

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/68



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 02105179.8

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1202263C

[22] 申请日 2002.2.25 [21] 申请号 02105179.8

[71] 专利权人 财团法人工业技术研究院

地址 中国台湾

[72] 发明人 张耀嵩 钟永强 石明正

审查员 孙大龙

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 戈 泊 程 伟

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 9 页

[54] 发明名称 高效核酸杂交装置及方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于液体中的靶分子和探针之间杂交反应的装置，该装置包括一个含有第一部分和接续第一部分之后的第二部分的微量液体管道；其中第一部分有一个不规则的横截面，第二部分有一种探针，以及一个连接所述管道末端与试管的液体驱动元件，其中所述的液体元件可以重复地来回移动所述的靶分子通过所述的第二部分。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于液体中的靶分子和探针之间杂交反应的装置，其特征在于包括：

一个微量液体管道，它包括第一部分和接续第一部分之后的第二部分，其中所述的第一部分有一个不规则的横截面，所述的第二部分有一种探针，以及

一个连接所述管道末端与试管的液体驱动元件，其中所述的液体元件可以重复地来回移动所述的靶分子通过所述的第二部分。

2. 根据权利要求 1 所述的装置，其特征在于所述的不规则横截面是通过不规则的改变所述管道的所述第一部分横截面的大小产生的。

3. 根据权利要求 1 所述的装置，其特征在于所述的微量液体管道的内表面是粗糙的或有凹缝。

4. 根据权利要求 1 所述的装置，其特征在于所述的探针是核酸、肽或肽核酸。

5. 根据权利要求 4 所述的装置，其特征在于所述的核酸是 DNA 或 RNA。

6. 根据权利要求 4 所述的装置，其特征在于所述的核酸是单链核酸或双链核酸。

7. 根据权利要求 1 所述的装置，其特征在于进一步包括给所述的靶分子提供能量的装置。

8. 一种增加靶分子和探针之间杂交反应的方法，其特征在于包括以下步骤：

(a) 提供一个含有第一部分和接续所述的第一部分之后的第二部分的微量液体管道，其中所述的第一部分有一个不规则的横截面，所

述的第二部分有第一和第二或更多的探针，其中所述的第一探针与所述的靶分子特异结合；

(b) 将含有所述靶分子的液体导入本发明杂交反应装置中的微量液体管道；

(c) 驱动所述的液体来回流动。

9. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于所述的探针是核酸，肽或肽核酸。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于所述的核酸是 DNA 或 RNA。

11. 根据权利要求 9 所述的方法，其特征在于所述的核酸是单链核酸或双链核酸。

12. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于所述的管道的表面是粗糙的。

13. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于所述的不规则横截面是通过不规则的改变所述管道的所述第一部分横截面的大小产生的。

14. 根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于进一步包括给所述的靶分子提供能量的步骤。

高效核酸杂交装置及方法

技术领域

本发明涉及一种用于液体中的靶分子和探针之间杂交反应的装置，以及杂交反应的方法。

背景技术

分子生物学包括许多分析核酸和蛋白的技术。许多这些技术和方法构成了临床诊断测试的基础。这些技术包括核酸杂交分析、限制酶分析、基因序列分析以及核酸和蛋白的分离和纯化。例如，目前核酸杂交通常用于基因研究、生物医学研究和临床诊断。然而，这些技术包括了许多复杂和耗费时间的步骤。由于缺乏敏感性、特异性或可重复性，通常限制了它们的应用。

有许多装置和方法通过改变杂交条件改善了杂交反应的效率。例如，美国专利 5, 639, 423 涉及一种在微结构环境内用于原位化学反应的装置。该装置在需要高度准确的温度循环的生化反应中尤其有用，尤其是基于 DNA 的控制如 PCR，这是因为微装置较小的体积有利于快速的循环周期。美国专利 6, 238, 910 提供了一种能准确控制温度和液体的 DNA 杂交装置。

另外，有些技术改进了用于杂交测定装置的元件。美国专利 5, 849, 486 公开了用于分子生物学诊断、分析和多步骤及多元反应的系统，该系统利用可以自身移动的、自身组装的微电子系统以便在精细条件下主动控制反应条件。美国专利 6, 197, 565 提供了一种微小的整合液体系统，用于多种操作的准备和分析，以及操作和使用这些系统的方法。美国专利 6, 255, 050 利用一种力，如离心力、电泳力、重力、真空吸引力或压力，在杂交反应中驱动含核酸碱基的序列分隔聚集。美国专利 6, 287, 850 公开了一种振动装置，用于可逆的介导液体样品沿着核酸列阵来回流动，因此促进液体样品靶序列和探针在核酸列阵中的杂交。另外，Liu 等人改进了微量液体生化列阵，用摩托罗拉 (Motorola) 基于玻璃的微列阵生物芯片大量的整合了平行微量液体通道 (第 14 届 IEEE 国际微电子机械系统研讨会 2001, 439-442 页, 2001 年 1 月 21-25 日)。

然而，上述已知技术不能提供满意的杂交效率，也不能有效减少杂交所需的时间。因此，有必要发明一种改善杂交测定的装置和方法。

发明内容本发明的一个目的是提供一种用于液体中的靶分子和探针之间杂交反应的装置，包括：

一个微量液体管道包括第一部分和接续所述的第一部分之后的第

二部分，其中所述的第一部分有一个不规则的横截面，所述的第二部分有一种探针，以及

一个连接所述管道末端与试管的液体驱动元件，其中所述的液体元件可以重复地来回移动所述的靶分子通过所述的第二部分。

本发明的另一个目的是提供增加靶分子和探针之间杂交反应的方法，包括以下步骤：

(a) 提供一个含有第一部分和接续所述的第一部分之后的第二部分的微量液体管道，其中所述的第一部分有一个不规则的横截面，所述的第二部分有第一种和第二种或更多种探针，其中所述的第一种探针与所述的靶分子特异结合；

(b) 将含有所述靶分子的液体导入本发明杂交反应装置中的微量液体管道；

(c) 驱动所述的液体来回流动，使所述的靶分子可以重复通过所述的第二部分，因此移走与第二或更多探针非特异结合的所述的靶分子，保留与所述第一种探针结合的靶分子。

附图说明

图 1 表示用于杂交反应装置微量液体管道不规则横断面形状的实例。

图 2 阐述了发明的装置。

图 3 表示不同形状（装置 I：圆圈，装置 II：直线）的不规则横断面的微量液体管道。

图 4 表示不考虑不规则横断面的形状，由微泵驱动的靶 DNA 的杂交效率较孵育靶 DNA（对照）为佳。

图 5 表示圆圈状不规则断面的杂交效率。

图 6 表示不同大小横断面的微量液体管道。

图 7 表示不管在装置 III 还是装置 IV，由微泵驱动的靶 DNA 的杂交效率较孵育靶 DNA（对照）为佳。

图 8 表示在装置 III 的慢区域（横断面大）30 分钟后的杂交信号是对照 4 小时后杂交信号的 1.5 倍。

图 9 表示在装置 IV 的慢区域（横断面大）30 分钟后的杂交信号是对照 4 小时后杂交信号的 2.7 倍，如是对照 30 分钟时的 6.1 倍。

具体实施方式

本发明利用了能产生剪切力的微量液体管道使液体前后晃动，增加液体中的靶分子和探针的杂交效率，减少杂交所需的时间。

本发明的一个目的是提供一种用于液体中的靶分子和探针之间杂交反应的装置，包括：

一个含有第一部分和接续所述的第一部分之后的第二部分的微量

液体管道，其中所述的第一部分有一个不规则的横截面，所述的第二部分有一种探针，以及

一个连接所述管道末端与试管的液体驱动元件，其中所述的液体元件可以重复地来回移动所述的靶分子通过所述的第二部分。

根据本发明，探针是一种表面固定不动的分子，被特别的靶序列识别，有时也指作为配体。可以用该发明研究的探针例子包括，但不局限于，细胞膜受体的激动剂和拮抗剂、毒素和毒液、病毒表位、激素（如鸦片肽、类固醇等）、激素受体、肽、酶、酶作用物、辅因子、药物、外源凝集素、糖类、寡核苷酸或核酸、寡糖、蛋白质和单克隆抗体。

根据本发明，靶分子是与给定探针有亲和力的分子，有时指作为一个受体。靶分子可以是自然产生的分子，也可以是人工制造的分子。另外，它们可以以无变化状态使用，也可以与其他种类结合使用。靶分子可以直接或通过特异结合介质以共价键或非共价键与结合膜结合。本发明使用的靶分子例子包括，但不局限于，抗体、细胞膜受体、与特异抗原决定簇（如病毒、细胞或其他物质）反应的单克隆抗体和抗血清、药物、寡核苷酸或核酸、肽、辅因子、外源凝集素、糖类、多糖、细胞、细胞膜和细胞器。优选的本发明的靶分子是核酸、肽或肽核糖核酸。本发明更优选的靶分子是 DNA 或 RNA。更优选的本发明的靶分子是单链核酸或双链核酸。

根据本发明，本装置的微量液体管道包括第一部分和接续所述的第一部分之后的第二部分。根据本发明，第一部分有一个不规则的横截面。不规则的横截面是通过不规则的改变所述管道的所述第一部分的横截面的大小产生的。第一部分形状的例子见图 1。由于分子内氢键的形成，多数单链核酸分子可以形成盘状构造。考虑到此种构造，进行杂交反应的区域位于分子构造之内，因此，杂交反应并不完全。过去，只有大约 8% 的核酸分子可以完全反应。根据本发明，第一部分可以产生切应力，该切应力能将核酸分子拉成线性构造，线性核酸分子的形成有利于杂交反应。另外，本发明装置也可以使用双链核酸。本发明第一部分产生的切应力可以使双链核酸变性产生单链核酸。类似的，蛋白分子的反应区也可能位于三维结构之内。剪切力可以损伤蛋白的三维结构，使得反应区暴露出来，杂交反应容易的进行。根据本发明，微量液体管道的内表面是粗糙的或有凹缝。

根据本发明，该装置包括一个连接所述管道末端与试管的液体驱动元件。优选的液体驱动元件是微气体驱动泵、微机械泵或微电动泵。更优选的，微机械泵选自微静电泵、微磁力驱动泵、微扩散泵。更优选的，微电动泵选自以下团体包括微水电泵和微电泳泵以及微电渗透泵。

根据本发明,该装置进一步包括给所述的靶分子提供能量的方法。优选的方法是加热器如温度循环仪。能量可以增加靶分子和探针碰撞的次数。因此可以提高杂交效率。

本发明一个优选的实例是为了阐明该装置用于液体中靶分子和探针(见图2)之间的杂交反应。微泵1驱动液体流至阀2。液体通过试管4流进微量液体管道3,杂交反应在管道3进行。获得的液体通过试管5流出管道3。

根据本发明,任何已知的技术(如微铸造、刻蚀和粘合方法)可以用于制造本发明杂交反应的装置,如在“第14届IEEE国际微电子机械系统研讨会2001,439-442页,2001年1月21-25日”中描述的方法。优选的本发明装置可以用于去除与探针非特异结合的靶分子。

本发明的另一个目的是提供为去除杂交反应中靶分子和探针之间非特异结合的靶分子的方法,它包括以下步骤:

(a) 提供一个微量液体管道包括第一部分和接续所述的第一部分之后的第二部分;其中所述的第一部分有一个不规则的横截面,所述的第二部分有第一和第二或更多的探针,其中所述的第一探针与所述的靶分子特异结合;

(b) 将含有所述靶分子的液体导入本发明杂交反应装置中的微管道;

(c) 驱动所述的液体来回流动,使所述的靶分子可以重复通过所述的第二部分,去除与第二或更多探针非特异结合的靶分子,保留与所述第一种探针结合的靶分子。

根据本发明,本方法中使用的去除非特异结合的靶分子的微量液体装置包括有一个不规则的横截面的第一部分和有第一和第二或更多探针的第二部分,其中所述的第一探针与所述的靶分子特异结合。与其它探针非特异结合的靶分子可以通过重复驱动液体通过所述的第二部分去除。

根据本发明,该发明的装置和方法可以减少杂交反应所需的时间,增加杂交效率。本发明为进行杂交反应提供了商业上可行的装置。可以理解上述描述意在阐明而非限定。通过阅读上述说明,许多实例对本领域的技术人员来说是显而易见的。

实施例

实施例1 杂交反应

本实施例比较了不同形状的(图3,装置I:圆圈,装置II:直线)微量液体管道的杂交效率。

四种探针,Sp5(0.5 μ M),Alo3(5 μ M),Alo1(5 μ M)和P3(5 μ M)分别用移液器点至薄片上(固定液:2 \times SSC;薄片:工业技术研究所制造的sol-gel;每一点的体积:200nl),37 $^{\circ}$ C反应4小时。然后将薄片

在 0.5%SDS 中用超声波降解, 用去离子水洗两次, 每次一分钟, 在 DNA 杂交炉 (杂交公司) 中风干。

其上有一个包括圆圈状或直线状的第一部分微量液体管道的特别铸造的模具与上述含有特异核酸探针的薄片紧密结合, 其上用强有力的弹簧别针固定。铸造模具上的微量液体管道应该正确覆盖固定在薄片上的核酸探针, 使核酸探针暴露在微量液体管道中。

靶 DNA, Cy5O3 (1 μ M; 与 A1O3 互补的 25 碱基单链序列, 其 5' 端用 Cy5 探测荧光标记), 变性。含有 10 μ l 靶 DNA、20 μ l 去离子水和 30 μ l 的 2 \times 杂交缓冲液的液体进入微量液体管道。提供附加能量以增加杂交效率。靶 DNA 用微量泵前后驱动以进行杂交 (40 $^{\circ}$ C; 1 小时)。靶 DNA 分别引入另外一个微量液体管道, 40 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时以进行杂交 (作为对照)。杂交后, 薄片用扫描仪 (ScanArray 4000, 通用扫描公司) 探测荧光。

结果见图 4 和图 5。图 4 表示不考虑第一部分的形状, 由微泵驱动的靶 DNA 的杂交效率较孵育靶 DNA (对照) 好。图 5 表示直线状的第一部分 (信号大约是对照的 3.8 倍) 的杂交效率较圆圈状 (信号大约是对照的 2.1 倍) 的杂交效率高。

实施例 2 杂交反应

本实施例比较了不同大小的横断面 (图 6) 的微量液体管道的杂交效率。

五种探针, Sp5(0.5 μ M), 2 号探针(5 μ M), 3 号探针(5 μ M), 4 号探针(5 μ M) 和 5 号探针(5 μ M) 分别用移液器点至薄片上 (固定液: 2 \times SSC; 薄片: 工业技术研究所制造的 sol-gel; 每一点的体积: 200nl), 37 $^{\circ}$ C 反应 4 小时。然后将薄片在 0.5%SDS 中用超声波降解, 用去离子水洗两次, 每次一分钟, 在 DNA 杂交炉 (杂交公司) 中风干。

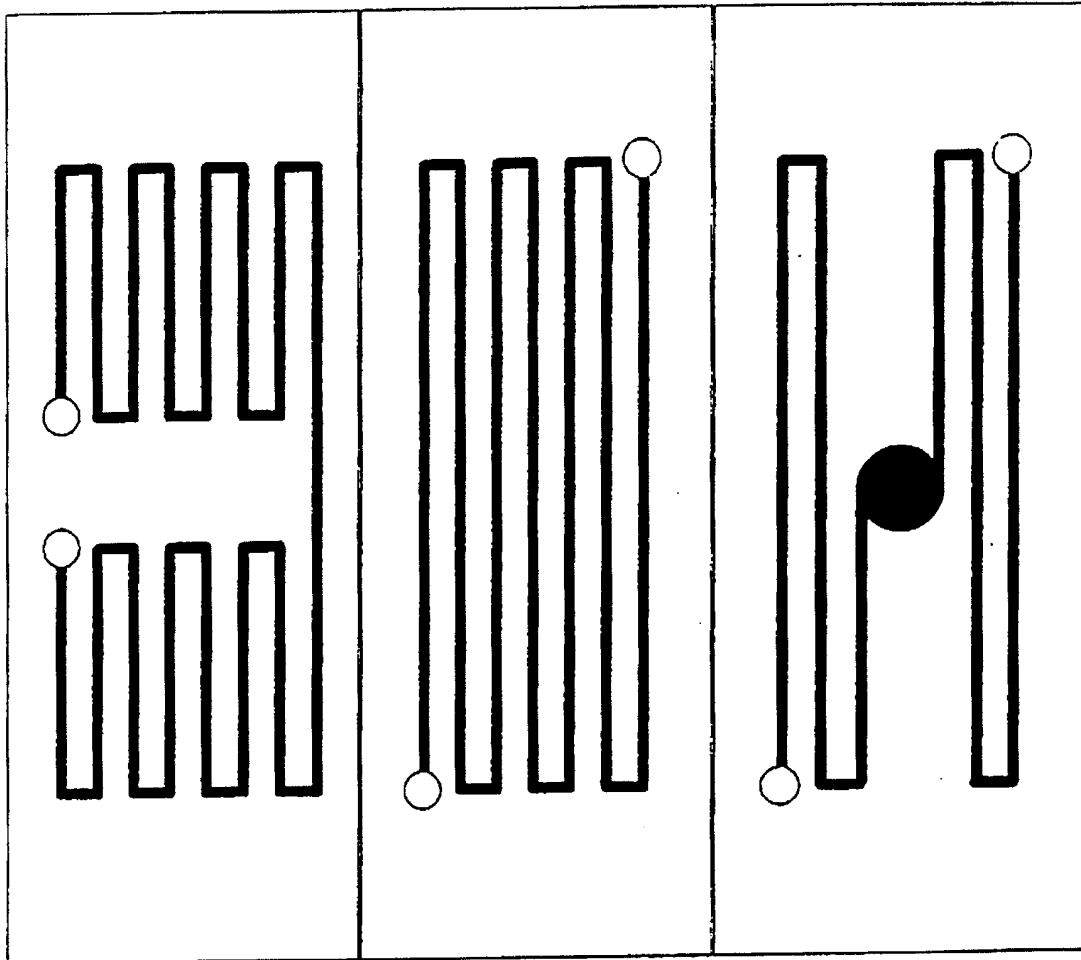
根据实施例 1 的描述产生两个直线微量液体管道, 横截面为 2: 1 (装置 III) 和 5: 1 (装置 IV), 在以下杂交实验中使用。

靶 DNA (与 5 号探针互补的 1K 碱基单链序列, 其 5' 端用 Cy5 探测荧光标记) 变性。含有 10 μ l 靶 DNA、20 μ l 去离子水和 30 μ l 的 2 \times 杂交缓冲液的液体进入微量液体管道。靶 DNA 用微量泵前后驱动以进行杂交 (40 $^{\circ}$ C; 30 分钟)。靶 DNA 分别引入另外一个微量液体管道, 40 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟以进行杂交 (作为对照)。杂交后, 薄片用扫描仪 (ScanArray 4000, 通用扫描公司) 探测荧光。

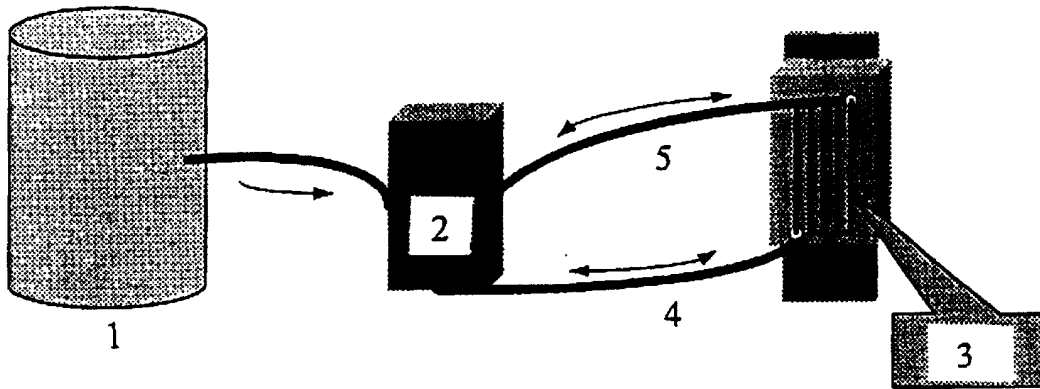
结果见图 7 至 9。图 7 表示不管在装置 III 还是装置 IV, 由微泵驱动的靶 DNA 的杂交效率较孵育靶 DNA (对照) 好。图 8 表示在装置 III 的慢区域 (横断面大) 30 分钟后的杂交信号是对照 4 小时后杂交信号的 1.5 倍。图 9 表示在装置 IV 的慢区域 (横断面大) 30 分钟后的杂交信号是对照 4 小时后杂交信号的 2.7 倍, 如是对照 30 分钟时的 6.1 倍。

这些结果表明杂交信号的数量不仅被用以驱动靶 DNA 的动力能量影响，而且还被微量液体管道的形状影响。

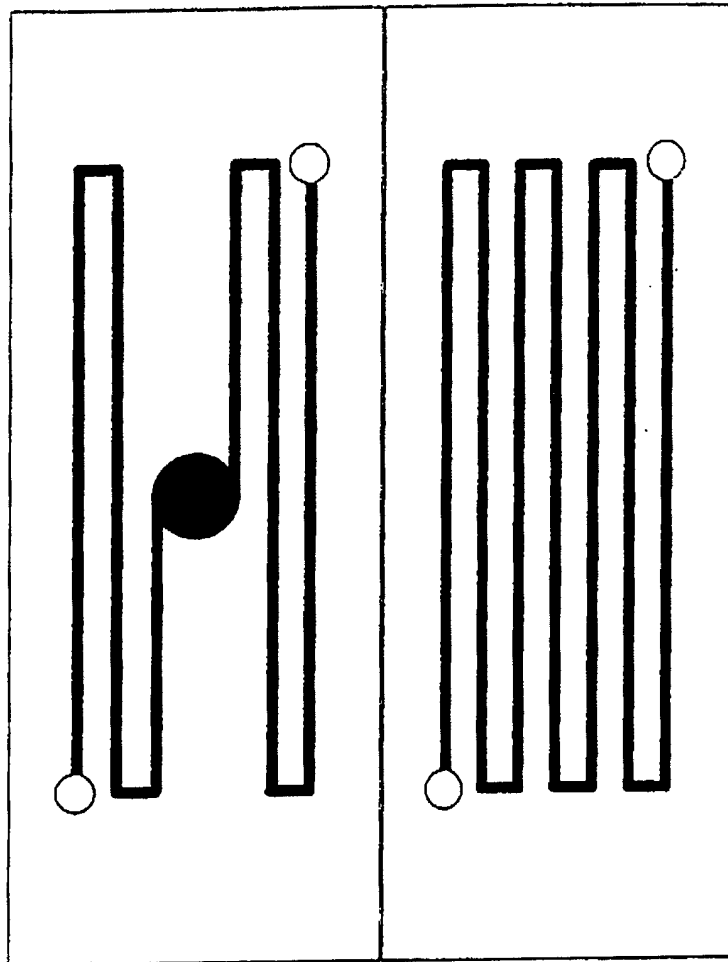
虽然本发明在优选的参考实施例中特别的显示与描述，但本领域的技术人员可以理解，只要不背离本发明的精神和范围，可以有形式和细节上的多种变化。



附图 1



附图 2



装置 1

装置 2

附图 3

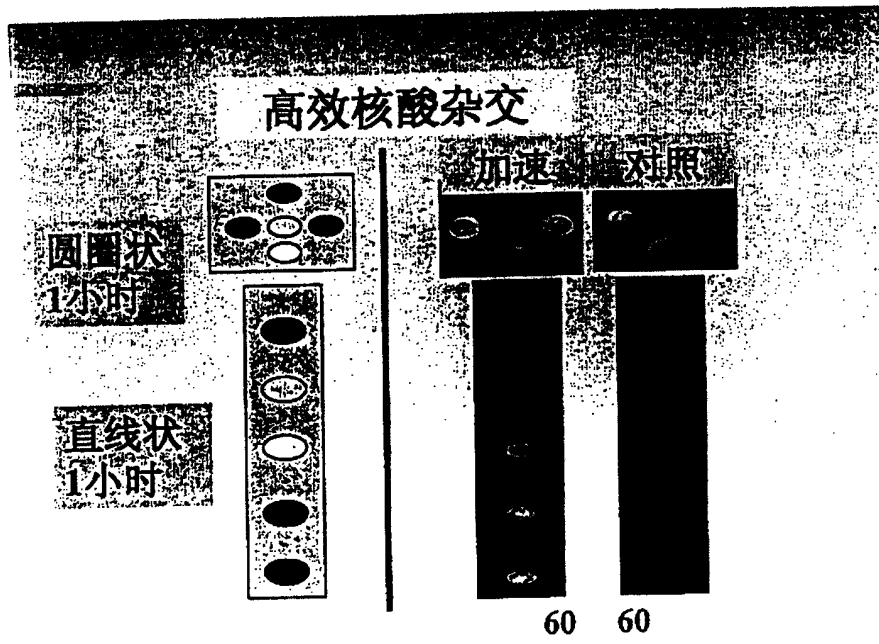


图 4

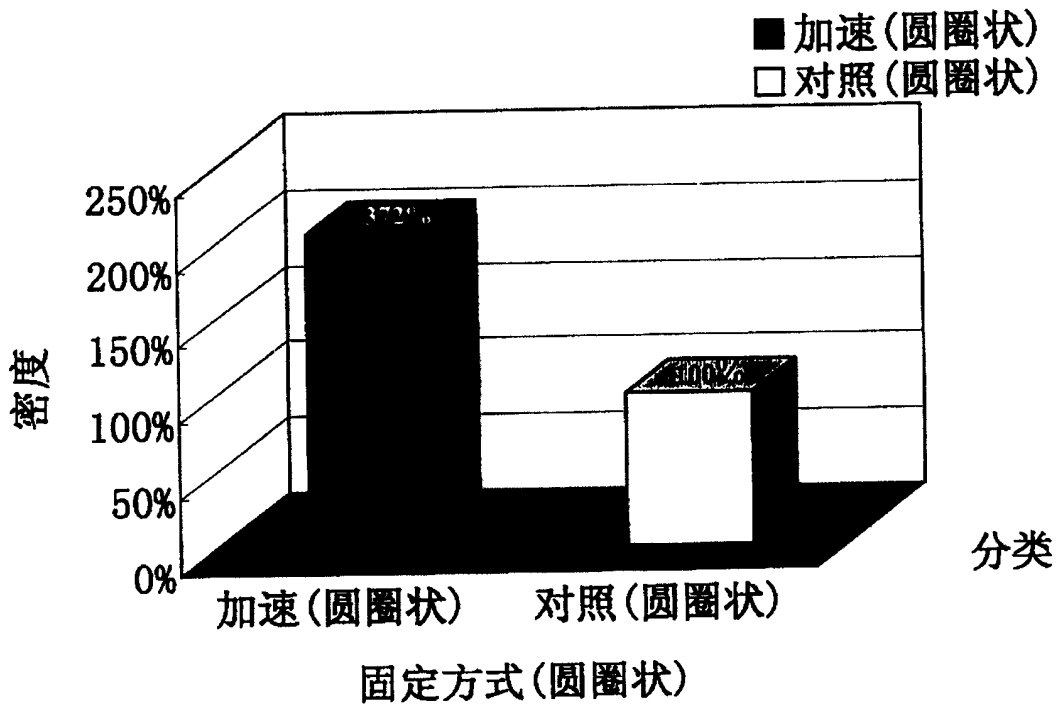
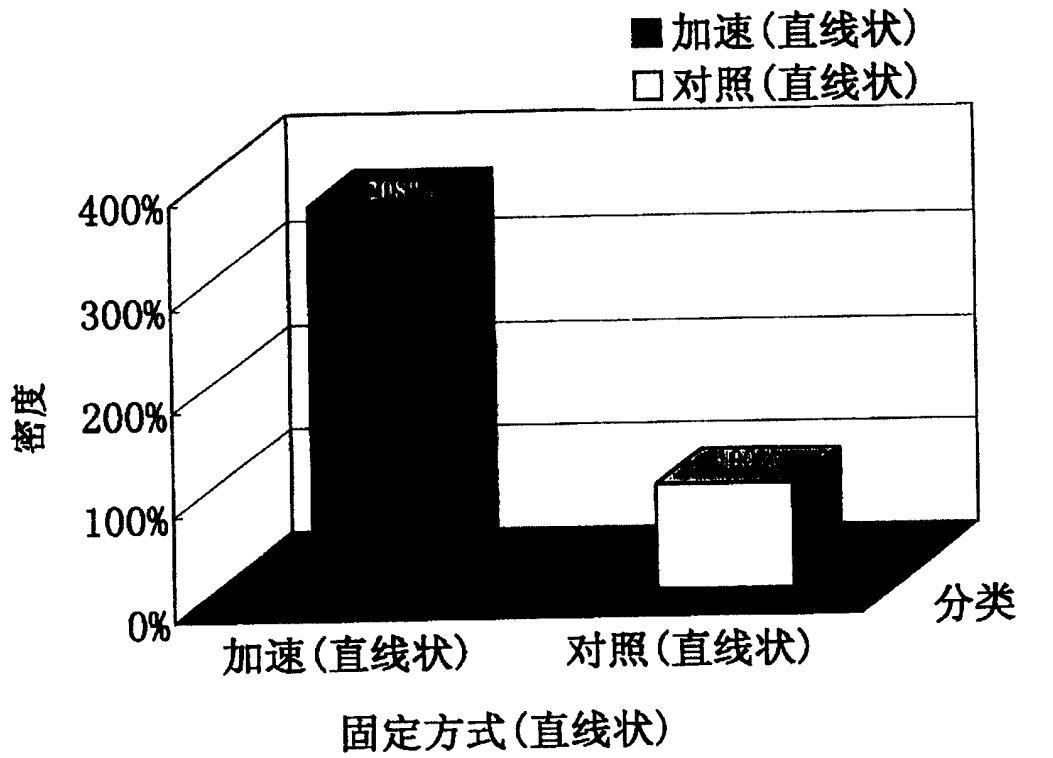
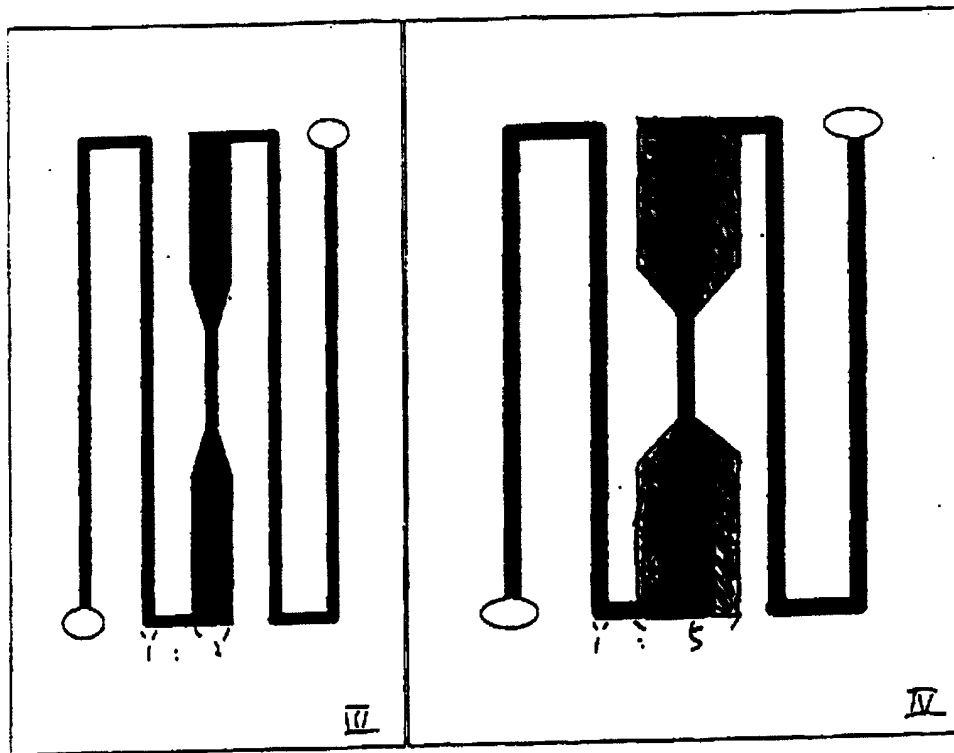


图 5



附图 6

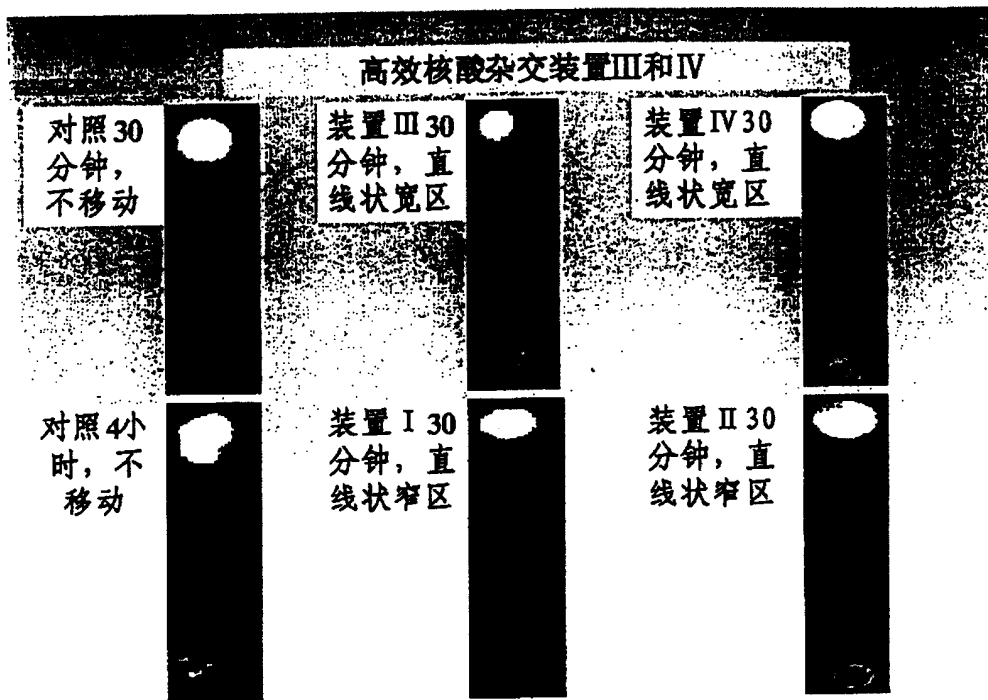


图 7

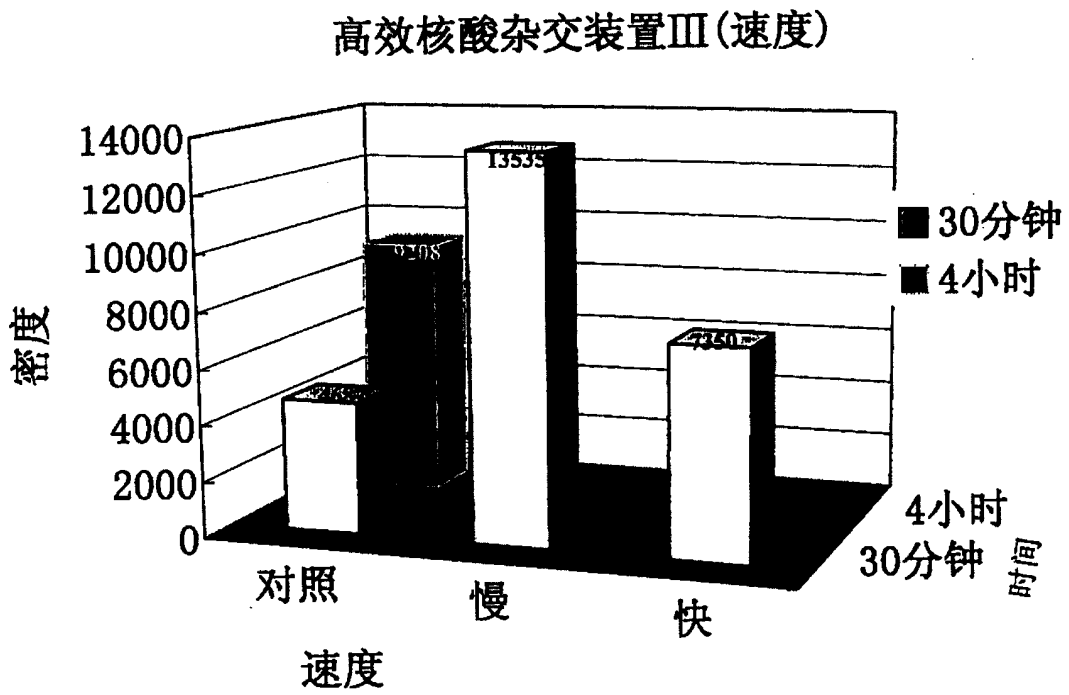


图 8

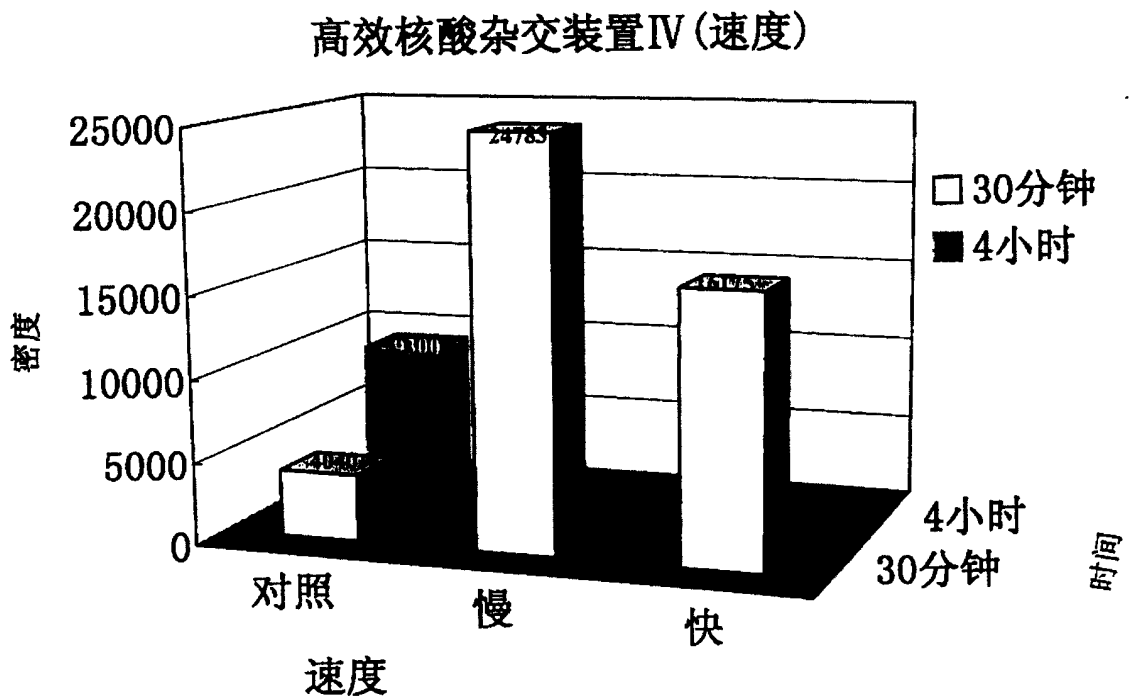


图 9