



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106029885 A

(43)申请公布日 2016.10.12

(21)申请号 201580007560.2

(22)申请日 2015.02.09

(30)优先权数据

61/937,879 2014.02.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.08.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/015047 2015.02.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/120398 EN 2015.08.13

(71)申请人 基因细胞生物系统有限公司

地址 爱尔兰利默里克

(72)发明人 布莱恩·查克 诺埃尔·希尔

基兰·柯伦

(74)专利代理机构 北京友联知识产权代理事务所(普通合伙) 11343

代理人 尚志峰 汪海屏

(51)Int.Cl.

C12N 15/10(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

C12M 1/38(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

G40B 50/14(2006.01)

G06F 19/10(2006.01)

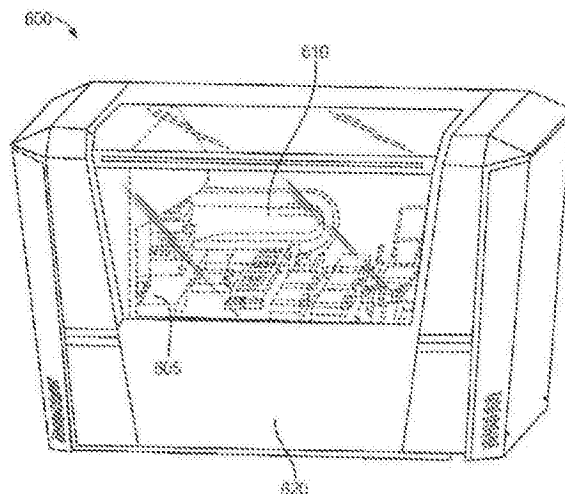
权利要求书1页 说明书19页 附图11页

(54)发明名称

复合液体池(CLC)介导的核酸文库制备装置及其使用方法

(57)摘要

提供了多种完整的核酸文库制备装置。这些装置的多个方面包括：一个热芯片模块，该热芯片模块包括多个节点；一个或多个板位置；一个机器人控制的移液器，该移液器被配置成在一个或多个板位置与该热芯片模块之间转移液体；以及一个散装试剂分配器，该散装试剂分配器被配置成接入该热芯片模块的每个节点。



1. 一种完整的核酸文库制备装置,该装置包括:
 - 一个热芯片模块,该热芯片模块包括多个节点;
 - 一个板位置;
 - 一个机器人控制的移液器,该移液器被配置成在该板位置与该热芯片模块之间转移液体;
 - 一个散装试剂分配器,该散装试剂分配器被配置成接入该热芯片模块的每个节点。
2. 根据权利要求1所述的装置,其中该热芯片模块包括96个或384个节点。
3. 根据权利要求1至2中任一项所述的装置,其中该装置包括用于每个热芯片模块的一个机械致动的盖。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的装置,其中这些板位置中的一个是一个振动筛单元。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的装置,其中该装置包括六个板位置。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的装置,其中该机器人控制的移液器包括多个可互换头部,这些可互换头部被配置用于样品分配、条形码分配、真空和纯化任务。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的装置,其中该装置包括一个液面控制系统,该液面控制系统被配置成维持该或这些热芯片模块内的载油高度。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的装置,其中该装置被操作性地联接到一个手持式条形码扫描器上。
9. 一种核酸文库制备装置,该装置包括:
 - 一个热芯片模块,该热芯片模块包括多个节点;以及
 - 一个液面控制系统,该液面控制系统被配置成维持该热芯片模块内的载油高度。
10. 根据权利要求9所述的装置,其中该液面控制系统被配置成维持这些热芯片模块中的每一个内的载油高度。
11. 根据权利要求9至10中任一项所述的装置,其中该装置包括一个或多个板位置;一个机器人控制的移液器,该移液器被配置成在该一个或多个板位置与该热芯片模块之间转移液体;以及一个散装试剂分配器,该散装试剂分配器被配置成接入该热芯片模块的每个节点。
12. 一种从初始核酸样品产生核酸文库的方法,该方法包括:
 - 将该核酸样品引入到根据权利要求1至11中任一项所述的一个装置中;并且
 - 从该装置获得该核酸文库。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中该核酸文库包括一个有条形码的核酸的文库。
14. 根据权利要求12至13中任一项所述的方法,其中该核酸文库包括一个汇集的有条形码的核酸的文库。
15. 根据权利要求12至14中任一项所述的方法产生的该核酸文库,其中该核酸文库被配置用于通过下一代测序方案进行测序。

复合液体池(CLC)介导的核酸文库制备装置及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35 U.S.C. §119(e), 本申请要求2014年2月10日提交的美国临时专利申请序列号61/937,879的申请日的优先权, 该申请的披露内容通过引用结合在此。

[0003] 引言

[0004] 复合液体池(CLC)技术是一种非常适用于在小的工作容积中执行精确的生化反应的相对新近的平台技术。复合液体池是具有一个核心的小体积的大致球形结构, 该核心是由一种水性介质制成, 该水性介质是由与该核心水性介质不可混溶的一种介质的液体壳封装。在实践中, 液体池存在于与该核心介质和该封装介质均互相不可混溶的一种第三载液的自由表面上。图1提供了一个复合液体池(CLC)的表示, 该表示示出了被封在一种封装油中的一种核心水性介质(有时被称为小滴反应堆), 其中所得大致球形结构存在于与该封装油和该核心水性介质均不可混溶的一种载油的一个表面上。图2提供了一个CLC的照片。

[0005] CLC技术的一个实际应用是产生核酸文库以用于下一代测序(NGS)。文库制备是这样的一种过程: 制备一个基因组核酸样品以用于经由下一代测序进行分析。目前, 下一代平台使用稍微不同的方法诸如焦磷酸测序、合成法测序或连接法测序。然而, 大多数平台需要在测序之前制备核酸。典型的步骤包括片段化(超声处理、雾化或剪切), 接着DNA修复和末端精修(end polishing)(平端或A突出端), 以及最后平台特异性衔接子连接。即使对于当今技术水平测序仪, 也需要一个相对较高的靶分子局部浓度以便准确地测序。为了简化特定 workflow, 自动化机械必须克服与使目的在于修饰和扩增核酸内容物的一系列过程自动化和微型化相关联的挑战。这种生物化学过程通常在96或384静态孔板中执行, 其中典型体积在从10微升至200微升的范围内。

[0006] 概述

[0007] 提供了多种完整的核酸文库制备装置。这些装置的多个方面包括: 一个热芯片模块, 该热芯片模块包括多个节点; 一个或多个板位置; 一个机器人控制的移液器, 该移液器被配置成在该一个或多个板位置与该热芯片模块之间转移液体; 以及一个散装试剂分配器, 该散装试剂分配器被配置成接入该热芯片模块的每个节点。除其他应用外, 这些装置应用于CLC介导的核酸文库生成方案, 例如以供在下一代测序应用中使用。

[0008] 附图简要说明

[0009] 当结合附图阅读时, 本发明可以从以下详细说明书得到最好的理解。以下图包括在附图中:

[0010] 图1提供了一个复合液体池(CLC)的表示。

[0011] 图2提供了一个CLC的三维表示。

[0012] 图3提供了一个热芯片模块的三维图示。

[0013] 图4提供了一个液面控制系统的三维图示。

[0014] 图5提供了一个液面控制系统(诸如图4所示的)的流体学的示意图。

[0015] 图6提供了一个闭合的NGS文库制备装置的三维图示。

[0016] 图7提供了一个打开的NGS文库制备装置的三维图示, 其示出了主甲板。

[0017] 图8提供了存在于主甲板上的不同部件的三维图示。

[0018] 图9提供了机器人移液器及其部件的三维图示。

[0019] 图10提供了该装置的服务甲板的三维图示。

[0020] 图11提供了该装置的主甲板的俯视图。

[0021] 详细说明

[0022] 提供了多种完整的核酸文库制备装置。这些装置的多个方面包括：一个热芯片模块，该热芯片模块包括多个节点；一个或多个板位置；一个机器人控制的移液器，该移液器被配置成在该一个或多个板位置与该热芯片模块之间转移液体；以及一个散装试剂分配器，该散装试剂分配器被配置成接入该热芯片模块的每个节点。除其他应用外，这些装置应用于CLC介导的核酸文库生成方案，例如以供在下一代测序应用中使用。

[0023] 在更详细地描述本发明之前，应当理解的是本发明不限于所描述的具体实施例，因为这些可以改变。还应当理解的是，在此使用的术语仅是出于描述具体实施例的目的，并且不旨在限制，因为本发明的范围将仅由所附权利要求书限制。

[0024] 在提供了一系列值时，应当理解的是每个中间值，到下限的第十个单位(除非上下文清晰地另外指示)，该范围的上限与下限之间以及任何其他陈述的或在该陈述范围内的中间值均被涵盖在本发明之内。这些更小范围的上限和下限可以独立地被包括在更小范围之内，并且也被涵盖在本发明之内，服从于在所陈述范围内任何确切排除的限值。在所陈述的范围包括一个或两个限值时，排除了那些被包括的限值的任一个或两者的范围也被包括在本发明之内。

[0025] 除非另外定义，在此所使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域之内的普通技术人员通常所理解的相同的意思。虽然类似于或等同于在此描述的那些的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试中，现在将对代表性说明性方法和材料进行描述。

[0026] 在本说明书中引用的所有公开物和专利通过引用结合在此，就像每个单独公开物或专利被确切地并且单独地指示为通过引用被结合并且通过引用结合于此，以结合所引用的这些公开物来披露和描述这些方法和/或材料。任何公开物的引用内容是针对其在申请日之前的披露，并且不能理解为承认因为先前发明而本发明不能获得比这些公开物更早的申请日。另外，所提供的公开日期可能与实际公开日期不同，实际公开日期可能需要独立地确定。

[0027] 应当指出，如在此以及在所附权利要求书中使用的，单数形式“一个”、“一种”、以及“该”包括复数指代物，除非上下文另外清晰地指示。另外指出的是，权利要求书可以撰写以排除任何任选的要素。这样，这种陈述意在作为使用与权利要求要素的叙述有关的这类排他性术语诸如“单独”、“仅”等或使用“否定型”限定的前提基础。

[0028] 如将对于本领域技术人员清楚的是，在阅读本披露时，在此描述和展示单独实施例中的每一个具有离散的组成部分和特征，这些组成部分和特征可以在不偏离本发明的范围或精神的情况下易于与任何其他一些实施例的特征分离或组合。可以按照所叙述的事件的顺序或按照逻辑上可行的任何其他顺序来进行任何所叙述的方法。

[0029] 装置

[0030] 如上文概述的，本发明的多个方面包括一种完整的、紧凑的核酸NGS文库制备装

置。因为这些装置是完整的核酸文库制备装置,所以它们包括从一个初始核酸样品制备适用于下一代测序(NGS)的一个核酸文库所必须的所有部件。因此,这些装置被配置成使得一个初始核酸样品可以被引入到装置中并且可以从装置获得准备好在下一代测序方案中使用的一个完整的核酸文库,在样品引入与产物NGS文库检索的时间之间,用户与装置的交互很少(如果有的话)。这些装置包括产生一个NGS核酸文库所必须的所有移液部件和其他部件,如以下更详细地评论的。这些装置是自动化的,原因在于它们被配置成使得一个给定文库制备方案的至少一些步骤(如果不是所有步骤的话)可以在没有人为干涉的情况下发生,除了以下各项之外:将核酸样品引入到装置中;加载任何必要的试剂并且输入信息;以及激活装置以便从该核酸样品产生核酸文库。在这些装置中可以是自动化的一个核酸产生方案的多个步骤包括但不限于液体转移步骤、试剂添加步骤、热循环步骤、产品纯化步骤等。

[0031] 如上文指出的,这些装置是紧凑的。“紧凑的”意味着该装置的尺寸被设定成被定位在一个研究实验室环境中的一个台面或桌面上。在一些实例中,该装置具有在从0.5米至4米、诸如1米至2米的范围内、例如1.54米的长度;在从0.25米至1.75米、诸如0.5米至1米的范围内、例如0.805米的宽度;以及在从0.5米至2米、诸如0.75米至1.25米的范围内、例如0.885米的高度。该装置的重量可以改变,并且在一些实例中,在从100kg至300kg、诸如150kg至200kg的范围内,例如180kg。

[0032] 如上文概述的,根据本发明的实施例的装置包括:至少一个热芯片模块;一个或多个板位置;一个机器人控制的移液器,该移液器被配置成在该一个或多个板位置与该至少一个热芯片模块之间转移液体;以及一个散装试剂分配器,该散装试剂分配器被配置成接入该至少一个热芯片模块的每个节点。现在将更详细地描述该装置的这些部件或子单元中的每一个。

[0033] 热芯片模块

[0034] 如上文概述的,在此描述的装置包括一个热芯片模块。这些装置可以包括单个热芯片模块,或者两个热芯片模块。多个热芯片模块是包括一个或多个节点的板型或芯片型结构,其中每个节点被配置成容纳位于定位在该节点的底部处的一种载液的一个表面上的一个CLC。每个节点在顶部可以是开放的,以便提供对存在于该节点中的一个CLC的液体接入。由一个热芯片模块的一个给定节点限定的体积可以改变,并且在一些实例中,在从2 μ l至1ml、诸如5 μ l至20 μ l的范围内。一个给定节点的截面形状也可以改变,其中所考虑的截面形状包括但不限于圆形、矩形(包括正方形)、三角形等。虽然每个节点的尺寸可以改变,但是在一些实例中,这些节点具有在从1mm至25mm、诸如2.5mm至10mm的范围内、一个最长截面尺寸(例如,直径)以及在从1mm至20mm、诸如3mm至10mm的范围内、一个深度。一个给定热芯片模块中所存在的节点的数目也可以改变,在一些实例中,在从1至2000、诸如10至768的范围内。在一些实施例中,例如在其中希望与常规多孔板相一致的实施例中,节点的数目是96或384。

[0035] 在一些实例中,多个热芯片模块包括一个节点限定底板,该节点限定底板是由一种方便的材料制成并且被配置成限定模块的多个节点。虽然该节点限定底板可以由任何方便的材料制成,但是在一些实例中,该节点限定底板是由导热材料制成。所考虑的多种材料包括但不限于导热材料,例如复合材料、陶瓷以及金属(包括铝)。虽然该节点限定板的尺寸可以改变,但是在一些实例中,该节点限定板具有在从10mm至400mm、诸如10mm至200mm cm

的范围内的长度；在从10mm至400mm、诸如10mm至200mm cm的范围内的宽度；以及在从1mm至20mm、诸如3mm至10mm cm的范围内的宽度。

[0036] 如上文提及的，由节点限定板限定的每个节点被配置成在其底部部分处容纳用于CLC的一种载液。虽然一个给定板可以具有带有一个封闭底部的多个节点，这样使得在使用过程中一定量的载液单独地被定位在每个节点的底部处，但是在一些实例中，该芯片模块被配置成使得这些节点在它们的底部是开放的，以便在每个节点中提供一种共同的载液。在一些实例中，限定具有多个开放的底部的多个节点的节点限定的板被可操作地联接到一个底座或器皿部分上，该节点限定板的大小和形状被设定成包含一池载液，这样使得每个节点具有存在于其底部部分中的相同液面的载液。该载液可以具有上面可以容纳多个CLC的一个自由表面。与该节点限定板相同，该器皿可以是高导热性的，例如复合材料、陶瓷、以及金属，特别是铝，这样使得施加到该器皿上的热量将均匀地分布在所有载液中并且进入多个CLC中。这些热芯片模块的一个方面在于：它们是热控的，这样使得由每个节点限定的（并且因此由容纳在其中的一个CLC经历的）环境温度可以被控制，例如包括被精确地控制，例如达到0.1度或者更好的精确度。温度控制的范围可以改变，其中在一些实例中，温度可以被控制在4℃至120℃、诸如4℃至98℃之间。为了提供热控制，该热芯片模块可以包括加热元件和/或冷却元件。例如，该热芯片模块可以包括一个冷却区域，该冷却区域被配置成可操作地附接到温度调节器上，例如一个热电模块、一个流体冷却系统或者一个强制对流冷却系统上。该芯片模块还可以包括与该器皿热接触的一个加热元件。该加热元件可以是，例如电连接到一个控制器上的一个蚀刻箔加热器，该控制器被编程来激活该加热元件以便在多个节点以及容纳在其中的多个CLC中生成所希望的热循环。可替代地，该加热元件可以是一根电导线，该电导线通过使电流穿过该导线来激活。该导线可以用一种材料（例如PTFE）电绝缘的，该材料还可以用于形成这些稳定特征。在这个实施例中，该加热元件不需要与该器皿直接热接触；热量将通过电绝缘稳定特征更直接地传递到这些CLC。这些稳定特征可以与该导线的绝缘物成整体，并且可以由相同的材料形成。可替代地，这些稳定特征可以附接到该导线上，和/或由与绝缘物不同的一种材料制成。这种实施例还可以包括或不包括具有这些稳定特征的多个节点。稳定特征在公开为W0/2014/188281的PCT申请序列号PCT/IB2014/001784中有进一步描述；该申请的披露内容通过引用结合在此。可替代地，稳定特征可以仅存在于该模块上并且不与该加热元件整合。该加热元件可以被并入到该节点限定板或器皿中，或者例如根据需要可以被提供为该模块的一个单独元件。

[0037] 图3示意性地示出了这种板的一个实例。图3提供了根据本发明的一个实施例的一个96节点热芯片模块的三维视图。热芯片模块300包括96个节点305。每个节点305具有一个圆形截面形状并且在顶部和底部均开放的，这样使得这些节点是圆柱体。这些节点305存在于节点限定板310中，该节点限定板是由例如如上所述的一种导热材料制成。该模块进一步包括一个加热器元件315以及流体冷却元件，该液体冷却元件是由一个冷却剂入口320和一个冷却剂出口330组成，该冷却剂入口被操作性地联接到一个头部入口歧管325上，该头部入口歧管进而被操作性地联接到一个冷却管阵列327，该冷却剂出口被操作性地联接到一个头部出口歧管335上。一个共用载液储器（未示出）位于该节点限定板310的下面，该共用载液储器由导管340流体联接到一个载液储器（未示出）上。其他元件安排也是可行的。在一些情况下，可能有益的是使加热元件定位成尽可能地靠近稳定特征，CLC典型地定位在这些稳定特

征中。因为应当控制的是CLC内的样品的温度,所以将加热元件定位成尽可能地靠近CLC可以降低能量消耗并且提高效率,同时还减少载液的蒸发。

[0038] 该模块可以被配置成允许完整的CLC光学询问,其中从一个检测器至一个CLC的视线通过该板来维持。光学检测方法包括但不限于荧光、吸光度、拉曼(Raman)、干涉测量法以及影相术。

[0039] 该热芯片模块还可以被操作性地联接到一个盖上,该盖的大小和形状被设定成与该模块或其一部分(例如节点限定板)配对,以便密闭这些节点以及容纳在其中的任何CLC。该盖可以是由一个自动致动器可打开和可关闭的,或者可以手动操作。该盖可以将载液密封到该器皿中以便抑制载液的蒸发。该盖可以抵靠该器皿进行部分密封,或者它可以是基本上气密的,从而维持一种压力密封。该盖对任何特别所希望的光波长可以是透明的,以便允许对CLC的电磁询问。根据需要,该盖中可以包括一个加热元件。该盖可以根据需要被热控制,这样使得该盖的温度可以被调节到一个希望值。

[0040] 液面控制系统

[0041] 如上所述,在一些实例中,这些热芯片模块包括一个共用的器皿,该器皿定位在一个节点限定板的下面以便在该节点限定板的每个节点的底部中提供一种共同的载液。在这类实施例中,该装置可以包括一个液面控制系统,该液面控制系统被配置成将一个或多个热芯片模块内的载液(例如油)高度维持在一个所希望的且确定的液面处。该液面控制系统是将每个节点的底部处的载液保持在该节点的底部上方一个所希望的(并且在一些实例中是已知的)高度处的系统。在一些实例中,该系统是将每个节点的底部处的载液保持在每个节点中相同的液面处、这样使得载液液面跨该装置中的一个或多个热芯片模块的所有节点一致的系统。在这些节点中将载液维持在一个共同的、一致的液面处会这些节点中的CLC维持在这些节点中的一个共同的位置处,从而促进对这些节点中的CLC进行自动化操纵。

[0042] 图4展示了适用于在此描述的具有两个热芯片模块的装置实施例中的一个液面控制系统的实施例。如图4所示,液面控制系统400包括热芯片模块440和450所共用的一个载液储器405,该载液储器被配置成由一个出口(410a,410b)流体连接到每个热芯片模块440和450上,该出口联接每个热芯片模块的载液入口(415a,415b)上。储器405中的载液液面由一个传感器420(诸如超声波传感器)进行监测。通过在储器405中将该载液液面维持在所希望的液面处,液体液面在这两个热芯片模块的这些节点中的每一个中也被维持在所希望的液面处。

[0043] 图4描绘的液面控制系统被配置成在共用储器405中准确地维持一个所希望的载液液面,并且由此在热芯片模块440和450的每个节点中准确地维持一个所希望的载液液面。在一个实例中,该液面控制系统包括如图5所描绘的一个流体安排。如图5所示,一种载液从供应瓶505被泵送到定位在热芯片模块540和550旁边的一个共用储器510,其中载液液面由一个超声波传感器进行监测。该载液从共用储器510重力供给到两个热芯片模块540和550中,并且储器510被填充或排空以便将液面维持在设定点的设定公差内,由此控制这些热芯片模块540和550的每个节点的底部中的液面。泵515具有变速控件,该变速控件允许该系统的快速装填并且允许降低速度以便将液面平稳地控制在设定点处。在图5所示的实施例中,泵515不是可逆的,因此使用两个3/2电磁阀520和525来在液面需要下降时通过将载液往回泵送到供应瓶505来使流动从储器510反向。

[0044] 板位置

[0045] 如上文概述的,在此描述的多个装置包括一个或多个板位置。虽然该装置中所存在的板位置的数目可以改变,但是在一些实例中,该装置包括1至10个、诸如2个至8个、例如6个板位置。该一个或多个板位置在该装置中可以按任何方便的方式来安排,其中在该装置包括多个板位置的一些实例中,该多个板位置例如相对于该装置的一个进入端口按一种纵向格式彼此邻近地安排,例如如图11所示。板位置是该装置的被配置成固持一个实验室板的区域或地点,该实验室板诸如一个多孔板(例如,96或384多孔板)或类似的结构(例如,试管夹或试管架)等。一个给定板位置可以是配置成固持一个实验室板的一个简单的载物台或支撑件。虽然这些板位置的尺寸可以改变,但是在一些实例中,这些板位置将具有被配置成与一个实验室板稳定地关联的一个平面表面,其中该平面表面可以具有在从10mm至400mm、诸如10mm至200mm的范围内的一个区域。该平面表面根据需要可以具有任何方便的形状,例如圆形、矩形(包括正方形)、三角形、椭圆形等。为了在一个板位置与一个研究板之间提供稳定关联,该板位置可以包括一个或多个稳定关联元件,例如夹子、对准柱等。

[0046] 在一些实例中,该板位置可以被热调节,这意味着该板位置的温度可以是可控的,例如以便控制与该板位置稳定地关联的一个研究板(及其内容物)的温度。可以采用任何方便的温度调节器来按一种所希望的方式控制该板位置的温度,其中可以采用的温度调节器包括上文结合热芯片模块所描述的那些。

[0047] 在一些实例中,一个给定板位置可以被配置成是被扰动的,即,该板位置是一个振动筛单元。这样,该板位置可以包括一个振荡器(例如,振荡器部件或振动筛部件)。虽然由振荡器部件提供的板位置的移动的频率可以改变,但是在一些实例中,该振荡器可以被配置成以在从1rpm至4000rpm、诸如50rpm至2500rpm的范围内的频率使该板位置在第一位置与第二位置之间移动,其中该第一位置与该第二位置之间的距离可以改变,并且在一些实例中,在从10mm至400mm、诸如25mm至100mm的范围内。

[0048] 如上文评论的,在一些实例中,该装置包括六个不同的板位置。虽然可以出于不同的目的而采用六个不同的板位置,但是在一些实施例中,该装置包括两个样品板位置,这些板位置被配置成固持盛放着核酸样品的多个实验室板。除了这两个样品板位置之外,该装置可以根据需要包括两个条形码板位置,这些条形码板位置被配置成固持盛放着标识符核酸试剂(例如,条形码试剂)的多个实验室板,在一些实例中,该标识符核酸试剂可以包括多个测序衔接子结构域。在这类装置中,振动筛单元板可以被配置成固持具有磁珠的一个实验室板,例如以供在一个纯化步骤中使用,诸如以下更详细地描述的。最终的板可以被配置成固持用于一旦产生最终文库产物就将其接收的一个或多个贮器。

[0049] 机器人控制的移液器

[0050] 如上文概述的,在此描述的多个装置包括一个机器人控制的移液器。该机器人控制的移液器是以下这样的单元:被配置成在该装置的不同位置之间(诸如该一个或多个板位置与该热芯片模块之间)转移液体和/或CLC。在广义上,该机器人移液器可以是能够在该装置的两个相异位置之间(诸如一个板位置与一个热芯片模块的一个节点之间)转移一定量的液体的任何移液单元。所考虑的机器人移液器是以下移液器:可以从该装置的一个第一位置(诸如一个实验室板的一个孔或者一个热芯片模块的一个节点)移走一个限定体积的液体,并且将该体积的液体沉积在该装置的第二位置处(例如,一个热芯片模块的一

个节点或者一个产物收集位置处)。虽然该移动器被配置成转移的液体的体积可以改变,但是在一些实例中,该体积是在从100n1至10ml、诸如100n1至1ml的范围内。

[0051] 在一些实例中,该机器人移液器是被配置用于分配一种水性液体的一个毛细管系统。这种毛细管系统可以包括一个毛细管,该毛细管具有限定毛细管或管腔的一个内表面。该管还可以具有一个外表面。该外表面可以是大体上圆柱形的,包括侧面、顶部以及底部。该内表面可以包括两个区域,一个远端计量区域和一个近端限制区域。该内表面的计量区域可以是基本上亲水性的,而该内表面的限制区域可以是基本上疏水性的。整个外表面也可以是疏水性的。

[0052] 当使该毛细管的一端(在此标记为远端)与一种水性样品相接触时,该样品通过毛细管作用被吸入到管腔中。但毛细管作用将仅在一定程度上起作用,即水性样品包含于该管腔的一个亲水性(即可润湿)区段内。当足够的水性样品被吸入到该管腔中以至于计量区域被完全填充时,毛细作用将停止吸入另外的样品液体,因为没有更多可润湿表面可供用于水性样品。以此方式,可以利用毛细管作用来精确地计量所希望量的水性液体。对于具有恒定截面面积的一个管腔,通过毛细作用被吸入的液体的体积将等于该计量区段的长度乘以该管腔的截面面积。

[0053] 在一些实施例中,可以如下构建该计量区域和该限制区域。可以用一种疏水性聚合物涂覆一定长度的毛细管道或完全由该疏水性聚合物形成该一定长度的毛细管道,该疏水性聚合物是例如一种氟碳聚合物,诸如聚四氟乙烯(PTFE)。然后使一种蚀刻溶液穿过该管的内部管腔,从而剥离PTFE表面附近的含氟原子的PTFE涂层。通过这个过程,氟原子典型地被剥离至几埃的深度。所得到的蚀刻PTFE表面是亲水性的。然后将该管洗涤并且定长切割以便形成具有所希望的内部体积的一个计量区域。然后将管道的该内部蚀刻的、内部亲水性区段附接到疏水性管道的一个区段上以便形成整个毛细管。在一些实施例中,聚合物诸如聚酰亚胺可以用于形成该毛细管。

[0054] 在一些实施例中,该毛细管是由一种玻璃衬底形成。玻璃是天然亲水性的,因此在衬底是玻璃而不是例如一种天然疏水性聚合物的情况下,表面处理不是形成该计量区域所必须的。该外表面和该限制区域可以通过用一种疏水性材料(诸如上文提及的聚合物)涂覆玻璃来形成。

[0055] 使该管的外表面,尤其是该管的远端具有疏水性的一种益处是水性样品将不会粘附到这种材料上。疏水性外表面因此保护该系统免于一种水性液体样品被来自一种不同的水性样品的液滴污染。将该管的远端插入到一种水性样品中将导致液体被吸入到亲水性计量区域中,但是不会粘附到疏水性区域上。

[0056] 除了一个毛细管之外,一个毛细管系统还可以包括与该管的近端处于流体联通的一个压力源。该压力源可以从任何方便的气体(例如空气)提供正压。施加正压可以用于驱使一种水性样品离开毛细管。发现最低正气压,在该最低正气压下,水性样品被完全驱逐出毛细管,并且在此之后可以准确且精确地进行控制。当存在并行使用的多个毛细管时,该正压可以均匀地分布。找出用于以下事项的最短时间:向毛细管施加正压以便允许所有水性样品被驱逐出,并且一旦水性样品被驱逐出毛细管就立即使压力平衡以便防止空气通过毛细管被吹出。然后可以使用所施加的正压和时间进行样品分配测试,其中对样品体积准确度和精确度、样品分裂和对CLC的干扰进行研究。之后调整正压和时间以便在这些参数内获

得对CLC而言最佳的样品分配。该系统还可以包括一个毛细管控制器,该毛细管控制器被编程来在所希望的时间施加正压,这样使得水性样品被分配在一个预定位置处。该位置可以例如是一个复合液体池的一个稳定部位,其中封装流体的一个等分试样可以准备接收水性样品。应当注意,虽然可以使用正压来将水性液体驱逐出管腔,但是不需要负压来将液体吸入到管腔中,因为液体是通过毛细管作用被吸入的。

[0057] 该毛细管系统还可以包括一个空气护套,该空气护套包括从外部向该毛细管施加的气流。外部施加的气流降低了一种水性样品将附接到任何外部亲水性区域上的可能性。

[0058] 该毛细管系统还可以包括一个致动器以便使该毛细管在多个位置之间移动。该致动器可以由毛细管控制器控制,该毛细管控制器可以被编程来致使该致动器使该管移动。一种典型的程序可以首先使该管的远端移动成与一种水性样品相接触,以便将该水性样品吸入到该管中,然后移动毛细管,这样使得该远端邻近一个分配位置,诸如一个稳定特征或一个现有复合液体池(下文称为“CLC”),并且最后将足够的正压施加到该管的近端上以便使该水性样品从该管的远端喷出。

[0059] 虽然毛细管的尺寸可以变化,但是在一个实施例中,毛细管的内径是约200 μm 至250 μm 诸如221 μm 或230 μm ,并且外径是约800 μm 。可以选择任何体积的水性溶液来被吸入到该系统中。特定毛细管可以被设计成吸入从约10纳升至约10000纳升,诸如500纳升。

[0060] 在另一个实施例中,对于来自单个控制器的多毛细管计量——具有包括单个远端计量区域的内表面的多个毛细管被安排在一个空腔内,由此提供一个限制区域。

[0061] 在另一个实施例中,压力控制器可变地控制毛细管计量体积。按一个给定长度切割该处理的管,并且基于该管的半径,这之后给出一个设定最大体积。远端计量区域内的体积是使用组件内的气压来进行控制。该气压用于分配,然而在这个实施例中,在毛细管内维持一个受控的恒定压力——由此提供亲水性远端计量区域内的体积控制。这是通过以下方式来实现的:对于一个给定体积,使压力与毛细作用力平衡。流体将毛细作用至一定高度,该高度由压力匹配。改变压力,则体积改变。对于一种给定流体和管半径,这都在总毛细高度内。

[0062] 在另一个实施例中,一个毛细管计量系统可以包括多个毛细管。所有毛细管的近端可以与单个压力导管处于流体联通,并且该压力导管与压力源处于流体联通。以此方式,单个压力源可以用于施加单个正压以便从所有多个毛细管同时分配液体。类似地,单个压力源可以施加单个正压以便平衡所有多个毛细管中的毛细作用力。在这类实施例中,该多个毛细管可以存在于一个头部子单元中,该头部子单元包括用于该多个毛细管的一个支架。一个头部子单元中毛细管的数目可以改变,其中在一些实例中,该数目是在从12至768、诸如24至384、例如24至96、包括24至48的范围内。这些毛细管在该头部子单元中可以被安排成使得当该头部被定位在一个实验室板(例如,存在于该装置的一个板位置上的实验室板)上方时,多个管容易与一个实验室板的多个孔对准。

[0063] 关于该装置中可以采用的毛细管移液系统的其他细节在公布为W02014/08345的PCT申请序列号PCT/IB2013/003145中提供;该申请的披露内容通过引用结合在此。

[0064] 所考虑的是被进一步配置用于例如按CLC介导的NGS文库产生方案制造和处理CLC的机器人移液系统。在这类实施例中,移液系统可以包括与美国专利号8,465,707中详细描述的部位相同的一个CLC形成部件,该申请的披露内容通过引用结合在此。如所描述的,一

个CLC形成系统可以包括一个样品液体输入端、一个封装液体输入端、一个移液系统、以及可操作地连接到该移液系统上的一个池形成控制器。该池形成控制器可以被编程来致使该移液系统：(1)从该封装液体输入端吸取一种封装液体；(2)将所吸取的封装液体(a)排出到位于一个热芯片模块的一个节点的底部处的一种载液的一个自由表面上，该封装液体是与该载液不可混溶的，这样使得所排出的封装液体不与该载液混合，而是漂浮在该载液的顶部上；(3)从定位在一个板位置处的一个研究板的孔吸取一种样品液体；并且(4)以一种非接触方式将所吸取的样品液体排出到该节点中(该样品液体是与该封装液体和该载液不可混溶的)，这样使得该样品液体不与该封装液体或与该载液混合。在这种系统中，毛细管系统和可重复使用的板可以相对于彼此定位，这样使得致动器能够使毛细管移动到该节点的一个分配位置。这将允许该毛细管将例如一种试剂分配到一个现有CLC中，或使样品材料沉积在例如该节点的一个稳定特征处，以便形成一个CLC。相关地，该毛细管系统同时可以是该CLC形成系统的移液系统。同样，池形成控制器和毛细管控制器可以是单个控制器。

[0065] 在一些实例中，机器人移液器包括一个移动件，该移动件可以被选择性地、操作性地联接到多个相异的可互换液体操纵器头部(例如像上述的毛细管头部)上。在这类实施例中，该移动件可以与来自一批两个或更多个液体操纵器头部的一个液体操纵器头部联接和分离，这样使得这些液体操纵器头部是与该移动件可互换的(即，可以彼此替代)。在移动件在使用时向液体操纵器头部提供负压的情况下，当该头部被联接到该移动件上时，联接构型允许负压被联接到该头部的这些液体操纵器(例如，毛细管)上。该装置中的可互换液体操纵器头部的数目可以改变，在一些实例中，在从2个至6个、诸如2个至4个的范围内。这类可互换液体操纵器头部的功能也可以改变，其中在一些实例中，该装置包括被配置用于样品分配、条形码分配、试剂分配、真空和纯化任务的多个可互换液体操纵器头部。这些可互换头部可以被操作性地联接到的移动件是该装置的被配置成在该装置的两个或更多个位置之间移动一个可互换头部的一个子单元。该移动件可以是一个机器人臂或者被配置成在该装置中的X方向和/或Y方向和/或Z方向上移动一个给定可互换头部的其他方便的结构。

[0066] 散装试剂分配器

[0067] 如上文概述的，在此描述的多个装置包括一个散装试剂分配器。该散装试剂分配器是一个自动化试剂分配器，该自动化试剂分配器被配置成将计量体积的一种试剂组合物(例如，一种液体试剂组合物)沉积到该热芯片模块的这些节点中。在一些实例中，该散装试剂分配器被配置成将计量体积的试剂组合物(例如，聚合酶、核苷酸混合物、引物、衔接子、缓冲剂、连接酶等)沉积到一个热芯片模块的每个节点中，这样使得该试剂组合物能够例如通过将一个试剂分配器(诸如液体试剂分配器)单独引入到一个热芯片模块的不同节点中来接入该热芯片模块的每个节点。在一些实例中，该散装试剂分配器包括一个试剂计量单元(诸如液体试剂计量单元)，该试剂计量单元由一个自动化移动臂(例如，被配置成在X方向和/或Y方向和/或Z方向上移动的一个臂)操作性地联接到一个散装试剂源(诸如，例如存在于一个盒中的一个液体试剂储器)上。在一些实例中，该散装试剂分配器被配置成能够以一种非接触微流体分配方式(例如，通过将一定量的一种试剂组合物滴到一个节点中的一个CLC上)来将计量的量的试剂组合物引入到该节点以及存在于其中的任何CLC中，这样使得该试剂组合物与该节点中的CLC融合。

[0068] 流体模块

[0069] 在此描述的多个装置可以包括一个流体模块,该流体模块包括用于例如系统流体、废物收集等的一个或多个液体储器。所考虑的系统流体包括但不限于洗涤液、洗脱液等。在希望的情况下,该废物收集储器被操作性地联接到单个废物排出口上。

[0070] 另外方面

[0071] 在此描述的多个装置可以被配置成在一次给定文库制备运行开始之后的一个短时间段内自动地产生大量文库。在一些实例中,这些装置可以被配置成同时产生的文库样品的数目是在从1个至1000个、诸如8个至768个、例如96个、192个、384个或768个文库的范围内。虽然产生这类文库所需的时间量可以改变,但是在一些实例中,该时间量是在从1小时至48小时、诸如2小时至36小时、例如6小时的范围内。

[0072] 为了促进试剂移动和装置设置,该装置可以包括一个控制处理器,该控制处理器与一个手持式唯一标识符(例如条形码)扫描器处于操作性通信,该扫描器可以由一个有线或无线通信协议与该处理器通信。这类实施例可以用于将关于实验室板和/或试剂源的标识信息上传到该装置的控制处理器中,以便将该装置配置成自动地执行一个文库制备方案。

具体实施方式

[0073] 图6至图11描绘了根据本发明的一种文库制备装置的一个具体实施例。图6提供了装置600的全视图。装置600是紧凑的,深约0.805m、长1.54m长且高0.885m,并且重量小于500kg或更小、诸如300kg或更小、包括180kg或更小。该系统被设计成经由一个邻近台面上的一个典型的Windows个人计算机上的一个用户界面进行控制。图6所示的装置被配置成使用一个复合液体池(CLC)介导的方案来创建DNA文库。该装置被配置成使用多个CLC在约6小时内创建768个文库;以24个样品的最小样品数进行操作;以24的倍数递送样品和条形码;并且对于更低数目,能够使用一个替代缓冲剂来确保该系统的有效操作。

[0074] 如图6所示,装置600包括一个主甲板605,处理步骤在该主甲板中执行,该主甲板是经由一个检修门610可接入的。用户对该主甲板的接入是经由互锁的一个用户操作的罩(检修门610)来达到。装置600还包括位于主甲板605下面的一个服务甲板(未示出),外围硬件位于该服务甲板中并且该服务甲板是经由一个服务抽屉620可接近的。检修门610是通透的或透明的,以便允许在门关闭的情况下在使用过程中对该装置及其主甲板605的内部进行检查。图7提供了装置600的视图,其中门610在打开位置中,从而允许介入主甲板605。系统外壳具有有效的内部-外部空气交换。

[0075] 图8提供了主甲板605以及该装置位于该主甲板上的部件的详细视图。如图8所示,以下子部件存在于主甲板605上:(a)两个独立控制的384节点热芯片模块805和810,其中每个模块的设计是基于一个384孔微滴定板的SBS格式;(b)两个机械致动的盖815和820,它们各自用于每个384热芯片模块(其中每个盖是热控的且是气动致动的);(c)诸如以上所述的一个液面控制系统825,该液面控制系统被配置成维持热芯片模块805和810内的这些节点内的载油高度;(d)单个散装试剂分配器830,该散装试剂分配器能够(即,被配置用于)接入这些热芯片模块805和810中的每一个的所有节点;以及(d)六个热控的板位置841至846。

[0076] 散装试剂分配器830被配置成在该方案内的适当点处接入每个384热芯片模块805、810的所有节点并且分配不同试剂,诸如一种核苷酸混合物(例如,来自基因细胞生物

系统有限公司(GenCell Biosystem)的预混合液)、引物集合体(例如,一个引物池,该池可以结合或不结合衔接子序列)、酶类(例如,聚合酶、FuPa、连接酶、以及的其他分子试剂),如下更详细地描述的。散装试剂分配器830被设计成容纳被装载到该分配单元上的一个或多个有条形码的“试剂盒”850。该散装试剂分配器被配置成容纳一个单独地有条形码的“洗盒”,该洗盒在一个给定方案过程中的适当时候与“试剂盒”互换。这些盒是与标准实验室管兼容的。多个盒条形码具有分离码以便在试剂盒与洗盒之间进行标识。试剂盒的设计是以下这样的:该盒上的这些试剂位置可以被颜色编码和/或编号以便匹配相应微量离心机管。该盒具有多个定位特征以便确保正确地装载到该分配单元上。

[0077] 如上文提及的,该装置包括6个板位置:其中的两个(841,842)是样品源位置,其中的两个(843,844)是条形码源位置,其中的一个(845)被配置成接收文库产物(即,固持产物贮器)并且其中的一个(846)是一个振动筛单元(虽然图6所示的装置具有这种板布局构型,但是本发明也包含其他构型,例如3个样品板、1个条形码板、1个振动筛单元以及1个贮器板等。)样品板841和842、珠/洗脱板846、条形码(即,索引)板843和844以及文库收集板846是与标准实验室板兼容的。用于样品收集器皿的一个任意的收集容器可以采用标准实验室5ml管。用于DNA、条形码(即,索引)、珠和洗脱缓冲剂的多个源板可以被安装在多个热控的板位置单元上。如图所示,存在用于x4个源板、x1个振动筛板、x1个文库收集板/器皿的容量。这些热控的板位置可以具有可互换的适配器以便促进该主甲板上的替代板布局。多个源板可以在纵向视图中取向,例如如图11所示。多个源板可以被装载成使得A1孔位于如图11所查看的左下角。多个源板可以是有1D和/或2D条形码的,并且可以在运行设置过程中当由系统软件提示时由用户手动地扫描。多个板位置可以被颜色编码以便协助用户装载。在一些实例中,用户在设置过程中需要扫描多个源板、分配盒、汇集收集器皿。为了手动地输入运行细节,一个空白模版可以与自动填充选项一起使用,以便迅速地填入信息以用于稍后编辑。

[0078] 还示出了是由多个可互换头部(未示出)可接入的一个毛细管真空干燥单元860。

[0079] 还示出了洗涤台870,该洗涤台包括洗涤溶液储器,由此流体从分离定位的瓶以及由用户填充和更换的一个小的洗涤溶液储器被泵送到每个储器。该系统进一步包括一个废物排出口,所有流体废物在该废物排出口处被泵送到一个分离定位的储器瓶。包含洗涤液的多个洗槽可以由来自主甲板605的适当头部可接入的。多个洗槽可以自动地从一个分离定位的瓶被馈送。多个洗瓶可以盛放足够用于在该系统上运行一次的流体。多个洗瓶可以被颜色编码以便协助用户装载并避免错误。

[0080] 图9提供了该装置的移液器部件的详细视图。如图9所示,机器人地且气动地控制的移液器900包括一个台架(gantry)910,该台架被配置成与多个相异移液头部可逆地、可操作地连接(即,接合)和脱离接合,并且在该装置的不同位置之间移动这类头部。虽然以下结合一种特定类型的液体转移(例如,样品或条形码)描述了这些头部,但是它们的功能并不受限,因为这些头部是可互换的并且可以根据需要被用于在该装置内进行任何液体转移。确切地,移液器900包括一个机器人改变工具920,该机器人改变工具被配置成可操作地且可逆地将台架910接合到以下各项中的每一项上:(a)用于样品分配的一个样品毛细管计量头部930(该样品毛细管计量头部被配置成将来自一个板位置上的一个实验室板中的多个孔的多个体积的样品转移到一个热芯片模块的多个节点,并且经由一个非接触方案将这

种样品沉积到一个CLC中);(b)用于条形码分配的一个条形码毛细管计量头部940(该条形码毛细管计量头部被配置成将来自一个板位置上的一个实验室板中的多个孔的多个体积的条形码试剂液体转移到一个热芯片模块的多个节点,并且经由一个非接触方案将这种条形码试剂液体沉积到一个CLC中);(c)一个真空头部950(该真空头部可以用于多种目的,例如用于从这些节点移除所不想要的物项,在其中一个清洁程序可以运行并且真空移除浪费掉的任何洗涤缓冲剂的热芯片重置时,在每次运行结束时用于移除该热芯片的这些节点中的任何封装油或水性残余物);以及(d)用于CLC沉降、纯化、洗涤和汇集任务的一个纯化头部960(该纯化头部被配置成从该振动筛单元获得多个磁珠;将这些珠分配到该热芯片模块的多个节点中;从这些节点取回具有结合到其上的核酸产物的珠,并且纯化这些珠上的核酸产物)。

[0081] 图10提供了装置600的服务甲板1000的视图,该服务甲板是经由服务门620可接入的。如图10所示,服务甲板1000包括一个AC面板1005、一个DC面板1010、一个机器人电机控制器1015、一个空气制备模块1020以及一个气动控制器1025。服务甲板1000被安装在一个可移动抽屉上以用于故障查找和预防性维护接入,并且从该系统的前面向外移动。

[0082] 图11提供了装置600的主甲板605的顶视图,该顶视图示出了主甲板605上的不同部件的布局。如图11所示,主甲板605包括6个板位置,即,两个样品板位置(641和642);两个条形码板位置(643和644);一个文库收集板644以及一个磁珠/振动筛单元板645。还示出了两个热芯片模块(805,810);散装试剂分配器830、洗涤台870、以及移液器900的可互换头部920至960。多个导轨1110和1120被配置成允许移液器台架910在X方向上跨主甲板605移动。

[0083] 装置600进一步包括一个手持式条形码扫描器(未示出),该手持式条形码扫描器被配置成执行运行设置和信息跟踪。装置600进一步包括一个外部定位的流体模块(未示出),该外部定位的流体模块收容供应系统流体:CLC封装油、CLC载油、以及洗涤液的储器瓶。位置保持器(Placeholder)可以被颜色编码或编号以便协助用户设置并避免错误。多个瓶储器可以具有快连式连接。多个瓶可以具有足够完成单次系统运行的最小容纳体积。

[0084] NGS文库制备的方法

[0085] 本发明的多个方面包括通过按例如如上所述的一个CLC介导的文库制备方案使用本发明的一个装置来从一个初始核酸样品产生下一代测序(NGS)文库的多种方法。可以采用本发明的这些装置来产生适用于在多种不同的NGS平台中进行测序的NGS文库,这些NGS平台包括但不限于:来自Illumina®的HiSeq™、MiSeq™、以及Genome Analyzer™测序系统;来自Ion Torrent™的Ion PGM™和Ion Proton™测序系统;来自太平洋生物科学公司(Pacific Biosciences)的PACBIO RS II测序系统、来自Life Technologies™的SOLiD测序系统、来自罗氏企业(Roche)的454GS FLX+和GS Junior测序系统、或者任何其他所考虑的测序平台。

[0086] 在制备一个NGS文库时,首先提供有待从其制备文库的一个核酸样品。可以采用任何方便的核酸样品制备方法。核酸样品制备可以包括使一个初始核酸源样品片段化,以便产生由具有适合利用一个给定NGS测序平台进行测序的大小的核酸片段组成的一个片段化核酸样品。所考虑的源核酸包括但不限于:脱氧核糖核酸,例如基因组DNA、互补DNA(或者由任何所考虑的RNA或DNA合成的“cDNA”)、重组DNA(例如,质粒DNA);核糖核酸,例如信使RNA(mRNA)、微RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)、反式作用小干扰RNA(ta-siRNA)、天然小干扰

RNA(nat-siRNA)、核糖体RNA(rRNA)、转移RNA(tRNA)、核仁小RNA(snoRNA)、核内小RNA(snRNA)、长链非编码RNA(lncRNA)、非编码RNA(ncRNA)、转移信使RNA(tmRNA)、前体信使RNA(pre-mRNA)、小卡哈尔氏体特异性RNA(scaRNA)、piwi相互作用RNA(piRNA)、内切核糖核酸酶制备的siRNA(esiRNA)、时序小RNA(stRNA)、信号识别RNA、端粒RNA、核酶;等。

[0087] 多种源核酸可以使用任何方便的方案来片段化,例如,使样品通过一个微量加液器尖端或细计量注射针一次或多次;使样品雾化;对样品进行超声处理(例如;使用科瓦里斯股份有限公司(Covaris, Inc.)(马萨诸塞州沃本市(Woburn, MA))的聚焦超声发生器);珠介导剪切;酶促剪切(例如,使用一种或多种RNA剪切酶);基于化学品的片段化(例如,使用二价阳离子、片段化缓冲液(该片段化缓冲液可以结合热量使用));或者用于对一个初始核酸进行剪切/片段化以便生成适合于NGS文库制备的更短的模板核酸的任何其他适合途径。在某些方面中,视所选择的测序平台的需要,由对一个起始核酸样品进行剪切/片段化而生成的模板核酸具有以下长度:例如,从10个至20个核苷酸、从20个至30个核苷酸、从30个至40个核苷酸、从40个至50个核苷酸、从50个至60个核苷酸、从60个至70个核苷酸、从70个至80个核苷酸、从80个至90个核苷酸、从90个至100个核苷酸、从100个至150个核苷酸、从150个至200个核苷酸、从200个至250个核苷酸、或者从200个至1000个核苷酸、或者甚至从1000个至10000个核苷酸。

[0088] 一旦制备好,就将核酸样品连同有待在该装置的一次给定运行中从其制备一个NGS文库的任何其他样品放置到一个样品板的一个孔或类似的容器中,并且例如通过通向该装置的主甲板的一扇打开的检修门来将其定位在该装置的一个样品板位置上。该装置还装载有一个或多个实验室板,该一个或多个实验室板包括样品标识核酸(即,条形码)、纯化磁珠、文库产物贮器(例如,被配置成维持单独的产物文库或汇集两个或更多个不同的产物文库)、散装试剂液体、洗涤和纯化流体、CLC液体等。另外,可以例如通过使用一个自动化方案(诸如使用一个手持式条形码扫描器)或者经由一个适当用户界面手动地等等来将关于一次给定运行的控制指令和数据输入到该装置中。多个控制指令可以包括有待运行的样品的数目,该数目可以使用任何方便的方案输入,例如经由手动键入的用户数据或者一个预先生成的.csv文件。有待输入的信息可以进一步包括样品的数目和样品的位置。该装置可以包括一个主用户界面。在希望的情况下,该主用户界面提供以下运行状态信息的反馈:示出正由该移液器执行的当前动作的该主甲板的一个动画图形表示;用于每个芯片的指示其在整个方案过程中的进度的一个状态指示器;到总运行完成的一个倒数计时器,准确到 ± 10 min;用于每个芯片的一个反馈面板,该反馈面板将示出有关正执行的当前任务的信息,即,热信息、曼提斯(mantis)分配操作、以及载油液面状态;一个警告和错误面板,其中将显示由软件标记的任何问题。该装置可以进一步包括一个网页服务部件,该网页服务部件例如被配置成监测状态并且生成有待在发生严重错误的情况下发送的一封电子邮件。该系统还可以被配置成产生一个输出文件:例如,该输出文件可以包括一个编条形码文件和一个板定义文件,其中这类文件可以任选地被混合成一个。运行日志文件夹的名称可以被包括在该输出文件以及所运行的方案中。多个运行日志可以被编号以便保持它们有序。该装置可以被配置成在设置过程中引导用户。例如,在运行设置过程中,用户可以被引导通过盒装载序列并且被提示在适当时候扫描盒条形码。该系统的软件可以包括用于散装分配芯片对准的一个特定的简单且集成的子程序。当用户被要求键入信息时,该系统可以提示用户从

一个下拉列表内的数个预定义选项中选择,而不是自由地键入信息。在装置设置(包括关闭任何打开的检修门或其他打开的部件)之后,该装置准备好执行一个自动化CLC介导的文库制备方案。

[0089] 这样,一旦该装置装载有一个或多个核酸样品并且被配置用于一个给定NGS文库产生运行,运行就开始。在运行过程中,该装置首先在该或这些热芯片模块的这些节点中产生多个CLC,例如通过使用该机器人移液器的纯化头部将适合体积的封装液体放置在该或这些热芯片模块的这些节点中。接着,用该机器人移液器的样品转移头部替换该纯化头部,并且采用该样品转移头部来将适合体积(例如100n1至1ml)的核酸样品从一个样品板的一个或多个孔转移到该热芯片模块的其中具有一定体积的封装液体的一个或多个节点。该样品转移头部使用一个非接触微流体分配方案以足以产生具有一个样品核心的一个CLC的方式将一定体积的核酸样品沉积到该节点中。关于可以由该装置采用的CLC产生方法的多个细节在美国专利号8,465,707中得到进一步描述,该专利的披露内容通过引用结合在此。

[0090] 当在该或这些热芯片模块中产生含有样品的一个或多个CLC节点之后,该散装试剂分配器将共同试剂分配到含有CLC的每个节点中。可以由该散装试剂分配器分配到不同节点中的共同试剂包括但不限于:dNTP(例如,呈预混合液的形式)、酶类(例如,聚合酶、引物、平台特定的测序衔接子(这些平台特定的测序衔接子可以与或不与引物整合))等。该散装试剂分配器可以采用一个非接触微流体分配方案以便向这些CLC添加这些试剂。可以按顺序添加每种试剂,或者可以根据需要,预混两种或更多种试剂并且将其添加到这些CLC。在由该散装试剂分配器向这些节点中的这些CLC添加了试剂之后,可以根据一个给定文库制备方案的需要,使这些热芯片模块经历温度调节,例如以热循环的形式。

[0091] 接着,可以向这些节点添加样品标识符(例如,核酸条形码)以便通过样品源唯一地标识这些CLC。在这个步骤中,该机器人移液器将样品分配头部换成条形码分配头部。该条形码分配头部被采用来将一定体积的条形码试剂从一个条形码板的一个孔转移到该热芯片模块的具有存在于其中的一个含有样品的CLC的一个节点。该条形码转移头部使用一个非接触微流体分配方案以足以产生具有包括一个核酸条形码的一个样品核心的一个CLC的方式来将一定体积的条形码试剂沉积到该节点中。

[0092] 该散装试剂分配器接着将连接酶分配到含有CLC的每个节点中。该散装试剂分配器可以采用一个非接触微流体分配方案以便向这些CLC添加连接酶。在由该散装试剂分配器向这些节点中的这些CLC添加了连接酶之后,可以根据需要使这些热芯片模块经历热循环,例如,以便将这些条形码连接到这些CLC中的核酸扩增子上并且由此在CLC中产生有条形码的核酸扩增子。

[0093] 当在这些热芯片模块的这些节点的这些CLC中产生有条形码的核酸扩增子之后,可以对所得到的有条形码的核酸扩增子进行纯化以便产生适于供在一个NGS测序方案中使用的一个产物NGS文库。虽然所得到的有条形码的扩增子可以使用任何方便的方案来纯化,但是在一些实例中,采用了一个基于磁珠的纯化方案。在这种方案中,用该机器人移液器的纯化头部替换条形码分配头部,并且采用该纯化头部来将一个适合量的磁珠(例如,100n1至1ml)从存在于振动筛单元板位置上的含有珠的一个实验室板的一个头部的一个或多个孔转移到该热芯片模块的一个或多个节点。该纯化头部使用一个非接触微流体分配方案以一种足以产生包括磁珠的一个CLC的方式将一定量的磁珠沉积到该节点中。这些珠被配置

成例如经由彼此杂交的互补核酸结构域来特异性结合到该CLC中的有条形码的核酸扩增子上。在使有条形码的核酸扩增子特异性结合到这些珠上的一个适合的时间段之后,使用该纯化头部从这些热芯片模块的这些节点取回结合了含有核酸的CLC的珠,并且将这些珠移动到该装置的一个适合的纯化位置。一旦位于该装置的纯化位置处,就对结合了珠的有条形码的核酸扩增子进行洗涤,并且接着使用一个测序流体接触方案来使其与这些珠分离。在这种方案中,首先例如通过将该纯化头部的一个导管定位在一个磁场附近来使这些磁珠在该导管的一个位置(例如,一个内表面)处固定不动。接着,使一种洗液流过这些固定不动的珠,这将CLC封装流体和其他未结合珠的实体从这些固定不动的珠移除。在洗涤之后,可以通过使一种适合的洗脱液流过这些固定不动的珠来将结合了珠的核酸扩增子从这些珠释放。接着可以将所得到的释放的有条形码的核酸扩增子收集(包括汇集)到定位在贮器板位置上的适合的贮器中,并且接着准备好供在一个NGS测序方案中使用。关于可以由该装置采用的基于磁珠/导管的纯化方案的细节在公布为WO 2014/207577的PCT申请序列号PCT/IB2014/002159中得到进一步描述;该申请的披露内容通过引用结合在此。

[0094] 接着可以根据需要使用任何方便的NGS测序平台对所得到的产物NGS文库进行测序,这些测序平台包括:来自Illumina®的HiSeq™、MiSeq™以及Genome Analyzer™测序系统;来自Ion Torrent™的Ion PGM™和Ion Proton™测序系统;来自太平洋生物科学公司(Pacific Biosciences)的PACBIO RS II测序系统;来自Life Technologies™的SOLiD测序系统;来自罗氏企业的454GS FLX+和GS Junior测序系统;或者任何其他方便的测序平台。

[0095] 计算机控制器

[0096] 本披露的多个方面进一步包括用于操作这些装置的计算机控制器,其中这些控制器进一步包括用于使如在此描述的一个装置完全自动化或部分自动化的一个或多个计算机元件。在一些实施例中,这些控制器包括一个计算机,该计算机具有其上存储有一个计算机程序的一个计算机可读存储介质,其中该计算机程序在被加载到该计算机上时包括用于致动该装置以执行例如如上所述的一个CLC介导的NGS文库产生方案的指令。

[0097] 在多个实施例中,该控制器包括一个输入模块、一个处理模块以及一个输出模块。所考虑的处理模块可以包括被配置并且自动化成实现例如如上所述的装置的一个或多个例程的一个或多个处理器。例如,处理模块可以包括被配置并且自动化成产生一个NGS文库的两个或更多个处理器、诸如三个或更多个处理器、诸如四个或更多个处理器、并且包括五个或更多个处理器。如上所述,每个处理器包括具有用于执行本发明方法的这些步骤的多个指令的存储器。

[0098] 这些控制器可以包括硬件部件和软件部件两者,其中这些硬件部件可以采取一个或多个平台的形式,这样使得功能元件、即控制器的实行该控制器的特定任务(诸如管理信息的输入和输出、处理信息等)的那些元件可以通过在代表该系统的一个或多个计算机平台上并且跨越该一个或多个计算机平台执行软件应用来实行。

[0099] 多个控制器可以包括一个显示和操作者输入装置。操作者输入装置可以例如是一个键盘、鼠标或类似装置。该处理模块包括可访问存储器的一个处理器,该存储器具有存储在其上的用于执行本发明方法的这些步骤的指令。该处理模块可以包括一个操作系统、一个图形用户界面(GUI)控制器、一个系统存储器、存储器存储装置和输入-输出控制器、高速缓冲存储器、一个数据备份单元以及许多其他装置。该处理器可以是可商购处理器,或该处

理器可以是可获得或将变得可获得的其他处理器中的一种。该处理器执行该操作系统并且该操作系统以众所周知的方式与固件和硬件对接,并且有助于该处理器协调和执行可以用各种编程语言来编写的不同计算机程序的功能,这些编程语言如Java、Perl、C++、其他高级或低级语言以及其组合,如本领域中所已知的。该操作系统典型地与该处理器配合来协调和执行计算机的其他部件的功能。该操作系统还提供调度、输入-输出控制、文档和数据管理、存储器管理以及通信控制和相关的服务,所有这些都是根据已知的技术。

[0100] 系统存储器可以是多种已知的或未来的存储器存储装置中的任何一种。实例包括任何通常可获得的随机存取存储器(RAM)、磁介质诸如常驻硬盘或磁带、光学介质诸如读写压光盘、快闪式存储器装置、或其他存储器存储装置。该存储器存储装置可以是多种已知的或未来的装置中的任何一种,包括光盘驱动器、磁带驱动器、可移动硬盘驱动器或盘片驱动器。这种类型的存储器存储装置典型地从一个程序存储介质(未示出)中读取和/或写入该程序存储介质,诸如对应地光盘、磁带、可移动硬盘或软盘片。任何这些程序存储介质或现在使用的或以后可能开发出的其他程序存储介质可以被认为是一种计算机程序产品。如将了解的是,这些程序存储介质典型地存储一种计算机软件程序和/或数据。计算机软件程序(又称为计算机控制逻辑)典型地被存储在系统存储器和/或结合存储器存储装置使用的程序存储装置中。

[0101] 在一些实施例中,一个计算机程序产品被描述包括计算机可使用介质,该计算机可使用介质具有存储在其中的控制逻辑(计算机软件程序,包括程序代码)。当由计算机的处理器执行时,该控制逻辑引起该处理器执行在此描述的功能。在其他实施例中,一些功能是使用例如一个硬件状态机来主要在硬件中实施。实施该硬件状态机以便执行在此描述的功能对于相关领域中的技术人员而言将是清楚的。

[0102] 存储器可以是其中该处理器可以存储和检索数据的任何适合的装置,诸如磁、光学或固态存储装置(包括磁盘或光盘或磁带或RAM,或任何其他适合的装置,或者固定式或者便携式)。该处理器可以包括从携带必要程序代码的一个计算机可读介质适当编程的通用数字微处理器。编程可以通过一个通信通道来远程提供给处理器,或编程先前保存在一种计算机程序产品中,诸如存储器或使用与存储器相关的任何那些装置的一些其他便携式或固定式计算机可读存储介质。例如,磁盘或光盘可以携带编程,并且可以由盘写入器/读取器来读取。本发明的系统还包括例如呈计算机程序产品、用于实践如上所述的方法的算法的形式的编程。根据本发明的编程可以被记录在计算机可读介质上,例如可以由计算机直接读取和访问的任何介质。此类介质包括,但不限于:磁存储介质,诸如软盘、硬盘存储介质和磁带;光学存储介质,诸如CD-ROM;电存储介质,诸如RAM和ROM;便携式闪存驱动器;以及这些分类的混杂体,诸如磁/光学存储介质。

[0103] 该处理器也可以访问一个通信通道以便与远程位置处的用户通信。远程位置意指用户不直接与该系统接触并且从一个外部装置将输入信息转播至一个输入管理器,该外部装置诸如连接到广域网(“WAN”)、电话网络、卫星网络或任何其他适合的通信通道上的计算机,包括移动电话(即,智能手机)。

[0104] 在一些实施例中,根据本披露的控制器可以被配置成包括一个通信接口。在一些实施例中,该通信接口包括用于与一个网络和/或另一个装置通信的一个接收器和/或发送器。该通信接口可以被配置用于有线或无线通信,包括但不限于:射频(RF)通信(例如,射频

标识(RFID)、Zigbee通信协议、WiFi、红外、无线通用串行总线(USB)、超宽带(UWB)、Bluetooth®通信协议、以及蜂窝通信,诸如码分多址(CDMA)或全球移动通信系统(GSM)。

[0105] 输出控制器可以包括用于多种已知的用于向用户呈现信息的显示装置中的任何一种的控制器,无论是人还是机器,无论是本地还是远程。如果这些显示装置中的一种提供可视信息,这种信息典型地可以被逻辑地和/或物理地组织为图片元素的阵列。图形用户界面(GUI)控制器可以包括用于在该系统与用户之间提供图形输入输出接口并且用于处理用户输入的多种已知的或未来的软件程序中的任何一种。计算机的功能元件可以经由系统总线彼此通信。在替代实施例中,这些通信中的一些可以使用网络或其他类型的远程通信实现。根据已知的技术,输出管理器还可以通过例如互联网、电话或卫星网络向位于远程位置处的用户提供由处理模块产生的信息。由输出管理器对数据的呈现可以根据多种已知的技术来实施。在一些实例中,数据可以包括SQL、HTML或XML文件、电子邮件或其他文档,或呈其他形式的数据。该数据可以包括互联网URL地址,这样使得用户可以从远程来源中检索另外的SQL、HTML、XML或其他文件或数据。存在于本发明系统中的一个或多个平台可以是任何类型的已知的计算机平台或未来有待开发出的一种类型的计算机平台,尽管它们典型地将属于通常称为服务器的一类计算机。然而,这些平台也可以是大型计算机、工作站或其他计算机类型。这些平台可以经由任何已知的或未来的类型的电缆敷设或包括无线系统的其他通信系统来连接,或者经互联网或者以另外的方式。这些平台可以是共同定位的或这些平台可以是物理上分离的。可能取决于所选择的计算机平台的类型和/或配置,可以在任何计算机平台上采用不同操作系统。适当的操作系统包括Windows NT®、Windows XP、Windows 7、Windows 8、iOS、Sun Solaris、Linux、OS/400、Compaq Tru64Unix、SGI IRIX、Siemens Reliant Unix以及其他操作系统。

[0106] 尽管为附加条款,在此提出的披露内容也由以下条款限定:

[0107] 1. 一种完整的核酸文库制备装置,该装置包括:

[0108] 一个热芯片模块,该热芯片模块包括多个节点;

[0109] 一个板位置;

[0110] 一个机器人控制的移液器,该移液器被配置成在该板位置与该热芯片模块之间转移液体;

[0111] 一个散装试剂分配器,该散装试剂分配器被配置成接入该热芯片模块的每个节点。

[0112] 2. 根据条款1所述的装置,其中该装置包括单个热芯片模块。

[0113] 3. 根据条款1所述的装置,其中该装置包括仅两个热芯片模块。

[0114] 4. 根据条款1至3中任一项所述的装置,其中每个热芯片模块包括384个节点。

[0115] 5. 根据条款1至4中任一项所述的装置,其中该装置包括用于每个热芯片模块的一个机械致动的盖。

[0116] 6. 根据条款1至5中任一项所述的装置,其中这些板位置中的一个是一个振动筛单元。

[0117] 7. 根据条款1至6中任一项所述的装置,其中该装置包括六个板位置。

[0118] 8. 根据条款7所述的装置,其中该装置包括两个样品板位置。

[0119] 9. 根据条款7所述的装置,其中该装置包括两个条形码板位置。

- [0120] 10. 根据条款1至9中任一项所述的装置,其中该机器人控制的移液器包括多个可互换头部,这些可互换头部被配置用于样品分配、条形码分配、真空和纯化任务。
- [0121] 11. 根据条款1至10中任一项所述的装置,其中该装置包括一个液面控制系统,该液面控制系统被配置成维持该或这些热芯片模块内的载油高度。
- [0122] 12. 根据条款1至11中任一项所述的装置,其中该装置包括一个流体模块,该流体模块包括用于系统流体和废物收集的多个液体储器。
- [0123] 13. 根据条款12所述的装置,其中该废物收集储器被操作性地联接到单个废物排出口上。
- [0124] 14. 根据条款1至12中任一项所述的装置,其中该装置被操作性地联接到一个手持式条形码扫描器上。
- [0125] 15. 根据条款1至14中任一项所述的装置,其中该装置被配置成经由一个复合液体池介导的方案来产生768个文库。
- [0126] 16. 根据以上条款中任一项所述的装置,其中该装置深0.805m、长1.54m且高0.885m。
- [0127] 17. 一种核酸文库制备装置,该装置包括:
- [0128] 一个热芯片模块,该热芯片模块包括多个节点;以及
- [0129] 一个液面控制系统,该液面控制系统被配置成维持该热芯片模块内的载油高度。
- [0130] 18. 根据条款17所述的装置,其中该装置包括单个热芯片模块。
- [0131] 19. 根据条款17或18所述的装置,其中该装置包括两个热芯片模块。
- [0132] 20. 根据条款19所述的装置,其中该液面控制系统被配置成维持这些热芯片模块中的每一个内的载油高度。
- [0133] 21. 根据条款17至20中任一项所述的装置,其中每个热芯片模块包括384个节点。
- [0134] 22. 根据条款17至21中任一项所述的装置,其中该装置包括用于每个热芯片模块的一个机械致动的盖。
- [0135] 23. 根据条款17至22中任一项所述的装置,其中该装置包括一个或多个板位置。
- [0136] 24. 根据条款23所述的装置,其中这些板位置中的一个是一个振动筛单元。
- [0137] 25. 根据条款23或24所述的装置,其中该装置包括六个板位置。
- [0138] 26. 根据条款25所述的装置,其中该装置包括两个样品板位置。
- [0139] 27. 根据条款25或26所述的装置,其中该装置包括两个条形码板位置。
- [0140] 28. 根据条款17至27中任一项所述的装置,其中该装置包括一个机器人控制的移液器,该移液器被配置成在该两个或更多个板位置与该热芯片模块之间转移液体。
- [0141] 29. 根据条款28所述的装置,其中该机器人控制的移液器包括多个可互换头部,这些可互换头部被配置样品分配、条形码分配、试剂分配、真空和纯化任务。
- [0142] 30. 根据条款17至29中任一项所述的装置,其中该装置包括一个散装试剂分配器,该散装试剂分配器被配置成用于接入该热芯片模块的每个节点。
- [0143] 31. 根据条款17至30中任一项所述的装置,其中该装置包括一个流体模块,该流体模块包括用于系统流体和废物收集的多个液体储器。
- [0144] 32. 根据条款31所述的装置,其中该废物收集储器被操作性地联接到单个废物排出口上。

[0145] 33. 根据条款17至32中任一项所述的装置,其中该装置被操作性地联接到一个手持式条形码扫描器上。

[0146] 34. 根据条款17至33中任一项所述的装置,其中该装置被配置成经由一个复合液体池介导的方案来产生768个文库。

[0147] 35. 根据条款17至34中任一项所述的装置,其中该装置深0.805m、长1.54m且高0.885m。

[0148] 36. 一种从初始核酸样品产生核酸文库的方法,该方法包括:

[0149] 将该核酸样品引入到根据条款1至35中任一项所述的一个装置中;并且

[0150] 从该装置获得该核酸文库。

[0151] 37. 根据条款36所述的方法,其中该核酸文库包括一个有条形码的核酸的文库。

[0152] 38. 根据条款36至37中任一项所述的方法,其中该核酸文库包括一个汇集的有条形码的核酸的文库。

[0153] 39. 一种根据条款36至38中任一项所述的方法产生的核酸文库,其中该核酸文库被配置用于通过下一代测序方案进行测序。

[0154] 虽然上述发明已经通过说明和实例的方式出于清楚理解的目的在一些细节方面进行了描述,但是本领域技术人员根据本披露传授的内容很容易明白可以在不偏离所附权利要求书的精神或范围的情况下对本发明进行某些改变和修改。

[0155] 因此,前述内容仅说明本发明的原理。应当理解,本领域的普通技术人员应当能够设计不同的安排,尽管在此未明确描述或展示这些安排,但是它们体现本发明的原理并且被包括在本发明的精神和范围内。另外,在此叙述的所有实例和条件性语言原则上旨在帮助读者理解本发明的原理,而限于这些具体叙述的实例和条件。此外,在此叙述本发明的原理、方面和实施例以及其具体实例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等效物两者。另外,预期此类等效物包括当前已知的等效物以及未来开发出的等效物两者,即不论结构而执行相同功能的所开发出的任何要素。因此,本发明的范围不是旨在受限于在此显示和描述的示例性实施例。相反地,本发明的范围和精神由所附权利要求书体现。

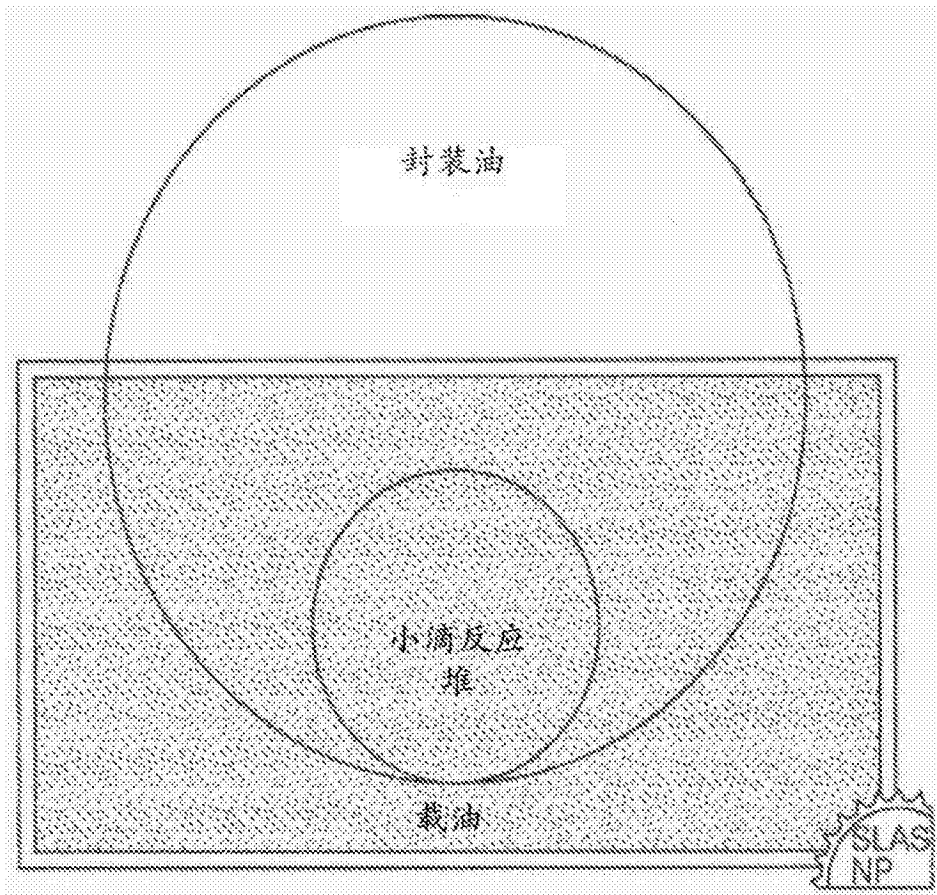


图1

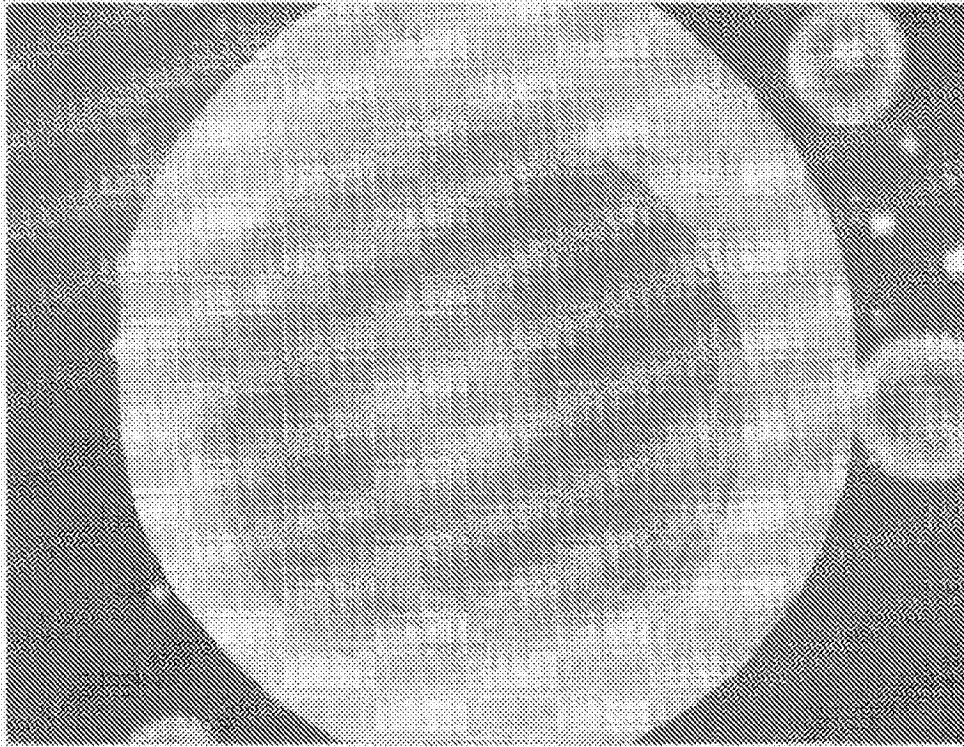


图2

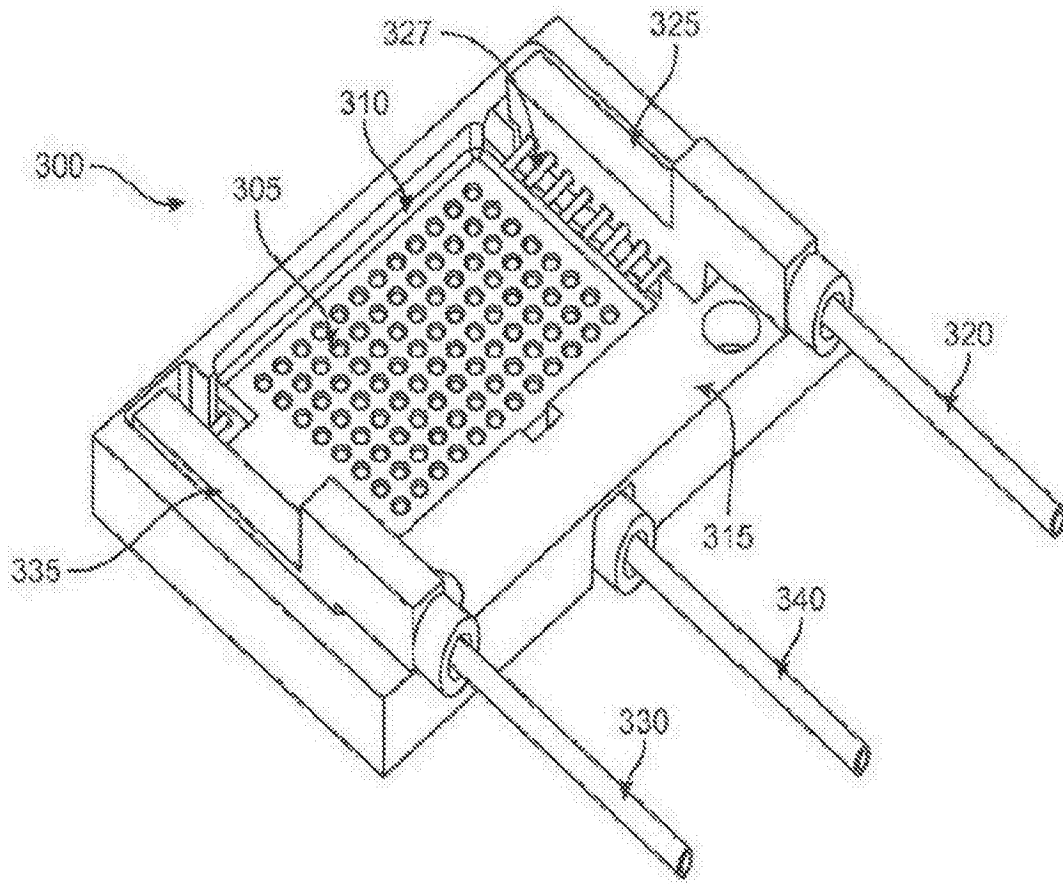


图3

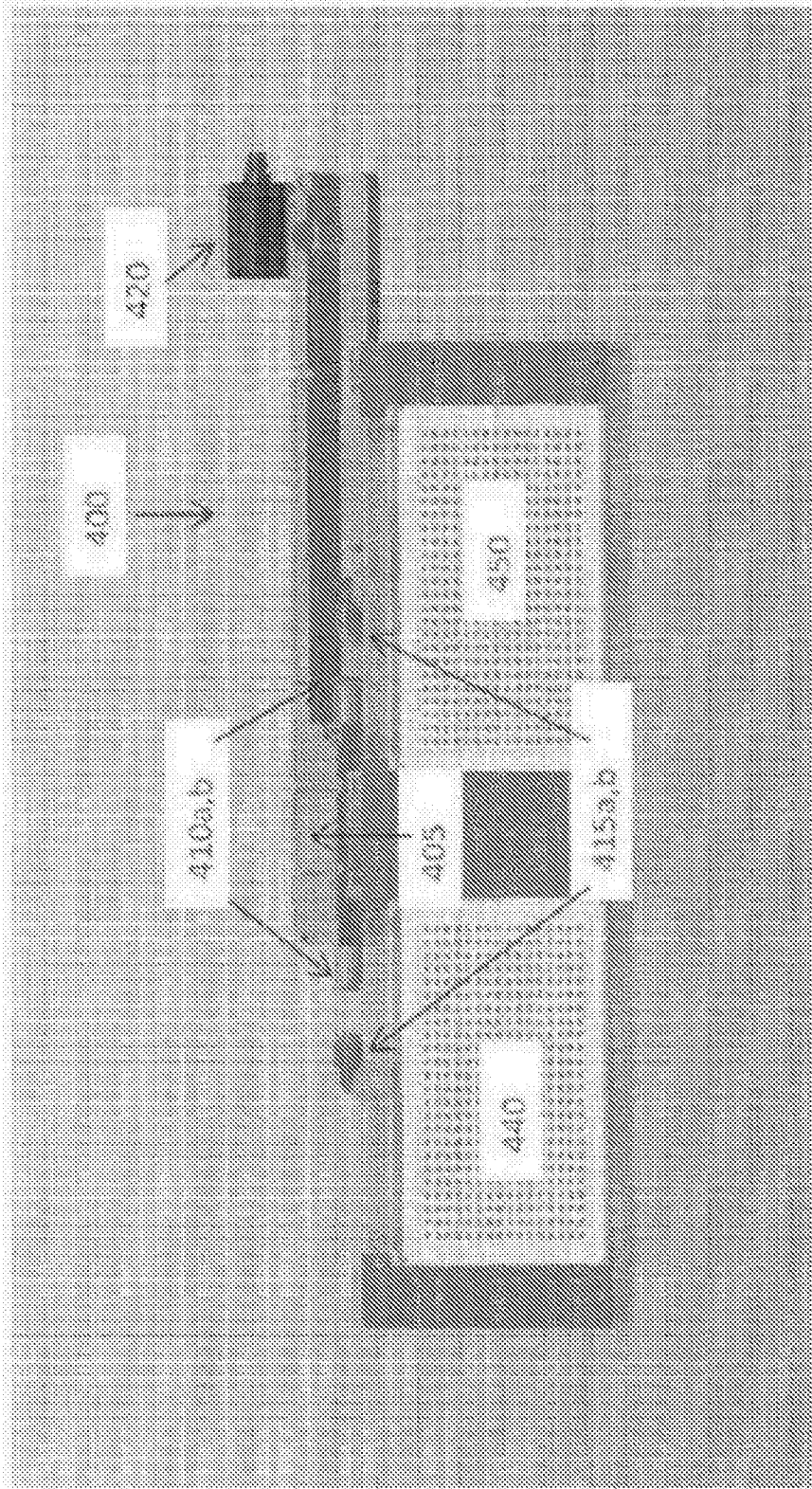


图4

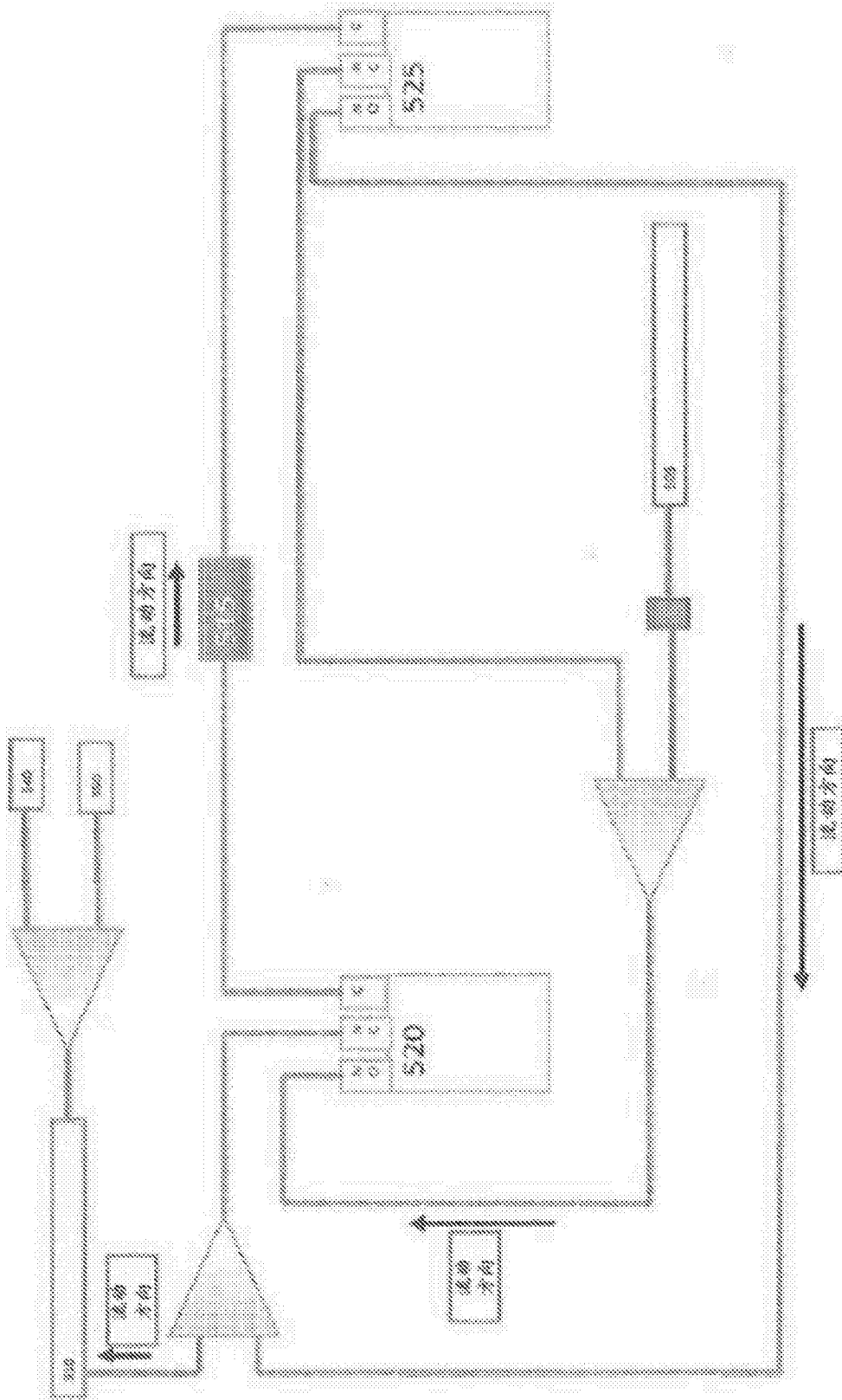


图5

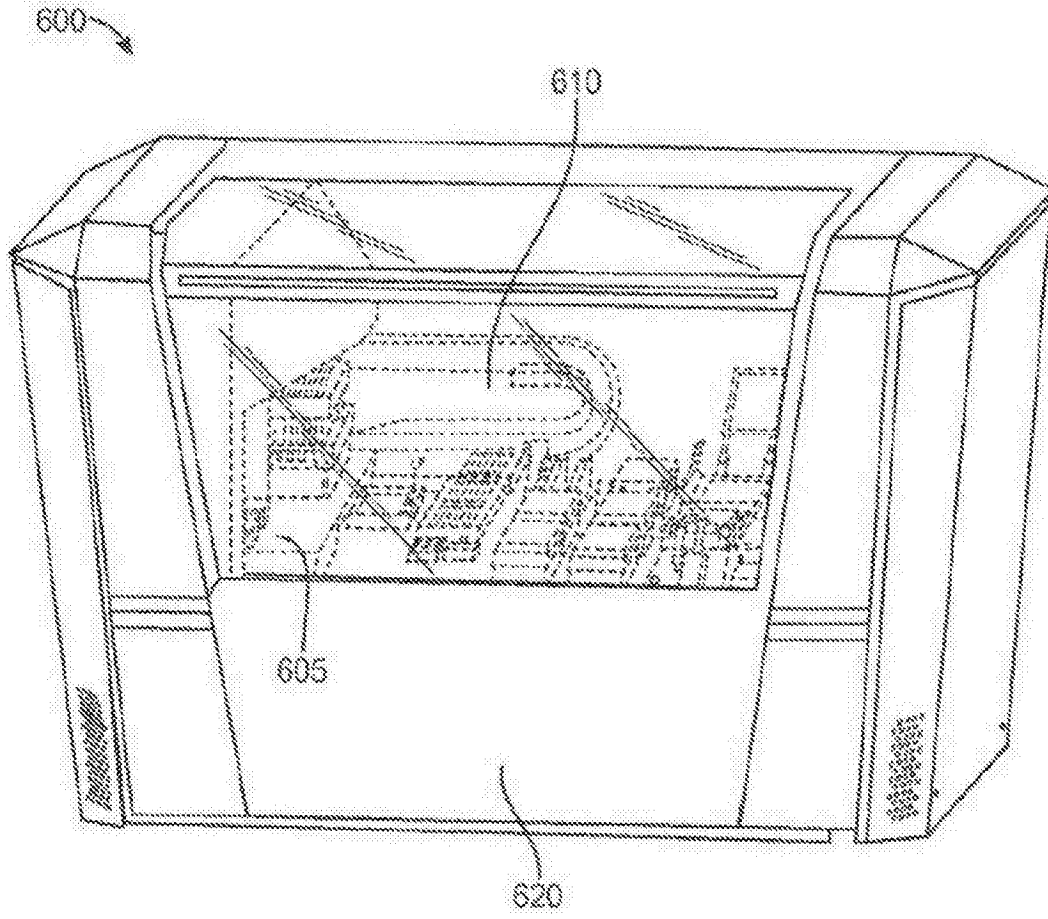


图6

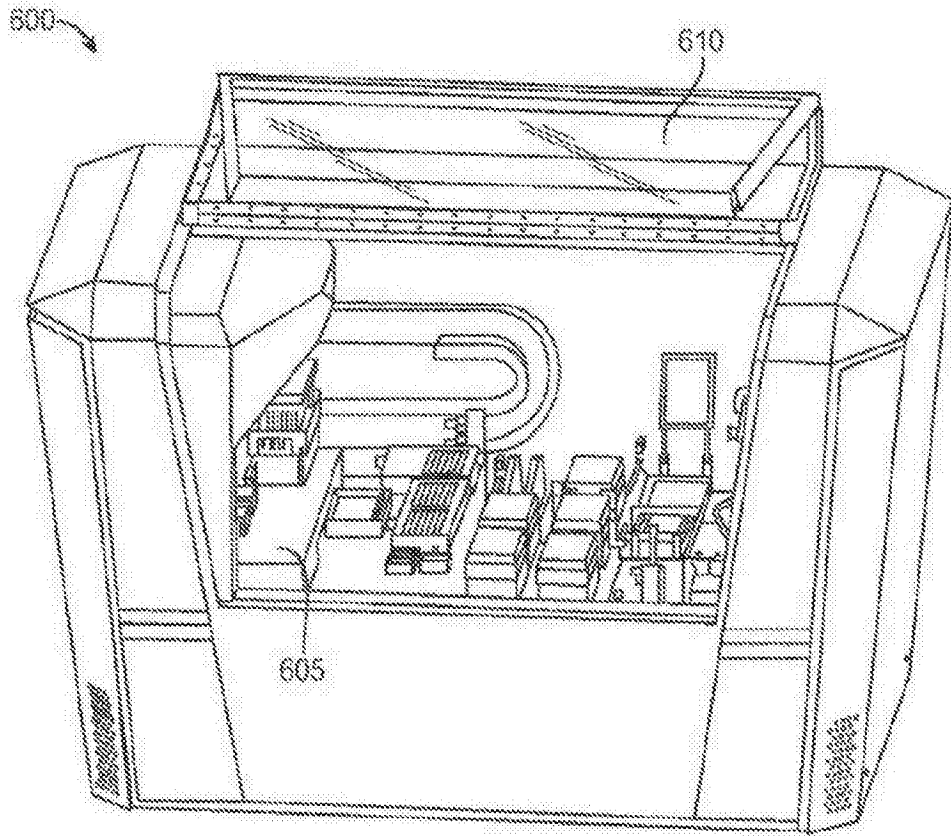


图7

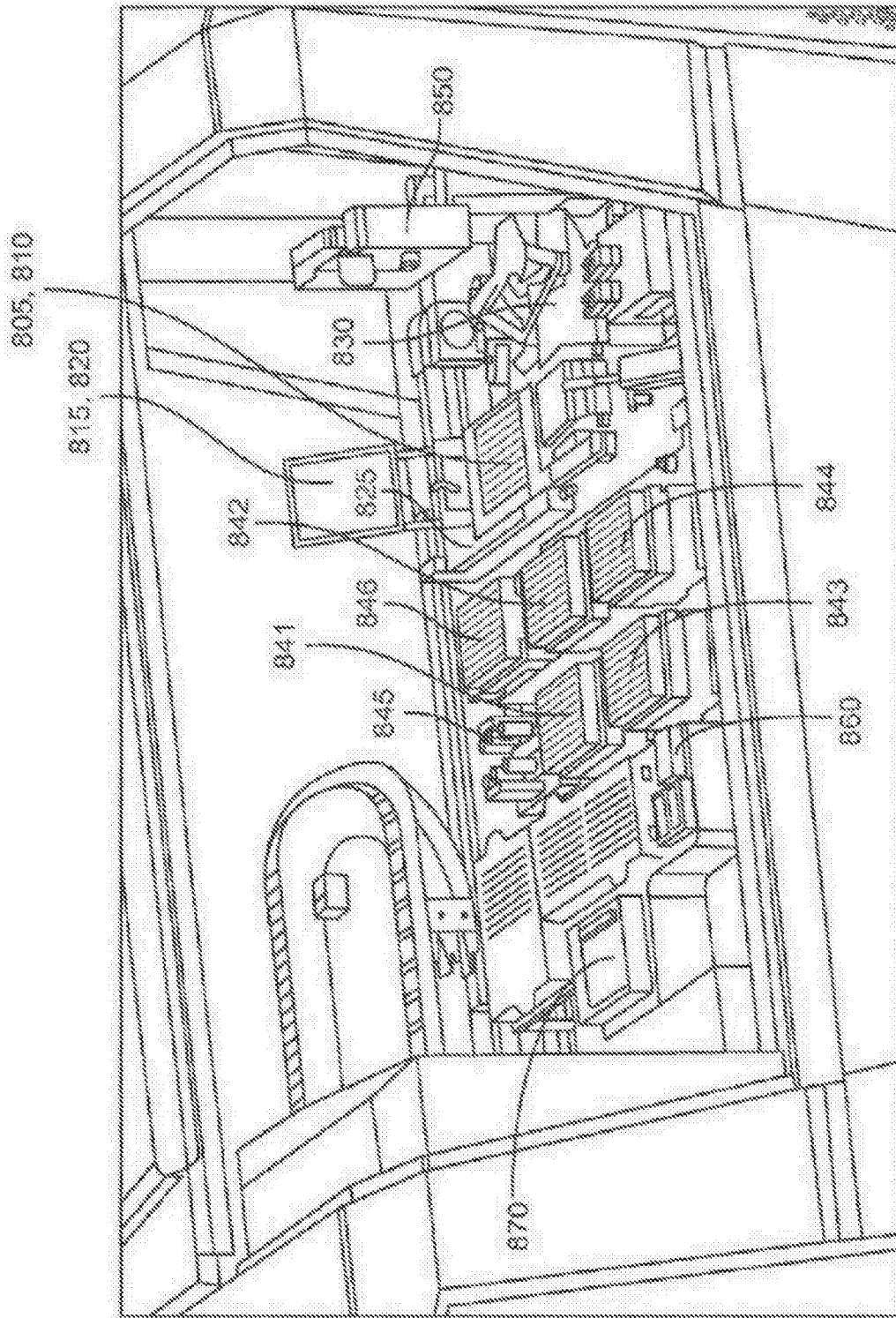


图8

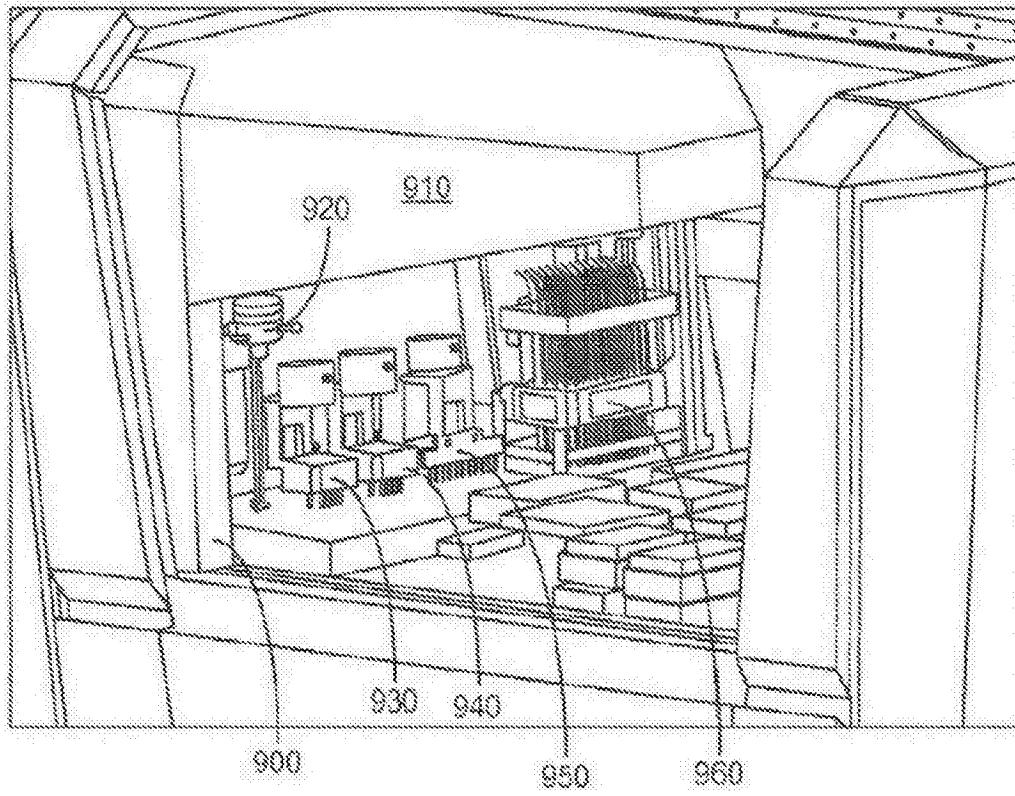


图9

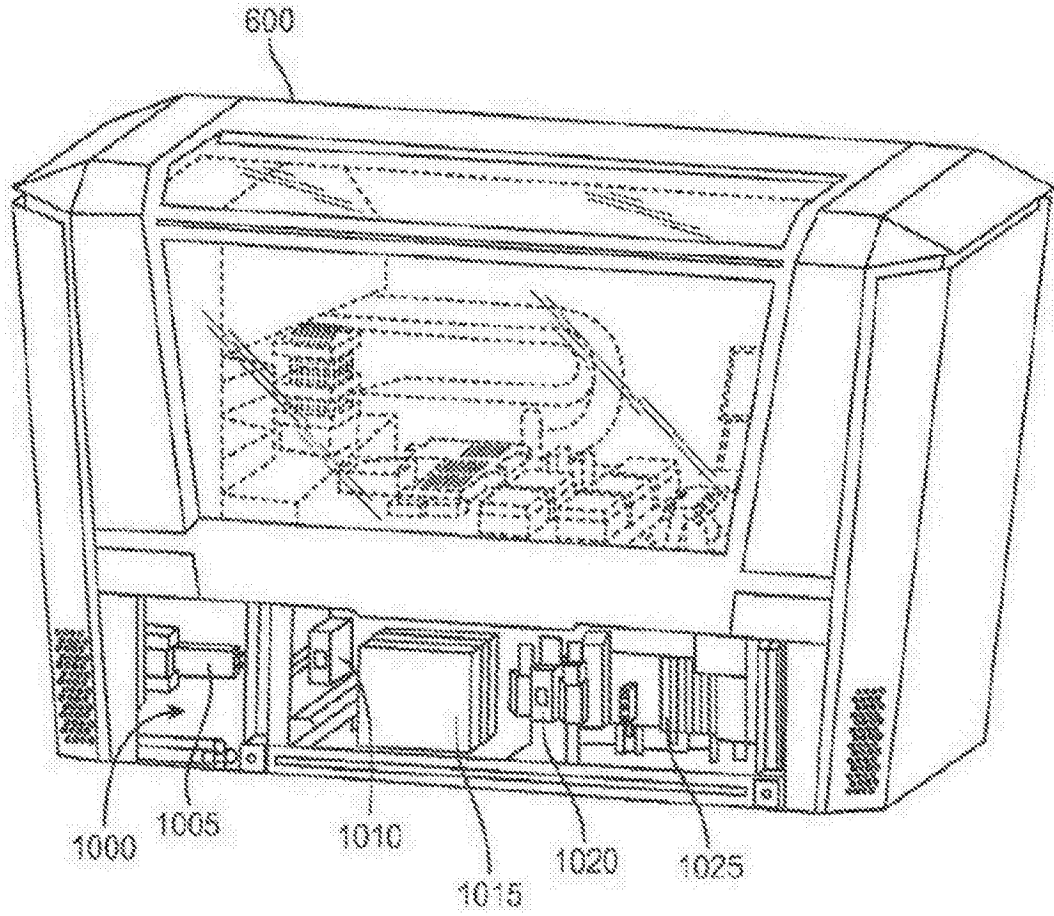


图10

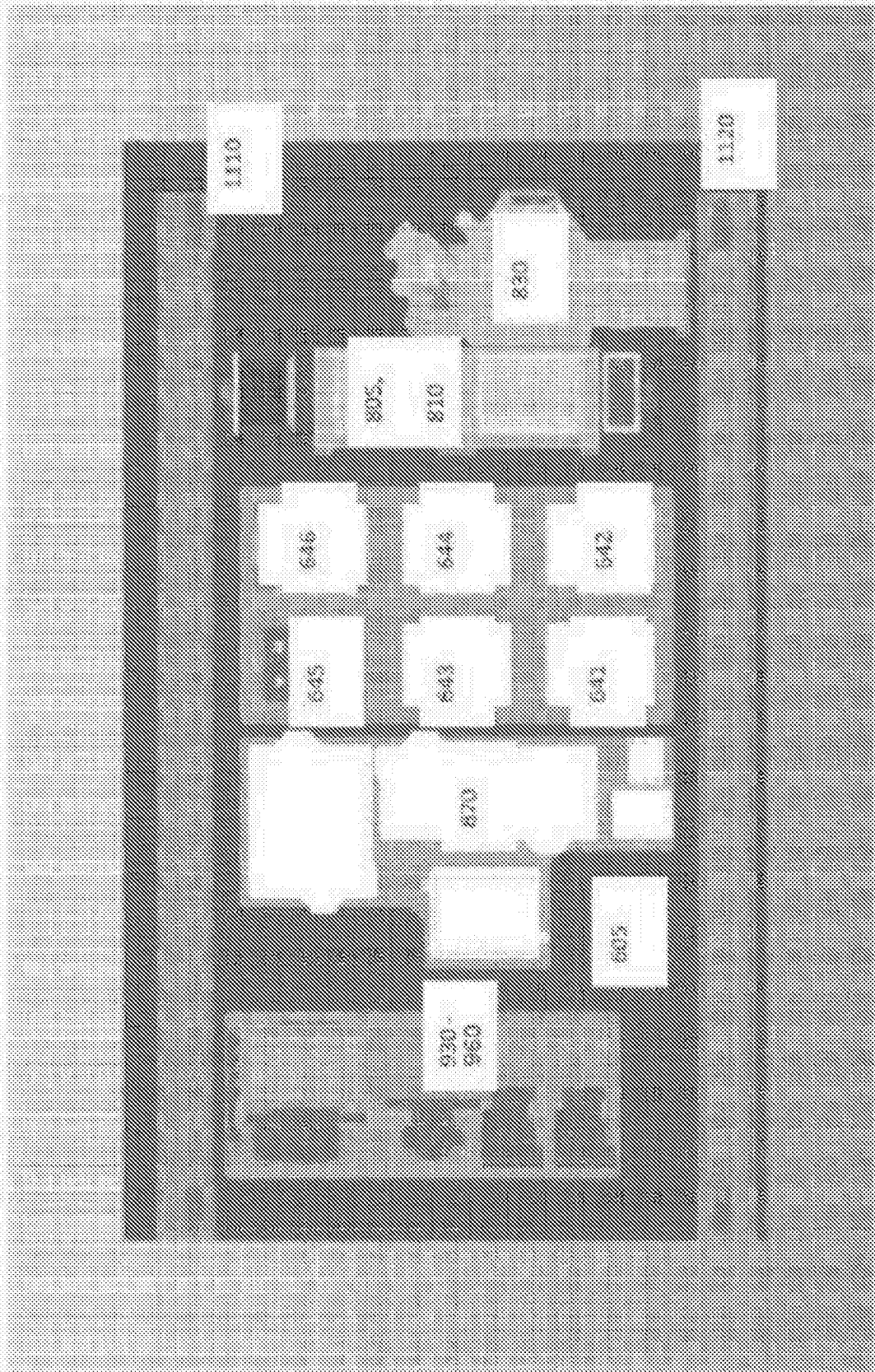


图11