



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 95190860.X

[51]Int.Cl⁶

C07H 21/00

[43]公开日 1996年11月6日

[22]申请日 95.7.5

[30]优先权

[32]94.7.7 [33]US[31]08 / 271,882

[86]国际申请 PCT / US95 / 08570 95.7.5

[87]国际公布 WO96 / 01836 英 96.1.25

[85]进入国家阶段日期 96.5.6

[71]申请人 内诺金有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 M·J·赫勒 E·杜

G·A·艾文斯

R·G·索斯诺斯基

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 姜建成

权利要求书 12 页 说明书 94 页 附图页数 20 页

[54]发明名称 用于分子生物学分析和诊断的自我可寻址自我装配的微电子学系统及装置

[57]摘要

设计和制造了一台可自我寻址,自我组装的微电子装置,它能以显微形式主动地进行和控制多步和多路的分子生物学反应。这些反应包括核酸杂交,抗体/抗原反应,诊断,和生物高分子合成。该装置能借助微平版印刷和微加工技术而制造。该装置能电子控制特异性结合实体的转移和结合到特异性微场所上。特异性结合实体包括分子生物学分子例如核酸和多肽。该装置能在被寻址的特异性微场所上逐次地控制分析物或反应物的转移和反应。该装置能浓缩分析物和反应物,移走非特异性结合的分子,为DNA杂交反应提供严格控制,和提高对分析物的识别力。该装置能电子地被复制。

权利要求书

1. 一台用电子学方法自我寻址的装置，它包含：一种基质；一个电极，该电极由上述基质支持着；一个操作地连接着该电极的电源和一种靠近该电极的粘附层，这里所说的粘附层可渗透反荷离子但不渗透一种能够绝缘或结合到该电极上的分子并且粘附层能够结合大分子。

2. 权利要求 1 的电子学装置，进一步包括一个渗透层，该渗透层置于所说的粘附层和电极之间。

3. 权利要求 1 的电子学装置，其中所提的电源包括一个直流电源。

4. 权利要求 1 的电子学装置，其中所提的基质包括从硅、玻璃、二氧化硅、塑料和陶瓷组成的材料组中挑选的一种。

5. 权利要求 1 的电子学装置，其中所提的基质包括一个底层和一个覆盖绝缘层。

6. 权利要求 5 的电子学装置，其中所提的底层包括从硅、玻璃、二氧化硅、塑料和陶瓷组成的材料组中挑选的一种。

7. 权利要求 5 的电子学装置，其中所提的底层由硅组成。

8. 权利要求 5 的电子学装置，其中所提的绝缘层包括二氧化硅。

9. 权利要求 1 的电子学装置，其中所提的基质包括一种电路模型或电路板。

10. 权利要求 1 的电子学装置，其中所提的电极是能够转移一个带电大分子到该粘附层上。

1 1 . 权利要求 1 的电子学装置，其中所说的电极能够同时地移动带电的第一个大分子到该粘附层上，并从该粘附层上转移带相反电荷的第二个大分子到该粘附层中的第一个大分子上。

1 2 . 权利要求 2 的电子学装置，其中所提的渗透层包括氨基丙基三乙氧基硅烷。

1 3 . 权利要求 2 的电子学装置，进一步包含一个位于所说的渗透层和电极间的缓冲液贮槽。

1 4 . 权利要求 1 的电子学装置，其中结合该大分子到该粘附层上不会使该电极绝缘。

1 5 . 权利要求 1 的电子学装置，其中提到的电极包括选自铝、金、银、锡、铜、铂、钯、碳和半导体材料的一种材料。

1 6 . 权利要求 1 的电子学装置，其中电极包括选自铝、金、银、锡、铜、铂、钯、碳和半导体材料的一种材料。

1 7 . 权利要求 1 的电子学装置，其中使一个结合实体结合到该粘附层上不会使该电极绝缘。

1 8 . 一台用电子学方法自我寻址的装置，它包含：一种基质；多个电极，每个电极置于所说的基质上；一个与所说的多个电极操作地连接着的电源；和一个接近着每个所说电极的粘附层，这里所说的粘附层可渗透反荷离子但不渗透一种能够绝缘或结合到该电极上的分子，并且该粘附层能够结合大分子。

1 9 . 权利要求 1 8 的电子学装置，进一步包含一个连接着电源和所说的多个电极的开关控制器。

2 0 . 权利要求 1 8 的电子学装置，进一步包含一个位于该粘附层和每一个电极间的渗透层。

2 1 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 其中每个电极包括选自铝、金、银、锡、铜、铂、钯、碳和半导体材料的一种材料。

2 2 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 进一步包含位于多个电极之间的电子绝缘材料。

2 3 . 权利要求 1 8 的电子学装置中所提的多个电极以矩阵式排列。

2 4 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 进一步包含一个能容纳一种含实体的溶液的腔, 该实体选自结合实体、试剂和分析物。

2 5 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 其中特异结合实体已被选择性地转移和结合到所说的多个可寻址的结合场所上, 而形成一个已寻址的活性场所装置。

2 6 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 其中装置上结合场所的宽度是在 0.5 微米和 200 微米之间。

2 7 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 其中装置上结合场所的宽度是在 5 微米和 100 微米之间。

2 8 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 其中所提的多个结合场所被安排在一个二维的矩阵中。

2 9 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 其中所提的多个结合场所被安排在一个三维的矩阵中。

3 0 . 权利要求 1 8 的电子学装置, 进一步包含一个计算系统, 这里所说的系统是用电子学方法连接到所说的多个结合场所上。

3 1 . 权利要求 3 0 的电子学装置, 其中提到的计算系统被连接到所说的电极上。

3 2 . 电子控制核酸杂交的方法, 包括下列步骤:

提供一个连接着电源的场所；

使一个第 1 核酸和一个第 2 核酸接触，其中的第 2 核酸是结合在所述场所上的；和

放置该场所在一个负电势下达足够时间，其中所说的第 1 核酸如果对于第 2 核酸是一个非特异性核酸序列，则将其从第 2 核酸上移走，但如果第 1 核酸对于第 2 核酸是一个特异的核酸序列则不将其移走。

3 3 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸和第 2 核酸都处在一种溶液中。

3 4 . 权利要求 3 2 所述方法，进一步包括一个在放置所说的场所在负电势中之前，放置该场所在正电势的步骤，这样在该场所上浓缩第 1 核酸。

3 5 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的负电势是逐渐增加或减少的。

3 6 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的非 - 特异性核酸序列与第 2 核酸序列有一个碱基错配。

3 7 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸由不多于 7 个核苷酸组成。

3 8 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸由不少于 2 2 个核苷酸组成。

3 9 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸由在 7 至 2 2 个的核苷酸组成。

4 0 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸包括一个可识别的元件。

4 1 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸包括一个荧光团。

4 2 . 权利要求 4 1 所述方法，其中提到的荧光团是从德克萨斯红和荧光素组成的组中挑选的。

4 3 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸包括一个脱氧核糖核苷酸。

4 4 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸包括一个核糖核苷酸。

4 5 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸包括一个修饰过的核苷酸。

4 6 . 权利要求 3 3 所述方法，进一步包括下列步骤：

在所述溶液中加入可识别的染料，其中所述的染料结合到双链核酸上比结合到单链核酸上的亲和力高；和

通过测定在该场所上染料的水平而确定在第 1 核酸和第 2 核酸间在该场所上杂交的水平。

4 7 . 权利要求 4 6 所述方法，其中提到的染料包括溴化乙锭。

4 8 . 权利要求 3 3 所述方法，进一步包括下列步骤：

在所述溶液中加入一个可识别染料，其中当该染料与双链核酸接触时，该染料产生一个比与单链核酸接触时更强的可识别信号；和

通过测定在该场所上染料产生可识别信号的水平，来确定在该场所上在第 1 核酸和第 2 核酸间发生杂交的水平。

4 9 . 权利要求 4 8 所述方法，其中提到的染料包括溴化乙锭。

5 0 . 权利要求 3 3 所述方法，其中提到的溶液包括由对于第 2 核酸的非特异性核酸序列组成的一种第 3 核酸。

5 1 . 权利要求 5 0 所述方法，其中的第 3 核酸的浓度是高于第 1 核酸浓度的 1000 倍。

5 2 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸由 7 个核苷酸组成。

5 3 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸由 5 至 7 个核苷酸组成。

5 4 . 权利要求 3 2 所述方法，其中提到的第 1 核酸由 2 2 个核苷酸组成。

5 5 . 电子控制核酸杂交的方法，包括下列步骤：

提供一个连接着电源的场所；

将多个核酸与一个目标核酸接触，其中所说的目标核酸是结合在该场所上的；和

放置该场所在一个负电势下达足够时间，其中对于所说目标核酸的非特异性核酸序列，而不是从所说的多个核酸中来的特异性核酸序列，被从所说的目标核酸上移走。

5 6 . 在场所上并在溶液中用电子学方法浓缩一个带电实体的方法，包括下列步骤：

将所说的溶液与包括第 1 下埋的电极的第 1 场所，和包括第 2 下埋电极的第 2 场所接触；和

在相对于第二场所的第一场所，放置与所说实体相反的电荷，从而在第 1 场所上而不是第 2 场所上浓缩所说的实体。

5 7 . 权利要求 5 6 所述方法，进一步包括在第二场所放置与所说实体相同的电荷。

5 8 . 权利要求 5 6 所述方法，进一步包括在第 1 场所上的实体

和粘附层之间形成共价键的步骤。

59. 权利要求56所述方法，其中提到的实体是一个核酸分子，并且第1场所是带正电势。

60. 权利要求59所述方法，其中提到的第2场所是带负电势。

61. 权利要求56所述方法，其中在第1场所的实体浓度高于在第2场所所说实体的浓度10倍。

62. 权利要求56所述方法，其中在第1场所的实体浓度高于在第2场所实体的浓度100倍。

63. 权利要求56所述方法，其中在第1场所的实体浓度高于在第2场所实体的浓度 10^6 倍。

64. 权利要求56所述方法，进一步包括结合实体到第1场所的步骤。

65. 用电子学方法将溶液中的一个带电实体从第1场所转移到第2场所上的方法，包括下列步骤：

将所说溶液与第1和第2场所接触；

在相对于第2场所的第1场所，放置与所说实体相反的电荷，从而使该实体转移到第1场所；和

此后，在相对于第1场所的第2场所，放置与实体相反的电荷，从而将所说的核酸从第1场所转移到第2场所。

66. 权利要求65所述方法，其中提到的实体是一个核酸。

67. 权利要求65所述方法，进一步包括将所说实体结合到第2场所的步骤。

68. 在多个场所用电子学方法控制合成生物高分子的方法，包括下列步骤：

在基质上提供多个反应场所，其中每个反应场所是单个地用电子学方法可寻址的；

在每个反应场所上形成一个粘附层；

使多个反应场所与包含一个带电单体 - A 的溶液接触；

选择性地将一个要发生反应 A 的被命名为 A 的场所偏压在与单体 - A 相反的电荷，和将另一个无反应 A 发生的场所偏压在与单体 - A 相同的电荷，因此在所说的 A 场所上使单体 A 浓缩和反应；

此后，从多个反应场所上移走未反应的单体 A；

使多个反应场所与包含一个带电的单体 - B 的溶液接触；

选择性地将所说的 A 场所偏压在单体 B 相反电荷下，和将另一个无反应 B 发生的场所偏压在与单体 B 相同的电荷下，从而在所说的 A 的场所上浓缩和反应单体 B 以形成二聚体 A - B。

69. 权利要求 68 所述方法，其中提到的单体 A 由一个核苷酸组成并且提到的单体 B 由一个核苷酸组成。

70. 权利要求 68 所述方法，其中提到的单体 A 由一种氨基酸组成并且提到的单体 B 由一种氨基酸组成。

71. 复制一个由特异性核酸序列寻址的一个主要自我可寻址的电子学装置的方法，包括下列步骤：

对所说的特异性核酸序列提供互补序列，并杂交该互补序列到寻址在主要装置上的特异性核酸序列；

用在主要装置上的寻址场所排列在一个受体自我可寻址电子装置上的未寻址场所；和

偏压在所说的主要装置上的场所成负 和在所说的受体装置上的场所成正，从而将所说的互补序列转移到受体装置上的未寻址场所上。

7 2 . 权利要求 7 1 所述的复制模式序列的方法，进一步包括提供一个带正电的离液剂试剂或变性剂，从主要的模板上变性互补序列的步骤。

7 3 . 一台用于遗传分型的自我可寻址的电子学装置，包括：
多个用电子学方法可寻址的每个场所包括一个电极；和
一个结合到每个场所上的结合实体，其中每个实体能够识别基因序列的存在。

7 4 . 权利要求 7 3 所述的自我可寻址电子装置，其中所说的基因序列是一个核苷酸序列。

7 5 . 权利要求 7 4 所述的自我可寻址电子装置，其中所说的核苷酸序列是一个cDNA序列。

7 6 . 权利要求 7 4 所述的自我可寻址电子学装置，其中所说的核苷酸序列是一个基因组DNA 序列。

7 7 . 权利要求 7 4 所述的自我可寻址电子学装置，其中所说的核苷酸序列是一个mRNA 序列。

7 8 . 权利要求 7 4 所述的自我可寻址电子学装置，其中所说的核苷酸序列是一个cRNA 序列。

7 9 . 权利要求 7 3 所述的自我可寻址电子学装置，其中所说的基因序列是一个氨基酸序列。

8 0 . 权利要求 7 3 所述的自我可寻址电子学装置，其中结合到每个场所上的每个结合实体是相同的。

8 1 . 权利要求 7 3 所述的自我可寻址电子学装置，其中一个结合实体是不同于其它所说的结合实体。

8 2 . 用于电子学方法控制遗传分型的方法，包括下列步骤：

提供多个电子可寻址的场所，每个场所含有一个电极；

使一种结合实体结合到每个场所上，其中每个实体能够识别某个基因序列的存在；

用一个样品接触多个场所；

通过识别在每个场所上存在或缺乏所说的基因序列，来确定该样品的遗传图谱。

8 3 . 在某个可寻址场所用电子学方法控制酶反应的方法，包括下列步骤：

提供一个含有一个电极的电子学可寻址场所；

使一个底物与所说的场所接触；

放置该场所在与该底物相反的电荷下，因此在该场所上浓缩该底物；

结合该底物到该场所上；

使一种酶与该场所接触；

放置该场所在与该酶相反的电荷下，因此在该场所上浓缩该酶；

和

允许该酶在该场所上与该底物起反应。

8 4 . 权利要求 8 3 所述方法，其中提到的底物包括一种核酸。

8 5 . 权利要求 8 3 所述方法，其中提到的酶包括一种限制性酶，一种连接酶，一种蛋白酶，一种糖苷酶，或一种磷酸化酶。

8 6 . 权利要求 8 3 所述方法，其中提到的酶包括一种DNA 聚合酶。

8 7 . 权利要求 8 3 所述方法，其中提到的酶包括一种RNA 聚合酶。

88. 权利要求83所述方法，其中提到的酶反应包括一种核酸的酶消化。

89. 权利要求83所述方法，其中提到的酶反应包括一种核酸的合成。

90. 权利要求83所述方法，其中提到的酶反应包括一种多肽的合成。

91. 用电子学方法控制扩增核酸的方法，包括下列步骤：

(1) 提供一个含有一个电极的电子学可寻址场所；

(2) 提供一个结合在该场所上的寡聚核苷酸引物Y；

(3) 使一种单链核酸X与该场所接触，其中该引物Y特异地与该核酸X杂交；

(4) 置该场所于与该核酸X相反的电荷下，从而在该场所上浓缩该核酸X并且将该核酸X与该引物Y杂交；

(5) 使一种核酸聚合酶与该场所接触；

(6) 置该场所于与该聚合酶相反的电荷下，从而在该场所上浓缩该聚合酶并且在该场所上允许该聚合酶从该引物Y合成一个核酸Y；

(7) 置该场所于一个负电势下达足够时间以便从该场所上移走该核酸X；

(8) 使一个寡聚核苷酸引物X与该场所接触，其中该引物X与该核酸Y特异性地杂交；

(9) 置该场所于与该引物X相反的电荷下，从而在该场所上浓缩该引物X并且将该引物X与该核酸Y杂交；

(10) 置该场所于与该聚合酶相反的电荷下，因此在该场所上浓缩该聚合酶，并且在该场所上允许该聚合酶从该引物X合成一种核酸。

9 2 . 在大分子间用电子学方法控制结合的方法，包括下列步骤：
在一个直流电场中使一种带电第 1 大分子与一种第 2 大分子接触，
其中所说的第 2 大分子被结合在一个场所上；

置该场所于与该第 1 大分子所带电荷相反的电势下达足够时间，
其中该第 1 大分子如果非特异性地与该第 2 大分子结合，则将其从该
第 2 大分子处移走，但如果所说的第 1 大分子特异性地与该第 2 大分
子结合则它不被移走。

9 3 . 权利要求 9 2 所述方法，其中提到的第 1 大分子是一种多
肽。

9 4 . 权利要求 9 2 所述方法，其中提到的第 1 大分子是一种核
酸。

说明书

用于分子生物学分析和诊断的自我可
寻址自我装配的微电子学系统及装置

发明领域

本发明有关一种能有效地进行和控制微观形式的多步和复合反应的自我寻址、自我装配的微电子系统的设计、制作和使用。更具体地说，这些反应包括分子生物学反应，如核酸分子杂交、核酸分子扩增、样品制备、抗体/抗原反应、临床诊断，和生物高分子合成。

发明背景

分子生物学包含用于核酸和蛋白质分子分析的多种技术，大部分这些技术形成了临床诊断分析的基础。这些技术包括核酸分子杂交分析，限制酶切分析，基因序列分析，和核酸蛋白质分子分离和纯化（参见，如，J. Sambrook, E. F. Fritsch, 和 T. Maniatis, 分子克隆：实验室手册，2nd., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989）。

大部分分子生物学技术包括在多种样品间进行大量的反应。它们常是复杂和耗时的，而通常需要较高的精确度。多种技术因缺少灵敏度、特异性、或重现性而限制其的应用。例如，因灵敏性和特异性的不足已极大地限制了核酸分子杂交的实际应用。

核酸分子杂交分析通常包括在大量的非目标核酸分子中用探针识别极少数特殊的目标核酸分子（DNA 和 RNA）。为了保证高度的特异

性，杂交试验常在通过温度、盐类、洗涤剂、溶剂、离液序列高的介质和变性剂之间各种组合而获得的高度严格条件下进行。

多倍的样品核酸分子杂交分析已以种种滤膜和固体载体的形式进行（参见G. A. Beltz et al., in 酶学方法Vol. 100, Part B, R. Wu. L. Grossman, K. Moldave. Eds., Academic Press, New York, 19章, 266-308页, 1985）。一种形式为“斑点印迹”杂交的形式，包括目标DNA分子非共价粘附在一种滤膜上，随后与放射性同位素标记过的探针杂交。“斑点印迹”杂交技术获得了广泛的应用，并发展了多种改进方法（参见M. L. M. Anderson 和B. D. Young, in 核酸分子杂交—实用方法B. D. Hames 和 S. J. Higgins, Eds., IRL Press, Washington DC, 第4章, 73-111页, 1985）。“斑点印迹”杂交技术已进一步发展能进行基因组突变复合分析（D. Nanibhushan 和D. Rabin, in EPA 0228075, July 8, 1987）和重叠克隆的鉴别以及基因组图谱的构建（G. A. Evans, in USP # 5,219,726, June 15, construction, 1993）。

另一种被称为“夹心”杂交的形式包括共价地粘附寡聚核苷酸探针于一种固体载体上然后用它们来捕获和识别多种的核酸目标分子。（M. Ranki et al., Gene, 21, pp. 77-85, 1983; A. M. Palva, T. M. Ranki, 和H. E. Soderlund, in UK Patent Application GB 2156074A, Oct 2, 1985; T. M. Ranki 和 H. E. Soderlund in USP # 4,563,419, January 7, 1986; A.D.B. Malcolm 和 J.A. Langdale, in PCT WO 86/03782, July 3, 1986; Y. Stabinsky, in USP # 4,751,177, January 14, 1988, T. H. Adams et al., in PCT WO 90/01564, Feb 22, 1990; R. B. Wallace et al., 6 Nucleic

Acid Res. 11, p. 3543, 1979; 和B. J. Connor et al., 80 Proc. Natl. Acad. Sci. USA pp. 278-282, 1983)。这些形式多种改进方法统称为“反向斑点印迹”方法。

使用通用的核酸分子杂交形式和严格控制方法，仍然难以识别低拷贝数（即，1-100,000）核酸目标分子甚至使用灵敏度最高的标记物质（酶，荧光团，同位素，等）和配套的识别系统（荧光计，鲁米诺仪，光子计数器，闪烁计数仪，等）。

这个难点是由直接探针杂交法本身带有的一些不足之处引起的。一种不足涉及杂交反应的严格控制。杂交反应为了获得杂交的特异性通常在严格的条件下进行。严格控制的方法基本地包括杂交反应温度，离子强度和变性剂的优化和随后的漂洗过程。不幸地，应用这些严格的条件导致用于识别的探针/目标分子杂交复合物的数量降低。

另一种问题涉及存在于大多数样品，尤其是人类基因组DNA样品中的高度复杂的DNA分子。当一个样品中含有极大量的与特定的目标序列有紧密关系的序列时，即使最独特的探针也会与非目标序列形成大量的部分杂交。

第三个问题涉及存在于探针与它的特殊目标分子间的不合适的杂交动力学。即使在最适合的条件下，大部分杂交反应是在相当低浓度的探针和目标分子间进行。此外，探针常不得不与互补链竞争目标核酸分子。

最常用杂交技术形式存在的第四种问题是高水平的非特异性背景信号。这是由DNA探针与几乎所有物质亲和性引起的。

上述这些问题，单个或联合出现导致在上述几种形式的核酸分子杂交反应中丧失灵敏度和/或特异性。这一点是不幸的因为在极大多

数基于核酸分子的临床诊断分析中识别考贝数的核酸目标分子是必不可少的。

鉴于识别低考贝数核酸目标分子的难度，研究者们极大地依靠聚合酶链式反应（PCR）扩增目标核酸序列（参见M. A. Innis et al., PCR 方案、方法和应用的介绍, Academic Press, 1990）。由PCR反应产生的极大量目标核酸序列促进了随后的直接核酸探针技术，尽管操作过程变长麻烦和费用增加。

与在用直接探针识别低考贝数目标核酸分子中通常出现的难点完全不同的一种例外是原位杂交技术。这种技术使得低考贝数稀少的核酸序列能在单个细胞中被识别。在原位杂交形式中，目标核酸分子自然地限制在一个细胞（ $\sim 20-50 \mu m^2$ ）或一个细胞核（ $\sim 10 \mu m^2$ ）范围内可达到相当高的区域浓度。而且，探针目标分子杂交信号被限制在微观的形态上独特的区域；这使得从人工的或非特异的信号中区分阳性信号比在固体载体上的杂交反应更加容易。

在某些方面模仿原位杂交反应，一些在形成的微小复合器或模型装置（如，DNA 芯片）上进行多倍的样品核酸分子杂交分析的新技术正在发展起来。（参见M. Barinaga, 253 Science, pp. 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, pp. 757-758, 1992）。这些方法通常把特殊的DNA 序列结合在一种固体载体非常小的特定区域上，例如DNA 芯片的微孔。这些杂交反应的形式是传统的“反向斑点印迹”和“夹心”杂交系统朝微观范围的改进。

微观形式杂交反应可用来进行“通过杂交测序”（SBH）（参见M. Barinaga, 253 Science, pp. 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, pp. 757-758, 1992）。SBH 通过使用所有可能的 $n -$

核苷酸寡聚体 (n -mers) 来确定在未知DNA 样品中的 n -mers, 随后通过规则系统分析而线性化进而确定DNA 序列 (R. Drmanac和R. Crkvenjakov, Yugoslav Patent Application #570/87, 1987; R. Drmanac et al., 4 Genomics, 114, 1989; Strezoska et al., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10089, 1991; 和R. Drmanac和R. B. Crkvenjakov, USP # 5,202,231, April 13, 1993)。

有两种形式可进行SBH。一种形式包括在一个载体上构建一个所有可能的 n -mers列阵, 然后与目标序列进行杂交。这是反向斑点印迹杂交的一种改进。另一种形式包括把目标序列结合在一个载体上, 随后用所有可能的 n -mers来探测。两种形式具有直接探针杂交的基本问题和与复合杂交有关的其它的难点。

在UK Patent Application GB 8810400, 1988; E.M. Southern et al., 13 Genomics 1008, 1992.中, Southern 提议使用“反向斑点印迹”杂交形式来分析或测定DNA 序列。Southern使用PCR 扩增的基因组DNA 确定了一个已知的单点突变。Southern也描述了一种用于SBH 的在固体载体上合成一个寡聚核苷酸列阵的方法。然而, Southern 没有提出如何获得列阵中每一个寡聚核苷酸的最适严格条件。

在364 期Nature, pp. 555-556, 1993中, Fodor et al., 使用一个在固体载体上的1,024 8-mer 寡聚核苷酸列阵进行了DNA 序列测定。在这种情况下, 目标DNA 是一条荧光标记单链的12-mer 寡聚核苷酸链仅含有A和C碱基。一种浓度为1皮摩尔 ($\sim 6 \times 10^{11}$ 分子) 的12-mer 目标序列与列阵中8-mer 寡聚体进行杂交反应是必需的。这结果表明了多个错配序列。象Southern一样, Fodor et al., 没有提出直接探针杂交存在的问题, 例如复合杂交反应的严格控制。这些

问题与需要大量的简单12-mer 目标分子一起表明对这种SBH 形式的严重限制性。

同时地，Drmanac et al., 260 Science 1649-1652, 1993, 应用上面讨论的第二种形式测定了几种短(116 bp)的DNA 序列。目标DNA 分子结合在膜载体上(“斑点印迹”形式)。每一张膜顺序地与272 标记的10-mer和11-mer寡聚核苷酸进行杂交。广范围的严格条件用来获得对每一个n-mer 探针特殊的杂交反应;漂洗时间从5分钟到隔夜不等,温度从0℃到16℃不等。大多数探针需要在16℃漂洗3小时。每一张膜需要曝光2到18小时以便识别杂交信号。尽管是简单的目标序列,还原的寡聚体探针和使用现有的最严格条件,总的假阳性杂交率是5%。

Fodor et al., 251 Science 767-773, 1991, 使用照相平版印刷的技术在基质上合成寡聚核苷酸。Pirrung et al., 在USP # 5,143,854, Sept. 1, 1992中,介绍在硅基底上以列阵方式大规模照相平版印刷固相合成多肽。

在另一种基质杂交方法中,Beattie et al., 在1992年圣地亚哥会议:基因识别, Nov. 1992, 使用一种微型机器人系统在玻璃基底上把含有特殊DNA 序列的微滴滴入单个的微型构建的样品孔内。每一个孔内杂交反应的检测是通过在每一个微孔周围带有交流(AC)电场的微型电极测试固定装置的反映而进行的。

不管形式的不同,所有现今通用的微小规模DNA 杂交和SBH 方法都没有克服与核酸杂交反应相联系的潜在困难。它们需要非常高浓度的相当短的单链目标序列或PCR 扩增DNA 分子,和即使在最严格条件下也产生高水平的假阳性杂交信号。在使用短的寡聚核苷酸序列的列

阵列复合形式这种情况下，对每一个单个序列用任何传统的方法优化严格的条件是不可能的，因为用于这些形式的阵列或装置不能改变或调整单个位置相对其它位置的温度，离子强度，或变性剂。因此，一个共同的严格条件必须用于装置上所有的序列。其结果是大量非特异性的和部分的杂交信号的产生这就严重地限制了这种装置的应用。这问题随着阵列中不同序列数目的增加，随着序列长度在10-mers以下或在20-mers以上时而成为更加复杂化。这是特别麻烦的对于SBH，它需要大量的短寡聚核苷酸探针。

不同大小、电荷，或结构的核酸分子通常是用电泳技术分离，电泳技术可通过它们在电场中不同的泳动能力来区分不同的杂交分子。脉冲场电泳利用在一种介质（如，凝胶）周围复合电极的排列来分离那些用传统凝胶电泳系统不能分开的非常大的DNA片段（参见R. Anand 和E. M. Southern in 核酸凝胶电泳—实用方法2 ed., D. Rickwood 和 B. D. Hames Eds., IRL Press, New York, pp.101-122, 1990）。

Pace, USP # 4,908,112, March 13, 1990, 描述利用显微制造技术在硅基底上产生一种毛细管凝胶电泳系统。在此装置内，复合电极被结合入该系统中用于移动分子通过分离介质。

Soane 和 Soane, USP 5,126,022, June 30, 1992, 指明多个电极可用来控制混合物中带电分子在管中通过凝胶分离介质的线性移动。所有电极必须装入管中以便控制分离介质中分子的移动和位置。

Washizu, M.和Kurosawa, O., 在26 IEEE工业应用学报6, pp. 1165-1172, 1990中介绍，应用高频交流电（AC）场按照在微型制作的电极间形成的电场线来排列DNA分子。然而，应用直流电（DC）场

则抑制了它们的功能。Washizu 在25卷静电学杂志109-123, 1990中, 描述了利用介电电泳操作细胞和生物分子的方法。细胞间能融合, 生物分子可按微电极结构间交流电压产生的电场线排列。然而, 介电电泳过程需要极高频交流(1 MHz)电压和低电导率介质。虽然这些技术能沿着交流(AC)电场线排列不同大小的DNA分子, 但它们不能区别相同大小分子的杂交复合物。

从上述讨论可知, 已尽了很大的努力力求提供有效的技术进行多步、复合的分子生物学反应。然而, 正因上述的原因, 这些技术证明不够完善。尽管对有效技术的需求已被充分认识到, 但满意的解决方法仍至今未提出来。

发明概述

本发明涉及设计、制造和使用能编程的、自我寻址的和自我装配的微电子系统以及能有效地进行控制的多步和复合的以微观形式反应的装置。这些反应包括, 但不局限于, 大多数分子生物学过程, 例如核酸分子杂交, 抗体/抗原反应, 和有关的临床诊断。此外, 申请专利的装置能进行多步组合的生物高分子合成, 包括, 但不局限于, 在特定的微场所合成不同的寡聚核苷酸或多肽。

申请专利的装置是采用微型平版印刷术和微机械加工技术制造的。这些装置在其表面有一种可寻址的显微场所的基质; 每一单独的微场所能够用电子学方法控制和引导特异的结合实体(如, 核酸分子、抗体)转移和粘附至其身上。所有的微场所能够被它们特异的结合实体寻址。应用这些装置, 这系统可在最小外界干预下自我组装。

这被寻址的装置可以控制和有效地进行种种测定和反应。分析物或反应物通过自由场电泳可被转移到任何特殊的微场所, 在那里分析

物或反应物可有效地在所提的微场所浓缩并与特异的结合实体反应。因为浓缩效应，识别特殊分析物或反应物的灵敏度提高了，任何未结合的分析物或反应物可通过反向微场所的极性而去除。这样，该装置也提高了测定和反应的特异性。

装置的积极特性对发生在每一个特殊的微场所的杂交反应（或任何其它的亲和反应）的所有方面提供独立的电子学控制。这些装置为影响杂交反应提供了一种机理被称为电子学严格控制（ESC）。对需要不同严格条件的DNA杂交反应，ESC克服了传统列阵技术固有的限制。这种发明的有效装置可在每一个微场所电子学地产生“不同的严格条件”。这样，所有的杂交反应可在同一大批溶液中优化地进行。这些有效的装置基本上不同于传统的复合杂交列阵和DNA芯片。传统的列阵法在每一位点有不同的探针或目标DNA分子；在列阵中所有位点具有相同的反应或温度、缓冲液、盐浓度、和pH的严格条件。反应或严格条件的任何变化影响列阵中所有位点。虽然复杂的照相平版印刷技术可用于制作列阵，或微电子传感元件参与测定，传统的装置是被动的不能控制或影响实际的杂交过程。本发明的有效装置使得每一个微场所的功能如同完全独立的测定或分析位点（即它们在每一场所形成如同一个“测定管”）。复合的杂交反应可在最小的外界操作情况下进行。此外，改变温度交换缓冲液是不需要的，复合漂洗过程也就不需要。

因此，申请专利的装置能在完全和精确的电子学控制下，优选在完全微处理机控制下（即，由计算机控制）进行多步和复合反应。多步和复合反应的速率、特异性、和灵敏度在权利要求装置的每一个特殊微场所都极大地提高了。

这装置在每一微场所通过使用辅助的光学（荧光、化学发光、或紫外分光）图象识别系统也促进杂交复合物的识别。可直接识别DNA的组合视电或电子传感元件也可组装入装置内。

如果需要，一个由特异结合实体寻址的主装置能用电子学方法复制或复制出另一个基本装置。

本发明可应用与本发明目的一致的大小或形状的微场所。在本发明优选的实施方案中，使用的微场所在亚-毫米范围内。

“特异结合实体”通常表示一种生物或合成的分子，其具有对另一种分子，大分子或细胞通过共价结合或非共价结合的特殊亲和力。优选地，一个特异的结合实体包括（或是自然的或通过修饰的）一个功能的化学基团（伯胺、巯基、醛基等），一段共有序列（核酸），一个表位（抗体），一个半抗原，或一个配基以便使其共价地反应或非共价地结合到微场所表面的共有的功能基团上。特异的结合实体包括但不仅局限于脱氧核糖核酸（DNA），核糖核酸（RNA），合成的寡聚核苷酸、抗体、蛋白质、多肽、凝集素、修饰过的多糖、细胞、合成的复合大分子，超功能的纳米结构、合成的高分子，修饰的/封闭的核苷酸/核苷，修饰的/封闭的氨基酸、荧光团、生成团、配基、螯合剂和半抗原。

通过“严格控制”来表示一种借助改变一些物理学参数，来区别特异的和非特异的结合相互作用的能力。在核酸分子杂交时，温度控制是常用来提高严格性。杂交反应是在或接近特殊双链杂交对的解链温度（ T_m ）下进行。

因此，本发明第一和最重要的方面是一种带有一个电子学编程和能自我寻址显微场所的列阵的装置。每一个显微场所含有一个由基质

支持的基础工作直流（DC）微电极。在每一个微场所的表面具有一层能自由转移小相对离子的渗透层，和一个用于共价结合特定结合实体的粘附层。这些特别的设计特性提供了该装置如下关键性的特性：

（1）允许可控制的具功能的DC电极被保持在微场所之下；（2）允许保持电泳样的移动；和（3）区别发生在电极（金属）表面间的电化学反应和反向电解反应以及亲和或结合反应。应该强调这些装置中应用的微电极的基本功能是提供结合的和反应物的实体朝特定场所电泳推进力。

“列阵”或“基质”用来表示装置上可寻址场所的一种排列。场所可按二维列阵，三维列阵，或其它基质形式排列。场所的数目在从几个到至少数十万个的范围内。每一个场所代表一个完全独立的反应点。

在第二方面，本发明特别描述了一种转移结合实体到装置上任何特殊微场所的方法。当被活化后，微场所能影响自由场电泳转移任何带电功能化的特异结合实体到微场所本身处。一旦接触到特定的微场所时，这功能化的特定结合实体立即变成共价结合到这个特定微场所表面的粘附层上。其它的微场所能同时通过保持它们处于带电分子相反电势而被保护。这个过程能迅速地重复，直至所有的微场所都被它们特异的结合实体寻址。

“带电的具功能的特异结合实体”体用来表示一个特异的结合实体，它是化学上活泼的（即，能被共价结合到微场所上）和带有净电荷（正电或负电）。

在第三个方面，本发明特别描述一种在装置中任何特定的微场所浓缩分析物和反应物并与其反应的方法。在特异的结合实体结合以后，

在每一个微场所的基础微电极以直流（DC）模式起作用。这独有的特性使得溶液中自由存在的相对稀释带电的分析物或反应物被迅速转移、浓缩，或在任何保持与分析物或反应物分子带相反电荷的特定的微场所以系列或平行的方式进行反应。特异的微场所可通过保持它们带有与分析物或反应物分子相同的电荷而被保护或防护。这种在选择微场所浓缩稀释的分析物或反应物分子的能力极大地加速了在这些微场所的反应速率。

当所需的反应完成时，微电极电势能被反转，从而从微场所移去非特异的分析物或未反应的分子。

特定的分析物或反应产物可从任何微场所释放出而转移到其它场所进行进一步分析；或者在其它能寻址的场所贮存；或从该系统中全部移去。

在特定的微场所上随后对分析物的分析，借助从这些场所排斥非特异实体的能力也极大地改进。

在第四个方面，本发明特别描述了一种改进核酸分子杂交反应严格控制的方法，该方法由下列步骤组成：

——在杂交反应将发生的特定微场所快速浓缩稀释了的目标DNA和/或探针DNA序列；

——在杂交反应已发生的特定微场所快速移走非特异结合的目标DNA序列；

——从杂交反应已发生的特定微场所快速移走竞争的互补目标DNA序列；

——调整电子严格控制（ESC）以便移去部分杂交的DNA序列（多于一个碱基的错配序列）；

——调整ESC 以使用 8 - mer 到 21 - mer 范围内的探针改进单个错配序列杂交反应的分辨率（例如，识别单点突变）；

——应用ESC 有效地杂交寡聚核苷酸点突变探针尽管在传统杂交过程使用的探针范围以外（例如，长于 21 - mers 和短于 8 - mers 的探针）；

——应用独立的ESC 到发生在相同容积溶液中和相同温度下的单个杂交反应中；和

——应用ESC 促进未扩增的目标DNA 序列杂交到捕获寡聚核苷酸探针的阵列上。

在第五个方面，本发明特别描述了一种在微场所组合合成生物高分子的方法。

在第六个方面，本发明特别描述了一种复制主装置的方法。

在第七个方面，本发明特别描述一种装置它能电子学地进行样品制备和转移目标DNA 到装置的分析部分。

在第八个方面，本发明特别描述一种装置它能电子学地输送试剂和反应物而最小限度地使用射流。

在第九个方面，本发明特别描述一种装置它能进行分子生物学和DNA 扩增反应（例如，限制性切割反应；和DNA/RNA聚合酶和DNA 连接酶目标扩增反应。）

在第十个方面，本发明特别描述一种装置它能电子学地确定大小和识别限制性片段（例如，进行电子学限制片段长度多态性和DNA 指纹分析）。

在第十一个方面，本发明特别描述一种装置，它能进行抗体 - 抗原和免疫诊断反应。

在第十二个方面，本发明特别描述一种装置，它能进行组合的合成寡聚核苷酸和多肽。

在第十三个方面，本发明特别描述一种装置，它能选择性地结合细胞，为杂交反应加工细胞，从细胞中移去DNA，或在细胞内进行电子学的原位杂交。

在第十四个方面，本发明特别描述一种方法，该方法能识别和分析已发生在被寻址的微场所上的反应，应用自我寻址的微电子学装置与联合的光学、光电子学或电子学识别系统，或自我寻址的微电子学装置与完整的光学、光电子学或电子学识别系统。

由于本发明的装置是有效的可编程的电子学矩阵变换电路，首字母缩写词“APEX”用来描述或指明这些装置的固有特性。这AREX首字母缩写词被用在显微平版印刷技术生产的“芯片”和微机械加工生产的装置中。

APEX微电子装置和芯片的活泼的特性让我们构建新的机理用于进行各种各样的分子生物学反应。这些包括获得线性和指数的增加或扩增目标DNA和RNA分子的新方法。

本装置提供电子学机理进行：（1）在相同缓冲液中室温下有选择性地变性DNA杂交子（例如，常在低于它们的解链温度很多的温度下进行）；（2）在两个或更多的微场所间快速朝后和向前转移或移动DNA；和（3）有选择性地所需要的微场所浓缩特定的反应物，试剂，和酶分子。这些都含有新的物理学参数用于进行分子生物学和目标分子扩增类型的反应。

大量电子学控制的分子生物学反应的实例已发展起来，这些包括：（1）电子学直接的限制酶切特定的ds-DNA序列；（2）电子学的

限制性片段分析；（3）通过DNA聚合酶反应的电子学的倍增目标DNA分子；（4）通过DNA和RNA连接酶电子学的连接和倍增目标DNA序列；和（5）通过RNA聚合酶电子学的倍增目标DNA分子。这些实例是能在APEX装置上进行的分子生物学反应和过程类型的代表。

本发明的其它特性和优点将从下列详细的发明描述和权利要求中明显地知道。

附图简述

图1是用微平版印刷技术组建的三个自我寻址的微场所截面图。

图2是单个微平版印刷组建的微场所截面图，

图3一个自我寻址的64个微场所芯片的图解的例子，它是实际上组建的，被寡聚核苷酸寻址的、和被测试的。

图4表明特别的化学结合过程，它允许快速共价结合特异的寡聚核苷酸到微场所表面的粘附层上。

图5是一个微加工的96个微场所的装置的放大图解。

图6是一个微加工的装置的截面图。

图7表明装置用来电子学地浓缩分析物或反应物分子在某个特定的微场所的机理。

图8表明一个装置与三个特定的寡聚核苷酸结合实体（SSO-A、SSO-B和SSO-C）的自我引导的装配过程。

图9表明一个电子学地控制的杂交过程与在微场所被浓缩的含有特定的DNA捕获序列的样品/目标DNA分子。

图10表明一个电子学地引导的系列杂交过程。

图11表明为确定单个点突变的电子学严格控制（ESC）杂交过程。

图 1 2 表明识别杂交了的DNA 分子而不用标记过的DNA 探针的图解，即，电子学地控制荧光染料识别过程。

图 1 3 表明电子学地控制的装置复制的图解。

图 1 4 表明电子学地引导组合合成寡聚核苷酸的图解。

图 1 5 表明一个图解，关于进行15-mer Ras 12 点突变杂交反应应用电子学严格控制和传统技术产生结果间的比较。

图 1 6 表明电子学地控制限制片段切割DNA 分子的图解。

图 1 7 表明电子学地控制应用DNA 聚合酶进行DNA 扩增的图解。

图 1 8 表明一个APEX装置的图解，该装置设计用来进行样品制备和DNA 分析。

发明详述

本装置和本发明有关的方法学允许分子生物学和诊断反应在“完全电子控制”下进行。“电子控制”在本发明中的意思超过了这一术语传统的涵义。大多数传统的微电子装置，仪器，和识别系统总是在一定程度上受电子学控制。本发明的微电子装置不但在传统电子控制下，而且更重要地它们也提供进一步直接电子学控制进行分子生物学和诊断反应的物理学方面。本发明基本概念是一个带能编程的和寻址的显微场所的微电子装置。每一个微场所具有为共价结合特异结合实体的一个衍生上表面（即，粘附层），一个中间渗透层，和一个基础直流（DC）微电极。在基本的微电子学结构最初组建后，这装置能自我引导每一个特殊的微场所与特异的结合实体的寻址。从这种意义上说，这装置它自己自我组装。这自我寻址装置随后能有效地进行在任何它的微场所上单个的多步和组合的反应。装置能进行多路反应，但有在与真正独立测试点相同的地点发生的每一个反应的重要优点。装

置能够电子学地引导和控制分析物和反应物去或从装置上任何微场所快速移动和浓缩。装置电子学地控制各种反应动力学方面的能力提供了大量新机理和重要的优点和改进。

本发明观念和实施方案以三部分来描述。第一部分，“设计和组建基本装置”描述设计基本基础微电子装置和应用微平版印刷和微加工技术组建装置。第二个部分，“装置自我引导寻址”，描述了装置自我寻址和自我装配，特别是快速移动和结合特异的结合实体到每一个微场所。第三个方面，“装置的应用”描述装置如何提供各种多步，组合的，和多路反应电子学控制。这部分也描述本装置的各种用法和应用。

I. 设计和组装基本装置

一个装置为了进行多步和多路反应，它的电子元件必须在水溶液中能够保持活泼工作状态。为满足这一要求，每一个微场所必须有一个基础的能控制的和具功能的DC式微电极。然而，对于装置的操作，特别是灵敏度（信噪比）这是重要的即结合和亲和反应不能受在活泼的DC电极表面发生的电解反应影响。其它为设计和组建该装置的考虑包括，但不局限于，材料的兼容性，特异的结合实体的特性和随后的反应物和分析物的特性，和微场所的数目。

“能控制的和具功能的DC式微电极”用来表明一个偏压或正或负的微电极，以直流方式（或连续或脉冲）运行的，能够以可控方式影响或引起带电特异结合实体，反应物，或分析物去或从装置上任何场所，或从样品溶液的自由场电泳式移动。

在本发明范围内，分子的自由场电泳式移动，不是实际上取决于产生的电场，该电场被绝缘材料围起或限制。传统的电泳分离技术需

要用绝缘（不导电）材料限制或围绕电场线。在自由场电泳式移动情况下，带电的分子从一个微场所移动到任何其它微场所，或从大量溶液到特殊的微场所。因此，特有的排列或由绝缘材料的限制，不是本发明这方面必须的。

装置可以设计成具有少至只有 2 个可寻址微场所，或有多至数十万个微场所。一般来说，具大量微场所的复杂装置是用微平版印刷技术制造的。制造的进行是在硅或其它合适基质材料，例如玻璃，二氧化硅，塑料，或陶器材料上。这些微电子“芯片”的设计可被认为是大范围的列阵或多路分析装置。装置具有少数的微场所或大场所可用微加工技术来制造。

可寻址的微场所可以是任何形状，优选圆形、方形、或长方形。可寻址微场所的大小可为任何大小，优选地范围从亚一微米（ $\sim 0.5 \mu\text{m}$ ）到几厘米（cm），从 $5 \mu\text{m}$ 到 $100 \mu\text{m}$ 是最优选的尺寸范围使用微平版印刷技术制造装置，从 $100 \mu\text{m}$ 到 10 毫米是最优选的尺寸范围使用微机械加工技术来制造装置。制造微场所小于微平版印刷方法的分辨能力将需要如下的技术例如电子束平版印刷，离子束平版印刷，或分子束外延。虽然显微场所对分析和诊断类型反应是需要的。而较大的可寻址场所或大场所（例如，大于 5 mm）对一些应用例如，但不局限于，制备规模生物高分子合成，样品制备，试剂的电子学分配是需要的。

在借助微平版印刷和/或微加工技术微场所已构建后，化学修饰，聚合反应，或甚至进一步微平版印刷制造技术被用来建成特殊的粘附和渗透层。这些重要的层次把结合实体从电极的金属表面隔离开。这些重要的结构允许在每一个微场所表面下的 DC 式微电极起如下的功能：

(1) 影响或引起特异的(带电)结合实体从一个微场所的表面自由场电泳式移动到另一个微场所的表面, 或从大量溶液中移动到特异的微场所; (2) 浓缩和共价结合特异的结合实体到一个特定微场所经特殊修饰过的表面; (3) 在结合特定结合实体后继续以DC方式有效地起作用以便其它的反应物和分析物能以可控制的方式被转移到或从微场所转移; 和(4) 非反向地影响与电化学反应和产物结合或亲和反应。

I(a): 设计参数(微平版印刷)

图1表明应用微平版印刷技术制造自我寻址微场所的基本设计。三个微场所(10)(ML-1, ML-2, ML-3)形成在已沉积在一个绝缘层/基础材料上的金属位点(12)的表面。这金属位点(12)作为基础微电极结构(10)。绝缘材料把金属位点彼此分隔开。绝缘材料包括, 但不局限于, 二氧化硅、氮化硅、玻璃、防染剂、聚酰亚胺、橡胶、塑料或陶瓷材料。

图2表示在由微平版印刷技术制造的金屬位点(12)上形成的单个微场所(10)的基本特点。可寻址的微场所是在金属位点(12)上形成的, 结合上一氧化层(20), 一渗透层(22), 一粘附层(24), 和一个结合实体层(26)。金属氧化层提供共价结合渗透层的基础。金属氧化物和羟基基团(单个或组合), 和其它表面涂盖化学领域技术人员熟知的材料可以提供共价结合位点用于构建或支撑渗透层。这不是绝对必须的即渗透层实际上是共价结合到金属电极表面。渗透层的物理涂盖代表了另一种方法, 它也在本发明的范围内。

渗透层金属表面和粘附/结合实体层提供了空间并允许溶剂分子, 小相对离子, 和电解反应气体自由地通过去和金属表面。这是可能

的在渗透层内包含有能降低电解反应相反物理和化学的影响的物质，包括，但不局限于，氧化还原反应截留物质，例如针对氢气的钯，和针对氧气和过氧化物的含铁复合物。对微平版印刷制造装置和渗透层厚度能从大约1纳米(nm)到100微米(μm)间，最优选的厚度在2纳米到10微米间。

粘附层为共价结合需要结合实体提供一个基架。对微平版印刷技术制造的装置的粘附层厚度能从0.5nm到5 μm ，在1nm到500nm间是最优选的。在一些情况下，渗透层和粘附层可用同一材料制成。能进一步被活化用于结合需结合实体的特定渗透层材料也包括在本发明的范围内。

特异的结合实体是共价地结合到粘附层上，形成特异的结合实体层。理想地，特异的结合实体层通常是特异的结合单层。然而，在一些情况下结合实体层能有几个或甚至多层的结合分子。

渗透和粘附层的特定设计和功能的方面是由特异的结合实体分子物理的(如，尺寸和形状)和化学特性支配的。它们也由反应物和分析物分子的物化性质支配到一定程度，这些反应物和分析物分子随后移动和结合到微场所上。例如，寡聚核苷酸结合实体可被结合到一种类型的微场所表面而不引起丧失DC式功能，即，基础微电极仍能引起快速自由场电泳式移动其它与分析物分子到或离开寡聚核苷酸结合实体结合的表面。然而，如果较大的球形蛋白结合实体(如，抗体)结合到相同类型的表面，它们可能使表面绝缘和引起降低或完全丧失DC式功能。粘附层合适的修饰将不得不进行以便降低较大结合实体(如，大的球形蛋白)的数目或提供在表面结合实体间的空间。

微场所间的空间的确定是通过制造的难易程度，微场所间所需要

的识别分辨率，和一个装置上所需微场所的数量来进行的。然而，在微场所间，或特定排列间或微场所的几何形状间的特殊的空间对装置的功能正是必须的，即任何微场所（即，基础微电极）的组合能在整个装置范围内运行。实际上无需包围装置或完全地用绝缘或不导电的屏障来限制微场所。这是因为复杂的电子场型或不导电的边界对于选择性地移动、分离、承托，或调整特殊分子在任何电极间介质或空间中，是不需要的。装置完成这个是通过结合特异的结合分子和随后的分析物和反应物到一个能寻址的微场所的表面。自由场电泳推进力提供任何带电分子在装置任何或所有场所间；或从大量溶液到微场所快速和直接转移。然而，必须指出装置为了液体抑制和生物有害物的目的可被包围起来。

随着微场所的数目增加超过几百，微场所基本回路的复杂性增加。在这种情况下微场所组式样必须改变的空间距离成比例地增加，或多层回路能被制造到基本装置内。

除了已被特异的结合实体寻址的微场所外，一个装置将含有起到其它的功能非分析的微场所和大场所。这些微场所或大场所可被用于贮存试剂，短暂地承托反应物，分析物或细胞，或作为处理单位为多余的反应物，分析物，或其它样品中干扰成份（即，试剂分配和样品制备系统）。其它未被寻址的微场所可被用于与已被寻址的微场所组合影响或干扰在这些特殊的微场所发生的反应。这些微场所加到装置间和装置内的活性和控制。因此，微场所在两个分开的装置间相互作用和转移分子也是可能的。这为从一个贮存装置中取结合实体或反应物加样到工作装置上，为样品制备和为装置的复制或倍增提供了一个机理。

图 3 表示了一个含有 64 可寻址微场所的矩阵类型装置 (30)。一个 64 微场所装置是个方便的设计, 它刚好吻合于标准微电子芯片包装组成。这种装置是在大约 $1.5\text{cm} \times 1.5\text{cm}$ 的硅芯片基质上制造的, 在中心区域大约 $750\ \mu\text{m} \times 750\ \mu\text{m}$ 含有 64 个微场所。每个微场所 (32) 大约是 $50\ \mu\text{m}$ 的方形, 在邻近微场所间具 $50\ \mu\text{m}$ 空间。每一独立的基础微电极连接回路通向金属接触垫 ($300\ \mu\text{m}^2$) 的外周 ($10\text{mm} \times 10\text{mm}$)。一个凸起的内周可在带有微场所区域和接触垫之间形成, 产生一个洞能装大约 2 到 10 微升 (μl) 的样品溶液。这芯片能被放入标准空铅外壳中, 和芯片接触的垫 (34) 用线连到空铅外壳引线上。含有多于 1 个芯片和附带的外壳和外周组成的系统可用于设计成解决有关于临床诊断的问题, 即, 样品材料的加入, 液体转移, 和生物有害物质的抑制。外壳包装好的芯片然后可插入微处理机控制的 DC 电源和万用表仪器它能控制和操作该装置。本发明期望装置制造 (寻址前) 将根本地包括三种基本成份的组合, 这些成份将基本地夹心在一起。结合实体结合的基本芯片装置将处在中间位置, 样品或液体限制成份将在基本芯片装置的上方退火; 和一个微电子识别和广泛控制器成份将在基本芯片装置的底部退火。这种策略解决了有关于制造技术和材料相容性的大量问题。

I (b) . 微平版印刷制造程序

I (b) (1) 制造步骤

通常微平版印刷或光平版印刷技术能被用于制造复杂“芯片”类型装置, 这类装置有大量小的微场所。虽然装置的制造不需要复杂的光平版印刷技术, 材料的选择和电子学装置有效地在水溶液中起作用的需求极需要特殊的考虑。

图3中表示的64微场所装置(30)可应用相对简单的蒙片设计和标准的微平版印刷技术制造。一般地,基本的基质物质是1到2厘米见方的硅片或芯片约0.5毫米厚。这硅芯片首先覆盖1到2 μm 厚的二氧化硅(SiO_2)绝缘层,它是由等离子体增强化学蒸汽沉积法(PECVD)制成。

在下一步,一个0.2到0.5 μm 金属层(如,铝)通过真空蒸发沉积而成。这也可能通过飞溅技术沉积金属。除铝以外,合适的金属和材料用于回路的包括金、银、锡、钛、铜、铂、钯、聚硅、碳,和各种金属的组合。用于保证完全粘附到绝缘基质材料(SiO_2)的特殊技术被用来粘附不同的金属。不同的金属和其它材料可被用作装置不同的导电元件,例如,使用铝用于周边接触垫,聚硅用于相互联系的回路,和贵金属(金或铂)用于微电极。

这芯片下一步覆盖带正电的光致抗蚀剂(Shipley, Microposit AZ 1350J),用回路的式样蒙片(光场)修正,曝光和冲洗。光溶解的抗蚀剂被去除,曝光后铝蚀刻掉。抗蚀剂小岛被去除,留下铝回路式样在芯片上。这包括外周边的金属接触垫,相连接电路(电线)和微电极中心列阵作为可寻址微场所下面的基础。

应用PECVD,这芯片首先覆盖0.2到0.4微米的 SiO_2 层,然后0.1到0.2微米氮化硅(Si_3N_4)层。芯片再涂盖带正电的光致抗蚀剂,为接触垫和微电极场所蒙片修正,曝光,和冲洗。光溶解的抗蚀剂被去掉, SiO_2 和 Si_3N_4 层蚀刻掉,曝光铝接触垫和微电极。周围的抗蚀剂小岛随后被去除,位于接触垫和微电极间的相连接线路由 SiO_2 和 Si_3N_4 层保持绝缘。

SiO_2 和 Si_3N_4 层为装置的功能提供了重要的特性。第二个 SiO_2

层提供更好接触和促进密封铝电路。这也可能用抗蚀剂材料来绝缘和密封。这可防止微电极运行中电解反应引起的电路的逐渐损害。最后的 Si_3N_4 表层应用是因为它与随后用于修饰粘附特异结合实体的微电极表面的试剂反应性能低。

I(b)(2) 渗透和粘附层形成的步骤

在这步装置上微电极场所已准备可用特殊的渗透和粘附层来修饰。这是本发明一个重要的方面。目的是在微电极上构建一个中间的渗透层并带有选择性的扩散特性和一个具有最佳的结合特性粘附表层。

最佳地，粘附层每平方微米 (μm^2) 中具有 10^5 到 10^7 个具功能的微场所可用于粘附特异的结合实体。特异的结合实体的粘附必须不覆盖或绝缘表层以防止下面的微电极丧失功能。一个具功能的装置需要实际金属微电极表面的部分 ($\sim 5\%$ 到 25%) 保持与溶剂 (H_2O) 分子接触，和允许发生相反离子 (如, Na^+ 和 Cl^-) 和电解气体 (如, 氧气和氢气) 的扩散。

中间的渗透层也设计成允许发生扩散。此外，渗透层必须有孔限特性以便抑制或阻止较大的结合实体、反应物，和分析物与微电极表面物理接触。渗透层保持活泼的微电极表面物理学上性质不同于微场所的结合实体层。

这种设计允许因电泳移动需要的电解反应在微电极表面发生，但避免对于结合实体，反应物和分析物不利的电化影响。

渗透层也可被设计成包括那些能清除在电解反应中产生的不利的物质 (H_2 , O_2 , 自由基团等) 的基质。另一个渗透层的亚层可被设计用于这一目的。

许多种设计和技木可用于制造渗透层。常用的设计包括:(1)

“草坪法”，(2)“网眼法”，和(3)“多孔法”结构。

草坪式渗透层包括金属表层和线性分子或高分子垂直排列，以一个类似于厚草坪的方式。这些结构可通过直接粘附线性或聚合和亲水分子到金属表面形成，其中在垂直分子间有最少量的交叉联系。理想地这些亲水线性分子是双功能的，即在一端适合共价结合到金属垫上，而另一端适合结合实体的共价结合。

网眼式渗透层包括聚合分子随机排列形成网眼状结构，具有可由交叉联系的程度确定的平均孔径。这些结构的形成可由含水凝胶类物质例如，但不局限于，聚丙烯酰胺，琼脂糖，和种种其它能聚合和交叉连结的生物和非生物物质。。

孔式渗透层包括应用能在金属垫表面层的上面直接形成通道或孔的物质，包括，但不局限于，聚碳酸酯、聚砷、或玻璃物质。在所有的情况下渗透层必须物理地或化学地固定在金属表面，并且必须含有功能基团或能够转化成功能化的基团用于粘附结合实体到它的表面。

一个用于产生草坪式结构的优选过程包括用氨基丙基三乙氧基硅烷(APS)衍生金属微电极表面。APS容易与在金属和硅表面的氧化物和羟基基团起反应。APS提供一组合的渗透层和粘附层，并带有能与随后结合实体共价结合的伯胺基团。就表面结合位点而言，APS在轻度氧化的铝表面产生相当高水平的活化功能(即，大量的伯胺基团)，在 SiO_2 表面产生一个中间水平的活化功能，和在 Si_3N_4 表面产生非常有限的活化功能。

APS反应的进行是通过用10% APS溶于甲苯的溶液在50℃处理整个装置(如，芯片)表面30分钟。然后芯片依次在甲苯、乙醇中冲洗然后在50℃干燥1小时。微电极金属表面用大量伯胺基团

而被活化（每平方微米 10^5 到 10^6 ）。结合实体现在能被共价地结合到衍生了的微电极表面。这种“草坪式”渗透层的深度也可通过应用聚氧乙烯双（胺），双（聚氧乙烯双（胺）），和其它聚乙烯醇或类似的化合物而增加。

APS 过程对于寡聚核苷酸结合实体的结合很成功。图 4 表示用于结合 3' - 末端醛基衍生了的寡聚核苷酸（40）到一个 APS 活化过的表面的机理（42）。虽然这代表一种方法，各种其它用于形成渗透和粘附层的方法是可能的。这些包括利用自我引导的寻址通过基础电极本身进行：（1）借助电镀到基础微电极上形成第二种金属层；（2）借助电聚合反应到微电极场所形成渗透层；或（3）借助自由场电泳过程转移活化的聚合物和试剂到微电极表面形成随后的渗透和粘附层。

I(c) 微加工的装置的设计和制造

这部分描述如何应用微加工技术（如，钻孔、铣，等）或非平版印刷技术来制造装置。一般地说，这些装置比那些由微平版印刷技术制造的装置有相对较大的微场所（ >100 微米）。这些装置能被用于分析应用和制备型应用，例如生物高分子合成，样品制备，试剂分配，贮藏所，和废物处理。大的寻址场所可被制造成三维形式（例如，管状或圆柱状）而携带大量的结合实体，这种装置能应用各种材料制造，包括，但不局限于，塑料、橡胶、硅、玻璃（例如，微槽的，微毛细管的，等），或陶瓷。低荧光材料是较理想的应用于分析应用。在微加工的装置情况下，使用标准的电路版印刷技术连接电路和较大的电极结构能被印刷到材料上，而这种技术对本领域的技术人员是熟知的。

可寻址的微场所装置能使用微加工技术被相当地容易地制造。图 5 是一个代表性的 9.6 微场所装置的图解。这微场所装置是从一个合

适材料块 ($2\text{ cm} \times 4\text{ cm} \times 1\text{ cm}$) 制造的, 借助钻孔 96 个成比例空间的孔 (直径 1 mm) 穿过这材料。一个电极电路块 (52) 在一薄层的塑料材料块上形成, 它准确地配合在微场所元件 (54) 顶部上方。电路板的背面含有 (印刷电路) 通向每个微场所 (55) 的单个电路。短的铂电极结构 ($\sim 3 - 4\text{ mm}$) (62) 被设计成向下扩展进入单个的微场所腔 (57) 。这印刷的电路线路用一层合适的防水绝缘材料覆盖。这印刷的电路线路汇聚到一个孔内, 这允许连接到一个多路开关控制器 (56) 和 D C 电源供应器 (58) 。这装置是部分地埋没和操作在一个共同的缓冲液池 (59) 中。

虽然在由微加工和微平版印刷技术制造的装置中微场所的原始功能都是相同的, 但它们的设计是不同的。在由微平版印刷制造的装置中, 渗透和粘附层是在埋在下面的金属微电极上直接形成的。在由微加工技术制造的装置中, 渗透层和粘附层是物理上从它们单个的金属电极结构 (62) 分离的借助单个的孔或池 (57) 中的缓冲液 (见图 6) 。在微加工的装置中渗透和粘附层能通过使用功能性的亲水凝胶, 膜, 或其它合适的多孔材料而形成。

一般地, 组合的渗透和粘附层的厚度范围从 $10\text{ }\mu\text{ m}$ 到 30 mm 。例如, 一个修饰过的 20% 到 35% 的聚丙烯酰胺亲水凝胶 (带 0.1% 聚赖氨酸), 能被用来部分填补 ($\sim 0.5\text{ mm}$) 装置中每一个单个微场所腔。这些浓度的凝胶形成一个理想的渗透层其孔径限度从 2 nm 到 10 nm 。聚赖氨酸组合入凝胶内为随后的结合特异的结合实体提供伯胺功能基团。这种类型的凝胶渗透层允许电极有效地以 D C 模式起作用。当电极被活化后, 这凝胶渗透层允许小的相反离子通过这渗透层, 但较大的特异结合实体分子在外表面被浓缩。这儿它们成为共价地结

合到外层的伯胺上，而有效地成为粘附层。

用于形成渗透和粘附层另一种技术是把一种多孔膜材料组合入每一个微场所腔基部。膜的外表面然后被衍生化用化学的功能基团形成粘附层。用于进行本方法的适合的技术和材料是对本领域的技术人员熟知的。

上面对于微平版印刷和微加工的装置的设计和制造描述必须不被认为是对其它改变或类型的基本装置的限制。多个改变型的装置并带有较大或较小量的可寻址的微场所或组合的装置能用于不同的分析和制备应用。改变型的装置并带有较大可寻址的场所能被设成用于制备生物高分子合成应用，样品制备，细胞分类系统，原位杂交，试剂分配，贮存系统，和废物处理系统。

II. 自我引导的寻址的装置

本发明的装置能够电子学地自我寻址每一个微场所与一个特异的结合实体。这装置本身直接影响或引起移动一个带电特殊结合实体到一个特异的微场所。结合实体一般地是功能化的以便它们迅速地反应和共价地结合到粘附层上。装置自我装配意味着不需要外部过程，机械装置或设备进行物理地引导，定位，或放置一个特异的结合实体在一个特殊的微场所上。这自我寻址过程是既快又特异。能以连续或平行的方式进行。

一个装置能用特异的结合实体连续地被寻址通过保持被选择的微场所以DC方式和与特异的结合实所带电荷相反的电荷（电势）。如果一个结合实体有一个净负电荷，那么这结合实体将转移到的微场所必须带正电荷。相反地，一个带负电荷的微场所被用于转移一个带正电荷的结合实体。其它的选择在连续的寻址过程中用于偏压遗留的微

场所包括：偏压所有在相反的电荷的其它微场所（与被寻址的微场所带电荷相反）；在相反电荷偏压微场所的一个有限基团；或在相反电荷偏压仅一个微场所（或其它的电极）。在一些情况下，这将是希望的即强烈地偏压一个或更多的微场所在相反的电荷，然而其它组的微场所仅较弱地偏压。这个过程允许以前寻址的微场所在寻址遗留的微场所过程中被保护起来。在结合实体不多于微场所上结合位点的情况下，可能只需要去活化一个其它微电极去影响自由场电泳式移动到特异的微场所上。特异的结合实体能被快速地转移通过大量溶液，和直接地浓缩在特定的微场所并在此处它们立即成为共价地结合到粘附层特定表面。转移的速率取决于结合实体的大小和所带的电荷，和在微场所间使用的电压和电流水平。一般地，转移速率能从数秒到数分钟范围。在一个特定的微场所（72）上的电子学地浓缩结合实体，反应物，或分析物（70）能力显示于图7。在特异的结合实体寻址过程中所有其它微场所能被保护起来和保持不受影响。任何未反应的结合实体被移去是通过转换特殊微场所的极性，和电泳这实体到一个废物场所。这循环被重复直到所有企望的微场所由它们特异的结合实体寻址。图8表示用特异的寡聚核苷酸结合实体（82、84、86）寻址特殊的微场所（81、83、85）的连续过程。

为了寻址微场所的平行过程包含同时地活化多于一个微场所（一个特定组群）以便相同的特异结合实体被转移，浓缩，和与多于一个特殊的微场所起反应。随后的平行过程与连续的过程是相似的。

III. 装置的应用

一旦装置已经用特定的结合实体自我寻址，各种分子生物学类型的多步和多路反应和分析能在装置上进行。本发明的装置能够电子学

地对大量重要反应参数提供活力的和动力学的控制。这种电子控制导致控制反应的新的物理学的机械装置，和反应速率，特异性，和灵敏度重要的改进。这些参数的改进来自装置电子学地控制和直接地影响：

(1) 快速转移反应物或分析物到一个含结合的特异结合实体的特定的微场所；(2) 反应速率的增加是因为浓缩反应物或分析物与在特定微场所的表面的特异的结合实体；(3) 从微场所迅速和选择性的移去未反应的和非特异性结合的成份；和(4) 为最适结合条件的严格性。

本发明自我寻址的装置能够迅速地进行各种微形式的多步和/或多路反应和过程；它包括但不局限于：

——传统形式的DNA和RNA杂交反应过程和分析；如，结合的目标DNA/探针DNA，结合的探针DNA/目标DNA，结合的捕获DNA/目标DNA/探针DNA；

——多倍的或多路的杂交反应以连续的和平行的方式；

——限制性片段和一般DNA/RNA片段大小分析；

——分子生物学反应，如，限制性酶反应和分析，连接反应，激酶反应，和DNA/RNA扩增；

——抗体/抗原反应包括大或小抗原和半抗原；

——诊断测定，如，杂交分析（包括原位杂交），基因分析，指纹分析，和免疫诊断；

——样品制备，细胞分类，选择和分析；

——生物分子接合过程（即，共价和非共价标记核酸、酶，蛋白，或抗体，用报告基团，包括荧光团，化学发光剂，比色法，和同位素标记）；

——生物高分子合成，如，组合的合成寡聚核苷酸或多肽；

——水溶合成的高分子的合成，如，碳水化合物或线状的聚丙烯酸酯；和

——大分子和纳米结构（纳米大小颗粒和结构）的合成和制造。

III (a) 核酸杂交

核酸杂交被用作本发明主要的实例因为它们¹在诊断中的重要性，和因为它们是多²种结合（亲和）反应³的类型中具特征性的一种。这是特别真实的当它们以多路形式进行，这儿每个单独的杂交反应需要不同的严格条件。

权利要求的装置和方法允许核酸杂交以各种传统的和新的方式进行。装置电子学地控制反应参数的能力极大地促进核酸杂交分析，特别是装置对列阵上每一单独微场所提供电子学的严格控制（ESC）的能力。本质上，这允许每个单个杂交反应在同一列阵上能进行如同一个单个试管测定。

术语“核酸杂交”用来表示包括在所有天然的和合成形式以及衍生的核酸分子间的所有杂交反应，包括：脱氧核糖核酸（DNA），核糖核酸（RNA），聚核苷酸，寡聚核苷酸。

传统的杂交形式，例如“斑点印迹”杂交和“夹心法”杂交，能用权利要求的装置以及大范围列阵或矩阵形式进行。

作为一实例，一台用于DNA杂交分析的APEX装置被设计，制造，和以如下方式使用。微场所的列阵首先用微平版印刷（或微加工）技术制造。在一个列阵上可寻址微场所的数目取决于最终的用途。装置用一组特异寡聚核苷酸以连续的方式迅速地自我寻址。在这种情况下，特异的寡聚核苷酸是3'-末端醛基功能化的寡聚核苷酸在6-mers

到100-mers 的范围内，如需要的话较大的寡聚核苷酸能被结合。醛基功能的基团允许共价结合到特定的微场所粘附表层（见图4）。这个特异寡聚核苷酸组能可容易地应用传统的技术在一个传统的DNA合成仪上合成。合成每一个特异寡聚核苷酸是从一个核糖核苷酸控制的多孔玻璃（CPG）载体上起始的。这样，3'-末端含有一个核糖核苷酸，在合成和纯化后它随后容易地被经高碘酸氧化转变成一个末端的二醛衍生物。含有醛基的寡聚核苷酸（40）将很容易地通过席夫碱反应过程与微场所表面的伯胺功能基团起反应。

装置用特异的寡聚核苷酸的电子学寻址图解在图8。第一个特异微场所（ML-1）（81）与它的特殊的序列寡聚核苷酸（SSO-1）（82）的寻址的完成是通过保持特定的微电极（ML-1）在一个正的DC电势，同时所有其它微电极保持在一个负的电势（图8（A））。在水的缓冲液中醛基功能化特殊序列（SSO-1）自由场电泳到ML-1地址，在那里它浓缩（ $>10^6$ 倍）和快速地变成共价地结合到ML-1的表面（81）。所有其它微电极保持在负电，和处在受保护或掩盖，不与SSO-1序列起反应（82）。然后ML-1电势相反到负（-）去电泳任何未反应的SSO-1到一个废弃系统。这周期被重复，SSO-1（84）…… $>$ ML-2（83），SSO-3（86）…… $>$ ML-3（85），SSO-n…… $>$ ML-n直到所有期望的微场所被用它们特异DNA序列寻址（图8（D））。

另一种用于寻址装置的方法是从一个电子学的试剂提供装置转移特定的结合实体例如特异的寡聚核苷酸。这提供装置必须保持大量结合实体或试剂和必须被用于加样到分析装置。结合实体必须在两个装置间电子学地转移。这个系统消除了物理学操作的需求，例如微移液，

并消除了在装置内或装置间的复杂的流体输送系统。

然而用于寻址装置另一种方法是进行组合的在特定的微场所合成特异的寡聚核苷酸。组合的合成在后面部分描述。

在装置已被特异的DNA 序列寻址后，这一点是重要的即在列阵装置微场所下面的微电极保持作为独立的工作直流（DC）电极。这是可能的，因为结合到电极表面是在这种方式下进行的即下面的微电极不被化学地或物理地绝缘。每一个微电极仍能产生强的直流电足够向和从微场所表面上自由电泳式转移其它带电的DNA 分子。因此，DNA 列阵装置提供完全电子学控制DNA 杂交和任何其它随后反应的所有方面。

电子学地控制的杂交方法的一个实例表示在图 9。在这种情况下，每一个可寻址的微场所有一个特异的捕获序列（90）。含有目标DNA（92）的样品溶液被用到装置上。所有的微场所被活化并且样品DNA 在微场所被浓缩（图 9（B））。稀释了的溶液中的目标DNA 分子在微场所被高度浓缩，允许迅速杂交到表面上的特异互补DNA 序列上。反向微电极的电势从微场所上排除所有未被杂交的DNA，而目标DNA 保持被杂交状态（图 9（C））。以相同的类型，在随后步骤中报告探针被杂交去识别杂交的复合体。

杂交过程的电子学控制通过提高总的杂交效率和通过从微场所区域移走非特异DNA 极大地促进随后识别目标DNA 分子。这是期望的即在未扩增的基因组DNA 中10,000到100,000 拷贝数的目标序列将可被识别。这种类型的杂交反应能在几分钟甚至更短的时间内进行，在大大低于探针 T_m 的等温条件下，和最少外界操作次数下（即，传统的漂洗步骤完全被省掉）。

另一个DNA杂交测定的常用方式包括把目标DNA固定在表面，随后用特异的探针与这些目标DNA分子杂交。这种形式能包括在复杂的场所的相同目标DNA，或在特定的场所的不同的目标DNA。图10表示这一连续杂交形式一个改进方式。在这种情况下微场所（101-107）被不同的捕获DNA分子寻址。这些是以连续的形式与不同的序列特异寡聚核苷酸（108, 109）杂交。微场所随后被偏压成正去转移分子到其自身，然后偏压成负去转移分子到下一个微场所。在合适的电极电势下，特异地杂交了的DNA探针将保留在那微场所，而未杂交的探针被转移到下一个微场所。这序列特异寡聚核苷酸探针能被合适的报告基因如荧光团所标记。

权利要求的装置能够提供电子学的严格控制。严格控制对杂交特异性是必须的，对识别点突变单个碱基错配序列特别重要。图11表示电子学严格控制如何能被用于单个碱基错配序列分析。电子学严格控制也能被应用于多数碱基错配序列分析。在图11（A）中完全地配合的DNA杂交子（110）是比错配DNA（112）杂交子略更加稳定。通过偏压微场所负电（图11（B））和在一定时间传送一固定量的电泳电力，这是可能的即变性或移走错配DNA杂交子而保持完全配合的DNA杂交子（图11（C））。图（15）比较应用电子学严格控制所得的电子学杂交过程的结果与传统的杂交过程的结果。杂交包括为了Ras 12癌基因突变的15-mer G和A点突变探针。电子学杂交结果表明与传统的过程比较极大地提高了单个碱基错配的杂交效率和有一个非常高的辨别率。

更准确地说，权利要求的装置对每一个发生在装置上的特异的杂交反应提供独立的严格条件。实际上每一个杂交是一个独立的反应。

用传统的或被动的列阵形式，不可能对所有发生在相同的杂交溶液中的杂交反应获得最适合的严格性。然而，本发明主动的列阵装置能够对不同微场所上的杂交提供不同的电子学严格性，甚至是那些在同一容积杂交溶液中。这属性克服了对传统矩阵或列阵杂交形式，通过杂交测序（SBH）形式，和其它多路分析的固有限制。

除提高杂交的特异性（即，辨别率）和灵敏度（例如单点突变识别）外，电子学严格性控制允许在正常尺寸范围外的寡聚核苷酸能用于这些应用。寡聚核苷酸序列范围从 8-mer 到 21-mer 被认为用传统的杂交方法进行点突变检测可接受的。在应用传统杂交方法现行的实践中，寡聚核苷酸在 10-mer 到 19-mer 是最常用于这些传统方法中，而传统方法应用温度和盐浓度达到严格性控制。寡聚核苷酸短于 10-mers 已被发现对多路杂交不合适；序列短于 8-mers 因为其低杂交效率甚至不能考虑使用。序列长于 21-mers 不能应用因为它们配合和错配探针之间具有极差的辨别率。随着序列长度超过 21-mer，区别配合和错配探针间的差异性的能力极大地下降了。

我们发现在 APEX 装置上采用电子学严格控制进行的杂交允许较短的（7-mer 和更短的）和较长的（22-mer 和更长的）寡聚核苷酸能被应用并具非常高的辨别率。使用较短寡聚核苷酸序列（7-mer 和更短）对利用杂交测序（SBH）具有优点。较短长度序列允许具有极少数寡聚核苷酸（8-mers = 65,536, 7-mers = 16,384, 6-mers = 4,096）的列阵能被使用于这种 SBH 应用。使用较长序列（22-mer 和更长）与电子学严格控制使更灵敏和选择性更强的点突变分析能进行。使用较长探针在具有高复杂性的 DNA 样品中能提供更高的灵敏度，和更高的总杂交效率。

电子学杂交技术能被用于进行原位杂交。原位代表一个基本地不同的杂交形式，不同点在于其中目标DNA (or RNA) 不从细胞中移走，而直接在细胞内被识别。原位杂交方法一般是复杂和耗时的，识别短的目标序列 (即，单点突变) 几乎是不可能的。电子学控制原位杂交能在APEX装置上进行，该装置直接地在装置活性表面上吸附和处理细胞 (见实例 1 4 有关样品制备技术)。然而，而不是从细胞中提取出DNA，这APEX装置直接地在细胞内电子学地杂交报告探针到DNA上。电子学严格控制被用于通过消除大量非特异性结合和促进总杂交外效率增加选择性和灵敏度。

对杂交提供电子学严格控制的能力也提供新的机理用于识别DNA杂交而不使用报告基团标记过的DNA探针。这提供了一种方法进行更直接识别杂交过程它本身。一个荧光染料识别过程在图 1 2 中图解并在实例 4 和 6 中描述。直接识别DNA杂交子能通过使用DNA结合染料例如溴化乙锭获得。这染料结合到双链的和单链的DNA上但对前者亲和性更大。在图12(B)带正电荷的染料(122)能转移到负电偏压的微场所上。染料结合到杂交的(120)和未杂交的(121)DNA序列上(图12(C))。通过偏压微场所带正电和在一定时间内输送一定量的电力，结合在未杂交的微场所上的染料分子被选择性地移走。一个合适量的电势能被使用只要不相反地影响DNA杂交子。杂交子的DNA与结合的染料分子然后能使用联合的或结合的光学系统荧光地识别出来。

如下重申本发明的装置为核酸杂交反应和分析提供的重要优点：

- (1) 迅速转移稀释的目标DNA和/或探针DNA序列到将发生杂交的特定的微场所上。这一过程能在5到120秒的时间范

圈内发生。

- (2) 在将发生杂交的特定的微场所浓缩稀释的目标DNA 和 / 或探针DNA 序列。浓缩效果能大大超过一百万倍 ($>10^6$)。
- (3) 从已发生杂交的特定的微场所迅速转移非特异性结合的目标DNA 序列。这一过程能在 5 到 120 秒的时间范围内发生。
- (4) 从已发生杂交的特定的微场所迅速转移竞争的互补目标DNA 序列。这一过程能在 5 到 120 秒的时间范围内发生。
- (6) 在数分钟时间内进行大量独立杂交反应的能力。
- (7) 在大大低于探针 T_m 的等温条件下进行杂交过程的能力, 以及最少的外界操作或漂洗步骤。
- (8) 使用电子学严格控制 (ESS) 移走部分杂交的DNA序列。
- (9) 对在 1000 到 100,000 拷贝数范围内的未扩增的基因组目标DNA 序列进行杂交分析的能力。
- (10) 使用ESC 提高单个碱基错配杂交的分辨率 (即, 分辨能力) 和灵敏度 (点突变)。
- (11) 使用短于 (7-mer 和更短) 长 (22-mer 或更大) 于那些被用于传统杂交过程中者白单点突变探针的能力。
- (12) 在矩阵杂交中使用ESC 提供单个严格控制。
- (13) 通过移去非特异性背景成份而改进杂交反应的识别能力。
- (14) 在固定细胞上进行电子学原位杂交的能力。
- (15) 发展了一种分析方法, 它去除了需要使用共价地标记的报告探针或目标DNA 来识别杂交。

III (b) 装置的重复生产

除了用特异的结合实体分别地寻址单个装置外, 也可能生产一种

主控装置，它能够为其它装置复制特异的结合实体。这代表另一种生产或制造装置的方法。复制装置的过程图解在图 1 3。一个含有已被特异的结合序列寻址的微场所的主控装置与期望的互补DNA序列（130）杂交。这些互补序列被活化因此能够共价地结合到粘附层的微场所上。

一个含有粘附层的未被寻址的姐妹装置（132）与已杂交的主控装置排成一线（图13(B)）。主控装置微场所被偏压成负而姐妹装置微场所被偏压成正。DNA 杂交子被电子学地变性和被转移到姐妹装置上，在那儿被活化的DNA 序列共价结合到微场所上（图13(C)）。这过程能以平行的或连续的方式进行，这取决于装置的表面结构以便在微场所间的交叉结构减少到最低。杂交子能通过使用一个足够的负电势或通过使用带正电荷的离液剂或变性剂被变性。

III (c) 元件装置和集成的APEX系统

大量分离的APEX装置或芯片能被组合形成一个集成的APEX系统。因为APEX型装置能进行许多不同的功能，和反应物能在装置间借助自由场电泳被移动，集成的系统能发展起来。例如，分离的APEX装置或芯片具有：（1）选择性地结合和裂解细胞，（2）电子学地分配试剂，（3）进行前期杂交，（4）用作废弃处理单元，（5）为DNA片段提供贮存，和（6）进行杂交分析可被组合形成一个样品制备和杂交分析系统（见实例 1 4 和图 1 9）。这些集合的APEX微电子学系统是完善临床分析仪或可编程的分子生物学实验室的相等物（即，芯片上的实验室）。然而，它们超过了自动化（机器人）或其它微分析装置，因为它们需要最少量的射流或物理学操作样品。试剂，和反应物。另外集成的APEX系统类型将包括，但局限于那些能进行原位杂交，细胞选择和处理系统，和免疫诊断分析仪。

III (d) 识别系统和报告基团

在结合反应包括荧光标记的报告基团情况下，这是可能的即应用落射荧光式显微镜识别系统在APEX装置上分析结合反应。该系统的总灵敏度取决于联合的识别元件（冷却充电耦合装置（CCD），增强充电耦合装置（ICCD），微通道平板识别器，或光子记数光电倍增管（PMT）系统）。此外，灵敏的CCD芯片识别仪或雪崩光电二极管（APD）识别仪能被更直接地与APEX装置联合。这些系统能在一定程度上减少复杂的光学装置的需求性。更先进的系统将包括集成光电子或电子识别元件进入APEX芯片。用这些系统进行光学的和直接电子学的DNA识别是可能的。这一点是本发明期望的即最先进的系统将最终包括夹心一个微电子识别仪和板上控制仪元件到基础APEX芯片元件。电子学的和光学的（波导）连接将被制成直接穿过APEX元件的底部。这个策略解决了有关制造技术，材料兼容性，和用于制造可处理的APEX元件的有效性成本的一系列问题。

除了各种荧光染料和报告基团能用于标记DNA探针，目标DNA，或抗体以外；其它类型的标记或报告基团也可被使用。这些包括化学发生标记，非线性光学（频率倍频器）材料，生物素/亲和素复合物和各种酶类。

III (e) 组合的生物高分子合成

本发明的装置也能进行组合的合成生物高分子例如寡聚核苷酸和多肽。这种过程允许自我引导的合成进行无需任何外界引导、影响、或机械移动。组合的合成的其它方法需要物理的遮蔽和复杂的光平版印刷过程，微机械自动移样系统用于试剂输送，或复杂的元件的物理移动以便在显微场所进行实际的合成。本发明描述的组合合成允许极

大量的序列能在一个装置上合成。组合合成的基本概念包含使用自由场电泳式转移到输送器上，浓缩，和反应单体连接试剂，或去封闭试剂在装置的特异的可寻址的微场所上。利用装置的固有能力去电子学地保护其它微场所避免附近试剂和反应物的影响的概念。对此概念也重要的是鉴别在这些化学合成过程中选择的步骤，在化学合成过程中一个或多个反应物具有一个净正电或负电，或构建用于这些过程的合适试剂。

组合的寡聚核苷酸合成的一种方法图解在图 14。这方法开始于一系列选择性的可寻址的微场所 (140)，其表面已被用封闭的伯胺 (X-NH-) 基团 (142) 衍生过。这方法的起始步骤包含使用一种带电的去封闭试剂 (144) 选择性的去除一些微场所的封闭。在这种情况下，试剂必须带正 (+) 电荷。这过程进行通过使那些被去封闭的微场所带负电势，而那些仍被保护的微场所带正电势 (图 14 (B))。应用正和负电势到选择的电极上引起带电的试剂从一个试剂输送位点移动和在所期望的被去封闭的微场所浓缩，同时从其它微场所上清除试剂。

在第二步，第一个碱基，在这例子是胞嘧啶，化学连接到去封闭的微场所上是通过简单地暴露这系统于氨基磷酸酯试剂 (X-C) (146) 上而进行的。该 (C) 核苷酸连接到去封闭的微场所表面，而不是任何封闭的电极表面 (图 14 (C) 和 (D))。在这点正常的磷酸胺化学是进行着直到下一个去封闭步骤。

在第二个去封闭步骤 (图 14 (D))，那些准备连接下一个碱基的电极位置被赋予负电，而那些保留被保护的被赋予正电。该系统现在接触将被连接的下一个碱基，在这种情况下为 (X-A) (148)、

并获得选择的连接到去封闭的微场所上（图14（E）和（F））。这连接和去封闭步骤交替重复，直到所有不同DNA序列在每一个可寻址的微场所表面合成完。

上述的实例代表了一种用于核酸的合成可能的方法。另一种方法包含一个完全水溶DNA合成。在这种情况下，带电的水溶连接试剂，例如1-乙基-3-（3-二甲基氨基丙基）碳化二亚胺（EDCA），用于与水溶核苷酸衍生物进行寡聚核苷酸的合成。这种方法比现在基于有机溶剂的方法应有极大的优越性，基于有机溶剂的方法需要广泛地封闭碱基分子。水溶合成应是低花费的和取消了使用多个用于当今基于有机溶剂的方法中的毒性的物质。第三种方法，另一种水溶合成，包括应用带电的单体和酶类。

III (e) (1) 用末端转移酶的寡聚核苷酸合成

本方法用于组合合成寡聚核苷酸包含使用核酸聚合酶。这方法应用末端转移酶，5'-脱氧核糖核苷酸三磷酸的3'-单磷酸酯，和一种磷酸化酶。末端转移酶被用于连接核苷酸。这3'-磷酸酯作为一种封闭基团以防止在每一连接步骤中加上多于一个核苷酸。3'-磷酸化酶被用来去除3'-磷酸酯以供下一步的连接。

因为所有试剂是水溶和带电的，一般APEX技术能被用于这种组合合成过程的所有步骤。在这种方法中，一个APEX矩阵被使用，这矩阵具有A、T、G和C核苷酸通过它们的5'-羟基位点连接在装置上合适数量的寻址的微场所上。用标准APEX寻址的技术连接最先的核苷酸。

连接反应的第一个周期的开始是通过偏压正电所有那些在它们第二位点能够连接一个A核苷酸的微场所，和偏压负电含有末端转移酶

和脱氧腺苷三磷酸的 3' - 磷酸酯的二个电子学的试剂分配单元进行的。试剂是被自由场电泳到合适的微场所和这 A 核苷酸通过末端转移酶连接到矩阵上第一个核苷酸上。因为核苷酸三磷酸是在它们的 3' 位与一个磷酸基团酯化而成，末端转移酶每一次仅增加一个核苷酸。

在核苷酸连接完成后，微场所被偏压负电和废弃处理系统偏压正电以及酶和使用过的试剂被移走。这过程为第一个周期连接 G、C 和 T 核苷酸重复直到所有的微场所被连接上。

当第一个整周期连接（A、T、G 和 C）过程完成所有的微场所被偏压正电而试剂分配器与 3' - 磷酸化酶被偏压负电。这 3' - 磷酸化酶被自由场电泳到微场所上并水解 3' - 磷酸酯。移去磷酸酯露出 3' - 羟基团准备为连接反应的下一步周期。连接反应被进行直到所期望的寡聚核苷酸序列在 APEX 装置上被合成出来。

除了 DNA 合成之外，一个类似方法可发展起来用于 RNA 的合成，多肽的合成，和其它复杂高分子的合成。

III (f) 电子学地控制的分子生物学和扩增反应

包括线性和指数的倍增或扩增目标 DNA 和 RNA 分子的各种分子生物学反应能用 APEX 微电子学的装置和芯片进行。

限制性酶切反应和 DNA 片段分析可在完全电子学的控制下进行。用 APEX 装置进行核酸倍增或扩增反应是本质不同于其它“DNA 芯片”装置它们是基本地被动的微矩阵基质用于传统的扩增过程（PCR，LCR 等等）。用于扩增的新机理直接来自于 APEX 装置的主动特性。主动的装置提供唯一的电子学的机理去：（1）在等温反应条件和大大低于它们 T_m 点（解链温度）下选择性地变性 DNA 杂交子；（2）在二个或多个微场所间迅速地向后和向前转移或移动 DNA；和（3）在装置

任何期望的微场所上选择性地浓缩DNA 修饰酶，例如，但不局限于，限制性内切酶，DNA或RNA聚合酶，和连接酶。在APEX装置上能进行的电子学控制的分子生物学和扩增反应的实例包括：（1）电子学地引导限制性酶切ds-DNA 序列；（2）通过DNA 聚合酶电子学的倍增目标DNA ；（3）通过DNA 和RNA 连接酶电子学的连接和倍增目标DNA 序列，和（4）通过RNA 聚合酶电子学的倍增目标DNA 。

III (g) 电子学的限制性片段分析

除了进行限制性酶切ds-DNA 外，APEX装置和电子学技术能被用于分析和测定DNA 片段的相对大小。这是可能的当不同长度的DNA 片段能被杂交到在单个微场所上一个共同捕获的序列上时。或者当DNA 长度的DNA 片段能被杂交到不同的捕获序列上，而这些序列具有相同的杂交或结合能量的时候。在这些情况下，电子学的严格控制能被用来选择性地使不同的DNA 片段按照它们未-杂交或突出端序列的长度去-杂交。具有较长突出序列的片段上的电泳力使它们在具有较短的突出序列前被去杂交。因此，如果片段被标记用于识别，和寻址到特定的微场所，它们的大小可被测定，通过电泳的电势或电力水平需要来从这些微场所上去-杂交这些片段。这也是可能的去进行电子学的限制性片段长度多态性分析的同等 分析。

现在通过参考如下关于制造和应用APEX装置的无-限制性实施例本发明将被更详细地描述。

在如下实施例中缓冲液、溶液和培养基的配方在J. Sambrook, E. F. Fritsch 和T. Maniatis, 分子克隆：实验室手册，第二版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约，1989.中被描述。

IV. 实施例

实施例 1 : 寡聚核苷酸的合成和修饰

合成的DNA 探针的制造是应用常规的氨基磷酸酯化学在Applied Biosystems 自动DNA合成仪上进行。寡聚体被设计成含有5' -氨基或3' -核糖核苷末端。5' 功能团是通过使用ABI 氨基连接 2号试剂被结合入而3' 功能团是通过从RNA CPG 载体上起始合成而引入。

3' -核糖核苷酸末端通过高碘酸氧化方法能被转化成一个二醛末端, 它能与伯胺反应形成席夫碱。

反应条件如下: 在水中溶解20~30 O.D寡聚体达终浓度1 OD/ μ l。加入1 体积0.1M醋酸钠, pH 5.2和1 体积0.45M 高碘酸钠(在水中新配制)。搅拌保持反应至少2 小时在周围温度中, 在黑暗中。把反应混合液加样到Sephadex G-10柱上(巴氏吸管, 0.6 \times 5.5cm), 柱子平衡用0.1 M 磷酸钠, pH 7.4缓冲液。收集200 μ l级分, 将2 μ l 等分试样在薄层层析(TLC)上点样并收集紫外(UV)吸收级分。

如下的寡聚体含有3' -核糖核苷末端(U):

ET-12R	5' -GCT AGC CCC TGC TCA TGA GTC TCU
CP-1	5' -AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAU
AT-A1	5' -CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U
AT-A2	5' -GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU
AT-A3	5' -CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU
AT-A4	5' - GTC TCC TTC CTC TCC AGU
AT-A5	5' - GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU
AT-A6	5' - CTG GAG AAG AAG GAG ACU
AT-A7	5' - TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U
AT-A8	5' - TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU
AT-A9	5' - TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU
AT-A10	5' - CAT CGC TGT GAC AAA ACA TU

含有 5' - 胺基团的寡聚体一般地与荧光团反应，例如Texas 红 (TR, 激发590nm, 发射610nm)。磺酰氯是非常活泼的对伯胺形成一个稳定的氨磺酰链。

德克萨斯红 - DNA 结合物形成过程如下：德克萨斯红磺酰氯 (分子探针) 被溶解在二甲基甲酰胺 (DMF) 中达最终浓度为 50mg/ml (80mM)。寡聚体溶解在 0.4M 碳酸氢钠, pH 9.0-9.1 中达最终浓度为 10.D./μl (对 21-mer 为 5.4mM)。在一个微试管中，混合 10μl 寡聚体和 20μl Te克萨斯红。在黑暗中让反应进行 1 小时。用氨或羟胺中止反应，冻干样品并用 PAGE 纯化 (Sambrook et al., 1989, supra)。

如下的寡聚体含有 5' - 氨基末端：

ET-21A	5'-氨基	-TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT
ET-10AL	5'-氨基	-GAG AGA CTC ATG AGC AGG
ET-11AL	5'-氨基	-CCT GCT CAT GAG TCT CTC
T-2	5'-氨基	-TTT TTT TTT TTT TTT TTT T
RC-A1	5'-氨基	-CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG TCC ACG TAG
RC-A2	5'-氨基	-CTC CAA ATT TGC TGA ACT C
RC-A3	5'-氨基	-GGA GAT GAG GAG TTC TAC G
RC-A4	5'-氨基	-CTG GAG AGG AAG GAG AC
RC-A5	5'-氨基	-CCA CGT AGA ACT GCT CAT C
RC-A6	5'-氨基	-GTC TCC TTC TTC TCC AG
RC-A7	5'-氨基	-GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA
RC-A8	5'-氨基	-ATC TTC TAA ATC TGC GGA A
RC-A9	5'-氨基	-GTC TGA GAA CAG GCA AAC A
RC-A10	5'-氨基	-ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

实施例 2：在一个微制造的试验装置上的电子学地可寻址的微场所 - 聚赖氨酸方法

微场所从微毛细管（0.2mm×5mm）制造。这微毛细管充满18-26%聚丙烯酰胺含有0.1-1.0%聚赖氨酸让其聚合。多余的毛细管被划痕和去除防止在管中陷入的空气泡以及使管的长度标准化。毛细管以它们共使用一个上缓冲液贮槽而具有单个低缓冲液贮槽的形式被安放。每一个低缓冲液贮槽含有一个铂线电极。

在上贮槽中的微毛细管的顶表面被认为是可寻址的微场所。这上和下贮槽被充满0.1M磷酸钠，pH 7.4缓冲液并先电泳10分钟在0.05mA电流使用BioRad 500/1000电源。大约2 μl（0.1 O.D.）的高碘酸氧化的ET-12R捕获序列被加入进上贮槽将电源加上并在恒电流下电泳2-5分钟。这ET-12R捕获序列变成浓缩的和很快地共价结合到微场所表面的伯胺基团上。极性随后被反转使得测试毛细管现在被偏压负压并电泳另外2-5分钟。任何保留的未结合DNA序列被排斥而共价结合DNA保留在微场所。

上面缓冲液贮槽被吸出液体并用缓冲液冲洗。仪器被拆卸并且一个新参考试验装置被安放。贮槽被重新充满和荧光地标记的完全DNA序列被加入，即，ET-10AL-TR。寡聚体在0.05mA恒流下被电泳地浓缩在正电荷偏压的试验微场所达2-5分钟。极性被反转并且未结合的被完全移走。试验装置被移走并用落射荧光显微镜检查。一个为了非-特异性结合的阴性对照被如同上述用一个非-互补的DNA序列ET-21A-TR代替ET-10AL-TR进行。

毛细管微场所表面的交叉部分用与Hamamatsu ICCD照像成像系统相配合的Jena落射荧光显微镜检测。荧光分析结果表明互补ET-10AL-TR序列杂交到结合实体/捕获序列和保持杂交状态，甚至当电势被偏压成负电时。ET-21A-TR非-受体序列当电势被反转时不保持在

试验装置表面。

实施例 3：在微机械制造的试验装置上的电子学地可寻址的微场所— 丙烯酸琥珀酰亚胺法

本实施例描述另一种共价结合寡聚核苷酸 5' - 末端的粘附化学。毛细管的制备除了 1% 丙烯酸琥珀酰亚胺（分子探针）代替聚赖氨酸外同上述。毛细管新鲜制备因为用于与伯胺基团反应的琥珀酰亚胺酯是相对不稳定的，尤其在 pH 8.0 以上。毛细管的安放同上，贮槽充满 0.1M 磷酸钠，pH 7.4。毛细管在 0.05mA 下预先电泳 10 分钟。大约 2 μ l ET-10AL (0.1 O.D.) 并含有 5' - 氨基末端的样品在电源接通下加入到上贮槽并电泳式移动进行 2 - 5 分钟。极性被反转以便试验装置被偏压成负电并电泳继续 2 - 5 分钟。未结合的 DNA 被排斥，然而共价结合的 DNA 保留在微场所。

上缓冲液贮槽被吸出液体并用缓冲液冲洗。参考试验装置被取出而一个新的参考装置被装入。这贮槽重新充满并加入荧光标记的互补寡聚体 ET-11AL-TR 并电泳如同上。为非 - 特异结合的阴性对照被同上一样实施，用一个非 - 互补 DNA 序列 ET-21A-TR 代替 ET-11AL-TR。

每一个试验装置的荧光分析表明互补 ET-11AL-TR 杂交到捕获序列 (ET-10AL) 上，并保留杂交的甚至当电势变换成负的。非 - 互补的序列，ET-21A-TR，当电势被反转时不被保留在微场所上。

实施例 4：电子学地控制的荧光 DNA / 染料识别方法

有些染料例如溴化乙锭 (EB) 当结合 (嵌入) 到双 - 链 DNA 中时成为高度荧光的。然而当结合入双 - 链 DNA 时荧光和结合亲和力较大，这染料对单 - 链 DNA 也有一定程度的亲和力当结合时产生低水平的荧光。如下的实施例表明一个电子学控制的 DNA / 染料识别方法怎样能

被产生出来。

微毛细管试验装置的制备和杂交同实施例 2 和 3 中描述一样。溴化乙锭 (EB) 加入到缓冲液中 ($\sim 0.05\text{mM}$ EB 终浓度) 这试验装置被偏压成负以在杂交的和未杂交微场所上浓缩 EB (带正电荷)。试验装置通过落射荧光显微镜在 550nm 激发和 600nm 发射处被观察。杂交的和未杂交的微场所都从浓缩的 EB 上显示强烈红色荧光。

试验装置被重新装入并偏压正恒电流在 0.05mA 达 0.03 伏一小时, 去选择性地移走 EB。未杂交微场所的荧光减弱然而杂交的微场所保持非常高水平的 EB 荧光。这结果如下:

捕获	目标	标准化信号
ET-10AL	ET-11AL(+)	>200
ET-10AL	ET-21A(-)	1

荧光信号是应用 ICCD 成像照像系统测定的并代表荧光密度峰。如果整个荧光信号区被积分的话信噪比应大于 1000 倍。这示范了一种使用嵌入染料用于增加信噪比和 DNA 测定的动态范围的方法。

实施例 5: 在金属基质上电子学可寻址场所

铝 (Al) 和金 (Au) 线 (0.25mm Aldrich) 与溶于甲苯中的 10% 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APS) 反应。APS 试剂容易与金属表面的氧化物和 / 或羟基团反应形成在氧化物和 / 或羟基团与伯胺基团间的共价键。无需对铝任何前期处理。金线在 $5 \times \text{SSC}$ 溶液中电解以形成氧化层。或者金属线能通过高氯酸浴被氧化。

APS 反应的实施如下: 线被切割成 3 英寸放入玻璃皿中。加入甲苯完全浸没线并在一加热板上加温到 $50 \sim 60^\circ\text{C}$, 加入 APS 到终浓度 10%。混合溶液继续反应达 30 分钟。用大量甲苯冲洗 3 次, 然

后用大量乙醇冲洗 3 次并在 50 °C 烘箱中干燥。

APS 处理过的线能与一种醛反应形成席夫碱。结合实体 ET-12R 被高碘酸氧化如同在说明书中其它地方描述的一样。电极被放入含有去空气水的贮槽中。加上电源在 0.05mA 恒流下保持约 30 秒。迅速加入活化了的 ET-12R。加上电源，液体被抽吸掉，加入新鲜水随后再被抽吸掉。试验（偏压成正）和参考电极被放入含有荧光标记的互补 DNA，ET-10-TR 的杂交缓冲液（HB，5 × SSC，0.1% SDS）中。经过 2 分钟电极用漂洗缓冲液（1 × SSC，0.1% SDS）漂洗 3 次每次 1 分钟并用荧光法（激发 590nm，发射 610nm）来观察。

结果表明 ET-12R 被特异性地结合到处理过的金属表面上。试验电极是荧光的然而参考电极不是。非-特异性吸附 DNA 到金属上被在杂交缓冲液中含有的 SDS 抑制。粘附到金基质上通过电解和随后的 APS 处理是有效的。得到的信号比由非-氧化的金观察的信号有意识地强。更重要地，这实例表明金属表明能被化学地活化和与结合实体衍生而不成为与溶液是绝缘的。这 APS 方法代表多个可用的形成 DNA-金属结合物的化学方法中的种。

实例 6：电子学控制的荧光染料识别方法-金属线

DNA 铝电极基质的制备和杂交如例 5 中描述的。一个杂交的和一个未杂交的 DNA-AL 电极被用一根未衍生过的铝线加工作为参考物。在溶液中加入溴化乙锭（EB）试验的 DNA 电极被偏压成负以吸引染料。这溶液被抽吸掉并加入新鲜缓冲液。金属表面在显微镜下检查。

重新安装装置加上一个正电势达一定量伏特一小时。缓冲液被抽吸掉，电极用落射荧光来观察。这过程重复直到在杂交的和未杂交的金属表面之间的荧光出现显著的区别。

捕获	目标	标准化的信号
ET-12R	ET-10AL(+)	>140
ET-12R	无(-)	1

未杂交金属表面的荧光减弱而杂交的金属表面保持荧光。荧光信号是用ICCD照像成像系统测定的其代表荧光密度峰如果整个荧光信号区被积分的话信噪比将远远大于1000倍。这实施例表明一种用于增加信噪比和如此测定的动态范围的方法。应用毛细管凝胶构型获得了类似的结果，表明电化学影响不在重大程度上影响测定的实施。

实施例 7：有功能的可编程电子学矩阵（APEX）——微机械制造

6个可寻址的250 μm毛细管场所的一个放射状列阵是从塑料基质材料微加工成的。该装置具有一共同的上贮槽和分离的下贮槽以便每一个微场所是单个可寻址的。一个唯一的寡聚体序列结合实体被定位和结合到用以前描述的方法从高度交叉连接的聚丙烯酰胺制得的特异微场所上。试验微场所具有一正电势而其它微场所具有负电势以防止非一特异性相互作用。

列阵被漂洗然后与一个互补荧光标记的DNA探针杂交。列阵被漂洗移走多余探针然后在落射荧光显微镜下观察。只有特异性地寻址的微场所是荧光的。这过程在另一场所用另一结合实体重复进行并用一个标记了另外一个荧光团的探针杂交以便证实。

DNA序列被特异地定位于预定的位置，与其它场所间的交叉可忽视。这使得制造在预定位置带有几个到数百个独特的序列的微矩阵成为可能。

为了挑选合适的低荧光背景的塑料基质，不同的塑料基质被测试在600nm处的荧光特性。塑料用落射荧光显微镜成像系统和荧光仪进

行测试。下表提供基质目录和用LS50B 荧光仪测得的荧光读数：

塑料基质		密度610nm, 5秒间隔
ABS	黑色	0.140
	白色	6.811
聚苯乙烯		7.955
丙烯类	光亮的	0.169
	白色	51.77
	浅色	0.151
	黑色	0.035
	超白	51.22
UHMW 黑		0.743
	白色	
Delrin	黑色	1.834
	白色	61.39
TFE		96.05
聚丙烯	白色	22.18
	天然	25.82
聚碳酸酯	光亮	11.32
	浅色	3.103
	白色	45.31
	黑色	0.156
PVC	灰色	2.667

实验表明黑色丙烯，ABS，和聚碳酸酯具有最低的荧光本底水平。

实例 8：有功能的，可编程的电子学矩阵（APEX）——微平版印刷制造

一个在一硅片上 8×8 矩阵（64 位点）的 50 平方微米的微场所（见图 3）被设计出，制造和用一个开关盒包装（详见装置制造部分）。数种材料和方法的改进，如下描述，被用来增加 APEX DNA 芯片装置的选择性和有效性。

8a) 顶端层的选择

APS（3-氨基丙基三乙氧基硅烷）方法包含芯片整个表面的反应。这起始功能化方法的选择性取决于芯片表面各种材料的相对反应性。为了减少功能化和随后的 DNA 结合到微场所周围区域，一种比 SiO_2 或金属氧化物具有低反应性的材料是需要的。抗光蚀剂和氮化硅被测试。不同的顶端层被用于二氧化硅芯片。芯片由落射荧光检测然后 APS 处理接着共价结合高碘酸氧化的 poly-ARNA 序列（Sigma, M100,000）。这芯片与 200nM 德克萨斯红标记过的 20-mer（T₂-TR）在杂交缓冲液中在 37℃ 杂交 5 分钟。芯片用漂洗缓冲液漂洗 3 次并用 $1 \times \text{SSC}$ 漂洗 1 次。芯片在 590nm 激发和 610nm 发射下进行荧光检查。

氮化硅被选中因为它与二氧化硅比较具有较少的对 APS 的反应性同时并不象所试的抗光蚀剂那样具固有的荧光性。其它方法例如背景区域紫外燃烧也是可能的。

8b) APEX 物理学的特性

一个完成的矩阵芯片用探针测试平台（微操作型号 6000）配有 B & L 显微镜和 CCD 照相机进行光学的检查。芯片被测试在受试垫和外

界接触垫间的连续性。这测试是通过用连接着万用表的操作探测头与垫接触而进行的。连续性保证了垫已被浸蚀到金属表面。垫然后被检查在电解环境中的稳定性。金属线被评价承担 1 mA 电流在正常干燥条件下。

一滴 (1 - 5 μ l) 缓冲液 (1 \times SSC) 被取到 8 \times 8 矩阵上。表面张力使得液体在一处留下四周接触的垫区域干燥。将一个探测头接触到一个接触的垫而另一个探测头与液体接触。使用 HP6625A 电源和 HP3458A 数字万用表在 50V 最大电压下电流递增地增加到 50nA。

最初的制造包含硅基质，一个二氧化硅绝缘层，铝沉积和模型化，和一个氮化硅顶端层。

第二个制造过程包括在铝金属和氮化硅层间的二氧化硅绝缘层。二氧化硅和铝具有更多的兼容物理学特性和可形成一个更好的化学分界面以便提供一种比由原始制造方法制造的芯片更加稳定和坚强的芯片。

8c) DNA 的结合

一个 8 \times 8 矩阵芯片被功能化用如同实例 5 中描述的 APS 试剂。这芯片然后用高碘酸氧化过的 poly-A RNA (Sigma, 平均 M 100,000) 处理。芯片用漂洗缓冲液 (WB) 漂洗以便移去多余的和未结合的 RNA。这一步用捕获序列覆盖了整个芯片，然而在暴露的金属表面比在氮化物覆盖的区域有更高的密度。芯片用 200nM T₂ - TR 在杂交缓冲液 (HB) 中在 37 $^{\circ}$ C 杂交 5 分钟。然后用 WB 漂洗 3 次和用 1 \times SSC 漂洗 1 次，每次 1 分钟，在周围的温度下。芯片在 590nm 激发和 610nm 发射下进行荧光测试。

开放的金属区域是轻微荧光的并有 50 μ m 见方垫形状 (微场所)。

低荧光密度和/或不规则的边缘表示一些垫是不完全地开放的。在这些情况下额外的等离子体浸蚀时间应是需要的。

8d) 电子学控制的杂交

活性的杂交被实施通过使用从实例 8 c 中的一个芯片和偏压一个特定的微场所为正电。通过使用也能自动地偏压其余微场所为负电的开关盒或通过使用在外界溶液中的一个电极来进行。3 微升缓冲液仅放置在矩阵垫(微场所)上。一个 1 ~ 5 nA 的电流被加上达数秒钟并加 0.1 皮摩尔的 T₂ - TR 到溶液中。液体被移走芯片被干燥然后在激发光 590nm 和发射光 610nm 下检测德克萨斯红的荧光。只有特定的被偏压或正的微场所是荧光的。这一实验被重复多次, 使用 APEX 芯片上其它特定的微场所。另外, 在一个微场所上荧光的 DNA 通过偏压原始场所负电和目的微场所正电而被电子学地去杂交和转移定位到另一个微场所上。

8e) 电子学控制的寻址和装置制造

8×8 APEX 矩阵被用 APS 功能化如同前述。寡聚核苷酸结合实体 CP-1 被高碘酸氧化法活化。矩阵中 4 个微场所被偏压成正电而其余的被偏压成负电。2 微升缓冲液放置在矩阵上并加上电流。结合实体 CP-1 被加入并在设计的场所浓缩。液体被移走, 芯片用缓冲液简单冲洗然后 2 微升缓冲液加在芯片上。电流再次加上达数秒钟并加入 0.1 皮摩尔的 T₂ - TR。经短暂时间后液体被移走而整个芯片用 WB 漂洗 3 次。干燥芯片并检查荧光。

结果表明 4 个正电偏压的微场所都是荧光的。这个实施例显示应用特定的结合实体的微场所的选择的寻址, 定位和共价结合粘附的序列到微场所, 和互补的目标序列特异性杂交到衍生的微场所上。

8f) 基因的模式APEX芯片

对HLA 基因dQa 多态性特异的带有3' -核糖核苷末端的DNA 结合实体被合成出。结合实体通过高碘酸氧化被活化如上所述。反向补体被合成带有5' -氨基末端并与荧光团，例如德克萨斯红，罗丹明或Bodipy染料结合，如上所述。微场所通过APS 处理被功能化带有伯胺基团，如上所述。

数微升溶液置于 8×8 矩阵之上。通过偏压微场所正电一个特定的微场所被寻址；高碘酸氧化的DNA 寡聚体以 ~ 0.1 皮摩尔被加入，然后被转移和共价地结合到那个场所上。极性被反转未结合的结合实体分子被移走。在另一个寻址的微场所对另一种结合实体重复该过程直到所有特有的粘附结合实体被结合到芯片上。

然后将该芯片与单个荧光标记互补序列杂交以便确定结合反应的特异性以及立刻观察所有被寻址的微场所。

在这芯片被电子学地变性去移走互补的寡聚体（在 90°C 0.05% SDS 中 10 分钟）的同一芯片上，被寻址的微场所被与未标记的目标DNA 或基因组DNA 杂交。识别是通过本说明书上面已描述的荧光染料识别分析。

结果将表明微场所是用特定的结合实体特异性地寻址的。对负电偏压的微场所非特异性的结合是微不足道的。装置和联合的结合实体的化学组成和性质在变性条件下是稳定的，因此使得寻址的和制造的装置可重复使用。变性杂交子的电子学方法是增加电流和/或增加电流加上的时间。

实施例 9：电子学严格限制

9A) 用15-mer Ras-12 探针（测定）单点突变

装置影响高水平的电子严格控制的能力是用15-mer 探针来测定 Ras-12 癌基因型系统来表明的。在DNA 双螺旋中一单个碱基对错配在杂交对中引起仅仅极微量的不稳定与配合的双螺旋相比较。这极微量的不稳定引起这错配的双螺旋在略低于配合的双螺旋的 T_m 下变性。当配对子（配合和错配的）都在配合配对子最适严格性条件下杂交时，错配配对子杂交效率较低。错配的杂交信号将一定程度的低于配合杂交信号。用传统的杂交方法，单点突变分析能用 8-mer 到 21-mer 范围的探针进行。10-mer 到20-mer 范围的探针最常用。当突变特异性探针变成短于 8-mers或长于20-mers时，可信地区分配合和错配变得非常地困难。这是因为在配合和错配配对子之间的杂交信号上几乎无区别。在点突变分析中应用的杂交严格控制的传统方法依赖于温度和盐浓度。我们已发现严格控制也能受电泳电势的影响。

在Ras-12 的实例中，15-mer 点突变特异探针被电子学地杂交到粘附在试验装置微场所上30-mer 目标序列上。微场所上的极性被偏压成负，所有杂交子被受到恒电流达一定时间，提供使错配变性而不影响完全配合的一定的电力水平。

如下序列被合成并在一套 3 种试验结构上试验，每一种结构带有 250 μ m 表面微场所。下划线的 / 黑体的碱基表明错配位点。

粘附的序列是：

Ras-G 5'-GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU-3'-
微场所

Ras-T 5'-GGT GGT GGG CGC CGT CGG TGT GGG CAA GAU-3'-
微场所

报告探针序列（用德克萨斯红标记）是：

Ras-1 3'-CC-GCG-GCC-GCC-ACA-C-5'-(TR)
 Ras-2 3'-CC-GCG-GCA-GCC-ACA-C-5'-(TR)
 Ras-3 3'-CC-GTG-GCA-GCC-ACA-C-5'-(TR)

试验装置如同在前说明书中所述从微毛细管制成。粘附序列 Ras-G 和 Ras-T 被高碘酸氧化并共价结合到被寻址的微场所上。

Ras-G 微场所然后与 Ras-1, Ras-2 或 Ras-3 杂交。Ras-1 是完全配合 Ras-G。Ras-2 是单个碱基对错配 (G-A)。Ras-3 是二个碱基对错配 (G-A 和 G-T)。G-A 错配对 DNA 双螺旋产生最小的不稳定性, 因此是最困难与完全配合区分的。

首先进行传统的杂交并荧光地检查微场所以便测定互补序列被杂交到什么程度。试验装置(微毛细管)被重新安装并随后进行电子学杂交。试验装置都被受到相同的电子严格性通过偏压它们在负电势(恒电流)上而获得直到这错配的杂交子被完全移走而不有意义地影响完全配合的杂交子。方法和结果如下:

传统的杂交方法:

- 在 40 °C 在 5×SSC 中杂交 15 分钟
- 在 20 °C 在 1×SSC 中漂洗 3 次每次 5 分钟
- 进行荧光分析
- 观察完全配合 (Ras-G/Ras-1) 和单个碱基对错配 (Ras-G/Ras-2) 的信号比: 约 10 比 1

电子学严格控制 (ESC) 方法:

- 在 20 °C 在 5×SSC 中杂交 5 分钟
- “无漂洗过程”
- 应用在 150 伏 (V) 0.15 微安 (MA) 的电子学严格性达 4 分钟

(20°C)

——进行荧光分析

——观察完全配合 (Ras - G / Ras - 1) 和单个碱基对错配 (Ras - G / Ras - 2) 的信号比 : > 100 比 1

所有实验的全部结果被图示在图 (15) 。这些结果表明这不但可能用电泳电势在DNA 杂交反应中达到严格控制, 而且表明ESC 比传统杂交方法提供较高的杂交效率和更高的分辨率。此外, ESC 能被应用到每一单个微场所上, 在同一容积溶液中提供独立的严格控制。

(9B) 应用 7 - mers和22 - mer 探针进行单点突变分析

在单点突变分析中经常使用的正常大小范围以外的 7 - mer 和 22 - mer 探针, 被制备出来去进一步证明电子学杂交和ESC 的优越性。如下列出的点突变特异寡聚体探针能被配对而导致具有 0、1 或 2 个碱基错配的杂交子。互补寡聚体序列被结合到微场所上并如同上述一样杂交。微场所上的极性被反转 (偏压负电) 杂交子受到恒电流达一指定时间, 提供一个特定的电力水平以便变性错配而不移走完全配合。

Ras - G或Ras - GA 寡聚体 (如下所示) 被结合到微场所上用作目标序列。如下所示的22 - mer 和 7 - mer Ras 特异寡聚体的系列被用德克萨斯红荧光团标记如同本说明书其它地方描述。“下划线的和**黑体**”碱基表示错配和 / 或潜在的错配位点 :

Ras - G	5' - GGT GGT GGG <u>CGC</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> TGT GGG CAA GAU
Ras - GA	5' - 氨基 - GGT GGT GGG <u>CGC</u> <u>CGG</u> <u>CGG</u> TGT GGG CAA GA
Ras - 22C - TR	(TR) - 5' - TGC CCA CAC <u>CGC</u> CGG CGC CCA C
Ras - 22A - TR	(TR) - 5' - TGC CCA CAC <u>CGA</u> CGG CGC CCA C
Ras - TA	(TR) - 5' - TGC CCA CAC <u>CGA</u> CGG <u>TGC</u> CCA C

Ras-7C (TR) -5' -ACA CCG C
Ras-7A (TR) -5' -ACA ACG C

从微毛细管制造试验装置如同本说明书中上面描述的。寡聚体目标序列Ras-G或Ras-GA 被共价地合到微场所上。一个微场所然后与德克萨斯红标记的完全22-mer 补体Ras-22C-TR杂交。第二个微场所与Ras-22A-TR即一个带有一个碱基对错配 (G-A) 的22-mer ; 或Ras-22-TA 即带有二个碱基对错配 (G-A 和 G-T) 的22-mer 杂交。

如本说明书上面所述, 试验装置被同时地以双通道方式电泳即两个微场所同时经受相同的电流或电力水平。试验装置首先用传统方法杂交并且微场所被荧光检测以确定已经杂交的互补序列的数量。然后试验装置被用于进行电子杂交达一控制时间在恒定电流下直到错配的杂交子被移走而不有意义地影响完全配合的杂交子。Bio-Rad 1000 /500 电源装置被典型地调到0.02到0.1mA 而在恒流下电泳达0.02到0.04伏特一小时。装置被拆开并在配有硅增强的CAD照像机(Hamamatsu)的Jena显微镜下进行落射荧光观察。影像用Hamamatsu Argus 10影像处理机处理并用Sony影视打印机记录。当额外的电子控制是需要时毛细管被再次电泳。

单个碱基对错配的辨别如上所述用7-mers进行。然而, 鉴于它们较低的 T_m , 装置在4-6°C的冷盒中电泳而不是在室温下运行。

结果表明当用7-mers和22-mers时电子杂交和严格控制可以辨别单个碱基对错配配合: 错配的比例是100:1 或更大。这个信噪比一般是优于由任何使用温度和离子强度控制严格条件的杂交方法报告的结果。

电子严格控制能够从完全配合中区别一个碱基 G - A 错配，即使这 G - A 错配是最稳定的错配因为 G 的亚氨基质子能参与和 A 的氢键从而稳定双螺旋。

能量的消耗计算和测量表明仅产生极少量温度变化，这一点证明严格性不是由微场所的温度变化引起的。微场所是被动地杂交如上所述（不受到电子杂交）表明在配合和错配间无区别证明扩散不是引起区别的原因。

这些实例也证实每个微场所能有单个的严格控制，因此克服了大范围多重杂交技术其中被限制在单个共同的严格水平下所面临的主要障碍。这也是可能的即电子严格能量水平与温度解链（ T_m ）数据相互联系而产生预言的电子解链（ E_m ）曲线和方程式。

（9C）在高基因组背景下电子杂交

实例的目标DNA 序列通常仅占一个基因组DNA 样品总DNA 中非常小的一部分。通过在APEX装置一个非常小的场所上浓缩总DNA，本发明在存在有过量异源DNA 情况下提高目标杂交效率。

在本实例中，具有 5' - 氨基的结合序列被结合到含有 2.2% PAGE, 1% 琥珀酰亚胺丙烯酸酯的试验装置上。毛细管由 ET-23AL 或 ET-11AL 捕获序列衍生。目标探针 ET-12R 用德克萨斯红标记。ET-12R-TR 能分别地与试验序列 ET-23AL 而不是对照 ET-11AL 捕获序列杂交。

异源基因组DNA，小牛胸腺DNA（CT DNA, Sigma），被溶解在水中达终浓度为 1 mg/ml，超声和加热去变性DNA。样品在含有 10^{10} 拷贝数的 ET-12R-TR 目标和 0、0.1 μ g、或 1.0 μ g 变性的 CT DNA 的 $0.5 \times$ TBE 中制备终体积为 100 μ l。这代表着相对于目标DNA 0、1000

或10000倍过量的CT DNA。

试验装置预电泳5分钟在0.03 mA下0.5×TBE 中使用Bio-Rad 1000/500 电源装置。装置被以双通道方式电泳以便试验和对照毛细管能在同一时间准确的完全相同条件下电泳。加入样品(100 μl)毛细管被偏压成正电势而在0.03mA下吸引DNA 达5分钟。极性被反转并使用相同的电力从试验装置表面移走所有未杂交的ET-12R-TR 目标分子。缓冲液被吸掉, 试验装置用配有硅增强CAD 照像机的Jena显微镜(Hamamatsu) 进行落射荧光观察。影像用Hamamatsu Argus 10影像处理机处理并用Sony影视打印机记录。

在存在和缺少每100 μl 0.1 μg CT DNA时没有区别存在于直接杂交信号和信/噪比。信号强度是相同的信号是一致地分布在活性区域中。

在每100 μl 1 μg CT DNA 的水平, 信号大量地沿着毛细管周边分布, 提示捕获序列被封闭或被饱和。这种假象通过在杂交步骤中摆动极性容易被克服。这能脉冲总DNA 朝向和离开活性区域, 允许目标分子更加有效地和一致地杂交。

(9D) 与电子控制杂交相对的被动杂交

因为电子控制杂交的浓缩效应电子控制杂交是更有效和更快于被动杂交。

微毛细管试验装置由ET-23AL和ET-11AL结合序列构建分别作为试验和对照装置。含有 1×10^{10} 拷贝数ET-12R-TR 并有1 μg CT DNA 总体积为100 μl的杂交溶液制备的。

被动杂交:

一套试验和对照装置被在50℃放入一个含有100 μl杂交溶液的小试管中杂交15分钟。样品然后用 $1 \times$ SSC, 0.1% SDS 在45℃漂

洗 3 次，每次 5 分钟。

电子控制杂交：

试验装置被放好并在 0.06mA 预电泳 5 分钟。吸掉缓冲液加入 100 μ l 杂交溶液。试验装置在 0.06mA 被偏压成正达 3 分钟。极性然后被反转 30 秒，并再次反转以便使试验装置被再次偏压成正达另外 3 分钟。试验装置被偏压成负达 3 分钟进行电子漂洗。

杂交效率和程度用主动形式获得是有意义地好于用被动形式获得的。在主动（电子的）形式中的直接信号是超过 100 倍高于在被动形式中的信号。主动形式的信 / 噪比比被动形式的信号增加了 10 倍。主动杂交测定可在 10 分钟内需要极少的人工操作下完成。被动杂交形式需要约 30 分钟需要大量试管和缓冲液的人工操作。

传统的杂交方法使用 2.5nM 探针在 3 次 Cot，达 15 分钟，完成反应的 90%。在我们实验中使用浓度为 0.17nM 探针，被动杂交反应动力学正常下需要约 4 小时。

主动杂交使能够使用引起较低本底的较低的探针浓度。传统的方法取决于扩散因此必须使用较高探针浓度去推动反应动力学。主动的方法能够浓缩样品在一个非常小的体积内从而产生非常高的区域探针浓度及随后的非常快的杂交反应动力学。

实施例 10：用荧光的 DNA 纳米结构进行杂交

正常地，非扩增型杂交测试的总灵敏度是由非特异性结合产生的本底限制。当多倍的报告基团，或多倍报告基团带有第二种复合物，被用来标记 DNA 探针时这通常是一个主要问题。因此，在报告标记物实际的或固有的识别极限被达到之前测试的识别极限通常已达到。

使用电子控制杂交方法，我们已发现高度荧光的亚 - 微米或纳米

一范围的颗粒可与结合的DNA 探针一起被用于超一灵敏的测试。我们已经能够使用自由场电泳来控制DNA- 探针- 荧光纳米结构的运动。由于电子严格控制提供高水平的分辨力从未杂交结构中区别杂交，DNA 探针- 荧光纳米结构能有意义地提高杂交灵敏度。电子严格控制允许我们应用这些高度荧光纳米结构或其它多倍标记的方案解决低拷贝数（50到1000目标分子）识别，而无需 扩增。到如今，用传统的杂交方法和步骤这是不可能的。

荧光纳米颗粒，荧光球，可从分子探针Inc.获得。这颗粒是由附有荧光染料的例如德克萨斯红或荧光素羧甲基胶乳球组成。胶乳球能被获得而带有不同的功能基团在其表面，例如胺和醛。大小从0.01到5 μm 直径的颗粒是能获得的。

1) 荧光纳米颗粒的特性

纳米颗粒，未修饰的，胺基修饰的，或醛基修饰的，具有一个净正电荷。在电场中这些颗粒朝负电偏压的微场所移动。

2) DNA 结合到荧光球上的化学

胺基修饰过的颗粒能被结合到含有末端醛基的核酸上。这后者能通过带有本说明书前面介绍的高碘酸方法一系列氧化的3' -末端核苷的DNA 探针被产生出。

颗粒以2%悬浮在蒸馏水中贮存。一滴25到50 μl 的0.02-1.0 μm 胺修饰过的红色荧光的荧光球被离心沉淀并再悬浮在0.1M磷酸钠，pH 7.4中。过量的高碘酸氧化过的聚ribo-A被加入到悬浮液中。反应在室温下进行90分钟。颗粒在1 \times SSC，0.1% SDS（0.15mM NaCl，0.015mM 柠檬酸钠，0.1%（w/v）SDS，pH 7.0）中被漂洗并沉淀数次每人移走未结合和非特异性结合的聚ribo-A。

在缓冲液中的DNA-荧光球被放入一个直流电场中。被观察到DNA-荧光球朝正电极移动，表明它们的净电荷现在是负。这是确定DNA结合反应是否成功的一个简单和方便的方法。传统的杂交方法需要使用放射性同位素标记报告探针因为颗粒的强荧光能遮掩任何杂交信号。

3) DNA 结合到试验装置上

试验装置用含有1%琥珀酰亚胺丙烯酸酯的高度交联的聚丙烯酰胺进行聚合，琥珀酰亚胺丙烯酸酯随后能与5'-氨基末端的DNA探针起反应。结合捕获序列，寡聚体T，是通过与荧光标记的互补探针CP-1-TR杂交而证实的。试验装置表面是高度荧光的，表明该表面已被捕获序列衍生了。

4) 电子杂交和DNA-荧光球的识别

杂交反应的实施是在一种能安装2个微毛细管试验装置并共用一个上贮槽和独立的下贮槽的结构中进行。反应表面被暴露在共同的上贮槽中。

试验装置被安放在这结构中并预电泳15分钟在 $0.5 \times$ TBE和0.05mA下。一个试验装置有T₂互补结合序列，而另一个具有ET-10AL非互补结合序列。1 μ l DNA-荧光球被加入到上贮槽中。试验装置在0.02mA被偏压成正达5分钟，以吸引DNA-荧光球（荧光纳米颗粒）。试验装置被检查以确定颗粒在表面上。极性被反转以便试验装置现被偏压成负和未杂交的DNA-荧光球必须被排斥。

在试验和对照装置间没有区别。经反复试尝颗粒能够被移走而不管使用的电量。

5) 被动杂交和DNA-荧光球的识别

未被任何理论或假设限制，我们相信颗粒的电子杂交物理地在试

验装置凝胶基质的表面埋置或抓住颗粒。因此被动地杂交到凝胶表面的结合序列上的DNA-荧光球须非常容易地由电子去-杂交移走。

新的试验装置同上述一样被安装。0.05%的DNA-荧光球悬浮液被加入到上贮槽中并被动地杂交5分钟。吸掉缓冲液加入新鲜的 $1 \times$ TBE缓冲液。试验装置现在被偏压成负去排斥颗粒。试验装置在0.02mA操作5分钟，然后用荧光法检查。

在进行室温下ECS 10分钟后在试验和对照装置间现在有一个有意义的区别。信号不是一致地分布在试验表面，而是浓缩在信号袋中。这暗示表面结合序列的可用性是有限的。使用较长的具有疏水、亲水，或混合特性的空间臂可使杂交有改进。这种空间臂例如可用己二胺、琥珀酰，和本领域中熟知的各种其它空间基团来构建。

实例 1 1：特异的ds-DNA 序列的电子引导的限制性酶切

两个实例被用来证实APEX装置选择性地对ds-DNA 序列限制性内切酶切的能力。M13mp18（具有一个Xba I限制性位点）和M13mp8（不具有Xba I限制性位点）载体被用于这些实例中。这些载体常被用于多个克隆DNA 序列分析程序中。

第一个实例证实：（1）电子杂交M13mp 序列到试验装置的特异微场所上，（2）自由场电泳式转移Xba I 限制性酶到微场所上，和（3）在另一微场所上捕获已切割的片段。这实例也证实装置用特异结合实体（寡聚核苷酸捕获序列，等）自我组装自身能力。

这过程中的基本步骤图解在图（16）共价地结合寡聚核苷酸捕获序列的四个特异的微场所（ML-1、ML-2、ML-3和ML-4）被用在这过程中。电子输送系统被用于输送试剂（寡聚核苷酸，限制性酶等等）和处理反应物。

第一步包括转移和共价结合M13-1寡聚核苷酸捕获序列到ML-1和ML-2微场所上,以及转移和结合M13-2寡聚核苷酸捕获序列到ML-3和ML-4微场所上。由于核酸在pH>4时是带负电的,在pH5-9的缓冲液中电泳时它们总是朝带正电的电极处移动。

第二步包括在ML-1微场所上自由场电泳式转移和杂交M13mp18序列到M13-1捕获序列,和在ML-2微场所上M13mp8序列到M13-1序列。

第三步包括转移Xba I限制性酶到ML-1(M13mp18)微场所和ML-2(M13mp8)微场所上。Xba I切割ML-1上的M13mp18,而不切割ML-2上的M13mp8。被切割的片段从ML-1上被转移和杂交到ML-3上的M13-2序列上。作为实验对照,在ML-2和ML-4之间也进行自由场电泳。由于ML-2上的M13mp8序列未被酶切,在ML-4上无片段被识别到。

应用在这实施例中的各种M13结合和探针序列如本说明书上面所述一样被制备。这些序列如下所示:

M13-C1	5'-CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG U
M13-C2	5'-GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT TCC TGT GTG U
MP18-40C	5'-GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG- GGT ACC G
MP8-40C	5'-TGC CAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC GGA TCC- CCG GGA ATT C
MP18-R1	(TR)-5'-AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TGC
MP8-R2	(F)-5'-ACA CAA CAT ACG AGC CGG AAG CAT

步骤 1 结合 M13 捕获序列

一台 APEX 试验装置带有氨基活化的高度交联的 (26%) 聚丙烯酰胺表面或聚碳酸酯 (5-10 nm) 多孔膜表面的 200 μm 微场所被用在这步骤中。

M13-C1 捕获序列是含有 3' - 核糖核苷酸的 31-mer 的 DNA 寡聚核苷酸。M13-C1 序列是与 M13mp18 和 M13mp8 单链 (+) 载体 3' - 末端互补的。M13-C1 捕获序列被设计成能杂交和牢固地结合所有未切割的 M13 载体。

M13-C2 序列是一个含有 3' - 核糖核苷酸的 31-mer 寡聚核苷酸。M13-C2 是与 M13 序列中含有 Xba I 限制性位点的克隆区域的上游部分互补。M13-C2 捕获序列被设计成能杂交和牢固地结合 Xba I 切割的 M13 片段。

M13-C1 和 M13-C2 捕获序列用 paraded 氧化而活化以便结合到 APEX 微场所的氨基衍生物上。3' - 核糖核苷酸末端通过 paraded 氧化而转化成末端二醛它能与伯胺基团反应形成席夫碱。

反应条件如下：

溶解 10-20 O.D. 的 M13-C1 或 M13-C2 寡聚体在水中达终浓度为 1 OD/ μl 。加入 1 体积 0.1 M 醋酸钠, pH 5.2 和 1 体积 0.45 M Sodium paraded (水中新鲜配制)。搅拌保持反应在周围温度黑暗下达至少 2 小时。把反应混合物加样到平衡在 0.1M 磷酸钠, pH 7.4 中的 Sephadex G-10 柱 (巴氏吸管 0.6 \times 5.5cm) 上。收集 200 μl 级分, 点样 2 μl 在薄层层析 (TLC) 上并收集紫外 (UV) 吸收级分。

四个 APEX 试验装置的顶端表面被称为可寻址的微场所 ML-1、ML-2、ML-3 和 ML-4。

M13-C1 被共价地结合到ML-1和ML-2微场所上通过如下的步骤：

用0.1M磷酸钠，pH 7.4缓冲液充满上下贮槽并在0.05mA恒电流下预电泳5分钟，使用Bio-Rad 500/1000电源。含有约0.1 O.D.单位的paraded 氧化过的M13-C1 寡聚核苷酸的电子输送系统顶端被放入低贮槽。电子输送系统是一个内部带有一个铂电极的特殊地修饰过的塑料吸管头。电子输送系统在0.1 mA下被偏压为负（-）而微场所ML-1和ML-2被偏压成正（+）。M13C-1 在恒流下被电泳到ML-1和ML-2达2分钟，在那儿它共价地结合到表面。极性被反转，达约4分钟，使得未反应的M13C-1从ML-1和ML-2微场所上移走。

M13C-2序列是按上面描述的相同步骤结合到ML-3和ML-4微场所上。

步骤2 - 杂交M13载体，互补序列，和荧光报告探针

由于限制性内切核酸酶需要双链DNA用于切割，位于单链M13mp18（从6240到6280）和M13mp8（从6230到6270）上的克隆/限制性位点区域必须与互补DNA序列杂交。电子杂交被用于分别地杂交一个40-mer 互补片段（MP18-40C序列）到ML-1/M13C-1微场所上的M13mp18载体上；以及杂交一个40-mer 互补片段（MP8-40C序列）到ML-2/M13C-1微场所上的M13mp8载体上。

电子杂交进行通过负地偏压含有0.05 O.D. 单位的M13mp18的电子输送系统，和正地偏压ML-1/MP13C-1微场所在0.1 mA达2分钟。极性被反转达4分钟未杂交的M13mp18从微场所上被移走。同样的过程被用于电子杂交M13mp8载体到ML-1/M13C-1微场所上。

M13mp18和M13mp8序列然后与二种不同的荧光报告探针电子杂交。

在ML-1 / M13C-1 微场所上的M13mp18 载体与一个24-mer 德克萨斯红标记的报告探针 (MP18-R1序列) 电子杂交, 该探针能杂交到克隆/限制性位点的5' - 末端。M13mp8载体与一个24-mer 荧光素标记的报告探针 (MP8-R2 序列) 电子杂交, 该探针能杂交到克隆/限制性位点的5' - 末端。

步骤3 - 应用Xba I 限制性酶限制性酶切M13mp18载体

取决于它们的等电点 (pI), 多个蛋白和酶在pH 5 - 9 范围中能带负电荷 (pH > pI), 中性 (pH = pI), 或带正电荷 (pH < pI)。大量限制性内切核酶酶的pI在6 ~ 7 范围内。在pH大于pI时, 这些酶将携带一个净负电荷。因此, 当自由场电泳在缓冲液pH > 7 中进行时, 这些酶将朝带正电荷的微场所移动。

在多个DNA 修饰酶的情况下, 类似限制性内切核酶酶, 总希望选择一种缓冲溶液它能提供一种pH能平衡最适酶活力和相对快的电泳迁移。在一些情况下在pI上面和下面时都具有适当的酶活性是可能的。取决于选择的pH, 这些酶能朝正地或负地偏压的微场所移动。

在ML-1 上Xba I 酶切M13mp18 载体按如下进行。

Xba I 内切核酶酶应用电子输送系统首先被自由场电泳到ML-1 / M13mp18 微场所上。含有100 单位Xba I pH 7.6缓冲液电子输送系统被偏压成负而ML-1 / M13mp18 微场所被偏压成正在0.1 mA达2 分钟。电流然后被减少到0.02mA达3 分钟。电子输送系统去掉电源, 而ML-1 / M13mp18 微场所被偏压成负以及ML-3 / M13C-2 微场所被偏压成正在0.1 mA达5 分钟。ML-3 / M13C-2 微场所现在被偏压成负而电子输送系统接上电源并被偏压成正在0.1 mA达2 分钟以便从ML-3 / M13C-2 微场所上移走Xba I 和未杂交的片段。

落射荧光显微镜观察表明ML-1 / M13mp18 微场所上的红色荧光信号消失而在ML-3 / M13C-2 微场所上出现红色荧光信号，这证明Xba I 酶切了M13mp18 载体。相同的基本Xba I 切割过程被重复用在ML-2 / M13mp8微场所上，这作为一个阴性对照。由于M13mp8载体上没有Xba I 位点，酶切和产生片段是不可能的。因此ML-2 / M13mp18 微场所上保持它的绿色荧光信号，而在ML-4 / M13C-2 微场所上观察不到荧光信号。

第二个实例包括应用被共价地结合在装置上可寻址微场所上的限制性酶进行限制性酶切反应。这种情况，限制性内切核酸酶被衍生并被自由场电泳到APEX装置的可寻址微场所上在那儿它们共价地结合。用于衍生和共价结合限制性酶到固体支持物上的方法是本领域的技术人员熟知的。各种不同的限制性酶能被寻址到APEX装置上。特异的酶切反应可通过使用自由场电泳来浓缩ds-DNA 载体或DNA 样品到已含有所需限制性内切核酸酶的微场所上而被进行。ds-DNA 被酶切而片段然后被移到装置的其它微场所上。当所需或有用时其它DNA 修饰酶能被结合到APEX装置的可寻址微场所上。而且，不应认为本实施例限制于DNA 修饰酶，因为大多数其它酶能被结合到APEX装置的可寻址微场所上。

实例 1 2 : 电子扩增方法

在用非常低目标序列拷贝数（如，HIV，腐败性的血液侵染，等）进行杂交分析的情况下，倍增或扩增目标DNA 序列能通过直接在APEX装置上扩增纯化的目标DNA 和 / 或RNA 使得灵敏度提高。扩增也能降低对在杂交分析前极高产率制备步骤的需求。

APEX扩增步骤提供完全电子控制的DNA 移动，变性、和合成反应。

最重要的是，DNA 杂交子被电子地变性而不需要应用高温或无需耐热聚合酶或其它热稳定性酶。

作为第一个实例，DNA 合成能用DNA 聚合酶（Klenow大片段）非常精确地获得而不需要加热循环。在这实例中，一条DNA 链以让其共价结合到一个微场所上的方式被扩增。过程按如下进行：1）所知的目标序列被电子杂交到被寻址的微场所上一个已知序列的捕获探针上，2）通过DNA 聚合酶和捕获探针作引物进行合成初生的互补链DNA(-)，3）新合成的DNA 杂交子被电子变性，4）进行目标链DNA 到未—伸长的捕获探针的退火和负链互补探针到初生的负链DNA 的退火，5）通过DNA 聚合酶进行合成初生的目标链DNA (+) 并伴随进行同2)一样的合成负链DNA，因此每次加倍正和负的数目这些步骤重复进行，和6）通过杂交到特异地设计的互补探针上来进行被扩增目标的大小选择。完整的步骤。图解在图17，并详细描述如下：

步骤1）结合目标序列到捕获探针上

目标序列被电泳地转移到含有共价地结合的捕获探针的微场所上（1）。目标序列能在非目标（基因组的）序列的背景中出现但在退火到捕获探针前必须被变性。被开始地捕获的目标序列可为各种长度。

步骤2）合成对目标互补的DNA

DNA 聚合酶和dNTP's被电泳地转移到微场所1上。捕获探针为DNA 聚合酶提供3'—末端而被捕获的目标序列提供模板。足够保持能够合成所需试剂浓度的电流被应用。电流可以是恒流或脉冲式的。这些参数能被操作去获得不同范围长度的初生互补（-）链。

步骤3）电子变性新合成的链

微场所1的极性被反转并加电压以分离两条链。电压量和使用的

时间将取决于杂交DNA复合物的长度和碱基组成。这些参数可从电子变性曲线中经验地或计算而确定。

步骤4) 引物(捕获和互补探针)到DNA链上的退火

寡聚体需要被退火到+和-DNA链上以提供DNA聚合酶的引物位点。对目标或+链这是通过电泳转移+链到未-延长的捕获探针上完成的。只要未-延长的捕获探针是比已延长的,共价地结合-链DNA过量这将要发生。现在+和-链都有引物结合着而作为DNA聚合酶催化合成的模板(见图)。结合互补探针也可与非共价结合的-链DNA发生,然而这些杂交子将不被电子变性因此对总的扩增不产生影响。

步骤5) 合成DNA的两条新链

重复步骤2并由于+和-链是被引物结合的模板,序列特异DNA的量加倍。这些步骤每重复一次DNA量这种几何级数的增加将发生。

步骤6) 扩增的目标序列的大小选择

互补探针的核苷酸序列将决定被扩增目标DNA的大小和序列。因此,被扩增DNA能通常被设计成增加随后分析和/或操作的效率。

其它酶能被用于本发明的扩增方法中,包括,但不局限于,其它DNA聚合酶, T_7 或SP6 RNA聚合酶,反向转录酶, DNA连接酶,和聚核苷酸磷酸化酶,和组合使用其它核酸修饰酶(内切酶,外切酶,等)。

实例13: 电子控制器和数据系统

所有装置,是APEX芯片还是微机械装置,将是可寻址矩阵的微场所(或大场所)的同类,计算机控制/数据采集系统已被设计出提供独立地应用电子势能到矩阵上任何垫上并测定在微场所-电解系统中流动的结果电流。计算机控制/数据采集联系的方法提供:

a) 代表微场所的矩阵。高水平和低水平的描述提供所有微场所的全景，提供了在最高水平解决微场所的障碍，和在低水平微场所的完全解决的障碍。

b) 一个微场所的成功将跃出微场所的窗式显示详细描述微场所的特性，允许各种形态的用时间序列信号建立微场所的控制、电势强度和符号，等，显示控制序列覆盖其它微场所的等。这系统出提供显示数据和信号收集着为带有统计和数据比较的微场所形成其它微场所。菜单为控制设计、观察的实际控制信号和数据收集提供分析、文献编辑和档案作用。

c) 软件提供整个开关和数据收集通过硬件交界由从描述在 b) 中的矩阵控制软件的输入来控制。

d) 一个分离的硬件和软件系统提供影像收集和处理能力。这系统成像微场所矩阵和记录在活性的微场所从DNA 结合之间反应的荧光信号以提供DNA 结合实验结果的记录。成像处理软件提供定量处理这些图像和提取定量测定结果的能力。这个软件是完全与矩阵控制器 / 数据收集软件有联系以便提供一个组合系统它能记录从成像数据来的所有APEX装置控制 / 电解电流数据和测定结果，分析这些数据以便为伴随关于这些结果的一致性和可靠性辅助信息的测定，和获得所有数据和分析提供经归纳的结果。

e) 一个APEX控制器将组合所有这软件加上一个顶端层它提供仅仅“测定”和“结果”显示，加上一个按键如果需要的话通过 c) 接道 a)，但通过 c) 到 a) 将被收集并在所有情况下被获得。

f) 用于发展项目的控制器初版应用Macintosh Quadra 950作为宿主计算机并用National Instruments boards 与 Quadra 950

联用以便提供上述的硬件联系器。这些面版应用可变的电势到APEX微一场所上并测定在电解系统中流动的结果电流。用在这控制器上的国家仪器面版 (National Instruments boards) 是高分辨力多功能 I/O 面版, NB-MIO-16XL-18, 模拟输出面版, NB-AO-6, 同步输入/输出面版, NB-TIO-10, 阻闭式DMA和GPIB联系面版, NB-DMA-2800, 和模拟信号调节组件面版和热电偶组件, 和其它环境传感器, 5B系列, 在Qudra 中的NuBus面版和APEX 装置间的连接部分将是安装在SCXI-1001机壳中的整个SCXI 16-通道SPDT 继电器元件面版。

实例 1 4 : 电子控制的样品制备和杂交分析——一个组合的APEX系统

样品制备一般地包括选择细胞, 细胞材料的破碎 (如, 裂解) 以及一系列的制备步骤和亲和反应。样品制备对分子生物学反应是重要的。例如, 杂交分析常常被限制是因为在样品制备过程中的无效率而损失足够量的实际目标DNA 序列。

用于电子控制的基本APEX概念能在DNA 杂交测定中用于样品制备。电子方法将允许样品制备, 细胞选择和分析在APEX元件的一个主动电子系统上进行。样品制备开始于细胞筛选和裂解, 并从样品的细胞和体外的材料中粗的分离DNA。电子装置能电子地处理样品DNA并有效地转移它到装置的分析元件上, 同时移走其它材料。这系统为有效的处理目标DNA 提供合适的测量因子。对人类基因组分析, 电子样品制备能包括一个高效的预杂交步骤通过此步骤大部分复杂的非特异性DNA 能与目标DNA 分离开。

一台带有样品制备的组合装置或完全的APEX装置能取得相对粗糙的样品 (血液, 唾液, 尿液等), 并用最少的机械操作和射流来处理

它，然后电子地输送目标DNA到装置的分析元件上。这“主动的电子处理”不同于自动化或机械化处理，它们通常是人工处理和技术的机械化翻版。

一个为DNA样品制备和分析的组合APEX系统能用多个全基于一般APEX概念的元件制造。这个系统的元件包括（1）一个电子细胞筛选单元；（2）一个电子试剂分配单元；（3）一个电子废物处理单元；（4）一个粗DNA筛选单元；（5）一个第二DNA或限制性片段筛选单元；（6）一个DNA片段贮存单元；和（7）APEX分析单元（芯片）。这组合的APEX系统被图解在图18。

这种系统能在一个大硅片上制造。此外，单个元件能通过微平版印刷或微加工技术制造并被安排在（如，插入）一个特殊设计平板单元上。完全系统的元件被设计成它们活性的区域的大小取决于相关样品中的材料量和大小（例如，细胞）。例如，细胞筛选器的活性部位一般地应大于粗DNA筛选器活性区域，它依次应大于限制性片段筛选器活性区域，它应该是大于APEX分析芯片活性区域。

在实例中，细胞筛选器“活性区域”能是数平方厘米，而一个64微场所APEX分析元件的总“活性区域”能是少于一平方毫米，平板单元被设计成在一个密封的共同缓冲液贮槽中支持所有的元件单元。多至数百微升的合适样品通过靠近细胞筛选器元件的加样口被加入到系统中。细胞筛选元件是一种较大规模的APEX装置它能对不同细胞类型具有一个或多个经筛选的亲合性。这些亲合性筛选能基于细胞表面电荷，半抗原，和抗原被建立。

作为实例，对全血样品的亲合性选择能被用于筛选从红血细胞中白血细胞（白血球，等）。高选择性的过程能用于从材料血液样品中

选择胎儿细胞。这也可能去提供传染性微生物（酵母，真菌，细菌，和病毒）的亲亲和性和选择。当被选择的细胞保持结合在细胞筛选器元件上时；所有其它细胞和蛋白质的材料被转移到废料处理单元上。在这点上细胞能被裂解通过自由场电泳式转移带电去污剂，和/或离液剂，和/或合适的裂解酶和蛋白酶（溶菌酶，蛋白酶K，胃蛋白酶，等）从电子试剂分配单元到细胞筛选器单元上的细胞上。合适的偏压电子废物处理系统能被用于移走一定的裂解废物材料。正地偏压粗DNA筛选器单元现在能被用来转移粗核酸（DNA/RNA）材料到这元件上。

粗DNA筛选器是一种具有一般DNA亲和力的APEX装置。这种亲和力能是一种带正电的表面，或者含有一个共同的或重复的DNA序列的表面。例如，Alu重复捕获序列能有效地捕获从人类细胞提取的粗DNA。当传染性疾病分析是工作对象时一个普通的或一般的细菌或病毒序列能被使用。除了从DNA中移走体外的材料以外；APEX系统也被设计成去降低样品DNA的复杂度。这能被获得通过使用限制性酶去选择性地切割DNA在粗DNA选择器单元上。限制性酶从试剂分配器单元上被转移。被切割的限制性片段通过偏压为正现在能被转移到第二个DNA或限制性片段选择器单元上。这个单元被设计成选择性地结合DNA大片段，使用其表面的合适捕获序列。

在这点上，被选择的DNA片段能被转移到APEX分析芯片以进行杂交分析。这也可能转移DNA片段到贮存单元或甚至该系统以外。上面的实施例仅代表样品制备和成倍杂交分析一些可能的方案。元件的结合亲和性编程能力和组合不同元件的可变性及功能允许进行大量过程。

当DNA被用作初始实例时，上述的装置和方法也能用于处理和分

析目标DNA 分子，蛋白质，多糖，脂类和其它大分子。

所有参考文献在此引入作为参考，包括在每篇文献记录的核酸序列和氨基酸序列。

其它实施方案在下面的权利要求书中。

序列目录

(1) 一般信息 :

(i) 申请人: Michael J. Heller

Eugene Tu

Glen A. Evans

Ronald G. Sosnowski

(ii) 发明题目: 为分子生物学分析和诊断的自我一寻址 自我
— 组装的微电子系统和装置

(iii) 序列数目: 45

(iv) 联系地址:

(A) 收信人: Lyon & Lyon

(B) 街道: 611 West Sixth Street

(C) 城市: Los Angeles

(D) 州名: 加利福尼亚

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 90017

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒介类型: 3.5" 磁盘, 1.44 Mb 内存

(B) 计算机: IBM 兼容机

(C) 操作系统: IBM P. C. DOS (5.0 版)

(D) 软件: Wordperfect (5.1 版)

(vi) 现行申请数据:

(A) 申请号: 08/271,882

(B) 归档日期: July 7, 1994

(C) 分类：

(vii) 在先申请数据：

(A) 申请号： 08/146,504

(B) 归档日期： Nov.1, 1993

(viii) 律师/代理人信息：

(A) 姓名： Murphy, David B.

(B) 登记号： 31,125

(C) 文献/摘要号： 207/263

(ix) 电信信息：

(A) 电话： (213) 489-1600

(B) 传真： (213) 955-0440

(C) 电传： 67-3510

(2) SEQ ID NO: 1 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 24

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO: 1：

GCT ACG CCC TGC TCA TGA GTC TCU

24

(2) SEQ ID NO: 2 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 21

(B) 类型： 核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 2：

AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAU

21

(2) 关于SEQ ID NO： 3 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：34

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 3：

CTA CGT GGA CCT GGA GAG GAA GGA GAC TGC CTG U

34

(2) 关于SEQ ID NO： 4 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 4：

GAG TTC AGC AAA TTT GGA GU

20

(2) 关于SEQ ID NO： 5 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 5：

CGT AGA ACT CCT CAT CTC CU

20

(2) 关于SEQ ID NO： 6 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：18

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 6：

GTC TCC TTC CTC TCC AGU

18

(2) 关于SEQ ID NO： 7 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 7：

GAT GAG CAG TTC TAC GTG GU

20

(2) 关于SEQ ID NO： 8 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：18

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 8：

CTG GAG AAG AAG GAG ACU

18

(2) 关于SEQ ID NO： 9 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 9：

TTC CAC AGA CTT AGA TTT GAC U

22

(2) 关于SEQ ID NO： 10 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO： 10：

TTC CGC AGA TTT AGA AGA TU

20

(2) 关于SEQ ID NO： 11 的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：11：

TGT TTG CCT GTT CTC AGA CU

20

(2) 关于SEQ ID NO：12的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：12：

CAG CGC TGT GAC AAA ACA TU

20

(2) 关于SEQ ID NO：13的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：20

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：13：

TGC GAG CTG CAG TCA GAC AT

20

(2) 关于SEQ ID NO：14的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：18

(B) 类型：核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 14：

GAG AGA CTC ATG AGC AGG

18

(2) 关于SEQ ID NO： 15的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 18

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 15：

CCT CGT CAT GAG TCT CTC

18

(2) 关于SEQ ID NO： 16的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 19

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 16：

TTT TTT TTT TTT TTT TTT T

19

(2) 关于SEQ ID NO： 17的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 33

(B) 类型： 核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：17：

CAG GCA GTC TCC TTC CTC TCC AGG TCC ACG TAG

33

(2) 关于SEQ ID NO：18的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：19

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：18：

CTC CAA ATT TGC TGA ACT C

19

(2) 关于SEQ ID NO：20的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：19

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：20：

GGA GAT GAG GAG TTC TAC G

19

(2) 关于SEQ ID NO：21的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：17

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：21：

CTG GAG AGG AAG GAG AC

17

(2) 关于SEQ ID NO：22的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：19

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：22：

CCA CGT AGA ACT GCT CAT C

19

(2) 关于SEQ ID NO：23的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：17

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：23：

GTC TCC TTC TTC TCC AG

17

(2) 关于SEQ ID NO：24的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：21

(B) 类型：核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 24：

GTC AAA TCT AAG TCT GTG GAA

21

(2) 关于SEQ ID NO： 25的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 19

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 25：

ATC TTC TAA ATC TGC GGA A

19

(2) 关于SEQ ID NO： 26的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 19

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 26：

GTC TGA GAA CAG GCA AAC A

19

(2) 关于SEQ ID NO： 27的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 19

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 27：

ATG TTT TGT CAC AGC GAT G

19

(2) 关于SEQ ID NO： 28的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 30

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 28：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU

30

(2) 关于SEQ ID NO： 29的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 30

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 29：

GGT GGT GGG CGC CGT CGG TGT GGG CAA GAU

30

(2) 关于SEQ ID NO： 30的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 15

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 30：

CC GCG GCC GCC ACA C

15

(2) 关于SEQ ID NO： 31的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 15

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 31：

CC GCG GCA GCC ACA C

15

(2) 关于SEQ ID NO： 32的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 15

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 32：

CC TGT GCA GCC ACA C

15

(2) 关于SEQ ID NO： 33的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 30

(B) 类型： 核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：33：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GAU

30

(2) 关于SEQ ID NO：34的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：29

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：34：

GGT GGT GGG CGC CGG CGG TGT GGG CAA GA

29

(2) 关于SEQ ID NO：35的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：35：

TGC CCA CAC CGC CGG CGC CCA C

22

(2) 关于SEQ ID NO：36的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：22

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO: 36:

TGC CCA CAC CGA CGG CGC CCA C

22

(2) 关于SEQ ID NO: 37的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：?

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO: 37:

TGC CCA CAC CAC CGA CGG TGC CCA C

22

(2) 关于SEQ ID NO: 38的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：7

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO: 38:

ACA CCG C

7

(2) 关于SEQ ID NO: 39的信息:

(i) 序列特征:

(A) 长度：7

(B) 类型：核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 39：

ACA ACG C

7

(2) 关于SEQ ID NO： 40的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 31

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 40：

CCA GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG U

31

(2) 关于SEQ ID NO： 41的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 31

(B) 类型： 核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO： 41：

GTA ATC ATG GTC ATA CGT GTT TCC TGT GTG U

31

(2) 关于SEQ ID NO： 42的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度： 40

(B) 类型： 核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：42：

GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT ACC G 40

(2) 关于SEQ ID NO：43的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：40

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：43：

TGC CAA GCT TGG CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCT GGA ATT C 40

(2) 关于SEQ ID NO：44的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：24

(B) 类型：核酸

(C) 链型：单链

(D) 拓扑学：线形

(ii) 序列描述：SEQ ID NO：44：

AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TGC 24

(2) 关于SEQ ID NO：45的信息：

(i) 序列特征：

(A) 长度：24

(B) 类型：核酸

(C) 链型： 单链

(D) 拓扑学： 线形

(ii) 序列描述： SEQ ID NO: 45:

ACA CAA CAT ACG AGC AGC CGG AAG CAT

24

图1

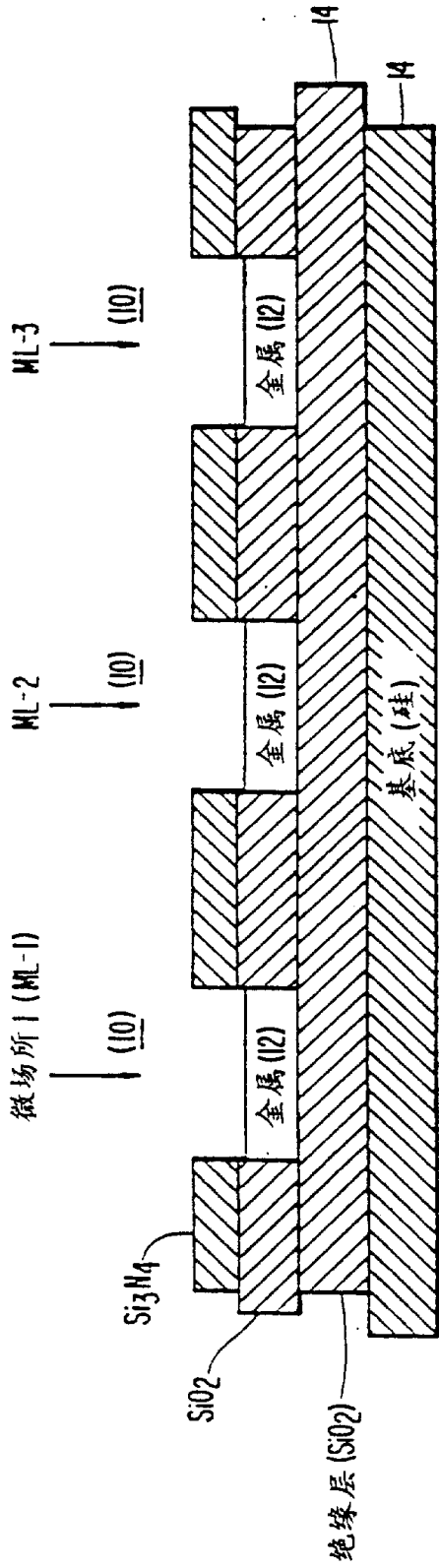


图2

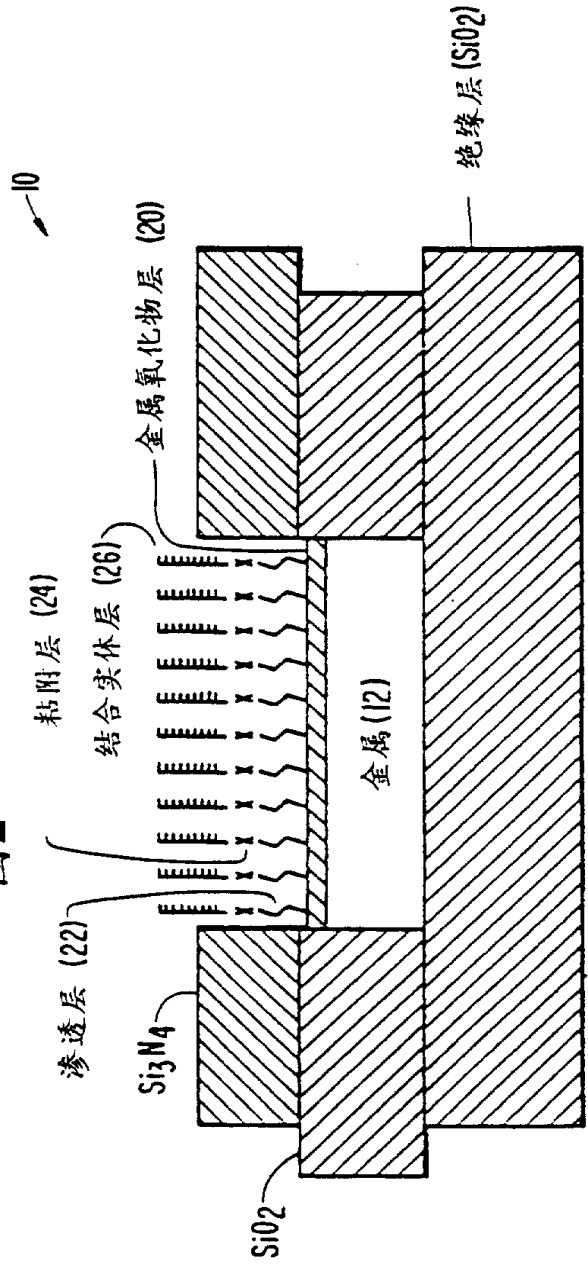


图3

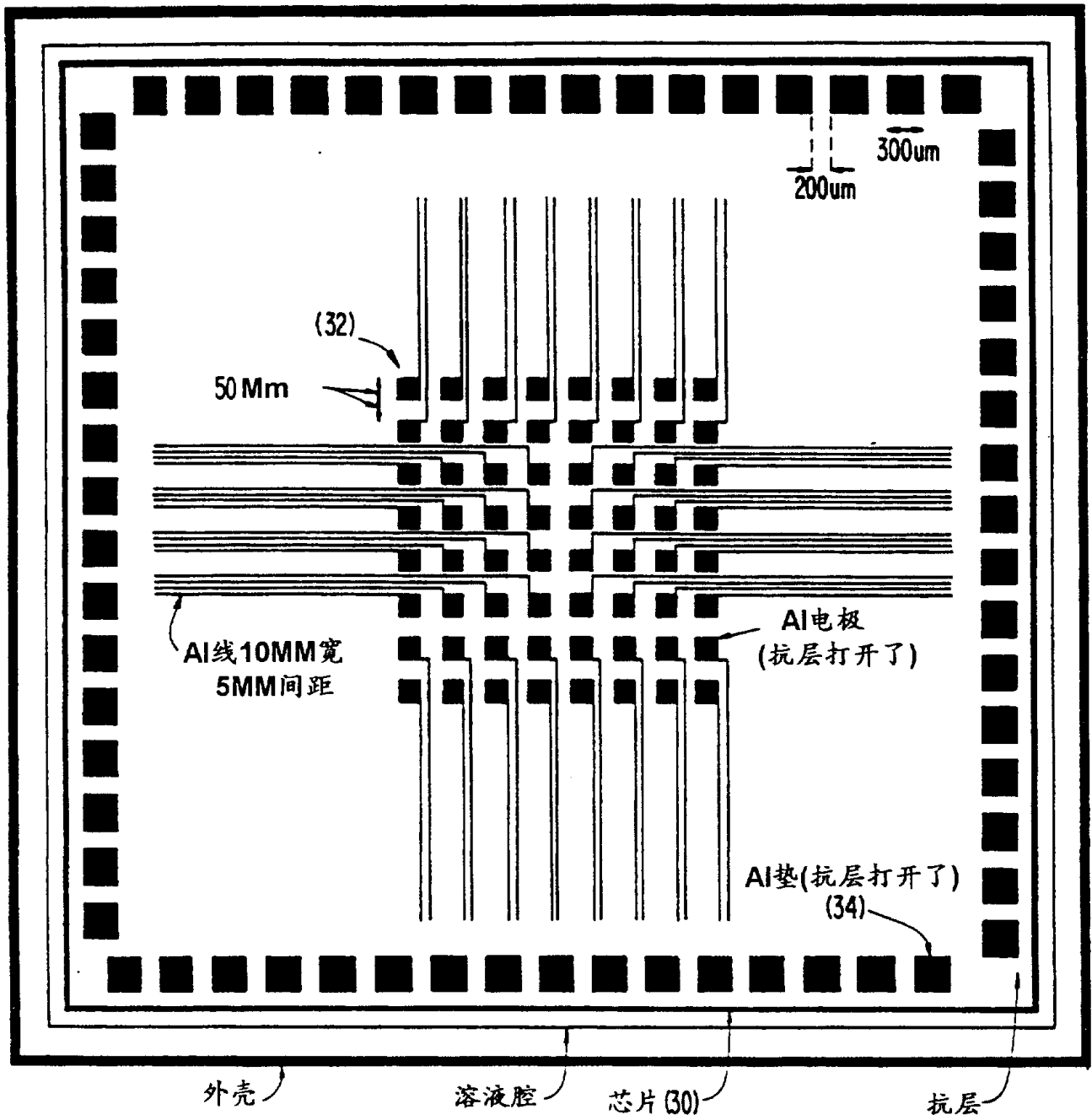
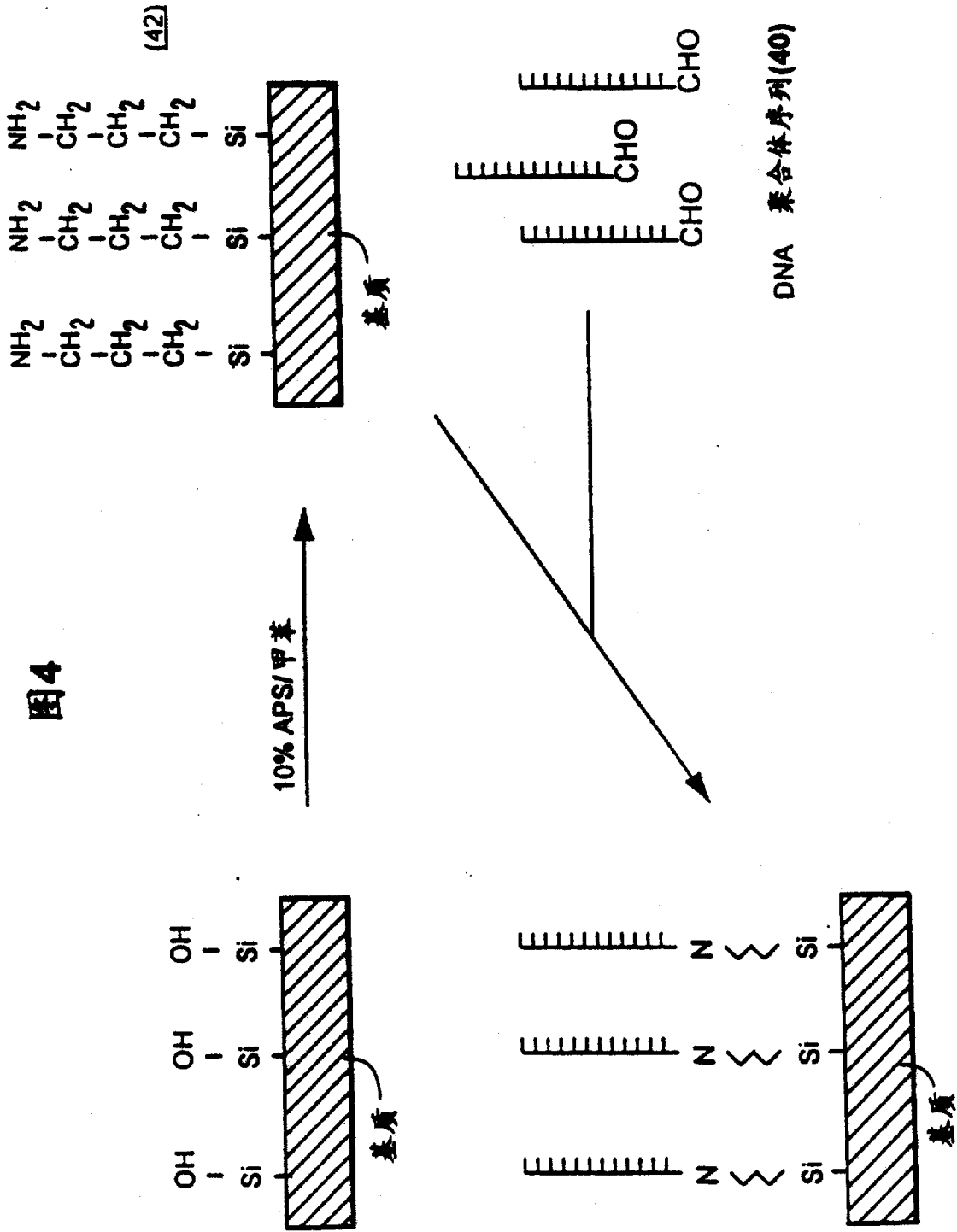


图4



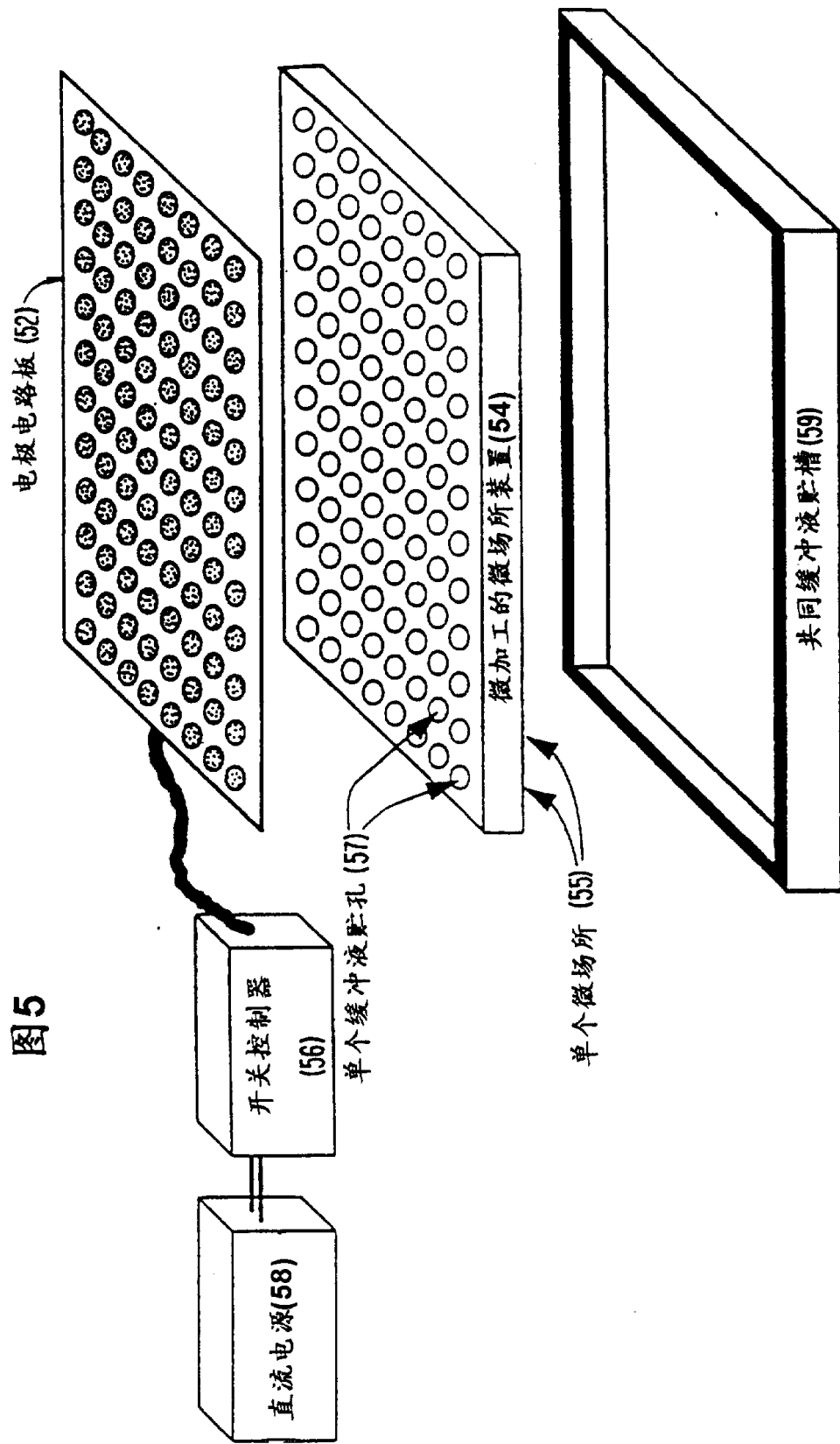


图6

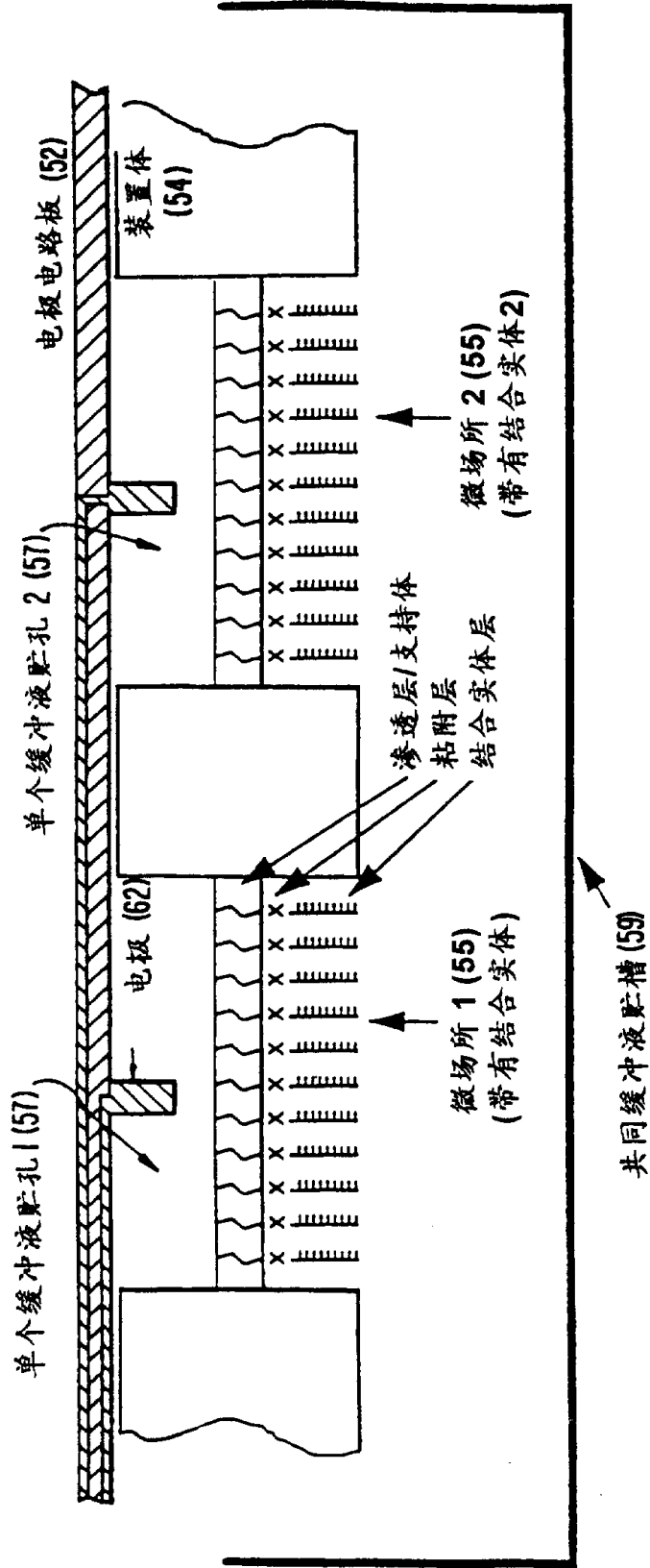


图7a

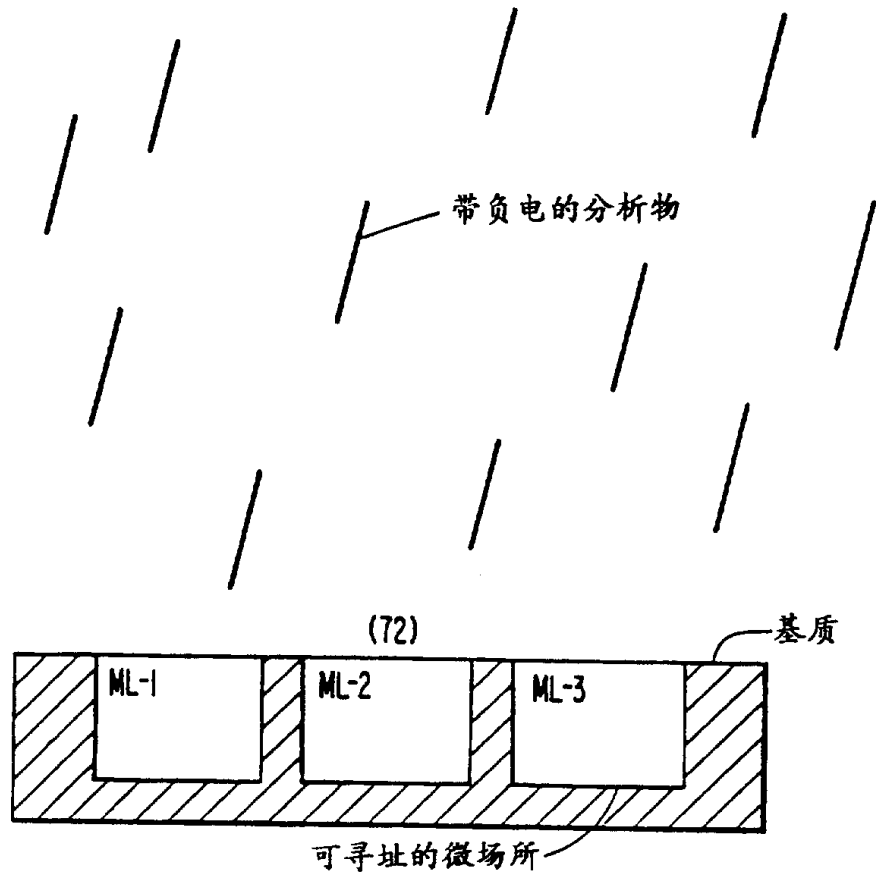


图7b

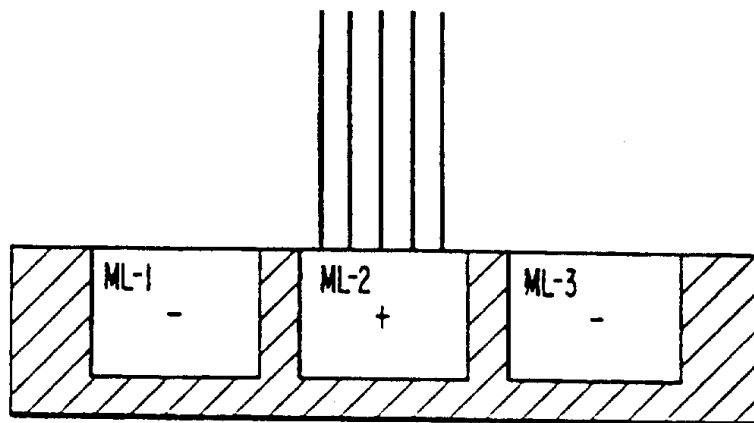


图8a

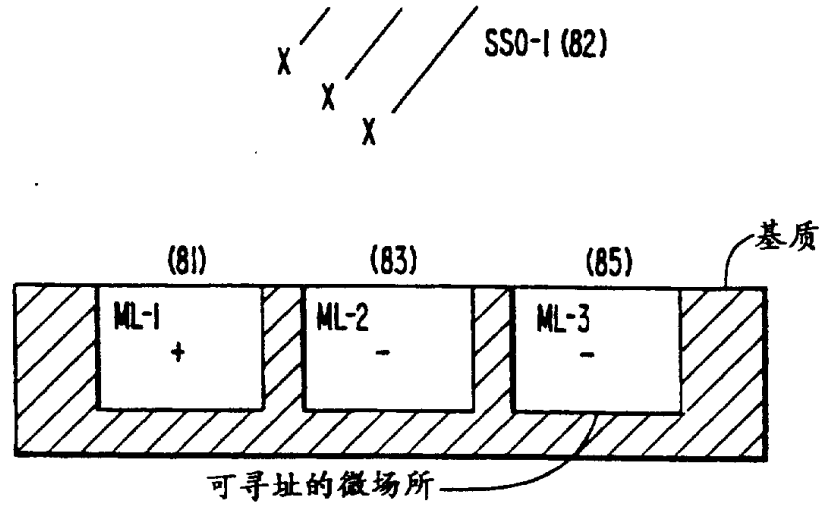


图8b

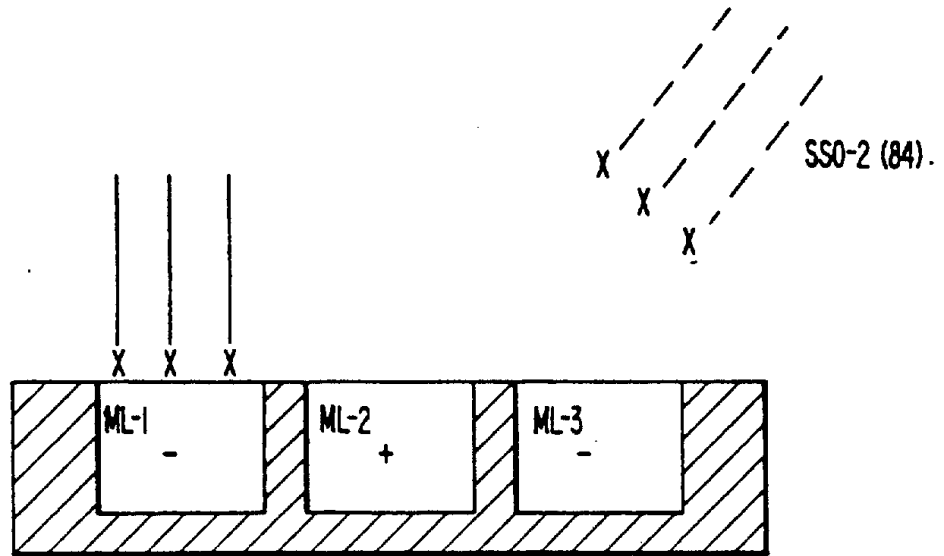


图8c

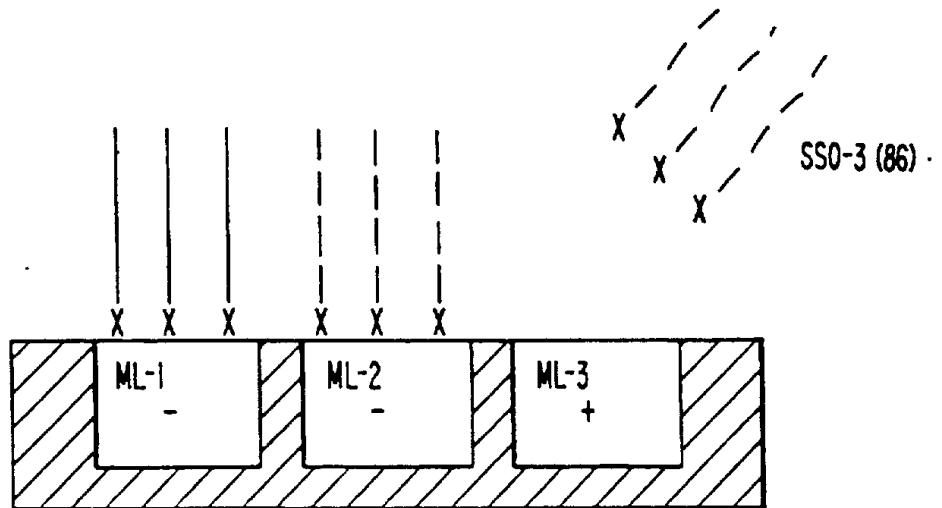
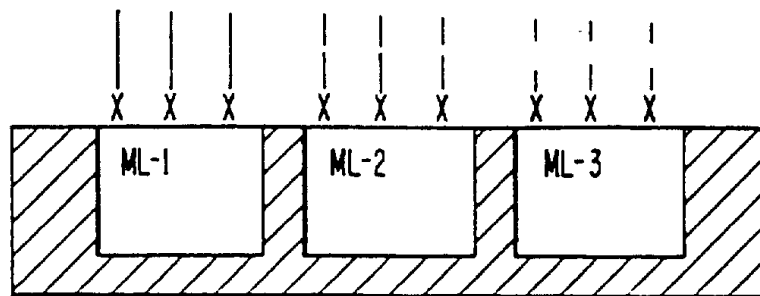
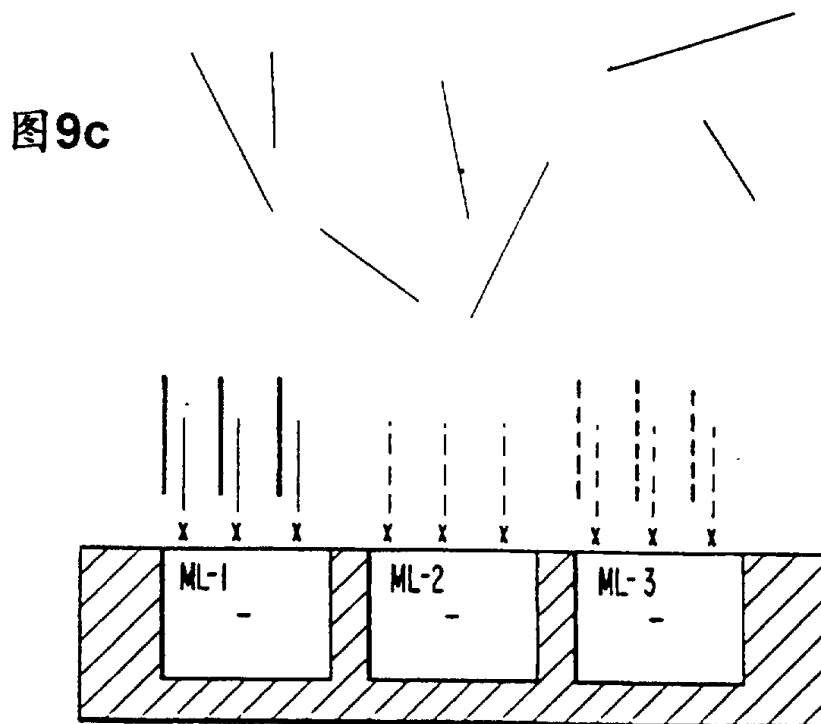
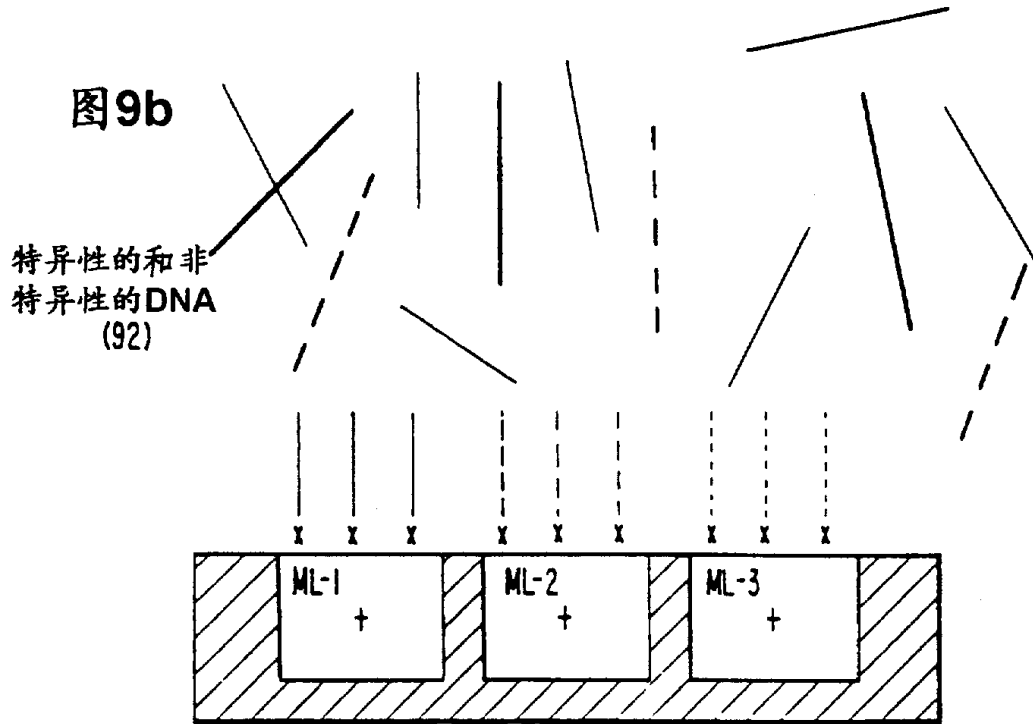
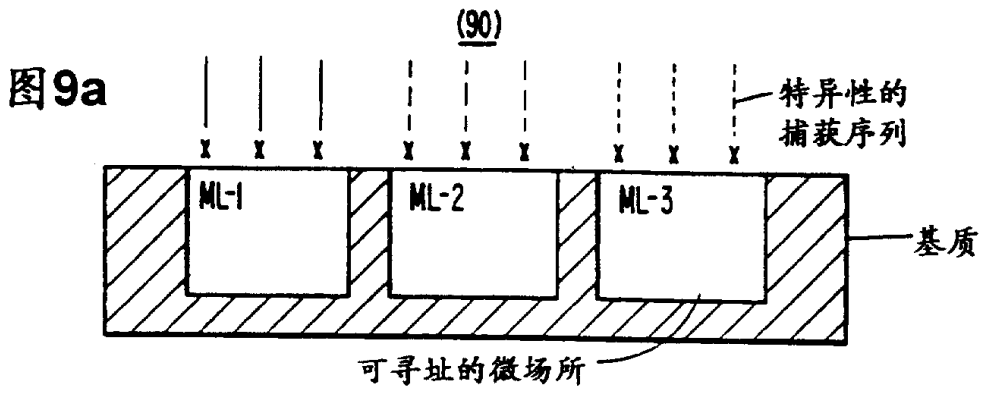


图8d





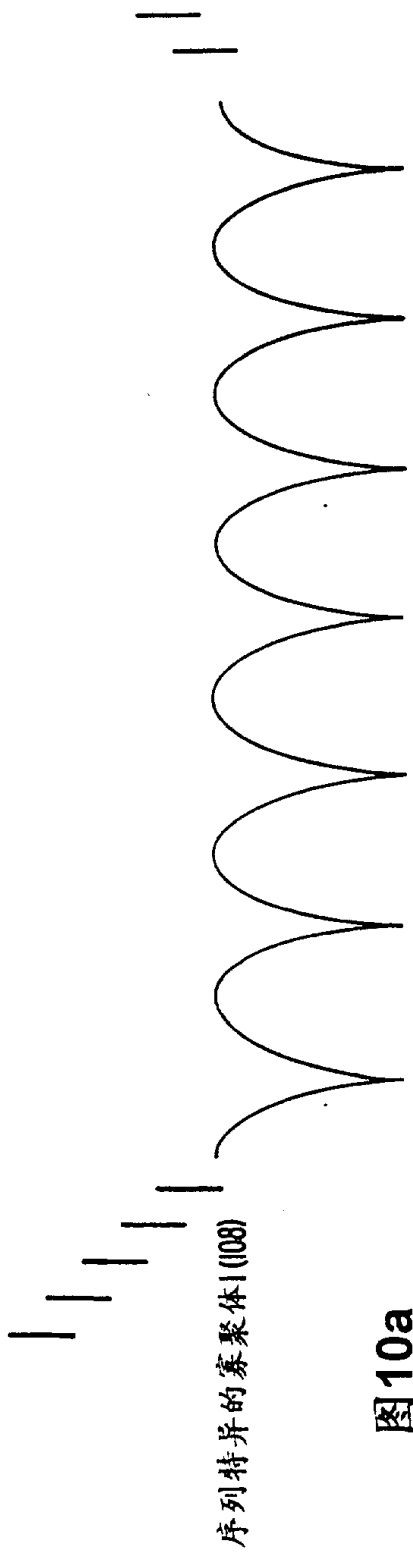


图 10a

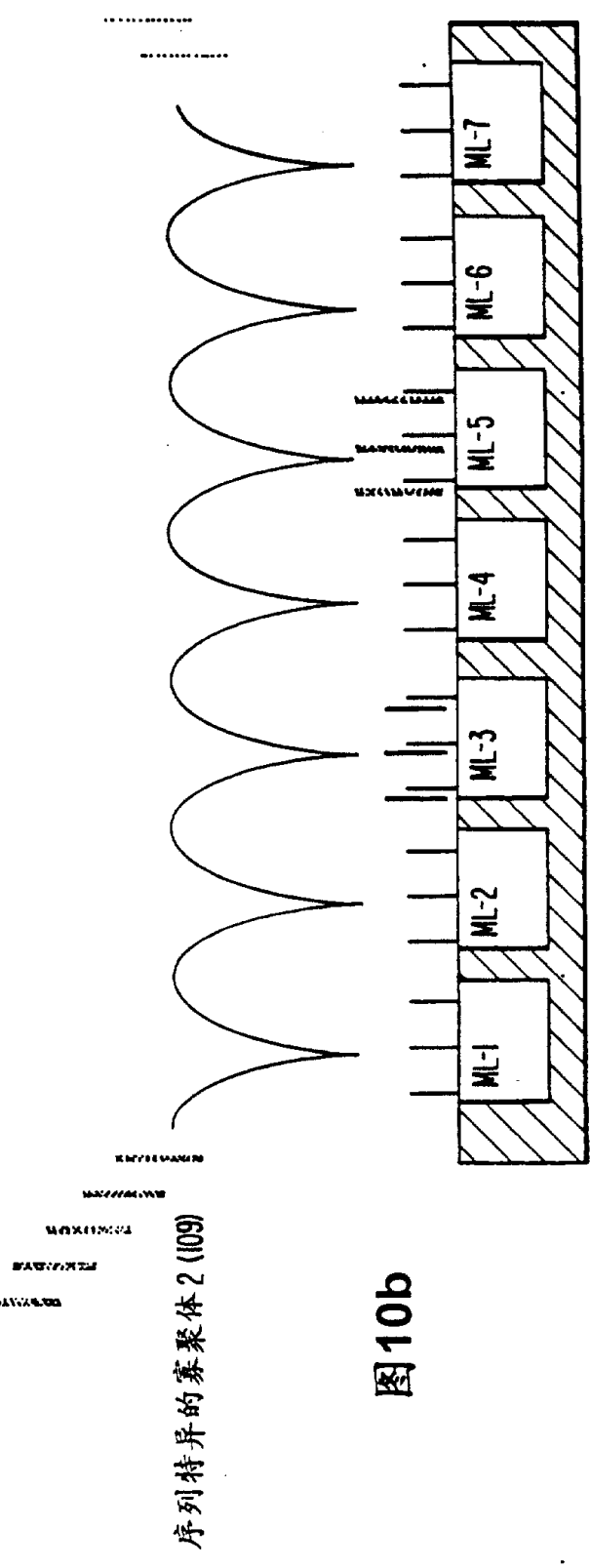
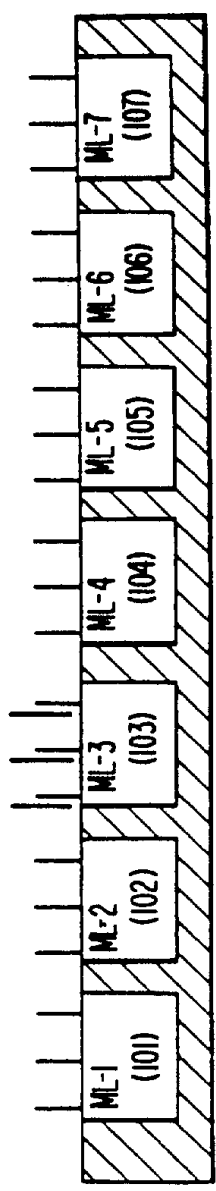
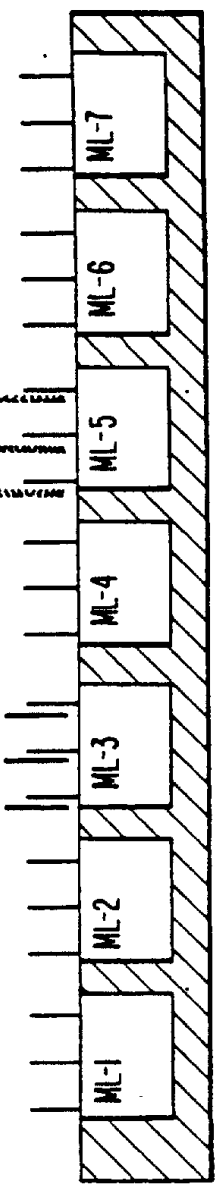


图 10b



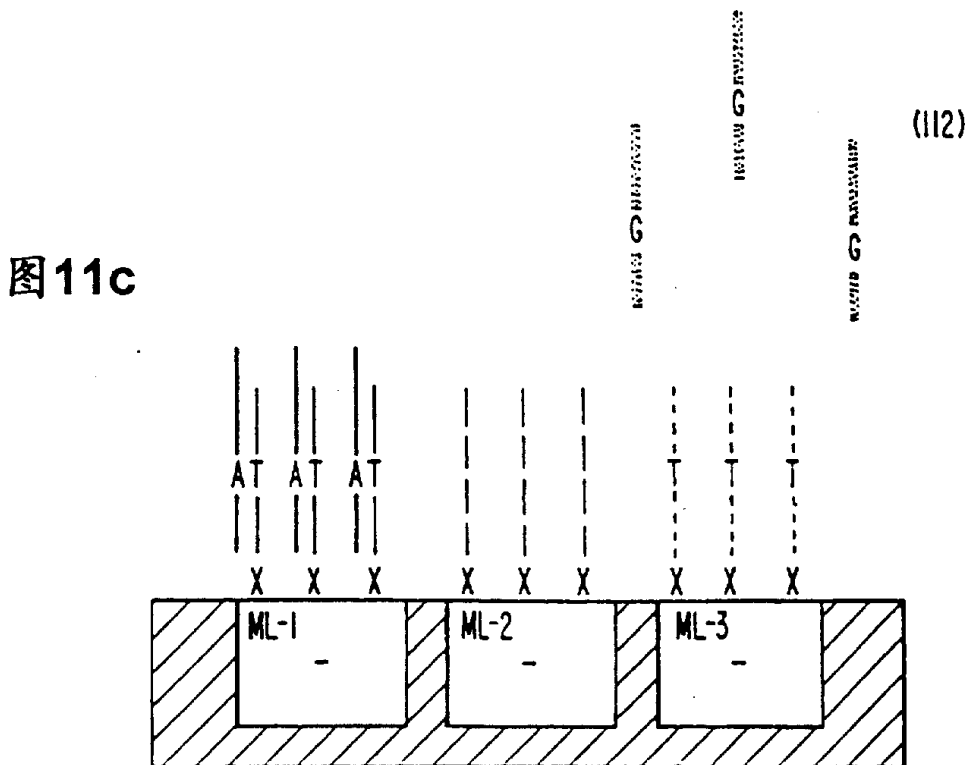
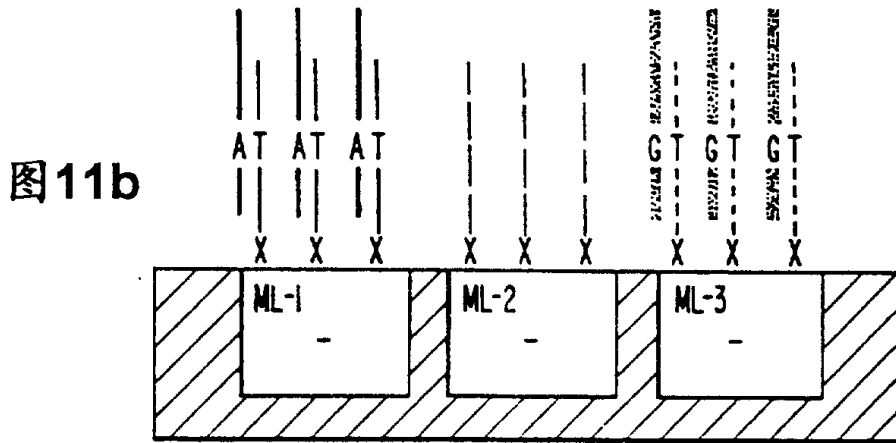
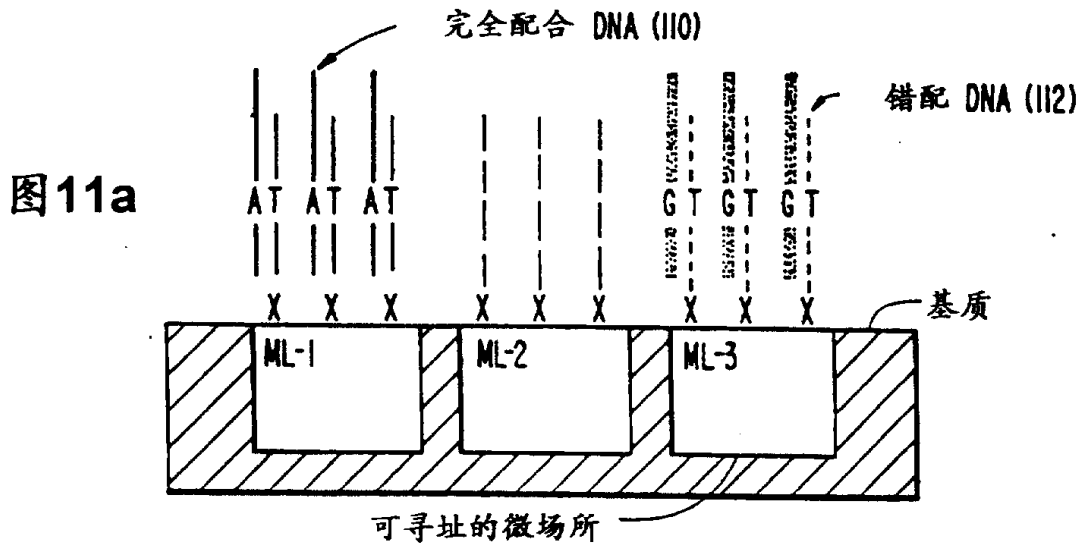


图12a

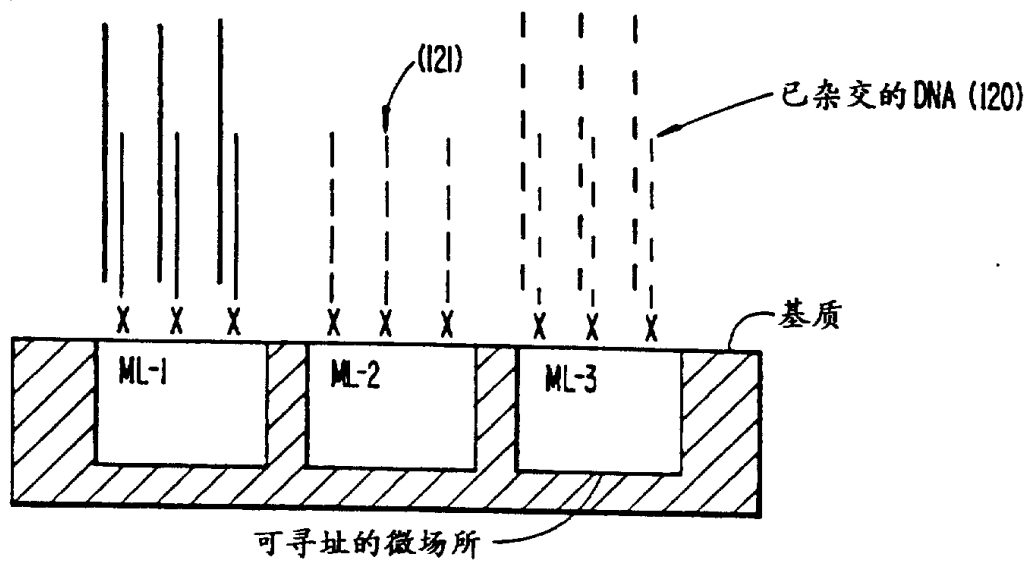


图12b

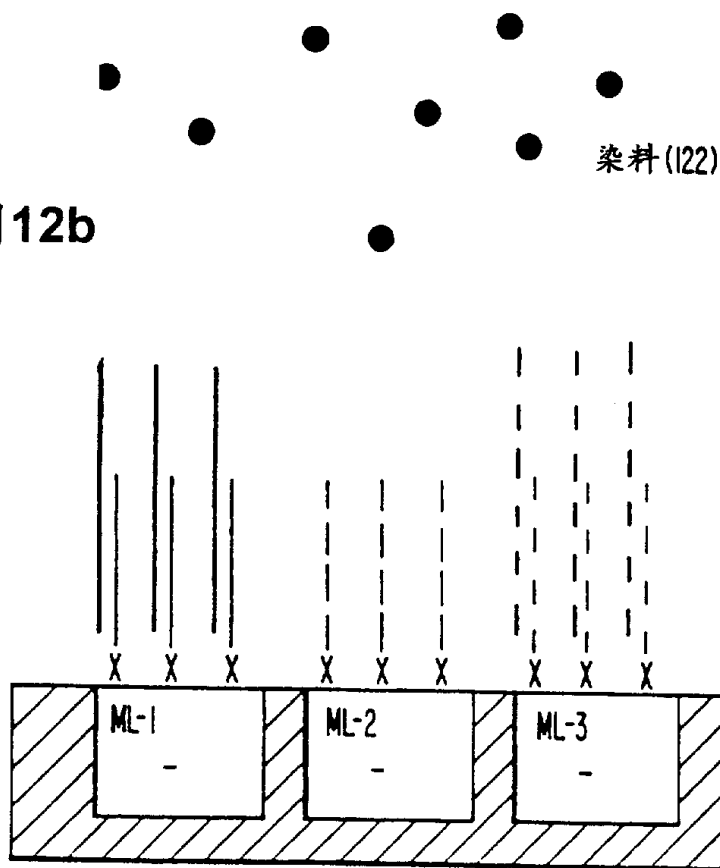


图12c

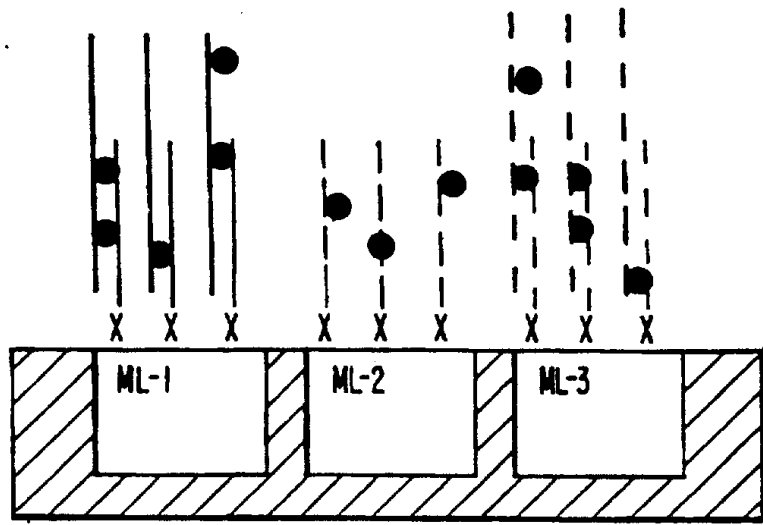


图12d

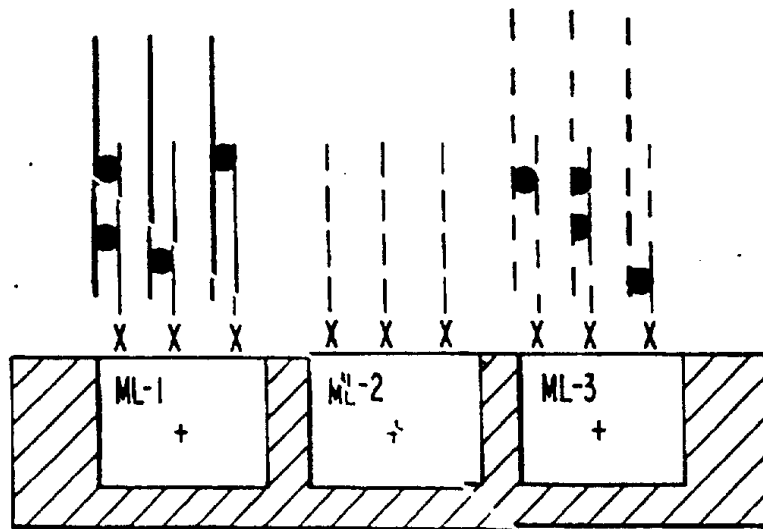


图13a

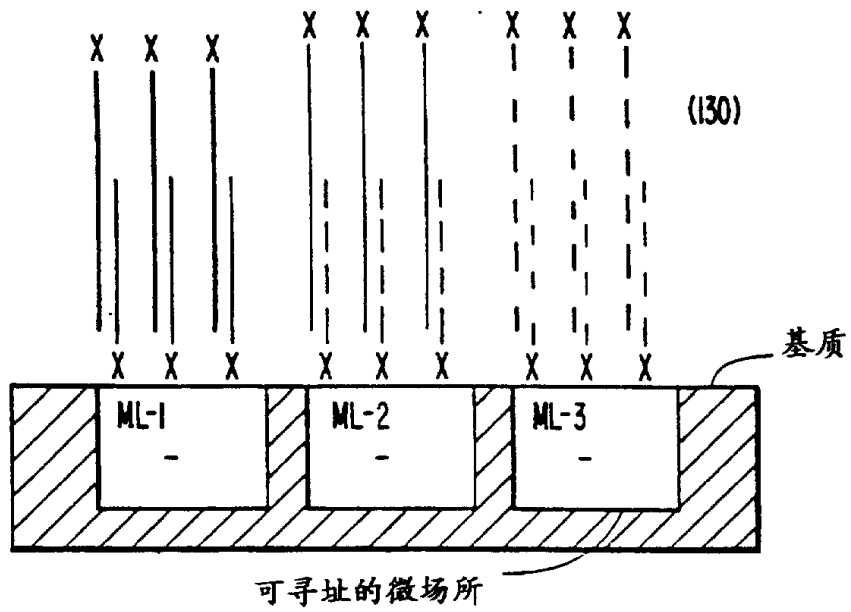


图13b

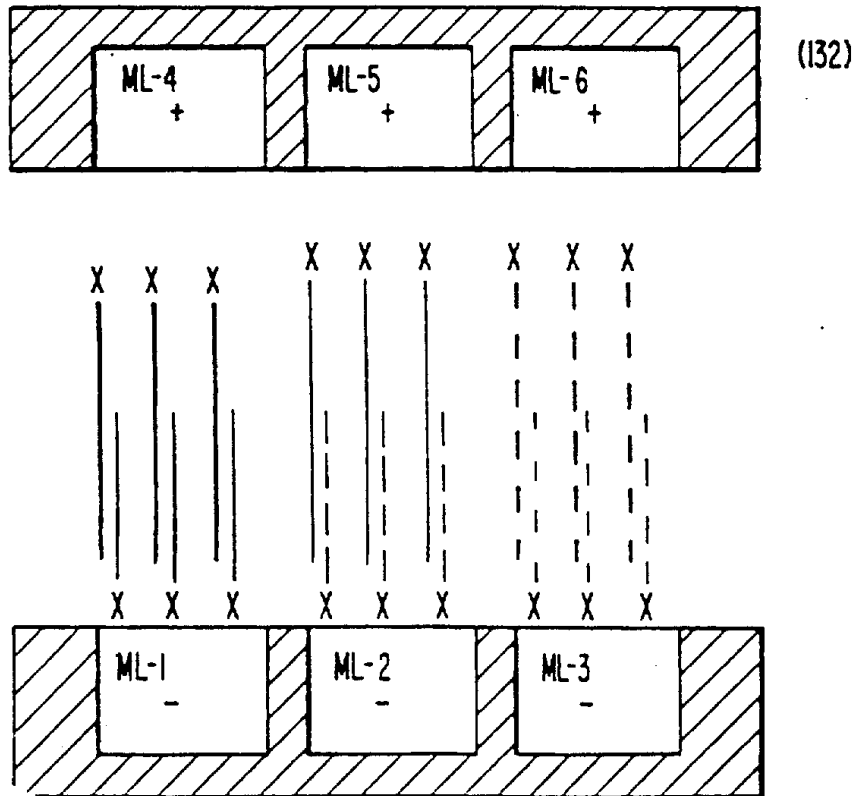


图13c

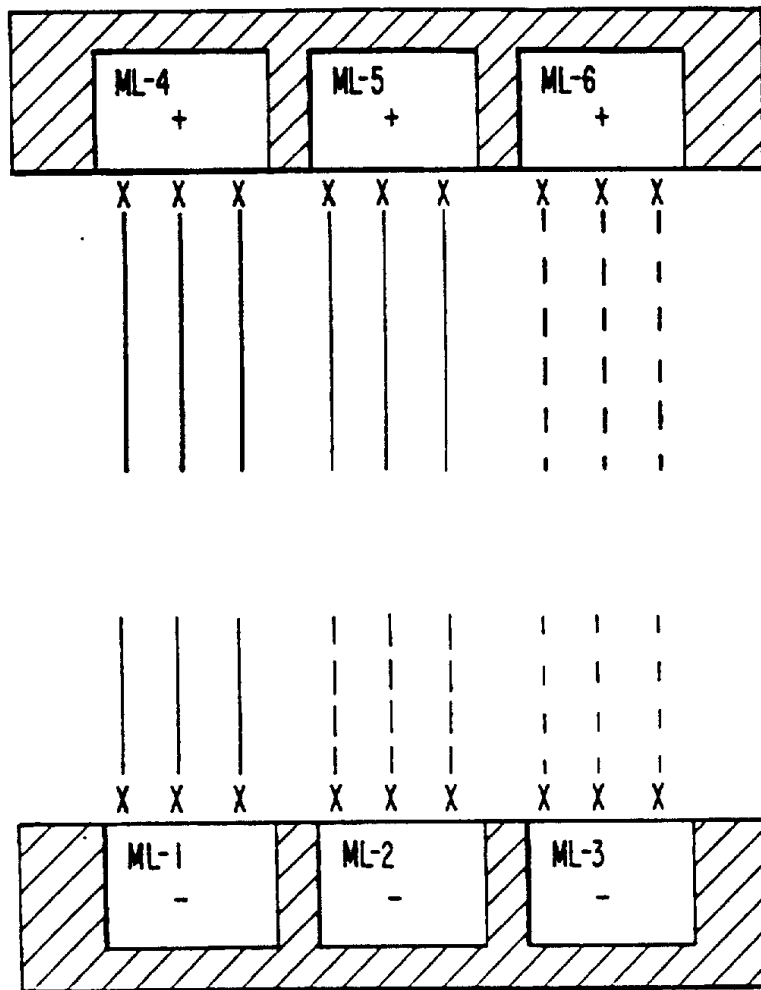


图14a

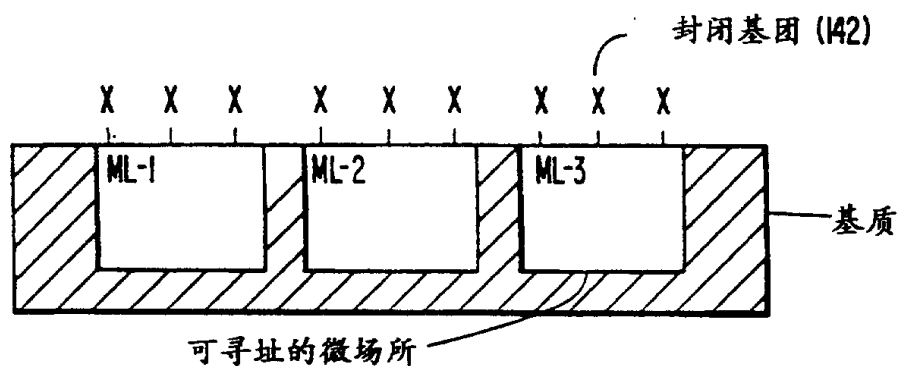


图14b

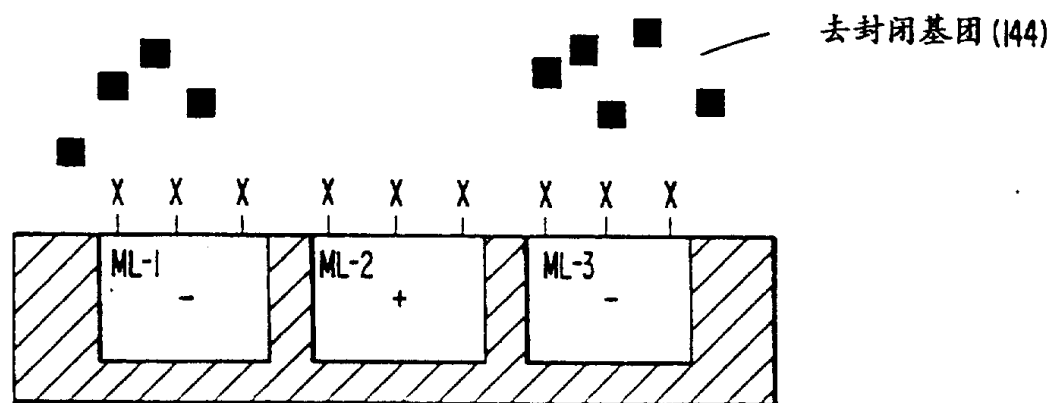


图14c

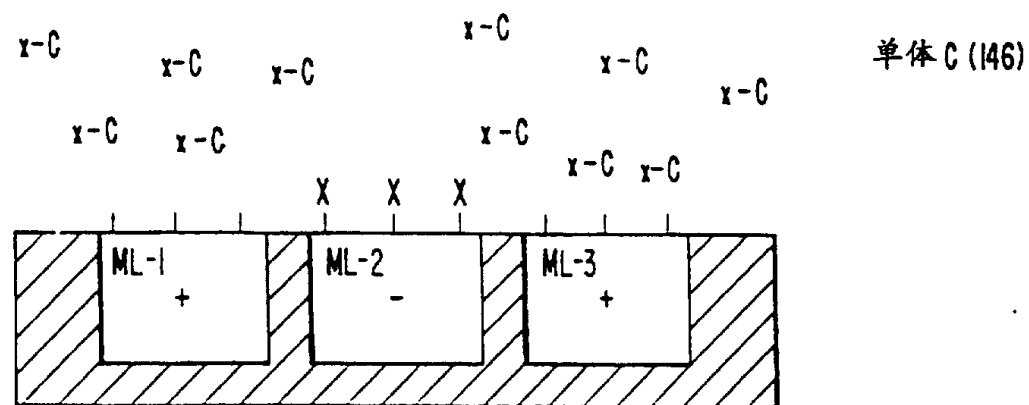


图14d

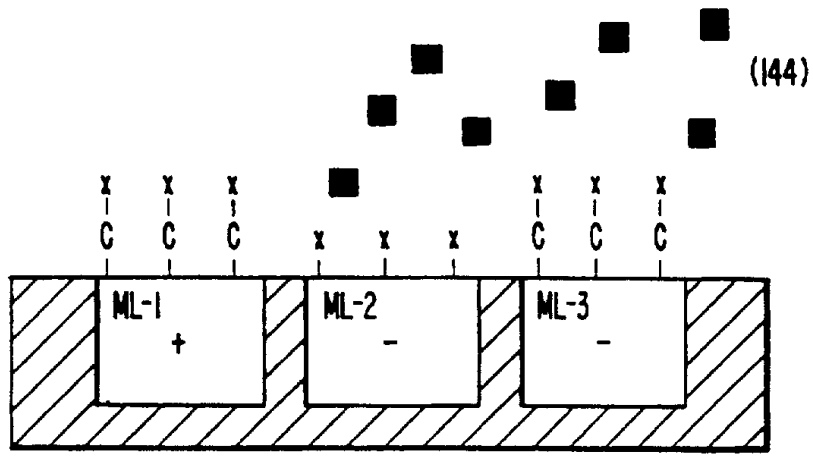


图14e

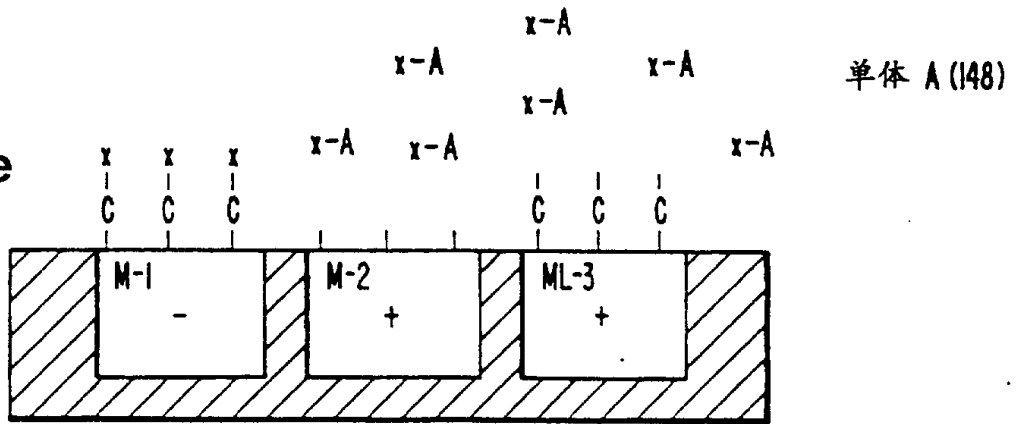


图14f

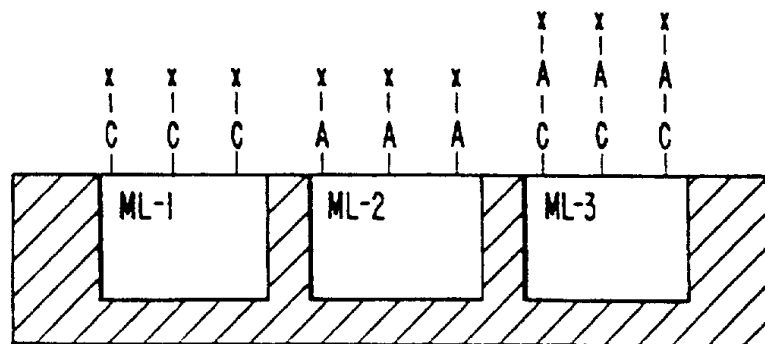


图15

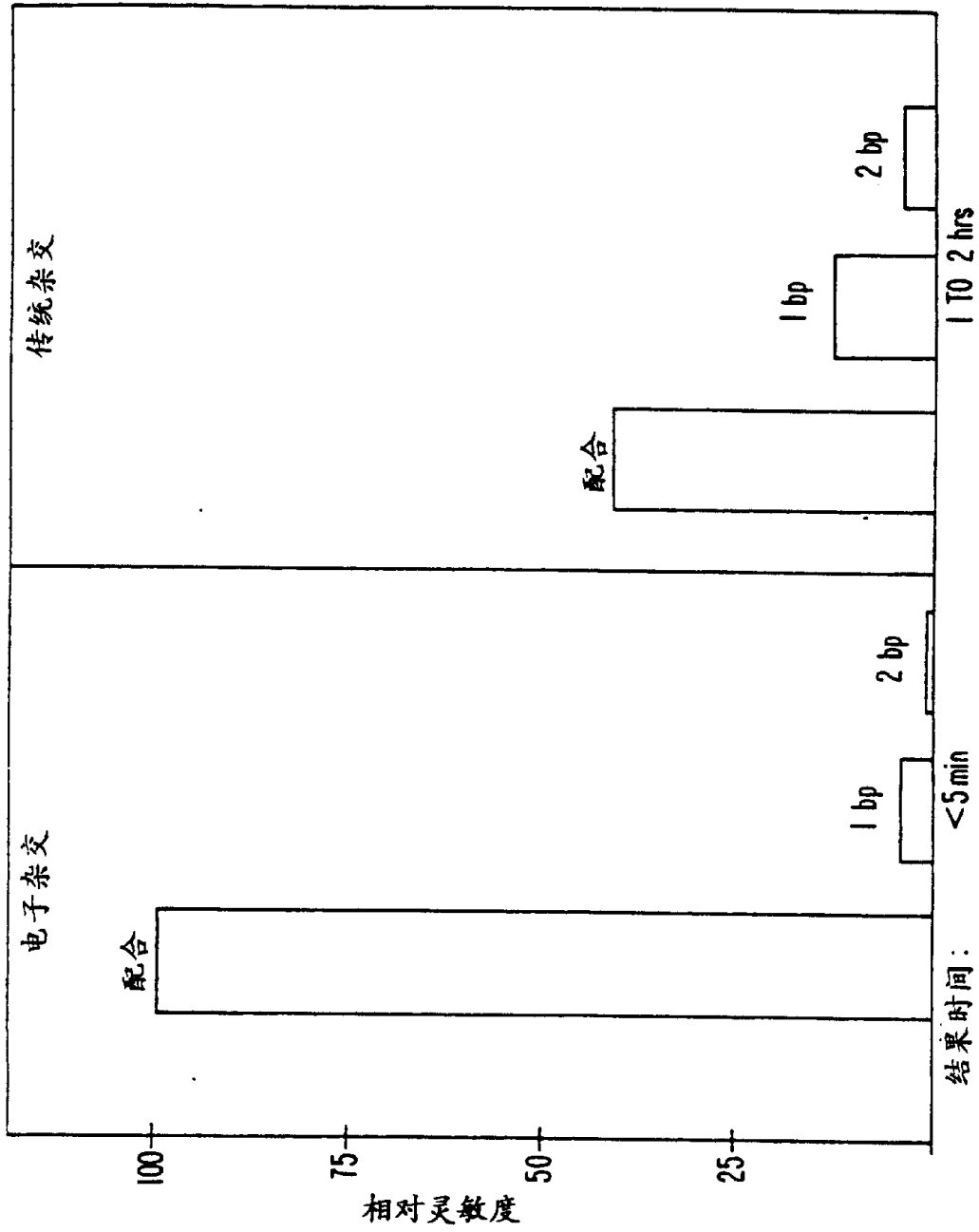
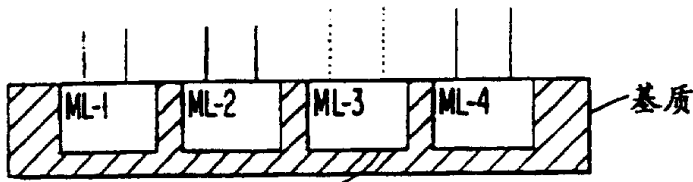
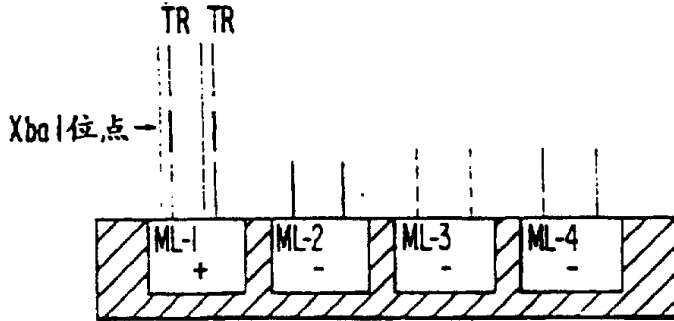


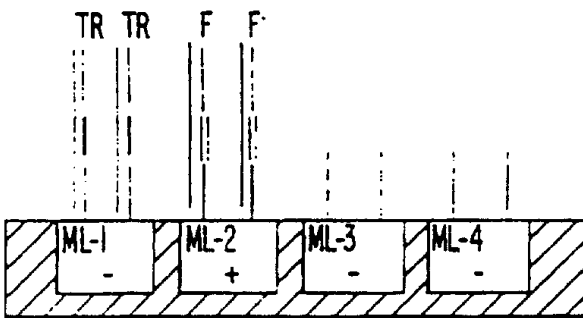
图16



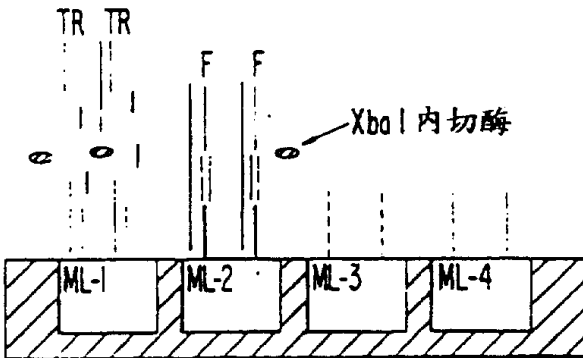
可寻址的微场所



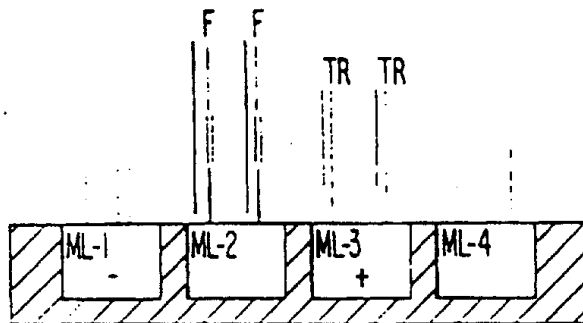
用M13mp18目标限制性探针和TR探针(Xba I 位点)寻址ML-1



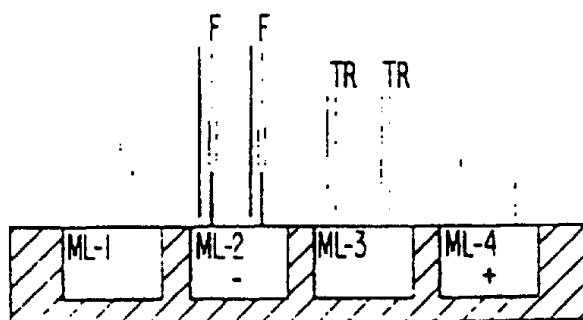
用M13mp8目标限制性探针和F探针(非Xba I 位点)寻址ML-2



在 ML-1 处 Xba I 限制性消化



限制性片段被移向 ML-3



ML-2 没有被 Xba I 限制性切割

图17

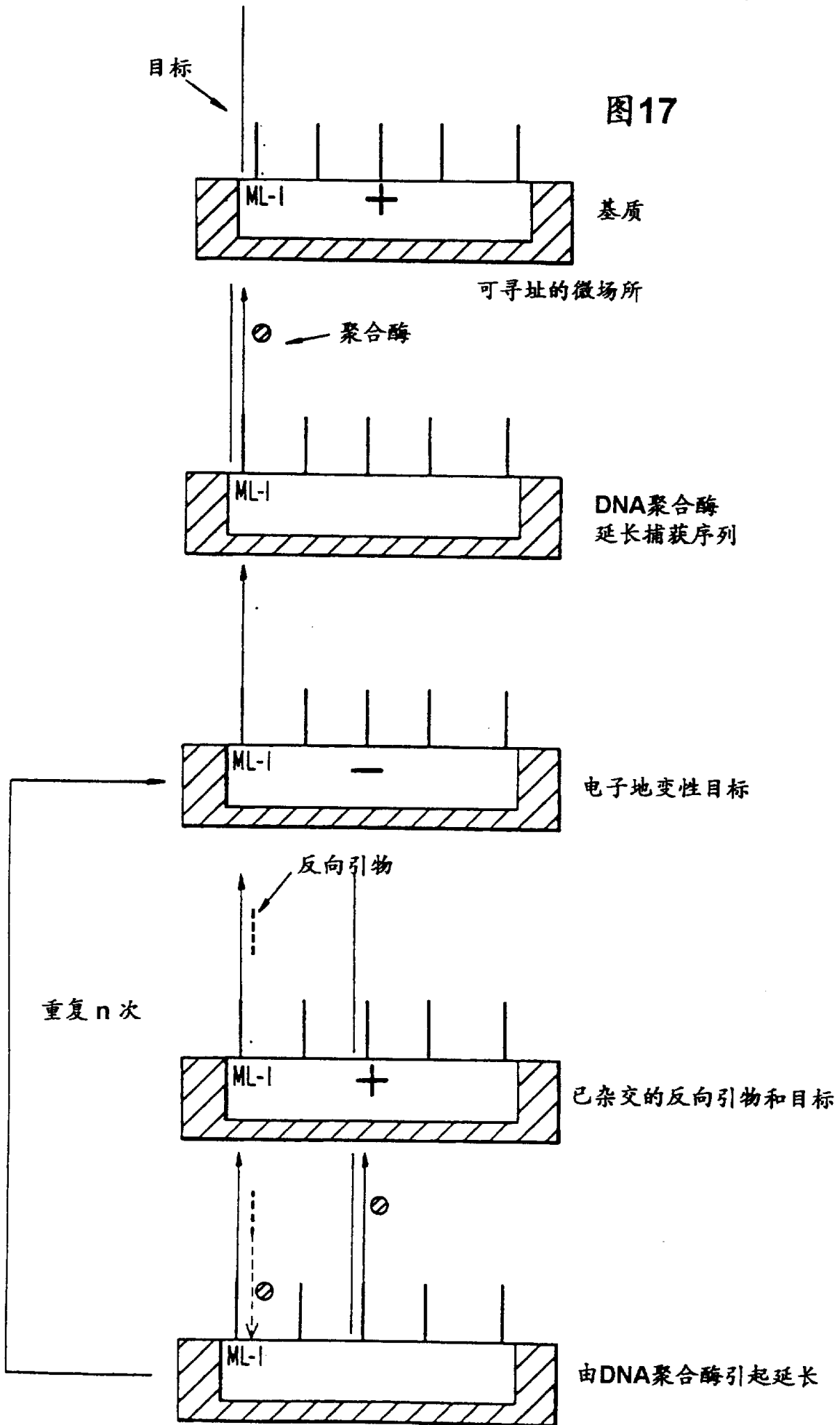


图18

