



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102803507 B

(45) 授权公告日 2016. 05. 25

(21) 申请号 201080029480. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 06. 10

C12Q 1/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/186, 442 2009. 06. 12 US

(56) 对比文件

US 2003/019042 A1, 2003. 06. 26,

WO 2007/106579 A2, 2007. 09. 20,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 12. 30

章春笋. 连续流动式 PCR 芯片相关技术研究进展. 《分析测试学报》. 2004, (第 6 期), 14-118.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/038141 2010. 06. 10

审查员 孙谦

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2010/144683 EN 2010. 12. 16

(73) 专利权人 精密公司

地址 美国华盛顿

(72) 发明人 C·F·拜特瑞尔 D·M·霍克斯特拉

J·哈伯 J·R·维利福德

S·N·盖茨 E·R·莱博尔

I·斯普拉格

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

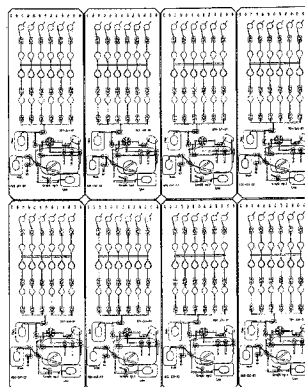
权利要求书2页 说明书18页 附图6页

(54) 发明名称

用于微流体装置中在板反应剂的脱水储存的组合物及方法

(57) 摘要

描述了用于生产具有分子生物学测试用车载反应剂的独立微流体卡盒装置的制造方法及组合物。敏感性反应剂不经冻干或冷冻以干燥形式进行储存, 在使用时以生物学样品或样品稀释剂进行重构。制造方法包括片或卷轴制造过程, 其中在凝胶玻璃化前将反应剂印记到位置并密封于单个微流体卡盒中。



1. 微流体卡盒,其包含用于进行分子诊断性测定法的在板反应剂,所述微流体卡盒包含具有封闭的微流体结构的塑料体,所述微流体结构具有至少一个腔室或通道,所述腔室或通道具有连接于样品进口的上游流体路径以及连接于出口的下游流体路径,其中有至少一种玻璃化的凝胶反应剂点封闭于所述腔室或通道内,这是通过以下方法装配于其中的:

a)组合包含Taq聚合酶的第一种反应剂与印记和稳定化溶液以形成第一种反应剂溶液,其中所述印记和稳定化溶液包含:

i)1.0%-10%w/v的三糖;

ii)0.001%-0.1%w/v的高分子量聚乙二醇或聚羟基化合物;

iii)0.001%-0.3%w/v的含氟表面活性剂,其中所述含氟表面活性剂是FC-4430;

iv)具有氨基或酰胺官能团的非蛋白质化合物;

v)0.1mg/ml的载体蛋白质;以及

vi)兼容的缓冲液

并将所述第一种反应剂溶液的液滴印记到所述腔室或通道里,并使所述液滴干燥,由此形成其中的第一种凝胶反应剂点;

b)组合第二种反应剂与第二种印记和稳定化溶液以形成第二种反应剂溶液,将第二种反应剂溶液的液滴印记到所述腔室或通道里,并使所述液滴干燥,由此形成其中的第二种凝胶反应剂点;

c)继续步骤b直到将多个在板凝胶反应剂点点样于其中;

d)通过层压、粘合、超声焊接或在其上附着一个或多个盖以封闭所述塑料体中的所述腔室或通道;

e)然后在干燥的环境下,将所述具有一种或多种封闭的凝胶反应剂点的微流体卡盒密封于具有干燥剂的气密性袋子中,所述干燥剂在储存期间进一步玻璃化所述第一种和第二种凝胶反应剂点,所述微流体卡盒具有延长的保质期,不需要冻干或冷冻储存,并含有分子诊断性测定法所要求的所有在板反应剂。

2. 权利要求1的微流体卡盒,其中所述第二个玻璃化的凝胶反应剂点包含一种或多种引物。

3. 权利要求1的微流体卡盒,其中所述多个玻璃化的凝胶反应剂点选自含有一种或多种探针的点、含有逆转录酶的点、含有RNA聚合酶的点、含有核苷酸三磷酸的点、含有核酸模板的点和含有缓冲液的点。

4. 权利要求1的微流体卡盒,其中所述微流体结构包含多个的腔室或通道,所述腔室或通道流动地连接作为在所述样品入口和所述出口之间的测定法路径的平行阵列,其中每个所述测定法路径之内是印记在其中的至少一个玻璃化的凝胶反应剂点。

5. 权利要求4的微流体卡盒,其中在每个所述测定路径之内是含有至少一对独特的引物对的玻璃化的凝胶反应剂点。

6. 权利要求4的微流体卡盒,其中在每个所述测定路径之内是含有至少一种探针的玻璃化的凝胶反应剂点。

7. 权利要求4的微流体卡盒,其中每个所述测定路径包含具有稳定化基质中的Taq聚合酶的玻璃化的凝胶反应剂点。

8. 作为加工过程中间产物的权利要求1或4的微流体卡盒的片,所述片包含可分离的微

流体卡盒形成的镶嵌布局,所述镶嵌布局的每个所述可分离的卡盒已经形成具有至少一个装配于其中的玻璃化的凝胶反应剂点。

9. 权利要求8的微流体卡盒的片,其中每个所述的可分离的微流体卡盒印记有为具体分子诊断性测定法或测定法组所构建的玻璃化的凝胶反应剂点的模式。

10. 权利要求9的微流体卡盒的片,其中每个片包含为多重诊断性测定法或多组测定法构建的可分离的微流体卡盒。

11. 权利要求1或4的微流体卡盒,其中所述至少一个玻璃化的凝胶反应剂点进一步包含经选择以在室温下形成玻璃体的PCR增强剂。

12. 权利要求11的微流体卡盒,其中所述PCR增强剂为甜菜碱、n-甲酰吗啉、 δ -戊内酰胺(2-哌啶酮)、 ϵ -己内酰胺、1,2-环戊二醇、PVP-10、PVP-40或其混合物。

13. 权利要求1或4的微流体卡盒,其中所述至少一种玻璃化的凝胶反应剂点进一步包含菊粉、纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、赖氨酸、精氨酸或美拉德反应抑制剂。

14. 权利要求13的微流体卡盒,其中所述纤维素是衍生的纤维素。

15. 包含权利要求1-7和11-14中任一项的微流体卡盒或权利要求8-10中任一项的片的试剂盒,其在干燥环境下单独包装于具有干燥剂的气密性袋子中,具有标记和使用说明书。

用于微流体装置中在板反应剂的脱水储存的组合物及方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2009年6月12日提交的美国临时专利申请号61/186,442的根据35U.S.C. §119(e)的权益,该申请以其全文并入本文作为参考。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 本发明一般涉及具有在板(on-board)脱水反应剂的微流体卡盒(microfluidic cartridge)中的分子诊断性测定法领域,其中反应剂通过不经冻干的脱水得以稳定化,本发明还涉及制造具有该在板反应剂的微流体卡盒的方法。

[0005] 相关技术描述

[0006] 微流体卡盒由于其方便性、非技术人员可操作性以及方便丢弃而非非常适用于诊断性分子生物学。每个卡盒包含用于具体测定法的所有反应剂,这样只有样品需要加入。然后简单地将卡盒插入自动化设备便可实施测定法。然而,自从在20世纪90年代早期首次构想以来,开发这些卡盒的道路已经进行了二十年并通过了各种障碍才有商业化的延续。这些卡盒的保质期是尤其值得关注的问题,因为大多数目标用户无法使用冷冻储存设施。

[0007] 尽管“冷冻干燥”已经成功应用于潮湿-敏感性反应剂的室温长期储存,然而微流体卡盒的制造不容易将使用冷冻干燥作为此加工过程的部分。在将反应剂置于部分装配好的装置的孔(well)或通道(channel)内后,需要进行另外的装配。粉末或松散的球(sphere)会移动或不能处于正确的位置,并干扰由片(sheet)或卷轴(roll)形成的卡盒进行高速装配。干燥反应剂也会干扰粘合剂的使用。微流体卡盒的最终装配包含脱掩膜(demasking)、层压(lamination)、粘合(gluing)和/或超声焊接的步骤,这些步骤在商业规模上不易与冷冻干燥技术兼容。而且,微流体卡盒装配中遇到的潮湿或热的环境会使冷冻干燥的反应剂甚至在产品完全装配之前就失活。

[0008] 备选地,已知以玻璃体形式脱水会在冰点(freezing)以上储存过程中保持酶或反应剂的功能,但是此项技术是高度不可预测,并且所述方法和组合物必须针对所研究的每种反应剂而变动——没有具体的成功预期。

[0009] 装配用于分子生物学测定法的独立(self-contained)微流体卡盒中需要的蛋白质反应剂包括:TAQ聚合酶、DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶、RNA酶H、蛋白酶K、免疫球蛋白、荧光素酶、焦磷酸酶、发色肽酶(chromopeptidase)、溶菌酶等等。其他可能对光、潮湿或热具有敏感性的反应剂包括核苷酸三磷酸、脱氧核苷酸三磷酸、引物和探针。

[0010] PCR是分子生物学测定法的庞大家族的基础,并且目前是不可用于微流体卡盒形式的许多分子诊断的金标准。采用PCR用于微流体形式涉及开发用于反应剂的稳定在板储存的方法,所述反应剂包括TAQ聚合酶、逆转录酶、脱氧核苷酸三磷酸、引物和探针。已经证明PCR中所使用的嗜热生物体的DNA聚合酶——由于其首次发现于水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)中而通常称为“TAQ聚合酶”——尤其在室温储存时很难稳定。尽管如此,开发在微流体装置中在室温下具有商业有效保质期的PCR产品依赖于该问题的解决。

[0011] TAQ具有5'-3'的聚合酶以及外切核酸酶活性,却没有其他聚合酶的3'-5'的校对(proofreading)能力。然而,该酶结构是与其他DNA聚合酶共有的,并且包含对生拇指内收(opposable thumb-palm)结构域,其被与DNA模板结合相关的深裂口所分开。与TAQ聚合酶的热稳定性相关的特征包括Arg对Lys、Glu对Asp、Ala对Gly、Thr对Ser的比例升高以及不含半胱氨酸。在升高的温度下的折叠通过疏水作用、氢键、静电及范德华相互作用而建立并维持。

[0012] 酶是复杂折叠的纳米机器,具有与其催化功能及折叠相关的协作运动和灵活性。特定的结构性亚结构域在结构中相对固定,而其他亚结构域更具高流动性和动态性。理想的是,这种天然状态在通过脱水的储存期间得到保持,但是脱水最经常地导致一定水平的折叠去稳定。酶的去折叠会导致变性和活性丧失;脱水(或冷冻)之后产生的结构变化可严重到在再水合之后不会发生重新折叠成为活性“天然状态”形式。

[0013] 已经牢牢确立了水在酶结构中的作用。蛋白质的水合程度可由“Dh”表示,其中 $Dh \cong 0.4(g H_2O/g \text{蛋白质})$ 表示蛋白质周围有完全水合外壳或单层水。水合的中间水平也是已知的。在 $Dh \cong 0.15-0.2$ 时,水仅仅足以与更高极性和离子化的表面结合,而酶活性丧失。最极端的冻干过程导致 $Dh \cong 0.02$ 。在没有水的电介质屏蔽(dielectric shielding)时,静电相互作用可导致变性。水通过水合外壳中氢键连续的断裂和重建(导致疏水和亲水相互作用),以及通过由肽间和侧链相互作用引导二级和四级结构如 α -螺旋和 β -折叠基序而控制了蛋白质结构。作为溶剂,水的液晶态、氢键合能力润滑或“弹性化”了酶的结构性结构域的运动。

[0014] 无定形固体优选地用于反应剂的“干燥”储存,因为再水合过程比用于相对应晶体状态更迅速。理想的是,蛋白质稳定化于固体的、非吸湿性的玻璃样(glassy)基质中,当以过量的水再水合时,其发生受控的失透作用(devitrification)。此优选状态与通过过冷液体而形成的玻璃样状态有很多共同点。类似地,可在温度 T_d (动态转化温度(dynamical transition temperature))或以下将蛋白质结构域以无定形“玻璃样”或凝胶样状态进行冷冻,此温度类似于形成小分子和聚合物中玻璃样状态的 T_g (玻璃转化温度)。在 T_d 以下,蛋白质去折叠受到有效的抑制。类似地,脱水到临界水平可与蛋白质去折叠的抑制相关:尽管室温下可用的热能足以使蛋白质变性,但是在 $Dh < 0.2$ 时水合外壳碎片化,并且没有足够的水分子以执行与蛋白质结构域的去折叠相关的氢键的重排。

[0015] 尤其感兴趣的是蛋白质在由冻干保护剂(lyoprotectant)(其为在干燥储存过程中保护蛋白质不发生变性的分子)组成的玻璃体(glass)内的脱水。冻干保护剂的活性最好地可由“水置换模型”解释,其中认为冻干保护剂通过氢键和疏水键与蛋白质直接相互作用,这以某种方式抵消了移除水造成的变性效应。例如,认为甘油在蛋白质水合外壳中置换了水并有效地弹性化了以可再水合形式的脱水蛋白质,尽管其中没有产生水的构象不稳定性。

[0016] 因此,可使用普通的框架来考虑通过用玻璃体形成分子(glass-forming molecule)冷却紧密混合物中的蛋白质而形成的无定形玻璃样状态以及通过脱水所述混合物而形成的无定形玻璃样状态。在所述两种情况下的固体产物都由具有不同程度的天然状态的蛋白质构象异构体组成,所述蛋白质构象异构体经“溶剂化”并分子上地分散于无定形玻璃体如糖中。例如,已经发现蛋白质和糖混合物在热测量学上具有糖的 T_g 和蛋白质的 T_d 之

间的总 T_g 中间值,该值与混合物的组成成比例。类似地,蛋白质的 T_d 可通过蛋白质与合适的冻干保护剂的紧密结合而进行调节,尽管机制并未完全理解。因此,人们相信去水的蛋白质的构象会以某种方式缀合于玻璃体的分子结构。

[0017] 通常地,候选的冻干保护剂包括多羟化合物(PHC),具体而言为多种糖类(包括单糖、双糖、三糖和寡糖)、糖醇,以及多种多羟小分子和聚合物。乳糖醇、甘露醇、麦芽糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、肌醇、苏糖醇、山梨醇(葡萄糖醇)以及甘油为糖醇的实例。非还原性糖包括蔗糖、海藻糖、山梨糖、水苏糖、龙胆三糖、松三糖和蜜三糖。是冻干保护剂的糖衍生物包括甲基葡萄糖苷和2'-脱氧葡萄糖,等等。糖酸包括L-葡萄糖酸盐及其金属盐。对大多数应用不那么优选的包括还原性糖如果糖、芹菜糖、甘露糖、麦芽糖、异麦芽酮糖、乳糖、乳酮糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、洋地黄毒素糖、岩藻糖(fucose)、槲皮醇、阿洛糖、阿卓糖、樱草糖、核糖、鼠李糖、半乳糖、甘油醛、阿洛糖、芹菜糖、阿卓糖、塔格糖、松二糖、槐糖、麦芽三糖、甘露三糖、芸香糖、海葱二糖、纤维二糖、龙胆二糖以及葡萄糖。还可用的为聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯亚胺、果胶、纤维素、衍生的纤维素(如羟甲基纤维素、羟乙基纤维素以及羟丙甲基纤维素)、羟乙基淀粉、可溶性淀粉、葡聚糖、高分支高质量亲水的多糖如 **Ficoll®**,也已经发现玻璃体形成白蛋白、明胶和氨基酸是可行的。经过试错法,也已经发现可用的上述物质的混合物,这通常对于各个靶标蛋白有所不同。

[0018] 也已知成功形成玻璃体对冷却速度、浓度、压力和其他加工过程参数如晶种的存在与否是敏感的。要记住的是玻璃体为亚稳定状态。这些复杂系统的难点通过出自W01996/033744的以下实施例得到举例说明,其中报道在其 T_g 为40°C以上生产出一种无定形固体冻干组合物,其是95%的乳糖中含降钙素2%并具有2%的残留水,导致乳糖的爆发性结晶以及由60%水和40%蛋白质组成的结晶水的形成,并被排除出晶体相。溶液相的玻璃化温度低于冰点,并且因此在室温下蛋白质非常迅速丧失生物学活性。类似的酶失活在使用结晶的蔗糖时注意到(Schebor C等人,2008,Glassy state and thermal inactivation of invertase and lactase in dried amorphous matrices.Biotech Progress13:857-863)。

[0019] 如已过期美国专利号4891319中所公开的,Rosen发现了具有比乳糖或蔗糖更高的 T_g 的海藻糖在蛋白质室温干燥时具有冻干保护性,避免使用冷冻干燥和喷雾干燥的激烈条件,且据报道荧光标记物也可以此方式脱水。Rosen提出糖:淀粉比例为1.4:1至10:1。海藻糖被认为起干燥骨架的作用,在将水移除时维持高分子的结构完整性。这些发现在其他地方也有进一步扩展(Colaco C等人,1992,Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose:simplified molecular biology,Bio/Technology10:1007-11),并且在美国专利号5955448中报道只要剂型还包括美拉德反应(Maillard browning reaction)的抑制剂便可采用多种碳水化合物,包括乳糖或蔗糖。相关的观察已经由Franks(美国专利号5098893)以及Wettlaufer(美国专利号5200399)所报道,其还评论了在玻璃化的生物学物质活性丧失中氧气、光以及化学反应的重要性。

[0020] 有人提出将蔗糖、山梨醇、松三糖和蜜三糖作为优选的冻干保护剂。然而,据我们所知,未报道有使用海藻糖或任何其他糖在不经冻干而稳定化干燥TAQ用于延长的储存稳定期的成功案例。相反的,在Madejón(图5—来源:美国专利申请号10/292848文档夹)的声明中显示海藻糖以干燥反应剂形式在4°C下储存一周的至多有部分保护性,而不加冻干保

护剂的标准PCR混合物在37°C下一周后比具有冻干保护剂的干燥反应剂具有更多的残留活性。Madejón进一步显示松三糖本身根本不具保护性。参考凝胶(如图5所示在本文中重复),在4°C下储存反应混合物后跑1-9泳道(阶梯标记物(ladder)之间);在37°C下储存后跑10-18泳道(“M”-松三糖,“L”-赖氨酸,“G”-糖原,“T”-海藻糖,“S”-不含冻干保护剂的标准混合物)。

[0021] 已经有报道认为海藻糖是不寻常的或甚至是极好的,因为添加少量的水不会像在其他糖中那样压低 T_g 值(Crowe JH等人,1998,The role of vitrification in anhydrobiosis. *Ann Rev Physiol*60:73-103)。相反,形成海藻糖的二水晶体,由此保护剩余的玻璃样海藻糖不受所添加水的影响。然而Franks在美国专利号6071428中显示此效应并不显著,且五水蜜二糖对于储存干燥状态的酶也可用。据报道此五水晶体与周围无水材料的玻璃样状态共存。这些水合糖类通常不与会有助于变性的结晶或爆发结晶(irruptive crystallization)的水的形式结合。

[0022] Arieli在W02007/137291中提出通过在冰点以上进行干燥,一般在55°C干燥1-3hr,用稳定化试剂如蔗糖、海藻糖、松二糖、糖醇和还原性糖与BSA组合而稳定化TAQ。所述申请中示例显示的定性数据显示了TAQ在过夜或短期储存后的活性。然而,并没有提到在干燥过程中达到的水合度(Dh),并且如已知的,TAQ在水溶液中在室温下过夜后保留完全的活性(图6-来源:Marenco A等人,2004,Fluorescent-based genetic analysis for a microfluidics device,Defence R&D Canada Contract W7702-00-R849/001/EDM Final Report),对于短期储存推测也是一样。因此,并不清楚所达到的水合和玻璃样状态是否足以用于在数月数年内长期储存。Rosado(美国专利申请2003/0119042)提出TAQ在完全水合的“凝胶化”形式中最好地得到稳定化,然而所公开的数据显示其只能达到有限持续时间的稳定性,可能为数天或数周。

[0023] 例如,在美国专利号6127155中已经报道了对TAQ的冷冻商业化剂型的开发。然而,冷冻储存要求专门的设备,这些设备一般在微流体卡片使用的照护点(point-of-care)设施处是不可使用的。还要注意的,多个的研究者已经报道了成功的冻干TAQ制备物。这些包括Walker(美国专利号5565318),Trem1(美国专利号5763157)以及Park等人(美国专利号5861251和6153412)。Park描述了在葡萄糖、山梨醇、蔗糖或Ficoll®存在下对TAQ的冻干。Klatser PR等人描述了一种冻干的PCR混合物,其使用海藻糖作为低温保护剂,并使用了Triton X-100。Klatser发现在制备后多至一年时再水合,TAQ的冻干混合物仍具TAQ活性。包含TAQ和赋形剂的商业可用的冻干珠子也已经可得(Ready-to-Go PCR珠,Amersham Biosciences; Sprint™ Advantage®, Clontech, Mt View CA)。一旦冻干,这些产品就具有吸湿性并对湿度敏感,必须立即密封。显然,这些产品还必须在用超纯水进行再水合加工过程期间以及随后的使用之前置于冰上,这样使得其在下一代有在板反应剂的微流体装置中的使用如果不是不可能也是困难的。

[0024] 相反,下一代微流体装置经配置使得不可能在反应剂的再水合期间使用冰或纯净水。装置反应剂一般是通过样品或从样品制备的稀释液进行再水合的,例如通过Boom的方法(美国专利号5234809)。因此,本领域仍然需要这样的方法,使得实现PCR反应剂混合物组成中的DNA聚合酶的环境稳定化(ambient stabilization),其中不涉及冻干并在延长的储

存时间内保持足够的可靠性足以在微流体卡片中进行敏感性诊断测定法的商业化。

[0025] 因此,迄今为止的公开都没有明显地提出适合于不经冻干或冷冻而对TAQ聚合酶进行延长稳定干燥储存的剂型。用于诊断性应用的微流体装置的商业化越来越接近完成,更迫切地需要对此问题有可行的解决方案。

[0026] 发明简述

[0027] 用于在微流体卡片上进行核酸测定法的分子生物学反应剂,具体而言是TAQ聚合酶的室温干燥储存已经证明是十分困难的。如本文所表明的,将反应剂以液体形式印记在含有冻干保护剂的基质里。自动化的印记装置将含有生物制品的基质的微升液滴印记在卡片的微流体通道中,不经过会破坏卡片装置的制造的冷冻或冻干步骤。在液滴基质凝胶化之后,通常是在受控室温下干燥大约10分钟,然后完成了卡盒的装配。幸运地,通过此过程可以实现六个月或更长的储存稳定期,足以用于商业化。

[0028] 关于TAQ聚合酶,我们推理对于在高温环境下的活性而言合适的酶很可能具有高的 T_d 值,如许多TAQ聚合酶的 V_{max} 为75°C左右就是证明,并且为了最好地保持其天然状态,应当将其以玻璃化状态与具有相对高 T_g 的玻璃体相缀合。我们还认识到可能需要其他赋形剂如表面活性剂以在干燥储存期间稳定化TAQ的高度折叠的结构,尤其在微流体装置中,因为反应剂材料优选地印记在低表面活性的表面上,如聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET),并且然后在干燥和再水合期间进行界面吸附和变性。钝化方法也是合适的。一旦反应剂印记在位置上,就通过层压或超声焊接进一步加工微流体装置以形成完整的卡盒体。使用自动化的打印机分配反应剂,并随后进行凝胶玻璃化使得可以进行卷绕式(roll-to-roll)和单片式(sheet-to-sheet)制造,这些加工过程与冻干步骤不兼容,因为对包含密封的反应剂的化合物塑料片或卷进行冷冻和真空加工有技术困难。

[0029] 在受控室温下干燥一段时间之后,所述方法依赖于在密封的防潮袋中使用凝胶干燥剂以完成卡盒体内酶的玻璃化。样品入口和废液出口提供了卡盒体中的开口,通过这些开口, $D_h < 0.2$ 以下的缓慢脱水过程继续进行。因此在脱水过程中酶会经历几周时间的部分脱水状态。尽管不受理论的制约,我们认为延长的连续时间-脱水曲线对酶在糖或其他多醇逐渐置换水作为氢键供体的过程中以天然状态进行稳定化是至关重要的。惊奇的是,我们发现TAQ的活性实际上在此干燥加工过程中急速增加。尽管不受任何具体理论的制约,我们将此解释为通过以部分水合状态进行重折叠的过程,在冷冻储备物中构象异构体的潜在活性得到回复,这更接近地类似于以摩尔渗透压浓度(osmolality)的细胞内溶胶。在此过程中,该材料由凝胶发展为复合的凝胶样玻璃体,发展出复合的 T_g (即,产生于混合物中超过一种的玻璃体前体(glass-precursor)),其由于糖的高 T_g 值性质而超过室温。

[0030] 据发现联合冻干保护剂(co-lyoprotectant),包括高分子量聚乙二醇(PEG)、纤维素树胶、白蛋白或明胶、增强剂、氨基酸以及可选地,选定的含氟表面活性剂可用于此加工过程并促成复合 T_g 。尽管不受理论制约,然而认为联合冻干保护剂可选择性地与蛋白质外壳结合而不破坏由糖形成的大块凝胶玻璃体。所描述的方法对TAQ聚合酶进行了优化,但是如果有必要可以进行调整并如需要地有效用于稳定化其他生物学反应剂如dNTP、一般的DNA聚合酶、一般的RNA聚合酶、逆转录酶、蛋白酶K、RNA酶H、引物和探针,不会与生产这些微流体卡盒的卷绕式或单片式的加工过程有不兼容。

[0031] 方便地,其不要求冻干和冷冻储存条件。所述一般方法广泛用于而限于制造用

于诊断性核酸测定法的微流体装置和试剂盒。庆幸的是根据这些方法大量生产的微流体卡盒具有超过6个月的储存保质期。

[0032] 附图简述

[0033] 本发明的所教导的内容可通过参考下文详述的说明书结合所附的图和权利要求更好地理解,其中:

[0034] 图1显示了用于核酸测定法的可分离式微流体卡盒的片。此片是制造单个微流体卡盒的中间产物。在本例中的片包含8个可分离式微流体卡盒。

[0035] 图2A和2B示意性说明了最终装配期间反应剂点在微流体卡盒上的印记情况。图2A显示了具有四个液体反应剂点(黑圈)的底层(underlayer);图2B显示了有封装的凝胶点(空心圈)的完成的卡盒装配体(assembly)。

[0036] 图3A-3D示意性说明了几种构造,其中液体反应剂可应用于微流体通道或腔室(chamber);在最终装配之前液体反应剂在位置上发生凝胶化。

[0037] 图4A-D为具有在板反应剂以及珀尔贴式(Peltier-type)热循环能力的微流体卡盒的备选构造示意图。

[0038] 图5是现有技术的凝胶的复制,展示了多种脱水反应混合物中的PCR扩增产物。该图复制于A Madejón(图1,上部图组)的声明,来源于美国专利申请号10/292848的文档夹中的记录。

[0039] 图6是现有技术的凝胶的复制,展示了TAQ反应剂溶液储存过夜后的PCR扩增产物。

[0040] 图7为柱状图,比较干燥储存两个月后的TAQ剂型。

[0041] 图8为rtPCR曲线,显示了再水合后的干燥混合物相比新鲜制备的湿反应混合物(未干燥)中TAQ酶的活性。

[0042] 图9为柱状图,显示在室温下TAQ活力在商业化供应的储备物中在松三糖玻璃体中的连续玻璃化期间的增加。

[0043] 图10为柱状图,显示在含有选定赋形剂的松三糖相比海藻糖中进行玻璃化储存后的TAQ活力。

[0044] 图11显示在含有赋形剂含氟表面活性剂FC-4430(3M Corp)的玻璃化储存后的TAQ活力。

[0045] 发明详述

[0046] 发明者意欲在本文中为特定意义进行限定,即,其为固有的意义。本文使用的其他词语和短语的意义与相关领域技术人员所清楚的使用法相一致。当引用的文献通过参考并入时,若参考文献中任何词语的意义或定义抵触或约束本文所使用的意义,则认为其为所述参考文献的特有风格而不会取代本文公开中所使用的词语意义。

[0047] 定义

[0048] 冻干保护剂:保护蛋白质、引物或探针,例如TAQ聚合酶在干燥储存期间不发生变性或丧失生物学活性的分子。许多冻干保护剂为多醇,但这类物质还可包括氨基酸、肽、蛋白质以及PHC、糖、聚乙烯基吡咯烷酮、PEG,等等。应当理解的是此定义还包括联合冻干保护剂,其中在混合物中使用了第一种物质以及第二种与第一种具有协同保护效应的物质。

[0049] “Tg”为玻璃转化温度,高于此温度时无定形玻璃样材料的粘稠度迅速下降,从凝胶发展为可变形的塑料(plastic)再变为液体,相反地,低于此温度则变为无定形非晶体固

体形式。人们认为40°C或更高的T_g会确保室温下反应剂的稳定性,但是这对于TAQ聚合酶还是未知的。一般地T_g是使用差示扫描量热法(DSC)确定的,并且可定义为作为转化的起始、中点或末点。技术细节在Jan P. Wolanczyk, 1989, *Cryo-Letters*, 10, 73-76(1989)的“Differential Scanning Calorimetry Analysis of Glass Transitions”以及Gibbs JH和EA DiMarzio, 1958, *Nature of the Glass Transition and the Glassy State*, *J. Chemical Physics* 28:373-393中提供。用于此方法的玻璃体通常并非形成于纯的玻璃体前体,而相反地形成于冻干保护剂和联合冻干保护剂、联合溶剂、联合表面活性剂或所添加的赋形剂形成的混合物,因此称为“复合玻璃体”。这些复合玻璃体可具有中间玻璃体和“凝胶样”特性,其水合值范围为约 $0.01 \leq Dh \leq -0.4$,更优选的为 $0.022 \leq Dh \leq 0.2$ 。复合材料的T_g一般取决于单个组分的T_g值(Franks, F, 1994, *Long term stabilization of biologicals*, *Bio/Technology* 12:253-56)。优选的T_g超过预期储存温度20度以上。

[0050] 探针:“探针”为能够在室温下以足够的互补性通过互补碱基配对结合至靶标核酸以形成稳定的双螺旋的核酸。探针可以加标签。可连接至探针的合适标签包括但不限于,放射性同位素、荧光素、发色团、质量标签(mass label)、电子致密颗粒(electron dense particle)、磁性颗粒、自旋标签、发射化学光的分子、电化学活性分子、酶、辅助因子以及酶底物。荧光探针包括插入型探针,如Syber Green® (Molecular Probes)、溴化乙锭或噻唑橙、FRET探针、TaqMan® 探针(Roche Molecular Systems)、分子信标探针、Black Hole Quencher™ (Biosearch Technologies)、MGB-Eclipse® 探针(Nanogen)、Scorpions™ (DxS Ltd)探针、LUX™ 引物-探针(Invitrogen)、Sunrise™ 探针(Oncor)、MGB-Pleiades(Nanogen),等等。探针技术上的最近进展由例如Lukhtanov EA等人在2007, *Novel DNA Probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence*, *Nucl Acids Res* 35:e30中综述。

[0051] “储存稳定期”指的是一段时期,例如“保质期”,其中干燥反应剂混合物在受控条件下储存于微流体卡片中同时保留生物学活性。如果生物学活性材料的生物学活性在进行PCR扩增时任何给定的时间都有效,则TAQ聚合酶在反应剂复合物中“保留其生物学活性”。优选的组合物具有超过6个月的保质期。

[0052] 微流体卡盒:具有内部液体操作中结构(mesostructure)的“装置”、“卡片”或“芯片”,其按惯例具有至少一个维度小于500um。这些流体结构可包括例如微流体通道、腔室、阀门、出口、过道(via)、泵、入口、喷嘴以及检测工具。

[0053] 微流体通道为用于流体的封闭的导管或通路,其z-维度(高度或深度)小于500um,更优选的为大约或小于150um(大约4密耳),其横截面一般宽于深度。通道的最窄的维度对流体、雷诺数(Reynolds Number)、压力降(pressure drop)影响最大,并且在本文描述的设备中,最窄的维度一般为z-维度或直径。当通过注塑(injection molding)成形时,通道的顶(roof)和壁一般通过径辐相连。一些微流体通道具有环形的横截面,并且特征在于直径。其他形状也是可能的。

[0054] 要认识到如本文使用的词语“顶部”、“底部”、“上部”、“下部”、“侧边”、“顶”、“底”和“基片(base)”为相关术语,并且除非有明确的陈述,并不一定描述的是装置或装置组件相对于地表平面的方向。这些装置在桌表面的平面上的优选用途不意欲为限制性的,且一

般取z-轴垂直于装置体的主平面,这仅仅是出于说明和制造上的方便。

[0055] “常规的”为指出哪些是在与本发明相关的现有技术中已知的术语。

[0056] “大约”与“一般地”为不确定性(inexactitude)的宽泛表达,描述了“或多或少”、“大约地”、或“几乎”在“仅仅大约”的意义上的情况,其中的变化不显著、明显、或具有等价的用途或功能,并进一步指出了存在对基准、规则或限制的明显的较小例外。

[0057] 除非上下文有另外的要求,下文的整个说明书及权利要求中词语“包括”及其变化形式如“含有”和“包含”要在开放而包含的意义上解释,即“包括但不限于”。

[0058] 用于PCR的微流体装置的设计及操作

[0059] 在微流体装置中的PCR由于对于装置典型的高的面积对体积比而具有挑战性。几微升样品的反应体积是典型的,且通道和腔室的维度一般在宽度上小于500微米,在深度上可能为该数值的10-20%。本发明的微流体装置为小型化学反应器,优选地大量生产自具有包含预印记的测定法反应剂的微型通道和腔室的塑料。

[0060] 在一个优选的实施方式中,进行诊断性测定法所要求的所有反应剂预先置于装置之内,这样装置就是用于进行核酸诊断性测定法的独立可丢弃设备。可选地,所述装置还包含在板稀释剂、洗涤溶液以及体积足以包含所有测定法中产生的液体废物的废物收集器。

[0061] 适合于本发明的实践的微流体卡片的设计和特征的详述公开于例如美国专利申请12/207627,“Integrated Nucleic Acid Assays;11/562611“Microfluidic Mixing and Analytical Apparatus”;12/203715“System and Method for Diagnosis of Infectious Diseases”以及10/862826“System and Method for Heating,Cooling and Heat Cycling on Microfluidic Device”,所有这些申请都共转让给本申请人。这些技术是Zhang的近期的综述的主题(2007,Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis:latest advances and future trends.Nucl Acids Res35:4223-37)。

[0062] 如本领域已知的,微流体PCR可在四种构造的PCR热循环反应器中进行:a)蛇形,b)环形,c)往复型,d)具有定位加热冷却的单腔室型。蛇形反应器包括加长的通道,这些通道来回循环于两或三个温度区域之间,环形反应器为穿过两或三个温度区域的单回路,往复型反应器包含两或三个不同温度的腔室,每个腔室相互连接以交换反应混合物,基于单室的反应器则含有反应混合物并有定位加热和冷却的供应,如通过帕尔贴热电子设备。蛇形、环形和往复型反应器都需要一个泵或数个泵使得反应混合物穿过或在温度区域之间进行循环。微流体装置的结构也是不同,以反映出这些不同构造。

[0063] 测定法可包括末点或动态(也称为“实时”)检测。当使用了指示型反应剂如探针时,可在扩增期间或扩增后将其加入。优选的为荧光、荧光淬灭以及“升频转换(up-converting)”荧光探针,这些都在本领域已知。

[0064] 在一个优选的实施方式中,将含有核酸的生物学样品吸取到微流体卡片的入口,该入口随后在测定法的余下操作中被密封。使用气动控制器按需要引导样品和液体反应剂而完成测定法。在第一个步骤中,样品的核酸可选地在固相基质中提取并在与含有引物的干燥的PCR反应剂接触前在PCR缓冲液中再水合。含有TAQ聚合酶的干燥反应剂是分开提供的。然后在卡片上进行热循环,并且通过多种方法进行扩增子的阳性检测,包括使用在微流体装置上提供的荧光探针。

[0065] 由于水和塑料之间的表面张力,有时候会将表面活性剂和联合表面活性剂如PEG

或白蛋白用于减少微流体装置的塑料表面对生物学品的吸附。已知的用于减少吸附性损失的表面活性剂包括Tween-20、Triton X-100、Nonidet P40、PEG-8000和牛血清白蛋白。还认为这些物质减少TAQ聚合酶的聚集,并频繁用于增加聚合酶活性。我们还使用的有用于钝化接触生物学品的塑料表面的技术。这些技术涉及用亲水分子如聚乙二醇二丙烯酸酯对塑料进行钝化和共价修饰,其中塑料通过自由基引发剂而被激活。不需要修饰的表面,如要粘合在一起的表面,在钝化处理过程中受到掩膜。

[0066] 通常地,dNTP、镁盐、氯化钾、氯化钠、缓冲液、探针类、可选的引物、以及非特异性湿润试剂或表面活性剂可选地组合在“主要混合物(master-mix)”中,所述主要混合物等量分配于并干燥于独立的微流体装置上。

[0067] 经验显示引物最好是分别印记并与TAQ聚合酶反应剂隔一段距离。这样的原因未能完全理解,但是我们的产率与此种修饰一致地得到增强。引物在干燥状态得到较好储存,并可通过例如在密封袋中干燥剂的存在下从1.6%海藻糖水溶液进行凝胶-至-玻璃体玻璃化过程而在延长的室温储存中得到稳定化。

[0068] 在制造有在板反应剂的微流体装置的过程中,含有玻璃体、赋形剂和生物学反应剂的溶液一般使用多种自动化液滴分配器设备印记在微流体装置的通道或腔室中。然后将覆盖层或盖子置于装置上并将装置密封。在装配和检查后,将完成的微流体装置插入箔衬袋(foil bag)。每个装置的袋子中都放有干燥剂。可用的干燥剂的实例包括硅胶、皂土、硼砂、**Anhydron®**、高氯酸镁、氧化钡、活性氧化铝、无水氯化钙、无水硫酸钙、硅酸钛、无水氧化钙以及无水氧化镁、硫酸镁,和 **Dryrite®**,等等,可以加入或不加指示剂。然后用热压封口机在干燥气体环境下(优选地为无氧)将这些袋子密封,并储存以所标示的保质期。

[0069] 卡盒制造

[0070] 提供了用于制造PCR的微流体卡盒的详细介绍,但是所提供的方法和剂型一般地适用于通过热循环和等温方式进行的核酸扩增,也适用于预期使用在板干燥反应剂的一般性核酸测定法。

[0071] 微流体卡盒是通过层层组建的过程用塑料体制成的。

[0072] 每个卡盒是由一对部件或层(layer)粘合或融合在一起,或者多个层粘合或融合在一起而形成。术语“层”指的是任何一种或多种组成卡盒的通常为平面固体的衬底(substrate)部件或胶层;“层”还包括单个片、卷轴堆以及任何形成一般平面部件的模塑体部件。这些层片可使用压力敏感性粘合剂(PSA)或热粘合剂进行连接。备选地,其可在压力下以加热、溶剂或通过超声焊接进行融合。装置中层的数量将取决于所需要的功能特性已选择的制造加工过程。

[0073] 层中形成的通道和腔室在随后层连接成堆而封闭时形成液体的导管。这样,这些卡盒通过片的堆积或多重卷轴相互叠放,如其来自多重折卷机(multiple feed reel),例如在卷绕式加工过程中,而适合于制造。通过众多加工过程之一将单个通道和腔室进行剪切、压印(emboss)或模塑(mold)入层中。制造方法包括激光模板印记(laser stenciling)、层压、压印、印塑(stamp)、注塑、掩膜、蚀刻、光催化立体刻蚀、软刻蚀等等,或上述方式的任何组合。

[0074] 塑料是用于构建本发明的微流体装置的优选材料。可使用的塑料包括烯烃、环状聚烯烃、环状烯烃共聚体、聚酯、聚乙烯对苯二甲酸酯、聚丁烯对苯二甲酸酯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯、聚氨酯、聚醚砜、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯酯、聚酰胺、聚酰亚胺、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚四氟乙烯、聚二甲硅氧烷(PDMS)、聚硅烷、纤维素三醋酸、一般的热塑塑料,等等。复合物和共聚物也常常使用。选择塑料或其他固体衬底及常规的粘合剂的知识在相关技术领域广为人知。

[0075] 设计卡盒的微流体结构(works)可以简单或复杂,但是均包括提供将样品插入样品入口并提供液体流经结构的出口,其中结构为通道、腔室、阀门、泵和其他微流体特征物组成的水力网络,可选地由通过弹性薄膜可操作地连接于此水力网络的气动网络覆盖层控制。样品入口和出口是通过串联或平行的通道和腔室组成的系统流动地连接的,其中腔室或通道具有连接至样品入口的上游流体路径和连接于出口的下游流体路径。

[0076] 封闭在内部腔室或通道内是至少一个玻璃化的凝胶反应剂点,其通过以下方法装配于其中:

[0077] a)组合第一种反应剂与印记和稳定化溶液,并将第一种印记和稳定化溶液的液滴印记到腔室或通道里,很快地使液滴干燥到水合凝胶状态,由此形成其中的第一种凝胶反应剂点;

[0078] b)可选地,组合第二种反应剂与印记和稳定化溶液,并将第二种印记和稳定化溶液的液滴印记到腔室或通道里,很快地使液滴干燥到水合凝胶状态,由此形成其中的第二种凝胶反应剂点;

[0079] c)可选地,继续步骤b直到将多个在板凝胶反应剂点被点样于其中;

[0080] d)通过层压、粘合、超声焊接或其它的在其上附着一个或多个盖,以封闭塑料体中的腔室或通道;

[0081] e)然后在干燥的气氛下,将具有一种或多种封闭的凝胶反应剂点的微流体卡盒密封于具有干燥剂的气密性袋子中,干燥剂在储存期间进一步玻璃化一种或多种凝胶反应剂点,由此形成玻璃化的一种或多种凝胶点,此微流体卡盒具有在室温下延长的保质期,不需要冻干或冷冻储存,并含有分子诊断性测定法所需要的所有在板反应剂。

[0082] 这种方式使得有可能在制造加工过程的中间步骤将干燥反应剂点封闭到微流体卡盒内。使用此方法,微流体卡盒的片可以以连续或半连续过程由卷轴堆(roll stock)材料制造,如图1中说明的。本文中,显示了八个单个可分离的微流体卡盒,形成单个生产单元(1)。精确的数量并不重要,可同时生产48或60或200个卡盒。在加工的最终步骤中,单个卡盒(2)相互分开并包装于如上文描述的有干燥剂的箔衬袋中。

[0083] 通过使用自动化的反应剂打印机如具有BioDot Plus Dispenser(Biodot,Irvine CA)和X-Y-Z主控(head control)的BioDot AD1500,可以实现将液滴快速自动化地置于片的基片或底层上。通过系列使用多重控头,不同反应剂组成的液滴形式可以在片上反复进行。可选地,片的单个微流体卡盒可印记上不同的反应剂。印记控头可以是接触式的或非接触式的。

[0084] 现在参照图2,其更详细地描述了印记加工过程。通过图2A的实例,显示了塑料底层(20),其具有剪切块(cutouts)用做通道和腔室的底孔,形成了PCR扩增的分支回路。此阶段的通道和腔室的孔常常不是连续的,这样可以使得在随后的层中置换过道和阀门。在该

示意图中,显示了四个腔室,其接收到四个反应剂点(黑圈),每个点在点样时为液体,并在环境条件下迅速凝胶化。点1(21)包含荧光探针,用于检测扩增的扩增子产物。点2(22)包含一定量的TAQ聚合酶、dNTP、缓冲液和镁盐,用于在稳定化凝胶基质中扩增靶标。点3(23)在液滴中包含引物对。点4(24)是可选的,含有逆转录酶、dNTP、以及以有效从RNA模板合成cDNA的剂型的缓冲液。每个点都配制于点样后快速变为凝胶的可印记的基质中,然后其会干燥成为复合凝胶或玻璃体用于在卡盒保质期内稳定化反应剂。最终的干燥加工从每个点移除多余的水合水,此步骤发生在提供一定量干燥剂的箔衬袋中。每个点都配制成在流体,通常为生物学样品或稀释剂,或生物学样品的提取物或滤出物,引入样品入口(底部)时会迅速再水合。

[0085] 在图2B中,所有这四个反应剂点(空心圈)都是以玻璃化凝胶状态。通过将覆盖层的堆加到印记了这些点的底层上进行卡盒体(25)的完全装配。气动隔膜也已经按要求置于阀门及退火腔室之上,连同气动控制线延伸到外部界面(未显示)。在使用时,通过第一个阀门(26)使核酸提取物进入卡盒底部并进入到含有逆转录酶和dNTP(存在于迅速水合基质(点24))的腔室中。将通道排气(29)。随后进行孵育,其中任何RNA靶标都被转换为适合之后进行PCR的双链螺旋。在扩增的第二个步骤中,打开第二个阀门(27),样品流体继续进入退火腔室(15)。在这里特异于靶标核酸序列的引物对已经印记于玻璃体基质(点23)中,后者迅速溶解入样品。然后样品继续进入解链(melting)腔室(16)并在具有靶标序列的DNA双螺旋融解温度以上的温度下与TAQ聚合酶以及修饰的“主要混合物”(玻璃化于凝胶基质(点22)中)相接触。然后样品以往复运动的形式在解链腔室和退火腔室之间流动(由形成退火腔室顶的隔膜17驱动),每个热循环引起靶标序列的扩增以及扩增子产物量的连续加倍。在配对扩增腔室(18)中进行了一定数量的热循环后,通过使产物流经第三个阀门(28)并进入检测腔室(19)并与Spot1(21)(其含有存在于玻璃体或凝胶基质中的荧光探针)相接触,对任何扩增子进行检测。在再水合和探针杂交后,可通过荧光光谱法就扩增子的存在情况检查样品。出于此目的,在检测腔室上提供光学窗。在读出并记录测定法结果后,可移除并丢弃此微流体卡盒。

[0086] 尽管上文的描述是总体概述,而该结构的卡盒不限于进行所显示的具有往复流动的PCR和热循环,但上文实例提供了清楚而准确的描写,说明了在最终装配之前的卡盒制造过程中需要中间步骤。在印记之后,通过随后的层压、焊接或粘合步骤将凝胶点密封于塑料体之内,这样除了通过小的排气洞(29)和样品入口就没有与主体外部的任何联系。按冻干的需要,随后对此塑料体进行冷冻及采用真空则有可能破坏或热拉伸层压结构,还可能堵塞光学观察窗口。此外,冻干过程中形成的灰尘和细小颗粒可能在真空释放时通过微流体结构重新分布,由此例如用特异于第二种靶标的引物污染了特异于具体靶标的第一个测定途径。类似地,一个通道中的阳性对照模板可能无意地被引入旨在用于样品或阴性对照的测定法通道中,导致主要部分的质量控制问题。在制造加工过程后使用高度真空也会损坏卡盒体内置于一定位置中的弹性隔膜。因此,很难或甚至不可能想象如何将冻干应用于具有封装在内部通道和腔室内的在板反应剂的微流体卡片的制造加工过程,这样就如同将船放入瓶子中一样。

[0087] 本发明组合物和方法的凝胶点的用途比用石蜡包被所有反应剂并熔解石蜡以起始反应(如Barlag所提出的(WO2006/042838))要更加准确可靠。凝胶点可靠地避免了与冻

干、片剂装或反应剂球等其他方案相关的灰尘和细小颗粒的问题。并且考虑到卡片上的靶标腔室或通道的维数精细,现有技术的灰尘、片剂或冻干反应剂球的精确分布在技术上很难或不可能做到,并且在随后加工中所需要的处理一定会扰乱及重新分配这些内容物,再次使得质量控制问题复杂化。

[0088] 仅仅进行干燥不是可接受的备选方案。多个研究已经显示许多生物学反应剂在没有合适基质的存在下无法经受干燥。合适的基质必须首先通过试错法的过程而发现,在这个过程中花费了大量工作,常常没有成功。TAQ聚合酶就是这样一个实例。不曾有这样的方法——通过仅仅对TAQ聚合酶进行干燥产生在干燥后6、3、2或甚至1个月还有活性的可再水合固体。

[0089] 根据本发明,可凝胶化基质中的液体反应剂首先分配至微流体卡盒的多个表面上,在表面其凝胶化从而不干扰随后的装配步骤。可凝胶化基质为玻璃体前体,并然后在制造卡盒之后在数天或数周的时期内进一步去水。形成可接近印记控头的表面的卡盒的任何层都是用于点样的候选。如图3A-D中显示的,腔室或通道的顶和底可在多种构造中用玻璃化的凝胶反应剂点(31a-e)进行点样。可选地,可允许点在腔室中从一个壁扩展到一个壁,或可限定在腔室顶或底上更孤立的点上。如果有需要,可通过层堆积时将腔室顶的一个点与腔室底的另一个点配对,将应用于一个层的点和应用于另一个层的点置于临近位置。

[0090] 可见,装配的方法依赖于反应剂的剂型(formulation)以实现所需要的目的:商业可接受的保质期内的储存稳定性、使用自动化分配器的精确操作、迅速凝胶化以防止最终装配期间反应剂在卡盒上的无意移动、在微流体卡盒所具有的密封于气密性包或袋中的干燥剂的影响下原位慢速玻璃化,以及最终,在生物学样品或其衍生流体中迅速再水合以及反应剂活化。因此剂型是将反应剂应用于本发明的具有封闭的玻璃化的凝胶反应剂点的微流体卡盒的一个重要考虑。

[0091] 在本发明另一个微流体卡盒的实施方式中,如与图2中所描述的相反,构造及反应剂的点样可适用于帕尔贴型PCR或等温扩增。在帕尔贴扩增方案中,单个腔室与可逆加热机冷却源以及热交换膜相接触(例如在共转让的美国专利申请10/862826中描述的)以使腔室中的温度在变性温度和退火温度之间进行热循环,其间具有可选的用于链延伸的停延时间。这种设置消除了热循环期间对移动扩增混合物的需要。

[0092] 现在参考图4A,显示了用于具有在板印记反应剂的微流体卡盒的帕尔贴-驱动式PCR构造。认为(最左边的腔室40)逆转录酶是以玻璃化的凝胶反应剂点(41)提供的且靶标RNA提取物首先经处理以形成cDNA复制物。如果需要也可提供dNTP和必要的引物。在中心腔室——“帕尔贴扩增腔室”(42)中,样品材料首先被用来溶解两个反应剂点,TAQ聚合酶反应剂点(43)和含有引物的点(44)。TAQ聚合酶点可含有必要的辅助因子如所添加的镁盐、dNTP、KCl和干燥缓冲试剂。然后在单个腔室中进行热循环而样品保持静止。在所需数量的循环后,扩增反应产物被移至检测腔室(46),其中液体溶解反应剂点中的玻璃化的探针(47)。在杂交之后,例如通过安装在检测腔室上的光学窗进行荧光检查而检测反应混合物中的任何扩增子。检测腔室可包括用于温度逐渐变化(ramping)的独立加热模块以确定例如用于FRET检测复合物的熔解曲线。

[0093] 在第二个实施例中,如图4B中说明的,可选地再次(在逆转录酶腔室51中)使用包含逆转录酶的反应剂点(50)以将任何RNA转换为适合于PCR的DNA模板。RNA在例如多种微生

物学或病毒学诊断性测定法中是很有意义的。然后将样品推进到最右边的腔室中(52)——组合的帕尔贴扩增和检测腔室,其包含三种玻璃化的凝胶反应剂点。这些点几乎立即溶解并由以下组成:具有辅助因子的TAQ聚合酶玻璃化的凝胶反应剂点(53)、引物反应剂点(54)以及探针反应剂点(55)。这样,完成了扩增和同时的扩增子检测所需要的完全的反应剂加样。当需要实施实时PCR时,探针必须存在于扩增腔室中。这就是前文讨论的(图2)用于扩增的帕尔贴或分开的加热区域是否在物理上隔离开的情况。所述扩增和检测腔室可因此成为双用途的腔室,并可选地如本文所说明的,具有用于循环温度的加热方式和用于监测荧光的监测工具。

[0094] 图4C显示了微流体腔室中玻璃化的凝胶反应剂点的装配可以是紧凑型的,例如当所有用于PCR及用于检测RNA靶标的反应剂都印记在单个腔室中的情况。显示了PCR检测腔室(60)中的逆转录酶反应剂点(61)、TAQ聚合酶反应剂点(62)、引物反应剂点(63)以及探针反应剂点(64)。清楚的是DNA靶标可不使用逆转录酶而进行检测。

[0095] 图4D中更详细地显示了凝胶点的构造,其中显示了横截面视图。此处将TAQ聚合酶和逆转录酶(72,73)点样于腔室(70)的顶上,不与加热模块(71)直接接触,其可以在样品引入左方入口前就被激活。引物(74)和探针(75)被点样到腔室的底上。在装配之前,顶和底的衬底层是开放的并且能够进行印记,这样使得最终的装配产物包含腔室里的反应剂。通过使用点样基质中的无定形的玻璃化的凝胶复合物,能在一般小于20uL的总反应体积中达到快速溶解,其中缓冲液和盐浓度都调整为最适于每个反应。加热模块通过薄的热交换膜接触扩增腔室,并幸运地促进反应剂进行混合。

[0096] 如所显示的,反应剂可点样于单个腔室或多个腔室中。可采用多种点构造。可将点并排放置或将其分开以使一些点在面对腔室的一个衬底层上而其他点在面对腔室的另一个衬底层上,可以作必要的变通。在一个优选的构造中,可提供分开的检测腔室,并且在检测腔室中点样一种或多种探针。在制造过程中,很容易做到将一些反应剂点样于卡盒的一个层而将其他反应剂点样于另一个层,这样卡盒的每个单个通道可具有独特模式的单个反应剂以适合于具体的测定法应用。以这种方式,在单个卡盒上可进行一系列测定法。单反应和多反应都可进行。有时候探针是以不对称的比例提供的,如用于不对称PCR。正向和反向探针可混合在一起并单个地点样,或其可进行分开点样。因为这些点迅速凝胶化,在一些情况下这些点可相互堆积或可以接触。使用系统固有的灵活变动也预期用于巢式PCR的构造。如图3中示例说明的点样几何学(geometry)以及如图2中示例说明的通道或腔室的几何学都可变动以满足实际应用的需要。

[0097] 剂型

[0098] 现在讨论凝胶反应剂点的剂型,其必须稳定化其中包含的生物学反应剂、必须在装配过程中迅速凝胶化,以及允许在装配后步骤中连续玻璃化,并且必须很容易再水合。再一次选择TAQ聚合酶作为实例以示例说明配制反应剂用于本发明微流体卡盒制造中的考虑因素。然而这些一般考虑还可应用于NASBA等中所使用的DNA聚合酶的凝胶稳定化。图5和6为现有技术的示意图,并在发明背景中有所讨论(上文)。

[0099] 为了在制造具有在板反应剂的微流体装置后数月通过PCR扩增靶标核酸序列,必须在储存期间保持有效水平的TAQ活性。可通过将装置包装在有干燥剂的密封箔衬袋中改变室温储存的条件,从而防止了湿度的波动。在将具有玻璃体冻干保护剂前体和赋形剂的

缓冲混合物中的TAQ反应剂点样于装置上之后,在达到完全干燥之前将装置密封在袋中。在此阶段,这些点在稠度上是凝胶样的。在密封于袋中之后,通过结合水从反应剂点到干燥剂的转移,玻璃化继续进行。通过选择兼容性的玻璃体/赋形剂组合物,此方法产生出装配在独立微流体装置中的储存稳定性TAQ,该装置只需要加入样品就可以运行测定法。

[0100] 在研究了糖、联合冻干保护剂、赋形剂、表面活性剂和载体蛋白质的数百种组合后,选择海藻糖和松三糖进行进一步研究。我们推论就活性而言适用于高温环境的酶可能具有高的 T_d ,如许多TAQ聚合酶的 V_{max} 在75°C左右就是证明,并且为了最好地保持天然状态,其应当以玻璃态化的状态与具有相对高的 T_g 的玻璃体相缀合。我们还认识到可能需要其他赋形剂如表面活性剂以在干燥储存过程中稳定化TAQ的高度折叠结构并防止界面变性所造成的活性丧失。

[0101] 海藻糖为由两个葡萄糖分子组成的二糖,这两个分子通过 $\alpha, \alpha-1, 1$ 键相连。由于葡萄糖残基的还原性末端相互连接,海藻糖没有还原能力。海藻糖广泛分布于自然界中并保护生物体应对多种压力,如干燥、冷冻以及渗透压。脱水生活(anhydrobiotic)生物体如卤虫(brine shrimp)和特定的线虫,其抗干燥,由于其高的海藻糖含量能够耐受水缺乏;海藻糖在极端环境条件下稳定化膜和其他高分子装配物中起到关键作用。海藻糖相对于其他二糖还具有更高的玻璃转化温度,并且有在干燥产品中作为稳定剂的很长的历史(见例如Crowe JH等人,1984,Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms the role of trehalose,Science223:701-703;美国专利号4457916、4206200和4762857,以及英国专利GB2009198),因此认为其优于蔗糖。广泛认为海藻糖比所有其他冻干保护剂优越(Colaco C等人,1992,Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology,Bio/Technology10:1007-11)。

[0102] 松三糖(α -D-吡喃葡萄糖基-[1 \rightarrow 3]- β -D-呋喃果糖基-[2 \rightarrow 1]- α -D-吡喃葡萄糖苷)水合物为由2个葡萄糖分子和1个果糖分子组成的三糖,干燥状态下的分子量为504.44Da。其由许多食用植物液汁的昆虫包括蚜虫和粉虱产生。松三糖对这些昆虫有益,是因为其作为储备碳水化合物通过减少细胞内水势能而减少渗透应力。还广为人知的是其起到冷冻保护剂的功能并由于其低的摩尔渗透压浓度而用于广泛多种哺乳动物细胞的冷冻储存。水解作用释放葡萄糖和松二糖,但是这种三糖本身是非还原性的并相对耐受美拉德反应。松三糖的玻璃转化温度比二糖要高。

[0103] 下文表I中显示了 T_g 的比较值:

[0104] 表I

	T_g (°K)	T_g (°C)
甘油	180.0	-93.2
蔗糖	348.0	74.9
[0105] 蜜三糖(五水)	352.7	79.6
蜜三糖(三水)	358.4	85.3
蜜三糖(无水)	376.4	103.3
海藻糖(脱水)	305.2	32.0
海藻糖(无水)	352.2	79.0

[0106]	水苏糖(无水)	405.1	132.0
	松三糖(无水)	433.1	160.0

[0107] 松三糖的 T_g 值获自Mollmann, SH等人, 2006, The stability of insulin in solid formulations containing melezitose and starch. Drug Dev Indust Pharmacy 32:765-778。其他值获自Green JL和CA Angell, 1989, Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly, J Phys Chem 93:2880-82; Kajiwaru K和F Franks, 1997, Crystalline and amorphous phases in the binary system water-raffinose, J Chem Soc Faraday Trans 93:1779-1783; Slade L和H Levine. 1988. Non-equilibrium behavior of small carbohydrate-water systems, Pure&Appl Chem 60:1841-64; 以及Heldman DR和DB Lund, 2006, Handbook of Food Engineering(2nd ed) CRC Press, Boca Raton FL。并非所有来源的数据都完全一致; 然而, 通常认为 T_g 随着分子量而增加并随着水合水而减少。

[0108] 以水合糖开始确保了 T_g 一开始较低且剂型为液体, 但是在干燥时, T_g 会增加并达到一个值使得室温储存为无定形玻璃体的形式。在这个过程中, 要求无水糖的结晶过程不发生。共溶剂赋形剂用于防止不想要的结晶并更具选择性地与TAQ聚合酶结合, 这一点是通过试错法的过程而确定的。

[0109] 剂型1由(以水中终浓度计)1.5%的松三糖水合物、0.005%的Polyox WSR-301 (Amerchol Corp, Piscataway NY)、0.1mg/mL的BSA以及10单位TAQ聚合酶的水性溶液组成。在制备具有稳定剂的TAQ溶液储备物之后, 清澈的凝胶前体溶液以3uL点加到塑料微流体装置或卡片的内部表面。引物和探针是分开储存的。让这些点在受控的室温下干燥大约10分钟或更短, 然后将塑料装置密封于有干燥剂小袋的气密性袋子中并储存于受控室温下。Polyox WSR-301是一种长链聚氧乙二醇(4MDa分子量, 也叫做“PEG-90M”)。所有剂型都使用分子生物学级的水。牛血清白蛋白是一种优选的蛋白质载体, 而鱼明胶也可用于此方法。还可使用甜菜碱或赖氨酸。

[0110] 制备下文的剂型用于两个月稳定性研究中的并排比较: 剂型2的复合成分为1.5%海藻糖、0.005%Polyox WSR-301、0.1mg/mL BSA以及10单位TAQ聚合酶。剂型3含有1.5%松三糖水合物、0.1% **Ficoll®400**、0.1mg/mL BSA。剂型4含有1.5%海藻糖、0.1%含氟表面活性剂FC4430(3M Corp)以及0.1mg/mL BSA。剂型5含有1.5%海藻糖、0.1%PEG8000以及0.1mg/mL BSA。剂型6含有1.5%海藻糖、0.1%纤维素树胶7LF以及0.1mg/mL BSA。剂型7含有1.5%乳糖醇、0.005%Polyox WSR-301以及0.1mg/mL BSA。这些实验中使用的TAQ为 **EconoTaq®Plus** (Lucigen Corp, Middleton WI), 配制成10U/uL。

[0111] 所有的剂型都与标准量的TAQ聚合酶混合并点样于塑料表面用于测试。在点样后, 让凝胶复合物前体点简单放置大约10分钟, 然后封闭并将其和过量的干燥剂一同密封于防潮的气密性袋子中以连续地玻璃化这些凝胶点。一般地, 使用带有指示剂的硅胶或皂土。这些袋子在干燥、惰性气氛中进行热密封。

[0112] 图7报道了2个月稳定性储存测试的数据。这些结果显示为相对于未干燥而进行的新鲜混合的“湿”扩增的活性而标准化得到的荧光比率。如可见的, 大多数剂型无法保持完全的活力。然而, 可见剂型1, 基于松三糖/Polyox WSR-301/BSA凝胶的剂型, 在室温储存2个

月后以1.3倍的系数超过了标准的湿扩增混合物的效果。相反,用Ficoll1400制备的松三糖水合物在两个月后并未令人信服地具有稳定性,以Polyox WSR-301或多种备选赋形剂配制的海藻糖类似地也无法提供合适的储存稳定期。

[0113] 在这些研究中,使用具有5000拷贝/反应的副伤寒沙门菌(*Salmonella paratyphi*)引物对用于扩增。再水合的完全扩增混合物进行热循环,并使用分子信标或FRET探针完成检测。对每个反应测量Ct及荧光输出比率。图8中显示了样品的实时PCR扩增曲线,对比了延长干燥储存后的松三糖剂型1与新鲜湿反应。实心曲线(81)为干燥的TAQ反应剂的活性,虚线曲线(82)为标准湿TAQ反应混合物的活性。

[0114] 在图9中,将剂型1松三糖的表现作为储存稳定期的函数进行进一步检查。可见,在加工的起始期,TAQ聚合酶活性在4周的时期内稳步增加。再次地,荧光比率是实时PCR中达到的荧光的比率。我们认为此结果不是人为造成的;其可能表示从在含有制造和储存过程中损坏的TAQ酶分子的储备物中募集到天然状态构象异构体。尽管不受理论约束,认为商业可用的冷冻制备物包含一定百分比的冷冻变性的TAQ分子、构象异构体混合物,其中有一些是天然态构象而有一些不是,一些变体比其他活性更弱,并且稳定化步骤具有修复至少一些受损分子的构象状态的效应。

[0115] 图10比较了在具有不同的引物系统的扩增中的三种剂型。比较了剂型10A、10B和10C,其中剂型10A等价于上文的剂型3,10B等价于上文的剂型1,10C等价于上文的剂型5。如可见的,在使用将凝胶点密封于有干燥剂的气密性袋子以实现酶的逐步、连续脱水的方法进行干燥储存后,含有松三糖1.5%/0.005%PolyoxWSR-301/0.1mg/ml BSA的剂型再次显示出优越性。

[0116] 图11比较了含有海藻糖和0.1%PEG8000的剂型11A与含有海藻糖及0.1%含氟表面活性剂FC4430的剂型11B。惊奇的是,含氟表面活性剂对2周干燥储存数据中的荧光输出有显著的效应。

[0117] 进一步地,已经发现干燥PCR增强剂在微流体PCR中有作用。增强剂有多重功能,包括提高富含GC的DNA底物作为模板时的效果并增加特异性和产量。已知多种酰胺、亚砷、砷及二醇提高PCR产量及特异性,常常比甜菜碱明显更好。DMSO、四亚甲基亚砷、甲酰胺、2-吡咯烷酮都是实例。一些增强剂,如*n,n*-二甲基甲酰胺和DMSO已经用于降低热循环所需的温度,而在盐溶液中可能需要将溶液加热到近沸腾,还有附随的压力及除气问题。然而,本文需要可以以干燥形式如以凝胶或玻璃体复合物形式储存的增强剂。

[0118] 增强剂包括可用作联合冻干保护剂的玻璃形成体。这些增强剂包括*n*-甲酰吗啉(熔点23°C)、 δ -戊内酰胺(2-哌啶酮,熔点38-40°C)、 ϵ -己内酰胺(熔点69-70°C)以及1,2-环戊二醇(熔点为54-56°C)。据报道PVP-10的玻璃转化温度为66°C而PVP-40的T_g为99°C。其他有提高PCR的功能的玻璃形成体包括氨基酸如赖氨酸、低分子量酰胺、碳水化合物如糖原和菊粉、白蛋白(HSA和BSA),以及一系列如前文讨论的糖。

实施例

[0119] 实施例1.PCR标准反应

[0120] 作为湿标准反应,根据表II,将储备的冷冻TAQ聚合酶加入新鲜制备的PCR反应剂储备物混合物中。

[0121] 表II

[0122]

组合物	储备物浓度	反应体积 (uL)	终浓度
100mM Tris pH8.0, 500mM KCl,15mM MgCl ₂	10x	2.0	1x
MgCl ₂	50mM	1.4	3.5mM
dNTP	10mM	0.4	0.2mM
引物/探针混合物	20x	1.0	1x
TAQ 聚合酶	2.5U/uL	0.4	1U
标准 DNA 模板		5.0	
水		9.8	
总体积		20.0uL	

[0123] 使用Rotor **Gene®Q** (Qiagen Carlsbad CA)热循环仪对反应混合物进行热循环,并进行rtPCR监视。监视实时PCR以获得交叉阈值(crossing threshold,Ct);即,荧光(也就是DNA)增长为指数时的循环数及荧光输出(F_{SM})的测量值。对所有成功的扩增运行熔解曲线以验证靶标扩增子的正确扩增。还可使用末点监测。可选地,可包括FRET熔解曲线以验证扩增子的性质。

[0124] 实施例2.干燥反应剂测定法

[0125] 将含有TAQ聚合酶、冻干保护剂、联合冻干保护剂以及蛋白质载体或赋形剂并有KCl、Mg²⁺、dNTP的反应混合物制备成约5x的储备物并以3uL的点点样于微流体卡片中或塑料表面上。让这些点在室温下凝胶化大约10min或更少,然后置于Vaporflex Preservation Packaging(LPS Industries, Moonachie, NJ)提供的箔衬袋中。重构时,使用体积15uL的含有靶标DNA和引物的样品。

[0126] 然后将重构的量在引物和模板的存在下于Rotor **Gene®**中扩增。测量Ct和荧光输出(F_x)并与标准、湿混合物(上文)相比较。计算荧光比率(F_x/F_{SM})。

[0127] 松三糖、海藻糖、乳果糖和其他糖获自Sigma Chemicals(St Louis MO)。Polyol WRS301(也叫做“PEG90M”,1%粘稠度1650-550cps,4MDa MW)由Amerchol Corp,Piscataway NY提供。含氟表面活性剂FC-4430获自3M Corp。如果可能,反应剂近可能为分子生物学级。

[0128] 实施例3.剂型1

[0129] 用于微流体装置中TAQ聚合酶的环境干燥储存的剂型根据表III进行制备。糖以松三糖水合物的25%水溶液加入。在此实施例中使用含有0.01%Polyol WRS301的储备物作为赋形剂。

[0130] 表III

[0131]

组合物	储备物浓度	每个反应体积 (uL)	每个反应终浓度
1M Tris pH8.4, 2.5M KCl	50x	0.3	20mM Tris 50mM KCl
dNTP 混合物	10mM	0.3	0.2mM
MgCl ₂	1M	0.15	10mM
BSA	25%	0.15	0.25%
糖	25%	0.9	1.50%
赋形剂	变化	0.15	变化
TAQ 聚合酶	10U/uL	0.96	10U
以靶标 DNA/引物溶液再 水合时的总体积		15uL	

[0132] 将所得的清澈的凝胶复合物前体溶液用移液管点样到微流体装置已钝化的塑料表面(PET)上。让这些点放置约10min然后密封于含干燥剂的箔衬袋中。使用发色指示剂验证密封袋在储存期间的完整性。这些袋子在储存前进行热密封。

[0133] 尽管上文是本发明目前优选的实施方式的完全描述,然而有可能 使用多种备选方案、改动以及等价方案。本说明书参考的、声明为优先权文件的和/或在任何信息数据页面列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、国外专利、国外专利申请及非专利出版物都以其全文并入本文作为参考。一般地,在下文的权利要求中,所使用的术语不应当解释为将权利要求限制到本说明书和权利要求中公开的具体实施方式,而应当解释为这些权利要求所赋予的所有可能的实施方式和等价方案的全范围。因此,这些权利要求并不受本公开的限制。

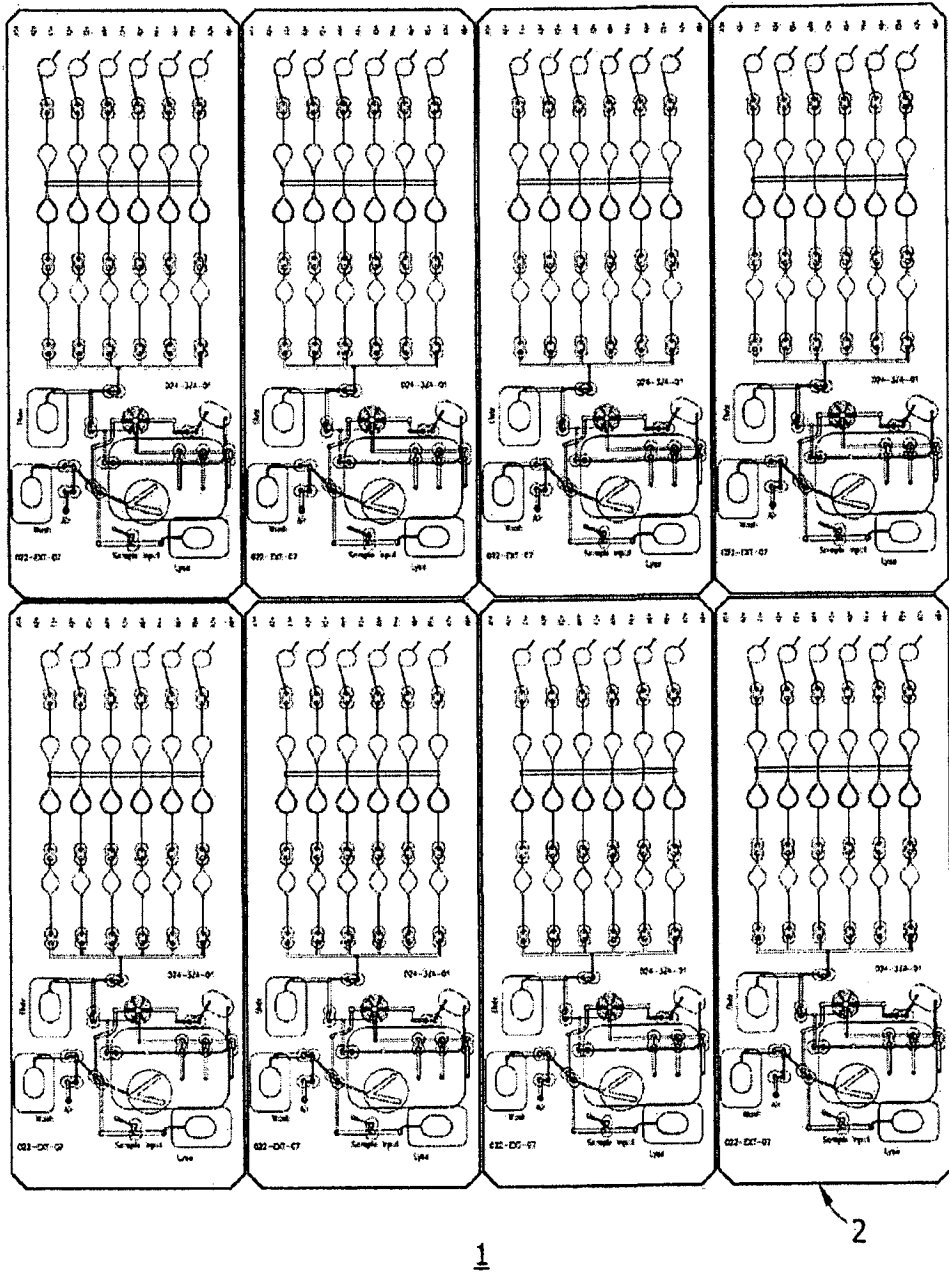


图1

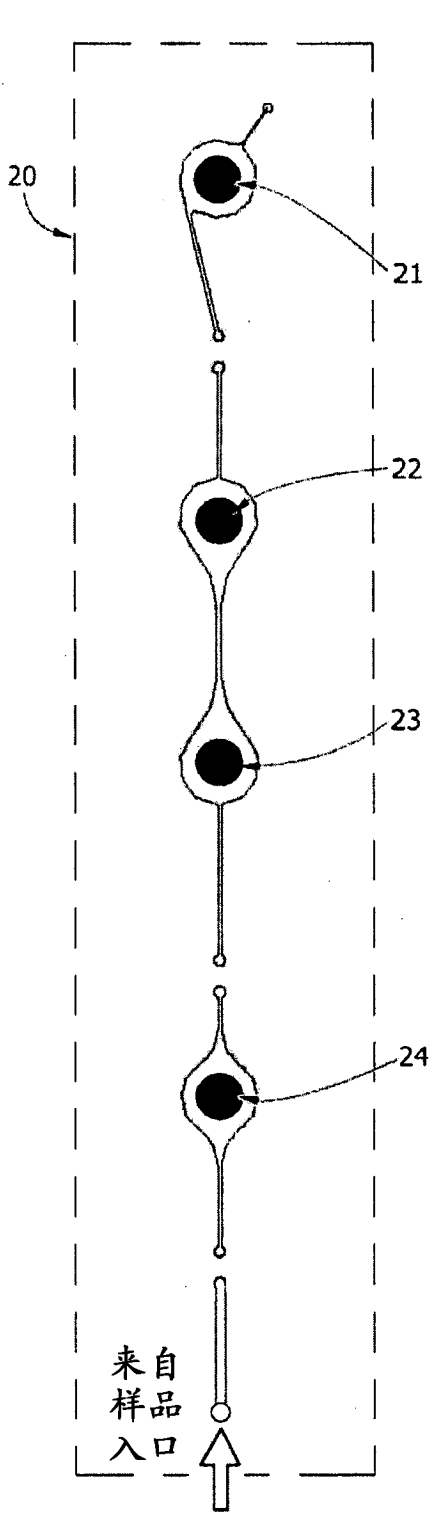


图2A

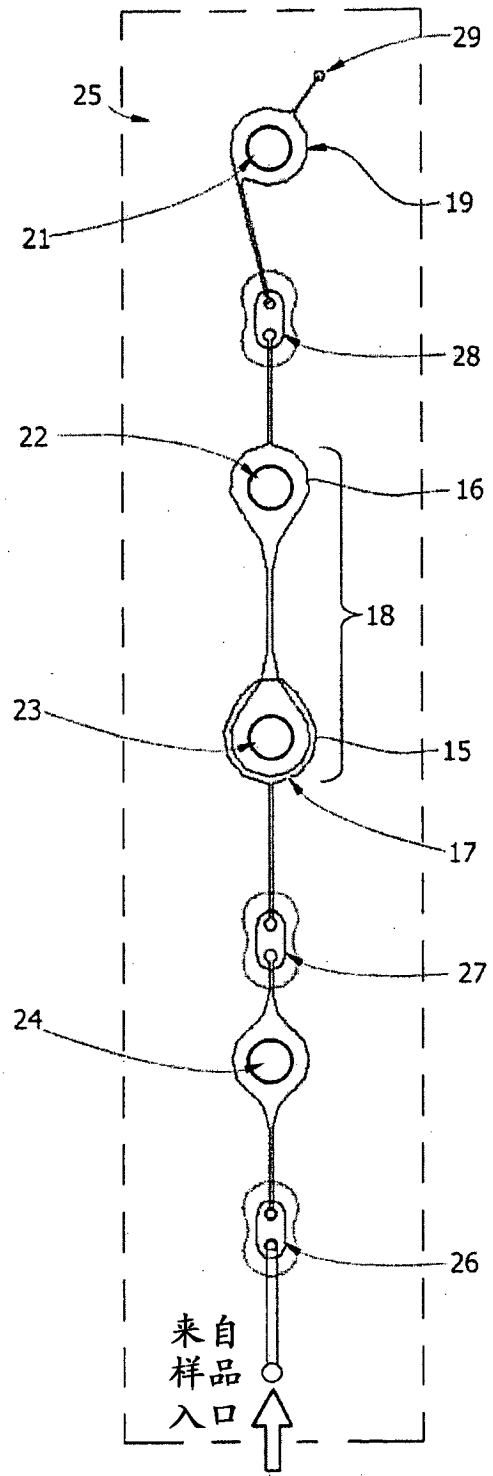


图2B

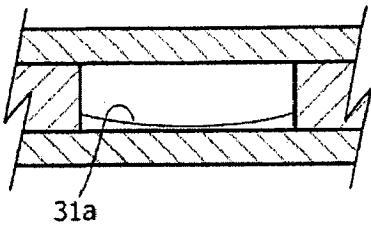


图3A

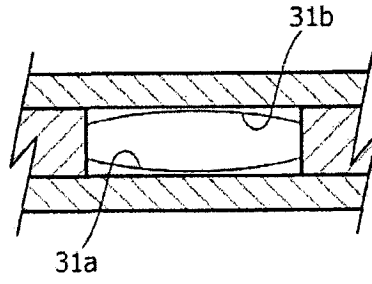


图3B

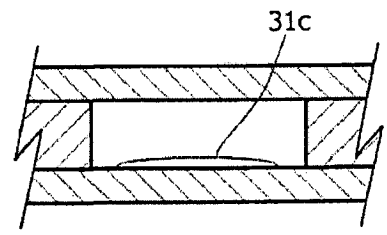


图3C

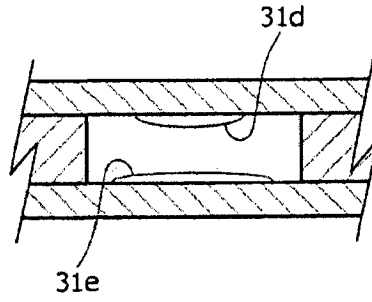


图3D

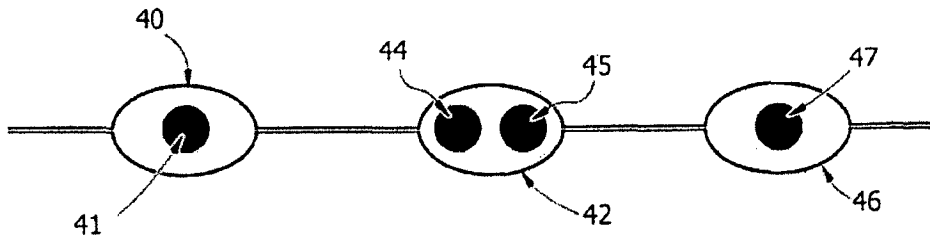


图4A

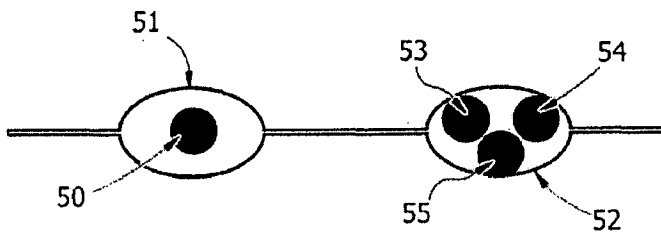


图4B

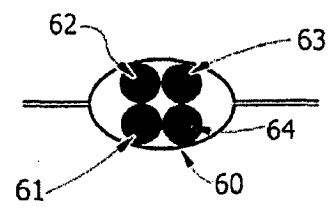


图4C

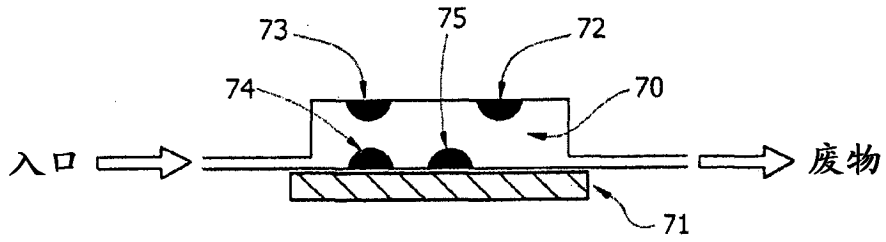


图4D

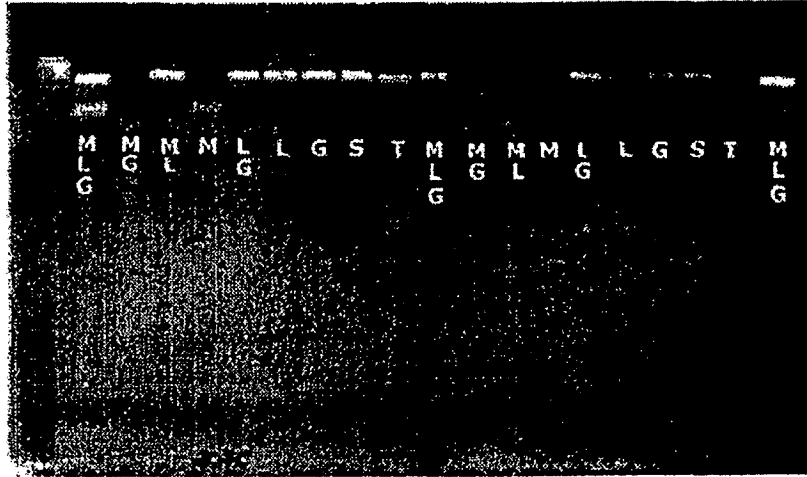


图5(现有技术)

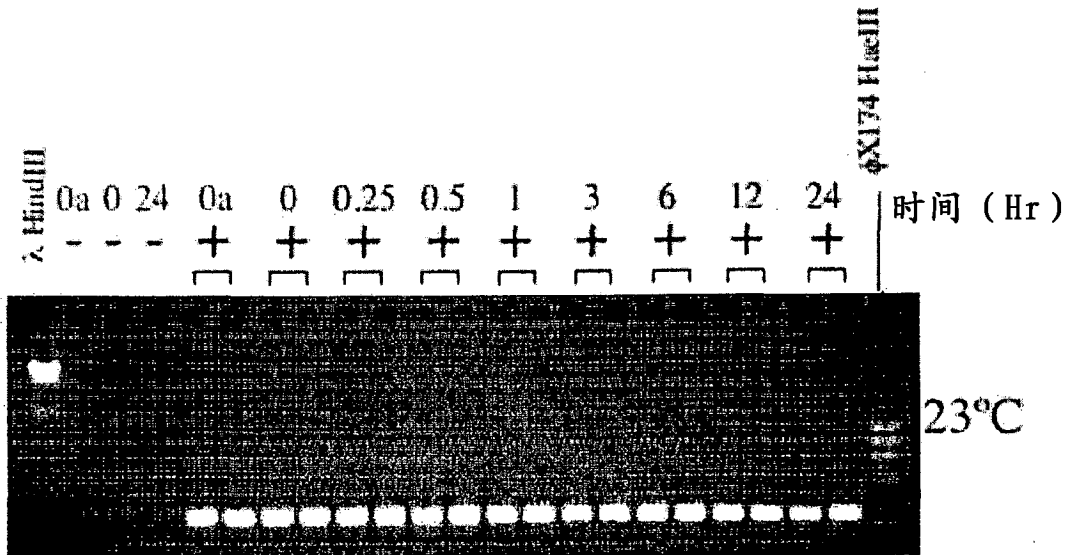


图6(现有技术)

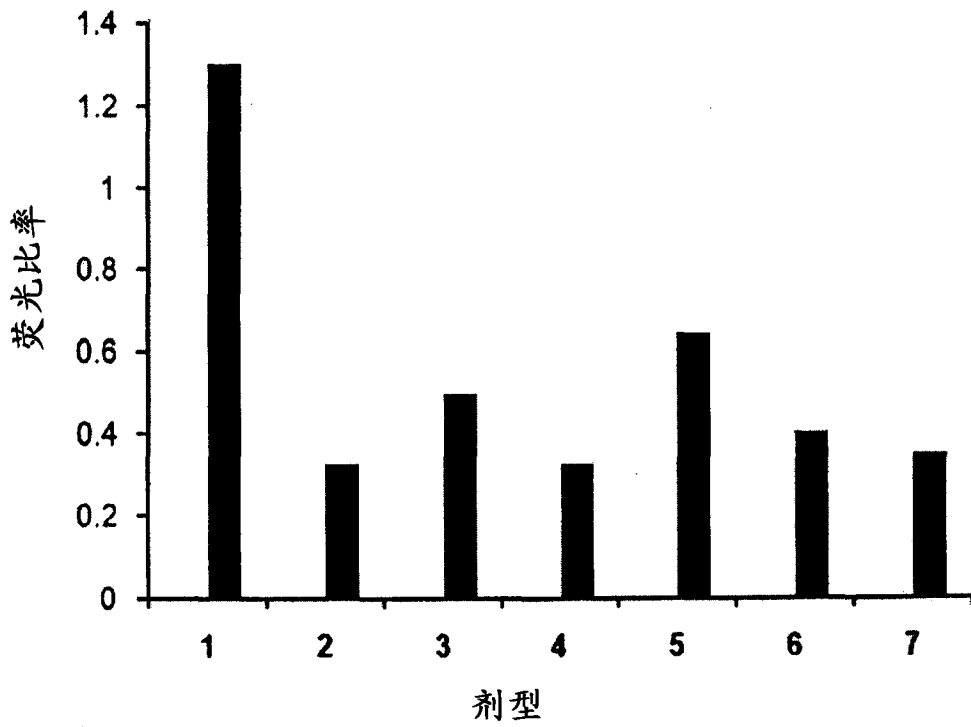


图7

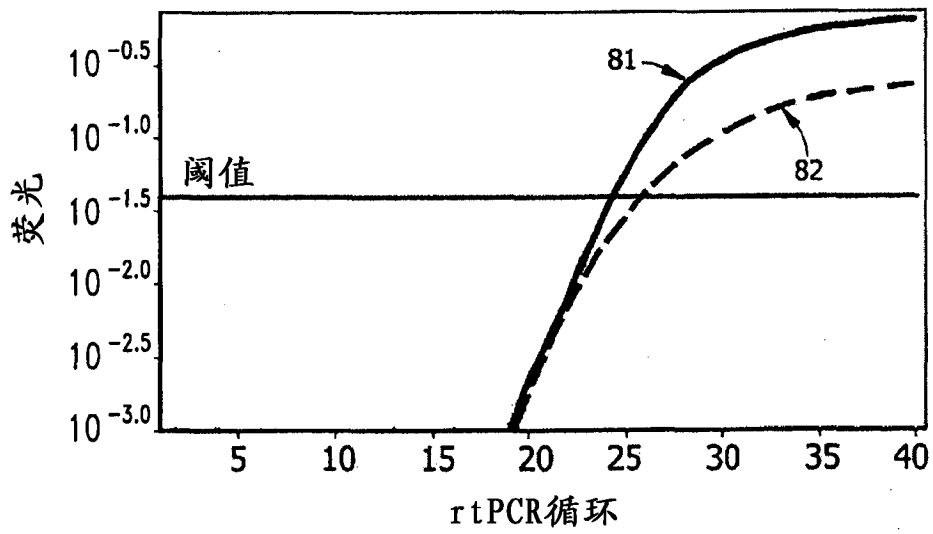


图8

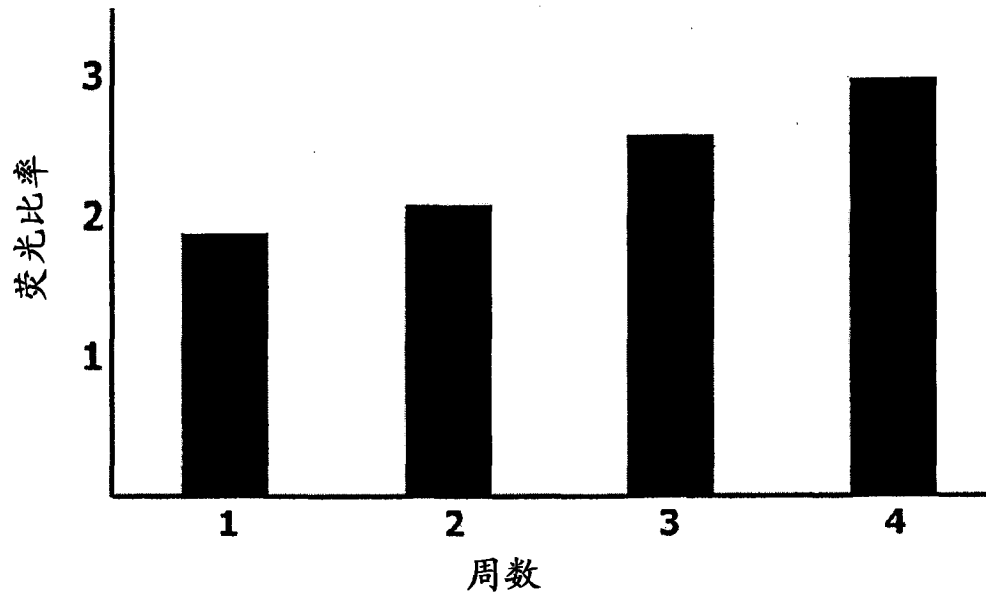


图9

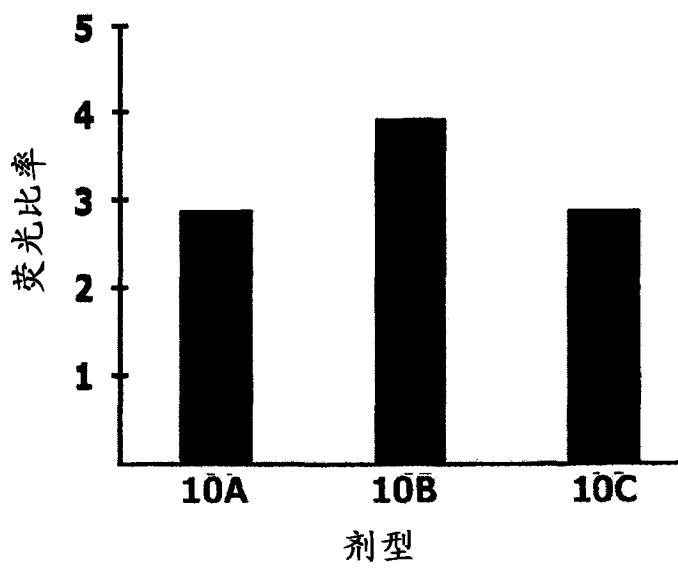


图10

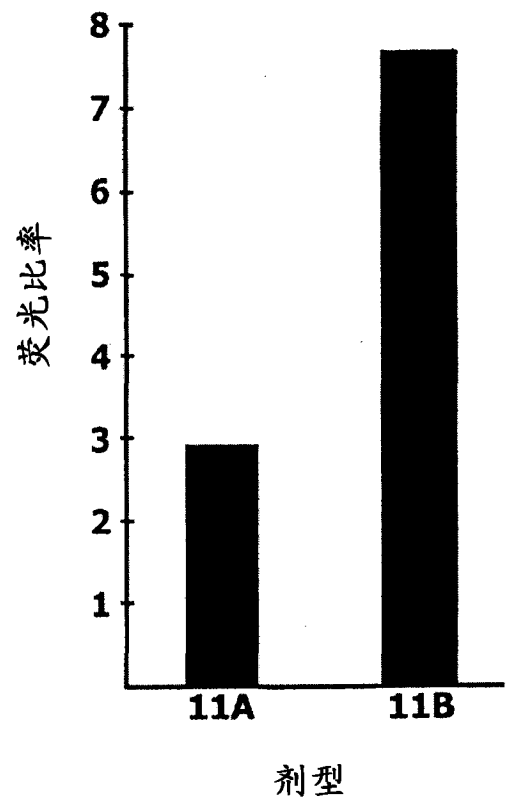


图11