包括：

提供具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置；

将全血置于加载腔室中；

将全血转移到阀处理腔室；

在阀处理腔室中对全血施加离心作用以形成血浆层、红细胞层以及含有白细胞的中间层；

将含有白细胞的中间层的至少一部分去除；

在所分离出的中间层中将白细胞溶解并且可选的将其中的细胞核溶解以释放抑制剂和/或核酸。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中在溶解白细胞之前，该方法包括利用水或者缓冲液对样品的被分离中间层进行稀释，可选进一步将稀释层浓缩以提高核酸材料的浓度，可选将进一步浓缩的区域进行分离，并且可选重复该稀释过程，随后进行浓缩和分离以便将抑制剂浓度降低至不会影响扩增方法的水平。

25. 根据权利要求 23 所述的方法，其中该装置还包括含有固相材料的分离腔室。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中该固相材料具有俘获部位、涂覆在固相材料上的涂覆剂或两者均有；其中涂覆剂从包括表面活性剂、强碱、聚合电解质、可选择性渗透的聚合物阻挡剂，及其组合的组中进行选择。

27. 根据权利要求 25 所述的方法，还包括使被溶解的样品接触分离腔室中的固相材料，从而优选将至少一部分抑制剂粘附到固相材料；其中所述的溶解可在接触固相材料之前、与之同时或者之后进行。

28. 根据权利要求 25 所述的方法，还包括将细胞核和/或核酸的至少一部分从固相材料分离，该固相材料具有至少一部分抑制剂粘附于其上。

29. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述的溶解步骤包括使白

细胞经受强碱处理，可选进行加热以释放核酸。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，还包括将含有被释放核酸的样品的 pH 调整至 7.5 到 9 的范围内。

31. 根据权利要求 23 所述的方法，还包括利用水对被溶解的样品进行稀释以便将抑制剂的浓度降低至不会影响扩增方法的水平；可选进一步的溶解细胞核以释放核酸；并且可选对含有被释放核酸的样品的 pH 进行调整。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中稀释被溶解的样品的步骤包括利用水进行稀释以便将亚铁血红素浓度降低至低于 2 微摩尔。

33. 根据权利要求 31 所述的方法，其中稀释被溶解的样品的步骤包括利用水进行充分稀释以形成被溶解样品的 20x-1000x 的稀释液。

34. 根据权利要求 31 所述的方法，其中，所述的水为不含 RNase 的无菌水。

35. 一种从全血分离核酸的方法，该方法包括：

提供具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置；

将全血置于加载腔室中；

将全血转移到阀处理腔室中；

使得全血接触密度梯度材料；

在阀处理腔室中对全血和密度梯度材料施加离心作用以形成多个层，其中的至少一个层含有所关注的细胞；

将含有所关注细胞的层的至少一部分去除；并且

对所关注的分离细胞进行溶解以释放核酸。

36. 根据权利要求 35 所述的方法，其中在将所关注的分离细胞溶

解之前，该方法包括利用水或缓冲液将所关注的分离细胞进行稀释，可选进一步浓缩该稀释层以提高所关注细胞的浓度，可选将该进一步浓缩的区域分离，并且可选重复该稀释过程，随后进行浓缩和分离。

37. 根据权利要求 35 所述的方法，其中在将所关注的分离细胞溶解之前，该方法包括利用水将所关注的分离细胞稀释。

38. 根据权利要求 37 所述的方法，其中将所关注的分离细胞稀释的步骤包括利用水充分稀释以形成 20x-1000x 的稀释液。

39. 一种从含有一种或多种病原体的全血分离核酸的方法，该方法包括：

提供具有加载腔室、可变阀处理腔室、和含有病原体俘获材料的分离腔室的装置；

将全血置于加载腔室中；

将全血转移到阀处理腔室；

在阀处理腔室中对全血施加离心作用以形成含有一种或多种病原体的血浆层、红细胞层和具有白细胞的中间层；

将含有一种或多种病原体的血浆层的至少一部分转移到其中具有病原体俘获材料的分离腔室；

从病原体俘获材料将一种或多种病原体的至少一部分分离；并且将一种或多种病原体进行溶解以释放核酸。

40. 一种用于从样品分离核酸的成套工具，该成套工具包括：

具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置；以及

根据权利要求 23 所述的方法对全血施加离心作用并且将全血的一部分去除的说明。

---

## 可变阀装置和方法

### 背景技术

具有在其中进行各种化学或生物学处理的处理腔室的样品处理装置在科学和/或诊断研究中发挥日益重要的作用。设置在这种装置中的处理腔室优选具有较小的容积，以便降低进行这种处理所需的样品材料量。

与具有处理腔室的样品处理装置相关的一个长期问题在于在该装置中的不同特征之间转移流体。用于分离和转移处理腔室中所含流体的传统方法经常需要人工干预（例如，手工移液）和/或机器人操纵。这种转移过程具有多种缺点，包括但不限于，产生误差的可能性、复杂性以及相关的高成本等。

用于解决流体转移问题的尝试关注于通过例如阀、弯曲路径等转移处理腔室中所含的全部流体。

### 发明内容

本发明提供具有阀结构的样品处理装置。该阀结构允许将位于处理腔室中的样品材料的选定部分去除。将所选定的部分去除是通过在理想位置处在阀膜中形成开口而实现的。

该阀膜优选足够大以允许基于处理腔室中样品材料的特性而对开口的位置进行调整。如果在形成开口之后旋转样品处理装置，则较为靠近旋转轴线的材料的选定部分通过该开口离开处理腔室。样品材料的剩余部分不能通过开口离开，因为该部分比开口更加远离旋转轴线。

可基于在处理腔室中所探测到的样品材料的一种或多种特性而将

阀膜中的开口形成到位。优选处理腔室具有探测窗口，其能够透射光线进和/或出处理腔室。所探测到的样品材料特性可包括，例如，样品材料的自由表面（可表征处理腔室中的样品材料的数量）。在选定距离处从该自由表面径向向外的在阀膜中形成开口可提供将选定数量的样品材料从处理腔室去除的能力。

对于能够分离成各种成分的样品材料，例如全血，旋转样品处理装置可导致血浆和红细胞成分相分离，因此允许选择性地将成分去除到例如不同的处理腔室。

在一些实施例中，通过在一个或多个阀膜中在选定位置处形成开口，能够将选定测定用量的样品材料去除。该选定的测定用量可基于开口之间的径向距离（关于旋转轴线进行测量）和开口之间的处理腔室截面面积进行确定。

优选在不存在物理接触的情形中形成阀膜中的开口，例如，通过激光烧蚀、聚焦光学加热等。因此，能够优选在样品处理装置的最外层不被穿透的情形下形成开口，由此可限制样品材料从样品处理装置泄漏的可能性。

在一个方面，本发明提供一种样品处理装置上的阀处理腔室，该阀处理腔室包括：处理腔室，其具有位于样品处理装置的相对的第一和第二主侧之间的处理腔室空间，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一定的处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，而且该长度大于该宽度。该阀处理腔室还具有位于处理腔室区域内的阀腔室，该阀腔室位于处理腔室空间和样品处理装置的第二主侧之间，其中通过将阀腔室和处理腔室相分离的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离，并且处理腔室空间的一部分位于阀膜和样品处理装置的第一主侧之间。在处理腔室区域中设置探测窗口，其中该探测窗口能够透射被引导进和/或出处理腔室空间的选定电磁能。

在另一个方面，本发明提供一种样品处理装置上的阀处理腔室，该阀处理腔室包括：处理腔室，其具有位于样品处理装置的相对的第一和第二主侧之间的处理腔室空间，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一定的处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽度，该长度大于该宽度。该阀处理腔室还具有位于处理腔室区域内的阀腔室，该阀腔室位于处理腔室空间和样品处理装置的第二主侧之间，其中通过将阀腔室和处理腔室相分离的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离，并且处理腔室空间的一部分位于阀膜和样品处理装置的第一主侧之间，阀腔室和探测窗口占据处理腔室区域的互斥部分，阀腔室的至少一部分位于延伸到处理腔室区域中的阀盖内，阀膜在阀盖中形成。在处理腔室区域中设置探测窗口，其中该探测窗口能够透射被引导进和/或出处理腔室空间的选定电磁能。

在另一个方面，本发明提供一种从处理腔室选择性地去除样品材料的方法。该方法包括提供一种样品处理装置，其包括：处理腔室，其具有处理腔室空间，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一定的处理腔室区域；位于处理腔室区域中的阀腔室，其中通过位于阀腔室和处理腔室之间的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离；以及位于处理腔室区域中的探测窗口，其中该探测窗口能够透射选定的电磁能。该方法还包括在处理腔室中提供样品材料；通过探测窗口探测处理腔室中样品材料的特性；并且沿着处理腔室长度在选定位置处在阀膜中形成开口，其中该选定位置与所探测到的样品材料特性相关联。该方法还包括仅将样品材料的一部分从处理腔室通过形成于阀膜中的开口移动到阀腔室中。

在另一个方面，本发明提供一种从处理腔室选择性地去除样品材料的方法。该方法包括提供一种样品处理装置，其包括：处理腔室，其具有处理腔室空间，其中该处理腔室在样品处理装置上占据一定的处理腔室区域，并且该处理腔室区域具有长度以及横向于该长度的宽

度，该长度大于该宽度。该样品处理装置还具有位于处理腔室区域中的阀腔室，其中通过位于阀腔室和处理腔室之间的阀膜，该阀腔室与处理腔室相隔离；以及位于处理腔室区域中的探测窗口，其中该探测窗口能够透射选定的电磁能。该方法还包括在处理腔室中提供样品材料；通过探测窗口探测处理腔室中样品材料的特性；并且在处理腔室区域中在选定位置处在阀膜中形成开口，其中该选定位置与所探测到的样品材料特性相关联；并且通过旋转该样品处理装置而仅将样品材料的一部分从处理腔室通过形成于阀膜中的开口移动到阀腔室中。

在另一个实施例中，本发明提供一种从全血中分离核酸的方法，该方法包括：提供一种具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置；将全血置于加载腔室中；将全血转移到阀处理腔室；在阀处理腔室中对全血施加离心作用以形成血浆层（通常为上层），红细胞层（通常为下层），以及含有白细胞的中间层；将中间层的至少一部分去除；在所分离出的中间层中将白细胞溶解并且可选的将其中的细胞核溶解以释放抑制剂和/或核酸。

如果需要，在溶解白细胞之前，该方法可包括利用水（优选，不含RNase的无菌水）或者缓冲液对样品的被分离中间层进行稀释，可选进一步将稀释层浓缩以提高核酸材料的浓度，可选将进一步浓缩的区域进行分离，并且可选重复该稀释过程，随后进行浓缩和分离以便将抑制剂浓度降低至不会影响扩增方法的水平。

如果需要，在溶解白细胞之前、同时或之后，该方法可包括将分离出的中间层转移到分离腔室以接触固相材料，从而优选将至少一部分抑制剂粘附到固相材料；其中该固相材料具有俘获部位（例如，螯合官能团）、涂覆在固相材料上的涂覆剂或两者均有；其中涂覆剂从包括表面活性剂、强碱、聚合电解质、可选择性渗透的聚合物阻挡剂，及其组合的组中进行选择。

本发明的另一个实施例包括使用密度梯度材料从全血中分离核酸的方法。在该实施例中，该方法包括：提供具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置；将全血置于加载腔室中；将全血转移到阀处理腔室中；使得全血接触密度梯度材料；在阀处理腔室中对全血和密度梯度材料施加离心作用以形成多个层，其中的至少一个层含有所关注的细胞；将含有所关注细胞的层的至少一部分去除；并对所关注的分离细胞进行溶解以释放核酸。

在另一个实施例中，本发明提供从含有病原体的全血中分离核酸的方法，该方法包括：提供具有加载腔室、可变阀处理腔室和其中含有病原体俘获材料的分离腔室的装置；将全血置于加载腔室中；将全血转移到阀处理腔室；在阀处理腔室中对全血施加离心作用以形成含有病原体的血浆层、红细胞层，和具有白细胞的中间层；将具有病原体的血浆层的至少一部分转移到具有病原体俘获材料的分离腔室；从病原体俘获材料将病原体的至少一部分分离；并且将病原体溶解以释放核酸。

本发明还提供用于执行本发明各种方法的成套工具。

下面结合本发明装置和方法的各种示意性实施例描述本发明的这些以及其它的特征和优点。

### 定义

“核酸”具有在本领域所公知的含义并且指的是 DNA（例如，基因组 DNA、cDNA 或者质粒 DNA）、RNA（例如，mRNA、tRNA、或 rRNA），和 PNA。它可具有多种形式，包括但不限于，双链或单链构形、圆形形式、质粒、较短寡核苷酸、肽核酸，也称为 PNA（如在 Nielsen 等人的 Chem.Soc.Rev. 26, 73-78 (1997) 中所述的），等等。核酸可以是基因组 DNA，它可包括完整的染色体或者染色体的一部分。DNA 可具有编码（例如，编码 mRNA、tRNA 和/或 rRNA）和/或非编码序

列（例如，着丝粒、端粒、基因间区域、基因内区、转位子和/或微随体（微卫星）序列）。核酸可包括任何的天然核苷酸以及人造或化学改性的核苷酸、突变核苷酸等。核酸可含有非核酸成分，例如肽（如在 PNA 中）、标签（放射性同位素或荧光标记）等。

“含核酸材料”指的是核酸源材料例如细胞（例如，白细胞、去核红细胞）、细胞核，或者病毒，或任何其它容纳有含核酸结构的合成物（例如质粒、科斯质粒（粘粒），或类病毒、古细菌）。所述细胞可以是原核的（例如，革兰氏阳性或革兰氏阴性细菌）或真核的（例如，血细胞或组织细胞）。如果含核酸材料是病毒，则可以包括 RNA 或 DNA 基因组；它可以是病毒性的，减毒的或非感染性的；并且它可感染原核或者真核细胞。含核酸材料可以是天然的、人工改性的或人造的。

“被隔离的”指的是已经从样品中的至少一部分抑制剂（即，至少一种类型的抑制剂的至少一部分）分离出的核酸（或含核酸材料）。这包括从其它材料，例如细胞成分如蛋白质、脂质、盐和其它抑制剂分离所需要的核酸。更优选的，被隔离的核酸是基本纯净的。“基本纯净”指的是隔离至少 3 皮克每微升 ( $\text{pg}/\mu\text{L}$ )，优选至少 2 毫微克/微升 ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ )，并且更优选至少  $15\text{ng}/\mu\text{L}$  的核酸，同时将原始样品中抑制剂的量降低至少 20%，优选至少 80% 并且更优选至少 99%。污染物一般为除了样品中的溶剂之外的细胞成分和有核成分例如亚铁血红素和有关产物（血晶质，血色素）和金属离子、蛋白质、脂质、盐等。因此，术语“基本纯净”通常指的是将大部分的抑制剂（例如，亚铁血红素及其降解产物）从样品分离，从而能够将所隔离核酸的后续使用造成干扰的化合物至少被部分的去除。

“粘附到”或“粘附”或“粘结”指的是通过多种机制，例如微弱作用力如 Van der Waals 相互作用、静电相互作用、亲和粘结或物理捕获以可逆方式将抑制剂保持在可选固相材料上。该术语的使用并不

意味着作用机制，并且包括吸附和吸收机制。

“固相材料”（能够可选的容纳于本发明方法的装置中）指的是无机和/或有机材料，优选由天然和/或合成的有机和/或无机化合物的重复单元形成的聚合物，所述单元可以相同或者不同。这包括均聚物和杂聚物（例如，共聚物、三元共聚物、四元共聚物等，它们例如可以是无规则的或者块状的）。该术语包括纤维或颗粒形式的聚合物，它们易于由本领域公知的方法制备。这种材料一般形成多孔基质，但是对于特定的实施例，所述的固相还指固体表面，例如聚合物材料的非多孔薄片。

可选的固相材料可具有俘获部位。“俘获部位”指的是一种材料粘附到该固相材料上的部位。一般的，俘获部位包括官能团或分子，它们或者以共价方式结合或者以其它方式结合（例如，疏水结合）到固相材料。

短语“涂覆在固相材料上的涂覆剂”指的是一种在固相材料的至少一部分例如在纤丝基质和/或吸着颗粒的至少一部分上涂覆的材料。

“表面活性剂”指的是在溶解它的介质中降低该介质的表面或界面张力的物质。

“强碱”指的是在水中完全离解的碱，例如 NaOH。

“聚合电解质”指的是作为充电聚合物的电解质，一般具有较高的分子量，例如，聚苯乙烯磺酸。

“可选择性渗透的聚合物阻挡剂”指的是允许基于尺寸和电荷选择性的运送流体的聚合物阻挡剂。

“浓缩区域”指的是相对于浓缩度较低的区域而言，含核酸材料、细胞核和/或核酸（其可以为小球的形式）浓度较高的样品区域。

“基本分离”，如在此所使用的，特别在将样品的浓缩区域从样品的低浓缩区域分离的情形，指的是在低于总量的 25% 的样品中将核酸（无论它是自由的、在细胞核内，或者在其它含核酸材料中）总量的至少 40% 去除。优选，将低于总量的 10% 的样品中的核酸总量的至少 75% 从样品的其余部分分离。更优选的，将低于总量的 5% 的样品中的核酸总量的至少 95% 从样品的其余部分分离。

“抑制剂”指的是例如在扩增反应中使用的酶的抑制剂。这种抑制剂的例子一般包括铁离子或它的盐类（例如， $\text{Fe}^{2+}$  或它的盐类）和其他的金属盐类（例如，碱金属离子、过渡金属离子）。其它抑制剂可包括蛋白质、缩氨酸、脂质、碳水化合物、亚铁血红素及其降解产物、尿素、胆汁酸、黑腐酸、多醣、细胞膜，以及细胞溶质成分。人血中用于 PCR 的主要抑制剂为血红蛋白、乳铁结合蛋白和 IgG，它们分别存在于红细胞、白细胞和血浆中。本发明方法从含核酸材料将至少一部分抑制剂（即，至少一种类型的抑制剂的至少一部分）分离。如在此所述的，含有抑制剂的细胞可以与含有细胞核或者其它含核酸材料的细胞相同。抑制剂可以含于细胞中或者位于细胞外。细胞外抑制剂包括不含于细胞中的所有的抑制剂，例如它们包括那些存在于血清或病毒中的抑制剂。

“优选将抑制剂的至少一部分粘附到固相材料”指的是一种或多种类型的抑制剂比含核酸材料（例如，细胞核）和/或核酸以更高的程度粘附到可选的固相材料上，并且一般不将很大部分的含核酸材料和/或细胞核粘附到固相材料。

“微观流体的”（当在此使用时）指的是这样一种装置，其具有一个或多个流体通道、腔室或导管，它们具有至少一个低于  $500 \mu\text{m}$  并

且通常在  $0.1 \mu m$  和  $500 \mu m$  之间的内部截面尺寸，例如深度、宽度、长度、直径等。并且在用于本发明的装置中，所述的微尺寸通道或腔室可优选具有至少一个优选在  $0.1 \mu m$  和  $200 \mu m$  之间，更优选在  $0.1 \mu m$  和  $100 \mu m$  之间，并且经常在  $1 \mu m$  和  $20 \mu m$  之间的截面尺寸。通常，该微观流体装置具有多个腔室（处理腔室、分离腔室、混合腔室、废液腔室、稀释剂腔室、扩增反应腔室、加载腔室等），各个腔室形成用于容纳样品的空间；以及至少一个连接该阵列的多个腔室的配送通道；例如，其中阵列中的至少一个腔室可含有固相材料（因此经常被称为分离腔室）和/或阵列中的至少一个处理腔室可例如含有溶解剂（因此经常被称为混合腔室）。

术语“包括”及其变型在这些术语出现于说明书和权利要求书中之处并不具有限制性的含义。

同样在这里，利用端点对数值范围的叙述包括落入该范围中的所有数值（例如，1 到 5 包括 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5 等）。

上述的本发明概要并不旨在对本发明的各个公开实施例或各种实现方式予以描述。随后的描述更加具体的示例出示意性实施例。在整个申请的多个地方，通过列举例子而提供指导，能够以各种组合的形式使用这些例子。在各种情形，所述的列举仅用作具有代表性的组并且不应被解释为具有排它性的列举。而且，对各个实施例进行描述，其中各实施例的各种元素可用于其它实施例中，即使没有特别描述。

#### 附图简要描述

图 1 是根据本发明的一个示例性样品处理装置的平面视图。

图 2 是图 1 样品处理装置的一部分沿图 1 中的线 2-2 的放大截面视图。

图 3A-3D 描述了将流体移动通过具有处理腔室和阀腔室的处理阵列的一种示例性方法。

图 4 是根据本发明的可替代处理腔室和多个阀腔室的平面视图。

图 5 是根据本发明的另一种可替代处理腔室和阀腔室构造的截面视图，包括面向样品处理装置的两个主侧的可选探测设备。

图 6 是用于本发明特定方法中的装置的示意图。

### 具体实施方式

在随后对本发明示意性实施例的详细描述中，将参考附图，这些附图构成本发明的一个部分，并且通过图解方式示出可用于实施本发明的各种具体实施例。应该理解，在不背离本发明范围的前提下，还可采用其它的实施例，并且可在结构方面予以改动。

本发明提供一种样品处理装置，其可用于在多个处理腔室中对液体样品材料（或者夹带在液体中的样品材料）进行处理以实现理想的反应过程，例如 PCR 扩增、连接酶链反应（LCR）、自维持性序列复制、酶动力学研究、匀质配体结合分析，以及其它化学的、生物化学的，或其它可能例如要求精确和/或快速热变的反应。更具体的，本发明提供具有一个或多个处理阵列的样品处理装置，其各个处理阵列优选具有加载腔室、至少一个处理腔室、阀室，以及用于在处理阵列的各个构件之间输送流体的导管。本发明的装置可以具有或者不具有微观流体特征。

虽然在下面描述了具有各种构造的示意性实施例，但是本发明的样品处理装置可与例如在以下文献中所描述的那些装置类似：美国专利申请公开 No. US2002/0064885 (Bedingham 等)；US2002/0048533 (Bedingham 等)；US2002/0047003 (Bedingham 等)；和 US2003/138779 (Parthasarathy 等)；以及美国专利 No. 6, 627, 159B1 (Bedingham 等)。上面所列文献均公开了各种不同构造的样品处理装置，它们可用于制造根据本发明原理的样品处理装置。

在图 1 和 2 中示出根据本发明原理制造的一个示意性样品处理装

置，其中图 1 是一种样品处理装置 10 的平面视图并且图 2 是该样品处理装置 10 的一部分的放大截面视图（沿着图 1 中的线 2-2 截取）。该样品处理装置 10 优选具有如在图 1 中所示意的圆盘形状，但是任何其它能够旋转的形状均可用于取代圆盘形状。

该样品处理装置 10 具有至少一个并且优选为多个的处理阵列 20。如果该样品处理装置 10 具有如图所示的圆形形状，则优选的是所示的各个处理阵列 20 从靠近样品处理装置 10 的中心 12 处朝向样品处理装置 10 的周边延伸。所示处理阵列 20 沿着径向关于样品处理装置 10 的中心 12 基本对准。虽然这种布置可以是优选的，应该理解能够以替代方式使用处理阵列 20 的任何布置方式。而且，虽然所示意的样品处理装置 10 具有四个处理阵列 20，关于根据本发明制造的样品处理装置设置的处理阵列的实际数目可以多于或者少于四个。

各个处理阵列 20（在图 1 所示实施例中）具有沿着导管 32 连接到处理腔室 40 的加载腔室 30。处理阵列 20 还具有通过导管 62 连接到第二处理腔室 70 的阀腔室 60。阀腔室 60 可优选设置于延伸到在样品处理装置 10 上由处理腔室 40 所占据的区域中的阀盖 50 中。

应该理解与一个或多个处理阵列 20 有关的多个特征都是可选的。例如，加载腔室 30 和相关的导管 32 是可选的，其中样品材料可通过不同的加载结构被直接引入到处理腔室 40 中。同时，对于一个或多个处理阵列 20 可设置附加的特征。例如，一个或多个处理阵列 20 可与两个或多个阀腔室 60 相关联。另外的阀腔室可与另外的处理腔室或者其它特征相关联。

对于该处理阵列 20 所设置的任何加载结构均可被设计为与外部设备（例如移液管、中空注射器或其它流体供给设备）相配合以接收样品材料。加载结构自身可形成一定的容积（如图 1 的加载腔室 30），或者该加载结构并不形成特定的容积而是在此位置处将样品材料引

入。例如，该加载结构可设置成端口的形式，通过该端口将移液管或者针插入。在一个实施例中，例如该加载结构可以是沿着导管的一个指定位置，该位置适于接收移液管、注射针等。可以通过人工方式或者通过自动化系统（例如机器人等）执行加载操作。而且，可以直接从另一个装置直接对该样品处理装置 10 进行加载（使用自动化系统或者人工方式）。

图 2 是样品处理装置 10 沿图 1 中的线 2-2 的放大截面视图。虽然本发明的样品处理装置可以利用任何适当数目的构造技术进行制造，在图 2 的截面视图中示出一种示意性的构造。该样品处理装置 10 具有连接到阀层 16 的底层 14。盖层 18 在阀层 16 背离底层 14 的一侧上连接到阀层 16。

样品处理装置 10 的各个层可由任何适当的材料或者材料的组合进行制造。用于底层 14 和/或阀层 16 的一些适当材料的例子包括但并不限制于聚合材料、玻璃、硅、石英、陶瓷等。对于这些层将与样品材料直接接触的那些样品处理装置 10，优先用于这些层的材料不与样品材料发生反应。在很多不同的生物分析应用中，可用于基层的一些适当聚合材料的例子可包括但并不限制于聚碳酸酯、聚丙烯（例如等规聚丙烯）、聚乙烯、聚酯等。

可以利用任意适当的技术或者多种技术的结合将构成样品处理装置 10 的这些层相互连接到一起。适当的连接技术优选可提供充分的完整性从而这种连接能够经受在处理腔室中处理样品材料期间所产生的作用力。一些适当的连接技术的例子可包括例如胶粘剂连接技术（使用压敏胶粘剂、可固化胶粘剂、热熔性胶粘剂等）、热密封、热焊接、超声波焊接、化学焊接、溶剂粘合、混合挤压、模压铸造等，及其组合。进而，用于连接不同层的技术可以是相同的或不同的。例如，用于连接底层 14 和阀层 16 的一种或多种技术可以是与用以连接盖层 18 和阀层 16 的一种或多种技术相同的或不同的。

图 2 示意出处理腔室 40 的截面视图。图 2 还示出阀盖 50，在所示实施例中，其位于由处理腔室所占据的区域内，即处理腔室区域。处理腔室可优选通过将处理腔室边界突出到样品处理装置 10 的任何一个主侧上而形成。在图 2 所示实施例中，样品处理装置 10 的第一主侧 15 由底层 14 的最下方表面（即，背离阀层 16 的表面）确定并且第二主侧 19 由盖层 18 的最上方表面（即，背离阀层 16 的表面）确定。应该理解如在这里所使用的“上方”和“下方”仅参考图 2 描述并且不应被理解为对样品处理装置 10 在使用时的定向加以限制。

阀盖 50 被描述为延伸到如由处理腔室 40 的最外边界所限定的处理腔室区域内。由于阀盖 50 位于处理腔室区域中，该阀盖 50 可被描述成悬于处理腔室 40 一部分的上方或者以悬臂方式位于处理腔室 40 一部分的上方。

本发明优选的处理腔室可具有探测窗口，从而允许探测处理腔室 40 中的样品材料的一种或多种特性。优选的是使用选定光线实现该探测，这里术语“光线”指的是电磁能，无论其对于肉眼可视与否。优选该光线在从紫外线到红外线电磁能的范围内，并且，在一些情形中，优选该光线包括在肉眼可视的光谱中的电磁能。而且，该选定光线可以例如是具有一种或多种特定波长、一种或多种波长范围、一种或多种偏振态或者其组合的光线。

在图 2 所示的实施例中，探测窗口可设于盖层 18 中或者底层 14 中（或者两者）。无论是哪个构件用作探测窗口，所用材料优选可透射很大部分的选定光线。对于本发明的目的而言，所述很大的部分例如可以是 50% 或更多的正入射（垂直入射）选定光线，更优选 75% 或更多的正入射选定光线。用于探测窗口的一些适当材料的例子包括但不限于例如聚丙烯、聚酯、聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯-聚乙烯共聚物、环烯烃聚合物（例如，聚二环戊二烯）等。

在一些情形中，优选样品处理装置 10 底层 14 和/或盖层 18 是不透明的，从而样品处理装置 10 在处理腔室空间 14 的空间和样品处理装置 10 的至少一侧之间是不透明的。不透明指的是基本上阻止上述选定光线的透射（例如，这种正入射光线的 5%或者更少被透射）。

阀腔室 60 在图 2 中示出并且优选至少部分的位于阀盖 50 中，如图 2 所示。阀腔室 60 的至少一部分可优选位于样品处理装置 10 的第二主侧 19 和至少一部分的处理腔室 40 之间。阀腔室 60 也优选通过将阀腔室 64 和处理腔室 40 分离的阀膜 64 与处理腔室 40 隔离，从而处理腔室 40 空间的一部分位于阀膜 64 和样品处理装置 10 的第一主侧 15 之间。在所示的实施例中，盖层 18 优选沿着表面 52 密封到阀盖 50 以将阀腔室 60 从处理腔室 50 隔离。

阀膜 64 优选由其中开口可由非接触方法（例如激光烧蚀）等方法形成的材料形成。这样，用于膜 64 中的一种材料或多种材料可包括优选的吸收用于打开膜 64 的能量的材料。例如，膜 64 可例如包括如碳黑、UV/IR 吸收剂等材料。

用于在阀膜 64 中形成开口的能量可通过盖层 18 或底层 14（或通过二者）引导到阀膜 64 上。然而，优选通过盖层 18 将能量引导到阀膜 64 以避免产生与能量到达阀膜 64 之前引导其通过处理腔室 40 中的样品材料有关的问题。

现在参考图 3A-3D，描述使用处理阵列 120 的一种示意性方法，各图为处理阵列在根据本发明的一种示意性方法的不同阶段中的平面视图。在各图中所示的处理阵列 120 包括通过导管 132 连接到处理腔室 140 的加载腔室 130。该处理阵列还具有阀盖 150 以及位于阀盖 150 的一部分中的阀腔室 160。阀盖 150 和阀腔室 160 限定阀膜 164，其在通过阀膜 164 形成任何开口之前将阀腔室 160 从处理腔室 140 分离并

且隔离。阀膜 164 边界在图中示为虚线，因为它对裸眼不可视。

处理阵列 120 的另一个特征是探测窗口 142，选定光线可通过该窗口透射进和/或出处理腔室 140。该探测窗口 142 可通过装置的其中设置有处理阵列 120 的任何主侧形成(或者通过两个主侧，如果需要)。在所示实施例中，探测窗口 142 可优选由被处理腔室 140 所占据并且还未被阀盖 150 所占据的那个区域部分形成。在表征探测窗口 142 的另一种方式中，探测窗口 142 和阀盖 150(和/或位于其中的阀腔室 160)可被描述成占据处理腔室 140 区域的互斥部分。

处理阵列 120 还具有通过导管 162 连接到阀腔室 160 的输出处理腔室 170。该输出处理腔室 170 可含有，例如，位于其中的一种或多种试剂 172。试剂 172 可固定于处理腔室 170 中或者可松散的置于处理腔室中。虽然在处理腔室 170 中示出，但是能够在处理阵列 120 中将一种或多种试剂置于任何适当的一个位置或者多个位置处，例如加载腔室 130、导管 132&162、处理腔室 140、阀腔室 160 等。

试剂的使用是可选的，即，本发明的样品处理装置在处理腔室中可以含有或者不含有任何试剂。在另一种变型中，在不同处理阵列中的某些处理腔室可含有试剂，而另外一些则不含有。在又一种变型中，不同的处理腔室可含有不同的试剂。而且，处理腔室结构的内部可被涂覆或者以其它方式进行处理以便控制试剂的粘附。

处理腔室 140 (及其相关处理腔室区域) 可优选具有大于处理腔室 140 宽度的长度(例如沿着图 3A 中的轴线 121 测量)，其中垂直于处理腔室长度测出处理腔室宽度。这样，处理腔室 140 可被描述成“细长形的”。优选处理腔室 140 沿其进行延展的轴线 121 与从旋转轴线延伸的径向方向对准，含有处理阵列的样品处理装置围绕该轴线旋转(如果旋转是用于实现流体转移的驱动力)。

在其它方面，优选探测窗口 142 至少沿着处理腔室 140 的长度与阀膜 164 一起延伸。虽然所示探测窗口 142 是独立的单式特征，可以理解对于每个处理腔室 140 可以设置两个或者更多个的探测窗口。例如，多个独立的探测窗口可以沿着处理腔室 140 的长度分布（例如，沿着阀膜 164）。

表征各种特征的相对尺寸的另一种方式可以是例如阀膜 164 沿着处理腔室区域的长度在处理腔室 140 最大长度（沿其延展轴线 121）的 30% 或更多（或者，可选的，50% 或更多）上延伸。对于很多样品处理装置，对于阀膜 164 的尺寸的这种表征能够以实际的测量值表示，例如，阀膜 164 可被描述成沿着处理腔室 140 的长度延伸 1 毫米或者更长的长度。

所示方法的第一阶段示于图 3A，其中加载腔室 130 中含有样品材料 180。为了实现所示意方法的目的，样品材料 180 为全血。在加载之后，优选通过导管 132 将全血 180 转移到处理腔室 140。优选通过围绕旋转轴线 111 旋转处理阵列 120 而实现这种转移。该旋转优选，在例如图 3A 位于其上的纸面中进行，但是围绕点 111 的任何的旋转都是可以接受的，其中处理腔室 140 在一条弧线中移动，该弧线围绕位于加载腔室 130 关于处理腔室 140 的相对侧上的一点。下面给出用于处理全血以去除核酸的优选方法的进一步描述。

用于本发明样品处理装置中的处理阵列可以优选是“没有通气孔的”。如结合本发明所使用的，一种“没有通气孔的处理阵列”是这样一种处理阵列（即，至少两个连接的腔室），其中仅有通向处理阵列的开口位于加载结构例如加载腔室中。换言之，为了到达没有通气孔的处理阵列中的处理腔室，样品材料应该被配送到加载腔室。同样，位于处理阵列中的任何空气或者其它流体在加载样品材料之前也必须通过加载腔室从处理阵列排出。相反，通气的处理阵列具有至少一个位于加载腔室外侧的开口。该开口可允许位于处理阵列中的任何空气

或者其它流体在加载之前排出。

可通过在旋转期间交替的加速和减速该装置而促进样品材料通过具有没有通气孔的处理阵列的样品处理装置移动，特别是通过导管和处理腔室使得样品材料排气（burping）。该旋转可利用至少两个加速/减速循环进行，即，初始加速、随后减速、第二轮加速，以及第二轮减速。如果加速和/或减速是快速的，则将更有利。该旋转还可优选仅在一个方向中进行，即，在加载过程中可以不必反转旋转方向。这种加载过程使得样品材料能够移动位于处理阵列的更加远离装置旋转中心的那些部分中的空气。实际的加速和减速速率可基于各种因素而改变，例如温度、装置尺寸、样品材料距旋转轴线的距离、用于制造装置的材料、样品材料的特性（例如，粘度）等。

图 3B 示出在全血 180 移动进入处理腔室 140 之后的处理阵列。全血 180 停留在处理腔室 140 中，即，没有流动到阀腔室 160，因为阀腔室 160 通过阀膜 164 与处理腔室 140 隔离。

进一步旋转处理阵列 120 可优选导致全血 180 的成分分离成为红细胞 182、白细胞层（血沉棕黄层）184 和血浆 186，如图 3C 所示。该分离通常是离心力和材料相对密度的结果。

如果在各个全血样品 180 中的不同成分的精确含量（或者如果全血样品 180 自身的量）未知，则不同分离层之间的边界位置不可知。然而，对于本发明，优选能够探测不同分离成分之间的边界位置。

这种探测可利用任何适当的选定光线优选通过探测窗口发生。可通过全血成分 182、184&186 透射光线或者从上述全血成分反射光线以获得处理腔室 140 中的样品材料图像。在另一种可选实施例中，可利用光线吸光率探测一种或多种选定成分的边界或位置。例如，在将全血旋转之后，能够探测成层的红细胞层、血沉棕黄层（白细胞）和血

浆之间的界面。在将微粒旋转之后，能够探测成层的微粒层和上层清液层之间的界面。

优选确定样品材料的所有特征或特性的位置，即所有边界的位置，包括血浆 186 的自由表面 187。在其它情形中，仅确定一个特征的位置，例如，血沉棕黄层 184 和血浆 186 之间的边界便足以，其中所探测到的特性为执行该方法中的下一个步骤提供了充分的信息。

在已探测到处理腔室 140 中的材料的适当的一种或者多种特性之后，优选在理想位置处在阀膜 164 中形成开口 168。在所示方法中，开口 168 的理想位置被选择成将血浆 186 的一部分从处理腔室 140 去除。可能期望将基本上所有的血浆 186 去除，仅在处理腔室 140 中剩余一小部分（见图 3D 中的 186r）。可能需要在处理腔室 140 中保留少量的血浆以限制或者防止红细胞 182 转移离开处理腔室 140。

开口 168 可利用任何适当的非接触技术形成。这种技术的一种可以例如是阀膜 168 的激光烧蚀。其它技术可包括但是并不限于例如聚焦光学加热等。

在开口 168 形成之后，进一步旋转处理阵列 120 优选将血浆 186 通过开口 168 从处理腔室 140 移动到阀腔室 160 内，随后通过导管 162 转移到输出处理腔室 170。结果，血浆 186 被置于处理腔室 170 中，并且剩余少量的血浆 186r 与血沉棕黄层 184 和红细胞 182 一起位于处理腔室 140 中。

在图 4 中示出根据本发明的具有处理腔室 240 和阀结构的处理阵列 220 的另一个实施例的一部分。在所示实施例中，处理腔室 240 沿着轴线 221 延展并且处理阵列 220 被设计成可以旋转以提供用于移动流体的作用力。该旋转可围绕点 211 进行，该点在所示实施例中位于轴线 221 上。然而，应该理解处理阵列围绕其进行旋转的点并不必须

位于轴线 221 上。

处理腔室 240 在阀盖 250a、250b 和 250c 延伸进入处理腔室区域处以虚线示出并且在阀盖 250a、250b 和 250c 没有延伸进入处理腔室区域处以实线示出。优选在处理腔室区域的未被阀盖 250a、250b 和 250c 占据的那些部分中，处理腔室 240 具有探测窗口 242，其允许选定光线透射进和/或出处理腔室 240 以允许探测处理腔室 240 中的样品材料 280。

该处理阵列 220 也具有与处理腔室 240 隔离并分离的阀腔室 260a、260b 和 260c。各个阀腔室 260a、260b 和 260c 与腔室 270a、270b 和 270c（分别的）连通。阀腔室 260a、260b 和 260c 可通过导管连接到它们各自的腔室 270a、270b 和 270c，如图 4 所示。

各个阀腔室 260a、260b 和 260c 可优选至少部分的（分别的）位于阀盖 250a、250b 和 250c 上。各个阀腔室 260a、260b 和 260c 还可优选利用位于各个阀腔室 260a、260b 和 260c 中的阀膜 264a、264b 和 264c 从处理腔室 240 隔离并且分离。各个阀膜 264a、264b 和 264c 部分的由处理腔室 240 的虚线限定。

对于处理腔室 240 设置的多个阀腔室 260a、260b 和 260c 可提供将处理腔室中任何样品材料的不同部分选择性去除并且将该样品材料移动到不同腔室 270a、270b 和 270c 的能力。例如，通过在阀腔室 260a 的阀膜 264a 中形成开口 268a，可将处理腔室 240 中样品材料 280 的第一部分移动到腔室 270a 中。

在通过阀腔室 260a 中的开口 268a 将样品材料 280 的第一部分移动到腔室 270a 中之后，可在阀腔室 260b 的阀膜 264b 中设置另一个开口 268b 以将样品材料 280 的第二部分移动到腔室 270b 中。该第二部分将通常包括位于开口 268a 和 268b 之间的样品材料 280。沿着处理腔

室 240 的长度这两个开口分开的距离在图 4 中由 x 表示。因此，如果已知处理腔室 240 的截面面积（在垂直于轴线 221 的平面中截取），则可确定样品材料 280 的第二部分的数量。因此，通过将开口 268a 和 268b 以彼此间隔选定距离的方式形成，能够将已知的或者选定量的样品材料移动到腔室 270b 中。

处理腔室 240 还具有在处理腔室 240 的最远离处理阵列 220 的旋转点 211 的端部处设置于阀盖 250c 中的第三阀腔室 260c。阀盖 250c 在处理腔室 240 的整个宽度上延伸（相对于阀盖 250a 和 250b，它们仅在处理腔室 240 的一部分宽度上延伸）。

图 5 示出根据本发明的另一种处理腔室 340 的截面图。该处理腔室 340 形成于具有底层 313、中间层 314、阀层 316 和盖层 318 的样品处理装置 310 中。可以利用任何适当的技术组合将各层相互连接。

虽然这些层被示意为单独的、匀质的构造，可以理解可以由多种材料和/或层形成一个或多个层。而且，能够将其中一些层相结合。例如，层 313 和 314 可以被结合（作为例子，见图 2 截面视图中的层 14）。可选的，能够将层 314 和 316 结合为单独的结构，其可由例如模制、挤出等方法形成。

图 5 所示的构造包括通过阀膜 364 与处理腔室 340 分离的阀腔室 360。阀腔室 360 进一步由盖层 318 限定。还在图 5 中示出装置 390，其可用于例如在阀膜 364 中形成开口。装置 390 例如可以是激光器等，其能够优选发送在阀膜 364 中形成开口而不会在盖层 318 中形成开口所需的能量。

如果用于在阀膜 364 中形成开口的能量可被引导通过盖层 318，则底层 313 可由任何能够阻挡这种能量的材料形成。例如，底层 313 可由例如金属箔片或者其它材料形成。如果阀层 316 和/或阀膜 364 允

许足量的选定波长光线通过，则能够通过阀层 316 和/或阀膜 364 探测处理腔室 340 中的样品材料。

如果，可选的，阀层 316 和阀膜 364 能够阻挡光线通过，从而不能对处理腔室 340 中的样品材料进行探测，则可期望通过底层 313 探测处理腔室 340 中的样品材料。这种探测可使用如图 5 所示的探测装置 392 实现，其能够通过层 313 探测处理腔室 340 中的样品材料。在一些情形中，能够使用引导能量通过层 313 的装置 392 在阀膜 364 中形成开口（如果这种能量通过处理腔室 340 中的样品材料的穿透是可以接受的）。

#### 使用全血的示意性方法

本发明还提供用于从含有核酸（例如 DNA、RNA、PNA）的全血中分离核酸的方法和组件，该核酸存在于含有核酸的细胞（例如，白细胞）内。

应该理解虽然所述方法涉及从样品分离核酸，该方法并非必须从含核酸材料（例如细胞核）中去除核酸。即，例如可能需要进一步的步骤以便从细胞核将核酸进一步分离。

本发明的特定方法旨在从抑制剂例如亚铁血红素及其降解产物（例如铁盐）中将核酸最终分离，这些抑制剂是不利的，因为它们能够抑制扩增反应（例如，如在 PCR 反应中所使用的）。更特殊的，本发明的特定方法可涉及从至少一种类型的抑制剂的至少一部分中将样品中的至少一部分核酸予以分离。优选方法可涉及将含核酸样品中基本上所有的抑制剂予以去除从而核酸是基本纯净的。例如，含铁抑制剂的最终浓度优选为不高于约 0.8 微摩尔( $\mu\text{M}$ )，这是目前在传统 PCR 系统中所能够接受的浓度水平。

为了从全血中获取纯净的 DNA，通常需要去除血红蛋白以及血浆

蛋白质。当红细胞被溶解时，将释放出能够抑制 Taq 聚合酶的亚铁血红素及有关的化合物。在全血中，通常血色素的浓度为 15 克 (g) 每 100 毫升 (mL)，基于此，亚铁血红素在红细胞溶解的全血中的浓度约为 10 毫摩尔 (mM)。为了使得 PCR 顺利进行，亚铁血红素的浓度应被降低至微摩尔 ( $\mu M$ ) 的水平。这可例如通过将抑制剂进行稀释或者使用能够粘结抑制剂的材料将其去除而得以实现。

在一个实施例中，本发明提供一种从全血中分离核酸的方法，该方法包括：提供具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置；将全血置于加载腔室中；将全血转移到阀处理腔室；在阀处理腔室中对全血施加离心作用以形成血浆层（通常为上层），红细胞层（通常为下层），以及含有白细胞的中间层（位于血浆层和红细胞层之间）；将中间层的至少一部分去除；在所分离出的中间层中将白细胞溶解并且可选的将其中的细胞核溶解以释放抑制剂和/或核酸。在特定实施例中，该溶解步骤包括使白细胞经受强碱处理，可选进行加热以释放核酸。如果需要，该方法还可包括将含有被释放核酸的样品的 pH 调整至 7.5 到 9 的范围内。可选的，该溶解步骤可包括使白细胞经受表面活性剂处理。

如果需要，在溶解白细胞之前、同时或之后，该方法可包括将分离出的中间层转移到分离腔室以接触固相材料，从而优选将至少一部分抑制剂粘附到固相材料。更特殊的，在该方法的特定实施例中，该装置还具有其中容纳有固相材料的分离腔室。该固相材料优选具有俘获部位（例如，螯合官能团）、涂覆在固相材料上的涂覆剂或两者均有；其中涂覆剂从包括表面活性剂、强碱、聚合电解质、可选择性渗透的聚合物阻挡剂及其组合的组中进行选择。

当存在固相材料时，该方法包括在分离腔室中使得被溶解样品与固相材料相接触以便优选将至少一部分抑制剂粘附到固相材料；其中溶解可在接触固相材料之前、同时或之后进行。然后，该方法一般包括将至少一部分细胞核和/或核酸从其上粘附有至少一部分抑制剂的固

相材料分离。

在其中未使用任何固相材料的特定实施例中，该方法可包括利用水（优选，不含 RNase 的无菌水）或者缓冲液对被溶解的样品进行稀释以便将抑制剂的浓度降低至不会影响扩增方法的水平；可选进一步的溶解细胞核以释放核酸；可选加热该样品以使得蛋白质变性，并且可选对含有被释放核酸的样品的 pH 进行调整，并且可选执行 PCR。可利用充足的水完成稀释以便将亚铁血红素浓度降低至低于 2 微摩尔。可选的，可利用充足的水完成稀释以形成被溶解样品的 2x 到 1000x 的稀释溶液。

可选的，如果需要，在溶解白细胞之前，该方法可包括利用水或缓冲液对样品的被分离中间层进行稀释，可选进一步将稀释层浓缩以提高核酸材料的浓度，可选将进一步浓缩的区域进行分离，并且可选重复该稀释处理步骤，随后进行浓缩和分离以便将抑制剂浓度降低至不会影响扩增方法的水平。

参考图 6，适用于这些实施例的装置的一个可能优选实施例的实例具有加载腔室 670、可变阀处理腔室 672、可选分离腔室 676、洗提剂腔室 678、废液腔室 680 以及可选的扩增腔室 682。这些腔室相互间形成流体连通从而全血样品能够被加载到加载腔室 670 中，然后能够被转移到可变阀处理腔室 672。通过在阀处理腔室 672 中对全血施加离心作用以形成血浆层（通常为上层）、红细胞层（通常为下层）以及含有白细胞的中间层，至少一部分（并且优选为很大部分）中间层被转移到可选的分离腔室 676，从而将白细胞（血沉棕黄层）至少从红细胞层并且优选从全血的另外两层（血浆层和红细胞层）进行分离，其能够被转移到可选的废液腔室 680。在其中血沉棕黄层中的白细胞可被溶解以释放抑制剂以及细胞核和/或核酸。如果分离腔室 676 含有固相材料，则该过程可包括优选的将至少一部分抑制剂粘附到固相材料。然后洗提剂腔室 678 中的洗提剂被转移到分离腔室 676 以将至少一部

分的目标的含核酸材料和/或核酸去除。在特定实施例中，例如，该材料可被直接转移到扩增反应腔室 682 以执行 PCR 过程。该扩增反应腔室 682 可选的可具有用于扩增反应（例如 PCR）的预沉积反应剂。

### 溶解剂和条件

对于本发明的特定实施例，在处理期间的某个时刻，样品中的细胞，特别是含核酸细胞（例如白细胞、细菌细胞、病毒细胞）被溶解以释放细胞内物质并且形成样品（即溶解产物）。如在这里所述的细胞溶解，是对细胞膜，涉及外部细胞膜，并且如果存在的话还有核膜进行物理破坏。这可通过使用标准技术完成，例如利用蛋白酶水解，随后对蛋白酶进行热失活，利用表面活性剂（例如非离子表面活性剂或者十二烷基硫酸钠）、胍盐、或强碱（例如 NaOH）处理，进行物理破坏（例如利用超声波），煮沸，或加热/冷却（例如，加热至至少 55 ° C（通常 95 ° C）并且冷却至室温或更低温度（通常到 8 ° C）），这可包括冷冻/融化过程。一般的，如果使用溶解剂，则将其溶于水介质中，但是如果需要可以使用有机溶剂。

通过使用水（即水稀释）作为溶解试剂（即溶解剂）可以将红细胞（RBC）溶解而不会破坏全血中的白细胞（WBC），以释放抑制剂。可选的，也可使用氯化铵或季铵盐以破坏 RBC。还可利用低渗缓冲液通过低渗透压冲击而将 RBC 溶解。例如可通过离心作用回收完整 WBC 或其细胞核。

一般的，可使用较强的溶解剂，例如表面活性剂，溶解 RBC 以及含核酸细胞（例如，白细胞（WBC）、细菌细胞、病毒细胞）以释放抑制剂、细胞核和/或核酸。例如，非离子表面活性剂可用于溶解 RBC 以及 WBC 而保持细胞核完整。非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂和两性离子表面活性剂可用于溶解细胞。非离子表面活性剂特别有用。如果需要，可使用表面活性剂的组合物。可将非离子表面活性剂例如 TRITON X-100 添加到含有蔗糖和镁盐的 TRIS 缓

冲液以用于分离细胞核。

例如，用于溶解的表面活性剂的用量足够高以有效溶解样品，然而足够低以避免沉淀。基于样品总重量，用于溶解过程中的表面活性剂浓度一般至少为 0.1wt-%。基于样品总重量，用于溶解过程中的表面活性剂浓度一般不高于 4.0wt-%，并且优选不高于 1.0wt-%。浓度通常被最优化以便在最短可能的时间内实现完全的细胞溶解，并且使得所形成的混合物具有 PCR 相容性。事实上，在添加到 PCR 混合物的制剂中的核酸不会对实时 PCR 产生任何抑制。

如果需要，可与表面活性剂相混合的使用缓冲液。一般，这种缓冲液提供的样品具有至少为 7，并且一般不高于 9 的 pH。

一般的，可使用更强的溶解剂，例如强碱，溶解含核酸细胞中（如在白细胞中）含有的任何细胞核以释放核酸。例如，在美国专利 No.5,620,852 (Lin 等) 中所描述的方法可适合于本发明的特定方法，所述专利中的方法包括在室温下在短至 1 分钟的时间内利用碱处理（例如 NaOH）从全血萃取 DNA。通常，多种强碱均可用于在碱溶解过程中形成有效的 pH（例如 8-13，优选 13）。强碱一般为氢氧化物例如 NaOH、LiOH、KOH；具有含季氮阳离子的氢氧化物（例如，季铵）以及例如叔胺、仲胺或伯胺这些碱类。一般，强碱的浓度至少为 0.01Normal(N)，并且一般不高于 1N。一般的，随后可将混合物中和，特别当核酸被用于 PCR 时。在另一个过程中，在利用碱进行溶解之后，可以利用加热以进一步使得蛋白质变性，随后将样品中和。

还可在高温使用蛋白酶 K，随后在更高温度下将蛋白酶 K 热失活以将核酸从细胞核或 WBC 分离。

还可使用市售溶解剂和中和剂，例如在根据需要可按照比例缩小至例如微观流体尺寸的 Sigma 的 Extract-N-Amp Blood PCR 工具包。较

强的溶解溶液例如用于溶解不同细菌如葡萄状球菌、链球菌等的 GenPoint (Oslo, Norway) 的 POWERLYSE 可有利的用于本发明的特定方法中。

在另一个过程中，可使用煮沸方法以溶解细胞和细胞核，释放 DNA，并且同时析出血红蛋白。上层清液中的 DNA 可直接用于 PCR 而无需浓缩步骤，从而使得该过程可用于低拷贝数的样品。

对于传染性疾病，需要从全血对细菌或病毒进行分析。例如，在细菌的情形，白细胞可与细菌细胞共存。在装置中，可以溶解红细胞以释放抑制剂，并且然后例如在进一步溶解之前通过离心作用分离出细菌细胞和白细胞。含核酸细胞（细菌和白细胞/细胞核）的该浓缩块可进而被移至用于去除抑制剂的腔室。然后例如细菌细胞可被溶解。

细菌细胞溶解根据其类型可使用加热实现。可选的，细菌细胞溶解可通过使用酶方法（例如，溶解酵素、变溶菌素）或化学方法进行。优选通过碱溶解方法将细菌细胞溶解。

在染色体、分析分子生物学、防疫分子生物学等的研究中通常使用细菌来传播质粒。在含质粒细菌的情形，在细菌和质粒中均存在遗传物质。可以使用本发明方法执行从基因组 DNA 分离细胞蛋白质和细胞碎片的清洁过程。如此获得的含有质粒 DNA 的上层清液被称为“清洁的溶解产物”。该清洁的溶解产物可以使用各种方法进一步纯化，例如阴离子交换色谱法、凝胶过滤或者利用酒精析出。

在能够结合于装置中的细菌培养协定的一个具体实例中，E.Coli 细胞培养物被施以离心作用并且再悬浮于 TE 缓冲液 (10mM TRIS、1mMEDTA, pH 7.5) 中，并且通过添加 0.1M NaOH/1%SDS (十二烷基硫酸钠) 而被溶解。通过添加 3M (三摩尔) 1 容积的乙酸钾 (pH 4.8) 使得细胞溶解停止并且对上层清液施加离心作用。细胞溶解产物被进

一步纯化以获得清洁的质粒 DNA。

血浆和血清是含有病毒的用于分子检测的标本的主要部分。在全血分离之后，血浆或血清样品可被用于萃取病毒（即，病毒颗粒）。例如，为了从病毒分离 DNA，可以首先通过回旋血液而分离出血清。通过使用可变阀，可单独将血清排空到另一个腔室中。血清可在离心作用下将病毒浓缩，或者在使用例如在此所描述的固相材料去除抑制剂之后直接用于后续的细胞溶解步骤。固相材料可以吸收溶液从而病毒颗粒并不穿过该材料。然后可将病毒颗粒以小的洗提量洗提出。病毒可通过加热或通过酶或化学方法例如通过使用表面活性剂而被溶解并且用于下游的应用中，例如 PCR 或实时 PCR。在需要病毒 RNA 的情形中，需要将 RNase 抑制剂添加到溶液以避免 RNA 降解。

#### 可以任选的固相材料

对于本发明的特定实施例，已经发现抑制剂可粘附到含有任何形式的固体基质（例如，颗粒、纤丝、膜）的固相材料上，该材料优选附有俘获部位（例如螯合官能团）、涂覆在固相材料上的涂覆剂（优选表面活性剂），或者二者均有。涂覆剂可为阳离子、阴离子、非离子或两性离子表面活性剂。可选的，涂覆剂可以是聚合电解质或强碱。如果需要，可以使用涂覆剂的各种组合。

可用于本发明方法的固相材料可包括多种有机和/或无机材料，该材料含有抑制剂例如亚铁血红素和亚铁血红素降解产物，如特别是铁离子。这种材料通过具有俘获部位（优选为螯合官能团）、涂覆有一种或多种涂覆剂（例如，表面活性剂，聚合电解质或强碱）或二者均有而被功能化。一般的，该固相材料具有有机聚合物基质。

通常，适当的材料具有化学惰性的、物理和化学稳定性，并且与各种生物样品相容。固相材料的例子包括氧化硅、氧化锆、氧化铝微粒、金属胶体例如金、金涂覆薄片，其例如通过巯基化学方法而被功

能化，以产生俘获部位。适当聚合物的例子例如包括聚烯烃和氟化聚合物。固相材料一般在使用之前被洗去盐分和其它污染物。它既可以干燥方式存放也可以备用的水悬浮液的形式。固相材料优选在流通式容器中使用，例如，如移液管、注射器、或较大柱体、微量滴定板或其它装置，但是也可使用并不涉及这种容器的悬浮方法。

可用于本发明方法的固相材料可包括多种形式的多种材料。例如，其形式可为颗粒或微粒，其可以是松散的或固定的，纤维、泡沫、釉料、多微孔膜、膜，或具有缩微复制表面的基质。如果固相材料包括颗粒，则它们优选是均匀的、球形的，并且是刚性的，以保证良好的流体流动特性。

对于本发明的流通式应用，这种材料一般形式为松散的，多孔网络以使得大分子能够一致的和不受损伤的进出，并且提供大的表面面积。优选，对于这种应用，固相材料具有较高的表面面积，例如，如，高于一平方米每克 ( $m^2/g$ )。对于不使用流通式装置的应用，固相材料可以是或者不是多孔基质的形式。这样，在本发明特定方法中也可以使用膜。

对于使用颗粒或微粒的应用，可将它们引导到样品或者将样品引导到颗粒/微粒床并且例如通过离心作用从该处将其去除。可选的，颗粒/微粒可被涂覆（例如，图案方式涂覆）到惰性基质（例如，聚碳酸酯或聚乙烯），该基质可选利用各种方法（例如喷雾干燥）涂覆有粘结剂。如果需要，该基质可被缩微复制以提高表面面积并且增强净化。可利用氧等离子体、电子束或紫外线照射、加热或电晕放电处理对其进行预处理。该基质可例如用作覆盖膜或者在装置的存储器上碾压到覆盖膜上。

在一个实施例中，固相材料包括纤丝基质，其中可含有或者不含有颗粒。纤丝基质可包括多种纤维的任何一种。一般的，纤维在水环

境中不可溶。其例子包括玻璃纤维、聚烯烃纤维，特别是聚丙烯和聚乙烯微纤维、芳族聚酸胺纤维、氟化聚合物，特别是聚四氟乙烯纤维，和天然纤维素纤维。可以使用纤维混合物，其关于粘结核酸而言可以是活性的或非活性的。优选，纤丝基质形成网，其厚度至少约 15 微米，并且不大于约 1 毫米，并且更优选，不大于约 500 微米。

当使用时，颗粒一般在水环境中不可溶。它们可由一种材料或者组合材料制成，例如涂覆颗粒。它们可以是可膨胀的或不可膨胀的，但是它们优选在水和有机液体中不可膨胀。优选，如果颗粒进行粘附，其由非膨胀疏水材料制成。它们可由其对于核酸的亲和力而被选择。在美国专利 No.4, 565, 663 (Errede 等)、4, 460, 642 (Errede 等) 和 4, 373, 519 (Errede 等) 中描述了一些水膨胀颗粒的例子。在美国专利 No.4, 810, 381 (Hagen 等)、4, 906, 378 (Hagen 等)、4, 971, 736 (Hagen 等)；和 5, 279, 742 (Markell 等) 中描述了在水中不可膨胀的颗粒。优选的颗粒为聚烯烃颗粒，例如聚丙烯颗粒（例如粉末）。可以使用颗粒混合物，其关于粘结核酸而言可以是活性的或非活性的。

如果使用涂覆颗粒，涂层优选是在水或有机溶剂中不可溶、不可膨胀的材料。涂层可以是或者不是核酸可粘附于其上的涂层。这样，被涂覆的基础颗粒可以是无机的或有机的。基础颗粒可包括无机氧化物例如氧化硅、氧化铝、氧化钛、氧化锆等，有机官能团以共价方式粘结到其上。例如，可以使用的共价粘结有机官能团，例如具有各种链长（C2、C4、C8 或 C18 官能团）的脂肪族官能团。

在美国专利 No.5, 279, 742 (Markell 等)、4, 906, 378 (Hagen 等)、4, 153, 661 (Ree 等)、5, 071, 610 (Hagen 等)、5, 147, 539 (Hagen 等)、5, 207, 915 (Hagen 等) 和 5, 238, 621 (Hagen 等) 中描述了具有纤丝基质的适当固相材料的例子。这种材料在商业上可从 3M 公司 (St.Paul, MN) 获得，商标名称为 SDB-RPS (苯乙烯二乙烯基苯反相磺酸盐, 3M Part No.2241)、阳离子-SR 膜 (3M Part

No.2251)、C-8 膜(3M Part No.2214)和阴离子-SR 膜(3M Part No.2252)。

特别优选具有聚四氟乙烯基质(PTFE)的材料。例如，美国专利No.4, 810, 381(Hagen等)公开了一种固相材料，其具有：聚四氟乙烯纤丝基质和陷于基质中的不可膨胀吸着颗粒，其中不可膨胀吸着颗粒与聚四氟乙烯的比率按重量在19:1到4:1的范围内，并且复合固相材料的净表面能量在20到300毫牛顿每米的范围内。美国专利No.RE 36, 811(Markell等)公开了一种固相萃取介质，其具有：PTFE纤丝基质和陷于基质中的吸着颗粒，其中该颗粒具有高于30并且上至100重量百分比的多孔有机颗粒，和低于70到0重量百分比的多孔(有机涂覆或未涂覆)的无机颗粒，吸着颗粒与PTFE的比率按重量在40:1到1:4的范围内。

特别优选的固相材料能够以商标名称EMPORE从3M公司(St.Paul, MN)获得。EMPORE技术的基础在于使用任何吸附颗粒都能形成颗粒加载膜或片的能力。颗粒在聚四氟乙烯惰性基质(90%吸附剂：10%PTFE，按重量)内紧密保持到一起。PTFE纤丝绝对不会影响到颗粒的活性。与利用传统的固相萃取(SPE)柱体或圆筒制备相同尺寸的颗粒相比，EMPORE膜制造过程可产生更稠密的、更均匀的萃取介质。

在另一个优选实施例中，固相(例如多微孔热塑性聚合物载体)具有多微孔结构，特征在于，热塑性聚合物的多种间隔的、随机分布的、非均匀形状的等轴颗粒由纤丝连接。颗粒彼此间隔以在它们之间提供微孔网络。颗粒通过从各个颗粒辐射到相邻颗粒的纤丝而相互连接。颗粒或纤丝的一种或者二者都可以是疏水性的。优选的这种材料的例子具有高的表面面积，通常高达40平方米/克，如由Hg表面面积技术所测得的，以及可达约5微米的孔径大小。

这种类型的纤维材料可由包括诱导相分离使用的优选技术制造。

这包括在足以形成匀质混合物的温度下热熔混合热塑性聚合物与不互溶的液体，将来自溶液的物质形成所期望的形状，冷却该成形物质以便诱导液体和聚合物相分离，并且最终将聚合物固化并且去除大部分的液体，并将多微孔聚合物基质保留。在美国专利 No.4, 726, 989 (Mrozinski)、4, 957, 943 (McAllister 等) 和 4, 539, 256 (Shipman) 中详细描述了该方法和优选材料。这种材料被称为诱导相分离膜 (TIPS 膜) 并且特别优选。

其它适当的固相材料包括非纺织材料，如在美国专利 No.5, 328, 758 (Markell 等) 中所公开的。该材料具有压缩的或熔凝的含颗粒的非纺织品 (优选吹制微纤维)，其含有高吸着效率的色谱级颗粒。

其它适当的固相材料包括称为 HIPE 泡沫的那些材料，其例如在美国专利公开 No.2003/0011092 (Tan 等) 中被描述。“HIPE”或“高内相乳液”指的是乳液具有连续反应相，一般为油相，以及与油相不互溶的非连续或共连续相，一般为水相，其中不共溶的相包括至少 74 体积百分比的乳液。由 HIPE 制造的很多聚合物泡沫一般是相对开胞式的。这意味着大多数或所有的细胞均与相邻的细胞形成无阻碍的连通。这种基本开胞式泡沫结构中的细胞具有细胞间窗口，这些窗口通常足够大以使得在泡沫结构中流体能够从一个细胞转移到另一个。

固相材料可包括用于抑制剂的俘获部位。这里，“俘获部位”指的是或者共价结合到固相材料的团 (例如官能团) 或者非共价 (例如，疏水的) 结合到固相材料的分子。

优选，固相材料具有能够俘获抑制剂的官能团。例如，固相材料可具有螯合官能团。在该文中，“螯合官能团”是多配位基的并且能够利用金属原子或离子形成螯合物的那些官能团 (但是抑制剂会或者不会通过螯合机制保持在固相材料上)。螯合官能团的集成可通过各种技术实现。例如，非纺织材料能够保持利用螯合官能团功能化的微

粒。可选的，非纺织材料的纤维可利用螯合官能团直接功能化。

螯合官能团的例子包括例如-(CH<sub>2</sub>-C(O)OH)<sub>2</sub>、3(2-氨基)胺官能团、亚氨基二乙酸官能团、次氨基三乙酸官能团。螯合官能团可通过各种技术结合到固相材料中。可通过将材料进行化学合成而将其结合到其中。可选的，含有所需螯合官能团的聚合物可以涂覆（例如，图案式涂覆）在惰性基质（例如，聚碳酸酯或聚乙烯）上。如果需要，可对基质进行缩微复制以增加表面面积和增强净化。也可利用氧等离子体、电子束或紫外线照射、加热或电晕放电处理处理对其进行预处理。该基质可例如用作覆盖膜或者在装置中的容器上碾压到覆盖膜。

螯合固相材料可从商业获得并且可用作本发明中的固相材料。例如，对于本发明的特定实施例，具有螯合官能团例如亚氨基二乙酸（以钠盐的形式）的 EMPORE 膜是优选的。在美国专利 No.5, 147, 539 (Hagen 等) 中公开了这种膜的例子，并且在商业上可从 3M 公司以名称 EMPORE Extraction Disk (47mm, No.2271 或 90mm, No.2371) 获得。对于本发明的特定实施例，优选使用具有螯合官能团的铵衍生 EMPORE 膜。为使得该片具有铵的形式，可用 50mL 的 0.1M 醋酸铵缓冲液在 pH 为 5.3 时冲洗，随后利用试剂水进行几次冲洗。

其它螯合材料的例子包括但并不限于能够以商标名称 CHELEX 从 Bio-Rad Laboratories 公司 (Hercules, CA) 获得的交联聚苯乙烯微粒，具有 3(2-氨基)胺的交联琼脂糖微粒、亚氨基二乙酸、次氨基三乙酸、聚胺和聚亚胺，以及在商业上能够以商标名称 DUOLITE-467 和 DUOLITE GT 73 从 Rohm 和 Haas (Philadelphia, PA) 获得的螯合离子交换树脂、AMBERLITE IRC-748、DIAION CR11、DUOLITE C647。

一般的，螯合官能团在固相材料上的浓缩密度约 0.02 纳摩尔每平方毫米，但是相信较大范围的浓缩密度也是可能的。

其它类型的俘获材料包括阴离子交换材料、阳离子交换材料、活性碳、反相、正相、苯乙烯二乙烯基苯、氧化铝、氧化硅、氧化锆和金属胶体。适当阴离子交换材料的例子包括强阴离子交换剂例如季铵、二甲乙醇胺、四烷基胺、三甲基苄氯胺和通常为氯化物形式的二甲乙醇苄基胺，以及弱阴离子交换剂例如聚胺。适当阳离子交换材料的例子包括强阳离子交换剂例如形式通常为纳的磺酸，和弱阳离子交换剂例如形式通常为氢的羧酸。适当碳基材料的例子包括 EMPORE 碳材料、碳微粒。适当反相 C8 和 C18 材料的例子包括端部罩有乙酸十八烷官能团或辛基官能团的氧化硅微粒，以及具有 C8 和 C18 氧化硅微粒的 EMPORE 材料（EMPORE 材料可从 St.Paul, MN 的 3M 公司获得）。正相材料的例子包括羟基官能团和二羟基官能团。

可从商业上获取的材料还可被改性或者直接用于本发明的方法。例如，可将能够以商标名称 LYSE AND GO (Pierce, Rockford, IL)、RELEASE-IT (CPG, NJ)、GENE FIZZ (Eurobio, France)、GENE RELEASER (Bioventure 公司, Murfreesboro, TN) 和 BUGS N BEADS (GenPoint, Oslo, Norway) 获得的固相材料，以及 Zymo 微粒 (Zymo Research, Orange, CA) 和 Dynal 微粒 (Dynal, Oslo, Norway) 作为固相俘获材料结合到本发明方法中，特别是装置中。

在这种方法的特定实施例中，固相材料具有涂覆剂。涂覆剂优选从表面活性剂、强碱、聚合电解质，可选择性渗透的聚合物阻挡剂及其组合所构成的组中选择。在这些方法的特定实施例中，固相材料具有聚四氟乙烯纤丝基质、陷于基质中的吸着颗粒，以及涂覆在固相材料上的涂覆剂，其中涂覆剂从表面活性剂、强碱、聚合电解质、可选择性渗透的聚合物阻挡剂及其组合所构成的组中选择。这里，短语“涂覆在固相材料上的涂覆剂”指的是涂覆在至少一部分固相材料上的材料，例如，涂覆在纤丝基质和/或吸着颗粒的至少一部分上。

在下面列出适当表面活性剂的例子。

适当强碱的例子包括 NaOH、KOH、LiOH、NH<sub>4</sub>OH，以及伯胺、仲胺或叔胺。

适当聚合电解质的例子包括聚苯乙烯磺酸（例如聚 4-苯乙烯磺酸钠或 PSSA）、聚乙烯基膦酸、聚乙烯基硼酸、聚乙烯基磺酸、聚乙烯基硫酸、聚苯乙烯膦酸、聚丙烯酸、聚甲基丙烯酸、木素磺化盐、角叉菜聚糖、肝素、软骨硫酸盐和盐或它们的其它衍生物。

适当可选择性渗透的聚合物阻挡剂的例子包括聚合物例如丙烯酸盐、丙烯酰胺、吖内酯、酒精聚乙烯醇、聚乙烯亚胺、多醣。这种聚合物可为各种形式。它们可以是水溶性的、水膨胀性的、不可水溶解的、水凝胶等。例如，聚合物阻挡剂可制备成能够用作较大颗粒例如白细胞、细胞核、病毒、细菌以及核酸例如人类基因组 DNA 和蛋白质的过滤器。这些表面可由本领域普通技术人员适当制成，以通过适当的选择官能团，通过交联等，基于尺寸和/或电荷分离。这种材料易于获得或者可由本领域普通技术人员制备。

优选，利用表面活性剂涂覆固相材料，并且不将任何过量的表面活性剂冲走，但是如果需要，可将另一涂覆剂冲去。通常，可以使用各种方法例如浸渍、碾压、喷雾等进行涂覆，然后，在使用之前一般将载有涂覆剂的固相材料例如在空气中进行干燥。

特别期望的是涂覆有表面活性剂，优选非离子表面活性剂的固相材料。这可根据在实例部分中所提出的过程而实现。虽然不希望局限于理论，相信添加表面活性剂可增加固相材料的可湿性，这使得抑制剂能够渗透到固相材料内并且结合到那儿。

用于固相材料的涂覆剂，优选是水基溶液，但是如果需要可以使用有机溶剂（酒精等）。涂覆剂加载应该足够高从而样品能够将固相

材料浸湿。然而，不应该高到将涂覆剂自身显著稀释的程度。优选，如果涂覆剂利用核酸稀释，则在稀释样品中具有不高于约 2wt-%的涂覆剂。通常，涂层溶液浓度可低至在溶液中具有 0.1wt-%的涂覆剂并且高至在溶液中具有 10wt-%的涂覆剂。

### 表面活性剂

非离子表面活性剂。已知多种适当的非离子表面活性剂可用作(上述)溶解剂和(下述)洗提剂，和/或固相材料上的涂层。它们包括，例如聚氧乙烯表面活性剂、羧酸脂表面活性剂、羧酸胺表面活性剂等。可从商业上获取的非离子表面活性剂包括，n-十二酰蔗糖、n-十二(烷)基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、n-辛基- $\beta$ -D-麦芽吡喃糖苷、n-辛基- $\beta$ -D-硫代吡喃葡萄糖苷、n-癸酰基蔗糖、n-癸基- $\beta$ -D-麦芽吡喃糖苷、n-癸基- $\beta$ -D-硫代麦芽糖苷、n-庚基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、n-庚基- $\beta$ -D-硫代吡喃葡萄糖苷、n-己基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、n-壬基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、n-辛酰蔗糖、n-辛基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、环己基-n-己基- $\beta$ -D-麦芽糖苷、环己基-n-甲基- $\beta$ -D-麦芽糖苷、洋地黄皂苷和能够以商标名称 PLURONIC、TRITON、TWEEN 获得的那些表面活性剂，以及可从商业上获取的并且在中列出的很多中其它的表面活性剂。在下表 1 中列出一些示例。优选的表面活性剂为聚氧乙烯表面活性剂。更优选的表面活性剂包括辛基苯氧基聚乙氧乙醇。

表 1

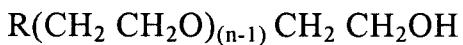
| 表面活性剂商品名       | 非离子表面活性剂            | 供应商                             |
|----------------|---------------------|---------------------------------|
| PLURONIC F127  | 改性乙氧基化乙醇和/或丙氧基化直链乙醇 | Sigma<br>St.Louis,<br>MO        |
| TWEEN 20       | 聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单月桂酸酯 | Sigma<br>St.Louis,<br>MO        |
| TRITON X-100   | t-辛基苯氧基聚乙氧乙醇        | Sigma<br>St.Louis,<br>MO        |
| BRIJ 97        | 聚氧乙烯(10)油基醚         | Sigma<br>St.Louis,<br>MO        |
| IGEPAL CA-630  | 辛基苯氧基聚(乙烯氧基)乙醇      | Sigma<br>St.Louis,<br>MO        |
| TOMADOL 1-7    | 乙氧化乙醇               | Tomah<br>Products<br>Milton, WI |
| Vitamin E TPGS | d-α-生育基聚乙二醇 1000    | Eastman<br>Kingsport,<br>TN     |

在美国专利公开 No.2003/0139550(Savu 等)和 2003/0139549(Savu 等) 中所公开类型的氟化非离子表面活性剂也是适当的。其它非离子氟化表面活性剂包括可从 DuPont(Wilmington, DE)以商标名称 ZONYL 获得的表面活性剂。

两性离子表面活性剂。已知多种适当的两性离子表面活性剂可用

作固相材料上的涂层，用作溶解剂和/或用作洗提剂。它们包括，例如烷基酰胺甜菜碱及其氧化胺、烷基甜菜碱及其氧化胺、碘基甜菜碱、羟基碘基甜菜碱、两性甘氨酸酯、两性丙酸盐、平衡的两性聚羧基甘氨酸酯和烷基聚氨基甘氨酸酯。根据 pH 蛋白质具有被充电和放电的能力；因此，在适当的 pH 时，蛋白质，优选具有约 8 到 9 的 pI，例如改性 Bovine Serum Albumin 或胰凝乳蛋白酶原，可用作两性离子表面活性剂。两性离子表面活性剂的一个具体的例子是乙醇胺丙烷基二甲基铵丙磺酸盐，能够以商标名称 CHAPS 从 Sigma 获得。更加优选的表面活性剂包括 N-十二（烷）基-N、N 二甲基-3-氨-1-丙烷磺酸盐。

阳离子表面活性剂。已知多种适当的阳离子表面活性剂可用作溶解剂，洗提剂和/或固相材料上的涂层。它们包括，例如季铵盐、聚氧乙烯烷基胺和氧化烷基胺。一般的，适当季铵盐包括至少一种较高分子量的官能团并且两种或三种较低分子量的官能团联接到公共的氮原子以产生阳离子，并且其中电平衡阴离子从由卤化物（溴化物、氯化物等）、醋酸盐、亚硝酸盐、以及较低硫酸醇盐（硫酸甲酯等）所构成的组中选择。在氮上的较高分子量的取代基通常是较高烷基官能团，其含有约 10 到约 20 个碳原子，并且较低分子量的取代基可以是较低的烷基，其含有约 1 到约 4 个碳原子，例如甲基或乙基，在一些情形中，它例如可被羟基取代。取代基的一种或多种可具有芳基部分或可被芳基取代，例如苯甲基或苯基。可能的低分子量取代基中还有较低的烷基，其含有约 1 到约 4 个碳原子，例如甲基或乙基，由较低的聚烷氧基部分取代，例如聚氧乙烯部分，其带有羟基末端官能团，并且符合基本公式：



其中 R 为结合到氮的(C1-C4)二价烷基官能团，n 表示约 1 到约 15 的整数。可选的，一个或两个具有末端羟基的这种较低的聚烷氧基部分可直接结合到季氮而不是通过前述的较低烷基结合到其上。可用于本发明的有用季铵卤化物表面活性剂的例子包括但并不限于甲基-二(2-羟乙基)coco-氯化铵或油烯基-氯化铵，(分别为 ETHOQUAD C/12

和 O/12) 以及 Akzo Chemical 公司的甲基聚氧乙烯 (15) 十八烷氯化铵 (ETHOQUAD 18/25)。

阴离子表面活性剂。已知多种适当的阴离子表面活性剂可用作溶解剂, 洗提剂和/或固相材料上的涂层。可用的阴离子类型的表面活性剂包括磺酸盐和硫酸盐, 例如烷基硫酸盐、烷基醚硫酸盐、烷基磺酸盐、烷基醚磺酸盐、烷基苯磺酸盐、烷基苯醚硫酸盐、烷基磺基乙酸盐、二级链烷磺酸盐、二级烷基硫酸盐等。其中很多都具有聚烷氧基官能团 (例如, 环氧乙烷官能团和/或环氧丙烷官能团, 其可具有随机的、顺序的或块状的排列) 和/或阳离子抗衡离子例如 Na、K、Li、胺、质子化叔胺例如三乙醇胺或季铵官能团。例子包括: 烷基醚磺酸盐例如月桂基乙醚硫酸盐, 能够以商标名称 POLYSTEP B12 和 B22 从 Northfield, IL 的 Stepan 公司获得, 和甲基牛磺酸钠, 能够以商标名称 NIKKOL CMT30 从日本东京的 Nikko Chemicals 公司获得; 二级链烷磺酸盐, 能够以商标名称 HOSTAPUR SAS, 其为二级链烷磺酸钠 ( $\alpha$ -烯烃磺酸盐) (C14-C17), 从 Charlotte, NC 的 Clariant 公司获得; 甲基-2-磺烷基酯, 例如甲基钠-2-磺酸 (C12-C16) 酯和 2-磺酸 (C12-C16) 脂肪酸二钠, 能够从 Stepan 公司以商标名称 ALPHASTE PC-48 获得; 烷基磺基乙酸盐和烷基磺基琥珀酸盐, 能够以月桂醇磺基乙酸酯钠盐 (商标名称 LANTHANOL LAL) 和月桂磺基琥珀酸二钠 (商标名称 STEPANMILD SL3), 均从 Stepan 公司获得; 以及烷基磺酸盐例如十二烷基硫酸铵, 可在商业上以商标名称 STEPANOL AM 从 Stepan 公司获得。

有用阴离子表面活性剂的另一类别包括磷酸盐例如磷酸烷基酯、烷基醚磷酸盐、芳烷基磷酸盐和芳烷基醚磷酸盐。其中很多都具有聚烷氧基多官能团 (例如, 环氧乙烷官能团和/或环氧丙烷官能团, 其可具有随机的、顺序的或块状的排列)。例子包括单-, 二-和三- (烷基四乙二醇醚) -o-磷酸酯的混合物, 一般称为三月桂基-4-磷酸盐, 在商业上能够以商标名称 HOSTAPHAT 340KL 从 Clariant 公司获得, 以及

PPG-5 ceteth 10 磷酸盐，能够以商标名称 CRODAPHOS SG 从 Parsipanny, NJ 的 Croda 公司获得，以及烷基和烷基氨基烷基二烃基氧化胺。氧化胺表面活性剂的例子包括在商业上能够以商标名称 AMMONYX LO、LMDO、和 CO 获得的表面活性剂，它们为十二烷基二甲基氧化胺、十二烷基氨基丙基二甲基氧化胺和十六烷基氧化胺，均来自 Stepan 公司。

### 洗提技术

对于使用固相材料以保持抑制剂的实施例，具有含核酸材料（例如细胞核）和/或被释放的核酸的样品的更加浓缩的区域可以使用各种洗提剂进行洗提。这种洗提剂可包括水（优选不含 RNase 的水）、缓冲液、表面活性剂，其可以是阳离子的、阴离子的、非离子的、或两性离子的，或者为强碱。

优选该洗提剂是碱性的（即，高于 7）。对于特定实施例，洗提剂的 pH 至少为 8。对于特定实施例，洗提剂的 pH 可达 10。对于特定实施例，洗提剂的 pH 可达 13。如果被洗提的核酸直接用于扩增处理例如 PCR 中，应该将洗提剂配制成成分的浓度不会对酶（例如，Taq 聚合酶）产生抑制，否则将抑制扩增反应。

适当表面活性剂的例子包括上面所列的那些，特别是已知的 SDS、TRITON X-100、TWEEN、氟化表面活性剂，和 PLURONICS 的那些表面活性剂。表面活性剂通常以水基溶液提供，但是如果需要可以使用有机溶剂（酒精等）。基于洗提剂的总重量，表面活性剂在洗提剂中的浓度优选至少为 0.1 重量/体积百分比（w/v-%）。基于洗提剂的总重量，表面活性剂在洗提剂中的浓度优选不高于 1w/v-%。稳定剂，例如聚乙二醇，可选的可与表面活性剂一起使用。

适当的洗提缓冲液的例子包括 TRIS-HCl、N-[2-羟乙基]哌嗪-N'-[2-乙磺酸]（HEPES）、3-[N-吗啉代]丙磺酸（MOPS）、哌嗪-N,

N'-二(2-乙磺酸)(PIPES)、2-[N-吗啉代]乙烷磺酸(MES)、TRIS-EDTA(TE)缓冲液、柠檬酸钠、醋酸铵、碳酸盐和重碳酸盐等。

洗提缓冲液在洗提剂中的浓度优选至少为 10 毫摩尔(mM)。表面活性剂在洗提剂中的浓度优选不高于 2 重量百分比(wt-%)。

通常，优选使用碱性溶液完成对含核酸材料和/或所释放的核酸的洗提。虽然不希望局限于理论，相信与用水进行洗提相比碱性溶液能够改进抑制剂的结合。碱性溶液还促进含核酸材料的溶解。优选，碱性溶液具有 8 到 13，并且更优选为 13 的 pH。高 pH 源的例子包括 NaOH、KOH、LiOH 的水溶液、季氨基氢氧化物、叔胺、仲胺或伯胺等。如果碱性溶液用于洗提，通常将其在随后的步骤中例如利用 TRIS 缓冲液中和以形成 PCR 备用样品。

碱性溶液的使用能够选择性的破坏 RNA，以便能够对 DNA 进行分析。在其它情形，可将 RNase 添加到制剂中以使 RNA 失活，随后对 RNase 进行热失活。类似的，可以添加 DNase 以便选择性的破坏 DNA 并且允许对 RNA 进行分析；然而，在该方法将使用其它不会破坏 RNA 的溶解缓冲液（例如 TE）。RNase 抑制剂例如 RNAsin 也可添加到用于 RNA 制备的制剂中，对其进行实时 PCR。

通常在室温进行洗提，但是较高的温度可产生更高的产量。例如，如果需要，洗提剂温度可达 95° C。虽然 1-3 分钟的洗提时间是优选的，但通常在 10 分钟的时间内进行洗提。

### 其它实施例

在其它情形，可能需要使用已知密度梯度材料选择性的将各种细胞类型分离。这些密度梯度材料包括蔗糖和其它可从商业上以商标名称 FICOLL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)、PERCOLL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)、HISTOPAQUE (Sigma,

St.Louis, MO)、ISOPREP (Robbins Scientific 公司, Sunnyvale, CA)、HISTODENZ (Sigma, St.Louis, MO) 和 OPTIPREP (Sigma, St.Louis, MO) 获得的材料。所关注的特殊细胞,例如,外周血单个核细胞(PBMC)可以通过使用可变阀装置而被选择性的去除。在将所关注的特殊细胞萃取之后,PCR 可以直接在细胞溶解之后进行,只要梯度材料具有 PCR 相容性。在当梯度材料不具有 PCR 相容性的情形中,应该谨慎的确保样品被充分稀释(例如,利用水或缓冲液),随后对细胞进行浓缩,并且在几次中重复该处理以生产 PCR 备用样品。可选的,仅仅充分的进行稀释便足以产生 PCR 备用样品。

例如,在本发明的一个实施例中,方法包括:提供具有加载腔室和可变阀处理腔室的装置;将全血置于加载腔室中;将全血转移到阀处理腔室中;使得全血接触密度梯度材料;在阀处理腔室中对全血和密度梯度材料施加离心作用以形成多个层,其中的至少一个层含有所关注的细胞;将含有所关注细胞的层的至少一部分去除;并对所关注的分离细胞进行溶解以释放核酸。在该方法的一个方面,在将所关注的分离细胞溶解之前,该方法包括利用水或缓冲液将所关注的分离细胞进行稀释,可选进一步浓缩该稀释层以提高所关注细胞的浓度,可选将该进一步浓缩的区域分离,并且可选重复该稀释过程,随后进行浓缩和分离。在该方法的另一个方面,在将所关注的分离细胞溶解之前,该方法包括利用水将所关注的分离细胞稀释,优选充分稀释以形成 20x-1000x 的稀释溶液。

在将病毒颗粒俘获到微粒(例如在下面描述的)上之前或之后,可以使用如在这里所描述的(以及在美国专利申请 METHODS FOR NUCLEIC ACID ISOLATION AND KITS USING SOLID PHASE MATERIAL(备案号 59073US003)中描述的)固相材料将抑制剂去除。这种固相材料可用于这里所述的各种方法并且利用各种样品。

除此之外,可以使用浓缩/分离/可选的稀释步骤而降低抑制剂的水

平，如在美国专利申请 METHODS FOR NUCLEIC ACID ISOLATION AND KITS USING A MICROFLUIDIC DEVICE AND CONCENTRATION STEP(备案号 59801US002) 中所公开的。

在其它实施例中，可能需要俘获白细胞中的 DNA/RNA 病毒。在这些情形中，可以使用可变阀将白细胞分离并且可将微粒用于俘获 DNA/RNA 病毒。

例如，微粒可利用适当的官能团而被功能化以分离特殊的细胞、病毒、细菌、蛋白质、核酸等。可以通过离心作用并且随后进行分离而将微粒从样品隔离。微粒可被设计成具有用于隔离的适当密度和尺寸（纳米到微米）。例如，在病毒俘获的情形，可识别病毒的蛋白质外壳的微粒可被用于在将少量残余抑制剂从血清样品去除之前或之后俘获并且浓缩病毒。

可通过细胞溶解而将核酸从隔离病毒颗粒中萃取出来。这样，微粒可提供在装置中的特殊区域内浓缩相关材料的一种途径，并且还允许能够从被俘获的颗粒中冲洗非相关材料并且洗提相关材料。

这种微粒的例子包括但不限于交联聚苯乙烯微粒，能够以商标名称 CHELEX 从 Bio-Rad Laboratories 公司 (Hercules, CA) 获得，具有三(2-氨基乙基)胺的交联琼脂糖微粒、亚氨基二乙酸、次氨基三乙酸 (NTA)、聚胺和聚亚胺以及螯合离子交换树脂，其在商业上能够以商标名称 DUOLITE C-467 和 DUOLITE GT73 从 Rohm 和 Haas (Philadelphia, PA)、AMBERLITE IRC-748、DIAION CR11、DUOLITE C647 获得。这些微粒还适于用作如上所述的固相材料。

微粒的其它例子包括能够以商标名称 GENE FIZZ (Eurobio, France)、GENE RELEASEER (Bioventures 公司, Murfreesboro, TN)，和 BUGS N BEADS (GenPoint, Oslo, Norway) 获得的微粒以及 Zymo

的微粒 (Zymo Research, Orange, CA) 和 DYNAL 微粒 (Dynal, Oslo, Norway)。

其它材料也可用于病原体俘获。例如，在本发明特定实施例中，聚合物涂层也可用于分离特殊的细胞、病毒、细菌、蛋白质、核酸等。这些聚合物涂层可例如被直接喷射到装置的覆盖膜上。

通过将抗体共价的附着到微粒表面，可将病毒颗粒俘获到微粒上。可支靠着病毒壳体蛋白质培养抗体。例如，DYNAL 微粒可被用于共价联接抗体。可选的，合成聚合物例如阴离子交换聚合物可被用于浓缩病毒颗粒。可从商业上获得的树脂例如 viraffinity (Biotech Support Group, East Brunswick, NJ) 可被用于涂覆微粒或者作为聚合物涂层涂覆到装置中的选定位置以浓缩病毒颗粒。BUGS N BEADS (GenPoint, Oslo, Norway) 能够例如用于萃取细菌。这里，这些微粒可用于俘获细菌例如葡萄状球菌、链球菌、E coli、Salmonella 和 Clamydia 原生小体。

因此，在本发明的一个实施例中，当样品包括病毒颗粒或其它病原体（例如细菌）时，装置可包括形式为病毒俘获微粒或其它病原体俘获材料的固相材料。在该方法中，样品与病毒俘获微粒相接触。更具体的，在一种情形中，例如，病毒俘获微粒可仅被用于浓缩病毒或细菌，随后将微粒隔离到另一个腔室，最后将病毒或细菌溶解。在另一个情形中，微粒可被用于浓缩病毒或细菌，随后将核酸溶解并且俘获到相同微粒上、稀释微粒、浓缩微粒、隔离微粒，并且在将所俘获核酸进行洗提之前多次重复该过程。

在特殊实施例中，方法包括：提供具有加载腔室、可变阀处理腔室、和含有病原体俘获材料的分离腔室的装置；将全血置于加载腔室中；将全血转移到阀处理腔室；在阀处理腔室中对全血施加离心作用以形成具有一种或多种病原体的血浆层、红细胞层和具有白细胞的中

间层（位于它们之间）；将具有一种或多种病原体的血浆层的至少一部分转移到其中具有病原体俘获材料的分离腔室；从病原体俘获材料将一种或多种病原体的至少一部分分离；并且将一种或多种病原体进行溶解以释放核酸。

可选的，如果微粒（或者其它病原体俘获材料）并非选择用于病毒俘获（或其它病原体俘获）的方法，则可以选择利用超速离心法从血清或血浆将病毒颗粒分离。如果需要将病毒分离，随后进行扩增反应（RT-PCR），则这些被浓缩的病毒颗粒可被转移到例如通过添加 RNase 抑制剂而利用表面活性剂进行溶解的装置。

如果核酸的下游应用是对其进行扩增处理例如 PCR，则优选所有用于该方法的试剂是与该处理相容的（例如，PCR 相容）。而且，添加 PCR 促进剂是有用的，特别对于诊断的目的。同样，在扩增之前对将要扩增的材料进行加热也是有益的。

在其中抑制剂未被完全去除的实施例中，可添加使用缓冲液、酶和 PCR 促进剂，在存在抑制剂的情形中，其有助于扩增过程。例如，可使用除了 Taq 聚合酶的酶，例如 rTth，其对于抑制剂更加具有抗性，由此显著有益于 PCR 扩增。可以添加使用 Bovine Serum Albumin、甜菜碱、蛋白酶抑制剂、牛转铁蛋白等，因为已知它们进一步有助于扩增过程。可选的，可以使用可从商业上获得的产品例如 Novagen 的 Blood Direct PCR Buffer 工具盒（EMD Biosciences, Darmstadt, Germany）用于从全血直接扩增而无需高成本的净化过程。

下面的例子进一步示意了本发明的目的和优点，但是在这些例子中所述的具体材料和数量，以及其它的条件和细节不应被理解为不当的限制本发明。

## 实例

### 例 1：制备固相材料：具有 TRITON-X 100 的氨形式

将 3M No.2271EMPORE Extraction Chelating Disk 置于玻璃滤器支架中。按照印于说明书上的程序将萃取片转化为氨形式。将该片放于药水瓶中并且浸入 1% 的 TRITON-X 100 (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 溶液 (0.1 克 (g) TRITON-X-100 在 10mL 的水中)，在 Thermolyne Vari-Mix Model M48725 Rocker (Barnstead/Thermolyne, Dubuque, IA) 上混合约 6-8 小时。将该片放置到玻璃滤器支架内，通过施加真空约 20 分钟 (min) 而进行干燥，然后在室温 (大约 21° C) 下干燥一整夜，注意不要清洗或者漂洗该片。

### 例 2：抑制剂/DNA 对 PCR 的效果：DNA 浓度固定时改变抑制剂的浓度

在利用清洁人类基因组 DNA 强化之前，制备一系列稀释的抑制剂以便研究抑制剂对于 PCR 的效果。对于 10 μ L 的 15 毫微克每微升 (ng/μ L) 的人类基因组 DNA，添加 1 μ L 的 不同的 Mix I (纯的或稀释的) (样品 2-未添加抑制剂，2D-纯的，2E-1: 10, 2F-1: 30, 2G-1: 100, 2H-1: 300) 并且搅拌。各个样品采用二 (2) μ L 的测定用量用于 20 μ L 的 PCR。结果示于表 2。

Mix I: 将一百 (100) μ L 的全血添加到 1 μ L 的纯 TRITON-X 100。在室温 (约 21° C) 将溶液培养约 5 分钟，间歇的搅拌该溶液 (每 20 秒大约搅拌 5 秒)。在进行下一步骤之前，检查该溶液以确保它是透明的。在 Eppendorf Model 5415D 离心机中以 400rcf 将该溶液旋转约 10 分钟。从微型离心机管的顶部取出大约 80 μ L 的液体并且标记为 Mix I。

### 例 2B: 抑制剂/DNA 对 PCR 的效果：抑制剂浓度固定时改变 DNA 的浓度

对于 10 μ L 的人类基因组 DNA，添加 1 μ L 的 1: 3 稀释 Mix I (如上所述)。所检查到的 DNA 浓度如下：样品 2J-15 ng/μ L、2K-7.5 ng/μ L、2L-3.75 ng/μ L、2M-1.5 ng/μ L。各个样品采用二 (2) μ L 的

测定用量用于 20 μ L 的 PCR。结果示于表 2。

#### 例 2C：抑制剂/DNA 对 PCR 的效果：未添加抑制剂

通过将 1 μ L 的水添加到各 DNA 样品而非抑制剂，制备下面的样品：样品 2N-15 ng/ μ L、， 2P-7.5 ng/ μ L 、 2Q-3.75 ng/ μ L、 2R-1.5 ng/ μ L。各个样品采用二（2） μ L 的测定用量用于 20 μ L 的 PCR。结果示于表 2。

表 2

| 样品编号 | Ct(副样) | 样品编号 | Ct(副样) |
|------|--------|------|--------|
| 2    | 1910   | 2K   | 29.16  |
|      | 19.06  |      | 30.22  |
| 2D   | 13.94  | 2L   | 30.47  |
|      | 29.50  |      | 29.96  |
| 2E   | 27.39  | 2M   | 28.43  |
|      | 26.22  |      | 26.16  |
| 2F   | 21.44  | 2N   | 20.05  |
|      | 20.66  |      | 19.80  |
| 2G   | 19.90  | 2P   | 20.74  |
|      | 19.30  |      | 20.54  |
| 2H   | 19.90  | 2Q   | 21.95  |
|      | 20.08  |      | 21.88  |
| 2J   | 28.45  | 2R   | 22.67  |
|      | 28.61  |      | 23.10  |

#### 例 3：通过使用螯合固相材料从全血分离基因组 DNA 的过程

将六百（600） μ L 的全血在 2500rpm 下旋转 10 分钟。将上层清液分离并且废弃，并且从中间层萃取血沉棕黄层。将五(5) μ L 的血沉棕黄层添加到五(5) μ L 的 2% TRITON-X 。将溶液充分混合，并且放置到 3M No.2271 EMPORE Extraction Chelating Disk(萃取螯合片)上，

其制备如例 1 所述, 使用 10% 的 TRITON-X -100 而非 1% 的 TRITON-X 100 作为加载溶液。在溶液渗入该片之后, 用二十 (20)  $\mu\text{L}$  测定用量的 0.1M NaOH 萃取该样品。在 Eppendorf Model 5415D 离心机中以 400rcf 快速旋转该溶液, 将十一 (11)  $\mu\text{L}$  测定用量的样品在 95° C 加热 3 分钟, 并且然后添加到三 (3)  $\mu\text{L}$  的 1M TRIS-HCl (pH 7.4)。

#### 例 4: 用于从全血分离基因组 DNA 的过程

将六百 (600)  $\mu\text{L}$  的全血在 2500rpm 下旋转 10 分钟。将上层清液分离并且废弃, 并且从中间层萃取血沉棕黄层。将五(5)  $\mu\text{L}$  的血沉棕黄层添加到九十五 (95)  $\mu\text{L}$  的不含 RNase 的无菌水。将溶液混合至颜色变均匀并且在 Eppendorf Model 5415D 离心机中以 400rcf 旋转约 2 分钟。来自顶部的九十五 (95)  $\mu\text{L}$  测定用量的溶液被分离和废弃, 在离心机管的底部留下约五 (5)  $\mu\text{L}$  的浓缩材料。对于最后的 5 $\mu\text{L}$  的浓缩材料, 添加 95 $\mu\text{L}$  的不含 RNase 的无菌水。将溶液混合至颜色变均匀。溶液在 Eppendorf Model 5415D 离心机中以 400rcf 旋转约 2 分钟。顶部的 95 $\mu\text{L}$  的溶液被分离和废弃, 在离心机管的底部留下约十 (10)  $\mu\text{L}$  的浓缩材料。对于最后的 10 $\mu\text{L}$  的浓缩材料, 添加一 (1)  $\mu\text{L}$  的 1M NaOH。在培养 1 分钟之后, 将样品在 95° C 加热 3 分钟。将 3 $\mu\text{L}$  的 1M TRIS-HCl (pH 7.4) 添加到 11 $\mu\text{L}$  的样品。

## 结果

表 3 示出: 对于例 1-2, 按照 QuantiTech SYBR Green PCR Handbook (p.10-12) 中用于制备 10 $\mu\text{L}$  的 PCR 样品 (2 $\mu\text{L}$  样品, 10 $\mu\text{L}$  SYBR Green Master Mix, 4 $\mu\text{L}$   $\beta$ -actin, 4 $\mu\text{L}$  水) 的说明、在 ABI 7700 QPCR 机器 (Applera, Foster City, CA) 上获得的结果; 对于例 3-4, 按照 LightCycler Factor V Leiden Mutation Kit 说明书在 p.2-3 上用于制备 10 $\mu\text{L}$  的 PCR 样品 (2.5 $\mu\text{L}$  样品, 5.5 $\mu\text{L}$  不含 RNase 的无菌水, 1 $\mu\text{L}$  的 10xFactor V Leiden Reaction Mix 和 1 $\mu\text{L}$  的 10x Factor Leiden Mutation Detection Mix) 的说明、在 LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) 上获得的结果。在 405nm 在 SpectraMax Plus<sup>384</sup> 分光光度计

(Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA.) 上进行光谱测量。对于每个样品，两个、三个或者四个数值表示二重、三重或四重。

表 3

| 样品   | Ct    | 405nm<br>(平均) |
|--|-------|---------------|
| 在 0.1M NaOH/40mM TRIS-HCl 缓冲液中<br>1.5 ng/ μ L 的人类基因组 DNA | 16.92 | -             |
|  | 20.67 |               |
| 在水中 1.5 ng/ μ L 的人类基因组 DNA                               | 19.01 | 0             |
|  | 18.67 |               |
| 在水中 1.5 ng/ μ L 的人类基因组 DNA                               | 16.18 | -             |
|  | 16.28 |               |
| 例 2A 和 2B Mix I 稀释 1: 36                                 | -     | 2.63          |
| 例 2A 和 2B Mix I 稀释 1: 360                                | -     | 0.38          |
| 例 2A 和 2B Mix I 稀释 1: 3600                               | -     | 0.036         |
| 例 2A 和 2B Mix I 稀释 1: 36000                              | -     | 0             |
| 例 3*   | 26.02 | -             |
|  | 24.93 |               |
| 例 4*   | 22.73 | -             |
|  | 23.93 |               |

\*对例 3-4 的正控制为根据在 QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook p.27 中描述的“Blood and Body Fluid Spin Protocol”从二百 (200) μ L 的全血提取的 DNA，在 200 μ L 的水中稀释并且具有 20-21 的 Ct 值。负控制 (NTC 或者无模板控制) 在这些实验中没有放大。

如在这里以及在所附权利要求中所使用的，除非该文明确指定为其它情形单数形式“一个(a)”、“和(and)”以及“该(the)”也包括复数指代。因此，例如，“一个阀盖”的指代包括多个阀盖并且“该处理腔室”的指代包括对一个或多个处理腔室及其为本领域普通技术人员所公知的等价形式。

已经讨论了本发明的示意性实施例并且提及在本发明范围内的各种可能的改变。在不背离本发明范围的前提下对本发明所作出的这些和其它改变和改进对于本领域普通技术人员而言将是明显的，并且应该理解本发明并不限制于在此所提出的示意性实施例。因此，本发明仅由所附权利要求及其等价形式所限定。

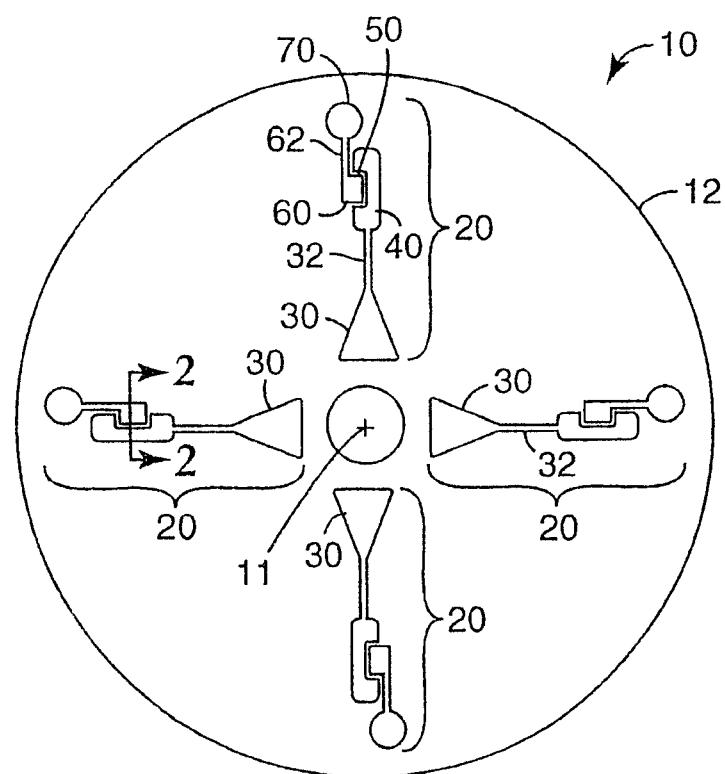


图1

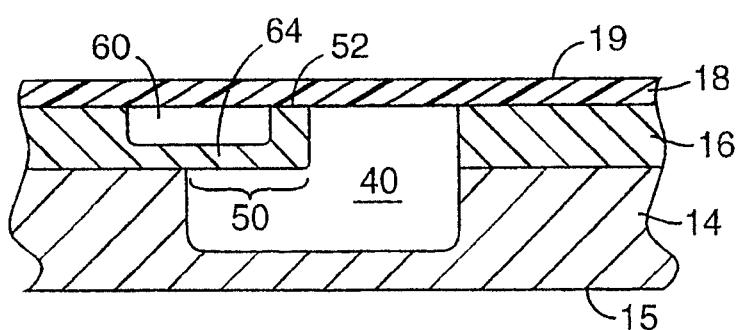


图2

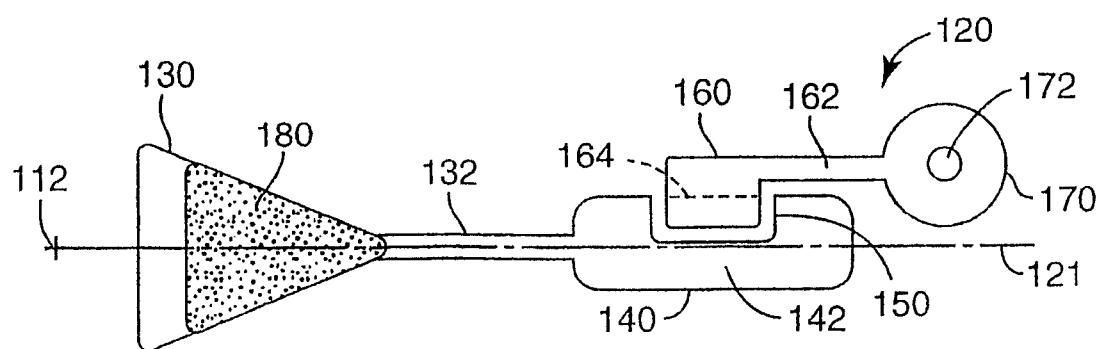


图3A

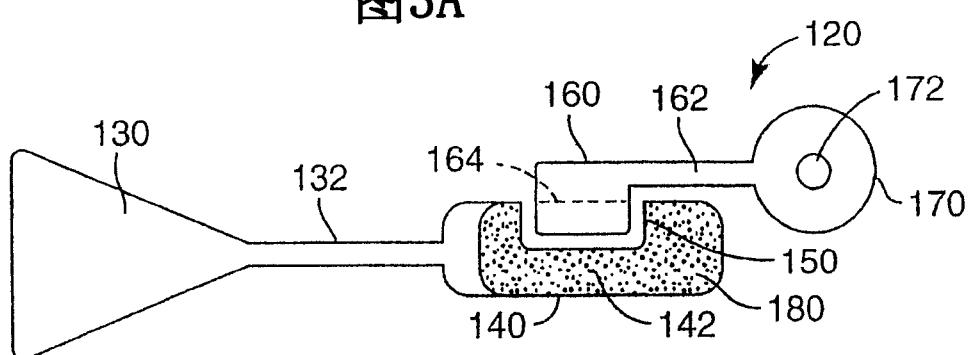


图3B

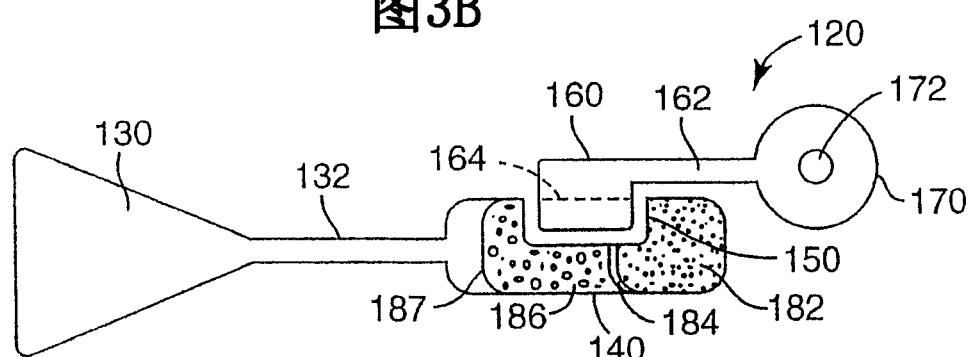


图3C

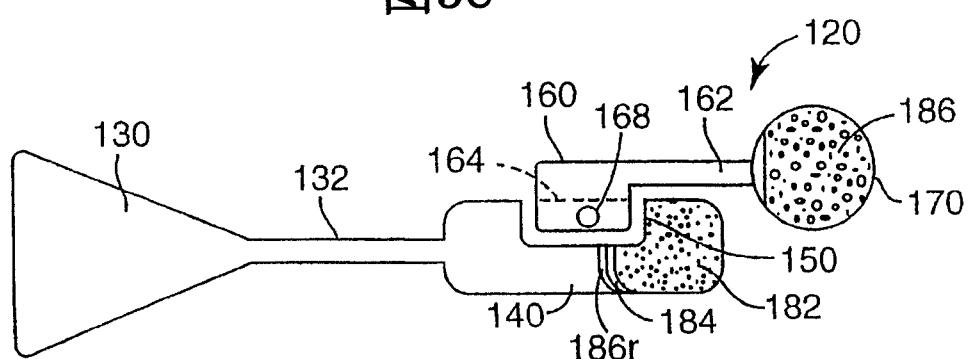


图3D

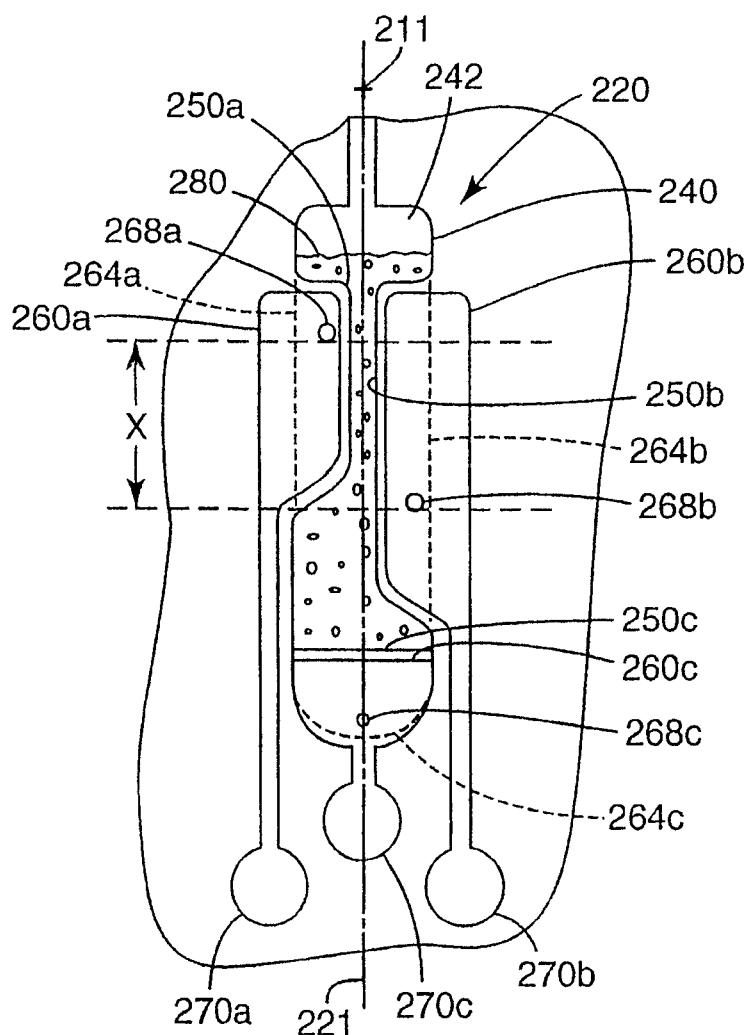


图4

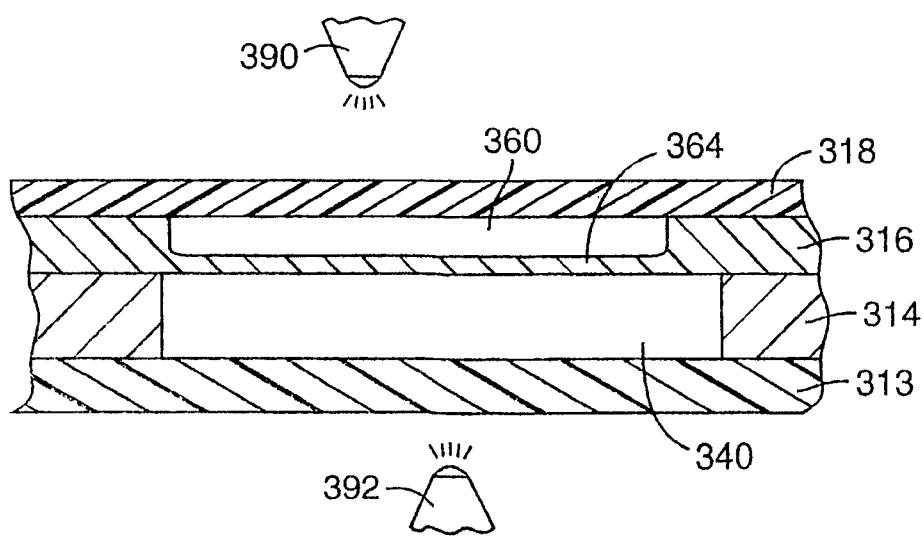


图5

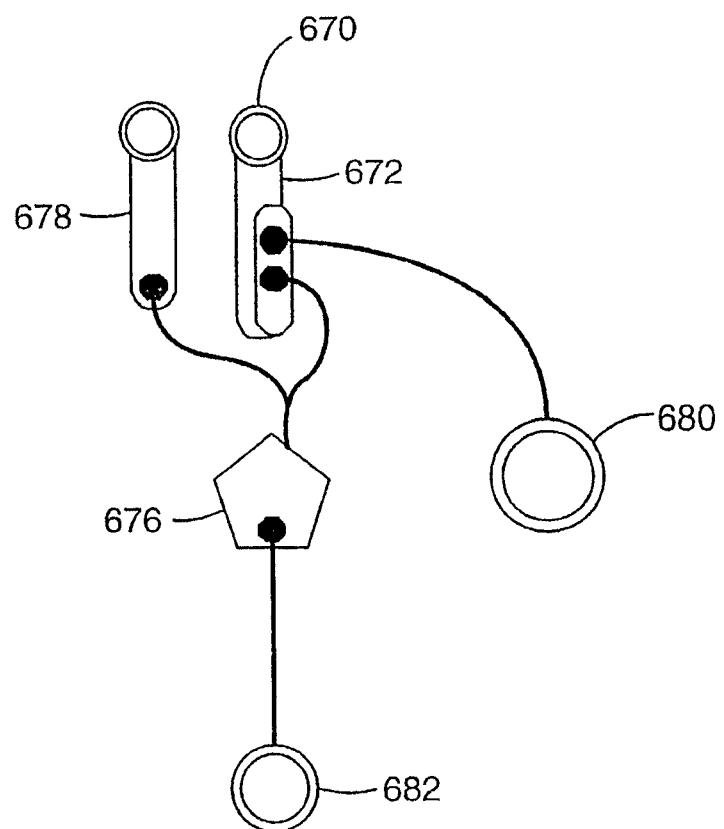


图6