



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117062902 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 14

(21) 申请号 202280018363.0

(22) 申请日 2022.03.03

(30) 优先权数据

63/155940 2021.03.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.08.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/055421 2022.03.03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/184836 EN 2022.09.09

(71) 申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 Y·阿斯蒂尔 P·盖比 J·杨

V·达廷斯卡 K·杰斐逊

K·维塔亚鲁克斯库

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

专利代理师 石克虎 张华

(51) Int.Cl.

C12M 1/00 (2006.01)

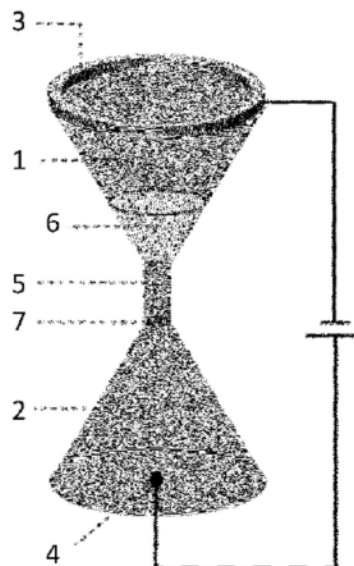
权利要求书2页 说明书7页 附图9页

(54) 发明名称

用于从生物学样品中电泳提取核酸的装置和方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于从样品中分离生物聚合物的装置方法和组装体,装置包括:顶部储器、底部储器、位于所述顶部储器与所述底部储器之间并且可操作地连接到所述顶部储器和所述底部储器的收集室、能够使待提取的所述生物聚合物通过的筛分基质、不能够使待提取的所述生物聚合物通过的半透膜以及至少一组工作电极和对电极。



1. 一种用于从样品中分离生物聚合物的装置,所述装置包括:
 - a) 顶部储器,
 - b) 底部储器,
 - c) 位于所述顶部储器与所述底部储器之间并且可操作地连接到所述顶部储器和所述底部储器的收集室,
 - d) 能够使待提取的所述生物聚合物通过的筛分基质,
 - e) 不能够使待提取的所述生物聚合物通过的半透膜,以及
 - f) 至少一组工作电极和对电极。
2. 根据权利要求1所述的装置,其中所述工作电极位于所述顶部储器中。
3. 根据权利要求1所述的装置,其中所述对电极位于所述底部储器中。
4. 根据权利要求1所述的装置,其中所述收集室为圆柱形的。
5. 根据权利要求1所述的装置,其中所述收集室为圆锥形的。
6. 根据权利要求1所述的装置,其中所述筛分基质放置在顶部室中。
7. 根据权利要求6所述的装置,其中所述筛分基质放置在所述顶部室与所述收集室的界面处。
8. 根据权利要求1所述的装置,其中所述半透膜放置在所述收集室中。
9. 根据权利要求9所述的装置,其中所述半透膜放置在所述收集室与所述底部储器的界面处。
10. 根据权利要求1所述的装置,其中所述半透膜的截留分子量(MWCO)大于所述筛分基质的MWCO。
11. 根据权利要求1所述的装置,其进一步包括在所述顶部储器和所述底部储器中的电解质缓冲剂。
12. 根据权利要求11所述的装置,其中所述顶部储器和所述底部储器包括相同的电解质。
13. 根据权利要求11所述的装置,其中所述顶部储器包括具有前导电解质的缓冲剂,并且所述底部储器包括具有尾随电解质的缓冲剂。
14. 一种从样品中提取生物聚合物的方法,所述方法包括:
 - a. 将前导电解质加载到根据权利要求1所述的装置的所述底部储器和所述收集室中;
 - b. 使生物学样品与尾随电解质接触;
 - c. 将所述样品放置到根据权利要求1所述的装置的所述顶部储器中;
 - d. 向所述电极施加电压;
 - e. 收集包括提取的生物聚合物的所述收集室的内容物。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中在步骤c.中,将所述样品放置到顶部室内的筛分基质上。
16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述生物聚合物为核酸。
17. 根据权利要求14所述的方法,其进一步包括对分离的核酸进行扩增。
18. 根据权利要求14所述的方法,其进一步包括对分离的核酸进行测序。
19. 根据权利要求14所述的方法,其中在步骤d.中,以恒定功率施加所述电压。
20. 根据权利要求14所述的方法,其中在步骤b.之前浓缩所述样品。

21. 根据权利要求14所述的方法,其中所述样品在步骤b.之前经历提取过程。
22. 根据权利要求14所述的方法,其中所述样品在步骤b.之前经历脱蜡过程。
23. 一种用于从样品中分离生物聚合物的组装体,所述组装体包括:
 - a) 多个顶部储器,
 - b) 与所述顶部储器的数量匹配的多个底部储器,
 - c) 位于所述顶部储器与所述底部储器之间并且可操作地连接到所述顶部储器和所述底部储器的多个收集室,
 - d) 在每个顶部储器中的能够使待提取的所述生物聚合物通过的筛分基质,
 - e) 在每个收集室中的不能够使待提取的所述生物聚合物通过的半透膜,以及
 - f) 在每个顶部储器中的一组工作电极和对电极。
24. 根据权利要求23所述的组装体,其进一步包括用于将一个或多个样品分配到所述多个顶部储器中的一个或多个储器中的自动分配器。
25. 根据权利要求23所述的组装体,其进一步包括用于对核酸进行扩增的模块。
26. 根据权利要求23所述的组装体,其进一步包括用于对核酸进行测序的模块。
27. 根据权利要求23所述的组装体,其进一步包括用于转移所述样品的转移模块。

用于从生物学样品中电泳提取核酸的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及从生物学样品中分离核酸的领域。更具体地,本发明涉及使用电泳分离核酸的仪器、系统和方法。

背景技术

[0002] 基于核酸的诊断正在成为常规临床实践。例如,使用血液中的肿瘤或无细胞肿瘤DNA的遗传分析通过指出对患者肿瘤突变谱具有特异性的靶向疗法来指导治疗。发现母血中的胎儿DNA已经使得能够进行针对一系列遗传和染色体异常的早期产前检测。基因组测试涉及分析来自临床样品的核酸。对多种临床样品类型进行分析,包括体液、新鲜组织、冷冻组织和福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织。前者的特征在于体积大,其中可能存在微量的核酸。后者对于核酸分离尤其具有挑战性,因为已知保存过程会损坏和分裂核酸。下游分析步骤包括例如下一代测序和其他复杂方法,这些方法依赖于足够量的优质核酸来递送临床测定所需的灵敏度和特异性。

[0003] 随着近几十年来技术的不断进步,迫切需要一种更稳健和快速的能够处理广泛生物学样品的核酸提取系统。所描述的发明旨在通过提供适合从常用类型的临床样品中提取总核酸 (DNA和RNA) 的适应性强的提取系统来满足这一需求。

发明内容

[0004] 本发明包括用于从生物学样品中电泳分离生物聚合物 (包括核酸) 的装置、组装体和方法。

[0005] 在一些实施例中,本发明是一种用于从样品中分离生物聚合物的装置,该装置包括:顶部储器,底部储器,位于顶部储器和底部储器之间并可操作地连接到顶部储器和底部储器的收集室,能够使待提取的生物聚合物通过的筛分基质,不能通过待提取的生物聚合物的半透膜,以及至少一组工作电极和对电极。在一些实施例中,工作电极位于顶部储器中并且对电极位于底部储器中。在一些实施例中,收集室是圆柱形收集室或圆锥形收集室。在一些实施例中,筛分基质放置在顶部室中,例如放置在顶部室和收集室的界面处。在一些实施例中,半透膜放置在收集室中,例如放置在收集室和底部储器的界面处。在一些实施例中,半透膜的截留分子量 (MWCO) 大于筛分基质的MWCO。

[0006] 在一些实施例中,该装置进一步包括在顶部储器和底部储器中的电解质缓冲剂。在一些实施例中,顶部储器和底部储器包括相同的电解质。在一些实施例中,顶部储器包括具有前导电解质的缓冲剂,并且底部储器包括具有尾随电解质的缓冲剂。

[0007] 在一些实施例中,本发明是一种从样品中提取生物聚合物的方法,该方法包括:将前导电解质加载到前面部分所述装置的底部储器和收集室中;使生物学样品与尾随电解质接触;将样品放置到前面部分所述装置的顶部储器中;向电极施加电压;收集包括提取的生物聚合物的收集室的内容物。在一些实施例中,将样品放置在顶部室内的筛分基质上。

[0008] 在一些实施例中,生物聚合物是核酸。在一些实施例中,该方法进一步包括对分离

的核酸进行扩增和/或测序。

[0009] 在一些实施例中,以恒定功率施加电压。在一些实施例中,样品在施加至装置之前被浓缩、经历提取过程或脱蜡过程。

[0010] 在一些实施例中,本发明是一种用于从样品中分离生物聚合物的组装体,该组装体包括:多个顶部储器,与顶部储器的数量匹配的多个底部储器,位于顶部储器和底部储器之间并可操作地连接到顶部储器和底部储器的多个收集室,在每个顶部储器中的能够使待提取的生物聚合物通过的筛分基质,在每个收集室中的不能通过待提取的生物聚合物的半透膜,以及在每个顶部储器中的一组工作电极和对电极。在一些实施例中,该组装体进一步包括用于将一个或多个样品分配到多个顶部储器中的一个或多个储器中的自动分配器。在一些实施例中,该组装体进一步包括用于对核酸进行扩增的模块。在一些实施例中,该组装体进一步包括用于对核酸进行测序的模块。在一些实施例中,该组装体进一步包括用于转移样品的转移模块。

附图说明

[0011] 图1是用于电泳提取生物聚合物的装置的概览。

[0012] 图2显示了收集室的形状和示例性尺寸。

[0013] 图3是用于电泳提取生物聚合物的组装体系统的图。

[0014] 图4是用于电泳提取生物聚合物的自动化装置的图。

[0015] 图5说明了组装用于电泳提取生物聚合物的原型装置的步骤。

[0016] 图6显示了使用该装置分离核酸的结果。

具体实施方式

[0017] 前言

[0018] 本发明描述了集成了从生物学样品中电驱动提取包括核酸(DNA和RNA)在内的生物聚合物所需的多个组件的装置。每个装置均由图1所描绘的排列的组件组成。下面就每个组件的功能、几何形状和/或材料来解释每个组件。下面进一步详细描述本发明的各个方面。

[0019] 样品

[0020] 本发明涉及一种从样品提取生物聚合物(诸如核酸)的方法。在一些实施例中,该样品获自受试者或患者。在一些实施例中,该样品可包括例如通过活检而获自该受试者或患者的固体组织或实体肿瘤的片段。样品还可包括可能含有核酸的体液(例如,尿液、痰、血清、血液或血液成分(即,血浆)、淋巴、唾液、痰、汗液、泪液、脑脊液、羊水、滑液、心包液、腹膜液、胸膜液、囊液、胆汁、胃液、肠液或粪便样品)。在其他实施例中,样品为培养物样品,例如,含有可以从中分离出核酸的细胞和液体的组织培养物。在一些实施例中,样品中的目的核酸来自感染原,诸如病毒、细菌、原生动物或真菌。在又其他实施例中,样品是包含其中存在待提取的生物聚合物的固体或液体材料的环境样品。

[0021] 在一些实施例中,样品是选自FFPET、新鲜冷冻组织、针吸活检的固体样品。在一些实施例中,样品是选自培养的细胞和体液(诸如血浆、血液、尿液和唾液)的液体样品。在一些实施例中,施加至电泳装置的样品经历预浓缩步骤。在一些实施例中,使用例如在浓缩柱

(诸如Amicon柱(Millipore,Sigma))中离心来浓缩样品(例如大体积样品,诸如尿液或血浆)以减少体积并浓缩样品。

[0022] 在一些实施例中,在将样品施加至本文公开的电泳装置之前,对样品进行预处理以从样品中的相关分子中释放生物聚合物。在一些实施例中,预处理从蛋白质、脂质和磷脂(诸如例如细胞膜和核膜)中释放核酸。此类处理包括但不限于FFPET样品的脱蜡、蛋白酶消化和细胞裂解。

[0023] 将核酸与其他生物材料分离的方法是本领域众所周知的。参见J.Sambrook等人,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual”,1989,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press:New York,N.Y.。多种试剂盒是可商购的以用于从生物学样品中提取核酸(DNA或RNA)以形成核酸溶液(例如,KAPA表达提取物(Roche Sequencing Solutions,Pleasanton,Cal.)和来自BD Biosciences Clontech(Palo Alto,Cal.)、Epicentre Technologies(Madison,Wisc.)、Gentra Systems(Minneapolis,Minn.)和Qiagen(Valencia,Cal.)、Ambion(Austin,Tex.)、BioRad Laboratories(Hercules,Cal.)等的其他类似产品。

[0024] 设备

[0025] 在一些实施例中,本发明是一种集成了从生物学样品中电驱动提取包括核酸(DNA和RNA)在内的生物聚合物所需的多个组件的装置。每个装置均由图1所描绘的排列的组件组成。下面就每个组件的功能、几何形状和材料来解释每个组件。在一些实施例中,该装置包括顶部储器1和底部储器2。顶部储器1含有与电解质缓冲剂混合的样品。底部储器2含有电解质缓冲剂。该装置进一步包括一组工作电极3和对电极4,在该工作电极和对电极之间形成驱动电场。在一些实施例中,工作电极3位于顶部储器1中。在一些实施例中,工作电极3位于顶部储器1的顶部边缘处或顶部边缘附近。在一些实施例中,对电极4位于底部储器2中。

[0026] 在一些实施例中,该装置进一步包括收集室5,在该收集室中富集所提取的材料以用于随后的收集。在一些实施例中,收集室5位于顶部储器1和底部储器2之间。在一些实施例中,收集室5具有在相对侧具有开口的本体,其中顶侧开口连接至顶部储器1,并且底侧开口连接至底部储器2。收集室5可以具有不同的几何形状,如图2所描绘的。在各种实施例中,收集室5是圆柱形收集室(A)或圆锥形收集室(B-C)。在一些实施例中,圆锥形(B)收集室5具有面向顶部储器1的较宽底部。在一些实施例中,圆锥形(C)收集室5具有面向底部储器2的较宽底部并且被称为“倒圆锥形”。在一些实施例中,收集室5被配置成匹配任何应用特异性的收集体积或用于抽取包含分离的核酸的样品的移液管吸头的类型。

[0027] 在一些实施例中,装置包括用于将待提取的生物聚合物与样品的其他组分分离的筛分基质或过滤器6。在一些实施例中,筛分基质或过滤器6放置在顶部储器1中。在一些实施例中,筛分基质或过滤器6放置在顶部储器1和收集室5的界面处。筛分基质或过滤器6的性质根据样品的组成和期望的下游程序而不同。在一些实施例中,筛分基质或过滤器6的尺寸使得样品核酸穿过筛分基质或过滤器6内的孔。在一些实施例中,筛分基质或过滤器6的尺寸使得能够基于尺寸排除污染颗粒,例如细胞碎片、未裂解的细胞和比核酸大的其他材料。在一些实施例中,筛分基质或过滤器6的尺寸使得能够最小化加载到顶部储器和底部储器中的两种不同缓冲剂之间的预混合。

[0028] 在一些实施例中,该装置包括用于保留包括核酸在内的生物聚合物的半透膜7。在一些实施例中,半透膜7放置在收集室5中。在一些实施例中,半透膜7放置在收集室5和底部储器2的界面处。在一些实施例中,半透膜7具有特定的截留分子量(MWCO)以保留待提取的生物聚合物。在一些实施例中,半透膜7的MWCO小于收集室中的筛分基质或过滤器6的MWCO。在一些实施例中,半透膜7包括透析膜或多孔箔并且包括多孔塑料材料、玻璃料、凝胶、纸、无纺布和滤纸中的一种或多种。

[0029] 缓冲剂体系

[0030] 在一些实施例中,电泳装置利用单电解质系统,其中两个储器都填充有背景电解质(例如,区带电泳)。在其他实施例中,电泳装置用于不连续电解质系统,其中顶部储器和底部储器填充有两种不同的电解质缓冲剂。在一些实施例中,电泳装置与包含用于外延电泳的前导和尾随电解质的双缓冲剂系统一起使用,如例如US20200282392使用加速电泳进行样品分析的装置中所述。在一些实施例中,电泳装置与包含用于等速电泳的前导和尾随电解质的双缓冲剂系统一起使用,如例如US20190071661用于等速电泳的系统装置和方法中所述。

[0031] 装置的操作

[0032] 在一些实施例中,电泳装置利用电流朝向浸没在电解质填充的底部储器2中的带正电荷的电极电传输带负电荷的核酸分子。在一些实施例中,电泳装置在恒定电参数下操作。恒定电参数是恒定功率、恒定电流或恒定电压中的一种。

[0033] 组装体

[0034] 在一些实施例中,电泳装置是图3A和3B中描述的用于分离核酸的组装体系统的一部分。在一些实施例中,组装体装置包括顶部板8和底部板9。顶部板8包括储器和收集室5内的电极3、4、过滤器6和膜7。顶部板8与底部孔板9组装在一起,如图3A和3B所示。

[0035] 组装体的操作

[0036] 在图3A和3B的示例中,底部储器2连同收集室5和滤纸6的内侧填充有含有前导电解质离子的缓冲剂。然后滤纸6的外部区域填充有与尾随电解质预混合的液体样品P36741。

[0037] 在一些实施例中,在施加至组装体之前浓缩样品。在其他实施例中,浓缩含有待分离的痕量生物聚合物(例如,无细胞核酸)的大体积样品以增加无细胞核酸的浓度。在一些实施例中,在施加至组装体之前,样品已经历初始预处理程序以破坏包含待分离的生物聚合物的任何细胞和亚细胞结构。在一些实施例中,用洗涤剂 and 蛋白酶处理含有细胞的样品以释放核酸。在一些实施例中,样品是FFPET样品,其在施加至组装体之前已经历脱石蜡程序。

[0038] 接下来,在工作电极3和对电极4之间施加电压。在电压驱动下,分散的带电生物聚合物沿着生成的电场迁移到相反电荷的电极。例如,带负电荷的核酸朝向阴极迁移。在一些实施例中,防止样品中存在的大的污染颗粒(诸如未裂解的细胞或细胞碎片)通过具有适当孔径的过滤器6中的孔扩散。同时,待提取的生物聚合物穿过过滤器6并到达收集室5。在一些实施例中,构成杂质的较小分子穿过半透膜7。同时,待提取的生物聚合物具有大于半透膜7的MWCO的分子量,并且被保留并富集在收集室5内(图3C)。然后经由手动或自动移液收集所富集的材料,并将其转移以用于后续样品处理和分析。

[0039] 自动化

[0040] 在一些实施例中,使用电泳装置分离生物聚合物是自动化的。该技术可以在仪器下操作以使工作流程自动化,从而提高生产量和重现性。可以在用于移液以及电和热控制的液体处理机器人下实现完全自动化的工作流程。在一些实施例中,使用标准培养板(例如,6孔、12孔、96孔或类似的培养板)来组装自动化装置。为了说明,图4显示了简单的固定装置。如图4所示,首先将加载有样品和电解质缓冲剂的6孔提取板8,9放置到底部基板10中。底部基板10容纳多个(例如,图4示例中的六个)可编程电源11以向各个孔提供电力。在此过程期间,电源11还读取各孔的反馈电压。一旦电压达到预定的截止值,电力就自动降低或关闭,然后启动注射泵12以通过流体管线13从收集室5吸出所富集的核酸。

[0041] 组装装置

[0042] 在一些实施例中,装置由一层或多层可塑材料(诸如塑料)组装,如图5所示。在一些实施例中,层压多个可塑层,如图5A左侧所示,其中层2提供顶部储器2的侧壁,并且层3提供顶部储器2的底部和顶部插入件的收集室5。在一些实施例中,将半透膜7放入装置底部的收集室5的底部开口处,其中使半透膜7成形为适应每个室(例如,孔)的形状,如图5B(左:底视图,右:半透膜7分解的透视图)可见的。过滤器6布置在收集室5的开口周围,如图5C所示。在一些实施例中,选择过滤器6的厚度和颗粒截留以适应样品的性质。在一些实施例中,颗粒截留是25 μm 。在一些实施例中,层的厚度(高度)为5mm。

[0043] 提取生物聚合物的方法

[0044] 为了操作该装置,将前导电解质放入底部储器2和顶部插入件的收集室5中。在一些实施例中,前导电解质缓冲剂具有比尾随电解质更高的离子强度和更低的pH。在一些实施例中,为了分离核酸,前导电解质包含100mM HCl.His缓冲液,pH 6.25。接下来,使包含生物聚合物(例如核酸)的样品溶液与中空储器接触。在一些实施例中,使样品与位于顶部储器中的过滤器6接触。在一些实施例中,将样品加载到顶部储器中的顶部插入件内的滤纸壁6的外侧。

[0045] 在一些实施例中,样品溶液进一步包含一种或多种示踪染料。在一些实施例中,示踪染料(例如亮蓝)溶液在尾随电解质中制备。在一些实施例中,与前导电解质缓冲剂相比,尾随电解质缓冲剂具有较低的离子强度和较高的pH。在一些实施例中,为了分离核酸,尾随电解质包含20mM Taps.Tris,pH 8.30。

[0046] 在一些实施例中,为了进行生物聚合物的分离,装置以恒定功率运行。在其他实施例中,可以使用恒定电压或恒定电流。电力驱动聚合物和示踪染料进入收集室5(图6A)。回收从收集室收集的级分用于进一步分析。在一些实施例中,基于示踪染料的迁移来对收集进行定时。

[0047] 所提取核酸的检测

[0048] 在一些实施例中,本发明包括经由聚合酶链式反应(PCR)扩增来检测、定性或定量所提取的核酸的步骤。扩增利用上游引物和下游引物。在一些实施例中,两种引物都是靶特异性引物,即包含与已知存在于所提取的核酸中的序列互补的序列的引物。在一些实施例中,一种或两种引物是随机引物的混合物。在一些实施例中,PCR是实时PCR,也称为定量PCR。qPCR利用荧光探针,其中荧光水平反映了反应混合物中靶核酸的量。在一些实施例中,qPCR用于检测、定性或定量用本文公开的方法和设备提取的核酸的量。

[0049] 在一些实施例中,本发明包括使用对生物聚合物具有特异性的荧光来检测用本文

公开的方法和设备提取的生物聚合物的步骤。在一些实施例中,本发明包括用能够读取260nm和280nm处的光吸收的荧光计分析提取物并确定蛋白质和核酸的260/280吸收比特征

[0050] 测序

[0051] 在一些实施例中,对用本文公开的方法和设备分离和提取的核酸进行测序。在一些实施例中,在测序之前对所分离和提取的核酸进行扩增。目前使用的测序方法和平台需要形成测序文库。该文库包括连接至平台特异性衔接子的多个核酸。各种形状和功能的衔接子在本领域中是已知的(参见例如,W02019/166565A1、US8822150和US8455193)。在一些实施例中,衔接子的功能为将所期望的元件引入核酸中。衔接子携带元件包括核酸条形码、引物结合位点或连接使能位点中的至少一者。用于制备核酸、执行衔接子连接以形成文库和扩增文库的可商购试剂盒包括AVENIO ctDNA文库制备试剂盒、或KAPA HyperPrep和HyperPlus试剂盒(Roche Sequencing Solutions,Pleasanton,CA)。在一些实施例中,衔接子或扩增引物引入条形码序列。分子条形码和样品条形码在测序过程中的使用描述于美国专利第7,393,665号、第8,168,385号、第8,481,292号、第8,685,678号、第8,722,368号和W02019/166565A1中。

[0052] 适合与本文公开的方法一起使用的序列测定和平台的非限制性实例包括纳米孔测序(美国专利公开第2013/0244340号、第2013/0264207、2014/0134616号、第2015/0119259号和第2015/0337366号)、桑格测序、毛细管阵列测序、热循环测序(Sears等人,Biotechniques,13:626-633(1992))、固相测序(Zimmerman等人,Methods Mol.Cell Biol.,3:39-42(1992))、用诸如基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱的质谱法测序(MALDI-TOF/MS;Fu等人,Nature Biotech.,16:381-384(1998))、通过杂交测序(Drmanac等人,Nature Biotech.,16:54-58(1998)),和NGS方法,包括但不限于通过合成测序(例如,HiSeq™、MiSeq™或Genome Analyzer,均可从Illumina获得)、通过连接测序(例如SOLiD™、Life Technologies)、离子半导体测序(例如,Ion Torrent™、Life Technologies)和SMRT®测序(例如Pacific Biosciences)。

[0053] 可商购的测序技术包括Affymetrix有限公司(加利福尼亚州森尼维耳市)的边杂交边测序平台、Illumina/Solexa(加利福尼亚州圣地亚哥市)和Helicos Biosciences(马萨诸塞州坎布里奇市)的边合成边测序平台、Applied Biosystems(加利福尼亚州福斯特城)的边连接边测序平台。其他测序技术包括但不限于Ion Torrent技术(ThermoFisher Scientific)以及纳米孔测序(Genia Technology from Roche Sequencing Solutions, Santa Clara,Cal.)和Oxford Nanopore Technologies(Oxford,UK)。

[0054] 参考文献

[0055] 美国临时申请序列第63/000,022号,用于样品分析的装置和方法

[0056] US20200282392,使用加速电泳进行样品分析的装置

[0057] W02020/074742,用于加速电泳工作流程自动化的检测方法

[0058] W02020/229431,用于样品分析的装置和方法

[0059] Foret,F.等人(2019)Macrofluidic Device for Preparative Concentration Based on Electrophoresis Analytical Chemistry 91(11),7047-7053,DOI:10.1021/acs.analchem.8b05860

[0060] 实例

[0061] 实例1.使用电泳装置分离核酸(预言?)

[0062] 在此实例中,图3A和3B所示的装置用于从FFPET样品中分离核酸。底部储器2连同收集室5和滤纸6的内侧填充有含有前导电解质离子的缓冲剂。然后滤纸6的外部区域填充有与含有尾随电解质离子的缓冲剂混合的预处理的FFPET样品。当在工作电极3和对电极4之间施加电压时,样品中分散的带负电荷的核酸沿着生成的电场朝向带正电荷的对电极4迁移。当防止大的污染颗粒(诸如未裂解的细胞或细胞碎片)通过滤纸6中的孔扩散时,核酸分子穿过该结构并到达收集室5。分子量大于半透膜7的MWC0的核酸被保留并富集在收集室5内(图3C)。然后经由移液收集所富集的核酸并将其转移以用于后续样品处理和分析。

[0063] 实例2.用于核酸电泳分离的原型装置的组装。

[0064] 在此实例中,为了证明NA提取的技术可行性,我们首先制作了单插入件形式的装置原型,其可以放置在标准6孔培养板上。使用激光切割机切割多层塑料部件(层1、层2、层3),并使用双面胶进行层压,然后将半透膜粘贴到装置底部上,如图5所述。将滤纸(VWR® 415级滤纸,定性,皱纹,颗粒截留25 μ m)贴到收集室的内壁上以在顶部插入物中形成高度为5mm的分离壁。

[0065] 实例3.测试用于电泳分离核酸的原型装置。

[0066] 在此实例中,测试图6A的原型装置的基于加速电泳的DNA提取。首先将前导电解质溶液(8.3mL 100mM HCl.His缓冲剂,pH 6.25)加载到底部储器2中。顶部插入件的收集室5填充有200 μ L的前导电解质溶液。然后将在尾随缓冲剂(1.0mL 20mM Taps.Tris,pH 8.30)中制备的含有DNA梯状条带(1 μ g1 Kb plus,100bp-10Kbp)和亮蓝色染料(作为示踪标记物)的样品溶液加载到顶部插入件内的滤纸壁6的外侧。向装置施加恒定的0.5W以驱动DNA和蓝色染料分子迁移到收集室中(图6A)。然后通过Qubit分析8分钟后收集的样品洗脱液以确定提取率(即回收率=75%,图6C)。此外,图6D中的Tapestation结果显示了样品输入和输出(即从装置收集的洗脱液)之间的可比较的尺寸分布,表明该装置能够提取DNA,无论其尺寸如何。

[0067] 尽管已经参考特定实施例详细描述了本发明,但对本领域技术人员显而易见的是,可以在本发明的范围内进行各种修改。因此,本发明的范围不应当由本文所描述的实例限制,而应当由下文呈现的权利要求书限制。

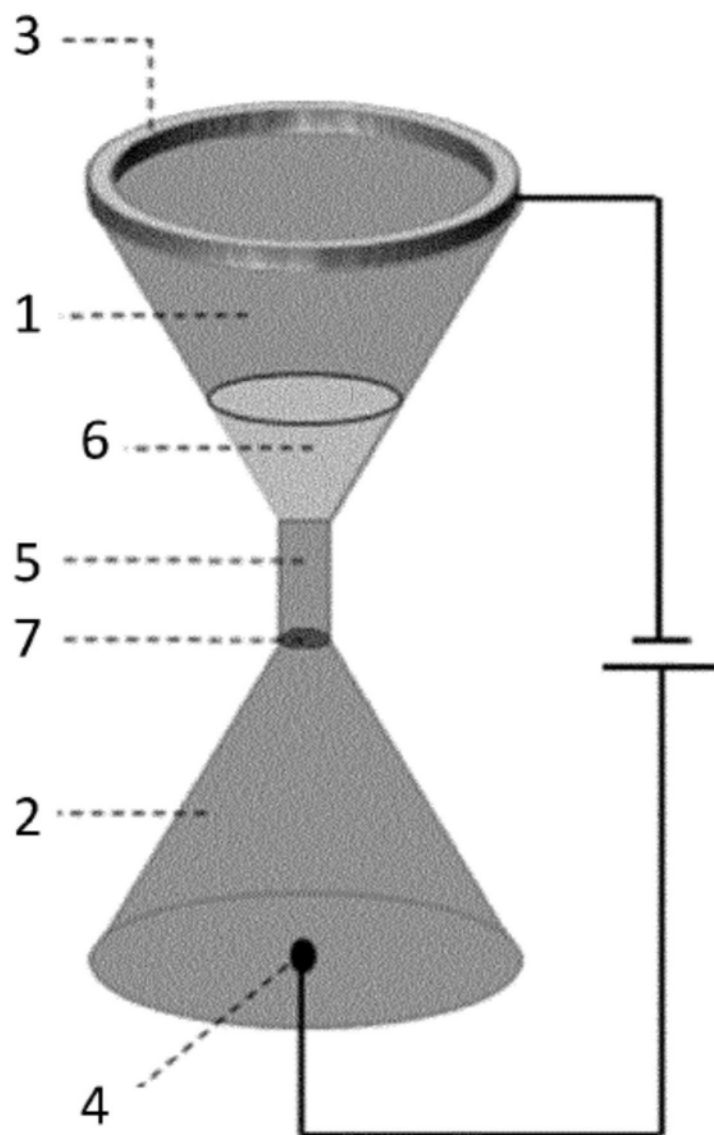


图1

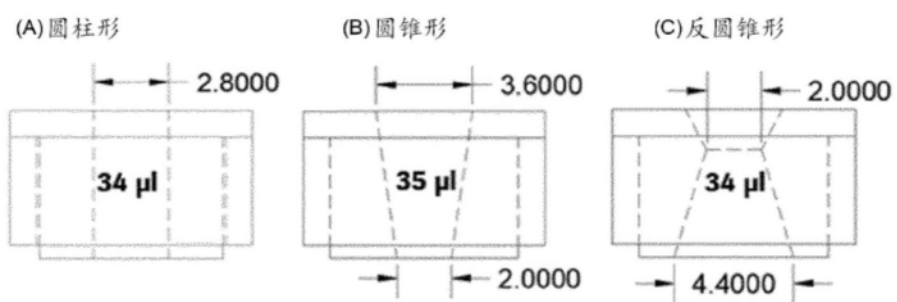
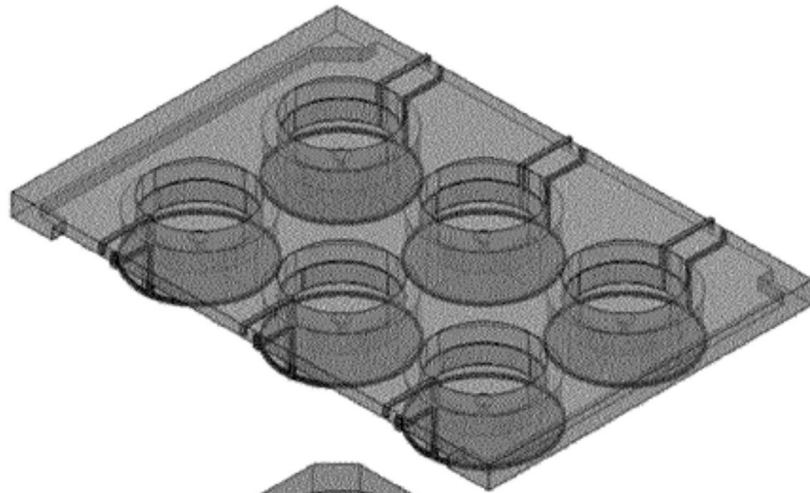


图2

8



9

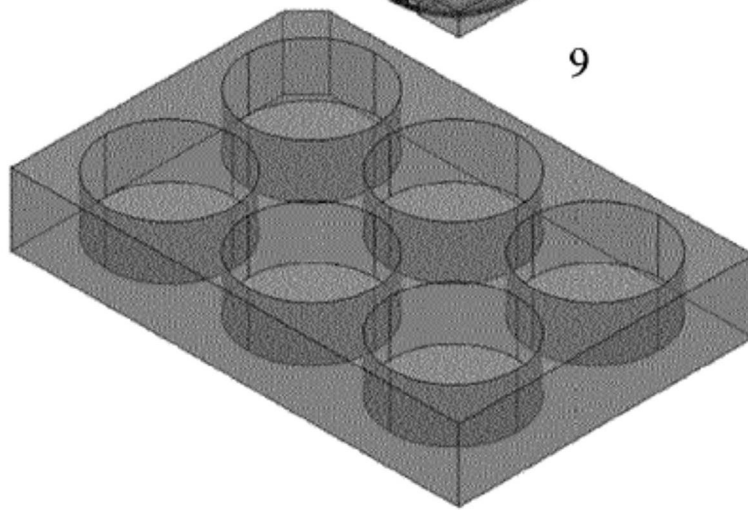


图3A

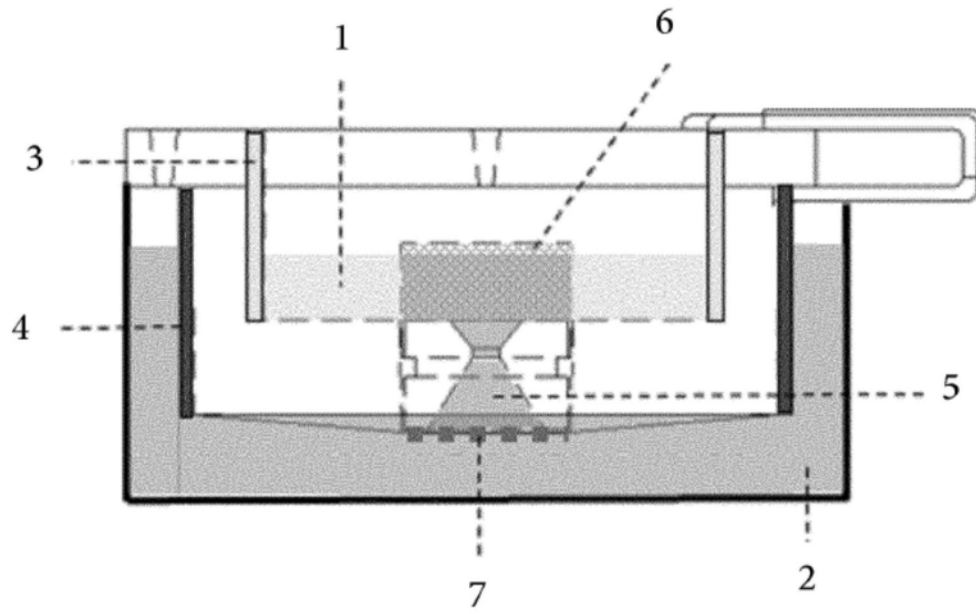


图3B

污染颗粒
(例如未裂解的细胞)

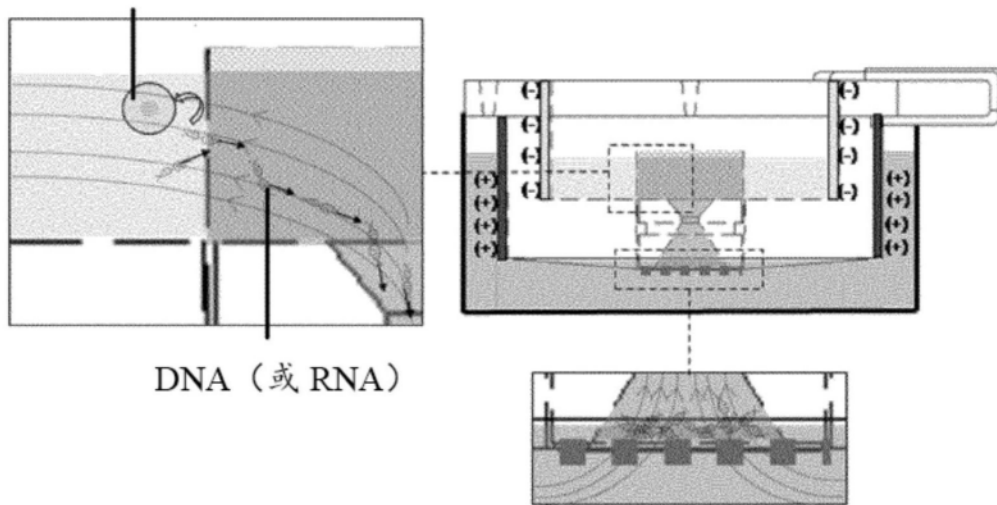


图3C

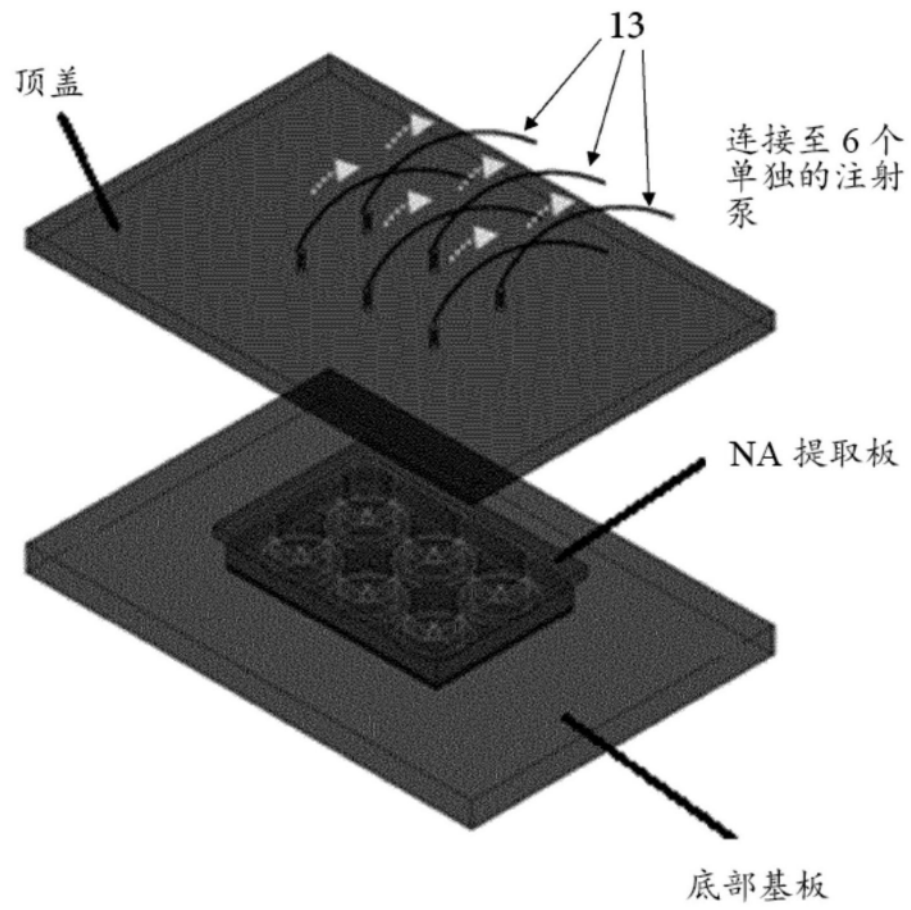


图4A

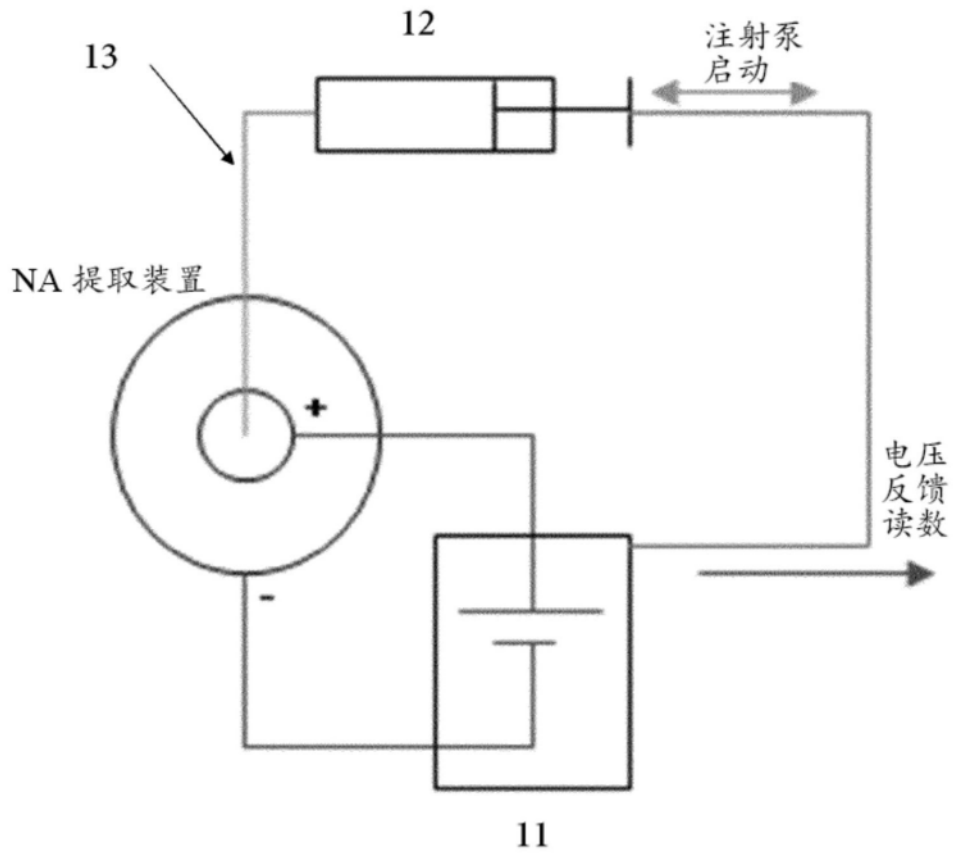


图4B

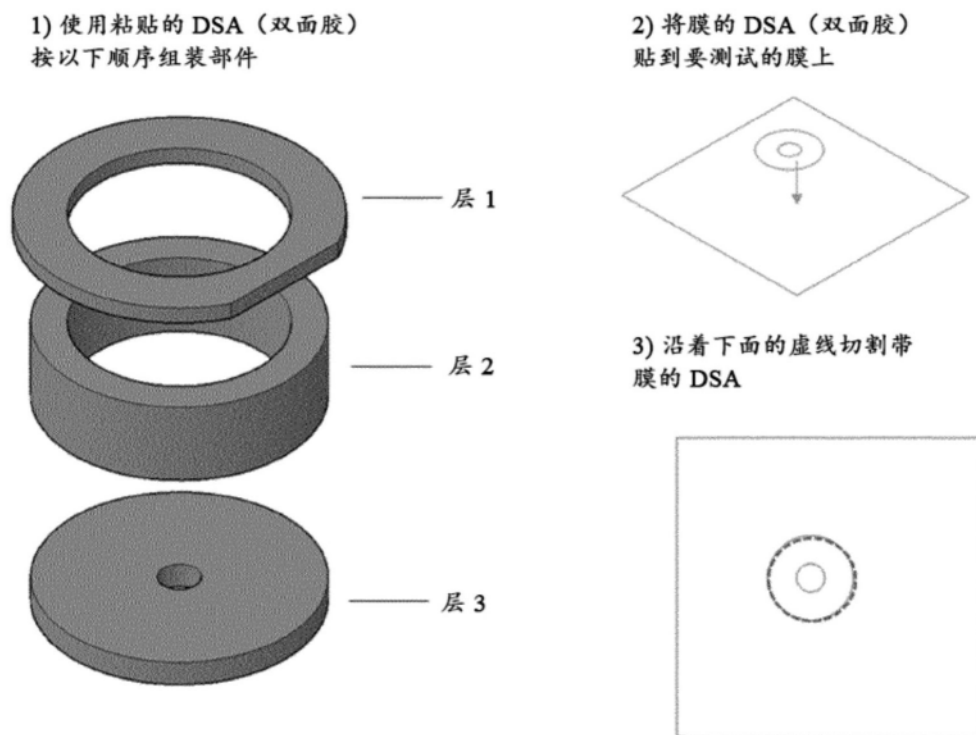


图5A

4) 将 DSA 粘贴的膜
贴到层 3 的底部上

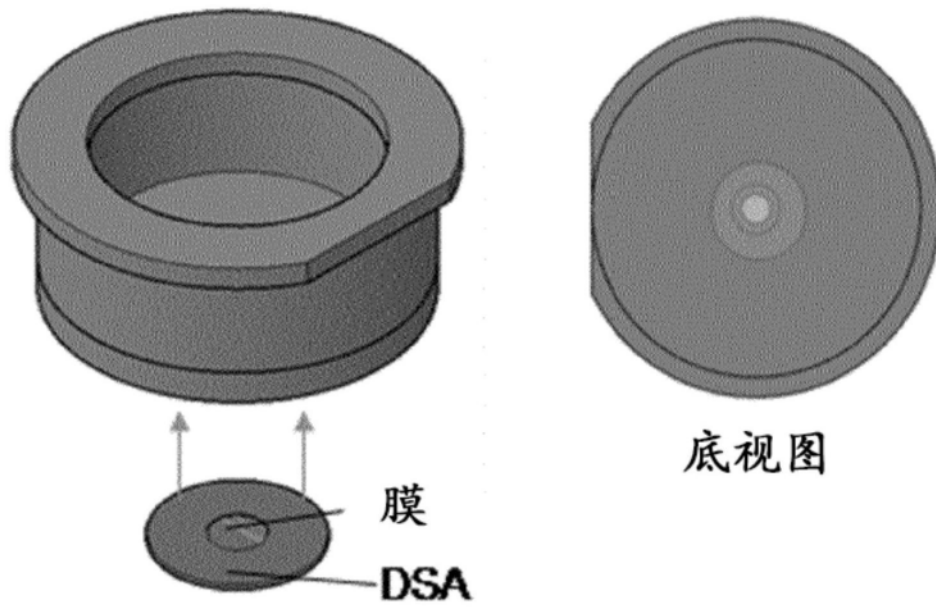


图5B

5) 将滤纸贴到收集室的内壁上以在顶部插入物中形成分离壁

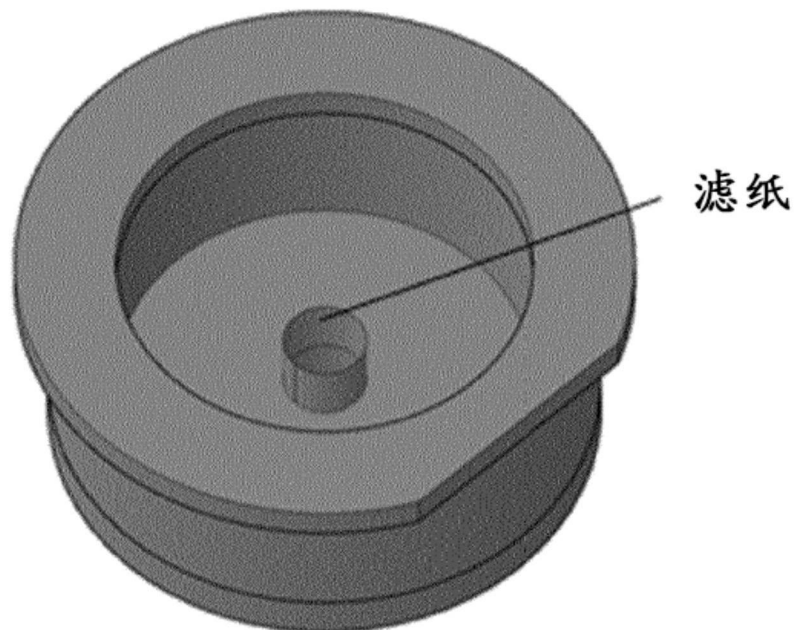


图5C

装置和 6 孔托盘的照片

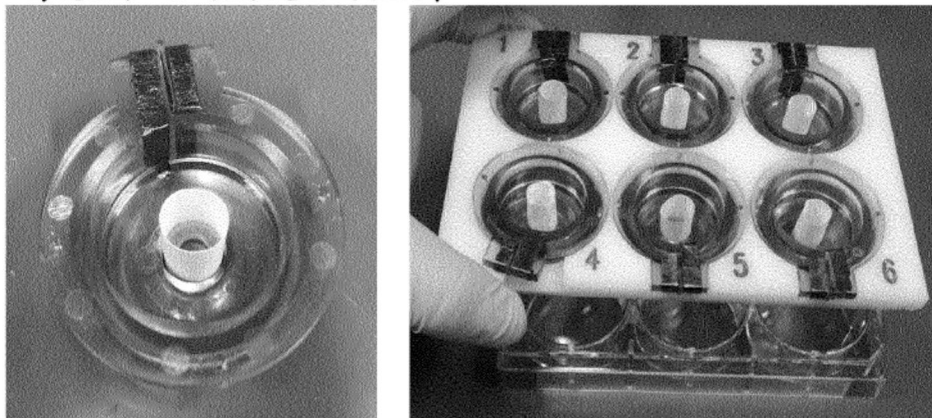


图6A

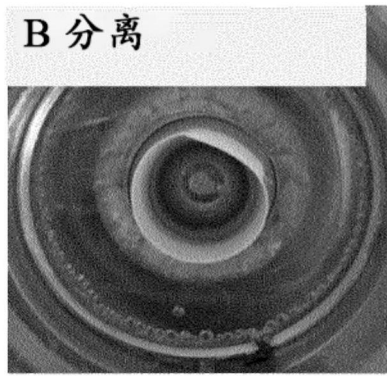


图6B

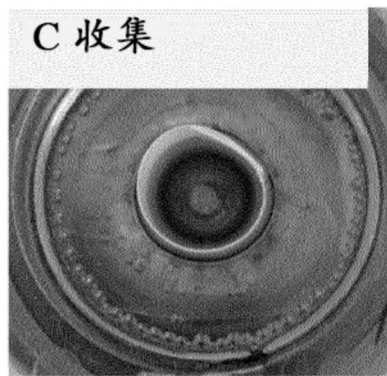


图6C

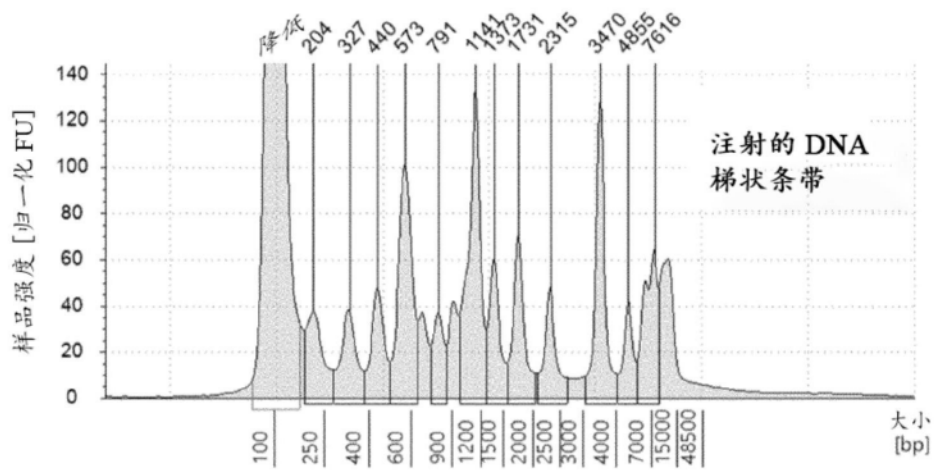


图6D

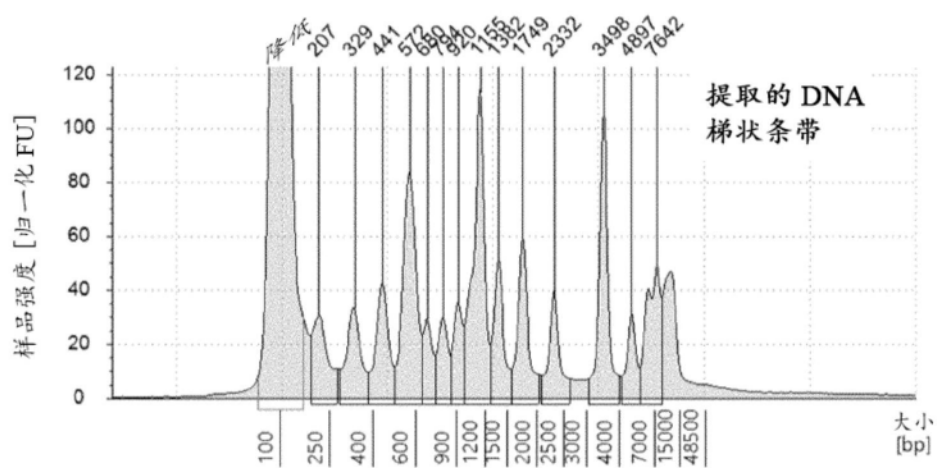


图6E