



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1763171 B

(45) 授权公告日 2010.05.05

(21) 申请号 200510104049.2

(22) 申请日 2000.03.06

(30) 优先权数据

59361/1999 1999.03.05 JP

83964/1999 1999.03.26 JP

84100/1999 1999.03.26 JP

84101/1999 1999.03.26 JP

93043/1999 1999.03.31 JP

93044/1999 1999.03.31 JP

215014/1999 1999.07.29 JP

240041/1999 1999.08.26 JP

298613/1999 1999.10.20 JP

324194/1999 1999.11.15 JP

346288/1999 1999.12.06 JP

346309/1999 1999.12.06 JP

346521/1999 1999.12.06 JP

55658/2000 2000.03.01 JP

57075/2000 2000.03.02 JP

(62) 分案原申请数据

00806694.9 2000.03.06

(73) 专利权人 三菱丽阳株式会社

地址 日本东京

(72) 发明人 秋田隆 伊藤千穗 石丸辉太

宫内阳子 村濑圭 高桥厚

隅敏则 前原修 池田忠信

大上畅子 槇野隆之 汤不二夫

渡边文昭 浦垣俊孝 藤井涉

森下岳晴

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 龙传红

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

D06M 16/00(2006.01)

D06M 23/00(2006.01)

审查员 孔佳音

权利要求书 1 页 说明书 62 页 附图 6 页

(54) 发明名称

带有生物物质的载体的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及固定了生物物质的纤维,其中生物物质固定于纤维上,涉及带有固定了生物物质的凝胶之纤维,和具有上述纤维的束之纤维排列及薄片。

1. 一种用于制备薄片的方法,其包括:结合多重纤维以制备一种纤维排列,将生物物质导入构成该纤维排列的每一纤维之上和/或之中,并固定生物物质于其中;且以与纤维轴相交的方向切割该纤维排列成薄片,其中所述纤维排列具有选自如下(a)至(d)的任一纤维束:

(a) 一种掺入固定的生物物质的中空纤维,其中生物物质直接固定于纤维之上和/或之中,

(b) 一种掺入固定的生物物质的多孔纤维,其中生物物质直接固定于纤维之上和/或之中,

(c) 一种掺入固定的生物物质的多孔中空纤维,其中生物物质直接固定于纤维之上和/或之中,

(d) 一种保留了其中掺入固定的生物物质的凝胶之纤维,籍此生物物质固定于纤维之上和/或之中。

2. 权利要求1的方法,其中通过将构成纤维排列的每一纤维的延伸端浸入含有生物物质的溶液,且将溶液导入构成纤维排列的每一纤维之上和/或之中,以将生物物质固定于其中。

3. 权利要求1或2的方法,其中当所述纤维为多孔纤维或多孔中空纤维时,还包括将生物物质导入构成纤维排列的每一纤维的多孔部分,以将生物物质固定于其中。

带有生物物质的载体的制备方法

[0001] 本申请为分案申请,其母案申请的申请号为 00806694.9,申请日为 2000 年 3 月 6 日,发明名称为“带有生物物质的载体”。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种含有生物物质的载体。更具体地,本发明涉及含有固定于其上的生物物质的纤维,其纤维排列,及其薄片。

背景技术

[0003] 近来,已经开展了关于多种生物体的基因组计划,且大量包括人类基因及其核苷酸序列的基因被迅速确定。利用了多种方法检验序列已经明晰的基因的功能,已知这些方法中的一种是利用明晰的序列信息的基因表达分析。例如,已经开发了多种方法,如 Northern 杂交,其利用核酸-核酸杂交反应或其利用 PCR 反应。这些多种多样的方法使得能够检测多种基因之间的关系以及其生物功能表达。但是,可应用这类方法的基因的数目有限。因此,给定一个由非常大量的基因(如由基因组计划在个体水平上明晰的那些基因)构成的复杂反应系统,在利用上述方法施行全面的和系统的基因分析中存在困难。

[0004] 近来,开发了一种新的分析方法和方法学,也称为 DNA 微阵列方法(DNA 芯片法)受到人们的关注,其可以允许大量基因的单次操作表达分析。

[0005] 此方法原理上与常规方法在如下事实方面不同:其核酸检测及分析方法基于核酸-核酸杂交。尤其是,此方法的一个主要特征在于利用了以高密度在平面基底薄片(称为微阵列或芯片)上排列及固定的大量 DNA 片段。一个利用微阵列方法之特定方法的实例包括例如,在平面基底薄片上与用荧光色素标记的测试受试者细胞之表达基因的样品杂交,允许彼此互补的核酸(DNA 或 RNA)结合,用荧光色素标记其位置后,快速地用高分辨率仪器读取。由此,样品中各个基因的量可被迅速评估。也就是说,应当理解本新方法的要点基本上是反应样品量减少与将这些反应样品排列和比对为一种特定模式的技术的结合,其中所述模式可允许大体积、高速、系统性分析和高重复性的定量。

[0006] 就将核酸固定在基底上的技术而言,除了在尼龙基片上高密度固定的方法,如上述 Northern 法以外,为了进一步增加密度,开发了一种将多聚赖氨酸涂覆在玻璃等基底上的方法,或一种包括短链核酸在硅基底等上直接固相合成的方法。

[0007] 但是,虽然核酸在玻璃等具有经化学或物理修饰的基底上固定的点样法(spotting method,科学(Science)270,467-470(1995))就点密度而言优于片层法(sheet method),已经表明,与直接合成方法(美国专利 5,445,934,美国专利 5,774,305)相比,点密度及每个点固定的核酸量较低,且此方法就可重复性而言较差。另外,虽然利用光刻法以规则方式将多种短链核酸固相合成到硅基底上的方法在每单位面积可合成的核酸类型的数量(点密度)、每点固定的量(合成的量)与可重复性上有优势,能固定的核酸类型局限于用石印术可控制的相对短链的核酸。此外,由于使用昂贵的制造设备和多个制备步骤,用此方法很难实现每个芯片成本的大幅度降低。还知道一种在微型载体上固相合成核酸和其

实验室转化的方法,其是一种利用微型珠的方法。据信,此方法允许合成更多类型的长链核酸,成本低于芯片法,并且允许较长核酸(如 cDNA 等)的固定。但是,与芯片法不同,很难生产这样的产品,使得特定化合物以良好的可重复性根据特定排列标准加以排列。

[0008] 此外,当用现有微阵列进行基因分析时,需要很长时间进行杂交和杂交后的洗涤处理。

[0009] 业已尝试了一种在凝胶中固定探针核酸且检测与样品中的核酸杂交的方法(日本专利申请未审公开 No. 3-47097, W098/51823)。

[0010] 已知方法的例子包括在凝胶中固定核酸的方法;在具有羟基琥珀酰亚胺作为离去基团的共聚物凝胶中胺化 DNA 的固定的方法(聚合物凝胶网络(Polym. Gel. Netw)., 4, (2), 111(1996));包括胺化 DNA 与其中已导入醛基的聚丙烯酰胺凝胶的结合的方法(核酸研究(Nucleic Acid Res.), 24, 3142(1996));包括胺化 DNA 与其中导入甲磺酰基的聚丙烯酰胺凝胶的结合的方法(出处同前);和包括醛基化聚丙烯酰胺与其中导入酰肼基的聚丙烯酰胺的结合的方法(美国国家科学院院报(Proc. Natl. Acad. Sci.), 93, 4913(1996))等。

[0011] 此外,也尝试了包括用凝胶填充中空纤维的方法。这类方法的例子包括描述于日本专利未审公开 No. 11-211694 中的一种关于电泳用毛细管的生产的方法。在此方法中,在毛细管纺丝的过程中在中空部分形成凝胶,由此获得毛细管。

[0012] 但是,由于聚合反应过程中通常发生的聚合作用收缩,待注入的凝胶容易从中空纤维中移出。因此,很难用填充有凝胶的中空纤维用于毛细管电泳,或用于 DNA 分析的微阵列。一般地,存在于微阵列的凝胶是透明的,所以不容易证实每一位点上的凝胶存在。因此,就操作性和实践性而言,需要更好的方法。

[0013] 发明公开

[0014] 在这样的情况下,强烈需要建立一种用于基因分析的新的系统性方法,其适用于低成本大量操作、允许以特定浓度与链长无关地固定核酸,允许以高密度和良好的可重复性以一种可测量的形式排列,这种方法据信将变成未来非常重要的领域。这正是本发明致力于解决决定问题。

[0015] 具体的,本发明要解决的问题是建立一种产生排列的方法,即其上固定有核酸的二维(平面)排列,这种排列与生产在二维基底(如尼龙基片和玻璃基底)上包含微点样(micro-spotting)或微注射(micro-injection)的核酸的排列相比,具有较高的固定核酸量,允许在每个面积单位上安排高致密性的核酸类型,且适于大量生产的应用。本发明致力于解决的另一个问题是建立一种固定化核酸的二维排列的生产方法,其适用于包括 cDNA 的长链核酸,且与通过在硅基底上的光刻法与固相合成的结合生产高密度寡核苷酸排列的方法相比,本发明具有较低的生产成本。

[0016] 作为本发明部分发明人致力于上述问题的大量研究的结果,他们首先修正了传统方法中生物物质布置工艺和在相同二维载体上进行的固定工艺中的概念,然后发现,包含固定生物物质纤维的二维高密度排列之薄片可以通过这样一种工艺制备,其中包括在作为一维结构的纤维(单纤维)上施行生物物质固定化工艺,制备其中以有序方式布置的多重固定了生物物质的纤维之三维结构,以及将三维纤维排列切成薄片。

[0017] 在此方法中,固定了生物物质的纤维之有效地系统性和高密度布置是待实现的又一个重要目标,这一目标的实现将对工业生产有极大的益处。因此,本发明人发现了采用夹

具(jig)进行的高精度序列测定技术可制备包含固定了生物物质纤维的二维高密度排列的方法。

[0018] 此外,通过对上述问题的充分研究,本发明人发现,在用凝胶填充中空纤维的中空部分之前,通过在纤维内壁上粘附并聚合一种凝胶形成单体溶液进行预处理(内壁处理),籍此防止填充凝胶的移出。

[0019] 此外,本发明人还发现,通过在凝胶上固定色素,如荧光色素,可以容易地用荧光显微镜检测凝胶生产中凝胶的充填、变形和移出等状态以及杂交。

[0020] 这就是说,本发明涉及以下方面:

[0021] 1) 本发明是一种掺入固定了生物物质的中空纤维,一种掺入固定了生物物质的多孔纤维,或一种掺入固定了生物物质的多孔中空纤维,其中生物物质直接固定于纤维之上和/或之中。此外,本发明是一种存留了其中掺入固定了生物物质的凝胶之纤维,籍此,生物物质固定于纤维之上和/或之中。

[0022] 存留凝胶的纤维的例子包括实心纤维、中空纤维、多孔纤维和多孔中空纤维。在这些例子中,掺入一种固定了生物物质的凝胶存留在实心纤维的表面、中空纤维的中空部分或者纤维的孔中。

[0023] 生物物质的例子包括选自以下物质的任一个:

[0024] (a) 核酸、氨基酸、糖或脂类;

[0025] (b) 由一种或多种上面(a)中所述物质的成分构成的聚合物;以及

[0026] (c) 与上面(a)或(b)所述物质相互作用的物质,但是优选核酸。

[0027] 上述含有固定了生物物质的凝胶之纤维包括其中通过凝胶而在纤维之上和/或之中带有色素的纤维。

[0028] (2) 另外,本发明是一种具有上述纤维束的纤维排列(alignment)。纤维排列的例子包括其中每个纤维有规则布置的纤维排列,和其中每平方厘米横截面的纤维束包含100或者更多纤维的纤维排列。在这种情况下,每个纤维上的生物物质类型在部分或者全部纤维上可以是不同的。

[0029] (3) 此外,本发明是一种纤维排列的薄片,其与上述纤维排列的纤维轴相交。该薄片可含有纤维单元及其坐标参照点(如,在薄片上的两个和多个标记纤维)。薄片可包含染色的纤维单元。在本发明中,包含有基于坐标参照点确定的纤维单元的坐标之薄片也包括在本发明的范围内。

[0030] (4) 又一方面,本发明是一种用于制备上述具有其上的每一纤维单元的坐标之薄片的方法,包括如下步骤:

[0031] (a) 顺序切割通过结合并固定获得的纤维排列,以得到一系列纤维排列薄片 $S(1), S(2), \dots S(h), \dots S(m)$;

[0032] (b) 由 m 个薄片中选择任一个薄片 $S(h)$,并基于在所述薄片 $S(h)$ 中的坐标参照点确定在所述薄片 $S(h)$ 中所含各个纤维单元的二维坐标;

[0033] (c) 基于在步骤(b)中获得的薄片 $S(h)$ 的坐标数据和薄片 $S(i)$ 中的坐标参照点确定位于最靠近所述薄片 $S(h)$ 的薄片 $S(i)$ 中所含各个纤维单元的二维坐标;以及

[0034] (d) 重复步骤(b)和(c)的步骤以确定所述纤维排列薄片中的每一纤维单元的二维坐标。

[0035] (5) 此外,本发明是一种确定上述薄片上每一纤维单元的位置的方法,所述方法包括如下步骤:

[0036] (a) 顺序切割通过结合并固定纤维获得的纤维排列,以得到一系列纤维排列薄片 $S(1), S(2), \dots S(h), \dots S(m)$;

[0037] (b) 由 m 个薄片中选择任一薄片 $S(h)$,并基于在所述薄片 $S(h)$ 中的坐标参照点确定在所述薄片 $S(h)$ 中所含各个纤维单元的二维坐标;

[0038] (c) 基于在步骤 (b) 中获得的薄片 $S(h)$ 的坐标数据和薄片 $S(i)$ 中的坐标参照点确定位于最靠近所述薄片 $S(h)$ 的薄片 $S(i)$ 中所含各个纤维单元的二维坐标;以及

[0039] (d) 重复步骤 (b) 和 (c) 的步骤以确定所述纤维排列薄片上每一纤维单元的二维坐标。

[0040] (6) 此外,本发明是一种计算机可读介质,其上记录了上述薄片的每一纤维单元的坐标数据。

[0041] (7) 此外,本发明是一种用于样品检测的装置,包含上述薄片和上述记录介质。

[0042] (8) 另外,本发明是一种用于制备上述薄片的方法,其包括:结合多重中空纤维以制备薄片,将生物物质导入构成该排列的每一中空纤维的内壁和/或中空部分,并固定物质于其中;且以与纤维轴相交的方向切割该排列成片。在此方法中,通过例如将构成排列的每一中空纤维的延伸端浸入含有生物物质的溶液,且将溶液导入构成排列的每一中空纤维的中空部分,将生物物质固定于构成排列的每一中空纤维的内壁和/或中空部分中。

[0043] (9) 又一方面,本发明是一种用于制备上述薄片的方法,其包括:结合多重多孔中空纤维以制备薄片,将生物物质导入构成该排列的每一多孔中空纤维的内壁、中空和/或多孔部分,并固定物质于其中;且以与纤维轴相交的方向切割该排列成片。在此方法中,通过例如将构成排列的每一多孔中空纤维的延伸端浸入含有生物物质的溶液,且将溶液导入构成排列的每一多孔中空纤维的中空和/或多孔部分,将生物物质固定于构成排列的每一多孔中空纤维的内壁、中空和/或多孔部分中。

[0044] (10) 此外,本发明是一种用于制备纤维排列的方法,其包括向根据目标顺序模式布置的纤维束施加张力,通过向所述纤维束的纤维中充填树脂固定所述纤维束以制备纤维排列。在此制备方法中,纤维束的顺序通过如下步骤形成:

[0045] (a) 使纤维穿过具有与目标顺序模式相同的模式的孔之多重夹具;且

[0046] (b) 加宽夹具之间的间隔。

[0047] 此外,夹具的例子包括由经线和纬线获得构成网络的支持线,或穿孔的板。

[0048] (11) 此外,本发明是一种处理中空纤维内壁部分的方法,其包括向中空纤维的内壁加入凝胶形成单体 (a) 溶液,然后通过单体的聚合作用在中空纤维内壁上形成凝胶。内壁优选是多孔的。单体 (a) 的例子包括两亲性单体。

[0049] (12) 又一方面,本发明是一种用凝胶充填中空纤维的中空部分的方法,其包括用凝胶形成单体 (b) 充填根据权利要求 31-33 的任一项方法处理的中空纤维的中空部分,且通过所述单体的聚合作用在中空部分形成凝胶,以及一种制备这种凝胶充填纤维的方法。单体 (b) 的例子是一种具有丙烯酰胺为主要成分的物质。

[0050] (13) 此外,本发明是一种掺入固定的核酸之聚合物凝胶,其中通过缩水甘油基将修饰的核酸结合并固定于其上。修饰的核酸的例子包括其末端胺化的核酸。聚合物凝胶的

例子包括由（甲基）丙烯酸缩水甘油酯、聚合的单体（如丙烯酰胺）和交联剂构成的共聚物凝胶。

[0051] (14) 此外,本发明是一种用于制备上述聚合物凝胶的方法,其包括（甲基）丙烯酸缩水甘油酯与修饰的核酸反应,且将聚合的单体及交联剂加入所得反应产物,将其聚合。或一种用于制备上述聚合物凝胶的方法,其包括将由（甲基）丙烯酸缩水甘油酯、聚合的单体及交联剂构成的共聚物凝胶与修饰的核酸反应。修饰的核酸的例子包括其末端胺化的核酸。聚合的单体的例子包括丙烯酰胺。

[0052] (15) 又一方面,本发明是一种含有核酸组分、多价胺组分和至少两种或多种聚合单体组分的聚合物凝胶。本发明中,至少一种聚合单体组分优选的是具有缩水甘油基的聚合单体,如（甲基）丙烯酸甘油酯。核酸组分的一个例子是具有胺化末端的核酸。

[0053] 此外,本发明是一种制备上述聚合物凝胶的方法,其包括聚合含有核酸组分、多价胺组分和至少两种或多种聚合单体组分的溶液,或者一种用于制备上述聚合物凝胶的方法,其包括聚合含有核酸组分、和至少两种或多种聚合单体组分的溶液,并将所得聚合物与多价胺组分交联。

[0054] (17) 此外,本发明是一种用于检测样品的方法,其包括利用上述薄片,所述薄片具有与载体结合的作为探针的生物物质（如,核酸）,其中所述方法包括将样品与所述薄片通过不同于自然扩散的方法相接触,以形成杂合物,从该薄片样品上去除不与生物物质探针结合的物质。不同于天然扩散的方法的例子包括通过向该薄片施加电压使样品与薄片接触,以及将吸水物质置于该薄片的一侧,籍此使位于对侧的样品与薄片接触,等等。在上述检测方法中,样品优选地用荧光标记。载体的例子包括可溶性聚合物凝胶（例如,具有聚丙烯酰胺作为重要成分的凝胶）,且载体存留在中空纤维的中空部分。

[0055] 本说明书包括了如上描述中公开的内容和/或本发明优先权文件的日本专利申请 No 11-59361, 11-84100, 11-84101, 11-83964, 11-93043, 11-93044, 11-215014, 11-240041, 11-298613, 11-324194, 11-346288, 11-346309, 11-346521, 2000-55658 和 2000-57075 中的附图。

[0056] 本发明进一步详细描述如下。

[0057] 本发明涉及新的微阵列。根据本发明,制备了固定了生物物质的纤维或者其表面上、中空部分或者其多孔部分中带有固定了生物物质的凝胶之纤维和其排列,然后通过沿着与排列之纤维轴相交的方法切割排列,获得薄片。该薄片是一种固定了核酸的二维高密度排列,即微阵列。

[0058] 1. 生物物质

[0059] 本发明中,直接固定于固体、中空或者多孔纤维上的靶生物物质,和固定于凝胶上的靶生物物质的例子包括核酸,如脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 和肽核酸 (PNA)、氨基酸、蛋白质、糖（如,多糖）和脂类等。

[0060] (1) 核酸

[0061] 当核酸用如生物物质时,可使用任何链长。核酸可以为市售的或者可从活细胞中获得。从活细胞中制备 DNA 或 RNA 可利用已知的方法,例如,利用 Blin 等人 (Blin 等人,核酸研究,3:2303(1976)) 等方法进行 DNA 提取,通过 Favaloro 等人 (Favaloro 等人,酶学方法 (MethodsEnzymol.), 65:718(1980) 的方法进行 RNA 提取等。

[0062] 此外,因核酸待固定,也可使用线性或环状质粒 DNA、染色体 DNA、通过用限制性酶或化学方法切割这些 DNA 分子获得的 DNA 片段、用酶等在试管中合成的 DNA 分子以及化学合成的寡核苷酸等。

[0063] 本发明中,核酸可直接固定于中空纤维,或者化学修饰的核酸衍生物或需要时变性的核酸也可固定。

[0064] 已知核酸的化学修饰的例子包括胺化、生物素化和转化为地高辛配基等(当代分子生物学方法(Current Protocols In Molecular Biology), Frederick M. Ausubel 等人编(1990);无同位素的实验方法(Experimental Protocol without using Isotope)(1) DIG 杂交(Syujyun-sha));这些修饰方法可应用于本发明。通过举例方式,下面描述了将氨基导入核酸。

[0065] 具有氨基的脂族烃链与单链核酸的结合位置无特别限制,且其可不仅仅是核酸的 5' 或 3' 末端,也可在核酸链内(如,磷酸二酯键结合位点或核苷酸结合位点)。此单链核酸的衍生物可根据如日本已审公开 No. 3-74239、美国专利 No. 4,667,025 和 4,789,737 等所述的方法制备。此外,上述方法以外的方法,例如,利用市售的用于导入氨基基团的试剂(如 Aminolink II(商标), PE Biosystems Japan;Amino Modifiers(商标), Clontech)可制备衍生物,或根据公知的方法将具有氨基基团脂族烃链导入 DNA 的 5' 末端磷酸(核酸研究,11(18),6513-(1983))。

[0066] (2) 氨基酸

[0067] 术语“靶定待固定于纤维上的氨基酸”在本发明中用于指任何构成蛋白质、多肽或肽的氨基酸。氨基酸的长度无特别限制,可任意选择。这类氨基酸的例子包括含有 2-10 个氨基酸的肽和含有 11 个或者更多氨基酸的多肽或蛋白质。

[0068] 这些物质的获得可通过常规肽合成等方法。方法的例子包括叠氮化物法、盐酸酸盐法、酸酐法、混合酸酐法、DCC 法、活性酯法、碳亚胺法、氧化-还原法和酶合成法等。作为合成方法,固相合成法或液相合成法均可采用。

[0069] 就缩合及去除保护基而言,可采用任何已知方法(例如, Bodanszky, M 和 M. A. Ondetti, 肽合成, Interscience Publishers, New York(1966);Schroeder 和 Luebke, 肽, Academic Press, New York(1965);Nobuo Izumiya 等人, 肽合成的基础与实验(1975), 等等)。

[0070] 反应后,可组合利用常规纯化方法如溶剂萃取、蒸馏、柱层析、液相层析和重结晶纯化目标肽。此外,其也可从生物体中提取并纯化而获得。

[0071] (3) 脂类

[0072] 术语“脂类”在本发明中用于指其分子中具有长链脂肪酸或类似烃链且存在于或衍生于生物体的物质,脂类的例子包括中性脂、脂蛋白、磷脂和糖脂等。中性脂的例子包括脂肪酸、蜡、酰基甘油、甾醇、多萜醇和胆汁酸等。脂蛋白的例子包括乳糜微粒、VLDL、IDL、LDL 和 HDL 等。磷脂的例子包括二酰基型甘油磷酸酯(磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸等)、醚型甘油磷酸酯、鞘磷脂、麟酸酯等。糖脂的例子包括中性糖脂(单己糖苷神经酰胺、二己糖苷神经酰胺)和酸性糖脂(神经节苷酯、硫苷酯等)。

[0073] 这些脂类可从组织或细胞中单独或适当时组合利用高效液相层析、气相层析和薄层层析等提取。此外,也可使用市售的产品,且可进行酶反应合成。

[0074] (4) 糖

[0075] 在此糖类型的例子包括以简单物质存在的单糖、包含数个(2-10个)缩合单糖的寡糖,以及含有更多单糖的多糖。糖蛋白也包括于此。

[0076] 上述糖的特定例子包括蛋白聚糖、糖胺聚糖和糖蛋白,如 γ -谷氨酰转肽酶、粘蛋白和血型糖蛋白。

[0077] 可单独或者适当时组合使用具有凝集素柱的亲和层析、CsCl 沉降平衡离心、区带速度沉降离心、液相层析、疏水柱层析和免疫沉淀方法等制备糖。也可使用市售产品。

[0078] (5) 聚合物

[0079] 用于本发明的生物物质也包括通过结合且聚合一种或多种上述(1)-(4)中的物质获得的聚合物。这类聚合物的例子包括由一种类型的氨基酸组成的同型多肽和具有特定序列的重复结构的共聚物(氨基酸聚合物)等。为得到这些聚合物,应用聚合同种核酸或肽的方法,以及一种聚合不同种核酸或肽的方法等。

[0080] (6) 相互作用物质

[0081] 本发明中,可使用与上述(1)-(5)中相互作用的物质。术语“相互作用”在此用于指一种通过将物质与其他特定物质的结合或组合形成一种复合物的作用。这类相互作用的例子包括抗原与抗体之间的反应,核酸与反义核酸之间的反应,以及生物素与链霉抗生物素蛋白之间的反应等。因此,任一个或一对上述相互作用物质固定于纤维上。

[0082] 2. 纤维

[0083] 纤维类型

[0084] 用于在本发明中固定生物物质的纤维包括实心纤维、中空纤维、多孔纤维和多孔中空纤维等。作为这些纤维,可使用合成纤维、半合成纤维、再生纤维和天然纤维的任一种。

[0085] 合成纤维的代表性例子包括:多种聚酰胺基纤维,如尼龙6、尼龙66和芳香聚酰胺;多种聚酯基纤维,如聚乙烯对苯二酸酯、聚丁烯对苯二酸酯、聚乳酸酯(poly lactate)和聚乙醇酸;以及多种丙烯基纤维,如聚丙烯腈;多种聚烯烃基纤维,如聚乙烯和聚丙烯;多种聚氯乙烯醇基纤维;多种聚偏二氯乙烯基纤维;多种聚氯乙基纤维;多种聚氨基甲酸酯基纤维;苯酚基纤维;氟基纤维如聚偏氟乙烯和聚四氟乙烯;以及多种对羟基苯甲酸亚烷基二醇酯(polyalkylene para oxy benzoate)基纤维等。

[0086] 半合成纤维的代表性例子包括多种纤维素衍生物基纤维,如粗原料,二乙酸酯、三乙酸酯、几丁质和壳聚糖等和多种蛋白质基纤维,其称为 promix。

[0087] 代表性的再生纤维包括多种通过粘胶工艺、铜胺法和有机溶剂法获得的纤维素基再生纤维(人造丝、铜胺丝、polynosic等)。

[0088] 代表性的天然纤维例子包括植物纤维如棉花、亚麻、苧麻和黄麻;动物纤维如羊毛和丝;矿物纤维如石棉。这些植物纤维可用在本发明中,因为纤维呈中空纤维形式。

[0089] 无机纤维的代表性例子包括玻璃纤维和碳纤维等。

[0090] 天然纤维以外的中空纤维可利用特定喷嘴通过已知方法制备。对于聚酰胺、聚酯和聚烯烃等,优选应用熔体纺丝工艺,可使用马蹄形喷嘴、C型喷嘴和双管喷嘴等作为喷嘴。在本发明中,优选使用双管喷嘴,因为它可形成一系列同质中空部分。

[0091] 对于熔体纺丝不适用的合成纤维的纺丝及用于半合成或再生纤维的聚合物纺丝,优选应用溶剂纺丝工艺。在这种情形中,通过边纺丝边利用双管喷嘴用液体(适当地作为

核) 充填入中空部分, 如同熔体纺丝工艺中的情形。

[0092] (2) 纤维的形式

[0093] 靶定用于本发明的纤维形式并不特别限定, 故本发明纤维包括任一种实心纤维、中空纤维、多孔纤维和多孔中空纤维。术语“实体”此处是指一种形式, 其中纤维的内部不是中空的, 但纤维用构成纤维的组分充填, 术语“中空”此处用来指一种形式, 其中纤维的内部是弯曲、管形或麦管样的, 术语“多孔”此处用来指纤维上存在不限定数目的空隙(孔)。截面的形状可能不仅仅是环状, 但也可变为变形的, 如扁的和中空的截面。形式优选为中空和多孔的, 特别是就凝胶强固定的方面。

[0094] 用于本发明的纤维可为单丝或多丝的。而且, 其也可通过纺丝原料获得的短细纱。当使用多丝和短细纱纤维时, 原料等之间的空隙可用于固定生物物质。

[0095] 用在本发明的纤维可以以未处理的状态使用, 如需要, 纤维可为其中导入反应性功能基的纤维, 或其也可作为一种等离子体处理和进行如 γ -辐照的辐照处理和电子束处理的纤维。

[0096] 此外, 也可使用纺织纤维以外的纤维, 即包含透明无定形聚合物作为主要成分的光学纤维, 如聚甲基丙烯酸甲酯和聚苯乙烯。

[0097] 当在本发明中使用多孔纤维时, 多孔纤维可利用已知的成孔技术 (poration) 如拉丝工艺 (drawing process)、微相分离工艺 (micro-phaseseparation process) 和萃取工艺结合熔体纺丝工艺或溶液纺丝工艺获得。

[0098] 本发明多孔纤维的空隙率未特别限定, 但从增加每单位纤维长度所固定的生物物质密度角度考虑, 期望高空隙率以增加其比表面积。多孔纤维材料的空隙率未特别限定, 但从增加每单位纤维材料长度固定的生物物质密度角度考虑, 期望高空隙率以增加其比表面积, 范围在纤维强度不受到破坏的情况之内。例如, 优选具有 20-80% 空隙率的多孔纤维, 更优选具有 30-60% 空隙率的多孔纤维。

[0099] 用于本发明的多孔纤维的孔径未特别限定, 只要其能够固定生物物质并进行随后的杂交。但是, 从增加每单位纤维长度固定的生物物质密度角度考虑, 期望较小的尺寸。

[0100] 对于多孔纤维材料, 使用如下材料: 市售用于精细过滤和超滤的多孔中空纤维膜, 通过多孔中空纤维膜外表面包被非多孔性均质膜获得的反渗透膜、气相分离膜和通过多孔层之间夹层非多孔均质膜获得的膜等。

[0101] 用于本发明的多孔中空纤维的结构未特别限定, 只要其能够充填固定了生物物质的凝胶, 可优选地采用一种三维网状结构, 其具有从多孔中空纤维的外表面连续贯通到内表面的孔, 由原纤维样元件构成的连续贯通的孔的结构, 手指形结构, 独立的泡沫结构, 和具有相通单元的泡沫结构, 对于三维网状结构, 优选由原纤维样元件构成的结构。待用的孔的大小从大约 0.01 微米至数十微米, 从一个多孔层表面至另一个表面的孔径可以是一致的, 或多孔结构可为一种具有对称 / 不对称倾斜结构, 该结构在沿着多孔层厚度的方向具有不同的孔径。

[0102] 此外, 为了坚固的保留固定了生物物质的凝胶, 优选较高的空隙率和较大的比表面积的多孔结构, 只要其在不破坏多孔中空纤维的处理的范围内。

[0103] 因此, 可采用市售的用于精细过滤和超滤的多孔中空纤维膜, 通过多孔中空纤维膜外表面包被非多孔性均质膜获得的反渗透膜、气相分离膜和通过多孔层之间夹层非

多孔均质膜获得的膜等。

[0104] 3. 生物物质在纤维上的固定

[0105] 本发明提供了 (i) 一种掺入固定了的生物物质的纤维, 其中, 生物物质固定在纤维之上和 / 或之中 (此后, 有时称为“生物物质固定纤维”), 和 (ii) 一种保留掺入了固定的生物物质之凝胶的纤维, 籍此生物物质固定在纤维之上和 / 或之中 (此后有时称为“保留生物物质固定凝胶的纤维”)。靶纤维包括中空纤维、多孔中空纤维和上述 (i) 的多孔纤维, 以及上述 (ii) 的中空纤维、实心纤维和多孔中空纤维。

[0106] 就每一纤维而言, 下面描述了固定生物物质的方法。

[0107] 当固定生物物质在纤维上时, 可利用多种纤维与生物物质间的化学或物理相互作用, 即纤维的官能基与组成生物物质的组分间的化学或物理相互作用。就使用多孔纤维、中空纤维或多孔中空纤维的情况而言, 将含有生物物质的溶液导入构成排列的纤维之中空或多孔部分, 然后利用纤维的中空或多孔部分的内壁上存在的功能基与构成生物物质的组分之间的相互作用, 将生物物质导入纤维中。

[0108] 当固定非修饰生物物质于纤维上时, 在允许生物物质作用于纤维后, 可通过焙烤或紫外线照射进行固定。

[0109] 当固定氨基修饰的生物物质于纤维上时, 可用交联剂, 如戊二醛 (glutalaldehyde) 和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC) 将物质结合到纤维的功能基上。

[0110] 此外, 可进行热处理、碱处理和表面活性剂处理等变性固定的生物物质。当使用获自活体材料如细胞和细胞体的生物物质时, 可进行去除不需要的成分等等处理。这些处理可单独或同时进行。或者, 适当时在将含有生物物质的样品固定于纤维之前进行处理。

[0111] 对于中空纤维和多孔中空纤维的情况, 其特征生物物质可被固定在纤维的中空部分。然而在本发明中, 生物物质可被固定在纤维的外壁以及内壁上。因此, 从纤维截面看, 生物物质可被固定在外壁以及内壁部分, 所以其特征生物物质在于每单位横截面固定的生物物质的量可比正常纤维增加。当生物物质仅固定于内壁部分时, 由于用来制备排列的粘合材料不粘附 (后面描述), 固定的生物物质可有效的 (精确的, 无粘附材料的影响) 用作探针。

[0112] 作为一种在多孔纤维上固定生物物质的方法, 可允许含有生物物质的样品作用于多孔纤维。在多孔纤维的情况中, 其特征生物物质可被固定于纤维的具有大的比表面积之多孔部分。因此, 其特征生物物质在于每单位横截面固定的生物物质的量可比正常纤维增加。

[0113] 生物物质的固定可通过溶解或悬浮于水、缓冲液及生理盐水等中进行。根据生物物质的物理或化学性质可选择适当地用于生物物质的溶剂。可在上述溶液或悬浮液中含有稳定剂等。

[0114] 当允许含有生物物质的样品作用于纤维时, 温度优选 5-95℃, 更优选 15-60℃。处理时间一般为 5 分钟-24 小时, 更优选 1 小时或更长。

[0115] 制备保留固定生物物质凝胶之纤维 (实心纤维、中空纤维、多孔纤维、多孔中空纤维) 的方法未特别限定, 且可使用多种纤维与凝胶间的化学或物理相互作用, 也就是说, 多种纤维与构成凝胶的组分之功能基之间的化学或物理相互作用。这类方法的例子包括: (i) 一种将纤维浸没入共聚物的混合溶液中以胶凝成 (gelate) 纤维的方法, 其中共聚物由单体、引发剂、其末端带有乙烯基的生物物质和交联剂组成; (ii) 一种将纤维浸没入用引

发剂聚合的单体、交联剂和生物物质的混合溶液中以胶凝成纤维的方法；(iii) 一种将纤维浸入用引发剂聚合的单体、交联剂和经结合生物物质到载体上获得的产物（聚合物颗粒、无机颗粒等）所构成的混合溶液中以胶凝成纤维的方法；以及 (iv) 通过加热融解固定了生物物质的琼脂糖等，将纤维浸入其中，随后冷却纤维凝胶的方法。

[0116] 在上述方法中，对于中空纤维和多孔中空纤维等的情形除了将纤维浸入含生物物质的溶液外，可将溶液注射或拉伸 (drawn) 入纤维的中空部分和多孔部分等，随后胶凝。

[0117] 本发明的一个方面是制备保留生物物质固定凝胶的中空纤维，但凝胶也可保留在纤维的外壁部分以及中空部分内。因此，与前述类似，从纤维截面看，生物物质可被固定在外壁以及中空部分，所以其特征不在于每单位横截面固定的生物物质的量可比正常纤维增加。当生物物质仅固定于中空部分时，由于用来制备排列的粘合材料不粘附（后面描述），固定的生物物质可有效地（精确的，无粘附材料的影响）用作探针。

[0118] 对于保留固定了生物物质凝胶的多孔中空纤维，中空部分和多孔部分均用凝胶充填。故固定了生物物质的凝胶与多孔中空纤维的接触面积大，形式复杂，因此固定了生物物质的凝胶可牢固地保留在纤维的多孔部分。

[0119] 依上述方法所得保留固定了生物物质的纤维可经历适当处理，只要凝胶不被破坏。例如，通过经历热处理、碱处理和表面活性剂处理等可变性固定的生物物质。另外，当使用获自活体材料入细胞或细胞体的生物物质时，去除不需要的细胞成分等。然后，经处理的保留固定了生物物质凝胶的纤维可用作材料检测生物物质。这些处理可单独或同时进行。或者，适当时在固定含生物物质的样品于纤维上之前进行处理。

[0120] 上述制备的保留生物物质固定凝胶之纤维可用作构成纤维排列的基本单元，所述纤维排列保留了本发明的生物物质固定凝胶。

[0121] 用于本发明的凝胶类型无特别限定，例如，可利用通过共聚合由一种和多种单体组成的多功能单体而获得的凝胶，所述单体如丙烯酰胺、N, N- 二甲基丙烯酰胺、N- 异丙基丙烯酰胺、N- 丙烯酰氨基乙氧基乙醇、N- 丙烯酰氨基丙醇、N- 羟甲基丙烯酰胺、N- 乙烯基吡咯烷酮、甲基丙烯酸羟乙基酯、（甲基）丙烯酸和烯丙基糊精、以及亚甲基二（甲基）丙烯酰胺、聚乙二醇二（甲基）丙烯酸等的，例如，水性溶剂的溶液。其它用于本发明的凝胶的例子包括如琼脂糖、藻酸、葡聚糖、聚乙烯醇和聚乙二醇的凝胶，和通过交联上述凝胶获得的凝胶。

[0122] 在本发明中，聚合的单体和多价胺可用作凝胶材料。类型没有限制，例如，可使用具有缩水甘油基的单体。

[0123] 具有缩水甘油基的聚合的单体包括缩水甘油基（甲基）丙烯酸等。其它聚合的单体的例子包括丙烯酰胺、N, N- 二甲基丙烯酰胺、N- 异丙基丙烯酰胺、N- 丙烯酰氨基乙氧基乙醇、N- 丙烯酰氨基丙醇、N- 羟甲基丙烯酰胺、N- 乙烯基吡咯烷酮、甲基丙烯酸羟乙基酯、（甲基）丙烯酸和烯丙基糊精等。多价胺的例子包括乙二胺、二氨基丙烷、二氨基丁烷、二氨基戊烷、六亚甲基二胺、二亚甲基三胺、三亚甲基四胺、四亚甲基五胺、五亚甲基六胺和二甲基氨基丙胺。

[0124] 当核酸作为生物物质通过缩水甘油基的方法固定于凝胶上时（例如，利用缩水甘油基的方法将乙烯基导入核酸末端基团），核酸需要事先被修饰。核酸的修饰无特别限制，只要其能够与缩水甘油基反应。

[0125] 核酸的常规化学修饰、胺化、生物素化和地高辛配基 (digoxigenin) 转化等为已知 (当代分子生物学实验方法, Frederick M. Ausubel 等编, (1990); 无同位素的实验方法 (1) DIG 杂交 (Syujyun-sha)), 以及任一种这些修饰方法可用于本发明。通过举例的方式, 下面描述了向核酸导入氨基酸。

[0126] 具有氨基的脂族烃链与单链核酸的结合位置无特别限定, 其可能不仅仅是核酸的 5' 或 3' 末端, 但也可在核酸链之内 (例如, 磷酸二酯键结合位点或核苷酸结合位点)。优选在核酸的 5' 或 3' 末端。可根据在日本审查公开 No. 3-74239, 美国专利 Nos. 4, 667, 025 和 4, 789, 737 等中所述的方法制备单链核酸衍生物。此外, 除了上述方法以外, 例如, 利用市售的用于导入氨基基团的试剂 (如 Aminolink II (Trademark), PEBiosystems Japan; Amino Modifiers (Trademark), Clontech) 可制备衍生物, 或根据公知的方法将具有氨基基团脂族烃链导入 DNA 的 5' 末端磷酸 (核酸研究, 11(18), 6513-(1983))。

[0127] 本发明中, 生物物质可直接被固定于凝胶上, 或者由化学修饰获得的生物物质或如需要变性的生物物质也可被固定于其上。为将生物物质固定于凝胶上, 可使用其中物质被物理地包含于凝胶的方法和直接结合于凝胶的组分的方法。此外, 生物物质可通过共价或非共价键结合于一种载体, 如聚合物或无机颗粒, 然后该载体可结合于凝胶。

[0128] 例如, 乙烯基可被导入核酸末端 (W098/39351) 以与一种凝胶组分 (如丙烯酰胺) 共聚合。共聚合方法的例子包括一种包含单体、多聚功能性单体和聚合作用引发剂的共聚合的方法; 以及一种包含单体与聚合作用引发剂共聚合并与交联剂胶凝的方法。

[0129] 此外, 也可将琼脂糖经溴化氰法酰亚胺碳酸酯化, 结合到带有胺化末端的核酸之氨基后, 所得产物胶凝。在这种情况下, 凝胶可为固定了核酸的琼脂糖与其它凝胶 (例如, 丙烯酰胺凝胶) 的混合凝胶。

[0130] 为在纤维上携带凝胶, 可将纤维浸没入含有单体 (例如, 作为凝胶组分的丙烯酰胺)、多官能基单体、引发剂和生物物质组分以聚合并胶凝。在这种情况下, 如上述, 生物物质优选结合到单体 (如丙烯酰胺) 或载体 (如聚合物颗粒和无机颗粒)。

[0131] 除了涉及在多官能基单体存在下共聚合的方法, 胶凝也可通过不存在多官能基单体下共聚合, 然后应用交联剂而进行。

[0132] 此外, 有一种方法是利用加热融解固定了生物物质的琼脂糖等, 然后将纤维浸没入其中以获得一种冷却凝胶。

[0133] 在中空纤维和多孔中空纤维的情况下, 不是将纤维浸没入含有上述每一组分的溶液, 而是将溶液注射或拉伸入纤维的中空部分和 / 或多孔部分以充填这些部分, 随后胶凝。

[0134] 在这种情况下中可通过导入含有生物物质的溶液、上述单体和上述聚合作用引发剂到中空纤维等的中空部分, 随后在聚合作用过程中胶凝。

[0135] 固定于包含在三维排列中的每一中空纤维和多孔中空纤维上的生物物质可彼此不同。也就是说, 根据本发明, 固定的生物物质种类和排列的顺序可根据用途任意决定。

[0136] 本发明中, 色素可被混合入上述凝胶组分中。

[0137] 用于本发明的色素主要分为天然色素和合成染料。天然色素的代表性例子包括黄酮衍生物、查耳酮衍生物、蒽醌衍生物和靛青衍生物等。合成染料的代表性例子包括偶氮染料、蒽醌染料、靛类染料、二苯甲烷染料、三苯基染料、咕吨染料和吡啶染料等。特别是上述色素中, 有些色素带有荧光。

[0138] 用在本发明的荧光染料种类无特别限定,只要其发射荧光,这类染料的例子包括罗丹明、德克萨斯红、荧光黄、异硫氰酸荧光素 (FITC)、俄勒冈绿、太平洋蓝、R-藻红蛋白、Rhodol 绿、香豆素衍生物和氨基香豆素等。

[0139] 对于用于本发明的色素固定方法,色素可直接固定于凝胶,或者由化学修饰色素获得的衍生物或如需要时经变性的色素也可直接固定到凝胶上。为将色素固定于凝胶,可使用涉及将物质物理地包含在凝胶中的方法,和涉及直接结合于凝胶组分的方法。此外,一旦色素通过共价或非共价键被结合于载体如聚合物颗粒或无机颗粒,载体可被结合于凝胶。例如,可通过将聚合基团导入色素而将色素与凝胶组分(如丙烯酰胺)共聚合。

[0140] 例如,当色素被直接结合于凝胶组分时,可使用的方法的例子包括其中由聚合物科学利用二甲基丙烯酸荧光素或甲基丙烯酸 1-苣基甲酯,使色素与凝胶组分(如丙烯酰胺等)共聚合的方法;其中将具有氨基的色素衍生物与甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)反应,然后乙烯基与凝胶组分(如丙烯酰胺)共聚合,使聚合的乙烯基导入凝胶的方法;以及一种其中阴离子单体导入凝胶,随后阳离子色素与其离子键结合。

[0141] 本发明中,当利用荧光素标记的样品(尤其是经固定特定波长的荧光素染料)进行杂交时,可赋予凝胶可视性而不损害检测波长处的凝胶高透明性。

[0142] 生物物质在聚合物凝胶上的固定可通过混合聚合物凝胶及生物物质进行。考虑到响应速度或反应速度,可使用诸如核苷酸的催化剂。

[0143] 用于固定的温度优选 0-100°C,更优选 20-80°C。

[0144] 经修饰的生物物质在聚合物凝胶上的固定可通过混合聚合物凝胶及经修饰的生物物质进行。考虑到响应速度或反应速度,可使用诸如核苷酸的催化剂。

[0145] 用于固定的温度优选 0-100°C,更优选 20-80°C。

[0146] 其它方法的例子包括一种方法,其中核酸结合于一种载体,诸如聚合物颗粒或无机颗粒等,且颗粒完全固定于上述凝胶上。例如,可通过生物素化核酸与抗生物素蛋白化琼脂糖珠(抗生物素蛋白化琼脂糖等,Sigma)反应获得固定了核酸的琼脂糖珠。可将固定了核酸的珠完全固定于丙烯酰胺凝胶等上。

[0147] 此外,当核酸固定于凝胶或载体上时,可使用诸如戊二醛(glutalaldehyde)和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)。

[0148] 固定了生物物质的聚合物凝胶可用于检测样品中与生物物质发生相互作用的物质,方法是利用固定的生物物质为探针将其与样品杂交。例如,具有与核酸互补序列的核酸可由固定于凝胶上的核酸检测。

[0149] 如上形成的纤维的多种形式(见实施例)示于图 1A-F。

[0150] 4. 纤维排列的制备

[0151] 为布置纤维使得能获得其上以高密度固定生物物质的纤维排列,每一纤维的外径优选为细的。在本发明的一个优选实施方案中,以每平方厘米 100 或更高的高密度进行生物物质的固定。然而,为实现此目的,一个纤维的外径需要小于约 1mm。例如,可从具有外径约 500 μm 的多孔中空纤维膜获得其上每平方厘米固定了 400 或更多生物物质的多孔中空纤维排列的薄片。可从具有外径约 30 μm 的多孔中空纤维(利用中空纤维纺丝制备)获得其上每平方厘米固定了 100,000 或更多生物物质的多孔中空纤维排列的薄片。

[0152] 上述制备的固定生物物质的纤维(实心纤维、中空纤维、多孔纤维、多孔中空纤维

和保留这些纤维的凝胶的纤维)可用作基本单元构成本发明的纤维排列。将这些固定了生物物质的纤维绑扎成束并粘合以获得纤维排列(三维排列)。

[0153] 此外,保留了生物物质的纤维及固定色素凝胶被绑扎成束并粘合以获得保留生物物质和固定了色素的凝胶之纤维排列。

[0154] 具有固定了生物物质的纤维排列截面(图2)的薄片(图3)可这样获得:以与纤维轴相交的方法切割上述三维排列,优选以与纤维轴垂直的方向切割。

[0155] 在这种情况下,例如,包含纵向和横向均规则地布置的生物物质之纤维排列可如此获得:有规则地布置固定了生物物质的纤维,并用树脂粘合剂等粘合。纤维排列的形式并无限定,但一般地其经规则布置纤维而形成正方形或长方形。

[0156] 术语“规则地”用于指纤维以有序的方式布置使得在一定尺寸的框架中所含纤维的数目可为相同的。例如,当每一纤维的直径为1mm的纤维之纤维束布置为截面呈10mmX10mm正方形时,在正方形(1平方厘米)框架一边中所含纤维数目设定为10个纤维,将这10个纤维系成一线以得到片层,然后将此片层重叠得到10层。结果,总共100个纤维被布置成10纤维长和10纤维宽。但是,规则布置纤维的方法不局限于上述片层的重叠。

[0157] 在这种情况下,纤维应当按特定的固定生物物质的纤维的预定位置布置,但并不要求总是这样。这是因为当形成排列时即使特定固定了生物物质的纤维之位置未知,可通过切割排列,然后利用杂交确定横截面上生物物质布置的位置,证实这些位置。因此,布置在薄片上的数种类型的生物物质位置的预确定可使由相同排列上获得所有薄片之生物物质的位置变成已知,因为获自相同排列的薄片具有相同的生物物质布置位置。

[0158] 本发明中纤维束的数目可根据目的适当地确定,为100或更多,且优选1000-10000000。排列中纤维的密度优选调整为每平方厘米100-1000000。此外,为布置纤维使可获得以高密度固定的生物物质之纤维排列的薄片,优选较细的纤维。在本发明的一个优选实施方案中,要求纤维粗细为1mm或更小。

[0159] 当本发明使用直径50 μ m的单丝时,可布置单丝为200纤维/1cm。可在一个正方形(1cm²X1cm²)中布置40000单丝。因此,每平方厘米可固定最大40000类型的生物物质。

[0160] 例如,当使用具有外径为500 μ m的单丝中空纤维或单丝多孔中空纤维,可获得固定的排列之横截面每平方厘米布置了400或更多中空纤维或多孔中空纤维的三维结构。此外,利用用于此目的之中空纤维纺丝技术制备具有外径约为30 μ m的中空纤维或多孔中空纤维。这类中空纤维使得可获得这样的三维结构,其中在固定的排列之横截面每平方厘米布置1000000或更多中空纤维或多孔中空纤维。

[0161] 单丝的例子是市售的鱼线,其为50-900 μ m粗的线。此外,1dtex(当为聚对苯二甲酸乙二醇酯时直径约14 μ m)的单丝及甚至更细的纤维(超细纤维或超超细纤维)可由最近的纺丝工艺制备(直径1-10 μ m)。

[0162] 另一方面,也可使用多丝,例如83dtex/36丝和82dtex/45丝。

[0163] 固定于每个纤维排列的每一纤维内的生物物质的类型可不同,即,类型可彼此不同。此外,可从相同固定了生物物质的纤维中选择任一数目的纤维,所选纤维可被制成束并被适当地布置。在本发明中,可根据目的自由设定固定的生物物质类型及排列的顺序。

[0164] 本发明中,在构成每一排列的每一纤维中提供了一个未用树脂固定的延伸的部分;此部分的尖端浸入含有生物物质的池中,以将溶液导入构成排列中每一纤维(见6,纤

维的内壁处理)。

[0165] 在排列的一端(或优选地两端)上提供了构成排列之每一中空纤维或多孔中空纤维的延伸的部分,该部分未用树脂固定,使得可根据需要进行除了导入含有生物物质的溶液以外的多种处理。例如,用热、碱、表面活性剂等处理可改变固定于构成排列之中空纤维或多孔中空纤维内壁的生物物质。当使用获自活材料如细胞和细菌的生物物质时,这样的处理可除去不必要的细胞成分。这些处理也可单独或同时进行。此外,这些处理可适当地在将含生物物质的样品固定入构成排列的中空纤维或多孔中空纤维中以前进行。

[0166] 5. 利用夹具制备纤维排列

[0167] 本发明中,具有布置的纤维以形成三维结构之纤维排列可利用夹具制备。

[0168] 本发明的纤维排列可由将纤维穿过夹具的孔制备,所述夹具包括许多依照排列模式的小孔,以制备纤维束和将纤维之间的空间用树脂充填以在张力下固定。

[0169] 用在本发明中的在夹具上穿孔的小孔以例如特定的模式布置。夹具的例子包括一个包含横向和纵向布置的圆形孔的夹具(如图4),和一个具有由网络形成的空间的夹具,所述网络由横向和纵向线构成的支持线组分开(如图5)。

[0170] 如图4中所示,当形成特定模式且使用其上具有许多小孔穿孔(穿孔板)时,纤维12穿过夹具11的孔,然后夹具之间的空间增大。此时,夹具11的孔位置优选适当地布置,以相应于相邻夹具的孔位置。或者,如图5所示,纤维穿过由横向线和纵向线构成的支持线组21的部分,以制备纤维束,增加夹具间的空间。然后,向纤维施加张力,在此条件下纤维间的空间可用树脂充填,以固定纤维束,籍此获得纤维排列。

[0171] 待制入三维排列的纤维数目可根据目的适当设定。这类纤维数目为100或更多,优选1000-10000000。在此,将排列中纤维的优选密度调整为每平方厘米100-1000000个纤维。此外,为以高密度布置纤维,优选纤维的外径较细。在本发明的一个实施方案中,纤维的外径为1mm或更低,优选300-10 μ m。当使用具有50 μ m外径的单丝,每1cm可布置200纤维。因此,在1平方厘米方块内可布置40000纤维。换言之,每平方厘米可固定最大40000种类型的生物物质。换言之,可完整地使用多丝,例如83dtex/36丝和82dtex/45丝。当使用单丝中空纤维或具有约300 μ m外径的单丝多孔中空纤维时,可获得这样的三维排列,其中每平方厘米的固定排列之横截面上布置1000或更多的纤维。

[0172] 当使用具有孔的穿孔板(孔以与纤维排列相同的模式布置)作为夹具定义纤维排列时,纤维排列中纤维间的距离将与夹具的孔间距相同(孔中心与其相邻的孔中心间的距离)。

[0173] 夹具的每一孔优选直径为纤维外径的100%或以上到纤维外径的125%或以下,就排列限定能力与排列中的困难而言最优选105%。

[0174] 用于制备这种穿孔板的优选工艺是光蚀刻工艺,其可以低成本大量提供具有高准确度的板。在此情况中,适于加工的板厚度为孔间留隙尺寸的200%或以下,优选100%或以下。一般地,使用不锈钢、铜或铜合金作为板的材料。在本发明中,就材料强度、加工成本和材料成本而言,不锈钢板(SUS304材料)是最合适的材料。

[0175] 构成纵向和横向线的支持线用在夹具,使具有与纤维排列模式相同或相似图形、且可被延伸和减少的网络得以形成。与穿孔板的使用相比,支持线组的使用可改善排列限定能力并可消除排列中的困难。

[0176] 例如,将支持线布置成对于纤维轴而言的两个垂直方向(待布置的支持线的数目等于每个方向固定了生物物质纤维的数目+1),籍此,形成具有与排列中的固定了生物物质纤维相等数目的孔的数目(图5)。支持线的两个端拥有线性运动机理。由支持线组形成的每个筛尺寸可通过将每一支持线平行移位到其相邻的支持线从而增加或减少。筛尺寸的增加大大方便了纤维排列。在所以纤维布置后筛尺寸的减少使夹具与纤维间不形成开口,因此,能限定非常紧密的排列。由此,纤维排列中纤维间的距离可减少到支持线的直径或宽度。

[0177] 布置两个这样的夹具(或如需要两个或者更多)彼此相邻使得孔或筛的位置以正确的顺序设定。然后通过将纤维穿过夹具的孔或筛进行布置。当支持线用作夹具时,部分或者完全完成了布置,然后将筛尺寸减少以调整到特定尺寸。

[0178] 然后,增加夹具之间的空间。增加可在上述筛调整之前进行或同时进行。空间未特别限定,且可适当地确定。设定较大空间可形成长的三维排列。此外,这种情况的制备成本可通过最小化后加工(如切割成薄片的步骤中)中的损失而降低。设定过分大的空间,由于跨度中心周围的纤维拘束力降低,可引起异常排列。这种情况中空间应适当调整,使得不引起这类问题。此外,如需要,夹具的数目可适当增加从而增强跨度中心周围的排列的限定。

[0179] 随后,向所有穿过夹具的纤维施加张力。在这种情况下,纤维间的空间用树脂充填并固定。根据纤维横截面形状或材料的不同张力,即弹性模量、拉伸率等可不同。但是,待应用的张力应设定为不引起纤维的松弛和断裂。为使纤维保持紧张而不松弛的状态,维持张力。保持张力的方法之例子包括一种拉伸带有螺旋的所有纤维的方法,一种用空气抽吸器抽吸(不接触)的方法,一种用粘胶带正确收集并将纤维绑于夹具的方法,和一种利用重力的方法。

[0180] 可用于本发明的支持线的例子未特别限定,只要其由不易用张力断裂的材料构成,包括 SUS304 和鱼线。

[0181] 用于本发明以固定纤维束的树脂是低粘度的液体,其可被方便地充填纤维间的空间并于常温下固化。树脂的优选实例是双重液体反应设定树脂(double-fluid reactive setting resin),例如聚氨基甲酸乙酯树脂。

[0182] 6. 纤维内壁的处理

[0183] 本发明提供了一种用于在中空纤维内壁部分形成凝胶的方法(包括内壁表面,和从内壁表面至外壁表面的区域)。

[0184] 此方法包括凝胶形成单体溶液(a)粘附至中空纤维的内壁部分,以及聚合单体以引起在内壁部分形成凝胶。本发明中,这种方法称为内壁处理。此处,单体溶液(a)是指待用于内壁处理的溶液,且能从内壁表面浸入内壁的内部,从内壁表面渗透到外壁表面。因此,本发明的内壁部分是指单体可从内壁表面向内浸润的部分,包括除了内壁表面外从内壁表面到外壁表面的区域。

[0185] 内壁处理使得当凝胶充填入纤维中心时,凝胶物理地或化学地固定在中空纤维的内壁部分。

[0186] 此外,本发明提供了一种在中央部分内充填凝胶的方法,其包括在以上述方法预处理的中空纤维(即,其中凝胶在内壁部分形成的中空纤维)中央充填凝胶形成单体(b),

并聚合化单体。本发明中,单体溶液(b)是指,用于通过用凝胶充填具有预处理内壁部分的中空纤维的中央而用于凝胶形成的溶液。此外,本发明提供了一种制备含有中空纤维的中央用凝胶经上述充填工艺充填的纤维的方法。由此,所得纤维适用于毛细管电泳和用于分析 DNA 的微阵列等。

[0187] 本发明中经历内壁处理的中空纤维或多孔中空纤维的例子包括多种聚酰胺纤维,如尼龙 6、尼龙 66 和芳香聚酰胺;多种聚酯基纤维,如聚乙烯对苯二甲酸酯、聚丁烯对苯二甲酸酯、聚乳酸酯和聚乙醇酸;以及多种丙烯基纤维,如聚丙烯腈;多种聚烯烃基纤维,如聚乙烯和聚丙烯;多种聚甲基丙烯酸酯纤维,如聚甲基丙烯酸甲酯;多种聚氯乙烯醇基纤维;多种聚偏二氯乙烯基纤维;多种聚氯乙烯基纤维;多种聚氨基甲酸乙酯基纤维;苯酚基纤维;氟基纤维如聚偏氟乙烯和聚四氟乙烯;以及多种对羟基苯甲酸亚烷基二醇酯基纤维等。

[0188] 毛细管电泳需要检测光从毛细管外照射。因此,当用作毛细管电泳用中空纤维时,优选具有透明性的材料。优选地,中空纤维或毛细管(以后统称为中空纤维)由甲基丙烯酸树脂制成,代表性的例子是聚甲基丙烯酸甲酯。

[0189] 所用多孔中空纤维的结构例子包括一种三维网状结构,其具有从多孔中空纤维的外表面连续贯通到内表面的孔,由原纤维样元件构成的连续贯通的孔的结构,手指形结构,独立的泡沫结构,和具有相通单元的泡沫结构。

[0190] 此外,也可使用用于精密过滤和超滤的多孔中空纤维,具有外表面用非多孔均质膜包被的反渗透膜、气相分离膜、具有非多孔均质多孔层置于多孔层间的多孔中空纤维膜。本发明的中空纤维具有 2mm 或以下,优选 1mm 或以下,更优选 0.05mm-0.5mm 的外径。中空纤维的内径优选为 0.03mm 或以上,更优选 0.03-0.08mm。优选的毛细管电泳用中空纤维是相对粗的中空纤维,因为它容易处置。此外,本发明的充填了凝胶的纤维可用于分析 DNA 等的微阵列中。在这种情况下,探针 DNA 被固定于充填凝胶的纤维,大量纤维被布置,用树脂设定,然后以垂直于纤维轴的方向切割,籍此制备微阵列(纤维排列的薄片)。用于这种用途的微阵列需要每单位面积存在大量纤维。优选具有较细外径的纤维,为 0.5mm 或以下,更优选 0.05mm-0.3mm。此外,应维持阵列的规律性用于布置纤维。因此,为在布置步骤中向纤维施加张力,优选使用具有高坚度的材料。这类材料的例子包括甲基丙烯酸树脂,如芳香族聚酰胺和甲基丙烯酸甲酯。

[0191] 本发明的目的是通过凝胶与内壁部分的物理或化学结合稳定地将固定化凝胶填入中央。因此,当中空纤维的内壁部分形成至少一定孔隙度时,内壁部分优选地具有允许凝胶形成单体溶液(a)用于内壁处理的结构,以容易的从表面穿透至内壁的内侧。此外,当中空纤维的内壁部分不形成空隙的时候,内壁部分优选具有允许单体或单体溶液溶胀中空纤维材料的结构,以穿透到内壁部分。然后,单体聚合实现固定于内壁部分的凝胶形成。

[0192] 由于本发明的凝胶充填纤维用于电泳或 DNA 分析等,待充填入中央的凝胶含有对水有高亲和性的聚丙烯酰胺作为主要成分。因此,用于内壁处理的凝胶形成单体(a)优选是两亲单体,其对中空纤维材料和待充填入中央的凝胶均具有亲和性。

[0193] 这类单体(a)的例子包括(甲基)丙烯酰胺单体,和(甲基)丙烯酸单体。丙烯酰胺单体的例子包括 N-甲基(甲基)丙烯酰胺、N,N-二甲基(甲基)丙烯酰胺、N-乙基-N-甲基(甲基)丙烯酰胺、N,N-二乙基(甲基)丙烯酰胺、N-n-丙基(甲基)丙烯酰胺

胺、N- 异丙基（甲基）丙烯酰胺、N- 叔丁基（甲基）丙烯酰胺、N-s- 丁基（甲基）丙烯酰胺、N-n- 丁基（甲基）丙烯酰胺、N- 甲基 -N- 异丙基（甲基）丙烯酰胺、N- 甲基 -N-n- 丙基（甲基）丙烯酰胺、N- 乙基 -N- 异丙基（甲基）丙烯酰胺、N- 乙基 -N-n- 丙基（甲基）丙烯酰胺、和 N,N- 二 -n- 丙基（甲基）丙烯酰胺。（甲基）丙烯酸酯单体的例子包括（甲基）丙烯酸单甲基氨基乙基酯、（甲基）丙烯酸单甲基氨基丙基酯、（甲基）丙烯酸二甲基氨基乙基酯、（甲基）丙烯酸二甲基氨基丙基酯、（甲基）丙烯酸二乙基氨基乙基酯、（甲基）丙烯酸二丙基氨基乙基酯、（甲基）丙烯酸二异丙基氨基乙基酯、（甲基）丙烯酸二乙基氨基丙基酯、（甲基）丙烯酸二丙基氨基丙基酯、（甲基）丙烯酸二异丙基氨基丙基酯、（甲基）丙烯酸甲基乙基氨基乙基酯、（甲基）丙烯酸甲基乙基氨基丙基酯、（甲基）丙烯酸羟甲基酯、（甲基）丙烯酸 2- 羟乙基酯和（甲基）丙烯酸 3- 羟丙基酯。这些单体可单独使用，或以两种或多种这些单体的混合物形式使用。如需要，也可与上述单体组合，使用带有官能团的单体，所述官能团能与如下述待充填中央的凝胶化学结合。这类单体的例子包括（甲基）丙烯酸酯和甲基丙烯酸缩水甘油酯，其具有羧酸基或环氧基；和烯丙基甲基丙烯酸酯，除带有羟基的上述单体外其是接枝交联剂。

[0194] 凝胶形成所需的交联剂的例子包括双（或更多）官能的丙烯酰胺单体，优选如 N, N'- 亚甲基双丙烯酰胺，N, N'-(1,2- 二羟基亚乙基)- 双丙烯酰胺，N, N'- 二烯丙基 taltal 二酰胺，N, N'- 脒胺 - 双丙烯酰胺，或 N- 丙烯酰 (acryloyl) 三（羟甲基）氨基甲烷。

[0195] 这些单体通常为溶解单体和交联剂，并且以醇溶液使用，包括甲醇、乙醇和丙醇及丙酮，其能从中空纤维的内壁部分穿透入内部。

[0196] 聚合作用引发剂的例子可包括偶氮、过氧化物和氧化还原引发剂，其能溶于所用的溶剂。这种引发剂包括 2,2'- 偶氮双异丁基腈，2,2'- 偶氮双（2- 甲基丁基腈）异丁基腈，过氧苯甲酰和过氧苯甲酰 - 二甲基苯胺引发剂。

[0197] 内壁处理的程度可取决于单体溶液的单体浓度或交联剂的浓度。单体浓度范围优选为 80% 或以下，更优选 1-50%。交联剂浓度优选为 0.5-50%（相对于单体浓度），更优选 1-30%。

[0198] 然后，更详细地描述处理过程。

[0199] 首先解释内壁处理。将中空纤维或多孔中空纤维的尖端浸入含有单体或交联剂的溶液中用于抽吸。将单体溶液导入中空纤维或多孔中空纤维的内壁和 / 或多孔部分用于聚合，由此在内壁表面和内壁的内部形成凝胶。

[0200] 当处理中空纤维或多孔中空纤维的内壁部分时，通过抽吸将单体溶液 (a) 充填入中空纤维，并允许粘附至内壁部分。排出不粘附并保留在内壁的溶液，随后聚合。

[0201] 现在，描述用来用凝胶形成单体溶液 (b) 充填经内壁处理的中空纤维的中央的步骤。丙烯酰胺基单体溶液可用作待充填的凝胶形成单体溶液 (b)。溶剂的例子包括醇类，如甲醇、乙醇和水。一般地，丙烯酰胺用作单体与凝胶形成单体溶液 (b) 混合。其它单体的例子包括，但不限于上述（甲基）丙烯酰胺，和可与丙烯酰胺共聚合的（甲基）丙烯酸酯。在这种情况下，优选的单体浓度范围为总单体溶液的 2-20%。聚合优选地通过向溶液加入交联剂和聚合作用引发剂而进行。用单体溶液充填中空纤维中央的方法一般为，但不限于，真空抽吸。

[0202] 当多孔纤维、中空纤维或多孔中空纤维用在本发明中时，优选提供用树脂固定的

纤维排列 31 和未用树脂固定的纤维部分（延伸部分）32，如图 6 所示。尖端部分 32 在含生物物质的容器 33 中的浸没使得溶液导入每一纤维的中央或多孔部分。在此图中，尖端部分 32 经连续表面 34 连接到容器 33。

[0203] 即，未用树脂固定的纤维部分 32 从用树脂固定的纤维排列 31 中延伸。因此，当纤维部分 32 浸没入含生物物质的容器 33 中，生物物质被从浸入部分（用树脂固定的纤维端）的相对端抽吸，生物物质被抽吸入纤维排列 31 中的纤维中央。用此方法，可将生物物质导入纤维排列 31。

[0204] 待固定于三维排列的每一纤维的生物物质类型可多种多样。

[0205] 允许含生物物质的样品作用于纤维的温度优选范围为 5–95℃，更优选 15–60℃。用于加工的时间通常从 5 分钟到 24 小时，优选 1 小时或更长。

[0206] 7. 纤维排列的薄片

[0207] 本发明可提供含有随机布置的固定了生物物质的中空纤维排列之横截面的薄片，方法是以与纤维轴相交，优选垂直的方向切割上述固定了生物物质的纤维排列，或固定了生物物质和色素的纤维排列。一种切割方法的例子包括利用显微切片机从排列切割薄片。薄片的厚度可自由调整，一般从 1–5000 μm，优选 10–2000 μm。

[0208] 如此获得薄片可利用荧光显微镜方便地观察到凝胶变形、脱落的形状等。

[0209] 由于如上述向纤维赋予张力的一个步骤被包括在本发明中，优选具有高坚固度的纤维。例如，优选使用甲基丙烯酸甲酯纤维、芳香聚酰胺纤维等。

[0210] 在所得固定了生物物质中空纤维排列或具有固定了生物物质的多孔中空纤维排列的薄片（布置了生物物质的薄片）的横截面中，生物物质以相应于构成排列的中空纤维或多孔中空纤维的数目存在。就薄片的每一横截面面积的生物物质数目而言，利用适当地选择所用中空纤维或多孔中空纤维的外径等，可制备薄片的每一平方厘米横截面含有 100 或更多生物物质的薄片。此外，可制备薄片的每一平方厘米横截面含有 1000 或更多生物物质的薄片。

[0211] 由于由相同排列获得的薄片生物物质的排列位置彼此均完全相同，可鉴定获自相同排列的所有薄片生物物质的位置和布置。

[0212] 当固定于纤维的生物物质是例如核酸时，允许薄片与样品反应用来杂交，利用上述核酸作为探针，使得样品中存在的特定多核苷酸可被检测。

[0213] 8. 带有坐标参照点的纤维排列的薄片，每一纤维单元的坐标确定，及含有坐标参考数据的记录介质

[0214] 本发明提供了这样的纤维排列薄片，其中薄片中所含每一纤维单元的位置以坐标确定。本发明中的术语如下。“纤维排列”是指纤维束。“纤维排列的薄片”指经切割纤维排列获得的薄片。“一个纤维单元”指切割后纤维排列的薄片每一纤维位置。“坐标”指用 X 和 Y 坐标显示的数值。

[0215] 本发明的纤维排列的薄片可经过使纤维成束，使其彼此粘附并固定来制备。用于本发明的纤维，即含有来自特定纤维的纤维单元之纤维排列的薄片实现根据本申请的特定功能（如，检测特定物质的功能）。为实现目的，可将化学物质（如染料）化学活化的官能团、配基、核酸及蛋白质（如抗体）结合到每一纤维，或由每一纤维携带（此后，结合和保留总称为固定化）；或可将电荷等引起电磁物理相互作用的固定于每一纤维。

[0216] 现在,详细描述固定了生物物质的纤维排列的薄片,其中,每一纤维单元的位置(如坐标确定)将作为本发明的一个优选实施方案提供。

[0217] 在纤维排列的加工过程中每一基本纤维单元可能被扭曲或弯曲,使得从纤维排列切出的薄片中的每一纤维单元可能彼此慢慢地移动。当利用纤维排列的薄片分析样品中的生物物质的类型或量时,机械地识别并检测纤维排列薄片中的每一纤维单元。因此,薄片上每一纤维单元的位置应被精确确定。在多数情况中,这种获自同一纤维排列的薄片间纤维单元位置的移动由纤维的连续扭曲移动引起。因此,每一薄片中的两个不同位置上设定基本坐标。基于基本坐标,可确定每一薄片上所有纤维单元的坐标。

[0218] (1) 坐标参照点

[0219] 坐标参照点是纤维排列的纤维轴中连续的记号。可利用多种类型的坐标参照点而无限制,只要由记号设定的误差边界较小。可利用的坐标参照点的例子包括任意选择的存在于纤维排列的薄片上的纤维单元,用例如纤维排列侧面上的魔术墨水拉伸的线,用切刀在纤维排列的侧面切割的槽。在纤维排列的薄片上可提供 2-10 坐标参照点,最优选每 1000 纤维单元 2 个坐标参照点。

[0220] 例如,当纤维排列的薄片中的纤维单元用作坐标参照点时,经制造纤维排列薄片时,就将用染料染色(如荧光染料)的纤维(此后称为标记纤维)包含在纤维排列中,所述纤维在显微镜下可与光有良好反应,有利于检测用染料染色的位置。由此,可制备含有标记纤维单元的纤维排列之薄片。

[0221] (2) 每一纤维单元的检测

[0222] 纤维排列薄片中的每一纤维单元的坐标可通过如下方法确定。首先,上面 7 中获得的薄片依切割顺序编号,如 $S(1), S(2), \dots, S(h), \dots, S(m)$ 。从薄片中的任意选取一个薄片编号为 $S(h)$ 。确定了薄片中的“ n ”(n = 纤维数) 纤维的坐标。后面描述一种确定个别坐标的方法。如果薄片中存在固定了“ n ”生物物质(n = 生物物质数) 的纤维,利用由一些多重标记物质标记的生物物质可确定坐标,其中标记物质可引起例如与每一生物物质的杂交反应。

[0223] 用在这种情况下中的坐标应为存在于薄片中的坐标参照点。此外,包含在薄片中的“ n ”纤维的坐标按照标准而规则化。一旦基于坐标确定了 $S(h)$ 的坐标,位于邻近 $S(h)$ 的薄片 $S(i)$ 中“ n ”纤维的坐标可基于薄片 $S(i)$ 中的坐标参照点类似的确定。这种确定利用了薄片 $S(h)$ 中预先确定的“ n ”纤维的坐标数据。一种确定方法在后面描述。由上述解释可清楚地知道优选地 $S(i)$ 与 $S(h)$ 彼此直接相邻。类似的,基于 $S(j)$ 上提供的坐标参照点和薄片 $S(i)$ 中所含的“ n ”坐标数据确定邻近 $S(i)$ 的薄片 $S(j)$ 的坐标。因此,可确定所得“ m ”薄片数的所有坐标。

[0224] 为给出简单解释,解释了这样的例子,其中从具有标记得纤维排列中连续切割两个薄片,所述标记为沿着纤维排列的纤维轴方向的两个连续基本坐标。

[0225] 每一薄片中的纤维单元具有有限的面积。此面积的中央部分认为是代表点。基于首先切出的薄片中的坐标参照点,确定了首先切出的薄片中的所有纤维单元的每一纤维单元之二维坐标。利用具有可读出 XY 坐标的 XY 载物台的投影显微镜可读取坐标。为确定坐标,首先切出的薄片中的两个坐标参照点被记为 P1 和 P2。然后用带有 XY 载物台的投影显微镜读出的坐标记为 (P1X, P1Y) 和 (P2X, P2Y)。进一步,首先切出的薄片中的一个任选的纤维单元被记为 A1,且用带有 XY 载物台的投影显微镜读出的坐标记为 (A1X, A1Y)。于是,薄片中的

以 P1 和 P2 为标准的坐标系统中 A1 纤维单元 (B1X, B1Y) 的坐标可从如下公式 (1) 和 (2) 中得到 :

[0226] 公式 (1)

$$[0227] \begin{pmatrix} B1X \\ B1Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(-\theta 1) & -\sin(-\theta 1) \\ \sin(-\theta 1) & \cos(-\theta 1) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A1X - P1X \\ A1Y - P1Y \end{pmatrix}$$

[0228] 公式 (2)

$$[0229] \theta 1 = \tan^{-1} \left(\frac{P2Y - P1Y}{P2X - P1X} \right)$$

[0230] 在此,任选的待用具有 XY 载物台的投影显微镜读取之纤维单元的坐标优选地位于纤维单元横截面的重心位置。

[0231] 类似的,当首先切出的薄片中的所有纤维单元的坐标用带有 XY 载物台的投影显微镜读出时,可确定基于 P1 和 P2 的坐标系统中所有纤维单元的坐标。

[0232] 然后切出较薄的薄片,使得首先切出的薄片相同纤维单元的二维坐标和随后切出的薄片中的彼此近似。因此,随后切出的薄片之纤维单元(其与首先切出的薄片相同)可从随后切出的薄片中的容易的发现。然后基于随后切出的薄片基本坐标,可确定坐标系统中纤维单元的二维坐标。例如,基于首先切出的薄片基本坐标,任选的 A1 纤维单元坐标被记为 (B1X,B1Y)。然后,随后切出的薄片中的两个基本坐标被记为 P3 和 P4;用带有 XY 载物台的投影显微镜读取 P3 的坐标记为 (P3X,P3Y),P4 的记为 (P4X,P4Y)。如果第一薄片中标记纤维单元和纤维单元 A1 平行移动到第二薄片中的位置,带有 XY 载物台的投影显微镜上随后切出的薄片内纤维单元的坐标 (C1X,C1Y) (与 A1 相同) 由下面公式 (3) 和公式 (4) 显示 :

[0233] 公式 (3)

$$[0234] \begin{pmatrix} C1X \\ C1Y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \cos(\theta 2) & -\sin(\theta 2) \\ \sin(\theta 2) & \cos(\theta 2) \end{pmatrix} \begin{pmatrix} B1X \\ B1Y \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} P3X \\ P3Y \end{pmatrix}$$

[0235] 公式 (4)

$$[0236] \theta 2 = \tan^{-1} \left(\frac{P4Y - P3Y}{P4X - P3X} \right)$$

[0237] 通过调节带有 XY 载物台的投影显微镜至 (C1X,C1Y),可容易的发现相应于首先切出的薄片内 A1 纤维单元的随后切出的薄片内的纤维单元。然后在 XY 载物台上可发现如此找到的 A1 纤维单元的正确坐标 (A2X,A2Y)。在对上述第一薄片所用的相同方法中,利用上述公式 (1) 和 (2),在第二薄片内基于基本坐标 P3 和 P4 确定坐标 (B2X,B2Y)。还以同样方法,基于第一薄片纤维单元的坐标数据可确定第二薄片所有纤维单元的坐标。或者,利用公式 (1) 和 (2) 基于第二薄片内的基本单元,可确定第二薄片内的任意选择的纤维单元的坐标。然后,将第二薄片内任意选择的纤维单元坐标,与基于第一薄片标准坐标确定的第一薄片中的纤维单元坐标比较。由此位于彼此最邻近的纤维单元可被确定为同一纤维单元。

[0238] 类似的,基于第三个切出的薄片和第二个切出的薄片内的基本坐标获得了第二个切出的薄片内纤维单元的二维坐标。第三个切出的薄片内所有纤维单元的二维坐标也可基

于第三个切出的薄片内的基本坐标确定。此处,第三个切出的薄片内所有纤维单元的二维坐标相应于第二个切出的薄片内所有纤维单元的(即,相应于第一个切出的薄片内的所有纤维单元)。通过重复上述步骤,基于从纤维排列中切出的薄片内的基本坐标,可确定从纤维排列中切出的薄片内所有纤维单元的二维结构,甚至是当纤维排列扭曲或纤维排列内的纤维弯曲或彼此卷曲时。因此,第一个切出的薄片内的特定纤维单元使得可确定从纤维排列中切出的薄片内的所有薄片内纤维单元的每一个之二维结构,这是基于从纤维排列中切出的所有薄片内的纤维单元的规格,和从纤维排列切出的薄片内的基本坐标。

[0239] 上述解释涉及用于确定相邻的两个薄片的两种方法,其中,第一个薄片的坐标数据用于确定第二个薄片的坐标。但是,不一定总需要利用彼此相邻的薄片之坐标数据。尤其是当纤维束中的排列相对较好时,利用与其具有一定间距(数个薄片)的薄片以上述方法确定坐标。置于其间的薄片的坐标可利用已确定了坐标的两个薄片的坐标数据以间插法确定。

[0240] (3) 包含纤维排列薄片内每一纤维单元的计算机可读记录介质

[0241] 如上述确定的纤维排列薄片之纤维单元的坐标数据可以计算机可读记录介质的形式使用。坐标数据的例子为基于每一纤维排列薄片的基本坐标确定并且绘于表格中的坐标。此处可用的记录介质包括磁盘、软盘、磁带、CD-ROM、IC卡和RAM。在测量纤维排列的薄片前,在与检测仪联合的计算机中记录这些坐标数据,使得计算机可自动识别哪个纤维单元相应于哪个生物物质探针。

[0242] 9. 一种包括纤维排列薄片和含有纤维单元坐标数据的记录介质的装置。

[0243] 本发明中,可制备一种用于检测生物物质的纤维排列薄片的装置,其中,该装置包含在上面7中获得的纤维排列的薄片以及在上面8中获得的含有纤维排列薄片内每一纤维单元的坐标数据之记录介质。例如,本发明可提供用于大肠杆菌基因型分析的纤维排列薄片装置,其包含用于分析大肠杆菌基因型的纤维排列之10个薄片,以及含有绘制于表中的纤维排列个别薄片内的每一纤维单元的位置之坐标数据。

[0244] 10. 样品的杂交与检测

[0245] 本发明的薄片可用于样品中特定物质(一种与生物物质相互作用的物质)的检测,方法是通过用固定的生物物质作为探针与样品杂交。

[0246] 本发明中探针广义的指可特异性地与样品中存在的生物物质结合的固定化的生物物质,如蛋白质和低分子化合物。本发明中的探针狭义的指具有与待检测的基因互补的核苷酸序列之核酸。即,样品中具有目标核苷酸序列的核酸的检测,可通过使本发明的薄片与样品反应(杂交),引起探针与样品中存在的核酸杂合体的形成进行。

[0247] 可利用已知方法用于检测能与固定的核酸形成杂合体的核酸,以及检测能特异性与固定的核酸结合的多种生物组分。例如,用荧光物质、发光物质、放射性同位素等标记的样品中的生物物质,然后可检测标记的物质。这类标记的类型和用于将这类标记导入的方法无特别限定,可利用多种标准方法。

[0248] 如上述用上述方法形成杂合体的薄片可利用荧光显微镜检查。

[0249] 因此,本发明的薄片之应用不仅仅用于检测与固定的核酸(探针)形成杂合体的核酸,也用于检测多种样品(包含生物物质),如与固定的核酸特异性结合的蛋白质和低分子化合物。

[0250] 本发明中所含探针对类型 and 形式无特别限定, 只要可对其应用本发明的方法。这类作为探针对生物物质的例子包括脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)、肽核酸、蛋白质 (例如, 酶和抗体)、抗原和多糖。

[0251] 探针与样品之杂合体的形成优选通过物理或化学处理而不是自由扩散进行。例如, 当样品带电时, 样品与探针对杂交可有效的通过施加电压进行。或者, 薄片的一个表面 (前或后) 允许与吸水物质接触 (例如, 滤纸、海绵和吸水树脂), 从而促进杂合体形成, 因为水从另一表面朝向吸水物质移动。尤其是当组成薄片的纤维是中空纤维时, 此方法有效。

[0252] 当电压同时施加到本发明的薄片之前面和后面以进行样品与探针杂交时, 装置的例子包括但不限于潜水型电泳 (图 7) 和印迹装置 (图 8)。通过例如允许样品吸收到滤纸或滤膜或高分子聚合物 (如丙烯酰胺或琼脂糖) 使分析物立即粘附于生物物质芯片, 以密封样品。然后施加一定时间的电压, 然后利用检测仪鉴定发生杂交的位置。此外, 在生物物质芯片的一侧上布置吸水物质, 籍此允许布置在相对侧的样品向芯片内部移动, 发生结合反应。这些吸水物质的例子包括海绵和纸。

[0253] 现在, 下面给出来自细胞的总 RNA 检测的详细描述。

[0254] (1) 细胞总 RNA 的制备

[0255] 利用标准技术从细胞制备总 RNA (例如, 见 Sambrook 等人, 分子克隆, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))。市售试剂盒 (例如总 RNA 试剂盒 (Qiagen)) 也可用于这种制备。

[0256] 由上述技术获得总 RNA 用例如荧光物质或放射性物质标记, 以检测总 RNA。对于荧光标记, 例如可使用荧光黄 (FITC)、硫氰酸罗丹明 (TR) 和四甲基罗丹明 (TRITC)。

[0257] (2) 杂交

[0258] 如上述标记的总 RNA 杂交至上面 7 中制备的纤维排列薄片上。杂交的条件应根据固定于纤维排列薄片上的探针类型优化。即, 待定的条件应允许纤维排列薄片上的探针仅与同探针有高同源性的核苷酸序列杂交。例如, 当通过将纤维排列薄片浸没入总 RNA 溶液进行杂交时, 经杂交的溶液的盐浓度 (例如, 氯化钠浓度, 或柠檬酸三钠浓度)、温度和时间等和洗涤时间设定为使得探针仅与同探针有高同源性的核苷酸序列杂交。此外, 低盐浓度或较高温度可加快具有高同源性的杂合体形成。

[0259] (3) 检测

[0260] 经杂交在纤维排列薄片上形成的双链用 RI 或荧光图象扫描仪分析。此时, 基于上面 8 中所得每一纤维单元的坐标数据识别纤维排列薄片上的每一纤维单元的位置。纤维排列薄片上的荧光强度可利用组合有荧光激光显微镜、CCD 照相机和计算机的一种设备自动检测。当每一纤维单元直径约为 10-500 μm 时, 优选的扫描仪可定量的区分彼此距离 10-1000 μm 的点。此外, 优选的扫描仪可识别多种标记类型, 以高速扫描宽范围, 且拥有一种能适应物质微变形的自动对焦功能。提供这种功能的扫描仪是 GMS 418 分析阅读仪 (Micro Systems (GMS))。用于数据分析的优选软件可用于复杂分析, 如分析突变或含有部分重叠序列第许多寡核苷酸之多态性。

[0261] 附图简述

[0262] 图 1 是显示固定了核酸的纤维 (中空纤维、多孔纤维、多孔中空纤维、保留凝胶的中空纤维、保留凝胶的多孔纤维、保留凝胶的多孔中空纤维) 的示意图。

[0263] 图 2 是显示了含有两种类型固定了核酸的纤维之固定了核酸的纤维排列的示意图。

[0264] 图 3 是显示了固定了核酸的纤维排列之薄片的示意图。这是当固定了核酸的纤维排列被垂直于纤维轴切割的横截面观。

[0265] 图 4 是显示了一种制备纤维排列的方法的示意图,其中穿孔的板用作夹具。

[0266] 图 5 是显示了一种制备纤维排列的方法的示意图,其中组成网络的支持线组用作夹具。

[0267] 图 6 是显示了将生物物质导入中空纤维排列内部的步骤的示意图。

[0268] 图 7 显示潜水艇型电泳。

[0269] 图 8 显示一种印迹装置。

[0270] 图 9 显示合成的用于制备探针对寡核苷酸的位置。

[0271] 符号的解释

[0272] 11. 穿孔板

[0273] 12. 中空纤维

[0274] 21. 支持线组

[0275] 22. 中空纤维

[0276] 31. 中空纤维排列(用树脂固定)

[0277] 32. 未用树脂固定的中空纤维

[0278] 33. 含生物物质的容器

[0279] 34. 连续表面

[0280] 实施发明的最佳方式

[0281] 利用下面的实施例进一步描述本发明。但是,本发明的技术范围不限于这些实施例。

[0282] 参考 1

[0283] 中空纤维(1)的预处理:

[0284] 如下预处理中空纤维。室温下甲酸(0.1ml,99%纯)注射入约 1m 的尼龙中空纤维(外径:约 300 μ m)的中央,保持 10 秒。然后,室温下将大量的水注射入中央彻底洗涤,干燥成孔。

[0285] 参考 2

[0286] 中空纤维(2)的预处理:

[0287] 以与参考 1 中相同方法进行尼龙中空纤维的预处理,除了使用硫酸的乙醇溶液(10%)替代甲酸(99%纯)。

[0288] 参考 3

[0289] 制备在其 5' 末端具有氨基或生物素的寡核苷酸。

[0290] 合成如下寡核苷酸(探针 A 和 B)。

[0291] 探针 A :GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC(SEQID NO:1)

[0292] 探针 B :GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG(SEQ IDNO:2)

[0293] 利用自动合成仪,DNA/RNA 合成仪(394 型,PE Biosystems)合成寡核苷酸。在 DNA 合成的最后步骤,利用 Amino Link II(商标,Applied

[0294] Biosystems) 将 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 导入每一寡核苷酸的 5' 末端, 然后制备胺化探针和用生物素酰亚胺生物素化的探针。在脱保护并用常规技术纯化后使用这些探针。

[0295] 实施例 1

[0296] 固定了核酸的中空纤维 (1) 的制备:

[0297] 参考 3 中制备的具有氨基的寡核苷酸 (探针 A 和 B) 各自固定于参考 1 和 2 中制备的尼龙中空纤维内侧。

[0298] 通过将参考 3 中制备的具有氨基的寡核苷酸 (0.1–30mM) 加入 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH8) 中制备溶液, 将其注射入参考 1 和 2 中制备的尼龙中空纤维中。于 20℃ 反应过夜, 用 10mM 磷酸钾缓冲液 (pH8)、1M 磷酸钾溶液 (pH8)、1M KCl 溶液和水洗涤中空纤维, 由此获得其中寡核苷酸固定于中空纤维内壁上的固定了核酸的中空纤维 (图 1A)。图 1A 显示 (1) 固定了探针 A 的中空纤维和 (2) 固定了探针 B 的中空纤维。图 2 中, 用白色环 (○) 显示固定了探针 A 的纤维束, 用黑色点 (•) 显示固定了探针 B 的纤维束。

[0299] 实施例 2

[0300] 固定了核酸的中空纤维 (2) 的制备

[0301] 参考 3 中制备的具有氨基的寡核苷酸 (探针 A 和 B) 各自用如下方法固定于参考 1 和 2 中预处理的尼龙中空纤维的内部。

[0302] 2500 μl 制备于参考 3 中的带有氨基的寡核苷酸溶液 (核酸浓度: 10 $\mu\text{g/ml}$, 含有 0.1M MgCl_2 的磷酸缓冲的生理盐水作为溶剂) 与 0.06g 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 混合。混合物注射入在参考 1 和 2 中预处理的尼龙中空纤维。然后, 用 1/15mol/l 磷酸缓冲液洗涤 (pH8) 中空纤维, 浸入 5ml 相同缓冲液中, 然后加入 0.12gEDC, 室温下振荡摇动 3 小时。随后, 将中空纤维用 1/15mol/l 磷酸缓冲液 (pH8.0) 再一次洗涤。由此, 获得固定了核酸的中空纤维, 其中寡核苷酸被固定于中空纤维的内壁。

[0303] 实施例 3

[0304] 固定了核酸的纤维排列的制备

[0305] 获自实施例 1 的 20 个固定了探针 A 的尼龙纤维 (参考 1 中预处理, 20cm 长) 排列在特氟隆板上, 彼此靠近但未重叠, 然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂 (由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造, 产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后, 从特氟隆板上移出纤维, 获得片层样产品, 其上规则地 (in line) 布置了固定了探针 A 的纤维。以相同的方法, 获得了固定了探针 B 纤维的片层样产品。然后, 将 20 个片层形状的产品层积形成如图 2 中所述的顺序, 然后利用上述粘合剂粘附。由此, 获得了固定了核酸的纤维排列, 其含有规则地布置的总共 400 个纤维 (长 20 个纤维, 宽 20 个纤维) 以形成正方形。

[0306] 以相同方法, 由经过参考 2 中表面处理的每一纤维获得了固定了核酸的纤维排列。

[0307] 此外, 以相同方法, 由获自实施例 2 的固定了核酸的纤维获得了固定了核酸的纤维排列。

[0308] 实施例 4

[0309] 固定了核酸的纤维排列的制备

[0310] 获自实施例 1 的 20 个固定了两种类型 (其表面处理不同) 探针 A 的尼龙纤维

(20cm 长) 排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸乙酯树脂粘合剂(由 NipponPolyurethane Industry Co., Ltd 制造,产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸乙酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地(in line)布置了固定了探针 A 的纤维。以相同的方法,获得了固定了探针 B 纤维的片层样产品。

[0311] 然后,由经历相同表面处理的纤维制备片层形状的产品。产品为由固定了探针 A 的纤维构成的片层形产品,由固定了探针 B 的纤维构成的片层形产品,和包含由固定了探针 B 的纤维作为其一部分以及固定了探针 A 的纤维作为另一部分所组成的纤维排列线的产品。如图 2 所示,20 个这些片层形状的产品层积,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了两种类型的固定了核酸的纤维排列,每一个均其含有规则地布置的总共 400 个纤维(长 20 个纤维,宽 20 个纤维)以形成正方形(图 3)。

[0312] 以相同方法,从获自实施例 2 和 3 的固定了核酸的中空纤维中获得了 4 种类型的固定了核酸的中空纤维。

[0313] 实施例 5

[0314] 固定了核酸的纤维排列的薄片之制备

[0315] 利用超薄切片机垂直于纤维轴切割获自实施例 4 的固定了核酸的 100 μ m 厚纤维排列。获得固定了核酸的纤维排列薄片,其含有规则布置以形成正方形的总共 400 个纤维(20 个纤维长,20 个纤维宽)(图 3)。

[0316] 参考 4

[0317] 样品核酸的标记

[0318] 作为核酸样品模型,合成寡核苷酸(C, D) 以与参考 3 中合成的寡核苷酸(探针 A 和 B) 序列的部分互补。

[0319] 寡核苷酸 C :GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (SEQ ID NO :3)

[0320] 寡核苷酸 D :CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (SEQ ID NO :4)

[0321] 以如参考 3 中相同的方法利用 Amino Link II(商标, PE Biosystems) 将 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 导入这些寡核苷酸的每一 5' 末端。然后按照如下方法用地高辛配基(DIG, Roche Diagnostics)) 标记产物。

[0322] 每一带有胺化末端的寡核苷酸溶于 100mM 硼酸缓冲液((pH 8.5) 至终浓度 2mM。向溶液加入等量地高辛配基-3-O-甲羰基- ϵ -氨基己酸-N-羟基-琥珀酰亚胺酯(26mg/ml 二甲基甲酰胺溶液),然后室温下静置过夜。

[0323] 上述溶液的量调整为 100 μ l, 然后加入 2 μ l 糖原((Roche Diagnostics)、10 μ l 3M 乙酸钠((pH5.2) 和 300 μ l 冷乙醇。于 15000 转/分离心混合物 15 分钟,由此收集沉淀。500 μ l 的 70%乙醇加入沉淀,然后于 15000 转/分离心 5 分钟,再次收集试管底部的沉淀。空气干燥沉淀,然后溶于 100 μ l 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 和 1mM EDTA。

[0324] 由此获得 DIG 标记的寡核苷酸用作核酸样品模型。

[0325] 实施例 6 保留固定了核酸的凝胶之中空纤维(1) 的制备

[0326] 配制包含获自参考 3 的 5' 末端带有生物素基团的寡核苷酸之溶液,以具有如下组成成分:

[0327] 丙烯酰胺

3.7 重量份

[0328] 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份

[0329] 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐 0.1 重量份

[0330] 生物素化寡核苷酸(探针 A 或 B) 0.005 重量份

[0331] 抗生物素蛋白化琼脂糖(6%)悬液 1.0 重量份

[0332] 溶液注射入于参考 1 和 2 中预处理的尼龙中空纤维(外径 300 微米)的中央。然后,将中空纤维转移到用水蒸气饱和地密闭玻璃容器中,在 80℃ 下进行聚合反应 4 小时。

[0333] 由此,得到内部保留了凝胶的中空纤维(图 1B),其中凝胶上通过生物素-抗生物素蛋白结合固定了寡核苷酸。

[0334] 图 1B 显示(1)保留了固定探针 A 的凝胶之中空纤维,和(2)保留了固定了探针 B 的凝胶之中空纤维。在(3)和(4)中,用白色环(○)显示固定了探针 A 的纤维束;用黑色点(•)显示固定了探针 B 的纤维束。

[0335] 实施例 7 保留固定了核酸的凝胶之中空纤维(2)的制备:

[0336] 以如实施例 1 的方法获得保留固定了核酸的凝胶之中空纤维,除了不是尼龙中空纤维,而是使用其表面经处理具有亲水性的聚乙烯中空纤维(外径:约 300 μm,表面用聚乙烯-乙烯醇共聚物包被)。

[0337] 实施例 8

[0338] 保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列的制备

[0339] 获自实施例 6 的 20 个保留固定了探针 A 凝胶的尼龙中空纤维(20cm 长,表面如参考 1 中处理)排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂(由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造,产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地布置了保留固定了探针 A 的凝胶之中空纤维。以相同的方法,获得了保留固定了探针 B 的凝胶之中空纤维的片层样产品。如图 2 所示,20 个这些片层形状的产品层积,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列,其含有规则地、方块形布置的总共 400 个纤维(长 20 个纤维,宽 20 个纤维)。

[0340] 以相同方法,从经参考 2 中表面处理的纤维中获得保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列。

[0341] 此外,以相同方法,从获自实施例 7 的保留固定了核酸的凝胶之中空纤维,获得了保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列。

[0342] 实施例 9

[0343] 保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列的薄片之制备

[0344] 利用超薄切片机垂直于纤维轴切割获自实施例 8 的保留固定了核酸的凝胶之 100 μm 厚的中空纤维排列。获得保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列薄片,其含有规则布置以形成正方形横截面的总共 400 个纤维(20 个纤维长,20 个纤维宽)(图 3)。

[0345] 实施例 10

[0346] 保留固定了核酸的凝胶之纤维的制备

[0347] 配制包含获自参考 3 的 5'末端带有生物素基团的寡核苷酸之溶液,以具有如下组成成分:

[0348] 丙烯酰胺 3.7 重量份

[0349] 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份

[0350] 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐 0.1 重量份

[0351] 生物素化寡核苷酸(探针 A 或 B) 0.005 重量份

[0352] 抗生物素蛋白化琼脂糖(6%)悬液 1.0 重量份

[0353] 将由两个双重螺旋纱线制成得棉纱线(25tex,在先用甲乙酮洗涤并干燥)浸没入此溶液。然后,将纱线转移到用水蒸气饱和的密闭玻璃容器中,在80℃下静置4小时以进行聚合反应。

[0354] 由此,得到保留了凝胶的纤维(图1C),其中凝胶上通过生物素-抗生物素蛋白结合固定了寡核苷酸(探针 A 或 B)。图1C显示(1)保留了固定探针 A 及核酸的凝胶之纤维,和(2)保留固定了探针 B-及核酸的凝胶之纤维。

[0355] 实施例 11 保留固定了核酸的凝胶之中空纤维排列的制备

[0356] 获自实施例 10 的 20 个保留固定了探针 A 凝胶的纤维(20cm 长)排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂(由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造,产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地布置了保留固定了核酸的凝胶(其上已固定了探针 A)之纤维。以相同的方法,获得了保留固定了核酸的凝胶(其上已固定了探针 B)之纤维的片层样产品。20 个这些片层形状的产品层积形成如图 2 所示的顺序,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了固定了核酸的纤维排列,其含有规则地布置的总共 400 个纤维(长 20 个纤维,宽 20 个纤维)以形成正方形横截面。

[0357] 实施例 12

[0358] 保留固定了核酸的凝胶之纤维排列的薄片之制备

[0359] 利用超薄切片机垂直于纤维轴切割获自实施例 11 的保留固定了核酸的凝胶之 100 μm 厚的纤维排列。获得纤维排列薄片,其含有规则布置以形成正方形的总共 400 个纤维(20 个纤维长,20 个纤维宽)(图 3)。

[0360] 实施例 13

[0361] 将市售尼龙多孔中空纱线(yarn)膜(其表面经处理具有亲水性,中空纱线外径约 0.6mm)浸没入参考 3 中合成的寡核苷酸(探针 A 或 B,在最后步骤中未引入氨基)的水溶液(10mg/l 核酸浓度)。然后,产物空气干燥,于 80℃焙烤 1 小时,由此获得固定了寡核苷酸(探针 A 或 B)的尼龙多孔中空纱线膜(图 1D)。图 1D 显示(1)固定了探针 A 的尼龙多孔中空纱线,和(2)固定了探针 B 的尼龙多孔中空纱线。

[0362] 实施例 14

[0363] 25ml 用于实施例 1 中的寡核苷酸(探针 A 或 B,其 5'端带有氨基)溶液(核酸浓度:10 μg/ml,含有 0.1M MgCl₂ 的磷酸缓冲液作为溶剂)与 0.06g 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)以及 0.5g 尼龙多孔中空纱线膜,浸入 5ml 水中,混合。室温下静置 10 分钟。

[0364] 混合物用 50mmol/l 磷酸缓冲液洗涤(pH8.0),浸入 50ml 相同缓冲液中,然后加入 1.2g EDC,室温下静置 3 小时。随后,将混合物用 50mmol/l 磷酸缓冲液(pH8.0)再一次洗涤。由此,获得固定了寡核苷酸(探针 A 或 B)的尼龙多孔中空纱线膜(图 1D),图 1D 显示(1)固定了核酸的多孔中空纤维,其中探针 A 固定于多孔部分,和(2)固定了核酸的多孔中

空纤维,其中探针 B 固定于多孔部分。

[0365] 实施例 15

[0366] 1 克溴化氰溶于 2ml N,N-二甲基甲酰胺。溶液加入含有 5 克多孔纤维素纤维 (20 厘米长) 的溶液中,在 15-20℃ 下静置 10-20 分钟,同时加入 5mol/l 氢氧化钠溶液,以维持 pH 在 10.5-11.5。反应后,用混合物 15 倍体积以上的冷水洗涤混合物。最后用 10mmol/l 磷酸缓冲液 (pH8.0) 洗涤混合物。

[0367] 含有多孔纤维素纤维和在参考 3 中经调整带有氨基的寡核苷酸 (探针 A 或 B, 0.1-30mmol/l) 的所得 10mmol/l 磷酸缓冲液在 20℃ 下静置过夜,以进行反应。反应后,依次用 10mmol/l 磷酸缓冲液 (pH8.0)、用 1mmol/l 磷酸缓冲液 (pH8.0)、用 1mmol/l 氯化钾溶液和水洗涤。由此,获得固定了寡核苷酸 (探针 A 或 B) 的多孔纤维素纤维 (图 D(3) 和 (4))。图 1D 显示 (3) 固定了核酸的多孔纤维,其中探针 A 固定于多孔部分,和 (4) 固定了核酸的多孔纤维,其中探针 B 固定于多孔部分。

[0368] 实施例 16

[0369] 获自实施例 13 的 20 个固定了探针 A 的多孔纤维排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂 (由 Nippon Polyurethane Industry Co.,Ltd 制造,产品号 4403,nippolan 4223)。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地布置了固定了核酸的多孔纤维。

[0370] 以相同的方法,从固定了探针 B 和核酸的多孔中空纤维获得了片层样产品。20 个这些片层层积形成如图 2 所示的顺序,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了固定了核酸的纤维排列,其含有规则地布置的总共 400 个纤维 (长 20 个纤维,宽 20 个纤维) 以形成正方形横截面。

[0371] 此外,以相同方法,从获自实施例 14 和 15 的多孔纤维的每一种中获得固定了核酸的多孔纤维排列 (图 2)。

[0372] 实施例 17

[0373] 利用超薄切片机切割获自实施例 16 的固定了核酸的 0.1mm 厚的多孔纤维排列 (含有两种类型的寡核苷酸),获得薄片,其含有规则布置以形成正方形横截面的总共 400 个固定了核酸的多孔纤维 (20 个纤维长,20 个纤维宽) (图 3)。以大约每平方厘米 220 的密度将核酸于薄片上。

[0374] 实施例 18

[0375] 保留固定了核酸的凝胶之多孔纤维的制备

[0376] 配制包含获自参考 3 的 5' 末端带有生物素基团的寡核苷酸之溶液,以具有如下组成成分:

[0377] 丙烯酰胺 3.7 重量份

[0378] 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份

[0379] 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐 0.1 重量份

[0380] 生物素化寡核苷酸 (探针 A 或 B) 0.005 重量份

[0381] 抗生物素蛋白化琼脂糖 (6%) 悬液 1.0 重量份

[0382] 将聚乙烯多孔纤维 (外径:200 μ m) 浸没入此溶液。然后,转移到用水蒸气饱和的

密闭玻璃容器中,在 80℃下静置 4 小时以进行聚合反应。

[0383] 由此,得到在其空间保留凝胶的多孔纤维,其中凝胶上通过生物素-抗生物素蛋白结合固定了寡核苷酸(探针 A 或 B)(图 1E)。图 1E 显示 (1) 保留固定了核酸的凝胶之多孔纤维,其中探针 A 固定于多孔部分,和 (2) 保留固定了核酸的凝胶之多孔纤维,其中探针 B 固定于多孔部分。

[0384] 实施例 19 保留固定了核酸之多孔纤维排列的制备

[0385] 获自实施例 18 的 20 个保留固定了探针 A 或探针 B 的凝胶之多孔纤维排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸乙酯树脂粘合剂(由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造,产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸乙酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地布置了保留固定了探针 A 和核酸的凝胶之多孔纤维。以相同的方法,从保留固定了探针 B 和核酸的凝胶之多孔纤维获得了片层样产品。20 个这些片层层积形成如图 2 所示的顺序,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了保留固定了核酸的凝胶之多孔纤维排列,其含有规则地布置形成正方形的总共 400 个纤维(长 20 个纤维,宽 20 个纤维)。

[0386] 实施例 20 保留固定了核酸的凝胶之多孔纤维排列的制备

[0387] 利用超薄切片机垂直于纤维轴切割获自实施例 19 的保留固定了核酸的凝胶之 0.1mm 厚的多孔纤维排列,获得多孔纤维排列的薄片,其含有规则布置以形成正方形横截面的总共 400 个保留固定了核酸的凝胶之多孔纤维排列(20 个纤维长,20 个纤维宽)(图 3)。

[0388] 实施例 21

[0389] 制备具有如下组成的水性溶液 A。在溶液 A 中浸没入具有非多孔中间层的聚乙烯多孔中空纱线膜 MHF200TL(Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径:290 μm, 内径 200 μm)。将膜转移到用水蒸气饱和的密闭玻璃容器中,在 80℃下静置 4 小时以进行聚合反应。

[0390] 由此,得到在其位于中央内部和非多孔中间层内保留凝胶的多孔中空纱线膜纤维(图 1F),其中凝胶上含有通过生物素-抗生物素蛋白结合固定的寡核苷酸(探针 A 或 B)。图 1F 显示 (1) 保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维,其中探针 A 固定于凝胶,和 (2) 保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维,其中探针 B 固定于凝胶。

[0391] 溶液 A

[0392]	丙烯酰胺	3.7 重量份
[0393]	亚甲基双丙烯酰胺	0.3 重量份
[0394]	,2'-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐	0.1 重量份
[0395]	生物素化寡核苷酸(探针 A 或 B)	0.005 重量份
[0396]	抗生物素蛋白化琼脂糖(6%)悬液	1.0 重量份

[0397] 实施例 22

[0398] 获自实施例 21 的 20 个保留固定了探针 A 的凝胶之多孔中空纤维排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸乙酯树脂粘合剂(由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造,产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸乙酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地布置了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维。

[0399] 以相同的方法,获得了保留固定了探针 B 的凝胶之多孔中空纤维的片层样产品。

[0400] 然后,20 个这些片层层积形成如图 2 所示的顺序,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维排列,其含有规则地布置形成正方形的总共 400 个固定了核酸的多孔纤维(长 20 个纤维,宽 20 个纤维)(图 3)。

[0401] 实施例 23

[0402] 利用超薄切片机切割获自实施例 22 的保留固定了核酸的凝胶之 0.1mm 厚的多孔中空纤维排列(含有两种类型的寡核苷酸,探针 A 和 B),获得薄片,其含有规则布置以形成正方形横截面的总共 400 个固定了核酸的多孔纤维(20 个纤维长,20 个纤维宽)(图 3)。以大约每平方厘米 1100 的密度将核酸于薄片上。

[0403] 实施例 24 多孔中空纤维的制备

[0404] 制备具有如下组成的水性溶液 A。在溶液 A 中浸没入具有非多孔中间层的聚乙烯多孔中空纱线膜 MHF200TL(Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径:290 μ m, 内径 200 μ m)。将膜转移到用水蒸气饱和的密闭玻璃容器中,在 80℃ 下静置 4 小时以进行聚合反应。

[0405] 由此,得到在其位于中央内部和非多孔中间层内保留凝胶的多孔中空纱线膜纤维(图 1D),其中凝胶上含有通过生物素-抗生物素蛋白结合固定的寡核苷酸(探针 A 或 B)。图 1D 显示 (1) 保留固定了探针 A 和核酸的凝胶之多孔中空纤维,和 (2) 保留固定了探针 B 和核酸的凝胶之多孔中空纤维。

[0406] 溶液 A

[0407] 丙烯酰胺 3.7 重量份

[0408] 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份

[0409] 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐 0.1 重量份

[0410] 生物素化寡核苷酸(探针 A 或 B) 0.005 重量份

[0411] 抗生物素蛋白化琼脂糖(6%)悬液 1.0 重量份

[0412] 实施例 25 多孔中空纤维排列的制备

[0413] 获自实施例 24 的 20 个保留固定了探针 A 的凝胶之多孔中空纤维排列在特氟隆板上,彼此靠近但未重叠,然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂(由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造,产品号 4403, nippolan 4223)。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后,从特氟隆板上移出纤维,获得片层样产品,其上规则地布置了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维。

[0414] 以相同的方法,获得了保留固定了探针 B 的凝胶之多孔中空纤维的片层样产品。

[0415] 然后,20 个这些片层层积形成如图 2 所示的顺序,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维排列,其含有规则地布置形成正方形的总共 400 个固定了核酸的多孔纤维(长 20 个纤维,宽 20 个纤维)(图 2)。

[0416] 实施例 26

[0417] 利用超薄切片机切割获自实施例 25 的保留固定了核酸的凝胶之 0.1mm 厚的多孔中空纤维排列(含有两种类型的寡核苷酸,探针 A 和 B),获得薄片,其含有规则布置以形成正方形横截面的总共 400 个保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维(20 个纤维长,20 个纤维宽)(图 3)。以大约每平方厘米 1100 的密度将核酸于薄片上。

[0418] 实施例 27 固定了核酸的薄片制备以及核酸检测

[0419] (1) 染色体 DNA 的制备

[0420] 胭脂红分枝杆菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 菌株 J1 培养在 100ml 营养液中 (葡萄糖 15g, 酵母提取物 1g, 谷氨酸钠 10g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, pH7.2) 于 30℃ 培养 3 天, 然后收集。从细胞制备染色体 DNA 并用作 PCR 模板。胭脂红分枝杆菌菌株 J1 保藏于国立生命科学和人体技术研究所 (1-1-3, Higashi, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan), 保藏号 FERM BP-1478。

[0421] (2) 探针的制备

[0422] 图 9 显示用于制备探针的合成的寡核苷酸位置。寡核苷酸 A (SEQ ID NO:1) 位于寡核苷酸 B (SEQ ID NO:2) 上游约 400 碱基; 寡核苷酸 E ((SEQ ID NO:5) 位于寡核苷酸 A 上游 400 碱基; 寡核苷酸 F (SEQ ID NO:6) 位于寡核苷酸 B 下游 600 碱基。

[0423] 寡核苷酸 E : GCTCAAGCGC GATTTCGGTT TCGACATCCC C (SEQ ID NO:5)

[0424] 寡核苷酸 F : CATGTCGCGT CGTTGTTGGA CGAAGCGGTA (SEQ ID NO:6)

[0425] 合成了用丙烯酰胺修饰寡核苷酸 A 和 B 的 5' 末端而制备的寡核苷酸 (带有 5' 末端已加上丙烯酰胺的寡核苷酸, W098/39351) (由 WakoPure Chemical Industries Co., Ltd 合成), 并用于 PCR。

[0426] 进行不对称 PCR (一个引物相对于另一个而言以过量存在)。此处制备的引物浓度为带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的寡核苷酸 A : 寡核苷酸 E = 100 : 1, 或带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的寡核苷酸 B : 寡核苷酸 F = 100 : 1。其它条件如 Ex-Taq ((Takara Shuzo Co., Ltd) 的说明书中所述, 利用个人 TaKaRa PCR 热循环仪进行 PCR。反应以 100 μ l 体积在如下温度条件下进行 40 个循环 : 93℃ 30 秒, 65℃ 30 秒和 72℃ 2 分钟。

[0427] 扩增所得的 PCR 产物为大约 400 碱基 (探针 G : SEQ ID NO:7) 和 600 碱基 (探针 H : SEQ ID NO:8) 的带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的探针 DNA。

[0428] (3) 固定了核酸的薄片的制备

[0429] 以如实施例 24-26 中相同的方法制备固定了核酸的薄片, 除了在步骤 (2) 中制备的用丙烯酰胺修饰的探针 DNA 用于核酸向凝胶的固定。依照此种变化, 溶液 A 的组成成分改变为如下 :

[0430] 溶液 A

[0431] 丙烯酰胺 3.7 重量份

[0432] 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份

[0433] 2,2-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐 0.1 重量份

[0434] 探针 G (或探针 H) 0.005 重量份

[0435] 固定了探针 G 或 H 的凝胶保留在多孔层中, 所述多孔层位于所得多孔中空纱线膜的中央和非多孔中间层的内侧。

[0436] 如上述获得的 5 个保留固定了探针 G 的凝胶之多孔中空纤维排列在特氟隆板上, 彼此靠近但未重叠, 然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸乙酯树脂粘合剂 (由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造, 产品号 4403, nippolan 4223) 以粘合该固定了核酸的多孔中空纤维。在聚氨基甲酸乙酯树脂充分固化后, 从特氟隆板上移出纤维, 获得片层样产品, 其上规则地布置了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维。以相同的方法, 获得了探针 H 的片层样产品。此外, 制备了类似的片层样产品, 但是其上未固定核酸 (空白)。

[0437] 然后,5个这些片层以空白、探针G、空白、探针H和空白的顺序层积,然后利用上述粘合剂粘附。由此,获得了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维排列,其含有规则地布置形成正方形的总共25个固定了核酸的多孔纤维(长5个纤维,宽5个纤维)。

[0438] (4) 荧光标记的样品的制备

[0439] 为制备仅与探针G杂交的样品,利用寡核苷酸E和A进行PCR,制备样品I(约400碱基)。为制备仅与探针H杂交的样品,利用寡核苷酸F和B进行PCR,制备样品J(约600碱基)。

[0440] 为荧光标记样品,合成了带有5'末端用Cy5(Cy5-寡核苷酸E, Cy5-寡核苷酸F)标记的寡核苷酸E和F(Amersham Pharmacia Biotech, OligoExpress)用于PCR。

[0441] 制备用于PCR的引物浓度为Cy5-寡核苷酸E:寡核苷酸A=100:1,或者Cy5-寡核苷酸F:寡核苷酸B=100:1。其它条件在Ex-Taq(Takara Shuzo Co., Ltd)的说明书中描述,利用TaKaRa PCR热循环仪(PERSONAL)进行PCR。反应以100 μ l体积在如下温度条件下进行40个循环:93 $^{\circ}$ C 30秒,65 $^{\circ}$ C 30秒和72 $^{\circ}$ C 2分钟。扩增所得的PCR产物为大约400碱基的DNA(样品I:SEQ ID NO:9)和600碱基(样品J:SEQ ID NO:10)。

[0442] 未反应的引物利用SUPEC-02(Takara Shuzo Co., Ltd)反应后从溶液中去除,利用GFX PCR DNA和Gel Band纯化试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech)收集溶液。

[0443] (5) 杂交

[0444] 获自步骤(3)的固定了核酸的薄片放入杂交袋中,加入杂交溶液,于45 $^{\circ}$ C进行预杂交30分钟。然后,加入荧光标记的样品,随后于45 $^{\circ}$ C杂交15小时。

[0445] 杂交后,将固定了核酸的薄片转移入50ml预温育的溶液(0.1 $\times$ SSC,0.1% SDS)。于45 $^{\circ}$ C轻摇洗涤20分钟,三次。然后,溶液用0.5 $\times$ SSC替换,用荧光监测器观察(荧光显微镜)。

[0446] 因此,在固定了核酸的薄片上证实,样品I仅与固定了探针G的多孔纤维横截面特异性杂交,以及样品J仅与固定了探针H的多孔纤维横截面特异性杂交。

[0447] 实施例28固定了核酸的薄片之制备及核酸检测

[0448] (1) 酵母(JCM7255)染色体DNA的制备

[0449] 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)培养在100ml的YPD培养液中(葡萄糖20g,酵母提取物10g,多聚蛋白胨20g/l, pH6.0)于30 $^{\circ}$ C培养1天,然后收集。从细胞制备染色体DNA并用作PCR模板。

[0450] (2) 探针的制备

[0451] 从酵母基因组中随机选择开放阅读框(ORF),利用PCR扩增ORF。表1显示了4种类型的探针(SEQ ID NOS:11,12,13和14)之间的关系,和用于PCR的寡核苷酸。

[0452] 表1

[0453]

探针	PCR 引物		样品
探针 K (SEQ ID NO: 11)	寡核苷酸 O (SEQ ID NO: 15)	寡核苷酸 S (SEQ ID NO: 19)	寡核苷酸 W (SEQ ID NO: 23)
探针 L (SEQ ID NO: 12)	寡核苷酸 P (SEQ ID NO: 16)	寡核苷酸 T (SEQ ID NO: 20)	寡核苷酸 X (SEQ ID NO: 24)
探针 M (SEQ ID NO: 13)	寡核苷酸 Q (SEQ ID NO: 17)	寡核苷酸 U (SEQ ID NO: 21)	寡核苷酸 Y (SEQ ID NO: 25)
探针 N (SEQ ID NO: 14)	寡核苷酸 R (SEQ ID NO: 18)	寡核苷酸 V (SEQ ID NO: 22)	寡核苷酸 Z (SEQ ID NO: 26)

[0454] 合成了 5' 末端用丙烯酰胺修饰的寡核苷酸 O、P、Q 和 R (由 WakoPure Chemical Industries Co., Ltd 合成), 并用于 PCR。进行不对称 PCR (一个引物相对于另一个而言以过量存在)。当探针 K 扩增时, 此处制备的引物浓度为带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的寡核苷酸 O : 寡核苷酸 P = 100 : 1。其它条件如 Ex-Taq ((Takara Shuzo Co., Ltd) 的说明书中所述, 利用个人 TaKaRa PCR 热循环仪进行 PCR。反应以 100 μ l 体积在如下温度条件下进行 40 个循环: 93°C 30 秒, 65°C 30 秒和 72°C 2 分钟。扩增所得的 PCR 产物为大约 600 碱基 (探针 K: SEQ ID NO: 11) 的带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的探针 DNA。以类似的方法, 制备探针 L、M 和 N。

[0455] (3) 固定了核酸的薄片的制备

[0456] 以如实施例 24-26 中相同的方法制备固定了核酸的薄片, 除了在步骤 (2) 中制备的用丙烯酰胺修饰的探针 DNA 用于核酸向凝胶的固定。依照此种变化, 溶液 A 的组成成分改变为如下:

[0457] 水性溶液 A

[0458] 丙烯酰胺 3.7 重量份

[0459] 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份

[0460] 2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷基)二盐酸盐 0.1 重量份

[0461] 探针 K (或探针 L、M 和 N) 0.005 重量份

[0462] 如上述获得的保留固定了探针 K 的凝胶之多孔中空纤维排列在特氟隆板上, 彼此靠近但未重叠, 然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂 (由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造, 产品号 4403, nippolan 4223) 以粘合该固定了核酸的多孔中空纤维。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后, 从特氟隆板上移出纤维, 获得片层样产品, 其上规则地布置了多孔中空纤维。以相同的方法, 获得了探针 L、M、N 的片层样产品。此外, 制备了类似的片层样产品, 但是其上未固定核酸 (空白)。

[0463] 然后, 7 个这些片层以空白、探针 K、空白、探针 L、空白、探针 N、探针 M 和空白的顺序层积, 然后利用上述粘合剂彼此粘附。由此, 获得了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维排列, 其中, 在正方形中规则地布置了总共 49 个固定了核酸的多孔纤维 (长 7 个纤维, 宽

7 个纤维)。

[0464] (4) 荧光标记的样品的制备

[0465] 合成了 5' 末端带有 Cy5 标记的寡核苷酸之样品 W (SEQ ID NO:23) 和 Z (SEQ ID NO:26), 以及合成了 5' 末端带有 Cy3 标记的寡核苷酸之样品 X (SEQ ID NO:24) 和 Y (SEQ ID NO:25) (Amersham PharmaciaBiotech, OligoExpress) 待用, 每种样品均仅与其各自的探针杂交。

[0466] (5) 杂交

[0467] 获自步骤 (3) 的固定了核酸的薄片放入杂交袋中, 加入杂交溶液, 于 45℃ 进行预杂交 30 分钟。然后, 加入荧光标记的样品, 随后于 45℃ 杂交 15 小时。

[0468] 杂交后, 将固定了核酸的薄片转移入 50ml 预温育的溶液 (0.1×SSC, 0.1% SDS)。于 45℃ 轻摇洗涤 20 分钟, 三次。然后, 溶液用 0.5×SSC 替换, 用荧光监测器观察 (荧光显微镜) 薄片。

[0469] 结果发现, 在固定了核酸的薄片上, 样品 W 仅与固定了探针 K 的多孔纤维截面特异性杂交, 以及样品 X 仅与固定了探针 L 的多孔纤维截面特异性杂交, 样品 Y 仅与固定了探针 M 的多孔纤维截面特异性杂交, 以及样品 Z 仅与固定了探针 N 的多孔纤维截面特异性杂交。

[0470] 实施例 29

[0471] (1) 杂交

[0472] 在实施例 5、9、12、17、20、23 和 26 的固定了核酸的薄片放入杂交袋中, 加入具有如下组成的杂交溶液, 于 45℃ 进行预杂交 30 分钟。

[0473] 然后, 加入参考 4 中制备的 DIG 标记的 DNA, 随后于 45℃ 进一步杂交 15 小时。

[0474] 杂交溶液的组成:

[0475] 5×SSC (0.75M 氯化钠, 0.075M 柠檬酸钠, pH 7.0)

[0476] 5% 封闭试剂 (Roche Diagnostic Systems)

[0477] 0.1% N-月桂酰肌氨酸钠

[0478] 0.02% SDS (十二烷基硫酸钠)

[0479] 50% 甲酰胺

[0480] (2) 检测

[0481] 杂交完成后, 将固定了核酸的薄片转移入 50ml 预温育的溶液 (0.1×SSC, 0.1% SDS)。于 45℃ 轻摇洗涤 20 分钟, 三次。

[0482] 然后, 加入 DIG 缓冲液 1, 室温下轻摇去除 SDS。重复一次, 然后加入 DIG 缓冲液 2, 轻摇 1 小时。除去缓冲液后, DIG 缓冲液 2 中加入含有 1/10000 体积之抗 DIG 碱性磷酸酶标记的抗体溶液, 然后轻轻摇动 30 分钟, 以发生抗原抗体反应。然后, 此反应溶液利用在含有 0.2% 吐温 20 的 DIG 缓冲液 1 中摇动 15 分钟, 两次, 随后, 浸入 DIG 缓冲液 3 中 3 分钟。除去 DIG 缓冲液 3 后, 加入含有 AMPPD 的 DIG 缓冲液 3ml 以平衡 10 分钟。

[0483] 沥干后, 所得溶液转移入新杂交袋中, 于 37℃ 放置 1 小时, 利用 X 射线胶片固定器与 X 射线胶片结合, 使胶片感光。

[0484] 结果发现, 每个胶片上, 寡核苷酸 C 结合于探针 A 放置的位点, 寡核苷酸 D 结合于探针 B 放置的位点。

[0485] DIG 缓冲液 1: 0.1M 马来酸, 0.15M 氯化钠 (pH 7.5)。

[0486] DIG 缓冲液 2 :以 0.5% 浓度加入封闭试剂的缓冲液。

[0487] DIG 缓冲液 3 :0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1M 氯化钠, 和 0.05M 氯化镁。

[0488] 封闭试剂 :抗 DIG 碱性磷酸酶标记的抗体溶液, AMPPD 是包括在 DIG 检测试剂盒中的试剂 (Roche-Diagnostic Systems)。

[0489] 实施例 30 制备纤维排列薄片

[0490] 为能够鉴别每一纤维单元, 制备了尺寸大约为 0.25 (mm) 的 10 个纤维, 分别染色成下列颜色 :橙、粉、浅绿、蓝、绿、青绿、红、棕、白和黄色。将这 10 个纤维悬着, 用橙色和粉色的纤维作为基本坐标, 在具有大约 10mm×10mm 正方形的塑料容器中呈适当的间隔, 长为 50mm, 向其中填充聚氨基甲酸乙酯树脂粘合剂, 固化, 以制备纤维排列。

[0491] 从塑料容器中取出所得纤维排列, 然后以垂直于纤维轴的方向利用切片机切成具有 0.25mm 厚度的薄片, 获得纤维排列薄片。

[0492] 实施例 31 纤维单元坐标的测定

[0493] 如下述测定纤维单元坐标。即, 依照切出的顺序用 1, 2, 3... 编号获自实施例 30 中的纤维单元薄片。为确定来自纤维排列的薄片中的每一纤维单元的二维坐标, 将所得薄片中的 1-5 号置于投影显微镜 (NikonPROFILER PROJECTOR V-12, 放大倍数 100 倍) 装有能够读取 XY 坐标的 XY 载物台, 随后利用肉眼在 XY 载物台上读出首先切出的薄片中的每一纤维单元区域重心位置之坐标。基于 1 号薄片的基本坐标, 根据公式 (1) 和 (2) 获得了 1 号薄片中的每一纤维单元的二维坐标。坐标的测定示于表 2。

[0494] 表 2

[0495] 1 号薄片中的每一纤维单元的二维坐标

[0496]

1号薄片				
1号薄片作为基本	X (mm)	Y (mm)		
坐标的纤维单元				
橙色(P1)	4.147	7.894		
粉色 (P2)	12.084	7.744		
θ_1 (径向)	-0.0189			
纤维单元	1号薄片纤维单元XY载 基于1号薄片纤维单元的基			
	物台上的坐标		本坐标确定的坐标	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
浅绿	6.636	4.056	2.561	-3.790
蓝色	6.062	5.182	1.966	-2.675
绿色	5.266	8.840	1.101	0.967
青绿色	9.792	4.100	5.716	-3.687
红色	9.866	4.998	5.773	-2.787
棕色	10.876	7.463	6.736	-0.304
白色	8.044	9.870	3.859	2.049
黄色	8.800	10.480	4.603	2.673

[0497] 为确定来自第二个切出的薄片中的每一纤维单元的二维坐标,将2号薄片置于装有能够读取XY坐标的XY载物台的投影显微镜。基于1号薄片的坐标确定的第一个切出的薄片中的每一纤维单元的坐标数据,根据公式(3)和(4)获得了XY载物台上2号薄片纤维单元的坐标(与1号薄片的纤维单元相同),然后XY载物台移动到如此确定的坐标位置。此时,表明与上述坐标位置最近的纤维单元之纤维单元的颜色为1号薄片中的相同纤维单元。基于2号薄片的基本坐标,读取最接近2号薄片的纤维单元区域之重心的XY载物台上的坐标,根据公式(1)和(2)获得了2号薄片纤维单元的二维坐标(与1号薄片的纤维单元相同)。测定的坐标示于表3。如表3清楚显示,利用计算获得的每一纤维单元坐标与利用投影显微镜视觉观察获得的那些接近,显示上述方法允许最大限度的准确评估每一纤维单元的坐标。

[0498] 表32号薄片中的每一纤维单元的二维坐标

[0499]

2号薄片						
2号薄片中作为 基本坐标的纤维 单元	X (mm)	Y (mm)				
橙色(P3)	3.893	19.277				
粉色 (P4)	11.738	20.350				
$\theta 2$ (径向)	0.1359					
纤维单元	根据公式 (3) 和 (4) 2号薄片纤维单元 基于2号薄片纤维 计算的相应于1号薄片 XY载物台上 单元的基本坐标确定					
	中纤维单元的坐标		的坐标		的坐标	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
浅绿	6.944	15.869	6.910	15.870	2.527	-3.784
蓝色	6.203	16.893	6.160	16.885	1.922	-2.677
绿色	4.853	20.384	4.830	20.351	1.074	0.937
青绿色	10.056	16.399	10.004	16.421	5.668	-3.658
红色	9.990	17.298	9.943	17.306	5.727	-2.773
棕色	10.608	19.889	10.545	19.858	6.669	-0.326
白色	7.439	21.830	7.443	21.819	3.862	2.037
黄色	8.092	22.550	8.052	22.492	4.556	2.622

[0500] 类似的,2号薄片纤维单元的坐标数据允许我们获得第3个切出的薄片每一纤维单元的二维坐标。

[0501] 如上述重复相同操作以获得m号薄片中所含纤维单元的二维坐标。此时,在任何一个具有与第(n-1)个切出的薄片纤维单元相同的纤维单元的薄片(根据基于(n-1)号薄片的基本坐标确定的坐标数据),利用纤维单元的颜色,发现:具有n号薄片XY载物台上坐标位置的纤维单元最接近由公式(3)和(4)获得的XY载物台上的坐标,与(n-1)号薄片纤维单元相同。此外,还证实了,基于(n-1)号薄片第(n-1)基本坐标确定的纤维单元的坐标与基于n号薄片第n基本坐标确定的纤维单元最接近,这些纤维单元相同。表4,5和6分别显示在3,4和5号薄片纤维单元的坐标。

[0502] 表4 3号薄片每一纤维单元的二维坐标

[0503]

3号薄片						
3号薄片作为	X (mm)	Y (mm)				
基本坐标的纤维						
单元						
3号						
橙色(P3)	4.66	30.414				
粉色 (P4)	12.575	30.399				
$\theta 2$ (径向)	-0.0019					
纤维单元	根据公式 (3) 和 (4) 3号薄片纤维单元 基于3号薄片纤维单元					
	计算的相应于2号薄片		XY载物台上		元的基本坐标确定的	
	中纤维单元的坐标		的坐标		坐标	
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
浅绿	7.180	26.625	7.190	26.629	2.537	-3.780
蓝色	6.577	27.733	6.626	27.742	1.971	-2.668
绿色	5.736	31.349	5.730	31.339	1.068	0.927
青绿色	10.321	26.745	10.315	26.736	5.662	-3.667
红色	10.382	27.630	10.389	27.638	5.734	-2.765
棕色	11.329	30.076	11.325	30.026	6.666	-0.375
白色	8.526	32.444	8.522	32.385	3.858	1.978
黄色	9.221	33.027	9.212	32.992	4.547	2.587

[0504] 表 5 4 号薄片纤维单元中每一纤维单元的二维坐标

[0505]

4号薄片						
4号薄片作为基本坐标的纤维单元						
	X (mm)		Y (mm)			
橙色(P3)						
	15.506		7.738			
粉色 (P4)						
	23.356		7.173			
θ 2 (径向)						
	-0.0719					
纤维单元						
根据公式 (3) 和 (4) 4号薄片纤维单元 基于4号薄片纤维						
计算的相应于3号薄片 XY载物台上 单元的基本坐标确定						
中纤维单元的坐标 的坐标 的坐标						
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
浅绿	17.765	3.785	17.721	3.789	2.493	-3.780
蓝色	17.280	4.935	17.240	4.939	1.930	-2.667
绿色	16.638	8.586	16.623	8.549	1.056	0.889
青绿色	20.890	3.674	20.846	3.700	5.616	-3.644
红色	21.027	4.568	20.969	4.583	5.675	-2.755
棕色	22.128	6.885	22.059	6.853	6.600	-0.412
白色	19.496	9.434	19.417	9.392	3.782	1.930
黄色	20.227	9.992	20.177	9.977	4.498	2.569

[0506] 表 6 5 号薄片每一纤维单元的二维坐标

[0507]

5号薄片						
5号薄片作为基本	X (mm)	Y (mm)				
坐标的纤维单元						
橙色 (P3)	15.78	18.445				
粉色 (P4)	23.575	18.323				
$\theta 2$ (径向)	-0.0156					
纤维单元	根据公式(3)和(4)5号薄片纤维单元 基于5号薄片纤维					
	计算的相应于4号薄 XY载物台上 单元的基本坐标确定					
	片中纤维单元的坐 的坐标 的坐标					
	标					
	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)	X (mm)	Y (mm)
浅绿	18.213	14.627	18.195	14.662	2.474	-3.745
蓝色	17.668	15.748	17.634	15.768	1.896	-2.648
绿色	16.850	19.317	16.845	19.346	1.051	0.918
青绿色	21.338	14.713	21.297	14.715	5.575	-3.643
红色	21.412	15.602	21.375	15.624	5.638	-2.733
棕色	22.372	17.929	22.309	17.904	6.537	-0.439
白色	19.592	20.316	19.581	20.301	3.771	1.915
黄色	20.318	20.943	20.297	20.881	4.478	2.506

[0508] 实施例 32

[0509] 其上记录了纤维单元坐标数据之计算机可读记录介质

[0510] 个人计算机 (Nihon Denki Co., Ltd. 制造, PC9821 型) 用于将实施例 31 中确定的每一纤维排列中各个纤维单元以文本形式记录在软盘上。利用该个人计算机从其上记录了坐标数据的所得软盘上读取数据, 以与输入该数据的相同形式输出坐标数据。

[0511] 实施例 33 中空纤维排列 (1) 的制备:

[0512] 使用两个导引板, 其中以正方形在 1 平方厘米的方块中规则布置了总共 400 个孔 (长 20 个, 宽 20 个)。400 尼龙中空纤维 (外径约 300 μm , 长度约 50cm) 穿过所述孔, 得到中空纤维排列。

[0513] 两个纤维导引板间隔制成 20cm, 板间的空间用聚氨基甲酸乙酯树脂固定, 以制备

具有未用树脂在每一端固定的部分之中空纤维排列。

[0514] 实施例 34 中空纤维排列 (2) 的制备：

[0515] 不是用尼龙中空纤维，利用经处理的聚乙烯中空纤维（外径约 300 μm ，长度约 50cm）用聚乙烯-乙醇共聚物使内表面亲水，方法如实施例 33，由此获得具有未用树脂在每一端固定的部分之中空纤维排列。

[0516] 实施例 35：制备多孔中空纤维排列：

[0517] 重复实施例 33 的方法，除了尼龙中空纤维用具有非多孔中间层的多孔中空纤维膜 MHF200TL (Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径约 290 μm ，内径约 200 μm ，长度约 50cm) 替代，得到具有未用树脂在每一端固定的部分之多孔中空纤维排列。

[0518] 实施例 36 多孔中空纤维排列 (1) 的内表面处理：

[0519] 通过未用树脂固定的纤维部分将甲酸导入形成获自实施例 33 的中空纤维排列的每一中空纤维的中空部分，保持 1 分钟。然后，室温下导入大量水重复洗涤该中空部分，然后干燥，完成尼龙中空纤维的预处理。

[0520] 实施例 37 多孔中空纤维排列 (2) 的内表面处理：

[0521] 重复实施例 36 的步骤，除了使用碘酸的 10% 乙醇溶液替代甲酸，以进行尼龙中空纤维的预处理。

[0522] 实施例 38 在中空纤维排列 (1) 中导入并固定生物物质：

[0523] 在将实施例 33 中制备的构成中空纤维排列的每一中空纤维进行如实施例 36 和 37 的内表面处理，将在参考 3 中合成的具有氨基之寡核苷酸（探针 A 和 B），作为生物物质的例子，导入构成中空纤维排列的每一中空纤维，然后根据如下方法固定中空纤维。

[0524] 经中空纤维排列的一端导入溶液，溶液的制备是向磷酸钾缓冲液加入具有参考 1 中合成的氨基之寡核苷酸，20 $^{\circ}\text{C}$ 保持于其中过夜。

[0525] 此后，用磷酸钾缓冲液、氯化钾溶液然后是水洗涤每一中空纤维的内部，制备固定了核酸的中空纤维排列，其中寡核苷酸固定于每一中空纤维的内壁。

[0526] 在上述方法中，寡核苷酸探针 A 和 B 被导入并固定，使得自中空纤维排列中实现示于图 2 的布置。

[0527] 实施例 39 在中空纤维排列 (2) 中导入并固定生物物质：

[0528] 利用实施例 34 中的每一中空纤维，进行如实施例 38 的步骤制备固定了核酸的中空纤维排列，其中寡核苷酸固定于每一中空纤维的内壁。

[0529] 在上述方法中，寡核苷酸探针 A 和 B 的序列与实施例 38 所述的那些相同。

[0530] 实施例 40 固定了生物物质的纤维排列薄片的制备

[0531] 实施例 38 和 39 制备的固定了生物物质之中空纤维排列以垂直于纤维轴的方向利用切片机切成具有约 100 μm 厚的薄片，得到固定了生物物质的纤维排列薄片，其中以正方形规则布置了总共 400 个（长 20 个，宽 20 个）寡核苷酸。

[0532] 实施例 41

[0533] (1) 杂交

[0534] 在实施例 40 中制备的生物物质排列片（其中以正方形规则布置了寡核苷酸）放入杂交袋中用于杂交，加入具有如下组成的杂交溶液，于 45 $^{\circ}\text{C}$ 进行预杂交 30 分钟。

[0535] 然后，加入参考 4 中制备的 DIG 标记的 DNA，随后于 45 $^{\circ}\text{C}$ 进一步杂交 15 小时。

[0536] 杂交溶液的组成：

[0537] 5xSSC(0.75M 氯化钠,0.075M 柠檬酸钠, pH 7.0)

[0538] 5%封闭试剂 (Roche Diagnostic Systems)

[0539] 0.1% N- 月桂酰肌氨酸钠

[0540] 0.02% SDS(十二烷基硫酸钠)

[0541] 50% 甲酰胺

[0542] (2) 检测

[0543] 杂交完成后,将生物物质排列薄片(其中以正方形规则布置了寡核苷酸)转移入 50ml 预温育的溶液(0.1×SSC,0.1% SDS)。于 45℃轻摇洗涤 20 分钟,三次。

[0544] 然后,加入 DIG 缓冲液 1,室温下轻摇去除 SDS。重复一次,然后加入 DIG 缓冲液 2,轻摇 1 小时。除去缓冲液后,DIG 缓冲液 2 中加入含有 1/10000 体积之抗 DIG 碱性磷酸酶标记的抗体溶液,然后轻轻摇动 30 分钟,以发生抗原抗体反应。然后,利用在含有 0.2%吐温 20 的 DIG 缓冲液 1 中摇动 15 分钟,两次,随后,浸入 DIG 缓冲液 3 中 3 分钟。除去 DIG 缓冲液 3 后,加入含有 AMPPD 的 DIG 缓冲液 3ml 以平衡 10 分钟。

[0545] 沥干后,所得薄片转移入新杂交袋中,于 37℃放置 1 小时,利用 X 射线胶片固定器与 X 射线胶片结合,使胶片感光。

[0546] 结果发现,任一生物物质排列薄片上,寡核苷酸 C 结合于探针 A 放置的位点,寡核苷酸 D 结合于探针 B 放置的位点。

[0547] DIG 缓冲液 1:0.1M 马来酸,0.15M 氯化钠(pH 7.5)。

[0548] DIG 缓冲液 2:以 0.5%浓度加入封闭试剂的缓冲液。

[0549] DIG 缓冲液 3:0.1M Tris-HCl(pH 9.5),0.1M 氯化钠,和 0.05M 氯化镁。

[0550] 封闭试剂:抗 DIG 碱性磷酸酶标记的抗体溶液,AMPPD 是包括在 DIG 检测试剂盒中的试剂(Roche-Diagnostic Systems)。

[0551] 实施例 42 中空纤维排列(1)的制备：

[0552] 使用两个具有 0.1mm 厚的穿孔板,其中以 10×10mm 正方形规则布置了总共 400 个具有 0.32mm 直径的孔(长 20 个,宽 20 个),间距 0.5mm。400 个尼龙中空纤维(外径约 300 μm,长度约 50cm)穿过全部所述孔,得到中空纤维排列。

[0553] 两个纤维导引板间隔制成 20cm,板间的空间用聚氨基甲酸酯树脂固定,以制备具有未用树脂在每一端固定的部分之中空纤维排列。

[0554] 实施例 43 中空纤维排列(2)的制备：

[0555] 不是用尼龙中空纤维,经处理的用聚乙烯-乙烯醇共聚物使内表面亲水之聚乙烯中空纤维(外径约 300 μm,长度约 50cm)经历实施例 42 所述的相同步骤。

[0556] 实施例 44 中空纤维排列(3)的制备：

[0557] 不是用尼龙中空纤维,利用如实施例 42 中相同步骤以甲基丙烯酸聚甲基酯中空纤维(外径约 300 μm,长度约 50cm)制备具有未用树脂在每一端固定的部分之中空纤维排列。

[0558] 实施例 45:制备多孔中空纤维排列：

[0559] 重复实施例 42 的方法,除了尼龙中空纤维用具有非多孔中间层的多孔中空纤维膜 MHF200TL(Mitsubishi Rayon Co.,Ltd.,外径约 290 μm,内径约 200 μm,长度约 50cm)替

代,得到具有未用树脂在每一端固定的部分之多孔中空纤维排列。

[0560] 实施例 46

[0561] 25 个多孔聚乙烯中空纤维膜 MHF200TL(Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径 290 μm , 内径 200 μm) 绑成一束,一端用氨基甲酸乙酯树脂固定,使得中空纤维膜的中空部分保持开放。在反应器中,利用抽吸,此部件的中空纤维用具有如下组成的乙醇溶液 A 填充。此后,反应器中的压力从正常压力略减,以使部分乙醇溶液 A 从中空部分释放。在将反应器内部压力转变为正常压力后,在氮气氛下于 70°C 进行聚合化 3 小时。一旦完成聚合反应,所得产物在真空干燥机中过夜干燥,除去乙醇。

[0562] 乙醇溶液 A:

[0563] N, N- 二甲基丙烯酰胺 19 重量份

[0564] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 1 重量份

[0565] 2, 2' - 偶氮双异丁基腈 0.1 重量份

[0566] 乙醇 80 重量份

[0567] 实施例 47

[0568] 制备具有如下组成的乙醇溶液 B 用于以如实施例 46 相同的方法处理中空纤维的内部。

[0569] 乙醇溶液 B:

[0570] N, N- 二甲基丙烯酰胺 10 重量份

[0571] 2- 羟基乙基 (甲基) 丙烯酸酯 9 重量份

[0572] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 1 重量份

[0573] 2, 2' - 偶氮双异丁基腈 0.1 重量份

[0574] 乙醇 80 重量份

[0575] 实施例 48

[0576] 制备具有如下组成的乙醇溶液 C 用于以如实施例 46 相同的方法处理中空纤维的内部。

[0577] 乙醇溶液 C:

[0578] N, N- 二甲基丙烯酰胺 38 重量份

[0579] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 2 重量份

[0580] 2, 2' - 偶氮双异丁基腈 0.2 重量份

[0581] 乙醇 60 重量份

[0582] 实施例 49

[0583] 制备具有如下组成的乙醇溶液 D 用于以如实施例 46 相同的方法处理中空纤维的内部。

[0584] 乙醇溶液 D:

[0585] N, N- 二甲基丙烯酰胺 19 重量份

[0586] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 1 重量份

[0587] 过氧化苯甲酰 0.1 重量份

[0588] 乙醇 80 重量份

[0589] 实施例 50

[0590] 制备具有如下组成的乙醇溶液 E 用于以如实施例 46 相同的方法处理中空纤维的内部。

[0591] 乙醇溶液 E :

[0592] N, N- 二甲基丙烯酰胺 19 重量份

[0593] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 1 重量份

[0594] 2, 2' - 偶氮双异丁基腈 0.1 重量份

[0595] 乙醇 80 重量份

[0596] 实施例 51

[0597] 25 个甲基丙烯酸聚甲基酯中空纤维 (外径 300 μm , 内径 180 μm) 绑成一束, 一端用氨基甲酸乙酯树脂固定, 使得中空纤维的中空部分保持开放。制备具有如下组成的乙醇溶液 F 用于如实施例 46 所述的方法处理中空纤维的内部。

[0598] 乙醇溶液 F :

[0599] N, N- 二甲基丙烯酰胺 19 重量份

[0600] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 1 重量份

[0601] 2, 2' - 偶氮双异丁基腈 0.1 重量份

[0602] 乙醇 80 重量份

[0603] 实施例 52

[0604] 利用实施例 46 中已处理中空纤维内部的元件 (block) 验证处理的效果。根据如下方法, 完成每一中空纤维内部丙烯酰胺凝胶的聚合后, 所得元件以垂直于中空纤维轴的方向切割成具有厚度约 750 μm 的薄片。将这些薄片导入水中, 于 38 $^{\circ}\text{C}$ 振摇过夜, 进一步于 50 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 小时。振摇后, 观察薄片, 显示在所有 25 个中空纤维中用丙烯酰胺凝胶充填。

[0605] < 丙烯酰胺凝胶的聚合 >

[0606] 制备具有如下组成的水性溶液 G 用于通过抽吸充填实施例 46-51 制备的元件之中空纤维内部。用水性溶液充填后, 在氮气氛下于 70 $^{\circ}\text{C}$ 3 小时进行聚合。

[0607] 水性溶液 G

[0608] 丙烯酰胺 9 重量份

[0609] N, N' - 亚甲基 - 双丙烯酰胺 1 重量份

[0610] 2, 2' - 偶氮双 (2- 甲基丙脒) 二盐酸盐 (V-50) 0.1 重量份

[0611] 水 90 重量份

[0612] 实施例 53

[0613] 利用实施例 47 中已处理中空纤维内部的元件验证以实施例 52 中相同的方法处理的效果。操作后, 观察薄片, 证实在所有 25 个中空纤维中被丙烯酰胺凝胶充填。

[0614] 实施例 54

[0615] 利用实施例 48 中已处理中空纤维内部的元件验证以实施例 52 中相同的方法处理的效果。操作后, 观察薄片, 证实在所有 25 个中空纤维中被丙烯酰胺凝胶充填。

[0616] 实施例 55

[0617] 利用实施例 49 中已处理中空纤维内部的元件验证以实施例 52 中相同的方法处理的效果。操作后, 观察薄片, 证实在所有 25 个中空纤维中被丙烯酰胺凝胶充填。

[0618] 实施例 56

[0619] 利用实施例 50 中已处理中空纤维内部的元件验证以实施例 52 中相同的方法处理的效果。操作后,观察薄片,证实在所有 25 个中空纤维中被丙烯酰胺凝胶充填。

[0620] 实施例 57

[0621] 利用实施例 51 中已处理中空纤维内部的元件验证以实施例 52 中相同的方法处理的效果。操作后,观察薄片,证实在所有 25 个中空纤维中被丙烯酰胺凝胶充填。

[0622] 比较实施例 1

[0623] 25 个多孔聚乙烯中空纤维膜 MHF200TL(Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径 290 μm , 内径 200 μm) 绑成一束,一端用氨基甲酸乙酯树脂固定,使得中空纤维的中空部分保持开放。

[0624] 比较实施例 2

[0625] 制备具有如下组成的乙醇溶液 G 用于如实施例 46 所述相同方法处理中空纤维内部。

[0626] 乙醇溶液 G:

[0627] N, N- 二甲基丙烯酰胺 86 重量份

[0628] N, N' - 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 4 重量份

[0629] 2, 2' - 偶氮双异丁基脒 0.45 重量份

[0630] 乙醇 10 重量份

[0631] 比较实施例 3

[0632] 利用比较实施例 1 制备的元件观察处理的效果。当通过切割元件制备薄片时,发现 25 个中空纤维的 4 个丢失凝胶。振摇薄片后,在总共 12 个中空纤维中观察到凝胶完全缺失。

[0633] 比较实施例 4

[0634] 利用比较实施例 2 制备的元件,我们试着观察处理的效果。但是,中空纤维的内部填充了用于处理的凝胶,因此不能使我们向其中注射丙烯酰胺溶液。

[0635] 参考 5

[0636] (a) 制备具有甲基丙烯酸基团的寡核苷酸探针

[0637] 寡核苷酸(探针 A, 探针 B) 如下所示合成。

[0638] 探针: GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (SEQ IDNO:1)

[0639] 探针 B: GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (SEQ IDNO:2)

[0640] 利用自动合成仪 DNA/RNA 合成仪(394 型)进行寡核苷酸合成。在 DNA 合成的最后步骤,利用 Aminolink II(商标)(Applied Biosystems, Inc.) 在每一寡核苷酸的 5' 末端导入 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 基团以制备胺化探针。这些探针经去保护并按照常规方法纯化,用于下面的步骤。

[0641] 5 μl 所得探针 A 或 B(500nmol/ml) 与 0.5 μl 缩水甘油基甲基丙烯酸酯(GMA) 混合,混合物于 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 小时,制备具有甲基丙烯酸基团的寡核苷酸探针。加入 190 μl 水得到具有甲基丙烯酸基团的 100nmol/ml 探针溶液(GMA 修饰的探针 A 和 GMA 修饰的探针 B)。

[0642] (b) 核酸样品模型的制备

[0643] 作为核酸样品模型,合成了寡核苷酸(C, D),其分别互补于上述步骤(a)中合成的

寡核苷酸（探针 A, 探针 B）序列的一部分。

[0644] 寡核苷酸 C :GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (SEQ IDNO :3)

[0645] 寡核苷酸 D :CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC (SEQ IDNO :4)

[0646] 以与上述步骤 (a) 类似的方法合成寡核苷酸。由此制备荧光标记的核酸样品模型, 其中在寡核苷酸 C 的 5' 末端导入 Cy3, 在寡核苷酸 D 的 5' 末端导入 Cy5。这些产物经去保护并按照常规方法纯化, 用于下面的步骤。

[0647] (c) 纤维排列的制备

[0648] 5 个多孔聚乙烯中空纤维膜 MHF200TL (Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径 290 μm , 内径 200 μm) 排列在特氟隆板上, 彼此靠近但未重叠, 然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂 (由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造, 产品号 4403, nippolan4223) 以粘合该中空纤维。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后, 从特氟隆板上移出纤维, 获得片层样产品, 其上规则布置了多孔中空纤维。然后, 5 个这些片层样产品层积, 然后利用上述粘合剂彼此粘附。由此, 获得了多孔中空纤维排列, 其中, 在正方形中规则地布置了总共 25 个中空纤维 (长 5 个纤维, 宽 5 个纤维)。

[0649] 实施例 58

[0650] (1) 荧光标记的寡核苷酸的合成

[0651] 如上述参考 5(a) 合成具有 GCAT 序列的寡核苷酸, 其中在 5' 端导入异硫氰酸荧光素 (FITC)。

[0652] (2) 具有甲基丙烯酸基团的荧光色素的制备

[0653] 50 μl 在上述步骤 (1) 中制备的 5' 端具有 FITC 之寡核苷酸 (500nmol/ml) 与 0.5 μl 缩水甘油基甲基丙烯酸酯 (GMA) 混合。所得混合物于 70°C 反应 2 小时, 制备具有甲基丙烯酸基团的荧光色素。向该荧光色素加入加入 190 μl 水, 得到具有甲基丙烯酸基团的 100nmol/ml 荧光色素 (GMA 修饰的荧光色素)。

[0654] (3) 保留固定了生物物质的凝胶之纤维排列的制备

[0655] 制备具有示于表 7 的聚合溶液 1-3 以填充中空纤维的中空部分, 所述中空纤维构成在参考 5(c) 中制备的排列中的特定行, 然后将其转移入密闭的玻璃容器, 其中用水蒸气饱和, 80°C 下放置 4 小时以进行聚合反应。

[0656] < 单体溶液与聚合引发剂溶液的制备 >

[0657] 以下面的重量比混合组分制备单体溶液和引发剂溶液。

[0658] a) 单体溶液

[0659] 丙烯酰胺 0.76 重量份

[0660] 亚甲基 - 双 - 丙烯酰胺 0.04 重量份

[0661] 水 4.2 重量份

[0662] b) 引发剂溶液

[0663] 2,2' - 偶氮双 (2- 脒基丙烷) 二盐酸盐 0.01 重量份

[0664] 水 4.99 重量份

[0665] < 聚合作用溶液的制备 >

[0666] 以示于表 7 的体积比, 通过混合所述单体溶液 a)、引发剂溶液 b)、在上述步骤 (2) 中制备的 GMA 修饰的探针 A 或 GMA 修饰的探针 B, 以及在参考 5(c) 中制备的 GMA 修饰的

FITC, 制备聚合作用溶液 1-3。得到的聚合作用溶液用于填充中空纤维的中空部分, 所述中空纤维构成在参考 5(c) 中制备的中空纤维排列中的特定行, 然后将其转移入密闭的玻璃容器, 其中用水蒸气饱和, 80℃ 下放置 4 小时以进行聚合反应。

[0667] 表 7

[0668]

	聚合作用溶液 1	聚合作用溶液 2	聚合作用溶液 3
单体溶液	500 μ l	500 μ l	500 μ l
引发剂溶液	500 μ l	500 μ l	500 μ l
GMA 修饰的 FITC (100nmol/ml)	5 μ l	5 μ l	5 μ l
GMA 修饰的探针 A (100nmol/ml)	0	50 μ l	0
GMA 修饰的探针 B (100nmol/ml)	0	0	50 μ l
在排列中的行	1, 3, 5	2	4

[0669] (4) 薄片的观察及用凝胶充填的情况

[0670] 如上 (3) 中制备的排列利用超薄切片机切成具有 500 μ m 厚的薄片。利用荧光显微镜观察这些薄片 (由 NIKON 制造的荧光显微镜 E400), 使用用于 FITC 的滤光片 (激发波长范围从 465-495nm, 荧光波长范围从 515-555nm), 允许我们方便地观察用凝胶充填的情况。

[0671] (5) 杂交

[0672] 在上面步骤 (4) 中制备的薄片放入杂交袋中用于杂交, 加入具有如下组成的杂交溶液, 于 45℃ 进行预杂交 30 分钟。

[0673] < 杂交溶液的组成 > :

[0674] 5xSSC (0.75M 氯化钠, 0.075M 柠檬酸钠, pH 7.0)

[0675] 5% 封闭试剂 (Roche Diagnostic Systems)

[0676] 0.1% N- 月桂酰肌氨酸钠

[0677] 0.02% SDS (十二烷基硫酸钠)

[0678] 50% 甲酰胺

[0679] 随后, 以 50pmol/ml 的浓度加入参考 (5) 中制备的荧光标记的核酸样品模型, 随后于 45℃ 杂交 15 小时。

[0680] 杂交完成后, 将所得固定了核酸的薄片转移入 50ml 预温育的溶液 (0.1×SSC, 0.1% SDS), 于 45℃ 轻摇洗涤 20 分钟, 三次。

[0681] (2) 检测

[0682] 利用针对 CY3 的滤光片 (激发波长峰范围 : 535nm, 半数值宽 : 50nm, 荧光波长峰 :

610nm,半数值宽:75nm)于杂交后观察获自上述步骤(5)的芯片,得到的图象显示仅有排列中第2行发射荧光而不被GMA修饰的FITC之荧光阻碍。然后,利用针对如上述(4)中的FITC之滤光片使用荧光显微镜进行观察,表明所有中空纤维均用凝胶充填,甚至是利用针对CY3的滤光片无荧光发射的那些号的行。类似的,利用针对CY5的滤光片(激发波长峰范围:620nm,半数值宽:60nm,荧光波长峰:700nm,半数值宽:75nm)观察,得到的图象显示仅有排列中第4行发射荧光而不被GMA修饰的FITC之荧光阻碍。由上述结果,证实了寡核苷酸C仅特异性杂交于其中固定了探针A的区段,而寡核苷酸D仅特异性杂交于其中固定了探针B的区段,在杂交操作过程中无凝胶的溢出或变形。

[0683] 实施例 59

[0684] 如实施例 58 所述的相同条件制备纤维排列薄片,除了GMA修饰的FITC用由Polysciences, Inc 制备的二甲基丙烯酸荧光素替换,利用荧光显微镜观察这些薄片,使得我们方便地观察用凝胶充填的情况。此外,如实施例 58 所述进行的杂交表明,CY3 和 CY5 的荧光检测不受荧光素的荧光之妨碍,且在杂交操作过程中无凝胶溢出或变形。

[0685] 比较实施例 5

[0686] 如实施例 58 所述的相同条件制备薄片,未用GMA修饰的FITC,利用针对CY3的滤光片以荧光显微镜观察这些薄片,提供的图象表明,仅有排列第2行发射荧光。但是,很难观察填充的情况,如在第2行以外的行中凝胶的丢失,即,难以确定不发射荧光的行不形成任何杂合体或丧失了凝胶。

[0687] 实施例 60

[0688] (a) 制备具有氨基基团的寡核苷酸

[0689] 寡核苷酸(探针A,探针B)如下所示合成。

[0690] 探针:GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC(SEQ IDNO:1)

[0691] 探针B:GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (SEQ IDNO:2)

[0692] 利用自动DNA/RNA合成仪(394型,PE Biosystems, Inc. 制造)进行寡核苷酸合成。在DNA合成的最后步骤,利用Aminolink II(商标)(Applied Biosystems, Inc.)在每一寡核苷酸的5'末端导入 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 基团以制备胺化探针。这些探针经去保护并按照常规方法纯化,用于下面的步骤。

[0693] (2) 固定了核酸的大分子凝胶的制备

[0694] 5 μl 上述步骤(1)中制备的探针A或B(500nmol/ml)与5 μl 缩水甘油基甲基丙烯酸酯混合,混合物于70°C反应2小时。向反应混合物加入50 μl 单体混合的水性溶液(一种水性溶液,含有丙烯酰胺47.5% w/w,和亚甲基双丙烯酰胺2.5% w/w),450 μl 水和5 μl 偶氮双异丁基腈水性溶液,该混合物于70°C经历聚合反应2小时,制备固定了核酸的大分子凝胶。如此制备的固定了核酸的大分子凝胶被切成具有5mm厚度的薄片用于检测操作。

[0695] (3) 核酸样品的制备

[0696] 作为核酸样品模型,合成了寡核苷酸(C,D),其分别互补于上述步骤(1)中制备探针A和探针B序列的一部分。

[0697] 寡核苷酸C:GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG(SEQ IDNO:3)

[0698] 寡核苷酸D:CTGCTGTCCCAAACCCTGACCTCCACC(SEQ IDNO:4)

[0699] 以如上述(1)中相同的方法利用AminoLink II(商标,PE Biosystems)将

$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 导入每一寡核苷酸的 5' 末端。然后按照如下方法用地高辛配基 (DIG, Roche Diagnostics)) 标记产物。

[0700] 每一带有胺化末端的寡核苷酸溶于 100mM 硼酸缓冲液 ((pH 8.5) 至终浓度 2mM。向溶液加入等量地高辛配基 -3-O- 甲基羰基 - ϵ - 氨基己酸 -N- 羟基 - 琥珀酰亚胺酯 (26mg/ml 二甲基甲酰胺溶液), 然后混合物室温下静置过夜。

[0701] 上述溶液的量调整为 100 μl , 然后加入 2 μl 糖原 ((Roche Diagnostics)、10 μl 3M 乙酸钠 ((pH5.2) 和 300 μl 冷乙醇。于 15000 转 / 分离心混合物 15 分钟, 由此收集沉淀。500 μl 的 70% 乙醇加入沉淀, 然后于 15000 转 / 分离心 5 分钟, 再次收集试管底部的沉淀。空气干燥沉淀, 然后溶于 100 μl 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 和 1mM EDTA。由此获得 DIG 标记的寡核苷酸用作核酸样品模型。

[0702] (4) 杂交

[0703] 在上面步骤 (2) 中制备的固定了核酸之大分子凝胶薄片放入杂交袋中用于杂交, 加入具有如下组成的杂交溶液, 于 45°C 进行预杂交 30 分钟。随后加入在上面步骤 (3) 中制备的 DIG 标记的 DNA, 于 45°C 进行杂交 15 小时。

[0704] < 杂交溶液的组成 > :

[0705] 5×SSC

[0706] 5% 封闭试剂 (包括在 DIG 检测试剂盒中的试剂)

[0707] 0.1% N- 月桂酰肌氨酸钠

[0708] 0.02% SDS (十二烷基硫酸钠)

[0709] 50% 甲酰胺

[0710] (5) 检测

[0711] 杂交完成后, 将所得固定了核酸的大分子凝胶薄片转移入 50ml 预温育的溶液 (0.1×SSC, 0.1% SDS), 于 45°C 轻摇洗涤 20 分钟, 三次。

[0712] 然后, 加入 DIG 缓冲液 1 (0.1M 马来酸, 0.15M 氯化钠 (pH 7.5), 室温下轻摇去除 SDS。重复一次, 然后加入 DIG 缓冲液 2 (以 0.5% 浓度加入封闭试剂到 DIG 缓冲液中制备), 轻摇 1 小时。除去缓冲液后, 加入含有 1/10000 体积之抗 DIG 碱性磷酸酶标记的抗体 (DIG 检测试剂盒中的试剂) 溶液之 10ml DIG 缓冲液 2, 然后轻轻摇动 30 分钟, 以发生抗原抗体反应。然后, 此反应溶液通过在含有 0.2% 吐温 20 的 DIG 缓冲液 1 中摇动 15 分钟, 洗涤两次, 随后, 浸入 DIG 缓冲液 3 (0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1M 氯化钠, 和 0.05M 氯化镁) 中 3 分钟。除去 DIG 缓冲液 3 后, 加入含有 CDP-Star (Roche-Diagnostic Systems 制造) 的 DIG 缓冲液 3ml。

[0713] 沥干后, 所得溶液转移入新杂交袋中, 利用 X 射线胶片固定器与 X 射线胶片结合, 使胶片感光。

[0714] 结果发现, 寡核苷酸 C 结合于探针 A 放置的位点, 寡核苷酸 D 结合于探针 B 放置的位点。

[0715] 实施例 61

[0716] (1) 含缩水甘油基的大分子凝胶的制备

[0717] 以 0.1% 的浓度向水性溶液中加入偶氮双异丁基腈 (azobisisobutyronitrile), 所述溶液含有 4.65 重量份 (pbw) 丙烯酰胺, 0.25 重量份亚甲基 - 双丙烯酰胺和 0.1 重量份

的甲基丙烯酸缩水甘油酯,然后将上述溶液在 70℃经历聚合反应 2 小时,制备大分子凝胶。

[0718] (2) 固定了核酸的大分子凝胶的制备

[0719] 如上述步骤 (1) 中制备的大分子凝胶切成 10mm 的立方块,然后与 100 μ l 如前面实施例 60 (1) 的方法制备的探针 A 或 B (500nmol/ml) 混合,在 70℃下反应 2 小时,以得到固定了核酸的大分子凝胶。如此制备的大分子凝胶切成具有 5mm 厚度的薄片,用于如实施例 60 的 (3)、(4) 和 (5) 中类似操作的检测。

[0720] 结果,发现寡核苷酸 C 结合于探针 A 的凝胶薄片,而寡核苷酸 D 结合于探针 B 的凝胶薄片。

[0721] 实施例 62

[0722] (1) 具有 5' 端氨基的寡核苷酸的制备

[0723] 合成具有如下所示的寡核苷酸 (探针 A, 探针 B) :

[0724] 探针 A :GCGATCGAAACCTTGCTGTACGAGCGAGGGCTC (SEQ ID NO :1)

[0725] 探针 B :GATGAGGTGGAGGTCAGGGTTTGGGACAGCAG (SEQ ID NO :2)

[0726] 利用自动 DNA/RNA 合成仪 (394 型, PE Biosystems, Inc. 制造) 进行寡核苷酸合成。在 DNA 合成的最后步骤,利用 Aminolink II (商标) (Applied Biosystems, Inc.) 在每一寡核苷酸的 5' 末端导入 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 基团以制备胺化探针。这些探针经去保护并按照常规方法纯化,用于下面的步骤。

[0727] (2) 固定了核酸的大分子凝胶的制备

[0728] 5 μ l 上述步骤 (1) 中制备的探针 A 或 B (500nmol/ml) 与 5 μ l 甲基丙烯酸缩水甘油酯混合,混合物于 70℃反应 2 小时。向反应混合物加入 50 μ l 50% 丙烯酰胺水性溶液, 10 μ l 10% 乙二胺水性溶液, 450 μ l 水和 5 μ l 10% 的偶氮双异丁基腈水性溶液,然后于 70℃经历聚合反应 2 小时,制备固定了核酸的大分子凝胶。如此制备的固定了核酸的大分子凝胶被切成具有 5mm 厚度的薄片用于检测操作。

[0729] (3) 核酸样品的制备

[0730] 作为核酸样品模型,合成了寡核苷酸 (C,D),其分别互补于上述步骤 (1) 中制备探针 A 和探针 B 序列的一部分。

[0731] 寡核苷酸 C :GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG (SEQ ID NO :3)

[0732] 寡核苷酸 D :CTGCTGTCCCAAACCTGACCTCCACC (SEQ ID NO :4)

[0733] 以如上述步骤 (1) 中相同的方法利用 AminoLink II (商标, PE Biosystems) 将 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_6-$ 导入每一寡核苷酸的 5' 末端。然后按照如下方法用地高辛配基 (DIG :Roche Diagnostics 制造) 标记产物。

[0734] 每一带有胺化末端的寡核苷酸溶于 100mM 硼酸缓冲液 ((pH 8.5) 至终浓度 2mM。向溶液加入等量地高辛配基 -3-O- 甲基羰基 - ϵ - 氨基己酸 -N- 羟基 - 琥珀酰亚胺酯 (26mg/ml 二甲基甲酰胺溶液),然后混合物室温下静置过夜。

[0735] 上述所得混合物的量调整为 100 μ l,然后加入 2 μ l 糖原 (RocheDiagnostics Inc. 制造)、10 μ l 3M 乙酸钠 (pH5.2) 和 300 μ l 冷乙醇。于 15000 转 / 分离心 15 分钟,由此收集沉淀。500 μ l 的 70% 乙醇加入沉淀,然后于 15000 转 / 分离心 5 分钟,再次收集试管底部的沉淀。空气干燥所得沉淀,然后溶于 100 μ l 10mM Tris-HCl (pH 7.5) 和 1mM EDTA。由此获得 DIG 标记的寡核苷酸用作核酸样品模型。

[0736] (4) 杂交

[0737] 在上面步骤 (2) 中制备的固定了核酸之大分子凝胶薄片放入杂交袋中用于杂交, 加入具有如下组成的杂交溶液, 于 45℃ 进行预杂交 30 分钟。随后加入在上面步骤 (3) 中制备的 DIG 标记的 DNA, 于 45℃ 进行杂交 15 小时。

[0738] < 杂交溶液的组成 >:

[0739] 5x SSC

[0740] 5% 封闭试剂 (包括在 DIG 检测试剂盒中的试剂)

[0741] 0.1% N- 月桂酰肌氨酸钠

[0742] 0.02% SDS (十二烷基硫酸钠)

[0743] 50% 甲酰胺

[0744] (5) 检测

[0745] 杂交完成后, 将固定了核酸的大分子凝胶薄片转移入 50ml 预温育的溶液 (0.1×SSC, 0.1% SDS), 于 45℃ 轻摇洗涤 20 分钟, 三次。

[0746] 然后, 加入 DIG 缓冲液 1 (0.1M 马来酸, 0.15M 氯化钠 (pH 7.5), 室温下轻摇去除 SDS。重复一次, 然后加入 DIG 缓冲液 2 (以 0.5% 浓度加入封闭试剂到 DIG 缓冲液中制备), 轻摇 1 小时。除去缓冲液后, 加入含有 10^{-4} 体积之抗 DIG 碱性磷酸酶标记的抗体 (DIG 检测试剂盒中的试剂) 溶液之 10ml DIG 缓冲液 2, 然后轻轻摇动 30 分钟, 以发生抗原抗体反应。然后, 此反应混合物利用在含有 0.2% 吐温 20 的 DIG 缓冲液 1 中摇动 15 分钟, 洗涤两次, 随后, 浸入 DIG 缓冲液 3 (0.1M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1M 氯化钠, 和 0.05M 氯化镁) 中 3 分钟。除去 DIG 缓冲液 3 后, 加入含有 CDP-Star (Roche-Diagnostic Systems 制造) 的 DIG 缓冲液 3ml。

[0747] 沥干后, 所得薄片转移入新杂交袋中, 利用 X 射线胶片固定器与 X 射线胶片结合, 使胶片感光。

[0748] 结果发现, 寡核苷酸 C 结合于探针 A 放置的位点, 寡核苷酸 D 结合于探针 B 放置的位点。

[0749] 实施例 63

[0750] (1) 含缩水甘油基的大分子凝胶的制备

[0751] 以 0.1% 的浓度向水性溶液中加入偶氮双异丁基腈 (azobisisobutyronitrile), 所述溶液含有 4.88 重量份 (pbw) 丙烯酰胺, 0.02 乙二胺和 0.1 重量份的甲基丙烯酸缩水甘油酯, 然后将上述溶液在 70℃ 经历聚合反应 2 小时, 制备大分子凝胶。

[0752] (2) 固定了核酸的大分子凝胶的制备

[0753] 如上述制备的大分子凝胶切成 10mm 方块, 然后与 100 μl 如前面实施例 62 (1) 的方法制备的探针 A 或 B (500nmol/ml) 混合, 在 70℃ 下反应 2 小时, 以得到固定了核酸的大分子凝胶。对于探针 B, 进行同样的操作以制备固定了核酸的大分子凝胶。如此制备的大分子凝胶切成具有 5mm 厚度的薄片, 用于如实施例 62 的 (3) (4) (5) 中类似操作的检测。

[0754] 结果, 发现寡核苷酸 C 结合于探针 A 的凝胶薄片, 而寡核苷酸 D 结合于探针 B 的凝胶薄片。

[0755] 实施例 64

[0756] (1) 染色体 DNA 的制备

[0757] 胭脂红分枝杆菌菌株 J1 (FERM BP-1478) 培养在营养液中 (葡萄糖 15g, 酵母提取物 1g, 谷氨酸钠 10g, KH_2PO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/l, pH7.2) 于 30℃ 培养 3 天, 然后收集菌体细胞。从细胞制备染色体 DNA 并用作 PCR 模板。

[0758] (2) 探针的制备

[0759] 图 9 显示用于制备探针的合成的寡核苷酸位置。寡核苷酸 A (SEQ ID NO:1) 位于寡核苷酸 B (SEQ ID NO:2) 上游约 400 碱基; 寡核苷酸 E (SEQ ID NO:5) 位于寡核苷酸 A 上游 400 碱基; 寡核苷酸 F (SEQ ID NO:6) 位于寡核苷酸 B 下游 600 碱基。在 PCR 中, 使用这些寡核苷酸, 其中用丙烯酰胺修饰寡核苷酸 A 和 B 的 5' 末端 (由 Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd 合成)。至于 PCR, 利用一个引物相对于另一个而言以过量存在进行不对称 PCR。此处制备的引物浓度为带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的寡核苷酸 A: 寡核苷酸 E 为 100:1, 或带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的寡核苷酸 B: 寡核苷酸 F 为 100:1。其它条件如 Ex-Taq (Takara Shuzo Co., Ltd) 的说明书中所述, 利用个人 TaKaRa PCR 热循环仪进行 PCR。反应以 100 μ l 总体积在如下温度条件下进行 40 个循环: 93℃ 30 秒, 65℃ 30 秒和 72℃ 2 分钟 / 每一循环。此 PCR 扩增了大约 400 碱基 (探针 G: SEQ ID NO:7) 和 600 碱基 (探针 H: SEQ ID NO:8) 的带有 5' 端用丙烯酰胺修饰的探针 DNA。

[0760] (3) 固定了核酸的薄片的制备

[0761] 制备如下组成的水性溶液 A: 丙烯酰胺 3.7 重量份 (by mass); 亚甲基双丙烯酰胺 0.3 重量份; 2,2'-偶氮双 (2-脒基丙烷基) 二盐酸盐 0.1 重量份; 探针 G (或探针 H) 0.005 重量份。在此溶液 A 中浸入具有非多孔中间层的多孔聚乙烯中空纤维膜 MHF200TL (Mitsubishi Rayon Co., Ltd., 外径为 290 μ m, 内径为 200 μ m), 然后将其转移入密封的玻璃容器中, 置于 80℃ 4 小时, 以进行聚合反应。

[0762] 固定了探针 G 或 H 的凝胶保留在多孔层中而非中空部分或非多孔中间层中, 所述多孔层位于所得多孔中空纤维膜的内侧。如上述获得的保留固定了探针 G 的凝胶之多孔中空纤维排列在特氟隆板上, 彼此靠近但未重叠, 然后在两端固定。向此板加一薄层聚氨基甲酸酯树脂粘合剂 (由 Nippon Polyurethane Industry Co., Ltd 制造, 产品号 4403, nipolan4223) 以粘合所述固定了核酸的多孔中空纤维。在聚氨基甲酸酯树脂充分固化后, 从特氟隆板上移出纤维, 获得片层样产品, 其上规则地布置了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维。以相同的方法, 获得了探针 H 的片层样产品, 其中规则地布置了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维。此外, 制备了类似的片层样产品, 但是其上未固定核酸 (空白)。

[0763] 然后, 5 个这些片层以空白、探针 G、空白、探针 H 和空白的顺序层积, 然后利用上述粘合剂粘附。由此, 获得了保留固定了核酸的凝胶之多孔中空纤维排列, 其含有规则地布置形成正方形的总共 25 个固定了核酸的多孔中空纤维 (长 5 个纤维, 宽 5 个纤维)。将如此制备的含有固定了核酸之凝胶的多孔中空纤维排列利用切片机切割成具有 0.1mm 厚度的薄片, 获得其中纵向和横向各 20 个多孔中空纤维 (总计 400 个) 规则排列的截面之薄片。

[0764] (4) 荧光标记的样品的制备

[0765] 制备如下样品作为核酸样品模型用于杂交。为制备仅与探针 G 杂交的样品, 利用寡核苷酸 E 和 A 进行 PCR, 制备约 400 碱基的样品 I (SEQ ID NO:9)。另一方面, 为制备仅与探针 H 杂交的样品, 利用寡核苷酸 F 和 B 进行 PCR, 制备约 600 碱基的样品 J (SEQ ID NO:

10)。

[0766] 为荧光标记样品,合成了带有 5' 末端用 Cy5 (Cy5- 寡核苷酸 E, Cy5- 寡核苷酸 F) 标记的寡核苷酸 E 和 F (Amersham Pharmacia Biotech, OligoExpress) 用于 PCR。制备用于 PCR 的引物浓度为 Cy5- 寡核苷酸 E : 寡核苷酸 A 为 100 : 1, 或者 Cy5- 寡核苷酸 F : 寡核苷酸 B 为 100 : 1。其它条件在 Ex-Taq (Takara Shuzo Co., Ltd) 的说明书中描述, 利用 TaKaRa PCR 热循环仪 (PERSONAL) 进行 PCR。反应以 100 μ l 体积在如下温度条件下进行 40 个循环 : 93°C 30 秒, 65°C 30 秒和 72°C 2 分钟。此 PCR 扩增了样品 I 和样品 J 的 DNA。反应完成后, 未反应的引物利用 SUPEC-02 (Takara Shuzo Co., Ltd) 去除, 利用 GFX PCR DNA 和 GelBand 纯化试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 回收样品。

[0767] (5) 杂交

[0768] 如此回收的 2 μ l 样品点样于滤纸上 (PhastTransfer FilterPaper : Amersham Pharmacia Biotech), 然后插入实施例 64(3) 中制备的固定了 DNA 的薄片一侧, 施加 5V 电压 2 小时实现杂交。洗涤后, 所得样品用荧光监测器观察 (荧光显微镜)。

[0769] 结果发现, 在固定了核酸的薄片上, 样品 I 仅与固定了探针 G 的多孔纤维横截面特异性杂交, 以及样品 J 仅与固定了探针 H 的多孔纤维横截面特异性杂交。

[0770] 所有上述引用的公开文本、专利、专利申请均在此完整引用作为参考。

[0771] 序列表说明

[0772] SEQ ID No. 1 : 合成 DNA

[0773] SEQ ID No. 2 : 合成 DNA

[0774] SEQ ID No. 3 : 合成 DNA

[0775] SEQ ID No. 4 : 合成 DNA

[0776] SEQ ID No. 5 : 合成 DNA

[0777] SEQ ID No. 6 : 合成 DNA

[0778] SEQ ID No. 15 : 带有结合于 5' 端的丙烯酰胺之合成 DNA

[0779] SEQ ID No. 16 : 带有结合于 5' 端的丙烯酰胺之合成 DNA

[0780] SEQ ID No. 17 : 带有结合于 5' 端的丙烯酰胺之合成 DNA

[0781] SEQ ID No. 18 : 带有结合于 5' 端的丙烯酰胺之合成 DNA

[0782] SEQ ID No. 23 : 5' 端用 Cy5 标记的合成 DNA

[0783] SEQ ID No. 24 : 5' 端用 Cy3 标记的合成 DNA

[0784] SEQ ID No. 25 : 5' 端用 Cy3 标记的合成 DNA

[0785] SEQ ID No. 26 : 5' 端用 Cy5 标记的合成 DNA

[0786] 本发明的工业应用

[0787] 本发明制备了固定了生物物质的大分子材料, 其中任何生物物质被以高密度牢固地固定。此外, 本发明中, 能够容易获得大量具有在小面积中固定了核酸之宽范围的薄片, 这是由于如下事实 : 固定方法不是在二维平面上, 而是在分别的和独立的一维结构之纤维上进行, 从而固定了与核酸链长无关的大量核酸 ; 在排列工艺中引入了多种用于纤维成形和制备编织材料的技术, 从而实现了高密度 ; 为了从所得呈三维结构之纤维束中制备目标二维排列, 全新引入了现有技术中不存在的切割工艺, 由此避免了显微注射操作 (诸如易于产生差错的点样工艺) 从而实现连续切割。由此, 本发明可用于临床检测和食品检测等

使用基因结构分析等的诸多领域。

[0788] 此外,本发明提供了一种用于处理中空纤维内壁部分的方法,一种用于用凝胶填充中空纤维的中空部分的方法,以及一种制备用凝胶充填的纤维的方法。

[0789] 根据本发明充填的纤维内部的凝胶能够防止从中脱出,因为其被物理地固定在中空纤维的内壁部分。如此制备的充填凝胶的纤维可用于制备毛细管电泳和 DNA 分析用的微阵列等。特别是,在毛细管电泳中,凝胶与毛细管内壁的界面被紧密结合,使得迁移溶质如 DNA 等在内壁部分不存在短路途径,从而形成均一的条带。

[0790] 序列表

[0791] <110>MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

[0792] <120> 带有生物物质的纤维

[0793] <130>PH-789-PCT

[0794] <140>PCT/JP00/01353

[0795] <141>2000-03-06

[0796] <150>JP99/59361

[0797] <151>1999-03-05

[0798] <150>JP99/84100

[0799] <151>1999-03-26

[0800] <150>JP99/84101

[0801] <151>1999-03-26

[0802] <150>JP99/83964

[0803] <151>1999-03-26

[0804] <150>JP99/93043

[0805] <151>1999-03-31

[0806] <150>JP99/93044

[0807] <151>1999-03-31

[0808] <150>JP99/215014

[0809] <151>1999-07-29

[0810] <150>JP99/240041

[0811] <151>1999-08-26

[0812] <150>JP99/298613

[0813] <151>1999-10-05

[0814] <150>JP99/324194

[0815] <151>1999-11-15

[0816] <150>JP99/346288

[0817] <151>1999-12-06

[0818] <150>JP99/346309

[0819] <151>1999-12-06

[0820] <150>JP99/346521

[0821] <151>1999-12-06

[0822]	<150>JP2000/55658	
[0823]	<151>2000-03-01	
[0824]	<150>JP2000/57075	
[0825]	<151>2000-03-02	
[0826]	<160>26	
[0827]	<170>PatentIn Ver. 2.0	
[0828]	<210>1	
[0829]	<211>33	
[0830]	<212>DNA	
[0831]	<213>人工序列	
[0832]	<220>	
[0833]	<223>合成 DNA	
[0834]	<400>1	
[0835]	gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcgaggg ctc	33
[0836]	<210>2	
[0837]	<211>32	
[0838]	<212>DNA	
[0839]	<213>人工序列	
[0840]	<220>	
[0841]	<223>合成 DNA	
[0842]	<400>2	
[0843]	gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc ag	32
[0844]	<210>3	
[0845]	<211>28	
[0846]	<212>DNA	
[0847]	<213>人工序列	
[0848]	<220>	
[0849]	<223>合成 DNA	
[0850]	<400>3	
[0851]	gagccctcgc tcgtacagca aggt ttcg	28
[0852]	<210>4	
[0853]	<211>27	
[0854]	<212>DNA	
[0855]	<213>人工序列	
[0856]	<220>	
[0857]	<223>合成 DNA	
[0858]	<400>4	
[0859]	ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc	27
[0860]	<210>5	

- [0861] <211>31
 [0862] <212>DNA
 [0863] <213> 人工序列
 [0864] <220>
 [0865] <223> 合成 DNA
 [0866] <400>5
 [0867] gctcaagcgc gatttcgggtt tcgacatccc c 31
 [0868] <210>6
 [0869] <211>30
 [0870] <212>DNA
 [0871] <213> 人工序列
 [0872] <220>
 [0873] <223> 合成 DNA
 [0874] <400>6
 [0875] catgtcgcgt cgtttgttga cgaagcggta 30
 [0876] <210>7
 [0877] <211>388
 [0878] <212>DNA
 [0879] <213> 玫瑰色红球菌
 [0880] <400>7
 [0881] gcgatcgaaa ccttgctgta cgagcagagg ctcacacgc ccgccgcggt cgaccgagtc 60
 [0882] gtttcgtact acgagaacga gatcggtccc atgggcggtg ccaaggtcgt ggccaagtcc 120
 [0883] tgggtggacc ctgagtaccg caagtggctc gaagaggacg cgacggccgc gatggcgtca 180
 [0884] ttgggctatg ccggtgagca ggcacaccaa atttcggcgg tcttcaacga ctcccaaacg 240
 [0885] catcacgtgg tgggtgtcac tctgtgttcg tgctatccgt ggccggtgct tgggtctccc 300
 [0886] cccgcctggt acaagagcat ggagtaccgg tcccagatgg tagcggaccc tcgtggagtg 360
 [0887] ctcaagcgcg atttcgggtt cgacatcc 388
 [0888] <210>8
 [0889] <211>611
 [0890] <212>DNA
 [0891] <213> 玫瑰色红球菌
 [0892] <400>8
 [0893] gatgaggtgg aggtcagggt ttgggacagc agctccgaaa tccgctacat cgtcatcccc 60
 [0894] gaacggccgg ccggcaccca cggttggtcc gaggaggagc tgacgaagct ggtgagccgg 120
 [0895] gactcgatga tcggtgtcag taatgcgctc acaccgcagg aagtgatcgt atgagtgaag 180
 [0896] acacactcac tgateggctc ccggcgactg ggaccgccgc accgccccgc gacaatggcg 240
 [0897] agcttgtatt caccgagcct tgggaagcaa cggcattcgg ggtcgccatc gcgctttcgg 300
 [0898] atcagaagtc gtacgaatgg gaggctcttc gacagcgtct cattcactcc atcgctgagg 360
 [0899] ccaacggttg cgaggcatac tacgagagct ggacaaaggc gctcgaggcc agcgtgggtc 420

[0900] actcggggct gatcagegaa gatgagatcc gcgagcgcat ggaatcgatg gccatcatcg 480
 [0901] actgacatcc cctgtgtctc catctagcag cagtgcgggc gtaccccgac ggtgctgagc 540
 [0902] cgacggggta cgcccgact tcatcaatga cgggtggttc taatttggct cgggtggatac 600
 [0903] tgatctcgcg g 611
 [0904] <210>9
 [0905] <211>388
 [0906] <212>DNA
 [0907] <213> 玫瑰色红球菌
 [0908] <400>9
 [0909] ggatgtcgaa accgaaatcg cgcttgagca ctccacgagg gtccgctacc actcgggacc 60
 [0910] ggtactccat gctcttgtag caggcgggcg ggagaccaag caccggccac ggatagcacg 120
 [0911] aacacagagt gcacaccacc acgtgatgcg tttgggagtc gttgaagacc gccgaaattt 180
 [0912] ggtgtgcctg ctacccggca tagcccaatg acgccatgcg ggccgtcgcg tcctcttcga 240
 [0913] gccacttgcg gtactcaggg tccaccagg acttggccac gaccttggca ccgcccacg 300
 [0914] ggccgatctc gttctcgtag tacgaaacga ctcggtcgac cgccggcgggc gtgatgagcc 360
 [0915] ctgctcgta cagcaagggt tcgacgc 388
 [0916] <210>10
 [0917] <211>611
 [0918] <212>DNA
 [0919] <213> 玫瑰色红球菌
 [0920] <400>10
 [0921] ccgcgagatc agtatccacc gagccaaatt aggaaccacc gtcattgatg aagtgcgggc 60
 [0922] gtaccccgtc ggctcagcac cgtcggggta cgcccgact gctgctagat ggagacacag 120
 [0923] gggatgtcag tcgatgatgg ccatcgattc catgcgctcg cggatctcat ctctgctgat 180
 [0924] cagcccgag tcgaccacgc tggcctcgag cgctttgtc cagctctcgt agtatgcctc 240
 [0925] gcaaccgttg gcctcagcga tggagtgaat gagacgctgt cggaagaact cccattcgta 300
 [0926] cgacttctga tccgaaagcg cgatggcgac ccgaatgcc gttgcttccc aaggctcggt 360
 [0927] gaatacaagc tcgccattgt cgcggggcgg tgcggcggtc ccagtcgccg ggagccgac 420
 [0928] agtgagtgtg tcttactca tacgatcact tcctgcggtg tgagcgcat actgacaccg 480
 [0929] atcatcgagt cccggctcac cagcttcgtc agctcctcct cggaccaacc gtcggtgccg 540
 [0930] gccggcgtt ccgggatgac gatgtagcgg atttcggagc tgctgtccca aaccctgacc 600
 [0931] tccacctcat c 611
 [0932] <210>11
 [0933] <211>651
 [0934] <212>DNA
 [0935] <213> 啤酒糖酵母
 [0936] <400>11
 [0937] caaccaacca caactacata cacatacata cacaatggtc gctcaagttc aaaagcaagc 60
 [0938] tccaactttt aagaaaactg ccgtcgctga cgggtgtctt gacgaagtct ccttggacaa 120

[0939] atacaagggt aagtacgttg tcctagcctt tattccattg gccttcactt tcgtctgtcc 180
 [0940] aaccgaaatc attgctttct cagaagctgc taagaaattc gaagaacaag gcgctcaagt 240
 [0941] tcttttcgcc tccactgact ccgaatactc ccttttggca tggaccaata tccaagaaa 300
 [0942] ggaagggtgtt ttgggcccac tcaacattcc attgttggct gacaccaacc actctttgtc 360
 [0943] cagagactat ggtgtcttga tcgaagaaga aggtgtcgcc ttgagagggt tgttcatcat 420
 [0944] cgacccaaag ggtgtcatta gacacatcac cattaacgat ttgccagtcg gtagaaacgt 480
 [0945] tgacgaagcc ttgagattgg ttgaagcctt ccaatggacc gacaagaacg gtactgtctt 540
 [0946] gccatgtaac tggactccag gtgctgtctac catcaagcca accgttgaag actccaagga 600
 [0947] atacttcgaa gctgccaaca aataagacgc ttgcagagtt gtctaaatga c 651
 [0948] <210>12
 [0949] <211>586
 [0950] <212>DNA
 [0951] <213> 啤酒糖酵母
 [0952] <400>12
 [0953] caaagcatac ctaataacaa tataatccca taatgctagc cctagctgat aacattctac 60
 [0954] gtataataaa tttcctatit ttggttatit ccatcggtit aatcagttcg ttgttaaaca 120
 [0955] cccaacatag gcacagctcc agagttaaact actgtatggt tgcctgtgca tatggtatat 180
 [0956] tcaccgattc attgtacggt gtcttttgcca acttcattga accattggca tggccactag 240
 [0957] ttttgttcac actggacttt ttgaactttg tgttcacttt cactgccggt acagtgttgg 300
 [0958] ccgttggtat cagagctcac tcatgtaaca acagctcata cgttgacagt aacaagatta 360
 [0959] ctcaaggttc cgggtaccaga tgtagacaag ctcaagccgc tgttgcatc ctctacttct 420
 [0960] cttgtgccat ctttttggct aagaccctga tgtctgtttt caacatgac tccaatggtg 480
 [0961] cttttggttc tggttctttc tccaagagaa gaagaactgg ccaagtcggt gttccaacca 540
 [0962] tttcccaagt ctaattgaag cgcaccaact taaattttac gccact 586
 [0963] <210>13
 [0964] <211>1105
 [0965] <212>DNA
 [0966] <213> 啤酒糖酵母
 [0967] <400>13
 [0968] aagaaacatc cctcatacta ccacacatat gccaaactcta gtaaattggac caagaagaga 60
 [0969] ctctaccgaa gggtttgata ccgatatcat cactcttcct agattcataa tcgagacca 120
 [0970] gaagcaattt aagaacgcta ctggtgattt cacattagta ctgaatgcct tgcaattcgc 180
 [0971] gttcaaatit gtatctcaca ccatcagacg tgctgaattg gtttaacttg ttgggttagc 240
 [0972] aggegccttc aacttcactg gtgaccagca aaagaagttg gacgttctag gtgatgaaat 300
 [0973] atttatcaat gccatgaggg ctagtgggat catcaaggtc cttgtatctg aagaacagga 360
 [0974] agacttgatc gtttttccca caaacacggg ctcatagcga gtgtgttgtg atcctattga 420
 [0975] tggtctctca aatttggacg ccggtgtctc cgttggaact atcgcgctca tattcagact 480
 [0976] gctaccagac tcatcaggta ctataaacga cgtactgaga tgtggtaaag aaatggtagc 540
 [0977] cgcttgctat gccatgtacg gatcctctac gcacttagta ttgacattgg gtgatggagt 600

[0978]	tgatgggttt accttagaca caaacttggg cgaattcatc ttgactcatc ctaacttaag	660
[0979]	aattccgcct caaaaggcca tctactcaat taatgaaggt aacaccctct actggaacga	720
[0980]	gactataaga acatttattg agaaagtcaa acaaccccaa gcagacaaca acaacaagcc	780
[0981]	tttctcggt aggtatgttg gatccatggt tgctgatgtt cacaggacgt ttctttacgg	840
[0982]	tggccttttc gcataccctt gcgacaagaa gagccccaac ggaaaactga ggttgcttta	900
[0983]	tgaggccttc ccaatggctt tcttaatgga acaagcaggg ggaaaagcgg tcaacgatcg	960
[0984]	cggagagaga atcttggatt tggtgccaag tcatatccat gacaaatctt ctatttgggt	1020
[0985]	gggttcttca ggtgaaattg acaaatTTTT agaccatatt ggcaagtcac agtagttcaa	1080
[0986]	tgatgcctt cttttcttat tttct	1105
[0987]	<210>14	
[0988]	<211>670	
[0989]	<212>DNA	
[0990]	<213> 啤酒糖酵母	
[0991]	<400>14	
[0992]	ctaagaaaac cacgatcaaa caaataaatc agcaatgggt gcctacaaat atttgaaga	60
[0993]	attgcaaaga aagaagcaat ctgatgtttt gagattcttg caaagagtca gagtctggga	120
[0994]	atacagacaa aagaatgtca ttcacagagc cgctagacca actagaccag acaaggctag	180
[0995]	aagattgggt tacaaagcta agcaaggttt cgttatctac cgtgtcagag ttagacgtgg	240
[0996]	taacagaaag agacctgttc caaagggtgc tacttacggt aagccaacta accaaggtgt	300
[0997]	caatgaattg aaatacaaaa gatccttgag agctaccgct gaagaaagag ttggtcgtcg	360
[0998]	tgccgctaac ttgagagtct tgaactccta ctgggttaac caagattcta cttacaagta	420
[0999]	cttcgaagtt atcttggctg accctcaaca caaggctatc agaagagatg ctcgttaca	480
[1000]	ctggatctgt gaccagttc acaagcaccg tgaagctaga ggtttgactg ccactggtaa	540
[1001]	gaaatccaga ggtatcaaca agggtcacaa attcaacaac accaaggctg gtagaagaaa	600
[1002]	gacctggaag agacaaaaca ctttgtcctt gtggagatac agaaaataag ctggttgatg	660
[1003]	gaaaatataa	670
[1004]	<210>15	
[1005]	<211>27	
[1006]	<212>DNA	
[1007]	<213> 人工序列	
[1008]	<220>	
[1009]	<223> 与丙烯酰胺在 5' 末端相连的合成 DNA	
[1010]	<400>15	
[1011]	caaccaacca caactacata cacatac	27
[1012]	<210>16	
[1013]	<211>21	
[1014]	<212>DNA	
[1015]	<213> 人工序列	
[1016]	<220>	

[1017]	<223> 与丙烯酰胺在 5' 末端相连的合成 DNA	
[1018]	<400>16	
[1019]	ctaagaaaac cacgatcaaa c	21
[1020]	<210>17	
[1021]	<211>26	
[1022]	<212>DNA	
[1023]	<213> 人工序列	
[1024]	<220>	
[1025]	<223> 与丙烯酰胺在 5' 末端相连的合成 DNA	
[1026]	<400>17	
[1027]	aagaaacatc cctcatacta ccacac	26
[1028]	<210>18	
[1029]	<211>21	
[1030]	<212>DNA	
[1031]	<213> 人工序列	
[1032]	<220>	
[1033]	<223> 与丙烯酰胺在 5' 末端相连的合成 DNA	
[1034]	<400>18	
[1035]	ctaagaaaac cacgatcaaa c	21
[1036]	<210>19	
[1037]	<211>25	
[1038]	<212>DNA	
[1039]	<213> 人工序列	
[1040]	<220>	
[1041]	<223> 合成 DNA	
[1042]	<400>19	
[1043]	gtcattttaga caactctgca agcgt	25
[1044]	<210>20	
[1045]	<211>21	
[1046]	<212>DNA	
[1047]	<213> 人工序列	
[1048]	<220>	
[1049]	<223> 合成 DNA	
[1050]	<400>20	
[1051]	ttatatatttc catcaaccag c	21
[1052]	<210>21	
[1053]	<211>25	
[1054]	<212>DNA	
[1055]	<213> 人工序列	

- [1056] <220>
[1057] <223> 合成 DNA
[1058] <400>21
[1059] agaaaataag aaaagaaggc gatca 25
[1060] <210>22
[1061] <211>21
[1062] <212>DNA
[1063] <213> 人工序列
[1064] <220>
[1065] <223> 合成 DNA
[1066] <400>22
[1067] ttatatatt tc catcaaccag c 21
[1068] <210>23
[1069] <211>40
[1070] <212>DNA
[1071] <213> 人工序列
[1072] <220>
[1073] <223> 用 Cy5 在 5' 末端标记的合成 DNA
[1074] <400>23
[1075] gaacttgagc gaccattgtg tatgtatgtg tatgtagttg 40
[1076] <210>24
[1077] <211>40
[1078] <212>DNA
[1079] <213> 人工序列
[1080] <220>
[1081] <223> 用 Cy3 在 5' 末端标记的合成 DNA
[1082] <400>24
[1083] atcagctagg gctagcatta tgggattata ttgttattag 40
[1084] <210>25
[1085] <211>40
[1086] <212>DNA
[1087] <213> 人工序列
[1088] <220>
[1089] <223> 用 Cy3 在 5' 末端标记的合成 DNA
[1090] <400>25
[1091] gtccatttac tagagttggc atatgtgtgg tagtatgagg 40
[1092] <210>26
[1093] <211>40
[1094] <212>DNA

-
- [1095] <213> 人工序列
- [1096] <220>
- [1097] <223> 用 Cy5 在 5' 末端标记的合成 DNA
- [1098] <400>26
- [1099] atttgtaggc acccattgct gatttatttg tttgatcgtg 40

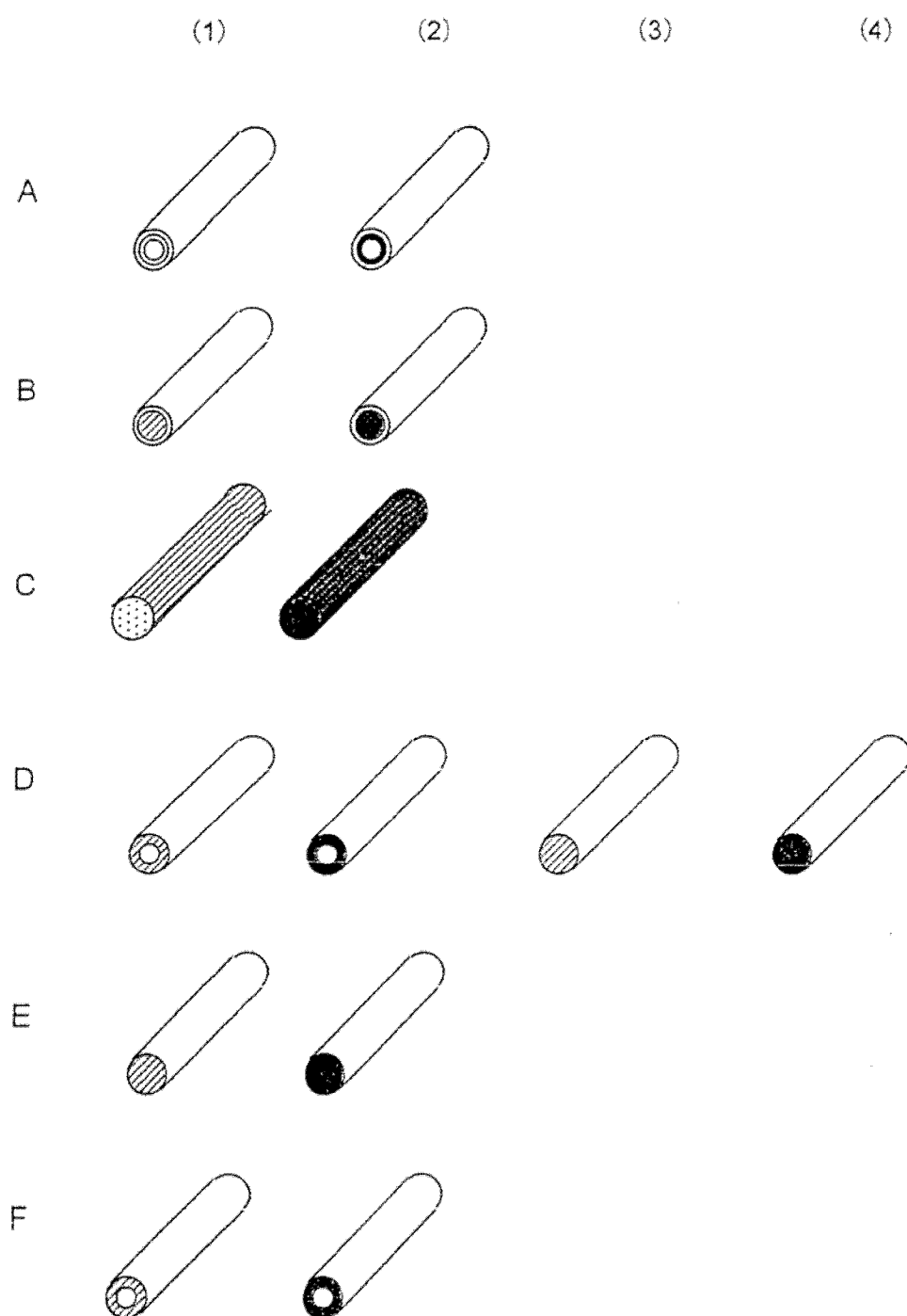


图 1

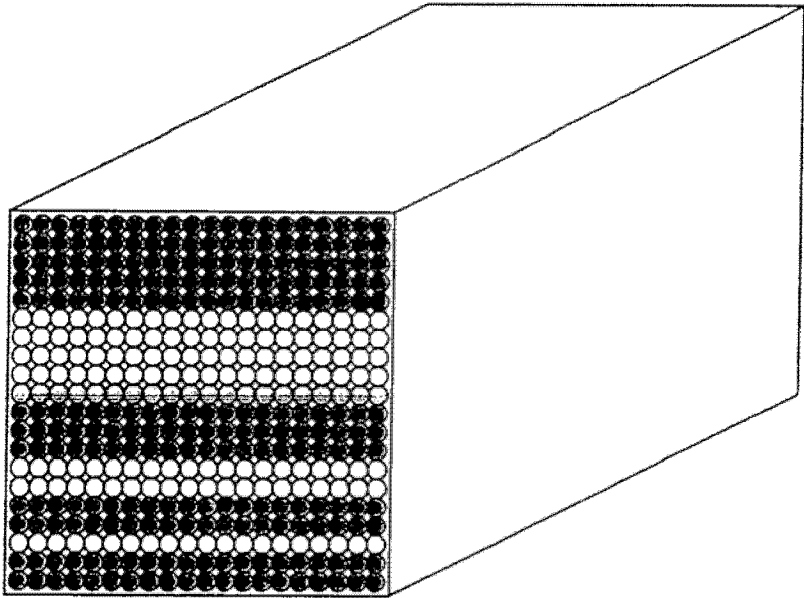


图 2

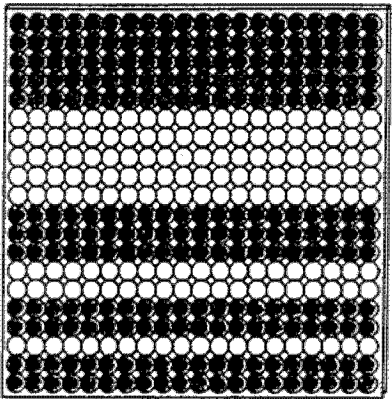


图 3

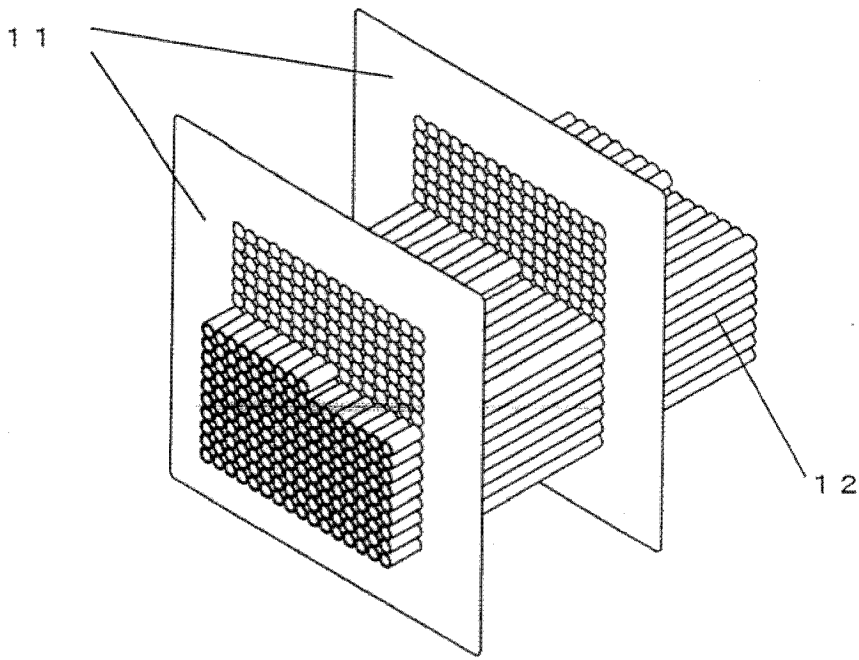


图 4

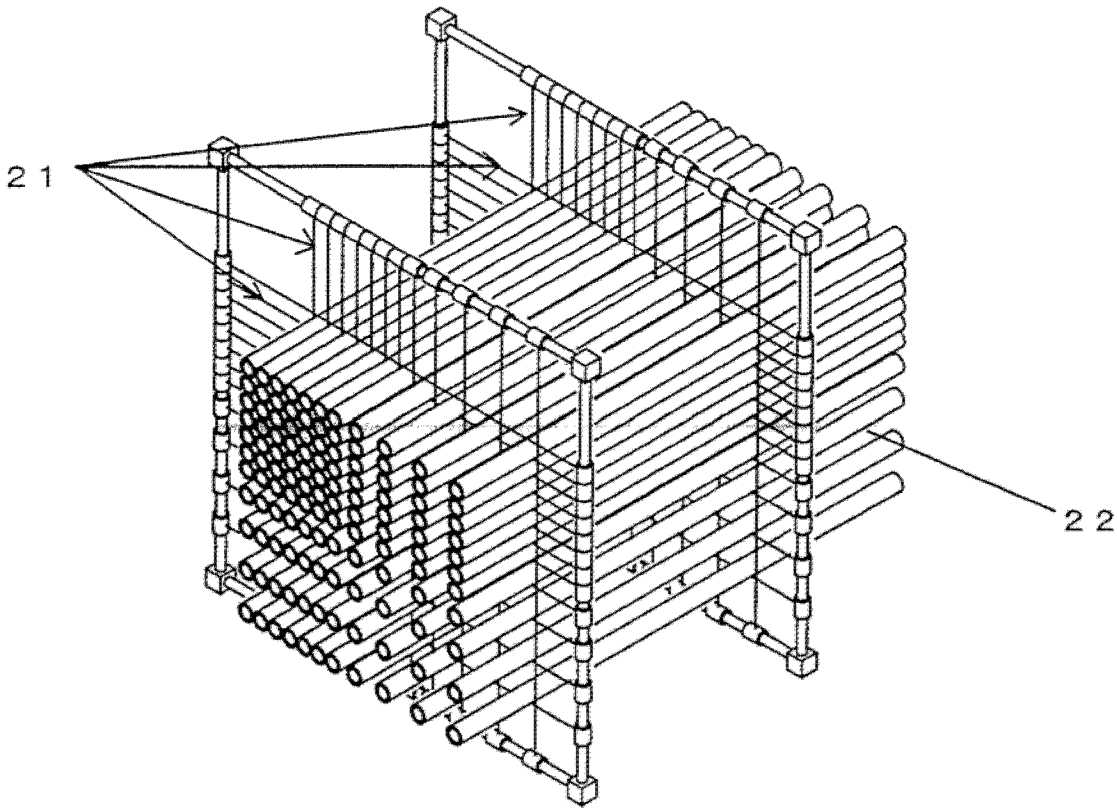


图 5

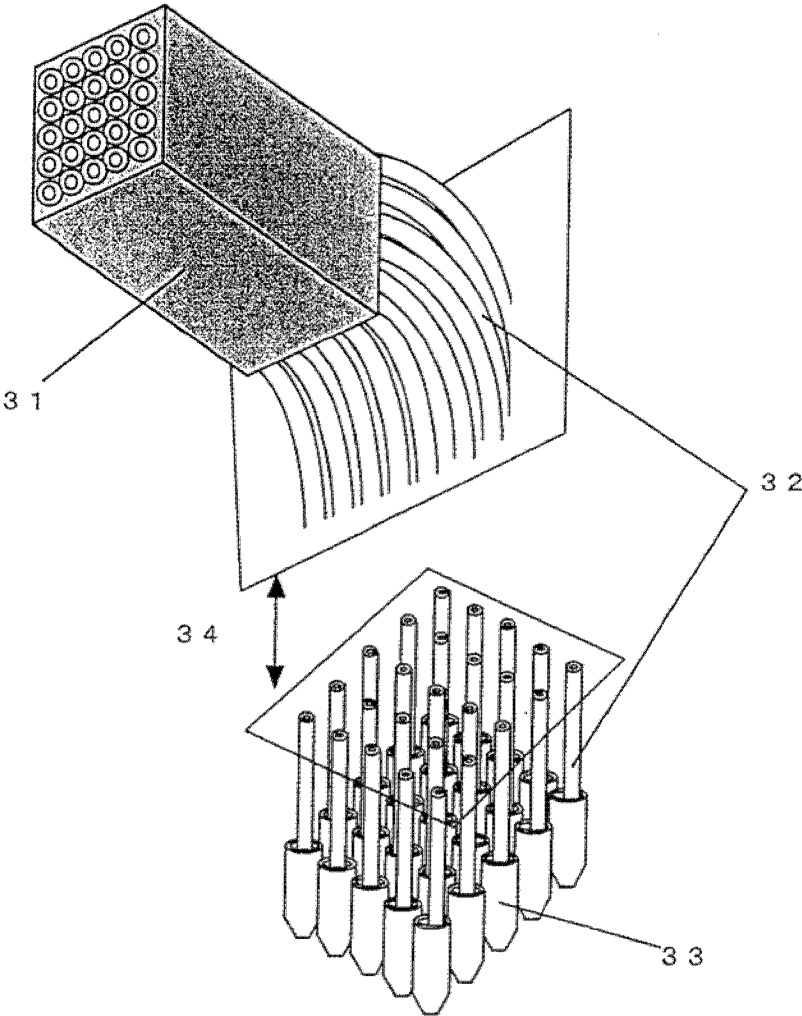
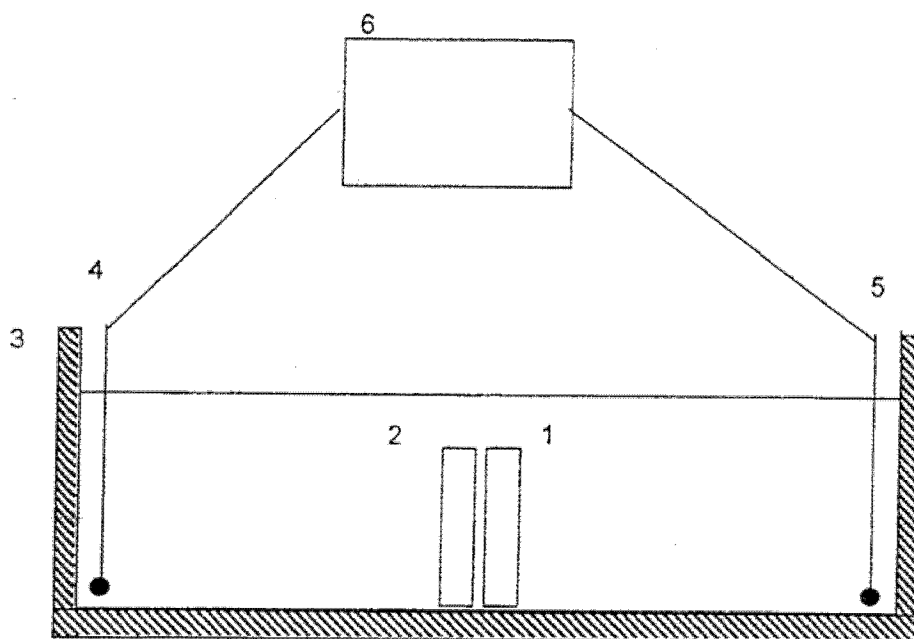
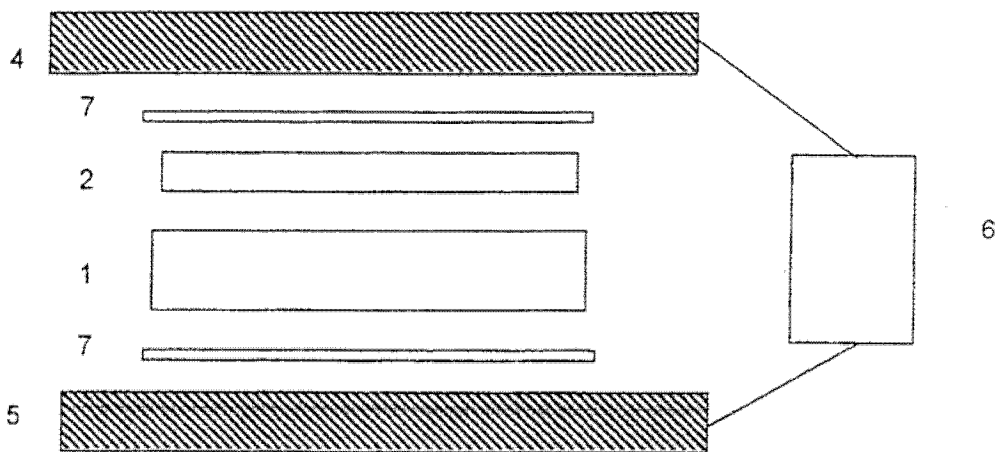


图 6



1. 固定了DNA的薄片 2. 样品 3. 电泳槽
4. 阴极 5. 阳极 6. 直流电
7. 滤纸

图 7



1. 固定了DNA的薄片 2. 样品 3. 电泳槽
4. 阴极 5. 阳极 6. 直流电 7. 滤纸

图 8

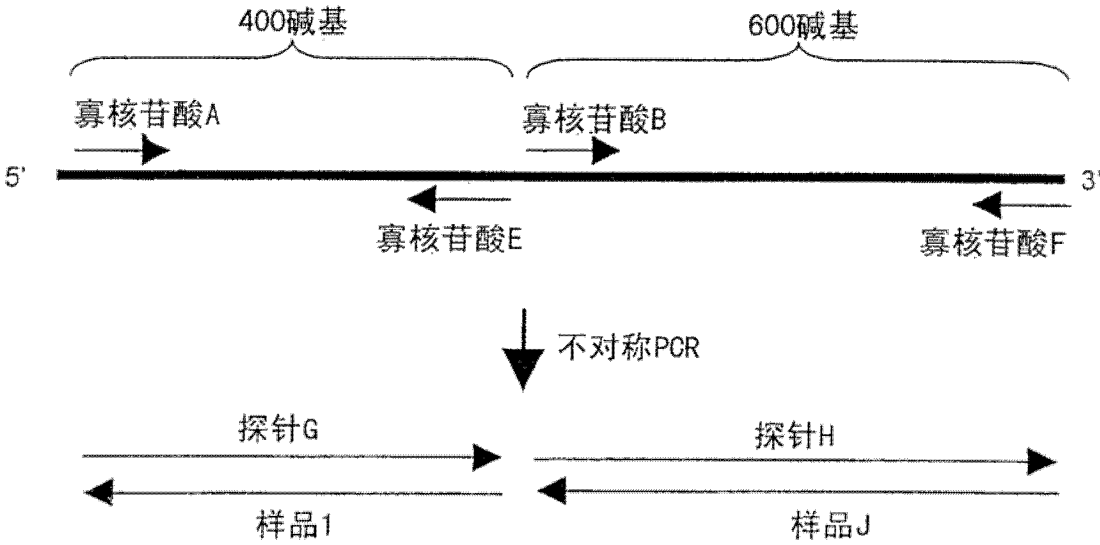


图 9