



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00813877. X

[43] 公开日 2003 年 2 月 26 日

[11] 公开号 CN 1399716A

[22] 申请日 2000. 8. 4 [21] 申请号 00813877. X

[30] 优先权

[32] 1999. 8. 5 [33] AU [31] PQ2039

[32] 2000. 4. 20 [33] AU [31] PQ7039

[86] 国际申请 PCT/AU00/00931 2000. 8. 4

[87] 国际公布 WO01/11336 英 2001. 2. 15

[85] 进入国家阶段日期 2002. 4. 4

[71] 申请人 布赖恩·威廉·金

地址 澳大利亚昆士兰

共同申请人 布鲁斯·哈里斯(贸易时称做 SXY 技术公司)

[72] 发明人 布赖恩·威廉·金 布鲁斯·哈里森

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

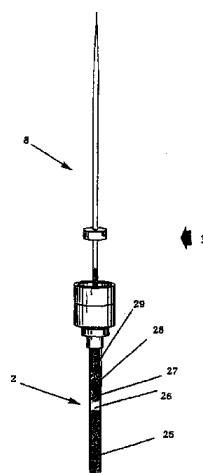
代理人 林晓红

权利要求书 6 页 说明书 20 页 附图 6 页

[54] 发明名称 直接吸入一反应和注射装置及使用
方法

[57] 摘要

一种装置(8)，它包含具有第一开口末端(3)和第二封闭末端(4)的腔室(25)，具有第一和第二开口末端(9, 10)的细长件(11)，和在细长件(11)进入腔室(25)时为其提供密封的密封机构。细长件的第二末端(10)可由腔室(25)中的第一位置滑动至腔室(25)中的第二位置导致腔室(25)中的压力改变。装置使得样品的采集和分析可在单个腔室(25)中进行。本文公开了包括腔室(25)内的蜡和试剂组合物在内的装置和方法。



1. 一种装置，它包含具有第一开口末端和第二封闭末端及内表面和外表面的腔室，具有第一和第二开口末端及内表面和外表面的细长件，和为细长件和腔室之间提供密封的密封机构，细长件的第二末端可从腔室的第一位置滑动到腔室的第二位置，细长件第二末端从第一位置到第二位置的运动造成了腔室中压力的变化。

2. 根据权利要求 1 的装置，其中腔室是细长的。

3. 根据权利要求 1 或 2 的装置，其中密封机构为细长件的外表面和腔室的内表面间提供了密封。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的装置，其中腔室能够透射电磁辐射。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的装置，其中腔室为圆柱形。

6. 根据权利要求 5 的装置，其中圆柱形腔室外径达 2.8mm。

7. 根据权利要求 5 或 6 的装置，其中圆柱形腔室内径达 2.5mm。

8. 根据权利要求 5 至 7 中任一项的装置，其中圆柱形腔室长度为 20-40mm。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项的装置，其中细长件的第一末端包含一成型尖端。

10. 根据权利要求 9 的装置，其中成型尖端直径为 1-200 μm 。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项的装置，其中腔室和细长件由同种材料制成。

12. 根据权利要求 11 的装置，其中所述材料为玻璃或塑料。

13. 根据权利要求 1 至 10 中任一项的装置，其中腔室由塑料制成而细长件由玻璃制成。

14. 根据权利要求 12 或 13 的装置，其中塑料选自聚乙烯对苯二酸酯、聚丙烯和聚碳酸酯。

15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的装置，其中密封机构包

括位于细长件外表面上临近细长件第二末端的套管。

16. 根据权利要求 1 至 15 中任一项的装置，其中腔室还包括临近腔室开口末端的凸起环管。

17. 根据权利要求 16 的装置，还包括位于环管处的第一导杆，导杆具有一接受细长件的孔。

18. 根据权利要求 17 的装置，其中细长件通过孔被接受而在细长件和导杆间形成密封。

19. 根据权利要求 1 至 18 中任一项的装置，其中腔室的内表面和/或细长件的内表面至少部分为封闭剂包被。

20. 根据权利要求 19 的装置，其中封闭剂包括至少一种选自牛血清清蛋白、胎牛血清、人血清清蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷醇和硅烷化合物的成分。

21. 根据权利要求 1 至 20 中任一项的装置，其中腔室的第二末端包括一透射电磁辐射的透镜。

22. 根据权利要求 1 至 21 中任一项的装置，其中腔室含有第一试剂组合物；

为第一试剂组合物提供密封的第一蜡层；

与第一蜡层毗连而与第一试剂组合物通过第一蜡层分开的第二试剂组合物；和

基本上覆盖了第二试剂组合物的第二蜡层；

其中第二蜡层的熔点低于第一蜡层的熔点，因而在第二蜡层的熔点温度第一蜡层仍为固体。

23. 根据权利要求 22 的装置，其中第一蜡层的熔点约为 70℃。

24. 根据权利要求 22 或 23 的装置，其中第二蜡层的熔点约为 55℃。

25. 根据权利要求 22 至 24 中任一项的装置，其中第一试剂组合物包含扩增靶核酸分子所需的试剂。

26. 根据权利要求 22 至 25 中任一项的装置，其中第二试剂组合物包含导致细胞裂解，蛋白消化和/或修饰，或 DNA 消化和/或修饰的试剂。

27. 根据权利要求 26 的装置，其中第二试剂组合物包含促进细胞裂解的碱性缓冲液。

28. 根据权利要求 22 至 27 中任一项的装置，其中腔室还含有与第二蜡层相邻的第三试剂组合物。

29. 根据权利要求 28 的装置，其中腔室还含有与第三试剂组合物相邻的第三蜡层。

30. 根据权利要求 1 至 21 中任一项的装置，其中腔室含有与第一蜡载体混合的第一试剂组合物；和与第二蜡载体混合的第二试剂组合物；

其中第二试剂组合物至少部分包被、覆盖第一试剂组合物或在第一试剂组合物上形成层，且其中第二蜡载体的熔点低于第一蜡载体的熔点，因而在第二蜡载体的熔点温度第一蜡载体仍为固体。

31. 根据权利要求 30 的装置，其中第一蜡载体的熔点约为 70 °C。

32. 根据权利要求 30 或 31 的装置，其中第二蜡载体的熔点约为 55°C。

33. 根据权利要求 30 至 32 中任一项的装置，其中第一试剂组合物包含扩增靶核酸分子所需的试剂。

34. 根据权利要求 30 至 33 中任一项的装置，其中第二试剂组合物包含导致细胞裂解，蛋白消化和/或修饰，或 DNA 消化和/或修饰的试剂。

35. 根据权利要求 34 的装置，其中第二试剂组合物包含促进细胞裂解的碱性缓冲液。

36. 根据权利要求 30 至 35 中任一项的装置，其中腔室进一步

含有与第三蜡载体形成混合物的第三试剂组合物，其中第三试剂组合物至少部分包被、覆盖第二试剂组合物或在第二试剂组合物上形成层。

37. 一种检测样品中某种物质的方法，该方法包括：

(i) 向权利要求 1 至 21 中任一项的装置的腔室中引入一种样品和一种试剂组合物使得样品和试剂组合物形成反应混合物，其中试剂组合物包含至少一种可以与待检测物质相互作用的试剂，使得在与试剂组合物单独发射的电磁辐射水平相比较时反应混合物发射的电磁辐射水平发生改变；

(ii) 任选地对反应混合物用电磁辐射进行激发；

(iii) 使腔室处于允许反应发生的条件；和

(iv) 检测反应混合物发射的电磁辐射。

38. 一种扩增样品中至少一种靶核酸分子的方法，该方法包括：

(i) 向权利要求 1 至 21 中任一项的装置的腔室中引入一种样品和一种试剂组合物使得样品和试剂组合物形成反应混合物，其中试剂组合物包含用于扩增靶序列的试剂；和

(ii) 使腔室处于允许靶序列扩增发生的条件。

39. 一种扩增样品中至少一种靶核酸分子的方法，该方法包括：

(i) 向权利要求 1 至 21 中任一项的装置的腔室中引入一种样品和一种试剂组合物使得样品和试剂组合物形成反应混合物；

其中试剂混合物包含用于靶序列扩增的试剂和至少一种与扩增序列相互作用使得在与试剂组合物单独发射的电磁辐射水平相比较时反应混合物发射的电磁辐射水平发生改变的试剂；

(ii) 任选地对反应混合物用电磁辐射进行激发；

(iii) 使腔室处于允许靶序列扩增发生的条件；

(iv) 检测反应混合物发射的电磁辐射。

40.根据权利要求 37 或 39 的方法，其中电磁辐射由外部来源通过腔室透射至反应混合物。

41.根据权利要求 37 或 39 的方法，其中从腔室检测反应混合物电磁辐射的改变。

42.根据权利要求 37 至 41 中任一项的方法，其中通过细长件将试剂组合物吸入腔室中。

43.根据权利要求 37 至 42 中任一项的方法，其中通过细长件将样品吸入腔室中。

44.一种在单一容器中进行一系列反应的方法，该方法包括：

(i) 将样品引入权利要求 22 至 27 任一项的装置的腔室中至临近第二蜡层处；

(ii) 加热腔室至第二蜡层熔化而第一蜡层仍为固体的温度；

(iii) 使样品与第二试剂组合物相互作用形成反应混合物；

(iv) 加热腔室至第一蜡层熔化的温度；和

(v) 使反应混合物与第一试剂组合物相互作用。

45. 一种在单一容器中进行一系列反应的方法，该方法包括：

(i) 将样品引入权利要求 30 至 35 任一项的装置的腔室中至临近第二试剂组合物处；

(ii) 加热腔室至第二蜡载体熔化而第一蜡载体仍为固体的温度；

(iii) 使样品与第二试剂组合物相互作用形成反应混合物；

(iv) 加热腔室至第一蜡载体熔化的温度；和

(v) 使反应混合物与第一试剂组合物相互作用。

46.根据权利要求 44 或 45 的方法，其中通过离心腔室进行步骤 (iii) 和/或 (v)。

47.根据权利要求 37 至 46 任一项的方法，其中样品包括生物材

料。

48.根据权利要求 47 的方法，其中生物材料包括细胞或病毒颗粒。

49.根据权利要求 37 至 48 任一项的方法，其中第二试剂组合物包含用于蛋白消化和/或细胞裂解的试剂。

50.根据权利要求 37 至 49 任一项的方法，其中第一试剂组合物包含用于扩增靶核酸分子的试剂。

51.根据权利要求 37 至 50 任一项的方法，其中样品选自红细胞、白细胞、胚胎细胞、细菌、精子、花粉、细胞培养物、涂片、单个细胞、血细胞寄生物、病毒感染的单个细胞及含有 DNA，RNA 或蛋白的液体。

52.权利要求 1 至 21 任一项的装置将液体样品注射入细胞的用途。

53.如权利要求 52 的用途，其中液体样品包括遗传物质。

在优选实施方案中，密封机构包括一个位于细长件外表面靠近第二末端的套管。优选地，套管与腔室的内表面配合形成密封。套管可为任意合适的长度。例如，套管长度可为 10-80mm。但是应当理解，可能需要较长的套管以使细长件能够得到更大的刚性。套管可以沿套管的整个长度和腔室的内表面相配合。然而优选地，套管包括长为 0.2-2.0mm 的渐张区域与腔室的内表面配合形成密封。

在一个优选实施方案中，腔室在邻近腔室第一开口末端处进一步包括一个环管，环管包含一内表面和一外表面。

装置还可以包括一个在环管内的第一导杆。第一导杆优选包括与环管内表面配合而在第一导杆和环管内表面间形成密封的环状外表面。优选地，第一导杆还包括接受细长件的孔。第一导杆可通过该孔接受细长件从而在细长件的外表面和导杆间形成密封。

优选地，该装置还包含位于细长件外表面临近细长件第一末端的第二导杆。第二导杆可被用于在吸入过程中令细长件处于合适的位置。

鉴于很多生物反应提供定量的结果，优选在反应中能够控制样品的体积。因此，在更优选实施方案中，该装置适合与一种控制吸入样品体积的装置共用。控制样品体积的装置可能是，例如，一种手工或电子的移液器。应理解的是，现有的电子移液器可被用于本发明的装置中。这样的电子移液器的实例包括 World Precision Instruments 生产的 UltraMicroPump- IITM 和 Nanoliter 2000TM。

而在另一优选实施方案中，对腔室和/或细长件的内表面用封闭剂进行了处理以避免样品粘着于腔室或细长件。封闭剂可选自牛血清清蛋白、胎牛血清、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷醇、硅氧烷化合物及其它合适的蛋白。最优选地，溶液中包括商标为“Sigmacot”（Sigma）的硅氧烷化合物。

在另一优选实施方案中，细长件中充油便于样品的吸入。

直接吸入—反应和注射装置及使用方法

发明领域

本发明涉及一种适于生物样品的吸入和分析及将样品注射入生物材料中的装置。本发明也涉及使用该装置检测样品中靶分子的方法。

发明背景

临床诊断鉴定通常包括生物样品的采集和通过鉴定程序对这些样品进行进一步的分析。在很多情况下，在实验室或实验室外的不同区域进行样品的采集和接下来的分析，因此需要对生物样品和鉴定试剂进行传送和/或转移。对这些样品的这类处理会引起其它生物材料对样品的污染的增加。

在方法中包括核酸扩增反应时这种污染的危险尤为值得注意，核酸扩增反应例如聚合酶链式反应（PCR），它能够将一单链核酸（靶核酸）扩增至数百万拷贝（扩增子）。尽管 PCR 技术在临床诊断实验室中有巨大的实用潜力，核酸扩增反应很容易为外源核酸分子污染。例如，污染可能发生在取样过程中。另外，在反应室的打开和应用标准取样技术的过程中，产生气溶胶，这样，上次扩增反应的扩增产物（扩增子）可能会污染样品。这些污染可能会在 PCR 反应中被扩增，从而导致检测出反应物的假阳性结果而最终导致错误诊断。

鉴于以上讨论的问题，许多反应，特别是高度灵敏的 PCR 试验，需时很长并且为了确保得到可靠的结果需要具有相当技术的操作人员。

因此，迫切需要能够简化取样和样品分析及减少污染危险的产品和操作。

发明概述

本发明人开发了一种装置，它能够减少与临床诊断鉴定中涉及的多步骤操作相关的问题，能够更可靠地得到准确结果。特别是本装置能够在单个腔室中完成样品采集和分析，从而减少了污染的危险。

第一方面，本发明提供了一种装置，该装置包括有第一开口末端和第二封闭末端和内外表面的腔室，具有第一和第二开口末端和内外表面的细长件，和为细长件和腔室之间提供密封的密封机构(sealing means)，细长件的第二末端可从腔室的第一位置滑动到腔室的第二位置，细长件第二末端从第一位置到第二位置的运动造成了腔室中压力的变化。

在第一方面的一个优选实施方案中，腔室是细长的。

在本发明另一优选的实施方案中，腔室可透射电磁辐射。细长腔室的第二末端可包含一透射电磁辐射的透镜。优选地，电磁辐射为波长在 400-800nm 间的光线。更优选地，电磁辐射为荧光。

在另一优选的实施方案中，腔室为圆柱形。优选地，腔室的外径可达 2.8mm，和/或内径可达 2.5mm。优选地，腔室长度为 20 至 40mm。

优选地，细长件外径可达 2.5mm，内径为 0.2 至 1.2mm。

在另一优选的实施方案中，细长件的第一末端包括一成型尖端。优选地，该尖端能够刺穿生物组织。在优选实施方案中，尖端直径大约为 1 μ m 级别，但也可增至 200 μ m 或更多，优选地，尖端的直径在 20 至 40 μ m 之间。

而在另一实施方案中，腔室和细长件由同一种材料制成。优选地，此材料为玻璃或塑料。然而在优选实施方案中，腔室由塑料制成而细长件由玻璃制成。合适的塑料包括但不限于为聚乙烯对苯二甲酸酯、聚丙烯和聚碳酸酯。

本发明也提供了一种能够在腔室中连续进行一系列独立反应的装置。

因此，第二方面，本发明提供了一种根据第一方面的装置，其中腔室包含：

第一试剂组合物；

为第一试剂组合物提供密封的第一蜡层。

与第一蜡层毗连而与第一试剂组合物通过第一蜡层分开的第二试剂组合物；和

基本上覆盖了第二试剂组合物的第二蜡层；

其中第二蜡层的熔点低于第一蜡层的熔点，因而在第二蜡层的熔点温度第一蜡层仍为固体。

在第二方面的一个优选实施方案中，第一和第二试剂组合物中至少一个，更优选为每个在室温下为液态。但是也可设想试剂组合物在室温下可为固体。例如试剂组合物可为冻干物。

第三方面，本发明提供了一种根据第一方面的装置，其中腔室包含：

与第一蜡载体混合的第一试剂组合物；和

与第二蜡载体混合的第二试剂组合物；

其中第二试剂组合物至少部分包被、覆盖在第一试剂组合物上或在第一试剂组合物上形成层，且其中第二蜡载体的熔点低于第一蜡载体的熔点，因而在第二蜡载体的熔点温度第一蜡载体仍为固体。

第四方面，本发明提供了一种检测样品中某种物质的方法，该方法包括：

(i) 向根据第一方面的装置的腔室中引入一种样品和一种试剂组合物使得样品和试剂组合物形成反应混合物，其中试剂组合物包含至少一种可以与待检测物质作用的试剂，使得在与试剂组合物单独发射的电磁辐射水平相比较时反应混合物发射的电磁辐射水平会

发生改变；

- (ii) 任选地对反应混合物用电磁辐射进行激发；
- (iii) 使腔室处于允许反应发生的条件；和
- (iv) 检测反应混合物发射的电磁辐射。

第五方面，本发明提供了一种扩增样品中至少一个靶核酸分子的方法，该方法包括；

(i) 向根据第一方面的装置的腔室中引入一种样品和一种试剂组合物使得样品和试剂组合物形成反应混合物，其中试剂组合物包含用于扩增靶序列的试剂；和

- (ii) 使腔室处于允许靶序列扩增发生的条件。

第六方面，本发明提供了一种扩增样品中至少一个靶核酸分子的方法，该方法包括

(i) 向根据第一方面的装置的腔室中引入一种样品和一种试剂组合物使得样品和试剂组合物形成反应混合物，

其中试剂组合物包含用于靶序列扩增的试剂和至少一种与扩增序列相互作用使得在与试剂组合物单独发射的电磁辐射水平相比较时反应混合物发射的电磁辐射水平发生改变的试剂；

- (ii) 任选地对反应混合物用电磁辐射进行激发；
- (iii) 使腔室处于允许靶序列扩增发生的条件；
- (iv) 检测反应混合物发射的电磁辐射。

第七方面，本发明提供了一种在单一容器中进行一系列反应的方法，该方法包括

- (i) 将样品引入根据第二方面的装置的腔室中至临近第二蜡层处；
- (ii) 加热腔室至第二蜡层熔化而第一蜡层仍为固体的温度；
- (iii) 使样品与第二试剂组合物相互作用形成反应混合物；
- (iv) 加热腔室至第一蜡层熔化的温度；和

(v) 使反应混合物与第一试剂组合物相互作用。

第八方面，本发明提供了一种在单一容器中进行一系列反应的方法，该方法包括

(i) 将样品引入根据第三方面的装置的腔室中至临近第二试剂组合物处与第二蜡载体形成混合物；

(ii) 加热腔室至第二蜡载体熔化而第一蜡载体仍为固体的温度；

(iii) 使样品与第二试剂组合物相互作用形成反应混合物；

(iv) 加热腔室至第一蜡载体熔化的温度；和

(v) 使反应混合物与第一试剂组合物相互作用。

在第四至第六方面的优选实施方案中，通过细长件将样品引入腔室中。

在第四和第六方面的优选实施方案中，电磁辐射由外部来源通过腔室透射至反应混合物。此外优选通过腔室检测任何反应混合物电磁辐射的改变。

在第六方面的优选实施方案中试剂组合物包含可以通过寡核苷酸杂交对扩增核酸分子产物进行荧光检测的组分。

在第二和第三方面的优选实施方案中，第一蜡层的熔点约为 70 °C。任何熔点约为 70 °C 的蜡均适用。优选地，蜡为 T 蜡 (EnerGene®) 或 F 蜡 (20% 来自 Schumann Sasol 的合成蜡 C80N6, 80%T 蜡)。

在第二和第三方面另一优选的实施方案中，第一蜡层的熔点约为 55 °C。任何熔点约为 55 °C 的蜡均适用。优选地，蜡为 AmpliWax® (PE Applied Biosystems)。

在第二和第三方面另一优选的实施方案中，有一油层覆盖第二蜡层。油层具有一种或多种功能，包括维持样品以团状形式位于第二蜡层毗邻部位，协助样品从细长件至腔室的运输和减少污染。

在第二和第三方面另一优选的实施方案中，第一试剂组合物包含扩增靶核酸分子所需的试剂。更优选地，第一试剂组合物包含可

为表示包括一特定元素，整体或步骤，或元素，整体或步骤组，而不应排除任何其它元素，整体或步骤或元素，整体或步骤组。

下文中将通过以下的非限制的图和实施例对本发明进行详述。

附图简述

图 1 为本发明优选实施方案中装配状态下的装置的透视图。

图 2 为显示细长件在第一位置的优选装置的截面图。

图 3 为显示细长件在第二位置的优选装置的截面图。

图 4 为图 2 中装置的分解截面图。

图 5 为显示本发明优选装置的 (a) 装备好的装置；和 (b) 细长件和密封机构的截面图。

图 6 为使用本发明优选实施方案中的装置通过直接吸入和一步实时扩增和检测对人白细胞进行性别判定分析的结果。

优选实施方案详述

下文中将根据图 1-4 描述依照本发明的优选实施方案构建的吸入装置 (1)。该装置包含具有第一开口末端 (3) 和第二封闭末端 (4)，一内表面 (5) 和一外表面 (6) 的腔室 (2)。腔室为圆柱形，外径可达 2.8mm，内径可达 2.5mm，长度为 20-40mm。优选地，腔室可容纳样品体积至 20 μ l。

优选地腔室 (2) 由化学惰性、生物相容和稳定的材料制成。化学惰性指材料在遇热，高压灭菌，抽提剂，稀释液或其它化学溶液下稳定，不会变形、脱色、断裂、爆裂等。生物相容指材料不会在接触溶液时结合溶液中的生物材料影响生物材料的稳定性、功能或构象，或因材料在生物溶液中的沥滤以任何形式污染生物溶液。稳

以通过寡核苷酸杂交对扩增核酸分子产物进行荧光检测的组分。

在第二和第三方面另一优选的实施方案中，第二试剂组合物包含可导致细胞裂解，蛋白消化和/或修饰，和/或 DNA 消化和/或修饰的组分。优选地，第二试剂组合物中包含促进细胞裂解的碱性缓冲液。更优选地，第二试剂组合物包含在与蛋白酶 K 或蛋白酶活性相容的缓冲液中的蛋白酶 K 或蛋白酶。

在第七和第八方面的优选实施方案中，步骤 (iii) 和/或步骤 (v) 包括将细长腔室离心的步骤。优选地，离心力为 5g-200g，更优选为 5g-70g。但是本领域技术人员应当理解所需的离心力会根据参数而改变，参数包括腔室的温度，蜡的熔点，组合物的粘度等。

本领域的技术人员应理解第二和第三方面中装置的腔室可包含额外的试剂组合物和蜡层使得多于两种的不同反应可在同一腔室中进行。

在本发明的优选实施方案中，样品包括生物材料。优选地，生物材料包括细胞或病毒颗粒。

在本发明的更优选实施方案中，样品选自红细胞、白细胞、胚胎细胞、细菌、精子、花粉、细胞培养物、涂片、单个细胞、血细胞寄生物、病毒感染的单个细胞，及其它含有 DNA、RNA 或蛋白的液体。

应当理解本发明第一方面中的装置也可用于向生物组织中注射样品或用于样品由一处至另一处的转移。

因此，第九方面，本发明提供了第一方面中的装置将液体样品注射至细胞中的应用。优选地，液体样品包含诸如 DNA 或精子等遗传物质。

在第九方面的优选实施方案中，本装置适合与显微操作器共用以控制样品引入细胞。

在本说明书中，词“包含”(comprise)或其变格形式应被理解

定指材料在室温保持以上性质数年不变。

优选的塑造整个装置的聚合物包括聚丙烯、聚乙烯对苯二酸酯和聚碳酸酯。许多等级的聚丙烯已经商品化。一种例如 Himont PD701 natural (Himont USA, Inc., Wilmington, Del.) 的树脂因具有足够的惰性且可被高压灭菌可被优选使用。合适的聚碳酸酯的例子包括 makrolon (Bayer), calibre (Dow Chemical), lexan (GE) 和 acrifix192 (Rohm Chemical Fabrik)。整个装置可在高注塑压力下注塑成型。此外细长件也可由玻璃等物质制成。

优选地, 材料可透射电磁辐射。或者或此外腔室的第二封闭末端 (4) 包含可透射电磁辐射的透镜 (7)。

装置还包含具有第一 (9) 和第二 (10) 开口末端和内 (11) 外 (12) 表面的细长件 (8)。细长件可在细长腔室 (2) 中由第一位置 (13) 滑动至第二位置 (14)。第一末端 (9) 包括一针尖 (15)。优选地, 针尖的直径为 $1-200\ \mu\text{m}$ 。更优选地, 针尖的直径为 $1-50\ \mu\text{m}$ 。优选地, 针尖能刺穿生物组织如胚胎组织。因此, 优选细长件的至少针尖区域由玻璃制成。在一个优选实施方案中, 整个细长件都由玻璃制成。

密封机构 (16) 为细长件的外表面 (12) 和腔室 (2) 的内表面 (5) 提供了密封。密封机构包括一个位于细长件 (8) 外表面 (12) 靠近第二末端的套管 (17)。尽管也可使用其它诸如橡胶, 塑料或玻璃等材料, 优选使用聚四氟乙烯作为套管 (17) 的材料。套管 (17) 与腔室 (2) 的内表面 (5) 配合形成套管 (17) 和腔室内表面 (5) 间的密封。套管可以全长或大部分与腔室的内表面配合。图 5 为另一实施方案, 其中套管 (29) 包括一与腔室 (32) 内表面 (31) 配合共同形成密封的渐张区域 (30)。

在使用中, 可通过细长件 (8) 由第一位置 (13) 至第二位置 (14) 的移动通过细长件 (8) 将液体样品引入腔室 (2)。可通过将腔室 (2)

滑离细长件（8）的第一末端（9）而进行移动。应当理解，这种腔室（2）相对细长件（8）的运动造成了腔室（2）中压力的减低而将样品通过细长件（8）吸入腔室（2）中。

腔室还包括位于腔室（2）临近第一开口末端（3）处的凸起环管（18），环管包含一内表面（19）和一外表面（20）。使用者可握住外表面（20）以将腔室（2）向细长件（8）的第一末端（9）来回推动。

该装置还包含在凸起环管（18）内的第一导杆（21）。第一导杆包括环状外表面（22），其与环管（18）内表面（19）啮合而在环形外表面（22）和内表面（19）间形成密封。第一导杆还包括接受细长件（8）的孔（23）。第一导杆（21）可通过该孔（23）接受细长件（8）使细长件（8）与腔室（2）共轴。细长件的外表面（12）和形成孔的表面配合形成密封。优选第一导杆由硅制成。

该装置还包含位于外表面（12）上临近细长件（8）第一末端（9）的第二导杆（24）。第二导杆（24）可被用于在腔室（2）朝向或离开细长件（8）第一末端（9）滑动时固定细长件（8）。

下面介绍本发明优选装置（1）的一般使用。

本发明的装置可被用于将液体样品注射入细胞。应当理解腔室（2）向细长件（8）第一末端（9）的滑动会增加腔室（2）中的压力从而引起腔室（2）中液体通过细长件（8）排出。如此，本装置可被用于将外源遗传物质，诸如 DNA 或精子注射入细胞。

然而，优选使用本装置将样品吸入腔室（2）再进行分析。可通过在腔室中对样品进行期望的反应进行分析。在本实施方案中，可在细长腔室中注入进行反应所需的一单位剂量试剂组合物。“单位剂量”指包含除待分析样品外反应所需的全部或几乎全部试剂的试剂组合物。优选地，使用者只需加入样品便可开始反应。反应组合物在装置装备前预先注入腔室（2）中。此外反应组合物可通过细长件

(8) 被吸入至腔室(2)中。优选地,在腔室(2)中已注入试剂组合物后通过细长件将样品单独吸入腔室中。这样试剂组合物和样品再在腔室(2)中相互作用形成反应混合物。

可使用封闭剂处理腔室(2)的内表面(5)和/或细长件(8)的内表面(11)以帮助样品吸入腔室(2)。“封闭剂”指一种减少或防止溶液中的生物材料与细长件(8)内表面(11)或细长腔室(2)内表面(5)结合的试剂。细长件(8)的内表面(11)或腔室(2)的内表面(5)可在样品吸入前与封闭剂接触而钝化任何结合位点。或者或此外可将封闭剂在吸入前直接加至样品中。样品中的封闭剂可促进吸入过程中样品通过细长件的进入。封闭剂可为表面活性物质。合适的封闭剂包括但不限于牛血清清蛋白、胎牛血清、人血清清蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷醇,及其它合适的蛋白来源。本领域的技术人员应熟知本文中适用于封闭剂的商业化产品。合适的例子包括,“Sigmacote”(Sigma)和“Vigro Retrieval”。

可在细长件(8)中充油便于样品通过细长件进入腔室。

尽管本发明中的装置(1)可被用于进行各种反应,在优选实施方案中,该装置(1)被用于采集生物样品并对生物样品中的靶分子进行分析。优选地,试剂组合物能够通过令反应混合物发射的电磁辐射水平发生改变以检测生物材料中的靶分子。

在另一优选的实施方案中,靶分子为一核酸序列。优选地,试剂组合物包含能使靶核酸分子扩增的试剂。优选地,试剂组合物包含至少一种能与扩增序列作用而引起反应混合物发射的电磁辐射水平发生改变的试剂。

“扩增”反应指一种通常通过重复酶复制过程若干循环而得到最初核酸序列的多拷贝的反应。当可以从上一循环中得到的每一拷贝得到新拷贝时,称扩增过程与循环次数具有指数关系。尽管指数扩增对增加试验灵敏度是有利的,但在扩增产物未经仔细控制时,这

种增高的灵敏度会造成污染。

本领域的技术人员熟知扩增核酸分子的技术。例如公开于 U.S. Patent Nos. 4,683,202 和 4,683,195 (Mullis) 的聚合酶链式反应, 公开于 EP-A320 308 (Backman 等) 的连接酶链式反应, 及公开于 WO90/01069 (Segev), EP-A-439-182, (Backman 等), GB 2,225,112A (Newton 等) 和 WO93/00447 (Birkenmeyer 等) 的缺口填补 LCR (GLCR) 或其变异。其它扩增技术包括文献中报道的 Q-Beta Replicase, EP-A-497 272 (Walker), EP-A-500 224 (Walker 等), 及 Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 89:392 (1992) 中的链置换扩增 (SDA); Fahy 等, PCR 方法和应用 1: 25 (1991) 中的自动持续序列扩增, 及文献中报道的基于核酸序列的扩增 (NASBA)。

一些扩增反应, 例如 PCR 和 LCR, 涉及高低温度变化的循环, 即“热循环”过程。PCR 或称“聚合酶链式反应”是一种用通常为热稳定的聚合酶以原始核酸作为模板, 通过引物的延伸, 得到原始序列的多拷贝的扩增反应。PCR 方法详细介绍于 U.S. Pat. Nos. 4,683,202 和 4,683,195 中。LCR 或称“连接酶链式反应”是一种用通常为热稳定的连接酶通过将两个或多个与靶序列杂交的寡核苷酸探针连接起来得到原始序列的多拷贝的扩增反应。LCR, 及其变异缺口 LCR 详细介绍于 EP-A-320-308 (Backman 等), EP-A-439-182 (Backman 等) 及 WO90/100447 (Birkenmeyer 等) 等处。

此外, 扩增技术也包括本领域的技术人员所熟悉的涉及以荧光为基础的检测试验。实施例包括分子信号试验 (Tyagi 和 Kramer, 1996)、TaqMan™ 荧光能量转移试验 (Livak 等, 1995) 和导致 Forster 共振能量转移的杂交探针 (Deniz A.A.等, 美国国家科学院院报, 96:3670 (1999))。

当试剂组合物和样品已加至腔室 (2) 内后, 可优选采用将细长件 (8) 在临近腔室 (2) 处切割再加热的方法将细长件 (8) 密封。

例如可利用加热将细长件(8)同时切割和密封。或者可将细长件(8)从腔室(2)上取下并用加热或加帽的方法将腔室(2)的第一末端(3)密封。

可将封闭的腔室置于热循环仪中对靶核酸分子进行扩增。同时可通过腔室壁或腔室底部的透镜对发射的电磁辐射进行检测。

本发明中的装置和方法适用于一系列直接反应检测技术/化学过程的使用,例如 Taqman (Perkin-Elmer), 分子信号和 LightCycler™ 荧光杂交探针分析 (Roche Molecular Systems)。

一种优选的实时 DNA 扩增和检测系统为 LightCycler™ 荧光杂交探针分析。该系统涉及三种基本成分的使用: 两种不同的寡核苷酸(标记的)和扩增产物。寡核苷酸 1 在其 3' 端带有荧光标记而寡核苷酸 2 在其 5' 端带有另一标记, LC Red 640 或 LC Red 705。选择两种寡核苷酸的序列使其与扩增的 DNA 片段以从头至尾的顺序杂交。当寡核苷酸以这种方向杂交时, 两种荧光染料处于接近的位置。第一种染料(荧光素)被 LightCycler 的发光二极管(Light Emitting Diode)滤波光源激发出波长稍长一些的绿色荧光。当两种染料距离很近时, 发射出的能量会激发第二杂交探针上的 LC Red640 或 LC Red705 而发出波长更长一些的红色荧光。这种被称为 FRET (Forster 共振能量转移, 或荧光共振能量转移) 的能量转移与两染料分子间的间隔高度相关。只有当分子间距离很近(1-3 核苷酸)时, 能量才会以高效被转移。选择合适的检测频段, 用热循环仪中的光学仪器滤波并测量 LC Red640 或 LC Red705 发射的光线的强度。检测到的增加的荧光强度与正在进行中的 PCR 过程中产生的增加的 DNA 量成比例。因为 LC Red640 和 LC Red705 只有在两寡核苷酸都处于杂交时才发射信号, 所以在退火步骤后进行荧光检测。使用杂交探针对于样品中只含有少量模板分子的情况也十分有益。用杂交探针的 DNA 定量法不仅十分灵敏而且高度特异。它可以与琼脂糖凝胶电泳

与 Southern 印迹分析的联合相当而不需传统分析所需的费时步骤。

“TaqMan” 荧光能量转移试验使用与靶 DNA 内部片段互补的核酸探针。探针用两种荧光部分标记，其中一种的发射光谱与另一种的重叠；因而第一种荧光团的大部分发射会为第二种荧光团的发射猝灭。探针在 PCR 过程中存在，且如果 PCR 产物产生，则探针易为特异于与模板杂交的 DNA 的 Taq 聚合酶的 5' 核酸酶活性所降解。探针的核酸降解使得两种荧光团能够在溶液中分开，从而减少猝灭而增加了发射光的强度。

作为分子信号的探针基于具有茎环结构的单链核酸分子的原理。分子的环区是互补于靶核酸分子上预定的序列的探针序列。探针序列两侧两互补序列臂的退火形成了茎区域。臂上的序列与靶序列无关。一荧光部分附着于一臂的末端，而另一非荧光猝灭部分附着于另一臂的末端。茎结构使两部分相互距离很近，造成荧光团的发射荧光因荧光共振能量转移猝灭。我们选择的荧光猝灭对中荧光团接受的能量被转移至猝灭剂并以热量形式逸散而不发射光线。因此荧光团不能发射荧光。当探针遇到靶分子时，它与靶分子杂交形成比臂序列间的杂交更稳定的杂化物而不再进行臂间杂交。由于核酸的双螺旋刚性很强，探针-靶分子间杂交的形成阻止了臂序列间形成的杂交的同时发生。因此，探针经历了自发的构象变化使臂序列分开导致荧光团及猝灭剂相互分开。由于荧光团不再与猝灭剂接近，它在合适的光源照射下发射荧光。探针被称为“分子信号”因为它们只在与靶分子杂交时才会发射荧光信号。

现有一些如上所述最终产物发射荧光，化学过程可互变的实时荧光检测热循环仪。这些热循环仪包括 Pekin Elmer Biosystems 7700，Corbett Research 的 Rotogene，和 Hoffman La Roche Light Cycler。可设想任何一种上述的热循环仪都适用于配合本发明中的装置，实施本发明的方法。

在优选实施方案中，本发明中的装置可被用于在单个腔室中进行一系列连续的反应。在实施方案中，预先在细长腔室（2）装入两种或多种试剂组合物，试剂组合物由蜡层分开。

图 1 为适合进行连续反应的预装装置。第一试剂组合物（25）被第一蜡层（26）覆盖。第二试剂组合物（27）在第一蜡层（26）上为第二蜡层（28）覆盖。第一蜡层（26）的熔点高于第二蜡层（28）。可用油（29）覆盖第二蜡层（28）。

应当理解可在使用本发明装置（1）前将如图 1 所示预装试剂组合物的腔室（2）进行保存。可在保存前加帽密封腔室的第一开口末端（3）。优选在腔室中固化的蜡层在常规运输和搬运时保持附着于腔室的内表面上。

在此使用的“蜡”为一种蜡样的有机物质，在温度低于约 40℃ 时为固体但硬度大于脂肪，而在较高温度时熔化形成密度比水小的液体。蜡可能由烃、醇、脂肪酸和酯组成。可来源于植物、动物或矿物或可为合成物质。矿物蜡的例子包括石油蜡和褐煤蜡。合成蜡的例子包括 Fischer-Tropsch 蜡和聚烯烃蜡。优选地，蜡主要含有脂肪酸和高级醇的酯、游离脂肪酸和醇，和饱和烃。典型有用的蜡的纯化合物包括二十碳烷、二十八碳烷、棕榈酸十六烷酯和季戊四醇四山嵛酸酯。例如，蜡样物质包括聚酯胶。非硅氧烷触变凝胶样物质也可被用做蜡样物质。例如，一种烃凝胶样物质聚丁烯 H-100 当与 AEROSIL OX50 混合时可以适用，烃凝胶样物质聚丁烯 H-100 由 Amoco Chemicals Corporation, Chicago, Ill. 生产，在该公司产品目录中也称为 12-H，其是主要由高分子量单烯烃（85-98%）及余量的异链烷烃组成的丁烯聚合物，AEROSIL OX50 是纽约 Degussa 公司色素部生产的烟状二氧化硅粉末。另一可用的烃凝胶样物质的例子为纽约 ARCO 化学公司生产，见于该公司 1976 年 4 月一般公告中的 Poly bd® R-45HT，一种聚合度在 50 范围内的丁二烯的羟基末

端均聚物。另一例子为硅流体和微细疏水二氧化硅粉末的混合物。

通常可用的蜡混合物包括石蜡, Paraplast (Sherwood Medical 的商品名称)、Ultraflex (Petrolite Corporation 的商品名称) 和 BeSquare 175 (Petrolite Corporation 的商品名称)。本发明中特别有用的蜡包括: T waxTM (Energene, Regensburg, Germany)、AmpliWaxTM (PE Applied Biosystems) 和 Polyester Wax (Electron Microscopy Sciences)。蜡可通过以任意比例将纯蜡和混合蜡互相混合或将纯蜡和混合蜡与脂肪或油混合而保持蜡的相对硬度和粘性特性来制备。优选地, 在使用前使用任何有效的方法对用于本发明中的蜡进行灭菌。

本发明中所需的蜡量为能够覆盖试剂组合物表面的量。可通过常规实验测定所需蜡量。量的变化取决于参数包括, 例如, 反应腔室的大小。例如, 0.2ml 的小管使用 0.015-0.025g 蜡, 0.5ml 的小管使用 0.023-0.04g 蜡。

“油”指一种与水不混溶的有机物质, 在温度低于约 40℃时为液体, 密度比水小。“矿物油”也称液体凡士林油和石蜡油, 是一种无色透明, 密度大约 0.84g/ml 的高分子量烃混合物, 市场上大批供应, 通常用于 PCR 反应中防止蒸发。也可使用 Sigma 公司的 Melting Point Bath Oil (硅流体) (目录号 M6884, 密度 0.96g/ml, 或目录号 M9389, 密度 1.05g/ml)。

可通过上述的腔室 (2) 和细长件 (8) 间的相对运动将生物样品吸入腔室 (2) 中。应当理解, 以这种方式吸入腔室 (2) 的样品位于毗近第二蜡层 (28) 处。接下来可封闭腔室 (2) 并加热其至第二蜡层 (28) 熔化而第一蜡层 (26) 仍为固体的温度。第二蜡层 (28) 的熔化优选地使样品和第二试剂组合物 (27) 进行液体对流。可在此阶段离心腔室 (2) 以确保样品和第二试剂组合物的混合以形成反应混合物。离心力可为 5-200g, 更优选为 5-70g。接下来可将腔室 (2) 置于期望的反应能够发生的条件。

物。可以设想，例如，可以使用每一蜡层具有不同熔点的多蜡层分开多层试剂组合物。这样可以在腔室中依次进行多于两个的独立反应。

应当理解，本发明的装置和方法可用于一系列的应用中，例如法医分析，临床遗传测试，单细胞中的基因表达检验和性别决定测试。特别可以设想本发明的装置和方法可用于小量样品的反应，如单个细胞、胚胎细胞、精子、花粉、血细胞寄生物、病毒感染的单个细胞及其它含有 DNA 的液体。

实施例 1：吸入装置的准备

将 PCR 反应混合物（17 μ l）加入直接可达约 1.6mm 的腔室中。17 μ l 的 PCR 反应混合物中含有 DNA 聚合酶，含有核苷酸和 $MgCl_2$ 的反应缓冲液（TaqMan Universal PCR Master Mix – PE Applied Biosystems），和两套寡核苷酸引物，一套引物特异于人类 Y 染色体上的靶区域（SRY HMG 框），一套引物特异于人类 X 染色体上的常染色体靶区域 G6PD。每套 PCR 引物的终浓度分别为 0.3 μ M。反应混合物中还含有浓度分别为 0.2 μ M 的 PCR 产物检测探针。一探针检测人类 Y 染色体的扩增产物，而另一探针检测人类 X 染色体的扩增产物。

将熔化温度约 76°C 的 F 蜡（20%来自 Schumann Sasol 的合成蜡 C80N6，80%T 蜡）加热至 90°C 并使用 Drummond Capillary Positive Displacement Pipette 移液管吸入 3.3 μ l，使其凝固并注入毛细管装置中。接下来将装置置于 Rotogene（Corbett Research），于 78°C 离心 30 秒，取下冷却至 4°C，以得到覆盖于 PCR 反应混合物上的固体蜡层。

在固化的 F 蜡层上加入 2.5 μ l 蛋白酶 K 混合物（2X Gold PCR 缓冲液（Perkin Elmer），0.4mg/ml 蛋白酶 K（Boehringer Mannheim），18 μ M SDS 及补充水）。以与 F 蜡相同的方式向装置中加入熔化温

接下来将腔室（2）加热至第一蜡层（26）熔化的温度。第一蜡层（26）的熔化优选地使反应混合物与第一试剂组合物（25）进行液体对流。可在此阶段按上述方法离心腔室（2）以确保反应混合物与第一试剂组合物（25）的混合。接下来可将腔室（2）置于期望的反应能够发生的条件。

也可想象在蜡层的熔化和样品与试剂的混合前封闭并倒置已上样的腔室。例如，在样品吸入腔室后，封闭腔室的开口端，倒置腔室并将倒置腔室置于热循环仪中。如果这样，则优选将环管从腔室上取下。在此实施方案中，上述的事件也按同样的时间顺序进行。但第二和第一试剂组合物将以一种温度依赖的形式落入样品中，而不是样品落入试剂组合物中。

如前面所讨论，在优选实施方案中，本发明中的装置用于检测生物样品中的靶核酸分子。因此，第一试剂组合物优选包含允许靶核酸分子扩增的试剂。

本领域的技术人员应当理解，生物样品中的蛋白，特别是 DNA 降解酶，会严重的干扰核酸扩增反应。此外，将核酸从细胞中释放以及将核酸从诸如组蛋白的结合蛋白上的释放也十分重要，以确保核酸能够与扩增反应组合物中的聚合酶起作用。

因此，第二试剂组合物（27）中优选包含能够导致蛋白降解和/或修饰和引起核酸分子由细胞组分中释放的试剂。应当理解样品和第二试剂组合物（27）的相互作用在扩增反应进行前引起了细胞裂解，蛋白消化和核酸分子的释放。此外，将腔室加热以熔化第一蜡层（26）也可在扩增反应进行前灭活在第二试剂组合物中出现的任何蛋白酶。因此，本实施方案使使用者能够对生物样品进行有效可靠的扩增反应。由于细胞消化和扩增反应依次发生在同一腔室中，污染的危险被大大减低了。

应当理解腔室（2）可能包含多于两个的用蜡层分开的试剂组合

度约 55℃的 A 蜡，但是在 75℃熔化 A 蜡并于 60℃在 Rotogene 离心机上离心 30 秒。

最后，在 A 蜡层上加入 15 μ l 的矿物油（Sigma chemicals）。

在该腔室上装上一含有针尖的玻璃细长件以得到图 1 中所示的装置。

实施例 2：人白细胞中靶核酸的检测

收集男性或女性的白细胞（WBC）至装有柠檬酸钠（CPT）（Becton Dickinson，目录号 362761）的细胞制备管中将 WBC 和红细胞分开，用磷酸盐缓冲液（0.01M 磷酸缓冲液，0.0027M KCl，0.137M NaCl）洗涤两遍。将最后的 WBC 沉淀重悬浮于“Vigro Retrieval”（A.B. Technology）中。“Vigro Retrieval”起着防止 WBC 附着在管壁上的作用。接下来将 WBC 置于培养皿中。并覆盖矿物油以备用。

使用按实施例 1 中所述而准备的装置吸入在 2.5 μ l “Vigro Retrieval”中的含有目测记数所需数目的 WBC 制剂。用单独的装置分别吸入相同体积的男性或女性 DNA 或单独的“Vigro Retrieval”溶液（不含 DNA）作为对照。

将 WBC 吸入细长腔室至第二蜡层上油层下，然后取下玻璃制细长件。在将装置加帽后，将其置于 Rotogene 热循环仪上。将装置加热至 60℃持续 10 分钟进行蛋白消化反应。在此步骤中，A 蜡熔化而 F 蜡仍为固体。该反应后，将腔室加热至 72℃持续 10 分钟以使蛋白酶 K 失活。再将装置置于下面的 PCR 条件中：1x94℃10 分钟（F 蜡层熔化）；50x93℃15 秒，60℃40 秒，60℃10 秒。

图 6 为 PCR 反应的最终结果。x 轴清晰地显示了样品类型，分离的 DNA 或 WBC，来源，男性或女性，及加入反应腔室的基因组或 WBC 数目。

除了无 DNA 而无性别或常染色体信号的对照组（样品 3 和 16），

所有分析的对照样品及 12 个样品中的 11 个都得出了预期的性别和阳性 X 内部对照结果，样品 6 未能得到性别或常染色体信号。

显然，对于每个分析的男性 WBC 和 DNA 样品，都检测到了信号且在所有女性来源的样品中，都没有得到错误的阳性信号。此外，从样品 10 到 15 可以看出，本方法足够灵敏检测到靶序列单拷贝，即单个 WBC 中的单个 Y 染色体。

上文中明确引用的每一专利，专利申请和文献资料均在此以整体引入作为参考。

本领域的技术人员应当理解和上面特定的实施方案一样，可得到很多不背离本发明精神或范围的变动和/或修改。因此，应认为这些实施方案是说明而非限制性的。

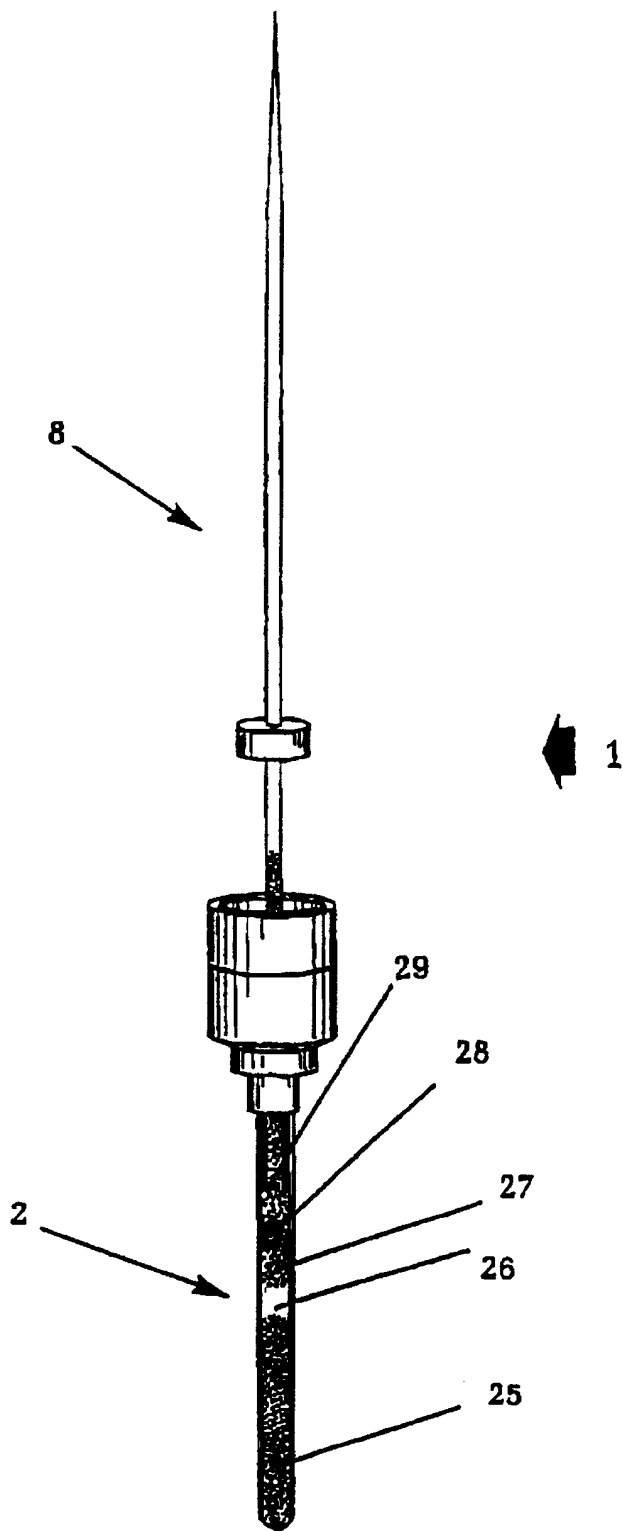


图 1

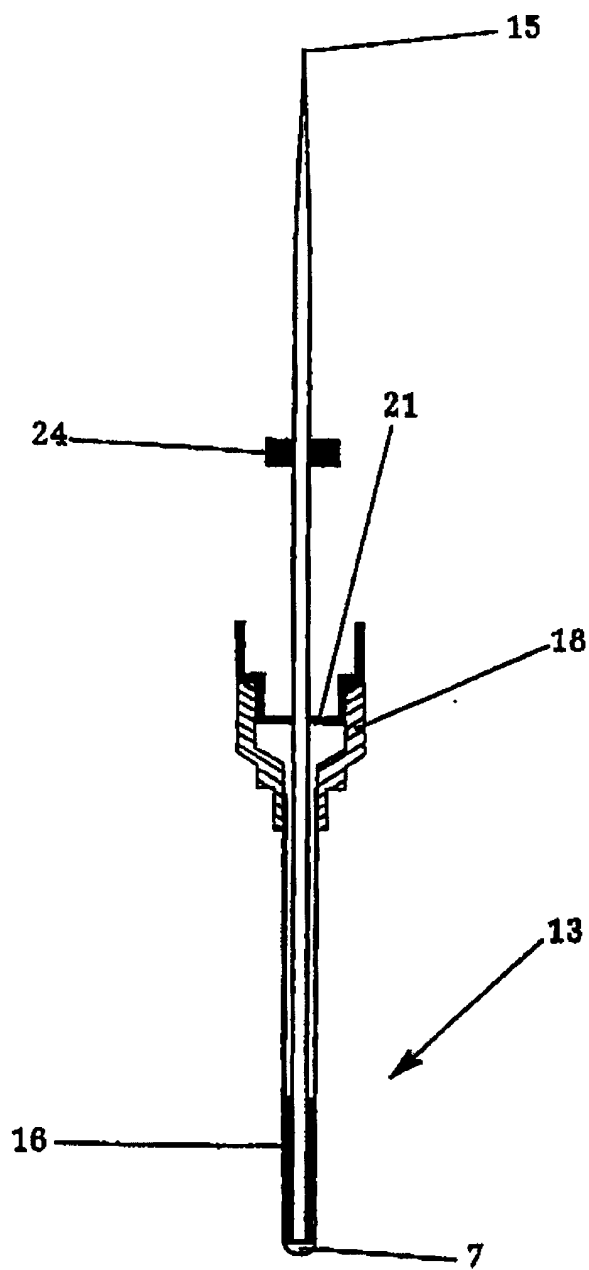


图2

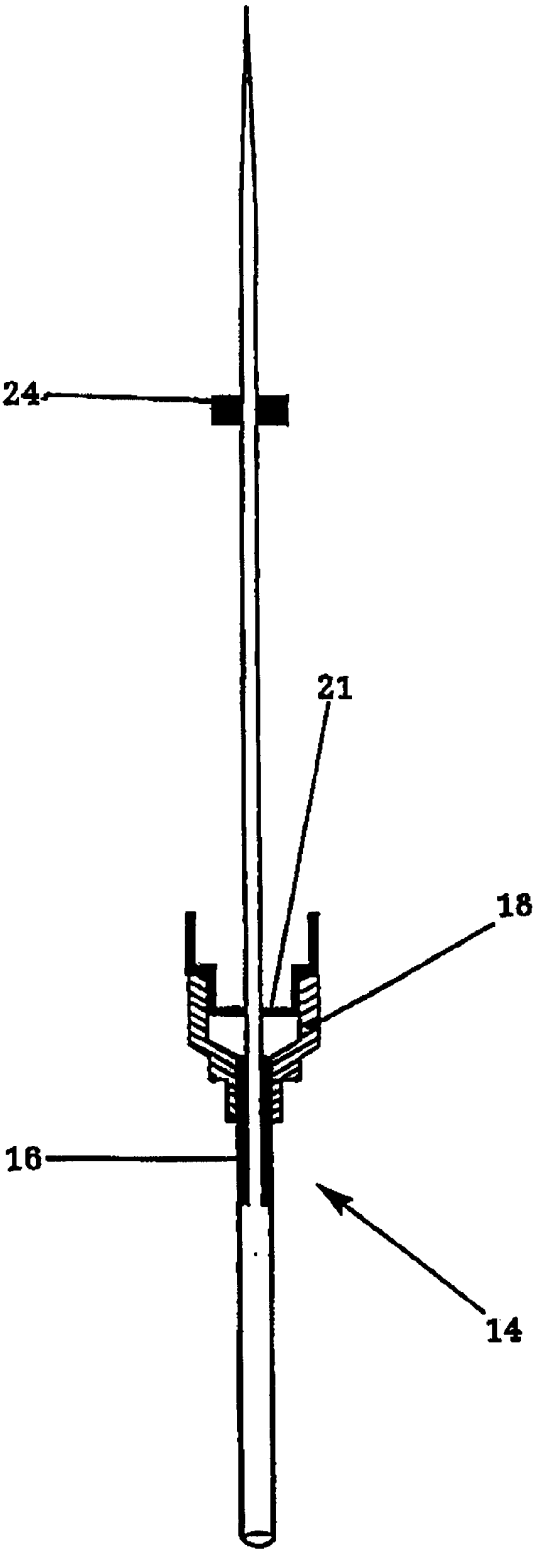


图3

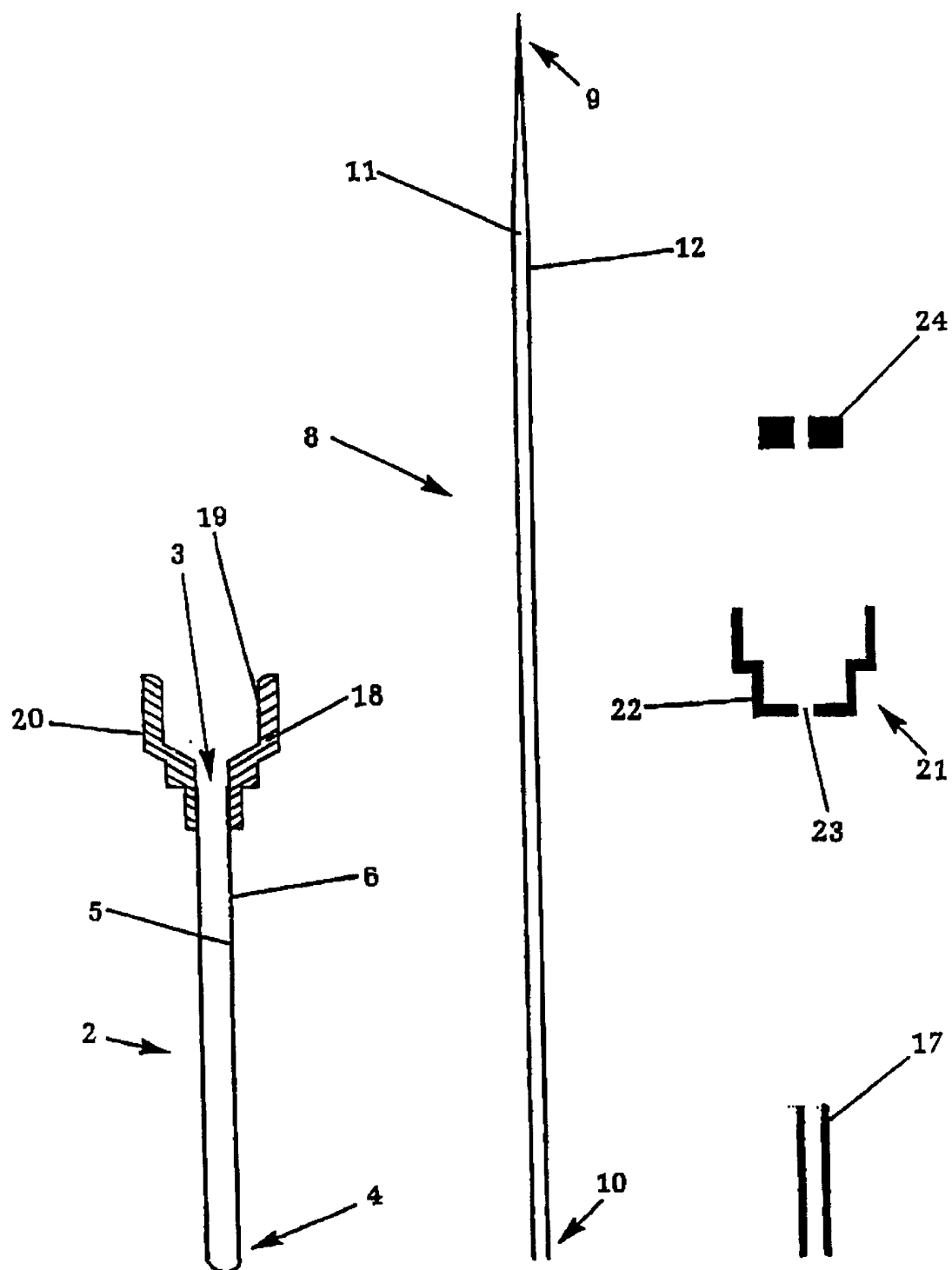
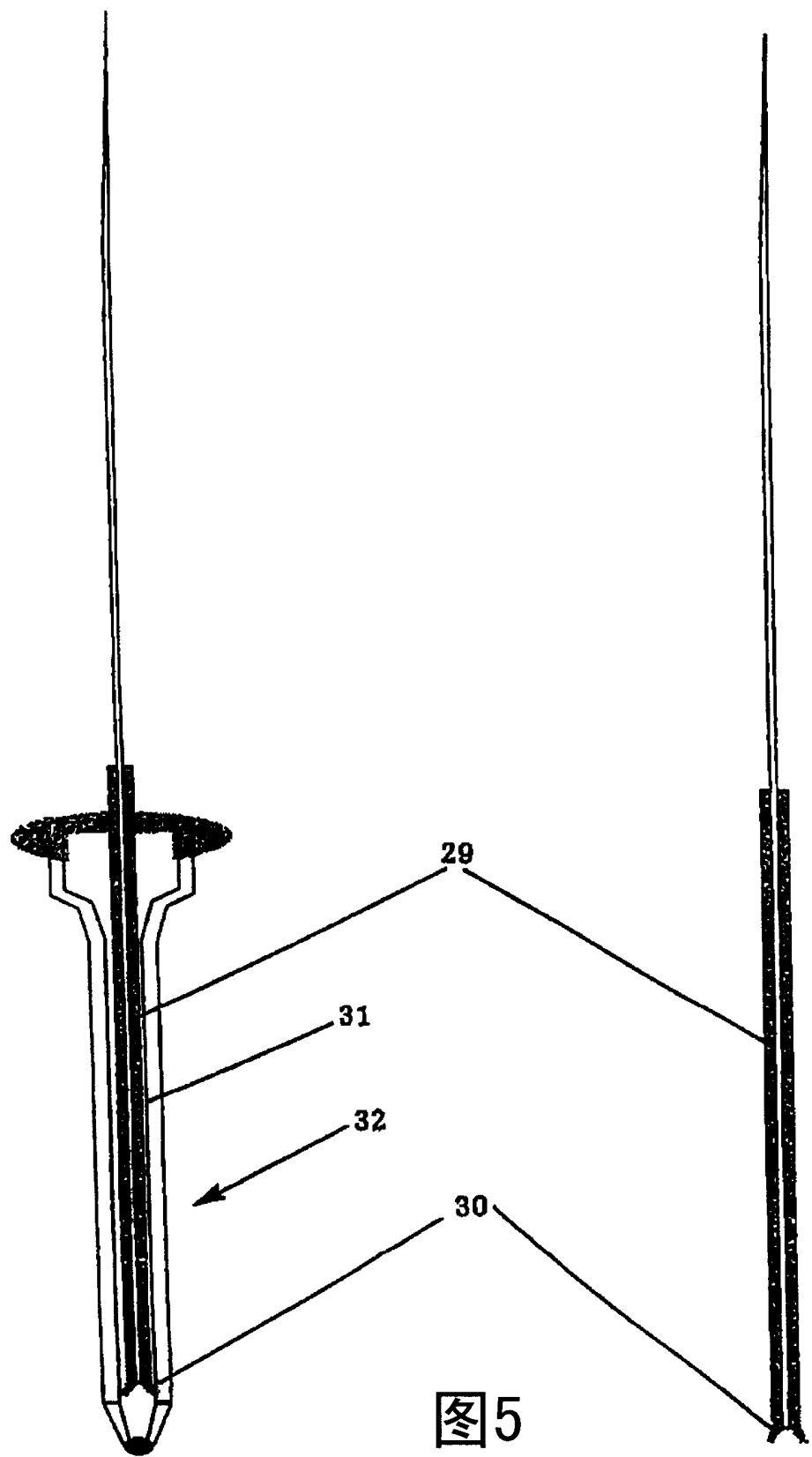
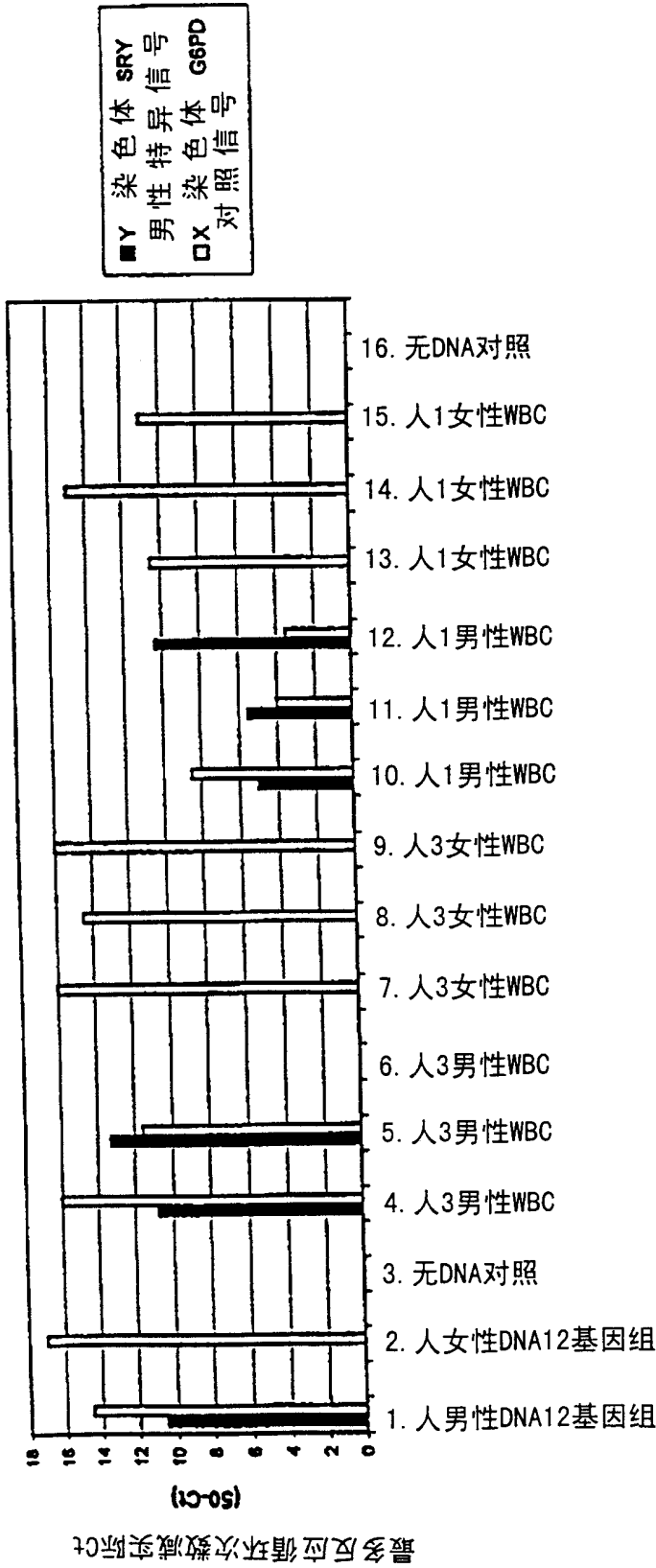


图4





样品号和描述

图6