



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101073002 B

(45) 授权公告日 2012. 08. 08

(21) 申请号 200580035911. 7

B01L 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 09. 15

审查员 海岩冰

(30) 优先权数据

60/609, 970 2004. 09. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 04. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/033347 2005. 09. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02006/032044 EN 2006. 03. 23

(73) 专利权人 英特基因有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·B·乔瓦诺维齐 L·L·布拉加

D·兰克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 高少蔚 彭鲲鹏

(51) Int. Cl.

G01N 27/447 (2006. 01)

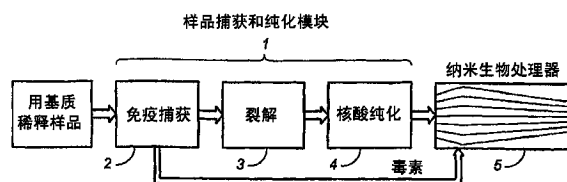
权利要求书 1 页 说明书 28 页 附图 36 页

(54) 发明名称

微流体装置

(57) 摘要

本发明公开了将微芯片与各种类型的模块接口连接的方法和装置。所述技术可用作各种应用，如 DNA 测序和基因型分析、蛋白质组学、病原体检测、诊断和生物防卫的样品制备和分析系统。



1. 一种用于制备和分析靶分析物的模块化系统,其包括:

用于捕获、浓缩和纯化样品中靶分析物的样品捕获和纯化模块,以及用于进一步制备和/或分析的包括一个或多个微流体装置的生物处理器模块,

其中所述样品捕获和纯化模块用于将大规模样品溶液减少到小规模体积,以将所述靶分析物引入所述一个或多个微流体装置,和

其中所述样品捕获和纯化模块将捕获珠引入所述生物处理器模块中,其中所述捕获珠可包含一种或多种附于其上的靶分析物,以下调含靶分析物的样品体积,从而使大规模模块与小规模装置接口连接。

2. 如权利要求1所述的系统,其特征在于,所述靶分析物选自细菌、病毒、芽孢、真核细胞或核酸。

3. 如权利要求2所述的系统,其特征在于,所述靶分析物是DNA。

4. 如权利要求1所述的系统,其中所述珠结合核酸。

5. 如权利要求1所述的系统,其中所述珠是磁珠。

6. 如权利要求1所述的系统,其中所述珠是亲和捕获珠。

7. 如权利要求1所述的系统,其中所述系统还包括循环测序试剂。

8. 如权利要求1所述的系统,其中所述系统还包括PCR试剂。

9. 如权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个微流体装置包括横隔板阀。

10. 如权利要求1所述的系统,其中所述一个或多个微流体装置包括可形变的膜层。

11. 如权利要求1所述的系统,其中所述系统还包括位于微流体装置上的横隔板泵。

12. 如权利要求11所述的系统,其中所述横隔板泵包括一系列三个横隔板阀。

13. 如权利要求1所述的系统,其中所述生物处理器模块配制成用于核酸分析。

14. 如权利要求1所述的系统,其中所述系统还包括微型机器人控制的芯片上的阀和具有可形变膜层的泵。

微流体装置

[0001] A. 相关申请的交叉参考

[0002] 根据 35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求 2004 年 9 月 15 日提交的美国临时专利申请序列号 60/609,970 的优先权, 将其全部公开内容纳入本文作参考。

[0003] B. 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0004] 在国防部授予的项目号 W911SR-04-P-0047、NIH 授予的资助号 5R01HG003583-01、HSARPA 授予的合同号 NBCHC050133、HSARPA 授予的序号 TTA-1-0014(协议号 W81XWH-04-9-0012) 中一个或多个的政府支持下进行本发明的各个方面。政府享有本发明的某些权利。

[0005] C. 背景

[0006] 在过去的 10-20 年中, 开发了各种不同且常常不相容的微流体装置设计, 通常其目的是减小生物分析方法中的样品体积需求。在不存在控制外部尺寸形状因子、上游和下游外部接口的特性、以及内部微流体通路的长度、横截面几何形状和直径的标准的情况下, 这种微流体装置常常互不相容, 并且与现有的上游纯化和下游分析装置不相容。

[0007] 尽管微型制造取得的进步使得可能在微升、甚至纳升或皮升级进行分析, 但首次获得的许多生物和环境样品的体积比现有微流体分析装置的量级大得多并与其不相容。

[0008] 因此, 本领域需要一种模块化微流体组件, 它可用作集成流体系统的组件, 可将具有不同外部尺寸形状因子、外部接口和 / 或内部流体几何形状的微流体组件连接成有效的流体连接, 并可连接微流体制备和 / 或分析组件和在较大量级上操作的制备模块或方法。

[0009] D. 发明概述

[0010] 本发明解决了本领域的这些和其它需求。

[0011] E. 附图简要说明

[0012] 本领域技术人员将理解, 下述附图仅仅为了说明目的, 而不旨在以任何方式限制本发明的范围。

[0013] 图 1 说明了样品捕获和纯化模块 (SCPM) 和生物处理器模块 (BPM) 工作流程的一种实施方式。

[0014] 图 2 说明了毒素试验工作流程的一种实施方式。

[0015] 图 3 说明了集成生物处理器模块 (BPM) 的样品捕获和纯化模块 (SCPM) 的一种实施方式。

[0016] 图 4 说明了芯片外流过筒 (off-chip flow-through cartridge) 的一种实施方式。

[0017] 图 5 说明了行波流过式珠搅拌器 (traveling wave flowthrough bead beater) 的一种实施方式。

[0018] 图 6 说明了流过式 (flowthrough) 超声的一种实施方式, 其中将探针直接插入收集器流出物。

[0019] 图 7 说明了核酸纯化模块的一种实施方式。

[0020] 图 8 说明了纳米生物处理器模块化系统的一种实施方式, 包括空气取样器、样品

浓缩模块以及微流体样品扩增和分析模块,可用于生物防卫应用。

[0021] 图 9 说明了 MOV™ 阀的一种实施方式。

[0022] 图 10 说明了显微制造泵的一种实施方式。

[0023] 图 11 说明了显微制造路由选择器的一种实施方式。

[0024] 图 12 说明了提供样品净化基质的三维连接工作通道的横截面的一种实施方式。

[0025] 图 13 说明了将一种或多种反应物加入反应室的流体线路的一种实施方式。

[0026] 图 14 说明了循环测序模块 (CSM) 重复单元的一种实施方式。

[0027] 图 15 说明了一个生物处理器单元的一种实施方式。

[0028] 图 16 说明了采用外部传动的 MOV 阀和泵的微芯片筒的一种实施方式。

[0029] 图 17 说明了 12 单元生物处理器筒的一种实施方式。

[0030] 图 18 说明了非生物处理器单元和微芯片设计的一种实施方式。

[0031] 图 19 说明了微芯片实施方式 MBI-11。图 A 显示蒙板 (mask) 设计,其中流体层显示为蓝色,传动层显示为红色。图 B 显示其中一个组件,其具有两组输入和输出储存室、反应室和存储室以及三向路由选择器。该阀门的 8 条气动控制线终止于与气动装置相连的标准连接器。图 C 显示出蚀刻的微流体晶片。图 D 显示出组装的 MBI-11 三层微芯片,用实验室记号笔标出了比例尺。

[0032] 图 20 说明了微芯片实施方式 MBI-12,其装有集成样品制备的显微毛细管电泳 (μ CAE) 所用的纳米流体结构。用蓝色表示流体通道,用红色表示 MOV 传动通道。

[0033] 图 21 说明了具有双分析通道的双成对 - 末端读出亲和捕获样品净化的一种实施方式。深色层是微流体,灰线是工作层。阀传动层未显示。虚线框确定了 DNA 分析重复单元。

[0034] 图 22 说明了集成的样品、制备、净化和分析 MINDS 微芯片重复单元的一种实施方式。

[0035] 图 23 说明了 16- 通道 200nL 循环测序模块微芯片的一种实施方式。

[0036] 图 24 说明了加入微珠的集成的样品、制备、净化和分析 MINDS 微芯片重复单元的一种实施方式。显示出 25nL 样品制备室具有两条亲和捕获和分离通道。

[0037] 图 25 说明了设计为包括板载试剂、核酸纯化和毒素模块的一次性筒的微芯片的一种实施方式。

[0038] 图 26 说明了微芯片接口装置的仪器控制的一种实施方式。

[0039] 图 27 说明了 MiniPrep 设备中装配有管道的微芯片真空吸盘的一种实施方式。

[0040] 图 28 说明了操纵 MiniPrep 设备内的生物处理器微芯片的连接硬件的一种实施方式。

[0041] 图 29 说明了路径长度增加的 RT-PCR 室的一种实施方式。

[0042] 图 30 说明了旋转扫描器的一种实施方式。

[0043] 图 31 说明了可用于核酸分析 (RT-PCR 和 μ CAE) 的生物处理器模块的蒙板设计的一种实施方式。

[0044] 图 32 说明了生物处理器微芯片的晶片级设计的一种实施方式,其中在 6" 晶片上有 48 个单元,各单元具有 RT-PCR 和 μ CAE 能力。

[0045] 图 33 说明了多重生物处理器线路的一种实施方式。MOV 路由选择器将样品分为三

个多重 RT-PCR 反应,产生法医 (forensics) 样品和再测试样品,并可选择样品进行 μ CAE 验证。

[0046] 图 34 说明了用 8" 晶片模拟 12" 晶片。

[0047] 图 35 显示出用珠在一定浓度范围内捕获大肠杆菌 (*E. coli*)。

[0048] 图 36 显示出在大肠杆菌的免疫捕获中偶联于 DYNAL™ 珠的单克隆抗体的滴定。

[0049] 图 37 显示出蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*) 对大肠杆菌的免疫捕获的影响。

[0050] 图 38 显示出用免疫捕获从掺入 (spike) 空气取样器液体中回收大肠杆菌。

[0051] 图 39 显示出图 38 的特定滴度 10^4 CFU/ml 的数据组。

[0052] 图 40 显示对通过 100mg 二氧化硅提取物 - 清洁 (Extract-Clean) SPE 介质床的各种样品组分中高滴度大肠杆菌进行浓缩的结果。

[0053] 图 41 显示出通过 100mg 二氧化硅提取物 - 清洁 SPE 介质床的各种组分中存在的高浓度大肠杆菌样品的总细菌百分数。

[0054] 图 42 显示出用二氧化硅珠 (左) 和大珠 (右) 回收 β - 半乳糖苷酶。

[0055] 图 43 显示出用大珠回收大肠杆菌。

[0056] 图 44 显示出将净化样品直接注射入分离通道的直接注射方案的一种实施方式。

[0057] F. 发明详述

[0058] 应理解,上述总说明,包括附图以及以下详述仅为示范性和解释性,不限制本公开。在本公开中,采用单数形式时包括复数,除非另有特别说明。同时,采用“或者”指“和 / 或”,除非另有说明。相似地,“包括”、“包含”不旨在限制。术语如“元件”或“部件”包括包含一个单元的元件和部件,以及包含一个以上单元的元件或部件,除非另有特别说明。本文所用的章节标题仅为组织目的,不旨在限制所述主题。本文特别将引用的所有参考文献和参考文献的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍和论文的全文纳入本文作参考,用于所有目的。在一个或多个掺入的参考文献与本申请矛盾的情况下,本申请居于控制地位。

[0059] 本公开提供了集成的模块化系统,它具有制备和分析各种样品的靶分析物的补充功能。本文所述系统可用于制备和分析各种靶分析物,包括但不限于:分子 (如毒素、药物)、生物分子 (如核酸、多肽、脂质)、细胞 (如真核和原核细胞 (如芽孢杆菌、埃希菌))、芽孢 (spore) (如炭疽杆菌 (*B. anthracis*))、病毒 (如流感、天花) 和其它材料,可根据实施人的判断进行选择。在各种示范性实施方式中,可用一个或多个系统模块进行样品制备和分析,如下所述。

[0060] 在一些实施方式中,本文所述系统包括用于样品捕获或纯化 (SCPM) 的前端模块,在典型的实施方式中,它还能将捕获和 / 或纯化的样品引入生物处理器模块 (BPM),该模块可包括一个或多个微流体装置 (如微米级、纳米级或皮米级装置),用于进一步制备和 / 或分析。因此,本文公开的是用于捕获、浓缩或纯化样品中的靶分析物,然后将该靶分析物引入一个或多个微流体装置的模块化系统和方法。在一些实施方式中,微流体装置可向芯片外平台供料。

[0061] 在各种示范性实施方式中,SCPM 可通过各种方法,如通过裂解、乳化、超声、离心、层析、固相提取 (SPE)、免疫捕获 (如免疫磁性分离 (IMS))、基于珠的捕获及其组合捕获、纯化或浓缩靶分析物。在一些实施方式中,SCPM 可将大规模样品溶液减少到小规模体积 (例

如通过将毫升浓缩至微升或更小的体积)以引入一种或多种微流体装置。这些 SCPM 实施方式能够用作模块化规模接口,允许将微米级和 / 或纳米级装置集成到包括在较大规模上操作的操作模块的流体系统中。这些 SCPM 实施方式可允许具有不同尺寸形状因子的模块集成到流体相连的系统中。在一些实施方式中,SCPM 可通过去除可能存在于粗样品中的一种或多种物质以及作为下游加工或分析的抑制剂的一种或多种物质而纯化样品。与常规方法相比,通过捕获、纯化或浓缩样品中的靶分析物,SCPM 可提高本文所述系统的灵敏度。

[0062] BPM 一般包括一个或多个微流体装置。本文所用“微流体装置”指适合操作、储存、加工或分析毫升以下量,如微升(μL)、纳升(nL)和 / 或皮升(pL)体积的流体的装置。在各种示范性实施方式中,微流体装置可包括一个或多个微芯片(如微米级、纳米级或皮米级装置)、毛细管及其组合。可通过本领域已知的显微制造技术生产本文所述微芯片,该芯片可包括阀、泵、室、通道、储存库等,可能适合加工或分析一种或多种靶分析物。在各种示范性实施方式中,微流体装置可以是基于微芯片的筒(cartridge),可以是不可替换 / 不可重复使用的或一次性的。本文所述微芯片可具有任何形状或尺寸。例如,微芯片可以是具有一个或多个辐射状样品制备或分析单元的圆筒,可与操作微芯片的设备一起使用。在一些实施方式中,微流体装置可以是自动化装置。例如,可将微芯片储存在“CD 换片装置”中并自动插入、操作来进行一项或多项功能,如果需要,由可编程设备储存。因此,设备可提供微芯片处理、外部气动操作、温度控制、试剂溶液等,以同时或连续操作一个或多个微芯片。

[0063] 在一些实施方式中,SCPM 能够将可包含一种或多种附于其上的靶分析物的悬液、胶体(如乳剂)或捕获珠引入 BPM,在各种这样的实施方式中,将其引入 BPM 的一个或多个微流体装置中。在这种实施方式中,BPM 的一个或多个微流体装置适合移动一种或多种所述固体如珠使其通过该装置的微流体通路而不堵塞。

[0064] 珠或其它固体从 SCPM 进入 BPM 可用于实现含分析物的样品体积的下调,从而使大规模模块与小规模装置接口连接(interface)。因此,这种 SCPM 和 BPM 实施方式能够使规模和 / 或尺寸形状因子不同的装置模块化地接口连接,允许将微米级和 / 或纳米级装置集成到包括在较大规模上操作的操作模块的流体系统中。

[0065] 在适合基于珠的微流体装置加工的各种示范性实施方式中,可通过流体线路内插入闸板或其它物理阻碍物、磁场、珠的亲 and 捕获、电捕获或其它机制将珠可逆地固定在微流体通道或线路的各点上。在各种实施方式中,可使珠通过流体通道或线路,并可对其进行物理或化学加工。随后,可将粘附、附着或吸附或连接于珠的分析物移动到下游反应室中,在芯片上(即在微流体装置内)进行进一步加工或分析。在一些实施方式中,如果需要,可洗脱掉珠上的物质,如靶分析物。在一些实施方式中,具有不同亲和力的珠系列可连接成具有高特异性和灵敏度的较复杂的生物分子工艺,如一个步骤可将细胞结合到珠上,下一步骤可将特定 DNA 序列固定在珠上,以在反应前净化,第三种珠可用于结合反应产物,以在引入质谱等之前进行纯化。在一些实施方式中,根据本领域技术人员的判断选择的各种步骤中也可采用含有亲和捕获试剂的凝胶。

[0066] 在一些实施方式中,BPM 可用作独立的样品制备系统。因此,在各种示范性实施方式中,BPM 可连接于各种上游样品收集装置(如气溶胶取样器)或给下游分析平台或方法(如质谱(MS)、核磁共振(NMR)、毛细管阵列电泳(CAE)、逆转录-PCR(RT-PCR)、单分子检测系统等)供料。然而,在一些实施方式中,可在微芯片的通道、储存库、反应室等或其组合中

进行一种或多种分析方法。

[0067] 本文所述系统可广泛应用于生物防卫监测、传染病诊断、法医学、基因组学、蛋白质组学和其它领域。在生物防卫中,该技术提供了装配紧密的部件,可用作(例如)建筑物、飞机或机场的野外病原体监测装置,或用于实验室以解决日益增长的测试需求。该系统可制备和分析来自空气、生物液体、农产品或其它来源的样品,以检测目标病原体。低消费成本与自动化制备和分析的组合对分子诊断有显著影响。在临床诊断中,可使该技术适合产生采用无缝集成的一次性装置(目的是产生所需的额外分析)的PCR诊断设备。本文所述系统也可应用于药物遗传学、人类药物遗传学、生物医药研究、动物和植物分型以及人类鉴定。

[0068] 所述系统的其它应用包括分子诊断,如检测微生物、生物体基因型分析、测序和法医学;产生用于各种方法(如RT-PCR、再测序和蛋白质分析)的样品的制备和分析平台;产生用于大多数分析平台,如质谱、毛细管阵列电泳、差别展示和单分子检测的样品制备台;以及用于生物防卫应用。

[0069] 本文所述系统可(例如)通过采用机器人整体或部分自动化,它的大小可缩放,从手持式装置至野外检测器至实验室设备。

[0070] 1. 靶分析物的浓缩

[0071] 在一些实施方式中,在引入微流体装置进行进一步加工或分析之前可浓缩样品中的靶分析物。在一些实施方式中,可用可容纳大规模体积(如毫升至升)并将一种或多种靶分析物浓缩到小表面(例如微珠)上的一种或多种芯片外流过装置浓缩一种或多种靶分析物。在一些实施方式中,可采用可由容纳大规模体积的芯片外储存库供料的芯片上的流过装置浓缩一种或多种靶分析物。在一些实施方式中,芯片上和芯片外的装置可组合使用。在一些实施方式中,捕获的靶分析物可选择性洗脱到适合下游加工或分析的体积中。如图1所示,SCPM 1可包括以下模块:免疫捕获模块2、裂解模块3、核酸纯化模块4,并可与纳米生物处理器5集成。在一些实施方式中,可免疫捕获分子如毒素,并将其直接供给纳米生物处理器5(图2)。

[0072] 适合将靶分析物捕获到表面上的材料包括各种类型的提取基质材料,可由珠、整体料(monolith)、改性聚合物等组成。在一些实施方式中,提取基质材料可包含各种连接的官能团(如 C_4 、 C_{18} 、羧基和氨基),各种珠或化学物质的混合床,或亲和捕获部分(如抗体、凝集素、半抗原、配体(如生物素)、受体、核酸等)。在一些实施方式中,可用羧化珠,如SPRI或未改性的二氧化硅珠捕获核酸,并洗脱入合适体积的极性溶剂如水中。在一些实施方式中,可采用纳米级的捕获方法,其采用二氧化硅毛细管,其中离液剂如硫氰酸盐将核酸压到毛细管表面上,洗涤后,可将浓缩和纯化的核酸洗脱入缓冲液中用于进一步加工或分析(参见美国专利号6,489,112)。各种靶分析物的其它固相捕获方法参见例如,Weimer等,2001Appl. Environ. Microbiology, 67:1300-1307。

[0073] a) 芯片外流过式(off-chip flowthrough)装置

[0074] 在一些实施方式中,可用芯片外流过装置130浓缩靶分析物,该装置通过浓缩基质140连通大规模样品体积(图4)。在一些实施方式中,浓缩基质保留了靶分析物,而本体溶液和干扰化合物通过该装置。在一些实施方式中,干扰化合物或不需要的化合物保留在基质140上,而靶分析物通过该装置。根据样品形式(表面、水、土壤、气溶胶、生物物质),

可采用粗过滤 (ca. 20 μ m) 去除本体污染物和颗粒。在一些实施方式中, 芯片外流过装置的底板上可包括烧结的开口 150, 其中加载基质, 该装置还可包括用于洗脱的钻孔 (≤ 1 mm) (图 4)。浓缩基质可采用非亲和介质或亲和捕获介质, 如本文所述。与 BPM 微流体装置集成的芯片外流过装置的例子见图 3。

[0075] i) 非亲和捕获

[0076] 本文所用“非亲和捕获”指通过疏水、亲水或离子相互作用在介质上非特异性捕获靶分析物。

[0077] 在一些实施方式中, 靶分析物的非亲和捕获可采用 Extract-Clean™ 固相抽提 (SPE) 试剂盒 (Alltech), 该试剂盒包括 1.5 mL (或 4 mL) 柱, 该柱中预先填充有含有 20 μ m 聚乙烯熔块的一种 SPE 介质。该介质可捕获靶分析物用于进一步洗脱, 或可允许靶分析物通过而不需要的物质保留在该介质上。例如, 范围分别为约 $1-10^4$ CFU/mL、约 10^2-10^3 PFU/mL 和 $0.1-10^2$ ng/mL 的细胞、病毒或细胞裂解物中的蛋白质可施加于介质。可手工或通过机器人加载样品, 如果需要, 用真空使介质流通。在一些实施方式中, 靶分析物结合于可洗涤的填充材料, 可通过从介质中洗脱来浓缩靶分析物。在各种示范性实施方式中, 可采用 3 mL 注射器筒体 SPEC (ANSYS Technologies), 其装有二氧化硅微纤维盘, 以防止流动特性和保留特征的沟通 (to prevent channeling for flow properties and retention characteristics), 或可采用大珠 (Big Beads)。也可采用标准或特殊色谱介质浓缩或纯化所需材料。在任何所选介质中, 本领域普通技术人员可优化床体积、不同介质制备、洗涤和洗脱条件, 实现最大保留以提高灵敏度。

[0078] 可用各种方法监测流过该装置的样品, 这些方法有, 如采用 (例如) Avalanche 荧光扫描仪 (GE) 的免疫标记 (immunotagging) 和荧光检测、采用 (例如) MegaBACE1000 (GE) 的毛细管电泳、细胞生长试验或本领域技术人员熟知的其它方法。

[0079] ii) 亲和捕获

[0080] 本文所用“亲和捕获”指用介质捕获靶分析物, 介质含有对靶分析物基本特异的分子 (如抗体、配体、受体、凝集素、半抗原、表位、寡核苷酸等)。在一些实施方式中, 可将用靶分析物 (如细胞、生物体、芽孢或毒素) 表面表位的单克隆抗体修饰的磁珠加入样品。在一些实施方式中, 根据实施者的判断, 可连续地或以各种组合将用特定生物体、细胞类型、亚型、种类、核酸、蛋白质等的抗体包被的珠的混合物或组施加于样品。抗体包被的珠结合靶分析物, 从而从溶液中捕获它们。可通过磁性收集珠, 可通过洗涤去除不需要的污染物和可能的抑制剂。

[0081] 在各种示范性实施方式中, 可重悬收集、洗涤的珠, 以在流过装置或另一装置中进一步加工, 或移动到 BPM 的微芯片上。如本文所述, 在涉及生物防卫应用的实施方式中, 收集并洗涤的珠可重悬于 10 μ L 缓冲液中, 插入小超声杆。在一些实施方式中, 可利用采用如图 6 所述装置的流过超声。超声后, 可使超声后的材料通过滤膜, 流到 BPM 微流体装置上。

[0082] b) 芯片上的流过式 (on-chip flowthrough) 装置

[0083] 在一些实施方式中, 可用 BMP 微流体装置浓缩靶分析物。在一些实施方式中, 靶分析物的芯片上浓缩可有利于在同一小室中进行模块集成、应用显微制造技术并能够进行各种方法如 PCR。在一些实施方式中, 这可能需要采用直径相对较大的通道, 以产生合适的流速。在一些实施方式中, 免疫亲和捕获提供了快速而特异地浓缩和纯化样品中的病原微生

物或病毒、蛋白质或其它靶分析物的方法。例如,为了浓缩靶分析物,基于珠的样品制备可适合成批方法至芯片上的方法。例如,可用电动珠床填充和闸板珠捕获法 (Oleschuk 等, 2000. *Analytical Chemistry* 72 :585-5909) 将抗体包被的珠放置在集成的显微制造捕获室中。

[0084] 在一些实施方式中,流过模式的填充床中的羧化珠可用于显微制造的玻璃装置,以便后加工多核苷酸,如DNA测序混合物。可用Borofloat玻璃显微制造装有捕获珠用的挡板的玻璃芯片。可设计挡板顶端和相对通道之间的挡板缺口,使其适合羧化珠或其它类型的珠,如二氧化硅珠,能用抗体、凝集素或核酸等亲和捕获的珠。首先可用HF蚀刻深通道,然后第二层浅蚀刻可确定挡板高度为 $0.5\mu\text{m}$ 或更多,这取决于特定的珠和应用。在一些实施方式中,可通过压力填充珠,用真空吸引去除珠。在一些实施方式中,可将免疫官能化的或其它磁珠加入没有闸板的小室中。垂直于小室平面施加小磁场后,珠自身组装成准规则的一系列竖柱,间距约 5-mm (Doyle 等, 2002. *Science* 295 :2237)。

[0085] 在各种示范性实施方式中,可采用基质如色谱介质、附着有抗体或其它亲和捕获材料的凝胶、含有或不含化学修饰的凝胶、固相提取介质、整体料或者本领域技术人员熟知的其它分离或结合基质。

[0086] 2. 裂解模块

[0087] 在一些实施方式中,可在芯片上或芯片外破坏和裂解靶分析物。可被破坏或裂解的靶分析物的非限制性例子是(如原核、真核、古细菌)、芽孢(如细菌(如炭疽杆菌、梭状芽孢杆菌(*Clostridium*))或真菌(如粗球孢子菌(*C. immitis*))、细胞器(如线粒体、核等)、核酸、染色体、质粒、核糖体、蛋白体、病毒(如天花病毒、流感病毒、西尼罗河病毒、脊髓灰质炎病毒、肝炎病毒和逆转录病毒)。在一些实施方式中,可通过超声破坏或裂解靶分析物。在一些实施方式中,可超声处理捕获到珠上的靶分析物,然后将其引入微芯片。

[0088] 可采用浸入含有粗靶分析物溶液或已捕获到珠上、浓缩和纯化的靶分析物的溶液中的杆进行超声破坏。超声器也可以是装有可直接插入收集器流出物的探头的流过式超声装置(图6)。也可设计该室,使其含有或捕获气溶胶,并可如本文所述地自动化。

[0089] 在一些实施方式中,可通过珠摩擦(bead beating)实现破坏或裂解。该珠可与本文所述捕获珠相同或不同。在一些实施方式中,用于裂解和/或捕获的珠的不同特性,如磁性与非磁性、不同密度等可用于分离各种类型的珠,以简化下游加工或分析。在一些实施方式中,可采用流过、行波、珠摩擦装置10(图5)。例如,如图5所示,当极片被旋转时,旋转的磁性极片20产生磁波下(magnetic wave down)流过管30。该旋转可以高达约100Hz,并可使珠产生足够的加速通过相邻的管,以破碎流过该管的芽孢和其它类型的靶分析物。在一些实施方式中,珠具有多种形状以有利于裂解。

[0090] 为了评价破坏或裂解,可用活力损失与时间确定所需的动力设定、接触时间、体积和几何形状;本领域技术人员能够设定这些参数。在一些实施方式中,可用所选样品测试TaqMan测定中DNA或RNA的释放。可针对芽孢和正在剪切的大分子来优化破坏,以降低其粘度和截面积,而不使它们不适合下游加工或分析。在一些实施方式中,可使裂解物通过孔径大小至少约为 $10\mu\text{m}$,甚至至少约为 $20\mu\text{m}$ 、 $30\mu\text{m}$ 或更大的滤膜,以去除可能堵塞微流体装置的微通道的凝块。

[0091] 在一些实施方式中,破坏或裂解的材料可用作芯片上或芯片外进一步纯化的给

料。例如,为了测定核酸,在具有选择性寡核苷酸的珠上进行核酸杂交这一纯化步骤可纯化背景中的靶序列。对蛋白质而言,捕获到固体表面如疏水性、羧化或其它化学物质上可非特异性纯化一类蛋白质,而亲和捕获可在需要时提供增强的特异性。相似地,可进行多步骤纯化,其中采用芯片上和芯片外的混合和匹配,以及基于珠的基质和其它基质(如果需要)。

[0092] 在一些实施方式中,可在引入微芯片后进行裂解。在这种实施方式中,微芯片接受含有待裂解细胞的样品。

[0093] 3. 核酸纯化模块

[0094] 在一些实施方式中,本发明系统可包括核酸纯化模块(NAPM)。可设计NAPM,使其接受其它物理形式的溶液或样品,如一种或多种珠、胶体、多相(非均相或异相)溶液或其它组合物。在一些实施方式中,可设计NAP,使其接受裂解模块的输入。NAPM接受的体积范围可以从毫升至皮升以下。在一些实施方式中,NAP输出物可输送至BPM微芯片或其它微流体装置,进行进一步加工或分析。

[0095] 可使各种化学物质适合NAPM使用。在各种示范性实施方式中,可设计NAPM,以用各种方法进行总核酸纯化,如用离液剂通过表面吸附/解吸纯化;通过(例如)电泳捕获到含有寡核苷酸的凝胶上进行选择性核酸纯化;或通过杂交到含有寡核苷酸的珠上进行选择性核酸纯化。NAPM的一个例子见图7。

[0096] a) 总核酸纯化

[0097] 可采用非特异性捕获法纯化样品中的总核酸,该方法采用离液剂将溶液中的核酸压到表面上。例如,美国专利号6,489,112描述了定量纳米级“模板捕获”法,它采用离液剂如硫氰酸盐或胍盐将核酸压到二氧化硅毛细管的表面上。洗涤后,将浓缩和纯化的核酸洗脱到缓冲液中,进行纳米级样品加工或分析,如循环测序。也可用该方法纯化裂解物中的核酸。

[0098] 在一些实施方式中,可在玻璃珠或其它合适表面,如通道壁的存在下将输入样品与离液剂混合。离液剂使核酸离开溶液,使它们吸附于玻璃珠或其它表面。离液剂也使样品中可能存在的核酸酶失活,从而基本抑制核酸降解。孵育期后,可通过(例如)真空吸引去除离液剂中溶解的细胞碎片、变性蛋白质和其它组分,并将它们丢弃到废液流中。可进一步洗涤纯化的样品,以去除其它污染物,可将核酸洗脱到缓冲液中进行回收并引入微芯片或其它流体系统。

[0099] 在一些实施方式中,核酸纯化条件包括5M硫氰酸钠,95℃90秒变性,30℃5分钟结合于表面(如玻璃珠),80%EtOH2秒。在一些实施方式中,可用几种不同的离液剂和洗脱回收化学物质将核酸纯化到改性珠,如SPRI羧化珠上。

[0100] b) 选择性核酸纯化

[0101] 在一些实施方式中,可通过芯片外杂交于寡核苷酸捕获序列选择性纯化靶核酸。

[0102] 在一些实施方式中,可通过电泳、动水压力、离心或其它力将样品移动到固定或可移动的基质上,所述基质包括未改性珠、改性珠、可更换的亲和捕获凝胶、整体料、胶体、两相溶液和其它材料。在各种示范性实施方式中,基质可以是未改性的,并根据材料的表面特性结合于靶核酸,可改性基质以增加或阻滞样品组分的结合,或者基质可附着有与靶序列互补的寡核苷酸序列、结合抗体或其它亲和捕获材料。在一些实施方式中,寡核苷酸上的生物素标记可与靶DNA杂交。珠上的链霉抗生素蛋白部分可结合于生物素,以纯化所需的靶

核酸。

[0103] 例如,可将包含靶核酸的样品施加于结合有与靶核酸互补的寡核苷酸序列的珠。可用低离子强度的缓冲液洗涤结合的靶核酸以去除盐、污染物和错配片段,可通过加热和电压洗脱纳升体积的靶核酸。在一些实施方式中,亲和捕获可以是一种快速(≤ 7 分钟)和高效率(循环测序产物 $\geq 90\%$)的方法。可调节该方法的规模,使其适应芯片外构造。输出体积可约为 10nL-1mL,这取决于物理构造。

[0104] 在一些实施方式中,也可用上述组合物和方法去除可测定蛋白质、脂质、糖或非关联核酸的样品中的核酸。

[0105] 4. 将珠或溶液引入微芯片

[0106] 可直接或在(例如)本文所述的捕获和核酸纯化加工后将样品引入各种微流体装置或其它流体系统。在一些实施方式中,可将小体积,如微升或纳升体积的来自亲和捕获步骤的珠引入微芯片。可用(如)注射器泵或移液装置将珠泵入微芯片上的储存库,可用微芯片上的泵将珠移动到微芯片的一个部分中,在该部分可捕获或保留珠。

[0107] 在一些实施方式中,单个珠可在微芯片上移动,以进行加工或分析,如 DNA 测序、单分子分析、蛋白质的 MS 分析,包括基质辅助激光解吸/电离(MALDI)扫描和肽指纹分析。在微芯片上可用(例如)流式细胞技术将单个珠导向单独小室。或者,可用随机分配法将单个珠放入小室,在这种方法中,平均来说,预计每个小室仅有一个珠到达。

[0108] 在一些实施方式中,可在各种类型的流体系统(如分批模式)或流过系统,或其组合中进一步加工样品。系统可基于微芯片、毛细管、管道、孔或其它容器和微流体装置。可通过生化方法或化学方法加工引入的样品以分离组分、标记组分,或在微芯片上进行分析,或准备用于下游分析。

[0109] 5. BPM

[0110] BPM 一般包括可由下述设备和可编程软件任选地操作的一个或多个微流体装置。在一些实施方式中,微流体装置可以是筒中装配的微芯片、纳米芯片或皮米芯片,该装置能输入 SCPM 的样品、指导流体线路和反应室之间的液体路由、加入试剂和进行各种靶分析物(如核酸和毒素)的测定。在一些实施方式中,各种类型的芯片可在单独的生物处理器模块中加工样品,其中采用 MOV 阀、泵和路由选择器作为系统控制零件,从而控制反应时间和顺序。在一些实施方式中,本文所述芯片可与 SCPM 集成。

[0111] a) 微型机器人控制的芯片上的阀和泵(MOV™)技术

[0112] MOV 微型阀、微型泵和微型路由选择器组合了两个玻璃微流体层、可形变的膜层和气动层,可形变的膜层如聚二甲基硅氧烷(PDMS),它能打开和关闭阀,气动层能使膜变形并起该阀。上层玻璃层中蚀刻的流体通道(图 9)不连续,产生用作阀座的通孔。PDMS 膜 40 安置在阀座上,通常关闭两个通孔之间的流体通路。在 PDMS 膜 40 反面,蚀刻形成的气动移位室连接于全尺寸(full scale)真空或压力源。通过控制小型化的芯片外电磁阀,可将真空或压力(约半个大气压)施加于 PDMS 膜 40,以通过弹性膜的简单变形打开 50 或关闭 60 该阀。

[0113] 可通过协调三个阀 70、80、90 的操作制备自吸性 MOV 泵(图 10),它可产生双向流动。可通过安排操作顺序、横隔板大小、改变通道宽度或其它芯片上的尺寸实现各种流速。可用这些阀和泵类似地形成路由选择器(图 11)。可用三个或多个阀形成路由选择器,这些

阀各自位于连接于中央横隔板阀 100 的分离通道 110、120。通过启动合适的阀组合,可将通道之一的液体抽入中央横隔板阀并排入不同通道,从而指导液体的路由。也可产生总线(bus)结构。

[0114] 可在一种制造方法中用一层 PDMS 膜同时产生 MOV 阀和泵,即在芯片上产生 5 个 MOV 泵的成本与产生 500 个的成本相同。因此,本文所述内容提供了在芯片上产生复杂的微米、纳米、皮米流体线路的方法,并且,事实上能够在芯片上进行任何反应或测定。通常,此技术可能至少对溶液离子强度和表面污染的变化基本不敏感,并且不需要施加电场。

[0115] b) 微流体装置

[0116] 图 31 显示了可用于核酸分析的一个生物处理器模块的例子。在这个设计中,可将结合有来自 IMS 和核酸纯化的纯化核酸的捕获珠输入下方通道 350。芯片上的 MOV 泵 351 将该珠移动到闸板 352,在此处可通过局部加热释放核酸并将核酸泵入 μ RT-PCR 室 353 作为实时 PCR 试剂,可通过试剂输入加入内标。环绕该室的阀关闭以进行热循环。

[0117] 图 32 显示了采用图 31 的设计在 6"微芯片上设计 48 个单元的例子。在一些实施方式中,可将 96 个或更多单元辐射状地布置在 6"芯片上。在一些实施方式中,可将 384 个分离通道布置在 8"芯片上。如果通道仅重复使用约 3 次,那么 96 通道微芯片可操作约 30 天。在一些实施方式中,可将 240 个单元辐射状地布置在 12"微芯片上,这取决于最终规格的要求、所测试的靶分析物的数量和多路程度。

[0118] 在一些实施方式中,各种芯片可包括钻出的通孔,这些通孔形成的阀室就是可用于(例如)RT-PCR 的反应室(图 29)。采用厚 3mm 的钻孔晶片和 300 μ m 直径的(dia) 钻孔机,可产生 212nL 小室,沿长轴(而非横穿通道)的检测通路长度为 3mm。在一些实施方式中,这些小室可具有出色的表面积体积比。在一些实施方式中,较大体积可具有较好的表面积体积比和较长的通路长度。通常,可以横穿通道在芯片上进行检测,其通路长度等于通道深度,约为 30 μ m;相似地,在毛细管系统中,通路长度约为 50-200 μ m。通过这种简单设计,出色的体积表面积比和约长 100 倍的通路长度分别有利于样品制备生物化学(通过较高的体积表面积比)和荧光检测。相同的检测设计可用于检测毒素。

[0119] 在一些实施方式中,各种芯片可采用 MOV 路由选择器并加入试剂如含有内标的 PCR 主混合物(master mix)将输入样品分为合适数量的反应(取决于所实现的多路程度)。如图 33 所示,可用输入 MOV 路由选择器将法医储存和再测试样品分成等份,然后可选择来自阳性实时 PCR 反应的样品进行 μ CAE。图 33 说明在一些实施方式中,各生物处理器单元或反应中不需要 μ CAE 通道。在一些实施方式中,整个 6"微芯片上可采用 2-4 条 μ CAE 通道,因为它们可用于验证并可深度嵌套以连接几十个实时 PCR 小室和其它类型的试验小室(如毒素试验小室)。

[0120] 图 25 说明用于生物防卫应用的微芯片的例子,它设计为一次性筒和操作该微芯片进行病原体的样品制备的平台。该芯片包括 MOV 阀、泵和反应室,注射试剂的样品端口,以及与上游浓缩模块和下游分析模块接口相连的进口和出口。图 17 说明采用圆形基材的微芯片,该圆形基材上辐射状布置了 12 个生物处理器单元。在一些实施方式中,一次可使用一个单元,在各使用之间可旋转该微芯片。或者,可采用基材几何形状不同并且流体设计不同的实施方式。

[0121] 含有流体系统的生物处理器模块(在本实施例中在微芯片上)可接受上游 SCPM

的样品,产生用于储存和再测试的等份,在芯片上裂解样品,制备和标记样品,以及将它们输出至检测器进行分析。在本实施例中,BPM 包括含有流体系统的微芯片筒和操作筒的设备。该筒可以是“CD”形式,每个筒的扇区中具有 12 个生物处理器单元,各单元用于一种样品或多种样品(图 17)。例如,该筒可加工一种样品,然后旋转以接受下一个样品。该筒可适合于不同取样方案并按需改变。在一些实施方式中,可将筒组储存于类似于 CD 交换器的小圆盘传送带中。该设备可提供某些机构来储存、加载试剂、运行和换筒,以及控制该过程。

[0122] 在一些实施方式中,可采用纳米生物处理器筒,设计该筒的目的是用筒上装配的 MOV 阀和泵作为控制元件的纳米流体系统加工样品。MOV 阀通常是关闭的、高低不平的(rugged)、容易制造的、可在密集阵列中操作的并具有低死体积。可按照 Grover 等(2003),Sensors and Actuators B89 :315-323 的设计,通过组合玻璃层与作为可变形膜的聚二甲基硅烷(PDMS)层来制备阀。

[0123] 在一些实施方式中,可通过组合图 9 所示阀中的三种阀制备自吸泵(图 10)。中央横隔板阀可大于用于控制流向的侧阀。此外,中央阀可用作反应室或混合器;PDMS 的变形可高达 2mm,产生可容纳多至几百微升或少至几十纳升的反应室(Grover 等(2003),Sensors and Actuators B89 :315-323)。这些小室可动态扩展和收缩。

[0124] 在本发明中,MOV 阀和泵可组合为处理器,以制备和加工微升和纳升级的样品。

[0125] 在本发明中,可改变通孔大小,以在通孔中产生反应室。通过组合通孔宽度和通孔通过的晶片厚度的变化,可形成各种范围的小室。除了用作反应室以外,通孔也可用于增加用于光学检测和其它检测的通路长度。例如,图 29 显示了微芯片 230,其中通孔 231 用于进行实时 PCR 并用作检测室。也可用内反射物质涂覆通孔或晶片基材以增强检测。

[0126] 6. 应用、设备和软件

[0127] 在一些实施方式中,微芯片可装在真空吸盘的固定位置中。微芯片接口装置可连接于微芯片,以提供外部控制元件,包括外部气动元件、热循环温度控制元件、温度控制和试剂引入线。

[0128] 图 16 显示了设计用外部操纵的 MOV 阀和泵控制流动的微芯片筒的实施方式,其中较大的中央横隔板阀也用作反应室。该筒含有三条进行生物处理的主通道 160-162、储存区 170 和储存库 180。这些通道之一可用于加工基于 DNA 的分析所用的样品,第二条和第三条通道分别用于加工免疫测定分析所用的毒素和颗粒。图 16 所示设计是许多可能设计之一,该设计与用于生物防卫应用的下游单分子检测器接口相连。

[0129] 在一些实施方式中,该筒可如下所述地运行。加入内标后,芯片外样品浓缩器将 100 μ l 样品递送至筒上的输入储存库 190。用标为“A”的路由选择器 200 将 7 份未处理的 10 μ l 等份从储存库泵入筒上的储存室(保持 4°C)。这些等份中三份用于再测试 180,如果分析样品测试为阳性,可进行验证;如果再测试确认了初始阳性检测结果,那么将另外 4 等份 170 用于进行后续补救(retrieval)和法医学分析。通过外部冷却器如 TEC Peltier 冷却器将所有等份冷却储存在筒上;如果需要,可干燥储存于这些储存库中。筒使用后,将使用过的筒储存于冷藏的小圆盘传送带中。

[0130] 然后,形成和加工立即加工的等份。通过路由选择器 A200 将 10 μ l 试验等份移动到生物处理通道 2161-室 D 163,进行免疫标记以检测毒素,如下所述。通过路由选择器 A 120 将第二个 10 μ l 试验等份移动到生物处理通道 3160-室 E164,进行免疫标记以检测完

整的细菌或病毒颗粒,如下所述。然后,从上面盖上输入储存库,用通过筒底部偶联的外部超声器杆超声处理其余样品。产生的超声波能破坏植物细胞、芽孢和病毒,并剪切DNA,从而降低粘度以改进杂交动力学和流动特性。通过路由选择器 A 200 将裂解的样品移动到生物处理通道 1162-室 C165,与标记探针杂交以进行 DNA 分析。

[0131] 三条通道的生物处理可同时进行。可能需要能降解 RNA、蛋白质和脂质的样品消化步骤来降低基于 DNA 的单分子检测样品的背景,并降低下游检测器的需要。如果进行这种加工(如单分子检测中),那么在 DNA 分析样品中可加入缓冲液配制的 RNA 酶、蛋白酶和脂酶的混合物,以降解非 DNA 物质。可通过将储存库 B 的物质泵入含有样品的小室 C 实现加入。如果需要,可将样品和消化试剂在相邻小室之间来回抽吸以混合。可标记小室 C 中的等份,以通过与储存库 F 的 DNA 探针杂交进行 DNA 分析。可将杂交探针或抗体探针冷藏于试剂筒中,并在使用单个生物处理器单元之前才用外部泵加入筒。可用筒上的泵将探针泵入小室,以混合试剂。再一次,如果需要,可将样品和试剂在探针室和反应室 C 之间来回抽吸以进一步混合。该设备的小室下面可装有加热元件。在杂交中,可以关闭侧阀,将小室加热到 95℃ 以使 DNA 变性,然后冷却到杂交优化条件以使 DNA 探针与存在的任何目标物杂交。这些阀的密封足以使得能够在这些小室中进行 PCR,因此,可基本上避免蒸发。

[0132] 上述 BPM 可应用于任何基于 PCR 的测定,如单一或多重 PCR、可变数量的串联重复(VNTR)、多基因座 VNTR 分析(MLVA)或其它测定。可用合适的 PCR 引物和外部热源循环取代杂交探针。可用限制性消化取代消化步骤,以实现扩增片段长度多态性(AFLP)。在毒素检测中,小室 D 中的等份可与储存库 G 的毒素的抗体探针混合,而在颗粒检测中,小室 E 中的等份可与储存库 H 的微生物表面被膜(coat)的抗体探针混合,样品维持于 37℃。

[0133] 标记后,可将生物处理过的样品泵入三个外部储存库中,在储存库中可通过吸出获得这些样品用于检测器分析。或者,可用变化形式的微芯片进行毛细管电泳或光学检测。

[0134] 如果检测器仅检测到内标,那么可旋转该筒并准备下一个生物处理器单元。如果样品测试为阳性,则不旋转生物处理器单元,取而代之的是由再测试冲洗库冲洗并加载新鲜试剂。可通过路由选择器将储存用于再测试的三种样品泵回,一种直接泵入小室 D 进行毒性检测,第二种泵入小室 C 进行颗粒检测,第三种泵入输入储存库进行超声处理和 DNA 分析。可如上所述加工再测试样品,并输出至检测器,作为可能的假定阳性检测事件进行验证。

[0135] 作为外部设备的微芯片接口装置可包括操作微芯片的设备。可开发一种微芯片,其中微芯片筒装在真空吸盘顶端,微芯片接口装置与微芯片连接,其具有气动部件、加热部件和冷却部件、以及注射器泵以将试剂移动到储存室中。计算机控制的微芯片接口装置可控制电磁阀,以开放和关闭外部全部的(full scale)阀,从而控制微芯片阀并通过泵吸移动微芯片上的样品。

[0136] 微芯片接口装置可包括加热器,例如电阻加热器,如镍铬合金、Peltier 加热器、基于空气的加热器、红外加热器或本领域技术人员熟知的其它实施方式,还可包括热电偶或其它温度测定装置,以及相连的控制电路和软件,以控制微芯片的某个区域的温度和加热及冷却速率。冷却可以是辐射冷却、风扇主动冷却、Peltier 冷却、水冷或本领域技术人员熟知的其它方法。也可通过加热真空吸盘设定整个芯片的温度。

[0137] 可控制注射器泵以将试剂递送至安装的微芯片上的储存库,或者含有试剂的加压

室可具有打开以允许试剂流过小管进入微芯片上的储存库的阀。在一些实施方式中,可采用重力流。在一些实施方式中,利用电力移动试剂、利用磁力递送附着于珠或颗粒的试剂也属于本发明范围。可用 Laboratory Rapid Automation Toolkit 软件或其它软件控制所有上述硬件和 NanoPrep 软件。

[0138] Laboratory Rapid Automation Toolkit(LabRAT™) 软件平台 500(图 26) 是设备软件开发包,它能够快速产生强大的商业级软件平台来驱动设备和使工艺自动化。LabRAT 定义了一组通信和控制协议 501-503,它具有标准化的自动化体系结构和架构,它比任何现有的商业软件平台更简单、更灵活、更有效率。LabRAT 架构基于一组可跨越多种操作系统、开发语言和通信媒介 504 的核心技术。

[0139] LabRAT 自动化体系结构的中心是基于 XML-RPC(可扩展置标语言-远程过程调用)的设备通信和控制接口协议,它是 SOAP(简单对象访问协议)标准的核心。XML-RPC 是进程间通信的出色机制:它简单、快速、强大、几乎在每一种现有软件开发系统中都有广泛应用性、在 TCP/IP 和 HTTP 上操作、并且易于实现。XML-RPC 作为非常高水平的“中间机制(meta-mechanism)”操作,并可将不同部件连接在一起成为紧密排列的设备系统。除了核心通信和命令协议以外,也定义和实现一组适合实验室设备的接口,以在部件之间交换“实验室服务”。

[0140] 已经使 LabRAT 或类似软件适合控制微芯片接口装置。一旦单个部件的驱动程序被覆盖(wrapped),现有的 LabRAT 软件为所有层提供功能。控制局部热循环的 NanoPrep 热循环仪软件已经合并到 LabRAT 中。气动电磁阀、注射器泵和其它元件(包括检测器)也可由 LabRAT 软件控制。此外,可通过 LabRAT 脚本命令协调不同硬件部件的相互作用。

[0141] 在一些实施方式中,可控制以下三种硬件装置:1) 加热和热循环,2) 芯片上的阀和泵(气动操作),和 3) 用于递送试剂的注射器泵。可用直接位于反应室下并由现有的 NanoPrep 软件和硬件控制的镍铬合金加热线圈实现热循环。MiniPrep Cartesian 机器人(Tecan)可用于驱动“智能 I/O”板(Tecan),以操作控制芯片上微型机器人控制的阀和泵的多达 32ttl 的输出线,以及用于在微芯片上加载或卸载样品的全部(full scale)机器人;LabRAT CAN 接口也可操作高精度注射器泵,以将流体分配到芯片中。

[0142] 智能 I/O 板可驱动 Crydom 固态继电器模块(每条线一个,MODC-5SSR 模块(DigiKey #CC1226-ND)和 MS-4 4-Pos 安装板(DigiKey #CC1230-ND)),它进而可操作 24V DC 电磁阀(ARO, P251SS-024-0)。这些阀是三通的直接驱动单元,一个是通用端口,另外两个端口通常一个开放一个关闭(分别连接于真空和加压空气线)。该电磁阀控制所有(full-scale)8 条真空和压力线,它们将通过 8 条多支管(微芯片上的 M1-M8)进行操作。控制软件可连续操作这些电磁阀,以产生驱动芯片上通道内的流体的泵吸作用。机器人控制软件可以是 LabRAT 软件控制下的 Express 脚本引擎(Tecan)执行的 ASCII 编码脚本形式。现有 LabRAT 软件提供了用先进的基于 XML-RPC 的架构操作设备的完整功能。

[0143] 可将操作微芯片的硬件开发为独立的设备或与现有设备组合。例如,可用 TecanMiniPrep 设备按需在芯片上或芯片外吸取溶液,用 Tecan 智能 I/O 卡控制硬件,进而控制 MOV 阀和泵。

[0144] 图 27 显示了将 MiniPrep 机器人和微芯片联用的系统的正视图。该平台的前景(foreground)(右)是铝合金真空吸盘。该吸盘具有电阻加热元件,它嵌入能够全局加热

该芯片的“三明治型”结构中。在最左端黑色图片的顶部可见温度控制器。从该吸盘的左侧,驱动芯片上的阀和泵的 8 条真空线通过管道连接于安装在 Tecan 面板之一的背面的真空支管(此照片中不可见)。该平台的左侧是用于将“储存库”试剂分配到芯片上的注射器泵(连接有注射器)。

[0145] 图 28 显示了含有许多安装部件的 MiniPrep 的内侧(去除背面板之后),所述安装部件包括温度控制器、8 个 24V DC 电磁阀和继电器。空气泵和智能 I/O 板也安装在 MiniPrep 内侧,但不可见。

[0146] 可设计本文所述生物处理器筒使其用微流体筒上阀和泵作为控制元件加工样品。可设计该筒,以用这些外部驱动的阀和泵控制流动,较大的中央横隔板阀也用作反应室。图 15 显示了筒上 12 个相同的生物处理器单元 200 中的一个。各单元输入样品并制备三种经生物处理的输出样品 201-203:1) 用 DNA 杂交标记进行 DNA 分析,2) 用免疫标记进行毒素分析,和 3) 用免疫标记进行颗粒分析。此外,各单元可具有用于试剂加入 204、混合和反应 205 以及储存再测试样品 206 的区域。

[0147] 在一些实施方式中,加入内标后,可用空气取样器将 1mL 样品递送入筒上的输入储存库 207。输入储存库可带有粗滤器,加入它的目的是去除可能阻塞通道的“大颗粒”。可将未处理的 700 μ L 等份从输入储存库泵入标为“A”的小室 208 中,然后进入维持在 4°C 的筒上储存室 206。储存样品可用于:1) 再测试,以及如果分析样品测试为阳性,可能用于验证和 2) 如果再测试确认了初始阳性检测结果,则用于后续补救和法医学分析。可用外部冷却器如 TEC Peltier 冷却器冷藏筒上的储存样品;如果需要,可将稳定试剂干燥储存于这些储存库中。筒使用后,将使用过的筒储存于冷藏的小圆盘传送带中。

[0148] 在一些实施方式中,可形成和加工用于立即加工的 3 等份 DNA、毒素和颗粒。首先,可将用于毒素标记的 100 μ L 试验等份泵入小室 A 208,并可泵入用于免疫标记和检测毒素的试剂。如果需要,可将样品来回泵吸至小室 B 209 以混合样品和试剂。可将样品泵入输出储存库 201-203,进行孵育并转移至检测器。可将第二个 100 μ L 试验等份移入小室 A 208,进行免疫标记以检测完整的细菌或病毒颗粒。可将微生物或病毒表面被膜的抗体探针泵入小室 A 208,可将样品维持在 37°C。抗体探针可以是随后可用检测器区分的抗体的复杂混合物。标记后,可将生物处理的颗粒样品泵入储存库,以通过吸引将样品引入毛细管进行检测器分析。

[0149] 在 DNA 样品制备中,为毒素和颗粒检测加工这些等份和样品后,可从上面盖上输入储存库,用通过筒底部偶联的外部超声器杆超声处理其余样品。产生的超声波能破坏植物细胞、芽孢和病毒,并剪切 DNA,从而降低粘度以改进杂交动力学和流动特性。可将裂解样品从试剂输入 204 移动到小室 A 208 中与标记探针杂交,以进行 DNA 分析。为了杂交,该设备的小室 A 208 下面可装有加热元件。可关闭侧阀,将小室加热到 95°C 以变性 DNA,然后冷却到最优温度以使 DNA 探针与存在的任何目标物杂交。这些阀的密封足以使得能够在这些小室中进行 PCR,因此,可基本上避免蒸发。

[0150] 可能需要降解 RNA、蛋白质和脂质的样品消化步骤来降低基于 DNA 的检测样品的背景和降低下游检测器的需要。如果需要这种加工,那么从试剂输入 208 加入的 DNA 分析样品的缓冲液中可含有 RNA 酶、蛋白酶和脂酶的混合物,以降解非 DNA 物质。可通过将材料泵入含有样品的小室 A 208 实现加入。如果需要,可将样品和消化试剂在相邻小室 A 208

和 B 209 之间来回抽吸以混合。如果需要消化,可标记小室 A 208 中消化的等份通过以与本文所述 DNA 探针杂交进行 DNA 分析。

[0151] 杂交探针或抗体探针可冷藏于试剂筒中,并在单个生物处理器单元临用前用外部泵加入筒中。可用筒上的泵将该探针泵入小室以与试剂混合。再一次,如果需要,可将样品和试剂在小室 A 和 B 之间来回抽吸以进一步混合。未来的设备可含有预加载到生物处理器筒中的试剂。

[0152] 在一些实施方式中,如果检测器仅检测到加入的内标,那么可旋转该筒并准备下一个生物处理器单元。如果样品测试为阳性,则不旋转该生物处理器单元,取而代之的是用来自试剂输入(装置)的缓冲液冲洗。可将 100 μ L 储存样品泵回到小室 A 中从测试阳性的方法开始进行再测试。可如上所述加工再测试样品,并输出至检测器作为可能的假定阳性检测事件进行验证。LabRAT™ 软件可用于控制注射器泵、小室 A 的热循环加热元件和用于操作芯片上阀的所有(full scale)电磁阀。

[0153] 可根据全体积或宏观体积结果单独优化杂交和抗体结合的化学。根据筒形式和在采用掺入(spiked)空气样品的重组实验中测试的一系列输入微生物的影响再优化反应物浓度、反应事件和温度。本领域技术人员能够确定试剂的贮存条件。所有试剂可储存于 4°C 的试剂筒中;可加入其它稳定剂如渗透压保护剂(osmoprotectant)(海藻糖、甘氨酸甜菜碱)或其它物质以延长保存期限。

[0154] 在一些实施方式中,进行混合的方案可以是,布置两条液流使其在通道中混合,其中薄层蚀刻面上,一条在另一条的上方。液流之间的短路径增强了混合。另选的混合方案可利用珠(如磁珠)存在于反应室或加入它们以通过磁性操作该珠破坏层流。在一些实施方式中,这可将一条液流中的靶分析物压入“另一”液流,可用于启动处理或分析反应。在一些实施方式中,如果需要可用闸板捕获珠。在一些实施方式中,在使用后可冲洗出珠使其进入废液。

[0155] 试剂稳定可能是所述系统的各种实施方式如野外装置的主要问题。因此,在一些实施方式中,试剂储存库可用 Peltiers 冷却至 4°C 进行温度控制。在一些实施方式中,可用 Ready-To-Go™ 化学方法或采用渗透压保护剂如海藻糖或甘氨酸甜菜碱的其它冻干方法稳定试剂,然后在用前再水化。再水化构思可以是每天或每周取出密封可破坏的安瓿中稳定试剂的等份。可将水或缓冲液泵入该设备中的安瓿以将稳定的试剂水化提供每天或每周的工作母液。可将工作母液移动入注射器泵或直接加载到生物处理器中,这取决于稳定性。

[0156] a) 微珠集成 DNA 测序(MINDS)系统。

[0157] 在一些实施方式中,MINDS 系统可通过自动化、无人操作地制备和分析 Sanger 样品而超低成本制备和分析测序样品。可在珠上从剪切的染色体或 BAC DNA 开始用大量乳剂 PCR 反应制备测序模板,各珠携带衍生自一种 DNA 片段的 DNA。分选去除无片段的珠后,可将单个珠递送至整合到带净化和 μ CAE 分析的 400 通道微芯片上的小体积(如 25nL)循环测序反应室中。在一些实施方式中,可通过闸板捕获珠,可进行正向和逆向成对末端阅读的循环测序,将产物电泳入双样品净化室,其中含有亲和凝胶捕获基质以进行正向或反向阅读。可洗涤亲和凝胶以去除离子和未结合的核苷酸。可通过提高温度来洗脱亲和凝胶中纯化的循环测序片段,然后注射入折叠的 CE 通道进行电泳分析。此方法可使试剂体积和成本降低几个数量级,部分因为它可以接近分子数量的基本限制的规模进行测序。

[0158] 在一些实施方式中,集成的 MINDS 系统可使鸟枪测序、定向测序和再测序的所有过程自动化和小型化。MINDS 系统可产生基于微珠的荧光 DNA μ CAE 测序仪,其运行成本比维持现有测序设备的成本低 100 倍或更多。各系统可进行无人操作的完全自动化的测序长达一周,用小型机器人控制的微流体装置取代大型 (full-scale) 机器人。

[0159] MINDS 系统可以分模块执行,然后集成在一起。在一些实施方式中,可采用基于 200nL 循环测序微芯片的模块。将基于先进的旋转 LIF 扫描器的 DNA 分析模块构建为用于 MINDS 系统的平台模块,其中装有 μ CAE 微芯片,该芯片可在注射入采用先进基质的电泳通道对之前用双亲和捕获室净化成对末端阅读样品。可通过 MOV 阀和泵操作这 5 层微芯片,“实现”(servicing) 微流体操作。循环测序模块可组合在芯片上,产生整合 100nL 循环测序、样品净化和分离的核心 MINDS 芯片。在一些实施方式中,制备 25nL 样品的完整 MINDS 芯片可输入微珠库,并获得输出序列信息。

[0160] b) 循环测序模块

[0161] 微流体循环测序模块 (CSM) 可用作 MINDS 系统中的独立功能,也可用作基于微芯片的样品制备的模块。CSM 可包括:1) 含有样品制备微流体装置的微芯片,芯片上装有阀和泵以控制流动,和 2) 外部接口,以通过芯片上的阀和泵操作微芯片。样品制备 CSM 可以是循环测序体积为 200nL 的 16 条通道,用毛细管 (CAE) 和微芯片 (μ CAE) 进行芯片外分析。在一些实施方式中,可将具有外部流体接口、加热和气动装置的微芯片接口装置 (MID) 的规模改变到 400 条或更多条通道。

[0162] 在一些实施方式中,可采用芯片上装有阀和泵的 16 通道的 200nL 循环测序样品制备微芯片装置。图 14 中示意性地显示了简化的微芯片筒的两条通道。标为“输入”260 和“输出”261 的储存库主要是可连接于微流体通道的微芯片 262 的上层中的孔洞。该装置可接纳微量滴定板上的输入 DNA 样品 (PCR、质粒或其它模板),以 200nL 体积进行循环测序,并将荧光标记的循环测序产物输出到准备用于样品净化和注射到 CAE 设备或 μ CAE 分析的微量滴定板中。可通过微芯片接口装置操作微芯片,该接口装置是由 LabRAT™ 软件驱动的。CSM 微芯片接口装置可为以下过程提供机械力:1) 开放和关闭芯片上的阀,2) 操作芯片上的泵,3) 测定从储存(装置转移)到微芯片上的循环测序试剂,4) 控制加热和冷却以进行循环测序,和 5) 用缓冲液和洗涤溶液再生芯片。微芯片和 MID 可安装在可进行流体转移的 Tecan MiniPrep 流体处理机器人的平板上。

[0163] 在一些实施方式中,可如下操作 200nL CSM 微芯片。可用 Tecan MiniPrep 机器人将样品从微量滴定板加载到输入 260 储存库的孔中。通过驱动芯片上泵的真空/压力线的外部传动控制泵吸,从而将 MOV 芯片上的泵 264 可将等份移动到反应室中,如图 9-10 所述。可通过芯片上的泵吸循环测序混合物 265 (CS 混合物,图 14),以将染料终止物循环测序主混合物分配到反应室 263 中。在计算机控制下,MID 密封了环绕各反应室 263 的三个阀,并对反应混合物进行热循环。完成后,可通过筒上的泵将 200nL 样品泵入含有 5 μ L 水的输出储存库 261。可用 Tecan 将稀释的样品移动到微量滴定板中的 35 μ L 醇中,以进行随后的芯片外后处理和分析。在一些实施方式中,可将样品移动到双亲和捕获室进行净化和分析。可用缓冲液冲洗 CSM 筒,以去除残留的 DNA 模板,再加载新样品,再次开始该过程。循环测序可耐受的来自前一反应的模板污染大于 5%;因此冲洗该反应室可再生微芯片。在一些实施方式中,各微芯片可重复用于几百个反应。

[0164] c) CSM 设备。

[0165] 操作 CSM 的设备特征可包括：1) 使芯片上的微型机器人的外部传动的自动化，该机器人能控制基于 CSM 微芯片的筒中的液体移动，2) 控制外部加热和冷却以进行热循环，3) 驱动注射器泵以将循环测序试剂递送至芯片和 4) 控制 Tecan MiniPrep 机器人以将样品从微量滴定板移动到输入储存库中，并从微芯片输出储存库取出制备的循环测序样品放入微量滴定板中。可通过 LabRAT 软件控制所有这四个元件。

[0166] 热循环可采用外部来源进行加热和冷却以简化微芯片制造，并降低操作成本。一些实施方式采用一组电阻加热线圈，并用风扇冷却。在一些实施方式中，例如采用置于微芯片顶端的装有热电偶传感器的镍铬合金加热器，其加热速率可达到 30℃ / 秒以上。在一些实施方式中，可在 400 条通道的水平可重复和可靠地操作加热器，无需监测每条通道。在一些实施方式中，当将样品制备和分析集成在一起时，可封闭冷却空气以防止其改变微芯片其它部分的温度。在一些实施方式中，可使用条状高效 Peltier 效果热泵以快速循环反应室的温度。这些各种方法可采用 LabRAT™ 控制下的现有 NanoPrep 热循环软件。

[0167] 由 Peltier 热泵保持冷却的注射器泵可用于将循环测序试剂递送至微芯片上的 CS 储存库通道，用芯片上的泵分配试剂来补充该储存库。类似地，可递送和控制水或缓冲液以再生微芯片。在一些实施方式中，注射器泵的全步 (full step) 长可以是 1nL，它可由 LabRAT™ 软件控制。在一些实施方式中，可能采用根据简单重力流动的溶液来补充储存库；在软件控制下的小阀可调节流动。

[0168] 在一些实施方式中，可以在 Tecan MiniPrep 的平板上实施 CSM。Tecan 可将样品从微量滴定板移动到输入储存库中，并从输出储存库获得最终样品，并将它们移动到微量滴定板。Tecan 能够操作单个注射器泵，其尖头安装在机器人上，X-Y-Z 运动在 CAN 控制下。如上所述，LabRAT 软件可用 Microsoft WSH 控制器控制 CAN 装置。将液体移动到微量滴定板或从微量滴定板移动液体的脚本很简单。采用 Tecan 代替手工移液能够允许 CSM 以完全自动化的模式操作。

[0169] 在一些实施方式中，CSM 可包括芯片上的取样循环顺序以及芯片外 MegaBACE CAE 和 μ CAE 微芯片系统的分析。可基本按照生产商的详细说明书用 DYEnamic™ ET 终止物测序试剂盒 (Amersham) 进行染料 - 终止物测序反应。在一些实施方式中，可对试剂进行 30 个下述循环：95℃ 25 秒，50℃ 10 秒和 60℃ 2 分钟。热循环后，可将样品移动到微芯片输出储存库中，并用气压转移到微量滴定板中 40 μ L 80% 乙醇 (室温) 中。在乙醇后处理中，可以约 2,800RCF 离心样品 45 分钟，通过以 50RCF 反向离心 30 秒去除醇。可将样品悬浮于 10 μ L 双蒸水。

[0170] 对照可包括在微量滴定板中制备的全体积样品以及在毛细管中制备的 500nL 和 200nL NanoPrep 样品。可用 10kV、15 秒注射将样品注射入 96-毛细管 MegaBACE 设备，用 120V/cm 电场强度分离。可用序列分析仪碱基调用 (base-calling) 软件包处理四色电泳图谱，该软件包中含有 Cimarron 3.12 碱基调用程序 (AmershamBiosciences) 和 Phred 碱基调用和所述质量评分产生应用。可将所有阅读长度报道为 Phred20 窗口，它的准确率为 99%。

[0171] 如果需要，可单独优化扩增循环数、反应时间、循环特征以及不同反应物，即引物、聚合酶、dNTP、ddNTP 等的浓度，这属于本领域技术人员能力范围内。例如，可测定耐受

的 DNA 浓度范围,并测定一系列 DNA- 与 - 引物浓度的效能矩阵。起初,样品可以是纯化的 PCR 产物。为 PCR 产物优化 CSM 时,可测试代表非刺激和刺激序列的一系列实际样品(CAE 和 μ CAE 分析),并与具有 CAE 分析结果的全体积样品制备相比较。接受标准可以是与全体积样品制备结果相比的等价数据质量、阅读长度和成功率。对照包括全体积反应和 NanoPrep(500nL 和 200nL 体积)反应。

[0172] 可通过加热器和冷却器设计以及通过改变微芯片设计实现一致结构。可通过添加剂如 BSA 或 PVA 抑制表面相互作用。可用改性的 LPA、PEG 或其它涂层抑制反应室的表面化学。对玻璃而言,另选方法可以是将聚合物如聚醚和氧化多糖与许多表面位点同时多点共价连接,从而延长表面固定的寿命,因为必须水解许多位点来释放聚合物。

[0173] d) 集成的 MINDS 系统

[0174] 在一些实施方式中,完整的 MINDS 系统可包括三个模块珠文库模块、循环测序模块和 DNA 分析模块。在一些实施方式中,完整的 MINDS 系统可分析 400 条通道 MINDS 微芯片上的基于珠的文库,该微芯片在具有超转角(hyperturn)的折叠微通道上集成了 25nL 成对阅读循环测序、成对亲和捕获净化和 μ CAE 分离。MINDS 系统可以是用于鸟枪测序或再测序的完全自动化的系统,这取决于珠文库构建。在一些实施方式中,可集成循环测序模块和 DNA 分析模块,制备的样品如 PCR 或纯化的质粒可用作输入样品。在一些实施方式中,可在微芯片上进行 PCR 或其它扩增。

[0175] DNA 分析模块可包括旋转扫描器(图 30),并可在微芯片上进行成对末端阅读样品净化,然后将样品注射到两条单独的 μ CAE 通道中分离和检测正反向测序反应。检测器可以是能够进行 488nm 激发和四色检测的旋转 LIF 扫描器。为了产生核心 MINDS 系统,可将循环测序模块与 DNA 分析模块设备集成。这种核心系统可集成 100nL 循环测序、成对亲和捕获净化和相同微芯片上的分离。可将含有由 FACS 设备分选的 PCR 片段的珠递送到微芯片中,可将单个珠导入 25nL 循环测序室。

[0176] i) DNA 分析模块

[0177] DNA 分析模块可进行成对末端阅读的样品净化和 μ CAE 以分离和检测各成对末端阅读中的标记 DNA 片段。循环测序可采用各自含有独特的亲和捕获序列的正向和反向引物,插入载体。可将来自全体积、纳米级制备或 CSM 的成对循环测序样品加载到辐射状设计的分析微芯片的储存库中。可通过电动学方法将样品移动到两个样品净化室中,其中含有用于正向或反向阅读的亲和捕获寡核苷酸。可将循环测序样品浓缩到约 20nL 的体积,离子、未掺入的染料、模板、核苷酸和酶通过后进入废液。可通过提高温度释放浓缩和清洁的样品,并将其注射入双 T 注射器,以在充满分离基质的微通道中分离。辐射通道会聚在圆形检测区域上,可在该区域扫描和检测微通道。

[0178] 模块硬件部件包括:1) LIF 旋转扫描器,它可容纳许多不同的微芯片尺寸和设计,2) 微芯片,3) 电泳控制,4) 温度控制,和 5) 微芯片再生。DNA 分析模块可能是完全集成和自动化的 MINDS 系统的一部分。

[0179] 一些实施方式产生了极其灵敏的扫描系统,与现有旋转扫描器相比,其检测性能提高了多达 10 倍。可通过扫描器、微芯片设计和染料化学的小幅提高(1.5-3 倍)相乘,获得此 10 倍提高。对扫描器而言,最佳质量 PMT、二向色元件和镜可提高光效率,并可与装有高数值孔镜的大功率(200mW)小型激光器偶联。可用采用花青供体的较亮的染料提高染料

化学。微芯片的检测区可具有非常深的蚀刻,以用额外通路长度来提高检测和提高锐化条带的分辨率。微芯片夹心结构和小光学元件的反射表面可增强光收集。最后下述直接注射法能够将全部循环测序样品加载到分离的通道中。通过仔细优化各元件,与现有研究方法相比可显著提高检测限值,因为同时降低了强大测序所需的标记片段的用量。

[0180] 旋转扫描器和设备。在一些实施方式中,可采用倒置 (up-looking) 旋转共聚焦激光诱导的荧光扫描器来检测 (interrogate) 辐射状 μ CAE 装置。旋转扫描器包括旋转物镜头,该镜头偶联于四色共聚焦检测单元。旋转扫描的基本优点是提供了高扫描速率,以及高位置准确性和速度一致性。旋转扫描可能与具有少至 1 条-384 条以上通道的 10-、30-cm 或更大直径的晶片上的任何辐射状晶片装置相容。因此,可使芯片设计适合各种应用,如从头测序中的长通道和再测序中的短通道。

[0181] 旋转扫描器的一个例子的示意图见图 30。用双色分束器和镜通过步进电动机的空心轴反射 200mW、488nm 激光 (Sapphire™ OPSL, Coherent, Santa Clara)。在空心轴上方,菱形棱镜将光束从旋转轴处移开 1cm,高数值孔 (> 0.7) 物镜使其通过微芯片的底层聚焦于通道。通过物镜收集荧光,并通过光学系统将荧光传回,经光谱和空间过滤后,用模块化共聚焦四 PMT 单元检测,其中 Microstar IDSC 板装有 8 条 DA 通道。步进电动机以 5Hz 运转,每旋转一圈产生 5120 个数据点,空间分辨率为 12 微米,一般是 100 微米通道上 8 个数据点。第五条通道由光电二极管供料,该光电二极管由连接于扫描器轴的盘片上的槽触发;在另外四条通道中开始数据获取参照第五条通道中产生的电压。扫描率一般为 5Hz 时,此设计对几 pM 的荧光素检测限敏感。在一些实施方式中,可用市售碱基调用程序预先处理和分析这些数据。

[0182] 在一些实施方式中,DNA 分析模块设备也可具有微芯片接口装置,以控制电泳和微芯片再生。用校准工具定位后,可用加热的真空吸盘将微芯片保持在位置上。在一些实施方式中,微芯片可具有约 600 轮寿命。该吸盘可具有三点以调节芯片的提升,相对于共聚焦检测器平面保持平面。在微芯片周长上电极环可匹配储存库;可通过四个高电压电源 (Stanford Research Systems, 3101 型) 控制电极。可用中央定位的“脐带”原位进行下述微芯片再生,以冲洗用过的基质并进行再填充,而储存库清洁和补充可来自管中管设计,内管去除材料而外管流动缓冲液或其它溶液。

[0183] 微芯片和操作。在一些实施方式中,微芯片可在四层装置中整合亲和样品净化和分离通道。用寡核苷酸捕获序列进行亲和捕获净化可能是样品净化和浓缩的强大解决方案。与可在注射时浓缩稀释的样品的电动学注射相反,没有芯片上的浓缩步骤,双 T 注射器在加载时进行预分离,然后进行“心脏切开”注射,这些方法都针对稀释样品的检测。在分离微芯片上包括亲和捕获可使 200nL CSM 样品在加载前稀释到微升体积,因为亲和捕获可再浓缩稀释的样品,同时去除未掺入的终止物、离子和模板。因此,可分别设计 CSM 和 DNA 分析模块,然后集成。

[0184] 在一些实施方式中,MINDS 系统可采用具有辐射状设计 290 (图 34)、超转角和中心来源 291 的 12" 晶片。在一些实施方式中,可采用 8" 晶片 292 的部分辐射状设计,它们与可具有 400 条通道且分离长度长达 45cm 的 12" 设计的通道密度和长度相同 (通过折叠通道实现),这取决于应用。8" 晶片可具有约 108 个分离通道 293。

[0185] 图 21 说明了 8" 晶片的一个实施方式。在各种示范性实施方式中,此 8" 晶片可

具有用于短阅读的笔直 14cm 分离通道或用于长阅读的长达约 45cm 的折叠通道。可将样品吸入连接于两个亲和捕获室的一个加载储存库,进而各自注入分离通道。加载样品后,可降低具有电极的电极环,将各循环测序样品电泳到两个亲和捕获样品净化室上,各自具有基质以捕获和浓缩正向或反向阅读,同时去除循环测序反应混合物的不良组分。可通过将小室加热到 $> 65^{\circ}\text{C}$ 释放正向和反向阅读,将各阅读分别电泳到双 T 注射器中进行分析。因此,各加载储存库服务于两条分离通道。分离后,可替换分离基质。可通过中心“脐带”将基质泵入,所述“脐带”含有基质管道和冲洗溶液,以及用于中心共用阳极缓冲液储存库的电连接。许多几何形状和设计均可用于 400 条通道的 MINDS 微芯片。可在许多 CAE 基质中进行分离。

[0186] 在一些实施方式中,可将微芯片安置在 Peltier 加热器的真空吸盘上,以按需控制最优分离条件和基质操作的温度。分离后,可通过脐带用缓冲液冲洗,以替代用过的基质。微芯片接口装置中的手动管中管真空吸引单元 A 可去除储存库中用过的缓冲液和基质。可通过中央室加入新鲜基质;可加入基质感受器来提供反馈信号以最大程度降低基质浪费。在一些实施方式中,可用精确泵吸控制基质的替换,使其仅替换稍多于柱长度的基质。这两种方法都能使基质用量降低高达 10 倍。可通过管中管的外管将缓冲液补充到储存库中,通过内管吸除基质。也可用工作线按需替换亲和样品净化基质,如本文所述。

[0187] 在一些实施方式中,对洁净的样品来说,微芯片可持续 600 个循环。可通过软件监测微芯片性能,并由 LabRAT 通过 e-mail、寻呼或屏显警告操作者性能降低。操作者可手工更换微芯片。在一些实施方式中,去除用过的微芯片可能需要拔掉芯片上阀和泵的脐带、电极环和传动束,然后释放微芯片。可用校准工具帮助安装新的微芯片,以使微芯片合适地定位。可通过用软件辅助以手动方式或完全自动化地检测校准标记并使光学元件聚焦来验证校准。

[0188] 微芯片制造。在各种示范性实施方式中,显微制造方法如下所述:Liu 等,2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10):5369-5374 和 Anderson 等,2000, *Nucleic Acids Res.* 28:e60。通常,可用浓 HF 预蚀刻硼浮法 (Borofloat) 玻璃晶片 (Schott, 纽约州扬克斯),然后通过 CVD 或溅射法沉积(一层)非晶硅掩模。在一些实施方式中,铬-金可用于替换非晶硅。可将 HMDS 粘附层涂覆在非晶硅上,用一薄层光致抗蚀剂 (Shipley, 加利福尼亚州圣克拉拉) 旋涂晶片,并进行软烘培 (soft-bake)。可通过具有所需通道图案的掩模用紫外线使光致抗蚀剂图案化。光致抗蚀剂显影后,可去除暴露的非晶硅,用浓氢氟酸将通道图案化学蚀刻到玻璃内,流体晶片上的通道深度约为 $40\text{ }\mu\text{m}$,多支管晶片上的深度约为 $70\text{ }\mu\text{m}$ 。然而,本领域技术人员能够确定各种部件的深度。可剥离掉残留的光致抗蚀剂和非晶硅。用装有金刚石钻头的 CNC-小型磨机在硼浮法通路晶片上钻出 $250\text{ }\mu\text{m}$ 或更小的通孔。在一些实施方式中,可用定制激光器钻出更小的孔。对生产而言,超声钻法可同时钻所有孔。最后用 $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ 清洁后,可将流体晶片和通路晶片对齐,以使通孔与通道缺口处于合适位置,在真空电炉中用约 570°C 与通路晶片进行热粘结,产生双层 μCAE 芯片。对 5 层微芯片而言,首先可对齐并组装这三个玻璃晶片;其中两个玻璃层可以是薄晶片。可用 UV 臭氧清洁剂清洁多支管晶片和 $254\text{ }\mu\text{m}$ 厚 PDMS 膜 (Bisco Silicones, 伊利诺斯州 Elk Grove),组装这四层或五层微芯片。UV 臭氧处理可产生不可逆的玻璃-PDMS 粘结。最终可将微芯片切成单个 CSM 微芯片产品或整个用于 MINDS 微芯片。

[0189] 在一些实施方式中,可用塑料和其它材料制造微芯片以重现设计,所用方法如注射成型、热压凸、层压和其它熟知方法。应用这些制造方法来制备微芯片属于本公开范围。

[0190] DNA 分析模块的表征。在采用旋转扫描器的实施方式中,可用流动染料溶液和作为内标的水拉曼峰(来自 577.6nm 和 589.4nm 的两个峰)测定检测限。进行标准的全体积 PCR 反应然后对标准 PCR 产物进行连续稀释,从而表征装有 DNA 分析模块的样品净化和分离微芯片。可用本领域技术人员熟知的方法优化样品净化的参数(如加载、洗涤和洗脱条件)以及注射和分离的参数(时间、电压、分离温度、缓冲液浓度等)。可测定质量值、成功率和阅读长度,并与测试和真实样品进行比较。在一些实施方式中,阅读长度可约为 600 个碱基或更长。在一些实施方式中,可测试亲和捕获的再生,并可测定性能下降之前的轮次数。用 DMSO 部分替代分离基质中的脲可降低轮次次数和在毛细管中产生长阅读长度。在一些实施方式中,可用标准样品重复运行微芯片以测定具有不同基质或涂层的微芯片的寿命。例如,为了对 8x BAC 文库进行鸟枪测序,100 条通道的 DNA 分析模块微芯片可进行约 22 轮(测定)。

[0191] ii) 装有 DNA 分析模块的集成循环测序模块

[0192] 结合 CSM 与 DNA 分析模块的特征,可产生核心 MINDS 系统。上述和图 14 中的 CSM 微芯片的基本单元设计可与 8" DNA 分析模块微芯片端口相连。这可产生具有 50 个用于成对末端阅读的 100-nL 循环测序样品制备室的微芯片,所述制备室是与 100 个成对末端阅读亲和样品净化室和分离微通道集成的。该系统的运行可采用微流体功能和微型机器人操作的芯片上功能来操作和再生微芯片。在包括外部自动化加样设备的实施方式中,核心 MINDS 系统每天可产生 7M 碱基的高质量序列,与现有方法相比成本大大降低。

[0193] 设备。核心 MINDS 系统设备的基础可以是 DNA 分析模块设备。可采用未经改动的扫描器。可直接对上述 CSM 微芯片接口装置进行微小的改装,以 1) 使芯片上控制基于 CSM 微芯片的筒中液体移动的微型机器人的外部传动自动化,2) 控制外部加热和冷却,以进行热循环,和 3) 驱动注射器泵以将循环测序试剂递送给芯片。在一些实施方式中,不需要 Tecan 机器人。对于 1) 而言,外部传动芯片上的阀,不需要改装装备,因为各传动通道可服务于所有通道的所有特定阀,不管有 2 个或是 400 个。对于 2) 而言,加热和冷却可以在微芯片以外进行,可以是电阻加热器的阵列或 Peltiers 条带。可通过包括加热器的额外长度和数量的结构设计实现改装。加热管理是本系统的重要考虑因素。对 3) 而言,不需要除注射器泵之外的附加泵。如下所述加入工作通道应能够使一个注射器泵服务于所有通道。因此,装备改动可以将 CSM 微芯片接口装置的部件与 DNA 分析模块微芯片接口装置组合。

[0194] 在一些实施方式中,可设计微芯片接口装置和微芯片的细节,以消除任何空间或温度抵触。可改装真空吸盘,使其具有用于样品制备和净化室的较低温度的环。用下述芯片上微型机器人操作(service)微芯片的构思可大大简化组合 CSM 和 DNA 分析模块微芯片接口装置的设计。

[0195] 微芯片和操作。核心 MINDS 微芯片可直接将 CSM 微芯片功能和设计与 DNA 分析模块的样品净化和分离集成。图 22 显示了一种示范性设计的一对通道。需要注意,阀和泵的传动线 314 会在微芯片上的圆环中 - 在图 22 中它们表现为水平线。

[0196] 可将样品 -PCR 产物或带有 PCR 产物的珠 - 加载到输入储存库中。基本 CSM 重复单元(可重复约 200 次)可将样品泵入含有循环测序混合物的 100nL 循环测序反应室 316,

四个环绕阀关闭,进行循环测序。循环测序后,就像在 CSM 中那样,可将循环测序产物和反应物泵入含有水的储存库中,不同的是此时它具有电极连接。可将样品电泳到两个成对阅读的亲和捕获室 317-318 中。可去除污染物,并可通过双 T 注射器将纯化的荧光标记的循环测序片段注射到两条分离通道中;此单元可重复(例如)约 200 次,以产生 400 条分离通道。可在高效纳米凝胶或其它基质中分离片段,并通过旋转扫描器在中心附近进行检测。在一些实施方式中,具有约 100 条分离通道的 8" 晶片可用于模拟可具有约 400 条分离通道的 12" 晶片四分之一扇区。

[0197] 微芯片可提供 45 分钟的分离循环时间,以及 45 分钟的循环测序和净化循环时间,一个成对阅读循环测序反应室可提供两条分离通道。这简化了设计,减少了需要的阀、电极和通道的数量。分离可以是几乎连续的,仅微芯片再生和预运行与分离共享了循环时间。在 35 分钟分离期间,可从样品加载到输入储存库中再次开始样品分离循环。在一些实施方式中,可制备好样品并在分离通道准备好接受注射时准备分离。在一些实施方式中,可采用按需提供单分离通道的多循环测序或基因型分析室。除了具有共同的中心阳极以外,微芯片还可具有共同的圆形开放阴极通道,它环绕着具有大缓冲容量的微芯片圆周。此通道可具有额外的缓冲容量,以防止离子耗尽而减少分离,简化电极数量和安置,并可允许不去除缓冲液和过量基质的情况下重复加载基质。微芯片也可采用三维结构使工作通道(即循环测序混合物、废液、亲和凝胶聚合物、水)跨越其它通道,以大大简化设计和操作。

[0198] 在一些实施方式中,组合的 CSM 和 DNA 分析模块微芯片接口装置可依赖采用中心晶片双面蚀刻的三维微芯片设计使芯片上的微型机器人操作微芯片。该工作通道建立在阀连接多层设计中不同层的能力的基础上。

[0199] 图 12 说明工作通道 320 的连接的实施方式,它向样品净化室 321 提供新鲜的亲和捕获基质。在所示设计中,工作通道流径从蚀刻晶片 322 上方的左侧进入,跨过分离通道,上行至 PDMS 层的阀 323 的一个孔,跨过,然后下行至该阀的第二个孔,进入双蚀刻的晶片的下层,在这里蚀刻了样品制备、净化和分离通道 321、324。然后,工作通道流径通过亲和捕获样品净化室(它垂直于该图的平面)和通过一个阀再结合于蚀刻微芯片上方。这允许微芯片上侧的工作通道穿过样品分离和其它通道,从它们的上方穿过而不干扰它们。可将此相同原理应用于样品制备通道,但不可应用于分析通道。单个工作通道可以是宽而深的,它将递送循环测序混合物、用两种亲和捕获基质再填充两个样品净化室、提供洗涤以恢复样品制备室以及收集所有样品制备、样品净化和分离通道的废液。这六个工作通道将各自在微芯片上形成同心环。它们将连接于注射器泵、大规模流体装置或真空线。双蚀刻的晶片和 PDMS 之间的“额外”晶片层将仅含通孔。由于蚀刻通道位于蚀刻晶片的两侧;通孔可相对较大,除了循环测序混合物。

[0200] 可如下所述进行微芯片的再生。分离后,中央脐带可将新基质推入通道,仅仅充满分离通道。侧通道上不同的通道宽度可指导基质向阴极流动。在一些实施方式中,可用两条工作通道再生两个样品净化室。通常,由阀关闭工作通道。例如,为了取代亲和基质,可打开阀,激活通道的注射器泵,将新亲和基质泵入所有正向室(每次加载亲和基质都可能进行多轮)。在其它亲和室中进行了相似顺序的步骤。简单地,可通过将洗涤溶液从洗涤工作线泵入小室、然后进入废液储存室清洁循环测序反应室。缓冲液储存库可连接于晶片最上方的共用大储存库。大体积可最大程度降低蒸发和缓冲液耗尽的影响,并简化缓冲液填

充和冲洗。

[0201] 可根据以下实施例进一步理解本发明的各个方面,不应认为这些实施例以任何方式限制了本发明范围。

[0202] G. 实施例

[0203] 1. 基于珠的大肠杆菌 (E. coli) 捕获

[0204] 用偶联于磁珠的单克隆或多克隆抗体捕获稀释溶液中的模式靶生物可用于提供浓缩、纯化的物质,以用于引入 BPM 微装置。本文中,我们描述了偶联有抗大肠杆菌菌株 0157 抗体的 DYNAL® 珠的应用。我们进行了三个连续实验:(1) 捕获稀释母液中的大肠杆菌,(2) 在芽孢杆菌 (Bacillus) 大量过量的情况下捕获大肠杆菌,和 (3) 捕获获自 Baltimore 空气取样器的气溶胶样品中的大肠杆菌。

[0205] 我们首先比较了 DYNAL® “药签方案”,该方案用于检测食物样品中的大肠杆菌 0157,其中将珠直接接种到合适的生长培养基上。我们发现,将非病原性菌株 0157 和大肠杆菌 ATCC 菌株 700728 直接接种到胰酶解酪蛋白大豆琼脂 (TSA) 上产生的集落约多 5 倍,因此能比药签法更好地估计捕获生物体的数量。因此,我们在所有后续实验中都采用直接接种。

[0206] 我们测定了在 10^5 CFU/mL- 10^1 CFU/mL 的细胞效价范围 (在 PBS/ 吐温缓冲液中) 上 DYNAL® 珠结合大肠杆菌的能力。在这些和后续免疫磁性分离 (IMS) 实验中,方案是将 5 μ L DYNAL® 珠悬液加入大肠杆菌的 250 μ L PBS/ 吐温适当稀释液中。在摇床上在有帽塑料小离心管中混合细胞和加入的珠 10 分钟。然后在试管侧面用强大磁力捕获珠,去除上清 (但保存用于接种),用 PBS/ 吐温缓冲液洗涤珠三次。重悬珠,接种珠的稀释液。在几个实验中,我们也将洗液接种。通常,洗液含有少量靶生物;靶细胞或者被珠捕获,或者未结合并可在初级上清液中回收。

[0207] 图 35 显示出捕获稀释在 PBS/ 吐温中的大肠杆菌 0157 的结果,一式三份地进行捕获,细菌起始浓度为 2×10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、20 和 2 个细胞 /mL。在 10^5 -10 个细胞 /mL 的范围内,捕获细胞的观察数量为线性 ($R^2 = 0.995$),在 10^5 - 10^3 个细胞 /mL 的范围内捕获效率约超过 95%,在 100 个细胞 /mL 时降低到 87%,在 20 个细胞 /mL 时降低到 69%。在大肠杆菌浓度为 10^3 - 10^5 时,其它实验 (数据未显示) 中从 PBS/ 吐温中回收的回收率通常大于 85%。

[0208] 2. 用单克隆抗体捕获大肠杆菌的动态范围

[0209] 首先在试管中的 250 μ L 体积中研究捕获化学,用分散于缓冲液的模式生物优化捕获和洗涤。图 36 显示出用偶联于 DYNAL® 珠的单克隆抗体代表性捕获大肠杆菌。将大肠杆菌 0157 以各种浓度加入与抗大肠杆菌 0157 抗体偶联的 5 μ L 珠的 250 μ L PBS/ 吐温溶液中。在旋转混合器上混合该混合物 10 分钟。用强磁力将珠拉到试管一侧,去除上清。用 250 μ L PBS/ 吐温 (PBST) 洗涤珠三次。将洗涤过的珠重悬于 250 μ L PBST,在 TSA 上计数捕获的大肠杆菌。

[0210] 图 36 所示结果证明,发现在珠的用量和其捕获大肠杆菌的能力之间有剂量反应关系。图 36 显示出,在高达约 10^6 个细胞 /mL 时捕获呈线性,在最大约 4×10^7 个细胞 /mL 时达到饱和。 10^6 个细胞 /mL 以上时,在上清中回收到的细胞百分数逐渐增加。用大肠杆菌饱和的 DYNAL® 珠的直接显微镜检揭示出,约 5 个细胞 / 珠。此捕获方法证明,在 15 分钟内能够从 250 μ L (低至 10 μ L 以下体积) 中纯化和浓缩的靶细胞平均超过 90%。

[0211] 3. 用单克隆抗体特异性捕获大肠杆菌

[0212] 为了测定基于珠的捕获的特异性,我们测试了在标准试验条件下加入蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) (ATCC 11778) 细胞对大肠杆菌与抗体-包被的珠的结合的影响。将约 104 个大肠杆菌 /mL 的悬液与不同效价的蜡样芽孢杆菌混合,如上所述进行 IMS,除了回收所用的 TSA 培养基中加入了四唑盐,加入的水平能选择性抑制蜡样芽孢杆菌。这允许直接接种细胞混合物,但仅大肠杆菌可复制,从而可定量为菌落形成单位 (CFU)。

[0213] 如图 37 所示,当存在的两种微生物的比率为 1/1 时,蜡样芽孢杆菌的加入将结合于珠的大肠杆菌数量降低了约 20%,但芽孢杆菌过量 100,000 倍仅能将大肠杆菌结合降低至对照的 56%。这说明,对于这种抗体-细胞结合,DYNAL®珠可产生出色的特异性。

[0214] 4. 用单克隆抗体捕获气溶胶样品中的大肠杆菌

[0215] 已经证明,我们可有效捕获、纯化和回收细菌细胞,我们想要将其扩展至回收溶液中的大肠杆菌 0157,该溶液含有 90% (v/v) 来自 Baltimore 空气取样器的液体 (BASL) 样品 (Spector Industries)。BASL 含有极多种类的竞争微生物、花粉以及其它化学和生物物质,它们可能干扰抗体介导的结合和回收。

[0216] 为了测试我们浓缩和回收 BASL 溶液中的大肠杆菌 0157 的能力,我们在纯培养物中培养了菌株,并用 90% BASL 制备成 10^2 、 10^3 和 10^4 CFU/mL 的效价,用 PBST 作对照。将 5 μ L DYNAL®珠悬液 (含有抗-0157 抗体) 加入含有 90% BASL 或 PBST 中的大肠杆菌的 250 μ L 样品中,在摇床孵育 10 分钟,然后进行珠捕获。去除上清,用 PBST 洗涤珠三次,将珠重悬于 PBST。将原始上清和珠接种,以测定 CFU 数量。用加入 Cefixime 和 Tellurite 的 MacConkey-山梨糖醇琼脂 (CT-SMAC) 确定所有板计数。CT-SMAC 是大肠杆菌 0157 的半选择性培养基,它用于降低 BASL 中所含大量生物体中非大肠杆菌 CFU 的总数,并通过发酵山梨糖醇提供 0157 的比色指征。

[0217] 用我们的标准 IMS 方案出色地结合和回收了含 90% BASL 的溶液中的大肠杆菌 0157 (图 38)。通常,大于 90% 的细胞结合于 IMS 珠并被回收,无论细胞是分散于 PBST 或 90% BASL 中。在由 10^4 、 10^3 和 10^2 CFU/ml 测试的细胞浓度范围内,情况都是这样。

[0218] 图 39 显示了特别针对 10^4 CFR/ml 效价的数据组。第一个柱和第三个柱显示了对照的效价。第二个柱显示了仅用 PBST 中的样品作对照时,柱组分和上清组分中回收的细胞比例。第四个柱显示了仅用 90% BASL 进行实验时,柱组分和上清组分中回收的细胞比例。本实验说明,BASL 中的组分不干扰结合和回收,至少对这种抗体和其表位如此。

[0219] 5. 固相提取 (SPE)

[0220] 我们评价了可处理多达一升样品体积、使分析物结合到小表面上而允许干扰化物流过的芯片外一次性流过式装置的 SPE。最后,可回收浓缩形式的靶分析物,以用基于微芯片的生物处理器进行下游处理,或者 SPE 材料本身可以是该微芯片的给料。

[0221] 我们评价了大肠杆菌的二氧化硅基质 SPE 捕获。基本方案是:使不同效价的细菌通过固相、通过小体积的反向冲洗洗脱,然后分析上清和洗脱液中的细菌含量。在下述实验中,用 PBS/吐温 (PBST) 制备 10^4 - 10^2 个细胞 /mL 稀释度的大肠杆菌菌株 DH5a (Invitrogen Technologies)。将具有 100mg 固相床的裸露的二氧化硅提取物-清洁 SPE 筒 (Alltech Associates) 用于所有实验。

[0222] 对各筒而言:(1) 将 18mL 细菌/酶混合物通过 SPE 床,流速约为 5mL/分钟;(2) 收

集上清并分析细菌效价；(3) 用 2mL 缓冲液反向冲洗该筒，测定洗脱液中的细菌数量。如上所述用 TSA 在 37℃ 培养细菌进行分析，以测定细菌的相对捕获和回收。

[0223] 6. 在流过模式中 SPE 介质对细菌的保留。

[0224] 图 40 显示了细菌试验结果，表明在加载样品中、以及细菌浓度相对高 (25,000 或 45,000CFU/mL) 的样品的 SPE 后上清液（未结合）和洗脱液中的细菌浓度。在此范围内，80-90% 大肠杆菌保留在 SPE 基质上（图 41），而少量细菌通过，非常少量 (1%) 通过反向洗涤回收。因此，在二氧化硅上产生强烈结合，活细胞被洗脱的很少。在效价非常低 (125 和 250CFU/mL) 时，成比例地更多的细胞通过该柱，仅约 20% 的细胞被保留（数据未显示）。

[0225] 7. 在流过模式中通过 SPE 和琼脂糖“大珠”介质保留蛋白质 (β -半乳糖苷酶)

[0226] 一些实施方式采用基于琼脂糖的“大珠”来捕获或纯化生物物质。将市售 β -半乳糖苷酶 (Sigma) 溶解于 0.1M 磷酸盐缓冲液，pH 7.5, 1mM $MgCl_2$ 中，浓度为 :100 和 10ng/ml。将这两种溶液通过含有 100mg 50 μ m 二氧化硅颗粒（孔径 50Å）的“提取物清洁”SPE 筒 (Alltech)，或 5ml 含有 500 μ m 硬化琼脂糖珠的“大珠”柱。对琼脂糖和二氧化硅衍生的介质而言，将酶溶液 (20ml) 通过其各自的 SPE 床，流速约为 5mL/分钟，收集上清，用 2mL 缓冲液以约为 1ml/秒的流速反向冲洗该筒。用 o-硝基苯基- β -半乳糖苷 (ONPG) 作底物分析上清和洗脱液中的酶活性。

[0227] 图 42 显示出在 10 和 100ng/ml 酶浓度下两种基质的“上清”、“洗脱液”和“保留”组分的 β -半乳糖苷酶活性分布图。通过加载物、流过液和洗脱液之差计算“保留”。对于基于二氧化硅的 SPE 介质，流过了约 75% 的 β -半乳糖苷酶，在上清中回收。在反向冲洗洗脱液中检测到的酶非常少 (1-2%)。因此，约 25% β -半乳糖苷酶保留在柱上。对于“大珠”介质，85-99% 的 β -半乳糖苷酶流过该柱，而在洗脱液中回收的少于 5%（图 42）。这意味着非常少量（约 0-10%）保留在基质上。因此，这些介质可用于流过模式，以分离靶分析物（如毒素）与保留物质。

[0228] 8. 在流过模式中用琼脂糖“大珠”作为捕获介质保留大肠杆菌

[0229] 我们评价了琼脂糖大珠筒选择性结合和浓缩大肠杆菌菌株 DH5 α 的能力。图 43 显示出获自以初始细胞浓度 2,000 或 4,700CFU/ml 进行的大珠捕获试验的组分中大肠杆菌 DH5 α 的分布。用 0.1M 磷酸盐缓冲液，pH 7.5, 1mM $MgCl_2$ 进行这些实验，其中采用 10^4 或 10^3 CFU/mL 的 20mL 细菌悬液。该试验是在 TSA 平板上生长。较低效价 (2,000CFU/ml) 时，在流过组分中回收了 > 70% 细菌，在反向冲洗的洗脱物中回收的少于 1%。较高效价 (4,730CFU/ml) 时，在流过组分中回收了 > 80% 细菌，在洗脱物中回收的少于 5%。因此，仅 25-10% 细菌保持结合于大珠基质。

[0230] 9. 纳米生物处理器微芯片

[0231] 主要根据 Liu 等, 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(10) :5369-5374 所述显微制造微流体装置。简要说，清洁硼浮法玻璃晶片，沉积非晶硅掩模，然后沉积 HMDS 粘附层和光致抗蚀剂层。通过掩模用紫外线使光致抗蚀剂图案化，用浓 HF 化学蚀刻通道图案，流体晶片上的通道深度一般为 40 μ m，多支管晶片上的深度为 70 μ m。剥离掉光致抗蚀剂和非晶硅，用装有金刚石钻头的 CNC-小型磨机钻出通孔。这些孔可用于四层微芯片，作为反应和检测室。或者，我们采用超声钻法同时钻所有孔。清洁后，将流体晶片和通路晶片对齐，进行热粘结。加入多支管晶片和 PDMS 膜产生四层微芯片。

[0232] 设计和生产两种纳米生物处理器微芯片。第一种微芯片 MBI-11240 (图 19) 设计用于分离和测试芯片上各种规模的主要微流体处理部件。它包括以下实施方式:(1) 阀设计,(2) 反应室设计,(3) 成组 (ganging) 反应和 (4) 路由选择器设计。各元件的操作由全部 (full scale) 八条通道气动系统 241 控制,该系统操作阀、泵和路由选择器。我们测试了对 3 层和 4 层芯片中的 MOV 阀、泵和路由选择器的操作。经设计,该芯片的各元件与 8 通道全尺寸气动总线接口相连,以有助于阀操作。

[0233] 开发了第二种纳米生物处理器微芯片 MBI-12,以测试循环测序或 PCR 所用珠的样品制备和测试 μ CAE (单独或与样品制备联合)。蚀刻图 20 所示掩模设计,将其组装到有功能的四层微芯片中,进行测试。MBI-12 具有几种 μ CAE 通道设计以及如何将它们连接于上游样品制备装置的设计。

[0234] 我们已经证明了用 MOV 阀、泵和路由选择器混合以及用在深室如通路中能良好地发挥作用的表面声波 (SAW) 混合。SAW 在微芯片的小室内产生脉冲式内压波并使溶液均匀化以混合。

[0235] 10. 进行生物防卫样品制备的纳米生物处理器

[0236] 这种生物处理器模块接受来自上游空气样品收集器或其它输入装置的样品,产生用于储存或再测试的等份,裂解样品,制备和标记样品,并将它们输出至单分子荧光相关检测器进行分析。生物处理器模块包括含有流体的一次性塑料筒和操作该筒的设备。

[0237] 在分析之前分级样品并将其分为等份。自动化的微流体处理器可:1) 制备用于测试的核酸;2) 制备用于测试的蛋白质;3) 制备用于检测的细胞;4) 储存,以再测试阳性样品和进行法医分析。

[0238] 该筒是“CD”形式,每个筒的扇区中具有 12 个生物处理器单元,各单元用于一种样品。该筒加工生物处理器单元中的一种样品,然后旋转以接受下一个生物处理器单元中的下一个样品。在 2 小时取样方案中,每天可从小圆盘传送带中储存的筒组中自动改变该筒,类似于 CD 交换器。约每两周进行一次手工介入,以再供应筒和试剂。

[0239] 该设备提供了某些机构来储存、加载试剂、运行和换筒。该设备具有以下功能:1) 打开和关闭电磁阀以输送压力或真空来操作阀和泵,2) 加热和冷却筒上的区域,3) 从小圆盘传送带移出或移入筒,4) 超声破坏微生物,和 5) 需要的其它功能。

[0240] 11. 进行生物防卫遗传分析的纳米生物处理器

[0241] 样品浓缩模块。从宏观尺度 (macroscale) 开始,将用靶生物表面表位的抗体修饰的磁珠加入小室中毫升体积的空气收集器 210 流出物 (或由其它基质产生的浆液) 中 (图 8)。珠是用对单个生物、亚型、物种等特异的抗体包被的珠组的混合物。加入另外的试剂混合物可扩展所研究的生物范围。珠捕获靶生物,而通过洗涤去除污染物 - 提供了选择性和特异性的第一维度 (dimension)。在 SCPM 211 中通过磁力收集含有靶生物的珠。

[0242] 样品扩增和分析模块。现在进入微尺度,将这些珠加载到纳米生物处理器 (NBP) 微芯片 213 上的含有裂解缓冲液的储存室 212 中,所有进一步操作都在微流体尺度上进行。经设计,NBP 微芯片 200 (图 18) 能处理单个生物处理器单元中的样品,其中采用芯片上的微流体阀和泵作为控制元件。从储存库 221 泵吸珠,直到它们被闸板 222 捕获,在闸板处进行超声处理以破坏芽孢和 / 或细胞并释放 DNA。将 DNA 移动到反应室 223,在此通过芯片上的泵加入含有 μ RT-PCR 所用探针的特异性引物的 PCR 试剂,以多重反应进行 μ RT-PCR - 提

供选择性和特异性的第二生化维度。

[0243] 虽然 RT-PCR 是有力的分子诊断工具,但因为核酶不能淬灭荧光染料、非特异性延伸或其它机制,RT-PCR 也有背景高且可变的缺点。为了最大程度降低假阳性结果,通过快速 (< 5 分钟) 芯片上的微通道毛细管阵列电泳分离 224 分离推定阳性的 μ RT-PCR 样品,以进一步研究选择性和特异性。生物信息学引物设计产生了不同片段长度的产物,通过微通道电泳分离和荧光发射区分开这些产物 - 这允许增加 PCR 反应的多重数,其中通过片段筛分验证和鉴定真阳性结果。至少 96 个生物处理器单元辐射状地安置在微芯片 225 上 (图 18)。采用每小时一个通道时,96 通道微芯片工作 4 天。

[0244] 12. 在纳米生物处理器中进行的 EXPAR 反应

[0245] EXPAR 是用寡核苷酸序列、热稳定聚合酶和切口酶 (nicking enzyme) 在 60°C 特异性扩增 DNA 短节段的快速等温法。通过荧光或 MS 检测产物。可在纳米生物处理器中进行 EXPAR 反应,以进行遗传测试、基因表达测定、分子诊断、生物防卫和其它应用。

[0246] 在一个步骤中将反应混合物加入样品,热稳定聚合酶和切口酶的作用方式与微通道中的大多数其它蛋白质相似。在稍许改装的图 15 或 20 所示微芯片中或在图 13 所示微芯片中进行 EXPAR。将核酸 (DNA 或 RNA) 移动到微通道如标有 IMS 输入 250 的微通道中,用 MOV 泵 251 泵入小室,然后从试剂通道之一 252 加入单一反应混合物。流体线路用于将多种反应物之一加入反应室 253。任选地控制反应室的温度。反应后,用 MOV 泵将处理的样品泵入储存库或管 254 中,以进行芯片外 MS 分析或微芯片上的荧光、化学发光或其它检测方法的分析。除了用于分析的单个通道以外,可用 MOV 路由选择器将样品分到许多通道中,然后进行多重 -EXPAR。

[0247] 13. 在纳米生物处理器中进行的 RiboMaker 反应

[0248] RiboMaker 检测系统基于采用人造启动子复合物 (APC) 和称为 RiboLogs™ 的核苷酸类似物的 RNA 聚合酶 (RNAP) 转录起始中断 (称为 abscription™)。APC 提供了 RNAP 聚合酶的起始位点,以产生 50-450 个三核苷酸中断产物 / 分钟 / 位点。检测可以是 MS 分析、荧光、化学发光或本领域技术人员熟知的其它方法。对于 DNA 或 RNA 分析,APC 可具有提供靶位点探针特异性的侧接序列。具有不同质量单位的 RiboLog 可鉴定结合的是哪个位点。通过多重 APC 与待研究序列的不同部分的结合,RiboLog 指纹可为生物防卫提供额外的特异性信息,这可帮助消除假阳性和假警报。对蛋白质而言,APC 单元可连接于抗体。RiboMaker 检测声称能快速、线性地检测,并且对抑制的敏感性低于 PCR。

[0249] 在纳米生物处理器微芯片如图 13 所示芯片上完成 RiboMaker 反应。加入一种 APC 试剂,然后加入一种反应混合物,需要两个混合步骤。如果在珠上捕获了 RiboMaker 样品,该珠通过“IMS 输入”(图 13) 进入反应室,该反应室任选地装有闸板或具有磁性以捕获珠。用试剂通道之一加入 APC。从第二个试剂通道加入 RiboLog。如果需要,使该反应在泵 A 和 B 之间来回移动。

[0250] 14. 微芯片 CMS 阵列设计

[0251] 16 通道微芯片 270 的实施方式见图 23。阀和泵的传动线 271 互相垂直并终止于微芯片底部的通路上,外部传动线可连接于此。通过注射器泵将循环测序混合物供应到左侧通道 272 中,将用于再生微芯片的水或缓冲液供应到右侧通道 273 中。复合这两个“工作”通道,以注入所有 16 条通道,并使芯片上的泵或阀 274 分别控制流动。为来自玻璃晶片和

PDMS 膜的四层装置构造此微芯片。

[0252] 15. 完整的 MINDS 系统

[0253] 为了产生完整的 MINDS 系统,改装来自核心 MINDS 系统的设备:1) 加入珠工作通道,并与珠分选法接口相连,以递送单个珠;2) 微芯片接口装置上的电阻加热器设计和电极环更换到微芯片;3) 通过微芯片改装保证重复地加载和卸载单个珠。

[0254] MINDS 微芯片设计见图 24。该微芯片类似于图 22 所示核心 MINDS 微芯片,除了珠工作通道导联 330 至输入线,将样品体积减少四倍,至 25nL,在循环测序室中形成闸板以捕获珠。通过输入通道输入单个珠。将闸板蚀刻到仅 $2\mu\text{m}$,这需要额外的掩模和制造步骤。

[0255] 将单个珠泵入循环测序室,该小室具有导向电极和流向亲和捕获室的通道。闸板阻止了珠的移动。一旦加载珠后,通过芯片上的泵将含有正向和反向成对末端阅读引物的 25nL 循环测序混合物泵入反应室。关闭与小室相邻的阀,循环温度。循环后,将循环测序混合物中的循环测序产物泵入电极储存库 6 中,电泳至两个样品净化室中,基本如上所述进行处理,各成对末端阅读注射入分离的分离通道。打开导向废液的阀,通过洗涤线将珠冲洗到废液通道中。如上所述进行分离再生。

[0256] 通过以下方法将单个珠注入各通道:1) 操作良好分离的微流体珠串,并将它们连续或平行移动到各通道中,2) 从珠“箱”注入各通道,并将它们分配到循环测序反应器中,一次一个,或 3) 磁性操作单个珠或收集到毛细管末端进行“收集-和-放置”操作。对于珠串方法,在空间上一个珠与下一个珠通过一团(bolus)液体良好分离,所述液体可能是不混溶的如 FluorInert (3M)。我们以前成功地将 FluorInert 团用于循环测序和 PCR 反应。将珠串一起移动到粗糙位置上。然后关闭循环珠工作通道上的阀,使流动转向通过单个循环测序室,其长度足以将珠移动到加载通道中。关闭加载通道上的阀,打开珠工作通道上的阀,将下一个珠放入下一通道。也可能有平行变化,平行变化可能最大程度降低加载时间。光学珠感受器也可有助于调节时间和给料流。

[0257] MINDS 系统采用激光钻出 $50\mu\text{m}$ 测试孔的阀和泵,以使泵体积降低几纳升。或者,在各循环上完成部分“行程(stroke)”以部分打开具有 $250\mu\text{m}$ 孔的阀。脉冲小室周围的阀,以移动小室中的珠,或者施用外部超声混合。通过添加剂改善表面相互作用,按需进行表面修饰。

[0258] 对直接注射而言,样品净化基质位于分离通道的连线中。如图 44 所示,此设计具有用于珠和样品净化的循环测序室的常见元件,除了样品净化室被移动到分离通道的阴极侧。在样品净化基质上电泳循环测序样品,污染物移动到阴极室中,如果需要可冲洗阴极室。清洁样品是样品净化基质上的锐条带,通过加热该小室释放清洁样品,开始分离。这依体积将锐条带注射到分离通道上。因此,分析了各样品净化基质上收集的所有样品,这与典型双 T 注射中发现的“心脏切开”相反,在双 T 注射中双 T 的加载仅能分析一部分样品。

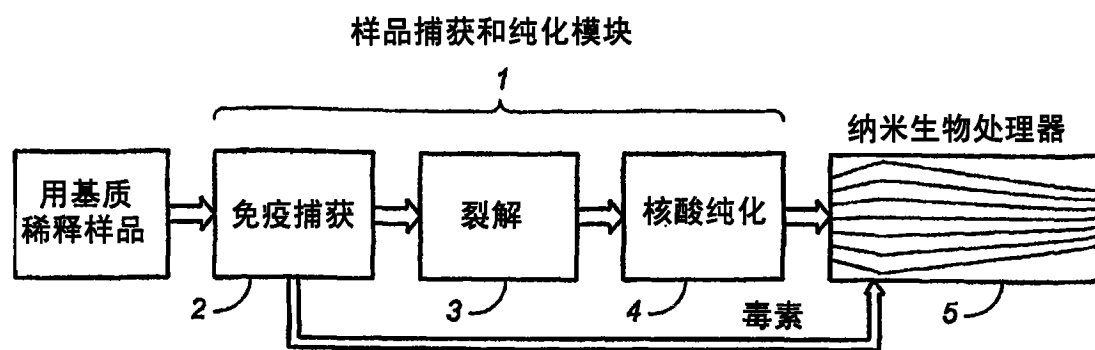


图 1

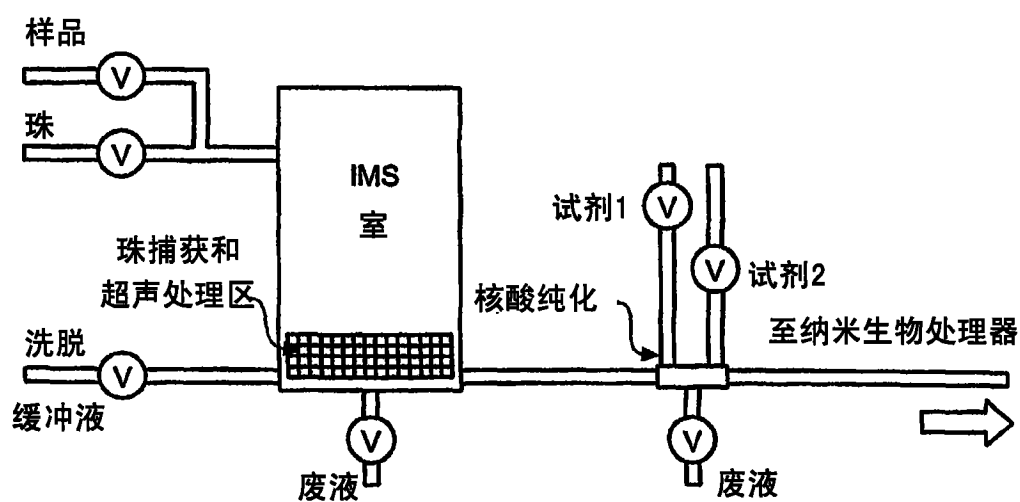


图 3

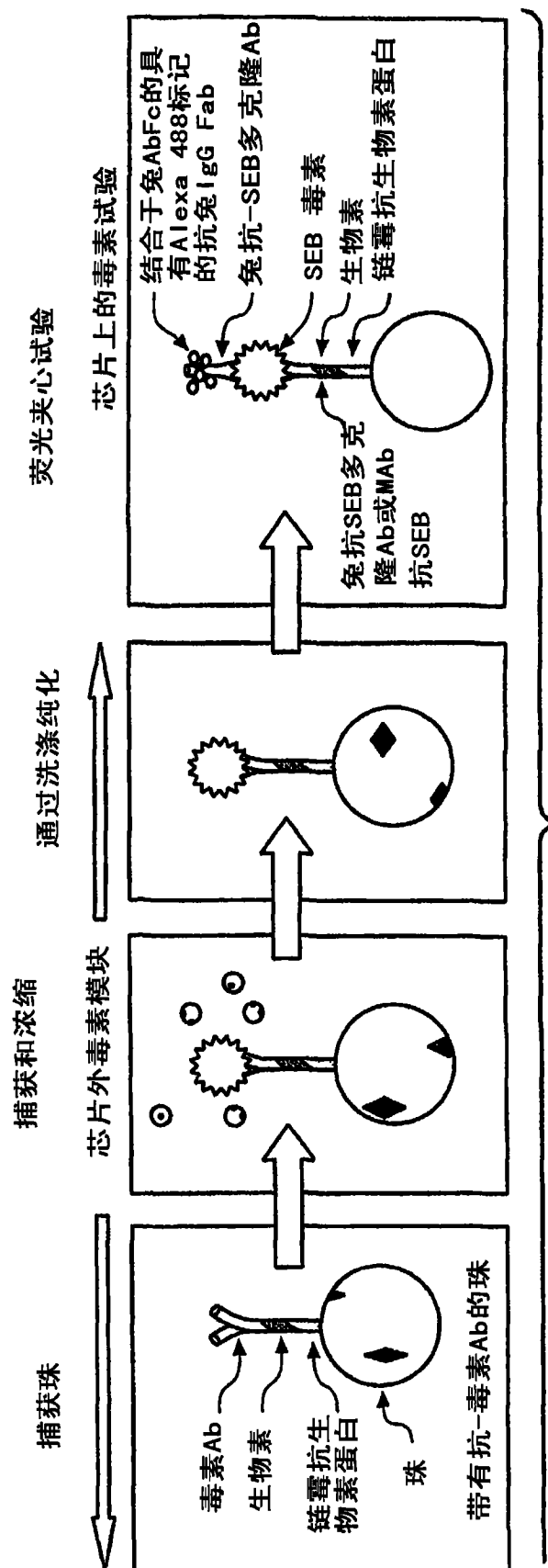


图 2

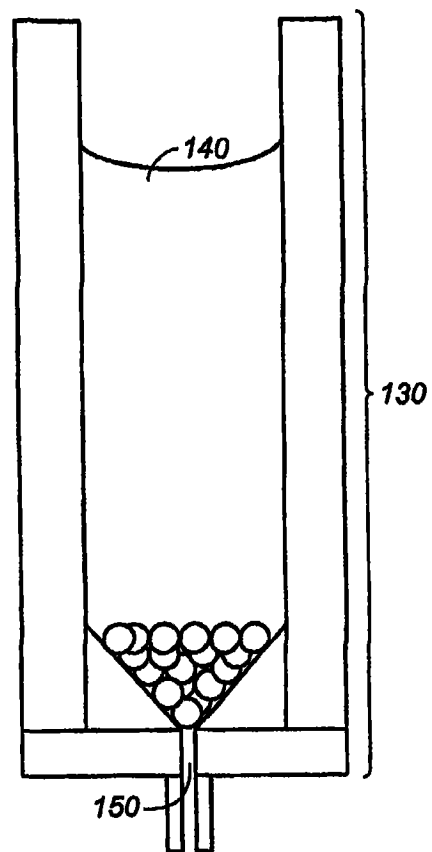


图 4

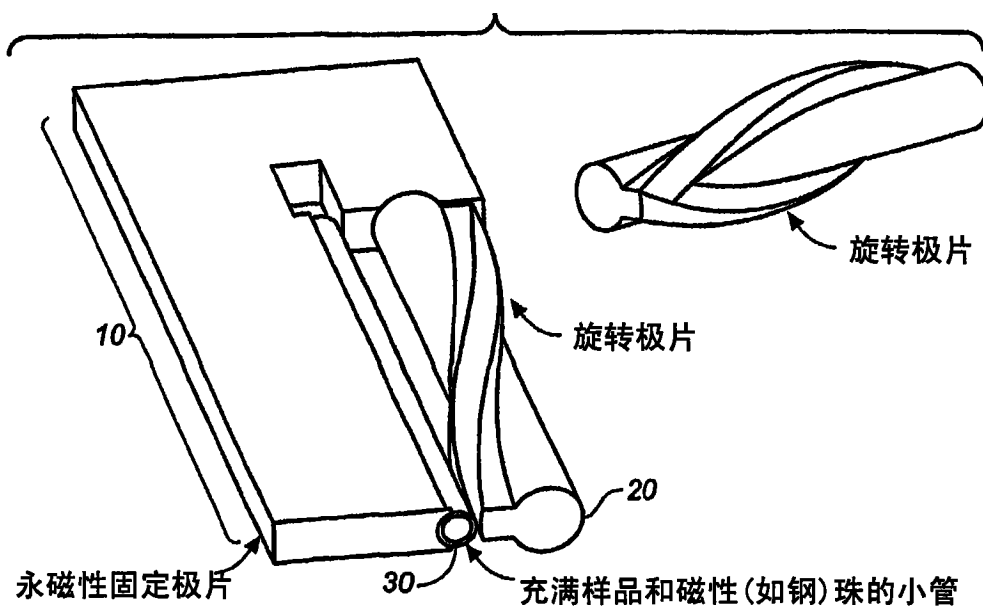


图 5

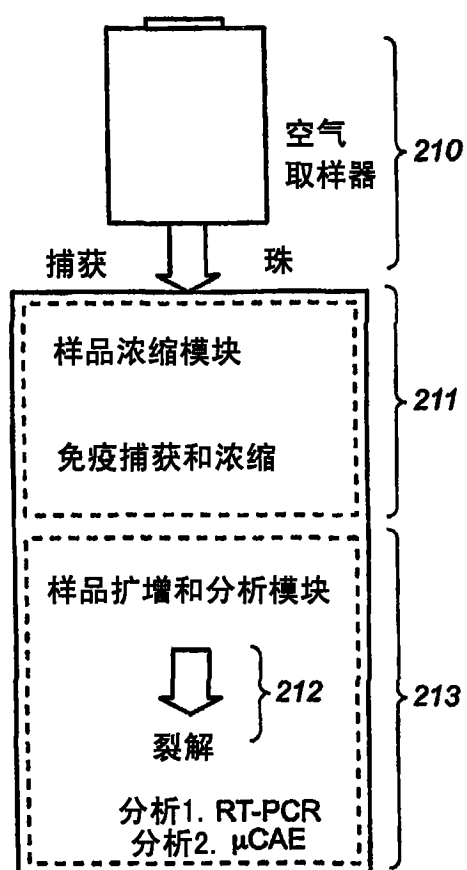


图 8

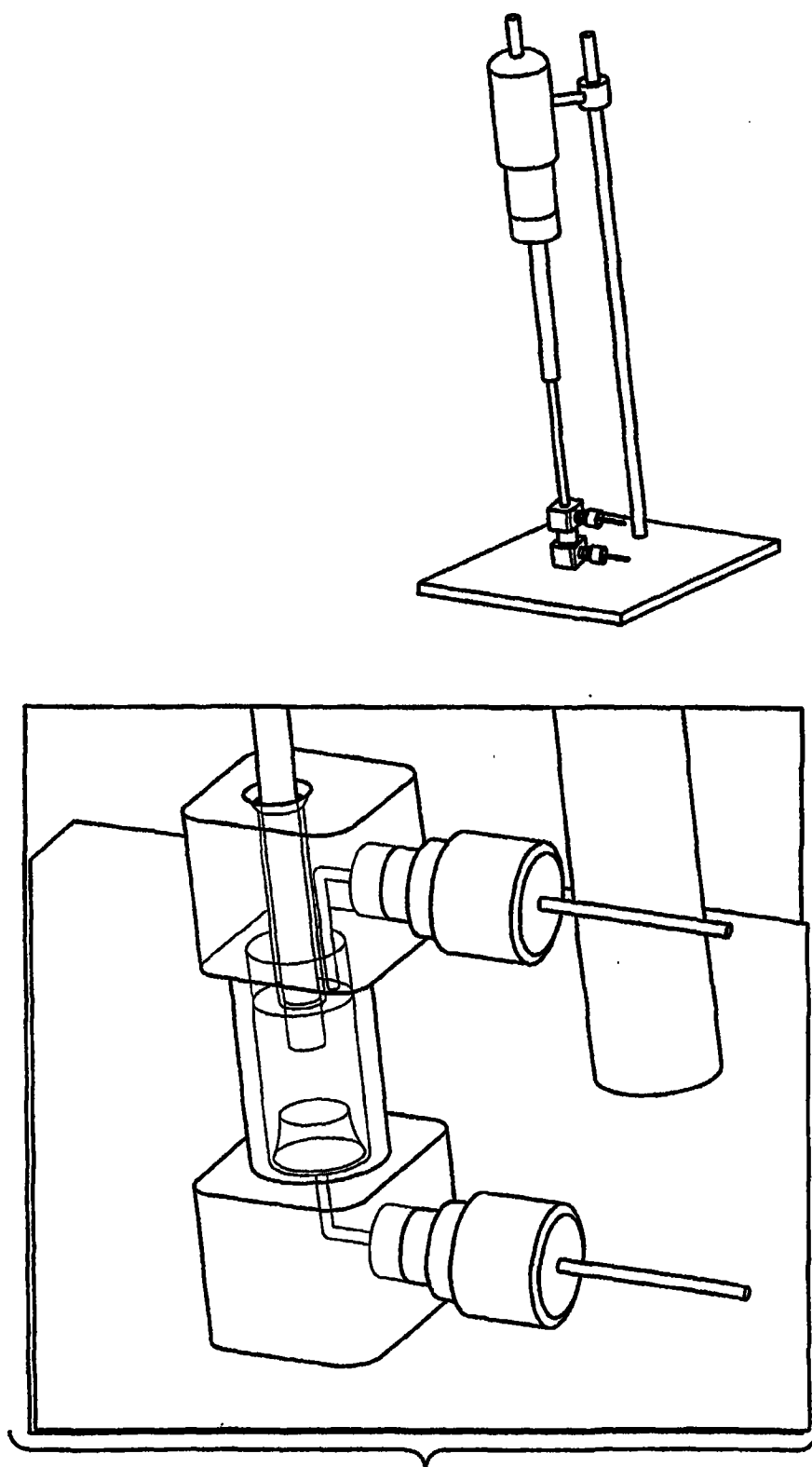


图 6

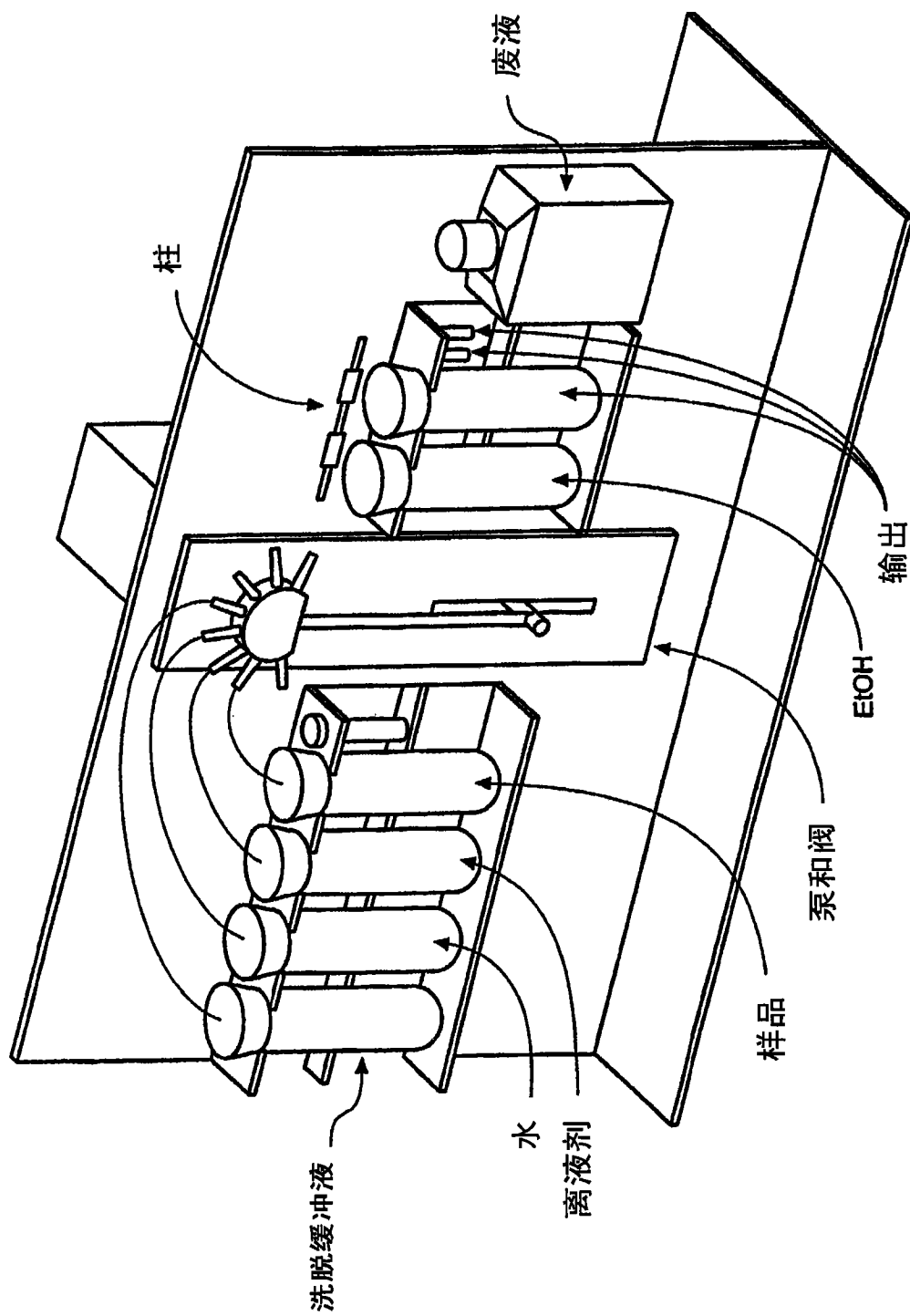
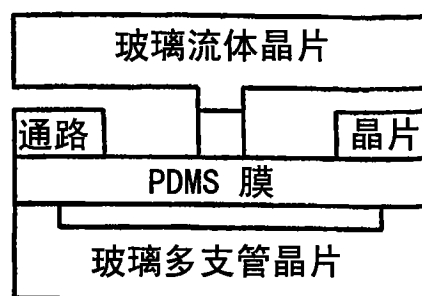
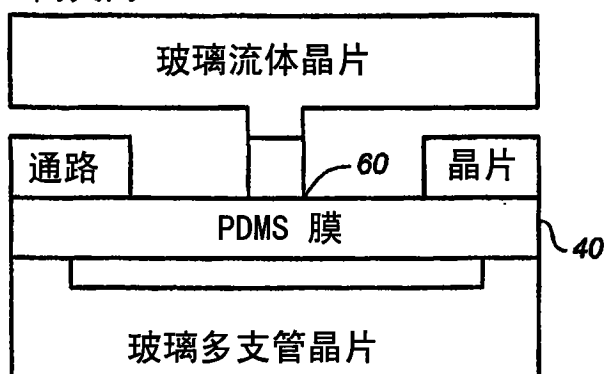


图 7

4层拓扑结构

阀关闭



阀开放

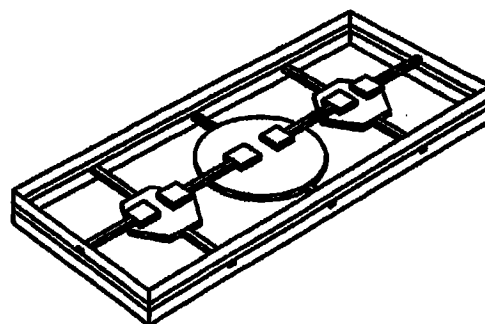
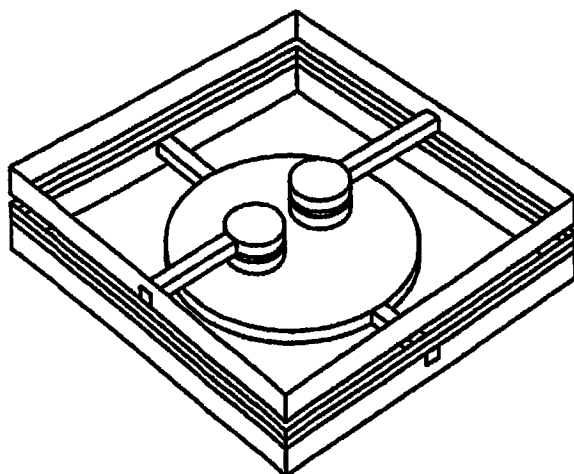
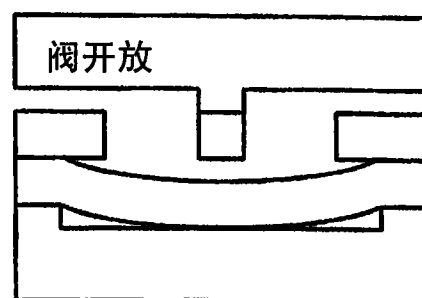
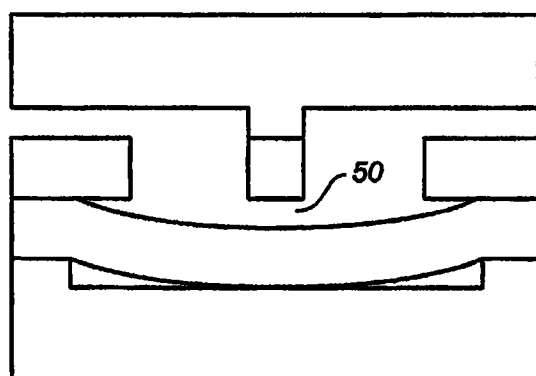


图 9

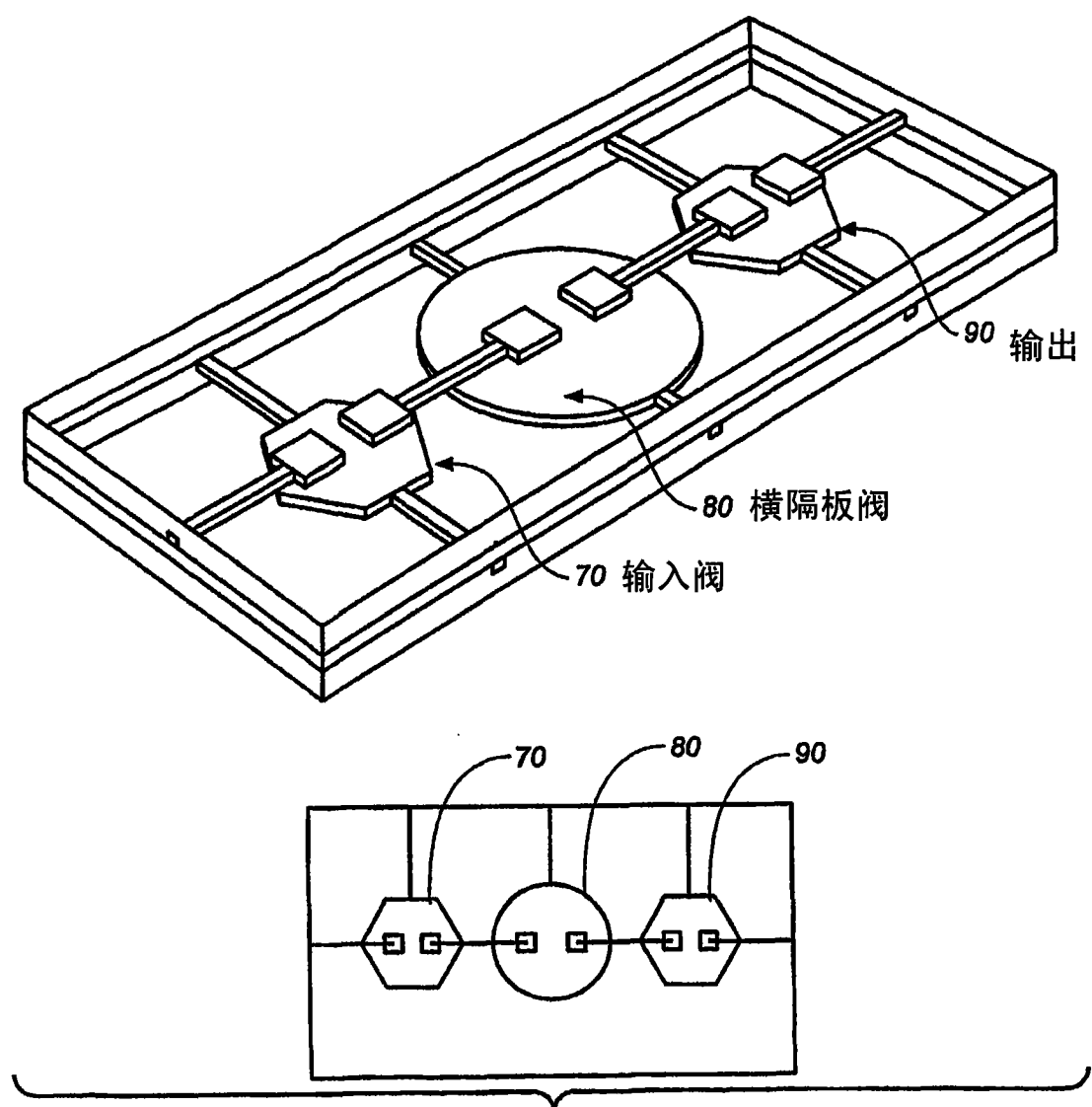


图 10

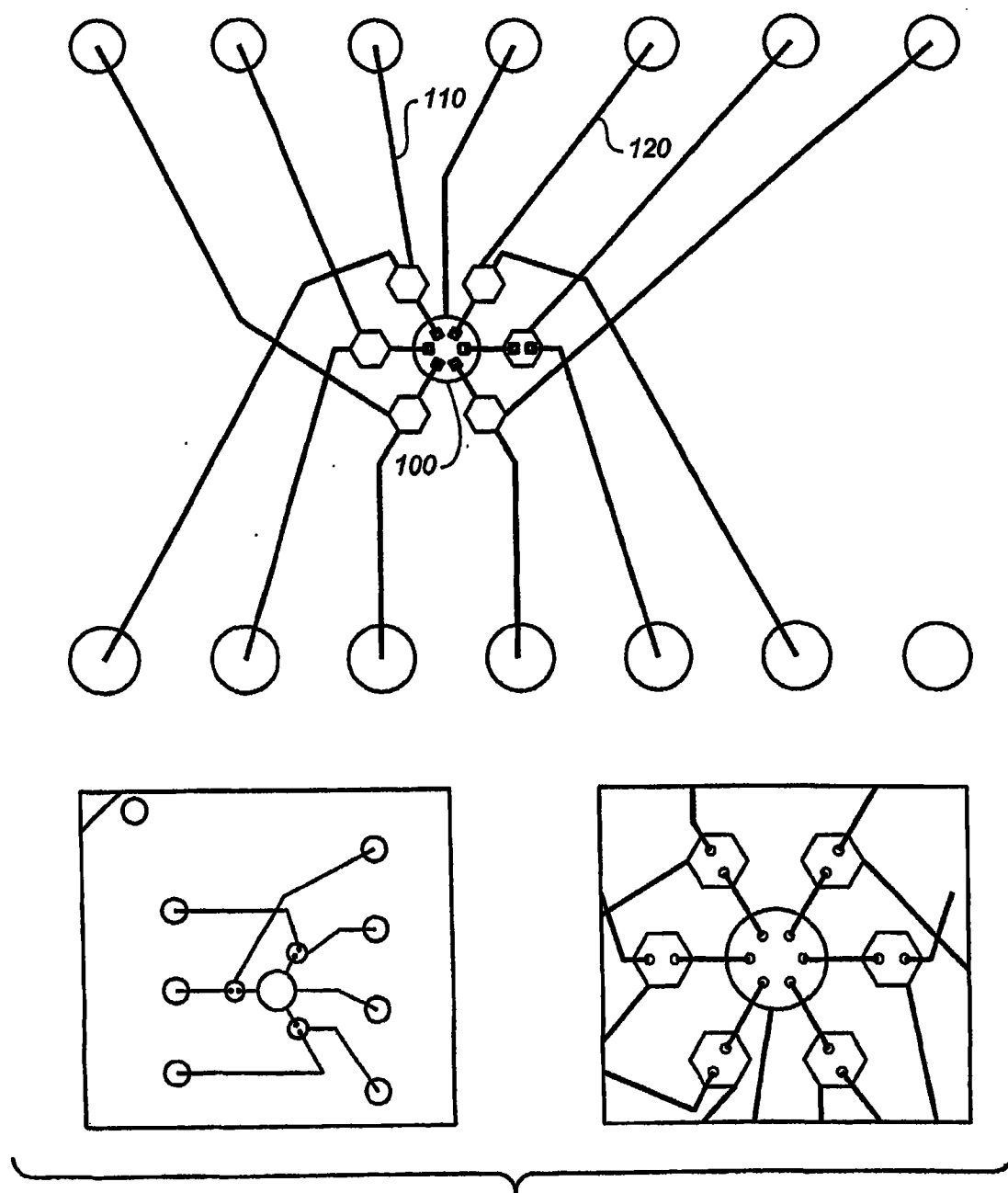


图 11

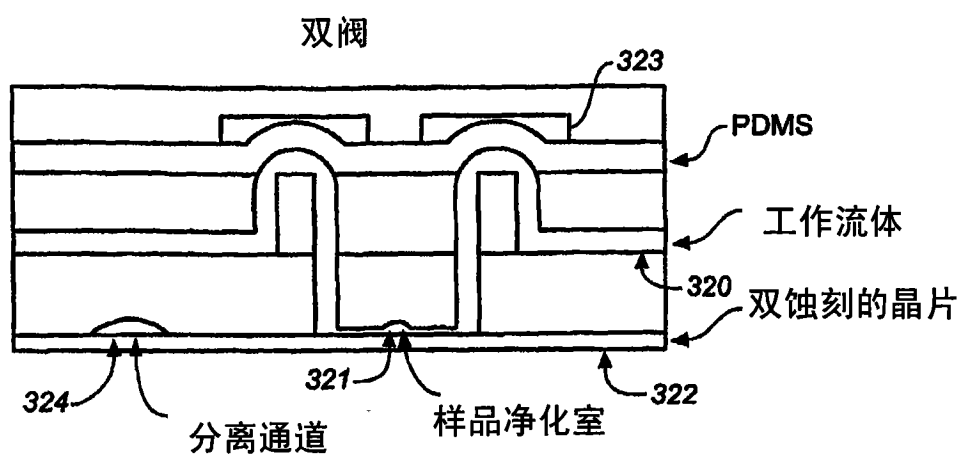


图 12

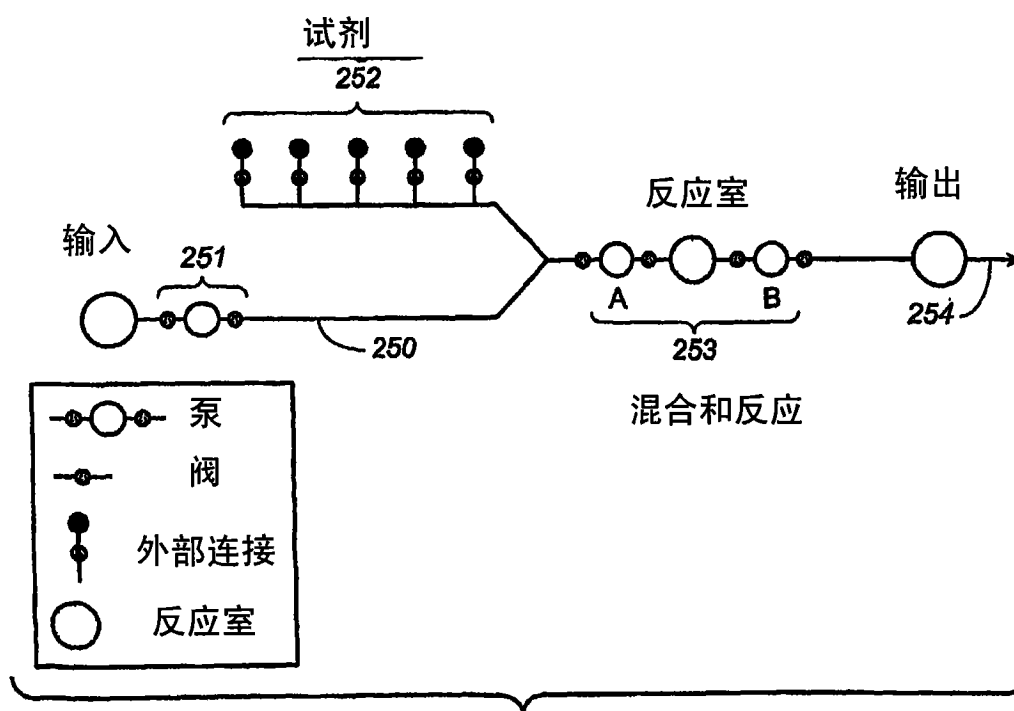


图 13

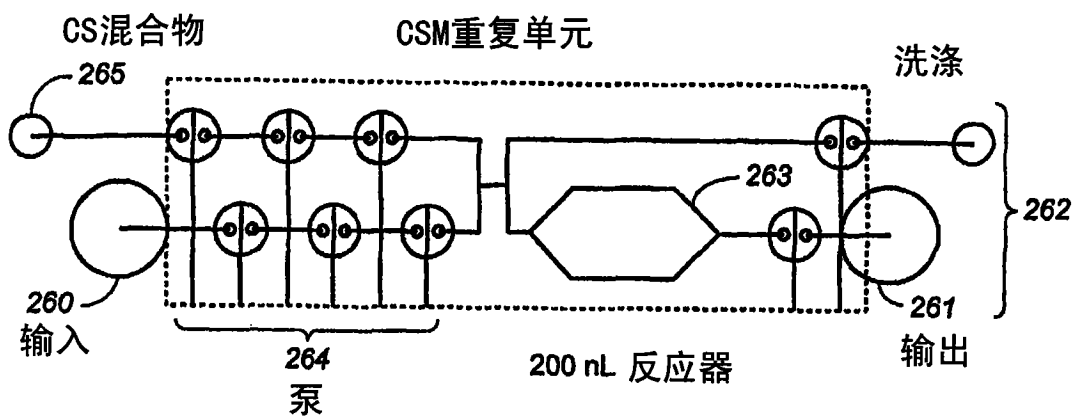


图 14

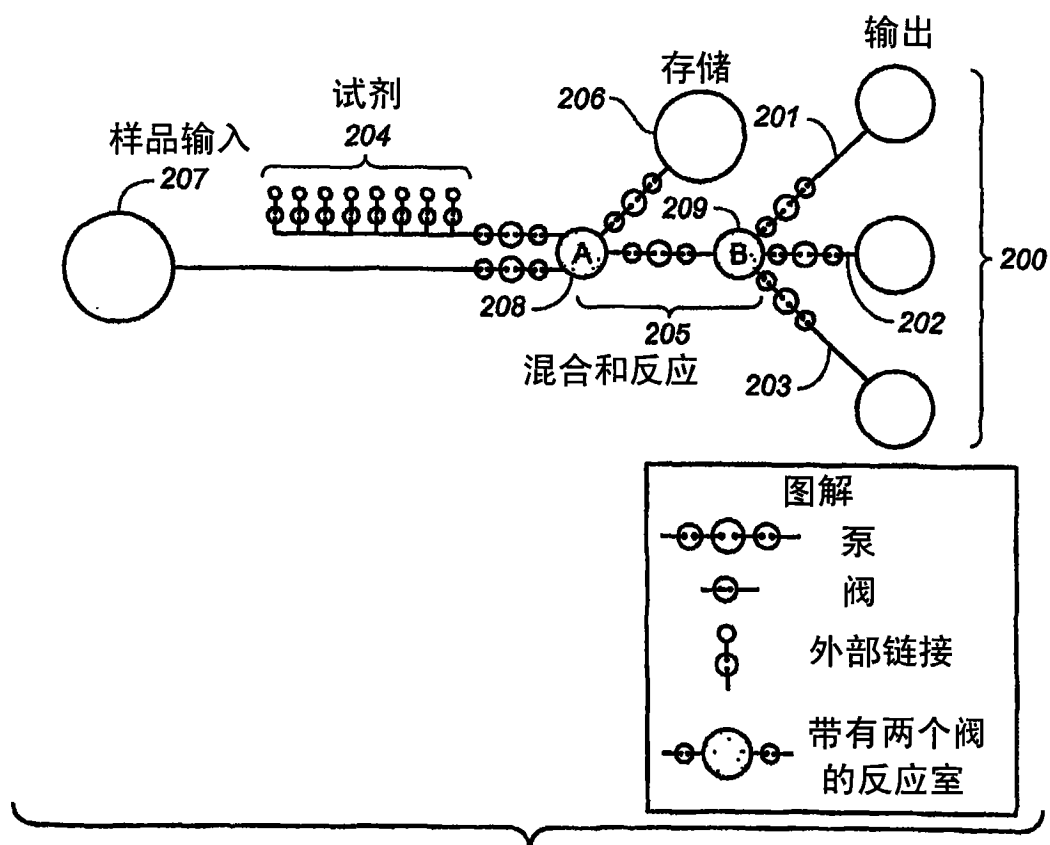


图 15

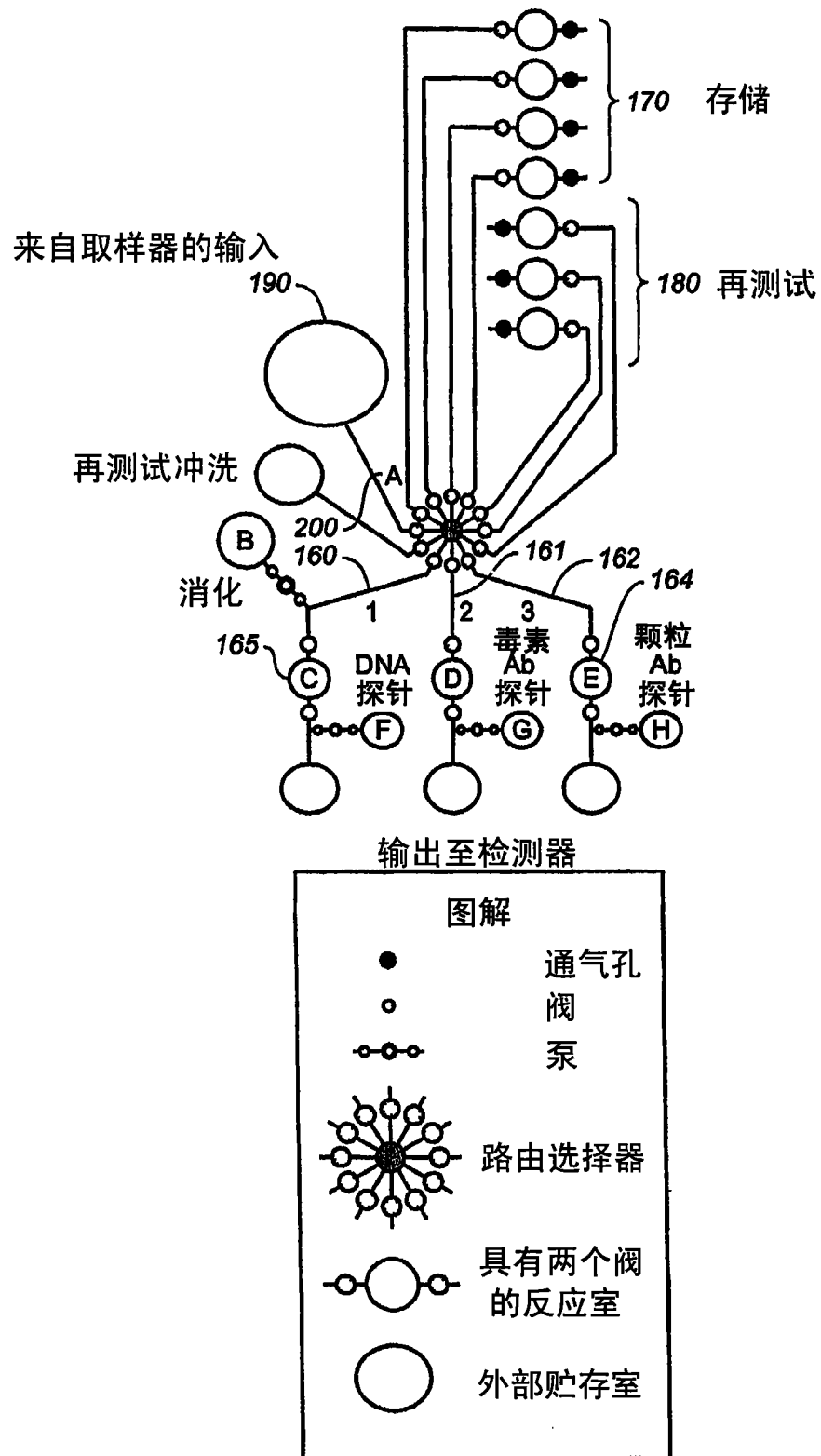


图 16

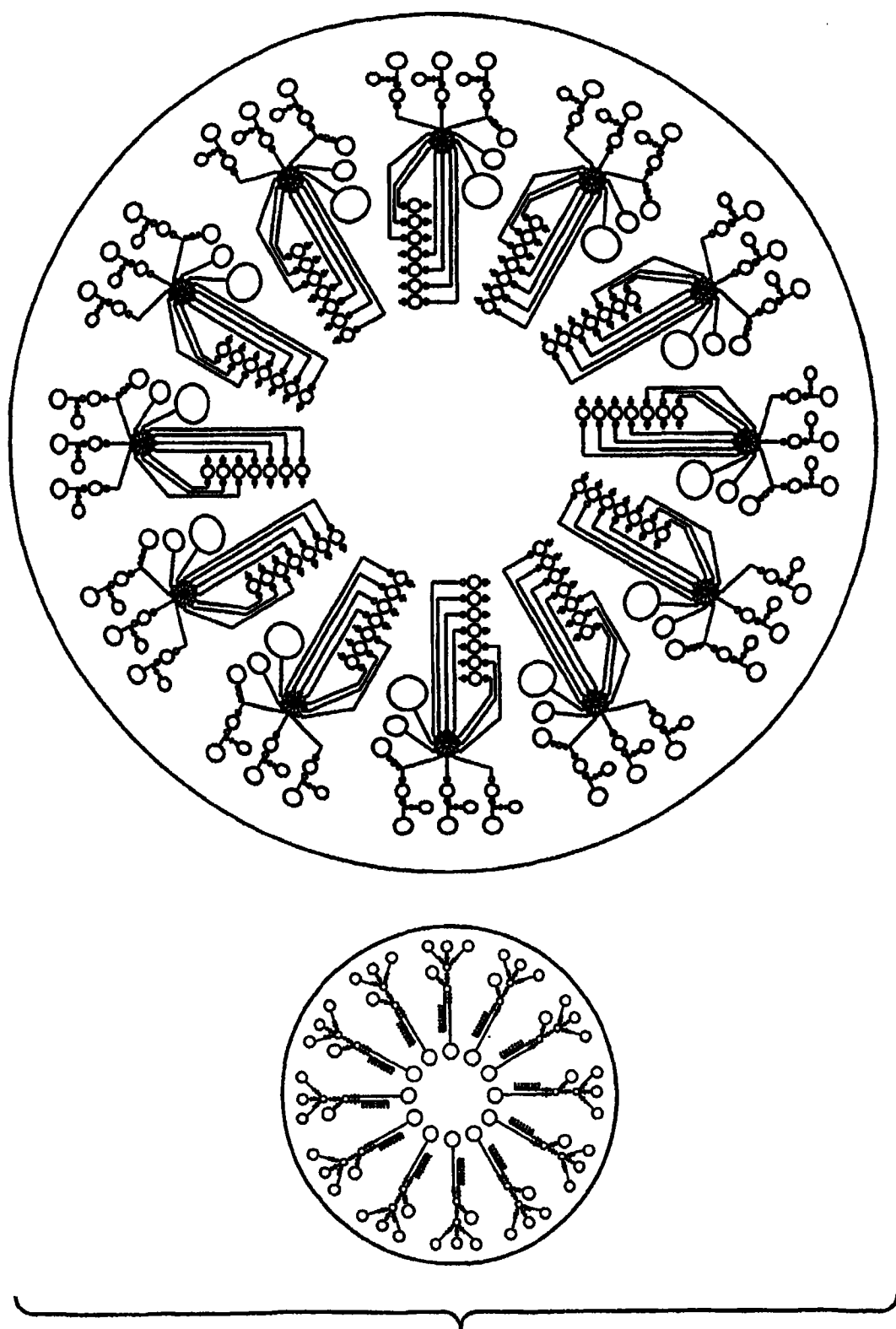


图 17

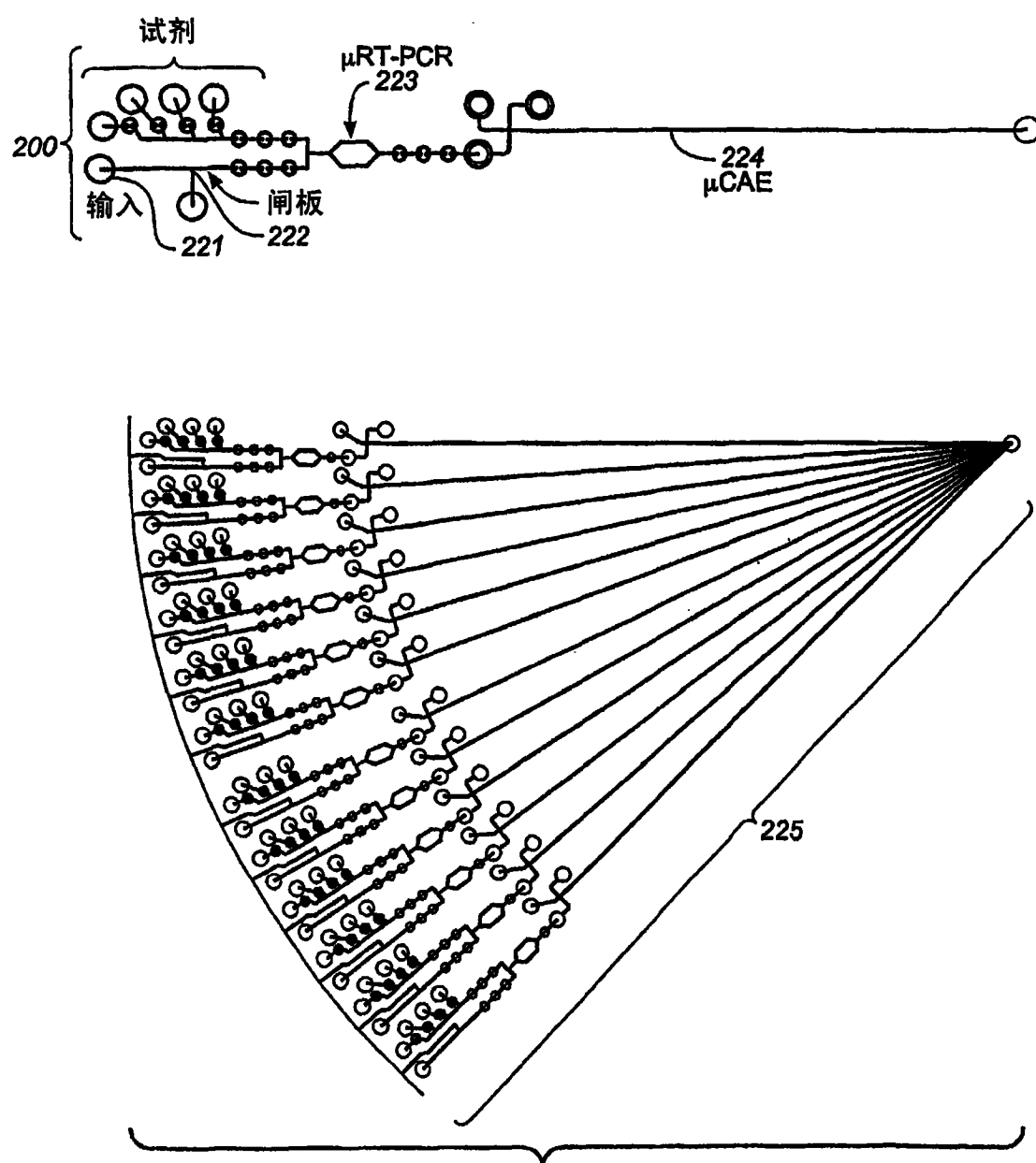


图 18

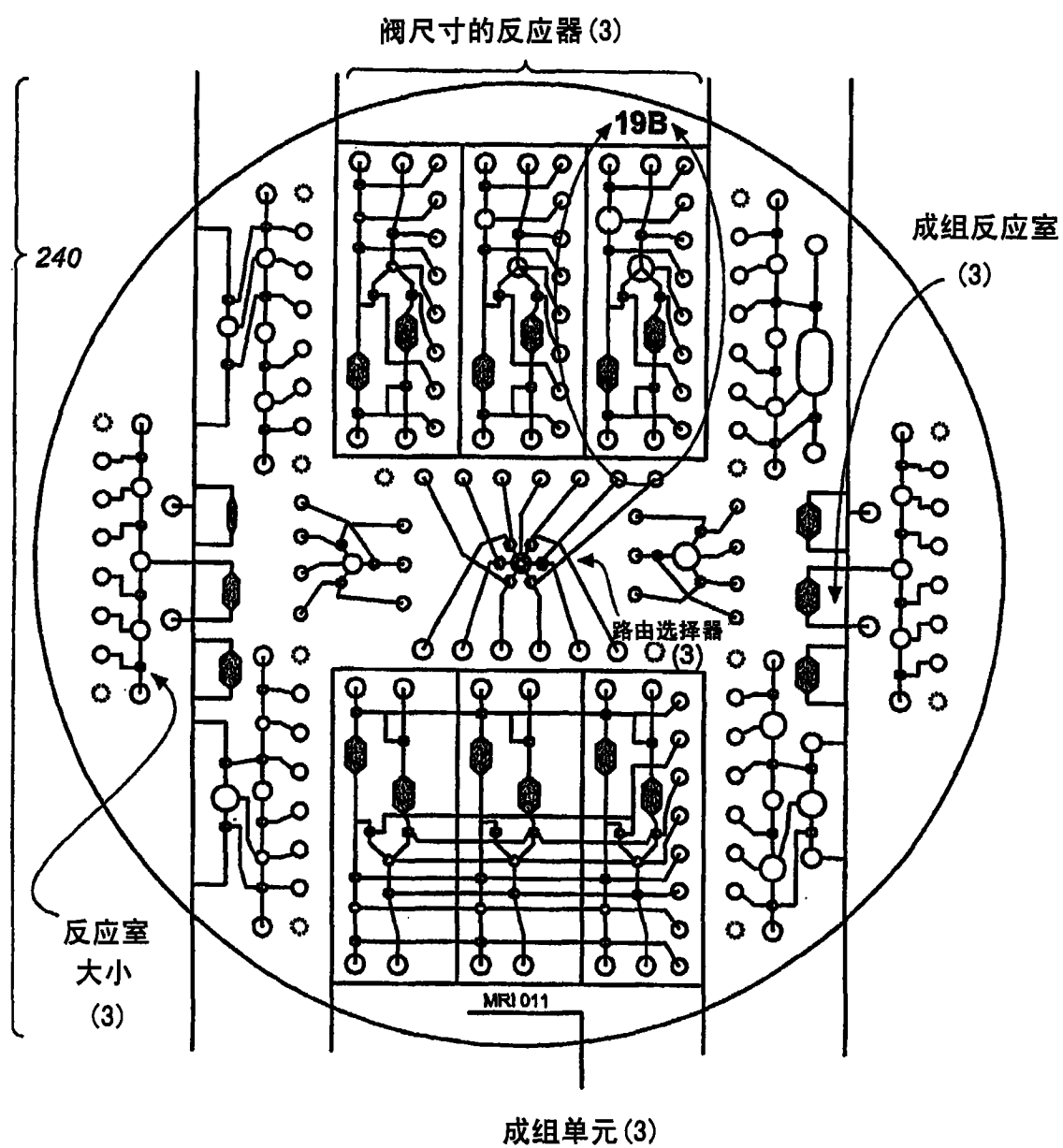


图 19A

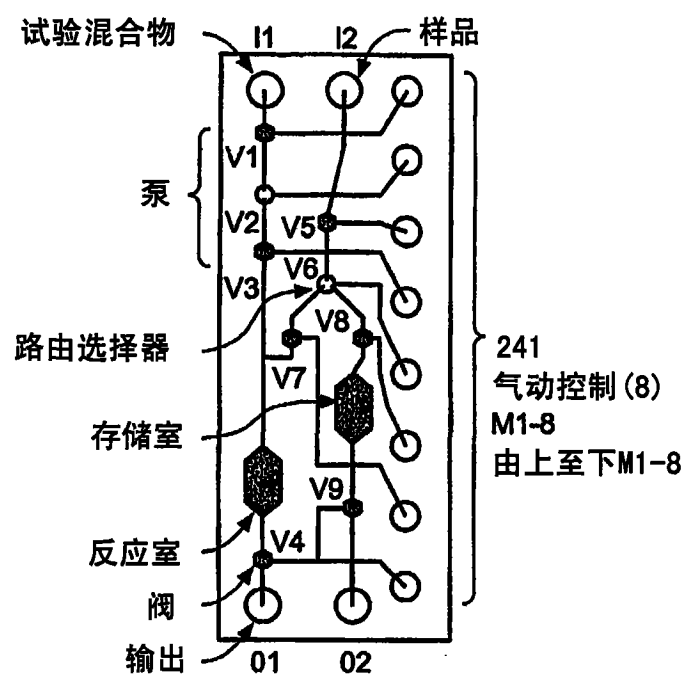


图 19B

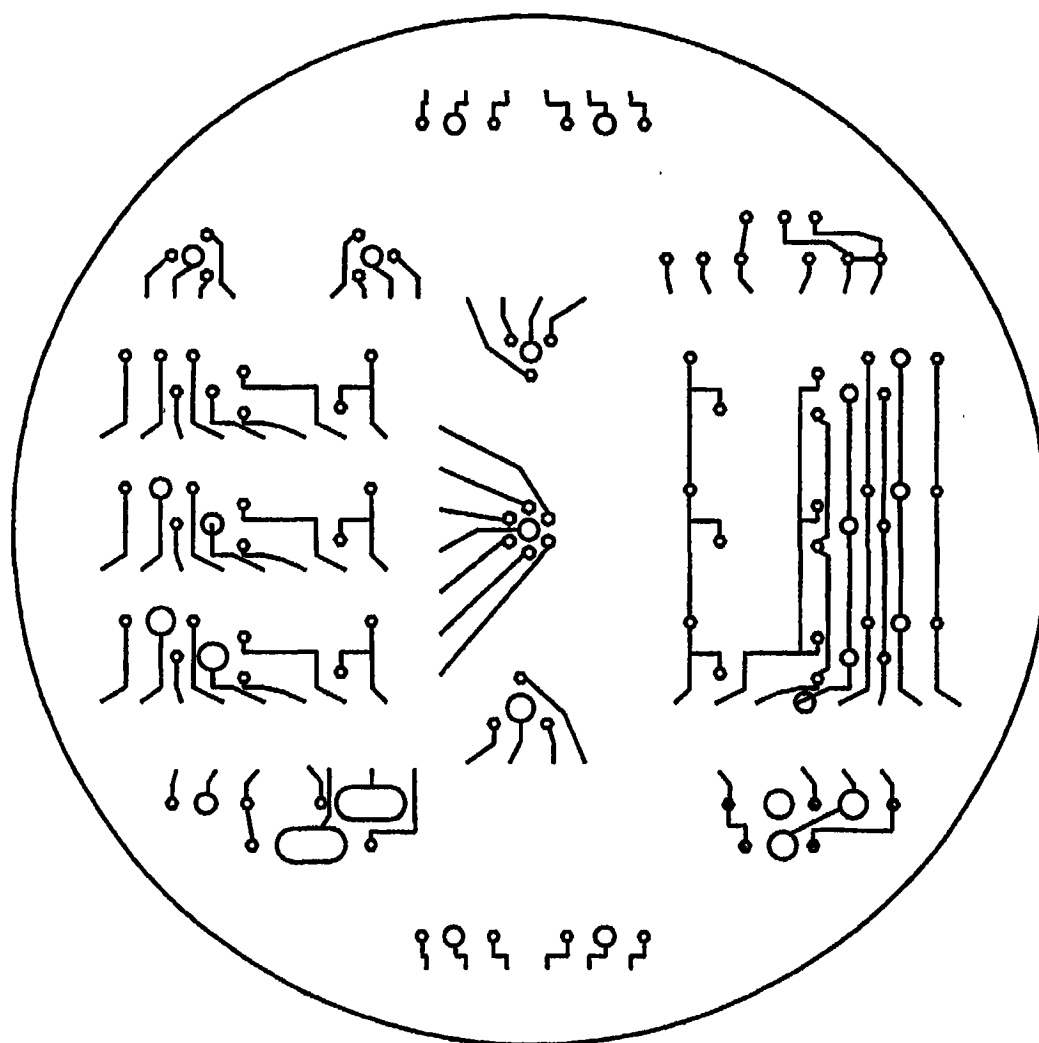


图 19C

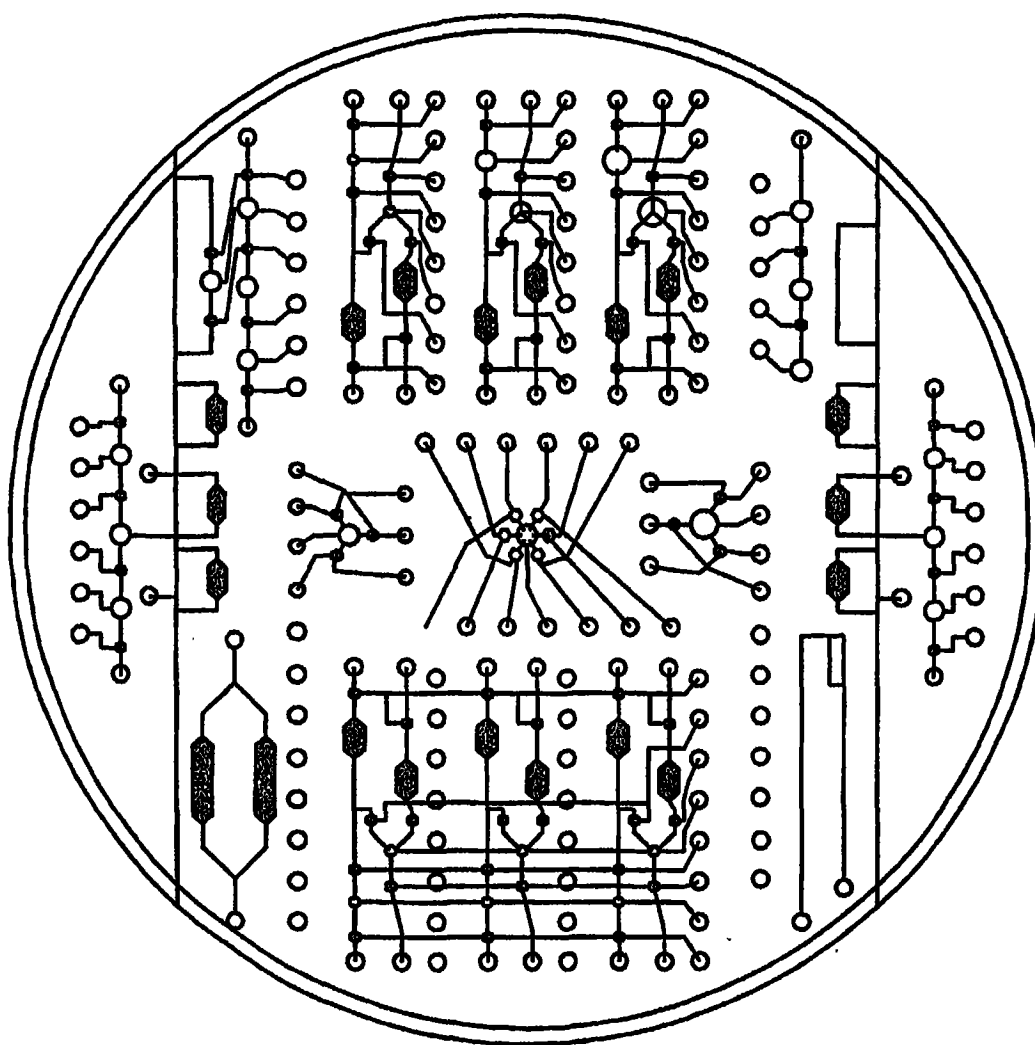


图 19D

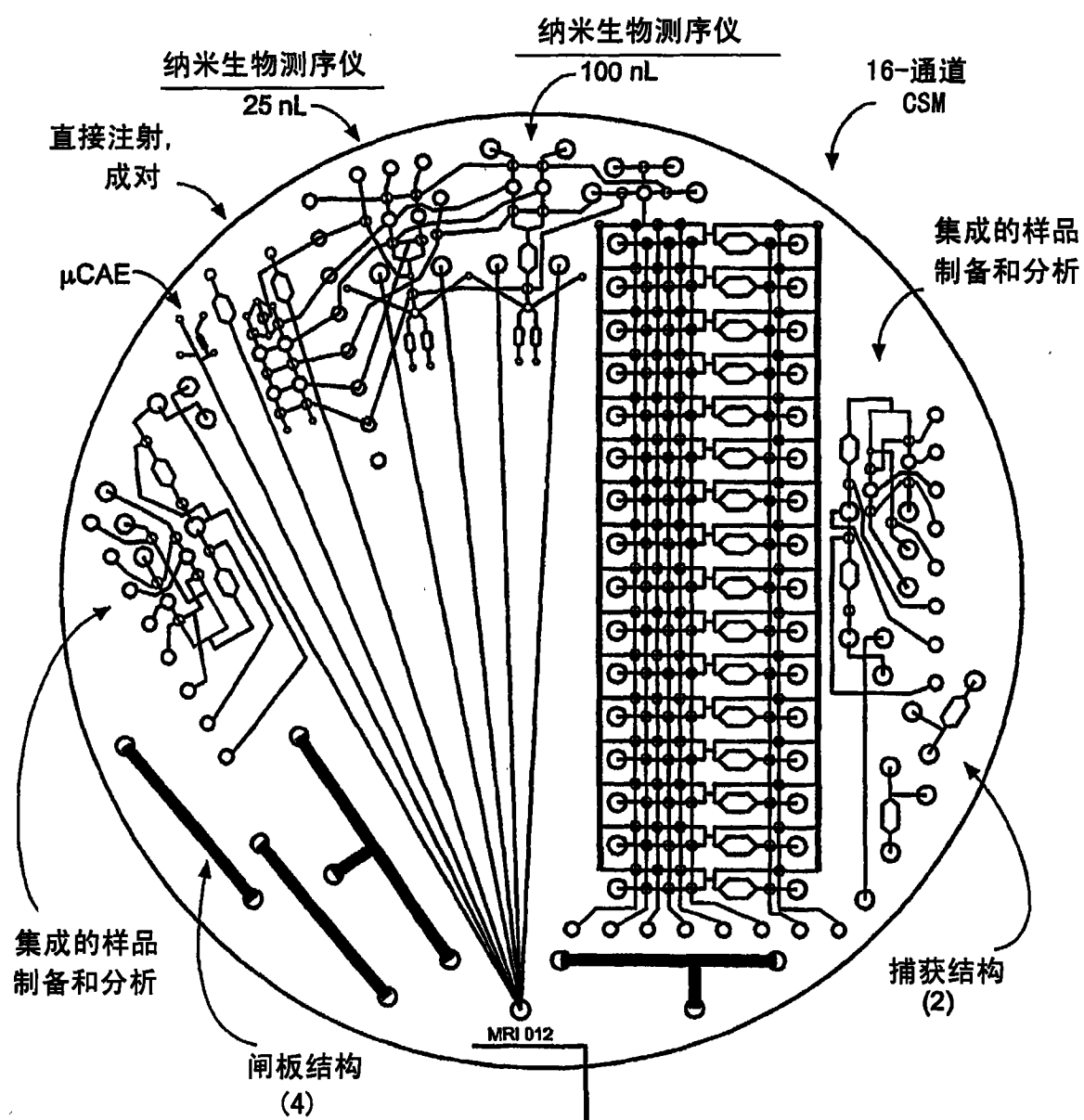


图 20

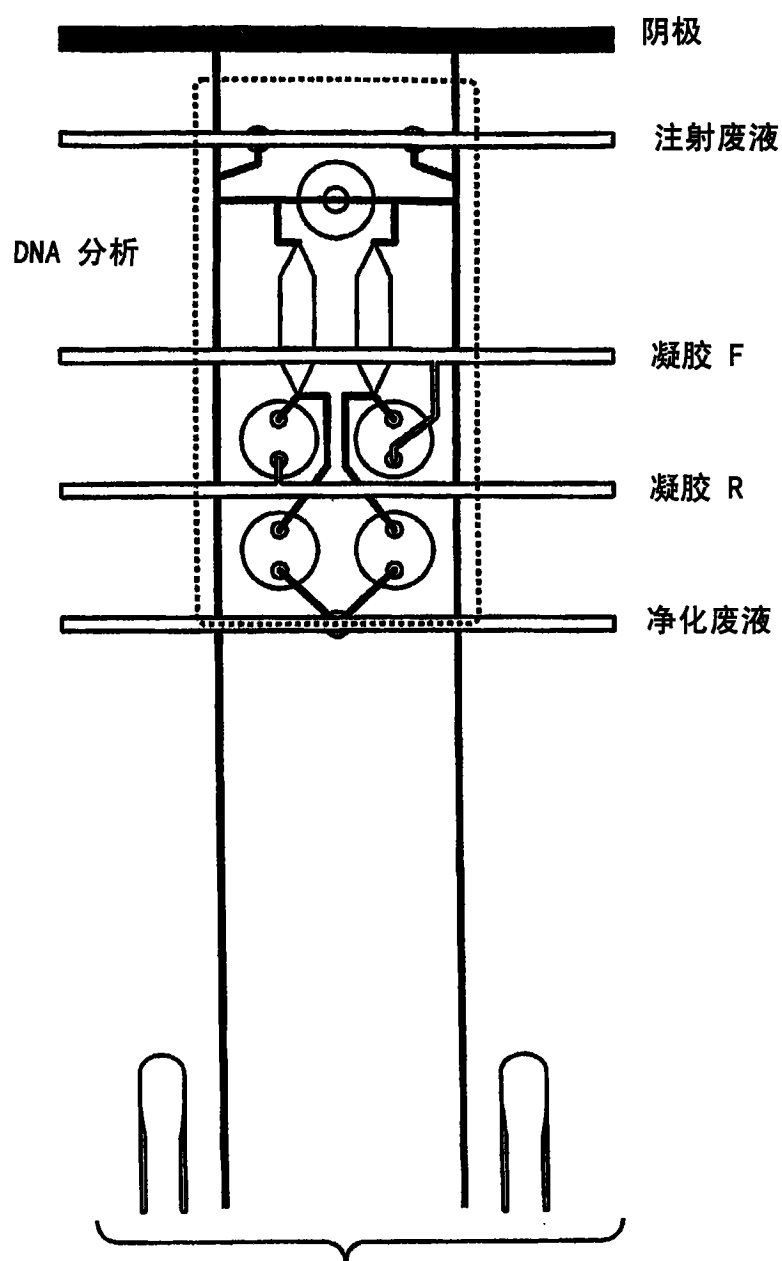


图 21

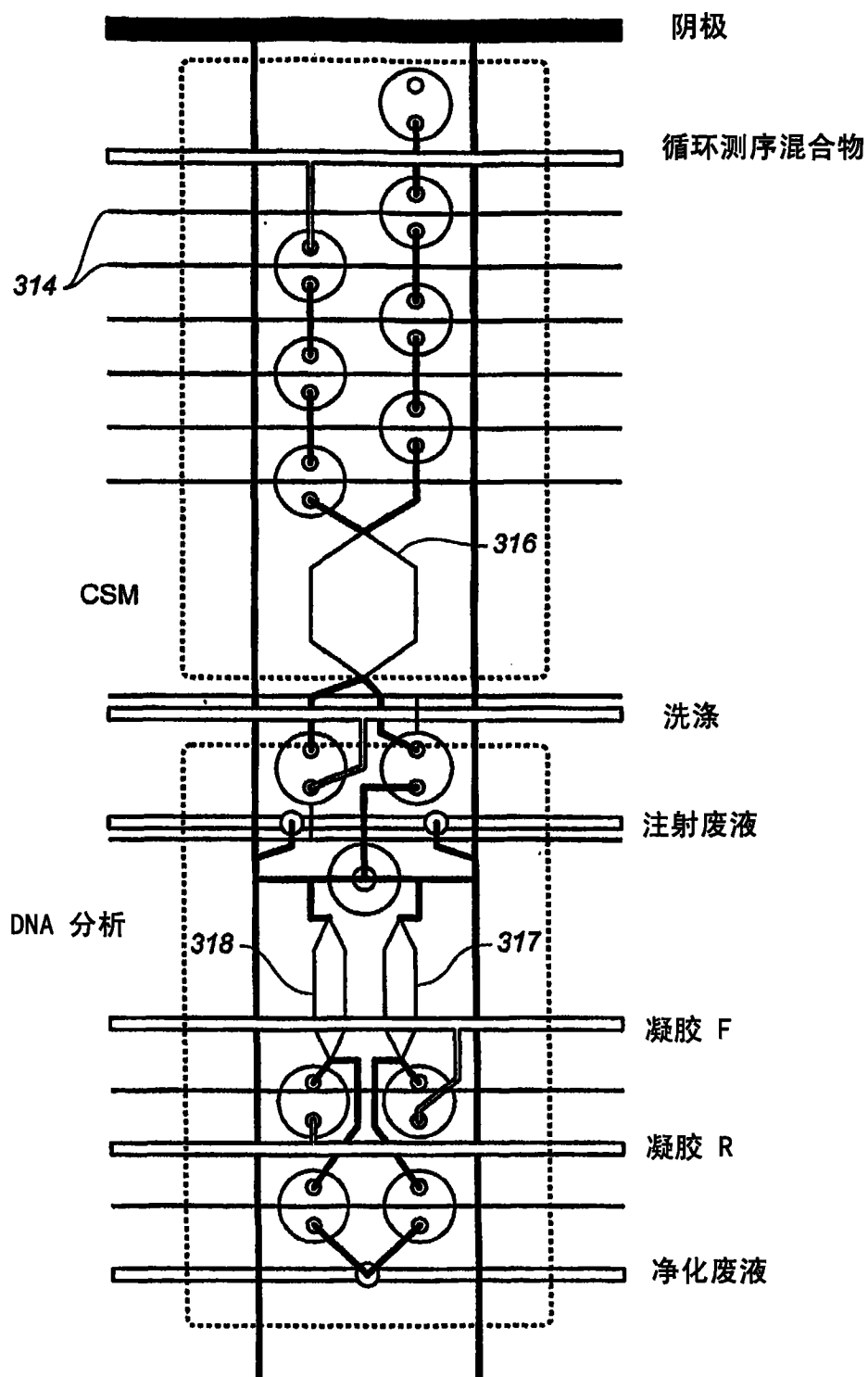


图 22

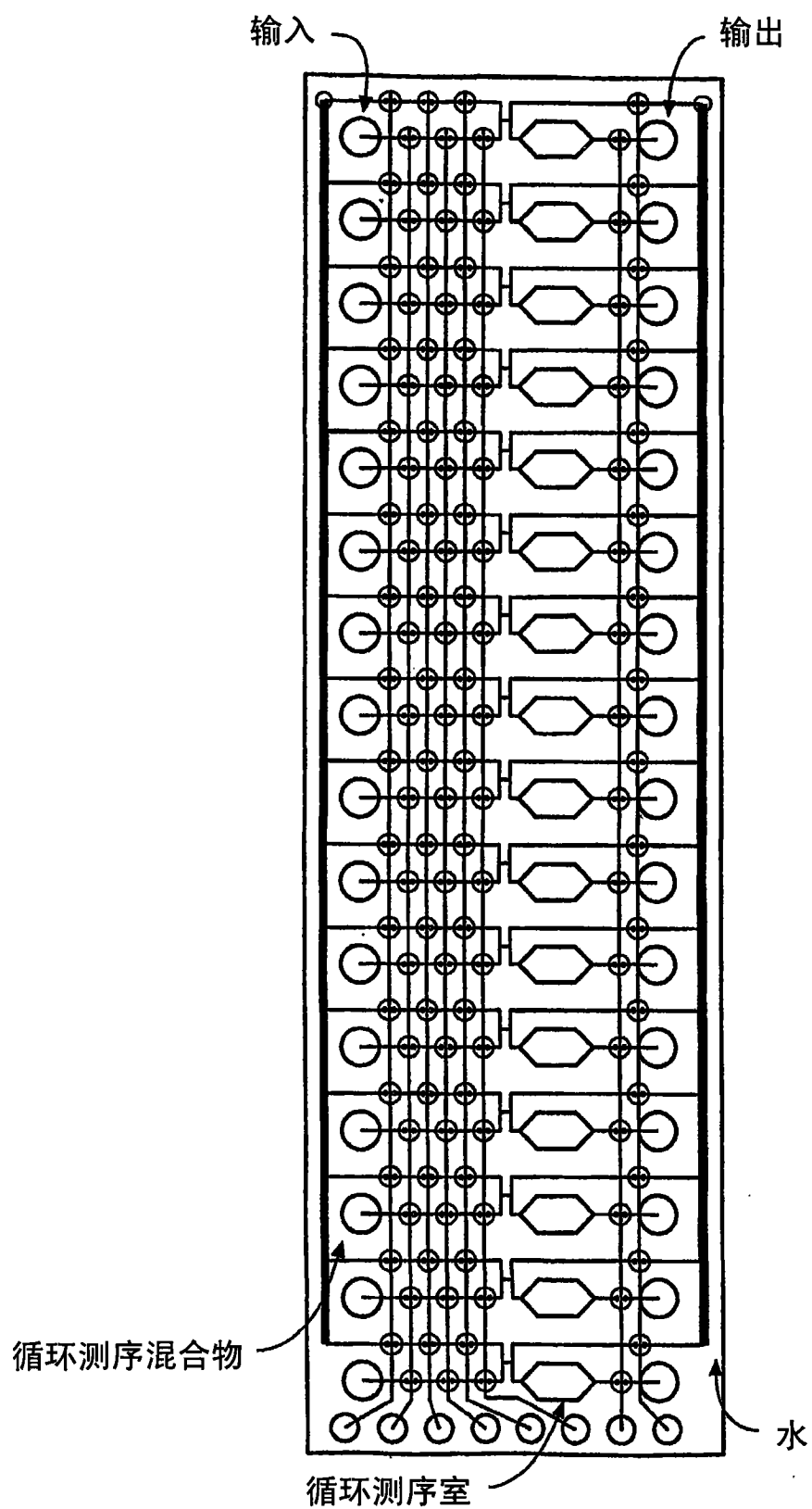


图 23

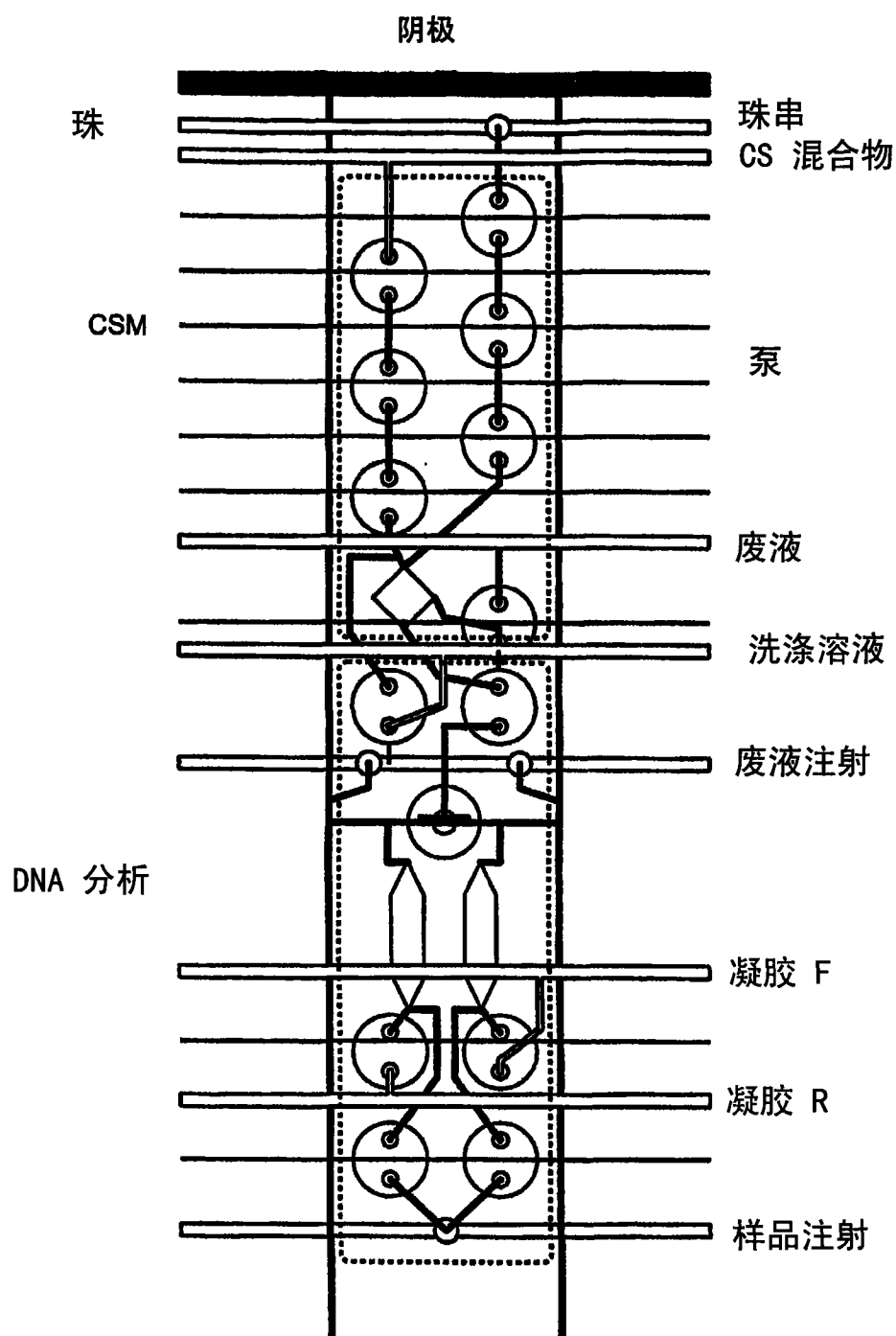


图 24

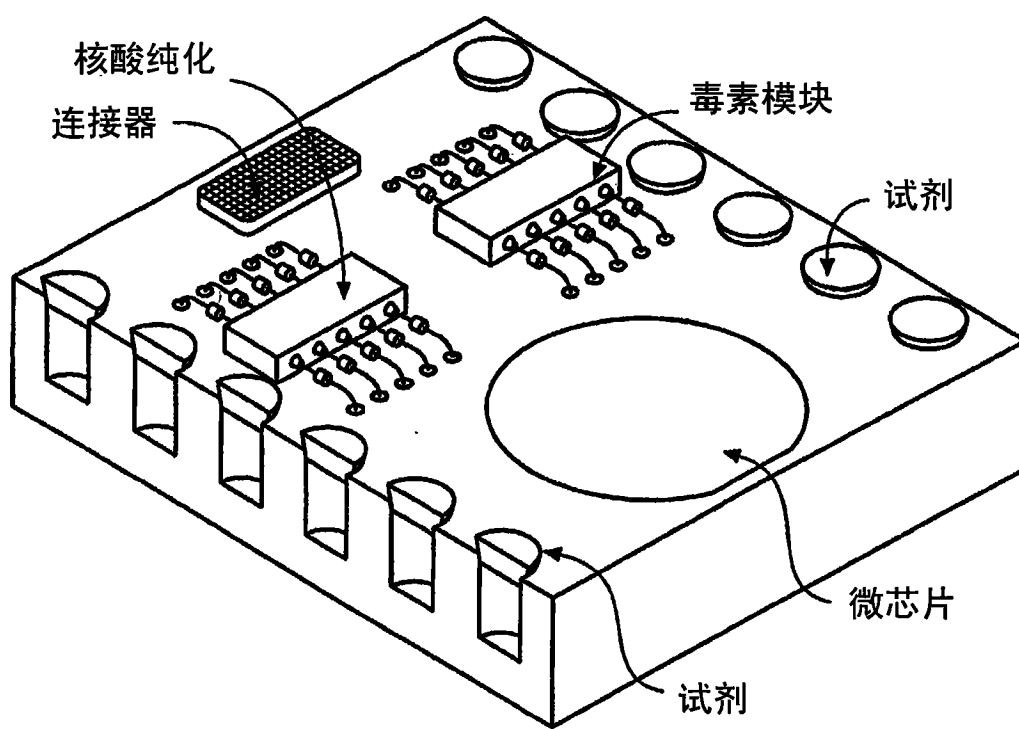


图 25

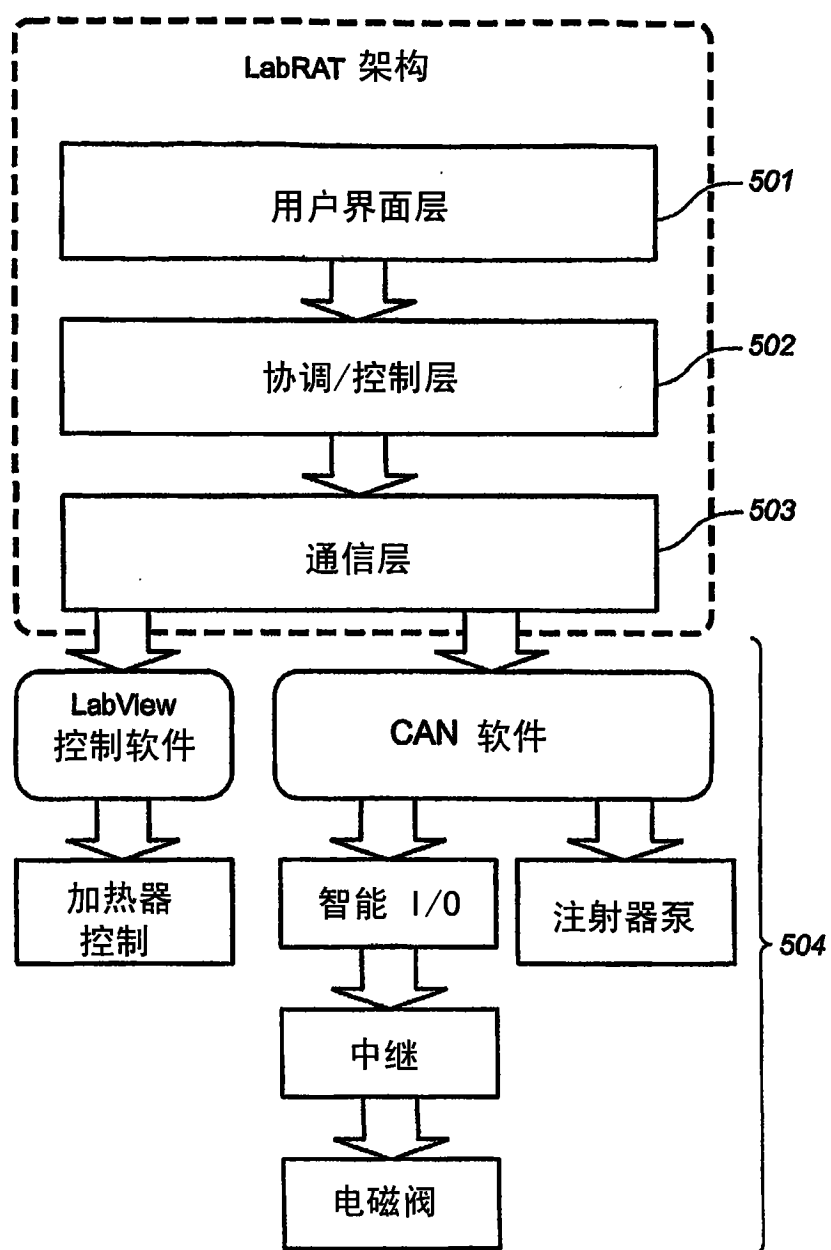


图 26

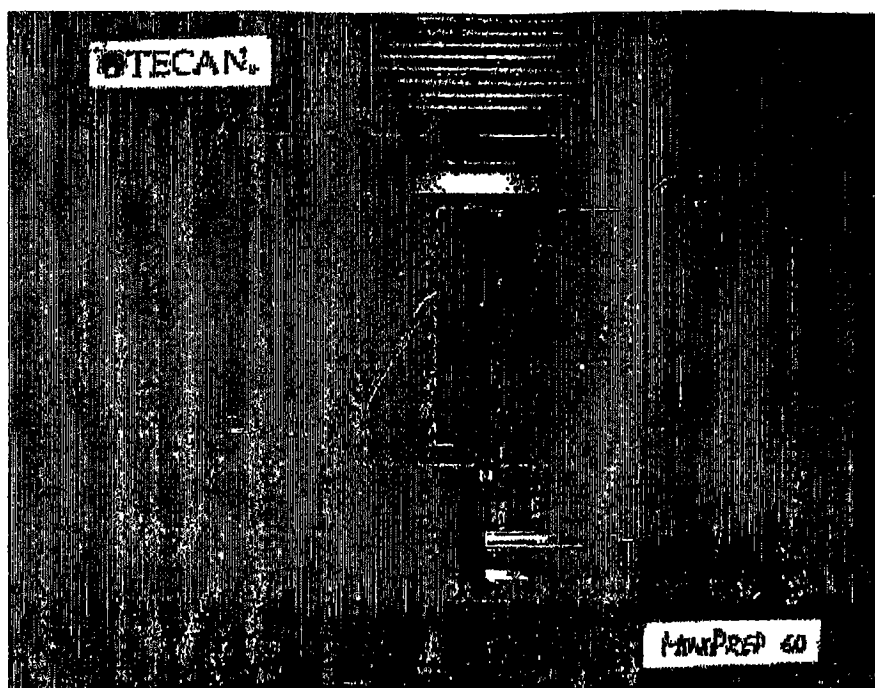


图 27

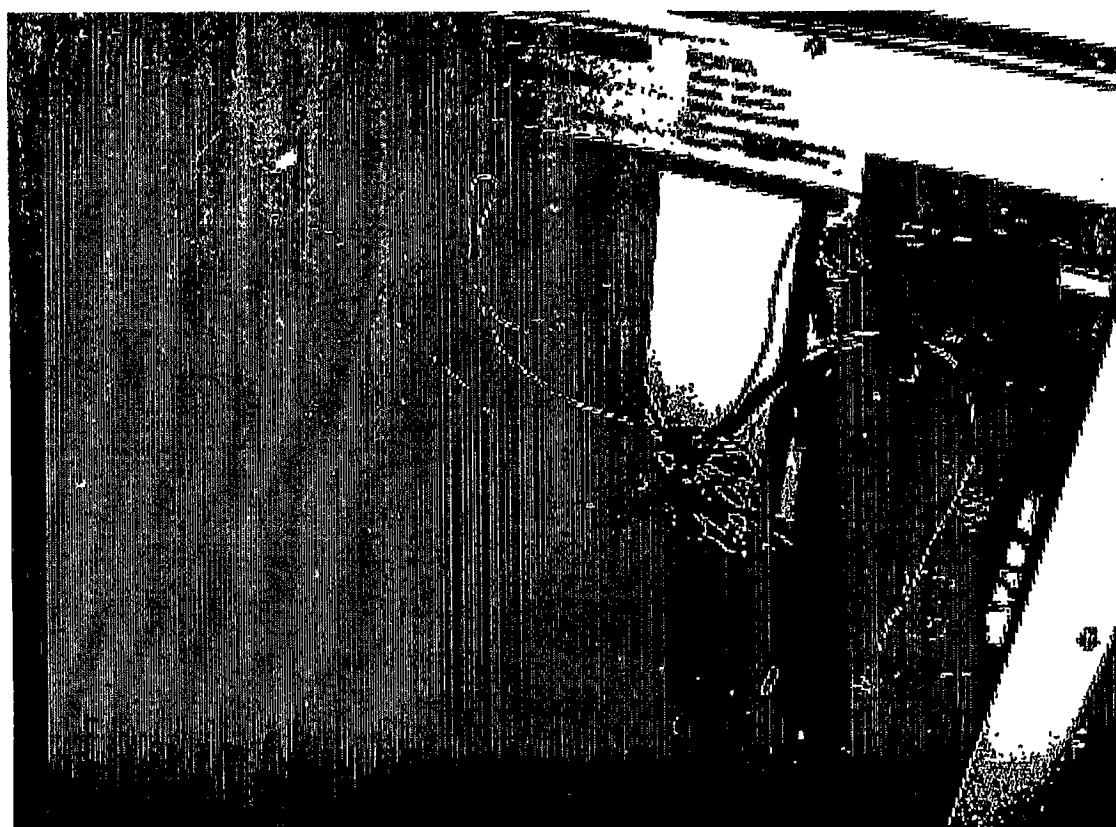


图 28

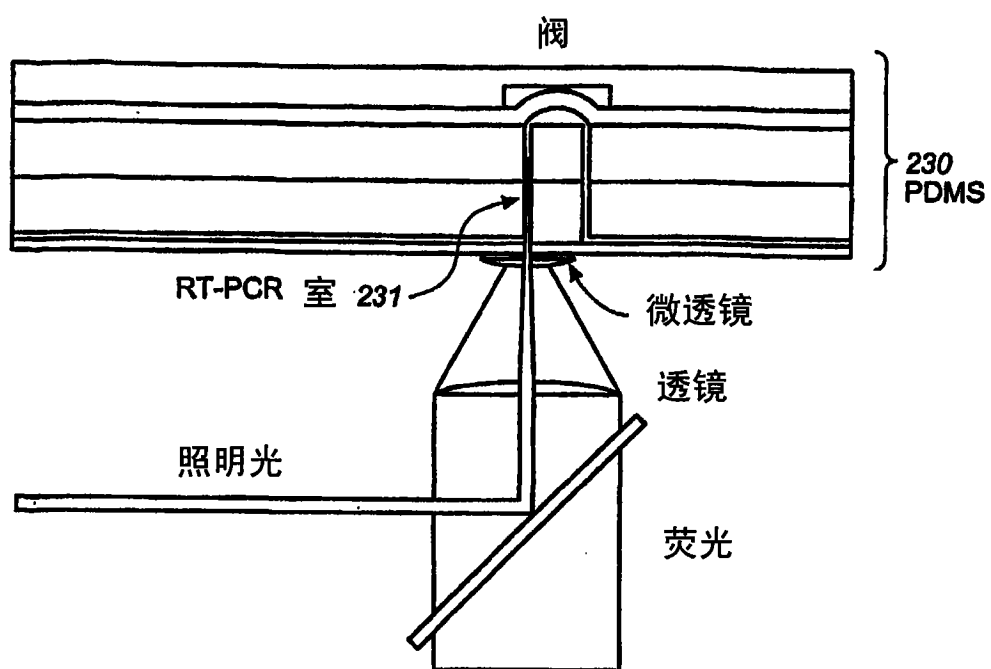


图 29

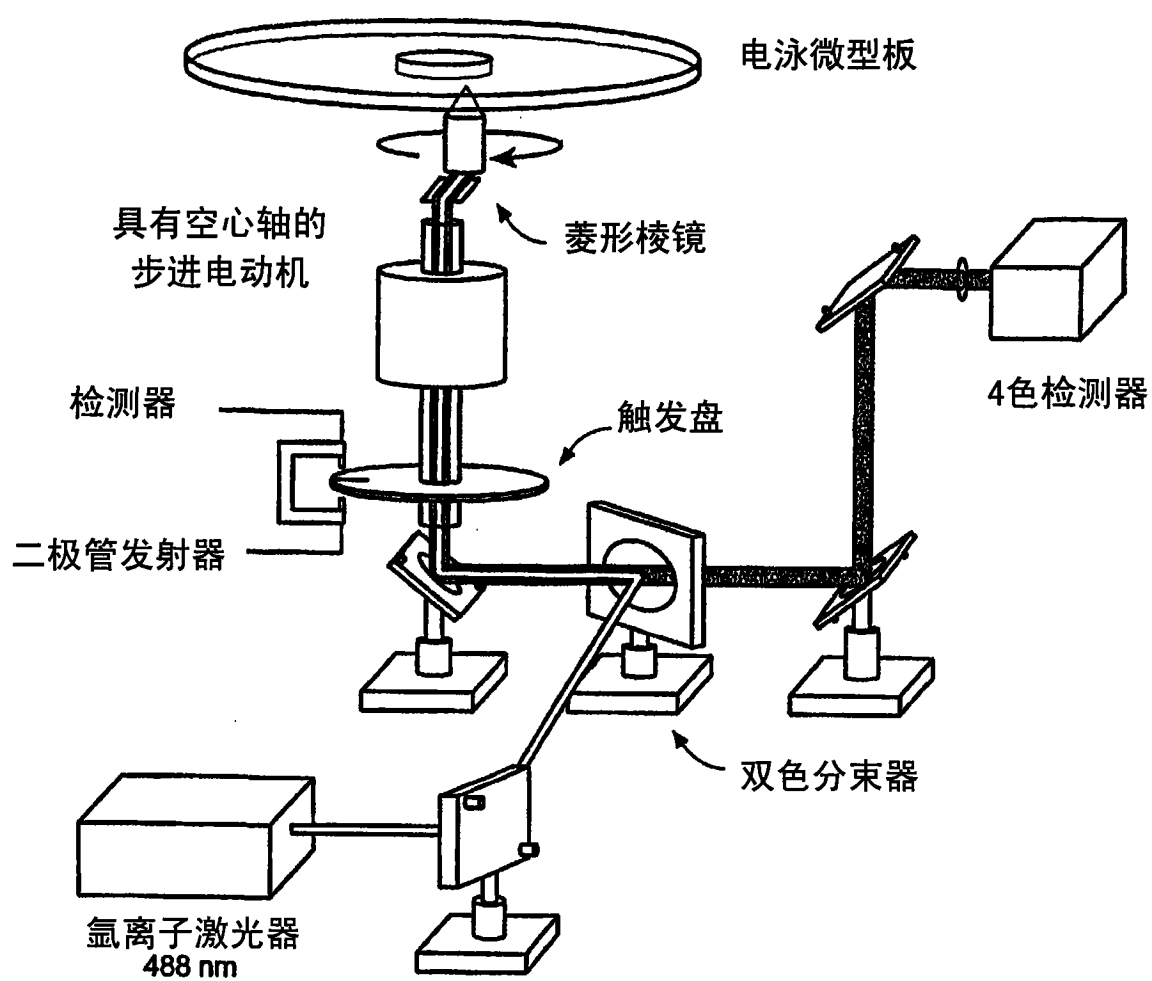


图 30

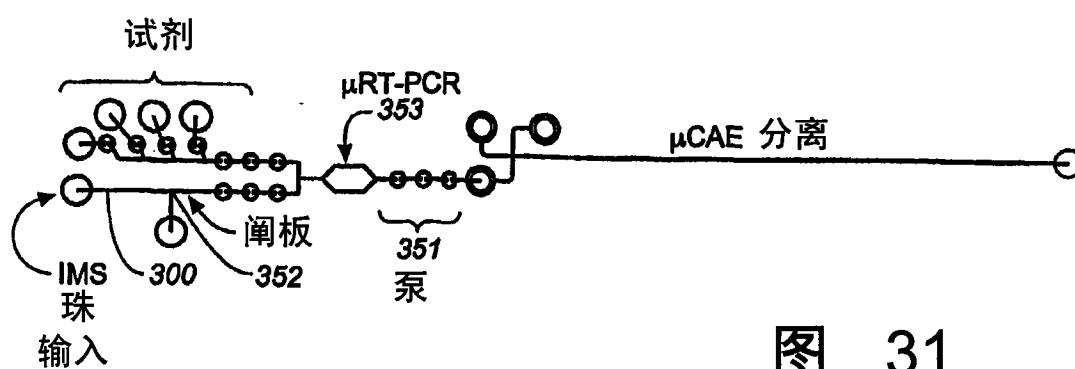


图 31

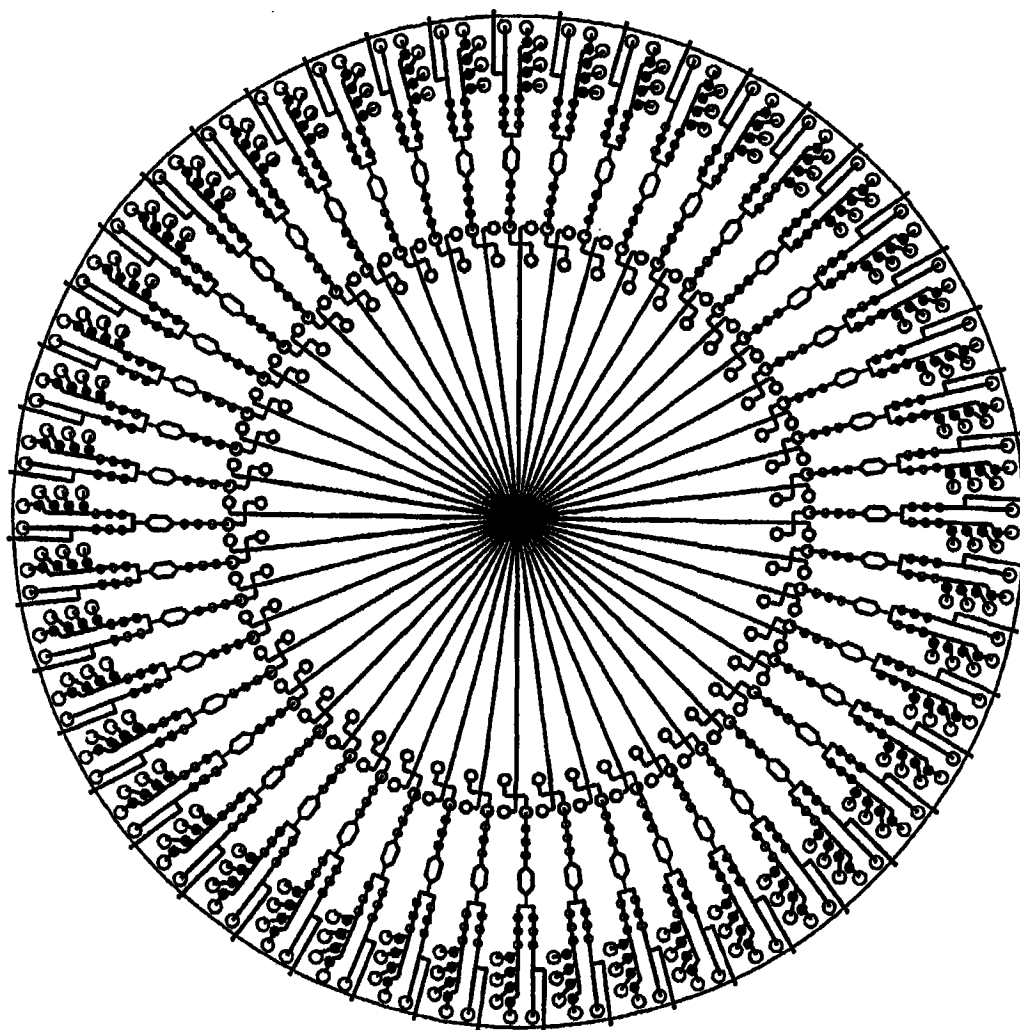


图 32

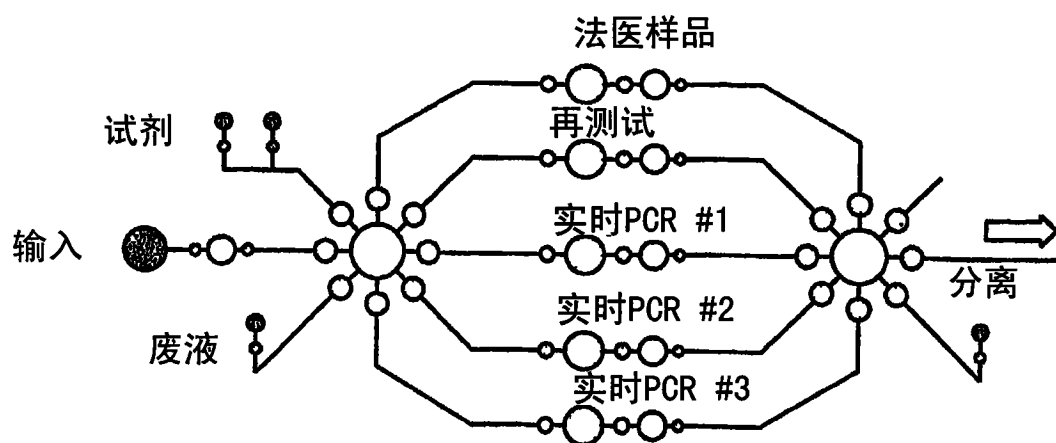


图 33

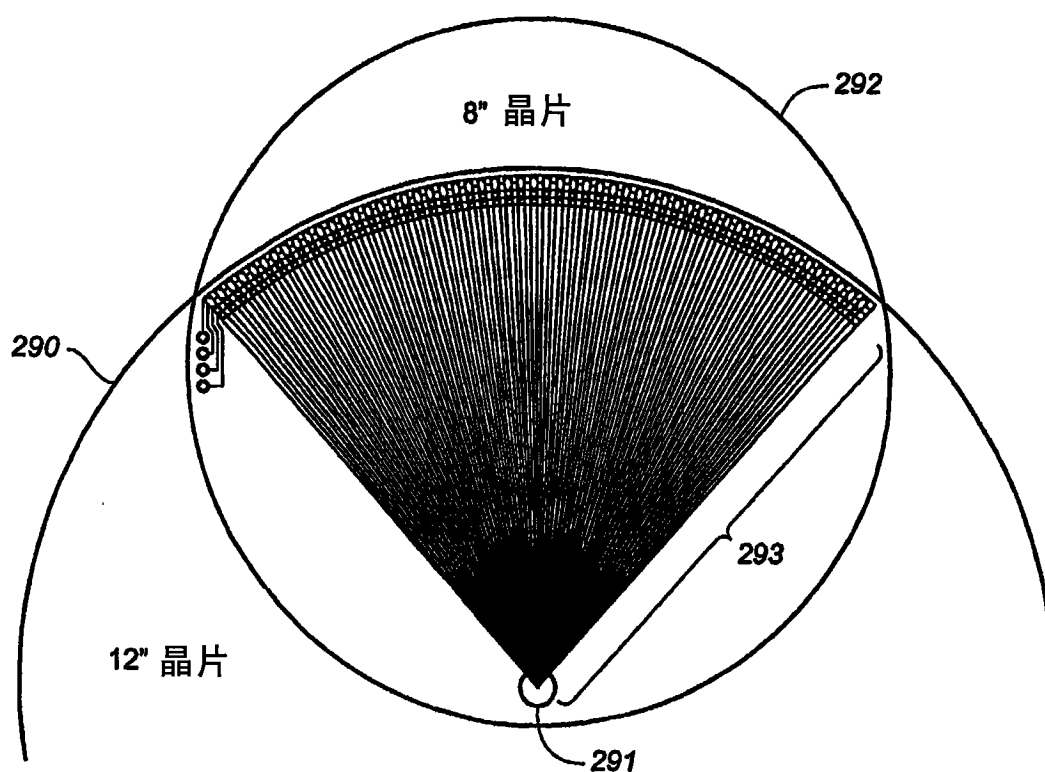


图 34

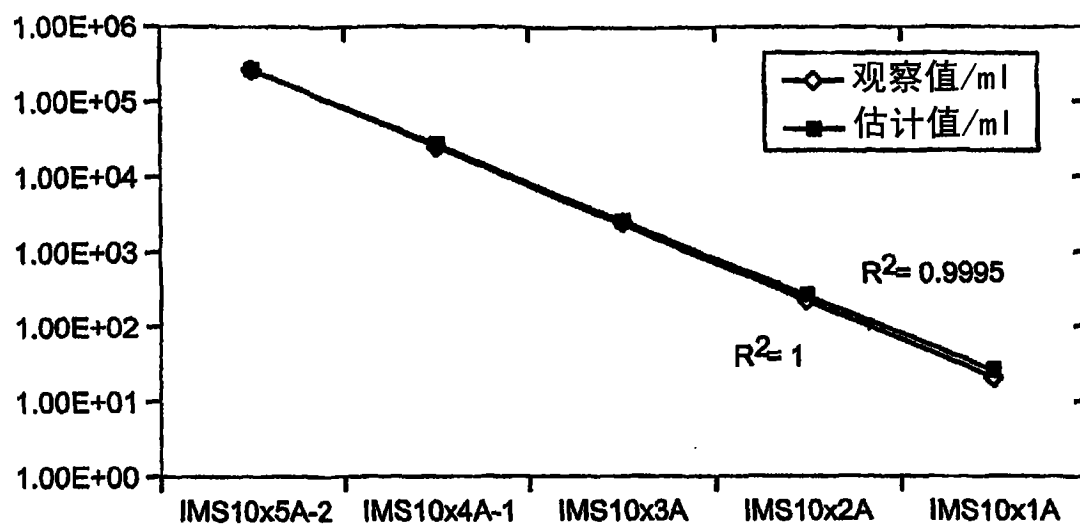


图 35

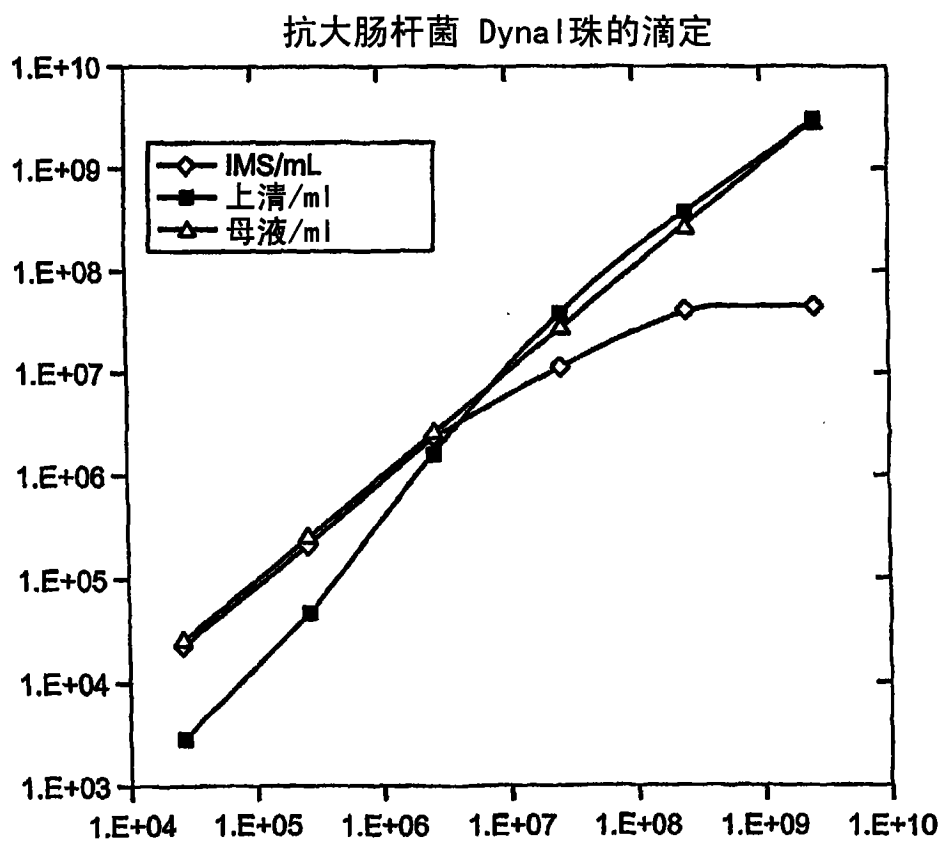


图 36

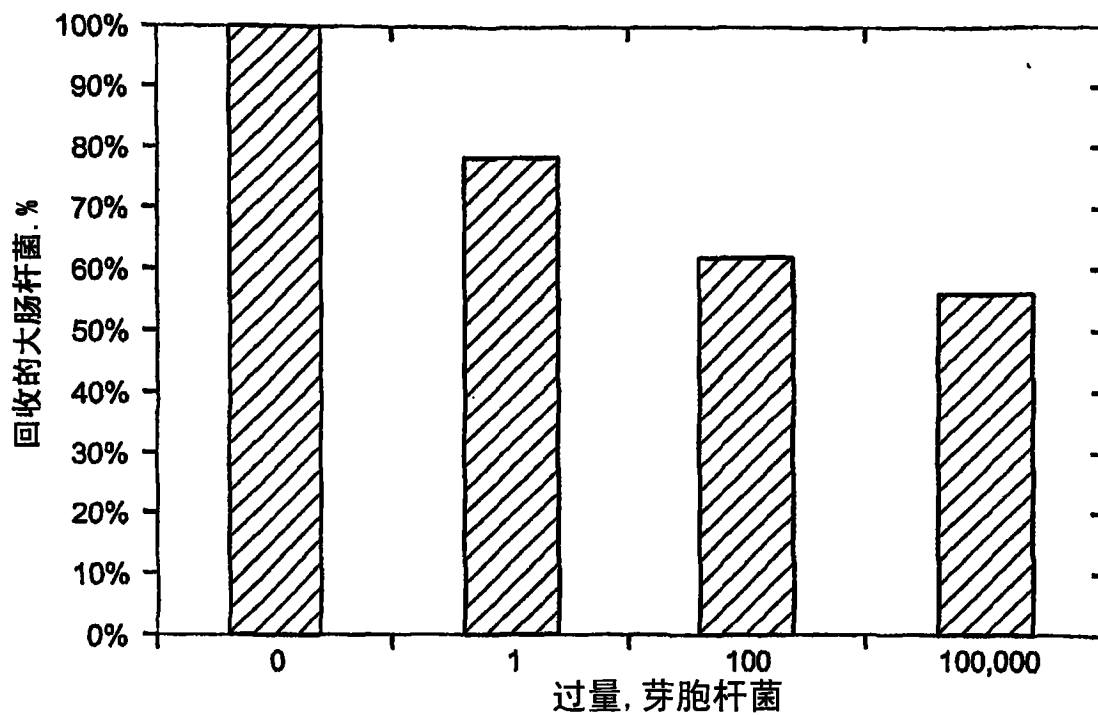


图 37

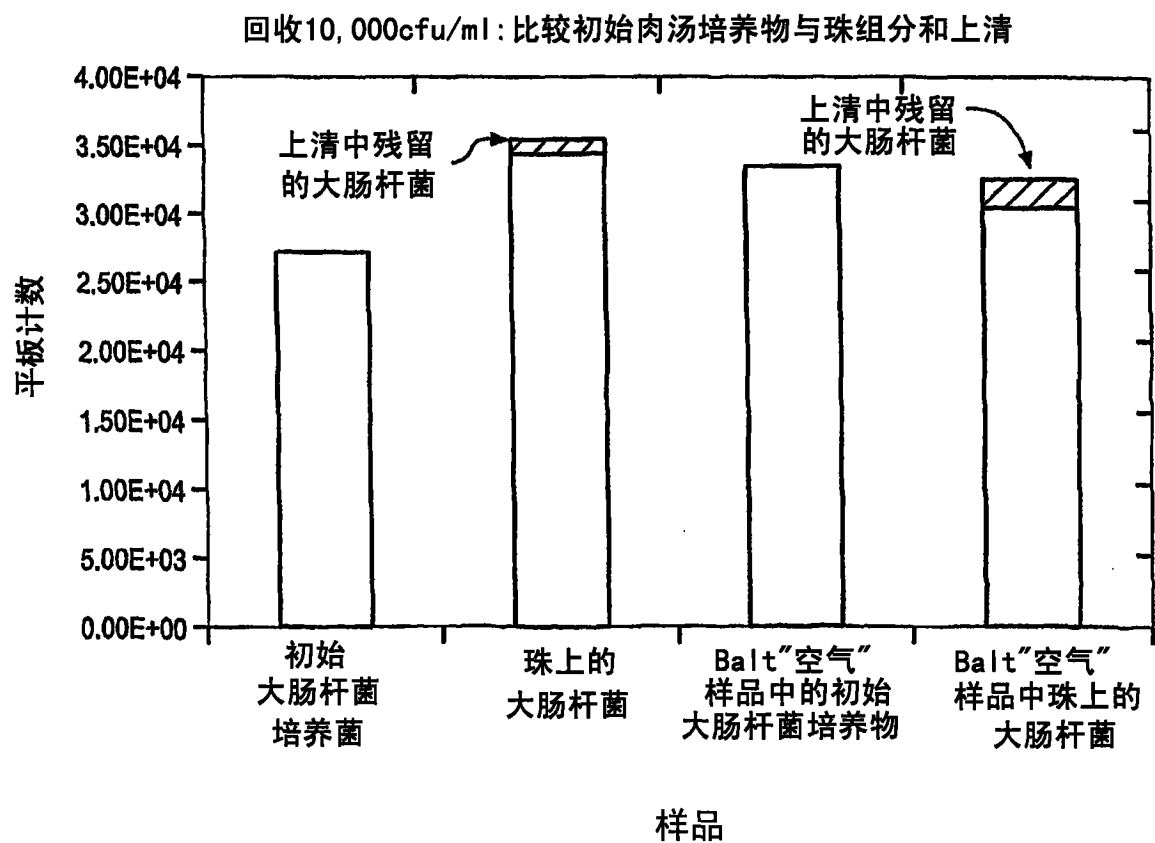


图 39

掺入含Baltimore“空气”提取物的水中的大肠杆菌0157

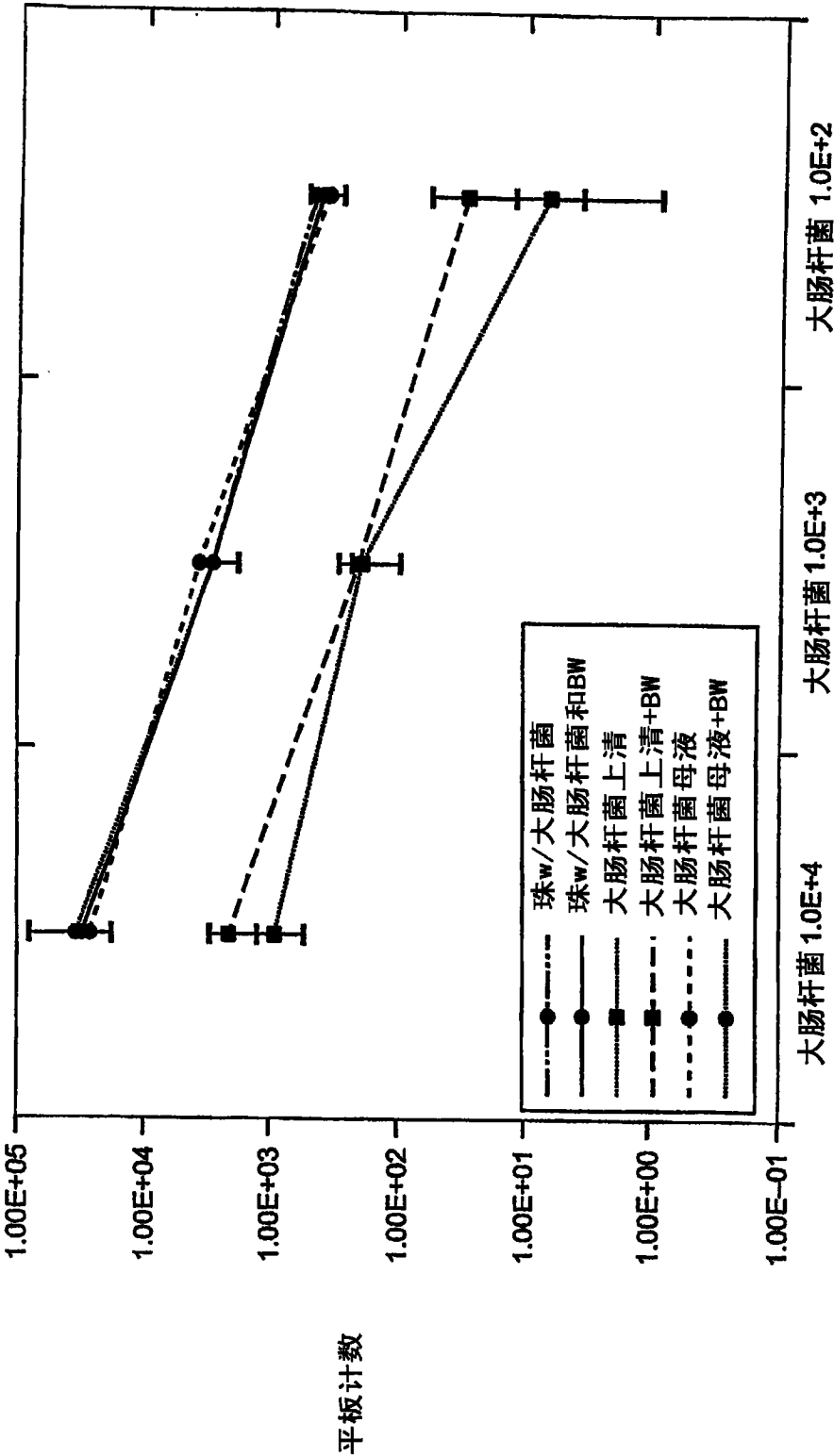


图 38

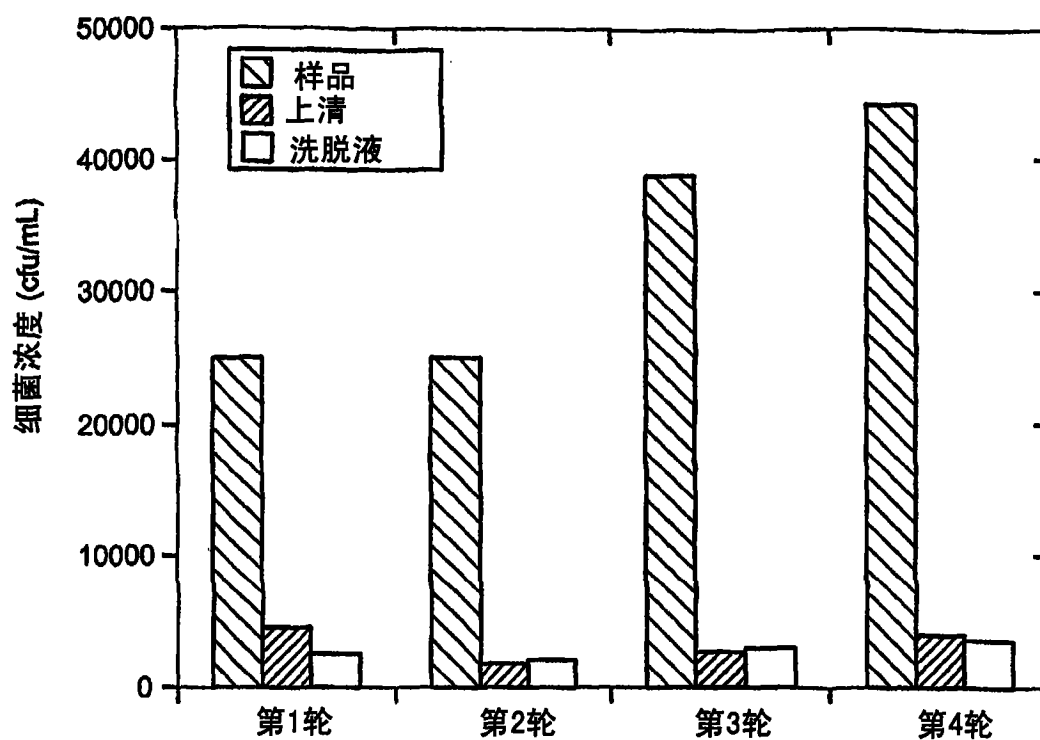


图 40

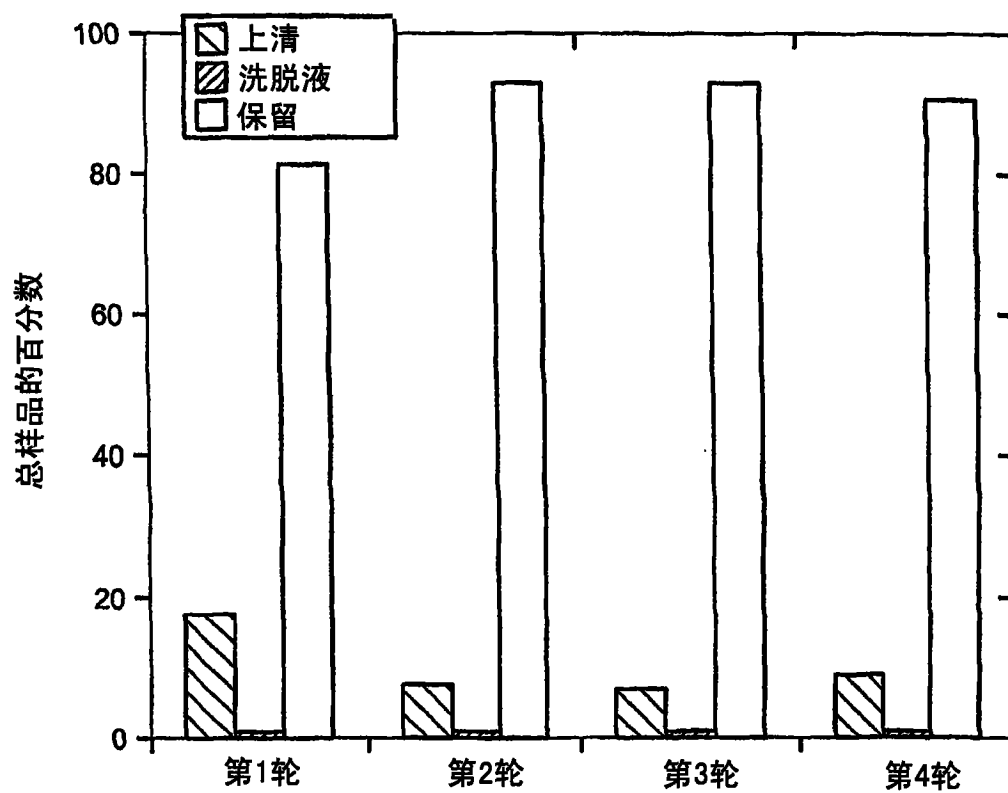


图 41

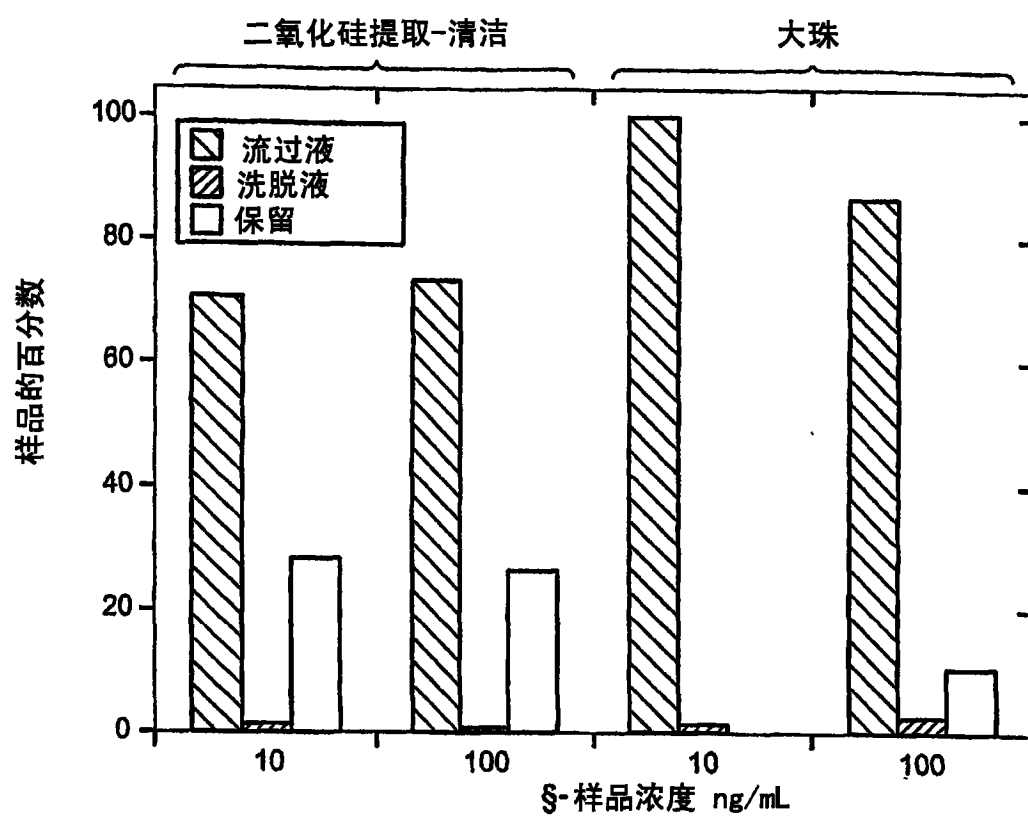


图 42

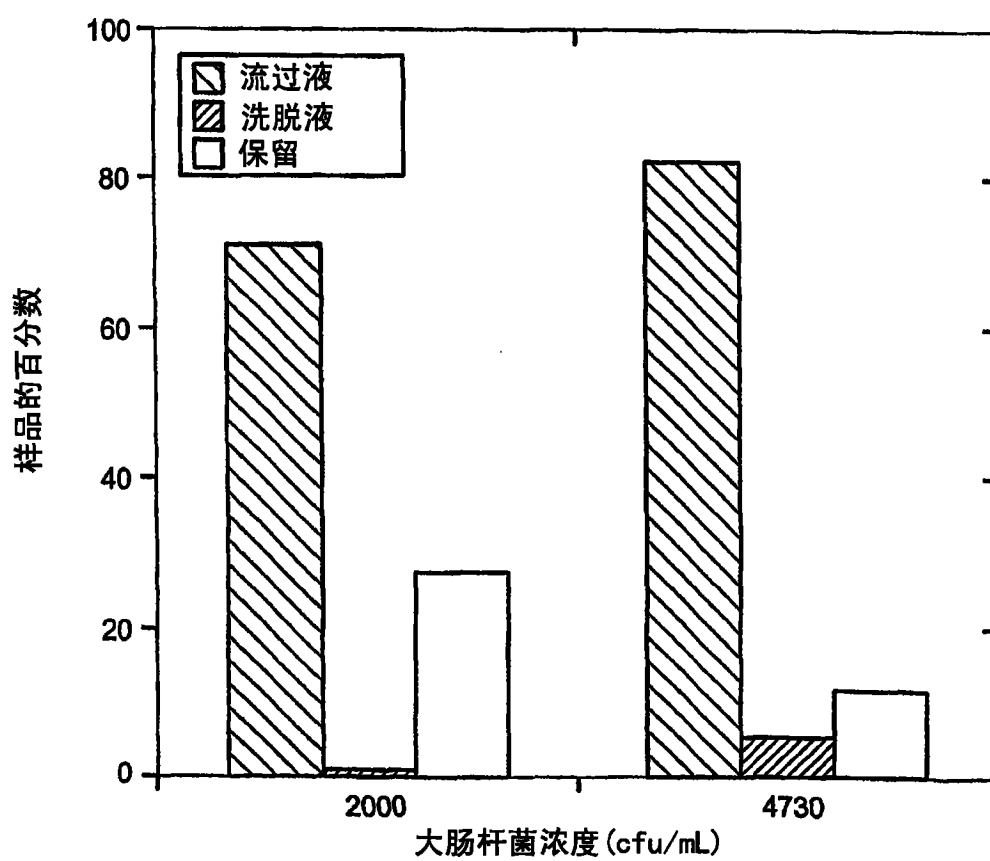


图 43

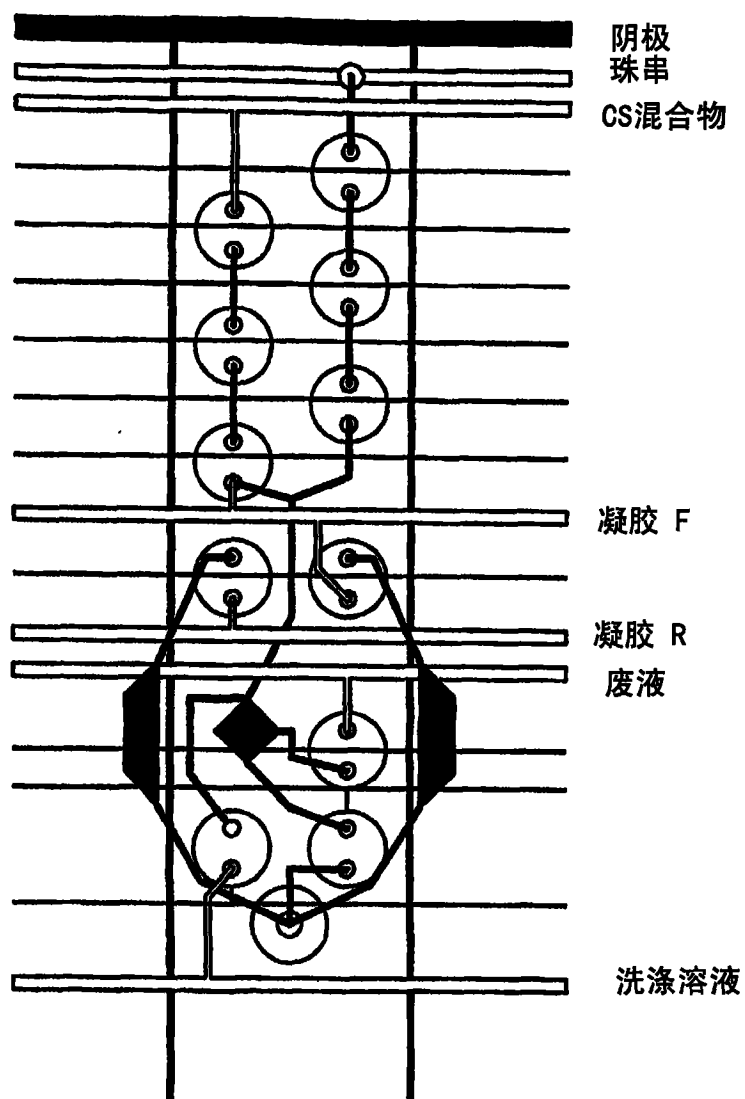


图 44