



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107002006 B

(45)授权公告日 2020.03.31

(21)申请号 201580059122.0
 (22)申请日 2015.10.30
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107002006 A
 (43)申请公布日 2017.08.01
 (30)优先权数据
 10-2014-0149495 2014.10.30 KR
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.04.28
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2015/011605 2015.10.30
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02016/068663 KO 2016.05.06
 (73)专利权人 梨花女子大学校产学协力团
 地址 韩国首尔
 专利权人 韩国科学技术院
 (72)发明人 李赫镇 李海臣 李浩然 丁一荣
 (74)专利代理机构 广州圣理华知识产权代理有限公司 44302
 代理人 顿海舟 王鸽

(51)Int.Cl.
 C12M 1/34(2006.01)
 C12Q 1/6844(2018.01)
 (56)对比文件
 Erik L. et al.Nucleic acid sensing by regenerable surface-associated isothermal rolling circle amplification.《Biosensors and Bioelectronics》.2006,
 Erik L. et al.Detection and identification of IHN and ISA viruses by isothermal DNA amplification in microcapillary tubes.《Anal Bioanal Chem》.2006,
 Yuntao Zhou et al.A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection.《Nucleic Acids Research》.2010, 第38卷(第15期),

审查员 吴漾

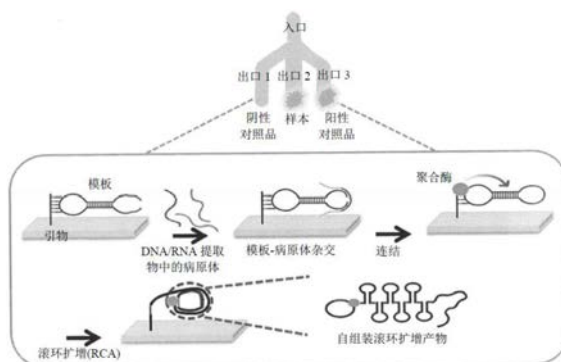
权利要求书2页 说明书23页
序列表6页 附图15页

(54)发明名称

用于检测目标基因的微流体装置、用于制造微流体装置的方法及用于使用微流体装置进行检测的方法

(57)摘要

本发明提供对能够肉眼检测的疾病特定基因的容易且准确分子诊断,所述够肉眼检测通过扩增目标基因以选择性地阻塞微流体装置中的流体路径来进行。具体来说,本发明包含一种通过滚环扩增而对目标基因进行的等温扩增、一种用于检测病原体基因的微流体装置及一种使用所述微流体装置的检测方法。因此,本发明可在不具有复杂机械设备的情况下方便地检测例如单个病原体的单个目标基因,或同时检测例如数个病原体的数个目标基因。



CN 107002006 B

1. 一种用于检测目标基因的微流体装置,其包括:
板;

入口,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;

第一通道,其连接到所述样本入口以容纳所述所引入样本溶液;

第二通道,其连接到所述第一通道;

出口,其连接到所述第二通道;

表面涂层,其位于所述第二通道上;

引物,其固定于所述第二通道的所述表面涂层上;及

模板,其互补地结合到所述引物,

其中所述模板具有40mer到160mer的长度,且包括与目标基因互补的结合区域、与所述引物互补的结合区域及用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域,所述与所述目标基因互补的结合区域单独形成于所述模板的两个端处,且所述与所述引物互补的结合区域形成于单独形成的所述用以形成所述哑铃形状的模板内互补结合区域之间,且

所述第二通道包括1个到20个通道,所述第二通道从所述第一通道的一端偏离,且结合到固定于每一第二通道上的引物的目标基因检测模板结合到相同或不同基因。

2. 根据权利要求1所述的微流体装置,其中所述第二通道表面涂覆有选自由以下各项组成的群组中的一或多者:5-羟基多巴胺HCl、去甲肾上腺素、肾上腺素、连苯三酚胺、3,4-二羟苯丙氨酸、儿茶酸、鞣酸、连苯三酚、邻苯二酚、肝素-邻苯二酚、壳聚糖-邻苯二酚、聚(乙二醇)-邻苯二酚、聚(乙烯亚胺)-邻苯二酚、聚(甲基丙烯酸甲酯)-邻苯二酚、透明质酸-邻苯二酚、聚赖氨酸-邻苯二酚及聚赖氨酸。

3. 根据权利要求1所述的微流体装置,其中所述引物具有以选自由以下各项组成的群组中的一或多者修饰的一端:硫醇、胺、羟基、羧基、异硫氰酸酯、NHS酯、醛、环氧化物、碳酸酯、HOBt酯、戊二醛、氨基甲酸酯、咪唑氨基甲酸酯、马来酰亚胺、氮丙啶、砒、乙烯砒、肼、叠氮苯、二苯甲酮、蒽醌及二烯。

4. 根据权利要求1所述的微流体装置,其中所述表面涂层包括5-羟基多巴胺HCl,且所述引物具有以硫醇基或胺基修饰的一端。

5. 根据权利要求1所述的微流体装置,其中所述目标基因是来源于选自由以下各项组成的群组中的一或多者的目标基因:禽流感、SARS、大肠埃希杆菌O157:H7、结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌、肺炎链球菌、疟原虫、沙门氏菌、肝炎A、B、C、D及E病毒、土拉热弗朗西丝菌、鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌及埃博拉病毒以及MERS-Cov病毒。

6. 根据权利要求1所述的微流体装置,其中所述模板选自由以下各项组成的群组:序列号1到4、序列号10、序列号11及序列号16。

7. 一种用于检测目标基因的微流体装置工具包,其包括:

根据权利要求1所述的用于检测所述目标基因的微流体装置;

dNTP;

连接酶;及

等温核酸聚合酶。

8. 根据权利要求7所述的微流体装置工具包,其中所述连接酶是DNA连接酶,且所述等

温核酸聚合酶是 ϕ 29聚合酶。

9. 根据权利要求7所述的微流体装置工具包,其进一步包括染料试剂、高盐溶液或荧光试剂。

10. 根据权利要求7所述的微流体装置工具包,其中根据权利要求1所述的用于检测目标基因的微流体装置的所述模板选自由以下各项组成的群组:序列号1到4、序列号10、序列号11及序列号16。

11. 一种用于制造用于检测目标基因的微流体装置的方法,其包括:

(S1) 提供微流体装置,所述微流体装置包括:板;入口,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道,其连接到所述入口以容纳所述所引入样本溶液;第二通道,其连接到所述第一通道;及出口,其连接到所述第二通道;

(S2) 涂覆所述微流体装置的所述第二通道;

(S3) 将用以结合到模板的引物固定于所述经涂覆第二通道上;及

(S4) 将模板结合到所述引物,所述模板包括与目标基因互补的结合区域、与所述引物互补的结合区域及用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域,

其中所述与所述目标基因互补的结合区域单独形成于所述模板的两个端处,且所述与所述引物互补的结合区域形成于单独形成的所述用以形成所述哑铃形状的模板内互补结合区域之间。

12. 一种用于使用根据权利要求1所述的用于检测目标基因的微流体装置来检测所述目标基因的方法:

(S1) 提供根据权利要求1所述的用于检测所述目标基因的微流体装置;

(S2) 将样本溶液引入到第一通道中;及

(S3) 将dNTP、连接酶及等温核酸聚合酶添加到所述用于检测所述目标基因的微流体装置的第二通道,

其中所述方法不用于疾病的诊断和治疗的目的。

13. 根据权利要求12所述的方法,其包括(S4) 允许经扩增基因产物絮凝以在所述第二通道及出口上形成具有50 μ m到5mm的直径的水凝胶。

14. 根据权利要求13所述的方法,其进一步包括(S5) 添加染料试剂、高盐溶液或荧光试剂。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中根据权利要求1所述的用于检测目标基因的微流体装置的所述模板选自由以下各项组成的群组:序列号1到4、序列号10、序列号11及序列号16。

用于检测目标基因的微流体装置、用于制造微流体装置的方法及用于使用微流体装置进行检测的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测目标基因的诊断装置、一种用于制造所述装置的方法及一种使用所述装置的检测方法。具体来说,本发明涉及一种用于检测目标基因的微流体装置(其通过检测疾病特定基因而检测各种病原体)、一种用于制造所述微流体装置的方法及一种使用所述微流体装置的检测方法。

[0002] 更具体来说,本发明涉及一种用于检测目标基因的微流体装置(其能够通过扩增目标基因以选择性地阻塞微流体装置的通道而用肉眼识别疾病特定目标基因)、一种用于制造所述微流体装置的方法及一种用于使用所述微流体装置来检测目标基因的方法。

[0003] 本研究已在来自科技部资助的韩国国家研究基金的生物学技术发展计划及基础科学研究计划、韩国ICT与未来规划以及来自健康与福利部资助的韩国健康产业发展研究所的健康与医疗技术R&D项目的支持下进行。

背景技术

[0004] 各种基于PCR的方法已被报告为基因检测技术。已开发直接使用PCR的SDT/RT-PCR(简单直管(simple-direct tube) RT-PCR)方法及用以消除PCR反应抑制剂且增加敏感度的IC/RT-PCR(免疫捕获RT-PCR)方法(包含免疫学方法)以用于基因检测。

[0005] 特定来说,为最初处理由各种细菌及病毒病原体引起的传染性疾病且防止疾病的进展及广泛传播,有必要快速且精确地诊断因特定病原体的感染。如果可能,在任何症状出现之前诊断处于潜伏期中的带有传染性病原体的患者,那么可有效地防止所述感染的传播以避免严重社会及经济损害。

[0006] 迄今为止所开发的方法在培养及检测病原体以用于诊断时涉及大量时间及人力资源、在确定感染时具有不充分准确性、需要需求外部电力供应器(包含热循环仪)的机器或装置且在同时检测多个病原体时具有难度。

[0007] 在使用PCR工具包的诊断方法中,基本上需要热循环仪且在PCR中难以满足缓冲溶液的循环温度、时间、条件等等,因此使得难以同时检测多个病原体。

[0008] 因此,需要开发一种用于以经减少检测成本及时间来方便且精确地检测目标基因(例如疾病特定目标基因)的方法。

[0009] 相关文件:KR专利公开案第2010-0053831号

发明内容

[0010] 技术目标

[0011] 本发明旨在提供一种用于诊断目标基因的微流体装置(其能够在不具有外部电力供应器或包含热循环仪等特殊装置的情况下在任何环境中方便且精确地检测目标基因)、一种用于制造所述微流体装置的方法及一种使用所述微流体装置的检测方法。

[0012] 技术解决方案

[0013] 为解决前述问题,本发明提供一种用于检测目标基因的微流体装置、一种用于制造所述微流体装置的方法及一种使用所述微流体装置的检测方法。下文中,详细地描述每一发明。

[0014] 用于检测目标基因的微流体装置

[0015] 根据本发明的一个特定实例,提供一种用于检测目标基因的微流体装置,所述微流体装置包含:板;入口,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道,其连接到所述样本入口以容纳所述所引入样本溶液;第二通道,其连接到所述第一通道;出口,其连接到所述第二通道;表面涂层,其位于所述第二通道上;引物,其固定于所述第二通道的所述表面涂层上;及模板,其互补地结合到所述引物,其中所述模板包含与目标基因互补的结合区域、与所述引物互补的结合区域及用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域,所述与目标基因互补的结合区域单独形成于所述模板的两个端处,且所述与引物互补的结合区域形成于单独形成的所述用以形成所述哑铃形状的模板内互补结合区域之间。

[0016] 也就是说,根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置是包含板、入口、第一通道及连接到第二通道的出口的装置。装置的第二通道具有表面涂层,引物固定于表面涂层上,且模板(用于检测目标基因的模板)结合到经固定引物。模板具有以下线性结构:‘第一目标基因结合区域-第一模板内互补结合区域(用以形成哑铃形状)-引物结合区域-第二模板内互补结合区域(用以形成哑铃形状)-第二目标基因结合区域’。也就是说,在此结构中,模板的引物结合区域结合到固定于装置上的引物,‘第一目标基因结合区域-第一模板内互补结合区域(用以形成哑铃形状)’存在于引物结合区域的一端处,且‘第二模板内互补结合区域(用以形成哑铃形状)-第二目标基因结合区域’存在于引物结合区域的另一端处。

[0017] 当目标基因存在于样本中时,目标基因结合到模板的第一目标基因结合区域及第二目标基因结合区域两者。接着,第一模板内互补结合区域及第二模板内互补结合区域变得物理上彼此接近以形成与目标基因的互补结合。因此,如从图2的B所见,模板转变为在第一目标基因结合区域与第二目标基因结合区域之间具有切口的哑铃形状。

[0018] 也就是说,根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置是包含以下各项的用于检测目标基因的微流体装置:板;入口,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道,其连接到所述样本入口以容纳所述所引入样本溶液;第二通道,其连接到所述第一通道;及出口,其连接到所述第二通道,其中所述第二通道具有位于表面上的表面涂层;引物固定于所述表面涂层上;用于检测目标基因的模板结合到所述经固定引物;所述用于检测所述目标基因的模板包含与所述引物互补的引物结合区域、结合到所述引物结合区域的一端-第一目标基因结合区域的第一模板内互补结合区域及结合到引物结合区域的另一端-第二目标基因结合区域的第二模板内互补结合区域。

[0019] 根据本发明的一个特定实例,第二通道可具有连接到第一通道且划分成两个或超过两个、优选地2个到20个分支的形状。第二通道的分支的数目可关于待被检测以用于诊断疾病特定基因的目标基因的模板数目而变化。举例来说,当存在两个目标基因模板时,第二通道的分支的数目可为两个或三个(包含针对目标基因模板及对照组的数目)。举例来说,当存在一个目标基因模板时,第二通道的分支的数目可为一个或两个(包含针对目标基因模板及对照组的数目)。

[0020] 样本出口的数目可与第二通道的分支的数目相同。举例来说,样本出口的数目可为两个或超过两个、优选地2个到20个,与第二通道的分支的数目相同。

[0021] 根据本发明的一个特定实例,为便于将引物固定于第二通道上,可将第二通道涂覆以具有用以与引物组合的官能基。而且,引物可经修饰以具有用以与第二通道上的官能基组合的官能基。

[0022] 根据本发明的一个特定实例,根据本发明的微流体装置的第二通道可涂覆有连苯三酚胺,举例来说,5-羟基多巴胺HCl。

[0023] 引物的一端可经修饰以具有各种官能基,举例来说,选自由以下各项组成的群组中的一或多个:硫醇、胺、羟基、羧基、异硫氰酸酯、NHS酯、醛、环氧化物、碳酸酯、HOBt酯、戊二醛、氨基甲酸酯、咪唑氨基甲酸酯、马来酰亚胺、氮丙啶、砜、乙烯砜、肼、叠氮苯、二苯甲酮、蒽醌及二烯。

[0024] 在本发明的一个实施例中,第二通道的涂层可为5-羟基多巴胺HCl,且引物的一端可经修饰成硫醇或胺基。

[0025] 根据本发明的一个特定实例,模板可经设计以鉴于目标基因(举例来说,病原体基因)的长度及引物的长度而具有各种长度及序列。根据本发明的一个特定实例,模板可具有40mer到160mer的长度。在本发明中,当模板太短时,模板为不稳定的;当模板太长时,滚环扩增(RCA)效率可减小。

[0026] 根据本发明的一个特定实例,在模板中,与病原体基因互补的结合区域单独形成于模板的两个端处,用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域经单独形成以邻近于位于两个端处的与病原体基因互补的结合区域,且与引物互补的引物结合区域形成于用以形成哑铃形状的板内互补结合区域之间(参见图2的A)。

[0027] 根据本发明的一个特定实例,模板可为具有40mer到160mer的总长度的模板,所述模板包含10mer到40mer长的与目标基因互补的结合区域、10mer到40mer长的与引物互补的结合区域及20mer到80mer长的与形成哑铃形状的模板内互补结合区域。

[0028] 根据本发明的一个特定实例,引入到用于检测目标基因的微流体装置中的样本溶液可为体液样本(例如血液、丹参(salvia)及尿液、食物、水供应源)及用于分析水污染、土壤污染的各种样本溶液(例如水或土壤样本)等等。

[0029] 此外,可将仅有从各种样本溶液提取的核酸的溶液引入到用于检测目标基因的微流体装置中。此处,提取不限于规定方法而是可通过液体-液体提取方法(例如苯酚-氯仿提取)或固体-液体提取方法(使用载体)而执行。此外,提取可使用蛋白酶K/苯酚提取、蛋白酶K/苯酚/氯仿提取、碱裂解、碱-SDS方法或溶菌酶方法。另外,可使用市售核酸提取方法—QIAamp(由德国凯杰公司(QIAGEN)制造)。举例来说,可使用苯酚及苯酚/氯仿混合物。

[0030] 在本发明中,目标基因(举例来说,核酸序列或分子)可为单链或双链或者可为有义链或反义链的DNA或RNA。因此,核酸序列可为dsDNA、ssDNA、混合ssDNA、混合dsDNA、由ssDNA制成(举例来说,使用融合、修饰、解旋酶等等)的dsDNA、A-、B-或Z-DNA、三链DNA、RNA、ssRNA、dsRNA、混合ssRNA及dsRNA、由ssRNA制成(举例来说,使用融合、修饰、解旋酶等等)的dsRNA、信使RNA(mRNA)、核糖体RNA(rRNA)、转移RNA(tRNA)、催化性RNA、snRNA、微RNA或蛋白质-核酸(PNA)。

[0031] 本发明不受所使用目标基因、举例来说核酸(举例来说,序列或分子(举例来说,目

标序列及/或寡核苷酸)的类型或供应源限制。在关于核酸序列而被使用时,术语“核苷酸”及“基底”彼此替换,除非在本说明书中另有规定。

[0032] 本发明还提供一种用于检测目标基因的微流体装置工具包,所述微流体装置工具包包含:用于检测目标基因的微流体装置;dNTP;连接酶;及等温核酸聚合酶。

[0033] 在所述工具包中,dNTP、连接酶及等温核酸聚合酶可包含于用于扩增基因产物(核酸)的扩增组合物中。扩增组合物是指含有用于扩增核酸的所有组分的混合物且可进一步包含核酸聚合酶(酶)、核酸聚合酶的活化或反应所必需的缓冲溶液、四个种类的dNTP、辅因子及/或基质。核酸聚合酶可为DNA聚合酶、RNA聚合酶、逆转录酶及其组合。

[0034] 根据本发明的一个特定实例,扩增组合物提供包含DNA聚合酶、反应缓冲溶液及dNTP的核酸扩增组合物。

[0035] 根据本发明的一个特定实例,DNA聚合酶可选自自由以下各项组成的群组:E.Coli DNA聚合酶I、克列诺(Klenow)片段、 ϕ 29 DNA聚合酶、Vent DNA聚合酶、T4、T7 DNA聚合酶及Taq聚合酶。

[0036] 根据本发明的一个特定实例,缓冲溶液(缓冲液)可为新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs)(NEB)缓冲溶液,举例来说,MEB缓冲溶液4、Bst DNA聚合酶缓冲溶液、T4 DNA连接酶缓冲溶液、T7 DNA连接酶缓冲溶液等等且不限于此。

[0037] 根据本发明的一个特定实例,用于检测目标基因的微流体装置可进一步包含检测组合物,所述检测组合物用以检测由微流体装置检测的经扩增基因产物的水凝胶形成或浊度的改变。

[0038] 此外,检测组合物可为用以帮助对经扩增基因产物进行肉眼识别的染料试剂,所述染料试剂可展现颜色且包含(举例来说)凝胶红(GelRed)、链霉亲和素磁珠(bead)、台盼(trypsin)蓝染料、伊文斯(Evans)蓝染料、苏木精-伊红染色剂、结晶紫或亚甲蓝且不限于此。

[0039] 此外,检测组合物可为高盐溶液,所述高盐溶液增加经扩增基因产物的絮凝以引起浊度的改变或沉淀,因此帮助对经扩增基因产物进行肉眼识别。高盐溶液可为无机盐溶液,举例来说,氯化镁($MgCl_2$)水溶液、氯化铵(NH_4Cl)水溶液、乙酸铵(NH_4OAc)水溶液、氯化钠($NaCl$)水溶液、硫酸铵($(NH_4)_2SO_4$)水溶液或含有中性氨基酸溶液的水溶液且不限于此。

[0040] 另外,检测组合物可为荧光试剂。

[0041] 根据本发明的一个特定实例,装置的第二通道可具有使得经扩增基因产物(团块)絮凝以阻塞第二通道的直径。第二通道可在一个特定实例中具有 $1\mu m$ 到 $5mm$ 的直径且可在另一特定实例中具有 $50\mu m$ 到 $5mm$ 的直径。替代地,第二通道可在一个特定实例中具有 $0.25mm$ 到 $2mm$ 的直径且可在另一特定实例中具有 $0.5mm$ 到 $1.5mm$ 的直径。

[0042] 根据本发明的一个特定实例,经扩增基因产物(团块)可具有约 $0.5\mu m$ 到约 $50\mu m$ 的直径。在本发明的一个特定实例中,经扩增基因产物(团块)可絮凝以形成水凝胶,因此具有约 $50\mu m$ 到 $5mm$ 的直径。在本发明的另一特定实例中,经扩增基因产物可絮凝以具有约 $0.25mm$ 到 $2mm$ 的直径。

[0043] 根据本发明的一个特定实例,微流体装置的第二通道的表面可包含以下各项中的任一者:聚二甲基硅氧烷、金(Au)、金属氧化物(SiO_2 、 TiO_2 、 Al_2O_3 及氧化铟锡)、陶瓷及合成聚合物(聚碳酸酯、环烯烃共聚物、聚四氟乙烯(PTFE)、聚苯乙烯及聚乙烯)。

[0044] 根据本发明的一个特定实例,涂层材料可包含酚类单体或聚合物涂层。此外,涂层材料可包含(举例来说)儿茶酚胺聚合物涂层。酚类单体或聚合物具有卓越表面性质且因此可容易地涂覆广泛范围的材料,包含贵金属、金属氧化物、陶瓷及合成聚合物。酚类单体及聚合物的特定实例可不受限制地包含:多巴胺、5-羟基多巴胺HCl、去甲肾上腺素、肾上腺素、连苯三酚胺、3,4-二羟苯丙氨酸、儿茶酸、鞣酸、连苯三酚、邻苯二酚、肝素邻苯二酚、壳聚糖邻苯二酚、聚(乙二醇)-邻苯二酚、聚(乙烯亚胺)-邻苯二酚、聚(甲基丙烯酸甲酯)-邻苯二酚及透明质酸-邻苯二酚。

[0045] 此外,涂层材料可为乙烯基。

[0046] 不存在对涂覆方法的限制。举例来说,可制备涂覆组合物且可将其放置到第二通道中以涂覆第二通道的表面。针对另一实例,可用乙烯基涂层通过气相沉积而涂覆第二通道。

[0047] 根据本发明的一个特定实例,本发明的微流体装置实现用肉眼对目标基因的经扩增基因产物的识别。在本发明的一个特定实例中,此检测可用肉眼来识别,这是因为经扩增基因产物絮凝以形成水凝胶或浊度改变。

[0048] 根据本发明的一个特定实例,可从动物、植物、细菌、病毒或真菌获得待被检测的目标基因。优选地,目标基因可从例如细菌、病毒或真菌等病原体获得。

[0049] 根据本发明的一个特定实例,待被检测的目标基因可为病原体基因。目标基因可为具有已知核酸序列的所有病原体。根据本发明的一个特定实例,病原体用于检测禽流感、SARS、大肠埃希杆菌O157:H7、结核分枝杆菌、炭疽芽孢杆菌、肺炎链球菌、疟原虫、沙门氏菌、肝炎A、B、C、D及E病毒、土拉热弗朗西丝菌、鼠疫耶尔森菌、小肠结肠炎耶尔森菌及埃博拉病毒以及MERS-Cov病毒。此外,根据本发明的一个特定实例,病原体还用于检测具有抗生素抗性的病原体,例如肺炎链球菌、肠球菌、葡萄球菌、恶性疟原虫及结核病或疟疾细菌(发展中国家)。

[0050] 以下表1图解说明根据本发明的一个特定实例的可检测目标基因(举例来说,病原体的可检测种类及序列,以及包含与所述目标基因互补的结合区域的模板的序列(粗体字:与目标病原体基因互补的结合区域,斜体字:模板内互补区域,加下划线斜体字:与引物互补的结合区域))。

[0051] [表1]

病原体种类	序列号	模板序列(5' → 3')	序列号	病原体的目标基因序列
沙门氏菌	1	5'-磷酸盐- TG CTA TGC CGA CTC AAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT AGA GGC AT <u>TA GCA</u> <u>TGC TAG TAT CGA CGT</u> <u>CCC ACG TAC CAA CAA</u> CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TG AGT G-3'	5	5'-GAG TCG GCA TAG CAC ACT CA-磷酸盐-3'
小肠结肠炎耶尔森菌	2	5'-磷酸盐- GC TCA CCC CAG TAA AAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT AGA GGC AT <u>TA GCA</u> <u>TGC TAG TAT CGA CGT</u> <u>CCC ACG TAC CAA CAA</u> CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT AG CTT TAC-3'	6	5'-TTA CTG GGG TGA GCG TAA AGC T-磷酸盐-3'
土拉热弗朗西丝菌	3	5'-磷酸盐- TG TTT CCA GTA TTT AAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT AGA GGC AT <u>TA GCA</u> <u>TGC TAG TAT CGA CGT</u> <u>CCC ACG TAC CAA CAA</u> CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TTT CCT CCG A-3'	7	5'-AAA TAC TGG AAA CAT CGG AGG AAA-磷酸盐-3'
鼠疫耶尔森菌	4	5'-磷酸盐- TC GAA TGC CAA CAA AAT CGA AGT ACT CAG CGT AAG TTT	8	5'-TTG TTG GCA TTC GAT GTT CAG AG-磷酸盐-3'
		AGA GGC AT <u>TA GCA</u> <u>TGC TAG TAT CGA CGT</u> <u>CCC ACG TAC CAA CAA</u> CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT CTC TGA ACA-3'		

[0052]

[0053]

[0054] 在此情形中,作为引物,可使用与模板序列互补的结合形式:5'-硫醇-AAA AAA AAA GGG ACG TCG ATA CTA GCA TGC TA 3' (序列号9)。

[0055] 以下表2图解说明根据本发明的实例3的可检测目标基因(举例来说,病原体)的可检测种类及序列,以及包含与所述目标基因互补的结合区域的模板的序列。

[0056] [表2]

病原体种类	序列号	模板序列(5' → 3')	序列号	病原体的目标基因序列
炭疽芽孢杆菌	10	5'-磷酸盐 TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TGA GCG-3'	12	5'-TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA 磷酸盐-3'
埃博拉病毒	11	5'-磷酸盐 GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'	13	5'-CGC GTG CGT CGT GCG ATT TCT CGT T-磷酸 盐-3'

[0058] 以下表3图解说明根据本发明的实例5的可检测MERS-CoV的可检测目标基因序列,及包含与所述MERS-CoV互补的结合区域的模板的序列。

[0059] [表3]

病原体种类	序列号	模板序列(5' → 3')	序列号	病原体的目标基因序列
MERS-CoV	16	5'-5 磷酸盐/ AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT ATA CCC 3'	17	5'-CG GAG AUG UGC CCU GGG UAU/3 磷酸盐-3'

[0061] 根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置可包含任何种类的病原体,且不限于前述内容。随机病原体序列是选自已知病原体基因,且制备能够结合到病原体序列的两个序列(其中切口插置于其间)以用作模板的目标基因结合区域序列(第一目标基因结合区域及第二目标基因结合区域)。以此方式,通过仅替换模板的目标基因结合区域序列,可制造能够检测各种各样的病原体基因的目标基因检测微流体装置。

[0062] 虽然根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置充分地实现甚至用肉眼对病原体的识别,但与本发明相关的所属领域的技术人员可在不改变本发明的基本特征的情况下取决于目的而以各种特定形式执行本发明。举例来说,所属领域的技术人员可取决于目的而通过进一步包含电化学传感器(其测量电极之间的电流、电压、电位差及电阻改变)、光学传感器(其使用各种光源,例如紫外线、可见光、荧光、红外线及拉曼(Raman)光源)、纳米传感器(其使用金属、陶瓷及聚合物材料)或生物传感器(其使用生物敏感材料,例如酶、抗原及抗体)来实施本发明以便增加根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置的检测敏感度。

[0063] 用于制造微流体装置的方法

[0064] 根据本发明的一种用于制造用于检测目标基因的微流体装置的方法可包含以下操作:

[0065] (S1) 提供微流体装置,所述微流体装置包含:板;入口,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道,其连接到所述入口以容纳所述所引入样本溶液;第二通道,其连接到所述第一通道;及出口,其连接到所述第二通道;

[0066] (S2) 涂覆所述微流体装置的所述第二通道的表面;

[0067] (S3) 将用以结合到模板的引物固定于所述经涂覆第二通道上;及

[0068] (S4) 将模板结合到所述引物,所述模板包含与目标基因互补的结合区域、与所述引物互补的结合区域及用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域。

[0069] 此处,所述与目标基因互补的结合区域单独形成于所述模板的两个端处,且所述与引物互补的结合区域形成于单独形成的所述用以形成所述哑铃形状的模板内互补结合区域之间。

[0070] 根据本发明的一个特定实例,微流体装置的第二通道的表面可包含以下各项中的任一者:聚二甲基硅氧烷、金(Au)、金属氧化物(SiO_2 、 TiO_2 、 Al_2O_3 及氧化铟锡)、陶瓷及合成聚合物(聚碳酸酯、环烯烃共聚物、聚四氟乙烯(PTFE)、聚苯乙烯及聚乙烯)。

[0071] 根据本发明的一个特定实例,在(S2)涂覆所述微流体装置的所述第二通道中,第二通道的涂层材料可涂覆有亲水性材料以帮助水液滴移动且可为具有用以将引物固定于第二通道上的官能基的各种材料。根据本发明的一个特定实例,为便于将引物固定于第二通道上,可将第二通道进行表面涂覆以具有用以与引物组合的官能基。而且,引物可经修饰以具有用以与第二通道上的官能基组合的官能基。

[0072] 根据本发明的一个特定实例,第二通道的涂层材料可包含酚类单体或聚合物涂层。此外,涂层材料可包含(举例来说)儿茶酚胺聚合物涂层。酚类单体或聚合物具有卓越表面性质且因此可容易地涂覆广泛范围的材料,包含贵金属、金属氧化物、陶瓷及合成聚合物。酚类单体及聚合物的特定实例可不受限制地包含:多巴胺、5-羟基多巴胺HCl、去甲肾上腺素、肾上腺素、连苯三酚胺、3,4-二羟苯丙氨酸、儿茶酸、鞣酸、连苯三酚、邻苯二酚、肝素

邻苯二酚、壳聚糖邻苯二酚、聚(乙二醇)-邻苯二酚、聚(乙烯亚胺)-邻苯二酚、聚(甲基丙烯酸甲酯)-邻苯二酚及透明质酸-邻苯二酚。此外,乙烯基也可用于涂层。

[0073] 根据本发明的一个特定实例,根据本发明的微流体装置的第二通道可涂覆有连苯三酚胺,举例来说,5-羟基多巴胺HCl。

[0074] 用于使用微流体装置来检测病原体基因的检测方法

[0075] 一种用于使用根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法可包含以下操作:

[0076] (S1) 提供用于检测目标基因的微流体装置;

[0077] (S2) 将样本溶液引入到第一通道中;及

[0078] (S3) 将dNTP、连接酶及等温核酸聚合酶添加到所述用于检测所述目标基因的微流体装置的第二通道。

[0079] 根据本发明的一个特定实例,所述方法可进一步包含(S4) 允许经扩增基因产物絮凝以在所述第二通道及出口上形成具有50 μ m到5mm的直径的水凝胶。

[0080] 根据本发明的一个特定实例,模板可经设计以鉴于病原体基因的长度及引物的长度而具有各种长度及序列。根据本发明的一个特定实例,模板可具有40mer到160mer的长度。在本发明中,当模板太短时,模板为不稳定的;当模板太长时,RCA效率可减小。

[0081] 在本发明中,引物是指用以将模板固定于第二通道上的引物及作为用以扩增基因的起始材料的引物两者。

[0082] 根据本发明的一个特定实例,用于检测目标基因的微流体装置的模板可形成哑铃形状。

[0083] 根据本发明的一个特定实例,在(S3)中,当添加dNTP、连接酶及等温核酸聚合酶时,在目标基因存在于样本溶液中的情况下发生滚环扩增(RCA)。也就是说,当目标基因结合到模板的与目标基因互补的结合区域时,模板形成哑铃形状且可通过等温核酸聚合酶而发生扩增。RCA可在室温(举例来说,15 $^{\circ}$ C到35 $^{\circ}$ C、优选地25 $^{\circ}$ C到35 $^{\circ}$ C且在一个实施例中30 $^{\circ}$ C)下发生。

[0084] 根据本发明的一个特定实例,从RCA所得的经扩增产物可为具有三个分叉(leg)的圆形经缠结单链RCA产物。

[0085] 根据本发明的一个特定实例,经扩增基因可形成经缠结单链基因产物。参考图2,经扩增目标基因产物可形成具有钩状圆形部分及长度的连续维可牢搭扣形(Velcro-shaped)经缠结单链。所述长度可为0.5 μ m到50 μ m。完全经扩增目标基因产物可具有三脚架形状,所述三脚架形状具有圆形部分及分叉(其具有长度)。

[0086] 根据本发明的一个特定实例,经缠结单链产物可形成水凝胶。

[0087] 此外,通过RCA的扩增及水凝胶形成的反应可发生达三个小时或更长,且在一个实施例中反应时间可为三个小时。

[0088] 根据本发明的另一特定实例,所述方法可进一步包含(S5) 添加染料试剂、高盐溶液或荧光试剂。

[0089] 根据本发明的一个特定实例,染料试剂、高盐溶液或荧光试剂可用以便于检测且可为以下各项中的任一者:凝胶红、链霉亲和素磁珠、台盼蓝染料、伊文斯蓝染料、苏木精-伊红染色剂、结晶紫、亚甲蓝、氯化镁(MgCl₂)水溶液、氯化铵(NH₄Cl)水溶液、乙酸铵

(NH₄OAc) 水溶液、氯化钠 (NaCl) 水溶液、硫酸铵 ((NH₄)₂SO₄) 水溶液及中性氨基酸溶液。举例来说,可使用牢固地结合到生物素的染料试剂、凝胶红或链霉亲和素磁珠。此外,检测组合物可为高盐溶液,例如MgCl₂及NH₄Cl。

[0090] 根据本发明的一个特定实例,待被检测的样本溶液可被上样于样本入口上且可流动穿过第一通道及第二通道。

[0091] 本发明效应

[0092] 本发明在不具有任何特殊装置且在不受外部光源及电能影响的情况下于室温下实现对例如单个病原体等单个目标基因或同时对例如多个病原体等多个目标基因的方便检测。

[0093] 因此,本发明在制造用于检测病原体的装置时提供时间及成本效益、使得可携载所述装置且在不具有昂贵检测设备的情况下实现快速诊断。

[0094] 因此,本发明不仅实现对病原体(例如发展中国家中的结核病或疟疾)的诊断或对威胁世界的各种传染性疾病(举例来说,埃博拉病毒及MERS病毒)的诊断,而且实现对与生物恐怖主义及环境污染相关的病原体的快速且方便检测,因此具有高实用性。

附图说明

[0095] 图1图解说明根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置的平面图(左)及透视图(右)。

[0096] 图2图解说明根据本发明使用用于检测目标基因的哑铃成形模板来检测目标基因的过程。A、B、C、D及E各自表示过程的操作。

[0097] 图3图解说明根据本发明的制备用于检测目标基因的微流体装置的过程及使用所述微流体装置来检测目标基因的方法。A、B、C、D、E及F各自表示过程的操作。

[0098] 图4图解说明展示对管中的用于检测炭疽芽孢杆菌的哑铃模板(Template_B_A)的进行连结的电泳结果。

[0099] 图5是展示在实验实施例2的(1)中使用用于炭疽芽孢杆菌的模板(Template_B_A)来在管中识别RCA产物的SEM图像。

[0100] 图6是展示在实验实施例2的(2)中使用用于埃博拉病毒的模板(Template_E)来在管中识别RCA产物的SEM图像。

[0101] 图7a展示通过用于埃博拉病毒的模板(Template_E)而在管中形成水凝胶的结果,且图7b是利用旋转粘度计测量的粘度的图表。

[0102] 图8a是在将引物固定于微流体装置的未经涂覆第二通道上的情形中的RCA结果的AFM图像,且图8b是在将引物固定于涂覆有5-羟基多巴胺HCl的第二通道上的情形中的RCA结果的AFM图像。

[0103] 图9a是展示使用本发明的微流体装置来检测炭疽芽孢杆菌的结果的图片,且图9b是展示使用成像器(Gel Doc™ EZ,伯乐公司(Bio-Rad))来识别炭疽芽孢杆菌的结果的图片。

[0104] 图10a是展示使用本发明的微流体装置来同时检测炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒的结果的图片,且图10b是展示使用成像器(Gel Doc™ EZ,伯乐公司)来识别炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒的结果的图片。

[0105] 图11展示使用链霉亲和素及本发明的微流体装置来检测炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒的结果。

[0106] 图12是具体图解说在结合到本发明的微流体装置的引物的模板中发生的切口连结及RCA的示意图。A、B、C、D及E各自表示方法的操作。

[0107] 图13是图解说用于使用本发明的微流体装置来检测目标基因的方法的示意图，所述微流体装置经制造以具有三个第二通道(阴性对照品、样本及阳性对照品)(如在实验实施例5中)。

[0108] 图14展示使用用于检测目标MERS基因的微流体装置来检测MERS病毒的结果。

具体实施方式

[0109] 下文中，参考图式详细地描述实施例以便帮助理解本发明。然而，提供以下实施例以仅图解说本发明，且本发明的范围不应限于以下实施例而是可包含不同实施例。在图式中，为清晰起见可放大元件之宽度、长度及厚度。贯穿本说明书，相同参考编号是指相同元件。此外，将理解，当将元件称为位于另一元件上时，所述元件可直接位于另一元件或介入元件上。

[0110] <预备性实施例1>制造模板

[0111] (1) 制造Template_BA

[0112] 基于炭疽芽孢杆菌的病原体基因序列(集成DNA技术公司(Integrated DNA Technology),美国加利福尼亚州圣何塞(San Jose,CA,USA))而制造炭疽芽孢杆菌特定模板(Template_BA),所述炭疽芽孢杆菌特定模板是具体来说结合到炭疽芽孢杆菌的模板(Template_BA,序列号10)。Template_BA包含:与目标基因(炭疽芽孢杆菌的病原体基因)互补的结合区域,其为病原体互补位点(20mer,在白色背景中为粗体字母);用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域,其为模板内互补区域(总共21mer×2—42mer,斜体);及与引物互补的结合区域,其为引物固定区域(37mer),其中与引物互补的结合区域以加下划线斜体类型来指示。

5'/5Phos/**TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG**
 [0113] GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT
TGA GCG-3'

[0114] (2) 制造Template_E

[0115] 基于埃博拉病毒的病原体基因序列而制造埃博拉病毒特定模板(Template_E),所述埃博拉病毒特定模板是具体来说结合到埃博拉病毒的模板(Template_E,序列号11)。Template_E包含:与目标基因(埃博拉病毒的病原体基因)互补的结合区域,其为病原体互补位点(25mer,在白色背景中为粗体字母);用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域,其为模板内互补区域(总共21mer×2—42mer,斜体);及与引物互补的结合区域,其为引物固定区域(37mer),其中与引物互补的结合区域以加下划线斜体类型来指示。

5'/5Phos/**GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA**
 [0116] GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC
GAG AAA TCG CAC-3'

[0117] <实施例1>用于检测目标基因的微流体装置

[0118] 参考图1到3描述根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置的说明性配置。

[0119] 参考图1,根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置包含:板100;入口101,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道102,其连接到所述入口以容纳所引入样本溶液;第二通道103,其连接到第一通道;及出口104,其连接到第二通道。第二通道103连接到第一通道且可划分成两个或超过两个分支(举例来说,三个分支)。参考图3,根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置包含固定于第二通道上的引物;及与引物互补的模板。参考图2,模板包含与目标基因互补(举例来说,与病原体互补)的结合区域、与引物互补的结合区域(引物结合区域)及用以形成哑铃形状(哑铃形状模板)的模板内互补结合区域。此外,与目标基因互补的结合区域单独形成于模板的两个端处,且与引物互补的结合区域形成于单独形成的用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域之间。也就是说,如图2的A中所图解说,模板具有以下线性结构:‘第一目标基因结合区域-第一模板内互补结合区域-引物结合区域-第二模板内互补结合区域-第二目标基因结合区域’。如图12的A中所图解说,模板的引物结合区域互补地结合到固定于第二通道上的引物。

[0120] 为便于将引物固定于第二通道上,可将第二通道涂覆以具有用以与引物组合的官能基。而且,引物可经修饰以具有用以与第二通道上的官能基组合的官能基。

[0121] <实施例2>制造用于检测目标基因的微流体装置(用于检测病原体基因的装置)

[0122] 实施例2-1:用于制造用于检测单个目标基因的微流体装置的方法(用于制造用于检测单个病原体(炭疽芽孢杆菌)基因的微流体装置的方法)

[0123] 操作1:提供微流体装置的操作

[0124] 根据本发明的一个实施例,微流体装置(1 III³ⁱⁿ¹未经涂覆显微镜室(易必迪公司(ibidi)))经制备以制造用于检测目标基因的微流体装置(用于检测病原体基因的微流体装置)。本发明的微流体装置包含:板100;入口101,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道102,其连接到所述入口以容纳所引入样本溶液;第二通道103,其连接到第一通道;及出口104,其连接到第二通道(参见图1)。第二通道103可连接到第一通道且可划分成两个或超过两个分支(举例来说,三个分支)。

[0125] 操作2:涂覆微流体装置的第二通道的操作

[0126] 将1mg/ml的5-羟基多巴胺HCl(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich))溶解于10mM Tris缓冲液(1M超纯1M Tris-HCl,pH 8.0,英杰公司(Invitrogen))中。接下来,将所得产物的pH调整到8,借此制备涂覆组合物。用涂覆组合物来填充装置(1 III³ⁱⁿ¹未经涂覆显微镜室(易必迪公司))的第二通道。在两个小时之后,使用DDW(水净化系统,拉博基因公司(LABOGENE))来冲洗第二通道。

[0127] 操作3:将结合到模板的引物固定(组合)到经涂覆第二通道上的操作

[0128] 将引物-5SS-聚A9(百奥尼公司(BIONEER),序列号9)用作引物。

[0129] 在制备100pmol的引物及5M DTT(DL-二硫苏糖醇,西格玛奥德里奇公司)之后,将100pmol的引物与5 μ l的5M DTT混合,且将DDW(水净化系统,拉博基因公司)添加到其中达总共50 μ l。使混合物经受DDT处理达四个小时以使引物的二硫键断裂,在此之后使用3K亚米康(Amicon)管(亚米康超离心过滤器3K,密理博公司(MILLIPORE))(艾本德(Eppendorf)离心机5415R)来将剩余DTT消除(总共执行两次离心分离以便彻底消除DTT,包含在132,000rpm及4°C下达25分钟的第一离心分离以及在添加40 μ l的DDW的情况下在132,000rpm及4°C下达

25分钟的第二离心分离)。将通过消除DTT而获得的5 μ l的溶液放置到第二通道103的三个分支中的每一者中(通道1:图1的第二通道的左分支,通道2:图1的第二通道的中间分支,及通道3:图1的第二通道的右分支)且搁置达两个小时,后续接着用DDW(水净化系统,拉博基因公司)进行冲洗。

[0130] 操作4:将包含与目标基因互补的结合区域、与引物互补的结合区域及用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域的模板与引物组合的操作(引物-模板组合操作)

[0131] 参考图1,通过每一出口104将模板施加到第二通道103,借此将每一模板与固定于具有分支的第二通道103上的引物组合及固定。针对阴性对照品,不将任何模板施加到第二通道。具体来说,将用于炭疽芽孢杆菌的模板(Template_B_A,序列号10)施加到具有三个分支的第二通道的通道2(图1的第二通道的中间分支),且将通道1及通道3用作阴性对照品。具体来说,将1X PBS(生命技术公司(Life Technologies)的胎牛血清(Gibco))添加到0.2 μ l(=20pmole)的100Template_B_A以达5 μ l并放置到通道2中,同时将6 μ l的1X PBS(生命技术公司的胎牛血清)放置到通道1及通道3中。在搁置达两个小时之后,用DDW(水净化系统/拉博基因公司)来冲洗第二通道。

[0132] 实施例2-2:用于制造用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的方法(用于制造用于检测两个或超过两个病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因的微流体装置的方法)

[0133] 操作1:提供微流体装置的操作

[0134] 根据本发明的一个实施例,微流体装置(1 III³ⁱⁿ¹未经涂覆显微镜室(易必迪公司))经制备以制造用于检测目标基因的微流体装置(用于检测病原体基因的微流体装置)。本发明的微流体装置包含:板100;入口101,其形成于所述板上且样本溶液是通过所述入口从外部被引入;第一通道102,其连接到所述入口以容纳所引入样本溶液;第二通道103,其连接到第一通道;及出口104,其连接到第二通道(参见图1)。第二通道103可连接到第一通道且可划分成两个或超过两个分支(举例来说,三个分支)。

[0135] 操作2:涂覆微流体装置的第二通道的操作

[0136] 将1mg/ml的5-羟基多巴胺HCl(西格玛奥德里奇公司)溶解于10mM Tris缓冲液(1M超纯1M Tris-HCl,pH 8.0,英杰公司)中。接下来,将所得产物的pH调整到8,借此制备涂覆组合物。用涂覆组合物来填充装置(1 III³ⁱⁿ¹未经涂覆显微镜室(易必迪公司))的第二通道。在两个小时之后,使用DDW(水净化系统,拉博基因公司)来冲洗第二通道。

[0137] 操作3:将结合到模板的引物固定(组合)到经涂覆第二通道上的操作

[0138] 将引物-5SS-聚A9(百奥尼公司,序列号9)用作引物。

[0139] 在制备100pmol的引物及5M DTT(DL-二硫苏糖醇,西格玛奥德里奇公司)之后,将100pmol的引物与5 μ l的5M DTT混合,且将DDW(水净化系统,拉博基因公司)添加到其中达总共50 μ l。使混合物经受DDT处理达四个小时以使引物的二硫键断裂,在此之后使用3K亚米康管(亚米康超离心过滤器3K,密理博公司)(艾本德离心机5415R)来将剩余DTT消除(总共执行两次离心分离以便彻底消除DTT,包含在132,000rpm及4 $^{\circ}$ C下达25分钟的第一离心分离以及在添加40 μ l的DDW的情况下在132,000rpm及4 $^{\circ}$ C下达25分钟的第二离心分离)。将通过消除DTT而获得的5 μ l的溶液放置到第二通道103的三个分支中的每一者中(通道1:图1的第二通道的左分支,通道2:图1的第二通道的中间分支,及通道3:图1的第二通道的右分支)且搁

置达两个小时,后续接着用DDW(水净化系统,拉博基因公司)进行冲洗。

[0140] 因此,可将引物固定于微流体装置的第二通道上(参见图3的A)。

[0141] 操作4:将包含与目标基因互补的结合区域、与引物互补的结合区域及用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域的模板与引物组合的操作(引物-模板组合操作)

[0142] 参考图1,通过每一出口104将模板施加到第二通道103,借此将每一模板与固定于具有分支的第二通道103上的引物组合及固定。针对阴性对照品,不将任何模板施加到第二通道。具体来说,将用于埃博拉病毒的模板(Template_E)施加到具有三个分支的第二通道的通道2(图1的第二通道的中间分支)、将用于炭疽芽孢杆菌的模板(Template_B_A)施加到第二通道的通道3(图1的第二通道的右分支),且将通道1用作阴性对照品。具体来说,将1X PBS(生命技术公司的胎牛血清)添加到0.24 μ l(=24pmole)的100Template_E(序列号11)以达6 μ l并放置到通道3中。将1X PBS(生命技术公司的胎牛血清)添加到0.2 μ l(=20pmole)的100Template_B_A(序列号10)以达5 μ l并放置到通道2中,同时将6 μ l的1X PBS(生命技术公司的胎牛血清)放置到通道1及通道3中。在搁置达两个小时之后,用DDW(水净化系统/拉博基因公司)来冲洗第二通道。

[0143] 因此,可将固定于第二通道上的引物与模板组合(参见图3的B)。用于辨识特定病原体基因的不同模板可结合到固定于第二通道的相应分支上的引物,借此同时检测不同目标基因。

[0144] <实施例3>用于使用用于检测目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法

[0145] 检测目标基因的原理

[0146] 用于使用用于检测目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法是基于以下原理:闭合形式哑铃形模板(其中切口消失)仅在存在目标基因(举例来说,病原体基因)的情况下被连结且随后通过滚环扩增(RCA)而被扩增以形成自组装粒子精确结构(参见图2)。

[0147] 图12是具体图解说明图3B到图3D的过程的示意图。也就是说,图12A展示模板结合到固定于根据本发明的用于检测目标基因的微流体装置的第二通道上的引物。当目标病原体基因存在于流动到用于检测目标基因的微流体装置的第二通道中的样本中时,目标病原体基因结合到模板的第一目标基因结合区域及第二目标基因结合区域两者(图12B及图2B)。此处,由于第一目标基因结合区域及第二目标基因结合区域的相对端变得彼此接近,因此仅小间隙(也就是说,切口)存在于所述第一目标基因结合区域与第二目标基因结合区域之间。同时,第一模板内互补结合区域与第二模板内互补结合区域也变得彼此接近以形成互补结合。切口通过连接酶(作为连接邻近5'及3'端的酶)而彼此连接,使得模板将完全闭合形式转变成哑铃形状(图12C及图2C)。

[0148] 等温核酸聚合酶使用用于检测目标基因的闭合形式模板作为模板来执行无限重复复制核酸的RCA直到耗尽dNTP为止(参见图12D及图2D)。由于经复制部分从用于检测目标基因的模板位移,因此产生具有用于检测目标基因的模板的重复序列的线性核酸。此线性核酸的第一目标基因结合区域及第二目标基因结合区域与目标基因组合,且长的经缠结核酸团块通过RCA而形成并与第二通道的涂层一起絮凝成大的水凝胶团块。观察到,所产生水凝胶团块存在于第二通道中且阻塞连接到第二通道的出口。

[0149] 实施例3-1:用于使用用于检测单个目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法(用于使用用于检测单个目标基因的微流体装置来检测单个目标病原体(炭疽芽孢杆菌))

基因的方法)

[0150] 操作1:根据实施例2-1提供用于检测单个目标基因的微流体装置(用于检测单个病原体(炭疽芽孢杆菌)基因的微流体装置)的操作

[0151] 提供(制备)用于检测单个目标基因的微流体装置。具体来说,根据实施例2-1提供用于检测单个目标基因的微流体装置(用于检测单个病原体(炭疽芽孢杆菌)基因的微流体装置)。

[0152] 操作2:将样本溶液引入到第一通道中的操作

[0153] (1) 制备样本溶液

[0154] 基于通过从百奥尼公司(HPLC净化)订购的炭疽芽孢杆菌的病原体基因序列而制备样本(Pathogen_BA,序列号12)。使用1X PBS中的Pathogen_B_A 100来制备样本溶液。

[0155] 以下表4图解说明实施例3中所使用的疽芽孢杆菌的模板及炭病原体序列。

[0156] [表4]

病原体种类	序列号	模板序列(5' → 3')	序列号	病原体序列
炭疽芽孢杆菌	10	5'-磷酸盐 TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TGA GCG-3'	12	5'-TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA 磷酸盐 -3'

[0157] (2) 将(1)中所制备的样本溶液引入到第一通道的操作

[0159] 通过用于检测单个目标基因的微流体装置的入口而将(1)中所制备的60μl的样本溶液引入到第一通道中。经由第一通道通过毛细管而将引入到用于检测单个目标基因的微流体装置的第一通道中的样本溶液转移到第二通道。在搁置达两个小时之后,用DDW(水净化系统,拉博基因公司)来冲洗装置。

[0160] 操作3:将包含于样本溶液中的单个目标基因(单个病原体(炭疽芽孢杆菌)基因)与模板进行连结

[0161] 通过毛细管而使引入到第一通道中的样本溶液流动到第二通道中。

[0162] 接下来,用30μl的2X T7连接酶、5μl的T7连接酶5、0.2μl的100mM DTT及24.8μl的DDW(水净化系统/拉博基因公司)来填充用于检测单个目标基因的微流体装置的第二通道。为防止装置中的湿气的蒸发,允许混合物在用封口膜来密封的塑料容器中与样本溶液进行反应。塑料容器填充有用水弄湿的组织及25℃水。接下来,使反应物在震荡培养箱(VS-8480(视觉科学公司(VISION SCIENTIFIC CO)))中在无震荡的情况下于25℃下经受反应达三个小时。

[0163] 操作4:对经连结基因产物进行扩增(滚环扩增)

[0164] 接下来,用2μl的25mM dNTP、6μl的10X T7连接酶反应缓冲液(生物实验室公司)、

50 μ l的 ϕ 29 聚合酶(10单位/ μ l)、1 μ l的焦磷酸酶及1 μ l的100mM DTT来填充用于检测单个目标基因的微流体装置的第二通道。在用封口膜密封的塑料容器中执行反应以便防止用于检测单个目标基因的微流体装置的第二通道中的湿气的蒸发。塑料容器填充有用水弄湿的组织及30 $^{\circ}$ C水。接下来,使反应物在震荡培养箱(VS-8480(视觉科学公司))中在无震荡的情况下于30 $^{\circ}$ C下经受反应达三个小时。

[0165] 操作5:检测经扩增目标基因产物(识别所检测目标基因)

[0166] 通过入口而添加50 μ l的1:1000凝胶红(GelRedTM,拜奥蒂乌姆公司(Biotium))稀释物(利用DDW(水净化系统,拉博基因公司)来稀释)作为检测组合物。允许1:200凝胶红(GelRedTM,拜奥蒂乌姆公司)稀释物经由第一通道流动到第二通道。虽然一般来说使用以1:10000稀释的凝胶红(GelRedTM,拜奥蒂乌姆公司),但凝胶红的稀释率经调整以用肉眼来观看颜色且并不限于此。

[0167] 参考图9的a,通道2中的红色标记是DNA膜,且可能使用染料试剂(例如凝胶红)作为检测组合物来检测经扩增目标基因产物。此外,参考图9的b,使用成像器(Gel DocTM EZ,伯乐公司)容易地认识到,用于检测单个目标基因的微流体装置的通道2中的流被阻塞。因此,已识别出:根据本发明的用于检测单个目标基因的微流体装置在不使用热循环仪且不特别改变温度的情况下于暖温度(举例来说,30 $^{\circ}$ C的温度)下利用肉眼实现对单个目标基因(举例来说,单个病原体(炭疽芽孢杆菌)基因)的检测。

[0168] 实施例3-2:用于使用用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法(用于使用用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置来检测单个目标病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因的方法)

[0169] 操作1:根据实施例2-2提供用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置(用于检测两个或超过两个病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因的微流体装置)的操作

[0170] 提供(制备)用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置。具体来说,根据实施例2-2提供用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置(用于检测两个或超过两个病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因的微流体装置)。

[0171] 操作2:将样本溶液引入到第一通道中的操作

[0172] (1) 制备样本溶液

[0173] 基于通过从百奥尼公司(HPLC净化)订购的炭疽芽孢杆菌的病原体基因序列而制备样本(Pathogen_BA,序列号12)。使用1X PBS中的Pathogen_B_A 100来制备样本溶液。

[0174] (2) 制备样本

[0175] 基于通过从百奥尼公司(HPLC净化)订购的炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒的病原体基因序列而制备样本(Pathogen_BA,序列号12及Pathogen_E,序列号13)。使用1X PBS中的Pathogen_B_A 100来制备样本溶液。此外,使用1X PBS中的Pathogen_E 100来制备样本溶液。

[0176] 以下表5图解说明实施例2中所使用的炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒的模板及病原体序列。

[0177] [表5]

	病原体种类	序列号	模板序列(5' → 3')	序列号	病原体序列
[0178]	炭疽芽孢杆菌	10	5'-磷酸盐-TTT GAA ATG GAG AAA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT TGA GCG-3'	12	5'-TTC TCC ATT TCA AAC GCT CA-磷酸盐 -3'
	埃博拉病毒	11	5'-磷酸盐-GA CGC ACG CG A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG	13	5'-CGC GTG CGT CGT GCG ATT TCT CGT
[0179]			G TA GCA T GC TA G T AT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT AAC GAG AAA TCG CAC-3'		T-磷酸盐-3'

[0180] (2) 将(1)中所制备的样本溶液引入到第一通道的操作

[0181] 通过用于检测单个目标基因的微流体装置的入口而将(1)中所制备的60μl的样本溶液引入到第一通道中。经由第一通道将引入到用于检测单个目标基因的微流体装置的第一通道中的样本溶液转移到第二通道。将总共20μl Template_E中的5μl及总共20μl Template_B_A中的5μl放置到第二通道的通道2及通道3中。在搁置达两个小时之后,用DDW(水净化系统,拉博基因公司)来冲洗装置。

[0182] 操作3:将包含于样本溶液中的两个或超过两个目标基因(两个或超过两个病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因))与模板进行连结

[0183] 用30μl的2X T7连接酶、5μl的T7连接酶、0.2μl的100mM DTT及24.8μl的DDW(水净化系统/拉博基因公司)来填充用于检测单个目标基因的微流体装置的第二通道。为防止装置中的湿气的蒸发,在用封口膜来密封的塑料容器中执行反应。塑料容器填充有用水弄湿的组织及25℃水。接下来,使反应物在震荡培养箱(VS-8480(视觉科学公司))中在无震荡的情况下于25℃下经受反应达三个小时。

[0184] 因此,存在于样本中的目标基因(病原体基因)互补地结合到特定模板以形成环形模板(参见图3的C)。

[0185] 操作4:对经连结基因产物进行扩增(滚环扩增)

[0186] <方法1>

[0187] 接下来,用2μl的25mM dNTP、6μl的10X T7连接酶反应缓冲液(生物实验室公司)、50μl的φ 29聚合酶(10单位/μl)、1μl的焦磷酸酶及1μl的100mM DTT来填充用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的第二通道。在用封口膜密封的塑料容器中执行反应以

便防止用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的第二通道中的湿气的蒸发。塑料容器填充有用水弄湿的组织及30℃水。接下来,使反应物在震荡培养箱(VS-8480(视觉科学公司))中在无震荡的情况下于30℃下经受反应达三个小时。

[0188] <方法2>

[0189] 接下来,用2μl的25mM dNTP、1μl的0.4mM生物素-14-dCTP、2μl的10X T7连接酶反应缓冲液(生物实验室公司)、5μl的φ 29聚合酶(500单位/μl)、1μl的焦磷酸酶、0.8μl的100mM DTT及6.2μl的DDW来填充用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的第二通道。在用封口膜密封的塑料容器中执行反应以便防止用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的第二通道中的湿气的蒸发。塑料容器填充有用水弄湿的组织及30℃水。接下来,使反应物在震荡培养箱(VS-8480(视觉科学公司))中于30℃下经受反应达三个小时。

[0190] 目标基因(核酸)可根据方法1或方法2通过RCA而得以扩增(参见图3的D)。

[0191] 操作5:检测经扩增目标基因产物(识别所检测目标基因)

[0192] 经缠结单链滚环扩增的基因产物(参见图3的E)可选择性地阻塞微流体装置的第二通道的每一分支,且因此可能检测基因。可将检测组合物添加到微流体装置的第二通道,借此促进检测(参见图3的F)。

[0193] <与操作4的方法1相关的检测方法>

[0194] 通过入口而添加50μl的1:1000凝胶红(GelRed™,拜奥蒂乌姆公司)稀释物(利用DDW(水净化系统,拉博基因公司)来稀释)作为检测组合物。允许1:80凝胶红(GelRed™,拜奥蒂乌姆公司)稀释物经由第一通道流动到第二通道。

[0195] 参考图10的b,使用成像器(Gel Doc™ EZ,伯乐公司)容易地认识到,用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的通道2及通道3中的流被阻塞。因此,已识别出:根据本发明的用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置在不使用热循环仪且不特别改变温度的情况下于暖温度(举例来说,30℃的温度)下利用肉眼实现对两个或超过两个目标基因(举例来说,两个或超过两个病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因)的同时检测。

[0196] <与操作4的方法2相关的检测方法>

[0197] 将链霉亲和素磁珠用作检测组合物。具体来说,通过入口而添加50μl的1:20链霉亲和素荧光分子(Fluoresbrite) YG微球2.0微稀释物(用DDW(水净化系统,拉博基因公司)来稀释)。

[0198] 参考图11,容易地认识到,用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置的通道2及通道3中的流被空气层阻塞(归因于RCA产物)或被通过RCA产物的生物素与链霉亲和素的反应而进一步缠结的RCA产物阻塞。因此,已识别出:根据本发明的用于检测两个或超过两个目标基因的微流体装置在不使用热循环仪且不特别改变温度的情况下于暖温度(举例来说,30℃的温度)下利用肉眼实现对两个或超过两个目标基因(举例来说,两个或超过两个病原体(炭疽芽孢杆菌及埃博拉病毒)基因)的同时检测。

[0199] <实验实施例1>识别每一操作的电泳结果

[0200] 进行实验以使用电泳结果来识别预备性实施例1中所制造的Template_BA与病原体的结合及连结。在实验实施例1中,在管中简单地执行实验以识别预备性实施例1的模板与病原体的反应。此外,将热循环仪用于不同反应条件中的测试。另外,进行实验以使用电泳结果来识别预备性实施例1中所制造的Template_E与病原体的结合及连结。在管实验中,

由于模板并未固定到引物,因此磷酸盐未附接到每一病原体的3'端(也就是说,病原体基因的3'端)。

[0201] (1) 识别粘接操作

[0202] 用DEPC(西格玛奥德里奇公司)作为溶剂将用于100炭疽芽孢杆菌的模板(Template_BA,序列号10)稀释成1Template_BA。将3.2 μ l的DDW(水净化系统,拉博基因公司)、1 μ l的具有pH 7.4的10X PBS(生命技术公司的胎牛血清)及5 μ l的40mM MgCl₂(西格玛奥德里奇公司)依序放置到管中,将0.8 μ l(也就是说,0.8pmole)的1Template_BA添加到所述管。随后,使用热循环仪(伯乐公司的T100™)使温度从95℃降低到4℃达一个小时。

[0203] 接下来,添加2 μ l的上样/loading)染料(凝胶上样染料蓝6X,生物实验室公司),后续接着在1X Tris-硼酸盐-EDTA(TBE)缓冲液中以15%PAGE进行电泳(150V,45分钟)且用凝胶红(GelRed™,拜奥蒂乌姆公司)来进行染色,借此使用Gel Doc™ EZ(伯乐公司)来识别电泳结果。

[0204] 以相同方式进行用于识别粘接操作的实验,只有使用Template_E(序列号11)而非Template_BA除外。

[0205] (2) 识别杂交操作

[0206] 如下进行实验以识别样本中的炭疽芽孢杆菌(Pathogen_BA Not Phosp,序列号14)与模板的杂交。首先,将2 μ l的DDW(水净化系统,拉博基因公司)、1 μ l的具有pH 7.4的10X PBS(生命技术公司的胎牛血清)及5 μ l的40mM MgCl₂(西格玛奥德里奇公司)依序放置到管中,将1 μ l的10Pathogen_BA_Not Phosp及1 μ l的10Template_B_A添加到所述管。随后,使用热循环仪(伯乐公司的T100™)使温度从95℃降低到4℃达一个小时。

[0207] 接下来,用9 μ l的1X PBS来稀释1 μ l(也就是说,0.8pmol)的模板以具有10 μ l的总体积,在此之后添加2 μ l的上样染料(凝胶上样染料蓝6X,生物实验室公司),后续接着在1X Tris-硼酸盐-EDTA(TBE)缓冲液中以15%PAGE进行电泳(150V,45分钟)且用凝胶红(GelRed™,拜奥蒂乌姆公司)来进行染色,借此使用Gel Doc™ EZ(伯乐公司)来识别电泳结果。

[0208] 以相同方式识别杂交操作,只有使用Template_E(序列号11)而非Template_BA(序列号1)且使用Template_E_Not Phosp(序列号15)而非Pathogen_BA_Not Phosp(序列号14)除外。

[0209] (3) 识别连结操作

[0210] 将2.4 μ l的DDW(水净化系统,拉博基因公司)、10 μ l的2X T7连接酶反应缓冲液(生物实验室公司)、1.6 μ l的100Pathogen_BA_Not Phosp(序列号14)及0.8 μ l的100Template_BA(序列号10)依序放置到管中,且使用热循环仪(伯乐公司的T100™)使温度从95℃降低到4℃达五分钟。接下来,添加0.2 μ l的100mM DTT(爱彼森特公司(Epicenter)的RepliPhi ϕ 29试剂组(0.1 μ g/ μ l))及5 μ l的T7连接酶(生物实验室公司)。接着,使用热循环仪(伯乐公司的T100™)将温度维持于25℃下达13个小时、维持于65℃下达20分钟且维持于10℃下。因此,获得20 μ l的4连结产物。将2 μ l的上样染料(凝胶上样染料蓝6X,生物实验室公司)添加到0.8pmole的连结产物,后续接着在1X Tris-硼酸盐-EDTA(TBE)缓冲液中以15%PAGE进行电泳(150V,45分钟)且用凝胶红(GelRed™,拜奥蒂乌姆公司)来进行染色,借此使用Gel Doc™ EZ(伯乐公司)来识别电泳结果。

[0211] 以相同方式识别连结操作,只有使用Template_E(序列号11)而非Template_BA(序列号1)且使用Template_E_Not Phosp(序列号15)而非Pathogen_BA_Not Phosp(序列号14)除外。

[0212] (4) 滚环扩增

[0213] 将7.2 μ l的DDW(水净化系统,拉博基因公司)、2 μ l的10X T7连接酶反应缓冲液(生物实验室公司)及爱彼森特公司的RepliPHI ϕ 29试剂组(0.1 μ g/ μ l)依序放置到管中,将在连结操作中获得的2 μ l(8pmole)的4连结产物添加到所述管。随后,依序添加2 μ l的25mM dNTP(爱彼森特公司的RepliPHI ϕ 29试剂组(0.1 μ g/ μ l))、0.8 μ l的100mM DTT(爱彼森特公司的RepliPHI ϕ 29试剂组(0.1 μ g/ μ l))、1 μ l的焦磷酸酶(100U/ml,生物实验室公司)及5 μ l的 ϕ 29聚合酶(爱彼森特公司的RepliPHI ϕ 29试剂组(0.1 μ g/ μ l))。接着,使用热循环仪(伯乐公司的T100™)将温度维持于30℃下达15个小时、维持于65℃下达10分钟且维持于4℃下。

[0214] (5) 识别电泳结果

[0215] 基于DNA梯(快速上样LMW梯,生物实验室公司),将模板(Template_BA,序列号10)、病原体(Pathogen_BA_Not Phosp,序列号14)及在操作(1)到(3)中获得的产物中的每一者中的0.8pmole上样并使其经受电泳,在图4中图解说明所述电泳的结果。

[0216] 参考图4,模板一般来说具有线性形式,也就是说,是线性模板(参见图4的a)。在模板中,用以形成哑铃形状的模板内互补结合区域彼此互补地结合以在自组装条件下进行粘接,借此形成自组装形式,也就是说,自组装模板(参见图4的b)。当目标基因(举例来说,病原体基因)结合到自组装模板中的与目标基因互补的结合区域时,模板形成为闭合形式哑铃形模板(其中切口消失)且对所述模板进行连结(参见图4的c)。随后,使经连结产物经受RCA。

[0217] <实验实施例2>识别RCA产物的SEM图像

[0218] (1) 识别炭疽芽孢杆菌

[0219] 将20 μ l的RCA产物(根据实验实施例1的方法(4)使用在预备性实施例1中制造的Template_B_A而获得)与2 μ l的2M MgCl₂混合且缓慢地冷却(从95℃到4℃达一个小时),使得形成约1mm的白色DNA球。

[0220] 将DNA球在玻璃器皿(马林费尔德公司(MARIENFELD))上进行干燥达24个小时、结合到云母(派尔高(Pelco)云母片,泰德派勒公司(Ted Pella Corp.))且利用SEM(Tm3030台式显微镜,日立高新技术公司(Hitachi High-Tech))来拍照。如图5中所展示,形成精细单链DNA团块。

[0221] (2) 识别埃博拉病毒

[0222] 将20 μ l的RCA产物(根据实验实施例1的方法(3)使用在预备性实施例1中制造的Template_E而获得)与5M NH₄OAc 40(西格玛奥德里奇公司)混合,且将100%EtOH 500添加到所述混合物,后续接着进行冷固达20分钟。使所得产物经受离心分离(10,000rpm,20分钟,4℃),且对40 μ l的上清液进行超声处理(必能信(BRANSON)5510)达30分钟。将产物在玻璃上进行干燥达24个小时、结合到云母(派尔高云母片,泰德派勒公司)且利用SEM(Tm3030台式显微镜,日立高新技术公司)来拍照。如图6中所展示,形成经缠结链团块的经扩增基因产物。

[0223] <实验实施例3>识别RCA基因产物的水凝胶形成

[0224] 进行实验以识别在实验实施例1中通过RCA而获得的经扩增基因产物是否形成水凝胶。将炭疽芽孢杆菌 (Pathogen_BA Not Phosp, 序列号14) 及埃博拉病毒 (Pathogen_E Not Phosp, 序列号15) 用作病原体。

[0225] 在实验实施例3中,在管中简单地执行实验以识别预备性实施例1的模板与病原体的反应。此外,热循环仪用于不同反应条件中的测试。

[0226] 针对归因于水凝胶形成的粘度测量,使用管及移液管尖端来执行粘度及旋转粘度测量。

[0227] (1) 使用管及移液管尖端进行粘度测量

[0228] 在将管基于所述管的主轴倾斜90度的同时,测量反应物液体(含有在实验实施例1的(4)中获得的RCA产物的溶液)的流动性。未识别出流动性达60秒指示检测到目标基因(举例来说,病原体基因(Template_BA或Template_E))。

[0229] 此外,当使用移液管尖端将反应物液体(含有在实验实施例1的(4)中获得的RCA产物的溶液)抽出(吸出)时,由于粘度改变而使反应物液体(含有在实验实施例1的(4)中获得的RCA产物的溶液)沿着移液管尖端的表面被吸起。当液体具有与水的粘度水平类似的粘度水平时,无液体沿着尖端被吸起。然而,当液体的粘度增加时,材料沿着尖端较多地被吸起且被返回(参见图7的a)。

[0230] 在使用Template_BA或Template_E(其在预备性实施例1中制造)的RCA中,产物具有粘度以几乎不展现流动性达60秒,从而使得可检测目标基因(举例来说,病原体基因(Template_BA或Template_E))。此外,已识别出:与使用Template_BA相比,使用与病原体互补的具有更长长度的Template_E会形成具有更高粘度的水凝胶。

[0231] (2) 利用旋转粘度计进行测量

[0232] 使用旋转粘度计来测量通过实验实施例1中所揭示的RCA(其使用在预备性实施例1中所制造的Template_E)而获得的经扩增基因产物的粘度改变。测量反应物液体(含有在实验实施例1的(4)中获得的RCA产物的溶液)的粘度改变的增加及储能模量(G')与耗能模量(G'')之间的比率,在图7的b(x轴:频率(Hz),y轴:帕斯卡(Pa))中图解说明其结果。由水凝胶形成所致的粘度改变的增加指示检测目标基因(举例来说,埃博拉病毒)的可能性。

[0233] <实验实施例4>识别涂覆用于检测目标基因的微流体装置的第二通道的效应

[0234] 在根据实施例3-1的方法执行用于使用用于检测目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法之后,用原子探针显微镜(AFM,NX-10,帕克系统公司(Park System))来观察第二通道。在执行用于使用通过实施例2-1的用于制造用于检测单个目标基因的微流体装置的方法(只有不执行操作2的过程除外(不具有用5-羟基多巴胺HCl涂覆第二通道的过程))而制造的用于检测单个目标基因的微流体装置来检测目标基因的方法(实施例3-1的方法)之后,用原子探针显微镜(AFM,NX-10,帕克系统公司)来观察第二通道。

[0235] 因此,当在不具有使用5-羟基多巴胺HCl进行涂覆的过程(使用5-羟基多巴胺HCl的预处理过程)的情况下将引物固定(图8的a)时,引物几乎不附接到板的表面,且因此在用于检测目标基因的微流体装置的第二通道上不发生扩增。相反,当在执行使用5-羟基多巴胺HCl进行涂覆的过程(使用5-羟基多巴胺HCl的预处理过程)且将引物固定(图8的b)之后对目标基因(核酸)进行扩增时,核酸在用于检测目标基因的微流体装置的第二通道上主动

扩增。因此,展示5-羟基多巴胺HCl将DNA引物有效地固定于用于检测目标基因的微流体装置的第二通道上。

[0236] 因此,当用5-羟基多巴胺HCl涂覆用于检测目标基因的微流体装置的第二通道时,5-羟基多巴胺HCl与含有硫醇基的引物进行反应,使得引物有效地固定于用于检测目标基因的微流体装置的第二通道上,因此通过后续过程而增加核酸的扩增。

[0237] <实验实施例5>使用用于检测目标基因的微流体装置来检测MERS病毒

[0238] (1) 制造用于检测目标MERS基因的微流体装置

[0239] 如上文在实施例2的操作1及操作2中所描述,在图1中制备包含入口、第一通道、三个第二通道及形成于第二通道(其形成于板上)的端处的出口的装置。虽然在实施例2中将5-羟基多巴胺HCl引入到第二通道中以涂覆第二通道,但在当前实验实施例中用乙烯基通过气相沉积而涂覆塑料材料的第二通道。通过与实施例2中相同的方法而进行涂覆也是可能的。接着,用DDW来冲洗装置。

[0240] 接下来,如在实施例2的操作3中,通过入口而引入作为引物的引物-5SS-聚A9(百奥尼公司,序列号9)与DTT的混合物溶液。通过DTT而使存在于引物中的硫醇基暴露,且经暴露硫醇基结合到第二通道上的乙烯基涂层(或5-羟基多巴胺HCl涂层)。接下来,执行用DDW来进行冲洗。

[0241] 将用1X PBS(生命技术公司的胎牛血清)来稀释的0.2 μ l(=20pmole)的不同模板100的溶液添加到固定于三个第二通道上的引物,使得每一模板结合到引物。

[0242] 具体来说,将在预备性实施例1的(1)中获得的Template_BA(用于炭疽芽孢杆菌的模板,序列号10)结合到从俯视图来看的左第二通道。此第二通道是阴性对照品(NC)。即使MERS病毒存在于引入到微流体装置中的样本中,MERS病毒也不与模板进行反应,因此不引起RCA。

[0243] 将用于MERS病毒(MERS-CoV)的模板结合到中间第二通道。中间第二通道是样本。仅在MERS基因存在于引入到微流体装置中的样本中时,RCA才发生。用于MERS病毒的模板具有以下序列。

[0244] 模板MERS

5'/5Phos/**AGG GCA CAT CTC CGA ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG**
 [0245] ***GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT***
ATA CCC - 3'

[0246] 在模板MERS序列中,与目标MERS-CoV基因互补的区域在白色背景中以粗体类型来指示、模板内互补区域以加下划线斜体类型来指示且与引物互补的结合区域以加下划线斜体类型来指示。

[0247] 将用于MERS病毒的模板结合到固定于第二通道(从俯视图来看的右第二通道)上的引物,且用以结合到模板的目标MERS基因经添加以总是引起RCA。右第二通道是阳性对照品(PC)。

[0248] (2) 检测目标MERS基因

[0249] 接下来,通过在(1)中所制造的微流体装置的入口而引入包含用以结合到用于MERS病毒的模板的MERS病毒基因的样本。随后,允许在25 $^{\circ}$ C下发生连结达一整夜,且允许在25 $^{\circ}$ C下发生RCA达四个小时。可取决于条件而调整连结时间及RCA时间。举例来说,当使用荧

光来识别结果时,可将连结时间及RCA时间调整到甚至更短。举例来说,可在两个小时的连结及两个小时的RCA之后执行观察。

[0250] 图13是图解说明如实验实施例5中的在具有三个第二通道(其为NC、样本及PC)的微流体装置中所发生的过程的示意图。

[0251] 在图14中图解说明结果。在图14中,作为NC的右第二通道的出口未被阻塞,使得样本流出。在作为样本的中间第二通道及作为PC的右第二通道中发生RCA以形成阻塞出口的水凝胶团块。

[0252] [参考编号描述]

[0253] 100:板

[0254] 101:入口

[0255] 102:第一通道

[0256] 103:第二通道

[0257] 104:出口

[序列表]

	<110>	梨花女子大学校产学协力团	
	<120>	用于检测目标基因的微流体装置、用于制造微流体装置的方法及用于使用微流体装置进行检测的方法	
	<130>	P15023-EWHA	
	<150>	KR 10-2014-0149495	
	<151>	2014-10-30	
	<160>	17	
	<170>	KopatentIn 2.0	
	<210>	1	
	<211>	108	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	对沙门氏菌具有特异性的模板	
	<220>		
[0001]	<221>	modified_base	
	<222>	(1)	
	<223>	t的5' OH基团经磷酸基取代	
	<400>	1	
		tgctatgccg actcaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat	60
		cgacgtccca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcca tttgagtg	108
	<210>	2	
	<211>	110	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	对小肠结肠炎耶尔森菌具有特异性的模板	
	<220>		
	<221>	modified_base	
	<222>	(1)	
	<223>	g的5' OH基团经磷酸基取代	
	<400>	2	
		gctcacccca gtaaaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat	60
		cgacgtccca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcca ttagctttac	110

<210>	3		
<211>	112		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	对土拉热弗朗西丝菌具有特异性的模板		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)		
<223>	t的5' OH基团经磷酸基取代		
<400>	3		
	tgtttccagt atttaacga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat		60
	cgacgtcca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcca tttttcctcc ga		112
<210>	4		
<211>	111		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	对鼠疫耶尔森菌具有特异性的模板		
[0002]			
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(1)		
<223>	t的5' OH基团经磷酸基取代		
<400>	4		
	tcgaatgcca acaaaatcga agtactcagc gtaagtttag aggcattagc atgctagtat		60
	cgacgtcca cgtaccaaca acttacgctg agtacttcca ttctctgaac a		111
<210>	5		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	结合到对沙门氏菌具有特异性的模板的沙门氏菌序列		
<220>			
<221>	modified_base		
<222>	(20)		
<223>	a的3' OH基团经磷酸基取代		
<400>	5		

	gagtcggcat agcacactca	20
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 结合到对小肠结肠炎耶尔森菌具有特异性的模板的小肠结肠炎耶尔森菌序列	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (22)	
	<223> t的3' OH基团经磷酸基取代	
	<400> 6	
	ttactggggt gagcgtaaag ct	22
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0003]	<223> 结合到对土拉热弗朗西丝菌具有特异性的模板的土拉热弗朗西丝菌序列	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (24)	
	<223> a的3' OH基团经磷酸基取代	
	<400> 7	
	aaatactgga aacatcggag gaaa	24
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 结合到对鼠疫耶尔森菌具有特异性的模板的鼠疫耶尔森菌序列	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (23)	
	<223> g的3' OH基团经磷酸基取代	
	<400> 8	
	ttgttgcat tcgatgttca gag	23

	<210>	9	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<220>		
	<221>	modified_base	
	<222>	(1)	
	<223>	a经硫醇基改质	
	<400>	9	
		aaaaaaaaag ggacgtcgat actagcatgc ta	32
	<210>	10	
	<211>	99	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	对炭疽芽孢杆菌具有特异性的模板	
[0004]	<220>		
	<221>	modified_base	
	<222>	(1)	
	<223>	t的5' OH基团经磷酸基取代	
	<400>	10	
		tttgaaatgg agaaaatcga agtactcagc gtaagtttag aggtagcatg ctagtatcga	60
		cgtacgtacc aacttacgct gactacttcg atttgagcg	99
	<210>	11	
	<211>	104	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	对埃博拉病毒具有特异性的模板	
	<220>		
	<221>	modified_base	
	<222>	(1)	
	<223>	g的5' OH基团经磷酸基取代	
	<400>	11	

	gacgcacgcg aatcgaagta ctcagcgtaa gtttagaggt agcatgctag tatcgacgta	60
	cgtaccaact tacgctgagt acttcgatta acgagaaatc gcac	104
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 结合到对炭疽芽孢杆菌具有特异性的模板的炭疽芽孢杆菌序列	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)	
	<223> a的3' OH基团经磷酸基取代	
	<400> 12	
	ttctccattt caaacgctca	20
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0005]	<220>	
	<223> 结合到对埃博拉病毒具有特异性的模板的埃博拉病毒序列	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (25)	
	<223> t的3' OH基团经磷酸基取代	
	<400> 13	
	cgcgtgcgtc gtgcgatttc tcgtt	25
	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 结合到对炭疽芽孢杆菌具有特异性的模板的炭疽芽孢杆菌序列	
	<220>	
	<221> modified_base	
	<222> (20)	
	<400> 14	
	ttctccattt caaacgctca	20

	<210>	15	
	<211>	25	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	结合到对埃博拉病毒具有特异性的模板的埃博拉病毒序列	
	<220>		
	<221>	modified_base	
	<222>	(25)	
	<400>	15	
		cgcgtagcgtc gtgcgatttc tcgtt	25
	<210>	16	
	<211>	99	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0006]	<220>		
	<223>	对MER-冠状病毒具有特异性的模板	
	<400>	16	
		agggcacatc tccgaatcga agtactcagc gtaagtttag aggtagcatg ctagtatcga	60
		cgtagctacc aacttacget gactactteg attataccc	99
	<210>	17	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	结合到对MERS-冠状病毒具有特异性的模板的MERS-冠状病毒序列	
	<400>	17	
		cggagaugug ccugggau	20

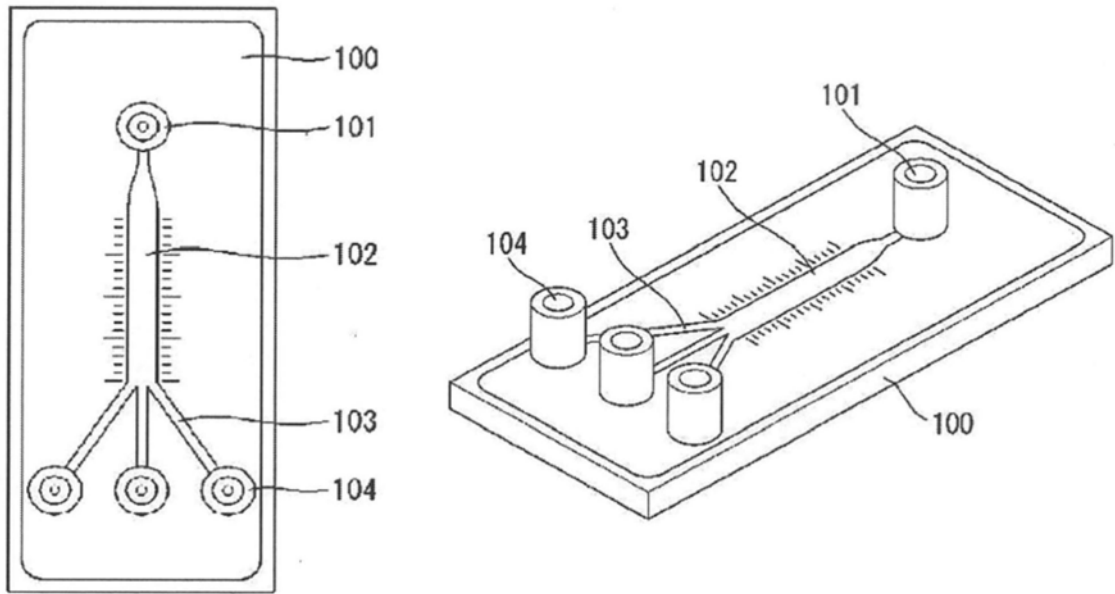


图1

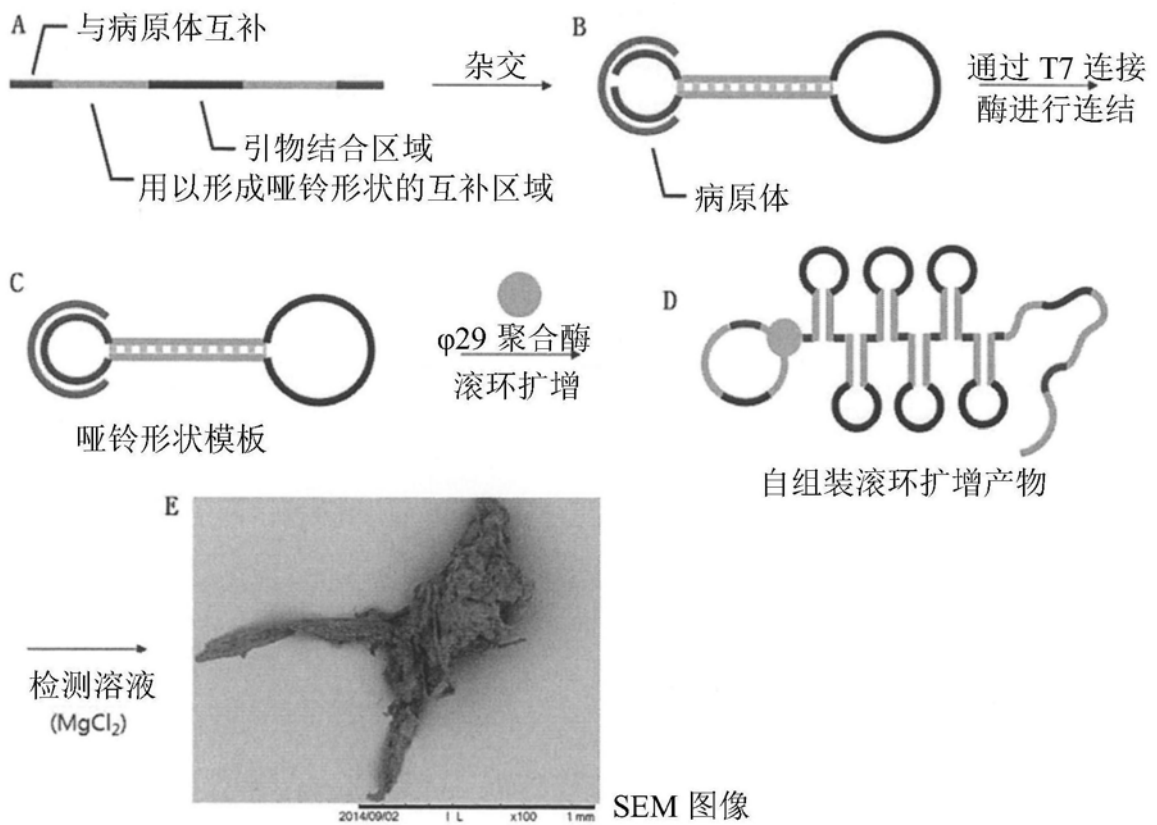


图2

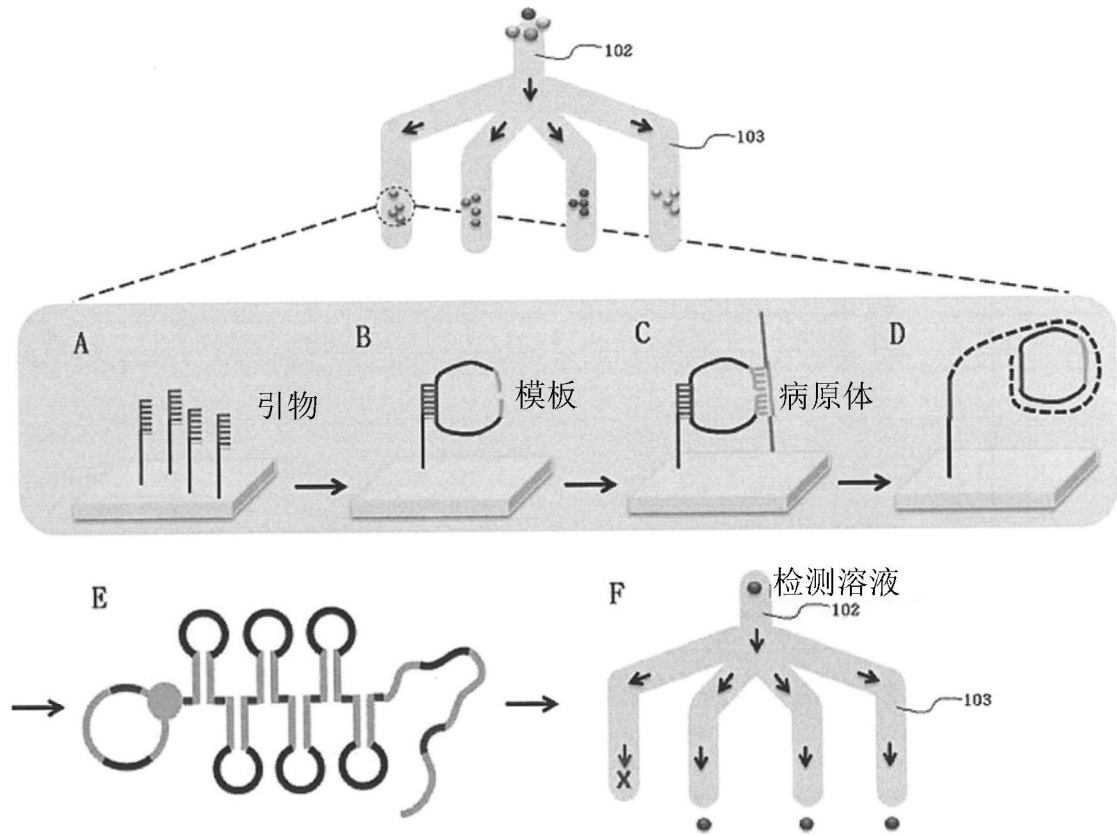


图3

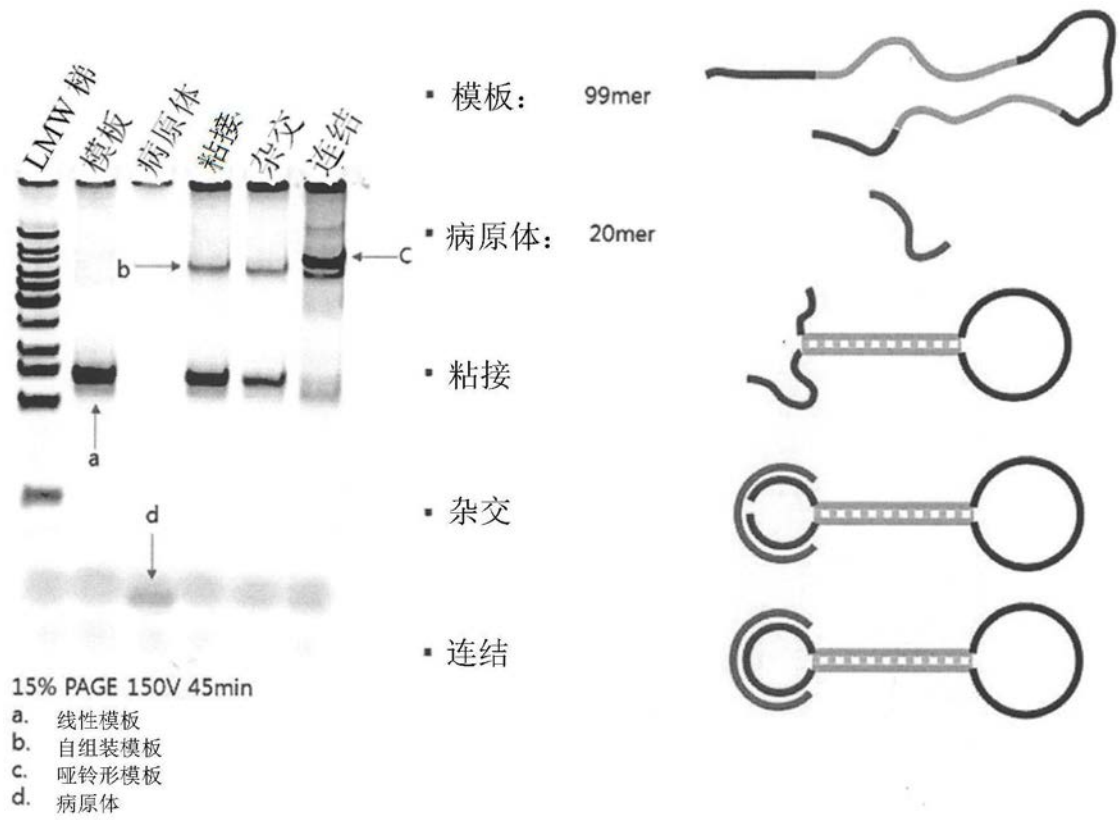


图4

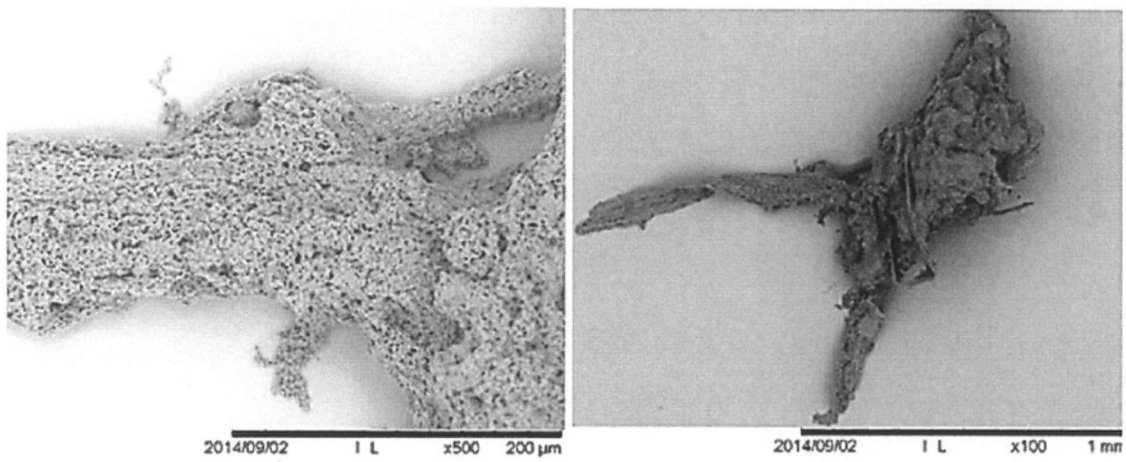


图5

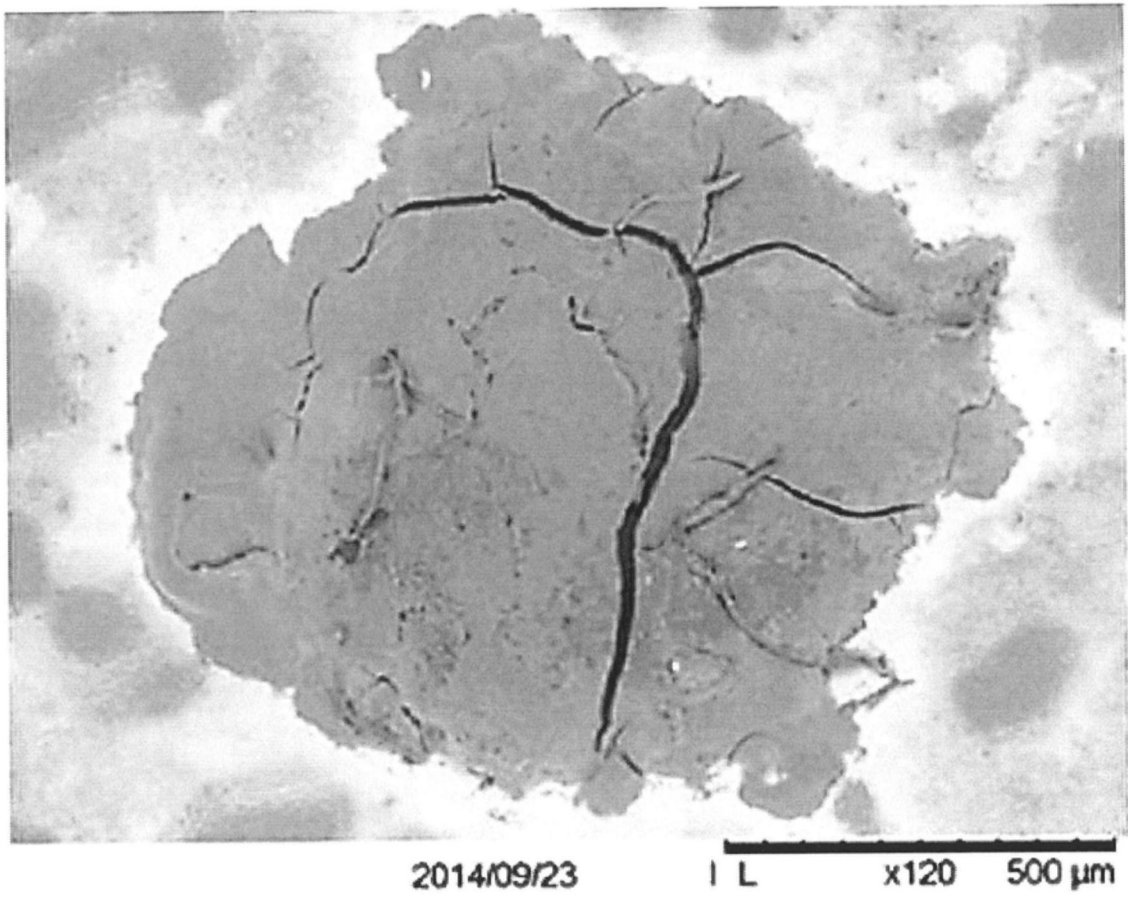


图6

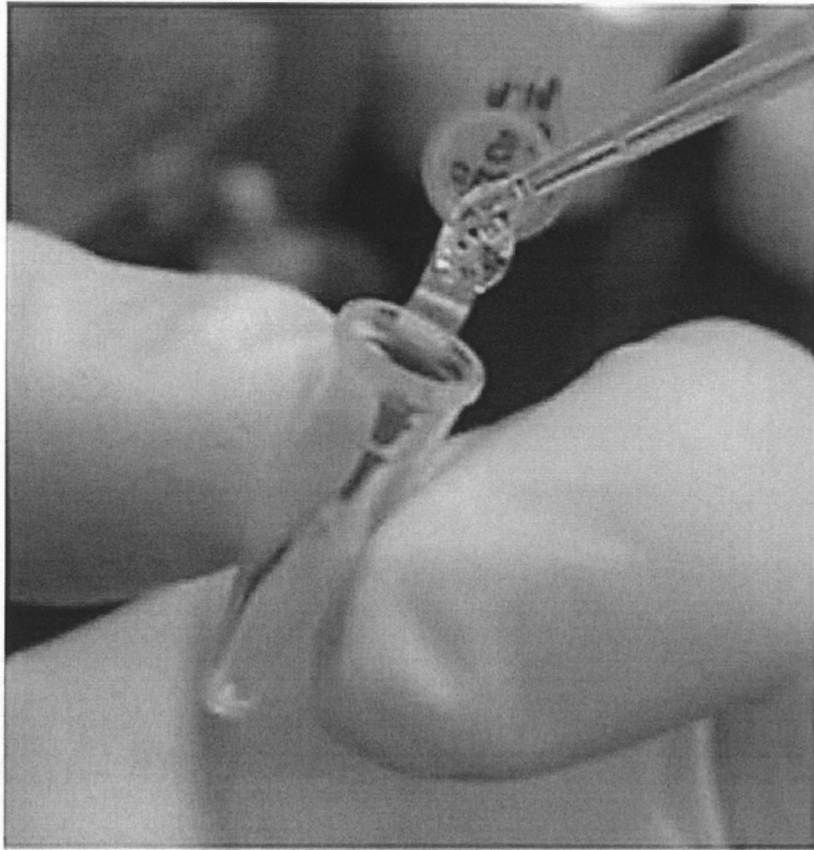


图7a

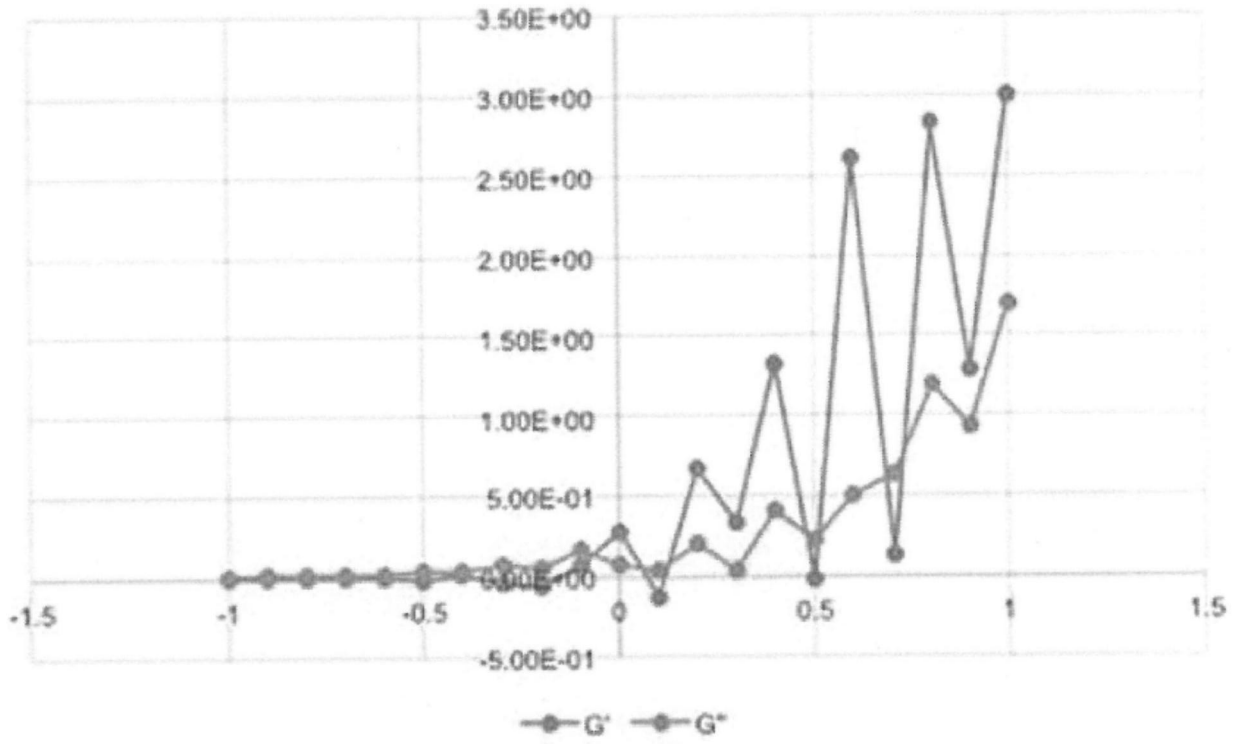


图7b

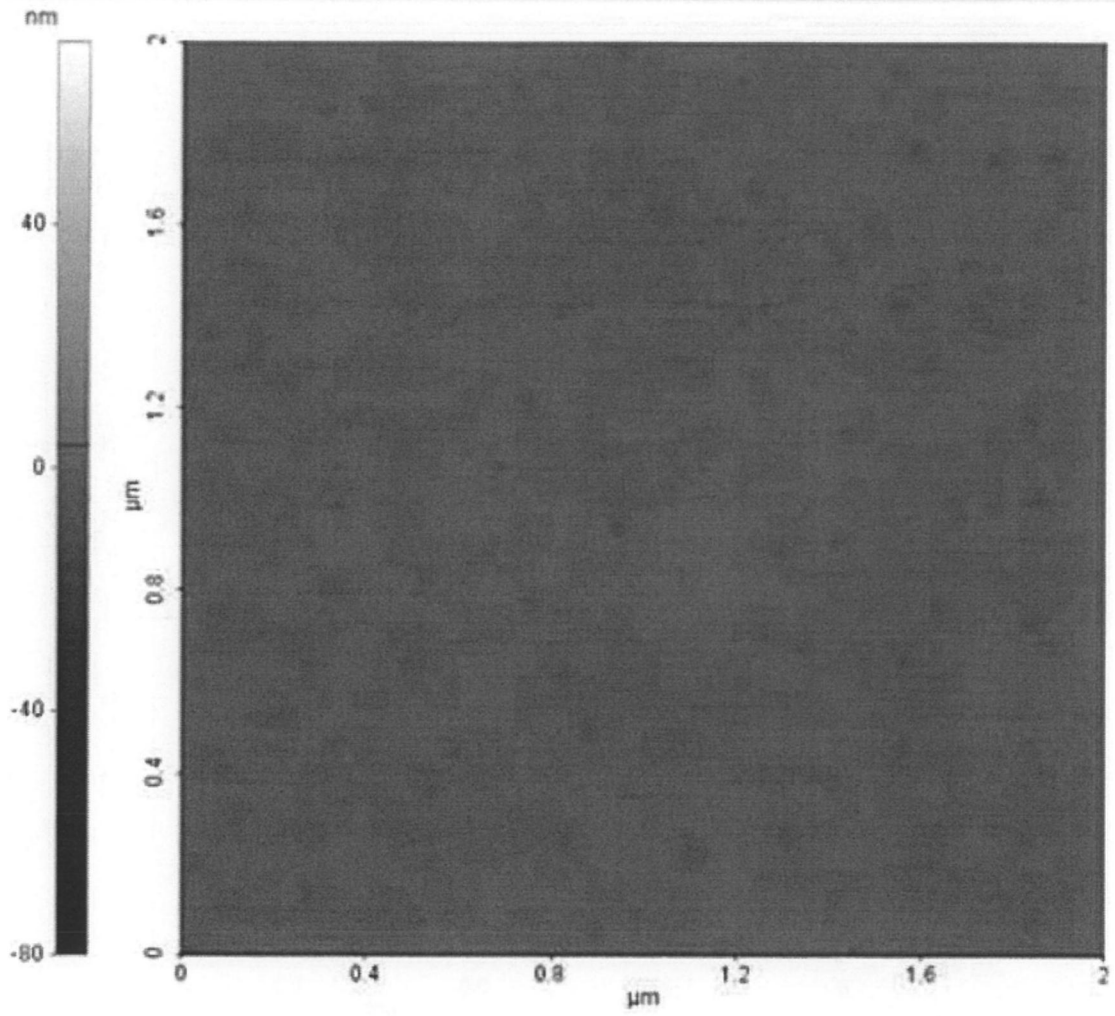


图8a

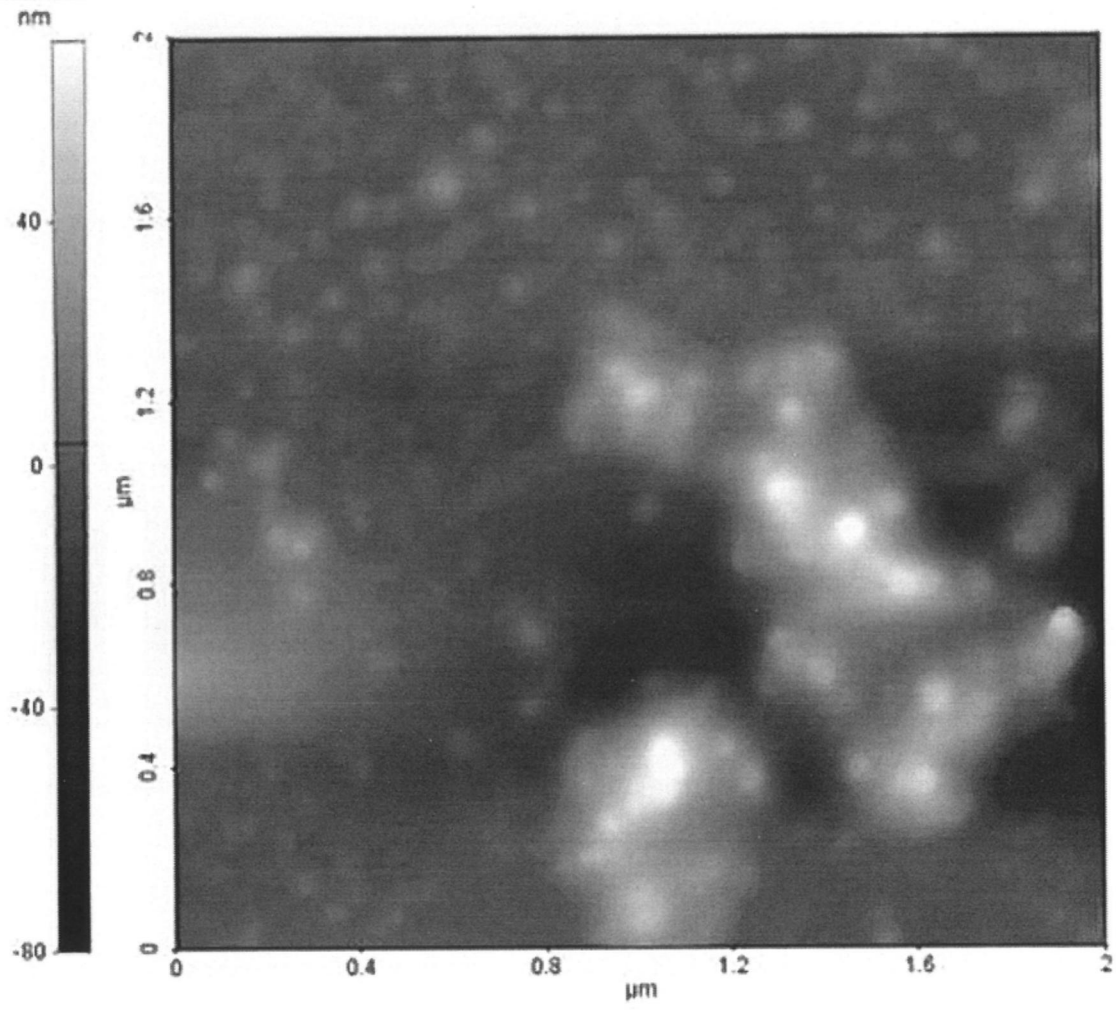


图8b

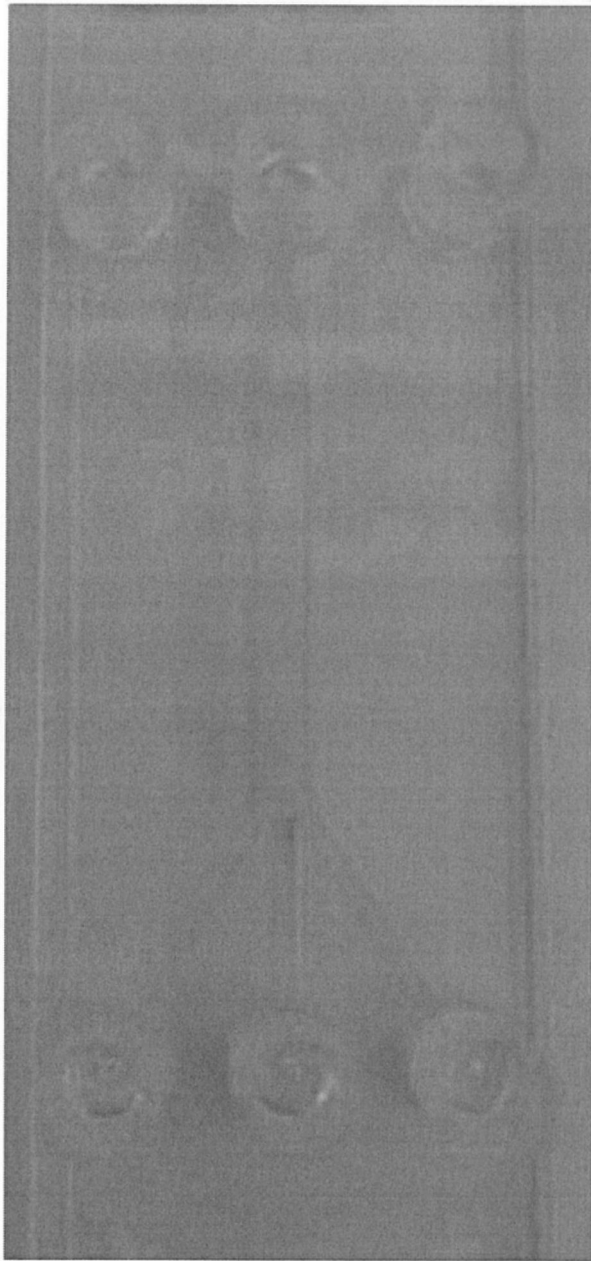


图9a

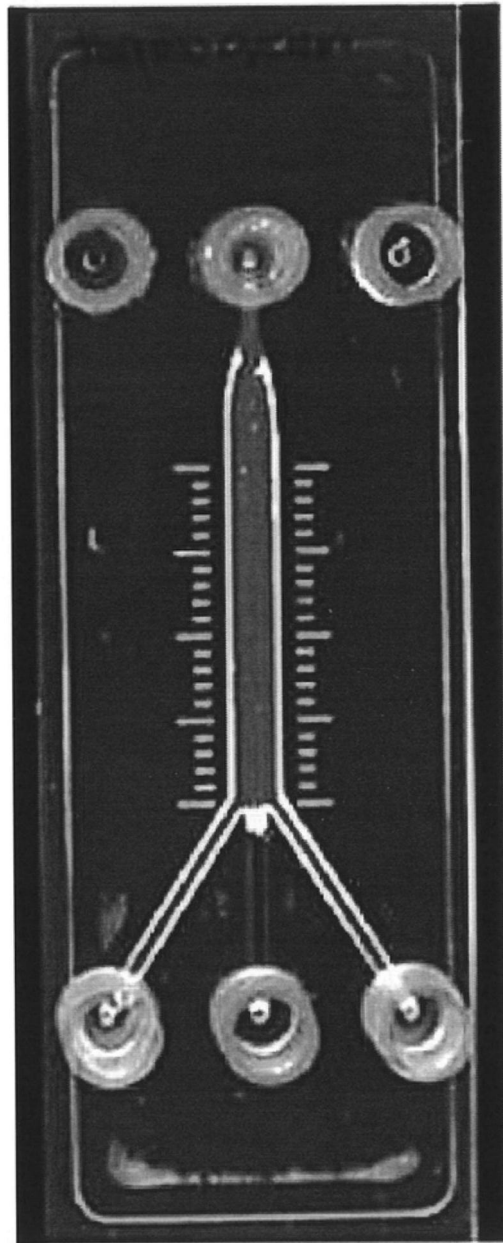


图9b

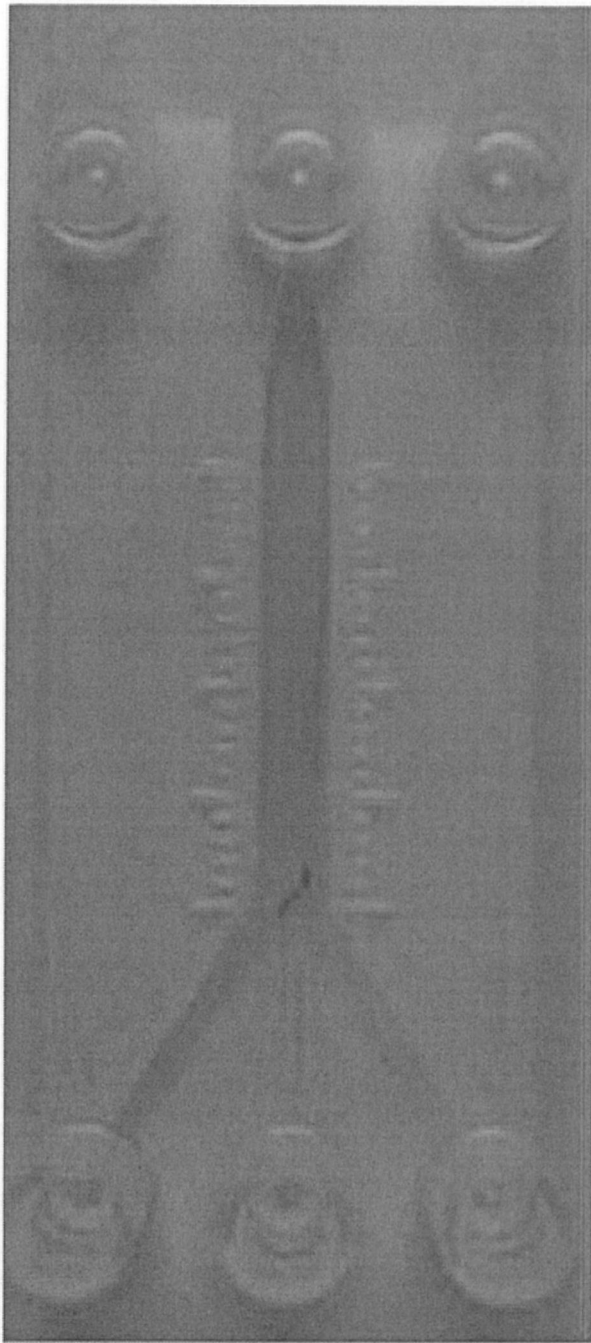


图10a

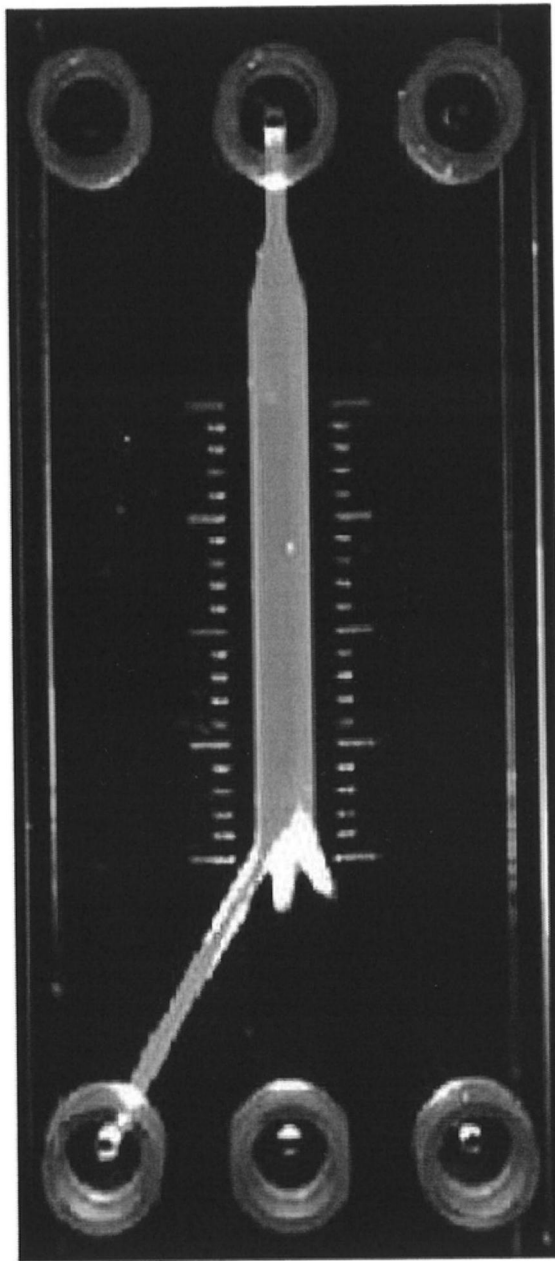


图10b

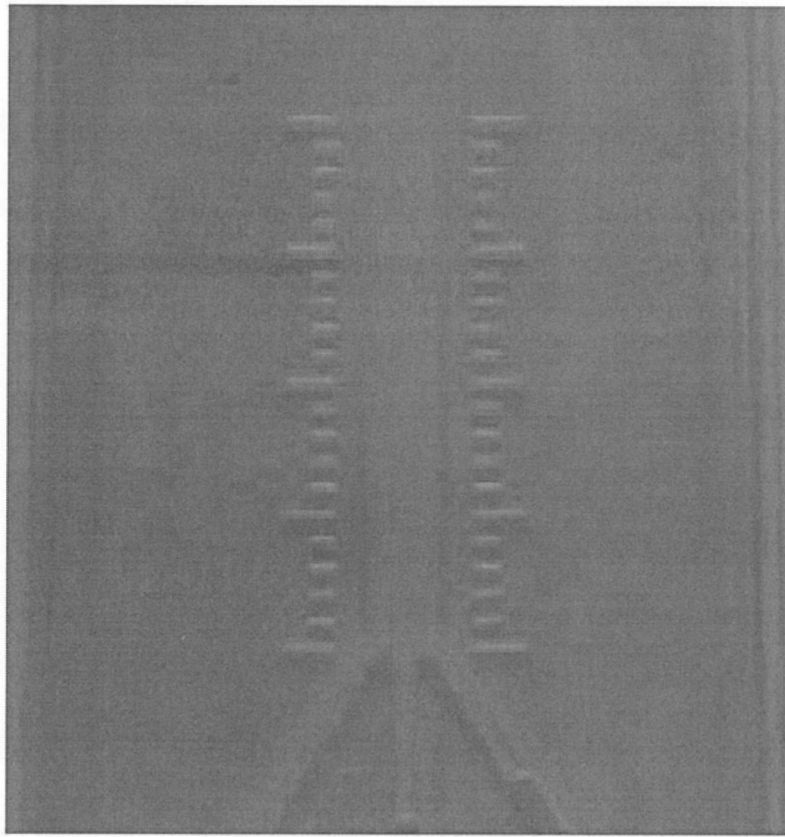


图11

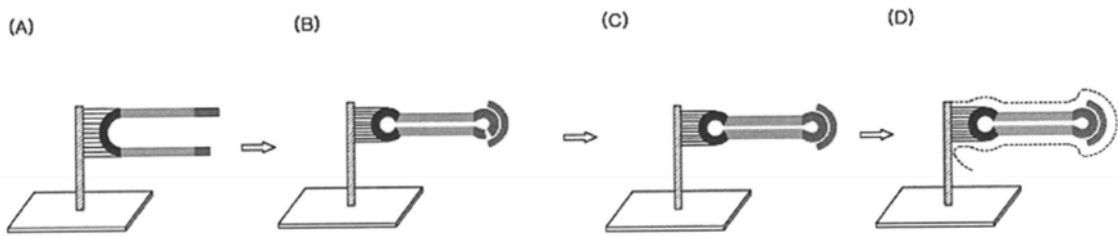


图12

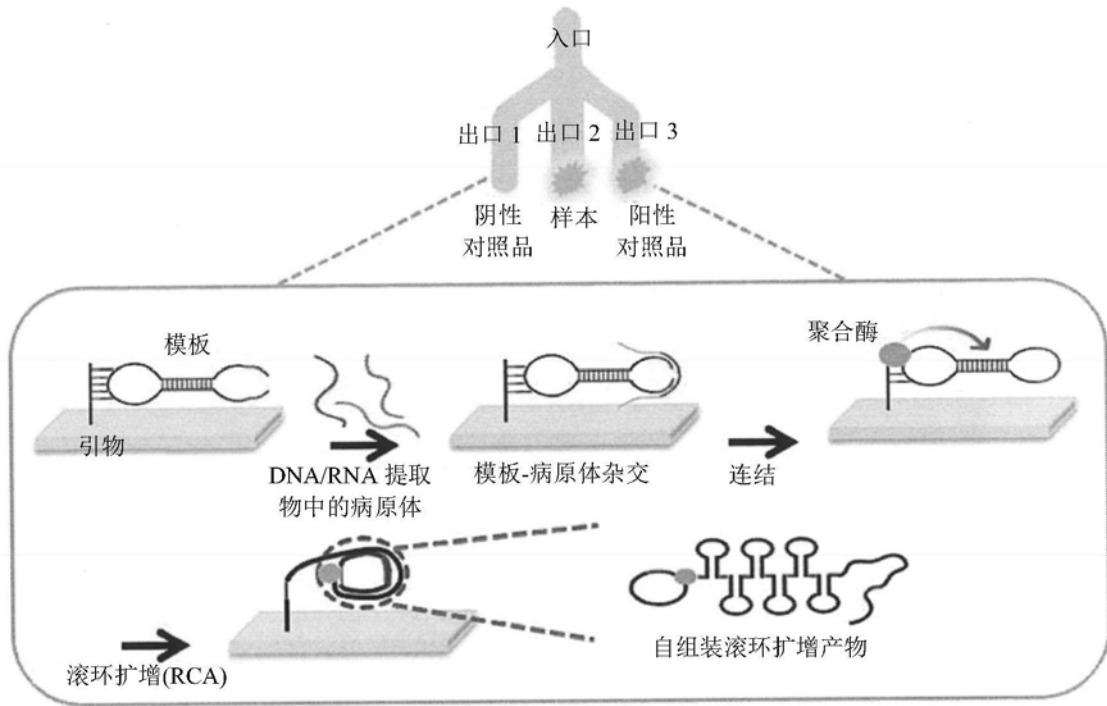


图13

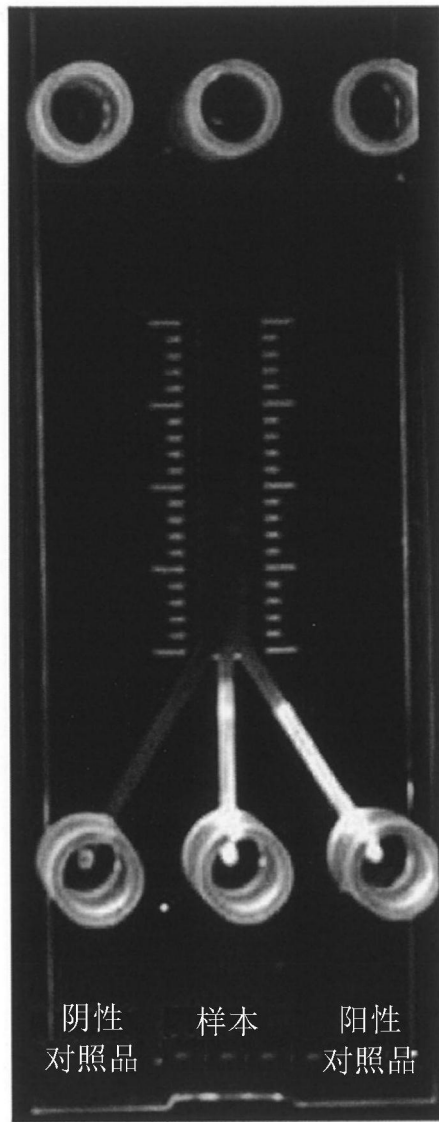


图14