(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
B01L 3/00

(45) 공고일자 1999년05월01일
(11) 등록번호 10-0182619
(24) 등록일자 1998년12월12일

(21) 출원번호 10-1992-0703240
(22) 출원일자 1992년12월15일
번역문제출일자 1992년12월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US 91/04207
(86) 국제출원일자 1991년06월13일
(81) 지정국 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 이탈리아 룩셈부르크 네덜란드 스웨덴 그리스
OA OAPI특허 : 베넹 부르키나파소 카메룬 중앙아프리카 차드 콩고 가봉 말리 모리타니 세네갈 토고
국내특허 : 오스트리아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 스위스 리히텐슈타인 캐나다 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 헝가리 일본 대한민국 북한 스리랑카 룩셈부르크 모나코 마다가스카르 말라위 네덜란드 노르웨이 루마니아 수단 스웨덴 러시아

(65) 공개번호 특1993-0701235
(43) 공개일자 1993년06월11일
(87) 국제공개번호 WO 91/19567
(87) 국제공개일자 1991년12월26일

(30) 우선권주장 539,002 1990년06월15일 미국(US)
(73) 특허권자 카이론 코오퍼레이션 로버트 피. 블랙버언
미합중국 캘리포니아 94608 에머리빌 호르톤 스트리트 4560
(72) 발명자 리치 티. 스메더스
미합중국 캘리포니아 95035 밀피타스 볼더 스트리트 360
레브 제이. 레이테스
미합중국 캘리포니아 94306 팔로 알토 펀 애비뉴 256
브라이언 디. 워너
미합중국 캘리포니아 94553 마티니즈 알함브라 애비뉴 1034
로버트 알. 새들
미합중국 캘리포니아 94131 샌프란시쓰코 처치 스트리트 1616
마이클 에스. 어디어
미합중국 캘리포니아 94507 알라모 번스 메도우 로드 100
(74) 대리인 라기상, 장용식

심사관 : 김장강

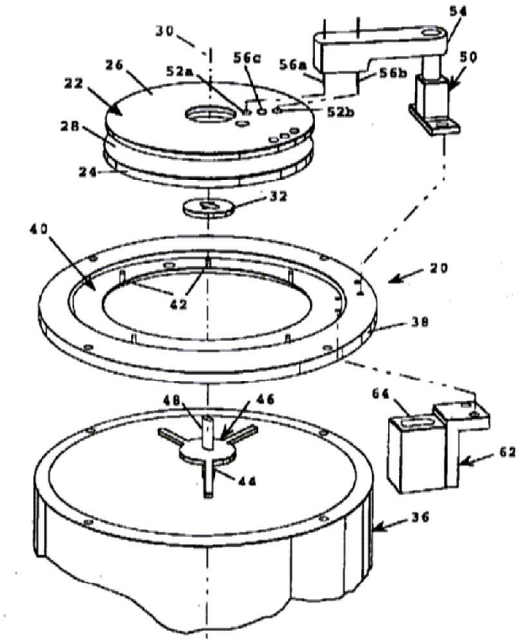
(54) 내장된 분석 조립체 및 장치

요약

액체샘풀의 분석물을 분석하는 내장된 조립체(22), 조립체를 형성하는 원반형의 회전가능한 플레이트쌍은 액체 또는 고체형태의 다중시약을 반응웰(66)에 연속적으로 첨가시키기 위해, 하나의 플레이트(28)에 있는 시약저장소(92,94,96,98)를 다른 플레이트(24)에 있는 반응웰(66)과 정렬되도록 상대적인 회전이 가능하다.

한가지 구체예에서 반응웰은 플레이트(28)의 상대적인 운동 및 전체조립체(22)의 회전의 조합에 의해 반응웰(66)에서 조립체의 이격된 웰(74a, 74b, 74c)로 이동할 수 있는 고체상 입자를 포함한다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

내장된 분석 조립체 및 장치

[발명의 상세한 설명]

[발명의 분야]

본 발명은 액체샘플내의 분석물을 분석하기 위한 조립품 및 특히 정해진 순서대로 샘플에 첨가될 수 있는 미리 포장된 시약을 제공하는 내장된 조립체에 관한 것이다.

[발명의 배경]

많은 분석물분석은 분석물이 둘 또는 그 이상의 시약과 연속적으로 반응하는 일련의 반응단계를 포함한다. 전형적으로 이러한 형태의 분석에서는 첨가된 시약 및 혼합물이 다음 시약이 첨가되기 전에 미리 정해진 시간동안 반응하게 된다. 거기에서 분석은 고체지지체와 분석물의 결합을 포함하는데, 지지체에 결합된 분석물을 포함하는 반응챔버(chamber)는 시약- 첨가단계들의 사이에 세척될 수 있다.

이상적으로, 임상적 셋팅(setting)의 자동 또는 반자동작동에 적용될 수 있거나, 또는 선택적으로, 간단한 분석절차가 셋팅되어 가정 또는 병원에서 실시될 수 있는 간단한 내장된 장치에서 이러한 형태의 다중- 첨가분석을 수행하는 것이 바람직하다.

지금까지 다중의 미리 포장된 시약을 제공하는 각종의 내장된 진단장치가 제안되었다. 미합중국 특허 제4,806,316호는 분석물과 반응하는 미리 포장된 시약을 포함하는 다중반응 웰(well)에 액상 샘플이 분산되는 1회용 진단장치에 대해 기술하고 있다. 장치는 각 샘플을 두 개 이상의 웰을 계속해서 통과시킴으로써 연속- 반응분석에 적용될 수 있다. 거기에서 각각의 웰은 미리 포장된 원하는 시약을 포함한다.

미합중국 특허 제4,519,981호는 나란히 방사상으로 겹쳐진 일련의 반응챔버를 포함하는 회전진단장치를 제시하고 있다. 각각의 챔버는 미리 포장된 시약을 포함할 것이다. 셀(cell)은 상호간에 연결되어 있어서 유체샘플은 교대 역방향 원심운동에 의해 각 챔버를 통과하여 다음 챔버로 흐를 수 있다. 즉 유체샘플은 한방향으로 장치를 회전시키므로서 제1챔버에서 면- 인접의 제2챔버로 이동된다. 정해진 반응시간후에, 유체샘플은 반대방향의 회전운동에 의해 제2챔버에서 면- 인접의 제3챔버로 이동된다.

다른 하나의 다중- 시약 회전장치가 미합중국 특허 제4,390,499호에 개시되어 있다. 장치는 파괴가 가능한 실(seal)에 의해 분리된 일련의 구획실을 포함한다. 작동시, 공기압 및 원심력에 의해 구획실사이의 실이 파괴되고 시약재료와 샘플이 연속적으로 희석된다.

미합중국 특허 제4,469,793호은 회전진단장치에 대해 개시하고 있다. 거기에서 유체샘플은 방사상의 내벽에 부착된후, 샘플을 우선 유출웰로 보내는 한방향으로 장치를 회전시키고 이어서 외부셀로 정해진 부피의 샘플을 분배시키도록 반대방향으로 회전 시킴으로써 가해지는 원심력하에서 많은 외부리셉터(receptor) 셀의 각각에 정해진 부피로 분포하게 된다. 셀의 구획실은 동시 분석으로 사용하기 위하여 다른 액체가 공급될 수도 있다. 측정되는 다량의 분석물에 이어서 생물학적 지시제를 함유하는 다량의 시약을 연속적으로 취하도록 설계된 고체반응기비드(bead)가 또한 이 특허에 개시되어 있다.

상기의 모든 분석장치는 미리 포장된 시약을 샘플로 방출시키거나 또는 샘플을 하나의 시약챔버에서 다

른 챔버로 전달시키기 위한 비교적 복잡한 압력 및/또는 원심력기계를 포함한다. 이러한 이유에서, 장치는 제조하는데 있어서 비교적 비싸고, 또한 작동시 장치에 인가되는 구심력 또는 공기압력의 변화, 또는 실을 파괴하거나 또는 챔버들 사이의 샘플을 진행시키는데 필요한 힘의 변화, 및/또는 액체가 챔버에서 챔버로 이동하므로서 발생하는 다양한 부피의 유실때문에 작동시에 신뢰할 수 없다.

[발명의 요약]

본 발명은 일면 고체지지체에의 검색가능한 분석물- 특이적 결합을 통해 분석물 리간드를 검출하기 위한 내장체 조립체를 포함한다. 조립체는 고체지지체를 포함하는 웰을 지니는 반응플레이트, 및 분리된 첫 번째 및 두 번째 저장소에 포함된 첫 번째 및 두 번째 시약을 함유하는 이동플레이트를 포함한다. 이동플레이트는 반응플레이트에서 샘플이 웰에 첨가될 수 있는 샘플- 첨가위치, 첫 번째 저장소가 웰과 정렬되는 하나의 시약- 이동위치, 세척 용액이 웰로 주입되는 세척위치, 및 두 번째 저장소가 웰과 정렬되는 다른 하나의 시약- 이동위치로 이동하도록 반응플레이트상에 설치되어 있다. 이동 및 반응플레이트는 관련된 저장소가 웰과 정렬될때까지 그것들의 대응하는 저장소로부터 시약의 방출을 방지하도록 설계되어 있다.

한가지 구체예에서, 시약은 액체용액형태이고, 용액을 포함하는 저장소는 플레이트에 형성된 채널(channel)을 포함하며, 채널은 이동플레이트의 개구에서 밀봉된다.

바람직하게 채널 및 실은 이동플레이트내의 채널에 부착되어 있는 탄성중합체 슬리이브에 의해 형성되고 이동 및 반응플레이트의 마주보는 평면은 모관잠금부를 형성하여 모관형성에 의해 저장소로부터 액체가 새는 것을 방지하기 위해 슬리이브의 부위에 인접하여 위치해 있다. 또한 바람직한 구체예에서, 이동플레이트는 반응플레이트에 있는 웰과 이동플레이트의 저장소를 연결하는 모서리가 깍인 개구를 포함한다.

다른 하나의 일반적인 구체예에서, 적어도 시약중의 하나는 정제 형태의 시약을 포함하며, 정제화된 시약은 중력에 의해 연결된 시약저장소로부터 웰로 이동하며, 이때 시약저장소는 반응웰과 정렬되어 있다.

반응플레이트에 있는 반응웰은 고체- 상의 분석지지체를 포함하는 길다란 체널에 의해 형성될 것이다. 이 구체예에서 이동플레이트는 채널의 공간부위와 정렬되어 있으며, 이때 이동플레이트는 세척위치로 이동하여 채널을 통해 용액을 통과시키는 폐쇄 회로를 형성하는 배출구를 포함한다.

한가지 방법에서, 조립체는 알려진 표적서열로 핵산을 검출하는데 사용된다. 여기서 반응의 고체- 상 지지체는 고정화된 핵산절편으로 코팅되어 있고, 조립체는 표적서열과 고정화된 절편을 효과적으로 혼성화시키는 프로브(1), 및 프로브에 직접 또는 간접적으로 효과적인 결합을 하는 리포터(reporter)분자(2)의 반응채널에 연속적으로 첨가시키기 위한 시약저장소를 포함한다.

다른 한가지 방법에서, 조립체는 면역특이적으로 고체지지체에 효과적으로 결합하는 리간드(ligand)를 검색하는 면역분석에 사용된다. 여기서 조립체는 리간드가 지지체에 결합되어 있을때 리간드와 면역특이적으로 결합할 수 있는 안티리간드(antiligand) 시약(1) 및 고체지지체에서 검출가능한 신호를 생성시키는 안티리간드시약과 반응할 수 있는 시약(2)의 반응채널에서의 연속적 첨가를 위한 시약저장소를 포함한다.

다른 일면에 있어서, 본 발명은 고체지지체에의 검출가능한 리간드-특이적 결합을 통해 분석물리간드를 검출하는 장치를 포함한다. 장치는 상기 형태의 내장된 조립체, 및 반응 플레이트를 고정시키고 상기 이동플레이트를 그것의 여러 위치로 회전시키는 장치를 포함한다.

한가지 구체예에서, 장치는 유니트로 조립체를 효과적으로 회전시키며, 반응웰은 방사상으로 뻗쳐있는 채널을 포함하고, 고체지지체 표면은 내부에서 외부의 방사형 위치로 이동이 일어나는 채널내에서 운반되는 적어도 두 고체상입자를 포함하며, 이동플레이트는 입자가 외력을 받을때, 입자가 수용될 수 있는 수용슬롯(slot)을 포함하고, 채널은 상기 슬롯과 정렬되어 있다. 반응플레이트는 축적된 입자를 포함하는 시약플레이트가 반응플레이트에 대하여 회전할때, 슬롯내 입자가 축적될 수 있는 입자- 수용웰을 포함한다.

웰의 액체내용물을 가열하기 위해 설계된 장치의 구체예에서, 조립체는 가열되었을 때 웰을 밀봉하는 구조물을 포함한다. 조립체는 반응플레이트에 부착된 커버(cover) 플레이트를 포함하고, 밀봉구조물은 (a) 플레이트면에 수직방향으로 이동하는 이동플레이트에서 운반되는 실링패드(pad) 및, (b) 이동플레이트가 가열위치로 이동할때, 웰바닥에 대해 패드가 가압하도록 하는 커버플레이트의 캠(cam) 표면체를 포함한다.

또한 장치의 구체예에서, 고체지지체는 웰에 비드(bead)를 포함하고, 장치는 광센서(sensor)를 지니는 검출기, 및 광센서에 연결되고 비드의 구형표면체 부분을 둘러싸도록 놓일 수 있는 튜브를 포함한다.

본 발명의 이들 목적 및 특징은 첨부된 도면과 함께 하기 발명의 상세한 설명을 읽으므로서 더욱 완전히 명백해질 것이다.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 본 발명에 따라 조립된 분석장치에 있는 구성요소의 부품 배열 투시도.

제2도는 본 발명에 따라 조립된 분석조립체의 일부를 잘라내어 확대한 투시도.

제3도는 제2도의 조립체에 있는 커버플레이트의 평면도.

제4도는 제2도의 조립체에 있는 이동플레이트의 평면도.

제5도는 제2도의 조립체에 있는 반응플레이트의 평면도.

제6a도 및 제6b도는 조립체의 이동디스크(disc)의 시약저장소가 반응플레이트(6A)의 반응채널에서 분리

되고, 저장소가 채널(6B)에 대해 이동위치에 있는 제2도의 조립체내의 적절한 플레이트위치에서 얻어진 부분단면도.

제7a도 및 제7b도는 제6a도의 선 A-A 및 제6b도의 선 B-B를 따라 각각 나타나 있는 저장소부분의 확대된 부분단면도.

제8도는 조립체의 작동시 가열단계에 있는 조립체에 밀봉된 웰의 확대된 부분단면도.

제9a도 및 제9b도는 제6a도 및 제6b도와 각각 유사하나 저장소의 시약이 건조된 입자형태로 존재하는 조립체의 구체예를 예시하는 단면도.

제10도는 조립체의 웰에 관개하는 위치에 있는 조립체를 보여주는 조립체의 확대된 부분단면도.

제11도는 웰의 비드로부터의 광신호를 검출하는 검출기구조물을 보여주는 조립체의 웰부분의 확대된 단면도.

제12a내지 12c도는 고체- 상 입자를 반응플레이트의 반응채널로부터 이동플레이트에 형성된 슬롯까지 이동시키고(12a,12b), 이 슬롯에서 반응플레이트의 분리된 웰로 이동시키는(12c) 단계를 예시하는 도면.

제13도는 전형적인 분석물분석을 실시하는 장치에 의해 수행되는 단계의 흐름도.

제14a 내지 제14d도는 본 발명의 장치에 의해 자동화된 방식으로 실행될 수 있는 DNA 분석물분석의 연속적인 핵산결합반응의 개략도.

[발명의 상세한 설명]

[A. 분석조립체 및 장치]

제1도는 본 발명에 따라 조립한 분석장치(20)의 부품배열도를 보여준다. 장치는 본 발명의 일부를 형성하는 조립체(22)를 포함하며 제2 내지 12도를 참조하여 하기에서 상세히 설명될 것이다. 요컨대, 조립체는 외부가장자리가 서로 연결된 반응 및 커버플레이트(24,26) 및 중심축(30) 주위의 두 외부 플레이트에 대해 회전할 수 있는 중간의 이동플레이트(28)로 형성되어 있다. 결국, 이동플레이트는 정지위치에서 지지되는 반응 및 커버플레이트와 이동플레이트를 회전시키는 연장된 개구(제2도)를 지니는 허브(32)를 포함한다.

장치의 조절장치(36)는 분석작동시 조립품을 지지하는 환상시이트(40)를 한정하는 베이스(38)를 포함한다. 나타낸 바와같이, 베이스는 시이트주위에 비대칭적으로 배열되어 있는 다섯개의 핀, 예컨대 핀(42)을 제공한다. 이들 핀은 하기에 기술된 바와같이 시이트의 회전에 대해 커버 및 반응플레이트를 고정시키기 위해 조립품의 바닥에 있는 대응개구에 삽입된다.

베이스는 도면의 드라이브샤프트(44)에 의해 표시되는 구동모터에 부착되어 지지된다. 모터자체는 모터틀(45)을 포함한다. 드라이브샤프트의 말단에 부착되어 있는 세개의 아암지지체(46)는 도면에서 알 수 있는 바와같이 지지아암에 놓여 있는 조립체의 반응표면과 함께 허브(32)의 개구에 연결되도록 설계한 돌출부(48)를 지닌다. 그러므로, 조립체가 시이트(40)에 설치되어 고정되고 돌출부(48)가 허브의 개구(34)에 설치된 경우, 조립품의 중간의 이동플레이트는 구동모터에 의해 커버 및 반응플레이트에 대해 정해진 방향으로 회전될 수 있다.

조절장치의 모터는 상기와 같이 조립품이 시이트(40)에 고정되어 있는 하부이동위치에서 조립체가 시이트에서 떨어져 구동모터(44)에서 자유롭게 회전하는 상부의 자유- 회전위치로 이동될 수 있다. 내부(이동플레이트) 운동의 계수가 비교적 높기 때문에, 조립체는 구동모터에 의해 유니트로서 회전될 수 있어, 자유- 회전위치의 조립체 및 모터는 하기 목적을 위해 원심기와 같이 작용하여 재료를 조립체에서 방사상으로 외부에 보낸다. 조립체는 또한 반응성분의 혼합을 위해 자유- 회전위치의 모터위에 있는 조립체의 진동에 의해 교반될 수 있다.

장치의 세척유니트(50)는 제10도를 참조하여 하기된 바와같이 조립체를 통해 세척용액이 순환하도록 설계되어 있다. 요컨대, 조립체가 세척상태에 놓여있을 때, 조립체의 커버플레이트에 형성된 개구(52a,52b)는 조립체의 반응웰부분을 포함하는 닫혀진 통로의 말단을 형성한다. 나타낸 바와같이, 베이스(38)에 설치된 유니트(50)는 아암이 하부의 세척위치로 이동할 때, 개구(52a,52b)에 각각 삽입시키기 위한 한쌍의 튜브(56a,56b)를 고정시키는, 수직으로 위치한 아암(54)을 포함한다. 세척작동중에, 세척용액은 가압하에 튜브(56a)를 통해 공급되고, 튜브(56b)를 통해 제거된다.

또한, 조립체내의 반응웰을 정해진 반응온도까지 가열하는데 사용되는 장치의 가열유니트(62)가 제1도에 나타나 있다. 나타낸 바와같이 유니트는 베이스(38)의 하면에 설치되어 있어서 베이스에 장착된 조립체와 함께, 유니트의 가열요소(64)를 조립체의 반응웰 바로 밑에 위치시킨다.

비록 제1도에는 나타나 있지 않지만, 장치(36)는 또한 조립체내의 분석물을 검출하는 광학적 탐지유니트를 포함할 것이다. 한가지 바람직한 유니트가 제11도를 참조하여 아래에 기술될 것이다.

본 발명의 분석조립체는 특히 제2내지 12도를 참조하여 설명될 것이다. 조립체(제2 및 5도)의 반응플레이트(24)는 방사상으로 길게 확장된 채널 또는 조립체의 반응챔버로 사용되는 웰(66)을 제공한다. 챔버에서 분석물 및 분석물의 결합 및 검출에 필요한 각종 시약은 웰에 포함된 고체상 지지체와 인접해 있는 액체에 삽입된다. 나타낸 구체예에서, 웰은 원반형 플레이트부재(168)의 하면에 부착된 알루미늄 등의 금속삽입물(166)로 형성된다. 삽입물은 삽입물 위에 있고 플레이트부재(168)의 상부면에 의해 한정되는 플랫폼(170) 아래에서 이동하게 된다. 채널의 반대말단부위에 인접한 방사상 위치의 개구(172a 및 172b), 및 중심개구(172c)가 플랫폼내에 위치한다. 개구(172a 및 172b)는 하기의 목적을 위해 플레이트(26)의 개구(52a 및 52b) 와 정렬되어 있다.

플레이트의 웰구조물에 대한 상세화가 플레이트(24)의 웰부위 및 플레이트(26,28)의 윗부분의 확대된 단

면도를 보여주는 제7b도에 나타나 있다. 삽입물에 형성되어 있는 채널 및 웰은 제10도에 나타낸 바와 같이 제5도의 개구(172a 및 172b) 하부에 대응하는 양말단간에 뻗쳐 있는 실질적인 U-형단면을 갖고 있으며, 채널의 외부방사형 말단부위는 테이퍼 램프(ramp)(70)를 형성한다. 삽입물은(176)에 나타나 있는 바와같이 플레이트부재(168)의 하부에 형성되어 있는 캐비티(cavity)(174)에 삽입되어 플랜지에 의해 플레이트부재에 부착된다. 플랫폼(170)의 각 개구, 예컨대 제7b도에 나타나 있는 개구(172a)는 웰과 연통해 있으며 짧은 원통형- 개구단면(178) 및 모서리가 깍인 단면(180)을 포함한다. 이 구조물은 하기된 바와 같이 구멍을 통해 플레이트(28)의 저장소로부터 이동플레이트의 채널로 액체를 보내는데 사용된다.

분석반응의 고체상 지지체를 형성하는 하나 또는 그 이상의 고체상 비드(bead) 또는 입자, 예컨대 입자(68a, 68b, 68c)가 채널에 운반된다. 고체상 DNA 분석을 위한 하기의 섹션 C에 기술된 구체예에서, 세가지 입자는 (1) 포지티브 컨트롤, (2) 네가티브 컨트롤 및 (3) 분석물결합을 위한 것이다. 채널 및 입자는 제10 및 12a도의 단면도에 나타나 있다. 본 발명은 또한 오로지 하나의 고체상 지지체를 포함하는 반응포맷에 관한 것이다.

또한 하기의 목적을 위해 입자의 유도장치로 사용되는 아치형 홈(72)이 플레이트(24)에 있는 채널의 외부말단 바로 밖에 위치해 있다. 또한 하기와 같이 세 개의 입자가 화학반응후 채널(66)로부터 이동할 수 있는 세개의 웰(74a, 74b, 74c) 이 이 홈에 인접해 있다. 세개의 웰은 고체입자에 결합한 리포터분자의 존재를 검출하기 위한 검출용액을 포함할 것이다.

반응플레이트는 두 플레이트의 외부환상림 부위를 결합시키는 죔쇠, 예컨대 리벳(75)(제2도)에 의해 커버플레이트에 고정되어 있다. 죔쇠는 플레이트에 형성되어 있는 개구, 예컨대 개구(76)에 끼워져 있다. 조립체가 조절장치에 정주해 있을때 돌출부(48)가 수용되어 있는 중심개구(82)가 반응플레이트에 형성되어 있다.

조립체의 커버플레이트(26)가 제3도의 평면도에 나타나 있다. 플레이트는 반응플레이트와 같은 직경의 원반형 디스크이다. 상부 및 반응플레이트를 고정시키기 위한 개구, 예컨대 개구(84)가 플레이트의 외부환상림부위(83)에 형성되어 있다(제3도에 있는 점선(85)은 조립품의 이동플레이트의 외부가장자리를 나타낸다). 또한 커버플레이트에는 다음과 같은 것이 형성되어 있다 :

(i) 제2도에 나타낸 바와 같이 허브(32)의 커버부분이 삽입되는 중심개구(86); (ii) 반응플레이트의 웰(74a,74b,74c)에 각각 정렬되어 있는 일련의 윈도우(88a,88b,88c); (iii) 채널을 통해 세척용액을 순환시키기 위해 개구(172a,172b)에 각각 정렬되는 상기 개구(52a,52b); 및 (iv) 배출구(172c)와 정렬되는, 배출구(52a) 및 배출구(52b) 사이의 개구(52c).

여기서 제2 및 제4도를 참조할때, 이동플레이트(28)는 플레이트와 회전하기 위해 허브(32)가 고정되는 중심개구(90)를 갖고 있는 플레이트부재(190)를 포함한다. 플레이트는 4개의 시약저장소(92,94,96 및 98)를 포함한다. 이들 저장소는 플레이트를 통과하는 원통형 채널형태를 갖는다. 특히 제7a도를 참조할 경우, 대표적인 저장소(92)는 플레이트부재(184)를 통과하는 슬리이브(100)로 이루어져 있으며, 플레이트부재의 상면 및 하면에 있는 플레이트부재의 평면외부에 뻗쳐있다. 완전한 조립체에서, 몇개의 저장소를 형성하는 슬리이브는 제7a도에 예시되어 있는 바와같이 축방향으로 압착되어 있는 커버플레이트 및 반응플레이트의 대응면에 대하여 액체가 새지 않는 실을 형성한다. 슬리이브는 바람직하게 테프론 또는 폴리에틸렌으로 만들어진다. 또한 저장소가 채널(66)과 통하는 이동플레이트의 개구 하나와 정렬될때까지 저장소에 있는 액체시약의 방출을 방지하기 위한 수단으로서 슬리이브의 실링(sealing) 말단이 여기에 언급되어 있다.

조립체에서 플레이트(28)를 형성하는 플레이트부재 및 커버 및 반응플레이트의 대응면간의 이격은 각 저장소에 포함된 액체가 모관현상에 의해 두 플레이트간의 갭(gap)으로 새는 것을 방지하는 작용을 한다. 즉, 대응하는 플레이트면 사이의 갭, 예컨대 갭(186)은 두 면 사이의 모관흐름을 일으키기에는 너무 넓다. 나타낸 구체예에서 갭은 플레이트부재(184)의 두께와 비교하여, 저장소를 형성하는 슬리이브의 길이가 더욱 크기 때문에 형성된다. 선택적으로 각 슬리이브에 바로 인접한 이동플레이트부재부위는 각 슬리이브주위에 모관- 억제 갭을 형성시키기 위해 함입되어 있을 것이다.

상기한 바와같이, 플레이트(28)의 각 저장소는 채널(66)과 통하는 반응플레이트에 있는 개구(172a-172c) 중의 하나와 정렬되어 있으며, 하기의 제6a, 6b 및 7b도에 기술되었듯이 액체시약을 반응챔버로 이동시킨다. 특히, 저장소가 커버 및 반응플레이트에 대하여 이동할 때 일부 저장소, 예컨대 저장소(94,96 및 98)는 방사상으로 위치해 있어서 두 저장소에 있는 액체시약의 교차- 오염을 방지한다.

또한 반응플레이트에 있는 개구(172a-172c) 및 커버플레이트에 있는 개구(52a-52c)와 동시에 각각 정렬되는 개구(102a-102c)가 이동플레이트에 형성되어 있다. 정렬가능한 개구의 세가지셋트중 어느하나는 조립체의 반응부위로 샘플을 삽입시키는 수단으로서 여기에 집합적으로 언급되어 있다.

이동플레이트에 형성되어 있는 다른 개구는 윈도우(88a,88b,88c)와 각각 정렬되는 3개의 윈도우(104a,104b,104c)를 포함하며, 두 셋트의 윈도우가 정렬되어 있을 경우, 각각의 웰(74a,74b,74c)이 보인다. 부가하여 이동플레이트는 세개의 다른 플레이트 위치중 한 위치에서 반응플레이트의 개구(172a,172b), 동시에 커버플레이트의 배출구(52a,52b)와 각각 정렬되는 세가지 셋트의 방사상으로 위치한 개구, 예컨대 개구(106a,106b)를 포함하여 반응부위를 통해 세척용액을 순환시키는 연속통로(108)(제10도)를 형성한다.

또한 이동플레이트는 반응플레이트에 있는 액체내용물이 가열되었을 때 반응플레이트의 채널개구를 밀봉시키도록 설계된 다수의 플로팅 실링패드, 예컨대 패드(192,194)를 포함한다. 가열조작에 있어서 패드의 조작에 대한 상세화가 제8도에 나타나 있다. 반응채널부위에 해당하는 조립체, 및 채널에 있는 액체내용물을 가열하는데 사용되는 히터요소(64) 부분을 통해 얻어진 확대된 단면도가 여기에 나타나 있다. 나타나 있는 바와같이, 가열요소는 가열시 삽입체(166)의 하면과 접촉하게 된다.

대표적인 패드(192)는 제8도에 나타나 있는 바와같이 패드가 플랫폼(170)에 위치할때, 개구(172a-172c)

를 덮을 수 있는 크기의 연장된 탄성중합체패드로서, 예를 들면 폴리에틸렌 또는 다른 압착성의 마찰이 적은 중합체 물질로부터 만들어진다. 패드는 플레이트의 평면과 수직방향으로 부동하기 위해, 이동플레이트부재에 방사상으로 연장되어 형성된 슬롯(194)에서 운반된다. 패드의 높이는 이동플레이트가 다른 두 플레이트에 대하여 회전할때, 커버 및 반응플레이트간에 패드의 압착없이 쉽게 움직일 수 있도록 한다. 그러나, 패드가 반응웰위의 실링위치로 이동함에 따라, 그것은 개구(172a-172c) 바로 위의 커버플레이트 하면에 방사상으로 연장되어 형성된 캠부재(195)와 접촉하게 된다. 제8도에서 알 수 있는 바와같이, 이 접촉은 반응웰에 대해 구멍을 개폐하는 플랫폼에 대해 패드를 치우치게, 즉 압착하도록 작용한다.

이동플레이트는 또한 그것의 하면, 즉, 반응플레이트에 직면하는 면에 형성되어 있는 L-형 슬롯(112)을 제공한다. 슬롯은 채널(66)의 외부말단부위 및 반응플레이트에 있는 홈(72)과 각각 정렬되는, 방사상으로 주위에 뻗쳐 있는 부분(112a,112b)을 포함한다. 슬롯은 섹션 B에 기술된 바와같이 채널(66)(제12a도)로부터 입자를 받을 수 있는 크기로 위치가 정해진다.

조립체의 플레이트는 바람직하게 적절한 플라스틱의 사출성형에 의해 만들어진다. 이동플레이트를 만들기 위해, 플레이트 부재(184)는 이동플레이트에 있는 4개의 저장소를 형성하는 4개의 슬리이브 및 허브(32)주위에 사출성형될 수 있고, 결과적으로 4개의 실링패드와 조립된다. 반응플레이트를 만들기 위해, 플레이트부재(168)는 수용체(166) 주위에 사출성형될 수 있다. 커버와 반응플레이트의 사이에 위치하는 이동플레이트와 함께, 두 개의 외부플레이트는 리벳, 접착제 또는 열용접등에 의해 서로 접착된다. 상기와 같이, 구조물 및 플레이트는 조립체의 탄성중합체 실을 압착하기 위해, 이동플레이트의 직면에 대해 커버 및 반응플레이트를 단단히 가압하도록 부착된다. 액체시약은 조립후 이동플레이트의 적절한 위치설정에 의해 저장소 및 웰로 주입될 수 있다.

조립체의 다른 일반적인 구체예에서, 시약저장소는 건조된 시약으로 이루어진, 바람직하게는 정제형태로 제조된 탈수된 시약입자의 운반을 위해 설계되어 있다. 이 구체예는 커버플레이트(122), 이동플레이트(124), 및 반응플레이트(126)와 함께 분석조립체(120)의 단면부분을 보여주는 제9a 및 9b도에 예시되어 있다. 조립체의 커버 및 반응플레이트는 실질적으로 조립체(22)의 것과 동일하다. 이동플레이트는 반응플레이트와는 통하나 커버플레이트와는 통하지 않는 다수의 저장소, 예컨대 저장소(128)를 포함한다.

각 저장소는 저장소내에 존재하는 건조된 시약입자, 예컨대 저장소(128)의 입자(130)를 포함하며, 입자는 제9b도에 예시된 바와같이 저장소가 이동플레이트와 정렬될 때 반응플레이트의 반응채널(132)에 축적된다. 저장소의 하단은 시약저장소를 형성하는 슬리이브에 의해 밀폐되어 있어, 시약에 수분이 공급되거나 또는 다른 시약에 의해 오염되는 것을 방지한다.

정제화된 시약은 잘 알려진 방법에 따라 원한다면 다양한 수용성팽창제(bulking agent), 예컨대 수용성 중합체와 함께 제제화될 수 있다. 조립체가 하나 이상의 고체- 상 입자를 포함하는 경우, 이것들은 이동 및 반응플레이트가 결합되기전에 반응플레이트의 반응채널에 첨가된다.

상기에 예시된 조립체는 특히 (i) 적어도 하나의 고체상입자, (ii) 연속적으로 첨가되는 4개의 분리된 액체 및/또는 고체시약, (iii) 각 시약첨가후의 가열단계, 및 (iv) 하기에 기술된 바와같이 두번째, 세번째 및 네번째 시약을 첨가한 후의 3가지 개별적인 세척단계를 포함하는 고체상 DNA 분석물 분석의 용도로 설계되었다.

다양한 선택적인 조립체형태가 본 발명에서 관찰되었다. 예를 들면, 저장소가 공통의 방사상선을 따라 이동하는 형태에 있어서, 분석은 단지 두개의 저장소를 요구하는, 두가지 시약의 연속적인 첨가를 포함할 수 있으며, 또는 두개 이상의 시약이 동시에 반응부위에 첨가될 수 있다.

더 나아가서 반응의 고체상입자는 채널벽에 형성되어 있는 하나 또는 그 이상의 분리된 고체상지지체로 대체될 수 있고, 및/또는 고체상입자가 반응챔버의 분리된 벽내에서 이동될 수 있으며, 이 경우에는 분석반응후 입자를 이동시킬 필요가 없다. 선택적으로, 분석반응은 액체상의 자유용액 또는 흡수성필터에서 일어날 수 있으며, 이 경우 세척단계가 제거된다. 흡수성- 필터형 반응분야의 경우, 액체시약은 윗킹 또는 모관현상에 의해 필터로 이동할 수 있으며, 이 경우 액체운반저장소에 구멍을 만들필요가 없다.

[B. 조립체 및 장치의 작동]

작동에 있어서, 조립체는 상기한 바와같이 조립체 반응플레이트에 상응하는 구멍에 수용된 장치의 핀 및 허브(32)에 삽입되어 있는 돌출부(48)로 조절장치의 대좌에 위치시킨다. 허브(32)는 처음에 이동플레이트가 모든 저장소 및 반응부위가 밀봉되어 있는 원위치에 있을때의 핀과 반향이 같다.

하기의 모범적인 조작이 아래의 섹션 C에 기술된 DNA-분석물 분석의 분석단계의 흐름도인 제13도를 참조하여 기술될 것이다. 직선테두리내에 나타낸 단계는 바람직하게 조절장치에 있는 적절한 마이크로프로세서(microprocessor) 조절유니트(나타나 있지 않음)에 의해 자동화된 방식으로 수행된다. 점선테두리내에 나타낸 샘플 및/또는 세척용액 첨가단계는 수동으로 또는 장치의 조절하에 수행될 수 있다.

조절장치는 맨처음 제2도에서 시계방향으로 이동플레이트를 움직여서, 이동플레이트의 개구(102a)를 커버플레이트의 개구(52a) 및 반응플레이트의 개구(172a)와 정렬하여 액체샘플이 정렬된 구멍을 통하여 반응채널에 주입되도록 작동된다. 분석물샘플은 통상적으로는 약 10 내지 200㎕의 적절한 양의 어떠한 액체샘플, 예컨대 혈액, 혈청 또는 혈장샘플일 것이다.

이동플레이트는 저장소에 있는 액체시약을 채널로 이동시키기 위해 제6b 및 7b도에 나타낸 바와같이 동일한 방향으로 더 회전시켜 저장소(92)를 반응플레이트의 개구(172a)와 정렬시킨다. 저장소의 실이 최초에 개구(172a)의 가장자리와 오버랩되므로서 저장소의 액체실이 파괴되어 액체가 쉽게 저장소밖으로 흐른다. 상기에 설명된 바와같이, 이동플레이트의 모관잠금특징은 액체가 모관현상에 의해 저장소에서 이동 및 반응플레이트 사이로 흐르는 것을 방지한다. 모서리가 깍인 개구(172a)는 개구의 좁은 상부에 의

해 제공된 모관현상 및 개구하부의 모서리가 깍인 부분에 의해 제공된 빠른 액체흐름의 조합에 의해 액체를 저장소로부터 웰로 향하게 되는데 기여한다.

위에서 언급하였듯이, 본 발명의 선택적인 구체예에서 저장소는 제9b도에 나타낸 바와 같이, 중력에 의해 반응채널에 축적된 정제화된 탈수시약을 포함할 것이다.

시약을 액체샘플과 혼합하기 위해, 이동플레이트는 채널실링위치까지 역회전하고, 조립체는 구동모터의 상승에 의해 조절장치의 대좌에서 자유회전위치까지 상승되고, 조립체는 모터에 의해 유니트로서 서서히 왕복하게 된다.

액체 (또는 고체) 시약을 반응웰로 주입시킨후, 이동플레이트는 반응웰을 지나 패드(192)위치까지 약간 회전한다. 제8도에 기술한 바와같이, 이 위치에서 패드는 커버와 반응플레이트 사이에서 압착되어 반응웰 주위에 밀봉된 실을 형성한다.

이어서 장치의 가열요소는 작동되어 정해진 반응기간동안 웰을 가열한다.

가열싸이클동안, 반응혼합물의 가열된 액체는 개구(172a-172c) 위의 실에 의해 웰에서 유출되는 것이 방지된다.

이때 이동플레이트는 회전하여 저장소(94)의 내용물을 채널로 이동시키고, 반응혼합물은 다시 혼합되어 정해진 온도에서 주어진 반응기간동안 반응하게 된다. 제4도를 참조하여 알 수 있듯이 이동플레이트의 시계방향 연속이동으로 106a, 106b로 나타낸 첫 번쨋세트의 세척용액 배출구는 커버플레이트의 개구(52a, 52b), 및 반응플레이트의 개구(172a. 172b)와 각각 정렬된다.

이 정렬이 이루어졌을 때, 세척유니트는 낮아져서 세척- 용액튜브를 정렬된 배출구로 수용시키고, 세척용액은 제10도에 예시된 바와같이 반응채널을 통해 순환하여 반응챔버의 최초샘플 및 첫 번째 두 시약을 세척한다.

상기의 단계가 반복되어 (i) 세 번째시약을 운반하고, 반응챔버로 세척된 고체-상 입자와 혼합하고, 배양하고, (ii)세척에 의해 세 번째시약을 제거하고, (iii) 네 번째시약을 운반하고, 세척된 입자와 혼합하고, 배양하고, (iv) 세척에 의해 네번째시약을 제거한다. 이러한 단계들이 제13도에서 보여지는데, 여기서 세가지의 분리된 세척단계가 (1),(2) 및 (3)에 표시되어 있다.

반응을 완결시킨후에, 고체상표면, 즉 고체- 상 비드위의 분석물- 의존시그날이 반응웰내의 비드로 판독될 수 있다. 반응웰내의 다른 비드로부터의 광학- 판독 인공물을 최소화 하기 위해, 그 장치(또는 별도의 광학판독장치) 내의 시그날디텍터는 바람직하게는 각 비드의 직접적인 판독이 가능하도록 제11도의 디텍터(196)에 대해 보여지는 것과 같은 구조를 갖는다. 디텍터는 표시된 대로 구의 한부분을 덮을 수 있는 크기의 내화튜브(200)와 광센서(198)을 포함하는데, 이때 튜브는 조립체내의 개구(커버, 이동, 및 반응플레이트내의 정렬된 구멍에 의해 형성됨)를 통해서 반응웰속으로 내려지게 된다. 각 비드가 판독된 후에, 튜브는 올려지고 그 다음 또다른 조립체개구속에 내려져서 다음 비드를 판독할 수 있게 된다.

또한 비드는 제12a-12c도에 대해 기술한 하기의 공정에 따라서 분리된 판독실속으로 분배될 수 있다. 간단하게, 이동플레이트를 슬롯(112)의 방사상부분이 반응채널과 정렬되도록 제12b도에서 보여지는 위치까지 회전시킨다. 제12a도에서 보여지는 것처럼 구동모터가 그것의 상승위치로 움직이면 반응채널에 있는 입자가 방사상으로 바깥쪽의 슬롯속으로 밀고 들어가는데 충분한 속도로 조립체가 새로 회전된다. 결국 제12b도에서 보여지는 것처럼, 입자는 슬롯의 원주부분속으로 들어가게 된다. 입자는 이 위치에서 홈(72)(제5도)에서 포획되어 원심분리종결시 그것은 반응채널로 되돌아가지 못하게 된다.

이 입자들을 반응플레이트내의 각각의 웰속에 분배하기 위하여, 모터를 하강위치로 움직이고, 조립체를 제어장치에 재고정시키고, 및 이동된 플레이트를 시계방향 즉 입자를 슬롯후면(제12b도에서 보여지는 입자위치) 쪽으로 가게 하는 경향이 있는 방향으로 회전시킨다. 슬롯이 반응플레이트내의 각 웰위로 움직여지면서, 세 개의 웰 모두로의 입자이동이 완결될때까지 슬롯에 있는 가장 앞쪽의 입자가 그 웰속으로 떨어진다.

고체상 입자의 각각과 관련된 분석물의 양은 많은 공지된 방법으로 결정할 수 있다. 전형적으로, 입자에 특이적으로 결합된 분석물은 그 자체가 라벨프로브(리포터분자)와 결합하는데, 이것은 표준광디텍터 또는 분광측정방법에 의해 검출될 수 있고 및/또는 정량될 수 있는 형광, 또는 효소리포터부를 포함한다. 상기에서 지적한 것처럼, 웰은 리포터부와 반응하여 원하는 검출시그날을 생성하는 검출용액을 포함할 수 있다.

본 발명의 입자이동특징의 한가지 이점은 여러개의 고체- 상 입자를 단일반응챔버에서 동일한 조건하에서 반응시킬 수 있고 그 다음 검출을 위해 분리할 수 있다는 것이다. 검출을 위한 입자의 분리는 입자들이 밀접하게 위치해 있고 및/또는 똑같은 반응챔버내에 있을때에는 가능하지 않은 화학발광, 형광, 또는 효소활성에 의한 정확한 검출을 허용한다. 그러나, 본 발명은 또한 반응웰내에서 하나이상의 비드, 또는 다른 고체- 지지체 표면을 이용하는 고체- 상 반응을 수행하고, 및 제11도에 대해 기술한 것처럼 웰내에서 고체표면을 판독하는데 유용하다는 것이 인정될 수 있을 것이다.

하기의 섹션 C는 고체- 상 반응방법에 의한 분석물 DNA의 검출에 대한 전형적인 분석방법을 기술한다. 이 방법은 이 조립체 및 장치의 다양한 이점을 예시하는데, 여기에는 (i) 간단한 내장된 조립체로 복잡하고 다중의 시약분석을 수행할 수 있는 것 (ii) 이동플레이트에서 반응플레이트까지 분량의 시약이 이동하는 것, (iii) 세척사이클을 반응단계들 사이사이에 삽입할 수 있는 것, (iv) 액체손실없이 가열배양단계를 수행할 수 있는 것, 및 (v) 단일 반응 챔버에서 다중 고체상 반응을 수행하고, 그 다음 분석물검출을 위해 고체상지지체를 분리할 수 있는 것이 포함된다.

DNA 분석물 분석이 본 발명의 조립체 및 장치에서 수행될 수 있는 분석중 한가지 유형을 예시함에도 불구하고, 본 발명은 반응영역내의 분석물의 검출 또는 정량을 위해 고체 또는 액체시약이 바람직하게는

연속적으로 반응부위에 첨가되어야 하는 많은 분석방법에 용이하게 적용된다는 것이 이해될 것이다.

특히, 본 발명은 첨가한 시약중 하나에 의해 제공된 2가의 중간분자를 통해서 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 또는 리간드에 특이적으로 결합하는 분자를 반응웰내의 고체- 지지체 표면이 포함하는 리간드분석물을 검출하는 것을 의도한다. 바람직한 포맷에서는, 리간드가 항원이고, 고체지지체에서 운반되는 리간드- 결합분자는 리간드- 특이적 항체이다. 고체지지체에 리간드- 함유 샘플을 첨가하고, 결합되지 않는 샘플물질을 제거하기 위해 세척단계를 수행한후, 웰에 첫번째 리포터시약을 첨가한다. 이 시약은 고체지지체에 결합된 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 리포터- 표지된 분자를 포함한다. 결합하지 않은 물질을 제거하기 위한 두 번째의 세척단계후, 결합된 리포터검출을 위한 기질을 함유하는 두번째시약을 반응웰이 첨가한다. 바람직하게는, 리포터가 알칼리포스파타제 또는 퍼옥시다제 따위의 효소이며, 두번째시약은 효소리포터와 반응하여 반응웰에서 검출가능한 색깔반응을 생성할 수 있는 기질을 포함한다.

방금 기술한 리간드포맷 및 DNA 프로브포맷에서, 고체지지체에 대한 분석물- 특이적 결합을 생성하기 위한 조립체에서 운반된 다수의 시약, 및 결합된 분석물의 검출가능한 시그날은 여기에서는 일괄하여 검출가능한 형태로 고체지지체에 분석물을 결합시키기 위해 필요한 반응시약으로 나타내어진다.

액체- 상에서 분석물- 의존 시그날을 생성하기 위하여 시약을 액체반응챔버에 첨가하는 단순화된 포맷을 조립체가 가지는 곳에서는 특히, 본 발명의 조립체가 수동적으로 작동될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 여기서 사용자는 조립체를 그것의 시약이동위치로 용이하게 조작할 수 있고, 수동적인 진탕에 의해 어떤 필요한 혼합을 수행할 수 있다.

[C. 고체- 상 DNA 분석]

제14a-14d도는 본 발명의 조립체 및 장치를 이용하여 수행되는 고체- 상 DNA 분석물 분석에서 반응단계의 순서를 도식적으로 나타낸다.

먼저 조립체내에 포함된 시약 및 고체- 상 입자를 고려하면, 세개의 고체- 상 입자는 포지티브 및 네가티브컨트롤(입자 a 및 b)과 특이적분석물 분석용(입자 c)이다. 네가티브- 컨트롤 입자는 코팅되지 않고 포지티브- 컨트롤 및 분석물입자는 각기 포지티드- 컨트롤 및 분석물- 특이적 포획프로브에 상보적인 단일- 가닥 DNA 단편으로 코팅되었다. 이 프로브의 성질은 하기에 기술되어 있다. 포지티브- 컨트롤 및 분석물입자는 표준커플링방법에 따라서 선택된 DNA 단편으로 중합체 또는 유리비드를 유도체화함으로써 제조되었다. 분석물 고체- 상 입자는 제14a-14d도에서 130으로 표시되어 있고, 분석물프로브에 상보적인 이 입자를 코팅하는 DNA 단편은 132에서와 같이 단속선으로 표시되어 있다.

조립체내의 저장소(92)에 포함된 첫번째 액체시약은 NaOH 따위의 변성제, 포지티ㅡ컨트롤 및 분석물- 특이적 포획프로브, 포지티브- 컨트롤 DNA, 포지티브- 컨트롤 및 특이적 증폭기프로브를 포함한다. 포지티브- 컨트롤 DNA는 이중나선 DNA 단편인데, 이것은 그 단편에 특이한, 즉 분석물 DNA에 존재하지 않는 수많은 공지된 서열부위들을 갖는다. 증폭기프로브는 포지티브컨트롤 DNA 및 분석물핵산의 여러개의 다른 서열중 하나에 상보적인 첫부위, 및 세번째시약에 포함된 분기된 DNA 서열에 상보적인 두번째 공통적인 부위를 갖는 일련의 프로브를 포함한다. 제14a도에서 134로 예시된 증폭기 프로브에서, 분석물 핵산서열에 상보적인 첫번째부위는 136에서 구형파로 표시되며, 분기된 DNA 상의 DNA 서열에 상보적인 두번째 공통적인 부위는 나선(138)을 표시된다.

포지티브- 컨트롤 포획프로브는 포지티브컨트롤 입자상에서 운반되는 DNA 단편서열에 상보적인 공통적인 첫- 서열, 및 포지티브- 컨트롤 DNA의 다른 공지된 서열부위에 상보적인 다른 두번째서열을 갖는 일련의 프로브를 포함한다. 분석물 포획프로브는 유사하게 분석물입자상에서 운반되는 DNA 단편서열에 상보적인 공통적인 첫- 서열, 및 분석물핵산의 다른 공지된 서열부위에 공통적인 다른 두 번째 서열을 갖는 일련의 프로브를 포함한다. 하나의 그러한 분석물 포획프로브는 제14a도에서 (140)으로 예시되어 있는데, 분석물핵산서열에 상보적인 첫 번째부위는 (142)에서 톱니모양으로 표시되어 있고, 분석물입자상에서 운반되는 DNA 서열에 상보적인 두번째 공통부위는 단속선(144)으로 표시되어 있다. 저장소(94)에 포함된 두번째 액체시약은 염기변성제를 중화시키는 것과 같이 DNA 어닐링을 가능하게 하는 어닐링제 또는 완충용액을 포함한다.

저장소(96)에서 운반된 세번째 액체시약은 상기에서 기술한 분기된 DNA 분자를 포함하는데, 이것은 제14b-14d도에서 (146)으로 표시되어 있다. 이 분자는 결합프로브의 부위(138)에 상보적이고 나선부위(148)로 표시된 서열, 및 라벨프로브서열에 상보적이고 점선(150)으로 표시된 것과 같은 분기된- 사슬서열의 군을 포함한다. 이 구체예에서는, 분기된 DNA가 분석물 및 포지티브 컨트롤 핵산에 대한 간접적인 결합, 즉 증폭기프로브를 통한 결합에 적합하다. 한편, 분기된 DNA가 분석물 및 포지티브 컨트롤핵산에 있는 서열과의 직접적인 혼성화를 위해 고안될 수도 있다.

저장소(98)에 포함된 네번째 액체시약은 표지프로브를 포함하는데, 이것은 제14c-14d도에서 (154)로 표시되어 있고 분기된 DNA 분자내의 서열(150)에 상보적인 뉴클레오티드서열을 갖는 DNA 단편부(154) 및 시그날검출을 위해 이용되는 리포터부(154)를 포함한다.

본 분석조립체의 리포터부는 바람직하게는 적당한 검출용액에서 화학발광시그날을 생성할 수 있는 알칼리포스파타제 따위의 효소이다.

조립체의 화학성분에 대한 기술을 완결하고, 조립체내의 웰을 리포터부와 반응하여 검출 가능한 시그날을 생성하는 검출용액으로 부분적으로 채운다. 예컨대, 독세탄을 함유하는 용액은 알칼리포스파타제 리포터부와 반응하여 화학발광시그날을 생성하는데, 이것은 통상적으로 광전자증배관으로 검출 및 정량할 수 있다.

처음에는 조립체를 샘플첨가에 대하여 위치시킨다. 그리고 DNA 분석물(160)을 함유하는 샘플을 조립체의 반응챔버에 첨가한다. 상기에서 지적한 것처럼, 분석물은 분석에서 분석물 포획브로브 부위에 상보적인

서열(162) 따위의 다수의 서열, 및 분석에서 결합프로브에 상보적인 서열(164) 따위의 하나이상의 서열을 포함한다.

샘플첨가후, 조립체를 조작하여 첫번째시약을 첨가 및 혼합하고 그 다음 65℃에서 10분 배양하여 분석물을 변성시킨다. 어닐링완충용액의 첨가, 혼합 및 추가로 10분동안 배양하면, 하기의 프로브-매개 결합반응이 일어난다 :

(1) 포지티브-컨트롤 포획프로브가 포지티브-컨트롤 입자와 그리고 포지티브-컨트롤 DNA와 혼성화하여 이 DNA를 포지티브-컨트롤입자에 연결시킨다; (2) 증폭기프로브가 포지티브컨트롤 DNA와 혼성화한다: (3) 분석물 포획프로브가 분석물입자와 그리고 분석물과 혼성화하여 분석물 DNA를 입자에 연결시킨다; 및 (4) 증폭기프로브가 분석물 DNA와 혼성화한다. 단계 (3) 및 (4)는 제14b도에서 예시되고 있다.

어닐링반응후에 조립체반응챔버가 세척용액이 반응채널을 통해서 순환되어 결합하지 않은 시약을 제거하는 하나이상의 세척단계를 위해 조작된다. 세번째시약이 새로 첨가되고 혼합되고, 55℃에서 어닐링되게 하여, 제14c도에서 도시되어 있는 것처럼 입자-결합 증폭기프로브와 분기된 DNA를 혼성화시킨다. 어닐링다음엔 결합하지 않은 분기된 DNA를 두번째 세척단계에 의하여 제거한다.

마지막 표지프로브를 입자에 첨가하고, 혼합하고 결합한 분기된 DNA와 어닐링시켜서, 리포터분자가 포지티브-컨트롤 및 분석물입자에 결합되게 한다. 표지프로브분자의 분석물입자와의 결합은 제14d도에 도시되어 있다. 그 다음에는 결합하지 않은 표지프로브를 지적한대로 세번째 세척단계에 의하여 제거한다.

제10도 우측에서 보여지고 상기에서 기술한 단계에 의하여 세개의 입자를 시그날 검출을 위해 각각의 웰속으로 이동하도록 조립체를 새로 조작한다. 웰내에서 검출액과 결합된 리포터의 반응은 검출가능한 화학발광시그날을 생성하는데 이것은 측정되어 정량분석값으로 바뀌어 표시된다. 세개의 입자분석에서, 포지티브-컨트롤 값을 사용하여 농도의 함수로서 분석물농도의 표준 곡선을 계산하였는데, 바탕값(네가티브콘트롤)은 공제하였다. 바탕값 공제후에 표준곡선으로부터 분석물농도를 결정하였다. 본 조립체 및 장치가 고체-상 DNA 분석에서 몇가지 이점을 제공한다는 것이 예상될 수 있다. 이 분석은 실질적으로 자동화된 방법으로 수행할 수도 있고 외부의 공급원으로부터 시약의 첨가없이도 수행할 수 있다. 따라서 최소한의 실험훈련 및 사용자조작이 필요하다.

단일반응채버에서 다수의 고체-상 반응을 수행할 수 있는 능력이 반응조건변화에 기인한 정량적 분석물 측정의 변화를 최소화하여, 바탕값을 공제한 표준곡선에 기초한 자동수정된 분석물 농도결정을 가능하게 한다.

하기의 실례는 B형간염 바이러스(HBV) 핵산의 검출을 위한 이 장치의 사용을 나타낸다. 이 실례에서는, 제14도에 대해 기술한 것과 유사한 HBV 분석을 수행하였고, 및 통상적인 마이크로타이터 플레이트포맷을 이용한 유사한 수동적분석을 병행하여 수행하였다. 샘플은 HBV-함유 플라스미드였고, 플라스미드농도는 10attomoles/㎕였다. 포지티브 비드(표면에 포획체가 결합되어 있음)와 컨트롤비드(포획서열이 없음)를 똑같은 반응챔버, 즉 마이크로타이터 플레이트 또는 내장된 장치에서 움직이게 하고, 마이크로타이터 플레이트분석은 3번씩 수행되었다. 하기의 표 1은 2개의 다른 작동결과를 나타낸다. 보여지는 것처럼, 내장된 분석포맷은 첫번째작동에서 평균마이크로타이터 분석포맷과 대략 같은 포지티브/컨트롤(시그날/노이즈) 비율을 나타냈고, 두번째작동에서 본질적으로 더 큰 포지티브/컨트롤 비율을 나타냈다.

[표 1]

	마이크로타이터 웰			카트리지		
	포지티브	컨트롤	시그날/노이즈	포지티브	컨트롤	시그날/노이즈
작동 1	102.8 76.59 100.3	20.81 11.21 23.88				
평균	93.23	18.63	4.95	11.8*	2.3	5.13
작동 2	89.85 111.2 92.69	18.28 13.29 12.14				
평균	97.91	14.57	6.72	35.5	0.64	55.5

* 현재의 단일카트리지 프로세서에서는 한번에 1회의 실험을 수행하는 것이 가능하다.

이 결과는 다-단계 DNA 혼성화분석을 본 발명의 장치를 이용하여 수동적인 마이크로타이터 플레이트포맷에 필적하는 시그날/노이즈비율로 자동화된 포맷으로 수행할 수 있다는 것을 나타낸다.

본 발명이 어떤 구체예, 배열, 및 이용에 대하여 기술했음에도 불구하고, 본 발명으로부터 벗어나지 않고 다양한 변화와 변형이 가능하다는 것은 당업자들에게 명백할 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

고체지지체(68a)에 검출가능한 분석물- 특이적 결합을 함으로써 분석물리간드를 검출하기 위한 장치(20)에서 사용되는 내장된 조립체(22)에 있어서, 이 조립체가 그 고체지지체(68a)를 함유하고 고체지지체와 접촉하는 시약을 유지하기 위한 웰(66)을 한정하는 반응플레이트(24); 고체지지체에 검출가능한 형태로 리간드를 결합시키는데 필요한 첫번째 및 두번째시약을 각각 지니는 첫번째 및 두번째 시약저장소(92,94)를 포함하는 이동플레이트(28); 샘플이 상기의 웰(66)에 첨가될 수 있는 샘플- 첨가위치, 첫번째저장소(92)가 상기의 웰과 정렬되는 첫번째시약- 이동위치, 세척용액이 웰을 통과할 수 있는 세척위치, 및 두번째저장소(94)가 상기의 웰과 정렬되는 두번째시약- 이동위치로의 회전이동을 위해 반응플레이트(24) 위에 이동플레이트(28)를 설치하는 수단(32); 및 관련된 저장소가 상기의 웰과 정렬될때까지 상기 시약이 그것의 저장소로부터 방출되지 못하도록 하기 위한, 저장소의 말단과 반응플레이트의 마주보는 면 사이에 탄성중합체실(100)을 포함하는 방출방지 수단으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 2

제1항에 있어서, 첫번째 및 두번째 시약모두가 액체시약이고, 상기 방출방지수단이 각각의 첫번째 및 두번째 저장소 각각에서 탄성중합체 슬리이브(100)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기의 저장소와 실이 이동플레이트내에 있는 채널속에 유지된 탄성중합체 슬리이브(100)에 의해 형성되고, 이동 및 반응플레이트의 마주보는 면이 슬리이브 부위에 위치하여 모관잠금부를 형성하고 모관현상에 의해 저장소로부터 액체의 물질이 새는 것을 방지하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 4

제3항에 있어서, 반응플레이트에 단단히 고정되고 이동위치에서 상기의 저장소와 정렬될 수 있는 배출구를 갖고 있는 커버플레이트(26)를 추가로 포함하고, 상기의 슬리이브(100)가 이동플레이트와 반응 및 커버플레이트 사이에서 실을 효과적으로 형성하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 5

상기항중 어느 한항에 있어서, 이동플레이트가 반응플레이트의 웰과 이동플레이트의 저장소를 통하게 하는 모서리를 깎은 개구(172a)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 6

제1항 내지 제4항중 어느 한항에 있어서, 상기의 웰은 방사상으로 연장된 채널(66)이 있고, 상기의 이동플레이트는 채널을 따라서 방사형방향으로 위치된 다수의 모서리가 깎인 개구(172a)를 포함하고, 상기의 저장소는 상기의 모서리가 깎인 개구중 다른것과 통하도록 방사상으로 편심되어 있는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 7

제1항 내지 제4항중 어느 한항에 있어서, 히터(62)가 웰의 내용물을 가열하기 위해 제공되고, 상기의 열을 가할때 상기의 웰을 밀봉하기 위한 밀봉수단(192)을 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기의 반응플레이트에 부착된 커버플레이트(26)를 추가로 포함하고, 상기의 밀봉수단이 (a) 플레이트면에 수직방향으로 부동하기 위해 상기의 이동플레이트내에서 운반된 실링패드(192), (b) 이동플레이트가 가열위치로 움직여질때 상기의 웰에 대해 패드를 가압시키기 위한 상기의 커버플레이트상의 수단(195)을 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 시약중 적어도 하나는 그 시약의 정제화된 형태의 시약을 포함하고, 정제화된 시약은 관계된 시약저장소가 반응웰과 정렬될때 그 시약저장소로부터 상기의 웰로 중력에 의하여 투입되는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 10

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제8항 및 제9항중 어느 한항에 있어서, 반응플레이트에 있는 상기의 반응웰은 고체- 상분석지지체(68a)를 포함하는 연장된 채널(66)에 의해 형성되고, 상기의 이동플레이트가 세척위치로 움직일때 채널을 통해서 용액을 통과시키기 위한 폐쇄 통로(108)를 형성하면서 채널내에 위치된 부위와 정렬가능한 배출구(106a,106b)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 11

알려진 표적서열을 갖는 핵산의 검출을 위한 DNA 프로브분석에 이용되는 상기 항중 어느 한항의 조립체에 있어서, 반응에서 고체- 상 지지체는 고정화된 핵산단편으로 코팅되어 있고, 상기의 조립체는 (1) 표적서열 및 고정화된 단편과 효과적으로 혼성화하는 프로브 및 (2) 상기의 프로브에 직접적으로 또는 간접적으로 결합하는데 효과적인 리포터분자를 반응채널에 연속첨가하기 위한 시약저장소를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 12

제11항에 있어서, 프로브첨가를 위한 시약저장소가 변성제내에 프로브를 함유하는 첫번째 저장소 및 변성완충용액 첨가후에 반응저장소에 첨가하기 위한 어닐링 완충용액을 포함하는 두번째 저장소를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 리포터분자를 첨가하기 위한 시약저장소가 상기의 분석물분자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합하는데 효가적인 분기된 핵산단편을 포함하는 첫번째 저장소, 및 분기된 단편에 결합하는데 효과적인 리포터- 표지된 분자를 포함하는 두번째 저장소를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 14

고체지지체에 면역특이적으로 결합하는데 효과적인 리간드의 검출을 위한 면역분석에 이용되는 제1항의 조립체에 있어서, 상기의 조립체가(1) 리간드가 지지체에 결합되어 있을때 그 리간드와 면역특이적으로 결합할 수 있는 안티리간드시약, 및 (2) 안티리간드 시약과 반응하여 고체지지체상에 검출가능한 시그날을 생성할 수 있는 시약을 반응채널에 연속첨가하기 위한 시약저장소를 포함하는 것을 특징으로 하는 조립체.

청구항 15

고체지지체에 검출가능한 리간드- 특이적 결합을 함으로써 분석물리간드를 검출하기 위한 장치(20)에 있어서, 이 장치가 어떠한 상기 항을 따르는 내장된 조립체(22) 및 반응플레이트를 조립체에 유지하고 이동플레이트를 조립체에서 그것의 다양한 위치로 회전하기 위한 장치(36)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 16

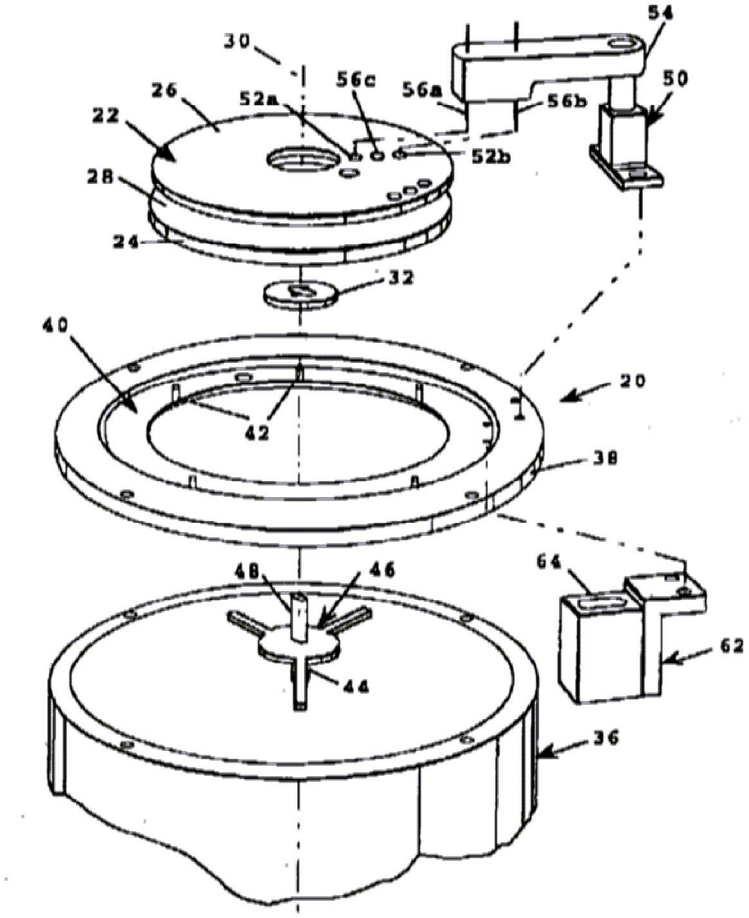
제15항에 있어서, 장치가 조립체를 한 유니트로 회전시키는데 효과적이고, 조립체중의 반응웰(66)은 방사상으로 연장된 채널을 포함하고, 상기 고체지지체 표면은 내부로부터 외부방사상위치를 향하여 움직이도록 채널속에서 운반된 적어도 2개의 고체- 상입자(68a,68b)를 포함하고, 상기 이동플레이트는 채널내의 입자가 외력을 받고 상기 슬롯이 상기 채널과 정렬될 때 그 입자들이 삽입될 수 있는 수용슬롯(112)을 포함하고, 침전된 입자를 함유하는 이동플레이트가 반응플레이트에 대해 회전할때 상기 슬롯내의 입자들이 침전될 수 있는 입자- 삽입웰(74a,74b,74c)을 상기 반응플레이트가 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 17

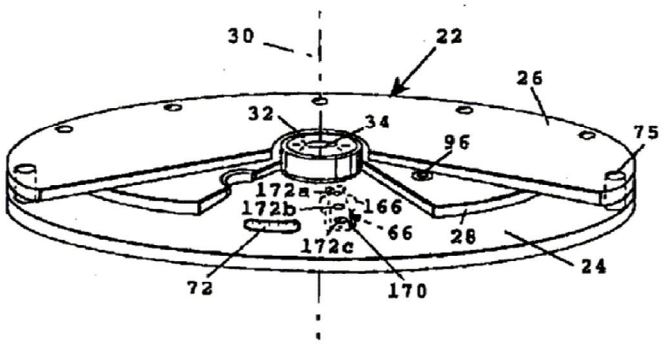
제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 고체지지체는 상기 웰내에 하나의 비드(68a)를 포함하고, 상기 장치는 비드에 결합된 분석물을 검출하기 위한 검출수단을 포함하고, 상기 검출수단은 광센서(198) 및 광센서로부터 연장되고 비드의 구면부분을 둘러싸도록 위치할 수 있는 튜브(200)를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

도면

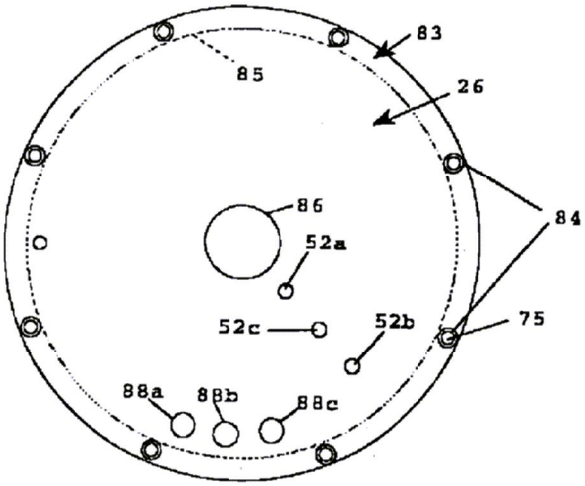
도면1


30
26
22
28
24
52a
56c
56a
52b
56b
54
50
32
40
42
20
38
48
46
44
64
62
36

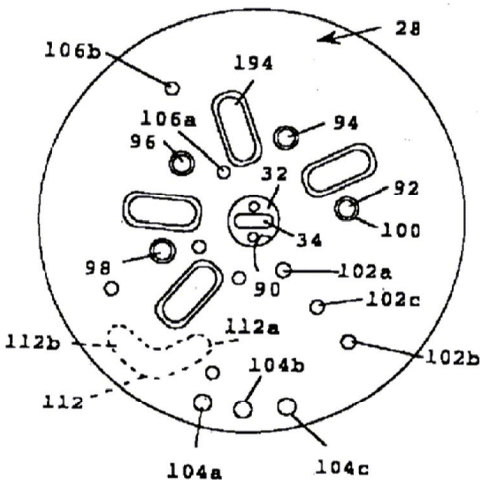
도면2


30
22
26
32
34
96
75
172a
172b
166
66
172c
28
24
72
170

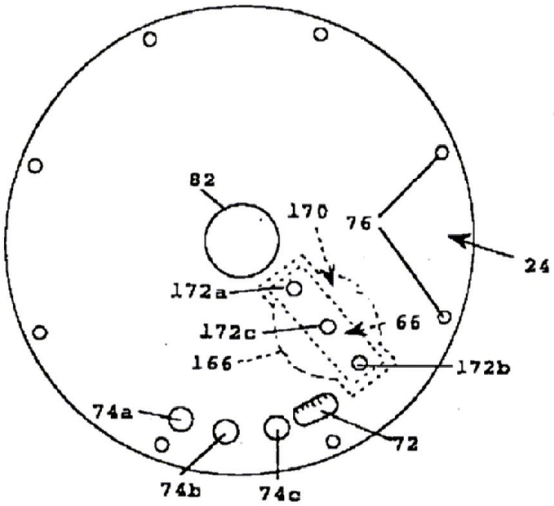
도면3


83
85
26
84
86
52a
52c
52b
75
88a
88b
88c

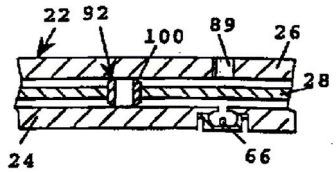
도면4


28
106b
194
106a
94
96
32
92
100
34
98
90
102a
102c
112a
112b
102b
104b
112
104a
104c

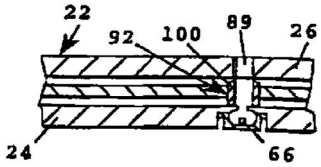
도면5


82
170
76
24
172a
66
172c
166
172b
74a
72
74b
74c

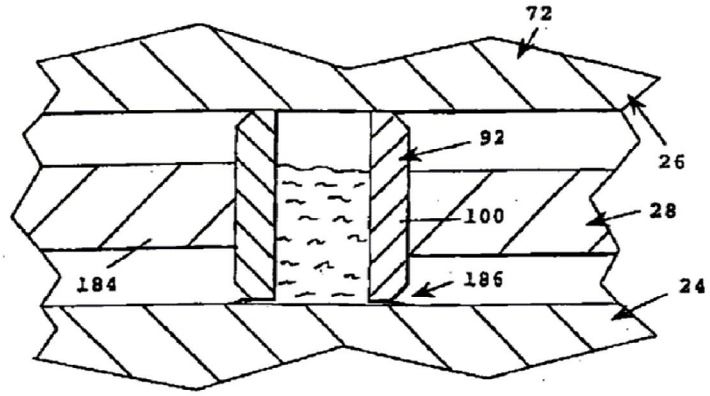
도면6a



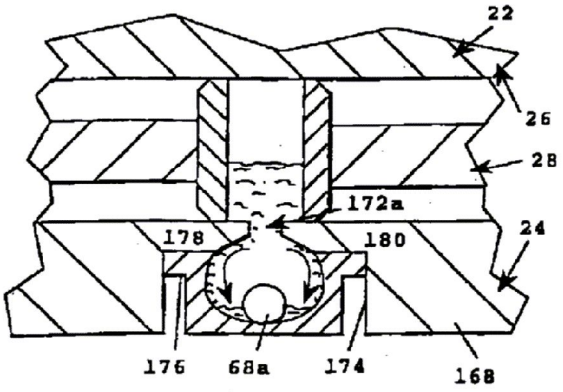
도면6b



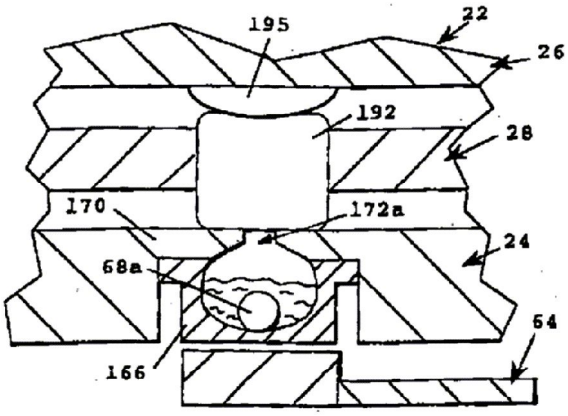
도면7a



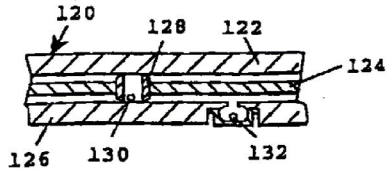
도면7b



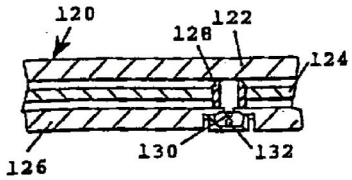
도면8



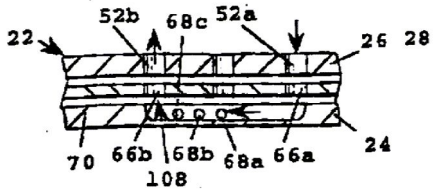
도면9a



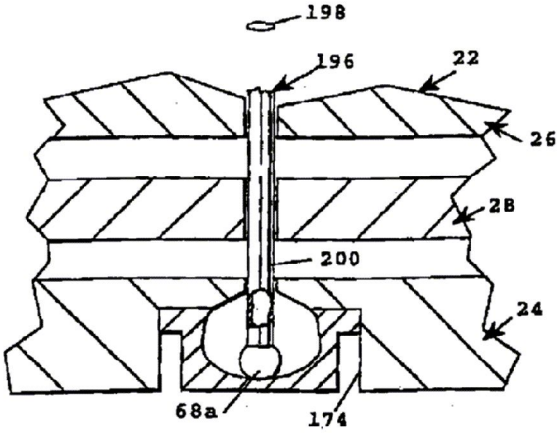
도면9b



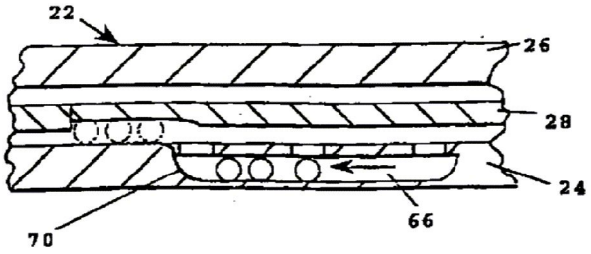
도면10



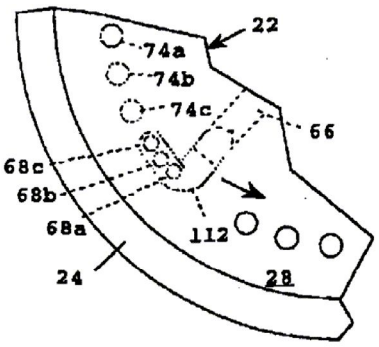
도면11



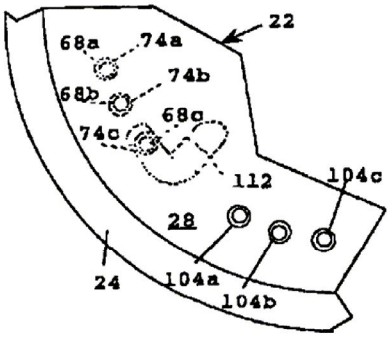
도면12a



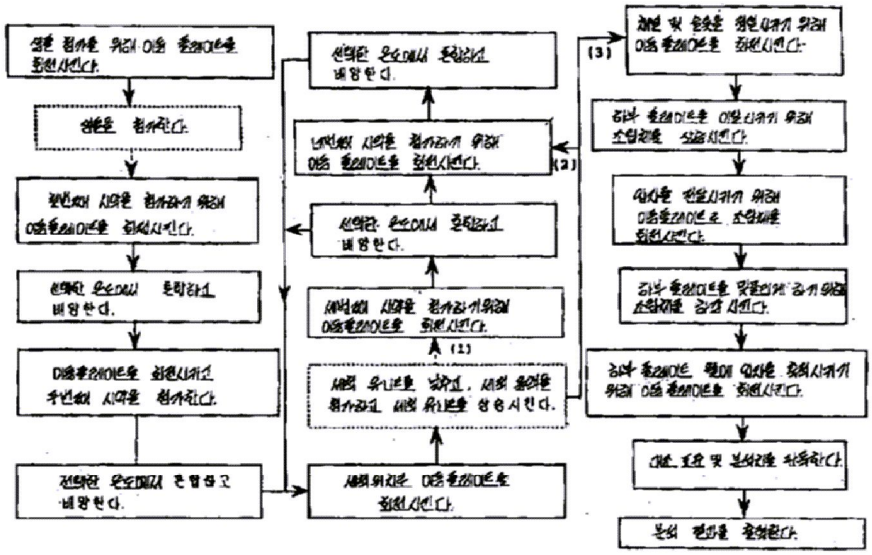
도면12b



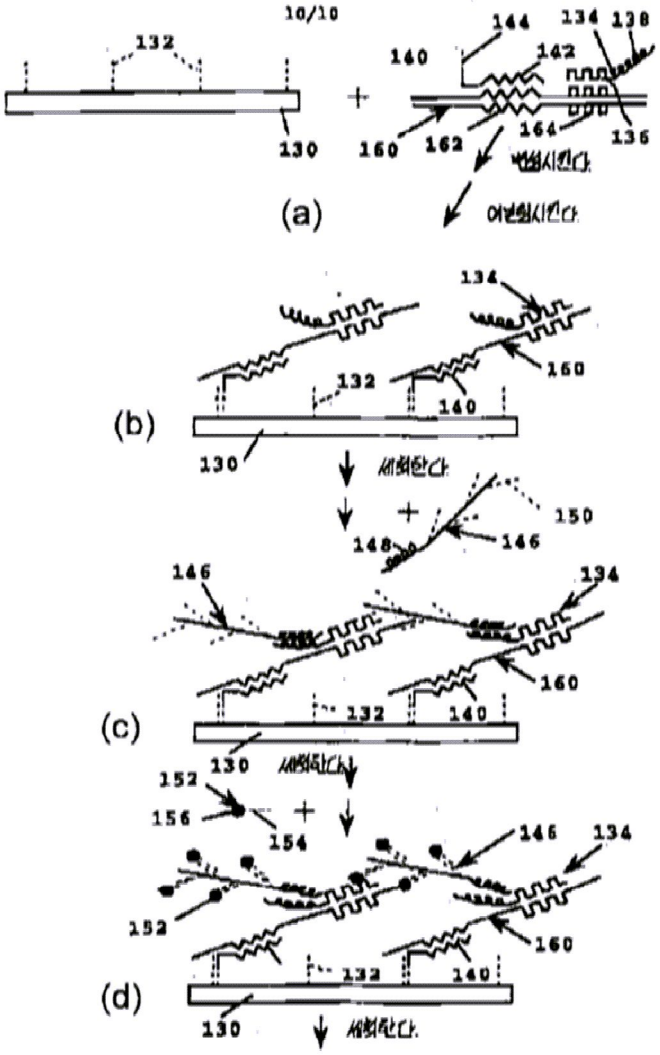
도면12c



도면13



도면14


10/10
132
130
140
144
134
138
142
160
162
164
136
(a)
(b)
(c)
(d)
146
148
150
152
154
156