

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680048554.2

[51] Int. Cl.
B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009年1月14日

[11] 公开号 CN 101346185A

[22] 申请日 2006.12.15

[21] 申请号 200680048554.2

[30] 优先权

[32] 2005.12.21 [33] EP [31] 05112544.1

[86] 国际申请 PCT/IB2006/054883 2006.12.15

[87] 国际公布 WO2007/072373 英 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.20

[71] 申请人 皇家飞利浦电子股份有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

[72] 发明人 J·巴赫尔 A·博斯 G·吕德克

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 张晓威

权利要求书1页 说明书9页

[54] 发明名称

生物分子的传感器和使用所述传感器的分析方法

[57] 摘要

本发明公开了用于分析样品流体的传感器的制备方法，所述样品流体含有一种或多种目标分子。该方法包括将所述样品流体引入至装有多孔基片的小室中的步骤，一种或多种探针分子被施加到所述多孔基片上，且所述探针能够特异性地结合于所述一种或多种目标分子。该方法进一步包括使所述基片与所述小室彼此相对移动的步骤，以迫使所述样品流体通过所述多孔基片的孔，并捕获带有一种或多种探针分子的一种或多种目标分子。本发明还公开了用于分析样品流体的传感器。

1. 用于分析含有一种或多种目标分子的样品流体的传感器的制备方法，其中所述方法包括：

- 将所述样品流体引入至装有多孔基片的小室中，一种或多种探针分子被施加至所述多孔基片，且所述探针能够特异性地结合于所述一种或多种目标分子，和

- 使所述基片和所述小室彼此相对地移动，以迫使所述样品流体通过所述多孔基片的孔，并捕获带有一种或多种探针分子的一种或多种目标分子。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述多孔基片和所述小室的相对移动以垂直于所述多孔基片的表面的方向进行。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述多孔基片含有跨越其表面的多个离散和独立的区域，每个所述区域均结合探针分子。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述基片包含聚合物。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述基片包含聚酰胺均聚物或共聚物。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述聚酰胺均聚物或共聚物通过引入季铵、溶剂解或者将酰胺基衍生化为脒基而得到修饰。

7. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述基片包含纤维素质。

8. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述基片包含热塑性氟化聚合物。

9. 权利要求 1-8 中任一项的方法，其进一步包括分析所述多孔基片以测定所述一种或多种目标分子的存在和/或浓度的步骤。

10. 传感器，其包含：

- 包含其上施加有一种或多种探针分子的多孔基片的小室，
- 用于将含有一种或多种目标分子的样品流体引入所述小室中的装置，
- 用于使所述多孔基片相对于所述小室移动的装置。

11. 权利要求 10 的传感器，其另外包含用于分析所述多孔基片以测定所述一种或多种目标分子的存在和/或浓度的装置。

生物分子的传感器和使用所述传感器的分析方法

本发明涉及制备和使用用于分析样品流体的传感器的方法。本发明还涉及用于分析生物分子的改良传感器。具体而言，本发明涉及制备和使用用于分析生物样品中的生物分子的传感器的改良和有效的方法。在操作期间，该传感器包含用于接受生物样品的小室和所述小室中包含的基片(substrate)，所述基片具有施加其上以结合所述生物分子的探针，且所述方法包括其中基片和小室彼此相对地移动的步骤。更具体而言，本发明涉及在微阵列分析中有用的传感器。

含有一种或多种其它分子的生物样品中特定目标分子(例如但不限于DNA、RNA或蛋白质)的存在和浓度可通过使用这些目标分子与捕获分子的复杂结合来测定。在传统的蛋白质/DNA/RNA印迹的情况下，目标分子被固定在印迹表面上，并接着被可溶性检测分子检测。对于ELISA(酶联免疫吸附测定)或基于微阵列的测试，被固定的则是捕获分子。在微阵列技术中，一套特定的探针分子(选择每种探针分子以与一种特定目标特异性地相互作用)被固定在固体表面的特定位置上。另一方面，目标分子由可检测的标记物分子(例如荧光团或磁珠)标记。通过使所述固体表面与生物样品接触，目标分子将被固定在相应于它们的特定探针的位置上。目标分子的检测和它们在生物样品中浓度的评估然后会分别通过定位和测量由结合于目标的可检测分子产生的信号的强度来各自进行。由于标准微阵列的平坦表面，生物样品流体内的分子转运大部分由扩散定律控制。由于这些阵列具有相当大的表面积，可能需要几个小时的杂交时间以获得充分的结合。扩散限制效应可通过搅拌、液体转运(泵)或表面声波得到一些降低。然而，由于需要使用越来越小的生物样品体积和因此需要使用在基片上的液体薄层，这种搅拌的效率低，且不允许在表面上直接有紊流混合物。另外，标准微阵列需要洗涤步骤以在测量前从阵列上除去该残余的流体层。这有效地限制或消除使用这种微阵列进行动力学测量的可能性，在动力学测量中在不同时间点(以改善测量的动态范围)和/或温度(以通过降低非特异性结合的影响来改善特异性)下的一系列连续测量提供有价值的附加信息。

这种方法在例如 WO03/004162 中被公开，其中表面排列有三种不同的寡核苷酸 DNA 探针，并杂交于三种不同的互补 DNA 目标的生物样品库。目标用荧光标记物(异硫氰酸荧光素)修饰以允许在表面上直接检测。当生物样品接触表面时，探针将特定的目标从溶液中捕获到表面上，并通过落射荧光显微镜进行检测。WO/03004162 公开了对上述的一般方法的几处改进，例如为了允许生物样品通过(任选经由泵系统的使用)流过表面而与探针接触，使用多孔基片。该方法具有明显加固杂交的优点。另一改进是使用控制生物样品温度的热室。杂交是温度依赖性现象，温度控制提供优点，例如对于核酸分析而言。

然而，泵系统既昂贵又是可能的泄漏源，且需要经常的维护。另外，通常难以避免回路中存在空气，这导致过量泡沫的形成，干扰检测过程。

因此，在本领域中需要改良和更有效的方法以加固生物分子在基片上的杂交。在本领域中还需要使用既廉价又易于维护的设备的省时的分析方法。

除非另外指出，本文所用的术语“类型”，当应用于目标分子或生物化合物时，指一组通过其分子结构而相关的化合物。本发明所涉及的目标分子的示例性类型包括但不限于 DNA 生物化合物、RNA 生物化合物、多肽、酶、蛋白质、抗体等等。

除非另外指出，本文所用的术语“微阵列分析”指这样的分析，其中使含有目标生物化合物的样品(优选生物流体样品)(其任选含有悬浮于其中的少量固体或胶体微粒)接触(例如流过)含有横跨其表面的多个离散和独立的区域的膜，每个所述区域均具有施加于其的一种或多种探针，且因其与目标生物化合物特异性结合的能力而选择每种所述探针。

除非另外指出，本文所用的术语“目标”指确定为分析目标或分析点的分子化合物。它包括分子化合物，例如但不限于核酸及相关化合物(例如 DNA、RNA、寡核苷酸或其类似物、PCR 产物、基因组 DNA、细菌人工染色体、质粒等等)、蛋白质和相关化合物(例如多肽、单克隆抗体、受体、转录因子等等)、抗原、配体、半抗原、糖和相关化合物(例如多糖、寡糖等等)、细胞器、完整细胞等等。

除非另外指出，本文所用的术语“探针”指固定在基片表面上和/或基

片内的试剂，所述基片当在探针存在下放置或与所述探针反应时能够与作为样品一部分的“目标”进行一些特异性相互作用，并用以检测所述目标的存在。探针包括分子化合物，例如但不限于核酸和相关化合物(例如 DNA、RNA、寡核苷酸或其类似物、PCR 产物、基因组 DNA、细菌人工染色体、质粒等等)、蛋白质和相关化合物(例如多肽、单克隆抗体、受体、转录因子等等)、抗原、配体、半抗原、糖与相关化合物(例如多糖、寡糖等等)、细胞器、完整细胞等等。

除非另外指出，本文所用的术语“标记物”指通过合适的方式可易于检测从而能够检测其物理分布和/或传递的信号的强度的试剂，例如但不限于荧光分子(例如荧光剂、磷光剂、化学发光剂、生物发光剂等等)、有色分子、反应后产生颜色的分子、酶、磁珠、放射性同位素、可特异性结合的配体、可通过声波谐振检测的微泡等等。

除非另外指出，本文所用的术语“标记”指在探针存在下带来标记物的动作，或者使标记物与探针连接或相互作用(例如反应)的动作。

概括来说，本发明在第一方面涉及用于分析含有目标分子的样品流体的传感器的制备方法，所述方法在于使其上施加有探针分子的多孔膜相对于含有所述样品流体的小室移动。本发明在第二方面还涉及传感器，其包含小室、其上施加有探针分子的多孔基片、用于将含有目标分子的样品流体引入至小室中的装置和用于使所述多孔基片相对于小室移动的装置。

在其最宽泛的意义上和在第一方面，本发明涉及制备和使用用于分析含有一种或多种目标分子的样品流体的传感器的方法，所述方法包括以下步骤：

1) 将所述样品流体引入至装有多孔基片的小室中，所述多孔基片上施加有一种或多种探针分子，且所述探针能够特异性地结合于所述一种或多种目标分子，和

2) 使所述基片和所述小室彼此相对地移动，以迫使所述样品流体通过所述多孔基片的孔，并捕获带有探针分子的一种或多种目标分子。

当要分析的存在于样品(优选流体样品)中的一种或多种目标分子是例如但不限于以下的分子时，本发明的方法特别有用：

- 具有约 5 个氨基酸单元至 50 个氨基酸单元的寡肽，

- 具有多于 50 个氨基酸单元的多肽,
- 包括酶在内的蛋白质,
- 寡核苷酸和多核苷酸,
- 抗体或其片段,
- RNA, 和
- DNA。

对于某些目标分子, 变性步骤可能是有益的, 例如双链 DNA 可被分离成单链, 从而允许单链和点滴(spot)在膜上的捕获探针特异性结合。这种变性步骤可通过方便的方式(例如通过加热基片(晶片或膜)或样品或两者)来实现。当在这种变性步骤中加热样品时, 可进行任选的冷却步骤以保持链分离。

在该方法的第一步中用于标记所述目标生物化合物并最后允许在该方法的最后一步中检测它们的标记物可以是发光的(荧光的、磷光的、化学发光的)、放射性的、酶的、色度的、声波的(例如微泡谐振)或磁性的。特别地, 可用结合配体替代标记物。在最后这种情况下, 该配体会在下一步中与相容的带有标记物的试剂结合。

适合的荧光或磷光标记物例如但不限于荧光素、Cy3、Cy5 等等。

适合的化学发光标记物例如但不限于鲁米诺、荧光染料(cyalume)等等。

适合的放射性标记物例如但不限于同位素如 ^{125}I 或 ^{32}P 。

适合的酶标记物例如但不限于辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、萤光素酶、碱性磷酸酶等等。

适合的色度标记物例如但不限于胶体金等等。

适合的声波标记物例如但不限于微泡等等。

适合的磁珠例如但不限于磁珠(Dynabead)等等。

为增加灵敏度, 每个目标分子可被标记以至多约 300 个相同的标记物(例如在最后的 PCR 扩增步骤中)。为降低随后测量中的背景信号, 作为任选的步骤, 可通过化学和/或物理处理(例如化学 PCR 纯化、透析或反渗透)将未被引入目标分子中而仍存在于样品流体中的未结合标记物从样品流体中除去。

样品流体可来自工业或天然来源。适于实施本发明的方法的样品流体

的实例可以是但不限于来自任何动物(包括哺乳动物(特别是人)、鸟和鱼)的体液如痰、血液、尿、唾液、粪便或血浆。其它非限制性实例包括含有来自植物、线虫、细菌等的生物材料的流体。对于适当实施本发明的方法而言,唯一的要求是所述生物材料基本上以流体(优选液体)形式存在,例如以于适合的溶解介质中的溶液形式存在。本发明的方法中所用的样品流体的体积可以是约 5 μL 至 1 mL 之间,优选约 50 μL 至 400 μL 间的任何值。

在许多情况下,期望将缓冲液(例如杂交缓冲液)直接引入要分析的样品流体中或者作为检测单元的组成部分(例如作为流体或者以冻干形式加入基片之上或之下),由此消除对杂交缓冲液单独贮存区域的需求。

存在于测试室中的基片呈现两个表面,上表面和下表面。为了允许迫使样品流体从上表面通过所述膜到达下表面和/或从下表面通过所述膜到达上表面,所述基片是多孔的。

多孔基片可包括具有多个孔、开口和/或各种几何形状和尺寸的通道的网络。基片可以是纳米多孔的(nanoporous)或微米多孔的(microporous),也就是孔、开口和/或通道的平均尺寸可以适宜地在 0.05 μm 至 10.0 μm 之间,优选在 0.1 μm 至 1.0 μm 之间,更优选在 0.3 至 0.6 μm 之间。取决于所述基片的制造技术,孔径分布可基本上均匀或者其可具有约 1.1 至约 4.0 的多分散性。相应于孔、开口或通道的表面可占多孔基片上表面或下表面总面积的约 1%至 99%,优选约 10%至 90%,更优选约 20%至 80%。

基片(例如膜)的厚度不是本发明的限制性特征,它可为约 10 μm 至 1 mm,优选 50 μm 至 400 μm ,更优选 70 μm 至 200 μm 。基片(例如膜)的形状不是本发明的限制性特征。它可以是圆形的,例如直径在约 3-15 mm 的范围内,但本发明的方法也可适用于其它任何基片形状和/或尺寸。

其上施加(例如点滴)有探针的多孔基片不是本发明的限制性特征,因此可由本领域已描述为对于在多孔基片上固定生物分子而言合适的基片的任何材料制成。这种材料的非限制性实例一般包括:

- 有机聚合物,例如聚酰胺均聚物或共聚物(例如尼龙)、热塑性氟化聚合物(例如 PVDF)、聚卤乙烯、聚砜、纤维素质例如硝酸纤维素或乙纤维素、聚烯烃或聚丙烯酰胺,和

- 无机材料例如玻璃、石英、硅石、其它含硅陶瓷材料、金属氧化物

材料例如氧化铝等。

这些基片材料可以是灭活的或者它们可以在其部分表面是活化的。如果是活化的，活化可通过化学或物理处理实施。活化的适合方式包括但不限于等离子体、电晕、UV 或火焰处理和化学修饰。取决于材料的种类，适合的化学修饰包括但不限于引入季铵离子(例如至聚酰胺中)、溶剂解(例如水解)、将酰胺基衍生化为脒基(例如在聚酰胺中)、羟基化、羧基化或硅烷基化。适当实施本发明的方法的不需要活化的基片材料的非限制性实例是尼龙(聚酰胺均聚物)，特别是当用于 DNA 或 RNA 分析时，因为它对寡核苷酸和多核苷酸具有固有亲合力。

本发明所用的探针应该根据它们对目标生物化合物的亲合力或它们对所述目标生物化合物的相关修饰形式(modification)的亲合力来适当选择。例如，如果目标生物化合物是 DNA，则探针可以是但不限于合成的寡核苷酸、其类似物或特异性抗体。目标生物化合物的适合的修饰形式的非限制性实例是生物素取代的目标生物化合物，在这种情况下探针可带有抗生物素蛋白官能团。

在本发明的优选实施方案中，多于一种不同的探针被施加在基片上，而在更优选的实施方案中，为了允许不同目标的平行测量，将多个不同的探针以阵列的方式沿所述基片的表面点滴在物理上不同的位置上。

为了更容易地支持后续的检测和鉴定，还可以将一个或多个附加斑点(例如用于强度校正和/或位置检测)点滴在基片表面上。

点滴后，由于基片(例如膜)的固有或(例如经活化)获得的性质，探针自发地固定在基片的表面上，或者探针通过附加的物理处理步骤(例如但不限于交联，如通过干燥、加热或通过暴露于光源)而固定在基片的表面上。

为了改善基片(例如膜)和其上连接的探针的贮存期限，当不使用时将膜干燥可能是有帮助的。其后膜在与样品流体接触时再水合。

一旦将探针施加(例如经喷墨点滴)至基片的表面上，为了灭活基片的未点滴区域而加入有效量的阻断剂可能有助于阻止目标生物化合物或未结合的标记物与未点滴区域的非特异性结合(其会导致不期望的背景信号)，并因此增加信/噪比。适合的阻断物质或阻断剂的实例一般包括但不限于鲑鱼精、脱脂乳或聚阴离子。

在本发明的另一实施方案中，可同时使用不同的标记物以同时测量：

i) 来自不同样品流体(例如不同的样品流体如血液和痰，或者来源于不同位置的不同样品流体)的一种或多种目标分子，或者

ii) 来自多个样品流体(例如经处理的对未经处理的，患病的对患病的等)的分析物的差异表达，或者

iii) 来自同一样品流体的不同类型的目标分子(例如分析血液样品流体的DNA和RNA成分)。

在实际的测知步骤中，由于所述多孔基片相对于含有样品的小室的相对移动，迫使样品流体通过多孔基片(例如膜)。为获得更佳效率，在迫使样品流体通过所述多孔基片的过程中，多孔基片相对于含有所述样品的小室的移动优选在基本上垂直于所述多孔基片表面的方向上进行。为了增加后续分析的灵敏度和特异性，上述基片移动步骤可以以规律或不规律的间隔在相同条件(如温度、pH或离子浓度)或不同条件下按需重复多次。

膜相对于小室的相对移动可以是单向的或双向的，优选双向的。如果是单向的，则将基片例如从小室的一侧到所述小室的对侧转换一次。

如果是双向的，则将基片例如从小室的一端到另一端来回转换。

在膜相对于小室的每次相对移动后，新的目标分子就有机会结合至存在于基片(如膜)表面上的探针。基片的移动允许：

(i) 目标生物分子接触探针并与之相互作用的扩散时间较短；由于孔径小，目标分子紧密接近之前点滴的探针，因此相互作用/杂交的机会显著增加，并克服了采用无孔基片的技术存在的扩散问题，

(ii) 为了跟踪结合过程的动力学，在膜相对于小室的每次相对移动后进行一次测量或探针检测，和

(iii) 在光学检测的情况下，减小分隔测量区域的光学透明窗和包含要分析的样品的小室之间的距离。

不用泵并替换以使多孔基片(如膜)相对于小室移动的概念允许通过限制空气进入小室的可能性而大大限制并且在很多情况下抑制泡沫形成。另外，多孔膜移过整个样品流体的步骤确保样品流体同时被混合和均化。

在预定数目的基片移动步骤或循环后(如在每个基片移动步骤或循环后)定量测量标记物的存在可能是有用的。这种定量测定的结果结合实际基

片的信息和/或样品流体温度，允许测定目标生物化合物的一些动力学性质。将样品流体加热至规定温度通过给予更严格的结合条件允许更精确地控制结合性质，特别是结合特异性。该加热步骤还可通过加热膜或样品流体或两者来实现。当达到期望温度后，接着使样品流体与基片接触。

可通过适合的手段提供该方法的灵敏度和/或结合特异性，例如但不限于：

- 使用适当的温度曲线(例如一系列一个或多个加热步骤，任选在连续加热步骤之间有平衡时间)，
- 调整基片移动循环的数目，和
- 用于测量系列的测量的标记物信号的信号后处理(例如荧光图象的图象处理)，和
- 测定捕获的目标生物化合物最佳结合或再分离的温度。

例如，当升高温度时，测量的信号的锐减指示已达到了给定捕获探针-目标生物化合物复合物分离(熔化)温度。这一特性可用于区别特异性和非特异性结合。为进一步改善特异性，可以在超过熔化温度域值后继续测量循环，这次是持续降低温度以确定目标生物化合物的再结合在低于适当的特定熔化温度下再次发生。

该方法任选的最后步骤则在于从检测室中除去残余样品流体，以进一步降低由于未结合标记物和/或分子引起的背景信号。

优选地设计检测室的形状以使测量过程中未结合标记物和/或分子被屏蔽于检测系统之外，例如(在标记物是发光分子的情况下)通过阻断膜下样品流体发出的光的光路或者通过将膜移近光学透明窗并由此驱散上清液来屏蔽。背景信号可进一步通过用内置的搅打器搅打上清液来降低。样品流体的除去以及检测室形状的设计确保面向检测系统的基片表面以及膜的对侧具有最小量的样品流体表面层。这降低未结合标记物和/或未结合分子的背景信号。

在基片与样品流体接触适当时间后，例如在适合的膜移动循环后，检测并测量结合至探针的目标生物化合物的标记物。另外，还可在膜移动的过程中测量标记物。

观察到的每个信号的物理位置、种类和强度允许鉴定被捕获的是哪种

目标生物化合物，允许鉴定该目标生物化合物来自哪个样品和/或生物化合物属于哪种类型，并允许评估其浓度。

本发明方法的最后步骤中基片的分析可经包括落射荧光显微镜和 CCD (电荷耦合器件)照相机或任何其它种类的照相机的光学装置进行。在荧光或磷光标记物的情况下，该光学装置优选包括在它们各自的激发波长下能激发标记物的(优选紫外)光源。

化学发光标记物的检测例如通过将适当的反应物添加至标记物中并使用显微镜观察其荧光来进行。

放射性标记物的检测例如通过将医用 X-射线胶卷直接放在基片上来进行，当所述胶卷暴露于标记物时显色并产生相应于感兴趣的探针的位置的暗区。

酶标记物的检测例如通过将适当的底物添加至标记物中并观察由该酶催化的反应的结果(例如颜色变化)来进行。

色度标记物的检测例如通过将适当的反应物添加至标记物中并观察所得外观或颜色变化来进行。

声波微泡标记物的检测例如通过将所述标记物暴露于特定频率的声波并记录所得谐振来进行。

磁珠的检测例如通过磁传感器进行。

本发明方法已通过提及大量参数、值或实施方案而在上面得到描述，所述参数中每个均包括优选的或更优选的可能选择。应该理解，除非另外就参数的某些组合进行解释，一个这样的参数的每个优选范围或实施方案都可随意与一个或多个其它参数的每个优选范围或实施方案组合。

专利名称(译)	生物分子的传感器和使用所述传感器的分析方法		
公开(公告)号	CN101346185A	公开(公告)日	2009-01-14
申请号	CN200680048554.2	申请日	2006-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
[标]发明人	J巴赫尔 A·波斯 G吕德克		
发明人	J·巴赫尔 A·波斯 G·吕德克		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/53		
CPC分类号	B01L3/502 B01L2300/0636 B01L2300/0681		
代理人(译)	张晓威		
优先权	2005112544 2005-12-21 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于分析样品流体的传感器的制备方法，所述样品流体含有一种或多种目标分子。该方法包括将所述样品流体引入至装有多孔基片的小室中的步骤，一种或多种探针分子被施加到所述多孔基片上，且所述探针能够特异性地结合于所述一种或多种目标分子。该方法进一步包括使所述基片与所述小室彼此相对移动的步骤，以迫使所述样品流体通过所述多孔基片的孔，并捕获带有一种或多种探针分子的一种或多种目标分子。本发明还公开了用于分析样品流体的传感器。