

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12Q 1/68
C12P 19/34

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94102008.8

[45]授权公告日 2001 年 10 月 10 日

[11]授权公告号 CN 1072725C

[22] 申请日 1994. 2. 16
[21] 申请号 94102008.8
[30] 优先权
[32]1993. 2. 16 [33]US [31]08/017,721
[73] 专利权人 帕金－埃尔默有限公司
地址 美国康湿狄克州
[72] 发明人 约翰·G·阿特伍德 拉里哈夫
[56] 参考文献
US3879106 1975. 4. 22 G02B21/34
审查员 刘素萍

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
代理人 张恒康

权利要求书 6 页 说明书 26 页 附图页数 8 页

[54] 发明名称 原位聚合酶链式反应扩增系统及其容纳装置和安装工具

[57] 摘要

一种制备细胞和组织试样中所含有的核酸扩增的成套原位聚合酶链式反应系统。聚合酶链式反应的容纳装置包括显微镜载玻片，一安放在载玻片上的含有目标核酸序列的试样，一盖在试样上的柔性塑料盖件和一夹紧到载玻片上和夹紧到盖件上的固定组件，以便在加热循环过程中使反应混合物相对试样固定和密封。

固定组件包括一位于盖件的边沿部分上的刚性环，一具有两由相对两平端部所连接的间隔平行横条的横梁和一对卡夹，它紧压住两端部和载玻片两相对侧上以把横梁和盖件夹紧到载玻片上。

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

权 利 要 求 书

1. 一种用于靶核酸序列原位 PCR 扩增的容纳装置包括:

一玻璃显微镜载玻片;

一放在所述载玻片上, 盖住所述试样和所述试剂混合物的盖件;
其特征在于,

所述盖件为柔性, 至少一围绕着所述盖件的一部分的环形密封件和至少一将所述的盖件和密封件相对于所述载玻片可卸地固定的卡夹机构; 以及

一横梁件, 所述横梁件适合于装配在所述卡夹机构和所述玻璃片之间并盖住至少所述的环的一部分。

2. 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述盖件是有弹性和塑性形式的凹面体。

3. 根据权利要求 2 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述凹面形盖件构成了保持特定试剂量的预定容积。

4. 根据权利要求 3 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述盖件由橡胶板材制成。

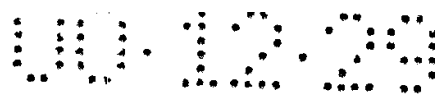
5. 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述盖件是夹紧到所述密封件上的。

6. 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述密封件与所述盖件是整体的。

7. 根据权利要求 6 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述盖件是一橡胶板材的圆盘, 而所述密封件是连接到刚性环的所述圆盘的一边沿部分。

8. 根据权利要求 7 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述刚性环由不锈钢环制成。

9. 根据权利要求 7 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述刚性环具有一连接到所述盖件的边沿部分上的平的基底部。



10. 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述卡夹机构为一普通 U 形板金属夹板, 该卡夹具有一对依一定尺寸制成的相对隔开的侧壁以把所述盖件夹紧到所述载玻片上。

11. 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述卡夹机构是一对普通 U 形夹板, 各个卡夹具有一对依一定尺寸制成的相对隔开的侧壁, 因而弹性地把所述横梁件的一端和所述载玻片的一边缘部夹紧在其间。

12. 根据权利要求 11 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述横梁件具有一对与所述环的间隔部分啮合的间隔横条, 以及连接与所述卡夹接合的所述横条的两相对平的端部。

13. 根据权利要求 12 所述的容纳装置, 其特征在于, 各个所述端部加以弯曲以形成一倾斜表面。

14. 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述盖件包括一不渗透层和一与聚合酶链式反应试剂不起化学作用的层。

15 根据权利要求 1 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述盖件在所述盖件的部分和所述盖件的中心部分之间具有一环形脊。

16. 根据权利要求 15 所述的容纳装置, 其特征在于, 进一步包括一具有中心部的横梁件, 其中心部具有一适于接纳所述环形脊的通孔以可卸地将所述横梁件和盖件固定在一起。

17. 根据权利要求 16 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述横梁件包括一对其间含有中心部的平行横条。

18. 根据权利要求 17 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述密封件包括一位于所述孔周围和所述横条之间的平的环部。

19. 根据权利要求 18 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述横梁件由金属板材制成。

20. 根据权利要求 18 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述横梁件的中心部是平的。

21. 根据权利要求 18 所述的容纳装置, 其特征在于, 所述通孔周围的平环部是所述横梁中心部分中的环槽的一部分。

22. 一种含核酸序列的试样的原位PCR扩增系统, 包括:

一使所述试样放置在其上的显微镜载玻片;

一具有温度控制部件的热循环仪, 该部件适合于接纳所述显微镜载玻片并使它靠在所述部件的部分, 因此, 在载玻片上试样的温度将伴随温度控制部件的温度的改变而变化; 其特征在于,

还包括根据权利要求 1 所述的容纳装置。

23. 根据权利要求 22 所述的系统, 其特征在于, 所述盖件具有有弹性和塑性凹面的形状。

24. 根据权利要求 23 所述的系统, 其特征在于, 所述盖件的形状构成在所述凹面内保持所述试剂混合物的预定体积度。

25. 根据权利要求 24 所述的系统, 其特征在于, 所述盖件由橡胶板材制成。

26. 根据权利要求 23 所述的系统, 其特征在于, 所述密封件包括一所述盖件的边沿部分和一夹紧到所述边沿部分上的刚性密封环。

27. 根据权利要求 23 所述的系统, 其特征在于, 所述的密封件包括所述盖件的一边沿部分。

28. 根据权利要求 26 所述的系统, 其特征在于, 所述的边沿部分粘连到所述环上。

29. 根据权利要求 28 所述的系统, 其特征在于, 所述环具有一粘连到所述边沿部分上的平的基底部。

30. 根据权利要求 22 所述的系统, 其特征在于, 所述卡夹是一普通 U 形卡板, 卡夹具有一对依一定尺寸制成的相对隔开的侧壁, 以使弹性地把所述盖件夹紧到所述载玻片上。

31. 根据权利要求 22 所述的系统, 其特征在于, 所述卡夹机构为一对普通 U 形卡板, 各个卡夹则具有一对依一定尺寸制成的相对隔开的侧壁, 而使所述横梁件端部之一弹性地夹紧到所述玻璃片的一边缘部分上。

32. 根据权利要求 31 所述的系统, 其特征在于, 所述横梁件具有一对一般间隔平行的横条, 所述横条连接与所述密封伯隔开部分接合的所述两相对端部。

33. 根据权利要求 32 所述的系统, 其特征在于, 将各所述端部弯曲以形成与所述卡夹相啮合的倾斜表面, 因此, 当所述一对卡夹安装在所述端部上和所述载玻片的边沿部分上时, 所述横梁件用其下所装配的所述密封件紧贴住所述载玻片的沿边部分。

34. 根据权利要求 32 所述的系统, 其特征在于, 所述部件是一金属体, 它具有多个垂直的狭槽, 各个狭槽可容纳至少所述诸载玻片, 盖件和固定组件之中的一件, 所述狭槽其间还形成隔板, 各隔板上具有一平的热交换表面和一对容纳所述卡夹的所述表面上横向隔开的凹槽, 因此, 所述狭槽中的载玻片的一侧可靠在所述热交换表面安放。

35. 根据权利要求 22 所述的系统, 其特征在于, 进一步包括一可卸地安装在所述热控制部件上的平的配接板以在热循环过程中支承至少一个所述载玻片。

36. 根据权利要求 35 所述的系统, 其特征在于, 所述配接板在一个表面上具有多个凹槽。

37. 根据权利要求 22 所述的系统, 其特征在于, 所述配接板具有一与所述部件配合的平滑底面和一具有至少一平载玻片容纳部分的上表面。

38. 根据权利要求 37 所述的系统, 其特征在于, 载玻片容纳部分具有至少一对凹槽, 以接纳一对安装到所述载玻片边缘上的卡夹。

39. 根据权利要求 37 所述的系统, 其特征在于, 所述配接板是一平的金属体。

40. 根据权利要求 39 所述的系统, 其特征在于, 所述的板由铝制成。

41. 根据权利要求 38 所述的系统, 其特征在于, 所述凹槽是平

底槽。

42. 一种在载玻片上放置原位 PCR 试样和试剂液体容纳装置的安装工具, 其特征在于, 所述的容纳装置如权利要求 1 所述, 所述工具包括:

一底座;

一安装在所述底座上的支承支柱, 所述支承支柱具有一以预定间隔关系接纳和支承所述固定组件的部件的水平的上表面;

一可垂直移动的载玻片支承台板, 所述台板可在支柱的上表面和所述台板部分之间移动, 所述台板部分紧靠所述支柱的上表面。

43. 根据权利要求 42 所述的工具, 其特征在于, 进一步包括一与所述支柱联结的加热机构, 因此, 在将所述盖件和固定组件装配到所述载玻片上前加热机构可加热安装在其上的所述盖件和所述试液。

44. 根据权利要求 43 所述的工具, 其特征在于, 所述加热机构包括一穿过所述支柱的通孔, 它使加热空气通道从所述加热机构朝向上通过以使所述盖件和所述试液加热。

45. 根据权利要求 44 所述的工具, 其特征在于, 所述支柱具有多个向孔中心突入所述孔的助片, 以便增强所述支柱和通过所述孔的空气之间的传热。

46. 根据权利要求 42 所述的工具, 其特征在于, 还包括一处于与所述支柱隔开位置上由所述底座可移动支承的长的压臂, 所述压臂可使与安放在所述支承台板上的载玻片接触且使所述台板和载玻片压降下直到所述载玻片与所述固定装置啮合为止; 以及

一枢轴地安装到所述支柱上的弹簧偏置固定组件装配安装机构, 所述机构具有一对弹簧钳, 所述弹簧钳具有一些位于所述支柱水平上表面的两相对边缘邻近或上方的钳爪部分, 并经操纵可使钳爪部分彼此相对移动。

47. 根据权利要求 46 所述的工具, 其特征在于, 所述安装机构进一步包括各个所述弹簧钳, 弹簧钳具有从各个所述钳爪部分伸出

的钳柄部,而各个所述弹簧钳枢轴地安装到所述支柱上。

48. 根据权利要求 47 所述的工具,其特征在于,所述钳柄部至少各围包在所述支柱两侧的一部分上。

49. 根据权利要求 46 所述的工具,其特征在于,所述压臂具有一对准所述支承支柱上方设置的通孔。

50. 根据权利要求 49 所述的工具,其特征在于,所述压臂在与所述载玻片接触的通孔周围具有一缓冲垫片。

原位聚合酶链式反应扩增装置及其容纳装置和安装工具

本发明主要涉及进行聚合酶链式反应(PCR)的系统,更具体地,涉及在 DNA 或 RNA 样品上直接进行 PCR 而不必将样品从原来的细胞结构中分离的方法及设备。

聚合酶链式反应是一种在热稳定的 DNA 聚合酶(典型的为 Taq 聚合酶),四种 DNA 核苷酸碱基和二种或更多种单链 DNA 引物的存在下,通过热循环一个或多个该 DNA(模板 DNA)的分子的方法制备极其大量双链 DNA 片段的忠实拷贝的过程(扩增)。这些引物是长度约 20 碱基的短片段,其碱基顺序与构成双链模板的两条互补 DNA 单链的 5' 末端是互补的。

PCR 是一种极其有价值而且应用广泛的技术,并且导致了分子生物学领域的革命。该技术在美国专利 No. 4,683,195、4,683,202 和 4,965,188 中有详细的公开。直至现在,反应是在小的反应管中于溶液中进行的,其中待扩增的 DNA 是悬浮着的。用于这种过程的设备公开于美国专利 No. 5,038,852 和 1992 年 4 月 20 日提出的美国专利申请 No. 07/871,274。

最近发现,有可能应用 PCR 去扩增细胞内的特异的 DNA 片段,而不必首先将 DNA 从细胞中抽提出来。该技术叫原位 PCR。细胞可以是单细胞,或部分组织样品。在绝大多数情况下,是在显微镜上的载玻片上的细胞或组织薄切片上进行原位 PCR 的。细胞或组织通常用福尔马林或其他试剂处理而固定,从而保留其形态,便于处理后识别。

如果被选择的 DNA 片段是以这样的方式扩增的,那么被扩增的产物 DNA 就能被选择性地染色,其后对 PCR 处理过的细胞显微镜检查就能鉴别出组织样品中含有特定的 DNA 片段(甚至在细胞内仅局限存在)的那一种细胞(如果存在的话)。如果存在的话使细胞中

的扩增 DNA 变得可见可以通过两种方法中的任一种达到。一种方法是使用互补的单链 DNA 探针, 探针上附着有标记分子。该探针会与扩增样品中特异 DNA 顺序(如果存在的话)杂交, 多余的探针和标记物被洗去。接着留有标记分子的部位通过显影剂处理而变得可见。这种使之可见的技术叫“原位杂交”, 或原位扩增 DNA 的“间接测定”。

另一种使之可见的方法是在 PCR 过程中, 使用包括附着有标记分子的经修饰的 DNA 核苷酸碱基在内的 PCR 试剂。许多携带标记分子的经修饰的碱基会通过 DNA 聚合酶直接掺入扩增产物。接着与前面一样用显影剂处理载玻片, 便使扩增 DNA 的部位变得可见了。这种技术叫原位扩增 DNA 的“直接掺入测定”。

在两种方法中, 典型地, 显影剂包括偶合于某分子的上一种酶, 例如碱性磷酸酶, 该分子牢固和特异地与扩增 DNA 或杂交探针上的标记分子结合; 以及一种底物, 酶可以将其转变成不溶的, 强吸收的染料。如果扩增 DNA 上的标记分子是生物素, 那么典型的与酶偶合的结合分子是抗生物素蛋白。如果标记分子是地高辛, 那么结合分子是抗-地高辛抗体。两类显影剂都已用于两种原位杂交的间接测定和直接掺入测定。标记分子上的标记物可以是显色性, 荧光性或放射性的。

测定原位扩增 DNA 的两种方法都是非常敏感的, 能测到每个细胞中 10~几百个扩增 DNA 片段的拷贝。两种方法都需要在原位 PCR 热循环结束之后进行某些载玻片的 PCR 后处理。

完整细胞的原位 PCR 的热循环方法因细胞来源的不同而有差异。不形成组织的细胞, 例如白细胞和多种培养细胞(如 HeLa 细胞), 并不一定需要特殊的仪器操作来进行原位 PCR 循环。Hasse 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4971-4975 (1990), 报导, 这样的固定细胞的悬浮液可以在正常用于液相 PCR 的相同反应管中进行热循环, 然后, 细胞涂布于载玻片上以便测定扩增产物。

然而, 更常用是这样的细胞可以在载玻片上进行热循环。它们

通过离心涂布于载玻片上,产生所谓的“细胞旋转”(cytospin)制备物。使细胞涂布有助于固定方法及其他前 PCR 样品处理。这并不需要额外多费功夫,因为否则的话为了使载玻片上的扩增产物变得可见,细胞旋转步骤在随后也是必需的。细胞旋转与载玻片上的组织一样,被扩增。

当待研究的是组织切片中的细胞时,它们必须被直接在表面上扩增,因为否则的话,薄切片将不能显示组织的形态。与这些组织的热循环相关的主要问题在于维持组织形态以及细胞形态,抑制样品上的 PCR 反应混合物的蒸发,以及获得均一的,重复性高的结果。

为了在玻璃质的显微镜载玻片上固定的细胞或组织样品上进行原位 PCR,人们必须使用经处理的载玻片,使得细胞会粘于载玻片上而不会被 PCR 过程或随后为了使扩增 DNA 变得可见而进行处理的过程中所用的水溶性试剂冲洗掉或漂浮掉。典型地,用将 3-氨基丙基三乙氧基硅烷分子共价结合于其表面的方式处理过硅化载玻片符合要求,或者,使用聚(赖氨酸)或凝胶/铬明矾涂层。

接着,带有待扩增样本的载玻片区域必须用过量的,含有适当浓度的 DNA 聚合酶,核苷酸,引物和其他成份的 PCR 试剂覆盖。然后,载玻片和试剂在典型的温度范围,近 90°C 和 68°C 之间,有时也可低至 37°C,典型地进行 10-30 次循环,在每个循环中的两个或三个选定的温度的任一处都停留至少一分钟的若干分之一或更长。

为了使原位 PCR 成功,有几个在热循环中必须达到的重要要求。其一是水从试剂中的蒸发必须几乎被完全防止。在不降低扩增产量或降低特异性的情况下,不超过最适试剂浓度的约 5% 的变化是可以容忍的。另一个要求是在反应过程中,任何对 PCR 反应有害的物质不能与试剂接触。还有一点是加热时试剂释放出的气泡或溶解气体不妨碍液体试剂进入到待反应的整个区域。

最后,有关原位 PCR 的出版物已表明,为了保持高特异的扩增,对反应进行“装配”(assemble)常常是重要的,以便实现“热启动”

或其化学等价的启动。在物理热启动中, 整个试剂既不经“装配”也不首先与样品 DNA 接触, 直到反应所需的全部成分都处于高温才进行装配和接触。温度必须足够高, 使得甚至是引物的部分杂交都不能发生于任何位置(除了在所期望的模板位置), 尽管细胞的整个基因组是能与引物非特异地部分杂交。温度也必须高得足以防止引物分子互相结合, 形成可扩增的产物, 叫“引物二聚物”。这种可靠的起始温度典型地在 $68^{\circ}\text{C} \sim 75^{\circ}\text{C}$ 之间, 而且通常比 PCR 中所用的退火温度高 10°C 左右。

在 PCR 中能够实现“化学热启动”的一种方法是通过在试剂中加入热不稳定成分如单链结合蛋白(SSB), 它防止任何由聚合酶产生的延伸, 直至反应混合物在第一个 PCR 循环中被加热到某温度, 该温度高得足以防止非特异杂交, 同时也破坏了热不稳定 SSB 组分。另一种实现化学热启动的方法是用尿嘧啶替代 dUTP, 并在试剂中加入热不稳定的酶 UNG(尿嘧啶-N-糖基化酶), 它会破坏在第一个 PCR 循环之前在低温保温时形成的任何的 PCR 的产物。

还有一种实现化学热启动的方法是在加入到试剂之前将 Taq 聚合酶与 Taq 抗体相混合。这样的一种 Taq 单克隆抗体最近由 Kodak Clinical Products Division 的 John Findlay 博士于 1992 San Diego 会议: Genetic Recognition, 十一月 18-20, 1992, 在题为“Development of PCR for In Vitro Dignostics”, 的论文中宣布。Taq 抗体与 Taq 聚合酶结合并抑制其在常温下发挥其功能。然而, 一旦加热受抑制的 Taq 聚合酶至近 95°C , 则 Taq 抗体, 一种正常蛋白, 即变性了, 释放出 Taq 聚合酶并允许其在 PCR 过程中正常作用。

这些类型的化学热启动需要在试剂中包含有一种通常是昂贵的组份(如 UNG 或 Taq 抗体), 而且对于 PCR 的操作可能会设置一些不合需要的限制, 例如在试剂制备好之后在一段相对短暂的时间界限前, 其必须被使用或者是较低的扩增效率。因此, 如果一切可能的话, 通常优选进行物理热启动。

今天使用原位 PCR 的技术人员常常是用他们在自己的实验室中发展起来的各种不同的方式来达到上述的要求。他们用原位 PCR 获得的信息常常不能以其他方式获得,因而他们经历了异乎寻常的烦扰及技术投资来获得信息便显得如此有价值。

如 Komminoth 等人,在 *Diagnostic Molecular Pathology* 1, #2, 85-97 (1992) 中所教授的那样。一种相当普通的策略是将一个盖玻片盖住待扩增的样品,并用指甲油(nail polish)或类似的粘附剂封住,对于这样的布置发生渗漏是不足为奇的,因为指甲油不能牢牢地粘附于组织样品。因为所有含试剂的部件都是刚性的,因此在变性温度(典型的为 94℃)产生的高压会使指甲油移位。硬的盖玻片如果与细胞接触的话还会破坏脆弱的下面的细胞的形态。这种方法不适于方便的热启动。另一个缺点在于需要在循环之后用氯仿处理装置以溶解指甲油。

这些载玻片通常位于热循环仪器的样品板(block)上,这些循环器并不是明确地为载玻片而设计的。这样获得好的热接触, Komminoth 等人在循环器的样品隔间覆盖物和载玻片之间使用垫片,以便将载玻片压向样品区。此外,现有的在加热区带有适用于反应器的小孔的热循环器不能均匀地热接触,对载玻片没有温度的均匀性。

一种相关技术由 Chiu 等人, *J. Histochemistry and Cytochemistry* 40, #3, 331—341 (1992) 所揭示,他们在分隔间的载玻片上培养待研究的细胞,并在同一载玻片上对细胞进行原位 PCR。在培养之后,去除样品隔墙,但是载玻片以及隔间之间的垫片被保留在载玻片上。为了进行原位 PCR,细胞先用含 2.5% 热琼脂糖的 PCR 反应混合物覆盖,然后将玻片用 Saran 包裹纸(wrap)密封地包裹起来。这种方法提供了一种韧性的细胞覆盖物,覆盖物置于防止细胞损伤的垫片上。Saran 包裹物提供了蒸发控制手段。整个装置置于样品间的长槽中注水的 Perkin-Elmer Cetus DNA 热循环仪上,在循环之前,用塑料膜和塑料盖覆盖装置。

Nuovo 等人, *American Journal of Pathology* 139 , #6, 1239 — 1244 (1992), 用韧性的, 热稳定的聚丙烯制得的盖玻片覆盖样品。典型地, 盖玻片通过每个角落的一滴指甲油而固定于所期望的组织切片上。载玻片典型地是置于放在 Perkin -Elmer Cetus DNA 热循环仪的样品区上的铝“船”中。该“船”主要起保留矿物油的功能, 矿物油随后加入载玻片装置中以防止试剂的蒸发。在用不含 Taq DNA 聚合酶的 PCR 反应混合物覆盖样品之后, 样品温度典型地升至约 65°C, 接着稍提起盖玻片, 以便将 Taq DNA 聚合酶加入反应混合物从而引发 PCR 反应。

提升盖玻片的能力使得热启动在原位 PCR 扩增中的特异性和特异的 PCR 产物的获得方面表现出重大的改进。在加入酶之后, 将预热的矿物油加到盖玻片的顶部和边缘。部分油也通过毛细作用被吸到盖玻片下。它的存在减少了盖玻片下的 PCR 试剂的液滴的直径, 同时也降低了对 PCR 试剂液滴的精确定位的控制。该方法获得了出色的结果, 但是需要一个或多个技术高超的操作人员, 而且该方法繁复, 不适于大量的载玻片。

另一种用于热循环和减少蒸发和浓缩问题的方法是将载玻片置于塑料袋中并且在空气炉型的热循环器中进行热循环。例如, Staskus 等人, *Microbial Pathogenesis* 1991, 11, 67 — 76 (1991) 和 Emberto 等人, *Proc. Natl Acad , Sci, U. S. A.* 90, 357—361 (1993) 用盖玻片覆盖组织, 然后在将载玻片置于在空气炉型热循环仪中的热可封闭的塑料小袋中之前用矿物油覆盖。空气炉方法避免了水从固定于盖玻片上的样品上蒸发的可能问题, 因为整个装置在热循环中大体是等温的。

空气炉法的主要缺点是该系统的热传递性能导致很慢的热循环次数。这样的系统也常常表现出炉中样品与样品之间的温度均一性差。

总而言之, 没有一种现存的方法揉合了所有所期望的性能, 如热均一性好, 不用矿物油进行蒸发控制, 试剂体积小, 保持细胞形态,

能热启动和能方便地在水平放置之外热循环大量的载玻片。今天, 几乎所有的人将制备好的载玻片放在矿物油中以防热循环过程中水从试剂中蒸发掉。

油层是一个主要的麻烦, 因为在热循环之后以及在用测定试剂进一步处理之前必须小心而完全地用额外步骤将其去除。油有时也是那些会抑制 PCR 的污染物的载体。

在实验工作中我们发现, 当样品上的水溶试剂的容纳(containment)是通过将塑料盖玻片盖在样品上并在角落或四周用粘附剂粘于载玻片而实现时, 表面张力作用和气体的淘析使得液体试剂在循环中四处流动。因此, 这些方法常常不是完全可靠的。通常, 它们要求载玻片呈水平, 从而限制了其在热循环仪中放置的方式。通过封闭性的粘附剂图在盖玻片周围而将试剂密封于盖玻片下的努力常常失败, 因为仅使用粘附剂是不可能或难以做到密不透风。此外, 载玻片表面至少在盖玻片的周边的部分通常为一薄层样品覆盖, 因此, 对载玻片的粘附性差。

因此, 很需要一种新且改良的用于操作原位 PCR 的完善的样品容纳装置。也需要一套装置, 它能为样品提供对试剂合适的物理容量, 以物理式地保护, 该装置能防止热循环过程中试剂和样品的蒸发。也需要一种装置, 它不必使用油, 也不使用粘附剂, 而且也不需要载玻片在热循环过程中保持水平。

根据本发明的一个方面, 提供了一种含靶核酸序列原位聚合酶链式反应扩增的容纳装置包括: 一玻璃显微镜载玻片; 一放在所述载玻片上, 盖住所述试样和所述试剂混合物的盖件; 特点为, 还包括一柔性盖件, 至少一围绕着所述盖件的一部分的环形密封件和至少一将所述的盖件和密封件相对于所述载玻片可卸地固定的卡夹机构; 以及一横梁件, 所述横梁件适合于装配在所述卡夹机构和所述玻璃片之间并盖住至少所述的环的一部分。

根据本发明的另一个方面, 提供了一种在试样中含有核酸序列的原位聚合酶链式反应扩增的装置, 包括: 一使所述试样放置在其

上的显微镜载玻片；一具有温度控制部件的热循环仪，该部件适合于接纳所述显微镜载玻片并使它靠在所述部件的部分，因此，在载玻片上试样的温度将伴随温度控制部件的温度的改变而变化；特征点为，还包括根据上文所述的容纳装置。

根据本发明再一个方面，提供了一种在载玻片上的原位聚合酶链式反应试样和试剂液体容纳装置的安装工具，特点为，所述的容纳装置如权利要求 1 所述，所述工具包括：一底座；一安装在所述底座上的支承支柱，所述支承支柱具有一以预定间隔关系接纳和支承所述固定组件的部件的水平的上表面；一可垂直移动的载玻片支承台板，所述台板可在支柱的上表面和所述台板部分之间移动，所述台板部分紧靠所述支柱的上表面。

根据本发明的容纳装置含有常用的玻璃载玻片，其上面有含靶核酸的组织样品，一个覆盖在样品上的柔软的盖件和固定装置，它机械式地固定于载玻片从而将试剂和样品保留在载玻片之上和盖件之下。

在根据本发明的装置中，试剂被薄的，柔性的，被机械夹于载玻片的盖件所包含，处于与样品标本的被选择出的部分接触之中。盖膜可以是不透明的或透明的，因为与其说要透过装置中的玻璃还不如说要通过盖件观察试剂，而且盖件必须与 PCR 试剂及样品不起化学反应。一个位于盖膜周围的通常为环形密封环将盖件压于载玻片，得到密不透风的密封。压力由弹性夹和横梁装置维持。载玻片上的被扩增样品可以在盖件和固定组件去除后用习用的方法通过显微镜观察。

该装置使得载玻片上的完整反应的装置快速、方便和可重复，而且只需最少的技术。装置操作程序能轻易地与物理热启动相匹配。最后，本发明的系统适合习用的显微镜测定技术。

本发明的这些以及其他特征，目的和优点，能够通过结合附图阅读下面详细的描述而变得更明显。

图 1 是一根据本发明的样品容纳装置的透视图；

图 2 是一颠倒过来看的图 1 所示的该装置的部件分解视图, 以及组装的方法;

图 3 是一颠倒过来看的图 1 所示的装置的部分放大顶视图;

图 4 是一沿图 3 中 4—4 线所作的装置的截面视图;

图 5 是一沿图 3 的 5—5 线所作的装置截面图;

图 6 是一根据本发明的弹性卡夹之一的端视图;

图 7 是一图 6 所示的弹性卡夹的顶视图;

图 8 是一根据本发明的装置中使用的较佳横梁的底视图;

图 9 是一图 8 所示横梁的侧视图;

图 10 是一在图 8 中沿着 10—10 线所作的横梁的截面视图;

图 11 是本发明容纳装置的手工装配安装用具一透视图;

图 12 是根据本发明的容纳装置的机械装置设备的一透视图;

图 13 是从图 12 的设备中分离出来的夹钳装置的一透视图;

图 14 是一现有热循环仪的槽式配接板的顶视图;

图 15 是一图 14 所示槽式配接板的截面视图;

图 16 是一热循环仪的透视图, 而该装置具有适合于接纳根据本发明的样品容纳装置的改进的热交换区;

图 17 是一图 16 所示的热循环仪热交换区放大的部分截面视图;

图 18 是根据本发明的一横梁和盖件的第一可替换实施例的顶视图;

图 19 是根据本发明的一横梁和盖件的第二可替换实施例的顶视图;

图 20 是根据本发明的一装配好的容纳装置的截面视图, 装置包括一在图 18—19 中所示的可替换的横梁和一可替换的盖件;

图 21 是一图 20 中所示容纳装置沿着 21—21 线所作的放大的部分截面视图;

图 22 是根据本发明装配到载玻片上的容纳装置的端视图, 该装置采用了横梁和盖件的第三可替换的较佳实施例;

图 23 是一图 22 中所示的, 按 23—23 线所作的本发明的部分截

面视图；

图 24 是一图 22 中所示的, 沿线 24—24 所作的部分截面视图。

在图 1 中示出了根据本发明的容纳装置 10, 它容纳固定在玻璃载玻片 14 上的含靶核酸的样品 12 及样品 12 上的试剂 13。该装置 10 包括载玻片 14、一盖住样品 12 的柔性盖件 16 和一把盖件 16 夹紧到载玻片 14 上的固定组件 18。

在图 1 的透视图示出了这个装置 10 的组合, 图 2 表示各个部件的一分解视图, 图 3 表示图 1 所示的组合装置经放大的一俯视图, 而图 4 和 5 则表示图 3 所示的装置 10 的截面视图。

约一滴试剂 13, 其通过周围的柔性密封件或密封垫封入盖件 16 和载玻片 14 之间的容积中。密封件可件是一分离部件或可以是一盖件 16 的整体部分。密封口最好是盖件 16 的柔性边沿部分 19, 而该盖件则由在化学上与 PCR 试剂相容的弹性材料制成。在最佳实施例中, 盖件是由硅橡胶制成的。盖件是足够宽的, 并且受到刚性密封环 20 以每单位面积足够大的力紧压住载玻片 14, 因此即使密封环下的载玻片表面复盖着一薄层样品 12 的细胞或组织, 但在热循环过程中也很少有水, 液体或蒸汽可从盖件 16 下的空隙中溢出。甚至在沸腾温度条件下, 仍能保持密封垫密封。

把柔性盖件 16 加工成形, 以使在放松后柔性盖件在接触试剂的一侧上为微微下凹的。盖件凹度可加以选择, 以限定密封环 20 将盖件 16 的边缘部分 19 紧压住载玻片 14 时盖件 16 和载玻片之间可保留的试剂的容积。一般, 对于直径约 12 毫米的圆形盖来说, 其容积约为 10 微升。容积可以如下方式进行选择。若容积太大, 所需的试剂 13 的量将不必要地耗费且需用稍长时间来加热和冷却。若容积太小, 那么盖件之下的表面容积比将变成不适当的大, 并且由于表面上酶的吸收而具有较大不良扩增的危险, 或通过部件或样品 12 上抑制性污染的痕量而毒化试剂 13。

一般, 待检验样品 12 的受关注的区域直径不大于 10 毫米。载玻片的清洁区红 25 毫米×27 毫米, 因为通常把其一端用作标记而

冻结起来。由于把仅几个微米厚组织片段(部分)精确地沉积在载玻片的预先位置是十分困难的,所以使盖件 16 能安置在清洁区的任何地方是最好的。此外,在载玻片上可以有超过一个受关注的区域,因这对于在载玻片上能放置多于一个样品和装置 10 是一好处,如图 1 所示。

将盖件 16 夹紧到载玻片 14 上的新的固定组件 18 使盖件 16 有更广的可变位置。在载玻片清洁区边缘的几个毫米范围内的任何位置上所安放的样本都可能被容纳的扩增。对于密封环 20 来说几个毫米范围是需要的。盖件 16 的边沿部分 19 在其四周通过刚性密封环 20 而得以加强,并且若使盖件的两相对边缘上的密封环 20 紧压住载玻片 14 以形成充分的密封,那么该密封在盖件四周围其它各部分上将是充分的。因此,刚性密封环 20 可迫使盖件的周围保持在一平面上。

盖件 16 最好是一橡胶薄板的圆盘。刚性密封环 20 是一粘接到橡胶盖件 16 边沿 19 上的不锈钢环。该环 20 可具有矩形、不规则四边形、三角形或其它多边形横截面形状,因而,至少有一与盖件 16 粘接的平端。更具体地说,环 20 具有矩形成不规则四边形的横截面形状。“D”形横截面也是允许的。此外,环不必是圆的。它可以是长方形的或其它连续的形状,只要盖件 16 可对载玻片表面加以密封。因此,连接到不锈钢环 20 上的盘形橡胶盖件 16 的边沿 19 构成了一密封垫,该密封垫与盘的托架是连续作用的。本实施例要求橡胶薄板盖件 16 可防止水蒸汽通过它扩散,同时,对 PCR 试剂没有害处的。尽管硅橡胶对 PCR 无害,但它对水蒸汽则是于透过的。因此,如图 4 和 5 中所示的盖件材料既可以选硅橡胶那样的无害弹性材料和聚丙烯那样的非渗透性弹性材料的夹层板或复合材料板,也可以选至少在非渗透性弹性材料下面用联合碳化合物公司的派雷里恩(Parylene)C 那样的无害涂覆层或薄层。

盖件 16 必需的凹面形状可以在平的盖件 16 模压过程中形成或通过把盖件连接到刚性环 20 上时使平的盖件 16 变形,或通过把盖

件 16 的外表面中央连接到固定在环 20(图中未画出)的连接板上使盘的中央微微伸出环 20 平面而加以形成。

盖件 16 通过带有平行横条 24 的刚性横梁 22 相对载玻片固定,该平行横条则仅与密封环 20 的两相对部分接触。横梁 22 的横条 24 从一长边缘到另一长边(缘)延伸过载玻片。这样,盖件 16 可位于横梁 22 的任何地方,如图 3 所示。此外,沿着载片长度的任何地方都可以把横梁 22 夹紧到载玻片上。因此,在本发明中盖件 16 可安装在载玻片清洁区内的任何位置。

横梁 22 的横条 24 最好具有如图 5 所示的 L 形截面以增加其刚性。横条 24 通过两扁平端部 26 连接起来,该扁平端部通过图 1、3 和 4 所示的两卡夹 28 夹紧到载玻片 14 上。这些卡夹 28 各伸过载玻片 14 背侧 30 的,即装有样品 12 的相反侧的纵向边缘。横梁 22 的各端 26 略加以弯折以形成倾斜平面。在把卡夹 28 推压入应有的位置上时,它们可在这些倾斜平面端 26 上滑动并将相当大的压力施加在横梁 22 和密封环 20 上,以便把盖 16 的边沿部分 19 压紧且使它紧贴住载玻片 14。

虽然卡夹 28 和横梁 22 可由相对薄的材料(可能是不锈钢)制成,但它们是足够硬的,因此在组装过程中它们很少挠曲。维持夹紧力的储能最好大量地来自橡胶密封垫(在密封环 20 下面的盖件 16 的边沿 19)的压缩,而不是从横梁 22 或夹板 28 的扭曲中产生。这种密封垫的有益的作用在于盖件 16 不论使安装在载玻片 14 何处,横梁 22 的横条 24 始终平行于载玻片且边沿 19 沿其整个周边过量均匀地受压。将盖件 16 夹紧到载玻片 14 上的横梁 22 和卡夹 28 也是足够硬的,以便经受得住将试剂 13 加热到将近沸腾温度下所引起的压力增加。盖件 16 是柔性的,大大地减少了可在盖件下面引起的最大压力。另外,在加热期间柔性盖件 16 承受得住流体的膨胀,而不会使有效地加压密闭容积的载玻片 14 破裂。在加热循环过程中使用本发明的高度独立容纳装置可以防止或至少可使这一试剂 13 中的气泡形成减至最小。通过横梁施加到环 20 上的压力

处在四磅压力的范围内且形成橡胶边沿 19 约 20% 的压缩。

图 6 和 7 示出了卡夹 28 之一的放大的顶视图和侧视图。卡夹 28 是一变成“J”形的不锈钢金属片以形成一长侧壁 32、一短侧壁 34 和一垂直连接的壁 36。壁 32 可以设有一对实向短侧壁 34 的凹陷 38。这些凹陷 38 被隔开以约束和咬住在横梁 22 倾斜表面端 26 的内缘上把卡夹 28、横梁 22 和载玻片 14 锁住在一起,如图 1 和 4 所示。另一方面,凹陷 38 的功能可通过固定装配 18 部件之间突起的脊部或其它干涉机构来加以实现。

在图 8、9 和 10 中示出了横梁 22 的一可替换的实施例。横梁 22a 通常是一带有矩形开孔的冲切式矩形金属板体,该矩形金属板体形成两由横向端部 26a 所连接的平行横条 24a。横梁 22a 的横条 24a 具有图 10 所示的 L 形截面。在装配时,由平的端部 26a 所连接的横条 24a 夹紧到上述载玻片 14 上。与图 3 至图 5 所示的第一横梁 22 的主要不同是端部 26a 以双弯曲部 27a 与横条 24a 连接。双弯部 27a 使卡夹 28 长的腿部能摩擦地与端部 26a 的表面接合。这种双弯曲部 27a 还差不多形成一台阶,因此,在卡夹 28 安装好后,装配好的载玻片和盖件装置的总厚度是最小的。

朝着端部 26a 近似 3° 的倾斜就足以在横梁端部 26a、载玻片 14 和卡夹 28 之间提供必要的夹紧力,并且可确保对刚性环 20 施加足够的压力。这样,当采用图 8—10 所示的替换横梁时,在卡夹 28 上的凹陷 38 就成为不必要的。

由于盖件 16 不比所必需的大,故所需的试剂容积仅是必要的,而且用密封环作不渗漏密封所需要的力也被减至最小。所有这些特性都是很有益的密封。因为它使装配成为较容易的,所以不需要大的密封力是所希望的,而必需刚性地承受得住较大力的机构会使装置变成不必要的粗厚的笨重,而倘若把笨重机构安装在边缘上的话,那么这也会阻止可在循环仪中容纳的载玻片的数目。它还增加了装置的热时间常数且减慢循环过程。

原位聚合酶链反应的载玻片的装配

在盖件 16 下适当位置装有试剂 13 的载玻片 14 上的整个容纳装置 10 的装配是通过一独特的程序加以完成的, 该独特程序也是本发明的一部分。在一最佳实施中, 使用了一手工装配的安装工具 40。这种安装用具 40 示于图 11。在另一最佳实施例中, 采用一机械辅助装配的安装用具或工具。在图 12 中示出了这样一种工具。

在图 11 中所示的手工装配安装用具 40 基本上由一固定于底座 45 上的装配支柱 42 和一可移动地安装在底座 45 上的滑动导向件 44 组成。滑动导向件 44 是弹簧向上偏压的, 以便在支柱 42 周围垂直移动。支柱 42 的顶端具有加工成形的凹陷区域 46 和 48 可松动地容纳卡夹 28 和横梁 22 且使它们保持在载玻片 14 的装配位置上。支柱 42 还具有—中心空气通孔 43。

滑动导向件 44 是一 U 形体, 它通常具有两位于紧靠支柱 42 两侧的平的盘部 50。这些盘部 50 具有一依一定尺寸制造的通道以安放—标准显微镜载玻片。两盘部 50 通过整体的 U 形架 52 连接在一起。各个盘部 50 具有一与其下侧固定的套筒 54, 套筒可在固定于底座 45 上的配合支杆 56 上滑动。围绕支杆 56 所安装的弹簧 58 把导向件向上偏压到某一位置上, 在此位置上, 由盘部 50 所支持的载玻片 14 将位于支柱 42 顶端的凹陷区域 46 和 48 上方。

容纳装置 10 的配装方式如下。首先, 把两卡夹 28 安装在装配支柱 42 顶端的凹陷区域 46 中, 而它们的长的侧壁 32 向下朝向支柱 42。然后, 将它们定位, 使得它们相对的两短侧壁 34 之间的间隔正好比标准的一英寸显微镜载玻片的宽度稍度一点。接着, 将横梁 22 安放在装配支柱上并进入凹陷区域 46 间, 而其横条边缘如图 2 向上且横条 24 处于凹陷区域 48 中。各部件的尺寸是这样的, 即由横梁 22 的端部 26 所形成的各倾斜表面的部分处在卡夹 28 的长侧壁 32 的顶端。这样, 构成了卡夹 28 与横梁 22 的初始啮合。

在另一方面, 可以提供由微弱粘附力保持初始接合和适当间隔关系的横梁 22 和卡夹 28 的预装配结合来减少制备装置的所必需的操作量。另外, 如果卡夹 28 由磁不锈钢制成, 那么埋在装配支柱

中的小永义磁铁可以以最少操作自动地把卡夹放在适当位置。

然后,在密封环 20 固定到边沿部分 19 上后,把盖件 16 安装在横梁 22 的横条 24 之间,而凹部、盖件 16 的密封垫侧向上,密封环 20 搁靠在横梁 22 的横条 24 上。接着,使盖件 16 定位,并使盖件对准载玻片 14 上受关注的(含有试样)的区域的中心。盖件的尺寸是那样的,即其边沿 19,也就是密封垫或密封表面以大于装配好后密封垫将受压缩的量突出于横梁 22 的横条上,因而即使在边沿受到挤压后,横梁 22 将令人满意地实际上不接触载玻片 14,如图 4 和 5 所示。

于是,把一滴试剂 13 滴放在盖件 16 上。最好使用一可用手调整移送所需试剂容量的吸液管,以便把一滴液的试剂滴送到接近凹部表面的中心。由于盖件的表面只可部分地湿润,故扩散不明显。它还很好的停滞在盖件 16 的边沿 19 上方。

然后,将具有至少一个预先固定在其上的试样 12 的载玻片 14 安放在装置的安装用具的滑动导向件 44 上,样品侧向下、直接位于试剂 13 液滴上。先使滑动导向部件 44 定位,以使载玻片的底部总是由弹簧 58 保持在试剂滴 13 的顶端以上至少几毫米处。通过将载玻片 14 纵向滑动使其定位,以便使待处理的样品区域对准盖件 16 上的液滴中心。这可透过载玻片 14 的后部观察得到(后部现在处在上端)。正如通常作法,如若所受关注的区域(部位)随在载玻片 14 的背部 30 上的链式标志而进行旋转,那末使操作变得极其容易。

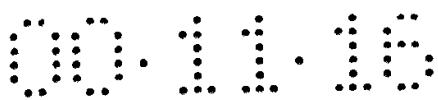
接着,使用者可把一手指(戴了手套的)放在直接位于装置支柱 42 上的载玻片 14 的背部,以足够大的力直接掀压以克服向上推压的弹簧 58 的弹性力且使滑动导向件 44 下移。这使载玻片 14 的样品侧与试剂液滴 13 接触,并且迫使液滴 13 扩散散布在边沿 19 内的载玻片 14 和盖件表面上。试剂液滴的容积已经被选定为稍大于盖件 16 的凹入表面和与其边沿 19 接触的面(载玻片表面)之间的容积。因此,在载玻片表面刚好与边沿 19 进行接触之前,该液滴达

到和越过边沿 19 的边缘。在载玻片 14 和盖件边沿 19 形成密封前, 以上所述作用将所有或几乎所有空气从盖件下排出。对于少量试剂的过度容量通过盖件 16 的边沿 19 流出是可接受的。流出的试剂(它)最后会完全变干。在载玻片 14 上的另一向下力开始将边沿 19 压紧。

当边沿 19 已经部分地受到挤压时, 载玻片 14 的背侧 30 应该恰好处在或低于各卡夹 28 短的侧壁 34 的底缘。此时, 操作者用它的另一手(戴手套的)大姆指和手指在载玻片 14 的边缘上和在横梁 22 的端部 26 上彼此相对地挤压两卡夹 28 直到卡板 28 以其相对载玻片 14 的边缘垂直连接壁 36 而停止为止。这种作用完成了盖件 16 边沿 19 的挤压。由于使横梁 22 的端部 26 啮合的诸小棘爪 38, 和/或因为横梁部各端 26 上的倾斜表面切线角度小于卡夹 28 和横梁端部 26 向摩擦系数, 故卡夹 28 保持安装就位直到有意加以移去为止。

在根据本发明的装配好的装置 10 中, 载玻片 14 和盖件 16 之间所截留容积完全由不可压缩试液 13 所填满。因此, 因要把盖件 16 的边沿部分 19 紧压到(反应)结束, 故盖件本身最好是柔性的, 它能够扩张以调节装入的试剂量而在压力上增加不大, 否则, 这会使装配成为很困难的。为什么盖件 16 应该是柔性的另一原因是在把试剂 13 加热到接近或超过其沸点的温度时, 它发生膨胀、其蒸汽气上升, 其中所溶解的气体趋向于从溶液中出来。如果盖件不是全部柔性的情况下, 在其内的压力可能升高到足以将载玻片或盖件密封破坏且造成试剂的丢失。然而, 足以容纳任何形成的气体气泡的容积的少量可塑性可使压力不升高太多。一般来说, 压力将升高到只稍大于试剂蒸汽压超过外部大气压力的量。这将确保装置甚至在高空(高的海拔)还能很好工作, 在高空上, 游离的试剂的沸点变成低于 PCR 变性温度。

在图 12 中示出了一机械辅助装配用具或工具 80。这种工具除了实际上省去了用手指装卸本装置外与图 11 所示的工具相类似。

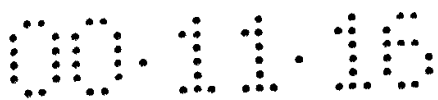


尤其是若要完成物理热启动的话,这种工具 80 是最好的。在图 12 中所示的工具 80 具有一底座 45 和一象图 11 所示的安装到其上的支柱 42, 并且利用一形状有点与图 11 所示的导向件 44 类似的滑动导向件 82。此外,工具 80 具有一压臂 84 和一卡夹安装机构 86, 因而,在装置操作过程中使用者不必实际接触固定装置 18 的热部件(或成分)。

滑动导向件 82 具有一对依一定尺寸制成的间隔的平盘部 88 以接纳载玻片 14。两盘部通过整体的 U 形支架 90 加以连接,这种 U 形支架 90 可绕着水平轴销 92 转动。轴销 92 由约同支柱 42 的顶端一样高度的两固定支座 94 水平地支承在底座 45 上。

在臂 84 的一端也以枢轴安装在轴销 92 的支架 90 内。压臂 84 中一扁平、细长件并在支柱 42 的顶端上方设有一通常的矩形开孔 96, 而支柱的顶端则接纳和支承横梁 22 和卡夹 28。当将压臂 84 从支柱 42 上方下放到载玻片 14 上时,开孔 96 使对载玻片 14 上的盖件 16, 横梁 22 和样品 12 能进行观察。在压臂 84 紧贴住载玻片 14 时一绕着开孔 96 的橡胶垫片 98 则用来防止载玻片破裂。压臂 84 最好是向弹性偏压时,以使它保持抬起(离开)直到需要的位置为止。同样,载玻片导向件 82 弹性向上偏压以使载玻片 14 保持在横梁 22、卡夹 28、盖件 16 和试剂液滴 13 上直至压臂被放入,使固定组件 18 最后安装到载玻板 14 上。压臂 84 和载玻片导向件 82 可以设有安装在轴销 90 上的普通弹簧(图中未画出)或弹簧可从底座 45 中伸出以提供所需的向上偏压。

卡夹安装机构 86 最好为一对安装在支柱 42 上的负荷弹簧钳 100, 该弹簧钳具有两各弯向凹入区域(部位)46 的相对钳爪 102, 凹入区域则在紧邻安装在导向件 82 中的载玻片 14 的边缘处放置一卡夹该弹簧钳还有一构成整体的、相对的钳柄部 104。弹簧钳 100 的相对钳柄部 104 用手工挤压在一起而把卡夹 28 从载玻片边缘和横梁 22 的端部 26 上方推压到载玻片的两侧边上,从而完成了容纳装置 10 的装配。各弹簧钳枢轴地安装在一固定的轴销 106 上,该



轴销穿过支柱 42 的侧壁正处在钳爪 102 和卡夹 28 之间的接触点下。

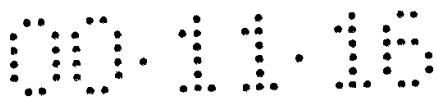
在图 13 中以透视方法独立地示出了卡夹安装机构 84。各 L 形钳爪 102 具有一短腿,该短腿可装配入支柱 42 顶端的凹入区域 46 之一中。各平的柄部 104 绕着支柱 42 的两邻接侧围起来。在各钳柄部 104 和支柱 42(未画出)之间安装的弹簧(未画出)使弹簧钳 100 的柄部 104 和钳爪部 102 向外偏置,以使固定卡夹 28 能安装在凹陷部分 46 中。在相对柄部 104 挤合在一起时,端部(钳爪)102 彼此相对移动,使卡夹 28 压在载玻片 14 上。

工具 80 以如下方式进行操作。卡夹 28 如前所述安装在凹陷部分 46 中。将横梁 22,密封环 20,盖件 16 和试剂 13 顺序地安放在支柱 42 上,然后,将一其上放有试样 12 的载玻片 14 放在导向件 82 的盘部 86 上,并使试样侧朝下且使试样垂直处于盖件 16 中的试剂 13 的上面。于是,压臂 84 绕着枢轴相对于载玻片向下转动,以将载玻片 14 降到盖件 16 上且使试剂和酶散布于载玻片 14 上的试样上。当压臂 84 充分地压降下来后,挤压弹簧钳 100,使钳爪 102 彼此相对移动,把固定卡夹 28 推压到载玻片 14 和横梁端部 26 上。再者,将整个载玻片容纳装置 10 从工具 80 上移去,把它放置在一改进的热循环仪上且进行以上所述的热循环。

热启动应用

为了实现使用本发明的热启动,我们只需要将一加热系统加装到手工装配安装用具 40 上或机械辅助工具 80 上且使已加热的容器蓄有系统的部件。此外,如上所述,某些载玻片和固定装置部件可以暂时组装在一起且在安装用具上放置和在所有容纳装置部件最后连结之前给予加热。

下列说明适用于图 11 所示的手工加热装配安装用具 40 和类似于图 12 所示的机械辅助装配工具 80。装配支柱 42 设有透过它的一垂直孔或空气通孔 43,通孔经底部同周围的空气交换。在电源接通后,一内部恒温控制加热器使支柱 42 柱体温度保持在约 75℃,这



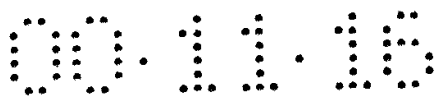
比热启动温度在近似 70°C 要热。这种加热器可以是一在中心孔 43 周围缠绕的阻抗线圈, 或可以简单将加热器埋在底座 45 或支柱 42 中。为了有助于加热垂直通孔中上升的空气可以在孔 43 的内部设置助片。对流可维持一象在烟囱中那样的热空气的提升圆柱, 它可在最后装配前洗涤安装在支柱 42 的顶端上的横梁 22 和盖件 16。横梁 22 和卡夹 28 也通过与金属装配支柱 42 接触而加以加热。

在一经加热载体中存放着待处理的一些载玻片 14, 而该载体使载玻片保持在约 75°C 。卡夹 28, 盖件 16 和横梁 22 可在工作场所的小型加热容器中进行贮存且用镊子来装卸。对于把两预加热卡夹, 一横梁 22 和一盖件 16 安装到已加热的装配支柱 42 上所需的时间一般可为 10 至 15 秒。对于使用一预热的移液管夹端输送预热的试剂 13 的时间小于 10 秒。在把预热载玻片推压下之前已加热的试剂 13 需要接触不超过又一 10 秒, 使它密封和把固定组件 18 的诸部件夹紧在一起。几秒钟以后, 装配好的载玻片可退回到其已加热载体上, 决不要冷至 70°C 以下。因为暴露时间是如此短, 所以由于蒸发试剂浓度(变化)应该是最小的。

一确切的物理性热启动可仅通过把装配工具加热和把载玻片、诸容纳部件、试剂和诸吸管尖端储藏在装置工作部分的加热载体中而加以获得。其它程序上的变化是不必要的。这种程序随图 12 所示的装配工具 80 的使用而得到简化, 因为排除了已加热部件的储存和正加热部件和导向件 82 接触。对于热启动而言如果诸部件通过粘结剂固定在一起, 那么也可使用卡夹 28 和横梁 22 的预装配, 粘结剂在环境温度下是很坚硬的, 使装配和装运方便, 但这在热启动温度下易于削弱最终装配。

容纳装置 10 的诸卡夹 28 伸出载玻片 14 的边缘外, 而占有其背面 30 向个毫米。由于这个原因, 任何一种放有新的容纳装置的热循环仪的平热交换表面必须设有一些槽, 槽的深度略小于 1 毫米, 宽为 3 毫米以容纳卡夹 28。

根据本发明, 若将一块配接板放在热循环仪部分的平的上表面



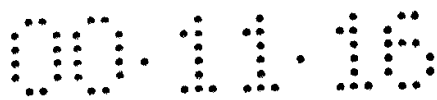
上,那么现有的一些热循环仪,例如 Perkin Elmer DNA 热循环仪,Perkin Elmer 480 型,或 Perkin Elmer9600 型都可用来使载玻片装置热循环。在图 14 和 15 的顶视和截面视图中示出了这样一配接板 110。这种配接板 110 具有一平的底表面 112 和一具有被间隔的平行槽 116 的上表面 114。这些槽 116 为接纳卡夹 28 而依一定尺寸制作,使得槽 116 之间的平的表面部分 118 可与放在配接板上的载玻片 14 的玻璃表面充分接触。配接板 110 可用来接纳 3 或 4 块载玻片组件。

最好将象油那样的导热液或导热脂散布在上表面部分以增加在载玻片 14 的背侧 30 和槽 116 之间平的热交换表面 118 之间的界面的热接触。在热循环仪装置和配接板 110 之间也应使用硅脂和矿物油以确保这种界面的良好热接触。乙二醇或其聚合物也能有益地用来提供二个界面之间的良好热接触。乙二醇或其聚合物具有可水溶的优点,因而简化了装置部件和热循环仪装置部分的清洗。在载玻片和配接板之间及在热循环仪装置和配接板之间使用不是油、脂,就是乙二醇或其聚合物的另一优点是:液体层起到一吸紧作用,因而将载玻片固定到配接板上和装配接板保持在热循环仪装置部分适当位置上,从而使处理过程中跌落的机率减至最小。

目前的实验已经表明调节 DNA 热循环仪的热校准,或规定稍高的原位扩增温度,以便补偿整个系统的热量的变化可能是必要的。举例来说,已经观察到从样品区段到载玻片顶面有不到 1°C 的小温差。这种温差可通过使用以上所述的油、脂或乙二醇而减至最小。

DNA 热循环仪的原位型式

本发明的容纳装置 10 适用于比上面刚提到的还要多的载玻片进行循环,因为,各个装置 10 其厚度均小于 4 毫米,可在任何实际场合加以循环,而不需要浸污在油中。例如,装置 10 可在改进的热循环仪部件垂直布置以接纳大量的载玻片组件。在图 16 中示出了一种含有一改进的金属架 122 的热循环仪 120。金属架 122 含有 8 条狭槽 124,后者处在金属隔板 126 之间,其中心间相距 10 毫米。



各个狭槽 124 宽约 5 毫米, 各个隔板 126 在各金属隔板 126 的左手侧上具有一平的、垂直的热交换表面 128 以及一对接纳卡夹 28 所必需的凹槽 130。

图 17 是通过安装在一个这种狭槽 124 的边缘上的载玻片装置 10 所作的(金属)架 122 的一部分截面图。底槽 130 的顶连 132 加以平滑倒角, 防止因载玻片 14 垂直移出时其碰着卡夹 28。根据同样的原理, 上槽 130 不设有上边缘。很显然, 当载玻片以这种方式安装后, 我们不能依赖重力使载玻片 14 对着平的金属热交换表面 128 固定。因此, 可将传统结构的小叶簧(在图中未画出)安置在各狭槽 124 的端部以使载玻片平缓但牢固地贴靠在垂直的金属表面 128 上。

再者, 在载玻片 14 和平的金属热金属表面之间应该使用矿物油、脂、乙二醇或其它的导热液体以使传热增至最大。弹簧可在载玻片装载后加以接合, 在它们卸载前加以脱开, 或者可永久地安装在狭槽 124 中, 以便将载玻片 14 及其装置 10 连接地压入与表面 128 接合。

当热循环完成之后, 被装入的载玻片容纳装置 10 从其狭槽 124 中移出, 用作进一步分析。诸容纳装置部件易于通过将卡夹 28 自载玻片 14 上滑出而加以分离。如果诸容纳装置部件和载玻片 14 被放入-5%的漂白剂的容器中使它们消毒, 再进行淋洗和干燥的话, 它们可以重复使用多次。对复复使用的限制将由盖件 16 和/或边沿 19 的磨损来确定, 其状况在盖件 16 被夹紧到载波片 14 上之前和之后通过目测可检验出来。值得注意的是不象对溶液中样本所进行的 PCR, 对于原位 PCR 而言, 不希望有的 DNA 的沾污问题是要小得多。其原因是使 DNA 沾污不进入适当固定的细胞的内部。此外, 任何沾污的 DNA 可在热循环后的加工步骤之前用试剂来清洗掉。有关原位 PCR 的这种事实使可清洗和重复使用的零件比它们在溶液中作 PCR 更可接受。

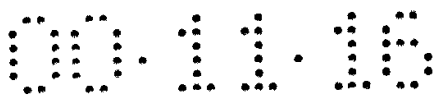
原位 PCR 的试剂

在我们的工作中,我们发现原位 PCR 用的最佳试剂数量与溶液中 PCR 用的试剂数量不同。首先,存在一表面与容积比的问题。在 MicroAmp™ 试管中的 10 微升试剂具有 17 毫米²左右的容器接触表面。在一载玻片 14 和 10 毫米直径的盖件之间同样容量的试剂约有 157 毫米²接触表面,也就是约大 9 倍。因此,在原位情况下任何由表面状况,所引起的对 PCR 的有害影响例如聚合酶的吸附被扩大了。如果表面条件比经仔细选择的 PCR 反应试管的聚丙烯材料更有害,那么这种有害影响被大大地扩大且能容易地把 PCR 完全摧毁。例如广泛采用的硅烷处理的玻璃载玻片实质上是一比例如聚丙烯更有害的表面。

我们还发现根据本发明对硅烷在载玻片上的 PCR 试剂,在容器的溶液中获得聚合酶链反应的成功扩增,我们需在反应中增加 Tag 聚合酶的数量,从溶液 PCR 中典型的每 100 μ l 2.5 单位增至每 100 μ l 12.5 单位。我们也发现往试剂中加入 1mg/ml 的牛血清白蛋白 (BSA) 会保护 PCR 免受载玻片表面的影响。我们认为牛血清白蛋白 (BSA) 通过在所有接触的表面上迅速地形成至少一单层蛋白质而产生作用。因而,这个单层提供了一 Tag 聚合酶不强烈的粘附的表面。

我们已讨论过在循环过程由反应而失水。尽管工作十分小心和迅速,在热启动负荷过程中,总有一些水要失去。还有一些水汽因扩散到柔性橡胶或塑料盖件 16 中或甚至通过柔性橡胶或塑料盖件 16 的薄壁而散失掉。由于这些少量的额外损失,原位扩增的 PCR 试剂的配方应该是处在各组分最佳浓度范围的最大稀释点,因为在施以热负载和循环时浓度的唯一变化,即使有的话,由于水的失去而有可能使浓度少量增加。

这样,原位聚合酶链反应装置的整体包括载玻片和容纳装置 10、装配安装用具 40 或 80、一个或多个附有容纳装置 10 的载玻片 14 的改进的热循环仪以及以上所述的改良的试剂 13。这种结合的新颖和不可预料的结果是、对细胞和组织样品内的特异 DNA 序



列的方便、可靠、灵敏的检测和定位。

倘若在载玻片 14 的边缘之间的试样 12 的侧方位和间隔是恒定的话, 环 20 可被整合入横梁 22。这将简化部件结构, 固定组件 18 和容纳装置 10 的装配。

容纳装置 10 的结构通过几个途径可加以简化。例如, 横梁和固定环可被整合。本发明中的横梁和盖件的第一个可选择的具体实施例见于图 18。可选择的横梁的变化描述于图 19。在下面的描述中类似的数字也可被利用来描述在上面已阐述的原位 PCR 容纳装置中的同一或可替换的部件。

现参阅图 18 和 19, 各示出了装配到可替换盖件 122 上的可替换横梁 120 和 140 的顶视图。横梁 120 和 140 之间的区别仅仅是圆孔 124 和 142 的方位不同。横梁 120 和孔 124 是位于中央相比较的话, 横梁 140 的孔 142 是位于紧靠横梁 140 的一端 144。两横梁 120 和 140 的结合有可能使盖件 122 盖住载玻片 14 任何位置上安放的样品 12, 而这种作用仅需改变横梁 140 的方位或仅需选择有中心配置孔 124 的横梁 120。在这些实施例中, 密封环与横梁成一体。横梁 120 通常具有一圆的环部 126, 当容纳装置 10 按图 20 和 21 部分截面视图安装好后, 该环部将压紧在盖件 122 的边沿部 128。

最好, 横梁 120 是一不锈钢板的一冲压件。横梁 120 具有一对平行、竖直的弯折边, 弯折边形成在相对端 132 之间延伸的横条 130, 而相对端则以约 3° 的小角向下弯曲以与以上所述第一实施例中卡夹 28 相类似的方式接纳卡夹 134。如图 21 所示, 各卡夹 134 在安装过程中将端部 132 和载玻片 14 挤压在一起, 因而将盖件 122 的边沿部分 128 压贴到载玻片 14 上。

这种横梁 120 和盖件 122 布置的可替换实施例的最独特特点是在边沿部分 128 和中心拱曲或凹面部分 138 之间具有一环形肋或脊 136, 在拱曲或凹后面部 138 下盛放试剂混合物 13。这种环形脊 136 最好具有一放大的鳞茎顶部 137, 顶部则咬入把各片件固定在

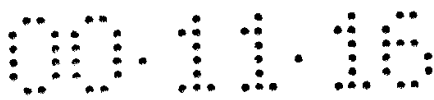
一起的孔 124 中。盖件 122 和横梁 120 可作为分离单元加以安装,以便简化图 21 所示本替换实施例的容纳装置 10 的部件的最后组装。

横梁 120 可以设有切去区域 139,以节约为余的金属材料。在另一方面,这些切去区域 139 可以用肋或波纹板(未画出)替代以提高横梁的刚性。

现参阅图 19,横梁 140 具有平行升高的横条边缘 146 和一单个切去区域 148,这与在横梁 120 上的两个切去区域不同。横梁 140 可从图 19 所示的载玻片 14 的方位转动 180° ,使得横梁 140 和横梁 120 的结合允许覆盖载玻片 14 上实际上所有的各可能性的样本位置。

图 18—21 所示的可替换容纳装置 10 的装配类似于以上第一实施例所述的装配情况,只是固定环 20 不再需要,也不必先将盖件 122 和横梁 120 装配在一起。如先前所述,可以利用手工或机械辅助装配工具 40 和 80,以便把容纳装置 10 安装到载玻片上和进行热启动。

图 22 至 24 表示根据本发明容纳装置 10 的第三个实施例,此实施例中利用了另一可替换的盖件和横梁 150。在图 22 的顶视图所示的这个实施例的横梁 150 又是一个冲压的薄片状金属片片,片片具有平行隆起的横条 152 和两个弯折端部 154。不过,这个实施例中不设有盖件 156 的中心部分伸过的中心孔。代之以金属片横梁 150 中的环状槽或凹陷 158,起到第一实施例中固定环 20 的作用和第二实施中环部分 126 的作用。这个环状槽 158 被制成一定尺寸,因此盖件 156 的边沿部分 160 与槽 158 的下边得以充分接合。就像第二实施例的盖件那样,隆起的脊 162 在盖件 156 的边沿部分 160 和中心部分 164 之间向上突出。盖件 156 可以任选地包括一中心隆起物或小丘 166,它是用来咬配入环状槽内中心配置的开孔 168 以把盖件 156 和横梁 150 固定在一起。如按所示的提供这种中心隆起物 166,那么就不必在盖件 156 设置脊 162。此外,不必模塑带



凹面形中心部 164 的盖件 156。隆起物 166 咬配入开孔 168 将使中心部对着横梁的 150 的中心部向上拉起,以产生容纳试剂 13 的必要的弯曲。尽管在这种情况下不需要脊 162,但脊 162 可有助于形成这种中心弯曲。

横梁 150 也可具有多个压入金属板材的波槽或肋条 170,如图 22 所示以增加结构的刚性,使之能用很薄的金属板材进行制造,从而减少其热质量和整个厚度。

该可替换的第三实施例比起以前所述的实施例来具有明显的优点。由于横梁 150 完全覆盖在柔性盖件 156 上,故盖件材料对水汽扩散的不渗透以及对 PCR 反应无害的要求大大地得到减小。因此,这可使材料的选择范围较宽。举例来说,盖件 156 可以是一种硅橡胶的单个模压体。不必用含有象聚丙烯那样的不渗透弹性体的硅橡胶夹层或复合材料。因为水汽通过盖件 156 的中心部位 164 扩散到密闭空间 172 会很快因容量很小而达到平衡,因而形成这种特征。通过取消所示的任选的隆起物 166 和任选的开孔 168 可进一步使蒸发减少。如去除中心小丘 166(隆起物),隆起脊 162 可用来把盖件 156 临时紧固在横梁下应有位置上。

但是,空档区 172 是必需的,以使在装配卡夹 28 或 134 时边沿部分 160 负压过程中盖件 156 位移,因而起到密封作用以有效地保持试剂 13 针对着样品 12。截留的容积 172 也用来控制在热循环过程中盖件 156 下的压力。这可减少或可防止在接近 95℃的变性温度下的保温过程中在试剂中形成气泡。

在图 24 的部分截面示图中清楚地示出了横条 152 的构形。这些位于形成横梁 150 的金属板件边缘上的平行横条 152 基本上成双的。这种结构有相当大刚性并可以使用最小厚度的板材。另外,横条成双处在边缘可使尖锐边缘存在减至最小,这种尖锐边缘用薄的金属材料可能有碍使用。同理,两横条 154 与可象横条 152 那样弯折过来。

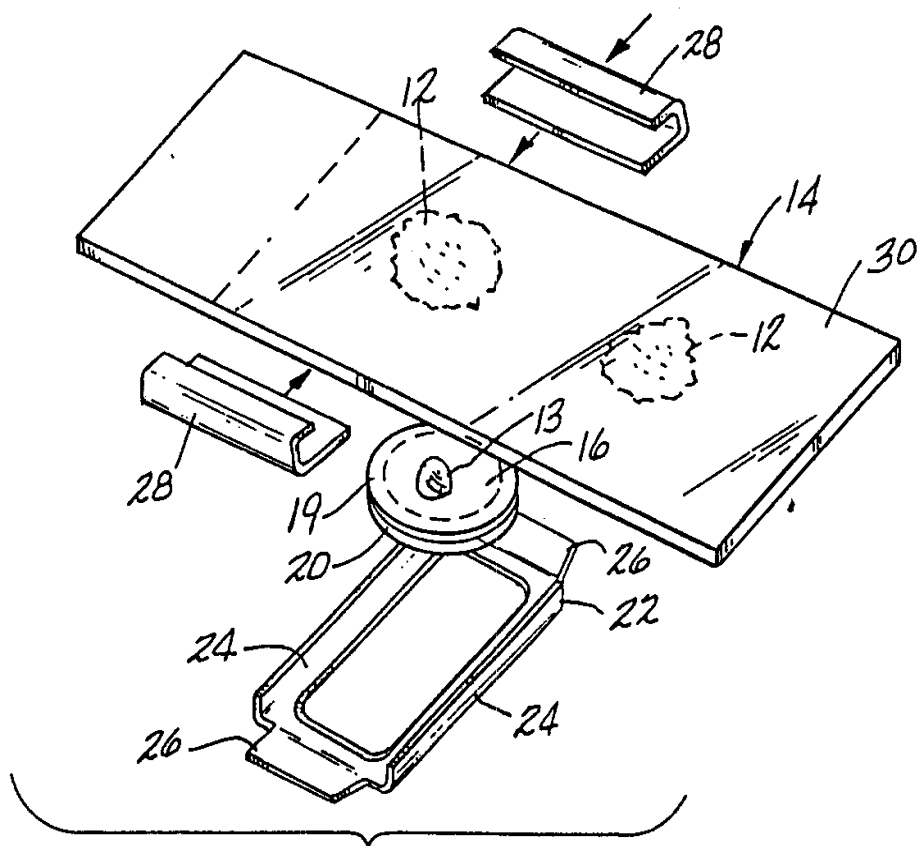
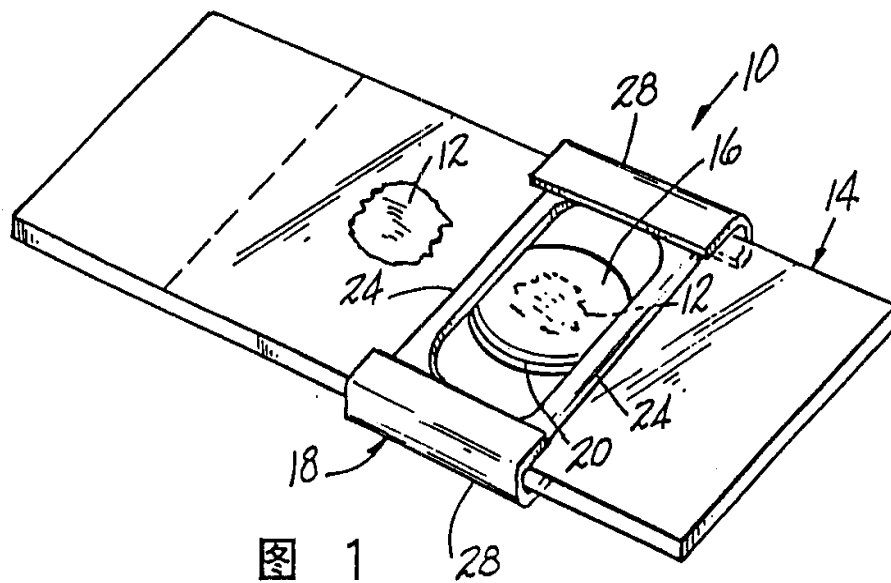
横梁 150 可设有与容纳在载玻片中心位置试样同心地配置的环

状槽 158。由于从图 22 所示的变换来看这是一种明显的变化, 这种可变换就不加以图解。

虽然上述说明是本发明最佳实施例的图解说明, 但应该理解到除了作特别说明外本发明的原位 PCR 容纳装置的发明概念可以加以实际操作。例如, 横梁和凹陷或卡夹体可由硬塑料制成, 或可将卡夹 28 之一构成横梁一端的一整体部分, 因而仅需要一个卡夹 28 以装配在横梁 22 的相对端上。这样, 本发明的诸实施例经历了变动、变化和改变而不偏离所附的权利要求的适当范围和明晰的含义。因此, 意欲包含所有这样的改变、变动和变化, 这多应看作落在所附权利要求的精神和其宽的范围內。

在本文中所援引的专利申请、专利和其它出版材料作为其完整的参考而结合在一起。

说明书附图



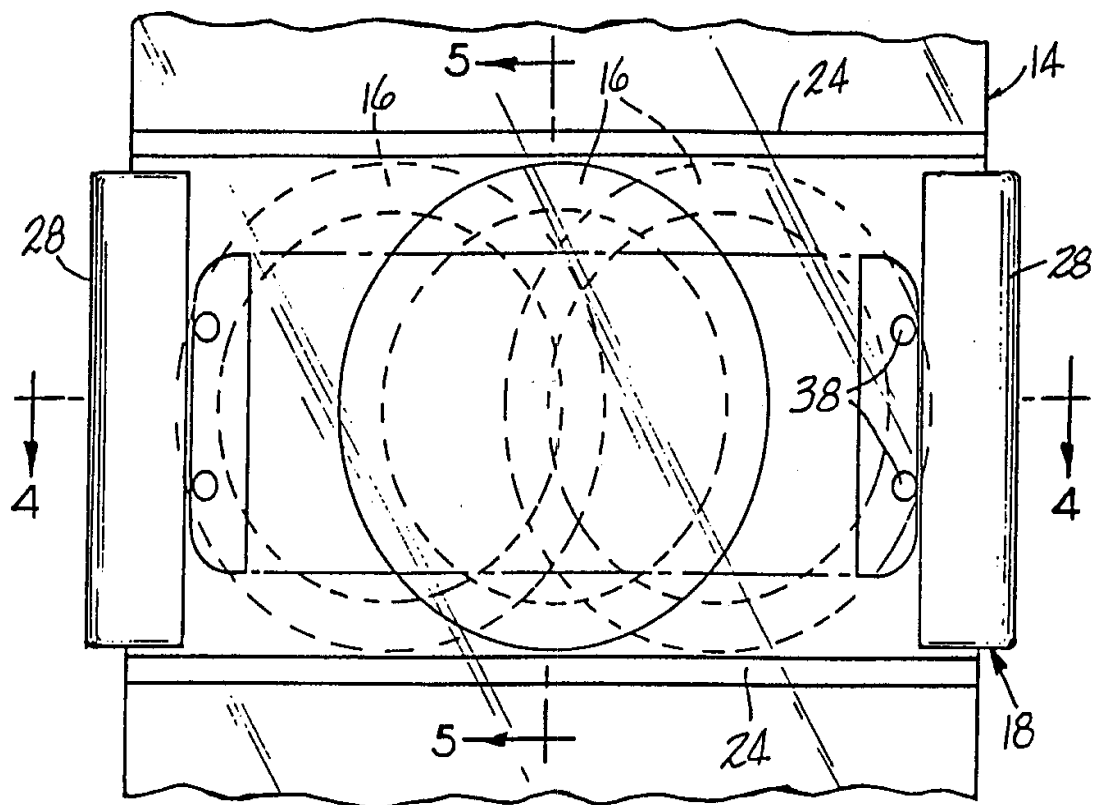


图 3

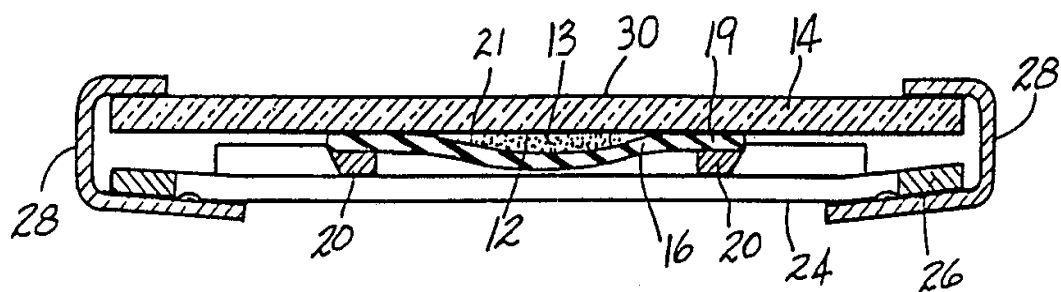


图 4

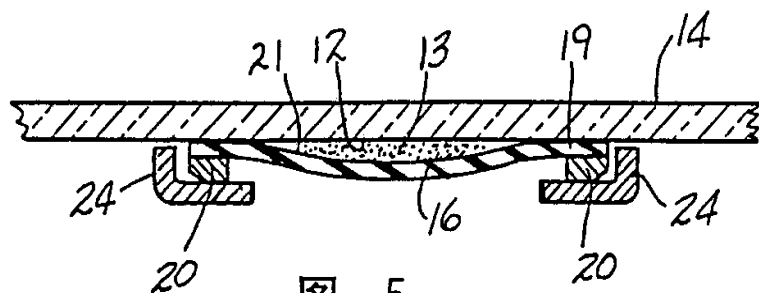


图 5

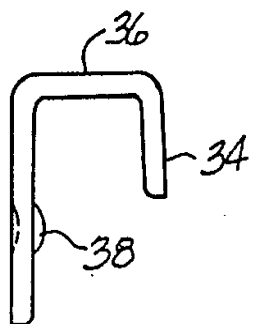


图 6

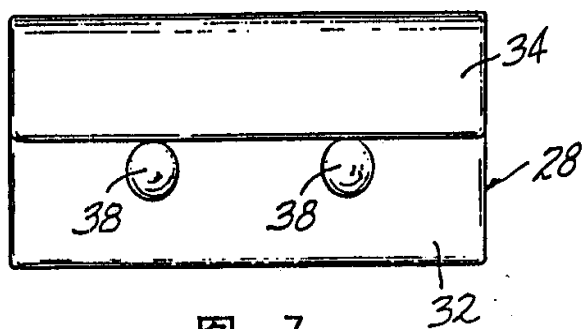


图 7

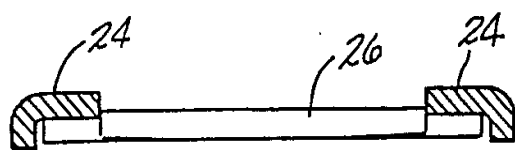


图 10

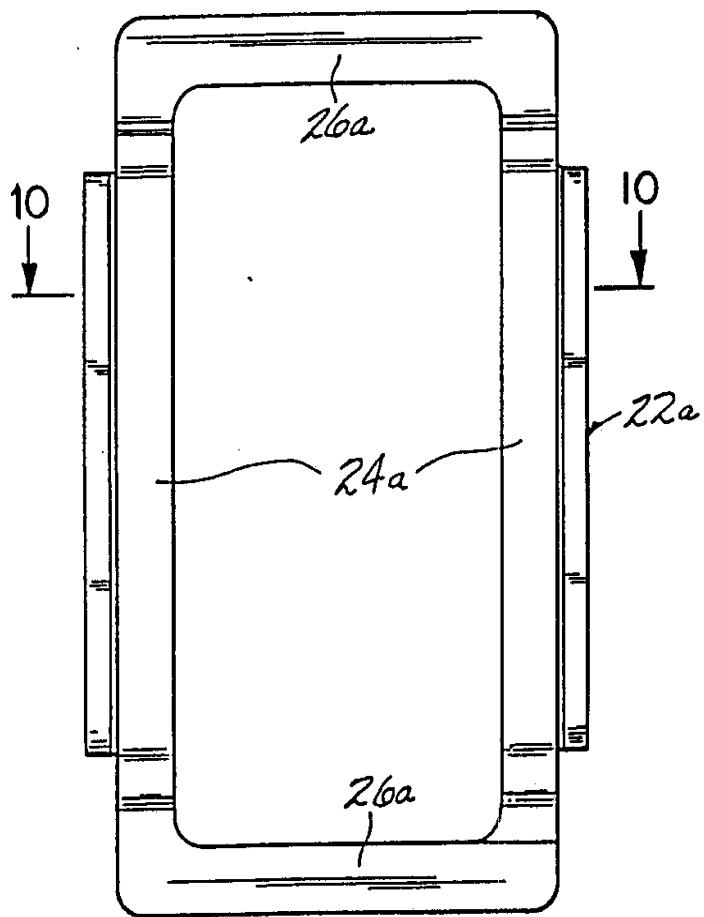


图 8

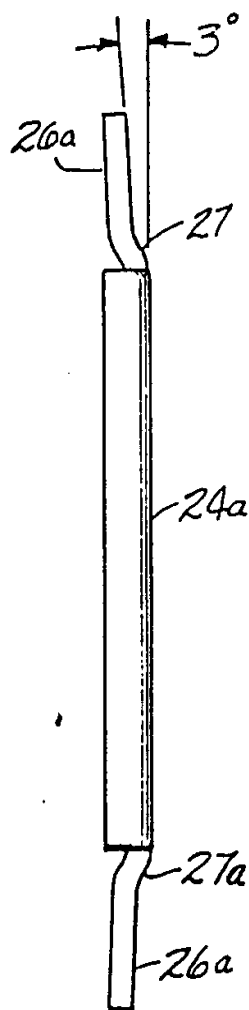


图 9

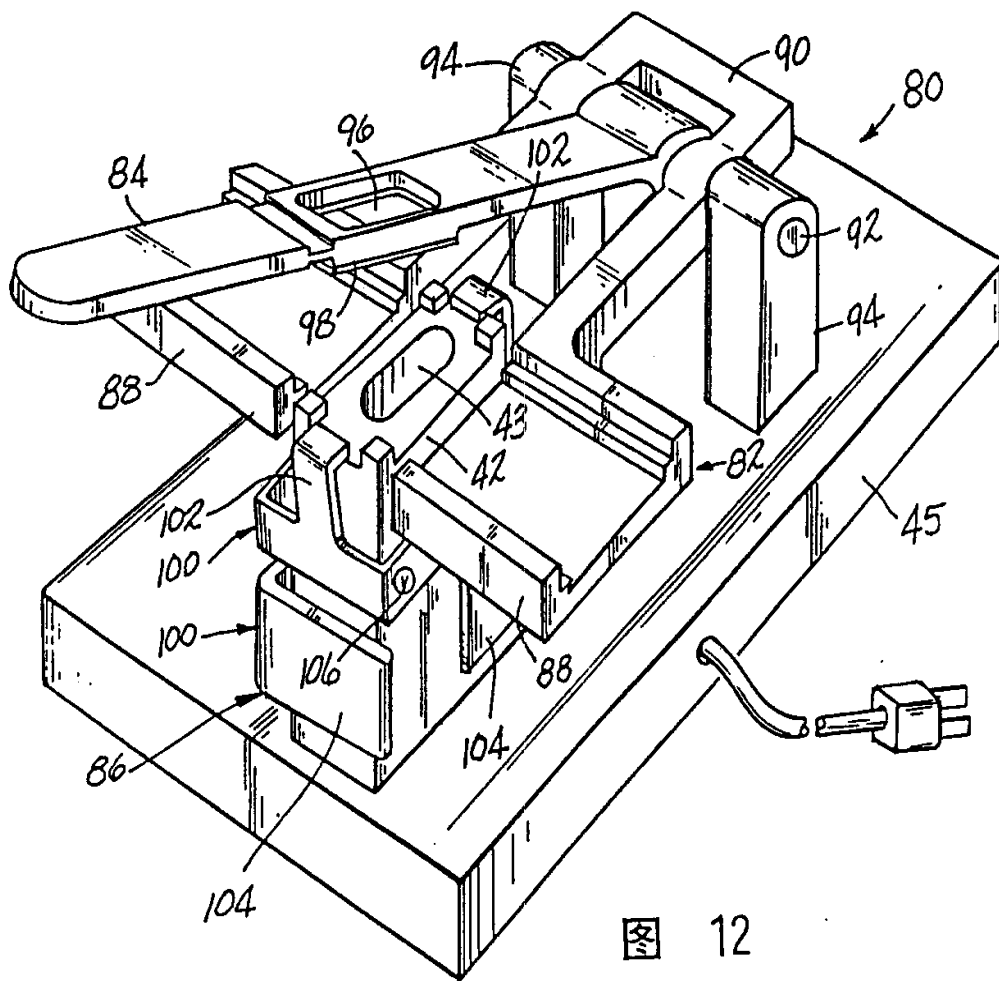


图 12

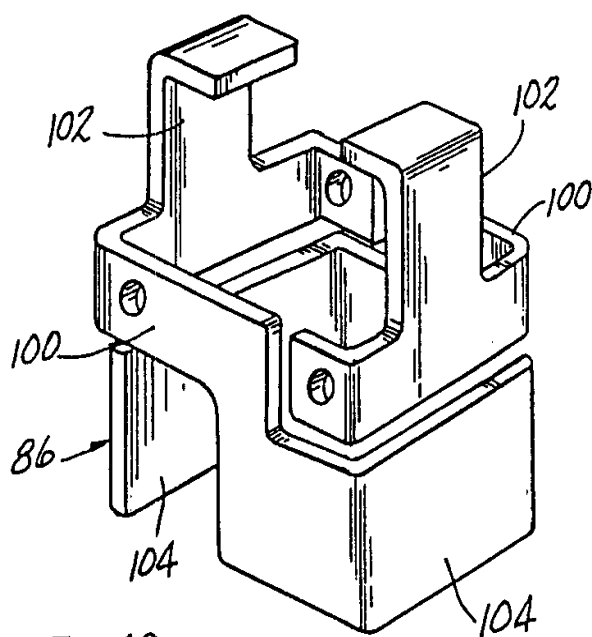
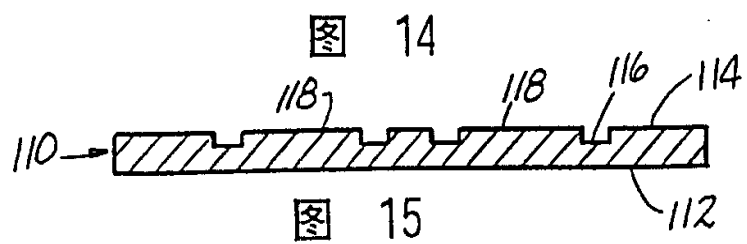
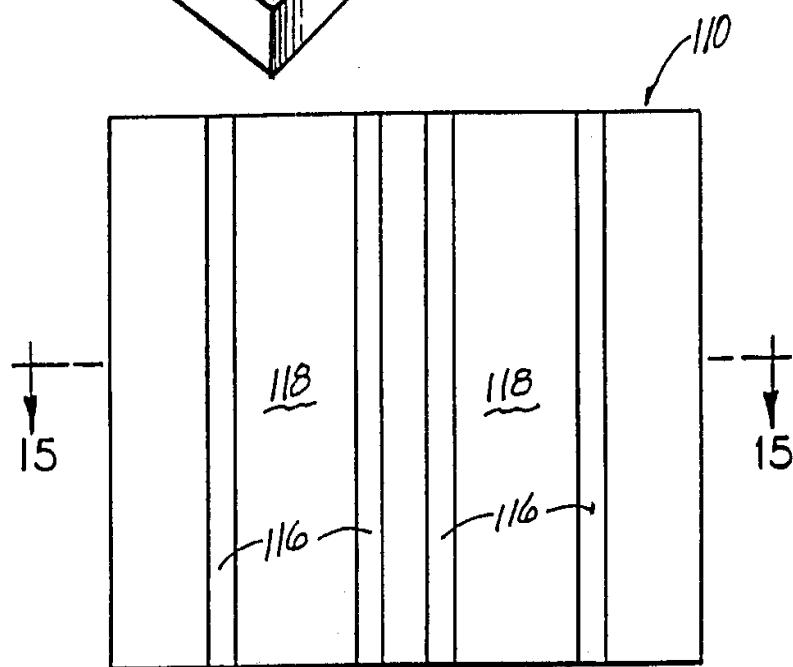
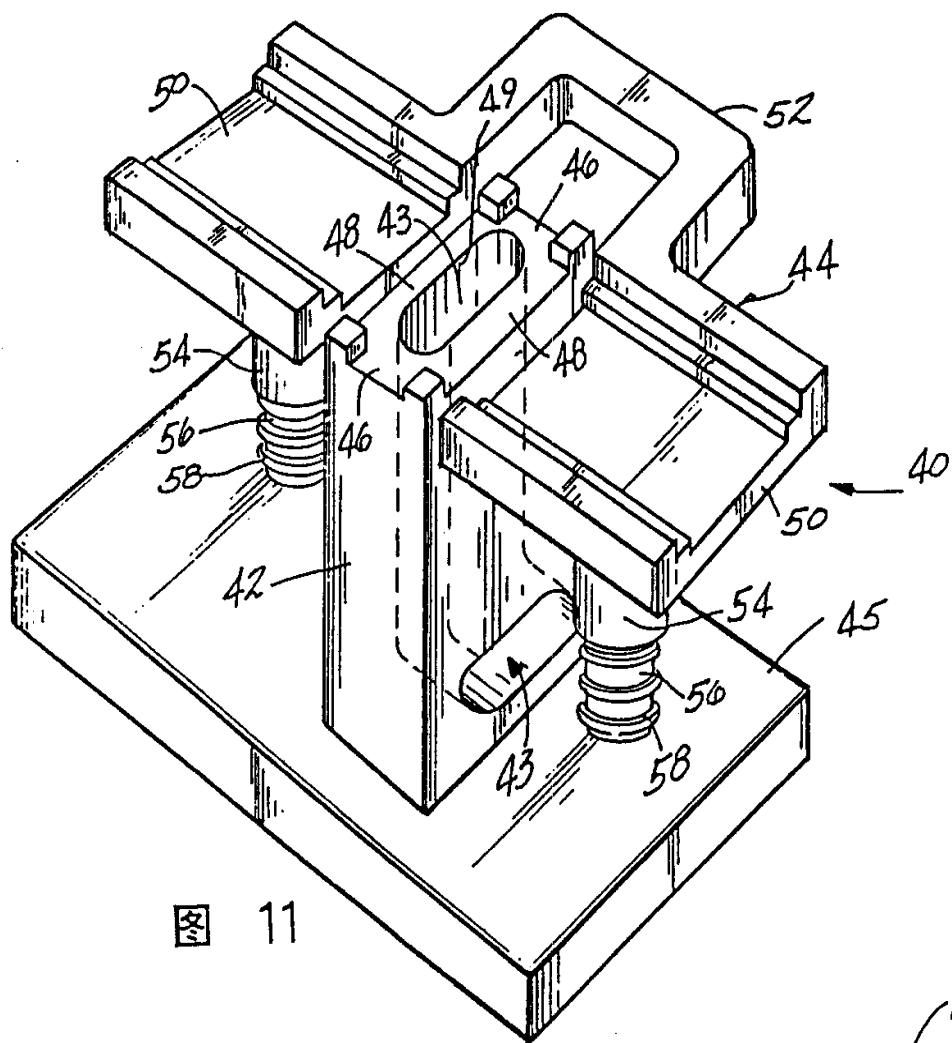
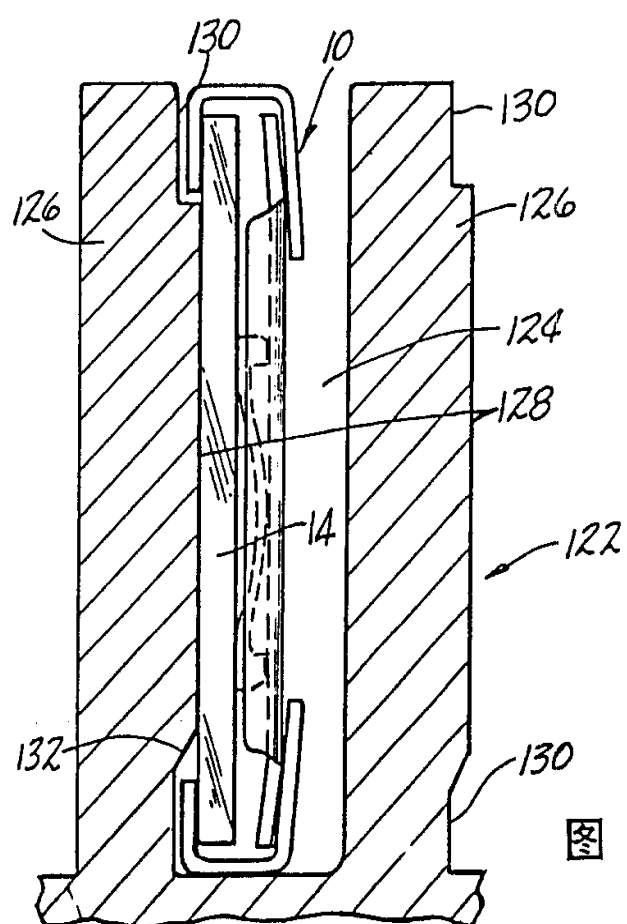
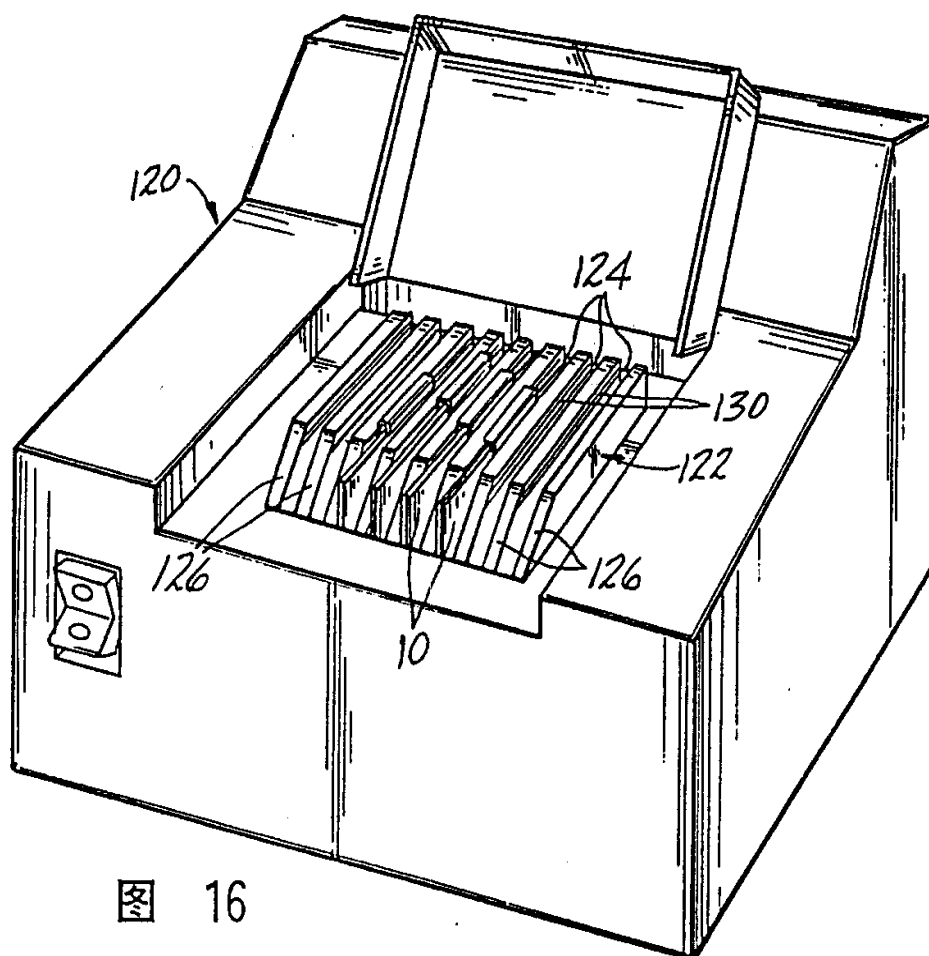


图 13





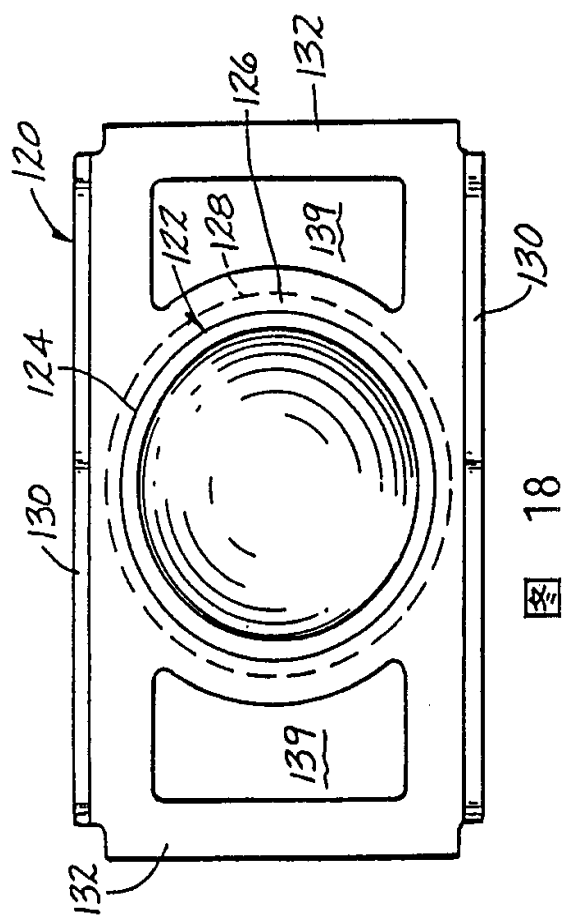


图 18

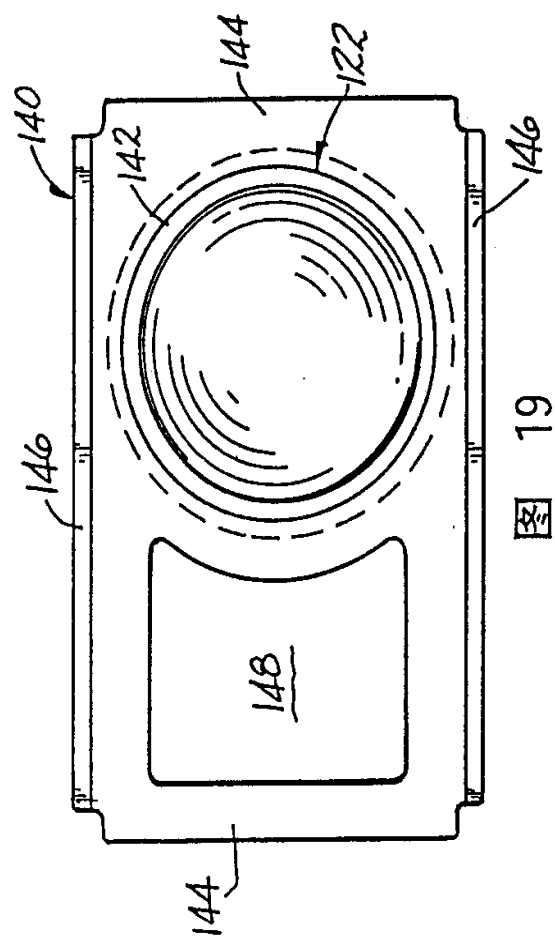


图 19

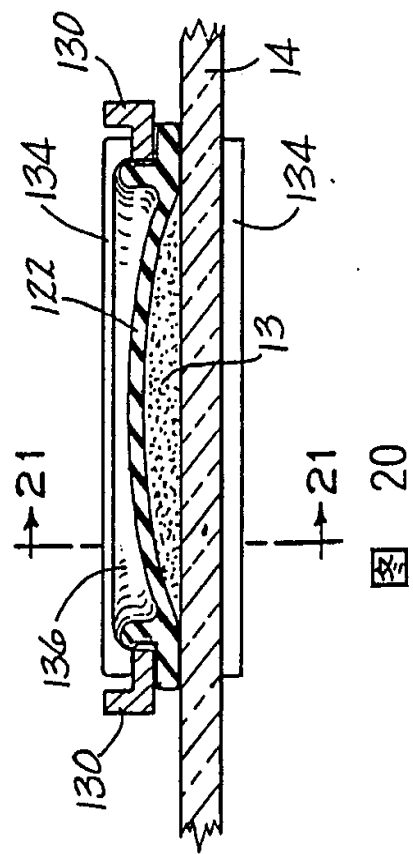


图 20

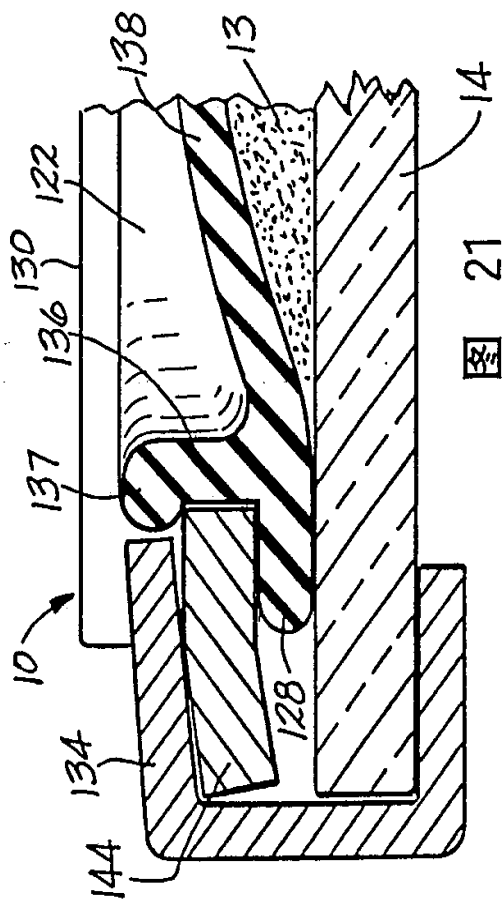


图 21

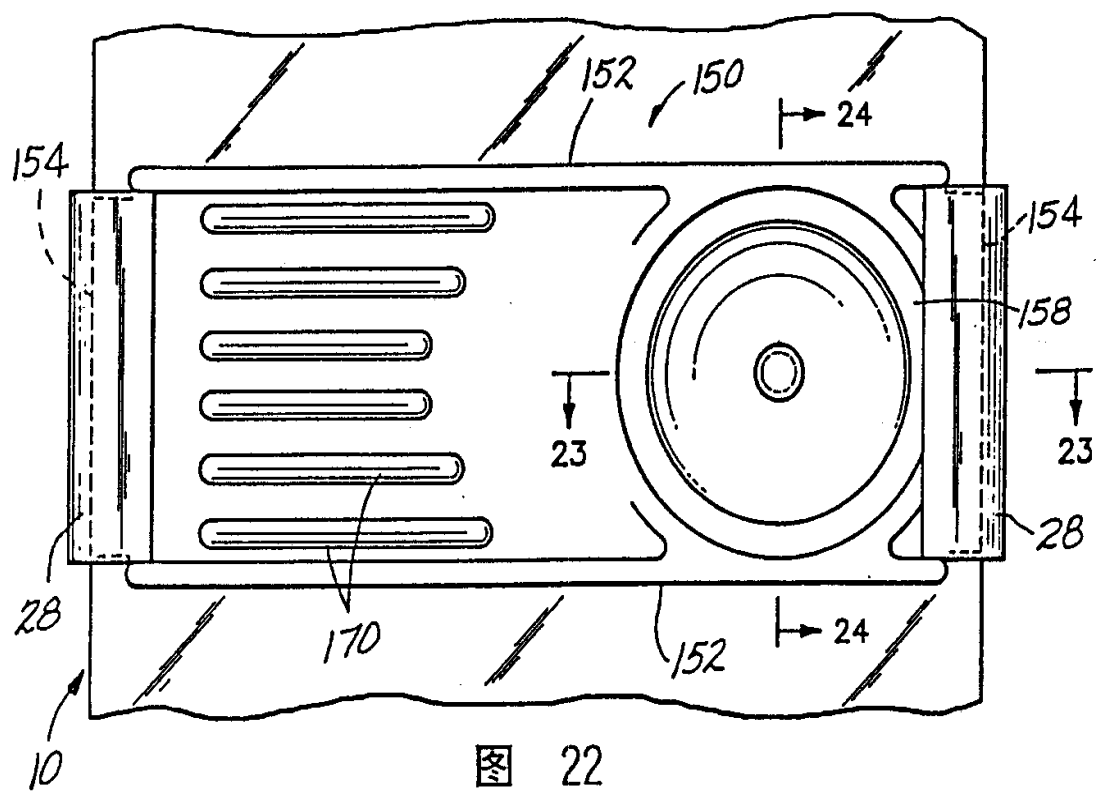


图 22

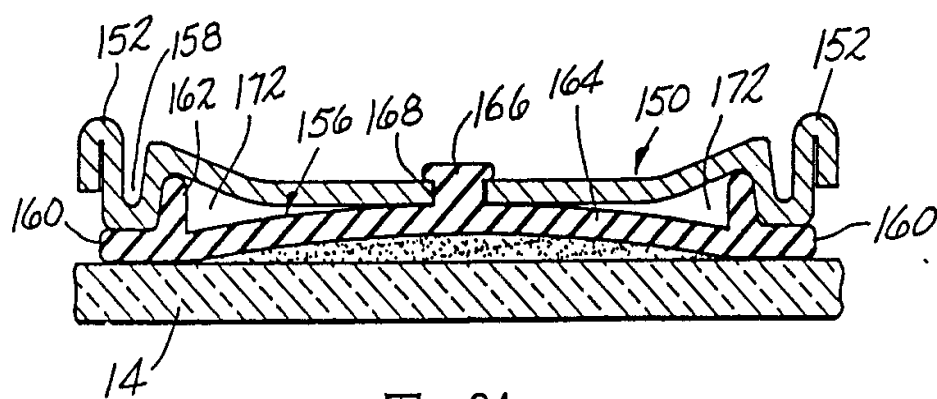


图 24

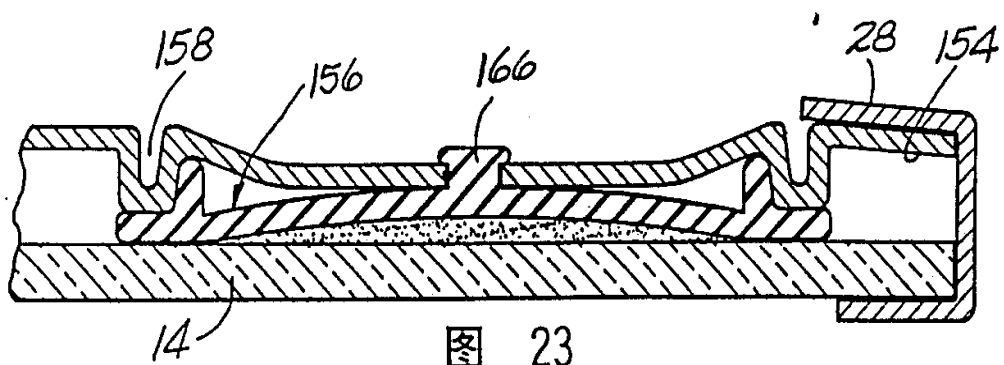


图 23