



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106536714 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201580040919.6

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22)申请日 2015.05.29

代理人 过晓东

(30)优先权数据

62/005,662 2014.05.30 US

(51)Int.Cl.

C12N 1/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12M 3/08(2006.01)

2017.01.23

G01N 1/28(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/033338 2015.05.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/184360 EN 2015.12.03

(71)申请人 压力生物科技公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 V·格罗斯 E·Y·汀

A·拉扎列夫 R·T·舒马赫

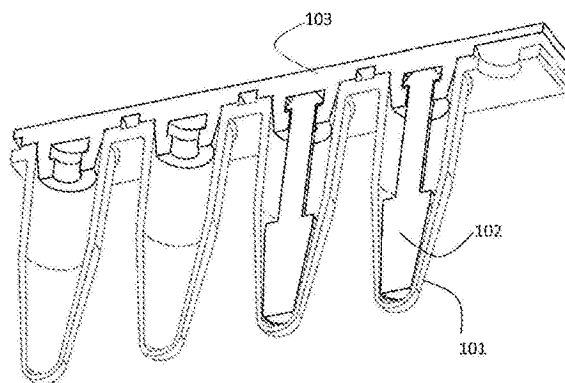
权利要求书2页 说明书14页 附图25页

(54)发明名称

样品制备装置及方法

(57)摘要

在此公开的是通过压力循环技术用于样品制备的装置和方法。所述用于样品制备的装置包括具有内部表面、顶部和底部的管状物，所述的管状物配置用于在所述底部包含样品，并被用于样品制备的压力腔室接收，可拆卸地连接到所述管状物的顶部的端盖，以及从所述端盖延伸进入所述管状物的锥形伸长部件，所述的锥形伸长部件配置用于与所述管状物的内部表面和在所述管状物的底部的样品接触其中所述的管状物是可变形的，使得在压力的操作下，所述管状物相对所述锥形伸长部件变形，从而促进所述样品的裂解。



1. 一种样品制备装置,其包括:

具有内部表面、顶部和底部的管状物,所述管状物配置用于在所述底部包含样品和被接收进入用于样品制备的压力腔室;

端盖,其可拆卸地连接到所述管状物的顶部;以及

锥形伸长部件,其从所述端盖延伸进入所述的管状物,所述的锥形伸长部件配置用于与所述管状物的内部表面和在所述管状物的底部的所述样品接触,

其中,所述管状物是可变形的使得在压力的操作下,所述管状物向所述锥形伸长部件变形从而促进所述样品的裂解。

2. 根据权利要求1所述的装置,其中所述样品是细针活检样品。

3. 根据权利要求1所述的装置,其中所述样品的大小为小于大约30mg。

4. 根据权利要求1所述的装置,其中所述管状物和所述锥形伸长部件的至少其中之一由聚四氟乙烯 (PTFE) 或氟化乙烯丙烯共聚物 (FEP) 制成。

5. 根据权利要求1所述的装置,其中所述管状物和所述锥形伸长部件的至少其中之一是一次性使用的消费品。

6. 根据权利要求1所述的装置,其中所述锥形伸长部件与所述端盖是一体的。

7. 一种样品制品试剂盒,其包括:

具有孔的阵列的多孔板,每个孔包括内壁和底部,所述的多孔板配置用于在其每个孔的底部包含样品并被用于样品制备的压力腔室接收;

衬垫,其配置用于与所述多孔板配合从而为每个孔形成端盖;以及

多个锥形伸长部件,其从所述衬垫延伸进入所述孔的阵列,所述的锥形伸长部件配置用于与所述孔的内部表面和所述孔的底部的样品接触,

其中所述的多孔板是可变形的使得在压力的操作下,所述的孔向所述锥形伸长部件变形从而促进所述样品的裂解。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中所述的样品是细针活检样品。

9. 根据权利要求7所述的试剂盒,进一步包括试剂源或酶源。

10. 根据权利要求7所述的试剂盒,其中所述管状物和所述锥形伸长部件的至少其中之一由聚四氟乙烯 (PTFE) 或氟化乙烯丙烯共聚物 (FEP) 制成。

11. 一种样品制备方法,其包括:

将样品引入到管状物中,其中所述的管状物具有内壁、顶部和底部,所述的管状物配置为被用于样品制备的压力循环技术系统接收;

可拆卸地将端盖连接到所述的管状物上,所述端盖包括延伸进入所述管状物内的锥形伸长部件,所述的锥形伸长部件配置用于与所述管状物的内部表面接触以及将所述样品限制在所述管状物的底部;

使所述管状物承受循环压力,所述的循环压力从升高的流体静压P1变化为实质上较低的压力P2,使得所述的内壁和管状物的底部交替地压缩所述的锥形伸长部件和对所述锥形伸长部件解压,从而促进所述样品的裂解;

在压力循环之后,从所述样品中分离出一种成分;以及

将所述分离后的样品成分引入下游的分离和/或分析设备。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述分离后的样品成分被定向给质谱设备用于

分析。

13. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述的压力循环范围从20,000psi到100,000psi。

14. 根据权利要求11所述的方法, 进一步包括在压力循环之前向所述管状物内引入一种试剂和/或一种酶。

15. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述的样品是细针活检样品。

样品制备装置及方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于2014年5月30日递交的美国临时申请号为62/005,662的优先权的权益,其全部内容在此通过引证并入本文。

技术领域

[0003] 本申请一个或多个方面涉及的是样品制备,更为详细地,涉及的是用于处于密闭的容器中的样品的机器裂解的装置和方法。

背景技术

[0004] 生物或环境样本的分析通常需要样品衍生分子存在于溶液中。然而,多种类型的样品(动物或植物组织、土壤样品等)具有一个相对牢固的结构,其感兴趣的分子被包含在细胞和细胞外基质中,因此其是不可用于溶解的。难以提取的样本的实施例可以是植物种子、完整的昆虫以及纤维组织等。用于分析这种样本的制备通常涉及通过研磨、均质化或者在适合的试剂中进行浸渍操作来使抽样结构进行机械裂解。

[0005] 虽然多数分析方法中抽样分子的分离和检测是高度自动化的,但其最初样品制备步骤通常需要操作人员参与和手动操作。一般来说,大的样本和单细胞生物的悬浮液,例如哺乳动物或植物细胞培养、细菌或真菌,是在大规模批量模式或连续高流量均质机中处理的,或者使用高能超声系统,也成为超声空化。少量的细胞悬浮液的小组织样品在这些设备中难以有效处理。由于分析方法的敏感性增加、发现研究或临床诊断应用需要对越来越多的少量的生物材料(例如小组织活检)进行分析,制备这种用于分析样品的新方法是必需的。然而,小样品的处理的专用设备是有限制的,例如较低的均质化效率、样品丢失或操作者接触到潜在的危险样品等。

发明内容

[0006] 根据一个或多个方面,样品制备装置可以包括具有内部表面、顶部和被用于样品制备的压力腔室接收,可拆卸地连接到所述管状物的顶部的端盖,以及从所述端盖延伸进入所述管状物的锥形伸长部件,所述的锥形伸长部件配置用于与所述管状物的内部表面和在所述管状物的底部的样品接触,其中所述管状物是可变形的,似的在压力的操作下,所述的管状物相对所述锥形伸长部件变形,从而促进所述样品的裂解。

[0007] 根据一个或多个方面,样品制备试剂盒可以包括具有孔的阵列的多孔板,每个孔包括内壁和底部,所述的多孔板配置用于在每个孔的底部包含样品并被用于样品制备的压力腔室接收,衬垫配置用于与所述多孔板配合从而为每个孔形成端盖,多个锥形伸长部件从所述衬垫延伸进入所述孔的阵列,所述的锥形伸长部件配置用于与所述孔的内部表面和所述孔的底部的样品接触,其中所述的多孔板是可变形的使得在压力的操作下,所述的孔相对于所述锥形伸长部件变形从而促进所述样品的裂解。

[0008] 根据一个或多个方面,样品制备方法可以包括将样品引入到具有内壁、顶部和底

部的管状物内,所述的管状物配置为被用于样品制备的压力循环技术系统接收,可拆卸地将端盖连接到所述的管状物上,所述端盖包括延伸进入所述管状物内的锥形伸长部件,所述的锥形伸长部件配置用于与所述管状物的内部表面接触以及将所述样品限制在所述管状物的底部,使所述管状物承受循环压力,所述的循环压力从升高的流体静压P1变化为实质上较低的压力P2,使得所述的内壁和管状物的底部交替地压缩所述的锥形伸长部件和对所述锥形伸长部件解压,从而促进所述样品的裂解,在压力循环之后,从所述样品中分离出一种成分并将所述分离后的样品成分引入下游的分离和/或分析设备。

[0009] 下述详细讨论了本申请的其他方面、实施方案以及这些示范性的方面和实施方案的优点。在此公开的任何实施方案可以以任何方式与在此公开的至少一个对象、目的和需求一致的其他方案结合,参考“一个(an)实施方案”、“一些实施方案”、“一个可替换的实施方案”、“不同的实施方案”、“一个(one)实施方案”或者类似的并不一定是相互排斥的,其是为了表明在至少一个实施方案中可能包括的与所述实施方案连接的特定的特征、结构或者特性。这些术语的出现并不一定都是指相同的实施方案。所包括的附图是为了提供说明和各方面和实施方案的进一步理解,其被并入并构成说明书的一部分。附图,连同说明书的其他部分,用于解释所描述和要求的方面和实施方案的原理和操作。

附图说明

[0010] 在下文中讨论的至少一个方案的各方面参考以下附图,所述附图并未按照比例绘制。所包括的附图是为了提供说明和各方面和实施方案的进一步理解,其被并入并构成说明书的一部分,但不应视为任何特定实施方案限定的定义。附图,连同说明书的其他部分,用于解释所描述和要求的方面和实施方案的原理和操作。在所述附图中,在不同附图中示出的每个相同或基本相同的部件使用相同的序号。为了清晰的目的,不是每个部件在每幅附图中都被标记。在附图中:

[0011] 附图1-2c是根据至少一个实施方案的代表性的视图;

[0012] 附图3是根据至少一个实施方案的示意图;

[0013] 附图4a和4b是当除了被支撑的顶部端盖外所有侧面受到流体静压时,根据至少一个实施方案的侧视图;

[0014] 附图5a和5b是相对于所述样品每个方向上受到均匀的流体静压时,根据至少一个实施方案的侧视图;

[0015] 附图6是根据至少一个实施方案由于流体静压引起的演示容器变形的计算机生成的模型;

[0016] 附图7a和7b是根据至少一个实施方案的收缩和扩张的插入物的侧视图;

[0017] 附图8a是根据不同实施方案的插入物形状的侧视图;

[0018] 附图8b是根据本发明的方面具有的四个样品均质化结果;

[0019] 附图9是根据一个实施例显示插入物直径大小和蛋白质产量之间的关系的图表;

[0020] 附图10是根据一个实施例显示在压力循环的数量和蛋白质产量之间的关系的图表;

[0021] 附图11是根据一个实施例的至少一个实施方案显示压力、压力循环的数量和蛋白质产量之间的关系的图表;

- [0022] 附图12a和12b是根据一个实施例显示样品大小和蛋白质产量之间的关系的图表；
- [0023] 附图13是根据一个实施例显示插入物、超声处理的插入物和仅超声处理的效果的图表；
- [0024] 附图14是根据一个实施例的比较插入效果的图表；
- [0025] 附图15是根据一个实施例显示具有插入物的压力循环和不具有插入物的压力循环的蛋白质产量之间的关系的图表；
- [0026] 附图16是根据一个实施例显示压力值和蛋白质产量之间的图表和表格；
- [0027] 附图17是根据一个或多个实施方案的可变形端盖和伸长部件组件的示意图；以及
- [0028] 附图18是根据一个或多个实施方案的盒子托架的示意图。

具体实施方式

[0029] 根据一个或多个实施方案，各领域中的前端样品制备可以在样品分析之前进行，例如基因组学、蛋白质组学、转录组学以及代谢组学等。用于样品制备的各种实施方案可以被用于与压力循环技术(PCT)结合，从而增强蛋白质、DNA、RNA、脂质和小分子，以及分子复合物(例如，亚细胞器、染色质、多聚核糖体、肌原纤维、模组分等)从固体组织中的提取，尤其是相对较小的样品中的提取。在PCT技术中，当样品受到在流体静力反应室中的环境压力和高压的交替循环时，裂解发生。例如，高压可以在大约20,000psi到大约100,000psi的范围内。根据不同的实施方案，压力可围绕杆插入物压缩非刚性管状容器，使得所述管状容器的壁移动接近所述的杆的表面并压碎样品材料。样品材料的其他机械裂解导致了更为有效的样品制备过程。在一些实施方案中，相对于所述管状容器来说，需要没有直线运动，例如进出运动(in-and-out motion)，或者所述杆的圆周运动，以此促进样品制备。在至少一些实施方案中，来自压力生物科学公司(Pressure Biosciences, Inc)的商业上可用的**Barocycler**®PCT机器可用于促进样品压缩，从而在样品制备期间导致增强的样品裂解。在一些实施方案中，在样品制备期间，所述的操作者并不手动操作插入件。各种分离和分析步骤可以在下游进行。举例来说，可以实施色谱分离、质谱分析和数据分析方法。在至少一些实施方案中，充足的蛋白质可能被有益地释放用于以前在常规设备中不易处理的细针活检样品的下游的质谱分析，其导致了样品材料损失和交叉污染。一些实施方案可能被发现于生物标志物的发现、诊断、法医学、药物发明和设计、生物治疗特性、土壤&植物生物学、疫苗开发和组织学应用等领域中使用。

[0030] 根据一个或多个实施方案，流体静压和/或机械力可用于裂解。伸长部件，例如杆，永久地或可拆卸地连接到端盖上，可便于样品制备。在一些实施方案中，变形是由来自四周的均匀的流体静压引起的。在其他实施方案中，当端盖被固定在顶盖上时，变形是由来自底部和/或侧面的压力引起的。在一些实施方案中，变形是由从顶部通过柔性端盖的具有附着的杆的压力引起的。所述的管状物可以在刚性孔中支撑。在其他的实施方案中，变形是由从顶部通过柔性端盖的具有附着的杆的机械力引起的。所述的管状物可以在刚性孔中支撑。在其他的实施方案中，变形可以是通过从顶部通过柔性端盖的具有附着的杆的压力引起的。

[0031] 根据一个或多个实施方案，样品可以被放置到样品容器中，例如来自压力生物科学公司的商业上可用的PCT_uTube™。所述的样品容器的尺寸和形状一般可与PCT设备一致。

所述的样品容器可以由任何惰性材料制成,一般与预期样品一致且一般可承受PCT处理。在至少一些实施方案中,所述的容器可由在非常高的流体静压下显著收缩的材料制成。所述的材料一般为非刚性的。所述材料也可以在宽泛的温度范围内保持完整性,例如从-200℃到100℃。化学抗性和可忽略的蛋白质和核酸吸附有助于确保几乎完整的样品回收,这对小样本来讲尤为重要。举例来说,所述的容器可由氟化乙烯丙烯共聚物(FEP)塑料制成。在一些实施方案中,所述容器的表面,例如内部表面,可被改进从而提供感兴趣的分子(例如,蛋白质、核酸或脂类)的选择性结合,并在样品均质化期间促进所述分子的富集。

[0032] 根据一个或多个实施方案,任何样品有利于在此描述的样品制备可使用的类型。在一些实施例中,所述的样品可以是聚合物材料。例如,所述的样品可以是丙烯酰胺或者琼脂糖凝胶。在一些实施方案中,所述的样品可以是生物样品。例如,所述的生物样品可以是植物样品、动物或微生物细胞样品,或者组织样品。在一些实施方案中,所述的组织样品可以是心脏或者骨骼肌组织、脉管组织、皮肤组织、肿瘤组织以及软组织的至少一种。例如,所述的软组织可以是肝、脾、脑、肺、肠或胃组织。组织样品可以在外科介入期间通过穿孔或穿刺活检的方式从有机体中提取,在培养基中生长,或者通过固定和随后移除固定剂和存储基质获得。样品也可以通过激光捕获显微切割技术从固定的或新鲜冷冻病理切片中获得。样品也可以表现为整个有机体(节肢动物、线虫等)以完全适合样品容器。在至少一些实施方案中,所述的样品可以是活检组织样品,例如来自于小针穿刺活检或者穿孔活检。所述的样品可能涉及的是正常或者病变的标本,从而辅助精准医疗。在其他实施例中,待同质化的标本可以是过滤纸的穿孔上的干燥的血点、含有上皮细胞的药签(swab)、含有触摸样品的法医学上的药签、聚丙烯酰胺或者琼脂糖凝胶的穿孔后的蛋白质或核酸点/带。所述的样品可以是固体的、凝胶的、半流质的或者悬浮的。

[0033] 相对较小的样品可以被所述样品容器容纳。例如,样品量可以少于大约30mg。在一些实施方案中,样品量可以小于10mg。在至少一些实施方案中,样品量可以在大约0.5到大约3.0mg的范围内。在其他实施方案中,样品量可以是只有一个或几个细胞。除了容纳小样品量以外,样品损失可以被最小化。热量和/或高剪切应力的产生也是可以避免的,从而保持提取组分的完整性。

[0034] 根据一个或多个实施方案,随后,一种或多种试剂可能被引入所述的样品容器。可使用移液管来实现该目的。可使用相对较低的提取试剂的体积,例如,低至大约20μL到大约30μL。多种试剂可以实现。所述的试剂可以是,例如,常用于蛋白质提取的任何试剂,例如,RIPA缓冲液、尿素缓冲液、盐酸胍缓冲液、磷酸盐缓冲液或者有机溶剂。其他的缓冲液和试剂,例如,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、Tris-EDTA缓冲液(TE)以及碳酸氢铵也可以使用。在一些实施方案中,在样品裂解之前可将内源酶活性的特异性抑制剂添加到提取缓冲液中从而保护样品成分免于暴露和损坏,在所述样品裂解或溶解的过程或在完成期间,内源酶被释放。

[0035] 根据一个或多个实施方案,可向所述样品容器中引入一种或多种酶。所述的酶可以是天然存在的或者设计合成的。代表性的酶可以包括胰蛋白酶(trypsin)、N-糖酰胺酶F(PNGase F)、内蛋白酶赖氨酸-C(Endoprotease Lys-C)、糜蛋白酶(trypsin)、内蛋白酶Glu-C。代表性的酶也可以包括,例如,内蛋白酶Asp-N、内蛋白酶Arg-C、胃蛋白酶(pepsin)和木瓜蛋白酶(papain)等。

[0036] 试剂也可以包括用于同时消化某些样品成分的酶。在一些实施方案中,所述的酶可以是用于消化样品中的DNA的脱氧核糖核酸酶(DNase),或者用于消化RNA的核糖核酸酶(RNase)。在一些实施方案中,所述的酶可以是benzonase核酸内切酶,或者一般的蛋白酶,例如链霉蛋白酶(Pronase)或者蛋白酶K(Proteinase K),用于无用的蛋白质的消化。在其他实施方案中,所述的酶可以是特异性蛋白酶,例如,用于样品样肽分离的胰蛋白酶,或者用于细菌或真菌细胞壁的溶解的酶,例如,溶菌酶(lysozyme)和消解酶(zymolase)。

[0037] 根据一个或多个实施方案,在所述的容器内至少可以在所述的样品的上方留有一定量的空气,以便提供可压缩性,从而允许所述管状物的变形,正如在此所讨论的那样。当所述的样品容器被适当填充时,样品材料和试剂可以填充大约2/3样品容器。剩余的1/3样品容器可以填充剩余的空气。

[0038] 根据一个或多个实施方案,然后,一个伸长部件可以引入到被填充的样品容器中以便于有效分解软组织从而通过压力驱动的机械解体来增强细胞溶解。在一些非限制性实施方案中,所述的伸长部件一般可为锥形,例如,与杵相似。本文实施的可以是各种尺寸和形状的。所述的伸长部件可以由任何材料制成。在一些实施方案中,所述的伸长部件可由惰性材料制成。在一些实施方案中,所述的伸长部件可以包括一个部件,其可专门与感兴趣的样品成分结合,例如,富集或纯化所述样品。所述的材料一般要比所述的样品坚硬,目的是在样品制备期间使其裂解。在一些实施方案中,为了实现相同的目的,所述的材料也可以是与非刚性容器的坚硬程度等同或比其硬。在至少一些非限制性实施方案中,所述的伸长部件可由聚四氟乙烯(PTFE)制成,例如,杜邦公司(DuPont Corp)的商业上可用的Teflon®。手动工具或者机械手可用于将所述的伸长部件插入所述的样品容器。所述的伸长部件可整体耦合或者可拆卸地耦合到样品容器的可变形端盖。

[0039] 根据一个或多个实施方案,所述样品容器和伸长部件的其中之一或二者通常可为一次性使用的。因此,二者之一或二者可为一次性的,例如,消耗品。二者之一或二者可批量性的单独提供。可替换的,也可以提供二者之一或二者的阵列,例如以支架形式。例如,多个样品容器和/或伸长部件可以标准形式提供,例如,96单元支架,其与标准样品制备和分析设备一致从而便于使用。在一些实施方案中,所述的样品容器可以包括可写表面。

[0040] 根据一个或多个实施方案,被填充的样品容器包括插入的伸长部件,然后其可以被放置并固定到PCT腔室。在一些实施方案中,多个样品容器可以被放置到PCT盒中用于多样品处理。然后,所述的盒可被放置到所述的PCT腔室。然后,PCT程序可在PCT设备上运行。在一些实施方案中,所述的PCT程序可涉及的是从升高的流体静压P1变化为实质上较低的压力P2的循环压力。在至少一些实施方案中,所述的PCT设备可以是如上所述的Barocycler®。在至少一些实施方案中,所述的PCT设备和/或PCT程序和/或样品容器可根据美国专利号6,111,096、6,120,985和7,626,017,以及美国公开号为2010-0281955-A1中任一专利申请所描述,上述所有美国专利均被转让给压力生物科学公司,其全部内容在此全部并入本文。

[0041] 在所述的PCT程序完成时,所述的PCT腔室可被打开,均质化的样品可被取回用于进一步处理、分离、提取和/或分析。均质化的样品可以包括与原始样品材料的结构不同的结构。在一些实施方案中,所述的细胞间基质和器连接可能被分解。在一些实施方案中,所述的细胞膜可能被破坏,从而将蛋白质、脂类、膜、细胞器、细菌、病毒以及核酸等成分释放

到所述的溶剂或提取试剂中。

[0042] 在至少一些实施方案中,PCT适配器工作站可用于简化处理。试剂盒可以是符合人体工程学设计的,其包括使用户能够一次处理多个样品的工具和硬件。例如,如上所述的PCT盒或样品架可被组装从而接收一个或多个样品容器。所述的盒可以支撑堆叠的阵列并允许通过基于阵列和/或等级(level)的唯一位置来识别样品。所述的盒可以将所述的端盖楔入所述管状物的顶部部分以及将所述管状物的顶部部分楔入所述的孔中以确保当流体静压的作用下发生管状物的变形时,每个管状物是紧密密封的。试剂盒可以包括,例如,一个或多个样品管状物和一个或多个伸长部件。所述的试剂盒也可以包括其他部件,例如,试剂源和/或酶源。

[0043] 在操作过程中,样品可以被所述伸长部件的一端包围在样品容器的底部。正如在此进一步讨论的那样,由于样品容器在所述伸长部件上、围绕所述伸长部件和/或紧靠所述伸长部件的变形,随着每个压力循环,所述的样品被压碎。这种机械作用,与高压下的缓冲液的提取能力相结合,导致了有效的均质化和提取。在高流体静压之下,空气也完全溶解到水中,这也有利于样品的制备。

[0044] 可使用一个或多个实施方案作为替换的或者使用高能量的机械破坏过程作为替换,例如,均质化、超声空化(超声降解法)以及振动珠磨(vibrational bead beating)等。在一些实施方案中,本文提出的装置和方法可以与样品的机械压碎力结合,所述的机械压碎力是将所述样品通过窄的环形缝隙反复按压在刚性表面上,由于所述样品容器和伸长部件的相对性状,其形成了在封闭容器内的抽样的均质化,相当于或优于由常规方法裂解的样品。

[0045] 根据一个或多个实施方案,完全封闭的单一的一次性容器的使用可被用于样品采集、机械破坏、保证样品完整性的提取、连续保管、防止污染,以及保护使用者免受潜在危险样品材料曝光。本文讨论了在伸长部件插入物和样品容器之间产生直线运动的各种装置和方法,同时保持所述的样品紧密密封,用于通过可控的机械破坏作用对生物样品成分进行提取。

[0046] 根据一个或多个实施方案,用于分析的样品可以使用在此描述的用于提取的装置和方法在封闭系统中制备。在一些实施方案中,在样品制备之前,溶解或提取缓冲液被加入到所述的样品容器内。溶解或提取缓冲液的选择基于期望的分析应用。例如,提取缓冲液可基于样品制备对酶联免疫吸附试验(ELISA)或蛋白质印迹法(Western Blot)的确认来选择。在一些实施方案中,样品可被压碎、均质、制成泥、浸渍、混合、淆杂,或者以其他方式因其他目的被机械操作。

[0047] 通过可控的机械破坏作用,样品被均质化且组分被提取。在一些实施方案中,可控的机械破坏作用可通过具有相对坚硬的插入物附着的弹性端盖的强制位移产生。所述的插入物可以是本文描述的伸长元件。在不同的实施方案中,所述的插入物可以描述为活塞、柱塞、撞锤(rammer)、扩孔器(reamer)、捣碎器(masher)、木槌(mallet)、冲击器(impinger)、杵或者粉碎机(disrupter)。所述的插入物具有附着到端盖的第一端,以及配置用于与用于制备的样品接触的第二端。所述的端盖可以密封所述的样品容器从而使所述的样品截至与周围压力和环境隔离。在一些实施方案中,所述的端盖是弹性的,以适应因流体静力压缩引起的线性变形。在至少一个实施方案中,所述的端盖可以是插入物的一部分。在其他实施方

案中,运动可由诱导样品孔收缩的压力产生,其可使孔的底部接触到所述插入物的尖端。所述的压力可以一次或重复使用,例如在一个或多个压力循环中,来优化所需样品的破坏的水平。在不同的实施方案中,所述的样品孔可称为容器(container)、容器(vessel)、支架(holder)或者管状物。本文公开的一些实施方案中,所述的样品孔可以由弹性或变形材料制成。在一些实施方案中,所述的样品孔的弹性模量在大约80,000psi到100,000psi。在其他实施方案中,其可以为半刚性或刚性材料。例如,所述的样品孔可以是聚四氟乙烯(PTFE)或氟化乙烯丙烯共聚物(FEP)。所述的样品孔可以比样品材料坚硬。例如,所述的样品孔可以具有至少R55的洛氏硬度(Rockwell)。

[0048] 所述的插入物一般可以由比样品更为坚硬的任何材料制成。在一些实施方案中,所述的插入物可由坚硬的材料制成,例如不锈钢等金属合金、玻璃、陶瓷或者聚四氟乙烯®(Teflon®)。可替换的实施方案可能涉及的是将坚硬的物体或者砂砾插入所述的孔中,从而增加坚硬的表面的硬度。在一些实施方案中,插入物的直径可以大大减小并可以暂时悬浮在样品容器的柔性膜上。在所述端盖上方的部件或者端盖的薄片,例如薄膜或垫子,可以沿所述膜的内圆周以圆周运动施加压力,从而在水平平面内产生振荡运动。在另外的实施方案中,在所述端盖上方的部件或者端盖的薄片,例如薄膜或垫子,可以以往复垂直运动施加压力,例如在封闭的容器内将相同运动传递到所述的伸长部件。

[0049] 在样品已被均质化后,提取的组分可以被转移到用于细胞和组织成分的检测和量化、药物或环境污染物及其代谢产物的下游分析方法。在一些实施方案中,提取的组分的下游分析可以通过使用凝胶电泳、蛋白质印迹(Western Blotting)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、化学亲和力或者免疫亲和性的富集实现。在一些实施方案中,提取的组分的下游分析可以通过使用色谱法(例如,薄层分析法、气相色谱和高效液相色谱法)、微阵列、质谱或串联质谱法(例如,液相色谱-质谱法和液相色谱-串联质谱法)实现。在一些实施方案中,提取的组分的下游分析可以通过使用聚合酶链反应和短串联重复法实现。

[0050] 在一些非限定性的实施方案中,一次性插入物可以通过柔性盖垫(通常是硅或者类似材料)以所需的阵列(通常为9mm间距)保存。所述的盖垫可以作为阵列的样品孔的平面的端盖。当所述的盖垫受力或受到压力,所述的盖垫可以变形并推动所述插入物进一步进入到相关的孔中,导致在每个孔中的内容物的均质化的动作。在一些实施方案中,所述的孔可在具有与每个孔的轮廓匹配的单独腔室内在支架内被支撑。所述的支架可由刚性材料制成,例如塑料或金属。在一些实施方案中,所述的金属可为耐腐蚀的。例如,所述的金属可以是黄铜、不锈钢和铝的至少一种。所述的支架的目的是支撑所述的孔和防止孔壁的撕裂,并促进所述容器和所述端盖之间的干涉配合和在所述容器、所述端盖或二者同时的变形期间维持密封。在一些实施方案中,可以没有支架的存在。

[0051] 在一些优选的实施方案中,所述孔的支架的位置可以是固定的,并且可以向所述盖垫施加一个力或者压力以形成所述盖垫的偏转,随后进行所述插入物的向下运动。向下力可由液体处理机器人的臂提供。在其他实施方案中,顶板可被固定,所述的孔或孔的支架可被移动。

[0052] 在其他实施方案中,所述的顶板和孔支架都可以保持静止,并且所述的支架可以被加压以使每个孔在径向和轴向上折叠。这也将导致所述插入物的尖端和所述孔的底部之间的空间被减少。在一些实施方案中,非常高的流体静压,例如大约10,000psi,或者更大的

流体静压,例如20,000psi,或者更大的流体静压,可被施加从而加强提取。施加到所述样品容器的最小的压力可能取决于试样的性质。举例来说,施加到所述样品容器上的最小压力可能取决于所述试样的硬度。施加到所述样品容器上的最小压力可能取决于所述样品容器和所述插入物的组合物。在一些实施方案中,所述最小压力可能是5000psi。施加到所述样品容器上的最大压力可能取决于所述设备的技术规格。在一些实施方案中,所述最大压力可能是100,000psi。在一些实施方案中,最大压力可能被施加到所有样品上,除非所需的是部分均质化。在本文讨论的其他实施方案中,所述的插入物可被扩张展开从而导致所述样品的机械破坏。

[0053] 根据一个或多个实施方案,样品制备过程可以在与现代流通处理设备兼容的隔离容器和样品容器阵列中进行。例如,样品容器可以以中心距测量间隔大约9mm的间距的阵列布置。这可与用于微孔板的ANSI-SBS标准兼容。在一些方面,所述的技术可能涉及样品没有旋转的机械故障。样品制备和后续的用于分析的提取可能都在封闭或密封的容器中进行,实质上与外部环境隔离。

[0054] 根据一个或多个实施方案,可以根据特定情况修改所述的管状物的间距和阵列结构。例如,代替9mm间隔的矩形阵列的是可以使用一些其他的间距的圆形阵列。

[0055] 这种技术可同时施用于大量的样品用于高吞吐量的处理。举例来说,在工业标准格式排列的样品,如96孔PCR板可被处理。在一些实施方案中,使用的是96孔美国国家标准微孔板。基座足迹的外部尺寸在外角的1.7mm内测量,其可以是大约127mm长、大约85mm宽。所述板的底部法兰的四个外角可能有一个大约3mm的外侧半径。如上所述,所述的孔可以以中心距间隔大约9mm间距的阵列排布。所公开的机制能够从感兴趣的生物样品中提取蛋白质、DNA和其他分析物,包括RNA和脂类。值得注意的是,根据不同的实施方案,传统的研钵和杵的旋转动作并不是必须的。在某些实施方案中,线性运动也不是必须的。

[0056] 热量和/或高剪切应力的产生可以避免提取的组分的完整性。在一些实施方案中,所述过程的温度是由护套(jacket)、珀尔帖(peltier)或其他类型的冷却器主动维护的。在一些实施方案中,所述的护套可含有水、防冻液或任何其他液体。在压力循环过程中,由于水的压缩和样品被淹没在水中,绝热生成相对较低。例如,如果所述的过程是在室温下进行的,且水作为压力介质,则绝热产生可能在大约1°C到大约20°C之间。与此相反,在样品均质化的典型的机械方式中,设备的动能被转换为所述样品的内部能量,或者热量。同样的,超声波均质化使用空化能量来破坏样品组分。空化也会将动能变成热能。在样品均质化和空化的传统机械方式中,如果不是间歇冷却,样品可能会达到100°C。

[0057] 在一些实施方案中,如附图1、2a-2c所示,待破坏的小试样105被限制在所述样品容器101的底部和插入物部件102之间形成的窄腔104中,直到其通过在所述插入物部件和容器壁之间的环形间隙6进入在所述插入物部件上方的空间107被挤压。这个过程可以由所述插入物部件在垂直尺寸上的往复运动驱动,如附图2所示。所述的插入物部件被附着到所述的可变形的端盖材料103上,其中所述的可变形的端盖材料103具有足够的柔性以使此运动发生。在一些实施方案中,施加到所述柔性端盖上的机械力可促进所述插入物的运动。在其他实施方案中,将带有样品、提取溶液和剩余空气的整个封闭的容器放置到流体静压容器中并受到交变的流体静压循环。柔性端盖103的柔性变形是由于所述试样容器的内外部压力差造成的,进而导致所述插入物部件在所述试样容器内部的往复运动,同时所述容器

保持紧密闭合。

[0058] 在一些实施方案中,如附图3所示,插入物支架309被附着到可变形的端盖材料303上。插入物之间的形状和尺寸设置为在插入物部件302的近端接收和支撑插入节点308。

[0059] 在其他的实施方案中,如附图4和5所示,所述的样品容器用不可变形端盖封闭,其延伸进入所述的容器并包括所述的插入物部件。当封闭的管状物受到高流体静压时,所述的管状物变形并且其尺寸变小。所述插入物部件的尺寸,其由较少的可压缩材料制成,保持相对不变。由于所述管状物相对于所述插入物部件的轴向运动,样品材料在所述插入物部件和管壁之间被压缩并通过由此产生的环形间隙挤压。所述管状物内空气的存在导致了所述的管状物相对于所述插入物部件的更大的压缩,从而导致更大程度的机械运动和样品均质化。在其他实施方案中,交替形状的插入物主体包括凹入区域,从而允许更多的空气保留在封闭的管状物内。从外部压缩的管状物的FEA计算机模拟(附图6)确定了轴向收缩和扩张在交替的流体静压条件下是所述管状物的优选变形。具体到所述管状物设计和材料的可压缩性或其他参数可能影响所述变形的性质。

[0060] 附图4a提出了由于流体静压的应用涉及局部收缩的示意图。施加压力后,样品容器401的壁压缩到压缩后的样品容器421。此外,样品402被挤压到所述的壁从而产生均质化的样品422。

[0061] 附图4b提出了由于流体静压的应用涉及局部收缩的示意图。在所述壁的下部的流体静压导致了孔的径向收缩、孔长的轴向收缩和样品向上的移动并经过所述的插入物。每个试样被放置到多孔样品容器412的单独的可变形壁中。随后,孔的阵列被容器端盖阵列413关闭,其中容器端盖阵列413含有附着其中的刚性插入物414,其伸入到每个孔中。在每个孔建立密封之后,整个多孔容器被放置到流体静压腔室411中并用刚性腔盖410关闭。然后,加压流体被引导进入所述的压力腔室415,包围所述的样品孔,造成样品孔壁对刚性插入物的压缩,导致试样破碎和均质化。如果需要的话,所述的过程可重复多次。在该实施方案中,由于所述的端盖阵列被支撑在刚性腔盖上,其并不会显著变形。

[0062] 附图5a提出了涉及均匀流体静力收缩的示意图。当施加压力时,样品容器503的壁压向压缩的样品容器523,并且可变形端盖508压向压缩的可变形端盖528。除此之外,样品507压在所述的壁上从而产生均质的样品527。

[0063] 附图5b示出了涉及均匀的流体静力收缩的示意图。每个试样被置于多孔样品容器503的单独的可变形孔中。随后,每个孔被可变形的容器端盖阵列504封闭,其中所述的可变形的容器端盖阵列504含有附着的刚性插入物505,其伸入到每个孔中。在每个孔的密封建立之后,整个多孔容器被放置到流体静压腔室502中并由腔盖501封闭。然后,加压的流体被引导进入压力腔室506,包围所述的样品孔,造成样品孔壁对刚性插入物的压缩,导致试样的粉碎和均质化。除此之外,在容器端盖阵列之上的流体静压造成所述单独的端盖向每个孔的内部变形并进一步均质化所述的试样。如果需要的话,该过程可以被多次重复。

[0064] 在一些实施方案中,插入物可以穿过端盖并通过压缩来密封,即隔膜。这将允许向所述过程中添加旋转动作,然后所述的插入物可以独立于端盖移动。

[0065] 附图7a和7b示出了涉及扩展的插入物的实施方案。端盖/插入物组件的组合可以通过压力的膨胀径向扩展。这可以粉碎在所述插入物和所述孔的壁之间的样品。所述的孔可被支撑以使其不能移动。端盖(704)和插入物(705)组件的组合的使用,可通过压力膨胀

来进行轴向和径向的扩展。扩展所述的插入物将粉碎在所述插入物和所述孔的壁之间的样品。所述的孔壁(703)将被支撑在刚性块(701)上,因此其不能够向外移动。通过在模块盖(702)中的歧管(707),流体或气体进入所述的插入物内部腔室(706),膨胀被介导。

[0066] 根据一个或多个实施方案,装置可以与多个下游的反应步骤集成,例如,在样品均质化后的还原、烷基化和酶消化等。均质化的样品可以保持在所述的样品停留在所述的样品管中,同时端盖包括减小尺寸的伸长部件,如长度可用于为所需实际的逐步添加提供更多的空间。

[0067] 这些实施例和其他实施例的功能和优点将通过以下非限制性实施例来更为充分地理解。所述的实施例的目的在性质上是说明性的,其不应被视为在此讨论的实施例的保护范围的限定。

[0068] 实施例

[0069] 实施例1:优化插入物形状

[0070] 肾组织样品被放置在用于分析制备的样品容器中。大约3-6mg的肾组织样品被放置到8个样品容器的每个中。所述的样品容器被放置到充满水的腔室中,其在20,000psi的压力下加压10个循环。每个循环包括20秒处于20,000psi,随后10秒处于大气压力。组织破坏的程度进行了视觉评估。如附图8b所示,未粉碎的组织块是深色的并保留在所述管状物的底部。粉碎的组织均浆为浅色的并沿所述管状物的壁被粉碎。

[0071] 如附图8a和8b所示,至少几种插入物形状是可以使用的。如附图8b所示,间隙尺寸对样品均质化的程度的影响进行了评估。样品管状物内径保持不变,为0.125"。通过改变插入物的直径,插入物和管状物的壁之间的间隙的量被改变。使用直径为0.100"、0.112"和0.124"的直的插入物表明在插入物和管状物的壁之间的紧密配合对良好的组织破坏是必要的。具有相同尖端直径的不同形状的插入物的比较表明了所述样品挤压通过在插入物和管状物的壁之间的环形间隙有助于显著的均质化机制。本实验还表明了在本设计中,所述尖端的直径是重要的因素。使用锥形的插入物具有附加的优点,所述管状物内部的可用的样品体积大于使用直的插入物,从而导致了在加压期间更大程度上的管状物的变形。

[0072] 实施例2:优化插入物配合

[0073] 各种直径的锥形插入物被用于均质化肝组织样品。肝组织样品被放置到内径为0.125英寸的样品容器中用于分析制备。大约0.5到大约1.5mg的肝组织样品被放置到80个样品容器的每个中。所述的样品容器被放置到充满水的腔室中,其在35,000psi下加压60个循环。每个循环包括20秒在35,000psi,随后10秒大气压力。组织破坏的程度被视觉评估,同时,所提取的蛋白质的产量通过Bradford法测量并通过每毫克(mg)组织重量的微克(μ g)蛋白质表示。附图9示出了尖端直径(因此,也可表示所述环状间隙的尺寸)对组织破坏和从所述组织试样中提取蛋白质的效率的影响的效果。使用不同直径的锥形插入物表明了太紧的配合导致了低效的组织破坏,可能是由于将组织压紧在管状物的底部,并且不允许足够的间隙用于组织被沿着所述管状物的侧壁向上挤压通过所述插入物的尖端。在附图9中可以看出,在0.118-0.122英寸之间的插入物直径产生的蛋白质产量高于在0.114-0.118英寸之间的插入物直径。在0.114-0.118英寸之间的插入物直径产生的蛋白质产量高于在0.110-0.114英寸之间的插入物直径,而在0.110-0.114英寸之间的插入物直径产生的蛋白质产量高于在0.122-0.126英寸之间的插入物直径。

[0074] 实施例3:优化压力循环的数量

[0075] 大约0.6-1.7mg的大鼠肝脏的样品和大约30 μ l的IEF提取试剂(在去离子水中的7M尿素、2M硫脲和4%CHAPS)被加入到每个管状物中。在指定的循环数目下,在35,000psi的压力下进行压力循环破坏。阴性对照是不间断的组织块,其被允许可以浸泡在所述

[0076] 附图10示出了压力循环的次数对蛋白质提取效率的影响。锥形插入物被用于在高压管状物压缩产生的样品破坏期间组织均质化发生过程中检测所述机制。

[0077] 样品以不同长度的时间被均质化,其使用了高压为35,000psi和低压为大气压力的0、10、60或99个循环。所述的样品保持在所述的管状物内的总时间保持不变,只有压力循环的数量是变化的。如附图10所示,相对于总量为10的压力循环,总量为60的压力循环产生了较高的蛋白质产量。通过使用99个压力循环减少样品破坏中的蛋白质产量,过度均质化的效果是明显的。这种过度均质化的效果可能是由于蛋白质聚集或沉淀,同时在高流体静压下处于部分展开状态。相比于没有压力循环,每种压力循环的数量) —10、60和99—产生了更大的蛋白质产量。

[0078] 实施例4:优化压力循环的压力和数量

[0079] 少于2mg的大鼠肝脏的样品和30 μ l的IEF提取试剂被加入到每个管状物中。在指定的循环数目下,作为指定压力,使用锥形插入物在35,000psi的压力下进行压力循环破坏。阴性对照的处理与试验样品相同,但不进行压力循环。

[0080] 附图11示出了膨胀/收缩循环的压力和数目对从组织样品中提取蛋白质的效率的影响。

[0081] 样品使用不同程度的压力和循环数目进行均质化。所述的样品保持在所述的管状物内的总时间保持不变,只有压力循环的数量是变化的。通过使用99个压力循环略微减少样品破坏中的蛋白质产量,过度均质化的效果是明显的。这种过度均质化的效果可能是由于压力诱导蛋白质聚集或蛋白质沉淀。相比于10,000psi,35,000psi处理后的样品的蛋白质产量略微改善,这表明了在较高的压力之下,更为剧烈的管状物压缩可以导致稍好的组织均质化。

[0082] 实施例5:减少样本大小优化效率

[0083] 解冻后的大鼠肝脏和心肌组织样品用PBS冲洗和吸干后称重(每组n=6)。大约30 μ L的裂解缓冲液被加入到每个样品中。如附图12a所示,使用所述的锥形插入物,相比于较大的样品(每个样品5-10mg),将每个样品的样品质量减少到 $\leq$ 2mg得到更佳的产量(如以每毫克组织质量的微克蛋白质测量)。如附图12b所示,当使用类似的质量和体积条件时,使用所述的锥形插入物以使用阳性对照的产量类似的压力从肝脏组织获得的蛋白质产量(在附图中标记为“微杵”)。阳性对照是使用一次性塑料杵手动均质化的。阴性“浸泡”对照并没有以任何方式断开,所述组织在裂解缓冲液中以与其他样品相同的总时间孵育。插入物被用于压力循环。

[0084] 实施例6:相比于声波降解法,插入物更为有效

[0085] 肝脏组织在IEF中使用常规协议(在40,000psi下60循环)、单独使用声波降解法(在超声浴中2x30s)或二者结合(40,000psi下30循环对30s声波降解与40,000psi下30循环对30s声波降解)提取。所有样品包括在30 μ L裂解缓冲液中 $<$ 2mg的组织。每组具有6个样品。

[0086] 如附图13所示,相比于两种方法的结合,常规微杵协议产生了更大的产量,而相比

于单独使用声波降解法,两种方法的结合产生更大的产量。

[0087] 实施例7:插入物的再利用对蛋白质产量的影响

[0088] 两批次插入物被用于具有大鼠肝脏组织的1-6-14。一个较老批次已经多次使用,其包含的杵具有尖端直径大约0.120英寸到大约0.123英寸。一个新的批次具有稍宽的杵直径,大约为0.127英寸,其得到了稍低的整体产量。然后,他们被清洗并重新运行14次,每次运行60循环,共840循环。每次运行时,所述的插入物从所述管状物中移除并重新插入。然后,这些相同的20个“新”插入物被再次用于肝脏组织的1-10-14。

[0089] 如附图14所示,重新使用这些插入物不会改善或损坏其有效性。除此之外,这些结果表明老批次更好,而差异性并不是由于老批次的再利用。这些结果表明了在所述样品容器和所述插入物之间的尺寸公差的重要性及所述插入物的最佳性能。如果间隙太大或太小,其均质化的结果是不好的。

[0090] 实施例8:具有插入物的压力循环与不具有插入物的压力循环的对比

[0091] 在大约0.5和大约1.5mg之间的大鼠肝脏组织的样品在PBS中冲洗和吸干后称重(每组n=12)。所有的样品(除阴性对照外)在45,000psi压力下60次循环处理。循环的长度被调整以改进在裂解缓冲液中的总培养时间。每次半分钟的循环用于0.5小时样品。每次1分钟的循环用于1小时样品。如附图15所示,没有插入物,无论所述组织样品受到压力与否,产量都是相同的,不管其他因素,例如体积(30μL对60μL)或者培养时间(0.5小时对1小时),暗示了压力循环本身并不能有效地破坏组织结构释放细胞蛋白。只有对具有所述锥形插入物的样品加压,其产量才会显著增加。

[0092] 实施例9:压力水平对具有锥形插入物的提取效果的影响

[0093] 在大约0.5和大约1.5mg之间的组织样品在PBS中冲洗和吸干后称重(除非另有说明,否则每组n=10)。30μL的裂解缓冲液添加到每个样品中。在有压力循环和无压力循环下使用插入物。压力循环是在指定压力下进行了30次循环。柱形图示出了从肝脏组织中提取蛋白质的平均±标准偏差。表格示出了从心肌组织中提取蛋白质的产量和平均值的标准差(SEM)。0kpsi对照指示的是设置具有插入物,但无压力循环。这不同于“仅浸泡”对照。如附图16所示,45kpsi的压力产生的蛋白质含量最高。

[0094] 实施例10:具有压力和插入物的提取可与其他方法相结合用于在分析前的样品制备

[0095] 如附图17所示的锥形插入物801,其是几种可互换的插入物802、803、804中的一种,其可在压力之下与样品管状物805一起使用。因此,无需将所述样品从一个容器中转移到其他容器中,其可进行以下协议,从而减少了样品损失、交叉污染和暴露于用户的风险:

[0096] 1.将组织放置到含有4M尿素的30μl裂解缓冲液的样品管状物内并用锥形插入物密封。

[0097] 2.将用插入物密封的管状物放置到盒子901中,其设计用于在Barocycler机器压力处理(附图18)期间支撑所述的管状物902。所述的盒子被设计用于保证所述管状物的安全,同时防止端盖的松动(其可能会导致样品泄漏(出)或压力介质的泄漏(入))。

[0098] 3.用压力循环处理所述样品。

[0099] 4.从Barocycler机器和盒子上移除管状物。移除所述的锥形插入物。

[0100] 5.向所述管状物内的均质化后的样品中加入10μl适当的缓冲液来稀释裂解缓冲

液中的尿素,从4M到3M。加入适当的酶,例如蛋白酶赖氨酸-C (proteinase Lys-C)。

[0101] 6. 用端盖密封所述的管状物,其中所述端盖足够长从而代替多余的空气并防止管状物在压力之下的凹陷,但是又足够短从而能够容纳所述的样品体积,并且将所述密封的管状物放置到设计用于在压力处理期间支撑所述的管状物的盒子中。

[0102] 7. 在适当的条件下使用压力循环处理所述的样品用于加速消化赖氨酸-C。

[0103] 8. 从Barocycler机器和盒子上移除管状物。移除所述的长端盖。

[0104] 9. 向所述管状物内部分消化的样品中加入100 μ l适当的缓冲液从而稀释缓冲液中的尿素从3M到0.8M。添加适当的酶,例如胰蛋白酶。

[0105] 10. 用短的端盖密封填满后的管状物,其中短的端盖用于容纳全部的样品体积。将密封后的管状物放置到设计用于在压力处理期间支撑所述管状物的盒子中。

[0106] 11. 在适当条件下使用压力循环处理所述的样品从而用胰蛋白酶加速消化。

[0107] 鉴于已经对本发明的某些用于举例说明的实施方案进行了描述,对于本领域内的任何一名普通技术人员来说是显而易见的是,上述内容仅仅是出于进行解释说明的目的,而非是对本发明的限制,而且仅仅是出于可以效仿的目的。本发明的各种不同的修改和其他的实施方案都是在本领域内的任何一名普通技术人员可以理解的范围之内的,并且完全落入到本发明的范围之内。特别是,尽管本文在此所提供的实施例中的绝大部分都包括方法步骤或系统元件的特定组合,但人们可以理解的是,所述步骤和元件都可以以其他方式进行组合,从而实现相同的目的。值得注意的是,本文所讨论的装置、系统和方法的实施方案并不限于以下介绍中所描述或附图所示的组件的结构和布置的细节的应用。所述装置、系统和方法能够在其他的实施方案中以各种方式实施或进行。在此提供的具体实现的实施例仅供说明,不应视为限制。特别是,与任何一个或多个实施方案有关的步骤、元件和特征不应当被任何其他实施方案的相似角色所排斥。

[0108] 本领域内的任何一名普通技术人员都可以理解的是,本文在此所描述的各种参数和配置结构都是出于可以效仿的目的,而实际的参数和/或配置结构将取决于本发明中所使用的系统和技术的特定应用。本领域内的任何一名普通技术人员也都能意识到或者都可以确定的是,可以使用不止一种的常规实验方法,与本发明的特定的实施方案相等的方案。因此,人们可以理解,本文在此描述的各种实施方案仅仅是处于可以效仿的目的,而且都在随附的权利要求书的范围之内并与之等同;除了特定的描述之外,本发明也是可以实践的。

[0109] 而且,人们可以理解的是,本发明所针对的是本文在此描述的每一种特征,系统,子系统或者技术,以及本文在此描述的两种或更多的特征,系统,子系统和/或者方法的任意的结合,如果所述的特征,系统,子系统和技术是相互协调的话,都可以被认为是在本发明的范围之内,并且都可以体现在权利要求中。更进一步说,与一个实施方案结合在一起就讨论的步骤,元素和特征都不应当被其他的实施方案中的相同的内容所排斥。

[0110] 在此使用的措辞和术语是用于说明的目的,并且不应当被视为限制。正如本文中所使用的,术语“数量众多”是指两个或更多的项目或部件。术语“包括(including)”、“包括(comprising)”、“携带(carrying)”、“具有(having)”、“包含(containing)”和“涉及(involving)”,无论是出现在说明书还是在权利要求书中,都是开放式的术语,即,它们是指“包括但不限于”的意思。因此,所述术语的使用意在涵盖其所附的全部项目,及其等同物,以及其他的项目。仅仅是这样一些传统的措辞,例如,“由……组成”,“实质上由……组

成”是封闭式的或者半封闭式的传统的措辞是分别与权利要求相关的。序数词的使用,例如“第一”,“第二”,“第三”,以及在权利要求中的类似的序数词是用于修改权利要求的,其本身并不意味着任何优选性,顺序性或者一个权项位于其他的权项或时间顺序之前,其中方法的步骤先于执行,实际上,这些术语的使用仅仅是进行标记,以便区分一个权项中的元素具有区别于另外一个具有相同的名称的元素(是顺序术语的使用),从而对权利要求的元素进行区分。

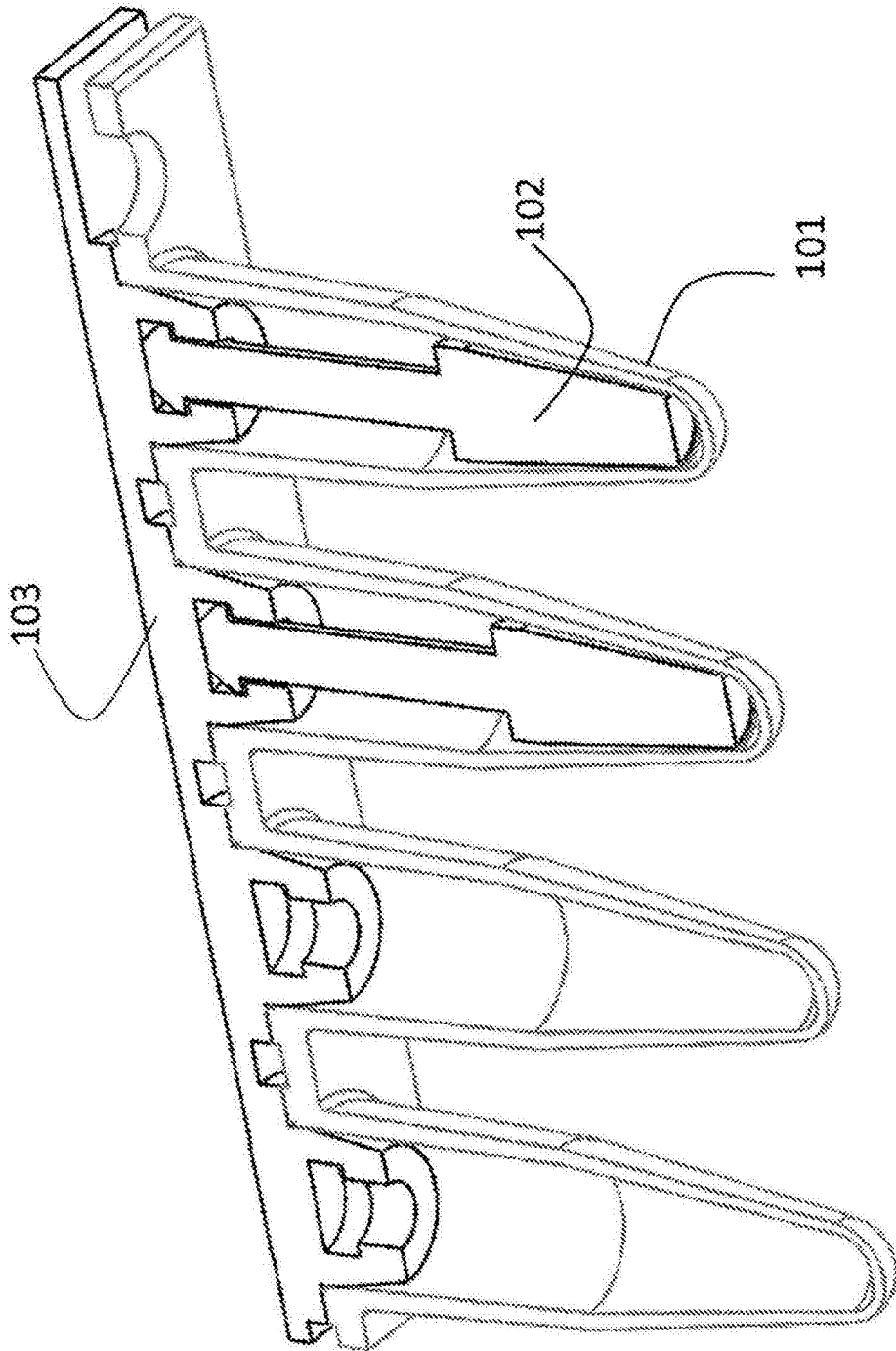


图1

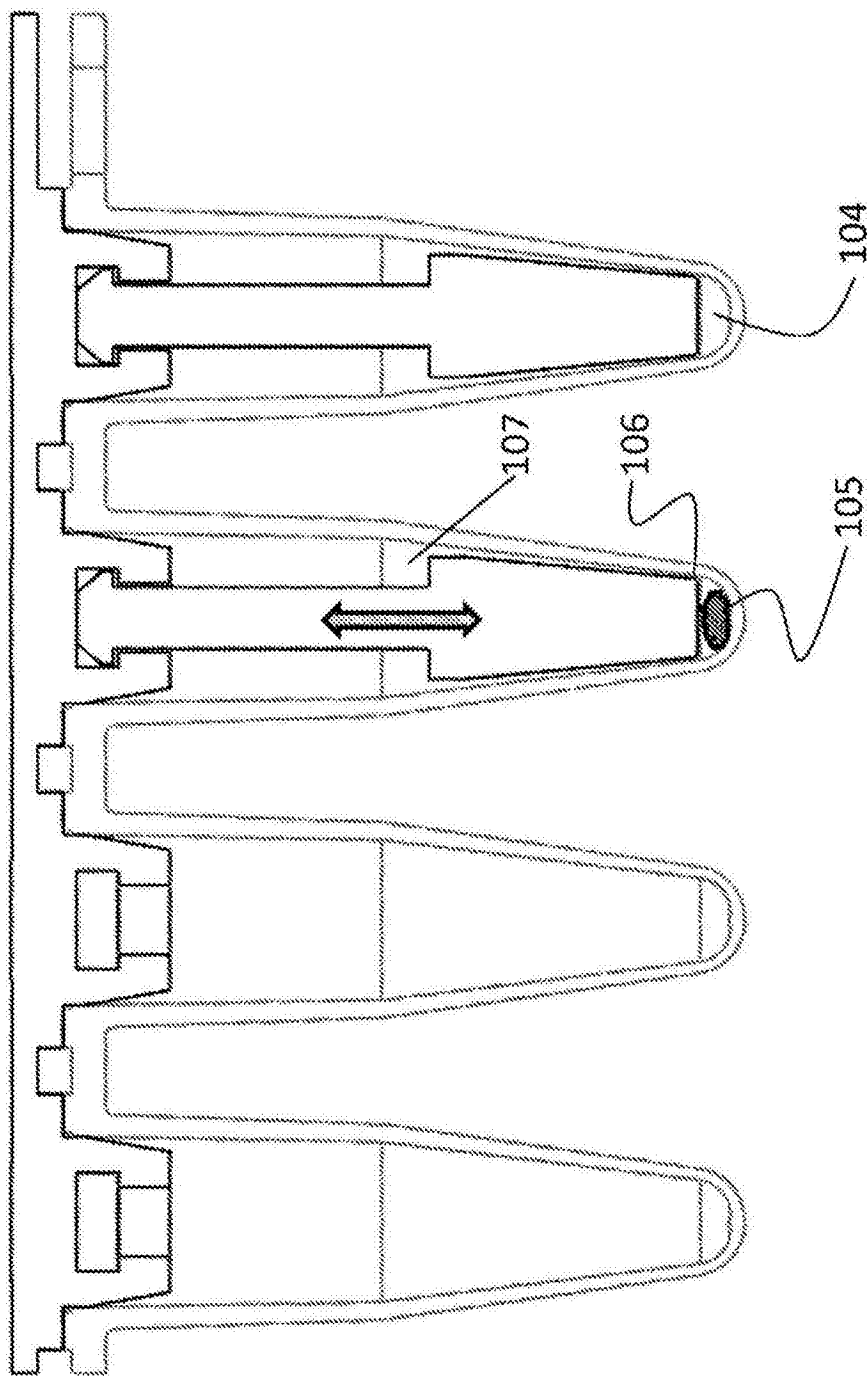


图2a

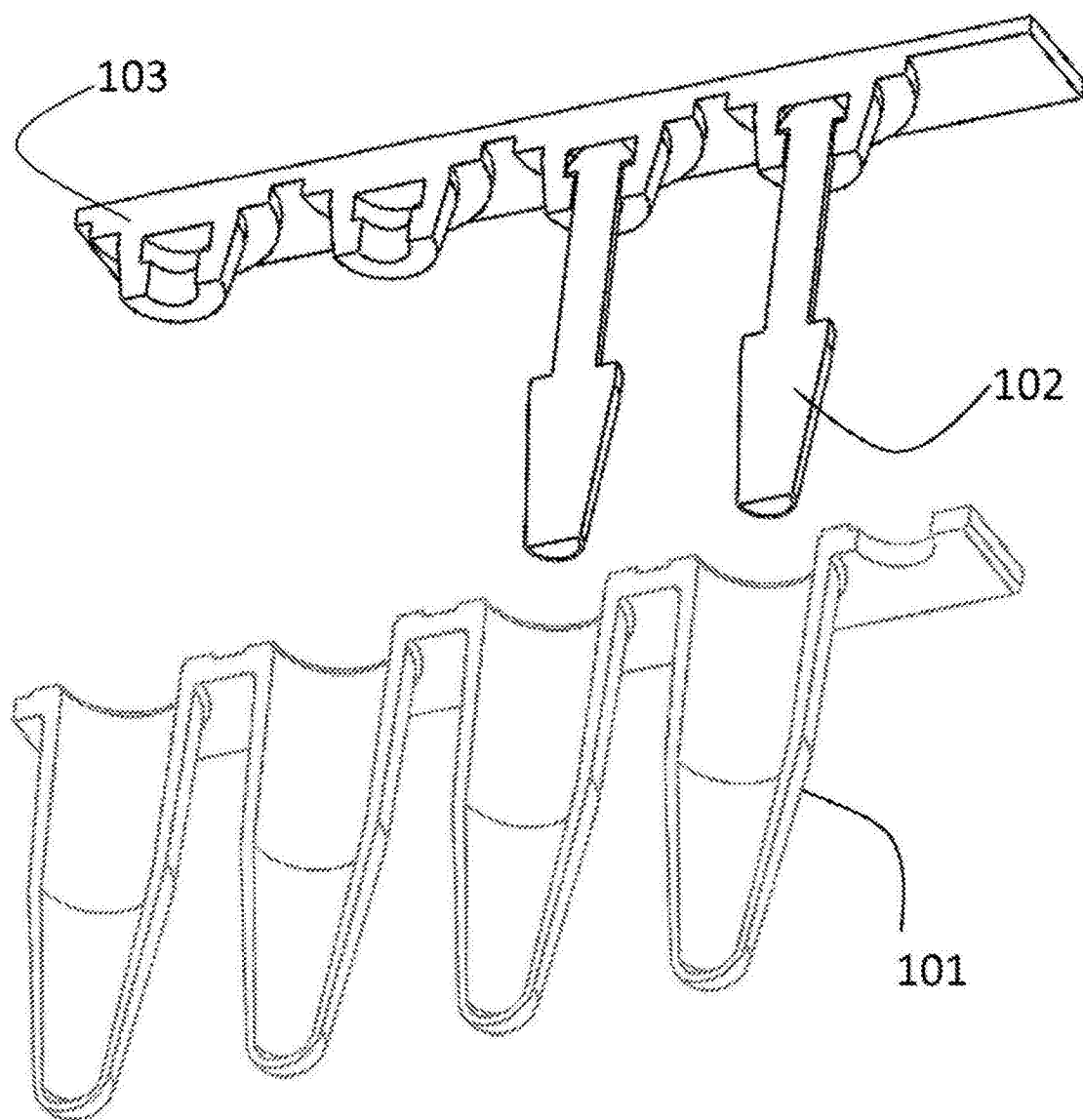


图2b

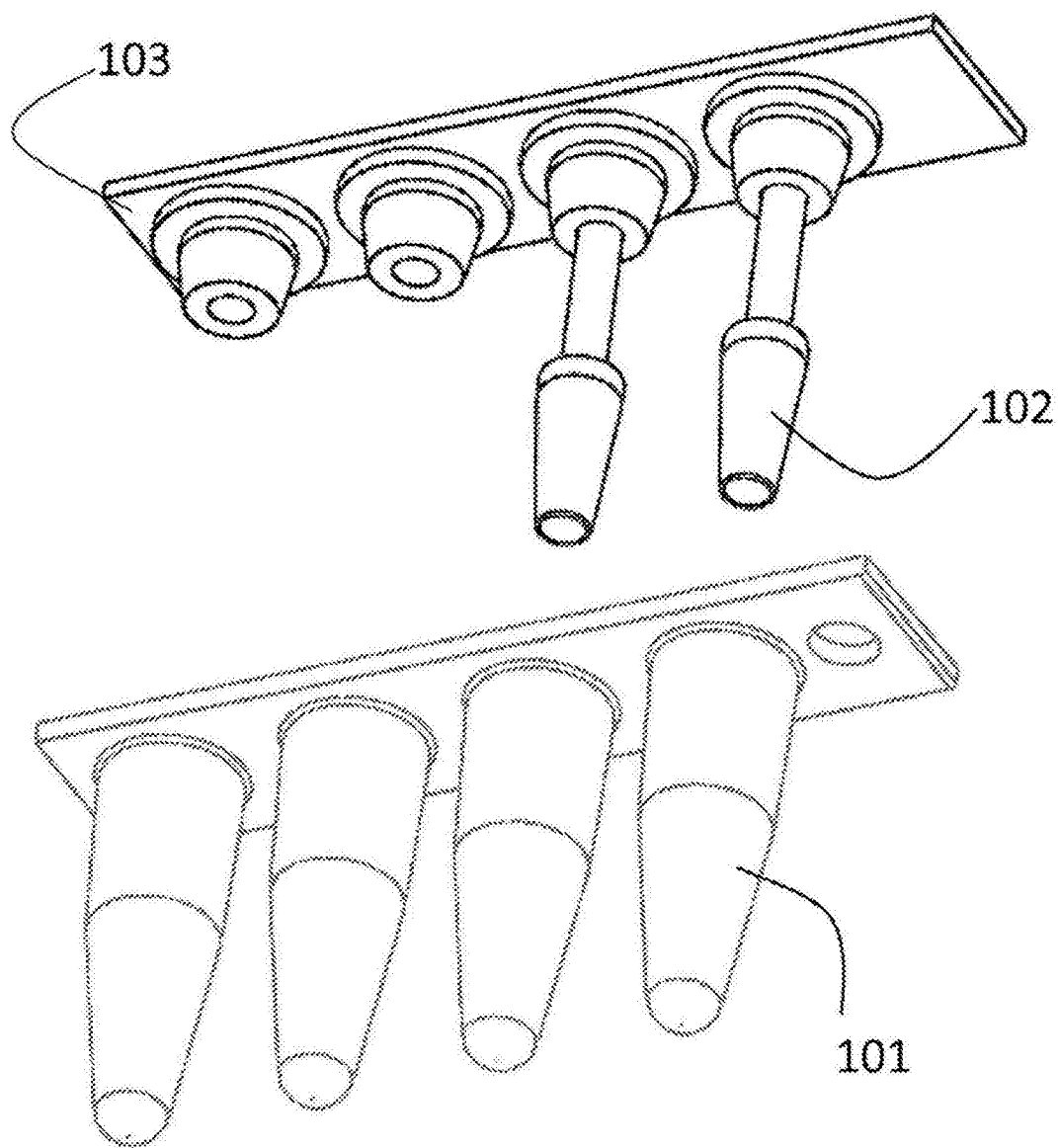


图2c

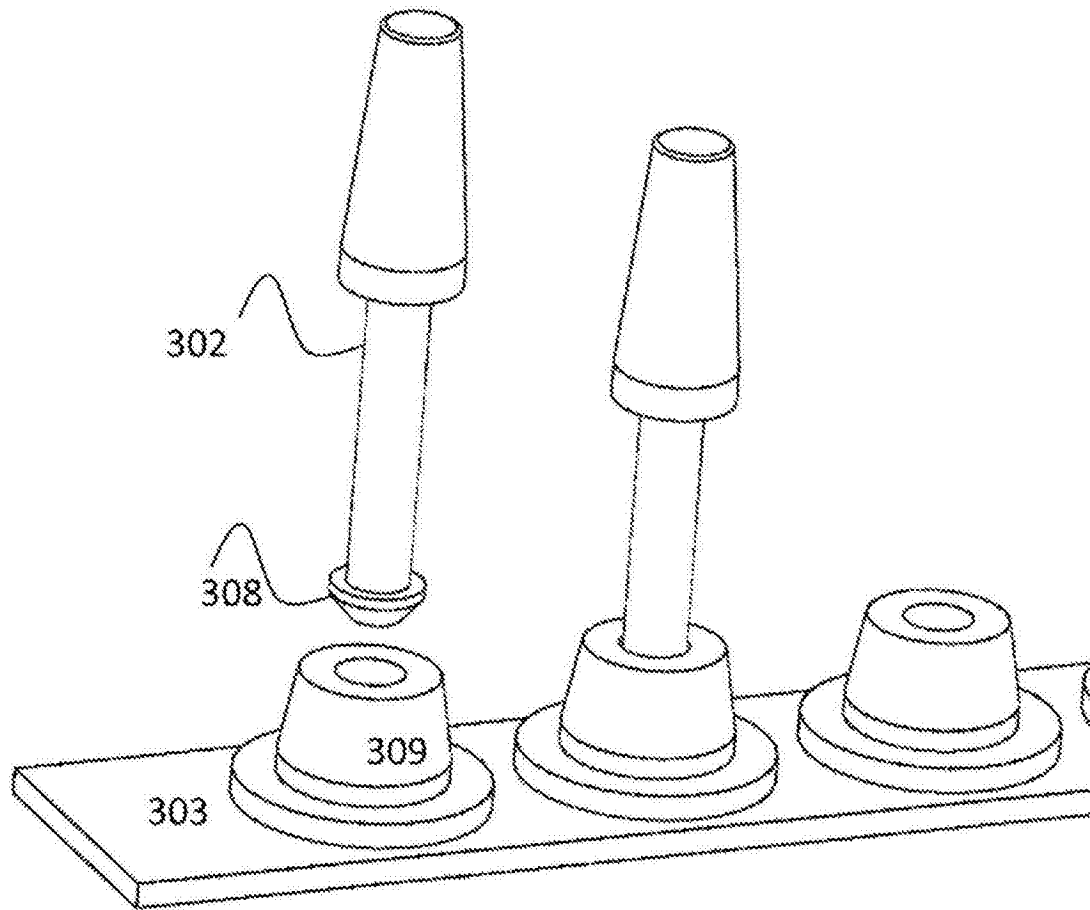


图3

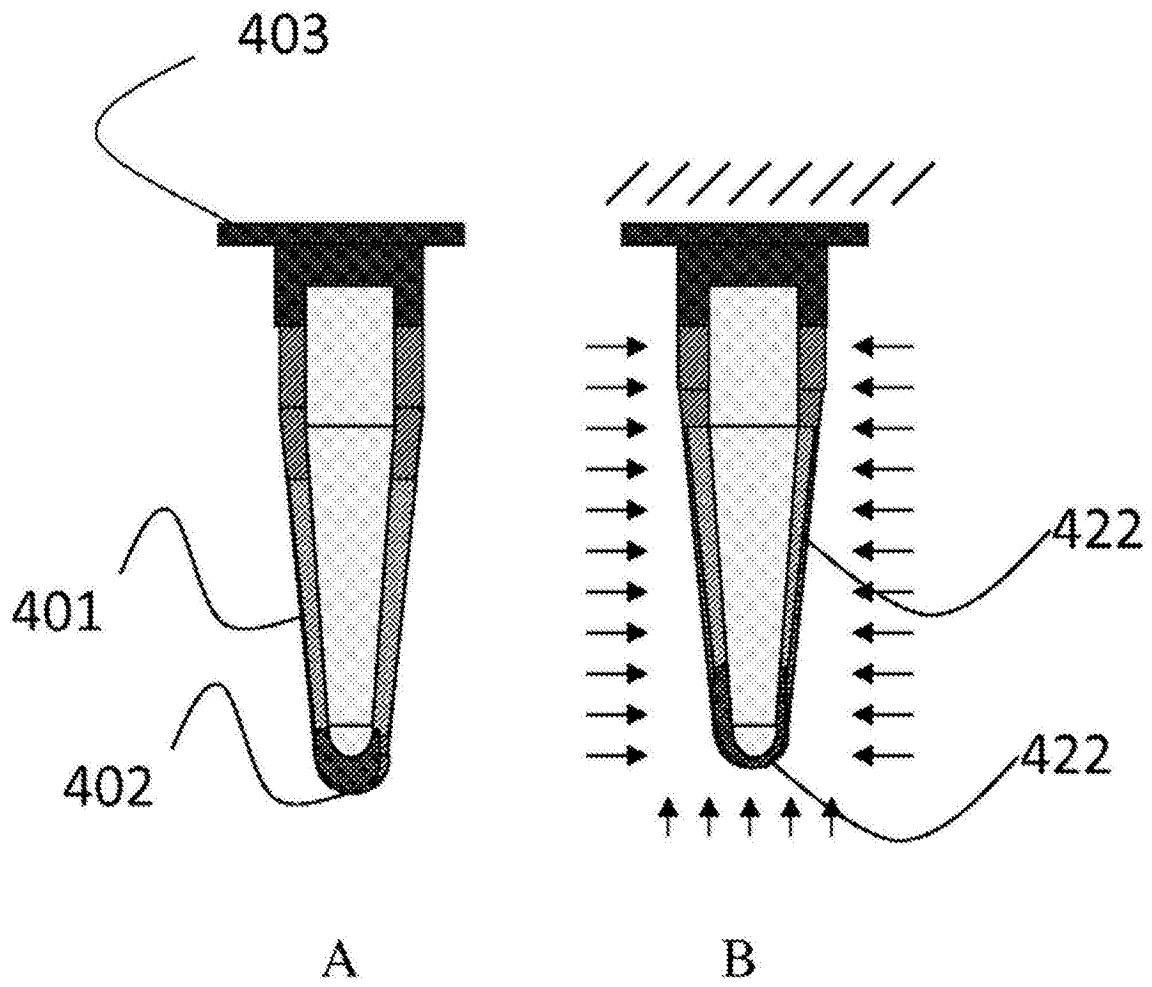


图4a

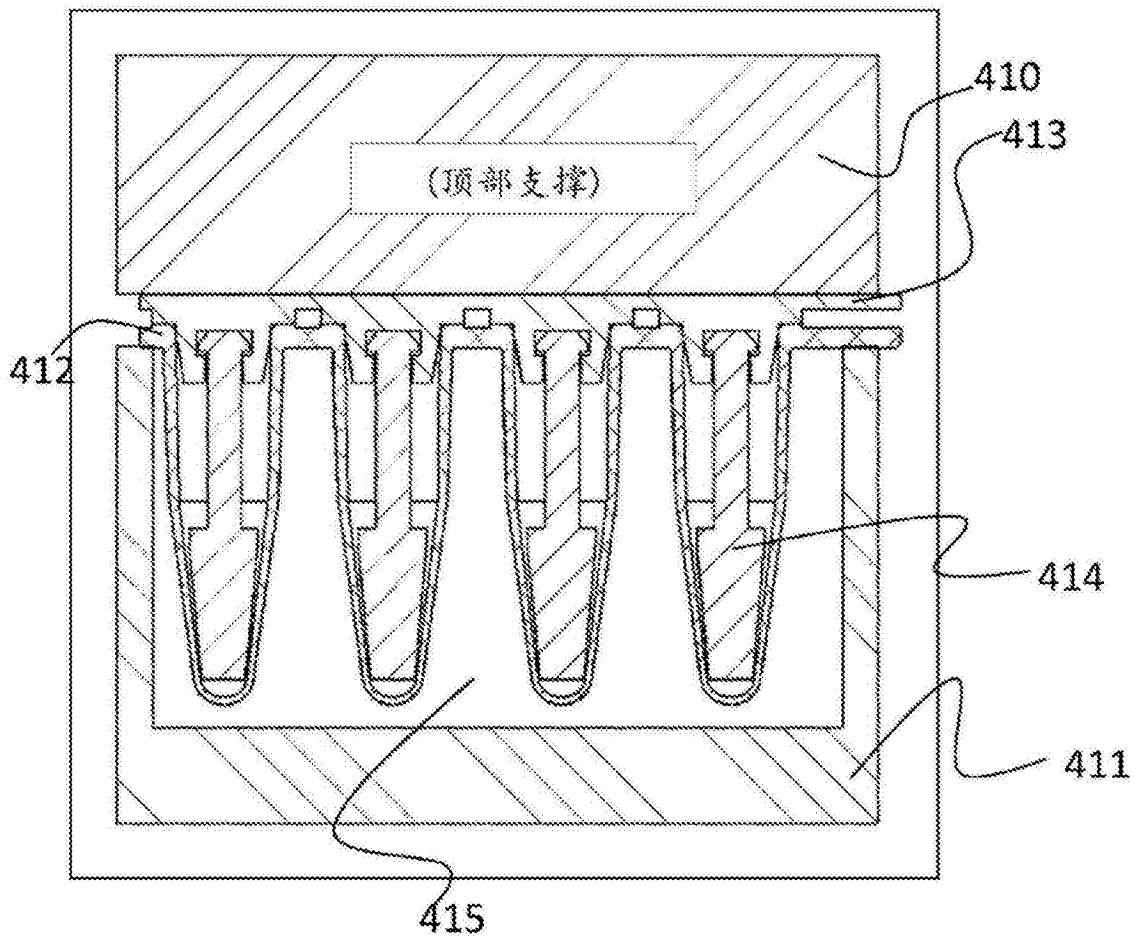


图4b

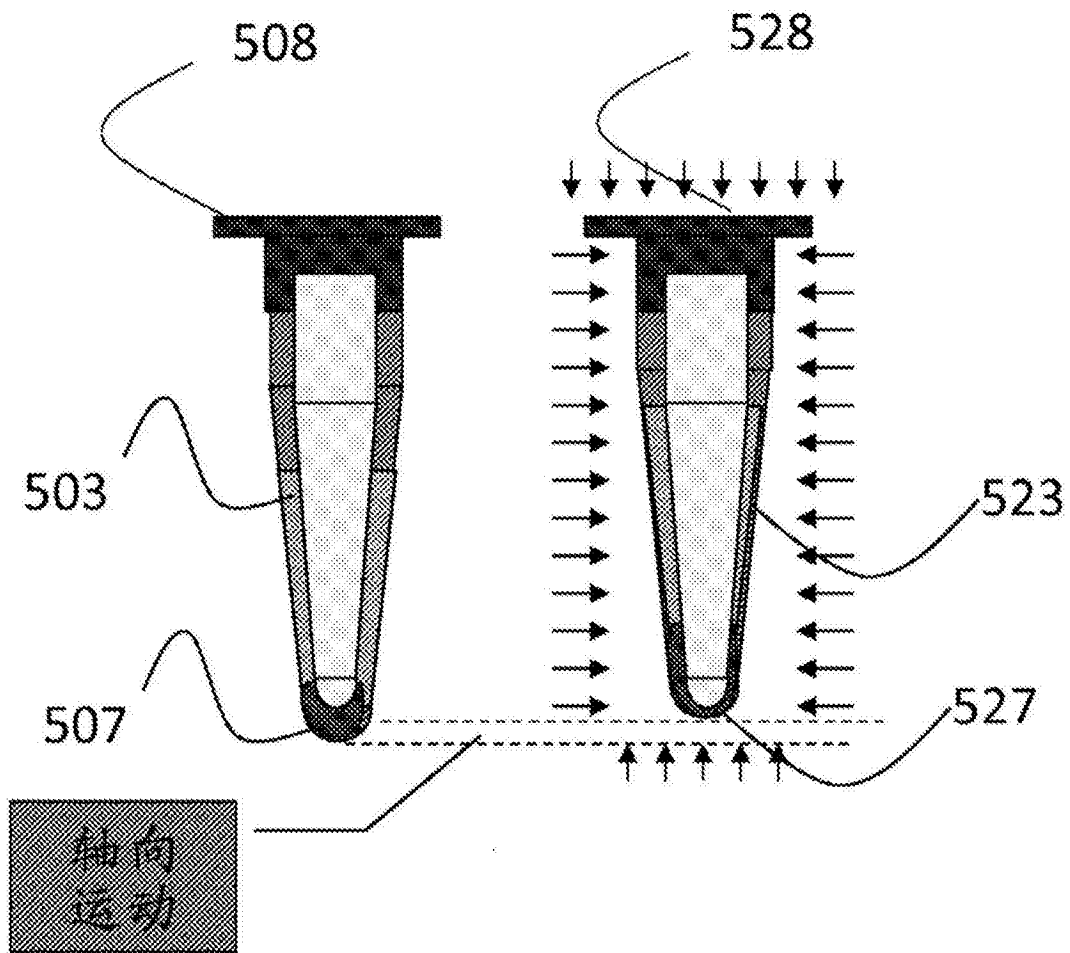


图5a

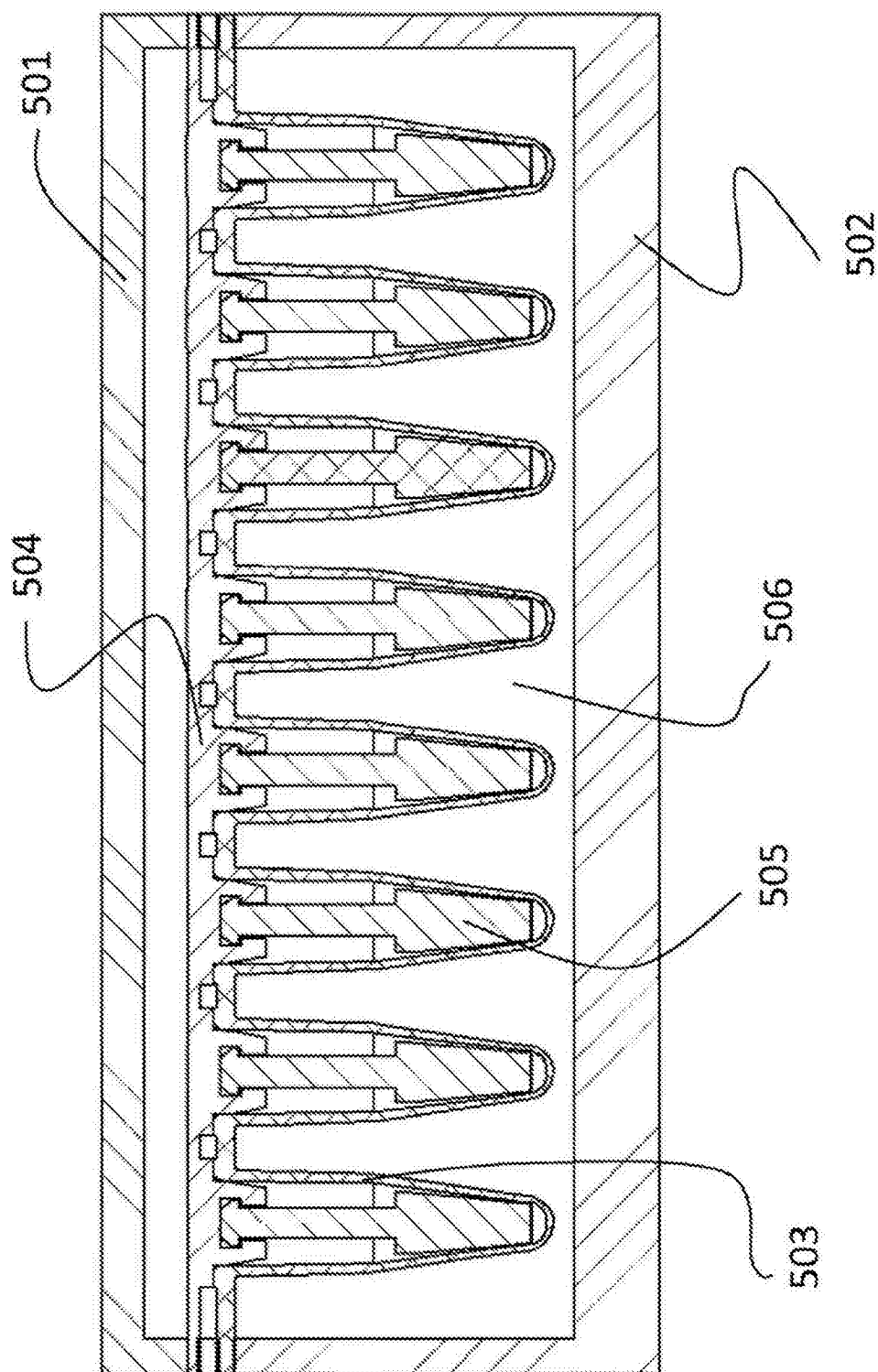


图5b

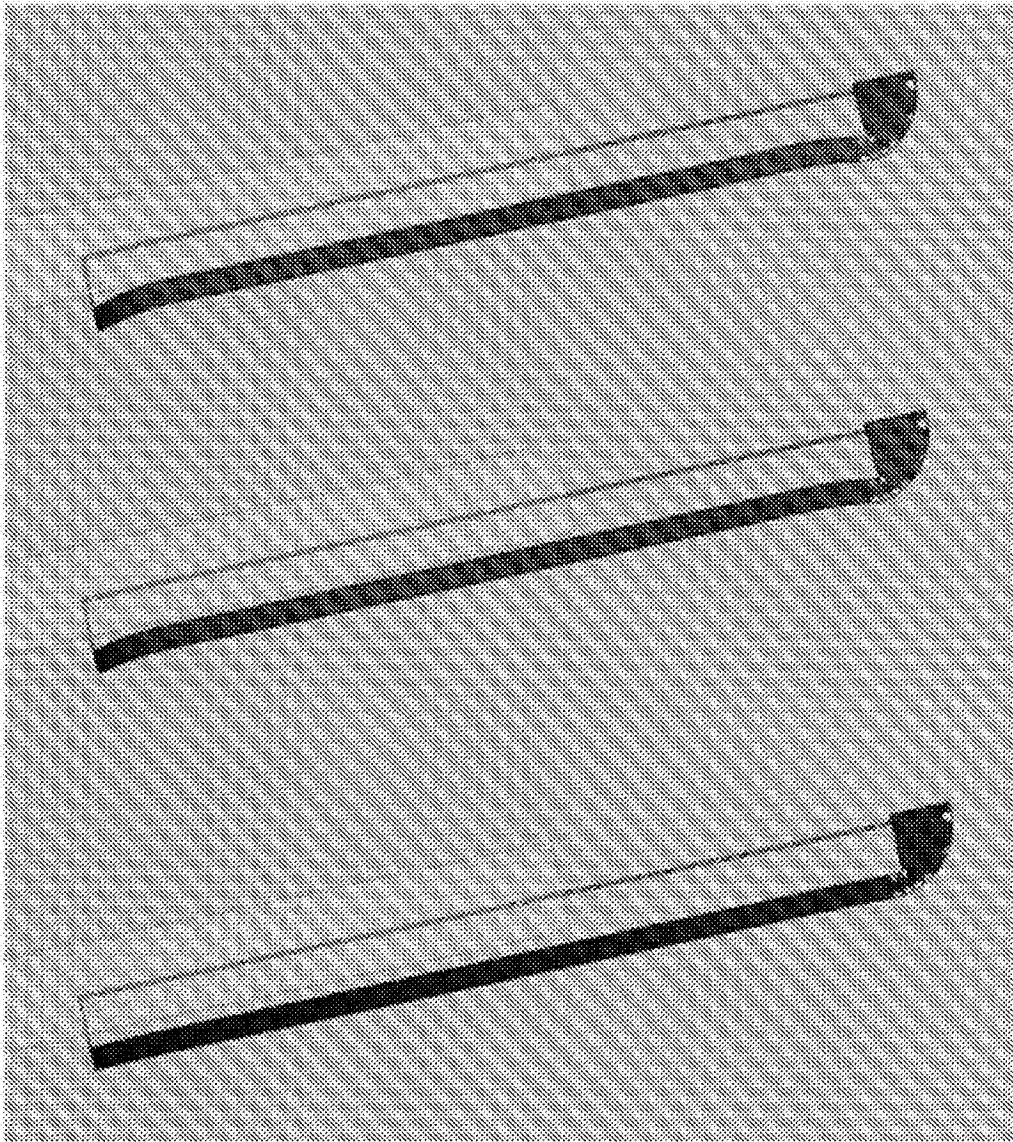


图6

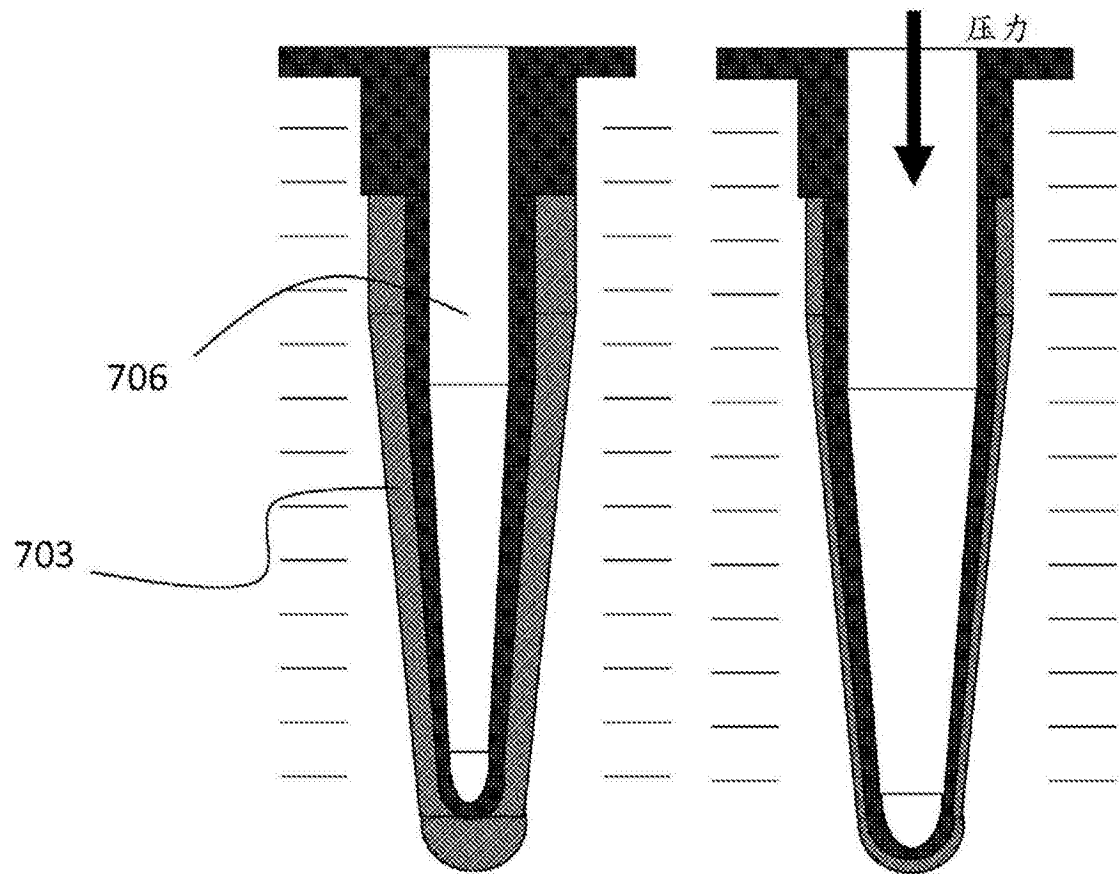


图7a

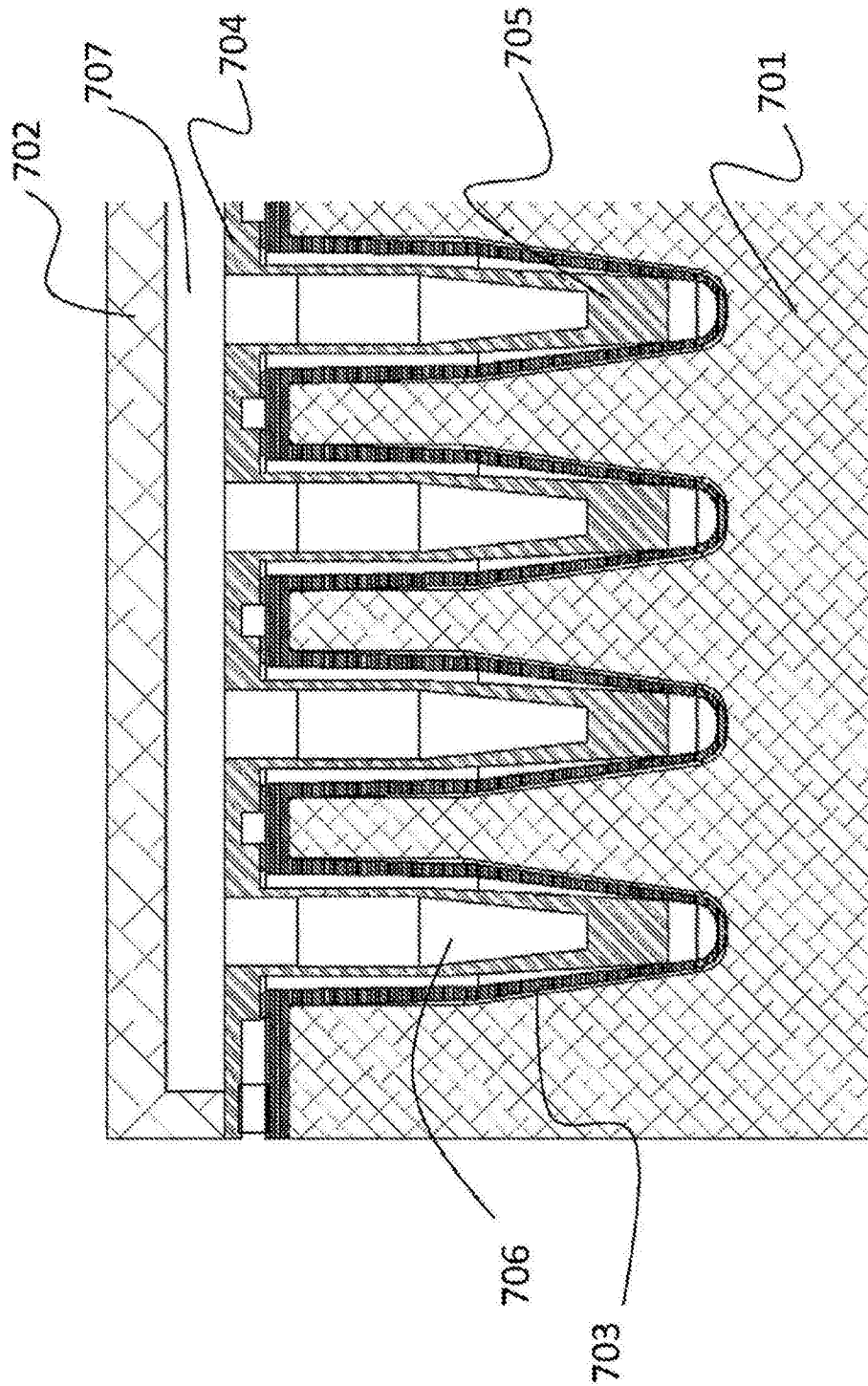


图7b

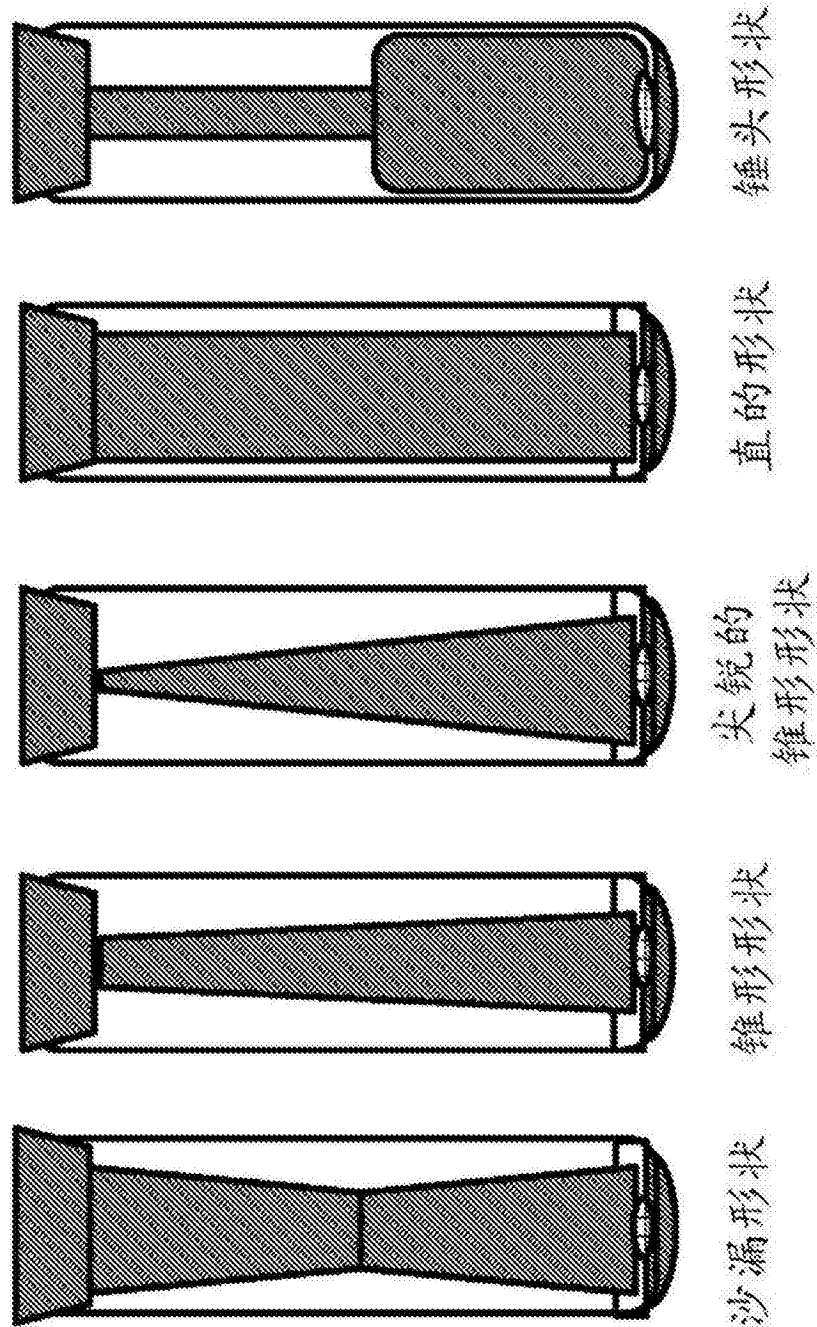


图8a

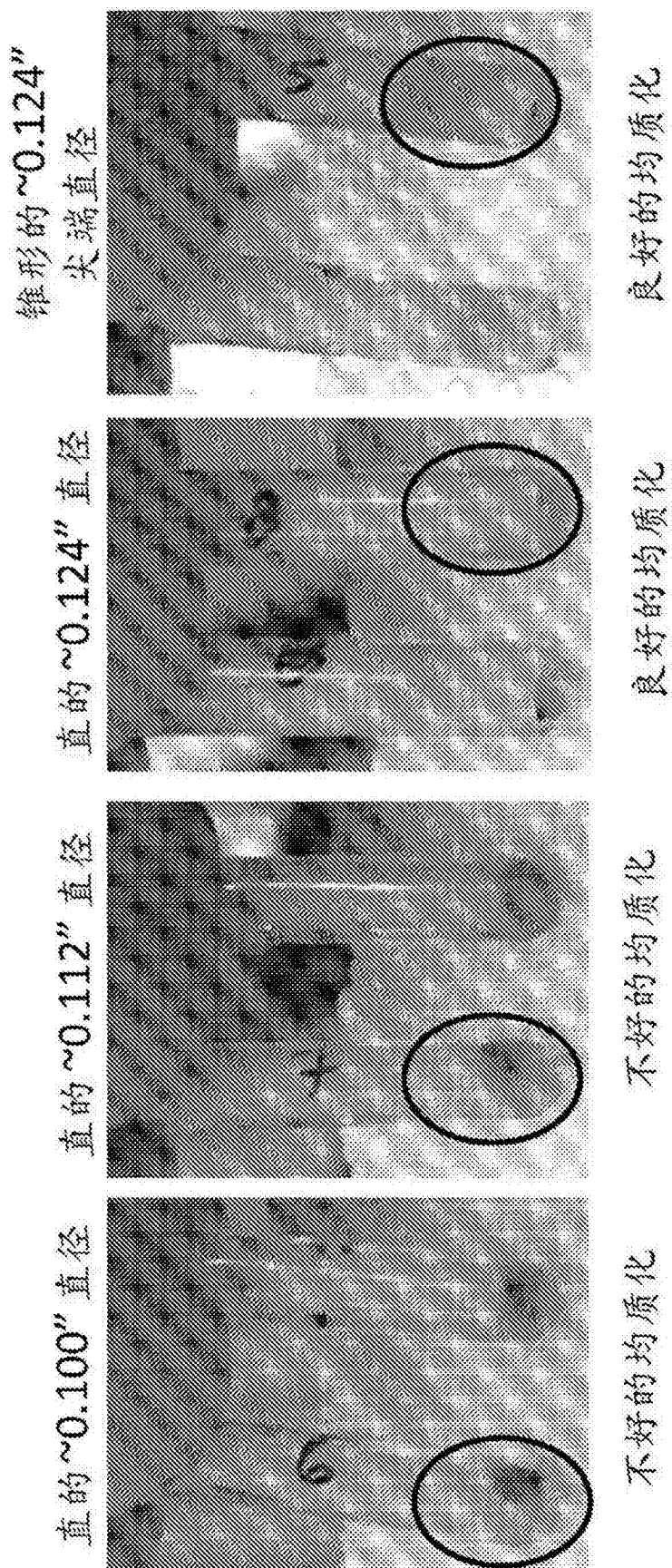


图8b

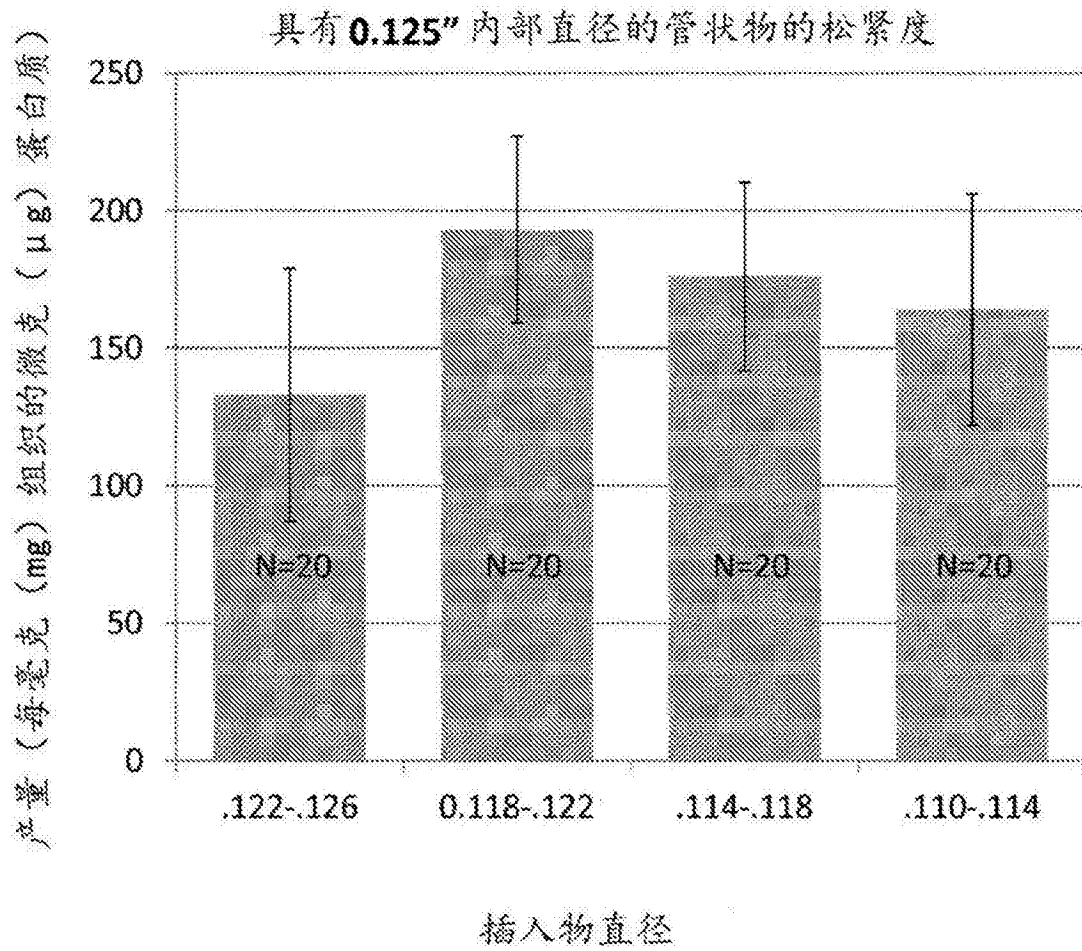


图9

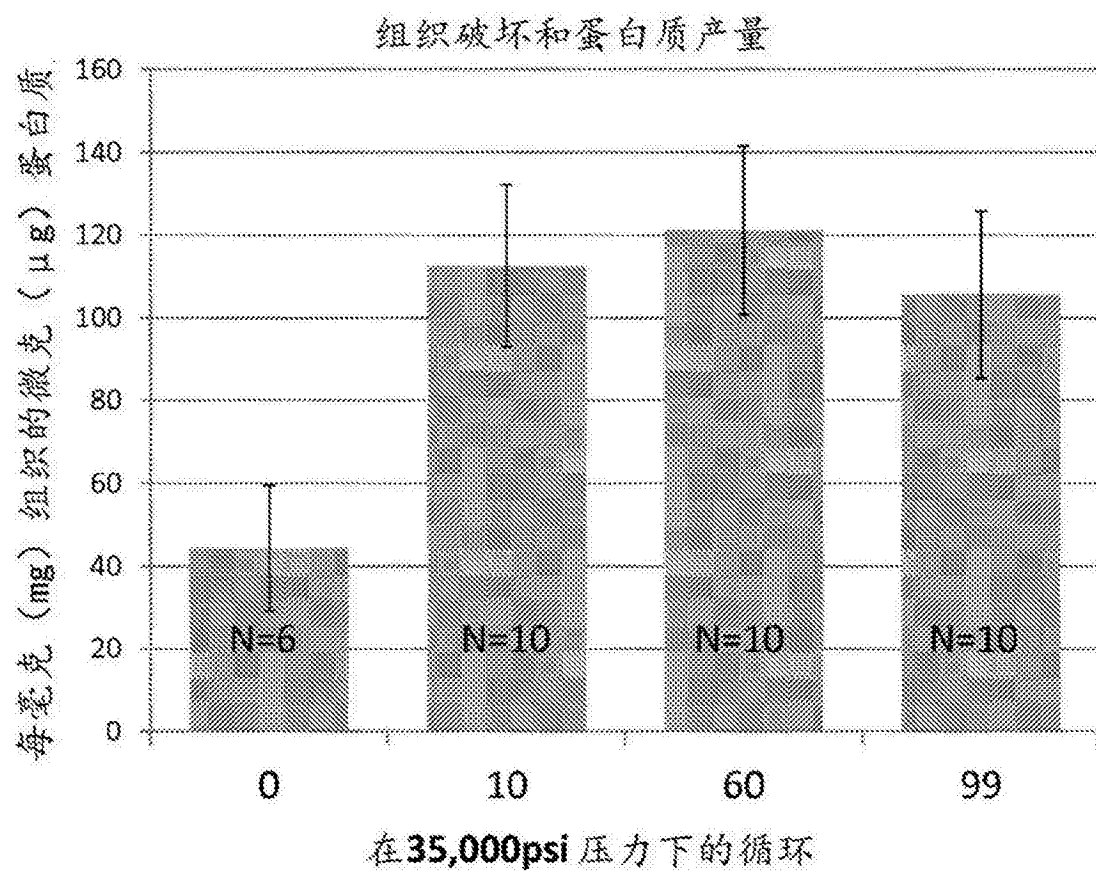


图10

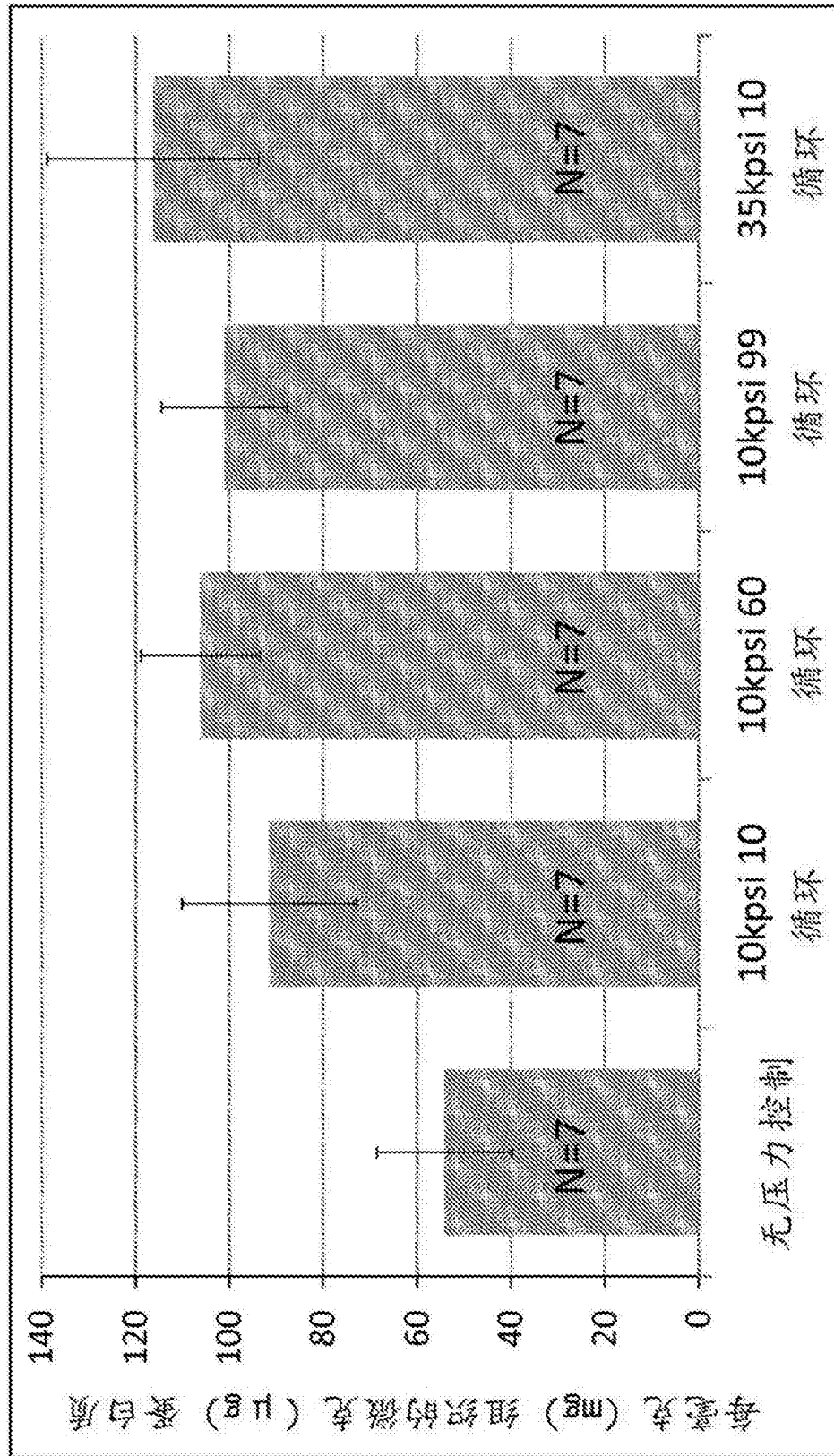


图11

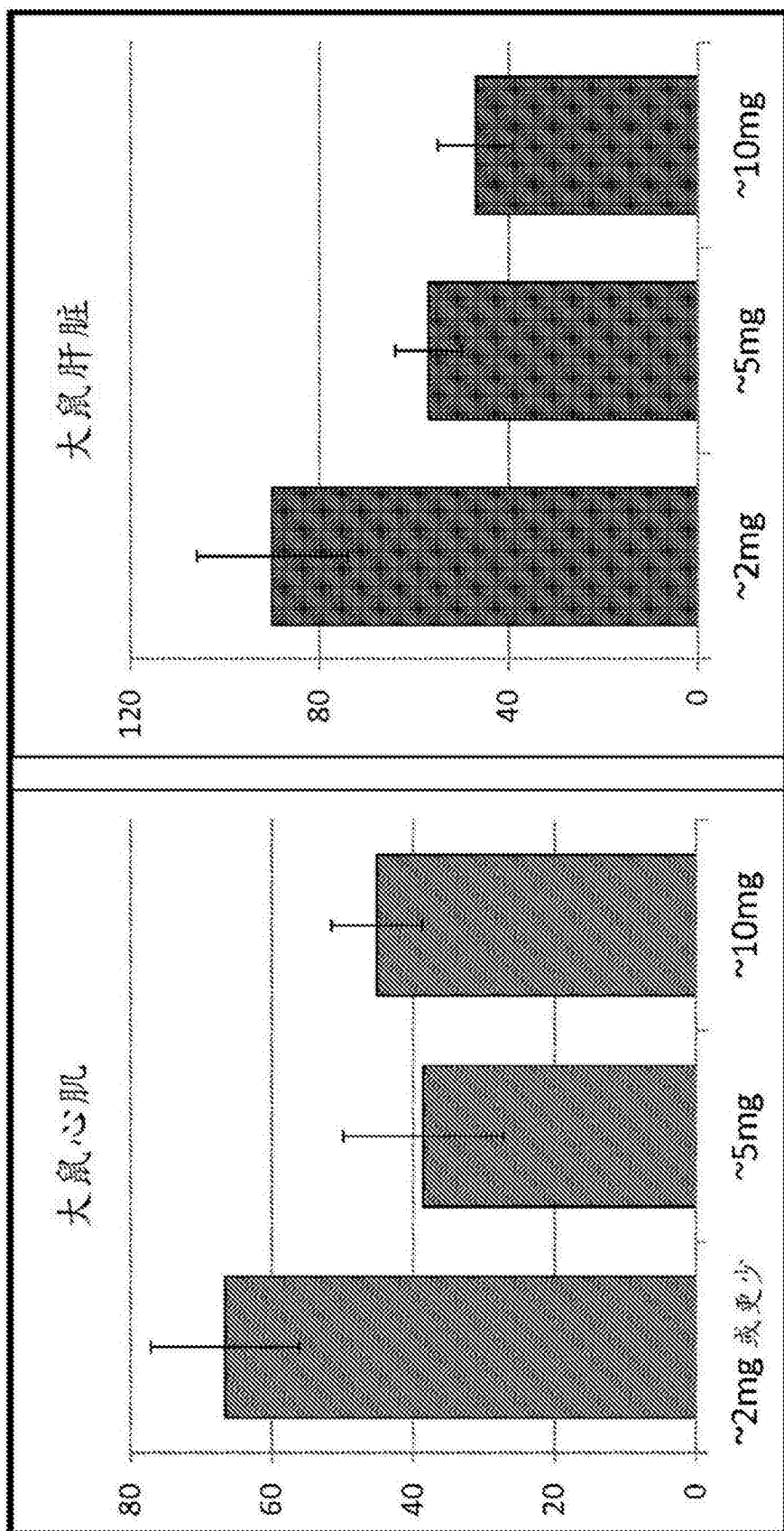


图12a

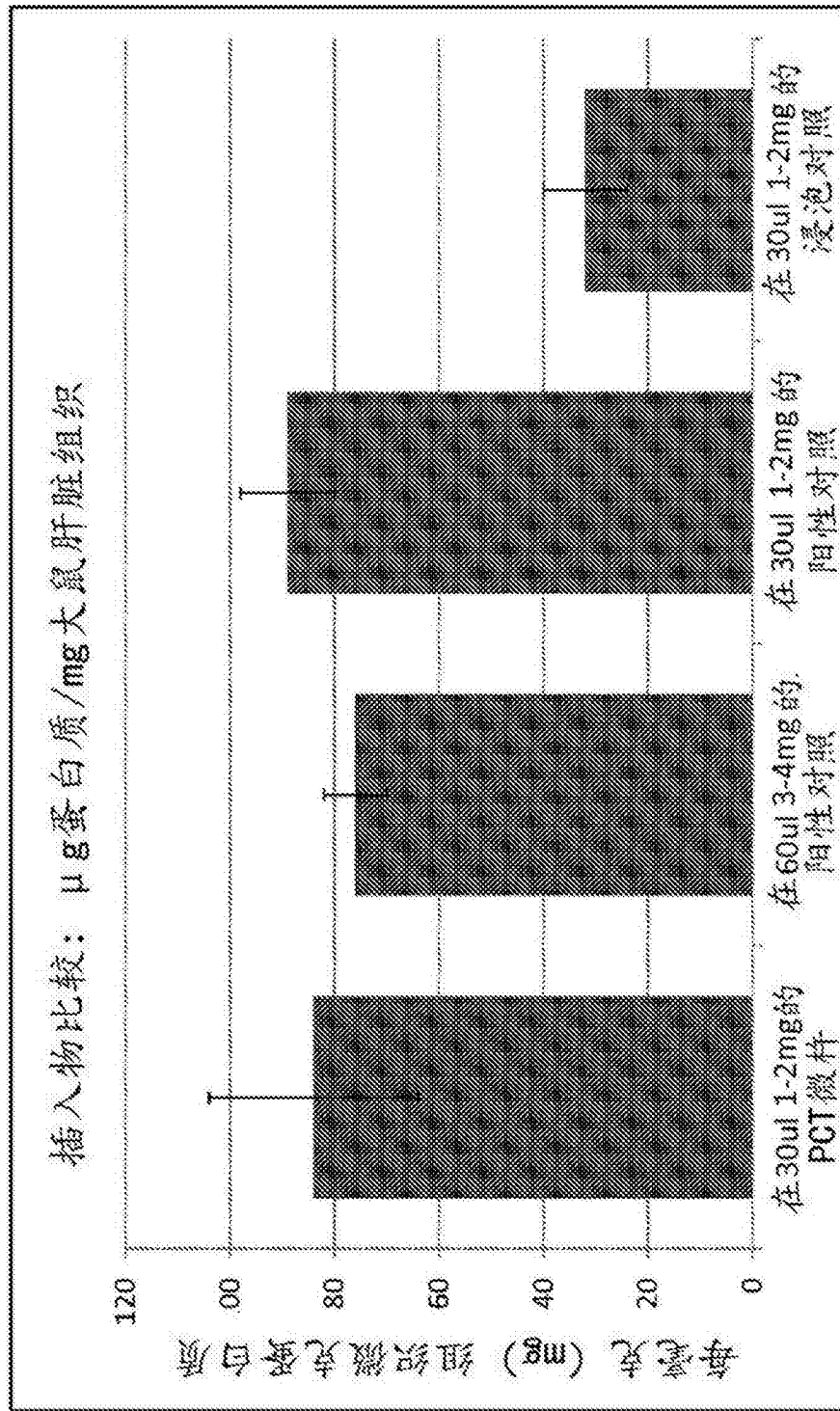


图12b

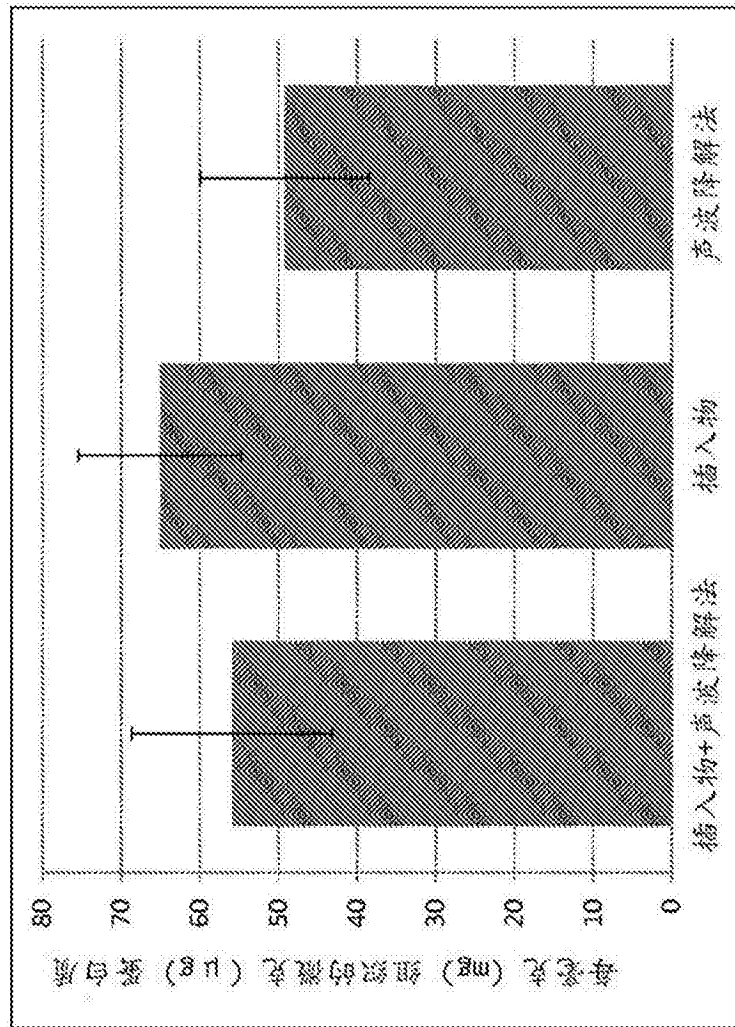


图13

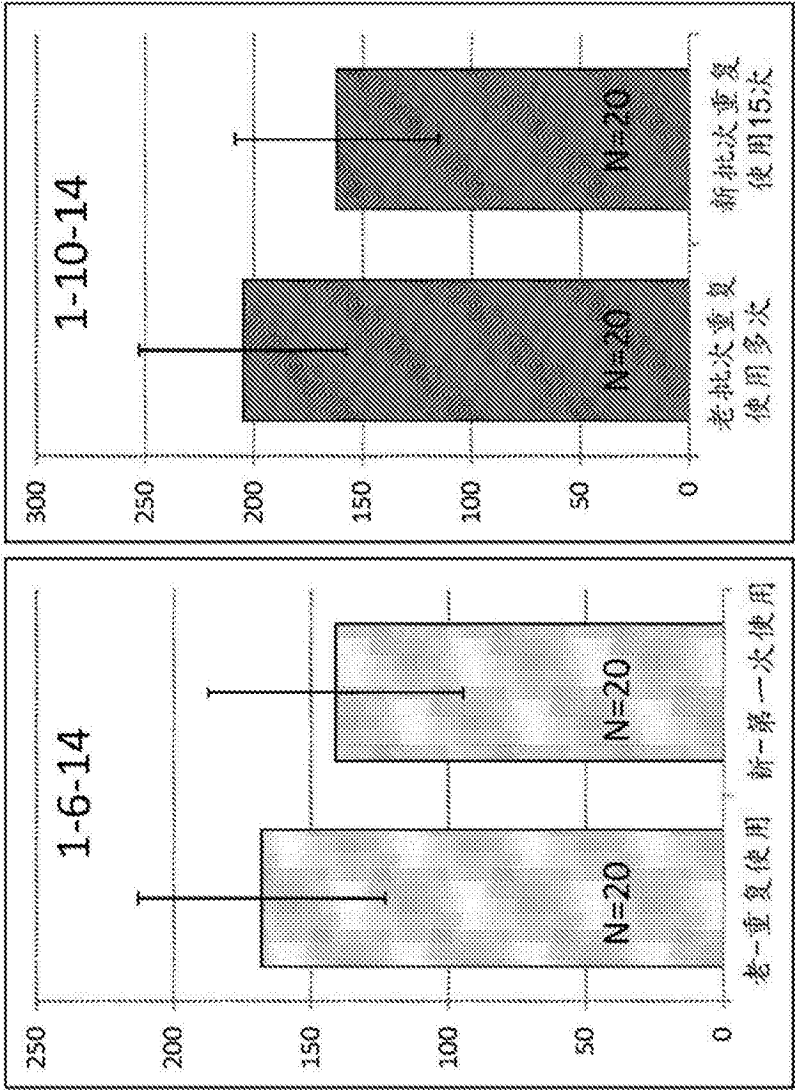


图14

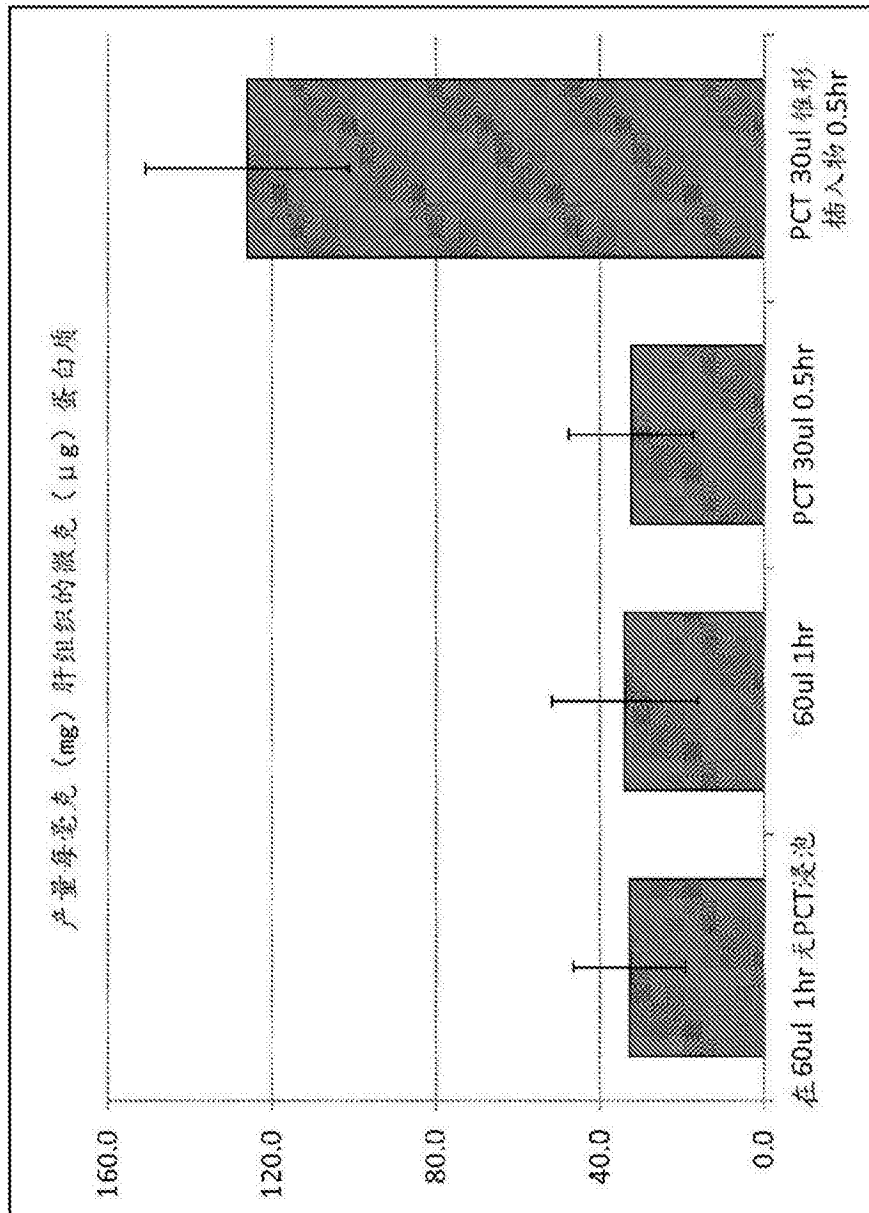


图15

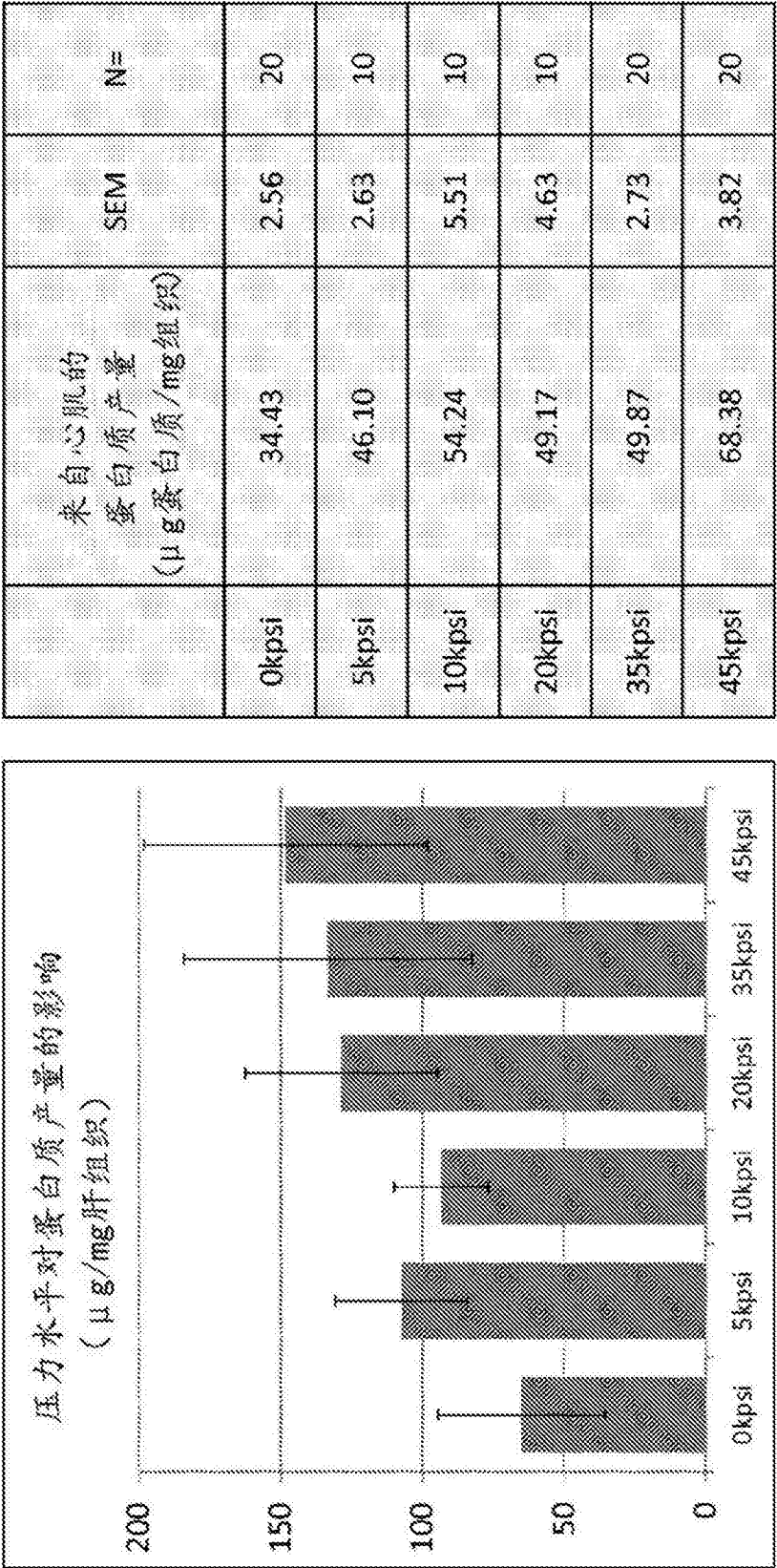


图16

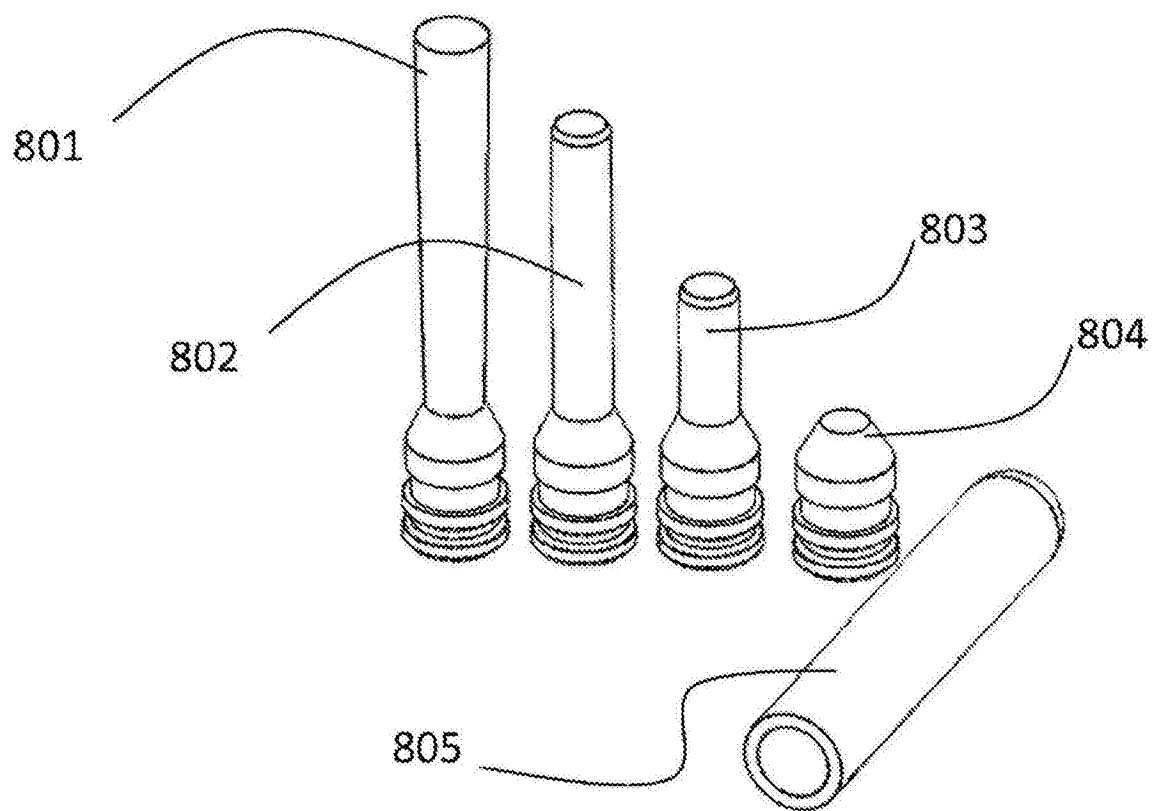


图17

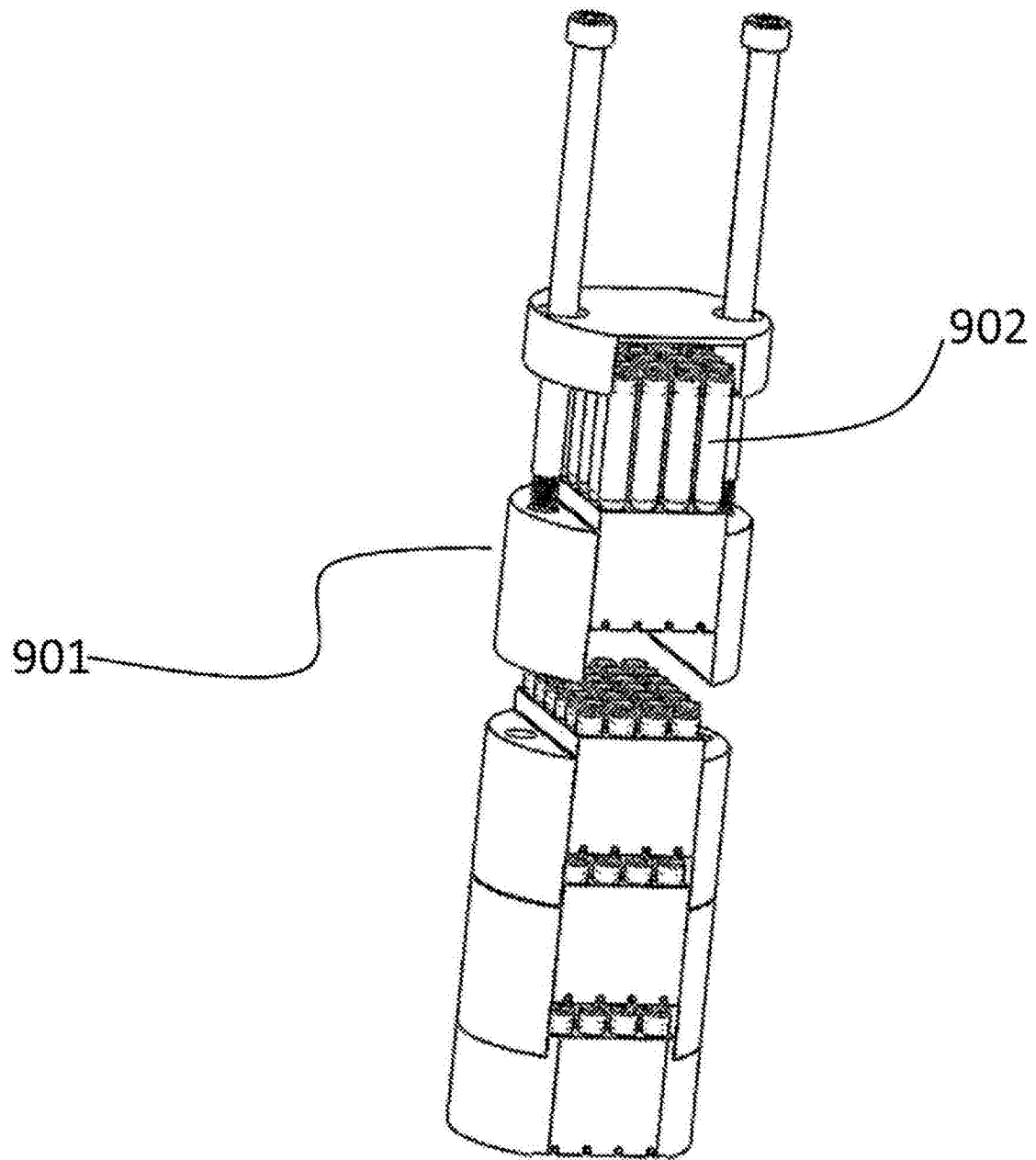


图18