

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 3/00 (2006.01)

C12M 1/38 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03800084.9

[45] 授权公告日 2008年3月26日

[11] 授权公告号 CN 100376692C

[22] 申请日 2003.1.15 [21] 申请号 03800084.9

[30] 优先权

[32] 2002.1.22 [33] EP [31] 02001519.4

[86] 国际申请 PCT/EP2003/000357 2003.1.15

[87] 国际公布 WO2003/062797 德 2003.7.31

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.22

[73] 专利权人 MPB 梅尔泰克专利代理有限公司

地址 德国马格德堡

[72] 发明人 瓦尔特·舒伯特

[56] 参考文献

WO93/19207A 1993.9.30

US6300124B 2001.10.9

CN21101671U 1992.4.15

US5451500A 1995.9.19

审查员 飞竹玲

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘兴鹏

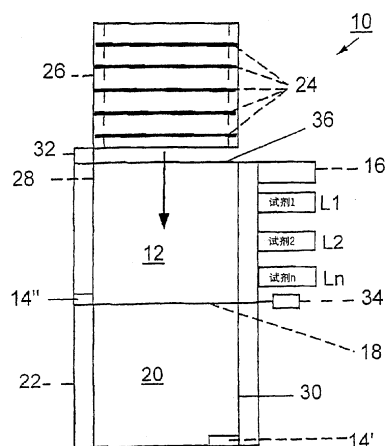
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

[54] 发明名称

制备分析用生物样品的方法和设备

[57] 摘要

本发明涉及一种制备分析用生物样品的方法，其包括如下步骤：a) 将生物样品放置在二维载体上；b) 在第一温度 T1 时，将蛋白质沉淀或变性用的第一溶液 L1 添加到生物样品和载体上，并保持预定的第一时间段 Z1；c) 在第二温度 T2 时，留下蛋白质沉淀或变性用溶液 L1 或添加更多的蛋白质沉淀或变性用溶液 L1，或添加第二种蛋白质沉淀或变性用溶液 L2 至生物样品和载体上，并保持预定的第二时间段 Z2，其中 T2 比 T1 温度低，且 Z2 长于、等于或短于 Z1；d) 干燥样品。本发明还涉及一种用于完成上述制备分析用生物样品的方法的设备，与前述权利要求中的一个相一致，该设备 (10) 包括有至少一个腔 (12)，其用于容纳生物样品或添加在至少一载体上的样品，还包括至少一个温度控制器 (14)，其用于控制和调节腔 (12) 内的温度。



1、一种用于制备分析用生物样品的设备，所述设备（10）包括至少一个腔（12，20），其用于容纳生物样品，或添加在至少一个载体（24）上的样品，并包括至少一个温度控制器（14'，14''），其用于控制和调节腔（12，20）内的温度，其特征在于：

所述腔（12、20）内设置有至少一个分隔壁（18），且所述分隔壁（18）能被手动或自动地移走或移动。

2、如权利要求1所述的设备，其特征在于：所述腔（12）被盖（36）封闭。

3、如权利要求1所述的设备，其特征在于：所述设备（10）包括至少一个真空泵（16），以便在腔（12，20）内产生真空。

4、如权利要求1所述的设备，其特征在于：多个腔（1，2，3…，n）被顺序地前后设置。

5、如权利要求1所述的设备，其特征在于：多个腔（12，20）被上下设置。

6、如权利要求1所述的设备，其特征在于：多个载体（24）被设置在一个或多个样品载波片（26）上。

7、如权利要求1所述的设备，其特征在于：所述设备（10）手动、半自动或全自动地执行和控制用于制备分析用生物样品的每个工艺步骤。

## 制备分析用生物样品的方法和设备

本发明涉及一种制备分析用生物样品的方法，以及实现上述制备分析用生物样品的方法的设备。

自从人类基因组和其它物种基因组的排序完成以后，在特定细胞或组织的样品内进行蛋白质的定性或定量分析在研究和工业上变得越来越重要。

关于蛋白质的化学分析方法，当代所谓大规模蛋白质化学分析（proteomics）方法是很有名地。该方法基于特定细胞或组织样品的分解，借助不同试剂对蛋白质进行提取和变性，以及单体蛋白质借助于例如二维平面凝胶电泳方法的分解。以充足的数量和尺寸存在于原始蛋白质混合物内，并具有适当的移动能力的每个单体蛋白质显示其作为一个墨点在与尺寸及净电荷相关的特殊位置存在于凝胶内。在已知的蛋白质研究的实际工作中，多达几千的蛋白质以这种方式从样品中分离。基于组织不同状态的比较，理论上有可能在合适软件的帮助下借助单个凝胶的叠加来测定蛋白质表达式的差异，该叠加的位置是准确的。特别是，在此过程中借助位置比较，识别最新表述蛋白质及不再表述或已经表述蛋白质应该是可能的。

在每天的实际分析工作中，仍有关于上述目的的重大局限性。例如，已知的分析方法显示出有限的再现性，因为自动化程度不足，在单体分析步骤中有很多不准确。关于单体蛋白质的位置，结果例如偏离多达几个百分数。至于蛋白质的相应数量结果偏离多达二十个百分数。

除了在技术上完成已知方法有困难外，其动力病原论也不充分，即极罕见的蛋白质不能与频繁出现的蛋白质并排地显示。这些局限性使其不能借助于依赖单体蛋白质可再现位置的适当软件通过自动方式比较例如大量的凝胶。彼此轻微偏离的单体蛋白质墨点的位置增加了比较分析的不确定性。然而在蛋白质化学分析（proteome）研究中，仍然依赖于大量细胞组织的比较，所以前述已知方法的局限性是不能容忍的。

已知分析方法的变异或不准确及有限的再现性的一个重要原因是因为非标准化的样品制备。

因而本发明的一个目的是进一步研究并获得一种用于制备分析用生物样品的方法，它能保证均一性及标准化，并可用于完全自动化的样品制备。

此外，本发明的一个目的是提供一种用于实现制备分析用生物样品的新方法的相应设备。

上述目的可通过提供一种用于制备分析用生物样品的方法及用于执行该制备分析用生物样品的方法的设备获得。

在根据本发明的用于制备分析用生物样品的方法中，下述步骤被执行：a)将生物样品放置在二维载体上；b)在第一温度 $T_1$ 时，将蛋白质沉淀或变性用的第一溶液 $L_1$ 添加到生物样品和载体上，并保持预定的第一时间段 $Z_1$ ；c)在第二温度 $T_2$ 时，留下蛋白质沉淀或变性用溶液 $L_1$ 或添加更多的蛋白质沉淀或变性用溶液 $L_1$ ，或添加第二种蛋白质沉淀或变性用溶液 $L_2$ 至该生物样品和载体上，并保持预定的第二时间段 $Z_2$ ，其中 $T_2$ 比 $T_1$ 温度低，且 $Z_2$ 长于、等于或短于 $Z_1$ ；d)干燥样品。通过根据本发明的用于制备样品的方法，能够保证均一、高标准的样品被制备，并且相应地产生均一的样品。因此，有

可能借助相应的计算机程序,将被分析和检查的蛋白质以一种更好的方式被识别和检定。测量结果显示蛋白质识别的错误可能性减小了3至4个系数。此外,蛋白质自动识别的数量增加了至少16%。最后,制备样品的新方法使采样能完全自动化,因此有可能比较不同实验室间的量化结果。

根据本发明方法的最佳实施例,在工艺步骤a)和b)之间作为工艺步骤a1)和/或在工艺步骤b)和c)之间作为工艺步骤b1)进行样品的干燥。结果显示要被检测的生物样品发生了进一步的均一化和浓缩,由此,根据工艺步骤a1)、b1)或d)的干燥能够借助空气或真空干燥而发生。

根据本发明方法的又一最佳实施例,样品在工艺步骤a)或a1)之后被冷冻,这作为步骤b2)。这种方式也更有利于获得均一的蛋白质浓度和更稳定的蛋白质沉淀物,生物样品可能是细胞或组织样品或蛋白质与核酸的混合物或是含有蛋白质和/或碳水化合物和/或脂肪和/或核酸的高分子混合物。

根据本发明方法的另一最佳实施例,溶液L1和/或L2是有机溶剂和/或具有临界PH值的溶液和/或具有临界离子浓度的溶液和/或盐溶液和/或含有金属离子的溶液。因为随着根据本发明制备样品的方法的实现,有机溶剂甲醇、乙醇、丁醇和丙酮被证明特别有利。苦味酸、鞣酸、钨酸、钼酸、三氯乙酸、高氯酸和磺基水杨酸的溶解盐被专门用作盐溶液。 $-10^{\circ}\text{C}$ 到 $60^{\circ}\text{C}$ 的范围已被证明是有利的温度范围T1。

根据本发明方法的另一最佳实施例,生物样品在工艺步骤d)之后经受蛋白质和/或核酸测定方法和/或蛋白质化学分离方法和/或用于细胞结构的原位分析方法。

根据本发明用于完成上述制备分析用生物样品的方法的设备显示有至少一个腔，其用于容纳样品，或添加在至少一载体上的样品，并且有至少一个温度控制器，其用于控制和调节腔内的温度，其中，所述腔内设置有至少一个分隔壁，且所述分隔壁能被手动或自动地移走或移动。这有利地保证了将被处理的生物样品在腔室内暴露于不同的温度范围。

在根据本发明设备的最佳实施例中，具有连续的前后设置的多个腔。但是，也有可能具有多个上下设置的腔，或具有至少一个设置在单个腔内的分隔壁。形成多腔室的结果是有可能便于给每个腔室分配一相应的温度范围或另一反应范围。这就提高了样品的处理量，因为例如不需要对单个腔室进行冷却或加热以获得不同的温度范围。

根据本发明设备的另一最佳实施例，在一个或多个样品载玻片上设置有多个载体。这也导致了样品处理量的显著提高，通过根据本发明的设备，由人工、半自动或自动操作执行和控制单个工艺步骤是可能的。

本发明进一步的细节、特征和有益效果可从下述实施例及附图中得到理解，其中：

图1是根据本发明第一实施例所述设备的示意图，该设备用于完成制备分析用生物样品的方法；

图2是根据图1所述设备的示意图，且样品载波片已送入第一腔；

图3是据图1所述设备的示意图，且样品载波片已位于第二腔内；

图4是所述设备的示意图，该设备用于完成根据本发明第二实

施例的制备分析用生物样品的方法；

图5是根据图4所述设备操作原理的示意图。

图1是实现制备分析用生物样品的方法的设备10的示意图，所述设备具有位于室22内的第一腔12和第二腔20。具有多个载体24的样品载波片26通过轨道28、30滑进及滑出第一腔12和第二腔20，生物样品添加在载体上，样品载波片26的运动是通过第一马达32实现的。

还可以看出，室22或第一腔12能够借助盖36关闭。第一腔12还装备一真空泵16和用于引入使蛋白质沉淀或变性的各种溶液L1、L2、Ln的几个连接件，该连接件被设计成使溶液能够流入或流出腔12、20。还可以看出，第一腔12与第二腔20通过一可移动的分隔壁18分隔。分隔壁18的移动由第二马达34控制。在第二腔20区域内设置一温度控制器14'，其用于控制腔12、20内的温度。可选择地，一相应的温度控制器14''也被设置在第一腔12内，腔12、20内的温度有可能设定在-10℃至60℃温度范围内。除了上述自动或机动地移动分隔壁18外，当然其也能由手动实现。

但是可以设想，可以仅用一个腔（未显示）代替两个腔12、20。

在下文中，所述第一实施例的操作原理将借助图1至3被详细描述。

设备10在全自动控制情况下，第一马达32在程序控制时间段Z1、Z2内将载波盒26从第一腔12移至第二腔20并从第二腔20移回至第一腔12，上述工序重复很多次是有可能的。通过起动真空泵16，根据分隔壁18的位置，能够在腔12内或在两个腔12、20内产生真空，以用于干燥载体24上的样品或样品载波片26上的样品。经过必要的修正，溶液L1、L2、Ln经抽吸用于供应和排除与此同理。此处，

同样根据分隔壁18的位置，仅有第一腔12或两个腔12、20都能充满相应的溶液L1、L2、Ln并排空。

在第一工艺步骤a)，生物样品被添加到二维载体24上。该生物样品通常是细胞或组织样品或蛋白质混合物或核酸或包含蛋白质和/或碳水化合物和/或脂肪和/或核酸的高分子混合物。用于细胞培养的细胞例如能容纳在缓冲剂内，细胞密度被设定为如 $3 \times 10^8$ 个细胞。但是，对于低温箱，也可能使用组织切片作为样品。细胞数量或组织切片数量的选择依赖于目的，即生物样品在样品制备完成后被提供的其它方法。这通常是蛋白质-和/或核酸测定方法和/或蛋白质-化学分离方法和/或用于细胞结构的原位分析方法。溶解在缓冲剂内的细胞被吸液管均匀地加入载体24内。或者，一个或多个组织切片被放在载体24上。根据样品载波片26的尺寸，因而有可能接受多个载体24。在样品载波片26送入设备10之前，分隔壁18被拉向外，于是第二腔20变得可从设置在其上的第一腔12出入。第二腔20随后充满第一蛋白质沉淀或变性溶液L1以正好到顶腔边缘下。此处所描述的实施例中，第一溶液L1包括有机溶剂，如甲醇、乙醇、丁醇或丙酮。但是对于溶液L1和L2，也可能不仅包括有机溶液，而且包括具有临界PH值的溶液和/或具有临界离子浓度的溶液和/或盐溶液和/或含金属离子溶液，所述盐溶液有可能含有溶解有苦味酸、鞣酸、钨酸、钼酸、三氯乙酸、高氯酸或磺基水杨酸的盐。

在下一个工作步骤中，分隔壁18被推回起始位置，即进入将第一腔12与第二腔20分开的最终位置。接着，载波盒26放入设备10的轨道28、30并被送入第一腔12。设备10的盖36也被关闭。接着，在下一个工作步骤中，通过真空泵16在第一腔12内生成真空。通过这种方式生物样品根据步骤a1)被干燥第一段时间。随着干燥工序

a1)的完成，真空从第一腔12内排除。最后，第一腔12和第二腔20之间的分隔壁18再次移走，且载波盒26沉入充有第一溶液L1的第二腔20内。通过这种方式使蛋白质沉淀或变性的第一溶液L1在第一温度T1时施加在生物样品和载体24上，在此情况下，该第一温度是室温。通过与有机溶液L1的接触，样品中的蛋白质使得水从水化套中被提取。经过一预定时间段Z1后，该时间段例如是10秒，载波片26再次被推入腔12。这完成了工艺步骤b)。由于很短的暴露时间，所以仅有局部及轻微的水抽取，所以细胞内三维结构的蛋白质不受影响或仅受很小的影响。这样蛋白质可以均匀地用于下一工艺步骤c)。在工艺步骤c)被执行前，分隔壁18再次被推回，于是两个腔10、20被再次分隔。根据工艺步骤b1)，样品现在通过真空泵16被再次干燥。最后，随着干燥工艺的完成和真空从第一腔12内的排除，腔12、20之间的分隔壁18再次被移开。

在随后的工艺步骤中，应用温度控制器14'，腔10、20内的温度被降低并设定在-20℃。由于生物样品在第一腔12内被安排在有机溶剂L1的气相中，根据工艺步骤b2)它们被冷冻。也有可能通过提供液态氮冷冻样品。经过必要的修正，提供液态异戊烷在接近-130℃进行冷冻与此同理。其后，这些液体不得不再次从系统移走。在第二腔20内，由于其比冰点低很多，有机溶剂L1处于液态。特别是当丙酮被用作有机溶剂时。此后，带有生物样品的载波盒26降入第二腔20，于是根据工艺步骤c)，使蛋白质沉淀或变性的第一溶液L1在第二温度T2下被再次施加到生物样品和载体上。现在，样品在第二腔20内保留一预定时间段Z2，如实施例所述，近似10分钟。由于第一溶液L1在低温T2的额外加入，细胞蛋白质的水套以平缓方式被原位抽取，因为准备的工艺步骤b)是均匀及完全的，所以已处理

的生物样品的蛋白质立体结构及蛋白质复合体被最大程度地维持。

此后，载波盒26再次送入第一腔12，分隔壁再次推入腔12、20之间并锁定在该位置。在最后的工艺步骤d)中，将被制备好的样品被干燥。这是再次通过真空泵16进行的。但是，样品的干燥也有可能通过空气干燥。

设备10的实施例也允许不仅使用一种溶液L1，而且使用顺次或同时充填并被抽吸走的多种溶液L2至Ln。

也可以省去设备10的分隔壁18。在此情况下，设备10仅包括一个腔12（未显示）和一温度控制器14'，腔12的上半部分被设想用于将通过抽吸而填充或除去的溶液L1、L2至Ln的气相，下半部分被设想用于上述溶液的液相。整个工艺在预定时间段内被手动控制。对于这种型式的设备10，它也可能省去真空泵和马达32、34。

此外，通过改变图1至3中的设备10的腔12、20的高度，有可能使用不同的具有根据载体24的数量可变运载能力的载波盒26。这提高了能够并行处理的样品的数量。这样，每个设备10例如可能同时处理10至50个样品。也可能通过并行操作设备10提高要处理样品的数量为任何数量。为此，单个真空泵16能被连接到使用相应连接件的多个设备10上。

图4显示了据第二实施例的用于实现制备分析用生物样品的方法的设备的示意图。能看出多个腔1, 2, 3..., n被连续设置，每个腔1, 2, 3..., n可以用相应的盖D1, D2, D3..., Dn关闭。

在下文中，此处显示的第二实施例将根据其操作原理被详细描述。样品容纳于其内的载波盒A或含样品的载体被插入轨道B并设置于腔1上。此后，载波盒A降低进入腔1中，腔盖D1借助导轨C被推到腔1上。接着，在腔1内产生真空。随后真空干燥工艺被完成，

空气充溢腔1，盖D1移回其起始位置。载波盒A被升出腔1并回到引导轨B。当载波盒A移到腔2上时，它降入腔2中。盖D2再次关闭腔2。在腔2内，使蛋白质沉淀或变性的第一溶液L1根据工艺步骤b)被添加。样品载波片A从腔2移开后，样品A相应地降入腔3中，根据工艺步骤b1)，样品在腔3内干燥。腔4用于完成工艺步骤c)，即，使蛋白质沉淀或变性的溶液在第二温度T2时的再次添加，该温度T2低于第一温度T1，在本实施例中，温度T1已在腔2中占优势。在所示的设备中，腔5用作根据步骤d)的使样品进一步干燥的真空腔。所有的其它腔都用于样品的进一步处理。例如在腔6中，缓冲剂或第二溶液L2被加入样品。经过必要修正，这同样适用于具有其它缓冲剂溶液或其它使蛋白质沉淀或变性的溶液的腔7至9。此外，可以设计腔用于一个周期之后样品的保存。并且，腔能够包括一所谓的“细胞/组织取样器”，它从试管或离心管内的载体上接受已处理过的样品。

能够看出，图1至3中显示的设备10内的同样的工作步骤能通过根据第二实施例的线性设备完成。但是，每种反应在专门用于每种反应的单个腔1, 2, 3..., n内执行（参照图5）。

在另一个未显示的实施例中，设备的每个腔还能被设置为所谓圆盘传送带内的一个圆。

图1

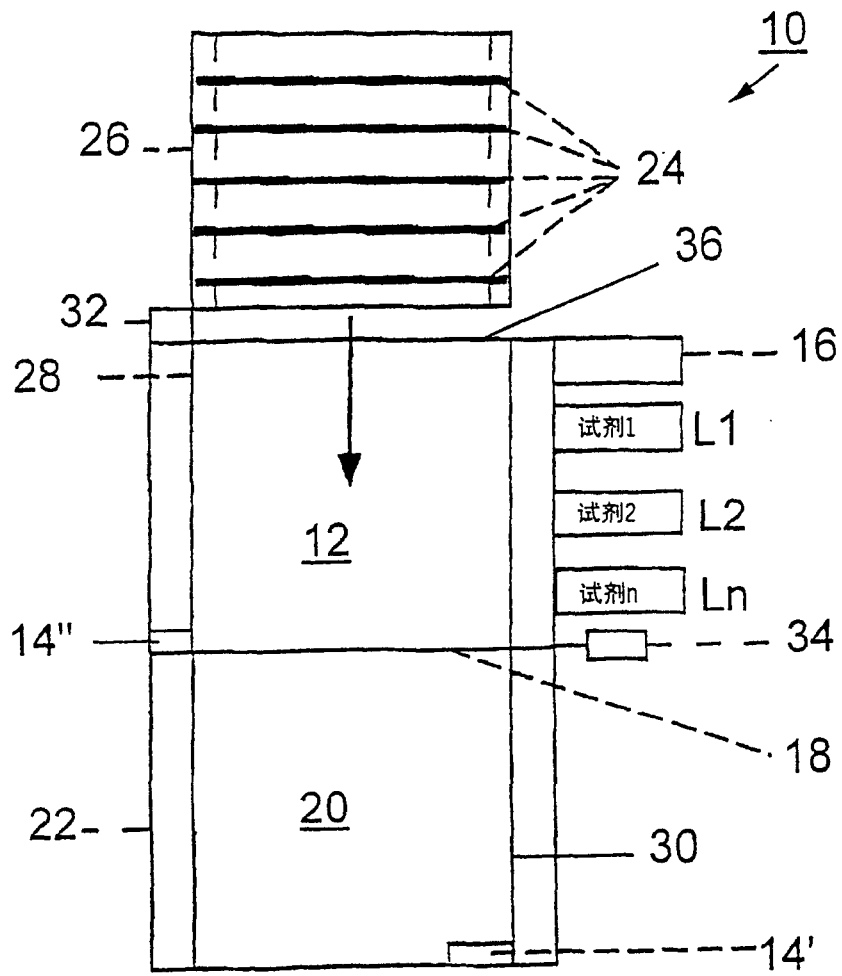


图2

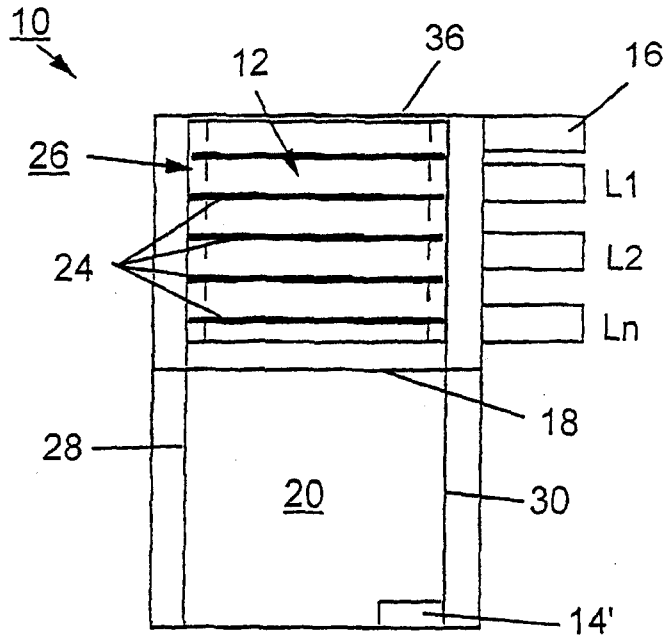


图3

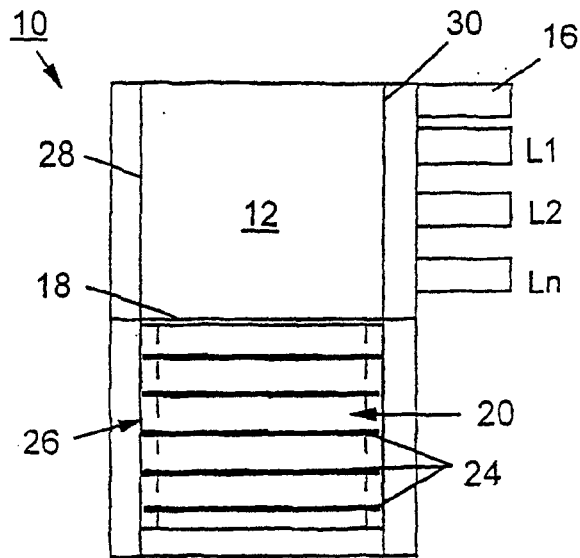


图4

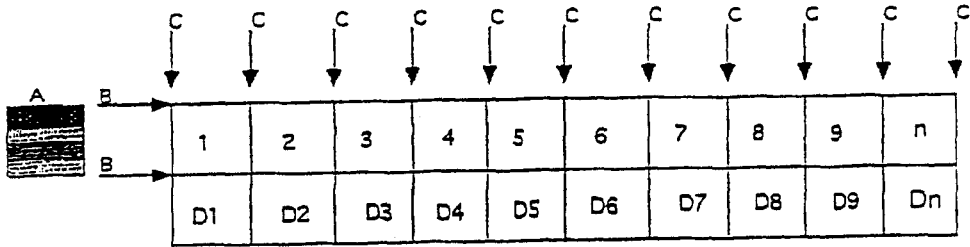
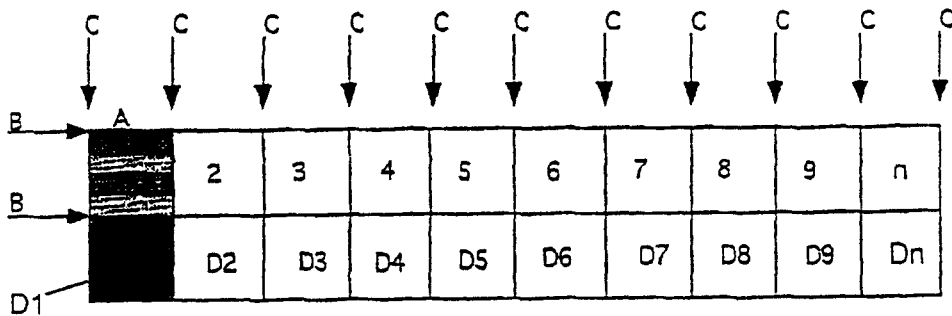
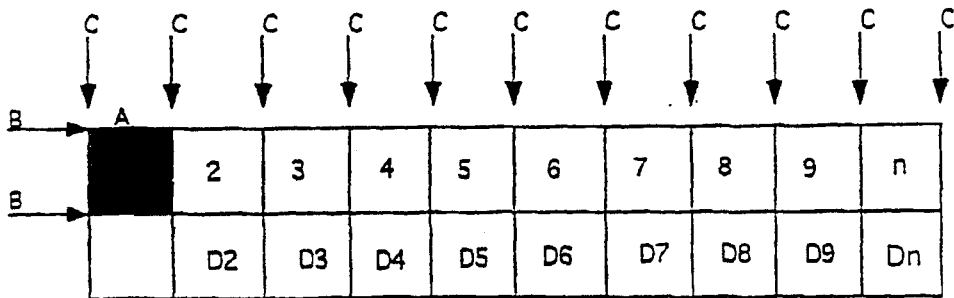


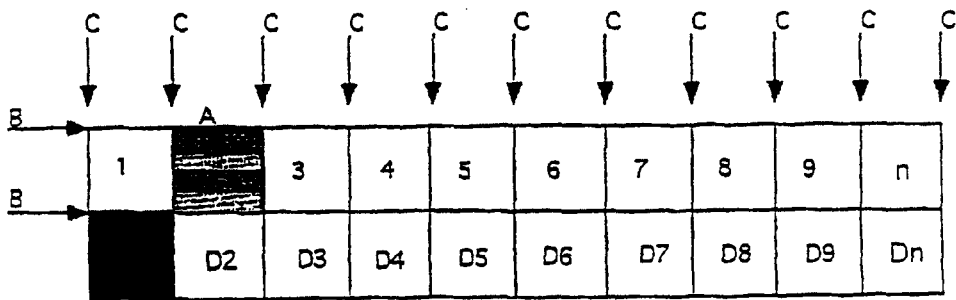
图5



工作步骤1



工作步骤2



工作步骤3