



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102046806 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 08

(21) 申请号 200880129099. 8

EP 1374996 A1, 2003. 06. 20,

(22) 申请日 2008. 05. 09

EP 1374988 A2, 2003. 06. 20,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2010. 11. 09

审查员 张丽玮

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/005933 2008. 05. 09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02009/136892 EN 2009. 11. 12

(73) 专利权人 阿科尼生物系统公司
地址 美国马里兰州

(72) 发明人 克里斯托弗·G·库尼

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006. 01)

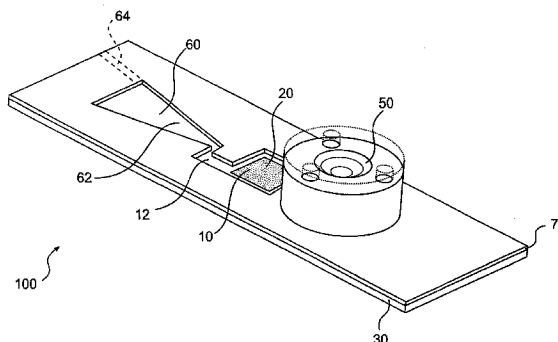
(56) 对比文件
W0 03015922 A1, 2003. 02. 27,

权利要求书2页 说明书9页 附图10页

(54) 发明名称
微阵列系统

(57) 摘要

公开了微阵列系统。所述微阵列系统包括形成在平面基底上的微阵列和形成在所述微阵列周围的孵育室。所述孵育室具有包括底部表面和顶部表面的多个内部表面,所述微阵列形成在所述底部表面上,所述顶部表面朝向所述底部表面并大体平行于所述底部表面。多个内部表面中的至少一个是亲水表面。



1. 微阵列系统,其包括:

形成在平面基底上的微阵列;

形成在所述微阵列周围的孵育室,其中所述孵育室包括多个内部表面,所述内部表面包括底部表面和顶部表面,所述微阵列形成在所述底部表面上,所述顶部表面朝向所述微阵列,并且其中所述多个内部表面中的至少一个是亲水表面;和

废液室,其中所述废液室包含能够从所述孵育室芯吸液体的吸收剂,并且所述废液室通过第二通道连结到所述孵育室,其中所述第二通道包括入口部分、漏斗状连结部分和出口部分,其中所述入口部分具有大于所述出口部分直径的直径。

2. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述亲水表面是所述顶部表面。

3. 如权利要求 2 所述的微阵列系统,其中通过用亲水涂层覆盖所述顶部表面形成所述亲水表面。

4. 如权利要求 2 所述的微阵列系统,其中通过将垫片置于所述微阵列周围并且用亲水带或亲水薄膜覆盖所述垫片来形成所述孵育室。

5. 如权利要求 4 所述的微阵列系统,其中所述亲水带或亲水薄膜是透明的。

6. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,还包括覆盖所述平面基底的盖片,其中所述微阵列形成在所述平面基底上的凹陷区域中,并且其中所述孵育室形成在所述盖片和所述平面基底上的所述凹陷区域之间。

7. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,还包括覆盖所述平面基底的盖片,其中所述盖片具有凹陷区域,所述凹陷区域大于所述微阵列并被置于所述微阵列的顶部上,并且其中所述孵育室形成在所述微阵列和所述盖片上的所述凹陷区域之间。

8. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述亲水表面包含浸渍的裂解细胞膜的化学品。

9. 如权利要求 8 所述的微阵列系统,其中所述亲水表面还包含保留来自所裂解细胞的核酸的亲水基质。

10. 如权利要求 8 所述的微阵列系统,其中所述亲水表面是所述顶部表面。

11. 如权利要求 8 所述的微阵列系统,其中所述亲水表面是所述底部表面。

12. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述亲水表面是所述底部表面。

13. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,还包括用于将液体样品上样到所述孵育室中的单向阀。

14. 如权利要求 13 所述的微阵列系统,其中所述单向阀是止回阀。

15. 如权利要求 13 所述的微阵列系统,其中所述单向阀是圆顶阀。

16. 如权利要求 13 所述的微阵列系统,其中所述单向阀通过第一通道连结所述孵育室。

17. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述吸收剂包含纤维素。

18. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述废液室具有大于所述孵育室容积的容积。

19. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述废液室包含吸收剂,所述吸收剂被放置在距所述第二通道一距离以控制芯吸速率。

20. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述废液室通过排放通道被排放到大气。

21. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述基底是玻璃。
22. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述基底是塑料。
23. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述微阵列是寡核苷酸阵列。
24. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述微阵列是蛋白阵列。
25. 如权利要求 24 所述的微阵列系统,其中所述蛋白阵列是抗体阵列。
26. 如权利要求 1 所述的微阵列系统,其中所述微阵列是通过凝胶点印制法 (gel spot printing method) 形成。
27. 微阵列系统,其包括:
 - 形成在平面基底上的微阵列;
 - 具有入口和出口的孵育室,其中所述孵育室围绕所述微阵列,并且其中所述孵育室包括亲水内部表面;
 - 含有吸收剂的废液室;和
 - 通过所述出口连结所述废液室与所述孵育室的通道,
 - 其中所述通道包括入口部分,出口部分,位于所述入口部分和所述出口部分之间的漏斗状连结部分,所述入口部分具有大于所述出口部分直径的直径,所述出口部分进一步分为接近所述漏斗状连接部分的较大直径的第一部分和接近所述废液室的较小直径的第二部分,其中所述漏斗状连结部分提供减少由所述废液室中的所述吸收剂可能过早芯吸所述孵育室中的液体的溢出区。
28. 如权利要求 27 所述的微阵列系统,其中所述第一部分与所述漏斗状连结部分以及与所述第二部分形成直角。

微阵列系统

技术领域

[0001] 本技术领域是微阵列系统,特别是具有与单向阀和 / 或废液室联接的孵育室的微阵列系统。

[0002] 背景

[0003] 微阵列通过同时进行多重检测反应提供实施样品的复杂分析的很大的可能性。通常,反应物分子的多点的微阵列是形成在例如玻璃显微镜载玻片的平面基底上,通常是二维网格模式。然后,将液体样品和试剂施加在载玻片以同时接触多点。可以用微阵列中的结合分子进行多种反应步骤,包括将结合反应物分子暴露于所述液体样品和试剂,以及洗涤步骤。可以监测微阵列中每个点的反应的进展或结果,目的是表征固定在载玻片上的一个或多个材料或液体样品中的一个或多个材料。

[0004] 微阵列分析通常需要从数分钟至数小时的孵育期。孵育期的持续时间取决于检测并且由许多因素所决定,例如反应物的类型、混合程度、样品体积、靶拷贝数和阵列密度。在孵育期中,液体样品中的靶分子必须与微阵列探针密切接触。孵育通常是在孵育室中进行。孵育室通常是通过在微阵列周围形成垫片而形成。垫片用盖片覆盖以形成封闭的室。盖片可以由例如玻璃的透明材料制成,从而允许孵育后微阵列的光学询问。

[0005] 如果盖片没有入口和排出口,液体样品和其他试剂需要在将盖片置于垫片的顶部之前添加到孵育室。如果反应混合物被填充到垫片的边缘,反应混合物可能从垫片的侧面漏出,危及垫片 / 盖密封并增加污染环境的风险。具有用于填充和排出的孔的盖片克服了这两个问题。然而,通过盖片上的孔填充孵育室通常有将气泡或气穴引入孵育室的风险。此外,液体样品或反应混合物的表面张力也可能阻止液体样品或反应混合物完全填充孵育室。部分充满的室可以导致假阴性,如果气穴覆盖阵列点并阻止阵列点和液体样品或反应混合物之间的接触。

[0006] 概述

[0007] 公开了微阵列系统。所述微阵列系统包括形成在平面基底上的微阵列和形成在所述微阵列周围的孵育室。所述孵育室具有包括底部表面和顶部表面在内的多个内部表面,所述微阵列形成在所述底部表面上,所述顶部表面朝向所述底部表面并通常平行于所述底部表面。多个内部表面中的至少一个是亲水表面。

[0008] 还公开了具有以下微阵列系统:形成在平面基底上的微阵列、形成在所述微阵列周围的孵育室、用于将液体样品进样到所述孵育室中的圆顶阀和连结所述单向阀与所述孵育室的通道。

[0009] 附图描述

[0010] 详细描述会涉及以下附图,其中相似的数字指相似的元件,并且其中:

[0011] 图 1 是微阵列系统的孵育室的实施方案示意图。

[0012] 图 2 是支持物中容纳穿透枪头的圆顶阀的示意图。

[0013] 图 3 是具有废液室的微阵列系统的实施方案的示意图。

[0014] 图 4 是具有废液室的微阵列系统的另一实施方案的示意图。

[0015] 图 5 是整合的微阵列系统的实施方案的示意图。

[0016] 图 6 是显示微阵列系统的实施方案尺寸的示意图。

[0017] 图 7 是显示用于评价液体芯吸 (wicking) 入废液室的 4 个微阵列孵育室组件 (插图 A) 和杂交结果 (插图 B) 的图片组合。

[0018] 图 8 是显示整合的微阵列系统的实施方案 (插图 A) 和来自该微阵列系统的杂交结果 (插图 B) 的图片组合。

[0019] 图 9 是显示微阵列系统的实施方案的示意图 (插图 A)、阵列图 (插图 B) 和杂交结果 (插图 C) 的图片组合。

[0020] 详述

[0021] 本说明书有意结合附图进行阅读,所述附图应视为本发明的整体书面描述的部分。图不必按照比例,并且为了利于清楚和简明,本发明的某些特征可能在比例上是夸张的或多少以示意图的形式。在本说明书中,相对的术语例如“正面”、“背面”、“上”、“下”、“顶部”和“底部”及其衍生词应被解释为是指按照当时所描述的方向或在讨论下如图中所示的方向。这些相对的术语是为了描述的方便并且通常不是意图要求特定的方向。关于连接 (attachments)、联接 (coupling) 和类似物例如“连通的 (connected)”和“连接的 (attached)”的术语是指其中通过中间结构 (intervening structures),结构彼此被直接地或间接地固定或连接的关系,以及可移动的或刚性连接或关系两者,除非另作特别表达。

[0022] 如本文使用,术语“微阵列”是指为与目的配体结合而存在的点的有序阵列。微阵列由至少两个点组成。所述目的配体包括但不限于,核酸、蛋白、肽、多糖、抗体、抗原、病毒和细菌。

[0023] 如本文使用,术语“亲水表面”是指表面,所述表面会与静止于该表面上的纯水滴形成 60° 或更小的接触角。如本文使用,术语“疏水表面”是指表面,所述表面会与静止于该表面上的纯水滴形成大于 60° 的接触角。可以使用接触角测角计测量接触角。

[0024] 如本文使用,术语“孵育室”是指微阵列周围的封闭空间。所述孵育室当充满液体样品时,允许所述微阵列浸没在所述液体样品中,这样所述液体样品中的靶分子可以与微阵列探针保持密切接触。

[0025] 本文描述的是具有孵育室的微阵列系统,所述孵育室具有亲水表面。亲水表面的使用允许孵育室的完全充满,所述亲水表面当液体进入室时与液体接触。

[0026] 如上文所述,液体样品或反应混合物的表面张力通常阻止液体样品或反应混合物完全充满例如微阵列系统的孵育室的小的空间。表面张力是通过不同分子间力的液体分子之间吸引的结果。在大部分液体中,每个分子被邻近液体分子在所有方向相等地牵拉,这导致了合力为零。在液体的表面,分子被液体内部较深的其他分子向内牵拉,和不被邻近介质 (例如真空、空气或另一液体) 中的分子强烈吸引。因此,所有位于表面的分子受到向内的分子吸引力,该分子吸引力只能被液体对压缩的抵抗所平衡。该向内的牵拉倾向于减小表面面积,并且在这方面液体表面相似于伸展的弹力薄膜。因此,液体将自身挤压在一起,直至其具有局部可能的最小表面面积。最终结果为液体在小的空间内可能保持近似球面的形状并且不会充满角落,特别是小空间的直角角落。将覆盖物与微阵列表面分离的典型的小间隙通常将液体压缩成圆柱形。

[0027] 对于微阵列系统来说,填充孵育室的液体最可能是基于水的液体,例如杂交缓冲

液或洗涤缓冲液。通过用亲水材料涂布至少一部分的孵育室的内部表面可以克服基于水的液体的表面张力。

[0028] 图 1 显示了孵育室的实施方案。在该实施方案中,孵育室 10 形成于微阵列 20 的周围,微阵列 20 由印制在或形成于平面基底 30 的顶部表面 32 上的多个阵列点 22 所组成。表面 32 也形成了孵育室 10 的底部表面。室 10 的顶部用盖片 40 覆盖。孵育室 10 可以是与平面基底 30 的尺寸匹配的任意大小或形状,平面基底 30 通常是玻璃或塑料载玻片。

[0029] 在该实施方案中,孵育室 10 是通过将垫片 34 置于平面基底 30 的顶部并用盖片 40 覆盖垫片 34 而形成。在另一实施方案中,孵育室 10 是通过以下形成:在平面基底 30 中创造穴 (pocket) 或凹陷区域 (例如通过铸造或蚀刻),在穴或凹陷区域的底部印制微阵列 20,并且用盖片 40 覆盖穴或凹陷区域。在另一实施方案中,穴或凹陷区域是形成在盖片 40 上,然后将盖片 40 直接置于平面基底 30 的顶部上。

[0030] 孵育室 10 通常形成于微阵列 20 周围,以便于减少孵育室 10 中的杂交或任何其他反应所需要的液体体积。在一实施方案中,孵育室具有约 $0.1\text{--}10\text{cm}^2$ 、优选地约 $0.5\text{--}5\text{cm}^2$ 的印迹,并且约 $0.05\text{--}5\text{mm}$,优选地约 $0.1\text{--}1\text{mm}$ 的高度。在一实施方案中,孵育室的总容积在 $1\text{--}250\text{ }\mu\text{l}$ 的范围。

[0031] 根据其形状,孵育室 10 可以具有数个内部表面,包括底部表面、顶部表面和一个或多个侧表面,微阵列 20 形成在所述底部表面上,所述顶部表面向下朝向所述底部表面并通常平行于所述底部表面。为了确保孵育室 10 的均匀填充的目的,不是所有内部表面都需要是亲水的。在一实施方案中,仅孵育室 10 的顶部表面是亲水的。在另一实施方案中,仅孵育室 10 的底部表面是亲水的。在另一实施方案中,顶部和底部表面都是亲水的。在又一实施方案中,孵育室的所有内部表面都是亲水的。

[0032] 亲水表面是吸引水的表面。亲水表面通常含有电荷极化的并能够形成氢键的分子。在一实施方案中,平面基底 30 或盖片 40 是由亲水材料制造,并因此分别提供亲水底部表面或亲水顶部表面。在另一实施方案中,孵育室 10 的顶部表面或底部表面是用不溶亲水材料涂布的。亲水材料的实例包括但不限于,亲水聚合物,例如聚(N-乙烯基内酰胺)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(氧化乙烯)、聚(氧化丙烯)、聚丙烯酰胺、纤维质、甲基纤维素、聚酐、聚丙烯酸、聚乙烯醇、聚乙烯醚、烷基酚乙氧基化物、复合多元醇单酯、油酸的聚氧乙烯酯、油酸的聚氧乙烯山梨聚糖酯以及脂肪酸的山梨聚糖酯;无机亲水材料,例如无机氧化物、金、沸石以及类钻碳;和表面活性剂,例如 Triton X-100、吐温 (Tween)、十二烷基磺酸钠 (SDS)、十二烷基硫酸铵、烷基硫酸盐、月桂基乙醚硫酸钠 (SLES)、烷基苯磺酸盐、肥皂、脂肪酸盐、溴化十六烷基三甲铵 (CTAB) 也称为十六烷基三甲基溴化胺、烷基三甲铵盐、氯化十六烷基嘧啶 (CPC)、聚乙氧基牛脂胺 (POEA)、氯化苯甲烃铵 (BAC)、氯化苄乙氧铵 (BZT)、十二烷基甜菜碱、氧化十二烷基二甲胺、椰油酰胺丙基甜菜碱、椰子两性甘氨酸盐 (coco amphoteric glycinate) 烷基聚(氧化乙烯)、聚(氧化乙烯)和聚(氧化丙烯)的共聚物(商业上称为泊洛沙姆 (Poloxamers 或 Poloxamines))、烷基多聚葡萄糖苷、脂肪醇、椰油胺 MEA、椰油胺 DEA、椰油胺 TEA。表面活性剂可以与例如聚氨基甲酸酯和环氧树脂的反应聚合物混合以作为亲水涂层。在另一实施方案中,通过大气等离子体处理使孵育室 10 的顶部表面或底部表面成为亲水的。

[0033] 可选地,孵育室的底部表面或顶部表面可以用商业可获得的亲水带或薄膜覆盖。

亲水带的实例包括但不限于,Adhesives Research (AR) 带 90128、AR 带 90469、AR 带 90368、AR 带 90119、AR 带 92276 和 AR 带 90741 (Adhesives Research, Inc., Glen Rock, PA)。亲水薄膜的实例包括但不限于,来自 (Film Specialties Inc., Hillsborough, NJ) 的 **Vistex®** 和 **Visguard®** 薄膜,以及 Lexan HPFAF (GE Plastics, Pittsfield, MA)。其他亲水表面可获得自 Surmodics, Inc. (Eden Prairie, MN), Biocora Inc. (Horsham, PA), Advanced Surface Technology (Billerica, MA) 和 Hydromer, Inc. (Branchburg, NJ)。

[0034] 在一实施方案中,亲水带或薄膜具有足够的透明性以允许从孵育室顶部的微阵列的光学询问。在另一实施方案中,通过用亲水涂层涂布孵育室的顶部表面创造亲水表面。在另一实施方案中,通过简单地用亲水带或亲水薄膜替代盖片 40 创造亲水表面。

[0035] 在又一实施方案中,亲水表面是具有浸渍 (impregnated) 化学品的亲水基质,所述化学品裂解细胞膜、使蛋白变性和捕获核酸。该亲水基质会行使两个功能,纯化样品和均匀地将样品芯吸入孵育室。在一实施方案中,亲水基质是 FTA 纸® (Whatman, Florham Park, NJ)。将生物样品施加到 FTA® 纸,并且样品中含有的细胞在该纸上被裂解。洗涤该纸以去除任何非 DNA 材料 (DNA 仍然保持缠在纸中)。然后洗脱 DNA 用于后续微阵列分析。可选地,可以原位扩增结合的 DNA 用于微阵列检测,而没有洗脱步骤。

[0036] FTA 纸® 可以被用作阵列的相对表面 (即孵育室的顶部表面)。可选地,微阵列可以被印制在 FTA 纸® 上,并且孵育室顶部上的透明盖玻片会允许微阵列的可视化。在另一实施方案中,PCR 试剂可以被引入孵育室用于 FTA 纸® 上核酸样品的扩增。在该实施方案中,扩增会在孵育室 10 内部进行。

[0037] 微阵列 20 可以是任何类型的微阵列,包括但不限于,核苷酸微阵列和蛋白微阵列。在一实施方案中,使用印制凝胶点法 (printing gel spots method) 形成微阵列 20,印制凝胶点法描述于例如美国专利第 5,741,700 号、第 5,770,721 号、第 5,981,734 号、第 6,656,725 号和美国专利申请第 10/068,474 号、第 11/425,667 号以及第 60/793,176 号,以上所有在此通过引用整体并入。

[0038] 在另一实施方案中,微阵列系统还含有用于将液体 (例如样品、杂交缓冲液或洗涤缓冲液) 引入孵育室 10 的单向阀。将样品通过单向阀引入孵育室 10 以防止环境污染,环境污染是某些应用中的重要考虑,所述应用例如生物战争用剂的检测。所述单向阀可以是置于孵育室 10 的入口的止回阀或圆顶阀。不同尺寸的圆顶阀是可商业获得的 (例如从 Minivalve International, Yellow Springs, OH)。在图 2 中所示的实施方案中,圆顶阀 50 含有两个组件:圆顶状阀体 52 和上密封 (back seal) 54。该上密封具有允许插入器 56 穿透上密封 54 的孔 (未显示)。插入器 56 可以是具有穿透上密封 54 的尖锐末端的任何液体递送装置。在该实施方案中,插入器 56 是枪头。在另一实施方案中,插入器 56 是注射针。

[0039] 圆顶阀 50 允许插入器 56 的容易进入并且当尖端通过上密封 54 进入圆顶阀 50 时符合插入器 56 的尖端。插入器 56 退出后,上密封 54 上的开口自发关闭以防止样品从圆顶阀 50 漏出孵育室 10。因此,圆顶阀 50 作为可刺穿的中隔和止回阀。圆顶阀可以通过支持结构 58 安装在微阵列组件上。在一实施方案中,圆顶阀通过入口 11 和进入通道 14 连接到孵育室 10 (图 3)。

[0040] 在又一实施方案中,微阵列系统还包括废液室。例如 Aurora Photonics Port Array 5000™ 微阵列读数器的很多光学读数器当读取干燥的影像时,给出改善的信噪比。因

此,将废液室并入微阵列系统,从而在将微阵列置入微阵列读数器之前从孵育室去除液体是有利的。现结合图 3,孵育室 10 连结到形成在同一微阵列载玻片上的废液室 60。

[0041] 废液室 60 可以是任何形状的,并通常具有大于孵育室 10 容积的容积。在一实施方案中,废液室形成在垫片带中,所述垫片带然后被连接到基底 30(参见图 1),微阵列 20 印制在所述基底 30 上。在又一实施方案中,基底 30 在其顶部表面上具有切除处(cut-out)。所述切除处具有与垫片 34 中的废液室 60 的大小和位置相匹配的大小和位置,这样废液室 60 一旦形成于基底 30 和垫片 34 之间,会具有大于孵育室 10 深度的深度。在另一实施方案中,基底 30 是由塑料材料制成,这样切除处可以容易地在基底 30 上作出。在又一实施方案中,孵育室 10 和废液室 60 都形成在基底 30 中,而不使用垫片 34。但是,废液室 60 可以具有大于孵育室 10 深度的深度。

[0042] 在一实施方案中,废液室 60 含有吸收剂 62,所述吸收剂 62 一旦与孵育室 10 中的液体接触,从孵育室 10 芯吸液体,因此允许微阵列 20 在干燥状态下读取。

[0043] 吸收剂 62 可以是能够保留相对大量液体的任何材料。在一实施方案中,吸收剂 62 是由纤维的聚集体制成。在另一实施方案中,吸收剂 62 是通风粘合(through-air bonding)工艺中产生的非机织物。非机织物的成分纤维可以是亲水合成纤维、果浆等的天然纤维素纤维或再生纤维素纤维。纤维可以用表面活性剂或亲水油涂布或浸润以提高液体吸收。不限于通风粘合工艺,用于本文的非机织物可以在任何其他工艺中生产,例如纺粘工艺,气流成网工艺,水刺(spun-lacing)工艺等。在一实施方案中,吸收剂 62 是来自 Millipore(Billerica, MA) 的纤维素纸(C048)。

[0044] 再次结合图 3,废液室 60 通过通道 12 与孵育室 10 连结。通道 12 担任双重用途。当填充液体时,通道 12 提供孵育室 10 和废液室 60 之间的液体通过途径。当填充空气时,通道 12 将孵育室 10 隔离于废液室 60,并且防止废液室 60 中的吸收剂 62 的过早芯吸。

[0045] 通过迫使孵育室 10 内部的液体进入通道 12 并建立通道 12 中的液体和废液室 60 中的吸收剂 62 之间的接触,去除孵育室 10 内部的液体。可以通过对孵育室 10 中的液体施加压力以将液体推出通道 12 或通过废液室 60 的出口 64 施加抽吸以将液体引出通道 12 来建立所述接触。可以借助通过圆顶阀 50 施加压力(例如是用移液管或注射器)产生对孵育室 10 中液体的压力。如果孵育室 10 仅用亲水带或亲水薄膜覆盖,可以通过简单地按压形成孵育室 10 顶部表面的亲水带或薄膜产生对孵育室 10 内液体的压力。可选地,可以通过使吸收剂 62 朝向通道 12 向前直至吸收剂 62 接触到通道 12 内的液体,来建立通道 12 中液体和吸收剂 62 之间的接触。

[0046] 一旦建立接触,孵育室 10 中的液体通过通道 12 被芯吸入废液室 60 中的吸收剂 62。液体的流速由通道 12 的大小,液体的表面张力和粘度以及吸收剂 62 的芯吸速率所决定。此外,当吸收剂变为较饱和时,流速下降。通过废液室 60 中吸收剂 62 的放置也可以控制流速。接近于通道 12 的出口放置的吸收剂导致比更远放置的吸收剂更高的流速。因此,切去吸收剂 62 的角导致较低的流速,这是因为通道 12 的出口和吸收剂 62 之间增加的距离。

[0047] 如果气泡被引入孵育室 10,气泡可能存在于通道 12 中并部分地或完全地阻断通道 12 中的液体流动。气泡还可能阻止吸收剂 62 的芯吸作用,如果气泡恰好位于液体和吸收剂 62 的界面。可以用图 4 中所示的通道设计克服这个问题。在该实施方案中,通道 12

包括 3 个部分：入口部分 15、漏斗状连结部分 16 和出口部分 17。出口部分 17 具有小于入口部分 15 直径的直径。更小的直径导致与入口部分 15 中的压力相比，出口部分 17 中更强的毛细压力。压力差异导致液体向出口部分 17 的移动。在操作中，已经在出口部分 17 中的液体被推出出口部分 17，并绕过位于液体和吸收剂 62 界面的气穴。漏斗状连结部分 16 提供防止由于通道的毛细作用的过早芯吸的溢出区。在另一实施方案中，出口部分 17 进一步分为两个次级部分，较大直径的第一部分（对应于图 4 中部分 17 的水平部分）和较小直径的第二部分（对应于进入废液室 60 的部分 17 的垂直部分）。

[0048] 如果孵育室 10 中的杂交或扩增过程涉及加热步骤，例如聚合酶链式反应 (PCR) 中热循环的变性步骤，孵育室 10 内的液体可能会被推出通道 12 并由于孵育室 10 中增加的压力，作出与吸收剂 62 过早的接触。在这些情况下，空气可以被有意地留在通道 12 中（当孵育室 10 被填充时），以防止吸收剂 62 过早的芯吸。可选地，可以将疏水止动件置于通道 12 内以防止吸收剂 62 过早的芯吸。在一实施方案中，疏水止动件包括具有疏水内部表面的通道部分。在一实施方案中，通过用疏水材料涂布或处理天然通道表面形成疏水表面，所述疏水材料例如 **Teflon®**、硅酮或甲硅烷。在另一实施方案中，通道 12 的内部表面是用亲水材料涂布，并且疏水止动件包括通道 12 的部分，该部分具有暴露天然疏水塑料材料的非涂布表面。

[0049] 在另一实施方案中，孵育室 10 与多废液室 62 连结以确保芯吸以适当的间隔发生。

[0050] 本文还描述的是整合的微阵列系统，其具有用于均匀填充的亲水孵育室，用以避免样品污染的单向阀和用于从孵育室去除液体的废液室。现结合图 5，整合的微阵列系统 100 的实施方案包括印制在或形成在基底 30 上的微阵列 20、形成在微阵列 20 周围的亲水孵育室 10、通过通道（未显示）与孵育室 10 流体交流的圆顶阀 50 和通过通道 12 与孵育室 10 连结的废液室 60。吸收剂 62 被合并并在废液室 60 中，废液室 60 通过排出口 64 被排到大气中。透明亲水覆盖物 70 形成了孵育室 10 和废液室 60 的顶部表面。在一实施方案中，通过简单地在废液室 60 的覆盖物上钻孔产生排出口 64。

[0051] 用亲水带或薄膜覆盖孵育室 10 和废液室 60 的一个优势是薄膜或带能够在压力下变形。因此，通过对废液室施加适度压力来在孵育室 10 中混合液体是可能的，所述施加压力可以造成孵育室 10 的轻微变形并因此造成孵育室 10 内液体的运动。

实施例

[0052] 实施例 1. 用亲水带覆盖孵育室导致室的完全充满

[0053] 图 6 显示微阵列载玻片的实施方案的几何构造。圆圈是填充入口 11，正方形是微阵列孵育室 10，并且长方形废液室 60。宽度为 0.5mm 的通道 14 连结填充入口 11 与微阵列孵育室 10，2.0mm 通道 12 连结微阵列孵育室 10 与废液室 60，并且从废液室 60 到外部的 1.0mm 通道 64 作为排出口。微阵列孵育室 10 具有 10mm×10mm 的大小。激光剪切厚度为 0.25mm（可获得自 3M，部件号 9087）的内部垫片带，以形成具有上述几何构造的垫片。将该垫片以与用于凝胶点印制过程的载玻片相似的接触角置于疏水表面上。垫片的顶部用亲水带 (AR 90128) 密封以提供亲水表面。30 μ l 水均匀填充室，而不留下气泡或气穴。30 μ l 杂交缓冲液 (3M 异硫氰酸胍、150mM HEPES pH 7.5 和 15mM EDTA) 也均匀地填充室，没有气泡。用疏水带 (AR 8192) 的相似测试由于非均匀的填充，在微阵列室中留下气穴。

[0054] 该实验表明,室的亲水表面克服了液体的表面张力并允许室、包括直角边缘的完全填充。该结果是意想不到的,因为当液体填充室时,直角角落通常困住气穴。

[0055] 实施例 2. 废液室的芯吸效率的评价

[0056] 图 7A 显示 4 个测试微阵列载玻片,每个具有连结到含有吸收剂的废液室的亲水孵育室。废液室被排放到大气中。通过将垫片(从 Grace Biolab 提供的双面带激光剪切)置于微阵列支持载玻片的顶部上形成室。通过用亲水带(AR 90469)覆盖孵育室空间,产生孵育室中的亲水表面。吸收剂来自于 Millipore(C048)。95 μ l 含有来自鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)的扩增产物、杂交标记、BSA 和杂交缓冲液的样品在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟并通过入口引入孵育室。然后,入口用带(AR90697)密封。反应在具有连接的载玻片塔的 MJ 研究 PTC-200DNA 引擎热循环仪中以 50 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。将微阵列载玻片从塔中移出并在室温用 150 μ l 水洗涤。当水通过入口被添加到孵育室中时,孵育室中的液体通过连结孵育室与废液室的通道被推入废液室。一旦建立孵育室内的液体和废液室中的吸收剂之间的接触,吸收剂能够将液体(包括洗涤体积)从孵育室芯吸出来。然后,微阵列载玻片在 95 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟以彻底干燥孵育室。微阵列在 Aurora Photonics PortArray 5000TM 上成像,没有对装置的任何操作。通过覆盖孵育室的亲水带取得图像。

[0057] 图 7B 显示杂交、洗涤和干燥步骤后,实施例微阵列的图像。产物点显示为暗黑小点。对照点包括 Cy3 点和杂交标记。每个阵列是 4 个次级阵列的重复,因此 4 组 Yp 产物点。在所有测试载玻片中实现了均匀的杂交。

[0058] 实施例 3. 含有圆顶阀、亲水孵育室和废液室的微阵列系统

[0059] 图 8A 显示整合的微阵列系统的实施方案,所述整合的微阵列系统具有用亲水带覆盖的孵育室、具有合并的吸收剂的废液室和连结到孵育室的圆顶阀。95 μ l 的由杂交预混混合物(master mix)和鼠疫耶尔森氏菌产物组成的样品在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟,并用 Rainin P200 μ l 移液器通过圆顶阀被引入孵育室。样品均匀地流入微阵列室,而不留下气泡或气穴。孵育室在具有连接的载玻片塔的 MJ 研究 PTC-200DNA 引擎热循环仪上以 50 $^{\circ}$ C 加热 60 分钟,没有任何对流式细胞装置的改变。将微阵列载玻片从载玻片塔中移出并用 150 μ l 水洗涤。当水被引入孵育室时,孵育室内的杂交混合物被推入废液室,并且 Millipore C048 吸收剂从孵育室将全部体积的液体芯吸出来。然后,微阵列载玻片在 95 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟以彻底干燥孵育室。微阵列在 Aurora Photonics Port Array 5000TM 上成像,没有对装置的任何操作。通过覆盖孵育室的亲水带取得图像。

[0060] 图 8B 显示杂交、洗涤和干燥步骤后,示例性微阵列的图像。产物点显示为暗黑小点。对照点包括 Cy3 点和杂交标记。每个阵列是 4 个次级阵列的重复,因此 4 组 Yp 产物点。如图 8B 所示,在所有次级阵列中实现了均匀的杂交。

[0061] 实施例 4. 含有亲水孵育室和废液室的微阵列系统

[0062] 图 9A 显示具有亲水室 10 和废液室 60 的微阵列系统的另一实施方案。两个室通过通道 12 连结,通道 12 具有入口部分 15、漏斗状连结部分 16、大直径出口部分 171 和小直径出口部分 172。液体样品通过入口 11 和通道 14 被添加到孵育室 10。

[0063] 图 9A 中所示的微阵列系统使用从双面带(Grace Biolabs)激光剪切的垫片构建在玻璃载玻片上。废液室 60 含有滤纸吸收剂(CF4, Millipore)并被排放到大气。用 Lexan HPFAF(0.007" /175 μ m)防雾带(GE Plastics)覆盖得到的微阵列组件。20 μ l 的含有来自

化脓性链球菌 (*Streptococcus pyrogenes*) 的扩增产物、杂交标记 (相应对照)、BSA 和杂交缓冲液的样品在 95°C 变性 5 分钟,并用 Rainin P200 μ L 移液器通过入口 11 被引入孵育室 10。用带密封入口 11 并且整个载玻片允许在具有连接的载玻片塔的 MJ 研究 PTC-200 DNA 引擎热循环仪中以 55°C 孵育 30 分钟。将载玻片从塔中移出并在室温用 150 μ L 水洗涤。阵列在 Aurora Photonics PortArray5000™ 微阵列读数器上成像 (2 秒暴露时间)。图 9B 显示杂交结果。图 9C 是显示阵列点的布局的芯片图。如图 9B 中所示,从杂交对照和链球菌特异探针获得强阳性结果。

[0064] 实施例 5. 一步蛋白微阵列系统

[0065] 使用含有捕获抗体的凝胶滴元件构建一步、整合的蛋白微阵列系统,例如图 5 和图 9 中所示的实施方案中的一个。所述捕获抗体是与生物战争用剂 (BWAs) 组特异性结合的抗体。每个凝胶点含有与特定 BWA 结合的抗体。将胶体金标记的二抗套置于接近入口通道的位置。二抗识别相同组的 BWAs。当液体样品通过入口通道被上样到孵育室中时,胶体金标记的二抗当样品进入孵育室时与样品混合。孵育中,目的 BWAs 被阵列凝胶点中的抗体所捕获并且二抗与被捕获的 BWAs 结合。孵育期后,洗去未结合的二抗。二抗与凝胶点上捕获的 BWAs 结合并在微阵列中产生阳性信号。

[0066] 如本文使用,术语“抗体”是用于最宽的可能的意义并且可以包括但不限于抗体、重组抗体、遗传改造的抗体、嵌合抗体、单特异性抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、双抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、异种抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、骆驼化抗体、去免疫抗体、抗独特型抗体和 / 或抗体片段。术语“抗体”还可以包括但不限于例如以下类型的抗体: IgA、IgD、IgE、IgG 和 / 或 IgM, 和 / 或亚型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 / 或 IgA2。术语“抗体”还可以包括但不限于抗体片段,例如至少部分的完整抗体,例如抗原结合可变区。抗体片段的实例包括 Fv、Fab、Fab'、F(ab')、F(ab')₂、Fv 片段,双抗体,线性抗体,单链抗体分子,多特异性抗体和 / 或抗体的其他抗原结合序列。其他信息可见于美国专利第 5,641,870 号、美国专利第 4,816,567 号、WO 93/11161、Holliger et al., Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments (双抗体: 小的二价且双特异性抗体片段), PNAS, 90: 6444-6448 (1993)、Zapata et al., Engineering linear F(ab')₂ fragments for efficient production in *Escherichia coli* and enhanced antiproliferative activity (为大肠杆菌中有效产生和增强的抗增殖活性而工程化线性 F(ab')₂ 片段), Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995), 通过引用将其并入本文。

[0067] 实施例 6. 两步蛋白微阵列系统

[0068] 使用含有抗体的凝胶滴元件构建两步、整合的蛋白微阵列系统,例如图 5 和图 9 中所示的实施方案中的一个。每个凝胶点含有与特异性靶标结合的抗体。样品被引入孵育室并且在室中孵育固定的时间段。添加洗涤缓冲液以去除未结合样品。洗涤缓冲液被芯吸入废液室,从而从孵育室去除所有液体。在接下来的步骤中,将一种或多种二抗添加到孵育室并且孵育固定的时间段。孵育期后,洗去未结合的二抗。与凝胶点上捕获的靶标结合的二抗在微阵列中产生阳性信号。

[0069] 在该实施方案中,气泡被留在连结孵育室与废液室的通道中,以将孵育室中的液体与废液分离并防止过早的芯吸。当另外的洗涤体积被添加到孵育室时,未结合的抗体被推出孵育室并被芯吸入废液室。多废液室确保芯吸以适当的间隔发生。

[0070] 本文使用的术语和描述仅以举例说明的方式进行阐述而不是意图表示为限制。本领域技术人员会意识到,在如下文权利要求书中所界定的本发明的精神和范围及其等同物中,许多变化是可能的,其中所有术语应理解为其最宽的可能意义,除非另作说明。

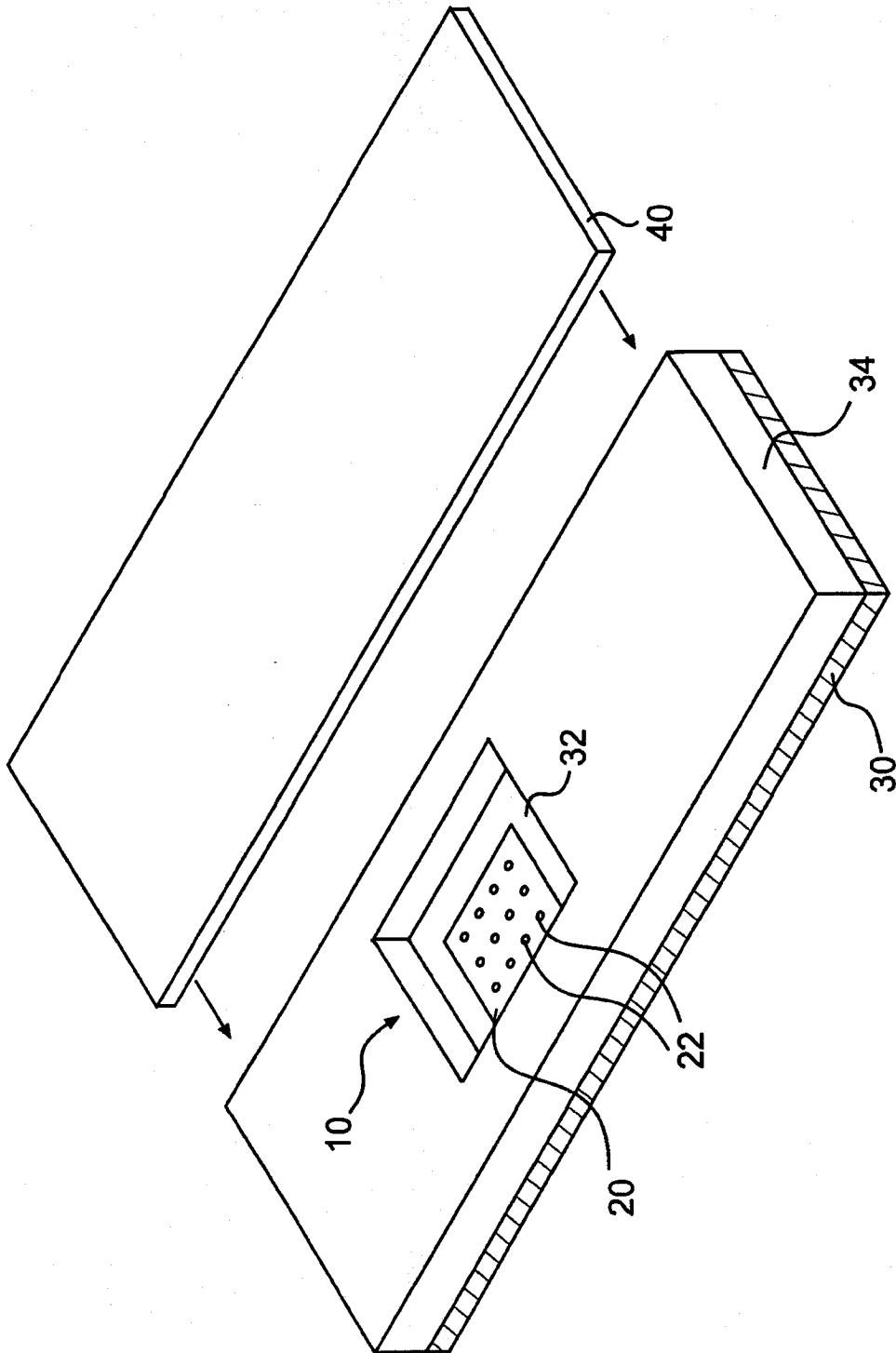


图 1

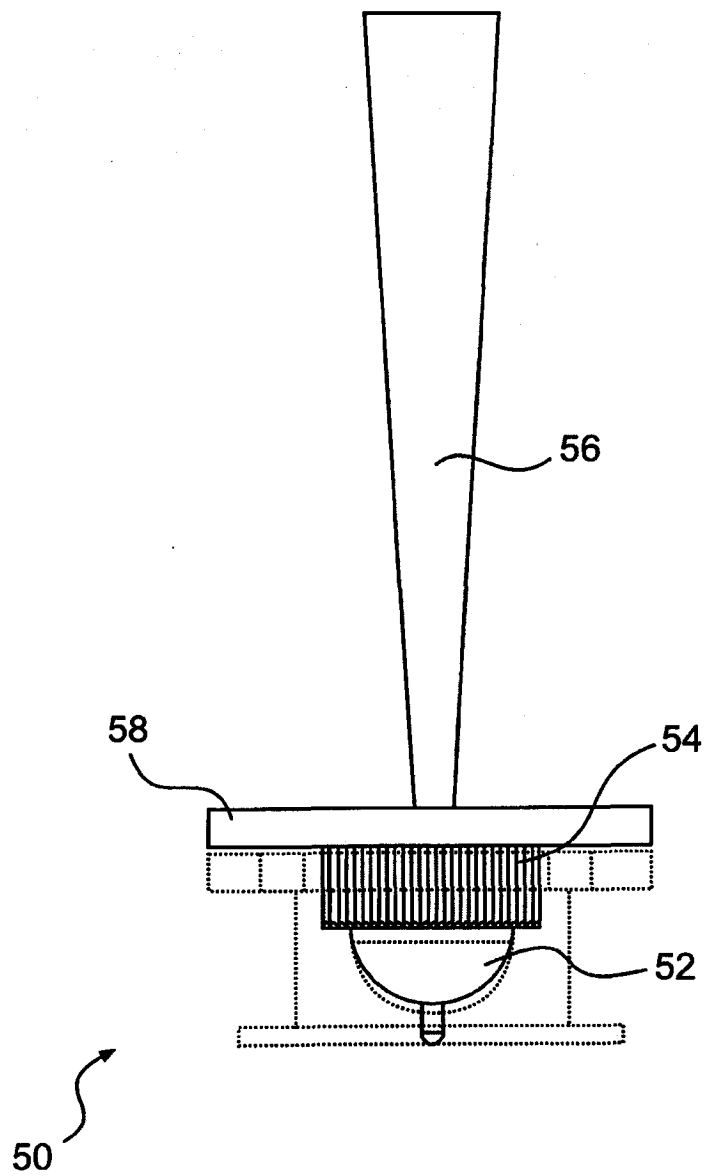


图 2

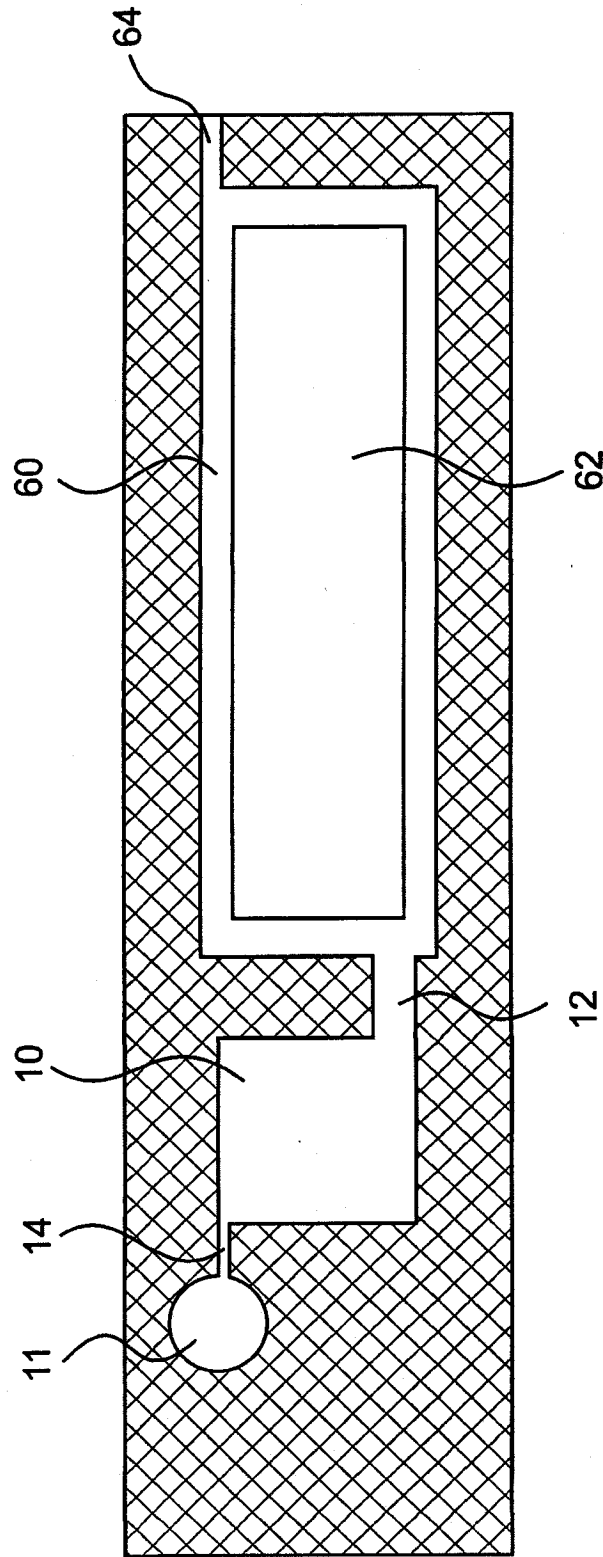


图 3

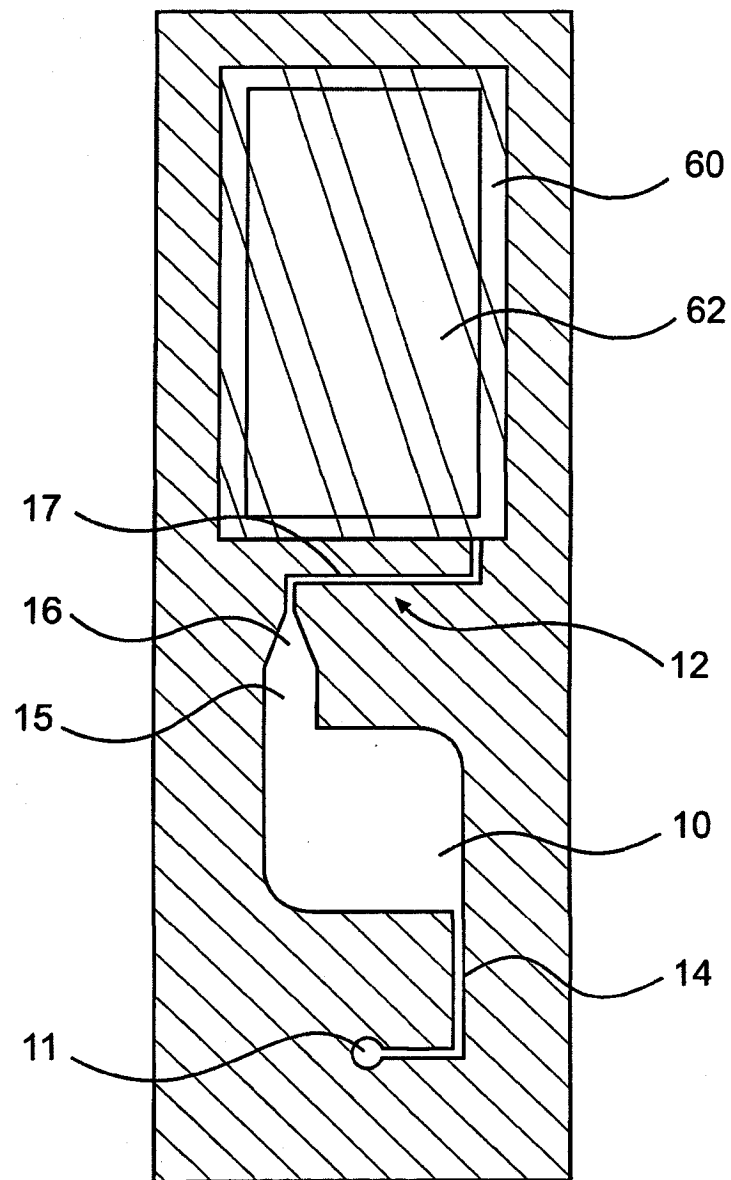


图 4

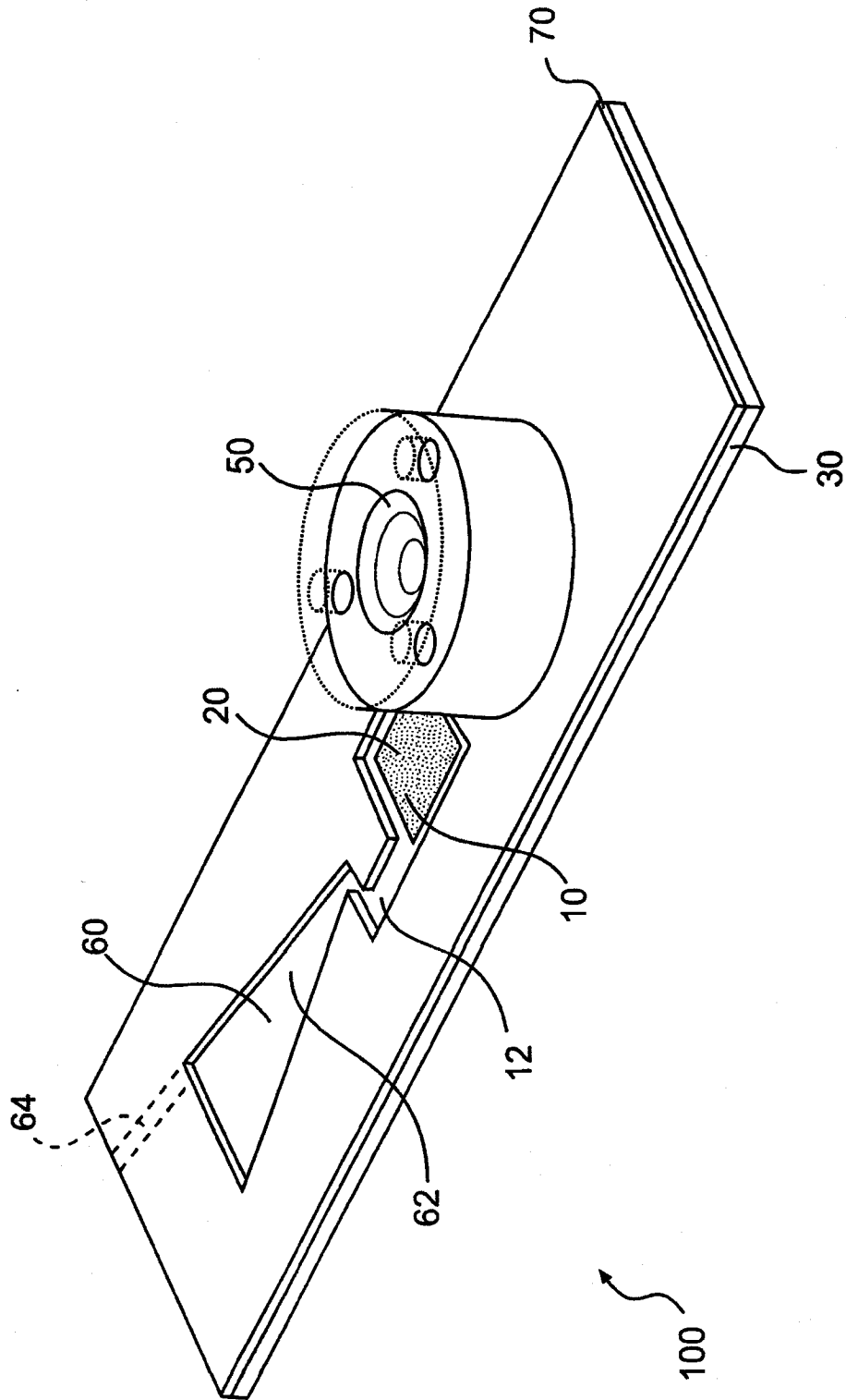


图 5

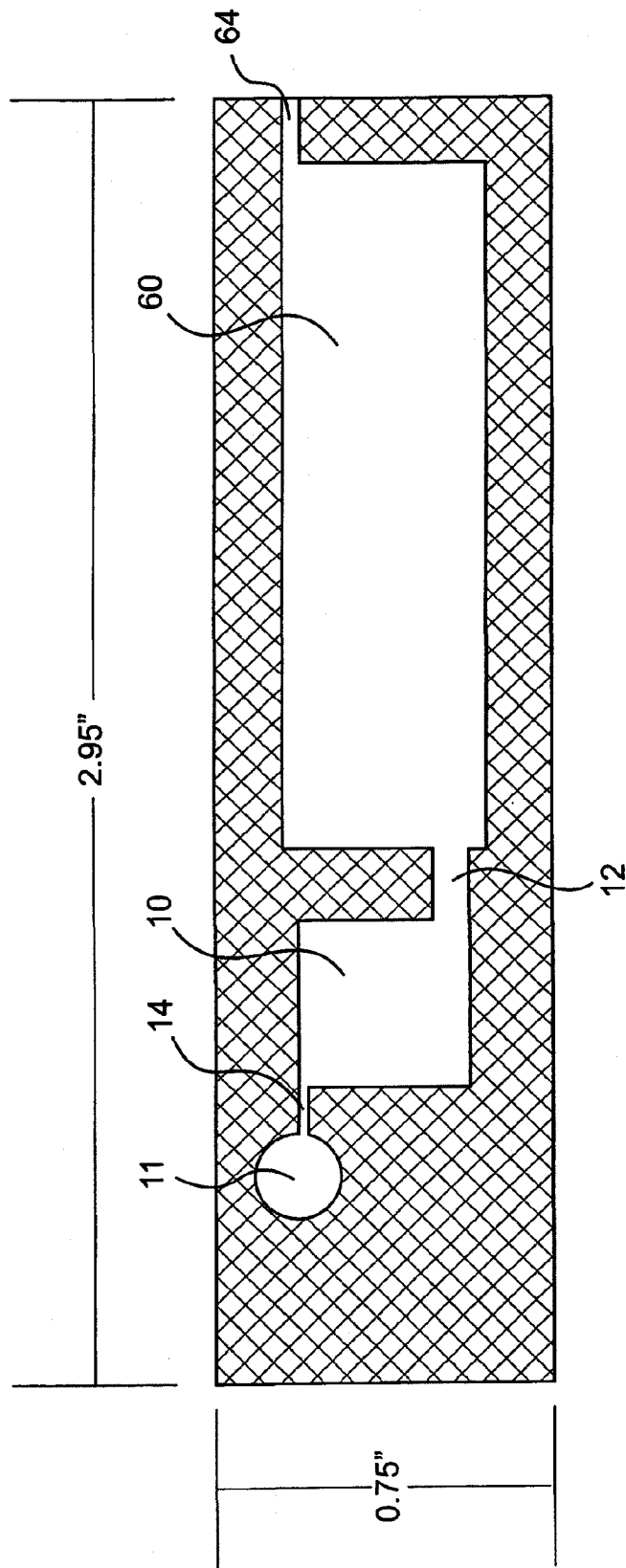


图 6

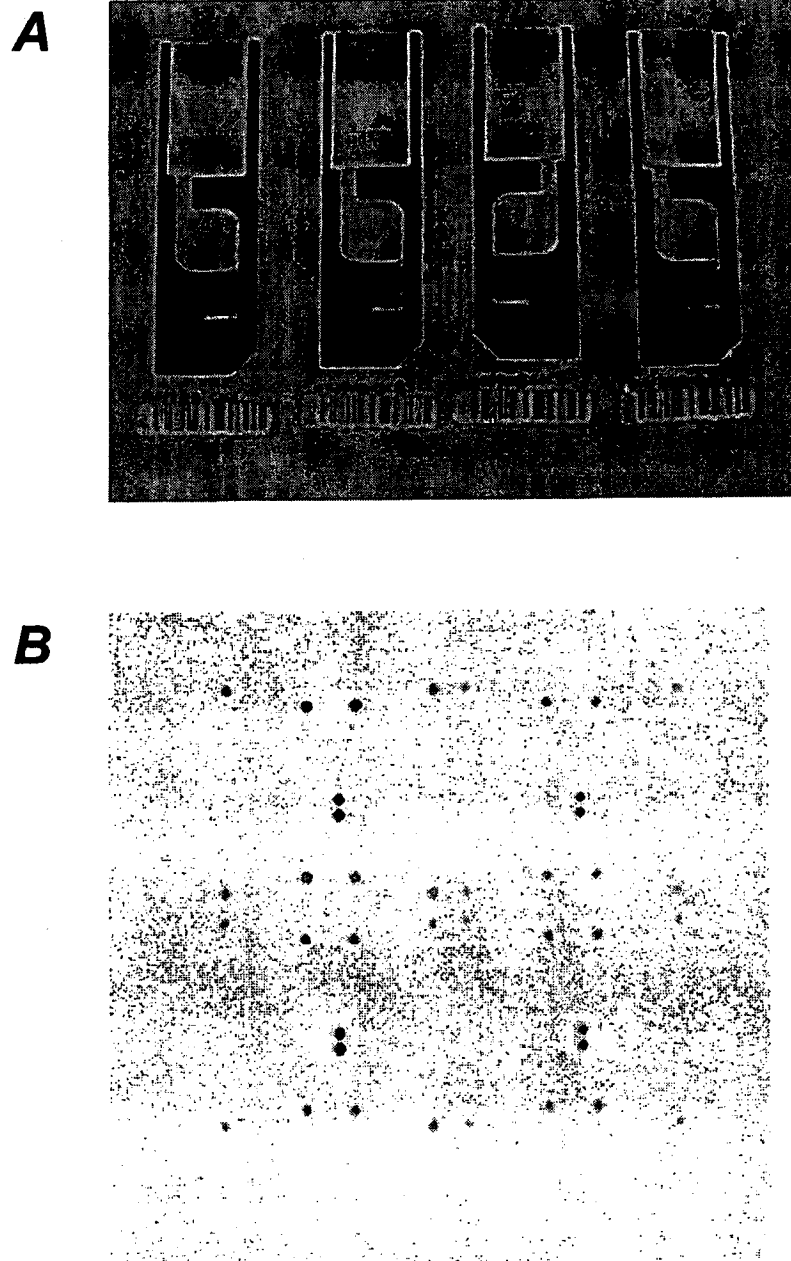
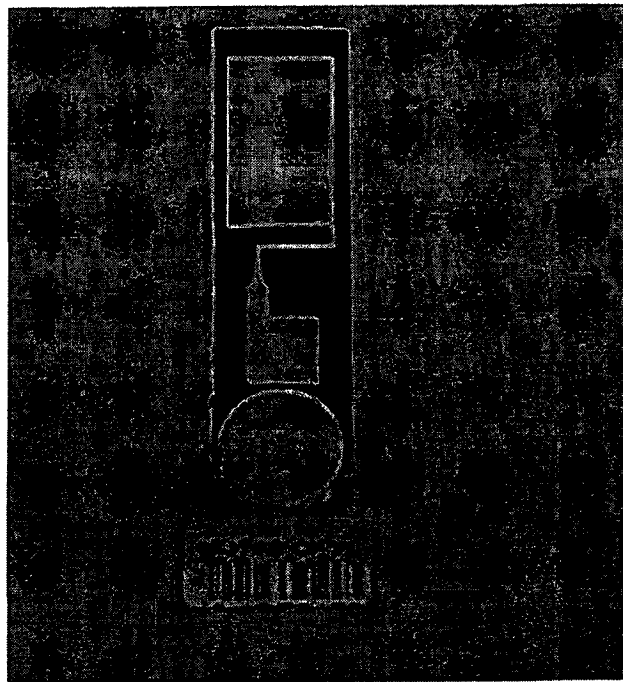


图 7

A



B

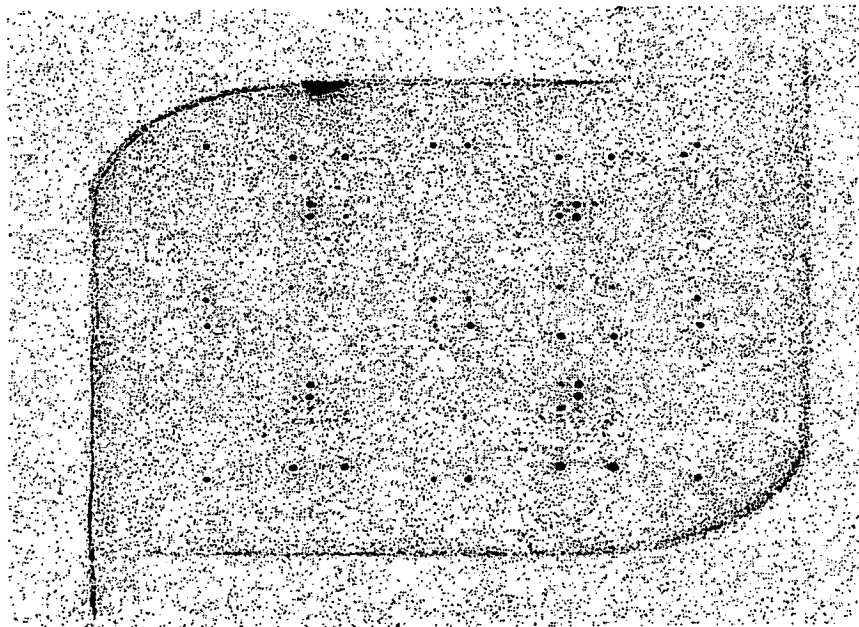


图 8

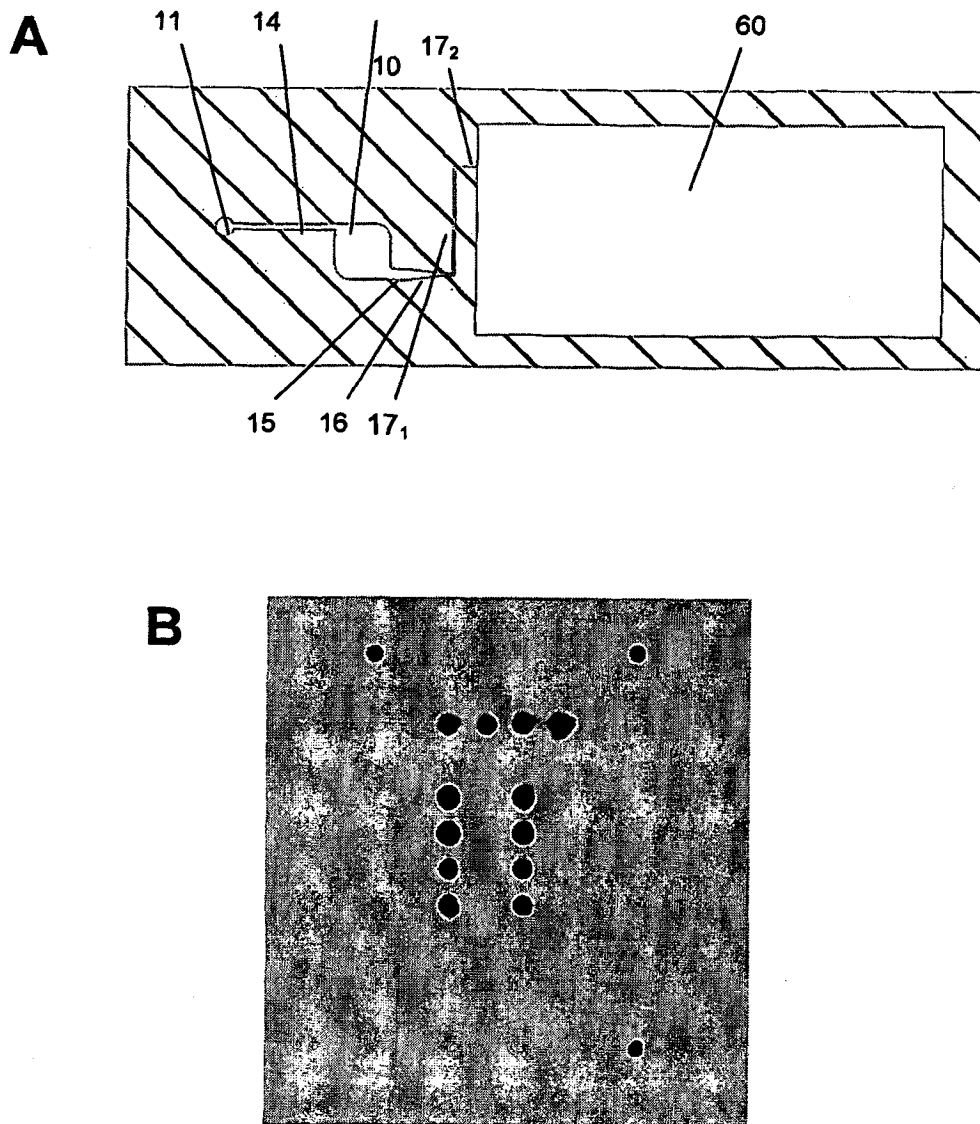


图 9

C

15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
															1
Cy3													Cy3		2
															3
															4
					H	H	H	H							5
															6
					226	E	323	E							7
					226	E	323	E							8
					226	E	323	E							9
					226	E	323	E							10
															11
					166	166	166	166							12
															13
															14
													Cy3		15

Cy3: 信标

166: 无义探针 (dN20)

H: 杂交对照

E: 空凝胶元件

226: 链球菌特异性探针 1

323: 链球菌特异性探针 2

图 9