

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12Q 1/68 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580013828.X

[43] 公开日 2008 年 2 月 13 日

[11] 公开号 CN 101124334A

[22] 申请日 2005.4.22

[21] 申请号 200580013828.X

[30] 优先权

[32] 2004.4.28 [33] US [31] 10/834,538

[86] 国际申请 PCT/US2005/013897 2005.4.22

[87] 国际公布 WO2005/106040 英 2005.11.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.30

[71] 申请人 塞弗德公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 威廉·麦克米伦

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 韩克飞

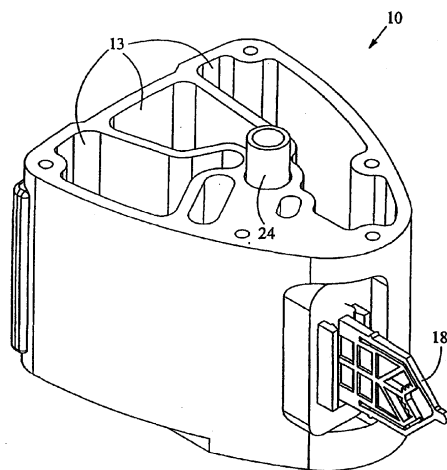
权利要求书 5 页 说明书 16 页 附图 21 页

## [54] 发明名称

用于样品制备控制的方法和装置

## [57] 摘要

本发明公开了制备用于核酸扩增反应的据推测含有目标核酸序列的样品和证明样品制备的有效性的方法，该方法包括将样品与样品制备对照物混合的步骤。所述样品制备对照物为包含标记物核酸序列的细胞、孢子、微生物或病毒。与样品制备对照物混合后的样品经受裂解处理，且裂解处理所释放的核酸置于核酸扩增条件下。然后测定目标核酸序列和标记物核酸序列是否存在。标记物核酸序列的阳性检测结果表明样品制备方法是令人满意的，而不能检测出标记物核酸序列则表明不充分的样品制备。



1. 制备用于核酸扩增反应的样品并证明所述样品制备的有效性的方法，所述样品据推测含有选自细胞、孢子、微生物和病毒的目标实体，所述目标实体包含至少一种目标核酸序列，所述方法包括下列步骤：

a) 将所述样品引入一装置，所述装置具有：

i) 混合室，用于使所述样品和样品制备对照物混合，所述样品制备对照物选自细胞、孢子、微生物和病毒，并且所述样品制备对照物包含标记物核酸序列；

ii) 裂解室；

iii) 反应室；

b) 使所述样品和所述样品制备对照物在所述混合室中混合；

c) 使所述样品制备对照物与假使存在于所述样品中的目标实体在所述裂解室中经受裂解处理；

d) 使在所述裂解室中释放的核酸处于所述反应室中的核酸扩增条件下；以及

e) 检测所述目标核酸序列以及所述标记物核酸序列是否存在；

由此检测出所述标记物核酸序列表示令人满意的样品制备。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述裂解室含有固相材料，且所述方法还包括以下步骤：推动与所述样品制备对照物混合的所述样品流经所述裂解室，以便在所述裂解处理前以所述固相材料捕获所述样品制备对照物和假使存在于所述样品中的目标实体。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中所述固相材料包括至少一个滤器，其孔径足以捕获所述样品制备对照物和所述目标实体。

4. 如权利要求 3 所述的方法，还包括在所述样品与所述样品制备对照物混合之前对所述样品预过滤的步骤。

5. 如权利要求 3 所述的方法，其中所述裂解处理包括使用结合到所

述裂解室的壁的超声换能器使所述样品制备对照物和所述目标实体经受超声能处理。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述裂解处理还包括搅动所述裂解室内的小珠。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述样品制备对照物是孢子。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中混合步骤包括溶解包含所述样品制备对照物的干燥小珠。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述裂解处理包括使用结合到所述裂解室的壁的超声换能器使所述样品制备对照物和所述目标实体经受超声能处理。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其中所述裂解处理还包括搅动所述裂解室中的小珠，以使所述样品制备对照物和所述目标实体破裂。

11. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述裂解处理包括与化学裂解试剂接触。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述核酸扩增条件包括聚合酶链式反应（PCR）条件。

13. 如权利要求 1 所述的方法，其中通过确定来自能结合所述标记物核酸序列的探针的信号是否超出阈值来检测所述标记物核酸序列是否存在。

14. 制备用于核酸扩增反应的样品并证明所述样品制备的有效性的装置，所述样品据推测含有选自细胞、孢子、微生物和病毒的目标实体，

所述目标实体包含至少一种目标核酸序列，所述装置包括主体，其具有：

a) 第一室，其包含要与所述样品混合的样品制备对照物，所述样品制备对照物选自细胞、孢子、微生物和病毒，并且所述样品制备对照物包括标记物核酸序列；

b) 裂解室，其用于使所述细胞制备对照物和假使存在于所述样品中的目标实体经受裂解处理以从中释放所述核酸；

c) 反应室，其用于容纳所述核酸以便扩增和检测；以及

d) 至少一个流动控制器，其用于引导与所述样品制备对照物混合的所述样品从所述第一室流入裂解室，以及引导在所述裂解室中释放的所述核酸流入所述反应室，其中所述装置还包含用于扩增和检测所述标记物核酸序列和所述至少一种目标核酸序列的引物和探针。

15. 如权利要求 14 所述的装置，其中所述裂解室包含固相材料，其用于当所述样品流经所述裂解室时捕获所述样品制备对照物和假使存在于所述样品中的目标实体，所述装置还包括至少一个用于接收已流经所述裂解室的废样品液的废液室，且所述至少一个流动控制器还能引导已流经所述裂解室的废样品液流入所述废液室。

16. 如权利要求 15 所述的装置，其中所述固相材料包括至少一个滤器，其孔径足以捕获所述样品制备对照物和所述目标实体。

17. 如权利要求 16 所述的装置，还包括结合到所述裂解室的壁以对所述裂解室进行超声处理的超声换能器。

18. 如权利要求 17 所述的装置，还包括位于所述裂解室内用于使所述样品制备对照物和所述目标实体破裂的小珠。

19. 如权利要求 14 所述的装置，其中所述样品制备对照物是孢子。

20. 如权利要求 14 所述的装置，其中所述样品制备对照物位于可溶

于液体的干燥小珠内。

21. 如权利要求 14 所述的装置，其中所述引物和探针位于所述反应室内的干燥小珠内，所述小珠可溶于液体。

22. 如权利要求 14 所述的装置，其中所述主体包括连接到所述反应室的试剂室，以及其中所述引物和探针位于所述混合室内的干燥小珠内，所述小珠可溶解于液体。

23. 如权利要求 14 所述的装置，还包括结合到所述裂解室的壁以对所述裂解室进行超声处理的超声换能器。

24. 如权利要求 23 所述的装置，还包括位于所述裂解室内用于使所述样品制备对照物和所述目标实体破裂的小珠。

25. 确定裂解过程有效性的方法，所述方法包括下列步骤：

a ) 将样品制备对照物与据推测包含选自细胞、孢子、微生物和病毒的目标实体的样品混合，其中所述目标实体包括至少一种目标核酸序列，以及其中所述样品制备对照物选自细胞、孢子、微生物和病毒，所述样品制备对照物包括标记物核酸序列；

b ) 使所述样品制备对照物和假使存在于所述样品中的目标实体的混合物经受裂解处理；

c ) 检测所述标记物核酸序列是否存在，以确定所述裂解处理期间核酸是否从所述样品制备对照物释放；由此所述标记物核酸序列的阳性检测结果表示令人满意的裂解。

26. 如权利要求 25 所述的方法，还包括以下步骤：推动与所述样品制备对照物混合的所述样品流经包含固相材料的室，以便在所述裂解处理前以所述固相材料捕获所述样品制备对照物和假使存在于所述样品中的目标实体。

27. 如权利要求 26 所述的方法，其中所述固相材料包括至少一个滤器，其孔径足以捕获所述样品制备对照物和所述目标实体。

28. 如权利要求 27 所述的方法，还包括在使所述样品与所述样品制备对照物混合之前对所述样品进行预过滤的步骤。

29. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述裂解处理包括使所述样品制备对照和所述目标实体经受超声能处理。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其中所述裂解处理还包括搅动小球以使所述样品制备对照物和所述目标实体破裂。

31. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述样品制备对照物是孢子。

32. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述混合步骤包括溶解包含所述样品制备对照物的小珠。

33. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述裂解处理包括与化学裂解试剂接触。

34. 如权利要求 25 所述的方法，其中通过扩增所述标记物核酸序列并检测所述扩增后的标记物核酸序列来检测所述标记物核酸序列。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述标记物核酸序列通过聚合酶链式反应（PCR）被扩增。

36. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述扩增后的标记物核酸序列通过确定来自能结合所述标记物核酸序列的探针的信号是否超出阈值来检测。

## 用于样品制备控制的方法和装置

### 发明背景

本发明主要涉及核酸测定，特别是涉及制备核酸扩增样品以及证明样品制备方法完整性的装置和方法。

扩增核酸的方法为人类病原的检测、人类遗传多态性的检测、RNA和DNA序列的检测、分子克隆、核酸测序等提供了有益的工具。特别地，聚合酶链式反应（PCR）已经成为DNA序列克隆、分辨、亲子鉴定、病原识别、疾病诊断以及其它需要扩增核酸序列的实用方法中的重要工具。例如参见，*PCR Technology: Principles and Application for DNA Amplification* (Erlich, ed., 1992); *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., eds, 1990)。

对据推测包含目的核酸序列的样品的分析通常涉及一系列样品制备步骤，可能包括过滤、细胞裂解、核酸纯化和与试剂的混合。为了对核酸测定的结果有信心，控制样品制备方法的完整性将会是有益的。本发明致力于这一问题以及其它问题。

### 概述

在一方面，本发明提供了制备用于核酸扩增反应的样品并证明样品制备的有效性的方法。该样品据推测含有选自细胞、孢子、微生物及病毒的目标实体，且该目标实体包含至少一种目标核酸序列。该方法包括将样品导入具有用于使样品与样品制备对照物混合的混合室的装置的步骤。样品制备对照物选自细胞、孢子、微生物及病毒，且样品制备对照物包含标记物核酸序列。该装置还具有裂解室和反应室。样品与样品制备对照物在混合室中混合。该方法还包括以下步骤：使样品制备对照物和目标实体（假使存在于样品中）在裂解室中经受裂解处理，使在裂解室中释放的核酸处于反应室中的核酸扩增条件下，并检测所述至少一种

目标核酸序列以及标记物核酸序列是否存在。对标记物核酸序列的阳性检测结果说明样品制备方法是令人满意的，而不能检测到标记物核酸序列则说明样品制备不充分。

在某些实施方案中，裂解室包含固相材料，并且所述方法还包括以下步骤：推动与样品制备对照物混合的样品流经裂解室，以便在裂解处理前以固相材料捕获样品制备对照物和目标实体（假使存在于所述样品中）。在某些实施方案中，固相材料包括至少一个其孔径足以捕获样品制备对照物和目标实体的滤器。在样品与样品制备对照物混合之前可对样品进行预过滤（例如除去粗粒物质）。在某些实施方案中，裂解处理包括使用结合到裂解室的壁的超声换能器使样品制备对照物和目标实体经受超声能处理。该裂解处理可任选地包括搅动裂解室中的小珠（bead）。在某些实施方案中，样品制备对照物是孢子。在某些实施方案中，混合步骤包括溶解含有样品制备对照物的干燥小珠。在某些实施方案中，裂解处理包括与化学裂解试剂接触。在某些实施方案中，核酸扩增条件包括聚合酶链式反应（PCR）条件。在某些实施方案中，通过确定来自能结合标记物核酸序列的探针的信号是否超出阈值来检测标记物核酸序列是否存在。

另一方面，本发明提供了制备用于核酸扩增反应的样品和证明样品制备的有效性的装置。该样品据推测含有选自细胞、孢子、微生物及病毒的目标实体，且目标实体包括至少一种目标核酸序列。该装置包括主体，该主体具有包含要与样品混合的样品制备对照物的第一室。样品制备对照物选自细胞、孢子、微生物及病毒，且样品制备对照物包含标记物核酸序列。该主体还具有裂解室，用于使样品制备对照物和目标实体（假使存在于样品中）经受裂解处理，以从中释放核酸。该主体还具有用于容纳核酸以便扩增和检测的反应室。该装置还包括至少一个流动控制器，用于引导与样品制备对照物混合的样品从第一室流入裂解室，以及引导在裂解室中释放的核酸流入反应室。该装置还包含引物和探针，用于扩增和检测标记物核酸序列及所述至少一种目标核酸序列。

在某些实施方案中，裂解室包含固相材料，其用于当样品流经裂解室时捕获样品制备对照物和目标实体（假使存在于样品中）。该装置还包

括至少一个用于接收已流经裂解室的废样品液的废液室，以及所述至少一个流动控制器还能够引导已流经裂解室的废样品液流入废液室。在某些实施方案中，固相材料包括至少一个滤器，其孔径足以捕获样品制备对照物和目标实体。在某些实施方案中，该装置还包括结合到裂解室的壁以对裂解室进行超声处理的超声换能器。在某些实施方案中，该装置还包括裂解室中用于使样品制备对照物和目标实体破裂的小珠。在某些实施方案中，样品制备对照物是孢子。在某些实施方案中，样品制备对照物位于可溶解于液体的干燥小珠内。在某些实施方案中，引物和探针位于反应室中的干燥小珠内，该小珠可溶于液体。在某些实施方案中，所述主体包括连接到反应室的混合室，以及引物和探针位于混合室中的干燥小珠内，该小珠可溶于液体。

另一方面，本发明提供了测定裂解过程的有效性的方法。该方法包括使样品制备对照物与据推测包含目标实体的样品混合的步骤，其中该目标实体选自细胞、孢子、微生物及病毒。目标实体包含至少一种目标核酸序列。样品制备对照物选自细胞、孢子、微生物及病毒，且包含标记物核酸序列。样品制备对照物和目标实体（假使存在于样品中）的混合物经受裂解处理。本方法还包括下述步骤，即检测标记物核酸序列是否存在，以测定在裂解处理期间核酸是否从样品制备对照物释放。标记物核酸序列的阳性检测结果表示令人满意的裂解，而不能检测到标记物核酸序列则表示不充分的裂解。

在某些实施方案中，所述方法还包括下述步骤，即推动与样品制备对照物混合的样品流经含有固相材料的室，从而在裂解处理前借助固相材料捕获样品制备对照物和目标实体（假使存在于样品中）。在某些实施方案中，固相材料包括至少一个滤器，其孔径足以捕获样品制备对照物和目标实体。在某些实施方案中，在使样品与样品制备对照物混合前对样品进行预过滤。在某些实施方案中，裂解处理包括使样品制备对照物和目标实体经受超声能处理。裂解处理也可包括搅动小珠以使样品制备对照物和目标实体破裂。在某些实施方案中，样品制备对照物是孢子。在某些实施方案中，混合步骤包括溶解包含样品制备对照物的干燥小珠。在某些实施方案中，裂解处理包括与化学裂解试剂接触。在某些实施方

案中，通过扩增标记物核酸序列（例如通过 PCR）和检测扩增后的标记物核酸序列，对标记物核酸序列进行检测。在某些实施方案中，通过测定来自于能结合标记物核酸序列的探针的信号是否超出阈值来检测扩增后的标记物核酸序列。

#### 附图简要说明

图 1 是本发明实施方案的流体控制和处理装置的立体图；

图 2 是图 1 的装置的另一立体图；

图 3 是图 1 的装置的分解图；

图 4 是图 2 的装置的分解图；

图 5 是图 1 的装置的流体控制设备和垫圈的前视图；

图 6 是图 5 的流体控制设备和垫圈的底视图；

图 7 是图 5 的流体控制设备和垫圈的顶视图；

图 8 是图 7 沿 8-8 的旋转流体控制设备的横截面图；

图 9A-9LL 为顶视图和横截面图，对使用图 1 流体控制和处理装置控制和处理液体的具体方法进行说明；

图 10 是活塞组件的横截面图；

图 11 是侧过滤室的横截面图。

#### 具体实施方案的说明

图 1-4 显示流体控制和处理系统 10，其包括具有多个室 13 的壳体 12。出于说明的目的，图 1 显示了暴露的室 13。通常会提供顶盖将室 13 封闭。正如图 3 和图 4 所示，流体控制装置 16 和反应容器 18 连接于壳体 12 的不同部分。本实施方案中所示的流体控制装置是旋转流体控制阀 16。阀 16 包括具有盘状部分 22 和管状部分 24 的阀体 20。盘状部分 22 具有大体平坦的外口表面 23，正如图 3 所示。阀 16 相对于壳体 12 可以旋转。壳体 12 包括多个面向阀 16 盘状部分 22 的外口表面 23 的室口 25（图 4），使得室 13 和阀 16 之间流体连通。任选的密封件或垫圈 26 被置于盘状部分 22 和壳体 12 之间。盘状部分 22 另包括滤器 27、外壁 28，和齿状外缘 29。

如图 4 所示, 盘状部分 22 包括裂解室 30。裂解室 30 可以包含固相材料用于捕获将被裂解的细胞、孢子、病毒或微生物。适合的固相材料包括, 但不限于滤器、小珠、纤维、膜、滤纸、玻璃绒、聚合物或凝胶。在具体实施方案中, 固相材料是孔径足以捕获将被裂解的目标细胞、孢子、病毒或微生物的滤器。

如图 5-8 所示, 外壁 28 封闭裂解室 30 和阀 16 的盘状部分 22 的底端。在图 8 中, 裂解室 30 包括连接到第一流体处理通道 34 的第一流体处理口 32, 以及连接到第二流体处理通道 38 的第二流体处理口 36。第一流体处理通道 34 连接到终止于位于外口表面 23 处的第一外口 42 的第一外管 40, 而第二流体处理通道 38 连接到终止于位于外口表面 23 处的第二外口 46 的第二外管 44。流体转移通道 48 在接近一端处连接到第一流体处理通道 34 和第一管 40, 另一端连接到流体转移室 50。第一外管 40 作为普通管, 用于使第一流体处理通道 34 及流体转移通道 48 之一或两者和第一外口 42 之间流体连通。裂解室 30 与流体转移室 50 处于持续的流体连通状态。

如图 6-8 所示, 外口 42、46 相对于阀 16 的轴 52 以约  $180^\circ$  有角度地彼此间隔。外口 42、46 与轴 52 间隔同样的径向距离。轴 52 垂直于外口表面 23。在另一个实施方案中, 外口 42、26 之间的角度间隔可以不同。盘状部分 22 中的通道的结构在另一实施方案中也可能不同。例如, 第一流体处理通道 34 和第一外管 40 可能被倾斜, 并且直接结合到第一排放室 50, 因而取消流体转移通道 48。第二流体转移通道 38 也可能被倾斜, 并在第二流体处理口 36 和第二外口 46 之间沿直线延伸, 进而取消第二外管 44。此外, 在阀 16 中可提供更多的通道和外口。正如图 3 所示, 希望在外口表面 23 上提供交叉通道或槽 56。槽 56 是弯曲的, 且希望以恒定半径与轴 52 隔开。在一个实施方案中, 槽 56 呈圆弧状并被置于距离轴 52 恒定半径的位置。如下文更加详细地讨论, 槽 56 用于装填容器。

如图 8 所示, 流体转移室 50 大体上设置在阀 16 的管状部分 24 内, 且部分延伸入盘状部分 22。柱塞或活塞 54 的形式流体转移部件可移动的设置于室 50 内。活塞 54 向上移动时, 它扩大室 50 的体积, 产生吸力拉动液体进入室 50。当活塞 54 向下移动时, 其缩小室 50 的体积, 驱使液

体流出室 50。

当旋转阀 16 相对图 1-4 的壳体围绕其轴 52 旋转时，外口 42、46 之一可以开放并流动性地连接到室 13 或反应容器 18，或者两个外口 42、46 均可被阻塞或关闭。在此实施方案中，最多只有一个外口 42、46 是流动性地连接到室中的一个或反应容器 18。其它实施方案可被制成允许两个外口 42、46 均流动性地连接到分开独立的室 13 或反应容器 18。因此，阀 16 相对于壳体 12 可旋转使得外口 42、46 被选择性地置于与包括室 13 和反应容器 18 在内的多个室处于流体连通状态。依赖于外口 42、46 的开放或关闭以及活塞 54 是向上还是向下移动，可以改变阀 16 中的液体流动方向，外口 42、46 每一个可由入口转换为出口，且液体流可以流经处理区域 30 或绕过裂解室 30。在具体的实施方案中，第一外口 42 是入口，因此裂解室 30 的入口侧比裂解室 30 的出口侧距离流体转移室 54 更近。

图 9A-9LL 说明了对阀 16 的操作，以对据推测包含一种或多种目标实体（如细胞、孢子、病毒活微生物）的样品进行核酸测定。目标实体包括至少一种为其而检测样品的目标核酸序列。样品可通过多种机制（手动或自动）被引入流体控制和处理装置 10 的制造成盒状物的壳体 12 内。对于手动进样，一定体积的材料经入口被置于壳体 12 的接收区域（如多个室中的一个），然后在入口处加上盖子。或者，可用橡胶或类似的屏障物覆盖接收区域，通过用针刺穿屏障物，再经针将样品注入，从而将样品注入接收区域。或者，多于分析所需量的样品材料可被加入壳体 12 中，壳体 12 内的机械构造可应具体规程所需实现精确的测量和分样。

可能有利的是，将某些样品，例如组织活检材料、土壤、粪便、渗出液及其它复合材料放入另一装置或附件中，然后将该二级装置或附件放入壳体内，引起实现诸如混合、分割或提取的功能的机械作用。例如，将一片组织放入用作入口盖子的二级装置的腔内。当盖子被压在入口时，则迫使组织穿过网孔，该网孔将该组织切成碎片或以其它方式分割。

对于自动进样，则采用另外的壳体或盒状物设计特征，在多数情况下，将样品收集功能直接赋予壳体。将某些样品，例如会给操作者或环境带来危险的样品，如人逆转录病毒病原，转入壳体时可能要冒一定的

风险。因此，在一个实施方案中，可将注射器或吸管整合到该装置上，提供了将样品直接移入壳体的手段。或者，该装置可包括形成套件的静脉穿刺针和管子，该套件能用于获取样品。收集后，移除并弃去针与管子，将壳体 12 安装在仪器上以进行处理。这种方式的优点是操作者或环境不会暴露于病原体。

入口的设计可以将适当的人体因素作为待检样品性质的相关事项加以考虑。例如，呼吸有关的样品主要取自下呼吸道，如来自咳嗽的痰样品。也可将刷子或拭子样品置入本装置中。在前面的情况下，入口可以被设计成允许病人直接咳入壳体 12 或方便病人将痰样品直接吐入壳体。对于刷子或拭子样品，优选将刷子或拭子置于装置 10 的一个室中，例如使用水或其它合适的洗脱液体将样品从刷子或拭子上洗脱下来。此外，壳体 12 可以包括下述结构特点，即便于在样品接收室中破坏和保留刷子或拭子的端部。

在另一实施方案中，壳体 12 包括一个或更多可定位在样品池中的输入管或吸管，因此样品材料可以流入壳体 12。或者，亲水性吸液芯材料可以行使将样品引入装置的功能。例如，整个盒状物可以被直接浸入样品中，这样足够数量的样品即被吸收入毛细吸附材料中，并通过毛细作用入壳体 12 中。而后移动壳体将其转移到实验室或直接使用便携设备直接分析。在另一实施方案中，可使用管形物，这样管子的一端直接与壳体连通，以提供与至少一个室的液体界面，而另一端作为样品接收器通向外部环境。此管随后可插入样品中作为吸管使用。因此，本装置可包括多个结构特征，用于从多种不同来源收集样品以及将样品移入壳体 12 中，因而减少了人工操作和不便。

在图 9A 和 9AA 中，样品例如借助移液管被置入混合室 60 中，然后用盖子将室 60 盖上。样品将被检验以确定其中是否包含一种或多种目标核酸序列。这需要样品制备步骤，例如裂解含有目标核酸序列的目标细胞、孢子、病毒或微生物。室 60 含有与样品进行混合的样品制备对照物。样品制备对照物也是细胞、孢子、病毒或微生物。样品制备对照物含有不同于为其而检测样品的目标核酸序列的标记物核酸序列。若目标核酸序列出现于样品中，则标记物核酸序列将连同目标核酸序列一起，在测

定的较晚阶段于反应室 18 中被检测。为了能检测到目标核酸序列，样品制备对照物必须被成功地裂解以释放其核酸，且核酸必须与扩增试剂成功地混合并被扩增。若样品制备对照物能被检测到，则表示样品制备物足以满足核酸测定，否则表示样品制备不能满足核酸测定。因此，如果样品制备对照物的检测呈阳性，则证明样品制备是有效的，可对检测结果充满信心。

在一个优选的实施方案中，样品制备对照物是含有将被扩增和检测的特异性标记物核酸序列的孢子。例如，通常优选 2,000 至 10,000 个含有特异标记物核酸序列的孢子，更有选使用 6,000 个孢子作为样品制备对照物。孢子应被净化，因而没有外来核酸，以证明样品制备的裂解步骤有效而不是仅释放外来核酸。此外，样品制备对照物优选贮存于壳体 12 的一个室内，置于已冻干的或彻底干燥(dried-down)的小珠内，该小珠可快速地溶解于液体中。制造这种小珠的方法已为所属领域所熟知，且描述于美国专利 5,593,824 和于 2003 年 9 月 25 日提交的同时待决的美国专利申请 10/672,266 中，将其公开内容纳入本文作为参考。

据推测含有目标细胞、孢子、病毒或微生物的样品在室 60 中与样品制备对照物混合。混合过程优选通过将包含样品制备对照物的干燥小珠溶于样品液中来实现。通过旋转阀 16 使第一外口 42 处于与室 60 流体连通状态，且向上拉动活塞 54 引导液体样品从室 60 经第一外管 40 和流体转移通道 48 流入流体转移室 50，而绕开了裂解室 30。为简化起见，活塞 54 未显示在图 9A-9LL 中。如图 9B 和 9BB 所示，随后旋转阀 16 使第二外口 46 与废液室 64 流体连通。向下推动活塞 54 驱动与样品制备对照物混合的液体样品经裂解室 30 流入废液室 64。在具体的实施方案中，裂解室 30 包括至少一个滤器，其孔径足以在样品流流经裂解室 30 时捕获目标细胞、孢子、病毒或微生物(假使存在于样品中)，并捕获样品制备对照物。基于此原因，希望样品制备对照物的大小大体上等于或略小于样品中的目标细胞、孢子、病毒或微生物，以证明对目标实体(假使存在于样品中)的过滤是成功的。在另外的实施方案中，其它固相材料也可提供于裂解室 30 中。

图 9C 和 9CC 中，旋转阀 16 使第一外口 42 与洗涤室 66 流体连通，

活塞 54 被向上拉动以拉动洗涤液体自洗涤室 66 流入流体转移室 50，而绕过了裂解室 30。然后旋转阀 16，使第二外口 46 与废液室 64 流体连通，如图 9D 和 9DD 所示。向下推动活塞 54，以驱使洗涤液体流经裂解室 30 进入废液室 64。上述洗涤步骤可视需要进行重复。其间的清洗用于除去阀 16 中的不需要的残留物。

图 9E 和 9EE 中，旋转阀 16 以使第一外口 42 置于与缓冲室 70 流体连通，且向上拉动活塞 54 以拉动裂解缓冲液（如水或混合了裂解试剂的水）自缓冲室 70 进入流体转移室 50，而绕过裂解室 30。继而旋转阀 16 以使第二外口 46 与废液室 64 流体连通中，如图 9F 和 9FF 所示。向下推动活塞 54 可驱使缓冲液进入裂解室 30。图 9G 和 9GG 中，旋转阀 16 以关闭外口 42、46。

样品制备对照物和目标细胞、病毒、孢子或微生物(如果存在)在裂解室 30 内经裂解处理。该裂解处理的目的是破坏样品制备对照物和目标细胞、病毒、孢子或微生物(如果存在)的外壁，以释放其核酸。样品制备对照物优选那些其裂解难度与目标细胞、病毒、孢子或微生物相比相同或更难裂解的，以证明裂解处理是有效的。从细胞、病毒、孢子或微生物释放核酸以及使 DNA 结合蛋白变性通常可借助化学、物理或电裂解方法进行。例如，化学方法通常使用裂解试剂破坏细胞并将核酸从细胞中提取出来，继而使用诸如异硫氰酸胍或尿素的高离液盐(chaotropic salt)对提取物进行处理，使任何污染性和潜在的干扰性蛋白变性。使用化学提取和/或变性方法时，适宜的裂解试剂优选处于贮存于室 70 中的裂解缓冲液中，并被压入裂解室 30 内。

或者，可以使用物理方法提取核酸并使 DNA 结合蛋白变性。美国专利 5,304,487 讨论了在微通道内使用物理突起、或在室或通道内使用边缘锋利的颗粒刺破细胞膜并提取其内容物的方法，处于所有目的将其整体纳入本文作为参考。此类结构合并使用可搅动压电元件可产生适当的剪切力用于裂解。更多的用于细胞提取的传统方法也可被使用，例如使用横断面尺寸有限的通道，当样品以足够的流动压力流经通道时，其使细胞裂解。或者，细胞提取和污染性蛋白的变性可借助交变电流来实施。本发明的装置中可使用大量其它方法来实现细胞裂解/提取，包括，例如

使细胞经受超声振荡，或迫使细胞通过微几何孔进而使细胞在强剪切力下破裂。

在一个优选实施方案中，裂解处理包括使用偶联于裂解室 30 外壁 28 的超声换能器 76 对裂解室 30 进行超声。使优选为超声波喇叭的超声换能器 76 与壁 28 接触，从而将超声能传入裂解室 30 以裂解细胞、孢子、病毒或微生物。适合的超声喇叭在 Sonics & Materials, Inc 有售，其办公室位于 53 Church Hill, Newton, Connecticut 06470-1614, U.S.A.. 或者，超声换能器可包括压电盘，或可偶联于壁 28 的任何其它类型超声换能器。此外，优选在裂解室 30 中搅动小珠（例如玻璃或聚苯乙烯小珠）以破裂细胞、孢子、病毒或微生物。由换能器 76 产生的通过振动壁 28 的压力波或压力脉冲，引发小珠移动，在裂解缓冲液中产生冲击运动，引起破裂。在使用超声换能器的这些实施方案中，裂解缓冲液应该为超声传输媒介，例如去离子水。此裂解缓冲液也可包括一种或多种裂解试剂以协助裂解。在目前的优选实施方案中，壁 28 是可偏斜的塑料壁，如 2001 年 10 月 4 日提交的同时待决的美国专利申请 09/972,221，将其公开内容纳入本文作为参考。

图 9H 和 9HH 中，旋转阀 16 使第二外口 46 与试剂室 78 流体连通，向下推动活塞 54 使裂解室 30 中的裂解产物洗脱至试剂室 78 中。试剂室 78 优选含有各种必需的核酸扩增试剂和探针（例如酶、引物和荧光探针），以扩增和检测样品制备对照物中的标记物核酸序列及一种或多种为其而检测样品的目标核酸序列。所有剩余的裂解产物将在旋转阀 16 使第二外口 46 与废液室 64 流体连通后，通过第二外口 46 排入废液室 64 中，如图 9I 和 9II 所示。然后包含在裂解室 30 中释放的核酸的裂解产物在试剂室 78 中混合。这是通过使流体转移室 50 与试剂室 78 流体连通，且向上和向下移动活塞 54 来实现的，如图 9J 和 9JJ 所示。例如，使混合物来回 (toggling) 流经处理区域 30 内的滤器，使得陷入滤器的大颗粒暂时移出，从而使小颗粒可以经过。

用于扩增和检测样品制备对照物的标记物核酸序列以及为其而检测样品的一种或多种目标核酸序列的试剂和探针，优选贮存于室 78 中并处于已冻干或彻底干燥的小珠内，该小珠可快速溶解于液体中。生产这种

小珠的方法已为所述领域所熟知,并描述于美国专利 5,593,824 和于 2003 年 9 月 25 日提交的同时待决的美国专利申请 10/672,266 中,将其公开内容纳入本文作为参考。在另一实施方案中,试剂和探针贮存于反应容器 18 的反应室内。

图 9K、9KK 和 9K'K' 中,旋转阀 16 以使第一外口 42 与连接到反应容器 18 的第一分支 84 流体连通,而连接到反应容器 18 的第二分支 86 与交叉槽 56 流体连通。第一分支 84 和第二分支 86 距阀 16 的轴 52 的半径不同,第一分支 84 与第一外口 42 有共同的半径,而第二分支 86 与交叉槽 56 具有共同的半径。交叉槽 56 也与试剂室 78 流体连通(图 9K),且在试剂室 78 和第二分支 86 之间起到桥梁的作用,在两者间提供交叉流动。外口被设置在自轴起始的外口半径范围内,而交叉槽也被设置于自轴起始的交叉槽半径范围内,其中外口半径的范围与交叉槽半径范围并不重叠。使交叉槽 56 处于与外口 42、46 的半径不同的半径是有利的,因为这样可避免在阀 16 旋转运动时引起出现在外口 42、46 半径处阀 16 和壳体 12 之间的表面附近区域的污染物对交叉槽 56 的交叉污染。因而,尽管也可使用其它结构的交叉槽,包括那些与外口 42、46 的半径相重叠的交叉槽结构,但是所示的本实施方案是优选配置,其将交叉槽 56 与来自位于外口 42、46 半径处阀 16 和壳体 12 之间的表面附近区域的污染物相分离。

为装填反应容器 18,向上拉动活塞 54 可拉动试剂室 78 中的反应混合物经交叉槽 56 和第二分支 86 进入反应容器 18。然后旋转阀 16 以使第二外口 46 和第一分支 84 流体连通,并封闭第一外口 42,如图 9L 和 9LL 所示。向下推动活塞 54 可对反应容器 18 内的反应混合物增压。反应容器 18 具有反应室,用于容纳核酸扩增和检测所用的反应混合物。反应室可插入热反应套管中,进行核酸扩增和检测。两个反应分支 84、86 使得能够对反应容器 18 进行装填和排空。反应容器可通过超声焊接、机械耦合等方式与壳体 12 连接,或例如通过模制于壳体成为整体。

将反应容器 18 的反应室内的反应混合物置于核酸扩增条件下。RNA 或 DNA 模板的扩增反应已为我们所熟知(见美国专利 4,683,195 和 4,683,202; *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*(Innis et al.,

ets, 1990) )。借助使用耐热酶的 PCR 扩增和检测核酸的方法已公开于美国专利 4,965,188 中, 将其纳入本文作为参考。对 DNA 的 PCR 扩增涉及 DNA 热变性的重复循环, 对两个寡核苷酸引物退火至待扩增 DNA 片段的侧翼序列上, 并使用 DNA 聚合酶延伸退火后的引物链。引物杂交到目标序列的相对链上, 并处于使得借助聚合酶的 DNA 合成可在两个引物间的区域交叉的方向, 有效地使 DNA 片段数量加倍。而且, 因为延伸产物也是互补于并能够结合引物, 每个相继的循环基本上可以使上个循环合成的 DNA 数量加倍。这就导致特定的目标片段数量呈指数增加, 增加率在每个循环约为  $2^n$ , 这里  $n$  代表循环数。诸如聚合酶链式反应 (PCR) 和连接酶链式反应 (LCR) 之类的方法可用于扩增直接来自 mRNA、cDNA、基因组文库和 cDNA 文库的目标 DNA 序列的核酸序列。

恒温扩增反应也为人所熟知且可依据本发明的方法使用。恒温扩增反应的实例包括链置换扩增 (SDA) (Walker, *et al. Nucleic acids Res.* 20(7): 1691-6(1992); Walker *PCR Methods Appl* 3(1): 1-6(1993)), 转录介导的扩增 (Phyffer, *et al., J. Clin. Microbiol.* 34: 834-841(1996); Vuorinen, *et al., J. Clin. Microbiol.* 33: 1856-1859(1995)) 核酸序列依赖性扩增 (NASBA) (Compton, *Nature* 350(6313): 91-2(1991), 滚环式扩增 (RCA) (Lisby, *Mol. Biotechnol.* 12(1): 75-99(1999); Hatch *et al., Genet. Anal* 15(2): 35-40(1999)) 及分支 DNA 信号扩增 (bDNA) (例如参见 Iqbal *et al., Mol. Cell. Probes* 13(4): 315-320(1999))。为所属领域内技术人员熟知的其它扩增方法包括 CPR (环形探针反应)、SSR (自主序列复制)、SDA (链置换扩增)、QBR (Q-Beta 复制酶)、Re-AMP (以前的 RAMP)、RCR (修复链式反应)、TAS (转录依赖性扩增系统) 以及 HCS。

核酸扩增反应优选使用热处理仪器进行, 其可对反应容器 18 中的反应混合物加热和/或冷却以达到扩增反应所需要的温度。热处理仪器也可任选地包括一个或多个检测机构, 用以检测样品制备对照物中的标记物核酸序列及为其而测试样品的一种或多种目标核酸序列。优选的热处理装置具有用于扩增和检测反应容器 18 内的核酸序列的内置光检测器, 其描述于共同转让的美国专利 6,369,893 和 6,391,541 中, 将其公开内容纳入本文作为参考。另有其他很多熟知的方法可用于控制反应混合物的温

度及检测反应混合物中的核酸序列，且适用于本发明。例如，其它进行核酸扩增及检测的仪器，例如描述于美国专利 5,958,349; 5,656,493; 5,333,675; 5,455,175; 5,589,136 和 5,935,522 中。

对样品制备对照物的标记物核酸序列及为其而测试样品的一种或多种目标核酸序列的检测，优选使用探针来进行。反应容器 18 优选具有一个或多个透明或可透光壁，来自探针的信号经过该壁可在光学上被检测到。优选地，杂交探针用于对核酸序列进行检测及定量。有很多不同类型使用核酸杂交探针的测定。某些此类探针产生由于荧光基团与其它分子或部分的相互作用所致的可变荧光信号。典型地，这种相互作用可通过改变荧光基团与相互作用的分子或部分之间的距离而引起。此类测定中信号的产生依赖于荧光共振能量转移，或“FRET”。FRET 利用了第一荧光基团与相互作用的共振能量接受体间隔的距离的改变而引起的荧光改变，该接受体或者是另一荧光基团，或者是吸收基团。荧光基团与相互作用的分子或部分(包括淬灭分子或部分)的组合，被称为“FRET 对”。FRET 对相互作用的机制要求配对中一个成员的吸收光谱与另一成员即第一荧光基团的发射光谱重叠。如果相互作用的分子或部分为淬灭物，则其吸收光谱必须重叠于荧光基团的发射光谱。Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.* 1978, 47: 819-846; BIOPHYSICAL CHEMISTRY part II. Techniques for the Study of Biological Structure and Function(研究生物学结构和功能的技术), (C. R. Cantor and P. R. Schimmel, eds., 1980), 448-455 页，以及 Selvin, P. R., *Methods in Enzymology* 246: 300-335(1995)。有效的或相当程度的 FRET 相互作用要求该配对的吸收和发射光谱高度重叠。FRET 相互作用的效率与重叠的程度成线性比例关系。Haugland, R. P., Yguerabide, Jr., 和 Stryer, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 24-30(1969)。非 FRET 探针也有相关描述。例如参见美国专利 6,150,097。

检测扩增产物的另一优选方法是 5'核酸酶 PCR 测定(也被称为 TaqMan® 测定)(Holland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280(1991); Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-3766(1993))。此测定借助扩增反应期间对双标记荧光探针(“TaqMan®”探针)的杂交和切割，对特异性 PCR 产物的积聚进行检测。荧光探针由标记了荧光报告染料和

淬灭染料的寡核苷酸组成。PCR 期间, 如果且只有该探针杂交于正扩增的片段上时, 其才被 DNA 聚合酶的 5'外切酶活性所切割,。切割探针将产生报告染料荧光强度的增加。

依赖于能量转移的应用的检测扩增产物的另一方法是 Tyagi 和 Kramer 描述的“信标探针”法 (*Nature Biotech.* 14: 303-309(1996)), 其也是美国专利 5,119,801 和 5,312,728 的主题。该方法使用了可形成发夹结构的寡核苷酸杂交探针。杂交探针的一端(5'端或 3'端)有供体荧光基团, 而在探针的另一端则有接收体部分。对于 Tyagi 和 Kramer 的方法, 接受体部分为淬灭物, 即它吸收了由供体释放的能量后, 自身并不发出荧光。因而当信标处于开放构象时, 供体荧光基团的荧光可被检测到, 而当信标处于发夹(关闭)构象时, 供体荧光基团的荧光被淬灭。当应用于 PCR 时, 杂交于 PCR 产物的一条链上分子信标探针处于“开放构象”, 并可检测到荧光, 而那些保持未杂交状态的探针则不会发出荧光 (Tyagi and Kramer *Nature Biotechnol.* 14: 303-309(1996))。作为结果, 荧光量伴随 PCR 产物数量的增加而增加, 并因此可用于 PCR 进程的测量。

为了对样品中目标核酸序列的检测有信心, 否则缺乏信心, 实验者应当控制样品制备的完整性。这就是为何样品制备对照物要与样品中的目标实体(例如包含目标核酸序列的目标细胞、孢子、病毒或微生物)经受同样的处理。如果样品制备对照物的标记物核酸序列被检测到, 则样品制备被视为令人满意的。若不能检测到标记物核酸序列的存在, 则样品制备被视为是不充分的, 且关于目标核酸序列的测试结果被视为“未决定的”。优选地, 通过确定来自可结合标记物核酸序列的杂交探针的信号是否超出阈值来检测标记物核酸序列是否存在, 该阈值例如为对于视为有效的测定来说必须达到或超出的预定荧光阈值。

为操作图 3-8 的阀 16, 诸如步进电动机的电动机通常偶联于盘状部分 22 的齿状外缘 29, 以相对于壳体 12 旋转阀 16, 进行高精度地分流。电动机可依据希望的程序被计算机控制。直线电动机通常用于驱动活塞 54 向上和向下精确运动, 以提供准确的计量, 并且同样可依据希望的程序被计算机控制。

单阀的使用产生高成品率, 因为仅有一个失效元件。流体控制和处

理部件的集中导致紧凑装置（如以小盒状物的形式）的产生且利于自动化铸型和组装。如前文所述，本系统有利地包括稀释和混合能力，中间清洗能力和正压能力。系统内液体的流动通路一般被关闭以使污染最小化并利于保留和控制系统内的液体。反应容器可被方便地拆卸及替换，且在某些实施方案中可为一次性使用。

流体控制和处理系统的部件可由多种材料制成并与所用液体兼容。适合的材料的实例包括聚合物材料，例如聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、丙烯酸或尼龙。系统中各种室、通道、口等可以是各种形状及大小。

图 10 显示另一实施方案，其中活塞组件 210 包括活塞杆 212，其连接于驱动小量液体的横截面小于活塞杆 212 的活塞轴 214。如果细活塞轴 214 过长，则其可在施加的力的作用下弯曲。活塞杆 212 沿活塞筒或壳体 216 的上部移动，而活塞轴 214 则沿活塞筒的下部移动。活塞杆 212 的运动引导活塞轴 214 的运动，并吸收了作用力的大部分，因此几乎没有弯曲力传递到细活塞轴 214。

图 11 显示另一实施方案，其中样品在与样品制备对照物混合前被预过滤。样品优选在整合到装置中的侧室 220 内被预过滤。侧室 220 包括入口 222 和出口 224。在此实例中，侧室 220 包括安装在入口 222 处的滤器 226。样品液体被引导流经入口 222 进入侧室 220，并经出口 224 进行侧滤。这使得能使用本发明的流体控制装置对液体样品等进行过滤。此液体可再循环以借助滤器 226 实现更好的过滤效果。在样品与样品制备对照物混合之前，此种过滤有益于除去可能会阻塞本装置其它部件的粗粒物质。在样品被预过滤之后，其与样品制备对照物例如在图 9C 的室 66 中或壳体 12 的另一个室内混合。侧室的使用是有益的，例如避免污染阀和本装置的其它室。

上述装置的配置和方法仅是说明本发明原理的应用，在不脱离所附权利要求书所定义的本发明的精神和范围的条件下，存在很多其它实施方案和各种修改。

例如，尽管已将旋转阀盒体作为优选实施实施方案进行了描述，本发明的样品制备对照物也适用于很多其它的盒体设计。可替换的盒体设计在美国专利 6,391,541、6,440,725 和 6,168,948 中进行了描述，将其公

开内容纳入本文作为参考。而且，当使用旋转阀箱体时，此箱体可能比优选实施方案中有较多或较少的室，且可使用很多不同的样品制备方法。

因而，本发明的范围不应参照以上描述来确定，而是应参照所附权利要求书及其在全部范围内的等价物来确定。

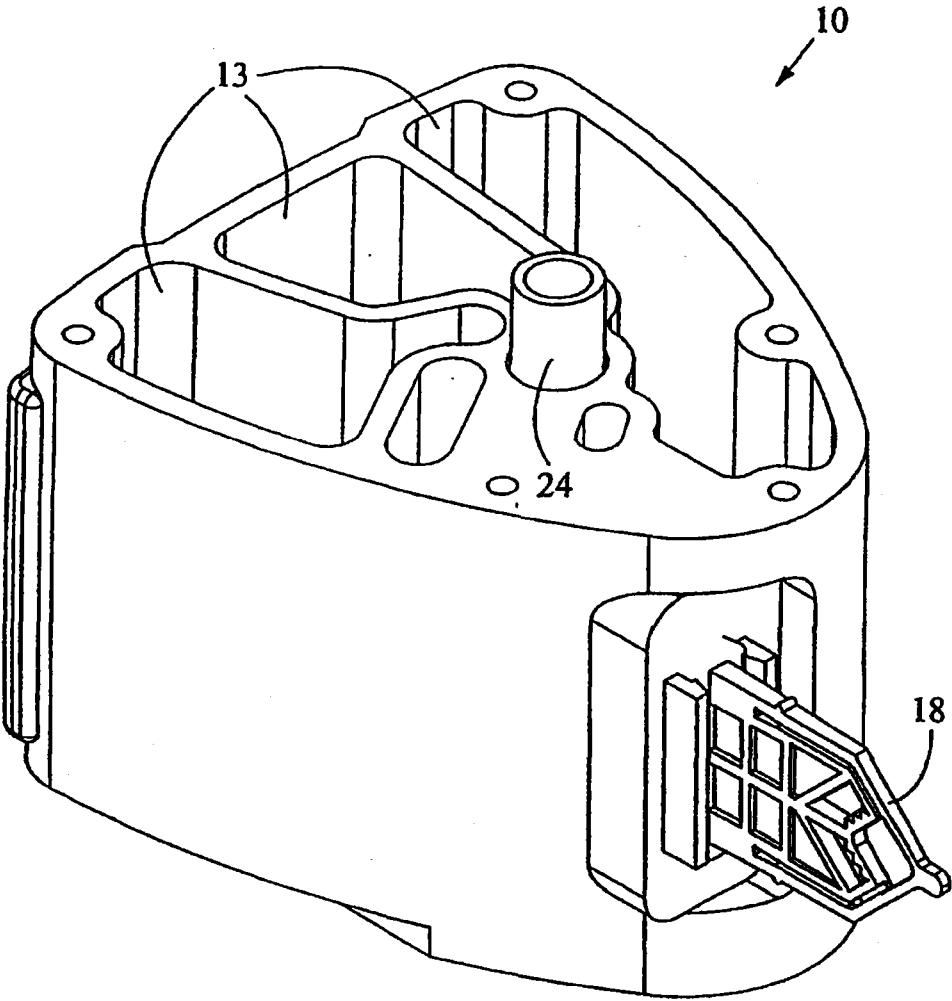


图 1

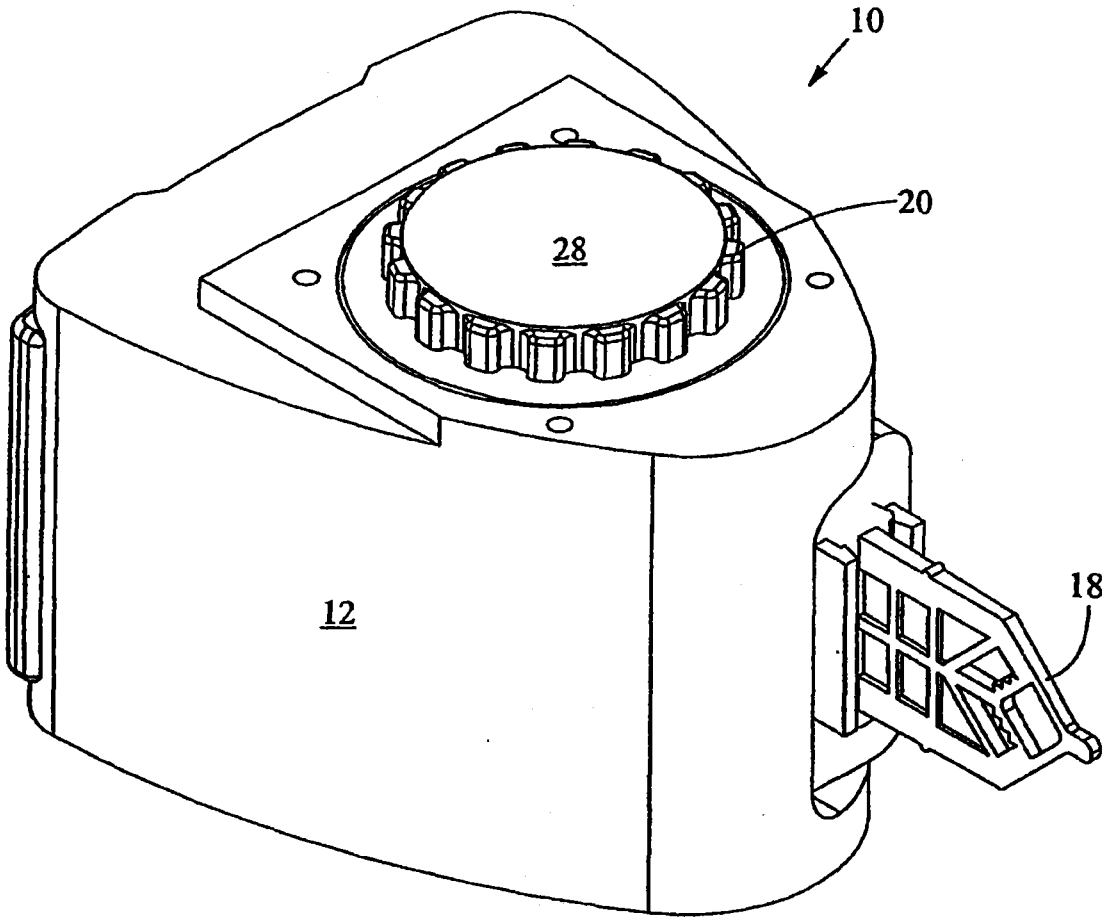


图 2

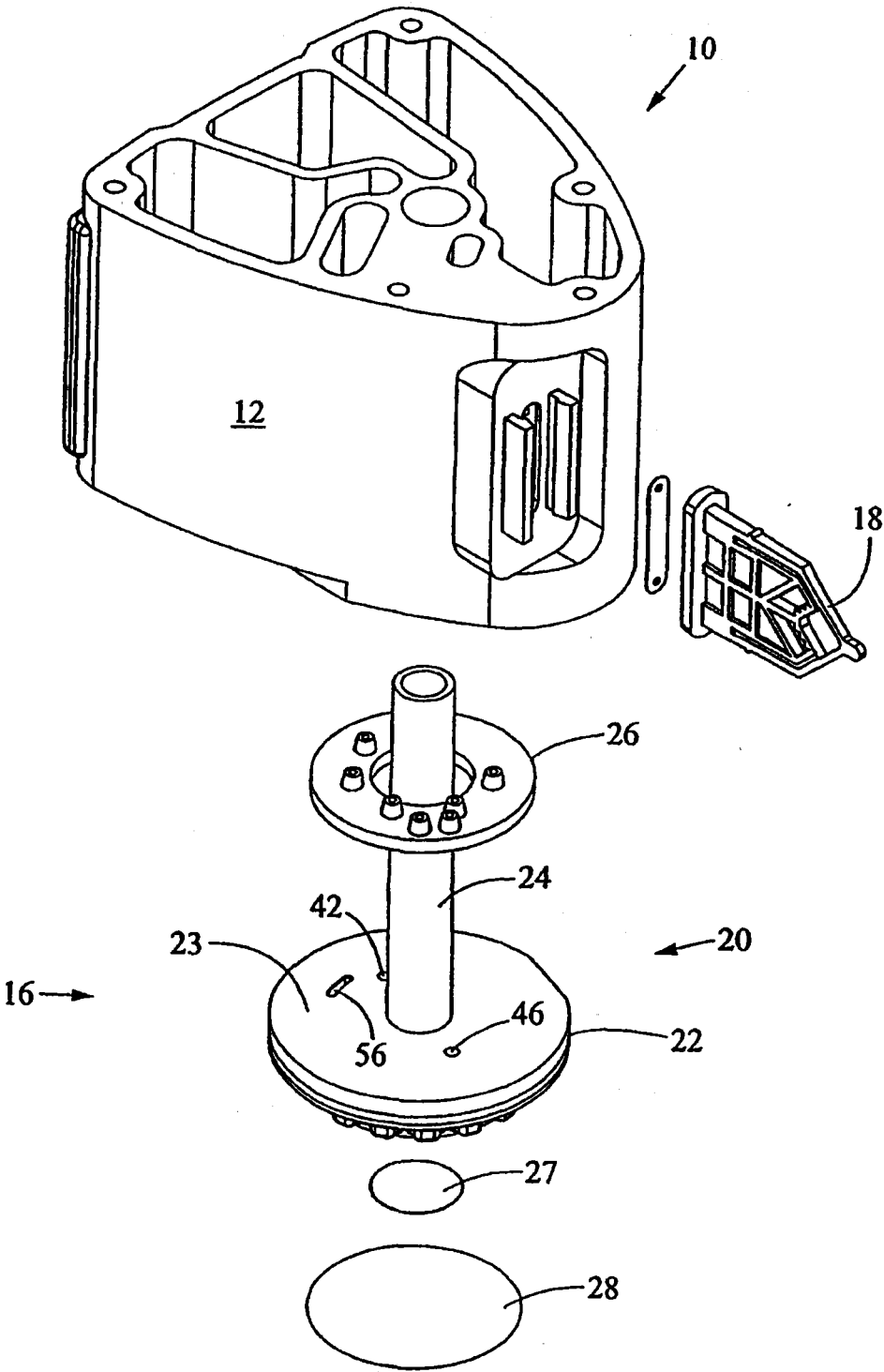


图 3

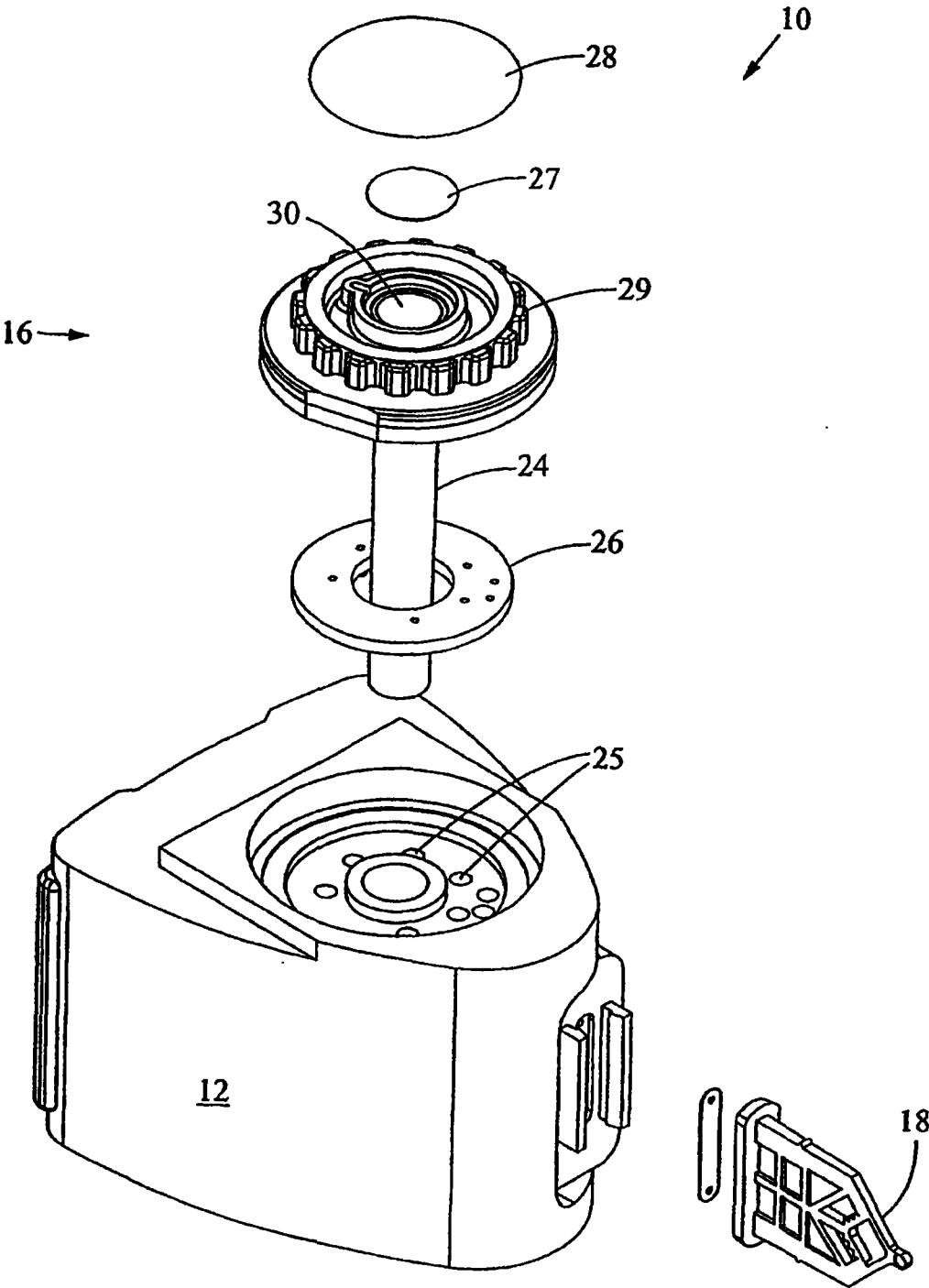


图 4

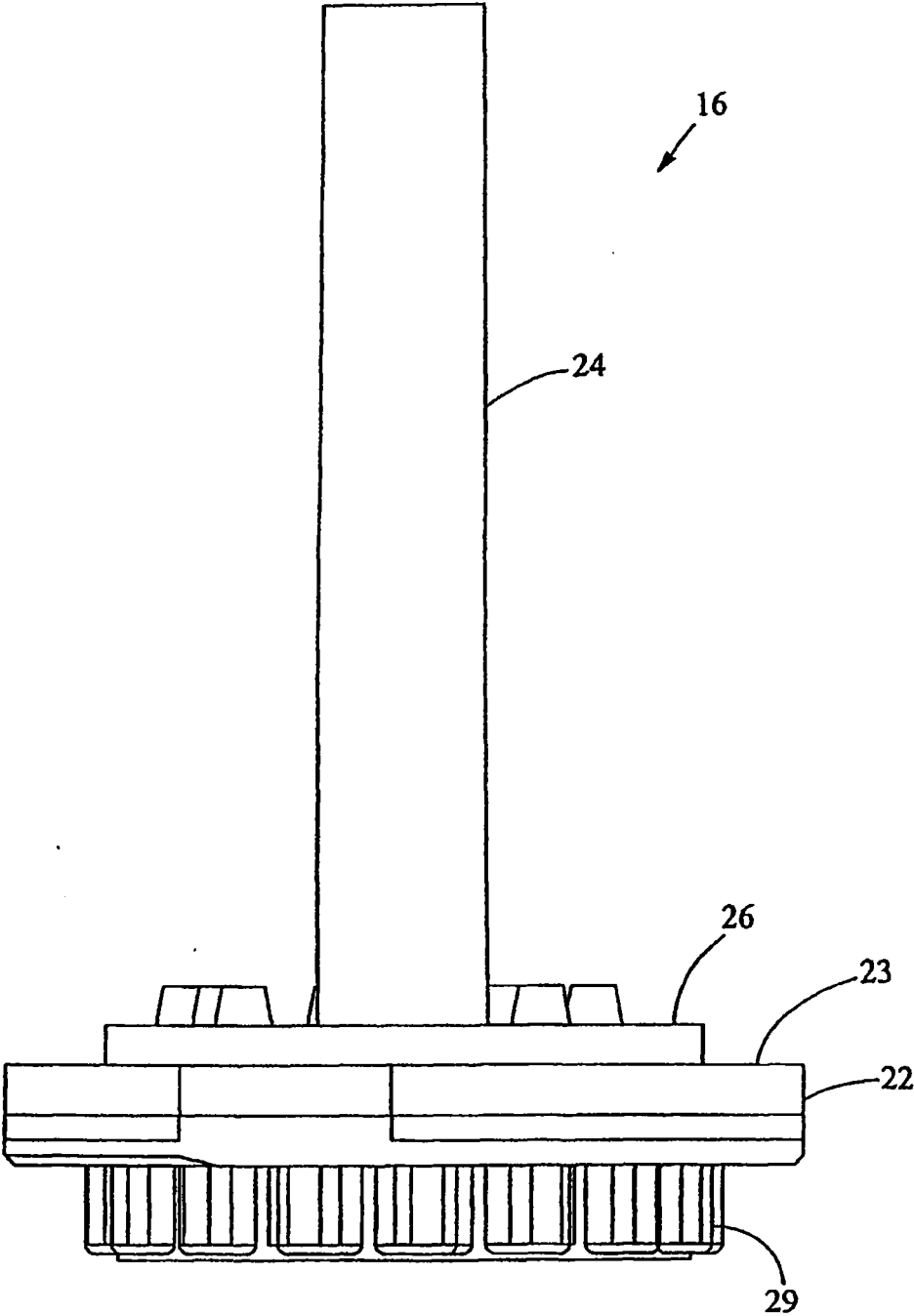


图 5

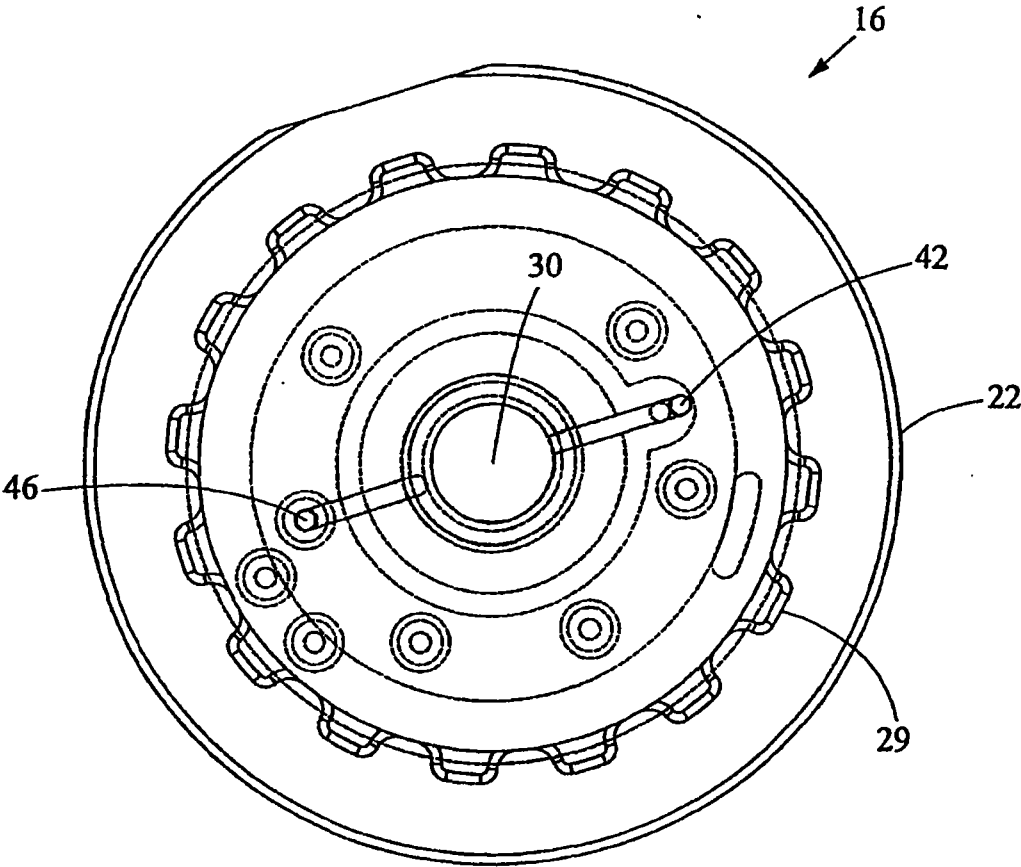


图 6

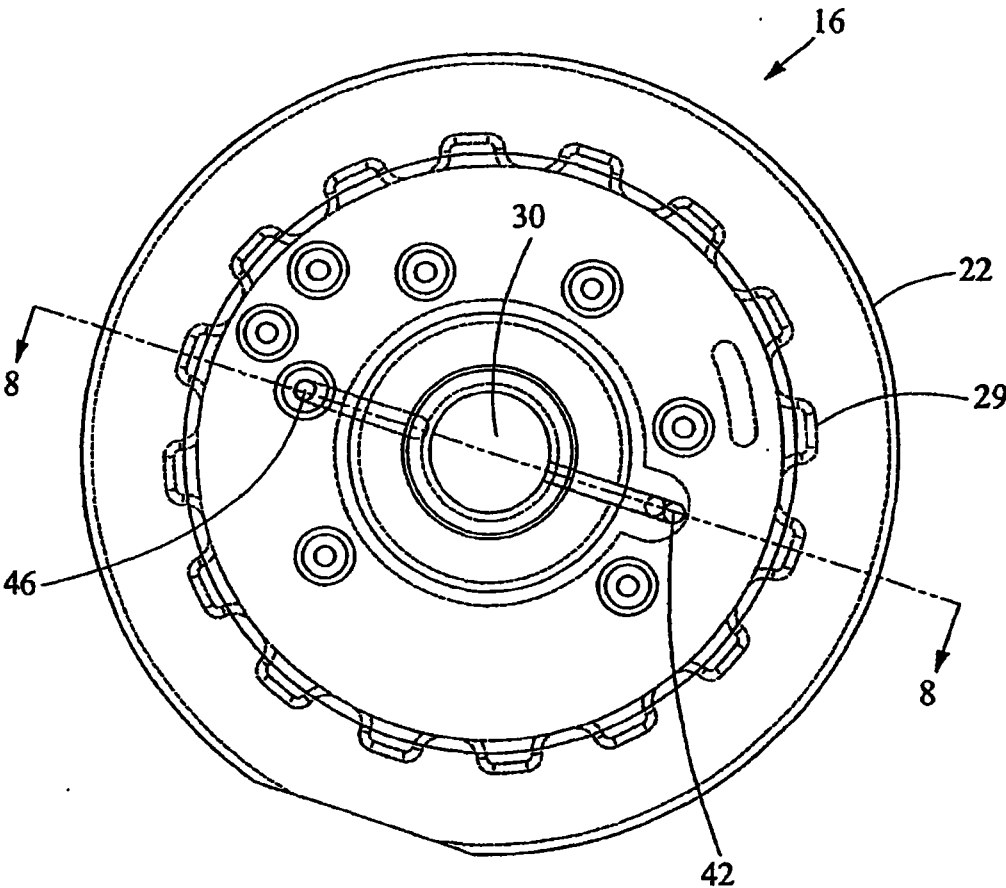


图 7

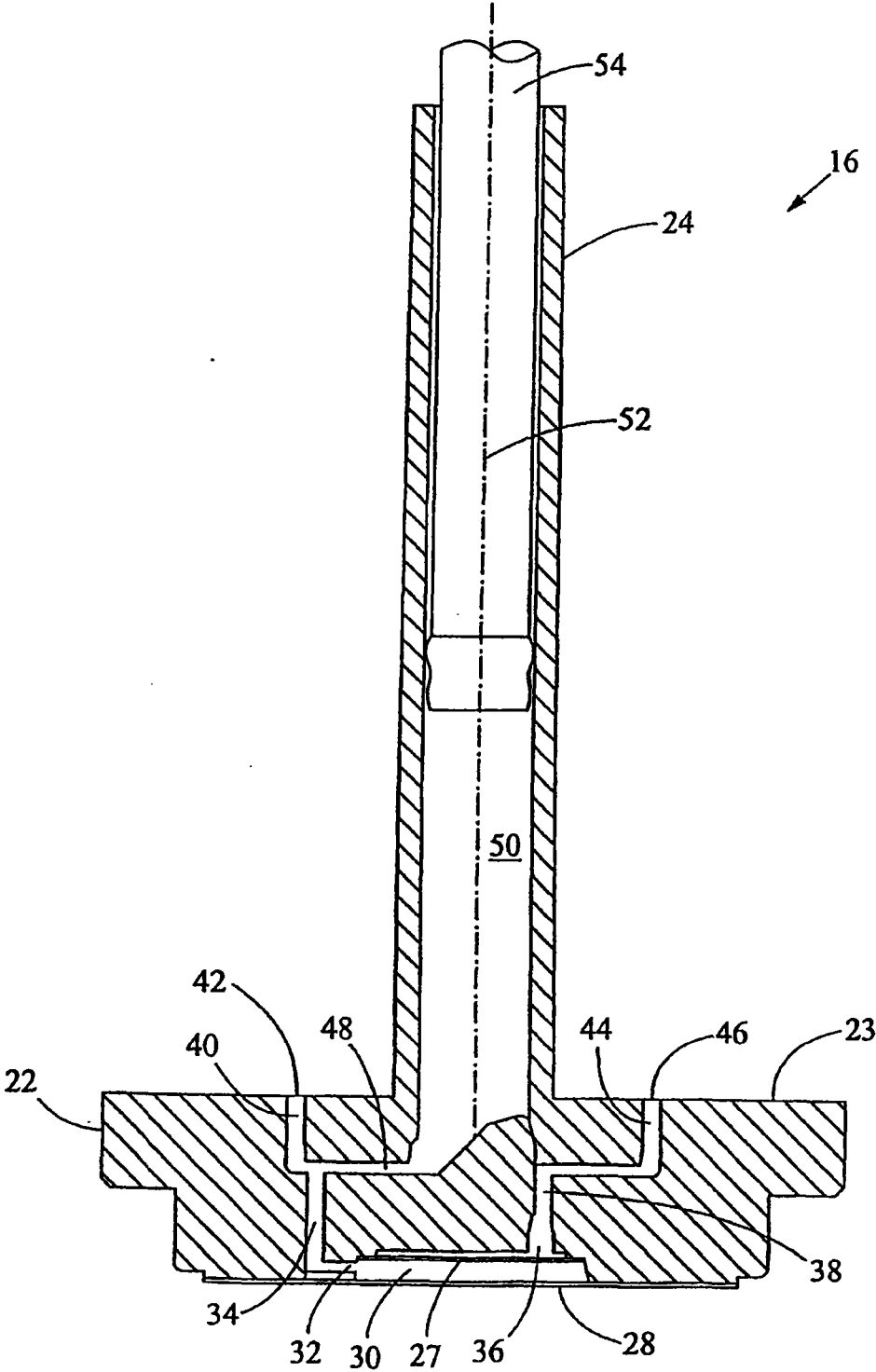


图 8

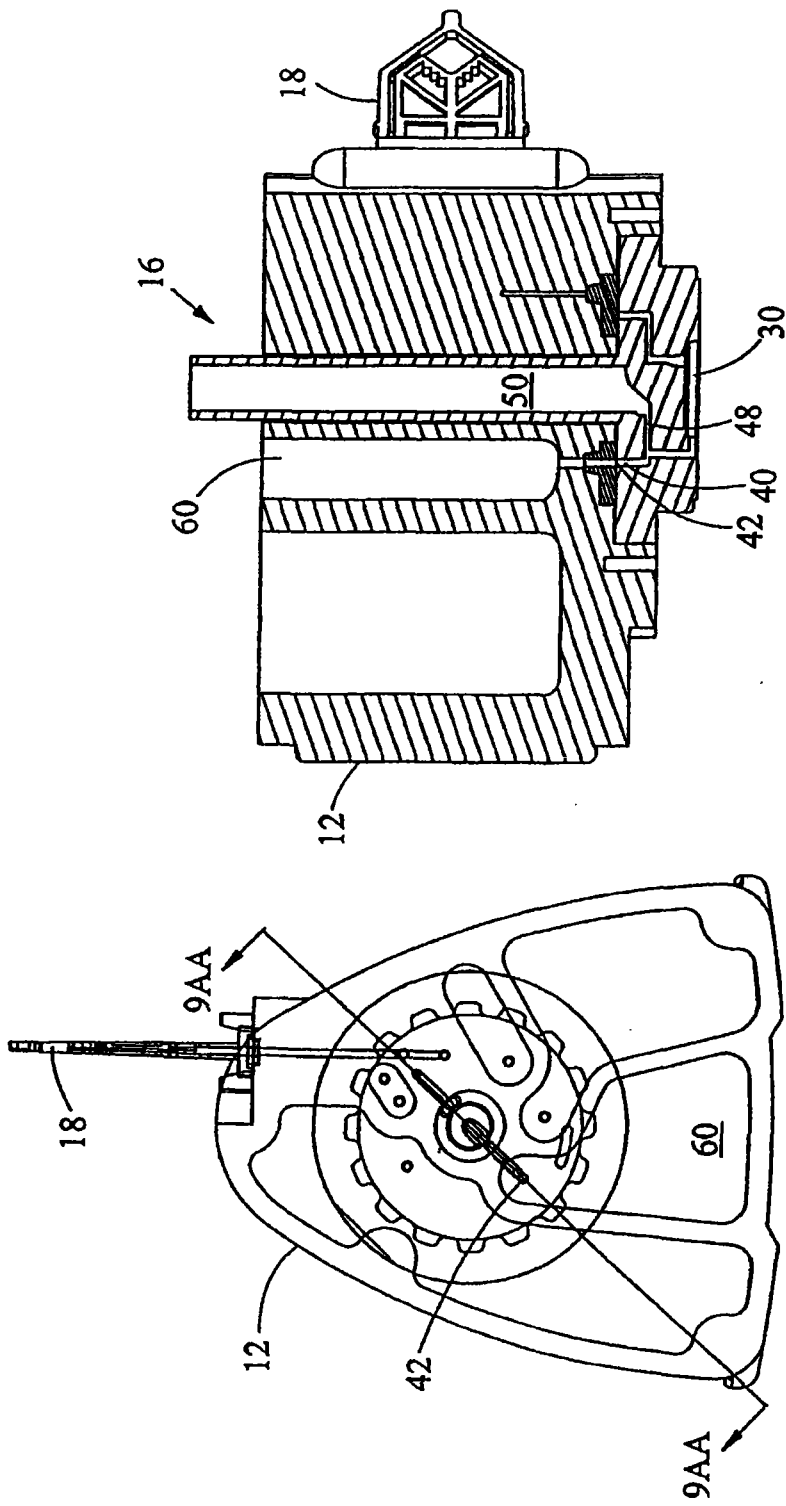


图 9AA

图 9A

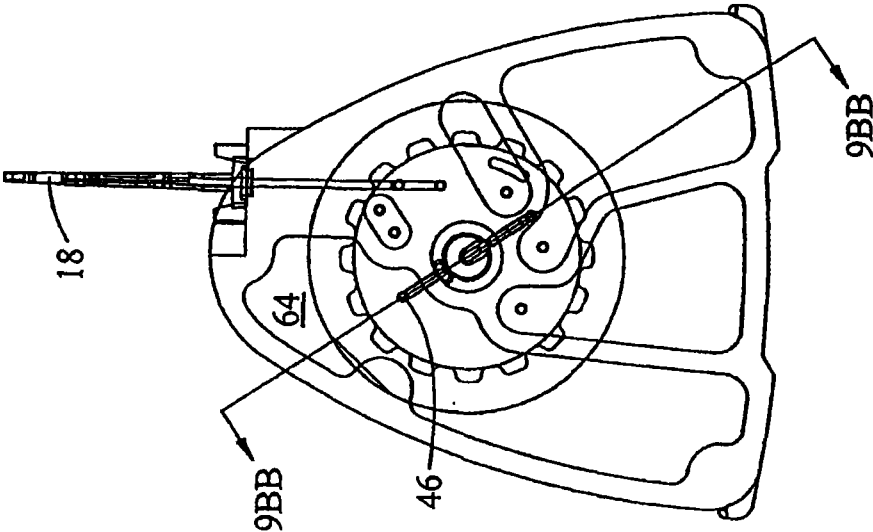


图 9B

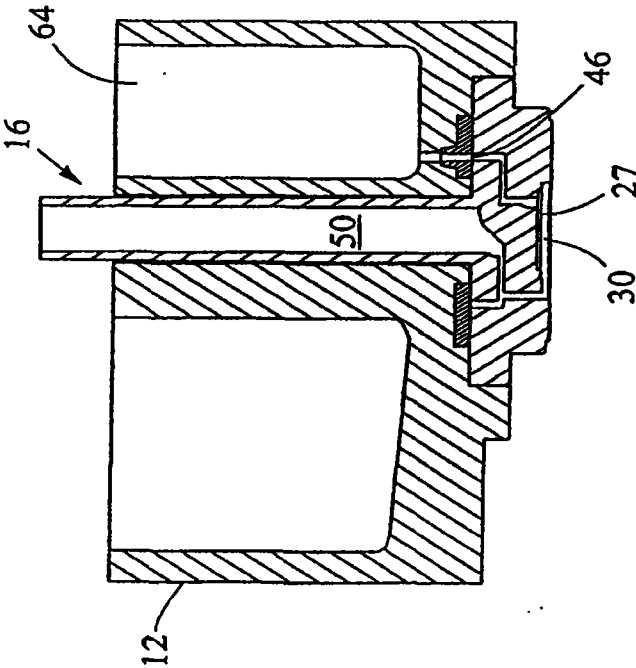


图 9BB

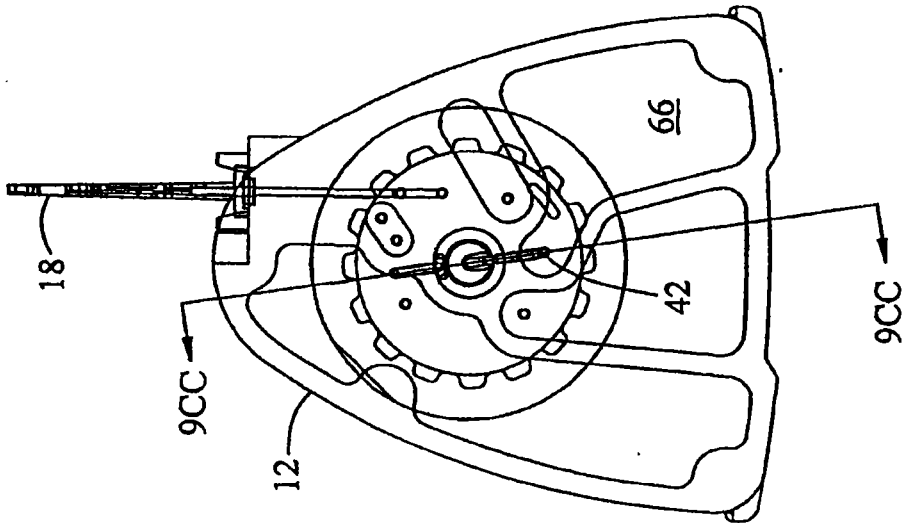


图 9C

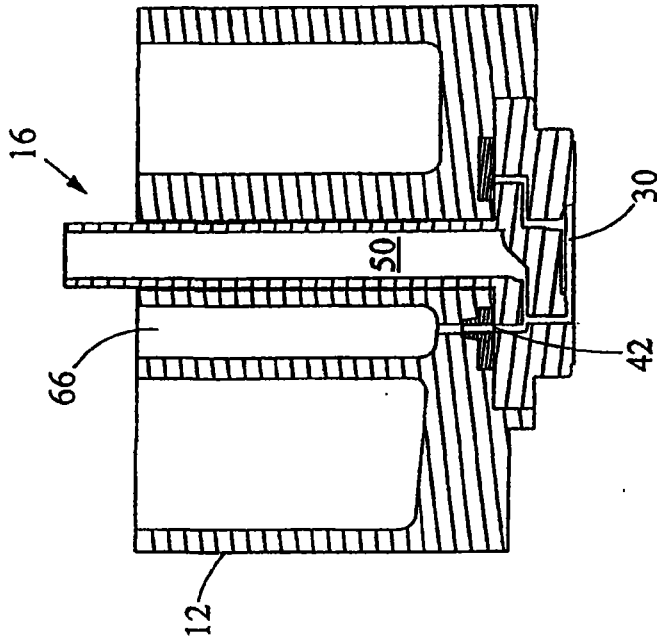


图 9CC

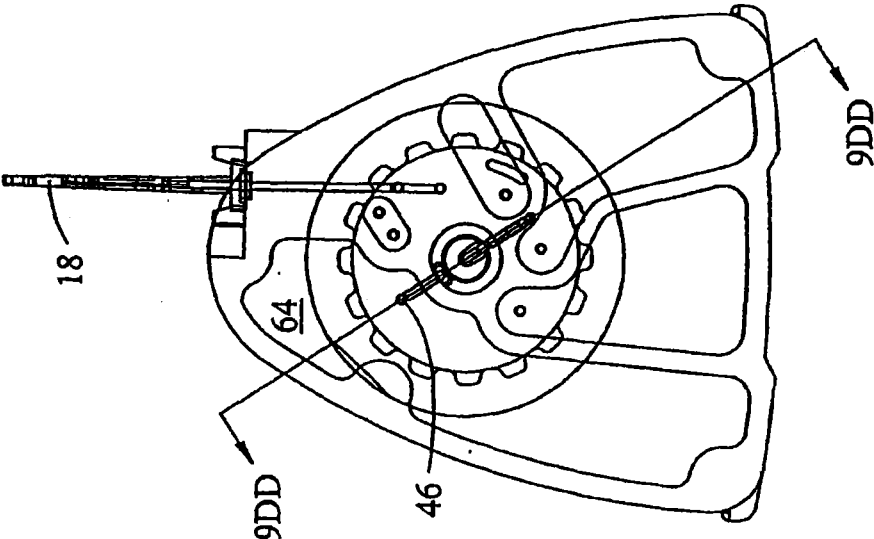


图 9D

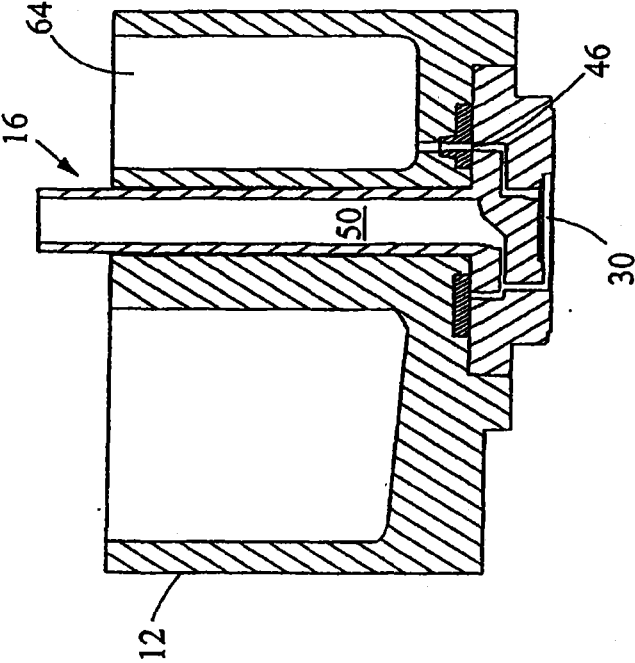


图 9DD

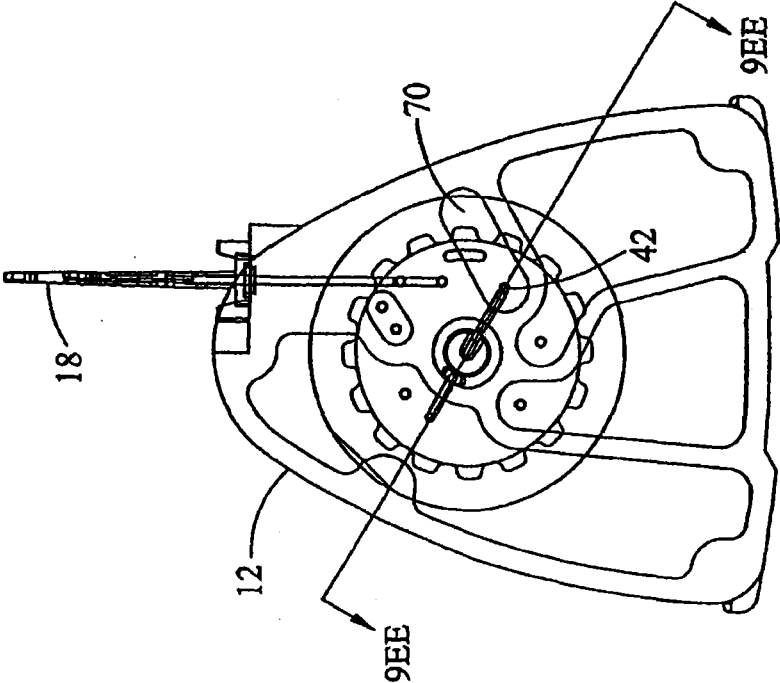


图 9E

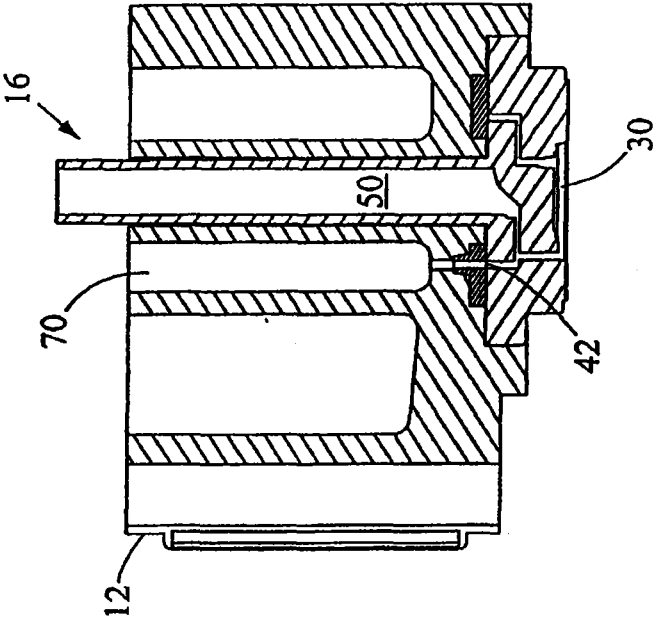


图 9EE

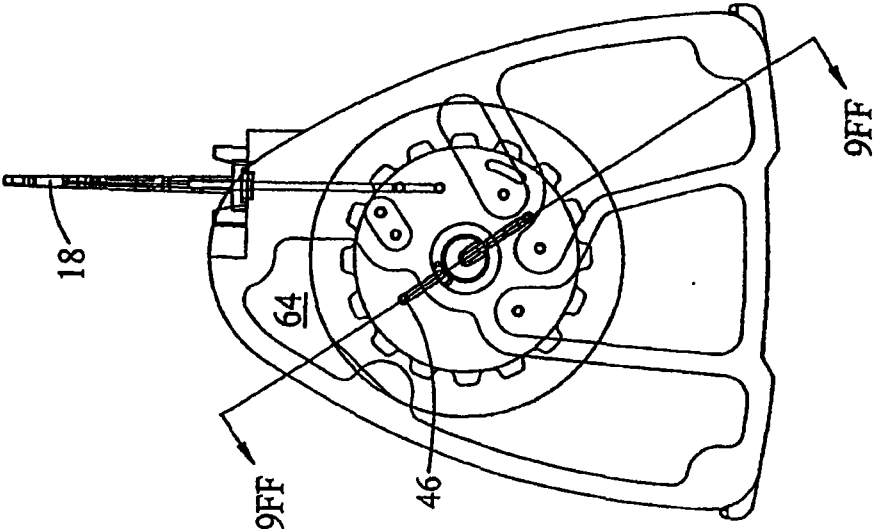


图 9F

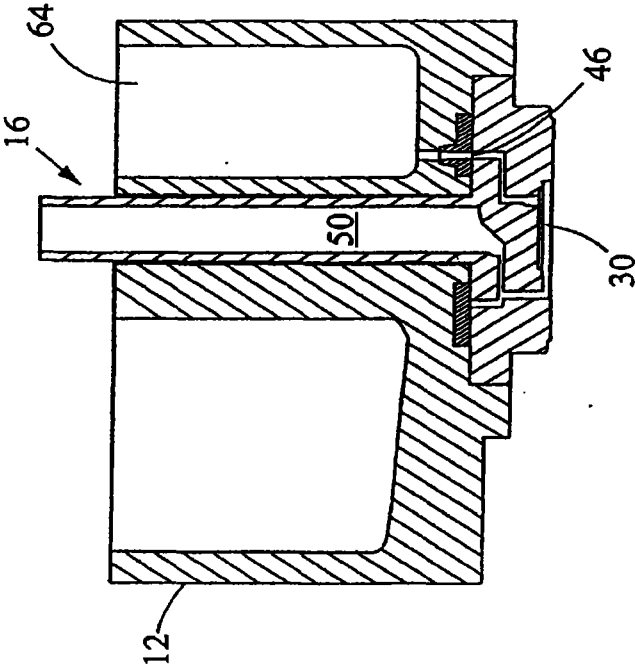
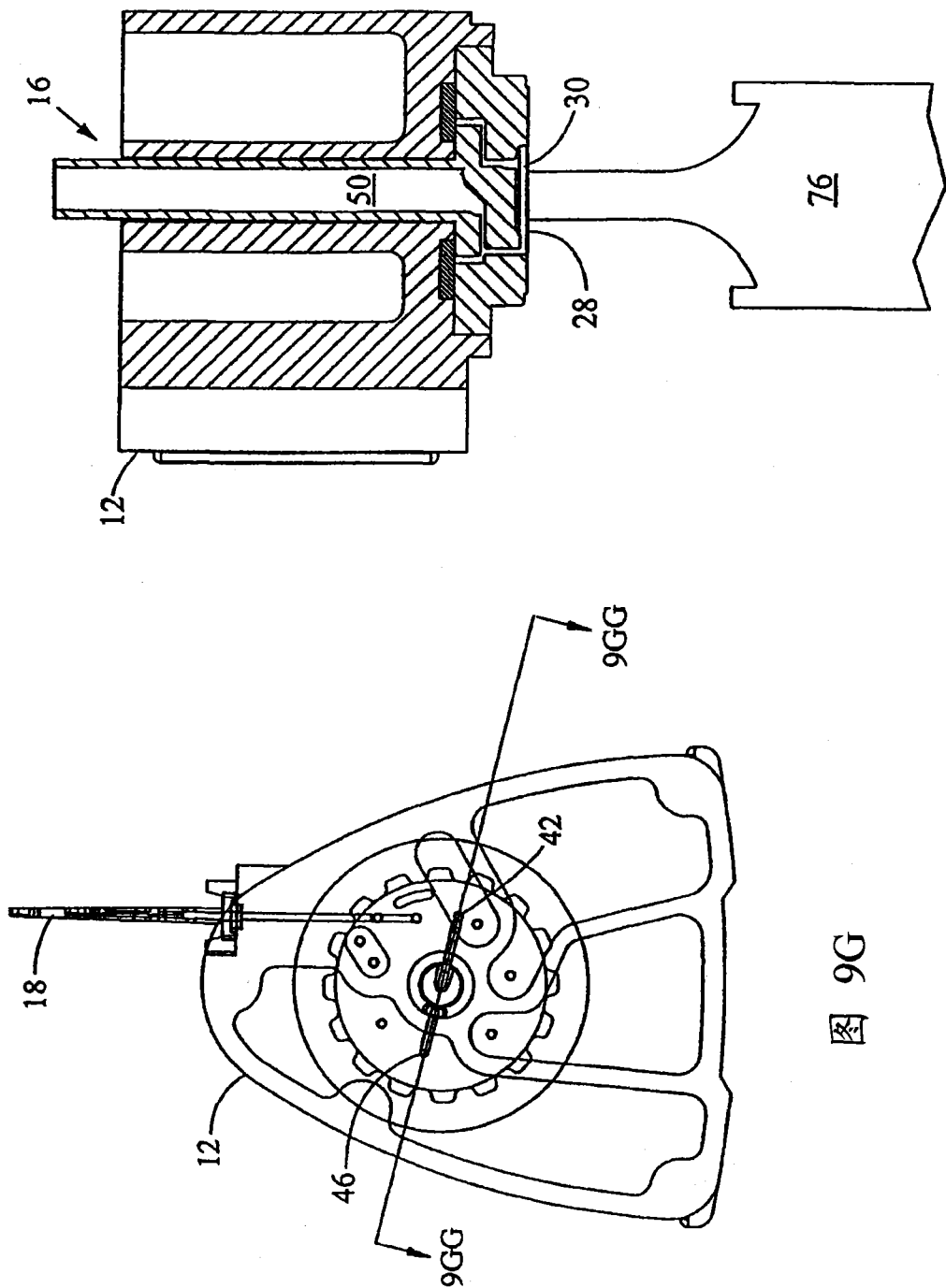
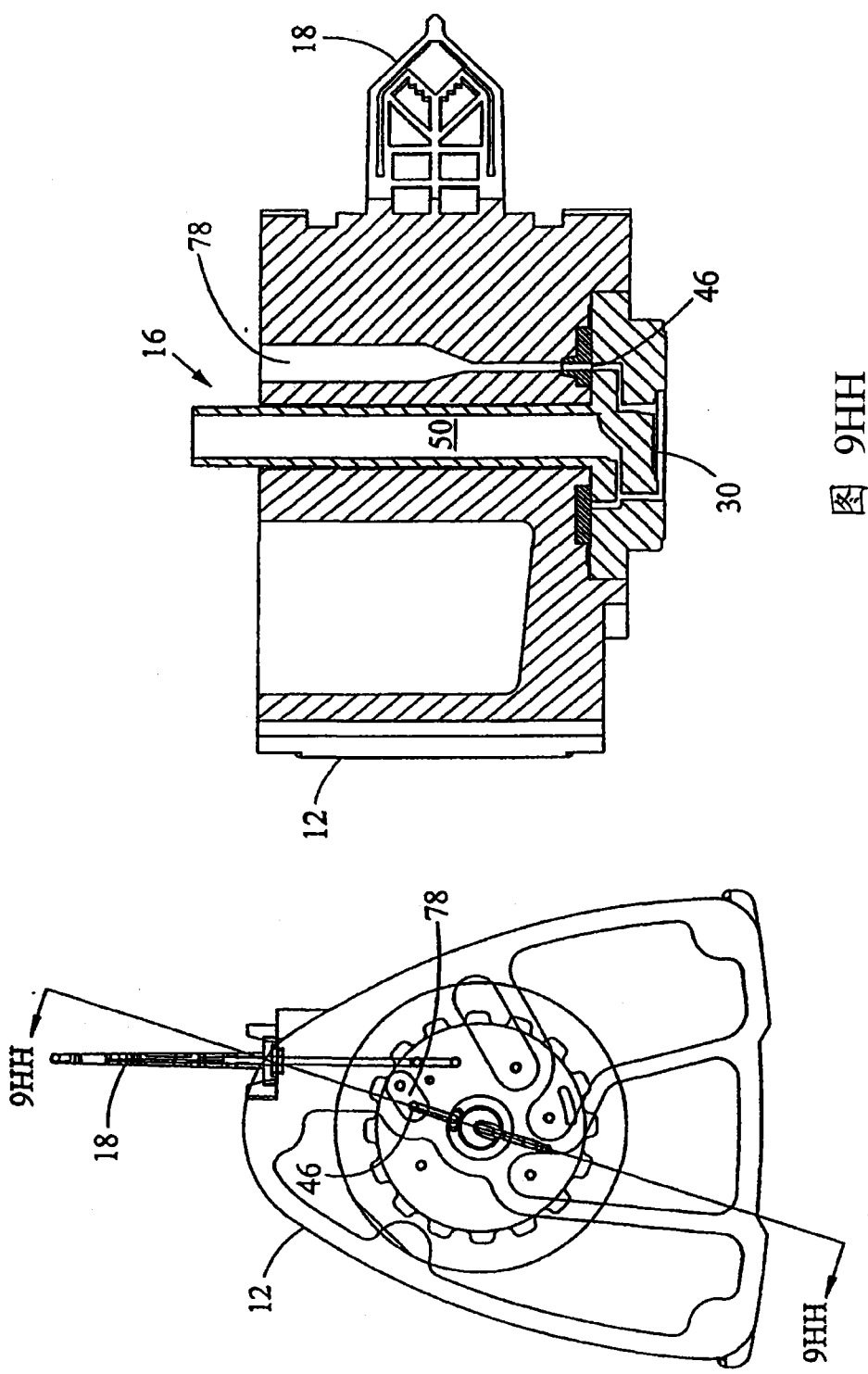


图 9FF





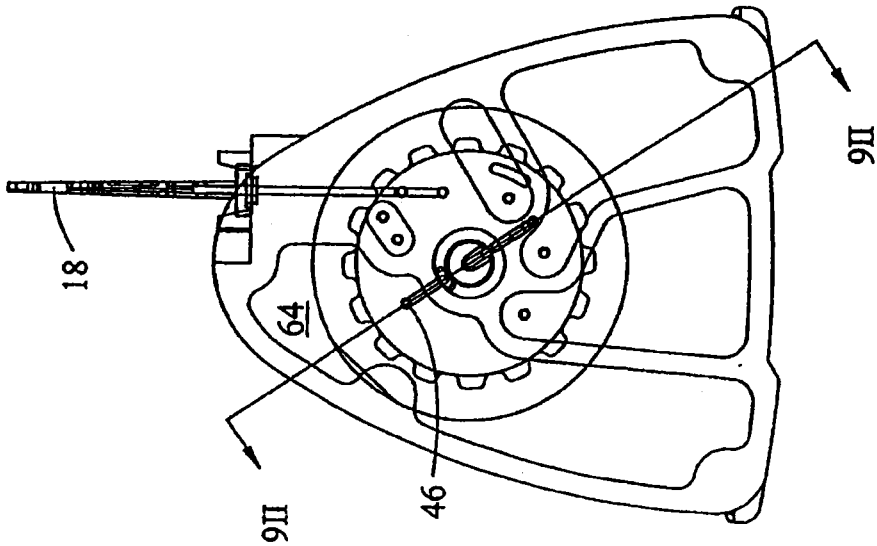


图 9I

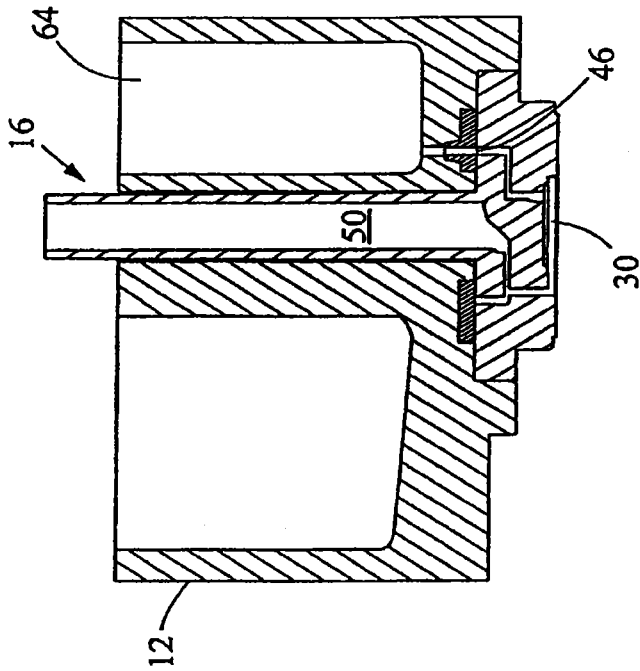
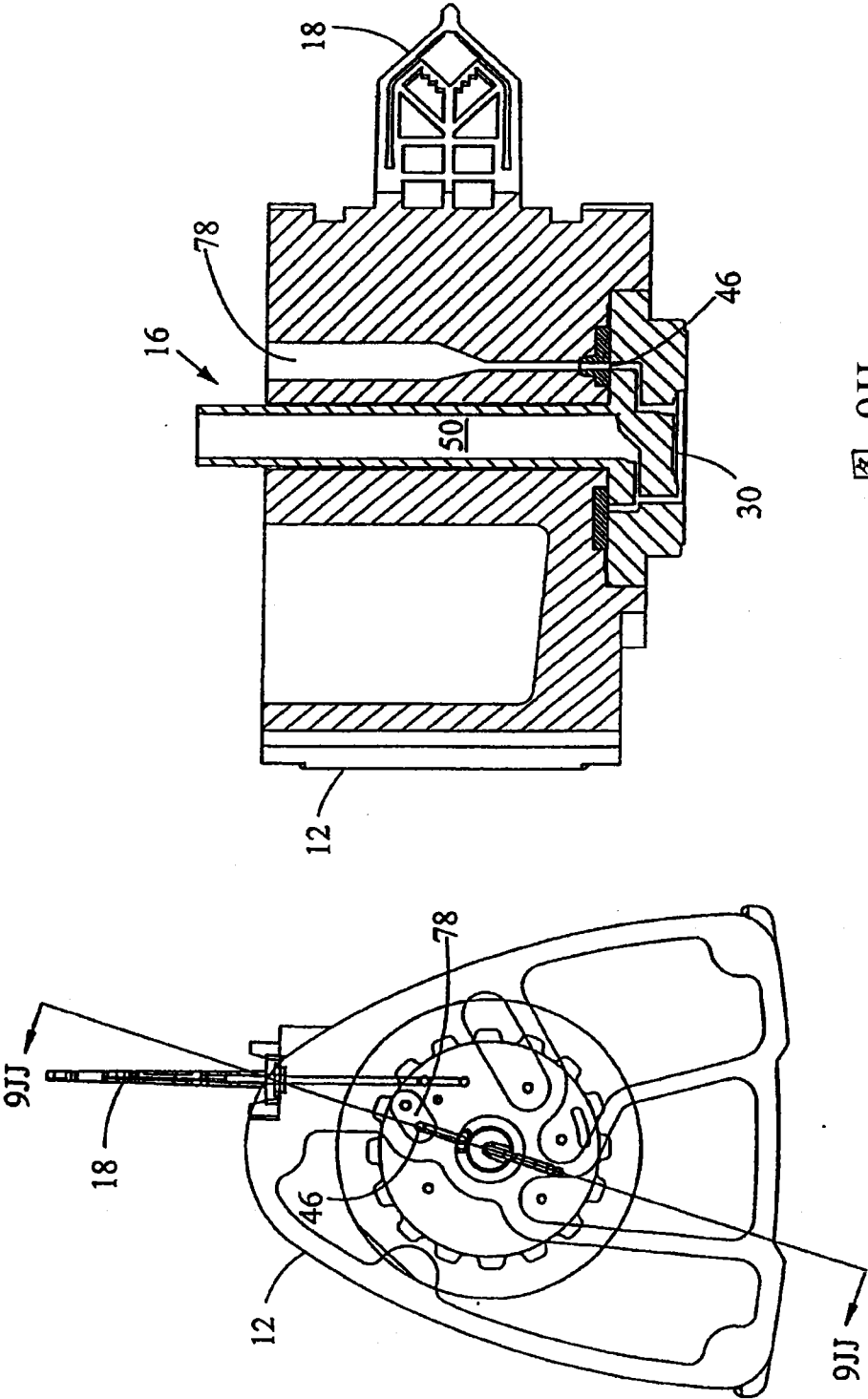
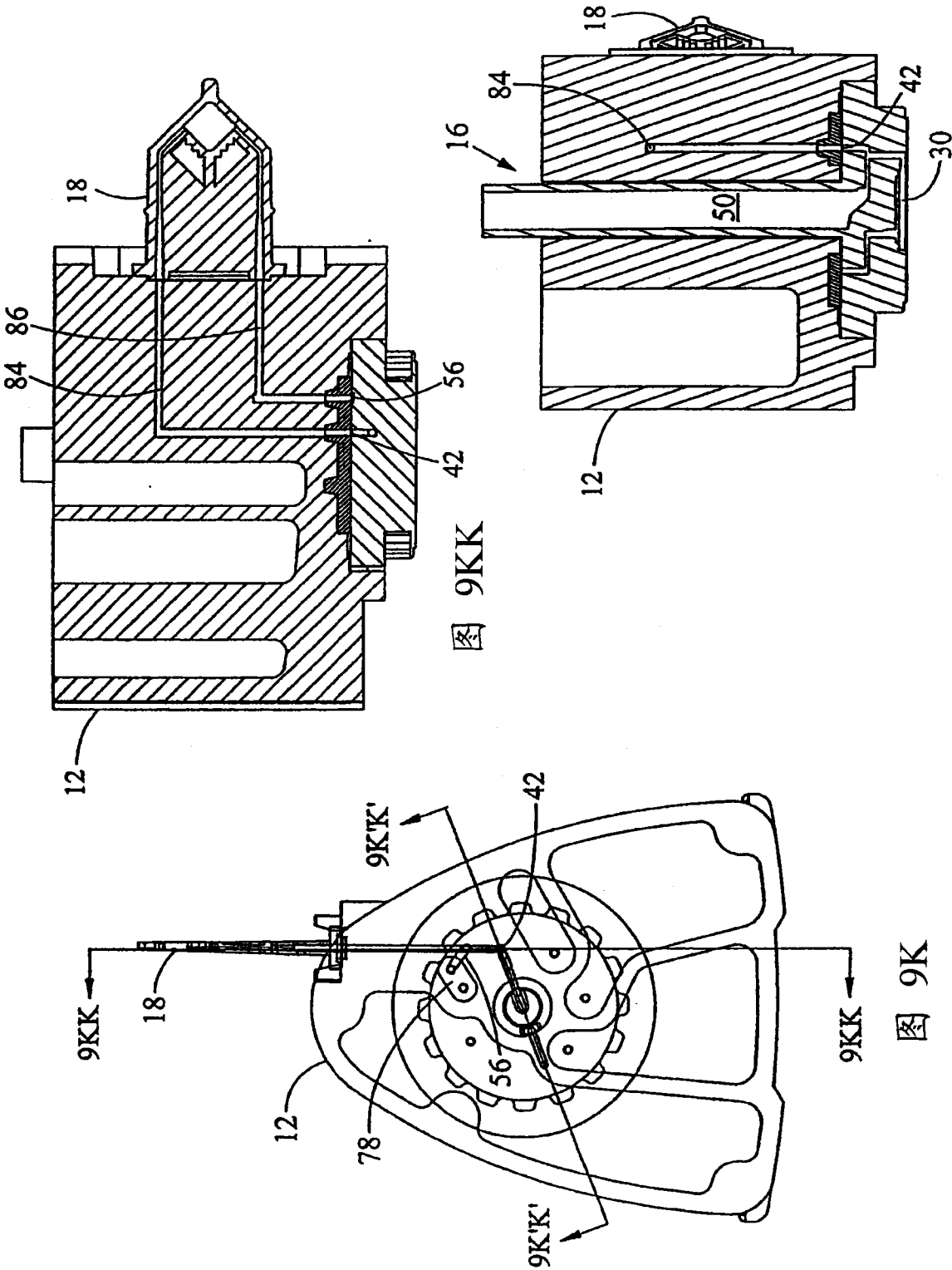


图 9II





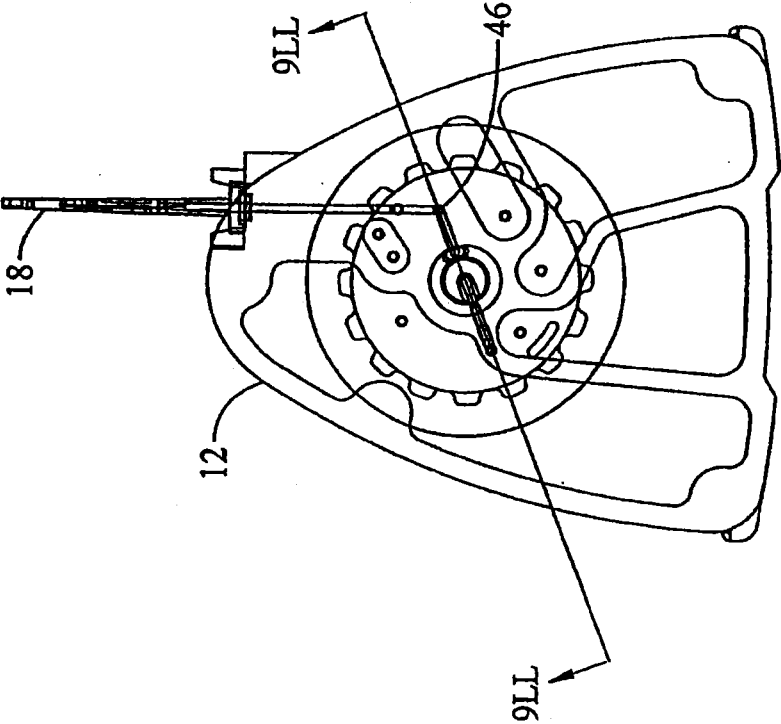


图 9L

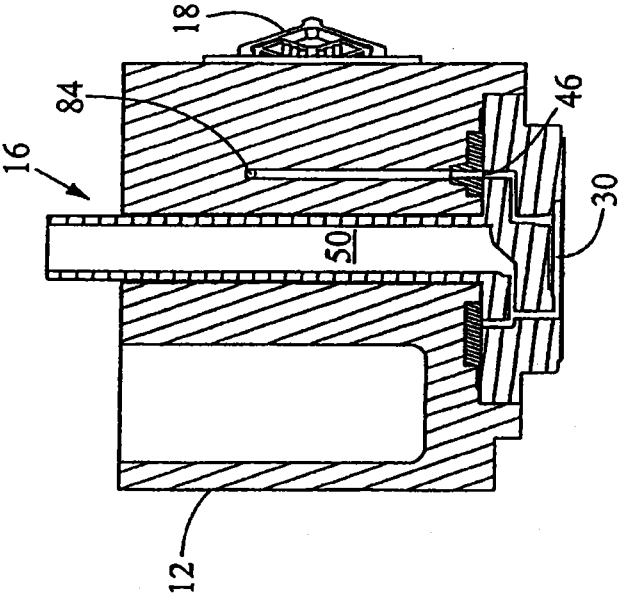


图 9LL

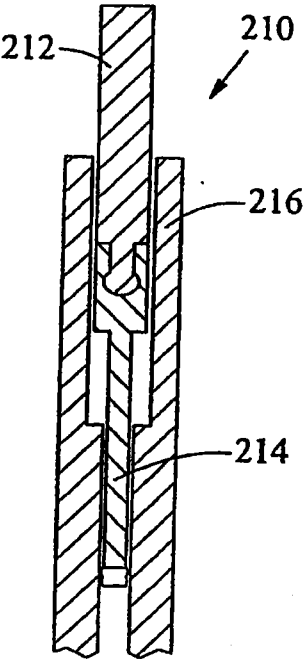


图 10

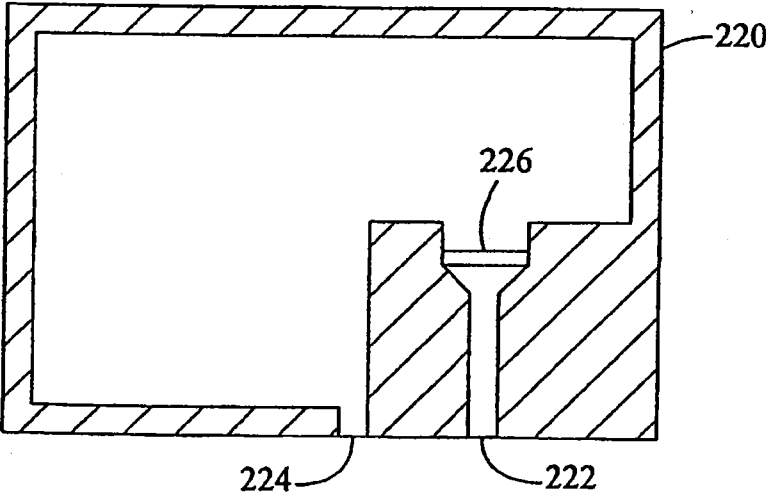


图 11