[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
C12Q 1/68
G01N 27/02 G01N 33/487

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97192698.0

[43]公开日 1999年3月31日

[11]公开号 CN 1212726A

[22]申请日 97.2.18 [21]申请号 97192698.0
[30]优先权
[32]96.2.29 [33]GB [31]9604292.4
[86]国际申请 PCT/GB97/00447 97.2.18
[87]国际公布 WO97/32039 英 97.9.4
[85]进入国家阶段日期 98.8.28
[71]申请人 分子感应器有限公司
地址 英国威尔特郡
[72]发明人 约翰·迈克尔·克拉克森
本杰明·戴维·科布
[74]专利代理机构 中科专利代理有限责任公司
代理人 林道濂

权利要求书2页 说明书7页 附图页数5页

[54]发明名称 通过测定导电率定量测定溶液中核酸的方法及使用的仪器

[57]摘要

一种估测核酸材料的性质或参数的方法，所述的性质或参数是一种与核酸材料 的导电率相关的性质或参数，包括测定核酸材料的导电率，并参照导电率和所 说的性质或参数之间预先确定的关系从该测定结果估测该材料的性质或参数。这是基于这样一个发现，即经常需要定量测定核酸的一些重要性质，而这些性 质可通过对核酸溶液的导电率的测定估测。这些性质的变化可反映在相应的导 电率的变化上。溶液中核酸的浓度和核酸的分子量为可测定的重要性质的例子。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1、一种用于测定核酸材料的性质或参数的方法，所说的性质或参数是与核酸材料的导电性相关的性质或参数，该方法包括测量核酸材料的导电率，从所说的测量结果参照导电率和所说的性质或参数之间预先确定的关系估算材料的性质或参数。

2、按照权利要求1所述的方法，其中，估算的参数是核酸溶液中核酸的浓度。

3、按照权利要求2所述的方法，其中，该核酸材料主要由单一种类的核酸组成。

4、按照权利要求1所述的方法，其中，估算的性质是核酸的分子量。

5、按照权利要求4所述的方法，包括使用在一个范围内不同频率的交流电测量含有核酸的溶液的导电率。

6、按照权利要求5所述的方法，其中，核酸分子量是从分子量和该电流/频率响应的特征曲线或其部分之间预先确定的关系估测的。

7、按照权利要求6所述的方法，其中，所述关系是在分子量和响应的梯度相对于频率的曲线之间的关系。

8、按照权利要求4至7中任意一项所述的方法，其中，估测的性质是某一范围核酸种类的分子量的一个总体指示。

9、按照前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，测定是使用已按照预先确定的关系预先校准的仪器进行的。

10、按照权利要求6所述的方法，其中，该仪器对于分子量/导电率关系和浓度/导电率关系已经作了预先校准。

11、按照前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，导电率是通过流经核酸材料溶液的交流电的测量而进行测量的。

12、按照前述权利要求中任意一项所述的方法，其中，所述核酸是DNA。

13、用于实施按照前述权利要求中任意一项所述的方法的仪器，包括导电率测定装置和所采用的交流电变换频率的装置。

说　　明　　书

通过测定导电率定量测定溶液中核酸的方法及使用的仪器

本发明涉及核酸的测定，具体地说涉及对核酸的性质或者参数的测定，尤其是本发明涉及对溶液中核酸浓度的测定（定量）和对核酸分子的分子量测定（测定大小）。

通常，DNA浓度是通过分光光度法测定的，这一方法依赖于DNA分子中核苷酸环结构对紫外线（约２６０nm）的特征吸收峰。为了测定分子量，通常将DNA分子通过醇脂糖凝胶电泳进行大小分离，然后使用溴化乙锭染料进行观察。DNA也可在醇脂凝胶上通过测量紫外线激发（约３００nm）后产生的荧光并与已知的标准相比较进行定量。这两种方法均具有内在的缺点。紫外分光光度计是很贵重的仪器，需要使用贵重的石英杯并依赖较大体积样品的破坏性处理。使用溴化乙锭对DNA进行观察和定量，虽然价格较低廉，但由于其剧烈毒性和致癌性也不能称心如意。

本发明包括一种测定核酸材料的性质或参数的方法，所说的性质或参数是与核酸材料的导电性相关的，该方法包括测定核酸材料的导电率，并通过与预先确定的导电率与所说的性质或参数之间的关系相比较从所说的测定结果估测该材料的性质或参数。

本发明是基于这样一个发现，即核酸的一些经常需要定量的重要性质，可通过对核酸溶液的导电率的测定进行估测。这些性质的变化可从导电率的相应变化反映出来。溶液中核酸的浓度以及核酸种类的分子量是可按照本发明的方法进行测定的重要性质的例子。

为了本发明的目的，导电率可通过使用固定表面积的电极，当电流流经核酸材料的溶液时很方便地测得。

本发明的主要好处在于对单一种类的核酸的性质进行测定。但该材料的绝对纯净并不总是需要的，本发明适用于含有少量其它材料的核

酸，包括其它种类核酸。

本发明的一个实施方案通过参阅附图，仅以举例的方式在下文进行描述。

图 1 是一个相对于DNA浓度的电流 / 导电率图；

图 2 是一个相对于电源频率的导电率图；

图 3 是相对于梯度的Log分子量的校准曲线；

图 4 是相对于频率的DNA分子的％响应图；

图 5 是相对于％响应梯度的分子量图。

DNA的浓度可通过在一个已知的交流电频率下测定电流 / 导电率来确定。在任意一个固定的频率记录的电流已发现的DNA的浓度成正比。例如，图 1 显示了在 2 kHz记录到的电流 / 导电率是如何随DNA的浓度变化的。这一关系不仅适用于单一大小的核酸，也适用于很多不同大小的分子。在设计实施本发明的方法的仪器时，按照电流和核酸浓度之间的关系可很容易调整和校准导电率计。实际上通常需要将该仪器校准的处理均一的DNA样品而不是一个范围的分子量。因此通常首先对样品“测定大小”，然后显示出用于浓度测定的适当的核酸背景。

DNA样品的分子量测定是通过测定这些分子对施加在电极之间变化的频率的响应来进行的。将记录到的电流 / 导电率（表 1 ）以最大的电流 / 导电率响应的百分数（％响应）相对于施加在两个电极之间的交流电信号的频率作图，得到特征曲线，它根据所涉及的分子量而有所不同（图 2 ）。

表 1

	电流（μ A）		
频率	25聚体	puc18	lambda(λ)
2.00E+03	6	62	93
4.00E+03	6	63	96
6.00E+03	6	64	98
8.00E+03	6	64	99
1.00E+04	7	64	99
2.00E+04	8	65	100
4.00E+04	11	65	102
6.00E+04	15	66	102
8.00E+04	19	67	102
1.00E+05	24	68	104

2.00E+05	45	78	109
4.00E+05	80	99	120
6.00E+05	98	109	122

对于单一DNA种类来说，分子量可通过首先计算响应对频率曲线的梯度（频率范围0－5×10^{5}Hz）来确定。然后可将该梯度值与画出Log分子量对梯度关系的校准曲线（图3）进行比较。对于所有检测的DNA分子来说，该梯度随着分子量变化，结果是梯度值越大，分子量越低。推测这种关系的基础是DNA分子的移动性随频率的变化而变化；当频率升高时，大分子对变化的响应比较小分子的要小。

按照本发明的DNA定量和分子量测定的方法，避开了已有技术中的问题并且相对于那些常规的方法具有几个明显的优点。因而，本发明可使分子量和浓度得到快速和准确的测定，它更为敏感和准确，对操作者来说更为安全并且只需要小体积的样品。

上述的对DNA的表征已使用在两个细铂线电极（也可使用如铜，不锈钢的金属）之间通过含有DNA的溶液的交流电信号而得到，所述的交流电信号的频率可被调整。通过一种在两个细导电极之间的固定的交流电信号。将这一交流电信号的一个范围的频率，0和1MHz之间，施加在这些电极之间，并以通过该溶液的电流依次在每一频率记录相应的导电率。例如，将样品DNA以至少10μl的体积溶解于水或TE缓冲溶液中。为方便起见，可使用一个标准的500μl塑料管。将两个铂细丝电极置于溶液中并与一个在1V交流电操作的函数发生器（function generator）相接。使一系列的0－1MHz的频率通过该溶液，并使用一个电流计以mA测量所产生的电流。DNA浓度是通过将在2kHz的频率通过溶液的电流与标准曲线（与固定频率的电流相关的DNA浓度）相比较进行计算的，也可使用其它的频率。

具体实施例

对溶液中的DNA分子的分子量可通过导电率方法测定验证是通过制备四种在milli Q水和Tris EDTA(TE)缓冲液中的四种不同的DNA溶液〔25碱基的寡核苷酸，700碱基对片段，pUC18（＝2690碱基对）和

Lambda（λ＝50000碱基对）〕和第五种含有未知分子量DNA的溶液（UN）来进行的。对这些溶液的导电率在2×10^{4}Hz至10^{5}Hz的频率范围内以μA进行测量。在milli Q和TE缓冲液之间没有显著差异，表明DNA分子可在用于贮存DNA的最普通的缓冲液中被精确地测定大小。

为证实分子量和导电率之间的关系，将溶液Q配制三份进行检测。表2提供了这一验证结果，并且表明重复样品之间的差异很小。表3显示了以μA计的基本的导电率，并且也显示了作为最大导电性的%的数值，以%响应提供数据的主要原因为，虽然在实验中差异很低（如表1所示）电流探头系统的脆性造成不同的实验之间μA读数上的巨大差异。但导电率变化的趋势（如%响应所表示的）在不同的实验之间是一致的。

图4显示了用表3的平均%响应数据作出的图。在DNA溶液之间最明显的差异是斜线的梯度。当该梯度从在2×10^{4}和4×10^{5}的导电率计算时，在梯度和Log分子量之间观察到近似线性的关系（图5）。这样，梯度可被用于计算分子量。

从图5发现，样品UN的分子量为约1047碱基对，该结果与将同样的片段在醇脂糖凝胶上测定的大小有很好的一致性。

如上所述，电流探头系统的脆性造成实验之间的显著并异。为克服这一问题，建议使用如下设计。

生产描述

本文所述的技术旨在形成一个用于测定核酸大小及进行核酸定量的实验室仪器的基础。该仪器基于移液管，这是一种所有的分子生物学家用以精确转移小体积溶液（如核酸）的工具。使用移液元件内产生的真空将溶液吸入一次性使用的管头中，然后溶液可被分配出去。DNA移液管具有安装在移液管中的感应电子元件。感应件是与移液管单元分开的，并被植于一次性使用的移液管头中，它可以是也可以不是无菌的。使用者将样品吸入移液管头。一旦适当的体积已被吸入移液管头中之后，该移液管便可在显示屏上（如LCD）显示出分子量和浓度。

优选的感应器由在适当的基质，如硅、玻璃或聚碳酸酯之上以交指式排列制造的工作电极和计数电极组成的。可使用参考电极（reference electrode），但不是必需的。这些电极可以是任何适当的材料。也可以

使用惰性材料，如铂、金和银、碳、石墨、碳糊和铂墨汁，改性的电极，其中，电子传递是通过电子接受或电子提供化合物介导的。电极几何排列可以包括任意的方便的对称性排列，球形半球形、盘形、环形和形成单一细线、电极的线性电极，可使用感应元件的交指或多重排列。电极可以是巨形、微形或超微形体积。管头和移液管体之间的接触是通过移液管的圆柱上的界面接触实现的。

所述的产品是袖珍型仪器，一些应用可能需要单座仪器（如需要快速处理的多个样品）。这一实施方案也可应用于其它具有高的一次处理样品量的仪器。特别是微滴板技术可以使大量的样品使用一个标准板模式进行检测。这可应用于筛查和诊断实验室中。

在本申请要求优先权的英国专利申请No. 9604292中公开的内容以及本申请所附摘要的内容均引入本文作为参考。

表 2 在一个频率范围内DNA溶液的导电率（μA）

重复样品			平 均	频 率	大 小
1	2	3			
20	21	22	21	2 • 00E+04	
21	22	22	21	4 • 00E+04	
22	23	22	22	6 • 00E+04	25碱基
35	35	36	36	8 • 00E+04	
54	56	56	55	1 • 00E+05	
80	86	82	82	2 • 00E+05	
111	115	116	114	4 • 00E+05	

32	35	33	33	2 • 00E+04	
35	37	38	36	4 • 00E+04	
40	40	43	41	6 • 00E+04	700碱基对
52	54	55	53	8 • 00E+04	
63	69	69	67	1 • 00E+03	
90	96	93	93	2 • 00E+05	
115	118	119	117	4 • 00E+05	

51	53	53	52	2・00E+04
55	58	55	56	4・00E+04
60	64	62	62	6・00E+04
65	71	68	68	8・00E+04
69	75	75	73	1・00E+05
94	100	100	98	2・00E+05
120	130	125	125	4・00E+05

un

68	68	72	70	2・00E+04
69	75	70	71	4・00E+04
75	80	79	78	6・00E+04
76	77	80	77	8・00E+04
78	81	82	80	1・00E+05
102	104	111	106	2・00E+05
135	145	139	139	4・00E+05

2,690碱基对

134	137	138	136	2・00E+04
138	142	152	144	4・00E+04
139	147	150	145	6・00E+04
142	143	153	146	8・00E+04
145	154	146	148	1・00E+03
151	154	163	156	2・00E+03
162	169	169	166	4・00E+05

50,000碱基对

表3 在一个范围的频率内DNA溶液的导电率（以μA和%响应计）

25碱基	700碱基对	un	2,690碱基对	50,000碱基对	
21	33	52	70	136	2・00E+04
21	36	56	71	144	4・00E+04
22	41	62	78	145	6・00E+04
36	53	68	77	146	8・00E+04
55	67	73	80	148	1・00E+05
82	93	98	106	156	2・00E+05
114	117	125	139	166	4・00E+05
114	117	125	139	166	100%
18	28	42	50	82	2・00E+04
18	31	45	51	87	4・00E+04
19	35	50	56	87	6・00E+04
32	45	54	55	88	8・00E+04
48	57	58	58	89	1・00E+05
72	79	78	76	94	2・00E+05
100	100	100	100	100	4・00E+05

μA

%响应

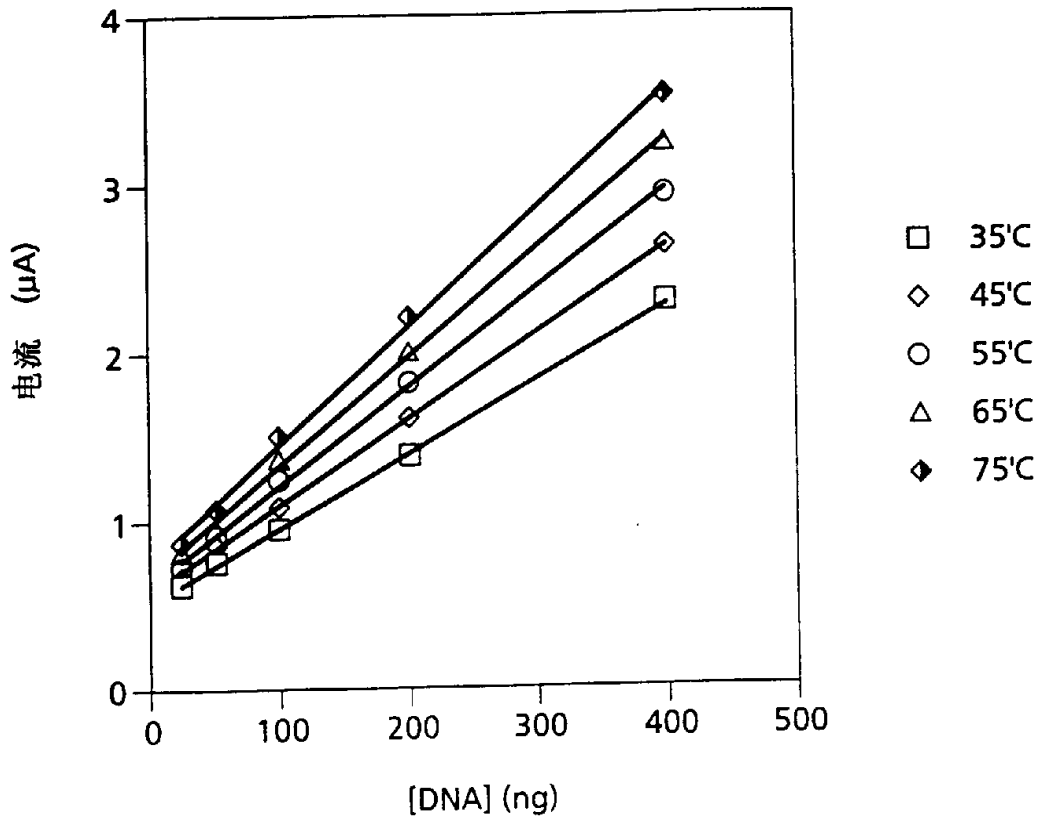

图 1

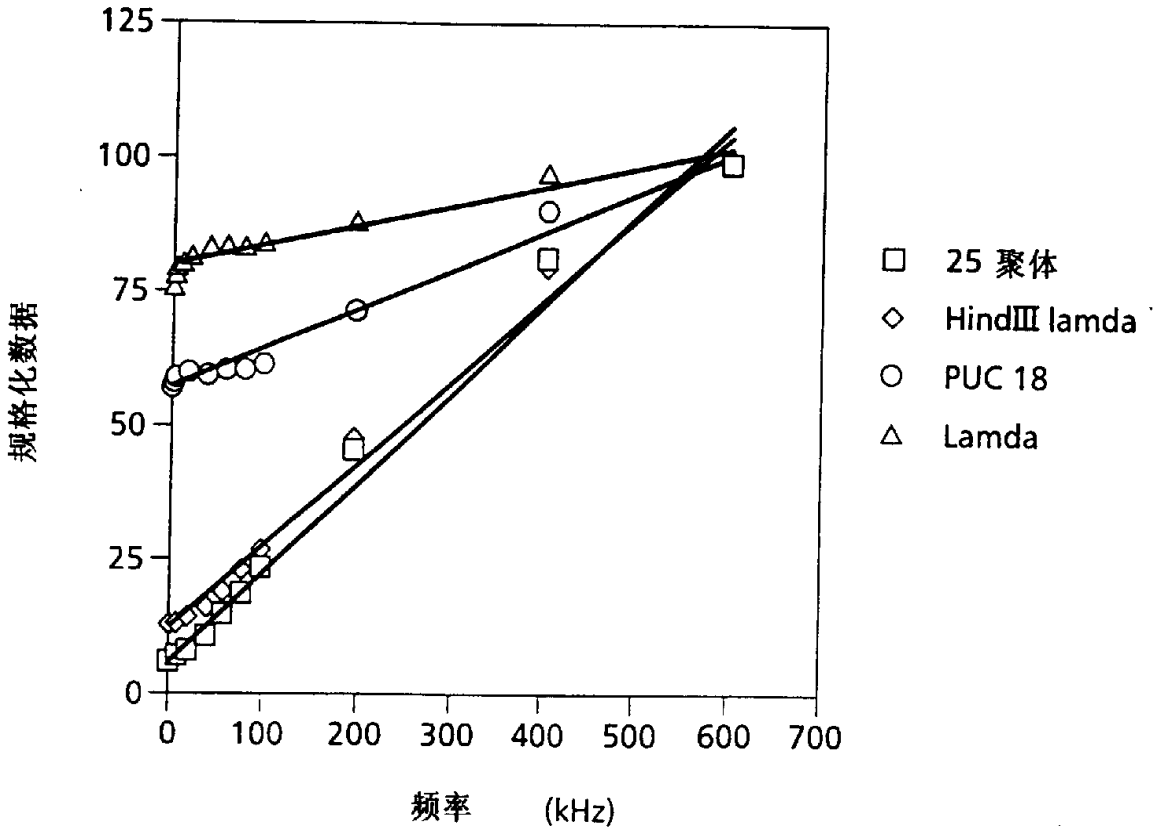
125
100
75
50
25
0
规格化数据
0
100
200
300
400
500
600
700
频率
(kHz)
25 聚体
HindIII lamda
PUC 18
Lamda

图 2

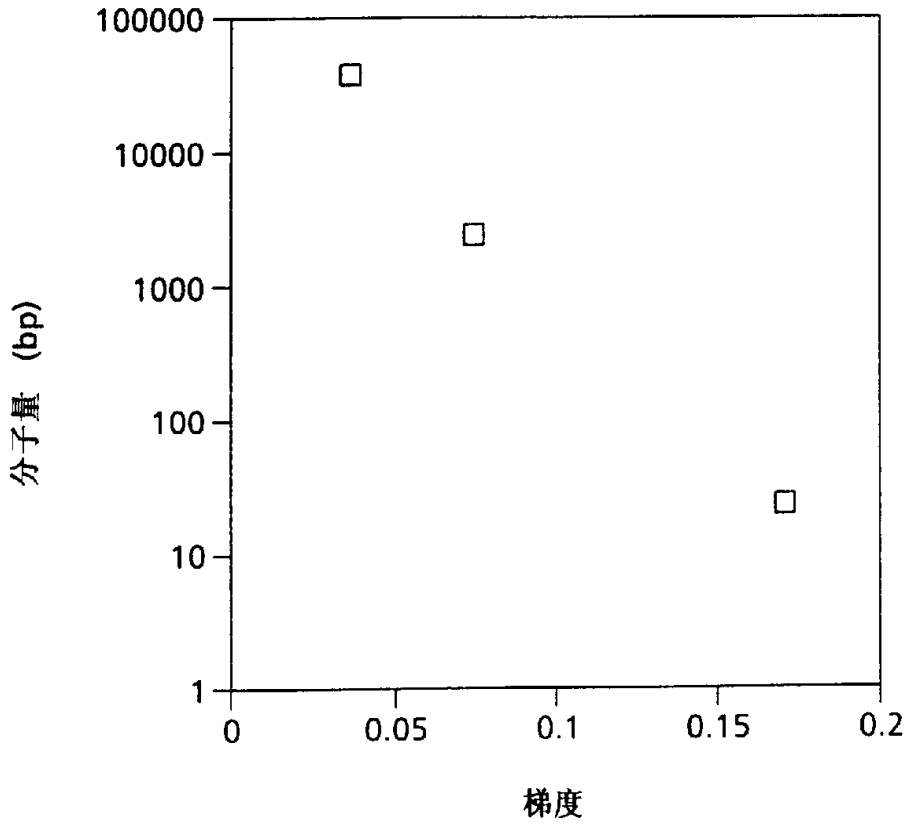

图 3

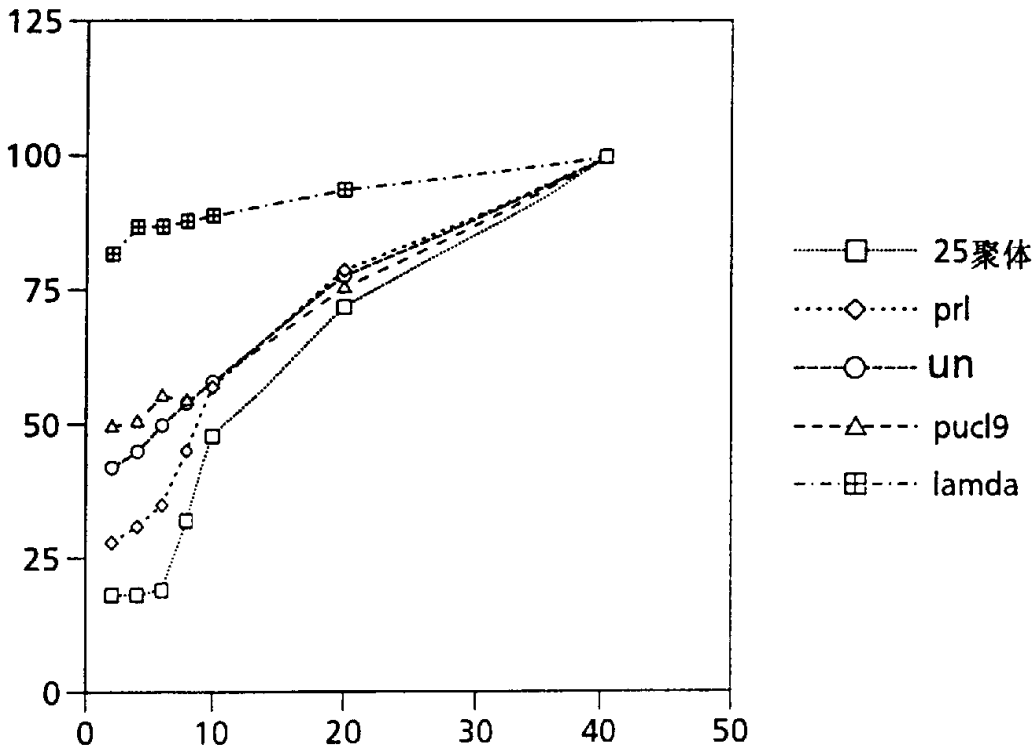

图 4

在一个范围的频率中 DNA 分子的%响应

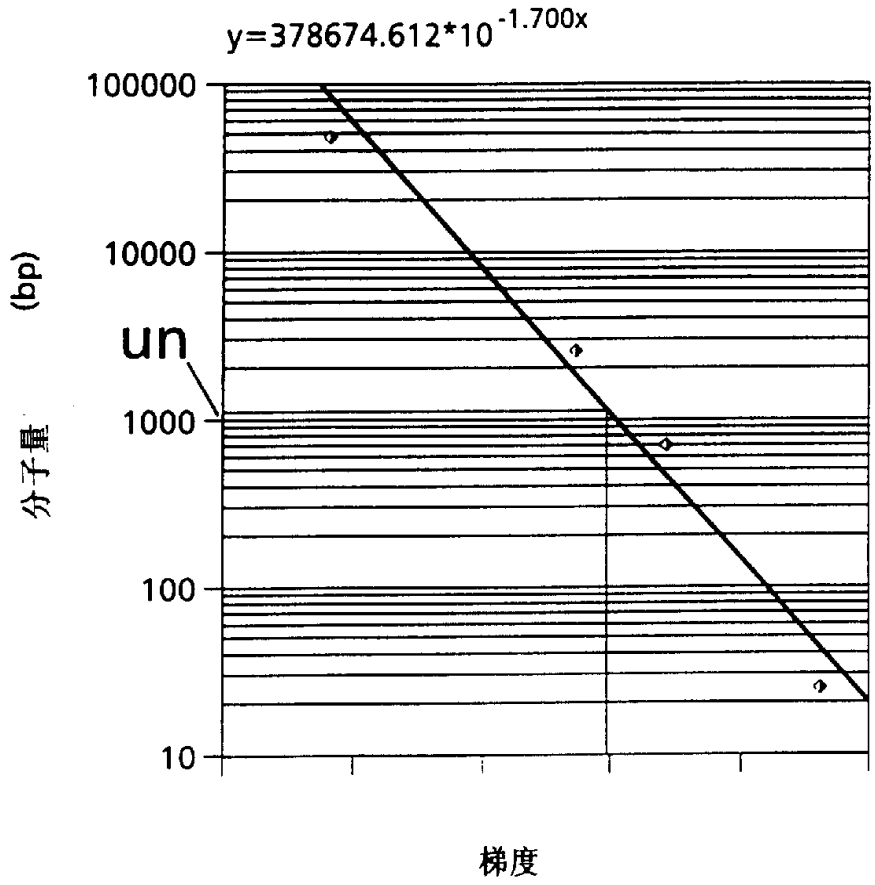

图 5

DNA%响应梯度相对于分子量