

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102121054 A

(43) 申请公布日 2011.07.13

(21) 申请号 201010585557.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2005.05.06

C12Q 1/68(2006.01)

(30) 优先权数据

102004022263.0 2004.05.06 DE

(62) 分案原申请数据

200580014351.7 2005.05.06

(71) 申请人 科隆迪亚戈芯片技术有限公司

地址 德国耶拿

(72) 发明人 亚力山大·德沃拉克

托马斯·艾林格尔

尤金·埃曼特劳特

托尔斯泰·舒尔茨

托马斯·乌尔里希 托马斯·凯泽

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有

限公司 33100

代理人 徐关寿

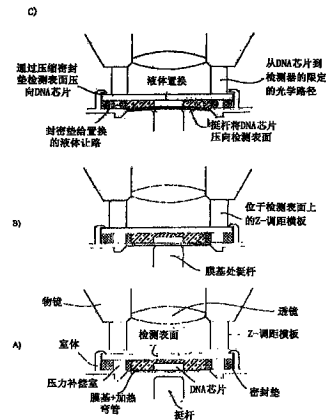
权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 21 页

(54) 发明名称

用于检测分子相互作用的装置和方法

(57) 摘要

本发明用于定性和 / 或定量检测探针分子和样品溶液中靶分子之间的相互作用的系统, 包含: 用于接收反应室的部件, 其中, 反应室由第一表面和第二表面之间形成, 探针分子被固定在微阵列上的阵列元件上, 该微阵列被放置在第一表面上; 以及该微阵列与第二表面之间的距离是可变的; 检测部件, 它被构建成当微阵列与第二表面之间的距离减少时能够进行检测; 一种工具, 通过该工具可以相对于第二表面指导该微阵列。



1. 用于定性和 / 或定量检测探针分子和样品溶液中靶分子之间的相互作用的系统, 包含: 用于接收反应室的部件, 其中, 反应室由第一表面和第二表面之间形成, 探针分子被固定在微阵列上的阵列元件上, 该微阵列被放置在第一表面上; 以及该微阵列与第二表面之间的距离是可变的; 检测部件, 它被构建成当微阵列与第二表面之间的距离减少时能够进行检测; 一种工具, 通过该工具可以相对于第二表面指导该微阵列。

2. 根据权利要求 1 中的系统, 其中, 通过该工具可以相对于第二表面指导该微阵列, 这样让位于微阵列与第二表面之间的样品溶液被实质移出。

3. 根据权利要求 1 或 2 中的系统, 其中, 通过该工具可以相对于第二表面指导该微阵列, 这样让该微阵列与第二表面之间的距离在 0 到 1mm 的范围内变化。

4. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中的检测部件是光学系统, 优选为荧光光学系统。

5. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中检测部件与一个间隔 (spacer) 连接, 当检测部件放置在第二表面的时候, 该间隔可以调节检测部件与第二表面之间的距离。

6. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中检测部件为不是自动聚焦的荧光显微镜或有固定焦距的荧光显微镜。

7. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中用于接收反应室的部件构建成可以用于调节或配置反应室的位置和精度。

8. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中用于接收反应室的部件构建成用于配置反应室的位置来从反应室替换溶液或 / 和给反应室补给溶液。

9. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中用于接收反应室的部件构建成用于配置反应室的位置来检测反应室里的信号。

10. 上述权利要求任何一个中的系统, 该系统还包括包温度控制单元和 / 或温度调节单元, 用于控制和 / 或调节反应室中的温度。

11. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中可以相对于第二表面指导该微阵列的工具是通过压缩和 / 或拉伸作用于第一表面。

12. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中第一表面可以通过该工具设定成振动。

13. 权利要求 6-12 的系统, 其中可以相对于第二表面指导该微阵列的工具是通过压缩和 / 或拉伸作用于第一表面, 第二表面可以相对与第一表面被移动让该微阵列与第二表面之间的距离是可变的。

14. 上述权利要求任何一个中的系统, 该系统还包括一个填充反应室的补给元件和 / 或用于纯化或浓缩样品溶液的回收元件, 和 / 或控制反应室中流体卸下或卸进的元件。

15. 权利要求 14 的系统, 填充元件具有一个连接反应室的流体截面 (afluidic interface)。

16. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中系统还包括读取编码的系统, 其中编码为矩阵和 / 或条形编码。

17. 上述权利要求任何一个中的系统, 该系统包括该反应室。

18. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中为第一和第二表面之间形成的反应室提供侧面限制补偿区, 该补偿区在该微阵列与第二表面之间的空间减小时, 使反应室中的体积保持基本恒定。

19. 权利要求 17 或 18 的系统, 其中的第一表面由透明材料制成, 优选的为透明塑料制成。

20. 权利要求 17-19 的系统, 其中, 第一表面至少在该微阵列下方的区域中被构建成可以相对于第二表面指导该微阵列, 以便可以改变该微阵列与第二表面之间的距离, 其中第一表面至少在该微阵列下方的区域为弹性变形的, 例如由弹性塑料制成。

21. 上述权利要求任何一个中的系统, 其中探针分子和 / 或靶分子是从下面的组中选择的生物聚合物: 核酸、肽、蛋白、抗原、抗体、碳水化合物和 / 或其类似物, 和 / 或上述生物聚合物的共聚物。

22. 定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用的方法, 包括下面的步骤:  
a) 将含有靶分子的探针溶液导入到放置了的微阵列的第一表面与第二表面之间形成的反应室中; 探针分子被固定在该微阵列的阵列元件上, 该微阵列被放置在装置的第一表面上; 其中微阵列与第二表面之间的距离可变;

b) 将反应室导入到一个如权利要求 1-21 中的系统;

c) 检测靶分子和固定在该底材上的探针分子之间的相互作用

23. 权利要求 22 的方法, 微阵列与第二表面之间的距离被保持在一个位置, 这样来促使被固定在该微阵列的阵列元件上的探针分子与靶分子中的探针的作用。

24. 权利要求 22 或 23 的方法中, 在步骤 C 中, 让微阵列与第二表面之间的距离可变, 优选为减少。

25. 权利要求 24 的方法中, 在步骤 C 中, 让微阵列与第二表面之间的距离可变来让位于微阵列与第二表面之间的样品溶液被实质移出。

26. 权利要求 22-25 的方法中, 靶分子被提供一种可检测的标记物质, 优选的为荧光标记物质。

27. 权利要求 26 的方法中, 荧光标记物质被不带有自动聚焦的荧光显微镜影响或者带有固定焦距的荧光显微镜影响。

28. 权利要求 22-27 的方法中, 其中靶分子和或探针分子为核算或核算的类似物质, 该靶分子在反应室中通过循环扩增反应来扩增, 其中在一个或几个循环之后和 / 或循环扩增反应完成之后进行的检测。

29. 权利要求 1 到 23 任何一个中的装置的应用, 用于进行基于微阵列的测试。

## 用于检测分子相互作用的装置和方法

[0001] 本申请是中国专利申请, 号码 200580014351.7, 申请日 2005 年 5 月 6 日的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于检测靶和探针分子之间的特异性相互作用的装置和方法。

### 背景技术

[0003] 生物学测试通常是基于对以已知量和位置存在的分子(分子探针)和被检测的未知分子(分子靶分子)之间的相互作用的检测。在现代的测试中, 探针是以支持物上的物质文库、即所谓的微阵列或芯片的形式排布, 以便可以以平行的方式同时用各种不同的探针对样品进行分析(参见例如 J. Lockhart, E. A. Winzeler, 基因组学、基因表达和 DNA 阵列; Nature 2000, 405, 827-836)。这里所说的探针通常固定化在适合的基体上, 例如在 WO 00/12575 中描述的那样(参见例如 US 5, 412, 087 和 WO 98/36827), 或者以预定的方式合成生产(参见例如 US 5, 143, 854) 用于微阵列的制备。

[0004] 基团标记的 DNA 或 RNA 分子形式的靶分子与微阵列的核酸探针之间那样的结合, 其先决条件是靶分子和探针分子都以单链核酸的形式存在。有效的、特异性的杂交只可能发生在这样的分子之间。单链核酸靶分子和核酸探针分子一般可以通过热变性, 并优化选择参数例如温度、离子强度和螺旋去稳定化分子的浓度的方式获得。因此, 确信的是只有事实上完全互补即彼此对应的序列的探针才能保持与靶序列的配对(A. A. Leitch, T. Schwarzacher, D. Jackson, I. J. Leitch, 1994, In vitro Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford)。

[0005] 在生物学测试方法中使用微阵列的一个典型例子是在生物学诊断中检测样品中的微生物。在此是利用了这样一个事实, 即核糖体 RNA (rRNA) 的基因是广泛分布的, 并具有对相应的种来说是特征性的序列部分。这些种特征性的序列被施加在单链 DNA 寡核苷酸形式的微阵列上。首先从被检测的样品中分离出被检测的靶分子, 并用标记物例如荧光标记物标记。然后将标记的靶 DNA 分子与固定在微阵列上的探针在溶液中保温, 通过相应的清洗步骤除去非特异性发生的相互作用, 并利用荧光光学评估的方式检测特异性相互作用。通过这种方式, 可能通过一个单一测试在一个样品中同时检测例如几个微生物。在这种测试方法中, 可以检测到的微生物的数量理论上只依赖于已经施加在微阵列上的特异性探针的数量。

[0006] 在分别在固相表面上的微阵列和探针阵列的帮助下检测分子相互作用的各种方法和技术体系已经被描述, 其中有些是可以商购的。

[0007] 用于检测分子相互作用的经典系统是基于荧光团标记的光谱激发的靶分子的荧光强度的比较。荧光是特定分子当受到特定波长的光激发时发射出它们自己的光的能力。此时, 相继发生了特征性的吸收和发射行为。在分析中, 荧光信号增加的比率被假定为官能化表面上标记的分子密度由于例如增加了靶和探针分子之间的分子相互作用的效率而增

加。

[0008] 具体来说, 荧光信号的定量检测是通过修改的荧光显微镜方法来进行的。在这种情况下, 通过滤光片或堇青石将具有吸收波长的光和具有发射波长的光分离开来, 通过光学元件例如物镜和透镜将测量到的信号成像在适当的检测器, 例如二维 CCD 阵列上。一般来说, 分析是通过数字成像方法来进行的。

[0009] 目前为止, 公知的技术解决方案根据它们所用的光学机构和元件而不同。问题和限制因素可能来自于信号噪音(背景), 它基本上是由例如所用染料的去色和淬灭效应, 介质、装配元件和光学元件自身荧光, 以及光学机构中的散射、反射和二级光源所决定的。

[0010] 这导致了对发展高灵敏度的、用于探针阵列的定性和定量比较的荧光检测器的极大的技术努力。具体而言, 对于中或高通量筛选来说, 需要表现出某种程度自动化的特别适合的检测系统。

[0011] 对于用于读出分子阵列的最优化标准 epifluorescence 机构来说, 已知的有基于 CCD 的检测器, 它在暗视野中通过入射光或透射光来执行荧光团的激发, 以鉴别例如散射和反射这样的光学效应(参见例如 C. E. Hooper 等, 在生命科学中使用增强式 CCD 相机进行定量光子成像, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* (1990), p. 337-344)。在这里, 阵列的成像或者通过曝光或者通过使用较高分辨率的光学器件进行光栅化来完成。多谱光源的使用允许相对容易地获得不同的荧光团, 这可以通过使用不同的激发滤光片(组合)来进行。但是, 缺点是阵列的自身荧光和例如照明均匀性这样的与系统相关的光学效应要求复杂的照明光学装置和滤镜系统。

[0012] 另外的定量检测荧光信号的方法是基于荧光共聚焦显微镜。例如在 US 5, 304, 810 中描述的共聚焦扫描系统是基于通过两个针孔沿着光轴选择荧光信号。这就要求对样品进行大量的调整尝试, 或建立起有效的自动聚焦系统。这样的系统在技术方案层面上是高度复杂的。所需的元件例如激光器、针孔、任选冷却的检测器如 PMT、雪崩二极管、或 CCD、复杂并高度精确的机械平移元件和光学装置必须通过大量的努力来进行最优化和整合(参见例如 US 5, 459, 325 ;US 5, 192, 980 ;US5, 834, 758)。小型化的程度和价格受到元件的多样性和功能性的限制。

[0013] 目前, 基于探针阵列的分析通常读出的是荧光数值(参见例如 A. Marshall 和 J. Hodgson, DNA 芯片:可能性的排列, *Nature Biotechnology*, 16, 1998, 27-31 ;G. Ramsay, DNA 芯片:技术状态, *Nature Biotechnology*, 16, Jan. 1998, 40-44)。然而, 上述检测装置和方法的缺点是高的信号背景导致的有限的精确性, 有时相当多的技术尝试, 以及与检测方法相关的高花费。

[0014] 具体来说, 已知有多种共聚焦系统, 适合于检测以阵列形式安装在流体室中的小规模集成物质文库(参见例如 US 5, 324, 633、US 6, 027, 880、US 5, 585, 639、WO 00/12759)。

[0015] 然而, 上述的方法和系统只能以非常有限的方式被改造用于检测特别是安装在流体系统中的大规模集成分子阵列, 特别是由于其中发生的散射、反射和光学象差。此外, 在这样的大规模集成阵列中, 对空间分辨率有极大的要求, 但是到目前为止, 这在技术上还不能实现。

[0016] 因此, 存在着对高度集成的阵列的需求, 其中探针和靶之间的相互作用可以以极

高的精确性并用相对而言很小的技术努力来定性和 / 或定量地检测。

[0017] 替代元件的选择性和获得性的增加促进了替代成像技术的建立,例如荧光偏振和时间分辨的荧光用于与固体结合的分析。通过以偏振的方式激发的荧光团扭曲偏振轴的效应被用于以微量滴定形式定量。此外,也有方法建立了廉价的具有高通量的系统(HTS系统),使用了相应修饰的聚合物箔作为偏振滤光片(参见 I. Gryczynski 等.,可目测的偏振感测, *Anal. Chem.* 1999, 71, 1241-1251)。

[0018] 最近的进展使用了无机材料的荧光,例如镧系元素(M. Kwiatowski 等,螯合物标记的寡核苷酸的固相合成:在三色连接酶介导的基因分析中的应用, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 13) 和量子点(M. P. Bruchez 等,半导体纳米晶体作为荧光生物标记物, *Science* 1998, 281, 2013)。表现出长的发射时间、范围在微秒级的染料,象镧系元素螯合物,需要将染料转化到流动相中,所以原位分辨检测是不可能的。

[0019] 在国际专利申请 WO 00/72018 中描述了用于检测用金珠标记的样品的光学机构以及通过银放大效应使它们可视化的机构。然而这里描述的机构只适合于静态测量中的检测。在静态测量中,将靶与布置在探针阵列上的探针相互作用,在反应开始后,在那些发生了相互作用的阵列元件上形成了沉淀,然后记录下图象,并根据沉淀形成的程度指派测量的灰度值浓度。

[0020] 在 WO 02/02810 中提供了通过探针和靶在探针阵列上的分子相互作用在样品中定性和 / 或定量检测靶的方法,其中阵列元件上沉淀形成的时间依赖性行为以信号强度的形式被检测,即执行动力学测量。在描述沉淀的形成作为时间的函数的曲线的基础上,给每个阵列元件指派定量阵列元件上探针和靶之间相互作用的值,从而也就是结合的靶的量。

[0021] 这样的动力学测量需要在例如特定的温度条件下或在过程的特定阶段中记录图象系列,例如在记录的时间中在存在特定溶液的情况下。这需要高度集成的阵列中每个元件的复杂的合作,特别是在基因分型领域中应用时。

[0022] 此外,在许多生物医学诊断测试中存在这样的问题,即最初存在的靶分子的量不足以被检测到,因此通常在实际测试步骤开始之前,首先必须从样品中扩增靶分子。一般来说,DNA 分子的扩增是通过聚合酶链反应(PCR)来进行的。对于 RNA 的扩增来说,必须通过反转录将 RNA 分子转化为相应的互补 DNA(cDNA)。然后也可以通过 PCR 扩增该 cDNA。PCR 是标准的实验室方法(例如在 Sambrook 等(2001) *分子克隆:实验室指南*,第三版, Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press 中)。

[0023] 通过 PCR 扩增 DNA 相对较快,通过微型化方法在小体积中允许高样品通量,并且能有效地进行自动化操作。

[0024] 但是,只通过扩增来表征核酸是不可能的。在扩增之后对 PCR 产物进行表征还需要使用一些分析方法,例如核酸序列测定、杂交、和 / 或电泳分离和分离方法。

[0025] 一般来说,用于扩增和检测核酸的装置和方法应该被设计成需要尽可能少的实验人员的介入。允许对核酸进行扩增和检测,并且在该过程中实验人员只需要最少介入的方法的优点是显而易见的。一方面,可以避免污染。另一方面,这种方法的可重复性相当高,因为它们可以达到自动化。考虑到诊断方法的合法性,这也是极端重要的。

[0026] 目前,有多种方法可以扩增和检测核酸,其中首先通过 PCR 扩增靶物质,然后通过与探针阵列进行杂交确定靶序列的身份或遗传状态。一般来说,在杂交范围内,为了获得足

够用于定性和定量检测所需的处理量,被检测的核酸分子或靶分子的扩增是必需的。

[0027] 核酸的 PCR 扩增和它们的杂交检测都受几个基本性问题的影响。这也同样适用于将核酸的 PCR 扩增和它们的杂交检测相结合的方法。

[0028] 在将 PCR 扩增和它的杂交检测相结合的方法中,如果在被检测的核酸或被检测的靶分子中插入可检测的标记物,例如以荧光标记的引物的形式,通常在实际检测前要执行清洗步骤。这样的清洗步骤用于除去未转化的引物,与扩增的产物相比这些未转化的引物的量大得多,以及用于除去带有荧光标记物的这些核苷酸,它们不参加检测反应或不与阵列上的核酸探针特异性杂交。通过这种方式,预计可以减少这些分子引起的高水平信号背景。但是,这样一个额外步骤显著地减慢了检测方法。此外,那些与微阵列上的核酸探针特异性杂交的被检测的核酸的检测信号也显著地降低了。后者主要是由于这样的事实,即通过杂交结合的靶和溶解的靶之间的平衡在清洗步骤之后不再存在。已经与阵列上的核酸探针杂交的核酸通过清洗而从结合位点上解离开来,因而与溶解的分子一起被洗掉。即便溶解的分子的清洗或漂洗步骤被执行得比已经杂交的核酸的解离更快,也仅仅留下可检测到的信号。

[0029] 因此,存在对高度集成的阵列的需求,其中探针和靶之间的相互作用可以以极高的精确性和相对而言很小的技术努力来定性和 / 或定量地检测。

[0030] 此外,存在着对装置的需要,该装置允许在一个反应空间中执行 PCR 和分析反应,例如杂交反应。

[0031] 因此,摆在本发明面前的问题是克服上面提到的本技术领域内的问题,特别是由于分析方法和测试系统之间缺少相容性而引起的问题。

[0032] 具体来说,摆在本发明面前的问题是分别提供方法和装置,其中探针和靶之间在探针阵列上的相互作用可以以极高的精确性和高灵敏度以及以易于使用和成本效率高的方式来定性和 / 或定量地检测。

[0033] 摆在本发明面前的另一个问题是分别提供方法和装置,用于核酸的扩增和定性定量检测,其中实验人员在检测步骤中的介入可以被最小化。

[0034] 摆在本发明面前的另一个问题是分别提供方法和装置,用于核酸的定性和定量检测,其中不损害靶分子和阵列上的探针分子之间的相互作用就能确保微阵列上相互作用检测中的高信噪比。

[0035] 摆在本发明面前的另一个问题是分别提供方法和装置,通过它们可以在检测中获得高的动力学分辨率,即能够确保在强的信号残留中检测弱的探针 / 靶相互作用。

[0036] 摆在本发明面前的另一个问题是分别提供方法和装置,它们允许以高通量速度几乎同时对核酸进行扩增和表征。

[0037] 这些以及其它摆在本发明面前的问题通过提供在发明权利要求中描述的实施方案得到了解决。

## 发明内容

[0038] 本发明提供了定性和 / 或定量检测探针分子和靶分子之间的分子相互作用的方法,其中溶液的替换和 / 或除去,即具体来说是清洗或漂洗步骤可以被省略。

[0039] 具体来说,本发明的这样的方法包含下列步骤:

[0040] a) 将含有靶分子的样品放入带有微阵列的反应室中,其中微阵列含有底材,其上探针分子被固定在阵列元件上;

[0041] b) 检测靶分子和固定在底材上的探针分子之间的相互作用,

[0042] 其中在将含有靶分子的样品放入反应室之后以及检测步骤之前或之中不进行反应室中溶液的替换和 / 或不从反应室中除去溶液。

[0043] 此外,在本发明的范围内提供了适合于实行这些方法的装置。

[0044] 具体来说,在本发明的范围内提供了用于定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用的装置,包括:

[0045] a) 具有底材的微阵列,其上探针分子被固定在阵列元件上,其中微阵列被安排在装置的第一个表面上;以及

[0046] b) 反应室,它上面排列了微阵列的第一个表面和第二个表面之间形成,

[0047] 其中微阵列和第二个表面之间的距离是可变的。

[0048] 具体来说,微阵列与第二个表面之间距离的可变性通常形成了本发明装置的检测平面,允许由不与微阵列的探针分子具有特异亲和性,因而不与它们相互作用的标记的靶分子引起的信号背景得以显著减小或完全避免。

[0049] 此外,本发明提供了用于定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用的方法,包括下列步骤:

[0050] a) 将含有靶分子的样品溶液放入上述的本发明装置的反应室中;以及

[0051] b) 检测靶分子和固定在底材上的探针分子之间的相互作用。

[0052] 本发明用于检测靶分子的方法和装置的设计方式使得在执行检测方法和任选靶分子的扩增过程中,反应室中需要尽可能少的实验人员的介入。这样提供的主要优点是避免了污染。此外,与常规方法相比,本发明的方法的可重复性也显著提高了,因为本发明的方法由于对外部介入进行了最小化从而更便于自动化。根据诊断方法的要求,上述的优点发挥了重要作用。

[0053] 此外,为了描述本发明,使用了下面的定义:

[0054] 在本发明的范围内,探针或探针分子或分子探针被理解是指这样的分子,它们由于特定的特征性结合行为或特定的反应性而被用于检测其它分子。每种能够与固体表面结合并具有特异亲和性的分子都可以用作布置在阵列上的探针。在优选实施方案中,它们是生物聚合物,特别是肽、蛋白、抗原、抗体、碳水化合物、核酸等类别的生物聚合物和 / 或其类似物,和 / 或上述生物聚合物的混合聚合物。在特别优选情况下,探针是核酸和 / 或核酸类似物。

[0055] 具体来说,具有确定的已知的序列,被用于杂交方法中检测靶分子的核酸分子被称为探针。DNA 和 RNA 分子都可以用作核酸。例如,核酸探针或寡核苷酸探针可以是具有 10 到 100 个碱基长度的寡核苷酸,优选情况下具有 15 到 50 个碱基长度,更优选情况下具有 20 到 30 个碱基长度。本发明中,典型情况下探针是单链的核酸分子或核酸类似物分子,优选为具有至少一个与靶分子的序列区域互补的序列区域的单链 DNA 分子或 RNA 分子。根据检测方法和使用的不同,探针可以被固定在固相支持底材上,例如以微阵列的形式。此外,根据检测方法的不同,它们可以被放射性或非放射性标记,以便它们可以通过本技术领域常规的检测方法被检测。



[0056] 在本发明的范围内,靶或靶分子被理解为是指通过分子探针被检测的分子。在本发明的优选实施方案中,被检测的靶是核酸。然而,本发明的探针阵列也可以以类似的方式用于检测肽 / 探针相互作用、蛋白 / 探针相互作用、碳水化合物 / 探针相互作用、抗体 / 探针相互作用等。

[0057] 在本发明的范围内,如果靶是通过与布置在探针阵列上的探针进行杂交而检测的核酸或核酸分子,该靶分子通常含有 40 到 10000 个碱基长度的序列,优选情况下含有 60 到 2000 个碱基长度的序列,更优选情况下含有 60 到 1000 个碱基长度的序列,特别优选情况下含有 60 到 500 个碱基长度的序列,最优选情况下含有 60 到 150 个碱基长度的序列。任选地,它们的序列也可以含有引物的序列以及由引物确定的模板的序列区域。具体来说,靶分子可以是单链的或双链的核酸分子,其一条或两条链被放射性或非放射性标记,以便它们可以通过本技术领域常规的检测方法被检测。

[0058] 根据本发明,靶序列是指通过与探针杂交而被检测的靶序列区域。根据本发明,它也称作被探针寻址的该区域。

[0059] 在本发明的范围内,物质文库被理解为是指大量不同的探针分子,优选至少 2 到 1000000 个不同的分子,特别优选至少 10 到 10000 个不同的分子,最优选 100 到 1000 个不同的分子。在具体的实施方案中,物质文库也可以只包含至少 50 个或以下或至少 30000 个不同的分子。在优选情况下,物质文库以阵列的形式布置在本发明装置的反应室内的支持物上。

[0060] 在本发明的范围内,探针阵列被理解为是指分子探针或物质文库 在支持物上的布局,其中每个探针的位置是单独确定的。优选情况下,阵列包含了被称为阵列元件的确定的位点或预定的区域,它们以特定的方式被特别优选地布置,其中每个阵列元件通常只包含一种探针。

[0061] 这里,分子或探针在支持物上的布局可以通过共价的或非共价的相互作用而产生。这里,探针被布置在支持物朝向反应室的一面上。布局中,即阵列中的位置通常被称为点。

[0062] 在本发明的范围内,阵列元件、或预定区域、或点、或阵列点被理解为是指表面上被确定要安置分子探针的区域;所有被占据的阵列元件的总和构成了探针阵列。

[0063] 在本发明的范围内,支持元件、或支持物、或物质文库支持物或底材被理解是指其上安装了探针阵列的固体。支持物,通常也被称为底材或基体,可以是指例如物体支持物、或晶片或陶瓷材料。在具体的实施方案中,探针也可以直接固定在第一表面上,优选在第一表面的分区上。

[0064] 布置在底材或检测表面上的阵列布局中的全体分子、或布置在底材或检测表面的阵列布局中和支持物或底材上的全体物质文库通常被称为“芯片”、“微阵列”、“DNA 芯片”、“探针阵列”等。

[0065] 在本发明的范围内,检测平面被理解为是指本发明的装置的第二个表面。在优选情况下,布置在微阵列上的探针在检测探针和靶的相互作用的过程中基本上位于检测平面中,这实际上是由于微阵列和第二表面之间的距离被减小到几乎为零。

[0066] 在本发明的范围内,室体被理解为是指形成反应室的固体。物质文库支持物或芯片通常是室体的一部分,其中物质文库支持物可以由与室体的其它部分不同的材料制成。

[0067] 在本发明的范围内,反应室或反应空间被理解为是指在微阵列和第二表面或检测平面之间形成的空间,在优选情况下被设计为可变的微隙。反应空间的侧面被侧壁所限制,这可以通过例如弹性密封垫来进行。固定在微阵列上的探针位于面向反应室内部的一侧上。反应室或反应空间的底部由阵列的第一或第二表面来界定。具体来说,第二表面或检测平面与底材或微阵列的表面之间的距离被称为反应空间或反应室或微隙的厚度。在本发明范围内,反应空间通常只有小的厚度,例如厚度最多 1cm、优选情况下最多 5mm、特别优选情况下最多 3mm、最优选情况下最多 1mm。

[0068] 在本发明的范围内,微阵列和第二表面之间的距离被理解为是指微阵列底材表面,即微阵列面向反应空间的一面,与面向反应空间的第二表面的面之间的距离。如果微阵列与第二表面之间的距离几乎为零,意味着底材表面均匀平坦地放置在第二表面上。

[0069] 在本发明的范围内,微隙被理解为是指反应空间,它可以被微阵列和第二表面之间的毛细作用力充满。一般来说,微隙具有小的厚度,例如最多 1mm,优选情况下最多 750  $\mu\text{m}$ ,特别优选情况下最多 500  $\mu\text{m}$ 。根据本发明,范围在 10  $\mu\text{m}$  到 300  $\mu\text{m}$ 、15  $\mu\text{m}$  到 200  $\mu\text{m}$  和 / 或 25  $\mu\text{m}$  到 150  $\mu\text{m}$  之间的厚度优选作为微隙的厚度。在具体的实施方案中,微隙的厚度为 50  $\mu\text{m}$ 、60  $\mu\text{m}$ 、70  $\mu\text{m}$ 、80  $\mu\text{m}$  或 90  $\mu\text{m}$ 。在本发明的范围内,如果反应空间或反应室的厚度超过 2mm,则反应空间或反应室将不再被称为微隙。

[0070] 在本发明的范围内,仓 (cartridge) 或反应仓被理解为是指具有室体和相应外套的反应室的单元。

[0071] 在本发明的范围内,共聚焦荧光检测系统被理解为是指荧光检测系统,其中物体在物镜的焦距平面上通过点光源照明。这里的点光源、物体和点光线检测器准确地位于光学共轭平面上。共聚焦系统的例子在 A. Diaspro, 共聚焦和二维光子显微术:基础、应用与进展, Wiley-Liss, 2002 中有描述。

[0072] 在本发明的范围内,为整个反应室成像的荧光光学系统被理解为是指非共聚焦的荧光检测系统,即荧光检测系统,其中利用点光源的照明不只限于物体。因此这样的荧光检测系统没有焦距限制。

[0073] 本发明的范围内的常规阵列或微阵列在优选例如 1mm 到 4mmx1mm 到 4mm、优选为 2mmx2mm 的方型表面上包含了大约 50 到 10000、优选为 150 到 2000 个不同种类的探针分子。在本发明范围内的其它实施方案中,微阵列在几  $\text{mm}^2$  到几  $\text{cm}^2$ 、优选大约 1 $\text{mm}^2$  到 10 $\text{cm}^2$ 、特别优选为 2 $\text{mm}^2$  到 1 $\text{cm}^2$ 、最优选大约 4 $\text{mm}^2$  到 6.25 $\text{mm}^2$  的表面上包含了大约 50 到大约 80000、优选大约 100 到大约 65000、特别优选大约 1000 到大约 10000 个不同种类的探针分子。例如,常规的微阵列在 2mmx2mm 的表面上具有 100 到 65000 个不同种类的探针分子。

[0074] 在本发明的范围内,标记或标记物被理解为是指可检测的单位,例如荧光团或其上可以连接可检测单位的锚定基团。

[0075] 在本发明的范围内,扩增反应通常包含 10 到 50 个或更多的扩增循环,优选大约 25 到 45 个循环,特别优选为大约 40 个循环。在本发明的范围内,循环扩增反应优选为聚合酶链反应 (PCR)。

[0076] 在本发明的范围内,扩增循环是指循环扩增反应的单一增加步骤。PCR 的增加步骤也被称为 PCR 循环。

[0077] 在本发明的范围内,扩增产物是指通过循环扩增反应、优选通过 PCR 扩增的核酸

分子的增加或拷贝或扩增而得到的产物。通过 PCR 方法扩增的核酸分子也被称为 PCR 产物。

[0078] 在本发明的范围内,变性温度被理解为是指在扩增循环中双链 DNA 被分开时的温度。通常情况下、特别是在 PCR 中,变性温度高于 90°C,优选大约 95°C。

[0079] 在本发明的范围内,退火温度被理解为是指引物与被检测的核酸杂交时的温度。通常情况下、特别是在 PCR 中,退火温度在 50°C 到 65°C 的范围内,优选大约 60°C。

[0080] 在本发明的范围内,链延伸温度或延伸温度被理解为是指通过插入单体元件合成核酸时的温度。通常情况下、特别是在 PCR 中,延伸温度在大约 68°C 到大约 75°C 的范围内,优选大约 72°C。

[0081] 在本发明的范围内,寡核苷酸引物或引物是指与被检测的 DNA、也被称为靶 DNA 结合或杂交的寡核苷酸,其中在循环扩增反应中,被检测的 DNA 的互补链的合成从结合位点开始。具体来说,引物是指优选具有大约 12 到 30 个碱基的短的 DNA 或 RNA 寡核苷酸,它与较大的 DNA 或 RNA 分子的一部分互补,并在其 3'-末端具有游离的 3-羟基基团。由于该游离的 3'-羟基基团,引物可以作为任何任选的 DNA 或 RNA 聚合酶的底材,该聚合酶在引物上以 5'-3' 的方向合成核苷酸。此处,新合成的核苷酸的序列由与引物杂交的模板序列中位于引物的游离 3'-羟基之后的序列所预先决定。常规长度的引物包含 12 到 50 个核苷酸,优选在 15 到 30 个核苷酸之间。

[0082] 作为模板用于合成互补核酸链的双链核酸分子或核酸链通常被称为模板或模板链。

[0083] 在本发明的范围内,分子相互作用或相互作用被理解为是指靶分子和固定化的探针分子之间特异性的、共价的或非共价的键。在本发明的优选实施方案中,探针和靶分子之间的相互作用是杂交。

[0084] 从互补的单链核酸分子形成双链核酸分子或双链体分子被称为杂交。此时,结合优选总是发生在 A 和 T 或 G 和 C 碱基对之间。在杂交的范围内,例如 DNA-DNA 双链体、DNA-RNA 双链体或 RNA-RNA 双链体可以形成。通过杂交,具有核酸类似物的双链体也可以形成,例如 DNA-PNA 双链体、RNA-PNA 双链体、DNA-LNA 双链体和 RNA-LNA 双链体。杂交实验通常被用于检测序列互补性,因此可以检测两个不同核酸分子的身份。

[0085] 在本发明的范围内,处理被理解为是指纯化、浓缩、标记、扩增、相互作用、杂交和/或清洗和漂洗步骤以及其它在利用物质文库检测靶的过程中进行的方法步骤。检测本身不落入术语处理之下。

[0086] 在本发明的范围内,样品或样品溶液或被分析物或溶液是被分析的液体,具体来说其中包含了被检测以及可能需要被扩增的靶分子。此外,除了常规的添加剂例如缓冲液之外,这种溶液中也可以包含执行扩增反应所需的物质,例如引物。

[0087] 在本发明的范围内,从反应室中替换反应室中的溶液具体来说是指漂洗或清洗步骤。替换溶液用来例如除去用可检测的标记物标记的、不能与微阵列上的探针发生特异性相互作用的分子,这可以在完成相互作用之后通过用无标记的溶液替换样品溶液来进行。不与微阵列上的探针发生特异性相互作用的分子是例如用可检测的标记物标记的、但在扩增反应中还没有被转化的引物,或者是用可检测的标记物标记的、但在阵列上不具有互补探针的靶分子,所述互补探针与所述靶分子发生特异性相互作用。

[0088] 在本发明的范围内,从反应室中除去溶液被理解是指这样的步骤,通过该步骤可以将用可检测的标记物标记的、但不与微阵列上的探针发生特异性相互作用的分子从反应室中除去。不与微阵列上的探针发生特异性相互作用的分子是例如用可检测的标记物标记的、但在扩增反应中还没有被转化的引物,或者是用可检测的标记物标记的、但在阵列上不具有互补探针的靶分子,所述互补探针与所述靶分子发生特异性相互作用。

[0089] 在本发明的范围内,如果在将含有靶分子的样品注入反应室和检测相互作用之间不进行反应室中溶液的替换和/或不从反应室中除去溶液,可以想象在这段时期内可以另外将溶液注入反应室中,而不替换或除去已经存在于反应室中的溶液。

[0090] 因此,本发明的第一个目标包含了定性和/或定量检测探针和靶分子之间的相互作用的方法,具体来说包含下列步骤:

[0091] a) 将含有靶分子的样品注入含有微阵列的反应室中,其中微阵列含有底材,其上探针分子被固定在阵列元件上;

[0092] b) 检测靶分子和固定在底材上的探针分子之间的相互作用。

[0093] 其中在将含有靶分子的样品注入反应室之后和检测步骤之前或之中不进行反应室中溶液的替换和/或不从反应室中移出溶液。

[0094] 在本发明的这个方面,本发明的方法的基本特征是在检测被检测的靶分子和固定在微阵列的底材上的探针分子之间的相互作用的过程中不进行反应室中溶液的替换或不从反应室中取出溶液。也就是说,在相互作用后不需要漂洗或清洗步骤,以及/或在相互作用后不从反应室中除去不与微阵列上的探针特异性相互作用的分子,就可以进行靶和探针之间相互作用的检测。

[0095] 在本发明的方法中,具体来说这可以通过焦距选择性检测方法来保证,例如通过共聚焦技术或通过样品底物中、基于深度选择性照明、由于例如总反射引起的激发光的逐渐消失解偶联 (TIFR),或者使用基于波导的方法。在为了增加灵敏度进一步排除由存在于液体中、即未杂交的荧光分子引起的背景信号的情况下,这样的焦点选择性方法将是特别优选的。使用荧光标记的靶分子,通过使用象总内部反射荧光显微术 (TIRF) 或共聚焦荧光显微术这样的方法,可以将特异性相互作用信号与背景荧光区分开来。

[0096] 这种例子是基于 CCD 的检测器,它在暗视野中通过入射光或透射光执行荧光团的激发,以辨别光学效应如散射和反射(参见例如 C. E. Hooper 等,在生命科学中使用增强式 CCD 相机进行定量光子成像, *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* (1990), p. 337-344)。其它替代的能够用于本发明的方法的荧光检测系统是例如在 WO 00/12759、WO 00/25113 和 WO 96/27025 中描述的内灯装置,例如在 US 5,324,633、US 6,027,880、US 5,585,639 和 WO 00/12759 中描述的共聚焦系统,例如在 US 5,760,950 中描述的基于共聚焦成像中的 Nipkow 盘的共聚焦激发系统,例如在 WO 98/57151 中描述的基于结构化激发分布的系统,例如在 WO 99/27140 中描述的使用微型光学元件的大规模集成荧光检测系统,以及例如在 WO 00/12759 中描述的激光扫描系统。使用这种常规荧光检测系统的荧光检测方法的总的进展在例如 US 5,324,633 中有描述。

[0097] 在 WO 2004/087951 中描述的装置,其中的反应室通过微隙形成,特别适合于执行本发明的检测方法,无需替换反应室中的溶液和/或不从反应室中移出溶液。WO 2004/087951 的相关内容在此明确地引用。

[0098] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中,反应室中溶液的替换和 / 或除去的步骤被避免,这是通过检测阵列表面上的质量变化来进行检测的,例如在 WO 03/004699 中描述的那样。WO 03/004699 的相关内容在此明确地引用。

[0099] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中,反应室中溶液的替换和 / 或除去的步骤被避免,这是通过检测声学表面波来进行检测的,例如在 Z. Guttenberg 等, Lab Chip. 2005 ;5(3) :308-17 中描述的那样。

[0100] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中,反应室中溶液的替换和 / 或除去的步骤被避免,这是通过阵列表面的电极的电化学检测来进行检测的,例如通过测量氧化还原电势的改变(参见例如 X. Zhu 等, Lab Chip. 2004 ;4(6) :581-7) 或 cyclic voltometry(参见例如 J. Liu 等, Anal Chem. 2005 ;77(9) :2756-2761 ;J. Wang, Anal Chem. 2003 ;75(15) :3941-5)。

[0101] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中,反应室中溶液的替换和 / 或除去的步骤被避免,这是通过阵列表面的电极的电检测来进行检测的,例如通过阻抗测量(另外参见 S. M. Radke 等, Biosens Bioelectron. 2005 ;20(8) :1662-7)。

[0102] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中,反应室中溶液的替换和 / 或除去的步骤被避免,这是通过使用具有 FRET 探针(FRET, 荧光共振能量转移)的微阵列来进行的。这种 FRET 探针的使用是基于荧光淬灭剂对的形成,从而使只有当靶分子与表面上的互补探针结合时才产生荧光信号。FRET 探针的使用在例如 B. Liu 等, PNAS 2005, 102, 3, 589-593 ; K. Usui 等, Mol Divers. 2004 ;8(3) :209-18 ;J. A. Cruz-Aguado 等, Anal Chem. 2004 ;76(14) :4182-8 和 J. Szollosi 等, J Biotechnol. 2002 ;82(3) :251-66 中有描述。

[0103] 在本发明的这个方面的另一个优选实施方案中,反应室中溶液的替换和 / 或除去的步骤被避免,这是通过使用下面详细描述用于定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间分子相互作用的本发明装置来实现的,其中该装置包含:

[0104] a) 具有底材的微阵列,其上探针分子被固定在阵列元件上,其中微阵列被安排在装置的第一个表面上;以及

[0105] b) 反应室,在上面排列了微阵列的第一个表面和第二个表面之间形成,

[0106] 其中微阵列和第二个表面之间的距离是可变的。

[0107] 本发明的另一个目标涉及使用上述的 FRET 探针分子,和 / 或从下列的组中选择的检测方法:上述的总内部反射荧光显微术(TIRF),上述的共聚焦荧光显微术,上述的检测质量改变的方法,上述的检测声学表面波的方法,上述的电化学和 / 或电学检测方法,以避免在将含有靶分子的样品注入反应室期间或之后、以及在定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用的方法中检测之前或期间替换反应室中的溶液和 / 或从反应室中除去溶液,具体来说包含下列步骤:

[0108] a) 将含有靶分子的样品溶液注入含有微阵列的反应室中,其中微阵列含有底材,其上探针分子被固定在阵列元件上;

[0109] b) 检测靶分子和固定在底材上的探针分子之间的相互作用。

[0110] 本发明的另一个目的具体来说是用于定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用的装置,包含:

[0111] a) 具有底材的微阵列,其上探针分子被固定在阵列元件上,其中微阵列被安排在

装置的第一个表面上；以及

[0112] b) 反应室,在上面排列了微阵列的第一个表面和第二个表面之间形成,

[0113] 其中微阵列和第二个表面之间的距离是可变的。

[0114] 在探针分子和靶分子之间完成相互作用后,由样品溶液中存在的、不与探针分子相互作用的标记的分子引起了不希望的背景。具体来说,在探针和 / 或靶分子是核酸和 / 或核酸类似物的情况下,该背景是由存在于样品溶液中不与探针分子杂交的标记的引物和 / 或标记的核酸引起的。

[0115] 已知除去干扰的背景信号的可能性是在相互作用完成之后用未标记的、例如无荧光的溶液替代样品溶液。但是,由于溶蚀、溶液的老化以及不渗透性问题,这种改变一般来说是浪费的并容易受到干扰。

[0116] 本发明的装置的基本特征是微阵列和第二表面之间的距离是可变的。微阵列和第二表面之间的距离的可变性意味着本发明的装置的反应室是可压缩的。具体来说,微阵列和第二表面之间的距离的变化方式使得微阵列可以均匀地和 / 或可逆地放置在第二表面上,或可以将其活性一面、即其上固定了核酸探针的一面压在该表面上。

[0117] 因此,可压缩的反应室允许在进行检测之前通过减小微阵列和检测平面之间的距离来替换含有不与探针分子相互作用、因而构成不希望的背景的标记分子的样品溶液。通过这种方式,有可能在检测之前不用非标记的溶液替换样品溶液,就能够使用任何光学检测系统检测探针和靶分子之间的相互作用。例如,通过本发明的装置,不用非标记的溶液替换样品溶液,使用 DNA 芯片的简单荧光显微成像技术检测相互作用信号,特别是弱的荧光液体,是可能的。

[0118] 具体来说,通过下面描述的本发明的装置的实施方案,最终可以确保不再需要光学检测系统的聚焦。因此,本发明的装置允许例如使用不具有自动对焦功能的简单的荧光显微镜装置作为读取装置,用来检测靶和探针之间的杂交,而不需要液体操作步骤,具体来说例如清洗步骤来除去不与阵列结合的靶分子,例如未杂交的靶核酸,这与迄今为止用于检测核酸的荧光光学检测系统相反。

[0119] 尽管通过本发明的装置进行多功能样品处理和分析是可行的,仍提供了用于检测和任选扩增样品中的靶分子的成本效率非常高的系统。本发明的装置、特别是与光学检测系统相连后,更加耐用,以至于它们也适合于移动使用。

[0120] 通过适当地选择芯片、处理方案和分析的化合物,本发明的装置可以被用于大多数不同类型的基因分析,例如诱因诊断、病菌诊断和分型。因此,在本发明的装置中,可以使用很少的设备执行完全的遗传分析,它也能够作为一次性仓使用。因此,本发明的装置允许执行在位的检测方法,例如在献血过程中。测量结果可以快速获得,优选在 0.5 到 2 小时之内。所有可以使用本发明的装置操作的步骤,例如纯化、处理、扩增核酸和实际的杂交都可以自动执行。操作者只需要熟悉样品的撤回、样品在本发明的装置中的注入,以及注意分析结果。

[0121] 在优选情况下,微阵列和第二表面之间的距离在大约 0 到大约 1mm 的范围内变化。微阵列和第二表面之间距离的进一步优选的下限是大约 0.1  $\mu\text{m}$ , 大约 1  $\mu\text{m}$ , 和大约 10  $\mu\text{m}$ 。微阵列和第二表面之间距离的进一步优选的上限为大约 0.01mm、大约 0.5mm、大约 1mm, 最优选的是大约 0.3mm。令人吃惊的是,如果底材表面和第二表面之间的距离大约为零或接近

零,探针和阵列表面上的靶之间的相互作用甚至不受影响。

[0122] 在优选情况下,本发明的装置还含有检测系统。此时,在优选情况下检测系统是光学系统。适合于本发明的范围的系统的例子是基于荧光、光吸收、共振转移等的检测系统。在优选情况下,光学检测系统是荧光光学系统。在特别优选的情况下,荧光光学系统是不具有自动对焦的荧光显微镜,例如具有固定焦距的荧光显微镜。

[0123] 在另一个实施方案中,检测系统与至少一个调距横板相连,它位于第二表面之上,可以调整检测系统和第二表面之间的距离。如果微阵列和第二表面之间的距离大约为零,该调距横板也确定了芯片表面与检测装置的光学系统之间的距离。因此,保持光学检测装置和微阵列表面之间的距离变化在很小的范围内是可能的。这种变化只包含第二表面,一般为玻璃表面的厚度变化,第二表面的偏斜,芯片和检测平面之间或调距横板和检测平面之间的压制表面上可能的污染物引起的层的厚度。这使得重新对焦使光学系统进入焦点成为不必需,极大地简化了装置的操作,并 / 或使得昂贵的自动对焦装备成为不必需。

[0124] 在另一个实施方案中,为第一和第二表面之间形成的反应空间提供了侧面限制的补偿区域,当微阵列和第二表面之间的距离减小时,它能够保持反应室中的体积基本上恒定。

[0125] 在优选情况下,在第一和第二表面之间形成的反应空间在侧面进一步受到弹性密封垫的限制。特别优选情况下,弹性密封垫由硅橡胶制成。

[0126] 为了确保探针和靶分子之间相互作用的检测,具体来说,第二表面由透光的材料,优选为玻璃制成。

[0127] 在本发明的装置的另一个实施方案中,第一表面,至少在其位于微阵列之下的区域中,被开发成能够相对于第二表面指导微阵列,使得微阵列与第二表面之间的距离是可变的。

[0128] 此时,第一表面,至少在其位于微阵列之下的区域中,可被开发成能够朝向第二表面指导微阵列,以便微阵列和第二表面之间的距离可以被减小,和 / 或能够背向第二表面指导微阵列,以便微阵列和第二表面之间的距离可以被增加。

[0129] 在本实施方案中,在优选情况下第一表面,至少在其位于微阵列之下的区域中,可以被弹性变形。在特别优选情况下,第一表面由弹性合成材料例如弹性膜制成。

[0130] 另外优选的是第一表面由两个重叠的层形成,两个重叠的层的外层至少在位于微阵列之下的区域具有凹口。在本实施方案中,优选情况下两个重叠的层的内层由弹性密封垫或密封膜形成,它们通常也限制了反应空间的侧面(参见图6)。密封膜可以被导向第二表面。密封膜封闭了外层上的凹口,它通常对应于室体的较低的一面。在反应室进行PCR的过程中,由于PCR中普遍存在的高温产生了内部压力,尽管密封膜相对不稳定,仍然使反应室产生压力抗性。因此本实施方案对应于自关闭的阀。为了确保密封膜的弹性,优选情况下膜被提供有补偿褶(参见图6)。

[0131] 还可以提供装置,该装置包含至少一种工具,通过该工具可以相对于第二表面指导微阵列。在下文中,该工具将被称为指导第一表面的工具。该指导第一表面的工具优选选自杆、针、挺杆和螺钉。

[0132] 此时,装置可以包含至少一种指导第一表面的工具,通过该工具可以将微阵列导向第二表面,使得微阵列和第二表面之间的距离可以被减小,和 / 或能够背向第二表面指

导微阵列,使得微阵列和第二表面之间的距离可以被增加。

[0133] 在特别优选的情况下,可以通过在第一表面上由工具施加压力和 / 或牵引来相对于第二表面指导微阵列。

[0134] 此时,上述安置在第二表面上的调距横板可以用作指导第一平面的工具的支架。

[0135] 在优选情况下,可以通过指导第一表面的工具引起第一表面的震动,特别是以 10 到 30Hz 的频率震动,特别优选的是以大约 20Hz 的频率震动。以这种方式,可以除去芯片上存在的可能干扰检测的泡,和 / 或通过指导第一表面的工具的震动引起的充分混合增加相互作用的速度,例如杂交速度。

[0136] 在优选情况下,也可以相对于第一表面指导第二表面,使得微阵列和第二表面之间的距离可变。

[0137] 此时,可以相对于第一表面指导第二表面,使得微阵列和第二表面之间的距离可以被减小,和 / 或使得微阵列和第二表面之间的距离可以被增加。

[0138] 具体来说,这可以确保通过调距横板在第二表面上施加压力和 / 或牵引使第二表面可以相对于第一表面进行引导,使得微阵列和第二表面之间的距离可变。

[0139] 在本发明的装置的另一个优选实施方案中,第一表面和第二表面都可以被指导,以便微阵列和第二表面之间的距离可变。

[0140] 在另一个实施方案中,本发明的装置被开发成已经在原始状态下的固定在第一表面上的微阵列在优选情况下均匀地安置在第二表面上以形成检测平面。可以对第一表面进行指导以便微阵列和第二表面之间的距离增加。此时,第一表面优选由弹性材料制成。

[0141] 在本发明的装置的另一个实施方案中,第一表面被开发成围绕旋转轴的可旋转的方式。旋转轴将第一表面分成两面。在本实施方案中,微阵列被安排在第一表面的第一个侧面部分上。在优选情况下,用于旋转运动的旋转轴通过第一表面的中心,即在优选情况下两个侧面部分是相等大小的。在优选情况下第一表面由弹性材料制成。

[0142] 在可旋转的第一表面的第一个位置,第一表面被排列得基本上平行于第二表面。在第一位置上,微阵列的表面与第二表面基本上平坦地接触,即其上固定有探针分子的底材表面基本上不被样品溶液弄湿。在该第一位置上,在第一表面的第二个侧面部分和第二表面之间形成了一个空间,它在后面也被称为处理室。该处理室可以作为处理样品溶液的室。

[0143] 在可旋转的第一表面的第二个位置,第一表面被排列得相对于第二表面成  $180^\circ$  以外的角度。在该第二个位置上,微阵列的表面不与第二表面接触,即固定在微阵列底材上的探针分子可以自由接近样品溶液中存在的靶分子,因此能够与后者相互作用。在第二个位置中,处理室被压缩。

[0144] 可旋转的第一表面在优选情况下可以通过在第一表面的第一个侧面部分上施加牵引力来旋转,和 / 或通过在第一表面的第二个侧面部分上施加压力来旋转。压力和 / 或牵引力可以通过上述的用于指导第一表面的工具来施加。

[0145] 芯片或底材或第一表面在优选情况下可以由硅、陶瓷材料如氧化铝陶瓷、浮法硼硅玻璃 (borofloat)、石英玻璃、单晶  $\text{CaF}_2$ 、蓝宝石、黄玉、PMMA、聚碳酸酯和 / 或聚苯乙烯构成。对材料的选择也依赖于装置或芯片所使用的目的而进行。如果例如芯片被用于表征 PCR 产物,只有那些能够抗拒  $95^\circ\text{C}$  温度的材料可以使用。



[0146] 在优选情况下,芯片通过核酸分子,具体来说通过 DNA 或 RNA 分子而官能化。但是,它们也可以通过肽和 / 或蛋白例如抗体、受体分子、药物活性肽和 / 或激素、碳水化合物和 / 或该生物聚合物的混合聚合物而官能化。

[0147] 在另一个优选实施方案中,分子探针通过聚合物接头例如改性的硅烷层固定在底材表面上。这样的聚合物接头可以用于底材表面的衍生制备,因此可以用于分子探针的固定化。在探针共价结合的情况下,可以使用已经用反应性官能团例如环氧化物或醛类进行官能化或改性的聚合物如硅烷。此外,本领域的专业人员也熟悉通过异硫氰酸酯、琥珀酰亚胺和酰亚胺酯对表面进行活化。最后,通常相应地衍生出氨基官能化的表面。此外,加入偶联试剂例如二环己基碳二亚胺能够确保分子探针相应的固定化。

[0148] 反应室的室体在优选情况下由例如玻璃、合成材料、和 / 或金属例如高等级钢、铝和黄铜这样的材料构成。为了生产室体,可以使用例如适合于注模法的合成材料。尤其是例如 macro lon、尼龙、PMMA 和特氟隆这样的合成材料是可能的。在具体的实施方案中,优选的是导电的合成材料例如含有 5% 到 30% 碳纤维的聚酰胺,含有 5% 到 30% 碳纤维的聚碳酸酯,含有 2% 到 20% 不锈钢纤维的聚酰胺,以及含有 5% 到 40%、特别是 20% 到 30% 碳纤维的 PPS。可以选择和 / 或可以加上的是,第一和第二表面之间的反应空间可以通过隔片关闭,该隔片允许例如利用注射器填充反应空间。在优选实施方案中,室体由透光的材料例如玻璃、PMMA、聚碳酸酯、聚苯乙烯和 / 或黄玉构成。此时,材料的选择将根据装置的使用目的进行调整。例如当选择材料时需要考虑装置将要暴露到的温度。如果,例如装置将要用于执行 PCR,只有那些在如 95°C 的温度下能够较长时间保持稳定的材料可以使用。

[0149] 具体来说,室体被开发成能够使微阵列用其活性面,即其上固定有核酸探针的阵列面均匀地和 / 或可逆地压向第二表面。

[0150] 在具体的实施方案中,本发明的装置含有从下列的组中选择的模块:优选由合成材料制成的室体,密封反应室的隔板或密封垫,DNA 芯片,和 / 或第二个透光的表面,优选为玻璃窗格,其中第二表面也可任选同时用作芯片(参见图 2 和图 3)。在本实施方案中,室体和密封垫被开发成具有弹性,以便 DNA 芯片可以以其活性面均匀和可逆地压向玻璃盖。由此,位于 DNA 芯片和检测表面之间的标记的分析液体被完全置换(参见图 5 和图 6)。通过这种方式可以进行高灵敏度的荧光检测例如计算机成像的荧光显微术,而不受样品溶液的背景荧光的损害。

[0151] 在优选情况下,室体的第二表面由透明的材料如玻璃和 / 或透光的合成材料如 PMMA、聚碳酸酯、聚苯乙烯或丙烯酸树脂构成。

[0152] 在优选情况下,反应室在第二表面和微阵列之间以具有可变厚度的微隙的形式形成。通过在芯片和检测平面之间形成微隙,可以利用毛细作用力安全地填充反应室。该毛细作用力也发生在反应室无压缩的状态中;但是它们可以通过压缩反应室来增加。在特别优选的情况下,微隙的厚度在大约 0m 到大约 100m 的范围内。

[0153] 从能够压缩反应空间从而减小微阵列和检测平面之间的缝隙的宽度的可能性,带来了在反应室中操作液体的其它可能性。因此,在本发明的另一个实施方案中,提供了几个小室代替一个单一的室,其中该小室之间的分区不达到第二表面的高度,以便在反应室未压缩的状态下小室之间能够产生流体联系。通过压缩反应室可以将小室分开。因此通过压缩,小室之间的分区可以像阀门一样操作。

[0154] 该通过阀门分开的小室的具体实施方案是将本发明的装置的反应空间进一步分成不同的 PCR 室。在每个室中呈现单独的引物。开始时,小室被同时充满被分析物。然后将反应空间压缩。此后,反应空间经历 PCR 的温度循环。因为每个小室充满不同的引物,在每个室中发生不同的扩增反应。室之间的交换不会发生。

[0155] 在 PCR 进行之后发生杂交。此时,每个小室可以含有单独的芯片区域或单独的芯片。但是,也可能通过增加微阵列与第二表面之间的距离促进小室之间的流体联系,以便被扩增的不同物质混合并以这种方式与芯片表面杂交。

[0156] 具有被阀门分开的小室的实施方案的优点是增加了 PCR 的多重性,即一个样品进行独立的 PCR 的数量,在一步反应中由于生物化学的原因受到限制。因此,将 PCR 的数量调整到芯片表面上可能的探针数量是可能的。

[0157] 因此,在本发明的另一个实施方案中,反应室包含了至少两个小室,其中在第一个未压缩状态中小室是有流体联系的,在第二个压缩的状态中小室之间没有流体联系。

[0158] 在特别优选情况下,每个小室被指派到微阵列的确定区域。

[0159] 具体来说,小室可以通过用孔洞装备微阵列和 / 或第二表面来形成,所述孔洞用作小室之间的壁。

[0160] 在特别优选情况下,小室之间的壁由弹性密封垫形成。

[0161] 当然,具有用阀门分开的小室的处理单元的实施方案可以任意地与任何前述的压缩原理相结合。

[0162] 在本发明的装置的另一个实施方案中,第一表面由部分可变形的弹性材料例如弹性膜制成。在只有一部分反应空间可以被压缩的情况下,可以产生芯片被导向第二表面的小室、不能彼此分开的小室以及不能被改变的小室。因此,能够例如在扩增反应结束时将盐泵入杂交室的简单的泵系统可以在反应空间中使用。这对于例如最优化 PCR 缓冲液的化学杂交条件来说可能是有利的,其中 PCR 缓冲液仅仅为了执行 PCR 而最优化。

[0163] 当将反应室分成几个小室时,优选使用几种工具进行搅拌。通常情况下,搅拌的工具与指导第一表面的工具相同。因此,单独的室可以被特异性地搅拌。这可能适合于例如执行分离的扩增空间和 / 或杂交空间。

[0164] 当然,本发明的装置的这个具有几种搅拌工具的实施方案也可以任意地与任何前述的压缩原理相结合。

[0165] 上述选自室体、侧面限制反应空间的密封垫、微阵列和检测平面的本发明的装置的元件或模块形成了本发明的装置的所谓的处理单元。在处理单元中,可以进行 PCR、杂交反应、检测和 / 或评估。在探针和靶是例如待检测的抗体和蛋白的情况下也是同样,由此不需要执行 PCR。但是,下面的解释是专门针对使用核酸靶和探针的检测技术而做的。然而,对于本领域的专业人员来说,如何对下面描述的单元进行修饰以使它们适合于其它的应用是很清楚的。

[0166] 在优选情况下,本发明的装置的处理单元以模块的方式构建。这意味着处理单元可以包含模块的任意组合。在分析过程中也可以交换模块。

[0167] 在另一个优选实施方案中,本发明的装置还包含温度控制和 / 或调节单元以控制和 / 或调节反应室中的温度。这样的用于控制和 / 或调节反应室中的温度的温度控制和 / 或调节单元具体来说包含加热和 / 或制冷元件或温度组块。此时,加热和 / 或制冷元件或温

度组块可以被安排成与第一表面和 / 或第二表面相接触。通过与第一和第二表面都接触, 可以确保特别有效的温度控制和调节。

[0168] 在本实施方案中, 微阵列的底材或第一表面和 / 或第二表面与加热和 / 或制冷元件或温度组块相连接, 在优选情况下它们应该由具有良好的导热性质的材料制成。这种导热材料提供了显著的优点, 确保在反应空间的整个表面上有着均匀的温度分布, 从而允许在整个反应室中均匀地执行温度依赖性的反应例如 PCR, 并得到高的产率, 并且可以高准确地控制或调节。

[0169] 因此, 在优选实施方案中, 微阵列的底材或第一表面或第二表面由具有良好导热性的材料制成, 其具有的热传导率优选在  $15$  到  $500\text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  的范围内, 特别优选在  $50$  到  $300\text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  的范围内, 最优选在  $100$  到  $200\text{Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  的范围内, 其中的材料通常是不透光的。适合的导热材料的例子是硅, 陶瓷材料如氧化铝陶瓷, 和 / 或金属如高级别钢、铝、铜或黄铜。

[0170] 如果本发明的装置的微阵列底材或第一表面或第二表面基本上由陶瓷材料构成, 优选使用氧化铝陶瓷。这样的氧化铝陶瓷的例子是 Kyocera 公司 (Neuss, Germany) 生产的陶瓷 A-473、A-476 和 A-493。

[0171] 在优选情况下, 微阵列底材或第一表面或第二表面装备有任选小型化的温度传感器和 / 或电极, 或者在其背面, 即背离反应室的一面具有加热器装置, 以便可能通过诱导的电渗透流对样品液体进行回火和混合。

[0172] 温度传感器可以被开发成例如镍 - 铬薄膜阻抗温度传感器。

[0173] 电极可以被开发成例如金 - 钛电极, 特别是四极。

[0174] 加热和 / 或制冷元件在优选情况下可以被选择, 以便可能在反应室中对液体进行快速加热和冷却。此时快速加热和冷却被理解是指可以通过加热和 / 或制冷元件介导范围在  $0.2\text{K/s}$  到  $30\text{K/s}$  之间、优选  $0.5\text{K/s}$  到  $15\text{K/s}$  之间、特别优选  $2\text{K/s}$  到  $15\text{K/s}$  之间、最优选  $8\text{K/s}$  到  $12\text{K/s}$  之间或大约  $10\text{K/s}$  的温度变化。在优选情况下, 加热和 / 或制冷元件也可以介导  $1\text{K/s}$  到  $10\text{K/s}$  之间的温度变化。

[0175] 加热和 / 或制冷元件例如阻抗加热器可以被开发成例如镍 - 铬薄膜阻抗加热器。

[0176] 对于温度传感器、加热和 / 或制冷元件或增加温度的工具和电极的进一步详细规格和大小, 可以参考国际专利申请 WO 01/02094 的内容。

[0177] 在优选实施方案中, 反应室的回火通过使用由导电材料构成的室体来确保。这样的导电材料在优选情况下是导电的合成材料, 例如任选含有  $5\%$  到  $30\%$  碳纤维的聚酰胺、任选含有  $5\%$  到  $30\%$  碳纤维的聚碳酸酯、和 / 或任选含有  $2\%$  到  $20\%$  不锈钢纤维的聚酰胺。优选情况下, 含有  $5\%$  到  $40\%$ 、特别优选是  $20\%$  到  $30\%$  碳纤维的 PPS (聚苯硫醚) 被用作导电合成材料。另外在优选情况下室体被开发成具有膨胀和变细的部分。室体中的这种膨胀和变细的部分允许对反应室或相应的表面进行特定的加热。此外, 使用这种体积的导体的优点是, 即使是使用的材料任选具有较低的导热性, 也可以确保室体或相应的表面被均匀地回火, 因为热被释放到每个体积元件中。

[0178] 偶联和导出热到反应空间中可以通过不同的方式进行。尤其是可以考虑通过外部微波辐射、内部或外部阻抗加热、内部感应线圈或表面、水制冷和加热、摩擦、光照、特别是用红外光照、空气冷却和 / 或加热、摩擦、温度发射器和珀耳帖元件带入热量。

[0179] 反应空间中温度的测量可以以不同的方式进行, 例如通过集成阻抗传感器、半导

体传感器、光波指导的传感器、多色染料、多色液晶、外部高温计例如所有类型的 IR 辐射和 / 或温度传感器,它们被整合在指导微阵列的工具中。

[0180] 反应室中温度的测量还可以通过下面的方式来进行,通过在室体中整合温度传感器,例如通过在室体的生产加工过程中注入,通过使用高温计、IR 传感器和 / 或温差电堆进行非接触性测量,通过用例如整合在装置中的热传感器并与室体或室的适当表面或适当体积相接触进行接触测量,通过测量检测平面的折射指数的温度依赖性变化,通过测定例如溶液中、探针阵列上或室密封垫中特定分子的颜色温度依赖性变化,和 / 或通过测量所用溶液的 pH 值的温度依赖性变化,所述 pH 值的变化可以通过测量 pH 敏感的指示剂的颜色变化,例如通过测量其吸收值。

[0181] 此外,由于加热器电阻的急速增加,可以实现对温度的自动限制,其中相应的阈值温度优选在 95°C 到 110°C 的范围内。当达到阈值温度时,加热器的电阻急速增加,从而实际上没有电流流过,因而实际上不再有热放出。具体来说,聚合物例如导电的聚酰胺可以用于这样的加热器,它的电阻在阈值温度下由于聚合物基体的改变或相的改变而增加。

[0182] 在一个实施方案中,温度控制和调节单元被集成在第一表面和 / 或第二表面中。在该实施方案中,具体来说处理单元装配有加热器(参见图 4),它用于执行 PCR 和杂交中的温度改变。

[0183] 在优选情况下,处理单元具有低的热容量,以便在低的电力需求下可以实现最大的温度改变速度,例如至少 5K/s。为了确保处理单元快速冷却,另一个优选实施方案打算提供制冷系统,例如空气冷却系统。

[0184] 在优选情况下,处理单元的冷却可以通过持续地将处理单元周围的空间回火到降低的温度、从而被动地冷却仓来实现。这使得主动地冷却反应仓成为不必需。

[0185] 在另一个实施方案中,温度控制和调节单元可以包含温度组块,其中每个被预热到确定的温度。在该实施方案中,具体来说处理单元没有集成加热器。由于省略了集成加热系统,可以提供更合算的处理单元。

[0186] 由于温度组块与本发明的装置的第一表面和 / 或第二表面接触,在优选情况下确保温度控制和调节单元的温度组块之间的热转移。在优选情况下,温度组块可以被排列成线型或排列在旋转盘上,并且以这种方式集成在例如检测装置中。图 7 显示了具有几个温度组块的旋转盘,每个温度组块被调整到确定的温度。通过交换处理单元下方的温度组块,处理单元被带到温度组块所限定的特定温度下。在优选情况下,温度组块的生产使得它们比处理单元具有明显高的热容量,以便在该实施方案中也可以实现最大的温度改变速度,例如至少 5K/s。在优选情况下,温度组块仅仅是温度调节型的而不是加热或制冷型的,以便在这种情况下对能量的需求也是最小的。在本实施方案中,可以省略对处理单元的制冷或加热。

[0187] 在另一个实施方案中,温度控制和调节单元被集成在用于指导第一表面的工具中和 / 或用于搅拌的工具中和 / 或调距横板中。在本实施方案中,热转移是通过将工具和 / 或调距横板与第一表面和 / 或第二表面相接触来进行的。

[0188] 在优选情况下,装置另外包含再加工单元,用于样品溶液的纯化和 / 或再浓缩,和 / 或控制反应室中流体的装载和卸载。在本发明的范围内,流体被理解为是指液体和气体。此外,分析溶液可以在再加工单元中重新缓冲。最后,再加工单元也可以用于提供必需的分

析化学物质。流体容器与反应室的连接可以按照例如国际专利申请 WO 01/02094 中的描述来开发。

[0189] 在本实施方案中,在特别优选情况下,反应室和再加工单元通过两个套管相连,其中套管的安排方式使得第一个套管确保流体从再加工单元注入到反应室中,而第二个套管确保被注入的流体从反应室中赶出的空气排出。注入到再加工单元中的样品因此可以通过套管达到处理单元的反应室中。为此,套管被安排的方式使得它们通过套管导管到达反应室。

[0190] 再加工单元可以被开发成与处理单元分开。在用样品溶液以及任选其它反应液体填充反应室后,再加工单元可以与处理单元分开,优选情况下使其脱离,也可以丢弃它。

[0191] 下面将描述用于填充反应室的集成或非集成单元的实施方案,这些单元在下面也被称为填充单元或再加工单元。

[0192] 通常,通过适当的工具例如吸管将反应溶液带入填充单元的特定开口。液体运输到装置中是通过用吸管施加压力、或通过另外的压力产生工具例如注射器或自动单元例如自动处理机的功能元件来进行的。

[0193] 在优选情况下,填充单元被开发成以工效学适合的方式手动操作。此外,在优选情况下,它在外部具有其它容易接近的开口以补加反应物质。

[0194] 在优选情况下,填充单元还含有适合的流体界面以穿透室体的密封垫。为此使用了特定的套管,它由例如高级别钢或聚合物构成,通常具有 0.05mm 到 2mm 的直径。在优选情况下,安排了至少一个或以上的套管,特别优选情况下安排两个,其中一个可以用于填充反应液体,另一个用于反应空间的通气并用于取出剩余的流体。这样的套管可以以固定或可互换的方式与填充单元相连,其中在优选情况下进行一个不能被操作者分离开的连接,用于操作一次性的填充物。

[0195] 填充单元也可以含有覆盖套管的单元,以便在系统分离后可以避免任何可能的操作者造成的损伤或环境的污染。

[0196] 在优选情况下,填充单元还包含了适合的机械界面以与反应仓滑动配合接触。该界面可以被开发成例如特定的咬合的形式。以这种方式,可以确保在优选的位点穿过室体的密封垫。

[0197] 当在相应的自动处理器中处理反应仓时,需要进行适合的机械测量,这允许在装置中进行调整 and 精确定位。具体来说这应用于液体的替换和 / 或进料的定位,以及为反应仓的定位,以用于在反应室中进行反应后检测信号。

[0198] 装置或填充单元还可以包含集成的废物容器,用来容纳剩余物或赶出的气体或液体介质,例如保护性气体填充物或缓冲液。废物容器可以用例如另外的气体、液体或固体介质填充,它们可逆或不可逆地结合液体或气体物质,例如纤维素、过滤材料、硅胶。此外,废物容器可以具有通气口,或可以表现出负压以改善整个单元的填充行为。

[0199] 此外,废物容器也可以被开发成分离的模块。在这种情况下,填充单元被装备有相应的流体界面,它们对应于商业标准,例如 LuerLock,并且通向外部。这样的界面可以与连续系统具有形式或力的联系。

[0200] 在第一个具体的实施方案中,填充是通过具有集成的废物容器的可分离的填充单元来进行的。具体来说,填充单元用于反应室的非重复填充。填充单元被开发成例如将它

插到或暂时连接到仓上,将样品注入到反应空间中,在填充完成之后,再将填充单元与仓分离并丢弃。在该第一个具体的实施方案中,填充单元还包含有集成的废物容器,可以如前所述被开发成。该实施方案的一个例子被显示在图 22 中。通过模块式填充单元填充反应仓的步骤显示在图 23 中。

[0201] 在第二个具体的实施方案中,填充通过集成的填充单元进行。此时,填充单元是反应仓的一个集成元件,因而不能与后者分开;填充单元和仓的丢弃是同时进行的。此时,在优选情况下填充单元被用于反应室的非重复填充,并可能用于其它的内部流体处理步骤。在该实施方案中,优选情况下填充单元还包含技术装置,用于执行套管在系统中的优选位置,特别用于防止在将套管插入室体的密封垫的过程中由于疏忽造成的刺穿。然而,也可以设想套管在该优选位置刺穿室体的密封垫。该技术装置可以通过例如设置弹簧、弹性元件、或用于进行捕获的凹口和隆起处来实现。在本实施方案中,填充元件还包含填充和废物通道,其中含有相应的流体界面,所述界面也可以对应于商业标准,例如 LuerLock,并通向外部。这样的界面可以与连续系统具有主动的或非主动的连锁,用于注入和/或除去气体和/或液体介质。该实施方案的一个例子显示在图 24 中。具有集成的填充单元的反应仓的填充步骤显示在图 25 中。

[0202] 在第三个具体的实施方案中,填充通过具有集成的废物容器的集成的填充单元来进行。在该实施方案中,填充单元是反应仓的一个集成元件,因此不能与后者分开;填充单元和仓同时被丢弃。此时,填充单元优选用于反应室的非重复填充,并可能用于其它的内部流体处理步骤。在本实施方案中,填充单元还优选包含技术装置,用于执行套管在系统中的优选位置,优选用于防止在将套管插入室体的密封垫的过程中由于疏忽造成的刺穿。然而,也可以设想套管在该优选位置刺穿室体的密封垫。该技术装置可以通过例如设置弹簧、弹性元件、或用于进行捕获的凹口和隆起处来实现。在本实施方案中,填充元件还包含集成的废物容器,可以按照上面的描述开发。该实施方案的一个例子显示在图 26 中。具有集成的填充单元和集成的废物容器的反应仓的填充步骤可以通过例如在图 23 和 25 中描述的步骤的组合来进行。

[0203] 下面将描述安排套管以便在压缩步骤中维持压力平衡的具体的实施方案。用于反应仓的填充工具的套管可以被安排成例如这样的方式,使得在非压缩状态下填充和反应空间压缩过程中转移多余的反应溶液都是可能的。在优选情况下,这可以通过适当改变密封垫和套管排列的结构来实现,其中套管优选刺穿反应室中的补偿区域。如果多余的体积不能通过特定的密封垫设计被吸收,这种排列结构是特别适合的。图 27 中举例显示了一种带有未改变形式的密封垫的可能的垂直套管排列结构。

[0204] 本发明的装置还可以含有与检测系统相连、用于控制试验步骤和/或用于处理由检测系统记录的信号的单元。控制和/或处理单元可以是微控制器或工业计算机。这种检测单元和处理单元的偶联,确保了反应结果转化为分析结果,允许将本发明的装置作为手持装置使用在例如医学诊断中。

[0205] 此外,在优选情况下,本发明的装置还具有用于外部计算机的界面。这尤其允许将数据转移到外部存储器中。

[0206] 在另一个优选实施方案中,装置装备有编码,优选为数据矩阵和/或条形码,包含了关于物质文库和/或扩增和/或检测反应的执行情况的信息。通过这样的个人识别数字,

读取或检测装置可以自动识别哪个试验已经被进行。为此,在生产本发明的装置时,含有关于物质文库、检测反应的执行等信息的数据记录被储存在数据库中。因此,具体来说,数据记录可以含有关于探针在阵列上布局的信息,以及关于如何以最有利的方式进行评估的信息。数据记录或数据矩阵还可以含有关于 PCR 的温度 - 时间模式的信息,该 PCR 任选用于扩增靶分子。如此获得的数据记录在优选情况下是数字,以数据矩阵的形式连接到支架上。通过记录在数据矩阵中的数字,在读出物质文库时可以任选地访问成套的数据记录。最后,数据矩阵可以被温度控制或调节单元和其它控制器,例如用于反应室通过流体容器的填充和卸载的控制器所读取,因此可以确保扩增和检测反应自动地进行。

[0207] 编码,例如数据矩阵,不必须含有全部的信息。它也可以简单地含有一个识别或进入号码,然后通过该号码从计算机或数据载体中下载必需的信息。

[0208] 本发明的装置可以非常容易地制造。图 3 中显示了处理单元可以由仅仅 4 个独立的元件构成,它们彼此之间简单地适合。图 10 和 11 显示的实施方案由于本发明的结构也可以容易地制造,尽管它们由几个元件组成。对每个元件的大小的几何耐受性可以是非常大的,例如 1/10 到 2/10mm,以便例如密封垫和室体的大规模注模可以以非常合算的方式进行。低耐受性通过将芯片压向检测平面而便利化,因此距离检测显微镜的光径基本上不受处理单元的元件的影响。仅有的几个具有低耐受性的几何数量是芯片的 x、y 位置和检测平面的厚度。但是芯片的 z 位置的变化只发挥次要作用。尽管它们的技术需求低,光学系统例如荧光检测显微镜的聚焦装置并不需要。这些性质清楚地表明了本发明的装置对于移动在位使用的适合性。

[0209] 在本发明的另一个方面,提供了定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用的方法,包括下面的步骤:

[0210] a 按照前面的描述将含有靶分子的样品、优选为样品溶液注入本发明装置的反应室中;以及

[0211] b 检测靶分子和固定在底材上的探针分子之间的相互作用。

[0212] 本发明的方法允许在反应室中定性和 / 或定量检测探针和靶分子之间的分子相互作用,而不需要在相互作用完成之后和检测之前替换样品或反应液体以除去干扰的背景。

[0213] 在本发明的范围内,探针和靶分子之间的相互作用的检测通常如下进行:在将探针或探针群以预定的方式以微阵列的形式固定到特定的基体上之后或提供微阵列之后,将靶与探针在溶液中接触,并在预定的条件下保温。通过保温,在探针和靶之间发生了特异性相互作用或杂交。此时形成的键比靶分子与不特异性针对该靶分子的探针形成的键明显稳定得多。

[0214] 靶及其探针之间的特异性相互作用的检测可以通过多种方法进行,这一般依赖于在靶分子与微阵列相互作用之前、之中或之后插入到靶分子中的标记物的类型。一般情况下,这样的标记物是荧光基团,以便可以通过荧光光学方法读出特异性的靶 / 探针相互作用,这种方法与其它常规的检测方法特别是质量敏感的方法相比具有较高的局部分辨率,并且工作量小(参见例如 A. Marshall, J. Hodgson, DNA 芯片:可能性的阵列, Nature Biotechnology 1998, 16, 27-31; G. Ramsay, DNA 芯片:技术状态, Nature Biotechnology 1998, 16, 40-44)。

[0215] 根据固定在微阵列上的物质文库和靶分子的化学本质,核酸与核酸之间、蛋白与蛋白之间以及核酸与蛋白之间的相互作用可以通过这种试验原理来检测(调查报告参见 F.Lottspeich, H.Zorbas,1998, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin, Germany)。

[0216] 此处,抗体文库、受体文库、肽文库和核酸文库都被当作物质文库,可以被固定在微阵列或芯片上。

[0217] 到目前为止核酸文库扮演了最重要的角色。它们是微阵列,其上固定了脱氧核糖核酸(DNA)分子或核糖核酸(RNA)分子。

[0218] 在本发明的方法的优选实施方案中,微阵列与第二表面之间的距离保持在这样一个位置,它允许在步骤b)的检测之前进行样品溶液的处理和/或靶分子与固定在底材上的探针分子之间的相互作用,例如被检测的核酸的扩增和/或被检测的核酸与固定在底材上的核酸探针之间的杂交。

[0219] 优选情况下步骤b)中微阵列和第二表面之间的距离可以改变,优选减小。即在优选情况下检测在微阵列与检测平面之间距离减小的情况下进行。特别优选情况下,微阵列与检测平面之间的距离在检测过程中大约为零。

[0220] 在一个实施方案中,微阵列被导向第二表面以减小微阵列和第二表面之间的距离。优选情况下,这是通过利用至少一种指导第一表面的工具施加压力以推动第一表面来确保的,所述工具例如挺杆、杆、针和螺钉,其中工具产生的压力作用点具体来说位于微阵列下方。

[0221] 将微阵列压向第二表面或检测平面可能是容易的,因为第一表面至少在微阵列下方的区域中是可以弹性变形的。此外,第一表面也可以被开发成具有两个重叠的层,其中两个重叠的层的外层至少在位于微阵列之下的区域具有凹口,而两个重叠的层的内层由弹性密封垫形成。然后通过指导第一表面的工具在内层靠近凹口的位置施加压力。

[0222] 但是,指导第一表面的工具例如针、杆、挺杆和/或螺钉不能仅仅用于对第一表面施加压力。在泡将在DNA芯片上形成这种可能干扰检测的情况下,可以通过指导第一表面的工具进行搅拌以除去这些泡,例如对第一表面施加大约20Hz的震动频率,特别是以弹性膜的形式。

[0223] 此外,常见的一个问题是芯片表面上的相互作用例如杂交花费非常长的时间。除了其它原因之外,这是由于相互作用或杂交的速度是由扩散作用决定的事实。在优选情况下,可以通过指导第一表面的工具进行搅拌以增加相互作用或杂交的速度,例如对第一表面施加大约20Hz的震动频率,特别是以弹性膜的形式,因为搅拌或震动导致反应室中的混合。

[0224] 在另一个实施方案中,第二表面被导向第一表面以减小微阵列与第二表面之间的距离。具体来说,通过利用调距横板在第二表面上施加压力将第二表面导向第一表面,这可以被确保。

[0225] 在另一个实施方案中,第一表面被导向第二表面,第二表面被导向第一表面,以减小微阵列与第二表面之间的距离。

[0226] 下面将描述相对第二表面指导第一表面或相对第一表面指导第二表面的其它实施方案。该实施方案不仅适合于相对第二表面或检测表面定位第一表面或探针阵列,而且



还可以具体来说用于相对于检测表面移动探针阵列。通过这样的运动,可以实现例如反应室中溶液的搅拌。

[0227] 在一个实施方案中,通过磁场将探针阵列相对于检测表面移动或在室中移动。探针阵列和/或第二表面可以,例如含有磁性材料或含有其上添加了磁性材料的元件,和/或固定在完全或部分由磁性材料构成的支架上。在优选情况下还可以通过移动磁体被动地移动探针阵列和/或第二表面,该磁体安置在相应的表面之下并且例如通过磁场与该表面相联。

[0228] 在另一个实施方案中,探针阵列通过重力冲击相对于检测平面移动和/或定位。

[0229] 在另一个实施方案中,探针阵列通过反应室中产生的液流相对于检测平面移动和/或定位。为此,装置可以被开发成例如这样的方式,在探针阵列被液流包围的情况下,在反应室的一侧产生负压,而在另一侧产生正压,这样就导致探针阵列在反应室中运动。这样的液流可以例如通过由反应室中局部的温差引起的热对流来产生。

[0230] 在另一个实施方案中,探针阵列通过电场冲击相对于检测平面移动和/或定位。

[0231] 在另一个实施方案中,通过局部过热在探针阵列下产生气泡,由此将芯片在反应室中移动或导向检测平面。

[0232] 通过在检测前减小微阵列与第二表面之间的距离,在优选情况下样品溶液几乎完全从微阵列与检测平面之间的区域中除去。因此,由不与阵列表面结合的标记的分子,例如标记的引物和/或标记的靶核酸引起的背景信号被减小了。

[0233] 因此,在步骤 b) 的检测中,微阵列与第二表面之间的距离优选通过这样的方式改变,使得微阵列与第二表面之间的样品溶液基本上被除去。然后微阵列基本上位于检测平面中,干扰的背景几乎被避免了。

[0234] 在另一个替代实施方案中,微阵列平坦地放置在在装置的原始状态下已经形成检测平面的第二表面上,并且不仅通过将第一表面导向第二表面和/或将第二表面导向第一表面而被带入检测平面。在该实施方案中,在处理步骤中微阵列不被样品溶液润湿。为了进行相互作用反应例如杂交,优选由弹性材料制成的第一表面例如弹性膜被导离检测表面。因此芯片表面移离检测表面并被样品溶液润湿。相互作用例如杂交可以发生。为了进行检测和进一步处理,例如以弹性膜形式的第一表面被再次释放,由此跳回至其最初被调整的位置,这可以通过指导第一表面的工具例如针、杆、螺钉和/或挺杆施加压力来加速。因此,微阵列可以被再次压向检测平面,检测可以在没有背景的情况下进行。

[0235] 在本发明的另一个实施方案中,使用了上述的本发明的装置,其第一表面被开发成可以围绕旋转轴旋转的方式。

[0236] 在第一个位置,也被称为起始位置中,安置在第一个侧面部分上的微阵列的表面基本上均匀地放置在第二表面上,即其上固定有探针分子的底材表面基本上不被样品溶液润湿。优选情况下,在第一个位置,在第一表面的第二个侧面部分与第二表面之间形成的空间,处理室中进行反应溶液的处理,即具体来说是纯化、重新浓缩、清洗和漂洗和/或扩增步骤。

[0237] 然后,将可旋转的第一表面带到第二个位置,其中第一表面被排列成相对于第二表面呈  $180^\circ$  以外的角度,优选为  $45^\circ$  的角度。优选情况下,这通过使用前述的指导第一表面的工具在第一表面的第一个侧面部分上施加牵引力和/或在第一表面的第二个侧面部

分施加压力来进行。通过将第一表面导向第二个位置,微阵列被导离第二表面,样品溶液渗入微阵列和第二表面之间形成的空洞。固定在微阵列的底材上的探针分子可以让样品溶液中存在的靶分子自由接近,从而使探针和靶分子之间的相互作用可以发生。在本发明的方法的实施方案中,在第一表面上施加压力和 / 或牵引力的优点在于,通过这种方式可以移动样品溶液,从而可以加速相互作用反应。

[0238] 为了进行检测以及任选其它处理,可旋转的第一表面被导离第一个位置,这可以通过例如在第一表面的第一个侧面部分施加压力和 / 或在第一表面的第二个侧面部分施加牵引力,或在第一表面是弹性设计的情况下,通过释放第一个侧面部分来进行。此时,微阵列又基本上平坦地放置在第二表面上,以便第二表面和微阵列之间的样品溶液在该位置上被基本上替换,可以产生基本上无背景的检测。

[0239] 被检测的靶可以存在于任何种类的样品中,优选在生物样品中。

[0240] 优选情况下,靶在通过本发明方法检测和定量之前被分离、纯化、复制和 / 或扩增。

[0241] 本发明的方法还允许在反应室中扩增和定性和 / 或定量检测核酸,其中分子相互作用或杂交的检测可以在完成不需要替换样品或反应液体的循环扩增反应之后进行。本发明的方法也确保了扩增中杂交事件的循环检测,也就是说即使是在循环扩增反应期间也可以检测杂交。最后,在本发明的方法的帮助下,扩增产物可以在扩增反应过程中和扩增反应完成后被定量。

[0242] 通常扩增是通过常规的 PCR 方法或通过平行地实行通过 PCR 对待分析的靶分子进行扩增并通过上述的靶分子与物质文库支持物的杂交的方法来进行的。

[0243] 在另一个实施方案中,扩增在两步方法中(也参见 WO 97/45559)以多重 PCR 的形式进行。在第一步中,通过使用融合引物进行多重 PCR,该引物的 3'-末端是基因特异性的,5'-末端代表通用的区域。后者在用于多重反应的所有正向和反向引物中都是相同的。在第一个阶段中,引物的量是有限的。此时,所有的多重产物可以被扩增直到达到一致的摩尔量,只要对所有产物来说循环的次数足够达到引物的限制就行。在第二个阶段中,使用了与融合引物的 5'-区域一致的通用引物。扩增被进行直到获得所需的 DNA 量。

[0244] 在本发明的方法的另一个优选实施方案中,检测在循环扩增反应期间和 / 或循环扩增反应完成之后进行。在优选情况下,检测在扩增反应过程的每个扩增循环中进行。另外,检测也可以在每两个循环中或每三个循环中或任意间隔中进行。

[0245] 在进行线性扩增反应,其中靶的量随着每一步以某个量增加,或在进行指数扩增反应,例如 PCR,其中 DNA 靶的量随着每一步相乘增加时,在处理单元中,芯片可以在每个扩增步骤之后被压向检测平面,从而进行检测。因此,有可能对扩增反应进行在线监测。具体来说在非线性扩增反应中,因此可能确定 DNA 靶量的起始浓度。

[0246] 通过这种方式,扩增步骤的数量也可以被在线最优化。只要 DNA 靶的量达到特定的浓度,扩增就可以中止。如果起始靶浓度低,循环步骤的次数就被增加以便能够确保进行产物的分析。在需要减少反应时间的阳性对照的情况下,分析处理可以在非常早就中止。

[0247] 执行扩增反应所需的化学物质,例如聚合酶、缓冲液、氯化镁、标记的引物、具体来说荧光标记的引物、dNTPs 等,可以被提供到反应室中,例如以冷冻干燥的形式。

[0248] 优选情况下,循环扩增反应是 PCR。在 PCR 中,通常每个 PCR 循环使用三个温度。

优选情况下,杂交的核酸在最高的温度即变性温度下从微阵列上解离。变性温度的优选值是 95°C。因此可以在该变性温度下测定杂交信号,作为在相应的 PCR 循环中被检测的核酸的零值或参照值。

[0249] PCR 循环中下一个温度是退火温度,为例如大约 60°C,在此温度下,有利于被检测的核酸和固定在微阵列的底材上的核酸之间的杂交。因此,在本发明的方法的一个实施方案中,存在于 PCR 循环中的靶核酸的检测在退火温度下进行。

[0250] 为了增加本发明的方法的灵敏度,将温度降低到退火温度以下,以便检测优选在低于扩增循环的退火温度的温度下进行,可能是有利的。例如,检测可以在 25°C 到 50°C 的温度范围内进行,优选在 30°C 到 45°C 的温度范围内。

[0251] 在本发明的方法的另一个替代实施方案中,被检测的核酸和固定在微阵列底材上的核酸之间的杂交首先在低温下进行,以便随后升高杂交温度。这样的实施方案的优点在于,与在高于 50°C 的温度下进行杂交相比杂交时间缩短了,而不损失相互作用中的特异性。

[0252] 如果从等于或低于退火温度下测定到的测量值中减去在变性温度下测定到的零值或对照值,可以获得无干扰的测量结果,其中的波动和漂移被消除了。

[0253] 通常被检测的靶分子带有可检测的标记。在本发明的方法中,检测优选通过用至少一种在步骤 b) 中检测的标记物标记被结合的靶来进行。

[0254] 正如上面已经提到的那样,与靶或探针偶联的标记物优选是可检测的单元或通过锚定基团与靶或探针偶联的可检测单元。对于检测或标记的可能性,本发明的方法是相当灵活的。因此,本发明的方法可以与多种物理、化学或生物化学的检测方法相容。唯一的先决条件是被检测的单元或结构可以直接偶联或经由能够与寡核苷酸偶联的锚定基团连接到探针或靶上,例如寡核苷酸上。

[0255] 标记物的检测可以基于荧光、磁性、电荷、质量、亲和性、酶活性、反应性、金标记等。因此,标记物可以是例如基于使用荧光团标记的结构或成分。在荧光检测的情况下,标记物可以是能够在分析过程中或之后与靶或探针偶联的任意染料。例如 Cy 染料 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)、Alexa 染料、德克萨斯红、荧光素、若丹明 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)、类镧族元素钐、铈和铕 (EG&G, Wallac, Freiburg, Germany)。

[0256] 在特别优选情况下,该可检测的标记物是荧光标记物。正如上面已经提到的那样,在本发明的方法中使用本发明的装置确保了利用不带自动聚焦的荧光显微镜、例如具有固定焦距的荧光显微镜,检测荧光标记物。

[0257] 除了荧光标记物之外,在本发明的范围内发光标记物、金属标记物、酶标记物、放射性标记物和 / 或聚合物标记物也可以用作标记和 / 或检测单元,与靶或探针偶联。

[0258] 同样地,可以通过与标记的报告分子杂交 (三明治杂交) 来检测的核酸可以用作标记物 (标签)。各种分子生物学检测反应例如引物延伸、连接和 RCA 被用来检测标签。

[0259] 在本发明的方法的替代实施方案中,可检测的单元通过锚定基团与靶或探针偶联。优选使用的锚定基团是生物素、地高辛配基等。在后续的反应中,锚定基团通过特异性结合成分例如链亲和素偶联物或抗体偶联物被转换,而这些偶联物是可以检测的或能够触发可检测的反应。通过使用锚定基团,锚定基团被转化为可检测的单元可以在加入含有靶的样品之前、期间或之后进行,或者也可以在切割探针中可以被选择性切割的键之前、期间

或之后进行。这些探针中可以被选择性切割的键是例如在国际专利申请 WO 03/018838 中描述的那些,其相关的内容在此被明确地引用。

[0260] 根据本发明,标记也可以通过标记的分子与探针分子的相互作用来进行。例如,标记可以通过用如上述标记的寡核苷酸与寡核苷酸探针或寡核苷酸靶进行杂交来进行。

[0261] 其它适合于本发明的范围的标记方法和检测系统在例如 Lottspeich 和 Zorbas, *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany 1998, 23.3 和 23.4 章节中有描述。

[0262] 在本发明的方法的优选实施方案中,使用了检测方法,其结果产生了含有特定溶解性产物的加成物,从而导致沉淀。为了进行标记,使用的具体底物或离析物可以被转化为几乎不溶的通常被染色的产物。在这种标记反应中,可以使用催化底物转化为几乎不溶的产物的酶。适合于在阵列元件上产生沉淀的反应以及检测沉淀的可能反应在例如国际专利申请 WO 00/72018 和国际专利申请 WO 02/02810 中有描述,其相关的内容在此明确地引用。

[0263] 在本发明的方法的特别优选的实施方案中,被结合的靶配备上标记物,催化可溶的底物或离析物反应形成阵列元件上几乎不溶的沉淀,其中探针 / 靶相互作用已经发生,或作为晶核将可溶的底物或离析物转化为阵列元件上几乎不溶的沉淀,其中探针 / 靶相互作用已经发生。

[0264] 通过这种方式,使用本发明的方法允许同时定性和定量分析各种探针 / 靶相互作用,其中可以使用单个大小小于等于 1000  $\mu\text{m}$ 、优选小于等于 100  $\mu\text{m}$ 、特别优选小于等于 50  $\mu\text{m}$  的阵列元件。

[0265] 酶法标记物已经知道被使用在基于微量滴定板的免疫细胞化学和免疫学测试中(参见 E. Lidell 和 I. Weeks, *抗体技术*, BIOS Scientific Publishers Limited, 1995)。因此,例如,酶催化底物转化为几乎不溶的通常被染色的产物。

[0266] 特别优选情况下,导致沉淀在阵列元件上形成的反应是酶催化的可溶的底物或离析物转化为几乎不溶的产物。在具体的实施方案中,导致沉淀在阵列元件上形成的反应是由过氧化物酶催化的 3,3',5,5' - 四甲联苯胺的氧化。

[0267] 优选情况下,辣根过氧化物酶被用于催化 3,3',5,5' - 四甲联苯胺的氧化。但是,本领域的专业人员将会知道其它的过氧化物酶也可用于 3,3',5,5' - 四甲联苯胺的氧化。

[0268] 据信 3,3',5,5' - 四甲联苯胺在过氧化物酶的催化作用下在第一步反应中被氧化形成蓝色的自由基正离子(参见例如 Gallati 和 Pracht, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1985, 23, 8, 454)。这种蓝色的自由基正离子通过聚阴离子,例如硫酸葡聚糖以复合物的形式沉淀。通过过氧化物酶催化 3,3',5,5' - 四甲联苯胺氧化的沉淀反应在例如 EP 0 456 782 中有描述。

[0269] 不求全部,下面的表 1 提供了可能适合于在靶和探针发生相互作用的阵列上引起沉淀的几种反应的调查报告。

[0270] 表 1

[0271]

催化剂或晶核	底物或离析物
辣根过氧化物酶	DAB (3,3'-二氨基联苯胺) 4-CN (4-氯-1-萘酚) AEC (3-氨基-9-乙基咔唑) HYR (对苯二胺-HCl和邻苯二酚) TMB (3,3',5,5'-四甲联苯胺) 萘酚/焦宁
碱性磷酸酶	溴-氯-吲哚基-磷酸(BCIP)和氮蓝四唑(NBT)
葡萄糖氧化酶	t-NBT和m-PMS (氮蓝四唑氯化物和吩嗪硫酸二甲酯)
金粒	硝酸银

[0272]

	酒石酸银
--	------

[0273] 具体来说,通过不溶性沉淀检测探针 / 靶相互作用在 WO 02/02810 中有描述。

[0274] 下面描述的本发明的实施方案可以用于克服在检测固相支持物上的分子相互作用中通常可能带来的问题,例如防止检测平面和探针阵列之间可能形成的牛顿环。

[0275] 牛顿环现象基本上是由照明的类型、用于检测的光的波长、检测平面与探针阵列之间的距离和位于反应室中的溶液的折射指数所确定的。这样的牛顿环可以通过例如改变用于检测的光的波长、使用与检测平面和 / 或探针阵列具有相同或相似折射指数的溶液、和 / 或在检测平面和探针阵列之间使用浸液来防止。

[0276] 此外,牛顿环还可以通过通过在芯片和 / 或检测平面朝向芯片的一面上施用调距横板来防止。

[0277] 此外,牛顿环还可以通过通过在粗糙的支持物表面上施加探针阵列来防止。

[0278] 此外,牛顿环还可以通过通过在吸光的表面上施加探针阵列来防止。

[0279] 此外还可能永久性地改变接触压力,由此相对于检测平面指导芯片。因此,芯片和检测平面之间缝隙的厚度,也就是牛顿环的位置被改变。通过将检测的荧光信号对时间积分,以这种方式防止了点的测量值彼此之间的失真。

[0280] 另一种特别优选的防止牛顿环的可能方法是从不同的方向使用几个光源进行照明,从而激发被结合的靶的荧光团。

[0281] 由被替换的液体中未结合的靶的荧光团引起的背景荧光,可以导致被检测信号的失真。在优选情况下这可以通过使用遮光物来防止,遮光物被固定在例如检测表面或芯片上、和 / 或芯片周围或成像光学装置中,它被开发成只有探针阵列的表面被照射或成像。

[0282] 在使用相应的光源例如激光时,由于光的相干性可能导致照明的不均匀性。这种不均匀性可以通过使用波导和 / 或组合滤光片和 / 或不同波长的光来减小或防止。同样地,

也可以考虑移动光源以消除这种效应。

[0283] 通过在探针阵列的支持物上使用有机的或无机的、在选定的波长范围内没有荧光的光吸收层,由探针支持物和 / 或位于其后的元件引起的荧光背景信号可以被减小或防止。在优选情况下,黑色的铬层被用作防护层。

[0284] 在所有上述的本发明的方法的实施方案中,不需要对被分析的材料进行预扩增。从细菌、血液或其它细胞提取的样品材料中,特定的部分可以在 PCR(聚合酶链反应)的帮助下被扩增并与支持物杂交,特别是在存在本发明的装置或物质文库支持物的情况下,如同在 DE 102 53 966 中描述的那样。这意味着劳动量的大量减少。

[0285] 因此,本发明的方法特别适合于平行进行通过 PCR 对被分析的靶分子进行扩增和通过靶分子与物质文库支持物的杂交进行检测。此时,被检测的核酸首先通过 PCR 进行扩增,其中在开始时向反应中优选加入至少一种竞争物,抑制由 PCR 扩增的两条模板链中的一条的形成。具体来说,向 PCR 中加入同用于模板的 PCR 扩增的一条引物竞争与模板的结合、并且不能通过酶法延伸的 DNA 分子。通过 PCR 扩增的单链核酸分子然后通过与互补的探针杂交来进行检测。此外,被检测的核酸也可以首先通过 PCR 扩增成单链过剩的形式,然后通过互补探针杂交来进行检测,其中在开始时向 PCR 反应中加入竞争物,该竞争物是 DNA 分子或核酸类似物分子,它能够与模板的两条链中的一条杂交,但不与通过探针杂交检测的区域杂交,并且不能通过酶法延伸。

[0286] 每个能够优选引起 PCR 反应中存在的两条模板链中的仅仅一条链的扩增的分子,都可以用作 PCR 反应中的竞争物。因此,在本发明中,竞争物可以是蛋白、肽、DNA 配体、嵌入剂、核酸或其类似物。优选情况下,使用能够序列特异地结合单链核酸并且具有前述特定性质的蛋白或肽作为竞争物。特别优选情况下,核酸分子和核酸类似物分子被用作二级结构阻断物。

[0287] 在扩增过程中通过在开始时向 PCR 中加入竞争物,基本上可以抑制两条模板链中的一条的形成。“基本上抑制”意味着对 PCR 来说一条单链过剩,另一条模板链产生的量足以允许通过杂交有效地检测被扩增的链。因此,扩增不遵循  $2^n$  (其中  $n$  = 循环数) 形式的指数动力学,而是减弱成  $< 2^n$  形式的扩增动力学。

[0288] 通过 PCR 获得的过剩单链与非扩增链相比倍数为 1.1 到 1000,优选倍数为 1.1 到 300、更优选倍数为 1.1 到 100、特别优选倍数为 1.5 到 100、特别优选倍数为 1.5 到 50、特别优选倍数为 1.5 到 20、以及最优选倍数为 1.5 到 10。

[0289] 一般来说,竞争物的功能是选择性地与两条模板链中的一条结合,从而抑制相应的互补链的扩增。因此,竞争物可以是对 PCR 中扩增的两条模板链中的一条具有特异性的单链 DNA 或 RNA 结合蛋白。它们也可以是仅仅与被扩增的两条模板链中的一条的特定区域序列特异性结合的适体 (aptamer)。

[0290] 优选使用核酸或核酸类似物作为竞争物。通常情况下,核酸或核酸类似物通过与用于 PCR 的引物之一竞争引物结合位点、或者由于序列互补性能够与被检测的模板链的区域杂交,从而发挥 PCR 的竞争物的作用。该区域不是探针检测的区域。这样的核酸竞争物是不可以用酶法延伸的。

[0291] 核酸类似物可以是例如所谓的肽核酸 (PNA)。但是,核酸类似物也可以是核苷酸彼此之间通过硫代磷酸酯键而不是磷酸酯键连接的核酸分子。它们也可以是其中天然存在的

糖组分核糖或脱氧核糖已经被其它可选的糖例如阿拉伯糖或海藻糖等取代的核酸类似物。此外,核酸衍生物可以是“锁核酸”(LNA)。其它常规核酸类似物为本领域的专业人员所熟知。

[0292] DNA 或 RNA 分子,特别优选是 DNA 或 RNA 寡核苷酸或其类似物,被优选用作竞争物。

[0293] 对 PCR 反应中两条模板链中的一条的扩增的抑制作用是基于不同的机制,这依赖于用作竞争物的核酸分子或核酸类似物的序列。对于使用 DNA 分子的实施例将在下面讨论。

[0294] 例如,如果使用 DNA 分子作为竞争物,它可以具有与用于 PCR 的引物之一的序列至少部分一致的序列,以便在严紧条件下 DNA 竞争物分子与相应的模板链之间的特异性杂交有可能进行。因为依据本发明,在这种情况下用于竞争的 DNA 分子不能通过 DNA 聚合酶延伸,在 PCR 反应中 DNA 分子与各自引物竞争与模板的结合。根据 DNA 竞争物分子与引物的比率,由引物定义的模板链的扩增因此可以被抑制,以至于该模板链的生产被显著地减少。此时,按照指数动力学进行的 PCR 高于根据竞争物的用量所预计的。通过这种方式,多余的单链出现,其量足以通过杂交有效地检测被扩增的靶分子。

[0295] 在本实施例中,用作竞争物的核酸分子或核酸类似物必须是不能通过酶法延伸的。“不能通过酶法延伸”意味着用于扩增的 DNA 或 RNA 聚合酶不能使用核酸竞争物作为引物,即不能从竞争物所定义的序列的 3' 端合成相应的模板的相反链。

[0296] 除了上述的可能方法之外, DNA 竞争物分子也可以具有与被检测的模板链的区域互补的序列,该区域不是引物序列之一所寻址的区域,并且不能通过酶法延伸。在 PCR 中, DNA 竞争物分子然后将与该模板链杂交,并相应地阻断该链的扩增。

[0297] 本领域的专业人员知道, DNA 竞争物分子,或者总的来说核酸竞争物分子的序列可以被相应地选择。如果核酸竞争物分子的序列不与用于 PCR 的引物之一的序列基本一致,而是与被检测的模板链的另一个区域互补,则该序列将被选择以便它不位于模板序列被杂交时的探针所检测的区域内。这是必需的,因为在 PCR 和杂交反应之间不必进行处理反应。如果位于被检测的区域内的核酸分子被用作竞争物,它将与单链靶分子竞争与探针的结合。

[0298] 这样的竞争物优选在探针检测的模板序列附近杂交。此处,根据本发明,关于位置的术语“附近”被理解为与描述二级结构阻断物时所给出的意义相同。但是,本发明的竞争物也可以在被检测的序列的最近点杂交,即距离被检测的靶序列刚好一个核苷酸。

[0299] 如果不能通过酶法延伸的核酸或核酸类似物被用作竞争分子,必须对它们的序列和结构进行选择,以便它们不能被 DNA 或 RNA 聚合酶酶法延伸。优选情况下,核酸竞争物的 3' 末端被设计成不与模板互补,和 / 或者在其 3' 末端有 3- 羟基基团之外的取代基。

[0300] 如果核酸竞争物的 3' 末端不与模板互补,不论核酸竞争物是与模板的引物结合位点之一结合,还是与通过 PCR 扩增的模板的序列之一结合,由于在其 3' 末端缺少碱基互补性,核酸竞争物都不能被常规的 DNA 聚合酶延伸。这种类型的不能被 DNA 聚合酶延伸的核酸竞争物为本领域的专业人员所熟知。在优选情况下核酸竞争物在其 3' 末端最后 4 个碱基、特别优选最后 3 个碱基、特别优选最后 2 个碱基、最优选最后一个碱基上与其靶序列没有互补性。在所提到的位置上,这种竞争物也可以具有不允许杂交的非天然碱基。

[0301] 不能通过酶法延伸的核酸竞争物也可以与它们的靶序列具有 100% 的互补性,如

果它们在骨架中或 3' 末端上进行了修饰以至于不能通过酶法延伸的话。

[0302] 如果核酸竞争物在其 3' 末端具有羟基基团之外的基团,这些取代基优选为磷酸基团、氢原子(双脱氧核苷酸)、生物素基团或氨基基团。这些基团不能被常规的聚合酶延伸。

[0303] 在这种方法中特别优选的是使用同用于 PCR 的两条引物之一竞争与模板的结合、并且在化学合成中在其 3' 末端装备有氨基连接的 DNA 分子作为竞争物。这样的竞争物可以与它们的靶序列具有 100% 的互补性。

[0304] 但是,核酸类似物竞争物例如 PNAs 在其 3' 末端不必具有封闭的 3' 羟基基团或非互补性碱基,理由是它们的骨架被肽键所修饰而不被 DNA 聚合酶识别,因此不能被延伸。其它对磷酸基团进行的不能被 DNA 聚合酶识别的修饰,为本领域的专业人员所熟知。在它们之中,尤其重要的是具有骨架修饰的核酸,例如 2'-5' 酰胺键(Chan 等(1999) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 315-320)、硫键(Kawai 等(1993) *Nucleic Acids Res.*, 1(6), 1473-1479)、LNA(Sorensen 等.(2002) *J. Am. Chem. Soc.*, 124(10), 2164-2176) 和 TNA(Schoning 等(2000) *Science*, 290(5495), 1347-1351)。

[0305] 与模板的不同区域(例如尤其是引物结合位点)杂交的几种竞争物也可以同时使用在 PCR 中。如果竞争物具有二级结构阻断物的性质,杂交的效率也可以额外被提高。

[0306] 在另一个实施方案中, DNA 竞争物分子也可以具有与引物之一互补的序列。根据反义 DNA 竞争物分子和引物的比率,也可以例如在 PCR 反应中使用反义 DNA 竞争物分子来滴定引物,以便它不再与相应的模板链杂交,因此,只有被另一条引物限定的模板链可以被扩增。本领域的专业人员将会认识到,在本发明的本实施方案中,核酸竞争物可以但不必须通过酶法延伸。

[0307] 在本发明的范围内,如果谈到核酸竞争物,它将包括核酸类似物竞争物,除非从相应的上下文中可以看出不同的意义。核酸竞争物可以可逆地或不可逆地与模板的相应链结合。键可以通过共价或非共价相互作用来发生。

[0308] 在优选情况下,核酸竞争物的结合通过非共价相互作用发生,并且是可逆的。在特别优选情况下,与模板的结合通过形成 Watson-Crick 碱基对发生。

[0309] 核酸竞争物的序列通常适应于被检测的模板链的序列。在反义引物的情况下,尽管它们适应于被滴定的引物序列,但该引物序列反过来仍由模板序列限定。

[0310] 核酸的 PCR 扩增是一种标准的实验室方法,其各种不同可能的改变和发展对本领域的专业人员来说都是熟悉的。原则上 PCR 的特征是,双链核酸模板,通常是双链 DNA 分子,首先在 95°C 进行 5 分钟的热变性,通过热变性两条链相互分开。在冷却到所谓的“退火”温度(由具有较低熔点温度的引物限定)后,反应溶液中存在的正向和反向引物积聚在各自模板链上与它们自己的序列互补的那些区域上。此处,引物的“退火”温度适应于引物的长度和碱基组成。它可以在理论条件的基础上计算出来。关于“退火”温度的计算的信息可以在例如 Sambrook 等(同上)的文献中找到。

[0311] 引物的退火一般在 40°C 到 75°C 的温度范围内进行,优选在 45°C 到 72°C 之间,特别优选在 50°C 到 72°C 之间,然后进行延伸步骤,在该步骤中脱氧核糖核苷酸在反应溶液中 DNA 聚合酶活性的作用下与引物的 3' - 末端连接。此处,插入的 dNTPs 的身份依赖于与引物杂交的模板链的序列。当使用正常热稳定的 DNA 聚合酶时,延伸步骤通常在 68°C 到 72°C



之间进行。

[0312] 在对称的 PCR 中,通过不断地重复所述的引物的变性、退火和延伸的循环。由引物序列确定的靶的核酸区域得到指数扩增。至于 PCR 的缓冲液条件,可以使用的 DNA 聚合酶,双链 DNA 模板的产生,引物的设计,退火温度的选择和对经典 PCR 的修改,本领域的专业技术人员有大量的文献资料任他处理。

[0313] 本领域的专业技术人员也熟知例如单链 RNA 如 mRNA 可以被用作模板。通常情况下,它先通过反转录被转录成双链的 cDNA。

[0314] 在优选实施方案中,热稳定的 DNA 依赖性的聚合酶被用作聚合酶。在特别优选的实施方案中,使用热稳定的 DNA 依赖性的 DNA 聚合酶,选自: Taq-DNA 聚合酶 (Eppendorf, Hamburg, Germany 和 Qiagen, Hilden, Germany)、Pfu-DNA 聚合酶 (Stratagene, La Jolla, USA)、Tth-DNA 聚合酶 (Biozym Epicenter Technol., Madison, USA)、Vent-DNA 聚合酶、DeepVent-DNA 聚合酶 (New England Biolabs, Beverly, USA)、Expand-DNA 聚合酶 (Roche, Mannheim, Germany)。

[0315] 通过特定的或进化的改变从天然存在的聚合酶最优化得到的聚合酶的使用也是优选的。当在存在物质文库支持物的情况下进行 PCR 时,特别优选的是使用 Eppendorf (Germany) 公司的 Taq 聚合酶和 Clontech (Palo Alto, CA, USA) 公司的优势 cDNA 聚合酶混合物。

[0316] 本发明的另一方面涉及使用本发明的装置进行基于微阵列的测试。

[0317] 下面将描述本发明的装置或本发明的方法的特定实施方案。

[0318] 图 5 中显示了第一表面,在这里是优选集成了加热装置的弹性膜,在针或挺杆的作用下变形,从而将芯片推向检测平面。此外,检测平面被第二表面上的调距横板推进反应室中,从而从上方接近 DNA 芯片,直到 DNA 芯片和检测平面之间的液体几乎完全被脱位。密封反应室的弹性密封垫由于检测平面导向芯片而被压缩。被脱位的流体使密封垫变形,从而将空气压缩在空气补偿室中。

[0319] 但是,处理单元也可以被开发成或者只有第一表面,例如弹性膜形式的第一表面变形,或者只是将检测平面推进室中。

[0320] 图 6 中描绘了压缩处理单元的另一个技术实施方案。反应室被密封膜所包围,密封膜上在侧面和检测平面的对面固定了 DNA 芯片。在 DNA 芯片的高度上,密封膜封闭室体底面的孔。该孔比 DNA 芯片略小。当在反应室中进行 PCR 时,孔被由与 PCR 相关的升高的温度而形成的内部压力紧密地密封。因此,尽管密封膜是易变的,但反应室是耐压的(自封闭阀的原理)。为了进行检测,针或挺杆通过底面的孔被推入。密封膜被升高, DNA 芯片被压向检测平面。为了确保密封膜具有所需的弹性,可以给膜提供补偿褶。在本实施方案中,压力补偿室也被脱位的液体压缩。

## 具体实施方式

[0321] 下面的实施例是用来说明本发明,不应被限制性地解释。

[0322] 实施例

[0323] 实施例 1:具有集成加热器的反应仓的结构

[0324] 在图 8 和图 9 中描述了没有集成加热器的处理单元和将 DNA 芯片导向检测平面

的装置的实施方案。显示的装置中的 DNA 芯片可以通过常规的荧光显微镜读出（例如 Axioskop, Zeiss, Jena, Germany）。

#### [0325] 实施例 2:具有硅加热底材的反应仓的结构

[0326] 图 10 和 11 中显示的本发明的装置的处理单元的变体是一个微型化的反应仓,含有集成的探针阵列 (DNA 芯片)、用于调节反应室中不同温度的集成了温度传感器的硅加热底材 (“加热底材”)、以及任选具有 EPROM 的线路板,该线路板用于与加热底材进行电气接触。每个元件被包埋在两个由合成材料制成的壳中。整个单元是空间封闭的系统,所有需要的反应 (例如 PCR) 都可以在其中以温度控制的方式进行。

[0327] 首先将线路板插入到下层壳中提供的杆中 (使 EPROM 面朝下)。在线路板的上侧,安排了三个电接触垫,它确保了与随后插入的加热底材的电气连接,而加热底材又反过来支撑接触垫。该加热底材大小为 8mmx6mm,厚度大约为 0.6mm。加热底材确保在所进行的检测的范围内不同温度 (例如 40°C 到 95°C) 的准确调节。此时,反应室中的温度可以通过集成在加热底材中的传感器来测量,或者也可以通过直接测量加热底材表面温度的外部测量单元来测量。在后一种情况下,加热底材中集成的传感器可以被省略。用于加热和 / 或温度测量的集成元件可以是例如二极管或晶体管。硅加热底材面朝反应空间的表面不含有任何电气系统,并用 SiO<sub>2</sub> 钝化层包被。

[0328] 下一个元件是弹性密封垫,它从侧面限制了反应空间。

[0329] 在反应空间中心,DNA 芯片被连接成使探针阵列面朝检测平面。在插入玻璃表面形式的检测平面后,该表面仍然从下层壳突出 0.2mm。然后通过使用定位针指导加入上层壳,将玻璃表面压在密封垫上,从而确保反应室得到最佳的密封。

[0330] 随后可以用反应溶液填充反应室。此处应该注意的是只有含有芯片的内部空间被填充,外层室不用填充。所需的液体通过提供的套管导管用套管注入反应空间中。

[0331] 然后,通过硅加热底材控制的生物化学反应,例如 PCR 和 / 或杂交,可以在反应室中进行。

[0332] 为了检测中间的结果或最终的结果,检测平面从上方通过检测单元的调距横板压向 DNA 芯片,直到检测平面与探针阵列之间的距离大约为零。此时,周围的液体脱位进入外室中,在此将局部空气压缩。该过程是可逆的,可以在例如每个 PCR 循环之后进行。

[0333] 由于其紧凑的设计和内置带有 EPROM 的线路板以及集成的加热底材,本发明的装置的变体特别适合于移动使用。

#### [0334] 实施例 3:检测通过脱位被分析物引起的背景信号的降低

[0335] 所有在本实施例中描述的荧光测量都是通过荧光显微镜 (Zeiss, Jena, Germany) 进行的。使用白色光源用入射光进行激发,滤光片被设置为适合于花菁 3。信号通过 CCD 像机 (PC0-Sensicam, Kehlheim, Germany) 记录。在下面,缝隙的厚度代表微阵列与检测平面之间的距离。

[0336] a) 根据缝隙的厚度测量被分析物的荧光信号

[0337] 具有确定的通道深度 (5μm、10μm、28μm) 的通道壳由 Sylgard 铸造。通道的宽度为 125 μm。玻璃芯片被安置在不一样深的通道上。然后用 200nM Cy-3 标记的寡核苷酸的 2x SSC+0.2% SDS 的溶液填充通道,并使用 1.5 秒的曝光时间测量信号。

[0338] 在图 12 中描述了测量的结果。随着通道深度的增加信号线性地增加。可以计算

出直的回归线（方程 1）

[0339] （方程 1） $F(x) = 6.2468x + 50.016$

[0340] 在获得的回归方程（方程 1）的帮助下，DNA 芯片和检测平面之间的层厚度现在可以通过背景荧光信号确定。

[0341] 这可以通过将两个在其上侧具有结构标记（图 14 中的十字交叉、数字和数据矩阵）、可以被聚焦的玻璃表面（芯片）进行堆积来检查。芯片堆积的方式使得结构标记被定向为彼此相对，仅仅通过薄液体层分开。200nM Cy-3 标记的寡核苷酸的 2xSSC+0.2% SDS 的溶液被用作液体。在装备有标尺的显微镜的聚焦装置的帮助下，标记之间的距离，因此也就是液体薄膜的层厚度可以被直接确定。背景的信号使用 0.75 秒的曝光时间时是 158 灰度值。在荧光显微镜下测量的缝隙的厚度是 40  $\mu\text{m}$ 。假设测量的灰度值相对于曝光时间呈线性（参见图 13），使用方程 1 获得的缝隙的厚度是 42.6  $\mu\text{m}$ 。因此与获得的液体层的厚度值匹配得很好。

[0342] b) 通过压缩处理单元减少或消除背景荧光的实验

[0343] 在该实验中，被测量的杂交信号依赖于通过挺杆施加的压力造成的荧光被分析物的替代。实验设置的草图见图 15。通过推压挺杆，硅片（3.15x3.15mm）被压向探针芯片（DNA 芯片），在该过程中位于两个平面之间的液体被脱位。

[0344] 为了进行实验，用杂交溶液填充反应室，这是用于 PCR 杂交条件的模型系统。杂交溶液中含有与探针阵列互补的 Cy3 标记的寡核苷酸（在 2xSSC+0.2% SDS 中的终浓度为 2nM）。此外，杂交溶液含有同样的 Cy3 标记的寡核苷酸，该寡核苷酸不与探针阵列杂交，因此只对溶液中的荧光背景信号有贡献，不对点的特异性信号有贡献。

[0345] 杂交进行 10 分钟。为了随后读出杂交信号，选择固定的曝光时间为 1.5 秒。在实验设置中，挺杆在每次记录后被推近探针阵列（检测平面），以便填充了杂交溶液的阵列和第二表面之间的缝隙被减小。

[0346] 图 16 显示了使用缝隙厚度为 10m 的杂交信号的记录。图 17 中描绘了点上测量到的背景信号和杂交信号的结果。按照预期，两种信号都对缝隙的厚度呈线性。因此，通过背景校正的点信号不随缝隙的厚度变化。

[0347] 当灰度值达到 255 时，测量仪器过载，即缝隙的厚度为大约 17  $\mu\text{m}$  时，只有通过减少曝光时间才可能测量点强度。因此，测量灵敏度降低了。

[0348] 因此，通过降低缝隙的厚度，动力学测量范围被增加。通过点信号的背景调整（差值形成），缝隙的厚度可以在相当宽的范围内变化而不影响测量和测量结果。使用厚度非常大的缝隙（> 20m）时，由于检测器的过载，测量受到严重损害。

[0349] c) 一步反应进行扩增、杂交和检测

[0350] 两个具有图 15 的结构的处理单元被安装和编号。

[0351] 准备两个相同的具有下列组成的反应设置：

[0352] 反应设置：

[0353] 20mM dNTPs.....0.5  $\mu\text{l}$

[0354] 1M 乙酸钾 (Kaac).....3  $\mu\text{l}$

[0355] 25mM 乙酸镁 Eppendorf.....5  $\mu\text{l}$

[0356] Clontech C-DNA PCR 缓冲液.....5  $\mu\text{l}$

[0357]	Eppendorf Taq 聚合酶.....	3 μ l
[0358]	10 μ M 引物 CMV_DP_Cy3.....	1 μ l
[0359]	Cy3_5 ‘TGAGGCTGGGAARCTGACA3 ‘	
[0360]	10 μ M 引物 CMV_UP_NH2.....	0.66 μ l
[0361]	5 ‘GGGYGAGGAYAACGAAATC3 ‘_NH2	
[0362]	10 μ M 引物 CMV_UP.....	0.33 μ l
[0363]	5 ‘GGGYGAGGAYAACGAAATC3 ‘	
[0364]	10 μ M 引物 Entero_DP_Cy3.....	1 μ l
[0365]	Cy3_5 ‘CCCTGAATGCGGCTAAT3 ‘	
[0366]	10 μ M 引物 Entero_UP_NH2.....	0.66 μ l
[0367]	5 ‘ATTGTCACCATAAGCAGCC3 ‘_NH2	
[0368]	10 μ M 引物 Entero_UP.....	0.33 μ l
[0369]	5 ‘ATTGTCACCATAAGCAGCC3 ‘.....	
[0370]	10 μ M 引物 HSV1_DP_Cy3.....	1 μ l
[0371]	Cy3_5 ‘CTCGTAAAATGGCCCCTCC3 ‘	
[0372]	10 μ M 引物 HSV1_UP_NH2.....	0.66 μ l
[0373]	5 ‘CGGCCGTGTGACACTATCG3 ‘_NH2 .....	
[0374]	10 μ M 引物 HSV1_UP.....	0.33 μ l
[0375]	5 ‘CGGCCGTGTGACACTATCG .....	
[0376]	10 μ M 引物 HSV2_UP_Cy3.....	1 μ l
[0377]	Cy3_5 ‘CGCTCTCGTAAATGCTTCCCT3 ‘.....	
[0378]	10 μ M 引物 HSV2_DP_NH2.....	0.66 μ l
[0379]	5 ‘TCTACCCACAACAGACCCACG3 ‘_NH2	
[0380]	10 μ M 引物 HSV2_DP.....	0.33 μ l
[0381]	5 ‘TCTACCCACAACAGACCCACG3 ‘	
[0382]	10 μ M 引物 VZV_DP_Cy3.....	1 μ l
[0383]	Cy3_5 ‘TCGCGTGCTGCGGC	
[0384]	10 μ M 引物 VZV_UP_NH2.....	0.66 μ l
[0385]	5 ‘CGGCATGGCCCGTCTAT3 ‘_NH2	
[0386]	10 μ M 引物 VZV_UP.....	0.33 μ l
[0387]	5 ‘CGGCATGGCCCGTCTAT	
[0388]	模板 CMV.....	1 μ l
[0389]	PCR 级水.....	22.5 μ l
[0390]	共计.....	50 μ l
[0391]	处理单元每个用 50 μ l 反应设置填充,并按照下面的温度 - 时间模式 进行。	
[0392]	1 变性.....	95°C
[0393]	时间.....	300s
[0394]	2 变性.....	95°C
[0395]	时间.....	10s

[0396]	3退火/延伸.....	60°C
[0397]	时间.....	20s
[0398]	重复步骤 2 到 3.....	35 次
[0399]	4 变性.....	95°C
[0400]	时间.....	300s
[0401]	5 杂交.....	40°C
[0402]	时间.....	3600s

[0403] 然后对两个处理单元进行不同的处理。在第一种情况下（处理单元 1），背景荧光通过替换被分析物而降低。这是通过推动挺杆向上朝向检测平面来确保的，以便填充了反应溶液的缝隙被尽可能减小。

[0404] 在第二种情况下（处理单元 2），被分析物被非荧光溶液替换。溶液的替换使用 2xSSC 溶液进行，波动率为 300  $\mu$  l/ 分钟，漂洗体积 900  $\mu$  l。本过程符合技术状态。

[0405] 然后，对两种减小背景荧光的策略进行比较。为此，两个处理单元的杂交信号在上述的荧光显微镜照相机设置的帮助下被检测。

[0406] 曝光是 5 秒（参见图 18 和图 19）。点强度的比较使用具有物质 CMV\_S\_21-3（5'-NH<sub>2</sub>TGTTGGGCAACCACCGCACTG-3'）的点进行。探针的位置指示在图 18 和 19 中。

[0407] 图 20 中概述了实验结果。通过在处理单元 2 中漂洗反应室，与处理单元 1 中的替换相比，杂交信号被减少了。据推测探针的渗出对此负责。

[0408] 因此，按照本发明的方法，替换被分析物的方法将优于替换溶液。

[0409] 为了获得扩增产物的量和完整性的检测，另取每种反应溶液 5  $\mu$  l 在 2% 琼脂糖凝胶上分析。结果（用 UV 透射仪检测溴化乙锭染色的凝胶）可以在图 21 中看见。

[0410] 实施例 4：处理和检测本发明的反应仓的装置

[0411] 本实施例中的处理和检测本发明的反应仓的装置显示在图 28 中。

[0412] 本发明的用于执行基于微阵列的测试的带有反应仓的装置通常由几个部件组成，它们可以整合在一个装置中，也可以从几个部分装置模块式地装配。此时，装置可以通过集成的计算机或通过外部计算机的界面激活。装置的结构显示在图 28 中。

[0413] 示例性的步骤如下进行：

[0414] 反应仓的流体界面被操作者手动设置到填充位置，此时套管穿透室体的密封垫。然后，操作者通过标准的实验室吸管将反应混合物注入反应室中。两个步骤也可以被相应开发的装置取代。然后将流体界面再次设置到起始位置，其中该步骤也可以通过相应开发的装置执行。

[0415] 然后将反应仓插入装置。安排在装置中的数据矩阵读取器识别隶属于反应仓的一对一的数据矩阵，并且通过用户传送的数据记录，为反应仓和在控制计算机中进行的测试装载数据特征。该计算机然后控制单个处理步骤，其中可以包含例如扩增和杂交。通过集成的压力机件，反应室中的微隙被减小以进行本发明的检测。

[0416] 检测可以使用常规的荧光 - 光学成像或非成像系统进行。然后将获得的数据传送到控制计算机，该计算机对数据进行评估，并将它们呈现或储存在内部或外部界面上。

[0417] 然后操作者可以从装置中取出反应仓并丢弃。

[0418] 实施例 5：由导电合成材料制成的反应仓

[0419] 准备图 29 中描述的反应仓。

[0420] 反应仓的下层壳 (1) 由形成反应室基部的导电合成材料 ( 导体 2, RKT, Germany) 制成。箔 PT-100 温度传感器在适当粘合剂例如 Loctite401 (Loctite, Germany) 的帮助下被固定到室基部的下面。下层壳与密封垫 (3) 和覆盖玻璃 (4) 一起形成了本发明的反应仓的反应室。

[0421] 反应仓还含有带螺纹的钻孔 (2) ( 用于插入螺钉进行电接触 ), 由例如丙烯酸树脂制成的反应仓的上层壳 (5), 用于附着上层壳的钻孔 (6) 和上层壳中的检测窗 (7)。

[0422] 制备标准的 PCR 反应混合物 :

[0423] 30.5  $\mu$  l 去离子水

[0424] 5  $\mu$  l 10xPCR 缓冲液 ( 例如 10xcDNA PCR 反应缓冲液, Clontech, Germany)

[0425] 5  $\mu$  l 乙酸镁, 25mM ( 例如 Eppendorf, Germany)

[0426] 0.5  $\mu$  l dNTP, 各 20mM

[0427] 1  $\mu$  l 16sfD1 (5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ), 10mM

[0428] 1  $\mu$  l 16sRa (5' -TACCGTCACCATAAGGCTTCGTCCCTA-3' ), 10mM

[0429] 3  $\mu$  l Taq DNA 聚合酶 ( 例如 Genaxxon, Germany)

[0430] 1  $\mu$  l 模板

[0431] 通过胰岛素注射器 (Becton Dickinson, Germany) 将反应室用反应混合物填充。为了在填充过程中通气, 将第二个套管穿透室体的密封垫。填充后, 通气套管和胰岛素注射器被专业性丢弃。

[0432] 然后通过两个用于该目的的螺钉将反应室与调节单元 (CLONDIAG chip technologies GmbH, Germany) 相连。同样地, 将温度传感器在下层壳的下面连接到该调节单元上。该调节单元能够按照预定的程序调节下层壳中的具体温度。

[0433] 通过这种方式, 执行下面的 PCR 程序 :5min 95 $^{\circ}$ C, 30x (30s 95 $^{\circ}$ C, 30s 62 $^{\circ}$ C, 50s 72 $^{\circ}$ C)。

[0434] 图 30 显示了用热成像像机在 95 $^{\circ}$ C 温度下记录的反应仓的图像。

[0435] 在完成程序后, 通过胰岛素注射器将反应产物从反应室中除去。类似地, 将套管穿透室体的密封垫, 用于在清空反应室过程中通气。

[0436] 现在通过琼脂糖凝胶电泳分析反应产物。为此, 5  $\mu$  l 反应溶液与适当的缓冲液 ( 例如 5  $\mu$  l 250mM 溴酚蓝的 50% 甘油 ) 一起施加在 2% 琼脂糖凝胶的槽中, 然后进行电泳。结果显示在图 31 中。

[0437] 正如可以清楚地看见的那样, 在所有情况下可以获得正确大小的、与阳性对照具有相当的量的扩增产物。

#### 附图说明

[0438] 图 1 :

[0439] 含有读出装置和处理单元的本发明的装置的调查。

[0440] 图 2 :

[0441] 本发明的处理单元的视图。

[0442] 图 3 :

[0443] 本发明的处理单元的分解视图,包含检测平面、密封垫、DNA 芯片和室体。室体具有可逆变形的弹性膜。

[0444] 图 4 :

[0445] 在弹性膜中由注模合成材料包围的具有加热弯管的室体的视图。

[0446] 图 5 :

[0447] 读取装置中本发明的处理单元的状态视图

[0448] A) PCR 期间, B) 检测前, 以及 C) 检测期间。

[0449] 图 6 :

[0450] 本发明的具有膜密封垫、补偿褶和下侧孔的处理单元的功能状态视图。在 A) 中可以看出正常位置的处理单元。在 B) 中可以看出压缩形式的处理单元, 其中 DNA 芯片和检测平面之间的荧光溶液被置换。

[0451] 图 7 :

[0452] 旋转盘的视图, 其上安装了 4 个温度模块。温度模块每个被恒温到一个温度。通过旋转盘和 / 或处理单元, 可以改变反应室中的温度。

[0453] 图 8 :

[0454] 铣制和螺栓的处理单元的例子视图。

[0455] 图 9 :

[0456] 用于本发明的处理单元的压缩或轧纹装置的例子视图, 该处理单元用于在常规的荧光显微镜下检测杂交信号。

[0457] 图 10 :

[0458] 本发明的处理单元的视图, 该处理单元具有线路板, 用于与加热器和温度传感器进行电气连接。加热器被开发成半导体元件。

[0459] 图 11 :

[0460] 图 10 中显示的处理单元的分解视图。

[0461] 图 12 :

[0462] 用于确定填充了荧光团的缝隙的宽度的直回归线图。

[0463] 图 13 :

[0464] 在测量区域内荧光信号随曝光时间的增加而线性增加图。

[0465] 图 14 :

[0466] 两个叠置的芯片的荧光记录, 它们之间的缝隙用 200nM Cy3 荧光团填充。曝光时间 0.75 秒时背景强度是 158 灰度值。用荧光显微镜测量的缝隙厚度是 40.00  $\mu\text{m}$ 。假设测量的灰度值相对于曝光时间呈线性 (参见图 13), 使用方程 1 获得的缝隙的厚度是 42.6  $\mu\text{m}$ 。因此获得的层的厚度值匹配得很好。

[0467] 图 15 :

[0468] 不用漂洗检测 DNA 阵列的实验设置图。

[0469] 图 16 :

[0470] 其上压有芯片的阵列的荧光记录。通过白边, 可以看见被置换的样品溶液的背景辐射。

[0471] 图 17 :

[0472] 当缝隙的厚度减小时信号和背景的绝对强度下降。两个值的差在整个测量区域是恒定的。

[0473] 图 18：

[0474] 通过置换背景荧光检测探针信号。在左边可以看见未置换的液体。

[0475] 图 19：

[0476] 通过漂洗进行背景调节的 DNA 阵列的探针信号的检测。

[0477] 图 20：

[0478] 实验比较被分析物的置换和替代的测量结果概述。

[0479] 图 21：

[0480] 通过凝胶电泳对处理单元中的 PCR 的参比分析。

[0481] 图 22：

[0482] 用于以反应物质或缓冲液填充反应仓的可分离的填充单元的概略图。其中使用了下面的参考号数：

[0483] 1 填充单元

[0484] 1.1 机械界面填充单元 - 仓

[0485] 2 仓

[0486] 2.1 机械界面仓 - 填充单元

[0487] 2.2 密封垫

[0488] 2.3 反应室

[0489] 2.4 反应室中用于套管的优选开口

[0490] 3 填充通道

[0491] 3.1 带有样品添加工具的流体和机械界面

[0492] 3.2 填充套管

[0493] 4 带有废物容器的废物通道

[0494] 4.1 通气孔

[0495] 4.2 废物套管

[0496] 图 23：

[0497] 通过模块式填充单元填充反应仓的过程图。

[0498] 图 24：

[0499] 用于以反应物质或缓冲液在优选的位置上不穿透室体的密封垫填充反应仓的集成的填充单元的概略图。其中使用了下面的参考号数：

[0500] 1 填充单元 - 仓

[0501] 1.1 机械界面仓 - 填充单元

[0502] 2 反应仓

[0503] 2.1 机械界面仓 - 填充单元

[0504] 2.2 密封垫

[0505] 2.3 反应空间

[0506] 2.4 仓壳中用于套管的优选开口

[0507] 3 填充通道



- [0508] 3.1 带有样品进料工具的流体和机械界面
- [0509] 3.2 填充套管
- [0510] 4 带有废物容器的废物通道
- [0511] 4.1 带有样品扣除单元的流体和机械界面
- [0512] 4.2 废物套管
- [0513] 5 优选位置的设备,此处是弹簧
- [0514] 图 25 :
- [0515] 填充具有集成填充单元的反应仓的步骤图。
- [0516] 图 26 :
- [0517] 用于以反应物质或缓冲液在优选的位置上不穿透室体的密封垫填充反应仓的带有集成废物容器的集成的填充单元的概略图。除了图 24 中使用的参考号数之外,还使用了下面的参考号数 :
- [0518] 4 带有废物容器的废物通道
- [0519] 4.1 通气孔
- [0520] 图 27 :
- [0521] a) 当将多余的液体扣除废物容器或通道时填充反应空间
- [0522] b) 当减小反应空间进行检测时扣除多余的液体
- [0523] 此处使用了下面的参考号数 :
- [0524] 1 反应室
- [0525] 2 密封垫
- [0526] 3 压力机件
- [0527] 4 流体界面
- [0528] 4.1 扣除套管
- [0529] 4.2 进料套管
- [0530] 图 28 :
- [0531] 实施例 4 中处理和检测本发明的反应仓的装置。此处使用了下面的参考号数 :
- [0532] 1 反应仓
- [0533] 1.1 带有微阵列的反应室
- [0534] 1.2 流体系统界面
- [0535] 1.3 室体的密封垫
- [0536] 1.4 用于加热系统,也可任选用于温度传感器的电气连接
- [0537] 1.5 芯片
- [0538] 1.6 用于实现优选位置和引导套管的位置保证系统
- [0539] 1.7 套管
- [0540] 2 压力机件
- [0541] 3 鉴定系统,例如条形码或数据矩阵
- [0542] 3.1 鉴定光学元件,例如条形码或数据矩阵读取器
- [0543] 4 检测光学元件
- [0544] 5 流体连接管

- [0545] 图 29 :
- [0546] 实施例 5 中的反应仓。
- [0547] 图 30 :
- [0548] 用热成像像机在 95°C 的温度下记录的实施例 5 中的反应仓的记录。
- [0549] 图 31 :
- [0550] 通过琼脂糖凝胶电泳对实施例 5 中的反应产物的分析。其中参考号码表示 :
- [0551] 1,5 :来自热循环仪的阳性对照
- [0552] 2-4 :来自仓的反应产物
- [0553] 6 :100bp 标准。

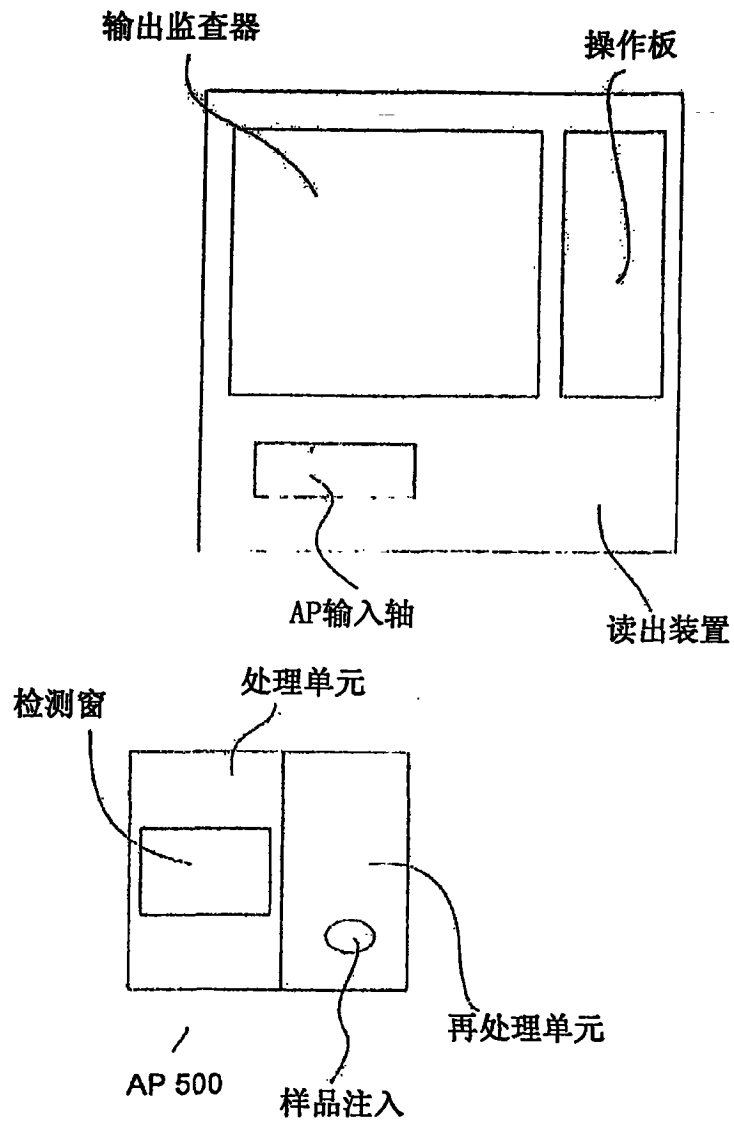


图 1

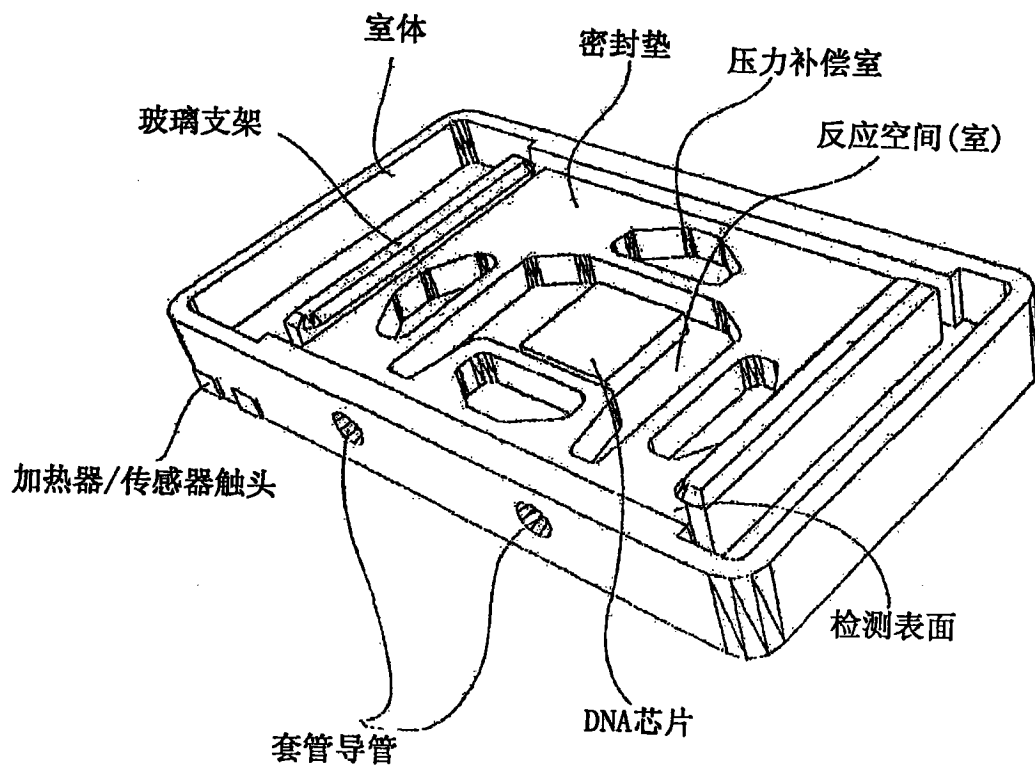


图 2

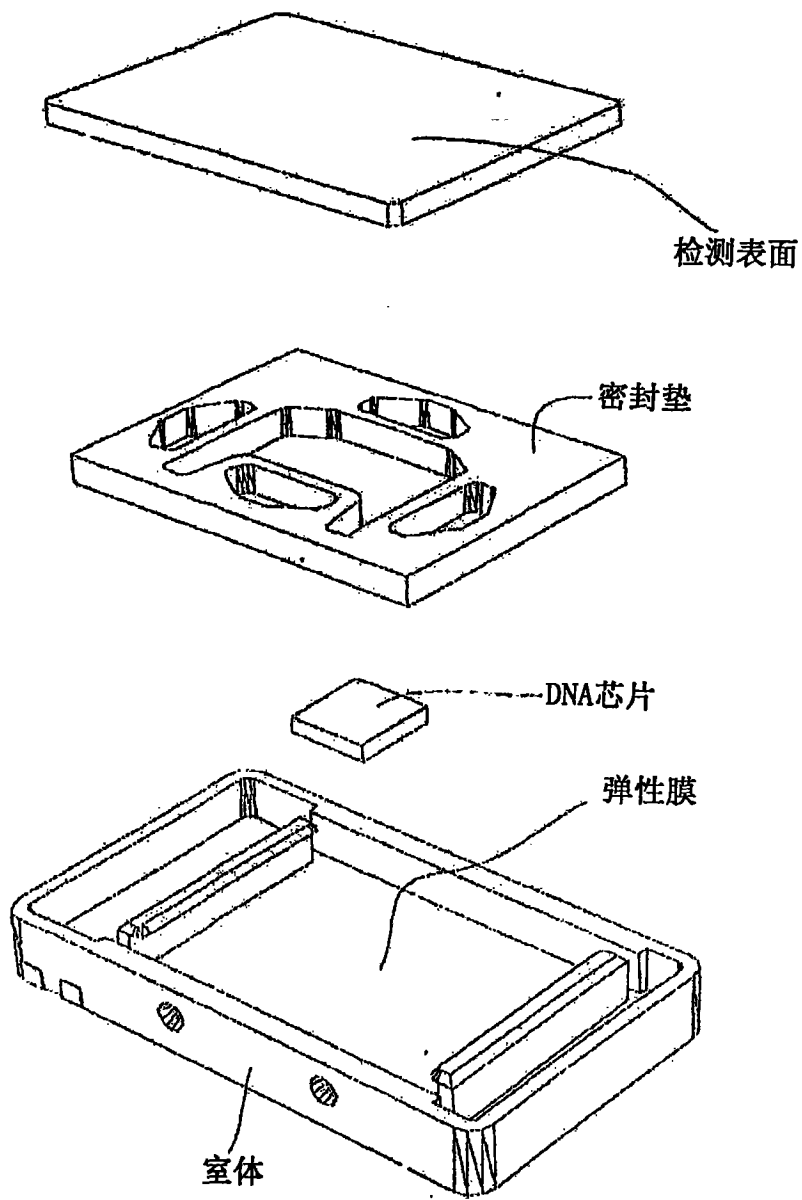


图 3

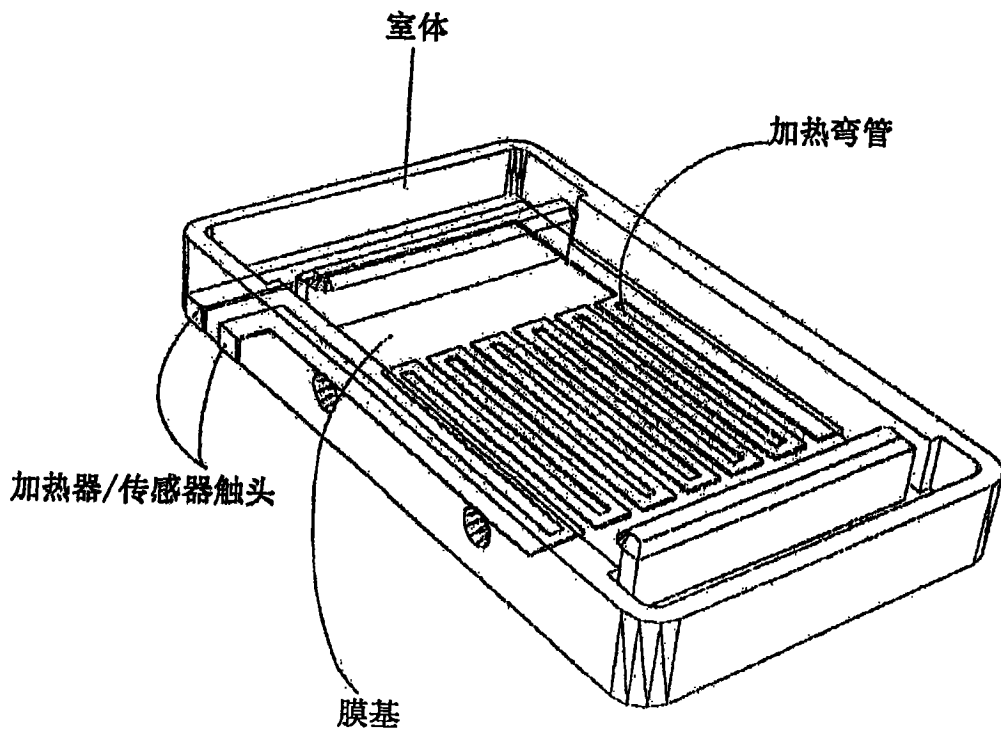


图 4

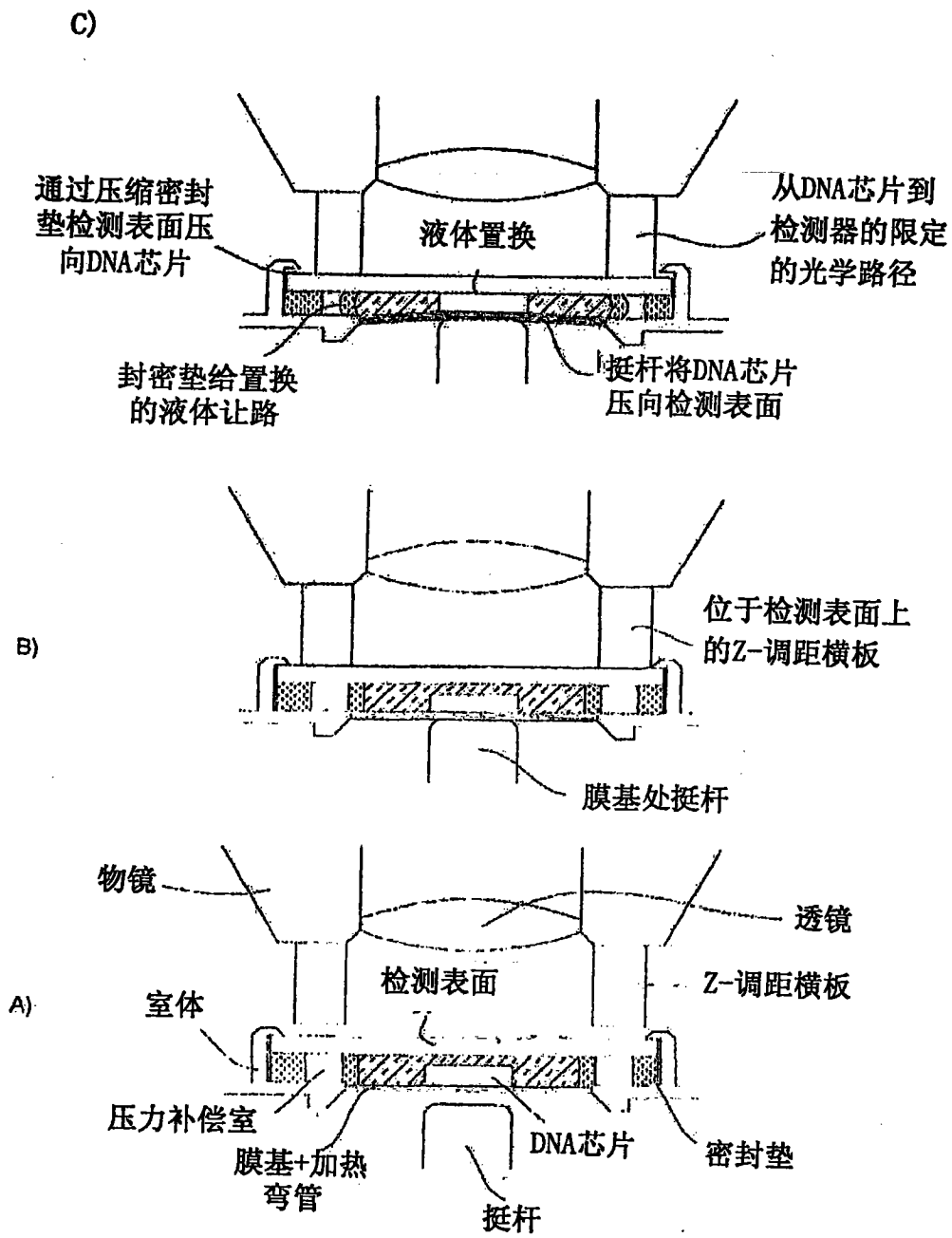


图 5

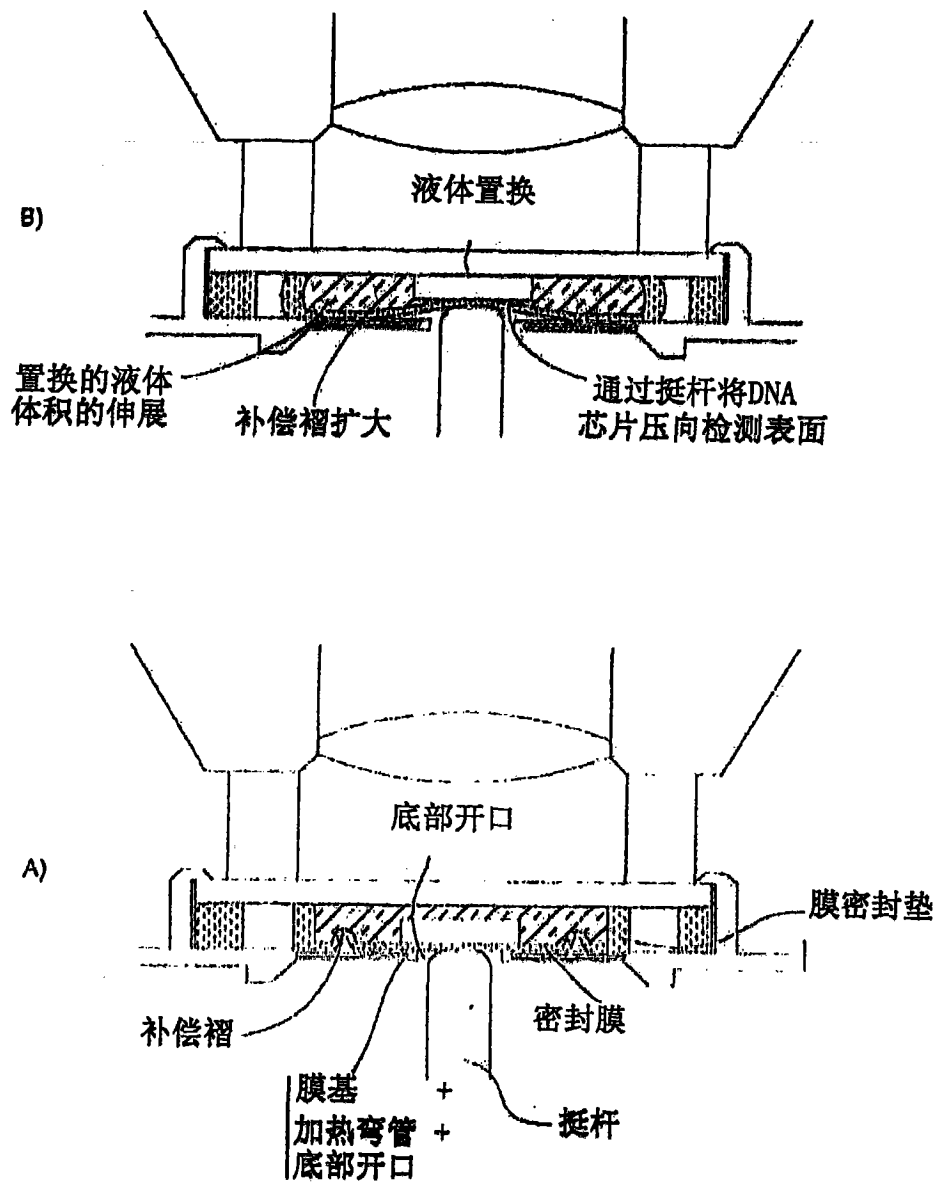


图 6



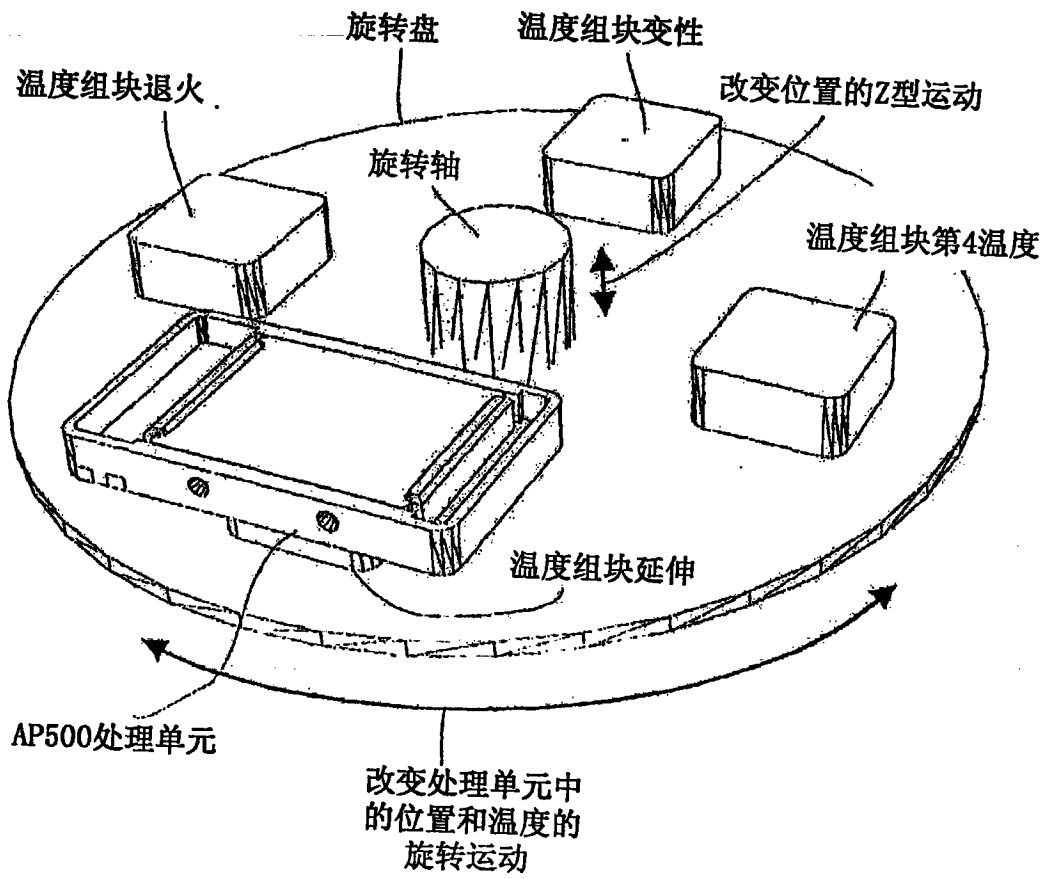


图 7

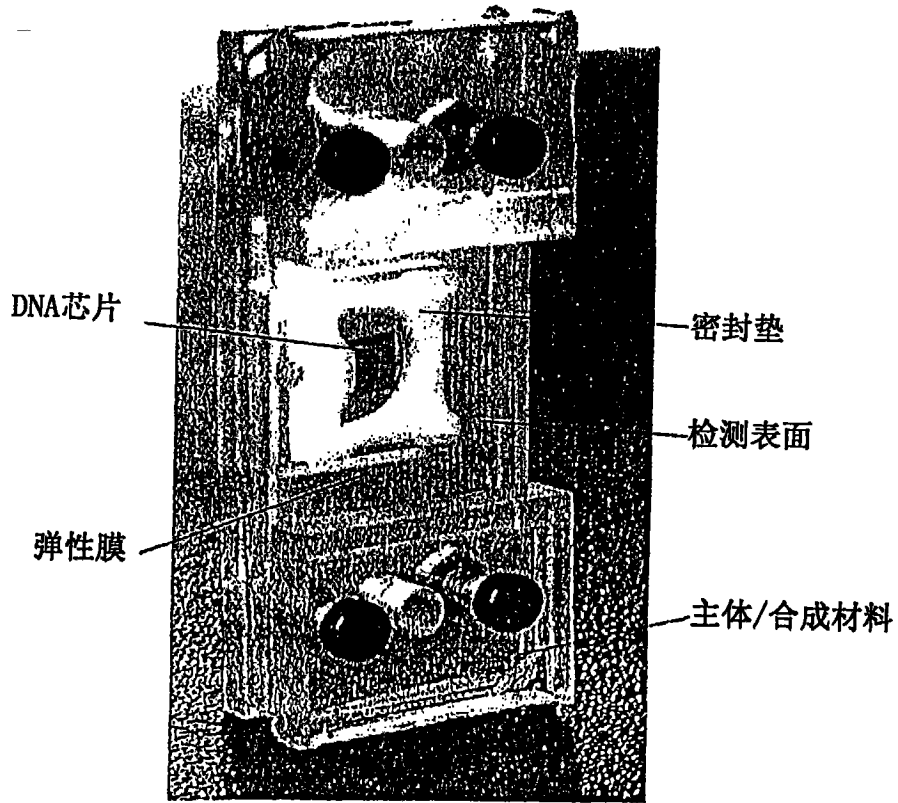


图 8

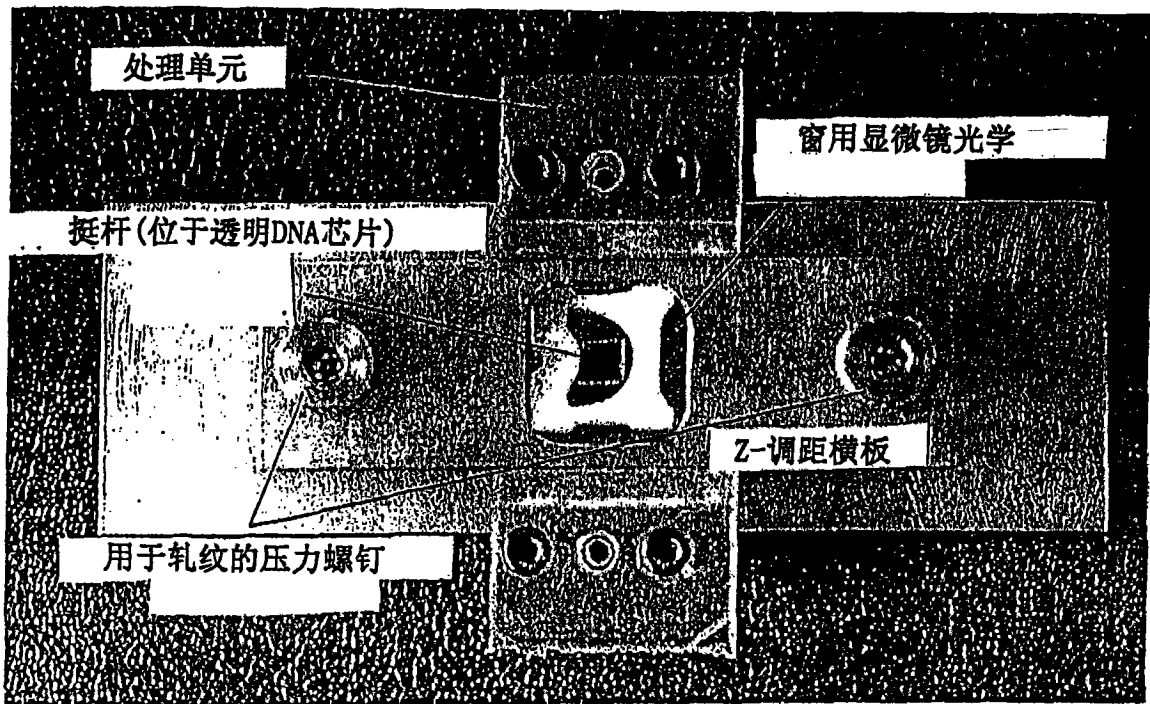


图 9

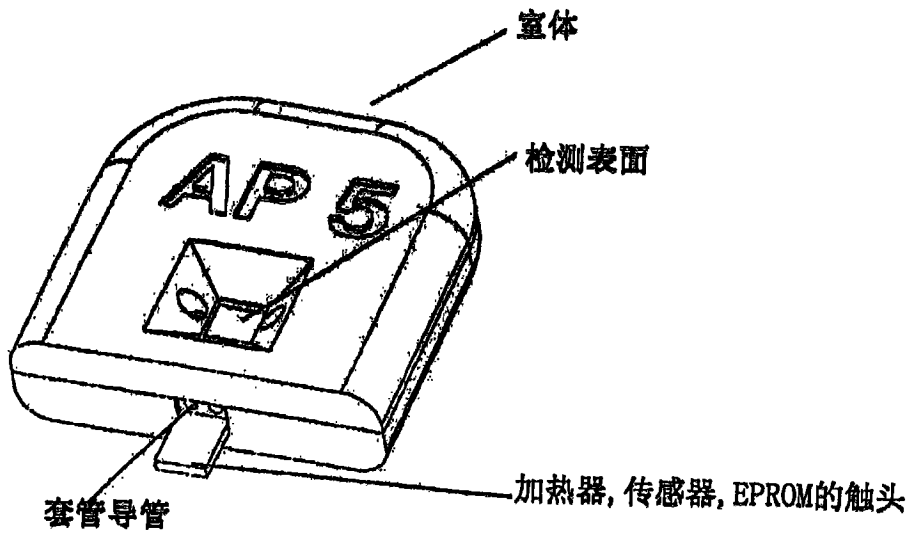


图 10

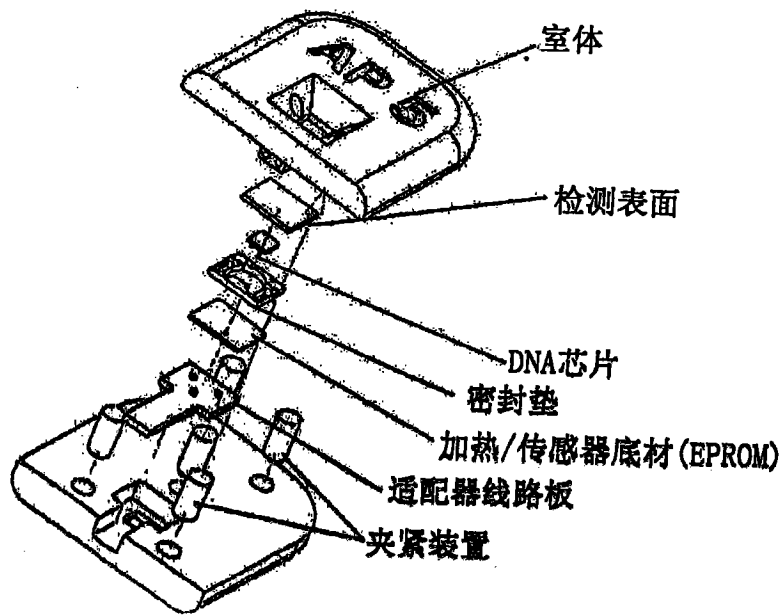


图 11

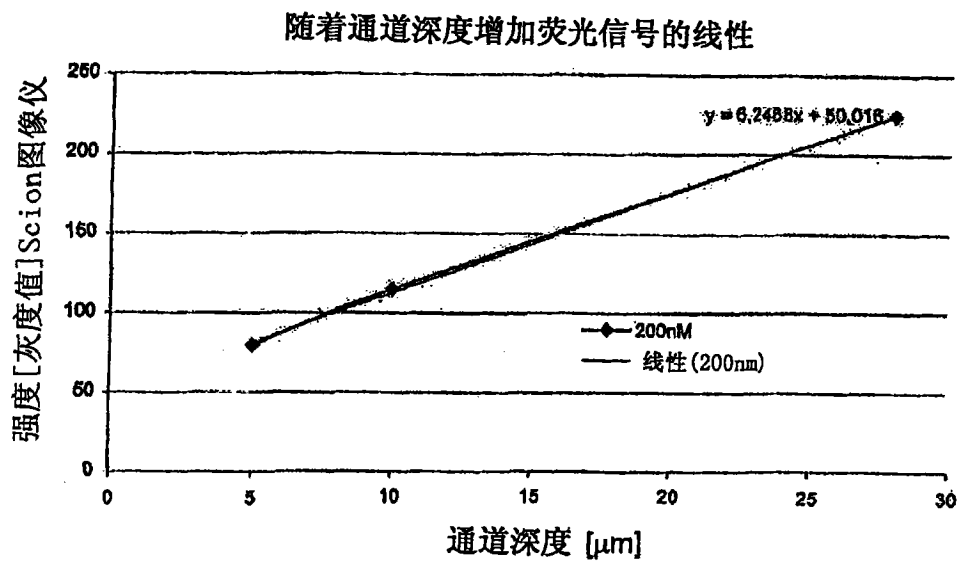


图 12

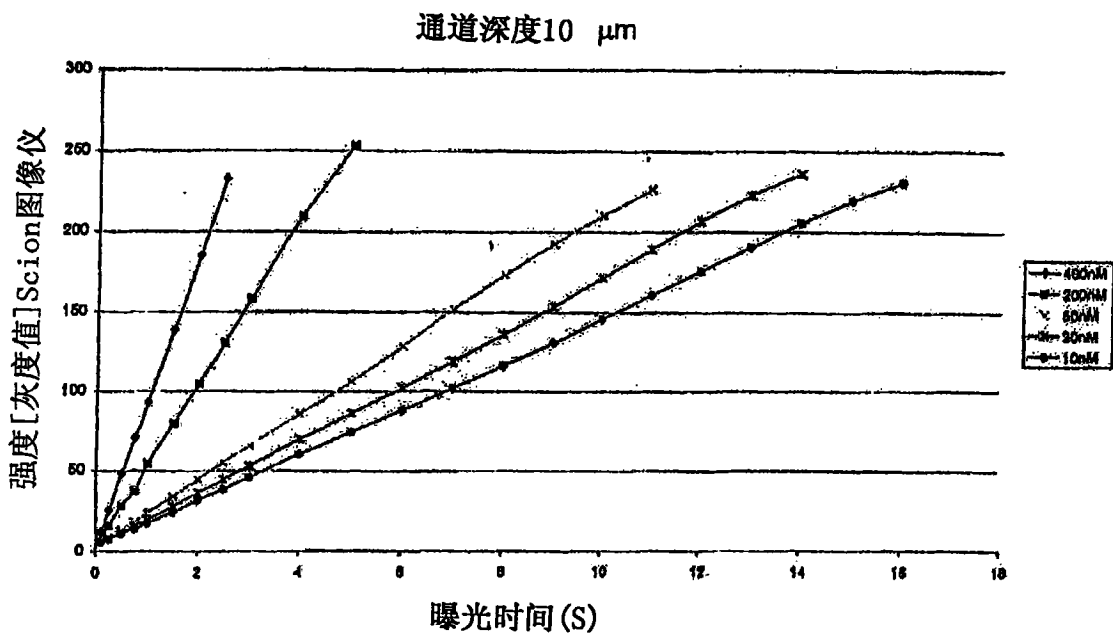


图 13

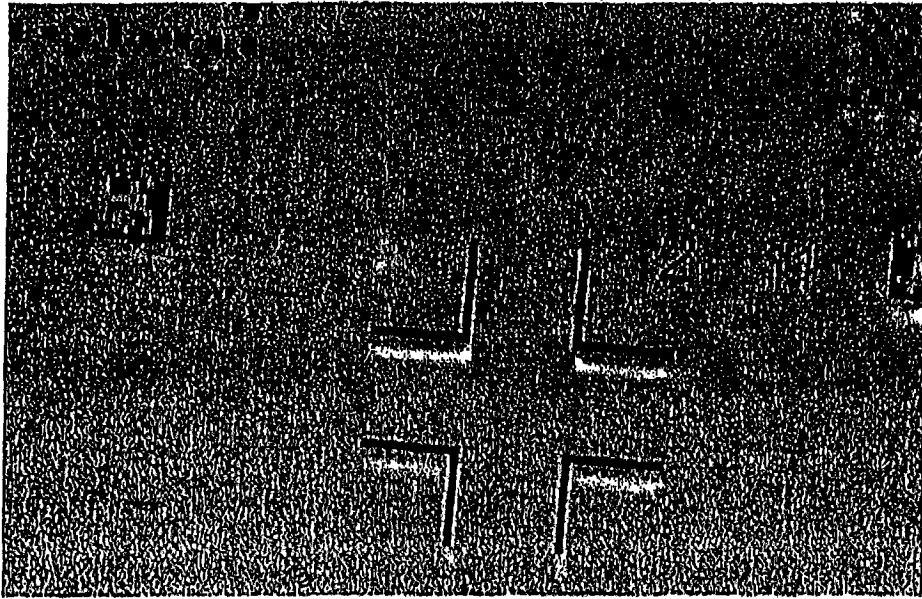


图 14

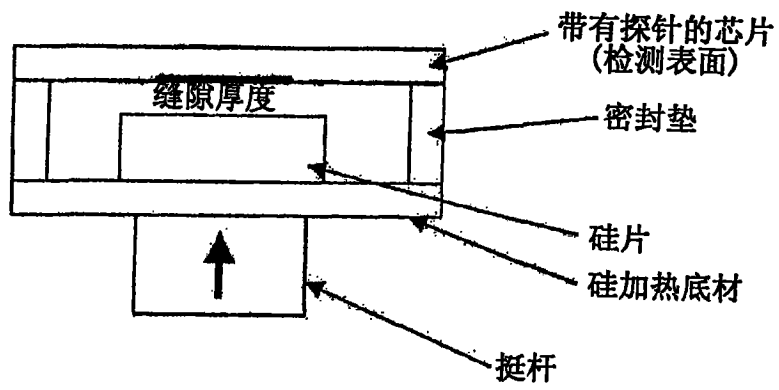


图 15

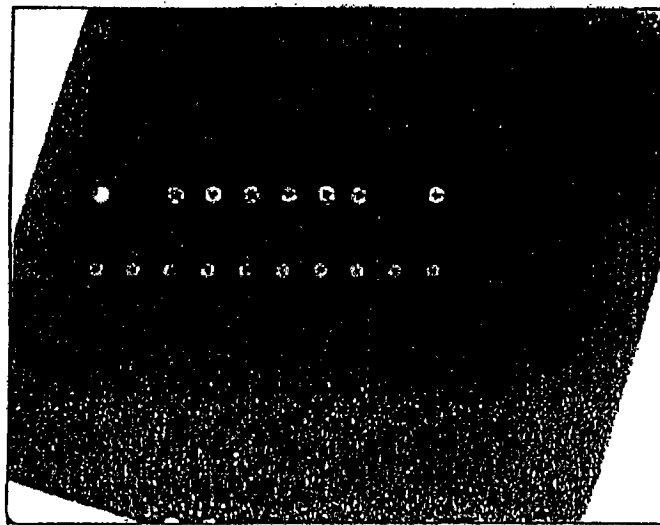


图 16

对于背景和用杂交溶液1的点, 不同缝隙厚度的灰度值的变化

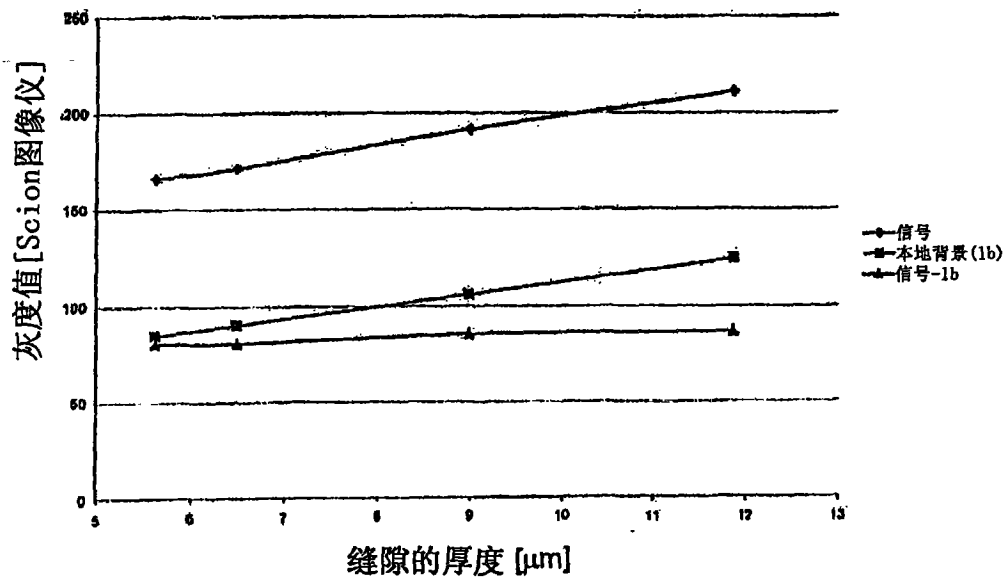


图 17

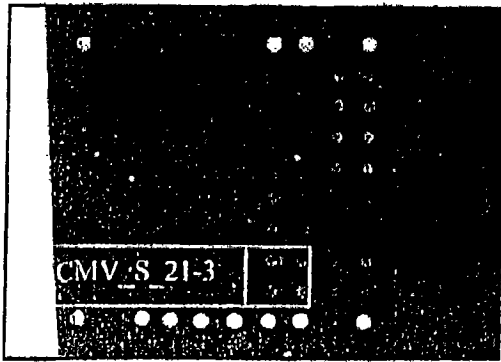


图 18

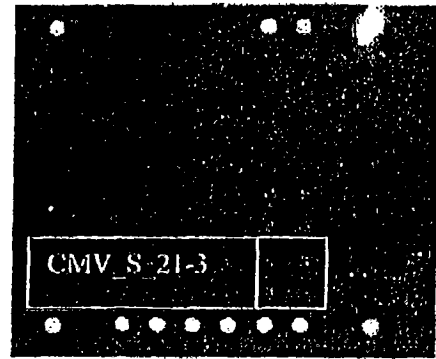


图 19

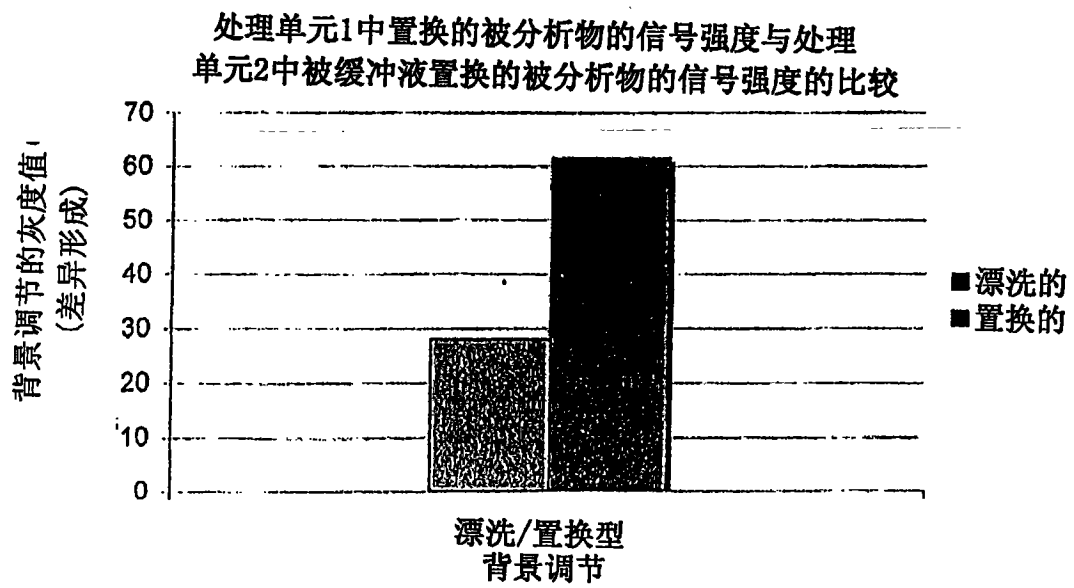
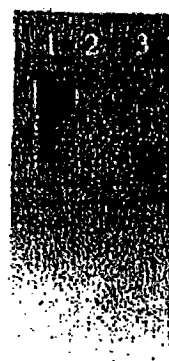


图 20



- (1) 标准DNA梯
- (2) 测试反应器1
- (3) 测试反应器2

图 21

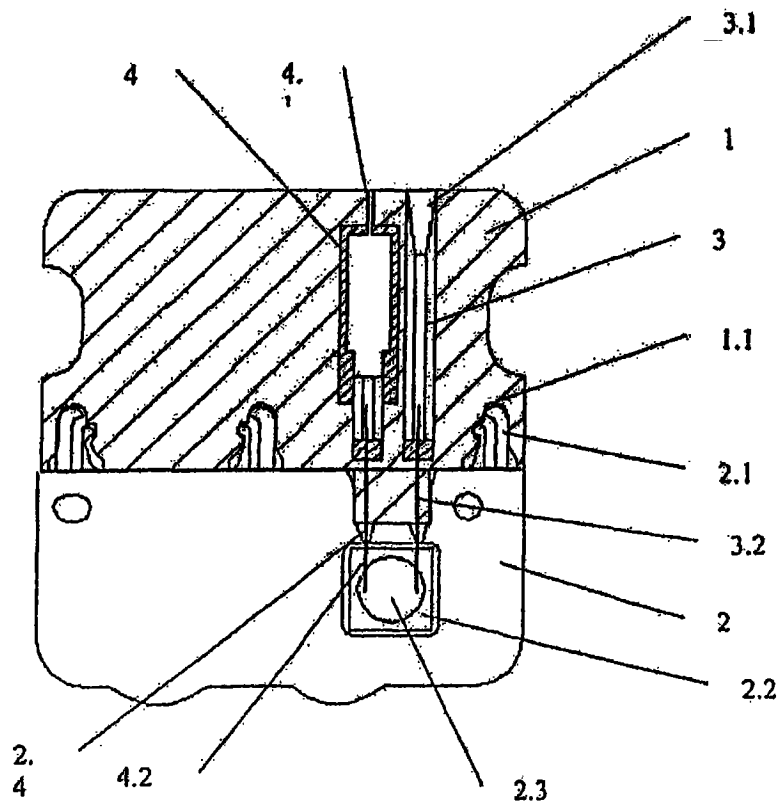


图 22



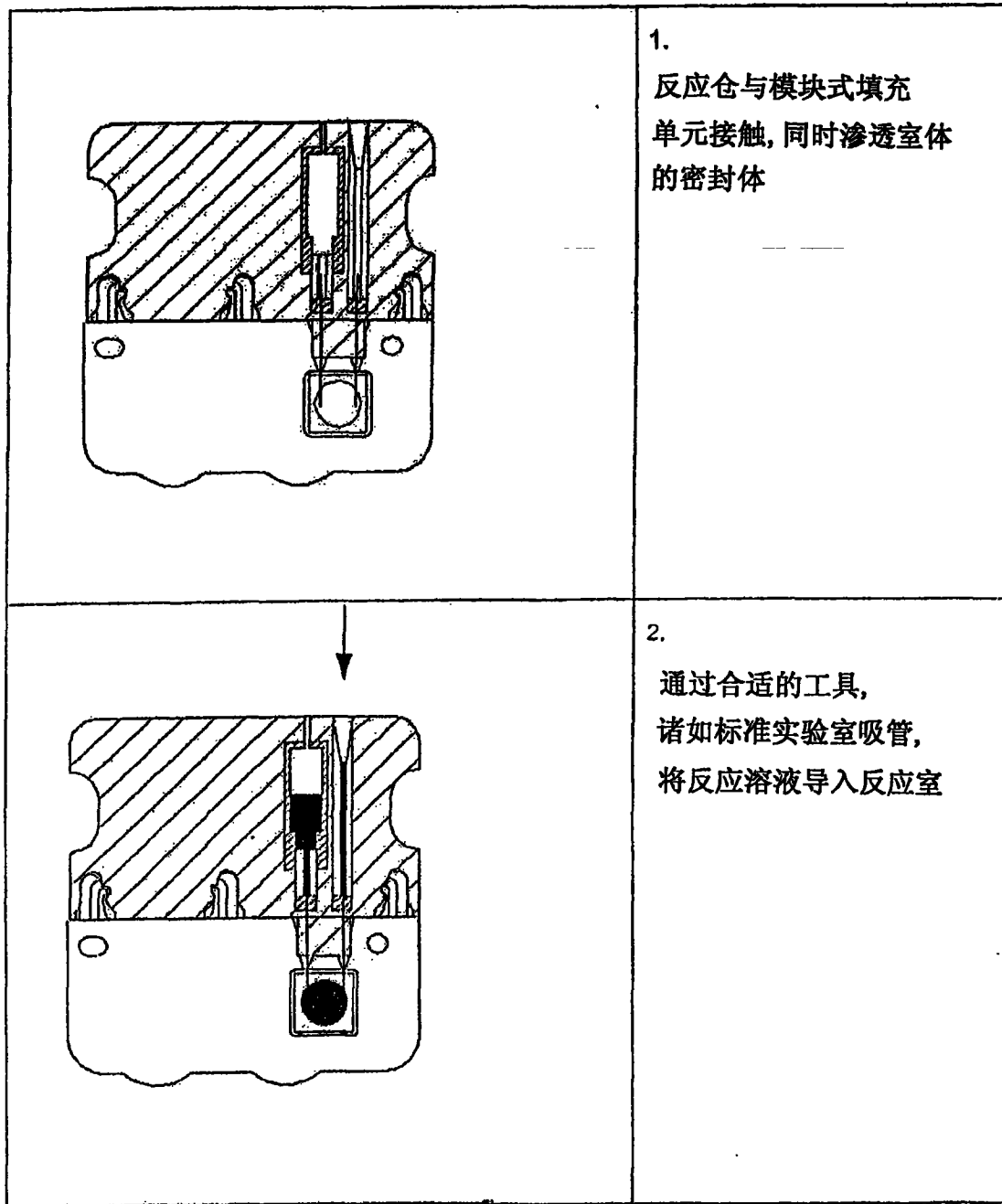


图 23a

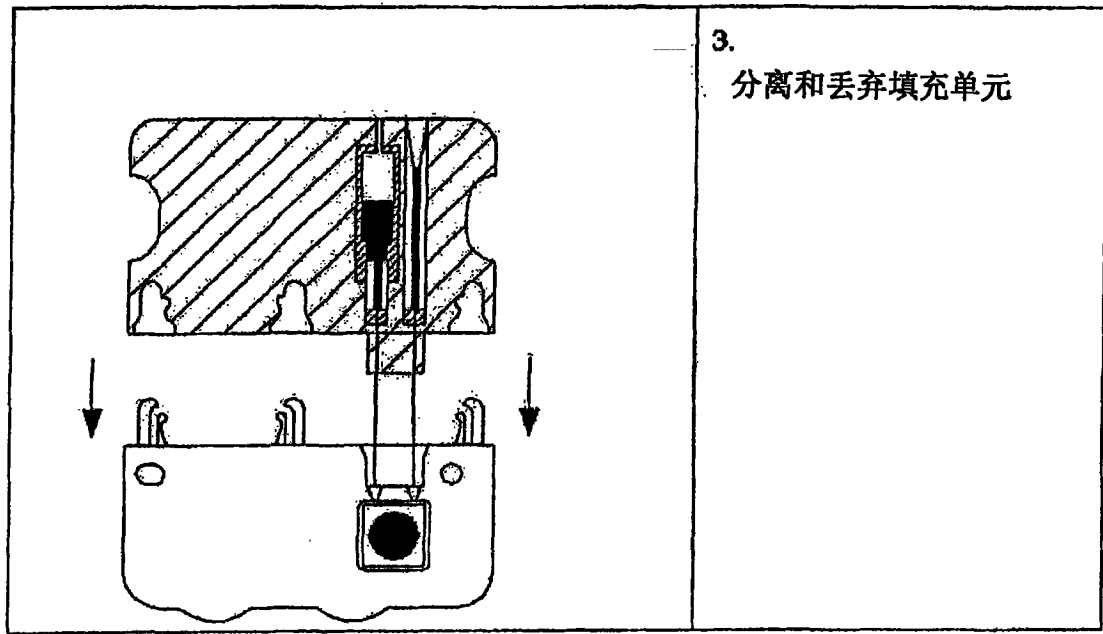


图 23b

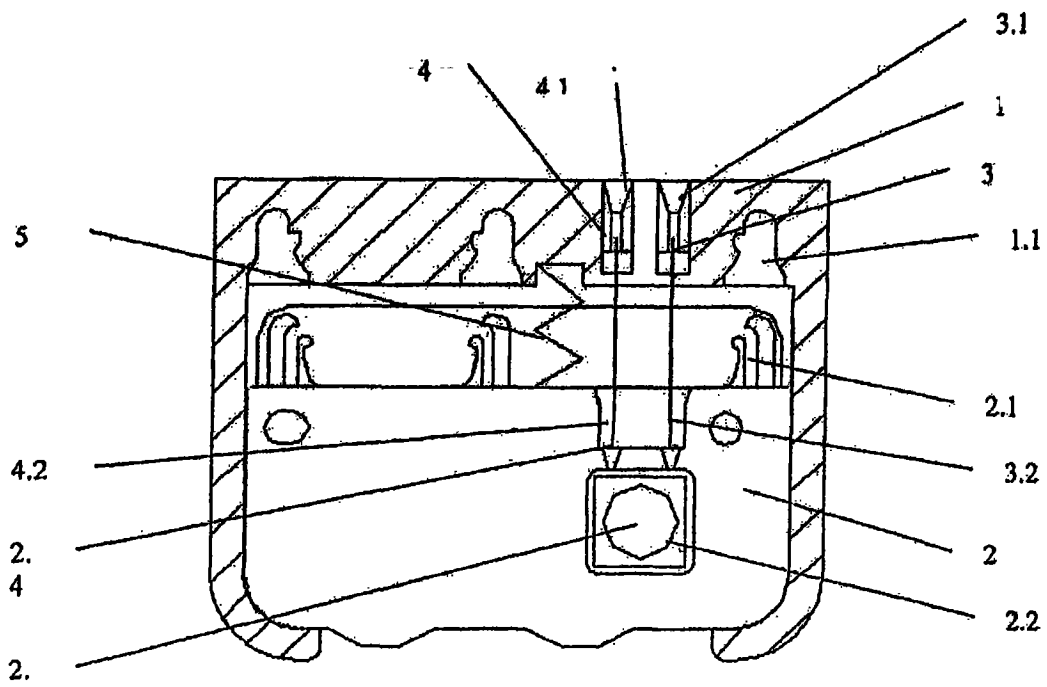


图 24

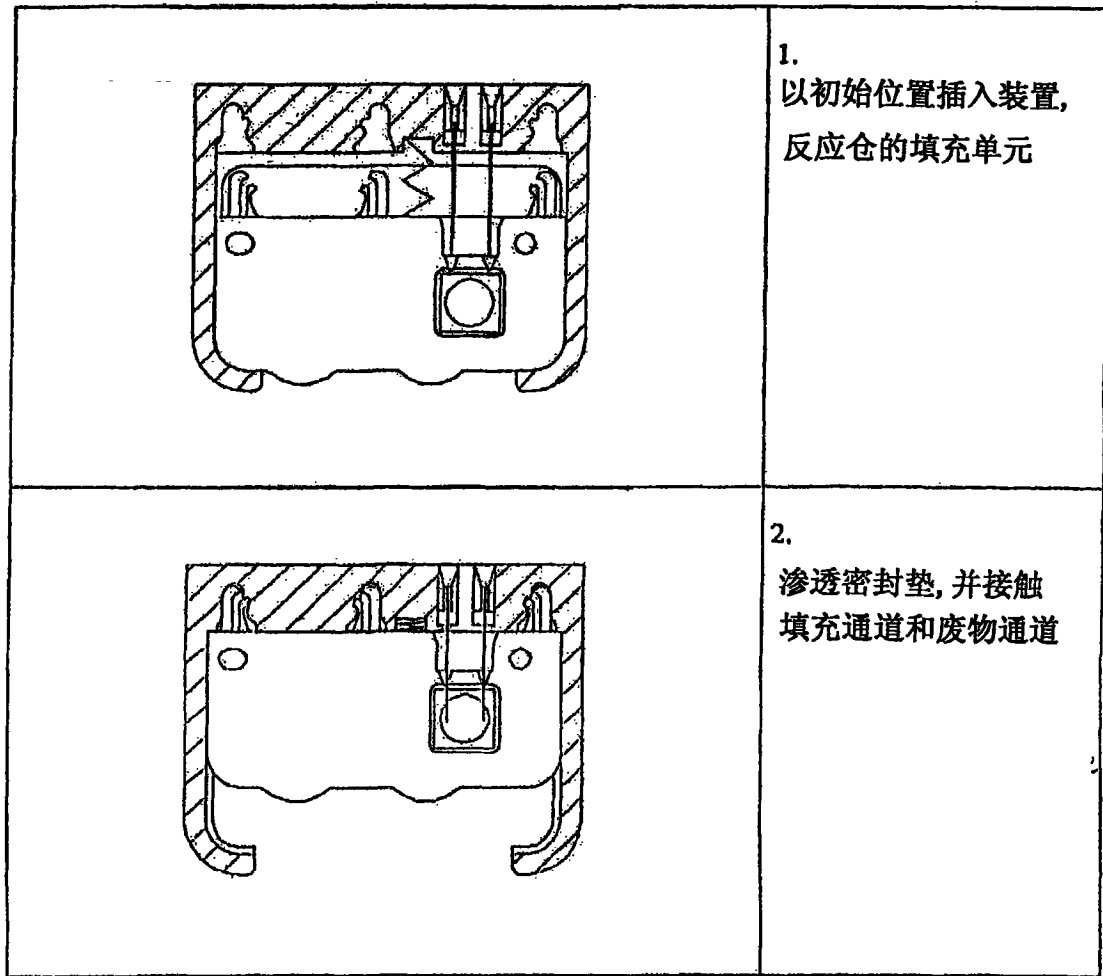


图 25a

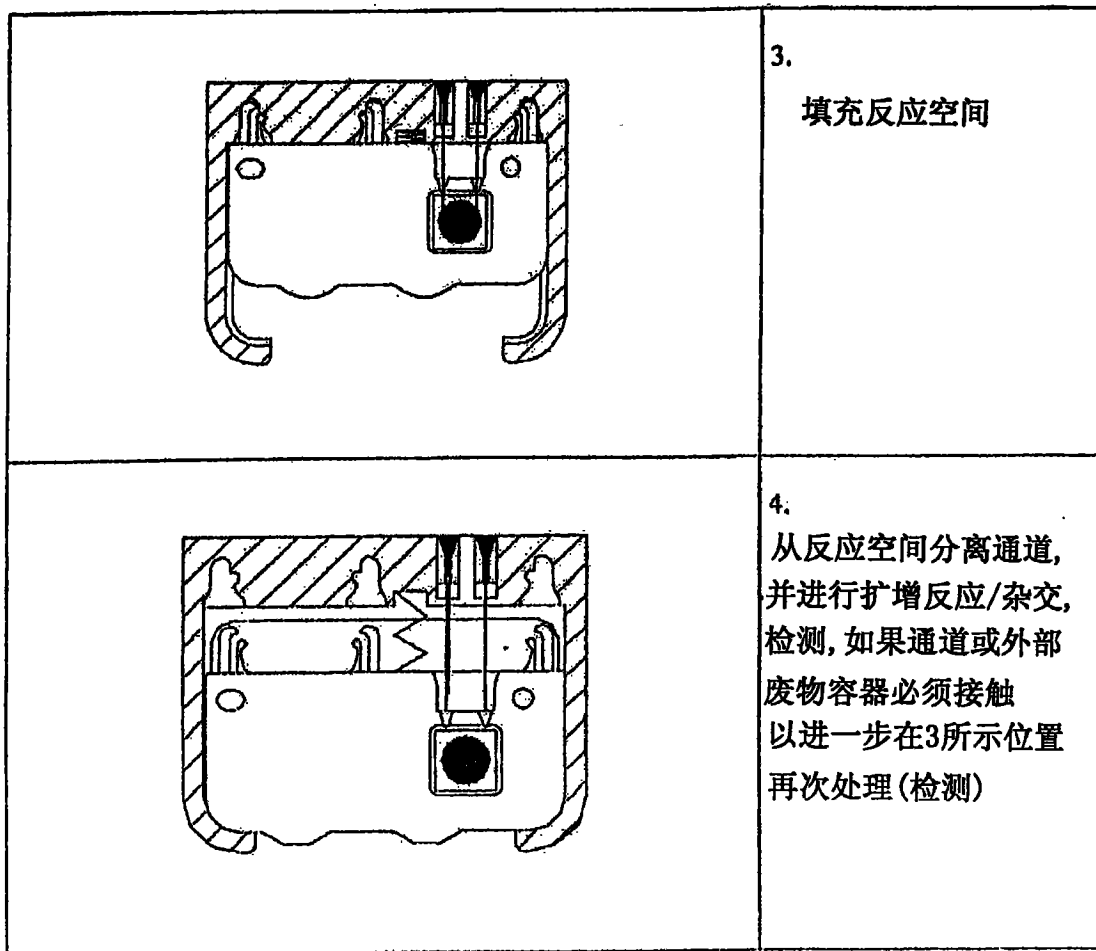


图 25b

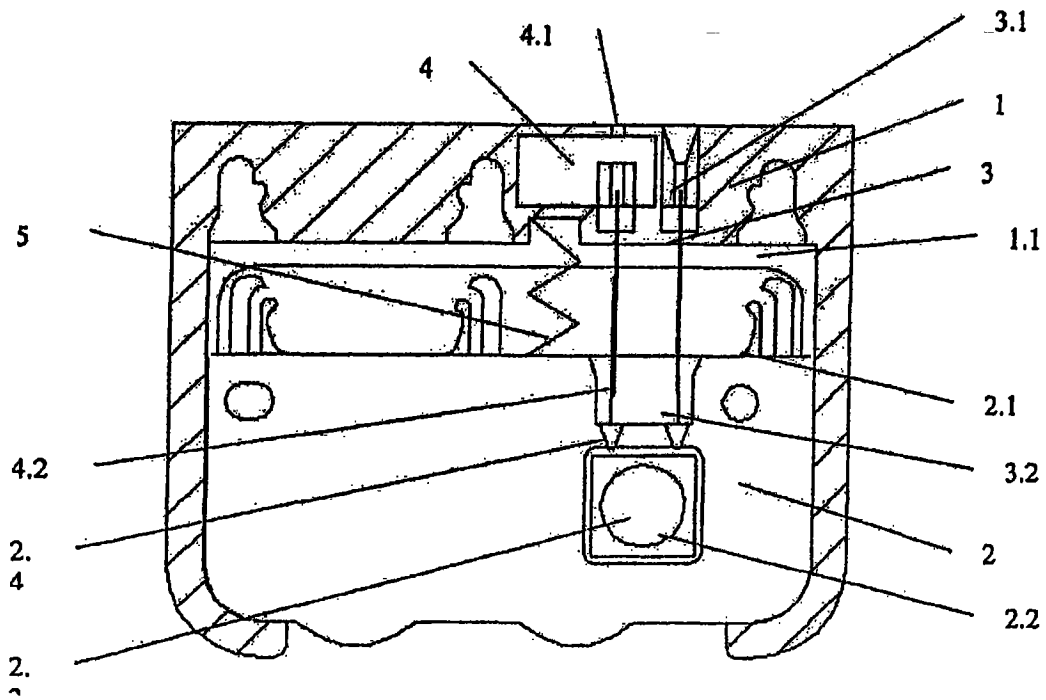


图 26

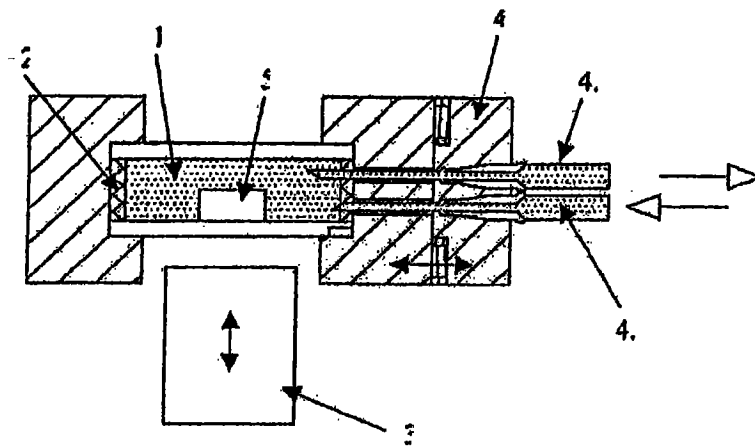


图 27a

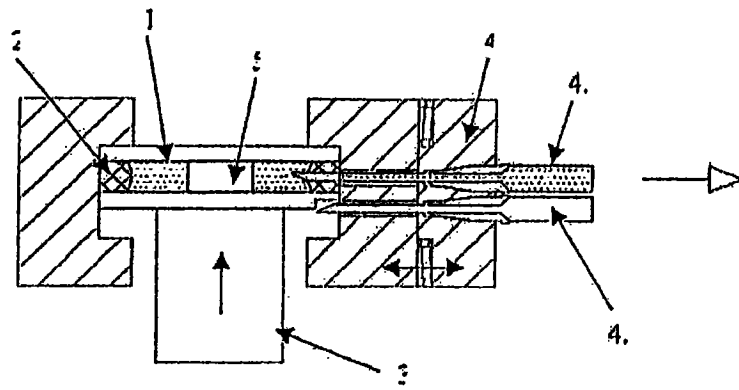


图 27b

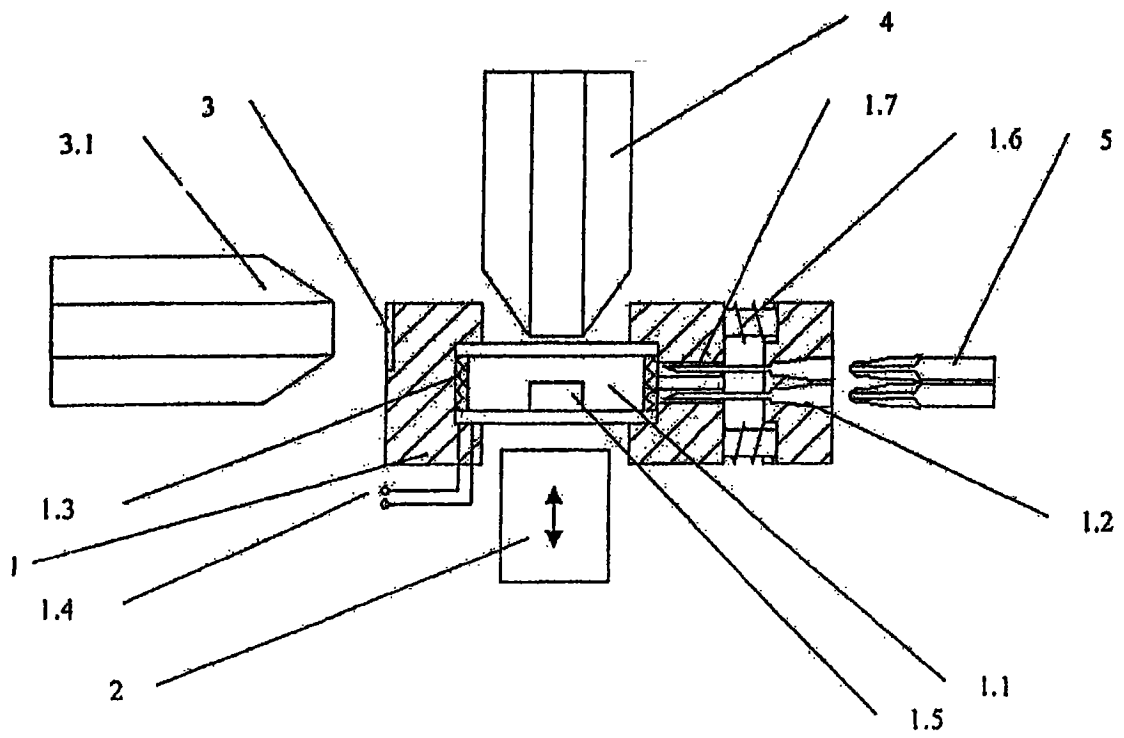


图 28

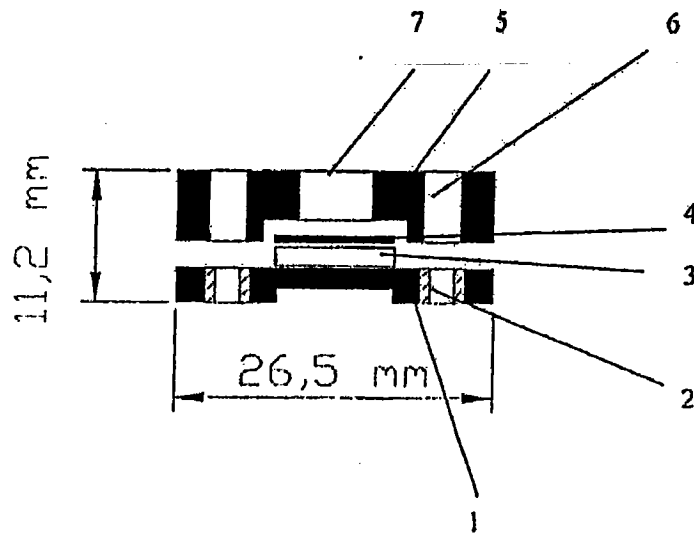


图 29

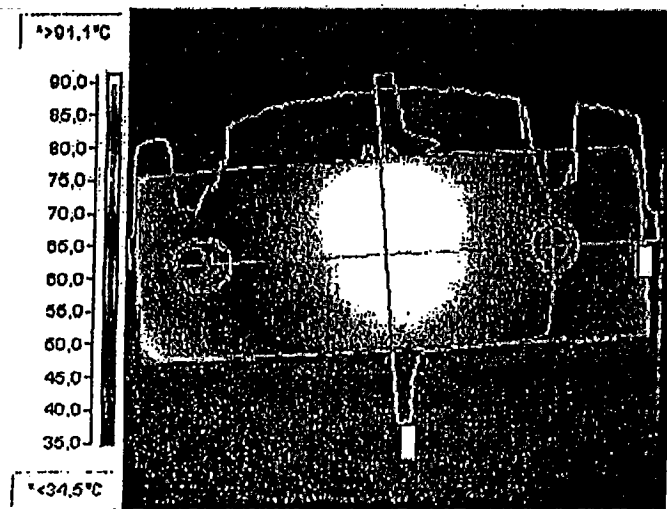


图 30

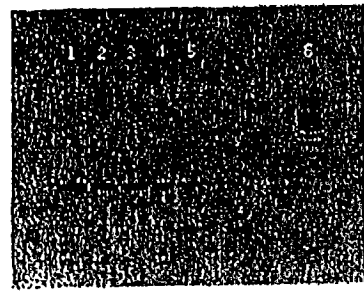


图 31