



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780040800.4

[43] 公开日 2009年9月16日

[11] 公开号 CN 101535806A

[22] 申请日 2007.10.24  
 [21] 申请号 200780040800.4  
 [30] 优先权  
     [32] 2006.10.30 [33] EP [31] 06123166.8  
 [86] 国际申请 PCT/IB2007/054324 2007.10.24  
 [87] 国际公布 WO2008/053406 英 2008.5.8  
 [85] 进入国家阶段日期 2009.4.30  
 [71] 申请人 皇家飞利浦电子股份有限公司  
     地址 荷兰艾恩德霍芬  
 [72] 发明人 R·库特 J·F·迪克斯曼  
     A·皮里克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
 代理人 谢建云 刘红

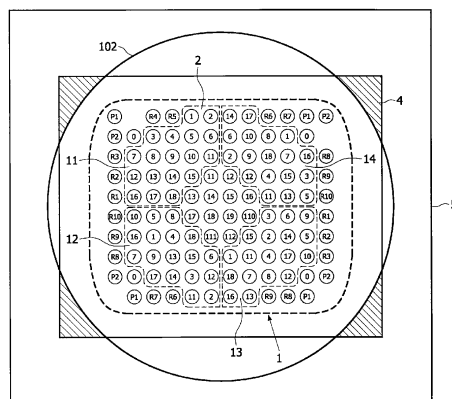
权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 4 页

## [54] 发明名称

多孔生物测定衬底以及用于生产这种衬底的方法和设备

## [57] 摘要

本发明提供一种多孔生物测定衬底，其适用于检测在生物样本流体中的至少一个分析物。该衬底包括一个或多个捕获探针，每一个捕获探针能够特定地结合一个目标分析物。在尺寸大于  $O_{50}$  的衬底孔径分布的孔中的捕获探针的平均浓度至少等于尺寸小于  $O_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度。因此，该衬底表现出改进的结合效率。本发明还涉及一种用于生产该生物测定衬底的方法和设备，并且涉及一种用于使用该衬底检查分析物流体的方法。



1. 一种多孔生物测定衬底，其适合用于检测在至少一种样本流体中的至少一种分析物，该衬底包括一个或多个捕获探针，每一个捕获探针能够特定地结合至少一个目标分析物，其中在尺寸大于  $0_{50}$  的衬底孔径分布的孔中的捕获探针的平均浓度至少等于尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度。

2. 根据权利要求 1 的多孔生物测定衬底，其中在尺寸大于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的两倍。

3. 根据权利要求 1 的多孔生物测定衬底，其中在尺寸大于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的五倍。

4. 根据前述权利要求中任意一项的多孔生物测定衬底，其中孔径分布是这样的：使得  $(0_{90}-0_{10}) \geq 20_{50}$ 。

5. 根据权利要求 4 的多孔生物测定衬底，其中孔径分布是这样的：使得  $(0_{90}-0_{10}) \geq 50_{50}$ 。

6. 根据前述权利要求中任意一项的多孔生物测定衬底，其中孔隙度的范围是从 20 vol% 到 98 vol%。

7. 根据权利要求 6 的多孔生物测定衬底，其中所述孔隙度的范围是从 30 vol% 到 80 vol%。

8. 根据权利要求 6 的多孔生物测定衬底，其中所述孔隙度的范围是从 40 vol% 到 70 vol%。

9. 一种用于生产生物测定衬底的方法，其中多个捕获探针分子溶液从至少一个印刷头释放到所述多孔衬底上，该方法包括以下步骤：向该衬底提供具有比所述捕获探针分子溶液的溶剂更低蒸发率的失活介质。

10. 根据权利要求 9 的方法，其中在将所述捕获探针分子溶液释放到所述衬底上之前，向所述衬底提供所述失活介质。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中在将所述捕获分子溶液释放到所述衬底上之前的 5 秒到 90 分钟之间的时限内向所述衬底提供所述失活介质。

12. 根据权利要求 11 的方法，其中所述时限是在 30 秒到 60 分钟

之间。

13. 根据权利要求 11 的方法，其中所述时限是在 1 分钟到 30 分钟之间。

14. 根据权利要求 9 到 13 中任意一项的方法，其中向所述衬底提供所述失活介质，以使得所述衬底的开口孔的体积的大约 50% 填充了所述失活介质。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中所述衬底的开口孔的体积的大约 80% 填充了所述失活介质。

16. 根据权利要求 14 的方法，其中基本上所述衬底的所有开口孔都填充了所述失活介质。

17. 根据权利要求 9-16 中任意一项的方法，包括另一个步骤：使得所述衬底受到这样的处理：在将所述捕获分子溶液释放到所述衬底之前，使部分失活介质从所述衬底蒸发。

18. 根据权利要求 9-17 中任意一项的方法，其中所述失活介质包括液体。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中所述失活液体包括丙烯醇或其混合物。

20. 根据权利要求 9-19 中任意一项的方法，其中所述捕获分子溶液包括生物化学反应物和/或寡核苷酸、和/或多肽和/或蛋白质、和/或细胞、和/或（部分）RNA/PNA/LNA。

21. 一种可通过权利要求 9-20 中任意一项的方法获得的多孔生物测定衬底，包括一个或多个捕获探针，每一个捕获探针能够特定地结合一个目标分析物，其中在尺寸大于  $0_{50}$  的衬底孔径分布的孔中的捕获探针的平均浓度至少等于尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度。

22. 一种用于检查分析物流体存在某种细菌、病毒和/或真菌的方法，该分析物流体例如为人类的血液或组织样本，其中迫使所述分析物流体流过根据权利要求 1-8 中任意一项的衬底或流过所述衬底之上。

23. 一种用于检查分析物流体存在某种细菌、病毒和/或真菌的方法，该分析物流体例如为人类的血液或组织样本，其中迫使所述分析物流体流过根据权利要求 9-20 中任意一项的方法所获得的衬底或

流过所述衬底之上。

24. 一种用于通过将多种物质释放到衬底上来生产物测定衬底的喷墨设备，该设备包括至少一个印刷头，以及分别用于印刷头和衬底的安装装置，其中该设备包括用于向衬底提供具有比所述捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率的失活介质的装置。

25. 根据权利要求 24 的喷墨设备，其中所述用于向衬底提供失活介质的装置包括印刷头。

26. 根据权利要求 24 或 25 的喷墨设备，其中所述设备进一步包括用于测量在所述衬底中存在的失活介质的量的装置。

27. 根据权利要求 24-26 中任意一项的喷墨设备，其中所述设备进一步包括用于测量在填充了失活介质的衬底中的孔的体积百分比的装置。

28. 根据权利要求 24-27 中任意一项的喷墨设备，其中所述设备进一步包括用于使得该衬底受到处理以便使部分失活介质从所述衬底蒸发的装置。

29. 根据权利要求 28 的喷墨设备，其中所述设备进一步包括用于控制所述失活介质和/或捕获探针溶剂的蒸发率的装置。

## 多孔生物测定衬底 以及用于生产这种衬底的方法和设备

### 技术领域

本发明涉及针对某些分析物来分析生物样本流体的领域，并且尤其涉及适于在生物样本流体中检测至少一个分析物的多孔生物测定衬底。具体来说，本发明允许对生物样本流体进行准确且高效的分析。本发明进一步涉及一种用于通过将多种物质沉积到该衬底上来生产生物测定衬底的方法，并且涉及一种可通过该方法获得的生物测定衬底。本发明还涉及一种用于针对样本流体中存在的一个或多个分析物分子来分析样本流体的方法。所述分析物可以包括能够结合到衬底上的捕获探针的任何化合物 (compound)，包括目标生物化合物、蛋白质、DNA 等。该方法可以用于分子诊断试验，例如用于测量传染病的病原体和抗病基因的存在。

### 背景技术

衬底上的捕获探针阵列在生物试验测定中使用以例如用于检查分析物生物流体（如人类的血液或组织样本）中的某种细菌、病毒和/或真菌的存在和/或浓度。捕获探针具有对预定指示因子的选择性结合能力，所述指示因子例如为蛋白质、属于特定细菌、病毒或真菌的 DNA 或 RNA 序列。在微阵列技术中，一组特定捕获探针例如通过印刷固定在生物传感器固体衬底的特定位置处，其中这组捕获探针中的每一个被选择来特别地与一个特定的目标生物化合物相互作用（例如在 DNA 微阵列的情况下的杂交）。合适的探针可以包括含有特定指示因子 (indicative factor) 的生物流体，例如特定 DNA 序列和/或抗体的溶液。在衬底已经装配了这样的捕获探针之后，强制分析物流体流过 (flow through) 该衬底，或强制析物流体在该衬底上流过 (flow over)。为了能够在分析物流体中使得指示因子的存在可视化，分析物流体的分子可以例如具有荧光和/或磁性标记。在 ELISA (酶联免疫吸附法) 的情况下，将酶而不是放射性标记附着到第二抗体。随后通过该酶的催化作用形成强烈的有色或荧光化合物。分析物流体的

(标记)分子附着到衬底中的那些对所考虑的分子具有结合能力的捕获探针上。至少在使用荧光标记时,这使得在特定因子附着到的斑点产生可检测的荧光。所捕获的分子典型地通过利用光源的照明以及例如在 CCD 相机的辅助下记录的荧光图案来读取。所述记录的图案是细菌或一组细菌存在的特征。通过向捕获探针提供对于不同因子的不同特异性,所述阵列可以用于同时对多种不同的因子进行测定。使用这样的阵列使得能够在单次运行中实现用于大量因子的分析物流体的高通量筛选。

为了确保高通量筛选的良好质量和效率,所希望的是将分析物流体的尽可能多的标记分子结合到衬底的那些对所考虑的分子具有结合能力的探针上。当分子的结合(或在 DNA 链的情况下的杂交)不够时,可能漏掉某些指示因子并且/或者荧光图案不可以被清楚地区分并且/或者在某种其它意义下是有缺陷的。虽然已知的生物测定衬底以及用于生成这种生物测定衬底的方法产生了令人满意的结合效率,但是仍然需要具有改进的结合效率的生物测定衬底以及用于生产这种生物测定衬底的方法。而且,具有增加的分析速度的快速筛选是所希望的,特别是在临床诊断领域中更是如此。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种具有改进的结合效率的多孔生物测定衬底,其包括用于 PCR 和/或电泳的衬底。本发明的另一个目的是提供一种用于通过将多种物质沉积到所述衬底上来生产这种衬底的方法。本发明的另一个目的是提供一种用于生产这种衬底的设备,其能够将多种物质沉积到所述衬底上。本发明的另一个目的是提供一种用于检查分析物流体(如人类的血液或组织样本)中的某些细菌、病毒和/或真菌的存在的方法,该方法具有改进的分析效率。

可以通过包括一个或多个捕获探针的多孔生物测定衬底来实现上述目的,该捕获探针的每一个能够特定地结合至少一个目标分析物,其中在尺寸大于衬底孔径分布  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少等于尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度。广义地说,通过提供其中平均来说较大孔包括较高浓度的捕获探针的衬底,与已知的生物测定衬底相比,获得了结合效率增加的衬底。本发明的另一个

优点在于,对于流过和流过其上的配置二者,都可以更快地执行分析。当施加了外部压力时,尤其如此。

在根据本发明的多孔生物测定衬底的优选实施例中,尺寸大于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的两倍,甚至更优选地至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的 5 倍,以及最优选地至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的 10 倍。

本发明的优点对于具有宽孔径分布的衬底尤其显著。特别优选的衬底具有这样的孔径分布:使得  $(0_{90}-0_{10}) \geq 20_{50}$ 。更优选的生物测定衬底具有这样的孔径分布:使得  $(0_{90}-0_{10}) \geq 50_{50}$ 。另一个优选的生物测定衬底具有这样的孔径分布:使得  $(0_{90}-0_{50}) \geq 20_{50}$  且  $(0_{50}-0_{10}) > 20_{10}$ 。

根据本发明,还提供一种用于生产这种生物测定衬底的方法。在该方法中,多个捕获分子溶液例如从喷墨印刷设备的印刷头释放到该多孔衬底上,并且该衬底具有失活(activating)介质,其具有比捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率和/或更高的沸点。优选地,在将捕获探针分子溶液释放到该衬底上之前,向该衬底提供失活的介质。而且,特别优选的方法还包括另一个步骤:处理该衬底使得在将捕获分子溶液释放到该衬底上之前使部分所述失活介质从衬底蒸发。通过用带有指示特征(indicated characteristics)的失活介质来处理衬底,衬底的至少部分孔被(暂时)阻挡。然而,该失活介质将更容易从较大的孔蒸发。当失活介质的被迫蒸发或自然蒸发发生时,衬底中的较小的孔将至少部分地保持被阻挡。当将捕获探针溶液施加到或进入衬底时,所述(被阻挡的)较小的孔将在较小程度上可用于摄入(uptake)捕获探针溶液,因此捕获探针溶液优选地渗透并附着到较大孔的表面。因为分析物流体更容易渗透所述多孔衬底中的较大的孔,这就导致本发明的生物测定衬底的所期望的增长的结合效率。这个优点在流过配置中特别显著,在流过配置中,流动受到毛细管力的影响比受到压降的影响更小。

具有比捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率和/或更高的沸点的任何失活介质在原则上可以用于根据本发明的方法。优选地,所述失活介质包括具有比捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率和/或更高的沸点

的液体。更优选的是，失活液体包括丙烯醇、醚以及从中获得的酯、和/或其混合物。

根据本发明的方法和测定衬底的额外的优点在于，与迄今已知的相比，对于相似的吞吐量，它需要更少的要被印刷的捕获探针并且/或者需要更少的分析物流体。两个优点都降低了分析的成本。而且，为了改进检测限制，可能要执行更多的流体混合和杂交的步骤，由此增加分析时间。然而根据本发明的优选实施例，与本领域公知的方法相比，显著减少了分析时间。

本发明进一步提供一种设备，并且具体地提供一种用于生产这种生物测定衬底的喷墨设备。根据本发明的喷墨设备包括：用于容纳要印刷到衬底上的物质的容器，该设备包括至少一个印刷头；以及分别用于印刷头和衬底的安装装置，其中该设备包括用于向衬底提供具有比捕获分子溶液的溶剂更低蒸发率的失活介质的装置。下面将更详细地描述该设备的特别优选的实施例。

本发明还提供一种用于检查分析物流体中的某些细菌、病毒和/或真菌的存在的方法，所述分析物流体诸如为人类的血液或组织样本。在该方法中，强制分析物流体流过根据本发明的衬底或者流过该衬底之上。由于所述衬底材料是多孔的，所以流过是可能的。目标生物化合物的结合是样本流体自由和/或被迫流过生物测定衬底（即从下表面到上表面或反之亦然）和/或通过衬底上从位置 A 到位置 B 的横向流动的结果。为了增加结合的机会，可以重复流过若干次。本发明的衬底具有额外的优点：对于相似的结合效率，这样的泵吸周期的数量可以更少。

如这里所使用的且除非另外声明，术语《微阵列测定》表示这样的测定：其中涉嫌（suspect）包括目标生物化合物的样本流体（优选地为生物流体样本（可选地包括悬浮在其中的较少数量的固体或胶体颗粒））与生物传感器固体衬底相接触（即，流过其上或流过），其中该生物传感器衬底包括跨越其表面的多个离散和孤立的区域，每一个所述区域都具有一个或多个施加到其上的探针，并且针对探针的特定地与目标生物化合物结合的能力来选择每一个所述探针。显然，不是每一种沉积在衬底上的流体都需要成为探针，即具有结合特定分析物的能力。所述测定还可以包括其他流体，如用于校准目的的流体、

网格标识器等等。这种流体可能已经包括标记。

如这里所使用的且除非另外声明，术语《分析物》或《目标生物化合物》表示被确定作为分析目标或分析点的生物分子化合物。它包括生物分子化合物，诸如但不限于核酸及其相关化合物（例如 DNA、RNA、寡核苷酸及其相似物、PCR 产物、基因组 DNA、细菌人工染色体、质粒等等）、蛋白质及其相关化合物（例如多肽、肽、单克隆抗体或多克隆抗体、可溶性或结合受体、转录因子等等）、抗原、配体、半抗原、碳水化合物及其相关化合物（例如，多糖、寡糖等等）、诸如薄膜片段的细胞片段（cellular fragment）、细胞器、完整细胞、细菌、病毒、原生生物等等。

如这里使用的且除非另外声明，术语《捕获探针》表示一种生物制剂，其能够在存在所述目标生物化合物或与之反应时特定地与《目标生物化合物》或《分析物》相结合，并且用于检测所述目标生物化合物的存在。探针包括生物分子化合物，诸如但不限于核酸及其相关化合物（例如 DNA、RNA、寡核苷酸及其相似物、PCR 产物、基因组 DNA、细菌人工染色体、质粒等等）、蛋白质及其相关化合物（例如多肽、单克隆抗体、受体、转录因子等等）、抗原、配体、半抗原、碳水化合物及其相关化合物（例如，多糖、寡糖等等）、细胞器、完整细胞等等。探针还可以包括特定物质，如目标化合物与之结合的某些生物聚合物。

如这里所使用的且除非另外声明，术语《标记》表示生物或化学的制剂，其具有可通过适当的装置来检测的至少一个物理属性（比如但不限于放射性（radioactivity）、光学属性、磁性），从而使得能够确定其空间位置和/或所述可检测物理属性的强度，所述标记诸如但不限于发光分子（例如荧光剂、磷光剂、化学发光剂、电学发光剂、生物学发光剂等等）、有色分子、在反应时产生颜色的分子、酶、磁珠、放射性同位素、可特定结合的配体、可由声波共振检测的微泡等等。

参照下面所描述的实施例并结合通过实例示出本发明原理的附图，本发明的这些和其他方面将变得显然并被阐明。

附图说明

在附图中：

图 1 示意性示出了根据本发明的可通过将捕获探针印刷到衬底上而获得的生物试验阵列；

图 2 示意性示出了根据本发明的具有多孔衬底的生物测定设备；

图 3 表示根据本发明的多孔衬底的照片；

图 4 示意性示出了根据本发明的多孔衬底的实施例的开孔孔径分布。

### 具体实施方式

将通过特定实施例并参考某些附图来描述本发明，但是本发明不限于此，而仅仅受权利要求的限定。权利要求中的任何附图标记不应被解释为限制其范围。所描述的附图仅仅是示意性的而非限制性的。在附图中，为了说明性的目的，一些元件的尺寸被夸大并且不是按比例绘制。在术语“包括”用于本说明书和权利要求的地方，它不排除其他元件或步骤。在指示单数名词时使用定冠词或不定冠词如“一”、“一个”或“这”的地方，除非另外特别地声明，这包括多个该名词。

而且，说明书和权利要求中使用的术语第一、第二、第三等被用于区分相似的元件，但不一定用于描述先后顺序或时间顺序。应当理解，如此使用的术语在适当情况下是可交换的，并且这里所描述的本发明的实施例能够以除这里所描述和示出的顺序之外的顺序来操作。

图 1 示出通过将多个捕获探针斑点 (2) 沉积 (优选地通过将其喷墨印刷) 在多孔衬底 (102) (比如薄膜) 上而获得的生物试验阵列 (1)。根据本发明的方法，在印刷捕获斑点 (2) 之前已经用失活介质 (并且在该特定实例中用乙二醇) 处理了衬底 (102)。在所示的实例中，试验阵列 (1) 被 128 个斑点 (2) 的图案覆盖，该图案包括以预定图案印刷的 43 种不同的生物流体。斑点 (2) 被编号，并且每个编号表示唯一的基因序列或包括参考材料。注意到，基因序列在阵列 (1) 中的多个相互距离较远的位置上多次重复出现。多孔衬底 (102) 被安装在支持结构 (4) 上。具有支持结构或支架 (4) 的多孔衬底 (102) 被放置在药筒 (cartridge) (5) 中。图 2 中示出了典型的设置。在外壳 (10) 中，要被分析的样本流体 (16) 在腔 (15) 中提供并且在入口 (3) 处施加压力。该压力迫使样本流体 (16) 向

下通过多孔固体衬底(102)。如果希望的话,玻璃板(7)允许对固体衬底(102)的光学分析。提供了用于分析固体衬底(102)关于一个或多个目标生物混合物的存在的分析装置(25)。所述分析装置(25)可以包括光源和光学检测路径、透镜、滤波器、数码相机等,以测量所述光学荧光图案。可以存在其他装置(26),例如用于分析固体衬底温度、填充孔容积以及其他想要监测的参数。虚线表示装置(25)和(26)可以最终组合为单一的设备(例如光学检测装置,如 CCD 相机或其他任何种类的光学检测设备,其中相机仅仅是一种可能的装置。其他可能的装置包括光电检测器或显微镜)。可以规定样本流体(16)多次循环通过腔(15)和衬底(102)。优选地,衬底(102)连续地或间歇地但是有规则地被样本流体(16)浸湿。通过强迫分析物流体通过多孔衬底来分析该分析物流体中的某种细菌、病毒和/或真菌的存在。样本流体自由和/或被迫流过生物测定衬底的表面(即从下表面流到上表面或反之亦然)使得分析物流体与捕获探针相接触,这允许目标生物混合物结合到这些能够与其结合的捕获探针。更特别地,使得包括具有对于不同细菌的 DNA 的不同基因序列特征的样本流体(比如 PCR 产物)与包括斑点(2)阵列的多孔衬底(102)相接触。不同的 DNA 类型(基因序列)附着到不同的印刷的捕获探针。在图 1 所示的实施例中,不同的斑点是可视化的。编号 1 到 18 表示 9 个不同的病原体和 9 个阻力。为了测量的可靠性,相同的生物选择性捕获材料可以被印刷在薄膜(102)的四个不同象限(11, 12, 13, 14)中。在每一个象限(11, 12, 13, 14)中,相同编号的斑点具有不同的相邻斑点,从而防止不太强烈的斑点(2)因为过度暴露(overexposure)于相邻的斑点而不被检测。可以将强度校准斑点(R1 到 R10)印刷在薄膜(102)上,以及将四个斑点(D)印刷在薄膜的角落以用于在薄膜(102)上的强度校准分布。也印刷了 PCR 控制斑点(P1, P2)以通过 PCR 验证合适的 DNA 放大。

如图 1 所示,根据本发明的生物试验阵列优选地包括总共 130 个斑点,但也可以包括更多的斑点,例如超过 1000 个。斑点的典型直径低于 100-300  $\mu\text{m}$ , 但还可以甚至更低,并且它们被定位为间距典型小于 400  $\mu\text{m}$  的图案中,所述间距优选地小于 300  $\mu\text{m}$ 。所述斑点优选地以周期性图案来印刷,例如以正方形、矩形或六边形的结构来印

刷。此外，典型地将大量的不同生物流体（优选地为 100 个或更多）印刷到薄膜上（102）。

根据本发明，提供一种多孔生物测定衬底，其包括一个或多个能够分别特定地结合一个目标分析物的捕获探针，其中在尺寸大于衬底的孔径分布  $O_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少等于尺寸小于  $O_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度。广义地说，通过提供其中平均来说更大的孔包括更高浓度的捕获探针的衬底，与已知的生物测定衬底相比，获得了结合效率增加的衬底。生物测定衬底通常由多孔材料制成，该多孔材料具有带有孔径分布的内孔。图 3 示出具有优选的宽孔径分布的合适生物测定衬底的照片。从图 3 容易推断出，典型的多孔衬底包括处于从几纳米（nm）到微米（ $\mu\text{m}$ ）范围内的开口孔径。当向已知的薄膜提供捕获探针时，由于毛细管力、溶剂的蒸发以及由于表面张力的作用等等，所述探针优选地附着到较小的孔的内表面。然而，分析物流体的流动运输（特别是在湿润的薄膜的情况下）更容易通过较大的孔发生，这是因为这些孔对于流过的阻力更低。由于平均来说，已知衬底中的较大孔包括较少的捕获探针分子，捕获探针分子与分析物流体特定结合的可能性将低于预期，并且因此将出现下降的结合效率。发明人已经首次设计了一种生产衬底（在该衬底中，平均来说与较小的孔相比，较大的孔包括更多的捕获探针分子）方法，并且因此获得了增加的结合效率和筛选方法，。

在本发明的上下文中，并参照图 4，尺寸  $O_{10}$ 、 $O_{50}$  和  $O_{90}$  是孔径分布的特征尺寸。如图 4 所示，由在 y 轴上表示的一些度量 30（其表示某一尺寸的孔的量、或相对表面、或体积分数）相对于在 x 轴上表示的开口孔径 31 的曲线图来表示孔径分布。度量 30 当然依赖于用于估计孔径分布的特定测量技术。这样定义特征尺寸  $O_{10}$ 、 $O_{50}$  和  $O_{90}$ ：使得孔体积的 10% 小于或等于  $O_{10}$ ，孔体积的 50% 的小于或等于  $O_{50}$ ，以及孔体积的 90% 的小于或等于  $O_{90}$ 。已知的若干方法本身可以用于估计所述多孔衬底的孔隙度和孔径分布。用于测量和/或量化孔径和孔径分布的公知方法包括成像分析技术、气体吸附以及侵入方法（如汞侵入方法）。除其他因素之外，要使用的合适方法依赖于平均孔径，例如汞入侵是更合适的用于测量较大孔的方法。这些方法是众所周知的并且本领域技术人员将能够没有任何困难地选择合适的测量方法。在孔

中的捕获探针的浓度也可以通过本领域中众所周知的方法来估计。合适的方法包括成像技术（光学和/或电子显微镜）与标准标记法的结合使用。典型地，荧光或放射性标记或包括金属纳米颗粒的标记使用允许分别通过（共焦的）荧光显微镜、通过 X 射线图像板、和/或在电子显微镜下检测捕获探针和它们的平均浓度。

在多孔生物测定衬底的优选实施例中，在尺寸大于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的两倍。所述多孔生物测定衬底的更优选实施例的特征在于，在尺寸大于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度至少是尺寸小于  $0_{50}$  的孔中的捕获探针的平均浓度的五倍。如下面将变得显而易见的那样，在较大的孔中的捕获探针的平均浓度可能受到较小孔的体积百分比的影响，其中所述较小的孔（暂时）在将捕获探针溶液提供给衬底时不能访问。

与现有技术的衬底相比，当衬底本身具有相对较宽的孔径分布时，本发明的衬底的结合效率方面的可被观察到的改进更大。因此特别优选的多孔生物衬底具有这样的孔径分布：使得  $(0_{90}-0_{10}) \geq 20_{50}$ ，以及更优选地为：使得  $(0_{90}-0_{10}) \geq 50_{50}$ 。另一个优选的生物测定衬底具有这样的孔孔径分布：使得  $(0_{90}-0_{50}) \geq 20_{50}$  且  $(0_{50}-0_{10}) \geq 20_{10}$ 。

合适的多孔衬底可以包括具有多个各种几何形状和尺寸的孔、开口和/或通道的网络。多孔衬底可以是纳米多孔或微孔的，即孔、开口和/或通道的平均尺寸（以  $0_{50}$  的值表征）可以适当地包含在大约  $0.05 \mu\text{m}$  到  $10.0 \mu\text{m}$  之间。在一个实施例中，这个平均孔径可以在  $0.1 \mu\text{m}$  到  $3.0 \mu\text{m}$  之间。在另一个实施例中，平均孔径可以在大约  $0.2 \mu\text{m}$  到  $1 \mu\text{m}$  之间。术语“孔隙度”通常意指或包括某一材料中的所有孔或孔洞（void）相对于整个材料的体积的比率。换句话说，孔隙度通常是非固体体积占材料的总体积的比例。在本发明的意义中，术语“开口孔隙度”（也被称为有效的孔隙度）尤其意指或包括其中有效地发生流体的流动的总总体积中的部分。由于所述开口孔隙度本身在本申请的上下文中是重要的（封闭的孔对于捕获探针和样本流体都不可访问），所以除非另外明确地指出，术语“孔隙度”和“开口孔隙度”可交换地在本申请中使用。在本发明的意义中，孔隙度尤其是 0% 体积到 100% 体积之间的分数。根据优选实施例，所述孔隙度的范围从 20% 体积到 98% 体积，更优选地为从 30% 体积到 80% 体积，并且更

优选地为从 40%体积到 70%体积。

根据本发明的优选实施例，所述多孔衬底材料选自包括下列的组：

- 非晶态聚合物，其优选地来自包括下列的组：PC（聚碳酸酯）、PS（聚苯乙烯）、PMMA（聚甲基丙烯酸甲酯）、聚丙烯酸酯、聚醚、纤维素酯、硝酸纤维素、醋酸纤维素、纤维素或其混合物，

- 半结晶聚合物，其优选地来自包括下列的组：PA（聚酰胺=尼龙材料）、PTFE（聚四氟乙烯）、聚三氟乙烯、PE（聚乙烯）、PP（聚丙烯）、或其混合物，

- 橡胶，其优选地来自包括下列的组：PU（聚氨酯）、聚丙烯酸酯、基于硅烷的聚合物（如 PDMS（聚二甲基硅氧烷））、或其混合物，

- 凝胶（=具有流体溶剂矩阵的聚合物网络），其优选地来自包括下列的组：琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶、或其混合物

- 金属（如铝、钽、钛）、两种或更多金属的合金，掺杂的金属或合金、金属氧化物、金属合金氧化物、或其混合物

或上述这些的混合物。这些材料已经示出了本发明内的合适材料。

根据本发明的实施例，固体的多孔衬底材料的内表面区域比该区域的尺寸大 X 倍，其中因子  $X > 100$ 。根据另一个实施例，因子  $X > 1000$ ，根据可替代实施例  $X > 10000$ ，以及根据又一个实施例， $X > 100000$ 。

衬底的厚度不是本发明的限制性特征，并且该厚度可以在从大约 50nm 到高达大约  $3\ \mu\text{m}$  或更高（例如高达 1mm）之间变化。如果薄膜是自由无束缚的，例如在流过（flow-through）设备（如上所述）的情况下，衬底厚度可以处于这样的范围中：从  $1\ \mu\text{m}$  到数百  $\mu\text{m}$ ，例如从  $20\ \mu\text{m}$  到  $400\ \mu\text{m}$ ，或从  $50\ \mu\text{m}$  到  $200\ \mu\text{m}$ 。

衬底（例如薄膜）的形状和/或尺寸不应当被认为是本发明的限制性特征。它可以是例如直径范围在大约 3mm 到 15mm 之间的圆形，但是任何其它衬底形状（矩形，正方形，椭圆形，...）和/或尺寸也可以是合适的。

用于本发明的探针应当针对他们对目标生物化合物或对被怀疑存在于要分析的样本中的所述目标生物化合物的相关修改的亲合性

来适当选择。例如，如果目标生物化合物是DNA，则探针可以是但不限于合成的寡核苷酸、其类似物、或特定抗体。目标生物化合物的合适修改的非限制性实例是置换了生物素的目标生物化合物，在该情况下，探针可以承载抗生物素蛋白的功能。

在本发明的特定实施例中，若干不同的探针被沉积到衬底中和/或衬底上。在更具体的实施例中，在沿着所述固体衬底的一个表面的物理上不同的位置上以阵列的方式定位 (spotted) 多个不同的探针，以允许并行地测量不同的目标生物化合物。该实施例通常被称为微阵列。

为了更容易地支持随后的检查和识别，一个或多个附加的斑点 (例如用于强度校准和/或位置检测) 也可定位到衬底材料的表面上。定位可以由本领域中已知的任何方法来实施，所述方法例如但不限于，喷墨印刷、压电定位、机器人接触印刷、微量吸管吸允等等。在定位之后，由于衬底 (例如薄膜) 固有的或 (例如经激活) 所获得的属性自发地，或通过附加的物理处理步骤 (比如但不限于例如通过烘干、加热、温度处理步骤的交联、或通过暴露于光源)，将探针固定到衬底材料的表面上。

根据本发明，提供一种用于生产生物测定衬底的方法，其中多个捕获分子溶液从至少一个印刷头释放到多孔衬底上，该方法包括以下步骤：向衬底提供具有比捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率和/或更高的沸点的失活介质。通过处理具有所指示特征的失活介质的衬底，可以获得改进的结合效率并且因此可以获得改进的筛选方法。

虽然发明人不知道所述改进的准确原因，但是下面提供了尝试性的解释。生物测定衬底由具有孔径分布的内部孔的多孔材料制成。当向已知的薄膜提供捕获分子溶液时，似乎合理的是，捕获探针优选附着到较小探针的内表面。事实上，捕获分子溶剂被认为首先从较大的孔蒸发，由此在较小的孔中局部地增加捕获探针的浓度。特别地，当薄膜是电荷中性的，则缺乏使得捕获探针附着到薄膜表面的驱动力。在捕获分子溶液的溶剂的蒸发期间，溶解的捕获分子在剩余流体中日益结块直到它们形成凝胶。而且，由于毛细管力和表面张力，剩余流体具有对最小孔的偏好。因此，凝胶化、沉降 (分子到孔壁的) 和最终结晶和/或固定优选地发生在最小的孔中。然而，分析物流体的流

动运输优选地通过较大的孔发生。因为平均来说，越大的孔包括越少的捕获探针分子，所以将导致捕获探针分子与分析物流体在流过期间特定结合的可能性的降低，并且因此导致降低的结合效率。根据本发明，通过处理包含具有比捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率的失活介质的衬底，可以相信，衬底中的较小孔被失活介质有效地（至少是部分地和/或暂时地）填充或阻挡，并且长时间保持如此，并且优选地至少直到向衬底提供捕获分子溶液和/或强迫分析物流体通过薄膜为止。

在根据本发明的优选方法中，在将捕获分子溶液释放到衬底上之前，向衬底提供失活介质。虽然这对于根据本发明的方法不是必不可少的，但是用失活介质来预处理衬底通常产生比在将捕获分子溶液释放到衬底上期间或之后用失活介质来处理衬底的结合效率更高的结合效率。

在根据本发明的另一个优选实施例中，在将捕获分子溶液释放到衬底上之前，在5秒到90分钟之间的时限内向衬底提供失活介质。甚至更优选的是，在30秒到60分钟之间的时限进行。最优选的是在1分钟到30分钟的时限进行。

根据本发明，在根据本发明的方法中可以使用与捕获分子溶液的溶剂相比蒸发更慢或在更高温度时沸腾的任何介质。所述介质可以是气态的或流体。在本方法的优选实施例中，失活介质包括流体。这种流体可以容易地通过任何适当的方法施加到衬底，如通过印刷技术或通过浸涂。特别合适的失活流体包括丙烯醇化合物，从其获得的乙醚和/或酯，或它们的混合。合适的示例一般包括例如乙二醇、二甘醇、三甘醇、四甘醇以及聚乙二醇，和/或它们与水的混合物。而且可有利地使用（聚）丙二醇、丙二醇、二丙二醇等等，例如与具有极性的聚乙二醇相比，后者是更低极性的溶剂。其他合适的示例包括对本二酸酯或邻苯二甲酸二辛酯。一些失活流体可能需要附加的清洗步骤。

当实施根据本发明的优选方法时，在捕获分子的实际印刷的步骤之前，衬底中的较小孔至少部分地被直接填充（临时）了失活介质。这样选择失活介质以使得其蒸发更慢并且优选地明显比用于印刷捕获分子的溶剂更慢，或在更高温度下（高于沸点）蒸发。因此，捕获分子溶液优选地采用具有比失活介质更好溶解性的溶剂。在本发明的

上下文内，当第一蒸发率比第二蒸发率低至少 10%，优选地低至少 30%，并且最优选地低至少 50%时，认为第一蒸发率显著低于第二蒸发率。虽然根据本发明的方法不限于此，但是当前使用的大多数捕获分子溶液是水溶液。这意味着在这种情况下的合适的失活介质以比在相同温度和压力条件的水更慢的速率蒸发。根据一般物理原理，毛细管力与孔半径成反比，并且因此其在最小的孔中最大。然而流动阻力与孔半径的四次方成反比，并且因此与毛细管力相比，随着孔直径的降低，流动阻力增加得快得多。因此，将要花费一些时间来用失活介质填充衬底中的孔，并且特别地填充较小的孔。因此，在用失活介质处理衬底的时间和已经填充了失活介质的孔的体积百分比 (vol.-%) 之间存在折中。失活液体存在或与多孔衬底接触的越长，则越多的孔将最终填充有失活液体。

根据本发明的优选方法的特征在于，向衬底提供失活介质，以使得衬底中的孔的大约 50%的体积填充有失活介质。优选地，孔的超过 80%的体积填充有失活介质。在本方法的甚至更优选的实施例中，向衬底提供失活介质以使得基本上衬底中的所有开口孔都被失活介质所填充。

为了加速处理，根据本发明来执行另一个附加(可选的)的处理，如清洗、温度处理步骤、光照或暴露于气流。

优选地，在多孔衬底中的至少部分孔已经填充了失活介质之后，向该衬底提供合适的生物流体的捕获探针阵列。根据本发明，使用适合于该目的的喷墨设备来将多个捕获分子溶液从至少一个印刷头释放到该多孔衬底上。当捕获分子溶液的液滴撞击衬底表面时，至少部分液滴材料由衬底的多孔结构所占据，即进入衬底的至少一些孔中。

根据本发明的特别优选的方法包括另一个步骤：使得该衬底受到这样的处理：以便在将捕获分子溶液释放到衬底上之前使部分失活介质从衬底蒸发。该处理可以例如包括：在压力下施加空气和/或其他气态介质的流。这些流的施加导致较大的孔首先打开，即释放那里存在的任何物质-如失活介质。事实上，对于这些(较大的)孔来说，毛细管力最低。在至少一些失活液体已经蒸发了之后，将捕获探针印刷到衬底上。由于在捕获分子溶液的溶剂与失活介质之间的蒸发率的不同，捕获分子优选地附着和/或开始附着到较大的孔的内表面。由

于分析物在其通过/沿着衬底被抽运时也优选通过较大的孔，所以该措施改进了杂交效率。本发明的方法提供对于在多孔衬底上和/或中的分析物流体分布的改进的控制。而且，所述方法通过匹配孔（基于尺寸选择）来增强生物流体流动的捕获可能性，其中捕获探针优选地位于其中分析物优选地正在流动的孔处。

在根据本发明的方法中，原则上可以使用具有任何孔隙度的任何衬底。优选的衬底包括具有宽孔径分布的多孔衬底。甚至更优选的衬底包括那些具有包括相互连接的和/或多方向的孔的孔隙形状的衬底。这样的优选衬底通常表现出在某种介质流过方面的差异，这依赖于衬底和介质分别是干-湿、湿-湿还是湿-干。衬底的优选种类包括合适聚合物的薄膜。在本领域中，多向和单向的多孔薄膜是公知的，而与根据本发明的方法无关，并且其是商业可获得的。此外，根据本发明，优选地使用带电的和增压的和/或化学功能化的薄膜。

本发明还涉及一种用于生产这种生物测定衬底的喷墨设备，并且涉及一种可通过该方法获得的生物测定衬底。根据本发明的喷墨设备包括分别用于印刷头和衬底的安装装置，由此该设备包括用于向衬底提供具有比捕获分子溶液的溶剂更低的蒸发率的失活介质的装置。在优选实施例中，用于向衬底提供失活介质的装置包括印刷头。更优选的喷墨设备还包括用于测量在填充由失活介质的衬底中存在的失活介质的量的装置，最优选的为衬底中的孔的体积百分比（vol.-%）。此外，根据优选实施例，所述设备包括用于通过控制所述衬底顶部的局部温度、气流和几何形状来控制所述印刷的流体（特别是所述失活流体和所述捕获探针流体的印刷溶剂）的蒸发率的装置。

包括生物活性分子的物质优选地溶解在溶液中。该溶液典型地为流体，如水或不同类型的酒精，并且该溶液还可以包括少量的添加剂，例如用于调节表面张力、粘度或沸点，从而优化印刷特性、斑点形成、生物流体的保质期（shelf life）等。

尽管已经针对特定实施例并参照某些附图和前面的描述而说明并描述了本发明，但是这些说明和描述被认为是说明性的或示范性的而非限制性的。本发明不限于所描述的实施例。相反地，根据本发明的喷墨印刷机可以用于液滴到薄膜上的任何布局（placement）。它特别适合于生产用于分子诊断的生物传感器。诊断包括在复杂的混合

---

物（比如血液或唾液）中迅速并灵敏地检测蛋白质和核酸，以用于现场试验和用于实验中心的诊断。其他应用在医疗（用于心脏病、传染病和肿瘤的 DNA/蛋白质的诊断）、食品以及环境诊断领域。

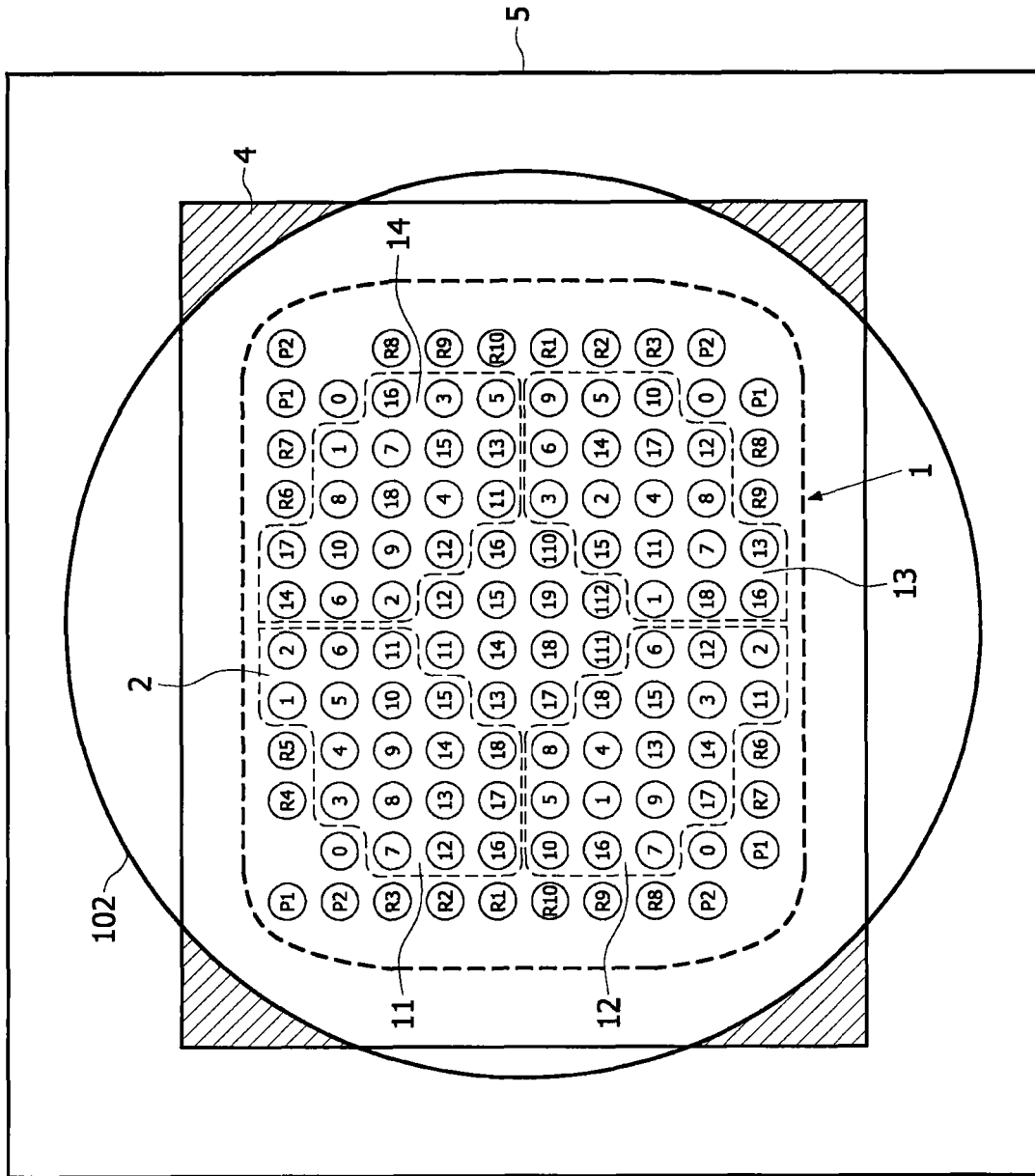


图 1

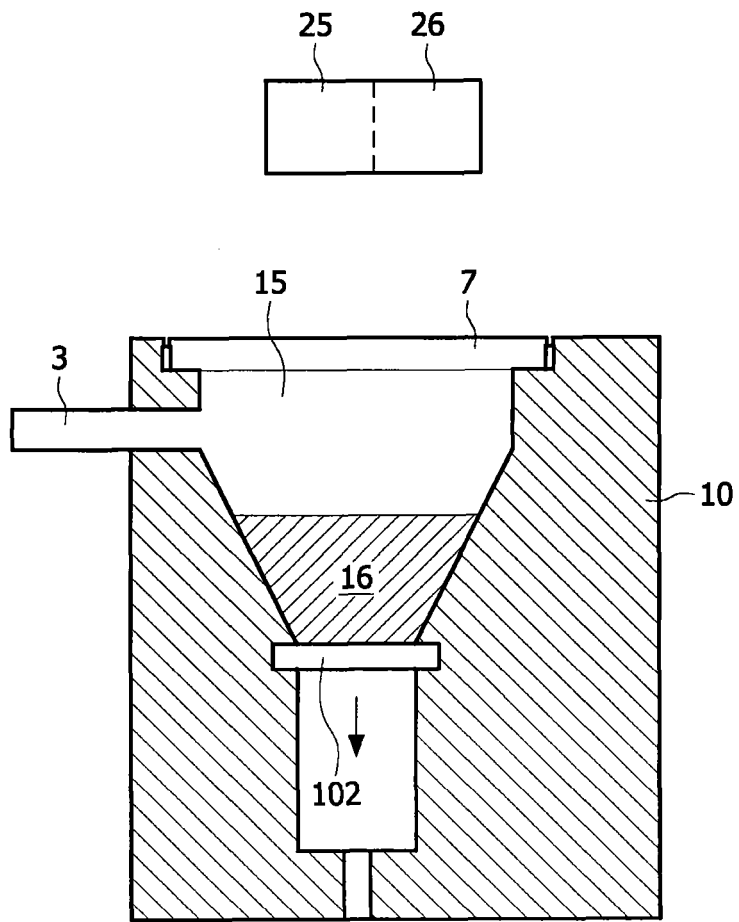


图 2

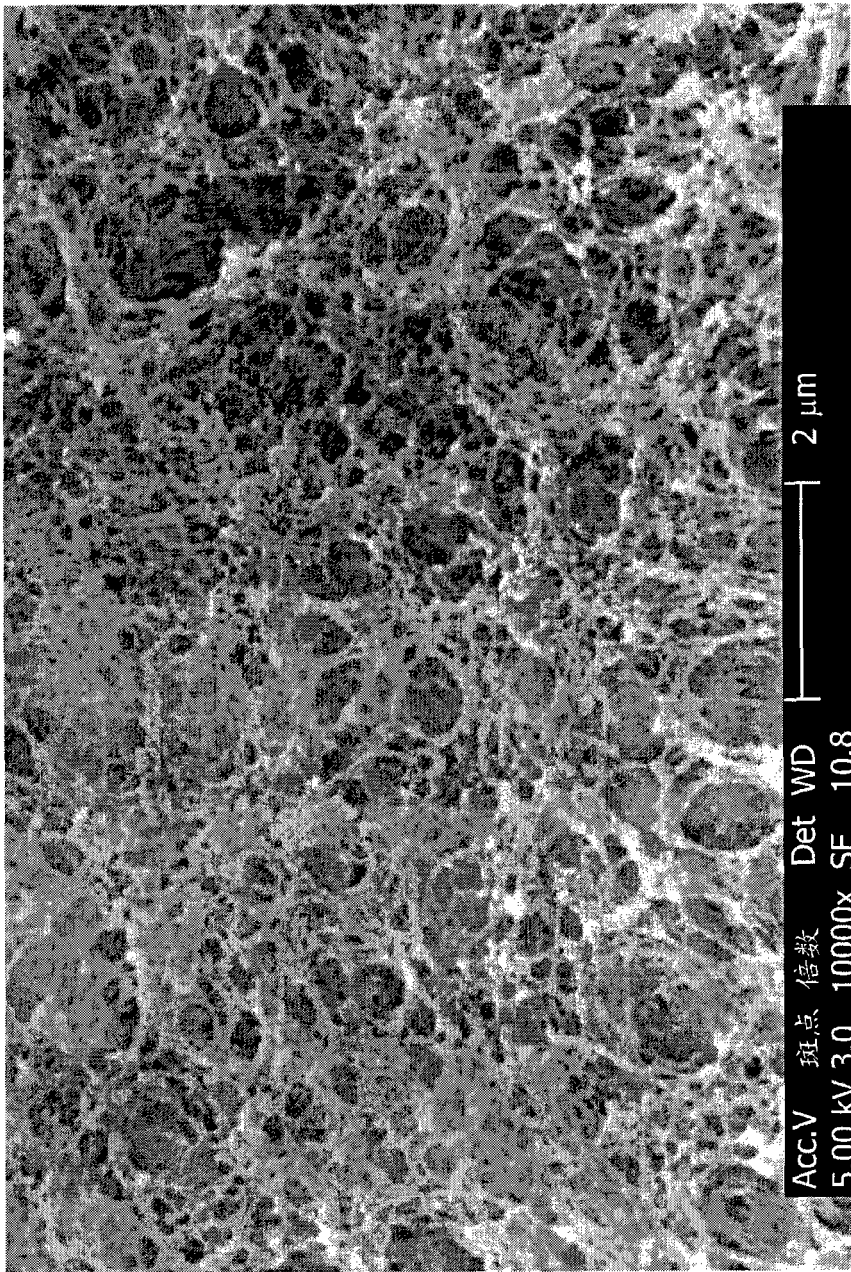


图 3

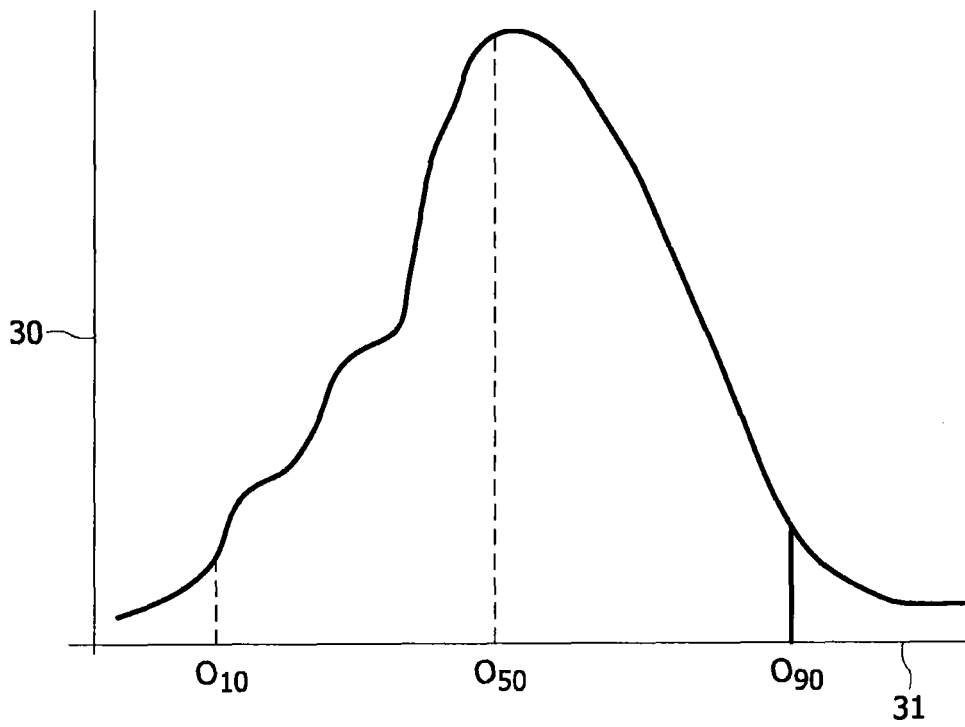


图 4

专利名称(译)	多孔生物测定衬底以及用于生产这种衬底的方法和设备		
公开(公告)号	<a href="#">CN101535806A</a>	公开(公告)日	2009-09-16
申请号	CN200780040800.4	申请日	2007-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
[标]发明人	R库特 JF迪克斯曼 A皮里克		
发明人	R·库特 J·F·迪克斯曼 A·皮里克		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/5436		
代理人(译)	谢建云 刘红		
优先权	2006123166 2006-10-30 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种多孔生物测定衬底，其适用于检测在生物样本流体中的至少一个分析物。该衬底包括一个或多个捕获探针，每一个捕获探针能够特定地结合一个目标分析物。在尺寸大于 $\phi 50$ 的衬底孔径分布的孔中的捕获探针的平均浓度至少等于尺寸小于 $\phi 50$ 的孔中的捕获探针的平均浓度。因此，该衬底表现出改进的结合效率。本发明还涉及一种用于生产该生物测定衬底的方法和设备，并且涉及一种用于使用该衬底检查分析物流体的方法。

