



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110168366 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201880005807.0

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(22)申请日 2018.01.04

代理人 康健 王思琪

(30)优先权数据

10201700040Y 2017.01.04 SG

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 15/10(2006.01)

2019.07.03

B01L 3/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SG2018/050005 2018.01.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/128585 EN 2018.07.12

(71)申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡

(72)发明人 应仪如 张翼 李玉山 A·法温

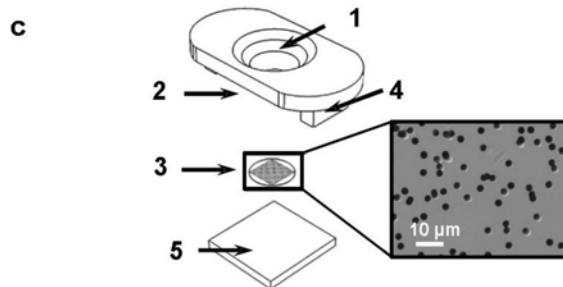
权利要求书3页 说明书18页 附图10页

(54)发明名称

用于基于颗粒的生物测定的过筛垂直流系统

(57)摘要

用于基于颗粒的生物测定的过筛垂直流系统。本发明涉及一种在基于颗粒的制备性测定和分析性测定中用于液体移除的装置。该装置利用多孔膜将液体容纳在测定的反应室中。一旦膜与可拆卸的吸收垫接触,该膜就能使液体流通过。多孔膜和吸收垫的组合使用允许通过毛细力有效地移除废液,从而将由残留液体引起的遗留污染最小化。本发明还涉及包含该装置的阵列和使用该装置的测定方法。通过利用这种装置进行基于颗粒的固相萃取,可以在过筛平台上分离高纯度的DNA。在过筛装置上运行基于颗粒的ELISA,以分析具有降低的背景和更大的信号背景比的蛋白质和细胞。此外,已经发现具有3x4筛阵列的过筛装置的高通量潜力,这种筛阵列允许多个样品并行处理。



1. 一种在基于颗粒的测定系统中用于液体移除的装置,包括
 - a) 室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口,并且所述室具有用于从所述室移除液体的至少一个其他开口;
 - b) 多孔膜或筛状膜,所述多孔膜或筛状膜附着至所述室,覆盖用于移除所述液体的所述至少一个开口,以防止液体在不与吸收垫接触时流出所述室;
其中所述膜具有孔或洞,所述孔或洞的直径小于所述测定中所用颗粒的粒径;以及
 - c) 液体吸收垫,所述液体吸收垫可被附着至所述膜的不面向内室的外侧并且从所述外侧分离。
2. 根据权利要求1所述的装置,其中液体可以通过垂直流从所述室移除,并且用于添加试剂的所述至少一个开口位于所述室的顶部或上部,并且用于从所述室移除液体的所述至少一个其他开口位于所述室的底部或下部。
3. 根据权利要求2所述的装置,其中液体通过所述膜的所述流是在与所述吸收垫接触后的被动流。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述膜在与所述液体吸收垫接触时变得对所述液体是可渗透的。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述室是用于在液体中进行化学反应或生化反应的反应室。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述膜是微孔膜。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述膜防止所述液体从所述室流出,其中滞留时间超过60分钟。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述膜具有0.05 μm 至50 μm 大小的孔或洞。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述膜由非吸收性聚合物制成。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中,选自聚碳酸酯、聚酰胺、变性聚丙烯腈共聚物、苯乙烯-丙烯酸共聚物、聚砜、聚偏二氟乙烯、聚氟乙烯、聚氯醚、热塑性聚醚、缩醛聚合物、聚丙烯腈、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸正丁酯、聚氨酯、聚酰亚胺、聚苯并咪唑、聚乙酸乙烯酯、芳香族聚醚和脂肪族聚醚、纤维素酯、环氧树脂、聚乙烯、聚丙烯、多孔橡胶、聚(环氧乙烷)、聚乙烯吡咯烷酮、聚(乙烯醇)、聚(苯乙烯磺酸钠)、聚乙烯苄基三甲基氯化铵、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(异丁基乙烯基醚)、聚异戊二烯、聚烯烃、乙烯乙酸乙烯酯共聚物、聚酰胺和聚氨酯。
11. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述吸收垫由亲水材料制成。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述基于颗粒的测定是制备性生物测定或分析性生物测定。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述颗粒任选地被官能化并且选自二氧化硅颗粒、聚合物颗粒、磁性颗粒或超顺磁性颗粒。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的装置,其中所述颗粒沉积在所述膜上或沉积在所述室的内壁上。
15. 一种根据前述权利要求中任一项所述的装置的阵列,其中所有或多个装置的所述膜可以同时或以交错顺序与单个吸收垫或多组吸收垫接触。

16. 根据权利要求15所述的阵列,其中所述阵列由孔板组成,其中所述膜通过粘合剂、双面胶带、聚二甲基硅氧烷(PDMS)或所述膜与板底部的热结合附着于所述孔板的底部。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的阵列,其中所述膜是具有微米尺寸孔的聚碳酸酯膜。

18. 一种制备性测定或定量测定方法,包括以下步骤:

a) 提供室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口;

并且所述室具有用于从被多孔膜或筛状膜覆盖的所述室移除液体的至少一个其他开口;

b) 将颗粒和至少一种液体与样品材料和任选的试剂和/或其他材料的制剂一起填充到所述室中;

c) 在所述室中进行反应,其中所述颗粒与样品材料的制剂反应或相互作用,而没有任何实质的液流通过所述膜;

d) 在所述膜与位于所述膜的不面向内室的外侧处的吸收垫接触之后,通过使流穿过所述多孔膜或筛状膜,经由所述多孔或筛状膜移除反应液体和任选溶解的副产物;

e) 任选地添加液体至所述室;以及

f) 检测或收集已经与所述颗粒反应的样品材料。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,在步骤d)之后,以洗涤液填充所述室,此后,在执行步骤e)或f)之前,通过使所述膜与所述吸收垫进一步接触使该洗涤液穿过所述膜被移除。

20. 根据权利要求18所述的方法,其中所述颗粒是用经标记的捕获抗体官能化的聚合物颗粒,并且所述样品材料的所述制剂包含酶标记的检测抗体。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述颗粒与所述样品材料相互作用以形成样品材料,所述样品材料通过粘附或化学结合被所述颗粒加标签。

22. 根据权利要求18所述的方法,其中所述制剂包含DNA,并且所述颗粒是磁性颗粒。

23. 根据权利要求18所述的方法,其中所述制剂包含mRNA,并且所述颗粒是poly(T)缀合的磁性颗粒。

24. 根据权利要求18所述的方法,其中在步骤b)中所述颗粒首先与液体一起填充到所述室中,在将所述样品材料与至少一种液体一起填充到所述室中之前,将所述液体移除并将所述颗粒沉积在所述膜和/或室壁上。

25. 根据权利要求18所述的方法,其中在步骤c)中将所述样品材料被加标签至颗粒。

26. 一种制备性测定或定量测定方法,包括以下步骤:

a) 提供室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口;

并且所述室具有用于从被多孔膜或筛状膜覆盖的所述室移除液体的至少一个其他开口;

b) 将颗粒形式的样品材料或固定在液体制剂中的颗粒上的样品材料和任选的试剂或填料填充到所述室中;

c) 在所述膜与位于所述膜的不面向内室的外侧处的吸收垫接触之后,通过使流穿过所述多孔膜或筛状膜,经由所述多孔或筛状膜移除所述液体和任选溶解的物质;

d) 任选地添加液体至所述室;以及

e) 检测或收集颗粒形式的所述样品材料或固定在颗粒上的所述样品材料。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中, 在步骤d) 之后, 以洗涤液填充所述室, 此后, 在执行步骤d) 或e) 之前, 通过使所述膜与所述吸收垫进一步接触而使该洗涤液穿过所述膜被移除。

28. 根据权利要求26所述的方法, 其中固定在颗粒上的所述样品材料包含DNA或RNA, 并且所述颗粒选自二氧化硅珠或二氧化硅包被的磁珠。

29. 根据权利要求26所述的方法, 其中固定在颗粒上的所述样品材料包含mRNA, 并且所述颗粒选自Oligo (dT) 磁珠。

用于基于颗粒的生物测定的过筛垂直流系统

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及一种过筛垂直流装置,该装置用于在基于颗粒的测定中、尤其是生物测定中进行有效的液体交换。过筛平台是本发明过筛装置的一部分,该平台利用多孔膜筛出颗粒,并利用吸收垫通过毛细力移除废液。多孔膜能够将液体容纳在反应室中,并且当废液与吸收垫接触时也允许废液流通过。

背景技术

[0002] 基于颗粒的系统已经在许多制备性生物测定和分析性生物测定中被广泛采用。基于颗粒的系统有几个优点。首先,颗粒为分子结合提供固体基质。靶分子可以非特异性地吸附到颗粒上,例如DNA吸附到二氧化硅颗粒上。或者,它们可以通过配体-受体相互作用与颗粒特异性结合以进行互补杂交。例如,在诸如免疫测定的应用中,抗体缀合的颗粒可以结合靶分子。寡核苷酸缀合的颗粒用于DNA文库制备以进行高通量测序。其次,具有独特性质如颜色、大小和电荷的颗粒是标记靶分子或细胞的有用标签。例如,荧光颗粒通常用作多重检测的条形码。第三,颗粒具有大的表面-体积比,因此少量的颗粒将为固相反应提供足够的表面积。最后,颗粒容易分散在液体中,并且通过离心力或磁力容易与溶液相分离。

[0003] 典型的基于颗粒的测定需要几个液体交换步骤。在与靶分子结合后,首先通过离心力或磁力将颗粒与液相分离。接下来,使用液体处理装置(通常是移液管或真空抽吸器)以从颗粒中移除废液。之后,加入新试剂,并将颗粒再分散。存在与这种液体交换过程相关的许多问题,这些问题可能潜在地损害基于颗粒的测定的性能。首先,难以从颗粒中完全除去液体。由于表面张力,少量液体将粘附到颗粒表面。此外,液体也会被截留在颗粒之间的间隙中。即使在几轮洗涤之后,残留的液体也会显著地造成污染。在使用二氧化硅颗粒分离的DNA中观察到这种污染,这由其异常的260/280和260/230比率证明。其次,虽然向颗粒中加入液体相对容易,但是从颗粒中回收液体需要更高水平的实践技能。需要仔细地定位液体处理装置,以便可以在不干扰颗粒的情况下移除大量的废液。如果在残留物中留下太多的液体,将导致高水平的遗留污染。如果颗粒与废液一起被意外地除去,将导致产率低或检测灵敏度低。因此,基于颗粒的系统的性能经常受到液体交换过程中残留试剂引起的遗留污染的影响。

[0004] 因此,需要有效地将基于颗粒的测定的颗粒与各测定步骤中使用的液体分离。因此,本领域需要一种装置,该装置能够有效地移除废液,从而实现与传统方法相比更有效的液体交换并且将遗留污染最小化。

发明内容

[0005] 根据本发明的第一方面,制成了在基于颗粒的分析系统中用于液体移除的装置,包括(a)室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口,并且所述室具有用于从所述室移除液体的至少一个其他开口;(b)多孔膜或筛状膜,所述多孔膜或筛状膜附着至所述室,覆盖用于移除液体的至少一个开口,以防止液体在不与吸收垫接触时

流出所述室；其中所述膜具有孔或洞，其直径小于测定中所用颗粒的粒径；以及(c)膜可拆卸的液体吸收垫，所述液体吸收垫可被附着至该膜的不面向内室的外侧并且从所述外侧分离。

[0006] 有利地，根据本发明的装置可用于有效地从颗粒移除废液。通过吸收垫的毛细管驱动液体交换过程能够有效地从颗粒分离（“擦除”）废液，从而减少任何遗留污染。吸收垫可提供被动泵送机制用于简单流体处理。相反，通过离心力或磁力的常规液体交换将由于表面张力而在颗粒表面上留下大量液体，导致高水平的污染。

[0007] 用装置中包含的吸收垫进行移除允许反应在流体处理室中孵育预定的持续时间，同时吸收垫与膜分离。吸收垫在与膜接触时移除废液。它还允许被动流体泵送，这消除了使用庞大且昂贵的外部流体控制系统。

[0008] 本发明的实施方案有利地提供了用于在基于颗粒的系统中的液体交换的毛细管驱动的垂直流平台。这种称为“过筛(sieve-through)”的平台由反应单元和吸收垫组成(图1)。过筛平台的关键特征是形成反应室底部的多孔膜。尽管膜是多孔的，但由于表面张力，膜能够将液体容纳在反应单元中。然而，当膜与吸收垫接触时，由吸收垫提供的毛细力将通过孔将液体拉出反应单元。膜的孔小于测定中所用颗粒的直径。结果，在通过孔除去废液的过程中，颗粒将被筛出来并保留在膜上，因此称为“过筛”。

[0009] 根据本发明的第二方面，提供了根据本发明第一方面的装置的阵列，其中所有或多个装置的膜可以同时或以交错顺序与单个吸收垫或多组吸收垫接触。

[0010] 有利地，阵列提供了本发明的实施方案，其中该实施方案具有通过提供筛阵列而用于高通量分析的可能，所述筛阵列允许并行地同时分析多个样品。过筛阵列可以显著改善基于颗粒的系统性能。

[0011] 根据本发明的第三方面，还提供了制备性测定或定量测定方法，包括以下步骤：(a) 提供室，所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口；并且所述室具有用于从被多孔膜或筛状膜覆盖的所述室移除液体的至少一个其他开口(b) 将颗粒和至少一种液体与样品材料和任选的试剂和/或其他材料的制剂一起填充到所述室中；(c) 在所述室中进行反应，其中所述颗粒与样品材料的制剂反应或相互作用，而没有任何实质的液流通过所述膜；(d) 在所述膜与位于所述膜的不面向内室的外侧处的吸收垫接触之后，通过使流穿过所述膜，经由所述多孔膜或筛状膜移除所述反应液体和任选溶解的副产物；(e) 任选地添加液体至所述室；以及(f) 检测或收集已经与所述颗粒反应的样品材料。

[0012] 该方法利用了根据本发明的第一方面的流体处理装置。有利地，本发明的方法可用于处理基于颗粒的酶联免疫吸附测定(ELISA)中的液体交换。通过有效“筛分”移除液体的本发明方法允许在ELISA过程中移除废液，导致低背景。该方法可用于多种具有液体移除步骤的测定，并不限于定量测定，也可用于制备性测定。因此，一个实施方案涉及方法，其中颗粒与样品材料相互作用以形成通过粘附或化学结合而被颗粒标记的样品材料。有利地，这些标记的材料可以容易地从反应溶液中分离并且在进一步使用之前洗涤。

[0013] 根据本发明的第四方面，提供了一种制备性测定或定量测定方法，该方法包括以下步骤：(a) 提供室，所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口；并且所述室具有用于从被多孔膜或筛状膜覆盖的所述室移除液体的至少一个其他开口；(b) 将颗粒形式的样品材料或固定在液体制剂中的颗粒上的样品材料和任选的试剂或填料填

充到所述室中；(c) 在所述膜与位于所述膜的不面向内室的外侧处的吸收垫接触之后，通过使流穿过所述膜，经由所述多孔膜或筛状膜移除所述液体和任选溶解的物质；(d) 任选地添加液体至所述室；以及(e) 检测或收集颗粒形式的所述样品材料或固定在颗粒上的所述样品材料。根据本发明的该方法，可以以简单的方式分离和/或洗涤已经呈颗粒形式的样品材料或被加标签至颗粒的样品材料。因此，该方法甚至允许分析诸如细胞等的“天然颗粒”。有利地，液体移除或交换非常简单。

[0014] 定义

[0015] 本文所用的以下词语和术语应具有所指示的含义：

[0016] 本领域技术人员将理解，除了具体描述的那些之外，本文所述的发明易于进行变化和修改。应当理解，本发明包括所有这些变化和修改。本发明还包括在本说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物，以及任何和所有组合或任何两个或多个所述步骤或特征。

[0017] 如本文所用，术语“测定”是指实验室医学、药理学、环境生物学和分子生物学中的研究(分析)程序，用于定性评估或定量测量目标实体(分析物)的存在、量或功能活性。测定法在本说明书中以广义使用，包括制备性测定方法，其涉及从制剂中除去分析物以确定其用量或进一步使用。

[0018] 如本文所用，术语“生物测定”是指通过测量物质与标准制剂相比对生物体、组织、细胞、酶或受体制剂的影响，来确定物质(例如，维生素、激素、植物生长因子、抗生素、酶)的浓度、纯度和/或生物活性的方法。

[0019] 如本文所用，术语“ELISA”是指分析生物化学测定，其使用固相酶免疫测定(EIA)来检测液体样品或湿样品中物质的存在。

[0020] 如本文所用，在制剂组分浓度的上下文中，术语“约”通常是指所述值的 $\pm 5\%$ ，更通常为所述值的 $\pm 4\%$ ，更通常为所述值的 $\pm 3\%$ ，更通常为所述值的 $\pm 2\%$ ，甚至更通常为所述值的 $\pm 1\%$ ，甚至更通常为 $\pm 0.5\%$ 。

[0021] 除非另外指明，否则术语“包括”(“comprising”、“comprise”)及其语法变体旨在表示“开放式”或“包括性”语言，使得它们包括所列举的要素，但也允许包括另外的、未列举的要素。

[0022] “基本上(“substantially”)”一词并不排除“完全(“completely”)”，例如“基本上不泄漏”的组合物可以完全紧密而没有任何泄漏。必要时，可以从本发明的定义中省略“基本上”一词。

[0023] 贯穿本公开，某些实施方案可以范围格式公开。应当理解，范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁，而不应被解释为对所公开范围的保护范围的非灵活限制。因此，应当认为范围的描述已经具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如，对诸如1至6的范围的描述应当被认为已经具体公开了诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等的子范围，以及在该范围内的单个数字，例如1、2、3、4、5、6。无论范围的广度如何，这都适用。

[0024] 某些实施方案也可以在本文中广泛地和一般性地描述。落入一般公开内容中的每个较窄种类和亚属分组也构成本公开的一部分。这包括具有附带条件或否定限制的实施方案的一般性描述，该附带条件或否定限制从该属中去除任何主题，而不管所去除的材料是否在本文中具体列举。

具体实施方式

[0025] 将通过参考具体实例进一步更详细地描述本发明的非限制性实施方案,这些具体实例不应被解释为以任何方式限制本发明的范围。

[0026] 根据第一方面,提供了在基于颗粒的分析系统中用于液体移除的装置,包括(a)室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口,并且所述室具有用于从所述室移除液体的至少一个其他开口;(b)多孔膜或筛状膜,所述多孔膜或筛状膜附着至所述室,覆盖用于移除液体的至少一个开口,以防止液体在不与吸收垫接触时流出所述室;其中所述膜具有孔或洞,该孔或洞的直径小于测定中所用颗粒的粒径;以及(c)液体吸收垫,所述液体吸收垫可被附着至该膜的不面向内室的外侧并且从所述外侧分离。

[0027] 图1c示出了该设备的一个可能的实施方案。室(1)具有用于从顶部添加颗粒、液体和任选的试剂的开口。室底部具有用于从室移除液体的另一个开口,该室被多孔膜(3)覆盖。该膜防止液体在不与吸收垫接触时流出室。该膜具有微米直径的孔,该孔小于室中使用的颗粒。整个流体处理单元(2)可以具有以便于处理的支撑柱(4),以防止膜与其他表面的接触。流体处理单元与可拆卸的吸收垫结合。如果液体吸收垫附着到膜的外侧,则可以从室(1)移除流体。

[0028] 室可以是圆柱形的,如图1c中的实例所示,但决不限于这种几何形状。室容积和尺寸不是关键特征,并且可以广泛变化。可提及约200 μ L至400 μ L的室容积,其适用于各种测定。可提及的特殊室容积约为300 μ L,但也可提及100 μ L和500 μ L。可以设计约50 μ L至1ml或10ml的室容积。室的直径可以为0.1cm至2cm,优选为0.5cm至1.5cm,但也可以使用直径为5cm的较大直径。

[0029] 液体通过膜的流可以是被动的(即,重力或毛细管流)或被主动支撑的(部分地由流泵、手动压力或真空的作用产生的流)。优选地,流是被动的并且在吸收垫与膜接触时由毛细力驱动。驱动力可以是吸收垫。吸收垫可具有各种几何形状。可特别提及片状。吸收垫可以由具有足够吸水能力的任何材料制成。举例来说,该材料可以包括纤维素纤维,诸如包含棉、苧麻、黄麻、大麻、亚麻和甘蔗渣在内的天然纤维素纤维,以及人造丝和醋酸纤维素等合成纤维素纤维,但不限于此。在本发明的一个优选实施方案中,吸收垫材料由亲水材料制成,例如亲水材料包括Ahlstrom材料目录号270和320,以及Schleicher&Schuell目录号300和900等。

[0030] 根据一个实施方案,可以通过垂直流从室移除液体,并且用于添加试剂的至少一个开口位于室的顶部或上部,且用于从室移除液体的至少一个其他开口位于室的底部或下部。优选地,用于添加试剂的至少一个开口位于室的顶部,且用于从室移除液体的至少一个其他开口位于室的底部。然后通过重力和毛细力的组合移除液体。移除液体之后可以加入另一种液体用于进一步反应、储存或洗涤。在这方面,本发明的装置可用于测定中的液体交换。

[0031] 根据一个实施方案,膜在与液体吸收垫接触时变得可渗透液体。在与垫接触之前,尽管膜是多孔的或具有孔,但膜可能由于表面张力而将液体容纳在流体室中。渗透性的差异和产生的流可以通过来自垫的毛细力来实现。膜可以是非吸附多孔(NSP)膜。作为非吸附材料,当吸收垫不与膜接触时,膜可能基本上不吸收或吸附来自室的大量液体。一旦与吸收垫接触,NSP膜允许液体基本上流通过它、优选完全流通过它,同时将颗粒保留在膜表面上

用于固相反应或颗粒收集。本发明的过筛机制能够从固相(颗粒)中完全移除液体,这显著减少了遗留污染。

[0032] 根据一个实施方案,该室是用于在液体中进行化学或生化反应的反应室。因此,它可以用作相应(生物)测定的一部分。通过使用本发明的装置,在进行反应后可以将可能污染颗粒的废物与溶剂一起除去。优选地,在吸收垫未附着到膜上并且液体保持在室中的同时发生反应。在适当的可确定的反应和滞留时间之后,可使吸收垫与膜接触。根据本发明的一个实施方案,该膜防止液体从室流出,其中滞留时间(定义为液体容纳在室中而基本上没有通过膜泄漏的持续时间)大于5分钟,优选地大于10、15、30、45或60分钟。滞留时间由所用液体限定。在一个实施方案中,使用具有高表面张力的液体,其特征在于表面活性成分(例如吐温)的最大浓度为5% (v/v),优选不超过3.5%、2%、1%、0.5%或0.1%。

[0033] 当膜与吸收垫接触时,由吸收垫提供的毛细力通过孔或洞将液体从室中拉出。膜的孔或洞小于测定中所用颗粒的直径。结果,在通过孔移除废液的过程中,颗粒将被筛出来并保留在膜上,因此称为“过筛(sieve-through)”。膜优选是微孔膜。典型的孔或洞的尺寸为0.05 μm 至50 μm ,优选0.5 μm 至25 μm ,更优选1 μm 至15 μm ,最优选3 μm 至8 μm 。可提及的其他孔和微孔尺寸是2 μm 、4 μm 、5 μm 、6 μm 、7 μm 、9 μm 、10 μm 、12 μm 、和17 μm 。

[0034] 所述膜可以由非吸收性聚合物制成,所述非吸收性聚合物使得所述膜是非吸收性的,并且当所述垫分离时不允许液体通过所述膜泄漏。可用作膜材料的聚合物包括但不限于聚碳酸酯、聚酰胺、变性聚丙烯腈共聚物(modacrylic copolymers)、苯乙烯-丙烯酸共聚物、聚砜、聚偏二氟乙烯、聚氟乙烯、聚氯醚、热塑性聚醚、缩醛聚合物、聚丙烯腈、聚甲基丙烯酸甲酯、聚甲基丙烯酸正丁酯、聚氨酯、聚酰亚胺、聚苯并咪唑、聚乙酸乙烯酯、芳香族聚醚和脂肪族聚醚、纤维素酯、环氧树脂、聚乙烯、聚丙烯、多孔橡胶、聚(环氧乙烷)、聚乙烯吡咯烷酮、聚(乙烯醇)、聚(苯乙烯磺酸钠)、聚乙烯苄基三甲基氯化铵、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚(异丁基乙烯基醚)、聚异戊二烯、聚烯烃、乙烯乙酸乙烯酯共聚物、聚酰胺和聚氨酯。优选含微孔或微洞的聚碳酸酯材料。

[0035] 液体优选是水性介质,除了水之外,其还可以包含其他液体,例如醇,任选地与测定中使用的缓冲液一起,例如各种混合物中的PBA(含有牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲盐水)或PBS(磷酸盐缓冲盐水)。可以通过与其他溶剂和缓冲液混合来调节液体,以保证在室中反应所需的显著滞留时间。

[0036] 还可以调节该装置以在室中的反应所需的不同温度使用;然而,大多数情况下可以选择室温(20 $^{\circ}\text{C}$ 至27 $^{\circ}\text{C}$)。

[0037] 根据各种可能的实施方案,基于颗粒的测定可以是制备性生物测定或定量生物测定。它可以用于需要从液体中分离固相(颗粒)的所有测定,例如具有污染物的反应溶剂的分离。可以分离颗粒用于收集颗粒或用于在室中进行的进一步洗涤和/或反应步骤。在这方面,可以根据需要进行一次或多次从室移除液体,以运行具有所需程序要求的测定。

[0038] 取决于测定和程序,颗粒任选地被官能化并且选自二氧化硅颗粒、二氧化硅包被的磁性颗粒、聚合物颗粒、磁性或超顺磁性颗粒。典型的颗粒包括市售的磁珠,例如由Thermo Fisher Scientific(美国马萨诸塞州)以商标Dynabeads[®]销售的磁珠系列;或者包括二氧化硅包被的磁珠,例如包被有二氧化硅(SiO_2)层的 Fe_3O_4 磁珠。聚合物颗粒也可用作例如ELISA应用的固相。聚合物颗粒可选自聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯化合物、尼龙、硝化

纤维素、聚苯乙烯和马来酸酐活化的聚苯乙烯颗粒。可以特别提及聚苯乙烯颗粒。颗粒大于膜孔或洞,并且平均直径可以为 $0.1\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$,优选 $0.75\mu\text{m}$ 至 $30\mu\text{m}$,更优选 $1\mu\text{m}$ 至 $15\mu\text{m}$,最优选 $3\mu\text{m}$ 至 $8\mu\text{m}$ 。可以提及的其他尺寸是 $2\mu\text{m}$ 、 $4\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 、 $7\mu\text{m}$ 、 $9\mu\text{m}$ 、 $10\mu\text{m}$ 、 $12\mu\text{m}$ 和 $20\mu\text{m}$ 。

[0039] 根据一个具体实施方案,颗粒沉积在膜上或沉积在室内壁上。这样的颗粒可以进一步官能化以用于测定的生物反应,例如举例而言,具有缀合的抗体(例如基于颗粒的ELISA中的捕获抗体)的聚苯乙烯颗粒。具有沉积颗粒的装置可优选用于ELISA应用中。通过将样品与液体和其他任选的试剂或添加剂(例如缓冲液)一起填充到室中,而容易地开始反应。以这种方式该装置准备好进行特定测定类型并且易于操作。反应后通过多孔膜或筛状膜移除或交换液体。

[0040] 在室的第一开口中添加的其他材料可以包括试剂、样品制剂或测定所需的其他材料。

[0041] 可以按比例放大根据本发明的装置的使用,以获得更高的通量和多个样本的并行处理。从基本形式的单个装置中,可以将(反应)室放大到大量装置的阵列中。可以根据需要获得潜在的阵列配置,例如6、12、24、48、96、384或任何其他数量的孔。

[0042] 在这种和类似的阵列配置中,本发明的第二方面是这样的装置阵列,其中根据测定需要,所有或多个装置的膜可同时或以交错顺序与单个吸收垫或多组吸收垫接触。根据本发明的一个实施方案,可以设置装置阵列,其中所有或多个装置的膜可以同时与一个吸收垫接触,以基本上在一个单个程序步骤中实现从所有装置室中移除液体。

[0043] 对于高通量阵列,96孔板格式可能是优选的。室容积约 $200\mu\text{L}$ 至 $400\mu\text{L}$ 适用于各种测定。可提及的特殊室容积为 $300\mu\text{L}$,但也可提及 $100\mu\text{L}$ 和 $500\mu\text{L}$ 。现有实验室自动化支持(例如,运输系统、液体处理和机器视觉)可用于96孔格式。可以使用本发明的装置制造全自动高通量的过筛垂直流阵列。这可以包括自动化样品和试剂分配、自动板运输、自动吸收垫布置和交换/处置,以及自动洗脱过程。阵列中的洗脱过程可以通过使用正压、真空、毛细管压力、离心力等或上述的组合来实现。

[0044] 根据本发明的装置可以通过如实例中示例的已知制造技术来制造。室优选地由3D印刷惰性材料制成。该材料可选自ABS塑料、PLA、聚酰胺(尼龙)、玻璃填充聚酰胺、立体平版印刷材料(环氧树脂)、银、钛、钢、蜡、光聚合物和聚碳酸酯,但其选择并不是关键的。膜可以通过加热胶合、层压或熔合到室覆盖开口。根据本发明的阵列是本发明的另一个实施方案,其中所述阵列由孔板组成,其中所述膜通过粘合剂、双面胶带、PDMS或所述膜与所述板底部的热粘合附着到所述孔板的底部。膜也可以在注塑过程中附着(用于大规模生产)。阵列的膜优选是具有微米尺寸的洞的聚碳酸酯膜。

[0045] 根据本发明的第三方面,已经发现了制备性测定或定量测定方法,该方法包括以下步骤:(a)提供室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口;并且所述室具有用于从被多孔膜或筛状膜覆盖的所述室移除液体的至少一个其他开口;(b)将颗粒和至少一种液体与样品材料和任选的试剂和/或其他材料的制剂一起填充到所述室中;(c)在所述室中进行反应,其中所述颗粒与样品材料的制剂反应或相互作用,而没有任何实质的液流通过所述膜;(d)在所述膜与位于所述膜的不面向所述内室的外侧处的吸收垫接触之后,通过使流穿过所述膜,经由所述多孔膜或筛状膜移除所述反应液体和任选溶解的副产物;(e)任选地添加液体至所述室;以及(f)检测或收集已经与所述颗粒反应的样

品材料。优选的步骤顺序是a)、b)、c)、d)、任选地e)和f)。

[0046] 步骤a)的室可以是作为根据本发明第一方面的装置的一部分的室。因此,根据本发明第一方面详细描述装置可用于该方法中。颗粒、液体膜是如上所述使用根据本发明第一方面的本发明装置进行测定的那些。

[0047] 测定方法可以是已知的基于颗粒的测定方法,例如基于颗粒的ELISA方法。可以使用所有基于颗粒的ELISA形式。可以特别提及为“三明治夹心式”测定的ELISA测定形式。在这种类型的捕获测定或“三明治夹心式”测定中,待测分析物结合在两种一抗-捕获抗体和检测抗体之间。使用三明治夹心形式是因为它敏感且坚固,并且可以用于基于颗粒的ELISA中。试剂是用于制备性(生物)测定或定量(生物)测定的常用试剂。在“三明治夹心式”ELISA的情况下,它们可以是检测抗体。

[0048] 在步骤b)中,将基于颗粒的测定的颗粒与液体一起填充到装置的室中,所述液体可以是测定的主要反应介质。样品材料也填充在室中。样品可以用于基于颗粒的测定中常用的任何形式的制剂中,并且可以包括溶剂、液体、缓冲液、天然存在的物质、添加剂和填料。样品的制备可直接从活生物体获得或通过预先的反应或修饰获得。样品材料可以是生物材料,例如细胞、存在于活生物体中或在活生物体中产生的化学物质、生物分子、存在于活生物体中的分子、生物源物质或由活生物体产生的化学物质。在填充到室中之前,生物材料可以与试剂(例如ELISA中的检测抗体)反应。任选地,可以根据步骤b)中的测定需要将测定试剂和其他填充剂或添加剂一起或依次添加。

[0049] 在步骤c)中,在室中进行反应,其中颗粒与样品材料的制剂反应或相互作用,而没有任何实质的液流通过膜。颗粒与液体一起保留在室内。通过时间控制反应,优选运行反应以实现样品材料完全转化为测定所需的反应产物。该反应可以是抗体反应、共价或其他结合反应、酶促反应,但不限于这种反应类型。在另一个实施方案中,样品材料可以化学结合或粘附至颗粒。在基于颗粒的ELISA中,反应可以例如是样品与颗粒上的捕获抗体的结合。

[0050] 在一个实施方案中,颗粒与样品材料相互作用以形成通过粘附或化学结合被颗粒加标签的样品材料。该实施方案特别适用于给细胞加标签并防止它们通过膜孔渗漏。可以提及的典型颗粒包括聚苯乙烯、二氧化硅、琼脂糖或金属颗粒,包括磁性颗粒。颗粒大于多孔或筛状材料中的孔或洞。

[0051] 在步骤d)中,在所述膜与位于所述膜的不面向液体填充的内室的外侧处的吸收垫接触之后,通过使流穿过所述膜,经由所述多孔膜或筛状膜移除所述反应液体和任选溶解的副产物。所述流可由与上述针对本发明装置的相同的方式例如通过毛细力引起。吸收垫与上述用于本发明装置的吸收垫相同。优选地,将反应的液体和所有副产物以及干扰以下测定步骤的污染物在很大程度上移除,更优选将其完全地与液体一起移除。任选的步骤e)可以用于将另一种液体填充到室中,例如为了用于将在步骤f)中用于检测或收集的颗粒分散。在另一个实施方案中,在步骤d)之后,用洗涤液填充所述室,然后在进行步骤e)或f)之前,通过使所述膜与所述吸收垫进一步接触而通过所述膜除去该洗涤液。洗涤液可以是典型的洗涤液,例如任选的缓冲水溶液、有机溶剂或其混合物。这些洗涤步骤可以重复1至5次、优选2次。

[0052] 在步骤f)中,检测或收集在步骤c)中已经与颗粒反应的样品材料。在制备性测定中,样品材料在结合或粘附至颗粒之后被收集。在收集步骤中,例如通过使用酸或缓冲溶

液,样品材料可以从颗粒裂解或分离。在定量测定中,可以使用基于颗粒的测定的常用检测手段来检测在先前步骤之后获得的颗粒。在ELISA中,检测可以基于酶活性的测量。所有检测方法都是可能的,例如磁性测量、UV-VIS光谱法、荧光测量等。可检测材料也可以通过另一步骤g)获得,其中收集的样品材料与标记物质反应。这种标记物质的实例是与荧光染料、多种荧光染料、磁性或光学标记物等缀合的抗体。

[0053] 在根据本发明第三方面的方法的一个实施方案中,颗粒是用标记的捕获抗体官能化的聚合物颗粒,并且样品材料的制剂包含酶标记的检测抗体。这种方法可以是基于颗粒的“三明治夹心式”ELISA方法。

[0054] 在该方法的另一个实施方案中,样品制剂包含DNA并且颗粒是磁性颗粒。该方法可适用于在制备性测定中从样品制剂中收集DNA。

[0055] 在该方法的另一个实施方案中,样品制剂包含mRNA,颗粒是poly(T)缀合的磁性颗粒。该方法可适于在制备性测定中从样品制剂中收集mRNA。

[0056] 在本发明方法的另一个实施方案中,在步骤b)中,首先在将颗粒与液体一起填充到室中,在将样品材料与至少一种液体一起填充到室中之前,移除液体并将颗粒沉积在膜和/或室壁上。在移除液体后,典型干燥步骤可以实现颗粒沉积到膜和/或室壁上。干燥可以通过风干或加热来实现。根据又一个实施方案,颗粒也可以通过其他方式预沉积到室中,例如作为包含任选预修饰颗粒的粉末。预沉积的颗粒可保留在室中并储存超过7天或甚至12个月。在沉积颗粒之后可以密封室的开口以增加储存时间。

[0057] 步骤a)至f)可以在各种温度进行。可特别提及约20°C至27°C的环境温度。液体中的颗粒、试剂和样品材料的浓度取决于测定,并且本领域技术人员可以通过研究使用不同液体移除步骤的相应测定方法容易地确定。

[0058] 根据本发明的第四方面,已经发现了制备性测定或定量测定方法,该方法包括以下步骤:(a)提供室,所述室具有用于添加颗粒、液体和任选的其他材料的至少一个开口;并且所述室具有用于从被多孔膜或筛状膜覆盖的所述室移除液体的至少一个其他开口;(b)将颗粒形式的样品材料或固定在液体制剂中的颗粒上的样品材料和任选的试剂或填料填充到所述室中;(c)在所述膜与位于所述膜的不面向内室的外侧处的吸收垫接触之后,通过使流穿过所述膜,经由所述多孔膜或筛状膜移除所述液体和任选溶解的物质;(d)任选地添加液体至所述室;以及(e)检测或收集颗粒形式的所述样品材料或固定在颗粒上的所述样品材料。优选的步骤顺序是a)、b)、c)、d)、任选地e)和f)。

[0059] 本发明第四方面的步骤a)的室可以是为根据本发明第一方面的装置的一部分的室。因此,根据本发明第一方面详细描述装置可用于该方法中。颗粒、液体膜是如上所述使用本发明装置进行测定的那些。

[0060] 测定方法可以是已知的基于颗粒的测定制备方法,例如DNA或mRNA提取方法。

[0061] 在步骤b)中,将颗粒形式的样品材料或固定在液体制剂中的颗粒上的样品材料和任选的试剂或填料填充到室中。样品可以用于基于颗粒的测定中常用的任何形式的制剂中,并且可以包括溶剂、液体、缓冲液、天然存在的物质、添加剂和填料。样品的制备可直接从活生物体获得或通过预先反应或修饰获得。通过缀合或其他化学或物理结合与颗粒的结合可以是所选类型的修饰。样品材料可以是生物材料,例如细胞、存在于活生物体中或在活生物体中产生的化学物质(例如蛋白质)、生物分子、存在于活生物体中的分子、生物源物质

或由活生物体产生的化学物质。在填充到室中之前,生物材料可以与试剂(例如,与磁性颗粒)反应。任选地,可以根据步骤b)中的测定需要将测定试剂和其他填充剂或添加剂一起或依次添加。

[0062] 根据一个实施方案,样品材料可以用颗粒加标签的细胞。

[0063] 在步骤c)中,在所述膜与位于所述膜的不面向液体填充的内室的外侧处的吸收垫接触之后,通过使流穿过所述膜,经由所述多孔膜或筛状膜移除所述反应液体和任选溶解的副产物。所述流可由与上述针对本发明装置的相同的方式例如通过毛细力引起。吸收垫与上述用于本发明装置的吸收垫相同。优选地,将液体以及来自制备样品制剂并干扰以下测定步骤的污染物在很大程度上移除,更优选将其完全地与液体一起移除。任选的步骤d)可以用于将另一种液体填充到室中,例如为了用于将在步骤e)中用于检测或收集的颗粒分散。在另一个实施方案中,在步骤c)之后,用洗涤液填充所述室,然后在进行步骤d)或e)之前,通过使所述膜与所述吸收垫进一步接触而通过所述膜移除该洗涤液。另外的液体可以是典型的洗涤液,例如任选的缓冲水溶液、有机溶剂或其混合物。这些洗涤步骤可以重复1至5次,优选2次。

[0064] 在步骤e)中,检测或收集颗粒形式的样品材料或固定在颗粒上的样品材料。在制备性测定中,从颗粒收集样品材料。在收集步骤中,例如通过使用酸或缓冲溶液,样品材料可以从颗粒裂解或分离。在定量测定中,可以使用基于颗粒的测定的常用检测手段来检测在先前步骤之后获得的颗粒。所有检测方法都是可能的,例如磁性测量、UV-VIS光谱法、荧光测量等。可检测材料也可以通过另一步骤g)获得,其中收集的样品材料与标记物质反应。这种标记物质的实例是与荧光染料、多种荧光染料、磁性或光学标记物等缀合的抗体。

[0065] 在根据第四方面的方法的一个实施方案中,吸附或固定在颗粒上的样品材料包含DNA或RNA,并且颗粒选自二氧化硅珠或二氧化硅包被的磁珠。该方法可适用于在制备性测定中从样品制剂中提取/收集DNA。

[0066] 在该方法的另一个实施方案中,样品制剂包含mRNA并且颗粒选自oligo(dT)磁珠。

[0067] 根据本发明第四方面的方法的步骤a)至f)可以在各种温度进行。可特别提及约20℃至27℃的环境温度。液体中的颗粒、试剂和样品材料的浓度取决于测定,并且本领域技术人员可以通过研究使用不同液体移除步骤的相应测定方法容易地确定。

[0068] 实施例

[0069] 过筛平台以及在平台上进行的制备性测定和分析测定的特征在于以下实施例,这些实施例决不将本发明限制在实施例的范围内。显示基于颗粒的固相DNA提取减少了所分离的DNA的污染。举例说明了在过筛平台上的基于颗粒的酶联免疫吸附测定(ELISA)。在ELISA过程中,过筛平台有效地移除了废液,故而降低了背景。此外,显示了本发明的过筛平台使用免疫测定法分析诸如细胞等“天然颗粒”的能力。此外,允许多个平行反应的筛阵列是本发明装置使用的另一个实施例,其证明了用于高通量应用的过筛平台的巨大潜力。

[0070] 实施例1:装置

[0071] 装置原型

[0072] 过筛平台由反应单元和吸收垫组成(图1)。反应单元使用SOLIDWORKS(法国Villacoublay Cedex,DassaultSystèmes)设计,并使用Stratasys 3D打印机(以色列雷霍沃特,Stratasys)进行原型设计(图1a和1b)。反应单元包括反应室和两个支撑柱组成。将一

块具有微米级孔的聚碳酸酯膜胶合以形成反应室的底部(图1c)。各种孔径的多种多孔膜可商购获得(美国密苏里州, Sigma-Aldrich, Nucleopores[®])。两个支撑柱将膜保持悬浮,使得膜不与任何表面接触。使用CO₂激光切割机(美国科罗拉多州, Epilog Laser)将吸收垫(芬兰赫尔辛基, Ahlstrom Filtration)切割成所需尺寸。吸收垫与反应室保持分开,并且仅在液体交换步骤期间与膜接触。对于过筛平台上的ELISA,将具有表面缀合的抗体的颗粒预先储存在反应室的多孔膜上并用铝箔密封(图1b)。图1d和1e示出了具有3- μm 孔的膜上的5- μm (图1d)和10- μm (图1e)直径的聚苯乙烯颗粒。

[0073] 装置表征

[0074] 为了测量通过膜的流速,将200 μL 液体加入反应室。然后将反应单元置于吸收垫上。记录所有液体流通过膜所花费的时间。计算流速并以体积通量表示,单位为 $\mu\text{L}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$ 。

[0075] 为了测量滞留时间,将200 μL 液体加入反应室。将反应单元放置在远离吸收垫的水平表面上。记录液体从反应室通过膜泄漏出所花费的时间。如果在1小时后没有观察到泄漏,则停止测量。

[0076] 过筛装置的最关键部件是多孔膜。膜必须在反应室中容纳液体足够长的持续时间,并且当它与吸收垫接触时,它还应该允许液体流通过它。

[0077] 孔径大小对流速有显著影响。对于所测试的所有三种缓冲液,包括水、含5% (w/v) BSA的1xPBS和70% (v/v) 乙醇,流速随着孔尺寸的增加而增加(图2a)。液体的性质也会影响流速。随着溶液中甘油浓度的增加,溶液变得越来越粘稠。结果,流速随着甘油浓度的增加而降低(图2b)。此外,溶剂的极性也会影响流速。由于膜是亲水的,极性溶剂将更容易流通过膜。当水中乙醇浓度增加时,溶剂的极性降低,导致流速降低(图2c)。令人惊奇的是,液体的表面张力不影响流速。在吐温20的浓度变化超过5个数量级时,没有观察到流速的显著变化(图2d)。然而,液体的表面张力极大地改变了滞留时间,滞留时间定义为液体被包含在反应室中而不通过膜泄漏的持续时间。超过滞留时间,液体将在没有吸收垫帮助的情况下通过膜泄漏。如图2e所示,随着液体表面张力的降低(即增加吐温20浓度),滞留时间也减少。对于在具有8- μm 孔的膜上的10% (v/v) 吐温20,液体将在约25秒内通过膜泄漏。对于具有3- μm 孔的膜上的0.1%吐温20,在1小时内未观察到泄漏。在常用缓冲液中,吐温20的通常浓度小于0.1%。因此,膜能够将缓冲液保持在反应室中足够的反应时间。

[0078] 实施例2:使用装置分离高纯度DNA

[0079] DNA提取

[0080] 使用Qiagen Biosprint 15血液试剂盒(Qiagen, Venlo, Netherlands)提取人基因组DNA (gDNA)。所有试剂均根据制造商的说明制备。首先将20 μL 水中的400ng人gDNA(美国威斯康星州Promega)与20 μL 缓冲液AL、20 μL 异丙醇和2 μL 磁性颗粒混合。将混合物在反应单元中与具有3- μm 孔的膜在室温孵育10分钟。孵育后,通过将反应单元放在吸收垫上移除液体。废液将流通过多孔膜并被吸收垫吸收。通过将洗涤缓冲液添加到反应室并随后使用吸收垫使废洗涤缓冲液穿过膜被移除来完成洗涤过程。用50 μL 缓冲液AW1洗涤颗粒一次,用50 μL 缓冲液AW2洗涤两次。最后,加入20 μL 水以从颗粒表面洗脱DNA。

[0081] 为了比较,还使用相同的方案在微量离心管中分离DNA。为了在微量离心管中交换液体,将管置于磁力架(美国马萨诸塞州, Thermo Fisher Scientific)上。通过磁力将颗粒拉到管的侧壁,并小心地将移液管插入管中以尽可能多地除去废液。最后, DNA也在20 μL 水

中洗脱。

[0082] 为了从全细胞中提取DNA,将含有不同量细胞的20 μ L样品与20 μ L缓冲液AL、20 μ L异丙醇、2 μ L蛋白酶K和2 μ L磁性颗粒混合。移除废液后,用50 μ L缓冲液AW1洗涤颗粒一次,用50 μ L缓冲液AW2洗涤两次。分离的DNA在20 μ L 5mM Tris缓冲液中洗脱。通过用注射器加压反应室收集洗脱液,这迫使溶液通过膜进入容器。

[0083] 为了评估分离的DNA的纯度,使用Nanodrop ND-1000UV-Vis光谱仪(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)测量260/280和260/230吸光度比。使用PicoGreen测定法(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)测量分离的DNA的浓度。为此,首先将洗脱的DNA在1 \times Tris EDTA(TE)缓冲液(pH=8)中稀释50倍,并将原料PicoGreen试剂在相同缓冲液中稀释200倍。接下来,将稀释的DNA和PicoGreen试剂以1:1的体积比混合,并在黑暗中孵育10分钟。通过使用Nanodrop ND-3300荧光分光光度计(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)测量荧光强度来确定DNA浓度。

[0084] 在过筛平台上分离高纯度DNA

[0085] 已经发现,使用二氧化硅颗粒分离的DNA被结合缓冲液中的化学物质严重污染,260/280和260/230的比率较差就是证明(Sambrook, J.; Russell, D.W.的《分子克隆实验指南》;冷泉港实验室出版社,2001年)。过筛平台装置能够通过结合和洗涤步骤期间有效地移除废液来获得高纯度DNA,从而减少残留污染。

[0086] 与在微量离心管中使用常规基于颗粒的方法分离的DNA相比,过筛平台上分离的DNA的纯度显著更高(表1)。对于被认为是纯的DNA,理想的260/280比率为1.8,理想的260/230比率为2.0至2.2。作为对照的输入DNA的260/280比率约为1.96,并且260/230比率约为1.77,这表明质量相当好。在过筛平台上分离的DNA的260/280比率约为1.80,260/230比率的约为1.67,其接近于对照的那些值。相比之下,在微量离心管中使用常规方法分离的DNA具有非常高的260/280比(约为2.46)和非常低的260/230比(约0.32)。两种比例均显著偏离最佳范围,表明分离的DNA纯度差。由于污染会影响260nm处的吸光度并导致DNA浓度的高估,因此使用PicoGreen测定法最佳地估计DNA浓度。过筛平台上的DNA回收率约为75%,使用常规方法获得的DNA回收率约为69%。过筛平台和常规方法都使用相同的试剂通过基于颗粒的固相萃取来分离DNA。然而,可以在过筛平台上获得纯度高得多的DNA。高纯度直接源于过筛平台在固相萃取过程中有效移除废液并实现有效的液体交换的能力。现认为,过筛装置可以显著改善许多现有的基于颗粒的制备性测定的性能。

[0087] [表1]显示了在过筛平台和微离心管中分离的DNA的纯度和回收率。

[0088] [表1]

[0089]

吸光度	260/280	260/230	回收率(%)
对照	1.96 \pm 0.05	1.77 \pm 0.09	-
过筛	1.80 \pm 0.10	1.67 \pm 0.07	75.5 \pm 8.5
常规	2.46 \pm 0.23	0.32 \pm 0.12	69.0 \pm 10.4

[0090] 还在微离心管中使用过筛平台和常规程序进行基于二氧化硅颗粒从DLD-1细胞系分离DNA。

[0091] 使用20至20000个细胞的10倍系列稀释。与前述情况相同,在过筛平台上分离的

DNA与在微量离心管中分离的DNA相比具有更高的纯度(图3a和表2)。微量离心管中分离的DNA被严重污染并显示异常的吸收光谱,这导致260/230比率小。污染物包括离液剂和有机溶剂,它们会抑制PCR扩增效率。然后用实时定量PCR分析分离的DNA。使用靶向GAPDH基因的一组引物和Taqman探针扩增DNA(关于引物、探针和合成靶序列,请参见支持信息表S2)。不管输入细胞数量如何,使用过筛平台分离的DNA样品显示出较低的循环阈值(Ct)数(图3b)。平均来说,在过筛平台上分离的DNA的Ct值约小于2个循环,表明更高的DNA纯度和/或更高的DNA产率。

[0092] [表2]显示了在过筛平台上和微量离心管中从HCT-116细胞(n=220,000)分离的DNA的260/280和260/230吸光度比值。

[0093] [表2]

[0094]

	260/280	260/230	
过筛	2.15±0.02	2.08±0.09	过筛
常规	2.52±0.44	0.72±0.32	常规

[0095] 还使用poly(T)缀合颗粒在过筛平台上进行mRNA分离。

[0096] DLD-1细胞培养

[0097] DLD-1细胞(ATCC[®] CCL-221[™])购自ATCC(美国弗吉尼亚州)。将DLD-1细胞以5000细胞/cm²的密度接种到T-75烧瓶中,并在含有10%胎牛血清(FBS)(ATCC 30-2001)和1%青霉素-链霉素的完全RPMI-1640培养基中扩增。每2天进行培养基更换直到细胞达到融合。一旦DLD-1细胞达到约90%融合,则使用0.25%(w/v)胰蛋白酶-0.53mM EDTA溶液的浓度收获它们。然后通过125g离心5分钟使细胞沉淀。除去上清液,并将细胞沉淀在1×DPBS中漂洗并再次离心。除去上清液,并将细胞沉淀在来自Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™]试剂盒(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)的裂解缓冲液中裂解用于提取mRNA。

[0098] 实施例3:分离mRNA

[0099] 使用poly(T)缀合的磁性颗粒(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific, Dynabeads[®] mRNA DIRECT[™]试剂盒)分离mRNA。将细胞沉淀与50μL裂解缓冲液和10μL oligo(dT)25官能化的磁性颗粒一起孵育。孵育后,具有poly(A)尾的mRNA与poly(T)缀合的磁性颗粒杂交。使用吸收垫使废液穿过膜被移除。接着,用50μL洗涤缓冲液A洗涤颗粒四次,用50μL洗涤缓冲液B洗涤一次,通过向反应室中加入缓冲液并用吸收垫使缓冲液穿过膜被移除。分离的mRNA在70℃在10μL洗脱缓冲液中洗脱。通过用注射器加压室收集洗脱液,这迫使溶液通过膜进入容器。

[0100] 为了比较,我们还根据制造商建议的方案在微量离心管中进行mRNA分离。通过将微量离心管放置在磁性支架上来进行液体交换,所述磁性支架固定颗粒以允许移除废液。在这种情况下,用600μL洗涤缓冲液A和300μL洗涤缓冲液B洗涤颗粒两次。所有其他条件相同。

[0101] 如定量逆转录酶PCR所示,可以实现高mRNA分离效率(图4a)。过筛平台的性能仅比微量离心管中的常规方法稍好(图4b)。由于用于mRNA分离的缓冲液不含高浓度的离液剂或有机溶剂,因此遗留污染不会抑制PCR。

[0102] 实施例4:使用过筛装置的ELISA

[0103] 方法:基于颗粒的ELISA

[0104] 除非另有说明,所有试剂均购自Sigma-Aldrich。使用检测 α -胎蛋白 (AFP) 的模型ELISA测定法来展示过筛平台装置上的ELISA。使用Lightning-Link[®]生物素试剂盒(英国剑桥巴布拉汉研究所,Innova Biosciences),用生物素标记捕获抗体(美国宾夕法尼亚州,Arista Biologicals),以及使用Lightning-Link[®]HRP试剂盒(英国剑桥巴布拉汉研究所,Innova Biosciences),用辣根过氧化物酶(HRP)标记检测抗体(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)。通过用1200g离心力将颗粒沉淀10分钟并将沉淀重悬于100mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中,从而对直径为5- μ m和10- μ m的链霉抗生物素蛋白缀合的聚苯乙烯颗粒(美国印第安纳州,Bang's Laboratories)进行一次洗涤。用100mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)将所需量的生物素化捕获抗体稀释至200 μ L,并与200 μ L的1% (w/v) 经洗涤的聚苯乙烯颗粒混合。然后将混合物在旋转器上孵育1小时。之后,将颗粒洗涤一次并重悬于400 μ L的100mM磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中,最终浓度为0.5% (w/v)。对于每个反应,将5 μ L抗体偶联的聚苯乙烯颗粒与50 μ L补充有5% (w/v) 牛血清白蛋白(BSA)(美国康涅狄格州,GE Healthcare)的1 \times 磷酸盐缓冲盐水(PBS)(新加坡,First Base Technology)混合。将混合物加入到具有3- μ m孔的膜的反应室中。对于全血样品,使用具有5- μ m孔的膜。通过使用吸收垫移除液体,使与捕获抗体缀合的颗粒在膜上干燥。之后,包含预干燥颗粒的反应室用铝箔密封(图1b)并在低湿度储存直至使用。

[0105] 为了测量AFP,首先将HRP标记的检测抗体在补充有5% (w/v) BSA的1 \times PBS中稀释至8 μ g/mL,并将5 μ L稀释的检测抗体与50 μ L样品混合。剥离铝箔,然后将样品混合物加入反应室并孵育10分钟。之后,使用吸收垫使废液穿过膜被移除。用由补充有0.05% (v/v) 吐温20的1 \times PBS组成的洗涤缓冲液洗涤聚苯乙烯颗粒两次。接下来,将50 μ L 1-Step[™] Ultra TMB-ELISA底物溶液(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)加入反应室并使其显色15分钟。最后,加入50 μ L的0.16M硫酸以终止反应。通过使用Nanodrop ND-1000UV-Vis光谱仪测量显色TMB的吸光度来测定AFP浓度。

[0106] 为了比较,基于颗粒的ELISA也在微量离心管中进行。所有试剂与用于过筛平台上的试剂相同。5 μ L的0.5% (w/v) 捕获抗体缀合的聚苯乙烯颗粒与40 μ g的HRP-标记的检测抗体和50 μ L样品在补充有5% (w/v) BSA的1 \times PBS中混合。为了交换缓冲液,通过在1200g离心力离心10分钟使颗粒沉淀。然后除去上清液,加入洗涤缓冲液。最后,用50 μ L TMB将反应物显色10分钟,并用0.16M硫酸终止反应。

[0107] 过筛平台上的ELISA

[0108] 过筛平台能够防止残留液体带来的遗留污染。这将允许对于ELISA应用实现低背景。

[0109] 与在微量离心管中进行的基于颗粒的ELISA相比,在过筛平台上背景明显较低(图5a)。此外,可能是由于液体交换过程中颗粒的损失,微量离心管中来自阳性样品的信号较低。在使用基于颗粒的ELISA的过筛平台上成功定量AFP的2倍连续稀释液(图5b)。AFP是肝癌诊断中常用的重要肿瘤标志物。用具有R平方值>0.99的4参数逻辑函数适当地拟合标准曲线(图5b插图)。用于该实验的颗粒直径为5 μ m,膜的孔径为3 μ m。

[0110] 还检测了颗粒大小对ELISA的影响。使用直径为5 μ m和10 μ m的颗粒来分析相同的系

列稀释度。两种颗粒的结果彼此相当一致,表明颗粒大小对ELISA没有强烈影响(图5b)。然而,颗粒上捕获抗体的量将影响ELISA的结果。每mg颗粒2 μ g捕获抗体,测定的动态范围将覆盖整个系列稀释度。如果捕获抗体的加载量减少至每mg颗粒0.8 μ g,则对含有高浓度AFP的样品,信号显著降低(图5c)。事实上,由于“钩状效应(Hook's效应)”,信号将随着AFP浓度的增加而降低。

[0111] 该筛选平台能够直接用全血样品进行ELISA。将AFP掺标入全血,所述全血是通过将填充的红细胞和培养的白细胞系(Jurkat细胞)与血清混合重建的。重建的血液每1 μ L血液含有800个白细胞,血细胞比容为45%。使用10 μ m大小的颗粒和具有5- μ m孔的膜。红细胞能够通过这种膜。尽管白细胞可能保留在膜上,但是它们是无色的并且不干扰信号。从全血样品获得的结果与来自缓冲液中的样品获得的结果很好地匹配,表明过筛平台能够直接从全血中检测靶标(图5d)。

[0112] 实施例5:使用过筛装置的ELISA

[0113] 方法:CD4+细胞计数

[0114] CD4+Jurkat细胞(美国内华达州,ATCC)在补充有10%FBS(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)的ATCC配制的RPMI-1640培养基中培养。将培养物保持在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境中。加入新鲜培养基以保持细胞密度低于1 \times 10⁶活细胞/mL。使用Lightning-Link[®] HRP试剂盒(英国剑桥巴布拉汉研究所,Innova Biosciences)用HRP标记抗CD4抗体(英国剑桥,Abcam)。将40ng标记的抗体与细胞在100 μ L补充有1% (w/v) BSA的1 \times PBS中混合,并在室温孵育10分钟。然后将细胞加入反应室。接着,使用吸收垫除去废液,仅在膜上留下细胞。对于缓冲液中的细胞,膜的孔径为3 μ m,对于全血样品,膜的孔径为5 μ m。随后,用50 μ L补充有0.05% (v/v) 吐温20的1 \times PBS洗涤多孔膜上的细胞两次。之后,加入50 μ L的1-Step[™] Ultra TMB-ELISA底物溶液并显色15分钟。最后,使用0.16M硫酸终止反应。通过测量显色的TMB底物的吸光度来测定细胞计数。

[0115] 也用标签颗粒进行细胞计数。在这种情况下,1 μ L的1% (w/v) 抗CD45 Dynabeads(美国马萨诸塞州,Thermo Fisher Scientific)加入样品中以捕获细胞。其余步骤保持不变。

[0116] 过筛平台装置上CD4+细胞计数

[0117] 通过使用多孔膜作为筛子,基于颗粒的尺寸从液体中分离颗粒来操作过筛平台。相同的策略适用于天然存在的颗粒如细胞。

[0118] 作为概念的证明,在过筛平台装置上进行CD4+细胞计数。CD4+ T细胞计数是免疫系统的重要标志物,常用于AIDS患者的预后判断。为了在过筛平台装置上进行CD4+细胞计数,首先用HRP标记的抗CD4抗体将细胞加标签。然后分离细胞并在过筛平台上洗涤。接着,通过测量TMB信号确定细胞数量。随着输入CD4+细胞量的增加,观察到吸光度相应增加(图6a)。针对具有高细胞计数的样品,信号稳定。

[0119] 测试了膜孔径的影响。使用具有不同孔径(1 μ m、3 μ m、5 μ m和8 μ m)的膜来定量CD4+细胞。对于所有四种类型的膜,信号随着细胞输入的增加而降低(图6b)。来自3- μ m和5- μ m膜的信号处于大致相同的水平。来自8- μ m膜的信号始终最低,因为孔径太大而不能将细胞保留在反应室中。来自1- μ m膜的信号也低于3- μ m和5- μ m膜的信号。这个结果有点违反直觉。会预期具有较小孔径的膜捕获更多细胞,因此导致更高的信号。小孔径可能诱导更高的剪切应力,其机械裂解细胞,导致细胞计数低。

[0120] 通过向细胞中引入标签颗粒,显著提高了过筛平台上的细胞计数。结果,可以以更宽动态范围和更好的线性量化细胞(图6c)。标签颗粒识别细胞表面上的CD45。它们不干扰靶CD4抗原。尽管它们大于孔,但是细胞是高度可变形的并且可能挤压通过孔。另一方面,标签颗粒是刚性的并且不能挤压通过孔。结果,标签颗粒与细胞的结合将使细胞更难以挤压通过膜(图6d)。值得注意的是,膜上的孔有时重叠形成大孔(图6e),并且细胞可以更容易地通过这些孔。标签颗粒增加了细胞的大小并阻止它们穿过这些重叠的孔。此外,标签颗粒捕获裂解的细胞膜。保留在过筛平台上的这些裂解的细胞膜将产生信号。

[0121] 标签颗粒用于在过筛平台装置上测量全血中CD₄₊细胞。然而,全血强烈干扰细胞计数。尽管观察到TMB吸光度与细胞计数之间呈正相关,但信号弱于1×PBSB缓冲液中CD₄₊细胞的信号(图6f)。我们推测,大量红细胞的存在将阻塞孔并诱导更高的剪切应力,从而裂解更多的CD₄₊细胞。此外,红细胞的存在可能会干扰抗体与CD₄₊细胞的结合。

[0122] 实施例5:高通量过筛垂直流平台

[0123] 原型

[0124] 过筛垂直流平台装置可以按比例放大,以实现更高的通量和多个样品的并行处理。从其基本形式的单个反应孔中,反应室可以按比例放大成大量孔的阵列。可以根据需要获得诸如6、12、24、48、96、384或任何其他数量孔的可能的阵列配置。在该阵列配置中,根据测定需要,可使用一片吸收垫或多组吸收垫来同时或以交错顺序从多个反应室中移除液体废物。

[0125] 对于下述原型装置,已选择96孔板格式用于高通量平台,因为其300μL的工作容积适用于各种测定。此外,还有许多现有的实验室自动化支持(例如运输系统、液体处理和机器视觉)可用于96孔形式。可以构建全自动的高通量过筛垂直流平台处理系统。这将包括自动化样品和试剂分配、自动化板运输、自动化吸收垫布置和交换/处置以及自动洗脱过程。洗脱过程可以通过使用正压、真空、毛细管压力、离心力等或上述的组合来实现。

[0126] 对于原型装置,使用无底96孔板,并且将多孔膜(例如具有3-μm孔的聚碳酸酯膜)附着到孔板的底部以形成孔底。几种可能的方法可用于将膜附着到孔板或装置的底部,例如通过粘合剂、双面胶带、聚二甲基硅氧烷(PDMS)或膜与板底部的热粘合。

[0127] 已经选择热粘合方法来制造原型装置。与聚苯乙烯96孔板(90℃)相比,聚碳酸酯膜具有较高的玻璃化转变温度T_g(147℃)。因此,通过将膜与96孔板一起放置在110℃至120℃温度范围的热板上,膜在热粘合过程中不会被损坏。所需的热粘合时间可根据所需密封速度而变化。通常,从板上施加轻微的压力10-20分钟就足够了。图7示出了高通量过筛垂直流平台的制造过程。

[0128] 许多应用适用于所制成的高通量过筛垂直流平台。特别地,应用之一是核酸提取。使用原型装置提取核酸的方案如下:

[0129] 1) 首先,使用细胞裂解缓冲液裂解500k细胞(例如来自HCT116结直肠癌细胞系)。

[0130] 2) 将细胞裂解物与微珠(用于总DNA、RNA提取的氧化硅珠或二氧化硅包被的磁珠;用于mRNA提取的poly(dT)缀合的磁珠)在室温孵育10分钟。该步骤导致核酸吸附到微珠上。

[0131] 3) 将含有吸附核酸的磁珠的细胞裂解物引入高通量过筛垂直流平台的反应孔中。

[0132] 4) 使吸收垫在反应孔下方与膜接触。通过吸收垫纤维施加的毛细力,吸收细胞裂解物废液并使其穿过多孔膜被移除。只移除废液,且比膜孔大的微珠将保留在反应室中。

[0133] 5) 将洗涤缓冲液引入反应孔中。

[0134] 6) 使吸收垫在反应孔下方与膜接触。从而,吸收废液并使其穿过多孔膜被移除。

[0135] 7) 洗涤步骤5至6可以重复多次(通常两次)。

[0136] 8) 少量洗脱溶液,例如,将50 μ L的10mM Tris-HCl、无核酸酶的水或其他合适的缓冲液加入到反应孔中,并使其孵育一段时间(例如10分钟)。通过洗脱溶液引入的降低的离子含量使核酸与微珠解离。

[0137] 9) 将含有核酸的洗脱液从反应孔中洗脱到收集器中用于下游处理。可能的洗脱方法包括加压空气吹扫、离心、真空抽空、纸基分析中的垫吸收、从上述膜抽吸等。

[0138] 利用高通量过筛垂直平台进行核酸提取已经通过500k HCT116细胞的mRNA提取进行了验证。所用试剂包括poly (dT) 缀合的磁珠、标准洗涤缓冲液和10mM Tris-HCl洗脱缓冲液(例如,在诸如DynaBeads mRNA提取试剂盒等典型的商业试剂盒中发现的试剂)。以4000rpm离心10分钟(Eppendorf 5810R)用于洗脱。在洗脱过程中,将高通量过筛垂直平台置于上方并固定到传统的96孔板上。将平台和常规96孔板固定在一起,使各自的孔对齐,从而有利于在离心过程中将洗脱液收集到常规96孔板中。

[0139] 高通量过筛垂直平台的mRNA提取性能与商业DynaBeads的mRNA提取性能进行比较(参见图8至11)。用分光光度法(NanoDrop ND2000)测定mRNA的质量和数量,发现用高通量过筛垂直平台提取的mRNA优于DynaBeads或与DynaBeads相当。

[0140] 图8显示与DynaBeads相比,使用高通量过筛垂直平台提取的mRNA在260nm处显著更高的吸光度。两种方法均获得了相当的260/280吸光度比。

[0141] 图9显示与DynaBeads相比,使用高通量过筛垂直平台提取的mRNA的浓度显著更高。

[0142] 图10显示与DynaBeads(通过移液管抽吸)相比,通过高通量过筛垂直平台(通过离心)回收的较低洗脱体积。洗脱液体积回收可使用离心方法或替代方法(例如使用加压空气吹扫、真空抽空和抽吸)进一步优化。

[0143] 图11显示与DynaBeads相比,使用高通量过筛垂直平台提取更大量的mRNA。如上所述,通过增加洗脱体积,可以进一步优化经由过筛提取的mRNA的绝对量。

[0144] 筛-阵列

[0145] 在不增加流体处理机构的复杂性的情况下,可以容易地放大过筛平台。如图12a所示,过筛反应单元以阵列排列,允许并行进行多个反应。使用覆盖所有反应单元的大块吸收垫同时进行筛阵列上的液体交换过程。当分析大量样品时,处理阵列比单个反应单元更方便。此外,筛阵列还减少了通过平行化进行液体交换所需的时间。

[0146] 如图12b所示,在筛阵列上同时测量AFP的系列稀释度。TMB信号随着AFP浓度的降低而降低。尽管仅证明了3 \times 4个阵列是可能的,但是通过减小反应单元的尺寸和它们之间的间距,更高密度的筛阵列是可能的。所述过筛平台可用于许多高通量应用中。

附图说明

[0147] 附图示出了公开的实施方案或反应方案,并用于解释所公开的实施方案的原理。然而,应当理解,附图仅仅是为了示例的目的而设计的,而不是作为本发明的限制。

[0148] 图1

[0149] 图1显示了本发明的过筛装置。(a)过筛原型的图片。(b)用铝箔密封的过筛反应单元。(c)过筛平台的不同组件的示意图。(d)具有3- μm 孔的膜上的5- μm 颗粒。(e)具有3- μm 孔的膜上的10- μm 颗粒。(d)和(e)是假彩色扫描电子显微镜(SEM)图像。

[0150] 图1c的示意图示出了该装置的特征:1-流体处理室;2-流体处理单元;3-多孔膜;4-可选支撑柱;5-吸收垫。

[0151] 图2

[0152] 图2示出了过筛装置的流动特性。(a)膜孔径[左列为水]、(b)液体粘度、(c)溶剂极性和(d)液体表面张力对过膜流速的影响;以及(e)液体表面张力对滞留时间的影响,以秒为单位。白色区域表示在3600秒内没有泄漏;按秒的灰度级在图中从上到下。

[0153] 图3

[0154] 图3显示使用过筛平台的mRNA分离。(a)与合成对照相比,使用过筛平台分离的mRNA的定量逆转录酶PCR分析。两条标准曲线匹配良好,表明了高的分离效率[左侧低线为筛槽线]。(b)使用过筛平台和常规微量离心管从DLD-1细胞分离的mRNA的定量逆转录酶PCR分析[较低线为筛槽线]。

[0155] 图4

[0156] 图4显示了使用过筛平台分离高纯度的DNA。(a)分离的DNA的归一化UV吸收光谱。使用常规方法在微量离心管中分离的DNA中观察到短波长的异常尾部,这导致异常的260/230比例[较高线为筛槽线]。(b)分离的DNA的实时PCR分析。对于使用过筛平台分离的DNA观察到较小的Ct值,表明高纯度和/或高产量[较低的线是筛槽线]。

[0157] 图5

[0158] 图5显示了过筛平台上的基于颗粒的ELISA。(a)在过筛平台上进行的和在微量离心管中进行的基于颗粒的ELISA之间的比较。过筛平台提供较低的背景。(b)在具有3- μm 孔的膜上用5- μm 和10- μm 颗粒测量的AFP的ELISA标准曲线。(c)颗粒抗体加载对ELISA结果的影响。(d)从全血中检测AFP。

[0159] 图6

[0160] 图6显示了过筛平台装置上的CD4⁺细胞计数。(a)在过筛平台上直接定量CD4⁺细胞。(b)孔径对过筛平台上细胞计数的影响。(c)标签颗粒对过筛平台上的细胞计数的影响。(d)在多孔膜上具有标签颗粒的CD4⁺细胞的假彩色SEM图像。(e)显示重叠孔的SEM图像。(f)来自全血和1 \times PBSB(1 \times PBS补充有1% (w/v) BSA)的CD4⁺细胞计数。

[0161] 图7

[0162] 图7显示了高通量过筛垂直平台的制造过程的照片。(a)膜和96孔板对齐。(b)用于膜和板的热粘合的加热,最初使用胶带(以绿色显示)确保对准。(c)热粘合后装置的底视图。

[0163] 图8

[0164] 图8显示了与DynaBeads (b)相比,对于使用高通量过筛垂直平台(a)提取的mRNA,在260nm处获得显著更高的吸光度。(c)两种方法的260/280吸光度比相当。

[0165] 图9

[0166] 图9显示了与DynaBeads相比,使用高通量过筛垂直平台提取的mRNA显著更高的浓度。(n=3)。

[0167] 图10

[0168] 图10显示了与DynaBeads (通过移液管抽吸) 相比,通过高通量过筛垂直流平台(通过离心)回收的洗脱物体积。(n=3)。

[0169] 图11

[0170] 图11显示了与DynaBeads相比,通过使用高通量过筛垂直流平台mRNA更高的绝对量被提取。(n=3)。

[0171] 图12

[0172] 图12显示了典型的筛阵列:(a) 筛阵列原型的照片;(b) 同时分析筛阵列上的多个样品,用于可能的高通量应用。

[0173] 工业实用性

[0174] 本发明的用于液体移除的装置可以在制备性生物测定和定量生物测定中具有各种应用,其中使用液体并且需要移除或更换液体。开发的微筛可用于样品制备、免疫测定、ELISA等。使用本发明构思的这些方法也是如上所述的本发明的一部分。

[0175] 如果使用本发明装置单元的阵列,则有效移除其中包括污染物的反应溶剂是简单的并且可以用于高通量应用。

[0176] 本发明的装置、阵列和方法可用于自动化ELISA、以及DNA和mRNA分离测定,其作为生物分析方法和研究工具的一部分是可商购的。

[0177] 显然,在阅读前述公开内容之后,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,本领域技术人员可以对本发明进行各种其他修改和改变,并且所有这些修改和改变都落入所附权利要求的范围内。

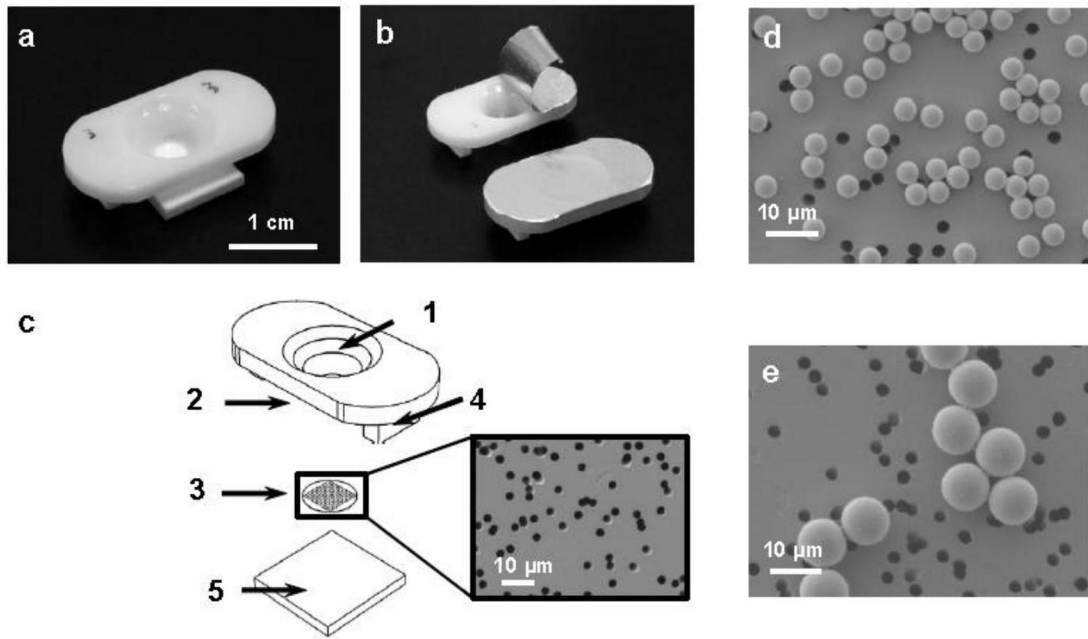


图1

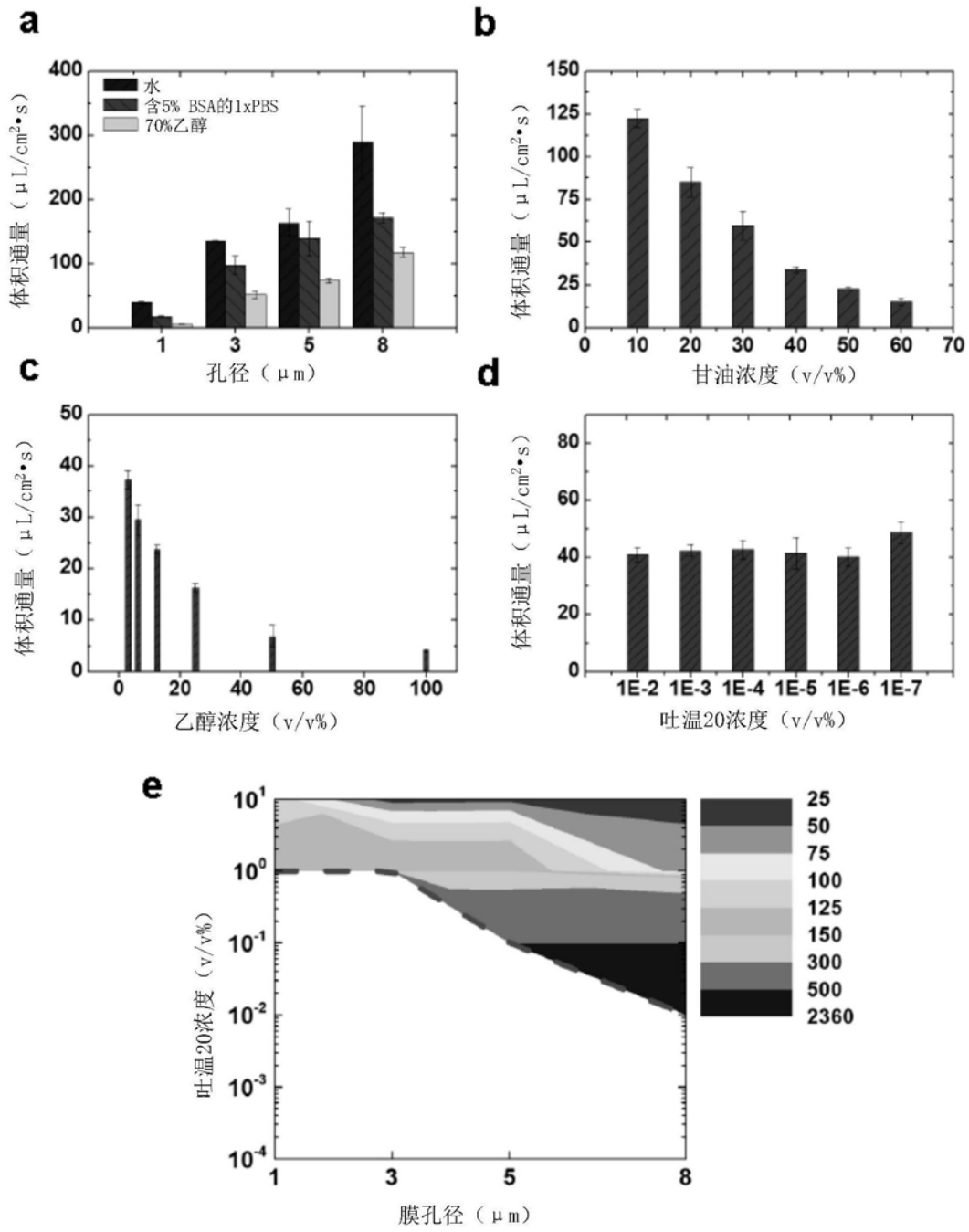


图2

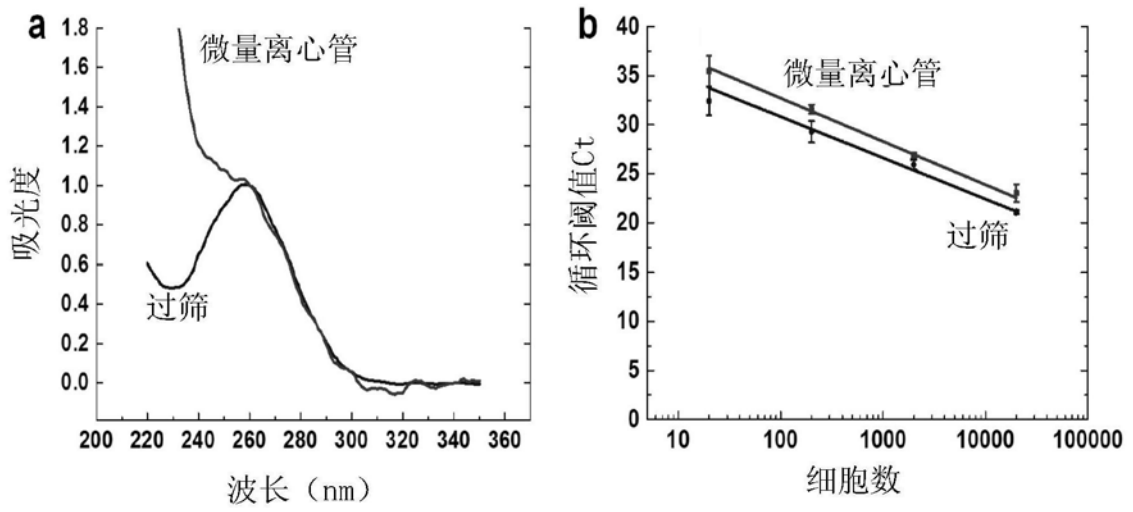
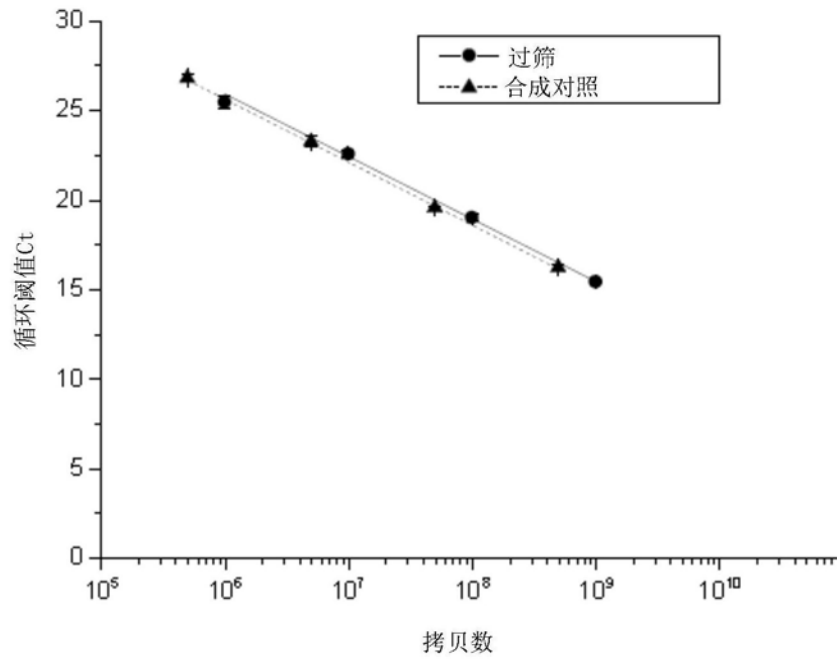
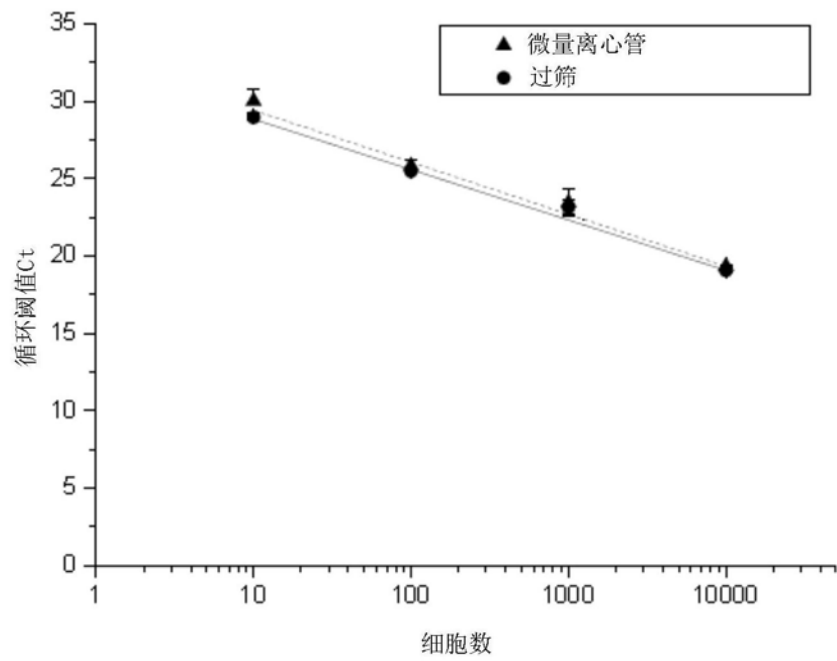


图3



(a)



(b)

图4

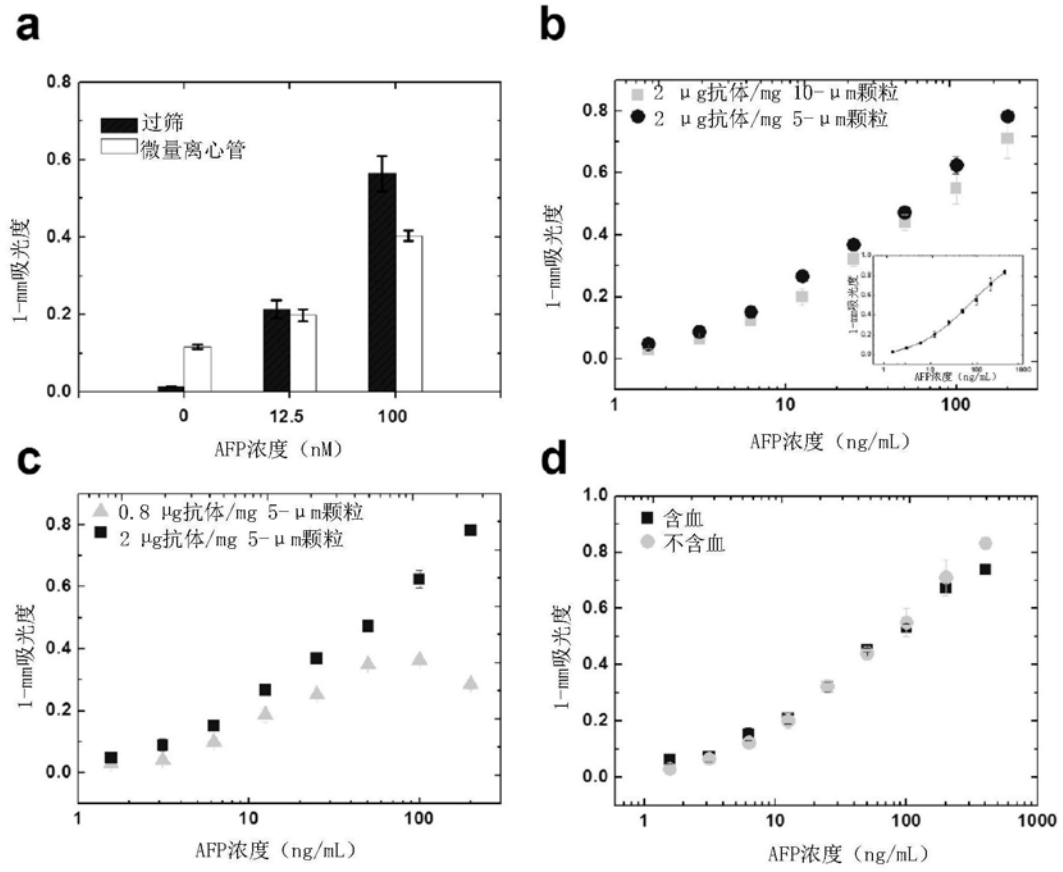


图5

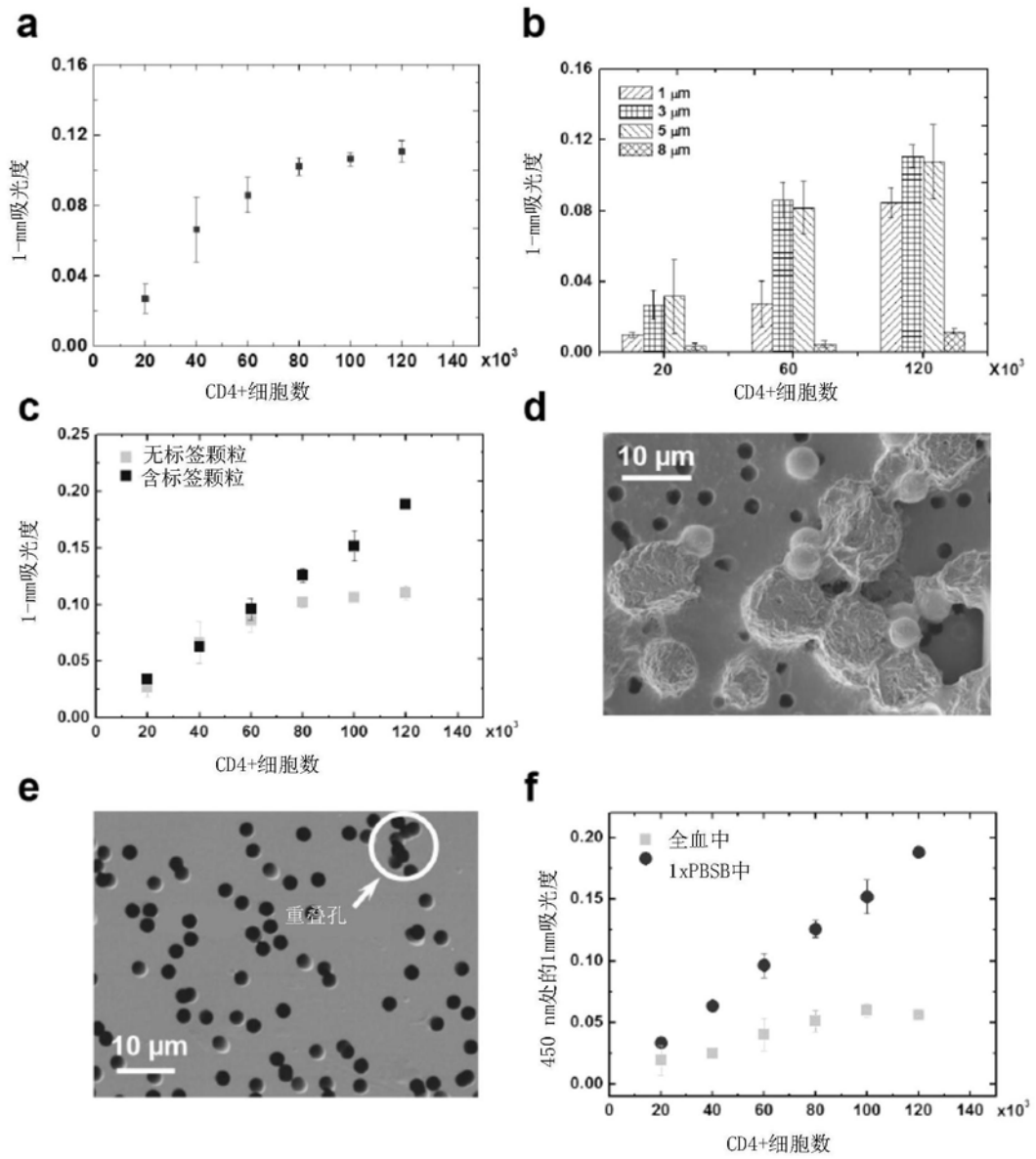
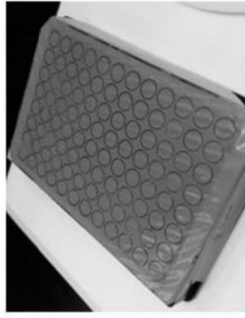


图6

完整装置 (底视图)



c

热粘合



b

膜对齐



a

图7

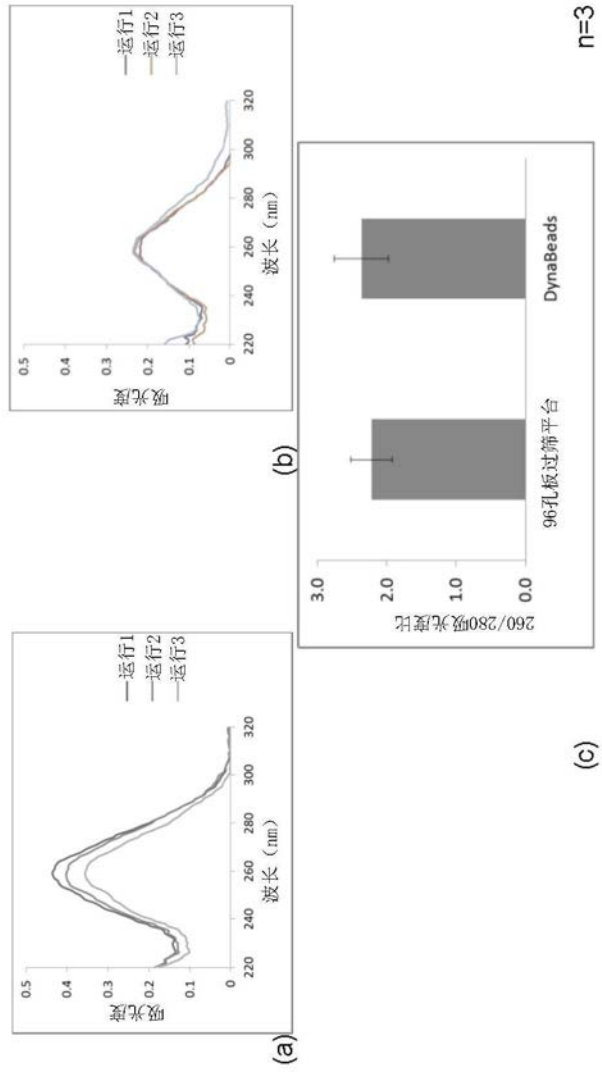


图8

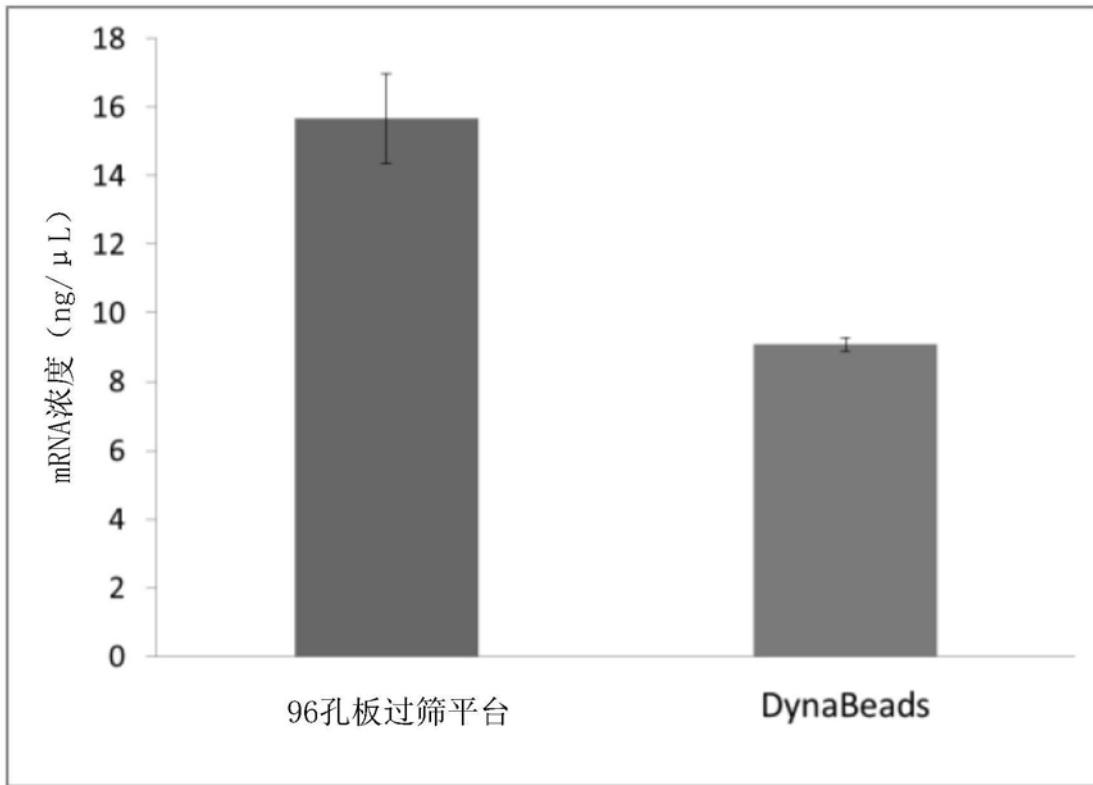


图9

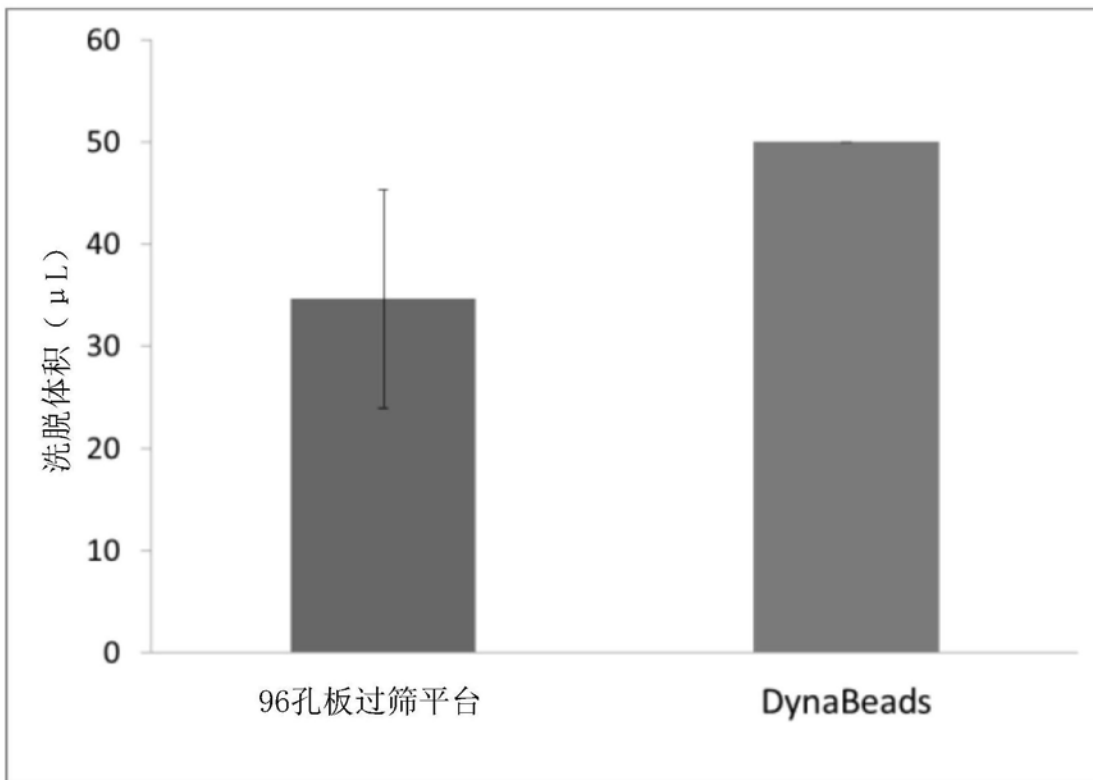


图10

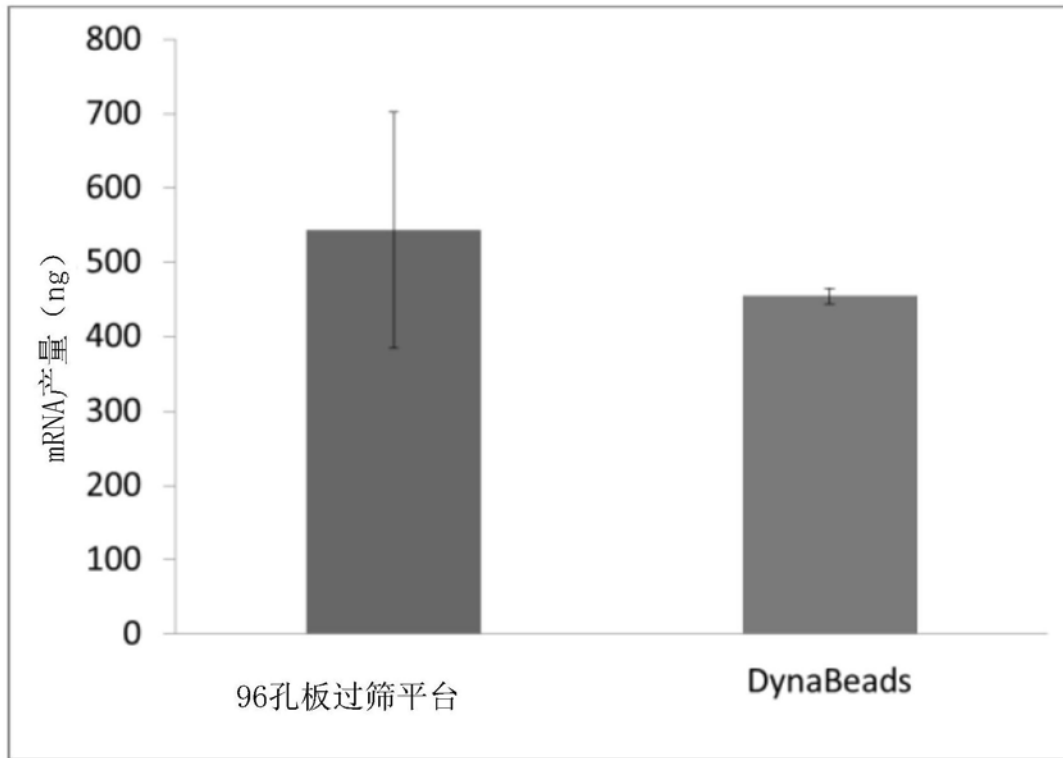


图11

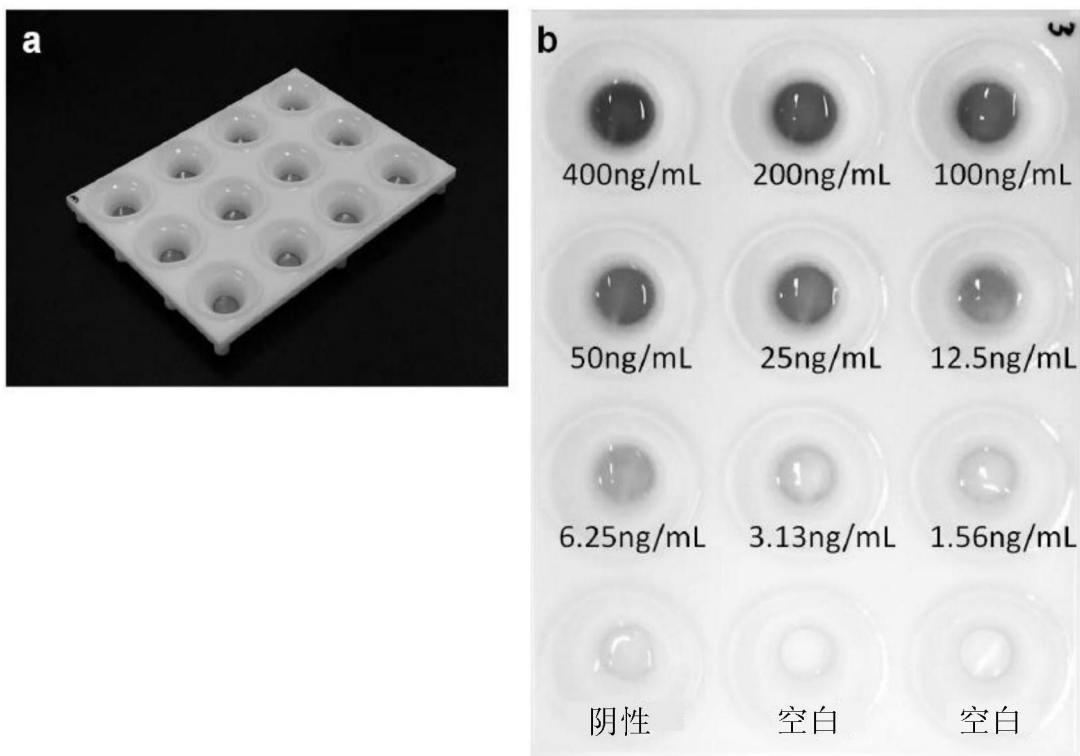


图12

专利名称(译)	用于基于颗粒的生物测定的过筛垂直流系统		
公开(公告)号	CN110168366A	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201880005807.0	申请日	2018-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡科技研究局		
[标]发明人	应仪如 张翼 李玉山		
发明人	应仪如 张翼 李玉山 A·法温		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/10 B01L3/00		
CPC分类号	B01L3/50255 B01L2200/0668 B01L2300/0681 B01L2300/069 B01L2400/0406 G01N33/54313		
代理人(译)	康健 王思琪		
优先权	10201700040Y 2017-01-04 SG		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于基于颗粒的生物测定的过筛垂直流系统。本发明涉及一种在基于颗粒的制备性测定和分析性测定中用于液体移除的装置。该装置利用多孔膜将液体容纳在测定的反应室中。一旦膜与可拆卸的吸收垫接触，该膜就能使液体流通过。多孔膜和吸收垫的组合使用允许通过毛细力有效地移除废液，从而将由残留液体引起的遗留污染最小化。本发明还涉及包含该装置的阵列和使用该装置的测定方法。通过利用这种装置进行基于颗粒的固相萃取，可以在过筛平台上分离高纯度的DNA。在过筛装置上运行基于颗粒的ELISA，以分析具有降低的背景和更大的信号背景比的蛋白质和细胞。此外，已经发现具有3x4筛阵列的过筛装置的高通量潜力，这种筛阵列允许多个样品并行处理。

