

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

G01N 27/447

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97199079.4

[43]公开日 1999年11月3日

[11]公开号 CN 1234116A

[22]申请日 97.7.31 [21]申请号 97199079.4

[30]优先权

[32]96.9.6 [33]US[31]08/709,358

[86]国际申请 PCT/US97/13525 97.7.31

[87]国际公布 WO98/10277 英 98.3.12

[85]进入国家阶段日期 99.4.23

[71]申请人 内诺金有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 爱德华·L·舍尔顿三世

托马斯·R·杰克逊 保罗·D·斯万逊

布拉德利·S·斯考特 迈克尔·J·海勒

[74]专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

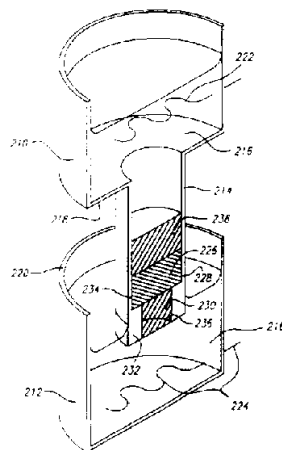
代理人 严舫

权利要求书 9 页 说明书 27 页 附图页数 13 页

[54]发明名称 用于活性生物样品制备的设备和方法

[57]摘要

一种用于生物材料电子样品制备的系统和方法,利用差异的荷质比及/或样品组成部分的差异亲和力分离材料用于样品制备。本发明提供了一种集成系统用于完成某些或所有这些过程:接收生物材料,选择细胞,提纯样品,浓缩样品,交换缓冲剂,复杂性简化及/或诊断和分析。在一种实施例中,一种或更多适于接收缓冲液的试样室被设置在邻近隔离区处,该区包括陷阱或其它亲和材料,通过操作这些电极产生待制备材料的电泳运动。



ISSN 1008-4274

权利要求书

1. 一种适于从不想要的材料中分离出想要的材料，用于活性生物样品制备的设备，包含：

一种适于接收缓冲液的第一试样室，

一种适于接收缓冲液的第二试样室，

一种配置在第一试样室和第二试样室之间的隔离区，该隔离区提供一种陷阱，具有想要的材料相对于不想要材料的差动效应，

当位于第一试样室中时，一种适于和缓冲液电接触的第一电极，和当在第二试样室中时，一种适于和缓冲液接触的第二电极。

2. 根据权利要求1所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该陷阱是疏水的。

3. 根据权利要求1所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该陷阱是一种蛋白质陷阱。

4. 根据权利要求3所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该蛋白质陷阱是聚偏氟乙烯。

5. 根据权利要求3所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该蛋白质陷阱是硝酸纤维素。

6. 根据权利要求1所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该陷阱是DNA陷阱。

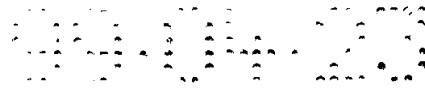
7. 根据权利要求1所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该陷阱是可以从设备上取出的。

8. 根据权利要求7所述的设备，还包括一种适于包括该陷阱的框架。

9. 根据权利要求1所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该陷阱适于和隔离区配合。

10. 根据权利要求1所述的设备，其特征在于，该陷阱包括一种接近陷阱的第三电极。

11. 根据权利要求10所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在



于，前面的电极和陷阱包含金属涂层的过滤材料。

12. 根据权利要求 1 所述的设备，还包括一种焚化电极，配置在一个或多个试样室内。

13. 根据权利要求 1 所述的用于活性生物样品制备的设备，还包括可操作地与那些电极耦合的控制系统。

14. 根据权利要求 1 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该隔离区的体积小于第一试样室体积的 50%。

15. 根据权利要求 14 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该隔离区是第一试样室 30% 的体积或更小的体积。

16. 根据权利要求 15 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该隔离区的体积是第一试样室体积的 25% 或更小的体积。

17. 根据权利要求 1 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，试样室的厚度是在第一电极和第二电极之间距离的 20% 或更薄的厚度。

18. 根据权利要求 17 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，试样室的厚度是第一电极和第二电极之间距离的 10% 或更薄的厚度。

19. 根据权利要求 18 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，试样室的厚度是第一电极和第二电极之间距离的 5% 或更薄的厚度。

20. 根据权利要求 1 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，试样室的宽度是 5 毫米或更窄。

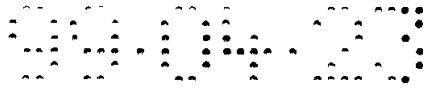
21. 根据权利要求 20 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，试样室的厚度是 4 毫米或更薄。

22. 根据权利要求 21 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，试样室的厚度约为 1 至 2 毫米。

23. 根据权利要求 1 所述的用于活性生物样品制备的设备，还包括在第一试样室和第一电极之间的保护层，从而构成第一电极室。

24. 根据权利要求 23 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该保护层是一种膜。

25. 根据权利要求 24 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该膜是一种超滤膜。



26. 根据权利要求 24 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，该膜是一种酸纤维膜。

27. 根据权利要求 26 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，第一电极室的体积至少是试样室体积的 10 倍。

28. 根据权利要求 1 所述的用于活性生物样品制备的设备，其特征在于，第一试样室垂直配置在隔离区上方。

29. 用于活性生物样品制备的一种方法，该样品包含一批包括具有差异荷质比的想要和不想要的材料，在一种包括溶液相区和至少一个在想要的材料和不想要的材料比较具有差动效应的陷阱区的电泳系统中实现分离，包含下列步骤：

向装置的第一溶液相区提供样品材料，

在系统内电泳样品以产生在想要的材料和不想要的材料之间的净差动迁移，从而使一种想要或不想要的材料位于陷阱内，而其它材料在溶液相区内，

从系统中取出想要的材料，从而制成相对提纯的想要的材料。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其特征在于，该陷阱选择性地捕集特定细胞。

31. 根据权利要求 30 所述的方法，其特征在于，从细胞特异性陷阱中洗提想要的材料。

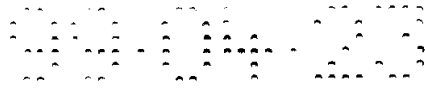
32. 根据权利要求 29 所述的方法，其特征在于，该陷阱用于捕集蛋白质并至少通过 DNA 和 RNA 中的一种。

33. 根据权利要求 29 所述的方法，其特征在于，该陷阱用于至少捕集 DNA 和 RNA 中的一种。

34. 根据权利要求 33 所述的方法，其特征在于，当至少一部分 DNA 或 RNA 接触陷阱后，一种电势加在溶液相区中的材料上，以便将它们从该陷阱排斥开。

35. 根据权利要求 29 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，在接触陷阱前，样品首先电泳输送通过液体区。

36. 根据权利要求 35 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，想要的材料位于陷阱内。



37. 根据权利要求 36 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，从系统中取出想要的材料和陷阱。

38. 根据权利要求 37 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，陷阱是测探杆。

39. 根据权利要求 36 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，从陷阱中取出想要的材料。

40. 根据权利要求 39 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，从陷阱中取出想要的材料进入液体区。

41. 根据权利要求 39 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，该液体区是所述第一溶液相区。

42. 根据权利要求 39 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，该液体区是第二液体区。

43. 根据权利要求 35 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，不想要的材料位于陷阱内。

44. 根据权利要求 43 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，通过液体技术将想要的材料从系统中取出。

45. 根据权利要求 43 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，将不想要的材料捕集在陷阱内以前，想要的材料电泳通过该陷阱。

46. 根据权利要求 29 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，样品首先被放在紧邻陷阱的第一液体区。

47. 根据权利要求 29 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，在向装置的第一溶液相区提供样品材料前，将样品进行蛋白酶处理步骤。

48. 根据权利要求 46 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，想要的材料保留在陷阱里，而不想要的材料电泳通过陷阱进入第二液体区。

49. 根据权利要求 48 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，当不想要的材料电泳通过陷阱后，将想要的材料从陷阱里洗提出来。

50. 根据权利要求 49 所述的用于活性生物样品制备的方法，其特征在于，洗提想要的材料进入第二液体区。



51. 根据权利要求 29 所述的用于活性生物样品制备的方法, 其特征在于, 样品经受增密步骤。

52. 根据权利要求 49 和 51 所述的用于活性生物样品制备的方法, 还包括样品经受蛋白酶解步骤。

53. 在含溶液相区的电泳系统中从不想要的带电生物材料中选择性分离想要的带电生物材料的方法, 该方法包含下列步骤:

对第一电极加上推斥势, 以便加速相对于第二电极更靠近第一电极的想要的带电材料的运动, 以及

对第二电极加推斥势, 以减速相对于第一电极更靠近第二电极的想要的带电材料的运动,

由此缩小了在第一和第二电极之间的想要带电材料的空间分布。

54. 根据权利要求 53 所述的方法, 其特征在于, 想要的材料至少是 DNA, RNA 和蛋白质中的一种。

55. 根据权利要求 53 所述的方法, 其特征在于, 当想要材料的空间分布缩小以后, 第一电极上的推斥势增大。

56. 一种用于在电泳系统中收集大分子核酸, 并用于输送核酸的设备, 包含:

在收集区配置第一收集材料,

和所述收集区接触的支持件,

收集材料的支持件提供集成结构用于收集和输送核酸。

57. 根据权利要求 56 所述的设备, 其特征在于, 大分子核酸是 DNA。

58. 根据权利要求 56 所述的设备, 其特征在于, 大分子核酸是 RNA。

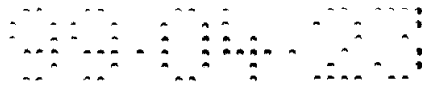
59. 根据权利要求 56 所述的设备, 其特征在于, 载体装置包含适于配套接合的框架的两半。

60. 根据权利要求 56 所述的设备, 其特征在于, 样品材料是层状材料。

61. 用于材料的活性生物样品制备的系统包含:

输入装置,

提纯室, 该提纯室包括至少一个第一电泳溶液区, 和第一及第二电泳电极,



在第一电泳溶液相区内的蛋白质陷阱区，
连接提纯区的排出孔，
适于从提纯区的排出孔接收输出的变性区，
适于接收该变性区输出的复杂性简化区，
适于接收复杂性简化区输出的诊断区。

62. 根据权利要求 61 所述的系统，还包括配置在输入装置和提纯区之间的细胞分离区。

63. 根据权利要求 62 所述的系统，其特征在于，用下组中选择的一种方法完成细胞分离，该组包括：

电穿孔，煮沸、添加用于破碎细胞膜的试剂和用刚性结构搅动样品。

64. 根据权利要求 61 所述的系统，还包括第三电极，该第三电极位于邻近排出孔处，并适于从提纯室至排出孔移动材料。

65. 根据权利要求 64 所述的系统，其特征在于，该电极是 C 形电极。

66. 根据权利要求 64 所述的系统，其特征在于，该电极包括：

第一和第二部分，它们通常配置在与第一和第二电极所限定的轴成倾斜的方向上，以及第三电极，其定位用于向陷阱驱动材料。

67. 用于带电生物大分子电泳运动的系统，包含：

第一聚束电极区，用于使所述带电大分子在与第一方向相同的方向含分量的方向运动，第二聚束电极区，用于使所述带电大分子在与所述第一方向含相反分量的方向运动，

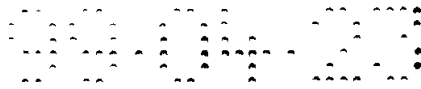
第三电极区，用于使所述带电大分子在通常垂直于第一方向含分量的方向运动，而且

电子控制系统，用于激励所述电极区以产生所述带电生物大分子的浓缩和净运动。

68. 根据权利要求 67 所述的用于带电生物大分子电泳运动的系统，其特征在于，第一聚束电极区，第二聚束电极区和第三电极区构成 C 形电极。

69. 一种用于从包括蛋白质的材料中提纯 DNA 的装置，该蛋白质材料的荷质比大于 DNA 的荷质比，该装置包含：

适于接收缓冲液的上游槽，该上游槽包括样品溶液接收区，用于接收 DNA 和蛋白质材料，



导电聚合物区，配置在相邻于并垂直地位于上游槽的样品溶液区下面，收集室，适于接收缓冲液并用于接收 DNA，而且

电极，适于和缓冲液电接触，以提供 DNA 和蛋白质材料穿过导电聚合物和集合室的电泳运动。

70. 根据权利要求 69 所述的用于提纯 DNA 的装置，还包括限定集合室的至少一部分的膜。

71. 根据权利要求 70 所述的用于提纯 DNA 的装置，其特征在于，该膜是超滤膜。

72. 根据权利要求 70 所述的用于提纯 DNA 的装置，其特征在于，该膜包含分子量截止膜。

73. 根据权利要求 72 所述的用于提纯 DNA 的装置，其特征在于，该分子量截止膜将 DNA 保留在集合室内。

74. 根据权利要求 69 所述的用于提纯 DNA 的装置，其特征在于，该集合室的体积小于导电聚合物的体积。

75. 根据权利要求 74 所述的装置，其特征在于，该集合室的体积小于或等于导电聚合物体积的一半。

76. 根据权利要求 75 所述的用于提纯 DNA 的装置，其特征在于，该集合室的体积等于或小于导电聚合物体积的 $1/3$ 。

77. 根据权利要求 69 所述的用于提纯 DNA 的装置，还包括在导电聚合物和集合室之间的膜。

78. 根据权利要求 77 所述的用于提纯 DNA 的装置，其特征在于，该膜含有的孔的尺寸允许 DNA 和蛋白质材料都被输送穿过膜。

79. 根据权利要求 69 所述的用于提纯 DNA 的装置，还包括适于接收缓冲液并配置在集合室下面的下槽。

80. 根据权利要求 69 所述的装置，其特征在于导电聚合物是分子筛。

81. 根据权利要求 80 所述的装置，其特征在于，该分子筛是丙烯酰胺。

82. 根据权利要求 69 所述的装置还包括缓冲剂。

83. 根据权利要求 82 所述的装置，其特征在于，该缓冲剂是组氨酸。

84. 根据权利要求 69 所述的装置，其特征在于，该导电聚合物在迁移方向的厚度基本上为 10 至 20 毫米。



85. 一种在含上游缓冲室，配置在上游室下面的导电聚合物区，和配置在邻近导电聚合物区的集合室，及用于使带电材料穿过系统的进行电泳运动的连接电极的装置中，用于从包括 DNA 和其它带电材料的混合物中提纯 DNA 的方法，所述的其它带电材料包括某些具有比 DNA 更高荷质比的材料，该方法包含的步骤为：

将样品混合物放在导电聚合物上面的上游缓冲室，
激励电极，以使样品混合物电泳进入导电聚合物区，并保持足够的时间，使不想要的材料基本上移过导电聚合物区，而且
洗提 DNA 进入集合室。

86. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，还包括增密样品混合物的步骤。

87. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，其特征在于，该增密步骤包括添加蔗糖。

88. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，包括在将样品混合物放进上游缓冲室以前，进一步溶解细胞的步骤。

89. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，还包括在将样品混合物放进上游缓冲室以前剪切样品的步骤。

90. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，其特征在于，使样品混合物经受蛋白酶解。

91. 根据权利要求 90 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，其特征在于，在所述蛋白酶解步骤以前，该样品混合物经受 RNA 酶解。

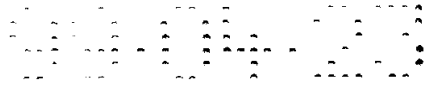
92. 根据权利要求 91 的方法，其特征在于，该蛋白酶是蛋白酶 k。

93. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，还包括在洗提 DNA 进入集合室以前，改变缓冲液的步骤。

94. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，还包括在洗提 DNA 进入集合室以前，对集合室添加膜的步骤。

95. 根据权利要求 85 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，包括从集合室萃取 DNA 的步骤。

96. 根据权利要求 95 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，其特征在于，通过将集合室穿孔从集合室萃取 DNA。



97. 根据权利要求 95 所述的用于从样品混合物提纯 DNA 的方法，其特征在于，通过阀门从集合室萃取 DNA。

说明书

用于活性生物样品制备的设备和方法

发明的领域

本发明涉及用于完成活性，多级分子和生物样品制备和诊断分析的设备和方法。本发明尤其涉及样品制备，细胞选择，生物样品提纯，复杂性简化，生物诊断和通用的样品制备及加工。

发明的背景

分子生物学包含分析核酸和蛋白质的多种技术。其中很多技术与工序构成临床诊断验定与测试的基础。这些技术包括核酸杂交分析，限制性内切酶分析，基因序列分析，和核酸及蛋白质的分离与提纯（如见 J.Sambrook, E.F. Fritsch and T.Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989）。

这些技术多数涉及在大量样品上的无数操作（如用滴管吸移，离心分离，电泳）。通常这些技术是复杂又费时间的，并要求高精度。由于灵敏度，特异性或可再现性不够，许多技术在应用中受到限制。例如，这些问题已限制了核酸杂交分析的许多临床诊断应用。

进行基因或传染病DNA杂交分析的全过程是很复杂的。一般地说，全过程可分成某些步骤或子步。在遗传疾病诊断的情况下，第一道步骤涉及获取样品（如血液或细胞组织）。将进行与样品类型有关的各种预处理。第二道步骤涉及破裂或溶解细胞，然后它与其它细胞成分一起释放天然的DNA和RNA（当简单起见，在适当的地方，在下文中对DNA的参考文献也可用于RNA）。通常，需用几个子步来清除细胞碎片并进一步提纯天然的溶解产物。这时，存在用于进一步加工和分析的几种选择。一种选择涉及使提纯的DNA变性并在许多形式（印渍、微珠、微滴定板）中之一进行直接的杂交分析。第二种选择，称为Southern印渍杂交，包括用限制性内切酶

切开DNA，在一种电凝胶上分离DNA碎片印在滤膜上，然后用特定的DNA探针序列杂交该印渍。该工序有效地简化了基因组DNA样品的复杂性，从而有助于改进杂交特异性和灵敏性，从而有助于改进杂交特异性和灵敏度。不幸，这种工序又长又费力。第三种选择是进行聚合酶链式反应（PCR）或其它放大工序。PCR工序放大（增加）靶DNA序列的数目。靶DNA的放大有助于克服在基因组DNA或RNA分析中涉及的复杂性和灵敏度问题。所有这些工序是费时间的，比较复杂，并显著地增加诊断测试的成本。在进行这些样品制备和DNA加工步骤后，完成了实际的杂交反应。最后，检验和数据分析将杂交事件转化成分析的结果。

样品制备和加工的步骤一般情况下单独完成并与杂交及检验和分析的其它主要步骤无关。确实，包含样品制备和DNA加工的各种子步常以单独的并与其它子步无关的分立操作的形式完成。更详细地考察这些子步，通过任何数量的手段获取样品，诸如获取全血，细胞组织或其它生物流体样品。在血的情况下，经常加工样品以清除红血细胞并保留所需的有核（白）细胞。该过程通常用密度梯度离心分离法进行。然后进行细胞碎裂或溶解，最好是用声处理，冷冻/融化，或通过添加溶解试剂的技术进行。

在某些情况下，彻底地加工血液以消除污染物。现有技术已知的一种这样的系统是Qiagen系统。该系统包括随后使用蛋白酶K消化的预溶解，此后样品装在柱体上并用浓盐缓冲剂（如1.25M 氯化钠）洗提。通过用异丙醇沉淀浓缩样品然后离心分离成小丸。然后小丸用乙醇洗涤并离心分离，此后将其放入所需的缓冲剂内。全部提纯时间大约两个多小时，而且制造商声称可获得1.7至1.9（OD 260-280）的光密度比（260纳米/280纳米）。高的盐浓度可消除在制备材料上某些酶反应的性能。此外，用Qiagen方法制备的DNA在使用电泳的电泳诊断系统上的传输比较差。

现在回到样品制备的一般讨论，天然DNA常用离心分离步骤从细胞碎片中分离。在杂交以前，双螺旋DNA变性为单螺旋形式。双螺旋DNA的变性常用涉及加热（ $> T_m$ ），改变盐浓度，添加碱（如氢氧化钠），或变性试剂（如尿素，乙酰胺）等技术完成。人们曾建议在电化学电池中将DNA变性成单螺旋形式。所述的理论是电子转移到电极界面处的DNA上，有效地

减弱双螺旋结构并导致螺旋分离。如见Stanley, "DNA Denaturation by an Electric Potential" U.K. Patent application 2,247,889 published March 18,1992.

在较大量的复杂非靶核酸中,核酸杂交分析通常涉及用多余的探针DNA检测很少量的特异靶核酸(DNA或RNA)。用聚合酶链式反应(PCR)通过放大靶核酸序列,有时在某种程度上克服DNA的复杂性。(见, M.A. Innis et al, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, 1990)。虽然放大产生极大量的靶核酸序列,从而改善了后续的直接探针杂交步骤,放大涉及一般必须在相对于其它子步单独的作业点完成的冗长和麻烦的工序。要求用复杂的较大型设备来完成放大步骤。

实际的杂交反应是一种重要步骤并放在接近过程终点时。杂交步骤涉及在一种与靶DNA序列发生杂交的最佳条件下,将制备的DNA样品暴露于特定的指示探针下。可以用任一种形式进行杂交。例如,可以在各种滤膜和固体支持物上进行多种核酸样品的杂交分析(见, G.A. Beltz et al., in Methods in Enzymology, vol. 100, Part B, R. Wu, L. Grossman, K. Moldave, Eds., Academic Press, New York, Chapter 19, pp. 266-308, 1985)。一种形式,所谓“印渍”杂交,涉及靶DNA对滤膜的非共价附着,随后用放射性同位素标记的探针进行杂交。“印渍”杂交得到广泛应用,并已开发出许多形式(见, M.L.M. Andersn and B.D. Young, in Nucleic Acid Hybridization-A Practical Approach, B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., IRL Press, Washington, D.C. Chapter 4. pp. 73-111, 1985)。“印渍”验定已经开发用于基因组突变的多种分析(D. Nanibhushan and D. Rabin, in EPA 0228075, July 8, 1987),并用于重迭克隆的检测和基因组图的构建(G.A. Evans in US Patent Number 5,219,726, June 15, 1993)。

在微小尺寸多重或基质器件(如DNA芯片)上已开发出进行多种样品核酸杂交分析的新技术(见, M. Barinaga, 253 Science, pp 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, pp. 757-758, 1992)。这些方法通常将特异DNA序列附着到固体支持物的很小特定区域,如DNA芯片的微孔上。这些

杂交形式是常规“印渍”和“夹层”杂交系的微量型。

微型杂交可用于进行“杂交测序 (SBH)” (见, M. Barinaga, 253 Science, pp 1489, 1991; W. Bains, 10 Bio/Technology, pp 757-758, 1992)。SBH利用所有可能的n重核苷酸寡聚物 (n-mers) 鉴别未知DNA样品中的n-mers, 随后将它们用规则分析方法进行排列而产生DNA序列 (R. Drmanac and R. Crkvenjakov, Yugoslav Patent Application #570/87, 1987; R. Drmanac et al., 4 Genomics, 114, 1989; Strezoska et al., 88 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10089, 1992; and R. Drmanac and R. B. Crkvenjakov, V. S. Patent #5,202,231, April 13, 1993)。

存在两种进行SBH的形式, 第一种形式涉及在一种支持物上产生所有可能n-mers的阵列, 然后用靶序列杂交。第二种形式涉及将靶序列附着到支持物上, 随后用所有可能的n-mers按进行探测。两种形式都存在直接探针杂交的基本问题和与多重杂交有关的其它问题。

Southern, 英国专利申请 GB 8810400, 1988; E. M. Southern et al., 13 Genomics 1008, 1992, 提出用第一种形式分析或测序DNA。Southern用PCR放大的基因DNA鉴定出一种已知的单点突变。Southern还描述了一种在用于SBH的固体支持物上合成一种寡核苷酸阵列的方法。可是, Southern并未提出怎样在一种阵列上实现用于每一种寡核苷酸的最佳强度条件。

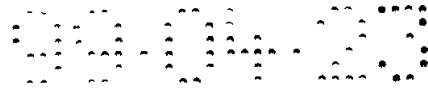
同时, Drmanac et al., 260 Science 1649-1652, 1993, 用第二种形式对几种短的 (116 bp) DNA序列进行了测序。靶DNA被附在薄膜支持物上 (“印渍”形式)。随后将每一种滤膜用272个标记的10-聚体和11-聚体寡核苷酸进行杂交。用多种多样的强度条件实现每一种n-mer探针的特异杂交; 洗涤时间从5分钟至过夜, 而温度从0℃至16℃。多数探针要求在16℃下洗涤3小时。滤膜必须暴露2至18小时才能检测到杂交信号。尽管采用简单的靶序列, 寡聚物探针的减少, 及使用最严格的条件, 总的错误正杂交率为5%。

存在检验和分析杂交事件的各种方法。根据用来标记DNA探针的报道基团 (荧光团, 酶, 放射性同位素等) 的不同, 检测和分析可用荧光, 比色, 或自动射线照相术进行。通过观察和测量发出的辐射, 诸如荧光辐射或粒子发射, 可获取关于杂交事件的信息。当检测方法具有很高本征灵敏

度时，由于存在非特异性结合材料的背景，杂交事件的检测是困难的。某些其它因素也可降低DNA杂交验定的灵敏度和选择性。

曾经企图将某些加工步骤或子步组合在一起。例如，已经提出各种微型自动化系统用于在一种支承材料上制备DNA探针阵列。例如，Beattie et al.，在1992年11月的The 1992 San Diego Conference: Genetic Recognition中，采用一种微型自动化系统将含有特异DNA序列的微滴沉积在玻璃基片上各个微孔中。已经作出各种尝试来描述一种在单个芯片或基底上形成的集成系统，其中将包括总的样品制备和诊断系统的多个步骤。例如，A. Manz et al.，在“Miniaturized Total Chemical Analysis System: A Novel Concept for Chemical Sensing”，Sensors And Actuators, B1 (1990)，pp. 244-248中，描述了一种‘全化学分析系统’（TAS），包含一种小型全化学分析系统的模块结构。将自动进行取样，样品输送，任何必要的化学化应，色谱分离及检测。可是Stapleton在U.S Patent NO. 5, 451, 500中提出了另一种集成系统，描述了一种自动检测靶核酸序列的系统，其中多个生物样品被分别装入一种二维格式中包含载体的基体上。描述了用于不同种类诊断试验或试板的不同类型的载体。

已公开了各种多电极系统，其目的是为了完成生物样品制备或分析的各个方面。Pace在U.S Patent NO. 4, 908, 112。标题为“Silicon Semiconductor Wafer for Analyzing Micronic Biological Samples”中描述了一种分析分离装置，其中通过在一种半导体器件中的通道构成的毛细管尺寸的导管，其中，在通道中定位电极以激活液体穿过导管的运动。Pace指出导管的横向尺寸小于100微米。Pace指出，一种分析仪器的所有功能可以集成在单个的硅夹层中：样品注入，加试剂、提纯、检验、信号处理电路、逻辑和机上分析。Soane et al.，在题为“Method and Device for Moving Molecules by the Application of a Plurality of Electrical Fields”的U.S Patent NO. 5, 126, 022中描述了一种系统，利用该系统，通过对电极加上电势使材料在沟槽中移动。其中，选定的成分可以被引导到充满与在介质中移动的给定带电粒子反应的抗原-抗体的槽沟中，或与互补成分，染料，荧光标签，放射性标记，酶特异标签，或与



用于任何目标，例如各种物理或化学性质变换，的其它类型化学品相接触。据称，通过复杂的沟槽网络并通过对电极施加电势可将细菌或哺乳动物细胞或病毒进行分类。其中，细胞或病毒通过施加电场在槽沟中的移动是基于特定材料的大小，电荷或形状进行的。Clark在题为“Sensor Devices”的U.S Patent NO. 5, 194, 133中公开了一种用于分析样品流体的传感器，它包括一种在一个表内的基底，该表面上形成一种延长的微型槽沟，该槽沟内含有一种材料，例如淀粉，琼脂糖，藻酸盐，角叉菜胶或聚丙烯酰胺聚合物凝胶。当样品流体经过该槽沟时使样品流体分离。生物材料可以包含如结合蛋白质，抗体，植物凝血素，酶的一种序列或脂肪。

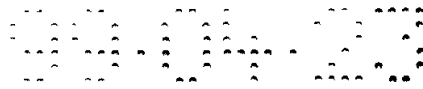
已知从各种表面洗提DNA的各种装置。Shukla在题为“Apparatus for Electroelution”的U.S Patent NO. 5, 340, 449中描述了一种系统和方法，用于在电场中从诸如聚丙烯酰胺，琼脂糖和像聚偏氟乙烯膜等固相材料中洗提像蛋白质，DNA和RNA等大分子。从固相洗提的材料进入由分子量截止膜部分组成的容器内。Okano在题为“Separation of Polynucleotides Using Supports Having a Plurality of Electrode-Containing Cells”的U.S. Patent NO. 5, 434, 049中，公开了一种在样品中检测多种靶聚核苷酸的方法，该方法包括对单独的室加电势的步骤，以使用做电极来洗提俘获的靶聚核苷酸，然后洗提的材料可被收集。

通常，现有技术的方法极费力和费时间。例如PCR放大过程是费时间的并增加诊断验定的成本。不论在过程期间或过程之间，要求人工介入的多级步骤不是优选的，在于可能存在污染或操作误差。此外，由于开支和物理空间的要求，除最大的实验室次外，采用多种机器和复杂的自动化系统用于完成单个工艺过程常是代价过高的。

从上述讨论显而易见，曾作出无数尝试提供进行样品的制备反应的有效技术。可是，由于上述理由，这些技术是有限和不足的。这些各种各样的手段不容易组成一种进行彻底DNA诊断验定的系统，尽管早已认识到需要这种系统，以前尚未提出满意的解决方案。

发明概述

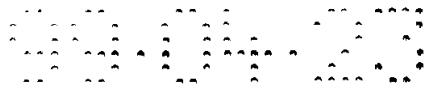
本发明广义地说涉及生物材料电子样品制备的方法和设备，以将它们最终用于诊断或分析中。本发明提供了一种集成系统用于完成下述的某些



或所有工艺过程：接收生物材料，细胞选择，样品提纯，复杂性简化及/或诊断和分析。从诸如生物材料或细胞溶解物等天然混合物中分离想要的成分，如DNA，RNA或蛋白质。电子样品制备采用样品中各种材料的差动迁移及/或差异亲和力，以将它们制备和分离。这些方法和设备可以用于在自由场电泳中从天然混合物或溶解物中提纯DNA。在本发明的一种情况中，一种设备包含至少一种适于接收缓冲液的第一中心或试样室，和一种适于接收相同或不同缓冲液的第二中心或试样室，其中第一试样室和第二试样室被隔离区分开，该区最好是包括一种陷阱，膜或其它亲和材料。提供和第一试样室的导电溶液电接触的第一电极和与第二试样室的导电溶液电接触的第二电极。最好是，每个电极装在自己的电极室中，通过一种保护层或隔离介质，膜，诸如超滤膜，聚合物或凝胶将该电极室与对应试样室分开。操作中，样品混合物放在第一中心室中。这些中心室装有溶液，最好是低导电缓冲液，如50mM组氨酸，250mM HEPES，或0.5 x TBE。生物物质的混合物，例如一种天然溶解物，加到第一室然后激励电极。基于物质上所带的电荷，可迁移的物质在电场中将移向一种或另一种电极。在一种实施方案中，带有相似电荷的想要和不想要的物质将被吸到位于第二室的，加偏压带有和想要物质相反电荷的电极。因此带有相似电荷的想要和不想要的物质将移向在第一和第二室之间的亲和物质。

在一种实施方案中，样品混合物由一种含电荷的想要物质和其中一些含电荷的不想要物质的混合物构成。在激励电极后，想要的物质向加偏压带有相反电荷的电极所在的第二室行进，并结合亲和材料。与此相比，带有类似电荷的不想要物质移向加偏压带相反电荷的电极，并通过亲和材料进入第二室。其它带相反电荷的不想要物质将被吸引指向第一室中的电极。在不想要物质穿过亲和材料后，将更换两个室中的电解液以消除不想要的物质。然后洗提想要的物质进入新的电解液。洗提可通过在相同或增大电流的条件下继续电泳或通过添加引起从亲和材料洗提的化学品，如洗涤剂，盐、碱，或酸来完成。另外，改变温度可用来洗提想要的物质。

在一种特定实施方案中，亲和材料由一种凝胶组成，它应具有足够的容量而使样品中的想要物质能够被保持一个足够大的百分比，如优选为50%，更优选为80%。选择凝胶的成分和浓度致使含高分子量（30,000至



3,000,000道尔顿)的想要物质的迁移被凝胶阻止,但含低分子量(100至10,000道尔顿)的不想要物质的迁移相对来说不受影响。因此,只有在长时间电泳后,或电流比通过不想要的物质更高时,凝胶将释放想要的物质。实际上,凝胶是用于想要物质的陷阱,但对不想要物质则不是显著的障碍。由于凝胶起到一种陷阱的作用,当想要和不想要的物质行进通过凝胶时,在电泳迁移率方面,最好有很大的差别。最好是,陷阱并未有效地分辨含相似成分和分子量彼此基本上差10倍以内的碎片的迁移率的差别。

根据本发明,为了有利于快速迁移,最好是牺牲对不同分子量的分辨率。最好是,装置中的凝胶在迁移方向比较紧凑(如0.5至10毫米),以便允许发生快速电泳运输。于是,这种技术的速度不能和普通的通过在大小上有很大差别的物质之间的大小排除来分辨物质的方法相比。因此,这种技术的固有性质是共同提纯分子量相差很多的想要的物质。制备成分类似但大小不同的物质可能对用户有利,例如为达到克隆一种生物基因组的整个或具代表性的部分的目的而提纯不同大小的DNA。

按照本发明的一种情况,在同一装置中将想要的物质推出或进入凝胶。就是说,在该优选实施方案中,在全系统的不同区域起陷阱的作用,因而有助于分离分析物或待洗提的材料。将电泳和洗提的步骤集合在一起对使用者也可节省时间,减少需要的步骤和需要的用于设备的空间。

在本发明的一种情况中,在电泳中可采用含有多个电极室的装置和第一及第二终端室与一种或更多中间试样室进行电交流是有利的。在优选实施例中,每一个终端试样室和中间试样室与一种电极室进行电交流,最好是试样室用膜和电极室分开。最好是,电极室的缓冲体积大于并最好远大于(如至少10比1)装入试样室的样品体积。

在本发明的另一种情况中,陷阱,膜或其它亲和材料用做输送机或“测探杆”来收集并允许输送材料。在该装置的一种实施例中,放在相邻试样室之间的膜或其它亲和材料具有结构坚固性,允许从室结构取出陷阱或亲和材料。在一种优选实施例中,一种膜或陷阱固定在一框架中,该框架适于和在隔离区形成的通道配合。输送机或测探杆可用来输送收集的材料用于进一步加工,如进一步提纯,复杂性简化或验定或诊断。输送机可任选地放在与电源相邻或与之形成电交流。

在本发明的另一种情况中，第一和第二电极放在中间的样品溶液内，该系统还包括在第一和第二电极之间的第三电极。第三电极可用做控制电极调节样品溶液中带电材料的流动。第三电极最好成栅状，并最好通过在膜上溅射一种金属涂层构成。第三电极或栅，优选放在样品溶液中与第二电极相距离更靠近第一电极的地方。在一种操作方式中，样品放在第一和第二电极之间的样品溶液中，而第一和第二电极加偏压，用于带有第一种电荷的带电材料向第二电极净迁移。第三电极或栅最好是稍带负电性的偏压或中性。一旦想要的DNA或其它带电材料穿过或从旁边绕过第三电极或栅，第三电极或栅优选带较负的电势。增加的电负性用于将带负电的DNA移向第二电极，并排斥其它，更多缓慢移动的仍停留在第一电极和第三电极或栅之间的带负电材料。

在本发明的又一种情况中，样品溶液中有一对电极，并对其操作以便在样品溶液中聚束或浓缩带电大分子的子集。对一种电极加偏压以便加速带电大分子指向另一电极的运动，而对另一电极加偏压以便阻止在电极间区域中靠近该电极带电大分子的运动。这种聚束用来物理地浓缩在该区域内的带电大分子。

在一种优选实施例中，采用一种“C”形电极。该结构用于聚束装由C形电极束缚区域内的材料，并排斥在C形区束缚区以外的带同种电荷的材料。另外，装在C形区内的材料承受侧向力（即对离开C形电极净流方向成横向或斜向）。C形电极可以是集成的连续电极，或者可以是片断状的。也可以使用其它结构，如抛物形结构。C形区体积的大小应将想要的材料或靶材料包括在区域内。

一种复杂性简化装置包括一种或更多探测区，这些区域包含一种支持材料，最好是附有俘获探针的一种聚合物凝胶，如琼脂糖，丙烯酰胺或其它导电聚合物。支持材料与一种电极形成接触，以便允许俘获探针与靶材料电泳吸引和杂交。可以采用俘获材料的电洗提或电子严谨性控制。在一种实施例中，由室配合一种印刷电路板的组合形成一种复杂性简化装置。该室包括其中存在支持材料的通路。该印刷电路板最好包括同心的通路，为包含支持材料提供连续的空间。在这种实施例中，用通路抽走气体或其它反应产物，部分原因是通路充满聚合物，气体一般不能上升进入通路。

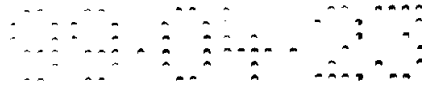
因此，这些气体或其它反应产物不和被分析物，如DNA，接触。复杂性简化系统可进一步任选包括用于吸引及/或处理不想要材料的处理区。这些处理区包括穿过导电聚合物进行电交流的电极。在操作中，该复杂性简化装置完成自由场电泳输送。另外，与溶液接触的未覆盖电极可用于处理不想要的材料。

在本发明的另一种情况中，提供DNA或其它核酸提纯装置。可识别为阴极的含一种电极的上槽，适于接收缓冲液和样品溶液。最好是上游槽包括一种与该槽进行流体交流的管子，该管的内直径小于上游槽的直径。该管包括至少一种第一差动迁移段，最好是凝胶，在管内提供一种插塞或陷阱区。凝胶可任选浇铸在支持膜顶部。一种集合室在邻近差异迁移区处。在该优选实施例中，收集区具有比差动迁移区小的体积并小于样品体积。从样品至收集体积的缩小，允许增大DNA的体积浓度，并使DNA交换进入已知体积的想要的缓冲配方。在下槽中配备阳极。在本发明的另一种情况中，DNA在水平平面中，而不是在垂直平面中排列和输送。

在操作中，样品承受细胞溶解和剪切预制备步骤。最好是，然后通过加一种蛋白酶，如蛋白酶K，使蛋白质的尺寸变小。最好是，当装置以垂直形式操作时，向样品添加蔗糖或增密剂。增密剂的作用是在恰好在第一差动迁移段上面的区域内收集和浓缩样品。然后在差动迁移段的直接上游，将包括增密剂的制备样品注射到管中的分离装置上。然后阴极和阳极通电在系统内提供带电材料的电泳输送，首先使尺寸缩小的蛋白质材料通过差动分离介质，却保留移动较慢的DNA，并导致蛋白酶K或其它带正电的材料迁移到阴极上，在足以允许需要量的蛋白质通过该差动迁移区及支持膜的一段时间以后，从差动区洗提DNA进入试样室。可任选地，将下槽中接收已经穿过支持物的蛋白质材料的缓冲液除去，并用新的缓冲液替换，而且任选配备一种膜用于在试样室内保留洗提的DNA。

在本发明的又一种情况中，阴极和阳极通过导电流体或凝胶或聚合物与样品交流，但停留在电源或其它控制仪器内。通过液体孔和最好不是消耗装置一部分的电极（贵金属）进行传导。

可以在有条件下构成包括细胞分离，提纯，复杂性简化和诊断的某些或所有功能的集成系统。在一种实施例中，一种提纯室包括输入装置和多



种电极用于向带电材料提供电泳驱动力。放在样品入口和出口之间的蛋白质陷阱用于捕集不想要的蛋白质或其它带电大分子。在另一种实施例中，像蛋白质这种不想要的材料尺寸缩小或改变电性，以便增加其相对于想要的材料，如DNA的迁移率。然后从陷阱或其它运输装置迁移用于进一步加工的材料，用于再加工，如复杂性简化及/或诊断工序。通过改变电场引导材料进入高纯度区（如纯缓冲剂），完成从不想要的材料分离出靶材料的步骤。通过C形电极或激励新的有利影响靶迁移方向的电极构型，可以实行电场的变性。

在本发明的另一种情况中，提供一种集成样品制备，复杂性简化和诊断的系统。一种输入区接收包括尺寸缩小的蛋白质的天然溶解物，如通过使用的蛋白酶。材料通过一种DNA陷阱，其中DNA的移动比蛋白质慢。在DNA到达前，蛋白质通过电泳到达一种蛋白质陷阱。然后DNA离开DNA陷阱走向收集区。最好是，该收集区的体积小于，优选为大大小于DNA陷阱的体积，如50微升。该体积和复杂性简化和诊断区交流。在本发明的一种情况中，装置中的液体输送由位于收集区每个端点的输入孔完成。这些双输入端适于接收任何流体，如缓冲剂，气堵，或试剂。通过电源或泵的选择性操作，在收集区内容纳的材料，如基本上提纯的DNA，可由该区域压入复杂性简化装置。通过使用气堵，各种流体可彼此分离。通过输入液体或气体的操作，一种水力或气动活塞用于在装置的流体段内移动材料。虽然材料可以被向前推动穿过系统，如从收集体积至复杂性简化至诊断系统，材料可以沿相反方向移动如从复杂性简化区至浓缩区。

因此，本发明的一种目的是提供可用于生物样品制备的样品制备系统。

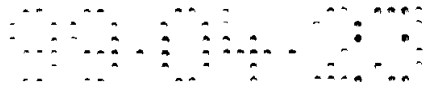
本发明还有另一种目的是提供从生物材料或其它天然样品中提纯DNA的系统。

本发明还有另一种目的是，通过差动溶液相迁移及/或差异亲和力，提供分离和提纯想要的生物带电大分子。

附图简述

图1是一种多试样室，多电极室装置的俯视，平面图。

图2是一种装置的俯视，平面图，包括多电极室，终端试样室和多级



中间试样室。

图3是本发明一种实施例的透视，分解图。

图4是一种多电极实施例的剖面图。

图5是包括一种陷阱电极的多电极实施例的剖面图。

图6是包括一种栅或控制电极的多电极结构的透视图。

图7是还包括聚束电极的多电极系统的透视图。

图8是一种集成样品制备和诊断装置的平面图。

图9是另一种集成样品制备和诊断装置的平面图。

图10是一种复杂性简化装置的透视，剖面图。

图11是该复杂性简化装置的透视，剖面特写图。

图12是带有印刷电路板与复杂性简化室彼此分解的复杂性简化装置透视图。

图13是一种垂直放置的样品制备装置的局部剖视图。

图14表示一种水平集成样品制备，复杂性简化，诊断和处理装置的平面图。

图14A表示沿图14的A-A'线截取的剖面图。

图15是存在由图13的装置提纯的表面金色葡萄球菌基因组的DNA和靶DNA输送，和现有技术Qiagen方法的比较，作为时间函数的图形。

图16是一种图形，对复杂性简化装置在不同缓冲液中操作进行比较。

图17是一种信号积累的图形，用于一种和各种缓冲剂的基于印刷电路板装置相比较的微电子装置。

图18是一种对运输和电子洗涤后特异和非特异的探针测定相对靶信号水平和存在每40微升不相干的人体DNA时，用一种Texas Red Bodipy™标记的链球菌靶序列去杂交后的图形。

图19是存在一种非标记互补DNA和不相干人体DNA的等克分子浓度时，标记链球菌靶DNA的杂交图形。

发明详述

图1表示本发明一种实施方案的自上而下的平面图。框架10支持第一中心或试样室12和第二中心或试样室14。任选地指定第一和第二，并且可以互换，这些室或许可称为左中心室12和右中心室14。隔离区16设在左中

心室12和右中心室14之间。隔离区适于接收陷阱，膜，或其它亲和材料或在隔离区16内相对分化生物材料。在一种情况中，隔离区16可充满浇铸在隔离区16的凝胶或放一种膜覆盖隔离区16。第一电极室18与左中心室12相邻。用膜22将电极室18与中心室12隔开，优选一种超滤膜，最优选一种醋酸纤维膜。同理，一个右或第二电极室被设置在邻接右中心室14处。用膜24隔开。膜22，24的功能是减小或防止那里的样品材料或选择的成分和电极26、28直接接触。放置第一电极26和第二电极28分别与第一电极室18及第二电极室20接触。这些电极最好用贵金属构成，尤其是用铂。

在优选实施方案中，框架10用较坚硬的支持材料构成。该支持材料与其接触的材料不起反应。理想的材料包括，聚甲基丙烯酸酯，塑料，聚丙烯，聚碳酸酯，聚四氟乙烯，特氟隆或其它不起反应的材料。通常，框架材料是和样品材料不起反应的，不相互作用的或不结合的。框架10内构成的区域包含电极室18、20、中心室12、14和隔离区16。在一种实施方案中，电极室18、20为0.4厘米宽，0.6厘米深和5厘米长（方向平行于在第一电极26和第二电极28之间的连线）。中心室12、14含与电极18、20相同的宽度和深度，并且长1.5厘米。隔离区16和室12、14、18和20具有相同的宽度和深度，并且长0.4厘米。通常，隔离区16的体积比中心室12、14小。优选隔离区16的体积小于50%，最优选小于中心室12、14体积的30%。上述实施方案为隔离区16具有中心室12、14大约25%的体积。作为一种替代措施，隔离区16可用其沿从第一电极26至第二电极18方向的距离来表征。优选线性距离小于5毫米，更优选4毫米或以下，通常在1至2毫米的范围内。在另一个特征中，隔离区16在介于第一电极16和第二电极28之间的方向的厚度比第一电极26和第二电极28之间的距离短。优选该长度小于20%，更优选小于10%，而最优选约小于5%。优选隔离区16的尺寸是这样的，相对于该装置的其它结构，想要的材料可以和不想要的材料隔开，以便允许分离想要的材料。

隔离区16包括一种材料，该材料用于区分装置内的大分子。一类材料将包含蛋白质陷阱，如像聚偏氟乙烯材料，硝酸纤维和疏水材料。另一类材料是带负电的材料。但第三类材料是带正电的材料。一类改性的材料采



用一种洗涤剂与陷阱组合，它允许DNA通过陷阱。对本领域的技术人员来说，已知可采用获得陷阱功能的各种表面活性剂，洗涤剂 and 材料来区分材料。DNA/RNA陷阱尤其将包括低密度聚合物（如0.5-3%的琼脂糖，或5%-15%的丙烯酰胺）和聚偏氟乙烯。后一种材料是在某种程度上捕集DNA的材料，但通过添加一种洗涤剂，由此可以选择性地洗提DNA或RNA。

电极室18, 20和中心室12, 14充满缓冲液。该缓冲液优选为较低导电缓冲液。缓冲剂的其它功能特征可以包括：低化学反应性，没有净电荷的两性离子或两性电解质。标题为“Methods and Materials for Optimization of Electronic Hybridization Reactions”与本发明同日申请，引入本文作为参考，以更充分地描述这种技术。适用于接收DNA的缓冲剂的实例包括：组氨酸，尤其约为50mM的组氨酸，HEPES和0.5×TBE。HEPES是4(-2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸。通过在去离子水中以1:10稀释10×TAE制备TAE(0.4M Tris 乙酸盐, 0.1M 乙二胺四乙酸, 0.2M 冰醋酸 pH 8.4) 通过在去离子水中以1:20稀释TBE(0.89M Tris 硼酸盐, 0.89M 硼酸, 0.02M 乙二胺四乙酸, pH 8.0) 制备0.5×TBE。

操作中，一种样品放在中心室12, 14中，为便于讨论，假定为左中心室12。跨越第一电极26和第二电极28加一种电势，允许电流穿过电极室18, 20和中心室12, 14。样品中的带电大分子电泳移过左中心室，指向隔离区16。如果隔离区16包括一种蛋白质陷阱，DNA移过隔离区16进入右中心室14。另外，如果隔离区16包括一种材料，设计来固定DNA，但通过蛋白质和其它不想要的材料，DNA停留在隔离区16的左侧部分，由此它可被洗提。在后一种操作方式中，左中心室12中的缓冲剂可以在洗提DNA回到左中心室12以前替换。

一般地说，本发明的方法提供一种样品的活性生物样品制备，该样品包含一批包括不同荷质比的想要材料和不想要的材料，在包括溶液相区和至少一种在想要的材料和不想要的材料比较时含有差动效应的陷阱区的电泳系统中实现分离。陷阱区的差动效应是陷阱的物理尺寸，成分和结构的函数，选择该函数使不论是想要的还是不想要的材料选择性地通过或停留。在优选实施方案中，该方法包括向装置的第一溶液相区提供样品材料的步骤。其后，在系统中电泳样品以便在想要的材料和不想要的材料之间

产生净的差动迁移，据此想要或不想要的材料中的一种位于陷阱内，而另一种材料在溶液相区内，就是说，或者是想要的材料基本上保留（如优选地 $\geq 50\%$ ，更优选地 $\geq 80\%$ ）在陷阱内，或者是不想要的材料基本上不留在陷阱内，或者相反。其次，以系统中取出想要的材料，从而制备出已相对提纯的想要的材料。如果想要的材料是被结合或被捕集的材料，它们可以用任何方式取出，包括但不限于从系统用物理方法取出，如用测探杆，接着被转移到一种流体或其它介质中，如靠移过陷阱或移回它们原来的室，尤其是假定在该室内缓冲液已改变了。

图2表示一种多室装置的平面图。框架30包括多电极室32。每个电极室32包括一种电极34。该电极优选用贵金属构成，如铂，并可放在电极室32内与一种缓冲液电接触。终端试样室36夹有一个或多个中间试样室38。该终端试样室36由分隔物40将直接相邻的中间试样室38隔开。分隔物40可包含一种亲和介质，一种膜或其它在通道间选择性区分的，或对各种生物材料亲和的其它材料。试样室36，38通过膜42与电极室32隔开。最好是电极室32的体积较大，相对于试样室36，38的尺寸，优选为大10倍，最优选为大20倍。之所以这样，是因为穿过膜42的电渗透可导致液面差。另外，这种较大的体积比缩小了在相邻的电极室32和试样室36，38之间的离子浓度梯度，并提供pH稳定度增大的围绕电极34的较大缓冲容量，而这些反过来又在电泳驱动的电渗透的不利影响开始起支配作用和对该方法起负面影响以前，对样品优化工作时间和功率（VXI）输入。较大电极室的另一种目的是在室膜42和电极34之间提供足够空间间隔，以便在电极34处形成气泡后，防止气泡附着在膜42上。防止气泡接触膜42是理想的，因为它们阻碍该膜并防止通过它们传导，而且气泡可能有大的pH值。另外，电极34有较大表面积，如5-20毫米²是理想的，它通过缩小靠近电极表面和内在表面核心位点的局部电流密度减少气泡的形成。

框架30可由任何与其接触的材料不起反应的材料构成，最好是，选择在紫外380纳米处和在480纳米和630纳米之间含低自身荧光的材料构成，以便缩小在量子化期间的背景信号。试样室36，38可以取不同的尺寸。优选试样室36，38在300微升至3毫升的范围内，最优选为1毫升。在提纯步骤后，在样品体积中较纯的材料体积缩小，而且体积可能在几十微升或更

小的数量级。

图3表示一种多室装置的透视，分解图。构成框架50，如通过研磨或模压成型，一个或更多个终端试样室56，试样室58和电极室52含与根据图2描述的功能和尺寸。电极54最好是离开电极室52，并通过一种连接器86，如本领域技术人员已知的一种带螺纹的连接器连接。相邻的试样室56，58用膜支架60隔开。任选膜支架60通过连接器66由膜支架的一半62构成。在膜支架66中有一种开口64。膜支架60中的开口64适于接收差动或区分生物材料通道的材料，如一种膜或亲和材料通道的材料。膜支架60适于和支架66配套接合。试样室56，58通过通道68和电极室52交流。在该实施例中，插件70在接收螺纹74中通过螺纹72与框架50螺纹接合。包括镗孔78并包括孔80的桶76，允许从电极室52，通过孔80，穿过镗孔78，至试样室56，58。插件70最好是终止在环82处，与插件70的螺纹端相对，其中环82适于在电极室52的环82和孔68之间夹住滤膜或膜84。试样室56，58的尺寸可以彼此不同。另外，可以采用各种膜支架60，否则，在确定试样室56，58的尺寸中另外提供附加的灵活性。

膜支架60是从框架50拆卸的。膜支架60可包括膜，筛孔或与带有和寡核苷酸共价链接官能团的小球。当材料在膜支架60的开口64内被俘获后，膜支架60可以从框架50上拆卸，而且材料输送到另一个地区。

图4表示本发明的一种实施例的剖面图。第一或左电极90和第二或右电极92适于向沉积在溶液相区94中的带电大分子提供电泳力。溶液相区94用虚线边界表示。其实际边界可以通过任何与本发明获得的材料和方法不一致的理想支持介质构成。陷阱96放在靠近或基本上围绕第二电极92处。陷阱96可由一种具有上述用于陷阱或隔离材料的属性的材料构成。任选一种保护或可渗透层98，放在溶液相区94的至少一部分和第一或右电极90之间。如图4所示，可渗透层98用来阻挡溶液相区94和左电极90直接接触。操作中，样品通过如设备中的孔或其它开口放在输入区100内。溶液相区94装有缓冲剂或其它包含或具有上述溶液相功能的适当传输介质。通过对电极90，92加电势，原来放在输入区100内的样品电泳移向陷阱96。当想要的材料，如DNA接触陷阱96时，然后操作系统以便取出现在捕集的材料。这可以通过从系统取出陷阱96，或通过从陷阱回到溶液相区洗提捕集

的材料。最好在洗提捕集的材料进行溶液相区以前，用新的溶液替换溶液相区94中的溶液。该溶液可以和以前存在的溶液相同或不同。

图5表示本发明另一种实施例的剖面图。第一电极110和第二电极112在第一溶液相区114和第二溶液相区115内提供带电材料总的电泳运动。任选第一电极110含布置在靠近或基本上围绕第一电极110处的第一可渗透层118，以便减少带电大分子与第一电极110的接触。第二层109在靠近或基本上围绕第二电极112处形成。在一种方案中，第二层109包含一种陷阱，其材料和功能如上述。另外，第二层109可包含第二可渗透层，主要适于保护带电大分子防止与第二电极112直接接触。任选陷阱电极122位于第一电极110和第二电极112之间，将溶液相区分成第一溶液相区114和第二溶液相区115。另外，任选陷阱电极122可包括形成在并与陷阱电极122构成整体的陷阱116。操作中，对输入区120提供一种样品，该样品通过第一电极110，第二电极112和陷阱电极122建立的电场操作下，使带电大分子做电泳运动。可任选位于溶液相区114，115内的附加电极。

图6表示第一电极130，第二电极132和控制电极134的透视图。通常，第一电极130可鉴别为阴极，第二电极132为阳极，尽管取决于极性连接这些术语可以互换。控制电极134可以在第一电极130和第二电极之间距二者等距离处，尽管可以任选它靠近电极130，132，最好是靠近阴极130处。改变加在控制电极134上的电势，可以用来调节在第一电极130和第二电极132之间区域内的带电大分子流。在一种操作方式中，样品放在第一电极130，阴极，和控制电极134之间。带负电材料的净流动是从阴极到阳极（第二电极132）。如使控制电极134为中性，甚至稍带负电性，带负电材料，如DNA，将沿从阴极至阳极方向流动。一旦想要的DNA通过或绕过控制电极134时，可使控制电极134变得更带负电性，从而帮助DNA的运动指向第二电极132，并排拆留在控制电极134和第一电极130（阴极）之间不想要的材料。

图7表示在聚束结构中在有利条件下使用的那些电极的透视图。分别配置（虽然术语可以反过来用）第一电极140和第二电极142为阴极和阳极。第一控制电极144和第二控制电极146配置在阴极和阳极之间。通过对第一控制电极144加电势，可以实现在第一控制电极和第二控制电极146之

间带电大分子的聚束，从而加速比对第二控制电路146更接近于第一控制电极144的带电材料的迁移。第二控制电极146加偏压，从而使比对第一控制电极144较接近第二控制电极146的带电材料减速。和通过室（如在第一电极140和第二电极142之间限定的区域）的过渡时间相比，溶液相环境中带电大分子的扩散是显著的，聚束过程用于在阻碍扩散效应的小区域内，定域想要的带电材料。在一种操作方式中，一旦想要的DNA数量经过第一控制电极144，该控制电极可以带负电势，用来使带负电材料进一步指向第二电极142（阳极）。图7却表示一种4电极装置，通过上述方式操作电极，以图6的结构可以形成一种聚束器。

一般地说，本发明的这种情况涉及在含溶液相区的电泳系统中，从不要的带电生物材料中选择性地分离想要的带电生物材料，该方法包括至少对第一电极加推斥势，从而加速比对第二电极更靠近第一电极的想要带电材料的运动，并对第二电极加推斥势，以便减速比对第一电极更靠近第二电极的想要的带电材料运动。这种操作导致缩小在第一和第二电极之间想要的带电材料的空间分布。

图8和图9表示本发明集成样品制备系统的两种装置的平面图。为方便起见，一般在图8和9鉴别的结构将用相同参考数字标记。图8表示一种系统，其中排出孔166配置在蛋白质陷阱区162的下游。图9表示一种系统，其中蛋白质陷阱区162是排出孔区166的下游。

在提纯室150终端配置第一电极152和第二电极154。样品添加孔156可包含提纯室150的输入区。样品添加孔156优选为包含液体相互连接或密封盖的装置（如路厄氏锁，面密封件，滑接）。样品添加孔156任选为包括一种滤膜，如0.2微米滤膜。任选滤膜起清除碎片的作用，并还能提供DNA的某些剪切，它将减少DNA的粘滞性。在提纯室150的一端或两端，可以任选采用膜158，膜158的主要功能是从电极152，154分离样品材料。在样品添加孔下游的提纯室150中，任选形成一种细胞分离区160（示于图8）。在提纯室150中配置一种蛋白质陷阱区162。在一种实施例中，如图8所示，蛋白质陷阱区162配置在样品添加孔156（以及如果包括任选的细胞分离区160）和排出孔166处。选择这一方案主要是假定用于诊断的想要的材料比捕集的蛋白质材料具有更高的电泳迁移率。另一种操作方式涉及使

蛋白质或其它不想要的材料具有比想要的材料，如DNA更高的迁移率的步骤。在该操作方式中，可以用如图9所示的装置，而且在想要的材料如DNA到达排出孔166以前，不想要的材料移过提纯室150经过排出孔166。在排出孔166的第二电极154之间可以任选地包括蛋白质陷阱区162。

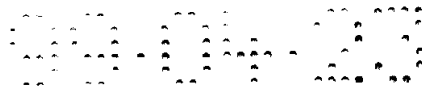
最好将一个电极164配置在提纯室150内，在提纯室150和排出孔166之间与排出孔166相邻的一点处。图9表示一种“C形的”电极165，通常配置在相邻于并且对排出孔166是对称的地方。当DNA带通过由“C”限定的区域，而且然后C电极的偏压变为负（-）时，C型电极用来浓缩包含在由“C”限定的空间内的DNA或其它带电材料，并在该区域内进行带电材料的聚焦，却进一步排斥C区以外的不想要的分子。另外，当正（+）电势转接到其位置与“C”的开口部分成一条直线的电极时，“C”中的整个DNA带被聚焦并在新方向中推向正电极的位置。该C形电极可以被认为是由各种小部分构成，它们可以形成连续的C形结构或相互独立的部分。第一和第二电极部分165a通常配置在垂直于第一电极152和第二电极154的连接线。这些垂直电极165a通常用来提供聚束功能。侧电极部分165b通常提供一种侧向或横向力，使装在C型区内的带电材料指向排出孔166。

排出孔166包含一种从提纯室150至变性区域168的通道或以提纯室150指向变性区168的室。变性可以任选由加热完成，如穿过电阻加热器170，或由本领域技术人员已知的其它方式或方法，包括，但不限于：足以断开DNA螺旋的其它能量输入形式，或其它技术上已知的化学方法。在优选实施例中，排出孔166的宽度大小100微米，而且最好是在1毫米的数量级。通常，具有低表面积与体积比的介质是理想的，该优选实施例缩小表面积的量值，用于样品或其它材料对装置壁的非特异结合。排出孔166通向复杂性简化室172。根据图10-12，下面描述了复杂性简化室的一种实例。阀174任选地配置在复杂性简化室172和诊断性验定装置176之间。在优选实施例中，该诊断性验定装置176包含一种活性可编程矩阵电子装置，其类型已在上述有关的应用信息段中鉴定的各种应用中描述。处理通道176任选地连接至废料室。

图10，11和12表示复杂性简化装置的一种实施例。装置180包含印刷电路板182和装在上面的室200。印刷电路板182最好包括边缘连接器184允

许将复杂性简化系统180连接到控制电子设备。边缘连接器184包括多种导电接头186，在配套的边缘连接器（未显示）中接触对应的导电部分。普通印刷电路板可包括基底188。印刷电路板182包括造型为导电条并淀积在基底188上的导体190。在印刷电路板中任选地形成通孔192，而且最好是导电部分194伸展进入通孔192。一种导电凝胶，如聚合物凝胶，最好是琼脂糖，丙烯酰胺或其它导电聚合物，放在通孔192内。这些材料可以任选地就地固化，最好是通过导体194加电势增强或促进固化。在优选实施例中，室200附着在印刷电路板182上。密封装置198用于在室200和基底188之间形成气密封件。在室200内，形成用于复杂性简化装置容纳样品的样品体积201。在室200内可以任选地包括一种输入孔和输出孔，提供到室体积201的入口。另外，通过在表面的开口可将样品供入样品体积201。在室200内，一种或更多探测面202构成通孔192的上部。优选凝胶196充满该空间并终止在样品体积201的底部。在室200内可以任选地包括处理或废料区204。在基底188内最好提供分度定位销206。优选在室200底侧构成配合钥匙，以帮助标定室200对印刷电路板182的位置。如图12所示，用这些钥匙208与分度定位锁206结合，室200可随后与印刷电路板182配套接合。操作中，聚合物凝胶196包括俘获探针。这些俘获探针随后与样品中的靶材料相互作用并向那里杂交。可以使用导电聚合物充满复杂性简化装置的通路，以便提供一种基质用于DNA探针附着，DNA靶杂交和分离。在充满装置的通路以前，聚合物可以和蛋白质结合的DNA俘获探针混合，以便引入聚合物功能或共价结合俘获探针，可以和导电聚合物预混合。另外，探针可以用电泳输送进入聚合物并用酶或共价装置链接，以便提供附加装置用于附着到聚合物支持物上。

操作中，靶DNA可以直接放进复杂性简化装置的样品井中，该装置以液体或电泳方式引入样品井。样品可导入几种不同的缓冲剂中之一，包括pH值为8的50mM硼酸钠，或 $0.5 \times$ TBE。这些缓冲剂在较低的离子强度下，提供DNA的自由场电泳输送。测试结果示于图17中。 $0.5 \times$ TBE和组氨酸的增强杂交也示于图16中。在输送期间，各电极用正电流加偏压，而靶DNA通过电泳被输送进入设备中充满聚合物的通路，使互补靶DNA与特异俘获探针杂交。其次，在电子冲洗工序中，不和俘获DNA特异匹配的DNA用适度



负电流从通路中取出。液体冲洗从样品井中清除任何不相干的DNA，然后导入新的缓冲剂。然后用强负电流，杂交的靶DNA可由电泳去杂交。

为了增大DNA纯度，用各种电子装置可以完成电泳输送，杂交，电子冲洗和去杂交。为了输送和积累，这些装置包括在每个充满聚合物的通路中，通入密度为5至2500微安/毫米²的正直流电流10秒至180秒（最好是：200至500微安/毫米²用于15至60秒内），在占空度为25-75%的条件下，在5至2500微安/毫米²的脉冲电流用于15秒至180秒内（最好是200至1000微安/毫米²，50%占空度，15赫用于20至180秒），和在15至90秒内，以100至500微安/毫米²的电流密度及线性阶梯起动，并终止在0至150微安/毫米²的电流密度（最好是：在90秒内，在250微安/毫米²起动并终止在25微安/毫米²）。在15至180秒内，用在200至300微安/毫米²的负直流偏压或在200至500微安/毫米²之间的脉冲电流密度进行电子冲洗。在60至420秒内。在400至750微安/毫米²的负直流电流密度下完成去杂交。

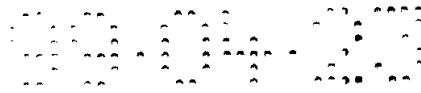
为了荧光检测的目的，靶DNA可以用荧光团标记，见图16和19，进行“反印渍”杂交。此外，通过导入与靶DNA“夹层”杂交的非杂交区相互补的用荧光团标记的DNA螺旋，可以检测与俘获探针杂交后的靶DNA。另外，荧光团标记可并入用PCR放大的靶DNA。

图13表示本发明的垂直处理DNA或核酸提纯装置的局部透视图。上槽管210和下槽212通过管214交流，允许流体从上槽210至下槽212交流。槽210，212适于接收缓冲液216。可以任选地形成上槽210和下槽212，从而允许形成一种闭合系统，如通过使上槽210的底部218和下槽212的顶部220密封地接触。另外，该系统可以是一种开放系统。上槽210装有第一电极222，而下槽装有第二电极224。第一电极222和第二电极224可分别称为阴极和阳极，尽管在给定操作的极性对这些术语可以互相交换。管214内直径优选为小于槽210，212的内直径。管214包含导电聚合物区226。导电聚合物区226是包含一种差动迁移区的分子筛。对带电生物大分子提供差动迁移的材料包括像琼脂糖和聚丙烯酰胺这样的材料。

在优选实施例中，差动迁移材料是一种浇铸在50mM组氨酸中的1.5%琼脂糖，形成在管214中的支持膜228上。导电聚合物区226可以任选地配

置在与膜228相邻的地方。膜228优选为多孔的，如孔的尺寸是5微米，并为形成导电聚合物226部分地提供支持。在邻接导电聚合物区226处配置室230。最好是室230体积小于导电聚合物区226的体积，如在体积中优选为大约50%或更小，而特别取导电聚合物区226体积的大约1/3或更小。如果室230含相对导电聚合物区226缩小的体积，在管214中可以形成缩小的内直径区232。该缩小的内直径区232有利地形成一种提供环状区的突起边缘234，膜228可以配置在该环状区上。第二膜236可以任选地限定室230边界的一部分。该第二膜236最好是构成分子量截止膜，如超滤膜，用于将DNA保留在室230内，但通过较小的材料，如可被蛋白酶k作用的蛋白质。这种超滤膜包括那些由醋酸纤维或纤维素构成的膜。

操作中，一种样品先溶解，如通过玻璃珠的运动作用在样品的细胞上。另外，最好是样品被剪切，如用移过较狭窄的孔径，如直径为250微米的孔径剪切。最好是样品经受一种缩小蛋白质或其不想要材料尺寸的处理步骤，从而增大它们相对于想要材料，如DNA的差动迁移率。例如，添加蛋白酶k可以缩小蛋白质的尺寸如达到20,000道尔顿或更小。可以在室温下完成蛋白酶k的应用，尽管在升高的温度，如37℃至50℃增加了反应速率。在优选实施例，溶解的细胞用总体积50微升的，带有250微克/毫升蛋白酶k，0.5×TBE 50mMEDTA缓冲剂（37℃-50℃）消化。其次，一种增密剂，如蔗糖，优选为5% - 20%，最优选为基本上8-10%，用于增密样品。增密的材料可任选地和一种染料，如溴酚蓝组合。然后增密的预制样品用注射器注入或放在导电聚合物区226上面。在导电聚合物区226上面用增密的样品定位和浓缩样品。然后操作该系统使带电材料作电泳运动。激活该系统一段时间，以允许DNA迁移至导电聚合物区226内，并允许尺寸缩小的蛋白质基本上经过导电聚合物区226进入室230和下槽212。在优选实施例，样品在2.25毫安电流，1,000伏极限电压下进入凝胶达六至八分钟。另外阴极用于允许吸引和破坏蛋白酶k和其它带正电材料。新的缓冲剂216任选地配置在下槽212中，而这时可以加上第二膜236（尽管开始时它可以包括在装置内）。在优选实施例，膜236是一种25千道尔顿分子量截止膜。其次，DNA由导电聚合物区226洗提进入室230。在优选实施例，用1,000伏极限电压，将样品从凝胶中洗提出来，进入洗提室



230约两分钟。然后通过破壁或提供孔和阀门装置从室230提取DNA。

虽然图13的系统表示为一种垂直装置，它也可以在水平装置中运行。该垂直装置允许在样品溶液236和导电聚合物226之间存在恒定的接触面积。进而，使用增密剂允许样品溶液236在紧邻导电聚合物区226的地方定位，缩短了样品溶液236到达导电聚合物区226必须用的时间。在水平装置中，如图13所示，一种聚合物（或凝胶或膜）挡板可用来保持样品与电极缓冲剂隔离以防止混合。

图14表示一种包括样品制备，复杂性简化，诊断区和处理区的集成装置平面图。图14A表示沿线A-A'截取图14的剖面图。一种支持件240，如印刷电路板，优选用于支持下述的各种元件。任选一种边缘连接器242可以对控制电子仪器提供电接触。如上面根据图10-12所述。样品制备区244优选为包括也和一种电极电交流的第一缓冲剂容纳区246。如凝胶或其它导电材料248配置在缓冲区246和输入孔250之间。在优选实施例中，输入孔250包括一种盖，可以任选地搬动用于样品输入而且一旦样品放在样品孔250内时，可以密封和穿孔。DNA陷阱252配置在输入孔250和蛋白质陷阱260之间。当材料电泳通过DNA阱252时，DNA陷阱252最好能变窄或收缩。在一种实施例中，倾斜的上部254和向内倾斜的侧壁256用于在凝胶边界258处形成缩颈。这种结构提供浓缩效应。蛋白质陷阱260和缓冲空间264优选形成为y型。然后蛋白质陷阱接触包括电极的缓冲空间262。

样品制备结构244通常操作如下。首先，样品放在输入孔250内。这些电极的电泳作用使带电大分子沿连接缓冲区246指向缓冲区262的方向传导。在该优选实施例中，样品经受一种溶解细胞和消化蛋白质的预制步骤，导致比DNA含较高活动性的蛋白质材料通过DNA陷阱252。于是，当电泳继续时，该蛋白质材料比DNA提前到达蛋白质陷阱260。蛋白质到达蛋白质陷阱260后，电极和缓冲区262转为中性，而电极和缓冲区264加偏压由中性变正电性。DNA移过DNA陷阱250，然后被加在缓冲空间264的正电势吸引。这样，蛋白质分流到蛋白质陷阱260，而DNA，最可能在较晚的时间，分流到室孔266。示于图14A的DNA浓度体积，如该部分在缓冲空间264内，在凝胶边界258上方。

在本发明的一种情况中，缓冲空间264包括作为输入装置的室孔266耦



合到缓冲空间264的一端，而第二孔或入口孔268液体耦合到缓冲空间264相对的一端，由束縛管270连接到缓冲空间264，如图14和14A所示。操作中，入口孔268和室孔266可以接收相同或不同的液体或气体，如缓冲剂，试剂或一种气堵。通过操作供给入口孔266和室孔266的材料，可以产生一种水力或气动活塞。例如，假定缓冲空间264包含从DNA陷阱252洗提进入缓冲空间264的DNA，用压力流体如缓冲剂，该材料可以被压入连接器272进入入口孔，使DNA移入连接器272。用气堵分离各种液体材料是有利的。另外，流体可以从入口孔266，268抽出，使其它材料以通常与正常加工流动相反的方向运动。

图14和14A表示的结构另外包括和复杂性简化区274交流的连接器272。外部容器276限定复杂性简化区274的外边缘。可以采用一种或更多探测区278，这些区含相对图10-12的上述结构和功能。同理，可以在复杂性简化区274内配置一种或更多废料区280，如按图10-12所述。最好是，体积缩小区282连接复杂性简化区274至诊断区284。体积缩小区282起浓缩作用。诊断部分284的结构和功能可以包括任何诊断功能，但优选包括一种电子增强杂交/去杂交装置，如在标题为“Active Programmable Electronic Devices for Molecular Biological Analysis and Diagnostics”，U.S. Serial No. 08/146,504, filed November 1, 1993中所述，引入本文作为参考。最好是，一种连接器288对废料区286提供流体交流。废料区286优选为一种装满的体积，以便防止生物污染。

尽管这里的方法和装置通常描述为一种系列的系统，如样品制备工段，复杂性简化工段，和验定工段，某些或所有各阶段可以在并行或多工的形式中完成。在一种实施例中，可使用两种或更多并行的集合，各自包含一种样品制备区，复杂性简化区，并可使用验定法。作为另一种实施例，两种或更多种集合的样品制备工段可以包括提供其输出到较小数量的，如一种复杂性简化区，最好跟随一种验定法。其它与本发明一致的变化和组合对本领域的技术人员是显而易见的。

另外，尽管专利中的叙述通常指的是DNA，可以理解，当和本发明的目的和功能一致时，这些技术可以用于RNA或其它带电大分子。当发明方法和设备在溶解时用于RNA，用户最好是添加RNA酶抑制剂和不含RNA酶的



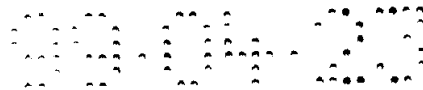
DNA酶以消除DNA。其余的提纯过程将和以前一样进行。包括大多数mRNA的聚A RNA的分离，和消除核糖体RNA优选在复杂性简化室中完成。在电子杂交期间，寡聚dT探针可以任选地用来结合聚A RNA，而大多为核糖体RNA的非杂交RNA将被消除。要释放聚A RNA，最好使用电子去杂交。同理，通过在复杂性简化装置中使用与该序列互补的探针，可以分离mRNA的特异序列。就像对DNA靶所做的那样，进行电子杂交就可消除非杂交，不相干的RNA。通过电子去杂交，想要的mRNA品种将从探针中洗提。

用于向本发明的任何电极供应电势，电流及/或功率的电源和控制系统，可在本领域技术人员已知的设备中进行选择。当不论是固定电流或固定电压，而其它变量允许任意地在从属于极限值或最大值下浮动时，可供应电压及/或电流。控制系统可以是模拟或数字的，并且可由分立或集成的元件构成，任选包括微处理器控制，或它们的任何组合。用软件控制系统是有利的。

实验数据--实例1--图13装置与Qiagen的比较

用图13所示装置的相对性能和现有技术的Qiagen系统进行过对比。为比较起见，图13装置的制备和操作如下。

首先，将50毫升的金黄色葡萄球菌细胞的固相悬浮培养物离心并再悬浮在1000微升的 $0.5 \times$ TBE, 50mM EDTA中，并通过玻璃珠的涡流溶解。然后，在50℃下通过用50微克/毫升RNA酶和250微克/毫升蛋白酶k消化40分钟破碎RNA和蛋白质。其次，通过向20微升样品，粗略等价于 10^9 个细胞，添加5微升40%的蔗糖，增加了样品密度以获得8%的最终浓度。在装样品以前，装置充满50mM的组氨酸，然后25微升的样品随即装入样品溶液区236。在其它实验中，高达100微升的容积用于类似的结果。其次，各电极连接电源而且起始电流是2.5毫安。在其它实验中，除输送变慢以外，曾使用低至1毫安的电流。3分钟后，切断电源，移开桶，而且插入带有25千道尔顿分子量截止的醋酸纤维膜用做第二膜236。溶液也被清除，而且向设备添加新的50mM组氨酸。重组后，接通电源，样品洗提进入由醋酸纤维膜228构成的室230，该室支持凝胶和25千道尔顿截止醋酸纤维膜236。要取出洗提的样品，切断电源，搬开桶，一种吸管/注射器用于给25千道



尔顿截止膜穿孔，而且抽出样品溶液。所有电泳步骤的总时间不到5分钟。样品用琼脂糖凝胶电泳和分光光度法分析，凝胶电泳表示DNA长度约为20kbp，而且产率约为20%。

为了比较，用溶解和消化的相同方法制备的天然样品在Qiagen装置中加工。Qiagen装置按照其说明书操作。和用Qiagen装置获得的结果比较如下：

完成光密度读数，并测定了在260纳米对280纳米光密度比值。图13的装置提供在各种操作中的比值为从1.6至1.8，比较起来，用同一材料的Qiagen装置提供小于1.3的结果（Qiagen的文献论述可获得1.7至1.9的比值）。于是，在该样品的实际测试中，图13的装置提供提纯的DNA。第二，在“Active Programmable Electronic Devices for Molecular Biological Analysis and Diagnostics”，Serial No.08/146,504，filed November 1, 1993中公开的方法制造的微电子芯片上制备的样品的输送优于Qiagen制备材料在同一装置上的输送。据信Qiagen材料含较高的剩余盐含量，而且因此芯片上的输送比由图13的方法和结构制备材料的输送差。图15表示由本发明装置制备的样品和由Qiagen装置制备样品输送比较的测试结果。第三，和用Qiagen装置超过两小时的制备时间相比，用图13装置制备样品要快得多，约为5分钟（在一次测试中6.5分钟）。最后，两种方法的产率相似，约为20%。

实例2—图1装置的性能

尽管其实际形状像这里公开的那样，装置是用如图1的相同结构元件制备的。提纯装置是用聚甲基丙烯酸酯（PMA）建造的，一般如图1所示。要允许插入不同材料22，16和24，该装置由PMA的单独部件组装，其终端与由隔离区16指示的线相交。各部件由纵向运行的螺钉固定。用铂丝制做的电极附在电极26，28上。这些丝伸入电极室18，20。电极室18，20各自充满300微升TAE，250mM HEPES。由Sohleider和Schuell制做的洗提陷阱超滤醋酸纤维膜在膜位置24处插入PMA部件之间，而Sialomed制的带有25千道尔顿截止的醋酸纤维膜在膜位置22处插入，将电极室18，20与试样室12，14分开。试样室12，14各自充满75微升TAE，250mM HEPES。虽然在隔离区16插入不同的膜以实现DNA与蛋白质的隔离，在该实验中，隔离区16

装有一种Millipore制的Immobilon P膜（带有0.45微米孔的聚偏氟乙烯）。在装入区域16前，该膜用甲醇润湿并浸泡在 $1 \times \text{TEA}$ ，250mM，0.1% Triton $\times 100$ 中。一种天然样品，162微升的蛋白质混合物，48.5微克Bodipy荧光素标记的牛血清白蛋白（BSA），和在 $1 \times \text{TAE}$ 中的0.79微克Bodipy Texas Red标记的19mer，250mM HEPES，装入室12中。添加样品后，第一电极加负偏压，而第二电极加正偏压，通10毫安电流2.75分钟。结果是，样品电泳输送至隔离区16。标记的DNA穿过膜并在右中心室14中膜的另一侧收集。DNA和BSA的数量用荧光光度测定法确定。结果表明DNA的产率是40%，而78%的BSA被消除。

实例3--复杂性简化装置的性能

在图18和19中，A组链球菌的（GAS）实验中，将导电聚合物与 $20 \mu\text{M}$ 浓度的25mer抗生蛋白链菌素-生物素束缚的探针预混合。在GAS实验中，见图18和19，40微升等分试样的靶DNA放入在50mM组氨酸中的样品井。采用250微安/毫米²电流密度的线性阶梯起动并在电流密度25微安/毫米²终止的条件下进行电泳输送，而且分别用250微安/毫米²的脉冲在45秒和120秒内进行电子冲洗。如图18，在 $0.5 \times \text{TBE}$ 中在电流密度400微安/毫米²条件下进行去杂交150秒。图18的结果表示约30倍（100:3）的提纯比，和回收82%的纯杂交靶。图19表示，当存在200,000倍质量多余不相干材料的条件下，用3.4倍提纯比在增加不相干DNA的比例中，提纯特异靶。

虽然为清楚和理解目的，通过说明和实例在某些细节中叙述了前面的发明。借助于本发明的讲授，对本领域的技术人员来说，显而易见在不偏离所附权利要求的精神和范围的条件下，可以对那里做出某些改动和修正。

说明书附图

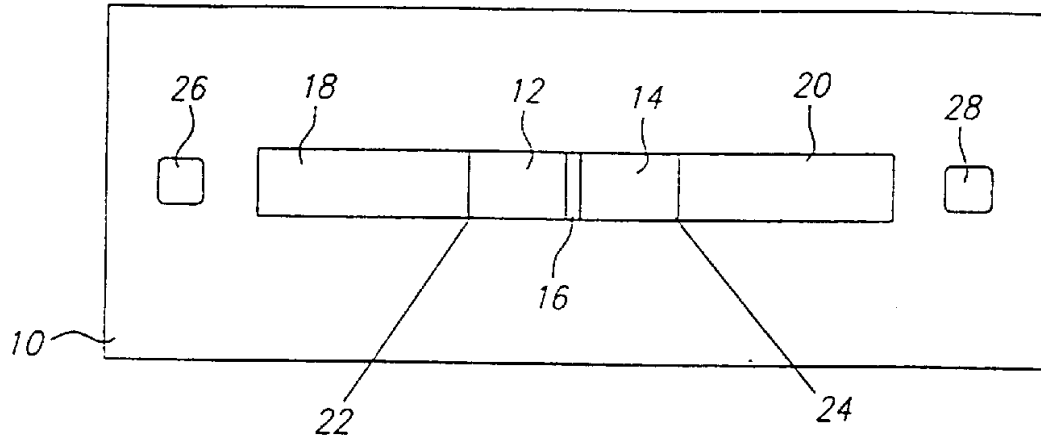


图 1

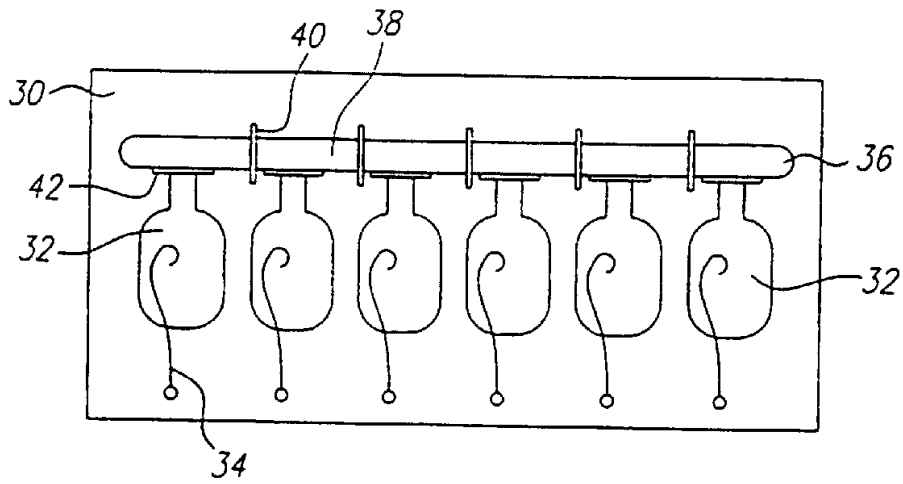


图 2

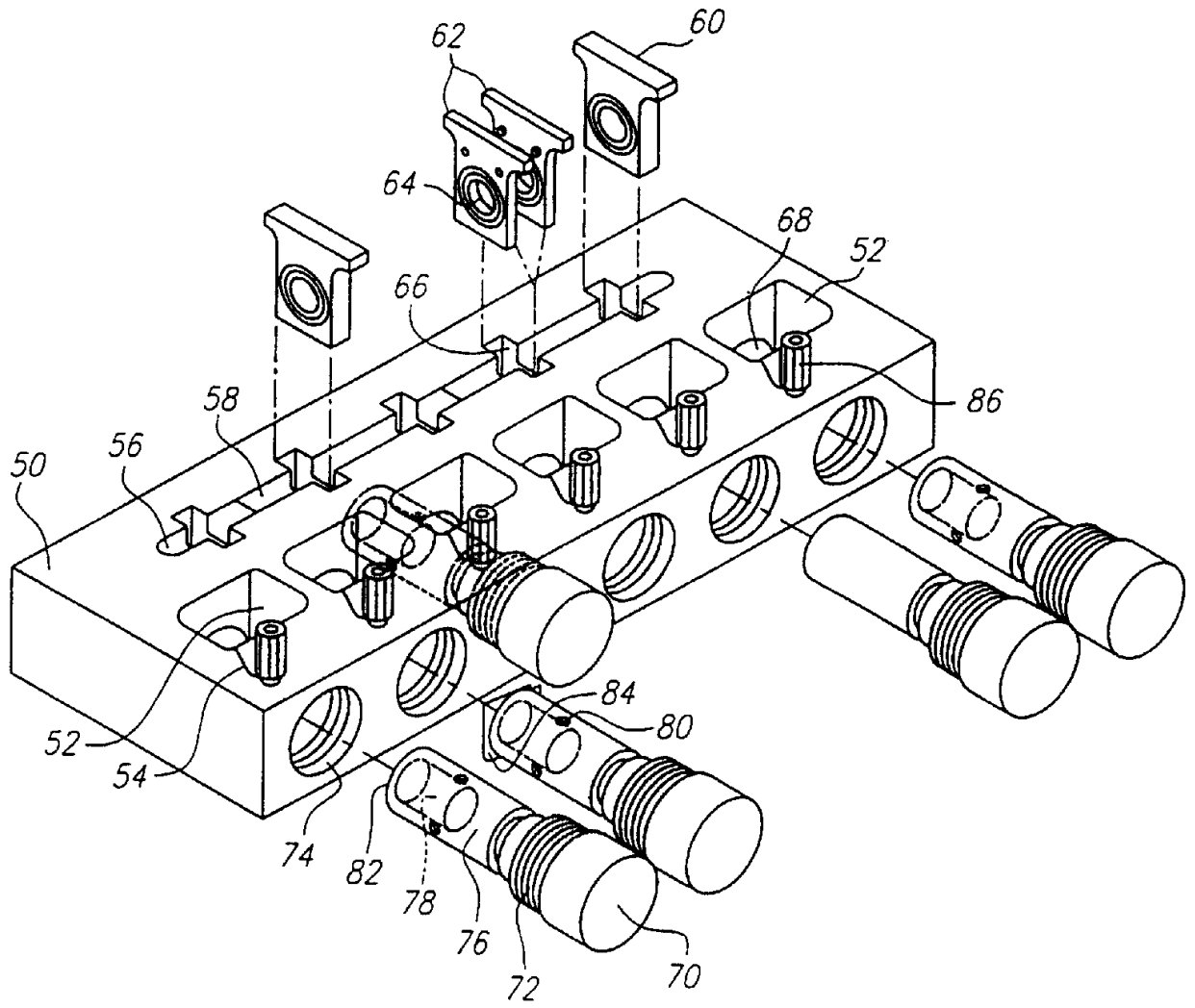


图 3

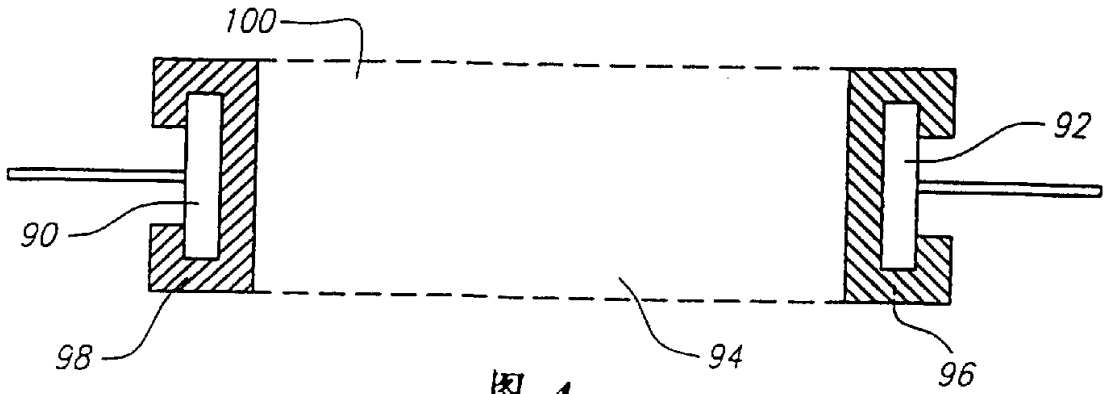


图 4

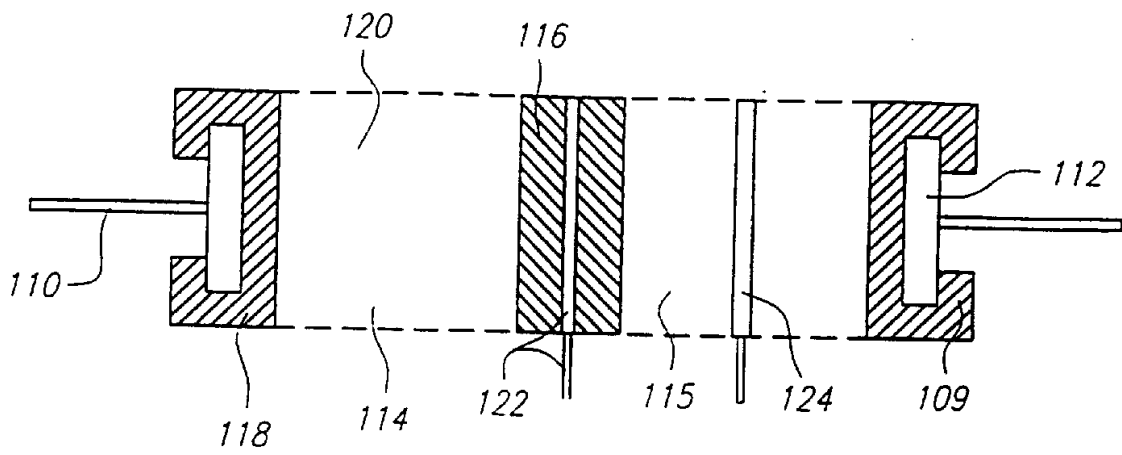


图 5

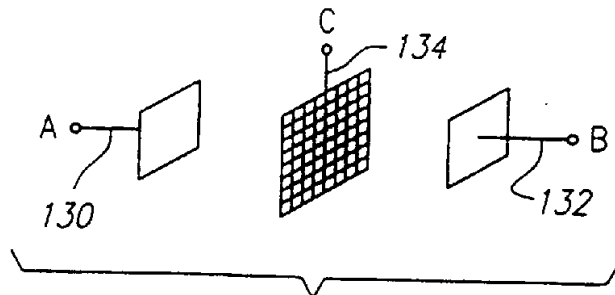


图 6

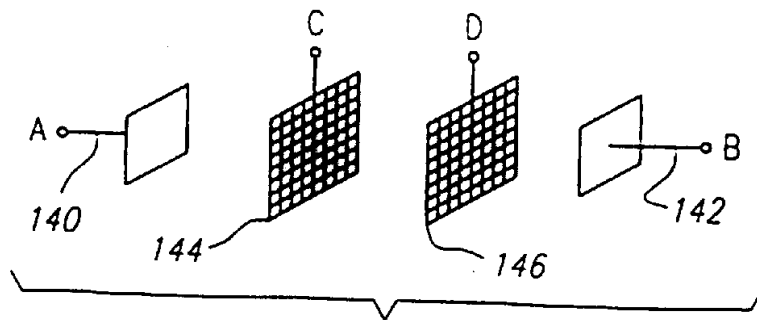


图 7

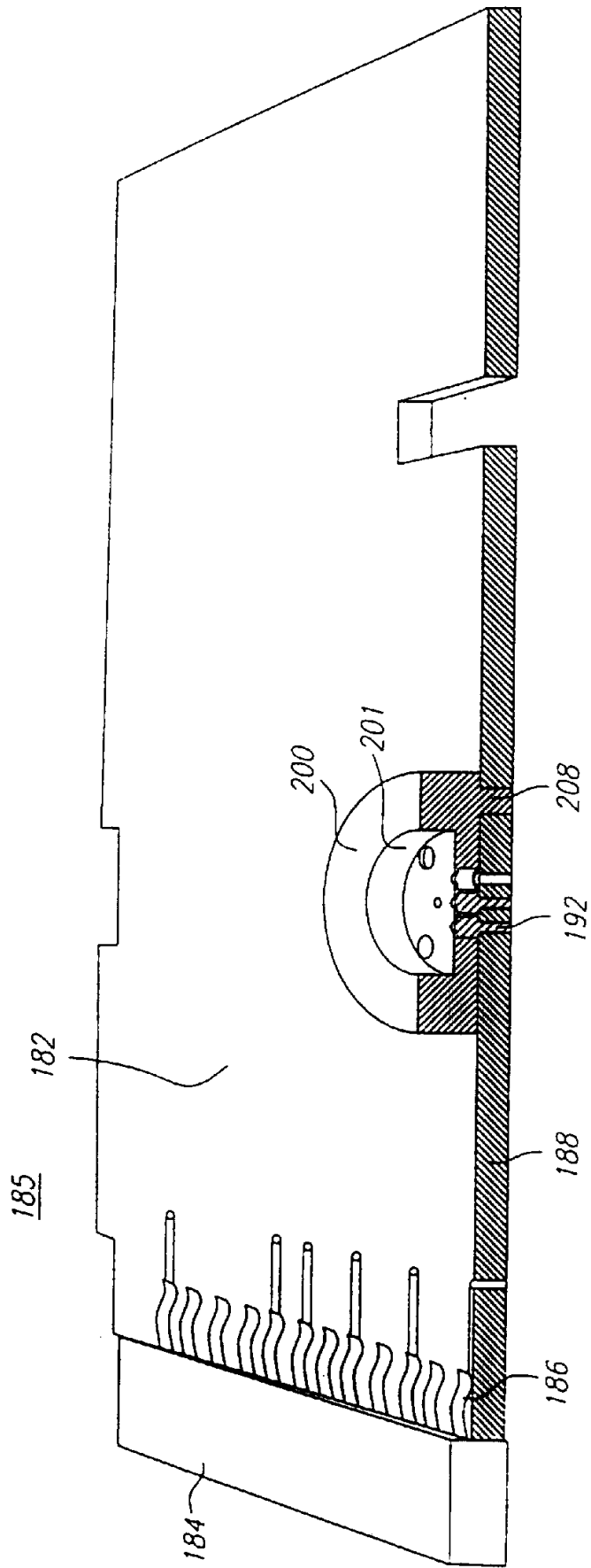


图 10

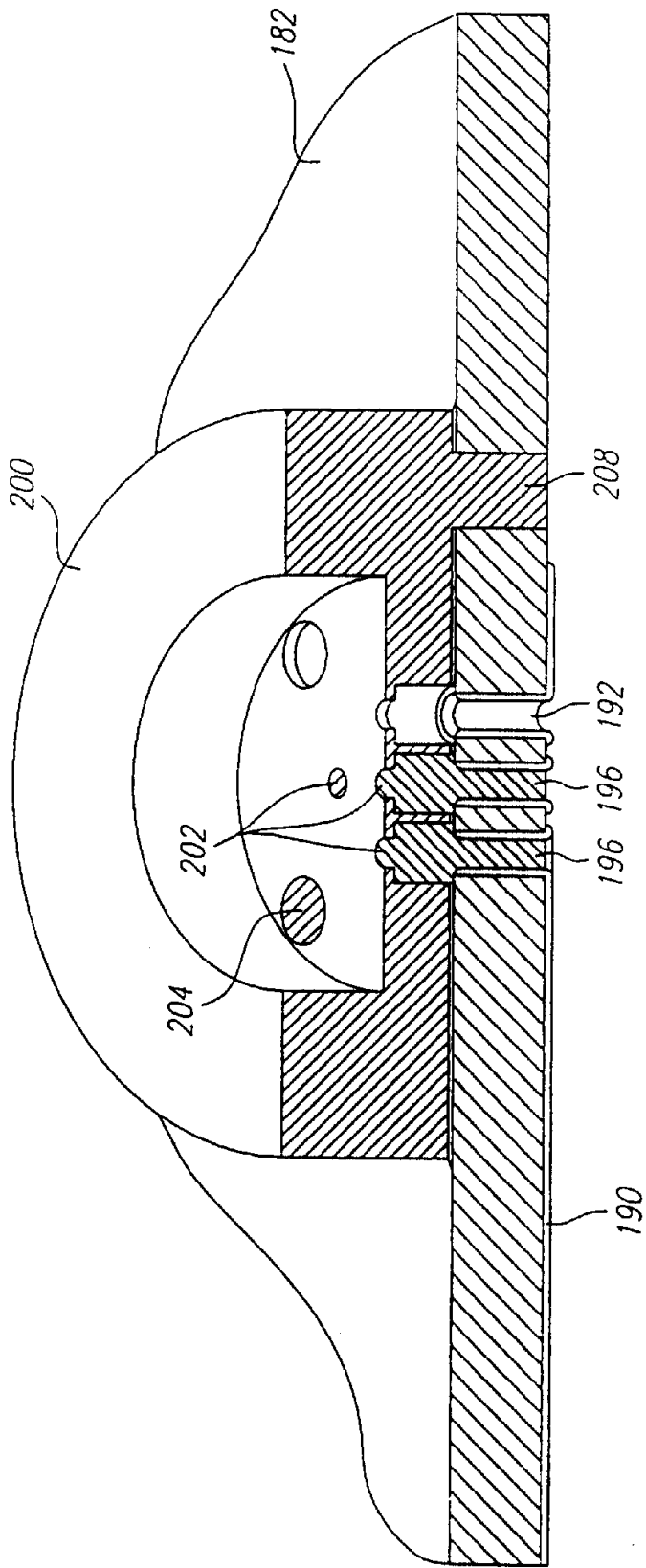


图 11

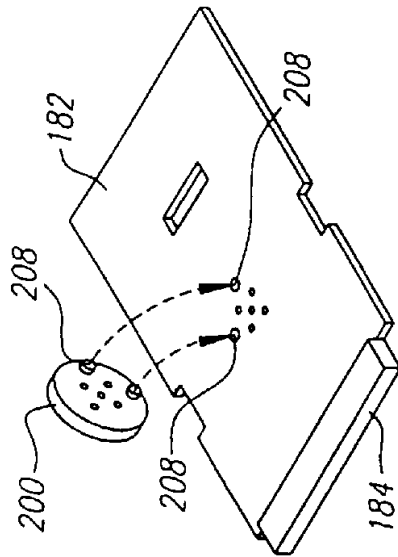


图 12

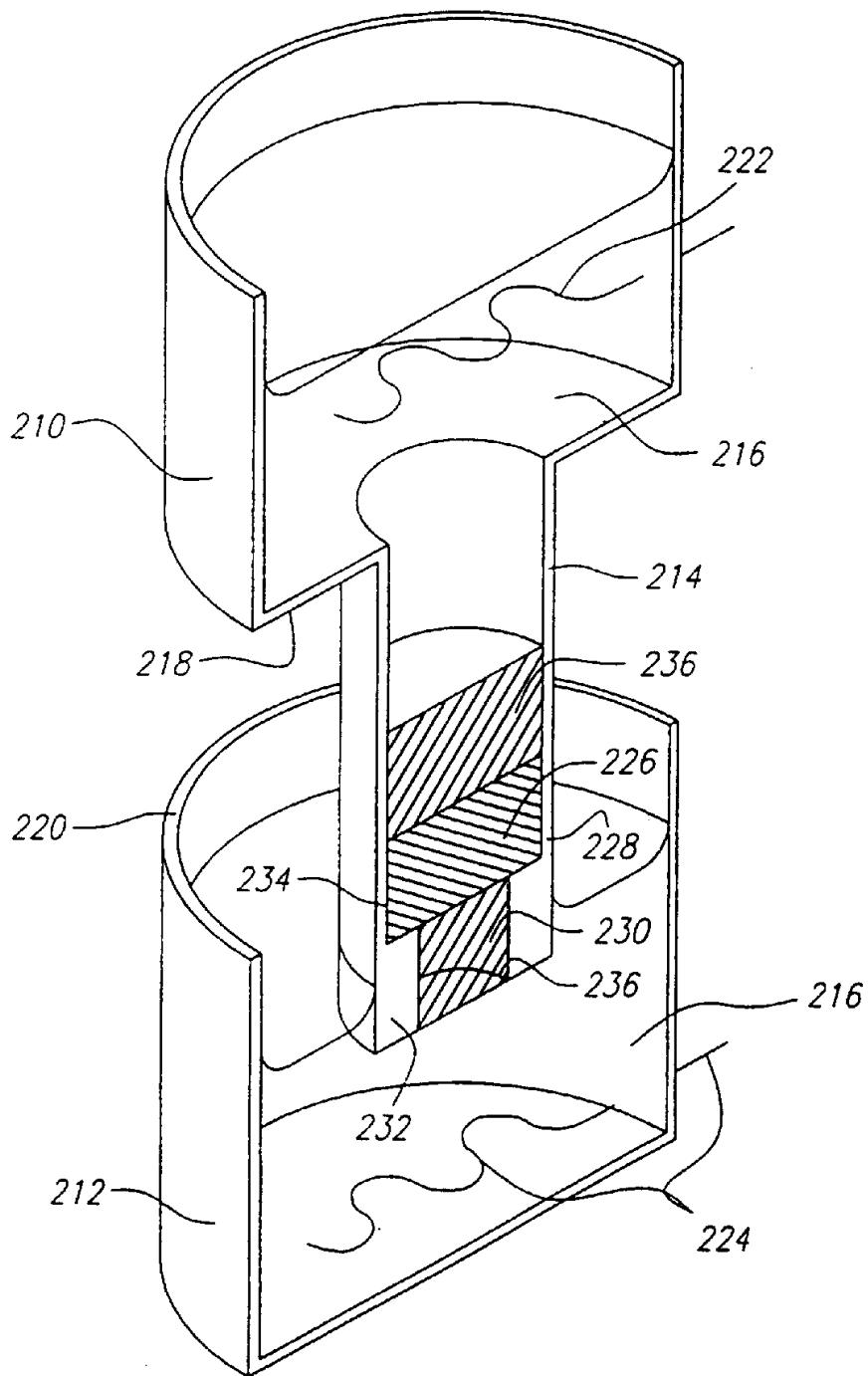


图 13

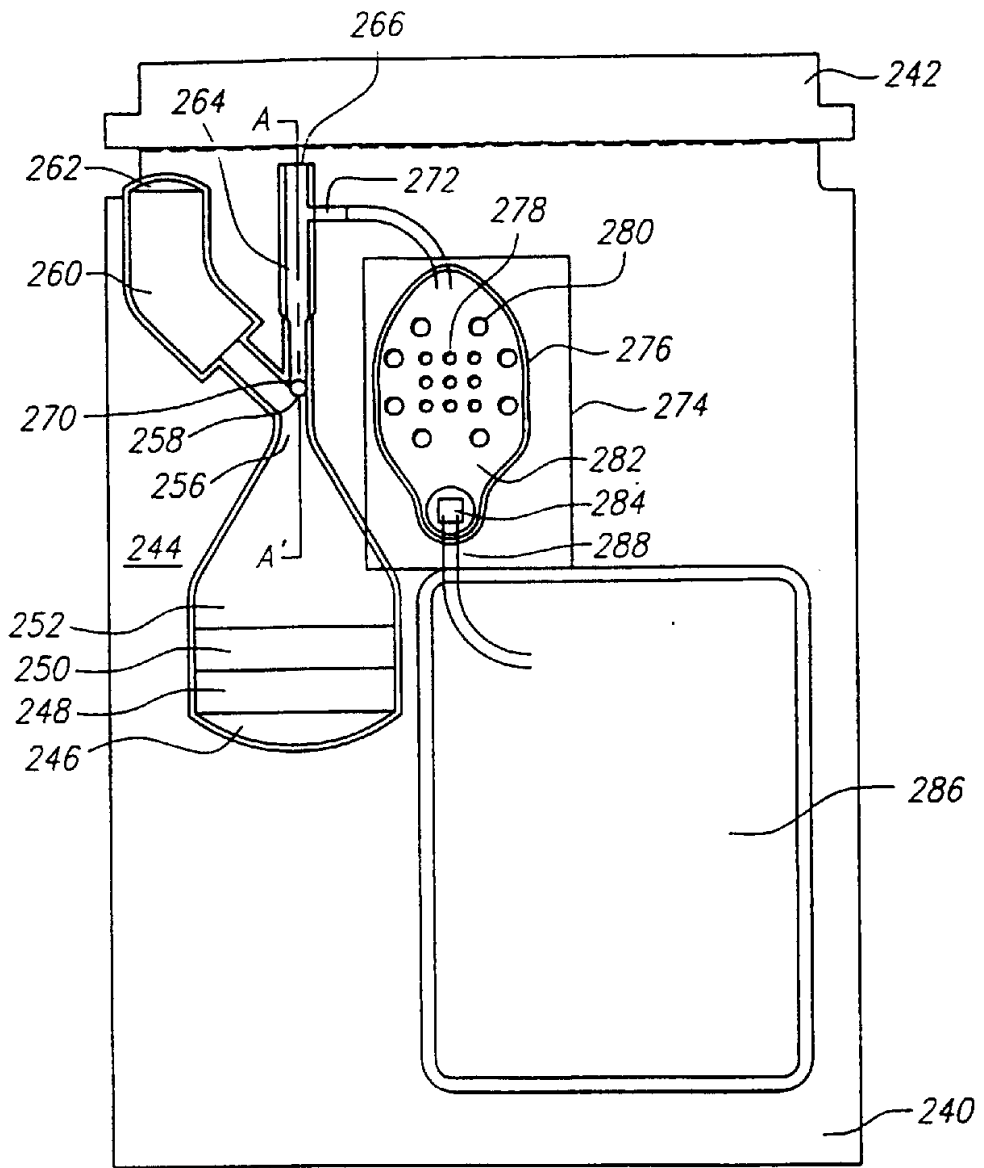


图 14

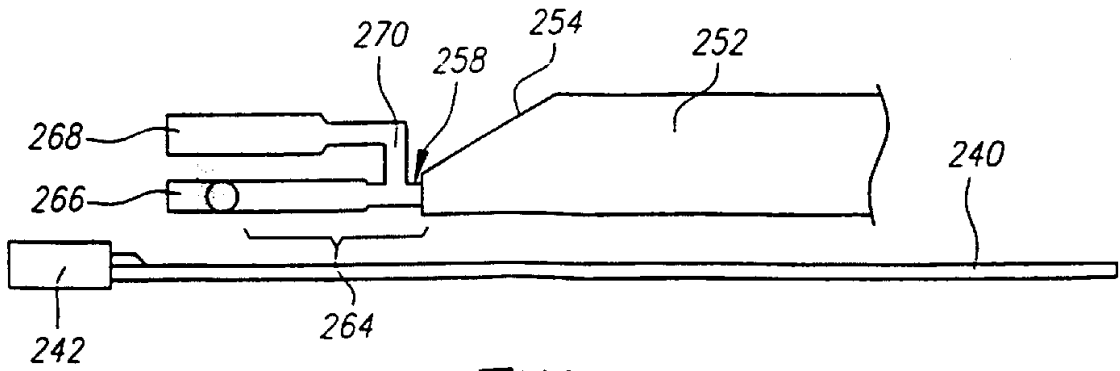


图 14A

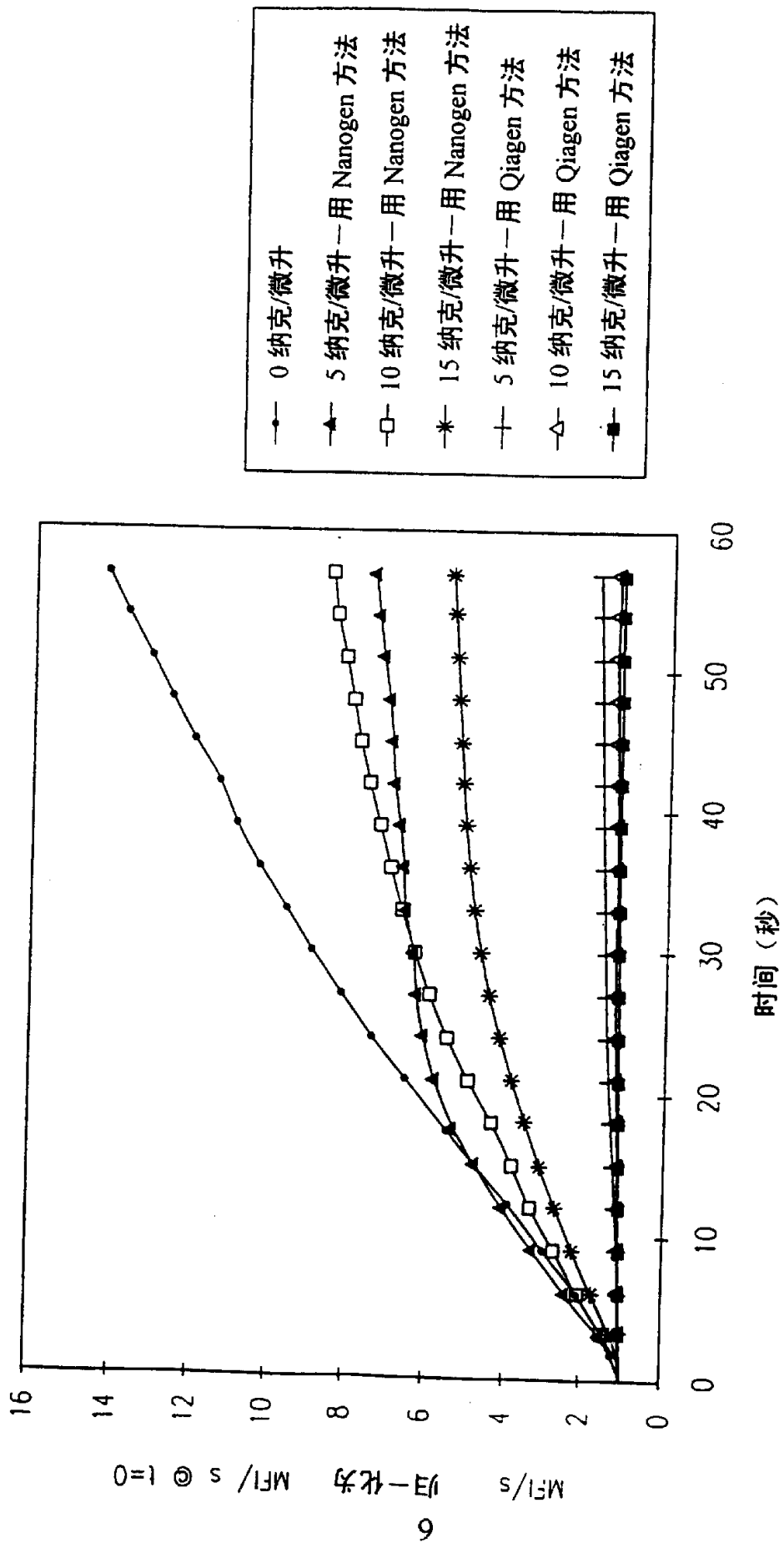
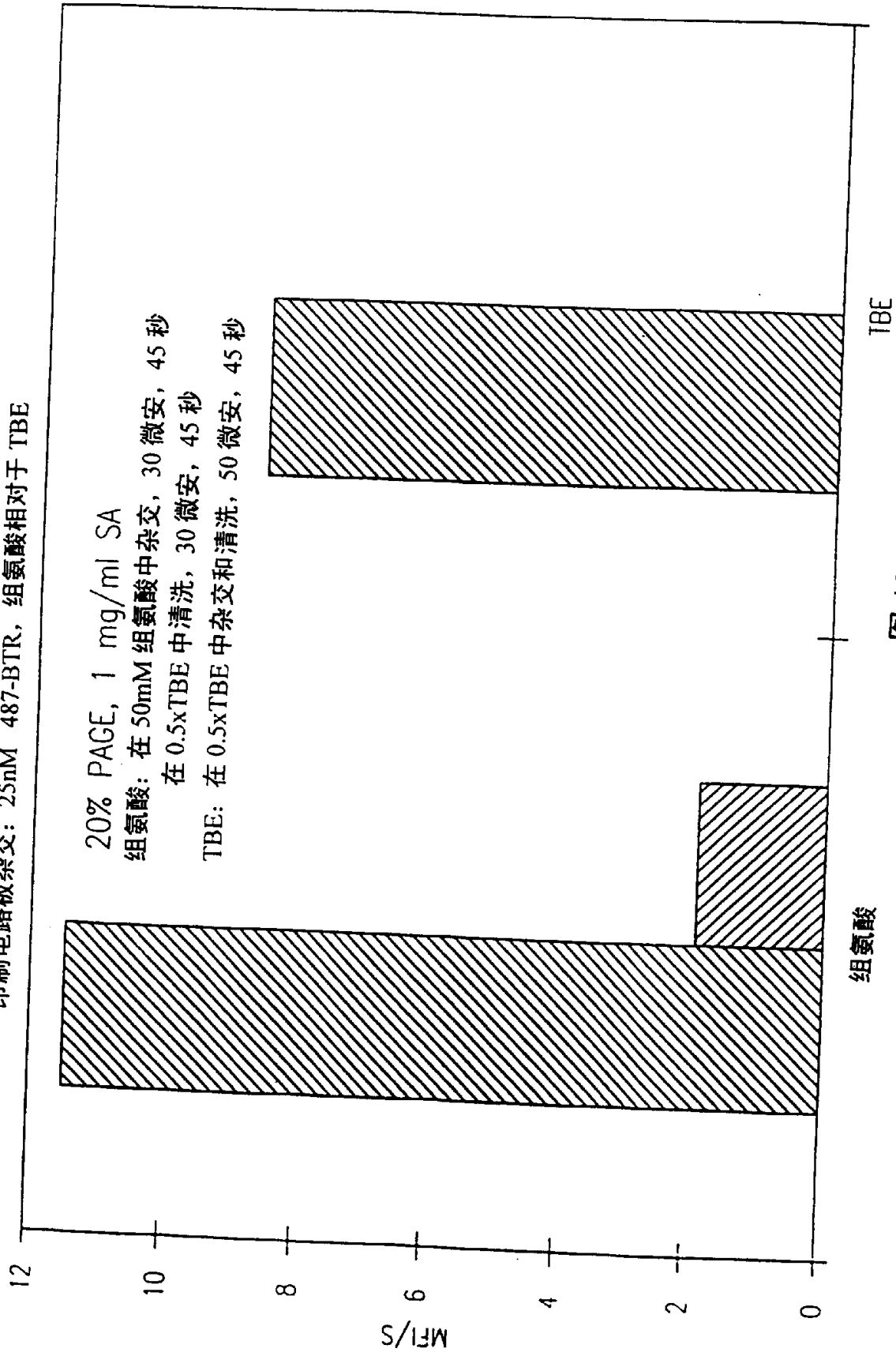


图 15

印刷电路板杂交: 25nM 487-BTR, 组氨酸相对于 TBE



▨ 特异
▩ 非特异

图 16

信号积累：芯片相对于印刷电路板装置，组氨酸相对于TBE，背景信号已修正

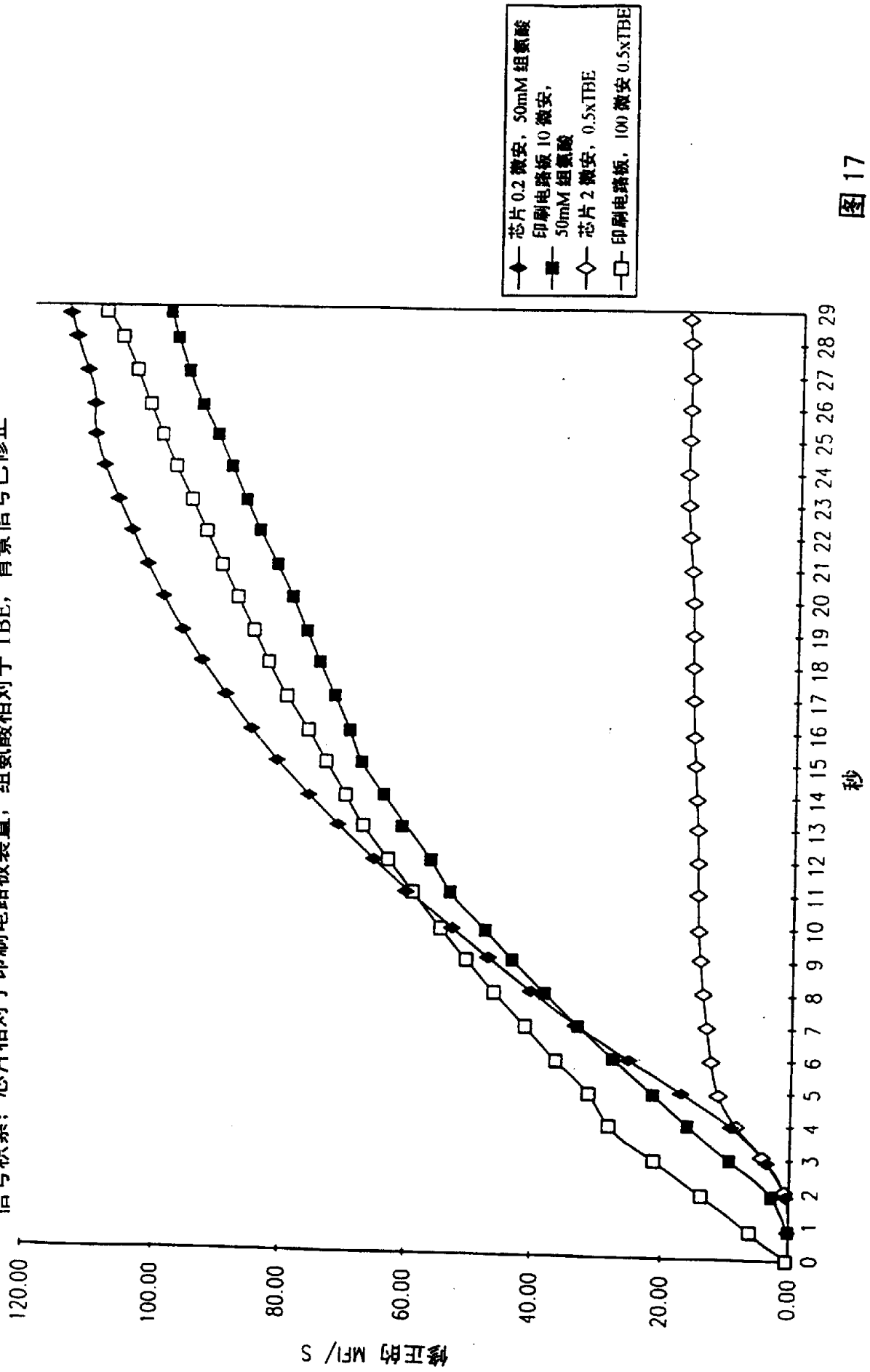


图 17

GAS 的杂交和去杂交后的信号水平

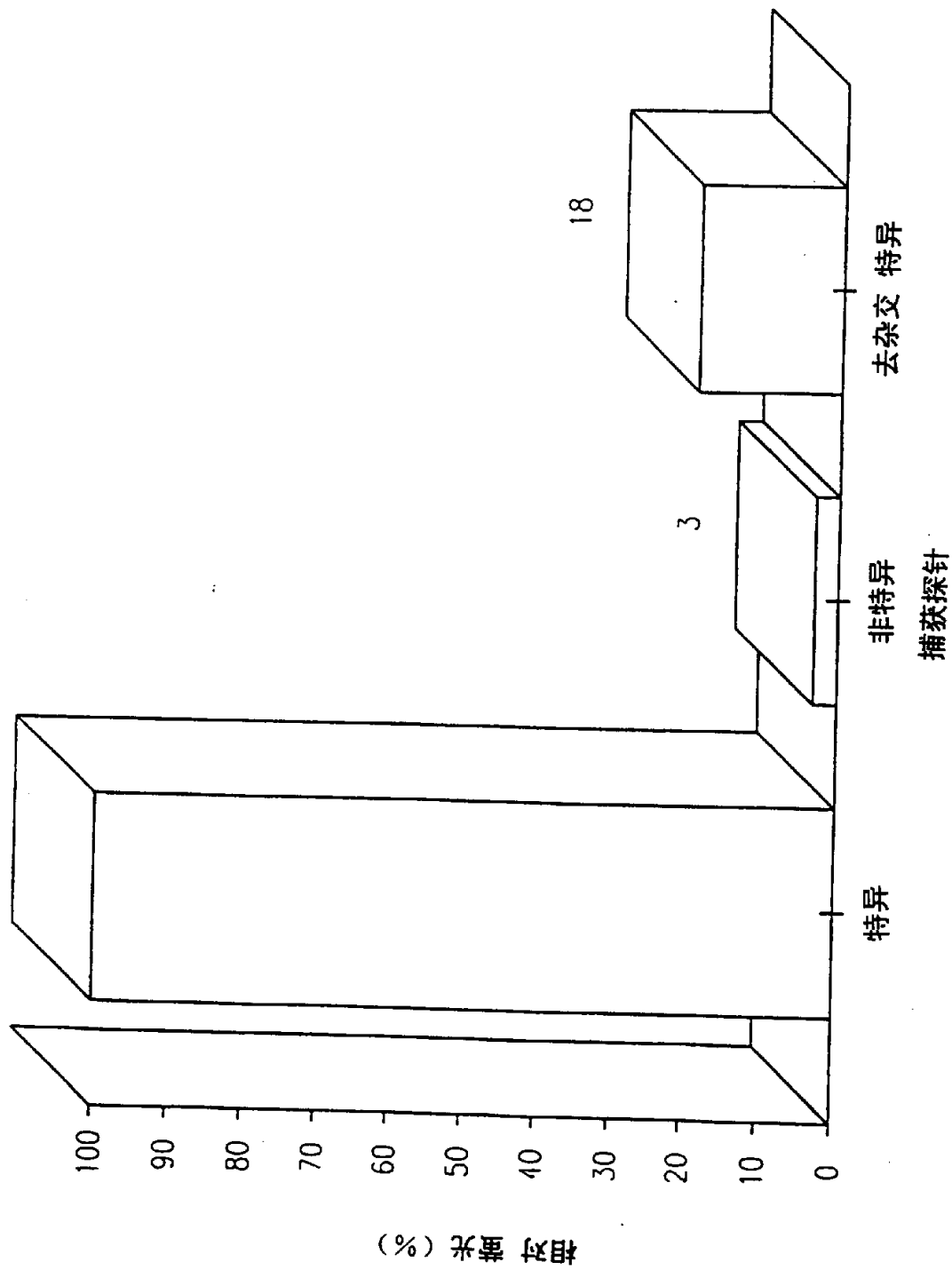


图 18

存在 2 微克 hu DNA/40 微升时 DS GAS 的杂交特异性

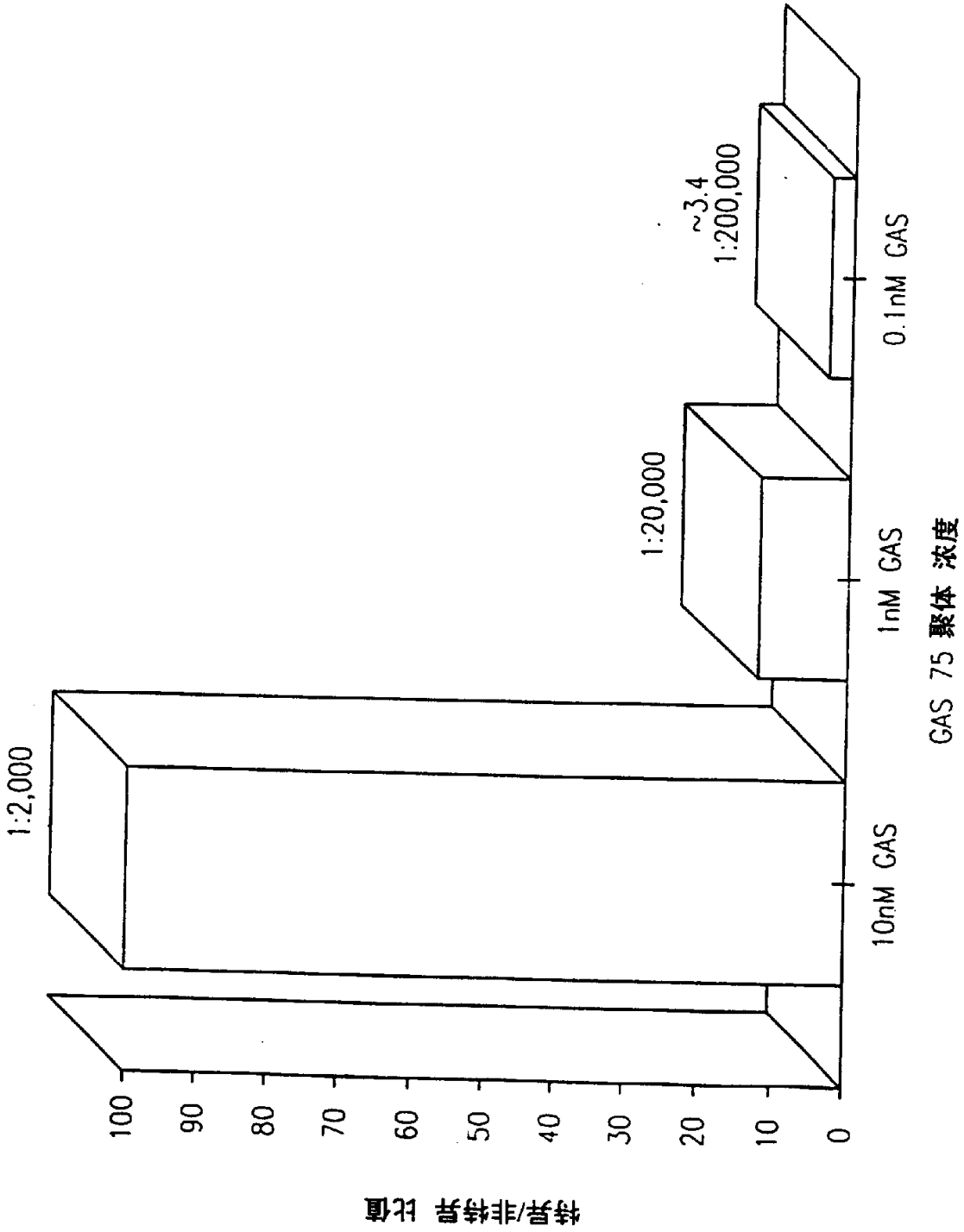


图 19