



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102084238 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 200980125614. X

(22) 申请日 2009. 05. 05

(30) 优先权数据

61/126, 645 2008. 05. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/002809 2009. 05. 05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/137059 EN 2009. 11. 12

(73) 专利权人 洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司

地址 美国新墨西哥州

(72) 发明人 罗伯特·B·凯瑞

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1254844 A, 2000. 05. 31,

CN 1254844 A, 2000. 05. 31,

CN 1954214 A, 2007. 04. 25,

US 2002076825 A1, 2002. 06. 20,

WO 2004092342 A2, 2004. 10. 28,

CN 1617938 A, 2005. 05. 18,

US 2003190608 A1, 2003. 10. 09,

US 2006024813 A1, 2006. 02. 02,

审查员 王晓媛

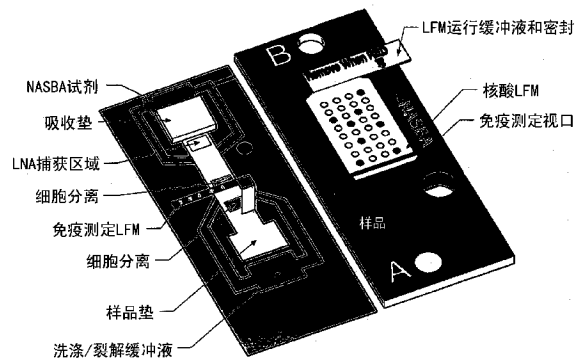
权利要求书3页 说明书20页 附图14页

(54) 发明名称

基于高度简化的侧向流动的核酸样品制备和被动流体流动控制

(57) 摘要

本发明提供高度简化的侧向流动色谱核酸样品制备方法、装置和集成系统,用于有效地浓缩痕量样品并且除去核酸扩增抑制剂。本发明还提供使用所述侧向流动装置的聚乙烯吡咯烷酮处理的元件捕获并且减少核酸扩增反应抑制剂诸如腐殖酸的方法。本发明进一步提供在侧向流动测定中使用的被动流体控制方法和系统。



CN 102084238 B

1. 一种用于处理样品的装置,所述装置包括多个流动路径,所述流动路径包括通过几何摹制吸收性材料能支持流体芯吸、毛细管流动和/或被动控制其中至少一种流体流动的所述吸收性材料,所述装置包含:

用于接收流体样品的样品接收区域,所述样品包括靶标,其中所述靶标包含核酸;

用于固定所述靶标的捕获区域;

连接所述样品接收区域和所述用于固定所述靶标的捕获区域的毛细管流动路径;和

一个或多个溶液供应区域,每个溶液供应区域与所述毛细管流动路径或所述捕获区域通过包括所述吸收性材料的至少一个溶液流动路径连接,每个所述溶液流动路径与所述毛细管流动路径或捕获区域在所述样品接收区域的下游形成接合处,在测定开始时加入全部所述样品和每种所述溶液后,每个所述溶液流动路径用于以需要的时间或顺序将相应的溶液递送至所述毛细管流动路径或所述捕获区域。

2. 根据权利要求1的装置,其中所述吸收性材料包括硝化纤维、色谱纸或玻璃纤维。

3. 根据权利要求1所述的装置,其中所述第一捕获区域包括用于结合所述靶标的配体,二氧化硅,玻璃纤维和/或二乙基氨基乙基(DEAE)膜。

4. 根据权利要求1所述的装置,其还包括用于捕获含有所述靶标的生物颗粒和/或细胞的捕获区域,所述用于捕获含有所述靶标的生物颗粒和/或细胞的捕获区域位于所述样品接收区域和所述用于固定所述靶标的捕获区域之间并且与所述样品接收区域和所述用于固定所述靶标的捕获区域毛细管流动接触。

5. 根据权利要求4所述的装置,其中所述用于捕获含有所述靶标的生物颗粒和/或细胞的捕获区域是免疫捕获区域。

6. 根据权利要求4所述的装置,其中所述用于捕获含有所述靶标的生物颗粒和/或细胞的捕获区域包括用于与所关注的生物颗粒或细胞结合的配体。

7. 根据权利要求6所述的装置,其中所述配体包括抗体。

8. 根据权利要求4所述的装置,其另外包括裂解区域,所述裂解区域与所述用于捕获含有所述靶标的生物颗粒和/或细胞的捕获区域毛细管流动接触,所述裂解区域用于裂解所述生物颗粒和/或细胞并且由此释放核酸。

9. 根据权利要求1所述的装置,其另外包括与所述用于固定所述靶标的捕获区域毛细管流动接触的一个或多个测定区域。

10. 根据权利要求9所述的装置,其中所述一个或多个测定区域一起形成用于夹心式核酸杂交测定的核酸和标记成分。

11. 根据权利要求1所述的装置,其另外包括核酸扩增区域,所述核酸扩增区域在所述用于固定所述靶标的捕获区域下游并且与所述用于固定所述靶标的捕获区域毛细管流动接触。

12. 根据权利要求1所述的装置,其中一个或多个所述区域包括所述吸收性材料。

13. 根据权利要求1所述的装置,其中所述几何摹制的吸收性材料形成连接至少两个所述区域的一个或多个流动路径。

14. 根据权利要求1所述的装置,其中所述溶液供应区域之一供应流体,所述流体包含选自以下组成的组的溶液:洗涤缓冲液,裂解缓冲液和核酸扩增缓冲液。

15. 根据权利要求1所述的装置,其中从包含所述吸收性材料的单一膜制作所述区域和

流动路径。

16. 根据权利要求1所述的装置,其中所述流动路径中的一个或多个包括第二材料。

17. 根据权利要求16所述的装置,其中所述第二材料包含纤维素酯、玻璃纤维、聚醚砜、棉、脱水聚丙烯酰胺、硅胶或聚乙二醇。

18. 根据权利要求1所述的装置,其中选择所述吸收性材料的组成和/或所述流动路径中至少一个的长度和/或宽度,从而被动控制在所述至少一个流动路径中流动的流体的流速。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的装置,其中所述流动路径的区域被修饰以去除或减少扩增抑制剂的活性或其他不想要的样品基质污染物。

20. 用于根据权利要求1所述的装置的几何限定的条,所述条包含所述吸收性材料。

21. 一种处理样品的方法,所述方法包括以下步骤:

将包含靶标的样品放置在样品接收区域,其中所述靶标包含核酸;

在将所述样品放置在所述样品接收区域的步骤同时,将一种或多种溶液各自放置在溶液供应区域上;

通过经由吸收性材料沿着流动路径的流体芯吸和/或毛细管流动,将所述靶标输送到捕获区域,其中通过几何摹制所述吸收性材料所述吸收性材料能够被动控制其中至少一种流体流动;和

将所述靶标与在所述捕获区域中的结合所述靶标的配体结合,由此提高了所述靶标相对于所述样品中其他成分的浓度,所述捕获区域与所述样品接收区域毛细管流动连接;

和在需要的时间将一种或多种溶液经由针对每种溶液的至少一个分开的流动路径输送到所述捕获区域,每个分开的流动路径包含所述吸收性材料并避免所述样品接收区域。

22. 根据权利要求21所述的方法,其还包括从所述捕获区域中除去所述其他成分。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中所述结合步骤包括将DNA或RNA与二氧化硅或寡核苷酸结合。

24. 根据权利要求21所述的方法,其中所述方法还包括:

将裂解和/或洗涤缓冲液加入到缓冲交换器中,所述缓冲液交换器与核酸亲和基质毛细管流动接触;

和直接纯化所述核酸。

25. 根据权利要求21所述的方法,其中所述溶液中的至少一种是缓冲液,并且所述吸收性材料被配置为在需要的时间在所述吸收性材料的所需区域自动与另一种所述溶液或所述样品进行被动缓冲液交换。

26. 根据权利要求21所述的方法,还包括通过选择所述吸收性材料的组成和/或所述流动路径或至少一个分开的流动路径的长度和/或宽度来被动控制所述样品、靶标、裂解物、洗涤缓冲液、和/或至少一种溶液的相对流速。

27. 根据权利要求21所述的方法,其中所述结合所述靶标的配体与所述捕获区域中的吸收性材料连接。

28. 根据权利要求21所述的方法,其中所述样品包括多个含有所述核酸的生物颗粒或细胞,并且所述方法还包括使用含有裂解缓冲液的溶液裂解所述生物颗粒或细胞,由此从所述生物颗粒或细胞释放所述靶标。

29. 根据权利要求28所述的方法,还包括在所述裂解步骤之前通过将固定在所述吸收性材料上的配体与所述生物颗粒或细胞反应来捕获所述生物颗粒或细胞。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述固定在所述吸收性材料上的配体包括抗体。

31. 根据权利要求28所述的方法,还包括用洗涤缓冲液去除所述裂解缓冲液,由此用所述洗涤缓冲液被动交换所述裂解缓冲液,所述洗涤缓冲液是通过经由所述吸收性材料沿着洗涤缓冲液流动路径的流体芯吸和/或毛细管流动来输送的。

32. 根据权利要求21所述的方法,还包括使用一种或多种溶液去除不想要的裂解产物,不想要的样品成分,基质污染物,和/或扩增抑制剂。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中至少一种所述溶液包含洗涤缓冲液。

34. 根据权利要求21所述的方法,还包括扩增所述靶标。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述扩增步骤包括使用核酸扩增缓冲液。

36. 根据权利要求34所述的方法,还包括在扩增之前洗脱所述靶标。

37. 根据权利要求34-36中任一项所述的方法,还包括在所述扩增步骤之前钻取所述捕获区域。

38. 根据权利要求1所述的装置,所述装置包括多个流动路径,所述流动路径包括:
能支持流体芯吸和/或毛细管流动的吸收性材料,其中通过几何摹制所述吸收性材料,所述吸收性材料是能够被动控制其中至少一种流体流动的吸收性材料;和
第二材料,所述第二材料被选择来控制其中至少一种流体的流动。

39. 根据权利要求38的装置,其中所述吸收性材料包括硝化纤维、色谱纸或玻璃纤维。

40. 根据权利要求38的装置,其中所述第二材料被布置来中断所述吸收性材料的连续性。

41. 根据权利要求38的装置,其中所述第二材料包括纤维素酯、玻璃纤维、聚醚砜、棉、脱水聚丙烯酰胺、二氧化硅或聚乙二醇。

42. 根据权利要求38的装置,其中所述第二材料减少或排除污染物的运输。

43. 根据权利要求42的装置,其中所述第二材料包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP)、抑制剂隐蔽剂、或阳离子交换配体。

44. 根据权利要求38-43中任一项的装置,其中选择所述吸收性材料的组成和/或所述流动路径中至少一个的长度和/或宽度,从而被动控制在所述至少一个流动路径中流动的流体的流速。

基于高度简化的侧向流动的核酸样品制备和被动流体流动控制

[0001] 关于在联邦资助的研究或开发下获得的发明权利的声明

[0002] 本发明是在由美国能源部资助的合同号DE-AC52-06NA25396下使用政府支持作出的。政府在本发明中具有某些权利。

[0003] 相关申请

[0004] 该申请要求2008年5月5日提交的美国临时申请号61/126,645的优先权。

[0005] 发明背景

[0006] 生物样品基质的多样性属性存在对有效但普遍的前端样品处理方法的需要,所述方法可以收集痕量分析物,即使当所述痕量分析物存在于非检验样品成分的复杂混合物中时[5]。这些挑战通常由使有效免疫或分子分析技术受挫的材料的存在而增加。例如,由人类组织获得的样品可能含有复合多糖类、血红蛋白、铁和已知对于聚合酶链式反应(PCR)所采用的DNA聚合酶是抑制性的其它物质。类似地,环境样品或被环境成分诸如土壤或植物材料污染的痕量样品也可以含有有机材料,诸如腐殖酸,其对于PCR和对于全面核酸分析至关重要的其它酶反应是强烈抑制性的。

[0007] 虽然已经对于DNA和RNA两者都报道了适用于各种生物样品的可靠核酸分离方法[5-11],但是这样的方法是劳动密集型的,依赖于实验室装置并且需要数小时来完成,导致有限的样品通过量和显著的样品积压[12]。下游酶操作,诸如聚合酶链式反应(PCR),可以受到对于酶活性是抑制性的基质成分存在的不利影响,这致使可靠的样品制备必不可少[5]。在生物样品中经常遇到血红蛋白、铁和复合多糖类,而另外的抑制化合物诸如腐殖酸经常伴随含有土壤、植物材料或腐烂材料(decaying mater)的环境收集的样品[13-15]。另外,诊断的和法庭的样品中许多分析物的痕量属性以及紧密相关但是非检验成分的丰富性显著地促成分析挑战[16-20]。

[0008] 侧向流动免疫色谱法是充分建立的并且已经在多年来用于检测蛋白质和小分子[21,22]。实际上,侧向流动期间的免疫捕获是已经在即时检验(point-of-care)(例如A组链球菌(*Streptococcal*)抗原)和在家(例如怀孕测试)中发现广泛用途的快速手持免疫测定法的基础。虽然这些测定法使用侧向流动期间的免疫捕获作为检测终点,但是本发明人提出了使用与获得快速且有效的免疫捕获的相同原理,作为设计成可以从混合样品回收稀有靶标(细胞、病毒、孢子)的样品制备策略中的第一步骤。一旦在固定相中捕获,则这些靶标可以然后进行用于核酸分离的进一步处理,或将其收集用于其它分析。

[0009] 用于病原体检测和鉴定的基于核酸的测定提供灵敏性、特异性和分辨率。这些特征使核酸分析成为强大的诊断和法庭技术。尽管如此,许多用于核酸制备的技术已经集中在来自相对大量的样品诸如临床血液样品的分离。然而,许多应用通常必须解决分离和鉴别多种来源的复杂混合样品中的痕量成分的需要。与基于DNA的测定相反,免疫测定已经在低成本、容易使用的形式中发现广泛的认同,其中或许最值得注意的是色谱侧向流动免疫测定[23]。侧向流动测定,也称为手持测定或试纸(dipstick)测定,用于广泛范围的应用,其中需要处于容易使用的低成本形式的快速抗原检测。侧向流动免疫测定已经成功用于病

原体鉴定、诊断,以及环境和农业监视[4]。已经描述了使用多种检测技术检测核酸序列的数种色谱侧向流动测定[24-28]。早期的工作使用麻烦的酶检测策略,其依赖于在引入样品以后费时的试纸操作[25,26]和不太适于多重应用的检测方案[24,27]。

[0010] 更最近描述的侧向流动微列阵(LFM)是用于多种核酸检测的小型化的基于侧向流动的方法[1]。所述方法使用小的侧向流动色谱条的DNA微列阵状模式设计,容许在单一测定中检测多种核酸序列。所述装置的减小的表面积赋予数个超越传统侧向流动装置形式因素的优点。样品体积被减少到10 μ L,导致减少的试剂消耗以及减少的样品运输时间。而且,与标准玻璃基底(substrate)微列阵相比,由侧向流动微列阵(LFM)显示的杂交时间显著地减少,其一般容许与样品杂交数小时,并且是使用微流体系统以促进更快杂交的更复杂的微列阵实施[1,29,30]。与基于小球的柱色谱法相比,通过侧向流动基底的对流流体运动以及采用的膜基底的开端孔隙导致优越的色谱性能[31-34]。这些因素导致在2分钟内基于杂交检测 <250 amol的分析物[1]。LFM进一步描述在美国专利申请号11/894,910和PCT国际申请号PCT/US2007/018537中。

[0011] LFM平台已经用于开发用于炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*),即炭疽病原体的快速测定,并且已经显示当存在于由1 μ g总人类RNA组成的复杂核酸背景中时从少至2-3个炭疽芽孢杆菌细胞检测RNA[1]。报道的LFM方法使用RNA分离的标准实验室方法和被称为基于核酸序列的扩增(NASBA)的等温RNA扩增方案[35-37]。或许最显著地,由LFM示范的侧向流动的小型化提供服从于与样品制备载体的流体或微流体系统的集成的物理构造。

[0012] 基于LFM的蛋白质和核酸检测与简化的样品处理方法的集成将提供用于处理和筛选广泛范围的样品类型的数种潜在的优点,并且是合乎需要的。类似地,适用于痕量的和/或稀释的分析物的更有效的样品制备方法将大大促进在即时检验的和野外展开的测定中的核酸扩增和检测。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供高度简化的侧向流动色谱核酸样品制备方法、装置和集成系统,用于有效地浓缩痕量样品并且除去核酸扩增抑制剂。本发明使用LFM技术和被动流体流动控制系统,实现下列的组合:(a)分析物的快速免疫亲和捕获,所述分析物包括真核和原核细胞、病毒以及植物的细胞和材料,和(b)特定DNA或RNA序列的基于杂交的亲亲和捕获,所述DNA或RNA序列是在细胞/病毒裂解后待浓缩的并且被洗涤得不含污染蛋白质和其它基质来源成分。本发明还在侧向流动装置的背景之内,提供除去核酸扩增反应(即PCR)的抑制剂的方法。

[0015] 本发明还提供用于被动控制侧向流动测定中使用的不同溶液和多种溶液流动的侧向流动结构和侧向流动测定的反应顺序。在一个实施方案中,LFSP装置的至少样品接收区域包括能支持流体芯吸(wicking)并且被动控制其中至少一种流体流动的几何限定的吸收性材料,诸如硝化纤维。在一个实施方案中,本发明提供包括侧向流动基质的装置,所述侧向流动基质限定流动路径并且包括能支持流体芯吸并且被动控制其中至少一种流体流动的几何限定的吸收性材料。在本文描述的其它实施方案中,几何限定的硝化纤维条具有基本上如图5、6、7、8、9或14A所示的构造。

[0016] 本发明的装置和系统是容易制作的,并且使用侧向毛细管流动色谱基底作为用于从生物样品有效低体积亲和纯化核酸的载体。本发明的样品制备途径在侧向流动样品制备

(LFSP)装置中的空间限定区域实现高度有效地捕获痕量分析物。这导致了在基底上固定化的靶标分析物的高局部浓度,因而大大促进广泛的洗涤和另外的操作,包括没有使用者介入的扩增或另外的样品处理。这些特征,以及它们与已建立的分子分析技术诸如实时PCR、MLVA、基因表型分析(genotyping)和其它基于核酸的方法的相容性,为侧向流动样品浓缩和处理赋予获得用于环境监视、疾病诊断和生物法庭调查的合适的核酸的有吸引力的方法。

[0017] 在一个实施方案中,LFSP装置包括限定流动路径并且以串联方式包括下列元件的侧向流动基质:(a)用于接收流体样品的等分试样的样品接收区域;和(b)与所述样品接收区域侧向流动接触的免疫捕获区域,其含有与所关注的生物颗粒或细胞上存在的配体反应的固定化抗体。另一个实施方案还以串联方式包括:(c)与所述免疫捕获区域侧向流动接触的裂解区域,其中实现所关注的生物颗粒或细胞的裂解,由此从那里释放核酸。在还另一个实施方案中,LFSP装置还以串联方式包括:(d)与所述裂解区域侧向流动接触的一个或多个测定区域,其一起形成用于夹心式核酸杂交测定的核酸和标记成分。在又一个实施方案中,LFSP装置还包括核酸扩增区域,所述核酸扩增区域在裂解区域下游且与所述裂解区域侧向流动接触,并且在测定区域上游且与所述测定区域侧向流动接触。经由下文的实施例进一步描述本发明的这个方面。

[0018] 本发明的LFSP装置还可以使用聚乙烯吡咯烷酮处理的侧向流动装置元件来结合本发明的用于捕获并减少核酸扩增反应抑制剂诸如腐殖酸的方法。因而,关于上述实施方案,LFSP装置的另一个实施方案还包括预处理区域,所述预处理区域包括聚乙烯吡咯烷酮,与它所邻近的装置的一个或多个元件侧向流动接触。例如,可以将处理区域放置在免疫捕获区域上游且与所述免疫捕获区域侧向流动接触,并且在样品区域下游且与所述样品区域侧向流动接触。在相关实施方案中,不同于或除聚乙烯吡咯烷酮以外的物质可以结合到预处理区域中,以便在扩增和/或测定之前捕获或减少不希望的抑制剂或其它来自样品基质的污染。在下文的实施例中进一步地描述了本发明的这个方面。

[0019] 本发明的LFSP装置还可以结合本发明的被动流体控制方法和系统。简言之,通过将侧向流动膜(例如,硝化纤维膜)或能支持毛细管流动/流体芯吸的其它吸水性材料诸如色谱纸切成不同的几何形状而实现被动的溶液或缓冲液流动控制,以致对于在使用所述装置进行的测定中要采用的每一种缓冲液,限定多种长度和/或宽度的单独流动路径,然而将其集成在单一膜内。在下文的实施例中进一步地描述了本发明的这个方面。

[0020] 本发明的LFSP装置可以以LF形式使用,但是可以特别适于与LFM方法、装置和系统一起使用。设想了包括与LFM集成的LFSP的充分集成的样品-到-响应测定装置。

[0021] 附图简述

[0022] 图1. 侧向流动微列阵(LFM)受到用来自指定数目的大肠杆菌(*E. coli*)细胞的粗制裂解产物设计的NASBA反应的攻击。阳性杂交对照标记LFM上的每一行斑点(LFM的左侧上的五个斑点列),并且一组双份斑点表明大肠杆菌的阳性检测(从底部开始的第二行,右侧)。“阴性”是无模板对照。“阳性”含有使用Qiagen RNeasy试剂盒分离的6ng大肠杆菌RNA。可以使用通过加热细胞-至-cDNA缓冲液(Ambion)中的细胞而制备的粗制裂解产物检测少至2000个细胞。见下文的实施例1。

[0023] 图2. 侧向流动侧向流动促进免疫-捕获。(A)使用200 μ L的处于SEB1提取缓冲液

(Agdia公司)中的指定稀释度的干燥熏烟叶提取物(DCTLE)运行Agdia TMV免疫-测定条。通过在装有磨料网(Agdia公司)的塑料袋中的3ml SEB1提取缓冲液(Agdia公司)中破碎100mg干燥熏烟叶而产生DCTLE。1:200以上的稀释度通过免疫测定是阴性的。(B)将实时反转录酶PCR(RT-PCR)用于检验在TMV捕获区域(CZ)之下、之中和之上的区域。使200 μ L的未稀释提取物进行侧向流动和随后进行捕获区域之下、之中和之上的条区域的实时RT-PCR。来自CZ下面的条区域显示很少或没有可检测的扩增,循环阈值(Ct)值为29.7。取自CZ的样品对于TMV产生强烈阳性的信号,Ct值为26.3。在捕获区域之上的区域也导致阳性检测,Ct值为27.1。因而,纯提取物仅在CZ之中和之上清楚地产生阳性PCR反应,而在CZ之下的区域抑制PCR扩增。这些数据表明,没有洗涤或其他操作的简单侧向流动免疫捕获可以通过目标颗粒的浓缩和通过抑制基质成分的物理隔离来减轻PCR抑制。显著地,纯提取物中的CZ之上的区域产生阳性PCR反应,这显然是由于病毒颗粒从CZ渗出和明显伴随的抑制剂消耗。(C)实时反转录酶PCR(RT-PCR)用于在用200 μ L处于样品缓冲液中的DCTLE的1:2000稀释物攻击以后,检验TMV免疫测定测试条的TMV捕获区域(CZ)之下、之中和之上的区域。来自CZ下面的条区域仅显示弱的扩增,表明在这个稀释度,抑制剂变成充分稀释的以容许发生一些扩增(Ct=28.9)。从CZ取得的样品对TMV产生强烈阳性的信号,Ct值为22.4,表明相对于纯提取物实验(与部分A相比),抑制剂稀释和免疫捕获介导的病毒浓缩的组合效果协力容许更有效的扩增。在捕获区域之上的区域也导致阳性检测,Ct值为28.0。

[0024] 图3.PVP样品垫减轻由外源添加的腐殖酸产生的PCR抑制。如关于图2产生DCTLE。使200 μ L提取物的等分试样掺有(spike)0、12、25ng的腐殖酸并且使用标准样品垫(未处理的垫)或用10%聚乙烯吡咯烷酮(分子量360,000)处理的样品垫(PVP样品垫)进行TMV的侧向流动免疫捕获。将捕获区域收集并进行RT-PCR。虽然在使用具有未处理的样品垫的侧向流动条的TMV捕获以后,12ng和25ng腐殖酸补充的提取物不能产生可检测的PCR产物,但是当使用PVP处理的样品垫进行免疫捕获时,全部样品显示可检测的PCR产物。有趣的是,相对于用未处理的垫进行的0ng对照,在PVP处理的样品垫上运行的0、12和25ng腐殖酸样品显示改善的PCR扩增。标记“RNA”的泳道是使用总烟草RNA制剂的阳性对照,所述总烟草RNA制剂是使用RNeasy(Qiagen)制备的。

[0025] 图4.对原型侧向流动基底的被动缓冲液流动控制:(A)样品(紫色的)和洗涤缓冲液(粉红色的)已经引入到所述装置但是在基底上还不可见。(B)样品溶液到达所述装置的捕获区域(位于框的顶部)。(C)随着洗涤缓冲液移动,通过经由比用于样品路径更长且更窄的路径的毛细管流动,样品继续流动经过捕获区域,到达主要的条接合处。(D)当样品用完时,洗涤缓冲液开始取代样品缓冲液。(E)这时,样品已经完全穿过捕获区域并且洗涤缓冲液开始注满捕获区域。(F)在5分钟之内,洗涤缓冲液已经完全替换了样品缓冲液。

[0026] 图5.可以使用乙烯基切刀或激光切刀从吸收性材料诸如硝化纤维或色谱纸切割的缓冲液交换结构的实例。描述的结构支持使用两种流体的系统。(A)两个流体流动通道支持缓冲液交换或试剂引入。可以通过采用诸如实施例8中描述的流体装置将样品引入。中心接头(tab)下降到储器室中以适应第一溶液的摄取。经由所述结构最左侧的吸收性区域引入第二溶液。第二储器中较大体积的溶液确保第二流体替换基底下游区域中的第一流体。(B)用于适应核酸或蛋白质捕获的亲基质的圆形钻取物(punch)的几何形状的实例。(C)容许支持流体系统容纳更大流体体积的具有延长的第二流体路径的几何形状的实例。

[0027] 图6. 可以使用乙烯基切刀或激光切刀从吸收性材料诸如硝化纤维或色谱纸切割的缓冲液交换结构的实例。描述的结构支持使用三种流体的体系。(A)具有三个流体输入垫的结构。最右侧的垫用于样品施用,中间的用于第一缓冲液交换例如染色或洗涤缓冲液,最左侧垫用于最终缓冲液交换以容纳,例如,洗涤缓冲液或扩增试剂。该结构用于免疫测定,所述免疫测定在紧凑的流体系统中使用胶体金缀合的抗体作为第一交换缓冲液和用于降低背景的洗涤液作为第二交换缓冲液(也参见图14)。(B)具有三个流体输入接头的结构,所述接头是隔开的以容许引入到96孔板中的溶液。(C)具有三个流体输入的结构,适于与简单的聚碳酸酯流体系统集成。

[0028] 图7. 背衬硝化纤维的硝化纤维层的激光烧蚀可用于产生缓冲液交换结构,其类似于用切割方法制作的缓冲液交换结构。(A)用于通过烧蚀产生两个流体输入交换器的模式。(B)两个溶液交换器模式的另一个实例。(C)背衬硝化纤维(HF-135, Millipore公司)使用双面胶带层压到聚碳酸酯(polycarbonate)片材并且使用部分(B)中显示的模式进行激光烧蚀。

[0029] 图8. 对精制微流体硝化纤维膜基底的被动缓冲液流动控制。(A)为了证明微流体硝化纤维结构对于实现被动然而快速并且完全的缓冲液交换的效用,将表示样品的携带容易显影染料的缓冲液(蓝色)、裂解缓冲液(红色)和扩增缓冲液(黄色)引入到所述装置。(B)样品通过宽的膜路径流动经过免疫捕获区域,将裂解和扩增缓冲液移动至邻近于基底壁的膜区域直到样品流用完。(C)当样品用完时,裂解缓冲液进入免疫捕获区域,破坏捕获的颗粒并且释放核酸,用于LNA探针上的基于杂交的捕获,所述LNA探针固定在下流“LNA-捕获区域”(以部分A表示)。(D)在裂解缓冲液用完以后,与NASBA扩增相容的缓冲液洗涤LNA-捕获区域,除去残留的裂解缓冲液并且促进引物杂交。在3分钟内,使用10 μ L样品、裂解和扩增缓冲液体积,实现三次缓冲液交换。免疫-和LNA-捕获区域的计算床体积大约是250nL,因而每一缓冲液交换用大约40个床体积洗涤捕获区域。使用容许进一步缓冲液洗涤和交换的多种长度和宽度的另外的流动路径,可以实现进一步的流体流动调节。类似地,调节缓冲液的粘度可用于进一步将这样的测定参数提炼为裂解缓冲液中的温育时间。最显著地,可以改变装置尺寸以适应较大样品体积的处理。在每幅图右边的标尺刻度是1mm。(E)显示缓冲液交换硝化纤维结构与免疫测定条集成的实验性三流体缓冲液交换系统。该装置用于在实施例5中描述的免疫捕获和洗涤实验。

[0030] 图9. 设计成与384孔滴定板一起使用的被动缓冲液交换结构。(A)使用384孔滴定板的五个孔的三流体交换器。中央流体输入占据一个孔,而将第二和第三流体置于在侧邻中心对称轴的孔对中。该结构用于从实施例7中所述的异硫氰酸胍裂解产物的核酸捕获。(B)384孔相容的缓冲液交换结构的另一个实例。(C)用于实施例6中描述的实验的缓冲液交换结构。

[0031] 图10. 在SEB1样品缓冲液中稀释烟草提取物以后的TMV的LFM检测。将DCTLE(3mL的SEB1中的100mg烟草)稀释到如所示的另外的SEB1中。(A)将100 μ L样品体积进行侧向流动免疫捕获并且使用25 μ L的H₂O将被动缓冲液交换用于从硝化纤维基质漂洗残留的SEB1(无洗涤)。将捕获区域收获并且进行NASBA扩增和LFM介导的比色检测。在这些条件下的纯的烟草提取物产生假阴性LFM结果,原因在于样品中高浓度的抑制剂。1:2000至1:8000的稀释度充分降低了抑制剂浓度以容许在这些条件下检测。1:16,000稀释度不产生可检测的LFM信号,

可能是由于低病毒效价以及由色谱基质中残留的SEB1缓冲液产生的抑制。显示无模板阴性对照(NTC)。TMV-2捕获探针提供TMV衍生的扩增子的最敏感检测。(B)使100 μ L样品体积进行侧向流动免疫捕获并且将被动缓冲液交换用于使用50 μ L NME缓冲液(50mM MOPS, pH7, 0.5M NaCl, 15%乙醇)洗涤捕获的病毒并且用最终漂洗液25 μ L H₂O漂洗来自硝化纤维基质的残留缓冲液。将捕获区域收获并且进行NASBA扩增和LFM介导的比色检测。在这些条件下的纯烟草提取物由LFM产生有效的阳性结果。1:2000至1:16,000的稀释度在这些条件下也是阳性的。相对于部分A中存在的无洗涤处理而增加的检测极限很可能是从硝化纤维基底更完全除去残留SEB1缓冲液的结果。一些SEB1介导的抑制已经在其它研究中提到。显示无模板阴性对照(NTC)。

[0032] 图11. 免疫捕获的和被动缓冲液交换洗涤的TMV的实时RT-PCR。使用改性成携带缓冲液交换硝化纤维结构的TMV免疫测定条,将掺有DCTLE的最终稀释度为1:2000或1:4000的土壤提取物进行免疫捕获和洗涤,所述缓冲液交换硝化纤维结构被设计成在384孔板形式中容纳样品、洗涤缓冲液、和最终H₂O漂洗液(见图8E和图9C)。土壤提取物是使用30mL的SEB1提取缓冲液中的3g土壤产生的。样品体积是100 μ L。使用50 μ L的NME缓冲液进行洗涤,接着是25 μ L H₂O平衡。包括使用Qiagen RNeasy试剂盒分离的土壤RNA作为阴性对照。在没有洗涤步骤而具有25 μ L H₂O漂洗的情况下,1:2000和1:4000稀释度分别产生28.2和28.3的高Ct值。包括75 μ L NME缓冲液洗涤产生TMV的阳性检测,1:2000样品显示Ct值为26.2,并且1:4000样品的Ct为27.2。

[0033] 图12. 在从高度抑制的土壤提取物免疫捕获的TMV的被动缓冲液交换洗涤以后的PCR抑制减轻。将土壤提取物掺有DCTLE,以得到1:2000的最终稀释度。样品体积是100 μ L,而NME洗涤液是50 μ L并且最终H₂O漂洗液是25 μ L。最终H₂O平衡减少携带残留洗涤缓冲液进入随后的PCR反应的潜力。使用50 μ L水洗涤,之后是25 μ L水漂洗(标记为75 μ L H₂O),产生微弱的PCR产物。使用NME洗涤缓冲液产生有效的PCR扩增(NME)。用RLT,一种基于Qiagen胍盐的裂解缓冲液,不能产生可检测的PCR扩增子(RLT)。除去50 μ L洗涤但是保持25 μ L漂洗不能充分降低抑制剂浓度,如通过这些样品(25 μ L H₂O)中没有可检测的扩增子所证实。进行NME洗涤的没有添加的TMV的土壤提取物样品不产生可检测的TMV扩增子(仅土壤(NME洗涤))。将单独的SEB1提取缓冲液作为另一个阴性对照(SEB1)来测定。另外,使用未用过的土壤提取物和NME缓冲液洗涤进行阴性对照免疫捕获实验,以进一步确定从所用的土壤中没有TMV。TMV泳道是阳性对照PCR反应,所述PCR反应是以使用Qiagen RNeasy试剂盒从烟草分离的RNA编排的。

[0034] 图13. 用干燥的熏烟叶裂解产物攻击的RNA结合基质的实时RT-PCR分析,所述裂解产物是通过将22 μ g/ μ L烟草在基于RLT异硫氰酸胍的裂解缓冲液(Qiagen公司)中破碎产生的。使用图9A中所示结构的硝化纤维缓冲液交换装置,将烟叶裂解产物进行侧向流动介导的核酸捕获,所述装置层压到RNeasy柱二氧化硅RNA结合基质的3mm活组织检查钻取物。将10 μ L的RLT烟草提取物用作样品。除无洗涤对照之外,使用NME缓冲液对于全部处理进行40 μ L洗涤。初始的NME洗涤以后是80 μ L的NME(仅NME),或如所示的浓度从0M到1M变化的NaCl。本发明的这个方面进一步描述在实施例7中。

[0035] 图14. 自包含的被动缓冲液交换装置的元件。(A)适于与简单支持流体系统集成的三流体交换器的实例。(B)切割聚碳酸酯以适应部分A中所描述的交换器的流体输入接头的

模式。(C)用于切割聚碳酸酯片材的流体储器形成模式。对于携带插入的交换结构的部分(B)中所示层和部分(D)中所示底部层的层压形成集成缓冲液交换装置,容许三种溶液经由溶液输入端口被引入。(D)用于切割装置的底部部件的模式。(E)这里所示的使用与免疫测定条交界的缓冲液交换成分的3MM色谱纸的装配装置的扫描。在描述装置中,通过将样品引入到最右边的端口,将染色试剂(抗体缀合的胶体金)引入到中间端口和将降低背景的最终洗涤缓冲液加入到最左边的端口进行免疫测定。在测定开始时添加全部溶液。装置的尺寸是25mm×75mm,类似于标准显微镜载玻片。

[0036] 图15.显示提议的集成样品制备装置的一个可能实施方案的绘图。将所述装置的一次性元件的不同子系统如所示描述在这里。由便宜的塑料外壳和支持的大孔硝化纤维制造地,该系统使用毛细管侧向流动和被动流动调节,从而使基于分析物亲和性和杂交的捕获、以及随后的裂解、洗涤和通过NASBA的等温扩增所需的缓冲液交换能够实现。在使用免疫测定LFM添加样品以后立即询问(interrogate)10%的样品体积。随后的细胞分离和裂解导致细胞RNA的释放并且通过胍盐基缓冲液稳定。通过在胍盐缓冲液中杂交到LNA捕获寡核苷酸而收集所关心的RNA序列。还应当LNA寡核苷酸上捕获存在于样品中的任何细胞外RNA。还可以优化拭样洗脱缓冲液的洗脱功效、免疫测定相容性和RNA稳定性能。对于离开装置的分析,可以结合简单的钻取(punch-out)系统以便可以容易地收集细胞分离或LNA捕获区域(未显示)。

[0037] 图16.备选集成装置设计的示意图,其利用阴离子/阳离子交换。侧向流动条接收用于使用固定化抗体配体来免疫亲和纯化细胞和病毒靶标的天然缓冲液中(细胞/颗粒捕获)的样品,或作为通过阴离子交换的核酸亲和纯化的裂解产物(阴离子交换配体)的样品。根据输入样品,在流程开始时将洗涤或裂解缓冲液引入到洗涤/裂解区域,在那里它从它的吸收垫(未显示)经由窄的硝化纤维路径流动到主基底,仅在样品溶液的完全输送以后达到主要的条。可以包括样品路径处理诸如PVP、PVPP或阳离子交换配体用于扩增抑制剂的去。高离子强度洗涤缓冲液从阴离子交换配体中洗脱核酸并且提供支持有效结合到二氧化硅基质的静电环境。得到的提纯的核酸可以通过二氧化硅基质的洗脱或收集被回收到携带玻璃料的微离心管中,在那里所述核酸可以使用至少2-床体积(>0.8μL)的低离子强度缓冲液(水、TE等)洗脱。

[0038] 发明详述

[0039] 除非另外限定,本文中使用的全部技术术语、符号及其它科学术语旨在具有本发明相关领域技术人员通常理解的含义,除非另外限定。在一些情况下,为了清楚和/或容易参考,本文中限定具有通常理解含义的术语,并且本文中包括这样的定义不应当被解释成表示本领域一般理解的实质差异。本文中描述或参考的技术和步骤一般是本领域技术人员使用常规方法所充分理解的和通常采用的,诸如,例如,在Sambrook等,分子克隆:实验室手册第3版(Molecular Cloning:A Laboratory Manual 3rd.edition)(2001)冷泉港实验室出版社,冷泉港,N.Y.和分子生物学中的通用流程(Current Protocols in Molecular Biology)(Ausbel等,编辑,JohnWiley & Sons公司,2001)中描述的广泛使用的分子克隆方法。适当地,除非另外注明,包括使用商售试剂盒和试剂的步骤一般是根据制造商限定的流程和/或参数进行的。

[0040] 侧向流动样品制备方法和系统

[0041] 本发明提供高度简化的侧向流动色谱核酸样品制备方法、装置和集成体系,其用于有效地浓缩痕量样品并且除去核酸扩增抑制剂。LFSP装置可以由本文中公开的本发明的多种元件组成,包括生物颗粒或细胞的侧向流动免疫捕获,侧向流动基质之内的直接裂解,构成夹心式杂交测定的多种元件、被动的流体/缓冲液控制系统、以及用能隔绝或降低核酸扩增抑制剂活性的组合物的预处理。

[0042] 例如,LFSP装置可以包括用于接收流体样品的等分试样的样品接收区域,以及与所述样品接收区域侧向流动接触的免疫捕获区域,其含有与所关心的生物颗粒或细胞上存在的配体反应的固定化抗体。这样一种装置可以用于捕获所关心的生物颗粒或细胞,并且还可以含有裂解颗粒或细胞的设备,和扩增由此释放的核酸的设备。所述装置可以连接到侧向流动测定或与其集成,所述侧向流动测定诸如夹心式杂交核酸测定。在优选实施方案中,将LFSP装置连接到LFM装置或测定或与其集成。LFM装置和测定描述在美国专利申请号11/894,910中。

[0043] 例如,免疫捕获区域可以如下制备。处理侧向流动基底(即,硝化纤维)以便固定配体(即,抗体)以在基底上形成免疫捕获区域。具体地,以实验发现的浓度在生理离子强度缓冲液中制备抗体溶液以提供对于抗原(典型是0.01mg/ml到1mg/ml)的特异性结合。抗体沉积到大孔硝化纤维膜上可以通过许多方法的任一种来实现,所述方法包括但不限于将受控的和可再现体积的配体沉积到基底上的人工施用、喷枪沉积、机器人流体处理系统或类似方法。适合的基底包括HiFlow 135(Millipore公司)和可以由多个商业提供商获得的类似产品。一旦沉积到基底上,则配体通过干燥(在蛋白质配体的情况下)和/或通过剂量为5000微焦耳的紫外线照射(在核酸/LNA固定的情况下)来固定。

[0044] 本发明的侧向流动免疫捕获方面提供从广泛范围的稀释样品体积浓缩靶分析物的能力。一旦固定在装置的捕获区域,则可以检测所述靶标以及随后洗涤、裂解和对任何释放的核酸进行扩增。结合多个各自携带针对不同分析物的配体的捕获区域,将可以分离并收集所关心的多个样品成分,以用于随后的装置上的分析或离开装置的分析。该方法的多重能力将容许多个蛋白质和核酸分析物在最少的使用者介入情况下被快速收集(并且如果需要被检测),需要小于2分钟来获得免疫测定结果,和小于60分钟来获得敏感序列特异性核酸扩增和检测。

[0045] 在简化的样品制备方案中,基于免疫捕获和随后的化学和/或热量介导的裂解,必须考虑数个因素,包括潜在的酶抑制剂的去和残留样品材料对于扩增效率的影响。虽然适当制备的粗制细胞裂解产物可以用于NASBA(见实施例1,下文中),本申请人假设通过使用设计成进一步减少细胞和基质污染同时通过免疫亲和捕获从复杂混合物浓缩分析物颗粒的方法,可以获得改善的灵敏性。这导致LFSP方法和装置的开发,其能够使病毒颗粒与复杂样品基质隔开,产生净化的病毒样品,所述净化的病毒样品可以裂解以提供适于随后在不进一步纯化的情况下扩增的核酸。本发明的该方面更详细地描述在下文的实施例2中,其中TMV颗粒是通过在硝化纤维膜背景内的免疫亲和色谱法与粗浸渍干燥的烟叶隔开。实施例2中描述的研究表明,侧向流动不仅可用于将稀释分析物浓缩到空间限定的捕获区域,而且使捕获区域下游的装置区域缺少捕获的种类。这些数据支持这样的假设,即,简单侧向流动免疫测定法可以形成用于分离和制备复杂生物样品的快速的和成本有效的免疫亲和纯化系统的基础,以及支持这样的断言,即,适当处理的基底可用于使下游捕获区域处缺少具

有不需成分样品。

[0046] 在实施例2描述的实验中利用的样品代表非常有挑战性的基质,原因在于存在对于酶催化操作诸如PCR和NASBA扩增强烈抑制,以及潜在混淆非检验核酸(植物来源的DNA和RNA)的复合多糖类、有机材料和其它成分。因此,实施例2中描述的结果表明上述侧向流动介导的免疫捕获步骤在分析复杂生物样品中的效用,在所述复杂生物样品中,靶分析物是少数种类,并且存在PCR和NASBA抑制剂,其排除了在不预先处理情况下直接扩增所述靶标。此外,实施例2的实验中获得的结果支持这样的假设,即,简单侧向流动免疫测定法可以形成用于分离和制备复杂生物样品的快速的和成本有效的免疫亲和纯化系统的基础,以及支持这样的断言,即,适当处理的基底可用于使下游捕获区域处缺少具有不需成分样品。

[0047] 被动LF缓冲液交换系统

[0048] 为了消除对于电子控制系统、阀门、及其它需要运动部件的流体流动控制方案的需要,本申请人已经开发了多种硝化纤维结构以介导侧向流动基底上的缓冲液和样品流的被动控制。通过在单一集成侧向流动膜诸如硝化纤维或色谱纸中使用几何限定的流动路径,可以被动控制多个溶液/缓冲液的流速。在一个方法中,经由下文实施例4中介绍的实例另外描述的是,切割硝化纤维膜以对不同溶液形成单独流动路径,所述流动路径在膜的长度和宽度上是不同的(见,例如,图4-9)。除图7、8和14中所示的原型装置例举的几何形状之外,本领域技术人员将容易地理解许多其它的形状也可以实现所需的多个溶液流动路径的调节,所述多个溶液流动路径是其旨在促进的测定法所需的。另外,虽然本发明的该方面是通过其中全部流动路径是无缝集成的单一硝化纤维膜例举的,但是其它系统也将是显而易见的,包括但不限于其中不仅通过膜流动路径长度和/或宽度而且通过中断除膜材料以外的材料的顺序来调节流动路径的那些,所述除膜材料以外的材料诸如纤维素酯、玻璃纤维、聚醚砜、棉、脱水聚丙烯酰胺、硅胶、和聚乙二醇。应当理解,限定精确控制的流体路径和反应顺序将根据测定类型和复杂性改变。然而,基于本文中提供的教导,人们将能用普通实验而实验性地导出对于具体测定的必要控制。

[0049] 集成系统:

[0050] 还设想结合本发明的一个或多个元件的完全集成的,样品-到-响应的侧向流动测定装置。实施例集成系统示意性表示在图15和16中。例如,在一个实施方案中,LFSP装置与免疫测定筛选和NASBA扩增两者以及随后的下游侧向流动夹心式杂交核酸测定集成的。这样一种装置的示意性表示显示在图15中。

[0051] 这样的装置可以包括侧向流动相容的色谱法载体,诸如HiFlow 135大孔支持硝化纤维(Millipore)。该基底是使用流体沉积系统诸如压动(piezo-actuated)皮升沉积系统(NanoPlotter 2.0, GeSim)摹制的,以便在样品流动的需要位置赋予具体的性质。例如,免疫捕获区域上游的区域将被处理成赋予能够除去或降低扩增抑制剂的活性或其它不合需要的样品基质污染的变化。定位所关心的病原体的抗体以便在毛细管侧向流动期间从样品溶液捕获靶颗粒。另外,通过结合被动流体流动控制,可以将捕获的细胞或病毒裂解以释放核酸,用于在下游基底区域的亲和捕获和纯化。一些实施方案可以装有由USB接口驱动的加热元件或者内部或外部电源或电池,以便在升高的温度下在裂解缓冲液中温育样品[49]。在裂解期间释放的核酸则流向下游亲和捕获区域,以用于固定、洗涤和收集。所述装置的捕获区域可以结合PCR、RT-PCR、NASBA或等温核酸扩增反应。

[0052] 为了容许结合更严格的洗涤条件,而不显著增加流程复杂性,本发明也提供开发LNA双链体的增加的稳定性的方法[39]。在该方案中,样品制备装置携带固定的LNA寡核苷酸。预计这些固定的探针在通过胍盐基裂解缓冲液施加的变性条件下容许靶RNA的序列特异性杂交介导的捕获。他人先前的工作已经显示,LNA寡核苷酸可用于通过杂交捕获含有4M胍盐的粗制细胞裂解产物中存在的RNA分子[40]。将LNA捕获探针设计成与在NASBA扩增引物结合位点附近但不与NASBA扩增引物结合位点重叠的区域杂交。

[0053] 支持的硝化纤维系统的一个优点是可以对膜进行化学改性的容易性。先前的报告已经详述了共价和吸附性改性硝化纤维以引入用于阳离子和阴离子交换色谱法两者的固定官能团的方法[17]。也可以包括的是,在多重膜系统的限定区域或组件膜处产生固定化阴离子交换配体的处理,以用于核酸结合和纯化,包括但不限于聚乙烯亚胺(PEI)以及二乙氨基乙基(DEAE)官能团,两者都已经用于基于膜的离子交换色谱法[17]。另外,可以处理核酸亲和配体上游区域以减少或排除通常的核酸样品污染的输送。这样的变化可以包括,例如,聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙烯聚吡咯烷酮(PVPP)[31-33],新的抑制剂/隐蔽剂(例如PIR,J.Dunbar,LANL,pers.comm.)和阳离子交换配体。

实施例

[0054] 实施例1:来自粗制细菌细胞裂解产物的RNA的NASBA扩增

[0055] 为了评价使用粗制裂解产物提供用于扩增的模板RNA的可行性,检验来自大肠杆菌裂解产物的NASBA扩增的功效。通过将不同量的大肠杆菌液体培养物添加到细胞-到-cDNA缓冲液(cells-to-cDNA buffer)(Ambion)并加热到75°C达10分钟而制备裂解产物。据报道该方法从粗制单核细胞增生利斯特氏菌(*L.monocytogenes*)裂解产物产生用于RT-PCR(反转录酶-聚合酶链式反应)的适合模板[49]。裂解产物被1:5稀释并且将2 μ L得到的材料用于10 μ L的NASBA反应。

[0056] 将组成型表达的mRNA、rp1V用作NASBA靶标[50]。NASBA P1和P2引物序列如下:

[0057] EC-rp1V-P1:5'-aattctaatacactcactatagggagaaggCCATCGTTGTGTTTCAGCGTTA-3'
[SEQ ID NO:1]

[0058] 和

[0059] EC-rp1V-P2:5'-gatgca aggtcg cat atg agAACTATCGCTAAACATCGCCA-3'[SEQ ID NO:2].

[0060] P1序列中小写字母表示T7RNA聚合酶启动子序列。P2序列中的小写字母代表用于杂交夹心式测定介导的检测的标签序列。用于LFM上的rp1V捕获和检测的序列是捕获探针:

[0061] rp1V-cap:5'-CTGCTCAGAAGGTTTCGCCTT-3'[SEQ ID NO:3]

[0062] 和检测探针:

[0063] UN1-det-5Tbio:5'-TT-U-生物素-TTTT-U-生物素-TTTT-U-生物素-TTTTTTT gatgca agg tcg cat atg ag-3'[SEQ ID NO:4].

[0064] 容许NASBA反应在41°C进行60分钟,其后移出4 μ L,并使用由与链酶抗生物素缀合的染色聚苯乙烯微球介导的比色检测通过LFM测定其rp1V扩增子。

[0065] 图1中提供的结果显示在暴露到含有来自指定数目细胞的粗制裂解产物的NASBA反应以后的LFM膜。使用粗制全细胞裂解产物以提供模板,在NASBA扩增以后,可以通过LFM

检测少至2000个细胞。该实验表明,在存在胍盐的变性条件下制备的粗制裂解产物可以成功用作NASBA模板。假定,一种提议的用于样品制备的侧向流动方法将容许序列特异性捕获靶RNA和胍盐缓冲液中的严格洗涤,很可能是,用粗制裂解产物获得的2000个细胞的检测极限可以被显著地改善。

[0066] 实施例2:分析物的侧向流动浓缩和随后从包含在叶组织内的TMV颗粒的扩增

[0067] 在该实施例中,侧向流动促进的免疫捕获作为在核酸分离或扩增之前浓缩分析物的方法的效用是用烟草花叶病毒(TMV)研究的。

[0068] 图2A-C描述在200 μ L的粗浸渍烟草的侧向流动和随后关于免疫捕获区域之下(邻近样品垫)、之中和之上(远离样品垫)的侧向流动基底区域(如图2A中所示)编排的扩增(反转录酶-PCR)反应期间的烟草花叶病毒(TMV)颗粒的免疫亲和捕获和浓缩的结果。捕获区域大大富集了病毒颗粒,而减少了抑制成分的相对浓度。这里显示的基于捕获区域的计算床体积,样品体积从200 μ L到200nL的1000-倍减少,也将促进随后的洗涤以进一步降低抑制剂浓度。

[0069] 这些数据表明,侧向流动不仅可用于将稀释分析物浓缩到空间限定的捕获区域,而且使捕获区域下游的装置区域缺少捕获的种类。这些数据支持本申请人的假设,即,简单侧向流动免疫测定法可以形成用于分离和制备复杂生物样品的快速的和成本有效的免疫亲和和性纯化系统的基础,以及支持这样的断言,即,适当处理的基底可用于使下游捕获区域处缺少具有不需要成分样品。

[0070] 实施例3:使用聚乙烯吡咯烷酮侧向流动减少扩增抑制剂

[0071] 该实施例显示,聚乙烯吡咯烷酮处理的样品垫可以经由侧向流动耗尽PCR抑制剂。

[0072] 在本申请人的初步研究过程期间进行的观察是,对于PCR是抑制性的粗制样品成分可以在侧向流动期间耗尽,表明特异性基底处理可以进一步促进来自捕获的靶细胞或颗粒的核酸的扩增。为了测试该假设,将吸收性样品垫用聚乙烯吡咯烷酮(分子量=360,000)的10%溶液处理[31-33],并且评价在携带PVP处理的或未处理的样品垫的装置上的侧向流动免疫捕获(实施例2,上文)以后从浸渍的叶组织浓缩的TMV的RT-PCR扩增。

[0073] 这些反应使用从前报道的用于TMV检测的引物组[35]。在没有预先免疫捕获以耗尽抑制剂的情况下,直接添加到RT-PCR反应的纯烟草提取物对于TMV是阴性的。与该解释一致,1:50稀释度的提取物通过PCR是阳性的,大概原因在于更低的抑制剂浓度。

[0074] 如图3中所示,PVP样品垫减轻来自外源添加的腐殖酸,一种强效PCR抑制剂的抑制[9,34],而未处理的样品垫没有这样。也许最显著地,相对于未处理的样品垫,甚至在没有外源添加的抑制剂情况下,使用PVP处理的样品垫导致显著改善的扩增。虽然在使用具有未处理的样品垫的侧向流动条进行TMV捕获以后,12ng和25ng腐殖酸补充的提取物不能产生可检测的PCR产物,但是当使用PVP处理的样品垫进行免疫捕获时,全部样品显示可检测的PCR产物(图3)。有趣的是,相对于用未处理的垫进行的0ng对照,在PVP处理的样品垫上运行的0、12和25ng腐殖酸样品显示改善的PCR扩增(图3)。

[0075] 实施例4:用于被动控制侧向流动系统中多种溶液流动的几何结构

[0076] 该实施例显示利用几何限定的硝化纤维条来控制流体流动速度和体积的属性的被动侧向流动缓冲液控制系统的原型。为了快速产生基于硝化纤维或其它吸收性材料的装置的原型,开发了使用乙烯基切刀(Roland GX-24CMM-1)或激光切割/雕刻系统(装有30W

的CO₂激光的VersaLaserVL-300(Universal Laser Systems, Inc(环球激光系统公司))从吸收性材料片材切割小型化结构的方法(图4-9)。另外,发现从背衬硝化纤维片材激光烧蚀硝化纤维容许制造适合用作流体流动控制和缓冲液交换元件的平面硝化纤维结构(图7)。通过侧向流动模式的被动毛细管芯吸,对于许多不同形状的硝化纤维结构评价它们在交换两种(图4、图5和图7)和三种流体(图6、8和9)中的效用。

[0077] 使用图4中所示原型装置的流体流动控制。在该粗制原型中,两种不同的缓冲溶液以不同速率通过经由可变路径的毛细管流动迁移,所述可变路径是通过切到硝化纤维条中的不同几何性质而限定的。

[0078] 使用乙烯基切刀制作更精制的原型装置,并且显示在图8A-D中。通过改变对于不同溶液所限定的硝化纤维路径的长度和宽度,相对于装置上的限定反应区,该装置能够操纵三种不同的溶液的暂时控制。如图8中所示,将样品、裂解缓冲液、和扩增缓冲液引入到所述装置(图8A)。样品通过宽的膜路径流动经过免疫捕获区域,将裂解和扩增缓冲液移动至邻近于基底膜的膜区域直到样品流用完(图8B)。当样品用完时,裂解缓冲液进入免疫捕获区域,破坏捕获的颗粒并且释放核酸,用于LNA探针上的基于杂交的捕获,所述LNA探针固定在下游“LNA-捕获区域”(表示在图8A中)。在裂解缓冲液用完以后,与NASBA扩增相容的缓冲液洗涤LNA-捕获区域,除去残留的裂解缓冲液并且促进引物杂交。在3分钟内,使用10 μ L样品、裂解和扩增缓冲液体积,实现三次缓冲液交换。免疫-和LNA-捕获区域的计算床体积大约是250nL,因而每一缓冲液交换用大约40个床体积洗涤捕获区域。使用容许进一步缓冲液洗涤和交换的多种长度和宽度的另外的流动途径,可以实现进一步的流体流动调节。类似地,调节缓冲液的粘度可用于进一步将这样的测定参数提炼为裂解缓冲液中的温育时间。最显著地,可以改变装置尺寸以适应较大样品体积的处理。在每幅图右边的标尺刻度是1mm。

[0079] 实施例5:用于被动洗涤免疫捕获的靶以增加扩增效率的几何构造

[0080] 从采用RT-PCR扩增子的实时检测以及NASBA反应产物的LFM检测的实验获得的结果表明,样品基质的残留抑制成分保持与免疫捕获的病毒缔合,或保持在色谱基底的内含床体积中。这些数据表明,在侧向流动免疫捕获以后的缓冲液洗涤可以提供从复杂样品基质增加扩增功效的简单而有效的方法。为了测试该假设,在捕获区域收获和核酸扩增之前,通过将设计用于介导被动缓冲液交换的硝化纤维结构层压到硝化纤维免疫测定条上,使侧向流动条进行缓冲液洗涤,所述硝化纤维免疫测定条在捕获区域线上携带抗TMV抗体且在对照线上携带能结合胶体金缀合的检测抗体的对照抗体。

[0081] 为了将实现侧向流动基底的缓冲液洗涤所需的用户介入水平最小化,将侧向流动条层压到切成设计成实现被动缓冲液交换的形状的背衬硝化纤维上。这些装置容许在PCR之前的样品与洗涤缓冲液的快速交换和在超纯H₂O中的最终平衡,以降低残留的洗涤缓冲液对于PCR性能的潜在影响。使用的装置显示在图8E中。使用100 μ L样品体积。洗涤缓冲液体积是50 μ L,随后是使用25 μ L的H₂O的最终漂洗以除去残留的缓冲液成分。在测定开始时,将样品、洗涤缓冲液和H₂O添加到384孔板的相应孔。在完成毛细管输送以后,收获捕获区域并通过实时RT-PCR进行分析。

[0082] 为了鉴别具有与侧向流动条的捕获区域处的病毒免疫亲和固定相容的组成的缓冲液,评价了多种洗涤缓冲液对于使用纯烟草提取物产生的TMV免疫条捕获区域信号的影响。

响。这些研究显示,在200 μ L含有乙醇的洗涤缓冲液(这里称为NME(0.5M NaCl、50mM MOPS pH7.0,15%乙醇)的毛细管芯吸以后,没有与捕获区域隔开的金颗粒的视觉可检测的洗脱。与NME对于捕获区域信号的影响相反,含有异硫氰酸胍的缓冲液RLT(Qiagen,Valencia,CA)快速清洁了检测颗粒的捕获区域。

[0083] 在层压为被动缓冲液交换结构的TMV免疫测定条被SEB1中多种稀释度的DCTLE攻击以后使用50 μ L的NME洗涤时,收获捕获区域并使其进行NASBA扩增和通过LFM的扩增子检测。这些研究显示,之前在反应中观察到的NASBA扩增抑制减轻,所述反应是用从暴露于未稀释的DCTLE的条收获的捕获区域材料编排(比较图10A与图10B)。另外,NME缓冲液洗涤导致在DCTLE稀释度至少为1:16,000时检测到TMV,表明从色谱基底更彻底地除去用于DCTLE稀释的SEB1提取缓冲液,进一步增加扩增效率。

[0084] TMV扩增子的LFM检测使用在LFM基底上固定的捕获探针TMV-1和TMV-2:

[0085] TMV-1:

[0086] 5' TTATGCTATAACCACCCAGG 3' [SEQ ID NO:5]

[0087] TMV-2:

[0088] 5' TTATGCTATAACCACCCAGGACGCGATGAAAAACGTCTGGCAA 3' [SEQ IDNO:6]

[0089] 和检测探针:

[0090] UN1-det-5Tbio:

[0091] 5' -TT-U-生物素-TTTT-U-生物素-TTTT-U-生物素-TTTTTT gat gca agg tcgcat atg ag-3' [SEQ ID NO:7]

[0092] 通过链酶抗生物素缀合的染色聚苯乙烯微球(Spherotech)捕获所显影。

[0093] 使用下列实现TMV诊断序列的NASBA扩增:

[0094] TMV-P1:5'aat tct aat acg act cac tat agg g aga GAA AGC GGA CAG AAA CCCGCT Ga 3' [SEQ ID NO:8]

[0095] TMV-P2:5'gat gca agg tcg cat atg ag GAC CTG ACA AAA ATG GAG AAG ATCT 3' [SEQ ID NO:9]

[0096] TMV-P2引物将标签序列结合到NASBA产物中,所述NASBA产物能够与UN1-det-5Tbio寡核苷酸杂交以介导检测。

[0097] 实施例6:使用被动缓冲液交换检测复杂的和抑制性样品基质中的痕量病毒

[0098] 使用烟草提取物的研究显示,这些样品中的高病毒效价容许通过将提取物简单稀释到足以使粗制裂解产物中的抑制剂落在临界浓度以下的程度来实现基于PCR的TMV检测。为了更好地评价侧向流动免疫捕获步骤用于使含有低效价靶病毒的负载抑制剂的样品易于扩增的效用,将使用土壤提取物的样品设计成含有足够的酶抑制剂浓度,以便在没有介入的样品处理步骤的情况下完全消除TMV诊断序列的PCR扩增。这些样品容许评价侧向流动免疫捕获对于基于PCR的检测方案的影响,并提供评价缓冲液洗涤对于扩增抑制水平的影响的方法。为了提供有挑战性的负载抑制剂的样品,如图11中所示,将DCTLE 1:2000或1:4000稀释到PCR抑制性土壤提取物中,所述PCR抑制性土壤提取物是使用称量到50mL聚丙烯离心管中的3g当地收集的土壤并且在30mL SEB 1提取缓冲液(Agdia公司)中猛烈涡旋并容许在室温下旋转过夜而制备的。容许所得到的土壤浆静置3分钟,之后收集等分试样用于RNA分离,TMV的PCR测试或掺有DCTLE的土壤提取物的制备。

[0099] 在完成样品和洗涤缓冲液输送以后,将捕获区域收集并引入到反转录酶反应中,接着是使用1 μ L的RT反应作为模板的实时PCR。为了表征土壤提取物,使用Qiagen RNeasy流程分离土壤提取物总RNA,并通过实时RT-PCR测定TMV以验证该基质对于TMV是阴性的。另外,使用从TMV测定条收获的捕获区域,DCTLE掺入的土壤来源的样品基质产生假阴性实时RT-PCR结果,所述TMV测定条是被100 μ L含有1:2000或1:4000的DCTLE的土壤提取物攻击的(图11)。使用50 μ L NME缓冲液进行被动毛细管流动介导的TMV测定条洗涤产生阳性实时RT-PCR结果($C_t=26.2$)(图11)和琼脂糖凝胶中明显可识别的条带(图12,NME),所述TMV测定条是用含有1:2000的最终稀释度的烟草提取物的土壤提取物攻击的。用50 μ L的RLT缓冲液的洗涤通过RT-PCR和凝胶分析(图12,RLT)或通过实时RT-PCR(未显示)不产生成功的TMV检测。另外,当在捕获区域收获之前采用50 μ L NME缓冲液洗涤时,土壤提取物中更稀释的DCTLE溶液,1:4000,也通过实时RT-PCR(图11)产生阳性TMV检测, C_t 值为27.2。

[0100] 实施例7:用于被动洗涤与亲和基质结合的核酸的几何构造

[0101] 为了评价被动缓冲液交换方法容许从胍盐裂解产物直接捕获核酸的能力,通过使用22 μ g烟草/ μ L RLT,在Qiagen RLT异硫氰酸胍裂解缓冲液中浸渍干燥熏烟叶制备烟草裂解产物。用于侧向流动色谱和缓冲液交换的装置是使用激光切刀(VersaLaser VL-300,30W CO₂激光,环球激光系统)制作的。设计所述装置以便缓冲液交换组件的输入尾端以4.5mm间隔隔开以容许从384孔板的孔吸收样品和缓冲液。将缓冲液交换器的远端层压到取自Qiagen RNeasy柱的3mm直径钻取物。该二氧化硅RNA结合基质用于评价毛细管侧向流动介导的缓冲液交换对于支持病毒RNA捕获的适合性。也可以采用其它材料,诸如玻璃纤维过滤材料。类似地,使用其它缓冲液系统,可以将DEAE膜结合到类似的系统中。

[0102] 将10 μ L的RLT烟草提取物用作样品。对除了无洗涤对照外的全部处理使用NME缓冲液进行40 μ L洗涤,接着是80 μ L的NME,或浓度在0到1M变化的NaCl,如图13中所示。这些数据显示,NME洗涤,接着是0.5M NaCl洗涤,提供测试条件的最好扩增。没有洗涤的样品不能产生可检测的实时RT-PCR产物。

[0103] 实施例8:将被动缓冲液交换几何构造集成到流体系统中以便在扩增和检测之前支持易做到的靶标浓缩和洗涤

[0104] 为了将侧向流动捕获和缓冲液交换系统结合到紧凑的和自包含的外壳中,设计支持性流体系统。通过使用激光切刀将聚碳酸酯片材切成图14B-D中所示的几何形状,将流体系统制作成适应硝化纤维或色谱纸缓冲液交换器诸如图14A中所示的那种。使用紫外线固化的粘合剂或防水双面胶带(ACE双面地毯胶带50106),将适当切割的聚碳酸酯片材层压以形成样品和缓冲液孔。得到的装置容许样品和洗涤缓冲液在测定开始时被引入,并在没有进一步的使用者介入的情况下支持样品色谱和洗涤。

[0105] 将该说明书中引用的全部出版物、专利、和专利申请通过参考结合在本文中,好象将每一单独出版物或专利申请具体地并单独地表明是通过参考结合的。

[0106] 本发明不限于本文中公开的实施方案的范围,所述实施方案旨在作为本发明各方面的单独举例,并且所述实施方案的任何功能等价物属于本发明范围之内。从上述说明和教导,本发明的模型和方法的除本文所描述的那些之外的多种变化,将对于本领域技术人员变得显而易见,并且类似地旨在属于本发明的范围。在不背离本发明真实范围和精神的情况下,可以实施这样的变化或其它实施方案。

[0107] 文献引用

[0108] 1. Carter, D. J. 和 R. B. Cary, 侧向流动微列阵: 基于小型化侧向流动色谱法的快速核酸检测的新平台 (Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography). 核酸研究 (Nucleic Acids Res), 2007. 35(10): 第 e74 页。

[0109] 2. Baeumner, A. J., 环境污染物和食品污染物的生物传感器 (Biosensors for environmental pollutants and food contaminants). 分析和生物分析化学 (Anal Bioanal Chem), 2003. 377(3): 第 434-445 页。

[0110] 3. Pristoupil, T. I., 硝化纤维膜上的微量色谱法和微量电泳法 (Microchromatography and microelectrophoresis on nitrocellulose membranes). 色谱法综述 (Chromatogr Rev), 1970. 12(2): 第 109-125 页。

[0111] 4. Kohn, J., 免疫色谱技术 (An immunochromatographic technique). 免疫学 (Immunology), 1968. 15(6): 第 863-865 页。

[0112] 5. Yang, S. 和 R. E. Rothman, 用于传染性疾病的 PCR 基诊断: 在急性病护理场景中的使用、限制和未来应用 (PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings). 柳叶刀传染性病学 (Lancet Infect Dis), 2004. 4(6): 第 337-348 页。

[0113] 6. Koch, W. H., 用于药物基因组诊断测定的技术平台 (Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays). 自然评述药物发现 (Nat Rev Drug Discov), 2004. 3(9): 第 749-761 页。

[0114] 7. Mackay, I. M., 微生物学实验室中的实时 PCR (Real-time PCR in the microbiology laboratory). 临床微生物学和感染 (Clin Microbiol Infect), 2004. 10(3): 第 190-212 页。

[0115] 8. Cirino, N. M., K. A. Musser, 和 C. Egan, 用于检测生物威胁试剂的多重诊断平台 (Multiplex diagnostic platforms for detection of biothreat agents). 分子诊断学的专家评述 (Expert Rev Mol Diagn), 2004. 4(6): 第 841-857 页。

[0116] 9. Wilson, I. G., 核酸扩增的抑制和促进 (Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification). 应用环境微生物学 (Appl Environ Microbiol), 1997. 63(10): 第 3741-3751 页。

[0117] 10. Akane, A., K. Matsubara, H. Nakamura, S. Takahashi, 和 K. Kimura, 鉴定从血迹中与脱氧核糖核酸 (DNA) 共纯化的血红素化合物, 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增的主要抑制剂 (Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification). 法庭科学杂志 (J Forensic Sci), 1994. 39(2): 第 362-372 页。

[0118] 11. Monteiro, L., D. Bonnemaison, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, 和 F. Megraud, 粪中的作为 PCR 抑制剂的复合多糖: 幽门螺杆菌模型 (Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model). 临床微生物学杂志 (J Clin Microbiol), 1997. 35(4): 第 995-998 页。

[0119] 12. Wickenheiser, R. A., 痕量 DNA: 通过皮肤接触传递痕量 DNA 的评述、理论讨论和

应用(Trace DNA:a review,discussion of theory,and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact).法庭科学杂志(J Forensic Sci),2002.47(3):第442-450页。

[0120] 13.Elliott,K.,D.S.Hill,C.Lambert,T.R.Burroughes,和P.Gill,使用激光显微解剖显著改善在显微镜载玻片上的从精子回收DNA(Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides).国际法庭科学(Forensic Sci Int),2003.137(1):第28-36页。

[0121] 14.Gill,P.,低拷贝数DNA序型分析的应用(Application of low copy number DNA profiling).克罗地亚医学杂志(Croat Med J),2001.42(3):第229-232页。

[0122] 15.Gill,P.,J.Whitaker,C.Fluxman,N.Brown,和J.Buckleton,从小于100pg的DNA得到的STR的解释规则精确性的研究(An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA).国际法庭科学(Forensic Sci Int),2000.112(1):第17-40页。

[0123] 16.Jobling,M.A.和P.Gill,编码证据:法庭分析中的DNA(Encoded evidence:DNA in forensic analysis).自然评述遗传学(Nat Rev Genet),2004.5(10):第739-751页。

[0124] 17.Lonnberg,M.和J.Carlsson,硝化纤维的薄微孔床的色谱性能(Chromatographic performance of a thin microporous bed of nitrocellulose).色谱学杂志B:生物医学科学和应用(J Chromatogr B Biomed Sci Appl),2001.763(1-2):第107-120页。

[0125] 18.Tennikov,T.B.和F.Svec,高性能膜色谱:用于离子交换、疏水相互作用和反相方式中的蛋白质的高度有效分离方法(High-performance membrane chromatography: highly efficient separation method for proteins in ion-exchange, hydrophobic interaction and reversed-phase modes).色谱学杂志(J.Chromatography),1993.646:第279-288页。

[0126] 19.Tennikova,T.B.和R.Freitag,作为用于高性能生物色谱法的固定相的单片盘的介绍(An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography).高分辨率色谱学杂志(J.High Resol.Chromatogr.),2000.23:第27-38页。

[0127] 20.Thommes,J.和M.Kula,膜色谱法-蛋白质下游处理中的集成概念(Membrane Chromatography-An Integrative Concept in the Downstream Processing of Proteins).生物技术进展(Biotechnol.Prog.),1995.11:第357-367页。

[0128] 21.Peytavi,R.,F.R.Raymond,D.Gagne,F.J.Picard,G.Jia,J.Zoval,M.Madou,K.Boissinot,M.Boissinot,L.Bissonnette,M.Ouellette,和M.G.Bergeron,用于快速(<15分钟)自动微阵列杂交的微流体装置(Microfluidic device for rapid (<15min) automated microarray hybridization).临床化学(Clin Chem),2005.51(10):第1836-1844页。

[0129] 22.Wei,C.W.,J.Y.Cheng,CT.Huang,M.H.Yen,和T.H.Young,在500秒内使用用于1微升DNA微阵列杂交的微流体装置(Using a microfluidic device for 1 microl DNA microarray hybridization in 500 s).核酸研究(Nucleic Acids Res),2005.33(8):第

e78页。

[0130] 23. Compton, J., 基于核酸序列的扩增(Nucleic acid sequence-based amplification). 自然(Nature), 1991. 350(6313): 第91-92页。

[0131] 24. Kievits, T., B. van Gemen, D. van Strijp, R. Schukkink, M. Dircks, H. Adriaanse, L. Malek, R. Sooknanan, 和 P. Lens, 为了诊断 HIV-1 感染而优化的 NASBA 等温酶促体外核酸扩增(NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection). 病毒学方法杂志(J Virol Methods), 1991. 35(3): 第273-286页。

[0132] 25. Malek, L., R. Sooknanan, 和 J. Compton, 基于核酸序列的扩增(NASBA)(Nucleic acid sequence-based amplification(NASBA)). 分子生物学方法(Methods Mol Biol), 1994. 28: 第253-260页。

[0133] 26. Wetzell, T., T. Candresse, G. Macquaire, M. Ravelonandro, 和 J. Dunez, 用于李痘病毒检测的高度灵敏的免疫捕获聚合酶链式反应方法(A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection). 病毒学方法杂志(J Virol Methods), 1992. 39(1-2): 第27-37页。

[0134] 27. Leone, G., H. B. van Schijndel, B. van Gemen, 和 C. D. Schoen, 通过免疫捕获和等温核酸扩增方法 NASBA 直接检测马铃薯块茎中的马铃薯卷叶病毒(Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA). 病毒学方法杂志(J Virol Methods), 1997. 66(1): 第19-27页。

[0135] 28. Romero, A., B. Blanco-Urgoiti, 和 F. Ponz, 使用免疫捕获-长 RT-PCR 扩增和克隆长 RNA 病毒基因组(Amplification and cloning of a long RNA virus genome using immunocapture-long RT-PCR). 病毒学方法杂志(J Virol Methods), 1997. 66(1): 第159-163页。

[0136] 29. Chanteau, S., L. Rahalison, M. Ratsitorahina, Mahafaly, M. Rasolomaharo, P. Boisier, T. O'Brien, J. Aldrich, A. Keleher, C. Morgan, 和 J. Burans, 使用 F1 抗原捕获 ELISA 测定和快速免疫金试纸早期诊断腹股沟淋巴结鼠疫(Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick), 国际医学生物学杂志(Int J Med Microbiol), 2000. 290(3): 第279-283页。

[0137] 30. Fukuta, S., K. Ohishi, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, 和 M. Kanbe, 用于检测来自菊花的番茄斑萎病病毒的免疫捕获反转录环介导的等温扩增的进展(Development of immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of tomato spotted wilt virus from chrysanthemum). 病毒学方法杂志(J Virol Methods), 2004. 121(1): 第49-55页。

[0138] 31. Young, C. C., R. L. Burghoff, L. G. Keim, V. Minak-Bernero, J. R. Lute, 和 S. M. Hinton, 聚合酶链式反应可扩增的来自土壤的 DNA 的聚乙烯吡咯烷酮-琼脂糖凝胶电泳纯化(Polyvinylpyrrolidone-Agarose Gel Electrophoresis Purification of Polymerase Chain Reaction-Amplifiable DNA from Soils). 应用环境微生物学(Appl Environ Microbiol), 1993. 59(6): 第1972-1974页。

- [0139] 32. Koonjul, P.K., W.F. Brandt, J.M. Farrant, 和 G.G. Lindsey, 聚合酶链式反应中包含聚乙烯吡咯烷酮逆转 RNA 的多酚污染的抑制作用 (Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA). 核酸研究 (Nucleic Acids Res), 1999. 27(3): 第 915-916 页。
- [0140] 33. Berthelet, M., L.G. Whyte, 和 C.W. Greer, 使用聚乙烯吡咯烷酮旋转柱快速直接从土壤提取 DNA 用于 PCR 分析 (Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns). FEMS 微生物学通信 (FEMS Microbiol Lett), 1996. 138(1): 第 17-22 页。
- [0141] 34. Tsai, Y.L. 和 B.H. Olson, 用于从沉淀物中的腐殖质分离细菌 DNA 用于聚合酶链式反应的快速方法 (Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction). 应用环境微生物学 (Appl Environ Microbiol), 1992. 58(7): 第 2292-2295 页。
- [0142] 35. Jacobi, V., G.D. Bachand, R.C. Hamelin, 和 J.D. Castello, 用于检测和区分番茄和烟草嵌合体烟草花叶病毒的多重免疫捕获 RT-PCR 测定的发展 (Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses). 病毒学方法杂志 (J Virol Methods), 1998. 74(2): 第 167-178 页。
- [0143] 36. Sterne, M., 从炭疽芽孢杆菌的无毒 (未胶囊化的) 变异体制备的炭疽疫苗的用途 (The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*). 昂德斯特惠兽医科学和畜牧业杂志 (Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind), 1939. 13: 第 307-312 页。
- [0144] 37. Loens, K., K. Bergs, D. Ursi, H. Goossens, 和 M. Leven, 用于从多种临床样本自动提取核酸的 NucliSens 简易 MAG 的评价 (Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens). 临床微生物学杂志 (J Clin Microbiol), 2007. 45(2): 第 421-425 页。
- [0145] 38. Biagini, R.E., D.L. Sammons, J.P. Smith, B.A. MacKenzie, C.A. Striley, J.E. Snawder, S.A. Robertson, 和 C.P. Quinn, 测量血清和全血中抗炭疽保护性抗原免疫球蛋白 G 的快速、灵敏和特异性侧向流动免疫色谱装置 (Rapid, sensitive, and specific lateral-flow immunochromatographic device to measure anti-anthrax protective antigen immunoglobulin G in serum and whole blood). 临床疫苗免疫学 (Clin Vaccine Immunol), 2006. 13(5): 第 541-546 页。
- [0146] 39. Singh, S.K., P. Nielsen, A. Koshkin, 和 J. Wengel, LNA (闭锁核酸): 合成和高亲和核酸识别 (LNA (locked nucleic acids): Synthesis and high-affinity nucleic acid recognition). 化学交流 (Chem. Commun.), 1998. 4: 第 455-456 页。
- [0147] 40. Jacobsen, N., P.S. Nielsen, D.C. Jeffares, J. Eriksen, H. Ohlsson, P. Arctander, 和 S. Kauppinen, 使用闭锁核酸-寡 (T) 捕获从 4M 硫氰酸胍-溶解的细胞提取物直接分离聚 (A)+RNA (Direct isolation of poly(A)+RNA from 4M guanidine thiocyanate-lysed cell extracts using locked nucleic acid-oligo(T) capture). 核

酸研究(Nucleic Acids Res),2004.32(7):第e64页。

[0148] 41.Lockley,A.K.,C.G.Jones,J.S.Bruce,S.J.Franklin,和R.G.Bardsley,固体载体上产生的固定化PCR产物的库仑法检测(Coulometric detection of immobilised PCR products generated on a solid support).核酸研究(Nucleic Acids Res),1997.25(6):第1313-1314页。

[0149] 42.Pemov,A.,H.Modi,D.P.Chandler,和S.Bavykin,使用多重微列阵增强的PCR的DNA分析(DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR).核酸研究(Nucleic Acids Res),2005.33(2):第e11页。

[0150] 43.Pannucci,J.,H.Cai,P.E.Pardington,E.Williams,RT.Okinaka,C.R.Kuske,和R.B.Cary,毒力特征:实现发现和基于微列阵的途径(Virulence signatures: microarray-based approaches to discovery and analysis).生物传感器和生物电子学(Biosens Bioelectron),2004.20(4):第706-718页。

[0151] 44.Pastinen,T.,M.Raitio,K.Lindroos,P.Tainola,L.Peltonen,和A.C.Syvanen,在微列阵上通过等位基因特异性引物延伸的特异性、高通量基因表型分析体系(A system for specific,high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays).基因组研究(Genome Res),2000.10(7):第1031-1042页。

[0152] 45.Huber,M.,A.Mundlein,E.Doorstaeder,C.Schneeberger,C.B.Tempfer,M.W Mueller,和W.M.Schmidt,通过寡核苷酸阵列上的直接多重聚合酶链式反应获得基因组DNA中的单核苷酸多态性(Accessing single nucleotide polymorphisms in genomic DNA by direct multiplex polymerase chain reaction amplification on oligonucleotide microarrays).分析生物化学(Anal Biochem),2002.303(1):第25-33页。

[0153] 46.Wahlestedt,C.,P.Salmi,L.Good,J.Kela,T.Johnsson,T.Hokfelt,C.Broberger,F.Porreca,J.Lai,K.Ren,M.Ossipov,A.Koshkin,N.Jakobsen,J.Skouv,H.Oerum,M.H.Jacobsen,和J.Wengel,含有闭锁核酸的有效和无毒性反义寡核苷酸(Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids).美国科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A),2000.97(10):第5633-5638页。

[0154] 47.Braasch,D.A.和D.R.Corey,闭锁核酸(LNA):DNA和RNA识别的微调(Locked nucleic acid (LNA):fine-tuning the recognition of DNA and RNA).化学生物学(Chem Biol),2001.8(1):第1-7页。

[0155] 48.Boom,R.,C.J.Sol,M.M.Salimans,C.L.Jansen,P.M.Wertheim-van Dillen,和J.van der Noordaa,用于纯化核酸的快速和简单方法(Rapid and simple method for purification of nucleic acids).临床微生物学杂志(J Clin Microbiol),1990.28(3):第495-503页。

[0156] 49.Boom,R.,C.J.Sol,R.Heijtkink,P.M.Wertheim-van Dillen,和J.vander Noordaa,快速纯化来自血清的乙型肝炎病毒DNA(Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum).临床微生物学杂志(J Clin Microbiol),1991.29(9):第1804-1811页。

[0157] 50.Cheek,B.J.,A.B.Steel,M.P.Torres,Y.Y.Yu,和H.Yang,流动通过芯片,即一

种三维微通道生物芯片上的杂交测定的化学发光检测(Chemiluminescence detection for hybridization assays on the flow-thru chip, a three-dimensional microchannel biochip). 分析化学(Anal Chem), 2001. 73(24): 第5777-5783页。

[0158] 51. Cook, A.F., E. Vuocolo, 和 CL. Brakel, 一系列生物素酰化的寡核苷酸的合成和杂交 (Synthesis and hybridization of a series of biotinylated oligonucleotides). 核酸研究(Nucleic Acids Res), 1988. 16(9): 第4077-4095页。

[0159] 52. Dineva, M.A., D. Candotti, F. Fletcher-Brown, J.P. Allain, 和 H. Lee, 通过试纸测定同步可视检测多个病毒扩增子 (Simultaneous visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay). 临床微生物学杂志(J Clin Microbiol), 2005. 43(8): 第4015-4021页。

[0160] 53. Capaldi, S., R.C. Getts, 和 S.D. Jayasena, 通过树状DNA平台上的核苷酸延伸和切除的信号放大 (Signal amplification through nucleotide extension and excision on a dendritic DNA platform). 核酸研究(Nucleic Acids Res), 2000. 28(7): 第E21页。

[0161] 54. Lowe, M., A. Spiro, Y. Z. Zhang, 和 R. Getts, 用具有用于信号放大的3DNA树状聚体的流式细胞计量术多重地基于颗粒地检测DNA (Multiplexed, particle-based detection of DNA using flow cytometry with 3DNA dendrimers for signal amplification). 细胞计量术A (Cytometry A), 2004. 60(2): 第135-144页。

[0162] 55. Stears, R.L., R.C. Getts, 和 S.R. Gullans, 使用树状聚体技术用于高密度微阵列的新的灵敏的检测系统 (A novel, sensitive detection system for high-density microarrays using dendrimer technology). 生理基因组学 (Physiol Genomics), 2000. 3(2): 第93-99页。

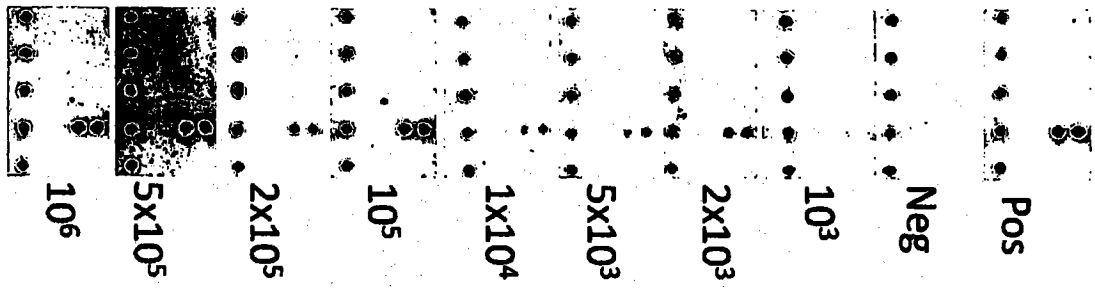


图1

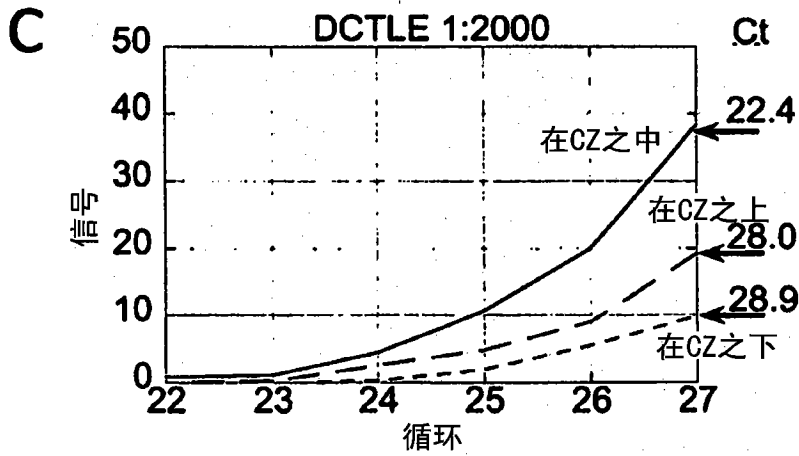
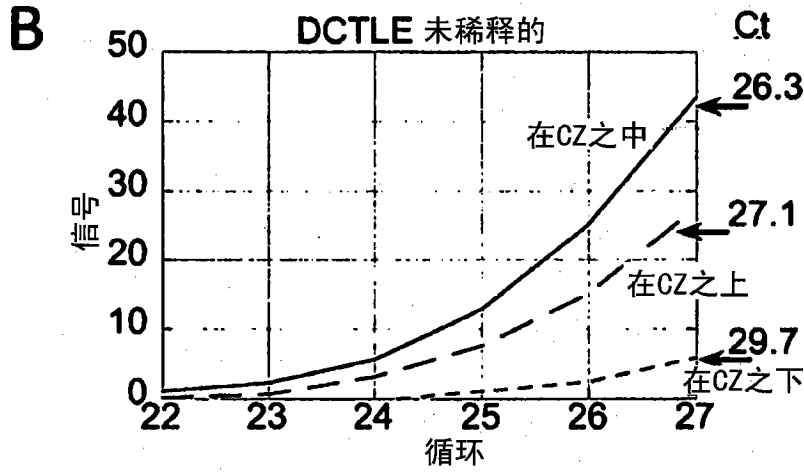
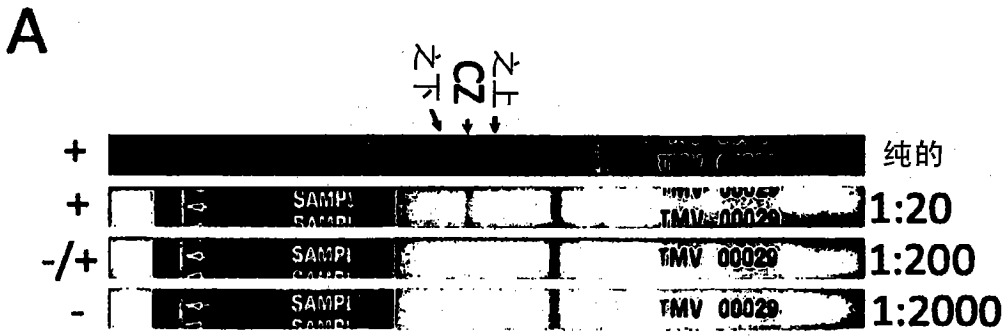


图2

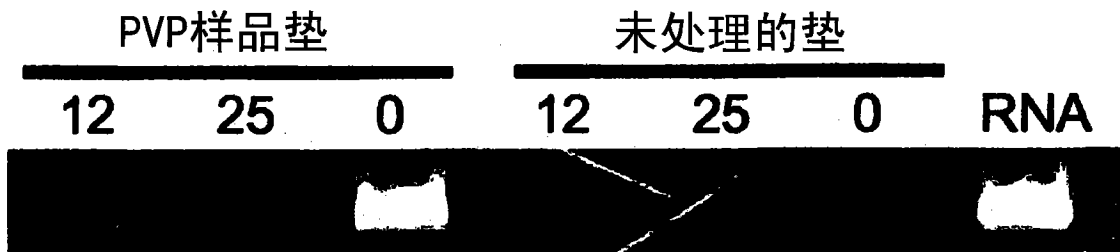


图3

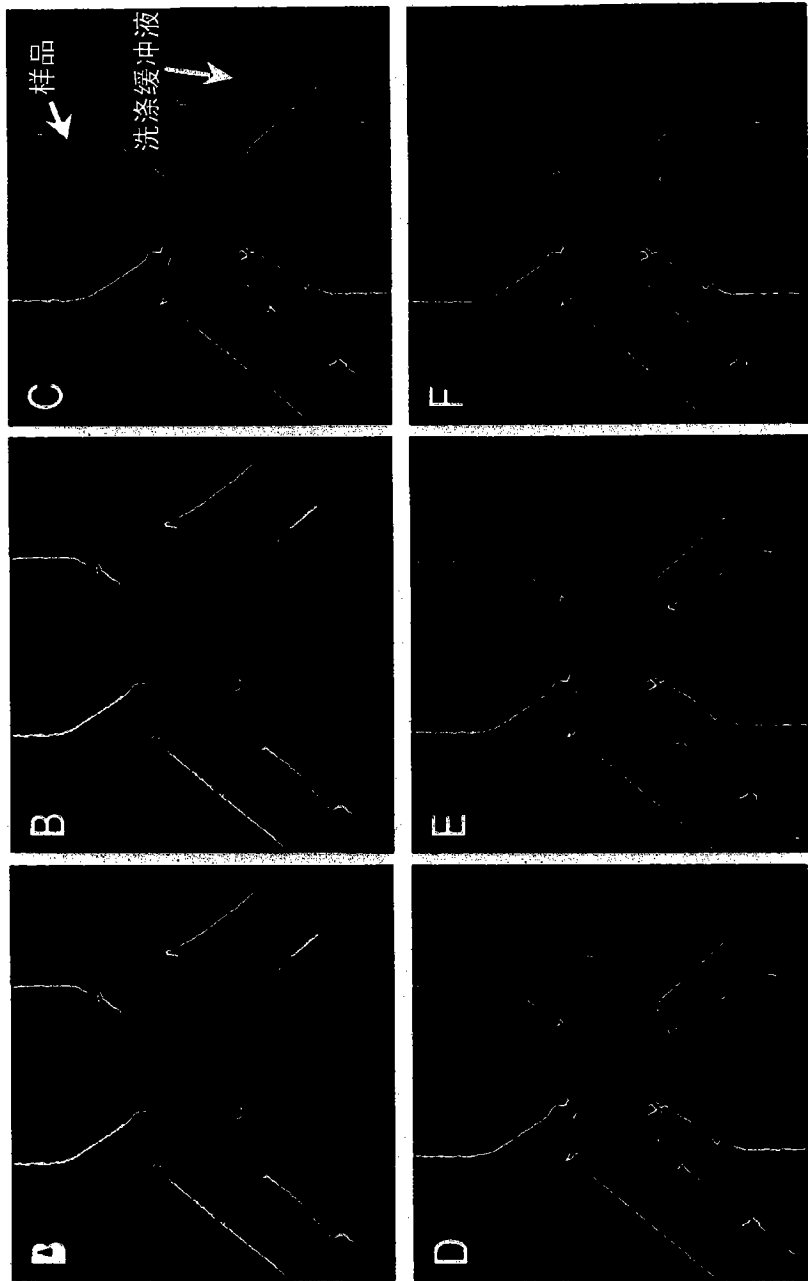


图4

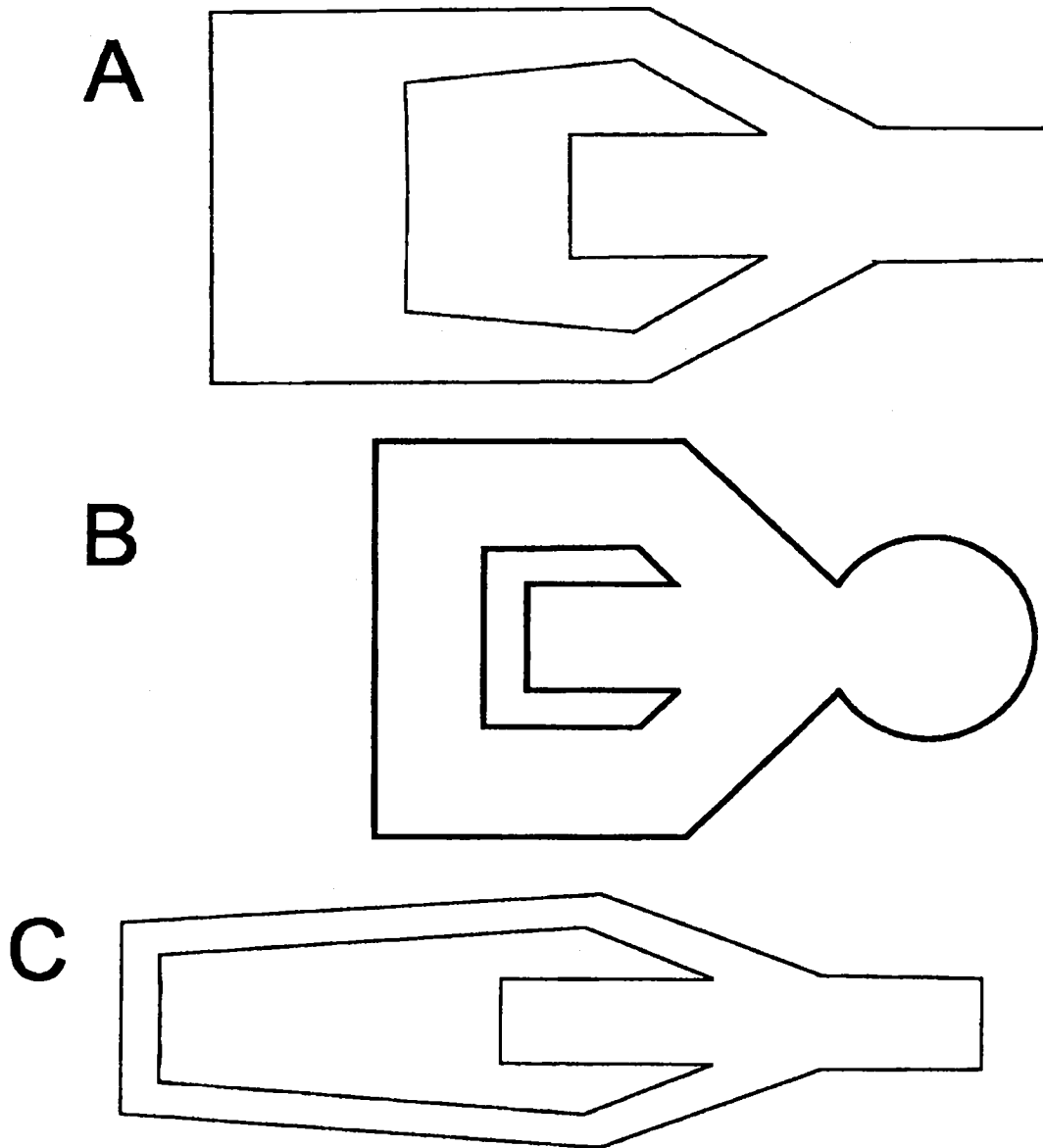


图5

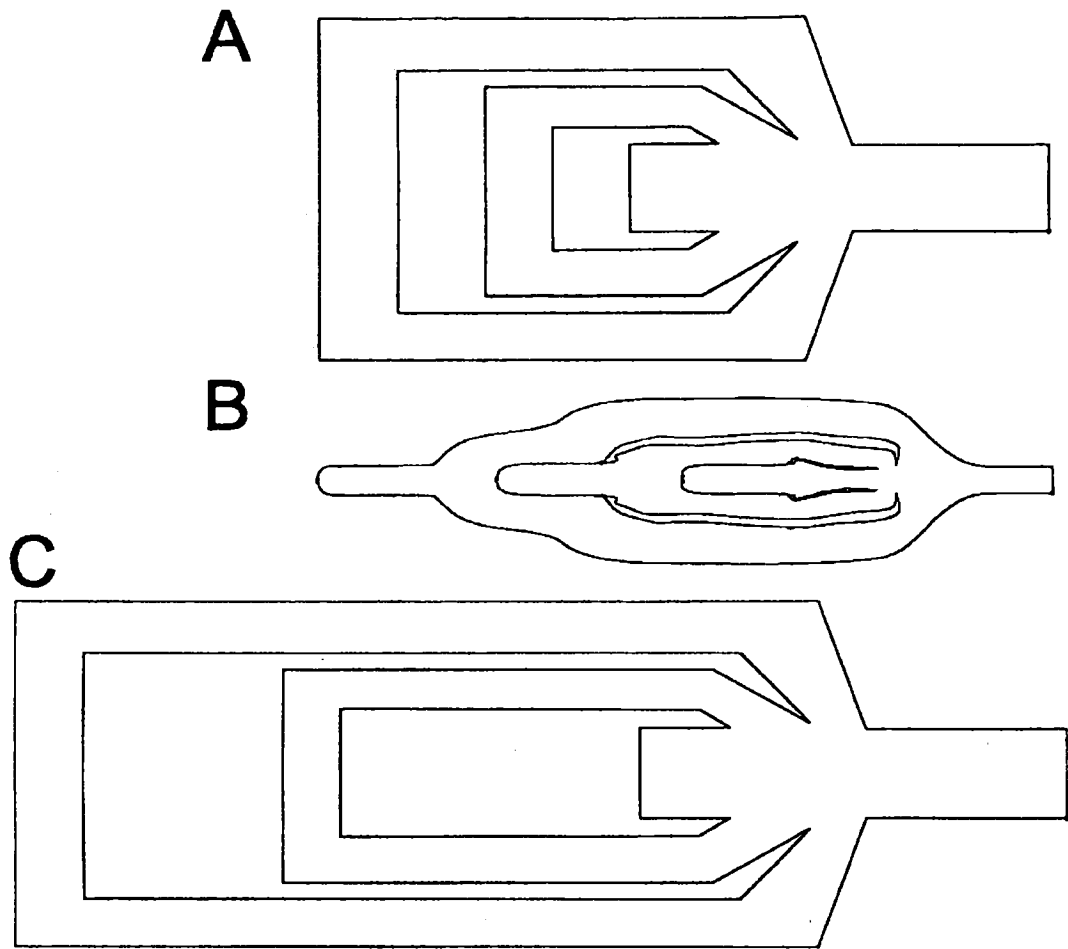


图6

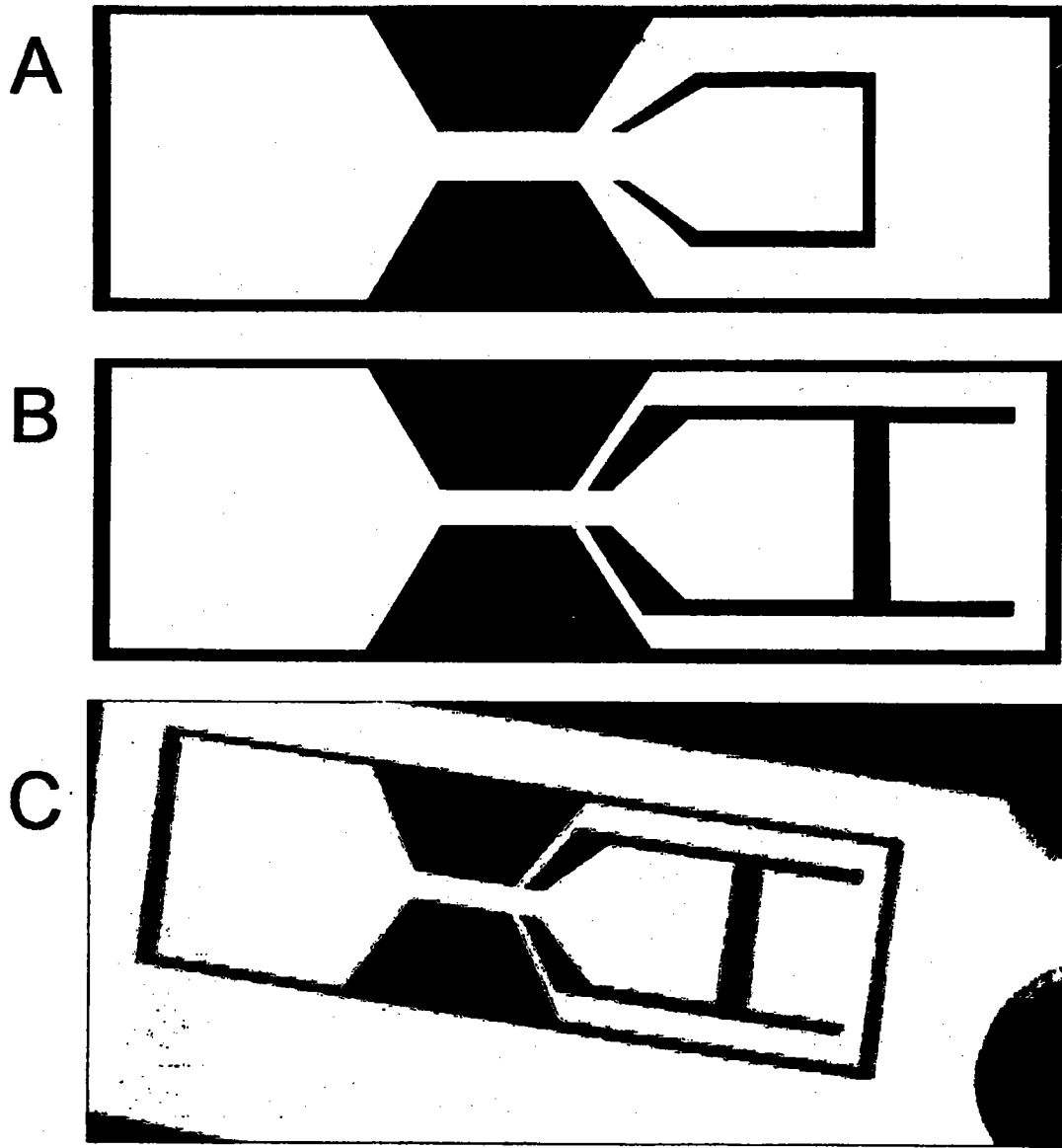


图7

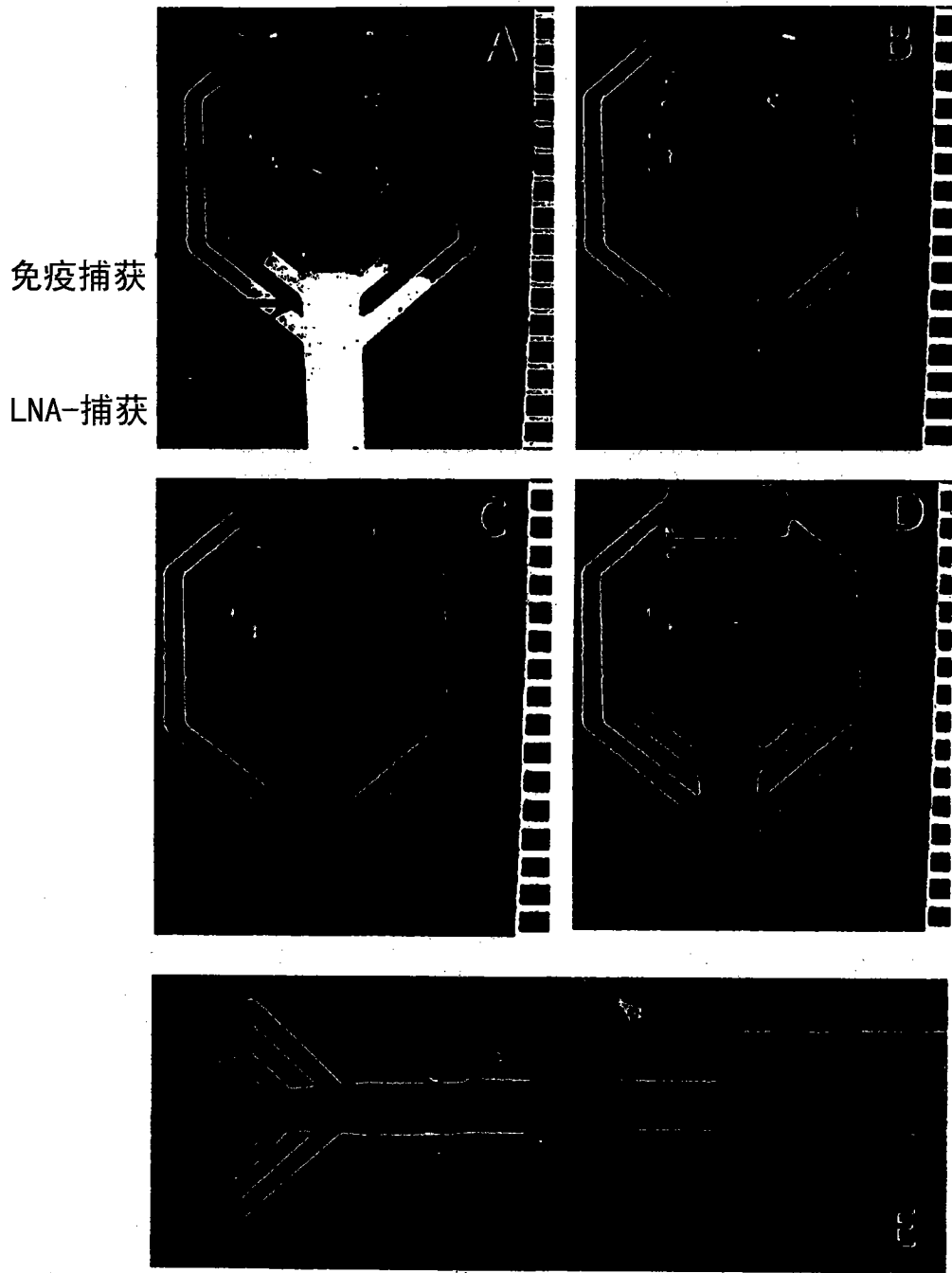


图8

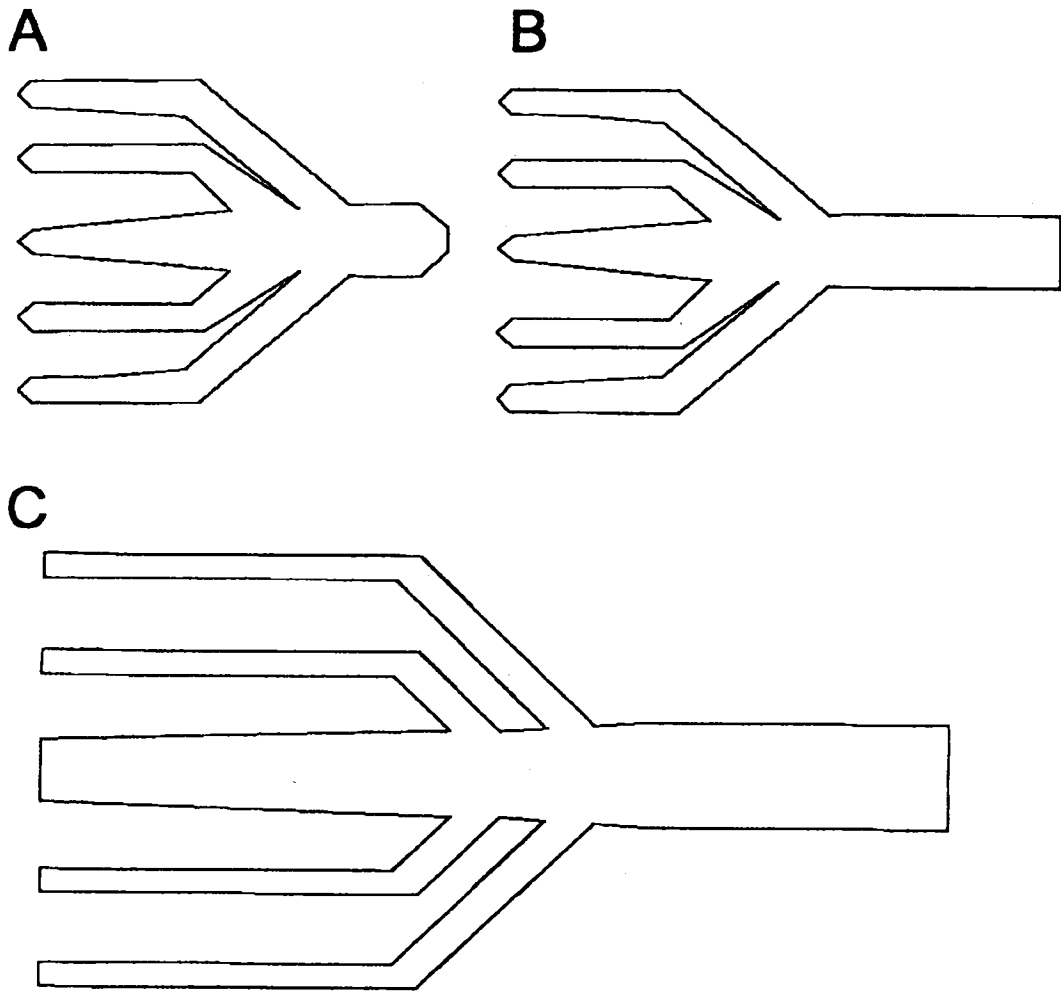


图9

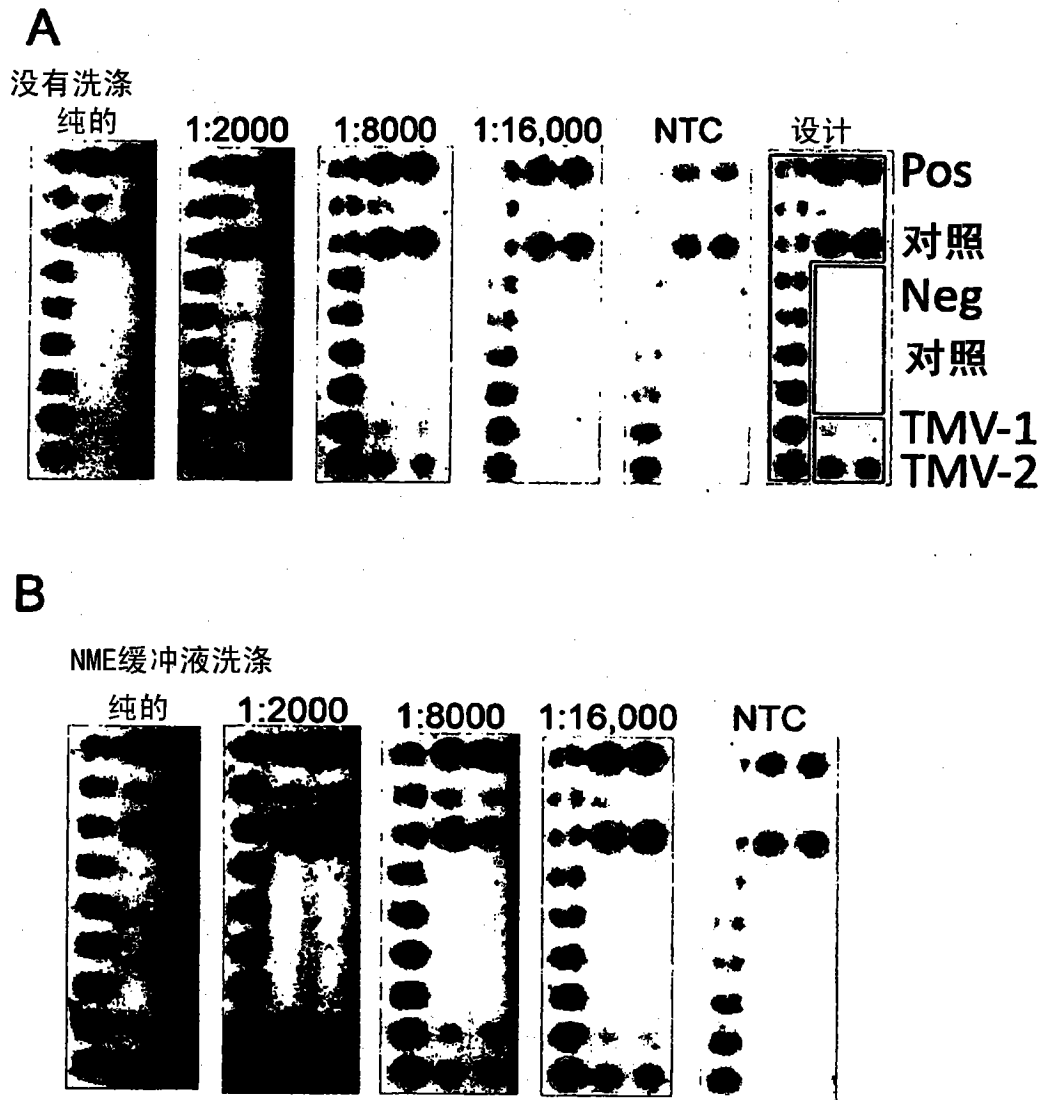


图10

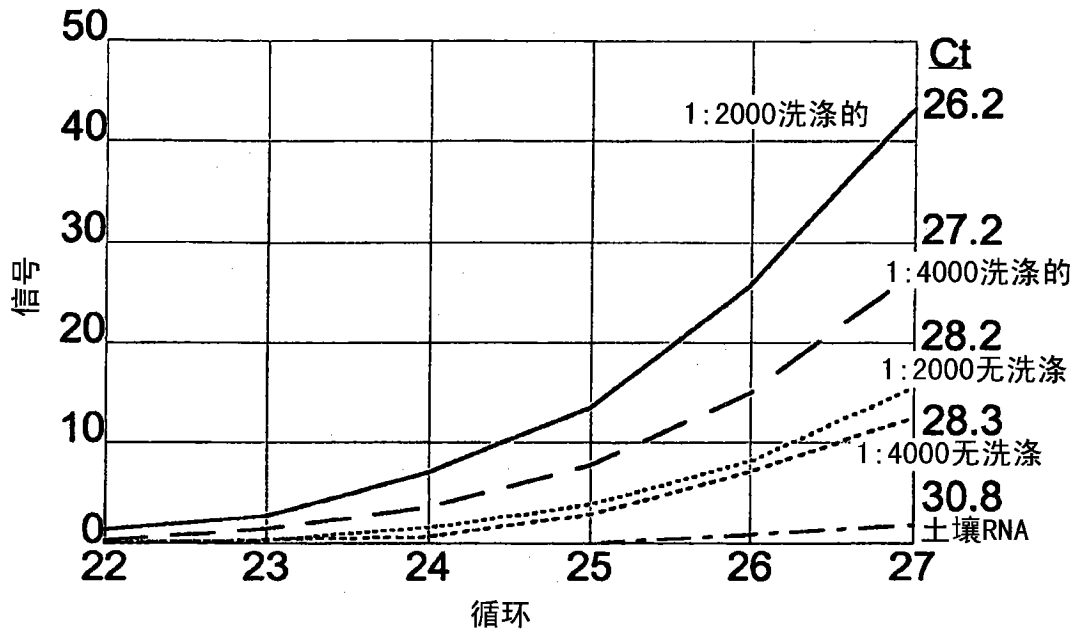


图11

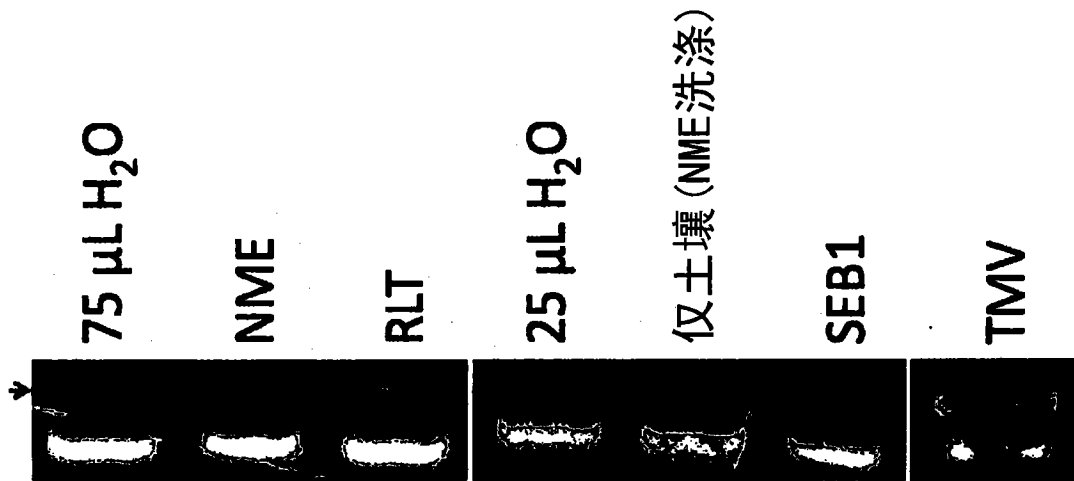


图12

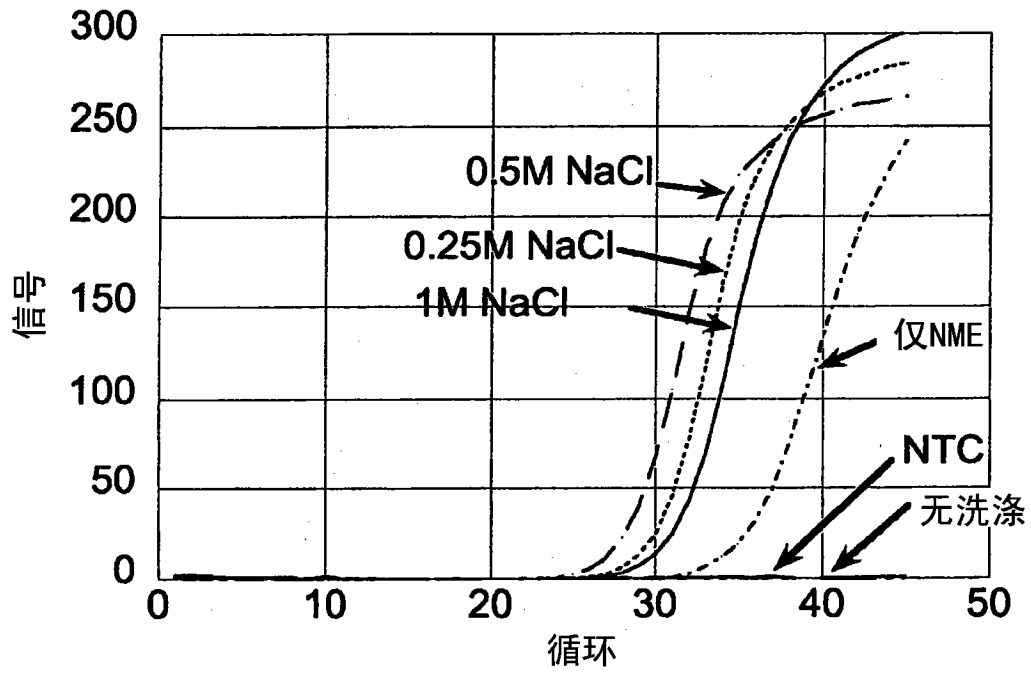


图13

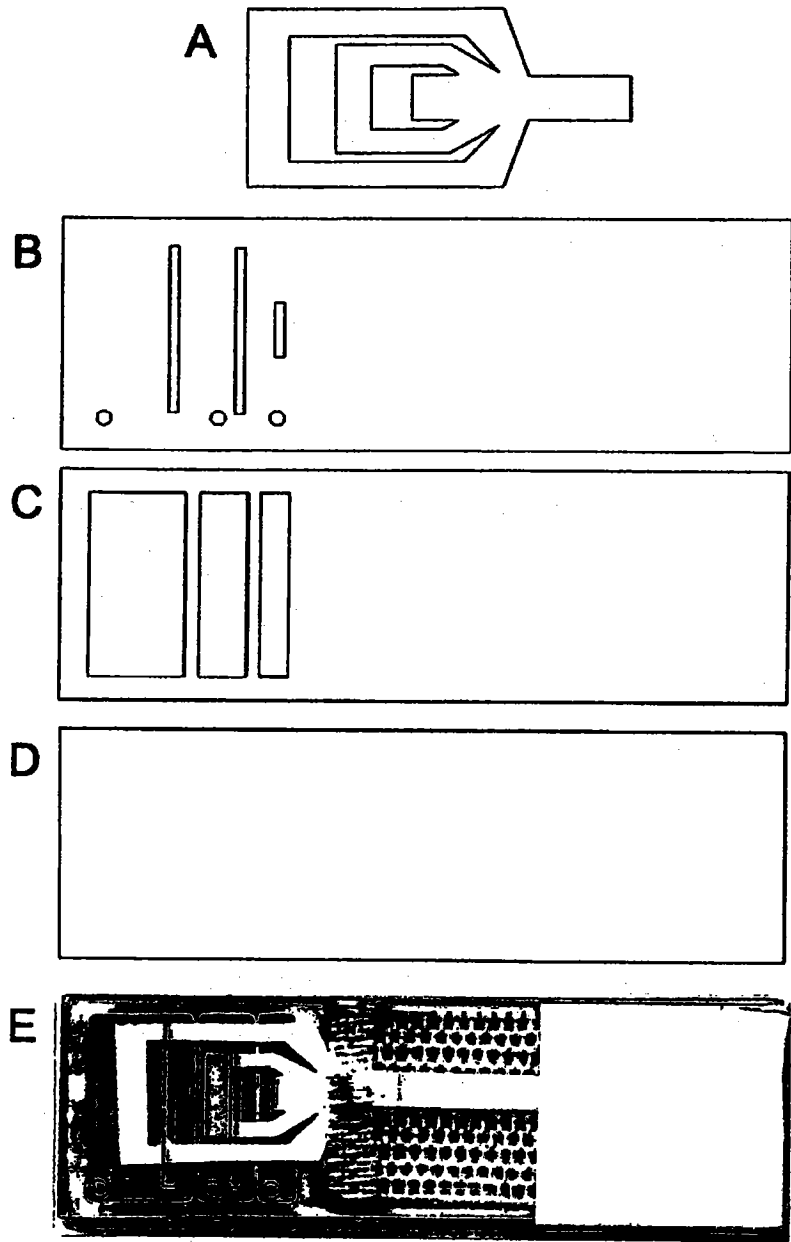


图14

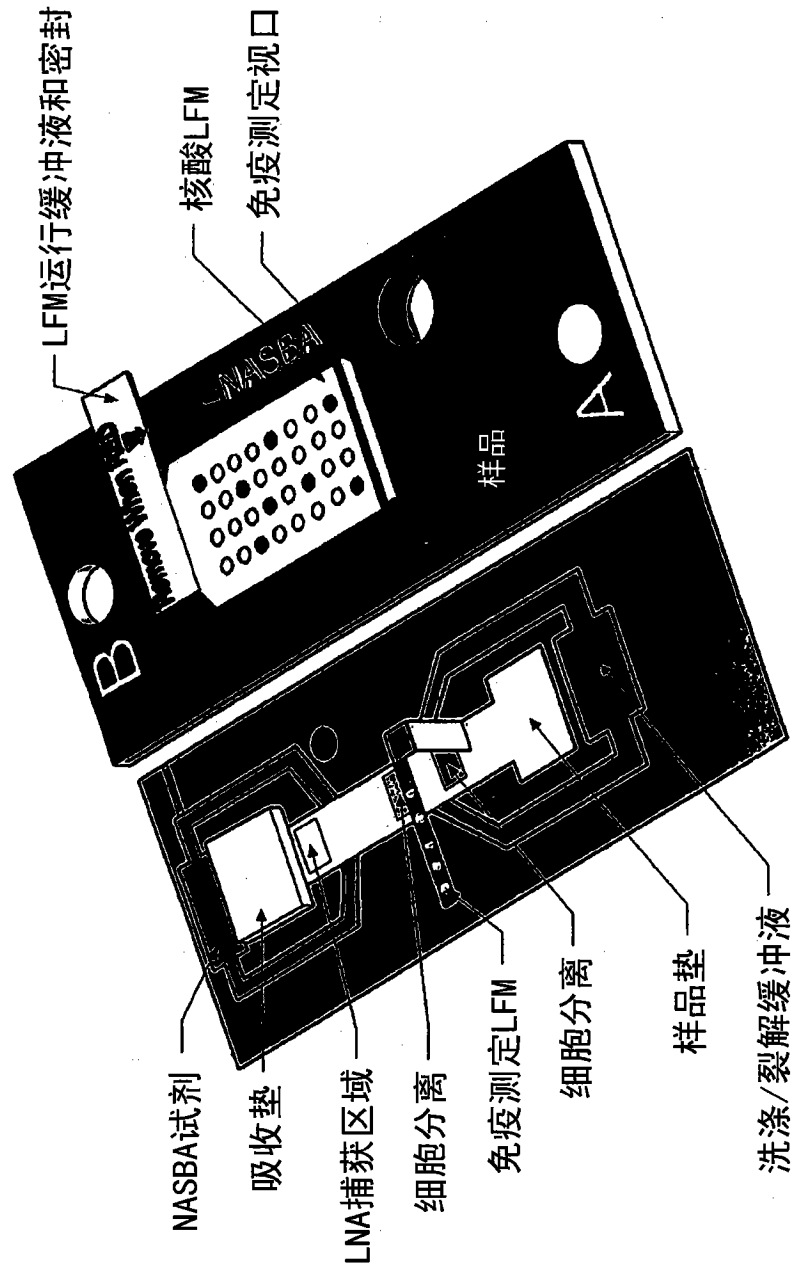


图15

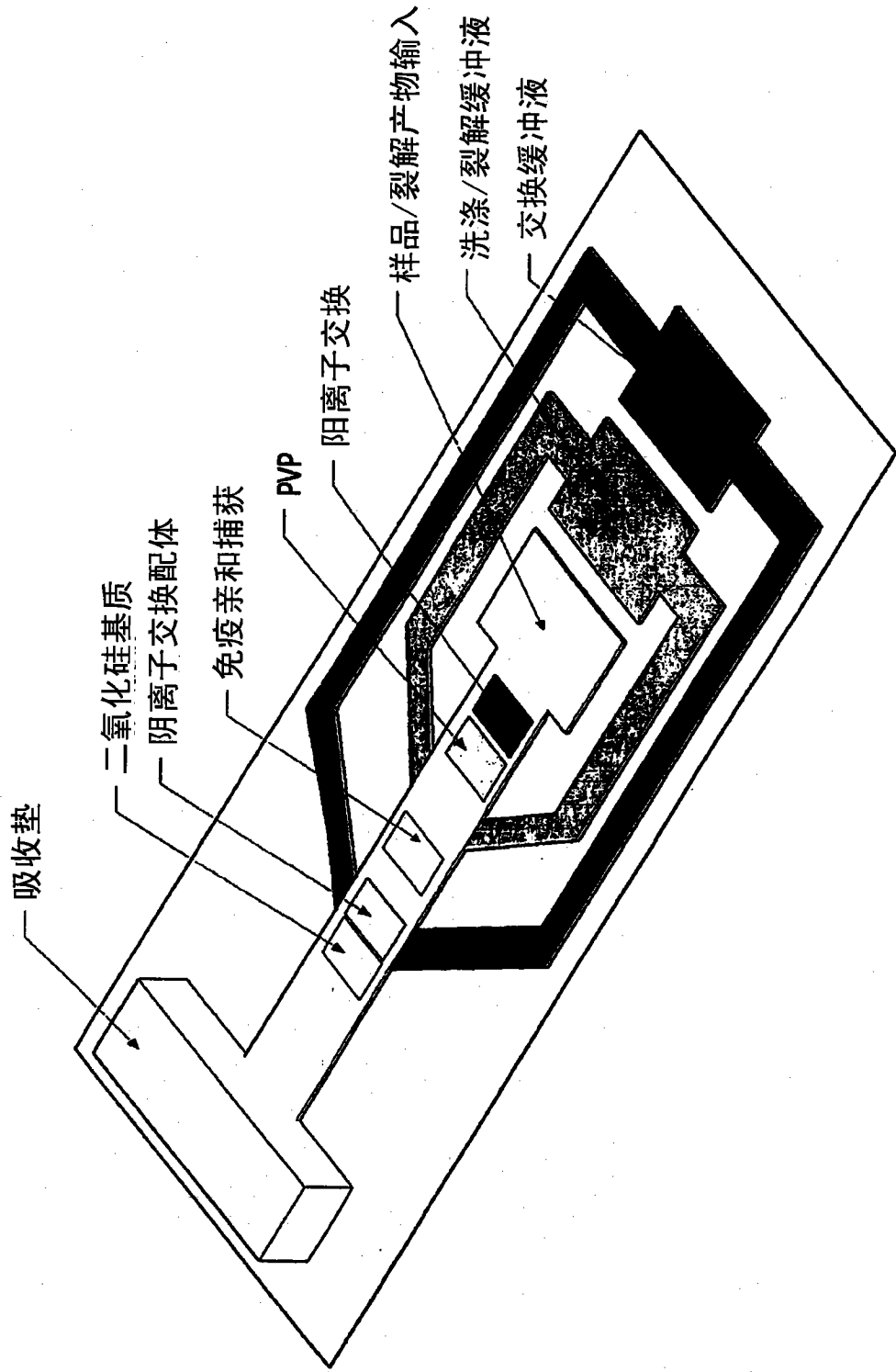


图16

专利名称(译)	基于高度简化的侧向流动的核酸样品制备和被动流体流动控制		
公开(公告)号	CN102084238B	公开(公告)日	2016-06-01
申请号	CN200980125614.X	申请日	2009-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司		
[标]发明人	罗伯特B凯瑞		
发明人	罗伯特·B·凯瑞		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12N15/101 G01N1/405 G01N33/558		
代理人(译)	吴小明		
审查员(译)	王晓媛		
优先权	61/126645 2008-05-05 US		
其他公开文献	CN102084238A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供高度简化的侧向流动色谱核酸样品制备方法、装置和集成系统，用于有效地浓缩痕量样品并且除去核酸扩增抑制剂。本发明还提供使用所述侧向流动装置的聚乙烯吡咯烷酮处理的元件捕获并且减少核酸扩增反应抑制剂诸如腐殖酸的方法。本发明进一步提供在侧向流动测定中使用的被动流体控制方法和系统。

