



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1898374 B

(45) 授权公告日 2012.12.05

(21) 申请号 200480038989.X

(56) 对比文件

(22) 申请日 2004.10.25

US 6403367 B1, 2002.06.11, 说明书第5栏 - 第6栏.

(30) 优先权数据

60/514,381 2003.10.24 US

US 6126804 A, 2000.10.03, 第2栏, 第10-48行, 图4.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.06.26

US 20020025576 A1, 2002.02.28, 全文, 着重参见说明书摘要, 的27-28、32-33段.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/035406 2004.10.25

ZHANG N ET AL. on line coupling of polymerase chain reaction and capillary electrophoresis for automatic DNA typing and HIV-1 diagnosis. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B714 1.1998, 714(1), 摘要, 图1.

(87) PCT申请的公布数据

W02005/040331 EN 2005.05.06

审查员 于群

(73) 专利权人 埃格尼股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 瓦罗杰·阿米尔卡尼安 刘铭桑

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉 巫肖南

(51) Int. Cl.

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 5 页

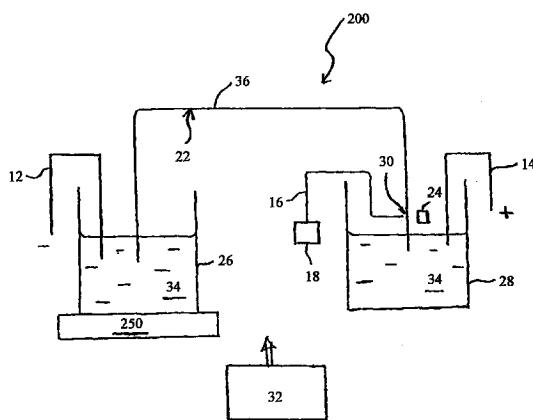
(54) 发明名称

集成的生物 - 分析和样品制备系统

(57) 摘要

集成的生物分析系统并入了内置的样品制备能力。在本发明的一个方面中，提供了具有内置的基于PCR（或热循环组 / 模块）的样品制备设备的生物分析仪器。在本发明的一个实施方案中，样品制备设备中的 peltier 单元提供多孔盘中承载的样品的热循环。在本发明的另一个方面，提供了具有内置的样品制备能力的CE仪器，其可包含基于热循环仪类型的样品制备（生物分子反应）设备。在本发明的另一个方面，提供了具有内置的分析设备，如CE设备的PCR设备，用于验证PCR（生物分子反应）过程的结果。

CN 1898374 B



1. 生物分析系统,其包含 :

样品制备设备,其接收原始样品以加工成适于后续分析的形式的样品 ;

样品分析设备,其从样品制备设备接收有待经受分析的样品 ;和

集成的传送机构以定位样品制备设备,使其可被样品分析设备接近,

其中所述的样品制备设备和样品分析设备有效偶联在集成的自动化系统中,并且其中将原始样品加载到样品制备设备中,由此通过传送机构定位样品制备设备以允许从所述样品制备设备输出的样品通过样品分析设备直接接近而用于输入所述样品分析设备而无进一步的用户干预。

2. 权利要求 1 的生物分析系统,其中所述样品分析设备包含分离能力,其将样品分离为组分。

3. 权利要求 2 的生物分析系统,其中所述样品分析设备还包含检测能力,其提供分离组分的分析。

4. 权利要求 3 的生物分析系统,其中所述样品分析设备包含毛细管电泳,其提供分离和检测能力。

5. 权利要求 1 的生物分析系统,其中所述样品制备设备被构造并配置成以使原始样品进行生物 - 分子反应。

6. 权利要求 5 的生物分析系统,其中所述样品制备设备被构造并配置成以提供原始样品的热循环处理以输出由原始样品扩增的样品。

7. 权利要求 1 的生物分析系统,其中所述样品制备设备包含热电单元,其为控制器以使原始样品的温度循环以引起生物分子反应。

8. 权利要求 7 的生物分析系统,其中所述样品制备设备被构造并配置成以在生物 - 分子反应中通过 PCR 实现 DNA 扩增。

9. 权利要求 8 的生物分析系统,其中所述分析设备包含毛细管电泳系统。

10. 权利要求 9 的生物分析系统,其中所述毛细管电泳系统包含多通道分离和分析。

11. 权利要求 10 的生物分析系统,其中所述原始样品包含提取自实地样品的 DNA。

12. 权利要求 9 的生物分析系统,其中将所述原始样品加载到样品制备设备中的样品孔中,而且其中所述集成的传送机构定位所述样品孔,使其可被毛细管电泳系统接近。

13. 权利要求 1 的生物分析系统,其中所述样品制备设备包含用于实现热循环的设备。

14. PCR 系统,其包含 :

进行 PCR 的热循环仪,其接收适于后续分析的形式的原始 DNA 样品,该原始 DNA 样品有待通过 PCR 扩增为 DNA 样品 ;

毛细管电泳系统,其从热循环仪接收 DNA 样品,以使之经历毛细管电泳,以分析 PCR 的结果 ;和

集成的传送机构以定位热循环仪,使其可被毛细管电泳系统接近,

其中所述的毛细管电泳系统和热循环仪有效偶联在自动化的集成系统中,由此通过传送机构定位热循环仪以允许从所述热循环仪输出的 DNA 样品通过毛细管电泳系统直接接近而用于输入所述毛细管电泳系统而无进一步的用户干预。

15. 分析原始样品的方法,其包含如下步骤 :

提供样品制备设备,其接收原始样品,该原始样品有待以加工成适于后续分析的形式

的样品；

提供样品分析设备，其从样品制备设备接收有待经历分析的样品；和

提供集成的传送机构以定位样品制备设备，使其可被样品分析系统接近，

其中所述的样品制备设备和样品分析设备有效偶联在集成的自动化系统中，由此通过传送机构定位样品制备设备以允许从所述样品制备设备输出的样品通过样品分析设备直接接近而用于输入所述样品分析设备而无进一步用户干预。

## 集成的生物 - 分析和样品制备系统

### [0001] 发明背景

[0002] 本申请要求 2003 年 10 月 24 日提交的美国临时专利申请 No. 60/514,381 的优先权。此临时专利申请在此完全并入作为参考,如同在本文中全部列出。此申请是如下申请的继续申请 (Continuation-in-Part) :2002 年 1 月 28 日提交的名称为 "Multi-Channel Bio-Separation Cartridge" 的美国专利申请 No. 10/059,993; 和 2002 年 1 月 28 日提交的名称为 "Optical Detection In A Multi-Channel Bio-Separation System" 的美国专利申请 No. 10/060,052; 和 2002 年 12 月 13 日提交的名称为 "Optical Detection Alignment Coupling Apparatus" 的美国专利申请 No. 10/319,803; 和 2003 年 12 月 15 日提交的名称为 "Optical Detection Alignment Coupling Apparatus" 的 PCT 申请 No. PCT/US03/39971; 和 2004 年 4 月 12 日提交的名称为 "Multi-Capillary Electrophoresis Cartridge Interface Mechanism" 的美国专利申请 No. 10/823,382, 其全部共同转让给本发明的受让人 BioCal Technology, Inc.。

[0003] 上述申请,和下面在本文的公开中提及的所有其它申请、文献和参考资料全部并入作为参考,如同在本文中全部列出。

### 技术领域

[0004] 本发明涉及生物 - 分析, 和更具体地集成样品制备过程 (integrating samplepreparation process) 的生物 - 分析系统, 而且更具体地涉及集成样品制备过程的多 - 通道 (multi-channel) 生物 - 分析系统。

### 背景技术

[0005] 生物分析,如 DNA 分析,正在迅速地从纯科学的对于准确度的追求转变为具有增加的而且被证实的可靠性的常规方法。医学研究者、药理学家和法医调查者在它们从事的工作中全都使用 DNA 分析。然而由于检测和测定 DNA 样品的设备的复杂性和样品制备中的困难,现有的 DNA 分析方法常常是费时而且昂贵的。因此需要减少部件 (part) 的大小、数量,和设备的成本,以在所述过程中简化样品处理,并大体上具有简单、低成本、高灵敏度的检测器。

[0006] 一类 DNA 分析仪器通过依靠电泳来分离 DNA 分子。电泳技术可用于分离 DNA 片段用于基因型分型 (genotyping) 应用,其包括人身份测试 (human identity testing)、表达分析、病原体检测、突变检测和药物遗传学 (pharmacogenetics) 研究。术语电泳是指带电的分子在电场影响下的运动。电泳可用于分离具有相等的荷质比 (charge-to-mass ratio) 但质量不同的分子。DNA 片段是上述分子的一个实例。

[0007] 有多种商业上可得到的采用电泳分析 DNA 样品的仪器。其一种类型是毛细管电泳 (CE) 仪。通过在融合的携带缓冲溶液的硅毛细管柱中应用电泳,与板 (slab) 凝胶 - 电泳方法相比,样品大小要求显著较小而且分离速度和分辨率可提高多倍。在 CE 中,这些 DNA 片段常常通过如下方法检测:引导光穿过毛细管壁,到达从样品分离的组分,所述样品已用荧光

物质标记，并检测由入射光 (incident light) 诱导的荧光发射 (fluorescence emission)。发射的强度代表样品组分的浓度、量和 / 或大小。在过去，已经开发了用于 CE 仪器的激光 - 诱导的荧光 (LIF) 检测方法。由于与其它检测方法相比荧光检测的突出的灵敏度，它常常是基因组学和蛋白质组学的领域中所选择的检测方法。

[0008] 迄今为止，CE 仪器被设计为对首先在其它设备制备，然后加载到 CE 仪器内的样品架上的样品起作用。可实际涉及一些样品制备方法，其需要手动和 / 或自动程序。已经设计了专用的设备和系统以仅仅处理样品制备，其包括步骤，如样品提取、纯化、扩增、稳定化等等，以产生适于通过 CE 仪器分离的样品。例如，DNA 样品可通过聚合酶链式反应 (PCR) 方法制备，以从痕量的 DNA 样品中扩增足量的样品。可将 PCR 过程的产品经过 CE 过程以验证 PCR 过程的结果的完整性或状态。从单独制备的样品到 CE 分离 / 分析仪器的转移需要足够的人工干预，这影响总生产量 (overall throughput)。

[0009] 需要开发全部集成的生物分析系统，其包括内置的样品制备加工能力 (sample preparation process capabilities)，以在样品制备和分离 / 分析的过程中避免用户干预。

## 发明内容

[0010] 本发明提供了集成的生物分析系统，其具有内置的样品制备加工能力。在本发明的一个方面中，提供了具有内置的样品制备设备的生物 - 分析仪器。在一个实施方案中，样品制备过程包括生物 - 分子反应过程。在具体的实施方案中，所述生物 - 分子反应过程是基于 PCR。在本发明的又一个实施方案中，样品制备设备中的 peltier 单元提供多孔盘 (multi-well tray) 中承载的 (supported) 样品的热循环。

[0011] 在本发明的另一个方面，提供了具有内置的样品制备能力的 CE 仪器，其可包含生物 - 分子反应过程，例如，基于 PCR 的样品制备设备。

[0012] 在本发明的另一个方面，提供了具有内置的分析设备，如 CE 设备的生物 - 分子反应系统，用于验证反应产物的结果，其可为修饰的生物 - 分子样品。在具体的实施方案中，所述生物 - 分子反应系统基于 PCR 制备样品。在本发明的又一个实施方案中，提供了样品制备设备中的热循环单元。通过 PCR 设备制备的样品可在其它系统中用于其它分析。

## 附图说明

[0013] 为了更全面地理解本发明的性质和优势，以及使用的优选模式，应该参考与附图一起阅读的如下详述的说明。在如下的附图中，所有附图中相同的附图标记数字表明相同或相似的部件。

[0014] 图 1 是根据本发明的一个实施方案的包含样品制备设备的毛细管电泳系统的示意图。

[0015] 图 2 是根据本发明的一个实施方案的包含样品制备设备的毛细管电泳系统的透视图。

[0016] 图 3 是根据本发明的一个实施方案的毛细管电泳系统的控制系统的方框图。

[0017] 图 4 是样品制备设备的透视图。

[0018] 图 5 是样品制备设备沿图 4 中线 5-5 的剖视图。

[0019] 图 6 是说明不同样品加工阶段的关系的示意方框图。

[0020] 发明详述

[0021] 下面参考附图根据不同的实施方案描述本发明。当为了实现本发明的目的按照最佳模式描述本发明时,本领域的技术人员将理解的是,鉴于这些教导,在不背离本发明的精神或范围的前提下可进行改变。

[0022] 本发明提供了与样品制备集成的生物 - 分析系统。在本发明的一个方面中,提供了具有内置的样品制备设备的生物 - 分析仪器。在一个实施方案中,样品制备过程包括生物 - 分子反应过程。在具体的实施方案中,生物 - 分子反应过程是基于 PCR。在本发明的另一个方面,提供了具有内置的样品制备能力的 CE 仪器,其可包含生物 - 分子反应过程,例如,基于 PCR 的样品制备设备。在本发明的另一个方面,提供了具有内置的分析设备,如 CE 设备的生物 - 分子反应系统,用于验证反应产物的结果,其可为修饰的生物 - 分子样品。在具体的实施方案中,生物 - 分子反应系统制备基于 PCR 的样品。在本发明的又一个实施方案中,提供了样品制备设备中的热循环单元。通过 PCR 设备 (device) 制备的样品可在其它系统中用于其它分析。

[0023] 为了说明本发明原理并且不用于限制的目的,通过参考涉及 CE 分析和 PCR 样品制备的实施方案描述本发明。在说明的实施方案中,本发明提供了在用于遗传分析的自动化多 - 通道 CE 系统中制备 PCR 样品的全部集成的系统。

[0024] 本发明的受让人 Biocal Technology, Inc. 开发了基于 CE 的自动化仪器 (HDA-GT12 DNA Analyzer System)。发明的自动化仪器的说明性的实施方案是基于 Biocal 的 CE 仪器,其并入了低成本和灵敏的光学检测技术,集成的试剂柱体 (cartridge) 和微 - 流体的 (micro-fluidic) 电泳原理用于实时荧光分析,以形成灵敏而准确的生物试剂检测 (遗传分析) 系统。该系统被设计为高处理量、易于使用、便携、廉价、非常坚固并用于实地操作 / 应用。

[0025] 将柱体 (cartridge) 设计为被所述仪器承载,而所有必需的柱体元件 (element) 排列并偶联以承载仪器中的元件。柱体相对于样品盘固定 (held), 该样品盘可相对于柱体中的毛细管分离通道移动。通过提供基于 PCR 的站 (station) 来改进所述仪器以从加载到系统中的原始样品来制备样品用于分离和分析,全部位于同一仪器中,由此一旦将原始样品 (例如, 提取的 DNA) 加载到自动化仪器中,在整个样品制备 (DNA 扩增 /PCR)、分离和分析的过程中使进一步用户干预最小化。

[0026] 注意到在本发明的上下文中,原始样品 (例如, 提取的 DNA) 可为中间体状态或在实地取得的样品的形式,其在被加载到自动化系统中的样品制备站中之前,可经过在前的预制备过程 (preliminary preparation process)。在本发明的上下文中,所述原始样品在自动化仪器中经过显著的样品制备过程 (例如, PCR), 所述自动化仪器将样品转化为明显不同的和 / 或修饰的形式和 / 或状态,而超出简单地将原始样品进行稀释,或仅仅以易于在后续过程中操作的形式提供原始样品的其它过程。例如,将原始样品经过样品制备设备中的生物 - 分子反应过程。图 6 是示意方框图,其说明本文中讨论的加工的各个过程的关系。关于后续的分离和 / 或分析过程,通过样品制备设备制备得到的样品是后续分离和 / 或分析过程的输入,而且其为进行分离和 / 或分析的样品。原始样品是输入样品制备设备的样品,其为通过样品制备设备进行加工的样品。原始样品可为在前的预加工的产物。

[0027] 例如,对于在实地取得的生物样品,如受试者唾液 (saliva) 或血液,将其进行预处理,包括而不限于提取和纯化,以获得受试者的 DNA 试样样本。这样提取的 DNA 片段是“原始样品”,连同不可避免的化学品(例如,引物、聚合酶等),其被加载到本发明的集成的系统 200 中(如下公开),和更具体的样品制备设备,如用于 PCR 扩增。PCR 过程的输出是用于后续分离和 / 或分析的样品。

[0028] CE 系统的概述

[0029] 为了实地 robustness 设计并构造该系统,其重量不大于 40 磅。

[0030] 该便携的系统也并入内装模块的和集成的 PCR 热循环仪,其具有 peltier 冷却设备用于 DNA 扩增。

[0031] 图 1 是根据本发明的实施方案的毛细管电泳 (CE) 系统 200 的图示。该 CE 系统 200 通常包含毛细管分离柱 22(例如,200–500,  $\mu\text{m}$  O.D.), 其限定了分离通道 36(例如,25–200  $\mu\text{m}$  I.D.)。所述毛细管柱 22 可由熔融石英 (fused silica)、玻璃、聚酰亚胺 (polyimide) 或其它塑料 / 陶瓷 / 玻璃质的材料制成。分离柱 22 的内壁(即,分离通道 36 的壁)可用物质涂覆,所述物质能积累静电荷以促进样品组分的电泳和 / 或电动迁移 (electrokinetic migration)。分离通道 36 以分离支持介质 (support medium) 填充,其简单地可为本领域已知的电泳缓冲液 (running buffer) 或筛析凝胶基质 (sieving gel matrix)。对于辐射诱导的 (radiation induced) 荧光检测而言,该凝胶基质包括已知的荧光团 (fluorophore), 如溴化乙锭 (Ethidium Bromide)。

[0032] 毛细管柱 22 的一端浸入电泳缓冲液 / 凝胶 34 的容器 (reservoir) 28 中。毛细管柱 22 的另一端与样品小瓶 (vial) 26 连接。可以理解可将在另一实施方案中显示的检测构造 (configuration) 同样地在类似于 CE 系统 200 的系统中实现。而且,分离通道 36 可为一个直的毛细管或微 - 通道,其具有检测窗口的部分,所述检测窗口最靠近位于成为检测区的出口端的凝胶 - 容器,这是目前本发明的优选模式。将辐射探测器 (radiation detector) 24 置于在检测区 30 的毛细管壁的透明部分之外。激发纤维 (excitation fiber) 16 从辐射源 18(例如,LED 或激光) 延伸并定向到柱壁之外检测区 30。电极 12 和 14,其为柱体装置的部分,与缓冲液容器 26 和凝胶容器 28 连接以使电泳通道完整。

[0033] 根据本发明,系统 200 包括样品制备设备 250。图 2 中说明的实施方案显示适于通过 PCR DNA 扩增的样品制备设备。具体地,该样品制备设备 250 包含用于 PCR 的热循环仪(其包含加热 / 冷却元件和控制器以实现所需的加热和冷却条件)。将从实地(土壤、空气和水)提取的生物分子 /DNA 样品加载到微量滴定板 (micro titer plate) 72 上,连同必需的化学性质和 / 或方案,并扩增(例如,在样品制备设备的生物 - 分子反应过程中)以允许在毛细管电泳的过程中容易的检测。在 PCR 过程已完成之后,将微量滴定板 72 移至毛细管柱 140 之下并垂直移动柱体 100 以允许毛细管柱 140 接近微量滴定板 72 中的孔。然后自动地操作扩增的 DNA 样品 (PCR 产物) 并通过电动注射穿过凝胶 - 柱体的微 - 通道导入用于分子的分离和荧光检测。

[0034] CE 分离和分析的概述

[0035] 在操作中,将从实地取得的原始样品制备(例如,提取、纯化 DNA 然后通过 PCR 扩增)成适用于 CE 的样品。例如,将在通过样品制备设备 250(即,所说明的实施方案中的 DNA 扩增设备)制备的样品小瓶 26 中制备好的生物样品(例如,DNA 样品),通过许多方式

中的任一种导入毛细管柱 22 远离检测区 30 的远端（例如，从样品容器电动注射）。所述样品与毛细管柱 22 中支持的凝胶基质中的荧光团结合。

[0036] 当将直流电位 (DC potential) (例如, 1-30KV) 施加于电极 12 和 14 之间时，样品在施加的电位下沿分离通道 36 迁移 (例如带负电荷的 DNA 通过具有集成的染料基质 / 荧光团的筛析凝胶向正电极行进, 如图 1 所示) 并分离成样品组分的条带 (DNA 片段)。分离的程度和沿分离通道 36 移动的距离依赖于许多因素, 如样品组分的迁移度 (migration mobility), 样品组分的质量和大小或长度, 和分离支持介质。分离通道 36 中用于样品分离的驱动力可为电泳的、压力, 或电渗流 (electro-osmotic flow) (EOF) 方法。

[0037] 当样品到达检测区时, 激发辐射经激发纤维 16 定向到检测区。样品组分以与各个样品组分的浓度成比例 (与荧光标记物质的量成比例) 的强度发荧光。检测器 24 在不同于入射辐射的波长测定发射的荧光的强度。检测到的发射辐射可通过已知的方法分析。对于自动化系统, 控制器 32 控制 CE 系统 200 的操作。

[0038] PCR 的概述

[0039] PCR 的目的是制备基因的大量拷贝。这是必需的以便于有足够的起始模板用于通过 CE 进行 DNA 片段分析。下面是 PCR 热循环反应的简单解释。

[0040] 1. 循环反应 :

[0041] 在 PCR 中有三个主要步骤, 其被重复 30 或 40 个循环。这在自动化循环仪上完成, 其能够在非常短的时间内加热和冷却含有反应混合物的样品小瓶。如将在稍后所述, peltier 冷却 / 加热型机构 (mechanism) 可为集成的作为多 - 通道毛细管电泳仪的 X-Y 传送机构的传送运输支架的一部分用于 DNA 扩增和分析的完全解决。通过 PCR 的 DNA 扩增在本领域中是公知的。方案和化学性质的细节 (例如, 引物、聚合酶等等) 从本文的讨论中省略掉。可进一步参考本领域中任何充分证明的文献。根据 PCR 的一个实施方案, PCR 中三个主要步骤包括 :

[0042] 1. 在 94°C 变性 :

[0043] 在变性过程中, 双链溶解开成为单链 DNA, 所有酶反应停止 (例如 : 来自前一个循环的延伸)。

[0044] 2. 在 54°C 退火 :

[0045] 由布朗运动 (Brownian motion) 引起引物在周围摆动 (jiggle)。离子键在单链引物和单链模板之间不断形成和断裂。更稳定的键维持略微较长 (精确配合的引物) 并在所述的一片 (little) 双链 DNA (模板和引物) 上, 聚合酶能结合并开始拷贝模板。一旦有几个碱基装入, 则模板和引物之间的离子键是如此之强以至于其不再断裂。

[0046] 3. 在 72°C 延伸 : 这是聚合酶的理想工作温度。引物, 当有几个碱基装入时, 对于模板具有的离子吸引比切断这些吸引的力更强。在没有准确匹配的位置上的引物又变得松散 (由于更高的温度) 并且得不到片段的延伸。(与模板互补的) 碱基在 3' 侧与引物连接 (聚合酶由 5' 到 3' 添加 dNTP's, 由 3' 到 5' 侧阅读模板, 加入碱基与模板互补)。可理解在不背离本发明的范围和精神的前提下可修改前述步骤, 但仍然提供 PCR 或 DNA 扩增。

[0047] 基于 CE 系统的多毛细管柱体

[0048] 根据本发明, 为了核酸检测, 将 PCR 扩增集成在微 - 流体的电泳系统。将提取自实地的 DNA 或 RNA 的原始样品纯化, 然后装入 (使用标准的 PCR 板 (plate) 制备步骤) 自动

微 - 流体电泳系统中的样品小瓶（例如，96- 孔微量滴定板）用于 PCR 扩增。特定基因标记的引物对将用于 PCR 分析。此外根据本发明，将样品小瓶中制成的 PCR 产品经过电动的样品注入自动导入多 - 通道凝胶柱体用于高 - 分辨率分离和荧光检测。

[0049] 图 2 显示 CE 系统 200（例如，DNA 分析仪）的总透视图。根据本发明的一个实施方案，所述 CE 系统 200 并入接口（interface）机构 300。根据本发明的一个实施方案，该接口机构 300 支持多 - 通道柱体 100，其提供多 - 通道分离柱的容易的操作，并允许检测区与 CE 系统 200 的检测光学器件（optics）容易的光耦合（optical coupling）。接口机构 300 的细节可参考美国专利申请 No. 10/823, 382，其已被全部并入本文作为参考。全部自动化的 DNA 分析系统 200 具有基板（base）74，其支持具有样品盘支承框架（support frame）81 的模块的 X-Z 机构 80。X-Z 机构 80 使承载 96- 孔微量滴定板 72 和缓冲液板 70 的 PCR 样品制备设备 250（细节根据图 4 和 5 稍后公开）相对于由接口机构 300 支承的多 - 毛细管柱体 100 移动。具体地，机构 80 包含 X 机构 82，其用于使支承框架 81 沿 X- 方向相对于柱体 100 移动，和 Z 机构 83，其用于使柱体在 Z 方向相对于支承框架 81 移动。该 PCR 样品制备设备 250 受 PCR 热电控制器 68 的控制。

#### [0050] PCR 样品制备设备

[0051] 关于图 4 和 5，PCR 样品制备设备包括加热单元如 a peltier 热电单元 251，其在它的顶部支承热接口结构 252，该结构具有互补的孔 255，该孔按尺寸制造以容纳孔 73 的底部。所述 peltier 热电单元 251 可被控制器 68 控制以加热或冷却孔 73，以使孔 73 中的内容物按 PCR 过程的要求进行热循环。在 peltier 热电单元 251 的底部，提供了散热器（heat sink）以在该单元的冷却循环的过程中从 peltier 热电单元 251 中除去热量和 / 或在加热循环过程中除去余热。所述 PCR 样品制备设备 250 支承在传送机构 80 的传送框架 81 上。

#### [0052] 自动化系统 200 的控制

[0053] 该系统 200 提供多 - 通道分离柱的容易的操作，并允许检测区与 CE 系统 200 的检测光学器件容易的光耦合。包括接口机构 300 的 CE 系统 200 的操作受控制器 32 的控制，所述控制器 32 与外部用户控制接口（例如，at the PC 918）连接。该 PCR 热电控制器 68 也可有效地与控制器 32 和 / 或 PC 918 连接，这样一来，使 PCR 样品制备设备与系统 200 的其余部分的控制协调以获得本文中描述的功能。

[0054] 同样关于图 3，根据本发明的一个实施方案，说明了 CE 系统 200 的控制器 32 的方框图。控制器 32 包含处理器作为具有 CPU 910 的模 / 数转换板（A/DBoard）（LED Processor PCBA）912 的一部分用于将从检测器 24（例如，PMT）接收的检测信号转换为对应的数字信号，其来自 LEDScan PCBA 接口 914 用于通过来自 CPU 910 的指令在 CE 系统 200 的各个部分来回地转移并接收信号。所述 A/D（LED Processor PCBA）接口 912 与接口机构 300 中不同的执行机构（actuator）连接以控制并连接（使用接口机构 300）至少高压电源（high voltage power supply）76、气动装置（pneumatics）78（在图 2 的接口机构 300 中的视图隐藏）、马达控制（motor control）（X-Z 样品 / 缓冲液盘）80 和联锁装置（柱体和传送门（transport door））61 和 62（这些细节在图 2 的接口机构 300 中未显示）。A/D 或 LED Processor PCBA 912 也控制高 - 压电源 76 用于样品注射和 CE 系统 200 的电泳功能，电路 914（LEDScan Board）用于调制激发辐射源（例如，LEDs）921 和 CE 系统 200 的检测器模块 24。激发辐射源的细节可参考共同未决的（copending）美国专利申请 No. 10/060, 052，其已被全部并入

本文作为参考。

[0055] 所述 A/D(LED Processor PCBA)912 可进一步与外部个人计算机 918 连接, 其又进行数据处理或 CE 系统 200 的附加控制功能, 例如, 使用 BioCal 的生物计算器软件 (BioCalculator Software) 以控制自动化多 - 通道 CE 系统 200(包括集成的 PCR 样品制备设备) 的不同特点和功能。

[0056] PCR 样品制备设备 250 受控制器 68 的控制以操作上述热循环反应的序列。设计由 X-Z 传送机构 80 支承的热电单元 251 用于 96- 孔微量滴定板 72。该热电单元 251 受热循环控制器模块 68 的控制, 该模块直接受模 / 数转换 (A/D) 或微处理器板 (microprocessor board)912 控制, 而且控制固件 (firmware) 受用户接口 (生物计算器软件) 在 PC918 通过 RS232 电缆的控制, 如图 3 所示。在替换的实施方案中, 可将热电控制器 68 并入控制器 32。

[0057] 可将控制器 32 除 PC918 以外的组件打包为 CE 系统 200 板上的电子板 (electronic board)64(图 2) 和冷却风扇 (cooling fan)63, 并通过串行端口 (未显示) 电耦合于 PC918, 或它们可为 CE 系统 200 之外分离控制器模块的一部分。编制 CPU210 和 / 或 PC218 的程序以实现 CE 系统 200 的各种控制功能和特点。在一个实施方案中, 可配置 PC218 以提供 CE 系统 200 的用户控制接口 (例如, 接口机构 300 的连接序列的用户初始化)。本领域的技术人员将可以执行给出本文中公开的功能和特点的程序代码。在替换的实施方案中, 可将控制器 32 或其组件并入作为 PC 918 的一部分。

#### [0058] 毛细管柱体

[0059] 所述多 - 通道毛细管柱体 200 包括 12 个检测区 (在图 1 中示意性描绘为 30), 其由固定在柱体内的毛细管 140 限定。柱体 100 包括 12- 通道熔融石英毛细管阵列, 其作为用完即可丢弃的 (disposable) 和 / 或便于携带的、可互换的柱体装置 100 的一部分用于样品的分离和检测。显示在图 2 中的柱体 100 支持多至 12 个 12-18cm 长的毛细管 140。柱体 100 与顶部为所有毛细管 140 所共用的出口缓冲液容器 130 集成, 该容器通过接口机构 300 直接与模块的压缩气体源 (compressed gas source)78 连接, 所述压缩气体源如惰性的、能共存的或不反应的气体 (例如, 氮气、CO<sub>2</sub> 等) 的可更换的压缩气体柱体或压力泵。提供了适当的压力管道设备 (plumbing), 包括管道 (tubing)、压力阀 (pressurevalve) 和螺线管控制 (solenoid control)。(将这些管道设备的细节省略, 因为本领域的技术人员能够配置这些管道设备, 其给出本文中公开的系统 200 的功能、特点和操作。) 压力源 (pressure source)78 提供所需的气压以用装于容器 130 中的筛析凝胶充满所有 12- 毛细管并且在再次充填过程中净化 (purge) 先前操作中来自毛细管的凝胶。取决于凝胶的粘度, 通过凝胶 - 填充的容器 130 可对毛细管 140 施加多至 40PSI 的压力。柱体凝胶 - 容器 130 装备内装式的所有 12- 毛细管共同的电极阳极 134, 当安装于系统 200 内时, 其通过接口机构 300 自动连接于高压电源 76(图 2) 用于电泳。在邻近柱体 100 的结构上可提供风扇或 Peltier 冷却器 (未显示) 以提供柱体的温度控制。另外或在替换方案中, 柱体可具有通风孔 (vent hole) (输入和输出) 用于空气循环 (控制温度的空气由仪器侧面导入柱体)。取决于 CE 分离过程中产生的热, 可简单地将柱体暴露于环境温度 (ambient temperature), 而没有辅助的冷却部件。电源 66(图 2) 提供 CE 系统 200 的直流电源 (DC power)。

[0060] 柱体的其它细节可参考共同未决的申请 no. 10/059,993, 其已被全部并入本文作为参考。

[0061] 检测系统

[0062] 美国专利申请 No. 10/060,052, 其已被全部并入本文作为参考, 更具体地指向可在 CE 系统 200 中采用的时间交错的 / 多元的 (staggered/multiplexed) 检测方案。

[0063] 接口机构

[0064] CE 系统 200 的接口机构的结构和操作可参考共同未决的美国专利申请 No. 10/823,382, 其已被全部并入本文作为参考。柱体接口实现与装有用后即可丢弃的凝胶的毛细管柱体 100 迅速而可靠的接口连接。这些接口连接包括气体加压连接 (gas pressurization connection)、高电压连接 (high voltage connections) 和精密光学连接 (precision optical connection)。接口也提供柱体精确而可重复的机械定位, 以准确地相对于 CE 系统 200 中支承元件定位柱体的组件, 包括相对于例如, 存在于 96- 孔滴定板上的外部样品或缓冲液容器定位毛细管尖 (tip)。此外, 接口提供与美国分离通道的不同的电、光和气动连接, 由此提供通道 - 与 - 通道隔离而免于电和光的串扰以及仪器的其它部分的高压绝缘。

[0065] CE 系统的操作

[0066] 在操作中, 具有 96- 孔板 (8x12) 72 和 70 的样品操作盘传送机构 80 用于将扩增的 DNA 样品 (或分析物) 导入每个毛细管 140。X-Z 传送机构 80 表明微量滴定板 72 中一排携带样品的孔 73 位于该排毛细管尖 140 的下方并将所述的尖浸入所述的孔。通过施加电压, 电动注射将已知量的 DNA 样品移动到分离柱 140 的开始处。注射后, 来自样品盘 72 的 DNA 样品可使用来自盘 70 的电泳缓冲液代替。可替换地, 注射后, 传送机构 80 可指示将含有缓冲溶液的滴定板 72 中的一排 12 孔 73 移动到柱体下方的位置, 以代替含有 DNA 样品的 12 个孔。

[0067] 通过穿过毛细管 140 的全长施加高电压, 实现将 DNA 样品分离为 DNA 片段。随着片段到达毛细管 140 的末端并进入检测区, 将激发光能 (例如, 来自通过光纤 (optical fiber) 输送的 12 个 LED) 集中于检测区, 照亮迁移的 DNA 片段。检测方案可为时间 - 交错的方式, 如在共同未决的美国申请 Serial No. 10/060,052 中公开的。

[0068] 为了用不同样品进行下一次操作做准备, 将前次操作中的旧的凝胶从毛细管中通过给容器加压来净化以用新鲜凝胶再次充填毛细管。盘 70 和 / 或 72 携带洗涤液 (cleaning solution)、废物收集 (waste collection) 和样品。由盘 70 和 72 中的一个通过将毛细管的尖定位于所述盘中的一个之中的成排废物收集孔来收集净化的凝胶。可用水或洗涤液通过定位并将毛细管的尖浸入适当盘孔中的上述溶液来清洁毛细管的尖。当毛细管被再次充填并准备好下次操作, 通过重新定位盘 72 来将毛细管的尖浸入样品。可将上述过程的顺序编制程序作为控制器 32 的自动化功能之一。接口机构 300 提供 CE 系统 200 中支承元件与柱体的接口连接 (interfacing), 如高电压、气压、LED 辐射源和检测光学器件 (optics), 如上所述。与应用分离 PCR 机械装置和电泳 (板凝胶或毛细管电泳) 仪的常规方法相比, 新的便携式自动化系统被设计为并入样品制备和分析 (例如, PCR 和电泳) 的组合功能作为一个仪器。发明的便携式基于微 - 流体电泳的仪器包含具有多 - 通道和多 - 颜色荧光检测系统的集成的 PCR 设备, 该仪器是可靠的工具用于更快且成本更低的遗传分析型应用。

[0069] 发明的系统如图 2 所示, 可为台式 (bench top) 系统, 其为高处理量生物试剂 (DNA) 检测 / 分析而设计。12- 通道分离 / 检测柱体可同时分析多个样品。与集成的 PCR 板

组合的 12-通道分离 / 检测柱体可在大大缩短的时间内完成 96-孔样品板扩增和电泳并带来可预测的结果。该系统是简单、可靠而且快速的。从 PCR 到 DNA 分离的全过程可在 2 小时内完成。用于 12 个 PCR 样品的分析时间标定在几分钟之内。提供的仪器的成本将比目前的多 - 通道高 - 端毛细管电泳仪低 10 倍。平均地, 估计每个分析的化学品成本明显低于现有技术 CE 系统的成本。

[0070] 发明的自动化仪器包括具有集成的 PCR 设备的样品操作盘机构, 用于直接的核酸分子扩增、电泳 / 分离、荧光检测, 对于用于免疫测定 (immunoassay) 的任何结合的染料具有改进的检测。全部自动化而且便携的系统通过普通的计算机控制。检测结果的数据分析是自动化的以给出就地的 (on-the-spot) 扩增 (PCR)、峰识别 (peak identification) 和半定量 (semi-quantitative) 分析。使用此新的、廉价的而且高 - 处理量的分析仪, DNA 实验室将具有能力在一个单元 (unit) 中实施高处理量而且迅速的生物试剂鉴定, 其成本低、劳动强度小、准确度高。该系统的检测能力可为专门检测一些可能存在的生物试剂和病原体而设计。

[0071] 在本发明的一个实施方案中, 将原始样品导入热循环仪中的 96-孔滴定板, 以在将样品注入凝胶 - 柱体之前、过程中或之后经过不同的温度 (热和冷的热循环过程)。在生物 - 分子的分离和分析之前, 在样品制备过程中, 热循环仪具有几个目的或功能。一个功能是生物 - 分子的直接 PCR 扩增而另一个功能则为样品 / 生物 - 分子的不同温度循环 (样品制备步骤) 以在用凝胶 - 毛细管柱体进行电泳之前改变样品的状态 / 情况。12-通道柱体也可起微 - 分配器 (micro-dispenser) 的作用。例如可以在样品盘的第一个位置 (96-孔板上的位置 A) 施加电动力 (electrokinetic) 以将带负电荷的 DNA 注入毛细管或柱体的微 - 通道, 然后该系统可逆转 HV 电源极性以能够到达 96-孔板的位置 B 以混合来自孔 A 及孔 B 的 DNA 样品 (或生物 - 分子) (生物 - 分子反应)。柱体能起样品分配器 (液体分配器) 的作用。加热块 (heat block) 可用于加热或冷却任何生物 - 分子, 然后通过 CE 柱体电泳并分析。生物 - 分子 (即 DNA、RNA、蛋白质、抗体和抗原) 都能用本集成的样品制备和电泳机构以非常灵活的方式来分析。例如可将样品加热高至 90 度 C 然后将其降至 80 或 70 度 C, 并用 CE 柱体 / 设备在温度循环之间、之前或之后快速分析它, 以验证探针与 DNA 的结合效应 (binding effect)。或类似于杂交的微阵列原理 (microarray concept), 可操纵样品温度以洗去 (wash away) 点突变, 然后进行快速电泳以将其定量或进行简单的样品质量检查。此方法 / 过程将允许快速检查测定的峰的位置用于定性的工作, 这用于点突变类型的检测。可通过改进当前荧光检测机构的光学检测系统 (即从 LED 激发变为激光激发 (Laser excitation)) 来增加检测灵敏度, 以能够在电泳过程中通过减少用加热块的热循环 (PCR) 步骤的数目来获得较高的检测灵敏度。使用此热电的模块, 为了贮存或保存的目的, 也可以将 PCR 得到的样品贮藏在较低的设定温度。使用发明的方法, 可简化 PCR 步骤以检测由于温度变化而引起的正确或错误检测的片段 (突变分析) 或单链分析或蛋白质分析。此用于样品制备的热循环组 (block) / 过程系统也可以用作毛细管管内的已注入样品的 PCR 步骤 / 过程。可简单地从一个样品孔电动地注射样品, 然后到达另一个其中含有油的孔, 将毛细管尖浸入油中并开始微 - 通道内已注入样品的温度循环 (在毛细管内 PCR) 然后进行电泳。与用于样品制备的样品板的热循环部件 (样品板加热块) 组合的此多 - 通道毛细管电泳系统将提供与微阵列或实时 - PCR 型设备类似的灵活性用于完整而且一站式解决 (one stop

solution) 的生物 - 分子分析。

[0072] \*\*\*

[0073] 当参考优选的实施方案具体地显示并描述本发明时, 本领域的那些技术人员将理解的是, 在不背离本发明的精神、范围和教导的前体下, 可以进行形式上和细节上的各种改变。

[0074] 可配置样品制备站 (station) 来承担除 PCR 之外的过程从而以适于 CE 分析的形式产生样品。可配置自动化系统 200 来进行不同于 CE 分离和分析或除 CE 分离和分析之外的其它类型的分析。例如, 对于蛋白质或生物试剂检测而言, 以可以使用与微 - 流体电泳系统组合的免疫测定。提取自培养物的蛋白质用于免疫测定。通过结合荧光染料的抗原和抗体的相互作用的扩增信号自动地应用于多 - 通道柱体用于在几分钟内的高 - 分辨率检测。

[0075] 可使接口机构适合于接收其它结构设计的毛细管柱体。本领域的技术人员将认识到, 并入本发明本质的仪器也可用于除 DNA 分析之外的生物 - 分子分析。例如, 通过改变分离凝胶或缓冲液, 也可改进该仪器来分析生物分子, 如蛋白质、碳水化合物和脂质。

[0076] 作为实例而不是限制, 将本发明的检测方案描述为与毛细管电泳和辐射诱导的荧光检测有关。可以理解本发明以适用于检测基于除电泳之外的生物 - 分离现象, 和除荧光发射之外的辐射发射的检测, 以及基于吸光度的检测而分离的分析物。所述除荧光发射之外的辐射发射包括其它类型的发射辐射 (emissive radiation), 如磷光 (phosphorescence)、发光 (luminescence) 和化学发光 (chemiluminescence)。

[0077] 此外, 当所述实施方案中的分离通道被圆柱形的柱或管限定时, 可以理解本发明的原理同样适用于由通道限定的分离通道, 例如通过基质 (substrate) 中的腐蚀 (etching) (微 - 流体型设备或生物芯片) 限定的微 - 通道 (如正方形、矩形或基本上半圆形的横截面)。

[0078] 可配置传送机构沿水平面移动盘, 并且可提供附加的传送机构来垂直地移动盘以接近盘。

[0079] 可将来自样品制备设备的样品输出输入分析设备而无需进行分离。

[0080] 因此, 公开的本发明将被仅仅看作说明性的, 并局限于仅仅如所附的权利要求中说明的范围。

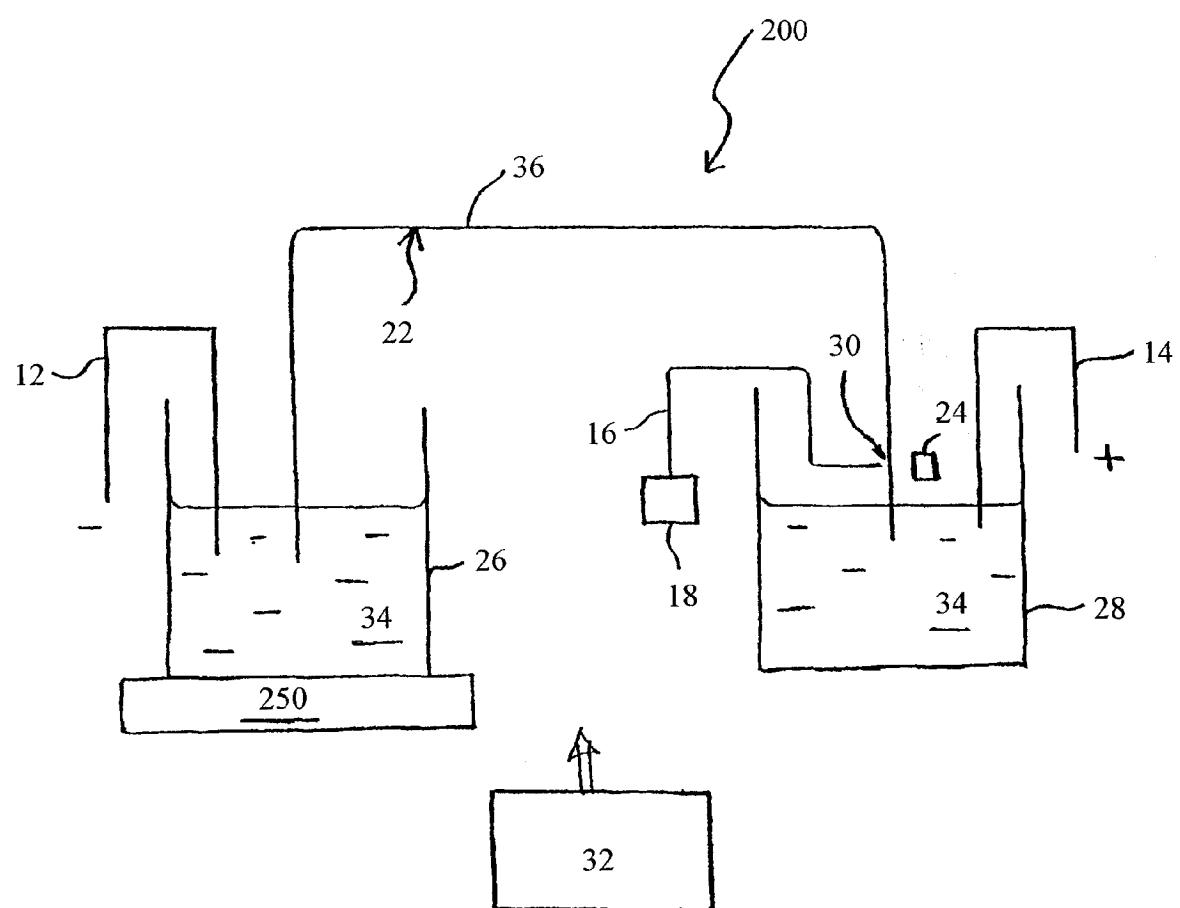


图 1

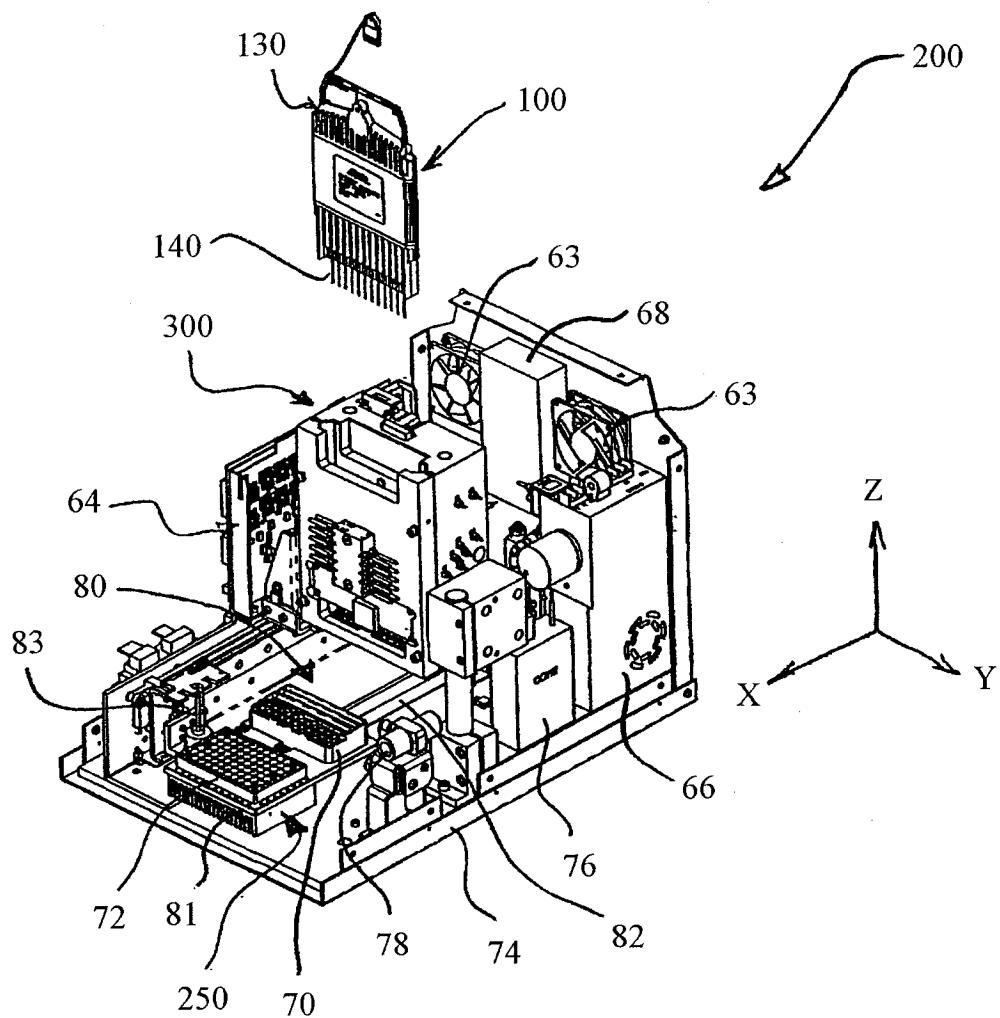


图 2

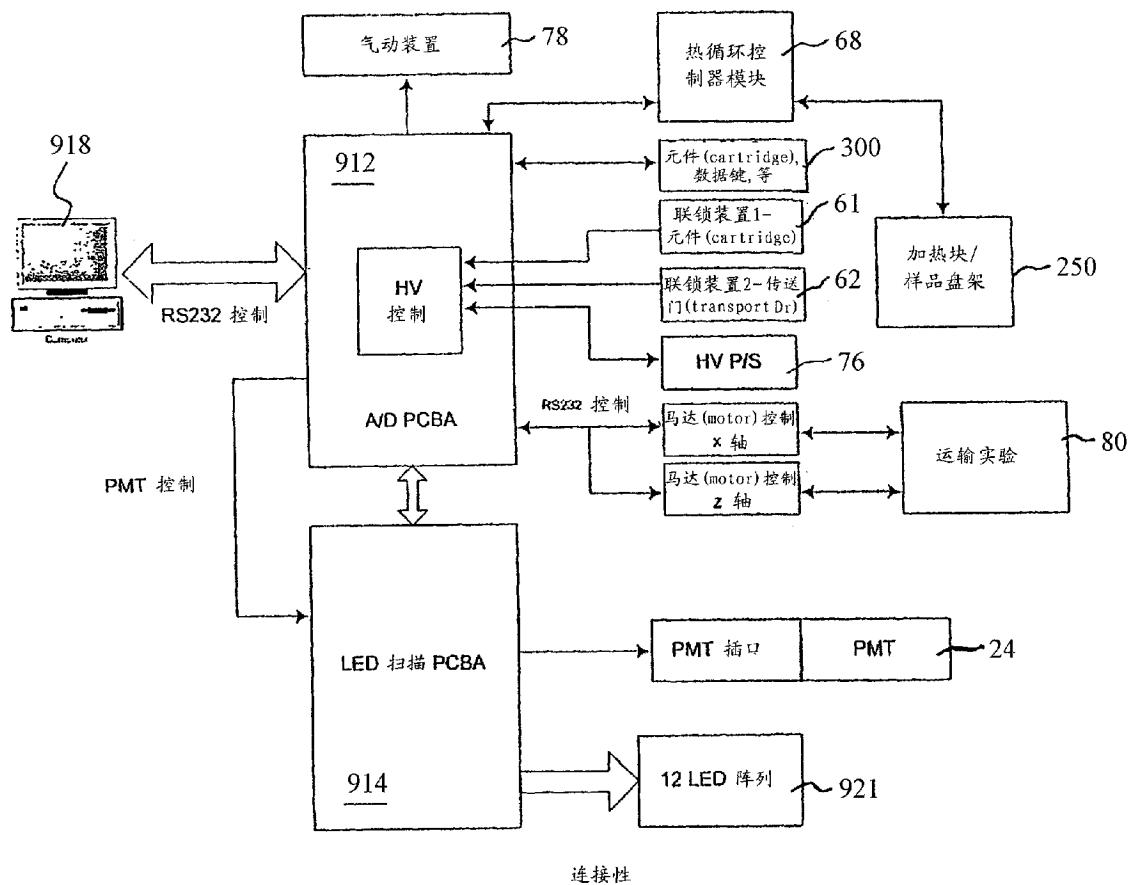


图 3

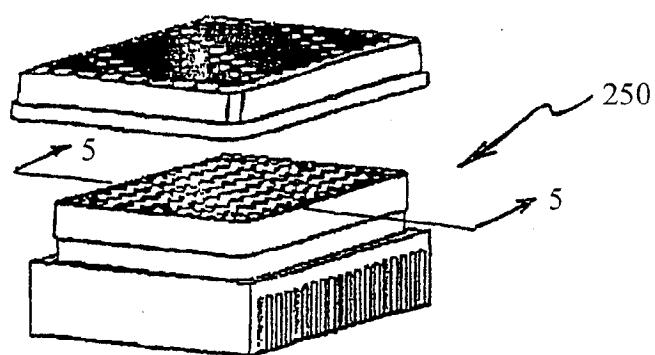


图 4

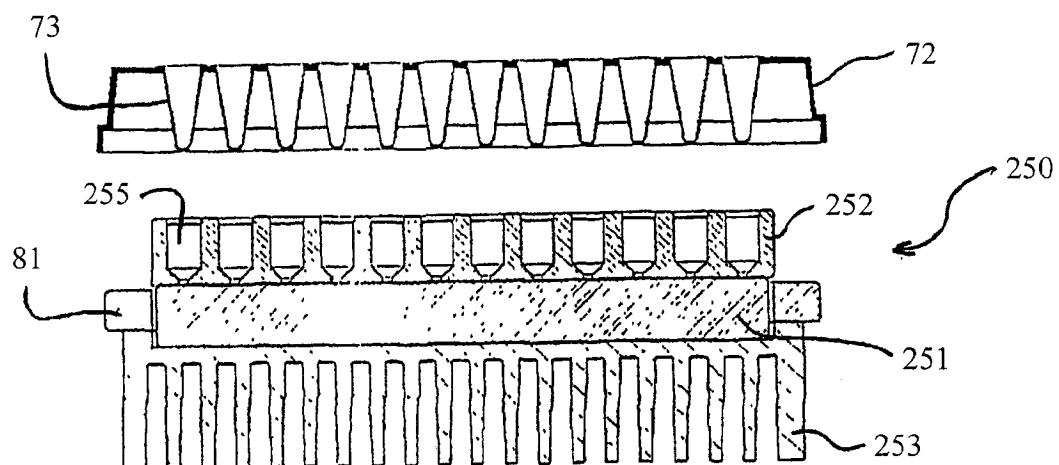


图 5

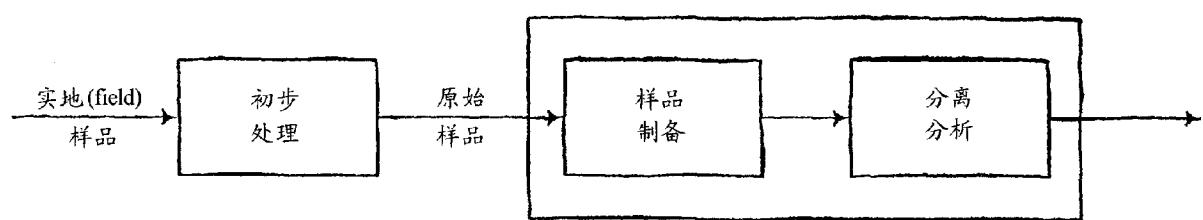


图 6