

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536292
(P2004-536292A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 1/00
C12M 1/33
C12N 15/00
C12Q 1/68
G01N 1/28

F 1

G01N 1/00
G01N 1/00
C12M 1/33
C12Q 1/68
C12N 15/00

1 O 1 M
1 O 2 Z
4 B 0 2 4
4 B 0 2 9
A

2 G 0 5 2
4 B 0 2 4
4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-585579 (P2002-585579)
(86) (22) 出願日 平成14年4月26日 (2002.4.26)
(85) 翻訳文提出日 平成15年10月27日 (2003.10.27)
(86) 國際出願番号 PCT/US2002/013187
(87) 國際公開番号 WO2002/088296
(87) 國際公開日 平成14年11月7日 (2002.11.7)
(31) 優先権主張番号 60/286,509
(32) 優先日 平成13年4月26日 (2001.4.26)
(33) 優先権主張國 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/308,869
(32) 優先日 平成13年7月30日 (2001.7.30)
(33) 優先権主張國 米国(US)
(31) 優先権主張番号 60/337,336
(32) 優先日 平成13年11月8日 (2001.11.8)
(33) 優先権主張國 米国(US)

(71) 出願人 502173936
ボストン・バイオメディカ・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02379, ウエスト・ブリッジウォーター, ウエスト・ストリート375番
(74) 代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣
(74) 代理人 100105957
弁理士 恩田 誠
(72) 発明者 シューマッハー、リチャード テイ
アメリカ合衆国 02780 マサチューセッツ州 タウントン ブラック ポンド
レーン 65

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】マルチチャンバデバイスおよび生物試料の加工処理のためのその用途

(57) 【要約】

昆虫、真菌、細菌、ならびに植物および動物の組織などの生物試料の、均質化、加工処理、検出および分析のためのデバイスおよび方法が記載されている。上記デバイス内の複数のチャンバにより、得られた均質化産物をさらに加工処理し、精製し、分析することができるか、および／または代謝物、タンパク質、核酸などの生体分子、あるいは薬学的生成物を検出することができるというように、各段階において異なる加工処理機能を実施することができる。本デバイスは、静水圧装置内で用いることができ、該装置内において、様々な作業、すなわちインキュベーション、試薬の添加または更新、およびシグナルの発生と検出を適切なチャンバ内で実施することができる。本方法では、従来の手法と比較して、化学的および酵素的分解からの生体分子の保護性が向上している。さらに、本方法は、試料の調製と分析的プロセスの自動化を可能にする。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

圧力調節装置において用いるための試料加工処理デバイスであって、該デバイスは、複数のチャンバと、

2つのチャンバ間に配置される少なくとも1つのバリアであって、多孔性もしくは貫通可能であるか、あるいは物理的、化学的もしくは機械的刺激への暴露によって多孔性または貫通可能なものとすることができるバリアと、

試料を高圧に供して、少なくとも1つのバリアに試料を強制通過させるような位置に配置された少なくとも1つの加圧部材とを含むことを特徴とするデバイス。

【請求項 2】

少なくとも1つのチャンバは、成型されたデバイスの一部であることを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 3】

2つまたはそれ以上のチャンバと、

複数のバリアであって、該複数のバリアのうちの少なくとも1つが多孔性であるか、あるいは物理的、化学的もしくは機械的刺激への暴露によって多孔性または貫通可能なものとすることができる、複数のバリアと、

異なる静水圧で独立して作動される2つまたはそれ以上の加圧部材であって、少なくとも1つの部材は、試料を高圧に供して、少なくとも1つのバリアに試料を強制通過させるような位置に配置されている加圧部材とを含むことを特徴とする請求項1に記載のデバイス。
。

【請求項 4】

チャンバの少なくとも2つが、ネジ込み機械的インターロックまたはネジ付機構によって互いに連結されていることを特徴とする請求項3に記載のデバイス。

【請求項 5】

チャンバの少なくとも1つがプラスチック、セラミック、金属またはガラスからなることを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 6】

チャンバの少なくとも1つが $100\mu L$ までの容積を有することを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 7】

チャンバの少なくとも1つが $100mL$ までの容積を有することを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 8】

チャンバの少なくとも1つが $500mL$ までの容積を有することを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 9】

1つ以上のチャンバの表面が、生体分子に対して不活性であることを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 10】

1つ以上のチャンバの表面が生体分子で誘導化されていることを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 11】

1つ以上のチャンバの表面が、生体分子と相互作用する分子で誘導化されていることを特徴とする請求項10に記載のデバイス。

【請求項 12】

分子は小有機分子からなることを特徴とする請求項11に記載のデバイス。

【請求項 13】

少なくとも1つのバリアは、フィルタをさらに含むことを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4】

フィルタは、塩化ポリビニル、ポリエステルスルホン、ナイロン、ニトロセルロース、セルロースエステル、酢酸セルロース、硝酸セルロース、ポリテトラフルオロエチレン(P F T A)、ビニル、ポリプロピレン、およびポリカーボネートからなる群より選択される材料からなることを特徴とする請求項 1 3 に記載のデバイス。

【請求項 1 5】

前記バリアは、第 1 のチャンバと第 2 のチャンバとの間に配置され、バリア内の開口部は、第 1 のチャンバと第 2 のチャンバとの間を連通していることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 6】

少なくとも 1 つのバリアが穿刺可能であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 7】

少なくとも 1 つのバリアが有機溶媒によって溶解可能であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 8】

少なくとも 1 つのバリアが、機械的に除去可能であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 1 9】

少なくとも 1 つのバリアが、温度変化を介して除去可能であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 0】

少なくとも 1 つのバリアが、バルブからなることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つのバリアが、穿刺、溶媒和、融解、破壊、および機械的除去からなる機構の任意の 1 つまたは組み合わせによって除去可能であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 2】

前記バリアは、ポリマー、金属またはセラミックからなることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 3】

前記バリアは、固体材料の複合体または層からなることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 4】

前記バリアは複数の開口部を有することを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 2 5】

前記開口部は略円形であることを特徴とする請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 6】

開口部の直径は、約 1 μm ~ 約 1 0 0 μm であることを特徴とする請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 7】

開口部の直径は、0 . 1 mm ~ 1 mm であることを特徴とする請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 8】

開口部の直径は、1 mm ~ 1 cm であることを特徴とする請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 2 9】

開口部の直径は、1 cm ~ 3 cm であることを特徴とする請求項 2 4 に記載のデバイス。

【請求項 3 0】

バリアは、複数の固体の尖った凸部を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3 1】

10

20

30

40

50

前記固体は、ポリマー、金属またはセラミックからなることを特徴とする請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 2】

前記尖った凸部は、ピラミッドまたは円錐の形状であることを特徴とする請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 3】

前記凸部は、前記スクリーンの基部の上方に 0 . 0 1 c m ~ 0 . 1 c m 延びることを特徴とする請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 4】

前記凸部は、前記スクリーンの基部の上方に 0 . 1 c m ~ 1 c m 延びることを特徴とする 10 請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 5】

前記凸部は、前記スクリーンの基部の上方に 1 c m ~ 3 c m 延びることを特徴とする請求項 3 0 に記載のデバイス。

【請求項 3 6】

前記加圧部材は、チャンバ内で移動するよう取り付けられた少なくとも 1 つのラムを含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3 7】

前記加圧部材は、ポリマー、金属またはセラミック材料からなることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。 20

【請求項 3 8】

前記加圧部材は、断面が円形であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 3 9】

チャンバは壁を備え、加圧部材は加圧部材が移動すると前記壁と接触する 1 つ以上の環状封止材を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 0】

前記封止材は、ポリマー、金属、またはセラミック製であることを特徴とする請求項 3 9 に記載のデバイス。 30

【請求項 4 1】

少なくとも 1 つの加圧部材は、周囲に封止リングを有するシリンダからなり、チャンバは 略円筒形であることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 2】

デバイスは、少なくとも 2 つの加圧部材を含み、一方の加圧部材はバリアの第 1 の側に配置され、他方のラムは、バリアの第 1 の側と対向するバリアの第 2 の側に配置されていることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 3】

1 つ以上のチャンバに加圧部材が取り付けられていることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 4】

オリフィスを有する容器をさらに含み、前記チャンバは該オリフィス内に配置されている 40 ことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 5】

チャンバの 1 つ以上に流体が充填されていることを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 6】

チャンバの 1 つ以上が、温度制御デバイスをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 7】

チャンバの 1 つ以上が、温度サイクルデバイスをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。 50

【請求項 4 8】

チャンバの 1 つ以上が、圧力制御デバイスをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 4 9】

チャンバの 1 つ以上が、圧力サイクルデバイスをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5 0】

チャンバの 1 つ以上に内蔵された検出モジュールをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。

【請求項 5 1】

圧力調節装置において使用するための試料加工処理デバイスであって、該デバイスは、垂直配置で配置された複数のチャンバと、

チャンバ対の間に配置された少なくとも 1 つの一時的バリアと、

バリアの少なくとも 1 つに試料を強制通過させるように配置された 1 つの加圧部材と、を含むことを特徴とするデバイス。

【請求項 5 2】

第 1 のチャンバと第 2 のチャンバとの間に配置された多孔性バリアをさらに含むことを特徴とする請求項 5 1 に記載のデバイス。

【請求項 5 3】

生物試料の加工処理方法であって、

請求項 1 に記載のデバイスを提供することと、

第 1 のチャンバに試料を添加することと、

デバイスを高い圧力に供して、加圧部材が試料を前記第 1 のチャンバと第 2 のチャンバとの間のバリアに強制通過させて、第 2 のチャンバに流入させることと、を含む方法。

【請求項 5 4】

生物試料は、加圧部材によって複数のバリアを強制通過させられることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

生物試料は、固体材料、半固体材料、気体および液体からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

生物試料は、昆虫または小動物、真菌、植物または動物組織、食品または農産物、科学検査試料、およびヒト組織からなる群より選択されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 7】

生物試料は、ヒト血液、血清または尿からなることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 8】

生物試料は凍結されていることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 9】

生物試料の大きさは 10 mg ~ 100 mg であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 0】

生物試料の大きさは 0.1 mg ~ 1.0 mg であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 1】

生物試料の大きさは 10 mg ~ 1 g であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 2】

生物試料の大きさは 1 g ~ 20 g であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 3】

生物試料の大きさは 20 g ~ 500 g であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 4】

高い圧力は、約 3447.5 kPa (500 psi) より高いことを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

高い圧力は、約 34475 kPa (5,000 psi) より高いことを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 6】

高い圧力は、約 68950 kPa (10,000 psi) より高いことを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。 10

【請求項 6 7】

高い圧力は、約 344750 kPa (50,000 psi) より高いことを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記高い圧力は、試料の大気圧凍結温度より低い温度にて試料に印加されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記高い圧力は、4 から周囲温度の間の温度にて印加されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。 20

【請求項 7 0】

前記高い圧力は、周囲温度にて印加されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記高い圧力は、周囲温度から 90 の間の温度にて印加されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記高い圧力は周期的に反復されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記高い圧力は、ミリ秒の範囲の頻度で周期的に反復されることを特徴とする請求項 7 2 30 に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記高い圧力は、秒の範囲の頻度で周期的に反復されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記高い圧力は、分の範囲の頻度で周期的に反復されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記試料の調製の後あるいはその一環として、試料を分析することをさらに含むことを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

生物試料から特定の物質を抽出することをさらに含むことを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記試料中の DNA、RNA、もしくは少なくとも 1 つの細胞タンパク質が、前記試料調製の後またはその一環として単離されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記試料調製の後またはその一環として、生物試料から薬学的組成物が単離されることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 8 0】

生物試料からの存在する特定の物質を加工処理することをさらに含む請求項 5 3 に記載の 50

方法。

【請求項 8 1】

加工処理工程は、特定の物質の増幅、リガンドへの特異的結合、リガンドからの特異的溶出、化学反応の実施、1つ以上の酵素反応の実施、1つ以上の核酸配列決定反応の実施、封入体からの組み換えタンパク質の可溶化、および1つ以上の触媒反応の実施からなる群より選択されることを特徴とする請求項80に記載の方法。

【請求項 8 2】

増幅はポリメラーゼ連鎖反応を用いて行われることを特徴とする請求項81に記載の方法。

【請求項 8 3】

化学反応は、核酸ハイブリダイゼーションを含むことを特徴とする請求項81に記載の方法。

【請求項 8 4】

化学反応は抗原と抗体とを相互作用させることを含むことを特徴とする請求項81に記載の方法。

【請求項 8 5】

加工処理は、段階的反応を実施することからなり、デバイスの各チャンバ内で異なる工程が起こることを特徴とする請求項80に記載の方法。

【請求項 8 6】

請求項1に記載の複数デバイスは、前記圧力調節装置内で互いに連結されていることを特徴とする請求項53に記載の方法。

【請求項 8 7】

請求項1に記載の8~12個のデバイスが互いに連結されて、細長い列を形成していることを特徴とする請求項86に記載の方法。

【請求項 8 8】

請求項1に記載の複数のデバイスが互いに連結されて、デバイスの2次元マトリクスを形成していることを特徴とする請求項86に記載の方法。

【請求項 8 9】

試薬を含む1つ以上のチャンバが、試料を収容したチャンバを環状に囲み、前記試薬は圧力によって作動されるバルブを介して試料に導入されることを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 9 0】

チャンバの少なくとも1つは、試料の加工処理の間にチャンバに電流を通過させることのできる電極を備えることを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 9 1】

デバイスの端部にキャップをさらに含むことを特徴とする請求項1に記載のデバイス。

【請求項 9 2】

キャップは、ネジ込み機械的インターロックまたはネジ付機構によってデバイスの端部においてチャンバに連結されることを特徴とする請求項91に記載のデバイス。

【請求項 9 3】

キャップは、穿刺、溶媒和、融解、破壊および機械的除去の機構のうちの任意の1つまたは組み合わせによって除去可能であることを特徴とする請求項91に記載のデバイス。

【請求項 9 4】

デバイスの端部のチャンバは壁を備え、キャップは、該キャップがチャンバに連結されている際に壁と接触する1つ以上の環状封止材をさらに含むことを特徴とする請求項92に記載のデバイス。

【請求項 9 5】

デバイスに高い圧力をかける前に、試料を保存するのに適した温度で試料を保存するに必要な時間だけ、試料をデバイス中に維持しておくことをさらに含む請求項53に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 6】

デバイスに高い圧力をかけた後に、試料を保存するのに適した温度で試料を保存するに必要な時間だけ、試料をデバイス中に維持しておくことをさらに含む請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 9 7】

検出モジュールは、照度計、蛍光計、光量計、分光光度計、イオン化検出器、流量計、シンチレーションカウンター、およびカメラからなる群より選択されることを特徴とする請求項 5 0 に記載のデバイス。

【請求項 9 8】

チャンバの少なくとも 1 つが $5\text{ }0\text{ }0 \mu\text{L}$ までの容積を有することを特徴とする請求項 1 に記載のデバイス。 10

【請求項 9 9】

生物試料の大きさが $1\text{. }0\text{ mg} \sim 1\text{. }0\text{ mg}$ であることを特徴とする請求項 5 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、一般には、随意で試料由来の材料の分析および／または検出を伴う、生物試料の調製（例えば、均質化）および加工処理（processing）のための方法およびマルチチャンバデバイスの分野に関する。個々の実施形態は、バイオテクノロジー、医学的診断、農業、食品、科学検査、薬学、環境学および獣医学における用途を有する。 20

【背景技術】**【0 0 0 2】**

生物試料はその単離後に処理工程や分析にかけられることが多い。このような試料の加工処理には、典型的には、生物組織の均質化、細胞の溶解、固体粒子の懸濁または可溶化、および固体材料の液化のうちの 1 つ以上が含まれる。また試料調製には、長時間にわたる酵素的消化、過酷な化学薬品、および／または機械的破碎を伴うことが多い。この最初の調製に続いて、試料は、試料中の核酸および／またはタンパク質などの目的の特定の分子を精製または增幅するために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはゲル電気泳動などの技術を用いてさらなる加工処理にかけることもできる。加工処理後、試料は典型的には分析および／または検出の工程にかけられる。 30

【0 0 0 3】

植物および動物の組織、ならびに強靭な細胞壁を有する例はある種のマイコバクテリアなどの細菌に分子的技術を応用する場合、ある困難に直面することがある。このような試料から生物分子を抽出するための現行の方法は、複数の工程を用いた複雑な加工処理を必要とするために限界があり、非常な時間と労力、ならびに費用を要することもある。細菌または組織の加工処理は、例えば、リゾチームまたはプロテイナーゼ K などの酵素による長時間にわたる前処理またはガラスピーブルを用いた粉碎を必要とする場合もある。細胞や組織によっては、乳棒と乳鉢、ビーズミル、ロータ・ステータホモジナイザー、ブレードブレンダ、超音波破碎機、粉碎機、乳鉢とチューブグラインダー、肉ひき機、Polytron（登録商標）、またはフレンチプレス（登録商標）などの道具を必要とする、さらなる機械的破碎が必要とされることも多い。例えば、組み換え細菌構築物の高レベル発現によって生産されるような、不溶性（封入体）タンパク質の調製や抽出のためには、長時間にわたる加工処理工程が要求される。 40

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0 0 0 4】**

試料の生物学的特性の分析では、核酸、タンパク質、抗体、因子または該試料から抽出される活性を検出するなどの、さらなる加工処理が必要になることがある。このようなさらなる加工処理は、核酸と特異的なプライマーまたはプローブとのハイブリダイゼーション 50

、増幅、および特異的シグナルの検出などのさらに別の工程を必要とすることがある。タンパク質または抗体活性の分析のためには、特異的リガンドへの結合または該リガンドからの溶離、抗原抗体反応性、または他の「加工処理」システムが、所望の生成物の同定および／または精製のために必要とされることもある。生物活性試験は、抽出物を酵素および／または補因子のカスケードとともにインキュベートして、検出可能な生成物を生成させることを含んでいてもよい。これらの分子を遊離するための緩和でありながらも効率的な方法が望まれている。

【0005】

プロセス全体を簡略化し、広範な標本タイプにわたって方法を標準化し、自動化しやすく、試料成分、特に生体分子の分解を制限するように設計された装置および手法を用いて、生物試料を調製、加工処理および分析することが非常に望ましい。
10

【0006】

試料調製工程の簡略化または自動化によって、時間と費用を節約することができ、例えば、試料の手動操作の減少により、分析技術からより信頼性のある出力が得られるようになる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、自動化しやすく、所望のプロセスのうちの少なくとも1つが高圧を用いて実施されるようなマルチチャンバデバイスのチャンバ内で、様々な精製および／または分析工程を実施することを可能にする。
20

【0008】

本発明は、貫通可能および／または多孔性バリアによって分離された複数のチャンバを有するデバイス内の試料に、周期的圧力、可変温度、またはその両方を与えることにより、生物試料を制御および自動化された方法で処理することが可能になるという発見に少なくとも部分的に基づいている。この新しいデバイスは液体試料とともに使用するのに適しているが、同様にして、植物全体または動物組織などの固体または半固体試料、およびガス状試料とともに使用することもできる。

【0009】

新規のデバイスおよび方法は試料を装入および装出すための単純な形式を提供し、上記方法は一般的に自動化が可能でなくとも、組織試料を効果的に分断化、均質化、加工処理することができる。本方法およびデバイスでは、試料が一般的に連続して処理されるため、試料および試薬の移送の必要性が軽減される。本発明の1つの実施形態において、組織の大きな塊はまず最初により小さい小片に分断化された後、完全に均質化されるが、試料のさらなる加工処理前に、標的とする生体分子が容認できないほど分解されることはない。核酸やタンパク質などの生体分子の遊離は効率的であり、これらの分子の機能（例えば溶解物中）はよく維持されている。試料を均質化して、生体分子を遊離させた後、試料は、典型的にはマルチチャンバデバイスの後続のチャンバに押込まれた後に、さらなる加工処理を受ける。試料のさらなる加工処理としては、特に限定されないが、以下の工程の1つまたは組み合わせが挙げられる。クロマトグラフィー、固相捕捉、またはゲル電気泳動による精製；酵素的加工処理；生体分子の増幅（例えばPCR）；タンパク質相互作用の加工処理および／または検出；化学的修飾；基質ラベリング；基質の可溶化；および基質検出。
30
40

【0010】

本方法の均質化の態様は、高静水圧サイクル技術（「PCT」）と連結して容易に用いられる。生物試料の分析にPCT技術を使用することは、以下の文献中など、他所に一般的に記載されている。下記の文献は、引用によりその全体が本願に組み込まれる。ローハーン・ジュニア（L a u g h a r n , J r . ）らの米国特許第6,111,096号；ローハーン・ジュニアらの米国特許第6,120,985号；ヘス（H e s s ），Rとローハーン・ジュニアらの米国特許第6,127,534号；ヘス，Rとローハーン・ジュニアの米国特許第6,245,506号；ローハーン・ジュニアらの米国特許第6,258,50

534号；ローハーン・ジュニアらの米国特許第6,270,723号；ローハーン・ジュニアらの米国特許第6,274,726号および国際出願国際公開第99/22868号。試料に与えられる物理的变化としては、固体または他の物質がスクリーンを通過する際の、例えば、圧力による相変化、高圧下における体積変化および、均質化などが挙げられる。このようなプロセスは、自動化に容易に適用可能である。

【0011】

1つの実施形態において、本発明は、圧力調節装置において用いるための試料調製デバイスを特徴とする。このデバイスは、複数のチャンバと、2つのチャンバ間に配置された少なくとも1つのバリアと、少なくとも1つの加圧部材であって、試料を高圧に供して少なくとも1つのバリアに試料を強制通過させるように配置されたラムなどの加圧部材とを含む。バリアは、多孔性または貫通可能性（例えば隔壁）のいずれであってもよく、あるいは、物理的、化学的または機械的刺激に暴露することにより多孔性または貫通可能にするようにしてもよい。チャンバのうちの1つ以上を単一の一体化成形されたデバイスの一部としてもよい。

【0012】

いくつかの場合において、スクリーンまたはシュレッダなどのバリアを、第1のチャンバと第2のチャンバとの間に配置して、バリア内の開口部が第1のチャンバと第2のチャンバとの間の材料（例えば、固体、半固体、液体または気体）の連通を可能にすることによってもよい。

【0013】

他の場合において、前記デバイスは、各チャンバ間に配置された複数のバリアを有する3つ以上のチャンバを含んでいてもよい。バリアのうちの少なくとも1つを、多孔性または貫通可能なものとしてもよいし、あるいは物理的、化学的または機械的刺激に暴露することによって多孔性または貫通可能なものとしてもよい。このデバイスは、それぞれ独立して、例えば異なる静水圧で作動させることのできる2つ以上の加圧部材をさらに含んでいてもよい。少なくとも1つの加圧部材、例えばラムは、試料を高圧に供して、該試料を少なくとも1つのバリアを強制通過させる位置に配置されている。チャンバのうちの2つ以上をネジ込み機械的インターロックまたはネジ付機構によって互いに連結することもできる。

【0014】

チャンバはプラスチック、ゴム、セラミック、金属またはガラス、あるいはこれらの材料の任意の組み合わせで作成することができる。例えば、チャンバの最大容量は、約100μL、約500μL、約1mL、約100mL、あるいは約500mLとすることができます。1つ以上のチャンバの表面を、生体分子に対して不活性化してもよい。1つ以上のチャンバの表面を、生体分子または薬学的有効成分または金属キレート剤などの小さい有機分子を用いて、共有結合、イオン相互作用、または非特異的吸着を介して誘導化（derivate）することもできる。いくつかの場合において、少なくとも1つのバリアは穿刺可能（すなわち鋭利な物を用いて穿孔可能）であり、少なくとも1つのバリアは有機溶媒に溶解可能であり（例えば、テトラヒドロフランまたは酢酸エチルによって溶解可能なポリ（メタクリル酸メチル）バリア）、少なくとも1つのバリアは機械的に除去可能であり（例えば、ラムまたは他のデバイスの作用によって）、少なくとも1つのバリアは温度変化を介して除去可能であり（例えば、ワックスバリアは加熱によって溶解させることができ、低融点ポリマーで閉塞された多孔性セラミックバリアは、加熱によって多孔性にすることができる）、少なくとも1つのバリアはバルブ（例えば、一方向弁）を含んでいてもよく、あるいは少なくとも1つのバリアは以下の機構のいずれか1つまたは組み合せによって除去することができる。上記機構としては、穿刺、溶媒和、融解、破壊、および機械的除去（例えば、ネジを外す、こじ開ける）が挙げられる。バリアは、ポリマー、金属、またはセラミックから作成することができる。バリアは、複合固体材料または固体材料の層（例えば、砂やシリカゲル）から構成することもできる。バリアは、精製または分析のために所望の基質を捕捉または除外するためのフィルタを含んでいてもよい。フ

イルタは、塩化ポリビニル、ポリエーテルスルфон、ナイロン、ニトロセルロース、セルロースエステル、酢酸セルロース、硝酸セルロース、ポリフルオロエチレン（PFTA）、ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネートまたは他の材料から作成することができる。バリアは、例えば、複数の開口部を有していてもよく、該開口部は、例えば円形であってもよく、約1μm～約3cm（例えば、約1μm～約100μm、約0.1mm～1mm、約1mm～1cm、約1cm～3cm、または前記範囲または中間範囲の任意の組み合わせ）の直径を有していてもよい。バリアは、例えばポリマー、金属またはセラミックからなる複数の固体の尖った凸部を含んでいてもよい。尖った凸部は、例えば、ピラミッドまたは円錐形状とすることができます、例えば、スクリーンの基部の上方に、約0.01～3cm（例えば、0.01cm、0.1cm、0.2cm、0.5cm、0.8cm、1cm、1.5cm、2cm、2.5cm、または3cm、あるいは任意の中間範囲）延びるものであってよい。10

【0015】

加圧部材は、例えば、チャンバに関して相対移動するように取り付けられ、例えばポリマー、金属またはセラミックからなるものであってよい、少なくとも1つのラムを含むもの（もしくはそれ自体）であってよい。加圧部材は、例えば、円形の断面（例えば部材は円柱または円錐状であってもよい）を有していてもよい。チャンバは、例えば、壁を含んでいてもよく、加圧部材は、該加圧部材が移動する際に前記壁と接触する1つ以上の環状封止材（例えば、ゴムまたはテフロンリング）を含んでいてもよい。封止材は、例えば、高分子、金属またはセラミック材料から作成することができます。加圧部材は、例えば、その周囲に封止リングを有するシリンダであってもよく、その場合チャンバは略円筒状とすることができます。いくつかの場合において、デバイスは、一方はバリアの第1の側に配置され、他方はバリアの第1の側と対向する第2の側に配置される、少なくとも2つの加圧部材を含んでいてもよい。2つ以上のチャンバに加圧部材を取り付けてよい（図15）。20

【0016】

デバイスは、オリフィスを有する容器を含んでいてもよく、この場合チャンバはオリフィス内に配置することができます。1つ以上のチャンバを流体で充填してもよい。また1つ以上のチャンバは、温度制御デバイス、温度サイクルデバイス、圧力制御デバイス、圧力サイクルデバイス、または適当なセンサを含んでいてもよい。30

【0017】

またデバイスの複数のチャンバは、随意で圧力調節装置内で相互接続されていてもよい。いくつかの場合において、多数のデバイス（例えば、2, 3, 4, 6, 8, 10, 12またはそれ以上のデバイス）を細長い列を形成するように相互接続してもよいし、あるいは2次元マトリクス（例えば、8×12, 4×4, 2×2, 4×6または3×5）を形成するように相互接続してもよい。

【0018】

いくつかの場合において、試薬を収容した1つ以上のチャンバが、試料を収容するチャンバを環状に包囲するようにしてよく、この場合、圧力によって作動されるバルブを介して試薬を試料に導入することができる。40

【0019】

チャンバのうちの少なくとも1つは、試料の加工処理の間にチャンバに電流を通過させる電極を備えていてもよい。

他の実施形態において、本発明は、圧力調節装置において使用するための試料加工処理デバイスを特徴とする。このデバイスは、垂直配置で配置された複数のチャンバと、チャンバ対間に配置された複数の一時的バリアと、バリアに試料を強制通過させるように配置された加圧部材とを含んでいる（図14を参照）。随意で、このデバイスは第1のチャンバと第2のチャンバの間に配置された多孔性バリアを含んでいてもよい。

【0020】

さらに別の実施形態において、本発明は、生物試料の加工処理方法を特徴とする。この方50

法は、上述のようなデバイスを提供することと、試料を該デバイスの第1のチャンバに添加することと、該デバイスを高圧力（例えば、少なくとも約690kPa（100psi）、約1724kPa（250psi）、約3,448kPa（500psi）、約5,171kPa（750psi）、約6,895kPa（1,000psi）、約34,475kPa（5,000psi）、約68,950kPa（10,000psi）、約137,900kPa（20,000psi）、約206,850kPa（30,000psi）、約275,800kPa（40,000psi）、約344,750kPa（50,000psi）、約413,700kPa（60,000psi）、約482,650kPa（70,000psi）、約551,600kPa（80,000psi）、約620,550kPa（90,000psi）、約689,500kPa（100,000psi）、あるいはそれ以上）に供して、加圧部材が、試料を強制的に第1のチャンバと第2のチャンバの間のバリアを通過させて第2のチャンバに流入させるようにすることを含む。
10

【0021】

試料は、例えば、加圧部材によって複数のバリアを強制通過されるようにしてもよい。生物試料としては、例えば、固体材料、半固体材料、および／または液体が挙げられる。特定の実施形態において、生物試料としては、例えば、昆虫または小動物、真菌、植物または動物組織、食品または農産物、科学検査試料、ヒト組織（筋肉、腫瘍または臓器など）、血清、唾液、血液または尿が挙げられる。生物試料は随意で凍結されていてもよい。生物試料の大きさは、例えば、約0.1mg～500g（例えば、0.1mg～1.0mg、1.0mg～10mg、10mg～100mg、100mg～1g、1g～20g、20g～100g、100g～200g、200g～500g）とすることができる。
20

【0022】

高圧力は、例えば、周囲温度または周囲温度より高い温度もしくは低い温度にて、印加することができる。そのような温度としては、例えば、周囲温度、その温度を下回ると大気圧下で試料が凍結するような温度（すなわち、試料の大気圧凍結温度）、試料の大気圧凍結温度から約4まで範囲の温度、4から周囲温度の間の温度、周囲温度から90の間の温度、あるいはそれ以上（例えば、-80、-40、-20、0、4、10、15、20、25、30、37、40、50、60、70、80、90、100、あるいはそれ以上）が挙げられる。
30

【0023】

高圧力は、（例えば、ミリ秒の範囲の頻度で（すなわち、1～10,000Hz）、秒の範囲の頻度で（すなわち、0.01～1Hz）、分の範囲の頻度で（すなわち、0.1～10mHz）周期的に反復することもできる。

【0024】

本方法は、試料の調製後または試料の調製の一環として、試料を分析する工程と、生物試料から特定の物質を抽出する工程と、および／または、生物試料からの特定の物質を加工処理する工程とをさらに含んでいてもよい。例えば、試料中のDNA、RNA、タンパク質または薬学的組成物（例えば、薬学的に活性な分子、天然の生成物、薬物、または薬物代謝物）は、試料調製の後またはその一環として単離してもよく、および／または、試料の一部（例えば核酸）を増幅させ（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）またはリガーゼ連鎖反応（LCR）を用いて）、リガンドに結合させ、リガンドから溶離させ、配列決定するか、ハイブリダイズさせてもよく、および／または、試料の一部を、特に限定されないが、抗原抗体反応、酵素反応、触媒反応、またはデバイスの各チャンバ内で異なる工程が起こる段階的反応などを含む化学反応に供してもよい。
40

【0025】

特に明記しない限り、本明細書中で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されている意味を有する。本明細書に記載したものと類似または同等の方法および材料を、本発明の実施または試験において用いることができるが、適切な方法および材料については以下に記載する。本明細書中で述べたすべ
50

ての出版物、特許出願、特許、および他の引例は、その全体が引用により本願に組み込まれる。抵触の場合には、定義を含めた本明細書が支配することになる。さらに、材料、方法および実施例は説明のためのものにすぎず、限定することを意図していない。

【0026】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細を、添付の図面および以下の記載のなかに挙げる。本発明の他の特徴、目的および利点は、説明および図面から、ならびに請求項から明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

様々な図面中で用いる同様の参照符号は、同様の要素を示している。

10

圧力駆動式細胞溶解方法は、米国特許第6,111,096号に記載されており、この特許の全体を引用により本願に組み込む。本発明は、高圧に供することのできる1つ以上の浸透性または貫通可能なバリアによって分割された複数の区画（すなわち、チャンバ）を有するデバイスを特徴とする。本発明は、試料を均質化することにより、またいくつかの実施形態においては試料をさらなる加工処理または分析に供することにより、有機試料または無機試料を調製するために用いられる。この新規のデバイスは、とりわけ、試料の回収、輸送、加工処理、および／または保存、ならびに有機体（organisms）の生育のために用いることができる。

【0028】

本特許出願の1つの実施形態において、本発明は、圧力調節装置に挿入されるデバイスを特徴とする。デバイスの基本成分としては、複数の区画／チャンバと、区画を分割する1つ以上のバリアと、キャップと、1つ以上の加圧部材（例えばラム）が挙げられる。

20

【0029】

個々の区画中で行う加工処理と試料の大きさのどちらにも適した容量を有する様々な容積の区画を具現することができる。容量は典型的には、25マイクロリットル～1リットルの範囲、あるいはそれ以上（例えば、25μL、50μL、100μL、250μL、500μL、1mL、2mL、5mL、10mL、15mL、20mL、25mL、30mL、40mL、50mL、75mL、100mL、250mL、500mL、750mL、または1L、あるいは中間の容積）である。区画は、デバイス内において垂直配置または水平配置のいずれか、あるいはその組み合わせで配置することができる。さらに、デバイスの区画は、一体物に形成してもよいし、あるいは、例えば96ウェル形式に配置してモジュール式に連結してもよい。

30

【0030】

いくつかの実施形態において、本発明は、半固体状または固体状の組織などの生物試料を調製、特に均質化し、全組織から微細に刻まれた組織またはスラリーを生成するための、スクリーンやシュレッダなどの少なくとも1つの多孔性バリアを特徴とする。本発明のこの均質化の態様は、試料をまず最初に分断化し、続いて均質化するという2つの基本的なプロセスのいずれか一方または両方を含んでいる。必要であれば、均質化された試料を除去する必要なく、そのままデバイス内でさらに加工処理することもできる。最初の均質化／加工処理は、例えば酵素、界面活性剤、変性剤またはカオトロピック塩などを用いた標準的な抽出または分析手順と組み合わせることもできる。

40

【0031】

本発明において用いる多孔性バリアは、ポリマー、金属、ガラスまたはセラミックなどの固体材料から作成することができる。オリフィスは、固体試料の分断化を容易にするための鋭いエッジを含んでいてもよい。加圧部材は、デバイス内部の試料と外側の加圧媒体との間の効果的な遮蔽物として作用しながら、バリアの一方側から他方側に試料を送達する1つ以上の封止材を有するピストンとして機能することができる。このプロセスを一次分断化という。圧力を周期的に印加することにより、一次分断化プロセスが反復されて、均質なスラリーが得られる。

【0032】

50

本デバイスは、典型的には 10 ミリグラムから少なくとも 15 グラムまでの様々な量の標本を分析用途のために加工処理することができ、調製作業のために大規模化することもできる。一次分断化において印加される圧力は、約 68,950 kPa (10,000 psi) ~ 約 344,750 kPa (50,000 psi) (psi : ポンド / 平方インチ) のオーダーの比較的低いものであってよい。区画の 1 つまたはそれ以上に、所定の容積の適当な溶解、捕捉、または加工処理溶液を予め装入しておくこともできる。多孔性バリア設計の詳細は、一部には使用する溶解 / 捕捉 / 反応流体の体積、および標本、例えば血液、尿、血清、肝臓、脳、骨格筋、植物の葉、幹、根または動物の歯もしくは骨などの性質によって決定される。使用される個々の標本に対する適切なデバイス（すなわち適切なスクリーンまたは多孔性バリア、容器、溶解 / 捕捉 / 試薬流体）が使用され、圧力サイクル条件は、加工処理する試料の大きさの試料特性に対して、および当該試料に対して実施される下流の分析に対して選択される。

10

20

30

【 0033 】

デバイスは、非多孔性の貫通可能バリアによって分割されたさらなる区画を含んでいてよい。これらの区画は、例えば、試料の精製、反応または分析に適した試薬を含有していてよい。1つ以上の区画の表面は、該表面を生体分子に対して不活性にする材料によって被覆されていてもよいし、あるいは、表面は生体分子と相互作用することのできる生体分子または分子で誘導化されて（すなわち、共有結合的に固着またはイオン結合されて）いてもよい。圧力調節装置からの圧力を用いて、試料を連続的に上記さらなる区画中に押し込むことができる。例えば、圧力を継続的に高めて、試料を連続した隣接する区画中に押し込むようにしてよい。圧力の周期的印加により、後続のチャンバ内の試料および試薬は十分に混合される。連続した各区画は、試料を追加の加工処理工程にかけることができる。各デバイスにおいて必要とされる連続する区画の数は、個々の試料に対して要求される加工処理の程度によって異なる。

20

30

【 0034 】

試料を強制的にデバイス内を通過させるために圧力を用いているが、バリアは様々な他の条件下で貫通されるものであってよい。例えば、バリアは、設定温度において崩壊する温度感受性のもの（例えば、ワックスバリア、当初ワックスで孔が塞がれている多孔性セラミックバリア）としてもよい。また、バリアは、溶媒に暴露してバリアを溶液中に溶解させることによって貫通されるものであってもよい。さらに、バリアは、機械的または電子的に除去可能なバルブであってもよい。

30

【 0035 】

適当なバリアと試薬とを選択した後、試料をホルダに装入し、1つ以上の加圧部材（例えばラム）をデバイスの形式によって必要なだけ設置することができる。次にこのデバイスを適当な温度に予め平衡化された圧力サイクル装置の内部に配置する。バリアおよび適当な圧力サイクルプロファイルの選択は、例えば以下に説明する原理に基づいて、標本の要件に応じてカスタマイズすることができる。

40

【 0036 】

本発明のデバイスおよび方法に馴染みやすい加工処理の1つの様式としては、組織試料の機械的分断化が挙げられる。スクリーンに組み込まれた鋭い縁または点の周りに圧力を局在化させる。圧力パルスを印加することにより、試料をスクリーンに（通常は複数の通路で）通過させる。試料と、隣接する区画中の捕捉流体との間の圧力差は小さいため（例えば、一平方インチあたり数百ポンド未満の範囲）、より穏和に組織を処理できるとともに、生物学的構造および活性をより良好に保つことができる。多孔性バリア前後での圧力降下は比較的小さいので、DNA や RNA などの大きい分子は、過酷な機械的剪断力を受けることがない。このプロセスは自動化に適しているとともに、より低い温度で実施することができ（典型的には約 4 の標準的な低温室の温度未満）、核酸分子などの無傷の分子の保持率を高める。

【 0037 】

大抵の液体は、高圧下において部分的に圧縮可能であり、圧力が解放されると膨張する。

50

試料は最初のうち、第1の圧力サイクルプロセスの間、反復してバリア（例えば、シュレッダまたはスクリーン）を強制的に通過させられる。各サイクルで、圧力が解放されると、細碎（macerate）されていない試料は試料装入区画に押し戻されることができる。プロセスの間に、溶解／捕捉溶液は試料に浸透し、組織試料内部の生体分子の遊離と可溶化を助けることができる。

【0038】

もう1つの形の加工処理である均質化もまた、周期的圧力をかけて、大きい多分子構造（細胞膜など）を摂動させてそれらを崩壊に至らしめることにより、達成することができる。この均質化プロセスは、上述の方法または他の方法によってすでに分断化されている材料に対して適用することもできるし、あるいは、細胞破壊にさらに寄与する、液／固（凍結）相変換などの相変換を反復導入することによりスラリーになっている場合もある凍結材料に対して適用することもできる。低温で実施することにより、プロセスの際の生物学的活性の保持を助けることができる。このプロセスは、例えば、半固体試料および固体試料の小断片に適用された場合に特に実用的かつ効果的である。

【0039】

本明細書に記載するPCTプロセスは、上述したものに加えて様々な機構によって細胞の破壊に寄与する。本発明の実用化成功は、その動作のどの特定の理論にも依存したものではない。

【0040】

均質化は、50～90などの比較的高い温度、もしくは、-5、0、4、10、20、25、30、37、または45などの中程度の温度で圧力サイクルを実施することによって達成することができる。脂質や多糖類などの生体分子の溶解性が高温においては高まることがあるため、高温均質化の機構は、低温での機構とは異なる場合もある。生体分子の分解は高温で増大しうる、また高温で高められたプロテアーゼまたはヌクレアーゼの活性がこれをさらに悪化させうるという潜在的な問題がある。それにもかかわらず、高温における高圧力プロセスは、適当な温度および圧力におけるある種の安定なタンパク質、核酸、および他の分子に対しては適切であるか好適であることもある。例えば、過酷な化学物質を用いることなく高収率かつ高品質のRNAを得るためにRNAアーゼを不活性化してもよい。

【0041】

PCT法は、閉じた容器内の試料に対して均一に与えられる静水圧または機械的圧力を使用する。PCTデバイスは、無処理の組織試料を受け入れることができる。バリア（例えばシュレッダ）内の複数の孔およびより大きな径を有する孔により、高い剪断力または開口部間での突然の圧力降下が起こることがなく、そのかわりに、剪断と変性を最小限に抑えながらより穏和かつ制御された様式で材料を通過させることができる。

【0042】

本発明の別の実施形態は、デバイス内への試料の装入とともに生じる空気をチャンバ内に捕捉せることを含む。加圧部材からの圧力が増大すると、この空気は圧縮されて、試料中に溶解させることができる。圧力を迅速に解放すると、空気の体積が迅速に膨張し、これにより試料に破壊効果を導入することができる。

【0043】

この迅速かつ、それでいて穏和なプロセスにより、遊離された分子の完全性と生物学的活性を維持しながら、細胞内容物を効果的に遊離させることができる。この理由のひとつとしては、上記プロセスが界面活性剤、過酷な化学物質または過剰な剪断力を必要としないことがある。あるいは、このデバイスは、生物学的活性の維持と両立可能な場合、あるいは生物学的活性の維持が必要とされないか望まれない場合には、洗剤および他の化学物質とともに使用することもできる。さらに、このプロセスは、細胞および組織中のタンパク質含有量および活性を調べるためにも適している。タンパク質の安定性に寄与する現行の方法の重要な特徴としては、低剪断、迅速溶解および高タンパク質濃度が挙げられる。安定化添加剤、例えばプロテアーゼ阻害剤、グリセロール、DTT、または特異的補因子な

10

20

30

40

50

どをバッファにさらに添加して、所望のタンパク質の完全性をさらに保護するようにしてもよい。多くの酵素、特に単量体タンパク質の酵素の生物学的活性は、処理後も完全に機能したまま残っている。これらのタンパク質は、一次元または二次元ゲル電気泳動、質量分析または酵素活性アッセイによる後続の精製および分析に適している。様々の細胞および組織から生物学的に活性なタンパク質を迅速かつ効率的に単離することができるため、研究において、また医学、薬学およびバイオテクノロジー産業において、非常に広い用途を有することになる。デバイスおよび方法の重要な用途としては特に限定されないが、以下のものが挙げられる。

【0044】

1. 微生物（例えば、大腸菌）中で生産された封入体から、または植物組み換え系からの組み換えタンパク質の遊離および可溶化。10
2. 初期癌発症の組織特異的マーカーのマッピングおよび同定に著しい進歩をもたらすことになる、腫瘍組織（例えば、植物または動物の腫瘍組織）の生検標本からの完全なタンパク質の単離。そのようなマーカーは、特定の癌の型を診断し早期に同定するために用いることができる。

【0045】

3. 脳または他の組織からのプリオンの遊離。
4. 生物組織の研究によって得られたデータに基づいて、薬剤の有効性と安全性を効果的にモニタできる可能性をもつバイオマーカーの同定。

【0046】

5. 様々な薬用植物、真菌、および他の有機体からの迅速なタンパク質の抽出と、癌、感染性および遺伝性疾病に対する潜在的な新しい薬剤の供給源、ならびに他の治療法を見つけるための有機体スクリーニングの容易化。20

【0047】

6. 創薬の初期段階における毒性および動物実験に適したタンパク質量決定の容易化。
7. 本願の別の箇所に記載の供給源（例えば、植物または動物組織などの有機材料、あるいは土壤などの無機材料）からの、鉛もしくは他の重金属、薬剤、農薬、または他の無機もしくは有機化学物質または成分の抽出。このような抽出は、例えば、環境モニタリング、有害物質の放出（例えば、化学物質流出、バイオテロによるもの）または有機体による摂取を追跡するために有用であろう。30

【0048】

- ある実施形態において、デバイスは、均質化された試料をさらに加工処理するさらに別の区画またはチャンバを含んでいてもよい。これらの区画は、互いに隣接して配置されてもよく、試料を強制的にデバイス内の連続するチャンバを通過させながら、試料を連続的に処理するのに適した種々の材料を含んでいてもよい。例えば、区画は、試料を精製するために用いられる様々な結合リガンドまたは固相粒子などの捕捉要素を含んでいてもよい。区画は様々な化学物質を含んでいてもよい。これらの化学物質は、酵素、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）に必要とされる基質、酸または塩基、触媒、および／または試料を加工処理することのできる他の生体分子であってもよい。さらに、区画には、試料の分析のために用いられる標識を装填することもできる。

【0049】

- 区画の表面は、試料と所望の加工処理に適した方法で誘導化することもできる。1つの実施形態において、表面を、該表面を生体分子に対して不活性にする材料で被覆して、その生体分子の付着または吸着を防ぐようにしてもよい。別の実施形態において、表面を、均質化された試料の要素と相互作用することができるか、あるいはそのような要素を捕捉することができる生体分子または薬品（すなわち、小有機化合物）に共有結合させるか、イオン結合させることもできる。

【0050】

- 別の実施形態において、区画の1つ以上が、試料の分析および／または検出を可能にする装置（例えば、光量計）を備えていてもよい。分析の形態としては、特に限定されないが4050

、温度、圧力、放射線、吸光度、蛍光または濁度が挙げられる。

【0051】

本デバイスによって加工処理される材料としては、広範な種類の標本がカバーされる。その例を以下に示す。加工処理できる試料の種類としては、特に限定されないが、血液、血清、科学検査試料、真菌、昆虫、植物組織（例えば、生、凍結、または乾燥状態のいずれであってもよい、花粉、葉、根、花または他の植物部分）、および動物組織（例えば、鳥類、は虫類、魚類、または哺乳類組織、たとえばヒト、ウシ、イヌ、ネコ、ネズミ、ブタの組織など）が挙げられる。組織には生検標本、農作物、または食品も含まれる。

【0052】

要約すると、従来の方法を越える本発明の利点としては、とりわけ以下のものが挙げられる。
10

- ・凍結試料を解凍することなく加工処理することができる。

【0053】

・最小限の手作業で、断片化、均質化および加工処理を一工程にて実施することができる。
。

- ・分析に必要かつ追跡アッセイに適した材料を予めデバイスに装入しておき、溶解プロトコールを特定の生物試料用に合ったものとすることができます。

【0054】

・ミリグラムから数百グラムにわたる柔軟な範囲の試料サイズを扱うことができ、試料を全片とすることもできる。
20

・プロセスを、液体、固体または半固体の組織など、広い範囲の種類の試料に適用することができます。

【0055】

・溶解およびさらなる試料加工処理、および／または分析を、手動操作が不要な自動圧力サイクル装置において実施することができる。
。

- ・酵素消化工程を必要とするような長いインキュベーションを行う必要なく、均質化プロセスを迅速に行える。

【0056】

・プロセスは、自動核酸抽出法（例えば、米国特許第6,111,096号を参照）などの自動分子抽出法、あるいは、より従来的な抽出方法を1つのデバイス内に含むものであってもよい。
30

【0057】

・本方法は、RNAや酵素などの生物分子の完全性が分解から保護され機能性を維持するように、サブゼロ温度（すなわち<0>）において実施することができる。
。

- ・試料を閉じた使い捨て可能なホルダ内で加工処理することができ、標本の交差汚染を防止できる。標本を野外で採集し、加工処理までデバイス内に入れて保存することができ、標本の操作を最小限に抑えることができる。

【0058】

・プロセスを同時または連続加工処理に適応させることができる。
。

- ・デバイスは、例えば、96ウェル形式などのマトリクスにセットすることにより、複数の試料を加工処理するように構成することができる。
40

【0059】

・プロセスは、科学検査、臨床、病理、農学、食品安全、薬学、バイオテクノロジー、および環境分析などの多くの用途に適応させることができる。
。

- ・有機体をデバイス（例えば、培養用または輸送用培地を含むデバイス）内で、培養、加工処理、分析、および／または不活性化することができる。特に重要なのは、潜在的に危険な、もしくは選好性の有機体を扱う場合に、上記方法は、試料の採取／装入から不活性化までの間にデバイスを開けることを必要とするか必要としないかを問わず実施することができ、これにより、このような有機体の取扱いに伴って起こりうる危険を最小限に抑え
50

【0060】

・植物または動物の供給源、または土壤などの無機物質から、全体の、完全な、生育可能な微生物およびその抽出物を抽出することができる。

第1部：2チャンバ均質化モジュール

試料加工処理デバイスに対する1つの設計として、図1に示すような2チャンバモジュールがある。この設計は、その構成要素として、ラム（A）である加圧部材と、2つのチャンバを有する区画（B）と、シュレッダスクリーンまたは多孔性バリアのいずれであってもよいバリア（D）と、キャップ（F）とを有している。別の設計において、このデバイスはOリングを有した第2の加圧部材（例えばラム）（図2）を有していてもよい。この均質化モジュールは、米国特許第6,111,096号の4~9頁、29~44頁ならびに図1および4に記載されているような、圧力サイクル装置内に嵌合するように構成されている。10

【0061】

試料を装入する前に、オプションの第2ラムをモジュール内に挿入してもよい。モジュールを直立させた状態で、所定体積の捕捉流体を添加し、バリア（例えばスクリーン）を上部から挿入するとよい。圧力サイクル装置の圧力区画と、モジュールとは、随意で-20

または-30などの所定温度に予め冷却しておいてもよい。そして試料を試料チャンバ内に配置するとよい。上側の加圧部材をモジュール本体内の試料の上方に配置する。そしてモジュールを圧力サイクル装置の区画内に配置して、ここで該モジュールを温度平衡化加圧流体内に浸漬する。その後、圧力区画を封止する。20

【0062】

チャンバ内の圧力が増大されると、モジュール内の加圧部材が第1のチャンバのモジュールの内部に向かって移動し、試料をバリア（例えばシュレッダスクリーン）内のオリフィスを介して第2の試料捕捉チャンバ内に押しやり、ここで、試料が捕捉流体と混合される。上記のプロセスにおいて、上部加圧部材と捕捉流体との間の空気は、液体に溶解されるようにもよい。スクリーンに向かって移動する加圧部材によって組織試料が加圧されると、組織と捕捉流体との混合液の体積は、例えば、大気圧下において全体積の約85~90%まで減少する。圧力が減少されると、組織/捕捉流体混合液と閉じ込められた空気が膨張し、上部加圧部材を押し戻し、混合物をスクリーンを介して後退させる。チャンバ内の圧力が周期的に変えられることにより、圧力サイクルと加圧部材の移動との組み合わせによって、溶液を繰り返しスクリーンを通過させることができ、これにより細胞と組織の物理的崩壊がより効果的に進む。30

【0063】

加圧部材は、モジュール本体内に配置された試料に対して最大圧力を送るよう設計することもできる。加圧部材は、金属（例えば、チタン、ステンレス鋼、アルミニウム）、プラスチック（例えば、ポリプロピレン、ポリエチレンスルフィド、ガラス強化PEI樹脂などの熱可塑物質）、ガラス、石、セラミック材料などの固い材料から作成することができる。接触点における加圧部材またはバリアの表面は、例えば、鋭利な点または縁を組み込むことにより、試料の崩壊をさらに補助するよう設計することもできる。加圧部材の円筒形の壁は、加圧部材とモジュールの内壁の間を封止して試料をモジュールの内区画内に閉じ込めておくことのできる、1つ以上のOリングを組み込んだものとしてもよい。いくつかの構成に対しては、加圧部材は、試料とは反対側の表面上に、モジュールへの該加圧部材の挿入または除去を容易にするためのハンドルまたはループを組み込んだものであってもよい。加圧部材は、均質化プロセスの間に内部に高圧力を伝達するようにモジュール本体内で自在に移動できるように設計してもよいし、試料と加圧流体の間の効果的バリアとして機能するような特徴（例えば、封止材）を組み込んだものであってもよい。40

【0064】

モジュール本体は、加圧部材が試料材料を推進してシュレッダスクリーン/多孔性バリアを通過させるように設計することも可能である。モジュール本体は、例えば、金属（例えば、チタン、ステンレス鋼、アルミニウム）、プラスチック（例えば、ポリプロピレン、50

p - フェニレンスルフィド、ガラス強化 P E I 樹脂などの熱可塑物質)、ガラス、石、セラミック材料などの剛性、または半剛性の材料から作成することができる。モジュール本体は、均質化プロセスの間にモジュール本体内の適切な圧力を維持できるように、加圧部材およびキャップと連結して設計することもできる。

【 0 0 6 5 】

加圧部材が自在に移動できることにより、区画内部の静水圧を試料チャンバの内部に伝達することができるようになる。モジュールの内外で圧力平衡を維持することができ、モジュール材料そのものは、圧力平衡に達する前の均質化モジュールの内外の小さな圧力差に対して安定なものとすればよい。このようにして、モジュールの一体性を維持できる。モジュールは、流体がそれぞれの圧力サイクルでバリアを通過することができるように、隙間にに対する適當な比率の試料および捕捉流体容積を収容するように設計される。10

【 0 0 6 6 】

バリア(例えば、スクリーン)は、試料を多孔性バリアの所定のオリフィスを通過させる際に、該試料の均質化をさらに支援するように設計することもできる。孔の大きさと数に関して、オリフィスの設計は、試料の種類、大きさおよび均質化プロセスの要件に応じて変えることができる。バリア、スクリーンは、試料を可溶化するのに適した、金属(例えば、チタン、ステンレス鋼、アルミニウム)、プラスチック(例えば、ポリプロピレン、p - フェニレンスルフィド、ガラス強化 P E I 樹脂などの熱可塑物質)、ガラス、石、セラミック材料から作成することができる。さらに、バリアはフィルタを含んでいてもよい。バリア上の試料との接触点は、適切な表面特徴、例えば鋭利な点または縁、あるいはオリフィス構造を組み込むことにより、試料の均質化を助けるように設計することもできる。バリアは、砂、微細ガラスピーブ、炭素、および/または焼結金属の固体マトリクスを含む任意の多孔性材料とすることもできる。バリアは、モジュール本体との一体部分として、あるいはデバイスの2つの区画間の均質化モジュールに挿入される構成要素として設計することもできる。20

【 0 0 6 7 】

キャップは、モジュール本体試料捕捉区画を封止して、均質化プロセス時の圧力維持を助け、加工処理後の試料捕捉区画へのアクセスを可能にするように設計することができる。キャップは、試料を可溶化するのに適した、金属(例えば、チタン、ステンレス鋼、アルミニウム)、プラスチック(例えば、ポリプロピレン、p - フェニレンスルフィド、ガラス強化 P E I 樹脂などの熱可塑物質)、ガラス、石、セラミック材料から作成することができる。キャップには、加圧部材をモジュール本体内に保持するための特徴(例えば、螺旋状のネジ山など)を組み込んでいてもよい。上部加圧部材の上方には、上側キャップを用いてもよい。この上側キャップは加圧流体にアクセスできるようにしてもよいが、加圧部材が圧力サイクルの間中モジュール内に確実に保持されるように設計することができる。30

【 0 0 6 8 】

捕捉流体を随意で含むモジュール全体は、使用者が標本を装入して、上部加圧部材上に置き、ユニットを圧力チャンバ内に挿入するだけでよいように、製造業者によって予め組立てられたものであってもよい。この構成において、デバイスは、P C T 処理後に圧力チャンバから除去される。組織が最初に載置される側の加圧部材を、組織を最初に装入したときの方向とは反対の方向に、組織側を下にしてバリアに対して一気に押し込むとよい。キャップ(および、下部加圧部材が使用されるときには該部材も)は着脱可能で、溶液をピペットで取り出すこともできる。キャップは、操作を最小限に抑え、材料の直接輸送を図るために、バルブを組み込んで、溶液を該バルブを介して回収チューブに滴下できるように設計することもできる。あるいは、キャップの代わりに、デバイスは、該デバイス上に設けられた、ミクロタイタープレートシーラーにおいて用いられるエチレンビニルアセテート(E V A)材料などの穿刺可能な膜と嵌合させてもよい。この膜は、キャップによって定位置に固定して、熱または高周波によってデバイスの壁に融着させることもできるし、あるいは、接着剤または他の機構を介して固定してもよい。加圧部材の移動を制限する4050

ことにより、膜全体にかかる圧力は最小限になり、これによりデバイスの内外での圧力平衡が得られる。PCT処理に続いて、膜を破壊して開けて得られる流体を回収チャンバ内に放出することのできる鋭い穿刺デバイスを含む回収チューブの上方に、デバイスを配置することができる。

【0069】

細胞および組織に加えて、流体（例えば、唾液、粘液、または、ハチミツ、糖蜜やコーンシロップなどの食品）もこのデバイス内で加工処理することができる。本デバイスは、例えば、微生物を殺傷するか、または殺傷せずに、同微生物をバッファまたは培地中に放出させるために、上記流体の粘度を低下させるか、あるいは試料を液化するために用いることができる。例えば、一般には化学物質を用いて液化される唾液は、さらなる分析または他の処理のために結核菌などの微生物を放出するために圧力を用いて、本発明のデバイスにおいて液化することができる。

第2部：加工処理モジュール

新規の試料加工処理デバイスは、随意で、試料のさらなる加工処理を行うための別のチャンバを含んでいてもよい。例えば、デバイスは、「加工処理モジュール」の形態をとるか、これを含んでいてもよい。このような加工処理モジュールに対する設計は典型的には、均質化モジュールに対する設計と同一または非常に類似したものであるが、加工処理モジュール内での試料のさらなる加工処理は、試料をさらに別のバリアを介してさらに別のチャンバに通すことによって達成することができる。例えば、均質化モジュールにおいて記載したような2つのチャンバしか有しないものの代わりに、加工処理モジュールは、均質化された試料の所望の加工処理または分析に必要とされる数の貫通可能バリアによって分離されたチャンバを有していてもよい。試料を加工処理するために用いられる加工処理モジュールのさらに別のチャンバは、典型的には、均質化プロセスにおいて用いた多孔性バリアではなく貫通可能バリアによって分離される。加工処理チャンバの分離により、チャンバ内に含まれる試薬を試料の導入の前に反応しないようにしておくことができる。

【0070】

図14は、チャンバが垂直方向に配置された加工処理モジュールを示している。図15は、チャンバが水平方向に配置された加工処理モジュールを示している。図16は、チャンバが水平、垂直の両方向に配置され、感圧性バリアによって分離されている加工処理モジュールを示している。

【0071】

図18は、チャンバが垂直方向に配置され、下方のチャンバを上方のチャンバおよびバリアに対して放射方向に移動可能として、試料を加工処理によって生じる廃棄物、デブリスおよび不純物から分離できるようにした加工処理モジュールを示している。上側チャンバを除去して所望の産物（例えば、精製された核酸）を回収することができる。加工処理モジュールのすべての操作は、コンピュータによる自動化およびプログラミングが可能である。さらに、デバイス全体は使い捨て可能である。

【0072】

バリアは、高圧に限定されることなく様々な条件下で貫通されるものであってよい。例えば、バリアは、設定温度において破壊する温度感受性のものとしてもよい。バリアは、溶媒に曝してバリアを溶液中に溶解させることによって貫通されるものであってもよい。さらに、バリアは、機械的または電子的のいずれかによって除去されるバルブであってもよい。

【0073】

バリアが貫通されると、加圧部材からの圧力により試料は隣接するチャンバに押し遣られて、当該チャンバ内に含まれる試薬と相互作用できるようになる。試料を後続のチャンバに押し遣るプロセスを続けることにより、試料の段階的加工処理および必要な場合には後続の分析が行われる。デバイス内の区画の性質によって、手動操作を行わずに試料の加工処理が行えるようになる。

第3部：チャンバ試薬

10

20

30

40

50

各チャンバ内の試薬の実体は、当該チャンバ内で行う加工処理によって異なる。

【0074】

例えば、均質化工程において捕捉流体中で用いられる試薬の物理的および化学的性質は、圧力サイクルの均質化効率に影響を与えることができるとともに、分子成分の完全性および安定性を維持することもできる。上述のように、可能な均質化機構のひとつとして、サブゼロ温度における「凍結解凍」効果があり、この効果は捕捉流体の特性に依存するものである。第2に、捕捉流体の組成は対象とする生体分子の遊離および可溶化に対して影響を及ぼす。第3に、捕捉流体の体積は、例えば加圧部材からの過剰な圧力への耐性を与えることにより、モジュールの統合性の維持に關係するため重要である。最後に、捕捉流体は、下流のアッセイと適合できるものでなければならない。

10

【0075】

捕捉流体の例は「実施例」の部に記載する。最も簡単な実施形態において、溶解流体は、水などの低張溶液、あるいは、細胞から出た細胞性材料の可溶化を促進する低塩トリスまたはリン酸バッファである。あるいは、溶解溶液は、下流のアッセイに適合する保存剤または化学物質を含んでいてもよい。捕捉溶液は、試料の破壊を助けるため酵素を含んでいてもよい。あるいは、タンパク質および核酸の完全性を維持するために、捕捉溶液にヌクレアーゼまたはプロテアーゼインヒビターを添加してもよい。リボ核酸の抽出を必要とする用途に対しては、変性剤（たとえば、グアニジン塩および尿素）または界面活性剤（SDSおよびCHAPS）を加えてよい。

20

【0076】

試料の均質化に続いてチャンバ内で用いられる試薬には、幅広い加工処理工程を可能にするのに十分な広範のものが含まれる。例えば、区画には、核酸または疎水性ペプチドなどの試料の特定の要素の分離を可能にする、捕捉要素が含まれていてもよい。試料の分離および/または精製は、クロマトグラフィー試薬、あるいはチャンバ内の電流を介して達成することもできる。

【0077】

1つ以上のチャンバが、有機体を接種して、これを本発明のデバイス内で直接インキュベートすることができるよう、随意で増殖用および/または輸送用培地を含んでいてもよい。このような有機体の例としては、特に限定されないが、細胞、ウィルス、細菌、または寄生虫が挙げられる。例えば、血液細胞および他の動物または植物細胞、HIV、HAV、HBV、HCV、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、結核菌(*Mycobacteria tuberculosis*)、コレラ菌(*Vibrio cholera*)、ペスト菌(*Yersinia pestis*)、サルモネラ(*Salmonella*)、赤痢菌(*Shigella*)、リステリア(*Listeria*)およびプラスモディウム(*Plasmodium*)を本デバイス内で生育させることができる。培地は液体または固体のいずれであってもよく、所与の有機体に対して特異的であってもよいし、非特異的なものであってもよい。適切な培地の例としては、ヒツジ血液寒天(SBA)、トリプチケースソイ寒天(TSA)、またはトリプチケースソイプロス(TSB)(例えば、炭疽菌の培養用)；マッコンキー寒天(例えば、グラム陰性細菌の培養用)；あるいは三糖鉄(TSI)プロスが挙げられる。輸送用培地としては、例えば、Tris EDTA(TE)などの緩衝化溶液が挙げられる。デバイスは、所与の有機体に対して適当な温度で(例えば、炭疽菌に対しては35~37)、集団が検出可能となるのに十分な時間、あるいはPCRにより增幅するのに十分なDNAまたはRT-PCRもしくは他の方法によるRNAの增幅(例えば、続いて検出が行われる)を与えるのに十分な時間インキュベートすることができる。増殖中の有機体をデバイスを開けることなく上述のように加工処理して(そして随意で不活性化して)、試料または環境の混入の機会を制限する。

30

【0078】

チャンバは、核酸抽出に続いてDNAハイブリダイゼーションを行えるような要素を含んでいてもよい。例えば、区画内に含まれる様々な蛍光標識オリゴヌクレオチドへの競合的

40

50

結合によって、DNAはハイブリッド形成することができる。次に、例えば米国特許第6,258,534号に記載されているように、ハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドの結合または解離を高めるために、圧力を印加することもできる。

【0079】

試薬としては、核酸配列の増幅に必要とされるようなもの、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）に用いられるようなものが挙げられる。これらの試薬を含むチャンバにおける圧力サイクルは、これらの反応を高めるために用いることもできる。これらの反応条件には温度サイクルを組み込んでもよい。

【0080】

DNA配列決定は、必要な試薬を有した1つ以上のチャンバ内で行うことができる。この場合も、反応を高めるために圧力サイクル（例えばPCT）を用いることもできる。例えば、高い圧力によってエキソヌクレアーゼ活性を調節して、ヌクレオチドポリマーをヌクレオチドモノマーに分解することもできる。

【0081】

加工処理チャンバ内の試薬は、試料中のタンパク質を加工処理するために用いることもできる。細胞溶解によってタンパク質を遊離させた後、カラムクロマトグラフィーやゲル電気泳動などの技術を用いて試料からタンパク質を精製することもできる。精製は、分子量または、大きさ、疎水性、イオン相互作用、金属キレート性などの物理的または化学的性質、および免疫学的反応性に基づいて行うことができる。圧力および圧力サイクルは、本加工処理の特徴となりうる。

【0082】

さらに、チャンバは、イムノアッセイまたは酵素的アッセイに関する試薬を含んでいてもよい。例えば、分子の会合および/または解離を、チャンバ内の条件を介して、特定の複合体の特異性と親和性とを制御することにより調節することができる。この技術は、免疫学的相互作用だけでなく酵素的相互作用にも適用できる。

第4部：検出モジュール

チャンバの1つを、試料に施された様々な加工処理工程により得られた生成物が発するシグナルの捕捉のための検出モジュールとして用いることができる。この検出モジュールは、モジュール内で発生したシグナルを検出器が読み取るように、検出器に隣接して配置することができる。モジュールは、光または放射線を検出器に向けて通過させる透過性材料で作成することができる。レーザーまたは他のイオン化発生器を検出器の反対側に設置して、検出モジュール内でのシグナル発生を誘起することができる。検出器は、照度計、蛍光計、光量計、分光光度計、イオン化検出器、流量計、シンチレーションカウンター、カメラまたは他の分析機器であってもよい。検出器によって受信されたシグナルは、物理的には電子的に記録器に送られ、試料中の測定する特定の分析物に反応して発生したシグナルの測定値が生成される。これらの測定値を、プリントアウトによって視覚的にあるいは他の手段によって、コンピュータ内に記録することができる。

第5部：細碎しにくい試料に対するシュレッダであるバリア

動物の骨や歯、植物の幹あるいは根などの非常に細碎しにくい（hard-to-macerate）試料には、たいていの場合、粉碎器またはアンビルなどの特別な均質化装置が必要になる。固い試料を均質化するための1つの手法としては、本発明のデバイス内で、鋼鉄や高品質プラスチックなどの剛性の高い材料からなるシュレッダスクリーンであるバリアを用いることがある。場合によっては、貫通穴を有する金属ディスクを用いて通常のプラスチック製溶解ディスクを強化するようにしてもよい。剛性材料からなるバリアの使用に加えて、疑似アンビル型構造または剛性固体材料からなるピラミッドをバリアに組み込んでもよい（例えば、図3Bを参照）。より強いモジュール、圧力部材、およびシュレッダスクリーンであるバリアの使用に加えて、pH2など非常にpHの低い捕捉流体を用いて骨または歯を柔らかくするようにしてもよい。こうした流体はその腐食性のために、通常は手動工程による取扱いが難しいが、PCT均質化について記載したような閉じた

系の中へは簡単に収容することができる。試料のさらなる細碎は、より少ない量の試料を用いることにより、細碎が不完全な場合に行うことができる。しかしながら、これは感度の低下を招くこともある。

第6部：生物試料を溶解するためのシュレッダの代替形式

PCT均質化原理は、組織の破壊と細胞内容物の放出を促進することのできる以下の2つの特徴を組み合わせたものである。すなわち2つの特徴とは、組織材料を物理的に押し遣ってデバイス内の小さな開口部を通過させることは、組織の大きな塊を破壊することに寄与するということ、ならびに、低い温度および圧力サイクルは、試料を繰り返し凍結解凍することになり、細胞破壊にさらに寄与するということである。本デバイスの代替形式は、これらの原理の一方または両方に基づいて設計することができる。種々のモジュールサイズと材料の組み合わせが可能であるとともに、モジュールの崩壊を防ぎ、流体の漏れを防ぎ、均質化効率を高め、試料への容易な接近可能性を与え、複数試料加工処理を容易にし、圧力チャンバへのモジュールの挿入および除去を容易にし、感染性材料を確実に封じ込めるための特徴を備えることが可能な、様々なモジュール構成が想定される。

第7部：96ウェルプレートのための使い捨て可能設計

デバイスは、その規模を拡大または縮小することにより、対応する試料の大きさ、区画の大きさ、および試薬の容積を変えることもできる。さらに、モジュールおよびチャンバの規模は、複数の試料を収容するように調整することもできる。複数の試料のためのキャップの設計は、単一のデバイスのそれとは違ったものとすることができる。最も簡単な構成は、圧縮中に空になる空間に破断なく伸張するのに十分な可撓性を有する封止可能および/または剥離可能な膜のシートの形状であろう。剛性のシート上で繋ぎ合わせられた一連の加圧部材を、96ウェル形式などの個々のウェル中に一斉に押し込むようにすることができる。96個の試料を圧力サイクル装置に嵌合させるために、シュレッダを6つの4×4または3つの4×8ブロックなどの規則的な配列で配置することもでき、このような配置のシュレッダは、容易に圧力チャンバに嵌合し、必要であれば、後続の加工処理のための96ウェル形式と適合するウェル内にそのまま転移することもできる（図13を参照）。

【0083】

図13は、96ウェルプレートの1つのウェルに嵌合している圧力サイクル機器を示している。バリアが2つのチャンバを分割し、加圧部材は加圧部材とチャンバ壁の間のOリングによって封止されている。試料をバリアの上面に載置し、加圧部材によってバリアを強制通過させる。圧力サイクルが終了すると、バリアおよび加圧部材を除去して、第2のチャンバ内の溶液をさらなる加工処理のために移送することができる。このチャンバは、米国特許第6,036,923号に記載されているような圧力サイクル反応器に嵌合させることができる。

【0084】

本デバイスは、スクリーンと加圧部材とをプロセスの終了後に一体物として除去できるように設計することもできる。

より多数の試料を加工処理するために、96ウェル系を用いることもできるが、この場合は、まず試料を溶解した後、別のチャンバまたはウェルに移して洗浄し、ろ液を回収する。あるいは、複数のチャンバを有する使い捨て可能なミクロウェル形式を用いて全抽出プロセスを扱うこともできる。この構成においては、試料を含む最初のチャンバを圧力溶解に供することができる。そしてウェル内のバルブを解放して、試料を洗浄し、廃棄物を除去するようにしてもよい。最後に、核酸回収チャンバに繋がる別のバルブによって、精製された核酸を溶出させるようにしてもよい。プロセス全体を流体交換が最小限ですむ単一の精製モジュール内で達成することができて、理想的である。

【0085】

本デバイスの構成要素の簡略化模式図が図15A～15Fに示されている。図15Aは、試料が第1のチャンバの上半部に装入されているが、圧力は与えられていない状態のマルチチャンバデバイスの図である。図15Bは、マルチチャンバデバイスへの第1回目の圧

力印加の結果を示した図であり、試料が加工処理され、第1のバリアを通過して押し込まれている。図15Cは、さらに圧力を増加させた結果を示しており、試料は水平方向へ押されてチャンバ2に入っている。図15C～図15Fは、圧力の増加に従って、水平方向に互いに連結されたチャンバを通る試料の移動を示した図である。このデバイスは、高度な熟練技術や、有毒または有害な化学物質を手動で扱うことを必要とせず好適である。精製された核酸産物は、増幅、配列決定または他の分析のための他の自動機器と適合可能な96ウェル配置で利用できるようにすることが可能である。

第7部：PCTプロセスによるオンチップ均質化

均質化プロセスはさらに小型化して、核酸または抗原の検出などの特定の実験用途に対する複数の機能を組み込むようにすることもできる。シュレッダスクリーン、加圧部材、捕捉流体、およびホルダは、均質化プロセスの終了時にチップ上の別の場所に抽出された材料を沈積させることのできる一体型使い捨て可能ユニットの一部とすることもできる。その後、チップを分析器に挿入し、ヒートシンクを用いて試料均質化領域の周りの温度を平衡化する。圧力は2つのピストンを介して、一方は加圧部材側から、もう一方はキャップ側から伝達することができる。圧力プロセスは、単一のシュレッダ動作と類似している。圧力は、従来の油圧ポンプを用いるのではなく、電磁ピストンによって発生させることもできる。電磁ピストンを用いる1つの利点は、電磁ピストンはミリ秒などのスケールのより高い頻度で移動可能であることである。圧力プロセスが終了すると直ちに、捕捉流体および／またはPCTプロセスを受けた試料は、例えば「キャップを穿刺する」ことにより、「キャップ」側から抜去することができる。

第8部：使い捨て可能デバイスの設計と製造

デバイスは、試料の調製ならびに個々の細胞および組織の溶解に対しての適性を維持しながらも、例えば高分子材料からなる使い捨て可能なモジュールとすることができる。

【実施例】

【0086】

以下の実施例において本発明についてさらに説明するが、実施例は請求項に記載の本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1：低温における圧力サイクルを用いたラット肝臓試料の溶解

ドライアイス上で急速凍結し、ドライアイス上または-70のいずれかで保存された、新鮮な凍結ラット肝臓の全片をPel-Freez（米国アーカンソー州ロジャーズ所在）より入手した。該凍結組織を、ドライアイスの塊の上で剃刀の刃を用いて、電子秤で計量して約0.20gとなるように裁断した。この裁断手順のあいだ試料は凍結状態に保ち、使用時まで微量遠心管中、-70で保存した。

【0087】

実験に使用したデバイスを、本体と、2つのラムと、ポリプロピレンからなるシュレッダ台とを含めて構成した（図2を参照）。本体は、長さが38.1mm、外径が13.8mm、内径が11.6mm円筒形のチューブとした。チューブの一方端は、キャップを受容するようねじ切りした。キャップを用いて、チューブの端部にラムを封止かつ保持した。ラムは、長さ12.7mm、直径11.5mmの円筒形の部品とした。それぞれのラムには、本体の内面に対して封止されるOリング封止材を設けた。シュレッダ台は、長さ9.53mm、外径11.5mm、内径10.7mmの円筒チューブの形状を有し、その一方端部にはスクリーンを取り付けた。スクリーンは、直径11.5mmのなかに、適当な間隔をおいて直径0.94mmの49個の穴を有するものとした（図3Aを参照）。

【0088】

デバイスは、まず最初に底部ラムを本体のネジ付端部に入れ、底部ラムを本体に保持するようにキャップを締めることにより組立てた。0.7mLの捕捉流体（飽和塩酸グアニジン、1%CHAPS；飽和GTC、0.1%NP40または独自仕様の溶解溶液）を開放端から挿入した。次に、シュレッダ台であるバリアを、穴を有する端部がネジ付端部の反対側にくるように本体の内部に配置した。約0.20gの凍結組織片を本体内のシュレッダ台上に載置した。試料をシュレッダ台の上面に配置したところで、封止リングと本体と

10

20

30

40

50

の間が封止されるように上部ラムを本体に挿入した。

【0089】

圧力サイクルのために、N e s l a b 社の循環冷却器を用いて予め冷却し、-20℃に平衡化しておいた圧力チャンバ(BaroCycler(登録商標)V2.4,米国カリフォルニア州ガーデングローブ所在のB B I S ource S c i e n t i f i c 社により特注)内にモジュールを配置した。シュレッダは試料とともに2分間この温度に平衡化した。試料に約103,425kPa(15ksi)の圧力を印加し、この圧力で20秒間保持し、20秒間大気圧に戻した。圧力の上昇および下降時間は10秒未満とし、上述の保持時間には含めていない。この一連の動作を全部で5回繰り返した。これらの約103,425kPa(15ksi)圧力サイクルに続いて、約241,325kPa(35,000psi)で20秒間と大気圧で20秒間の圧力サイクルをさらに3回繰り返した。すべての圧力サイクルは、プログラムに組み込み、プログラムを実行することにより実施した。最後の圧力サイクルの終了後、シュレッダモジュールを反応チャンバから取り出し、上下反転させた。元々底部にあったキャップとその下の隣接するラムとを除去し、組織のデbrisを含んだ捕捉流体を新しい微量遠心管に移した。試料を7,400×gで1分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移してドライアイス上で維持した。
10

【0090】

粗上清の一部についてはR o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s 社(在イリノイ州インディアナポリス)のP C R 鑄型精製キットによりさらに精製し、上清中の遊離核酸を抽出した。プロテイナーゼKを用いる溶解工程を省略したことを除いては、キットに示されている手順に従った。200μLの試料を、200μLのキット添付の結合バッファと、140μLの二重蒸留水と、100mLイソプロパノールと混合した。溶液をボルテックスにより混合し、h i g h p u r e(登録商標)フィルタ・チューブに移し、8,000r p mで1分間遠心分離した。遠心分離後、フィルタを、500μLの洗浄バッファを用い、もう一度8,000r p mで1分間遠心分離することにより洗浄した。1回目の洗浄の後、この洗浄工程を繰り返し、遠心分離を行った。13,000r p mで10秒間遠心分離することにより、残留している洗浄バッファを除去した。核酸を溶出するために、200μLの予め温めておいた(70℃)の溶出バッファをフィルタ・チューブに加え、8,000r p mで1分間遠心分離した。
20

【0091】

P C T 均質化手順によって遊離された核酸の収率とサイズを推定するために、アガロースゲル分析を、0.5' T B E バッファ中の0.67%アガロースを用い、120Vの一定電圧で、60分間泳動することによって実施した。アガロースゲルは臭化工チジウムで予備染色し、C hemi I m a g e r(登録商標)およびA l p h a E a s e(登録商標)V5.5ソフトウェア(A l p h a I n n o t e c h C o r p , 在カリフォルニア州サンレアンドロ)を用いて撮影した。
30

【0092】

図12は、精製手順を一切実施していない粗溶解物中に存在する全核酸を示したものであり(レーンE1~E7)、試料1(飽和塩酸グアニジン、1%C H A P S)、試料3(飽和G T C, 1%N P 4 0)および試料5(独自仕様の溶解バッファ)は、2×100M Paおよび3×235M Pa、-25℃、20秒高压/20秒大気圧保持の条件によるP C T 組織シュレッダ処理により得たものである。試料2,4および6は、それぞれ試料1,3および5に対する圧力制御を行っていない対照である。試料7は、乳鉢と乳棒で均質化したものである。また図12において、レーンD1~D7およびR1~R7は、R o c h e 社のH i g h P u r e(登録商標)P C R 鑄型キットを用いて抽出し、D N a s e(D1~D7)またはR N a s e(R1~R7)で処理した試料である。これらの結果から、P C T 処理した試料は、アガロースゲルのバンド強度(図12、レーンR1, R3, R5およびR7)または260nmでの吸光度によって判別される、R o c h e M o l e c u l a r キットの場合と同様のゲノムD N A レベルを達成することが分かった。陰性対照は、実験の間に圧力を大気圧に維持したことを除いては、同じ処理を行うことにより得
40

た。

【0093】

図12に示されるように、非加圧対照（レーンD2, R2, D4, R4）と比較すると、PCTシュレッダを用いた場合、大量のゲノムDNA（gDNA；レーンR1, R3）およびリボソームRNA（rRNA；レーンD1, D3）が維持および遊離されていた。gDNAの収率は、本実験において、抽出前に組織を可溶化するためにプロテイナーゼKと4時間プレインキュベーションするRocheのキット手順を用いて得られた陽性対照と比較しても（レーンR2, R4対R7）実際のところ大きかった。

実施例2：組織溶解効率の研究と2チャンバ均質化モジュール設計の向上

モデルとしてラットの肝臓を用い、圧力プロファイル（約103, 425kPa（15kpsi）から約344, 750kPa（50kpsi））、サイクル回数プロファイル（2回から45回）、温度プロファイル（-30から0）、シュレッダオリフィスの数（同一面積に10個から89個）、および様々な捕捉流体（Gdn/1%CHAPS；リン酸緩衝生理食塩水、GTC/1%NP40）について試験を行った。各試験条件に続いて、捕捉流体を新しい微量遠心管に移し、7, 600×gで手短に遠心分離した。上清を回収し新しい微量遠心管に保存した。この上清から市販のキットを用いて核酸を抽出した。DNA収率を分析するために、精製された核酸をRNase処理して、アガロースゲル電気泳動によって分析した。回収した材料をRNase処理してから、0.5×TBEバッファ中、0.8%アガロースで、120Vの一定電圧下で60分間電気泳動した。

【0094】

図4は、圧力サイクルプロファイルの1つを示したものである。ゲル上のgDNAに対するバンド強度のデンシトメトリ走査の積分によって決定された、5サイクルのPCTによって遊離されたgDNAの収率（レーン3）は、2サイクルのPCTによって遊離された収率（レーン2）よりも大きく、Rocheキットを用いた対照方法によって得られたものと同等であった。-25および大気圧下に保持した組織由来の上清を同様に処理して、陰性対照（レーン1）とした。

【0095】

上記の結果から、2チャンバ均質化モジュール処理方法では、長時間にわたる（4時間）プロテイナーゼK消化を必要とすることなく、標準的な方法によって達成されるのと少なくとも同等に組織からの核酸を遊離させうることが実証された。ゲノムDNAの収率は、陽性対照によって得られるものと類似していた。RNAは、リボソームRNAバンドによって判別したところ、よく保存されていた。非加圧対照の1つである図12の試料2に見られた比較的高いバックグラウンドの核酸は、これらの組織試料に対して典型的なものではなく、他の実験においては見られなかった。レーンD7にはRNAバンドが全く見られないが、これはRocheキット手順に明記されているプロテイナーゼKとの長いインキュベーション工程の間に、内在性RNaseが遊離されたあらゆるRNAを効果的に分解したためである。これらの研究に用いられたPCTシュレッダ自体は、比較的压力に安定であり、清浄後に再使用可能であるようである。シュレッダ中で用いられ、PCT条件にかけられたのと同様のプラスチックからなる密閉されたチューブとは異なり、上記モジュールに対しては压力かぶりが全く見られなかつたが、これはおそらくモジュールの内外の圧力がラムの移動によって容易に平衡化されたことによると思われる。

実施例3：ラット脳、脾臓、大腸および骨格筋のPCT均質化

抽出が明らかに困難であるいくつかのさらなる組織について、PCT均質化の有効性も調べた。脳組織はタンパク質および脂質を特に多く含み、通常は水性有機液相抽出において水相中に白色の綿状物質を与える。脾臓はヌクレアーゼ濃度が非常に高く、通常はRNAが分解されてしまい、従来の方法では回収が困難である。大腸および骨格筋は、結合組織成分を有した纖維組織であるため、均質化が難しい。

【0096】

上記組織について、200μLではなく100μLの溶解物をRocheのHigh Purre（登録商標）PCR鑄型キットを用いて抽出したことについては、図12に用いた

10

20

30

40

50

肝臓の場合と同じ実験手順で P C T プロセスを行った。最終溶出液の体積は 6 0 μ L であった。g D N A および r R N A はアガロースゲルによって判定した。図 5 は、大腸および筋肉に対する P C T プロセスの均質化の有効性が、従来のプロテイナーゼ K 法に匹敵することを示している。レーン 1 ~ 5 は、大腸から遊離されたゲノム D N A を含むものである。レーン 6 ~ 1 0 は、骨格筋から遊離されたゲノム D N A を含むものである。レーン 1 , 3 , 6 および 8 は、P C T モジュールを用いて均質化した試料である。レーン 2 , 4 , 7 および 9 は、それぞれレーン 1 , 3 , 6 および 8 に対応する非加圧対照である。レーン 5 および 1 0 は、プロテイナーゼ K を用いた均質化による陽性対照である。レーン 1 , 2 , 6 および 7 は、飽和 G d n / 1 % C H A P S の存在下で加工処理したものである。レーン 3 , 4 , 8 および 9 は、6 M G T C / 1 % N P 4 0 によって加工処理したものである。非加圧対照を除く全ての試料は、粗溶解物からの上清であり、プロテイナーゼ K 処理を除いた R o c h e の H i g h P u r e (登録商標) P C R 鑄型キットを用いて抽出した。

10

【 0 0 9 7 】

P C T 溶解物中に見られるゲノム D N A バンドは増幅させることができ、陽性対照によるものと同一の P C R 産物が產生された(図 6)。図 6 は、C l o n t e c h 社製の アクチンプライマーセットを用いて骨格筋試料から増幅したゲノム D N A の P C R 増幅物を示している。レーン 1 , 2 および 3 は、P C T 処理された鑄型の 1 : 5 、 1 : 2 5 および 1 : 6 2 5 希釀物からの P C R 産物である。レーン 4 , 5 および 6 は、「陽性対照」鑄型の 1 : 5 、 1 : 2 5 および 1 : 6 2 5 希釀物からの P C R 産物である。レーン 7 は、C l o n t e c h 社製の アクチン c D N A 対照を用いた P C R 産物を示している。

20

【 0 0 9 8 】

図 7 は、ラット脳溶解抽出物を示している。レーン 1 , 2 , 6 および 7 は、飽和 G d n / 1 % C H A P S の存在下で加工処理した。レーン 1 および 6 は、P C T 均質化試料からのものである。図 2 および 7 は、非加圧対照からの試料である。レーン 3 , 4 , 8 および 9 は、6 M G T C / 1 % N P 4 0 で処理したものである。レーン 3 および 8 は、圧力処理した試料であり、レーン 4 および 9 は非加圧対照である。レーン 5 および 1 0 は、R o s c h e のキットの「陽性対照」からのものである。レーン 1 ~ 5 は R N a s e で処理したものである。レーン 6 ~ 1 0 は、D N a s e で処理したものである。試料 1 0 はプロテイナーゼ K 工程が原因で R N A を欠如している。

30

【 0 0 9 9 】

P C T 処理した組織または非加圧組織の上清からの R T P C R R N A 鑄型は、プロテイナーゼ K 予備消化工程は省略したが、R o c h e の H i g h P u r e (登録商標) P C R 鑄型キットの手順を用いた抽出により得た。「陽性対照」は、プロテイナーゼ K 消化工程を含む R o c h e の H i g h P u r e T i s s u e (登録商標) R N A の手順を用いて同一の組織標本から作成した。得られた抽出物を、Q I A G E N (登録商標) O n e S t e p R T P C R プロトコールおよび C l o n t e c h 社(在カリフォルニア州パロアルト)から入手した アクチンに対するプライマーを用いた R T P C R に供した。P C T 均質化手順によって遊離された核酸の収率を推定するために、0 . 8 % アガロースを用いてアガロースゲル分析を実施した。この結果、P C T 鑄型から回収された R T P C R 産物が、キット対照に匹敵することが分かった。興味深いことに、対照である R o c h e のキットよりも P C T 法によって、より多くの m R N A が臍臓試料から回収されているようである。図 8 は、ラット脳鑄型からの アクチン R T P C R 産物を示したものである。レーン 1 ~ 3 は、圧力抽出された試料からの物である。レーン 4 ~ 6 は、R o c h e の H i g h P u r e (登録商標) 組織 R N A キットを用いて調製した陽性対照試料からのものである。1 ~ 3 および 4 ~ 6 に対する鑄型の希釀係数は、それぞれ 1 : 5 , 1 : 2 5 および 1 : 6 2 5 とした。レーン 7 は、C l o n t e c h プライマーセット対照を含んでいる。

40

【 0 1 0 0 】

図 9 は、P C T モジュールによって均質化されたラット臍臓を示している。レーン 1 ~ 5 は抽出物中のゲノム D N A を示しており、レーン 6 ~ 1 0 は R o c h e の H i g h P u

50

re (登録商標) Tissue RNA キットを用いて精製した同一の抽出物からの rRNA を示している。試料は図 7 に示したラット脳に対して行ったのと同様にして処理した。臍臓からのレーン a ~ g は、上述のラット脳からの図 8 に記載したレーン 1 ~ 7 と同等であった。

【0101】

図 9 のレーン a 中にシグナルが欠如しているが、おそらくは鋳型中に PCR インヒビタが存在していることが原因であろう。この実験を繰り返したところ、データは同様の結果を示した。最も重要な観察結果は、従来の組織均質化方法によっては特に困難な作業であった、臍臓から mRNA を遊離させて保護することに、PCT 方法が有効であるということである。10

実施例 4：植物組織の均質化：トウモロコシ葉核酸の遊離および PCR 増幅

トウモロコシの葉由来のゲノム DNA、リボソーム RNA およびメッセンジャー RNA の均質化および遊離を実証するために、さらなる実験を行った。核酸をトウモロコシの葉から遊離させる標準的な方法では、剃刀の刃を用いて細分化した後に乳鉢と乳棒を用いて均質化する必要がある。核酸を分解から保護するために、均質化プロセスは典型的には液体窒素の存在下で行われる。次に組織をプロテイナーゼ K とともにインキュベートして核酸を遊離させた後、標準的な抽出方法またはキットを用いたゲノム DNA の抽出を行う。

【0102】

PCT 均質化実験において、7 日間発芽させた後に新鮮なトウモロコシ葉を採集した。0.2 g の新鮮な葉を冷蒸留水で洗浄し、微量遠心管中、-70° で一時的に保存した。本実験のためには、0.7 mL の抽出バッファ (6 M グアニジン / 1% CHAPS; 10 mM Tris C1, pH 8.0, 10 mM EDTA [TE]、または GTC / 1% NP 40) を、シュレッダーモジュールの捕捉区画に添加し、動物組織に対して記載したような PCT 処理に供した。圧力パルスシーケンスは実施例 1 に記載したものと同様である。圧力処理後、捕捉流体を回収し、8,400 × g で 1 分間手短に遠心分離し、デbris を除去した。上清を回収し、アガロースゲル電気泳動によって分析した。20

【0103】

図 10 は、PCT モジュールを用いた DNA の遊離を示したものである。レーン 1 および 2 は、6 M Gdn / 1% CHAPS バッファ中で加工処理した試料を示している。レーン 3 および 4 は、10 mM Tris C1, pH 8.0, 10 mM EDTA [TE] バッファ中で加工処理したものである。レーン 5 および 6 は、GTC / 1% NP 40 バッファ中で加工処理したものである。非加圧試料については、レーン 2, 4 および 6 に示されている。QIAGEN の植物 DNA 抽出キットプロセスをレーン 7 の試料に適用した。図 10 に示したように、トウモロコシからは、抽出前に液体窒素中の乳鉢と乳棒による長時間にわたる粉碎を必要とした QIAGEN (登録商標) の DNeasy Plant Mini (登録商標) キットによって得られたのと同様の量の DNA が得られることが分かった (図 10)。興味深いことに、TE バッファを回収溶液として用いた場合でさえ、相当な量の DNA が回収された。すべての DNA 試料は PCR 反応の鋳型として効率的に働き、乳鉢と乳棒を使って抽出した対照の鋳型の場合と同様の結果を与えた。30

【0104】

これらの例において示された結果から、プロテイナーゼ K による長時間にわたる消化を必要とすることなく、あるいは乳鉢と乳棒を使った均質化を必要とすることなく、PCT 処理を用いて様々な動物や植物組織から核酸を遊離させることができることが証明された。RNA の消化が殆ど観察されることなく、RNA と DNA のいずれも効率的に回収された。界面活性剤を含まないバッファ中 (例えば、TE) でさえ、PCT によって核酸を遊離させることができる。40

【0105】

粗溶解物は、PCR などの下流の加工処理における鋳型として用いるのにも適している。図 11 は、上述のプロセスによって遊離されたトウモロコシ葉 DNA の PCR 増幅を示したものである。プライマーセットがトウモロコシゲノム中の「MTTC」領域を増幅した50

。レーン 1 a ~ 1 c 、 2 a ~ 2 c 、 および 3 a ~ 3 c には、 P C T モジュールによって遊離された試料を含めた。レーン 4 a ~ 4 c には、 陽性対照試料を含めた。レーン 1 a , 2 a , 3 a および 4 a には、 1 : 5 の鑄型濃度のものを含めた。レーン 1 b , 2 b , 3 b および 4 b には、 1 : 25 の鑄型濃度のものを含めた。レーン 1 c , 2 c , 3 c および 4 c には、 1 : 625 の鑄型濃度のものを含めた。これらの結果から、 P C T モジュールを用いて得られた D N A は、「陽性対照」と同一の産物を產生することが実証された。したがって記載の方法は、従来の方法に比べて少ない工程を用いて、はるかに迅速かつ容易に実施することができるとともに、良質の核酸を高収率で与えることができる。

実施例 5 : 圧力と電流によって核酸を精製するためのマルチチャンバデバイス

1 つの構成において、細胞から核酸を遊離させ、それらを精製するために圧力を電界と組み合わせることができる(図 17 A ~ 図 17 B)。図 17 A は抽出モジュールの 7 つの部品と組立体が示されている(例えば、上部キャップ、加圧部材(ラム)、モジュール本体、電極、モジュールの下部に配置されたバリア、および封止部材(O リング)、ならびに底部キャップ)。これらの特徴は断面図でも示されている。図 17 B は、組立モジュールの機能を示している。試料をチャンバ 1 内に配置し、ラムを移動させて「装入」期間のあいだにチャンバ 1 内に試料を送給する。本デバイスは、チャンバ 1 とチャンバ 2 の間に、組織を可溶化するためのバリア(例えば、シュレッダ)も備えている。適当な温度下で周期的圧力をかけた後、細胞の溶解と核酸の遊離が起こる。細胞の溶解に続いて、加圧によって区画間のバリア(シュレッダ)を通過させることにより、溶解物をチャンバ 2 に移送する。圧力駆動凍結解凍効果を誘導するためには温度も重要である。「装入」に続いて、周期的な高圧印加を伴う「溶解 / タンパク質除去」を開始する。電極 E 1 ~ E 2 をオンにし、 15 M P a ~ 75 M P a の間で圧力を周期的に変える。次に、電極 E 3 ~ E 4 を起動した状態で圧力を高くすることにより、「抽出」を開始する。チャンバ 2 において、遊離された核酸は核酸に対する特異的な親和性を有する樹脂に結合することになる。チャンバに電流を印加することにより、核酸が、チャンバ 2 A 内の結合樹脂からチャンバ 2 B 内の電極へと移動する(図 17 B を参照)。チャンバ 2 A からチャンバ 2 B への核酸の移動により、該核酸単離手順にクロマトグラフィーの要素が導入され、圧力と電界の強度を変えることにより、異なるサイズの核酸を分離することができるようになる。試料の性質に応じて、このプロセスは 1 ~ 15 分間かけて行うことができる。電気泳動分離に続き、核酸を回収チャンバであるチャンバ 3 B 中に溶出し、その後このチャンバ 3 B から結合している膜を回収することにより精製核酸を取り出す。細胞溶解と核酸分離の両方を助けることのできる高圧装置(例えば、 B B I 社の Barocycler (登録商標))により、高出力の加工処理と分析の両方が可能になる。反応チャンバは、複数のモジュールを収容するように設計することもできる。

実施例 6 : 圧力および樹脂への結合による核酸の精製

核酸調製モジュールは、一連のチャンバを介した段階的経過による細胞溶解と核酸の精製を可能にする(図 18)。このデバイスは、試料が装入されて細胞溶解を行う上側試料チャンバからなる。このチャンバは、ゴム製ガスケットを有するラムによって外部の圧力流体に対して密閉されている。このチャンバは、多孔性支持体(細胞用)、または多孔性「シュレッダ」を含んでいてもよく、組織の塊をより小さい小片に細分化することを容易にし、圧力下で組織をこれらの多孔に通過させることによって核酸の抽出を促進することができる。キャップまたはラムは、モジュールを封止する役目と、試料に圧力を伝達する役目の両方を果たす。 P C T (高圧サイクル) に続いて、核酸の精製のために、核酸を含む抽出バッファをチャンバ 1 からチャンバ 2 に移送する。核酸は、シリカやイオン交換樹脂などのマトリクス、あるいは Q I A G E N (登録商標) のプラスミド抽出カラムまたは Q I A a m p (登録商標) 抽出カラムなどの市販の試薬に結合させることもできる。区画間の液体の移送は、圧力の印加を介して区画間のバリアを破裂させることにより媒介される。温度または機械的手段を用いることもできる。あるいは、マルチチャンバデバイスに一連のバルブおよびチューブを組み込んで、チャンバから次のチャンバへの試薬の移送だけでなく、流体の追加と除去もできるようにすることができる。

10

20

30

40

50

【0106】

チャンバ2は、核酸と結合するDNA（またはRNA）結合樹脂（例えば、シリカDEAE）を含んでいる。液体入力／出力装置を用いて、デブリスと不純物をチャンバ2中へ洗い流すことができる液体を導入および除去する。次に精製された核酸を回収チャンバ（チャンバ3）中に溶出する。バルブは、洗浄バッファ流を廃棄容器に向け、精製された核酸を回収チャンバの方向に向ける。

【0107】

この構成において、試料は溶解バッファおよび結合マトリクスを含むチャンバに移送される。抽出モジュールは封止して、BaroCycler（登録商標）中に挿入する。圧力処理に続いて、デブリスを低圧力にて洗い流し、高圧力にてDNAを回収チャンバ内に溶出する。この柔軟な設計により、様々な溶解バッファおよび洗浄バッファ、ならびに核酸結合マトリクスの選択が可能になり、後続の各加工処理工程に必要とされる圧力条件のプログラミングも可能になる。

【0108】

抽出された核酸は、それ以上精製することなくそのままマイクロアレイ分析または増幅に用いることができる。あるいは、同溶質を、DNAのサイズ決定および分離のための要素、または全RNAおよびmRNAの分離のための要素を備えたラボオンチップ（lab on chip）システムの1つに適用することもできる。必要であれば、市販の抽出キットを用いて全核酸調製物からDNAおよび／またはRNAを抽出することもできる。実施例7：低塩条件における溶解

界面活性剤を含まない低塩溶液中で細胞溶解を行うことができれば、PCRおよび配列決定を含む多くの後続の分析的手順に対して十分な純度をもつ核酸を得ることができる。タンパク質や他のデブリスなどの不純物は、核酸を溶液中に残して、様々なマトリクス、例えば、Chellex（登録商標）またはPrincipitate（登録商標）に結合させることができる。この構成において（図18を参照）、デブリスおよび不純物はチャンバ1に保持され、可溶性核酸は単純な濾過によってチャンバ2内に回収される。その後この遊離された核酸はそのまま、制限エンドヌクレアーゼ消化、PCR、DNA配列決定および他の分析的手法を含む様々な生化学的および酵素的用途において用いられる。

【0109】

本発明に記載のデバイスは、核酸の精製に対する完全な自立した系を提供し、圧力によって媒介される溶解およびタンパク質除去と、それに続く精製をうまく利用して、濃縮された核酸生成物を得ることができる。その後の核酸の加工処理には、低压でデブリスを洗い流すことと、BBI BaroCycler（登録商標）v3.0を用いて第2の工程において精製された核酸を高压下で溶出する工程とが含まれる。

実施例8：二重Oリングデバイス

図19は、ラム104およびスクリューキャップ106の両方の上に二重Oリング102を有する本発明のマルチチャンバデバイス100を示した図である。また、ラムおよびキャップ内には、チューブの内側または外側からいずれかのOリングを通過してきたあらゆる流体を捕捉することのできる溝108も設けられている。デバイスは、溶解ディスク110と、試料チャンバ112と、流体／反応チャンバ114も備えている。デバイス100の典型的な使用において、流体／反応チャンバ114にバッファ溶液を入れ、スクリューキャップ106をチャンバ114に隣接するデバイス100のねじ切り部分118内に螺合し、加工処理または細碎しようとする試料を試料チャンバ112に入れ、ラム104を、随意でラムを所定の深さまで挿入させることのできる工具を用いて、試料チャンバ内に挿入する。このような工具の例が図20に示されている。図20に示される工具の一方端部は、キャップ106を螺合または脱螺合させるねじ回しとして機能する。工具の他方端部は、ラム104を所定の適切な深さに設定する支柱を有している。そしてデバイス100を、BBI BaroCycler（登録商標）などの圧力サイクル装置に入れ、該装置は、ラムに試料を溶解ディスク110を通過させるようにして、一般にはチャンバ114内のバッファ溶液内に溶解試料の溶液または懸濁液が得られることになる。

10

20

30

40

50

【0110】

デバイス100がチューブの内側または外側から「漏れている」かどうかを、既知濃度のフルオレセイン溶液を用いて、チューブ内側の溶液の蛍光またはチューブ外側のバッグ内の流体の蛍光を測定することにより、確かめることができる。適当なバッファ中のフルオレセインから作成した用量応答曲線と蛍光を比較する際には、蛍光の量を体積に変換することができる。この方法は非常に感度が高く、 $0.1 \mu\text{L}$ の体積の漏れを検出するためにも用いることができる。本方法は、新しく作られたチューブを評価するために、品質管理のために、あるいは加工処理された試料について用いることができる。

実施例9：PCTによるラット尾部の溶解

ラット尾部はPel Freez Biologicalsから入手し、新鮮な間に凍結しドライアイス上または-70°で保存した。ラット尾部の0.2gの小片を、図19に示されるような本発明のマルチチャンバデバイス中、BBI Barocycler（登録商標）v2.4を用いて約241,325kPa(35ksi)、4で1分間のサイクルを5回繰り返して、加工処理した。それぞれのデバイスには、図3Aに示されるような20個の2mmの穴を有するステンレス鋼ディスクを補足した。金属ディスクの目的は、デバイス本体内のプラスチック製溶解ディスクを強化することである。この試料セットに対して用いたバッファを表1の第3欄に示す。

10

20

30

40

【0111】

【表1】

表1

試料番号	処理	溶解バッファ	DNA濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	プロテイナーゼK 消化法によるDNAの収率 (%)
1	プロテイナーゼK 55°C、30分 +PCT	Qiagen ATLバッファ	41	81%
2	プロテイナーゼK 55°C、5時間	Qiagen ATLバッファ	79	100%
3	PCT	Qiagen ATLバッファ	72	91%
4	PCT	飽和Gdn. / 1%Chaps	71	90%
5	乳鉢と乳棒	Qiagen ATLバッファ	63	80%
6	陰性対照	飽和Gdn. / 1%Chaps	2	3%

溶解バッファによって決まる3つの異なる方法から粗溶解物を得た後、プロテイナーゼK 50

処理工程を「PCT」および「乳棒と乳鉢」試料（すなわち、試料3～5）に対しては省略したことを除いては、QIAGEN（登録商標）、QIAamp（登録商標）DNA組織キットプロトコールを行って、試料からゲノムDNAを精製した。陰性対照試料は、圧力処理を行わなかったことを除き、同様にして試料を処理することによって得た。表1に示したそれぞれのDNA収率は、260nmの読み取り値によって得たものである。

【0112】

図21に示される試料1～6から精製されたゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動によって実証されるように、圧力サイクル（「PCT」）を用いて得られる溶解効率は、従来のプロテイナーゼK消化または乳鉢と乳棒の方法を用いた場合と同等であった。アガロースゲルは表Xに示した通りであった。同一体積の精製DNA試料を各レーンに流した。他の実験（データ示さず）によって、乳鉢と乳棒を用いた方法と比較して類似量の全RNAをラット尾部から首尾良く抽出できることが実証された。PCT処理からのDNAおよびRNA収率は、アクチングリマーセットを用いたPCRまたはRT-PCRによって示されるようにPCR増幅可能であった。

実施例10：ラット脳の加工処理およびラット脳からの分子抽出

ラット脳試料は、Pel-Freez Biochemicalsより入手した。試料は新鮮凍結され、ドライアイス上または-70で保存した。試料を、1%CHAPSを含有する飽和塩酸グアニジン溶液中、PCTにより、約241,325kPa(35,000psi)、で、1分間のサイクルを5回繰り返すことにより処理した。図22Aは、QIAGEN（登録商標）のQIAamp DNA組織キットを用いて精製された（プロテイナーゼK消化工程は省略）粗溶解物中に抽出されたゲノムDNAが存在することを実証するアガロースゲルである。

【0113】

ラット脳タンパク質についても、PCT（リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中、25で1分間のサイクルを5回）、非加圧対照、および液体窒素中で乳鉢と乳棒を用いた後のOmniのホモジナイザーによる均質化、を用いて抽出を行った（図22B）。該ラットタンパク質を、ウェスタンプロット分析を用いて調べた（図22C）。ウェスタンプロットアッセイにおいて、一次抗体は、ユニバーサルな抗一酸化窒素シントーゼモノクローナル抗体（マウス）、二次抗体は、抗マウスIgM抗体（m鎖特異的）アルカリホスファターゼコンジュゲートとした（いずれの抗体も、在ミズーリー州セントルイスのSigma社より入手した）。脳組織はPBS中で均質化した。

【0114】

この実施例は、PCTがDNAおよびタンパク質を動物の脳組織から抽出できることを実証するものである。PCTプロセスは、DNA分析のためのPCR増幅と適合するものであった。一酸化窒素シントーゼの抗原活性も維持されていた。ELISAアッセイ（データ示さず）からも、ラット脳をPCTによって加工処理することにより、その他の天然のタンパク質が得られることが実証された。

（他の実施形態）

本発明の多数の実施形態を記載してきた。それでもなお、本発明の精神と範囲から逸脱しない限りにおいて様々な改変が可能であることが理解されよう。したがって、他の実施形態も請求項の範囲に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0115】

【図1】生物試料を調製するためのデバイスの断面図。

【図2】2つのラムを含むマルチチャンバデバイス組立図の斜視図。

【図3A】シュレッダ面を有するバリアの例を描いた図。シュレッダ面は単純な円形孔によって構成されている。

【図3B】シュレッダ面を有するバリアの例を描いた図。シュレッダ面は、孔だけでなく、孔間に試料の粉碎を助ける固体の尖った凸部を有している。

【図4】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。

10

20

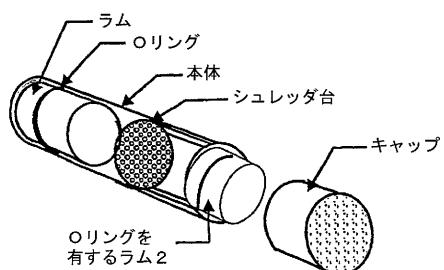
30

40

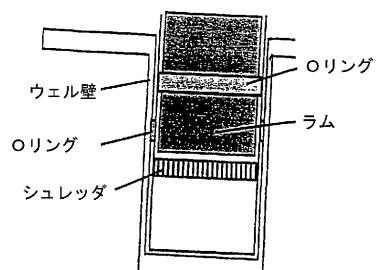
50

- 【図 5】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 6】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 7】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 8】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 9】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 10】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 11】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 12】発明を実施するための最良の形態に記載のゲル電気泳動の結果を示す図。
- 【図 13】96 ウェルプレートの1つのウェル内に嵌合するシュレッダ要素を有する試料調製デバイスの図。 10
- 【図 14】1つの多孔性バリアと、複数の貫通可能バリアと、1つの圧力調節装置とを有する試料調製デバイスの断面図。
- 【図 15A】複数の貫通可能バリアと、ラムである複数の加圧部材とを有する試料調製デバイスの簡略化模式図。
- 【図 15B】複数の貫通可能バリアと、ラムである複数の加圧部材とを有する試料調製デバイスの簡略化模式図。
- 【図 15C】複数の貫通可能バリアと、ラムである複数の加圧部材とを有する試料調製デバイスの簡略化模式図。
- 【図 15D】複数の貫通可能バリアと、ラムである複数の加圧部材とを有する試料調製デバイスの簡略化模式図。 20
- 【図 15E】複数の貫通可能バリアと、ラムである複数の加圧部材とを有する試料調製デバイスの簡略化模式図。
- 【図 15F】複数の貫通可能バリアと、ラムである複数の加圧部材とを有する試料調製デバイスの簡略化模式図。
- 【図 16A】垂直方向および水平方向のいずれの試料区画にも試料または試薬が導入されるデバイスの上面図。
- 【図 16B】垂直方向および水平方向のいずれの試料区画にも試料または試薬が導入されるデバイスの側面図。
- 【図 17A】圧力および電流を用いて核酸を抽出することのできるデバイスの図。
- 【図 17B】圧力および電流を用いて核酸を抽出することのできるデバイスの図。 30
- 【図 18A】シリンダの部分に分割された様々な区画に試料が送達されているデバイスの図。試料チャンバーと洗浄チャンバーとの相対位置を説明する。
- 【図 18B】シリンダの部分に分割された様々な区画に試料が送達されているデバイスの図。試料がバルブを通して送達され、また下側の区画が円運動で機械的に移動する仕組みを説明する図。
- 【図 19】二重Oリングを有する本発明のマルチチャンバデバイスの断面図。
- 【図 20】図24のデバイスのキャップとラムを設定するための工具の図。
- 【図 21】本発明のデバイスを用いて加工処理されたラットの尾部から精製したゲノムDNAを示す、アガロース電気泳動ゲルの写真。
- 【図 22A】本発明のデバイスおよび他の方法を用いて加工処理したラット脳から抽出されたDNAのアガロースゲルの写真。 40
- 【図 22B】本発明のデバイスおよび他の方法を用いて加工処理したラット脳から抽出されたDNAのアガロースゲルの写真。
- 【図 22C】本発明のデバイスおよび他の方法を用いて加工処理したラット脳から抽出されたタンパク質のウェスタンプロットの写真。

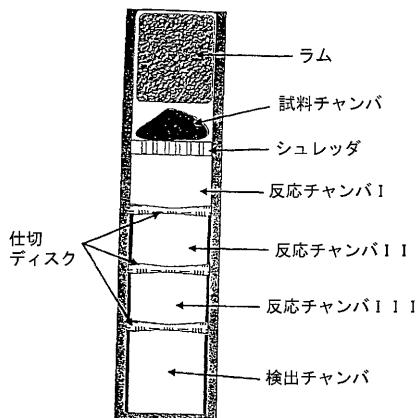
【図2】



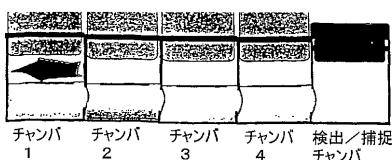
【図13】



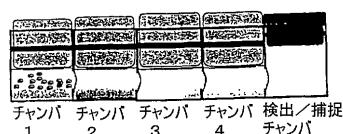
【図14】



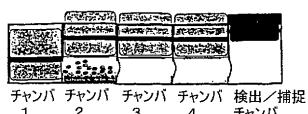
【図15A】



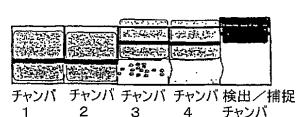
【図15B】



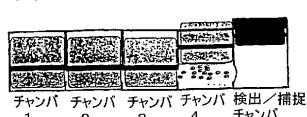
【図15C】



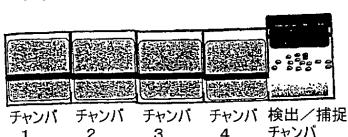
【図15D】



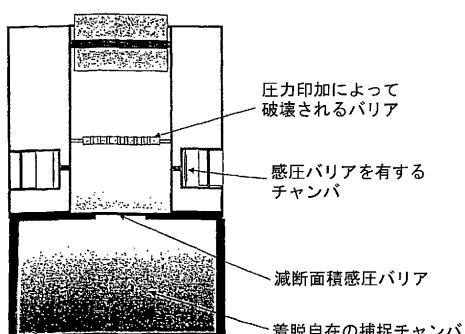
【図15E】



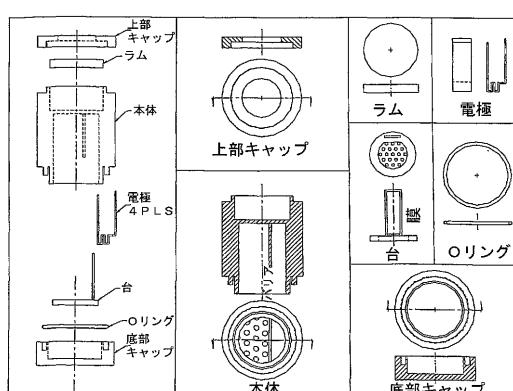
【図15F】



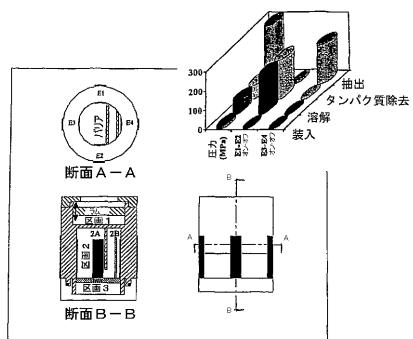
【図16B】



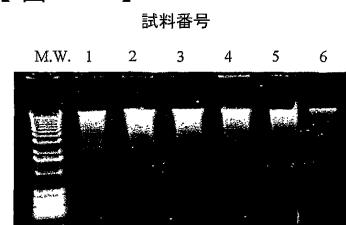
【図17A】



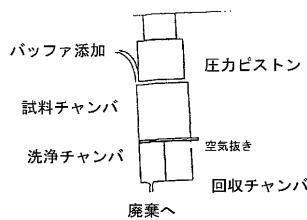
【図 17 B】



【図 21】



【図 18 A】



【図 18 B】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/088296 A1(51) International Patent Classification*: C12M 1/12 (74) Agent: FREEMAN, John, W.; Fish & Richardson, P.C.,
225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/13187

(22) International Filing Date: 26 April 2002 (26.04.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/286,509 26 April 2001 (26.04.2001) US
60/308,869 30 July 2001 (30.07.2001) US
60/357,336 8 November 2001 (08.11.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BOSTON BIOMEDICA, INC. [US/US]; 375 West Street, Bridgewater, MA 02379 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHUMACHER, Richard, T. [US/US]; 349 Foundry Street, Apt 2, South Easton, MA 02375 (US). TAO, Feng [US/US]; 18211 Lost Knob Circle, Apt. #102, Montgomery Village, MD 20886 (US). LAWRENCE, Nathan, P. [US/US]; 1960 Thurlow Drive, Timonium, MD 21093 (US). KAKITA, Allan [US/US]; 8451 Boothbay Circle, Huntington Beach, CA 92646 (US). MANAK, Mark, M. [US/US]; 200 Stanley Place, Laurel, MD 20707 (US). LAUGHARN, James, A., Jr. [US/US]; 16 Robinson Park, Winchester, MA 01890 (US).

(81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU,

AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FL, GB, GD, GE, GI,

GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,

LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG,
SI, SK, SL, TI, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Lusasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
Umpacan patent (AU, BH, CH, CY, DH, DK, IS, IL, IR,
GB, GR, IE, IT, IU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BR, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendmentsFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

A1

WO 02/088296

(54) Title: MULTICHAMBER DEVICE AND USES THEREOF FOR PROCESSING OF BIOLOGICAL SAMPLES

(57) Abstract: Devices and methods are described for homogenization, processing, detection, and analysis of biological samples such as insects, fungi, bacteria, and plant and animal tissues. Multiple chambers in these devices permit different processing functions to be carried out at each stage, such that the resulting homogenized product can be further processed, purified, analyzed, and/or biomolecules such as metabolites, proteins and nucleic acids, or pharmaceutical products can be detected. The device can be used in a hydrostatic pressure apparatus, in which different activities, i.e. incubations, addition or renewal of reagent, and generation and detection of signal can be carried out in the appropriate chamber. The method improves the preservation of biomolecules from chemical and enzymatic degradation relative to conventional means. Additionally, this method enables automated sample preparation and analytical processes.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

**MULTICHAMBER DEVICE AND USES THEREOF FOR
PROCESSING OF BIOLOGICAL SAMPLES**

FIELD OF THE INVENTION

The invention is in the general field of methods and multichamber devices for preparation (for example, homogenizing) and processing of biological samples, optionally in connection with analysis and/or detection of materials from a sample. Particular embodiments have applications in biotechnology, medical diagnostics, agriculture, food, forensic science, pharmaceutical, environmental and veterinary science.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Biological samples are frequently subjected to processing and analysis after they are isolated. Processing of such samples typically involves one or more of the following: homogenization of biological tissues, lysis of cells, suspension or dissolution of solid particulates, and liquefaction of solid material. Often, sample preparation also entails extensive enzymatic digestion, the use of harsh chemical reagents, and/or mechanical disruption. Following this initial preparation, the sample can be further processed using techniques such as polymerase chain reaction (PCR) or gel electrophoresis to purify or amplify particular molecules of interest such as nucleic acids and/or proteins in a sample. After processing, samples are typically subjected to an analytical and/or detection procedure.

Particular difficulties can be encountered in the application of molecular techniques to plant and animal tissues and to bacteria with rigid cell walls such as certain mycobacteria. Current methods for extracting biological molecules from such samples are limited by the requirement for complex processing using multiple steps and can be very time-consuming, labor intensive, and costly. Processing of bacteria or tissue, for example, can require extensive pretreatment with enzymes such as lysozyme or proteinase K, or grinding with glass beads. For some cells and tissues, additional mechanical disruption is also often necessary, requiring equipment such as a mortar and pestle, bead mills, a rotor-stator homogenizer, a blade blender, an ultrasonicator, a pulverizer, a pestle and tube grinder, a meat mincer, a Polytron®, or a

WO 02/088296

PCT/US02/13187

French Press™. Extensive processing steps are required, for example, for the preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins, such as those produced by high-level expression of recombinant bacterial constructs.

Analysis of the biological properties of a sample can require further processing such as detection of nucleic acids, proteins, antibodies, factors, or activities extracted from the sample. Such further processing can require additional steps such as hybridization of nucleic acids with specific primers or probes, amplification, and detection of specific signals. For analysis of protein or antibody activity, binding to, or elution from specific ligands, antigen-antibody reactivity, or another "processing" system is sometimes required for identification and/or purification of the desired products. Examination of biological activity can also include incubation of an extract with a cascade of enzymes and/or co-factors to generate a detectable product. Gentle, yet effective procedures to release these molecules are desirable.

It is highly desirable to prepare, process, and analyze biological samples using equipment and procedures designed to simplify the overall process, to standardize the methods over a wide range of specimen types, to be amenable to automation, and to limit degradation of sample components, particularly biomolecules.

Simplification or automation of sample preparation steps can save time and money, and can result in a more reliable output from analytical techniques, as a result of, for example, reduced manual handling of the sample.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention described allows for various purification and/or analytical steps to be carried out in the chambers of a multi-chamber device, which is amenable to automation, where at least one of the desired processes is achieved using high pressure.

The invention is based, at least in part, on the discovery that application of cycled pressure, variable temperatures, or both, to a sample in a device having multiple chambers separated by penetrable and/or porous barriers can allow biological samples to be processed in a controlled and automated manner. While the new device is amenable to use with liquid samples, it can also be used in a similar manner with

WO 02/088296

PCT/US02/13187

solid and semi-solid samples, such as whole plant or animal tissue, and gaseous samples.

The new devices and methods provide a simple format for loading and unloading samples and the methods generally can be automated while still effectively fragmenting, homogenizing, and processing tissue samples. The methods and devices reduce the necessity to transfer samples and reagents as the samples are generally processed sequentially. In one embodiment of the invention, large chunks of tissue are first fragmented into smaller pieces and then homogenized to completion, while avoiding unacceptable degradation of targeted biomolecules, before the sample is further processed. Release of biomolecules such as nucleic acids or proteins is efficient, and the function of those molecules (e.g., in the lysate) is well preserved. After the sample has been homogenized and the biomolecules have been released, the sample undergoes further processing, typically after being forced into a subsequent chamber of the multichamber device. Further processing of the sample can include, but is not limited to, one or a combination of the following processes: purification by chromatography, solid phase capture, or gel electrophoresis; enzymatic processing; amplification of biomolecules (e.g., PCR); processing and/or detection of protein interactions; chemical modification; substrate labeling; solubilization of substrate; and substrate detection.

The homogenization aspect of the method is readily used in conjunction with high hydrostatic pressure cycling technology ("PCT"). The use of PCT technology to analyze biological samples is generally described elsewhere, for example in the following documents which are incorporated by reference in their entirety: Laugharn, Jr. et al., U.S. Patent No. 6,111,096; Laugharn, Jr. et al., U.S. Patent No. 6,120,985; Hess, R. and Laugharn, Jr., U.S. Patent No. 6,127,534; Hess, R. and Laugharn, Jr., U.S. Patent No. 6,245,506; Laugharn, Jr. et al., U.S. Patent No. 6,258,534; Laugharn, Jr. et al., U.S. Patent No. 6,270,723; Laugharn, Jr. et al., U.S. Patent No. 6,274,726 and PCT Application No. WO99/22868. Physical changes effected on the sample can include pressure-driven phase changes, volume changes under high pressures and homogenization, for example, as solids or other matter pass through screens. Such processes are readily adaptable to automation.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

In one embodiment, the invention features a sample preparation device for use in a pressure modulation apparatus. The device includes multiple chambers, at least one barrier positioned between two chambers, and at least one pressurizing member such as a ram, positioned to subject the sample to high pressure and to force the sample through at least one barrier. The barrier can be either porous or penetrable (e.g., a septum) or can be rendered porous or penetrable by exposure to a physical, chemical, or mechanical stimulus. One or more of the chambers can be part of a single, one-piece, molded device.

5 In some cases, a barrier such as a screen or a shredder can be positioned between a first chamber and a second chamber, and openings in the barrier can allow communication of materials (e.g., solids, semi-solids, liquids, or gases) between the first chamber and the second chamber.

10 In other cases, the device can include three or more chambers with multiple barriers positioned between the chambers. At least one of the barriers can be porous or penetrable, or can be rendered porous or penetrable by exposure to a physical, chemical, or mechanical stimulus. The device can further include two or more 15 pressurizing members that can be activated independently, e.g., at differing hydrostatic pressures. At least one pressurizing member, for example, a ram, is in a position to subject the sample to high pressure and to force the sample through at least 20 one barrier. Two or more of the chambers can be linked together by threaded mechanical interlocks or a threading mechanism.

25 The chambers can be made of plastic, rubber, ceramic, metal, or glass or any combination of these materials. For example, the chamber can contain a volume up to about 100 µl, up to about 500 µl, up to about 1 ml, up to about 100 ml, or up to about 500 ml. The surface of one or more chambers can be rendered inert to biomolecules. The surface of one or more chambers can also be derivatized with biomolecules or small organic molecules such as pharmaceutically active compositions or metal chelators, through covalent bonding, ionic interactions, or non-specific adsorption. In some cases, at least one barrier is pierceable (i.e., can be punctured with a sharp 30 object), at least one barrier is capable of being dissolved by organic solvent (e.g., a poly(methyl methacrylate) barrier, which can be dissolved by, for example, tetrahydrofuran or ethyl acetate), at least one barrier can be removed mechanically

WO 02/088296

PCT/US02/13187

(e.g., by the action of the ram or other device), at least one barrier can be removed through a change in temperature (e.g., a wax barrier can be melted by heating; a porous ceramic barrier clogged with a low-melting polymer can be rendered porous by heating), at least one barrier can include a valve (e.g., a one-way valve), or at least one barrier can be removed by any one or a combination of the following mechanisms: piercing, solvation, melting, breaking, and mechanical removal (e.g., unscrewing or prying). The barrier(s) can be made of a polymer, metal, or ceramic. The barrier can also be made up of a composite or layers of solid materials (e.g., sand or silica gel). The barrier can also include a filter for either capturing or excluding desired substrates for purification, or analysis. The filter(s) can be made of polyvinyl chloride, polyether sulfone, nylon, nitrocellulose, cellulose esters, cellulose acetate, cellulose nitrate, polyfluorethylene (PFTA), vinyl, polypropylene, polycarbonate or other material. The barrier(s) can, for example, have a plurality of openings, which can be, for example, round, and can have a diameter of between about 1 μm and about 3 cm (e.g., between about 1 μm and about 100 μm , between about 0.1 mm and 1 mm, between about 1 mm and 1 cm, between about 1 cm and 3 cm, or any combination of such ranges or intermediate range). The barrier can also include a plurality of solid, pointed protrusions, made, for example, of a polymer, metal, or ceramic. The pointed protrusions can be, for example, in the shape of a pyramid or cone, and can, for example, extend about 0.01 to 3 cm (e.g., about 0.01 cm, 0.1 cm, 0.2 cm, 0.5 cm, 0.8 cm, 1 cm, 1.5 cm, 2 cm, 2.5 cm, or 3 cm, or any intermediate range) above the base of the screen.

The pressurizing member can include (or can be), for example, at least one ram mounted to move relative to the chamber, and can be, for example, made of a polymer, metal, or ceramic. The pressurizing member can be, for example, circular in cross-section (e.g., the member can be cylindrical or conical). The chambers can, for example, include a wall, and the pressurizing member can include one or more annular seals (e.g., rubber or teflon O-ring) that contact the wall as the pressurizing member moves. The seal can be, for example, made from a polymeric, metallic, or ceramic material. The pressurizing member(s) can, for example, be a cylinder having a sealing ring around its circumference, in which case the chambers can be generally cylindrical. In some cases, the device can include at least two pressurizing members,

WO 02/088296

PCT/US02/13187

one of the pressurizing members being positioned on a first side of a barrier and the other of the pressurizing members being positioned on a second side of the barrier, opposite to the first side of the barrier. More than one chamber can be mounted with a pressurizing member. (See FIG. 15.)

5 The device can also include a container having an orifice, in which case the chambers can be positioned within the orifice. One or more of the chambers can be filled with a fluid. One or more of the chambers can also include a temperature-controlling device, a temperature-cycling device, a pressure-controlling device, a pressure-cycling device, or an optical sensor.

10 The multiple chambers of the devices can also, optionally, be interconnected within the pressure-modulation apparatus. In some cases, a number of devices (e.g., 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 or more devices) can be interconnected to form a strip, or can be interconnected to form a two-dimensional matrix (e.g., an 8 x 12, 4 x 4, 2 x 2, 4 x 6, or 3 x 5 array).

15 In some cases, one or more chambers containing a reagent can annularly surround a chamber containing a sample, in which case the reagent can be introduced to the sample through a valve activated by pressure.

At least one of the chambers can also be equipped with electrodes to enable an electric current to be passed through the chamber during processing of the sample.

20 In another embodiment, the invention features a sample-processing device for use in a pressure-modulation apparatus. The device includes multiple chambers, positioned in a vertical configuration; multiple temporary barriers positioned between pairs of chambers; and a pressurizing member positioned to force a sample through the barriers. (See FIG. 14) Optionally, the device can also include a porous barrier positioned between the first and second chamber.

25 In still another embodiment, the invention features a method of processing a biological sample. The method includes providing a device as described above; adding the sample to a first chamber of the device; and subjecting the device to an elevated pressure (e.g., at least 100 psi, 250 psi, 500 psi, 750 psi, 1,000 psi, 5,000 psi, 30 10,000 psi, 20,000 psi, 30,000 psi, 40,000 psi, 50,000 psi, 60,000 psi, 70,000 psi, 80,000 psi, 90,000 psi, 100,000 psi, or more) to cause the pressurizing member to

WO 02/088296

PCT/US02/13187

force a sample through a barrier between the first chamber and second chamber and into the second chamber.

The sample can be, for example, forced through multiple barriers by the pressurizing member. The biological sample can include, for example, a solid material, a semi-solid material, and/or a liquid. In particular embodiments, the biological sample can include, for example, an insect or small animal, a fungus, plant or animal tissue, a food product or agricultural product, a forensic sample, a human tissue (such as muscle, tumor, or organ), serum, sputum, blood, or urine. The biological sample can, optionally, be frozen. The size of the biological sample can be, for example, between about 0.1 mg and 500 g (e.g., 0.1 mg to 1.0 mg, 1.0 mg to 10 mg, 10 mg to 100 mg, 100 mg to 1 g, 1 g to 20 g, 20 g to 100 g, 100 g to 200 g, 200 g to 500 g).

The elevated pressure can be, for example, applied to the sample at, above, or below ambient temperature, for example, at ambient temperature, at a temperature below which the sample would freeze at atmospheric pressure (i.e., the sample's atmospheric pressure freezing temperature), at a temperature in the range of that temperature to about 4°C, between about 4°C and ambient temperature, at a temperature in the range between ambient and 90°C or higher (e.g., -80°C, -40°C, -20°C, 0°C, 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C, 100°C, or higher).

The elevated pressure can also be repeatedly cycled (e.g., a frequency in the range of milliseconds (i.e., 1 – 10000 Hz), at a frequency in the range of seconds (0.01 – 1 Hz), or at a frequency in the range of minutes (e.g., 0.1 – 10 mHz).

The method can also include the steps of analyzing the sample after, or as part of, sample preparation, extracting a specific substance or substances from the biological sample, and/or processing a specific substance or substances from the biological sample. For example, DNA, RNA, proteins, or pharmaceutical compositions (e.g., pharmaceutically active molecules, natural products, drugs, or drug metabolites) in the sample can be isolated after or as part of the sample preparation; and/or a portion of the sample (e.g., a nucleic acid) can be amplified (e.g., using the polymerase chain reaction, "PCR", or ligase chain reaction, "LCR"), bound to a ligand, eluted from a ligand, sequenced, or hybridized; and/or a portion of

WO 02/088296

PCT/US02/13187

the sample can be subjected to chemical reactions including but not limited to antigen-antibody interactions, enzymatic reactions, catalytic reactions, or step-wise reactions wherein a different step takes place in each chamber of the device.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

The details of one or more embodiments of the invention are set forth in the accompanying drawings and the description below. Other features, objects, and advantages of the invention will be apparent from the description and drawings, and from the claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 is a cross-section of a device for preparing biological samples.

FIG. 2 is an illustration in perspective of a multichamber device assembly that contains two rams.

FIGS. 3A-3B depict two examples of barriers having shredder surfaces. The top shredder surface (3A) is composed by simple circular holes. The bottom shredder surface (3B) has not only holes, but also hard sharp protrusions between the holes, which aid in sample disruption.

FIGS. 4-12 depicts various gel electrophoresis results described below.

FIG. 13 is an illustration of a sample preparation device with shredder component, which fits in one well of a 96 well plate.

FIG. 14 is a cross-section of a sample preparation device having one porous barrier, multiple penetrable barriers, and one pressure modulation apparatus.

FIGS. 15A-15D are illustrations in a simplified schematic diagram of a sample preparation device having multiple penetrable barriers and multiple pressurizing

WO 02/088296

PCT/US02/13187

members, which are rams. FIGS. 16A-16B are illustrations of a top cross sectional view and side cross sectional view of a device, wherein sample or reagents are introduced into sample compartments both vertically and horizontally.

FIGS. 17A-17A are illustrations of a device capable of extracting nucleic acids using pressure and electrical current.

FIGS. 18A-18B are illustrations of a device having sample delivered into various compartments that are divided into portions of a cylinder. FIG. 18A illustrates the relative positions of the sample chamber and wash chamber. FIG. 18B illustrates how the sample is delivered through valves and the lower compartments move mechanically in a circular motion.

FIG. 19 is a cross-section of a multichamber device of the invention having double O-rings.

FIG. 20 is a drawing of a tool for setting the cap and ram of the device of FIG. 24.

FIG. 21 is a photograph of an agarose electrophoresis gel, showing genomic DNA purified from rat tails processed with the devices of the invention.

FIGS. 22A-22C are photographs of agarose gels (FIGS. 22A and 22B) of DNA and a Western blot (FIG. 22C) of proteins extracted from rat brains processed with the devices of the invention and other methods.

Like reference symbols in the various drawings indicate like elements.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A pressure-driven cell lysis method is described in U.S. Patent 6,111,096 and the entirety of that patent is incorporated herein by reference. This invention features a device having multiple compartments (i.e., chambers) separated by one or more permeable or penetrable barriers capable of being subjected to high pressure. The invention is used to prepare organic or inorganic samples by homogenizing the samples and, in some embodiments, subjecting the samples to additional processing or analysis. The new devices can be used, *inter alia*, for sample collection, transport, processing, and/or storage, and for growth of organisms.

In one embodiment of this patent application, the invention features a device for insertion into a pressure-modulation apparatus. The basic components of the

WO 02/088296

PCT/US02/13187

device include multiple compartments/chambers, one or more barriers separating the compartments, a cap, and one or more pressurizing members (e.g., rams).

Various volumes of compartments can be implemented with capacity appropriate for both the processing occurring in the particular compartments and the sample size. Capacity typically ranges from 25 microliters to 1 liter or greater (e.g., 5 25 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 750 ml, or 1 l, or intermediate volumes). The compartments can be positioned within the device in either a horizontal or vertical manner or a combination of the two. Additionally, the 10 compartments of the device can be formed into a single unit or can be connected together modularly, for example, positioned in a 96-well format.

In some embodiments, the invention features at least one porous barrier such as a screen or shredder for preparing, particularly homogenizing, biological samples such as tissues in semi-solid or solid forms, and generating a finely minced tissue or 15 slurry from the whole tissues. This homogenization aspect of the invention includes either or both of two basic processes, primary fragmentation and subsequent homogenization of the sample. If desired, the homogenized sample can be further processed directly within the device without need for removal. The initial 20 homogenization/processing can be further combined with standard extraction or analytical procedures utilizing, for example, enzymes, detergents, denaturants, or chaotropic salts and the like.

The porous barrier used in the invention can be made from solid material such as polymer, metal, glass, or ceramic. The orifices can contain sharp edges to facilitate 25 the fragmentation of a solid sample. The pressurizing member can serve as a piston with one or more seals that deliver sample from one side of the barrier to the other while acting as an effective shield between the sample inside the device and the pressurizing medium outside. This process is defined as the primary fragmentation. When pressure is cycled, the primary fragmentation process is repeated to generate homogeneous slurry.

30 The device can process various quantities of specimen, typically from 10 milligrams up to at least 15 grams for analytical applications, and can be scaled up even further for preparative work. Pressure applied in the primary fragmentation can

WO 02/088296

PCT/US02/13187

be relatively low, on the order of 10,000 to 50,000 psi (pounds per square inch). One or more of the compartments can be pre-loaded with appropriate lysis, capture, or processing solutions in predefined volumes. The specifics of the porous barrier design are determined in part by the volume of the lysis/capture/reaction fluid utilized
5 and nature of the specimen, e.g., blood, urine, serum, liver, brain, skeletal muscle, plant leave, stem, root or animal tooth or bone. An appropriate device for the particular specimen is used (i.e., appropriate screen or porous barrier, container, lysis/capture/reagent fluid) and pressure cycling conditions are selected for sample characteristics of the sample size being processed and for the downstream analysis to
10 be performed for that sample.

The device can contain additional compartments separated by non-porous, penetrable barriers. The compartments can, for example, contain reagents suitable for purification, reaction, or analysis of the sample. The surface of one or more compartments can be coated with material, making the surface inert to biomolecules;
15 or the surface can be derivatized (i.e. covalently attached or ionically bonded) with biomolecules or molecules capable of interacting with biomolecules. The sample can be forced into the additional compartments in a sequential manner using pressure from the pressure modulation apparatus. For example, pressure can be continually increased, forcing the sample into consecutive adjacent compartments. Cycling of the
20 pressure causes the sample and reagents in the subsequent chambers to become sufficiently mixed together. Each consecutive compartment can expose the sample to an additional step of processing. The number of consecutive compartments required in each device varies depending on the degree of processing desired for each individual sample.

25 While pressure is used to force the sample through the device, the barriers can also be penetrated under a variety of other conditions. For example, the barriers can be temperature-sensitive (e.g., wax barriers, or porous ceramic barriers, wherein the pores are initially clogged with wax), breaking down at a set temperature. The barriers can also be penetrated by exposure to solvents, causing the barrier to dissolve
30 into solution. Additionally, the barriers can be valves, removed either mechanically or electronically.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

After selecting the appropriate barriers and reagents, the sample can be loaded into the holder and one or more pressurizing members (e.g., rams) installed as required by the format of the device. The device is then placed inside a pressure cycling apparatus that is pre-equilibrated to the appropriate temperature. The 5 selection of the barriers and the appropriate pressure cycling profile can be customized to the specimen requirements, e.g., based on the principles illustrated below.

One manner of processing amenable to the devices and methods of the present invention includes mechanical fragmentation of the tissue sample. Pressure is 10 localized around the sharp edges or points incorporated into the screen. The sample is driven across the screen (usually in multiple passes) by the application of pressure pulses. The pressure difference between the sample and the capture fluid in the adjacent compartment is small (e.g., in the range of less than several hundred pound per square inch, resulting in a much gentler treatment of the tissue and better retention 15 of biological structure and activity. Because the pressure drop across the porous barrier is relatively small, large molecules such as, for example, DNA and RNA, are not subjected to harsh mechanical shearing forces. The process is suitable for automation and can be performed at reduced temperature (well below standard cold room temperatures, which typically are about 4°C) to improve retention of intact 20 molecules, such as nucleic acid molecules.

Most liquids are partially compressible under high pressure and expand when 25 pressure is released. The sample can initially be repeatedly pushed through a barrier (e.g., a shredder or a screen) during a first pressure cycling process. With each cycle, upon releasing pressure, unmacerated sample can be pushed back to the sample-loading compartment. During the process, lysis/capture solution can penetrate the 30 sample and help liberate and solubilize the biomolecules inside the tissue sample.

Another form of processing, homogenization, can also be achieved by applying cyclic pressure, resulting in perturbations of large, multi-molecular structures (such as cell membranes) leading to their destruction. The homogenization process can also be applied to material that has already been fragmented by the 35 methods described above or by other methods, or to frozen material, which can become a slurry by introduction of repeated phase changes such as liquid/solid

WO 02/088296

PCT/US02/13187

(frozen) phase changes, further contributing to cell breakage. The low temperatures can help preserve biological activity during the process. This process is particularly practical and effective, for example, when applied to small fragments of semi-solid and solid samples.

5 The PCT process described here contributes to cell disruption by a variety of mechanisms in addition to those described above. Successful practice of the invention does not depend on any particular theory of its operation.

The homogenization can also be achieved by carrying out pressure cycling at relatively high temperatures, such as 50°C to 90°C or at moderate temperatures such 10 as -5°C, 0°C, 4°C, 10°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, or 45°C. The mechanism of high temperature homogenization can be different from that at low temperature, as the solubility of biomolecules such as lipids and polysaccharides can be increased at the high temperature. There is a potential problem in that the degradation of biomolecules can increase at the higher temperatures and can be further exacerbated 15 by increased activity of proteases or nucleases at the high temperatures. Nevertheless, a high pressure process at high temperature can be suitable and even preferable for certain stable proteins, nucleic acids, and other molecules at appropriate temperatures and pressures. For example, RNases can be inactivated to generate high yield and high quality RNA without the use of harsh chemicals.

20 The PCT method uses hydrostatic pressure or mechanical pressure applied uniformly to the sample in a closed container. The PCT device can accommodate an intact tissue sample. The multiple holes in the barrier (e.g., shredder) and wider diameter holes do not result in high shear or sudden pressure drops across the 25 openings, but rather a more gentle and controlled passage of materials with minimum shearing and denaturation.

Another embodiment of the invention includes, having air trapped inside the chamber that occurs with the loading of the sample into the device. When pressure from the pressuring member increases, the air is compressed and can be dissolved into the samples. With a rapid release of pressure, the air can expand its volume rapidly, which can introduce disruptive effect on samples.

30 This rapid, yet gentle process allows efficient release of cellular contents while maintaining the integrity and biological activity of the liberated molecules in part

WO 02/088296

PCT/US02/13187

because this process does not require the use of detergents, harsh chemicals, or excessive shearing forces. Alternately, the device can be used with detergents and other chemicals, which are compatible with maintenance of biological activity or where maintenance of biological activity is not necessary or not desired. Additionally, 5 this process is well suited for the study of protein content and activities within cells and tissues. Important features of the current method that contribute to protein stability include low shear, rapid lysis, and high protein concentrations. Additional stabilizing additives such as proteinase inhibitors, glycerol, DTT, or specific cofactors can be added to the buffer to further protect the integrity of the desired proteins. The 10 biological activities of many enzymes, particularly of monomeric proteins, remain fully functional after treatment. These proteins are suitable for subsequent purification and analysis by 1-D and 2-D gel electrophoresis, mass spectroscopy, and enzymatic activity assays. The ability to rapidly and efficiently isolate biologically active proteins from a variety of cells and tissues can have very wide applications in 15 research, and in the medical, pharmaceutical, and biotechnology industries. Important applications of the device and method include, but are not limited to:

1. Liberation and solubilization of recombinant proteins from inclusion bodies produced in microbes (e.g., *E. coli*) or from plant recombinant systems.
2. Isolation of intact proteins from biopsy specimens of tumor tissues (e.g., plant or animal tumor tissues), providing a significant advance in mapping and identification of tissue specific marker of early cancer events. Such markers can be used for diagnostics and early identification of specific cancer types.
3. Release of prions from brain or other tissues.
4. Identification of biomarkers that have the potential to effectively monitor drug efficacy and safety, based on data derived from the study of biological tissues.
5. Rapid extraction of proteins from a variety of medicinal plants, fungi, and other organisms, and facilitation of screening of organisms for sources of potential new drugs against cancers, infectious, and genetic disease, and other therapies.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

6. Facilitation of adequate quantities of proteins for toxicological and animal tests in early stages of drug discovery.
7. Extraction of lead or other heavy metals, drugs, pesticides, or other inorganic or organic chemicals or components from sources described
5 elsewhere in this application (e.g., organic materials such as plant or animal tissue or inorganic materials such as soil). Such extraction can be useful, for example, for environmental monitoring, tracking releases of hazardous materials (e.g., due to chemical spills or bio-terrorism), or uptake by an organism.
- 10 In certain embodiments, the device can include additional compartments or chambers that further process the homogenized sample. The compartments can be positioned adjacent to one another and can contain a variety of ingredients suitable for sequential processing of the sample as the sample is forced through the consecutive chambers within the device. For example, a compartment can contain capture
15 elements used to purify the sample such as various binding ligands or solid phase particles. A compartment can also contain a variety of chemicals. These chemicals can be enzymes, substrates required for polymerase chain reaction (PCR), acids or bases, catalysts, and/or other biomolecules capable of processing the sample.
20 Additionally, the compartments can be charged with a label used for analysis of the sample.
- The surface of the compartments can be derivatized in a manner appropriate for the sample and the desired processing. In one embodiment, the surface can be coated with a material causing the surface to be inert to biomolecules, preventing attachment or adsorption thereof. In another embodiment, the surface can be
25 covalently bonded or ionically attached to biomolecules or pharmaceutical products (i.e., small organic compounds) capable of interacting with or trapping elements of the homogenized sample.
- In another embodiment, one or more of the compartments is equipped with a device (e.g., a photometer) that enables analysis and/or detection of the sample.
30 Forms of analysis include but are not limited to measurement of temperature, pressure, radiation, absorbance, fluorescence, or turbidity.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

5 The materials processed by this device cover a broad spectrum of specimen types. Examples are provided below. The sample types that can be processed include, but are not limited to, blood, serum, forensic samples, fungi, insects, plant tissue (e.g., pollen, leaves, roots, flowers or other plant parts, whether fresh, frozen, or dried), and animal tissue (e.g., avian, reptilian, fish, or mammalian tissue such as human, bovine, canine, feline, murine, or porcine tissue. Tissues can include biopsy specimens, crops or foods.

In summary, advantages of the present invention over the conventional methods include, *inter alia*:

- 10 • Frozen samples can be processed without thawing.
- One step fragmentation, homogenization, and processing can be carried out with minimum hands-on operation.
- Lysis protocols can be tailored for specific biological samples, having the materials necessary for analysis and suitable for follow-up assays pre-loaded into the device.
- 15 • Sample size can be flexible ranging from milligrams to hundreds of grams and the sample can be in whole pieces.
- The process can be applied to a broad spectrum of sample types, such as liquid, solid, or semi-solid tissues.
- 20 • The lysing and further sample processing and or analysis can be carried out in a hands-off, automated pressure cycling instrument.
- The homogenization process can be rapid without the need for lengthy incubation such as that requires enzymatic digestion steps.
- The process can include an automated molecular extraction procedure, such as, automated nucleic acid extraction method (see, e.g., U.S. Patent No. 6,111,096), or more conventional extraction methods within a single device.
- 25 • The method can be carried out at subzero temperatures (i.e. > 0°C) so that the integrity of biological molecules, such as RNA and enzymes, are preserved from degradation and remain functional.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

- Samples can be processed in a closed disposable holder, preventing cross-contamination of specimens. Specimens can be collected in the field, placed and stored in the device until processing, minimizing specimen handling.
- The process can be adapted for simultaneous or sequential processing.
- The device can be adapted to process multiple samples, for example, by being set-up in a matrix such as a 96-well format.
- The process can be adapted for many applications, such as, forensic, clinical, pathological, agricultural, food safety, pharmaceutical, bio-terrorism and environmental analysis.
- Organisms can be grown, processed, analyzed, and/or rendered inert within the device (e.g., a device containing a growth or transport medium). Of special importance when working with potentially dangerous or fastidious organisms, these methods can be carried out either with or without the need to open the device between sample collection/loading and rendering inert, thus minimizing possible hazards associated with handling of such organisms.
- Whole, intact, and viable microorganisms and extracts thereof can be extracted from plant or animal sources or from inorganic substances such as soil.

Part 1. The Two-Chamber Homogenization Module

One design for the sample-processing device is a two-chamber module as illustrated in FIG. 1. This design has as its components a pressurizing member, which is a ram (A), a compartment having two chambers (B), barrier, which can be either a shredder screen or porous barrier (D), and a cap (F). In another design, the device can also have a second pressurizing member (e.g., a ram) (FIG. 2) with an O-ring. This homogenization module is adapted to fit into a pressure-cycling apparatus such as those described in U.S. Patent 6,111,096 at pages 4-9 and 29-44 and in FIGS. 1 and 4.

Prior to loading the sample, the optional second ram can be inserted into the module. With the module placed upright, a defined volume of capture fluid added and the barrier (e.g., a screen) can be inserted from the top. The pressure compartment of the pressure-cycling apparatus and module can optionally be pre-chilled to a defined temperature, such as -20°C or -30°C. The sample can then be placed into the sample chamber. The upper pressurizing member is positioned into

WO 02/088296

PCT/US02/13187

the module body over the sample. The module is then placed into the compartment of the pressure cycling instrument where it is immersed in the temperature-equilibrated pressurizing fluid. The pressure compartment is then sealed.

As the pressure is increased in the chamber, the pressurizing member in the 5 module moves towards the interior of the module of the first chamber, forcing the sample through the orifices in the barrier (e.g., a shredder screen) to the second, sample-capture chamber, where it becomes mixed with the capture fluid. In that process, the air between the top pressurizing member and the capture fluid may become dissolved in the liquid. Once the tissue sample is pressed by the pressurizing 10 member driving towards the screen, the liquid volume of the combined tissue and capture fluid will decrease, down to, for example, 85-90% of the volume at atmospheric pressure. As the pressure is reduced, the tissue/capture fluid mix plus trapped air expands, force the top pressurizing member back up, and moving the mixture back through the screen. As the pressure within the chamber is cycled, the 15 combined action of the pressure cycling and movement of the pressurizing member can force the solution repeatedly through the screen, contributing further to the physical break up of the cells and tissues.

The pressurizing member can be designed to transfer maximum pressure to a 20 sample that is placed in the module body. The pressurizing member can be made of a hard material such as metal (e.g., titanium, stainless steel, or aluminum), plastic (e.g. thermoplastic such as polypropylene, p-phenylene sulfide, or glass reinforced PEI resin), glass, stone, or a ceramic material. The surface of the pressurizing member or the barrier at the point of contact can be designed to further assist in the disruption of the sample, e.g., by incorporating sharp point(s), or edge(s). The cylindrical walls of 25 the pressurizing member can incorporate one or more O-rings that can form a tight seal between the pressurizing member and the inside wall of the module, confining the sample within the interior compartment of the module. For some configurations, the pressurizing member can incorporate a handle or loop on the surface away from the sample to facilitate its insertion into or removal from the module. The 30 pressurizing member can be designed to move freely within the module body to transmit the high pressure to the interior during the homogenization process, and can

WO 02/088296

PCT/US02/13187

incorporate a feature (e.g., a seal) to act as an effective barrier between the sample and pressurizing fluid.

The module body can be designed to allow the pressurizing member to drive the sample material through the shredder screen/porous barrier. The module body can 5 be, for example, made of a rigid or semi-rigid material such as metal (e.g., titanium, stainless steel, or aluminum), plastic (e.g., thermoplastic such as polypropylene, p-phenylene sulfide, or glass reinforced PEI resin), glass, stone, or a ceramic material. The module body is designed in conjunction with the pressurizing member and the cap to maintain appropriate pressure within the module body during the 10 homogenization process.

The free movement of the pressurizing member allows the hydrostatic pressure inside the compartment to be transmitted to the interior of the sample chamber. Pressure equilibrium can be maintained between the inside and outside of the module, and the module material itself can be stable to the small differential 15 pressure between the interior and exterior of the homogenization module prior to the pressure equilibrium being reached. In that way, the integrity of the module can be maintained. The module is designed to accommodate the appropriate ratio of sample and capture fluid volume relative to the air space to allow fluid to move across the barrier with each pressure cycle.

20 The barrier (e.g., screen) can be designed to further support the homogenization of the sample material as it is forced through the specified orifices of the porous barrier. The design of the orifices as to the size and the number of holes can vary, depending on sample type, size and homogenization process requirements. The barrier, screen, can be made of metal (e.g., titanium, stainless steel, or 25 aluminum), plastic (e.g., thermoplastic such as polypropylene, p-phenylene sulfide, or glass reinforced PEI resin), glass, stone, or a ceramic material appropriate to solubilize the sample. Additionally, the barrier can also include a filter. The point of contact on the barrier with sample can be designed to assist in the homogenization of the sample by incorporating appropriate surface features, such as sharp point(s) or 30 edge(s), or orifice configuration. The barrier can also be any porous material including a solid matrix of sand, fine glass beads, carbon, and/or sintered metal. The

WO 02/088296

PCT/US02/13187

barrier can be designed as an integral part of the module body or as an inserted component of the homogenization module between two compartments of the device.

The cap can be designed such as to seal the module body sample capture compartment, assisting in maintaining pressure during the homogenization process and allowing access to the sample capture compartments following processing. The cap can be made of metal (e.g. titanium, stainless steel, or aluminum), plastic (e.g., thermoplastic such as polypropylene, p-phenylene sulfide, or glass reinforced PEI resin), glass, stone, or a ceramic material appropriate to solubilize the sample. The cap can incorporate a feature (e.g., a helical ridge of a screw) to hold the pressurizing member within the module body. Above the top pressurizing member, an upper cap can also be used. It can be accessible to the pressurizing fluid, but can be designed so as to ensure that the pressurizing member is retained within the module during pressure cycling.

The entire module, optionally including a capture fluid, can be pre-assembled by a manufacturer, such that a user would only need to load the specimen, put on the top pressurizing member, and insert the unit into the pressure chamber. In the current configuration, the device is removed from the pressure chamber following PCT treatment. The pressurizing member on the side where the tissue is originally placed can then be pushed all the way against the barrier with the tissue side on the bottom, in opposite orientation relative to that when the tissue was first loaded. The cap (and bottom pressurizing member, if used) can be removed and the solution can be pipetted out. The cap can also be designed to incorporate a valve through which the solution can be allowed to drip out into a collection tube for minimum handling and direct transfer of material. Alternatively, instead of a cap, the device can be fitted with a puncturable membrane, such as an ethylene vinyl acetate (EVA) material on that used in a microtiter plate sealer. The membrane can be held in place by a cap, fused to the device wall with heat or radio frequency, or otherwise attached through adhesive or other mechanisms. The pressure across the membrane will be minimized by limiting the travel of the pressurizing member, which will result in pressure equilibration between the inside and outside of the device. Following PCT treatment, the device can be positioned over a collection tube containing a sharp puncture device which can break open the membrane and release the resulting fluid into the collecting chamber.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

In addition to cells and tissues, fluids (e.g., sputum, mucus, or food products such as honey, molasses, or corn syrup), can also be processed in the devices. The device can be used to reduce the viscosity of such fluids or to liquefy samples so as to, for example, release microorganisms into a buffer or medium, with or without killing the organisms. Sputum, for example, which is generally liquefied using chemicals, can be liquefied in the devices of the invention, using pressure to release microorganisms such as Mycobacteria tuberculosis for further analysis or other treatment.

10 Part 2. The Processing Module

The new sample processing devices can also, optionally, include additional chambers for further processing of the sample. For example, the device can take the form of or include a "processing module." While the design for such a processing module is typically the same as or very similar to the design for the homogenization module, further processing of the sample can be achieved in the processing module through passage of the sample through additional barriers into additional chambers. For example, instead of having only two chambers, as described in the homogenization module, the processing module can have as many chambers separated by penetrable barriers as required for the desired processing or analysis of the homogenized sample. The additional chambers of the Processing Module that are used to process the sample are typically separated by penetrable barriers, rather than the porous barriers used in the homogenization process. Separation of the processing chambers can allow reagents contained within the chambers to remain unreacted prior to introduction of sample.

25 FIG. 14 illustrates a processing module wherein the chambers are positioned vertically. FIG. 15 illustrates a processing module wherein the chambers are positioned horizontally. FIG. 16 illustrates a processing module wherein the chambers are positioned both vertically and radially, separated by pressure sensitive barriers.

30 FIG. 18 illustrates a processing module wherein the chambers are positioned vertically, wherein the lower chambers can move radially with respect to the upper chamber and the barrier, allowing the sample to be separated from waste, debris and

WO 02/088296

PCT/US02/13187

impurities from the processing. The upper chamber can be removed to retrieve the desired product (e.g., purified nucleic acid). All operations of the processing module can be automated and programmable by computer. Furthermore, the entire device is disposable.

5 The barriers can be penetrated under a variety of conditions, not limited to high pressure. For example, the barriers can be temperature sensitive, breaking down at a set temperature. The barriers can also be penetrated by exposure to solvents, causing the barrier to dissolve into solution. Additionally, the barriers can be valves, removed either mechanically or electronically.

10 Once the barrier is penetrated, the pressure from the pressurizing member forces the sample into the adjacent chamber, allowing the sample to interact with the reagents contained within the chamber. This process of forcing sample into subsequent chambers continues, allowing stepwise processing of the sample, and subsequent analysis if desired. The nature of the compartments within the device
15 allows processing of the sample without manual handling.

Part 3. The Chamber Reagents

The identity of the reagents in each chamber can vary according to the processing to be achieved within that chamber.

20 For example, the physical and chemical properties of the reagents used in the capture fluid during the homogenization step can have an impact on the homogenization efficiency of pressure cycling and can also maintain the integrity and stability of the molecular components. As mentioned above, one possible homogenization mechanism is a "freezing and thawing" effect at subzero
25 temperatures, and that effect will depend on the characteristics of the capture fluid. Secondly, the composition of the capture fluid has an impact on the release and dissolution of the biomolecules of interest. Thirdly, the volume of the capture fluid is important, since it relates to the maintenance of the module integrity, e.g., by providing resistance to excessive pressure from the pressurizing member. Lastly, the
30 capture fluid needs to be compatible with the downstream assays.

Examples of the capture fluid can be found in the "Examples" section. In its simplest embodiment, the lysis fluid can be a hypotonic solution, such as water, or a

WO 02/088296

PCT/US02/13187

low salt Tris or Phosphate buffer that promotes the dissolution of the cellular material out of the cells. Alternatively, the lysis solution can contain preservatives or chemicals that are compatible with downstream assays. Capture solutions can also contain enzymes to assist in sample disruption. Alternatively, nuclease or protease inhibitors can be added to the capture solution to preserve the integrity of the proteins and nucleic acids. For applications requiring the extraction of ribonucleic acids, denaturants (e.g., guanidinium salt and urea) or detergents (e.g., SDS and CHAPS) can also be added.

The reagents used in chambers subsequent to homogenization of the sample include a variety wide enough to allow a range of processing steps. For example, a compartment can contain a capture element, allowing separation of particular elements of the sample such as nucleic acids or hydrophobic peptides. Separation and/or purification of the sample can further be achieved through chromatographic reagents, or even an electrical current within a chamber.

One or more chambers can optionally contain growth and/or transport media, allowing for inoculation with organisms, which can then be incubated directly in the devices of the invention. A non-limiting list of such organisms includes cells, viruses, bacteria, or parasites. For example, blood cells and other animal or plant cells, HIV, HAV, HBV, HCV, *Bacillus anthrasis*, *Mycobacteria tuberculosis*, *Vibrio cholera*, *Yersinia pestis*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Plasmodium* species can be grown in the devices. The media can be liquid or solid, and can be specific for a given organism or non-specific. Examples of suitable media include sheep blood agar (SBA), trypticase soy agar (TSA), or trypticase soy broth (TSB) (e.g., for growth of *Bacillus anthrasis*); MacConkey agar (e.g., for growth of Gram negative bacteria); or triple sugar iron (TSI) broth. The transport media can be, for example, a buffered solution such as Tris-EDTA (TE). The devices can be incubated at an appropriate temperature for the given organisms (e.g., 35-37°C for *Bacillus anthrasis*) for a sufficient time to allow for a detectable population, or to afford sufficient DNA for amplification by PCR or amplification of RNA by RT-PCR (e.g., followed by detection) or other methods. The growing organism can then be processed as described above (and optionally rendered inert) directly without opening the device, limiting the chances of contamination of the sample or the surroundings.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

The chambers can contain elements that allow DNA hybridization following nucleic acid extraction. For example, the DNA can hybridize by competitive binding to different fluorescent labeled oligonucleotides contained in the compartment.

5 Pressure can be subsequently applied to enhance the binding or dissociation of the hybridized oligonucleotides, as described, for example, in U.S. Patent No. 6,258,534.

Reagents can include those required for amplification of nucleic acid sequences, for example, those used in polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR), or reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

10 Pressure cycling in the chamber containing these reagents can also be used to enhance these reactions. Temperature cycling can also be incorporated with these reaction conditions.

DNA sequencing can be achieved in one or more chambers having the required reagents. Again, cycled pressure (e.g., PCT) can be used to enhance this reaction. For example, high pressure can modulate exonuclease activity, dissecting 15 nucleotide polymers into nucleotide monomers.

The reagents in the processing chambers can also be used to process proteins in a sample. Following the release of the proteins through cell lysis, proteins can be purified from the sample using such techniques as column chromatography or gel electrophoresis. Purification can occur based on molecular weight, or other physical 20 or chemical properties such as size, hydrophobicity, ionic interactions, metal chelating properties, and immunological reactivities. Pressure and cycled pressure can be an aspect of this processing.

Additionally, the chambers can contain reagents involved in immuno- or enzymatic assays. For example, the association and/or dissociation of molecules can 25 be controlled through the conditions within the chamber to control the specificity and affinity of specific complexes. The technology is applicable to both enzyme interactions as well as immunological interactions.

Part 4. Detection Module

30 One of the chambers can be used as a detection module for capturing a signal generated by the products as a result of the various processing steps applied to the sample. The detection module can be placed adjacent to a detector in such a way that

WO 02/088296

PCT/US02/13187

the signal generated inside this module can be read by the detector. The module can be made of transparent material that permits light or radiation to pass through to the Detector. A laser or other ionization generator can also be placed opposite the detector to excite signal generation inside the detection module. The Detector can be 5 a luminometer, fluorometer, photometer, spectrophotometer, ionization detector, flow counter, scintillation counter, camera or other analyzer. Signal received from the detector can be transmitted to a recorder physically or electronically to generate a measurement of the signal generated in response to specific analytes being measured in the sample. These measurements can be recorded in a computer, by print out, 10 visually or by other means.

Part 5. Barriers, which are Shredders for Difficult-To-Macerate Samples

Very hard-to-macerate samples, such as animal bones, teeth, plant stems, and roots, often require special homogenization equipment, such as a pulverizer or anvil. 15 One approach to homogenizing hard samples is to use in a device of the present invention a barrier that is a shredder screen of a more rigid material such as steel or high quality plastic. In some cases, a metal disk having holes through it can be used to reinforce an ordinary plastic lysis disk. In addition to using a barrier made of rigid material, simulated anvil type structures or pyramids made of rigid solid material will 20 be incorporated into the barrier (see, e.g., FIG. 3B). Besides using a stronger module, pressurizing member(s) and barrier which is a shredder screen, a capture fluid of very low pH, such as pH 2, can be used to soften the bone or tooth. Because of its corrosive nature, such fluids are normally difficult to handle by manual processes, but can be readily accommodated in the closed system as described for PCT 25 homogenization. Still further maceration of the sample can be accomplished, in the event maceration is incomplete, by using smaller samples. However, this can result in lowered sensitivity.

Part 6. Alternative Formats of Shredder for Lysing Biological Samples

The PCT homogenization principle incorporates two features which can 30 promote tissue disruption and release of cellular content: the physical forcing of tissue material through small openings in the devices can contribute to breaking up

WO 02/088296

PCT/US02/13187

large chunk of tissue, and the low temperatures and cycling pressure can subject the sample to repeated freeze-thaw thus further contributing to cellular disruption. The alternative formats of the devices can be designed based upon one or both of these principles. Various configurations of the module are envisioned, which can
5 incorporate various module sizes and materials, and can include features for preventing collapse of the module, preventing fluid leakage, increasing the homogenization efficiency, providing easy accessibility to the sample, facilitating multi-sample processing, providing easy insertion and removal of the module to and from the pressure chamber, and ensuring containment of infectious material.

10

Part 7. Disposable Design for a 96-well Plate

The device can be scaled up or down, thereby changing the corresponding sample size, compartment size, and reagent volume. Additionally, the scale of the module and chamber can be adjusted to accommodate multiple samples. The cap
15 design for multiple samples can be different from that of the single device. The simplest configuration would be in the form of a sheet of sealable and/or peelable membranes that are flexible enough to stretch into the space vacated during the compression without breaking. A series of pressurizing members joined together on a rigid sheet could be pushed simultaneously into the individual wells, such as in a 96-
20 well format. To fit 96 samples into the pressure cycling instrument, the shredders can be arranged in an orderly array such as six 4 x 4 or three 4 x 8 blocks, which can fit easily into the pressure chamber and download directly into wells compatible with a 96-well format for subsequent processing, if desired. (See FIG. 13)

FIG. 13 illustrates a pressure cycling instrument that fits into one well of a 96
25 wells plate. The barrier divides the two chambers, and the pressurizing member is sealed by an O-ring between the pressurizing member and the chamber wall. The sample is placed on top of the barrier and will be pushed through the barrier by the pressurizing member. When the pressure cycling is complete, the barrier and
30 pressurizing member will be removed and the solution in the second chamber can be transferred for further processing. This chamber can be fitted to a pressure cycling reactor such as that described in U.S. Patent No. 6,036,923.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

The device can also be designed such that the screen and pressurizing member are removable as a single unit after completion of the process.

For processing larger numbers of samples, a 96-well system can be used, in which samples are first lysed and subsequently transferred to another chamber or well 5 for washing and collection of filtrates. Alternatively, a disposable microwell format with multiple chambers can be used to handle the entire extraction process. In this configuration, an initial chamber containing the sample can be subjected to pressure lysis. A valve in the well would then open to allow washing of the sample and carrying away the waste. Finally, another valve leading to the nucleic acid collection 10 chamber would allow elution of the purified nucleic acid. Ideally, the entire process can be accomplished in a single purification module with minimum fluid exchange.

A simplified schematic diagram of the components of this device is shown in FIGS. 15A-15F. FIG. 15A illustrates the multichamber device wherein the sample is loaded into the upper half of the first chamber, but no pressure has been applied. FIG. 15B illustrates the result of initial application of pressure to the multichamber device, 15 wherein the sample has been processed and has been pushed through the first barrier. FIG. 15C illustrates the result of a further increase in pressure, wherein the sample has been pushed horizontally into Chamber 2. FIGS 15C-15F further illustrate the movement of the sample through the chambers, which are connected together in a 20 horizontal manner, as pressure is increased. This device preferably does not require highly skilled technicians, or manual handling of toxic or hazardous chemicals. The purified nucleic acid products can be made available in a 96-well configuration, which can be compatible with other automated instruments for amplification, sequencing or other analysis.

25

Part 7. On-Chip Homogenization by PCT Process

The homogenization process can be further miniaturized to incorporate 30 multiple functionalities for specific laboratory applications, such as nucleic acid or antigen detection. The shredder screen, pressurizing member, capture fluid, and holder can be made part of an integrated disposable unit that can deposit the extracted material to another location on a chip upon finishing the homogenization process. The chip can then be inserted into the analyzer and the temperature equilibrated

WO 02/088296

PCT/US02/13187

around the sample homogenization area using a heat sink. Pressure can be transmitted via two pistons, one from the pressurizing member side and the other from the cap side. The pressure process is similar to the single shredder operation. Pressure can also be generated by electrical magnetic pistons, rather than by using conventional hydraulic pumps. One advantage of using electrical magnetic pistons is that they can be moved at higher frequencies, such as on the millisecond scale. As soon as the pressure process is finished, the capture fluid and/or the PCT processed sample, can be withdrawn from the "cap" side by, for example, "piercing the cap."

10 Part 8. Disposable device design and fabrication

The device can be a disposable module, made of, for example, polymeric material, while maintaining its suitability for sample preparation and for lysis of individual cells and tissues.

15 **EXAMPLES**

The invention is further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention described in the claims.

20 Example 1: Lysis of Rat Liver Sample using Cycled Pressure at Low Temperature

Whole pieces of fresh frozen rat liver, which were immediately frozen on dry ice, and kept either on dry ice or at -70°C, were obtained from Pel-Freez (Rogers, AR). The frozen tissue was cut on a block of dry ice using a razor blade to approximately 0.20 g, as determined by weighing on an electronic scale. The sample was kept frozen during the cutting procedure and stored in microcentrifuge tubes at -70°C until use.

25 The device used in this experiment was comprised of a body, two rams, and a shredder stage made of polypropylene (see FIG. 2). The body was a cylindrical tube, 38.1 mm long, with an outside diameter of 13.8 mm, and an inside diameter of 11.6 mm. One end of the tube was threaded to accept a cap. The cap was used to seal and hold the ram at the end of the tube. The rams were cylindrical shaped parts that were 30 12.7 mm long and 11.5 mm diameter. Each of the rams was equipped with an O-ring

WO 02/088296

PCT/US02/13187

5 seal that sealed against the interior surface of the body. The shredder stage was a cylindrical tube in shape, 9.53 mm long, and with an outside diameter of 11.5 mm, and an inside diameter of 10.7 mm, with the screen attached at one end. The screen had 49 holes with diameters of 0.94 mm appropriately spaced in the 11.5 mm diameter (see FIG. 3A).

10 The device was assembled by, first putting the bottom ram into the body at the threaded end, and then tightening the cap to hold the bottom ram on the body. 0.7 ml capture fluid (saturated guanidinium HCl, 1% CHAPS; saturated GTC, 0.1% NP40, or a proprietary lysing solution) was loaded from the open end. Then, the barrier, which was a shredder stage, was placed inside the body with the end with the holes away from the threaded end. A piece of frozen tissue, approximately 0.20 g was placed into the body atop the shredder stage. Once the sample had been positioned atop the shredder stage, the top ram was inserted into the body, with the seal ring creating a seal with the body.

15 For pressure cycling, the module was placed into pressure chamber (BaroCycler™ V2.4, custom built by BBI Source Scientific, Garden Grove, CA) that had been pre-chilled and equilibrated to -20°C using a Neslab circulating chiller. The shredder with sample was equilibrated for temperature for 2 minutes. Pressure was applied to the sample at 15 kpsi, held at that pressure for 20 seconds, and then brought 20 back to atmospheric pressure for 20 seconds. The pressure ramp up and ramp down times were less than 10 seconds and were not included in the hold times described. This sequence was repeated again for a total of 5 cycles. Following these 15 kpsi pressure cycles, an additional three pressure cycles of 20 seconds at 35,000 psi and 20 seconds at atmospheric pressure were applied. All the pressure cycles were 25 programmed and carried out automatically by executing the program. Upon finishing the last pressure cycle, the shredder module was taken out of the reaction chamber and turned upside down. The cap that was originally on the bottom and the adjacent ram underneath were removed and the capture fluid including the tissue debris was transferred to a new microcentrifuge tube. The sample was centrifuged at 7,400 x g 30 for 1 min, and the supernatant was transferred to a new tube and was kept on dry ice.

A portion of the crude supernatant was also purified by the Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, IN) PCR template purification kit to extract the released

WO 02/088296

PCT/US02/13187

nucleic acids in the supernatant. The procedure as described in the kit was followed, except that the lysis step using proteinase K was omitted. 200 µl sample was mixed with 200 µl binding buffer provided with the kit, 140 µl double distilled water and 100 ml isopropanol. The solution was then mixed by vortex and transferred to the 5 high pure filter tube and centrifuged at 8,000 rpm for 1 min. After centrifugation, the filter was washed with 500 µl washing buffer by centrifugation again at 8,000 rpm for 1 min. After the first wash, the wash step was repeated and centrifuged. A 10 second centrifugation at 13,000 rpm was applied to remove residual wash buffer. To elute the nucleic acids, 200 µL pre-warmed (70°C) elution buffer was added to the filter 10 tube and centrifuged at 8,000 rpm for 1 min.

To estimate the yield and size of the nucleic acid released by the PCT homogenization procedure, an agarose gel analysis was performed using 0.67% agarose in 0.5' TBE buffer, running at constant 120 V for 60 minutes. The agarose gel was pre-stained with ethidium bromide and photographed using a ChemiImager™ 15 and AlphaEase™ V5.5 software (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA)

FIG. 12 illustrates the total nucleic acids present in the crude lysate (Lane E1-E7), without carrying out any purification procedures, where samples 1 (with sat. guanidinium•HCl, 1%CHAPS), 3 (with sat. GTC, 1%NP40) and 5 (with proprietary lysing buffer) were obtained by PCT tissue shredder treatment, cycled 5 times at 20 2×100 MPa and 3×235 MPa, -25°C, 20s high pressure/20s 1 atm holdings. Samples 2, 4 and 6 were no-pressure controls for sample 1, 3 and 5 respectively. Sample 7 was mortar/pestle homogenized. Also on FIG. 12, Lane D1-D7 and R1-R7 were samples extracted with Roche High Pure PCR template kit and treated with DNase (D1-D7) or 25 RNases (R1-R7). The results showed that the PCT treated sample achieved similar levels of genomic DNA as the Roche Molecular kit, judged by the band intensity of the agarose gel (FIG. 12, lane R1, R3, R5, and R7) or O.D. 260 nm reading. Negative controls were obtained following the same treatment except pressure is kept at atmospheric level during the experiment.

As shown in FIG. 12, large amounts of genomic DNA (gDNA; lanes R1, R3) 30 and ribosomal RNA (rRNA; lanes D1, D3) were preserved and released by PCT shredder as compared to no-pressure control (Lane D2, R2, D4, R4). The yield of gDNA was actually greater than that of the positive control obtained using the Roche

WO 02/088296

PCT/US02/13187

kit procedure, which included a 4-hour pre-incubation step with proteinase K to solubilize the tissue prior to extraction (Lane R2, R4 versus R7) in this experiment.

5 Example 2: Study of Tissue Lysis Efficiency and Improvements of The Two Chamber Homogenization Module Design

Using the rat liver as a model, tests were performed on pressure profile (from 15 to 50 kpsi), cycle number profile (from 2 to 45 cycles), temperature profile (from -30 to 0°C), number of shredder orifices (from 10 to 89 holes on identical area) and a variety of capture fluids (Gdn/1% CHAPS; phosphate buffered saline, GTC/1% NP40). Following each test condition, the capture fluid was transferred to a new microcentrifuge tube and briefly centrifuged at 7,600 x g. The supernatant was collected and stored in new microcentrifuge tubes. Nucleic acids were extracted from the supernatant using commercially available kits. For analysis of DNA yields, purified nucleic acids were subjected to RNase treatment followed by analysis by agarose gel electrophoresis. The recovered material was treated with RNase prior to electrophoresis in a 0.8% agarose gel in 0.5 x TBE buffer, running at constant 120 V for 60 min.

10 FIG. 4 illustrates one of the pressure cycling profiles. The yield of gDNA released by 5 cycles of PCT (Lane 3) was greater than that released by 2 cycles of PCT (Lane 2) as determined by integration of the densitometric scan of the band intensities for gDNA on the gel and was comparable to that obtained by the control method using the Roche kit. Similarly treated supernatant from tissue held at -25°C and at atmospheric pressure is shown as a negative control (Lane 1).

15 These results demonstrated at least an equivalent release of nucleic acids from tissues by the two chamber homogenization module method of treatment as achieved using the standard methods, without the requirement for extensive (4 hr) proteinase K digesting. The yield of genomic DNA was similar to that obtained by a positive control. The RNA was well preserved judging by the ribosomal RNA bands. The relatively high background of nucleic acids seen in one of the no-pressure controls, 20 sample 2 of FIG. 12 was not typical for these tissue samples and was not seen in other experiments. Lane D7 has no RNA bands, since during the prolonged incubation step with proteinase K specified in the Roche kit procedure, endogenous RNases

WO 02/088296

PCT/US02/13187

effectively degraded any RNA released. The PCT shredder itself used in these studies appeared to be relatively pressure-stable and reusable after cleaning. Unlike sealed tubes made of similar plastic as used in the shredder and subjected to PCT conditions, no stress marks were observed on these modules, presumably because the pressure 5 inside and outside the modules was readily equilibrated by the movement of the ram.

Example 3: PCT homogenization of rat brain, pancreas, large intestine and skeleton muscle

The effectiveness of PCT homogenization was also evaluated on several 10 additional tissues, which present distinctive difficulties in extractions. Brain tissue is particularly rich in proteins and lipids, which usually present white, flocculent material in the aqueous phase during an aqueous-organic liquid phase extraction. Pancreas is extremely high in nuclease concentration, such that RNA is usually 15 degraded and difficult to recover by conventional methods. Large intestine and skeleton muscle are fibrous tissues with connective tissue components, making them difficult to homogenize.

These tissues were PCT processed under the same experimental procedure in 20 the liver used for FIG. 12, except 100 µl, instead of 200 µl lysate was extracted using the Roche High Pure PCR template kit. The final elution volume was 60 µl. The gDNA and rRNA were determined by an agarose gel. FIG. 5 shows that the 25 homogenization efficiencies of the PCT process on intestine and muscle were comparable to the conventional proteinase K method. Lanes 1-5 contained genomic DNA released from large intestine. Lanes 6-10 contained genomic DNA released from skeleton muscle. Lanes 1, 3, 6, and 8 were samples homogenized using the PCT module. Lanes 2, 4, 7, and 9 were no-pressure controls respective to lanes 1, 3, 6, and 30 8. Lanes 5 and 10 were positive controls by proteinase K homogenization. Lanes 1, 2, 6, and 7 were processed in the presence of sat. Gdn/1% CHAPS. Lanes 3, 4, 8, and 9 were processed with 6M GTC/1% NP40. All samples, except the no pressure control were supernatants from the crude lysate and extracted with Roche High Pure PCR template kit without the proteinase K treatment.

The genomic DNA bands presented in the PCT lysate were amplifiable and resulted in identical PCR products produced by the positive control (FIG. 6). FIG 6

WO 02/088296

PCT/US02/13187

illustrates PCR amplification of genomic DNA from skeleton muscle samples using β-actin primer set from Clontech. Lanes 1, 2, and 3 were PCR products from 1:5, 1:25 and 1:625 diluted PCT treated template. Lanes 4, 5, and 6 were PCR products from 1:5, 1:25 and 1:625 diluted ‘positive control’ template. Lane 7 illustrates the 5 PCR product using β-actin cDNA control obtained from Clontech.

FIG. 7 illustrates rat brain lysate extract. Lanes 1, 2, 6, and 7 were processed in the presence of saturated Gdn/1% CHAPS. Lanes 1 and 6 were from a PCT homogenized sample. Lanes 2 and 7 were sample from no-pressure control. Lanes 3, 10 4, 8, and 9 were treated with 6M GTC/1% NP40. Lanes 3 and 8 were from pressure treated sample, wherein lanes 4 and 9 were no pressure controls. Lanes 5 and 10 were from the Roche kit ‘positive control.’ Lanes 1-5 were treated with RNase. Lanes 6-10 were treated with DNase. Sample 10 lacked RNA due to the proteinase K step.

RT-PCR RNA templates from PCT-treated or no-pressure treated tissue supernatants were obtained by extraction with the Roche High Pure PCR template kit 15 procedure, but omitting the proteinase K pre-digestion step. The “positive control” was generated from an identical tissue specimen using the Roche High Pure Tissue™ RNA procedure including the proteinase K digestion step. The resulting extracts were subjected to RT-PCR using the QIAGEN® One Step RT-PCR protocol and primers for β-actin obtained from Clontech (Palo Alto, CA). To estimate the yield of nucleic 20 acid released by the PCT homogenization procedure, an agarose gel analysis was performed using 0.8% agarose. Results show that RT-PCR products recovered from PCT templates were comparable to the kit control. Interestingly, it seems that more mRNA were recovered from the pancreas sample by the PCT method than by the control Roche kit. FIG. 8 illustrates β-Actin RT-PCR products from rat brain 25 templates. Lanes 1-3 were from a pressure extracted sample. Lanes 4-6 were from a positive control sample prepared using Roch High Pure tissue RNA kit. Template dilution factors for 1-3 and 4-6 were 1:5, 1:25 and 1:625 respectively. Lane 7 contained a Clontech primer set control.

FIG. 9 illustrates rat pancreas homogenized by the PCT module. Lanes 1-5 30 showed genomic DNA in the extract and lanes 6-10 showed rRNA from the same extracts purified using Roche High Pure Tissue RNA kit. Samples were treated

WO 02/088296

PCT/US02/13187

similarly to those for the rat brain shown in FIG.7 Lanes a-g from the pancreas were equivalent to lanes 1-7 described in FIG 8 from rat brain above.

The lack of signal in Lane a, FIG. 9 was likely due to the existence of PCR inhibitors in the template. This experiment was repeated and the data showed similar 5 results. The most important observation is that the PCT method is effective in releasing and protecting mRNA from pancreas, a particularly difficult task to accomplish by conventional tissue homogenization methods.

10 Example 4: Plant tissue homogenization: corn leaf nucleic acid release and
PCR amplification

Additional experiments were conducted to demonstrate homogenization and release of genomic DNA, ribosomal and messenger RNA from corn leaves. The standard method of release of nucleic acids from corn leaf requires mincing with razor blades followed by mortar and pestle homogenization. In order to preserve nucleic 15 acids from degradation, the homogenization process is typically performed in the presence of liquid nitrogen. The tissue is then incubated with proteinase K for release of nucleic acids followed by extraction for genomic DNA using standard extraction methods or kits.

In the PCT homogenization experiment, a fresh corn leaf was collected after 20 germination for 7 days. 0.2 g of fresh leaves was rinsed with cold distilled water and temporally stored in microcentrifuge tubes at -70°C. For these studies, 0.7 ml extraction buffer (6M guanidinium/1% CHAPS; 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA [TE]; or GTC/1% NP40) was added into the capture compartment, of the shredder module and subjected to PCT treatment as described for the animal tissues. 25 The pressure pulsing sequence is similar to that described in Example 1. After the pressure treatment, capture fluid was collected and briefly centrifuged, 8,400 x g for 1 min, to remove debris. The supernatant is collected and analyzed by an agarose gel electrophoresis.

FIG. 10 illustrates the release of DNA using the PCT module. Lanes 1 and 2 30 show samples processed in a 6M Gdn/1% CHAPS buffer. Lanes 3 and 4 were processed in a 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM EDTA [TE] buffer. And, lanes 5 and 6 were processed in a GTC/1% NP40 buffer. No pressure control samples were shown

WO 02/088296

PCT/US02/13187

in lanes 2, 4, and 6. A QIAGEN plant DNA extraction kit process was applied to the sample in lane 7. As shown in FIG. 10, the results illustrated that similar amounts of DNA were released from corn as compared to that by QIAGEN® DNeasy Plant Mini™ kit, which required extensive grinding with a mortar and pestle in liquid nitrogen prior to extraction (FIG. 10). Interestingly, even when TE buffer was used as collection solution, significant amount of DNA was recovered. All DNA samples served efficiently as templates for PCR reaction, giving similar results to those seen with the control template extracted with the mortar and pestle.

The results illustrated in these examples show that PCT treatment can be used to liberate nucleic acids from a variety of animal and plant tissues without the requirement for extensive digestions with proteinase K or the need for homogenization with mortar and pestle. Both RNA and DNA are recovered efficiently, with little degradation of RNA observed. Nucleic acids can be released by PCT even in buffers (e.g., TE) in the absence of detergents.

Crude lysates are suitable for use as templates in downstream processing, such as PCR. FIG. 11 illustrates PCR amplification of corn leaf DNA released from the above described process. The primer set amplified the 'MTTC' region in the corn genome. Lanes 1a-1c, 2a-2c, and 3a-3c contained PCT module released sample. Lanes 4a-4c contained the positive control sample. Lanes 1a, 2a, 3a, and 4a, contained template concentration of 1:5. Lanes 1b, 2b, 3b, and 4b, contained template concentration of 1:25. Lanes 1c, 2c, 3c, and 4c contained template concentrations of 1:625. The results demonstrate that DNA obtained using the PCT module yielded identical product to the 'positive control.' The methods described therefore are much faster and easier to conduct and result in high yields of good quality nucleic acids using fewer steps than conventional methods.

Example 5: Multichamber device for purification of Nucleic acid by pressure and electric current

In one configuration, pressure can be combined with an electric field to release the nucleic acids from the cells and purify them (FIGS. 17A-17B). FIG. 17A illustrates 7 parts of the extraction module and assembly are shown (e.g., the top cap, the pressurizing member (a ram), the body of the module, an electrode, a barrier

WO 02/088296

PCT/US02/13187

staged at the lower portion of the module, an sealing member (an o-ring), and a bottom cap). These features are also shown in cross section. FIG 17B illustrates the function of the assembled module. The sample is placed into chamber 1, and the RAM is moved to deliver sample into chamber 1 during 'Loading' period. Between 5 chamber 1 and 2, this device is also equipped with a barrier (e.g., a shredder) for solubilizing tissues. After applying cyclic pressure under appropriate temperature, lysis of cells and release of nucleic acids occur. Following cell lysis, the lysate is transferred into chamber 2 by passing the barrier (shredder) between the compartments via pressurization. Temperature can also be important to induce the 10 pressure drive freeze-thaw effects. Following the 'Loading', 'Lysis/Deproteinization' involving application of cycled high pressure begins. Electrode E1-E2 is on and pressure is cycled between 15 and 75 MPa. Then, the 'Extraction' is initiated at elevated pressure with electrodes E3-E4 activated. In chamber 2, the released nucleic acids would bind to a resin with specific affinity for nucleic acids. An electric current 15 applied to the chamber results in migration of nucleic acids from the binding resin in chamber 2A to an electrode in chamber 2B (See FIG. 17B). The movement of nucleic acid from chamber 2A to chamber 2B introduces a chromatographic component to the nucleic acid isolation procedure, making it possible to separate nucleic acids of different sizes by varying the pressure and intensity of the electric field. Depending 20 upon the nature of sample, this process may take 1-15 min. Following electrophoretic separation, the nucleic acids are eluted into a collection chamber, Chamber 3B, from which purified nucleic acids are subsequently removed by recovering the binding membrane. A high pressure instrument (e.g., BBI's Barocycler™) capable of supporting both the cell lysis and nucleic acid separation allows both high throughput 25 processing and analysis. The reaction chamber can be designed to accommodate multiple modules.

Example 6: Purification of Nucleic Acids by Pressure and binding to resin

A nucleic acid preparation module enables cell lysis and purification of 30 nucleic acids by step-wise passage through a series of chambers (FIG. 18). This device consists of an upper sample chamber into which the sample is loaded and in which the cell lysis takes place. This chamber is sealed off from the outside

WO 02/088296

PCT/US02/13187

pressurizing fluid by a ram having a rubber gasket. The chamber can also contain a porous support (for cells) or porous "shredder" to facilitate fragmentation of tissue chunks into smaller pieces to expedite nucleic acid extraction by forcing the tissue through these pores under pressure. The cap, or ram, serves both to seal the module and to transmit pressure to the sample. Following PCT (cycling of high pressure), the extraction buffer containing nucleic acids is transferred from chamber 1 to chamber 2 for purification of the nucleic acids. Nucleic acid could be bound to a matrix, such as silica, ion exchange resin, or commercially available reagents such as QIAGEN® plasmid extraction, or QIAamp extraction columns. The transfer of liquid between compartments is mediated by a rupture of the barrier between compartments through application of pressure. Temperature or mechanical means can also be used. Alternatively, a series of valves and tubes can be incorporated into the multichamber device, which would enable the addition and removal of fluids as well as transfer of reagents from one chamber to the next.

Chamber 2 contains a DNA (or RNA) binding resin (e.g., silica DEAE) that binds nucleic acids. A liquid input/output system is used to introduce and remove liquids allowing the debris and impurities to be washed away into Chamber 2. The purified nucleic acid is then eluted into the collection chamber (Chamber 3). A valve directs the flow of wash buffer to the waste receptacle and the purified nucleic acid to the collection chamber.

In this configuration, sample is transferred into the chamber containing lysis buffer and binding matrix. The extraction module is sealed and inserted into a BaroCycler™. Following pressure treatment, debris is washed away at low pressure and DNA eluted into the collection chamber at high pressure. This flexible design allows selection of different lysing and washing buffers and nucleic acid binding matrices, and also allows programming of pressure conditions required for each subsequent processing step.

The extracted nucleic acid can be used directly for microarray analysis or amplification without further purification. Alternatively, the solute might be applied to one of the lab-on-chip systems with components for DNA sizing and separation or for the separation of total and mRNA. If necessary, DNA and/or RNA can be extracted from the total nucleic acid preparation using commercial extraction kits.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

Example 7: Lysis in low salt

Achieving cell lysis in low salt solutions without detergents, allows the resulting nucleic acid to be sufficiently pure for many subsequent analytical procedures including PCR and sequencing. Impurities such as proteins and other debris can be bound to a different matrix, such as Chelex™, or Precipitate™ leaving the nucleic acid in solution. In this configuration, (See FIG. 18) the debris and impurities are retained in Chamber 1, while the soluble nucleic acid collected into Chamber 2 by simple filtration. The released nucleic acids are subsequently used directly in a variety of biochemical and enzymatic applications, including restriction endonuclease digestion, PCR, DNA sequencing and other analytical methodologies.

The devices described in this patent provide a complete, self-sustained system for nucleic acid purification, taking advantage of pressure mediated lysis and deproteinization, followed by purification to obtain a concentrated nucleic acid product. Subsequent processing of the nucleic acid can include washing away the debris at low pressure and eluting the purified nucleic acid under high pressure in a second step, using a BBI BaroCycler™ v3.0.

Example 8: Double O-Ring Device

FIG. 19 is a drawing of a multichamber device 100 of the invention having double O-rings 102 on both a ram 104 and a screw cap 106. There are also grooves 108 in the ram and cap that can capture any fluid that may have gotten past either O-ring from inside the tube or from outside the tube. The device also includes a lysis disk 110, a sample chamber 112, and a fluid/reaction chamber 114. In a typical use of the device 100, fluid/reaction chamber 114 is charged with a buffer solution, screw cap 106 is screwed into a threaded portion 118 of device 100 adjacent to chamber 114, a sample to be processed or macerated is put into sample chamber 112, and ram 104 is inserted into the sample chamber, optionally using a tool that enables the ram to be inserted to a preset depth. An example of such a tool is shown in FIG. 20. One end of the tool shown in FIG. 20 acts as a screw driver to screw in or unscrew cap 106. The other end of the tool has a post that sets ram 104 to a predetermined proper depth. The device 100 is then put into a pressure cycling apparatus such as a BBI

WO 02/088296

PCT/US02/13187

BaroCycler®, which causes the ram to force the sample through lysis disk 110, generally resulting in a solution or suspension of the lysed sample in the buffer solution in chamber 114.

It can be determined whether the devices 100 "leak" from either inside or outside of the tube by using a known concentration of fluorescein solution and measuring the fluorescence of the solution inside the tube or fluid in bags outside the tube. When the fluorescence is compared to a dose response curve made from fluorescein in the appropriate buffer, the amount of fluorescence can then be converted to volume. This method is very sensitive and can be used to detect leaks of as low as 0.1 μ l volume. The method can be used for evaluation of newly made tubes, for quality control, or for samples that have been processed.

Example 9: Rat tail lysis by PCT

Rat tails were obtained from Pel-Freez Biologicals, freshly frozen and kept on dry ice or at -70°C. 0.2 g pieces of rat tail were processed at 35 kpsi, 4°C, for five one-minute cycles using a BBI Barocycler® v2.4 in multichamber devices of the invention as shown in FIG. 19. The devices were each supplemented with a stainless steel disk having twenty 2 mm holes as shown in Figure 3A. The purpose of the metal disks is to reinforce the plastic lysis disk in the body of the devices. Buffers used in this set of samples are listed in the third column of Table 1:

Table 1

Sample Number	Treatment	Lysis Buffer	DNA conc. (μ g/mL)	% of DNA Yield by proteinase K digestion method
1	Protease K 55 °C 30 min. + PCT	Qiagen ATL buffer	41	81%
2	Protease K 55 °C 5 hours	Qiagen ATL buffer	79	100%
3	PCT	Qiagen ATL buffer	72	91%
4	PCT	Sat. Gdn./1% Chaps	71	90%

WO 02/088296

PCT/US02/13187

5	Mortar & Pestle	Qiagen ATL buffer	63	80%
6	Negative control	Sat. Gdn./1% Chaps	2	3%

After obtaining the crude lysate from the three different methods defined by the lysis buffers, the QIAGEN® QIAamp® DNA Tissue kit protocol was followed to purify genomic DNA from the samples, except that the proteinase K treatment step
5 was omitted for the "PCT" and "Mortar & Pestle" samples (i.e., samples 3-5). The negative control sample was obtained by treating the sample in the same way, except that no pressure treatment was conducted. The corresponding DNA yield indicated in Table I was obtained by O.D. 260 readings.

As demonstrated by agarose gel electrophoresis of the genomic DNA purified
10 from samples 1-6, shown in FIG. 21, the lysis efficiency accomplished using the pressure cycling ("PCT") is comparable to the conventional proteinase K digestion or mortar-pestle methods. Agarose gel shows listed in Table X. Same volume of purified DNA samples were loaded onto each lane. Other experiments (data not shown) demonstrated that similar amounts of total RNA were successfully extracted
15 from the rat tails compared to the mortar & pestle method. The DNA and RNA yielded from the PCT treatment were PCR-amplifiable as exhibited by the PCR or RT-PCR using β -actin primer sets.

Example 10: Rat brain processing and extraction of molecules therefrom

20 Rat brain samples were obtained from Pel-Freez Biologicals. The samples were fresh frozen, and then stored on dry ice or at -70°C. The samples were treated by PCT at 35,000 psi °C, for five one-minute cycles, in a saturated Guanidinium HCl solution containing 1% CHAPS. FIG. 22A shows an agarose gel that demonstrates the presence of extracted genomic DNA in the crude lysate, purified using a
25 QIAGEN® QIAamp DNA Tissue kit (the proteinase K digestion step was omitted).

Rat brain proteins were also extracted using PCT (five one-minute cycles at -
25°C in phosphate-buffered saline (PBS)), a no-pressure control, and by mortar and pestle in liquid nitrogen followed by Omni homogenization (FIG. 22B). The rat proteins were examined using Western blot analysis (FIG. 22C). In the Western Blot

WO 02/088296

PCT/US02/13187

assay, the first antibody was the universal monoclonal anti-nitric oxide synthase, mouse; and the second antibody was anti-Mouse IgM (m-Chain specific) alkaline phosphatase conjugate (both antibodies were obtained from Sigma, St. Louis, MO). Brain tissue was homogenized in PBS.

5 This example demonstrates that PCT can extract DNA and proteins from an animal brain tissue. The PCT process was compatible with PCR amplification for DNA analysis. The antigenic reactivity of the nitric oxide synthase was also preserved. The ELISA assay (data not shown), also demonstrated that rat brain can be processed by PCT to yield other natural proteins.

10

Other Embodiments

A number of embodiments of the invention have been described. Nevertheless, it will be understood that various modifications can be made without departing from the spirit and scope of the invention. Accordingly, other embodiments 15 are within the scope of the following claims.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

WHAT IS CLAIMED IS

1. A sample processing device for use in a pressure-modulation apparatus, said device comprising:
 - multiple chambers;
 - at least one barrier positioned between two chambers, wherein said barrier is either porous or penetrable, or can be rendered porous or penetrable by exposure to a physical, chemical, or mechanical stimulus; and
 - at least one pressurizing member in a position to subject the sample to high pressure and to force the sample through at least one barrier.
2. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers is part of a molded device.
3. The device of claim 1, comprising:
 - two or more chambers;
 - multiple barriers, at least one of which is porous or can be rendered porous or penetrable by exposure to a physical, chemical, or mechanical stimulus; and
 - two or more pressurizing members, which are activated independently, at differing hydrostatic pressures, having at least one member in a position to subject the sample to high pressure and to force the sample through at least one barrier.
4. The device of claim 3, wherein at least two of the chambers are linked together by threaded mechanical interlocks or a threading mechanism.
5. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers comprises plastic, ceramic, metal or glass.
6. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers has a volume up to 100 µl.
7. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers has a volume up to 100 ml.
8. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers has a volume up to 500 ml.
9. The device of claim 1, wherein the surface of one or more chambers is inert to biomolecules.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

10. The device of claim 1, wherein the surface of one or more chambers is derivatized with biomolecules.
11. The device of claim 10, wherein the surface of one or more chambers is derivatized with molecules that interact with biomolecules.
12. The device of claim 11, wherein the molecules comprise small organic molecules.
13. The device of claim 1, wherein at least one barrier further comprises a filter.
14. The device of claim 13, wherein the filter comprises a material selected from the group consisting of; polyvinyl chloride, polyether sulfone, nylon, nitrocellulose, cellulose esters, cellulose acetate, cellulose nitrate, polytetrafluoroethylene (PFTA), vinyl, polypropylene, and polycarbonate.
15. The device of claim 1, wherein said barrier is in a position between a first chamber and a second chamber, and openings in the barrier communicate between the first chamber and the second chamber.
16. The device of claim 1, wherein at least one barrier is pierceable.
17. The device of claim 1, wherein at least one barrier is capable of being dissolved by organic solvent.
18. The device of claim 1, wherein at least one barrier can be removed mechanically.
19. The device of claim 1, wherein at least one barrier can be removed through a change in temperature.
20. The device of claim 1, wherein at least one barrier comprises a valve.
21. The device of claim 1, wherein at least one barrier can be removed by any one or a combination of the following mechanisms: piercing, solvation, melting, breaking, and mechanical removal.
22. The device of claim 1, wherein said barrier comprises a polymer, metal, or ceramic.
23. The device of claim 1, wherein said barrier comprises a composite or layers of solid materials.
24. The device of claim 1, wherein said barrier has plurality of openings.
25. The device of claim 24, wherein said openings are generally round.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

26. The device of claim 24, wherein the diameter of the openings is between about 1 μm and about 100 μm .
27. The device of claim 24, wherein the diameter of the openings are between 0.1 mm and 1 mm.
28. The device of claim 24, wherein the diameter of the openings are between 1 mm and 1 cm.
29. The device of claim 24, wherein the diameter of the openings are between 1 cm and 3 cm.
30. The device of claim 1, wherein the barrier contains a plurality of solid, pointed protrusions.
31. The device of claim 30, wherein said solid comprises a polymer, metal, or ceramic.
32. The device of claim 30, wherein said pointed protrusions are in the shape of a pyramid or cone.
33. The device of claim 30, wherein said protrusion extends 0.01 cm to 0.1 cm above the base of said screen.
34. The device of claim 30, wherein said protrusion extends 0.1 cm to 1 cm above the base of said screen.
35. The device of claim 30, wherein said protrusion extends, 1 cm to 3 cm above the base of said screen.
36. The device of claim 1, wherein said pressurizing member comprises at least one ram mounted to move within a chamber.
37. The device of claim 1, wherein the pressurizing member comprises a polymer, metallic, or ceramic material.
38. The device of claim 1, wherein the pressurizing member is circular in cross-section.
39. The device of claim 1, wherein the chambers comprise a wall and the pressurizing member comprises one or more annular seals in contact with the wall as the pressurizing member moves.
40. The device of claim 39, wherein said seal is polymeric, metallic, or ceramic.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

41. The device of claim 1, wherein at least one pressurizing member comprises a cylinder having a sealing ring around its circumference, and the chambers are generally cylindrical.

42. The device of claim 1, wherein the device comprises at least two pressurizing members, one of the pressurizing members being positioned on a first side of a barrier and the other of the rams being positioned on a second side of the barrier, opposite to the first side of the barrier.

43. The device of claim 1, wherein more than one chamber is mounted with a pressurizing member.

44. The device of claim 1, further comprising a container having an orifice, said chambers being positioned within the orifice.

45. The device of claim 1, wherein one or more of the chambers is filled with a fluid.

46. The device of claim 1, wherein one or more of the chambers further comprises a temperature-controlling device.

47. The device of claim 1, wherein one or more of the chambers further comprises a temperature-cycling device.

48. The device of claim 1, wherein one or more of the chambers further comprises a pressure-controlling device.

49. The device of claim 1, wherein one or more of the chambers further comprises a pressure-cycling device.

50. The device of claim 1, further comprising an detection module built into one or more of the chambers.

51. A sample processing device for use in a pressure-modulation apparatus, said device comprising:

multiple chambers, wherein the chambers are positioned in a vertical configuration;

at least one temporary barrier positioned between pairs of chambers; and

one pressurizing member positioned to force a sample through at least one of the barriers.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

52. The device of claim 51, further comprising a porous barrier positioned between the first and second chamber.

53. A method of processing a biological sample, comprising:
providing a device according to claim 1;
adding sample to a first chamber; and
subjecting the device to elevated pressure to cause the pressurizing member to force a sample through a barrier between said first chamber and second chamber, and into said second chamber.

54. The method of claim 53, wherein the biological sample is forced through multiple barriers by the pressurizing member.

55. The method of claim 53, wherein the biological sample is selected from the group consisting of; a solid material, a semi-solid material, a gas and a liquid.

56. The method of claim 53, wherein the biological sample is selected from the group consisting of; an insect or small animal, a fungus, a plant or animal tissue, a food or agricultural product, a forensic sample, and a human tissue.

57. The method of claim 53, wherein the biological sample comprises human blood, serum, or urine.

58. The method of claim 53, wherein the biological sample is frozen.

59. The method of claim 53, wherein the size of the biological sample is between 10 mg and 100 mg.

60. The method of claim 53, wherein the size of the biological sample is between 0.1 mg and 1.0 mg.

61. The method of claim 53, wherein the size of the biological sample is between 10 mg and 1 g.

62. The method of claim 53, wherein the size of the biological sample is between 1 g and 20 g.

63. The method of claim 53, wherein the size of the biological sample is between 20 g and 500 g.

64. The method of claim 53, wherein the elevated pressure is above 500 psi.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

65. The method of claim 53, wherein the elevated pressure is above 5,000 psi.
66. The method of claim 53, wherein the elevated pressure is above 10,000 psi.
67. The method of claim 53, wherein the elevated pressure is above 50,000 psi.
68. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is applied to the sample below the sample's atmospheric pressure freezing temperature.
69. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is applied at a temperature in the range of 4°C to ambient temperature.
70. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is applied at ambient temperature.
71. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is applied at a temperature in the range of ambient to 90°C.
72. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is repeatedly cycled.
73. The method of claim 72, wherein said elevated pressure is cycled at a frequency in the range of milliseconds.
74. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is cycled at a frequency in the range of seconds.
75. The method of claim 53, wherein said elevated pressure is cycled at a frequency in the range of minutes.
76. The method of claim 53, further comprising analyzing the sample after, or as part of, said sample preparation.
77. The method of claim 53, further comprising extracting a specific substance or substances from the biological sample.
78. The method of claim 53, wherein DNA, RNA, or at least one cellular protein in said sample is isolated after or as part of said sample preparation.
79. The method of claim 53, wherein a pharmaceutical composition is isolated from the biological sample after or as part of said sample preparation.
80. The method of claim 53, further comprising processing a specific substance or substances present in from the biological sample.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

81. The method of claim 80, wherein the processing step is selected from the group consisting of; amplification of a specific substance, specific binding to a ligand, specific elution from a ligand, carrying out a chemical reaction, carrying out one or more enzymatic reactions, carrying out one or more nucleic acid sequencing reactions, solubilization of recombinant proteins from inclusion bodies, and carrying out one or more catalytic reactions.

82. The method of claim 81, wherein the amplification is carried out using polymerase chain reaction.

83. The method of claim 81, wherein the chemical reaction comprises nucleic acid hybridization.

84. The method of claim 81, wherein the chemical reaction comprises interacting an antigen and antibody.

85. The method of claim 80, wherein the processing comprises carrying out stepwise reactions, wherein a different step takes place in each chamber of the device.

86. The method of claim 53, wherein multiple devices according to claim 1 are interconnected in said pressure-modulation apparatus.

87. The method of claim 86, wherein 8 to 12 devices according to claim 1 are interconnected together to form a strip.

88. The method of claim 86, wherein multiple devices according to claim 1 are interconnected to form a two-dimensional matrix of devices.

89. The device of claim 1, wherein one or more chambers containing a reagent annularly surround a chamber containing a sample, and wherein said reagent is introduced to the sample through a valve activated by pressure.

90. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers is equipped with electrodes enabling electric current to be passed through a chamber during processing of the sample.

91. The device of claim 1, further comprising a cap at an end of the device.

92. The device of claim 91, wherein the cap is linked to a chamber at an end of the device by threaded mechanical interlocks or a threading mechanism.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

93. The device of claim 91, wherein the cap can be removed by any one or a combination of the following mechanisms: piercing, solvation, melting, breaking, and mechanical removal.

94. The device of claim 92, wherein the chamber at the end of the device comprises a wall and the cap further comprises one or more annular seals in contact with the wall when the cap is linked to the chamber.

95. The method of claim 53, further comprising maintaining the sample in the device prior to subjecting the device to elevated pressure, for a length of time required to store the sample at a temperature appropriate to store the sample.

96. The method of claim 53, further comprising maintaining the sample in the device subsequent to subjecting the device to elevated pressure for a length of time required to store the sample at a temperature appropriate to store the sample.

97. The device of claim 50, wherein the detection module is selected from the group consisting of; a luminometer, a fluorometer, a photometer, a spectrophotometer, an ionization detector, a flow counter, a scintillation counter, and a camera.

98. The device of claim 1, wherein at least one of the chambers has a volume up to 500 µl.

99. The method of claim 53, wherein the size of the biological sample is between 1.0 mg and 10 mg.

WO 02/088296

PCT/US02/13187

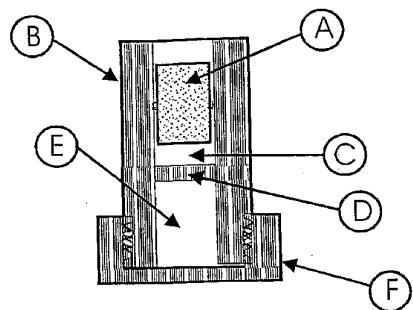


FIG. 1

WO 02/088296

PCT/US02/13187

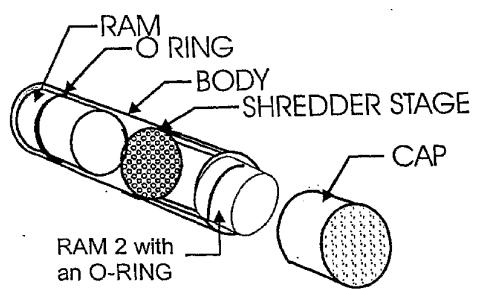
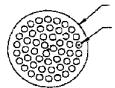


FIG. 2

WO 02/088296

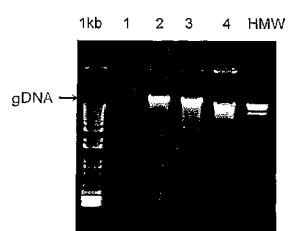
PCT/US02/13187

FIG. 3A**FIG. 3B**

WO 02/088296

PCT/US02/13187

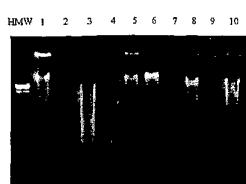
FIG. 4



WO 02/088296

PCT/US02/13187

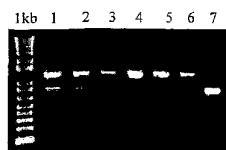
FIG. 5



WO 02/088296

PCT/US02/13187

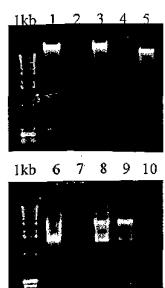
FIG. 6



WO 02/088296

PCT/US02/13187

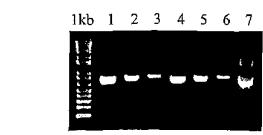
FIG. 7



WO 02/088296

PCT/US02/13187

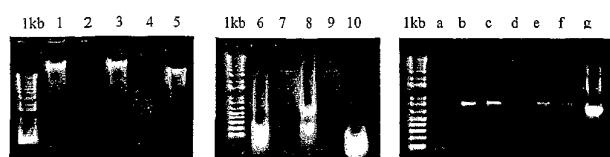
FIG. 8



WO 02/088296

PCT/US02/13187

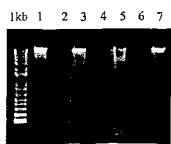
FIG. 9



WO 02/088296

PCT/US02/13187

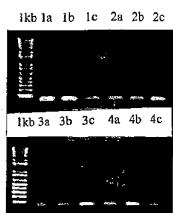
FIG. 10



WO 02/088296

PCT/US02/13187

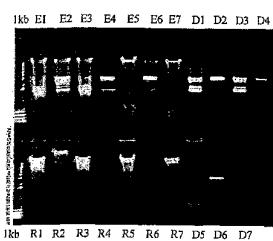
FIG. 11



WO 02/088296

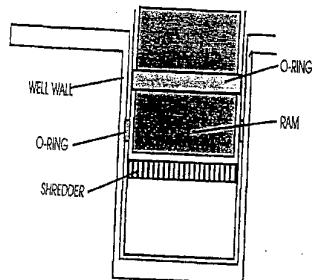
PCT/US02/13187

FIG. 12



WO 02/088296

PCT/US02/13187

**FIG. 13**

WO 02/088296

PCT/US02/13187

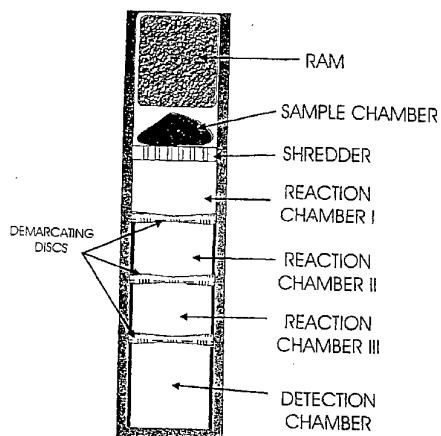


FIG. 14

WO 02/088296

PCT/US02/13187

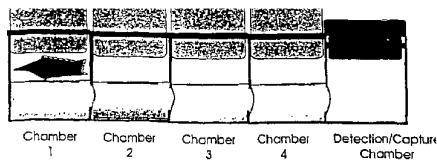


FIG. 15A

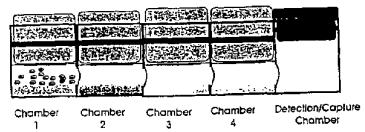


FIG. 15B

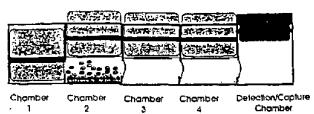
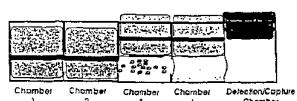
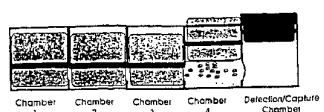
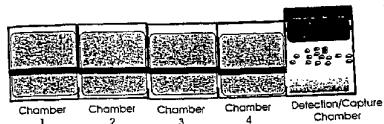


FIG. 15C

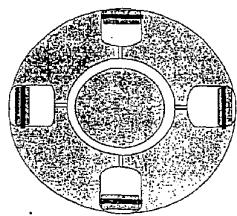
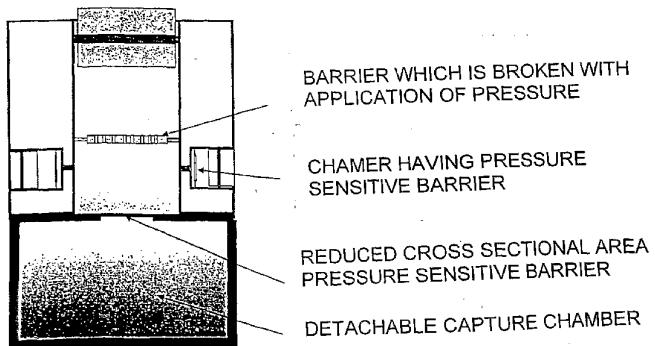
WO 02/088296

PCT/US02/13187

**FIG. 15D****FIG. 15E****FIG. 15F**

WO 02/088296

PCT/US02/13187

**FIG. 16A****FIG. 16B**

WO 02/088296

PCT/US02/13187

FIG. 17B

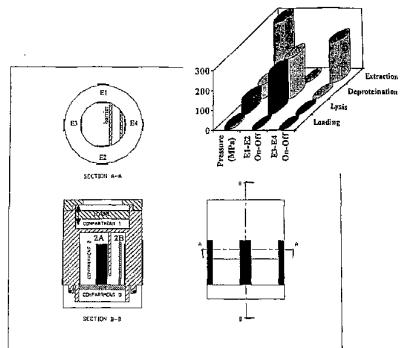
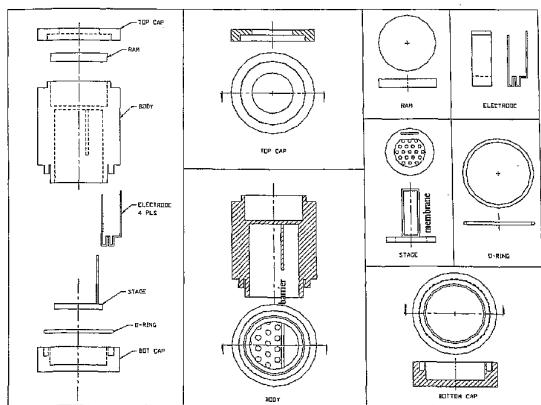


FIG. 17A



WO 02/088296

PCT/US02/13187

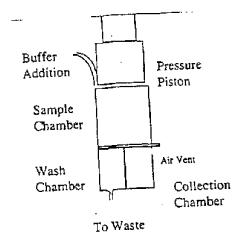


FIG. 18A

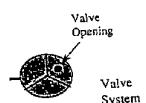


FIG. 18B

WO 02/088296

PCT/US02/13187

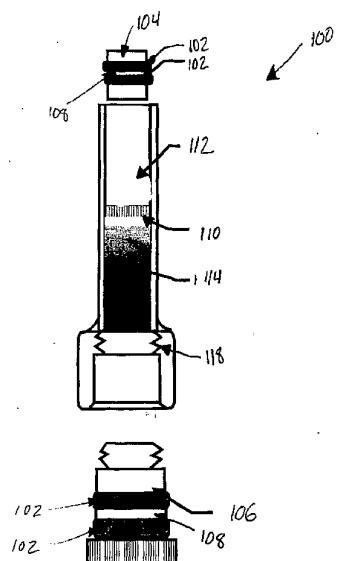


FIG. 19

WO 02/088296

PCT/US02/13187

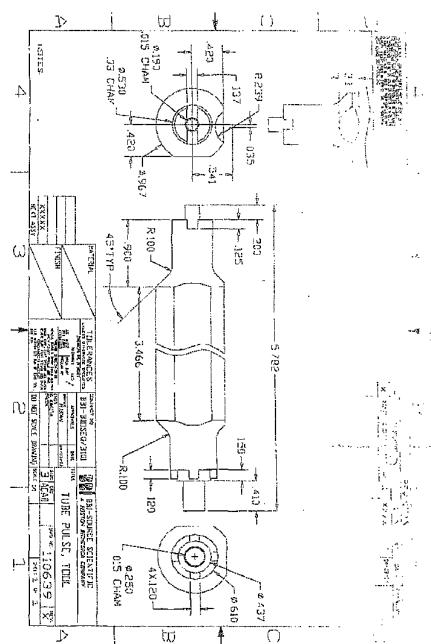
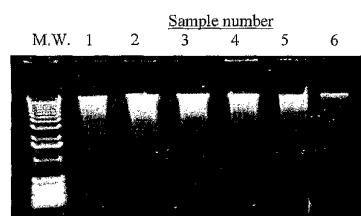


FIG. 20

21/23

WO 02/088296

PCT/US02/13187

FIG. 21

WO 02/088296

PCT/US02/13187

FIG. 22A
MW PCT M/P

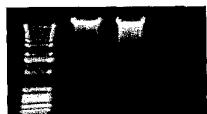


FIG. 22B
Neg. PCT M/P MW

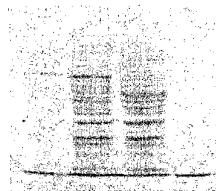
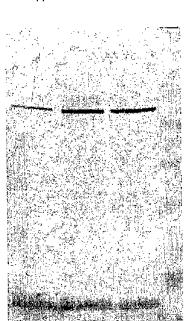
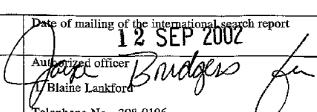


FIG. 22C

Neg. PCT M/P MW

kD
250
98
64
50
36
16
6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/13187
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : C12M 1/12 US CL : 435/297.1, 283.1		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/297.1, 283.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,111,096 A (LAUGHARN, JR. et al) 29 August 2000, see entire document.	1-99
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		See patent family annex.
<p>Special categories of cited documents:</p> <ul style="list-style-type: none"> *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier application or patent published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 		
Date of the actual completion of the international search 21 June 2002 (21.06.2002)	Date of mailing of the international search report 12 SEP 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box 1450 Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	 Authorized officer Blaine Lankford Telephone No. 308-0196	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 1/28	K
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P,L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

テフロン

(72) 発明者 タオ、フェン

アメリカ合衆国 20886 メリーランド州 モンゴメリービレッジ ロストナイフ サークル 18211 アパートメント ナンバー 102

(72) 発明者 ローレンス、ネイサン ピー。

アメリカ合衆国 21093 メリーランド州 ティモニウム スロー ドライブ 11960

(72) 発明者 カキタ、アラン

アメリカ合衆国 92646 カリフォルニア州 ハンティントン ビーチ ブースベイ サークル 8451

(72) 発明者 マナク、マーク エム。

アメリカ合衆国 20707 メリーランド州 ローレル スタンレー プレイス 200

(72) 発明者 ローグハーン、ジェームズ エイ. ジュニア。

アメリカ合衆国 01890 マサチューセッツ州 ウィンチェスター ロビンソン パーク 1
6

F ターム(参考) 2G052 AA00 AA24 AA30 AA32 AA35 AA36 AA37 AD22 AD26 AD32
 CA38 EA03 EB08 GA11 GA18 GA21 HA15 HC22 HC25 JA13
 JA15 JA16
 4B024 AA11 AA19 AA20 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA13 HA14
 HA20
 4B029 AA15 BB01 BB15 BB20
 4B063 QA01 QA13 QQ02 QQ03 QQ04 QQ05 QQ42 QQ52 QQ79 QR08
 QR32 QR35 QR38 QR42 QR56 QR62 QS11 QS16 QS25 QS34
 QS36 QS39 QX01 QX02

专利名称(译)	多室装置及其用于处理生物样品的用途		
公开(公告)号	JP2004536292A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2002585579	申请日	2002-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	波士顿生物医学公司		
申请(专利权)人(译)	波士顿生物医学公司		
[标]发明人	シーマッハーリチャードティ タオフエン ローレンスネイサンピー ¹ カキタアラン マナクマークエム ローグハーンジェームズエイジュニア		
发明人	シーマッハーリチャードティ. タオ、フエン ローレンス、ネイサンピー. カキタ、アラン マナク、マークエム. ローグハーン、ジェームズエイジュニア.		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 C12M1/33 C12N15/00 C12Q1/68 G01N1/00 G01N1/28 G01N33/566		
CPC分类号	B01L3/502 B01L2200/026 B01L2300/044 B01L2300/0663 B01L2300/0832 B01L2300/087 B01L2400/0481 B01L2400/0677 B01L2400/0683 G01N1/286 G01N1/4077 G01N2001/2866 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N1/00.101.M G01N1/00.102.Z C12M1/33 C12Q1/68.A C12N15/00 G01N1/28.K G01N33/53.M G01N33/566		
F-TERM分类号	2G052/AA00 2G052/AA24 2G052/AA30 2G052/AA32 2G052/AA35 2G052/AA36 2G052/AA37 2G052/AD22 2G052/AD26 2G052/AD32 2G052/CA38 2G052/EA03 2G052/EB08 2G052/GA11 2G052/GA18 2G052/GA21 2G052/HA15 2G052/HC22 2G052/HC25 2G052/JA13 2G052/JA15 2G052/JA16 4B024/AA11 4B024/AA19 4B024/AA20 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B024/HA20 4B029/AA15 4B029/BB01 4B029/BB15 4B029/BB20 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ04 4B063/QQ05 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS11 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	60/286509 2001-04-26 US 60/308869 2001-07-30 US 60/337336 2001-11-08 US		
其他公开文献	JP4633332B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用于植物和动物的昆虫，真菌，细菌和组织的生物样品的均质化，加工，检测和分析的装置和方法。通过装置中的多个腔室，可以进一步处理，纯化和分析获得的均质化产物和/或生物分子，例如代谢物，蛋白质，核酸或药物产品。这样就可以在每个阶

段执行不同的处理功能。该装置可以用在静液压装置中，其中可以在合适的腔室中进行各种操作，即孵育，添加或更新试剂
 产生和检测信号。在该方法中，与常规方法相比，改善了生物分子免受
 化学和酶降解的保护。此外，该方法允许样品制备和分析过程的自动
 化。

(P2004-556) (43) 公表日 平成15年12月2日(2004.)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G 01 N 1/00	G 01 N 1/00	2 G 052
C 12 M 1/33	G 01 N 1/00	4 B 024
C 12 N 15/00	C 12 M 1/33	4 B 029
C 12 Q 1/68	C 12 Q 1/68	4 B 063
G 01 N 1/28	C 12 N 15/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 110 頁) 最終頁:	
(21) 出願番号 特願2002-585579 (P2002-585579)	(71) 出願人 ポストン・バイオメディカ・インコーポレーテッド	
(66) (22) 出願日 平成14年4月26日 (2002. 4. 26)		
(65) 鑑識文提出日 平成15年10月27日 (2003. 10. 27)		
(66) 國際出願番号 PCT/US2002/013187		
(67) 國際公開番号 WO2002/088296		
(87) 國際公開日 平成14年11月7日 (2002. 11. 7)		
(31) 優先権主張番号 60/286,509	(74) 代理人 100068755	
(32) 優先日 平成13年4月26日 (2001. 4. 26)	弁理士 恩田 博宣	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	(74) 代理人 100105957	
(31) 優先権主張番号 60/308,869	弁理士 恩田 誠	
(32) 優先日 平成13年7月30日 (2001. 7. 30)	(72) 発明者 シューマッハ、リチャード テイ.	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	アメリカ合衆国 O 2780 マサチセツツ州 タウントン ブラック ポ	
(31) 優先権主張番号 60/337,336	レーイン 65	
(32) 優先日 平成13年11月8日 (2001. 11. 8)		
(33) 優先権主張国 米国 (US)		

最終頁に続