



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102762746 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

(21) 申请号 201180007918. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 02. 15

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/338, 676 2010. 02. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/024882 2011. 02. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02011/106198 EN 2011. 09. 01

(71) 申请人 克里斯托弗·戈登·阿特伍德

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 克里斯托弗·戈登·阿特伍德

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

11243

代理人 金鲜英 冯云

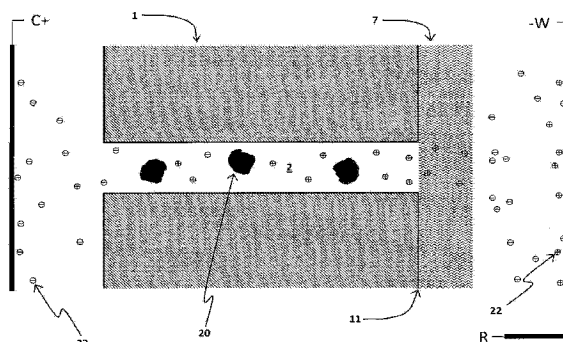
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 47 页

(54) 发明名称

检测生物相关分子及其相互作用性质的方法

(57) 摘要

用于检测生物相关分子的方法,其包括:将所述分子集中到化学惰性片材料中的显微的孔内;限制所述孔的开口;并且测量流过所述孔的电流或所述孔的开口附近的荧光。随着所述分子扩散到所述孔外,所述电流或荧光将发生改变;提供扩散速率的测量值,从而检测所述分子的存在以及所述分子的性质。对于相互作用的分子而言,所述扩散速率将慢于不相相互作用的分子的扩散速率,从而得出对所述分子的相互作用的确定。盖上所有孔,插入到质谱仪中,允许对所述分子进行鉴定。



1. 一种用于检测分析物微粒的存在、性质及相互作用的方法,其包括:

- 提供具有多个通孔的片材料构成的薄片,所述通孔具有基本上相近的直径;
- 在所述材料的至少一个面上,限制所述孔的开口;
- 将分析物微粒插入到所述孔的子群中;
- 施加电场,贯通含有所述分析物微粒的所述通孔;
- 测量电流随时间的变化,所述变化指示出所述分析物微粒的扩散速率;并且

其中,所述分析物微粒的所述扩散速率提供了对所述分析物微粒的存在、性质及相互作用的测量。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述片材料包括具有选自以下所组成的组中的性质的材料:基本上电绝缘;基本上化学惰性;厚度在500nm至1000000nm的范围内;厚度在1nm至10cm的范围内;所述通孔的直径为10nm至5000nm;所述通孔的直径为1nm至1cm;所述通孔具有化学衍生的内表面;具有化学衍生的外表面;所述通孔由凝胶填充。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述片材料选自由下列所组成的组中:聚碳酸酯;径迹蚀刻的聚碳酸酯;制有多个孔的聚合物;化学蚀刻有多个孔的聚合物;制有多个孔的玻璃;化学蚀刻有多个孔的玻璃;有孔的聚合物薄膜;有孔的单层薄膜;有孔的多层薄膜。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括利用与所述片材料的表面接触的凝胶层,来限制所述孔的开口。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述凝胶选自由下列所组成的组中:明胶;琼脂糖;聚丙烯酰胺;聚丙烯酸酯;渗透性聚合物;渗透性共聚物;淀粉;气凝胶;火棉胶;透析膜;与所述分析物微粒基质不混溶的液体;以上所列任一种材料的化学改性形式;嵌入有微粒的以上所列任一种材料;及它们的组合。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括:使用基本上球状体限制所述孔的开口,所述基本上球状体具有足够大的直径以导致基本上限制通过所述通孔的液体流;通过选自由下列所组成的组中的方式,使所述基本上球状体保持在基本上固定的位置上:施加电场;施加磁场梯度;施加重力场;施加向心力;施加离心力;施加动水压;施加静水压;化学键;以及使用凝胶基质。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述方法进一步包括从所述凝胶基质上移除所述球状体。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法包括使用安培计来测量所述电流,所述安培计能够以对于被测的扩散速率足够大的速率,测量通过所述薄片的选定区域的电流。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述选定区域是由选自由下列所组成的组中的方式来选定:绝缘管,所述绝缘管的一端与所述片材料物理接触;具有孔的绝缘片,所述绝缘片应用于所述片材料的表面;以及绝缘的、与水不混溶的液体,所述液体应用于所述片材料的表面。

10. 一种用于检测分析物微粒的存在、性质及相互作用的方法,其包括:

- 提供具有多个通孔的片材料,所述通孔具有基本上相近的直径;
- 在所述材料的至少一个面上,限制所述孔的开口;
- 将分析物微粒插入到所述孔的子群中;

- d. 传递迁移力,轴向上贯通含有所述分析物微粒的所述通孔;
- e. 测量荧光随时间的变化,所述变化指示出所述分析物微粒的扩散速率;并且

其中,通过所述分析物微粒的所述扩散速率提供了对所述分析物微粒的存在、性质及相互作用的测量。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述片材料包括具有选自以下所组成的组中的性质的材料:基本上电绝缘;基本上化学惰性;厚度在 500nm 至 1000000nm 的范围内;厚度在 1nm 至 10cm 的范围内;所述通孔的直径为 10nm 至 5000nm;所述通孔的直径为 1nm 至 1cm;所述通孔具有化学衍生的内表面;具有化学衍生的外表面;所述通孔由凝胶填充。

12. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述片材料选自由下列所组成的组中:聚碳酸酯;径迹蚀刻的聚碳酸酯;制有多个孔的聚合物;化学蚀刻有多个孔的聚合物;制有多个孔的玻璃;化学蚀刻有多个孔的玻璃;有孔的聚合物薄膜;有孔的单层薄膜;有孔的多层薄膜。

13. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述方法包括利用与所述片材料的表面接触的凝胶层,来限制所述孔的开口。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中,所述凝胶选自由下列所组成的组中:明胶;琼脂糖;聚丙烯酰胺;聚丙烯酸酯;渗透性聚合物;渗透性共聚物;淀粉;气凝胶;火棉胶;透析膜;与所述分析物微粒基质不混溶的液体;以上所列任一种材料的化学改性形式;嵌入有微粒的以上所列任一种材料;及它们的组合。

15. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述方法包括:使用球状体限制所述孔的开口,所述球状体具有足够大的直径以导致基本上限制通过所述通孔的液体流;通过选自由下列所组成的组中的方式,使所述球状体保持在应保持的位置上:施加电场;施加磁场梯度;施加重力场;施加向心力;施加离心力;施加动水压;施加静水压;化学键;以及使用凝胶基质。

16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述方法进一步包括从所述凝胶基质上移除所述球状体。

17. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述迁移力选自由下列所组成的组中:由电场产生的力;由磁场梯度产生的力;由重力场产生的力;向心力;离心力;由动水压产生的力;由静水压产生的力;及它们的组合。

18. 根据权利要求 10 所述的方法,其中,所述荧光由测光系统测得,所述测光系统能够以对于被测的扩散速率足够大的速率,测量所述薄片的选定区域的荧光。

19. 一种用于鉴定分析物微粒的方法,其包括:

- a. 提供具有多个通孔的片材料,所述通孔具有基本上相近的直径;
- b. 在所述材料的至少一个面上,限制所述孔的开口;
- c. 将分析物微粒插入到所述孔的子群中;
- d. 基本上关闭所述孔的开口;
- e. 将所述片材料插入到质谱仪中;
- f. 烧蚀所述片材料的选定区域;
- g. 使烧蚀所得的产物离子化;
- h. 测量所得离子的质荷比;并且

其中,所述质荷比提供用于鉴定所述分析物微粒的方式。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中,所述方法包括通过将球状体压进所述孔的入口的入口,以致基本上关闭所述开口,从而限制所述孔的开口。

检测生物相关分子及其相互作用性质的方法

[0001] 发明人:克里斯托弗·戈登·阿特伍德(Christopher Gordon ATWOOD)相关申请的交叉引用

[0002] 本申请按照美国专利法 35U. S. C. 的部分 119 (e)要求 2010 年 02 月 23 日所提交的美国临时专利申请第 61/338676 的权益,该临时申请以引用的方式整体并入本文中。

[0003] 发明背景

1. 技术领域

[0004] 本发明涉及用于检测分析物微粒、并在复杂介质中确定其相互作用性质的方法。更具体地,本发明涉及扩散免疫测定及其功能等同物。

[0005] 2. 相关背景技术描述

[0006] 生物相关分子例如蛋白质和核酸,是与生物系统广泛相关的,这些生物相关分子形成复杂的相互作用网络,从而完成相应的任务,例如细胞复制、新陈代谢、自身调节、细胞间信号传导(intercellular signaling),以及免疫响应。疾病使这些网络发生畸变,对于疾病的早期检测和利用药物治疗对畸变进行的化学修复而言,理解这些畸变是最基本的。存在很多鉴定和表征这些大分子以获得对相互作用网络理解的现有技术,但是这些技术的每一个都受到特定的限制。这些技术用于核酸(例如 DNA)已经广泛成功,归因于核酸的分析上的有利性质,但是蛋白质则在物理和化学上都是多变的。这种就是由须集中在较窄范围内的分析技术导致的,而较宽范围的技术更有利于表征复杂的蛋白质网络。而且,蛋白质即使在检测不到的浓度下也具有显著的功能,不能够像核酸那样容易地进行扩增,因此具有较高固有敏感度的技术的必需的。

[0007] 遗传学方法

[0008] 蛋白质的相互作用可以通过经典遗传学研究。将不同的变异结合到相同的细胞或有机体中,然后观察所得的表现型。这能够保证蛋白质的相互作用发生于接近其理想的原位环境(native environment)。不幸的是,所述方法只能用于小组的蛋白质,不能用于探究整个蛋白质组。进一步地,与基因变异有关的许多原因都能导致表现型的变化,因此实验结果所显示的蛋白质相互作用需要在生化水平上进行证实。

[0009] 生物信息学方法

[0010] 蛋白质的相互作用可以通过使用蛋白质功能注释(Functional annotation)的比较基因组学来研究。目前,存在三种主要的技术。第一种技术称为域融合(Domain Fusion)或罗赛塔石碑软件(Rosetta Stone),该技术假设蛋白质域结构上和功能上独立的单元,该单元作为离散的多肽发挥作用。第二种技术是基于细菌基因的操纵子组织,其中所述基因通常功能相关,即使它们实际的序列是不同的。第三种技术使用系统发育学数据,充分利用特定功能所涉及的基因的进化保育(evolutionary conservation)。不幸的是,这种生物信息学方法需要完整的基因组序列,并且一般地被限制为操纵子已经充分鉴定的细菌或其它有机体。另外,得到的结果并不能为特定蛋白质相互作用提供有力的证据,需要在生化水平上进行证实。

[0011] 基于亲和力的方法

[0012] 蛋白质的相互作用可以在生化水平上通过直接测定蛋白质与待选的相互作用对象之间的亲和力进行研究,例如在免疫测定中进行研究。蛋白质固定在静止相或平板玻璃的表面,用有潜力的互补配体浸没该固定的蛋白质。通过化学连接到配体上的荧光或放射探针随后显像来对结合(Binding)进行指示。不幸的是,固定操作严重地限制了蛋白质的功能。一种相关技术中,对蛋白质本身进行化学标记,然后使之浸没包覆有被固定的配体的表面。然而,这种操作经受这样的事实,不能以相同的效率对蛋白质进行均一标记,并且标记的化学连接会干扰蛋白质相互作用的范围。另外,标记的连接会给蛋白质溶解度带来不利影响,而且荧光探针可能由于连接而淬灭。还可以通过电化学电流测定法(例如美国专利 US 7, 297, 312)进行检测,但是仍然存在缺陷。

[0013] 扩散免疫测定中使用在毛细管通道中的一对相邻的液体流体(例如美国专利 US 6, 541, 213, US 7, 271, 007, US 7, 306, 672, US 7, 060, 446, US7, 704, 322 和美国专利申请 US 2010/0263732, US 2008/0182273, US 2003/0096310, US2009/0053732 和 US 2003/0234356),或其功能等价物,其中两个液体中的组分之间在流体界面处的相互作用会导致扩散性质的变化,从而影响液体界面附近的浓度数据。对浓度数据的检测可以提供相互作用的信息。这避免了与稳定相相关的难题。但是仍然优选使用标记法,并且每个样品只有一种测量值是实用的(即,是不可循环的(non-cyclable))。使用多价的反应物(例如 US 7, 550, 267)允许以差异较大的扩散系数使用组分,但是仍存在标记法和不可循环所导致的缺陷。使用多孔性膜的相关设备(例如 US 5, 212, 065)也具有同样的缺点。在一列电化学传感器上使用薄聚合物层(例如 US7, 144, 553),能够利用充满聚合物的时间延迟来确定扩散性质。但是不能将分析物集中到狭窄的孔中(从而加强敏感性),并且也难以控制分析物随着液体流循环接近和远离传感器。可以通过光学追踪一个分析物系统来测量扩散(例如 US 2008/0145856),但是这样做的缺点是优选使用标记技术。也可以通过检测水凝胶中的穿透深度来测量扩散(例如 US 2008/0145856),但是这样做的缺点是优选使用标记技术。

[0014] 微通道电导测定法测量蛋白质分子通过微通道时的横向电导,并且已有描述说明这种方法在无标记的蛋白质相互作用检测中非常有用(例如 US2005/0109621)。然而,该方法只能间接测定扩散性质,而难以循环进行测量。电导测量法也可用于无标记的细胞培养监测(例如 US 7, 732, 127 和 US7, 192, 752),但是没有对蛋白质及其相互作用的直接测量方法。使用纳米间隙(例如 US 2005/0136419)可以避免电化学测量的某些双层问题,但是这样做得缺点是优选链接(Tethering)技术。

[0015] 物理方法

[0016] 蛋白质相互作用可以在物理水平上进行研究。X 射线结晶学和核磁共振(NMR)技术来确定分子中的蛋白质微粒,并且得到的三维图可以用来建议哪些其它分子可能适合于这种结构或电荷分布。不幸的是,X 射线结晶学需要使每个要研究的蛋白质发生蛋白质结晶的生长,这个过程非常困难而且费时,而且结晶环境与蛋白质发挥其功能的水性环境非常不同。NMR 需要大量的纯化蛋白质,并且对于所得的复杂数据进行的分析并没有足够的说服力。

[0017] 表面等离子共振技术中,使用连接在金属膜上的蛋白质,但是这将给蛋白质功能带来不利影响。

[0018] 荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)技术的优点是能量转移能够发生在附近的荧光团之间,这时一个荧光的发射光谱与另一个荧光的激发相重叠。通过用一种荧光标记一个待选的相互作用对象,而用另一种荧光标记另一个待选的相互作用对象,从而相互作用可以通过荧光的此消彼长来指示。这种方法甚至适合于瞬时的相互作用。但不幸的是,这种方法需要将荧光团化学连接到每一蛋白质上,这将给蛋白质的功能带来不利影响。

[0019] 原子力显微镜技术用于树突分离(Dendron-Isolated)的分析物(例如 US6,645,558, US 2008/0113353, US 2009/0048120 和 US 2010/0261615),可以检测单个的分析物分子,但是需要链接(Tether)键并制备大量的样品。

[0020] 标准表达文库

[0021] 蛋白质相互作用可以通过使用 cDNA 文库来研究,其中 cDNA 产生诱饵蛋白,诱饵蛋白可以被标记并用作探针。典型地,诱饵蛋白通过使用噬菌体微粒来产生。这种技术允许诱饵蛋白与其相应的 cDNA 结合,但是主要的缺点是生产能力低下;需要对每个诱饵蛋白进行筛选。另外,由于诱饵蛋白并不是在原位条件下产生,因此可能出现错误折叠和假负值。

[0022] 相位间相互作用的显示

[0023] 蛋白质的相互作用可以通过使用表达式克隆策略来研究。将 cDNA 序列插入噬菌体蛋白的外壳基因,并在细菌细胞中培养。接着噬菌体在其外壳上表达出新的蛋白质,该蛋白质可用于蛋白质相互作用分析。如果这些噬菌体的混合物在小孔中与固定标记的蛋白质发生相互作用,则可以冲洗小孔以弃除相互所用的噬菌体,以及形成这种噬菌体的 cDNA 序列。再通过细菌感染对该 cDNA 序列进行大规模扩增。这种技术可以很容易进行自动平行筛选。但不幸的是,与标准表达文库一样,蛋白质没有在原位环境下形成。并且,这种技术也限于能形成于噬菌体表面上的短肽。

[0024] 酵母双杂交系统

[0025] 蛋白质相互作用可以通过使用酵母细胞中的转录因子进行研究,酵母细胞是相对于体外而言更加原位的环境。所研究的蛋白质在单倍体酵母细胞中表达,作为转录因子与 DNA 结合结构域的融合。另一个蛋白在另一个单倍体酵母细胞中表达,作为同样的转录因子与反式激活结构域的融合。使两个酵母菌株交配,得到二倍体菌株,使得两者的蛋白质能够相互作用。如果不发生相互作用,则转录因子将会聚集,使得测试基因被激活。这种技术易于进行大规模筛选,但是存在几点缺陷。实验的重复性很低,显示出对于环境条件的不规律的敏感性,或筛选不全面。已有许多利用其它更特定的技术检测人们熟知的相互作用失败的例子,说明假负值的概率很高。最后,许多所检测的相互作用都在进一步分析中被确定为无效,说明假正值的概率很高。

[0026] 本文中所提及的所有公开物在不发生相互矛盾的前提下,以引用的方式整体并入本文中。

发明内容

[0027] 本文所述方法是用了现有技术,包括球状体、磁场、荧光、光、过滤技术、凝胶技术、化学、电化学、色谱学以及基质辅助激光解析电离(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI),来检测和表征分析物微粒(例如生物相关分子),从而表征分析物微粒

的任何结构变化,以及定义它们的相互作用。

[0028] 在根据本发明的一个方法中,分析物微粒通过例如溶剂流体或电场的方法而被捕捉于离子环境(例如水性盐溶液)下的微池中。一旦被捕捉,则捕捉过程终止,随着分析物微粒扩散到池外,测量池中的电导率。通过电导率来测量离子流的容易程度。由于离子流受到分析物微粒的限制,因而电导率随着分析物微粒扩散到池外而下降。通过电导率下降的时间段可以测量分析物微粒的扩散系数。而通过扩散系数可以测量分析物微粒的性质,例如尺寸和形状。使用电场来补充或抑制扩散的操作也可以用来研究分析物微粒的电荷性质。另外,两个呈现结合相互作用的分析物微粒会表现出扩散系数与单个分析物微粒相关地下降;通过这种下降可以测量结合相互作用。分析物微粒扩散到池外后,重新被捕捉到池中,因而可以以连续的循环来重复测量。

[0029] 在与第一个方法相似的另一个方法中,使用荧光代替电导率来测量分析物微粒的扩散系数。荧光的使用方式是,可以通过在电场中限制微粒流从而延迟荧光的开始,或者通过限制荧光微粒流本身。

[0030] 进一步的方法设计将分析物微粒物理地捕捉于池中,从而可以将这个池移动到质谱仪的真空室中并同时保持水性环境。然后可以使用激光烧蚀来使分析物微粒的水性基质汽化,从而质谱样品的分子裂解得到更好的控制。

[0031] 本发明的方法可以对于尺寸差异较大的分析物微粒,在一个或多个参与者分析物微粒处于液体环境中的条件下,发现二者间、三者间或更多者间的相互作用。这种方法可能在生物标记物开发,药物开发以及药物评估得以广泛应用。本发明方法相比于现有方法的强有力的优点在于,本发明方法无标记且无链接(Tether),保证了分析物微粒在没有化学连接标记物或链接物的情况下在其原位状态发生相互作用;标记物或链接物仍然可以使用,但是不是必须的。本发明方法还高度不依赖于PH或其它溶液性质,可以用于非常复杂的水性混合物,且只使用很小的样品体积,并且允许循环(即,重复)测量以增强敏感度。

[0032] 根据本发明的一个方面,提供了一种检测分析物微粒的存在、性质及相互作用的方法,包括:提供由具有多个通孔的材料构成的薄片,所述通孔具有基本上相近的直径;在所述材料的至少一个面上,限制所述孔的开口;将分析物微粒插入到所述孔的子群中;施加电场,贯通含有所述分析物微粒的所述通孔;测量电流随时间的变化,所述变化能够指示出所述分析物微粒的扩散速率;并且其中,通过所述分析物微粒的所述扩散速率来测量所述分析物微粒的存在、性质及相互作用。

[0033] 所述片材料包括聚碳酸酯;径迹蚀刻的聚碳酸酯;钻有多个孔的聚合物;化学蚀刻有多个孔的聚合物;钻有多个孔的玻璃;有孔的聚合物薄膜;有孔的单层薄膜;或有孔的多层薄膜。典型地,所述材料是电绝缘且基本上化学惰性的。所述片材的厚度可以在500nm至1000000nm的范围内。或者,所述片材的厚度在1nm至10nm的范围内。所述通孔的直径为10nm至5000nm。或者,所述通孔的直径为1nm至1cm。在一种设定中,所述通孔的内表面是化学衍生的。或者,所述通孔的外表面是化学衍生的。所述通孔可以由凝胶填充。

[0034] 在一个实施方式中,利用与所述片材的表面接触的凝胶层,来限制所述孔的所述开口。所述凝胶包括:明胶;琼脂糖;聚丙烯酰胺;聚丙烯酸酯;渗透性聚合物;渗透性共聚物;淀粉;气凝胶;火棉胶;透析膜;与所述分析物微粒基质不混溶的液体;以上所列任一种材料的化学改性形式;嵌入有微粒的以上所列任一种材料;及它们的组合。

[0035] 在另一个实施方式中,使用球状体限制所述孔的开口,所述球状体具有的直径设置为能够基本上限制通过所述孔的液体流。通过以下的方式,使所述球状体位于固定在位置上:重力;向心力;离心力;动水压;静水压;化学键或使用凝胶基质。

[0036] 使用凝胶基质使所述球状体位于固定位置上时,所述方法进一步包括从所述凝胶基质上移除所述球状体。

[0037] 有利地,通过安培计来测量所述电流,所述安培计能够以对于被测的扩散速率足够大的速率,测量通过所述片的选定区域的电流。

[0038] 所述选定区域通过以下方式来选定:使用绝缘管,所述绝缘管的一端与所述片材料物理接触;使用具有孔的绝缘片,所述绝缘片应用于所述片材料的表面;或使用绝缘、与水不混溶的液体,所述液体应用于所述片材料的表面。

[0039] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于检测分析物微粒的存在、性质及相互作用的方法,其包括:提供具有多个通孔的片材料,所述通孔具有基本上相近的直径;在所述材料的至少一个面上,限制所述孔的开口;将分析物微粒插入到所述孔的子群中;传递迁移力,轴向上贯通含有所述分析物微粒的所述通孔;测量荧光随时间的变化,所述变化指示出所述分析物微粒的扩散速率;其中,通过所述分析物微粒的所述扩散速率提供了对所述分析物微粒的存在、性质及相互作用的测量。

[0040] 优选地通过测光系统来测量荧光,所述测光系统能够以对于被测的扩散速率足够大的速率,测量所述片的选定区域的荧光。

[0041] 根据本发明的另一方面提供了一种鉴定分析物微粒的方法,包括:提供具有多个通孔的片材料,所述通孔具有基本上相近的直径;在所述材料的至少一个面上,限制所述孔的开口;将分析物微粒插入到所述孔的子群中;基本上关闭所述孔的所述开口;将所述片材料插入到质谱仪中;烧蚀所述片材料的选定区域;使烧蚀的结果产物离子化;测量结果离子的质荷比;并且其中,通过所述质荷比来鉴定所述分析物微粒。

[0042] 本方法还可以进一步包括:将所述球状体压进所述孔的开口,来基本上关闭所述开口,从而限制所述孔的开口。

附图说明

[0043] 为了更好地理解本发明,现通过实施例的方式,参考附图对本发明的方法进行描述。其中:

[0044] 图 1A 表示本发明方法中所使用的有孔材料的示意图;

[0045] 图 1B 表示图 1A 的有孔材料沿线 x-x 的截面侧视图;

[0046] 图 2 表示图 1 的有孔材料的单个孔的放大图;

[0047] 图 3 表示可控厚度的双层材料的产物;

[0048] 图 4 表示用于形成丙烯酰胺凝胶的已知化学方法;

[0049] 图 5 表示图 3 的双层材料的放大图;

[0050] 图 6 表示肽键合成的已知化学方法;

[0051] 图 7 表示位置接近的图 1 的有孔材料以及图 3 的双层材料的示意图;

[0052] 图 8 表示图 1 的有孔材料以及图 3 的双层材料由肽键结合而产生的结构的示意图;

- [0053] 图 9 表示图 8 结构的示意图,其中双层中的外层被去除,凝胶层固定在有孔材料上;
- [0054] 图 10 表示图 9 的变化的示意图,其中荧光团或表面活性剂化学结合到凝胶的外表面上;
- [0055] 图 11 表示图 9 的变化的示意图,其中在结构聚集之前,球状体堵塞所述有孔材料中孔的一端,并保留出缝隙;
- [0056] 图 12 表示力的反堵塞作用,所述力例如来自通过移动图 11 的球状体的位置导致的磁场梯度;
- [0057] 图 13 表示图 9 的变化的示意图,其中在结构聚集之前,球状体堵塞所述有孔材料中孔的一端,并不保留出缝隙;
- [0058] 图 14 表示图 9 的变化的示意图,其中球状体堵塞所述有孔材料中孔的两端;
- [0059] 图 15 表示由于移除图 14 球状体中的一个而产生的凝胶中的裂口;
- [0060] 图 16 表示图 9 的变化的示意图,其中球状体堵塞所述有孔材料的孔的一端,通过例如磁场梯度等带来的力被固定位置;
- [0061] 图 17 表示通过图 9 结构中的孔的液体流的示意图;
- [0062] 图 18 表示图 9 结构的孔中分析物微粒聚集的示意图;
- [0063] 图 19 表示由电场 E 诱导的荧光团迁移的示意图;
- [0064] 图 20 表示由磁场梯度 ∇B 诱导的荧光团迁移的示意图;
- [0065] 图 21 表示由重力场 G 诱导的荧光团迁移的示意图;
- [0066] 图 22 表示由电场 E 诱导的电解质迁移的示意图;
- [0067] 图 23 表示由电场 J 诱导的电解质迁移导致的电容器形成;
- [0068] 图 24 表示与图 23 的电容器相关的电场;
- [0069] 图 25 表示电荷向图 23 的荧光团转移;
- [0070] 图 26 表示分子障碍物周围的荧光团迁移,其中 a) 无障碍物, b) 小障碍物和 c) 实质障碍物;
- [0071] 图 27 表示分子障碍物周围的电解质迁移,其中 a) 无障碍物, b) 小障碍物和 c) 实质障碍物;
- [0072] 图 28 表示带电分子障碍物周围的电解质迁移,其中 a) 无障碍物, b) 小障碍物和 c) 实质障碍物;
- [0073] 图 29 表示迁移的荧光团受到紫外光的激发及其发射的可见光的示意图;
- [0074] 图 30 表示带电的荧光团受到紫外光的激发及其发射的可见光的示意图;
- [0075] 图 31 表示电流流向电极的示意图;
- [0076] 图 32 表示如何将分析物微粒装载到图 9 所示结构的孔中;
- [0077] 图 33A 表示如何以分析上有用的方式检测电流的示意图;
- [0078] 图 33B 表示图 33A 中递送分析物微粒的管线顶端的放大图;
- [0079] 图 33C 表示由图 33A 产生的电导率图的视图;
- [0080] 图 34A 表示如何以分析上有用的方式检测荧光的示意图;
- [0081] 图 34B 表示由图 34A 产生的照片影像的视图;
- [0082] 图 35 表示当施加电场时随时间变化的电导率图;

- [0083] 图 36 表示当施加迁移力时随时间变化的照片影像；
- [0084] 图 37 表示一小组孔中的电流的垂直(增加)变化,不存在蛋白质分子和存在蛋白质分子的状况；
- [0085] 图 38 表示一小组孔中的荧光的水平(暂时)变化,不存在蛋白质分子和存在蛋白质分子的状况；
- [0086] 图 39 表示一小组孔中存在蛋白质分子以及不存在蛋白质分子时的重复 Δ 电流测量；
- [0087] 图 40 表示一小组孔中存在蛋白质分子以及不存在蛋白质分子时的重复 Δ 时间测量；
- [0088] 图 41 表示一小组孔中蛋白质发生二级反应以及另一小组孔蛋白质分子不发生而家反应时的重复 Δ 电流测量；
- [0089] 图 42 表示一小组孔中蛋白质发生二级反应以及另一小组孔蛋白质分子不发生而家反应时的重复 Δ 时间测量；
- [0090] 图 43 表示图 9 有孔材料中大数量的孔的示意图；
- [0091] 图 44 表示有孔材料中分子种类持久捕获的第一阶段的示意图；
- [0092] 图 45 表示有孔材料中分子种类持久捕获的第二阶段的示意图；
- [0093] 图 46 表示有孔材料中持久捕获的分子种类的示意图；
- [0094] 图 47 表示有孔材料的孔中持久捕获的分子种类通过激光而发光的示意图；
- [0095] 图 48 表示图 43 捕获的分子种类表现出蒸发的示意图。

具体实施方式

[0096] 本发明的实施方式以特有的方式使用现有技术的组合。这些现有技术包括：球状体,磁场,荧光,光学；滤光技术,化学,电化学,色谱学和基质辅助激光解吸电离离子源(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization,MALDI)。将分别对它们进行概述,然后描述根据本发明的各个实施方式的方法。在整篇专利说明书中,相同的附图标记表示相同的部件。

[0097] 球状体

[0098] 球状体可由商业途径从很多厂商处获得,比如从 <http://www.microspheres-nanospheres.com/> 获得。

[0099] 球状体具有在 50nm 至 5000nm 范围内的高精确的直径,可以由各种材料制成,例如聚苯乙烯或聚苯乙烯 / 三聚氰胺共聚物。另外,球状体可以灌注磁活性材料或灌注荧光材料。进一步,这些微粒可以以衍生的表面来生产,比如氨基(NH_2)或羧基(COOH),利用周知的化学方法可以使许多配体连接到微粒上。它们广泛地用于蛋白质纯化过程,其中特定的蛋白质与表面配体结合,然后能够磁性地从本体溶液(Bulk Solution)中提取出来。

[0100] 磁场

[0101] 在磁场梯度下,具有磁矩的微粒例如氧化铁微粒,会受到朝向电场汇集处的力,力的大小为磁矩 M 和梯度纳波拉(grad) B 的乘积。

[0102] 磁场梯度可以由简单的带电线圈产生。典型的线圈的最大磁场梯度点恰好位于线圈末端的外部,总是指向线圈的中心。一对相反的线圈,每个线圈都具有电流的补偿正弦

波,能够用于产生任意强度和极性的磁场梯度。

[0103] 荧光

[0104] 荧光材料吸收短波光,释放出长波光的能量。存在许多可商业获得的荧光染料,在生物技术领域具有广泛的用途。一个例子是荧光素钠(Sodium Fluoresceinate),其吸收紫外光,放射黄绿光。其自然形态,荧光黄(Fluorescein)是非荧光性的。除了荧光分子以外,一种新型的称为量子点(Quantum Dots)的材料也是荧光的。其由半导体(例如硫化镉(CdS)或碲化镉(CdTe))微粒组成。其非常小,以几纳米的直径排列,并且荧光性极强。微粒表面可以衍生有多种材料,例如氨基(NH₂)或羧基(COOH),利用周知的化学方法可以使许多配体连接到微粒上。它们广泛地用于显微染色。

[0105] 光学

[0106] 可以通过以短波光(例如紫外光)激发荧光并收集激发的长波光(例如可见光),利用光电传感器来检测荧光。紫外光源例如是汞蒸气泵和LED激光。对于近紫外而言,尤其便于使用普遍用于蓝光光碟的405nm LED激光。激发的荧光可用光学镜或光管来收集,并被引导至光电传感器中。光电传感器例如是光电倍增管和数码相机。光电倍增管具有较高的灵敏度和速度,数码相机可以检测较大的区域。

[0107] 滤光技术

[0108] 独特类型的有孔材料10包括径迹蚀刻的聚碳酸酯(Track-etched Polycarbonate, TEPC),该有孔材料10可以商业购得并用于滤光,例如从密理博(Millipore)公司和华特门(Whatman)公司购得。

[0109] TEPC包括具有平坦、玻璃状表面的聚碳酸酯材料12的片,不规则地制有非常均匀的通孔14。图1A和图1B示意性示出了这样的有孔材料10。这些孔14在尺寸为直径10nm至5000nm且材料厚度为6000nm至11000nm时是可获得的。有孔材料10通过对专有的聚碳酸酯材料进行生产。孔14是基本平行的。该材料显示出较小等级的荧光,但是可染黑色。该材料较强地吸收紫外光。具体地,用聚乙烯吡咯烷酮处理其表面使其具有亲水性,能够通过乙醇中浸泡而除去。根据孔的密度,偶尔会存在孔的重叠。

[0110] 凝胶技术

[0111] 技术上,凝胶由填充有液体的开放交联结构构成,然而,这里所使用的定义“凝胶”并不限于其严格的技术定义,而是普遍地指与限制分析物扩散有关的任何材料。普通凝胶是由明胶、琼脂糖或丙烯酰胺组成。其开放交联结构的密度可以通过调节凝胶形成材料的浓度而容易地控制。有一些凝胶,例如明胶或琼脂糖,具有低于凝胶结构形成温度的熔点。其他凝胶,例如由丙烯酰胺制成的凝胶,能够利用化学诱导的聚合反应或紫外线诱导的聚合反应来形成。这些凝胶经常在生物技术领域中很流行的称为凝胶电泳的技术中用于分离复杂的蛋白质混合物。在这个技术中,蛋白质混合物的浓缩等分被注射到凝胶薄片的中央,然后在薄片的每一侧对凝胶施加电场。凝胶的开放交联结构基本上是孔的集合,蛋白质分子通过这些孔。因为蛋白质分子典型地具有特有电荷和直径,因此会在电场中以特定的速率迁移,通过凝胶的孔。因为每种蛋白质类型都具有独特的电荷和直径,因此蛋白质混合物会物理分离成各个组分。

[0112] 如果凝胶的开发交联结构具有足够的密度,则只有小分子能够通过所述孔,而大分子完全从注射点开始进行迁移。上述无法迁移的分子尺寸通常被认为是凝胶的排阻限

(Exclusion Limit)。对于聚丙烯酰胺来说,排阻限可以小于大多数的典型蛋白质。

[0113] 化学

[0114] 丙烯酰胺共聚是周知的反应,普遍用于产生凝胶电泳用的凝胶。通过将丙烯酰胺单体与交联剂例如 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(双),并使用自由基进行催化来制备,所述自由基例如是来自过硫酸盐离子以及引发剂例如脂肪叔胺 N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)。也可以用核黄素和长波紫外光来进行聚合。额外的反应及例如尿素,可以用来降低凝胶的多孔性。另外,也可以包括其他的聚合物,例如聚丙烯酸酯,来辅助层压化学作用。

[0115] 羧酸盐衍生和氨衍生的过程中,基质例如分子或表面会与水性试剂发生化学反应,导致羧酸盐或氨部分(Moiety)连接到基质上。例如,羧酸盐表面的衍生是通过用适当的有机叠氮化物处理以产生主要的氨部分,或使用强碱将聚乙烯吡咯烷酮的表面打开以形成羧酸盐部分。一般地,这些部分基本上暴露于本体溶液中,且接下来能够用于多种用途,用于连接的化学作用高度依赖于基质的化学性质。

[0116] 肽键合成是周知的反应,普遍地用于肽合成。用 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺(EDC)处理羧酸盐部分以生成不稳定的反应性 O-酰基异脲酯(O-acylisourea ester)。该酯能够与主要的氨部分发生反应,形成未定的氨键。然而呢,由于该酯的反应性如此的强,因此也会与溶剂(水)发生反应,再生成羧酸盐部分。这降低了反应效率。可以通过将该酯与 N-羟基琥珀酰亚胺(琥珀代-NHS)反应来进行改善,形成半稳态的氨反应性 NHS 酯。后者的酯不与水反应,仅与主要的氨部分反应形成稳定的酰胺键。

[0117] 电化学

[0118] 如果两个电极放置与水性溶液中,且在两个电极间产生一个电势差,则会在水性溶液中形成电场。水自然地分成 H_3O^+ 和 OH^- 离子。由于这种分离产物带电荷,因此会迁移到电极表面,在电极表面金属会提供或提取电子,完成一个电流的回路。添加到水中的离子盐类例如氯化钠,会引入更高浓度的离子,允许非常高流量的电流。如果水性溶液中存在多种离子盐类(每种盐类都具有这样的化学性质使得能够容易的实现电迁移过程),则在检测电流的同时扫描电势,提供离子盐类在水溶液中的表征。经常地,在电化学领域中,在困难的电转移过程中添加离子盐类是非常有用的;这样的离子盐类普遍地作为“支持电解质”。金属电极表面的电场结构非常复杂,因为各种离子在金属表面附件形成层装。

[0119] 色谱学

[0120] 色谱学对液体介质中的组分进行物理分离,之后采用适当的检测方法。典型地,一种复杂混合物的浓缩塞通过载体流(“流动相”)冲至穿过窄管(“柱”),窄管中充满微粒(“固定相”),微粒覆盖有与混合物组分弱结合的材料。当组分流过固定相时,一些组分比其他组分更强地结合,会更慢地向外洗提。因此,来自柱的洗提液会首先包括非结合组分,然后是一系列结合强度递增的组分。用检测器监测组分的一些普遍性质,例如紫外吸收,这种普遍性质能够在组分流过柱子时指示其存在。洗提液可用阀分开,从而收集每个组分。

[0121] 在生物技术领域,凝胶色谱广泛应用于分离和检测蛋白质的复杂组合物。然而,该技术从某种意义上不够普遍,且需要相当大体积的蛋白质。最近,这项技术开始被“多维蛋白质鉴定技术(Multidimensional Protein Identification)”(也成为 MudPIT)所取代。该技术使用具有不同性质的柱的组合,以及一组流体阀,以达到优于凝胶电泳的蛋白质分离。使用毛细管区带电泳(Capillary Zone Electrophoresis)也能够降低所用蛋白质的

体积。

[0122] 基质辅助激光解吸电离离子源(MALDI)

[0123] 在传统的用途中,MALDI 涉及将微观量的生物样品散步在玻璃或硅片上,并将其与可挥发的化合物混合。将硅片干燥,然后放入质谱仪的腔室内。聚焦的激光脉冲使每个样品气化,得到的气态的离子化并且加速穿过质谱仪的主腔室。气化过程中,生物样品严重裂解,并从质谱数据中提取裂解图案。这种程序广泛应用于工业中,使用斯奎诺姆(Sequenom)和其他厂商制造的装置。

[0124] 第一实施方式概述

[0125] 特别构建的层状材料形成一组载有多种空间分离的分析物离子的池,所述层状材料用电化学探针进行扫描。由此得到多种分析物微粒性质的图,能提供关于生物样品的有用信息。

[0126] 根据本发明第一实施方式的方法

[0127] 在根据本发明第一实施方式的方法中,有孔材料(例如 TEPC 滤纸)具有限制开口的孔。将受控基质中的均匀或不均匀的分析物微粒群体载入 TEPC 滤纸的孔中,且使用电流测量向外的扩散,由此测量分析物微粒的存在、性质及相互作用。

[0128] 现结合图 1 至图 43 对本发明的方法进行描述。

[0129] 参考图 1A、图 1B 和图 2,TEPC 滤纸 1 具有不均匀尺寸孔的随机分布。图 1A 示出了顶视图,而图 1B 示出了截面图。TEPC 滤纸 1 可能具有由羧酸盐部分 3 化学衍生的外表面。也可以用其他具有相似性质的材料代替。

[0130] 参考图 3、图 4 和图 5,双层材料可能通过以下过程形成,第一,均匀尺寸的球状体 4 的稀释悬浮物形成于凝胶前体(例如丙烯酰胺和融化的琼脂糖)基质中。然后将悬浮物施加到薄塑料片 5 上并包在光滑圆柱体 6 的周围,光滑圆柱体 6 具有疏水表面。凝胶 7 通过化学、热或光聚合形成。化学聚合的例子示出图 4 中。间隔微粒 4 使凝胶 7 具有均匀的已知厚度。聚合以后,薄塑料片 5 从光滑圆柱体 6 上剥去,形成由凝胶 7 层和塑料 5 层组成的双层材料 8。这种双层材料的放大图示于图 5 中;球状体 4 没有在该放大图中示出,因为已经充分稀释。选择双层材料 8 的界面 9 的化学性质,使得薄塑料片 5 层将来能够容易地通过物理或化学手段除去。凝胶 7 的外表面可以化学衍生有氨基部分 10,但是聚丙烯酰胺原位的。

[0131] 对于所述双层材料,可替代地,将凝胶前体夹在两个疏水平坦平板中间,允许聚合和干燥。这形成坚固干燥的、可容易地处理的凝胶膜,然后当使用时进行水合。

[0132] 对于所述双层材料,可替代地,使用透析膜,该透析膜可以从很多提供商处购得,例如 Millipore 或 Whatman。

[0133] 参考图 6、图 7 和图 8,双层材料 8 可化学结合到 TEPC 滤纸 1 上。化学结合机制的例子示于图 6 中,其中羧酸盐部分和氨基部分化学结合以形成肽键 11。也可以由其他化学作用替代。图 7 示出了 TEPC 滤纸 1 和双层材料 8 相接近,且羧酸盐衍生表面 3 和氨基衍生表面 10 彼此相对。图 8 示出了 TEPC 滤纸 1 和双层材料 8 以肽键 11 化学结合在一起。

[0134] 参考图 8 和图 9,薄塑料片 5 可以通过物理或化学手段被除去,仅剩下凝胶 7 层固定与 TEPC 滤纸 1。

[0135] 对于化学结合,可替代地,凝胶 7 层和 TEPC 滤纸 1 可通过没有化学键合的物理力

简单压缩在一起,例如通过包住圆柱体周围并拉紧外部 TEPC 滤纸 1 层。

[0136] 对于化学结合,可替代地,TEPC 滤纸 1 可放置于传导液体表面,其中传导液体与含有分析物微粒基质的液体不混溶。

[0137] 对于图 9 所示的示意图可以用多种变化,其例子示于图 10、图 11、图 12、图 13、图 14、图 15 和图 16 中。虽然本方法其余的部分主要讲述图 9 的简单事例,但是应当理解这些变化都是可行的。

[0138] 参考图 10,凝胶 7 的外表面可用荧光团 12、表面活性剂 13、其他材料或材料的任意组合进行化学衍生。类似地,凝胶 7 的内表面(面向孔 2)或孔 2 的内表面也可以进行化学衍生。

[0139] 参考图 11、图 12 和图 13,可在形成肽键 11 之前,使球状体 14 暂位于孔 2 的开口中。该球状体 14 可具有稍大于孔 2 直径的直径。凝胶 7 层可由于球状体 14 的存在而凹回。可使用力 16(例如由磁场梯度、电场、重力场或动水压流产生)来将球状体 14 从其在孔 2 开口的位置上提起,在球状体 14 表面和孔 2 的开口之间制造出一个小缝隙 17。空闲体积 15 可通过短暂加热球状体 14 以熔化周围的凝胶 7 来除去,或者通过用凝胶前体使之饱和并随后进行化学聚合。所产生的结果示于图 13 中。

[0140] 参考图 14 和图 15,孔 2 的两端都用球状体 14 盖起。如果凝胶 7 足够柔顺,则其中一个球状体 14 可通过例如由磁场梯度产生的力被除去。这将在凝胶 7 中留出一个小裂口 18。这种特定的配置在没有有效保留机制的情况下对于孔 2 中的材料保留将非常有用。

[0141] 参考图 16,可不使用凝胶,而将球状体 14 通过例如由磁场梯度 16 产生的力固定在位置上。

[0142] 关于图 9 的简单实例,这种结构可以用于收集和浓缩孔 2 中的分析物微粒。图 17 表示从孔 2 的开口端通过孔 2 并随后通过凝胶 7 的液体流 19 的示意图。如果凝胶 7 具有充分紧密的交联结构,则悬浮于液体流 19 中的分析物微粒通过凝胶 7 被过滤。这种分析物微粒的例子是蛋白质 20、氨基酸、病毒、原生质结构,量子点、大荧光团 21、大电解质阳离子、大电解质阴离子和大氧化还原剂。可以通过在形成时将微粒包含在凝胶 7 中从而降低凝胶 7 的渗透性。能够穿过凝胶 7 的微粒的例子是水分子、小电解质阳离子 22、小电解质阴离子 23 和小氧化还原剂。图 18 表示孔 2 中聚集的分析物微粒的结果的示意图。

[0143] 一旦孔 2 中有聚集的分析物微粒,则可停止液体流 19。这时,分析物微粒会开始向外扩散,最终腾空孔 2。然后可恢复液体流 19,重复聚集/扩散的循环。可将微弱限制扩散的凝胶放于孔 2 的出口,以使循环变得更好。可将微弱限制扩散的凝胶放于孔中,以延长扩散时间。

[0144] 扩散时,孔 2 中的分析物微粒将具有与离子微粒交切的移动通道。由于微粒互相穿过,因此会围绕彼此运动,从而降低离子微粒移动通道的速度。这种速度降低取决于分析物微粒存在及其结合过程,因而形成了本方法的基础。

[0145] 扩散时,孔 2 中的分析物微粒在扩散意外还由迁移力(例如,由电场产生的迁移力)轴向驱动。

[0146] 这种过程适合于循环的聚集部分,而分析是通过额外的液体流 19 的力完成。

[0147] 在循环的扩散或聚集部分,液体流 19 将被高频轴向地摆动,用于更改微粒的移动。例如,图 15 中的球状体 14 具有磁矩且被磁性地摆动以将分析物微粒泵抽穿过裂口 18。

另外一个例子,图 9 中的凝胶 7 的外(内)表面会受到压力脉动,使得分析物微粒在孔 2 中同样地摆动。

[0148] 存在许多这样的机制,即孔 2 在扩散之外由力而被轴向驱动。图 22 示出了这些机制的一个例子。

[0149] 参考图 22,能够穿过凝胶 7 的电解质或氧化还原试剂通过工作电极(-W)、极板(C+)和参考电极(R)产生的电场而被移动穿过凝胶 7。

[0150] 在这些孔 2 中的微粒在扩散之外还由力而被轴向驱动的机制的每一个例子中,移动通道本身可能通过几种不同的机制被减速。一些这样机制的例子示于图 27 和图 28 中。

[0151] 参考图 27,小电解质阳离子 22 和小电解质阴离子 23 可由电场而被在一条直线上移动,如果路径上没有障碍物的话。然而,如果存在障碍物,例如分析物微粒 20 和分析物微粒 27,则阴离子 22 和阴离子 23 将需要围绕分析物微粒运动,降低离子轴向移动的速度。如果分析物微粒具有结合相互作用,则会形成大复合物 28,导致离子轴向运动速度降低得更多。例如,典型的蛋白质,例如牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)具有 4nm x 4nm x 14nm 的尺寸。使用 TEPC 滤纸 1 的 50nm 直径的孔 2,单独的 BSA 蛋白会阻碍孔 2 的横截面的很大一部分(0.8%至 2.9%),因而显著降低离子微粒流的速度。

[0152] 参考图 28,障碍物 29、30 和 31 本身带电荷。施加电场后,它们以复杂的方式与电解质或氧化还原试剂的移动相互影响。

[0153] 电解质分子或氧化还原试剂移动通过凝胶 7,这种移动取决于孔 2 中障碍物的性质,提供了一种高敏感度的测量障碍物性质的方法。图 31 示出了应用工作电极、极板和参考电极的电场。粒子微粒流将在电极中产生电流,且电流受到障碍物和凝胶 7 的阻抗,但是由于凝胶 7 的阻抗是相对不变的,因此可通过循环测定减去该阻抗。

[0154] 图 32 示出了样品载入状态下的整个装置。分析物微粒的液体流,例如从色谱柱 32 中洗提出的序列复杂的蛋白质,被引导流入 TEPC 滤纸 1 的特定区域。在另一侧施加较低的压力使得溶剂和其他小分子通过 TEPC 滤纸 1 和凝胶 7,使分析物微粒聚集在 TEPC 滤纸 1 的孔 2 中。由于分析物微粒从色谱柱 32 中洗提出来,因此 TEPC 滤纸 1 的表面以扫描的方式移动。所洗提的不同分析物微粒被捕获在 TEPC 滤纸 1 中空间上不同的位置。按照这样的操作,可以对从色谱柱 32 中洗提的不同分析物微粒进行第二次扫描,在 TEPC 滤纸 1 的区域上产生大量的特有二级混合物(其比例是可以控制的)。进一步的扫描可以用来对孔 2 中的群增加更多的复杂性。这与用于降低蛋白质交叉反应问题的“夹心阵列(Sandwich Array)”技术在功能上是等同的。还可以在孔 2 中使用液体胶束、胶体、固定材料或噬菌体抗体展示技术,使得留存的分析物微粒与环境发生相互作用。并且,还可以从一组孔 2 中提取出分析物微粒并添加到另一组孔 2 中。

[0155] 图 33 示出了测量状态的整个装置。通过表面例如 TEPC 滤纸 1 的标间,扫描电极 33 或多个电极,并测定电流。关于电极位置和电流的信息进入电导率图 34 中。这种电极结构的例子包括由绝缘体包围的暴露金属表面,以及由到点液体填充的管。

[0156] 参考图 35,测量结果为一组基本一致的电导率图 34。大部分区域一致地具有导电性,例外是几个具有明显迁移障碍物(例如分析物微粒)的低导电性区域。这种低导电性区域的性质与一致性的导电区域相关,是分析信号的基础。

[0157] 参考图 33,对欲测区域的限制可以通过填充有导电液体的绝缘管来实现,绝缘管

的一端与所述材料薄片物理接触,将具有孔的绝缘薄片应用于所述材料薄片的表面,或将绝缘的与水不混溶的液体应用于所述材料薄片的表面。在后者的情况下,在向 TEPC 滤纸 1 的凝胶侧施压后,孔中的水表面张力沿着 TEPC 滤纸 1 的另一个表面形成孤立的水性凸起,用填充有导电性液体的绝缘管进行扫描。

[0158] 参考图 37,电导率通过存在蛋白质的区域以及不存在蛋白质的另一区域的时间函数进行图表化。启动电场 E 以后,蛋白质的存在导致电流 i 级别的垂直(增加)变化,可以通过测量 Δ 电流 i 来量化。

[0159] 参考图 39,比较存在蛋白质与不存在蛋白质的理论结果。在循环中电场 E 重复被激活,得到重复的 Δ 电流 i 测量值。在更长的时间规模中,动水压 P 也在循环中重复启动。当增加的压力导致蛋白质聚集,则 Δ 电流增大。当解除压力,则蛋白质向外扩散, Δ 电流减少。循环启动静水压使得得到一系列连续的 Δ 电流峰,求其平均值以用作蛋白质存在的敏感度检测。

[0160] 参考图 41,比较蛋白质结合存在的理论结果。与其他蛋白质结合的蛋白质具有较强的位阻效应,成为较大的障碍物且具有较低的扩散速率;由此得到一系列连续的 Δ 电流 i 峰,其幅度较大。不与其他蛋白质结合的蛋白质具有较弱的位阻效应,不会成为较大的障碍物且不会具有较低的扩散速率;由此得到一系列连续的 Δ 电流峰,其幅度较小。注意到由于存在多重蛋白,因此会具有多个较小幅度的峰。

[0161] 图 43 总结性示出了测量结果。通过测量得到穿过 PETC 滤纸 1 区域的分析物微粒性质的图。某区域 38 将具有执行本方法的科学人员感兴趣的测量性质。对这些区域中内容物的鉴定可以通过多种技术来进行,例如质谱,或者利用原始传递该内容物的色谱系统的信息。

[0162] 通过使用相似的结构,例如有孔的单层膜,来代替 TEPC/凝胶结构,会得到基本上相同的功能,其中扩散时径向的而不是轴向的。

[0163] 第二实施方式概述

[0164] 特别构建的层状材料形成一组装载有多重空间分离的分析物颗粒的池,且所述多层材料用于荧光放射成像。结果得到多种分析物微粒的性质的图,能提供关于生物样品的有用信息。

[0165] 根据本发明第二实施方式的方法

[0166] 在根据本发明第二实施方式的方法中,有孔材料(例如 TEPC 滤纸)具有限制开口的孔。将受控基质中的均匀或不均匀的分析物微粒群体载入 TEPC 滤纸的孔中,且使用荧光测量向外的扩散,由此测量分析物微粒的存在、性质及相互作用。

[0167] 现结合图 1 至图 43 对本发明的方法进行描述。

[0168] 参考图 1A、图 1B 和图 2,TEPC 滤纸 1 具有不均匀尺寸孔的随机分布。图 1A 示出了顶视图,而图 1B 示出了截面图。TEPC 滤纸 1 可能具有由羧酸盐部分 3 化学衍生的外表面。也可以用其他具有相似性质的材料代替。

[0169] 参考图 3、图 4 和图 5,双层材料可能通过以下过程形成,第一,均匀尺寸的球状体 4 的稀释悬浮物形成于凝胶前体(例如丙烯酰胺和融化的琼脂糖)基质中。然后将悬浮物施加到薄塑料片 5 上并包在光滑圆柱体 6 的周围,光滑圆柱体 6 具有疏水表面。凝胶 7 通过化学、热或光聚合形成。化学聚合的例子示出图 4 中。间隔微粒 4 使凝胶 7 具有均匀的已

知厚度。聚合以后,薄塑料片 5 从光滑圆柱体 6 上剥去,形成由凝胶 7 层和塑料 5 层组成的双层材料 8。这种双层材料的放大图示于图 5 中;球状体 4 没有在该放大图中示出,因为已经充分稀释。选择双层材料 8 的界面 9 的化学性质,使得薄塑料片 5 层将来能够容易地通过物理或化学手段除去。凝胶 7 的外表面可以化学衍生有氨基部分 10,但是聚丙烯酰胺原位的。

[0170] 对于所述双层材料,可替代地,将凝胶前体夹在两个疏水平坦平板中间,允许聚合和干燥。这形成坚固干燥的、可容易地处理的凝胶膜,然后当使用时进行水合。

[0171] 对于所述双层材料,可替代地,使用透析膜,该透析膜可以从很多提供商处购得,例如 Millipore 或 Whatman。

[0172] 参考图 6、图 7 和图 8,双层材料 8 可化学结合到 TEPC 滤纸 1 上。化学结合机制的例子示于图 6 中,其中羧酸盐部分和氨基部分化学结合以形成肽键 11。也可以由其他化学作用替代。图 7 示出了 TEPC 滤纸 1 和双层材料 8 相接近,且羧酸盐衍生表面 3 和氨基衍生表面 10 彼此相对。图 8 示出了 TEPC 滤纸 1 和双层材料 8 以肽键 11 化学结合在一起。

[0173] 参考图 8 和图 9,薄塑料片 5 可以通过物理或化学手段被除去,只剩下凝胶 7 层固定与 TEPC 滤纸 1。

[0174] 对于化学结合,可替代地,凝胶 7 层和 TEPC 滤纸 1 可通过没有化学键合的物理力简单压缩在一起,例如通过包住圆柱体周围并拉紧外部 TEPC 滤纸 1 层。

[0175] 对于化学结合,可替代地,TEPC 滤纸 1 可放置于传导液体表面,其中传导液体与含有分析物微粒基质的液体不混溶。

[0176] 对于图 9 所示的示意图可以用多种变化,其例子示于图 10、图 11、图 12、图 13、图 14、图 15 和图 16 中。虽然本方法其余的部分主要讲述图 9 的简单事例,但是应当理解这些变化都是可行的。

[0177] 参考图 10,凝胶 7 的外表面可用荧光团 12、表面活性剂 13、其他材料或材料的任意组合进行化学衍生。类似地,凝胶 7 的内表面(面向孔 2)或孔 2 的内表面也可以进行化学衍生。

[0178] 参考图 11、图 12 和图 13,可在形成肽键 11 之前,使球状体 14 暂位于孔 2 的开口中。该球状体 14 可具有稍大于孔 2 直径的直径。凝胶 7 层可由于球状体 14 的存在而凹回。可使用力 16(例如由磁场梯度、电场、重力场或动水压流产生)来将球状体 14 从其在孔 2 开口的位置上提起,在球状体 14 表面和孔 2 的开口之间制造出一个小缝隙 17。空闲体积 15 可通过短暂加热球状体 14 以熔化周围的凝胶 7 来除去,或者通过用凝胶前体使之饱和并随后进行化学聚合。所产生的结果示于图 13 中。

[0179] 参考图 14 和图 15,孔 2 的两端都用球状体 14 盖起。如果凝胶 7 足够柔顺,则其中一个球状体 14 可通过例如由磁场梯度产生的力被除去。这将在凝胶 7 中留出一个裂口 18。这种特定的配置在没有有效保留机制的情况下对于孔 2 中的材料保留将非常有用。

[0180] 参考图 16,可不使用凝胶,而将球状体 14 通过例如由磁场梯度 16 产生的力固定在位置上。

[0181] 关于图 9 的简单实例,这种结构可以用于收集和浓缩孔 2 中的分析物微粒。图 17 表示从孔 2 的开口端通过孔 2 并随后通过凝胶 7 的液体流 19 的示意图。如果凝胶 7 具有充分紧密的交联结构,则悬浮于液体流 19 中的分析物微粒通过凝胶 7 被过滤。这种分析

物微粒的例子是蛋白质 20、氨基酸、病毒、原生质结构,量子点、大荧光团 21、大电解质阳离子、大电解质阴离子和大氧化还原剂。可以通过在形成时将微粒包含在凝胶 7 中从而降低凝胶 7 的渗透性。能够穿过凝胶 7 的微粒的例子是水分子、小电解质阳离子 22、小电解质阴离子 23 和小氧化还原剂。图 18 表示孔 2 中聚集的分析物微粒的结果的示意图。

[0182] 一旦孔 2 中有聚集的分析物微粒,则可停止液体流 19。这时,分析物微粒会开始向外扩散,最终腾空孔 2。然后可恢复液体流 19,重复聚集 / 扩散的循环。可将微弱限制扩散的凝胶放于孔 2 的出口,以使循环变得更好。可将微弱限制扩散的凝胶放于孔中,以延长扩散时间。

[0183] 扩散时,孔 2 中的分析物微粒将具有与离子微粒交切的移动通道。由于微粒互相穿过,因此会围绕彼此运动,从而降低离子微粒移动通道的速度。这种速度降低取决于分析物微粒存在及其结合过程,因而形成了本方法的基础。

[0184] 扩散时,孔 2 中的分析物微粒在扩散意外还由迁移力(例如,由电场产生的迁移力)轴向驱动。

[0185] 这种过程适合于循环的聚集部分,而分析是通过额外的液体流 19 的力完成。

[0186] 在循环的扩散或聚集部分,液体流 19 将被高频轴向地摆动,用于更改微粒的移动。例如,图 15 中的球状体 14 具有磁矩且被磁性摆动以将分析物微粒泵抽穿过裂口 18。另外一个例子,图 9 中的凝胶 7 的外(内)表面会受到压力脉动,使得分析物微粒在孔 2 中同样地摆动。

[0187] 存在许多这样的机制,即孔 2 在扩散之外由力而被轴向驱动。图 19、图 20、图 21 和图 23 示出了这些机制的一些例子。

[0188] 参考图 22,不能够穿过凝胶 7 的荧光团通过工作电极(-W)、极板(C+)和参考电极(R)产生的电场被朝向凝胶 7 移动。

[0189] 参考图 20,不能够穿过凝胶 7 的荧光团通过磁场梯度被朝向(或远离)凝胶 7 移动。

[0190] 参考图 21,不能够穿过凝胶 7 的荧光团通过重力场被朝向(或远离)凝胶 7 移动。

[0191] 参考图 23,不能够穿过凝胶 7 的大电解质阳离子 24 和大电解质阴离子 25 或氧化还原试剂通过电场被朝向(或远离)凝胶 7 内表面和凝胶 7 外表面移动,形成电容。

[0192] 电容器需要在图 24、图 25 和图 26 中进行更多的描述。

[0193] 参考图 24,与孔 2 成轴向的电场具有复杂的结构。所述复杂的结构与常规电化学研究中的存在于金属电极附近的电极相类似。在远离凝胶 7 外表面的一定距离,在本体溶液中,电场平缓且不会明显随距离的变化而变化。接近凝胶 7 外表面时,电解质表现出增大的浓度,使得电场呈指数提升;这通常称为“古依-查普曼电层(Gouy-Chapman Layer)”。非常接近凝胶 7 外表面时,电解质形成双层交流电层;这通常称为“赫姆霍兹层(Helmholtz Layer)”。继续向上进入凝胶 7,电场降低。从凝胶 7 内表面离开后,电场的结构与外表面的结构呈镜像。

[0194] 参考图 25,凝胶 7 外表面的赫姆霍兹层中的强电场导致形成电荷,例如形成电子,且从电解质(或合适的氧化还原试剂)阴离子(或阳离子)转移到固定在表面的荧光团 12 中。分子 25 转移器电荷后,成为另一个分子 26。荧光团 12 的荧光特性由于电荷转移而发生改变。例如不带电状态下荧光素是非荧光性的,但是当带负电后,具有强荧光性。

[0195] 在这些孔 2 中的微粒在扩散之外还由力而被轴向驱动的机制的每一个例子中,移

动通道本身可能通过几种不同的机制被减速。一些这样机制的例子示于图 26、图 27 和图 28 中。

[0196] 参考图 26, 荧光团 21 可通过迁移力(例如来自电场、磁场梯度或重力场)而被在一条直线上移动, 如果路径上没有障碍物的话。然而, 如果存在障碍物, 例如分析物微粒 20 和分析物微粒 27, 则阴离子 22 和阴离子 23 将需要围绕分析物微粒运动, 降低荧光团轴向移动的速度。如果分析物微粒具有结合相互作用, 则会形成大复合物 28, 导致荧光团轴向运动速度降低得更多。例如, 典型的蛋白质, 例如牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA) 具有 4nm x 4nm x 14nm 的尺寸。使用 TEPC 滤纸 1 的 50nm 直径的孔 2, 单独的 BSA 蛋白会阻碍孔 2 的横截面的很大一部分(0.8% 至 2.9%), 因而显著降低荧光团流的速度。

[0197] 参考图 27, 大电解质阳离子 24 和大电解质阴离子 25 可由电场而被在一条直线上移动, 如果路径上没有障碍物的话。然而, 如果存在障碍物, 例如分析物微粒 20 和分析物微粒 27, 则阴离子 22 和阴离子 23 将需要围绕分析物微粒运动, 降低离子轴向移动的速度。如果分析物微粒具有结合相互作用, 则会形成大复合物 28, 导致离子轴向运动速度降低得更多。

[0198] 参考图 28, 障碍物 29、30 和 31 本身带电荷。施加电场后, 它们以复杂的方式与电解质或氧化还原试剂的移动相互影响。

[0199] 凝胶附近的荧光团的聚集或活化, 取决于孔 2 中的障碍物的性质, 提供了一种高敏感度的测量障碍物性质的方法。图 29 和图 30 示出了对荧光团使用紫外光, 以及所得的放射可见光。放射可见光的强度取决于凝集 7 附近活化的荧光团的浓度。位于距离孔 2 一定距离的不会发出荧光, 因为 TEPC 滤纸 1 的聚碳酸酯材料较强地吸收紫外光。注意到虽然本方法的主要优点在于避免用荧光团标记分析物微粒, 但是标记有荧光团的分析物微粒也落在本发明的范围内。

[0200] 图 32 示出了样品载入状态下的整个装置。分析物的液体流, 例如从色谱柱 32 中洗提出的序列复杂的蛋白质, 被引导流入 TEPC 滤纸 1 的特定区域。在另一侧施加较低的压力使得溶剂和其他小分子通过 TEPC 滤纸 1 和凝胶 7, 使分析物微粒聚集在 TEPC 滤纸 1 的孔 2 中。由于分析物微粒从色谱柱 32 中洗提出来, 因此 TEPC 滤纸 1 的表面以扫描的方式移动。所洗提的不同分析物微粒被捕获在 TEPC 滤纸 1 中空间上不同的位置。按照这样的操作, 可以对从色谱柱 32 中洗提的不同分析物微粒进行第二次扫描, 在 TEPC 滤纸 1 的区域上产生大量的特有二级混合物(其比例是可以控制的)。进一步的扫描可以用来对孔 2 中的群增加更多的复杂性。这与用于降低蛋白质交叉反应问题的“夹心阵列(Sandwich Array)”技术在功能上是等同的。还可以在孔 2 中使用液体胶束、胶体、固定材料或噬菌体抗体展示技术, 使得留存的分析物微粒与环境发生相互作用。并且, 还可以从一组孔 2 中提取出分析物微粒并添加到另一组孔 2 中。

[0201] 图 34 示出了测量状态的整个装置。将一束荧光激发光, 例如紫外光, 引导向表面例如凝胶 7 的表面。通过镜片 35 或光导管、以及光敏器件例如数码相机, 来收集荧光激发光例如紫外光。在照片影像 37 中有来自相机的信息。

[0202] 参考图 36, 当施加了迁移力(例如来自电场、磁场梯度或重力场)时测量结果为一系列变化中的照片影像 37。起初, 照片影像相对较暗。短暂时间过后, 大部分区域发出荧光, 除了几个具有明显迁移障碍物(例如分析物微粒)的延迟区域。然而马上, 随着这些延迟

区域也完成迁移,影像的而整个区域均匀发出荧光。这种延迟区域的暂时性性质与为非延迟区域相关,是分析信号的基础。

[0203] 参考图 38,荧光通过存在蛋白质的区域以及不存在蛋白质的另一区域的时间函数进行图表化。启动电场 E 以后,蛋白质的存在导致电流 i 级别的垂直(增加)变化,可以通过测量 Δ 电流 i 来量化。

[0204] 参考图 40,比较存在蛋白质与不存在蛋白质的理论结果。在循环中电场 E 重复被激活,得到重复的 Δ 电流 i 测量值。在更长的时间规模中,动水压 P 也在循环中重复启动。当增加的压力导致蛋白质聚集,则 Δ 电流增大。当解除压力,则蛋白质向外扩散, Δ 电流减少。循环启动静水压使得得到一系列连续的 Δ 电流峰,求其平均值以用作蛋白质存在的敏感度检测。

[0205] 参考图 42,比较蛋白质结合存在的理论结果。与其他蛋白质结合的蛋白质具有较强的位阻效应,成为较大的障碍物且具有较低的扩散速率;由此得到一系列连续的 Δ 电流 i 峰,其幅度较大。不与其他蛋白质结合的蛋白质具有较弱的位阻效应,不会成为较大的障碍物且不会具有较低的扩散速率;由此得到一系列连续的 Δ 电流峰,其幅度较小。注意到由于存在多重蛋白,因此会具有多个较小幅度的峰。

[0206] 图 43 总结性示出了测量结果。通过测量得到穿过 PETC 滤纸 1 区域的分析物微粒性质的图。某区域 38 将具有执行本方法的科学人员感兴趣的测量性质。对这些区域中内容物的鉴定可以通过多种技术来进行,例如质谱,或者利用原始传递该内容物的色谱系统的信息。

[0207] 通过使用相似的结构,例如有孔的单层膜,来代替 TEPC/凝胶结构,会得到基本上相同的功能,其中扩散时径向的而不是轴向的。

[0208] 第三实施方式概述

[0209] 特别构建的层状材料形成一组装载有多重空间分离的分析物颗粒的池,且所述多层材料做质谱取样。结果得到多种分析物微粒的混合物的图,能提供关于生物样品的有用信息。

[0210] 根据本发明第三实施方式的方法

[0211] 在根据本发明第三实施方式的方法中,TEPC 滤纸(或功能性等同的结构)的孔具有限制的开口。将受控基质中的均匀或不均匀的分析物微粒群体载入 TEPC 滤纸的孔中,且孔的末端由球状体以力量紧紧盖住。将组件载入真空腔室中,照射激光束,并将所得的蒸汽导入到质谱腔中。通过离子化和质荷比检测来鉴定分析物微粒。

[0212] 现结合图 44 至图 48 对本发明的方法进行描述。

[0213] 参考图 44,通过在孔 2 每一端放置一个球状体 14,将分析物微粒 20、22 和 23 的混合物装入 TEPC 滤纸 1 的孔 2 中。

[0214] 参考图 45 和图 46,将 TEPC 滤纸 1 在两个平坦的辊之间压紧产生力 39,使得每个球状体 14 堵塞孔 2 的两端。然后将 TEPC 滤纸 1 从预备装置移除,得到图 16 所示的包含分析物微粒的稳定材料。

[0215] 参考图 47,将稳定材料放入真空室中。通过阻塞孔 2 且密封水性基质的球状体 14,从而在真空下保护孔 2 中含有分析物微粒的水性基质。通过薄聚合物膜外衣进一步进行密封。然后将强烈的、聚焦的激光束 40 引导入孔 2 中。

[0216] 参考图 48, 激光束将使 TEPC 滤纸 1 的孔 2 的上部阻塞物汽化, 导致水性基质向外暴露在真空中, 分散成气体。这与基质辅助激光解析电离(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) 分析相类似。然而, 生物样品受到的热压要小得多, 得到复杂性较低的裂解谱。这种复杂性降低在分析上是有用的。

[0217] 总结

[0218] 本方法的范围囊括检测、表征和鉴定分析物微粒, 以及利用纳米级别的池的性质来表征它们之间的相互作用。

[0219] 本方法用于执行这样的任务, 这些任务中存在各种不足, 例如受到标记技术和交叉反应的干扰。本方法消除了这些不足。并且, 本方法在分析极低浓度的分析物微粒时极为有用。

[0220] 本方法特别有用的领域是生物技术, 用于测量蛋白质相互作用。每个生物系统中都使用极大量的蛋白质, 这些蛋白质依赖许许多多因子而相互作用成一个复杂的网络。疾病会扰乱这些工作, 添加和去除其中成分和相互作用途径。理解这些系统能够对疾病进行早期诊断, 并提供了一种通过药物治疗的化学修复方式。人们研究了这些系统中最为大量和稳定的蛋白质, 但是尚需要更多的研究。为医药研究者们增加新且有用的手段, 例如本发明的方法, 将会加深对蛋白质网络的理解, 并使得能够发展处新的药物疗法。

[0221] 本文中所使用的术语“微粒”包括分子、细胞、多细胞结构、亚细胞组分、病毒、朊病毒、蛋白质、聚合物、离子、胶体和荧光团。微粒可以悬浮或溶解。微粒不必须是生物相关微粒。

[0222] 本文中所使用的术语“分析物”是指欲测的微粒。

[0223] 本文中所使用的术语“凝胶”并不限于其严格的技术定义, 而是也一般地包括与限制分析物微粒扩散相关的任何材料。术语“凝胶”意向包括但不限于, 明胶、琼脂糖、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、渗透性聚合物、渗透性共聚物、淀粉、气凝胶、火棉胶、透析膜、不混溶液体、以上所列任一种材料的化学改性形式、嵌入有微粒的以上所列任一种材料、及以上所列材料的组合。

[0224] 本文中所使用的术语“不混溶液体”包括与分析物微粒基质不混溶的液体。

[0225] 本文中所使用的术语“较大”用来描述不能通过 TEPC 滤纸孔末端限制的微粒, 例如通过凝胶限制。本文中所使用的术语“较小”用来描述能够通过 TEPC 滤纸孔末端限制的微粒, 例如通过凝胶限制。

[0226] 本文中所使用的术语“力”包括由电场产生的力、由磁场梯度产生的力、由重力场产生的力、向心力、离心力、由动水压产生的力、由静水压产生的力、或者这些力的组合。

[0227] 电场可以电容性生成, 与离子或氧化还原物没有直接的电极接触。可以使用多组电极来实现所需的电场。例如, 可以使用一组电极来发生强迁移力, 通过使用另一组电极来测量分析物微粒。

[0228] 对电流的测量可以针对恒定的电阻、电导率、阻抗、电容、感应系数或其组合来测量。例如可以通过测量电容来帮助表征类脂微泡(Lipid Micelle)、整个细胞、或具有阻抗边界的其他材料; 再例如通过测量感应系数来帮助表征手性分析物。

[0229] 可以通过完整细胞的原位破裂或其他技术, 以及标准色谱技术, 将分析物微粒传递到装置中。

[0230] 所述 TEPC 材料或其功能等价物中的孔或眼,其尺寸可以设为紧密配合单独的细胞,因而电阻抗和电容很大程度上由细胞本体决定。

[0231] 本发明所述的方法可以与传统的微通道阵列技术(Microchannel Array technology)、即通常所谓的“芯片实验室(Lab-on-a-Chip)”技术相结合。

[0232] 虽然参照某些优选实施方式来描述本发明,但是本领域的技术人员应当认识到,在本发明的权利要求所限定的精神和范围内,可以进行其他增添、删除、替代、改变或改进。

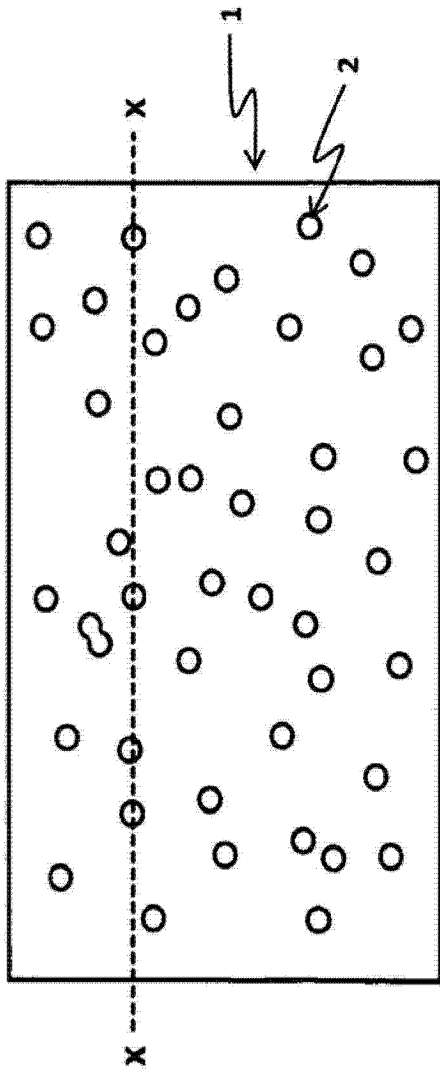


图 1A

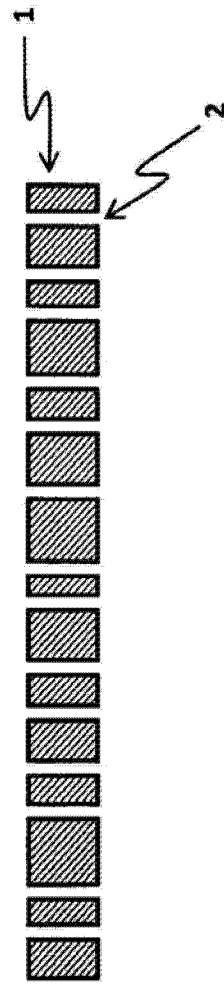


图 1B

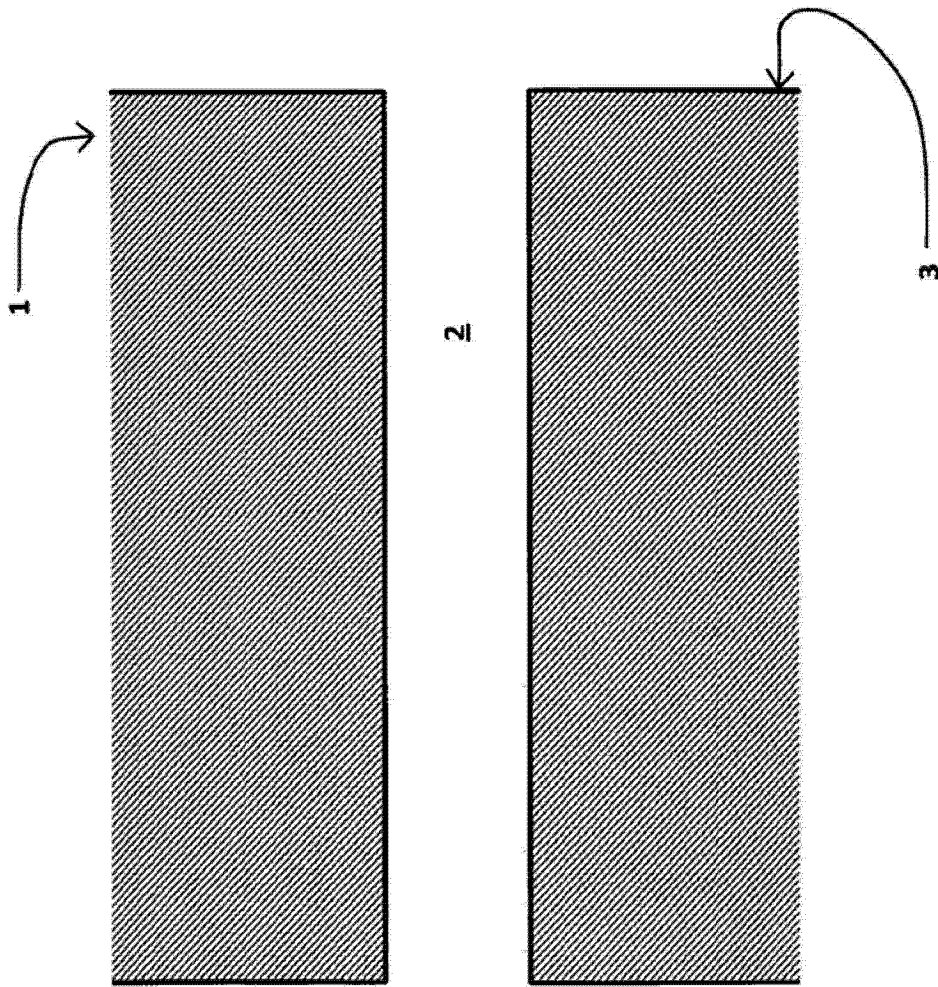


图 2

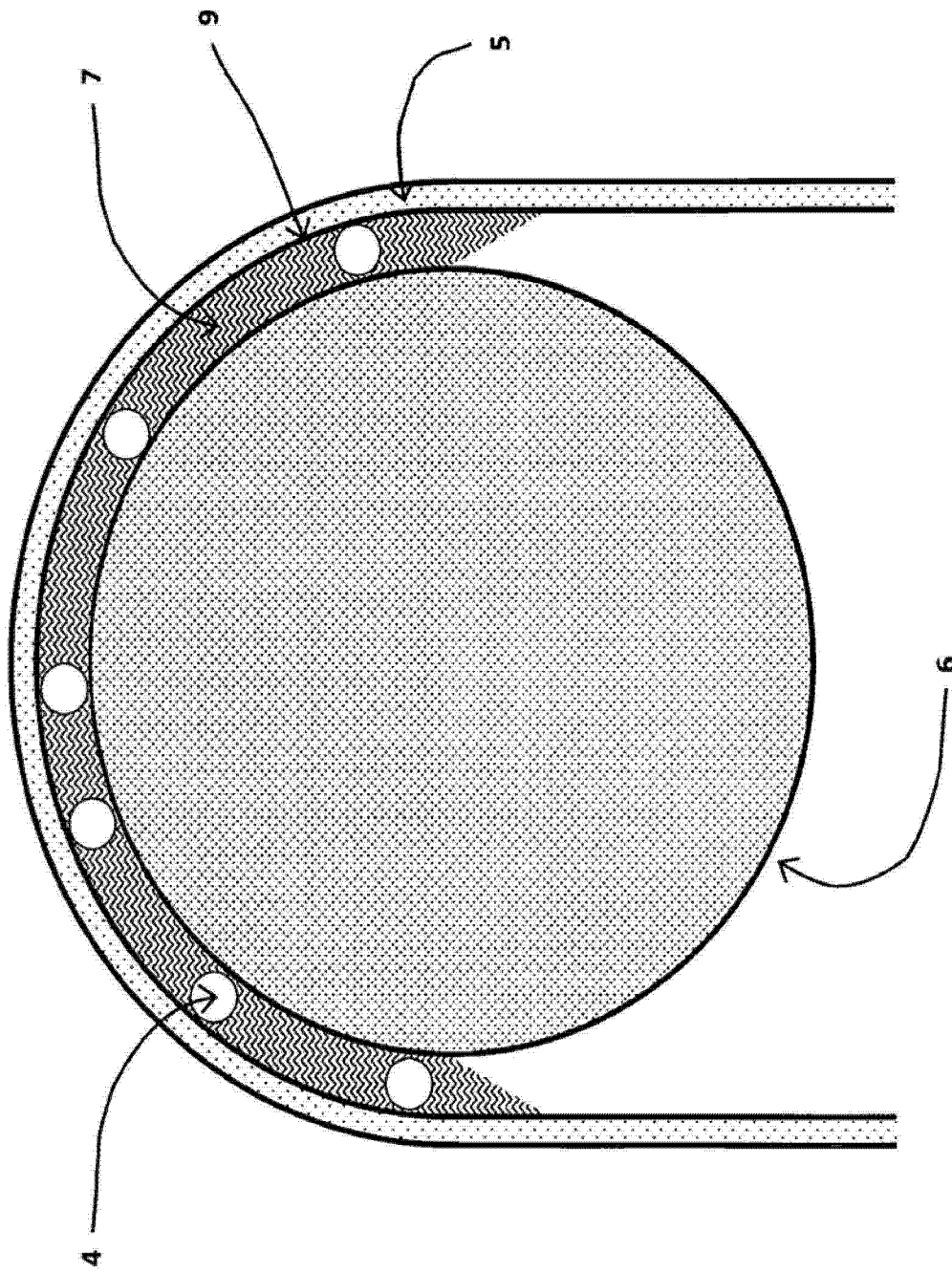


图 3

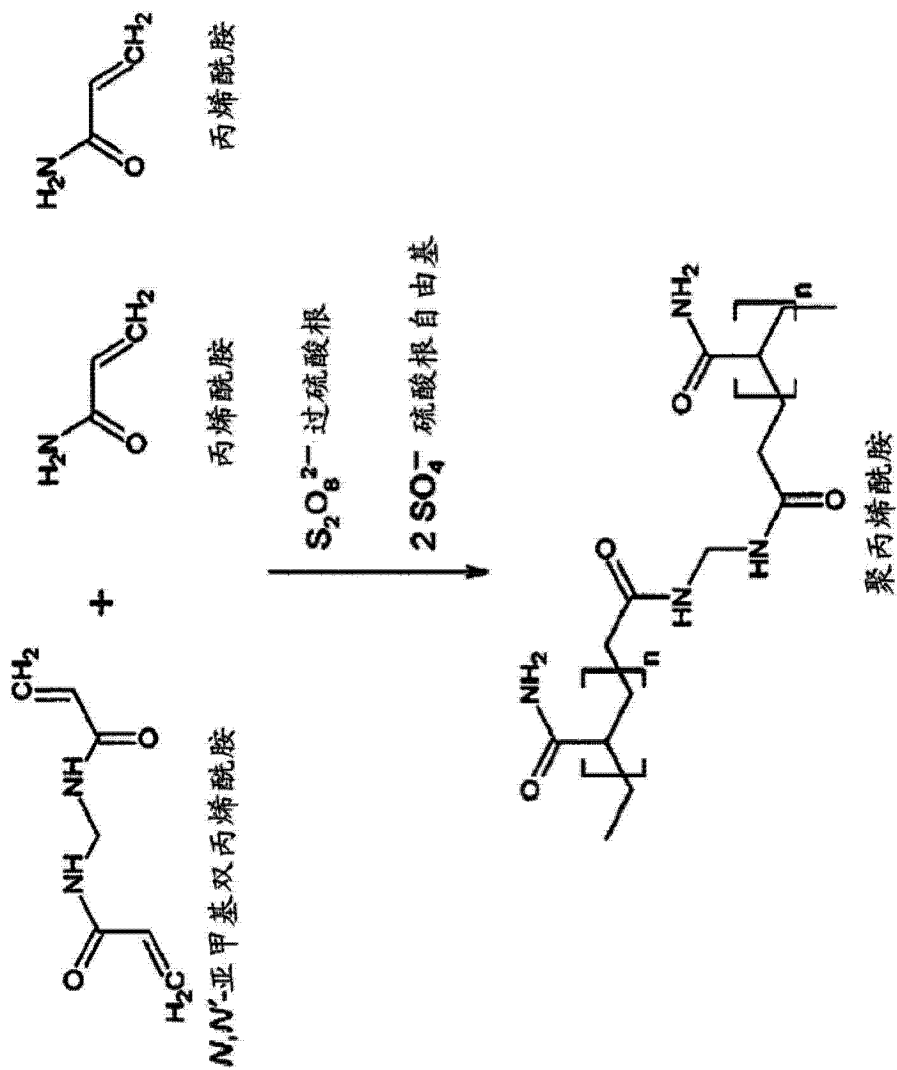


图 4

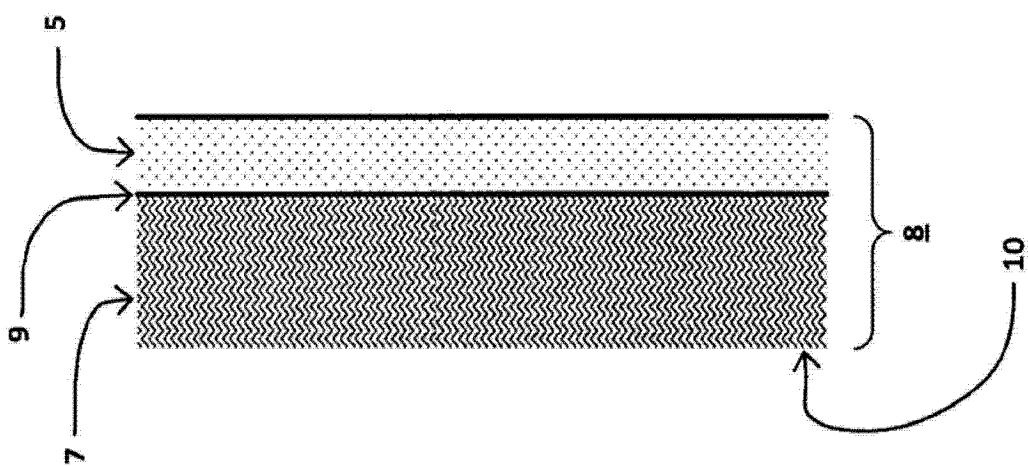


图 5

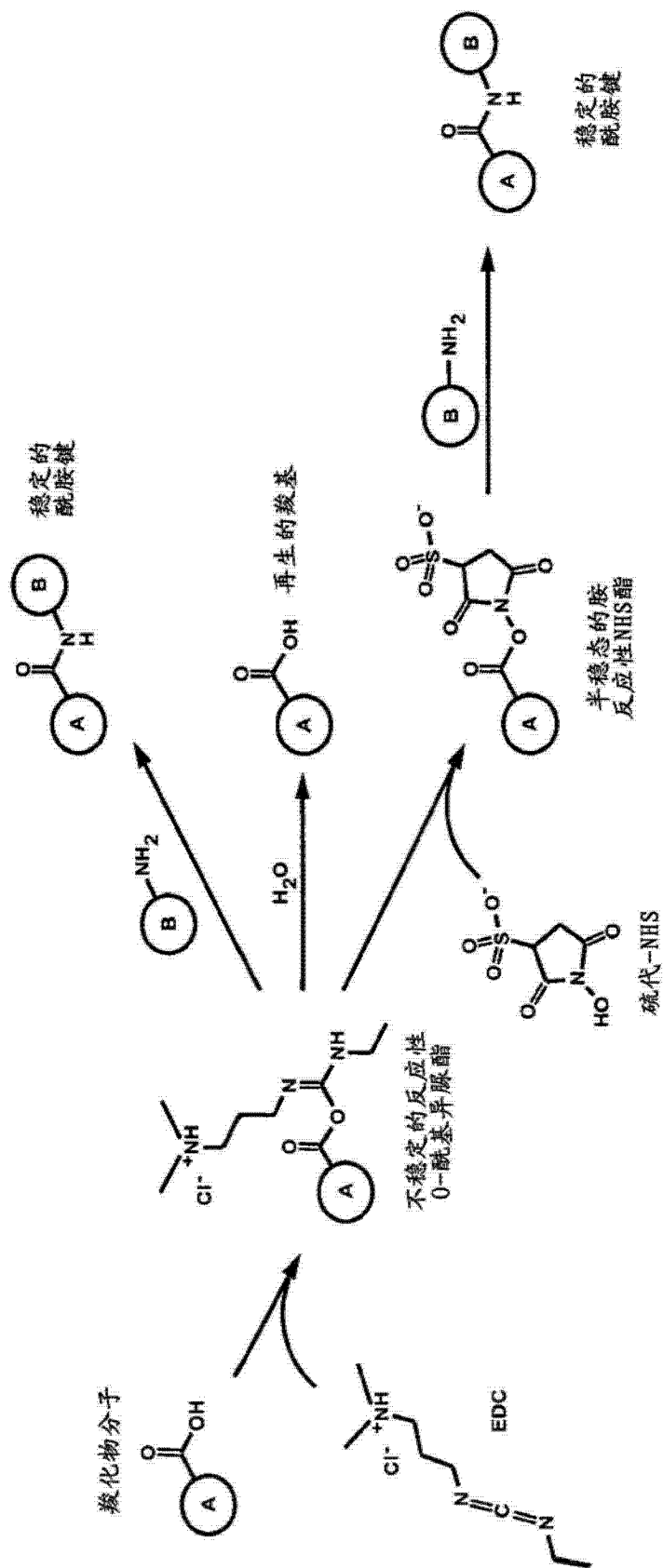


图 6

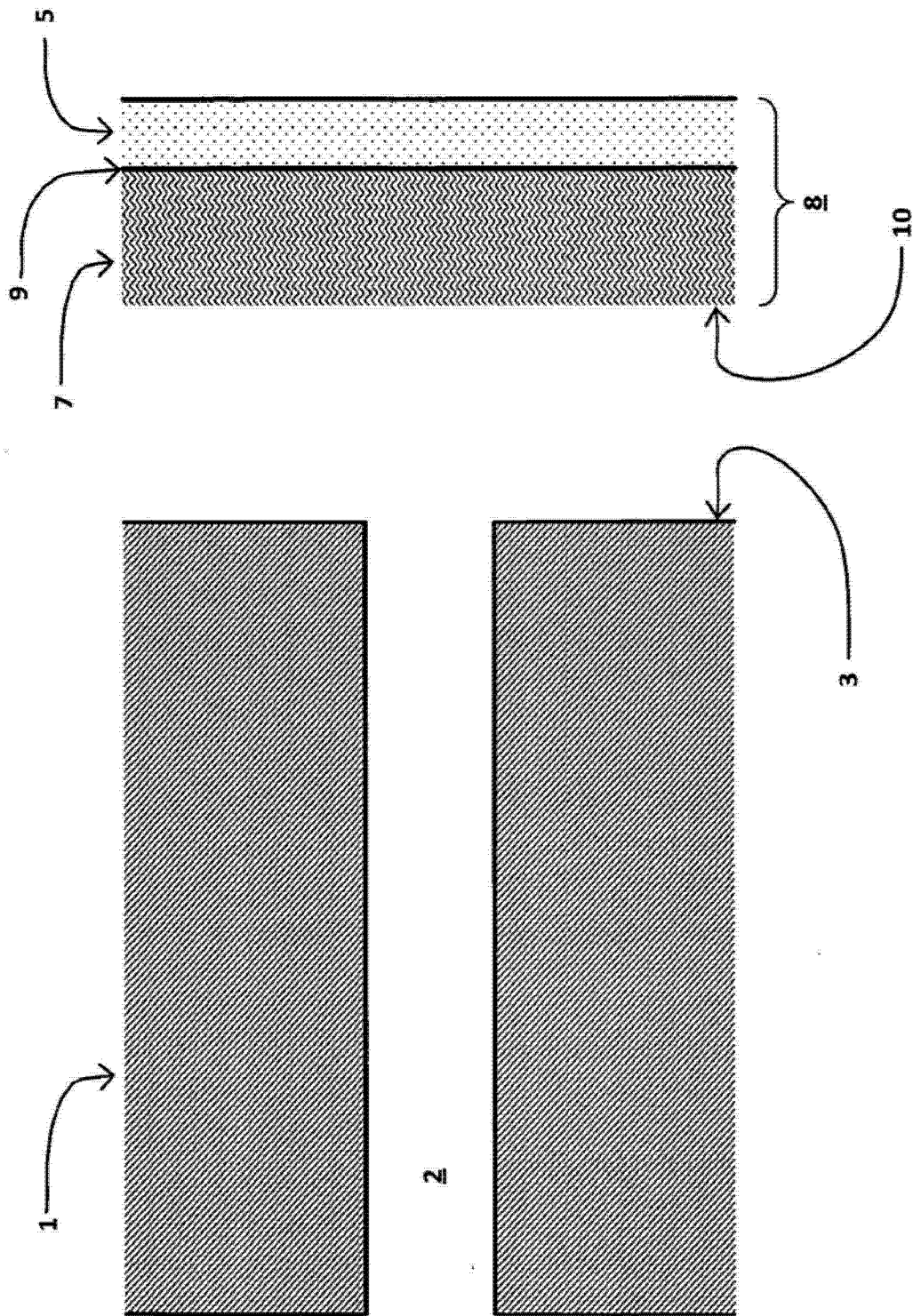


图 7

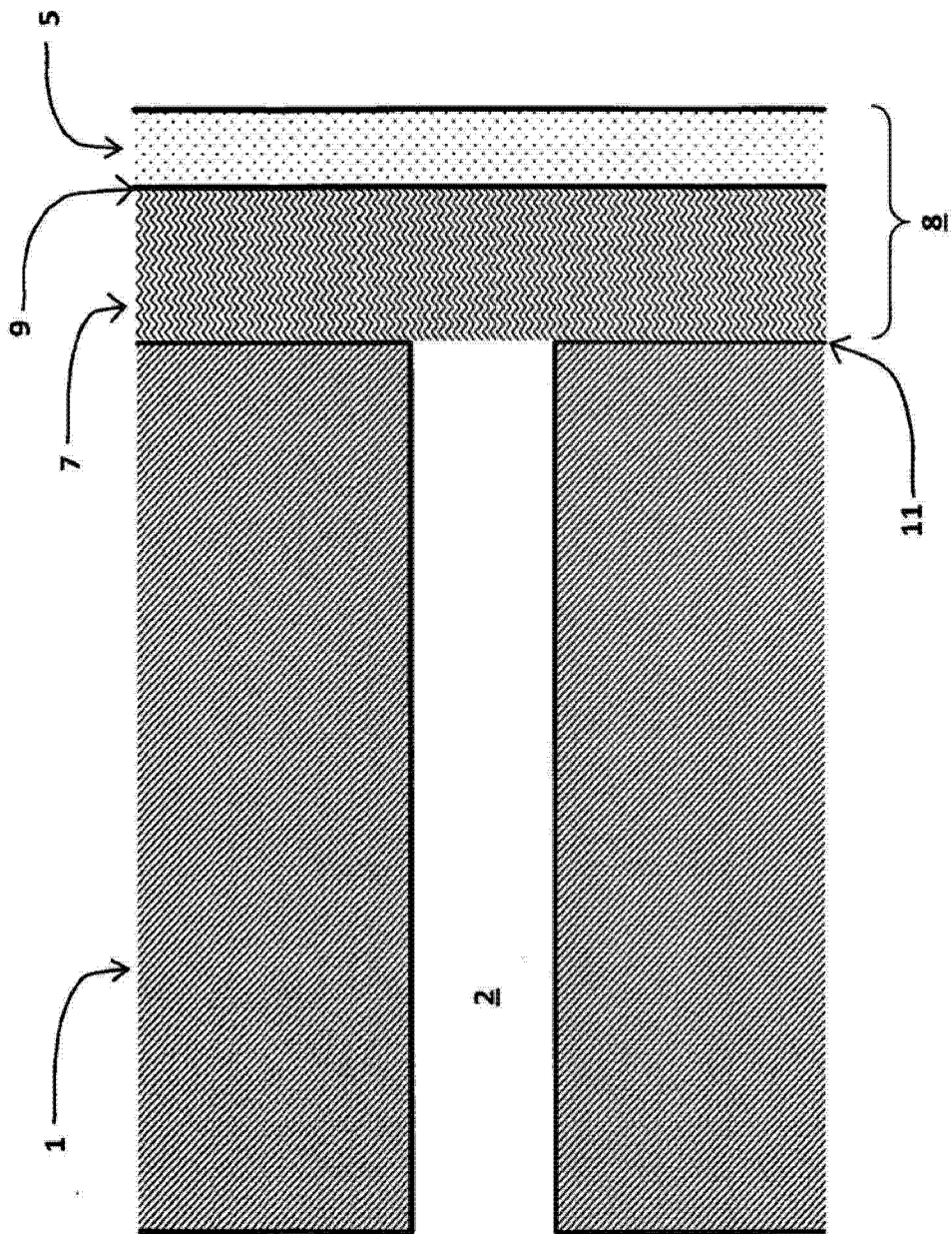


图 8

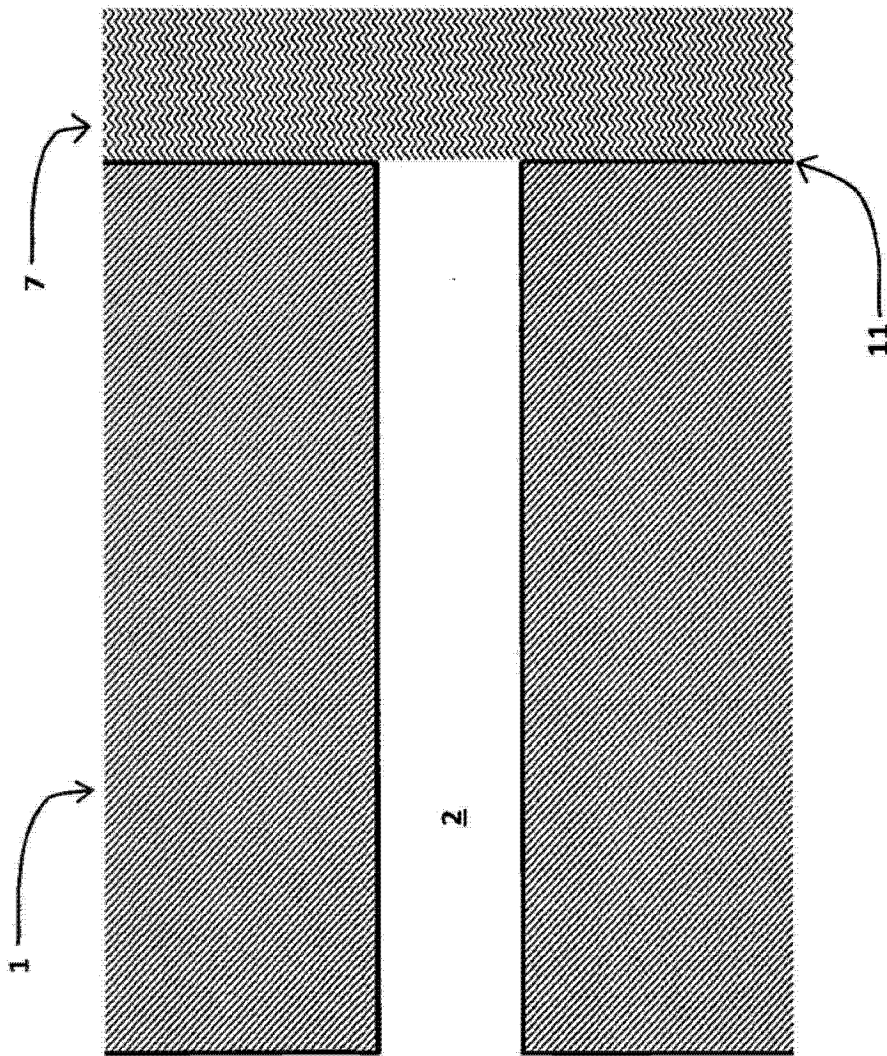


图 9

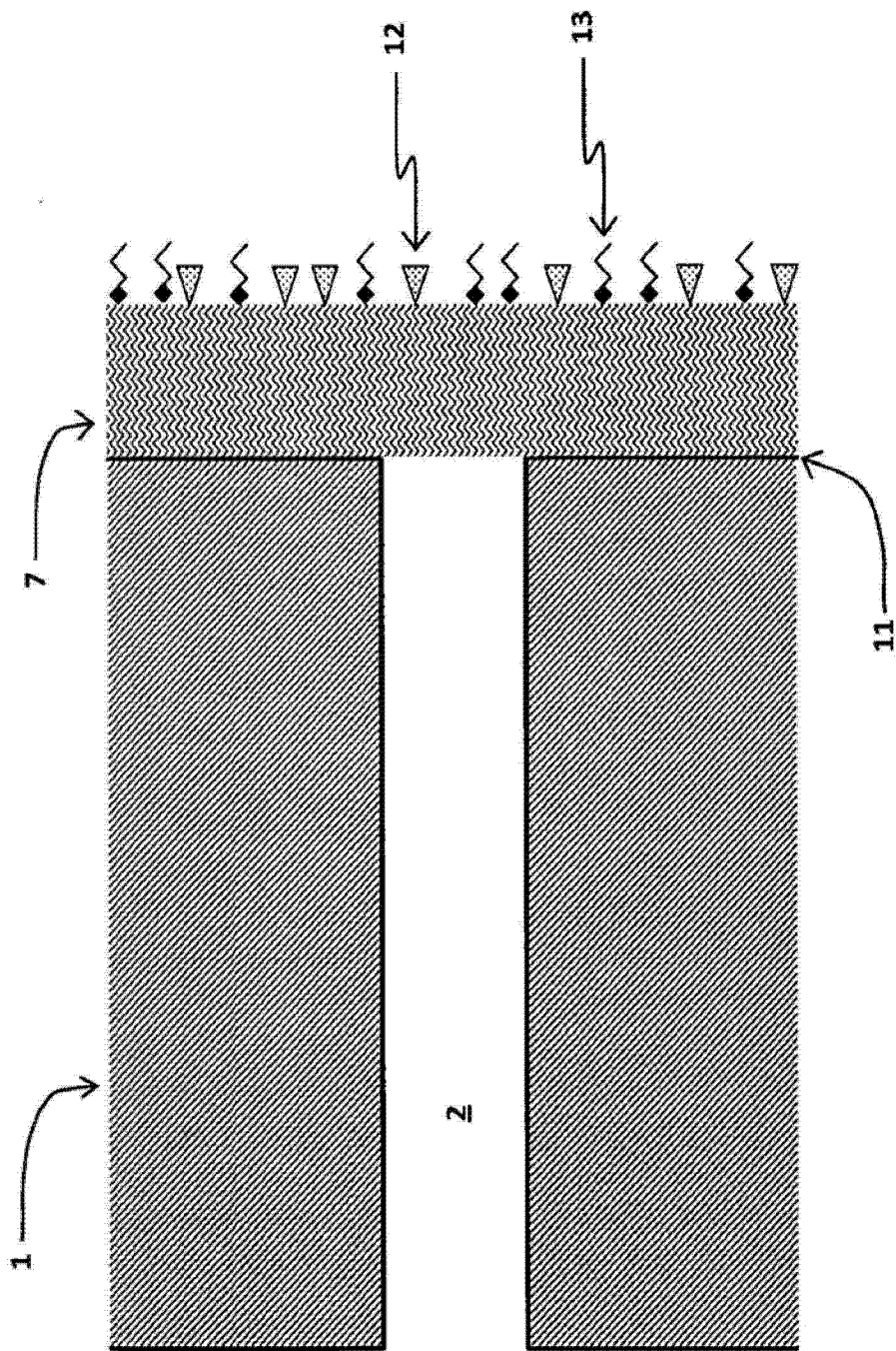


图 10

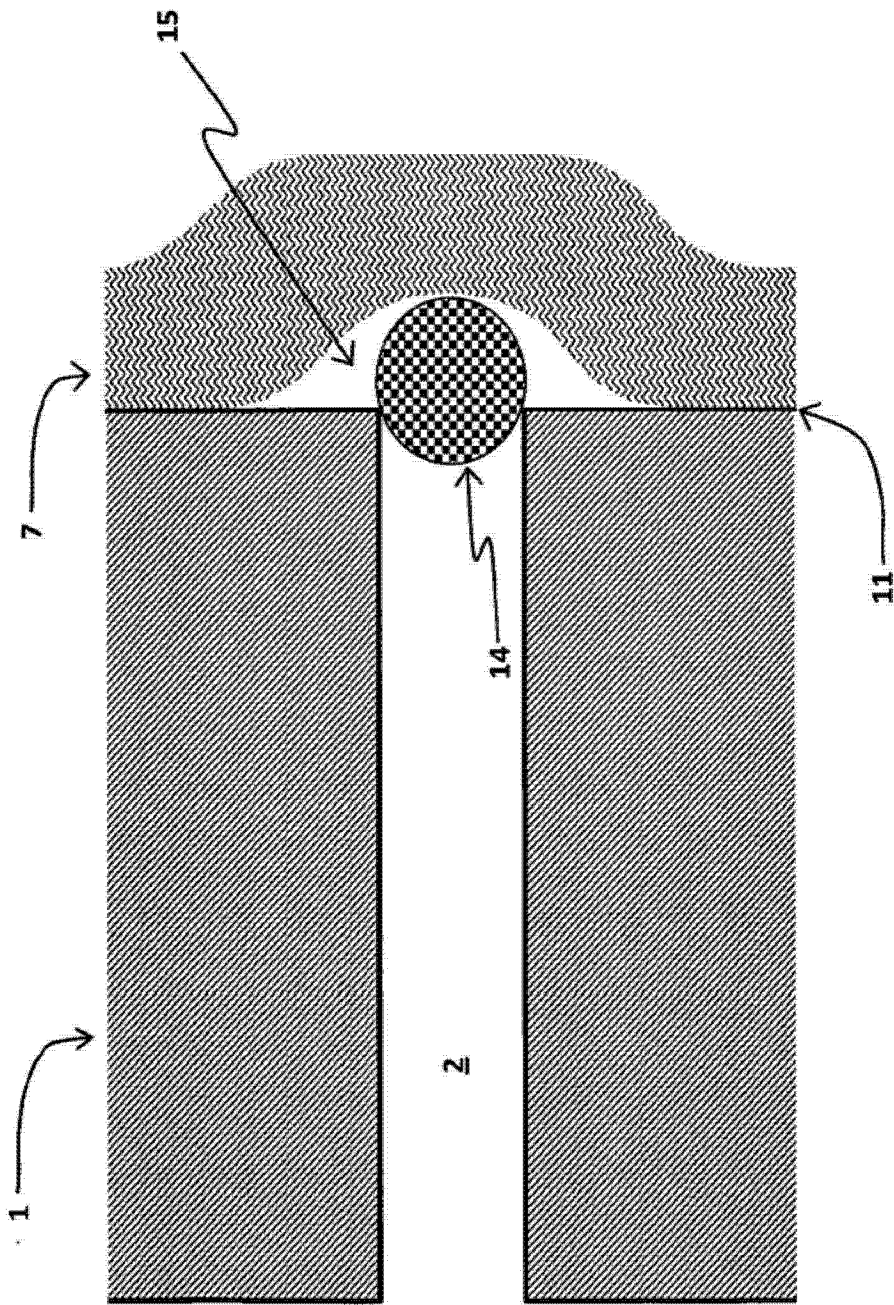


图 11

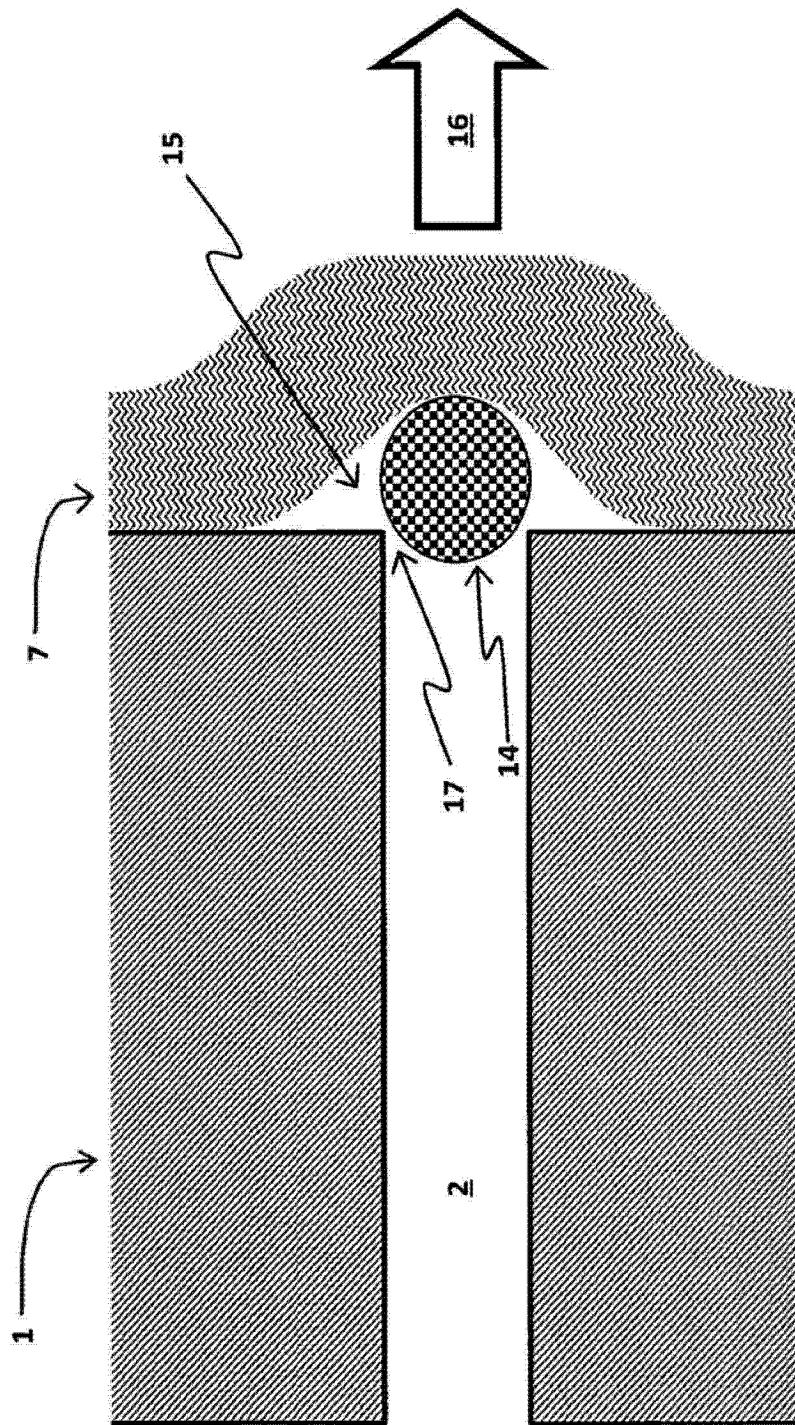


图 12

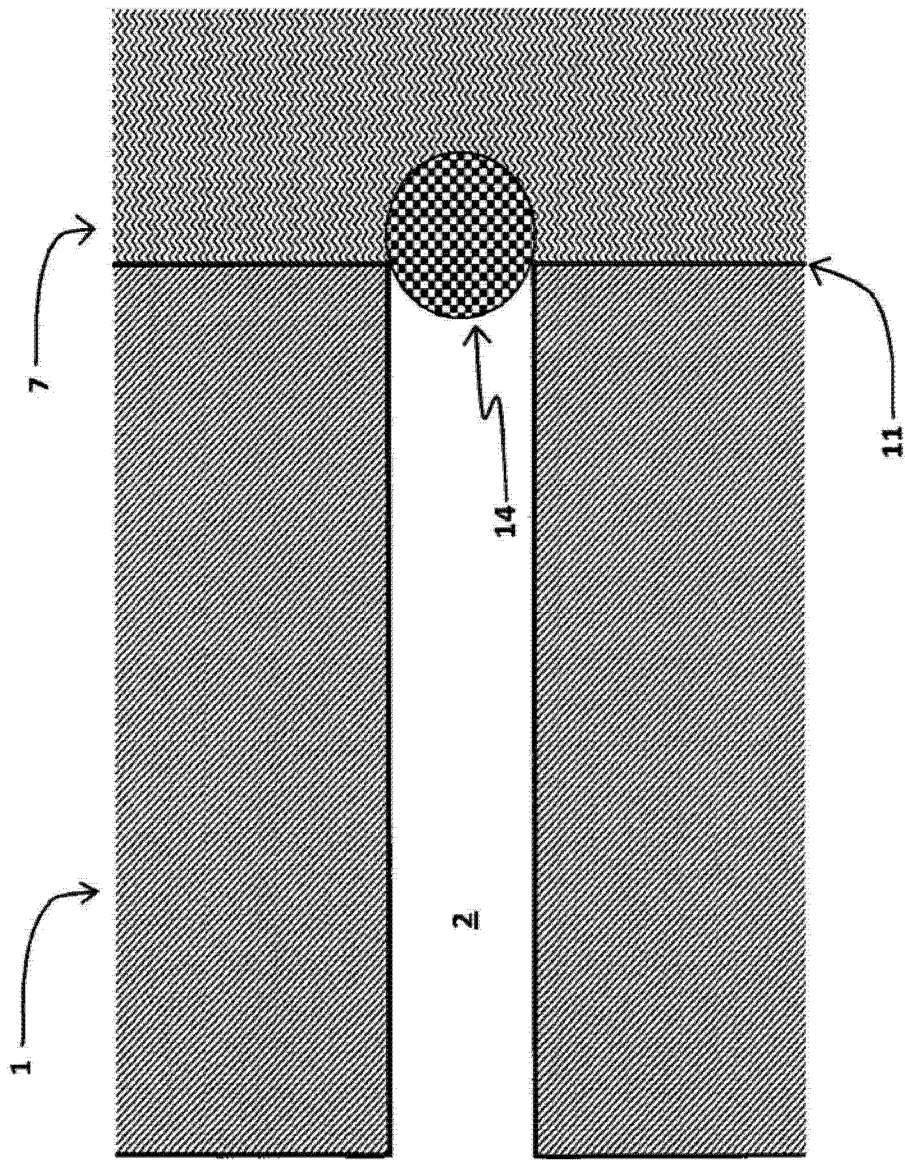


图 13

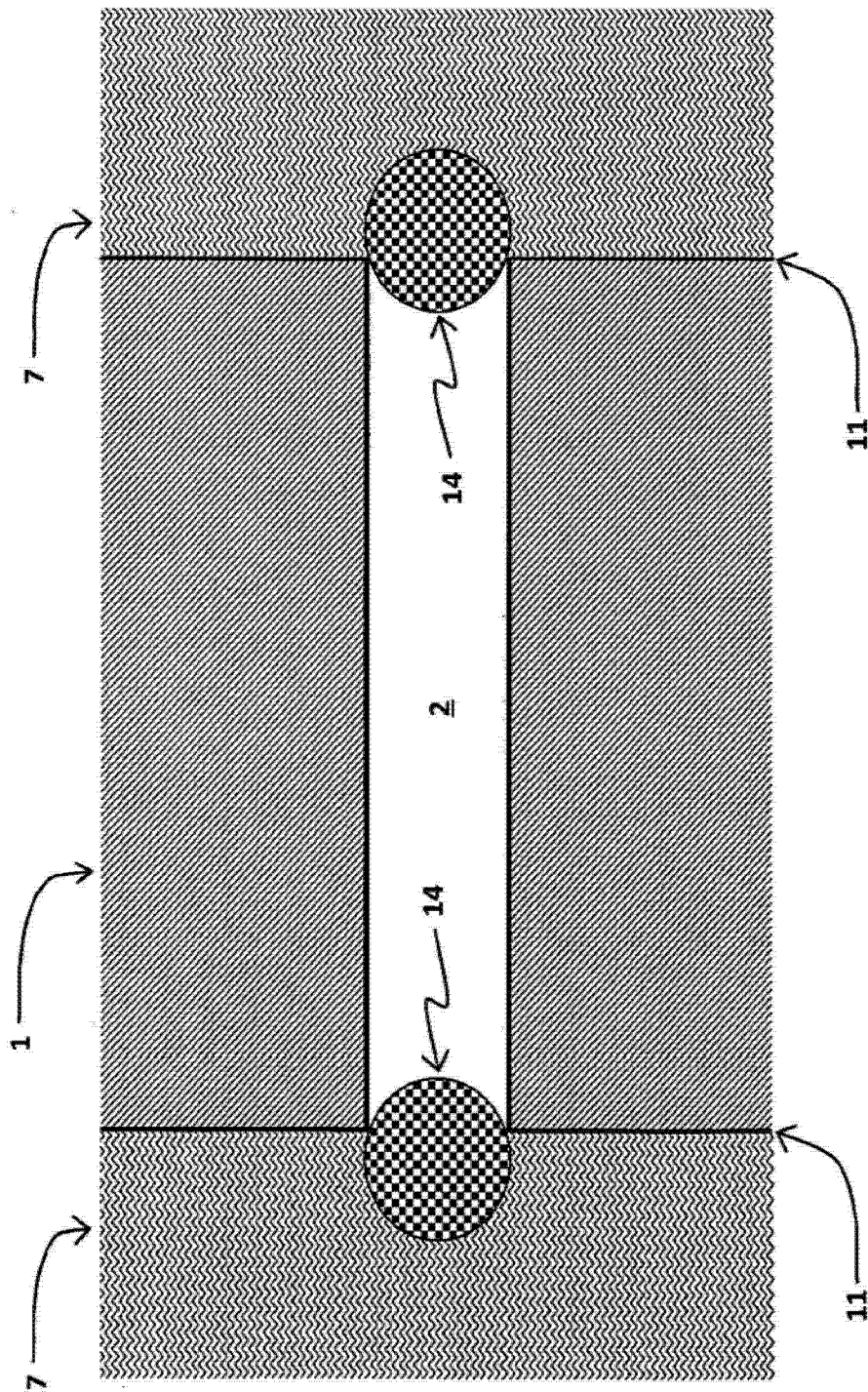


图 14

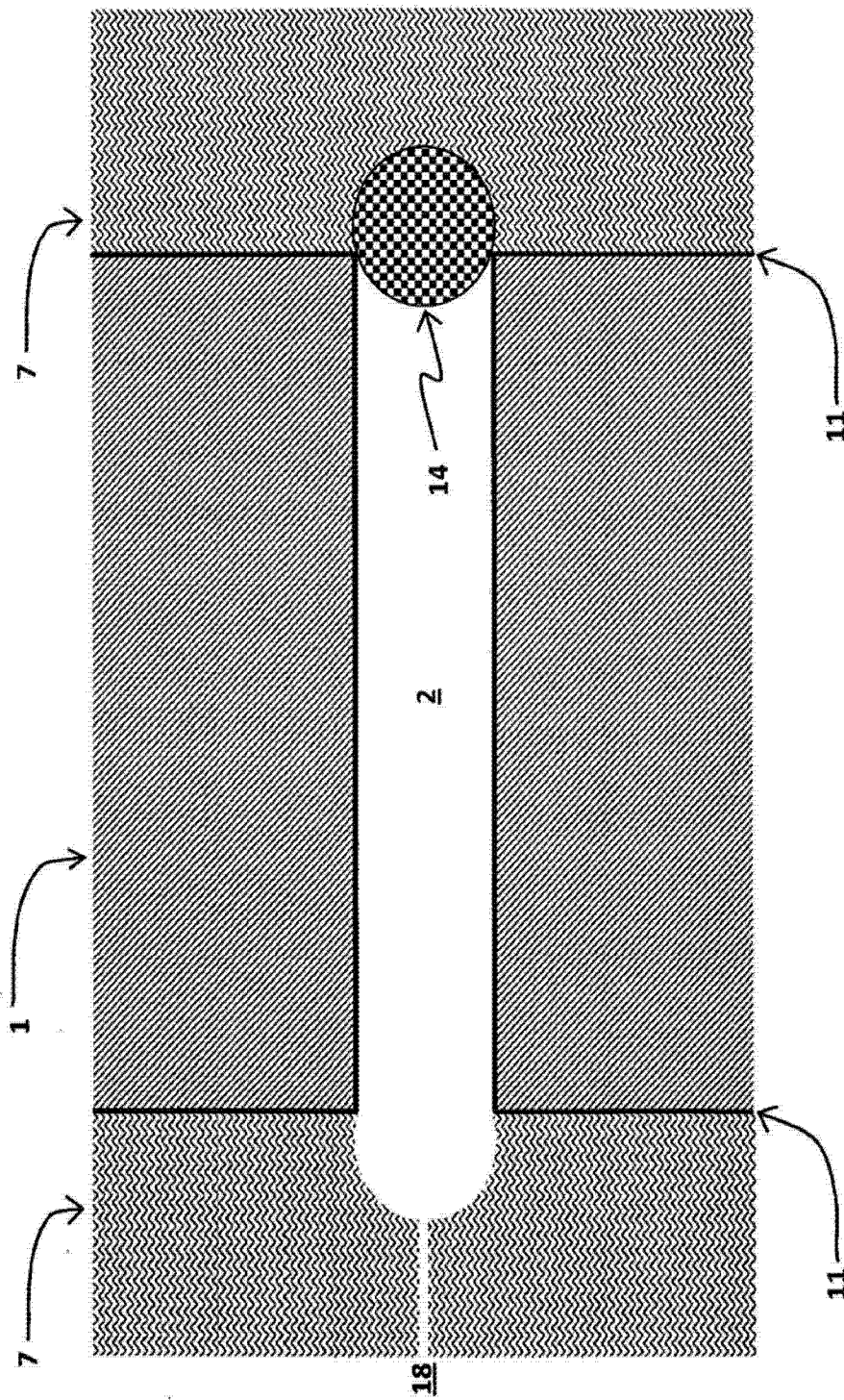


图 15

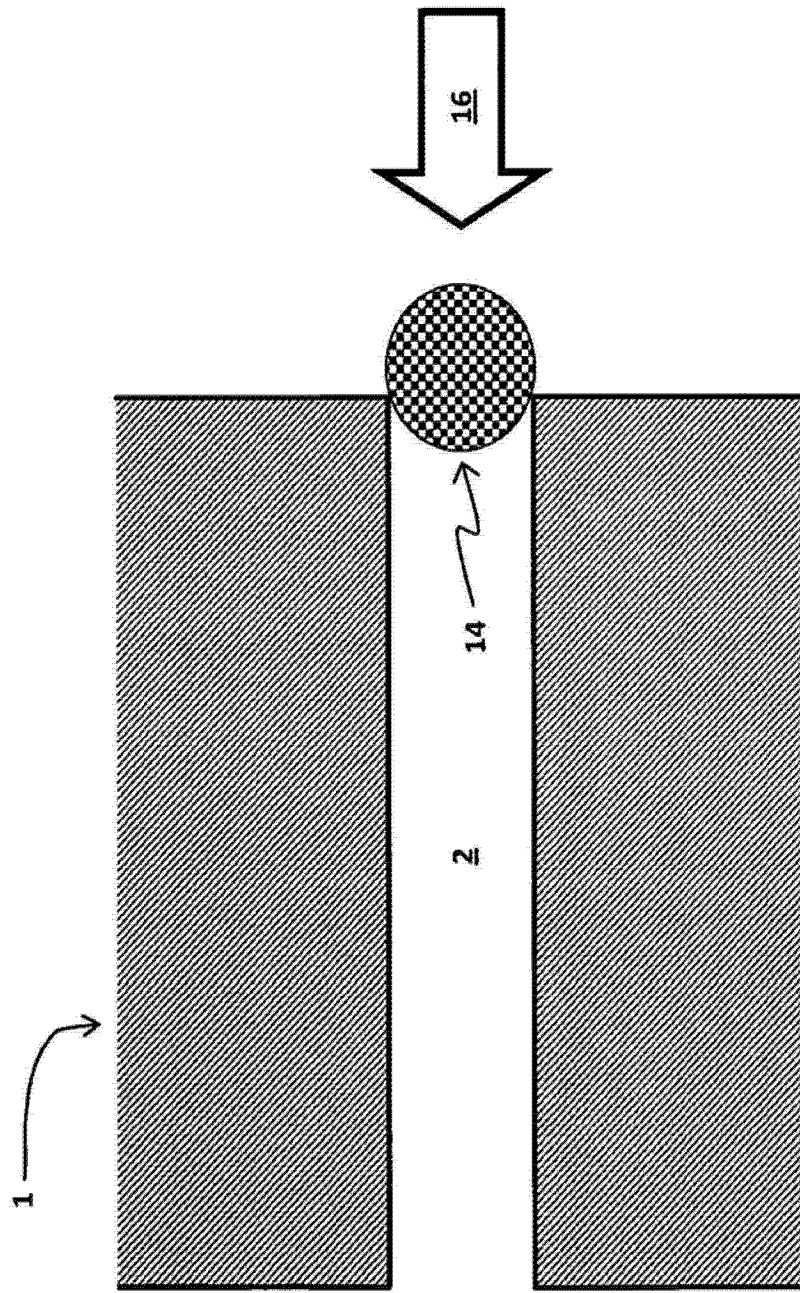


图 16

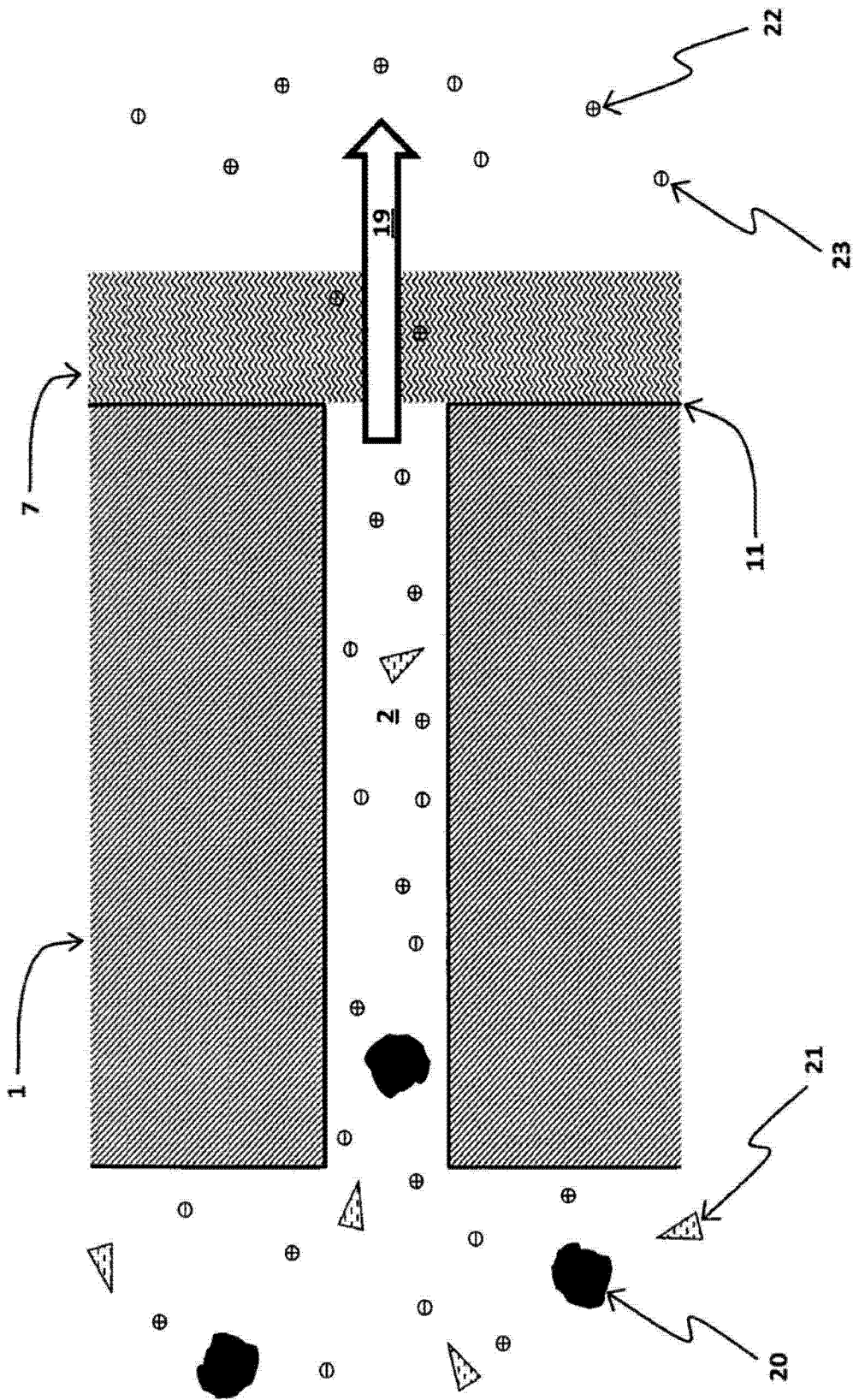


图 17

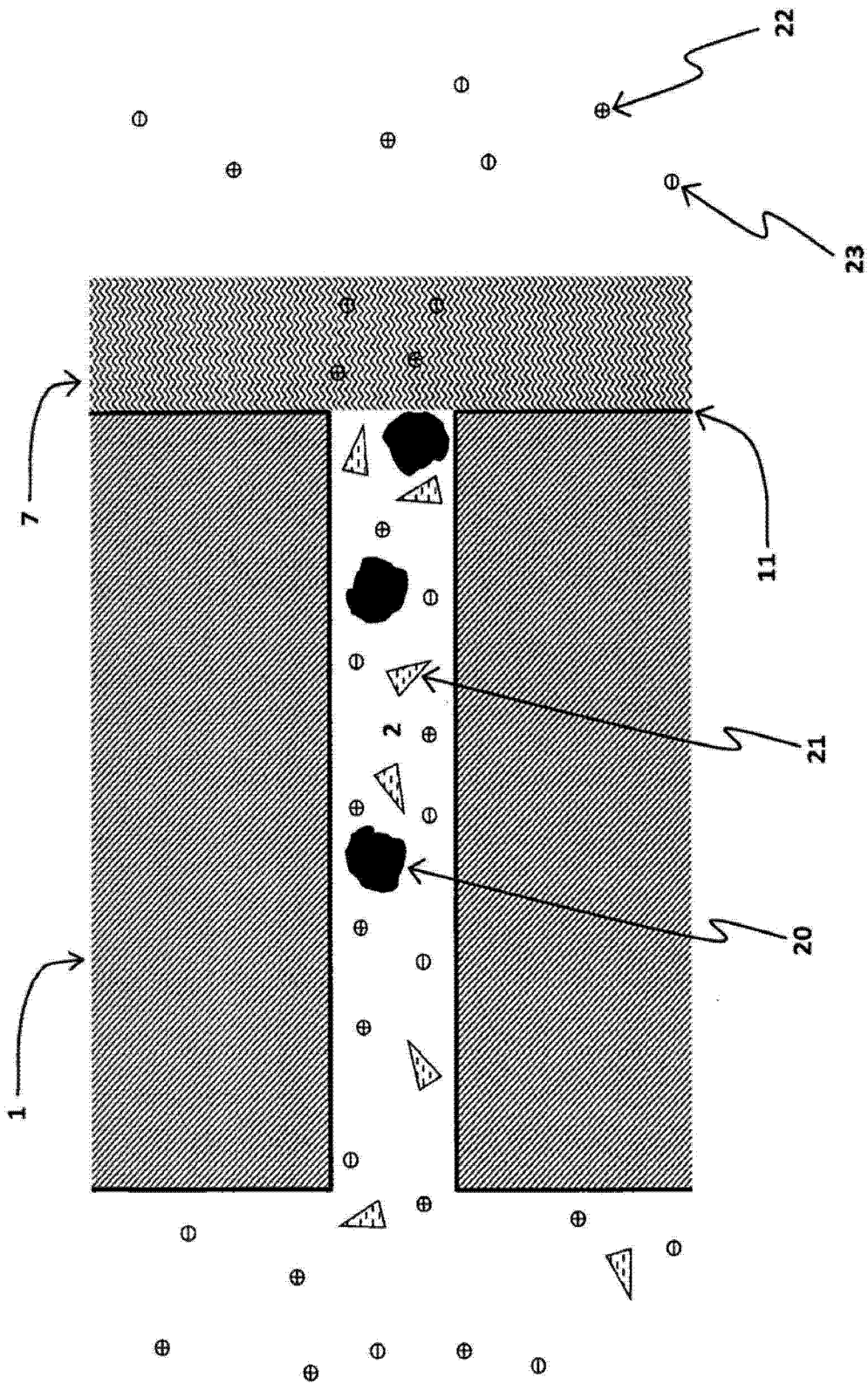


图 18

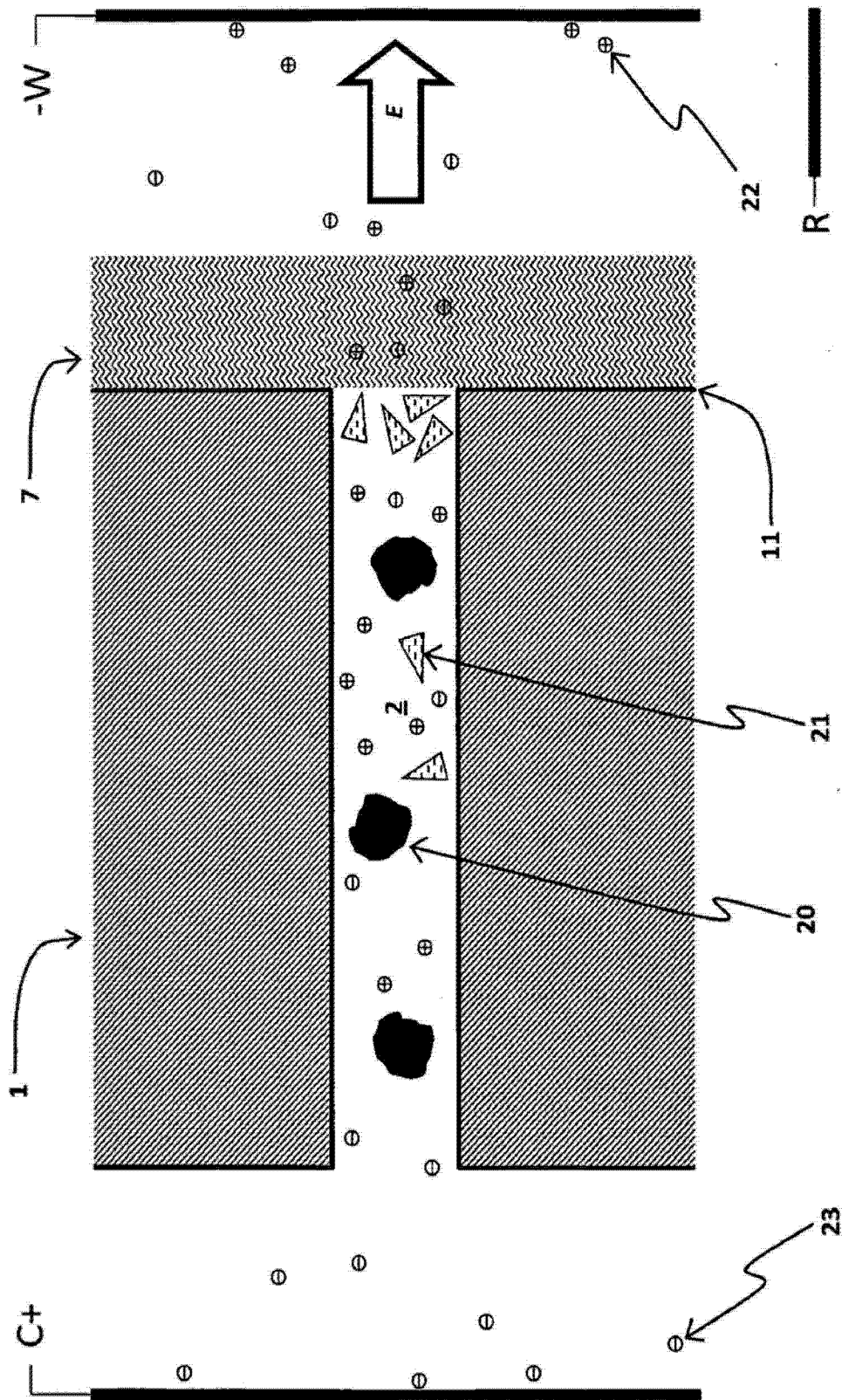


图 19

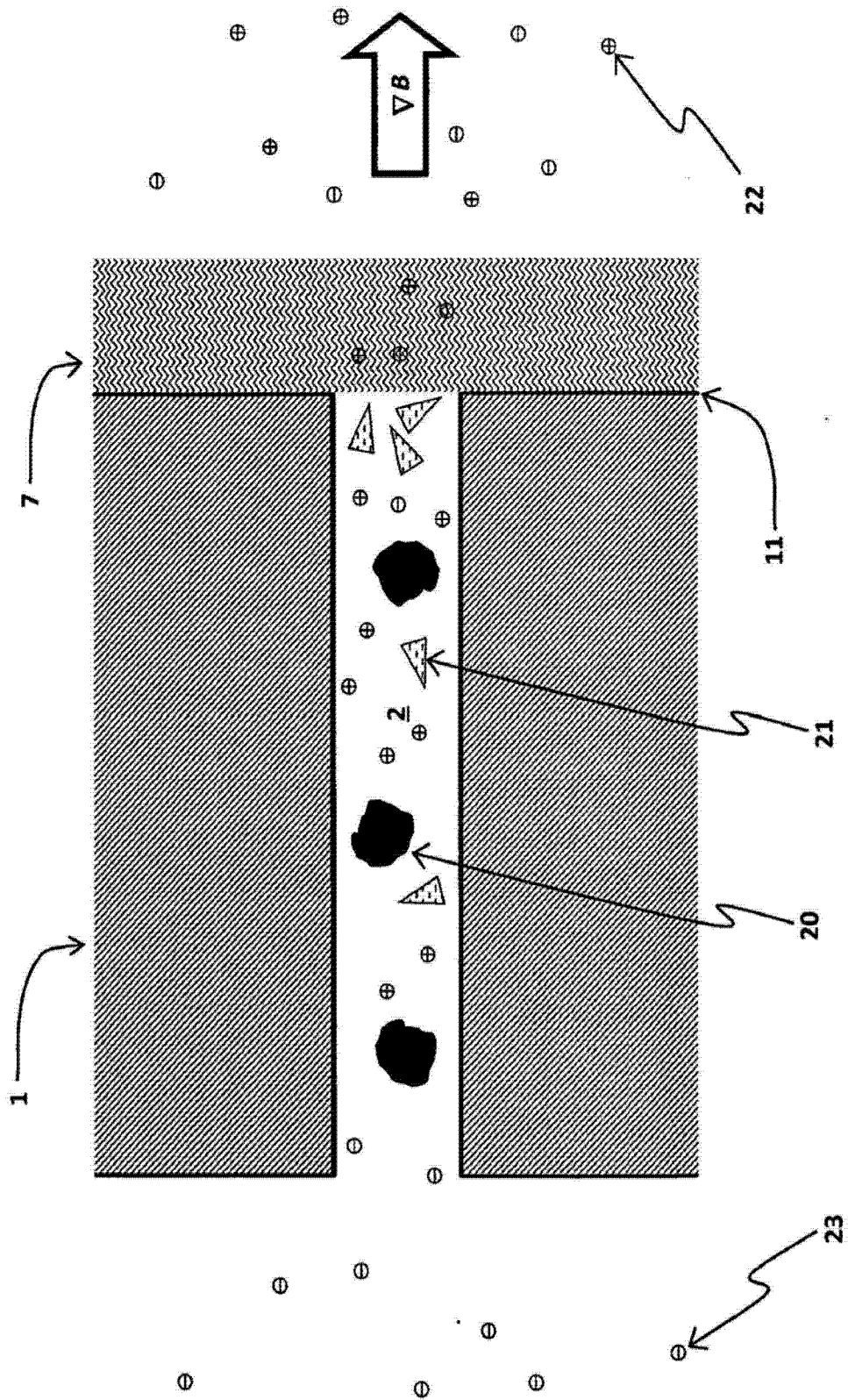


图 20

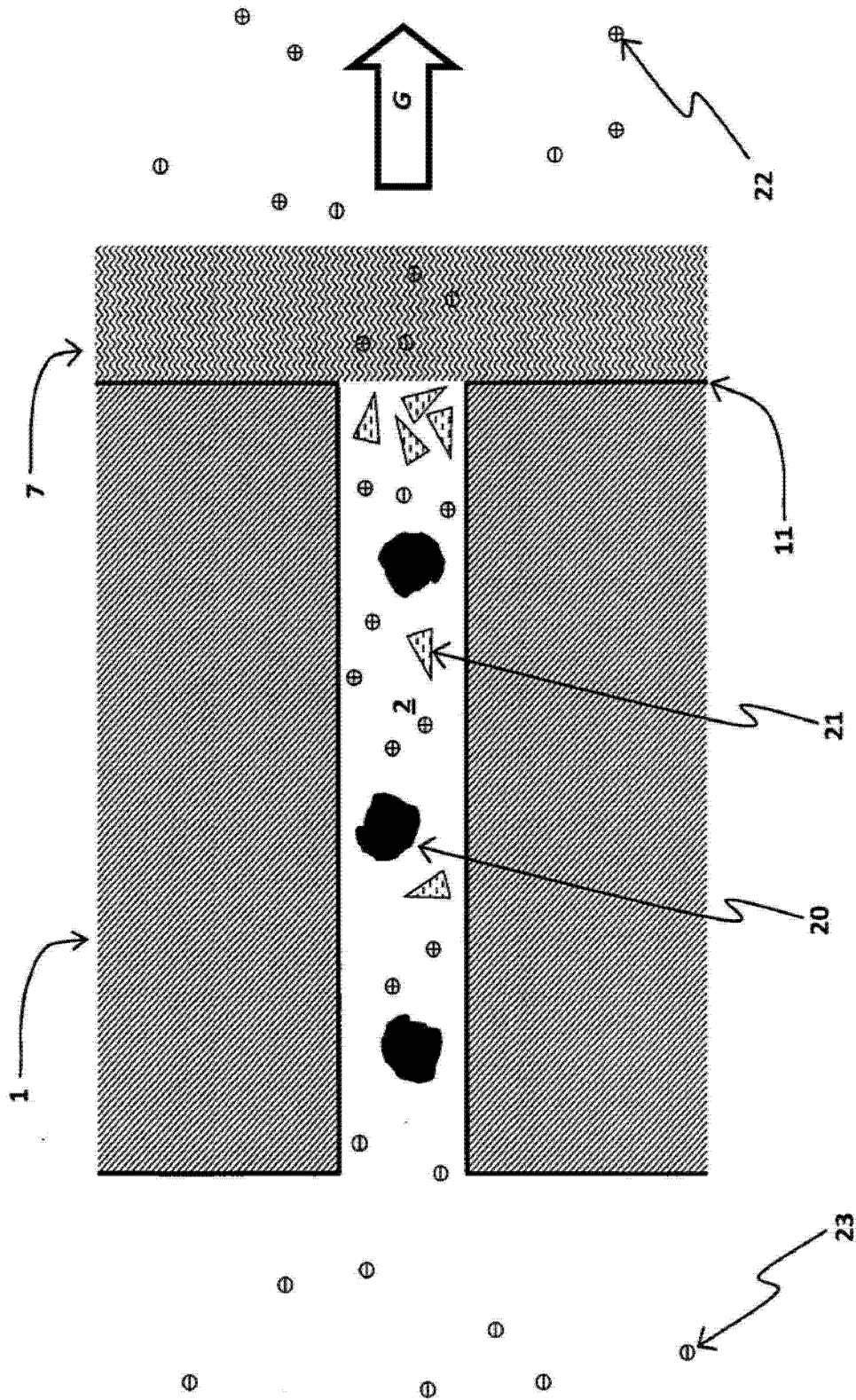


图 21

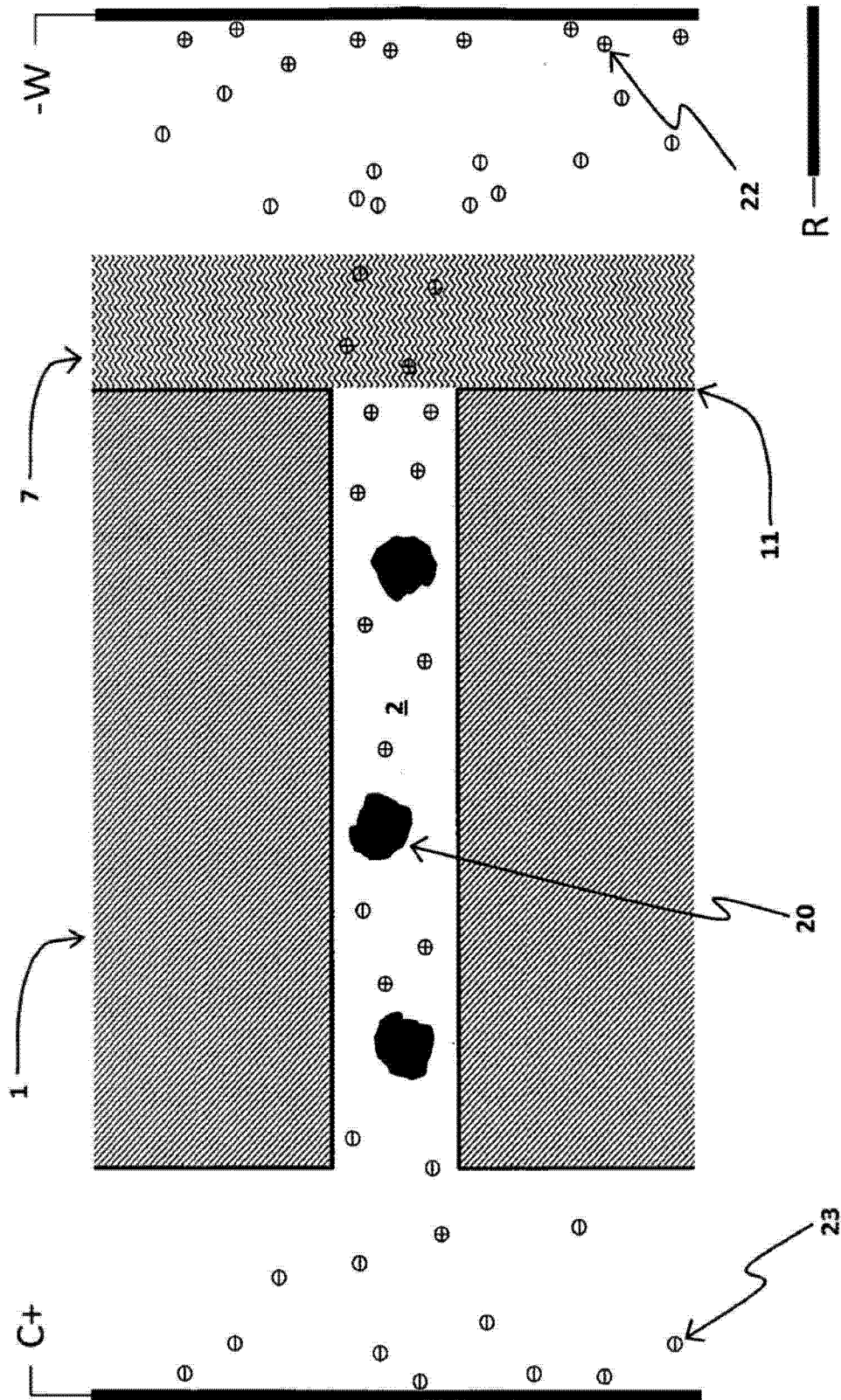


图 22

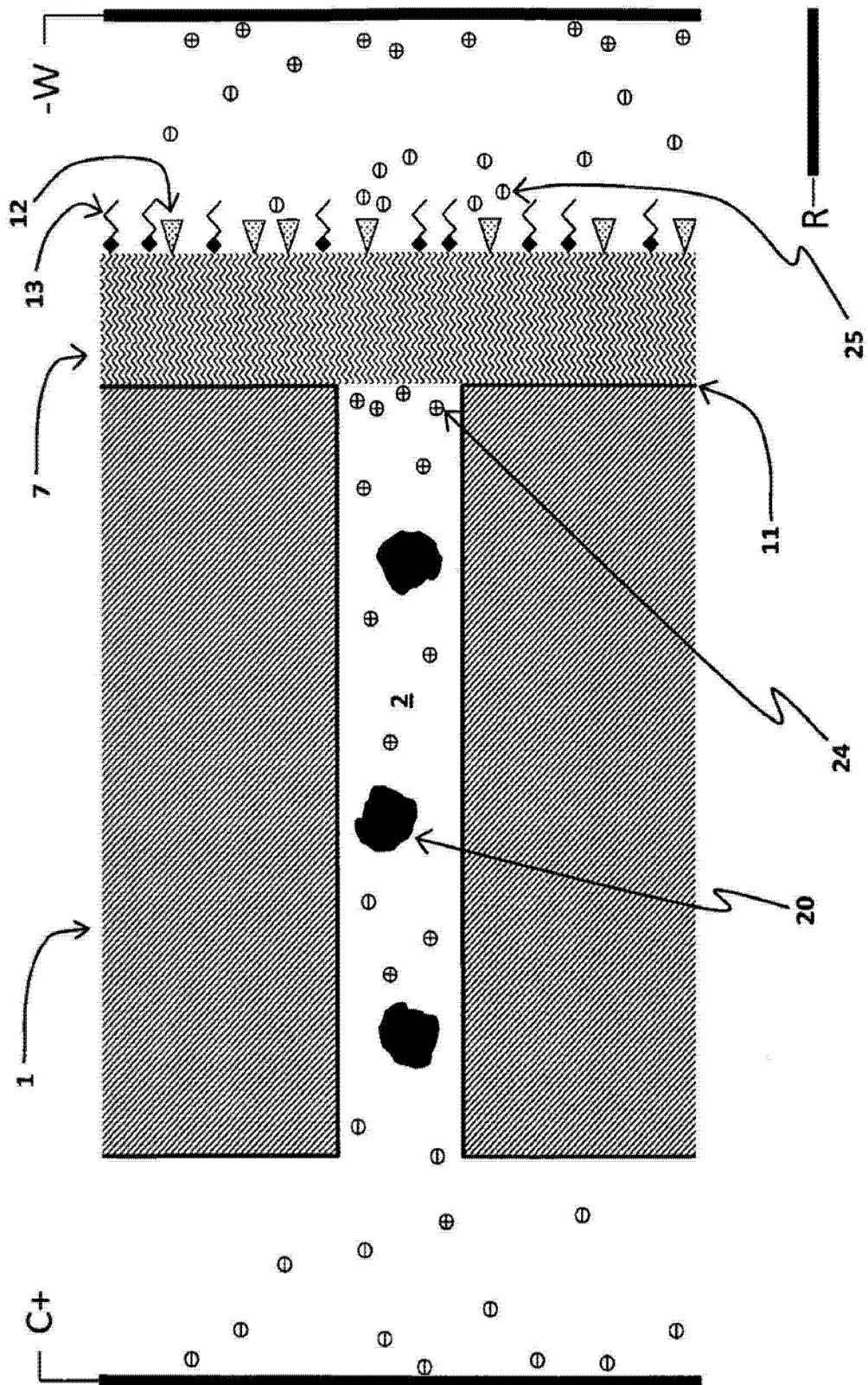


图 23

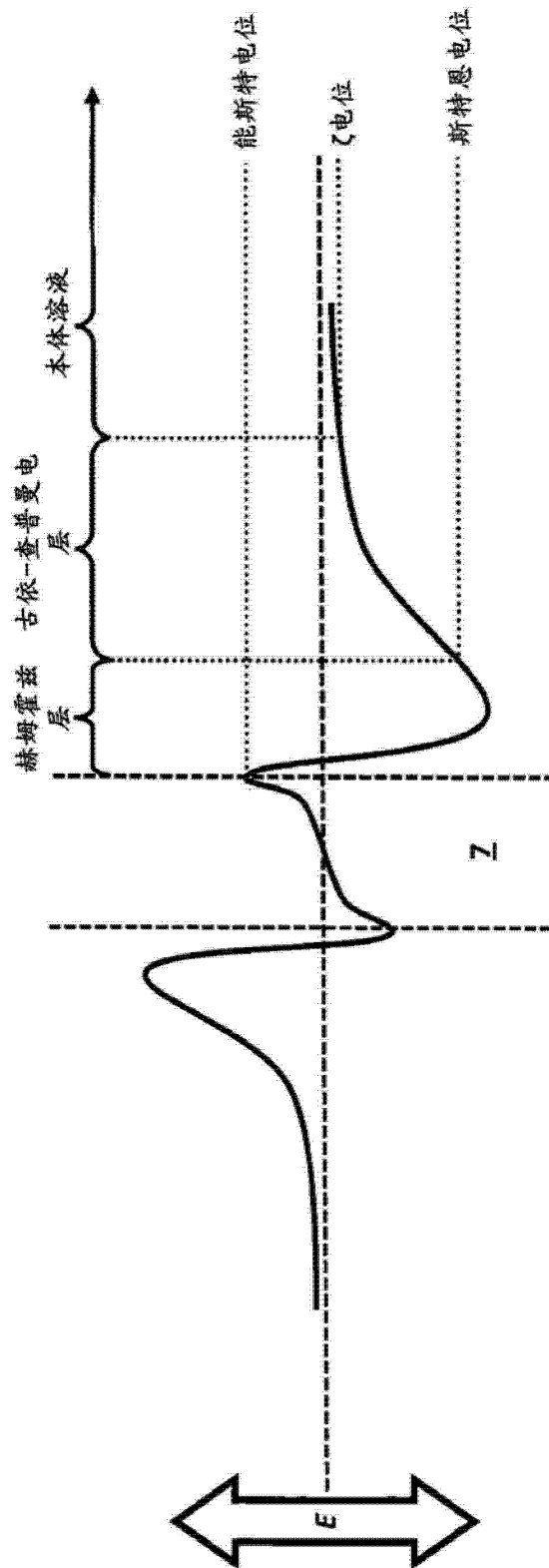


图 24

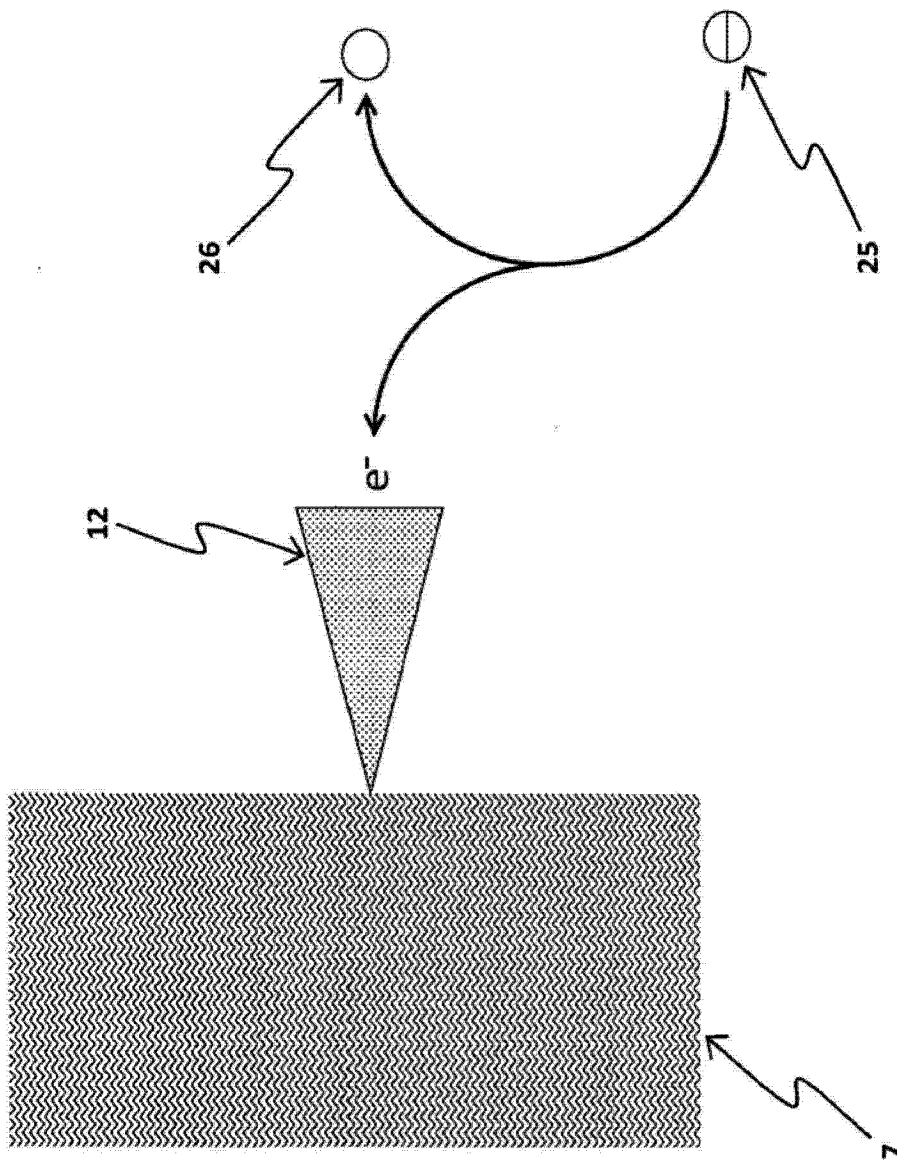


图 25

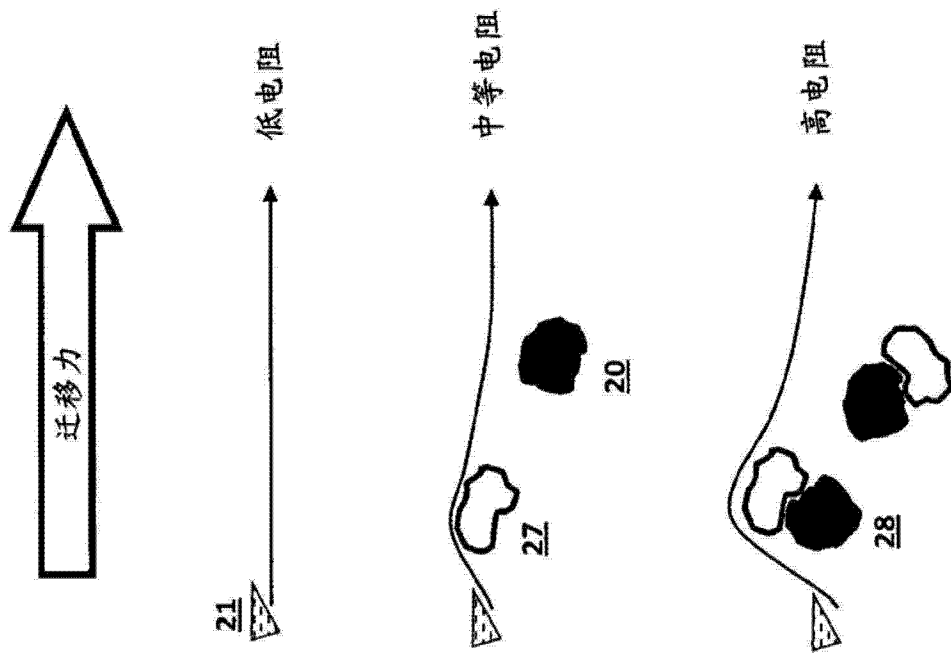


图 26

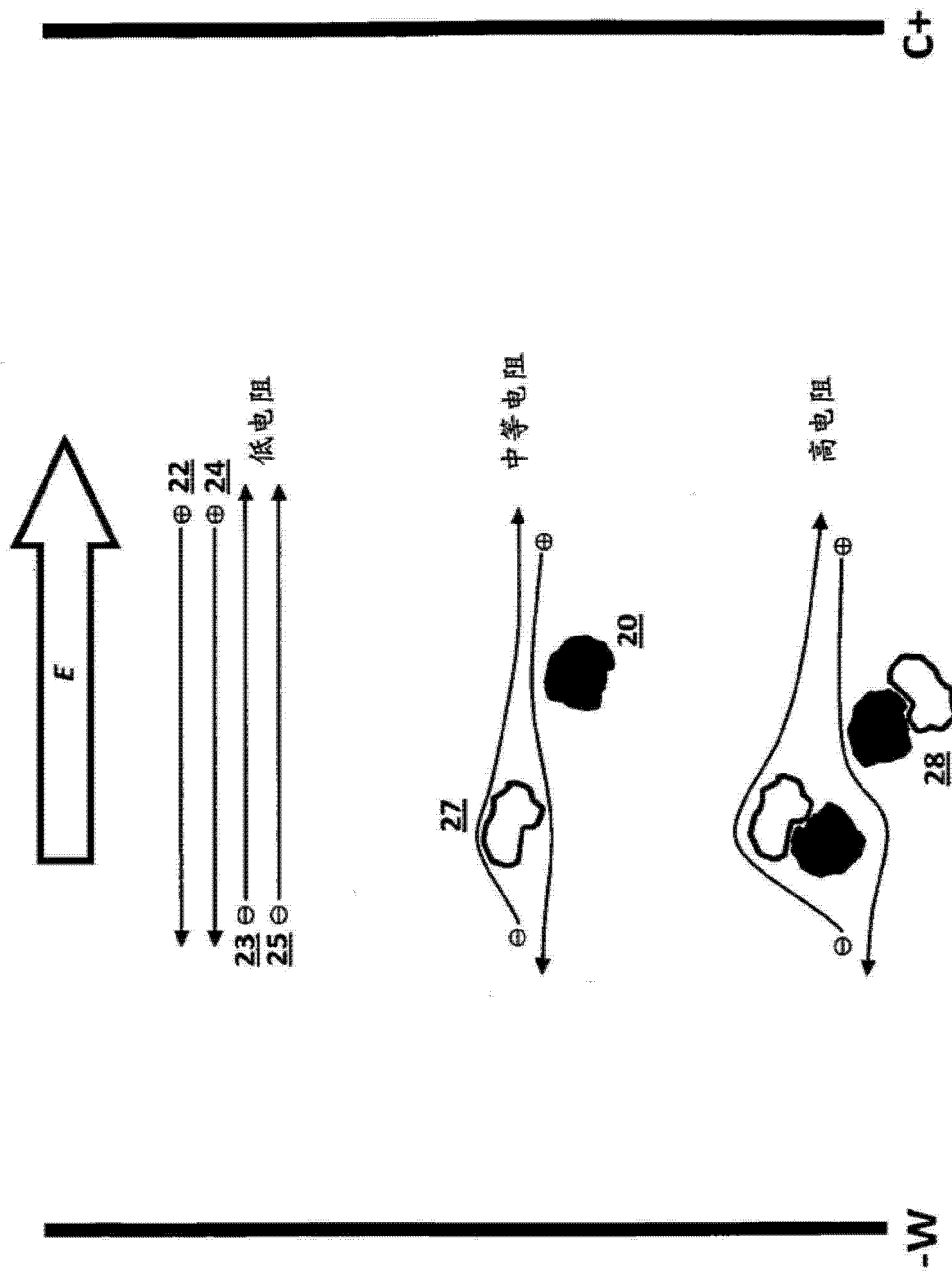


图 27

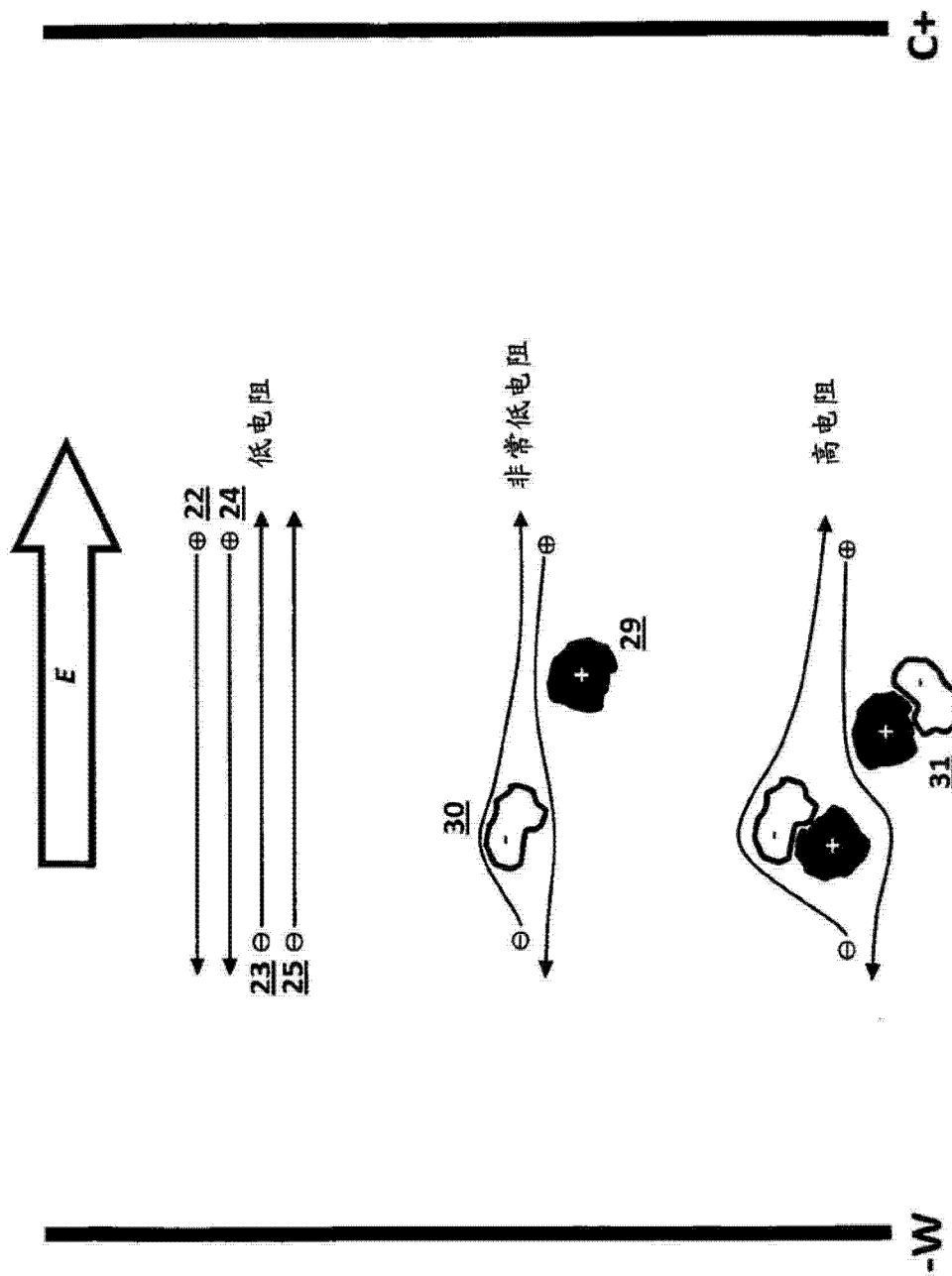


图 28

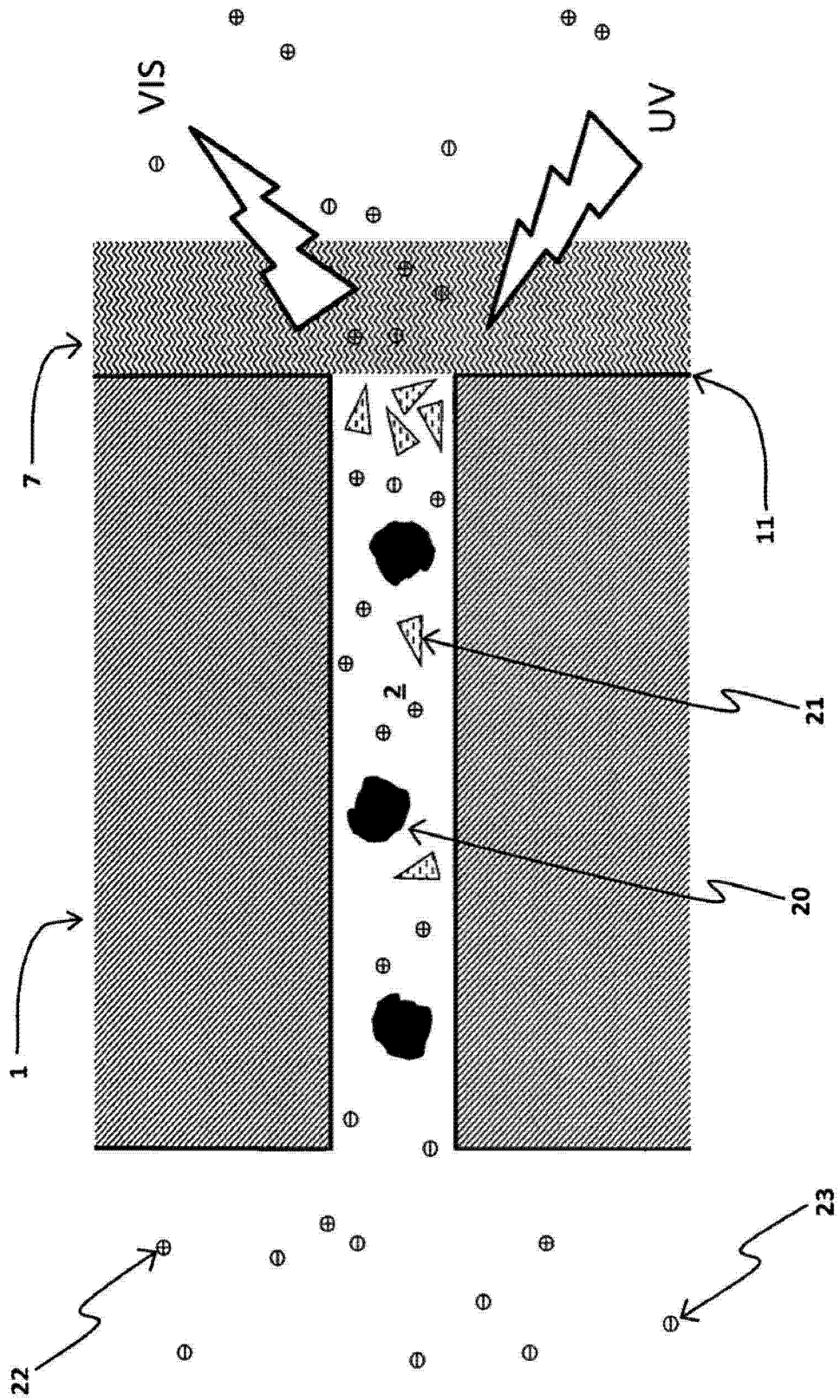


图 29

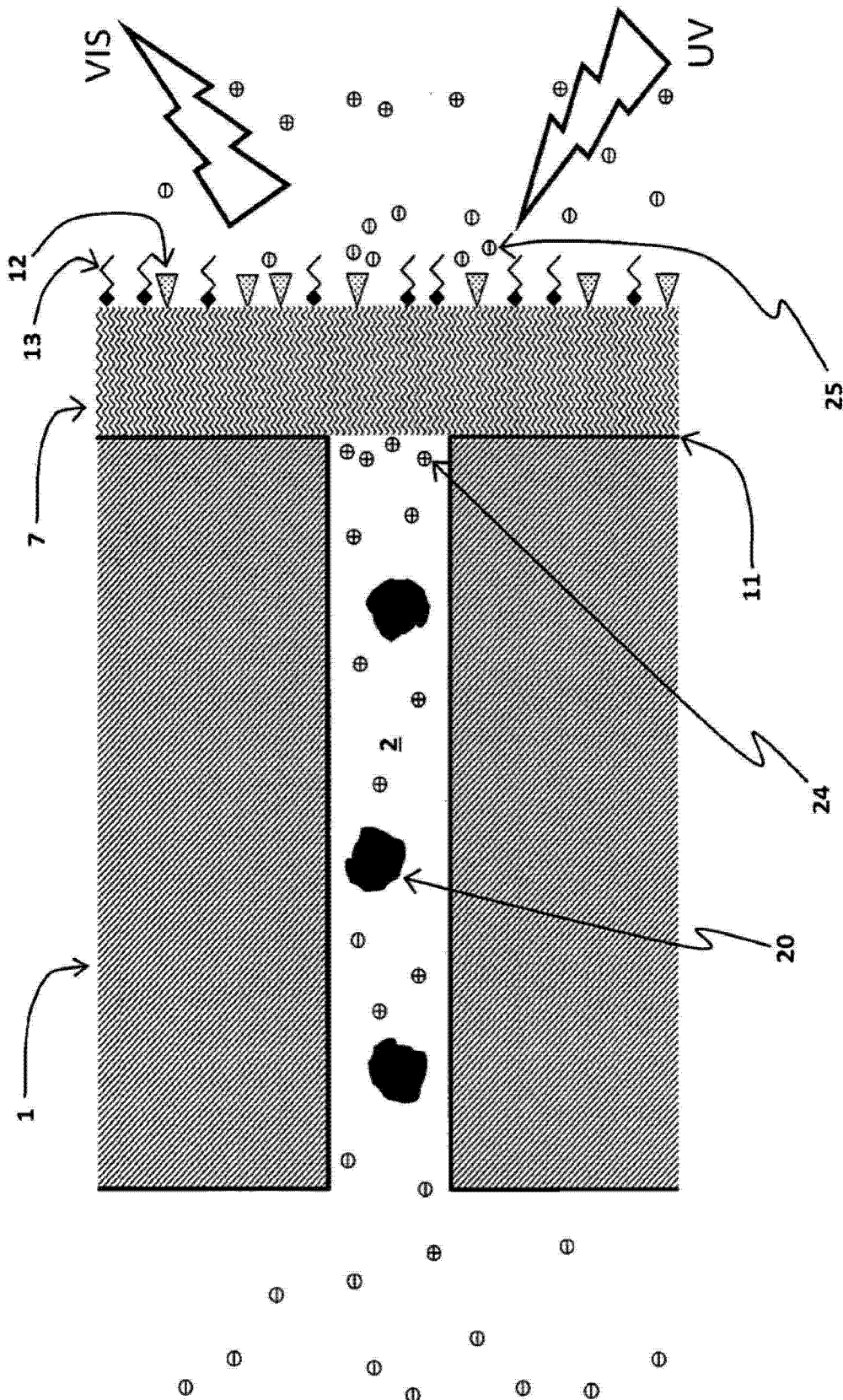


图 30

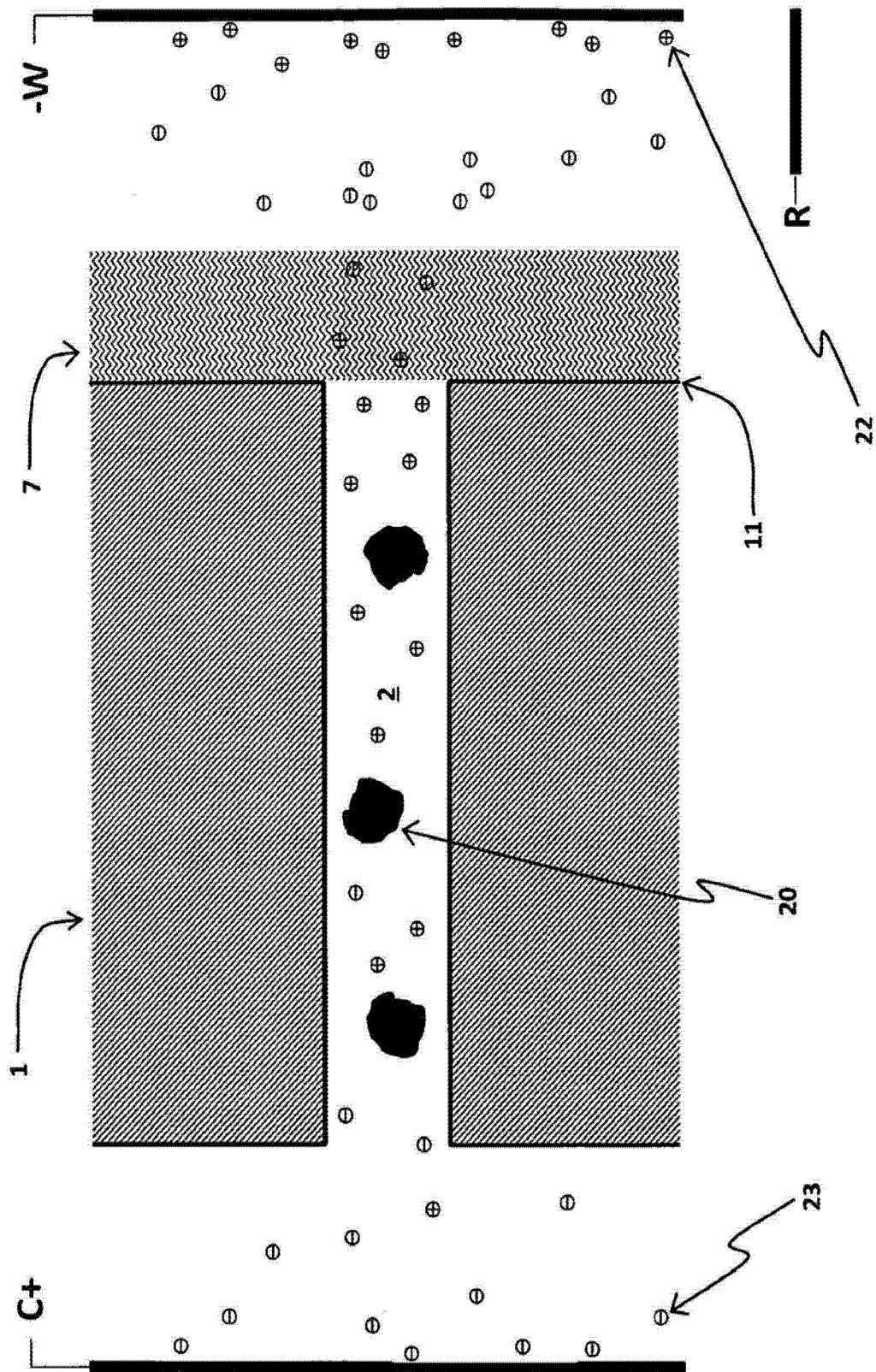


图 31

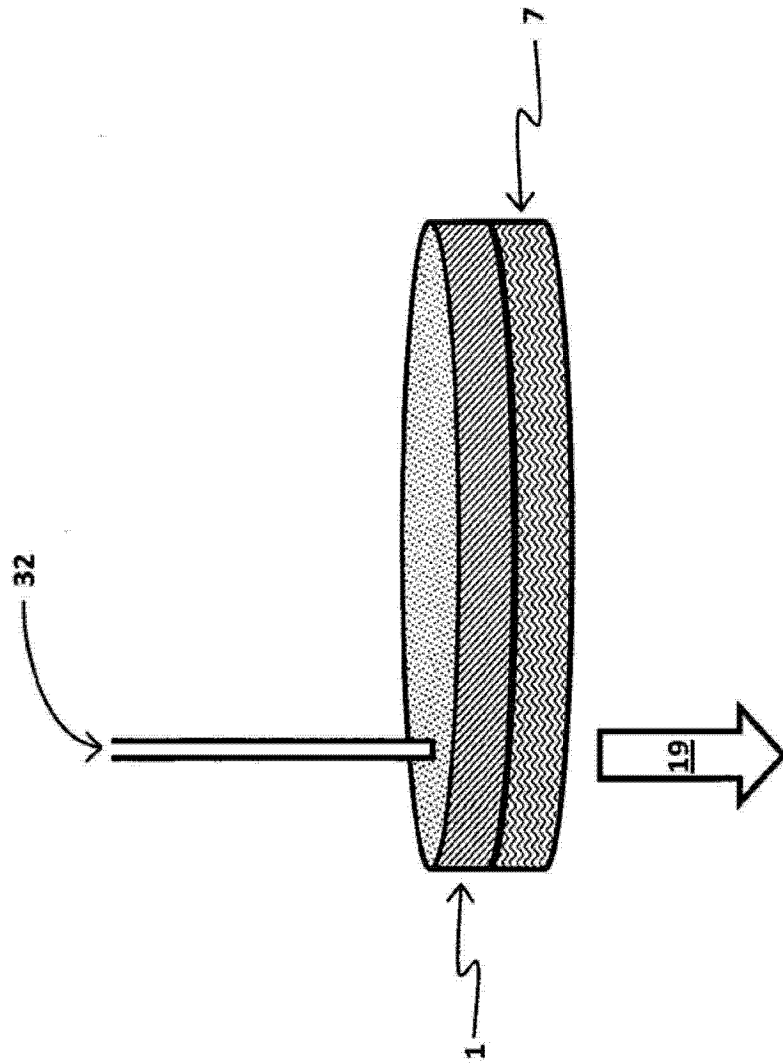


图 32

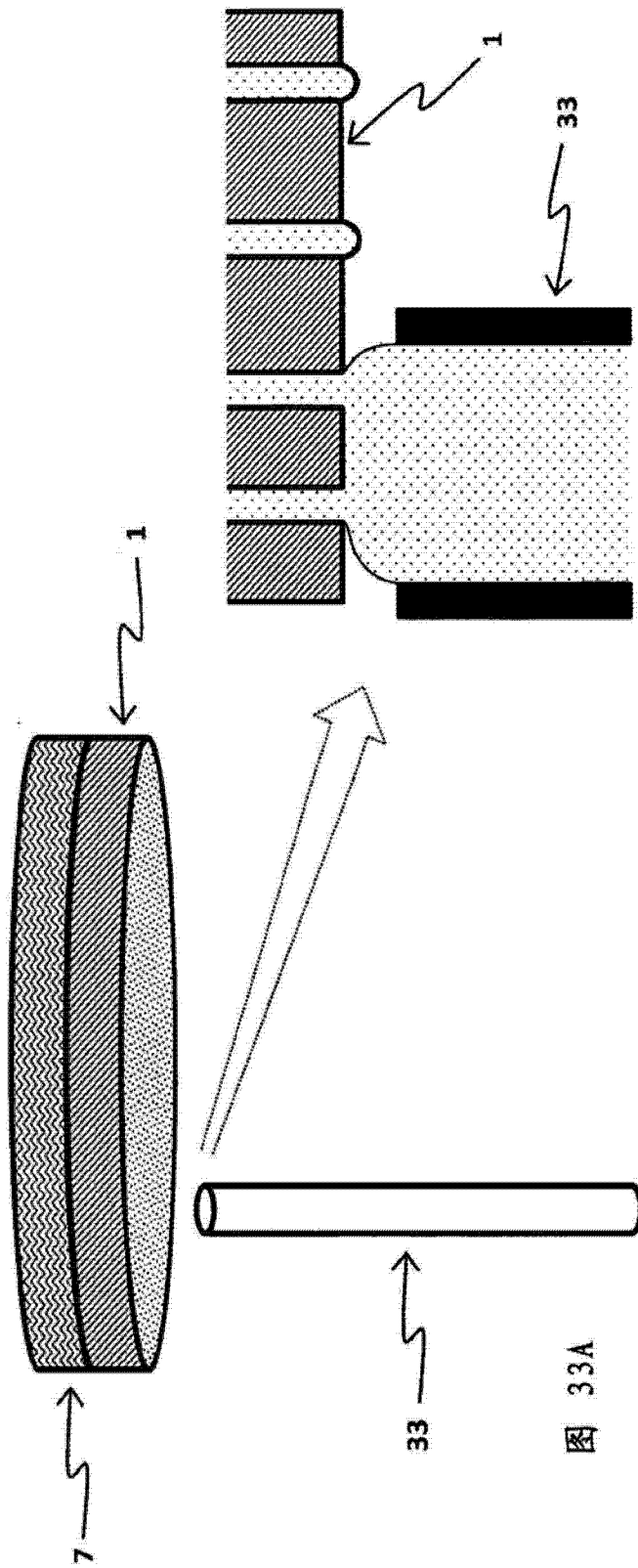


图 33A

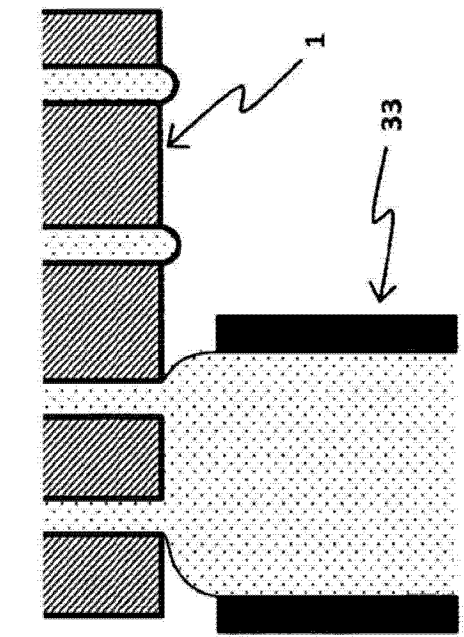


图 33B

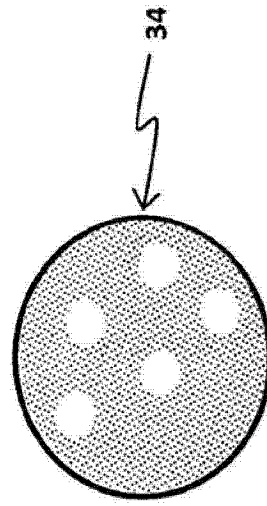


图 33C

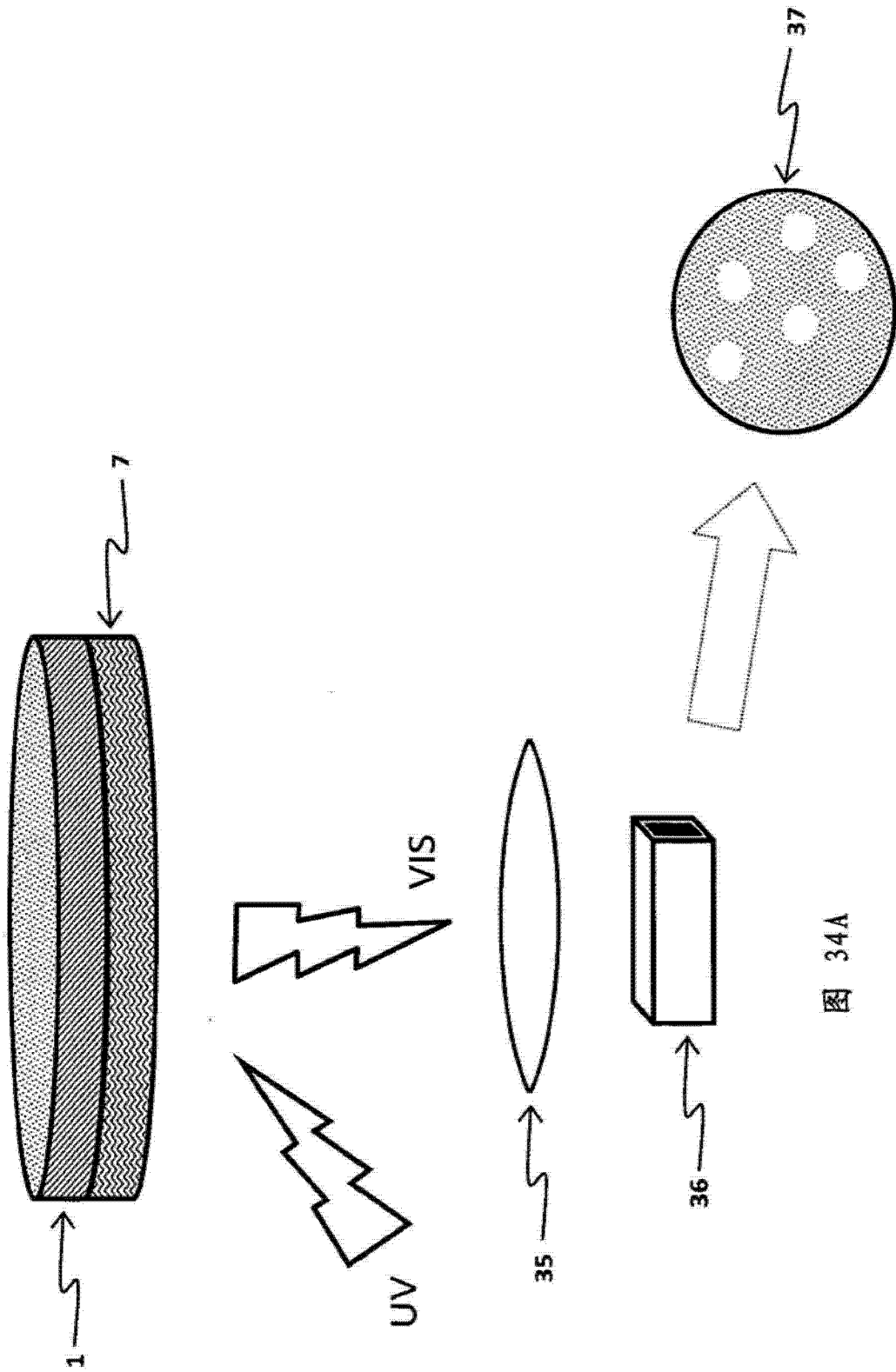


图 34A

图 34B

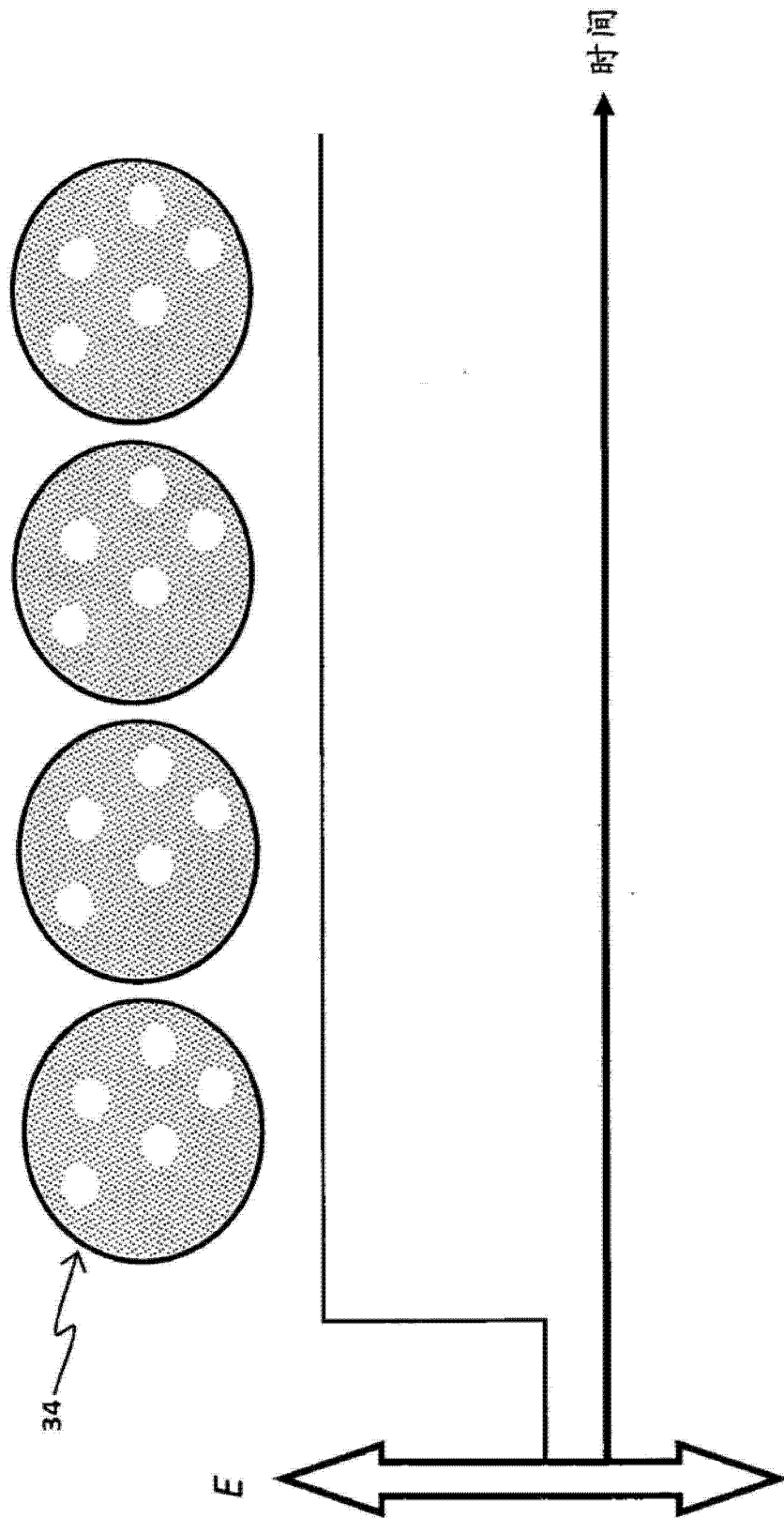


图 35

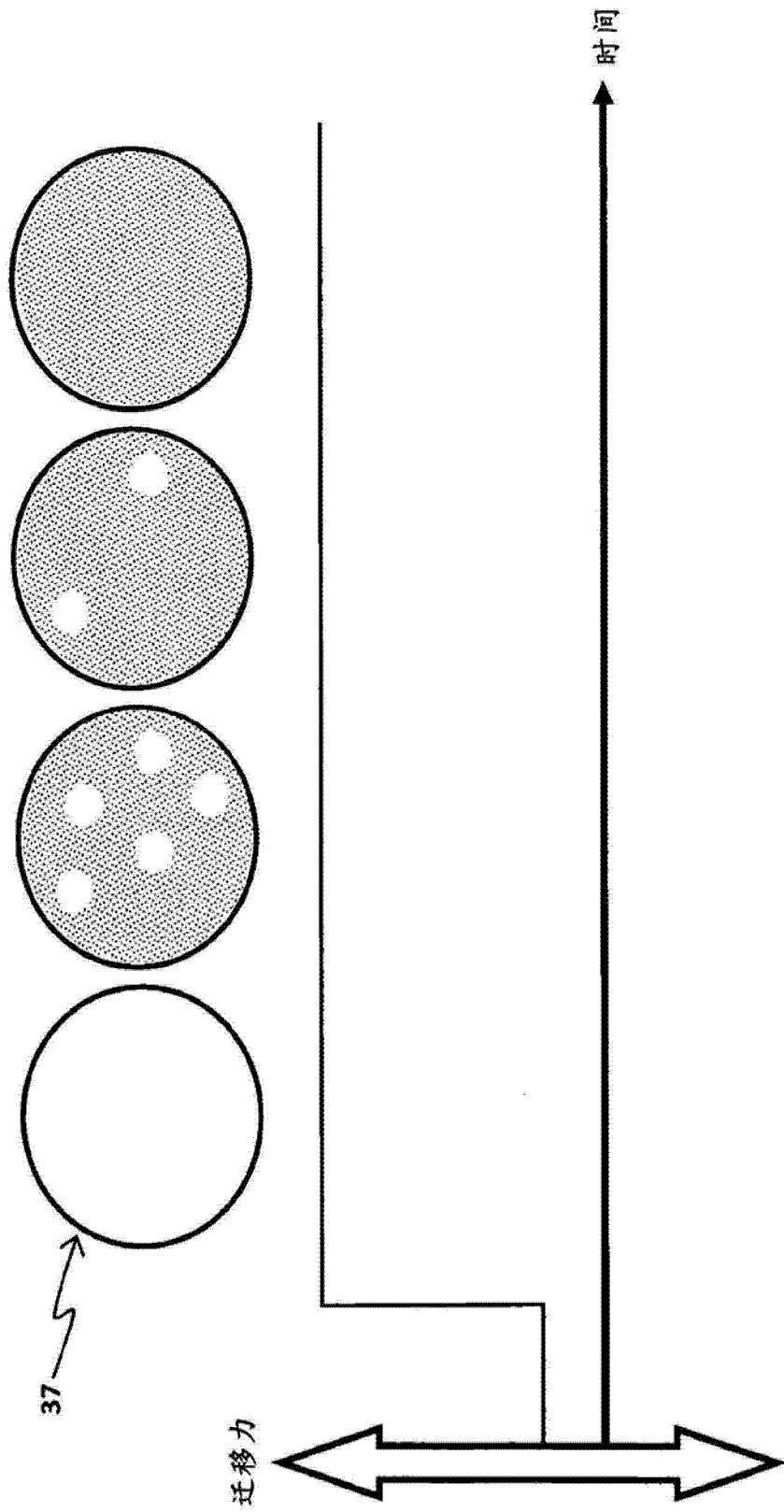


图 36

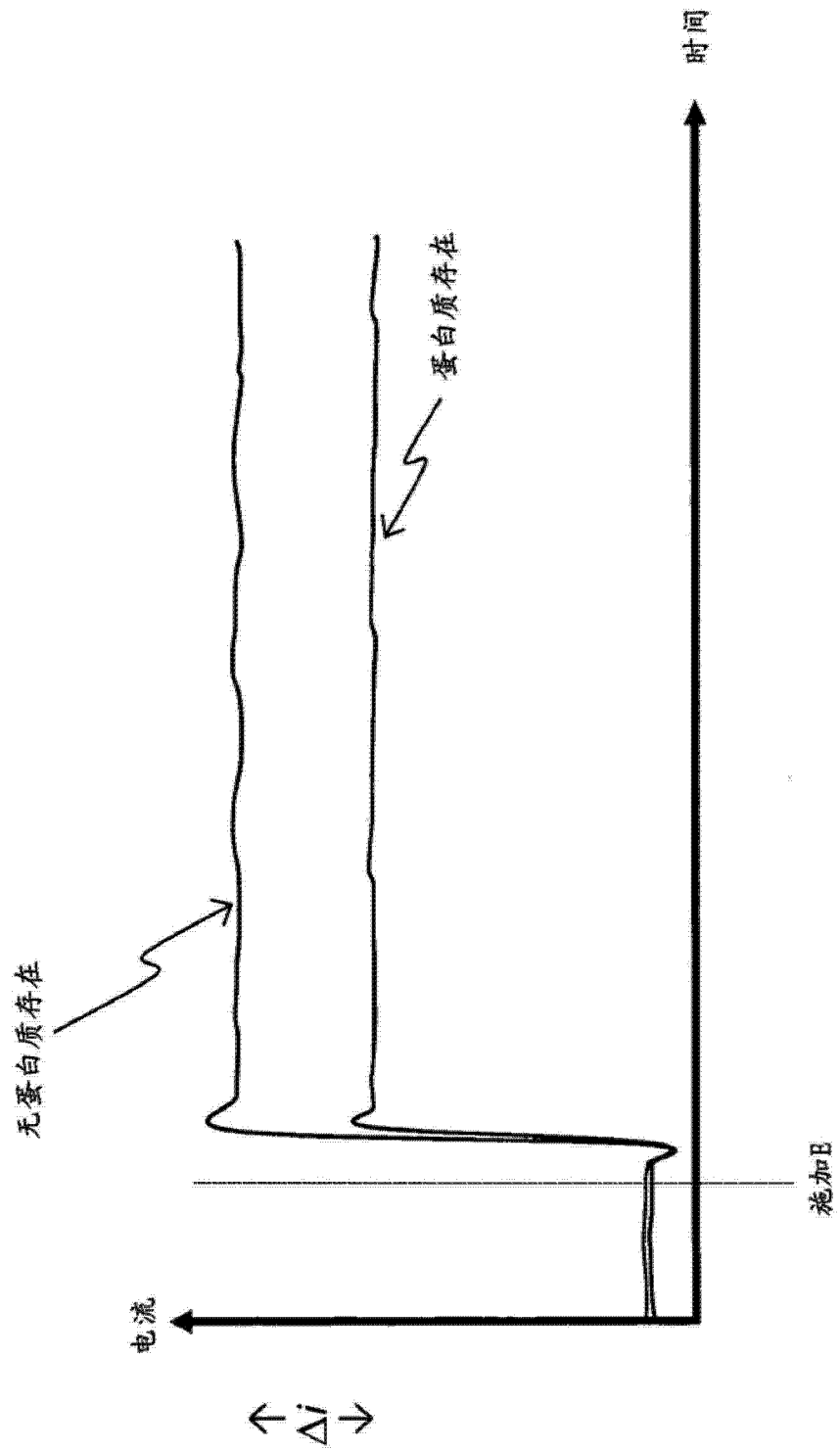


图 37

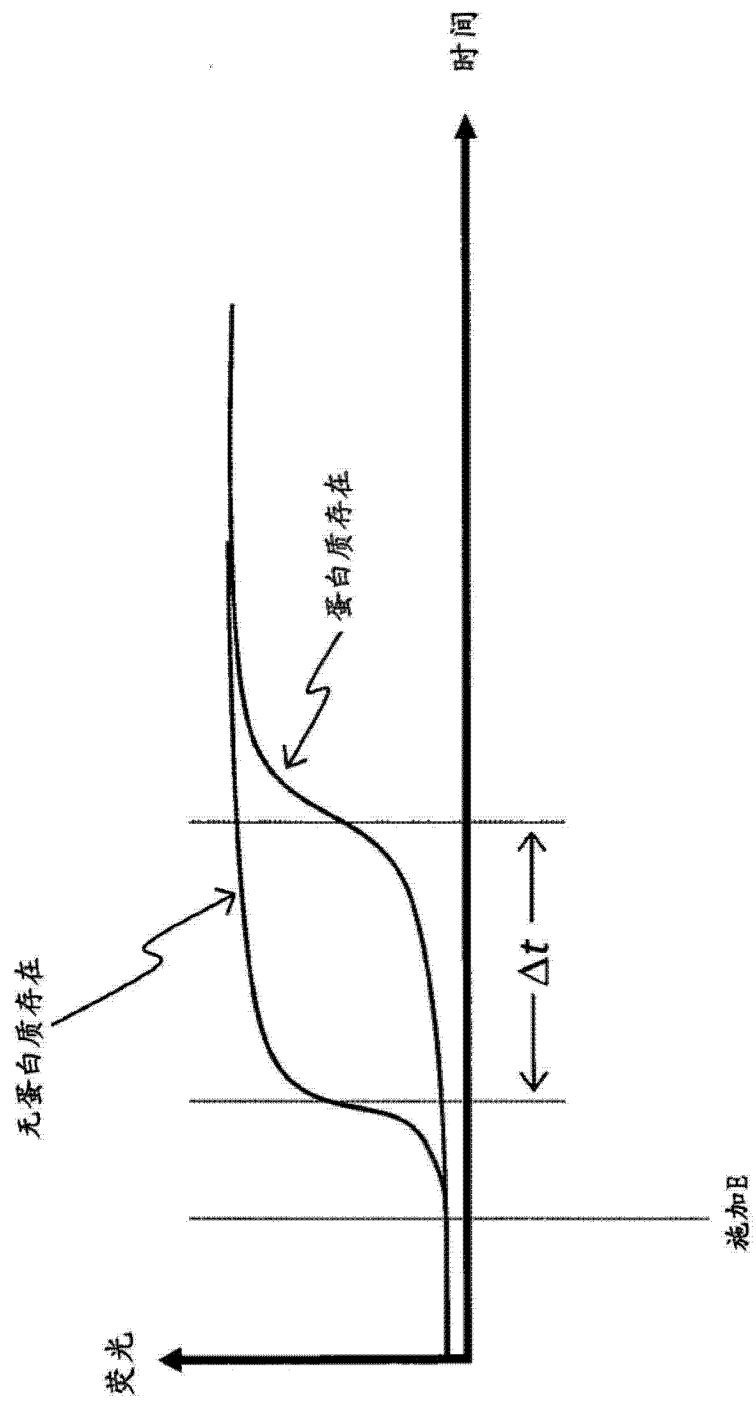


图 38

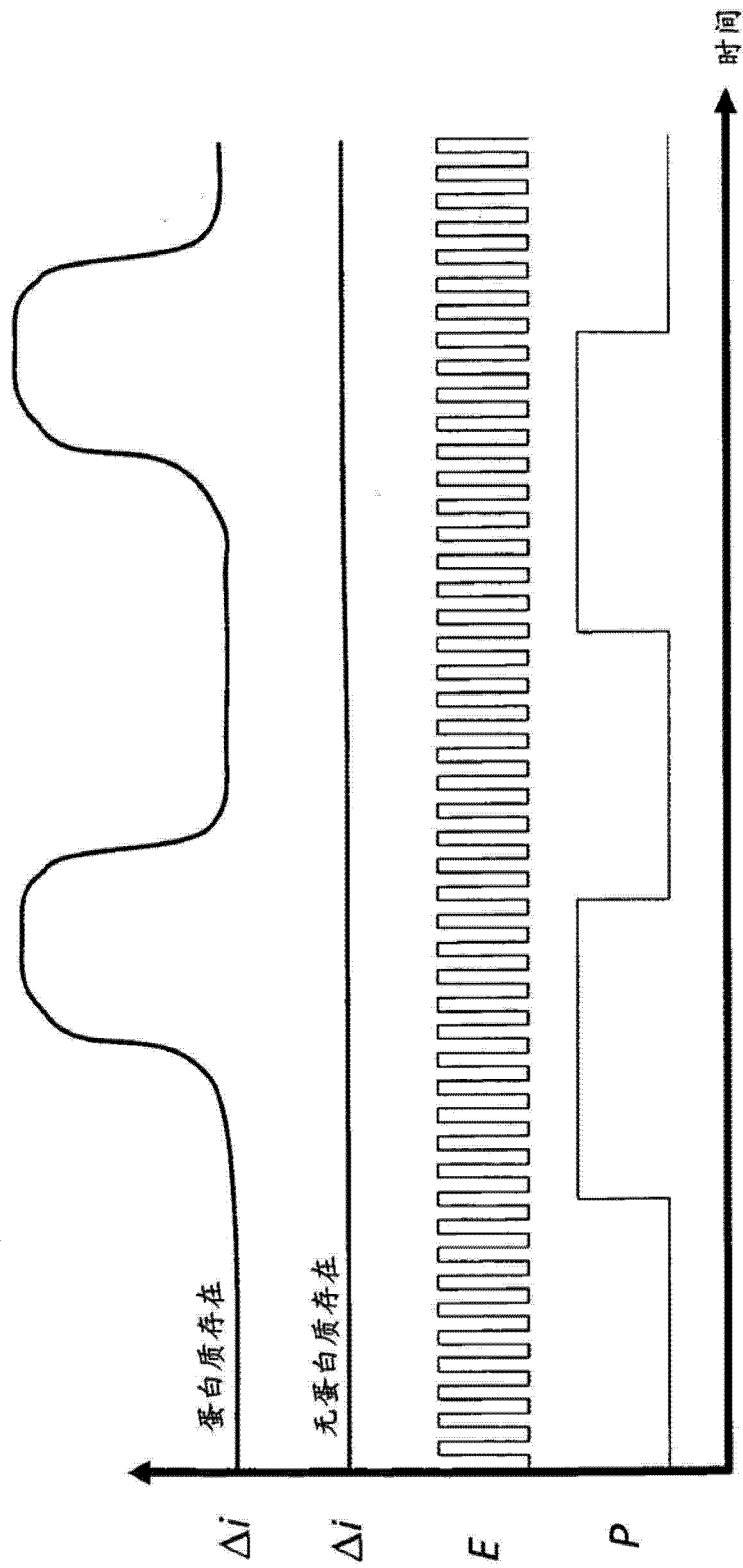


图 39

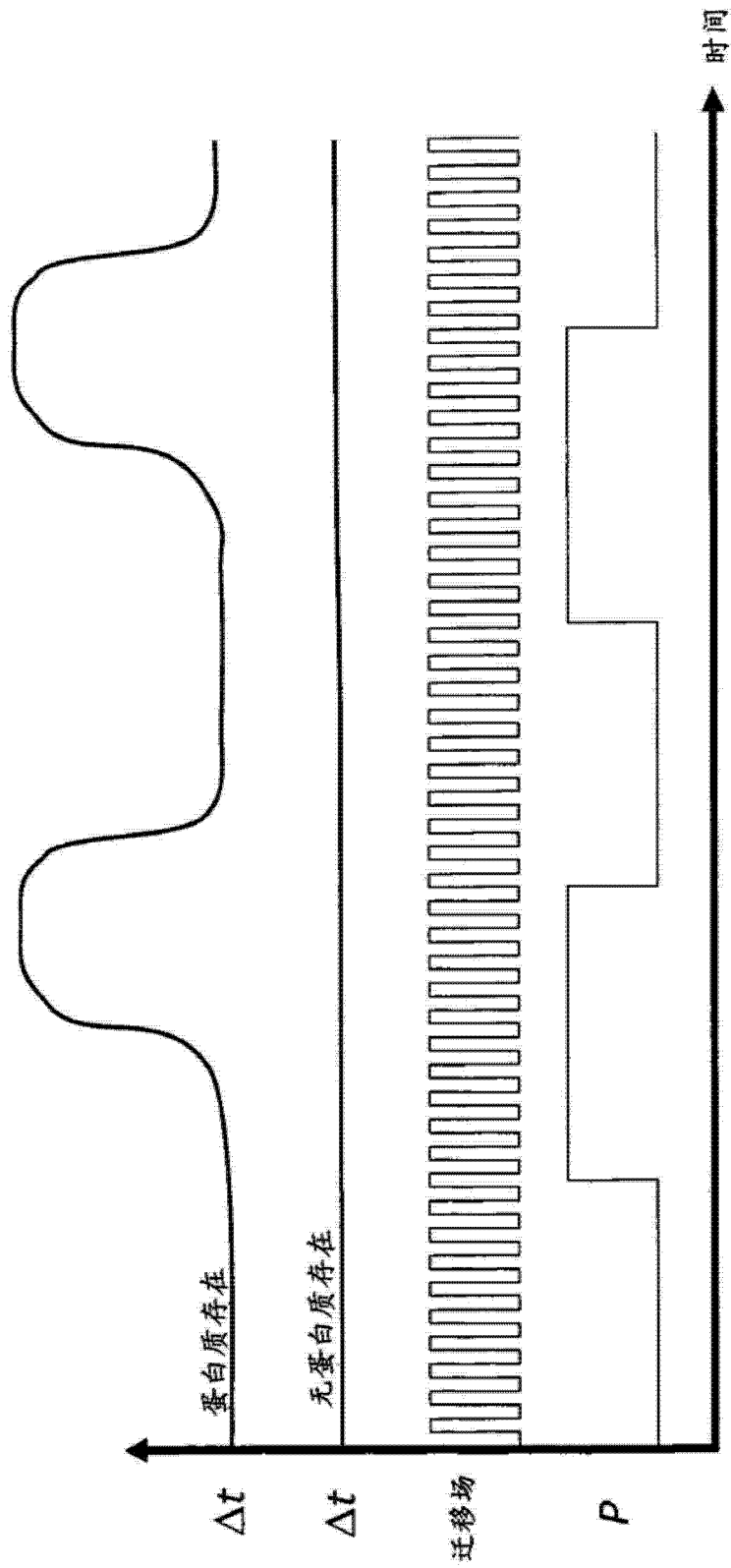


图 40

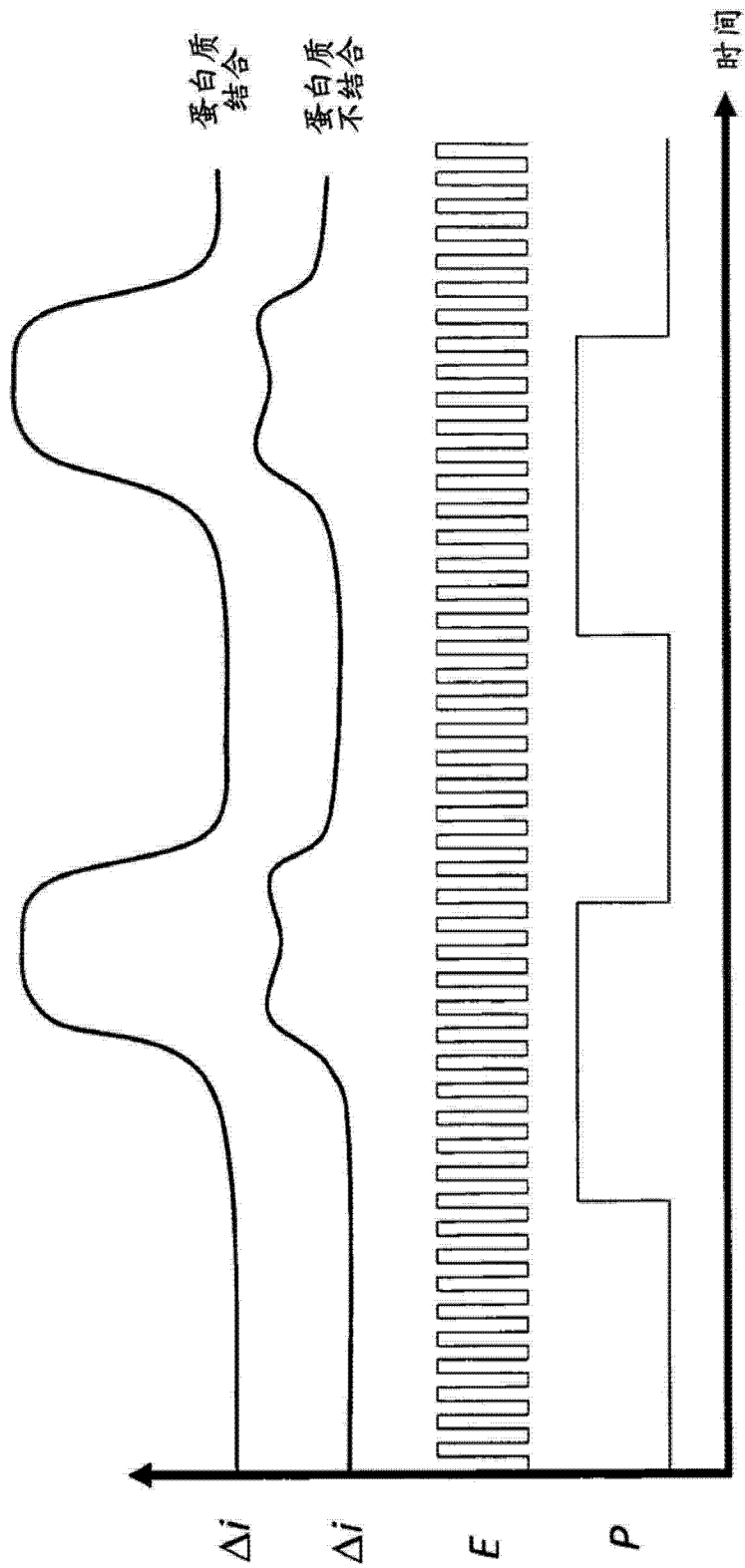


图 41

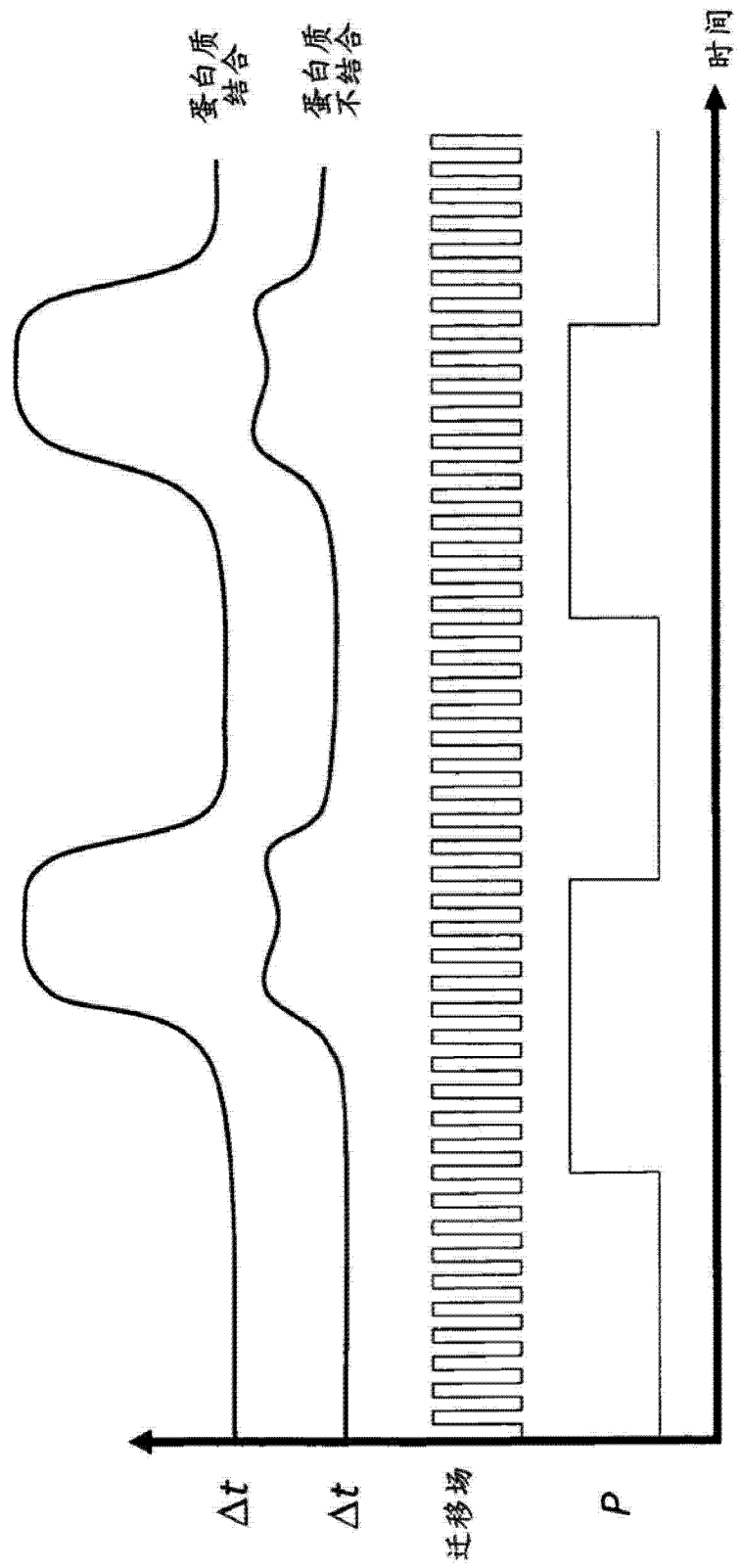


图 42

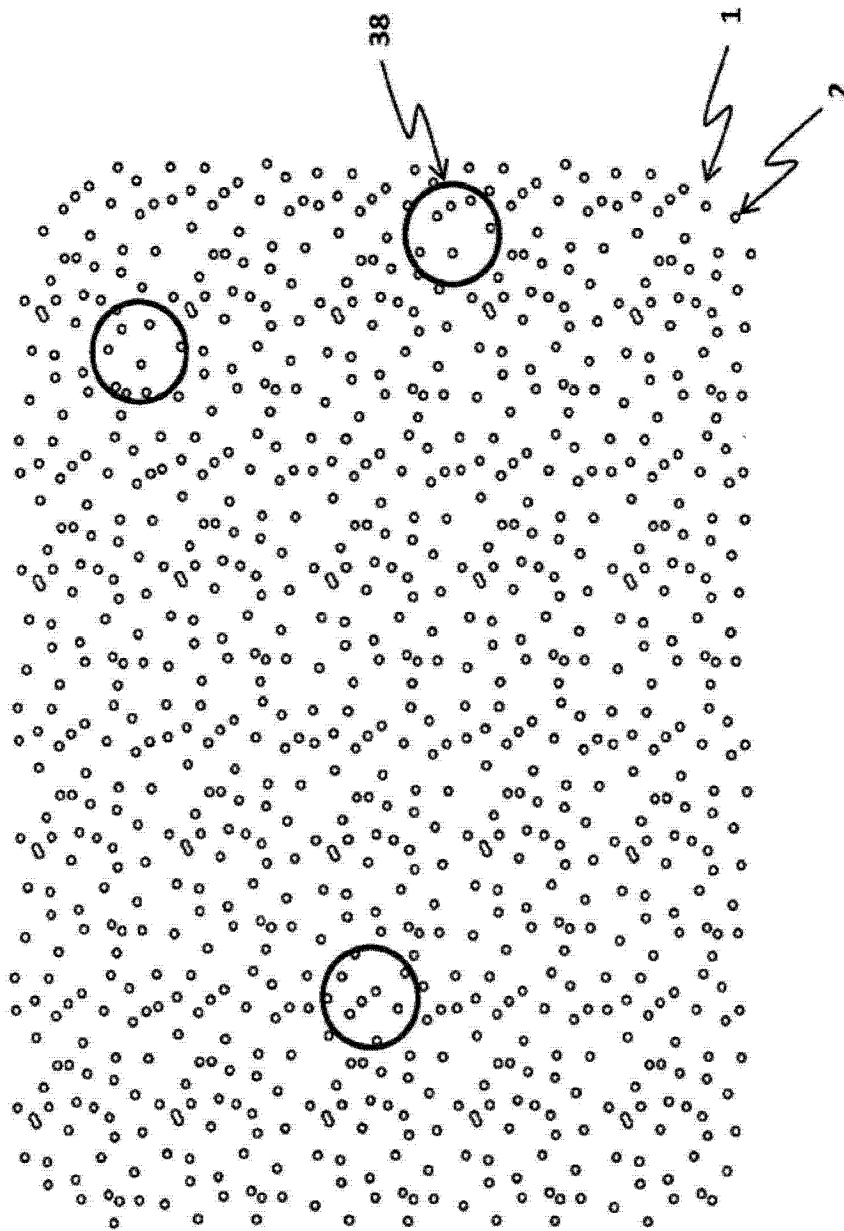


图 43

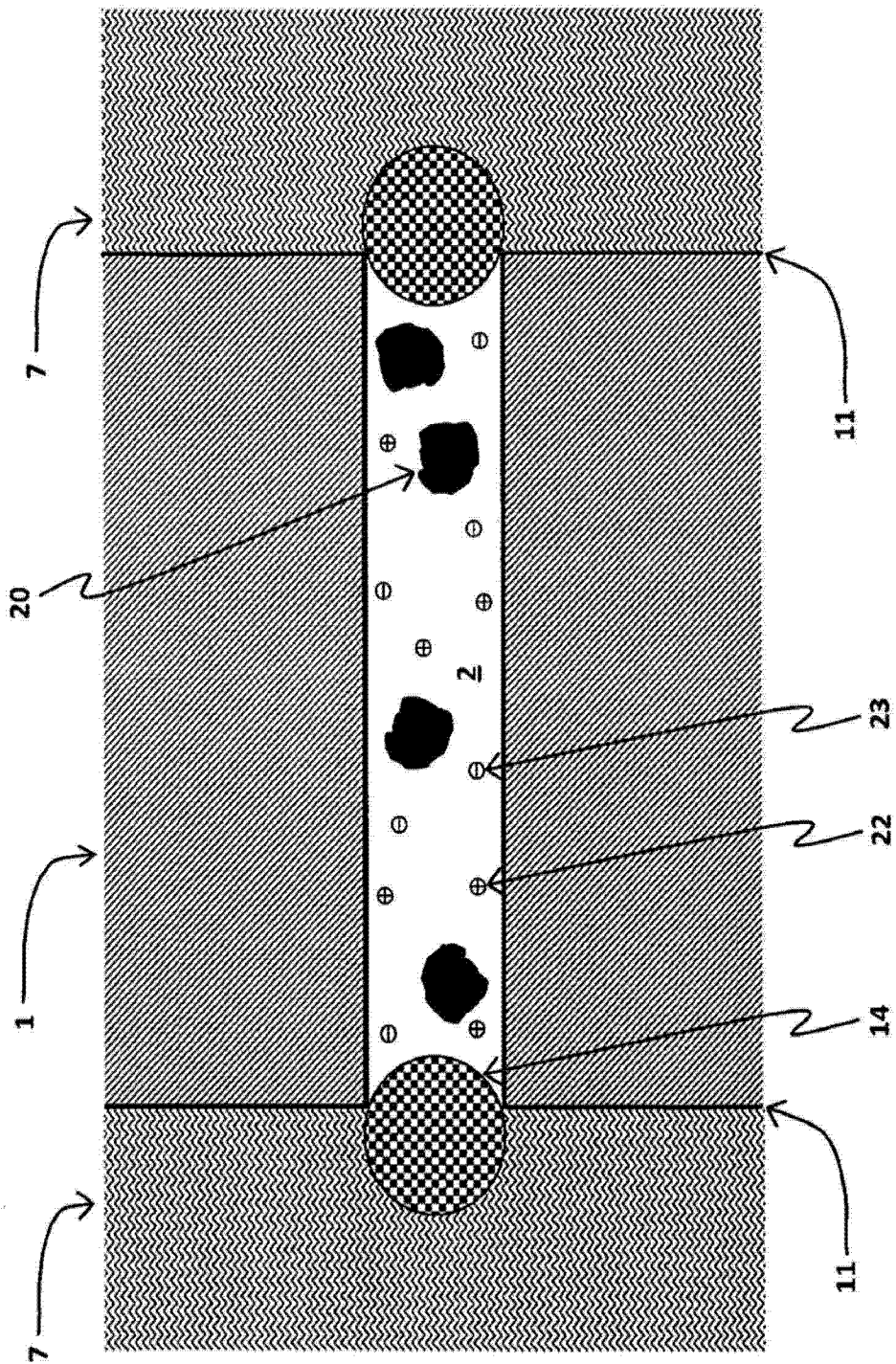


图 44

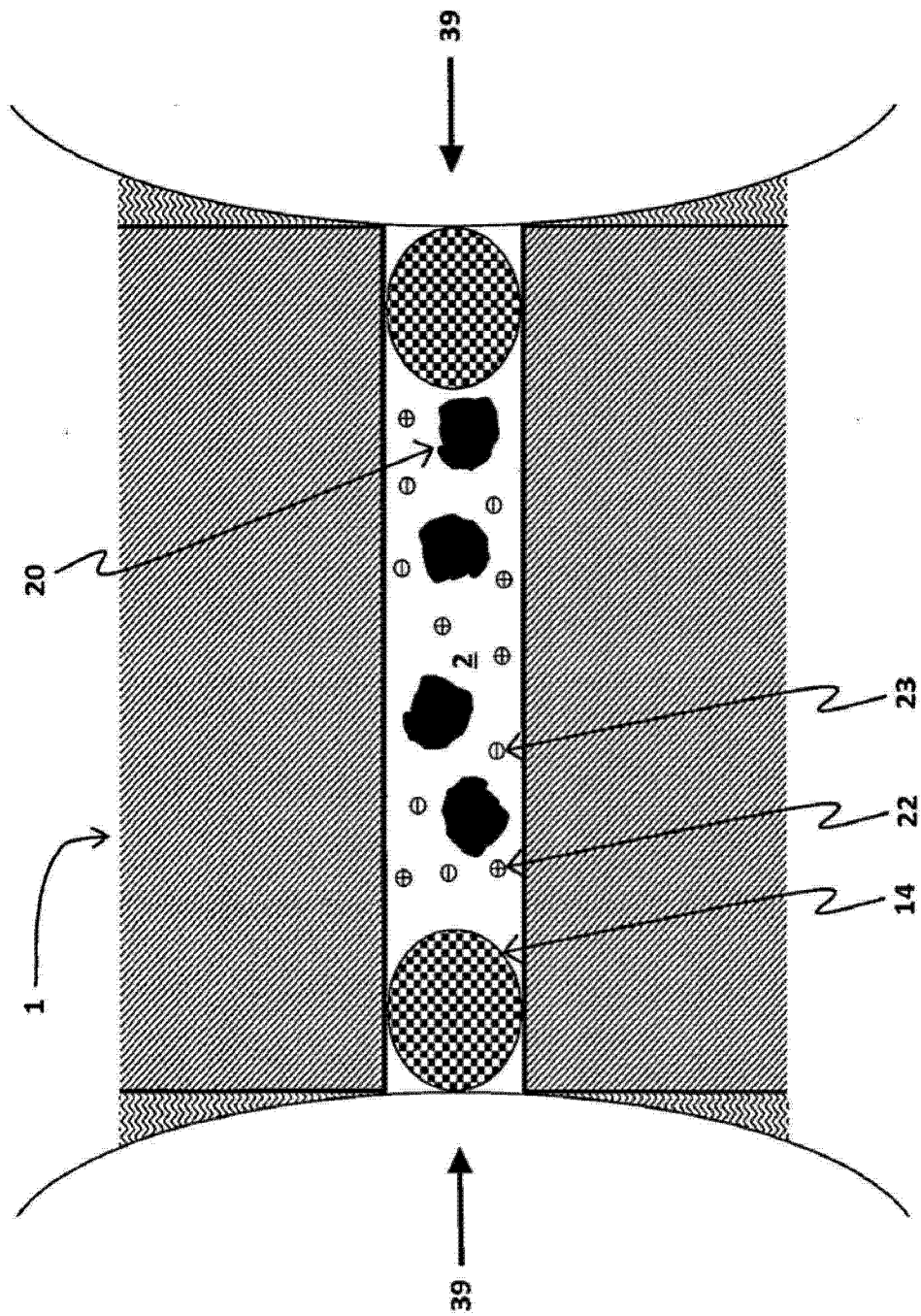


图 45

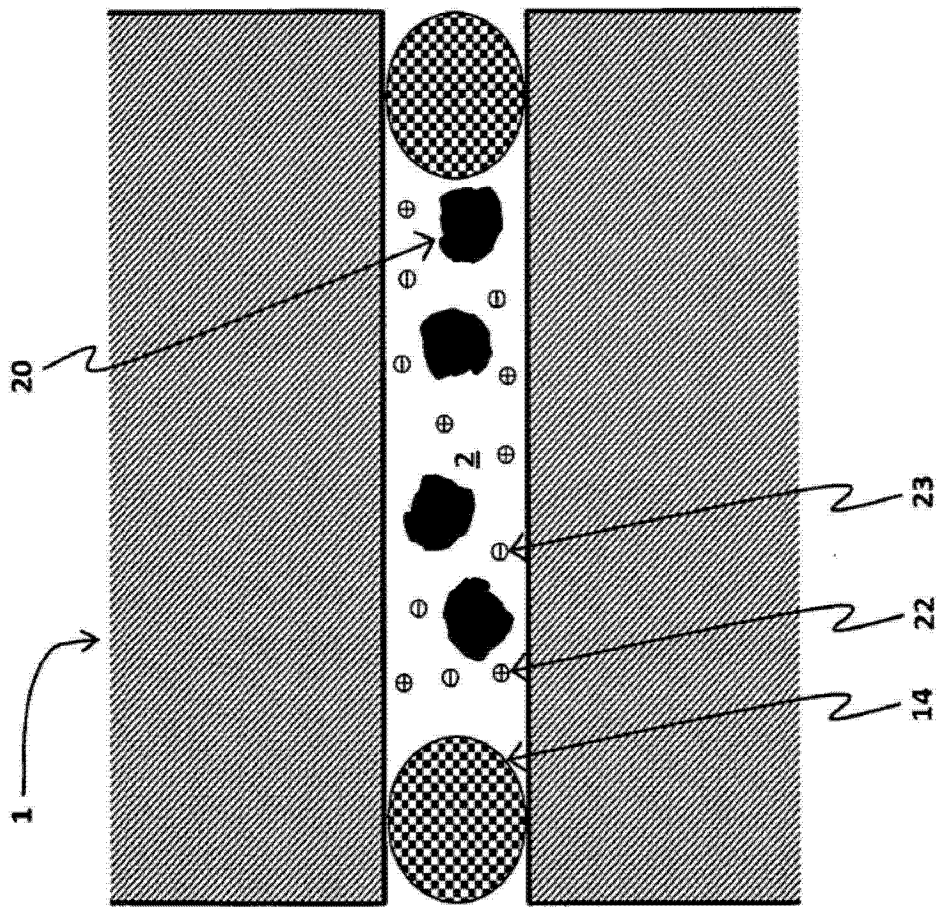


图 46

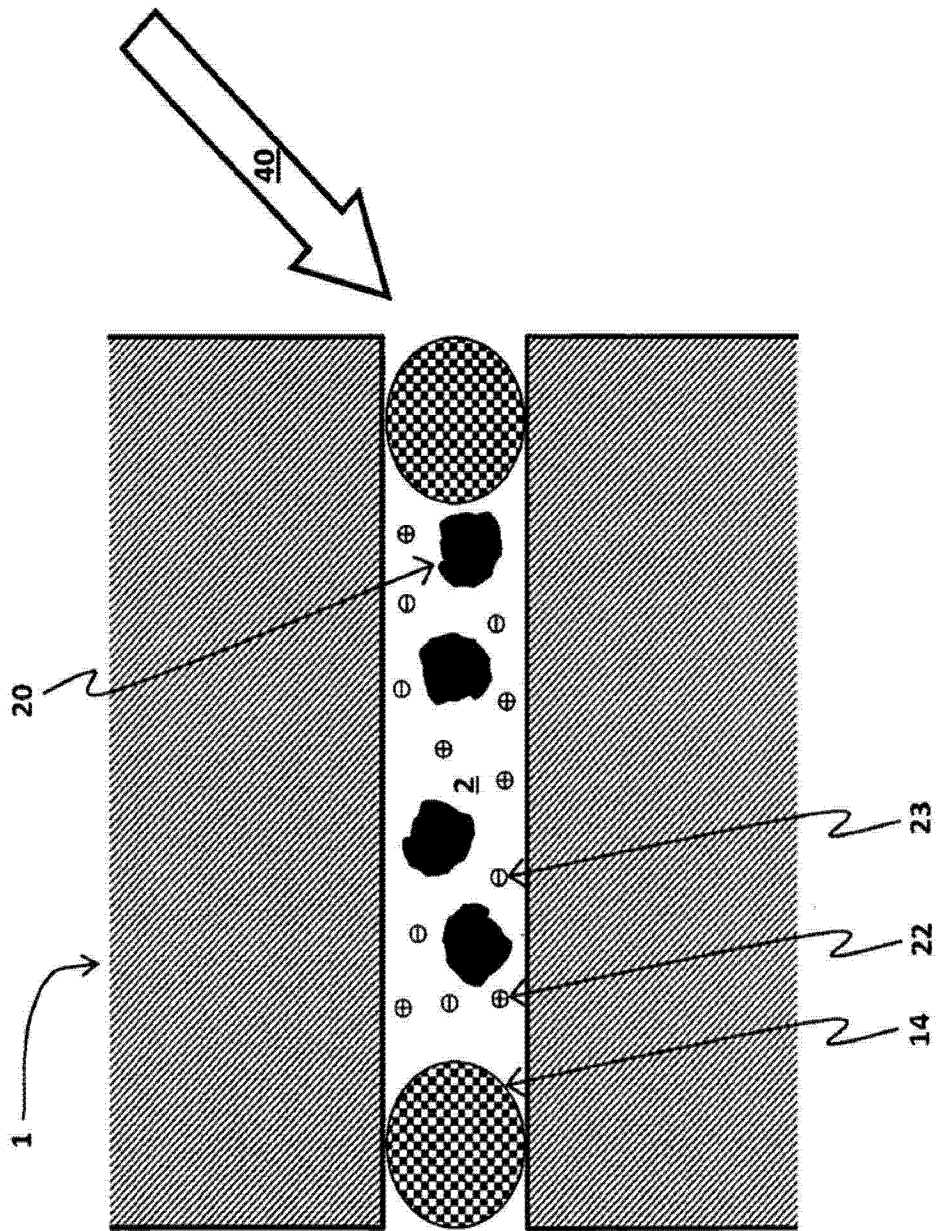


图 47

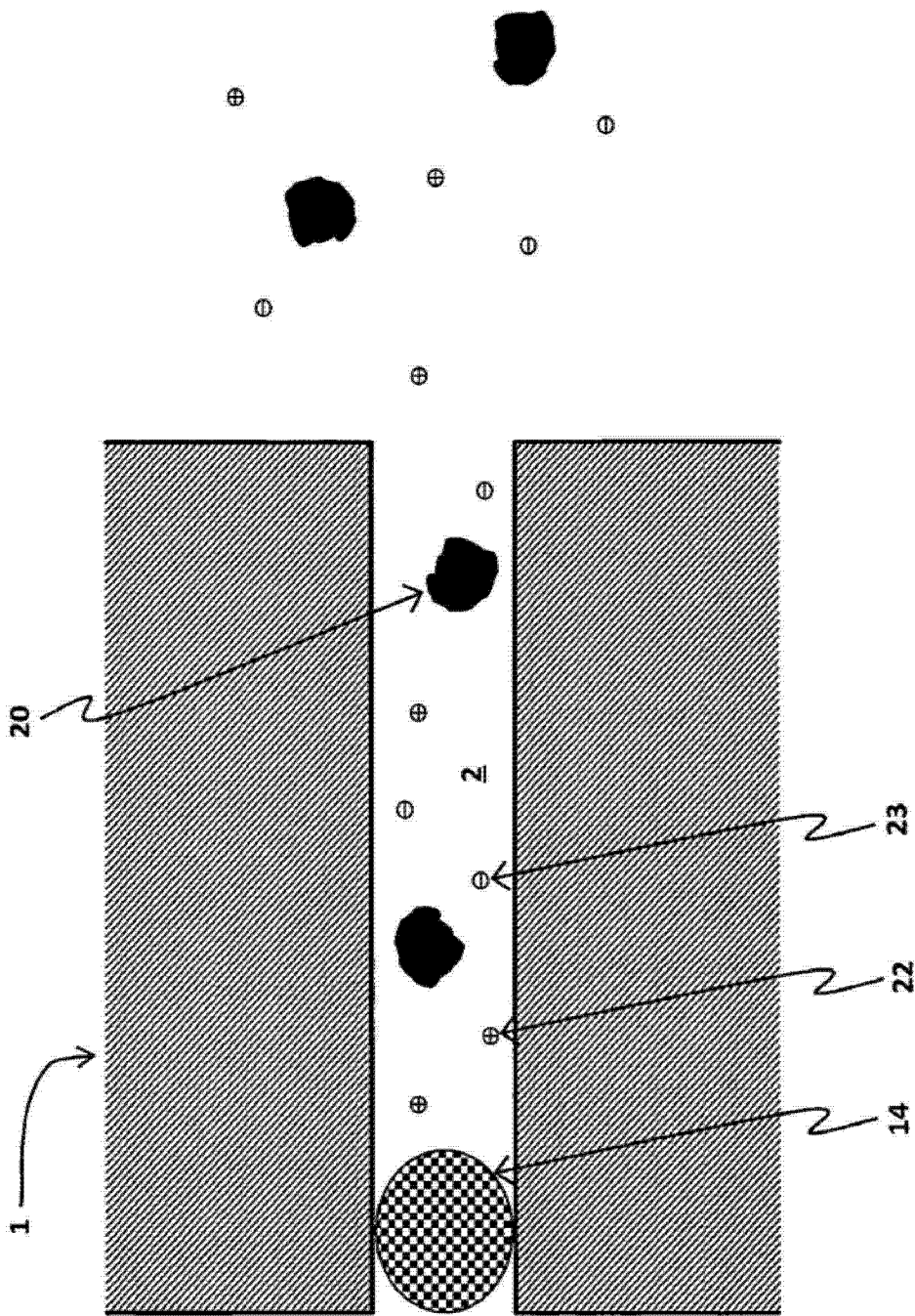


图 48