



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 013 339 T2** 2009.07.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 658 130 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 013 339.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US2004/025354**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 780 223.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2005/018787**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.08.2004**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **03.03.2005**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.05.2006**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **23.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.07.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **B01F 13/00** (2006.01)  
**B01F 5/06** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**643862**      **19.08.2003**      **US**

(73) Patentinhaber:  
**Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown,  
N.Y., US**

(74) Vertreter:  
**Maier, D., Dipl.-Ing. Univ., Pat.-Anw., 85221 Dachau**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,  
SK, TR**

(72) Erfinder:  
**PUGIA, Michael J., Granger, IN 46530, US;  
SCHULMAN, Lloyd S., Osceola, IN 46561, US;  
KUO, Hai-Hang, Granger, IN 46530, US;  
BLANKENSTEIN, Gert, 44141 Dortmund, DE**

(54) Bezeichnung: **MISCHEN IN MIKROFLUIDVORRICHTUNGEN**

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**

## Hintergrund der Erfindung

**[0001]** Die Erfindung betrifft allgemein Mikrofluidvorrichtungen und insbesondere Vorrichtungen zur Analyse von biologischen Proben, wie Blut, Urin usw. Diese Mikrofluidvorrichtungen bringen kleine Mengen einer flüssigen Probe in Kontakt mit Reagenzien, um ein qualitatives oder quantitatives Maß des Vorhandenseins oder der Abwesenheit eines Analyten von Interesse bereitzustellen. Üblicherweise wird eine abgemessene Menge der Probe durch eine oder mehrere Kammern geführt, die Reagenzien oder Konditionierungsmittel enthalten, die dazu dienen, die für das Inkontaktbringen mit den Reagenzien vorgesehene Probe vorzubereiten. Die Menge der Probe ist normalerweise kleiner als 10 µl, und die Kammern sind von ähnlicher Größe. Sie sind über Kapillarverbindungswege miteinander verbunden, durch die sich die Probe mittels Kapillarkräften oder einer angewandten Kraft, wie etwa einer Zentrifugalkraft, bewegt.

**[0002]** In vielen Fällen ist es notwendig, die Probe mit einer Konditionierungsflüssigkeit in Kontakt zu bringen, um die Probe zu verdünnen oder die Probe in sonstiger Form für eine nachfolgende Reaktion vorzubereiten. Beispielsweise ist es in Assays oft erforderlich, eine Probe in Kontakt zu bringen, um Interferenzen zu minimieren, Reaktionsbedingungen, wie pH-Wert, Co-Faktoren oder Innenstärke, zu kontrollieren, Komplexe zu bilden, wie Multi-Dentat-Liganden, Proteine, wie Antikörper-Antigen-Komplexe, Nukleinsäuren, Polykohlenhydrate, Lipide oder Metalle, zur Lyse von Zellen, z. B. Bakterien, roten Blutkörperchen oder weißen Blutkörperchen, und um Analyten und Metabolite in nachweisbarer Form zur Reaktion zu bringen. Das Mischen der Probe mit einer Konditionierungsflüssigkeit bereitet wegen der kleinen Größe der Mikrofluidvorrichtung Probleme. Die Bewegung kleiner Flüssigkeitsmengen durch enge Verbindungswege mithilfe von Kapillarkräften umfasst die Interaktion der Flüssigkeit mit den Wänden der Verbindungswege. Wenn die Flüssigkeit wasserhaltig ist, was für biologische Proben typisch ist, und die Wände der Verbindungswege hydrophil und schmal sind, beispielsweise 200 bis 200 µm breit und 1 bis 200 µm tief, erzeugt die Oberflächenenergie der Flüssigkeit eine Kraft, die die Flüssigkeit durch den Verbindungsweg bewegen kann. Aufgrund des großen Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen ist die Oberflächenwirkung auf die Flüssigkeit groß. Die Reynolds-Zahl, eine dimensionslose Kennzahl, die die Flüssigkeitsströmung kennzeichnet, ist sehr klein, was darauf hinweist, dass die Flüssigkeitsströmung laminar und nicht turbulent ist. Die laminare Strömung ist ohne Wirbelbildung, wobei sich die Geschwindigkeit mit dem Abstand zur Wandung erhöht.

**[0003]** Das Mischen einer Probe mit Konditionierungsflüssigkeiten ist schwierig, wenn laminare Strömung vorherrscht. Mischen erfolgt üblicherweise durch Erzeugen von Turbulenzen. Nach dem bisherigen Stand der Mikrofluidtechnik werden Flüssigkeiten in laminaren Strömungen in engen Kontakt gebracht, wobei man sich auf die Diffusion von Molekülen aus einer Schicht der Flüssigkeit in die andere verlässt, um eine Mischung der Flüssigkeiten zu erhalten. In aktiven Mikromischern, die mit Makrotechniken arbeiten, z. B. mechanischem Rühren, kann die Einbeziehung aktiver Elemente sehr komplexe und kostspielige Vorrichtungen erfordern.

**[0004]** Im US-Patent 6,136,272 beschreiben Weigl et al. eine Vorrichtung, die zwei oder mehr flache Laminarschichten erzeugt, um die Diffusion von Molekülen aus einer Schicht in eine benachbarte Schicht zu ermöglichen. Die Patentinhaber behaupten, dass ihre Vorrichtung so entwickelt wurde, dass die Reynolds-Zahl kleiner als 1 und vorzugsweise kleiner als 0,1 ist. Sie beobachteten, dass dann, wenn die Reynolds-Zahl größer als 1 ist, die Strömung laminar sein kann, aber dass derartige Systeme gegen Turbulenzbildung anfällig sind, wenn das Strömungsmuster gestört wird. Das System der Patentinhaber wurde daher entwickelt, um laminare Strömung mit Diffusionsmischen zu gewährleisten. In einer weiteren veröffentlichten US-Patentanmeldung 2002/0076300 (Weigl et al.) wird die Bildung einer verbesserten Diffusion zwischen parallelen Strömen in laminarer Strömung beschrieben.

**[0005]** Die veröffentlichte US-Patentanmeldung 2002/0097532 beschreibt eine Scheibe, die viele Kanäle enthält. Es wurden zwei Flüssigkeiten durch einen Zick-Zack-Kanal in laminarer Strömung geführt, während die Scheibe gedreht wurde, wobei die Mischung laut Beschreibung durch Diffusion erfolgte.

**[0006]** In der veröffentlichten US-Patentanmeldung 2001/0042712 wird ein T-Sensor gezeigt. Der Sensor berührt eine flüssige Probe mit einer Indikatorflüssigkeit, wobei die Ströme in paralleler laminarer Strömung fließen und wobei zwischen den Strömen Diffusion auftritt.

**[0007]** Die veröffentlichte US-Patentanmeldung 2001/0048637 beschreibt eine ähnliche Vorrichtung, die das Problem des "Schmetterlingseffekts" löst, der dadurch entsteht, dass die Diffusion an den Wänden stärker ist als in der Mitte der parallelen, laminaren Strömung.

**[0008]** Die veröffentlichte US-Patentanmeldung 2002/0076350 veranschaulicht ein weiteres Verfahren zur Verbesserung der Diffusion zwischen laminaren Strömungen. Parallele, laminare Strömungen wurden durch 90°-Kehren geführt, um das Seitenverhältnis der Ströme zu ändern, wodurch sich die Diffu-

sion zwischen den Strömen verbesserte.

**[0009]** Mikromischer werden in den US-Patenten 6,190,034 B1 und 6,241,379 B1 beschrieben. Flüssigkeiten werden durch Erzeugen dünner Schichten gemischt, um das Mischen durch Diffusion zu ermöglichen.

**[0010]** Die vorstehend erörterten Patente und Patentanmeldungen betreffen das Durchtreten eines Reagenzstroms in Nachbarschaft zu einem Probenstrom, so dass durch Diffusion eine Reaktion eintritt, die dann gemessen wird. In anderen Patenten und Patentanmeldungen wird das Mischen mithilfe verschiedener Mittel versucht, ungeachtet der Tatsache, dass sich die Flüssigkeiten in laminarer Strömung befinden.

**[0011]** Die veröffentlichte US-Patentanmeldung 2001/0048900 beschreibt das Mischen separater Ströme, indem eine Verwirbelung in einer Kammer erzeugt wird. Die Erfinder geben an, dass in einigen Ausführungsformen eine Reynolds-Zahl von 320 erzielt wird und dass die erste und zweite Flüssigkeit Reynolds-Zahlen zwischen 1 und 2000 aufweisen. Die Strömung liegt somit in einem Bereich zwischen laminarer Strömung und turbulenter Strömung.

**[0012]** Das US-Patent 5,921,678 beschreibt einen Flüssigkeitsmischer, in dem zwei Ströme einer Flüssigkeit frontal aufeinander treffen und gemeinsam in einem Kanal in 90° zu den Eintrittskanälen austreten. Die Reynolds-Zahl der Ströme wird mit 2000–6000 angegeben. Es werden scharfkantige Pfeiler gezeigt, die das Erzeugen einer Turbulenz am Schnittpunkt der Mischungsströme unterstützen sollen.

**[0013]** In der veröffentlichten US-Patentanmeldung 2002/0048535 ist eine Vorrichtung dargestellt, in der zwei Flüssigkeiten während der Drehung der Vorrichtung vereinigt werden, um die Flüssigkeiten aus einem Behälter in einen anderen zu übertragen.

**[0014]** Das US-Patent 6,264,900 beschreibt das Mischen paralleler, laminarer Strömungen zur Durchführung schneller chemischer Reaktionen.

**[0015]** Das US-Patent 6,065,864 beschreibt ein Mikro-Mischsystem mit blasengesteuerten Pumpen und Ventilen zur Erzeugung einer zirkulierenden Strömung in einer Mischkammer.

**[0016]** Die veröffentlichte US-Patentanmeldung 2003/0133358 A1 beschreibt einen Mehrstrom-Mikrofluidaperturmischer. In einer Ausführungsform enthalten diese Vorrichtungen Mikrofluidkanäle, die in verschiedenen Schichten einer dreidimensionalen Struktur ausgebildet sind. Das Mischen ist durch verschiedene Manipulationen der Flüssigkeitsströmungsbahn und/oder der Kontakte zwischen Flüssig-

keitsströmen erzielbar. In verschiedenen Ausführungsformen sind in einer Mischvorrichtung Strukturen vorsehbar, wie Kanalüberlagerungen, Rutschen, konvergierende oder divergierende Bereiche, Kehren und/oder Aperturen. Eine Mikrofluidvorrichtung zum Mischen mehrerer Flüssigkeitsströme kann mehrere Einlasskanäle beinhalten, die in einen Übergangskanal zusammenlaufen, und mehrere Kontraktions-/Expansionsbereiche, die in Fließbeziehung mit dem Übergangskanal stehen. Jeder Kontraktions-/Expansionsbereich beinhaltet eine kleine Apertur oder Öffnung.

**[0017]** Walter et al. beschreiben in Fluidodynamische Aspekte in Mikrostrukturreaktoren, Chemie Ingenieur Technik, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1999, Band 71, Nr. 5 (447-455) einen Mikrokanalreaktor mit bis zu einhundert Mikrokanälen. Die Fluidodynamik in Vorrichtungen mit 20 oder 30 Mikrokanälen wird untersucht.

**[0018]** US-A-2003/0044322 beschreibt ein Verfahren und eine Vorrichtung gemäß dem Oberbegriff der Ansprüche 1 und 21.

**[0019]** Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine effektive Mischung von flüssigen Reagenzien oder Konditionierungsflüssigkeiten mit Probenflüssigkeiten in Mikrofluidvorrichtungen bereitzustellen. Ein derartiges Mischen wird aufgrund des Missverhältnisses zwischen der Viskosität und dem Volumen der zu mischenden Flüssigkeiten erschwert. Die Lösung dieser Aufgabe wird nachfolgend detailliert beschrieben.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0020]** Flüssigkeiten werden in einer Mikrofluidvorrichtung nach Anspruch 21 mithilfe eines Verfahrens nach Anspruch 1 derart gemischt, dass mindestens zwei Flüssigkeiten in eine erste Kammer gegeben werden, um die Flüssigkeiten zu vereinigen. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Flüssigkeiten in die erste Kammer aus Behältern gegeben, die diese Flüssigkeiten enthalten. In einem zweiten Schritt werden die vereinigten Flüssigkeiten aus der ersten Kammer durch mindestens einen Kapillarverbindungsweg in eine zweite Kammer entleert, um die Flüssigkeiten zu mischen. In einigen Ausführungsformen werden zwei oder mehr parallele Kapillarverbindungswege verwendet. In einer weiteren Ausführungsform steht die zweite Kammer über mindestens einen Kapillarverbindungsweg mit mindestens einer dritten Mischkammer in Fließbeziehung.

**[0021]** Das Mischen von Flüssigkeiten erfolgt, wenn die Flüssigkeiten in Kammern ein- und austreten, die, bezogen auf die engen Kanäle, durch die sie ein- und austreten, relativ groß sind. Die Störung in dem Strömungsmuster der Flüssigkeiten wird dafür verant-

wortlich gemacht, dass das zu beobachtende Mischen erfolgt. In einigen Fällen wurde beobachtet, dass sich Tröpfchen bilden, wenn die Flüssigkeiten aus einem kapillaren Verbindungsweg in eine große Kammer austreten. Derartige Tröpfchen können zum Mischvorgang beitragen, wenn sie in der Kammer koaleszieren.

**[0022]** Der Mischvorgang wird abgeschlossen, indem die Flüssigkeiten in der ersten Kammer durch einen oder mehrere Kapillarverbindungswege in die zweite Kammer gedrückt werden. In Mikrofluidvorrichtungen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren arbeiten, haben die Kapillarverbindungswege Querschnitte zwischen 1 und 2000  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise zwischen 200 und 1000  $\mu\text{m}$  oder wie aufgrund der Eigenschaften der Flüssigkeiten erforderlich. Die Länge der Kapillaren zwischen den beiden Kammern beträgt zwischen 0,5 und 100 mm, vorzugsweise zwischen 1 und 50 mm. Die Querschnittsform der Kapillarverbindungswege gilt als nicht kritisch. Die Verbindungswege haben üblicherweise einen rechtwinkligen Querschnitt, wobei die Form allerdings von dem Verfahren abhängt, das zur Ausbildung der Verbindungswege verwendet wird. Die Abmessungen in einer typischen Konstruktion werden derart gewählt, dass in den Verbindungswegen unter Berücksichtigung der Viskosität der Flüssigkeit und der angewandten Kraft eine Flüssigkeitgeschwindigkeit von 1 mm/s oder mehr erzielt wird.

**[0023]** Jede der beiden Kammern ist größer als das Gesamtvolumen der gemischten Flüssigkeiten. Vorzugsweise ist das Volumen jeder Kammer doppelt so groß wie das Volumen der vereinigten Flüssigkeiten oder größer. Die Tiefe jeder Kammer reicht aus, um einen Freiraum über den Flüssigkeiten bereitzustellen, nachdem diese in die Kammer eingetreten sind. Vorzugsweise ist der Raum über der Flüssigkeit ausreichend groß, damit sich die in die Kammer eintretende Flüssigkeit in Tröpfchen von z. B. ca. 100  $\mu\text{m}$  oder größer aufzuteilen vermag. Noch bevorzugter ist die Tiefe der Kammer doppelt so groß wie notwendig wäre, um das Volumen der zu mischenden vereinigten Flüssigkeiten aufzunehmen. Die Kapillarverbindungswege sind vorzugsweise in dem freien Raum über der Flüssigkeit in den Kammern angeordnet.

#### Kurzbeschreibung der Zeichnungen

**[0024]** Es zeigen

**[0025]** **Abb. 1** das erfindungsgemäße Mischen von zwei Flüssigkeiten.

**[0026]** **Abb. 2** eine alternative Ausführungsform der Erfindung.

**[0027]** **Abb. 3** eine Mikrofluidvorrichtung.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

#### Strömung in Mikrokanälen

**[0028]** Die die Erfindung nutzenden Mikrofluidvorrichtungen verwenden üblicherweise Kanäle mit Querschnittmaßen im Bereich von ca. 1 bis 2000  $\mu\text{m}$ , vorzugsweise von ca. 200–1000  $\mu\text{m}$ . Wenn die Kanäle einen Querschnitt aufweisen, der im Allgemeinen rechteckig ist, kann sich das Maß auf die Diagonale des Rechtecks beziehen. Das Mindestmaß für solche Kanäle liegt für viele praktische Anwendungen vermutlich bei ca. 5  $\mu\text{m}$ , da kleinere Kanäle Komponenten in der zu analysierenden Probe effektiv ausfiltern können. Sofern keine Probleme auftreten, sind auch kleinere Maße verwendbar. Kanäle in dem bevorzugten Bereich ermöglichen es, flüssige Proben alleine durch Kapillarkräfte zu bewegen. Auch ist es möglich, die Bewegung durch Kapillarwände zu stoppen, die derart behandelt wurden, dass sie im Verhältnis zu der Probenflüssigkeit hydrophob geworden sind, oder durch merkliche Änderungen in den Kanalabmessungen. Der Widerstand gegenüber der Strömung kann durch Anwenden einer Druckdifferenz überwunden werden, beispielsweise durch Pumpen, Vakuum, Elektroosmose, Erwärmen, Absorptionsmaterialien, zusätzliche Kapillarkräfte oder Zentrifugalkraft. Demnach können Flüssigkeiten dosiert und aus einem Bereich der Vorrichtung in einen anderen Bereich bewegt werden, so wie dies für die in der Mikrofluidvorrichtung durchgeführte Analyse erforderlich ist.

**[0029]** Es ist ein mathematisches Modell verwendbar, um die Druckdifferenz (z. B. Zentrifugalkraft), die physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeit, die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, die Oberflächenenergie der Kapillarwände, die Kapillargröße und die Oberflächenenergie der Teilchen, die in den zu analysierenden Flüssigkeiten enthalten sind, ins Verhältnis zu setzen. Es ist möglich, die Strömungsgeschwindigkeit einer Flüssigkeit durch die Kapillarkräfte und den gewünschten Grad an Hydrophobie oder Hydrophilie vorherzusagen. Aus der Beziehung dieser Faktoren zueinander lassen sich die nachfolgenden Grundsätze ableiten.

**[0030]** Für einen gegebenen Verbindungsweg kann die Interaktion einer Flüssigkeit mit der Oberfläche des Verbindungswegs ggf. eine deutliche Wirkung auf die Bewegung der Flüssigkeit haben. Wenn das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen des Verbindungswegs groß ist, d. h. wenn die Querschnittsfläche klein ist, werden die Interaktionen zwischen der Flüssigkeit und den Wänden des Verbindungswegs sehr ausgeprägt. Dies ist insbesondere der Fall, wenn man es mit Verbindungswegen zu tun hat, deren Nenndurchmesser kleiner als ca. 200  $\mu\text{m}$  ist, wenn Kapillarkräfte, die sich auf die Oberflächenenergien der Flüssigkeitsprobe und der Wände bezie-

hen, vorherrschen. Wenn die Wände von der Flüssigkeit benetzt sind, bewegt sich die Flüssigkeit ohne Anwendung äußerer Kräfte durch den Verbindungsweg. Wenn die Wände von der Flüssigkeit nicht benetzt sind, versucht die Flüssigkeit dagegen, sich aus dem Verbindungsweg zurückzuziehen. Diese allgemeinen Tendenzen sind nutzbar, um zu bewirken, dass sich eine Flüssigkeit durch einen Verbindungsweg bewegt, oder um die Bewegung an dem Übergang zu einem anderen Verbindungsweg, der eine andere Querschnittsfläche aufweist, zu stoppen. Wenn sich die Flüssigkeit im Ruhezustand befindet, kann sie mithilfe einer Druckdifferenz bewegt werden, beispielsweise durch Anwendung einer Zentrifugalkraft. Andere Mittel sind ebenfalls verwendbar, u. a. Druckluft, Vakuum, Elektroosmose, Erwärmung, Absorptionsmaterialien, zusätzliche Kapillarwirkung usw., welche in der Lage sind, die zusätzlich benötigte Druckdifferenz an dem Übergang zwischen Verbindungswegen mit unterschiedlichen Querschnittsflächen oder Oberflächenenergien anzuwenden. In der vorliegenden Erfindung stehen hohe Kapillarkräfte zur Verfügung, wodurch es möglich ist, Flüssigkeiten ausschließlich durch Kapillarkräfte zu bewegen, ohne dass externe Kräfte erforderlich sind, ausgenommen für kurze Perioden, wenn ein Kapillarstopp überwunden werden muss. Allerdings sind die kleineren Verbindungswege wahrscheinlich gegenüber einer Behinderung aufgrund von Teilchen in den biologischen Proben oder den Reagenzien inhärent stärker anfällig. Daher wird die Oberflächenenergie der Verbindungswegwände nach Bedarf zur Verwendung mit der zu prüfenden Probenflüssigkeit abgestimmt, z. B. Blut, Urin usw. Dieses Merkmal ermöglicht die Anfertigung flexiblerer Entwürfe von Analysenvorrichtungen.

#### Mikrofluid-Analysenvorrichtungen

**[0031]** Die erfindungsgemäßen Analysenvorrichtungen können als „Chips“ bezeichnet werden. Sie sind im Allgemeinen klein und flach, üblicherweise ca. 1 bis 2 Zoll im Quadrat (25 bis 50 mm im Quadrat), oder scheibenförmig mit einem Radius von ca. 40 bis 80 mm. Das Volumen der Proben ist klein. Beispielsweise enthalten sie lediglich 0,1 bis 10 µl für jedes Assay, obwohl das Gesamtvolumen eines Musters zwischen 10 und 200 µl betragen kann. Die Kammern, die die Probenflüssigkeiten und Reagenzien enthalten, sind üblicherweise relativ breit und flach, damit die Proben leicht zu erkennen sind, und damit Änderungen, die auf die Reaktion der Proben zurückzuführen sind, durch geeignete Geräte gemessen werden können. Die verbindenden Kapillarverbindungswege haben üblicherweise einen Querschnitt im Bereich von 1 bis 2000 µm, vorzugsweise von 200 bis 500 µm. Die Form wird anhand des Verfahrens bestimmt, das zur Ausbildung der Verbindungswege verwendet wird, wobei allerdings Verbindungswege mit rechteckigen Querschnitten bevorzugt werden. Die Tiefe der Ver-

bindungswege beträgt in vielen praktischen Anwendungen, bei denen Proben Teilchen enthalten, mindestens 5 µm, kann jedoch kleiner sein, wenn es die Art der Probe zulässt.

**[0032]** Zwar gibt es mehrere Möglichkeiten, nach denen Kapillarverbindungswege und Kammern ausgebildet werden können, beispielsweise Spritzgießen, Laserablation, Diamantfräsen oder Stanzen, aber das bevorzugte Verfahren ist das Spritzgießen, um die Kosten der Chips zu reduzieren. Im Allgemeinen enthält ein Unterteil des Chips das gewünschte Netz aus Kammern und Kapillarverbindungswege. Nachdem Reagenzverbindungen wie gewünscht in den Kammern angeordnet worden sind, wird ein Oberteil über dem Unterteil befestigt, um den Chip zu vervollständigen.

**[0033]** Die Chips sind im Allgemeinen dazu vorgesehen, nach einmaligem Gebrauch entsorgt zu werden. Demnach werden sie – soweit möglich – aus preisgünstigen Materialien hergestellt, wobei sie aber mit den Reagenzien und den Proben, die es zu analysieren gilt, verträglich sein müssen. In den meisten Fällen werden die Chips aus Kunststoffen hergestellt, wie Polycarbonat, Polystyrol, Polyacrylaten oder Polyurethanen, und können alternativ aus Silicaten, Glas, Wachs oder Metall hergestellt werden.

**[0034]** Die Kapillarverbindungswege werden so abgestimmt, dass sie entweder hydrophob oder hydrophil sind, wobei die Eigenschaften hinsichtlich des Kontaktwinkels definiert werden, der von einer flüssigen Probe oder einem Reagenz an einer Festkörperoberfläche gebildet wird. Üblicherweise gilt eine Oberfläche als hydrophil, wenn der Kontaktwinkel von Wasser an der Oberfläche kleiner als 90° ist, und als hydrophob, wenn der Kontaktwinkel größer als 90° ist. Vorzugsweise wird die Oberflächenenergie durch plasmainduzierte Polymerisation an der Oberfläche der Verbindungswege angepasst. Die erfindungsgemäßen Analysenvorrichtungen sind zudem mit anderen zur Steuerung der Oberflächenenergie der Kapillarwände verwendeten Verfahren herstellbar, wie etwa durch Beschichten mit hydrophilen oder hydrophoben Materialien, Pfpfen oder Coronabehandlungen. Die Oberflächenenergie der Kapillarwände kann zur Verwendung mit der vorgesehenen Probenflüssigkeit abgestimmt werden, um beispielsweise Ablagerungen an den Wänden eines hydrophoben Verbindungsweges zu vermeiden oder um zu gewährleisten, dass kein Rest der Flüssigkeit in einem Verbindungsweg verbleibt. Für die meisten Verbindungswege in den erfindungsgemäßen Mikrofluidvorrichtungen ist die Oberfläche im Allgemeinen hydrophil, da die Flüssigkeit dazu tendiert, die Oberfläche zu benetzen, und da die Oberflächenspannungskräfte die Flüssigkeit dazu bringen, in den Verbindungsweg zu strömen. Die Oberflächenenergie der Kapillarverbindungswege ist beispielsweise so abge-

stimmt, dass der Kontaktwinkel von Wasser an der Oberfläche zwischen  $10^\circ$  und  $60^\circ$  beträgt, wenn der Verbindungsweg dazu vorgesehen ist, Vollblut zu berühren, oder dass der Kontaktwinkel von Wasser an der Oberfläche  $25^\circ$  bis  $80^\circ$  beträgt, wenn der Verbindungsweg dazu vorgesehen ist, Urin zu berühren.

**[0035]** Die Bewegung von Flüssigkeiten durch die Kapillarverbindungswege kann durch Kapillarstopps unterbunden werden, die – wie der Name besagt – verhindern, dass Flüssigkeiten durch die Kapillarverbindungswege strömen. Wenn der Kapillarverbindungsweg hydrophil ist und die Flüssigkeitsströmung fördert, ist ein hydrophober Kapillarstopp verwendbar, d. h. ein kleinerer Verbindungsweg mit hydrophoben Wänden. Die Flüssigkeit vermag nicht durch den hydrophoben Kapillarstopp hindurchzutreten, weil die Kombination aus der kleinen Größe und der nicht benetzbaren Wände eine Oberflächenspannungskraft aufbaut, die dem Eintritt der Flüssigkeit entgegensteht. Alternativ dazu gilt, dass bei einem hydrophoben Kapillarverbindungsweg kein Kapillarstopp zwischen einer Kammer und dem Kapillarverbindungsweg erforderlich ist. Die Flüssigkeit in der Kammer wird an dem Eintreten in den Kapillarverbindungsweg gehindert, bis eine ausreichende Kraft anliegt, etwa durch Zentrifugalkraft, die bewirkt, dass die Flüssigkeit die entgegenwirkende Oberflächenspannungskraft überwindet und durch den hydrophoben Kapillarverbindungsweg tritt. Die Zentrifugalkraft wird allerdings nur benötigt, um die Flüssigkeitsströmung zu veranlassen. Sobald die Wände des hydrophoben Verbindungswegs vollständigen Kontakt mit der Flüssigkeit haben, reduziert sich die entgegenwirkende Kraft, weil das Vorhandensein der Flüssigkeit die der hydrophoben Oberfläche zugeordneten Energiebarriere herabsetzt. Um zu strömen, bedarf die Flüssigkeit daher keiner Zentrifugalkraft mehr. Ohne notwendig zu sein, kann es in einigen Fällen sinnvoll sein, die Zentrifugalkraft weiter anzuwenden, während die Flüssigkeit durch die Kapillarverbindungswege strömt, um eine schnelle Analyse zu ermöglichen.

**[0036]** Wenn ein hydrophober Kapillarstopp in einem hydrophilen Kapillarverbindungsweg angeordnet ist, muss ein Druckdifferential angewandt werden, um die Wirkung des hydrophoben Kapillarstopps zu überwinden. Im Allgemeinen ist die erforderliche Druckdifferenz eine Funktion der Oberflächenspannung der Flüssigkeit, des Cosinus ihres Kontaktwinkels mit dem hydrophilen Kapillarverbindungsweg und der Änderung der Kapillarverbindungswegmaße. Eine Flüssigkeit, die eine große Oberflächenspannung aufweist, benötigt demnach weniger Kraft, um den hydrophoben Kapillarstopp zu überwinden, als eine Flüssigkeit mit einer kleineren Oberflächenspannung. Eine Flüssigkeit, die die Wände des hydrophilen Kapillarverbindungswegs benetzt, d. h. die einen kleinen Kontaktwinkel hat, bedarf einer größeren Kraft, um den hydrophoben Ka-

pillarstopp zu überwinden, als eine Flüssigkeit, die einen größeren Kontaktwinkel hat. Je kleiner der hydrophobe Kanal ist, umso größer muss die angewandte Kraft sein.

**[0037]** Wenn die Kapillarverbindungswege hydrophil sind, strömt eine Probenflüssigkeit (die wasserhaltig sei) auf natürliche Weise durch die Kapillarverbindungswege, ohne dass es einer zusätzlichen Kraft bedarf. Wenn ein Kapillarstopp benötigt wird, besteht eine Alternative darin, einen schmalen hydrophoben Abschnitt zu verwenden, der als ein Kapillarstopp – wie zuvor beschrieben – dienen kann. Ein hydrophiler Kapillarstopp ist ebenfalls verwendbar, auch wenn der Kapillarverbindungsweg hydrophil ist. Ein derartiger Kapillarstopp ist breiter und tiefer als der Kapillarverbindungsweg und bildet einen „Kapillarsprung“, wodurch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit eine kleinere Kraft zur Unterstützung der Flüssigkeitsströmung erzeugt. Wenn die Änderung der Abmessungen zwischen dem Kapillarverbindungsweg und dem breiteren Kapillarstopp ausreichend ist, stoppt die Flüssigkeit am Eingang zu dem Kapillarstopp. Es wurde festgestellt, dass die Flüssigkeit schließlich entlang den hydrophilen Wänden des Kapillarstopps kriecht, aber durch entsprechende Konstruktion der Form kann diese Bewegung ausreichend verzögert werden, so dass dieser Kapillarstopp auch dann effektiv ist, wenn die Wände hydrophil sind.

**[0038]** Um Chips zu entwerfen, in denen Zentrifugalkraft angewandt wird, um hydrophile oder hydrophobe Kapillarstopps zu überwinden, sind empirische Tests oder computergestützte Strömungssimulationen verwendbar, um aufschlussreiche Informationen zu erhalten, die es ermöglichen, die Position der flüssigkeitshaltigen Kammern auf Chips anzuordnen und die verbindenden Kapillarkanäle so zu bemessen, dass eine flüssige Probe wie gewünscht bewegt werden kann, indem die notwendige Kraft durch Abstimmen der Drehzahl bereitgestellt wird.

**[0039]** Mikrofluidvorrichtungen können so viele Formen annehmen, wie für die Analysenverfahren notwendig sind, mit denen der Analyt von Interesse gemessen wird. Die Mikrofluidvorrichtungen verwenden typischerweise ein System aus Kapillarverbindungswege, die Kammern miteinander verbinden, die trockene oder flüssige Reagenzien oder Konditionierungsmaterialien enthalten. Analysenverfahren können die Herstellung einer dosierten Probe durch Verdünnen der Probe, Vorreagieren des Analyten zu dessen Bereitstellung für nachfolgende Reaktionen, Entfernen von Interferenzkomponenten, Mischen von Reagenzien, Lysieren von Zellen, Erfassen von Biomolekülen, Ausführen von enzymatischen Reaktionen oder Inkubieren für Bindungsereignisse, Färben oder Abscheiden enthalten. Diese Vorbereitungsschritte können vor dem Dosieren oder während des

Dosierens der Probe oder nach dem Dosieren erfolgen, aber vor Ausführen von Reaktionen, die ein Maß des Analyten bereitstellen.

**[0040]** In derartigen Analysenverfahren wird eine Probe mit einer Konditionierungsflüssigkeit oder mit einer Reagenzflüssigkeit vereinigt und dann in eine Mischkammer übergeben, bevor sie zur weiteren Verarbeitung übertragen wird. Es liegt auf der Hand, dass ein gründliches Mischen der Probe mit dem Reagenz oder der Konditionierungsflüssigkeit wichtig ist, um genaue und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Bekanntermaßen ist die Strömung in Mikrofluidvorrichtungen üblicherweise laminar, d. h. die Viskosität der Flüssigkeit hat eine größere Wirkung als das Beharrungsvermögen der strömenden Flüssigkeit, so dass die Flüssigkeit linear und ohne Turbulenzen strömt. Eine Folge laminarer Strömungsbedingungen ist, dass das Mischen von zwei oder mehreren Flüssigkeiten langsam erfolgt, da dies grundsätzlich die Folge einer molekularen Diffusion ist. Wie zuvor besprochen, wurden einige Mikrofluidvorrichtungen derart entworfen, dass sie die Diffusion zwischen Flüssigkeitsschichten in laminarer Strömung verbessern. In vielen dieser Vorrichtungen ist nicht vorgesehen, dass es zu einer vollständigen Mischung kommt, während in anderen vorgesehen ist, dass die Flüssigkeitsströme engen Kontakt miteinander bilden.

**[0041]** In der vorliegenden Erfindung ist ein vollständiges Mischen erwünscht. Es wurde festgestellt, dass gründliches Mischen durch entsprechende Konstruktion der Vorrichtung erzielbar ist, sodass einheitliche Mischungen erzeugt werden, die flüssige Proben mit flüssigen Reagenzien oder Konditionierungsmitteln vereinigen, die unterschiedliche Viskositäten und Volumina aufweisen.

#### Mischen von Flüssigkeiten

**[0042]** Wenn genaue Analysenergebnisse erzielt werden sollen, ist das Mischen von Proben mit größeren Volumina von flüssigen Reagenzien oder Konditionierungsmitteln wichtig. Obwohl gründliches Mischen bei der Kombination von Kammern und Kapillarverbindungsweegen nachgewiesen wurde, die hier beschrieben sind, ist der Prozess, nach dem das Mischen erfolgt, nicht vollständig geklärt. Nach dem Stand der Technik gehen die meisten davon aus, dass laminare Strömung ein effizientes Mischen verhindert, und legen daher den Schwerpunkt auf die Erzeugung dünner Schichten aus parallel strömender Flüssigkeit, um Diffusionsmischen zu ermöglichen. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung gehen davon aus, dass in ihren Verfahren örtlich begrenzte Effekte auftreten, die dem Mischen zugute kommen, aber schwierig zu messen sind. Wenn Flüssigkeiten durch Kapillarverbindungswege treten, befinden sich diese in laminarer Strömung; man würde daher erwarten,

dass ein geringes Mischen auftritt. Während Flüssigkeiten in Kapillarverbindungswege ein- und austreten, die relativ große Kammern verbinden, ist es jedoch wahrscheinlich, dass einige örtlich begrenzte Wirbel oder Turbulenzen auftreten, die entstehen, wenn die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeiten zu- oder abnimmt und wenn die Flüssigkeit markante Kanten umströmt. Während die Strömung von Natur aus zwar laminar sein mag, tragen die am Schnittpunkt der Wände der Kapillarverbindungswege und Kammern mit der Flüssigkeit erzeugten Effekte möglicherweise zum Mischen der Flüssigkeiten bei. Zudem wirkt zusätzliche Energie auf die Flüssigkeiten durch Anwendung von Zentrifugalkraft (oder anderen Kräften) ein, um zu erwirken, dass die Flüssigkeiten Kapillarstopps überwinden. Die Flüssigkeiten werden beschleunigt und verzögert, wenn sie sich aus ihren Ausgangspositionen durch Kapillarverbindungswege in große Kammern bewegen. Es wurde beobachtet, dass sich häufig Tröpfchen bilden, wenn die Flüssigkeiten aus Kapillarverbindungswege austreten. Die Bildung von Tröpfchen, die unterschiedliche Flüssigkeiten miteinander vereinigen, induziert möglicherweise das Mischen der Flüssigkeiten. Man geht davon aus, dass das Vereinigen der einzelnen Tröpfchen ein weiteres Mischen in einem Prozess erzeugt, der analog zur Schichtung ist. Das heißt, wenn zwei unverträgliche Flüssigkeiten durch aufeinander folgendes Trennen und Schichten vereinigt werden, werden die Schichten schließlich so dünn, dass sie nicht mehr unterscheidbar sind. Wenn Tausende von Tröpfchen vereinigt werden, ist daher eine Trennung der beiden Flüssigkeiten nicht mehr offensichtlich, und die Flüssigkeiten sind effektiv vollständig gemischt. Man geht zudem davon aus, dass das Mischen zum gewissen Grad durch molekulare Diffusion erfolgt, wenn sich die Unterteilung der Flüssigkeiten fortsetzt und sich die Entfernung, um die die Moleküle sich bewegen, reduziert. Zwar kann der Mischungsgrad ermittelt werden, nachdem diese stattgefunden hat, aber der Entwurf der notwendigen Mikrofluidmerkmale variiert abhängig von den relativen Volumina der zu mischenden Flüssigkeiten und ihren physischen Eigenschaften und bedarf ggf. einer Bestätigung durch Versuche.

**[0043]** Diese allgemeine Beschreibung des Mischungsprozesses gilt für verschiedene Flüssigkeiten. Allerdings verlangen die verwendeten Bedingungen eine Modifikation je nach Viskosität und relativen Volumina der zu mischenden Flüssigkeiten. Es liegt auf der Hand, dass das Mischen einer viskosen Flüssigkeit mit einer, die viel weniger viskos ist, schwieriger ist, als das Mischen von zwei Flüssigkeiten mit ähnlich niedrigen Viskositäten. Das gleichmäßige Mischen von zwei viskosen Flüssigkeiten ist zudem schwierig. Es ist zu erwarten, dass das Vereinigen von zwei Flüssigkeiten mit deutlich unterschiedlichen Volumina schwieriger ist als das Mischen von Flüssigkeiten mit gleichen Volumina.

**[0044]** Es wurde festgestellt, dass bestimmte Parameter verwendbar sind, um die Bedingungen zu definieren, die erforderlich sind, um ein erfindungsgemäßes Mischen von Flüssigkeiten zu erzeugen. Im Allgemeinen werden zwei oder mehr Flüssigkeiten in einer ersten Kammer vereinigt, die durch mindestens einen verbindenden Kapillarverbindungsweg in eine zweite Kammer entleert wird, wo die Flüssigkeiten den Mischungsprozess abschließen. Ein derartiger Prozess wird in einem vereinfachten und nachfolgend erörterten Diagramm in **Abb. 1** dargestellt. Die Bewegung der Flüssigkeiten erfordert üblicherweise die Anwendung von Kraft zur Überwindung des Strömungswiderstands, wie er der Verwendung kleiner Verbindungswege zueigen ist, und desjenigen, der sich aus Kapillarstopps ergibt, die hinzugenommen werden, um ein Strömen von Flüssigkeiten zu verhindern. Zu diesem Zweck wird häufig Zentrifugalkraft verwendet, aber auch andere Verfahren, die die benötigte Kraft erzeugen können, sind verwendbar, einschließlich Luftdruck, Vakuum, Elektroosmose, Adsorptionsmaterialien, zusätzliche Kapillarwirkung usw. Die angewandte Kraft ist ausreichend, um eine Strömung der Flüssigkeit in den Kapillarverbindungswegen von 1 mm/s oder mehr zu erzeugen. Diese Verbindungswege haben Querschnitte zwischen 1 µm und 2000 µm, vorzugsweise zwischen 200 und 1000 µm, wie durch die physikalischen Eigenschaften der Flüssigkeiten bestimmt. Die Verbindungswege weisen eine Länge zwischen 0,5 und 100 mm auf, vorzugsweise zwischen 1 und 50 mm, je nach Anordnung der Kammern und Verbindungswege auf dem Chip. Der Unterschied in den Abmessungen der Kapillarverbindungswegen und der zugehörigen Kammern ist so groß, dass die Bewegung von Flüssigkeiten aus einer Kammer in eine andere eine Turbulenz in der Strömung erzeugt. Man geht zudem davon aus, dass die Oberflächenspannung der Flüssigkeiten für die Tröpfchen verantwortlich ist, die sich nach Beobachtung an dem Punkt bilden, an dem Flüssigkeiten aus den Kapillarverbindungswegen austreten und zum Mischen in eine größere Kammer eintreten. Die Tröpfchen werden (im üblichen Fall) durch Zentrifugalkraft zur Außenseite der Aufnahmekammer gedrängt, wo sie sich wiedervereinigen.

**[0045]** Die Kammern können unterschiedliche Formen aufweisen, aber üblicherweise sind sie im Allgemeinen kreisförmig oder rechteckig. Sie können interne Merkmale, wie Stufen oder Rampen, aufweisen. Man geht davon aus, dass solche Merkmale nur eine geringe Wirkung auf das Mischen der Flüssigkeiten haben, obwohl sie aus anderen Gründen vorgesehen werden können. Es gilt als wichtig, dass ein ausreichender Raum in den Mischkammern oberhalb der zu mischenden Flüssigkeiten bereitgestellt wird. Mindestens 100 µm freier Raum gilt in einer üblichen Kammer als notwendig, die ca. 0,1 bis 50 µl enthält. Vorzugsweise haben die Kammern ein Volumen, das ca. dem Doppelten des Gesamtvolumens der zu mi-

schenden Flüssigkeiten entspricht, und die Tiefe der Kammer beträgt ca. das Doppelte des Flüssigkeitsstandes in der Kammer. Man geht davon aus, dass größere Kammern und größere Tiefen das Mischen verbessern, ohne dass dies notwendigerweise optimal sein muss. Kleinere Kammern und kleinere Tiefen ergeben möglicherweise zufrieden stellende Ergebnisse, obwohl zu erwarten ist, dass das Mischen darunter leidet, da oberhalb der Flüssigkeiten weniger Luftraum vorhanden ist.

**[0046]** **Abb. 1A** u. B zeigen das erfindungsgemäße Mischen in Mikrofluidvorrichtungen in vereinfachter Form. Eine Probenflüssigkeit im Behälter **10** wird solange im Behälter **10** zurückgehalten, bis diese durch Anwenden einer Kraft, z. B. einer Zentrifugalkraft, zur Überwindung des Kapillarstopps **12** freigesetzt wird. Desgleichen verbleibt wegen eines Kapillarstopps **16** ein flüssiges Reagenz oder eine Konditionierungsflüssigkeit, z. B. eine Pufferlösung, im Behälter **14**, bis die notwendige Kraft angewandt worden ist. Die beiden Flüssigkeiten strömen durch Kapillarverbindungswegen in die erste Kammer **18**. Die Kammer **18** nimmt die Probe und die zweite Flüssigkeit gleichzeitig auf, so dass ein vorläufiges Mischen erfolgt, wenn die Flüssigkeiten in die Kammer **18** eintreten. In den meisten Fällen ist das Mischen nicht ausreichend, weshalb ein zweiter Schritt notwendig ist. Die vereinigten Flüssigkeiten treten aus der ersten Kammer **18** durch mindestens einen Kapillarverbindungsweg **20** aus und in die zweite Mischkammer **22** ein. Die Flüssigkeit kann kleine Tröpfchen bilden, wenn sie aus dem Kapillarverbindungsweg **20** austritt und in die Mischkammer eintritt, wodurch die Flüssigkeiten in den Tröpfchen während ihrer Bildung gemischt werden. Ein weiteres Mischen erfolgt, wenn sich die Tröpfchen am Boden der Mischkammer **22** wiedervereinigen.

**[0047]** In einer weiteren Ausführungsform aus **Abb. 1** werden drei Kapillarverbindungswegen verwendet, z. B. **20**, **20a** und **20b**, um die erste Kammer **18** mit der zweiten Mischkammer **22** zu verbinden. Es sind auch mehr als drei Kapillarverbindungswegen verwendbar, wie in Beispiel 1 nachstehend gezeigt. Vorzugsweise haben die Kapillarverbindungswegen nicht denselben Durchmesser, so dass die Geschwindigkeit in den Kapillarverbindungswegen variiert, wodurch unterschiedlich große Tröpfchen erzeugt werden, was das Mischen weiter verbessert. Wenn mehrere Kapillarverbindungswegen verwendet werden, können diese so angeordnet werden, dass diese ein Aufeinandertreffen der austretenden Flüssigkeiten in der Kammer **22** bewirken.

**[0048]** Eine weitere in **Abb. 2A** und B gezeigte Alternative ist besonders sinnvoll, wenn Flüssigkeiten mit unterschiedlichen Viskositäten gemischt werden. Die Kapillarverbindungswegen **20** et al. würden sich dann in eine Vormischkammer **24** entladen, aus der

zusätzliche Kapillarverbindungswege **21** et al. die vereinigten Flüssigkeiten in die Mischkammer **22** herausragen würden. Um das Mischen weiter zu verbessern, könnten zusätzliche Vormischkammern bereitgestellt werden. In beiden Schnittansichten in [Abb. 1B](#) und [Abb. 2B](#) ist zu erkennen, dass die Kapillarverbindungswege **20** und **21** üblicherweise oben auf einem Chip angeordnet werden, der die tieferen Kammern umfasst. Wenn auf die Flüssigkeiten Kraft angewandt wird, bewegen sich diese demnach hoch zu den Verbindungswegen und treten dann in die nächste Kammer ein.

**[0049]** Nachdem mehrere Ausführungsformen beschrieben worden sind, die in der Praxis ein effektives Mischen ermöglichen, wird deutlich, dass es bestimmte Varianten gibt, die in speziellen Fällen zu berücksichtigen sind. Eine Alternative bestünde darin, die Kapillarverbindungswege zu vereinigen, die die getrennten Flüssigkeiten einspeisen, bevor diese in die erste Kammer eintreten. Dies hätte den Vorteil, dass mit Erhöhen der Geschwindigkeit der Flüssigkeit ein gewisses Mischen in dem vereinigten Kapillarverbindungsweg erzielt wird, was mit Eintreten in die Kammer zu einem stärkeren Mischen führen würde. Auch in diesem Fall könnte die erste Kammer mit Mikrostrukturen versehen werden, um örtlich begrenzte Wirbel oder Turbulenzen zur Verbesserung des Mischens zu erzeugen. Im einfachsten Fall könnten die Flüssigkeiten direkt in der ersten Kammer **18** gelagert werden, anstatt zunächst in den Behältern **10** und **14** angeordnet zu werden.

**[0050]** Es wurde bereits vorgeschlagen, dass bei Verwendung mehrerer Kapillarverbindungswege zur Einspeisung der Flüssigkeiten in die zweite Mischkammer die Kapillarverbindungswege unterschiedliche Durchmesser aufweisen könnten, und dass diese so angeordnet sein könnten, dass sie aufeinander treffen, wenn die Flüssigkeitsströme/Tröpfchen in die Mischkammer eintreten. Eine weitere Alternative bestünde darin, die mehreren Kapillarverbindungswege vor Eintreten in die zweite Mischkammer zu vervielfältigen, um die Vorteile zu nutzen, die eintrittsbedingt erzeugte Wirbel und Änderungen der Flüssigkeitgeschwindigkeit mit sich bringen. Die zweite Mischkammer könnte ebenfalls mit Mikrostrukturen versehen werden, um ein Mischen zu unterstützen.

**[0051]** Die in [Abb. 3](#) dargestellte Mikrofluidvorrichtung wird in Beispiel 3 unter Verwendung in einem bestimmten Analysenverfahren beschrieben. Die Vorrichtung mischt eine Flüssigkeit in Kammer **18** mit einer dosierten Probe, die im Kapillarverbindungsweg **14** und in der Kammer **16** enthalten ist. Die Flüssigkeiten werden in der Kammer **20** aufgenommen und an die Mischkammer **30** übergeben, aus der die gemischten Flüssigkeiten zur Analyse herausströmen.

**[0052]** Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Bewegung der gemischten Flüssigkeiten in nachgelagerte Kammern zur weiteren Verarbeitung. Es liegt auf der Hand, dass das Mischen abgeschlossen sein sollte, bevor die Flüssigkeiten bewegt werden. Es wurden mehrere Mittel erwogen, um eine frühzeitige Bewegung der Flüssigkeiten zu verhindern, bevor das Mischen abgeschlossen ist. Nach einem Verfahren treten die gemischten Flüssigkeiten in einen Kapillarverbindungsweg ein, der über der normalen Tiefe der Flüssigkeit in dem Mischbehälter angeordnet ist. Es wurde festgestellt, dass nachdem die Zentrifugalkraft, die die Flüssigkeit in der Mischkammer in ihrer Position hält, reduziert worden ist, die Flüssigkeit dazu tendiert, an den Wänden der Kammer hochzukriechen, und dass sie den Austrittsverbindungsweg erreichen kann. In einem zweiten Verfahren erfolgt der Eintritt in den Austrittskapillarverbindungsweg von unterhalb des Flüssigkeitsstands in der Mischkammer, jedoch erst dann, wenn der Widerstand eines hydraulischen Stopps durch Anwenden der nötigen Kraft überwunden worden ist. In einem dritten Verfahren ist der Austrittskapillarverbindungsweg oberhalb der Flüssigkeitstiefe in der Mischkammer angeordnet, und die natürliche Tendenz der Flüssigkeit, sich durch Kapillarkräfte zu bewegen, wird durch Bereitstellen von Mikrostrukturen unterstützt, beispielsweise einer gerillten Rampe, die zu dem Austrittskapillarverbindungsweg führt.

#### Anwendungen

**[0053]** Für Mikrofluidvorrichtungen gibt es zahlreiche Anwendungen. Analysen können für Proben von zahlreichen biologischen Flüssigkeiten durchgeführt werden, beispielsweise, aber nicht abschließend, Blut, Urin, Wasser, Speichel, Rückenmarksflüssigkeit, Darmflüssigkeit, Lebensmittel und Blutplasma. Blut und Urin sind von besonderem Interesse. Eine Probe der zu testenden Flüssigkeit wird in dem Probenbehälter angeordnet und nachfolgend in einem oder mehreren Dosierverbindungswegen oder -behältern in der zu analysierenden Menge abgemessen. Die dosierte Probe wird auf den Analyten von Interesse analysiert, beispielsweise, aber nicht abschließend, ein Protein, eine Zelle, ein kleines organisches Molekül oder ein Metall. Beispiele solcher Proteine sind u. a. Albumin, HbA1c, Protease, Protease-Inhibitor, CRP, Esterase und BNP. Zu analysierende Zellen können E. coli, Pseudomonas, weiße Blutkörperchen, rote Blutkörperchen, H. pylori, Strep A, Chlamdia und Mononucleosis sein. Zu den Metallen, die nachgewiesen werden können, zählen Eisen, Mangan, Natrium, Kalium, Lithium, Calcium und Magnesium.

**[0054]** In vielen Anwendungen wird die durch die Reaktion von Reagenzien mit einer Probe entwickelte Farbe gemessen. Weitere spektroskopische Analysen der Probe sind möglich unter Verwendung von

Sensoren, die angeordnet sind, um Absorption, Reflexion, Transmission und Emission, wie beispielsweise Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Lumineszenz und sonstige Änderungen in den Nah- und Ferninfrarot-, Raman- und Ultraviolett-Wellenlängen, nachzuweisen. Zudem ist es möglich, elektrische Messungen der Probe mithilfe von Elektroden durchzuführen, die in den kleinen Behältern in der Vorrichtung angeordnet sind. Beispiele solcher Analysen sind u. a. elektrochemische Signalwandler auf Grundlage von amperometrischen, impedimetrischen und potentiometrischen Nachweisverfahren. Beispiele umfassen den Nachweis von oxidativen und reduktiven Chemikalien und den Nachweis von Bindungsereignissen.

**[0055]** Es gibt diverse Reagenzverfahren, die in Mikrofluidvorrichtungen verwendet werden könnten. Reagenzien sind Änderungen unterworfen, wodurch die Stärke des erzeugten Signals proportional zu der in dem klinischen Muster gemessenen Konzentration des Analyten ist. Diese Reagenzien enthalten Indikatorfarbstoffe, Metalle, Enzyme, Polymere, Antikörper, elektrochemisch reagierende Inhaltsstoffe und verschiedene andere, auf Trägern getrocknete Chemikalien. Häufig verwendete Träger sind Papiere, Membranen oder Polymere mit verschiedenen Probenaufnahme- und Transporteigenschaften. Sie können in die Reagenzkammern in den Mikrofluidvorrichtungen eingebracht werden.

**[0056]** Für Reagenzien sind verschiedene Verwendungen möglich. Beispielsweise kann ein Analyt mit einem Reagenz in einer ersten Kammer zur Reaktion gebracht und das reagierte Reagenz zur weiteren Reaktion in eine zweite Kammer weitergeleitet werden. Zudem kann ein Reagenz in einer ersten Kammer in einer Flüssigkeit resuspendiert und für eine Reaktion in eine zweite Kammer bewegt werden. Ein Analyt oder Reagenz kann in einer ersten oder zweiten Kammer eingefangen und eine Bestimmung des freien versus gebundenen Reagenz durchgeführt werden. Ein drittes flüssiges Reagenz kann verwendet werden, um Materialien in der zweiten Kammer zu waschen und Materialien zur Entsorgungskammer zu bewegen.

**[0057]** Die Bestimmung des freien versus gebundenen Reagenz ist insbesondere für Mehrzonen-Immunoassays und Nukleinsäure-Assays verwendbar. Es gibt verschiedene Arten von Mehrzonen-Immunoassays, die für diese Vorrichtungen adaptiert werden können. Im Falle der Adaption von Immunochromatographie-Assays werden Reagenzien und Filter in separaten Kammern platziert und müssen keinen physischen Kontakt haben, da keine chromatographischen Kräfte im Spiel sind. Immunoassays oder DNA-Assay können zum Nachweis von Bakterien entwickelt werden, wie etwa gramnegative Arten (z. B. E. Coli, Entereobacter, Pseudomonas, Klebsiella)

und grampositive Arten (z. B. Staphylococcus Aureus, Entereococc).

**[0058]** Immunoassays können für vollständige Panels von Proteinen und Peptiden entwickelt werden, wie Albumin, Hämoglobin, Myoglobulin,  $\alpha$ -1-Microglobulin, Immunglobuline, Enzyme, Glycoproteine, Protease-Inhibitoren, Arzneimittel und Cytokine. Siehe beispielsweise: Greenquist in US-Patent 4,806,311, Multizone analytical Element Having Labeled Reagent Concentration Zone, 21. Februar 1989, Liotta in US-Patent 4,446,232, Enzyme Immunoassay with Two-Zoned Device Having Bound Antigens, 1. Mai 1984.

**[0059]** Potenzielle Anwendungen, in denen getrocknete Reagenzien wieder löslich gemacht werden, sind u. a. Filtration, Sedimentationsanalyse, Lyse von Zellen, Zellsortieren (Massendifferenz) und Zentrifugaltrennung. Um die Empfindlichkeit zu verbessern, kann eine Anreicherung (Konzentration) des Probenanalyten auf eine feste Phase (z. B. Mikroperlen) vorgenommen werden. Die angereicherten Mikroperlen könnten durch kontinuierliches Zentrifugieren getrennt werden. Multiplexing ist verwendbar (z. B. Dosieren verschiedener Reagenzkammern parallel und/oder in Folge), was mehrere Kanäle ermöglicht, von denen jeder ein definiertes, diskretes Ergebnis erzeugt. Multiplexing kann mithilfe eines Arrays aus Kapillarverbindungswegen erfolgen, das eine Vielzahl von Dosierungs-Kapillarschleifen umfasst, und in Flüssigkeitsverbindung mit der Eintrittsöffnung steht, oder mithilfe eines Arrays aus Dosierungskanälen und/oder Kapillarstopps, die mit jedem der Dosierungs-Kapillarschleifen verbunden sind. Beim Entwurf des Geräts kann die Kombination mit sekundären Kräften genutzt werden, wie beispielsweise Magnetkräften. Teilchen, wie Magnetperlen, dienen als Träger für Reagenzien oder zum Erfassen von Probenbestandteilen, wie Analyten oder Störsubstanzen. Trennung der Teilchen nach physikalischen Eigenschaften, wie Dichte (analog zur Fraktionierung mit Split).

**[0060]** Das folgende Beispiel 3 stellt die Erfindung zur Durchführung eines Assays dar, um den Glykohämoglobingehalt (HbA1c) im Blut eines Patienten zu messen, was auf den Zustand von Patienten mit Diabetes hinweisen kann. Das verwendete Verfahren ist Gegenstand einer Reihe von Patenten, jüngst des US-Patents 6,043,043. Normalerweise liegt die Konzentration von Glykohämoglobin im Bereich von 3 bis 6%. Bei Diabetespatienten kann die Konzentration auf das 3- bis 4-fache ansteigen. Der Assay misst die mittlere Blutglukosekonzentration, der Hämoglobin über einen Zeitraum von ca. 100 Tagen ausgesetzt worden ist. Monoklonale Antikörper, die speziell für den glykierten N-endständigen Peptidrest in Hämoglobin A1c entwickelt wurden, werden mit gefärbten Latexteilchen markiert und in Kontakt mit einer Blut-

probe gebracht, um die markierten Antikörper an das Glykohämoglobin anzulagern. Vor Anlagern der markierten Antikörper wird die Blutprobe zunächst durch Kontakt mit einem Denaturierungsmittel/Oxidationsmittel denaturiert, z. B. Lithiumthiocyanat, wie von Lewis in US-Patent 5,258,311 beschrieben. Dann wird die denaturierte und markierte Blutprobe in Kontakt mit einem Agglutinatorreagenz gebracht, und die erzeugte Trübung ist proportional zu der Menge des in der Probe vorhandenen Glykohämoglobins. Die Gesamtmenge des vorhandenen Hämoglobins wird ebenfalls gemessen, um den Prozentsatz des Hämoglobins zu ermitteln, der glykiert ist. Das Mischen der Blutprobe mit dem Denaturierungsmittel/Oxidationsmittel erfolgt erfindungsgemäß.

#### Beispiel 1

**[0061]** Es wurde eine Mikrofluidvorrichtung mit der in **Abb. 1** dargestellten allgemeinen Konfiguration hergestellt, die fünf parallele Kapillarverbindungswege **20** et al. aufwies, die die Kammern **18** und **22** verbanden.

**[0062]** Der Probenbehälter **10** wurde mit 10 µl einer Phenolrot-Lösung mit Puffer (pH 4,0) gefüllt. Der Probenbehälter **14** wurde mit 10 µl einer Phenolrot-Lösung (pH 7,0) gefüllt. 10 mm lange Kapillarverbindungswege verbanden die Proben- und Reagenzkammern mit der ersten Kammer **18**. Jeder Kapillarverbindungsweg war 200 µm tief und 700 µm breit und enthielt 0,4 µl. Die erste Kammer **18** war 5,5 mm im Durchmesser, 1,5 mm tief und hatte eine Kapazität von ca. 36 µl. Die zweite Kammer **22** war 5,5 mm im Durchmesser, 1,1 mm tief und hatte eine Kapazität von ca. 26 µl. Die Vorrichtung war auf einer Plattform angeordnet und drehte sich mit 2.500 U/min in einem Abstand von ca. 28 mm, um den Widerstand der Stopps **12** und **16** zu überwinden und Flüssigkeiten aus den Behältern **10** und **14** gleichzeitig in die erste Kammer **18** einzuspeisen. Die gemischten Flüssigkeiten traten sofort durch fünf Kapillarverbindungswege (**20** et al.), die die erste Kammer **18** und die zweite Kammer **22** miteinander verbanden. Jeder Kapillarverbindungsweg war 3,5 mm lang, 200 µm tief und 200 µm breit. Die Farbe der Flüssigkeit, die sich in der zweiten Kammer **22** sammelte, war gleichmäßig gelb, was darauf hinwies, dass ein vollständiges Mischen stattgefunden hatte.

**[0063]** Es wurde festgestellt, dass sich die Flüssigkeit nach Wegfall der Zentrifugalkraft entlang den Seiten der zweiten Mischkammer **22** hochbewegt hatte, so dass die (in **Abb. 1** nicht gezeigten) Austritts-Kapillarverbindungswege gefüllt werden konnten.

#### Beispiel 2

**[0064]** Es wurde eine weitere Mikrofluidvorrichtung

hergestellt, die sich von der Vorrichtung in Beispiel 1 dadurch unterschied, dass nur ein Kapillarverbindungsweg die erste Kammer **18** und die zweite Kammer **22** verband. Zudem war die zweite Kammer **22** mit einer Reihe von fünf Stufen versehen, die in Richtung der angewandten Zentrifugalkraft herabführten. Die erste Kammer **18** war 5,5 mm im Durchmesser, 1,5 mm tief und hatte eine Kapazität von ca. 36 µl. Die zweite Kammer **22** war 5 mm breit und 7 mm lang mit einer mittleren Tiefe von ca. 1,2 mm und einem Volumen von ca. 46 µl. Der einzelne Kapillarverbindungsweg (3 mm lang, 200 µm tief, 500 µm breit) trat oben an der abgestuften Rampe aus. Die Mischkammer und die beiden Kapillarverbindungswege, die die Verdünnungskammer versorgten, hatten die gleichen Abmessungen wie in Beispiel 1.

**[0065]** 10 µl einer Phenolrot-Lösung (pH 7,0) wurden dem Behälter **10** zugegeben, und 10 µl einer Phenolrot-Lösung mit Puffer (pH 4,0) wurden dem Behälter **14** zugegeben. Die Vorrichtung wurde mit einer Drehzahl gedreht, die ausreichte, um die Kapillarstopps zu überwinden und die beiden Lösungen zu der abgestuften Verdünnungskammer und dann zur Mischkammer zu transportieren. Die Farbe der Flüssigkeit in der Mischkammer erwies sich als gleichmäßig, was darauf hinwies, dass ein vollständiges Mischen stattgefunden hatte.

#### Beispiel 3

**[0066]** In diesem Beispiel wurde ein Test auf HbA1c in einem Mikrofluidchip des in **Abb. 3** gezeigten Typs durchgeführt. Die Oberflächenenergie der internen Merkmale wurde derart eingestellt, dass ein Kontaktwinkel von 25° für Wasser auf der Oberfläche erzeugt wird, und diese wurden mit einem Polypropylenfoliendeckel bedeckt (Excel 2930). Eine Blutprobe wurde über eine Probenöffnung **10** eingebracht, über die sie durch Kapillarwirkung zur Vorkammer **12** und dann zur Dosierkapillare **14** gelangte. Der zusätzliche Dosierbehälter **16** ist optional und wird nur dann bereitgestellt, wenn die Probengröße zusätzliches Volumen erfordert. Das Volumen der Probe in der Dosierkapillare **14** und dem Dosierbehälter **16** betrug 0,3 µl. Die Denaturierungs-/Oxidationsflüssigkeit (9,62 µl) (Sigma-Säugerzell-Lyse/Extraktionsreagenz) war in Behälter **18** enthalten. Sie wurde in die erste Kammer **20** (18,84 µl) gleichzeitig mit dem Dosierbehälter **16** und der zugehörigen Dosierkapillare **14** durch Anwendung einer Zentrifugalkraft unter Schleudern mit 1200 U/min in einem Abstand von 29 mm entleert, um die (nicht gezeigten) Kapillarstopps zu überwinden. Die erste Kammer **20** hatte Platz für die Blutprobe und das Denaturierungs-/Oxidationsmittel. Die vereinigten Flüssigkeiten wurden über einen Satz von drei 2000 µm langen Kapillarverbindungswegen mit einem Querschnitt von 30 × 30 µm übertragen. Die zweite Kammer **30** nahm die Flüssigkeiten auf und mischte diese. Nach Wegnahme der

Kraft trat die Flüssigkeit oben aus der Kammer **30** aus und durch den Kapillar Verbindungsweg **23** in die Kammer **24** ein. Überschüssige Flüssigkeiten wurden in den Entsorgungsbehälter **31** durch Schleudern mit 2.500 U/min bei einem Abstand von 43 mm übertragen.

**[0067]** Die Kammer **24** erzeugte einen gleichmäßigen Kontakt der vorkonditionierten Probe mit markierten, monoklonalen Antikörpern, die auf einem trockenen Substrat angeordnet waren und als ein zweiter Dosierbereich dienten. Das Volumen der Probe in der zur Kammer **24** führenden Kapillare betrug 2,0 µl. Der Kontakt ungebundener, markierter Antikörper mit dem Agglutinator, der auf einem Substrat angeordnet war, erfolgte in Kammer **26** und erzeugte eine Farbe, die gemessen wurde, um die Menge des Glykohämoglobins in der Probe zu bestimmen. Die Anwendung einer Zentrifugalkraft durch Schleudern mit 2.500 U/min in einem Abstand von 53 mm bewirkte, dass sich das inkubierte Konjugat in Kammer **24** und der Waschpuffer in Kammer **22** in die Kammer **26** entleerten. Die verbleibenden Behälter stellten Raum für überschüssige Probe (**28**), überschüssige denaturierte Probe (**31**) und für ein Dochtmaterial (**32**) bereit, das verwendet wurde, um die Probe über das Substrat in Kammer **26** zu ziehen.

**[0068]** Eine Probe von 2 µl wurde in die Probenöffnung **10** pipettiert, aus der sie durch einen in dem (nicht gezeigten) Chip angeordneten Verbindungsweg hindurch und in die Vorkammer **12**, die Dosierkapillare **14** und dem zusätzlichen Dosierbehälter **16** trat. Jegliche überschüssige Probe trat in den Überlaufbehälter **28**, der einen Feuchtigkeitsdetektor enthielt. Es wurde keine Zentrifugalkraft angewandt, obwohl die Verwendung von bis zu 400 U/min möglich gewesen wäre. Die Probengröße (0,3 µl) wurde durch das Volumen der Kapillare **14** und dem Dosierbehälter **16** bestimmt. Ein Kapillarstopp am Einlass des Kapillarverbindungsweges, der den Dosierbehälter **16** und die erste Kammer **20** verbindet, verhinderte eine weitere Bewegung der Blutprobe bis zur Überwindung des Widerstands durch Zentrifugalkraft, was in diesem Beispiel durch Schleudern des Chips mit 1.200 U/min erfolgte. Auch die Denaturierungs-/Oxidationslösung (Sigma-Säugerzell-Lyse/Extraktionsreagenz) wurde mit einem Kapillarstopp daran gehindert, den Behälter **18** zu verlassen, bis eine Drehzahl von 1.200 U/min angewandt wurde, um 10 µl der Denaturierungs-/Oxidationslösung zusammen mit der dosierten Blutprobe in die erste Kammer **20** und anschließend in die zweite Mischkammer **30** zu übertragen. Das Volumen der ersten Kammer **20** betrug ca. das Doppelte der Menge der vereinigten Denaturierungs-/Oxidationslösung und der Blutprobe. Nach dem Mischen verließen 2 µl der Mischung die zweite Kammer **30** durch eine Kapillarverbindungsweg und traten in die Kammer **24** ein, in der Mikrostrukturen eine einheitliche Benetzung des Substrats gewähr-

leisteten (eine Whatman Glasfaser-Konjugattrennmembrane), das die latexmarkierten, monoklonalen Antikörper für HbA1c enthielt. Die Inkubation war innerhalb weniger Minuten abgeschlossen, wonach die markierte Probe in die Kammer **26** entlassen wurde, indem die Drehzahl auf 2.500 U/min angehoben wurde, um den (nicht gezeigten) Kapillarstopp am Auslass der Kammer **24** zu überwinden. Die markierte Probe gelangte in Kontakt mit dem Agglutinator (Polyaminasparginsäure HbA1c-Peptide), der auf ein Whatman Nitrozellulosereagenz mit 5 µm Porengröße in Konzentrationen von 0,1 bis 3 mg/ml abgestrichen worden war. Das Absorptionsmaterial (Whatman Glasfasermembrane) im Behälter **32** ermöglichte einen gleichmäßigen Durchtritt der markierten Probe über dem Streifen. Während die markierte Probe bei 2.500 U/min in die Kammer **26** transportiert wurde, verließ die Pufferlösung (phosphatgepufferte Salzlösung) den Behälter **22** und trat durch die Kammer **24** und über den Streifen in die Kammer **26**, um die Genauigkeit der Messergebnisse der Bänder auf dem Streifen zu verbessern. Die entwickelte Farbe wurde durch Reflexionsmessung mit einer Digitalkamera gemessen.

#### Beispiel 4

**[0069]** Der Chip aus [Abb. 3](#) wurde mit zwei Arten von Lösungen getestet. In dem ersten Test wurde eine Lösung eines Phosphatpuffers mit pH 4 an der Probenöffnung **10** eingebracht, von wo diese zur Dosierkapillare **14** und zum Behälter **16** transportiert wurde. Diese Lösung wurde dann mit dem Phosphatpuffer bei pH 10 in der Kammer **18** in der ersten Mischkammer **20** vereinigt. Durch Farbstoffmessung stellte sich heraus, dass das Mischen der beiden Pufferlösungen im Wesentlichen in Kammer **30** bei pH 7 abgeschlossen war. Wenn Blut als Probe diente, also eine stärker viskose Flüssigkeit als der Puffer, erforderte das Mischen mit einem Lyse-Puffer (Lithiumthiocyanat) aus Kammer **18** die Verwendung sowohl der ersten Kammer **20** als der zweiten Kammer **30** aus [Abb. 3](#).

#### Beispiel 5

**[0070]** Um das Mischen von Blut mit einer wasserhaltigen Pufferlösung in einer Mikrofluidvorrichtung zu simulieren, die die allgemeine Konfiguration und die Konstruktionselemente aus [Abb. 1](#) aufwies, wurden 25% Polyethylenglycol (PEG, Molmasse 20.000) einer 0,5 N NaOH Lösung zugegeben. Die Viskosität entsprach ungefähr der von menschlichem Blut. 10 µl der PEG/NaOH Lösung wurden dem Behälter **10** zugegeben, und 100 µl eines Puffers mit pH 4 (50 mm Phosphat) wurden dem Behälter **14** zugegeben. Ein Phenol-Rot-pH-Indikator wurde benutzt, um den Mischungsfortschritt anzuzeigen, während die beiden Lösungen in den Kammern **18** und **22** vereinigt wurden. Es wurde festgestellt, dass bei Sichtprüfung die

Flüssigkeiten bei Anwenden einer stärkeren Zentrifugalkraft dazu tendierten, als getrennte Flüssigkeiten zu erscheinen, dass aber ein vollständiges Mischen erfolgte, wenn die Zentrifugalkraft reduziert wurde.

**[0071]** Aus einer Reihe ähnlicher Tests konnte hergeleitet werden, dass es keinen wesentlichen Unterschied in der Mischungseffizienz zwischen dem Chip mit einer oder vier Kapillaren gab, zwischen Chips mit rechteckigen oder zylindrischen Aufnahmekammern, zwischen Chips mit oder ohne Rampenstrukturen, und dass ein vollständiges Mischen viskoser Flüssigkeiten möglich ist.

#### Beispiel 6

**[0072]** Die Effizienz der Blut-Lyse mit einem Puffer wurde durch Zentrifugieren verdünnter Proben der Blut-Puffer-Mischung und durch Untersuchen der Blut-Puffer-Mischung mit einem Bayer-Reagenzstreifen für okkultes Blut geprüft. Wenn die Lyse unvollständig war, bildeten sich rote Blutpellets in der Zentrifuge oder dunkelgrüne Punkte in dem Reagenzstreifen für okkultes Blut. Für Vergleichszwecke wurden Lösungen aus 50 µl Blut und 500 µl verdünnter oder unverdünnter Lyse-Puffer (Lithiumthiocyanat) für 3 Minuten inkubiert und dann in einer Zentrifuge bei 1.300 U/min für 10 Minuten geschleudert. Anschließend wurde die Lösung 100-fach in Phosphatpuffer-Salzlösung (pH 7,0) verdünnt und erneut bei 1.300 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Das Mischen des Bluts in dem Lyse-Puffer in einer Mikrofluidvorrichtung wurde durchgeführt, wonach die Mischung aus der Mischkammer entnommen und 100- und 10.000-fach in Phosphatpuffer verdünnt wurde, um diese dann mit dem Zentrifugierverfahren und dem Verfahren mit Reagenzstreifen zum Nachweis von okkultem Blut zu testen. Es wurde festgestellt, dass das Blut im Wesentlichen vollständig in der Mikrofluidvorrichtung lysiert worden war.

**[0073]** Eine weitere Untersuchung zeigte, dass die Blut-Lyse nahezu unmittelbar während des Mischens in der Mikrofluidvorrichtung erfolgte.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Mischen von Flüssigkeiten in Mikrofluidvorrichtungen, welches folgendes umfasst:  
 (a) Einspeisen mindestens einer ersten Flüssigkeit und einer zweiten Flüssigkeit in eine erste Kammer (18), um eine vereinigte Flüssigkeit zu bilden;  
 (b) Entleeren der vereinigten Flüssigkeit aus (a) der ersten Kammer (18) in eine zweite Kammer (22) über mindestens einen Kapillar Verbindungsweg (20) in Fließbeziehung mit der besagten ersten Kammer (18), um das Mischen der vereinigten Flüssigkeiten zu vervollständigen,  
**dadurch gekennzeichnet**, dass die besagte erste Kammer (18) und die besagte zwei-

te Kammer (22) größere Volumina als das der vereinigten Flüssigkeit aus Schritt (a) aufweisen.

2. Verfahren zum Mischen von Flüssigkeiten nach Anspruch 1, wobei die besagte vereinigte Flüssigkeit aus Schritt (a) in die besagte zweite Kammer (22) über mehr als einen Kapillar Verbindungsweg (20) entleert wird.

3. Verfahren zum Mischen von Flüssigkeiten nach Anspruch 2, wobei die besagte vereinigte Flüssigkeit aus Schritt (a) in die besagte zweite Kammer (22) über mindestens zwei Kapillar Verbindungswege (20a, 20b) entleert wird.

4. Verfahren zum Mischen von Flüssigkeiten nach Anspruch 1 bis 3, wobei die besagte zweite Kammer (22) in Fließbeziehung mit mindestens einer dritten Kammer (24) über mindestens einen Kapillar Verbindungsweg (21) steht.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die besagte vereinigte Flüssigkeit aus Schritt (a) in die besagte zweite Kammer (22) in Form von Tröpfchen entleert wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die besagte erste Kammer (18) ein Volumen aufweist, das mindestens ungefähr dem Doppelten der vereinigten Flüssigkeit aus Schritt (a) entspricht.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die besagte zweite Kammer (22) ein Volumen aufweist, das mindestens ungefähr dem Doppelten der vereinigten Flüssigkeit aus Schritt (a) entspricht.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die besagte erste Kammer (18) eine Tiefe aufweist, die mindestens ungefähr dem Doppelten entspricht, das erforderlich ist, um das vereinigte Volumen aus Schritt (a) aufzunehmen.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die besagte zweite Kammer (22) eine Tiefe aufweist, die mindestens ungefähr dem Doppelten entspricht, das erforderlich ist, um das vereinigte Volumen aus Schritt (a) aufzunehmen.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei ein Raum von mindestens 100 µm über dem Stand der Flüssigkeit in der ersten Kammer (18) vorhanden ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei ein Raum von mindestens 100 µm über dem Stand der Flüssigkeit in der zweiten Kammer (22) vorhanden ist.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der besagte mindestens eine Kapillarver-

bindungsweg **(20)** einen Querschnitt von 1 bis 2.000  $\mu\text{m}$  aufweist.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** einen Querschnitt von 200 bis 1.000  $\mu\text{m}$  aufweist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** eine Länge von 0,5 bis 100 mm aufweist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** eine Länge von 1 bis 50 mm aufweist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei drei oder mehr Kapillarverbindungswege **(20, 20a, 20b)** in Fließbeziehung zwischen der besagten ersten **(18)** und der besagten zweiten **(22)** Kammer stehen.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, wobei mindestens eine der besagten ersten **(18)** und zweiten **(22)** Kammern Stufen oder Rampen umfasst, um das Mischen der besagten vereinigten Flüssigkeiten zu unterstützen.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei die Geschwindigkeit der besagten vereinigten Flüssigkeiten aus Schritt (a) in dem besagten mindestens einen Kapillarverbindungsweg **(20)** mindestens 1 mm/s beträgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die besagte erste und die besagte zweite Flüssigkeit aus Behältern **(10, 14)** in die besagte erste Kammer **(18)** durch Kapillarverbindungswege eingespeist werden.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei die vereinigten Flüssigkeiten vollständig gemischt werden und anschließend in nachgelagerte Kammern zur weiteren Verarbeitung transportiert werden.

21. Mikrofluidvorrichtung, welche folgendes umfasst:

- (a) eine erste Kammer **(18)** zur Aufnahme und zum Vereinigen von mindestens einer ersten Flüssigkeit und einer zweiten Flüssigkeit;
- (b) Behälter **(10, 14)**, die die besagte mindestens erste und zweite Flüssigkeit enthalten und über Kapillarverbindungswege in Fließbeziehung mit der besagten ersten Kammer **(18)** stehen;
- (c) eine zweite Kammer **(22)** zum vollständigen Mischen der besagten mindestens ersten und zweiten Flüssigkeit, wobei die besagte zweite Kammer **(22)** über mindestens einen Kapillarverbindungsweg **(20)** in Fließbeziehung mit der besagten ersten Kammer

**(18)** steht, dadurch gekennzeichnet, dass die besagte erste Kammer **(18)** und die besagte zweite Kammer **(22)** größere Volumina als das der vereinigten Volumina der besagten Behälter **(10, 14)** aufweisen.

22. Mikrofluidvorrichtung nach Anspruch 21, wobei die besagte erste **(18)** und die besagte zweite **(22)** Kammer in Fließbeziehung über mehr als einen Kapillarverbindungsweg **(20)** stehen.

23. Mikrofluidvorrichtung nach Anspruch 22, wobei die besagte erste **(18)** und die besagte zweite **(22)** Kammer in Fließbeziehung über mindestens zwei Kapillarverbindungswege **(20a, 20b)** stehen.

24. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 23, wobei die besagte zweite Kammer **(22)** in Fließbeziehung mit mindestens einer dritten Kammer **(24)** über mindestens einen Kapillarverbindungsweg **(21)** steht.

25. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 24, wobei die besagte erste Kammer **(18)** ein Volumen aufweist, das mindestens ungefähr dem Doppelten der vereinigten Volumina aus den besagten Behältern **(10, 14)** entspricht.

26. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 25, wobei die besagte zweite Kammer **(22)** ein Volumen aufweist, das mindestens ungefähr dem Doppelten der vereinigten Volumina aus den besagten Behältern **(10, 14)** entspricht.

27. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 26, wobei die besagte erste Kammer **(18)** eine Tiefe aufweist, die mindestens ungefähr dem Doppelten entspricht, das erforderlich ist, um das vereinigte Volumen der besagten Behälter **(10, 14)** aufzunehmen.

28. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 27, wobei die besagte zweite Kammer **(22)** eine Tiefe aufweist, die mindestens ungefähr dem Doppelten entspricht, das erforderlich ist, um das vereinigte Volumen der besagten Behälter **(10, 14)** aufzunehmen.

29. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 28, wobei ein Raum von mindestens 100  $\mu\text{m}$  über dem Stand der Flüssigkeit in der ersten Kammer **(18)** vorhanden ist, wenn diese mit dem vereinigten Volumen der besagten Behälter **(10, 14)** gefüllt wird.

30. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 29, wobei ein Raum von mindestens 100  $\mu\text{m}$  über dem Stand der Flüssigkeit in der zweiten Kammer **(22)** vorhanden ist, wenn diese mit dem

vereinigten Volumen der besagten Behälter **(10, 14)** gefüllt wird.

31. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 30, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** einen Querschnitt von 1 bis 2.000  $\mu\text{m}$  aufweist.

32. Mikrofluidvorrichtung nach Anspruch 31, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** einen Querschnitt von 200 bis 1.000  $\mu\text{m}$  aufweist.

33. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 32, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** eine Länge von 0,5 bis 100 mm aufweist.

34. Mikrofluidvorrichtung nach Anspruch 33, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** eine Länge von 1 bis 50 mm aufweist.

35. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 34, wobei drei oder mehr Kapillarverbindungswege **(20, 20a, 20b)** in Fließbeziehung zwischen der besagten ersten **(18)** und der besagten zweiten **(20)** Kammer stehen.

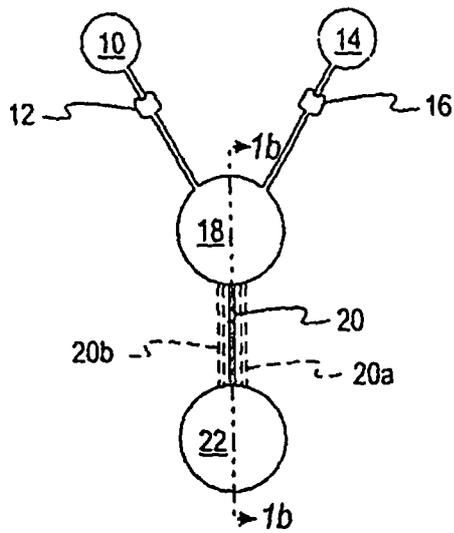
36. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 35, wobei der besagte mindestens eine Kapillarverbindungsweg **(20)** so bemessen ist, dass eine Geschwindigkeit der vereinigten Flüssigkeiten von mindestens 1 mm/s erzeugt wird, wenn dieser mit dem vereinigten Volumen der besagten Behälter **(10, 14)** gefüllt wird.

37. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 36, wobei mindestens eine der besagten ersten **(18)** und zweiten **(20)** Kammern Stufen oder Rampen umfasst, um das Mischen oder Entleeren der besagten ersten und der besagten zweiten Flüssigkeit zu unterstützen.

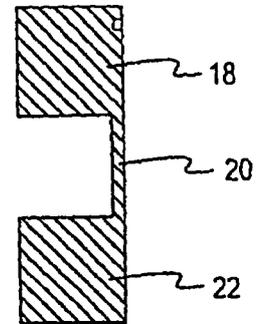
38. Mikrofluidvorrichtung nach einem der Ansprüche 21 bis 37, wobei die besagte zweite Kammer **(22)** Mittel enthält, um eine vorzeitige Bewegung der besagten ersten und der besagten zweiten Flüssigkeit zu verhindern, bevor das Mischen gemäß Schritt (c) vollständig abgeschlossen ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

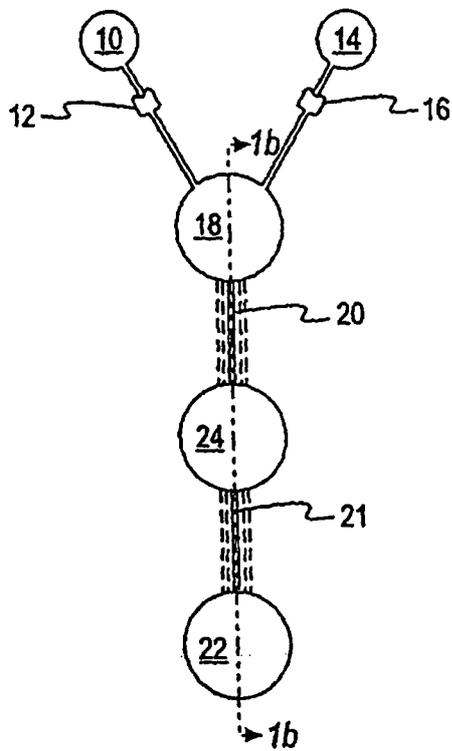
Anhängende Zeichnungen



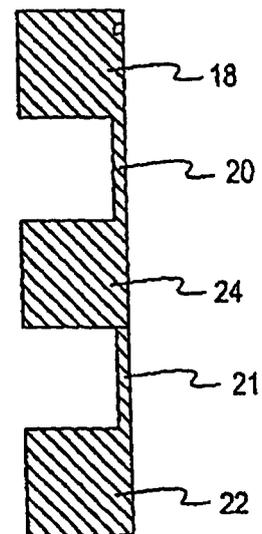
*Fig. 1a*



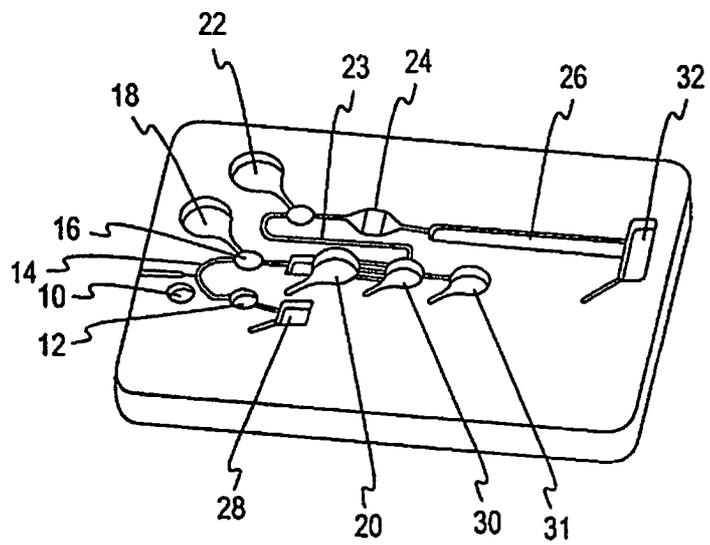
*Fig. 1b*



*Fig. 2a*



*Fig. 2b*



*Fig. 3*