



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522294 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 16

(21) 申请号 200780029232. 8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2007. 06. 21

B01F 13/00(2006. 01)

B01F 13/08(2006. 01)

(30) 优先权数据

PCT/IB2006/052005 2006. 06. 21 WO

PCT/IB2006/054182 2006. 11. 09 WO

(56) 对比文件

CN 2101524 U, 1992. 04. 15, 全文.

DE 4329329 A1, 1995. 03. 02, 全文.

EP 1658890 A2, 2006. 05. 24, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009. 02. 06

审查员 马蔚钧

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2007/052410 2007. 06. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02008/010111 EN 2008. 01. 24

(73) 专利权人 斯彼诺米克斯公司

地址 瑞士洛桑

(72) 发明人 埃玛·瑞达

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 王漪 郑霞

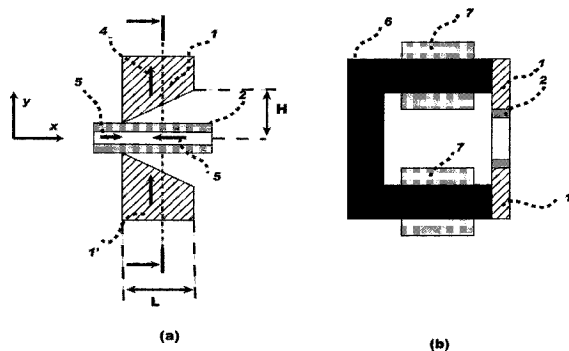
权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 11 页

(54) 发明名称

一种用于处理和混合液体介质中的磁性颗粒的设备和方法

(57) 摘要

一种用于处理和混合周围液体介质中的磁性颗粒 (3) 的设备, 其包括: 至少一对磁极 (1, 1'), 其位于间隙的两侧, 面向彼此, 面向彼此的磁极从间隙的窄端发散到间隙的宽端, 磁极 (1, 1') 形成电磁路的一部分, 并布置成提供间隙区域中的磁场梯度; 以及反应室 (2), 其为用于包含悬浮液中的所述磁性颗粒的流体网络的一部分, 并置于所述电磁极 (1, 1') 的间隙中。反应室 (2) 优选地具有带有共发散地布置在磁极之间的发散间隙中的发散腔的至少一个部分。



1. 一种用于混合周围液体介质中的磁性颗粒以及从液体介质分离磁性颗粒的设备,其包括:

(a) 至少一对磁极,其位于间隙的两侧,面向彼此,面向彼此的磁极从间隙的窄端发散到间隙的宽端,具有间隙的磁极是电磁路的一部分,布置成在所述间隙区域内提供磁场梯度;

(b) 反应室,其为包含悬浮液中的所述磁性颗粒的微流体网络的一部分,并被置于所述电磁极的间隙中,其中所述反应室具有用于将液体介质引入所述反应室的进口端以及从所述反应室移除液体介质的出口端,所述反应室在其端部之间沿着所述间隙延伸,使得所述反应室的端部相应于所述间隙的窄端和宽端。

2. 如权利要求 1 所述的设备,其中每个磁极用具有随时间变化的极性和振幅的磁场序列激励,以引起越过所述反应室的磁场梯度最大值的位置的时间变化,从而在使用中使颗粒作为颗粒雾而处于平移和旋转运动中,实质上覆盖整个反应室的体积。

3. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述反应室是微通道。

4. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述反应室是腔,所述腔具有在所述磁极之间的发散间隙中共发散地布置的至少一个发散部分,且所述反应室的窄端和宽端分别连接到用于将液体传送到所述反应室以及从所述反应室传送出来的进口和出口。

5. 如权利要求 4 所述的设备,其中宽端的深度 (H) 与所述反应室的发散部分的长度 (L) 之比在 0.1 到 1 之间。

6. 如权利要求 2 所述的设备,其中时间变化的磁场序列具有大致矩形、正弦曲线、锯齿形、不对称三角形或对称三角形的形式;或所述形式的任何组合。

7. 如权利要求 6 所述的设备,其中磁场的脉动或振荡频率在每秒 0.1 到 1000 周期之间。

8. 如权利要求 7 所述的设备,其中磁场的脉动或振荡频率在每秒 1 到 500 周期之间。

9. 如权利要求 1 所述的设备,其中使用中的颗粒是未磁化的磁性颗粒,所述未磁化的磁性颗粒响应于外部磁场而发展特定的铁磁磁滞。

10. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述颗粒具有表面涂层,所述表面涂层设计成通过流体流选择性地使所述颗粒与所述反应室中携带的至少一个目标分子结合。

11. 如权利要求 9 所述的设备,其中所述颗粒具有表面涂层,所述表面涂层设计成通过流体流选择性地使所述颗粒与所述反应室中携带的至少一个目标分子结合。

12. 如权利要求 10 所述的设备,其中流体作为振荡流或脉冲流流经所述反应室。

13. 如权利要求 11 所述的设备,其中流体作为振荡流或脉冲流流经所述反应室。

14. 一种根据前述权利要求中任一项所述的用于混合周围液体介质中的磁性颗粒以及从液体介质分离磁性颗粒的设备,其包括:

(a) 磁极的四极配置,所述四极配置包括:(i) 第一对磁极,其面向彼此,形成发散间隙;以及(ii) 第二对磁极,其面向彼此,并形成发散间隙,且所述第一对磁极和第二对磁极的发散间隙的宽端面向彼此;以及

(b) 反应室,其为流体网络的一部分,具有带有发散部分的腔,且所述发散部分的宽端面向彼此;其中

(c) 所述反应室的发散部分共发散地布置在所述磁极之间的发散间隙中。

15. 一种微流体芯片,其包括:

(a) 反应室,其用于包含悬浮液中的颗粒,所述反应室为微流体网络的一部分,具有带有发散-收敛部分的至少一个腔;

(b) 开口,其置于所述反应室的两侧上以接纳作为外部磁路的一部分的磁极,且当被接纳在所述开口中时,所述磁极以与所述反应室的发散-收敛部分共发散/共收敛的方式被几何地布置;

(c) 微流体通道,其位于所述芯片中,提供位于所述反应室的相对侧上的进口-出口。

## 一种用于处理和混合液体介质中的磁性颗粒的设备和方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一种处理和混合反应室内的磁性颗粒的系统,该反应室是流体或微流体平台 (microfluidic platform) 的一部分。更具体地说,本发明涉及一种以改善颗粒与周围液体介质的混合的方式来处理磁性颗粒的方法,且其中液体在流体平台中被自动处理。进一步,本发明涉及一种使用活性生物化学表面磁性颗粒来对包含特定的生物或化学物质的测试样品进行化验的方法,且其中颗粒是按照前述系统和方法来处理的。

### [0002] 相关技术的描述

[0003] 现在,磁性颗粒(珠)是生物化学化验和诊断中的标准技术 (standard technology)。磁性颗粒技术确实是坚实的技术,其允许实现高性能(敏感性和准确性),并且还展示了化验实验方案容易自动化的可能性。对于很多应用,磁性颗粒的表面涂有适当的配体或受体,例如抗体、凝集素、寡核苷酸或其它生物活性分子 (bioreactive molecule),其可选择性地使混合物中的目标物质与其它物质结合。在美国专利 4,230,685、美国专利 4,554,088 和美国专利 4,628,037 中公开了小磁性颗粒或珠的例子。

[0004] 磁性颗粒生物分离和处理技术 (magnetic particle bio-separation and handling technology) 中的一个关键要素是有效的混合,以提高目标物质和颗粒表面之间的反应率。实际上,对于任何基于表面的化验,反应强烈地由自然扩散过程限制,强大的操纵和混合对促进配体和目标物质之间的亲和结合反应 (affinity binding reaction) 是必要的。

[0005] 在测试介质中,磁性颗粒混合装置 (magnetic particle mixing apparatus) 的典型例子在美国专利 6,231,760 中公开,并可通过以 MixSep™ 系统名义的 Sigris Research Inc 在市场上买到。在本专利和系统中,适当容器中的测试介质与磁性颗粒被置于由外部磁体所产生的磁场梯度 (magnetic field gradient) 中。混合概念是以磁体相对于静止容器的运动或容器相对于使用机械装置的静止磁体的运动为基础的,因此引起容器内磁梯度位置 (magnetic gradient position) 的“相对位移”。该磁场梯度位移又引起磁性颗粒随着磁体(磁场梯度)位置的变化而连续移动,从而实现混合。然而,用这种方法,磁场梯度将颗粒吸引和限制在接近于容器的壁的腔区域中(见 [http://www.sigris.com/mixsep\\_technology.html](http://www.sigris.com/mixsep_technology.html))。在这样的条件下,颗粒和测试介质之间的接触被限制到所述腔空间中,这减小了混合效率。虽然磁体的“机械运动”被宣称为混合手段 (mixing means),但是还描述了通过布置在容器周围的电磁体的连续激励 (sequential actuation) 来产生颗粒的角运动的可能性。然而,虽然与永久磁体相比,电磁体能提供低得多的磁场,但是如所述,相邻电磁体之间的磁耦合强烈地排斥容器外部的磁通量,从而导致磁场强度的进一步减小和腔效应的增强。在这样的条件下,颗粒搅拌(运动)和混合将被强烈地改变,从而导致颗粒缓慢移动,大部分聚集在接近壁边界的区域。

[0006] 在相同的精神内,在美国专利 6,764,859 中,基于容器和磁体的介入阵列几何结构 (intervening array geometry) 之间的相对“机械”运动公开了一种在容器中混合磁性颗粒的方法。在这样的配置下,相邻磁体具有相反极性,这引起在容器和两个相邻磁体之间

的相对介入运动期间磁场极性的变化。实际上,在这样的条件下,颗粒可被移动,同时彼此相对地分离,这可能影响混合。然而,在此方法中,当人们考虑颗粒处理过程的整个持续时间时,在此期间颗粒彼此相对分离的时间相对较短。结果,几个混合周期必须确保有效的混合。而且,在混合过程期间,颗粒与测试试管中的样品体积不均匀地接触,这又强烈地限制混合效率。当样品体积大时,这个问题更显著。

[0007] 因此,当这些机械混合方法与“测试试管的手工摇动”比较时,反应时间和性能实质上相似,如果不是更低,指示扩散仍然是重要的限制因素。

[0008] 用于磁性颗粒分离和重新悬浮的其它方面在 E. P 专利 0, 504, 192 中公开。该专利公开了布置成在室的壁处彼此相对的两个磁场源(电磁体)的连续激励的使用。所提出的所述电磁体的激励概念(actuation concept)是以通过“二进制”(即,开和关)或“模拟”的电磁体的连续通电(sequential energizing)(激励)为基础的,其中第一电磁体被逐渐完全通电,并且接着使其功率减小,同时下一电磁体被逐渐通电,等等。通过该激励,颗粒将被移动并被拉到反应室体积,从而重新悬浮。虽然使用具有“连续”激励的(至少)两个电磁体的概念在概念上是用于从聚合体(aggregate)重新悬浮颗粒的明显方式,但是颗粒在其“运动”期间由于在所施加的磁场下其偶极相互作用而保持大部分成块。在移动“超顺磁(super-paramagnetic)”颗粒以占据室体积之后,充分保证室中“均匀”的重新悬浮的唯一方法是彻底移除外部磁场并保持对布朗运动和热扰动的隔离。此外,本申请公开,以足够快的速率交替地使两个电磁体通电和断电能使颗粒悬浮在室的中央。该过程将颗粒的运动限制到相对小的距离,从而明显减小颗粒和周围液体介质之间的混合效率。

[0009] 通常,在目前工艺水平的主要基于“将磁体引到测试试管附近”的概念的磁性颗粒技术的有限混合能力之外,磁性颗粒化验程序的整体化和自动化非常复杂,从而使庞大的机器人系统成为必要。当化验程序变得越来越复杂时,这些限制全都变得更加关键。

[0010] 基于微流体的技术(microfluidic based technology)现在被认为是具有巨大潜力的新兴技术,其在使用方便和小型化自动系统中可导致复杂的生物化学化验程序较容易整体化。磁性颗粒技术与微流体相结合当然非常重要,因为不同试剂(被微流体允许)的精确控制以及生物物种的处理及其反应(被磁性颗粒允许)将在单个系统内结合在一起。

[0011] 在 2002 年关于微电子机械系统的第十五届 IEEE 国际会议的程序中, Suzuki, H 在公布“magnetic force driven chaotic micro-mixer”中教导了在微流体通道(microfluidic channel)中混合磁性颗粒的一种方法。该方法在于在微流体通道中被注入悬浮液中的磁性颗粒的流动混合(flow mixing),且其中与周围介质的混合被由嵌入式微电磁体(embedded micro-electromagnet)所产生的沿着流动路径的磁场保证。由微电磁体引起的颗粒上的磁力连同微通道中的流驱动力的组合引起混杂状态(chaotic regime),并从而混合。最近在美国专利申请号 2006/140, 051 中公开了类似的概念,其中布置在侧壁上的电磁体在相对于流方向的预定方向上产生磁场。通过在连续操作中关闭/开启电磁体,可产生旋转的磁力,从而导致流所携带的颗粒的混合。该“流入混合(in flow mixing)”方法的主要限制是,可与颗粒混合的测试介质的体积非常小,且反应时间非常短,相当大地限制了其适用性的情况。

[0012] 为了克服“流入混合方法”的限制,解决方案在于使用磁场梯度将颗粒保持在流体通道或室的给定位置,同时使用流将测试介质注入通过被保持的磁性颗粒。在美国专

利申请号 2005/032, 051 和 2004/166, 547 中公开了该方法, 其中保持在流微通道 (flow microchannel) 中的颗粒用作对免疫测定程序 (immunoassay procedure) 的载体。以相同的方式, 在 *Analytical Chemistry*, 71, 1999 的 Z. Hugh Fan 等人的公布“Dynamics DNA hybridization on a Chip Using Paramagnetic Beads”中描述了适用于 DNA 杂交和检测化验的流通概念 (flow-through concept)。然而, 所描述的流通方法具有严重的物理限制的缺点, 因为为了在具有连续流体处理的环境中被处理, 颗粒必须连续暴露给磁场。在这样的条件下, 颗粒将粘在一起并成块, 从而丧失其主要优点: 与流体流有效接触的颗粒表面急剧减小, 这将严重损害化验性能。

[0013] 在美国专利申请 2005/208, 464 中公开了在流通方法中对磁性颗粒的成块问题的解决方案。在该方法中, 颗粒保持在流通道的一部分中, 以形成实质上均质地覆盖流通道截面的一种过滤器。为了获得该过滤器, 使用时间变化的场 (振幅、频率和极性) 来处理磁性颗粒, 以控制颗粒成块。在 *Analytical Chemistry*, 76, 2004 的 A. Rida 等人的来自同一作者群的公布“Manipulation of Self-Assembled Structures of Magnetic Beads for Microfluidic Mixing and Assaying”中展示了用于液体的微流体混合的这种方法的效率。即使在微流体环境中磁性颗粒处理和混合中展示了重要发展, 然而在美国专利申请 2005/208, 464 中公开的方法具有很多实际限制的缺点。首先, 当颗粒保持静止并被固定在流通小室 (flow-through cell) 的窄区域 (narrow segment) 中时, 颗粒和目标物质之间的接触被限制到该狭窄区域并持续非常短的时间, 这实际上使这样的过程难以建立。其次, 该方法特别适合于在微流体环境中在流通条件下处理和混合磁性颗粒, 这使它不完全适合于不同的化验条件。

[0014] 可应用的已知程序和方法具有缺点, 包括对在各种环境中以更集中于微流体的方式处理和混合磁性颗粒的要求, 以及各种过程限制、限制因素和低效率。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供了用于在流体环境中且更具体地说在微流体环境中处理和有效地混合磁性颗粒的设备和方法。在本上下文中“混合”特别意味着以非常有效的方法使大颗粒表面与周围液体介质接触, 以使得能够实现: (1) 颗粒与某个目标分子的有效结合, 以及 (2) 清洗、分离、洗提和检测在来自残留液体介质的颗粒上捕获的目标的进一步可能性。

[0017] 所提出的混合机制提供了每体积单位颗粒的活性表面的相当大的和不间断的增加, 从而导致颗粒的这个大表面和目标物质之间的增强的接触。进一步地, 所提出的磁性颗粒处理过程能有利地确保均匀混合, 在小部分时间内实质上覆盖整个反应体积, 从而允许更多的样品体积与颗粒表面有效和快速地接触。而且, 颗粒在其处理期间处于不间断的有效运动中, 从而覆盖整个反应室体积, 这是增强颗粒混合的关键。

[0018] 此外, 本发明提供了新的设备和方法, 其实际上允许将复杂的化验程序整合到紧凑且易于使用的系统中, 该系统可在流通下, 或有利地在非流通条件下操作。

[0019] 本发明的主要方面涉及用于处理和混合磁性颗粒的设备和方法, 特别是在微流体环境中。

[0020] 而且, 本发明公开了微流体结构和组成, 其尤其结合涉及用于处理和混合磁性颗粒的所述设备和方法的技术方面。这个目的是用以下微流体芯片达到的, 所述微流体芯片包括:

[0021] (a) 反应室,其用于包含悬浮液中的颗粒,所述反应室为微流体网络的一部分,具有带有发散-收敛部分的至少一个腔;

[0022] (b) 开口,其置于所述反应室的两侧上以接纳作为外部磁路的一部分的磁极,且当被接纳在所述开口中时,所述磁极以与所述反应室的发散-收敛部分共发散/共收敛的方式被几何地布置;

[0023] (c) 微流体通道,其位于所述芯片中,提供位于所述反应室的相对侧上的进口-出口。

[0024] 不同的实施方式在下文中被陈述,且用于处理和混合磁性颗粒的设备的另一方面在下文中被陈述。

[0025] 根据本发明的一个实施方式,用于混合周围液体介质中的磁性颗粒以及从液体介质分离磁性颗粒的设备包括:

[0026] (a) 至少一对磁极,其位于间隙的两侧,面向彼此,面向彼此的磁极从间隙的窄端发散到间隙的宽端,另外,具有间隙的磁极是优选闭合的电磁路的一部分,布置成在所述间隙区域内提供磁场梯度;

[0027] (b) 反应室,其为包含悬浮液中的所述磁性颗粒的微流体网络 (microfluidic network) 的一部分,并被置于所述电磁极的间隙中,其中反应室具有用于将液体介质引入反应室以及从反应室移除液体介质的进口/出口端,反应室在其端部之间沿着所述间隙延伸,使得反应室的端部相应于间隙的窄端和宽端;

[0028] (c) 其中优选地,每个磁极用具有随时间变化的极性和振幅的磁场序列 (magnetic field sequence) 激励,以引起越过反应室的磁场梯度最大值的位置的时间变化,从而在使用中使颗粒作为颗粒雾 (fog of particle) 而处于相对的平移和旋转运动中,覆盖整个反应室体积。

[0029] 在该设备中,时间变化的磁场序列可具有大致矩形、正弦曲线、锯齿形、不对称三角形或对称三角形的形式;或所述形式的任何组合。在该设备中,磁场的脉动或振荡频率可在每秒 0.1 到 1000 周期之间,且优选地可在每秒 1 到 500 周期之间。

[0030] 在该设备中,所述颗粒可具有表面涂层,所述表面涂层设计成通过流体流选择性地使所述颗粒与所述反应室中携带的至少一个目标分子结合。在该设备中,流体可作为振荡流或脉冲流流经所述反应室。

[0031] 该设备可包括:

[0032] (a) 磁极的四极配置,所述四极配置包括:(i) 第一对磁极,其面向彼此,形成发散间隙;以及(ii) 第二对磁极,其面向彼此,并形成发散间隙,且所述第一对磁极和第二对磁极的发散间隙的宽端面向彼此;以及

[0033] (b) 反应室,其为流体网络的一部分,具有带有发散部分的腔,且所述发散部分的宽端面向彼此;其中

[0034] (c) 所述反应室的发散部分共发散地布置在所述磁极之间的发散间隙中。

[0035] 根据本发明的该设备的一个关键要素是在这里通过通道尺寸(收敛部分)的横向增加或通道尺寸(发散部分)的减小来表示的反应室几何结构的变化。通道几何结构的这样的变化将引起越过反应室截面的流速变化,这是所公开的混合机制的关键因素。事实上,与其中流仅在垂直于主通道截面的方向上发展的具有均匀几何结构的通道相反,微通道几

何结构的变化将引起横向速率梯度,导致更有效的流混合。

[0036] 因此,可变几何结构的反应室被置于具有在与反应室的几何结构相同的方向上变化的形状的磁极之间的空气间隙中。反应室的发散/收敛部分被置于位于间隙两侧的面向彼此的至少一对磁极的空气间隙中,且其中所述磁极与反应室的发散/收敛部分一起共收敛/共发散地布置。磁极的收敛/发散布置将引起越过由磁极所定界的空气间隙区域的磁场的变化,从而产生覆盖置于所述磁极的空气间隙中的反应室的整个体积的磁场梯度。如此产生的磁场梯度用作用于反应室中的磁性颗粒处理和混合的驱动力。

[0037] 通过所述反应室/磁极几何结构获得的期望效果是,磁场梯度变化分布相应于与反应室中的流速梯度相同的变化分布。流速/磁场梯度(力)的这样的“共变(co-variation)”允许:(1)在流体流条件下保持和分离反应室中的所述磁性颗粒,以及(2)在混合条件下(以及因此更多的被控制和有效的混合)获得磁性颗粒与周围液体介质的更多的均匀性。

[0038] 本发明的另一关键方面涉及磁极激励机制,其包括:

[0039] (1)从电磁极应用具有随时间变化的极性和强度的磁场序列;所述变化的磁场序列(varying magnetic field sequence)能有效地制止或抑制颗粒聚集,并能有效地将悬浮液中的颗粒作为颗粒雾而维持在相对动态运动中;以及

[0040] (2)按序列(in a sequence)合并来自不同磁极的磁场,以引起颗粒雾越过反应室的移位,由此,颗粒雾实质上准即时地(quasi-instantaneously)或在一段时间内占据整个反应室体积。

[0041] 该方法还可包括以下步骤:

[0042] (a)按序列合并来自不同磁极的磁场,以分离或限制颗粒,使得颗粒占据所述反应室的体积中的子体积;

[0043] (b)将确定体积的样品注入到所述反应室中;

[0044] (c)均匀地混合颗粒,以实质上在确定的时间段内覆盖所述反应室;

[0045] (d)以连续方式重复步骤(a)-(c),直到全部样品体积与磁性颗粒混合。

[0046] 已发现,磁极激励的该机制导致越过反应室体积的磁场梯度最大值的位置(移位)的连续时间变化,从而导致颗粒处于可实质上覆盖整个反应室体积的不间断的相对平移和旋转运动。

[0047] 此外,通过根据本发明的激励机制获得的期望效果是,颗粒在其运动期间不是作为紧凑的聚合物(compact aggregate)移动,而更确切地是,它们是作为颗粒雾移动,从而强烈地增强了颗粒表面和周围液体介质之间的接触。

[0048] 此外,通过根据本发明的激励机制获得的期望效果是,颗粒混合将实质上覆盖整个反应室体积,且不被限制到如在所公开的现有技术概念中的窄区域。因此,该磁性颗粒处理过程能有利地确保均匀混合,从而允许更多的液体体积与颗粒表面有效地接触。

[0049] 此外,通过根据本发明的激励机制获得的期望效果是,不仅能够选择磁场序列以便均匀地混合颗粒,而且还能够分离或限制颗粒,以使颗粒在反应室的外边界处占据反应室体积中的子体积(sub-volume)。例如,人们可应用第一磁场序列来均匀地移动,并因此实质上在整个反应室体积中混合颗粒;并且接着应用特别选择磁场梯度方向的第二磁场序列,致使颗粒被拉到由所应用的磁场梯度的方向确定的反应室的子体积。控制颗粒的灵活

性有利地是重要的,因为它允许处理和控制相应于化验过程的颗粒状态。

[0050] 本发明的另一特征是,在其不间断的运动(移动)期间,颗粒聚合体的尺寸可主要由磁场极性变化的“频率”控制,而混合的均匀性由磁场振幅控制。因此,磁场(梯度)振幅可用作转换参数,以例如在反应室的实质上整个体积内均匀地混合颗粒或将其拉(分离)到反应室的外边界。

[0051] 此外,通过根据本发明的设备和激励机制获得的期望效果是颗粒的非常快的处理。例如,从其中首先使用特定的第一激励序列将颗粒分离到反应室的外边界的构型开始,小部分时间(1秒或更少)足以使用第二激励序列将颗粒置于均匀的混合构型中。然后可再次通过应用第一激励序列在小部分时间内将颗粒拉到反应室的外边界。此快速的处理过程可甚至在合成的高度粘性介质例如血液裂解液(blood lysate)中达到。

[0052] 为了达到期望的效果,使用中的磁性颗粒优选地是最初未磁化的磁性颗粒,其响应于外部磁场而发展特定的铁磁磁滞(ferromagnetic hysteresis)。更具体地说,颗粒具有在 2000e 到 10000e 之间的矫顽场。

[0053] 为了达到期望的效果,时间变化的磁场序列优选地具有正弦曲线、锯齿形、不对称三角形或对称三角形的形式,或这些形式的任何组合。

[0054] 根据本发明,微流体芯片包括:

[0055] (a) 反应室,其为流体网络的一部分,具有带有发散-收敛部分的至少一个腔,

[0056] (b) 开口,其置于反应室的两侧上,以接纳作为外部磁路的部分的磁极,且其中

[0057] (c) 磁极以与反应室的发散-收敛部分一起共发散/共收敛的方式被几何地布置。

[0058] 根据前面描述的方面和效果,本发明公开了在微流体环境中混合磁性颗粒与反应室中的周围介质的方法,该反应室作为微流体网络的一部分,其中至少一对电磁极位于反应室的两侧,面向彼此,所述方法包括:

[0059] (a) 从每一个电磁极应用具有随时间变化的极性和强度的磁场序列;

[0060] (b) 合并来自每个磁极的磁场,以引起越过整个反应室体积的磁场梯度最大值的位置的连续时间变化;以及

[0061] (c) 使颗粒均匀地分布,并使颗粒作为颗粒雾而在反应室体积的相当大一部分上动态地移动。

[0062] 关于本发明的最终目的,使用中的颗粒具有表面涂层,该表面涂层设计成允许在反应室内与至少一个目标分子的亲和力识别(affinity recognition)或与周围液体介质的反应。所述目标分子或试剂由流运送到反应室。当合并在一起时,本发明的所有方面允许用使用磁性颗粒作为载体的复合生物化学、合成和分析程序的增强性能来处理。典型例子但不限于这样程序的是,基于酶信号放大方法(enzymatic signal amplification methodology)例如 chemiluminescence、NASBA、TMA 或 PCR 的酶链接化验(enzymes-linked assay)、蛋白质和核酸萃取或检测方法。

[0063] 附图简述

[0064] 本发明的目的和特征详细阐述在所附权利要求中。本发明关于其组织和处理方式连同进一步的目标和优点可通过参考下列描述、结合附图来更好地理解,其中

[0065] 图 1(a) 和 (b) 是如现有技术中描述的流通磁性颗粒处理方法的概念的示意图。

[0066] 图 2(a) 示出本发明一个优选实施方式的示意图,其包括越过间隙面向彼此的一

对“发散”磁极和置于该间隙中的反应室（通道）。图 2(b) 是图 2(a) 的截面图，特别地示出提供反应室中的磁场的电磁路。

[0067] 图 3(a) 示出本发明另一优选实施方式的示意图，其特别包括一对“发散”磁极和具有与间隙几何结构共发散地布置的发散腔的反应室。图 3(b) 示出沿着所述磁极的轴的磁场变化分布。

[0068] 图 4(a) 和 (b) 示出由发散的腔几何结构引起的流速分布和变化。

[0069] 图 5(a) 和 (b) 是根据本发明优选实施方式的磁性颗粒处理和混合的示意图，该实施方式特别包括磁极的极性方向的变化，其感应的磁场具有轴向移动颗粒的效果。

[0070] 图 6 示出本发明又一优选实施方式的示意图，其包括与反应室腔共发散 / 共收敛的磁极的四极配置。

[0071] 图 7(a) 到 (d) 示意性示出图 6 的优选实施方式，越过反应室体积的颗粒的相对位置和运动作为使用具有随时间变化的极性和振幅的磁场的电磁极的激励序列的结果。

[0072] 图 8 示意性示出使用根据本发明的四极实施方式获得的期望效果，其中颗粒混合和运动均匀地覆盖整个反应室体积。

[0073] 图 9(a) 和 (b) 示出根据本发明优选实施方式的电磁路的透视图。

[0074] 图 10 示出根据本发明优选实施方式的微流体芯片的布局。

[0075] 图 11(a) 到 (c) 示意性示出使用本发明的混合方法和设备执行一般化验和特别免疫测定的过程。

[0076] 图 12 示意性示出在“脉冲注入 / 混合”模式中处理和混合磁性颗粒与周围介质的另一实施方式。

[0077] 图 13 示出在“旋转的磁场”下的磁性颗粒的不同行为。

[0078] 优选实施方式的详细描述

[0079] 本发明的主要可达到的效果是对磁性颗粒进行有效的控制，从而允许增强地和均匀地与周围介质混合。特别是，磁性颗粒的混合在反应室中实现，该反应室是微流体网络的一部分，且其中颗粒是使用具有特殊配置和几何结构的外部磁极处理的。相应地，使用液体流将不同的试剂引入反应室，且磁极被特别激励，以控制使用中反应室内部的磁性颗粒。

[0080] 通常，本发明的微流体环境涉及一般规模化地设计成适合于分析优选地在  $0.1 \mu\text{l}$  到  $500 \mu\text{l}$  范围内的微体积的设备。然而，在本发明的主要应用之一中，大样品用于将设备中的特定生物分子浓缩到小体积，用于以后的分析。微尺度的流通道和井具有大约  $0.05\text{--}1\text{mm}$  的优选深度和宽度。如这里使用的，作为微流体网络的一部分的“反应室”指具有腔的室，该腔具有在  $0.1 \mu\text{l}$  到  $500 \mu\text{l}$  的范围内和优选地在  $10 \mu\text{l}$  到  $100 \mu\text{l}$  的范围内体积。然而，对于很多应用，可使用在毫米规模上的较大的“中等尺度”尺寸。类似地，底物中的室常常具有比微通道更大的在  $1\text{--}10\text{mm}$  宽度和  $1\text{--}5\text{mm}$  深度规模上的尺寸。

[0081] 为了说明本发明的主要优点，图 1 示意性示出如现有技术中所述的流通磁性颗粒处理的概念。实际上，在现有技术中，颗粒 (3) 保持固定在由磁极末端 (magnetic pole tip) (1) 和 (1') 定界的流通小室 (2) 的狭窄区域中。如在美国专利申请 2004/166,547 中描述的，当静电场被施加时，颗粒可部分地覆盖流通小室的截面（图 1(a)），或如在美国专利申请 2005/208,464 中所述的，当时间变化的磁场被施加时，颗粒均匀地覆盖流通小室的截面（图 1(b)）。用于产生磁场梯度的磁极末端配置将颗粒限制在流通小室的静止固定

的且狭窄的区域中,这将颗粒和目标分子之间的接触限制到该狭窄区域并持续非常短的时间。

[0082] 为了克服现有技术的限制,公开了一种新的磁设备 (magnetic device) 和磁极几何结构。因此,如图 2 所示,用于处理和混合周围液体介质中的磁性颗粒的设备包括:(i) 在间隙两侧面向彼此的至少一对磁极 (1)-(1'),面向彼此的磁极从间隙的窄端发散到间隙的宽端。磁极形成电磁路的一部分,并被布置成提供间隙区域中的磁场梯度 (5)。在该间隙区域中放置有作为流体网络的一部分的管状反应室 (2),且在使用中,磁性颗粒将在管状反应室 (2) 中被处理。磁路主要由磁芯 (6) 和线圈 (7) 组成,在提供有电流时,磁芯 (6) 和线圈 (7) 通过磁极 (1)、(1') 在间隙区域中产生磁场。而且,优选地,通过使用两个可独立激励的线圈 (7),每个磁极 (1) 和 (1') 可被独立于彼此地电磁激励。

[0083] 由所述磁极几何结构获得的效果是,磁场梯度不限于狭窄区域,而是将覆盖沿着所述磁极空气间隙中的轴向 X 方向延伸的整个空间区域。

[0084] 为了增强混合效果,优选地,置于空气间隙区域中的反应室 (2) 具有在与磁极的几何结构相同的方向上变化的腔形状。如图 3(a) 中示意性示出的,不是有具有如图 2(a) 的均匀几何结构(均匀截面)的流通道,反应室 (2) 优选地具有实质上在磁极之间的发散间隙中共发散的可变几何结构。由于反应室几何结构的这样的变化,将引起横向速率梯度 (8),从而导致更有效的流混合(见图 4)。

[0085] 在操作中,由磁极 (1)-(1') 产生的空间变化的磁场提供磁场梯度,并且因而提供沿着 X 方向的磁力 (5),磁力 (5) 用于在流体的流动期间将磁性颗粒 (9) 保持在反应室 (2) 中(见图 5)。为了能够将颗粒 (9) 保持在反应室 (2) 中,所产生的作用在颗粒上的磁力 (5) 必须大于趋向于将颗粒驱赶开的流动曳力 (flow drag force)。而且,因为磁力 (5) 和流动曳力沿着 X 方向以相同的方式减小,所以可以控制所产生的磁力 (5),使得它实质上等于流动曳力。当被引入到反应室 (2) 中并受到静态磁场 (5) 时,磁性颗粒 (9) 趋向于形成沿着磁场流线的磁链 (magnetic chain)。由于在反应室 (2) 中产生的磁场梯度,磁性颗粒链将接合形成强烈聚合的链状结构。优选地,所使用的磁性颗粒 (9) 的数量使得磁性聚合结构 (magnetic aggregated structure) 主要位于反应室 (2) 的圆锥形部分中的磁极附近,如在图 5(a) 的左边所示的。接着,时间变化的磁场作为交变磁场被应用,以使用穿过这样的磁性颗粒结构的流体流以预定的流速(即,稍微增加的,按需要)分解聚合的链状结构。如图 5 的右边所示,低聚合的磁结构被获得,并通过调节磁场振幅和频率、由磁极几何结构提供的磁场梯度和反应室 (2) 中的流体流速来控制。

[0086] 由所描述的反应室/磁极几何结构获得的期望效果是,磁场梯度变化分布相应于与反应室中的流速梯度相同的变化分布(如图 3(b) 和图 4(b) 所示)。流速/磁场梯度(力)的这样的“共变”允许在磁性颗粒与液体流的混合条件(以及因此更多的被控制和有效的混合)下达到更大的均匀性。

[0087] 根据本发明的图 2 到图 5 的设备的几何参数必须以减小磁损耗并确保反应室 (2) 中的磁通量的最大聚集的方式设置。而且,这些尺寸的调节必须以这样一种方式进行,即使得所产生的磁场梯度覆盖整个反应室并使在具有消逝的磁场梯度的反应室内部的区域的存在最小化。以这种观点,反应室的发散部分的宽端深度 (H) 与长度 (L) 之比在 0.1 到 10 之间,且优选地在 0.1 到 1 之间。发散部分的长度 (L) 的一般值在 50  $\mu\text{m}$  和 10mm 之间,优

选地在 100  $\mu\text{m}$  和 5mm 之间。连接到反应室的窄端的微流体通道的尺寸在 50  $\mu\text{m}$  到 5mm 的范围内,且优选地在 100  $\mu\text{m}$  和 1mm 之间。

[0088] 因此,本发明的关键方面涉及磁极激励机制,该机制基于具有随时间变化的极性和强度的磁场序列的每个电磁极中的应用。

[0089] 根据本发明的该激励方面的典型例子在图 5 中示出。如图 5(a) 示意性示出的,“平行振荡”的磁场 (4)-(4') 被施加到磁极:

$$\text{极 } 1 \text{ 和 } 1' : B = B_0 \sin(2\pi f_1 t) \quad (1)$$

[0091] 在这样的条件下,且由于场极性的不断变化,磁结块(链)将分解成具有随着场频率( $f_1$ )减小的尺寸的较小的颗粒链状结构。最终,颗粒的行为将像处于相对动态运动中的颗粒雾一样。以“振荡”磁场的使用为特征的另一重要现象是颗粒之间的负偶极相互作用的产生(由于颗粒不以相同的速率旋转的事实),该负偶极相互作用进一步有助于颗粒结块分解。例如,与其中颗粒主要作为聚合块被吸引到磁极(如图 1(a) 所示)的静态场的情况相反,在振荡磁场中,颗粒(在旋转时)趋向于均匀地分布在反应室截面上(如图 5(a) 所示)。换句话说,在振荡磁场下,颗粒往往由于颗粒之间的排斥磁力的发展而占据较大的空间。

[0092] 总之,具有随时间变化的极性和振幅的磁场作为根据本发明的磁极的基本激励的使用允许有效地制止或抑制颗粒聚集,并趋向于将悬浮液中的颗粒作为颗粒雾而维持在相对动态运动中。

[0093] 然而,当磁性颗粒的处理使磁(力)梯度(5)的使用成为必要时,颗粒将被吸引到反应室的狭窄区域,这将限制颗粒并因此趋向于使颗粒成块。该成块可通过减小所施加的场振幅( $B_0$ )并从而减小磁力梯度来减小。事实上,如果我们通过减小所施加的场振幅( $B_0$ )来减小力,那么我们观察到,由于通过颗粒相对旋转引起的颗粒之间的排斥磁力,“旋转”颗粒结构(9)将沿着 X 方向径向扩展。

[0094] 根据本发明,如图 5(b) 所示,为了克服由磁场梯度所引起的进一步的成块,从每个磁极(1)和(1')产生的磁场极性(4)-(4')的极性从平行变化到相反(逆平行):

$$\text{极 } 1 : B = B_0 \sin(2\pi f_1 t + \pi)$$

$$\text{极 } 1' : B = B_0 \sin(2\pi f_1 t) \quad (2)$$

[0097] 以使磁力(5)的方向变化,这将使颗粒(9)在 X 方向、沿着磁力(5)的方向从反应室的狭窄区域轴向移动到宽区域。

[0098] 因此,由等式(1)和(2)定义的磁极的两个激励机制之间的连续“转换”导致磁场梯度最大值的位置从反应室的狭窄区域到宽区域的连续时间变化。这些磁场梯度最大值变化又导致颗粒按照磁场梯度(5)的变化在反应室的狭窄区域和宽区域之间的不间断的轴向运动。

[0099] 因此,根据本发明的激励机制基于以下结论:通过适当地选择由等式(1)和(2)所定义的磁极的激励机制之间的转换频率( $f_2$ ),我们可达到其中颗粒实质上均匀地覆盖整个反应体积的状态,如图 5(c) 示意性示出的。

[0100] 所描述的激励机制导致颗粒处于不间断的相对平移和旋转运动中,颗粒可实质上覆盖整个反应室体积。这样的颗粒动力学是在根据本发明的所公开的颗粒混合中的关键因素,因为该混合实质上覆盖整个反应室体积,且不限于如所公开的现有技术概念中的狭窄

区域。因此,该磁性颗粒处理过程有利地确保均匀混合,从而允许非常多的液体体积有效地与颗粒表面接触。

[0101] 而且,当与前述技术如 E. P 专利 0, 504, 192 的磁性颗粒重新悬浮概念比较时,通过用所公开的图 2 磁设备的“二进制”(即,开和关)或“模拟”的电磁体的连续通电(激励)的使用导致颗粒非常缓慢地移动,同时大部分保持成块。而且,图 5(a) 和 5(b) 的两种状态之间的极性改变实质上不解决该问题,如美国专利 6, 231, 760 所提议的。这样的困难是“微流体”的特征,其中相对“小”的工作体积导致相邻磁体之间强烈的磁耦合。

[0102] 为了解决该问题,本发明的重要结论是应用在具有随时间变化的极性和强度的每个电磁极磁场序列中,其作用是有效地制止或控制颗粒聚集,并将悬浮液中的颗粒作为颗粒雾而维持在相对动态运动中;并接着按序列合并来自不同磁极的磁场,以促使颗粒在实质上整个反应室体积内均匀混合。

[0103] 为了清楚起见,且与我们可作为第一观点预期的相反,在图 5(a) 和 5(b) 中(以及在所有其它图中)表示磁极极性的“箭头”不是固定的。实际上,这些极性随时间连续地改变方向。“固定”的窄方向“代替地”表示在颗粒处理期间电磁体的“相对”极化。

[0104] 在根据本发明的另一实施方式中且如图 6 所示,提供了用于处理和混合磁性颗粒的设备,其中磁极形成四极,包括:(i) 面向彼此形成发散间隙的第一对磁极(1)-(1');以及(ii) 面向彼此并形成发散间隙的第二对磁极(10)-(10'),且第一对磁极和第二对磁极的发散间隙的宽端面向彼此;以及(iii) 反应室(2),其为流体网络的一部分,具有腔,该腔具有共发散地布置在磁极之间的发散间隙中的反应室的发散部分。

[0105] 很清楚,四极配置是允许更增强的效果的前面实施方式的更复杂方案。更具体地,磁场梯度(5)不是大致轴向的(轴对称),如在前面描述的两极配置的情况中的,而是具有大致“球形对称”。使“多向”磁场梯度由多对磁极感应的可能性提供了按照如图 7(a)-(d) 所示的更“丰富”的配置移动磁场梯度最大值的位置的可能性。特别是,通过从多极(四极)配置的每个磁极感应的磁场(4)的正确和连续激励,我们可以按磁场梯度最大值的连续位置覆盖整个反应室体积的方式越过反应室体积来移动这些最大值的位置。

[0106] 图 7(a)-(d) 示意性示出不同磁极激励(4)和相应的磁性颗粒构型,其实际上相应于磁场梯度最大值的位置。由这样的磁处理过程获得的效果是,通过例如根据图 7(a)-(d) 的配置连续移动颗粒,颗粒运动将大致覆盖如图 8 所示的反应室的整个体积,从而确保与周围液体介质的强烈混合。

[0107] 从前面的内容看,根据本发明的激励机制的第一重要元素是磁极的“基本”磁场激励(4),该磁场是具有随时间变化的极性和振幅的磁场。该激励场的典型例子是作为等式(1)之一的振荡磁场。通常,这样的基本磁激励场具有大致矩形、正弦曲线、锯齿形、非对称三角形或对称三角形形式或这样的形式的任何组合。

[0108] 从前面的内容看,根据本发明的激励机制的第二重要元素是,磁极根据某个序列被激励,以引起越过整个反应室体积的磁场梯度最大值的位置的连续时间变化,由此在使用中使颗粒处于相对动态运动,从而覆盖整个反应室体积。

[0109] 因此,在本发明中,通过“具有随时间变化的极性和强度的场序列”,我们意指在每个磁极上的“基本”激励场与其连续变化的合成,以引起越过反应室体积的颗粒运动。当然,实际上,我们可将激励每个磁极的场序列分解成两个主要分量:(1) 基本激励场分量,其具

有随时间变化的极性和振幅,以及(2)该基本激励场的连续变化,以使颗粒越过反应室移位并从而影响颗粒混合。

[0110] 因此,实际上,基本激励场分量具有分解颗粒链聚合体的作用,并从而确保颗粒的大表面与周围液体介质接触,而该基本激励场的连续变化将引起颗粒“雾”在整个反应室内的连续运动,从而确保“分解”的颗粒在实质上反应室的整个体积上均匀暴露。

[0111] 因此,由根据本发明的激励机制获得的期望效果是,颗粒在其运动期间不是作为紧凑的聚合体移动,而更确切地是,它们是作为颗粒雾移动,从而强烈地增强了颗粒表面和周围液体介质之间的接触。

[0112] 在前面描述的激励机制中,基本激励场的时间变化以及磁极的连续激励是非周期性变化,但它优选地是周期性变化。在周期性的情况下,基本场频率( $f_1$ )和激励序列频率( $f_2$ )可实际上不同( $f_1 \neq f_2$ )。为了达到前面描述的颗粒混合效果,激励序列频率( $f_2$ )低于或至多等于基本场频率( $f_1$ )。通常,为了达到前面描述的颗粒混合效果,基本场的时间场变化(即,每个磁极的振幅和极性的时间变化)优选地高于或至少等于磁极的连续时间激励。

[0113] 根据本发明的由频率 $f_1$ 和 $f_2$ 定义的磁场的时间变化大约为0.1Hz到1000Hz,且优选地在1Hz和500Hz之间,或以非周期性变化为特征的其它时间数值范围。

[0114] 由根据本发明的激励机制获得的有利效果是,颗粒将展示在某个时间段内实质上覆盖整个反应体积的动态运动。实际上,根据本发明,颗粒将均匀地覆盖反应室体积的至少60%,且优选地覆盖反应室体积的80%和99%之间。该均匀的覆盖将在由磁极的连续激励时间(或频率)确定的一段时间内获得。实际上,均匀混合在10s和10ns,优选地在1s和10ms之间的一段时间内获得。在优选实施方式中并根据激励场参数,随着时间的过去,混合的均匀性将覆盖反应室的99%。

[0115] 为了达到期望的效果,使用中的磁性颗粒优选地最初为未磁化的磁性颗粒,其响应于外部磁场而发展特定的铁磁磁滞。更具体地说,颗粒具有在2000e到10000e之间的矫顽场。与其中使用中的颗粒优选地为“超顺磁”的前面技术中报道的相反,已经发现,颗粒展示特定(铁磁)磁滞响应的事实是获得根据本发明的混合效果的重要条件。事实上,如前所述,颗粒激励机制在于优选高频“振荡”场作为每个磁极上的“基本”激励磁场分量的使用,以控制和分解颗粒聚集。在这样的高变化频率( $f_1 > 1\text{Hz}$ )处,颗粒具有磁滞响应的事实允许它们通过随场振荡一起物理旋转来跟随这样的“快速”场变化。在高频振荡磁场(具有随时间变化的极性和强度的场)中的该颗粒旋转是颗粒分解过程的起源。

[0116] 而且,为了达到期望的效果,已经发现,优选地,使用中的颗粒用“振荡”磁场(具有随时间变化的极性和强度的场)处理,该“振荡”磁场具有低于使用中的颗粒的矫顽场的振幅(最大场强度)。

[0117] 因此,使用中的颗粒优选地综合有根据专利申请W02006/056579中所公开的过程的特点,该申请在这里作为引用被全部并入。

[0118] 通常,本发明提供将前面描述的磁性颗粒处理和混合的全部结合在微流体环境概念中的方法。该方法在于作为微流体网络的一部分的反应室的使用,其中:至少一对电磁极位于反应室的两侧,面向彼此,该方法包括:(a)从每个电磁极应用具有随时间变化的极性和强度的磁场序列;(b)合并来自每个磁极的磁场,以引起越过整个反应室体积的磁场梯

度最大值的位置的连续时间变化；以及 (c) 使颗粒处于相对平移和旋转运动中，从而覆盖整个反应室体积。

[0119] 为了获得期望的效果，磁极优选地通过“闭合的”磁路而磁耦合到彼此。这样的磁路的典型例子在图 9 的透视图示出。实际上，如图 10(a) 所示的，对于图 6 的四极配置，每个磁极 (1)-(1')、(10)-(10') 连接到由具有线圈 (7) 的磁芯 (6) 形成的电磁体。而且，每个磁芯 (6) 与以“8”形式的“基本”磁芯部分 (6') 接触。基本磁芯 6' 的“8”形状确保每个磁极对配置形成闭合的磁路，从而确保在如等式 (1) 所述的激励过程期间磁通量的较强的循环。而且，每对磁极形成“闭合的”磁路的事实对在反应室中强烈聚焦（浓缩）磁通量和磁通量梯度是必要的。此外，根据本发明，这种条件是特别优选的，以确保混合过程和效果，如前所述。

[0120] 图 9(b) 示出图 9(a) 的四极配置和磁路的更复杂的形式，该磁路具有四极配置阵列，以确保平行激励并根据本发明在四个不同的相邻反应室中处理磁性颗粒。四极阵列的相同设计和结构可被扩展，用于在较多数量的反应室中处理磁性颗粒。

[0121] 本发明的另一方面涉及微流体芯片，其结合了如上所述的磁性颗粒处理和混合的不同几何结构方面。因此，微流体芯片包括：(a) 反应室 (2)，其为流体网络的一部分，包括在悬浮液中处于使用中的颗粒并具有带有发散 / 收敛部分的至少一个腔，(b) 进口 (12) 和出口 (13) 通道，其用于将液体传送到反应室内并从反应室传送出来，并且分别连接到发散 / 收敛部分的狭窄区域，(c) 进入结构 (14)，其置于反应室 (2) 的两侧，以接纳作为外部磁路的部分的磁极，且其中磁极以与反应室的发散 - 收敛部分共发散 / 共收敛的方式被几何地布置。

[0122] 除了反应室以外，本发明的微流体芯片配置成包括根据其用途出现在任何给定的设备上的各种部件中的一个或多个。这些部件包括但不限于，样品入口；样品引入或收集模块；细胞处理模块（例如，用于细胞裂解（包括如这里所述的细胞的微波裂解 (microwave lysis)、细胞移除、细胞浓缩 (cell concentration)、细胞分离或捕获、细胞生长等；分离模块，例如用于电泳、凝胶过滤、离子交换 / 亲和层析 (affinity chromatography)（捕获和释放）等；反应模块，其用于样品的化学或生物反应或改变，包括目标分析物的扩增（例如，当目标分析物是核酸时，扩增技术是有用的）。

[0123] 本发明的所有前面描述的实施方案和方面作为主要目的必须增强液体介质内任何目标物质与所述液体中悬浮的颗粒表面之间的反应率。有效的混合确实对任何生物化学过程例如生物分子如（但不限于）核酸和蛋白质的提取或（和）检测的性能有强烈的影响。而且，所公开磁性颗粒处理概念的一个重要元素是颗粒处理程序可重新适合或调节成相应于在研究中的生物化学过程。

[0124] 通常磁性颗粒的表面通过特异性配体在生物化学上起作用，以用于使用公知技术的生物分子和化学物质的探测和处理。为此，磁性颗粒表面包括例如能够结合到目标分子或目标分子的类的功能组或配体。可能的功能组包括但不限于，羧酸、异羟肟酸、非粘附性化合物 (non-adhesive compound)、胺、异氰酸盐和氰化物。可能的配体包括但不限于，蛋白质、DNA、RNA、酶、疏水材料、亲水材料和抗体。更一般地，适合于用在本发明中的配体的例子包括但不限于，分子和大分子，例如蛋白质和蛋白质的碎片、缩氨酸和多肽、抗体、受体、适体、酶、底物、底物类似物、核酶 (ribozyme)、结构蛋白、核酸例如 DNA 和 RNA 以及 DNA/RNA

混合物、糖类、脂质、各种疏水或亲水物质、亲脂性材料、化学引诱物、酶、荷尔蒙、纤维连接蛋白和类似物。这样的分子和大分子可为自然出现的或合成的。术语配体也可包括较大的实体例如细胞、组织、整个微生物、病毒等。

[0125] 使用这样起作用的颗粒,本发明的混合和分离过程在各种实验室和涉及用于分离的生物特异性亲和结合反应 (biospecific affinity binding reaction) 的临床程序中具有特别的效用。这样的生物特异性亲和结合反应 可用来确定或隔离生物样品中的大范围的目标物质。目标物质的例子是,细胞、细胞成分、细胞亚群 (cell subpopulation) (真核状态的和原核的)、细菌、病毒、寄生物、抗原、特异性抗体 (specific antibody)、核酸序列和类似物。

[0126] 而且,本发明的混合和分离过程特别使用在检测程序中,包括但不限于,聚合酶链反应 (PCR)、实时 PCR、连接酶链反应 (LCR)、链置换扩增 (strand displacement amplification) (SDA) 和基于核酸序列的扩增 (NASBA)。

[0127] 在图 11 中示出所公开磁性颗粒处理和混合设备 / 方法的使用的例子。该图示出夹心免疫分析 (sandwich immunoassay) 的不同步骤,其中:(a) 在第一步骤(图 11(a))中,混合涂有特定捕获探针的颗粒,以均匀地覆盖反应室,如前面在图 7 和 8 中描述的。在该步骤中,包含目标生物分子的样品用穿过反应室的液体流推进。为此,反应室 / 磁极“共变”几何结构确保(如图 3 和图 4 所示)磁性颗粒与液体流的混合条件的均匀性。所有这些条件在被整齐地调节时允许颗粒表面上的目标的强大的捕获效率。(b) 在清洗步骤之后,如图 11(b) 所描述的,将包含检测探针的确定体积(实质上等于反应室的体积)的试剂注射在反应室中。在这种情况下,颗粒可再次与周围介质均匀地混合,从而允许有效地捕获颗粒表面上的检测探针。(c) 在清洗步骤之后,如图 11(c) 所描述的,将确定体积(实质上等于反应室的体积)的试剂检测底物注射在反应室中。在这种情况下,颗粒可与周围介质均匀地接触并混合,从而允许底物和颗粒表面上的检测探针之间的有效相互作用。与其中检测信号主要由扩散引起的典型免疫分析测试相反,我们的混合过程允许检测底物和覆盖整个反应室体积的颗粒表面之间的强烈的相互作用。因此,检测信号的较大增强可以按这种方式产生,从而允许起始样品(例如血液或血浆)内低目标分子浓度的检测。如图 11(c) 所示,在检测期间,颗粒可根据图 7(b) 的序列被拉(分离)到反应室边界。

[0128] 在使用根据本发明的磁性颗粒处理和混合的不同实施方式中,不是具有用于从大样品体积捕获目标的流通(例如在前面的例子 11(a) 的第一步骤中描述的),可在静态(不流动)条件下以更可控的方式获得目标浓度。在图 12 中示意性示出的该实施方式基于反应室中样品的“脉冲注入”(而不是连续流)的概念的使用,后面是颗粒的均匀混合。更具体地,在第一步骤(图 12,顶部)中,颗粒被吸引到反应室壁(使用图 7(b) 的激励序列)并被保持,同时不超过反应室体积的确定体积的样品被注入。在第二步骤(图 12,底部)中,涂有特定的捕获探针的颗粒被混合,以均匀地覆盖反应室,如前面在图 8 中描述的,但没有任何流。在确定时间段的混合之后,颗粒将被再次吸引到反应室壁,且新的样品体积被注入到反应室,然后混合。该过程将以连续的方式重复,直到全部样品体积与磁性颗粒混合。

[0129] 这样的“脉冲注入 / 混合”模式的一个优点是,我们将避免应付在流通条件下处理磁性颗粒的限制,该条件实际上非常难以建立。而且,与其中接触时间仍然相对非常短的流通情况相反,在脉冲模式中,混合时间可更容易地被控制,并适合于相应于目标分子和最后

的使用。

[0130] 后面的实施例进一步详细描述了使用本发明的方式和过程。这些实施例被认为是例证性的而不被认为是对本发明的限制。在实施例中给出的所有处理都处于常温，除非另外指出。

[0131] 激励机制的实施例 1

[0132] 图 7 的激励序列是关于在合并来自每个磁极的磁场之后磁性颗粒如何被移动的实例，当使用时间变化（振幅和极性）的磁场来激励磁极时，用作基本序列。在此移动期间，颗粒将作为颗粒雾而实质上覆盖整个反应室的体积，从而确保混合。虽然被表示为“间断的”序列，但是如图 7 所示的颗粒的序列可根据磁极激励序列以“旋转的磁场”获得：

[0133] 极 1 和 10' :  $B = B_0 \sin(ft)$

[0134] 极 1' 和 10 :  $B = B_0 \sin(ft + \pi/2)$  (3)

[0135] 在等式 (3) 中，每个磁极中的基本序列激励为振荡场，而激励过程由对角地耦合的磁极之间的  $\pi/2$  的相移保证。在该配置中，基本和序列激励场具有相同的频率  $f$ 。

[0136] 在根据等式 (3) 的序列的激励中，可区分两种颗粒状态：低频和高频状态。

[0137] 在低频处，一般对于  $f < 5\text{Hz}$ ，颗粒相对“缓慢地”旋转，且颗粒越过反应体积移动，一般产生如图 7 示意性示出的序列。该状态的特性是，颗粒在其从一个磁极配置移动到另一个磁极配置期间（见图 7），颗粒将具有足够的时间来“聚集”在较长的磁链中。对于高于 1Hz 的频率，颗粒将展示覆盖实质上整个（ $> 90\%$ ）反应体积的快速和强烈的动力学。然而，在旋转磁场的此状态时，颗粒仍然“相对”被聚集。

[0138] 更多分解的颗粒状态将最终在旋转场的较高频率  $f > 5\text{Hz}$  处获得。在该状态时，替代地，颗粒行为彻底不同，因为磁性颗粒的快速旋转将不对链形成提供足够的时间，从而导致颗粒链分解为具有随着场频率减小的尺寸的较小的颗粒链状结构。与低频状态不同，当颗粒没有时间沿着反应室的对角线延伸时，将观察不到图 7(b) 的序列。在高频处实际上发生的是，颗粒将被吸引和限制在反应室壁。图 13(a) 示出高频处的颗粒行为的视频。

[0139] 为了克服这个问题，本发明的结论是减小振幅，同时，与铁磁性颗粒的使用相结合来增加所施加的旋转场的频率。由于磁梯度力和旋转颗粒之间的排斥性偶极力的减小，磁场振幅的减小实际上允许颗粒在反应室体积内更多地扩展。然而，因为磁力的减小将使颗粒运动慢下来，所以需要较高频率的场来进一步排斥颗粒运动。在这样的高频处，一般在高于 20Hz 之间，且优选地在 100Hz 到 500Hz 的范围内，铁磁性颗粒的使用是关键，因为这些颗粒的“磁各向异性”致使颗粒移动，并遵循场变化。图 13(b) 示出了在高旋转频率（大约 300Hz）下获得的反应室中的颗粒的均匀覆盖。在此混合期间，颗粒强烈地移动，越过反应室，从而允许强烈和有效的混合。

[0140] 在这里重要地指出，本实施例中给出的频率值是仅用于指示的典型值，其以在实验（来自 Roche Diagnostics 的 MagNA Pure LC 颗粒）中使用的特定颗粒获得。其它颗粒类型的使用当然影响如前所述的不同颗粒状态和行为的频率限制。

[0141] 激励机制的实施例 2

[0142] 等式 (4) 描述了根据本发明实现混合的另一激励序列。

[0143] 极 1 和 10' :  $B = B_0 \sin(f_1 t) \sin(f_2 t)$

[0144] 极 1' 和 10 :  $B = B_0 \sin(f_1 t) \sin(f_2 t + \pi/2)$  (4)

[0145] 在该序列中,实际上,第一振荡分量 ( $\sin(f_1 t)$ ) 仅仅是在磁极的频率  $f_1$  处的基本激励场,而第二项定义以具有频率  $f_2$  的旋转形式移动颗粒“雾”的激励序列。等式 (4) 的序列尤其允许解决前面等式 (3) 的低频旋转场中报道的 (在实施例 1 中) 颗粒结块。例如,通过将颗粒旋转为频率  $f_2 = 1\text{Hz}$ ,颗粒链将由于基本场  $f_1 > 10\text{Hz}$  的快速振荡而断裂。

[0146] 激励机制的实施例 3

[0147] 等式 (5) 描述了根据本发明实现混合的另一激励序列,其中等式 (1) 的旋转磁场的频率被“调制”。

$$[0148] \quad f = f_0 + f_1 \sin(\Omega t) \quad (5)$$

[0149] 结论是调制低频状态和高频状态之间的频率,从而确保高效的混合。通过适当选择调制频率 ( $\Omega$ ),这时可在两个状态之间平衡:在较低的频率处与结块均匀混合以及在较高的频率处与雾颗粒结构“不均匀的”混合。这种“调制”旋转场的频率的方法对高度粘性液体特别重要,其中仅通过增加如实施例 1 所述的振荡频率难以实现均匀混合。

[0150] 对技术人员很明显,频率调制可通过其它形式来完成,例如“方”信号,其中一个方信号在一个高频值和低频值之间转换。每个值可维持一定的时间,以确保均匀混合,该时间基本上取决于液体粘性。

[0151] 在这里值得再次强调的是,使用中的颗粒优选地是铁磁性的,以允许颗粒在高频处移动并旋转。

[0152] 激励机制的实施例 4

[0153] 虽然前面的实施例基于使用“旋转的磁场”,但是也可使用颗粒雾的线性激励序列来混合并达到均匀状态。线性激励模式的典型实施例可通过使用激励序列首先将颗粒移到如图 7(b) 所示的外边界来实现:

$$[0154] \quad \text{极 } 1 \text{ 和 } 1' : B = B_0 \sin(\omega t)$$

$$[0155] \quad \text{极 } 10 \text{ 和 } 10' : B = B_0 \sin(\omega t + \pi) \quad (6)$$

[0156] 在此阶段,颗粒可通过序列移到反应室的左角(狭窄部分):

$$[0157] \quad \text{极 } 1 \text{ 和 } 1' : B = B_0 \sin(\omega t)$$

$$[0158] \quad \text{极 } 10 \text{ 和 } 10' : B = B_0 \sin(\omega t + \pi/2) \quad (7)$$

[0159] 通过对称,朝着反应室的右角(狭窄部分)的移位可通过以下序列获得:

$$[0160] \quad \text{极 } 1 \text{ 和 } 1' : B = B_0 \sin(\omega t + \pi/2)$$

$$[0161] \quad \text{极 } 10 \text{ 和 } 10' : B = B_0 \sin(\omega t) \quad (8)$$

[0162] 根据序列 (6)  $\rightarrow$  (7)  $\rightarrow$  (6)  $\rightarrow$  (8) 以确定的速率在前面三种配置之间连续移动,随着时间的过去,我们可实现均匀混合。

[0163] 实际上,更好的混合过程不仅仅通过旋转或线性模式实现,而且通常这两种模式的混合是优选的。

[0164] 这里,在这些实施例中,选择“正弦”场作为基本激励仅仅是因为它是具有等式的实际解析公式。在本发明范围内,具有随时间变化的极性和强度的更复杂的激励“基本序列”将导致相同的效果。

[0165] 混合概念和设备的使用的实施例 5

[0166] 在本实施例中,所公开的磁性颗粒设备和方法用于从具有被插入的质粒的细菌(E-coli)培养物中提取 DNA。对于提取,使用来自 RocheDiagnostics(瑞士)的 MagNA Pure

LC 成套元件。该成套元件的特性是磁性颗粒展示具有大约 2000e 的矫顽场的铁磁性响应。

[0167] 对于样品制备,在具有大约  $2 \times 10^8$  细胞/ml 浓度的 PBS 中 200  $\mu$ l 的细菌培养物与下列溶液混合:(a)400  $\mu$ l 的裂解粘合缓冲液 (lysis binding buffer), (b)100  $\mu$ l 的异丙醇,以及 (c)100  $\mu$ l 的蛋白酶-K。因此,总提取体积是 800  $\mu$ l。

[0168] 对于化验,使用具有图 11 布局的微流体芯片。此芯片中的反应室具有下列尺寸:  $H = 0.25\text{mm}$ ,  $L = 0.5\text{mm}$  和 1mm 的深度。因此,反应室的总体积为大约 25  $\mu$ l。在该反应室中,来自成套元件的大约 50  $\mu$ l 的玻璃颗粒被分离并保留在反应室中。

[0169] 通过芯片的样品和试剂处理根据前面描述的“脉冲注入”模式来执行,且其中颗粒在 2 秒时间内在反应室中被均匀混合,后面是大约 1 秒的分离和液体注入。大约 3 秒对处理 25  $\mu$ l 的样品体积是必须的,这相当于 0.5ml/min 的处理流速。

[0170] 使用成套元件的三种清洗剂来执行清洗步骤,每种 300  $\mu$ l 体积。通过合并流通模式和“脉冲注入”模式来执行清洗。小于 2 分钟对执行所有必要的清洗步骤是必须的。对于 DNA 洗提,来自成套元件的洗提缓冲液的体积实质上等于反应室体积 ( $\sim 30 \mu$ l),且被均匀混合大约 3 分钟。

[0171] 为了确定均匀混合的益处,提取性能与标准手工提取(作为参考)以及如实施例 1 中描述的并在图 13(a) 中示出的高频旋转磁场下的不均匀混合进行比较。对于 DNA 提取实验的性能,我们使用光吸收,得到下列结果:

[0172]

	总 DNA 数量 ( $\mu$ g)	纯度 (OD 260/280)
手工提取	6	1.7
均匀混合	5.5	1.9
不均匀混合	1.2	1.6

[0173] 从这些结果中,我们可看到所提出的磁性颗粒混合效果在增强颗粒和样品中目标分子 (DNA) 之间的亲合结合中的强大影响。事实上,虽然花费大约 20 分钟来进行手工提取,但是对于使用所公开的均匀混合方法和设备需要大约 8 分钟来完全提取。而且,在手工提取中,使用大约 100  $\mu$ l 的颗粒悬浮液,而只有 50  $\mu$ l 用在微流体均匀混合中。如这里所公开的,考虑可使用所公开的均匀混合在小反应室体积 (25  $\mu$ l) 中被净化的相对大数量的 DNA (高达 10  $\mu$ g),该 DNA 是在混合期间颗粒较大的可用表面的清楚的表达,示范在化验期间的有效颗粒反隔离和混合。颗粒均匀混合的另一示范是通过非均匀混合获得的低性能。

[0174] 混合概念和设备的使用的实施例 6

[0175] 在本实施例中,所公开的磁性颗粒设备和方法用于从人类全血提取 DNA。对于提取,来自 Roche Diagnostics(瑞士)的 MagNA Pure LC 成套元件用在与实施例 4 相同的过程和实验方案上。

[0176] 提取结果表明在 4-5  $\mu$ g 的 DNA 之间的产量,且 OD 值在  $> 1.7$  之间。该实施例展示了所公开的混合方法从复合样品例如全血有效地提取 DNA。

[0177] 本领域的技术人员应认识到,可设置刚刚描述的优选实施方式的各种修改和更

改,而不偏离本发明的范围和精神。因此,应理解,在所附权利要求的范围内,本发明可以按另外方式实践,而不是如这里特别描述的。

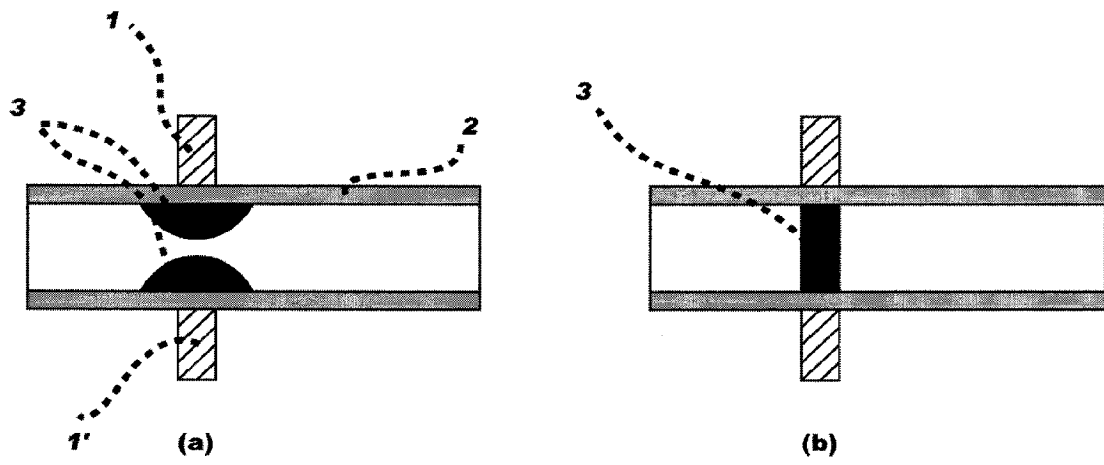


图 1

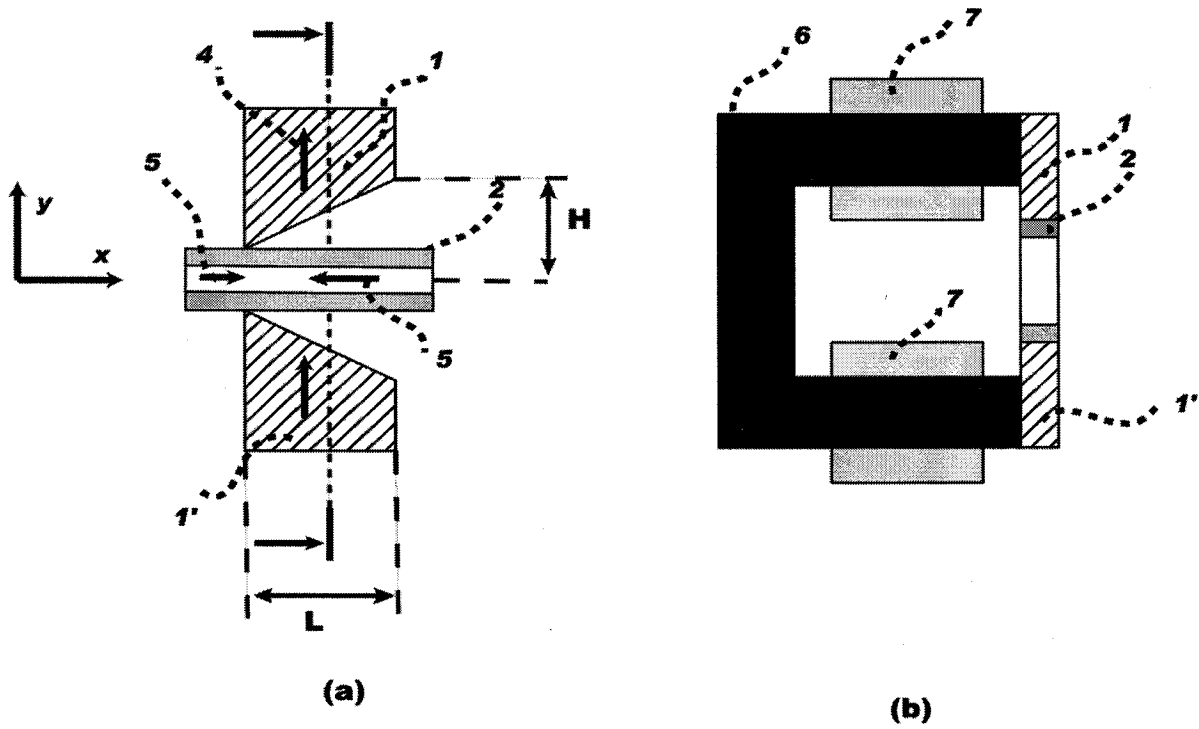


图 2

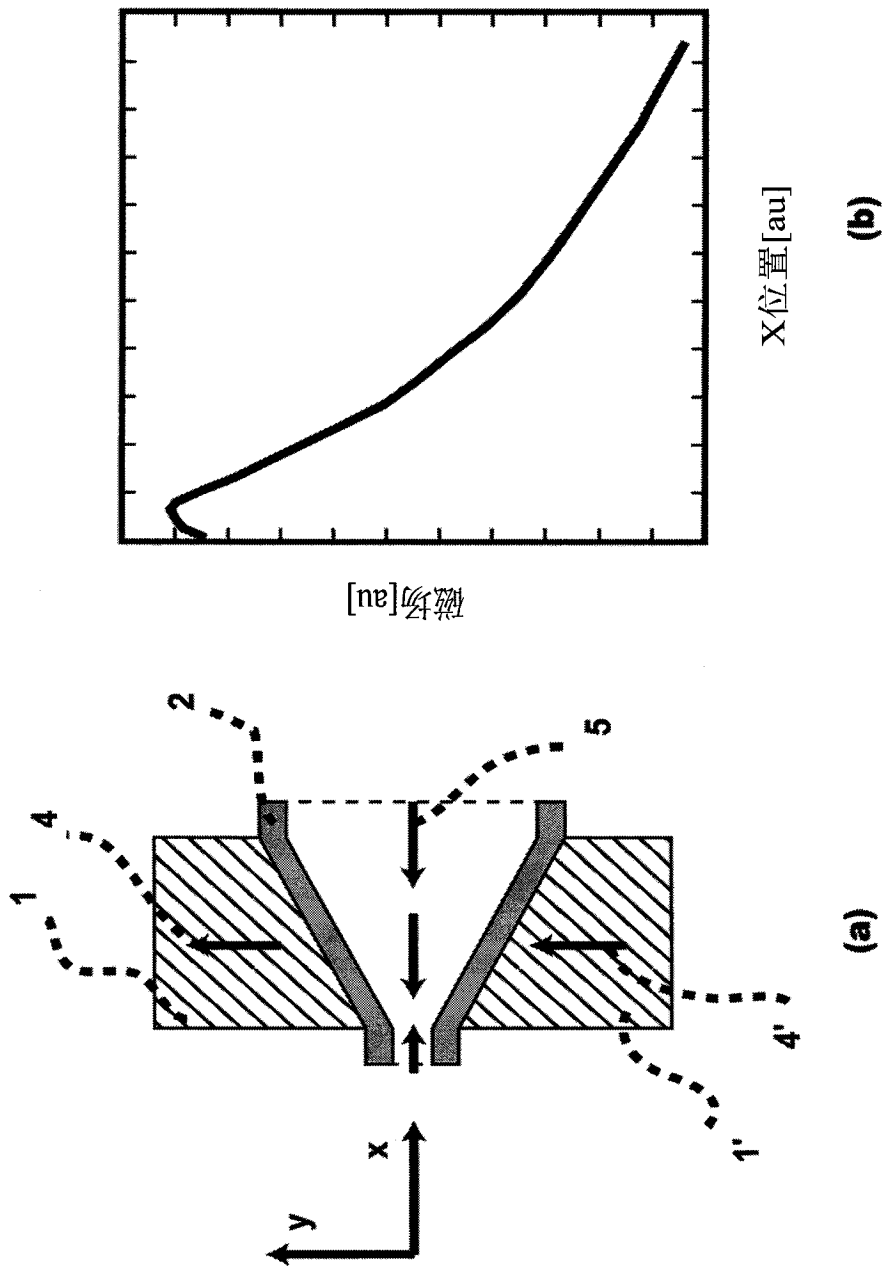


图 3

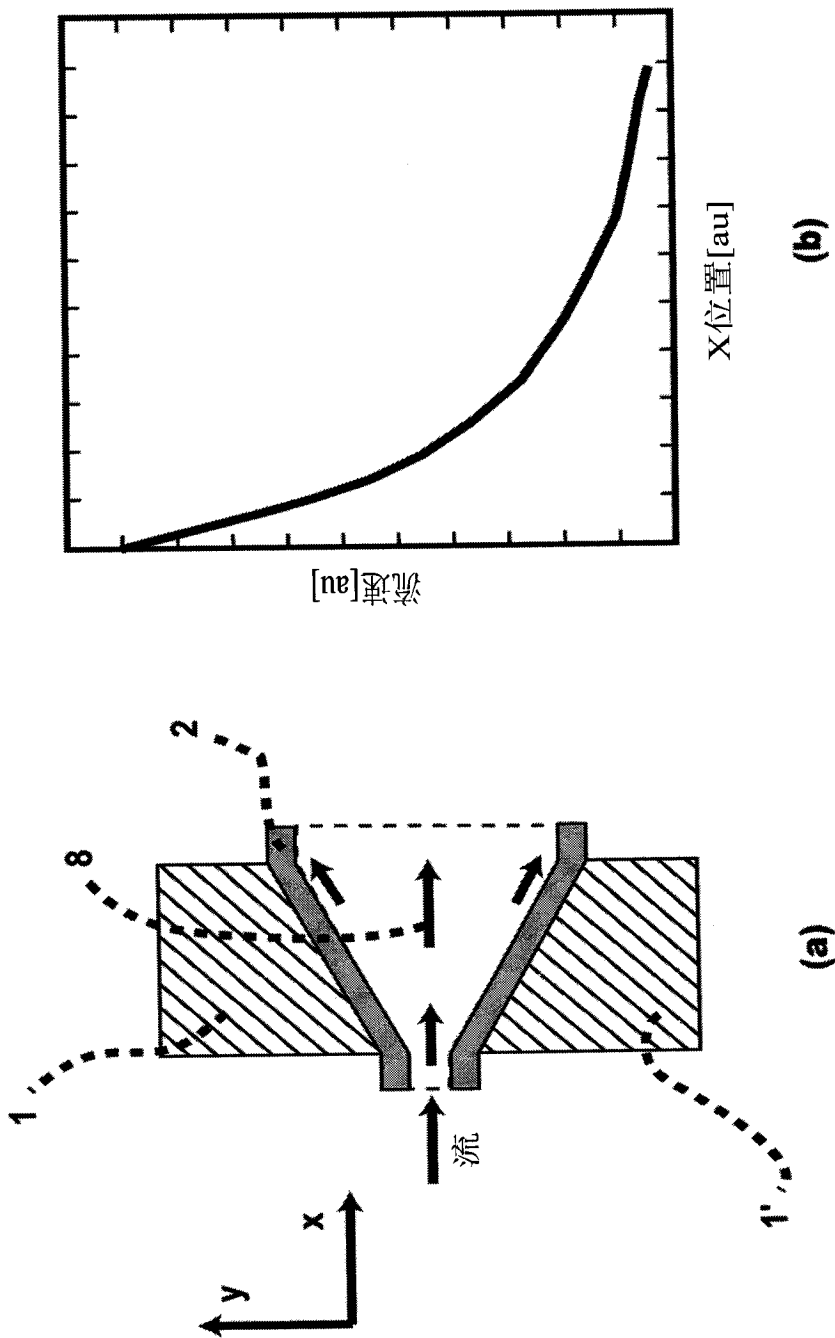


图 4

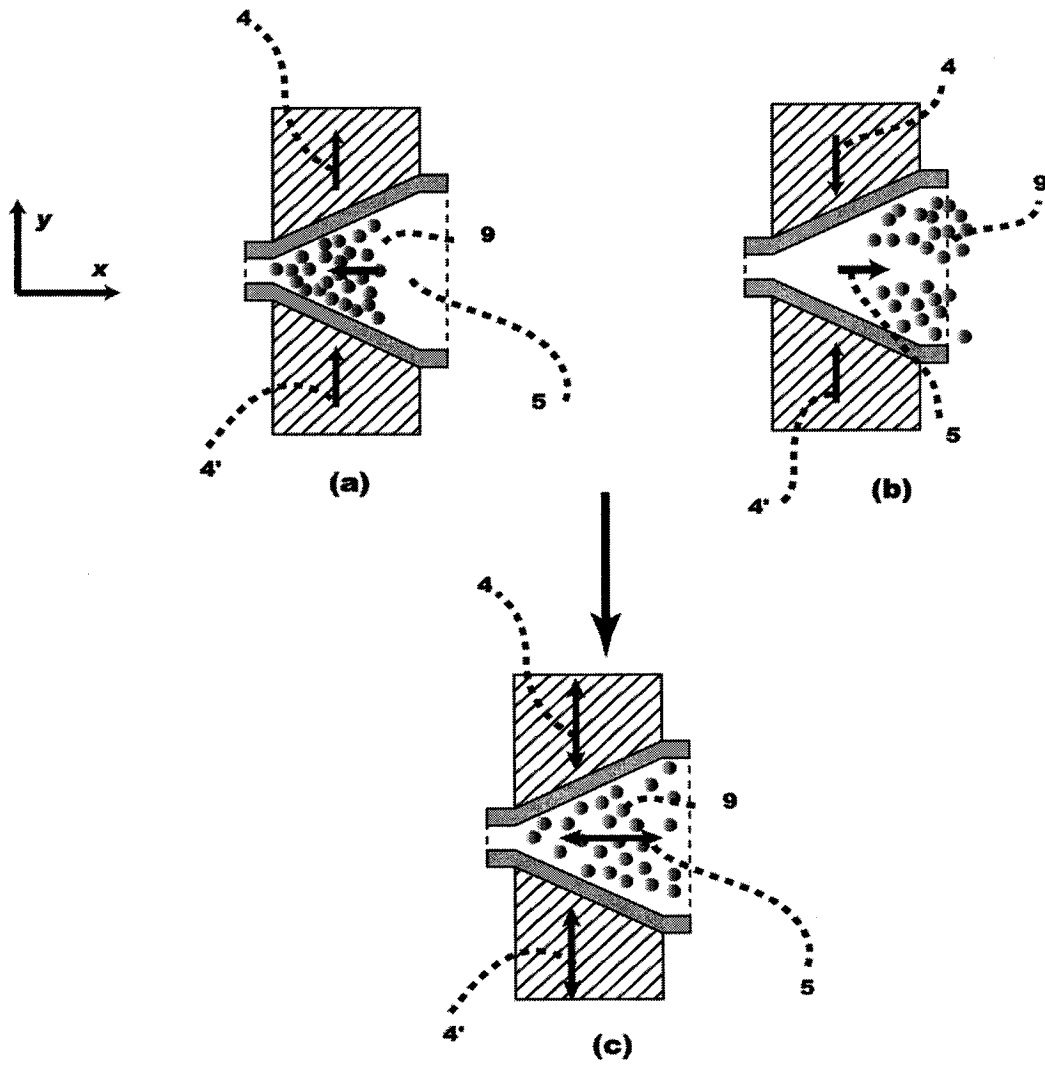


图 5

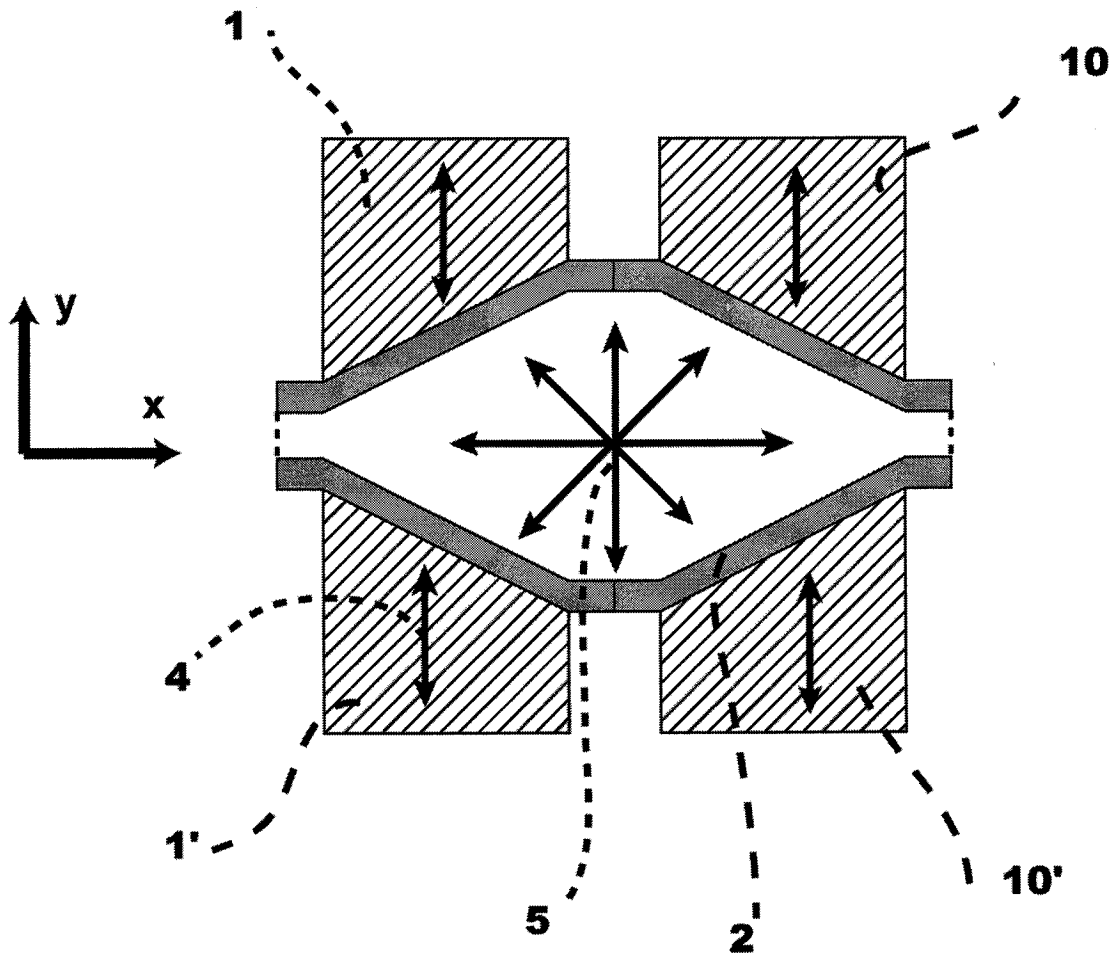


图 6

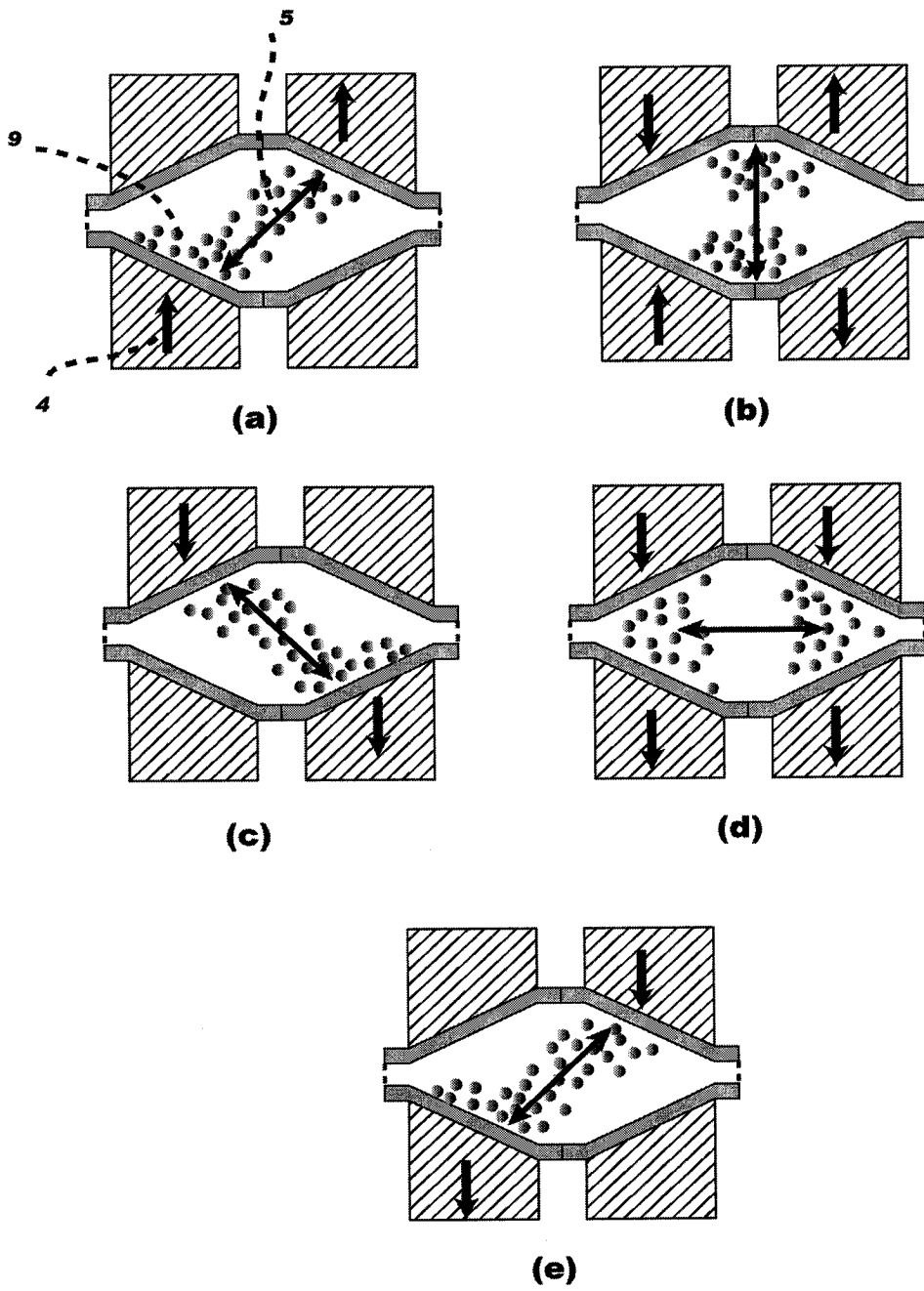


图 7

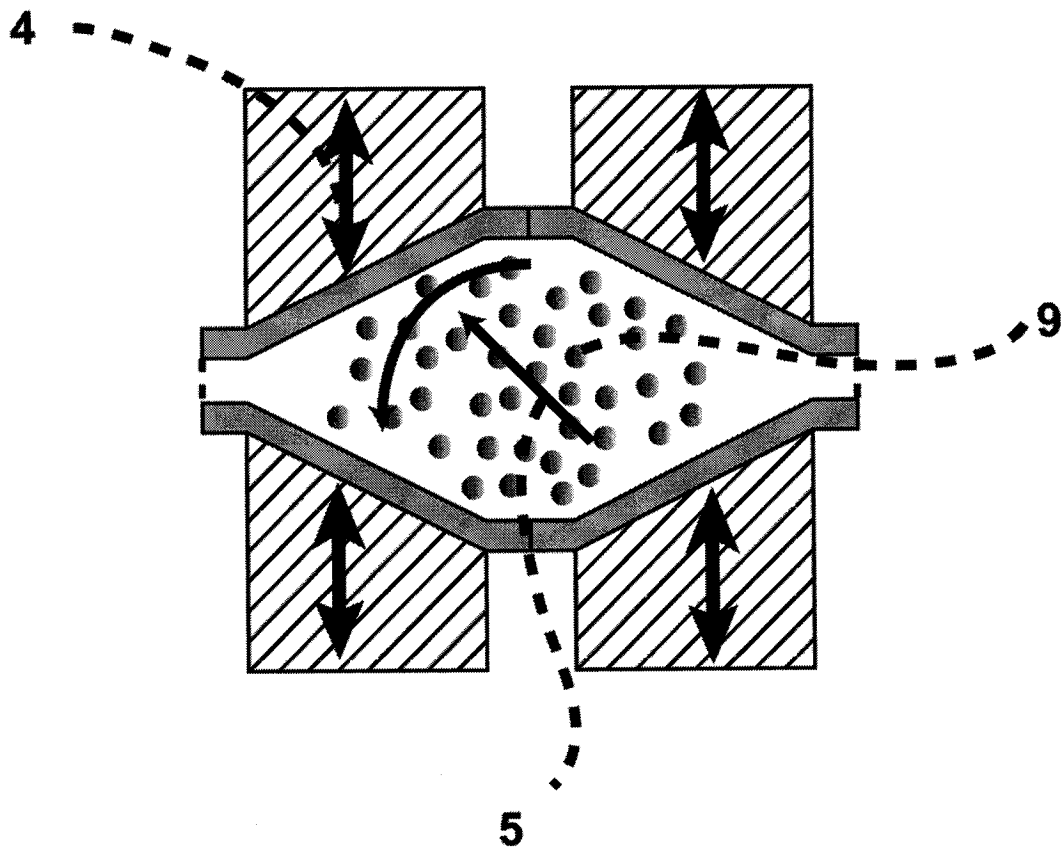


图 8

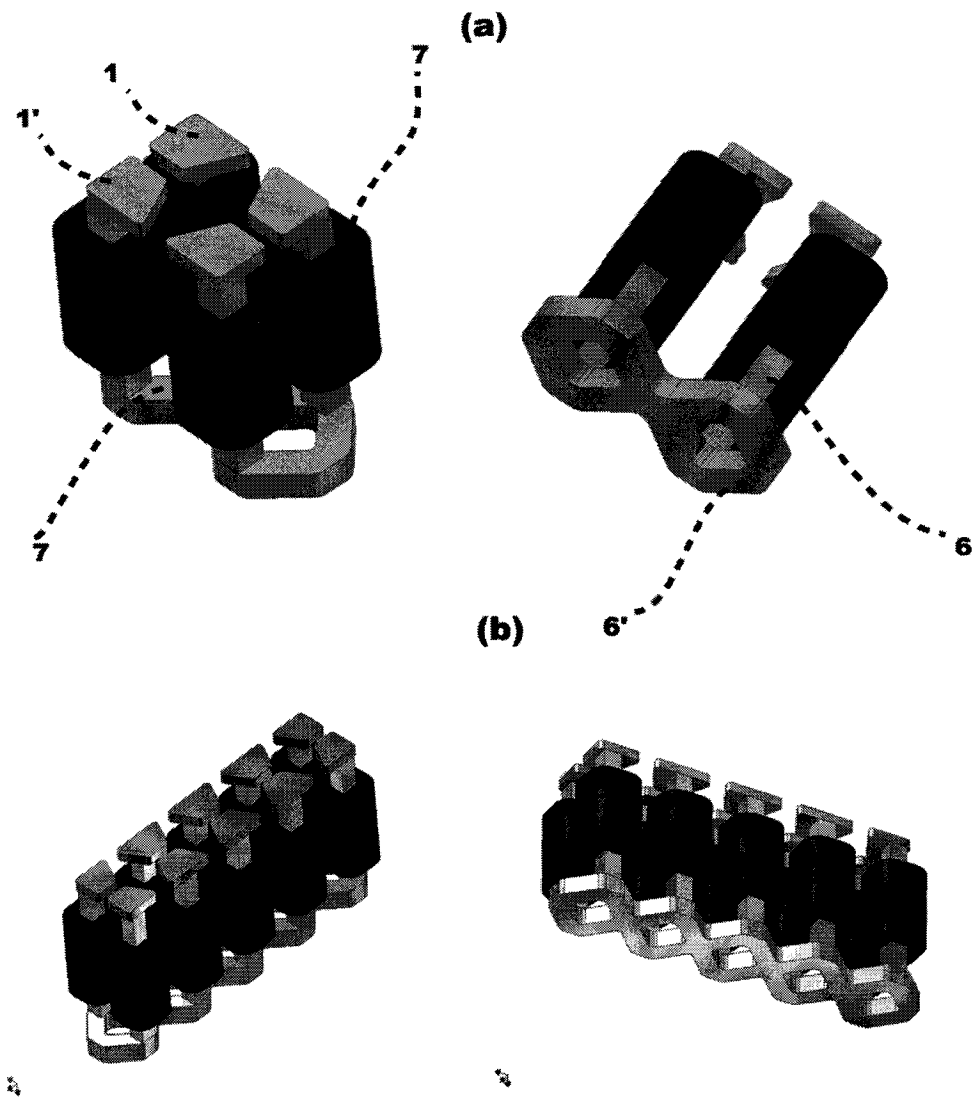


图 9

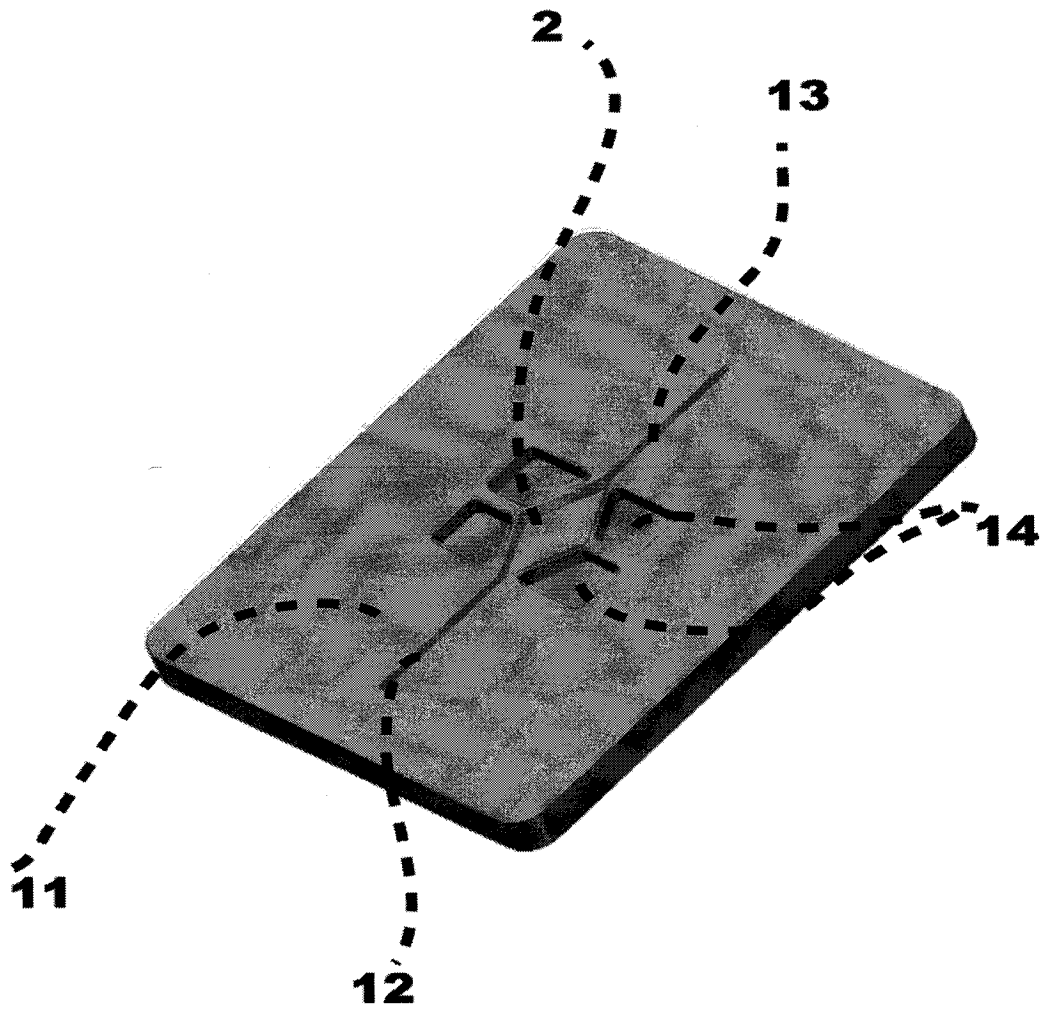


图 10

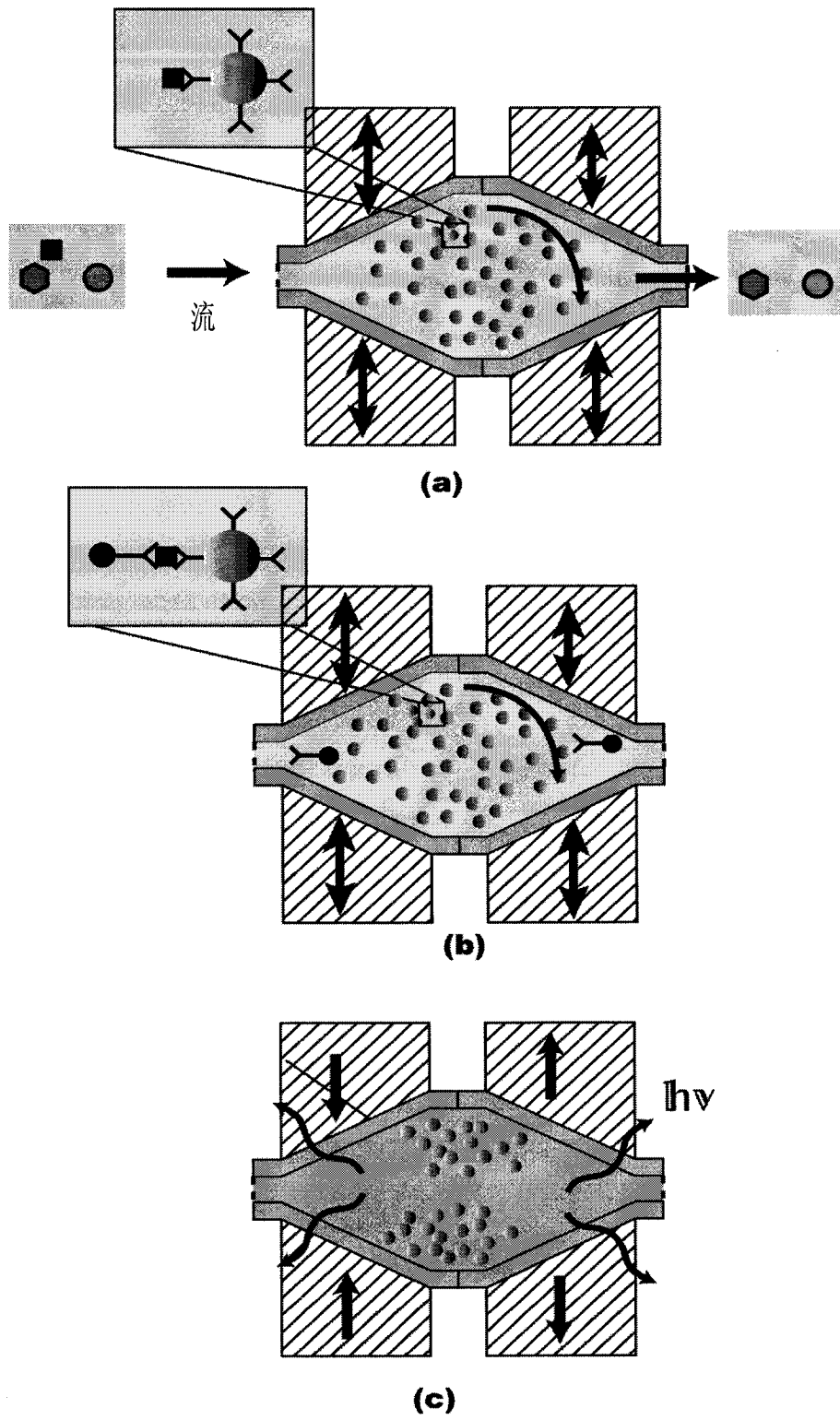


图 11

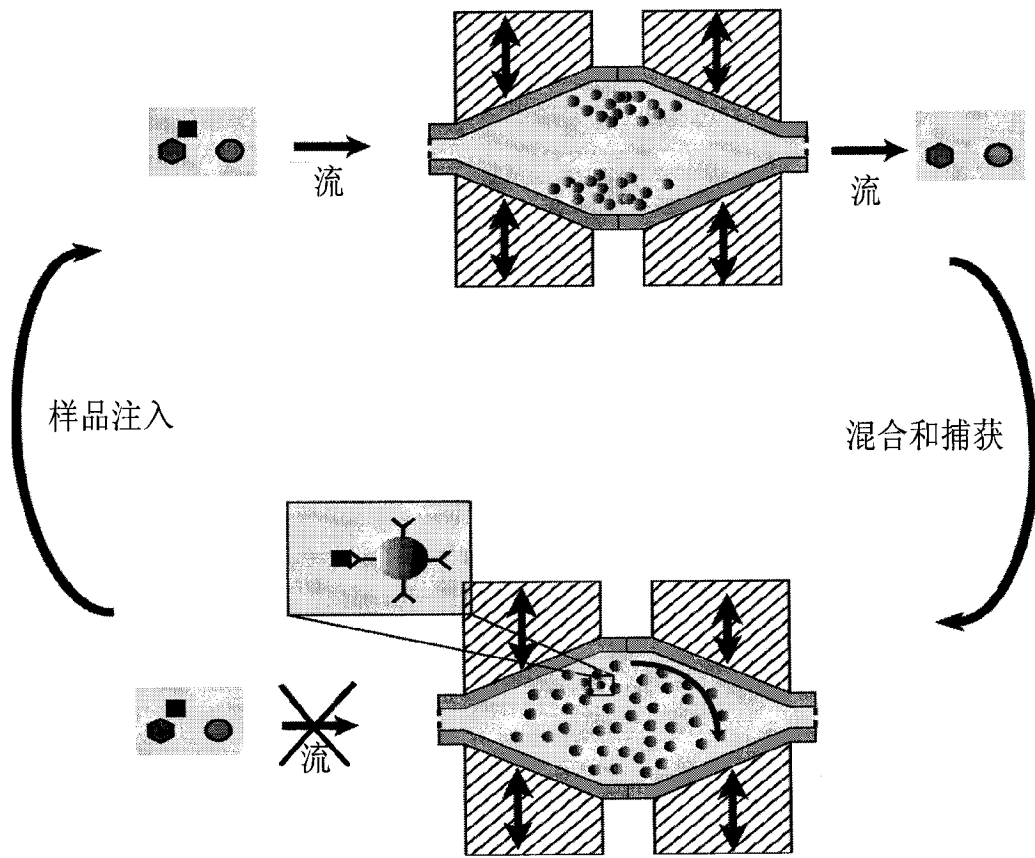


图 12

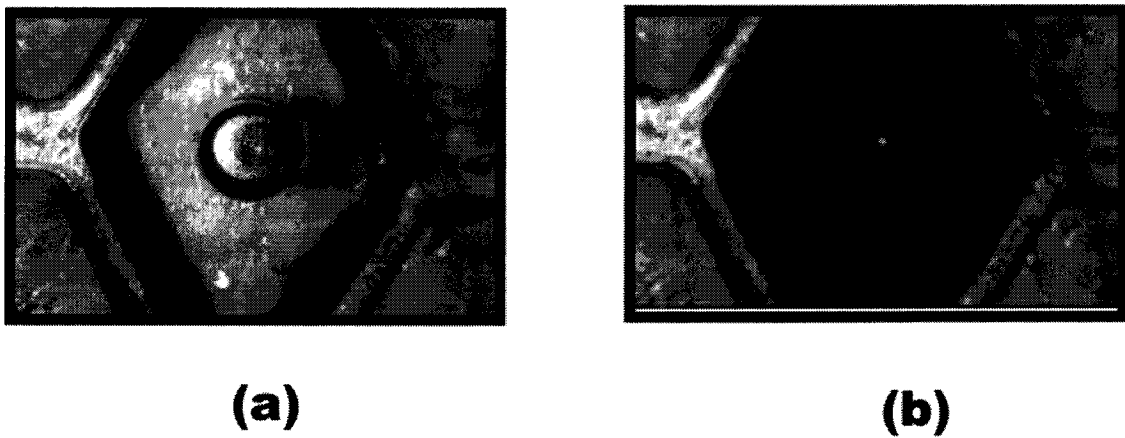


图 13