



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101228446 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 06

(21) 申请号 200680026645. 6

(22) 申请日 2006. 07. 06

(30) 优先权数据

60/701, 445 2005. 07. 20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2008. 01. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2006/026504 2006. 07. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02007/018872 EN 2007. 02. 15

(73) 专利权人 康宁股份有限公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 S·J·卡拉奇 V·H·埃卡特

A·G·弗鲁托斯 M·F·克罗尔

T·C·摩尔 D·A·帕斯泰尔

G·M·谢尔德

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东

(51) Int. Cl.

G01N 35/02(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20020090320 A1, 2002. 07. 11, 全文.

US 20030032039 A1, 2003. 02. 13, 全文.

CN 1477210 A, 2004. 02. 25, 全文.

CN 1484710 A, 2004. 03. 24, 全文.

US 2002009391 A1, 2002. 01. 24, 全文.

CUNNINGHAM B et al. A plastic

colorimetric resonant optical biosensor for multiparallel detection of label-free biochemical interactions. 《SENSORS AND ACTUATORS B》. 2002, 第85卷(第3期), 219-226.

审查员 刘梅

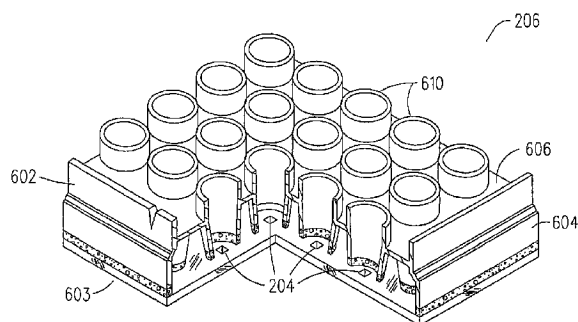
权利要求书2页 说明书16页 附图16页

(54) 发明名称

无标记高通量生物分子筛选系统和方法

(57) 摘要

本文描述了筛选系统和方法,所述系统和方法提供了一种独特的和实用的方案,使得可进行无标记高通量筛选(HTS),以有助于新药开发。在一个实施方式中,该筛选系统能够进行直接结合试验,其中,采用与当前制药工业中所用的HTS相兼容的试验体积和浓度检测化合物(药物候选物)和生物分子(治疗靶标)之间的生物分子间相互作用。该筛选系统还可检测微板各孔中发生的生化相互作用,该微板结合了生物传感器且其表面化学特征能将治疗靶标固定在生物传感器表面上。该筛选系统还包括液体处理和平板处理装置,以帮助实施自动HTS分析。



1. 一种筛选系统,它包括以下部件:具有用于在微板孔内生物传感器接受光学询问之前定位/复位微板的测量巢的测量室,和用于微板消热差的自动仪器、将微板移入和移出筛选系统的板处理系统、将微板移入和移出测量巢的平板转运子系统、用于定位/复位微板的自动仪器、执行基线和终点测量的自动仪器,其中,所述筛选系统能执行能够跟踪并计算终点测量数据的板 ID 和数据处理方案,以便实施测量方案,该测量方案对位于至少一块微板的孔中的生物传感器上发生的生物分子相互作用进行无标记检测,且其中所述筛选系统具有持续时间短于最小需求试验持续时间的板处理/数据点阅读循环,且所述至少一块微板是 384 孔微板时执行上述组件允许平板多路传送以实现 40,000 孔/8 小时的目标速率。

2. 如权利要求 1 所述的筛选系统,其特征在于,该系统还包括多个用于在所述至少一块微板的孔内分配液体和混合液体的自动仪器。

3. 如权利要求 2 所述的筛选系统,其特征在于,所述系统还包括控制所述多个自动仪器运行的计算机。

4. 如权利要求 3 所述的筛选系统,其特征在于,所述计算机执行无标记筛选方案,从而通过将基线和终点测量与所述至少一块微板移入和移出所述测量室内的测量巢的移动相结合来询问所述至少一块微板,所述至少一块微板是 384 孔微板时实现筛选 40,000 孔/8 小时的目标速率。

5. 如权利要求 3 所述的筛选系统,其特征在于,所述计算机执行通过筛选至少一块微板实时获得生化相互作用数据的试验模式。

6. 如权利要求 1 所述的筛选系统,其特征在于,所述至少一块微板上各自具有基准标记,所述基准标记用于将所述至少一块微板在所述测量室中正确定位/复位。

7. 如权利要求 1 所述的筛选系统,其特征在于,所述系统还包括与外部高通量系统线相互作用的设备,所述设备包括:

- 旋转臂;
- 拔取工具;
- 升降机构;
- 夹持器;
- 移板架;
- 导轨;或
- 传送带。

8. 如权利要求 1 所述的筛选系统,其特征在于,所述将微板移入和移出测量巢的平板转运子系统包括:

- 旋转臂;
- 移板架;
- 夹持器;
- 升降机构;和/或
- 传送系统。

9. 如权利要求 1 所述的筛选系统,其特征在于,所述用于定位/复位微板的自动仪器是:

微板操作模块 ;和 / 或  
X-Y 支持平台。

10. 如权利要求 1 所述的筛选系统,其特征在于,所述用于执行基线和终点测量的自动仪器是光学询问系统。

11. 一种实施无标记试验的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

对多块微板进行消热差处理;

根据测量方案,将至少一块所述微板移入和移出测量室;

根据测量方案,将至少一块所述微板移入和移出所述测量室内的测量巢;

根据测量方案,将至少一块所述微板定位 / 复位在所述测量室内;

根据测量方案,在至少一块所述微板上实施基线测量和终点测量,从而实现无标记检测所述至少一块微板的孔内的生物传感器上发生的生物分子相互作用 ;和

处理板 ID 和数据以便跟踪和计算终点测量数据,

其中所述筛选系统具有持续时间短于最小需求试验持续时间的板处理 / 数据点阅读循环,且所述至少一块微板是 384 孔微板时执行上述步骤允许平板多路传送以实现 40,000 孔 / 8 小时的目标速率。

12. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述测量方案是筛选方案,该方案能通过将基线和终点测量与所述微板移入和移出所述筛选系统的移动相结合来询问多块微板,所述至少一块微板是 384 孔微板时实现筛选 40,000 孔 / 8 小时的目标速率。

13. 如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述测量方案是通过筛选所述至少一块微板实时获得生化相互作用数据的试验模式。

## 无标记高通量生物分子筛选系统和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2005 年 7 月 20 日提交的标题为“无标记高通量生物分子筛选系统和方法”的美国申请系列号 60/701445 的益处,并将其纳入本文作为参考。

[0003] 发明背景

### 发明领域

[0004] 本发明涉及使用非标记依赖性光学检测技术来询问结合于微板的孔中的生物传感器的高通量生物分子筛选系统和方法。在优选的实施方式中,该高通量生物分子筛选系统包括分配、混合、孵育、微板处理和实施测量方案以提供微板中生物传感器上发生的生物分子相互作用的高通量检测和分析的自动仪器。

[0005] 相关技术的描述

[0006] 如今,生物学研究的许多领域用到无标记检测技术,以帮助进行敏感的、有时限的分析。典型的分析涉及检测与位于一次性微板各孔底部的单个光学传感器(生物传感器)表面之上的固定分子(治疗靶标)结合的化学/生化化合物(药物候选物)。此外,最近,使用无标记检测技术在药物开发过程中进行高通量筛选(HTS)分析的可能性在以下文章中讨论:John Comley,“无标记检测——新的生物传感器促进了更大范围的药物开发应用”(LABEL-FREE DETECTION-New Biosensors Facilitate Broader Range of Drug Discovery Applications), Drug Discovery World, Winter 2004/5, 第 63-74 页。

[0007] 在此文章中,所描述的一个系统使用到基于表面胞质基因共振(SPR)的无标记检测技术。例如,授予药物生物传感器公司(Pharmacia Biosensor AB)的美国专利 6313264 公开了一种分析系统,该系统使用 SPR 和微射流装置实时检测四个传感区域中的生物分子相互作用。此外,转让给普林克公司(Prolinx Incorporated)的美国专利申请 2003/0003018A1 公开了使用小型化 SPR 传感器以对分子间相互作用进行实时分析的仪器和系统。因为这两个系统都设计用于实时动态分析分子间的相互作用,因此它们的多路(multiplexing)性能有限,这限制了它们的通量,使得它们无法用于 HTS 中。此外,这些系统不使用标准的 SBS 96、384 或 1536 微板。基于光学检测原理的筛选系统也存在第一个缺点(见 John Comley 的文章)。因此,仍需要提供能在高通量基础筛选中对药物化合物和生物分子之间的生化相互作用进行无标记检测的无标记检测技术。这些和其它需求可采用本发明的高通量生物分子筛选系统和方法得以满足。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明包括筛选系统和方法,所述系统和方法提供了一种独特的和实用的方案,使得可进行无标记高通量筛选(HTS),以有助于新药开发。在一个实施方式中,该筛选系统能够进行直接结合试验,其中,采用与当前制药工业中所用的 HTS 相兼容的试验体积和浓度检测化合物(药物候选物)和生物分子(治疗靶标)之间的生物分子间相互作用。该筛选系统还可检测微板的各孔中发生的生化相互作用,该微板结合了生物传感器且其表面化学特征能将治疗靶标固定于生物传感器表面上。该筛选系统还包括液体处理和平板处理装

置,以帮助实施自动 HTS 分析。

[0010] 附图简述

[0011] 结合下文详细描述和附图将能对本发明有更完整的理解:

[0012] 图 1A-1C 是显示本发明几种不同筛选系统的基本部件的分块图。

[0013] 图 2 和 3 显示可用于任一图 1A-1C 所示本发明筛选系统的优选光学子系统的基本部件。

[0014] 图 4A 和 4B 显示可用于任一图 1A-1C 所示本发明筛选系统的优选微板排列子系统的基本部件。

[0015] 图 5 显示可用于任一图 1A-1C 所示本发明筛选系统的优选计算机/软件子系统的基本部件。

[0016] 图 6A-6B 显示可被任一图 1A-1C 所示本发明筛选系统询问两例微板(如多孔板)。

[0017] 图 7 显示可结合到图 6A-6B 所示微板的孔内的生物传感器(如共振波导光栅(RWG)生物传感器)的基本部件。

[0018] 图 8A 显示可结合到图 6A-6B 所示微板的孔内的生物传感器的另一设计,其中的生物传感器具有基准结构(fiducials)。

[0019] 图 8B 是结合有 384 个生物传感器的微板的基板的顶视图,其中所述生物传感器的构造如图 8A 所示的生物传感器。

[0020] 图 9A-9B 显示微板的另一设计,其中,生物传感器不具有基准标记,微板内形成有基准标记。

[0021] 图 10 是本发明的一个实施方式的生物传感器的顶视图,所示生物传感器上其具有用表面活性化学物质形成的两个参比区域和一个反应区域。

[0022] 图 11A-11C 是两张流程图和一张图表,用于帮助解释可采用任一图 1 所示筛选系统实施的不同试验,它是作为本发明实施方式之一的试验进展模式。

[0023] 图 12-15 是不同的图,用于帮助解释可采用任一图 1A-1C 所示筛选系统实施的 HTS 试验,它是作为本发明实施方式之一的 HTS 模式。

[0024] 图 16-17 用于帮助描述使用本发明的筛选系统进行的特定试验方案及所得结果的图。

[0025] 附图详述

[0026] 参见图 1A-1C,共三个分图,分别显示三个筛选系统 100a、100b 和 100c,各系统可与一个或多个一次性微板一起用于实施采用无标记光学检测技术进行的药物化合物文库的高通量筛选。筛选系统 100a、100b 和 100c 主要产生与化学/生化化合物(药物候选物)与位于一次性微板各孔底部的各生物光学传感器(生物传感器)表面上的固定分子(治疗靶标)之间相互结合有关的数据。

[0027] 筛选系统 100a、100b 和 100c 的结构稍有不同,但如下文将讨论的,它们都具有相同的能力,都能在一次微板中采用无标记光学检测技术实施药物化合物文库的高通量筛选。如图 1A 所示,筛选系统 100a 包括孵育室 110(消热差缓冲室 110)、进样锁定室(load lock chamber)120、测量室 130、接口装置 135 和计算机 140。在此实施例中,操作消热差缓冲室 110,以接受、存储和维持一个或多个微板周围的预定温度。进样锁定室 120 具有一区域,微板在从消热差缓冲室 110 向测量室 130 移动以及反过来移动时在此区域中移动。测

量室 130 维持微板周围于预定的温度,它还具有测量巢 (nest) 132,用于在微板孔内生物传感器接受光学询问之前高度精确地定位 / 复位微板。接口装置 135 用于在进样锁定室 130 和外部设备之间移动微板 ( 如见图 13)。

[0028] 如图 1B 所示,筛选系统 100b 包括孵育室 110 ( 消热差缓冲室 110)、测量室 130、接口装置 135 和计算机 140。筛选系统 100b 的结构与筛选系统 100a 相同,但它不包括无进样锁定室 120,且该接口装置 135 可用于将微板从消热差缓冲室 110 移动到测量室 130。与之相比,图 1C 显示的筛选系统 100c 包括测量室 130、接口装置 135 和计算机 140。筛选系统 100c 的结构与筛选系统 100b 相同,但消热差缓冲室 110 位于测量室 130 之内。在三种不同的筛选系统 100a、100b 和 100c 中,计算机 140 通过控制筛选系统 100a、100b 和 100c 内的各部件和子系统而进行大量不同的无标记试验。其中一些子系统如下:

[0029] 1.1 光学子系统 150

[0030] 1.2 平板找准子系统 160

[0031] 1.3 环境控制子系统 170

[0032] 1.4 液体处理和平板转运子系统 180a 和 180b

[0033] 1.5 计算机 / 软件子系统 190

[0034] 1.6 将筛选系统 100 与外部设备 1304 相关联 ( 见图 13) 的装置 135。

[0035] 1.1 光学子系统 150

[0036] 图 2 和 3 是阐述一个光学子系统 150 实施方式中不同部件的图。光学子系统 150 工作时主要将光束 202 传送到光学传感器 204 ( 显示位于微板 206 中) 并收集反射光束 208。该光学系统 150 位于测量室 130 内 ( 见图 1A-1C)。

[0037] 在一个实施方式中,光学子系统 150 具有光源 210 ( 超级发光二极管 (SLD) 210), 该光源以光纤传播,与可变光衰减器 (VOA) 212 连接,该可变光衰减器与极化扰频器 214 连接。该极化扰频器 214 输出的光束被  $1 \times 16$  析光镜 216 分入 16 股光纤 218。具有 16 个通道的  $1 \times 2$  析光镜阵列 220 将各光纤 216 分别连接到 16 个带尾纤的微透镜 222 ( 光头 222) ( 见图 3)。各个带尾纤的微透镜 222 将光束 202 传送至移动中的传感器 204 ( 或静止的传感器 204), 并接收反射光束 208。通常,反射光束 208 的波段窄,宽度在 1-2nm。反射光束 208 通过  $1 \times 2$  析光镜阵列 220, 由 16 个分光计 224 中的一个检测。分光计 224 用于测量反射光束 208 的峰值。然后,与反射光束 208 的该峰值有关的光谱数据由个人计算机 (PC) 226 来处理。个人计算机 226 ( 可以是计算机 140) 测定对应于反射光束 208 峰值的矩心 ( 或正方矩心) 的共振波长。或者,PC 226 可使用自相关法或最大导数法计算中心波长。

[0038] 共振波长指示化学 / 生化化合物 ( 药物候选物) 是否与位于一次性微板 206 各孔底部的一个生物传感器 204 的表面上的固定分子 ( 治疗靶标) 发生相互作用。这种生化相互作用,例如结合、吸附等,改变生物传感器 204 表面的折射率,从而改变生物传感器的光学响应,并因此改变测得的波长,由此可直接监控无标记试验中的生物学事件。应注意的是,生物传感器 204 检测到的折射率的增加使反射光 208 的波长增加。

[0039] 参见图 3 可见,各个带尾纤的微透镜 222 包括单模光纤 302、透镜 304、线偏振器 306 和  $\lambda / 4$  平板 308。或者,可使用圆偏振器替换线偏振器 306 和  $\lambda / 4$  平板 308。这一特定带尾纤微透镜 222 的集光角 (angular acceptance) 约为 5 毫弧度,在生物传感器 204 上产生的光斑直径约  $100 \mu\text{m}$ 。而且,该特定的带尾纤微透镜 222 被构造成拒绝微板 206 发出

的问题菲涅耳反射。但是,由底物 706 内多重反射产生的问题附属反射可通过圆偏振器(线偏振器 306 和  $\lambda/4$  平板 308)。然而,这些附属反射可通过信号的数字过滤或通过分光计 224 的排列调整而去除。所述 16 个带尾纤的微透镜 222 可沿着 5 个轴(斜度(pitch)、滚动轴(roll)、X、Y 和 Z)调整。在一个实施方式中,微板 206 以一个方向(一维扫描)移动,这样,多个生物传感器 204 和各生物传感器 204 内的多个区域可接受询问。关于这种类型的光学子系统 150 的详细讨论见下述文献:

[0040] •美国专利申请系列号 11/027,547,发明名称为“空间扫描光学阅读系统及其使用方法”(Spatially Scanned Optical Reader System and Method for Using Same);

[0041] •美国专利申请系列号 10/977,520,发明名称为“用于生物传感应用的单纤维发射/接收系统”(Single-Fiber Launch/Receive System for Biosensing Applications);

[0042] •美国专利申请系列号 10/856,572,发明名称为“具有减少的附加反射的光学询问系统和过滤附加反射的方法”(Optical Interrogation Systems With Reduced Parasitic Reflections and a Method for Filtering Parasitic Reflections);

[0043] •美国专利申请系列号 11/058,155,发明名称为“单模(SM)纤维光学阅读系统和询问共振波段光栅传感器的方法”(Single Mode(SM)Fiber Optical Reader System and Method for Interrogating Resonant Waveguide-Grating Sensor(s))。

[0044] 这些文献的内容被纳入本文作为参考。

[0045] 此外,下述文献描述了可用于本发明的其它类型的光学子系统 150:

[0046] •美国专利申请号 10/602,304,发明名称为“光学询问系统及其使用方法”(Optical Interrogation System and Method for Using Same);

[0047] •美国专利申请号 11/019,439,发明名称为“阵列式传感器测量系统及方法”(Arrayed Sensor Measurement System and Method);

[0048] •美国专利号 6,785,433,发明名称为“波段格栅阵列和光学测量排列”(Waveguide Grid Array and Optical Measurement Arrangement);

[0049] •美国专利申请号 11/100,199(案卷号 SP03-062B),发明名称为“光学询问系统和用于二维传感器阵列的方法”(Optical Interrogation System and Method for 2-D Sensor Arrays)。

[0050] 这些文献的内容被纳入本文作为参考。

[0051] 1.2 平板找准子系统 160

[0052] 图 4A 和 4B 是阐述一个平板找准子系统 160 例子中的不同部件的图。平板找准子系统 160 主要包括 X/Y 平移平台(未显示)和微板固定结构 400,该微板固定结构调整和移动微板 206,使其能被光学子系统 150 正确地扫描。平板找准子系统 160 位于测量室 130 之内(见图 1)。

[0053] 在一个实施方式中,平板找准子系统 160 具有微板固定结构 400,该微板固定结构包括具有两个表面的基底 402,其中一个是主表面 410,另一个是次表面 412。次表面 412 嵌在端壁 414 和侧壁 416 上,在基底 402 内形成开口/检测孔 406。次表面 412 形成一围绕检测孔 406 的凸缘,并限定了巢座(nesting receptacle)420。巢座 420 形成的区域将被固定微板 206 占据(见图 6A 和 6B)。界定巢座 420 的次表面 412 还可具有三个支撑物 430,它们能够在 Z 方向平面内接触并支承微板 206。但是,优选的是,约束结构 400 具有 8 个接

触点,以在 X、Y 和 Z 平面方向上确立微板 206 的位置,见图 4B 中优选约束结构 400 的顶视图。此约束结构 400 中的 8 个接触点包括:巢座 420 中的三个支撑物 430,成三角形布局,从表面 412 突出;和另外 5 个定位结构,包括位于端壁 414 上是两个 X 方向的接触点 440x,一个位于侧壁 416 上的 Y 方向的接触点以 440y,和两个弹簧加压的接触点 450x 和 450y,分别位于对面的端壁 414 和侧壁 416 上。定位接触点 440x/y 各自的调节器 417 位于约束结构 400 的外表面 421 上。用片簧调节器 419 来调节可施加的弹簧力。这种调节器 417 或片簧调节器 419 可以是螺钉之类或者是用于调节施加给微板 206 的力的其它可选装置。可再用其他调节器以适应不同的微板尺寸(即,支撑物 430 高度的调节机构)。关于这种特定的限制结构 400 以及其它限制结构的详细描述文献可参见:

[0054] •美国阵列申请系列号 60/701,452(代理案卷号 SP05-086P),发明名称为“运动孔板固定方法”(Kinematic Wellplate Mounting Method)。

[0055] 本文将此文献的内容纳入作为参考。

[0056] 1.3 环境控制子系统 170

[0057] 使用环境控制子系统 170 来将外部环境(如温度波动)在筛选系统 100 的孵育室 110、进样锁定室 120 和测量室 130(见图 1)内的影响减到最小。在一个实施方式中,环境控制子系统 170 包括具有热电模块和允许人们将温度控制在 50 毫度( $3\sigma$ , 12 小时)范围内的空气循环装置的壳体。本实施例所示的环境控制子系统 170 位于测量室 130 内(见图 1)。

[0058] 1.4 液体处理和平板转运子系统 180a 和 180b

[0059] 液体处理和平板转运子系统 180a 和 180b 用于将一个或多个微板 206 在测量室系统 110 中移动。在一个实施方式中,液体处理子系统 180a 具有移液器(未显示),该移液器可在分析微板 206 和来源微板(未显示)之间转运液体。平板转运子系统 180b 具有夹持器(未显示),该夹持器用于将微板 206(分析微板)移动到测量位置,并将另一微板(来源微板)移动到液体处理位置。在一个优选实施方式中,平板转运子系统 180b 将微板移动进出测量位置。它可包括一个或多个以下部件,如旋转臂、移板架(plate carriages)、夹持器、升降机构(lifter)和输送系统(例如)。平板转运子系统 180b 主要提供一能使多个微板进入测量室 130 内的工具。例如,当一个微板接受测量时(光学询问),另一微板可移动到位以待接下来将被检测,而先前的微板可移出筛选系统 100。关于这些子系统 180a 和 180b 的更详细描述可参见下文关于图 11-15 的描述。

[0060] 1.5 计算机 140/软件子系统 190

[0061] 计算机 140/软件子系统 190 控制着筛选系统 100 中的设备硬件,同时还协调测量并对询问微板 206 获得的数据进行处理。计算机 140/软件子系统 190 和光学子系统 150 的一个示范性电学结构描述在图 5 中。在此实施例中,计算机/软件子系统 190 包括 PC 226(见图 2)和数据存储单元 502。PC 226 具有以下部件:(1)原谱分选和分存(binching)单元 504;(2)峰值检测算法单元 506;和(3)分析结合信号单元 508(与数据存储单元 502 连接)。此外,PC 226 通过光谱数据流 516 与光学子系统 150 偶联。光学子系统 150(见图 2)包括分光计 I/O 板 505 和分光计 224。分光计 I/O 板 505 具有下述部件:(1)数字时标发生单元 510;(2)光束汇总单元 512;和(3)频谱交叠(spectrainterleaving)单元 514。此外,分光计 I/O 板 505 通过带状电缆 518 与分光计 224 连接。这些部件各自执行如下功

能：

[0062] 1.5.1 数字时标发生单元 510

[0063] 分光计 I/O 板 505 为光学模块 150 提供并跟踪所有实时数字信号。为了帮助分光计 I/O 板 505 做到这点,数字时标发生单元 510 接收来自扫描轴编码器的正交 (quadrature) 编码器输入信号,所述扫描轴编码器与平移平台和移动并支持微板 206 的约束结构 400 (见图 4A 和 4B) 相关联。基于平移平台的速度,数字时标发生单元 510 调动分光计 224 精确定时地获取光谱。在优选的实施方式中,所有 16 个分光计 224 同时对它们各自的生物传感器 204 区域采样。数字时标发生单元 510 还在带状光缆 518 中具有许多控制线,用于驱动各分光计 224 中 CCD 阵列和 A/D 转换器。CCD 阵列将光学信号转换成电模拟信号,其代表着各给定像素 (波长) 的能量 (power)。A/D 转换器将模拟信号转换成数字信号。这些数字信号被通过 112 比特的数据总线 518a 提供给分光计 I/O 板 505。

[0064] 1.5.2 112 比特数据总线 518a

[0065] 各分光计 224 中的各 A/D 转换器将 14 比特信号提供给分光计 I/O 板 505。对于各定时像素,存在一个代表该像素的信号水平的 14 比特数值。各组 (bank) 8 个分光计的 14 比特总线被捆在一起,形成 112 比特的数据总线 518a。各分光计带状光缆包括 14 比特的 A/D 数据。在分光计 I/O 板 505 上,该 112 比特数据总线 518a 与 112 比特 FPGA 输入端口 (未显示) 相连。两组的光分计 224 (每组 8 个) 共享同一根 112 比特数据总线 518a。此外,数字时标发生单元 510 使用分组控制线来控制有哪一组分光计 224 占用 112 比特数据总线 518a。在任一给定时刻,仅一组 8 个分光计 224 可向 112 数据总线 518 写入。

[0066] 1.5.3 光束汇总单元 512

[0067] 随着由分光计 224 汇总形成原始光谱,分光计 I/O 板 505 能够将该原谱上传给 PC 226,或者能够对像素数据执行增益 (gain) 和补偿 (offset) 校准,然后汇总出一原谱系列从而能够产生较大的“虚拟 (virtual)”光束 208。

[0068] 1.5.4 频谱交叠单元 514

[0069] 根据光谱是如何收集和 (任选地) 汇总的,可能需要在将数据传送给 PC 226 之前对各分光计 224 的像素数据进行交叠。因此,例如,分光计 #1 的像素 #1、接着是分光计 #2 的像素 #1 可能需要先交叠再传送到 PC 226。

[0070] 1.5.5 光谱数据流 516

[0071] 分光计 I/O 板 505 收集的光谱可通过 32MB/秒的总线通道 516 上传给 PC 226。在此例中,主机 PC 226 可具有指导数据进入内部存储器 (未显示) 的总线卡。

[0072] 1.5.6 原谱分选和分存单元 504

[0073] 根据数据是如何收集的,光谱可能需要恢复成适应各光学通道的光谱波形的形式来存储。此外,此时可进一步进行类似于之前在分光计 I/O 板 505 上所实施的汇总,以产生较大的“虚拟 (virtual)”光束 208。

[0074] 1.5.7 峰值检测算法单元 506

[0075] 然后,使用峰值检测算法处理各原谱或汇总在一起的原谱系列,该算法意图分辨各分光计 224 内 CCD 阵列上的共振位置。

[0076] 1.5.8 试验结合信号单元 508

[0077] 试验结合信号单元 508 使用峰值检测算法单元 506 的输出值计算插入测量室 130

的不同类型微板 206 的试验结合信号。例如,对于使用自参照 (selfreferencing) 的孔 610, 可以将信号衰减波长减去参比衰减波长 (padwavelength) 后作为结合信号 (见图 6A)。此外,对于不使用参照的孔 610,可直接采用整个孔的平均波长作为无参比结合信号。

[0078] PC 226 还具有图形化的用户界面 (未显示),在该界面,操作者可在其中给定排的传感器的反射光峰位置被实时监控的试验进展模式和其中微板被全面扫描并从各个孔产生各自数据的高通量筛选模式之间进行选择。这两种模式将在下文描述图 11-15 时有详细的描述。

[0079] 1.6 装置 135

[0080] 装置 135 起到与例如高通量筛选 (HTS) 线 1304 的外部设备 (如图 13 所示) 连接的作用。装置 135 可包括但不限于:旋转臂、拔取工具 (drawer)、升降机构 (lifter)、夹持器、导轨上的移板架、或传送带。它的主要功能是移动微板 206 进出筛选系统 100。它还可将微板传送至孵育室 110 或测量室 130。

[0081] 下文将提供关于可被筛选系统 100 询问的示例性一次性微板 206 的描述。图 6A 和 6B 是两张阐述能被定位在约束结构 400 (见图 4A 和 4B) 中的示例性一次性微板 206 (如多孔板) 的图。所示的微板 206 具有孔 610 阵列,其结构包括两个部分,即上部板 602 和下部板 603。上部板 602 包括外围边缘/框架 604、上表面 606,并以孔 610 外轮廓作为侧壁 608。各孔 610 能够接收待分析的等分样品。下部板 603 形成基本上且优选平整的各孔 610 的透明底壁/表面 613,其中形成或放置有生物传感器 204 (见图 6B)。生物传感器 204 用于检测孔 610 内或孔 610 的底表面上发生的生物分子活动。虽然所示的微板 206 具有 96 个孔 610,应理解,在优选的实施方式中,可使用具有 384 个孔的微板 206。下文是微板 206 内部部件的详细描述:

[0082] 2.1 生物传感器 204

[0083] 2.2 生物传感器基板 603

[0084] 2.3 上部 (有孔的) 板 602 和基板 603 组件

[0085] 2.4 生物传感器的表面连接化学特征

[0086] 2.5 生物传感器的信号/参比区域。

[0087] 2.1 生物传感器 204

[0088] 在一个实施方式中,生物传感器 204 是共振波导光栅 (RWG) 生物传感器 204,其具有如图 7 所示的结构。生物传感器 204 包括置于复制衍射光栅 (replicated diffraction grating) 704 之上的高折射率波导层 702,该光栅 704 置于玻璃基底 706 之上。例如,衍射光栅 704 可以是  $3\text{mm} \times 3\text{mm}$  的正方形,其具有栅距为  $500\text{nm}$ 、深度为  $50\text{nm}$  和  $50\%$  占空比的复制线性光栅。优选的是,优化波导层 702 的厚度和折射率以及衍射光栅 704 的特性 (栅距、深度和占空比),以产生针对生物传感器 204 顶部分析物 708 和靶标 710 的相互作用引起的折射率变化的最高敏感性。这种敏感性定义为相对于折射率变化的反射光 712 的偏移 ( $\text{nm}/$  折射率单位)。因为感测原理涉及从生物传感器 204 发出的倏逝波 714 的相互作用,因此被感容积通常局限于最贴近波导管 702 表面上的  $150\text{-}200\text{nm}$ 。

[0089] 关于生物传感器 204 的结构和功能的更详细讨论,可参见以下文献:

[0090] • 美国专利 4,815,843,发明名称为“用于选择性检测物质和/或检测气体、液体、固体和多孔样品中的折射率变化的光学传感器” (Optical Sensor for Selective

Detection of Substances and/or for the Detection of Refractive Index Changes in Gaseous, Liquid, Solid and Porous Samples) :

[0091] • 美国专利 5,738,825,发明名称为“光学生物传感器基质”(Optical Biosensor Matrix)。

[0092] 这些文献的内容被纳入本文作为参考。

[0093] 图 8A 和 8B 是阐述其上具有准线 802 的生物传感器 204 的另一设计的图。在此实施例中,除 1mm×1mm 的中心区域外,4mm×4mm 的生物传感器 204 在对角线上具有 4 条 0.2mm 的准线 802。这些准线 802 使人们可监测微板 206 相对于光学子系统 150 的定位。这是重要的,基于此,如果微板 206 从测量室 110 中移出然后重新插入的话,平板找准子系统 160 能够正确地定位微板 206(见图 1)。另一可选例子是图 9A 和 9B,它们是阐述未使用图 8A 和 8B 所示的孔内基准线 802 取而代之的是形成于微板 206 之上的有翼状基准 902 的另一设计的图。关于这些和几种其它类型的基准是如何可用来正确地将微板 206 定位到测量室 130 中的更详细讨论可参见以下文献:

[0094] • 美国专利申请号 11/027,547,发明名称为“空间扫描光学阅读系统及其使用方法”(Spatially Scanned Optical Reader System and Method for Using Same);

[0095] • 美国专利申请号 11/210,920(代理案卷号 SP04-149A/WJT003-0082),发明名称为“用于监控和校正非标记依赖性生物传感器的横向和角状误排列的光学阅读系统和方法”(Optical Reader System and Method for Monitoring and Correcting Lateral and Angular Misalignments of Label Independent Biosensors)。

[0096] 这些文献的内容被纳入本文作为参考。

#### [0097] 2.2 生物传感器基板 603

[0098] 在此实施方式中,微板 206 具有光学基板 603,该基板由玻璃基底 706 制得,其上覆盖有 UV 固化的树脂(如丙烯酸酯类制剂)涂层,其中,衍射光栅结构 704 是重复排列的(见图 7、8B 和 9B)。在该 UV 固化树脂层之上沉积波导层 702,它由高折射率透明绝缘体如无机氧化物(如 Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 或 Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)制成。可采用标准的溅射技术沉积光学波导层 702。离子枪可用作辅助手段,但并非必需,虽然优选的实施方式采用了离子枪辅助手段。还可在波导层 702 之上再沉积一层 SiO<sub>2</sub> 薄层,以提高波导层 702 上表面的生物学结合能力。虽然可使用由塑料或玻璃制得的任何足够平坦且光学透明的基底 706,但在优选的实施方式中,该玻璃基底 706 是康宁(Corning's)的代码为 1737 F 或 G 的铝硅酸盐玻璃。优选玻璃基底 706 呈 117.3mm×76.1mm(L×W),厚 0.7mm。图 8B 和 9B 是基板 603 的顶视图,所示基板 603 具有结合于其中的 384 个生物传感器 204,所示传感器看起来如图 8A 和 9B 所示的生物传感器 204。

#### [0099] 2.3 上部(有孔的)板 602/基板 603 组件

[0100] 如图 6A-6B 所示,通过将具有孔 610 的上部(有孔的)板 602 与光学基板 603 相连制得优选的微板 206。在优选的实施方式中,上部(有孔的)板 602 通过注模 COC-Ticona Topas® TKX-0001 而获得。优选的(有孔的)上部板 602 具有 384 个圆孔 610,各孔 610 具有以下尺寸:顶部直径 3.40mm±0.05,底部直径 2.80mm±0.05,高度 10.92mm,容积 82.6 μl。此外,优选的上部(有孔的)板 602 满足以下标准:

[0101] • ANSI/SBS 1-2004 足迹尺寸

[0102] • ANSI/SBS 2-2004 高度尺寸 (板的总高度是 14.22mm)

[0103] • ANSI/SBS 3-2004 底部外缘尺寸

[0104] • ANSI/SBS 4-2004 孔位置。

[0105] 此外,在优选的实施方式中,使用粘附剂(如 UV 阳离子环氧树脂——Loctite® 3340)将光学基板 603 与有孔板 602 粘合。关于优选微板 206 和优选粘合组装方法的详细描述可参考以下文献:

[0106] • 美国专利申请号 2003/0031829 A1,发明名称为“具有透明的孔底部的多孔板和制造该多孔板的方法”(Multiwell Plate having Transparent WellBottoms and Method for Making the Multiwell Plate);

[0107] • 美国专利号 6,767,607 B2,发明名称为“具有透明孔底部的多孔板”(Multiwell Plate having Transparent Well Bottoms);

[0108] • 美国专利申请号 11/046,427,发明名称为“多孔板和使用低细胞毒性、可光致固化的粘附剂制备多孔板的方法”(Multiwell Plate and Method for Making Multiwell Plate Using A Low Cytotoxicity Photocurable Adhesive)。

[0109] 这些文献的内容被纳入本文作为参考。

[0110] 2.4 生物传感器的表面连接化学特征

[0111] 如图 7 所示,优选的生物传感器 204 具有连接表面 716,该表面用于结合生物分子 710(靶标 710)。例如,可使用一联结层(tie layer)将反应性聚合物共价结合到波导层 702 的上表面从而形成连接表面 716。将靶标 710 固定后,可使用阻断分子消除反应性聚合物上的未反应基团。阻断分子还可用于在生物传感器 204 上形成参比区域(见图 10)。

[0112] 在优选的实施方式中,联结层可由氨基丙基硅倍半氧烷(APS)或  $\gamma$ -氨基丙基硅烷(GAPS)制成,其中 APS 采用溶液法沉积,而 GAPS 则采用蒸气法沉积。反应性聚合物可由乙烯与马来酐的交替共聚物(poly(ethylene-alt-maleic anhydride),EMA)和甲基乙烯醚与马来酐的交替共聚物(poly(methylvinylether-alt-maleic anhydride),MAMVE)制得。此外,任何能消除上表面未反应基团的化合物都可用作阻断剂,如乙醇胺(ethaloamine)和 0,0'-二(2-氨基丙基)聚乙烯醇 1900。这种表面化学特征允许多种靶标 610 的结合,所述靶标包括但不限于:小肽、配体或蛋白质、抗体、酶、受体和细胞。

[0113] 关于表面结合化学的详细描述可参见以下文献:

[0114] • 美国专利申请系列号 10/996,952,发明名称为“用于结合生物分子的聚合物包涂的基底及其制备和使用方法”(Polymer-Coated Substrates for Binding Biomolecules and Methods of Making and Using Thereof);

[0115] • 美国专利申请系列号 11/027,509,发明名称为“用于在生物传感器上产生参比区域和样品区域的方法和所产生的生物传感器”(Method for Creating A Reference Region and a Sample Region on a Biosensor and the Resulting Biosensor)。

[0116] 这些文献的内容被纳入本文作为参考。

[0117] 2.5 生物传感器的信号区 / 参比区

[0118] 在优选的微板 206 中,各孔 610/生物传感器 204 具有参比区域,该参比区域通过连接化学特征与阻断分子反应而形成于局部。基于几个理由该参比区域是需要的。首先,基于它可消除环境变化如温度、背景变化(如缓冲液折射率的不同)产生的影响,消除将微

板 206 移走和重新插入光学阅读器 150 引起的复位变化产生的影响。其次,它还可以就非特异性结合提供参照。

[0119] 在优选的实施方式中,通过用阻断剂在孔 610 的底部规画出参比区域。有几种接触和非接触方法可对孔 610 进行规画,例如,接触方法之一是将阻断剂针印 (pinprint) 到孔 610 中。此外,各孔 610 可具有许多不同的参比区规划,如:1) 左 / 右半侧被阻断;2) 衍射光栅的中心被阻断;和 3) 阻断区域成交替的条带或方块。不论如何,孔 610 的规划应如图 10 所示沿着衍射光栅 704 的轴排列,以避免参比区域 1002 和反应区域 1004 之间的串话。

[0120] 关于参比区域 1002 的产生和使用的详细讨论,可参见前述美国专利申请系列号 11/027,509。此外,下述文献描述了可用于本发明的几种类型的自参照生物传感器 204:

[0121] • 美国专利申请号 10/947,021,发明名称为“自参照波导光栅传感器”(Self-Referencing Waveguide Grating Sensors)。

[0122] 此文献的内容被纳入本文作为参考。

[0123] 下文将提供关于如何使用筛选系统 100a、100b 和 100c 来实施不同类型的测量分析的描述。但是,在讨论几种示例性测量分析之前,先提供关于筛选系统 100 主要部件的功能的简要讨论。再次参见图 1A-1C,它们显示了阐述筛选系统 100a、100b 和 100c 的不同结构的分块图。如图所示,具有受控内部环境的孵育室 110(消热差缓冲室 110)为大量的微板 206 到达热平衡提供了缓冲。这使得微板 206 以未受控制的温度从筛选系统 100 外部进入,然后达到热平衡。孵育室 110 优选足够大,以允许多个微板 206 达到平衡而不限限制筛选系统 100 的通量。进样锁定室 120(仅在图 1A 中显示,包括旋转臂 135(接口装置 135)、多轨系统 120b 和条形码阅读器 120c)是孵育室 110 和测量室 130 之间的转移区域。进样锁定室 120 基本上是个前庭 (vestibule),微板 206 由此通过进入测量室 130。受热控制的测量室 130 是微板 206 接受光学询问的地方。测量室 130 包括:(1) 测量模块 150;(2) 液体处理模块(移液器)180a;(3) 环境控制设备 170;和(4) 微板处理模块(夹持器或导轨)180b。

[0124] 筛选系统 100a、100b 和 100c 起到光学询问位于微板 206 的孔 610 底部上的生物传感器 204 的作用。在优选的结构中,筛选系统 100a、100b 和 100c 使用一柱光束 202 扫描移动中的微板 206 的一排孔 610/生物传感器 204(见图 2)。在一个实施方式中,光学询问光束 202 扫描过移动中的孔 610/生物传感器 204,检测并记录孔 610/生物传感器 204 的反应区域和阻断区域的读数。或者,可移动光头 222,使光学询问光束 202 扫描过静止的孔 610/生物传感器 204。为了检测结合事件,需要在将靶标 710 固定到孔 610/生物传感器 204 上之后进行第一次扫描。并且,需要在将生物材料 708(分析物 708)加到孔 610/生物传感器 204 上的固定靶标 710 上之后进行第二次扫描。如果需要,可在实施第二次扫描之前先利用基准点 802(见图 8 和 9)进行微板 206 在测量室 130 中的复位。下文是关于如何使用筛选系统 100a、100b 和 100c 实施不同类型的测量分析的详细描述:

[0125] 3.1 试验模式

[0126] 3.2 HTS 模式。

[0127] 3.1 试验模式

[0128] 以试验模式工作的筛选系统 100a、100b 和 100c 实时获得生化相互作用数据。图 11A 和 11B 是两种用于帮助描述可用筛选系统 100a、100b 和 100c 实施的两种不同类型的试验的流程图。在下文的描述中,来源微板存储将被转移到测试微板 206 的材料。而测试微

板 206 则具有嵌埋于孔 610 底部的生物传感器 204。

[0129] 图 11A 是显示用筛选系统 100a(例如)以试验进展模式 (assay development mode) 实施的一个连续法 1100a 的步骤的流程图。从步骤 1102a 开始,治疗靶标 710 被固定在测试微板 206 的孔 610 的内部,测试微板 206 此时位于筛选系统 100 之外。在固定了靶标 710 后,将一缓冲剂加到微板 206 的孔 610 中。在步骤 1104a,测试微板 206 被插入孵育室 110,消除热差。可能需要花费 30 分钟的时间使测试微板 206 达到热平衡,这取决于测试微板 206 的周边温度。在步骤 1106a,测试微板 206 从孵育室 110 移出,通过进样锁定室 120 进入测量室 130 的测试位置上。在测量室 130 中,测试微板 206 中的生物传感器 204 接受询问,由此获得测量基线。然后,在步骤 1108a,来源微板被插入孵育室 110 中消除热差。应注意的是,来源微板可在测试微板 206 插入孵育室 110 的同时插入孵育室 110 中。经过一段时间后,来源微板从孵育室 110 中移出,通过进样锁定室 120 进入测量室 130 中。在步骤 1110a,测量室 130 中的液体处理模块(移液器)180a 将分析物 708(测试化合物 708)从来源微板的孔中转移到测试微板 206 的孔 610 中。然后,询问测试微板 206 中的生物传感器 204,在测试微板 206 孵育过程中获得许多不同的测量值。测试微板 206 被询问之后,在步骤 1112a,测试微板 206 和来源微板都从筛选系统 100 中移出。这些步骤可不断重复,以连续地询问任意数量的测试微板 206。可以看出,这种模式没有通量要求,因此不需要像 HTS 模式(见图 12-15)那样使多个测试微板 206 同时进入和同时移出筛选系统 100。再次提请注意的是,筛选系统 100b 和 100c 不具有进样锁定室 120,且筛选系统 100c 具有包括了消热差缓冲室 110 的测量室 130。但是,筛选系统 100b 和 100c 也可实施上述类型的试验。

[0130] 图 11B 是显示可使用筛选系统 100a(例如)以试验进展模式实施的另一种连续方法 1100b 的流程图。从步骤 1102b 开始,测试微板 206(其上没有固定靶标 710)和第一来源微板(含有靶标 710)都插入孵育室 110 中消除热差。微板 206 达到热平衡可能需时 30 分钟,这取决于微板 206 的周边温度。在步骤 1104b,测试微板 206 和第一来源微板从孵育室 110 中移出,通过进样锁定室 120 进入测量室 130。在步骤 1106b,液体处理模块(移液器)180a 将治疗靶标 710 从第一来源微板的孔中移到测试微板 206 的孔 610 中。在步骤 1108b,第一来源微板从筛选系统 100 中移出,插入第二来源微板到孵育室 110 中消除热差。在步骤 1110b,从测量室 130 中移出测试微板 206,通过进样锁定室 120 进入孵育室 110,这样,治疗靶标 710 可被孵育并固定在测试微板 206 的孔 610 内。然后,在步骤 1112b,测试微板从孵育室 110 移出,通过进样锁定室 120 进入测量室 130 内的测量位置。此时,从微板 206 的孔 610 中除去未结合的靶标 710,加入缓冲液。然后,询问测试微板 206 内的生物传感器 204,获得测量基线。然后,在步骤 1114b,将第二来源微板移出孵育室 110,通过进样锁定室 120 进入测量室 130。在步骤 1116b,液体处理模块(移液器)180a 将测试化合物 708 从第二来源微板的孔中转移到测试微板 206 的孔 610 中。然后,询问测试微板 206 的生物传感器 204,在测试微板 206 孵育期间获得许多不同测量值。询问完测试微板 206 后,在步骤 1118b,测试微板 206 和第二来源微板一起移出筛选系统 100。这些步骤可不断重复,从而连续地询问任意数量的测试微板 206。可以看出,这种模式没有通量要求,因此不需要像 HTS 模式(见图 12-15)那样使多个测试微板 206 同时进入和同时移出筛选系统 100。再次提请注意的是,筛选系统 100b 和 100c 不具有进样锁定室 120,且筛选系统 100c 具有包括了

消热差缓冲室 110 的测量室 130。但是,这些筛选系统 100b 和 100c 也可实施上述类型的试验。

[0131] 下文将提供关于人们如何将靶标 710 加到测试微板 206 中以及如何实施结合试验的详细描述。

[0132] 3.1a 加入靶标 710:

[0133] 来源微板首先由自动内部平板处理模块 180a 和 180b 转移到测量室 130 内的来源板位置上(见步骤 1104b)。测试微板 206 也被放置到测量室 130 的测量位置上。然后移动来源平板到移液器之下,移液器下移到来源微板,将液体吸入到移液管的端头。接着,移动测试微板 206 到移液器之下,该移液器下移到该测试微板 206,并将液体从移液器端头转移到测试微板 206。测量系统 130 中的液体处理设备 180a 和 180b 还能够通过将一定量的液体抽回到移液器端头、然后将其重新放回到微板 206 的孔 610 中从而将加入的液体与测试微板 206 的孔 610 中原有的液体混合。混合时间可根据需要而定。将测试微板 206 返还到孵育室 110 中进行孵育(通常 30-90 分钟)。靶标 710 结合到生物传感器 204 的表面上之后,将测试微板 206 移动到移液器下,该移液器下移到测试微板 206,并将含有未结合的靶标 710 的余下液体移除。然后,将折射率匹配的缓冲液加到孔 610 中以稀释孔 610 中剩余的液体。然后将其除去。重复以上过程,直到测试微板 206 的孔 610 上不残留游离靶标 710,而仅留下结合的靶标 710。

[0134] 3.1b 实施结合试验

[0135] 将装有测试化合物 708 的来源微板从孵育室 110 中移到测量室 130 的来源板位置上(见步骤 1114b)。将表面上结合了靶标 710 的测试微板 206 移到测量室 130 的测试微板位置上(见步骤 1112b)。将该来源微板移到移液器端头下,移液器端头下移到来源微板使移液器的末头充满测试化合物 708。然后,将测试微板 206 移到测量位置。对表面上结合有靶标 710 的孔 610 进行基线扫描(见步骤 1112b)。之后,将移液器移到测试微板 206 的上方,将测试化合物 708 加到测试微板 206 中。将内容物混合一段时间,该时间由使用者控制。然后扫描位于测量位置上的测试微板 206(见步骤 1116b)。扫描后,孔 610 的内容物可再次混合,从而使得反应不受扩散限制。混合涉及将液体吸入移液器端头,再将液体射回到孔 610 中。通常,混合时间约为各试验开始时的 6 分钟。获得作为时间函数的结合信号,直到试验结束。这个时间范围可以是 20 分钟到 60 分钟,取决于试验的性质。这会将 384 孔测试微板 206 的处理速度(throughput rate)限制在每 8 个小时约 3000-10000 孔。但是,这并不是问题,因为试验进展模式并没有预设的通量要求。

[0136] 由此类试验进展运行模式获得的数据例子显示在图 11C 中。该图显示同时获得的作为时间函数的多个孔 610(孔 A、B、……P) 的响应。在响应饱和区(例如第 1000 秒)选择终点,然后确定有分析物 708 的孔 610 与阴性对照孔 610(即孔 G、H、L、O 和 P) 之间的差异,由此获得总体结合信息。

[0137] 3.1 HTS 模式

[0138] 筛选系统 100 包括几个部件和特征,共同允许高通量地运行直接结合、无标记试验。在 HTS 模式中,必须明白:进行无标记直接结合试验的微板 206 不能整个试验期间都滞留在筛选系统 100 中。因为,如果典型的无标记直接结合试验需时 20 分钟(包括化合物加入、但不包括靶标固定),那么,如果 384 孔微板 206 在筛选系统 100 内滞留的话,最大速率

只能达到~9200孔/8小时。远低于40000孔/8小时的目标速率,该目标速率在本文中定义为高通量。筛选系统100通过将终点试验与384孔微板206移入和移出筛选系统100结合达到40000孔/8小时的高通量筛选目标。

[0139] 图12是阐述可采用(例如)本发明的筛选系统100a实施的HTS方法1000的步骤的流程图。首先,384孔微板206具有连接于生物传感器204表面的靶标710,在孔610加入折射率与分析物缓冲液的折射率匹配的缓冲液(步骤1202和1204)。在优选的实施方式中,步骤1202和1204在筛选系统100a的外面实施。然后将微板206放到孵育室110中,以使其达到热平衡,这通常花费大约30分钟,但该时间取决于周围外部温度(步骤1206)。然后,将微板206从孵育室110通过进样锁定室120转移到测量室130内(步骤1208)。在优选的实施方式中,由与进样锁定室120相连的旋转臂将微板206移出孵育室110,然后用夹持器将微板206转移到进样锁定室120的移板架上。然后移板架将微板206移到测量室130,该室的温度保持在孵育室110温度的正负0.1℃范围内。应理解,测量室130中也可具有几个消热差位置,微板206可在这些位置上进一步消除热差。如果孵育室110的热环境与测量室130的不同,这将是需要的。实施完所有这些步骤之后,另一夹持器将微板206插入测量巢400中,移动微板206经过光学读数器140从而在约20秒内获得微板206的基线测量值(步骤1208)。在完成微板206的基线扫描后,从测量位置上移出微板206,将其置于第二移板架上。然后旋转臂将微板206转移到外部设备,有该外部设备将分析物708加入微板206的孔610(如见图13)。此时,微板206可返回孵育室110进行孵育,或者可在外部设备中孵育(步骤1210)。通常,直接结合试验需要孵育约30分钟。之后,将微板206返回孵育室110,以使其再一次达到热平衡(步骤1212)。然后,将微板206通过进样锁定使120送回测量室130,并再次询问(步骤1214)。再次,可能用约240秒来扫描微板206。之后,从筛选相同100中移出生物206(步骤1216)。然后用计算机140由两次读数的差异计算出结合信号(见步骤1218)。必要时,计算机140还可利用孔内参照除去与分析物708与靶标710的结合不相关的系统波长偏移。如图12所示,可通过使多个微板206同时进入和同时移出筛选系统100而重复该方法多次,以满足所需的HTS要求。再次提请注意的是,筛选系统100b和100c不具有进样锁定室120,且筛选系统100c具有包括了消热差缓冲室110的测量室130。但是,这些筛选系统100b和100c也可实施上述HTS分析。

[0140] 此外,为了帮助达到所需的HTS要求,筛选系统100可具有多个位置(停放位置),这样,微板206可放置于这些位置排队等待接下来的步骤或测量而不需要将它们从孵育室110移到测量室130所耗费的时间。例如,在靠近进样锁定室120的旋转臂的位置可有一个停放位置,用于处理进出筛选系统100的微板206,还可存在移板架形式的另一停放位置,用于将微板206移入、移出测量室130。

[0141] 如所看到的,为了实施此HTS方案,需将特定的功能整合到筛选系统100中。这些功能包括:

- [0142] • 用于将微板206移入和移出筛选系统100的板处理系统;
- [0143] • 持续时间短于最小需求/允许试验持续时间的板处理/数据点阅读循环;
- [0144] • 能够跟踪并计算终点试验数据的板ID和数据处理方案;
- [0145] • 允许平板多路传送以实现HTS的目标速率的所有前述三者的系统执行。

[0146] 此外,筛选系统100具有用于帮助执行上述HTS方案的另一一些部件:

[0147] • 具有孔内参照的微板 206/ 传感器 204, 孔内参照通过参比提示残留光学 / 机械找准误差、传感物质漂移 (sensor material drift)、和环境 / 热力学引起的漂移 ;

[0148] • 对由于平板出入导致的轻微失准不敏感的光学 / 机械平台 400 ;

[0149] • 能使生物传感器 204 的参比区域和信号区域都受到询问的光学读数器 150 和微板子系统设计。

[0150] 应注意的是, 上述筛选系统 100 仅仅是可用于实施这些功能以实现前述 HTS 方案的一个具体实施方式。还应注意的是, 该 HTS 方案并不限于基于微板的无标记检测, 它还可用于其它不基于微板的平台 ( 微阵列等 )。

[0151] 如上所述, 筛选系统 100a、100b 和 100c 可能需要与外部设备如高通量筛选 (HTS) 线相互作用, 以帮助实施该 HTS 方案。图 13 提供了一分块图, 阐述了筛选系统 100 在旋转臂 1302 的帮助下如何与例举的 HTS 线 1304 相互作用的一个例子。例举的 HTS 线 1304 包括机械手 1306a、荧光阅读器 1306b、叠式停放架 / 暂停处 1306c、移液器 1306d、孵育器 1306e ( 显示了 2 个 ) 和夹持移液器 1306f ( 例如 )。

[0152] 图 14 是阐述筛选系统 100a ( 例如 ) 与 HTS 线 1304 相互作用以实施 HTS 方案 ( 见图 12 和 13 ) 的一个方式的根特图表。该表阐述了单个微板 206 在检测过程的不同时间内在筛选系统 100a 和 HTS 线 1304 中的位置。再次, 旋转臂 1302 是筛选系统 100 和 HTS 线 1304 的接口。

[0153] 图 15 是用于阐述筛选系统 100a ( 例如 ) 如何稳态运行以达到 40000 孔 / 小时的扫描速率的图表。该图表显示了多个 384 孔微板 206 是如何在不同的位置最有效地相互交错从而最大限度利用筛选系统 100a 和 HTS 线 1304 中的每个仪器。应注意的是, 存在许多不同形式和类型的可与筛选系统 100a 接合的 HTS 线。

[0154] 下文描述的是使用筛选系统 100 实施以下试验的示例性方案, 所述试验为荧光素生物素 (831Da) 708 与固定在 384 孔微板 206 的孔 610 底部的链霉亲和素 (60kDa) 710 结合。虽然此方案设计为全板试验, 但是可实施任意数量的列以满足各种不同的需求。此试验使用孔间参照来计算结合导致的波长偏移。用于实施该检测的步骤如下 :

[0155] A. 测试板制备 ( 见图 16 )

[0156] 1) 将 15  $\mu$  l 含 50  $\mu$  g/mL 链霉亲和素的 20mM 醋酸缓冲液 (pH 5.5) 加到微板 206 的孔 A-F、I、J、M 和 N 中 ;

[0157] 2) 将 15  $\mu$  l 含 20mg/mL PEG- 胺的 100mM 硼酸盐缓冲液 (pH9) 加到孔 G、H、K、L、O 和 P 中。这些孔用做阴性对照。

[0158] 3) 通过重复吸 / 放而将溶液混合, 在室温孵育 20 分钟, 然后再混合 ;

[0159] 4) 从所有孔中移出溶液, 用缓冲液重复清洗 ;

[0160] 5) 将 20  $\mu$  l 含 200mM 乙醇胺的 150mM 硼酸盐缓冲液 (pH 9.2) 加到所有孔中, 并混合 ; 从所有孔中移出该溶液并废弃 ;

[0161] 6) 将 20  $\mu$  l 含 200mM 乙醇胺的 150mM 硼酸盐缓冲液 (pH 9.2) 加到所有孔中, 并混合 ; 孵育 5 分钟, 用缓冲液重复混合和清洗 ;

[0162] 7) 实施结合试验前使平板在 PBS 缓冲液中浸泡 4 小时。

[0163] B. 来源板的制备

[0164] 1) 将 250  $\mu$  l 含 200nM 荧光素生物素的 1X PBS 溶液加到 V 底 96 孔微板的各孔中 ;

[0165] 2) 用铝密封膜或塑料盖子盖住微板,以避免蒸发;在进行结合检测之前 30 分钟移去盖子(见以下注意 1)。

[0166] C. 仪器试验方法

[0167] 注意 1:为了获得最优的性能,来源板和测试板应被引入筛选系统 100 内无覆盖地静置 30 分钟,以在试验前达到热平衡。

[0168] 注意 2:在将平板引入筛选系统 100 之前先在测试板上加入 15  $\mu$ l 1X PBS。

[0169] 1) 获取微板 206 的基线测量值;

[0170] 2) 加入 15  $\mu$ l 的 200nM 荧光素生物素;

[0171] 3) 通过吸/放混合孔 610 中的溶液;

[0172] 4) 测量光学信号。

[0173] D. 检测结果/数据分析

[0174] 测定原始读数(在第 200 秒)和最终读数(在第 1200 秒)之间的响应差值用于计算各孔 610 的波长偏移。然后通过从每列各孔中减去该列对照孔的波长平均偏移而对数据进行参比处理(以校正漂移、整体(bulk)折射率影响等)。图 17 是显示检测结果的图。

[0175] E. 结论

[0176] 以试验进展模式在 13 块板上运行上述方案的筛选系统 100 就 3091 个反应孔和 1872 个参比孔的离散系数(coefficient of variance)为 7.9%。有 59 个孔因为与平均响应值的离散值大于  $3\sigma$  被作为界外值而不予考虑。

[0177] 以下是本发明的一些优点、特征和用途:

[0178] 1. 筛选系统 100a、100b 和 100c 可用于包括 HTS 筛选在内的多种试验。它可用于需要检测生物学结合的各种应用。这些其它应用包括但不限于诊断、食物安全和国防安全。

[0179] 2. 无标记检测与放射性和荧光检测相比:现有技术的 HTS 检测技术在生化酶学反应中使用标记物或生色化合物,如在 ELISA(酶联免疫吸附测定)使用的那些。已开发了可在 HTS 中利用荧光强度、荧光偏振、荧光共振能量转移(包括时间分辨技术)检测药物化合物与治疗靶标之间的相互作用的荧光标记物以及标记策略。出版了关于这些技术的综述(见 A. J. Pope 等,“微型 HTS 的均匀荧光读数:理论和实践”(Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized HTS: theory and practice), Drug Discovery Today, 4, 1999, 350)。周知标记物可能是影响筛选结果可靠性的人工制品来源。此外,用于 HTS 的标记和检测策略之间的比较显示,所鉴定的“活性”化合物在数量和性质方面存在显著不同(如 M. A. Sills 等,“比较 HTS 中检测酪氨酸激酶分析的技术产生不同结果”(Comparison of Assay Technologies for a Tyrosine Kinase Assay Generates Different Results in HTS), J. Biomolecular Screening, 7, 2002, 191)。本发明的无标记检测方法相比放射性检测也具有优点,因为不存在处理和处置放射性材料的难题。

[0180] 3. 直接结合分析成为可能:标记物的使用通常导致无法直接检测药物化合物与感兴趣治疗靶标之间的直接相互作用,因为对靶标进行标记可能影响到其生化活性。HTS 试验因此被称为“功能性”试验,其中天然配体或底物(在用酶的情况下)至少被标记一次并被允许与靶标相互作用以产生阴性或基线信号。通过这种基线信号的变化来检测药物化合物与靶标或其配体的相互作用。可以看到的,HTS 的这种功能性试验难以被开发成强大的和结果明确的筛选方法。但是,无标记的 HTS 筛选系统 100 能够在一次简单的试验检测到

化合物单独与生物分子治疗靶标之间的相互作用。

[0181] 4. 灵敏度高而变差小 :HTS 筛选系统 100a、100b 和 100c 的灵敏度足以检测化合物与固定在各孔中传感器表面上的大生物分子靶标之间的直接相互作用。

[0182] 5. 与平板进 / 出相结合的孔内参照可实现终点试验和平板多路输送, 以实现高通量 :HTS 检测技术和试验设计通常基于检测步骤过程中的终点读数。HTS 筛选系统 100a、100b 和 100c 可实现 96 孔和 384 孔微板 206 的终点读数, 包括在孵育步骤之前的基线读数, 其允许化合物 708 与靶标 710 在孵育步骤中相互作用选定的时间而不影响到总体通量。

[0183] 6. 标准 SBS 格式微板与传感器芯片相比 :HTS 筛选系统 100a、100b 和 100c 使用 SBS 标准 (ANSI/SBS 1 到 4-2004) 尺寸微板而不是专用传感芯片。这是重要的, 因为专用传感芯片与现有的自动液体处理装置和平板处理装置难以兼容或完全兼容。

[0184] 7. 标准液体处理和平板处理单元的整合 :HTS 筛选系统 100 的微板和读数部件可与多个液体处理和平板处理仪器整合, 从而增加了模块性。

[0185] 8. 在同一系统上即能进行试验进展测量模式 (实时) 又可进行 HTS (终点) 模式 : 筛选系统 100a、100b 和 100c 可实现实时获得数据的试验进展模式 (见图 11A-11C) 和通过两次测量获得数据的 HTS 模式 (见图 12-15) 之间的无缝运行。

[0186] 虽然已在附图和前述详细描述中描述了本发明的几个实施方式, 但是应理解本发明并不限于所公开的这些实施方式。本发明可有大量的重排、修改和替代, 而不偏离下述权利要求所描述和定义的精神。

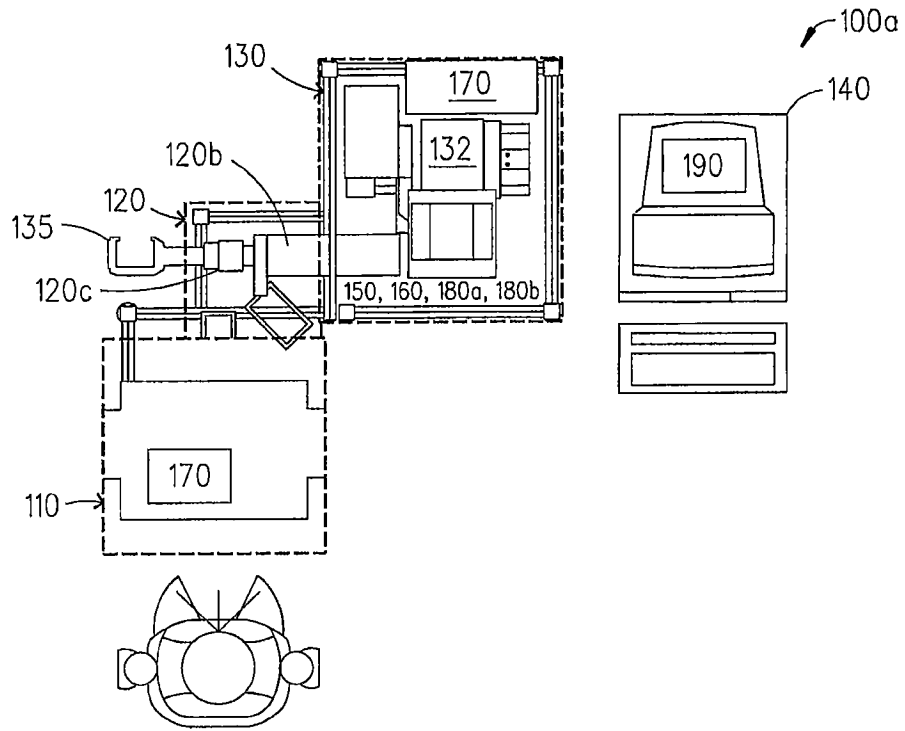


图 1A

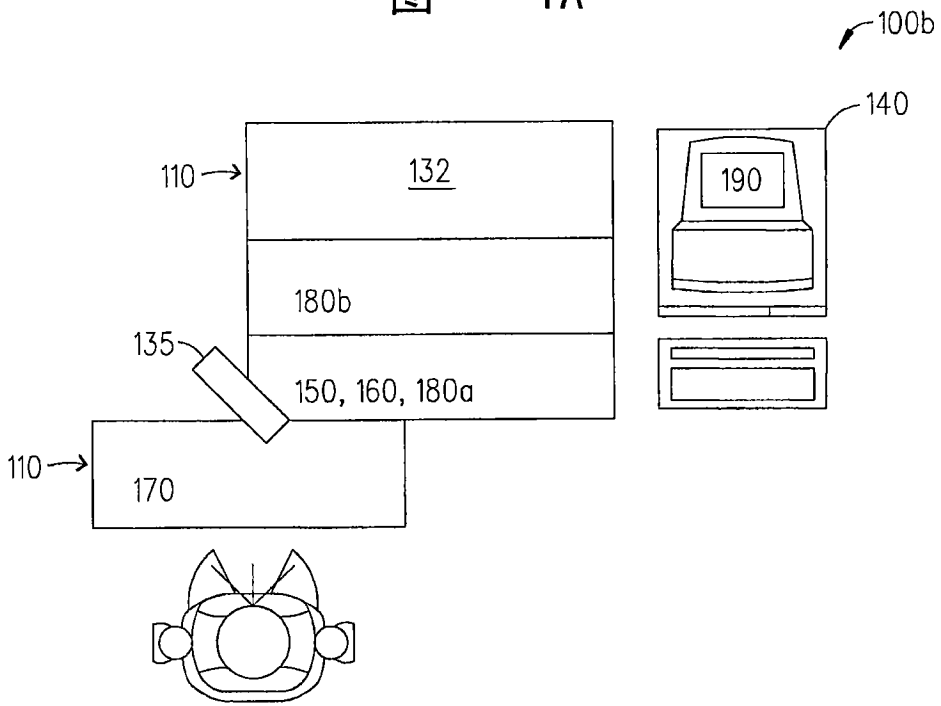


图 1B

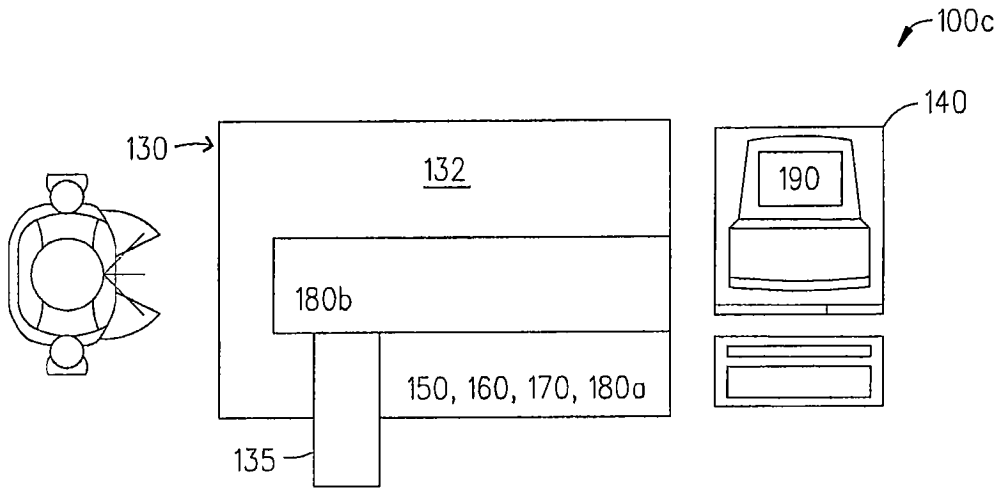


图 10

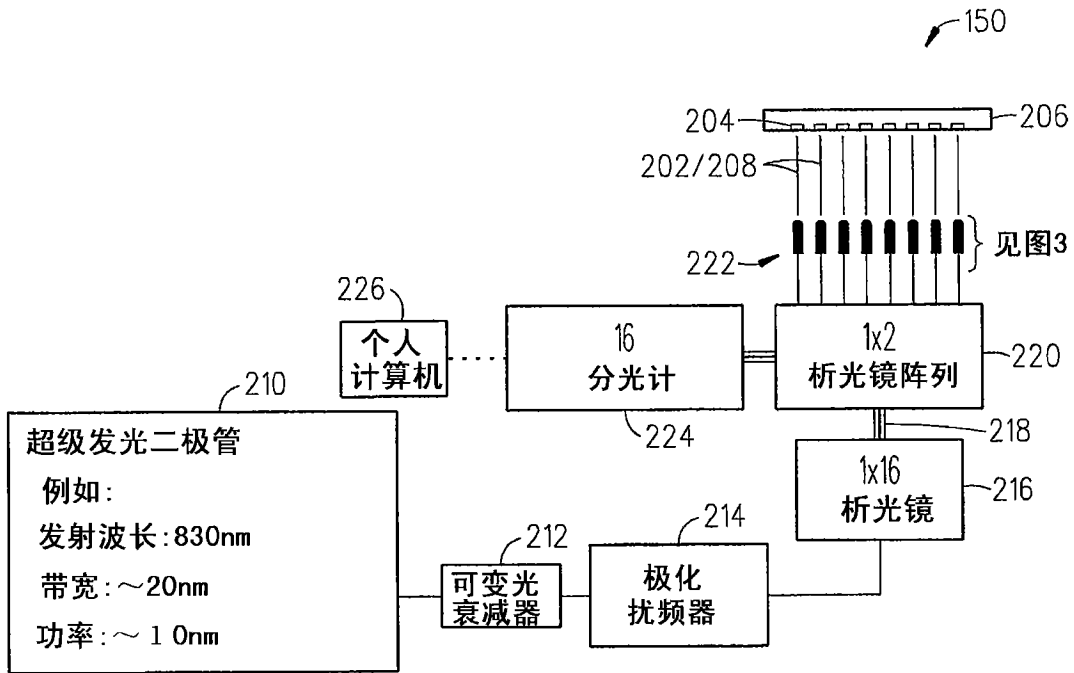


图 2

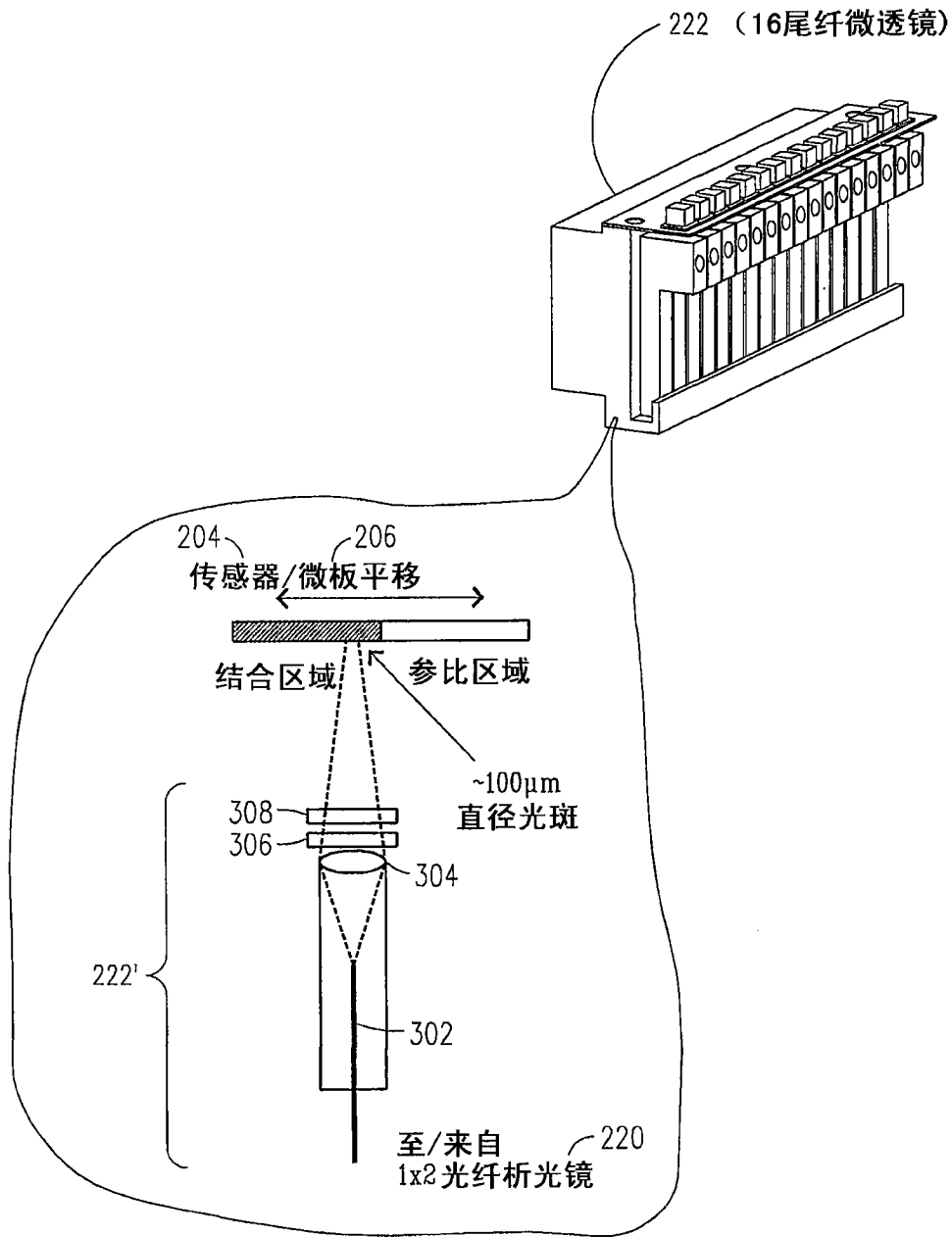


图 3



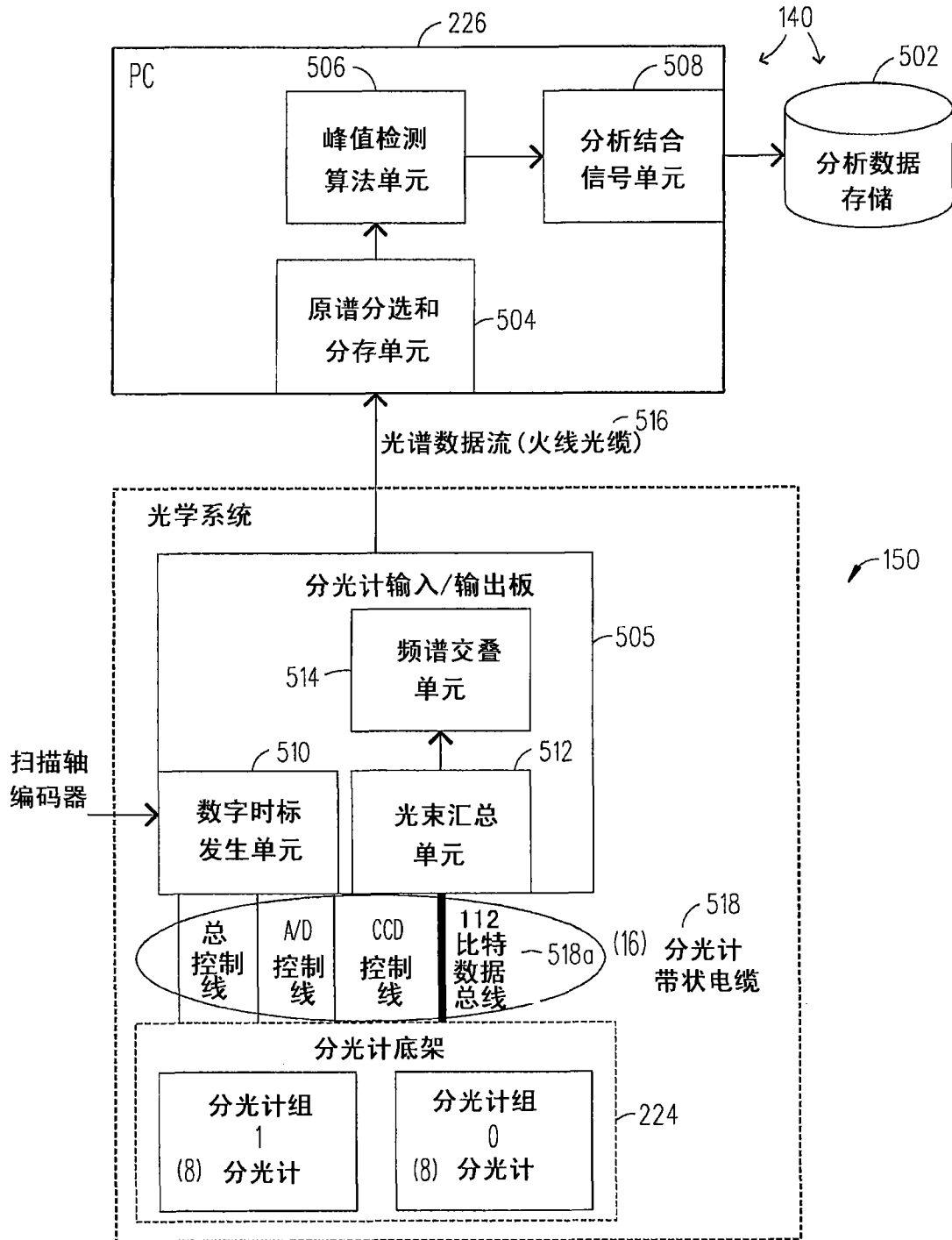


图 5

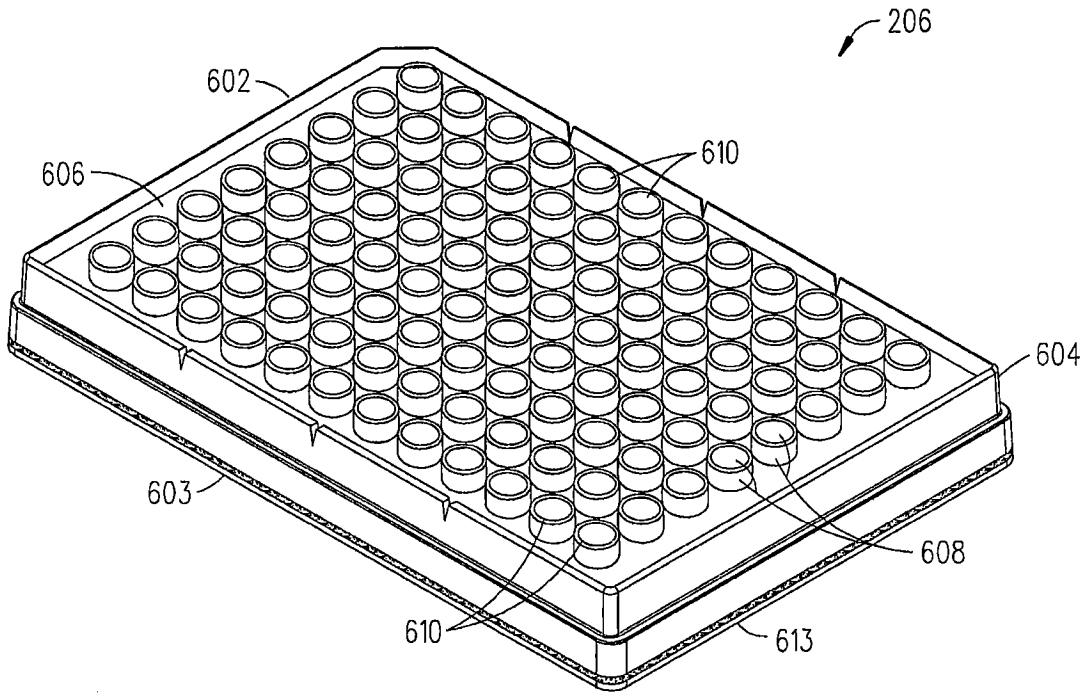


图 6A

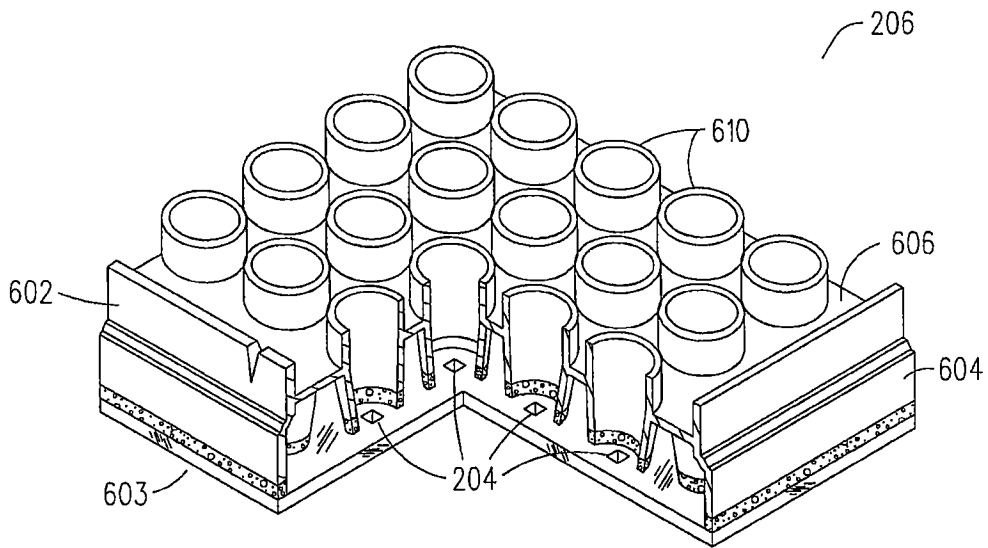


图 6B

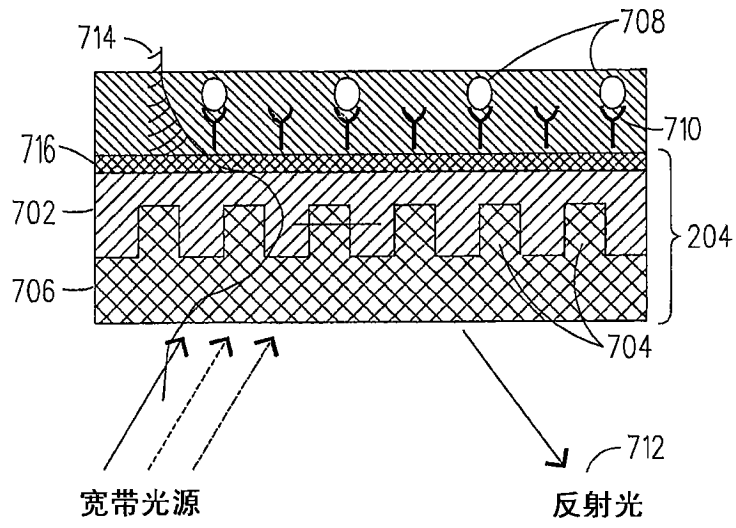


图 7

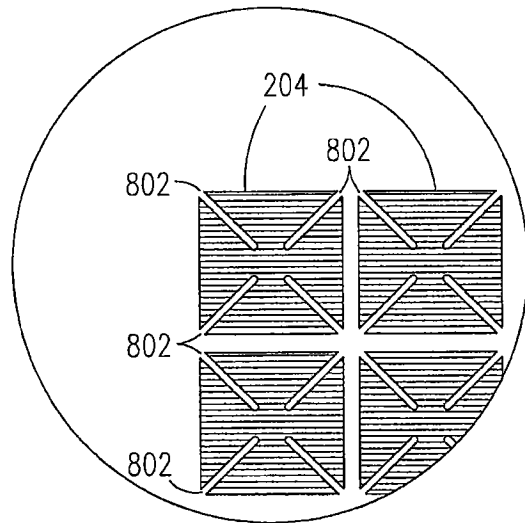


图 8A

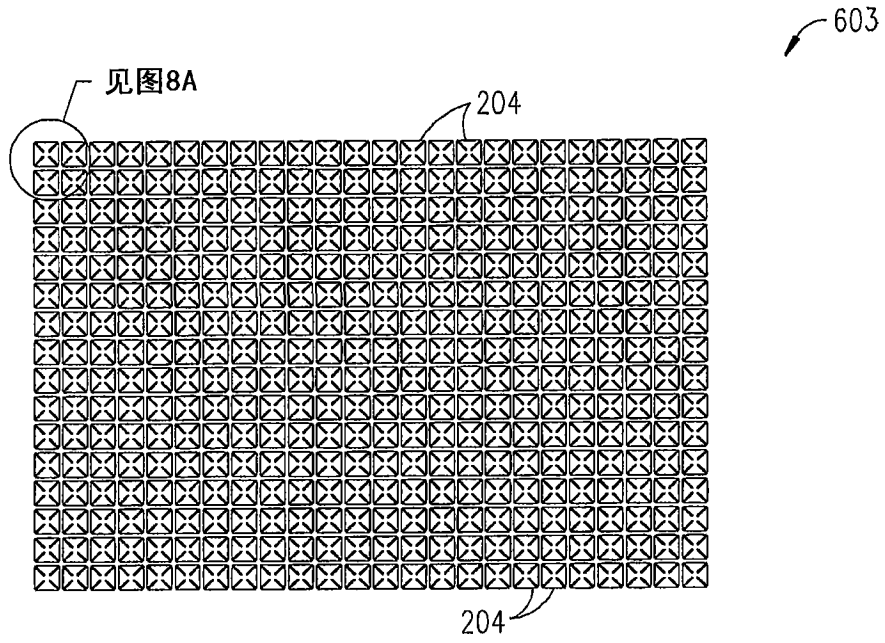


图 8B

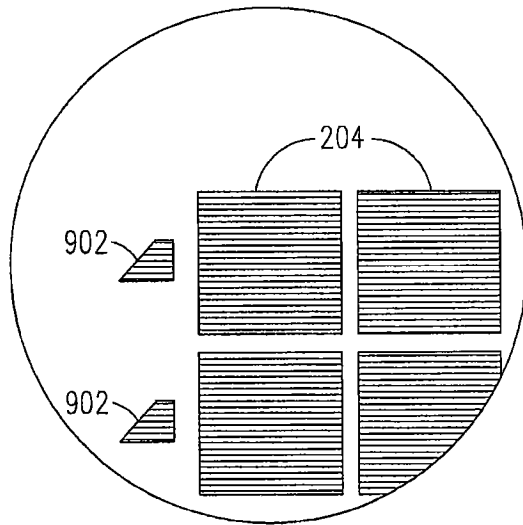


图 9A

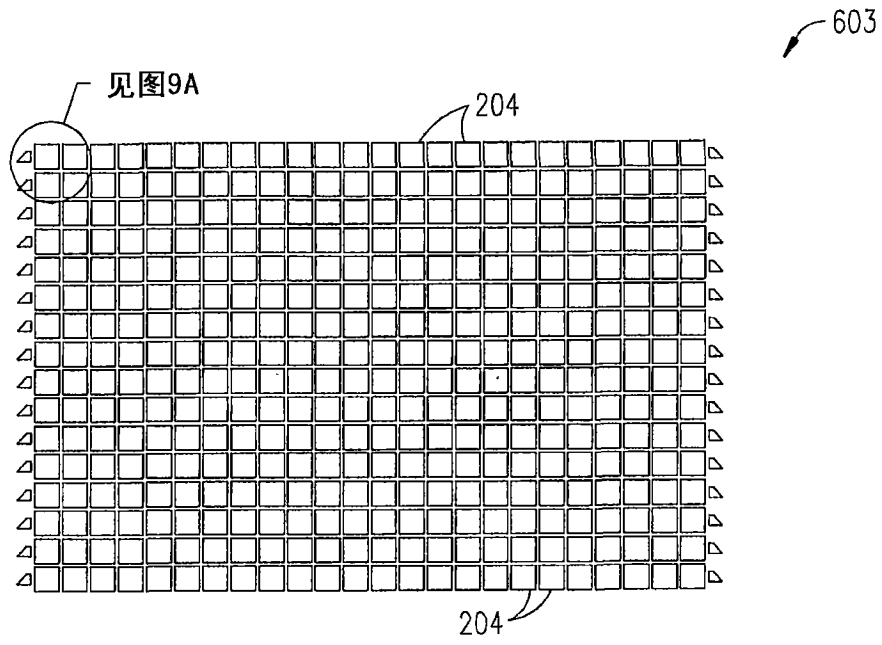


图 9B

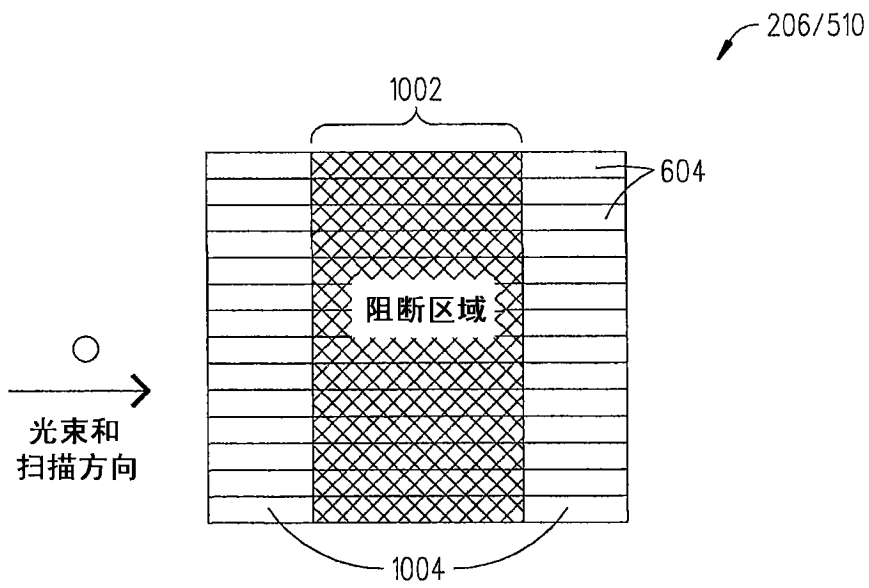


图 10

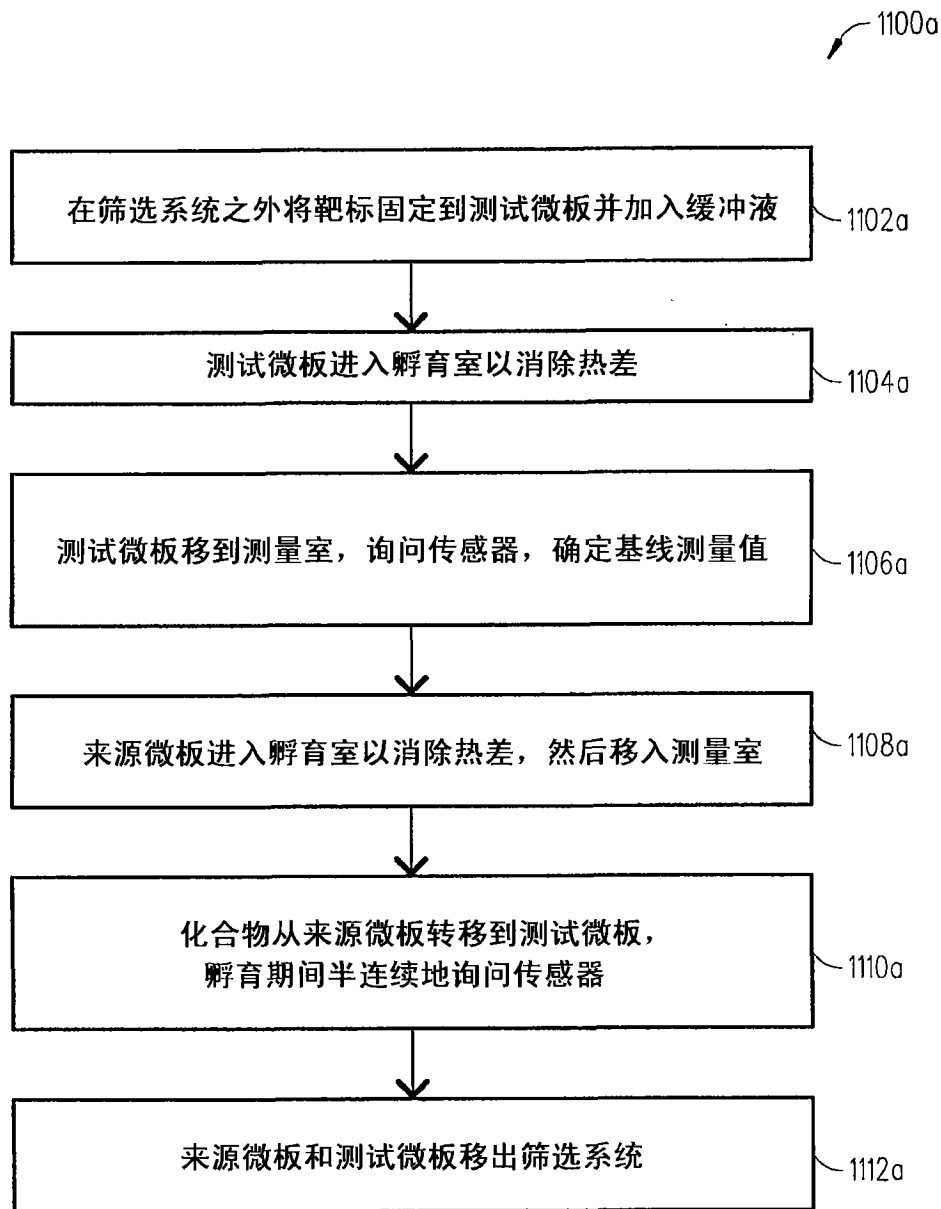


图 11A

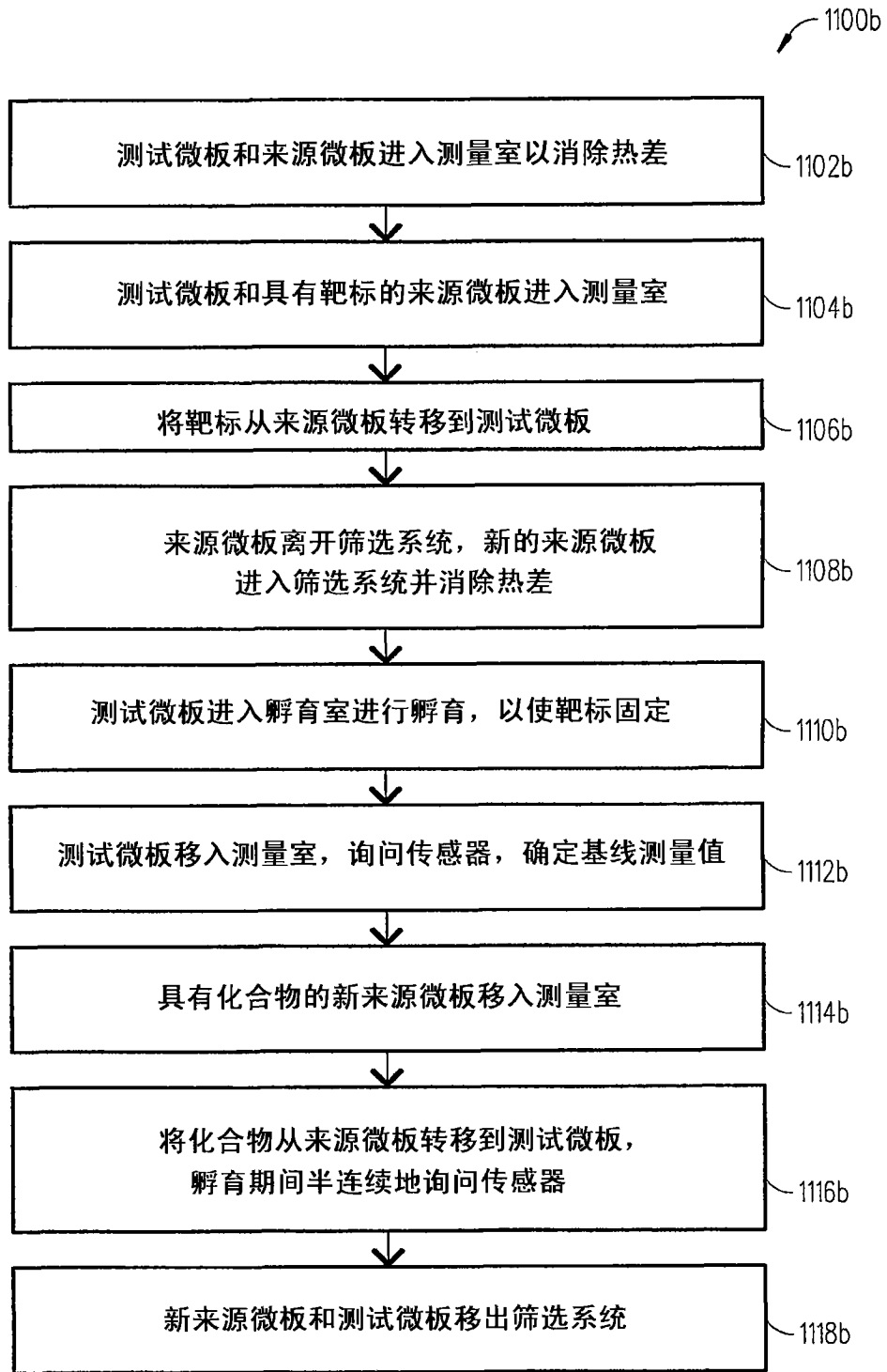


图 11B

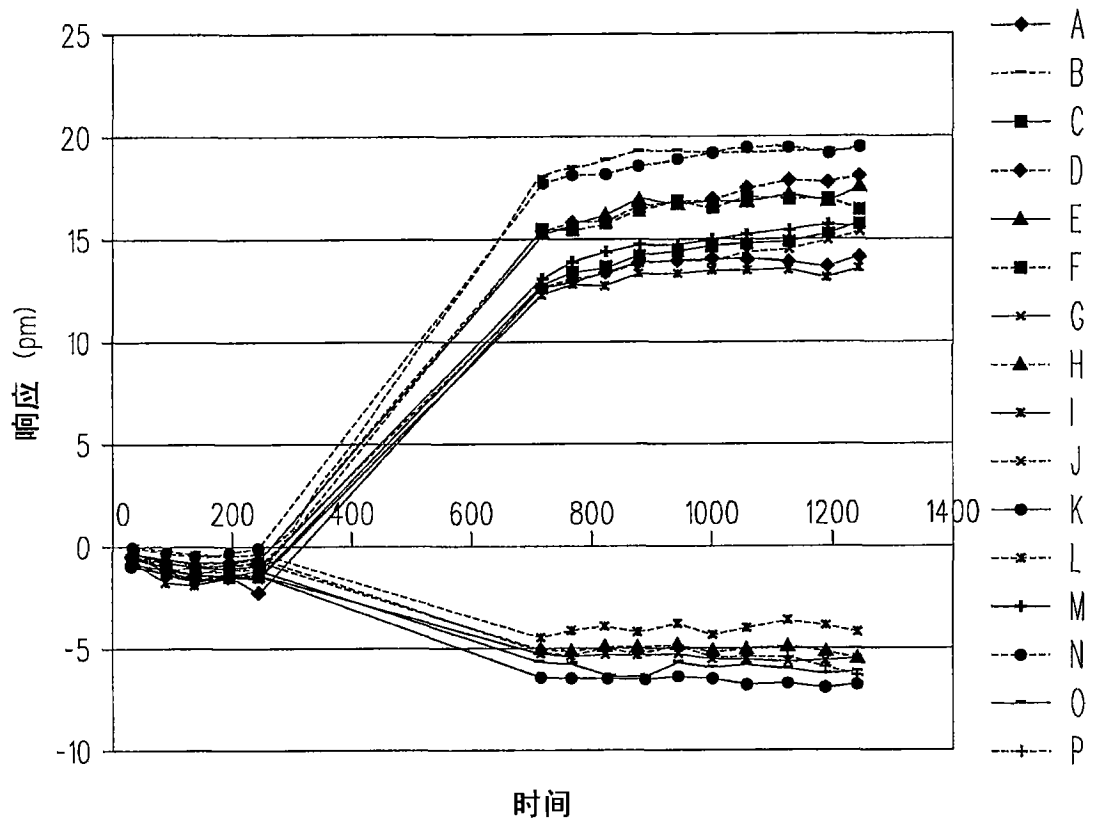


图 11C

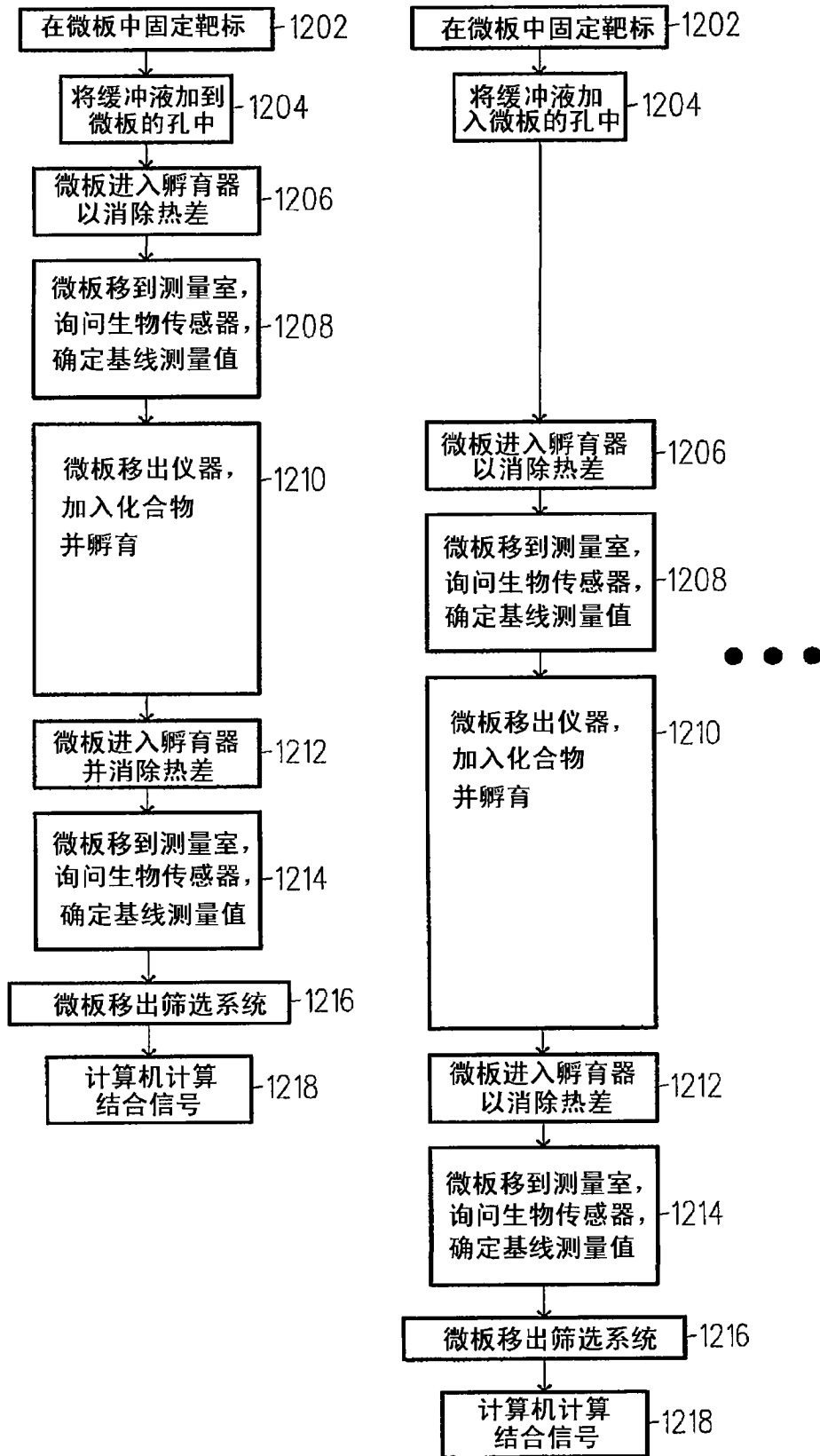


图 12

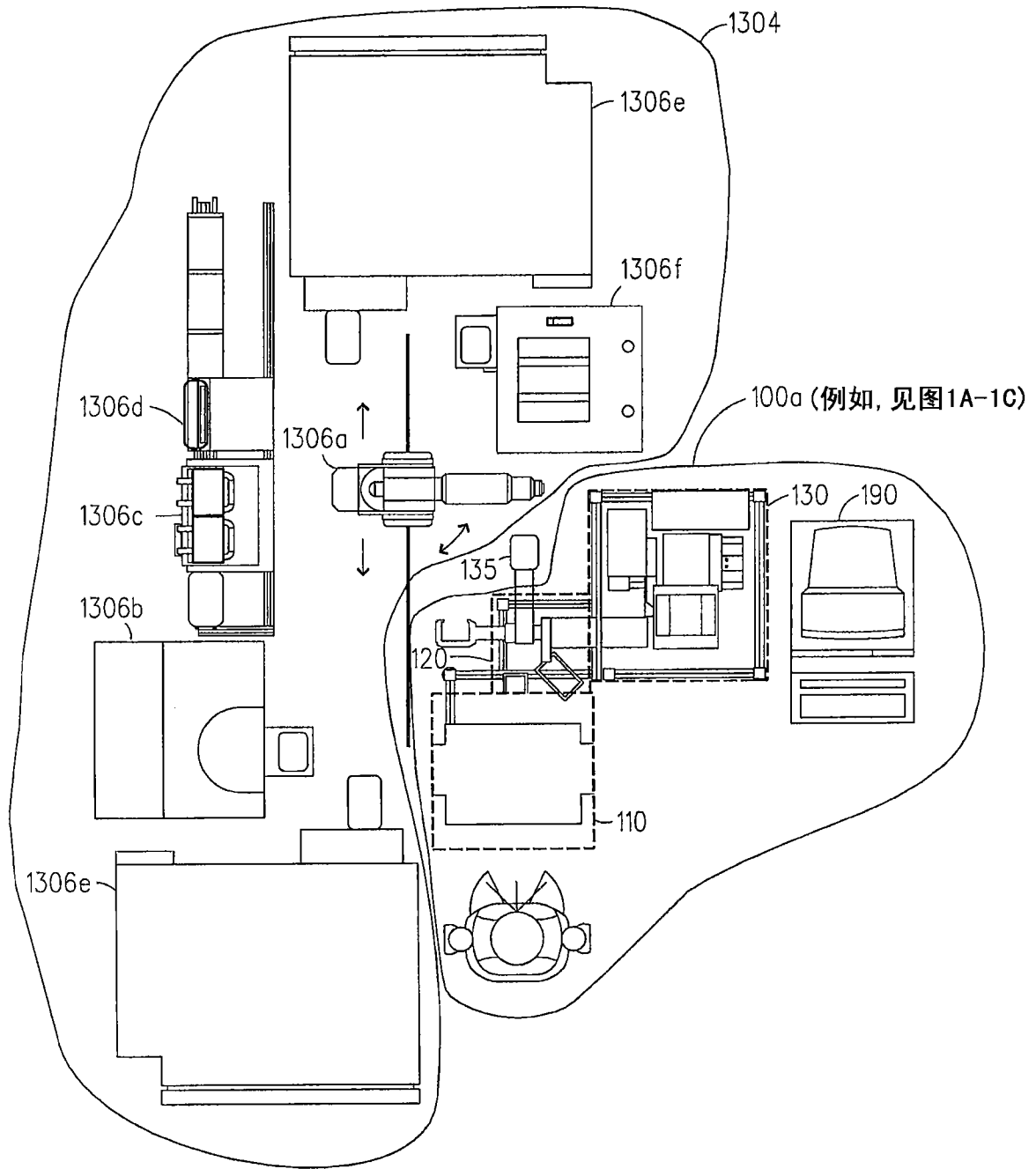


图 13

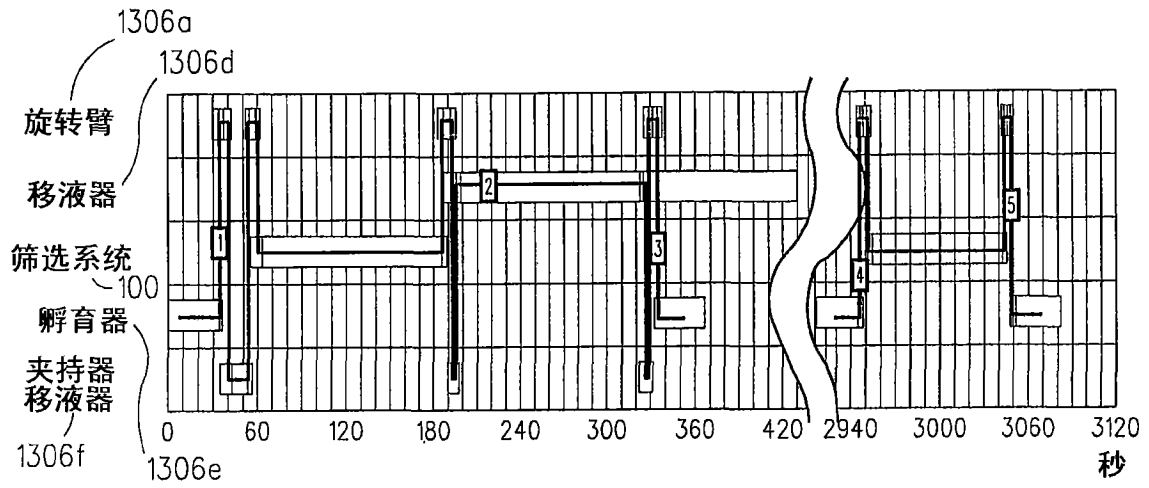


图 14

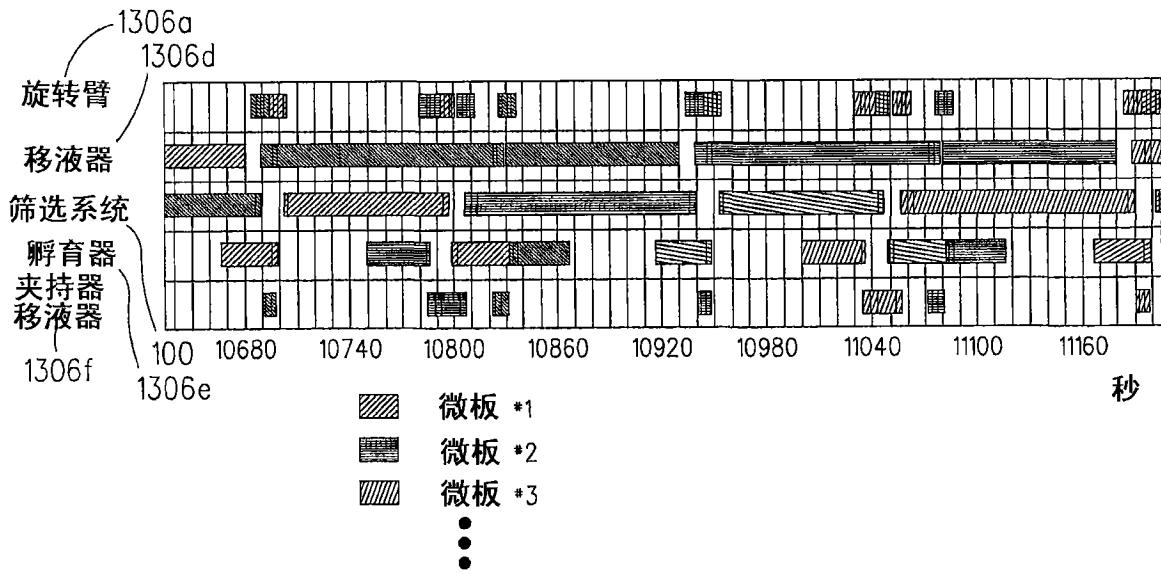


图 15

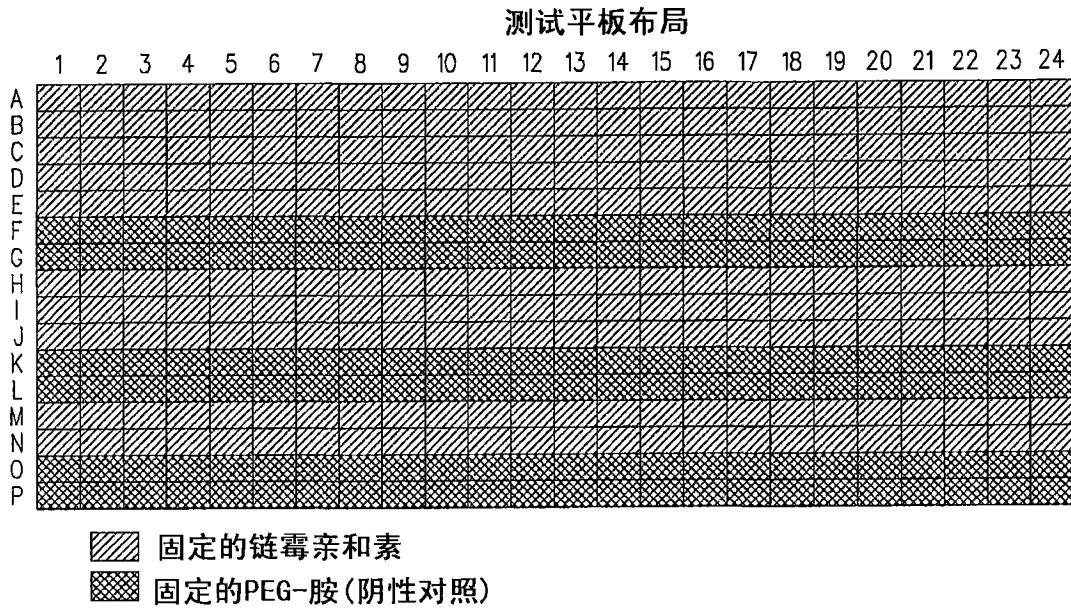


图 16

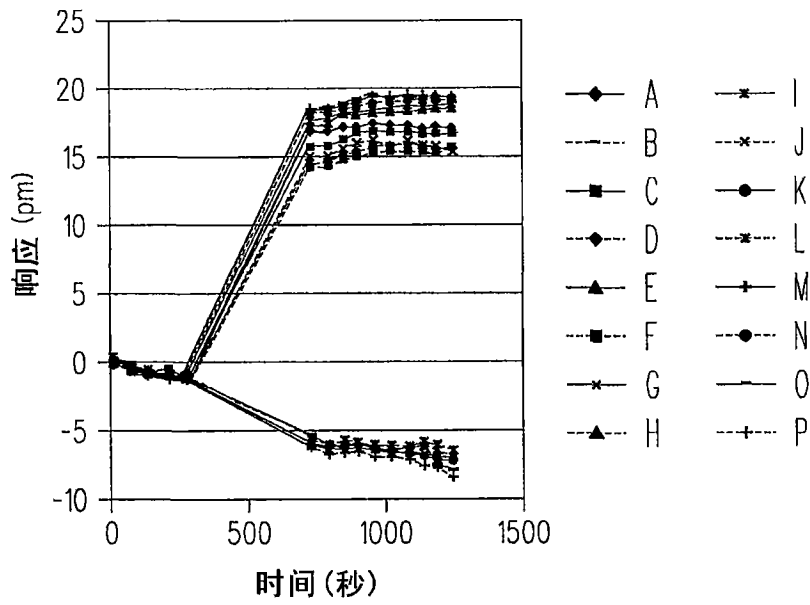


图 17

专利名称(译)	无标记高通量生物分子筛选系统和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101228446B</a>	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN200680026645.6	申请日	2006-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	康宁股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	康宁股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	康宁股份有限公司		
[标]发明人	SJ卡拉奇 VH埃卡特 AG弗鲁托斯 MF克罗尔 TC摩尔 DA帕斯泰尔 GM谢尔德		
发明人	S·J·卡拉奇 V·H·埃卡特 A·G·弗鲁托斯 M·F·克罗尔 T·C·摩尔 D·A·帕斯泰尔 G·M·谢尔德		
IPC分类号	G01N35/02 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2035/00356 G01N2035/00158 G01N35/028 G01N2035/0097		
代理人(译)	韦东		
审查员(译)	刘梅		
优先权	60/701445 2005-07-20 US		
其他公开文献	CN101228446A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本文描述了筛选系统和方法，所述系统和方法提供了一种独特的和实用的方案，使得可进行无标记高通量筛选(HTS)，以有助于新药开发。在一个实施方式中，该筛选系统能够进行直接结合试验，其中，采用与当前制药工业中所用的HTS相兼容的试验体积和浓度检测化合物(药物候选物)和生物分子(治疗靶标)之间的生物分子间相互作用。该筛选系统还可检测微板各孔中发生的生化相互作用，该微板结合了生物传感器且其表面化学特征能将治疗靶标固定在生物传感器表面上。该筛选系统还包括液体处理和平板处理装置，以帮助实施自动HTS分析。

