

[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 200580006151.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

C12M 1/33 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 5 月 16 日

[11] 公开号 CN 1965081A

[51] Int. Cl. (续)

B01L 3/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.2.25

[21] 申请号 200580006151.7

[30] 优先权

[32] 2004.2.26 [33] DK [31] PA200400305

[86] 国际申请 PCT/DK2005/000132 2005.2.25

[87] 国际公布 WO2005/083078 英 2005.9.9

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.25

[71] 申请人 汤姆森生物公司

地址 丹麦诺勒松比

[72] 发明人 格特·博兰德·詹森

拉尔斯·汤姆森

厄恩·罗伯特·韦尔特曼

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 钟晶

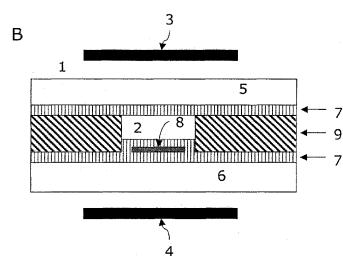
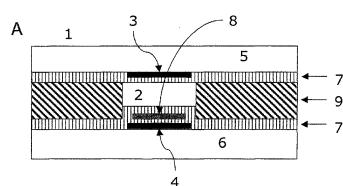
权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 6 页

[54] 发明名称

用于生物材料提取的方法、芯片、设备以及系统

[57] 摘要

本发明涉及用于从生物细胞中分离生物材料的方法、芯片、设备和系统。本发明包括将生物粒子暴露到样品室的交替电场中，并还可以包括在提取后对生物材料的后续分析。



1. 一种用于从生物细胞中提取生物材料的方法，该方法包括下列步骤：

a) 提供样品室和第一电极以及第二电极，第一电极和第二电极以及样品室被安置成至少部分样品室在第一电极和第二电极之间；

b) 提供样品室中的液体样品，该液体样品含有生物细胞；

c) 将所述液体样品暴露到所述样品室中的交替电场下，其中所述交替电场是通过第一电极和第二电极提供的，并且具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料；以及

d) 可选择地，对部分暴露的液体样品进行分析，其中所述部分包括从生物细胞中所提取的生物材料。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中第一和第二电极被分开最多 20mm 的距离，优选最多 10mm，更优选最多 5mm。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中将生物细胞附着到第一电极和第二电极上，和/或者被安置在第一电极和第二电极之间。

4. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中交替电场的频率为至少 5kHz，优选为至少 20 kHz，更优选为至少 50 kHz。

5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中交替电场的频率为至少 100kHz，优选为至少 250 kHz，更优选为至少 500 kHz。

6. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中交替电场是通过调节第一电极和第二电极的极性形成的。

7. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中交替电场可以具有从由下列所组成的组中选择的实质形式：矩形、正弦、锯齿、不对称三角形、对称三角形或者其任何组合。

8. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中在频域中交替电场至少含有第一频率分量和第二频率分量。

9. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中所述生物材料包括选自细胞器、遗传材料以及蛋白质所组成组的组分。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中遗传材料包括染色体 DNA 和/或质

粒 DNA 和/或任何类型的 RNA。

11. 根据权利要求 9 所述的方法，其中蛋白质选自由酶、结构蛋白质、转运蛋白质、离子通道、毒素、激素以及受体所组成的组。
12. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中生物细胞选自由细菌、古细菌、或真核微生物和真核细胞。
13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中所述细菌是形成孢子的细菌。
14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述形成孢子的细菌选自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和/或梭状芽孢杆菌属 (*Clostridia*)。
15. 根据前面权利要求任何一项所述的方法，其中所述细菌来自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 群。
16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述细菌是炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)。
17. 根据权利要求 12~16 任何一项所述的方法，其中生物细胞是无性细菌或者孢子。
18. 一种用于从生物细胞中提取生物材料的芯片，该带有样品室的芯片包括：
  - 样品室，其包括与周围空气流体连接的第一开口以及第二开口以形成与设备的流体连接；
  - 第一电极和第二电极，其被安置在样品室相对的两侧；
  - 可选择地，样品室还包括含有生物细胞的液体样品；以及
  - 可选择地，在第一电极和第二电极之间有交替电场，所述电场具有充分的强度以便从生物细胞中提取生物材料。
19. 根据权利要求 18 所述的芯片，其中第一电极和第二电极被安置在第一开口和第二开口之间。
20. 根据权利要求 18 或 19 所述的芯片，其中生物细胞位于第一电极和第二电极之间。
21. 一种用于从生物细胞中提取生物材料的设备，该设备包括：
  - 芯片位点，芯片位于此处以便能够功能上与该设备相连；

- 设备和芯片之间的电接口，以用于在样品室的电极之间施加交替电场；以及
- 可编程的单元，其包括能够使该设备实现进行从由下列所组成组中选择的一种或者多种行为的软件：
  - 提供样品室中的液体样品，其中液体样品含有生物细胞；
  - 将所述液体样品暴露到所述样品室的交替电场下，所述交替电场具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料；以及
  - 对部分所暴露的液体样品进行分析，其中该部分包括从生物细胞中所提取的生物材料。

22. 一种用于从生物细胞中提取生物材料的系统，其中该系统包括根据权利要求 18~20 中任何一项所述的芯片，该芯片与根据权利要求 21 所述的设备功能上相连。

## 用于生物材料提取的方法、芯片、设备以及系统

### 发明领域

本发明涉及用于从生物细胞中提取生物材料的方法、芯片、设备和系统。本发明包括将生物微粒在样品室中暴露到交替电场下，并且还可以包括在提取后对生物材料进行后续的分析。

### 背景技术

针对生物恐怖的威胁，进行生物战剂的快速和精确检测变得越来越重要。炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)细菌是形成蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)群内生孢子的成员。炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)是高度致命的生物战剂，其容易获得、储藏并作为生物武器进行应用。为了对炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)进行可靠的检测，必须要对 DNA 进行分析，因为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)群成员的表型差异在某些情况下小于 1%。

作为例子，蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)与炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)的区别仅仅在于因为后者含有两个另外的被称作 pXO1 和 pXO2 的质粒。缺少 pXO1 和 pXO2 的炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)无毒性株与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)实质上是难以区分的。理论上，将 pXO1 和 pXO2 质粒转入蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)群的膜内会将这些细菌变成有功能性的炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)。由于这个原因，如果所检测的生物是炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)的话，通过 DNA 杂交、测序或者 PCR 进行 DNA 分析以及对质粒 pXO1 和 pXO2 的辨别是进行确定的唯一可行的方法。

由于它们对恶劣环境的抵抗能力，从内生孢子中释放和提取 DNA 是困难的任务。在检测炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*) 中所使用的通常程序是在培养基质中使孢子发育，收集细菌，以及接着从无性细菌中提取 DNA，程序会耗费几个小时最多达到 1 天的时间(Levi 等人 2003)。其它的方法包括精巧的技术例如机械破碎、冻/融循环或者化学处理(Johns 等人 1994)。然而，芽孢的外壳和皮层是为长期的休眠所发育的生化结构，其能够持续数千年。

著名的例子是在琥珀中所包含蜜蜂的肠道中所发现的内生孢子所复苏的细菌 (Cano 和 Borucki 1995)。而且，机械破碎(使用珠子进行打碎 (bead beating)) 会导致所释放 DNA 的质量差(Levi 等人 2003)。使用目前的技术通过结合物理、机械和化学处理有可能在 5~10 分钟内从内生孢子中释放 DNA，但是当该应用是检测由浮质所携带的生物恐怖袭击时，即使是 5 分钟对于 DNA 提取也被认为是时间长的。使用精巧的多步骤程序在可能的炭疽袭击的紧迫情况下不是最佳的。由于这个原因，需要一种技术其能够快速（几秒钟内）无干涉的单一步骤从革兰氏阳性菌的内生孢子提取 DNA。

芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和梭状芽孢杆菌属 (*Clostridia*) 的革兰氏阳性菌能够在对数生长期的末期能够经历被称作形成孢子的过程。在形成孢子的过程中，细菌形成了有皱纹的孢子，其能够忍受恶劣的环境。孢子是休眠的结构，其只有几种代谢活性的酶，当将孢子暴露到营养物时这些酶会诱导发育。如表 1 所示，孢子在生化组成上非常不同。

表 I. 在芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 种类的孢子和无性细胞之间所存在的生化组成上的区别。

	分子含量 ( $\mu\text{mol/g}$ [干重])	
小分子	芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus</i> ) 孢子	芽孢杆菌属 ( <i>Bacillus</i> ) 无性细胞
NADH	<0.002	1.95
NAD	0.11	0.35
NADPH	<0.001	0.52
NADP	<0.018	0.44
ATP	<0.005	3.6
ADP	0.2	1
AMP	1.2-1.3	1
3PGA	5-18	<0.2
DPA	410-470	<0.1
Ca <sup>2+</sup>	380-916	
Mg <sup>2+</sup>	86-120	
Mn <sup>2+</sup>	27-56	
H <sup>+</sup>	6.3-6.5	7.5-8.2

生化结构和休眠的生理状态使内生孢子成为对机械、化学和热极端抵抗的整体，这对快速制备样品和生物战剂的 DNA 提取以快速鉴定提出了特别的问题。这些孢子可以抵抗例如长时间的煮沸而不破裂。对于孢子的环境归宿（environmental fate）知道得并不详细。孢子可以“不确定地”在干燥和受保护的环境中存活。在南非 Kruger 国家公园中的挖掘显示了寿命为 200 年以上的炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*) 孢子(通过  $^{14}\text{C}$  方法确定日期)，其仍能够在实验室中发育。

检测细菌和病毒的最灵敏的方法依赖获得得到生物细胞内组分（例如遗传材料）的途径。

US 2003/0,146,100 公开了通过双向电泳从血中分离细胞，接着对所分离的细胞在流动室的带有电极阵列的芯片上进行电裂解以及消化。在 10KHz 的正弦电场中进行电泳，裂解通过一系列 400 个 500V 和持续时间  $50\mu\text{s}$  的脉冲或者 40 个 200V 和持续时间  $10\mu\text{s}$  的脉冲（矩形波）进行的。

US 2002/0115201 公开了使用 2.45~310GHz 范围内的微波裂解细胞，进而从液体悬浮液的细胞中释放 DNA。其还公开了带有平行的平面外电极的室用于施加微波，该室具有流体通道以提供室内的样品。

US 4,970,154 公开了一种使用脉冲射频将外源基因注入细胞内的方法。其还描述了使用室内电极之间的脉冲射频震荡电场对悬浮在室中溶液内的细胞进行电穿孔和融合。频率在 60 Hz~10 MHz 之间变化，电场强度为 100-400V/cm。

## 发明内容

本发明的目的涉及提供用于提取的方法、芯片、设备以及系统，即得到生物细胞的生物材料的途径。

本发明的另一个目的涉及提供用于以高释放率提取生物细胞的生物材料的方法、芯片、设备以及系统，即从高百分比的生物细胞中提取或者释放出生物材料。

本发明的另一个目的涉及提供用于从生物细胞中提取生物材料而不损伤生物材料的方法、芯片、设备以及系统。

本发明的另一个目的涉及提供能够容易对所提取的生物材料进行进一

步分析的方法、芯片、设备以及系统。

本发明的再一个目的涉及提供在相同的结构中（优选相同的室中）进行生物材料的提取以及对所提取生物材料进行后续分析的方法、芯片、设备以及系统。

通过阅读说明书和实施例，本发明的其它目的将变得清楚。

本发明的一个方面涉及一种用于从生物细胞中提取生物材料的方法，该方法包括下列步骤：

- a) 提供样品室和第一电极以及第二电极，其中第一电极和第二电极以及样品室被安置成至少部分样品室在第一电极和第二电极之间；
- b) 提供样品室中的液体样品，该液体样品含有生物细胞；
- c) 将所述液体样品暴露到所述样品室中的交替电场下，所述交替电场是通过第一电极和第二电极提供的，并且具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料。

在本发明的优选实施方式中，该方法还包括对部分暴露的液体样品进行分析的步骤(d)，所述部分包括从生物细胞中所提取的生物材料。该分析可以例如包括遗传分析或者蛋白质分析。

本发明的另一个方面涉及一种用于从生物细胞中提取生物材料的芯片，该带有样品室的芯片包括：

- 样品室，其包括与周围空气流体连接的第一开口以及第二开口以形成与设备的流体连接；以及
- 第一电极和第二电极，其被安置在样品室相对的两侧。

本发明的另一个方面涉及一种用于从生物细胞中提取生物材料的设备，该设备包括：

- 芯片位点，芯片位于此处以便能够功能上与该设备相连；
- 设备和芯片之间的电接口，以用于在样品室的电极之间施加交替电场；以及
- 可编程的单元，其包括能够使该设备实现进行从由下列所组成组中选择的一种或者多种行为的软件：
  - 检测芯片是否与该设备功能上相连；

- 提供样品室中的液体样品，其中液体样品含有生物细胞；
- 将所述液体样品暴露到所述样品室的交替电场下，所述交替电场是通过第一电极和第二电极提供的，并具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料；以及
- 对部分所暴露的液体样品进行分析，其中该部分包括从生物细胞中所提取的生物材料。

本发明的另一个方面涉及用于从生物细胞中提取生物材料的系统，其中该系统包括与这里所述设备功能上相连的所述芯片。

#### 附图说明

通过参考附图将对本发明的下面一些实施方式进行描述，其中

图 1 表示暴露到交替电场的持续时间对 DNA/RNA 释放百分率的影响（通过实时 PCR 和荧光进行检测），

图 2 表示长时间暴露到交替电场对 DNA/RNA 释放百分率的影响（通过实时 PCR 和荧光进行检测），

图 3 表示更长的暴露时间对目标 DNA 的质量也没有负面影响，

图 4 表示交替电场的频率对 DNA/RNA 释放百分率的影响（通过实时 PCR 和荧光进行检测），

图 5 表示交替电场的强度对 DNA/RNA 释放百分率的影响（通过实时 PCR 和荧光进行检测），

表 6 表示芯片两个实施方式的截面。

#### 发明的详细描述

本发明的一个方面涉及一种用于从生物细胞中提取生物材料的方法，该方法包括下列步骤：

- a) 提供样品室和第一电极以及第二电极，其中第一电极和第二电极以及样品室被安置成至少部分样品室在第一电极和第二电极之间；
- b) 提供样品室中的液体样品，该液体样品含有生物细胞；
- c) 将所述液体样品暴露到所述样品室中的交替电场下，所述交替电场是通过第一电极和第二电极提供的，并且具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料。

在本发明的优选实施方式中，该方法还包括对部分暴露的液体样品进行分析的步骤(d)，所述部分包括从生物细胞中所提取的生物材料。该分析可以例如包括遗传分析或者蛋白质分析。

遗传分析可以例如包括诸如使用限制性酶的孵化处理、诸如 PCR 的核酸扩增反应、电泳以及检测诸如例如荧光检测或者电化学检测。PCR 处理以及检测可以根据例如审理中的 PCT 申请“用于增强嵌套式 PCR 的方法、试剂盒和系统 (Method, kit and system for enhanced nested PCR) ”(其申请号为 No. YYYYYYYY) 的方法和使用试剂盒来进行，这里将其引入作为参考。

在发明的优选实施方式中，对其进行进一步遗传分析的部分所暴露的液体样品，包括样品室中液体样品的至少 20%，例如样品室中液体样品的至少 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、99.5% 或者 99.9%，例如样品室中液体样品的至少几乎 100%。

根据本发明，术语“提取”涉及释放一种或者多种生物细胞的生物材料，也就是说：例如使可以得到的生物材料进行液体样品的进一步分析。术语“提取”还涉及例如将生物细胞的细胞壁或者细胞载体充分地打开和/或破碎以使生物材料溢出进入周围液体。在提取生物材料后，其可能仍位于生物细胞的附近或者可以被转运到其它位置例如通过电泳力。生物材料可以例如在电泳转运后被吸附到电极上。

在本文中，术语“生物细胞”涉及包括例如微生物、病毒、真核细胞或其碎片的颗粒。

真核细胞可以为例如植物细胞、植物孢子、动物细胞例如哺乳动物细胞。所述哺乳动物细胞可以为例如人细胞诸如白细胞或者有核的红细胞。

所述微生物可以是例如选自古微生物、真核细菌微生物或者真核微生物。

例如微生物可以选自由细菌、细菌孢子、病毒、真菌和真菌孢子所组成的组。

在本发明优选的实施方式中，生物细胞是气生微生物。

在本发明优选的实施方式中，生物细胞是细菌孢子。

例如，细菌孢子可以由选自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和/或梭状芽孢杆菌

属 (*Clostridia*) 的细菌形成。

在本发明优选的实施方式中，细菌孢子是由炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)所形成的孢子。生物细胞可以例如包括是由炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)所形成的细菌孢子。同时，生物细胞可以基本上由一种或者多种由炭疽芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*)所形成的细菌孢子组成。

同时，生物细胞可以是无性细菌或者孢子。

从生物细胞中所提取的生物材料通常包括选自细胞器官、遗传材料以及蛋白质所组成的组的组分。

遗传物质可以例如包括染色体 DNA 和/或质粒 DNA 和/或任何类型的 RNA。

蛋白质可以例如选自由酶、结构蛋白质、转运蛋白质、离子通道、毒素、激素以及受体所组成的组。

优选地，生物材料包括 DNA 和/或 RNA。

根据本发明术语“液体样品”涉及液体物质、溶液或者悬浮液，其可以包括或者不包括一种或者多种有关的化合物。液体样品可以是例如生物样品或者非生物样品。

生物样品可以例如为选自由皮肤拭子、脑脊液、血液、唾液、支气管肺泡灌洗液、支气管吸出物、肺组织和尿所组成的组。

非生物样品可以例如为一种液体悬浮液，其含有来自空气样品的粉末、颗粒以及来自土壤样品和表面清扫 (surface swipes) 的颗粒。

可以对生物样品或者非生物样品进行培养。接着可以使用本发明的方法、试剂盒、芯片、设备以及系统来评估该培养是否出现例如微生物诸如炭疽芽孢杆菌(*B. Anthracis*)。

另外，液体样品可以含有一种或者多种需要进行核酸扩增的试剂。

液体样品可以含有一种或者多种从下列所组成组选择的试剂：引物、核酸、三磷酸脱氧核苷酸以及核酸聚合酶。

该液体样品可能还含有添加剂例如 2-巯基乙醇例如浓度为 10mM、BSA 例如浓度为 1 mg/ml 和/或浓度为例如 0.5%~6% (w/v) 的去污剂。去污剂可以选自由下列所组成的组：Triton X-100、Triton X-114、NP-40、吐温-20、吐温

-80 以及类似的非离子去污剂。

在本文中，术语“核酸”、“核酸序列”或者“核酸分子”应当被广义解释，可以例如为核糖核酸(RNA) 或者脱氧核糖核酸(DNA)及其模拟物的寡聚物或者多聚物。该术语包括含有自然出现的核苷、糖和共价核苷酸间键合(骨架)以及功能相似的具有非自然出现的核苷、糖和共价核苷酸间键合(骨架)的分子或其组合。这样的被修饰和被取代的核酸可以比原始形式要优选，因为其期望的性能诸如例如核酸目标分子的增强的亲和力，以及在有核酸酶和其它酶存在的情况下提高的稳定性，在本文中使用术语“核酸类似物”或者“核酸模拟物”来描述被修饰和被取代的核酸。核酸模拟物的优选例子是含有肽核酸(PNA-)、锁定核酸(Locked Nucleic Acid, LNA-)、木糖-LNA-(xylo-LNA-)、硫代磷酸、2'-甲氧基、2'-甲氧乙氧基、吗啉和氨基磷酸酯的分子或者功能相似的核酸衍生物。

术语“核酸聚合酶”涉及依赖DNA-或者RNA-的DNA聚合酶，其优选是热稳定性的，即该酶催化与模板互补的引物延伸产物的形成，并且在对于双链模板核酸的变性所必要的提高的温度下一段时间内不会发生不可逆的变性。通常，在每条引物的3'末端开始合成并按照5'到3'的方向沿着模板链进行。已经从嗜热或者极端嗜热菌株中分离了热稳定的聚合酶，例如：*Thermus flavus*、*T. ruber*、*T. thermophilus*、*T. aquaticus*、*T. lacteus*、*T. rubens*、*Thermococcus litoralis*、*Pyrococcus furiosus*、*Bacillus stearothermophilus* 和 *Methanothermus fervidus*。但是尽管如此，不是热稳定的聚合酶也能够用于核酸扩增中，只要进行补充该酶。

液体样品还可以含有可以被5'-3'核酸外切酶降解的寡聚核酸探针，所述核酸探针的降解会导致释放氧化还原活性组分。

氧化还原活性组分可以例如为金属茂诸如例如二茂络铁。

在本发明的实施方式中，第一和第二电极被分开最多20mm的距离，优选的是最多20mm，例如最多15mm、10mm、9mm、8mm、7mm、6mm、5mm或者最多4mm，更优选的是最多3mm，更加优选的是最多0.5mm例如最多0.3mm、0.2mm和0.1mm例如最多0.05mm。

例如第一和第二电极可以被分开0.05-20mm范围内的距离，例如在

0.05-0.1mm、0.1-0.2mm、0.2-0.3 mm、0.3-0.4mm、0.4-0.5mm、0.5-1mm、1-2mm、2-5 mm、5-10 或者 10-15mm 的范围内，例如 15-20mm 的范围内。

通常第一和第二电极被分开至少 0.02mm 的距离，例如至少 0.03mm 或者 0.05mm。

通常至少部分样品室中的液体样品被置于第一电极和第二电极之间。例如，至少液体样品体积的 40% 被置于第一电极和第二电极之间，例如，至少液体样品体积的 50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、99.5% 或者 99.9 % 被置于第一电极和第二电极之间，例如至少液体样品体积的 100% 被置于第一电极和第二电极之间。

优选的是，在步骤 (c) 的过程中将生物细胞安置在第一电极和第二电极之间。甚至可以至少在步骤 (c) 的开始并可能在步骤 (c) 的过程中，将生物细胞附着在第一电极或者第二电极上。

本文在“X 和/或 Y”中所使用术语“和/或”应当被解释为“X”或“Y”或“X 和 Y”。

本发明的芯片包括带有第一开口的样品室。

第一开口可以用于将样品倒入样品室中。第一开口可以与样品（例如周围空气）以流体连接。可以选择的是，第一开口被连接到一个或者多个阀门上，这些阀门可以被打开以将样品室与样品流体相连。

在本发明重要的实施方式中，样品室（例如芯片的样品室）带有第二开口。第二开口可以例如用于通过将样品室的空气或者样品排出而辅助将新样品导入样品室中。第二开口也可以用于将第一液体试剂导入样品室中。可以替换的是，第一液体可以通过第一开口进入样品室。

样品室（例如芯片的样品室）通常是微量样品室。在本发明的实施方式中，样品室的体积为最多 500 $\mu$ L，例如最多 400 $\mu$ L、300 $\mu$ L、200 $\mu$ L、100 $\mu$ L、50 $\mu$ L、25 $\mu$ L、15 $\mu$ L、10 $\mu$ L、5 $\mu$ L、4 $\mu$ L、3 $\mu$ L 或者最多 2 $\mu$ L，例如最多 1 $\mu$ L。例如样品室的体积可以为最多 500nL，例如最多 400nL、300nL、200nL、100nL、50nL、25nL、15nL、10nL、5nL、4nL、3nL 或者最多 2nL，例如最多 1nL。

通常，样品室的体积为至少 10nL。在本发明优选的实施方式中，样品室的体积在 1 $\mu$ L-50 $\mu$ L 的范围内，例如 5 $\mu$ L-30 $\mu$ L。

在本发明的实施方式中，一对相对的壁之间的最小距离为最多 20mm，例如最多 15mm、10mm、8mm、6 mm、4mm、3mm 或者 2mm，例如最多 1mm。例如，一对相对的壁之间的最小距离为最多 800 $\mu\text{m}$ ，例如最多 600 $\mu\text{m}$ 、500 $\mu\text{m}$ 、400 $\mu\text{m}$ 、300 $\mu\text{m}$ 、200 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 、25 $\mu\text{m}$ 、15 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、4 $\mu\text{m}$ 、3 $\mu\text{m}$  或者最多 2 $\mu\text{m}$  例如最多 1 $\mu\text{m}$ 。

通常，一对相对的壁之间的最小距离为至少 5 $\mu\text{m}$ 。在本发明优选的实施方式中，一对相对的壁之间的最小距离在 50 $\mu\text{m}$ -500 $\mu\text{m}$  的范围内，例如 100 $\mu\text{m}$ -400 $\mu\text{m}$  和 150 $\mu\text{m}$ -350 $\mu\text{m}$ 。

在本发明的一个实施方式中，样品室（例如芯片的样品室）的长度在 1mm~50mm 的范围内，例如在 1mm-10mm、10mm-20mm、20mm-30mm、30mm-40mm 或者 40mm-50mm 的范围内。在优选的实施方式中，样品室的长度在 2mm-8mm、例如 3mm-7mm 或者 4mm-6mm 的范围内。例如样品室的长度为大约 4.5mm。

在本发明的实施方式中，样品室（例如芯片的样品室）的宽度在 0.2mm-10mm 的范围内，例如在 0.2mm-1mm、1mm-3mm、3mm-5mm、5mm-7mm 或者 7mm-10mm 的范围内。在优选的实施方式中，样品室的宽度在 0.2mm-2mm 的范围内，例如在 0.5mm-1.5mm 和 0.75mm-1.25mm 的范围内。例如样品室的宽度可以为大约 1mm。

在本发明的实施方式中，样品室（例如芯片的样品室）的高度在 50 $\mu\text{m}$ -2mm 的范围内，例如在 100 $\mu\text{m}$ -1mm、200 $\mu\text{m}$ -900 $\mu\text{m}$ 、300 $\mu\text{m}$ -800 $\mu\text{m}$ 、500 $\mu\text{m}$ -700 $\mu\text{m}$  的范围内。在优选的实施方式中，样品室的高度在 100 $\mu\text{m}$ -400 $\mu\text{m}$  的范围内，例如 200 $\mu\text{m}$ -300 $\mu\text{m}$  的范围内。

在本发明的实施方式中，样品室例如芯片的样品室的长度度为大约 4.5mm，样品室的宽度为大约 1mm，样品室的高度为 300 $\mu\text{m}$ 。

在本发明的实施方式中，芯片还包括第一和第二电极。

第一和/或第二电极可以具有不同的外形或者尺寸。例如，第一和/或第二电极可以具有从薄片、平板状、圆盘状、线状、棒状或其任意组合中所选择的实质的形状。

在本发明优选的实施方式中，第一电极和第二电极可以例如为薄片电

极。

在本发明优选的实施方式中，第一电极和第二电极相对。例如它们可以被安置在样品室的对边上。

第一电极和/或第二电极可以例如被安置在样品室的内部，不贴着样品室或者附着到样品室的一个或者多个壁上。

第一和/或第二电极可以植入样品室的壁中。例如，第一和第二电极可以植入样品室中的壁中。可以选择的是，第一和/或者第二电极可以被安置在芯片的外表面中。

优选的是，第一电极和第二电极安置在样品室相对的两边。

第一电极和第二电极之间的电势差可在在一个范围内，该范围引起相同或不同尺寸的颗粒被捕获至一个表面或偏离某个给定的方向，这样可以提供选择或捕获感兴趣的粒子。

电极，如第一电极和/或第二电极可以由许多种不同的材料构成。典型地，电极是由金属或合金构成。第一电极和第二电极可以例如包含从由下列金属所组成的组中选择的金属：银、金、铂、铜、碳、铁、石墨、铬、镍、钴、钛、水银或者其合金。

也可以预想到，电极可包含一种导电的液体，甚至基本上由一种导电的液体组成。导电的液体可以是例如水银。

电极的尺寸或/和结构通常依赖于样品室的尺寸和/或结构。电极的长度和宽度与样品室的长度和宽度具有相同的数据级。

电极可以由小至几个原子层的表面的导电材料构成。

在本发明的一个实施方式中，电极如第一和/或第二电极具有在 $0.001\mu\text{m}$ - $2000\mu\text{m}$ 范围内的厚度，如 $0.001\mu\text{m}$ - $1\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ - $20\mu\text{m}$ 、 $20\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$ 和 $200\mu\text{m}$ - $2000\mu\text{m}$ 。

在本发明的一个实施方式中，芯片的样品室还包括一组检测电极如两个或者三个检测电极，用于检测氧化还原活性组分的出现或者缺失，该氧化还原活性组分可以是如从探针中释放出来的。两个检测电极可分别作为工作电极和反电极。该组检测电极还可以包括一个参比电极。通常，检测电极是由金属或合金构成。电极可以如包括从有下列所组成的组中选择的材料：碳、

银、金或铂。检测以后，在电极表面会有膜形成。为了允许进一步检测所消化的探针，可以在芯片的样品室内安置更多组检测电极。

在本发明优选的一个实施方式中，第一电极和第二电极可以是检测电极组。

在本发明优选的一个实施方式中，芯片还包括一种温度敏感元件，其例如可以是温度敏感的金属基的电阻器(电热调节器)，具有正温度系数(PTC)，即随着环境温度的增加，电热调节器表现出电阻增加；随着环境温度的降低，电热调节器的电阻减小。

电热调节器可以是例如从包含下列材料的组中选出的：铜、镍、铁、铝、铂或其合金。

电热调节器可以有不同的形状或维度，例如，电热调节器可以具有从薄片、平板状、圆盘状、线状或者棒状的组中选择的实质形状。

电热调节器可以是例如线状的电极。

加热电极可以有不同的形状或者尺寸，例如，加热电极可以具有从薄片、平板状、圆盘状、线状或者棒状的组中选择的实质形状。

在本发明优选的一个实施方式中，加热电极可以是例如薄片状电极。本发明中优选的一个实施方式中，加热电极可以被安置成能够从反应室的至少一边进行加热。

在另一个实施方式中，一个或者多个补充的加热电极可以被安置在反应室的对边上。

加热电极由电导材料制成，优选为从镍铬合金(NiCr)、铁铬铝合金(FeCrAl)、铁镍铬合金(FeNiCr)或者其它加热元素合金的组中选取的材料。

本发明优选的一个实施方式中，芯片包括一个或者多个导电接触衬垫，该衬垫与芯片的电极电接触。芯片可包括与芯片的第一电极电接触的导电接触衬垫。芯片可包括与芯片的第二电极电接触的导电接触衬垫。芯片可包括与加热电极的每个末端电接触的两个导电接触衬垫。芯片可包括两个或三个导电接触衬垫，并且与该组检测电极的每个电极电接触。

在图1中，表示了两个代表性的芯片实施方式。在图1A)中，芯片(1)包含样品室(2)、第一电极(3)和第二电极(4)。第一电极(3)附着到芯

片的上部(5)，第二电极(4)附着到在芯片的下部(6)。第一电极和第二电极都被电绝缘层(7)覆盖，以防止样品室(2)中的液体成分的不必要电解。加热电极被植入第二电极顶部的绝缘层。通过间隔部分(9)形成样品室，间隔部分被夹在芯片(1)的第一部分(5)和第二部分(6)的中间。检测电极和温度敏感元件在图1中没有被示出。

芯片可以含有大批不同的材料。可以例如包括有机聚合物如塑料，金属和半导体(如硅、玻璃和陶瓷)等。

关于图1，第一部分和第二部分可能如包括诸如塑胶、半导体(如硅、玻璃和陶瓷)的材料。第一电极和第二电极可以例如含有金属如金或铜。绝缘层可以例如是二氧化硅或聚酰亚胺的薄膜。加热电极可以例如是NiCr电极，间隔层可以例如是聚二甲基硅氧烷(PDMS)弹性体的铸件。

图1B)中，第一电极和第二电极并不被包括在芯片里，但可以如包括在操作芯片的设备中。

芯片可以仅包括单一的样品室或者它可以包括多个样品室。

芯片通常具有在0.5mm-50mm范围内的厚度，优选在2mm-8mm的范围内。

芯片通常具有在10mm-500mm范围内的长度或者直径，优选在40mm-200mm的范围内。

芯片通常具有在5mm-200mm范围内的宽度，优选在20mm-100mm的范围内。

在步骤c)中，液体样品被暴露到交替电场下，其由第一电极和第二电极提供。重要的是交替电场具有充分的强度并被施加充分的持续时间以从生物细胞中提取生物材料。

根据本发明，术语“交替电场”涉及随时间变化的电场。交替电场可以例如为通过在正/负以及负/正之间周期性地改变两个电极极性而出现的电场，例如通过将交流电源连接到电极上。交替电场可以例如包括或者是交流电场。交替电场可以例如包括一个或者多个直流脉冲。

重要的是交替电场具有充分的强度并被施加充分的持续时间以提取生物材料。同时重要的是交替电场还具有充分的频率以提取生物材料。

本发明优选的实施方式中，交替电场的频率为至少 5kHz，优选为至少 20kHz，更优选为至少 50kHz。

在本发明优选的实施方式中，交替电场的频率为至少 100kHz，例如至少 250kHz，更优选为至少 500kHz。

例如交替电场的频率可以为至少 5kHz，例如至少 10kHz、20 kHz、50 kHz、100 kHz、200 kHz、300 kHz 或者 400 kHz，例如至少 500 kHz。也能够预想到更高的频率例如 1000 kHz、2000 kHz 或者 5000 kHz。

交替电场的频率优选为最多 750kHz，例如最多 500kHz。

这样，交替电场的频率可以例如在 5-750kHz 的范围内，例如在 5-10kHz、10-20 kHz、20-50 kHz、50-100 kHz、100-200kHz、200-300kHz、300-400kHz、400-500 kHz 的范围内，例如在 500-750kHz 的范围内。

在优选的实施方式中，通过调节两个电极的极性来提供交替电场。

交替电场可以具有从由下列所组成的组中选择的实质形式：矩形、正弦、锯齿、不对称三角形、对称三角形或者其任何组合。

同时，频域中的交替电场可以至少含有第一频率分量和第二频率分量。

交替电场的强度即第一电极和第二电极之间的最大电势差通常为最多 30V，例如最多 25V、20 V、15 V、10 V、8 V、6 V、5 V、4 V、3 V 或 2 V 例如最多 1V。

交替电场的强度即第一电极和第二电极之间的最大电势差可以例如在 1-100V 的范围内，例如在 1-2V、2-3V、3-4V、4-5V、5-6V、6-8V、8-10V、10-15V、15-20V 或者 20-30V 的范围内，例如在 30-100V 的范围内。优选的是，第一电极和第二电极之间的最大电势差在 5-50V 的范围内，例如 10-25V。

对生物材料提取产量的可用性测试是 DNA/RNA 释放百分率。

“DNA/RNA 释放百分率”是样品室中由于在步骤 c)中暴露到交替电场中而释放其染色体 DNA 和/或染色体 RNA 的生物细胞的百分率。DNA/RNA 释放百分率是根据实施例 5 中所描述的标准化的方法确定的。

在样品室或者带有样品室的芯片中的生物细胞的提取百分率或者 DNA/RNA 释放百分率强烈依赖于第一电极和第二电极的设计和之间的距离、样品室的结构和材料以及施加到第一电极和第二电极上的电势。

在本发明高度优选的实施方式中，对第一电极的第一电势、第二电极的第二电势以及进而第一电极和第二电极之间的交替电场进行调节以得到至少30%的DNA/RNA释放百分率，例如至少40%的DNA/RNA释放百分率，优选为至少50%，更优选为至少60%，例如至少70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%或者99.9%，例如大约100%。

在本发明的另一个优选实施方式中，对第一电极的第一电势、第二电极的第二电势以及进而第一电极和第二电极之间的交替电场进行调节以得到样品室中细菌孢子的至少30%的DNA/RNA释放百分率，例如样品室中细菌孢子的至少40%的DNA/RNA释放百分率，优选为至少50%，更优选为样品室中细菌孢子的至少60%，例如至少70%、80%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%或者99.9%，例如样品室中细菌孢子的大约100%。

在本发明的实施方式中，将液体样品暴露到交替电场中的持续时间最多为3600秒，例如最多3000秒、2000秒、1000秒、500秒、250秒、100秒、50秒、40秒、30秒、20秒、10秒、5秒、4秒或者3秒，例如最多1秒。

例如，将液体样品暴露到交替电场中的持续时间为0.01-3600秒的范围内，例如在0.1-1秒、1-5秒、5-10秒、10-25秒、25-50秒、50-100秒、100-250秒、250-500秒、500-1000秒或者1000-2000秒的范围内，例如在2000-3600秒的范围内。在本发明的优选实施方式中，将液体样品暴露到交替电场中的持续时间为5-100秒的范围内，例如6-90秒、7-80秒、8-70秒、9-60秒和10-50秒的范围内。

在本发明优选的实施方式中，液体样品被暴露到交替电场中最多250秒，优选为最多100秒，例如最多30秒。

本发明的另一个方面涉及一种用于从生物细胞中提取生物材料的芯片，其中该带有样品室的芯片包括：

- 样品室，其包括与周围空气流体连接的第一开口以及第二开口以形成与设备的流体连接；
- 第一电极和第二电极，其被安置为在样品室相对的两侧。

在本发明优选的实施方式中，芯片的样品室还包括含有生物细胞的液体样品。

该芯片还包括通过第一电极和第二电极提供的在第一电极和第二电极之间的交替电场，所述交替电场具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料。

在本发明的实施方式中，芯片的第一电极和第二电极被安置在样品室的第一开口和第二开口之间。

生物细胞优选位于芯片的第一电极和第二电极之间。

需要注意的是在本发明一个方面中所描述的实施方式和特征也可以用于本发明的其他方面。

本发明的另一个方面涉及一种用于从生物细胞中提取生物材料的设备，该设备包括：

- 芯片位点，芯片位于此处以便能够功能上与该设备相连；
- 设备和芯片之间的电接口，以用于在样品室的电极之间施加交替电场；以及
- 可编程的单元，其包括能够使该设备实现进行从由下列所组成组中选择的一种或者多种行为的软件：
  - 检测芯片是否与该设备功能上相连；
  - 提供样品室中的液体样品，其中液体样品含有生物细胞；
  - 将所述液体样品暴露到所述样品室的交替电场下，所述交替电场是通过第一电极和第二电极提供的，并具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料；以及
  - 对部分所暴露的液体样品进行分析，其中该部分包括从生物细胞中所提取的生物材料。

在本发明中，术语“功能上相连”的意思是指该芯片与该设备相连接，因此该设备可以进行一个或多个影响该芯片的行为。

在本发明的一个实施方式中，当该设备能影响样品室中成分的电场时，该芯片是与该设备功能上相连。

在本发明的一个实施方式中，当该设备能控制该芯片至少一个电极的电势时，该芯片是与该设备功能上相连。例如，当该设备能控制第一电极和/或第二电极的电势时，该芯片是与该设备功能上相连。

功能上相连还可以包括该芯片的样品室用流体控制装置以流体相连。

在本发明的一个实施方式中，该设备包括一组收集电极，并且当电极与该组收集电极之间的电场功能上相连时，会辅助在样品室中收集气体样品的生物细胞。在这个实施方式中，芯片不必包括该组收集电极。

该设备也可以包括一个接受和/或储藏第一液体试剂的第一试剂室。通常，第一试剂室有至少一个开口，当芯片与设备功能性相连时，该开口与样品室流体连接。可以替换的是，第一试剂室的至少一个开口与样品室是流体连接，如通过使用控制流体的装置。在贮存期间，可以通过一个可移动的障碍物来关闭第一试剂室。当使用该设备时，所述的障碍物被可逆或者不可逆地移开。

该设备还可以包括一个用于提供能量的电能供应器，如产生流动的装置、和/或给可编程的单元、第一电极和第二电极。

在本发明的实施方式中，芯片是通过芯片位点与该设备功能上相连的。芯片位点可以例如包括一个塑料界面，该塑料界面既可以当作连接材料，也可以当作衬垫，该衬垫保证芯片口和装置口紧密连接，以消除漏气和漏液现象。芯片位点可以如包括表面和/或接受芯片的支架。通常，芯片位点包括至少一个导电的接触衬垫。优选的是，芯片位点包括至少一个导电的接触衬垫，该接触衬垫提供与芯片第一电极的电接触，和提供与第二电极的电接触。

可编程的单元包含指令，优选计算机可以读取的，如可适合利于控制、监视的软件，和/或在操作之前、在操作中和/或操作后调控设备的软件。

可编程单元优选包括至少一个在所连接的存储设备上储存了一个或多个计算机程序的计算机，该计算机可适合用于控制该设备。本发明中的可编程单元可以是从以下非详尽组中选择：通用计算机、个人计算机（PC）、可编程的逻辑控制单元（PLC）、软程序的逻辑控制单元（soft-PLC）、硬程序逻辑控制单元（hard-PLC）、工业个人计算机或一个专用的微处理器。

本发明也涉及计算机程序产品，该产品适合使具有至少一个在其连接的存储设备上储存了计算机程序的计算机的计算机系统能控制、监视，和/或在操作之前、在操作中和/或操作后调控该设备。本发明还涉及一种计算机可读取的存储了一套工艺路线的媒介，该套工艺路线适应性使计算机系统能控制、

监视，和/或在操作之前、在操作中和/或操作后调控该设备，该计算机系统包括至少一个在其连接的存储设备上储存了计算机程序的计算机。

在操作之前、在操作中和/或在操作后，用于控制、监控和/或调控该设备的程序单元，优选能适应在恶劣的条件下操作，如北方气候、热带气候和战斗环境，特别是，遭受原子、生物和/或化学战（ABC-战争）攻击的战斗地区。优选的是，可编程的单元应遵照该单元的相关军事说明书。

在本发明的一个实施例中，可编程的单元包括软件，如果芯片与设备功能上相连的话，该软件还可实现设备检查。

可编程的单元包括能够进一步使该设备完成一种或者更多种行为的软件，例如从由下列所组成的组中选择的2或3个行为：

- 提供样品室中的液体样品；
- 将所述液体样品暴露到所述样品室的交替电场下，所述交替电场具有充分的强度以从生物细胞中提取生物材料；
- 对所暴露的液体样品的生物材料进行分析。

可编程的单元包括软件，其能够例如具有这样的作用，即通过操作用于提供气体样品的流动产生装置，设备提供样品室中的气体样品。

可编程的单元包括软件，其能够例如具有这样的作用，即设备对第一电极施加第一电势，对第二电极施加第二电势。

可编程的单元包括软件，其能够例如具有这样的作用，即通过调节至少两个电极的电势（例如这里所述的第一电极和第二电极或者交替电场专用的其他电极组），设备将反应混合物暴露到所述样品室的交替电场中。

可编程的单元包括软件，其能够例如具有这样的作用，即通过操纵这里所述的加热电极，设备进行目标核酸序列的核酸扩增。

可编程的单元包括软件，其能够例如具有这样的作用，即通过操纵涉及差值脉冲伏安法的检测电极，设备检测是否出现了所扩增的目标核酸序列和/或检测来自目标核酸序列扩增的产物。

在本发明优选的实施方式中，该设备还包括设备和芯片之间的电接口，以用于在样品室的第一和电极之间施加交替电场。

装置另外可测量参比信号，即来自于包括没有生物细胞的样品或包括确

定量的给定生物细胞的样品的信号。该参比信号可以例如被从距样品室较远的另一个室中得到，例如位于芯片另一个位置的室或者位于另一个芯片的室。

装置还可以包括一个内部的能量供应。

内部的能量供应可以例如包括电池。在 PCR 反应期间使用的能量，可以根据加热一定体积的水所需热量来估计，该体积的水应等同于在 PCR 循环中最小和最大温度之间的流体样品的量。温度的差别大约为 50K，因此对于 30 $\mu$ l 的样品，每个循环的转移的热量大约为 6 焦耳。例如运行 60 个循环，一个 PCR 反应的总能量消耗达到  $60 \times 6 = 360$  焦耳。使用与商业热循环器（即每秒 2°C）相差不大的等变率（ramping time），能量需要量为  $360 \times 2/50 = 14.4$ W。

电池电压被认为是电池的定额电压，如每个镍-铬（NiCr）和镍-金属氢（NiMH）电池电压为 1.2 伏，每个锂离子（Li 离子）电池电压为 3.6 伏。电池的蓄电量通常以毫安-小时（mAh）为单位，并且称为电池的 C-定额（C-rating）。例如，一个具有 C-定额 1200mA-小时的电池的负载电流 1C，就是指 1200 毫安。当电池电量耗尽至负载电流低于 0.1C 时（Linden D. 1984, 电池和燃料电池手册，纽约：McGraw-Hill），一个电池可以看作是理想的（即保持固定的电容量）。因而，当释放出 14.4W 的能量如用一个电池释放 10.8V 时，该电池的 C-定额应该在  $14.4/(10.8 * 0.1) = 13300$ mAh 范围，以避免剧烈减小电池容量的峰值电量消耗。

为了使能量消耗和电量释放，以及进一步确保真正的可携带，可充电电池是优选的。在本发明的优选实施方式中，可充电电池可以从由下列所组成的组中选择：镍金属氢（NiMH）类电池和锂离子（Li 离子）类电池。

同时，内部的电量供应可以包括发电机例如可携带的发电机。可携带的发电机可以用作外部的能量供应。可携带的发电机可以是日光模块、电池充电器（例如交流或者汽车电池充电器）、燃料燃烧发电机等进行充电或者只是由其所组成。

可以替换的是，来自外部能量供应的电能可被提供到该设备，例如使用备用电池进行补充。

在本发明的实施方式中，设备还包括一个流动产生装置，如为提供芯片样品室中的气体样品，和当芯片插入设备中时，与样品室的第二开口流体连

接。

流动产生装置可包括泵，如活塞泵、膜泵或者正排量泵。

在本发明的实施方式中，在选择加样（在 10ml/min-500ml/min 的范围内）的过程中，泵能够释放适量的气流通过芯片。优选的是，泵应该按照以下一个或者多个标准来选择：尺寸小、重量轻、没有脉冲流动、通过改变马达的极性使媒介可逆流动、通过控制电压可调节流量。在本发明的实施方式中，流动产生装置可以包括用于制造小滴试剂的喷射分配器，或者是类似的微分配设备。

在本发明的实施方式中，能够以通过芯片的被动流提供气体样品。这将要求在芯片和作为样品的周围气体之间的一个流速差。例如芯片可以被移动通过空气，如按第一开口与周围空气是流动相连的方式安装在飞机上，最佳的是与飞行方向相反。可以替换的是，如果空气在芯片周围移动，芯片与空气相比没有速度，如安置在出气口，会发生这种情况。

在本发明的实施方式中，设备还包括用于控制的装置，如通过样品室的流动。

流动可以是，如液体流动或者气体流动。

控制流动的装置通常包括一个或者是多个阀。阀可以是，如从由下列所组成的组中选择：单向阀、两路阀、多位置阀和夹管阀。

阀可以是例如微型组装的阀，在实施方式中阀被集成在芯片上。

在本发明的实施方式中，第一试剂液体能够使用喷墨微分配工艺进行释放。喷墨色带盒含有一个或多个隔间，隔间里包含有第一液体试剂或者第一液体试剂的分开组分，喷墨色带盒以这样一种方式安装，该种方式能使液体微分配到反应室中。

本发明的另一个实施方式中，将第一液体试剂或者其分开的各个组分装入塑料聚合物组成的密封的封套。塑料聚合物封套配置有一个内置的加热电极，可以通过使用适当的电流使塑料聚合物融化，接着将封套里的液体释放到芯片中。在另一个实施方式中，从密封的塑料聚合物封套中释放液体，能够通过机械的或者物理方式破裂封套如用尖的东西刺破来进行。

在本发明的一个实施方式中，设备可以装备一个视觉上读出结果的显示

器，显示器可以是光发射源形式的（LED，灯泡或者类似物）、显示屏、数字的读取器或者是上述的任何组合。在本发明的另一个实施方式中，读取器可以以声音信号来交流。

在本发明的优选实施方式中，设备包括可以允许无线通讯的组件。无线通讯的例子是 802.11 移动无线局域网，蜂窝通讯、蓝牙（Bluetooth®）、全球定位系统（GPS）、和超宽频带。通讯可以是单向的如从设备传输数据或者是给设备传输数据，或者是通讯可以是组合的如双向的。建立的通讯可进一步扩展为互联网和设备之间的通讯，如建立一个 ad-hoc 网络，该网络可以使一个设备触发另一个设备的样品，因此有利于监控如气雾云的进程。

在本发明的优选实施方式中，设备为重量轻和/或可携带的设备。

在本发明的实施方式中，设备重量至多 10kg，如至多 8kg、6kg、4kg、3kg 或 2kg，如至多 1kg。甚至更为优选的设备的重量至多 800g、如至多 600g、500g、400g、300g、200g、150g、100g、80g、60g、50g、40g、30g、20g、10g 或 5g，如至多 1g。

通常，设备总重量在 20g-1kg 的范围，如 20g-50g、50g-100g、100g-250g、250g-500g 或 500g-1000g。

本发明的一个方面涉及用于从生物细胞中提取生物材料的系统，其中该系统包括与这里所述设备功能上相连的所述芯片。

在本发明的实施方式中，系统的芯片和设备被集成在一起，并且不意味着互相物理上分开。在本发明的实施方式中，系统的芯片和设备被集成在一起以便他们不能够被相互物理上分开而不损坏芯片或者设备。

在本发明重要的实施方式中，该设备是一次性系统例如只能使用一次。

在另一个实施方式中，系统的芯片是一次性的，但是该设备可以被重复使用。

在本发明另一个重要的实施方式中，系统的芯片是一次性的，但是该设备可以被重复使用。

本发明特定的方面涉及方法和微结构，其简化了从来自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 群细菌的内生孢子提取 DNA 的方法。

本发明的目的是从高度机械、化学、热抗性的革兰氏阳性菌（包括炭疽

芽孢杆菌(*Bacillus Anthracis*) 的内生孢子中快速提取 DNA，以能够进行快速 DNA 检测。

该目的是通过包括对孢子结合使用脉冲电场的方法和结构而获得的，所述用法包括：被植入电场之间或者与电场相邻的含有孢子溶液的流体结构，所述电场可以以一定频率和强度变换并施加可变的时间，以及一组用于所述用法的最佳参数设置。

本发明描述了一种方法，其能够对含有孢子的溶液施加脉冲电场。所述方法的结果是在开始所述方法 5 秒钟的时间内释放出 DNA。

在特定的实施方式中，本发明提供了一种用于快速从孢子提取 DNA 的方法，其利用两个电极结构以及插入的含有内生孢子的溶液。所述电极被连接到电压源和频率发生器，这使得在溶液上可以诱导产生脉冲电场。

在另外特定的实施方式中，本发明利用微流体设备，该设备能够进行与上面相同的功能，并能够被集成为用于快速提取 DNA 的样品制备系统的一部分。

在本发明再一个特定的实施方式中，作为应用所述方法的结果，在通过后续的进行 PCR 或者视觉观察 DNA 的质量（在进行琼脂糖凝胶电泳和染色之后），所释放 DNA 的质量不受影响。

在使用两个电极结构以对细胞或者孢子溶液施加电穿孔电压的微结构中，关于在溶液中实际出现的所施加电势的量是特别重要的。由于这一点，在电极-溶液界面上的压降与所施加的电压相比是显著的。对于本领域技术人员，公知的是在实验中所使用的溶液对势能随时间的斜率设定了限制。例如低施加电压(<2V)导致在电极中有非常小的电压斜率，即使在长脉冲时间内(>100 μs)，这产生了峰状的斜率。在溶液中所施加电压的最大强度可以通过绘制设备提高时间和充电时间的指数函数来计算。例如，8μs 的设备提高时间和 20-40μs 范围内的充电时间会提供最大 15-18% 的所施加强度。在应用脉冲后的约 10-15μs 后达到最大值。50-75μs 后，压降有效地为零，因为所有所施加的电压出现在电极-溶液界面。在更高的电压下，界面的阻抗会成为不可忽视的，并且在电极之间通过的电流受到溶液电导系数的限制。

通常发现距离大于 10μm 的 100 mM KCl 溶液的电阻在  $30 \pm 3 \text{ k}\Omega$  的范围

内。

孢子的表层由蛋白质组成，其为整个孢子结构提供机械保护。蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)具有由一种蛋白质组成的孢子表层，而枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)在表层中已经被鉴定出了 20 种以上的蛋白质。而且，表层是功能性分子筛，其保护孢子内部免受除最小的分子外的全部的影响，尽管该孢子表层与对卤素（如氯和碘）的抗性相关。表层还参与发育，已经表明孢子中带有突变的孢子表层也会大部分在发育方面有缺陷。

在芽孢杆菌 (*Bacillus*) 类的无性细胞中，细胞壁肽聚糖由通过  $\beta$ -1,4 连接的 N-乙酰氨基葡萄糖(NAG)和 N-乙酰胞壁酸(NAM)组成。肽链（开始为 L-丙氨酸-D-谷氨酸酯-内消旋-二胺基庚二酸[Dpm]-D-丙氨酸-D-丙氨酸）附着到 NAM 残基上；在无性细胞中全部 PG 的大约 35% 参与交联。与无性细胞 PG（其表现出与芽孢杆菌 (*Bacillus*) 种类之间显著的不同）相反，皮质 PG 结构的基本特征在全部种类中是相似的。皮质 PG 的结构在两个主要方面与无性细胞 PG 有区别。

1. 位于皮质的大约 50% 的 NAM 残基作为胞壁酸- $\rho$ -内酯出现，其中大部分 MAL 残基被多糖链中的每两个胞壁酸位置隔开。

2. 大约 25% 的 NAM 残基只带有一个 L-丙氨酸，并且由于 MAL 残基不带有肽侧链，因此与生长中的细胞相比，只能有 1/4 的 Dpm 残基用于参与孢子皮质中交联的形成。结果是，孢子 PG 比无性细胞中的交联要少得多。然而，孢子皮质中确切的分子排布是未知的。已经显示孢子皮质参与到孢子的渗透性吸水和孢子的收缩。

作为所施加和交替电势的结果，由于在电极上的氧化反应或者还原反应，会出现 DNA 核苷酸碱基的化学变化。这可能会导致通过热稳定的 DNA 聚合酶在后续的 DNA 扩增、产生降低的扩增效率或者核苷酸的错误插入的差的核苷酸识别。

因此，本发明的特定方面涉及通过采用高频率交替电场使细胞内组分可以从孢子得到的方法。

在本发明特定的实施方式中，该方法可以例如针对提取 DNA 和/或纯化 DNA。

在本发明特定的实施方式中，该方法也可以针对用于 DNA 检测，例如在诊断分析中。

在本发明特定的实施方式中，该方法可以例如针对 PCR 中的应用，例如用于集成的 PCR 设备。

在本发明特定的实施方式中，该方法可以例如针对用于可移动的 PCR 设备或者生物战剂检测。

在本发明特定的实施方式中，该方法可以例如针对细菌孢子。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对来自革兰氏阳性菌的孢子。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对来自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和梭状芽孢杆菌属 (*Clostridia*) 的孢子。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对来自蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 群的孢子。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对来自炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus Anthracis*) 类的孢子。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对检测原核细胞。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对从细菌细胞中释放 DNA。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对热抗性细菌细胞。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对嗜热或者极端嗜热细菌。

在本发明特定的实施方式中，该方法针对通过 PCR 检测热抗性细菌。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对检测热裂解抗性细菌。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对分枝杆菌 (*Mycobacteria*) 的应用。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对真核细胞的应用。

在本发明特定的实施方式中，这里所描述的方法针对哺乳动物细胞的应用。

在本发明特定的实施方式中，该方法用于人类细胞、真菌细胞、植物细胞或者病毒。

在本发明特定的实施方式中，该方法用于毛细管设计，其中细胞或者孢子悬浮液含在两个或者多个电极表面之间。

在本发明特定的实施方式中，所述裂解是通过应用高频率交替电场所诱导的。

在本发明特定的实施方式中，对高频率交替电场所施加的频率在 8000-200,000Hz 的范围内。

在本发明特定的实施方式中，在 1 和 60 秒之间的脉冲顺序施加交替电场。

在本发明特定的实施方式中，该方法包括应用脉冲之间的短暂间隔。

在本发明特定的实施方式中，所施加的电压在 6-40V 之间。

在本发明特定的实施方式中，将该方法用于悬浮在去离子水中的细胞或者孢子。

在本发明特定的实施方式中，所述细胞或者孢子被悬浮在 PCR 缓冲液配方中。

在本发明特定的实施方式中，该方法与捕获设备结合使用。

在本发明特定的实施方式中，该方法与孢子捕获设备结合使用。

在本发明特定的实施方式中，该方法与细胞捕获设备结合使用。

在本发明特定的实施方式中，该方法与静电捕获设备结合使用。

在本发明特定的实施方式中，静电捕获设备是集成的孢子捕获和裂解设备的一部分。

在本发明优选的实施方式中，所述方法、芯片、设备和系统不用于电穿孔和/或生物细胞的融合。

需要说明的是，根据本发明，在本发明的一个方面中所描述的实施方式和特征也可以用于本发明的其它方面。

## 实施例

### 实施例 1 通过应用交替电势检测 DNA 质量

使用含有缓冲液、dNTP 的 和 Taq 聚合酶集成溶液的 TaqMan Universal

PCR Master Mix 系统(Applied Biosystems), 在 Opticon DNA 设备(MJ research) 上进行实时 PCR 分析。以 900nM 的最终浓度加入两条引物: 269-16-23 间隔子 1 5'-TAT GAG CTA CAC TGT TAT CTA GTT TTC AAA GAA-3' (SEQ ID NO 1) 和 270-16-23 间隔子 2 5'-TTT CCG TGT TTC GTT TTG TTC AG-3' (SEQ ID NO 2) , 和以 100mM 的浓度加入荧光 TAQMAN 探针 (FAM-ACT TCT CTC ATA TAT AAA TGT-MGB-NFQ) (SEQ ID NO 3), 其全部针对扩增苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 16S 和 23S tRNA 基因的基因间隔子。标准 PCR 使用 15  $\mu$ l 样品体积, 并通过在 95°C 下孵育 15 分钟活化 Taq 聚合酶以开始 PCR。接着进行 40 个循环的两步 PCR 反应: 94°C 下解链 15 秒以及 60°C 下退火和延伸结合的步骤 60 秒。在每个循环的最后, 在线检测荧光以分析 PCR 产物的形成。

使用 Boe 等人的方法 (Boe 等人 1989) 从 2ml (大约  $10^9$  个细胞/ml) 过夜培养的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 亚种 *kurstaki* 分离染色体 DNA。将所纯化的 DNA 溶解在 75  $\mu$ l TE 缓冲液中, 即进行  $10^{-6}$  稀释, 其应该含有来自大约 27 个细胞/ $\mu$ l 的 DNA。

使用  $10^{-6}$  稀释的染色体 DNA 溶液中的 4 $\mu$ l (相当于 $\sim$ 100 个基因组拷贝) 分析高频率电场对所稀释 DNA 样品可能的损伤影响。进行标准的检测 PCR 以探测所施加电场的影响。详细的说, 将  $10^{-6}$  稀释的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) 染色体 DNA 溶液中的 20 $\mu$ l 进行 10V, 100 kHz 高频率电解 5 秒、10 秒、20 秒或 30 秒。接着, 将 4 $\mu$ l (相当于 100 个染色体拷贝) 被处理的 DNA 进行实时 PCR 分析。将所有的样品置于电解条件, 在 34 个 PCR 循环后进行检测, 没有观察到检测灵敏度的损失。在相同的  $C_T$  点检测到全部不同处理的 DNA 样品的事实进一步说明核苷酸碱基的化学还原或者氧化对检测 PCR 灵敏度有较少的影响 (参见图 1)。然而, 更进一步提高电解程序的持续时间(30、90 或 180 秒)表示电解时间在时间延长的程序时没有影响 (参见图 2)。推测, 超过 30 秒的电解会导致目标 DNA 的释放和过饱和, 接着出现了通过定量 PCR 检测到的不佳的 PCR 检测。

## 实施例 2 通过定量 PCR 检测应用交替电势进行孢子裂解

将含有  $3.2 \times 10^9$  个孢子/g 的 100mg Biobit 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus*

*thuringiensis*)亚种 *kurstaki* (Valent BioSciences Corp, Libertyville, USA) 悬浮在 1ml 去离子水中，并在 12000rpm 下离心 90 秒。重复该步骤 4 次。去上清。最终溶液含有大约  $3.2 \times 10^8$  个孢子。将该溶液稀释到最终浓度为  $3.2 \times 10^5$  个孢子/ml，并接着用于电解和 PCR。

保持频率和电压稳定(分别为 100 kHz 和 10 V)，使用不同的暴露时间(从 5 秒钟到 30 秒钟)检测电解程序的持续时间。从图 3 中可以清楚看出，对  $C_T$  值没有显著的影响，这说明孢子的裂解实际上是不依赖时间的。然而，进一步提高电裂解程序的持续时间(分别为 30 秒、90 秒和 180 秒)，便显出当应用延长的程序时，电解时间有影响(参见图 4)。推测，超过 30 秒的电解会导致目标 DNA 的释放和过饱和，这样导致不佳的 PCR 检测。

### 实施例 3 不同的频率(10-100 kHz)对孢子电裂解效率的影响

将含有  $3.2 \times 10^9$  个孢子/g 的 100mg Biobit 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)亚种 *kurstaki* (Valent BioSciences Corp, Libertyville, USA) 悬浮在 1ml 去离子水中，并在 12000rpm 下离心 90 秒。重复该步骤 4 次。去上清。最终溶液含有大约  $3.2 \times 10^8$  个孢子。将该溶液稀释到最终浓度为  $3.2 \times 10^5$  个孢子/ml，并接着用于电解和 PCR。

保持电压和时间稳定(分别为 10 V 和 30 秒)。图 4 表示该实验的结果，显然，100kHz 的高频率表现了  $C_T$  (极限循环，threshold cycle) 的降低，这样说明从孢子释放了可扩增的 DNA。将频率降低到 50 kHz 或者 10 kHz 不会对  $C_T$  值的改进有任何提高(即与未处理的对照相比降低了  $C_T$ )。

### 实施例 4 确定用于孢子电解的最低有效电压

保持频率和时间稳定(分别为 100 kHz 和 30 秒)，使用不同的暴露电压 3~10V 的范围内(分别为 3V、5V、7V 和 10 V)检测电解程序的电压。从图 5 可以清除看出，对于膜/孢子捕获明显存在极限电压值 VT。因此，所施加的电压是高度依赖界面电极阻抗的重要参数，例如低施加电压(<2 V)对电极提供了非常小的电势梯度，即使在长脉冲时间内(>100 μs);并形成了峰状梯度。

在溶液中所施加电压的最大强度可以通过绘制设备提高时间和充电时间的指数函数来计算。例如，8μs 的设备提高时间和 20-40μs 范围内的充电时间会提供最大 15-18% 的所施加强度。在应用脉冲后的 10-15μs 后达到最大

值。50-75μs 后，压降有效地为零，因为所有所施加的电压出现在电极-溶液界面。在更高的电压下，界面的阻抗会成为不可忽视的，并且在电极之间通过的电流受到溶液电导系数的限制。

#### 实施例 5 确定 DNA/RNA 释放百分率

将含有大约  $10^9$ CFU/g 的 100mg Biobit 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)亚种 *kurstaki* (Valent BioSciences Corp, Libertyville, USA) 悬浮在 1ml 去离子水中，接着在 70°C 下用巴氏法灭菌 5 分钟，接着对溶液进行离心 (5000xg, 5 分钟)。去上清。再重复该步骤(Tyndalisation)2 次。最终的 1ml 溶液含有大约  $10^8$  个孢子。

将该溶液稀释成  $10^5$  个孢子/ml 的最终浓度，这样得到了储藏溶液。

使用储藏溶液的样品填充样品室，并将样品暴露到交流电场中，所述交流电场具有选定的频率、强度和持续时间。

为了确定样品生物细胞的 DNA/RNA 释放百分率，将所暴露的样品和含有存储溶液的对照都使用荧光染料 4',6-二咪基-2-联苯基吲哚(DAPI™)处理。DAPI 是广泛应用的 DNA 染料，其在结合到双链 DNA 小凹陷中富含 A-T 的序列时会形成荧光复合物。染料溶液是含有 2.0 μg/ml DAPI 的水溶液。而且，DAPI 限制了细胞的渗透性，并且因此对于显示遗传物质的细胞释放是最佳的。

使用一定体积的染料溶液对样品室进行洗脱，其体积是样品室体积的三倍。将来自样品室的洗脱液在室温下孵育 5 分钟。

在是对照体积大约 3 倍体积的染色溶液中，将与所暴露样品体积相当的体积的对照分别染色 5 分钟。

接着将适当体积的对照和适当体积的所暴露样品在相差显微镜和荧光显微镜（配有 DAPI 过滤器）下进行观察。使用相差显微镜对于对照和所暴露的样品计算孢子的数目，表示所释放的染色体 DNA 分子（可以看到的蓝点）的孢子的数目通过荧光显微镜计算。接着按照下式确定 DNA/RNA 释放百分率：

$$\frac{d_s}{s_s} \cdot 100\%， 其中 d_s 是所计算的蓝色 DNA 点的数目， s_s 是孢子的总数。$$

也可以确定背景 DNA/RNA 释放百分率作为对照，如果表示背景释放高于 5%，则建议所确定的被认为无效，需要对生物细胞的新储藏溶液进行重复。

#### 参考文献

- Levi 等人 Levi,K., Higham,J.L., Coates,D., & Hamlyn,P.F. (2003) Molecular detection of anthrax spores on animal fibres (在动物纤维上对炭疽孢子的分子检测). *Letters in Applied Microbiology* **36**, 418-422.
- Boe 等人 Boe L, Gros MF, te Riele H, Ehrlich SD, Gruss A. (1989) Replication origins of single-stranded-DNA plasmid pUB110 (扩增单链 DNA 质粒 pUB110 的起始区). *J Bacteriol.* **171**(6):3366-72
- Cano 和 Borucki Cano RJ, Borucki MK. (1995). Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber(多米尼加 2500 万~4000 万年的琥珀中细菌孢子的发育和鉴定). *Science*. **268**: 1060-4.
- Johns 等人. Johns, M., L. Harrington, R. W. Titball, and D. L. Leslie. (1994). Improved methods for the detection of *Bacillus anthracis* spores by the polymerase chain reaction (用于通过聚合酶链式反应用于炭疽芽孢杆菌孢子检测的改进的方法). *Lett. Appl. Microbiol.* **18**:236–238.
- Linden, D. Linden, David. (1984). *Handbook of Batteries and Fuel Cells* (电池和燃料电池手册). New York: McGraw-Hill.

在仅电裂解5-30秒后，孢子的有效和高度相似的PCR检测

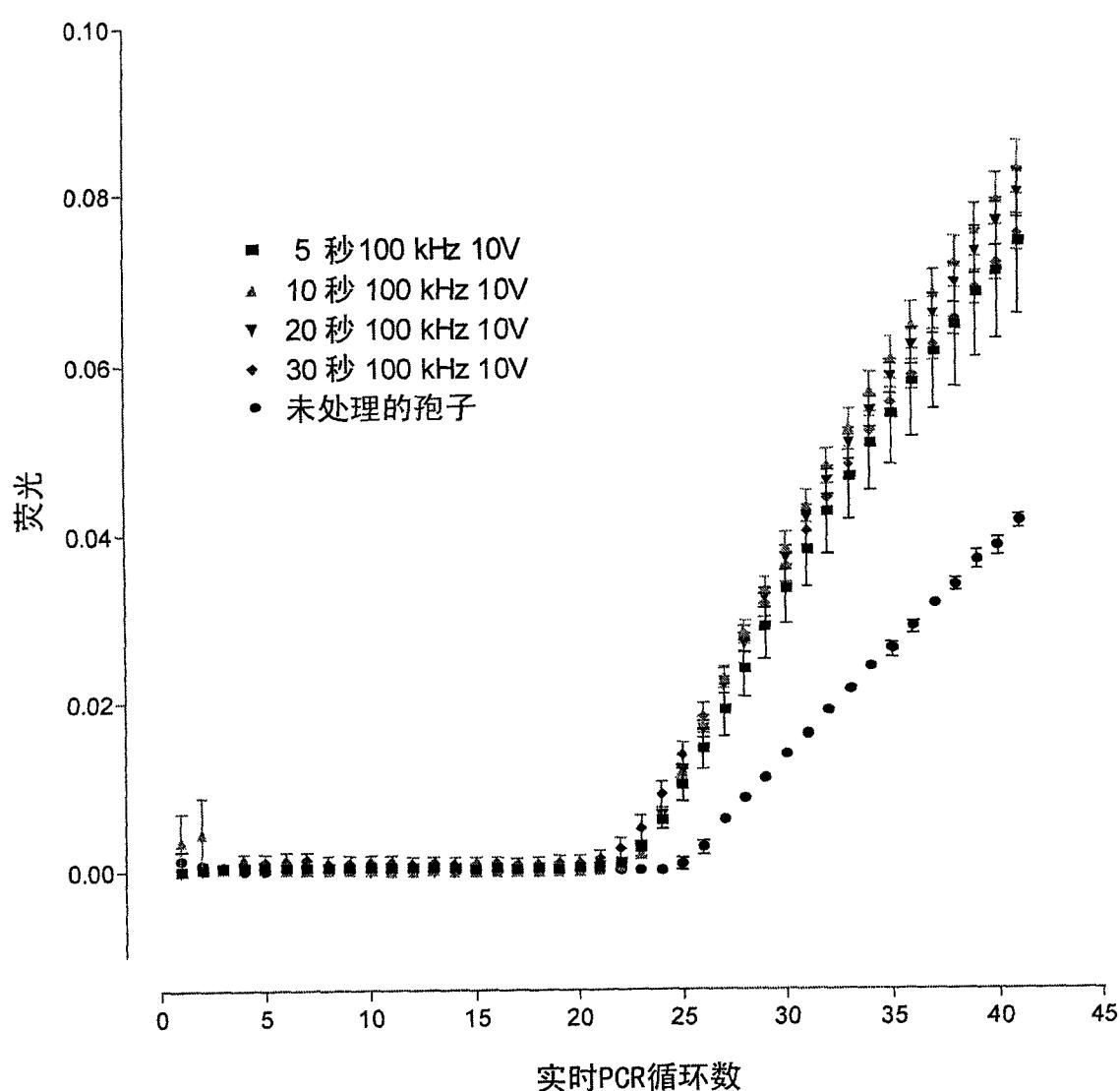


图1

延长的电裂解会降低PCR检测的灵敏度,  
推测是通过产生过多量的模板DNA.

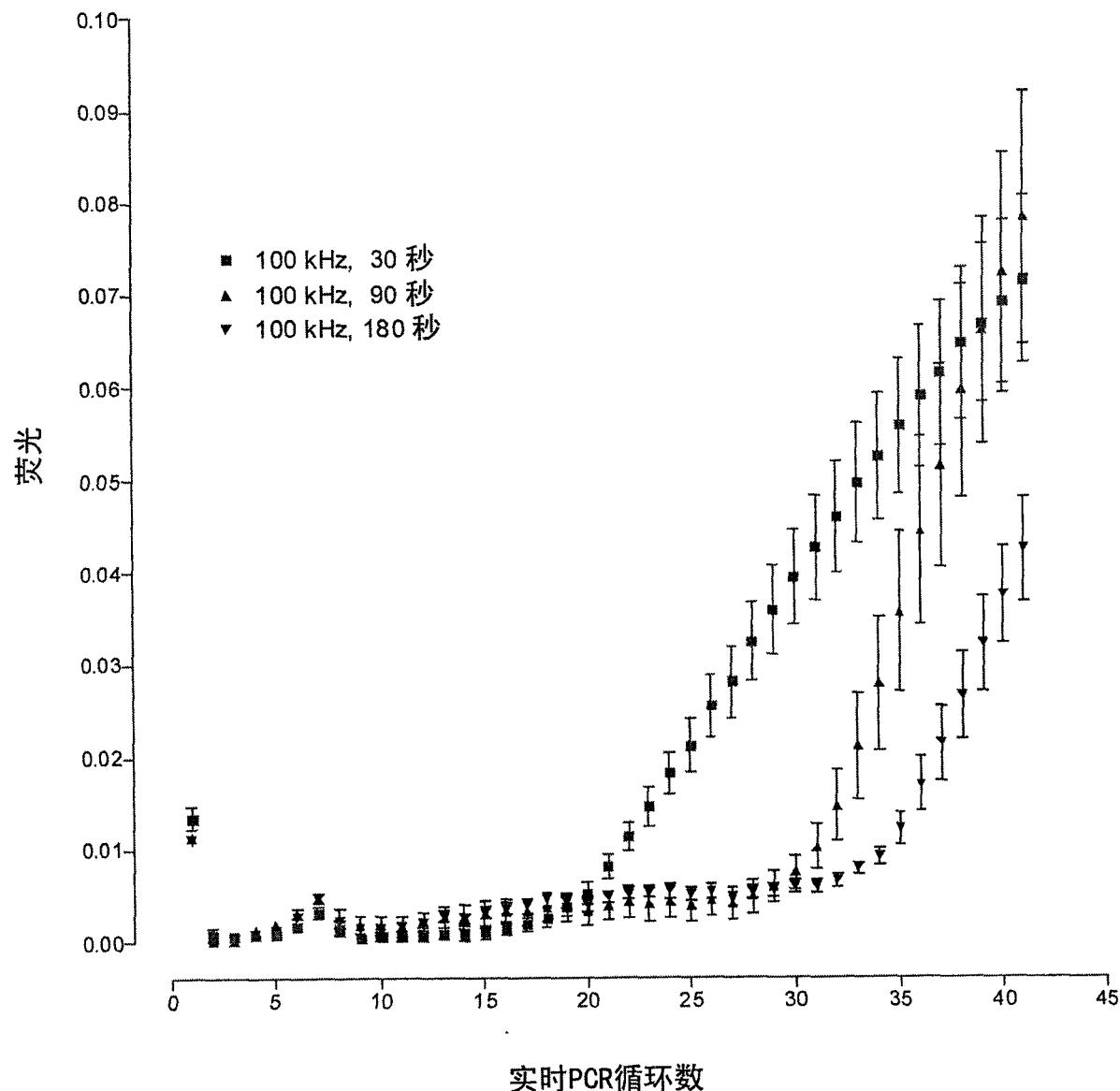


图2

通过PCR灵敏度所检测的更长的电裂解时间范围  
对目标DNA的质量没有负面影响

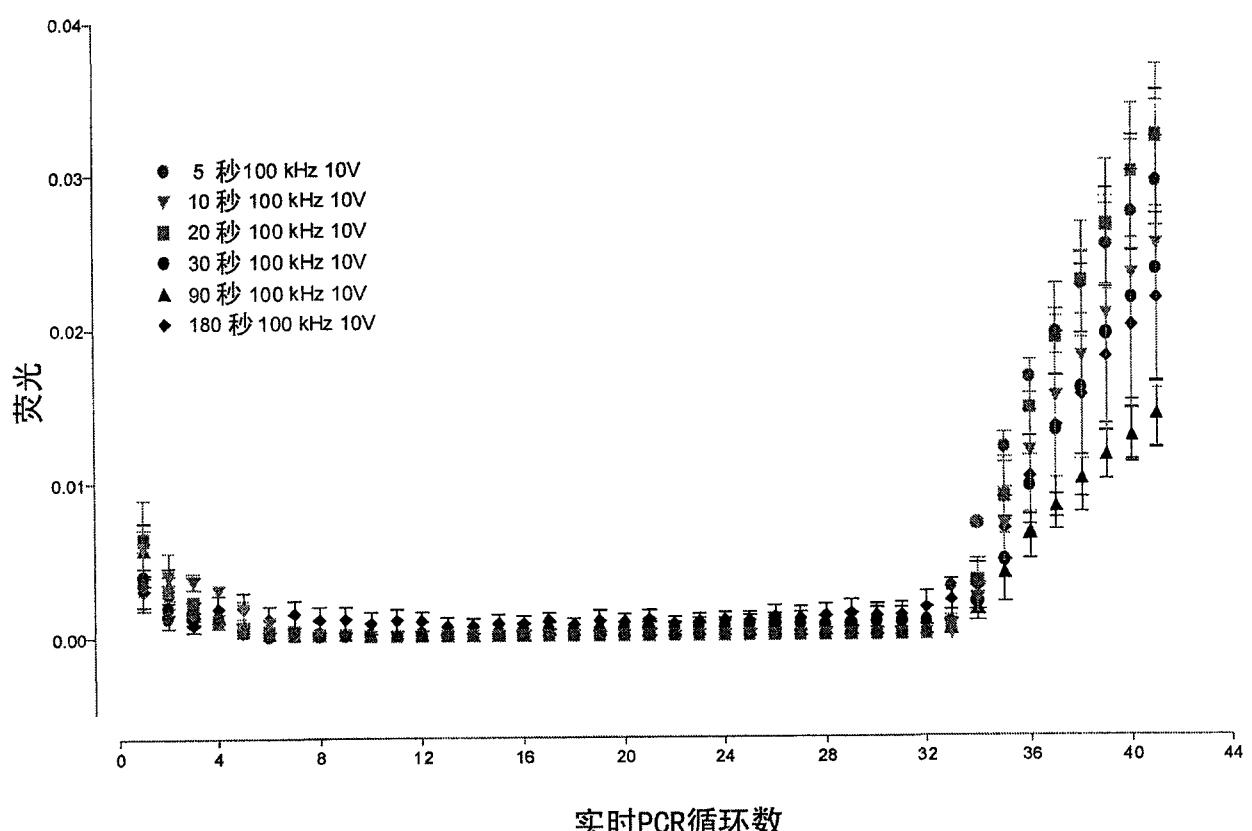


图3

使用10或50kHz进行孢子的电裂解对DNA产量  
没有影响, 而100kHz会导致显著的影响

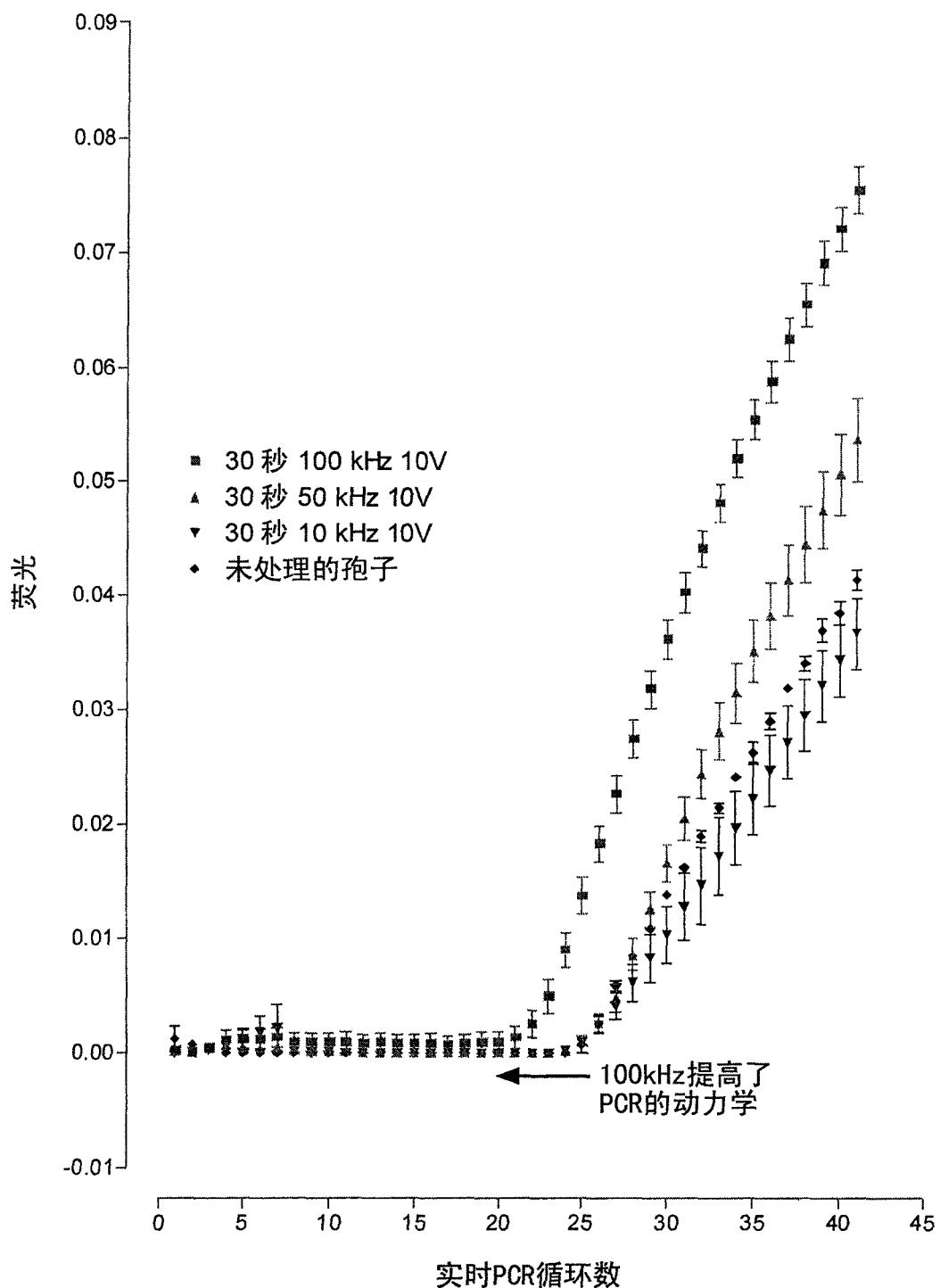


图4

孢子的电裂解依赖于界面电极阻抗

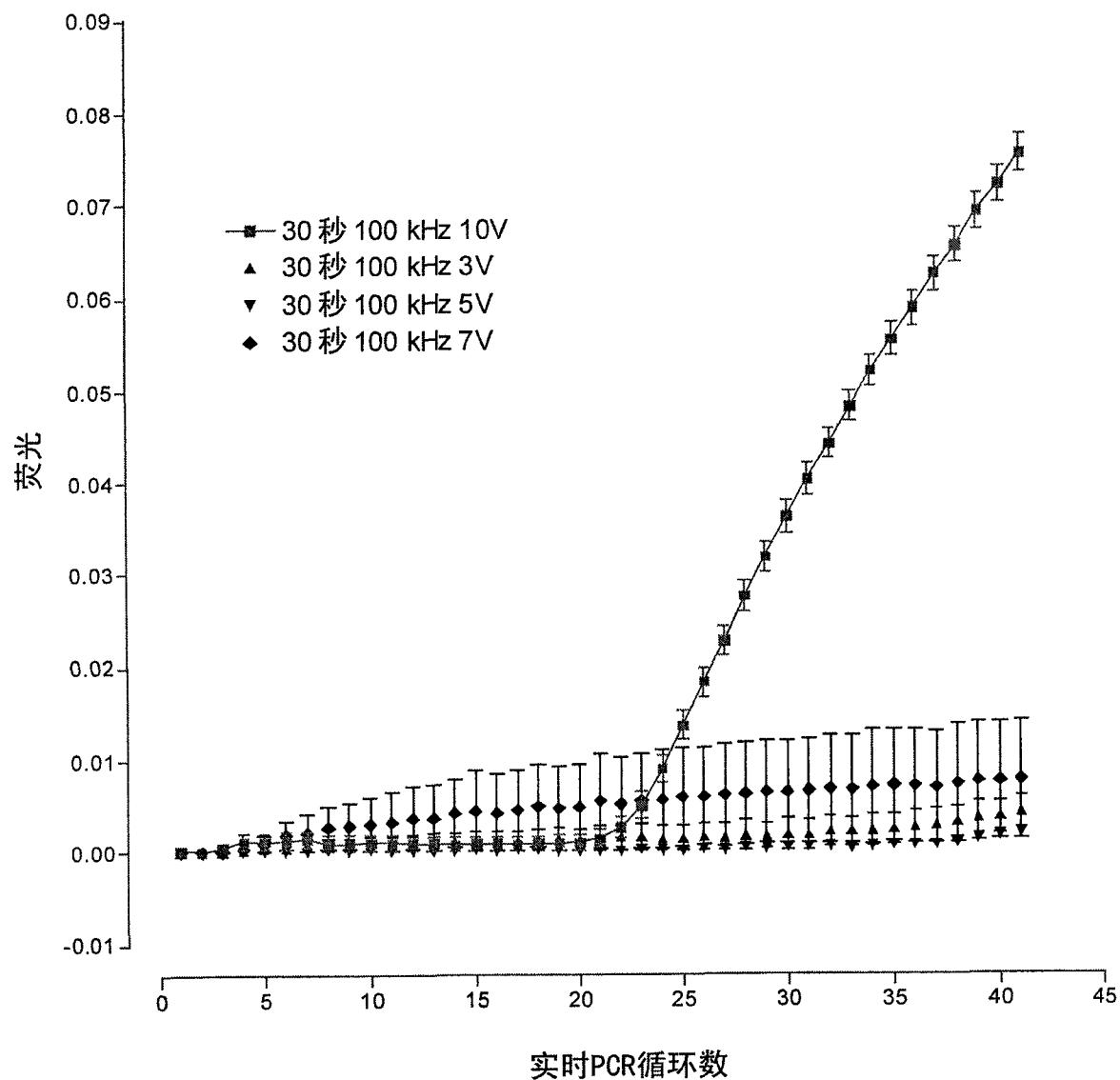


图5

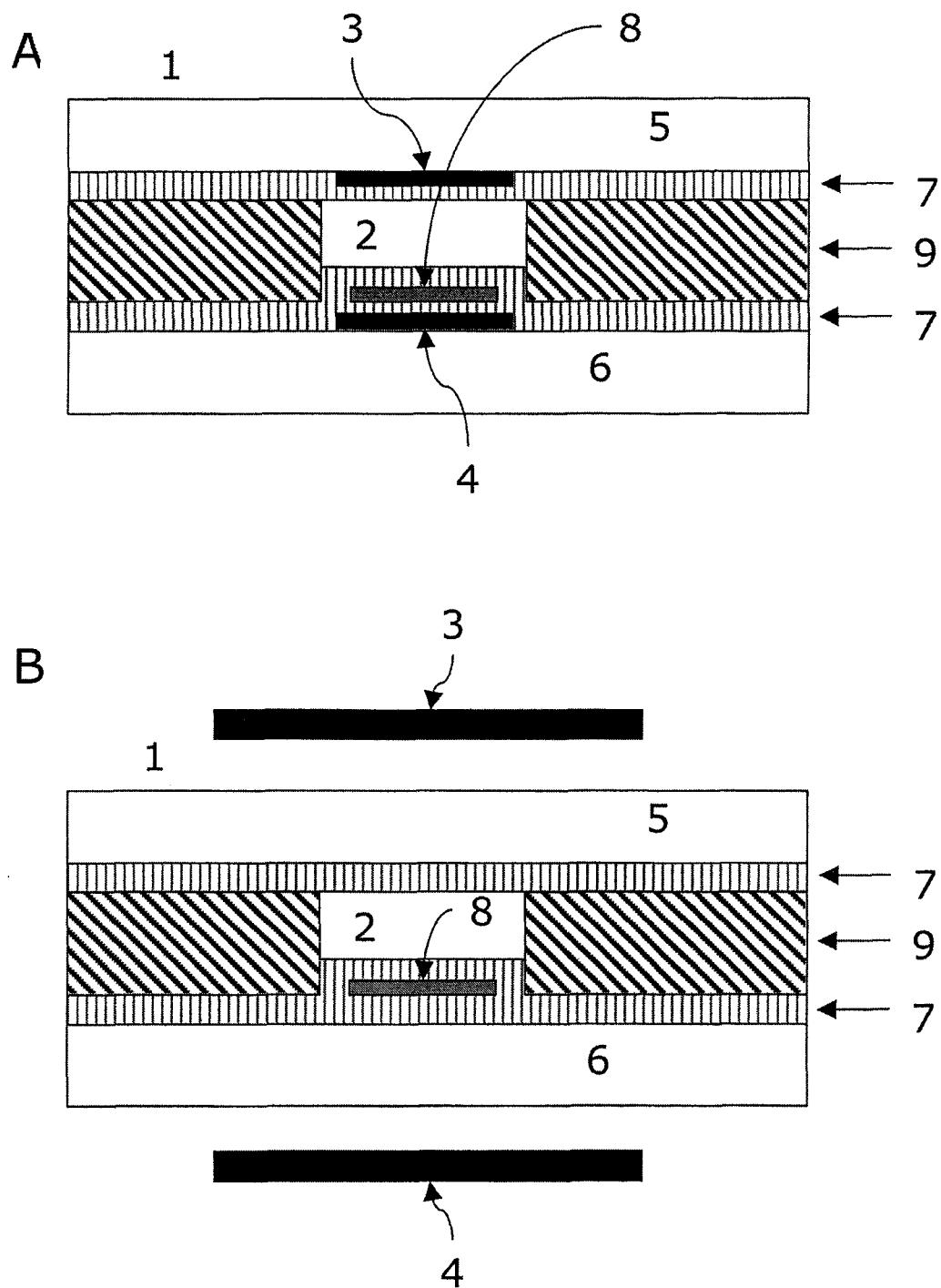


图6