

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/22 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03811044. X

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1326989C

[22] 申请日 2003.5.14 [21] 申请号 03811044. X

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 15 [33] US [31] 10/146,004

[86] 国际申请 PCT/US2003/015134 2003. 5. 14

[87] 国际公布 WO2003/097786 英 2003. 11. 27

[85] 进入国家阶段日期 2004. 11. 15

[73] 专利权人 贝克曼考尔特公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 罗伯特·S·马特森

[56] 参考文献

US6110669A 2000. 8. 2

US6146833A 2000. 11. 14

US6017696A 2000. 1. 25

审查员 徐 瑾

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 杨 青 樊卫民

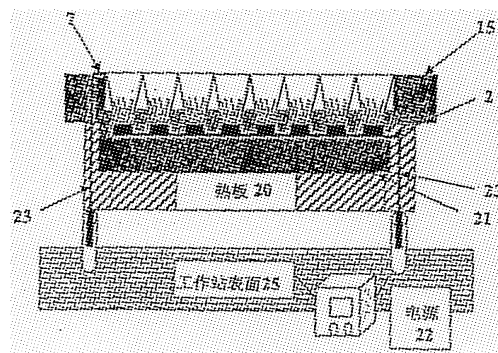
权利要求书 5 页 说明书 18 页 附图 8 页

[54] 发明名称

导电微孔板

[57] 摘要

本发明描述了一种用于检测样品中靶生物分子的导电微孔板设备(15)。微孔板(15)含有多孔基底(1)和导电层(2)的装配件,其中的装配件密封入微孔板(15)的至少几个孔底部。多孔基底(1)具有顶面(3)和底面。顶面(3)含有多个共价连接的探针生物分子。共价连接的探针生物分子与样品中含有的靶生物分子具有反应活性。连接至多孔基底(1)底面的导电层(2)能适于承受电压。本发明的微孔板可容易地适于机器人工作站采用。相应地,在一个实施方案中,电源合并入机器人手臂工具内,以用于快速的微孔板处理。



1. 一种用于检测样品中靶生物分子的导电微孔板，该微孔板具有多个孔，所述微孔板包括：

多孔基底和导电层的装配件，其中的装配件密封入至少一些孔的底部，其中

多孔基底具有顶面和底面，

顶面包括多个共价连接的探针生物分子，其中的探针生物分子对靶生物分子具有反应活性，且其中的探针生物分子连接在多孔基底顶面上的离散位置处，由此形成阵列，

导电层连接至多孔基底的底面，

并且导电层适于接收电压。

2. 权利要求 1 的微孔板，其中的顶面进一步含有多个与探针生物分子具有反应活性的活化官能侧基；并且顶面进一步含有多个共价结合至官能侧基的探针生物分子。

3. 权利要求 2 的微孔板，其中的活化官能侧基是酰氟基。

4. 权利要求 3 的微孔板，其中的探针生物分子未经修饰地连接至多孔基底的顶面。

5. 权利要求 1 的微孔板，其中每孔内的阵列含有 100 至 400 个探针生物分子。

6. 权利要求 1 的微孔板，其中

导电层构成第一电极，且微孔板进一步含有：

与第一电极电接触的第二电极。

7. 权利要求 6 的微孔板，其中第一和第二电极之间的电接触通

过电解质溶液实现。

8. 权利要求 1 的微孔板，其中的导电层直接连接至多孔基底的底面。

9. 权利要求 8 的微孔板，其中的导电层是金属镀层。

10. 权利要求 1 的微孔板，进一步含有置于多孔基底底面和导电层之间的渗透层。

11. 权利要求 10 的微孔板，其中的渗透层含有选自琼脂糖和交联聚合物的导电材料。

12. 权利要求 11 的微孔板，其中的渗透层含有异丁烯酸酯。

13. 权利要求 1 的微孔板，其中的多孔基底由含有羧基侧基的材料制备而得。

14. 权利要求 13 的微孔板，其中的多孔基底选自羧化聚丙烯，羧化聚乙烯以及聚碳酸酯。

15. 权利要求 1 的微孔板，其中的多孔基底由含有带羧基侧基涂敷层的材料制备而成。

16. 权利要求 1 的微孔板，其中的多孔基底具有直径为 16-18 μm 的孔。

17. 权利要求 1 的微孔板，其中的微孔板含有 96-384 个孔。

18. 权利要求 1 的微孔板，其中的探针和靶生物分子选自：核酸，

多核苷酸，多肽，蛋白，碳水化合物以及脂类。

19. 权利要求 18 的微孔板，其中的生物分子是多核苷酸，选自扩增的 DNA，cDNA，单链 DNA，双链 DNA，PNA，RNA 或 mRNA。

20. 一种设备，含有权利要求 6 的微孔板以及用于给第一和第二电极提供电压的电源。

21. 权利要求 20 的设备，其中的电源是热板，包括：
适于接收微孔板的表面；
电源；以及
用于将电压从电源提供给微孔板的第一和第二电极的装置。

22. 权利要求 21 的设备，其中用于供给电压的装置包括合并入热板的导线，其中当微孔板置于热板表面上时，导线与微孔板的第一和第二电极紧密配合。

23. 权利要求 21 的设备，其中的第一电极包括密封入单个孔基部的电极片网络，并且热板含有匹配的电导线网络，从而当微孔板置于热板表面上时，电压从电导线传送至电极片。

24. 一种用于检测样品中靶生物分子的导电微孔板，该微孔板具有多个孔，所述微孔板包括：

由多孔基底，形成第一电极的导电层，与第一电极电接触的第二电极，以及用于给第一和第二电极提供电压的电源构成的装配件，其中：

装配件密封入至少一些孔的底部，
多孔基底具有顶面和底面，

顶面包括多个与靶生物分子具有反应活性的共价连接的探针生物分子，

导电层连接至多孔基底的底面，

第一电极包括密封入单个孔基部的电极片网络，并且电源包括匹配的电导线网络，从而当装配微孔板时，电极片与匹配的电导线紧密配合。

25. 一种设备，含有权利要求 1 的微孔板以及给导电层提供电压的机器人手臂，所述设备包括电极支架工具，所述电极支架工具带有一个与导电层电接触的电极。

26. 权利要求 25 的设备，进一步包括通过电解质溶液与第一电极电接触的第二电极。

27. 权利要求 25 的设备，其中的第一电极刺入多孔基底。

28. 一种形成带有多个孔的导电微孔板的方法，所述方法包括：

(a) 提供带有顶面和底面的多孔基底；

(b) 用能与探针生物分子共价连接的活性官能团活化顶面；

(c) 在使探针生物分子与活性官能团充分共价连接条件下，将顶面与探针生物分子在多孔基底上的离散位置处接触，由此形成生物阵列；

(d) 将导电层连接至多孔基底的底面；以及

(e) 将带有导电层的多孔基底密封入微孔板的至少是有一些孔的底部，其中的导电层适于接收电压。

29. 权利要求 28 的方法，其中的接触步骤 (c) 通过选自如下的技术进行实施：喷印，固相或开放式毛细管设备接触印刷，微流体通道印刷，丝网印刷，以及采用基于电化学或电磁力的印刷设备的技术。

30. 权利要求 28 的方法，其中的连接步骤 (d) 通过选自如下的技术进行实施：丝网印刷，金属化学沉积，胶粘，分层，密封，以及

聚合。

31. 一种用于将靶生物分子杂交至探针生物分子的方法，所述方法包括：

- (a) 提供权利要求 7 的导电微孔板；
- (b) 将标记的靶生物分子引入电解质溶液； 以及
- (c) 在第一和第二电极之间施加电压，由此标记的靶生物分子与多孔基底表面上的探针生物分子杂交。

导电微孔板

技术领域

本发明涉及用于同时进行多个分析的设备。具体地，本发明涉及含有活性电极的微孔板设备，以用于吸引生物分子靶分析物。本发明还涉及制造和使用该方法。

现有技术的描述

多个现代分子生物学方法，包括核酸杂交分析和蛋白质结合分析，采用探针生物分子（“探针”）的“生物芯片”或阵列以结合和检测复杂样品体系中的靶生物物质（“靶”）。这些方法中，最通常地只是将某种样品置于阵列表面上，样品中含有的靶被动地朝固定于支持物上的探针扩散并与之结合。采用被动扩散原理的市售微阵列实例包括 Affymetrix（Santa Clara, California）公司生产的 GENECHIP®阵列，以及 Synteni（Fremont, CA）公司生产的 GEM™阵列。

虽然这种阵列处理高体积和高目标物含量的样品时有效，然而在低目标浓度的样品中其扩散是有限的。用户对付这种局限性采用的典型方法是，将温育时间延长至 15-20 小时或更长以俘获低丰度靶，或在试验前处理样品以提高靶的浓度。例如，样品中的靶 DNA 拷贝数可采用聚合酶链反应进行扩增。或者，可使用多个细胞以制备具有更高水平目标生物分子的样品。

然而，对于高通量和超高通量样品处理而言，延长杂交时间存在严重的瓶颈。多个细胞群的使用会导致包括不代表目标生物分子的其他细胞类型的可能性增加。另外，扩增包括复杂且冗长的步骤，并且通过低丰度物质的过度扩增可引入显著偏差。而且，由于引物-靶退火中的差别，并非所有物种都可以扩增至同样的程度。因此，成本、方

便性和灵活性限制了基于扩散的方法。

近来, Nanogen, Inc. (San Diego, Ca) 提出一种替代性的检测样品中低拷贝靶的方法(美国专利号 5,605,662; 5,632,957; 5,965,452; 5,849,486; 5,929,208; 6,017,696; 6,048,690; 6,051,380; 6,225,059; 6,287,517)。通过对阵列设备的特定区域提供电荷, 迫使带电靶生物分子朝该区域迁移并在该区域上集中。结果, 与上面讨论的被动扩散方法相比较, 探针生物分子与靶生物分子更快速和有效地结合。

由 Nanogen 开发的电子阵列设备典型地包括电流, 电压或电源, 偶联至电源的电极, 在电极的一个表面上形成的渗透层, 以及在渗透层上形成的生物连接层。渗透层为小抗衡离子在电极和溶液之间提供自由转运, 连接层则提供了特定结合实体的连接(美国专利号 5,965,452)。这种电子阵列设备的其中一种可从市售获得, 商标名为 NANOCHIP™。

虽然由 Nanogen 开发的电子阵列设备明显改进了探针-靶结合速率, 然而这些阵列并不能应用于高通量筛选(HTS)。Nanogen 的电子阵列设备较为庞大、昂贵, 并且难以控制。并且它们的探针生物分子密度非常有限, 并且不能通常如 HTS 所需的每天处理数以千计的样品。

发明概述

鉴于如上提及的传统阵列体系的缺点, 本发明的一个目的是提供廉价的阵列设备, 用于快速和有效的结合未扩增或扩增的生物分子。尤其理想的是提供廉价的具有足够高探针生物分子密度, 并且适合用于 HTS 形式的样品分析的阵列设备。本发明的另一目的是提供制造和使用这种阵列设备的方法。

本发明中, 通过采用导电微孔板设备用于样品中靶生物分子的检

测，即可达到这些及其他目的。本发明的微孔板包括多孔基底的和导电层的装配件，其中的装配件密封入微孔板的至少是有一些孔的底部。

多孔基底带有顶面和底面。顶面含有多个共价连接的探针生物分子。共价连接的探针生物分子与样品中含有的靶生物分子具有反应活性。连接至多孔基底底面的导电层适于接收电压。

在一个实施方案中，多孔基底的顶面进一步含有多个与探针生物分子具有反应活性的活化的官能侧基。在此实施方案中，多个探针生物分子共价连接至官能侧基。优选地，活化的官能侧基是酰氟基。最优选地，探针生物分子连接在多孔基底顶面上的离散位置，由此形成阵列。

本发明的另一方面包括一种设备，含有上述导电微孔板和用于给微孔板提供电压的电源。本发明的微孔板可容易地适于机器人工作站。因此，在一个实施方案中，电源合并入机器人手臂的工具内，以用于进行快速的微孔板处理。

本发明的另一方面涉及形成带有多个孔的导电微孔板的方法。该方法含有如下步骤：

- (a) 提供带有顶面和底面的多孔基底；
- (b) 用可与探针生物分子共价连接的活性官能团活化顶面；
- (c) 在使探针生物分子充分共价连接至具有活性官能团的条件下，将顶面与探针生物分子接触；
- (d) 将导电层连接至多孔基底的底面；以及
- (e) 将带有连接的导电层的多孔基底密封入微孔板的至少是有一些孔的底部，其中的导电层适于接收电压。

另一方面，本发明提供了将靶生物分子杂交至探针生物分子的方

法。该方法包括：

(a) 提供本发明的导电微孔板，其中的导电层形成第一电极，微孔板另外含有第二电极，所述第二电极通过电解质溶液与第一电极电接触；

(b) 将标记的靶生物分子引入电解质溶液中；以及

(c) 在第一和第二电极之间施加电压，由此标记的靶生物分子与多孔基底表面上的探针生物分子杂交。

本发明呈现出很多胜于传统设备的经济和技术优势。本发明以微孔板形式公开了生物分子靶的电泳浓缩。虽然微孔板印迹被广泛接受作为 HTS 的标准形式，然而采用诸如 NANOCHIPS™ 的传统微电子设备制造微孔板以增加靶结合速率将会极其昂贵而难以施行，尤其是当希望单纯使用消耗性微孔板时。

另一方面，本发明的微孔板通过活化廉价多孔导电基底并密封入微孔板的孔底部而得以构建。因而，本发明的导电微孔板提供了常规阵列设备的廉价、简易并且可靠的选择性替代。

本发明的导电微孔板适合用于未扩增和扩增生物分子的快速和有效结合。例如，本发明的导电微孔板适合于诸多 HTS 应用中核酸的超快杂交至微阵列，所述 HTS 应用包括药物开发和基于基因的诊断学。

另外，在本发明的优选实施方案中，多孔基底采用酰氟基进行活化。本领域技术人员将会理解酰氟化学物的优点。酰氟基对与水的反应具有相对的抗性（“经由氨基酸氟化物的肽合成”，Carpino, L., Beyerman, M., Wenschuh, H.&Bienert, M.: Acc. Chem. Res. :29, 268-74, 1996），而与氮和/或氧亲核试剂则具有高反应活性。这种高反应活性及与含水条件下的稳定性相结合使得酰氟活化的化学性质对生物阵列应用具有特别吸引力，因为它在探针生物分子的固定前和固定后延长了保存期限。最后，酰氟活化的基底既可结合修饰的探针生物分子，

也可结合未修饰的探针生物分子。由于并不需要修饰生物分子，基本上试剂成本的减少可达到 50%。

本发明的上述和其他特征，以及获得它们的方式，通过参考如下描述并与附图结合，可变得更明显并能被最好的理解。这些附图仅仅是描述本发明的典型实施方案，不应认为是对本发明范围的限制。

附图描述

图 1 描述电场中影响带负电荷分子运动的受力。

图 2a 和 2b 所示为电动杂交（图 2b）胜于基于扩散的 DNA/RNA 杂交（图 2a）的优点。

图 3 所示为带有导电层的多孔基底的装配件。

图 4 所示为根据本发明一个实施方案的多孔基底、渗透层及密封入孔底部的导电层的装配件。

图 5 所示为根据本发明一个实施方案的微孔板和热板电源的装配件。

图 6 所示为标记的 cDNA 靶与固定于活化的多孔膜基底上的 cDNA 探针的被动杂交。

图 7 描述了根据本发明一个实施方案的微孔板装配件，包括电极片网络和电源，所述电源含有匹配的电导线网络。

图 8 所示为本发明的 DNA 杂交开始之前的微孔板装配件。

图 9 所示为 DNA 电泳过程中（靶 DNA k' 结合至对应的探针 DNA k）的图 8 微孔板装配件。

图 10 所示为根据本发明一个实施方案的带有电极支架工具的微孔板装配件。

发明详述

核酸杂交率和其他生物分子结合过程的速率很大程度依赖于反应物的浓度。反应物浓度较低时，反应分子之间的碰撞数就很低，由此反应的出现就比较迟缓。

已经观察到，可利用电动势使带电生物分子运动并穿越各种介质。一些常规分析过程例如电泳、电印迹以及等电聚焦等采用了这种物理现象。

如图 1 所示，在某一施加的外部电场强度 E 中，净电荷为 q 的分子将受到一个电场力 F_e ，从而分子会根据如下关系 (1) 受到电场力的影响：

$$F_e = q \times E \quad (1)$$

阻挠分子在电场力作用下加速的是摩擦力。这可定义为拉力 F_d ，所述拉力与分子速度 V 及其摩擦系数 f 成比例。

$$F_d = f \times V \quad (2)$$

随着带电分子朝相反电荷的电极方向运动，当 $F_e = F_d$ 时可达到稳定状态的速度。单位电场强度下的稳定状态速度是分子的电泳迁移率：

$$\mu = q/f \quad (3)$$

对于 DNA 而言，摩擦系数 f 和总净电荷 q 都直接与生物分子的大小 (N ，碱基对) 成比例或：

$$\mu = q/f \sim N/N \quad (4)$$

由此，对于核酸而言，随分子大小的改变，电泳迁移率 μ 基本上保持恒定 (1992, 毛细管电泳：理论与实践, Grossman, PD 和 Colbum, JC(eds.), pp.111~120, Academic Press, San Diego)。这就意味着 DNA 分子在施加的电场内迁移速率基本上相同。对其他带电生物分子而言，净电荷与摩擦系数保持恒定比例时，这个结论也是正确的，诸如 SDS-蛋白质而言。本发明的导电微孔板允许带电生物分子快速移动

出溶液区，而感觉不出分子的分离，并在接近基底表面处进行浓缩。通过采用极短距离的自由溶液电泳，可最好地完成这一过程。

带电分子在自由溶液中的电泳移动可很容易实现。在合适条件下，这种分子可在电极表面处或其附近浓缩。例如，图 2a 示范了依赖于浓度的靶 DNA5 朝杂交基底 1 的扩散。然而，如图 2b 所示，施加电压后，扩散产生极大偏离，并且靶 DNAs 5 被拖向了杂交基底 1。

在 Nanogen 的基于微芯片的杂交分析的一系列文本中，阐明了互补 DNA 在电极表面附近的束缚，以及其与连接至电极表面的探针 DNA 的快速杂交（美国专利号 5,605,662；5,632,957；5,965,452；5,929,208；6,017,696；6,048,690；6,051,380；6,225,059；6,287,517）。这种有源微电子设备能够在选定区域上快速转运和浓缩核酸，并且因此较之基于扩散的阵列具有更高的（30-40 倍）的杂交速率。然而，传统微电子设备不能每天处理如高通量筛选（HTS）应用中所需的数以千计的样品。

参阅图 3、8 和 9，本发明的一方面涉及用于样品中靶生物分子 9 检测的导电微孔板设备。本发明的微孔板含有多孔基底 1 和导电层 2 的装配件，其中的装配件密封入微孔板的至少几个孔的底部。可有多多个方法密封基底装配件，下面微孔板构建部分将会详细解述。

多孔基底带有顶面 3 和底面。顶面 3 含有多个共价连接的探针生物分子 4。共价连接的探针生物分子 4 与样品中含有的靶生物分子 9 具有反应活性。例如，图 9 所示为一种靶生物分子 9，生物分子 k'，杂交至对应的探针生物分子 k（一种探针生物分子 4）上。连接至多孔基底底面的导电层 2 适于接收来自电源 22 的电压。

此处使用的术语“生物分子”，指的是核酸、多核苷酸，多肽，蛋白质，碳水化合物，脂类，它们的共轭物，半抗原，以及其类似物。

此处使用的“多核苷酸”是指脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物，形态为独立片段或作为更大的构建组分。此处使用的“多核苷酸”可以是 DNA，RNA，诸如 PNA（肽核酸）的 DNA 类似物，或合成的寡核苷酸。DNA 可以是单链或双链 DNA，或通过 PCR 技术扩增的 DNA。RNA 可以是 mRNA。多核苷酸的长度可以是 3bp 至 10bp。根据本发明的一个实施方案，多核苷酸的长度范围为约 50bp 至 10kb，优选地为 100bp 至 1.5kb。根据本发明的另一实施方案，合成的寡核苷酸的长度范围为约 3 至 100 个核苷酸，优选地为 25 至 75 个核苷酸。根据本发明的其它实施方案，寡核苷酸的长度范围为约 15 至 20 个核苷酸。

此处使用的术语“多肽”是指氨基酸的聚合物，其中一个氨基酸的 α -羧基通过肽键连接至另一个氨基酸的 α -氨基。一种蛋白质可含有一个或多个通过二硫键连接在一起的多肽。蛋白质的实例包括但不限于抗体、抗原、配体、受体，等。

靶生物分子可以是带任意电荷的分子。带电分子包括含有带电基团的天然生物分子，以及用带电基团进行衍生化的生物分子。本领域技术人员应可以认识到，除了化学衍生之外，可通过调节样品溶液的 pH 使生物分子带电。

1. 基底和表面化学物的选择

多孔基底可以是能共价结合探针生物分子的任意多孔材料。孔的尺寸必须足够大到允许荧光标记的靶生物分子通过，并且能维持基底及配件两边的电压。然而，孔又必须足够小到阻止通过探针的靶的快速逃逸，而未发生有效的杂交或结合。基底可以是任何构造，只要它能密封入孔底部。优选地，基底是多孔膜。例如，在一个实施方案中，多孔基底是高密度聚乙烯，带有 $16\ \mu\text{m}$ - $18\ \mu\text{m}$ 孔径且厚度为 4mm。

多孔基底可以是化学惰性的聚合材料，含有碳主链及各种元素的取代基，包括但不限于氢，碳，氧，氟，氯，溴，硫和氮。代表性的

聚合物包括但不限于聚丙烯，聚乙烯，聚丁烯，聚异丙烯，聚丁二烯，聚异戊二烯，聚乙烯吡咯烷酮，聚四氟乙烯，聚偏二氟乙烯，聚氟代乙烯-丙烯，聚乙烯烯醇，聚甲基戊烯，聚三氟氯乙烯，聚砜，以及其共聚物的混合物。

这些惰性聚合物可以某一方式进行表面活化（或修饰），从而使外部化学物种吸附至聚合物表面上，由此化学物能将生物高聚物或生物单体化学连接至聚合物的表面。优选地，化学连接经由亲核试剂而完成，最优选地，亲核试剂位于修饰的聚合物表面上。

例如，转让给本发明受让人并且此处以其全部引入的美国专利 5,583,211，描述了通过射频等离子体沉积（RFPD）进行的惰性聚合基底的表面活化（胺化）。胺化的聚合基底的表面胺可通过与环酐反应进一步转化成羧基，所述环酐例如琥珀酸酐。或者，惰性多孔聚合物可包被有共聚物以提供羧基，所述共聚物例如为异丁烯酸或异丁烯酸酯。通过化学气相沉积过程或利用硅烷连接剂，也可将羧基直接引入惰性聚合或非聚合表面上，例如金属或二氧化硅表面，如 2002 年 4 月 23 日提交的共同未决申请（1994-045）所公开，题目为“用于生物分子和细胞固定化的聚合物包被的基底”。在一个实施方案中，多孔基底是选自如下的材料：羧化聚丙烯，羧化聚乙烯和羧化硅烷。

在一个优选实施方案中，聚合材料被衍生化，以形成侧酰氟官能团。由乙烯丙烯酸共聚物，乙烯异丁烯酸共聚物，或衍生化的聚丙烯制造的聚合支持物其酰氟活化在美国专利 6,110,669 和 6,146,833 中已有描述，上述专利已转让给本发明受让人，其相关内容此处整体性引入作为参考。这种酰氟活化的聚合基底已成功用于连接胺修饰的寡核苷酸（美国专利 6,110,669 和 6,146,833）以及未修饰的生物高聚物例如 cDNA（美国专利 6,268,141B1）和蛋白质试剂。美国专利 6,268,141B1 的相关内容此处整体性引入作为参考。

酰氟化学物对用于生物分子连接的基底活化的成功应用归因于氟的独特物理和化学属性。它具有明显不同于其他卤素的属性，并且与周期表中卤族元素的趋势不一致。例如，虽然是最具负电性的元素，由于它尺寸很小并且导致的价电子之间很强的排斥力，氟所具有的电子亲和性要低于氯。将氟引入诸如酰基的含碳基，给其化学活性和反应动力学带来有效改变。

由于在碳-氟键中，氟原子以单一方式共享电子，以及它的相对尺寸和电离能，酰氟不象其他酰卤，较之竞争性物质，它选择性地朝向氮亲核试剂。酰氟对诸如水或醇的中性氧亲核试剂反应活性较低（Carpino 等，*supra* at 271），从而对水具有相对耐受性。酰氟与水的低反应活性使得酰氟活化的基底甚至是在潮湿条件下也具有很好的贮藏稳定性。相反，其他酰卤则很容易与空气中的微量水反应，这就阻碍了卤酰活化的聚合基底的长期贮存。

另外，氟原子的小尺寸避免了酰胺键生成中的空间障碍。相反，包括其他卤素在内的其他反应基团，经常会产生空间障碍，并由此延缓反应。酰氟对其靶的特定反应活性，以及其在水性条件下的稳定性，使得在需要生物分子共价连接至活化支持物时，酰氟活化化学物的应用具有高度的理想性。

酰氟的活化包括用氟化剂处理羧基使其转化成酰氟基。用于将羧基转化成酰氟基的合适试剂广泛包括具有羧基反应活性的氟化剂。最优的试剂是（二乙氨基硫）三氟化物（DAST）。其他合适的试剂包括氰尿酸酰氟和 tetramethylfluoroformadanium hexafluorophosphate。在一个实施方案中，羧化的聚合基底于溶剂中漂洗，以去除水分并干燥基底。然后，将无水溶剂中的 DAST（~10% v/v）应用于聚合基底。基底在周围环境温度下于干燥、密闭容器中培育 1~3 小时。然后，基底于溶剂中漂洗并干燥。

基底连接的酰氟虽然与水相对不具有反应活性，但可容易并选择性地与诸如氨基-，伯胺-和仲胺-，以及含羟基物质的亲核试剂发生反应，并生成共价键。因而，酰氟的 functionality 使氨基修饰或未修饰的生物分子得以快速固定至固相支持物。由于核酸的修饰（例如 5'氨基）是一个相当昂贵的过程，因而这可带来显著的成本节约。

通过将含亲核试剂的物质或含酯的物质与本发明的酰氟活化的多孔基底接触，可将这些物质共价连接至酰氟活化的多孔基底上，所述接触条件为能使这些物质充分连接至基底。若某一条件使得分子与酰氟侧基反应形成共价键，则该条件是充分的。

根据本发明的一个实施方案，将 cDNA 固定于活化的多孔膜上。在水性缓冲液存在条件下，完成多核苷酸与包被基底的接触过程，所述水性缓冲液优选地具有中性或碱性 pH。为了本发明目的，碱性 pH 条件是 pH 大于 8 的条件。若某一碱性 pH 条件能使得多核苷酸连接至固相支持物，则该碱性条件是充分的。根据本发明的一个实施方案，本发明的碱性 pH 条件所具有的 pH 为约 9~12。应当理解到，根据所使用的方法，碱性 pH 条件可进行变化。鉴于本发明的公开内容，本领域人员可很容易确定某一特定连接反应的碱性 pH 条件。

通过本领域人员已知的方法，可将本发明的活化基底与含亲核试剂或含酯物质接触。例如，通过喷印、固相或开放式毛细管设备接触打印、微流体通道打印、丝网打印，以及采用基于电化学或电磁力的打印设备的技术，可实施该接触步骤。或者，可通过手动将生物分子或细胞点样于活化基底上，从而实施接触步骤。

应当理解到，可通过任何方法将本发明的活化多孔基底暴露于含亲核试剂或含酯的物质，包括生物分子，只要这些分子能与基底接触。还应当理解，此处未清楚描述的其他水性缓冲体系也可以用于本发明中，只要该缓冲体系提供了使分子连接至基底的充分条件。

根据本发明的实施方案，水溶液中含有的分子浓度可根据分子的类型、大小、结构以及其他可影响分子溶解性的因素而变化。例如，当连接的聚合物是多核苷酸时，其优选的浓度范围是 5nM-40 μ M。更优选地，其浓度范围是 5nM-5 μ M。本领域人员将会理解，偶联过程的优化还可包括缓冲（墨）条件、时间、温度、湿度以及所用打印设备的类型的改变。基于即时公开内容的教导，这种优化可很容易执行。

在一个实施方案中，探针生物分子连接至多孔基底顶面上的离散位置，从而形成阵列。根据本发明，这通过手动将预定量的生物分子溶液应用于基底上的预选位置可得以实现。或者，采用市售的喷印机的热喷墨打印技术，以及压电微喷打印技术，可用来将选择的生物分子点样于选定的基底表面位点上，如美国专利 4,877,745 所描述。在一优选实施方案中，采用高分辨率精密打印机，可获得每孔 100-400 个探针的阵列密度，所述设备例如为 Cartesian, Inc. (Irvine, CA) 生产的 PS 7200 模型。此处可使用的其他微阵列打印设备制造商包括 PE-Packed Biosciences (Meriden, CT) 或 GeneMachines (San Carlos, CA)。

2. 导电层

参照图 3，导电层 2 可以化学键合或物理连接至多孔基底 1 的底侧。例如，基底的一面可以经由等离子体沉积过程进行金属喷镀，或涂抹上导电材料。诸如为丝网印刷的各种打印技术可用以产生基底上的电极模式。

也可采用市场有售的喷镀有金属的多孔基底，诸如 Oxyphen (Ann Arbor, MI) 公司的 ROTRAC® 毛细管孔膜。然而，采用预先制造好的喷镀有金属的多孔基底时，必须对 DAST 活化过程进行修改，以防止金属介导（催化）的二次反应，分层，以及其他不希望的效果。

在图 4（只显示有微孔板的一个孔）所示的一个实施方案中，多孔基底和导电层的装配件进一步包括一个渗透层 6，所述渗透层 6 置于多孔基底 1 底面和导电层 2 之间。这种渗透层允许相对较小的带电体穿越转运，而诸如 DNA 的较大的带电体则被阻止与导电层 2 的直接接触。渗透层进一步用来避免 DNA 对电极的强烈的非特异性吸附。用来制造渗透层的合适材料的实例包括但不限于支持导电的导电聚合物粘合剂以及水合网络，诸如琼脂糖（例如乙醛酰琼脂糖，如 Cheng 等，Nature Biotech.16,541-546,1998 中所描述，以及交联共聚物，例如异丁烯酸盐或丙烯酰胺）。

3. 微孔板构建物

本发明的微孔板通过将多孔基底和导电层的装配件密封入微孔板的至少几个孔底部进行构建。图 4 所示为根据本发明的一个实施方案构建的微孔板的一个孔。装配件以某一方式置入孔内，使得导电层可用以接收电压。为了本发明目的，“密封装配件”指能使导电层与外围溶液实现物理分离的任何过程。

因此，在如图 7 所示的一个实施方案中，电极含有多个电极片并且形成微孔板的底部。采用导电聚合物将多孔基底“胶粘”或“层压”至电极。微孔板底部粘附于带有无底孔的微孔板的顶部。装配时，微孔板的孔模式与电极片的位置相匹配。

或者，例如图 4 和图 5 所示，微孔板的一些孔可填充有导电单体，然后将多孔基底置入在导电单体之上的孔内。导电单体在原位聚合形成导电微孔板。在任一实施方案中，微孔板可以为带有标准 96-384 孔的形式。

通常，多孔基底和导电层的装配件可通过物理包埋（例如，夹入微孔板的顶部部分和底部之间，封铸，夹层或聚合）密封入孔底部。

多孔基底可包被有导电层。替代性地，导电层可吸附入基底内或以其他手段永久性地粘附于基底的一面。导电层也可以是密封胶的形式，用来粘附膜和电极。

总之，本发明提供了形成导电微孔板的新颖方法，所述方法包括：

- (a) 提供了带有顶面和底面的多孔基底。
- (b) 采用能与探针生物分子共价连接的活性官能团活化顶面；
- (c) 在能使探针生物分子充分共价连接至活性官能团的条件下，用探针生物分子接触顶面；
- (d) 将导电层连接至多孔基底的底面；以及
- (e) 将带有导电层的多孔基底密封入微孔板的至少几个孔底部，其中的导电层适于接收电压。

在优选实施方案中，接触步骤（c）包括将探针生物分子在多孔基底的离散位置上进行接触，由此形成生物阵列。

参照图 4 和 8，在一个实施方案中，导电层 2 形成第一电极，微孔板进一步含有一个与第一电极进行电接触的第二电极 7。优选地，第二电极位于多孔基底表面的外部。第一和第二电极之间通过电解质溶液 10 而实现电接触。根据被吸引至多孔基底表面的物质类型（正 vs 负离子），第一和第二电极之间的极性可转换或进行改变。

参照图 9，一旦装配好微孔板，即将标记的靶生物分子施加至电解质溶液，并在电极之间施加电流，以帮助靶生物分子 9 电泳传递至基底表面，并促进靶生物分子 9 结合至探针生物分子 4。

因而，另一方面，本发明提供了用于靶生物分子杂交至探针生物分子的方法，所述方法包括：

- (a) 提供本发明的导电微孔板，其中的导电层构成第一电极，

并且微孔板进一步含有一个通过电解质溶液与第一电极进行电接触的第二电极；

(b) 将标记的靶生物分子引入电解质溶液；以及

(c) 在第一和第二电极之间施加电压，由此标记的靶生物分子与多孔基底表面上的探针生物分子进行杂交。

4. 电源

本发明的微孔板可装配有电源，用于给第一和第二电极提供电压。虽然常规电源可以适用，但本发明的微孔板可适于应用于机器人平台。

如图 5 所示，在一个实施方案中，采用热（电子有源）板 20 作为电源。热板电源含有适合于接收微孔板 15 的表面 21，以及经由装置 23 给第一电极 2 和第二电极 7 提供电压的电源 22。

在如图 5 所示的实施方案中，用于提供电压的装置 23 是并入热板表面的电导线（以相同标号 23 表示）。当微孔板位于热板表面 21 上时，导线与微孔板的第一电极 2 和第二电极 7 紧密配合，并给电极提供电压。

热板电源可置于机器人工作站 25 上，从而当微孔板置于其上时，热板可提供电压以驱动电泳。或者，可使用机器人手臂工具（未示出）。当机器人手臂工具接触微孔板时，即提供用于电泳的电能。如果电泳杂交足够快，带电的机器人手臂工具可只需从工作表面上的一个板移动至另一个板。

在如图 7-9 所示的另一实施方案中，第一电极含有密封入单个孔基底的电极片 30 网络，并且电源含有匹配的电导线 31 网络。该装配件进一步含有置于外部样品溶液 10 的第二电极 7。装配微孔板时，电极片 30 和电导线 31 直接通过物理接触或者间接通过导电介质紧密配

合，并且电压从电导线传送至电极片。电压通过导线从电源供给至电极片。

或者，电导线 31 网络可合并入热板内（未示出）。在该实施方案中，当微孔板置于热板表面 21 上时，电极片 30 和电导线 31 直接通过物理接触或者间接通过导电介质紧密配合，电压从电导线传送至电极片。

同样，用于提供电压的工具可包括如图 10 中所示的电极支架工具 40。电极支架工具 40 可包括一个与导电层 2 电接触的电极 41，以及置于外部溶液 10 的另一电极 7。电极 41 可穿刺入多孔基底 1 的顶部（面临外部溶液的一侧）。电极 41 可与导电层 2 直接接触，或者可经由渗透层 6 接触导电层 2。通过采用与诸如 Biomek 的机器人手臂设备 42 紧密结合的电极支架工具 40 可执行任一实施方案，所述机器人手臂设备 42 供应有电源，并受机器人液体处理器控制。当机器人手臂接触微孔板时，即可提供用于电泳的动力。如果电泳杂交足够快，带电的机器人手臂工具可只需从工作表面上的一个板移动至另一个板。

以下实施例旨在描述但并不限制本发明的范围。虽然这些实施例都有那些可采用方案的特点，但也可另采用本领域人员已知的其他操作。实际上，基于此处的教导，本领域普通技术人员无需过度实验即可构想并得出进一步的实施方案。

实施例

实施例 1:

活化多孔基底:

在普通转让的美国专利 5,583,211 中所描述的条件下，采用炽热气体化学等离子体过程，用胺基对聚丙烯基底进行表面官能化，所述炽热气体化学等离子体过程采用射频等离子体沉积或 RFPD。采用琥

珀酰酐将表面胺转化成羧基。支持物在溶剂中漂洗以除去水分并进行干燥。将无水溶剂 (~10%v/v) 中的 DAST 试剂施用于支持物, 并于环境温度下在干燥密闭容器内温育 1-3 小时。温育后, 支持物于溶剂中漂洗并干燥。将酰氟活化的基底在 20°C 干燥条件下贮存, 直至需要时。

实施例 2:

探针 cDNA 共价连接至活化的基底

将 cDNA 溶液(20nL 的 1nM 储备溶液, 缓冲液为 50mM 碳酸钠-碳酸氢钠, pH9)打印于根据实施例 1 制备的活化多孔基底表面上。打印采用 Biomek 384-针 HDRT (高密度复制工具) 进行。打印的实施并不对 cDNA 进行任何修饰。于 25°C 的潮湿腔室内使 cDNA 打印的点样与基底反应 1 小时。在周围环境温度下, 将残留于表面上的活性氟化物基团于乙醇中淬灭 2 小时。将生物素标记的肌动蛋白、G3PDH 和 TNF 的 cDNA 靶 (例如, 将 1 μ l 的 41nM 储备溶液稀释至最终体积 150 μ L; 41fmol \sim 246 \times 10⁸ 分子) 杂交 (1 小时, 60°C, 2 \times SSC, 0.01%SDS) 至微阵列上。随后, 漂洗后施用链霉亲和素-碱性磷酸酶结合物; 采用 ELF 试剂 (Molecular Probes, Inc.) 对信号进行显影, 于冷却 CCD 摄像机下检测。

如图 6 所示, 结果证明了本发明的活化基底特异性杂交互补性的 cDNA 靶 (肌动蛋白、G3PDH 和 TNF) 的能力。因而, 本发明的活化基底可用于未修饰探针生物分子的共价连接。

实施例 3:

电泳辅助杂交

将超高分子量聚乙烯的多孔膜条带安置于平板凝胶电泳装置的正电极附近, 所述多孔膜条带的一面固定有 cDNA 探针。将条带用变性剂 (0.5M NaOH, 0.15M NaCl) 浸泡, 并培育 15 分钟。将残留变性剂从条带上除去, 然后漂洗条带, 于电泳装置中注满电泳缓冲液 (1

×TBE)。将靶 cDNA (肌动蛋白) 煮沸, 然后置于冰块上, 随后与含有电泳染料的凝胶上样缓冲液 (Digene Corp., Betsville, MD) 混合。将 cDNA 靶溶液置于与多孔条带距离约 0.5cm 处。于条带两侧施加电压 (274V, 122mA), 并在染料前端到达条带后仍维持电压 5 分钟。关闭电源, 进行杂交 5 分钟。将条带从装置上除去, 采用链霉亲和素-碱性磷酸酶和化学发光试剂 APS-5 (Lumigen, Southfield, MI) 对信号进行显色。于 2×SSC, 0.01%SDS 中漂洗 3×5 分钟后, 采用 ELF 试剂 (Molecular Probes, Eugene, OR) 来对荧光信号进行显色。化学发光和荧光信号均采用 CCD 摄像系统来检测。与肌动蛋白靶对互补的肌动蛋白探针特异性杂交相对应的荧光和化学发光点样被检测出。另外, 还观察到非特异性污点信号从膜底部移动至膜顶部边缘, 表明在电泳过程中, 膜上的靶 cDNA 肌动蛋白出现了进一步浓缩。本实验证明了通过电泳促进靶在互补探针附近浓缩后, 标记的 cDNA 靶的快速和特异性俘获, 所述互补探针共价连接至膜上。

虽然前面以相当的细节和优选实施方案进行了描述, 但这些不应解释为对本公开内容或附属权利要求的限制。在本领域人员视野范围内的修饰和改变认为都应在随后权利要求的范围内。

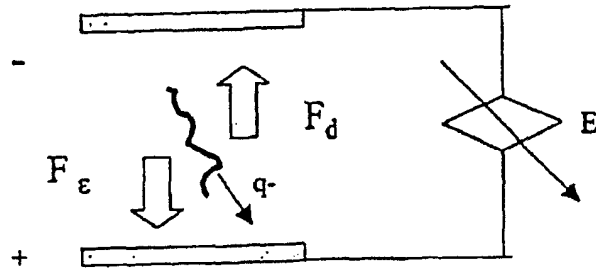


图1

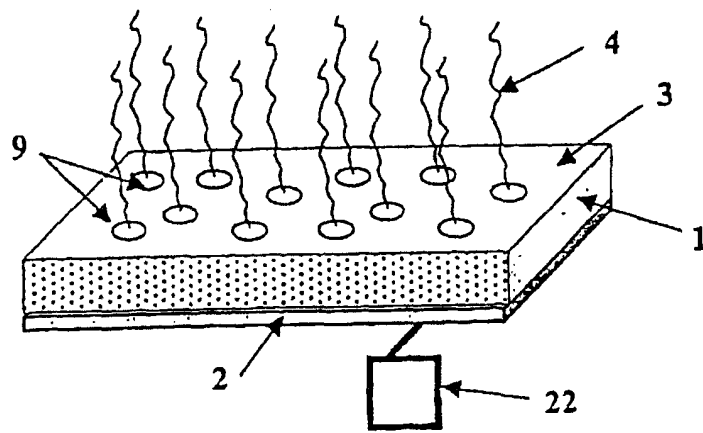


图3

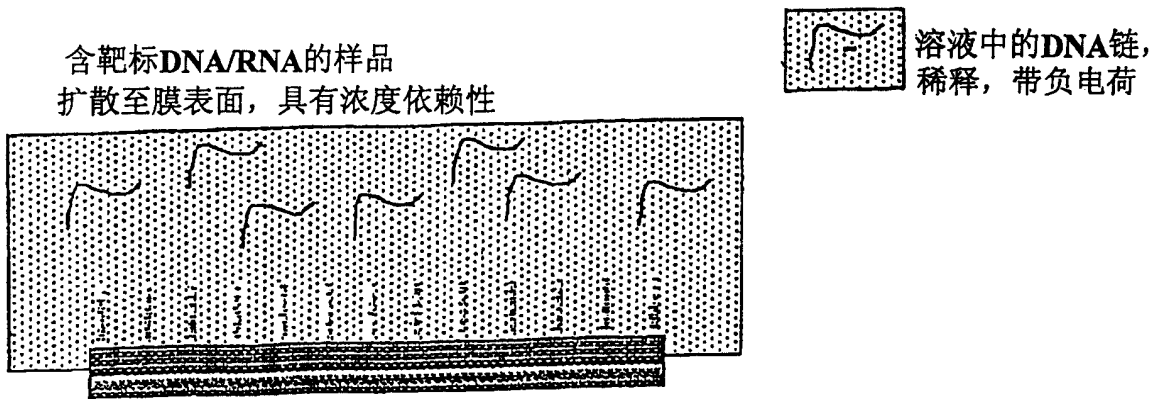


图2A

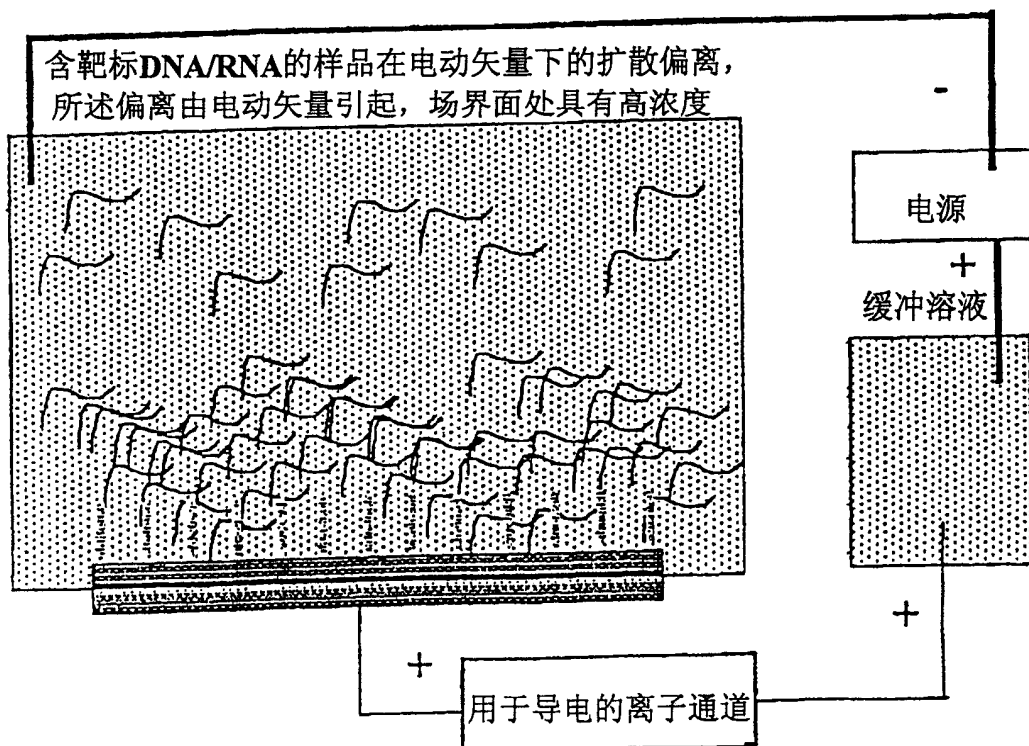


图2B

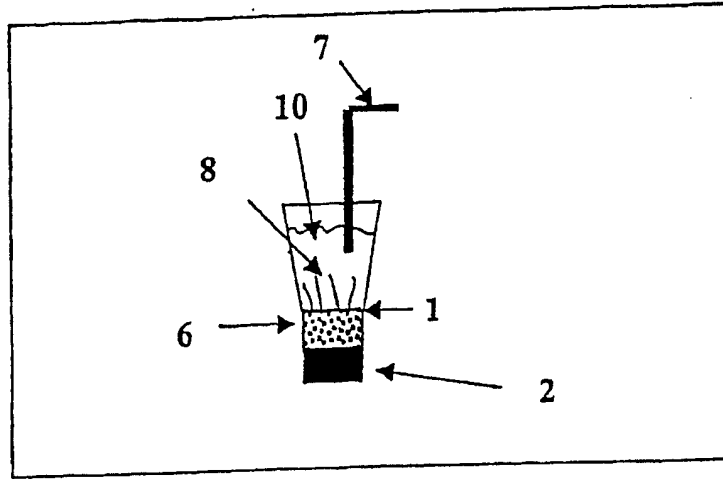


图4

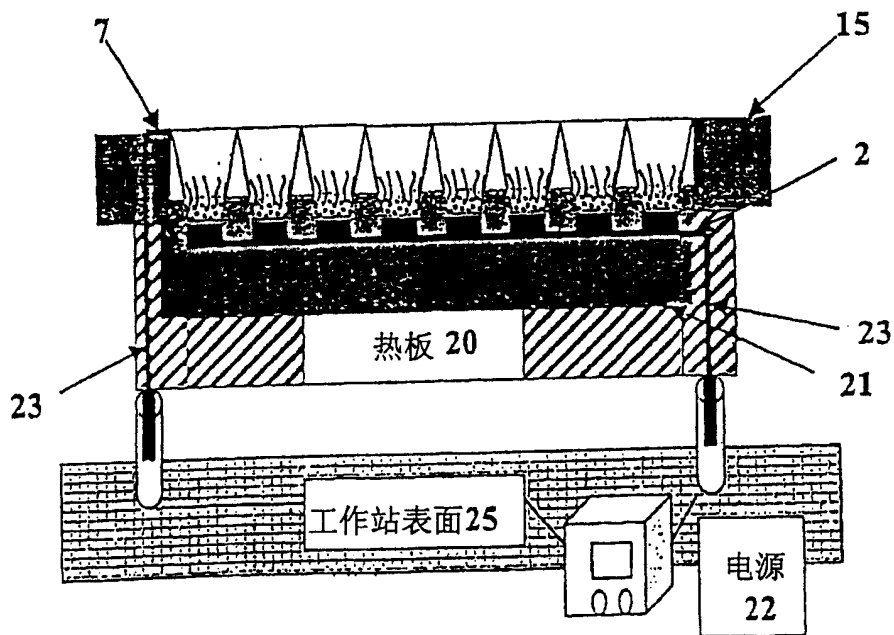


图5

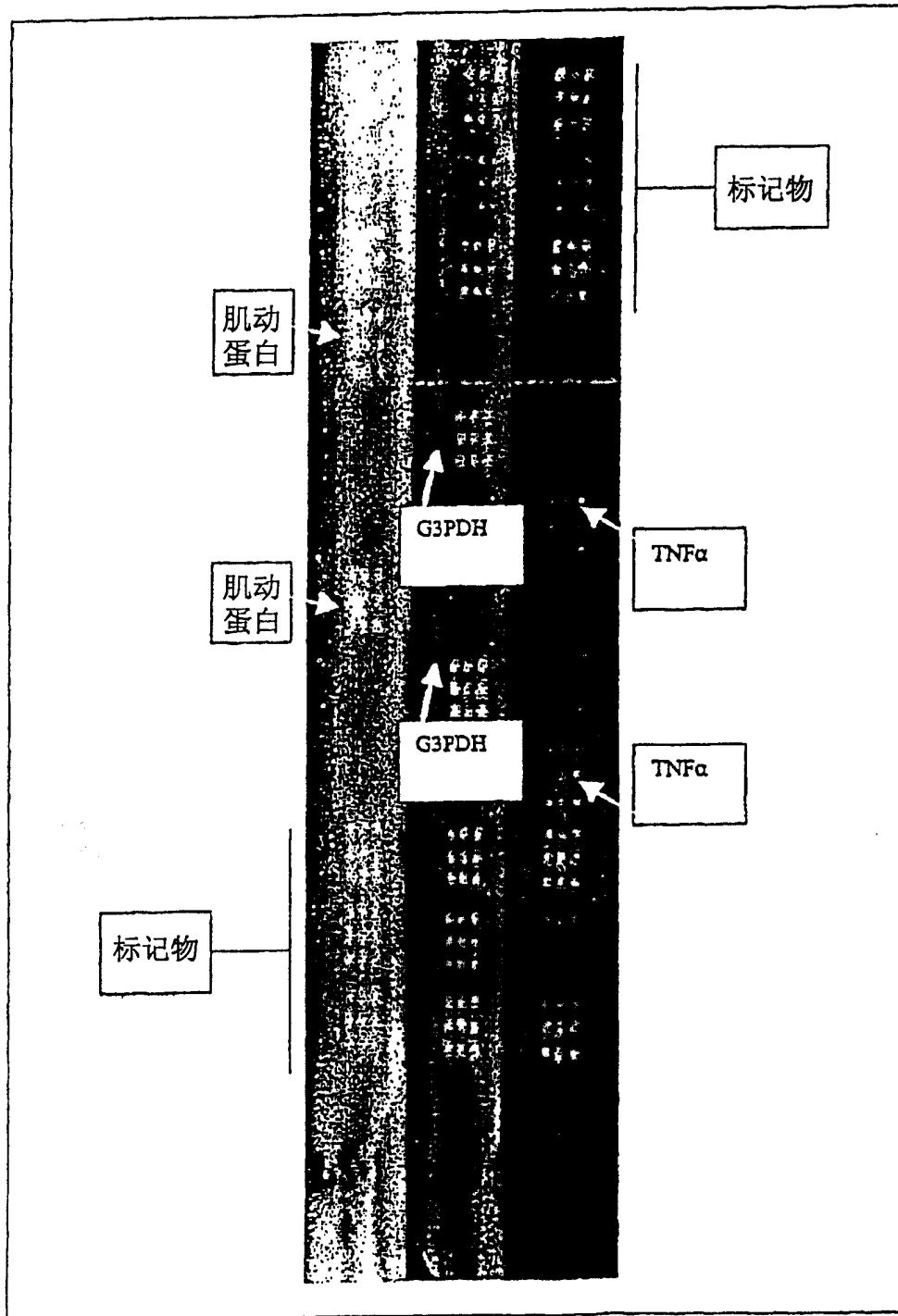


图6

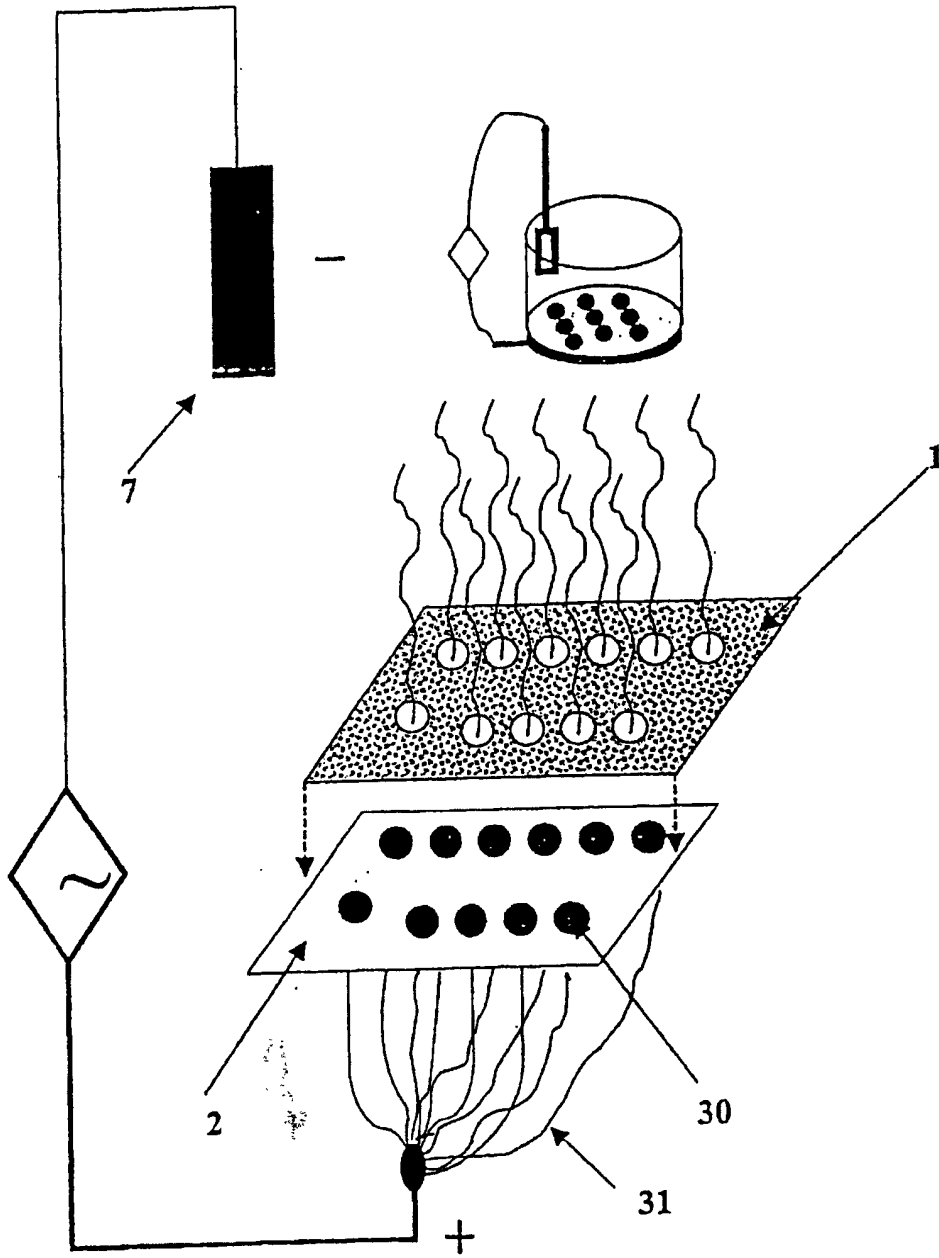


图7

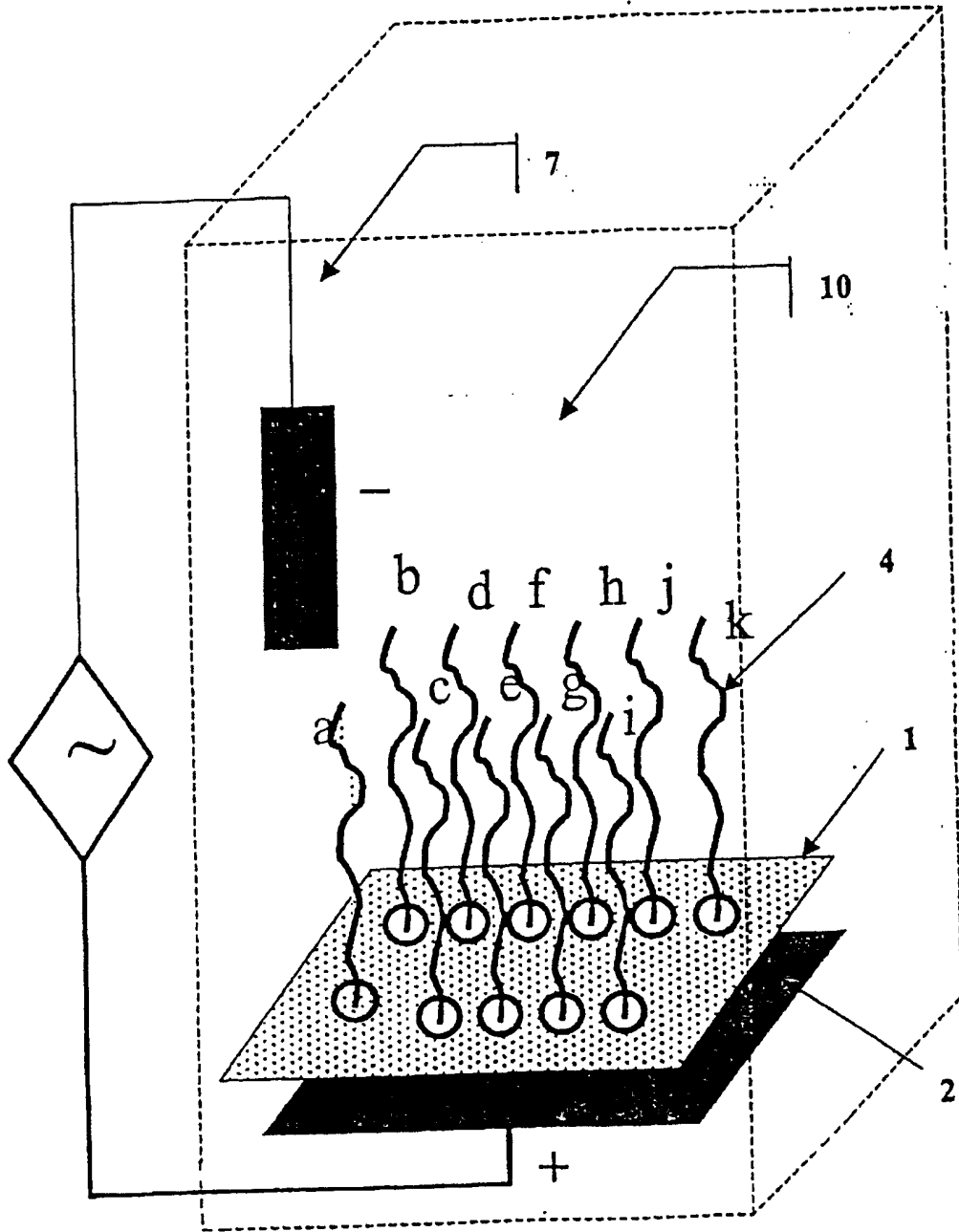
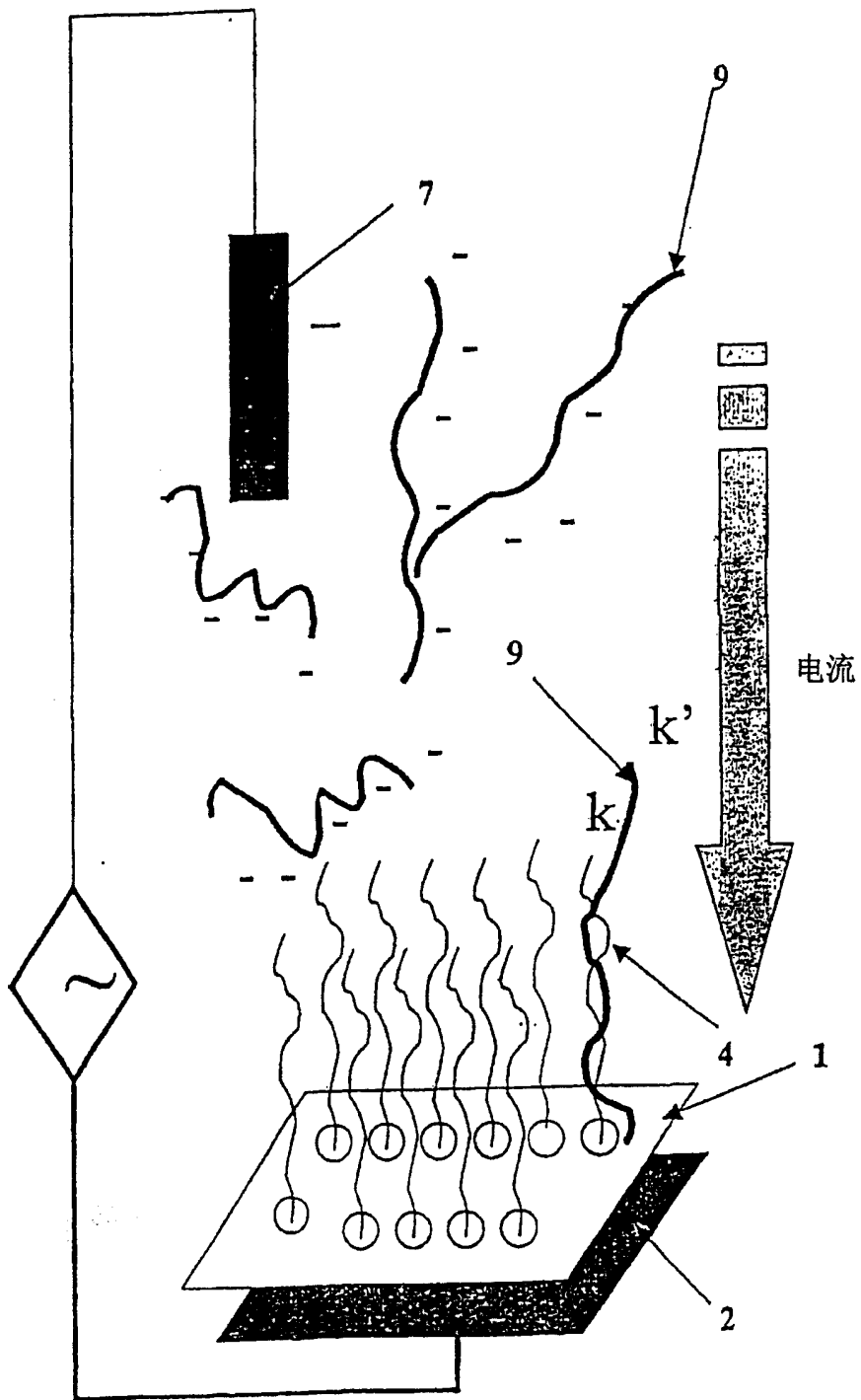


图8



+

图9

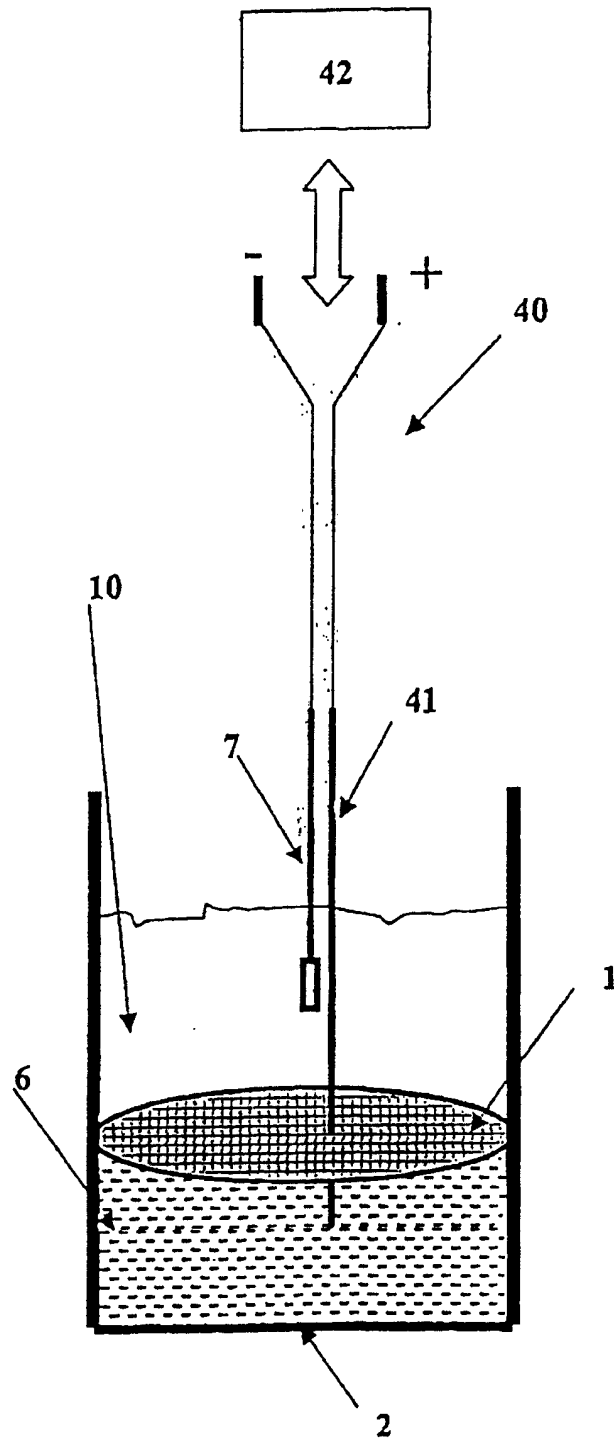


图10