



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 18 733 T2** 2006.02.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 181 541 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 18 733.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/08930**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 920 117.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/63704**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **26.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.02.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.03.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 27/447** (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
293313 16.04.1999 US

(73) Patentinhaber:
**PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, Mass.,
US**

(74) Vertreter:
**Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189
Wiesbaden**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
DE, GB

(72) Erfinder:
**TAYLOR, A., Todd, Framingham, US; CARSON, W.,
William, Hopkinton, US; KOUTNY, Lance,
Methuen, US**

(54) Bezeichnung: **VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR PROBENANALYSE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur Probenanalyse. Spezieller ist die Erfindung auf Vorrichtungen und Verfahren zur Probenpfropfenbildung und anschließenden Abtrennung und/oder Analyse gerichtet.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Verfahren zur Durchführung und Analyse von chemischen Reaktionen im Mikrobereich erfordern häufig mehrere Schritte und ein ausgedehntes Handhaben von Reagenzien. Diese Verfahren sind typischerweise arbeitsintensiv und beinhalten komplizierte Kombinationen einer Instrumentierung, z.B. Pipetten, Pumpen, Spritzen, Ventile, Rohrmaterial, Reagenzgefäße und Reaktionskammern. Solche Kompliziertheiten können zu Ungenauigkeiten, erhöhten Kosten und verringerten Reaktionsausbeuten beitragen.

[0003] Analysentechniken erfordern typischerweise einen hohen Grad an Arbeit und die Verwendung von komplizierten Vorrichtungen. Außerdem beinhalten viele chemische Labor- und Industrieprozesse die Verwendung von verhältnismäßig großen Volumina von Reagenzien und mehreren Laborinstrumenten. Typische Immunoassays großen Umfangs erfordern z.B. die Verwendung von Pipetten, Reagenzgefäßen und Reaktionskammern. Siehe z.B. Mattiasson et al., Proc. Int. Symp. on Enzyme-Labeled Immunoassay of Hormones and Drugs, (Pal, S., Herausgeber, Walter de Gruyter, Berlin (1978), Seite 91). Solche Prozesse können ungeachtet des Umfangs der Reaktion auch mehrere Schritte erfordern. Demgemäß existiert aufgrund der Einführung von Verunreinigungen, volumetrischen Ungenauigkeiten und geringer Reproduzierbarkeit ein Potential für verringerte Genauigkeit. Diese Probleme sind insbesondere bei diagnostischen Anwendungen im Mikrobereich spürbar, bei denen biologische Proben analysiert werden, wie z.B. Immunoassays, Polynucleotidamplifikationen oder -hybridisierungen.

[0004] In letzter Zeit sind Anstrengungen unternommen worden, um chemische Prozesse zu modernisieren, um Kosten zu reduzieren, Genauigkeit zu erhöhen und Reaktionsausbeuten zu verbessern. Z.B. sind Kapillarelektrophoretentechniken vorgeschlagen worden, um die Auflösung bei Immunoassays zu erhöhen. Verschiedene Versuche sind unternommen worden, um andere übliche Analysentechniken zu verbessern, wie z.B. die Polymerasekettenreaktion (PCR). Z.B. berichtet das US-Patent 5,273,907 über eine mit PCR-Reagenzien vorbeladene Kapillare, die verwendet wird, um zur DNA-Amplifikation eine Probe an die Reagenzien abzugeben. Ähnlich be-

schreibt die internationale Patentveröffentlichung WO 93/22058 ein Gerät im Mikrobereich zur Ausführung von PCR. In diesem Fall werden PCR-Reagenzien von einer ersten Kammer durch Bewegung von Materialien durch Kanäle in einem Mikrochip mit einer Probe in einer zweiten Kammer gemischt.

[0005] In letzter Zeit sind Anstrengungen unternommen worden, um chemische Prozesse zu modernisieren, um Arbeit und Kompliziertheit zu verringern. Eine solche Anstrengung beinhaltet die Verwendung von Mikrochipanordnungen. Eine Mikrochipanordnung besteht typischerweise aus einem dünnen Siliciumdioxidsubstrat oder einem anderen polymeren Substrat, auf dem Kanäle geätzt sind. Die Kanäle dienen als Mittel zum Reagenzientransport und/oder als die Reaktionskammern selbst. Mikrochipanordnungen zur Ausführung von chemischen Reaktionen im Mikrobereich können eine Reihe von miteinander verbundenen Kanälen umfassen. Z.B. können Kanäle auf der Oberfläche eines mikroverfertigten Festkörpers geätzt sein. Reagenzien in Lösung werden dann in die Kanäle platziert und mit z.B. Reagenzien reagieren gelassen, die sich bereits in den Kanälen befinden. Spannungsgradienten können verwendet werden, um Probenfluss und -mischen zu steuern. Siehe z.B. die internationale Veröffentlichung WO 96/04547. Wasserstoff- und Sauerstoffgas resultieren häufig aus einer Verwendung von Spannungsgradienten zum Steuern eines Probenflusses. Elektrolyseprodukte können sich auch in der Nähe der Elektrodenoberfläche ansammeln.

[0006] Mikrochipanordnungen, die keine Spannungsgradienten erfordern, um die Proben und Lösungen zu injizieren, sind konstruiert worden. Siehe z.B. das US-Patent No. 5,304,487; die internationale Veröffentlichung WO 93/22053; und die internationale Veröffentlichung WO 93/22054 (die Mikrochipanordnungen zur Probenanalyse beschreiben). In solchen Systemen wird ein stationärer Flüssigkeitsstrom durch eine Reihe von Kanälen gepumpt, die auf einem Mikrochip geätzt sind. Eine Probe wird durch einen der Kanäle eingeführt und mit dem Flüssigkeitsstrom gemischt. Diese Systeme werden verwendet, um das Vorhandensein einer Probenkomponente oder das Vorhandensein von einer gewissen biologischen Entität (z.B. ein Bakterium oder Virus) nachzuweisen, indem die Varianz in der Fließgeschwindigkeit zwischen Flüssigkeit und mit Probe gemischter Flüssigkeit gemessen wird, wenn jede durch den Mikrochip fließt.

[0007] Es verbleibt ein Bedarf in der Technik an Verfahren und Geräten, die die Zeit, Arbeit, Kosten, die biologische Gefährdungsexposition und die Kompliziertheit verringern, die im Augenblick in der Leistungsfähigkeit einer chemischen Analyse von biologischen Proben im Mikrobereich beinhaltet sind. Spezieller gibt es einen Bedarf an Vorrichtungen und Ver-

fahren, die effizient und ökonomisch einen Probenpfropfen bilden und ihn an einen Trennkanal und/oder ein Analysengerät abgeben.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Es sind Vorrichtungen und Verfahren zur schnellen, automatischen Analyse von Proben im Mikrobereich unter Verwendung von Druckunterschieden entwickelt worden. Ein Probenpfropfenbildungsgerät der Erfindung umfasst im Allgemeinen zwei sich kreuzende Kanäle, einen Einführkanal und einen Trennkanal. Eine Probe wird durch eine Öffnung in einen ersten Kanal eingeführt, der hierin als ein Probeneinführkanal bezeichnet wird. Die Probe bewegt sich durch den Probeneinführkanal durch Vakuum, Druck, Kapillarwirkung oder eine Kombination davon. In einem Abstand von dem Punkt einer Probeneinführung bildet der Probeneinführkanal eine Verbindungsstelle oder Kreuzung mit (d.h. er kreuzt sich mit) einem zweiten Kanal, der hierin als ein Trennkanal bezeichnet wird. Durch die Verwendung von Druck und/oder Vakuum, die an den Trennkanal und/oder den Probeneinführkanal angelegt werden, wird ein Teil der Probe in den Trennkanal transportiert, wenn die Probenhauptmasse die Kreuzung zwischen dem Probeneinführ- und -trennkanal kreuzt. Mit der richtigen Steuerung kann ein diskreter Pfropfen einer Probe im Trennkanal reproduzierbar gebildet werden und Abtrenntechniken und/oder einer Analyse unterzogen werden. Anschließend an die Bildung des Probenpfropfens wird der Teil der Probe, der den Probenpfropfen nicht bildet, typischerweise zu einem Abflussauslass bewegt.

[0009] Eine Bildung des Probenpfropfens an der Kanalkreuzung wird durch Aufbringung von Druckunterschieden in und zwischen dem Probeneinführ- und -trennkanal gesteuert. Ein erster Druckunterschied wird so aufgebracht, um einen Probenfluss durch den Einführkanal zu seiner Verbindungsstelle zu induzieren. Anschließend wird mindestens ein zweiter Druckunterschied aufgebracht, um einen Teil der Probe in den und entlang der Achse des Trennkanals zu bewegen. Ein Pfropfen einer Probe wird im Allgemeinen im Trennkanal an der Kreuzung gebildet, wenn der Druck axial entlang dem Trennkanal in Bezug zum Probeneinführkanal erhöht wird. Die Frequenz und Größe einer Pfropfenbildung wird gesteuert, indem die Druckunterschiede gesteuert werden.

[0010] Der Probeneinführ- und -trennkanal können Kapillaren sein, die gebildet sind, um sich an einer Kreuzung zu kreuzen. Eine bevorzugte Struktur, die den Probeneinführ- und -trennkanal definiert, ist ein mikroverfertigter Festkörper, wie z.B. ein Mikrochip. Typischerweise werden Kanäle direkt in den Mikrochip geätzt. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Mikrochip eine Reihe von Probeneinführ- und -trennkanälen, die auf seiner Oberfläche geätzt

sind. Solche Kanäle weisen vorzugsweise Querschnittsabmessungen von zwischen etwa 0,1 µm und etwa 1000 µm auf.

[0011] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Trennkanal eine Längsachse, die ein Medium, z.B. Wasser, einen Elektrolyten oder eine Polyacrylamidlösung oder -gel, enthält, was die Abtrennung von Komponenten unterstützt, von denen vermutet wird, dass sie sich in der Probe befinden. Folglich migriert ein Probenpfropfen, der an der Kreuzung des Probeneinführ- und -trennkanals gebildet ist, axial entlang dem Trennkanal, wo er in seine Komponenten getrennt werden kann. Vorzugsweise enthalten der Probeneinführ- und -trennkanal einen Puffer, der mit der Probe und dem Trennmedium kompatibel ist, wenn vorhanden. Das Gerät kann weiter einen Spannungsgenerator umfassen, um eine Spannung axial entlang der Längsachse des Trennkanals anzulegen. Die Anlegung einer Spannung entlang dem Trennkanal kann die Abtrennung von Komponenten der Probe unterstützen, z.B. wenn die Abtrennung durch Elektrophorese erreicht wird.

[0012] Auch umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform ein Gerät der Erfindung einen Detektor. Der Detektor ist in der Nähe des Trennkanals platziert, um abgetrennte Komponenten einer Probe nachzuweisen. Der Detektor kann einen Ultraviolett-detektor, einen Sichtlichtdetektor, einen Infrarotdetektor, einen Fluoreszenzdetektor, einen Chemilumineszenzdetektor, einen Brechungsindexdetektor, einen Ramandetektor, ein Massenspektrometer, einen elektrochemischen Detektor und/oder einen Leitfähigkeitsdetektor umfassen. Vorzugsweise ist der Detektor ein Massenspektrometer, ein Fluoreszenzdetektor oder ein Radioaktivitätsdetektor.

[0013] Ein Probenpfropfenbildungsgerät der Erfindung kann in Verbindung mit einem Probenabgabesystem verwendet werden. Ein bevorzugtes Probenabgabegerät ist in einer in gemeinsamem Besitz befindlichen, mitanhängigen US-Patentanmeldung, Serial No. 09/(zu verbessern in, wenn verfügbar; identifiziert durch das Vertreterzeichen No. SYP-131), mit dem Titel "Apparatus And Methods For Sample Delivery", offenbart. In einer bevorzugten Ausführungsform der Anmeldung findet eine chemische Reaktion in einem Probenabgabesystem statt, und die Produkte der Reaktion werden zu einem Probeneinführkanal eines Geräts der vorliegenden Erfindung eingebracht.

[0014] Ein bevorzugtes Probenabgabegerät weist ein Gehäuse auf, das eine Kapillare definiert, die ein offenes Ende zur Einführung einer Probe und ein geschlossenes Ende aufweist. Das geschlossene Ende ist vorzugsweise mit einem Temperaturregelgerät verbunden, das verwendet wird, um eine Bewegung der Probe und Reaktanten im Probenabgabesystem

zu steuern. Chemische Reagenzien, wie z.B. Bindeproteine, Liganden, Rezeptoren, Antikörper oder Antigene können in der Kapillare immobilisiert sein. Diese Reagenzien können nachweisbar markiert sein und sind vorzugsweise fluoreszenzmarkiert. Diese Reagenzien können auch chemisch oder enzymatisch markiert sein, z.B., um eine Amplifikation vor einem Nachweis zu ermöglichen.

[0015] Die vorliegende Erfindung sorgt für eine schnelle, genaue und reproduzierbare Analyse von Proben im Mikrobereich. Bei Verwendung in Verbindung mit einem Probenabgabegerät, wie oben beschrieben, ist die Analyse einer Probe vom Anfang bis zum Ende ein automatischer Prozess. Außerdem kann der automatische Prozess eine oder mehrere Reaktionen umfassen, die im Probenabgabegerät stattfinden können. Die Erfindung wird bei Erwägung der folgenden Zeichnungen, Beschreibung und Ansprüche weiter verstanden.

BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0016] **Fig. 1** ist eine schematische graphische Darstellung eines Probenpfropfenbildungsgeräts der Erfindung. Ein Probeneinführkanal bildet eine nichtparallele Verbindungsstelle mit einem Trennkanal, in dem ein Probenpfropfen ausgebildet ist. Die Richtung eines Probenflusses ist durch Pfeile **16**, **18** und **20** angezeigt.

[0017] **Fig. 2:** A–F sind schematische Querschnittsansichten eines Geräts der Erfindung, wobei ein Fluss einer Probe durch die Kanäle bei verschiedenen Stadien während der Durchführung eines Verfahrens der Erfindung dargestellt ist.

[0018] **Fig. 3:** A–F sind schematische Querschnittsansichten eines Geräts der Erfindung, wobei ein Fluss einer Probe durch die Kanäle bei Anlegung einer "Aufhäufungs"-Spannung entlang dem Trennkanal dargestellt ist.

[0019] **Fig. 4** stellt eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar, die eine Mikrochipanordnung ist, die mit einer Reihe von Probeneinführkanälen und -trennkanälen geätzt ist. Der wiedergegebene Mikrochip weist Verbindungen auf, die den Druck und/oder die Spannung durch die Kanäle steuern.

[0020] **Fig. 5** stellt ein Probenabgabesystem in Verbindung mit einer Mikrochipanordnungsform der vorliegenden Erfindung, wie in **Fig. 4** wiedergegeben, dar. Das Probenabgabesystem umfasst ein Array von Kapillaren, die mit einem Satz von chemischen Reagenzien vorbeladen sind und in Verbindung mit einem Temperaturregelgerät stehen. Die Kapillaren sind über der Mikrochipanordnung positioniert und werden verwendet, um eine Probe an die Probeneinführkanäle der Mikrochipanordnung abzu-

geben.

[0021] **Fig. 6** stellt ein Array von Kapillaren dar, die einen ersten Satz von chemischen Reagenzien und einen zweiten Satz von chemischen Reagenzien enthalten. Ein Temperaturregelgerät ist in Verbindung mit den Kapillaren dargestellt. Ein zweites Temperaturregelgerät zur örtlichen Erwärmung und Kühlung ist auch dargestellt. Die Kapillaren sind zur Abgabe von Proben an die Probeneinführkanäle über einer Mikrochipanordnung positioniert.

[0022] **Fig. 7** gibt ein wissenschaftliches Instrument der Erfindung wieder, das ein integriertes Probenabgabesystem, ein Probenpfropfenbildungsgerät und andere in Beziehung stehende Ausrüstung zur Durchführung einer schnellen, automatischen Analyse von Proben im Mikrobereich umfasst.

[0023] Gleiche Bezugszeichen in respektiven gezeichneten Figuren zeigen entsprechende Teile an.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0024] Die vorliegende Erfindung sorgt für die automatische Bildung eines Probenpfropfens, der in seine einzelnen Komponenten getrennt und/oder analysiert werden kann. Wie hierin verwendet, soll der Terminus "Probe" jegliche Quelle bedeuten, von der vermutet wird, dass sie eine beliebige Komponente, die nachzuweisen oder zu identifizieren ist, oder irgendeine potentiell reaktive chemische Entität enthält. Eine Probe kann "unverdünnt" sein oder kann mit einem geeigneten Lösungsmittel verdünnt sein. Im Augenblick bevorzugte Proben umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, ein beliebiges biologisches Untersuchungsmaterial, von dem vermutet wird, dass es eine Komponente von Interesse enthält. Zur Verwendung in der beanspruchten Erfindung geeignete Proben umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Körperfluide, wie z.B. Blut, Serum, Plasma, Urin, cerebrospinales Fluid, Saliva, Schweiß, Samen, Tränen, Vaginalfluid, Fruchtwasser und Aszitesflüssigkeit.

[0025] Wie hierin verwendet, soll der Terminus "Komponente" eine beliebige identifizierbare oder nachweisbare Substanz oder eine Substanz bedeuten, die eine Abtrennung von anderen Substanzen in einer Probe unter Verwendung einer Vorrichtung der Erfindung zulässt. Bevorzugte Komponenten umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, chemische und biologische Einheiten, wie z.B. Proteine, Peptide, Nucleinsäuren, Peptidhormone, Nicht-Peptidhormone, Missbrauchsarzneimittel, Pharmazeutika, mikrobielle Antigene, virale Antigene, Kohlenhydrate, polyklonale Antikörper, monoklonale Antikörper, Anti-Idiotyp-Antikörper, Antikörperfragmente, Enzymsubstrate, Enzyminhibitoren, Biotin, Rezeptoren, Li-

ganden, Inhibitoren und Bindungskompetitoren. Komponenten können auch an eine Sonde und insbesondere eine nachweisbar markierte Sonde gebunden sein. Übliche Sonden umfassen Polynucleotide, wie Ribosonden und Peptidnucleinsäuren (PNAs).

[0026] Allgemein gesprochen, liefert die Erfindung Vorrichtungen und Verfahren zur Analyse einer Probe im Mikrobereich. Jedoch kann eine Probe einer beliebigen Größe mit einem geeignet dimensionierten Probenanalysengerät der Erfindung unter Verwendung von Konzepten und Prinzipien, die hierin offenbart sind, analysiert werden. Eine Vorrichtung der Erfindung weist ein Gehäuse auf, das zwei Kanäle definiert. Die zwei Kanäle kreuzen sich, um eine Kreuzung zu bilden. Eine Probe wird in einen ersten Kanal, den Probeneinführkanal, eingeführt. Der Probeneinführkanal kreuzt einen zweiten Kanal, den Trennkanal. Die Kanäle können sich unter einem beliebigen Winkel kreuzen, um die Kreuzung zu bilden. Der Trennkanal ist typischerweise länger als die Länge des Probeneinführkanals. Vorzugsweise ist der Trennkanal mehr als zehnmals länger als der Probeneinführkanal und spezieller mehr als einhundertmal länger. Wenn der Unterschied in den Längen des Probeneinführkanals und des Trennkanals nicht äußerst groß ist, kann der Querschnitt des Probeneinführkanals größer sein, um den Druckabfall zu kompensieren, d.h. den Druckabfall zu verringern.

[0027] Eine Vorrichtung der Erfindung umfasst weiter ein Druckregelgerät, um Druckgradienten auf die Kanäle aufzubringen. Das Druckregelgerät selbst kann eine Überdruckquelle, wie z.B. eine peristaltische Pumpe, oder eine Vakuumquelle, wie z.B. eine Vakuumpumpe, sein. Eine Vakuumquelle kann auch ein Absorptionsgerät sein, wie z.B. ein Docht, der unter Verwendung von Oberflächenspannung (Kapillarkwirkung) Flüssigkeit in einen Kanal zieht. Jedoch kann das Druckregelgerät eine steuerbare Druckquelle, z.B. eine Vakuumquelle, oder eine Überdruckquelle, wie z.B. eine peristaltische Pumpe oder eine Druckgasquelle, umfassen. Demgemäß kann das Druckregelgerät Hardware, wie z.B. Ventile, Manifolds, Rohrmaterial und dergleichen, umfassen. Das Druckregelgerät kann auch Kontroller, wie z.B. einen beliebigen geeigneten programmierbaren Logikkontroller auf Mikroprozessor-Basis, einen Personalcomputerkontroller oder dergleichen, zur Prozesssteuerung umfassen. Ein geeigneter Kontroller umfasst Merkmale, wie z.B. Programmierbarkeit, Zuverlässigkeit, Flexibilität und Dauerhaftigkeit. Der geeignete Kontroller umfasst unter anderen Merkmalen verschiedene Eingangs/Ausgangs-Ports, die verwendet werden, um Verbindungen bereitzustellen, um Ventile zu öffnen und zu schließen, Fluide zu regeln und zuzumessen. Der Kontroller umfasst auch geeigneten Speicher, um Prozessrezepturen für gewünschte Anwendungen zu speichern. Natürlich hängt der Typ

von Kontroller von der speziellen Anwendung ab.

[0028] Aufbringung eines Druckgradienten in den Kanälen bewegt die Probe durch die Kanäle. Die Kanäle sind vorzugsweise auf einem mikroverfertigten Festkörper gebildet, wie z.B. einem Mikrochip. Der Trennkanal kann Siebmedien, wie z.B. Polyacrylamid, als eine viskose Lösung oder ein Gel aufweisen, die darin angeordnet sind, um eine Abtrennung und/oder Analyse zu erleichtern. Nach Abtrennung können die Probenkomponenten unter Verwendung eines Detektors nachgewiesen werden, der entlang oder in der Nähe des Endes des Trennkanals angeordnet ist. Die Vorrichtung kann verwendet werden, um automatisch Assays, wie z.B. unter anderem Immunoassays, Enzymassays, chemische Assays, Rezeptorassays, und Polynucleotididentifikationen auszuführen.

[0029] Eine Vorrichtung der Erfindung sorgt für die automatische gleichförmige Herstellung eines Probenpfropfens durch die Verwendung von Vakuum und/oder Überdruck auf dem Probeneinführ- und -trennkanal. Der Probeneinführ- und -trennkanal definieren ein Injektionssystem eines wissenschaftlichen Instruments der Erfindung. Wie in [Fig. 1](#) veranschaulicht, bildet der Probeneinführkanal **10** eine Kreuzung **11** mit dem Trennkanal **12**. Ein alternierendes Aufbringen von Überdruck und/oder Vakuum auf die Kanäle bewirkt, dass sich ein Probenpfropfen **14** stromabwärts der Kreuzung im Trennkanal **12** bildet. (Es versteht sich, dass [Fig. 1](#) eine schematische Darstellung ist und dass in der Wirklichkeit der Probenpfropfen **14** in den Kanälen enthalten ist.) Pfeile **16**, **18** und **20** zeigen die Richtung eines Probenflusses an. Ein Spannungsgenerator **19** kann verwendet werden, um einen Spannungsgradienten entlang der Längsachse des Trennkanals anzulegen. Z.B. kann ein Spannungsgradient angelegt werden, während ein Druckunterschied eine Probe durch den Probeneinführkanal in einem Typ von Probenpfropfenbildungsprozess bewegt, der als "Aufhäufung" bezeichnet wird, was ausführlicher unten beschrieben wird.

[0030] Um eine Automatisierung der hierin beschriebenen Verfahren zu unterstützen, ist ein anderer Aspekt der Erfindung ein wissenschaftliches Instrument, das die oben beschriebene Probenanalysevorrichtung enthält. Das wissenschaftliche Instrument ermöglicht die wirkungsvolle Automatisierung der Systeme der Erfindung mit seinen Hilfsgeräten und -ausrüstung. Das wissenschaftliche Instrument ermöglicht auch, dass andere Vorrichtungen, z.B. ein Probenabgabesystem, mit den Analysensystemen der Erfindung verbunden wird, um zu ermöglichen, dass eine funktionelle Konstruktion den Endbenutzeranforderungen entspricht. Z.B. können Analyseninstrumente mit einem wissenschaftlichen Instrument der Erfindung verbunden werden, um eine Analyse von Proben, z.B. zu gegebenen Zeitpunkten im Re-

aktionszyklus, zu ermöglichen. In der Erfindung nützliche Analyseninstrumente sind Fachleuten gut bekannt und umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, Massenspektrometrieinstrumente, Chromatographiesysteme und verschiedene Nachweisinstrumente, wie z.B. Ultraviolett-, Infrarot-, Fluoreszenz- und Brechungsindexdetektoren. Ein solcher Detektor kann entfernt von der Kreuzung und in Verbindung mit dem Trennkanal positioniert sein.

[0031] Andere nichtbeschränkende Beispiele für Hilfsinstrumente, die in der Erfindung nützlich sind, umfassen Diagnoseinstrumente zur Durchführung von Assays und Synthetisiervorrichtungen zum Automatisieren der Produktion von speziellen Verbindungen, um Teil einer Probe zu werden. Solche Synthetisiervorrichtungen umfassen diejenigen, die kombinatorische Synthesen, die das Durchmusteren von Bibliotheken von Verbindungen ermöglichen, mit den Abgabesystemen der Erfindung ausführen können. Sämtliche obigen Instrumente und Geräte können auf eine schrittweise Art von Hand betrieben werden. Jedoch wird eine volle Automatisierung bevorzugt. Wie für einen Fachmann ersichtlich ist, umfasst eine Automatisierung vorzugsweise einen Mikroprozessor und/oder Computer, der verschiedene Aspekte der Verfahren der Erfindung steuert, aber typischerweise mindestens in Verbindung mit den Einrichtungen zur Erzeugung der Druckunterschiede steht.

[0032] Verfahren der Erfindung sorgen für die Bildung eines Probenpfropfens und in gewissen Ausführungsformen für eine Abtrennung der Komponenten dieses Probenpfropfens. Die Aufbringung von Druck/Vakuum dient dazu, die Probe durch die Kanäle des Injektionssystems einer Vorrichtung der Erfindung zu drücken oder zu ziehen. Nachdem ein Probenpfropfen im Trennkanal gebildet ist, können seine Komponenten vorzugsweise durch Elektrophorese abgetrennt werden. Jedoch kann ein zugemessener Probenpfropfen zu einem anderen Analysengerät ohne weitere Abtrennung zur Analyse transportiert werden. Die [Fig. 2A-Fig. 2F](#) veranschaulichen die verschiedenen Stadien einer Probenpfropfenbildung. Zahlreiche Mittel sind zur Einführung einer Probe in die Vorrichtung vorhanden, z.B. eine Injektion von einer Spritze oder dergleichen oder eine Einführung von einem Probenabgabesystem, das im Stand der Technik bekannt ist. In einer anderen Ausführungsform kann ein Absorptionsmaterial, wie z.B. Baumwolle, in den Einführkanal platziert werden. Das Absorptionsmaterial zieht durch Kapillarwirkung Probe in den Probeneinführkanal an. In einer anderen Ausführungsform kann ein Absorptionsmaterial in Kontakt mit dem Auslass des Probeneinführkanals platziert sein, z.B. über dem Kanal, so dass das Absorptionsmaterial die Probe durch den Probeneinführkanal zieht, indem ein Vakuum von Oberflächenspannung (Kapillarwirkung) erzeugt wird.

[0033] Wie in [Fig. 2A](#) dargestellt, ist eine Probe **22** im Probeneinführkanal **10** abgelagert. In [Fig. 2B](#) zieht eine Aufbringung eines ersten Druckunterschieds, d.h. ein Vakuum, auf den Probeneinführkanal, entgegengesetzt dazu, wo die Probe eingeführt wurde, die Probe durch den Probeneinführkanal und über die Verbindungsstelle **11**, die mit dem Trennkanal **12** gebildet ist. In [Fig. 2C](#) zieht eine Aufbringung eines zweiten Druckunterschieds, d.h. ein anderes Vakuum, auf den Trennkanal einen Teil der Probe in den Trennkanal.

[0034] Eine Aufbringung eines Druckunterschieds auf den Trennkanal **12** für ein spezifiziertes Intervall erzeugt reproduzierbar diskrete Probenpfropfen. In [Fig. 2D](#) bewirkt eine Aufbringung eines Überdrucks auf den Trennkanal von der zum Proben-**22**-fluss entgegengesetzten Richtung, dass sich ein Pfropfen einer Probe **14** stromabwärts von der Kreuzung **11** bildet, während die restliche Probe zum Auslass oder zurück zur Einführstelle bewegt wird. In gewissen Ausführungsformen kann sich der Überdruck fortsetzen, um den Probenpfropfen durch den Trennkanal zu bewegen, um eine Abtrennung zu bewerkstelligen, ähnlich zum Betrieb einer Chromatographiesäule.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform enthält der Trennkanal ein Siebmedium zur Abtrennung der Probenkomponenten auf Grundlage von Ladung oder Größe. Das Siebmedium kann z.B. Polyacrylamid, Agarose, Polyethylenoxid, Polyvinylpyrrolidin und Methylcellulose umfassen. Andere Siebmedien, wie z.B. Chromatographieteilchen, können abhängig von der speziellen Anwendung verwendet werden. In [Fig. 2E](#) werden die Komponenten der Probe elektrophoretisch entlang dem Trennkanal bewegt und werden durch Anlegen eines Spannungsgradienten entlang der Längsachse des Trennkanals **12** abgetrennt. Eine Abtrennung der Probenkomponenten wird durch Standardelektrophoreseverfahren erzielt. Schließlich gibt anschließend an eine Abtrennung und/oder Analyse [Fig. 2F](#) einen Überdruck wieder, der von beiden Richtungen entlang dem Trennkanal aufgebracht wird, um die Probenüberbleibsel aus dem Kanal herauszudrängen, um das System zu reinigen.

[0036] Es versteht sich, dass die unterschiedlichen Druckunterschiede, die verwendet werden, um einen Probenpfropfen im Trennkanal zu bilden, für eine spezielle Anwendung angepasst werden können. D.h., ob Vakuum und/oder Überdruck verwendet werden, und in welcher Reihenfolge, hängt von der Analyse ab, die durchzuführen ist. Außerdem sind die zeitliche Steuerung, die Stärke und Stelle der Druckunterschiede Variablen, die unter Verwendung der allgemeinen Prinzipien und Konzepte, die hierin offenbart sind, optimiert werden sollten. Z.B. wird in einer Ausführungsform der erste Druckunterschied,

der auf den Einführkanal aufgebracht wird, vor der Aufbringung des zweiten Druckunterschieds auf den Trennkanal reduziert. Jedoch sollen die spezifischen Beispiele, die hierin erörtert und wiedergegeben sind, die vorliegende Erfindung veranschaulichen, aber in keiner Weise beschränken.

[0037] Ein Weg, um die Zusammensetzung eines Probenpfropfens zu manipulieren, der unter Verwendung von Verfahren der Erfindung gebildet ist, besteht darin, die Ionenstärke der Medien, z.B. der Pufferlösungen, in jedem Kanal zu variieren. In dem in den [Fig. 2A–Fig. 2F](#) wiedergegebenen Beispiel waren die Ionenstärken der Medien im Probeneinführkanal und dem Trennkanal im Wesentlichen gleich. Als Ergebnis ist der Probenpfropfen, der gebildet wird, in Bezug zu den in der Probe vorhandenen ionischen oder geladenen Spezies nicht konzentriert oder verdünnt. D.h. eine Konzentration der geladenen Spezies im Probenpfropfen sollte ungefähr gleich ihrer Konzentration in der in den Probeneinführkanal eingebrachten Anfangsprobe sein.

[0038] Jedoch kann ein Probenpfropfen auch unter Verwendung eines Prozesses gebildet werden, der als "Aufhäufung" bezeichnet wird, der die geladenen Komponenten einer Probe an der Kreuzung vor einer Probenpfropfenbildung konzentriert. Im Wesentlichen, wenn ein elektrisches Potenzial axial entlang dem Trennkanal angelegt wird, während ein Druckgradient eine Probe entlang dem Probeneinführkanal bewegt, ergibt sich ein Gebiet von erhöhter Ionenkonzentration an der Kreuzung, vorausgesetzt, dass sich das Medium im Probeneinführkanal bei einer niedrigeren Ionenstärke befindet als das Medium im Trennkanal. Dies führt zu einem Probenpfropfen, der in einer oder mehreren Ionenspezies in Bezug zur in die Probeneinführung eingeführten Probe konzentrierter ist. Eine Modulation der angelegten Spannung ermöglicht, dass eine gewünschte Probenkonzentration verwirklicht wird.

[0039] Mit Bezug auf die [Fig. 3A–Fig. 3F](#) ist das Verfahren zur Probenpfropfenbildung, das als "Aufhäufung" bezeichnet wird, wiedergegeben, wobei eine Vorrichtung der Erfindung verwendet wird. Die [Fig. 3A–Fig. 3F](#) zeigen eine Reihe von schematischen Darstellungen, die denen in den [Fig. 2A–Fig. 2F](#) ähneln, außer dass die Ionenstärke der Medien im Probeneinführkanal **10** geringer ist als die Ionenstärke des Mediums im Trennkanal **12**. Zusätzlich wird ein Spannungsgradient an den Trennkanal **12** angelegt, während ein Vakuum eine Probe entlang dem Probeneinführkanal **10** bewegt, wie in [Fig. 3B](#) dargestellt. Wie für einen Fachmann ersichtlich, erfahren Ionenspezies, die sich in einem angelegten elektrischen Potenzial von einem Medium geringerer Ionenstärke zu einem Medium höherer Ionenstärke bewegen, eine Abnahme in ihrer Bewegungsgeschwindigkeit aufgrund eines verminderten

elektrischen Feldes im Medium höherer Ionenstärke. Demgemäß, wie in [Fig. 3B](#) dargestellt, "akkumulieren" sich die Ionenspezies an der Grenzfläche **24** der zwei Medien sich unterscheidender Ionenstärke. Beim kontinuierlichem Fluss einer Probe durch die Verbindungsstelle werden die Ionenspezies in einer Probe an der Grenzfläche **24** hochkonzentriert. Anschließend an das geeignete Maß einer "Aufhäufung" wird das elektrische Potenzial entfernt, und es wird ein Druckunterschied am Trennkanal angelegt, um einen Probenpfropfen zu bilden, der in der Ionenspezies der Probe konzentriert ist, wie in den [Fig. 3C](#) und [Fig. 3D](#) dargestellt. Die restlichen Schritte des Verfahrens, die [Fig. 3E](#) und [Fig. 3F](#), sind wie oben für die [Fig. 2E](#) und [Fig. 2F](#) beschrieben.

[0040] Die Prozedur einer Aufhäufung kann nützlich sein, um Komponenten in verdünnten Proben zu konzentrieren, so dass eine nachweisbare Menge der Komponente oder Komponenten von Interesse durch den Trennkanal transportiert werden. Alternativ kann ein Probenmedium unter Verwendung von "Anti-Aufhäufung" verdünnt werden. Es wird im Wesentlichen dieselbe Prozedur praktiziert, jedoch befindet sich die Probe in einem Medium höherer Ionenstärke als im Trennkanal vorhanden ist. Demgemäß kann ein optimierter Probenpfropfen, z.B. seine Größe und Konzentration von Komponenten, durch die obigen Techniken gesteuert werden, d.h. Aufhäufung, Anti-Aufhäufung und Nicht-Aufhäufung.

[0041] [Fig. 4](#) veranschaulicht eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Eine Mikrochipanordnung **25**, die mit einer Reihe von Probeneinführkanälen **10** und Trennkanälen **12** geätzt ist, ist dargestellt. Die Kanäle treffen sich, um eine Kreuzung **11** zu bilden. Wie wiedergegeben, weist der Mikrochip eine Mehrzahl von Probeneinführ- und -trennkanälen auf. Die Kanäle sind zwischen etwa 10 µm und etwa 100 µm in der Breite und etwa 0,1 µm bis etwa 1000 µm in der Tiefe. Der Mikrochip weist auch Manifolds **26** und **27** auf, um eine Probe und/oder Reagenzien zu den und/oder in die Trenn- und Probeneinführkanäle zu transportieren.

[0042] Mikrochips mit Probeneinführ- und -trennkanälen können in großen Mengen von einem Festkörpersubstratmaterial konstruiert und gefertigt werden. Sie können leicht sterilisiert werden. Siliciumdioxid ist wegen der gut entwickelten Technologie, die seine genaue und effiziente Fertigung ermöglicht, ein bevorzugtes Substratmaterial, aber andere Materialien können verwendet werden, einschließlich Polymere, wie z.B. Polytetrafluorethylene. Die Probeneinführ- und -trennkanäle können von einem Siliciumdioxidsubstrat durch die verschiedensten maschinellen Mikrobearbeitungsverfahren, die Fachleuten bekannt sind, kostengünstig in großen Mengen gefertigt werden. Die maschinellen Mikrobearbeitungsverfahren, die verfügbar sind, umfassen Filmablagerungspro-

zesse, wie z.B. Schleuderbeschichtung und chemisches Aufdampfen, Laserfertigungs- oder fotolithografische Techniken, wie z.B. UV- oder Röntgenstrahlprozesse, und Ätzverfahren, die durch entweder nasschemische Prozesse oder Plasmaprozesse durchgeführt werden können. (Siehe z.B. Manz, et al., Trends in Analytical Chemistry 10: 144–149 (1991)).

[0043] Kanäle von variierenden Breiten und Tiefen können mit Abmessungen im Mikrobereich gefertigt werden. Ein Siliciumdioxidsubstrat, das gefertigte Probeneinführ- und -trennkänaäle enthält, kann mit einer dünnen anodisch gebundenen Glasabdeckung abgedeckt und versiegelt werden. Andere durchsichtige oder opake Abdeckmaterialien können verwendet werden. Jedoch sollte zur richtigen anodischen Bindung eines von dem Substrat oder der Abdeckung Siliciumdioxid und das andere Silicium sein. Demgemäß können z.B. ein Siliciumdioxid- und ein Siliciumsubstrat in Sandwichbauweise angeordnet sein, oder es kann ein Siliciumsubstrat zwischen zwei Glasabdeckungen eingefügt sein. Die Verwendung einer transparenten Abdeckung führt zu einem Fenster, das ein dynamisches Betrachten der Kanalinhalt erleichtert und ein optisches Probenehmen der Kanäle entweder visuell oder maschinell ermöglicht. Andere Fertigungsansätze können verwendet werden.

[0044] Zu analysierende Proben können an das Probenpfropfenbildungsgerät der Erfindung durch Probenabgabesysteme abgegeben werden, wie in der in gemeinsamem Besitz befindlichen mitanhängigen US-Patentanmeldung, Serial No. 09/(zu ändern in: identifiziert als Vertreterzeichen No. SYP-131), mit dem Titel "Apparatus And Methods For Sample Delivery", offenbart. Ein bevorzugtes Array von solchen Probenabgabesystemen ist in [Fig. 5](#) dargestellt. Ein Array von Kapillaren **28** wird durch einen Arrayhalter **30** gehalten. Der Innendurchmesser der Kapillaren liegt vorzugsweise zwischen etwa 5 µm und etwa 1000 µm, und bevorzugter zwischen etwa 20 µm und etwa 300 µm. Obwohl Abmessungen für im Wesentlichen kreisförmige Querschnittsflächen von Kapillaren bereitgestellt werden, werden ähnliche Querschnittsflächen für nicht kreisförmige Kanäle bevorzugt, beispielsweise wie rechteckige Kanäle mit einer Breite und einer Tiefe.

[0045] Ein Ende von jeder der Kapillaren ist versiegelt und berührt ein Temperaturregelgerät **32**. Die Kapillaren weisen auch eine Öffnung auf, die vorzugsweise zum geschlossenen Ende entgegengesetzt ist. Die Kapillaren können aus z.B. Glas oder Kunststoff hergestellt sein, und das Temperaturregelgerät kann ein beliebiges im Handel erhältliches oder kundenspezifisch hergestelltes Heiz- und Kühlgerät sein, z.B. ein Peltierelement. Die Kapillaren können weiter chemische Reagenzien **34** enthalten, die auf ihren Wänden immobilisiert sind. Eine Immobilisierung der

chemischen Reagenzien auf den Kapillarwänden kann durch Trocknen erzielt werden. Die Reagenzien können zur Kapillare abgegeben werden, indem sie z.B. mit einer Mikronadel in die Kapillare injiziert werden. Typischerweise weist die Mikronadel einen Durchmesser auf, der kleiner als der Innendurchmesser der Kapillare ist. Sobald sich die chemischen Reagenzien an ihrem Ort befinden, können sie durch Techniken getrocknet werden, die im Stand der Technik bekannt sind. Alternativ können die Reagenzien durch Erwärmen und Kühlen hydraulisch geladen werden, um eine die Reagenzien enthaltende Lösung in die Kapillare zu ziehen, wobei die Reagenzien an der gewünschten Stelle in der Kapillare getrocknet werden, dann diejenigen Gebiete gewaschen werden, wo die Reagenzien nicht gewünscht werden. Die Reagenzien können auch durch andere im Stand der Technik bekannte Techniken geladen werden.

[0046] Die in den Kapillaren immobilisierten chemischen Reagenzien können Bindeproteine, Liganden, Rezeptoren, Antikörper oder Antigene für eine Komponente sein, von der vermutet wird, dass sie in der Probe enthalten ist. Die Reagenzien können zusätzlich umfassen: Puffer, Tenside, Zusatzmittel, Arzneimittelträger, Träger, Haptane oder andere kompatible Moleküle, die eine Reaktion mit Probenkomponenten erleichtern oder beeinflussen.

[0047] Die Reagenzien können auch nachweisbare Einheiten umfassen. Wie hierin verwendet, soll der Terminus "nachweisbare Einheit" eine beliebige Einheit bedeuten, die zur Verwendung in der beanspruchten Erfindung geeignet ist, einschließlich aber nicht beschränkt auf: Enzyme, Fluorophore, Biotin, Chromophore, Radioisotope, Farbteilchen, elektrochemische oder chemilumineszierende Einheiten. Eine im Augenblick bevorzugte nachweisbare Einheit ist eine Fluoreszenzeinheit, wie z.B. Rhodamin. Andere im Augenblick bevorzugte nachweisbare Einheiten umfassen: Fluorescein, Cyaninfarbstoffe, Cumarine, Phycoerythrin, Phycobiliproteine, Dansylchlorid und Texasrot.

[0048] Ein Probenabgabesystem, wie oben beschrieben, kann zur Abgabe einer Probe zur Analyse über der Öffnung eines Probeneinführkanals einer Mikrochipanordnung **25** positioniert werden. Beim Betrieb nehmen die Probenabgabesysteme die Probe auf, ermöglichen, dass die Probe mit den chemischen Reagenzien reagiert, die auf ihren Wänden immobilisiert sind, und geben dann die Produkte der Reaktion, wenn vorhanden, zu den Probeneinführkanälen eines Geräts der Erfindung ab. Wie in [Fig. 5](#) dargestellt, kann ein Array von solchen Probenabgabesystemen gleichzeitig eine Mehrzahl von Proben an eine Mehrzahl von Probeneinführkanälen auf einer Mikrochipanordnung **25** abgeben.

[0049] Eine Modulation einer Temperatur in der Nähe des geschlossenen Endes der Kapillaren durch das Temperaturregelgerät **32** steuert die Aufnahme und Abgabe von Proben, d.h. die Bewegung der Probe in den Kapillaren. Da die Kapillaren an einem Ende versiegelt sind, bewirkt ein Erwärmen und Kühlen des Gases in dem geschlossenen Ende der Kapillaren, dass sich Gas expandiert bzw. kontrahiert. Wenn das Gas erwärmt wird, erhöht sich das Volumen, das es einnimmt, und folglich der Druck in der Kapillare ungefähr entsprechend dem idealen Gasgesetz $PV = nRT$, wobei P der Druck ist, V das Volumen ist, n die Anzahl von Gasmolekülen ist, R die Konstante $8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ ist und T die Temperatur ist. Gas wird deshalb durch die Öffnung in der Kapillare gedrängt, wenn das Gas erwärmt wird. Die Kapillare wird dann in die Probe eingetaucht und gekühlt. Beim Kühlen kontrahiert sich das Gas in der Kapillare, und die Probe tritt in die Kapillare ein. Wenn sich das Gas in der Kapillare kontrahiert, nimmt der Druck in der Kapillare ab. Der Druckunterschied zwischen der Außenseite und Innenseite der Kapillare drängt die Probe in die Kapillare.

[0050] Bei ausreichendem Kühlen berührt die Probe die chemischen Reagenzien, die auf den Kapillarwänden immobilisiert sind, und reagiert mit diesen Reagenzien. Die Zeit, die eine Probe in Kontakt mit den Reagenzien bleiben darf, wird durch die auszuführende Reaktion bestimmt. Ein weiteres Erwärmen und/oder Kühlen der Kapillare bewegt die Proben von einer ersten Stelle im Reaktor zur zweiten und zu anschließenden Stellen, wo eine zweite oder anschließende Reaktionen stattfinden. Nachdem die Reaktion beendet ist, bewirkt ein Wiedererwärmen der Kapillare, dass sich das Gas expandiert, wobei die Probe aus der Kapillare gedrängt wird. Wenn die Kapillare über der Öffnung eines Probeneinführkanals einer Vorrichtung der Erfindung positioniert ist, wird die Probe zur Probenpfropfenbildung direkt an diese Vorrichtung abgeben.

[0051] Ein Probenabgabesystem, das in Verbindung mit einem Probenanalysengerät der Erfindung verwendet wird, kann verwendet werden, um zahlreiche Typen von chemischen Reaktionen durchzuführen. Z.B. kann das System und das Gerät bei Diagnoseanwendungen, wie z.B. Blutuntersuchungen (z.B., um Blutkomponenten zu identifizieren oder um DNA im Blut nachzuweisen/zu identifizieren), Immunoassays (z.B., um das Vorhandensein eines spezifischen Antigens in einer Probe nachzuweisen) oder kolorimetrischen oder anderen Assays (z.B. radiochemischen, chemilumineszierenden, Bindungsassays und dergleichen) verwendet werden. Das System und das Gerät können verwendet werden, um Toxine (z.B. Bakterien, Alkohol, Arzneimittel, Viren, Organismen, Metalle, anormale Niveaus von physiologischen Chemikalien und dergleichen) oder andere Komponenten in einer Probe (z.B. einer biologischen

oder Umweltprobe) nachzuweisen. Ein Probenabgabesystem kann auch in einer chemischen Synthese (z.B. bei der Herstellung von Arzneimitteln, Peptiden, Nucleotiden usw.) verwendet werden. Zusätzlich kann ein Probenabgabesystem in zahlreichen Labortechniken, wie z.B. der Peptid- oder Nucleotidsequenzierung, -amplifikation oder -modifikation, verwendet werden.

[0052] Ein Probenabgabesystem, das Target-Polynucleotidsequenzen amplifiziert und bei ihrem Nachweis hilft, kann auch verwendet werden, um eine Probe an eine Vorrichtung der Erfindung abzugeben. **Fig. 6** stellt ein Array von Kapillaren **28** in thermischer Verbindung mit einem Temperaturregelgerät **32** dar. Jede Kapillare weist ein versiegeltes Ende auf, das sich in der Nähe des Temperaturregelgeräts **32** befindet. Die Kapillaren enthalten jeweils einen ersten Satz von chemischen Reagenzien **38** und einen zweiten Satz von chemischen Reagenzien **40**, die auf den Kapillarwänden immobilisiert sind. Ein zweites Temperaturregelgerät **42**, das Rohrleitungen für warmes und/oder kaltes Gas oder Flüssigkeit aufweist, ermöglicht eine Steuerung der Temperatur in einem diskreten Teil der Kapillare, z.B. dem Gebiet, das die chemischen Reagenzien enthält. Die dargestellten Probenabgabesysteme sind über einer Mikrochipanordnung **25** positioniert, um die Reaktionsprodukte an den Probeneinführkanälen **10** einer Vorrichtung der Erfindung abzulagern.

[0053] Eine Verwendung des zweiten Temperaturregelgeräts ermöglicht, dass die Temperatur der Reaktionen gesteuert wird, ohne dass die Temperatur des Gases im geschlossenen Ende der Kapillare beeinflusst wird. Wie bei Erörterung von **Fig. 5** oben beschrieben, bewirkt eine Erwärmung der Kapillare, dass sich das Gas expandiert, und bewegt folglich die Probe in der Kapillare oder aus ihr heraus. Indem ein diskreter Teil der Kapillare dort, wo die Reagenzien und die Probe lokalisiert sind, erwärmt wird, kann die Temperatur der Reaktion gesteuert werden, ohne dass die Probe in der Kapillare bewegt wird. Verschiedene in oder außerhalb der Kapillare vorhandene Isolatoren können verwendet werden, um eine Probe in der Kapillare stationär zu halten, während auch ein örtliches Erwärmen und/oder Kühlen ermöglicht wird. D.h. die Isolatoren können das Gas in der Nähe des geschlossenen Endes der Kapillare thermisch abschirmen, um seine Expansion oder Kontraktion zu verhindern.

[0054] In einer Ausführungsform der Erfindung kann der erste Satz von Reagenzien **38** Reagenzien zur Ausführung einer Polynucleotidamplifikationsreaktion sein, wie z.B. PCR. PCR ist im Stand der Technik wohlbekannt. Siehe z.B. das US-Patent No. 5,330,892. Zusätzlich können andere Polynucleotidamplifikationsreaktionen, die im Stand der Technik bekannt sind, unter Verwendung eines Reaktors

durchgeführt werden, einschließlich einer isothermen In-vitro-Amplifikation von DNA unter Verwendung eines Restriktionsenzym/DNA-Polymerasesystems, Walker, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 392–96 (1992), und einer Ligasekettenreaktion (LCR). Backman, Clin. Chem. 38: 457–58 (1992), die alle hierin durch Bezug aufgenommen werden.

[0055] Reagenzien zur Ausführung von PCR umfassen typischerweise einen Puffer, mindestens einen Primer, eine Polymerase, wie beispielsweise Taq-Polymerase, und mindestens ein Nucleosidtriphosphat. Die Wahl von Puffern, Primern und anderen Komponenten liegt innerhalb der fachlicher Sachkenntnis, abhängig von Charakteristiken der Sequenz, die zu amplifizieren ist (z.B. Länge, Abundanz in der Probe, G/C-Gehalt). Eine Polymerase kann aus der Gruppe ausgewählt werden, die besteht aus: Taq-Polymerase, E. coli-DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment von E. coli-DNA-Polymerase I, T4-DNA-Polymerase, anderen verfügbaren DNA-Polymerasen, reverser Transkriptase und anderen Enzymen, einschließlich wärmostabiler Enzymen. Die Nucleosidtriphosphate können dCTP, dGTP, dATP oder dTTP einschließen.

[0056] Der zweite Satz von Reagenzien **40** umfasst Sonden zur Bindung an amplifizierte Target-DNA. Sonden zur Verwendung in einem Reaktor können ein beliebiges DNA-Bindeprotein sein und können vorzugsweise eine komplementäre Sequenz sein, wie z.B. eine Ribosonde, ein Polynucleotid oder eine PNA. Es ist vorzuziehen, dass die Sonden nachweisbar markiert sind. Bevorzugte Markierungen umfassen Radioisotope, fluoreszierende oder kolorimetrische Markierungen, enzymatische Markierungen und Molekulargewichtsmarkierungen. Eine besonders bevorzugte Sonde ist eine Peptidnucleinsäure oder PNA. Peptidnucleinsäuren sind wohlbekannte DNA-Imitatoren mit einer neutralen Polyamidhauptkette, auf der die Nucleinsäurebasen auf dieselbe Weise angebracht sind, wie sie an der Phosphathauptkette der DNA angebracht sind. Siehe Egholm, et al., Nature, 365: 566–568 (1993); Oerum et al., Nucleic Acids Res., 23: 5332–36 (1993); Pluskal et al., The FASEB Journal, Poster#35 (1994); Practical PNA: Identifying Point Mutations by PNA Directed PCR Clamping, PerSeptive Biosystems, Band 1, Auflage 1 (1995). Peptidnucleinsäure-Synthone und -Oligomere sind im Handel erhältlich. (PerSeptive Biosystems, Inc., Framingham, MA). Siehe auch die PCT-Veröffentlichungen EP 92/01219, EP 92/01220 und die US 92/10921, die hierin durch Bezug aufgenommen sind. Peptidnucleinsäuresonden bilden typischerweise stabilere Duplexe mit DNA, verglichen mit DNA/DNA-Duplexen. Außerdem, weil PNA/DNA-Komplexe einen höheren thermischen Schmelzpunkt aufweisen als die analogen DNA/DNA-Duplexe kann eine Verwendung von PNA-Sonden die Reproduzierbarkeit von Blottingas-

says verbessern.

[0057] Fluorescein- oder Biotin-markierte PNA-Sonden werden auf einem Expedite Nucleic Acid Synthesis System (PerSeptive Biosystems) synthetisiert. Spacereinheiten aus 8-Amino-3,6-dioxaoctansäure (-o-) werden zur Harzgebundenen PNA hinzugefügt, bevor aktivierte Ester von Biotin (Bio) oder Fluorescein (Flu), wie z.B. der Dimethoxytritylbiotinester von 1-(4'-Nitrophenyl)pyrazolin-5-on (DMTr-bio-HPP) oder 5,6-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimid, mit der PNA umgesetzt werden. Nach Markierung werden die PNAs von dem Harz abgespalten, und jegliche Schutzgruppen werden unter Verwendung von z.B. einer TFMSA/TFA/m-Cresol/Thioanisol (2:6:1:1)-Mischung für zwei Stunden bei Raumtemperatur entfernt. Markierte PNA wird durch Zugabe von wasserfreiem Ether gefällt. Ein roher PNA-Niederschlag wird durch eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie auf einer Deltapack C18-Säule (Waters) und durch Sephadex G-25 gereinigt, um fluoreszierende Verunreinigungen zu entfernen.

[0058] Eine Immobilisierung der chemischen Reagenzien auf den Kapillarwänden kann durch Trocknen erzielt werden. Die Reagenzien können an die Kapillare abgegeben werden, z.B. indem sie mit einer Mikronadel in die Kapillare injiziert werden. Andere Techniken zur Einführung von Reagenzien in eine Kapillare oder einen Kanal sind zuvor erörtert worden oder sind Fachleuten bekannt. Nachdem sich die chemischen Reagenzien an ihrem Ort befinden, werden sie getrocknet, indem z.B. warme Luft über sie geblasen wird oder sie in einen Ofen platziert werden. Die PCR-Reagenzien können in einer Kohlenhydratmatrix getrocknet werden, wie beispielsweise Dextran oder Trehalose, bevor sie auf den Kapillarwänden immobilisiert werden. Jeder Satz von chemischen Reagenzien wird vorzugsweise in separaten Ringen um die Kapillarwände getrocknet.

[0059] Beim Betrieb wird die Probe, von der vermutet wird, dass sie eine Target-Polynucleotidsequenz enthält, in Kontakt mit dem ersten Satz von Reagenzien in den Kapillaren (d.h. den PCR-Reagenzien) gebracht, indem das geschlossene Ende der Kapillare erwärmt wird, um Gas zu verdrängen, wobei die Kapillare in die Probe gesetzt wird und dann das geschlossene Ende der Kapillare gekühlt wird, um das Gas zu kontrahieren und folglich die Probe hereinzuziehen. Sobald die Kapillare ausreichend gekühlt ist, berührt die Probe den ersten Satz von chemischen Reagenzien. Das zweite Temperaturregelgerät **42**, das an einer Position auf dem Reaktor platziert ist, die durch die PCR-Reagenzien eingenommen wird, steuert eine Temperaturwechselbehandlung. Das zweite Temperaturregelgerät **42** erhöht zuerst die Temperatur an der durch PCR-Reagenzien eingenommenen Position, um doppelsträngige DNA in der Probe zu denaturieren. Dasselbe oder ein unterschiedliches

Temperaturregelgerät kühlt dann das Reaktorgebiet, das die PCR-Reagenzien enthält, um ein Reassoziierenlassen von PCR-Primern an einzelsträngigen Matrizensträngen zu bewirken. Ein Erwärmen auf eine Temperatur, die zwischen derjenigen zur Denaturierung und derjenigen zum Reassoziierenlassen liegt, bewirkt eine Primerextension. Eine Anzahl von solchen Zyklen wird wiederholt, bis die Reaktion vollständig ist. Die Anzahl von PCR-Zyklen sowie die genauen Reagenzien, die verwendet werden, variieren abhängig von der Menge von verfügbarer Template-DNA, Reaktionswirkungsgrad und anderen bekannten Faktoren. Allgemeine Protokolle und Parameter zur PCR sind bekannt und sind z.B. in *Short Protocols in Molecular Biology*, 15-1-15-40 (Ausebel, et al., Herausgeber, 1995) verfügbar.

[0060] Sobald die PCR beendet ist, wird die amplifizierte Targetsequenz in Kontakt mit dem Satz von komplementären Sonden gebracht, indem das Gas im geschlossenen Ende der Kapillare mit dem Temperaturregelgerät **32** gekühlt wird. Der Fachmann erkennt, dass ein einziges Temperaturregelgerät verwendet werden kann, um die Kapillare zu erwärmen oder zu kühlen, um eine Probe zu bewegen, und um diskrete Kapillargebiete zur PCR zu erwärmen oder zu kühlen. Jedoch werden wie in [Fig. 6](#) dargestellt, separate Temperaturregelgeräte bevorzugt. Der Satz von Sonden kann mehrere Kopien einer einzigen Sonde umfassen, von der bekannt ist, dass sie mit mindestens einem Teil des amplifizierten Targets hybridisiert, oder der Satz kann eine Mehrzahl von unterschiedlichen Sonden umfassen, wobei einige an Teilen des Targets hybridisieren, einige nichtkomplementär zum Target sind.

[0061] Die Probe, die amplifizierte Nucleinsäure umfasst, wird in Kontakt mit den Sonden gebracht, indem die Kapillare gekühlt wird, um zu bewirken, dass sich die Probe nach oben (weg von dem Punkt eines Gas/Proben-Eintritts) und in Kontakt mit dem Gebiet der Kapillare bewegt, das Sonden umfasst, wie oben erwähnt. Eine Probe wird mit dem Satz von Sonden für eine Zeit inkubieren gelassen, die ausreicht, um eine Hybridisierung bis zu einem gewünschten Niveau von Stringenheit zu bewirken. Die Hybridisierungsparameter (d.h. Zeit, Puffer, Salzkonzentration, Temperatur usw.) werden auf Grundlage von Sequenzlänge, G/C-Gehalt, gewünschte Stringenheit und anderen Kriterien, die einem Fachmann bekannt sind, bestimmt. Siehe z.B. Ausubel, supra bei 6-7. Sobald ein gewünschtes Niveau von Hybridisierung erreicht worden ist, wird die Probe (einschließlich Hybridduplexe, die zwischen Target und Sonde gebildet sind) in einem Probenpfropfenbildungsgerät der Erfindung durch weiteres Erwärmen des Reaktors eluiert. Eine eluierte Probe kann dann gewaschen werden, um eine überschüssige (ungebundene) Markierung zu entfernen. Die Target-Polynucleotidsequenz wird dann unter Verwendung einer Probenanalysen-

vorrichtung der Erfindung nachgewiesen, um das Vorhandensein und/oder die Menge von Target-DNA zu bestimmen.

[0062] Die Probenanalysenvorrichtung zur Injektion, Abtrennung von Probenkomponenten und Nachweis von markierten Komponenten kann mit einem Probenabgabegerät, wie oben beschrieben, zur schnellen automatischen Analyse von biologischen Proben kombiniert werden, ohne die komplizierte Maschinerie, Zeit und die biologische Gefährdungsexposition, die vorhandenen Systemen inhärent sind. [Fig. 7](#) stellt eine integrierte Probenanalysenvorrichtung und Reaktorarray dar. Das integrierte Gerät enthält eine Probenkarte **44** mit einer Membran, auf der eine Probe, wie beispielsweise Blut, abgelagert ist. Die Karte kann z.B. eine IsoCode™-Karte (Schleicher & Schuell, King, NH) sein. Die Karte kann chemische Reagenzien zum Lysieren der Zellen der Probe, die auf der Kartenmembran abgelagert ist, enthalten. Das Lysat wird dann durch einen Ofen **46** getrocknet, wodurch die DNA von den lysierten Zellen an der Kartenmembran fixiert wird. Das integrierte Gerät umfasst weiter Reaktoren **48**, wie oben mit Bezug auf [Fig. 5](#) oder [Fig. 6](#) beschrieben. Das Gerät enthält eine Mikrochipanordnung **25** mit Probeneinführ- und -trennkänen, die mit einer Druck/Vakuum-Einheit **50**, Hochspannungsstromversorgung **52** und Hochdruckpatrone **54** verbunden sind.

[0063] In der Nähe des Endes der Trennkäne der Mikrochipanordnung befindet sich ein optisches Nachweismodul **56**. Das optische Nachweismodul weist das Vorhandensein von nachweisbaren Einheiten nach, die an die Komponente von Interesse in der Probe gebunden sind. Ein Nachweis kann durch Methodiken erzielt werden, umfassend, aber nicht beschränkt auf: Extinktion von Ultraviolettstrahlung, Extinktion von sichtbarer Strahlung, Fluoreszenz, Brechungsindex, Raman- oder Massenspektroskopie, Elektrochemie und Leitfähigkeit. Ein Nachweis durch Fluoreszenz wird bevorzugt. Ein Fluoreszenznachweis unter Verwendung dieses Moduls beinhaltet einen Mikrochip Laserstrahl, der über die Käne des Mikrochip scannt.

[0064] Das integrierte Gerät umfasst weiter eine sterile Deionateinheit **58**, eine Siebgelpuffereinheit **60** und eine Mikrokanalrekonditionierungslösungseinheit **62**. Jede von diesen drei Einheiten, wie wiedergegeben, ist in zwei Hälften aufgeteilt, wobei eine Hälfte die frischen Lösungen enthält und die andere Hälfte Abfalllösungen enthält.

[0065] Beim Betrieb wird eine Probe auf der Membran der Probenkarte **44** abgelagert, und die Karte wird in das integrierte Gerät eingesetzt, wie in [Fig. 7](#) dargestellt. Die Zellen in der Probe werden durch die chemischen Reagenzien, die in der Membran enthalten sind, lysiert. Die zelluläre DNA oder andere Pro-

benkomponenten werden dann auf der Membran durch Erwärmen mit dem Ofen **46** angetrocknet. An diesem Punkt kann die Karte entfernt und archiviert werden, oder sie kann beim fortgesetzten Verarbeiten verwendet werden. Alternativ kann ein Guthrie-Papier trockenblutblot verwendet werden, um die Probe abzulagern.

[0066] Nach Antrocknen der Probe an der Karte werden die Kartenmembranen unter Verwendung von sterilem Deionat von der Einheit **58** mit Dampf erwärmt, um die Probenkomponenten in einer kleinen Menge von Flüssigkeit zu extrahieren. Die Kapillaren der Reaktoren **48** werden dann erwärmt, um Gas zu verdrängen, über die Membranen in Position bewegt und in die Flüssigkeit eingetaucht, die die Probe enthält. Nach Kühlen der Kapillaren kontrahiert sich das Gas im geschlossenen Ende der Kapillaren, und die Probe wird in die Kapillaren gezogen. Die Kapillaren sind vorzugsweise mit Reagenzien vorbeladen, die für den Immunoassay oder den auszuführenden Polynucleotidnachweis spezifisch sind, wie oben beschrieben.

[0067] Die einmal in den Kapillaren umgesetzte Probe, wie oben beschrieben, wird in den Probeneinführkanälen der Mikrochipanordnung **25** abgelagert. Die Kapillaren bewegen sich darüber, so dass sie über den Probeneinführkanälen positioniert sind. Die Kapillaren werden dann durch ein Temperaturregelgerät **32** erwärmt, so dass sich Gas im Innern des geschlossenen Endes der Kapillare expandiert und die Probe aus der Kapillare heraus drängt, wie oben mit Bezug auf [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) beschrieben. Einmal verwendet, können die Probenabgabesysteme entsorgt werden, und neue Systeme, die Reagenzien für die nächste Reaktion von Interesse enthalten, können in das integrierte Gerät eingesetzt werden.

[0068] Sobald sie am Probeneinführkanal der Mikrochipanordnung abgelagert ist, wird die Druck/Vakuum-Einheit **50** verwendet, um einen Druckgradienten im Innern der Probeneinführ- und -trennkäule des Mikrochip zu erzeugen und dadurch die Probe in den Trennkäule zu injizieren, wie oben mit Bezug auf [Fig. 2](#) beschrieben. Der Spannungsgenerator **52** kann auch verwendet werden, um einen Spannungsgradienten am Trennkäule anzulegen, um die Aufhäufungstechnik auszuführen, wie oben mit Bezug auf [Fig. 3](#) beschrieben.

[0069] Nach Bildung des Probenpfropfens im Trennkäule wird der Spannungsgenerator **52** verwendet, um eine Spannung axial entlang dem Trennkäule des Mikrochip anzulegen, um die Komponenten der Probe zu trennen. Ein Siebmedium ist in den Käulen des Mikrochip vorbeladen. Der Puffer von der Einheit **60** wird in die Trennkäule vor einer Bildung des Probenpfropfens injiziert.

[0070] Wenn die Proben das Ende des Trennkäule erreichen, wird das optische Nachweismodul **56** verwendet, um das Vorhandensein der nachweisbaren Einheiten, die an den Probenkomponenten angebracht sind, in den Trennkäulen nachzuweisen. Für Polynucleotididentifikationen werden die Ergebnisse des optischen Nachweises mit Daten verglichen, die von Gendiagnoseexperimenten erzeugt sind. Diese Daten liegen in der Form von Intensität-gegen-Zeit-Kurven vor, die sich beim Bestimmen einer Entsprechungsähnlichkeit elektronisch suchen lassen.

[0071] Nach Ausführung der Analyse wird Druck von der Hochdruckpatrone **54** verwendet, um Druck an beiden Enden des Trennkäule anzulegen, um die Käule der Mikrochipanordnung zu reinigen. Die Käule werden dann unter Verwendung einer Rekonditionierungslösung von der Einheit **62** rekonditioniert. Die Mikrochipanordnung kann dann in anschließenden Analysen wiederverwendet werden. Alternativ kann die Mikrochipanordnung entsorgt werden.

[0072] Verglichen mit Verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind, verwendet ein Probenpfropfenbildungsgerät der Erfindung Druckunterschiede, um einen Probenpfropfen zur Abtrennung und/oder Analyse zu bilden. Vorteile der vorliegenden Erfindung umfassen das Vermögen, einen Probenpfropfen, der nichtionische Spezies enthält, zu bilden und zu trennen, und das Vermögen, einen Probenpfropfen ohne Anlegung eines elektrischen Feldes zu bilden, so dass die Oberflächencharakteristiken von dem und das Medium im Käule eine Probenpfropfenbildung nicht sehr beeinflussen. Demgemäß bietet die vorliegende Erfindung mehrere Vorteile gegen Pfropfenbildungsgeräte und -verfahren, die im Stand der Technik bekannt sind.

[0073] Zusätzlich, werden bei Verwendung in Verbindung mit einem oben beschriebenen Probenabgabesystem weitere Vorteile verwirklicht. Verglichen mit der Verwendung von herkömmlichen Mengenreglern, wie z.B. Spritzen und Pumpen, weist ein thermisch gesteuertes Probenabgabesystem weniger bewegliche Teile auf, die verschleifen oder eine umfassende Wartung erfordern mögen. Außerdem, da das Probenabgabesystem unabhängig von einem Analyseninstrument sein kann, werden andere Vorteile verwirklicht. Z.B. können die Probenabgabekäule aus kostengünstigen Materialien hergestellt sein, wie z.B. Kunststoffkapillarrohrmaterial, da eine optische Qualität oder integrierte Elektroden nicht erforderlich sind. Demgemäß ist eine Einmalverwendung eines Käule attraktiv, was einen Reinigungsschritt und/oder Querverunreinigungen beseitigen kann.

[0074] Zusätzlich, da die Käule typischerweise bei einer Analysentechnik nicht direkt verwendet werden, können die Käule leicht bewegbar sein und ei-

nen höheren Grad an Toleranz zum Positionieren mit einem Probenpfropfenbildungsgerät dieser Erfindung aufweisen. D.h., da das Nachweissystem eines Analysengeräts typischerweise stationär bleibt, muss die optische Ausrichtung einer Flüssigkeitsnachweiskapillare einmal für eine optimale Genauigkeit während der Analyse einer Mehrzahl von Proben durchgeführt werden. Weiter, wenn das Probenabgabesystem ein chemisches Reagenz enthält und dazu verwendet wird, um eine Reaktion auszuführen, können jegliche teilchenförmigen Stoffe, die vorhanden sind oder während der Reaktion gebildet werden, leicht vor einer Einführung der Reaktionsprodukte zu einem Probenpfropfenbildungsgerät filtriert werden, wodurch ein Verstopfen und/oder eine ungenaue Analyse verhindert werden. Diese obigen Merkmale ermöglichen, dass eine einfache und kostengünstige Automationsrobotik verwendet wird.

[0075] Verglichen mit einer Verwendung von herkömmlichen Systemen, die auf Kapillarwirkung angewiesen sind, um Chemikalien abzugeben, zu mischen und/oder umzusetzen, zeigt ein Probenabgabesystem der Erfindung mehrere Vorteile. Die Oberfläche eines Kanals eines Probenabgabesystems der Erfindung kann hydrophil oder hydrophob sein, im Gegensatz zu einer Kapillarwirkungsoberfläche, die eine hydrophile Oberfläche erfordert. Auch mit Bezug auf die Oberfläche des Kanals hängt die Probenlösungszumessungsreproduzierbarkeit weniger von den Oberflächencharakteristiken und Probenkonstituenten ab. Zusätzlich ermöglicht das Probenabgabesystem der Erfindung eine direkte Steuerung über die Zumessung von Proben und Reagenzien, und ermöglicht, dass eine Blasenabtrennung routinemäßig praktiziert wird. Diese Vorteile werden nicht nur durch das Probenabgabesystem, das oben beschrieben ist, erzielt, sondern auch mit Bezug auf ein Probenpfropfenbildungsgerät der Erfindung, das Druckunterschiede verwendet.

[0076] Verglichen mit elektroosmotischem Fluss zum Abgeben, Mischen und/oder Umsetzen von Chemikalien zeigt ein Probenabgabesystem, das Druck verwendet, einige derselben Vorteile im Vergleich mit einer Verwendung der oben erörterten Kapillarwirkung, d.h. Oberflächencharakteristiken und Lösungszumessungsreproduzierbarkeit. Außerdem ist das Probenabgabesystem typischerweise zur Ausführung einer Analyse und/oder von chemischen Reaktionen in seiner Lösungszusammensetzung unbeschränkt. D.h. Variablen, wie z.B. pH, Ionenstärke, Pufferzusammensetzung, chemische Zusatzmittel und Lösungsmittel sind häufig unbeschränkt, abhängig von der speziellen Anwendung. Diese Variablen sind typischerweise beschränkt, damit ein effektiver elektroosmotischer Fluss auftritt. Wieder werden, wie oben erwähnt, diese Vorteile nicht nur mit dem oben beschriebenen Probenabgabesystem verwirklicht, sondern auch mit Bezug auf ein Probenpfropfenbil-

ungsgerät der Erfindung, das Druckunterschiede verwendet.

[0077] Deshalb ermöglicht, wie oben beschrieben und veranschaulicht, die vorliegende Erfindung eine Hochgeschwindigkeitsanalyse von biologischen Proben im Mikrobereich ohne die Kompliziertheit, Zeit, Arbeit und die biologische Gefährdungsexposition herkömmlicher Techniken. Zusätzliche Aspekte und Ausführungsformen der Erfindung sind bei Betrachtung der vorhergehenden Offenbarung ersichtlich. Demgemäß ist der Bereich der Erfindung nur durch den Umfang der angefügten Ansprüche beschränkt.

[0078] Die Erfindung kann in anderen spezifische Formen verwirklicht sein.

Patentansprüche

1. Probenpfropfenbildungsgerät, umfassend:
ein Gehäuse, das begrenzt
einen eine Längsachse umfassenden Trennkanal (12) und
einen Einführkanal, der eine Verbindungsstelle mit dem Trennkanal bildet; und
ein Druckregelgerät unabhängig in Verbindung mit dem Trennkanal und dem Einführkanal, wobei das Druckregelgerät Einrichtungen umfasst
zum Aufbringen eines ersten Druckunterschieds auf den Einführkanal, um eine Probe zur Verbindungsstelle zu fördern, und
zum Aufbringen eines zweiten Druckunterschieds auf den Trennkanal, um einen Teil der Probe in der Verbindungsstelle in den Trennkanal zu fördern, um einen Probenpfropfen (14) zu bilden.

2. Probenpfropfenbildungsgerät nach Anspruch 1:
(a) weiter umfassend ein Trennmedium, das im Trennkanal angeordnet ist;
(b) wobei das Gehäuse einen mikroverfertigten festen Körper umfasst;
(c) wobei der Einführkanal und der Trennkanal unabhängig einen mittleren Durchmesser im Bereich von etwa 0,1 µm bis etwa 1000 µm aufweisen;
(d) weiter umfassend einen Spannungsgenerator (19) in Verbindung mit dem Trennkanal, um ein elektrisches Potenzial entlang der Längsachse anzulegen; und/oder
(e) wobei das Druckregelgerät eine steuerbare Druckquelle umfasst.

3. Wissenschaftliches Instrument, umfassend das Probenpfropfenbildungsgerät nach Anspruch 1 oder Anspruch 2.

4. Wissenschaftliches Instrument nach Anspruch 3, weiter umfassend:
(a) einen Rechner in Verbindung mit dem Druckregelgerät, um das Druckregelgerät zu steuern;

- (b) einen Detektor, der von der Verbindungsstelle im Abstand angeordnet ist und mit dem Trennkanal in Verbindung steht, um eine chemische Komponente zu detektieren; und/oder
- (c) ein thermisch gesteuertes Abgabesystem, um die Probe in den Einführkanal einzuführen.

thermisch gesteuerten Probenabgabengeräts, um die Probe mit dem Einführkanal in Verbindung zu bringen.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

5. Verfahren zum Bilden eines Probenpfropfens, umfassend die Schritte:

(a) Bereitstellen eines Probenpfropfenbildungsgeräts, umfassend:

ein Gehäuse, das begrenzt

einen eine Längsachse umfassenden Trennkanal und

einen Einführkanal, der eine Verbindungsstelle mit dem Trennkanal bildet; und

ein Druckregelgerät in Verbindung mit dem Trennkanal;

(b) Aufbringen eines ersten Druckunterschieds auf den Einführkanal, um eine Probe in Verbindung mit dem Einführkanal zu der Verbindungsstelle zu fördern; und

(c) Aufbringen eines zweiten Druckunterschieds auf den Trennkanal, um einen Teil der Probe in der Verbindungsstelle in den Trennkanal zu fördern, um einen Probenpfropfen zu bilden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem der erste Druckunterschied, der auf den Einführkanal aufgebracht wird, vor dem Aufbringen des zweiten Druckunterschieds auf den Trennkanal verringert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5, weiter umfassend den Schritt: Anlegen eines elektrischen Potentials entlang der Längsachse.

8. Verfahren nach Anspruch 7, entweder

(i) wobei ein Anlegen eines elektrischen Potentials entlang der Längsachse während Schritt (b) erfolgt, und fakultativ weiter umfassend den Schritt: Analysieren auf eine Komponente in dem Probenpfropfen; und/oder

(ii) wobei ein Anlegen eines elektrischen Potentials entlang der Längsachse Komponenten in dem Probenpfropfen trennt.

9. Verfahren nach Anspruch 5, weiter umfassend den Schritt: Aufbringen von positivem Druck auf den Trennkanal, um den Probenpfropfen entlang dem Trennkanal zu bewegen; und fakultativ wobei ein Anlegen eines positiven Drucks Komponenten in dem Probenpfropfen trennt; und weiter fakultativ weiter umfassend den Schritt: Analysieren auf eine Komponente in dem Probenpfropfen.

10. Verfahren nach Anspruch 5, entweder

(i) wobei ein Aufbringen des zweiten Druckunterschieds auf den Trennkanal für ein spezifiziertes Intervall erfolgt; und/oder

(ii) weiter umfassend den Schritt: Bereitstellen eines

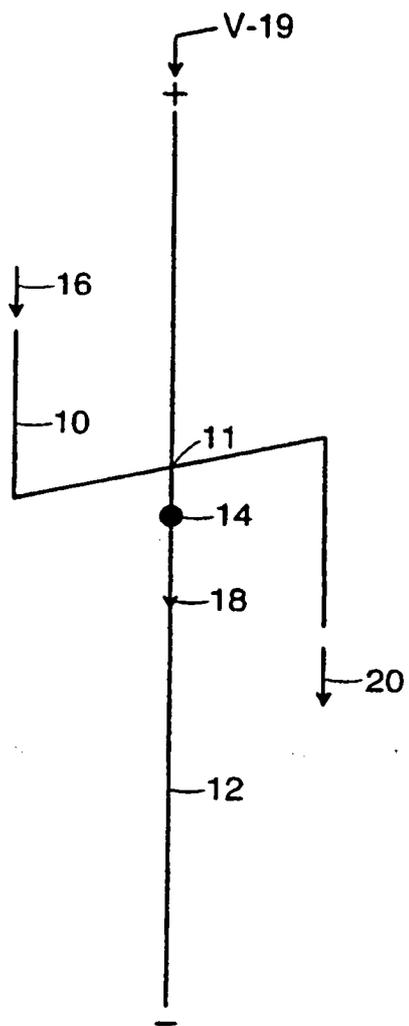


FIG. 1

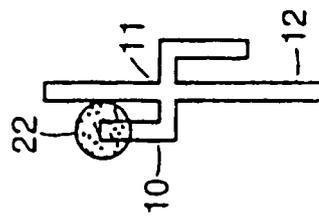


FIG. 2A

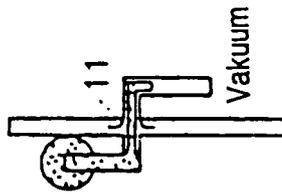


FIG. 2B

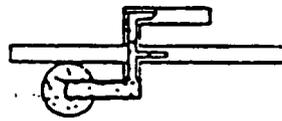


FIG. 2C

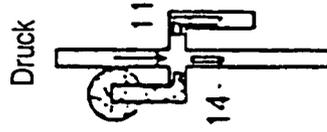


FIG. 2D

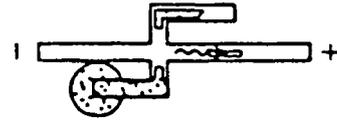


FIG. 2E

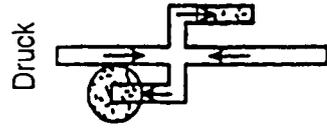


FIG. 2F

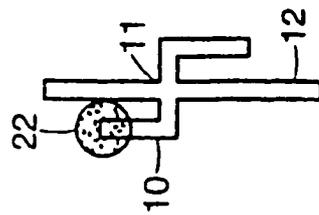


FIG. 3A

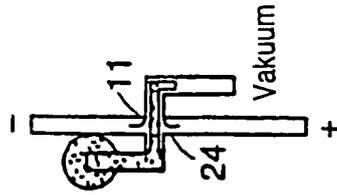


FIG. 3B

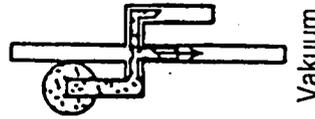


FIG. 3C

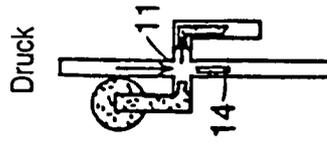


FIG. 4D

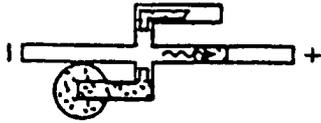


FIG. 3E

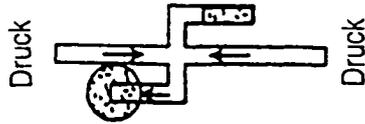


FIG. 3F

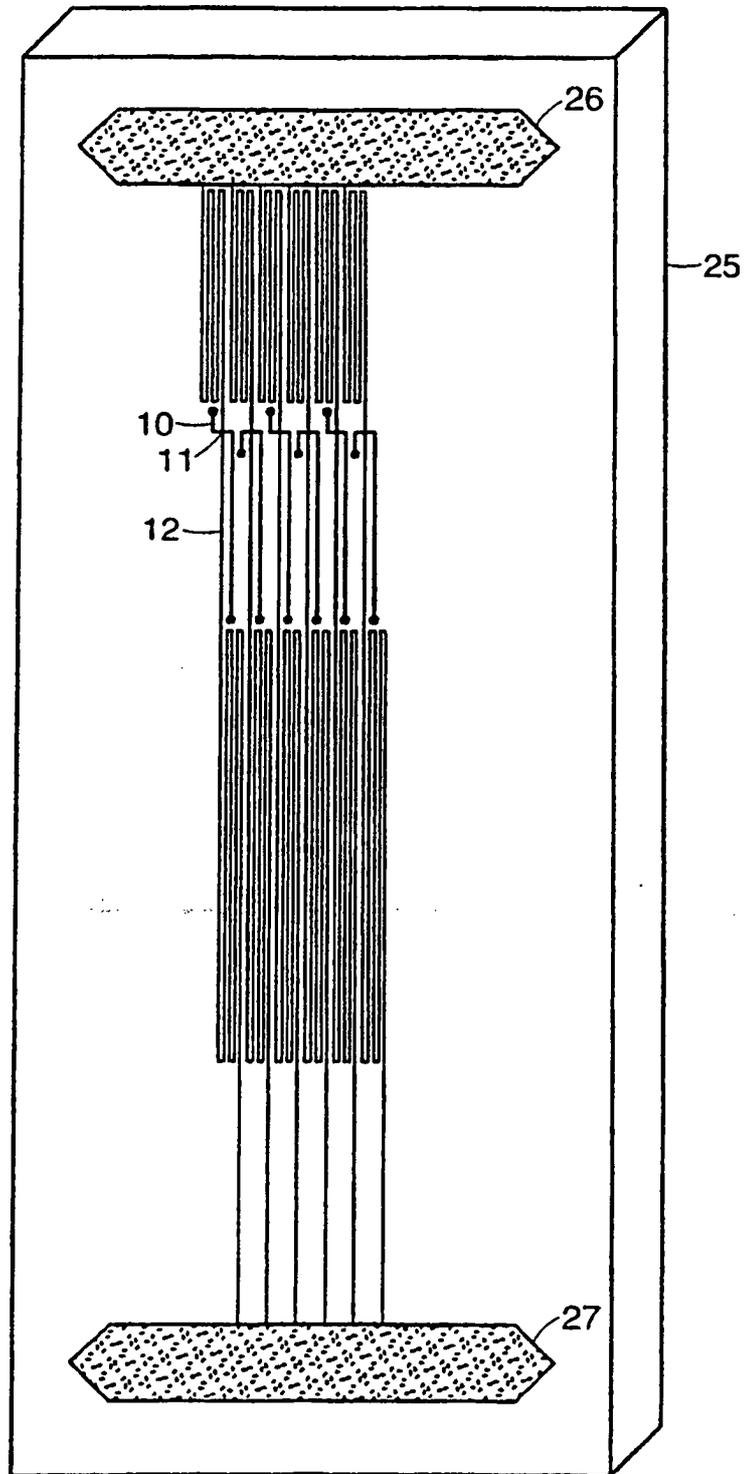


FIG. 4

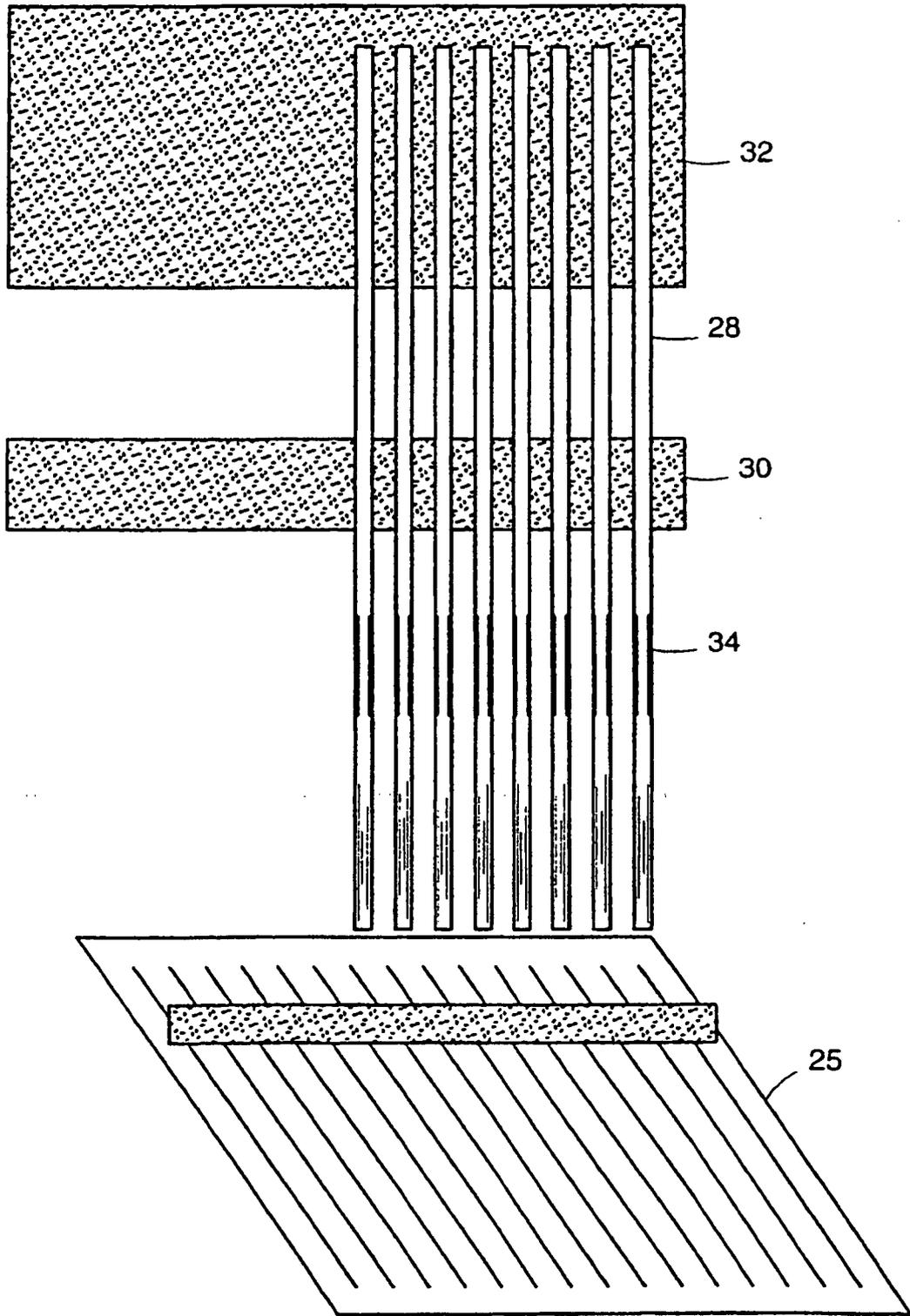


FIG. 5

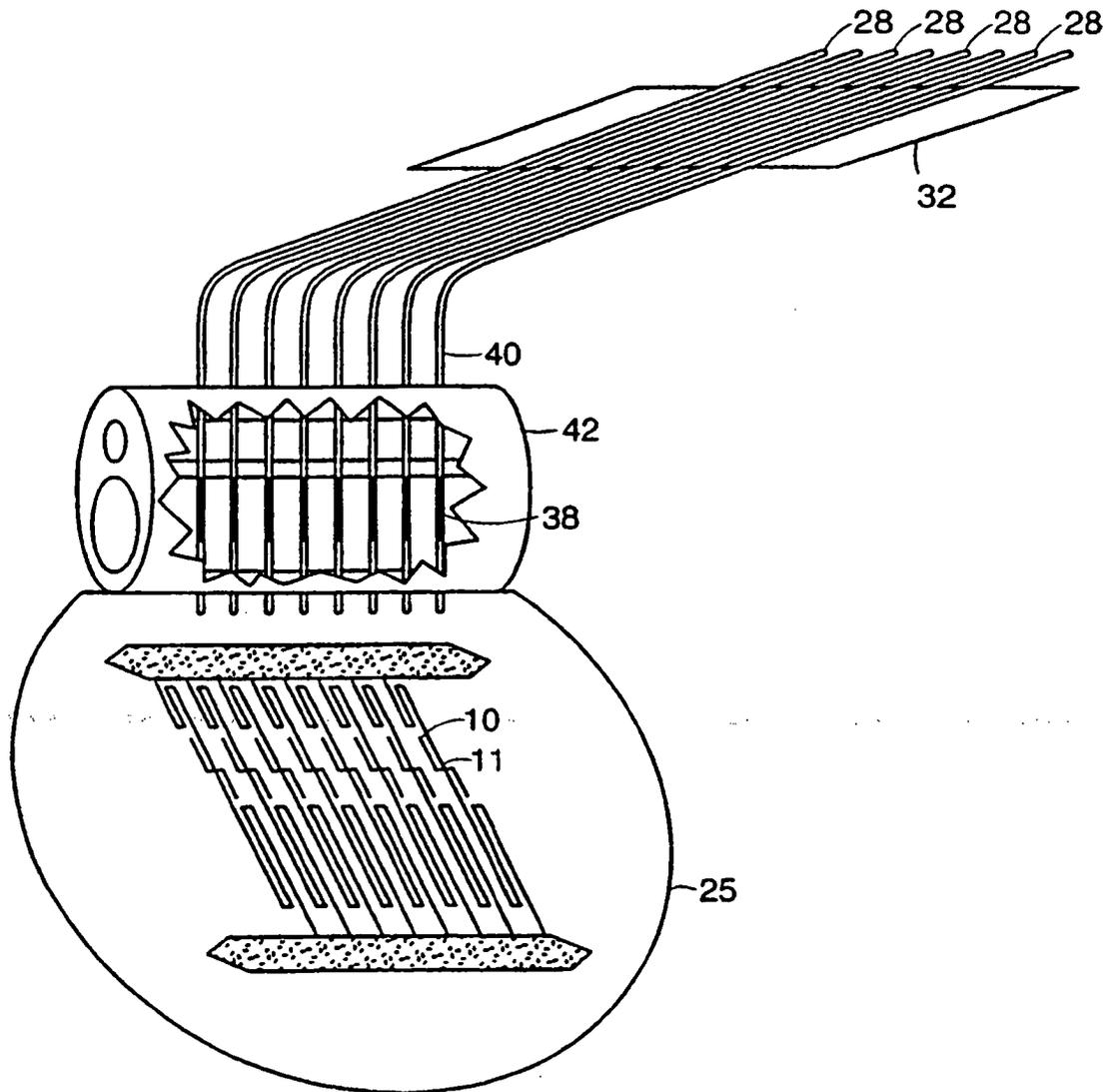


FIG. 6

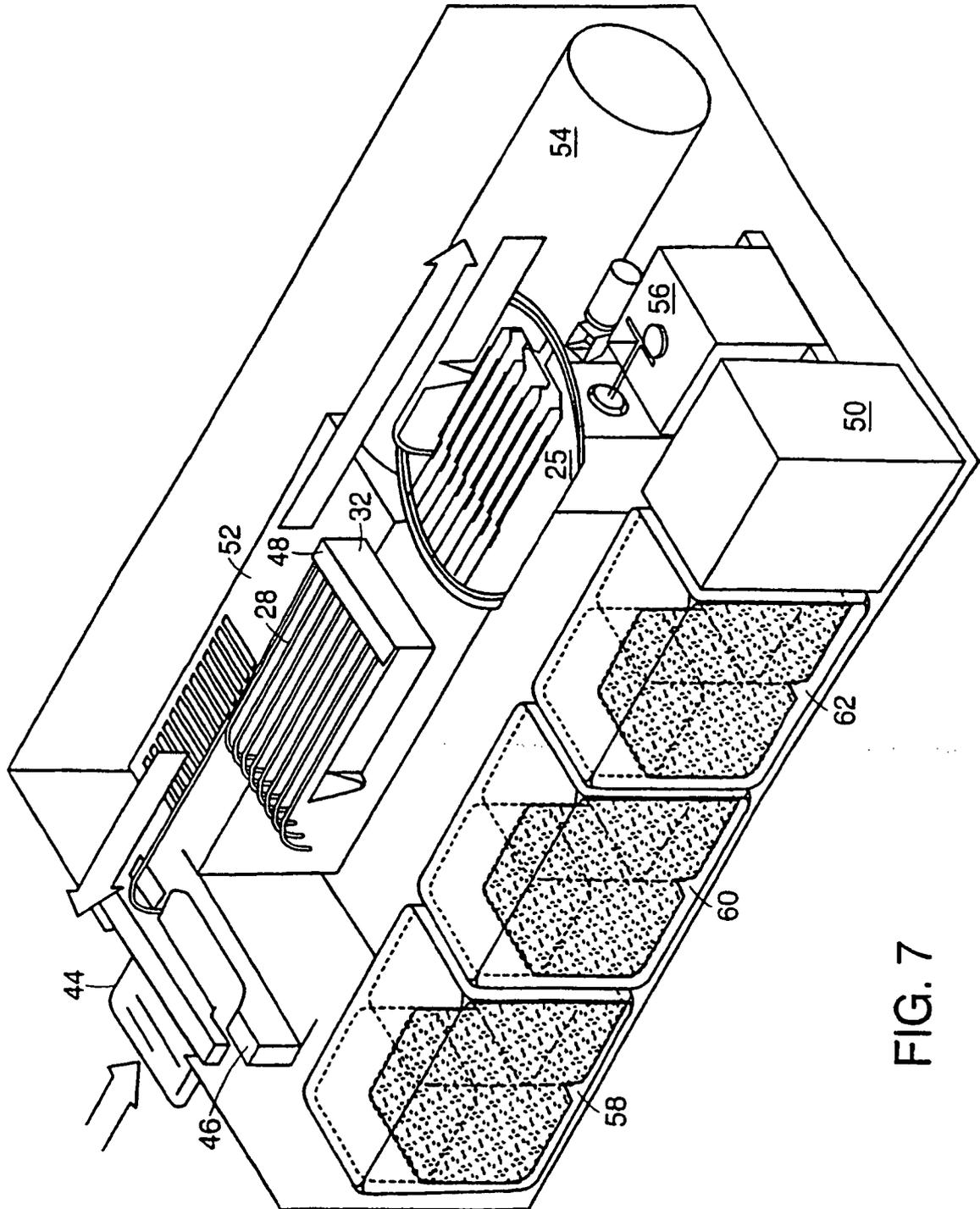


FIG. 7