



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103196725 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 08

(21) 申请号 201310101285. 3

(22) 申请日 2013. 03. 26

(73) 专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 王志民 程秀兰 黄伟东 侯彩玲
王跃 张林霞

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 郭国中

(51) Int. Cl.

G01N 1/28(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007207548 A1, 2007. 09. 06, 参见说明书第 2、95、128-129、137-138 段, 图 1-4 以及权利要求

求 15-17.

CN 1273602 A, 2000. 11. 15, 全文.

J Dapprichy et al. 《DNA attachment to optically trapped beads in microstructures monitored by bead displacement》.

《bioimaging》. wiley, 1998, 第 6 卷 25-32 页.

审查员 孙劭

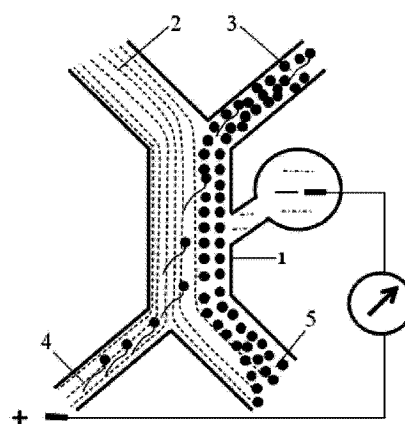
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法

(57) 摘要

本发明公开一种生物技术领域的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法, 该方法采用一内部有溶液通道的流室, 该流室溶液通道上游设有进样口和电泳缓冲液填充口; 将含有目的复合物的混合物通过进样口注入流室, 同时将电泳缓冲液通过电泳缓冲液填充口注入流室, 流室下端有目的复合物收集口和空微纳米珠出口, 连接目的复合物收集口的容器连接电源正极, 与目的复合物收集容器对应的流室溶液通道另一处连接电源负极; 利用外加电场, 使目的复合物进入目的复合物收集容器。本发明获得的目的复合物纯度高、数量多, 可用于在单分子水平的核酸-蛋白质相互作用动力学研究、免疫学观察、单分子核酸测序以及新一代测序仪的样品制备等。



1. 一种制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征在于,该方法在获得连接单根荧光分子的多聚物分子的单个微纳米珠即目的复合物和空微纳米珠的混合物后,采用一内部有溶液通道的流室,该流室溶液通道上游有进样口和电泳缓冲液填充口;

将所述混合物通过进样口注入流室,同时将电泳缓冲液通过电泳缓冲液填充口注入流室,流室下游有目的复合物收集口和空微纳米珠出口;

将连接目的复合物收集口的容器连接电源正极,与目的复合物收集容器对应的流室溶液通道另一侧连接电源负极,利用外加电场,使携带净负电荷的目的复合物进入目的复合物收集容器;

所述获得连接单根多聚物分子的单个微纳米珠和空微纳米珠的混合物,按照以下方法制备:

步骤一,在多聚物分子的一端标记一种活性基团,另一端或侧链标记荧光分子,纯化后用连接缓冲液重新溶解;

步骤二,采用能与步骤一活性基团发生反应的活性基团包被的微纳米珠,与经步骤一处理过的多聚物混合,通过连接反应将多聚物分子连接到微纳米珠上;

为使一个微纳米珠连接的多聚物分子不超过一根,多聚物分子数目与微纳米珠数目的比例按 $1 : \geq 10$ 混合,结果是一个微纳米珠上要么只连接一根多聚物分子,要么不连接多聚物分子,没有连接一根以上的微纳米珠,因微纳米珠数目大大超过多聚物分子数,所以,反应后也没有自由的多聚物分子。

2. 根据权利要求 1 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述的活性基团,是能用于实现连接多聚物分子与微纳米珠的活性基团对;所述的活性基团是中性、酸性或碱性,后两种情况下,用能使之钝化的试剂钝化连接产物中的微纳米珠表面,使微纳米珠表面不携带净电荷。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述的活性基团对包括生物素-抗生物素蛋白、地高辛-抗地高辛抗体、氨基-环氧基、氨基-羧基、氨基-羰基、巯基-马来酰亚胺、巯基-环氧基、巯基-巯基、巯基-羰基、羧基-酰肼基、羰基-酰肼基中的一种。

4. 根据权利要求 1 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述的多聚物分子数目与微纳米珠数目的比例按 1 比大于或等于 10 混合。

5. 根据权利要求 1 或 4 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述的微纳米珠,是单分子多聚物运载工具,其材质是硅、磁性材料或多聚物,其直径在纳米至微米量级。

6. 根据权利要求 1 所述的制备与富集单个微纳米携带接单根多聚物分子的方法,其特征是,所述的多聚物分子,是核酸、核酸与蛋白质以及核酸与人工合成的肽核酸多聚物分子连接后的嵌合体中的一种。

7. 根据权利要求 1 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述电泳缓冲液的方式为侧流或鞘流方式;设置为测流时,目的复合物收集口及空微纳米珠出口分别对应于流室溶液通道上游的填充电泳缓冲液和样品溶液进入流室溶液通道时的位置,设置为鞘流时,目的复合物收集口与空微纳米珠出口分叉设置;所述的进

样口和电泳缓冲液填充口连接进样控制器用于控制进样速度。

8. 根据权利要求 1 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述正极和负极间的外加电场,在各种条件确定后,将目的复合物牵引至目的复合物收集容器所需的最小电压阈值 V_{\min} ,通过计算得到,或通过显微镜观察得到,只要外加电压 $V \geq V_{\min}$,后续就不再借助光学手段而进行直接分离和富集目的复合物。

9. 根据权利要求 1 所述的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,其特征是,所述的目的复合物在外加电场驱动下,离开溶液通道中的样品溶液流,进入目的复合物收集容器;所述流室通道的溶液进入或者不进入目的复合物收集容器,当不进入目的复合物收集容器时,该容器中事先加满电泳缓冲液流。

制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生物技术领域的多聚物制备方法,具体是一种制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法。

背景技术

[0002] 经微纳米珠连接单根多聚物(DNA、RNA、蛋白质和肽核酸等)分子进行单分子操纵,可用于检测多种生命现象的单分子基本行为,包括核酸与核酸、核酸与相关蛋白相互作用动力学、抗体筛选、核酸单分子测序和新一代测序仪的样品制备等。比较常用的办法是采用光学镊和磁镊操纵连接单分子多聚物的微纳米珠,但如何快速和简便制备这种单个微纳米珠连接单根多聚物分子,一直没有很好解决。

[0003] 经对现有文献检索发现,Dapprich, J. & Nicklaus, N. 等在《生物成像》上发表了“通过监控珠子位移将DNA连接到被光学捕获在微结构的珠子上”一文(Dapprich, J. & Nicklaus, N. DNA attachment to optically trapped beads in microstructures monitored by bead displacement. Bioimaging, 6:25-32, 1998),文中称他们的研究结果可获得一个磁珠只连接一根DNA片段,但该方法需要光学镊,步骤比较繁琐,效率也较低。因此,本发明要解决的技术问题是提供快速、简便制备并富集大量的“单个微纳米珠携带单根多聚物分子”(以下称“目的复合物”)的方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术的不足,提供一种快速、简便制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法,用于在单分子水平研究核酸与相关蛋白分子相互作用动力学、遗传诊断、抗体筛选、核酸单分子测序和新一代测序仪的样品制备等。

[0005] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0006] 本发明提供一种制备与富集单个微纳米珠连接单根多聚物分子的方法,该方法在获得连接单根荧光标记的多聚物分子的单个微纳米珠(目的复合物)和空微纳米珠的混合物后,采用一内部有溶液通道的流室,该流室溶液通道上游有进样口和电泳缓冲液填充口;将混合物通过进样口注入流室,同时将电泳缓冲液通过电泳缓冲液填充口注入流室,流室下端有目的复合物收集口和空微纳米珠出口;将连接复合物收集口的目的复合物收集容器连接到电源正极,与目的复合物收集容器对应的流室溶液通道另一处连接到电源负极,利用外加电场,使携带净负电荷目的复合物进入目的复合物收集容器。

[0007] 本发明方法中,所述获得连接单根荧光标记的多聚物分子的单个微纳米珠(目的复合物)和空微纳米珠的混合物,可以采用现有技术制备,也可以按照以下方法制备:

[0008] 步骤一,在多聚物(包括DNA、RNA、以及二者之一与蛋白质或肽核酸连接后的嵌合体)一端标记一种活性基团,另一端或侧链标记荧光分子,纯化后用连接缓冲液重新溶解;

[0009] 步骤二,采用可与标记核酸活性基团发生反应的另一种活性基团包被的微纳米珠与经步骤一处理过的多聚物混合,通过连接反应将多聚物分子连接到微纳米珠上。为使一

个微纳米珠连接的多聚物分子不超过一根,多聚物分子数目与微纳米珠数目的比例按 1 : ≥ 10 混合,结果是一个微纳米珠上要么只连接一根多聚物分子,要么不连接多聚物分子,没有连接一根以上的微纳米珠,因微纳米珠数目大大超过多聚物分子数,所以,反应后也没有自由的多聚物分子。

[0010] 本发明方法中,对于在中性溶液中携带负电荷的核酸分子,可直接按上述步骤实施,对蛋白质和肽核酸等多聚物分子,则需要事先连接一段核酸作为电分离的介质,形成多聚物嵌合体。

[0011] 所述的荧光标记,是可以用于荧光显微镜观察的一类荧光分子。

[0012] 所述的多聚物分子,是核酸(DNA 和 RNA)、核酸与蛋白质以及核酸与人工合成的肽核酸多聚物连接后的嵌合体。

[0013] 所述的微纳米珠,是单分子多聚物运载工具,其材质可以是硅、磁性材料或多聚物等,其直径在纳米至微米量级。

[0014] 所述的标记多聚物分子和包被微纳米珠的活性基团,是二者能够发生免疫绑定、直接或介导形成共价键的活性基团对,凡是能够实现该目的的活性基团对均可,包括但不限于:生物素-抗生物素蛋白、地高辛-抗地高辛抗体、氨基-环氧基、氨基-羧基(包括羧基的活化形式如琥珀酰亚胺碳酸酯等)、氨基-羰基、巯基-马来酰亚胺、巯基-环氧基、巯基-巯基、巯基-羰基、羧基-酰肼基、羰基-酰肼基等。包被微纳米珠表面的活性基团可以是中性、酸性或碱性,后两种情况下,连接产物在分离与富集前,用能使之钝化的试剂处理微纳米珠,使微纳米珠表面不携带净电荷。

[0015] 所述的流室,是根据核酸在中性溶液携带负电荷,用核酸电泳和流体力学原理分离目的复合物的装置。样品在通过流室通道时,目的复合物因携带负电荷,在电场作用下,使目的复合物离开溶液通道中的样品液流,进入与其电性质相反的收集容器,实现分离和收集目的复合物,空微纳米珠进入空微纳米珠出口。流室通道的溶液可以进入目的复合物收集容器,也可以不进入目的复合物收集容器,后一种情况下,该容器中事先加满电泳缓冲液。

[0016] 本发明方法中,所述的电泳缓冲液,是用于将溶液的 pH 值维持在近中性范围以分离目的复合物的溶液,可以是 Good 缓冲液,如 25mM Hepes (pH7.5), 1M KCl,或其他电泳缓冲液,如 Tris-TAE、Tris-TPE、Tris-TBE 或碱性缓冲液等。填充电泳缓冲液起到屏蔽微纳米珠因布朗运动和扩散而进入目的复合物收集口的作用。所述电泳缓冲液流的设置方式可以是侧流方式,也可以是鞘流方式,侧流方式(即填充流)在样品流一侧形成屏蔽液流,鞘流方式则在样品流的四周形成屏蔽液流。填充电泳缓冲液设置为侧流时,目的复合物收集口及空微纳米珠出口的位置分别对应于填充缓冲液进入流室溶液通道时的位置以及样品溶液进入流室溶液通道时的位置;设置为鞘流时,目的复合物出口与空微纳米珠出口分叉即可,不受上游样品和填充电泳缓冲液入口的位置影响。

[0017] 本发明方法中,可以在各种条件确定后,计算得到能够将目的复合物牵引至目的复合物收集容器所需的最小外加电场的电压 V_{\min} ,也可以通过安装成像系统装备的荧光显微镜,通过显微镜观察得出 V_{\min} 。在外加电压 $V \geq V_{\min}$ 条件下,均可实现本发明的实施效果。

[0018] 本发明方法中,进样口和电泳缓冲液填充口可以采用注射泵、蠕动泵或鞘流泵来控制进样速度。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效益:制备出的目的复合物纯度高、数量多,在单分子 DNA 与相关蛋白分析中,在光学显微镜或荧光显微镜辅助下,直接拾取目的复合物,准确、便捷,不再需要复杂而缓慢的光学镊、磁镊或原子力显微镜操作步骤;目的复合物经修饰可用于在单分子水平研究 DNA 与相关蛋白相互作用动力学、结合高灵敏纳米孔传感器测序 DNA、检测免疫反应以及新一代 DNA 测序仪的样品制备等。

附图说明

[0020] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0021] 图 1 为本发明一实施例采用的流室装置示意图,其中电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式,流室通道中的部分填充电泳缓冲液进入目的复合物收集容器,目的复合物收集容器连接电源正极,溶液通道相对一侧连接电源负极;

[0022] 图 2 为本发明一实施例采用的流室装置示意图,其中电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式,流室通道中的部分填充电泳缓冲液进入目的复合物收集容器,目的复合物收集容器连接电源正极,进样口连接电源负极;

[0023] 图 3 为本发明另一实施例采用的流室装置示意图,其中电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式,流室通道溶液不能进入目的复合物收集容器,目的复合物收集容器连接电源正极,溶液通道相对一侧连接电源负极;

[0024] 图 4 为本发明另一实施例采用的流室装置示意图,其中电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式,流室通道溶液不能进入目的复合物收集容器,目的复合物收集容器连接电源正极,进样口连接电源负极;

[0025] 图 5 为本发明另一实施例采用的流室装置示意图,其中电泳缓冲液流的设置方式为鞘流方式。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造商所建议的条件进行。

[0027] 实施例 1

[0028] 如图 1-2 所示,本实施例采用一内部有溶液通道的流室 1,所述流室溶液通道上游设有进样口 2 和电泳缓冲液填充口 3;所述流室 1 溶液通道下游设有目的复合物收集口 4 和空微纳米珠出口 5,两者的位置分别对应于流室溶液通道上游的电泳缓冲液填充口 3 填充电泳缓冲液和进样口 2 样品溶液进入流室溶液通道时的位置;连接复合物收集口 4 的目的复合物收集容器连接电源正极,复合物收集容器相对的流室溶液通道另一侧(如图 1 或其他位置如图 2)连接电源负极。

[0029] 采用上述装置,将多聚物分子与微纳米珠按摩尔比 1:10 连接反应的产物,即连接单根多聚物分子的单个微纳米珠(目的复合物)和空微纳米珠的混合物通过进样口 2 注入流

室 1, 同时将电泳缓冲液通过电泳缓冲液填充口 3 注入流室 1, 流室 1 溶液通道下游分叉后分别进入经目的复合物收集口 4 和空微纳米珠出口 5 连接目的复合物收集容器和空微纳米珠收集容器, 利用外加电场使目的复合物进入目的复合物收集容器。

[0030] 本实施例中, 从进样口 2 进入的溶液完全从对应的空微纳米珠出口 5 流出, 目的复合物从复合物收集口 4 进入收集容器。

[0031] 本实施例中, 目的复合物收集口 4 与空微纳米珠出口 5 分叉处, 安装高灵敏成像系统装备的荧光显微镜, 用于观察和调节流室正负电极间的电压。

[0032] 本实施例中, 填充电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式, 进样口 2 和电泳缓冲液填充口 3 采用注射泵或蠕动泵来控制进样速度。

[0033] 本实施例中, 多聚物分子的一端用活性基团修饰、另一端或侧链用荧光分子标记; 微纳米珠包被有能够与多聚物携带的活性基团发生连接反应的活性基团, 该活性基团为中心、酸性或碱性, 中性情况下, 按上述实施步骤实施, 后两种情况下, 在完成连接反应后, 用能与之中和的试剂处理连接产物, 钝化混合物中的微纳米珠表面, 使之不携带净电荷, 纯化后悬浮于电泳缓冲液, 再按上述实施步骤实施。

[0034] 实施效果: 本实施例可获得纯度 90% 以上的目的复合物。

[0035] 实施例 2

[0036] 如图 3-4 所示, 本实施例采用一内部有溶液通道的流室 1, 连接目的复合物收集口 4 的目的复合物收集容器连接电源正极, 与目的复合物收集容器相对的流室溶液通道另一侧(如图 3 或者其他位置如图 4) 连接电源负极。本实施例中, 位于目的复合物收集口 4 的容器中事先加满电泳缓冲液, 流室 1 通道的溶液不进入目的复合物收集容器, 只允许电拉动的目的复合物进入。其他操作特征与实施例 1 相同。

[0037] 实施效果: 本实施例可获得纯度 90% 以上的目的复合物。

[0038] 实施例 3

[0039] 本实施例首先获得连接单根多聚物分子的单个纳米珠和空纳米珠的混合物:

[0040] 步骤一, 将 λ DNA 一端用氨基标记, 侧链用 YOYO-1 (Life Technologies) 荧光分子标记, 纯化, 重新溶解于连接缓冲液;

[0041] 步骤二, 将步骤一的 DNA 与包被环氧树脂、直径 200nm、悬浮于连接缓冲液的硅珠按摩耳数按 1:100 比例混合, 完成连接反应。

[0042] 目的复合物的分离与富集:

[0043] 采用如图 1 所示流室装置分离与富集单个纳米珠携带单根多聚物分子, 将步骤二的混合物加入连接进样口的注射泵, 填充电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式, 电泳缓冲液加入连接电泳缓冲液填充口的注射泵, 打开注射泵, 在光学系统(高灵敏成像系统装备的荧光显微镜) 辅助下, 逐步提高连接流室正负电极间的电压, 使目的复合物在电力驱动下, 进入目的复合物收集口, 并记载分离过程。

[0044] 实施效果: 用本实施例获得纯度在 95% 的目的复合物。同理, 该实施例还适用于 RNA 操纵。

[0045] 实施例 4

[0046] 本实施例先获得连接单根多聚物分子的单个微米珠和空微米珠的混合物:

[0047] 步骤一, 将线性 pUC18DNA 一端连接 Cy3 荧光分子标记的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)

单克隆抗体,另一端用标记氨基活性基团,纯化后重新溶解于连接缓冲液;

[0048] 步骤二,将步骤一复合物与羧基包被、直径 5 μm 、悬浮于连接缓冲液的磁珠按摩尔数 1:100 的比例混合,完成氨基与羧基的连接反应。

[0049] 步骤三,微米珠表面钝化,用碘甲烷将微米珠表面的自由羧基钝化,纯化后悬浮于电泳缓冲液。

[0050] 目的复合物的分离与富集:

[0051] 采用如图 2 所示流室装置分离与富集单个微米珠携带单根多聚物分子,操作程序同实施例 3。

[0052] 实施效果:该方法可获得纯度 95% 以上的目的复合物。同理,该实施例也适用于 RNA 与单克隆抗体嵌合物的操纵。

[0053] 实施例 5

[0054] 本实施例先获得连接单根多聚物分子的单个微米珠和空微米珠的混合物:

[0055] 步骤一,将线性 λ DNA 一端连接 Cy3 荧光分子标记的肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 单克隆抗体,另一端自由端用琥珀酰亚胺碳酸酯标记,纯化后重新溶解于连接缓冲液;

[0056] 步骤二,将步骤一复合物与氨基包被、直径 5 μm 、悬浮于连接缓冲液的磁珠按摩尔数 1:500 的比例混合,完成氨基与琥珀酰亚胺碳酸酯的连接反应。

[0057] 步骤三,微米珠表面钝化,用乙酸将微米珠表面的自由氨基钝化,纯化后悬浮于电泳缓冲液。

[0058] 目的复合物的分离与富集:

[0059] 采用如图 1 所示流室装置分离与富集单个微米珠携带单根多聚物分子,操作程序同实施例 3。

[0060] 实施效果:该方法可获得纯度 99% 以上的目的复合物。同理,该实施例也适用于 RNA 与单克隆抗体嵌合体的操纵。

[0061] 实施例 6

[0062] 本实施例首先获得连接单根多聚物分子的单个纳米珠和空纳米珠的混合物:

[0063] 步骤一,将线性 λ DNA 分别连接序列为(1) GCCGCACACG、(2) CAGGCACTTCT、(3) GCCGCGCACGT 和(4) CAGGCGCTTCT 的 4 种人工合成手性肽核酸(PNA),DNA 自由端用地高辛标记,DNA 测链用 YOYO-1 荧光分子标记,纯化后重新溶解于连接缓冲液;

[0064] 步骤二,将步骤一的 4 种产物分别与包被抗地高辛、直径 700nm、悬浮于连接缓冲液的聚苯乙烯(PS)珠按摩尔数 1:50 混合,完成地高辛与抗地高辛的免疫连接反应。

[0065] 目的复合物的分离与富集:

[0066] 采用如图 3 所示流室装置分离与富集单个纳米珠携带单根多聚物分子,操作程序同实施例 3。

[0067] 实施效果:本实施例可获得纯度 95% 以上的目的复合物。同理,该实施例也适用于 RNA 与肽核酸嵌合体的操纵。

[0068] 实施例 7

[0069] 本实施例先获得连接单根多聚物分子的单个微米珠和空微米珠的混合物:

[0070] 步骤一,用 454/Roche 的文库构建方法将待测序的靶 DNA 片段一端连接接头 A,另一端连接接头 B(接头 B 距靶 DNA 远端的 5' 端携带由四聚乙醇间隔的生物素),侧链用

TOTO-1 (Life Technologies) 荧光分子标记, 纯化后重新溶解于连接缓冲液;

[0071] 步骤二中, 将适于 454/Roche 焦磷酸测序仪的包被抗链霉生物素、直径约 20 μm 、悬浮于连接缓冲液的磁珠与步骤一的 DNA 按摩尔比 50 : 1 的比例混合, 完成 DNA 一端生物素向磁珠表面的绑定。

[0072] 目的复合物的分离与富集:

[0073] 采用如图 4 所示的流室装置, 将步骤二的混合物加入连接进样口的蠕动泵, 填充电泳缓冲液流的设置方式为侧流方式, 电泳缓冲液加入连接电泳缓冲液填充口的蠕动泵, 打开蠕动泵, 光学系统辅助下, 逐步提高连接流室正负电极间的电压, 使目的复合物在电力驱动下, 进入事先充满电泳缓冲液的目的复合物收集口, 流室通道的溶液不进入目的复合物收集容器, 只允许目的复合物在电场牵引下进入, 并记载分离过程。

[0074] 实施效果: 本实施例可获得 99% 以上的目的复合物, 没有携带多于一条靶 DNA 分子的磁珠。

[0075] 实施例 8

[0076] 如图 5 所示, 为实施例采用的流室装置示意图, 其中电泳缓冲液流的设置方式为鞘流方式, 鞘流在样品流的四周形成屏蔽。进样口 2 和电泳缓冲液填充口 3 采用鞘流泵来控制进样速度。电极位置以及填充电泳缓冲液进入或不进入目的复合物收集容器等其他操作特征与上述实施例类似。

[0077] 由以上实施例可以看出, 本发明制备出的目的复合物纯度高、数量多, 可获得纯度 90% 以上的目的复合物, 操作准确、便捷。

[0078] 当然, 本发明中所用的活性基团不限于上述实施例中列出的, 凡是可用于实现连接核酸与微纳米珠的活性基团对均可以, 例如生物素-抗生物素蛋白、地高辛-抗地高辛抗体、氨基-环氧基、氨基-羧基(包括羧基的活化形式如琥珀酰亚胺碳酸酯等)、氨基-羰基、巯基-马来酰亚胺、巯基-环氧基、巯基-巯基、巯基-羰基、羧基-酰肼基、羰基-酰肼基等。

[0079] 本发明中, 流室溶液通道的电源负极, 可以设置在如图所示的位置, 也可以设置在其他位置, 凡是能够实现本发明目的和效果的任何一处均可。

[0080] 本发明中, 在各种条件(包括温度、装置内各通道的尺寸、形状、电泳缓冲液组分、样品和填充电泳缓冲液进样速度以及电极间距)确定后, 经计算或显微镜观察下自小到大调节电压, 可以得出将目的复合物牵引至目的复合物收集容器所需的最小电压阈值 V_{\min} , 只要外加电压 $V \geq V_{\min}$, 后续就可不再借助光学手段(即用荧光分子标记核酸及使用显微镜)而进行直接分离。

[0081] 应当理解的是, 本发明中的装置形状也并不局限于实施例附图中所示的形状, 还可以是其他形状, 只要能够达到本发明上述分离的目的即可。

[0082] 尽管本发明的内容已经通过上述优选实施例作了详细介绍, 但应当认识到, 上述的描述不应被认为是对本发明的限制。在本领域技术人员阅读了上述内容后, 对于本发明的多种修改和替代都将是显而易见的。因此, 本发明的保护范围应由所附的权利要求来限定。

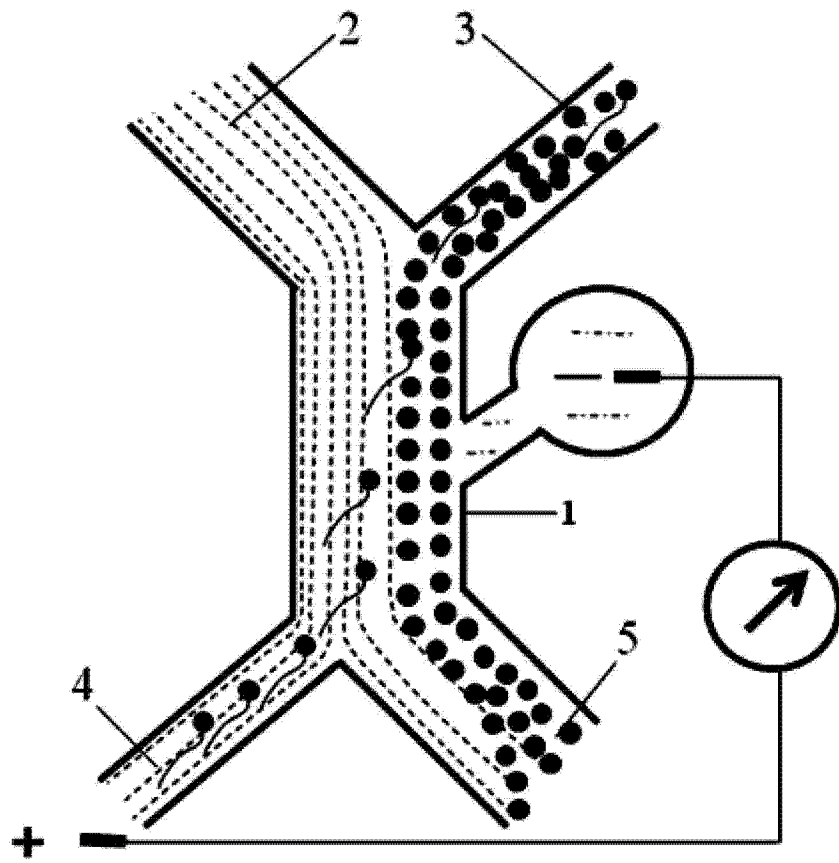


图 1

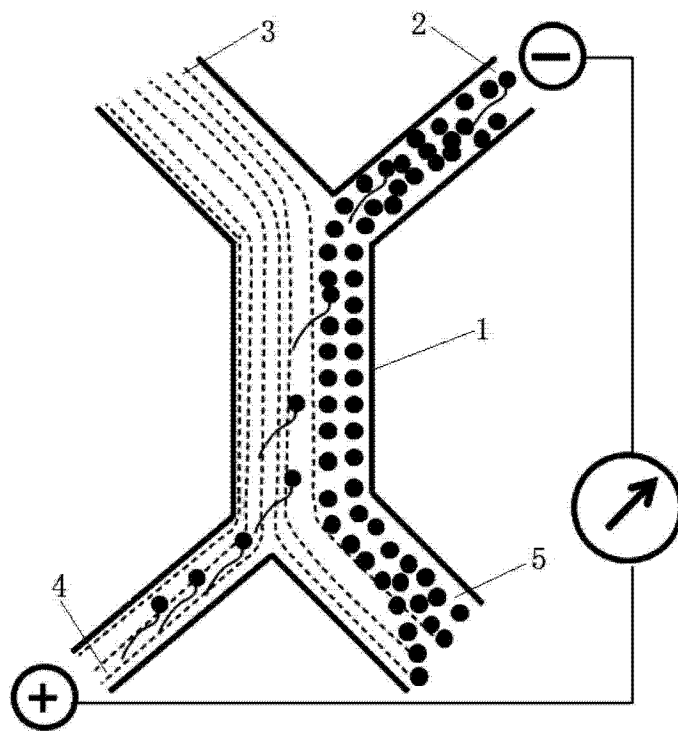


图 2

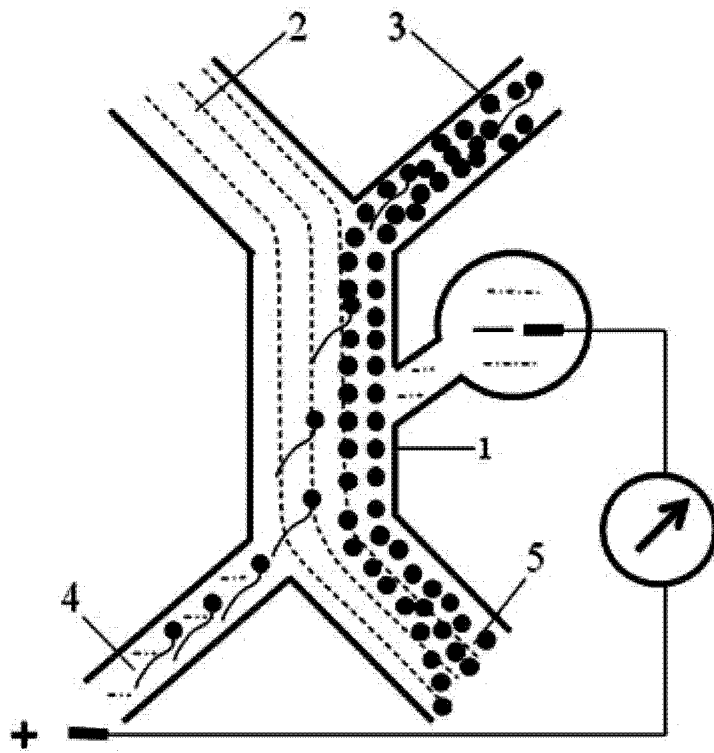


图 3

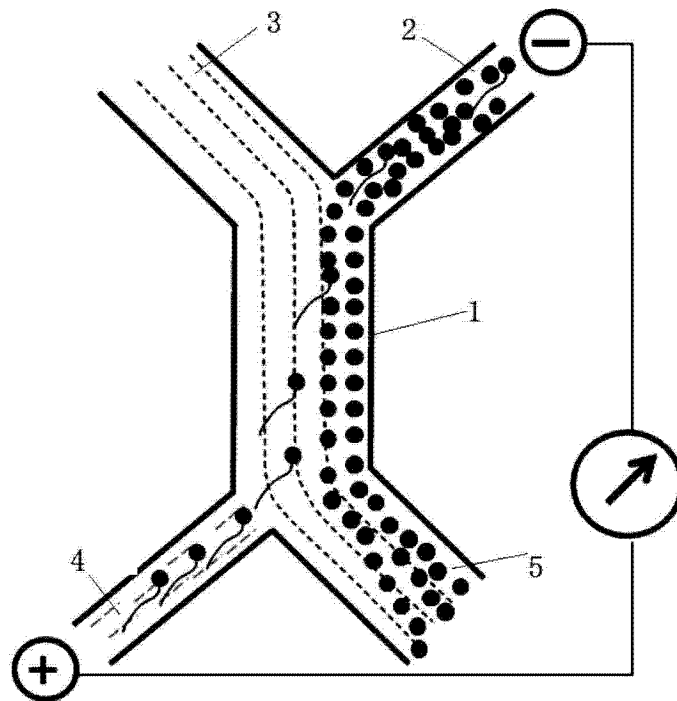


图 4

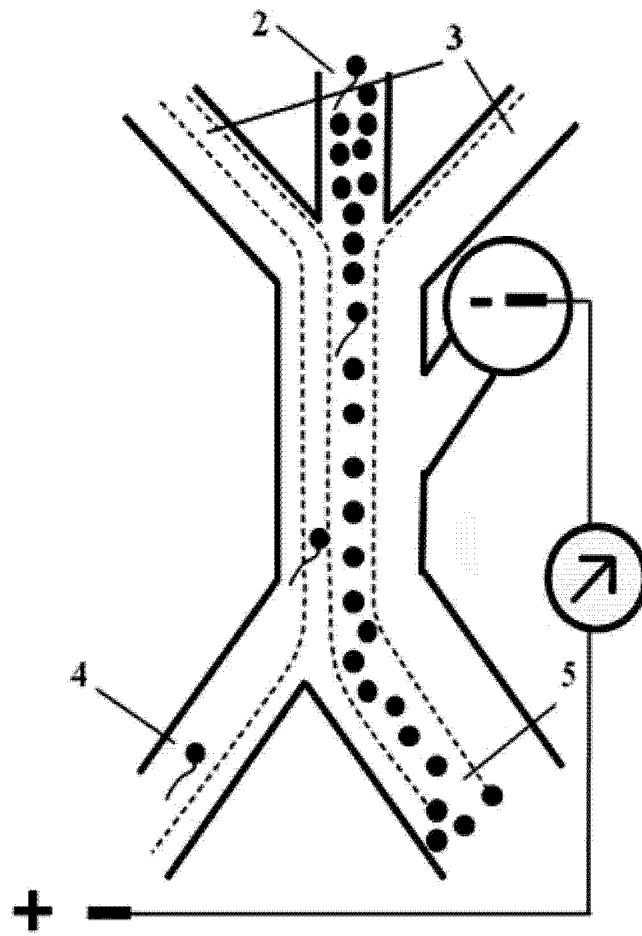


图 5

专利名称(译)	制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法		
公开(公告)号	CN103196725B	公开(公告)日	2015-07-08
申请号	CN201310101285.3	申请日	2013-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	王志民 程秀兰 黄伟东 侯彩玲 王跃 张林霞		
发明人	王志民 程秀兰 黄伟东 侯彩玲 王跃 张林霞		
IPC分类号	G01N1/28 G01N33/531		
审查员(译)	孙勐		
其他公开文献	CN103196725A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种生物技术领域的制备与富集单个微纳米珠携带单根多聚物分子的方法，该方法采用一内部有溶液通道的流室，该流室溶液通道上游设有进样口和电泳缓冲液填充口；将含有目的复合物的混合物通过进样口注入流室，同时将电泳缓冲液通过电泳缓冲液填充口注入流室，流室下端有目的复合物收集口和空微纳米珠出口，连接目的复合物收集口的容器连接电源正极，与目的复合物收集容器对应的流室溶液通道另一处连接电源负极；利用外加电场，使目的复合物进入目的复合物收集容器。本发明获得的目的复合物纯度高、数量多，可用于在单分子水平的核酸-蛋白质相互作用动力学研究、免疫学观察、单分子核酸测序以及新一代测序仪的样品制备等。

